



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0061668
(43) 공개일자 2011년06월10일

(51) Int. Cl.
C12N 9/12 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0118135
(22) 출원일자 2009년12월02일
심사청구일자 2009년12월02일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
대한민국(농촌진흥청장)
경기 수원시 권선구 서둔동 250번지
(72) 발명자
권해용
경기도 수원시 영통구 망포동 망포마을현대2차아
이파크아파트 201-1601
이광길
경기도 수원시 권선구 탑동 42-1 우방APT 105동
203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

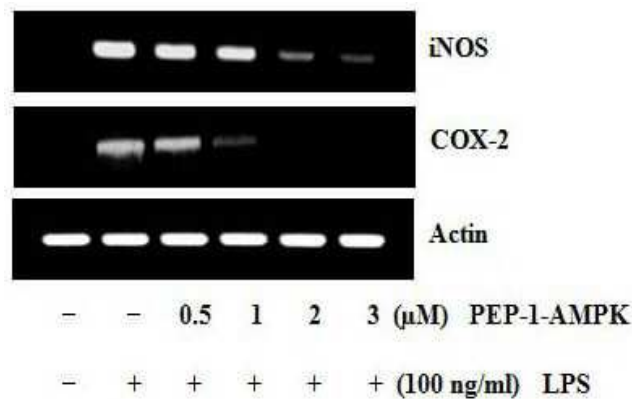
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 AMP-활성화 단백질 키나아제와 단백질 수송도메인이 공유결합되어 세포에 적용시킬 때 용이하게 세포 내로 도입되는 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질에 관한 것으로서, 대조군과 비교할 때 원활히 세포 내로 농도 의존적, 시간 의존적으로 도입되며, 염증을 억제하는 효과를 나타내었다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

강석우

경기도 화성시 반송동 79 우남퍼스트빌 350동 1903호

여주홍

경기도 수원시 영통구 매탄동 주공5단지APT 523동 1203호

조유영

경기도 용인시 처인구 김량장동 삼환나우빌 102동 1304호

최수영

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105-706

조용준

강원도 춘천시 석사동 대우아파트 110-802

장상호

강원도 춘천시 옥천동 1-1 한림창업보육센터(바이오셀트란)

음원식

강원 춘천시 후평2동 904번지 포스코더샵아파트 112동 802호

김대원

서울특별시 강남구 대치동 316 은미아파트 19동 103호

박진서

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105동 1404호

조성민

강원도 춘천시 석사동 현진아파트 111-901

신승훈

강원도 춘천시 칠전동 대우아파트 103-503

특허청구의 범위

청구항 1

단백질 수송 도메인이 AMP-활성화 단백질 키나아제의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 PEP-1 펩타이드임을 특징으로 하는 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 AMP-활성화 단백질 키나아제의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 단백질 수송도메인이 공유결합된 것을 특징으로 하는 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질.

청구항 5

상기 청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 6

상기 청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 타입 2 당뇨병, 비만, 피부암, 아토피성 염증, 녹내장 여과 수술 후 섬유화 반흔 형성 억제를 포함하는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

AMP-활성화 단백질 키나아제 cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 8

제7항에 있어서 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 6번의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 9

단백질 수송 도메인이 AMP-활성화 단백질 키나아제의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질을 발현시키기 위하여 AMP-활성화 단백질 키나아제 cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포침투성 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질을 발현시키는 벡터.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 AMP-활성화 단백질 키나아제와 단백질 수송도메인이 공유결합되어 세포에 적용시킬 때 용이하게 세포 내로 도입되는 AMP-활성화 단백질 키나아제 융합 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증반응은 단핵백혈구(monocyte)와 대식세포의 활성화를 포함하며, 이것은 산화질소(Nitric oxide, NO)를 포함하는 염증매개자를 분비한다. 유도성 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)는 산화질소를 생성하는 세 개의 효소 중 하나이며, 많은 생리적 현상을 매개한다. iNOS 과생산이 염증 및 신경질환을 포함하는 다양한 질병과 관련이 있다는 사실은 잘 알려져 있다.

[0003] 프로스타글란딘(PGs)은 염증성 반응 및 알러지 면역반응과 같은 병리생리학적 조건을 조절하는데 중요한 역할을 수행하는 사이클로 옥시게네이스(Cyclooxygenase, COXs)에 의하여 아라키돈산 대사에서 유래되는 전염증성(proinflammatory) 매개자이다(Tilley, S. L., Coffman, T. M. and Koller, B. A. (2001) Mixed message: gene: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Invest.* **107**, 191-195.). 사이클로옥시게네이스 효소의 두 가지 아이소폼에 대해서는 많이 연구되어 있다. COX-1은 구조적으로(constitutively) 발현되어 세포의 일반적인 생리학적 기능을 유지하는데 중요한 역할을 수행한다. COX-2는 염증반응 동안 사이토카인과 같은 자극에 의하여 현저히 유도된다(Smith, W. L. and Dewit, D. L. (1990) Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *Adv. Immunol.* **62**, 167-215, Carey, M. A., Germolec, D. R., Langenbach, R. and Zeldin, D. C. (2003) Cyclooxygenase enzymes in allergic inflammation and asthma. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **69**, 157-162, Vancheri, C., Mastruzzo, C., Sortino, M. A. and Crimi, N. (2004) The lung as a privileged site for the beneficial actions of PEG2. *Trends Immunol.* **25**, 40-46).

[0004] 리포다당류(Lipopolysaccharide, LPS)는 내독소의 주요 요소이며 친수성 헤테로다당류와 공유결합된 인당지질(phosphoglycolipid)에 의하여 형성된다. LPS는 대식세포 증식을 억제하며 대식세포로 하여금 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 전염증성 인자들을 생산하도록 활성화시킨다. 이러한 반응들은 전염증성 사이토카인, 활성산소종, COX-2 및 iNOS 유도를 포함한다. 따라서, COX-2 및 iNOS 발현 유도를 억제하는 것은 염증을 억제하는 새로운 패러다임이다(Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K. and Lee, S. S. (2001) Molecular mechanisms underlying chemoprventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268).

[0005] AMP-활성화 단백질 키나아제(AMP-activated protein kinase, AMPK)는 세포 에너지 항상성을 조절하는 진화학적으로 보존된 세린/트레오닌 키나아제이다(Winder, W. W. (2001) Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **91**, 1017-1028, Neumann, D., Woods, A., Carling, D., Wallimann, T. and Schlattner, U. (2003) Mammalian AMP-activated protein kinase: functional, heterotrimeric complexes by co-expression of subunits in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **30**, 230-237, Sag, D., Carling, D., Stout, R. D. and Suttles, J. (2008) Adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J. Immunol.* **181**, 8633-8641). AMPK는 열충격, 혈중산소 감소증(hypoxia), 허혈(ischemia), 근육 운동 및 세포 내 ATP 수준을 손상시키는 다른 자극과 같은 세포 에너지 상태의 변화에 반응하여 활성화된다(Carling, D. (2004) The AMP-activated protein kinase cascade- a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 18-24, Hardie, D. G. (2003) The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinol.* **144**, 5179-5183, Hardie, D. G. and Hawley, S. A. (2001) AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* **23**, 1112-1119, Winder, W. W. and Hardie, D. G. (1999) AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* **277**, E1-E10.). AMPK는 촉매 서브유닛(α)과 두 개의 조절 서브유닛(β 및 γ)으로 이루어진 헤테로 트라이머 효소이다. 각 서브유닛은 두 종류의 α , 두 종류의 β 및 세 종류의 γ 아이소폼이 있다. 몇몇 연구에서는 AMPK가 인슐린 민감성, 포도당 항상성 및 에너지 대사를 개선시킨다는 결과가 나와 있다. 그리하여 AMPK는 타입 2 당뇨, 비만 및 심장 비대(cardiac

hypertrophy) 치료의 새롭고 매력적인 타겟이 되고 있다(Carling, D. (2004) The AMP-activated protein kinase cascade- a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 18-24, Winder, W. W. (2000) AMP-activated protein kinase: possible target for treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* **2**, 441-448). AMPK의 약학적 활성인자인 5-아미노이미다졸-4-카복사마이드 리보스(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribose, AICAR)를 이용한 최근의 연구 결과는 AMPK가 항염증 타겟임을 암시한다. AICAR는 대식세포, 미세아교세포(Microglia) 및 성상세포(astrocyte)에서 종양괴사인자- α (TNF- α), 인터루킨-1 β (IL-1 β), 인터루킨-6(IL-6) 및 iNOS와 같은 전염증성 사이토카인을 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나, AICAR의 항염증 효과는 여전히 논란이 되고 있다(Nath, N., Giri, S., Prasad, R., Salem, M. L., Singh, A. K. and Singh, I. (2005) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a novel immunomodulator with therapeutic efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **175**, 566-574, Kue, C. L., Ho, F. M., Chang, M. Y., Prakash, E. and Lin, W. W. (2008) Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside is independent of AMP-activated protein kinase. *J. Cell. Biochem.* **103**, 931-940, Giri, S., Nath, N., Smith, B., Viollet, B., Singh, A. K. and Singh, I. (2004) 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J. Neurosci.* **24**, 479-487, Jhun, B. S., Jin, Q., Oh, T. Y., Kim, S. S., Kong, Y., Cho, Y. H., Ha, J., Baik, H. H. and Kang, I. (2004) 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside suppresses lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation in Raw 264.7 murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 372-380). 또한, AMPK가 염증반응에서 수행하는 역할에 대한 정보는 거의 없는 상태이다.

[0006] 최근, 단백질의 운반 방법 중 하나로 PEP-1 펩타이드를 이용하여 자연상태의 이형단백질을 세포 내로 운반할 수 있다는 것이 밝혀졌다[Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. (2001) *Nat. Biotech.* **19**, 1173-1176]. PEP-1 펩타이드는 21개의 아미노산(KETWWETWWTEW SQP KKKRKV)으로 이루어졌고, 3개의 도메인{소수성(hydrophobic), 스페이서(spacer), 친수성(hydrophilic) 도메인}을 갖고 있다. 지금까지, PEP-1 펩타이드를 이용한 연구에서는 PEP-1 펩타이드와 외부 단백질을 동시에 세포에 투여하였을 경우 자연상태로 단백질을 세포 내로 운반할 수 있다는 것만 밝혀졌다. 또한, PEP-1 펩타이드는 HIV-1 Tat 단백질에 비해 단백질 치료제로서의 여러 가지 장점 즉, 생리학적 완충액에서의 안정성, 독성의 결여, 혈청에 대한 민감성의 결여 등을 나타낸다. 그러나, PEP-1 펩타이드는 녹색형광단백질이나 β -갈락토시데이즈와 같은 외부 단백질과 일정한 비율로 맞추어 투여해야만 세포 내에 효과적으로 단백질이 운반되는 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라, 현재까지도 PEP-1 펩타이드가 치료 단백질이나 모든 단백질을 세포 내로 운반할 수 있는지는 밝혀지지 않았다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 AMPK의 세포 침투성을 높인 융합 단백질을 제공하려는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 PEP-1을 포함하여 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 도메인을 AMPK의 적어도 일측 말단과 공유결합시킴으로써 세포 침투성을 극대화하려는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 AMPK 융합단백질을 염증 예방 및 치료제로서 이용하려는 것이다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명자들은 PEP-1-AMPK 융합단백질을 유전적 인프레임 트랜스덕션으로 디자인하고, PEP-1-AMPK 융합단백질이 대식세포 Raw 264.7 세포 내로 직접 도입될 수 있고, 뿐만 아니라, LPS로 유도된 세포 내에서 iNOS 및 COX-2 mRNA 및 단백질 수준을 억제함을 밝혀내었다.

[0011] 좀 더 자세히 설명하면, 본 발명자들은 자연상태의 단백질을 세포 내로 운반하는 PEP-1 펩타이드와 같은 단백질

수송도메인을 외부 단백질인 AMPK에 융합시켰고, 이 융합 단백질을 대장균에서 과대발현시켰으며, 금속 킬레이팅 친화 크로마토그래피로 쉽고 편리하게 정제하였다. 정제된 융합 단백질이 효과적으로 생물학적인 활성을 지니고 세포 내로 운반되는 것을 배양된 세포를 이용한 실험을 통하여 확인하였다. 그리고, AMPK 융합 단백질이 세포 내로 운반되며 염증반응을 억제함을 밝혀냈다.

[0012] 따라서, 본 발명자들은 PEP-1-AMPK 융합단백질이 염증성 질환 치료제로 유용함을 알아내었다.

[0013]

효 과

[0014] 본 발명은 AMPK 단백질을 효과적인 방법으로 단백질 수준에서 세포 내로 직접 투과시키는 기술을 제공한다.

[0015] 본 발명에 따르면, 아토피 피부 염증을 회복하는데 있어 AMPK 융합단백질을 변성되거나 또는 변성되지 않은 자연상태로 세포 내 투여함으로써 피부 염증질환을 치료하는 단백질 치료에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

[0016] 본 발명을 바탕으로 AMPK 융합단백질을 세포 내로 직접 전달하여 아토피 피부염 등 염증으로부터 피부세포 및 조직을 보호할 수 있기 때문에 질병 이외에도 항암제 및 기능성 화장품 산업 등 더욱 효과적으로 본 발명이 광범위하게 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0017] PEP-1 펩타이드가 이형 단백질을 자연상태 그대로 세포 내로 이동시키는데 운반체로서 이용될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 그러나, 아직까지 PEP-1 펩타이드를 이용한 실험은 드문 실정이다. 따라서, 본 발명자들은 PEP-1 펩타이드를 비롯한 단백질 수송 도메인이 비만 및 2형 당뇨와 관련된 타겟 단백질로 잘 알려진 AMPK 단백질을 세포 내로 운반시킬 수 있는지, 운반된 AMPK 융합단백질이 세포 내에서 단백질의 기능(항염증 기능)을 나타내는지 여부를 알아보고자 연구를 수행하였다.

[0018] 먼저, 본 발명자들은 PEP-1-AMPK, AMPK-PEP-1 및 PEP-1-AMPK-PEP-1 융합단백질을 과대발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 발현벡터를 개발하였다. 이 발현벡터는 인간 AMPK cDNA, PEP 펩타이드 (21 아미노산) 그리고 6개의 히스티딘이 연속적으로 연결되어 있다. 이 발현벡터를 이용하여 PEP-1-AMPK, AMPK-PEP-1 및 PEP-1-AMPK-PEP-1 융합단백질을 대장균에서 과대발현시켜 자연상태로 Ni²⁺-친화 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 정제하였다. PEP-1-AMPK, AMPK-PEP-1 및 PEP-1-AMPK-PEP-1의 과대발현은 상당히 높게 나타났으며, 이런 결과로 정제된 단백질의 양도 높게 나타났다. 웨스턴 블랏 분석으로 배양된 피부 세포에 정제된 AMPK 융합단백질이 농도 및 시간 의존적으로 세포에 운반되는 것을 확인하였다. 세포 내로 투과된 AMPK 융합단백질은 최소 세포 내에서 24시간 지속적으로 유지되었다.

[0019] 또한, 세포 내로 투과된 AMPK 융합단백질은 LPS(Lipopolysaccharide)에 의한 iNOS 및 COX-2(Cyclooxygenase-2) 발현을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0020] 이러한 결과는 AMPK 융합단백질이 세포 내로 투과가 잘 일어나고, 세포 내에서 AMPK 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서, 이러한 AMPK 융합단백질은 피부암 및 아토피 피부염 등 피부 질환 치료 분야에 다양하게 응용될 가능성을 제시해 준다.

[0021] AMPK 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 주사형태 또는 도포제로 제형화할 수 있다. 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. AMPK 융합단백질을 함유한 약제학적 조성물은 암치료제로서 유용하며 특히 피부암 치료제, 아토피성 염증 치료제, 녹내장 여과 수술 후 섬유화 반흔 형성 억제제로서 유용하고, 타입 2 당뇨 또는 비만 치료제로서 유용하다.

[0022] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 비경구 방식 즉, 피하 투여, 근육 투여 또는 국소적용(topical application)할 수 있으며, 용량은 일일 투여량이 0.001 μ g~10mg/kg의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

- [0023] 또한, 본 발명의 융합 단백질을 유효성분으로 하는 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 AMPK 융합 단백질을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.
- [0024] 뿐만 아니라, 본 발명의 융합 단백질은 화장료로서 이용할 수 있는데, pH 조절제, 향료, 유화제, 방부제 등을 필요에 따라 부가하여 통상의 화장료 제조 방법으로 화장수, 젤, 수용성 파우더, 지용성 파우더, 수용성 리퀴드, 크림 또는 에센스 등으로 제형화될 수 있다.
- [0025] 본 발명은 AMPK 단백질을 세포 내 또는 피부 내부로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 AMPK 단백질 분자의 세포 내 전달은 AMPK에 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 세포투과성 수송도메인이 공유결합된 형태의 융합 단백질을 구성하여 수행된다. 세포투과성 수송도메인은 AMPK 단백질의 양말단 즉, N- 말단 및/또는 C- 말단에 결합시켰다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 21개의 아미노산으로 구성되고, 서열번호 3과 같은 아미노산 서열로 이루어진 PEP-1 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 서열번호 3의 PEP-1 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, PEP-1의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 PEP-1 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 도메인을 이용한 융합 단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.
- [0026] 구체적으로, 본 발명은 AMPK 융합 단백질, 이 융합 단백질을 제조하기 위한 재조합 뉴클레오타이드와 벡터, 융합 단백질을 포함하는 치료, 예방 목적의 약학 조성물, 피부 외용제 조성물 등에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0028] "AMPK 융합 단백질"이란 단백질 수송 도메인과 AMPK를 포함하며, 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 AMPK를 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 PEP-1 수송도메인이 결합된 방향에 따라 "PEP-1-AMPK"("PEP-AMPK"과 혼용함), "AMPK-PEP-1" 또는 "PEP-1-AMPK-PEP-1" 융합 단백질을 제조하여 실험하였다.
- [0029] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0030] 또한, "표적 세포"란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 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.
- [0031] 본 명세서의 "단백질 수송 도메인"은 펩타이드, 단백질과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 펩타이드나 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말하며, 예를 들면 PEP-1 펩타이드(서열번호 3), HIV-1 Tat 펩타이드, HSV VP22 펩타이드, Antp 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌, 올리고(라이신+아르기닌) 등을 말한다.
- [0032] 본 명세서의 "목표 단백질"은 PEP-1 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다.
- [0033] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0034] 본 발명은 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이스로 구성된 단백질 수송 도메인이 AMPK 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 도입성(cell-transducing) AMPK 융합 단백질에 관한 것이다. 또

한, 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 융합 단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성 AMPK 융합 단백질이 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송도메인(protein transducing domain; "PTD")이 AMPK 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 한 개 이상 공유결합된 것을 특징으로 한다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성(cell-transducing) AMPK 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성 AMPK 융합 단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0039] 또한, 본 발명은 AMPK cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 세포도입성 융합 단백질을 코딩하는 서열번호 6번을 비롯한 재조합 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명의 범위는 서열번호 6번의 재조합 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 유전암호의 codon degeneracy에 의한 서열을 갖는 핵산분자들도 미친다.

[0040] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 융합 단백질을 발현시키기 위하여 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포 도입성 융합 단백질을 발현시키는 벡터에 관한 것이다.

[0041] 아래에서는 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 한정되는 것은 아니다. 특별히 본 실시예에서는 AMPK 융합단백질 중 "PEP-1-AMPK" 융합단백질을 예로 들어 설명하였으나, "AMPK-PEP-1" 및 "PEP-1-AMPK-PEP-1" 융합단백질 또한 PEP-1-AMPK과 동일하거나 유사한 발현 양상, 세포 침투성, 안정성, 시간 및 농도 의존적 침투성을 나타내었음을 밝힌다.

[0042] 재료와 방법

[0043] 재료

[0044] Ni-nitrilotriacetic acid sepharose superflow는 Qiagen (Germany)에서 구입하였다. IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactoside)는 Duchefa사(Haarlem, Netherlands)에서 구입하였다. 우태혈청(FBS), DMEM 및 페니실린-스트렙토마이신 항생제는 Gibco BRL(Grand Island, USA)에서 구입하였다. COS-2 및 iNOS에 대한 일차 항체는 산타 크루즈 생명공학사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 이외 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

[0045] <실시예 1: PEP-1-AMPK 융합단백질 발현 및 정제>

[0046] PEP-1 융합단백질 플라스미드 구축 방법은 아래와 같다. AMP에 의하여 활성화되는 단백질 키나아제(AMPK) 유전자를 두 개의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 센스 프라이머는 *XhoI* 제한 부위를 갖고 서열이 5'-CTCGAGGCTGAGAAGCAGAAGC-3'이며, 안티센스 프라이머는 *BamHI* 제한 부위를 갖고 서열이 5'-GGATCCTCAACGGGCTAAAG TAGTAA-3'였다. PCR 산물은 정제되어 TA 클로닝 벡터에 클론되었다. *XhoI* 및 *BamHI*으로 절단한 다음 PEP-1-AMPK 유전자는 오픈리딩프레임 내에 6 히스티딘이 있는 pET-15b 발현벡터에 연결되었다. PEP-1-AMPK가 클론된 pET-15b 벡터는 이.콜라이 BL21 (DE3)에서 발현되었다. 숙주인 이.콜라이 BL21 (DE3)는 PEP-1-AMPK를 코딩하는 플라스미드로 형질변환되었고 형질변환체는 앰피실린 함유 LB 플레이트 상에서 선별되었다. 선별된 콜로니는 37℃로 앰피실린 함유 LB 배지에서 250rpm으로 교반하며 배양하였다. 세포는 O.D₆₀₀ =

0.5~0.6이 될 때까지 배양하였고, IPTG를 최종 농도 0.5mM가 되도록 가하여 3~4시간 동안 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 하비스트한 세포는 4℃에서 결합 완충액(8M 우레아, 5mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9) 내에서 초음파 처리하여 용균하였다. 원심분리 후 PEP-1-AMPK를 포함하는 상층액은 즉시 2.0ml Ni²⁺-니트로트리아세트산 세파로즈 컬럼에 로딩하였다. 컬럼은 10배의 결합완충액과 6배의 세척완충액(8M 우레아, 20mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 세척하였고, 융합단백질은 용출완충액(8M 우레아, 0.5M 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 용출시켰다. 정제 분획에 함유된 염은 PD10 컬럼 크로마토그래피(Amersham, Braunschweig, Germany)로 제거하였다. 정제된 PEP-1-AMPK 융합단백질은 Superose 6 FPLC 컬럼에 로딩하여 좀 더 정제하였다. 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준물질로 하여 브래드포드법으로 측정하였다.

[0047] <실시예 2: Raw 264.7 세포로 PEP-1-AMPK 융합단백질 도입>

[0048] 쥐 대식세포 Raw 264.7은 20mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 5mM NaHCO₃, 10% 우태혈청(FBS) 및 항생제(100μg/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린)를 함유한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 37℃로 95% 공기 및 5% CO₂의 습한 조건으로 배양하였다. PEP-1-AMPK 융합단백질을 세포도입하기 위하여 Raw 264.7 세포를 6-웰 플레이트에 키웠다. 그 후 배양배지를 신선한 용액 1 ml로 교체하였다. 세포를 다양한 농도의 PEP-1-AMPK 융합단백질로 한 시간 동안 처리한 다음 세포를 트립신-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA)로 처리하고 인산완충액 생리식염수(PBS)로 세척하였다. 세포를 하비스트하여 추출액을 웨스턴 블랏 분석에 사용하였다.

[0049] 세포도입된 PEP-1-AMPK 융합단백질의 세포 내 안정성은 다음과 같이 알아보았다. Raw 264.7 세포를 3mM PEP-1-AMPK 융합단백질로 한 시간 동안 처리한 다음 도입되지 않은 PEP-1-AMPK 융합단백질을 제거하기 위하여 세포를 세척하고 새로운 배지로 갈아주었다. 48시간 더 배양한 후 세포 추출액을 제조하여 웨스턴 블랏 분석하였다.

[0050] <실시예 3: 웨스턴 블랏 분석>

[0051] Raw 264.7 세포를 4℃ 용균완충액에 30분간 처리하여 세포 용균액을 제조하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 어세이 키트로 측정하였다. 단백질(30μg)을 8% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리한 다음 나이트로셀룰로스 막으로 전이시켰다. 막은 0.05% Tween-20을 함유한 트리스 완충액 생리식염수(TBST; 20mM Tris, 0.2M NaCl, pH 7.5)에 용해시킨 5% 탈지유로 한 시간 동안 처리하여 블로킹시킨 다음 실온에서 항-COX-2 및 항-iNOS 항체로 TBST 내에서 한 시간 동안 처리하였다 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; dilution 1:1000). 세척 후 막은 TBST에 1:10000로 희석된 호스 래디쉬 퍼옥시다제와 결합된 적절한 2차 항체로 한 시간 배양하였다. 막은 화학발광 기질과 함께 배양한 후 Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)에 노출시켰다.

[0052] <실시예 4: COX-2 및 iNOS 단백질 발현 측정>

[0053] Raw 264.7 쥐 대식세포를 24-웰 플레이트에서 70% 정도 되도록 12시간 동안 배양하였다. 세포는 PEP-1-AMPK 융합단백질(0.5-3 μM)로 한 시간 동안 처리한 후 LPS(100ng/ml)로 12시간 처리한 다음 배양배지를 하비스트하였다. COX-2와 iNOS 단백질 발현 수준은 각각 항-COX-2 및 항-iNOS 항체로 웨스턴 블랏팅하여 측정하였다.

[0054] <실시예 5: RT-PCR 분석>

[0055] 트리졸 반응 키트(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)로 제조자의 지시대로 Raw 264.7 세포에서 총 RNA를 분리하였다(40). 분리한 총 RNA(2μg)는 10,000U의 역전사효소 및 0.5μg/μl의 올리고-(dT) 프라이머로 역전사되었다. cDNA 일정 분량(aliquots)의 PCR 증폭을 다음의 프라이머를 이용하여 수행하였다.: COX-2 안티센스 프라이머, 5'-TGGACGAGGTTTT CCACCAG-3'; COX-2 센스 프라이머, 5'-CAAAGGCTCCATTGACCAGA-3'; 베타액틴 안티센스 프라이머, 5'-GGACAGTGAGCCAGGATGG-3'; 베타액틴 센스 프라이머, 5'-AGTGTGACGTTGACATCCGTAA AGA-3'; iNOS 안티센스 프라이머, 5'-CTGTCAGAGCCTCGTGGCTTT-3'; iNOS 센스 프라이머, 5'-ATGGCT CGGGATGTGGCTAC-3'. PCR은 50μl의 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 25mM MgCl₂, 10mM dNTP, 100U의 Taq DNA 중합효소 및 0.1μM의 각 프라이머를

넣어 수행하였고, 70℃로 15분간 가열하여 종료하였다. PCR 산물은 1% 아가로스 젤 상에서 분리되어 에티뮴 브로마이드 처리 후 UV로 관찰하였다.

[0056] 결과 1: PEP-1-AMPK 융합단백질 구축 및 정제

[0057] 세포 침투성 PEP-1AMPK 발현벡터를 제조하기 위하여 인간 AMPK cDNA를 PEP-1 펩타이드를 함유하도록 재구성된 pET-15b 플라스미드에 서브클론하였다. PEP-1-AMPK 발현벡터는 연속하여 인간 AMPK, PEP-1 펩타이드 및 아미노 말단에 6개의 히스티딘 잔기를 갖는 cDNA 서열을 함유하도록 형성하였다(도 1A). PEP-1 세포도입 펩타이드가 없는 대조군 AMPK 단백질을 생산하는 AMPK 발현벡터도 제조하였다.

[0058] 발현을 유도한 후 PEP-1-AMPK 융합단백질이 정제되었다. 융합단백질은 이.콜라이에서 발현되어 세포 추출액을 Ni^{2+} -니트로트리아세트산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼에 로딩하였다. 융합단백질을 함유한 분획을 모아 PD10 컬럼으로 염을 제거하였다. 수퍼포즈(superpose) 6 FPLC 크로마토그래피로 가장 큰 단일 밴드를 얻었다. 이.콜라이에서 얻은 전체 세포 추출물(crude cell extracts)과 정제된 PEP-1-AMPK 융합단백질을 8% SDS-PAGE로 전기영동하였다(도 1B). 발현 및 정제된 단백질은 항레빗 폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏으로 확인하였다. PEP-1-AMPK는 도 1C의 해당 밴드에서 탐지되었다.

[0059] 결과 2: 대식세포 Raw 264.7 내로 PEP-1-AMPK 융합단백질 세포 투과

[0060] PEP-1-AMPK 융합단백질의 세포투과성을 평가하기 위하여 본 발명자들은 Raw 264.7 세포 배양 배지에 다양한 농도(0.5~3mM)로 PEP-1-AMPK 융합단백질을 가한 후 웨스턴 블랏으로 세포 도입된 단백질 수준을 분석하였다. 도 2A와 같이, Raw 264.7 세포 내로 도입된 PEP-1-AMPK 융합단백질은 농도 의존적으로 증가하였다.

[0061] 시간 경과에 따른 PEP-1-AMPK 융합단백질의 세포 도입 정도도 분석하였다. 3mM의 PEP-1-AMPK 융합단백질을 세포에 처리시간을 달리하여(15~120분) 가한 다음 세포도입된 단백질 수준을 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다. 도 2B와 같이, 세포 내로 도입된 PEP-1-AMPK 융합단백질 농도는 점차 증가하였다. 또한, 세포 도입된 PEP-1-AMPK 융합단백질의 세포 내 안정성은 도 2C에 나타내었다. PEP-1-AMPK 융합 단백질을 3mM 농도로 처리 시간을 달리 하여 배양배지에 가하여 그 세포 도입 결과를 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. 세포 도입된 PEP-1-AMPK 융합단백질의 세포내 수준은 한 시간 후에 처음 측정하였고 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다. 그러나, 세포 도입된 AMPK 융합단백질의 상당량은 36시간까지 유지되었다.

[0062] PEP-1-AMPK 융합단백질의 Raw 264.7 세포로의 도입은 직접 형광법으로 확인되었다. 파라포름알데하이드에 의한 세포고정이 PEP-1-AMPK 융합단백질 세포도입에 영향을 미칠 가능성을 배제하기 위하여 FITC로 표지된 PEP-1-AMPK 융합단백질을 비고정된 세포에 도입하였다. 항 레빗 항 히스티딘 폴리클론 항체를 이용한 면역형광염색은 세포 내로 도입된 PEP-1-AMPK 융합단백질을 나타낸 반면, PEP-1-AMPK 융합단백질로 처리하지 않은 세포에서는 형광신호가 나타나지 않았다. 그러나, 고정된 세포의 형광 신호는 비고정된 세포의 형광신호와 유사하였다. 이러한 결과는 세포 고정이 PEP-1-AMPK 융합단백질 세포도입에 꼭 필요한 것이 아님을 말해준다(도 2D).

[0063] 결과 3: LPS에 의하여 유도된 Raw 264.7 세포 내에서 iNOS 및 COX-2 발현 수준에 미치는 PEP-1-AMPK 융합단백질의 영향

[0064] LPS는 내독소의 주요 요소이며 대식세포 증식을 억제하며 대식세포로 하여금 전염증성 인자들을 생산하도록 활성화시킨다. 그리하여, 본 발명자들은 LPS에 노출된 상태에서 iNOS 및 COX-2 발현 수준에 미치는 PEP-1-AMPK 융합단백질의 효과를 시험하였다. Raw 264.7 세포를 PEP-1-AMPK (0.5~3 μM)를 가하거나 가하지 않은 상태로 12시간 동안 LPS(100ng/ml)로 배양하였다. 그 결과 PEP-1-AMPK 융합단백질은 투여량 의존적으로 LPS-유도 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 수준을 억제하였다(도 3). 본 발명자들은 LPS-유도된 세포에서 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현 수준에 미치는 PEP-1-AMPK 융합단백질의 영향을 RT-PCR로 분석하였다. 도 4와 같이, PEP-1-AMPK 융합단백질은 LPS-유도 COX-2 및 iNOS mRNA 발현을 투여량 의존적으로 억제하였다. 이러한 결과들은 PEP-1-AMPK 융합단백질이 COX-2와 iNOS mRNA의 발현을 억제함으로써 COX-2와 NO의 생산을 저해함을 말해준다. COX-2와 iNOS 단백질은 피부염증, 세포증식 및 피부암 촉진과 밀접한 관련이 있고, 이러한 질환들은 전염증성 매개자에 의하여 빠르게 유도될 수 있다는 것이 보고되었다(Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K.

K. and Lee, S. S. (2001) Molecular mechanisms underlying chemoprventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268, Prescott, S. M. and Fitzpatrick, F. A. (2000) Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1470**, M69-M78, Chun, K. S., Cha, H. H., Shin, J. W., Na, H. K., Park, K. K., Chung, W. Y. and Surh, Y. J. (2004) Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF-kappa B. *Carcinogenesis* **25**, 445-454.). 그리하여, COX-2와 iNOS 발현 억제는 염증 치료 및 염증반응과 질환을 예방하는 효과적이고 새로운 치료 전략이 될 수 있다.

[0065] 간단히 말하자면 본 발명자들은 최초로 인간 AMPK를 단백질 수송도메인과 융합한 융합단백질이 Raw 264.7을 비롯한 세포에 효과적으로 투과되며, 나아가 이 융합단백질이 LPS-유도 iNOS 및 COX-2 발현 수준을 현저히 억제함을 밝혔다. 더 자세한 기작은 밝혀지지 않았지만, 본 발명자들이 얻은 결과는 AMPK 융합단백질이 염증을 예방하거나 치료하는 유용한 약제가 될 수 있음을 말해준다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 PEP-1-AMPK 융합단백질 발현과 정제를 나타낸다. (A)는 PEP-1-AMPK 융합단백질 발현벡터의 구조이다. AMPK 코딩 프레임은 6His 및 PEP-1 펩타이드와 함께 흰색 박스로 나타내었다. 발현은 IPTG를 가하여 유도하였다. 세포의 단백질 추출물 및 정제된 융합단백질은 8% SDS-PAGE로 분석하였고(B), 항 래빗 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석하였다(C). B와 C에서 레인 1, 유도되지 않은 PEP-1-AMPK; 레인 2, 유도된 PEP-1-AMPK; 레인 3, 정제된 PEP-1-AMPK.

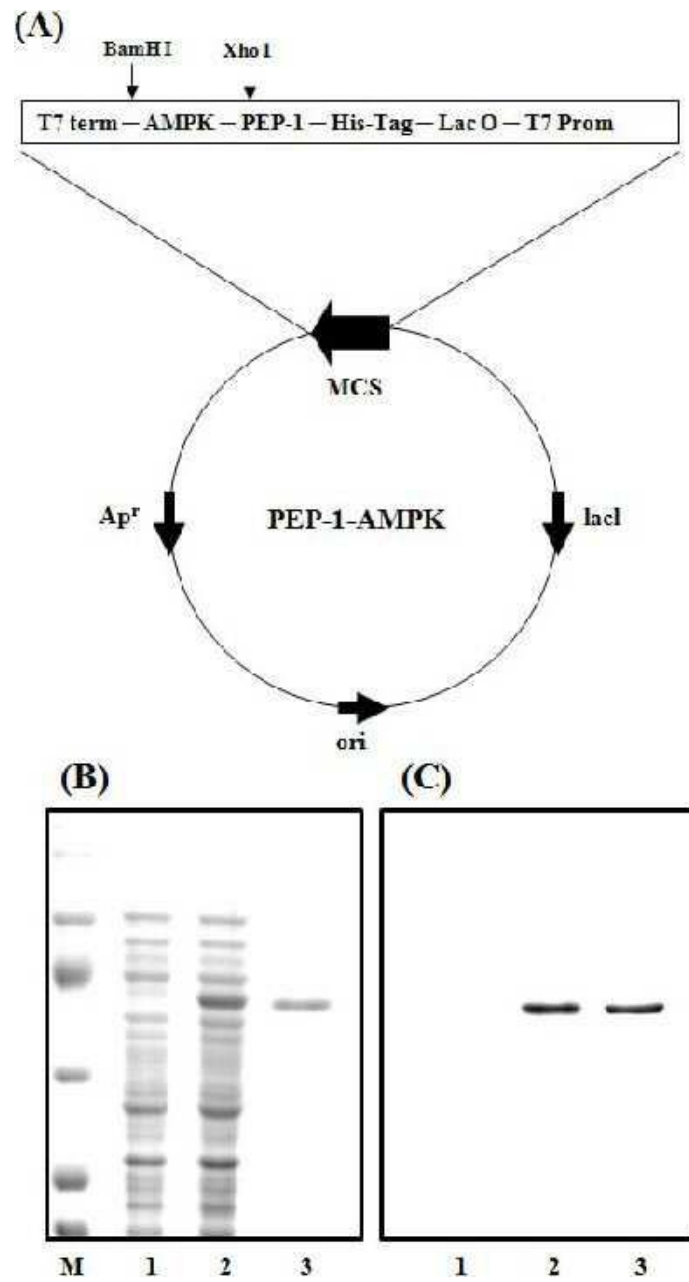
[0067] 도 2는 PEP-1-AMPK 융합단백질의 세포도입을 나타낸다. 0.5~3mM PEP-1-AMPK를 Raw 264.7 세포배양배지에 60분간 가하였고(A), 3mM의 PEP-1-AMPK를 15~120분간 가하였으며(B), 3mM PEP-1-AMPK로 미리 1~48h 처리한 후 웨스턴 블랏 분석하였다(C). FITC-표지된 PEP-1-AMPK(3mM)를 Raw 264.7 세포 내로 도입한 후 세포를 트립신-EDTA 및 PBS로 두 번 세척한 후 즉시 형광현미경으로 관찰하였다. PEP-1-AMPK가 없는 대조군 세포(D-a), PEP-1-AMPK 처리한 비고정 세포(D-b) 및 PEP-1-AMPK 처리한 고정 세포(D-c).

[0068] 도 3은 LPS에 의하여 유도된 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 대한 Raw 264.7 세포에 도입된 PEP-1-AMPK 융합단백질의 억제 효과를 나타낸다. 세포는 먼저 PEP-1-AMPK 융합단백질을 가하여 한 시간 동안 전처리한 다음 LPS (100ng/ml)를 가하여 12시간 동안 배양하였다. 세포 용균액을 제조하여 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다.

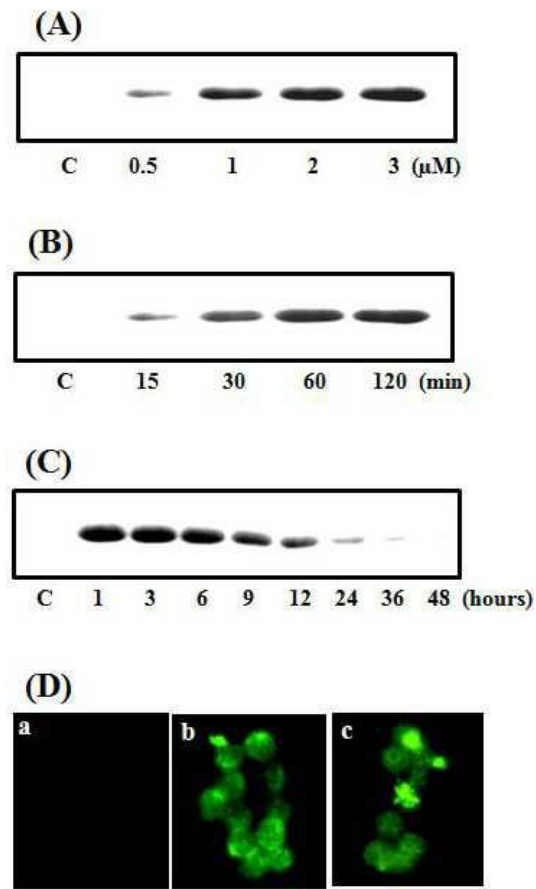
[0069] 도 4는 Raw 264.7 세포에서 LPS-유도된 iNOS 및 COX-2 mRNA에 대한 PEP-1-AMPK 융합 단백질의 저해효과를 분석한 결과이다. 세포는 PEP-1-AMPK 융합단백질로 한 시간 동안 미리 처리한 후 LPS(100ng/ml)로 12시간 처리하였다. 총 RNA를 추출한 후 iNOS 및 COX-2 mRNA를 특정 프라이머를 이용한 RT-PCR 방법으로 분석하였다.

도면

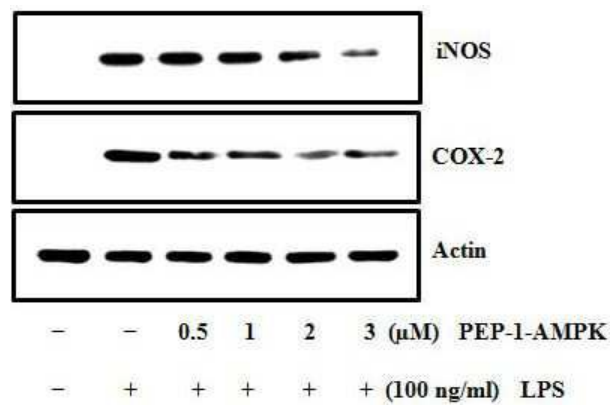
도면1



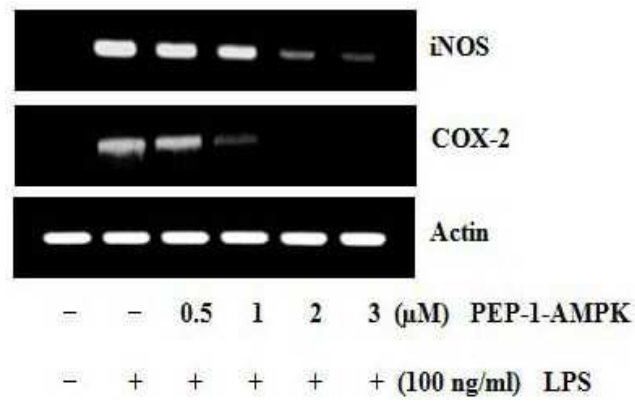
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Hallym University
 <120> Cell-transducing AMP-activated protein kinase and usage of the same

<130> sychoi-AMPK

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> top strand oligonucleotide coding PEP-1

<400> 1

tatgaaagaa accgtgtggg aaacctgtgtg gaccgaatgg tctcagccga aaaaaaacg 60

taaagtgc

68

<210> 2

<211> 70

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> bottom strand oligonucleotide coding PEP-1

<400> 2
tcgagcactt tacgtttttt tttcggctga caccattcgg tccaccaggt ttcccaccag 60

gtttctttcc 70

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> protein transducing domain called PEP-1

<400> 3
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
20

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of AMP-activated protein kinase

<400> 4
ctcgaggctg agaagcagaa gc 22

<210> 5
<211> 26
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer of AMP-activated protein kinase

<400> 5

ggatcctcaa cgggctaaag tagtaa

26

<210> 6

<211> 1728

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant polynucleotide coding PEP-1-AMPK fusion protein

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1725)

<400> 6

atg aaa gaa acc tgg tgg gaa acc tgg tgg acc gaa tct cag ccg aaa
Met Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

48

aaa aaa cgt aaa gtg ctc gag atg gct gag aag cag aag cac gac ggg
Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ala Glu Lys Gln Lys His Asp Gly
20 25 30

96

cgg gtg aag atc gga cac tac gtg ctg ggc gac acg ctg ggc gtc ggc
Arg Val Lys Ile Gly His Tyr Val Leu Gly Asp Thr Leu Gly Val Gly
35 40 45

144

acc ttc ggc aaa gtg aag att gga gaa cat caa tta aca ggc cat aaa
Thr Phe Gly Lys Val Lys Ile Gly Glu His Gln Leu Thr Gly His Lys
50 55 60

192

gtg gca gtt aaa atc tta aat aga cag aag att cgc agt tta gat gtt
Val Ala Val Lys Ile Leu Asn Arg Gln Lys Ile Arg Ser Leu Asp Val
65 70 75 80

240

gtt gga aaa ata aaa cga gaa att caa aat cta aaa ctc ttt cgt cat

288

Val Gly Lys Ile Lys Arg Glu Ile Gln Asn Leu Lys Leu Phe Arg His	
85 90 95	
cct cat att atc aaa cta tac cag gtg atc agc act cca aca gat ttt	336
Pro His Ile Ile Lys Leu Tyr Gln Val Ile Ser Thr Pro Thr Asp Phe	
100 105 110	
ttt atg gta atg gaa tat gtg tct gga ggt gaa tta ttt gac tac atc	384
Phe Met Val Met Glu Tyr Val Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Tyr Ile	
115 120 125	
tgt aag cat gga cgg gtt gaa gag atg gaa gcc agg cgg ctc ttt cag	432
Cys Lys His Gly Arg Val Glu Glu Met Glu Ala Arg Arg Leu Phe Gln	
130 135 140	
cag att ctg tct gct gtg gat tac tgt cat agg cat atg gtt gtt cat	480
Gln Ile Leu Ser Ala Val Asp Tyr Cys His Arg His Met Val Val His	
145 150 155 160	
cga gac ctg aaa cca gag aat gtc ctg ttg gat gca cac atg aat gcc	528
Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Val Leu Leu Asp Ala His Met Asn Ala	
165 170 175	
aag ata gcc gat ttc gga tta tct aat atg atg tca gat ggt gaa ttt	576
Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe	
180 185 190	
ctg aga act agt tgc gga tct cca aat tat gca gca cct gaa gtc atc	624
Leu Arg Thr Ser Cys Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Val Ile	
195 200 205	
tca ggc aga ttg tat gca ggt cct gaa gtt gat atc tgg agc tgt ggt	672
Ser Gly Arg Leu Tyr Ala Gly Pro Glu Val Asp Ile Trp Ser Cys Gly	
210 215 220	
gtt atc ttg tat gct ctt ctt tgt ggc acc ctc cca ttt gat gat gag	720
Val Ile Leu Tyr Ala Leu Leu Cys Gly Thr Leu Pro Phe Asp Asp Glu	
225 230 235 240	
cat gta cct acg tta ttt aag aag atc cga ggg ggt gtc ttt tat atc	768
His Val Pro Thr Leu Phe Lys Lys Ile Arg Gly Gly Val Phe Tyr Ile	
245 250 255	
cca gaa tat ctc aat cgt tct gtc gcc act ctc ctg atg cat atg ctg	816
Pro Glu Tyr Leu Asn Arg Ser Val Ala Thr Leu Leu Met His Met Leu	

260	265	270	
cag gtt gac cca ctg aaa cga gca act atc aaa gac ata aga gag cat			864
Gln Val Asp Pro Leu Lys Arg Ala Thr Ile Lys Asp Ile Arg Glu His			
275	280	285	
gaa tgg ttt aaa caa gat ttg ccc agt tac tta ttt cct gaa gac cct			912
Glu Trp Phe Lys Gln Asp Leu Pro Ser Tyr Leu Phe Pro Glu Asp Pro			
290	295	300	
tcc tat gat gct aac gtc att gat gat gag gct gtg aaa gaa gtg tgt			960
Ser Tyr Asp Ala Asn Val Ile Asp Asp Glu Ala Val Lys Glu Val Cys			
305	310	315	320
gaa aaa ttt gaa tgt aca gaa tca gaa gta atg aac agt tta tat agt			1008
Glu Lys Phe Glu Cys Thr Glu Ser Glu Val Met Asn Ser Leu Tyr Ser			
325	330	335	
ggt gac cct caa gac cag ctt gca gtg gct tat cat ctt atc att gac			1056
Gly Asp Pro Gln Asp Gln Leu Ala Val Ala Tyr His Leu Ile Ile Asp			
340	345	350	
aat cgg aga ata atg aac caa gcc agt gag ttc tac ctc gcc tct agt			1104
Asn Arg Arg Ile Met Asn Gln Ala Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Ser Ser			
355	360	365	
cct cca tct ggt tct ttt atg gat gat agt gcc atg cat att ccc cca			1152
Pro Pro Ser Gly Ser Phe Met Asp Asp Ser Ala Met His Ile Pro Pro			
370	375	380	
ggc ctg aaa cct cat cca gaa agg atg cca cct ctt ata gca gac agc			1200
Gly Leu Lys Pro His Pro Glu Arg Met Pro Pro Leu Ile Ala Asp Ser			
385	390	395	400
ccc aaa gca aga tgt cca ttg gat gca ctg aat acg act aag ccc aaa			1248
Pro Lys Ala Arg Cys Pro Leu Asp Ala Leu Asn Thr Thr Lys Pro Lys			
405	410	415	
tct tta gct gtg aaa aaa gcc aag tgg cat ctt gga atc cga agt cag			1296
Ser Leu Ala Val Lys Lys Ala Lys Trp His Leu Gly Ile Arg Ser Gln			
420	425	430	
agc aaa ccg tat gac att atg gct gaa gtt tac cga gct atg aag cag			1344
Ser Lys Pro Tyr Asp Ile Met Ala Glu Val Tyr Arg Ala Met Lys Gln			

435	440	445	
ctg gat ttt gaa tgg aag gta gtg aat gca tac cat ctt cgt gta aga			1392
Leu Asp Phe Glu Trp Lys Val Val Asn Ala Tyr His Leu Arg Val Arg			
450	455	460	
aga aaa aat cca gtg act ggc aat tac gtg aaa atg agc tta caa ctt			1440
Arg Lys Asn Pro Val Thr Gly Asn Tyr Val Lys Met Ser Leu Gln Leu			
465	470	475	480
tac ctg gtt gat aac agg agc tat ctt ttg gac ttt aaa agc att gat			1488
Tyr Leu Val Asp Asn Arg Ser Tyr Leu Leu Asp Phe Lys Ser Ile Asp			
485	490	495	
gat gaa gta gtg gag cag aga tct ggt tcc tca aca cct cag cgt tcc			1536
Asp Glu Val Val Glu Gln Arg Ser Gly Ser Ser Thr Pro Gln Arg Ser			
500	505	510	
tgt tct gct gct ggc tta cac aga cca aga tca agt ttt gat tcc aca			1584
Cys Ser Ala Ala Gly Leu His Arg Pro Arg Ser Ser Phe Asp Ser Thr			
515	520	525	
act gca gag agc cat tca ctt tct ggc tct ctc act ggc tct ttg acc			1632
Thr Ala Glu Ser His Ser Leu Ser Gly Ser Leu Thr Gly Ser Leu Thr			
530	535	540	
gga agc aca ttg tct tca gtt tca cct cgc ctg ggc agt cac acc atg			1680
Gly Ser Thr Leu Ser Ser Val Ser Pro Arg Leu Gly Ser His Thr Met			
545	550	555	560
gat ttt ttt gaa atg tgt gcc agt ctg att act act tta gcc cgt tga			1728
Asp Phe Phe Glu Met Cys Ala Ser Leu Ile Thr Thr Leu Ala Arg			
565	570	575	
 <210> 7			
<211> 575			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
 <400> 7			
Met Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Ser Gln Pro Lys			
1	5	10	15
 Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ala Glu Lys Gln Lys His Asp Gly			

20	25	30
Arg Val Lys Ile Gly His Tyr Val Leu Gly Asp Thr Leu Gly Val Gly		
35	40	45
Thr Phe Gly Lys Val Lys Ile Gly Glu His Gln Leu Thr Gly His Lys		
50	55	60
Val Ala Val Lys Ile Leu Asn Arg Gln Lys Ile Arg Ser Leu Asp Val		
65	70	75 80
Val Gly Lys Ile Lys Arg Glu Ile Gln Asn Leu Lys Leu Phe Arg His		
85	90	95
Pro His Ile Ile Lys Leu Tyr Gln Val Ile Ser Thr Pro Thr Asp Phe		
100	105	110
Phe Met Val Met Glu Tyr Val Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Tyr Ile		
115	120	125
Cys Lys His Gly Arg Val Glu Glu Met Glu Ala Arg Arg Leu Phe Gln		
130	135	140
Gln Ile Leu Ser Ala Val Asp Tyr Cys His Arg His Met Val Val His		
145	150	155 160
Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Val Leu Leu Asp Ala His Met Asn Ala		
165	170	175
Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe		
180	185	190
Leu Arg Thr Ser Cys Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Val Ile		
195	200	205
Ser Gly Arg Leu Tyr Ala Gly Pro Glu Val Asp Ile Trp Ser Cys Gly		
210	215	220
Val Ile Leu Tyr Ala Leu Leu Cys Gly Thr Leu Pro Phe Asp Asp Glu		
225	230	235 240
His Val Pro Thr Leu Phe Lys Lys Ile Arg Gly Gly Val Phe Tyr Ile		
245	250	255

Pro Glu Tyr Leu Asn Arg Ser Val Ala Thr Leu Leu Met His Met Leu
260 265 270

Gln Val Asp Pro Leu Lys Arg Ala Thr Ile Lys Asp Ile Arg Glu His
275 280 285

Glu Trp Phe Lys Gln Asp Leu Pro Ser Tyr Leu Phe Pro Glu Asp Pro
290 295 300

Ser Tyr Asp Ala Asn Val Ile Asp Asp Glu Ala Val Lys Glu Val Cys
305 310 315 320

Glu Lys Phe Glu Cys Thr Glu Ser Glu Val Met Asn Ser Leu Tyr Ser
325 330 335

Gly Asp Pro Gln Asp Gln Leu Ala Val Ala Tyr His Leu Ile Ile Asp
340 345 350

Asn Arg Arg Ile Met Asn Gln Ala Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Ser Ser
355 360 365

Pro Pro Ser Gly Ser Phe Met Asp Asp Ser Ala Met His Ile Pro Pro
370 375 380

Gly Leu Lys Pro His Pro Glu Arg Met Pro Pro Leu Ile Ala Asp Ser
385 390 395 400

Pro Lys Ala Arg Cys Pro Leu Asp Ala Leu Asn Thr Thr Lys Pro Lys
405 410 415

Ser Leu Ala Val Lys Lys Ala Lys Trp His Leu Gly Ile Arg Ser Gln
420 425 430

Ser Lys Pro Tyr Asp Ile Met Ala Glu Val Tyr Arg Ala Met Lys Gln
435 440 445

Leu Asp Phe Glu Trp Lys Val Val Asn Ala Tyr His Leu Arg Val Arg
450 455 460

Arg Lys Asn Pro Val Thr Gly Asn Tyr Val Lys Met Ser Leu Gln Leu
465 470 475 480

Tyr Leu Val Asp Asn Arg Ser Tyr Leu Leu Asp Phe Lys Ser Ile Asp
485 490 495

Asp Glu Val Val Glu Gln Arg Ser Gly Ser Ser Thr Pro Gln Arg Ser
500 505 510

Cys Ser Ala Ala Gly Leu His Arg Pro Arg Ser Ser Phe Asp Ser Thr
515 520 525

Thr Ala Glu Ser His Ser Leu Ser Gly Ser Leu Thr Gly Ser Leu Thr
530 535 540

Gly Ser Thr Leu Ser Ser Val Ser Pro Arg Leu Gly Ser His Thr Met
545 550 555 560

Asp Phe Phe Glu Met Cys Ala Ser Leu Ile Thr Thr Leu Ala Arg
565 570 575