(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0061366
(43) 공개일자 2015년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/46 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0145391
(22) 출원일자 2013년11월27일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(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

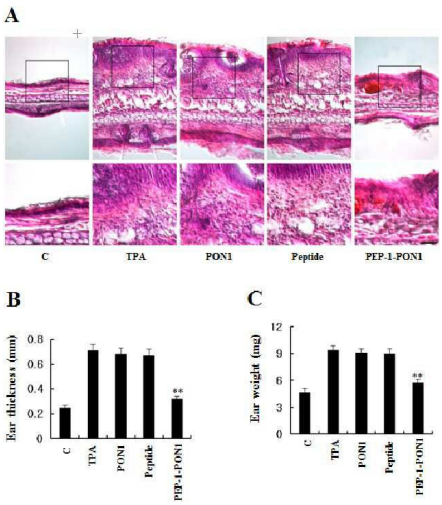
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **세포투과성 파라옥소네이즈 Ⅰ 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물**

(57) 요 약

파라옥소네이즈 1 (PON1)은 다양한 질환에서 중요한 기능을 담당하는 항산화효소이다. 그러나, PON1의 메카니즘과 기능은 잘 알려져 있지 않다. 본 발명자들은 세포투과성 PEP-1-PON1 융합단백질을 제조하여 LPS 또는 과산화수소로 처리된 Raw 264.7 세포 및 TPA 처리된 피부염증 동물모델에서 이 융합단백질이 염증에 대한 보호효과를 나타내는지를 시험하였다. 그 결과, PEP-1-PON1 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-PON1 융합단백질은 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)로 유도된 귀 부종에 대해 현저한 개선효과를 유도함으로써 PEP-1-PON1 융합단백질이 다양한 염증 및 산화 스트레스 관련 질병에 대한 치료제로 이용가능함을 밝혔다.

대 표 도 - 도8



(72) 발명자

한규형

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

음원식

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

김덕수

충남 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (다가동, 그린빌)

김대원

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소지원사업
연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 : 질환치료용 생리활성 고분자 신조재 물질 탐색 및 개발
기 여 율 1/3
주관기관 한림대학교산학협력단
연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A2A2A0604
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 단백질침투기술을 이용한 다낭신 치료제 탐색 및 개발
기 여 율 1/3
주관기관 한림대학교산학협력단
연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A120960
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건복지부
연구사업명 보건의료연구기술개발사업
연구과제명 표적단백질 세포 및 연골조직 침투기술 개발
기 여 율 1/3
주관기관 한림대학교산학협력단
연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

파라옥소네이즈 1의 N 말단에 단백질 수송도메인이 공유결합된 파라옥소네이즈 1 융합단백질을 함유하는 피부염증 치료제 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 PEP-1 펩타이드임을 특징으로 하는 피부염증 치료제 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 파라옥소네이즈 1 융합단백질은 그 아미노산 서열이 서열번호 16임을 특징으로 하는 피부염증 치료제 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포투과성 파라옥소네이즈 I 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것으로서, 파라옥소네이즈 I 단백질에 단백질 수송 도메인을 융합한 융합단백질이 인비보 및 인비트로에서 염증반응에 대해 세포 보호효과를 나타냄을 통하여 세포투과성 파라옥소네이즈 I 융합단백질이 염증 관련 질환에 대한 치료제 용도로 이용 가능함을 밝혔다.

배 경 기 술

[0002] 파라옥소네이즈 1 (Paraoxonase 1; PON1)은 *PON* 유전자 패밀리 (PON1, PON2 및 PON3) 중 하나이며, 7번 염색체 (q21.22)에 위치하고, 주로 간에서 합성되어 간, 신장 및 소장을 포함하는 조직에 널리 분포한다. PON1은 유기인산을 가수분해하는 것으로 알려진 칼슘-의존적 에스터레이즈이며 농약이다 [Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong C. (2005) Biochem Pharmacol 69: 541-550, Precourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, et al. (2011) Atherosclerosis 214: 20-36, Durnington PN, Mackness B, Mackness MI. (2001) Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 473-480, Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, et al. (2008) Free Radic Biol Med 45: 146-157, Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. (2003) Annu Rev Med 54: 371-392, Karakucuk S, Baskol G, Oner AO, Baskol M, Mirza E, et al. (2004) Br J Ophthalmol 88: 1256-1258]. PON1은 고밀도 지단백 (high-density lipoprotein; HDL)과 결합하여 저밀도 지단백 (low-density lipoprotein; LDL)의 산화를 저해한다. 따라서, 이 단백질은 항산화효소로 생각된다 [Karakucuk S, Baskol G, Oner AO, Baskol M, Mirza E, et al. (2004) Br J Ophthalmol 88: 1256-1258, Aviram M, Rosenblat M. (2004) Free Radic Biol Med 37: 1304-1316, Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. (1996) Curr Opin Lipidol 7: 69-76]. 몇몇 연구결과 PON1 녹아웃 마우스는 동맥경화에 걸리기 쉬운 것으로 나타난 반면, 마우스에서 PON1 과다발현은 동맥경화를 감소시켰다 [Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, et al. (1998) Nature 394: 284-287, Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. (2005) Atherosclerosis 181: 9-18, Ikeda Y, Suehiro T, Arii K, Kumon Y, Hashimoto K. (2008) Metabol Clin Exp 57: 1725-1732]. 뿐만 아니라, PON1과 심장질환, 파킨슨병 및 당뇨병을 포함하는 다양한 인간 질환과의 관계가 잘 입증되어 있다 [Ikeda Y,

Suehiro T, Arii K, Kumon Y, Hashimoto K. (2008) Metabol Clin Exp 57: 1725-1732, Ito T, Yasue H, Yoshimura M, Nakamura S, Nakayama M, et al. (2002) Hum Genet 110: 89-94, Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. (2006) J Hum Genet 49: 474-481, Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, Holloway B, Karschimkus C, et al. (2006) J Diabets Complicat 20: 322-328].

[0003] 지다당 (Lipopolysaccharide; LPS)은 그람 음성균 외부 막 구성요소로 잘 알려져 있고, 이는 염증반응과 COX-2 (cyclooxygenase-2), 사이토카인 (인터루킨-1β; 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, Huk-Kolega H, Kleniewska P, Piechota-Polanczyk A, Skibska B. (2013) Pharmacol Rep 65: 179-186, Hewett JA, Roth RA. (1993) Pharmacol Rev 45: 382-411, Yoshino S, Sasatomi E, Ohsawa M. (2000) Immunobiol 99: 607-614, Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. (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].

[0004] 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

[0005] 본 발명은 피부염증을 비롯한 염증관련 질환에 유용한 치료용 약학 조성물을 제공하려는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 PEP-1-PON1 융합단백질이 세포 및 조직 내로 잘 투과하여 LPS 또는 과산화수소로 유도되는 염증 및 산화 스트레스에 보호작용을 나타내는지를 시험하였다. 그 결과, PEP-1-PON1 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-PON1 융합단백질은 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)로 유도된 귀 부종에 대해 현저한 개선효과를 유도함으로써 PEP-1-PON1 융합단백질이 다양한 염증 및 산화 스트레스 관련 질병에 대한 치료제로 이용 가능함을 밝혔다.

[0007] 본 발명은 파라옥소네이즈 1의 N 말단에 단백질 수송도메인이 공유결합된 파라옥소네이즈 1 융합단백질을 함유하는 피부염증 치료제 조성물에 관한 것이다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 PEP-1 펩타이드임을 특징으로 하는 피부염증 치료제 조성물에 관한 것이다.

[0009] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 파라옥소네이즈 1 융합단백질의 아미노산 서열이 서열번호 16임을 특징으로 하는 피부염증 치료제 조성물에 관한 것이다.

[0010] 상기 파라옥소네이즈 1 융합단백질(이하 "PEP-1-PON1", "PON1 융합단백질", "파라옥소네이즈 1 융합단백질"과 혼용함)을 포함하여 수송도메인 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, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탤크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 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 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0011] 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 0.0001~100㎎/㎏을 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.

[0012] 나아가, 본 발명은 상기 PEP-1-PON1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아토피, 피부소양증과 같은 피부염증을 비롯한 염증질환의 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 파라옥소네이즈 1 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 파라옥소네이즈 1 단백질 분자의 세포 내 전달은 PEP-1 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 PEP-1 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 PEP-1 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, PEP-1 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0014] 구체적으로, 본 발명은 PEP-1-PON1 융합단백질, 이 융합단백질을 제조하기 위한 재조합 뉴클레오타이드와 벡터, 이 융합단백질을 포함하는 피부염증질환 치료, 예방 목적의 약학 조성물 등에 관한 것이다.

[0015] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0016] "PEP-1-PON1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 파라옥소네이즈 1을 포함하며, 수송 도메인과 목표 단백질(즉, 본 발명에서는 파라옥소네이즈 1을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "PEP-1-PON1", "PEP-1-PON1 융합단백질", "PON1 융합단백질", "파라옥소네이즈 1 융합단백질"과 혼용하였다.

[0017] "목표 단백질"이란 본래 표적 세포로 들어갈 수 없거나, 본래 유용한 속도로 표적 세포로 들어갈 수 없는 수송도메인 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 파라옥소네이즈 1을 의미한다.

[0018] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.

[0019] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0020] 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 세포

는 체외 세포, 즉 배양된 동물세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.

[0021] 본 발명에서의 "단백질 수송 도메인"은 고분자 유기화합물, 예컨대 펩타이드, 단백질 등과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 유기화합물들을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말한다.

[0022] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0023] 본 발명은 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.

[0024] 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.

[0025] 염증은 종양, 신경퇴화성 질병 및 당뇨를 포함하여 다양한 인간의 질병과 관련이 있다 [Ben-Neriah Y, Karin M. (2012) Nat Immunol 12: 715-723, Donath MY, Shoelson SE. (2012) Nat Rev Immunol 11: 98-107, Droge W. (2002) Physiol Rev 82: 47-95]. 뿐만 아니라, 염증성 효소 (cyclooxygenase-2; COX-2 및 inducible nitric oxide synthase; iNOS), 사이토카인 (interleukin-1β; IL-1β 및 IL-6, tumor necrosis factor-α; TNF-α) 그리고 활성산소종은 세포사멸에 기여하며 다양한 인간의 질병의 원인이 된다 [Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. (2002) Curr Med Chem 9: 1033-1043, Du Z, Liu H, Zhang Z, Li P. (2013) Int J Biol Macromol 58: 329-335]. 따라서, 이러한 요소들의 조절은 염증 및 염증 관련 질환에 중요하다. 비록 PON1이 항산화 효소이고 다양한 질병에서 유익한 기능을 수행한다고 여겨지지만 [Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong C. (2005) Biochem Pharmacol 69: 541-550], 대식세포 Raw 264.7과 염증 동물모델에서 PON1 단백질의 기능은 잘 알려져 있지 않다. 본 발명자들은 세포투과성 PEP-1-PON1 융합단백질들이 항염증 효과 및 항산화 효과에 의해 인비보 및 인비트로에서 LPS 및 TPA에 의해 유도되는 염증 및 산화 스트레스-유도 세포 손상을 저해함을 밝혔다.

[0026] 세포 내로의 단백질 수송은 단백질 치료에서 중요한 인자이다. 따라서, 본 발명자들은 단백질 수송 도메인을 이용하여 세포 침투성 PEP-1-PON1 융합단백질을 제조하였다. 많은 연구 결과, 치료용 단백질 수송 도메인 융합단백질들이 세포 및 조직 내로 전달되어 세포 독성으로부터 세포를 보호함을 밝혔다. 또한, 단백질 수송 도메인 융합단백질들은 다양한 질병에서 치료 가능성을 나타내었다 [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, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. (2001) Nat Biotechnol 19: 1173-1176, Dietz GP. (2010) Curr Pharm Biotechnol 11: 167-174, Embury J, Klein D, Pileggi A, Ribeiro M, Jayaraman S, et al. (2001) Diabetes 50: 1706-1713, Kubo E, Fatma N, Akagi Y, Beier DR, Singh SP, et al. (2008) Am J Physiol Cell Physiol 294: C842-C855]. 본 발명자들의 선행 연구에서도 PEP-1 융합단백질들이 세포 내로 잘 투과함을 밝힌바 있다 [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].

[0027] Detoxi-Gel™은 LPS의 효과를 제거하는 도구로 여겨지며, Limulus amebocyte lysate assay는 내독소 탐지에 널리 이용된다 [Zidek Z, Kmonickova E, Kostecka P, Jansa P. (2013) Nitric oxide 28: 1-7, Blahova L, Adamovsky O, Kubala L, Sindlerova LS, Zounkova R, et al. (2013) Toxicon 76: 187-196]. 본 발명자들은 정제된 PEP-1-PON1 융합단백질을 이 Detoxi-Gel 내독소 제거용 젤을 이용하여 좀 더 정제하여 세균 내 내독소를 제거하였다 (도 1). 정제 후, Limulus amebocyte lysate assay (BioWhitaker, Walkersville, MD, USA)로 확인

한 결과, 내독소 수준은 탐지한계 (< 0.1 EU/ml) 이하로 내려갔다. 뿐만 아니라, 최근의 보고는 마이크로여과가 신뢰할 만 하고 시료의 오염방지에 매우 유용한 도구임을 제시하였다 [Zidek Z, Kmonickova E, Kostecka P, Jansa P. (2013) Nitric oxide 28: 1-7, Blahova L, Adamovsky O, Kubala L, Sindlerova LS, Zounkova R, et al. (2013) Toxicon 76: 187-196].

[0028] 많은 연구들은 COX-2, iNOS 및 친염증성 사이토카인 과생산이 염증성 질환을 유도함을 밝혔다. 또한, MAPK 신호전달경로는 대식세포에서 NF-*k*B 활성화를 통해 친염증성 사이토카인 생성을 유도한다 [Mrak RE. (2009) J Alzheimers Dis 18: 473-481, Schwab C, McGeer PL. (2008) J Alzheimers Dis 13: 359-369, Fagerlund R, Melen K, Cao X, Julkunen I. (2008) Cell Signal 20: 1442-1451, Hoffmann A, Baltimore D. (2006) Immunol Rev 210: 171-186, Uto T, Suangkaew N, Morinaga O, Kariyazono H, Oiso S, et al. (2010) Am J Chin Med 38: 985-994]. 따라서, 본 발명자들은 Raw264.7 세포에서 LPS로 유도되는 COX-2, iNOS 및 친염증성 사이토카인 발현수준에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 효과를 시험하였다. 이를 위하여 본 발명자들은 실험에 앞서 LPS 또는 과산화수소의 최적 배양시간과 최적 농도를 결정하였다 (데이타 나타내지 않음). 이 실험에서 본 발명자들은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 LPS (10 ng/ml)로 유도되는 COX-2와 iNOS같은 친염증성 효소뿐만 아니라 사이토카인 (TNF-α, IL-1β 및 IL-6) 발현수준을 투여량 의존적으로 현저히 저해함을 ㅂ바발밝혔다. 뿐만 아니라, 1 ㎍/ml LPS로 처리한 세포에서 COX-2, iNOS 및 사이토카인 저해는 유사한 패턴을 보여주었다 (도 3). 또 본 발명자들은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 LPS로 유도되는 대식세포 내 신호전달경로 활성화와 NF-*k*B 활성화를 현저히 저해함을 밝혔다. 도 4와 같이, PEP-1-PON1 융합단백질은 LPS에 의해 유도되는 MAPK (p38, ERK 및 JNK)와 NF-*k*B (p65 and I*k*Bα)의 인산화를 저해하였다. 이러한 결과들은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 세포 내에서 LPS로 유도되는 염증성 효소를 저해함으로써 NF-*k*B와 MAPK 경로를 조절함을 제시한다.

[0029] 산화 스트레스는 세포 손상과 활성산소종 과다생산에 중요한 인자이며 세포 사멸과 염증과 관련된 다양한 인간의 질병에 기여하는 것으로 잘 알려져 있다 [Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford]. 따라서 본 발명자들은 산화 스트레스가 유도하는 세포사멸에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 효과를 시험하였다. 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질은 LPS 또는 H_2O_2로 유도되는 활성산소종 생성을 억제하였다 (도 5). 본 발명자들은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 과산화수소 처리된 세포와 비교하여 투여량 의존적으로 세포생존율을 증대시킴을 밝혔고, 또한 과산화수소 처리세포와 비교하여 DNA 조각화로부터 세포를 보호함을 밝혔다 (도 6). 본 발명은 단백질 수송 도메인과 융합한 PON1 단백질이 TLR4 활성화와 NF-*k*B 활성화를 억제함으로써 a대식세포에서 친염증성 사이토카인을 극적으로 저해함을 보여주었다. 또한, 재조합 PON1 융합단백질은 대식세포에서 자기세포사멸 및 활성산소종 생성에 대해 보호효과를 나타냄으로써 PON1 단백질이 동맥경화에 어떤 기능을 할지에 대해 연구가 필요함을 제시한다. PON1은 항염증효과를 나타내며, 치료용 단백질로서의 가능성을 가지고 있는 것으로 보인다 [Aharoni S, Aviram M, Fuhrman B. (2013) Atherosclerosis 228: 353-361]. 미토콘드리아 기능장애와 캐스페이즈-3 활성화는 세포사멸에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고된바 있다 [Kim MJ, Kim DW, Park JH, Kim SJ, Lee CH, et al. (2013) Free Radic Biol Med 63: 432-445, Ng DS, Chu T, Esposito B, Hui P, Connelly PW, et al. (2008) Cardiovasc Pathol 17: 226-232]. 본 발명자들은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 절단된 캐스페이즈-3와 미토콘드리아 막 전위를 조절함으로써 세포사멸에 대한 보호효과를 나타냄을 밝혔다. 또한, 산화 스트레스에 의해 증가한 Akt와 p53 단백질 인산화 수준은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질에 노출되면 감소하였다 (도 7). 몇몇 연구결과, PON1 단백질은 산화 스트레스를 저해함으로써 다양한 질환에서 중심적인 역할을 수행함이 밝혀졌다. 비록 정확한 메카니즘이 밝혀진 것은 아니지만, 많은 연구결과들은 PON1 단백질이 다양한 인간 질병에서 치료제로서의 잠재력을 가지고 있음을 제시한다 [Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong C. (2005) Biochem Pharmacol 69: 541-550, Ikeda Y, Suehiro T, Arii K, Kumon Y, Hashimoto K. (2008) Metabol Clin Exp 57: 1725-1732, Ng DS, Chu T, Esposito B, Hui P, Connelly PW, et al. (2008) Cardiovasc Pathol 17: 226-232, Marsillach J, Camps J, Ferre, N, Beltran R, Rull A, et al. (2009) BMC Gastroenterol 9: 3, Tomas M, Latorre G, Senti M, Marrugat J. (2004) Rev Esp Cardiol 57: 557-569]. 본 발명의 결과 또한, 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 산화 스트레스로 유도되는 세포사멸에 대해 항산화 기능을 가지고 있음을 제시한다.

[0030] TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)로 유도되는 귀 부종 모델은 국소 항염증 치료제 효과를 시험하는 좋은 모델이다 [Song HY, Lee JA, Ju SM, Yoo KY, Won MH, et al. (2008) Biochem Pharmacol 75: 1348-1357, Fu R, Zhang YT, Guo YR, Huang QL, Peng T, et al. (2013) J Ethnopharmacol 147: 517-524, Park MY, Cho SA, Lee HJ, Lee EJ, Kang JH, et al. Biomol Ther 20: 380-385]. 그리하여 본 발명자들은 TPA로 유도된 피부염증에 대하여 PEP-1-PON1 융합단백질의 저해효과를 시험하였다. TPA 처리된 마우스 귀는 부풀어 있고, 5 ㎜귀

생검은 두께와 무게가 현저히 증가된 상태이지만, PEP-1-PON1 융합단백질을 국소적용하면 TPA로 유도되는 귀 두께와 중량의 증가가 억제되었다 (도 8). 친염증성 사이토카인 (TNF-α, IL-1β 및 IL-6)은 TPA에 의해 유도되며, MAPK와 NF-κB 조절을 포함하여 염증반응에 중요한 역할을 수행한다 [Song HY, Lee JA, Ju SM, Yoo KY, Won MH, et al. (2008) Biochem Pharmacol 75: 1348-1357, Xian YF, Lin ZX, Xu XY, Su ZR, Chen JN, et al. (2012) J Ethnopharmacol 142: 851-856, Kwon DJ, Ju SM, Youn GS, Choi SY, Park J. (2013) Food Chem Toxicol 58: 479-486]. TPA로 유도되는 염증 동물모델에서 본 발명자들은 PEP-1-PON1 융합단백질 국소적용이 친염증성 사이토카인과 COX-2 발현수준을 현저히 억제함을 밝혔다 (도 9). 또한, PEP-1-PON1 융합단백질 국소적용은 마우스 귀에서 TPA로 유도되는 MAPKs (p38, ERK 및 JNK)의 인산화뿐만 아니라 NF-κB와 IκBα 인산화/분해를 저해한다 (도 10). 이 결과들은 PEP-1-PON1 융합단백질이 NF-κB와 MAPK 활성화를 통하여 신호전달경로를 조절함으로써 LPS로 유도되는 대식세포와 TPA로 유도되는 피부 조직에서의 ㅇ-여염증반응에 대하여 항염증 효과를 나타냄을 의미한다.

[0031] 본 발명에서 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질은 인비트로와 인비보에서 염증반응과 산화 스트레스를 조절함으로써 항염증 및 항산화 효과를 나타내었다. 따라서, PEP-1-PON1 융합단백질은 염증 및 활성산소종 관련 질환의 치료제로서 이용가능성이 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명의 PEP-1-PON1 융합단백질은 투여량 및 처리시간 의존적으로 세포 내로 투과하였고, 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질은 세포 내에서 36시간 동안 현저한 수준을 나타내었다.

[0033] 본 발명의 PEP-1-PON1 융합단백질은 LPS-유도된 COX-2와 iNOS 단백질 발현 수준을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다. 또한, PEP-1-PON1 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였다.

[0034] 또한, 본 발명의 PEP-1-PON1 융합단백질은 LPS로 유도되는 MAPKs와 NF-κB 활성화에 대해 세포 보호효과를 나타내었다. PEP-1-PON1 융합단백질 처리세포에서는 인산화된 ERK1/2, p38 및 JNK 발현수준이 현저히 감소하였다. 또한, 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질은 LPS로 유도되는 세포내 p65와 IκBα 인산화 수준을 현저히 저해하였다.

[0035] 또한, 본 발명의 PEP-1-PON1 융합단백질은 세포로 투과되어 LPS 또는 H_2O_2 처리한 세포에서 활성산소종 수준을 감소시킴으로써 세포 보호효과를 나타내었다.

[0036] 뿐만 아니라, H_2O_2 처리한 세포에서 세포생존율은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질에 의해 투여량 의존적으로 최대 72% 및 76%까지 현저히 증가하였다. 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질은 생물학적으로 활성을 나타내며, 활성산소종 생성 및 DNA 조각화를 저해하여 H_2O_2로 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호한다. 또한, PEP-1-PON1 융합단백질은 절단된 캐스페이즈-3 수준을 현저히 감소시켰다. 본 발명자들은 H_2O_2로 처리한 세포에서 인산화된 Akt와 p53 수준이 현저히 증가한 반면, PEP-1-PON1 융합단백질 처리세포에서는 현저히 감소함을 밝혔다. 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 세포자기사멸 경로를 저해함으로써 H_2O_2로 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호함을 말해준다.

[0037] 뿐만 아니라, PEP-1-PON1 융합단백질은 피부 염증에서 초기에 일어나는 모노사이트와 같은 염증세포의 침윤을 현저히 저해하였고, TPA로 유도되는 동물 염증모델에서 COX-2 발현 수준과 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성을 현저히 감소시켰고, TPA로 유도되는 피부염증 동물모델에서 TPA로 유도되는 p38, ERK1/2 및 JNK 인산화와 p65와 IκBα인산화를 저해하였다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 PEP-1-PON1 융합단백질 구축 및 정제에 관한 도면이다. A는 구축된 PEP-1-PON1 융합단백질의 대표적인 다이어그램이다. PEP-1-PON1 융합단백질은 여섯 개의 히스티딘 잔기로 이루어진 His 태그를 포함한다. 발현 및 정제 후 12% SDS-PAGE로 분석하였고 (B), 항-토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석하였다 (C).

도 2는 Raw 264.7 세포 내로 PEP-1-PON1 융합단백질의 투과를 나타낸다. 세포는 60 ㎜ 배양접시에서 배양한 후 PEP-1-PON1 융합단백질 (0.1 ~ 0.3 μM)과 대조군 PON1 단백질을 한 시간 동안 배양배지에 가하였고 (A), PEP-

1-PON1 융합단백질 (0.3 μM)과 대조군 PON1 단백질을 10 ~ 60분간 배양배지에 가하였으며 (B), 웨스턴 블랏으로 분석하였다. 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질의 안정성은 다양한 시간 경과 후 평가하였다 (1 ~ 60시간). 세포는 0.3 μM PEP-1-PON1 융합단백질로 한 시간 동안 선처리하고, 웨스턴 블랏으로 분석하였다 (C). 세포 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질의 세포내 분포는 공촛점 현미경으로 관찰하였다 (D). 크기 막대 = 20 ㎛.

도 3은 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도한 염증반응에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. Raw 264.7 세포는 PEP-1-PON1 융합단백질을 한 시간 동안 선처리하거나 처리하지 않고 LPS로 자극하였다. 세포 용균액 (A: 10 ng/ml LPS, 24 h 처리, B: 1 ㎍/ml LPS, 12 h 처리)을 준비하고 COX-2와 iNOS 단백질 발현을 웨스턴 블랏팅과 밀도계로 분석하였다 (a). 총 RNA를 세포에서 추출한 후 (10 ng/ml 및 1 ㎍/ml LPS, 24 h 처리), 사이토카인 (IL-1β, L-6, TNF-α 및 β-액틴 mRNA를 특이적 프라이머를 이용한 RT-PCR 및 밀도계로 분석하였다 (b). $^{*}P < 0.01$, LPS 처리 세포와 비교한 값.

도 4는 LPS로 유도되는 MAPK와 NF-*k*B 활성화에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. Raw 264.7 세포는 PEP-1-PON1 융합단백질을 한 시간 동안 선처리하거나 하지 않고 1 ㎍/ml LPS로 15분간 자극하였다. 세포 추출물을 제조하고 웨스턴 블랏팅과 밀도계로 MAPK 단백질 활성을 분석하였다 (A). p65 and I*k*Bα의 인산화와 분해는 웨스턴 블랏팅과 밀도계로 분석하였다 (B). 'p'는 단백질의 인산화된 형태를 나타낸다. $^{*}P < 0.01$, LPS 처리세포와의 비교값.

도 5는 LPS- 또는 H_2O_2-로 유도된 활성산소종 생성에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 효과를 나타낸다. 세포를 한 시간 동안 PEP-1-PON1 융합단백질로 처리한 후, 세포에 LPS 10 ng/ml로 50분간 그리고 1 ㎍/ml로 30분간 또는 H_2O_2 1 mM로 20분간 그리고 2 mM로 10분간 자극하였다. 세포내 활성산소종 수준은 DCF-DA로 염색한 후 ELISA 플레이트 판독기로 형광강도를 측정하여 분석하였다. 크기 막대 = 25 ㎛. $^{*}P < 0.01$, LPS 또는 H_2O_2로만 처리한 세포와 비교한 값.

도 6은 H_2O_2로 유도한 세포 생존율 및 DNA 조각화에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 효과를 나타낸다. PEP-1-PON1 융합단백질 (0.3 μM)로 한 시간 선처리한 Raw 264.7 세포에 hH_2O_2 (1 mM 및 1.5 mM, 16 h)를 처리하였다. 세포생존율은 MTT를 이용한 발색분석법으로 평가하였다 (A). $^{**}P < 0.01$, H_2O_2 처리세포와 비교한 값임. 세포는 PEP-1-PON1 융합단백질 (0.3 μM)로 한 시간 동안 처리한 후 H_2O_2 (1 mM, 15 h 및 5 mM, 4 h)에 노출하였다. DNA 조각화는 TUNEL 염색법으로 탐지하였다 (B). 크기 막대 = 50 ㎛.

도 7은 H_2O_2로 유도된 캐스페이즈-3 활성화와 미토콘드리아막 전위에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 효과를 나타낸다. PEP-1-PON1 융합단백질 (0.1-0.3 μM)로 한 시간 처리한 후 H_2O_2에 노출시켰다. 캐스페이즈-3와 절단된 캐스페이즈-3는 웨스턴 블랏팅과 밀도계로 분석하였다 (A). Akt, p53, 인산화된 Akt와 인산화된 p53 단백질 수준은 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다 (B). $^{*}P < 0.01$, H_2O_2 처리한 세포와 비교한 값임. 'p'는 인산화된 단백질 형태를 나타낸다. 미토콘드리아 막 전위는 미토콘드리아 막 전위 분석킷트를 이용하여 탐지하였다 (C). 크기 막대 = 50 ㎛.

도 8은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 TPA-유도된 귀 부종에 미치는 영향을 나타낸다. 마우스 귀는 TPA (1 ㎍/귀)로 처리한 후 PEP-1-PON1 융합단백질 및 PON1 단백질 및 PEP-1 펩타이드로 마우스 귀에 한 시간 동안 국부처리하였다. TPA로 유도된 마우스 귀 부종의 저해효과는 헤마토자일린과 에오신 면역염색으로 분석하였고 (A) 5 mm 귀 생검의 두께 (B)와 무게 (C) 변화를 측정하였다. A에서 크기 막대 = 50 ㎛ (위쪽 패널), A의 아래쪽 패널 고해상도에서는 25 ㎛. $^{**}P < 0.01$, TPA 처리한 쥐와의 비교값임.

도 9는 부종 동물모델에서 TPA로 유도된 COX-2와 사이토카인 발현에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. 마우스는 TPA (1㎍/귀)로 자극하고 마우스 귀에 PEP-1-PON1 융합단백질을 국부처리하였다. 마우스 귀 추출물을 제조하여 COX-2 단백질 (A) 및 COX-2 mRNA (B) 발현을 웨스턴 블랏팅과 특이적 프라이머를 이용한 RT-PCR로 분석하였다. 띠의 강도는 밀도계로 측정하였다. 총 RNA는 귀 생검으로부터 추출하였다. TNF-α, IL-1β, IL-6 및 GAPDH mRNA는 특이적 프라이머를 이용한 RT-PCR로 분석하였고, 띠는 밀도계로 측정하였다 (C). $^{*}P < 0.01$, TPA로 처리한 마우스와 비교함.

도 10은 귀 부종 모델에서 TPA로 유도된 MAPK와 NF-κB 활성화에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. 마우스 귀는 TPA (1㎍/귀)로 처리하고 PEP-1-PON1 융합단백질을 TPA 처리 후 마우스 귀에 국소적용하였다. 귀 생검을 제조한 후 웨스턴 블랏팅과 밀도계 측정으로 MAPK 단백질 활성화를 분석하였다 (A). p65 및 IκBα의 분해와 인산화를 웨스턴 블랏팅과 밀도계로 분석하였다 (B). 'p'는 단백질의 인산화된 형태를 나타낸다. $^{*}P < 0.01$, TPA 처리한 마우스와 비교한 값임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명 범위가 실시예의 기재에 의해 제한되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0040] **윤리 선언**

[0041] 본 발명에 사용된 동물과 관련된 모든 실험 절차와 관리는 국립수의과학검역원 (National Veterinary Research & Quarantine Service of Korea)의 실험동물 보호 및 이용에 관한 가이드를 따랐고, 이를 한림대학교 의과대학 동물 보호 및 이용 위원회가 입증한다.

[0042] **재료**

[0043] FBS와 항생제는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, LPS와 TPA는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. PEP-1 펩타이드는 펩트론 (Daejeon, Korea)에서 화학적으로 합성하였다. 사람 PON1 cDNA는 중합효소 연쇄반응 (PCR) 방법으로 분리하였다. 지시된 일차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 각각 구입하였다. PCR 프라이머는 바이오니아 (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 다른 모든 화학약품과 시료는 상업적으로 입수 가능한 최상급을 사용하였다.

[0044] **PEP-1-PON1 플라스미드 구축**

[0045] 세포 투과성 PEP-1-PON1 융합단백질을 제조하기 위해 인간 PON1의 cDNA 서열 및 두 개의 프라이머 (센스 프라이머 5'-CTCGAGGCGAAGCTGATTGCG-3'와 안티센스 프라이머 5'-GGATCCTTAGAGCTCACAGTAAAGAGC-3')를 기본으로 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 수행하였다. PCR 산물은 TA 클로닝 벡터에 연결되었고, PEP-1 발현 벡터, PEP-1-PON1 발현 벡터를 제조하였다. 또한, 대조군으로써 PEP-1이 없는 PON1 발현백터도 구축하였다.

[0046] **PON1 융합단백질 발현 및 정제**

[0047] 재조합 PEP-1-PON1 융합단백질 및 대조군 PON1 단백질 플라스미드는 *E. coli* BL21 (DE3) 세포로 형질변환되어 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactoside, Duchefa, Haarlem, Netherlands)로 37℃에서 6시간 동안 발현을 유도하였다. 하비스트한 세포는 초음파 처리로 용균하고, Ni^{2+}-나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 (Qiagen, Valencia, CA, USA)와 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Brauncschweig, Germany)로 정제하였다. Detoxi-Gel™ 엔도톡신 제거용 젤 (Pierce, Rockford, IL, USA)로 대조군 PON1 단백질과 PEP-1-PON1 융합단백질의 독소를 제거하였다. 단백질 농도는 브래드포드법으로 측정하였다.

[0048] **세포 배양 및 PEP-1-PON1 융합단백질의 도입**

[0049] 쥐 대식세포 Raw 264.7은 한국세포주연구재단에서 구입하였다. 쥐 대식세포 Raw 264.7은 20 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 5 mM $NaHCO_3$, 10% 우태혈청 (FBS) 및 항생제 (100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신, 100 U/㎖ 페니실린)를 함유한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 37 ℃로 95% 공기와 5% CO_2의 습한 조건에서 배양하였다.

[0050] PEP-1-PON1 융합단백질 및 대조군 PON1 단백질의 전달 능력을 확인하기 위하여 12시간 동안 60 ㎜ 접시에서 단

백질을 다양한 농도 (0.1 ~ 0.3 μM)로 한 시간 동안 처리하였다. 또한, 단백질 (0.3 μM)을 처리 시간을 달리하여 10~60분간 처리하였고, 그런 다음 세포는 트립신-EDTA로 처리하고 PBS로 씻어주었다. 세포를 하비스트한 후 웨스턴 블랏팅을 위해 세포 추출물을 제조하였다. 세포 용균액 단백질은 12% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질들은 나이트로셀룰로스 막으로 전기전이되었고, 막은 4℃에서 일차항체와 함께 오버나잇 배양한 다음, 호스래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 이차 항체와 ECL 키트로 단백질 밴드를 탐지하였다. 밴드 강도는 이미지 J 소프트웨어를 장착한 밀도계를 사용하여 정량하였다(NIH, Bethesda, MD, USA).

[0051] 형광물질이 표지된 단백질을 직접 탐지하기 위해, Raw 264.7 세포는 커버슬립 상에서 배양하여 37 ℃에서 한 시간 동안 0.3 μM의 PEP-1-PON1 융합단백질로 처리하였다. 세포는 세척하고, 4% 파라포름알데하이드로 고정시켰다. 일차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)는 1:2000으로 희석한 다음 상온에서 두 시간 동안 배양하였다. 이차 항체 (Alexafluor488, Invitrogen)는 1:15000으로 희석한 후 어두운 곳에서 상온으로 한 시간 배양하였다. 핵은 1:3000로 희석한 1 ㎍/㎖ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Roche)로 2분간 염색하였다. 형광 분포는 FV-300 공촛점 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 분석하였다 [Kim MJ, Kim DW, Park JH, Kim SJ, Lee CH, et al. (2013) Free Radic Biol Med 63: 432-445].

[0052] **RNA 분리 및 RT-PCR 분석**

[0053] 총 RNA는 제조자 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 지시에 따라 Easy blue kit를 이용하여 Raw 264.7 세포에서 분리하였다. 그런 다음 RNA (2 ㎍)는 역전사효소 및 올리고-(dT) 프라이머를 이용하여 역전사하였다. cDNA에 대한 PCR 증폭은 다음의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 수행하였다. COX-2 안티센스 프라이머, 5'-TGGACGAGGTTTTTCCACC AG-3'; COX-2 센스 프라이머, 5'-CAAAGGCCTCCATTGACCAGA-3'; TNF-α 안티센스 프라이머, 5'-TGGCACCACTAGTTGGTTGTCTTT-3' TNF-α 센스 프라이머, 5'-AAGTTCCCAAATGGCCTCCC-3' IL-1β 안티센스 프라이머, 5'-GTGCTGCCTAATGTCCCCTTGAATC-3' IL-1β 센스 프라이머, 5'-TGCAGAGTTCCCCAACTGGTACATC-3' IL-6 안티센스 프라이머, 5'-TGGATGGTCTTG GTCCTTAGCC-3' IL-6 센스 프라이머, 5'-CAAGAAAGACAAAGCCAGAGTCCTT-3' β-액틴 안티센스 프라이머, 5'-GGACAGTGAGGCCAGGATGG-3'; β-액틴 센스 프라이머, 5'-AGTGTG ACGTTGACATCCGTAAAGA-3'; 및 GAPDH 안티센스 프라이머, 5'-AGTGATGGCATGGA CTGTGGTCAT-3' GAPDH 센스 프라이머, 5'-ACCCCTTCATTGACCTCAACTACA-3'를 이용하여 수행하였고, PCR 수행에는 PCR 프리믹스 키트 (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하였다. PCR 산물은 1% 아가로즈 젤 상에서 분리하여 에티듐 브로마이드 염색 후 UV로 관찰하였고, 자외선으로 시각화하였다.

[0054] **세포생존율 분석**

[0055] 세포생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석법으로 측정하였다 [Ahn EH, Kim DW, Shin MJ, Kim YN, Kim HR, et al. (2013) Free Radic Biol Med 55: 36-45, Kim SY, Sohn EJ, Kim DW, Jeong HJ, Kim MJ, et al. (2011) J Invest Dermatol 131: 1477-1485, Kim MJ, Kim DW, Park JH, Kim SJ, Lee CH, et al. (2013) Free Radic Biol Med 63: 432-445]. Raw 264.7 세포를 70% 96-웰 배양 플레이트에 시드하고 12시간 동안 처리하였다. 그 다음으로 세포는 PEP-1-PON1 융합단백질 (0.1 ~ 0.3 μM), 대조군 PON1 단백질 (0.3 μM) 및 PEP-1 펩타이드 (0.3 μM)로 1시간 동안 과산화수소 (1 mM 및 1.5 mM)와 함께 처리하였다. 16시간 동안 세포를 배양한 후 세포 생존율은 MTT를 사용하여 평가하였다. 570 ㎚ 흡광도 및 세포생존률은 ELISA 마이크로플레이트 판독기로 측정하였다.

[0056] **세포내 활성산소종 수준 측정**

[0057] 세포내 활성산소종 수준은 활성산소종 민감성 안료 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 이용하여 측정하였는데, 이 안료는 활성산소종에 의해 형광을 띠는 DCF로 변환된다 [Sohn EJ, Kim DW, Kim MJ, Jeong HJ, Shin MJ, et al. (2012) Biochim Biophys Acta 1820: 1647-1655, Lee YP, Kim DW, Kang HW, Hwang JH, Jeong HJ, et al. (2012) FEBS J 279: 1929-1942, Ahn EH, Kim DW, Shin MJ, Kim YN, Kim HR, et al. (2013) Free Radic Biol Med 55: 36-45, Kim MJ, Kim DW, Park JH, Kim SJ, Lee CH, et al. (2013) Free Radic Biol Med 63: 432-445]. Raw 264.7 세포는 한 시간 동안 PEP-1-PON1 융합단백질 (0.3 μM)을 가하여 배양한 후 LPS (10 ng/㎖, 50분 및 1 ㎍/㎖, 30분)로 처리하였다. 또한, 과산화수소 (1 mM, 20분 및 2 mM, 10분)로 처리하였다. 세포는 PBS로 두 번 세척한 후 DCF-DA (20 μM)를 가하여 37℃에서 30분간 배양하였다. 세포의 형광강도는

여기 485 nm, 방출 538 nm에서 ELISA 플레이트 판독기 (LabsystemsOy, Helsinki, Finland)를 이용하여 측정하였다. 사진은 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)으로 촬영하였다.

[0058] **TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling) 분석**

[0059] 세포에 PEP-1-PON1 (0.3 μM)를 가하여 한 시간 동안 배양한 후 과산화수소 (1 mM, 15 시간 및 5 mM, 4 시간)로 처치하였다. TUNEL 염색은 세포 사멸 탐지키트 (Roche Applied Science, Basel, Switzerland)를 이용하여 수행하였다. 형광현미경 사진은 Eclipse 80i 형광현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)으로 찍었다.

[0060] **미토콘드리아 막 전위 측정(MMP)**

[0061] 미토콘드리아 막 전위를 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazoly-carbocyanine iodine) 분석 키트 (Cayman, MI, USA)로 분석하였다. JC-1은 양이온 형광염색을 하여 미토콘드리아에 축적 여부를 알 수 있다. MMP가 높은 경우, 미토콘드리아에 JC-1이 축적되었고, 빨간색 형광을 나타낸다. MMP가 낮은 경우, 세포질에 JC-1이 축적되었고, 녹색 형광을 나타낸다.

[0062] PEP-1-PON1 융합단백질 (0.3 μM)을 한 시간 동안 가하거나 또는 가하지 않고 세포를 배양한 후 과산화수소 (2 mM)로 30분간 처리하였다. 영상은 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)으로 촬영하였다.

[0063] **TPA로 유도된 피부염증 및 조직학적 분석**

[0064] 6 ~ 8주령(22 ~ 26g) 수컷 ICR 마우스를 일정 온도 23℃ 및 일정 상대습도 60%로 12시간은 밝게, 12시간은 어둡게 조절하고, 사료와 물에 자유롭게 접근 가능하도록 하여 사육하였다. 마우스는 한림대학교 실험동물센터에서 입수하였다.

[0065] TPA를 국부적용하여 피부염증을 유도하였다. 다섯 마리의 마우스를 한 군으로 하였다. 마우스는 다섯 개 군으로 나누었는데, 대조군, TPA 처리군, TPA 처리 후 PON1 단백질 처리군, TPA 처리 후 PEP-1-PON1 융합단백질 처리군 및 TPA 처리 후 PEP-1 펩타이드 처리군이다. TPA (1.0 ㎍)를 20 ㎕ 아세톤에 용해시켜 마우스 귀 안쪽 표면 및 바깥 표면에 3일 동안 매일 적용하였다. PEP-1-PON1 융합단백질과 PON1 단백질 (각각 10 ㎍//20 ㎕)을 TPA 처리한 다음 한 시간 후 마우스 귀에 국부 적용하였다. 대조군으로는 20 ㎕ 아세톤을 마우스 귀 안쪽 표면 및 바깥 표면 적용하였다. 융합단백질을 최종 처리하고 24시간이 경과한 후 마우스는 희생되어 5 ㎜ 직경의 귀 생검을 펀치 (Kai Industries, Gifu, Japan)로 얻어 중량을 측정하였다. 귀 두께는 디지탈 두께 측정기 (Mitutoyo Corporation, Toyko, Japan)로 측정하였다. 조직학적 분석을 위해 귀 생검은 4% 파라포름알데하이드로 고정시켰고, 파라핀에 포매하고 5 ㎛ 두께로 절편화한 후 헤마토자일린과 에오신으로 염색하였다 [Kim MJ, Kim DW, Park JH, Kim SJ, Lee CH, et al. (2013) Free Radic Biol Med 63: 432-445, Kim SY, Jeong HJ, Kim DW, Kim MJ, An JJ, et al. (2011) Immunobiol 216: 771-781].

[0066] **웨스턴 블랏 분석**

[0067] 귀 생검은 프로테이즈 억제제 칵테일과 함께 조직 단백질추출 버퍼에 넣고 균질화하였다. 각 세포 시료에서 추출한 동일량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고, 나이트로셀룰로스 막으로 전기이동하였다. 막은 0.1% Tween 20을 함유하는 TBS 완충액에 녹인 5% 탈지분유로 블로킹하였다. 막은 1차 항체 및 호스래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 2차 항체로 탐지하였다. 막은 지시된 항체로 탐지하고 면역반응성 밴드는 ECL에 의해 시각화되었다.

[0068] **통계학적 분석**

[0069] 데이타는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 군간 비교는 Student's t-test와 일방 ANOVA를 이용하였다. 오차는 $P < 0.05$일 때 유의한 것으로 하였다.

[0070] **결과 1: PEP-1-PON1 융합단백질 정제 및 Raw 264.7 세포로의 도입**

[0071] 도 1A와 같이, PEP-1-PON1 융합단백질은 인간 PON1 유전자와 단백질 수송 도메인 PEP-1 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 융합하여 제조하였다. PEP-1-PON1 융합단백질은 IPTG를 가하여 *E. coli*에서 발현시키고, Ni^{2+}-친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 또한, PEP-1-PON1 융합단백질은 Detoxi-Gel™ 내독소 제거용젤을 이용하여 좀 더 정제하였다. 발현되고 정제된 단백질은 SDS-PAGE와 항-토끼 폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다 (도 1B와 1C).

[0072] PEP-1-PON1 융합단백질이 Raw 264.7 세포 내로 투과 가능한지를 알아보기 위해 세포를 다양한 농도 (0.1-0.3 μM, 1 h)의 PEP-1-PON1 융합단백질로 처리하였고, 또한, 다양한 시간 (10-60 분, 0.3 μM)으로 처리하였다. 그런 다음 세포 투과 수준은 항-폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏팅하여 분석하였다. 도 2A, 2B와 같이, 웨스턴 블랏 분석 결과 PEP-1-PON1 융합단백질은 투여량 및 처리시간 의존적으로 세포 내로 투과하였다. 반면, PON1 단백질은 세포 내로 투과하지 않았다. 단백질 치료에서 안정성은 매우 중요한 요소이기 때문에, 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질의 안정성을 시험하였다. 세포에 처리시간을 달리하여 PEP-1-PON1 융합단백질을 처리하고 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. 도 2C와 같이, 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질은 세포 내에서 36시간 동안 현저한 수준을 나타내었다. 뿐만 아니라, 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질의 세포 내 분포는 면역형광염색법으로 관찰하였다. 형광신호는 PEP-1-PON1 융합단백질을 처리한 세포에서 증가하였다. 반면, PON1 단백질 처리군에서는 처리하지 않은 대조군과 비슷하였다 (도 2D).

[0073] **결과 2: LPS로 유도된 염증반응에 대한 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질의 저해효과**

[0074] LPS로 유도된 염증반응에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 보호효과를 시험하기 위해 COX-2, iNOS 및 사이토카인 (TNF-α, IL-1β 및 IL-6) 발현수준을 평가하였다. Raw 264.7 세포를 한 시간 동안 PEP-1-PON1 융합단백질로 처리한 후, 세포를 24시간 동안 10 ng/ml LPS와 함께 배양하였다. PEP-1-PON1 융합단백질로 처리한 세포에서, LPS-유도된 COX-2와 iNOS 단백질 발현 수준은 투여량 의존적으로 현저히 감소하였다 (도 3A). 또한, LPS에 의해 유도된 친염증성 사이토카인의 농도 증가는 PEP-1-PON1 융합단백질 처리 세포에서 현저히 감소하였다. 그러나, PON1 단백질 처리 세포에서는 LPS 단독 처리한 세포와 비교하여 사이토카인 수준이 감소하지 않았다 (도 3A). PEP-1 펩타이드만 처리한 군에서는 LPS로 유도된 사이토카인 수준에 대하여 보호효과가 나타나지 않았다 (데이타 제시하지 않음). 본 발명자들은 PEP-1-PON1 융합단백질의 보호효과를 명확히 하기 위하여 높은 (1 μg/ml) LPS로 유도된 염증반응을 시험하였다. PEP-1-PON1 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였고, 이 효과는 10 ng/ml LPS에 대한 효과와 유사하였다 (도 3B). 따라서 이는 PEP-1-PON1 융합단백질이 Raw 264.7 세포 내에서 LPS로 유도되는 염증반응을 억제함을 말해준다.

[0075] **결과 3: PEP-1-PON1 융합단백질은 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도되는 MAPK와 NF-κB 활성화를 저해한다.**

[0076] Raw 264.7 세포에서 LPS는 MAPKs와 NF-κB 활성화를 통해 염증을 유도한다. LPS로 유도되는 MAPKs와 NF-κB 활성화에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 보호효과를 시험하기 위해 세포를 1 μg/ml LPS로 15분간 처리하였다. 도 4A와 같이, ERK1/2, p38 및 JNK 인산화 발현수준은 LPS만 처리한 세포에서 현저히 증가하였다. 반면, PEP-1-PON1 융합단백질 처리세포에서는 인산화된 ERK1/2, p38 및 JNK 발현수준이 현저히 감소하였다. 또한, 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질은 LPS로 유도되는 세포내 p65와 IκBα 인산화 수준을 현저히 저해한 반면 (도 4B), LPS로 유도되는 MAPKs와 NF-κB 활성화는 PON1 단백질 처리군에서는 영향이 없었다. PEP-1 펩타이드만 처리한 세포에서는 LPS만 처리한 세포와 유사한 패턴을 보였다 (데이타 나타내지 않음).

[0077] **결과 4: 산화 스트레스로 유도되는 세포사멸에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 억제효과**

[0078] LPS는 염증매개자와 활성산소종과 같은 산화 스트레스를 유도한다. 과량의 활성산소종은 세포사멸을 유도한다 [Goraca A, Huk-Kolega H, Kleniewska P, Piechota-Polanczyk A, Skibska B. (2013) Pharmacol Rep 65: 179-186, Tiwari M, Dwivedi UN, Kakkar P. (2010) Food and Chem Toxicol 48: 2913-2919]. 따라서, 본 발명자들은 LPS로 유도되는 활성산소종 생성 및 LPS 또는 H_2O_2로 유도되는 활성산소종 생성에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 저해효과를 DCF-DA 염색을 이용하여 시험하였다. 10 ng/ml LPS로 50분간 처리한 세포에서 형광신호는 무처리 대조군에 비해 LPS에 의해 강하게 염색된 반면, 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질은 형광신호를 감소시켰다 (도 5A). 뿐만 아니라, 고농도 LPS (1 μg/ml) 처리세포에서는 10 ng/ml LPS 처리세포와 비교하여 더 강한 형광신호

가 나타났다 (도 5B). 그러나, 10 ng/ml LPS 처리세포와 1 ㎍/ml LPS 처리세포 간에 형광신호는 유사한 패턴을 나타내었다.

[0079] 뿐만 아니라, 본 발명자들은 H_2O_2 (1 mM, 20분 및 2 mM, 10분)로 처리한 세포에서 활성산소종 생성을 시험하였다. 도 5와 같이, 형광신호들은 LPS 처리세포와 유사한 패턴을 나타내었다. 또한, PON1 단백질 처리세포는 동일한 실험 조건에서 보호효과를 나타내지 않았다. 이러한 결과들은 세포로 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 LPS 또는 H_2O_2 처리한 세포에서 활성산소종 수준을 감소시킴으로써 세포 보호효과를 나타냄을 말해준다.

[0080] 세포 사멸에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 보호효과를 시험하기 위하여 세포생존율은 H_2O_2 (1 mM 및 1.5 mM)로 16시간 처리 후 측정하였다. 도 6A와 같이, 세포생존율은 H_2O_2에 의해 저하되었다. 세포생존율은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질에 의해 투여량 의존적으로 최대 72% 및 76%까지 현저히 증가하였다. 다음으로 본 발명자들은 TUNEL 염색법으로 DNA 조각화를 시험하였다. 도 6B와 같이, H_2O_2 (1 mM, 15 h 및 5 mM, 4 h) 처리세포에서 형광신호는 대조군 세포와 비교하여 증가한 반면, PEP-1-PON1 융합단백질 처리세포에서는 형광신호가 감소하였다. 그러나, PON1 단백질 처리세포의 형광신호는 H_2O_2 처리 세포와 유사하였다. PEP-1 펩타이드 처리세포에서는 H_2O_2 처리 세포의 활성산소종 생성 및 DNA 조각화에 아무런 영향을 미치지 못하였다 (데이타 나타내지 않음). 따라서, 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질은 생물학적으로 활성을 나타내며, 활성산소종 생성 및 DNA 조각화를 저해하여 H_2O_2로 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호한다.

[0081] H_2O_2로 유도되는 세포사멸에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 보호효과를 좀 더 확인하기 위하여 캐스페이즈-3, Akt, p53 및 미토콘드리아 막 전위를 시험하였다. 도 7A와 같이, 캐스페이즈-3 활성화는 H_2O_2에 의해 현저히 증가하였다. 그러나, PEP-1-PON1 융합단백질은 절단된 캐스페이즈-3 수준을 현저히 감소시켰다. 본 발명자들은 H_2O_2로 처리한 세포에서 인산화된 Akt와 p53 수준이 현저히 증가한 반면, PEP-1-PON1 융합단백질 처리세포에서는 현저히 감소함을 밝혔다. 그러나, PON1 단백질 처리군에서 인산화된 Akt와 p53 발현은 변화가 없었다 (도 7B). 뿐만 아니라, PEP-1-PON1 융합단백질 처리군은 H_2O_2 처리세포와 비교하여 미토콘드리아 막 전위가 증가하였다 (도 7C). PEP-1 펩타이드 처리세포는 동일 실험조건에서 캐스페이즈-3, Akt, p53 활성화 및 미토콘드리아 막 전위에 영향을 미치지 않았다 (데이타 나타내지 않음). 이 결과들은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 세포자기사멸 경로를 저해함으로써 H_2O_2로 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호함을 말해준다.

[0082] **결과 5: 동물모델에서 염증에 대한 PEP-1-PON1 융합단백질의 보호효과**

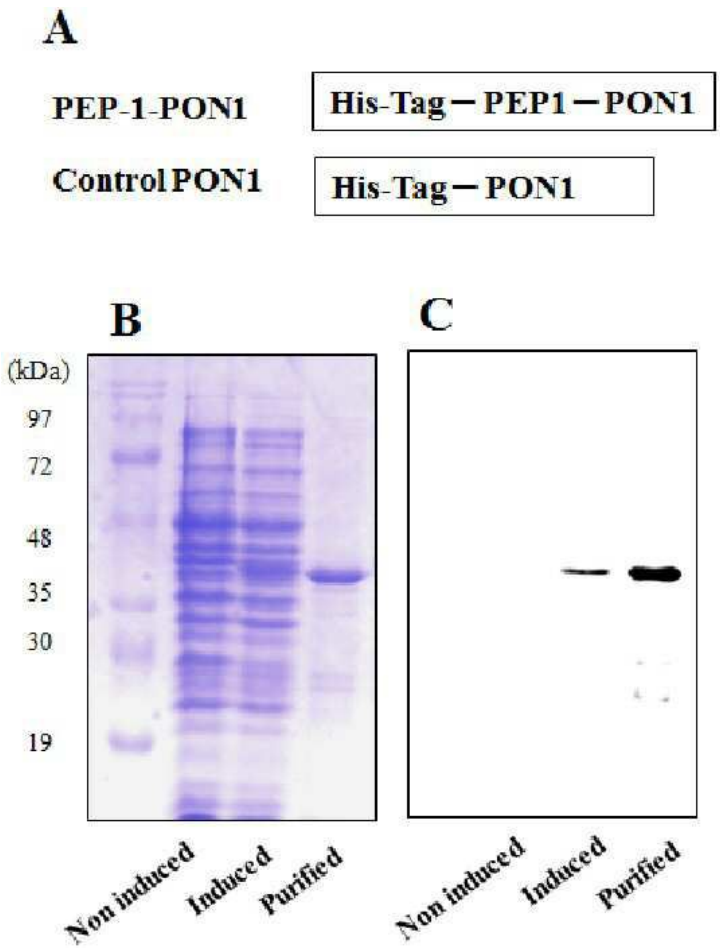
[0083] PEP-1-PON1 융합단백질이 피부 염증에 대하여 보호효과가 있는지를 알아보기 위해 TPA로 유도되는 마우스 귀 염증 모델을 이용하였다 [Kim MJ, Kim DW, Park JH, Kim SJ, Lee CH, et al. (2013) Free Radic Biol Med 63: 432-445, Kim SY, Jeong HJ, Kim DW, Kim MJ, An JJ, et al. (2011) Immunobiol 216: 771-781]. TPA와 PEP-1-PON1 융합단백질을 국소적용한 후 5 ㎜ 귀 생검의 두께와 무게를 측정하고 면역조직화학적 분석을 수행하였다. 도 8과 같이, PEP-1-PON1 융합단백질은 TPA로 유도된 귀 부종에서 두께와 무게의 증가를 현저히 저해하였다. 또한, PEP-1-PON1 융합단백질은 피부 염증에서 초기에 일어나는 모노사이트와 같은 염증세포의 침윤을 현저히 저해하였다. 그렇지만, 대조군인 PON1 단백질은 이와 같은 효과를 나타내지 않았다.

[0084] 다음으로 본 발명자들은 TPA로 유도되는 동물모델에서 COX-2와 사이토카인 발현 수준에 미치는 영향을 시험하였다. TPA는 COX-2 mRNA와 단백질 발현수준을 현저히 증가시켰다. 또한, TPA에 의하여 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성이 증가하였다. 그러나, PEP-1-PON1 융합단백질은 COX-2 발현 수준과 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성을 현저히 감소시켰다. 반면, 대조군 PON1 단백질은 COX-2와 사이토카인 수준에 아무런 영향을 미치지 않았다 (도 9).

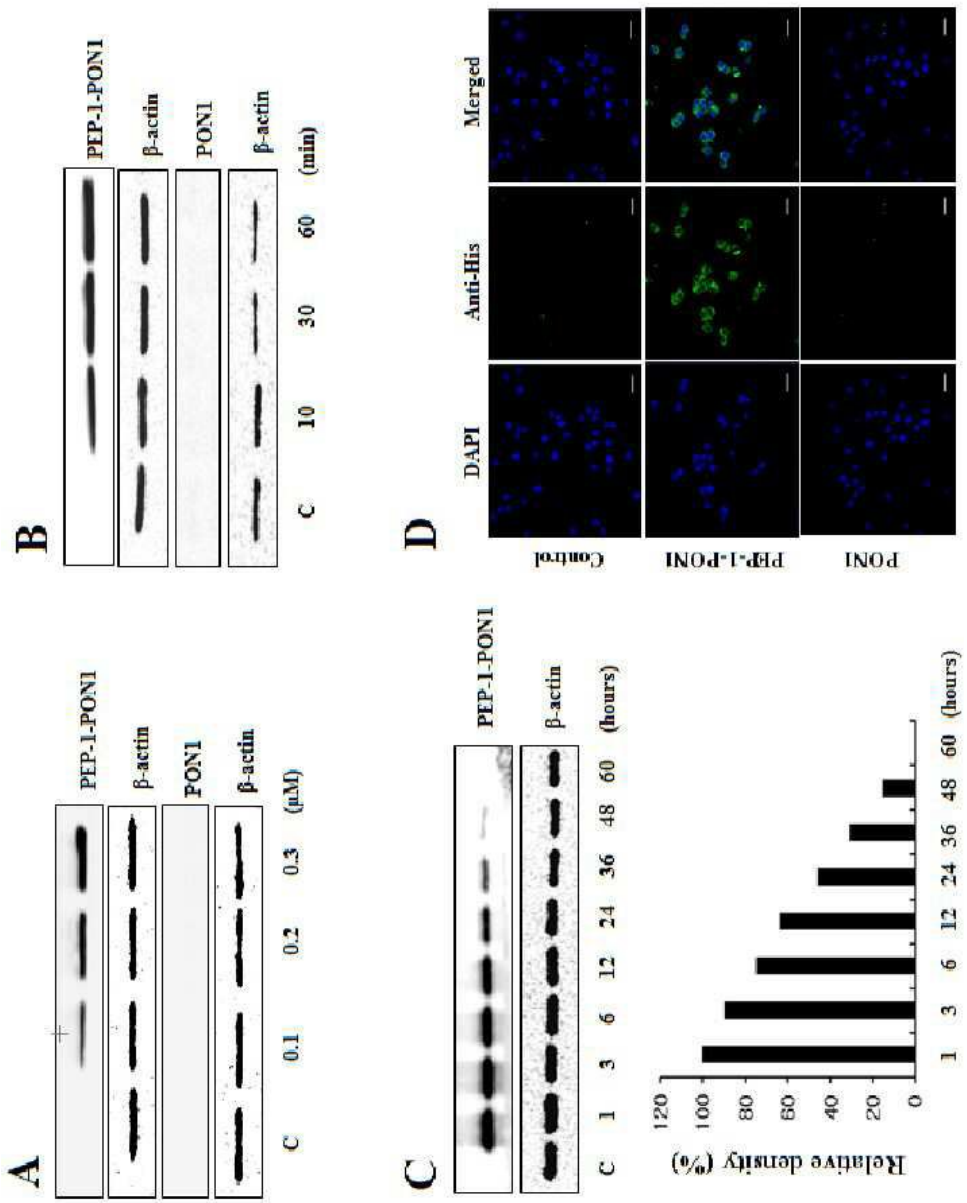
[0085] 본 발명자들은 또한 PEP-1-PON1 융합단백질이 MAPKs와 NF-κB 활성화에 미치는 영향을 웨스턴 블랏으로 분석하였다. PEP-1-PON1 융합단백질은 TPA로 유도되는 피부염증 동물모델에서 TPA로 유도되는 p38, ERK1/2 및 JNK 인산화와 p65와 IκBα 인산화를 저해하였다. 그러나, 대조군 PON1 단백질은 MAPK와 NF-κB 활성화에 영향을 미치지 않았다 (도 10). 종합하자면, 이러한 결과들은 투과된 PEP-1-PON1 융합단백질이 MAPK와 NF-κB 활성화 조절을 통하여 염증을 억제하는 것을 말해준다.

도면

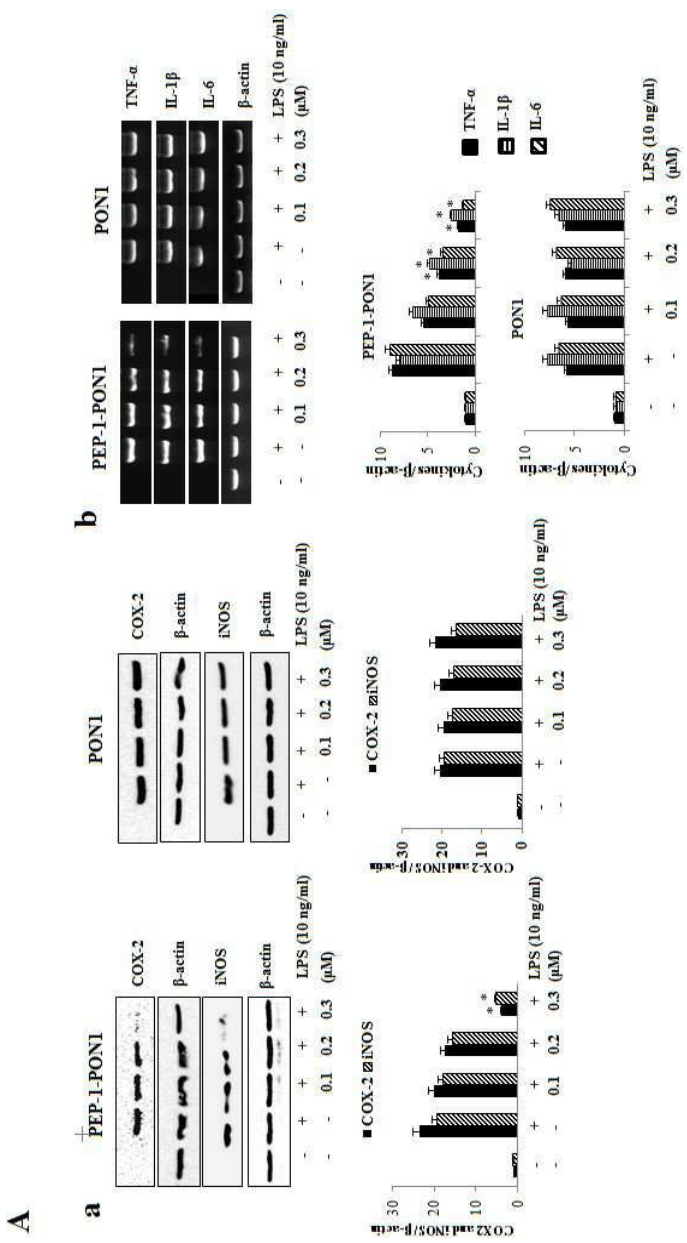
도면1


A
PEP-1-PON1
His-Tag－PEP1－PON1
Control PON1
His-Tag－PON1
B
C
(kDa)
97
72
48
35
30
19
Non induced
Induced
Purified
Non induced
Induced
Purified

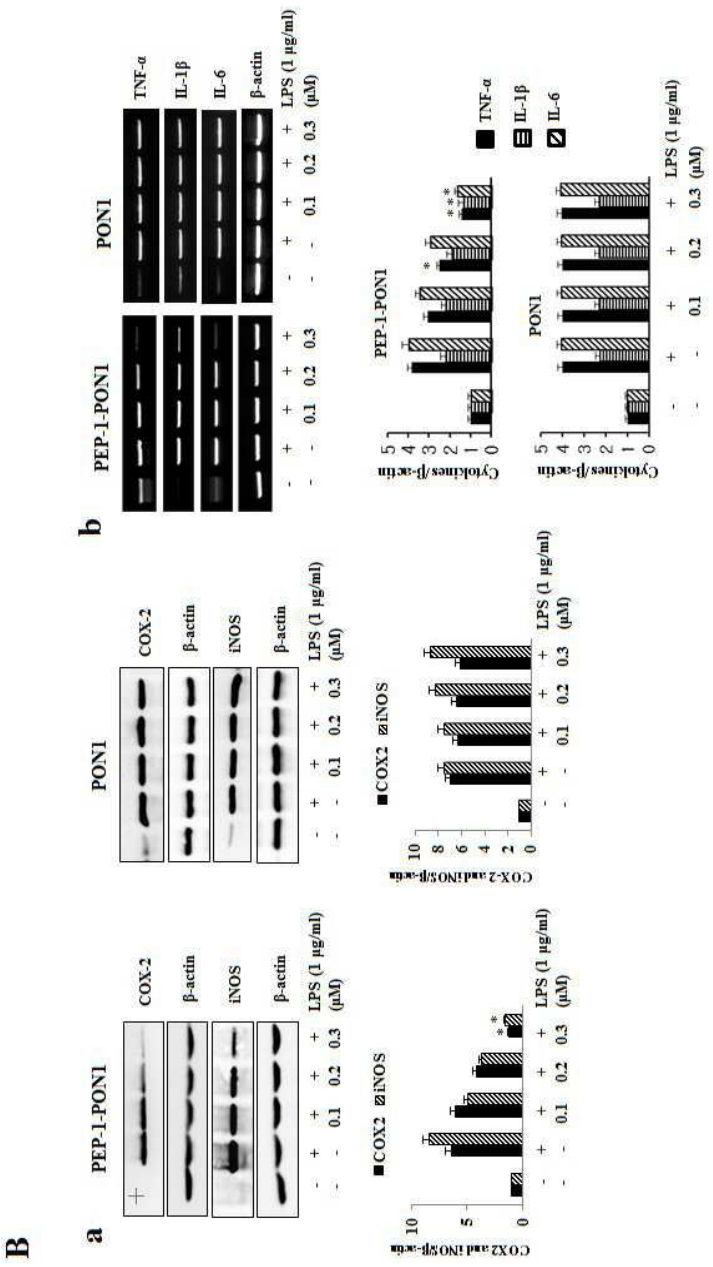
도면2


A
PEP-1-PON1
β-actin
PON1
β-actin
C 0.1 0.2 0.3 (μM)
B
PEP-1-PON1
β-actin
PON1
β-actin
C 10 30 60 (min)
C
PEP-1-PON1
β-actin
C 1 3 6 12 24 36 48 60 (hours)
Relative density (%)
120 100 80 60 40 20 0
1 3 6 12 24 36 48 60 (hours)
D
DAPI
Anti-His
Merged
Control
PEP-1-PON1
PON1

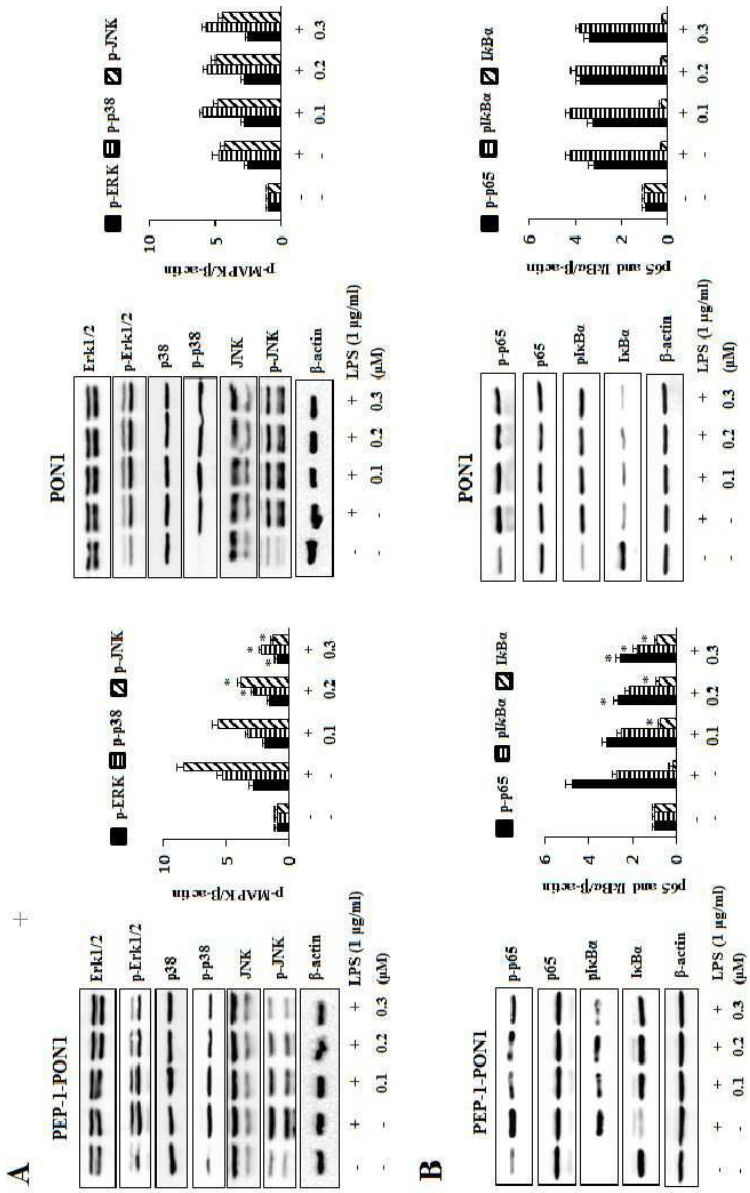
도면3a


A
a
PEP-1-PON1
COX-2
β-actin
iNOS
β-actin
LPS (10 ng/ml)
(μM)
COX-2 &iNOS
COX2 and iNOS/β-actin
b
PEP-1-PON1
TNF-α
IL-1β
IL-6
β-actin
Cytokines/β-actin

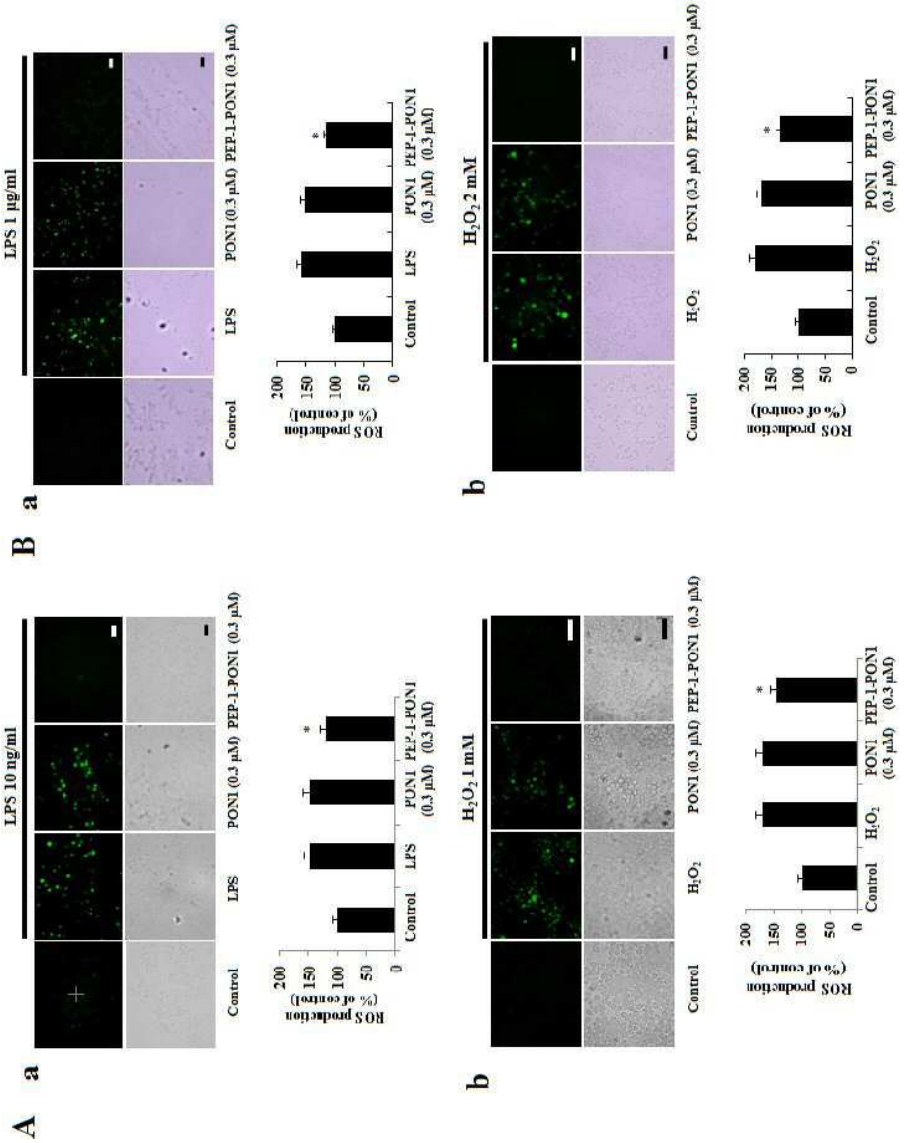
도면3b


B
a
PEP-1-PON1
PON1
COX-2
β-actin
iNOS
β-actin
LPS (1 μg/ml)
(μM)
COX2 iNOS
COX-2 and iNOS/β-actin
b
PEP-1-PON1
PON1
TNF-α
IL-1β
IL-6
β-actin
Cytokines/β-actin

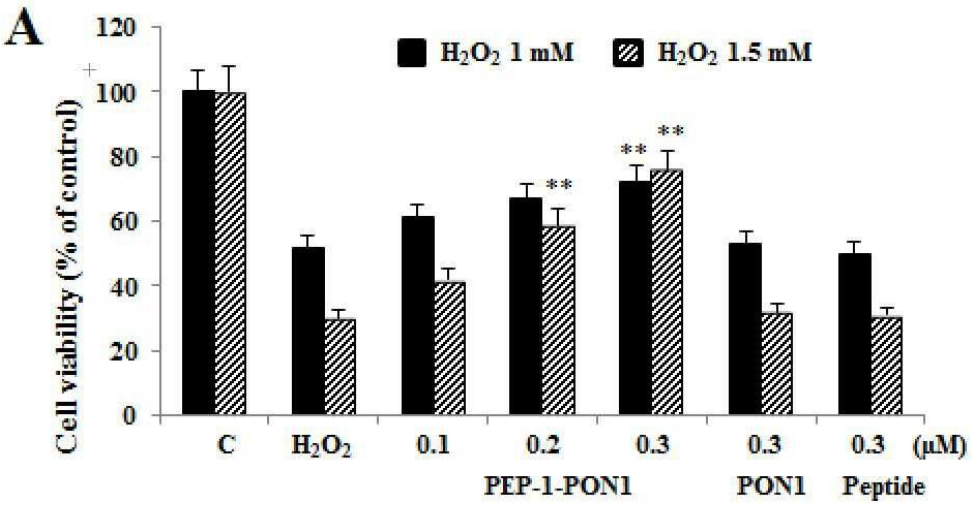
도면4


A
PEP-1-PON1
PON1
Erk1/2
p-Erk1/2
p38
p-p38
JNK
p-JNK
β-actin
p-ERK
p-p38
p-JNK
p-MAPK/β-actin
LPS (1 μg/ml)
(μM)
B
p-p65
p65
pIκBα
IκBα
p65 and IκBα/β-actin

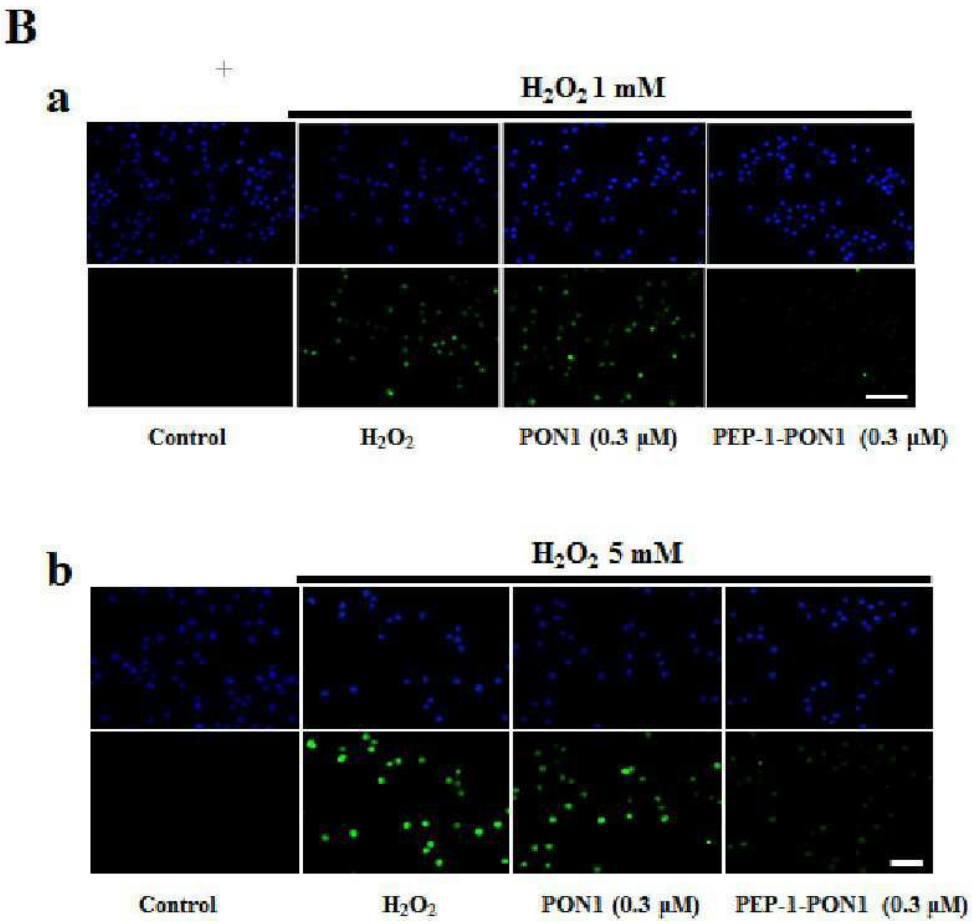
도면5


A
a
LPS 10 ng/ml
Control
LPS
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)
ROS production (% of control)
200
150
100
50
0
Control
LPS
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)
b
H2O2 1 mM
Control
H2O2
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)
ROS production (% of control)
Control
H2O2
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)
B
a
LPS 1 μg/ml
Control
LPS
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)
ROS production (% of control)
Control
LPS
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)
b
H2O2 2 mM
Control
H2O2
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)
ROS production (% of control)
Control
H2O2
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)

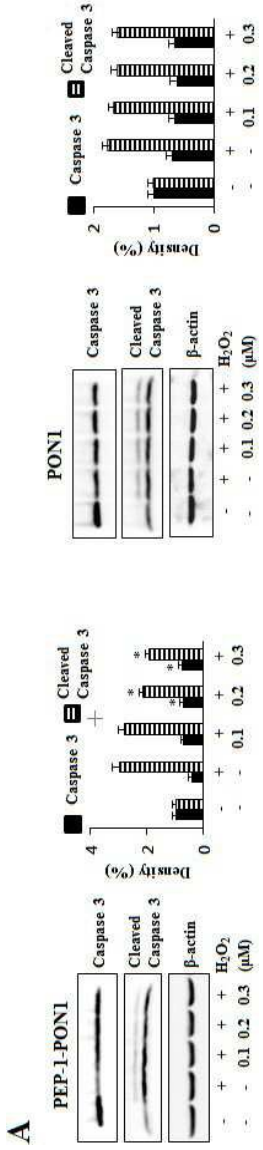
도면6a


A
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (% of control)
H2O2 1 mM
H2O2 1.5 mM
**
**
**
C
H2O2
0.1
0.2
0.3
0.3
0.3
(μM)
PEP-1-PON1
PON1
Peptide

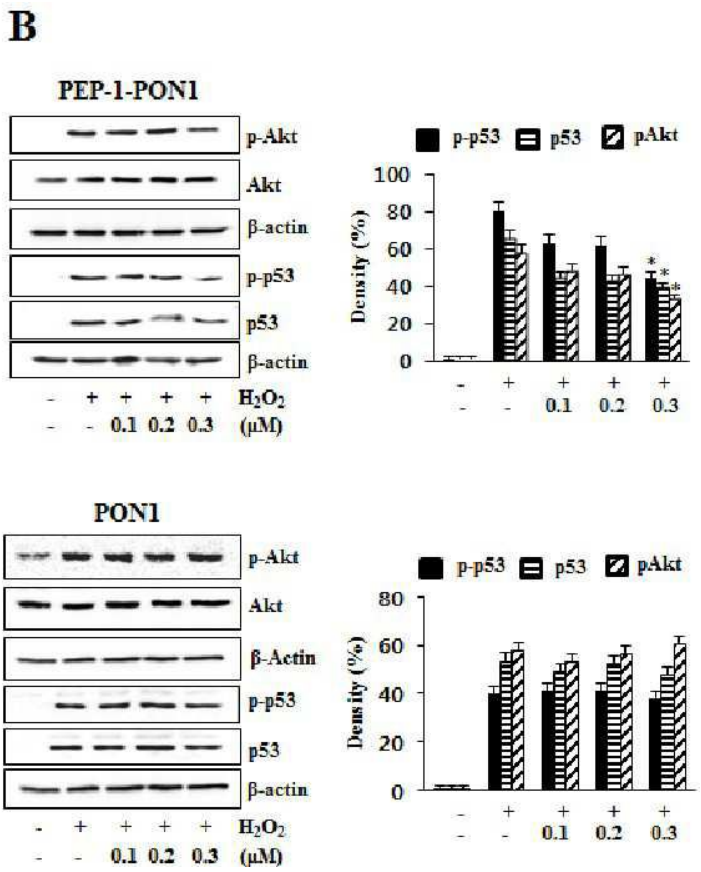
도면6b


B
a
H2O2 1 mM
Control
H2O2
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)
b
H2O2 5 mM
Control
H2O2
PON1 (0.3 μM)
PEP-1-PON1 (0.3 μM)

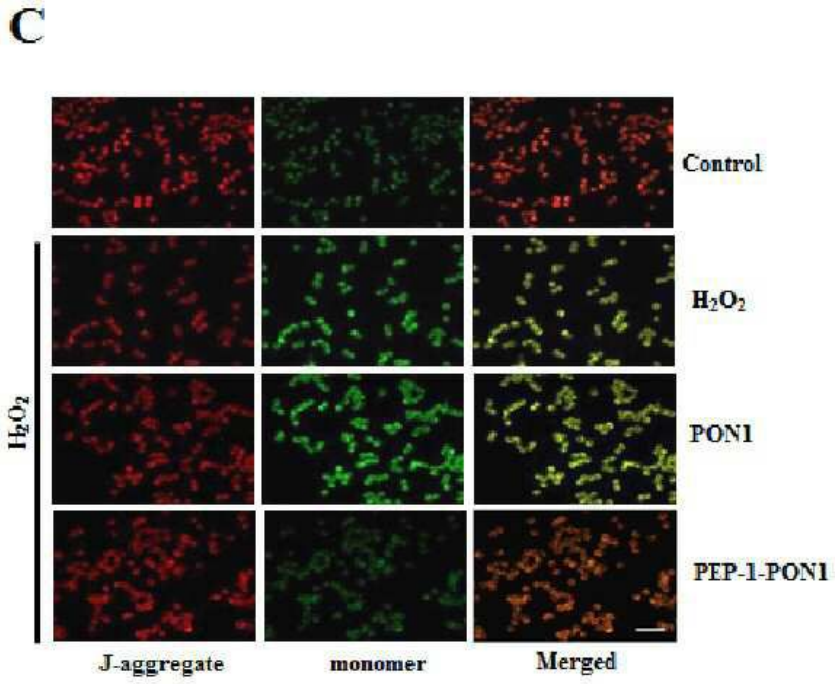
도면7a


A
PEP-1-PON1
Caspase 3
Cleaved Caspase 3
β-actin
H2O2 (μM)
- + + + + 0.1 0.2 0.3
Density (%)
Caspase 3
Cleaved Caspase 3
PON1
- + + + + 0.1 0.2 0.3

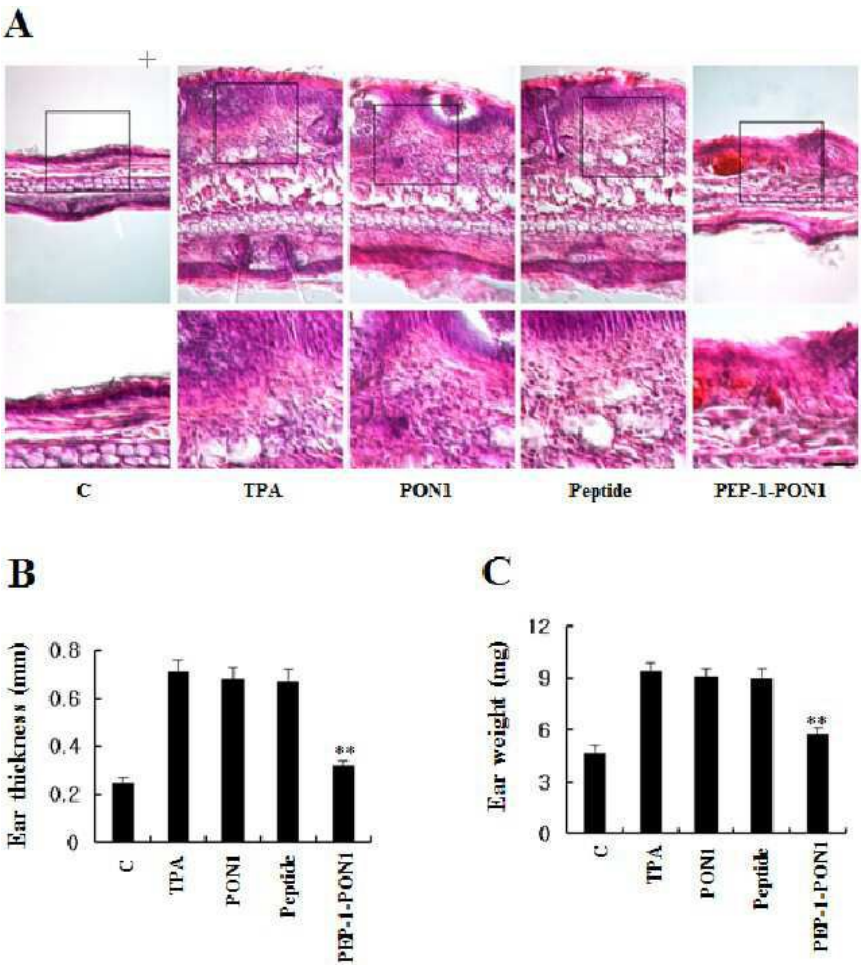
도면7b


B
PEP-1-PON1
p-Akt
Akt
β-actin
p-p53
p53
β-actin
- + + + + H2O2
- - 0.1 0.2 0.3 (μM)
p-p53 p53 pAkt
Density (%)
100
80
60
40
20
0
PON1
p-Akt
Akt
β-Actin
p-p53
p53
β-actin
- + + + + H2O2
- - 0.1 0.2 0.3 (μM)
p-p53 p53 pAkt
Density (%)
80
60
40
20
0

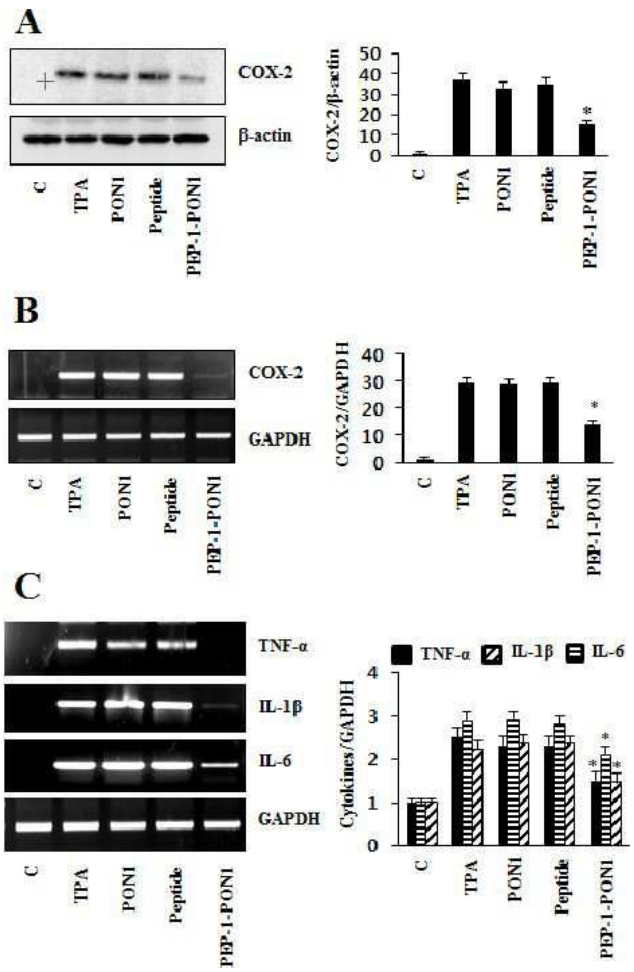
도면7c


C
Control
H2O2
PON1
PEP-1-PON1
H2O2
J-aggregate
monomer
Merged

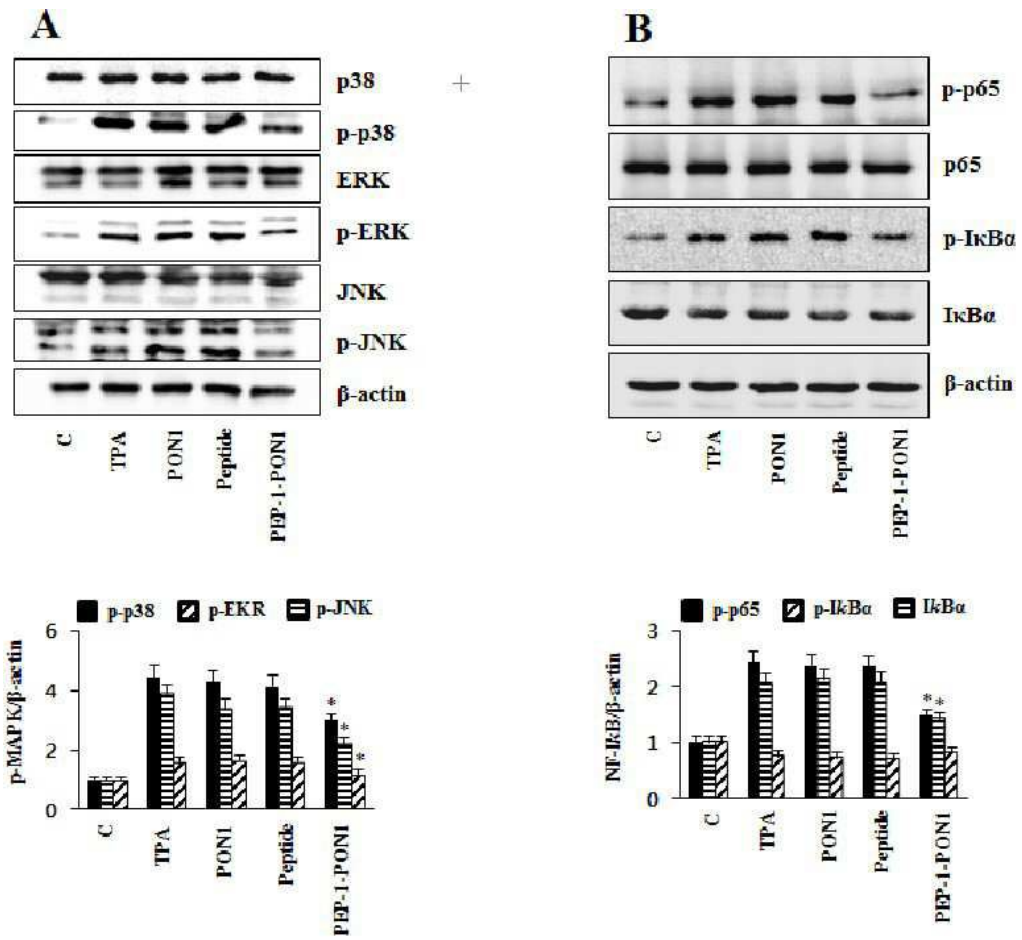
도면8


A
C
TPA
PON1
Peptide
PEP-1-PON1
B
Ear thickness (mm)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
**
C
TPA
PON1
Peptide
PEP-1-PON1
C
Ear weight (mg)
12
9
6
3
0
**
C
TPA
PON1
Peptide
PEP-1-PON1

도면9


A
COX-2
β-actin
C
TPA
PON1
Peptide
PEP-1-PON1
COX-2/β-actin
50
40
30
20
10
0
B
COX-2
GAPDH
COX-2/GAPDH
40
30
20
10
0
C
TNF-α
IL-1β
IL-6
GAPDH
TNF-α
IL-1β
IL-6
Cytokines/GAPDH
4
3
2
1
0

도면10



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Antipinflammatory pharmaceutical composition containing cell-transducible paraoxonase 1 fusion protein

<130> Hallym-SYCHOI-Pep-PON1-Inflam

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ctcgaggcga agctgattgc g 21

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggatccttag agctcacagt aaagagc 27

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

tggacgaggt ttttccacca g 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

caaaggcctc cattgaccag a 21

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tggcaccact agttggttgt cttt 24

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

aagttcccaa atggcctccc 20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gtgctgccta atgtcccctt gaatc 25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

tgcagagttc cccaactggt acatc 25

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

tggatggtct tggtccttag cc 22

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

caagaaagac aaagccagag tcctt 25

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ggacagtgag gccaggatgg 20

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

agtgtgacgt tgacatccgt aaaga 25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

agtgatggca tggactgtgg tcat 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

acccccttcat tgacctcaac taca 24

<210> 15

<211> 1192

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding PEP-1-PON1 fusion protein

<400> 15

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccataa aagaaacctg 60

gtgggaaacc tggtggaccg aatggtctca gccgaaaaaa aaacgtaaag tgctcgagat 120

ggcgaagctg attgcgctca ccctcttggg gatgggactg gcactcttca ggaaccacca 180

gtcttcttac caaacacgac ttaatgctct ccgagaggta caacccgtag aacttcctaa 240

ctgtaattta gttaaaggaa tcgaaactgg ctctgaagac ttggagatac tgcctaatgg 300

actggctttc attagctctg gattaaagta tcctggaata aagagcttca accccaacag 360

tcctggaaaa atacttctga tggacctgaa tgaagaagat ccaacagtgt tggaattggg 420

gatcactgga agtaaatttg atgtatcttc atttaaccct catgggatta gcacattcac 480

agatgaagat aatgccatgt acctcctggt ggtgaaccat ccagatgcca agtccacagt 540

ggagttgttt aaatttcaag aagaagaaaa atcgcttttg catctaaaaa ccatcagaca 600

taaacttctg cctaatttga atgatattgt tgctgtggga cctgagcact tttatggcac 660

aaatgatcac tattttcttg acccctactt acaatcctgg gagatgtatt tgggtttagc 720

gtggtcgtat gttgtctact atagtccaag tgaagttcga gtggtggcag aaggatttga 780

ttttgctaat ggaatcaaca tttcacccga tggcaagtat gtctatatag ctgagttgct 840

ggctcataag attcatgtgt atgaaaagca tgctaattgg actttaactc cattgaagtc 900

ccttgacttt aataccctcg tggataacat atctgtggat cctgagacag gagacctttg 960

ggttggatgc catcccaatg gcatgaaaat cttcttctat gactcagaga atcctcctgc 1020

atcagaggtg cttcgaatcc agaacattct aacagaagaa cctaaagtga cacaggttta 1080

tgcagaaaat ggcacagtgt tgcaaggcag tacagttgcc tctgtgtaca aagggaaact 1140

gctgattggc acagtgtttc acaaagctct ttactgtgag ctctaaggat cc 1192

<210> 16

<211> 378

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-PON1 fusion protein

<400> 16

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 Lys Leu Ile Ala Leu Thr Leu
20 25 30

Leu Gly Met Gly Leu Ala Leu Phe Arg Asn His Gln Ser Ser Tyr Gln
35 40 45

Thr Arg Leu Asn Ala Leu Arg Glu Val Gln Pro Val Glu Leu Pro Asn
50 55 60

Cys Asn Leu Val Lys Gly Ile Glu Thr Gly Ser Glu Asp Leu Glu Ile

65 70 75 80

Leu Pro Asn Gly Leu Ala Phe Ile Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Gly

85 90 95

Ile Lys Ser Phe Asn Pro Asn Ser Pro Gly Lys Ile Leu Leu Met Asp

100 105 110

Leu Asn Glu Glu Asp Pro Thr Val Leu Glu Leu Gly Ile Thr Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

Asp Glu Asp Asn Ala Met Tyr Leu Leu Val Val Asn His Pro Asp Ala

145 150 155 160

Lys Ser Thr Val Glu Leu Phe Lys Phe Gln Glu Glu Glu Lys Ser Leu

165 170 175

Leu His Leu Lys Thr Ile Arg His Lys Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asp

180 185 190

Ile Val Ala Val Gly Pro Glu His Phe Tyr Gly Thr Asn Asp His Tyr

195 200 205

Phe Leu Asp Pro Tyr Leu Gln Ser Trp Glu Met Tyr Leu Gly Leu Ala

210 215 220

Trp Ser Tyr Val Val Tyr Tyr Ser Pro Ser Glu Val Arg Val Val Ala

225 230 235 240

Glu Gly Phe Asp Phe Ala Asn Gly Ile Asn Ile Ser Pro Asp Gly Lys

245 250 255

Tyr Val Tyr Ile Ala Glu Leu Leu Ala His Lys Ile His Val Tyr Glu

260 265 270

Lys His Ala Asn Trp Thr Leu Thr Pro Leu Lys Ser Leu Asp Phe Asn

275 280 285

Thr Leu Val Asp Asn Ile Ser Val Asp Pro Glu Thr Gly Asp Leu Trp

290 295 300

Val Gly Cys His Pro Asn Gly Met Lys Ile Phe Phe Tyr Asp Ser Glu

305 310 315 320

Asn Pro Pro Ala Ser Glu Val Leu Arg Ile Gln Asn Ile Leu Thr Glu
325 330 335
Glu Pro Lys Val Thr Gln Val Tyr Ala Glu Asn Gly Thr Val Leu Gln
340 345 350
Gly Ser Thr Val Ala Ser Val Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Ile Gly Thr
355 360 365
Val Phe His Lys Ala Leu Tyr Cys Glu Leu
370 375