



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0119561

(43) 공개일자

2012년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/42 (2006.01)

A61K 9/38 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2011-0037572

(22) 출원일자

2011년04월22일

심사청구일자

2011년04월22일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

최수영

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

김대원

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

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

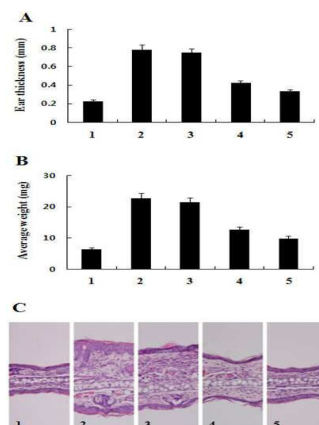
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 단백질 수송 도메인과 치료용 단백질이 공유결합한 융합 단백질에 레보설피라이드를 가하여 융합 단백질의 생체 세포 또는 조직 내 도입을 증가시키는 방법

(57) 요약

세포 침투 효율이 낮은 많은 단백질들은 단백질 수송 도메인에 의해 세포 내로 운반될 수 있음이 알려져 있다. 본 발명자들은 HaCaT 인간 각질세포 및 마우스 피부로 PEP-1-rpS3 융합단백질의 세포침투에 대한 레보설피라이드(Levosulpiride)의 영향 및 TPA에 의해 유도된 염증에 대한 PEP-1-rpS3의 치료 특성을 증진시키는 레보설피라이드의 영향을 시험하였다. 레보설피라이드는 직접적으로는 세포 생존율을 증대시키지 않으나, PEP-1-rpS3를 HaCaT 세포 내로 농도 및 시간 의존적으로 도입시켰다. 마우스 부종 모델에서 PEP-1-rpS3는 TPA에 의해 유도되는 사이클로옥시제네이스-2(cyclooxygenase-2), 유도성 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase), 인터류킨-6, 인터류킨-1 β 및 종양괴사인자 α 와 같은 염증 매개자 및 사이토카인의 발현 증가를 억제하였다. 반면, 레보설피라이드 단독으로는 항염증 효과에 효과를 나타내지 못하였다. 그러나, PEP-1-rpS3와 레보설피라이드를 함께 처리하면 항염증 효과가 PEP-1-rpS3를 단독 사용할 때보다 현저히 증가하였다. 이러한 결과는 레보설피라이드가 단백질 수송 도메인과 융합한 치료용 융합 단백질을 목표 세포나 목표 조직에 더 잘 침투하도록 작용하며, 다양한 질병에 대한 단백질 약제의 치료 효과를 높여주는 것으로 판단된다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

박진서

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

음원식

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

황현숙

경기도 파주시 교하읍 현대2차아이파크 210동 1404호

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가6길 6, 그린빌 301호 (다가동)

강태천

강원도 춘천시 새청말길 26, 111동 502호 (우두동, 강변코아루 아파트)

김준

서울특별시 강남구 선릉로 222, 아이파크아파트 106동 901호 (대치동)

임순성

강원도 춘천시 춘주로 174, 102동 401호 (퇴계동, 그린타운아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-0093812
부처명	교육과학기술부
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환치료제 개발: 질환치료용 생리활성 고
분자 신소재물질 탐색 및 개발	
주관기관	한림대학교

연구기간	2010.09.01 ~ 2011.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	없음
부처명	교육과학기술부
연구사업명	지역거점 연구단 육성사업
연구과제명	생체고분자 전달기술을 이용한 질환 치료용 신소재 개발
주관기관	한림대학교
연구기간	2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

생체 세포 또는 조직에 레보설피라이드와 단백질 수송 도메인과 염증 치료용 단백질이 공유결합한 융합 단백질을 가하여 융합 단백질의 생체 세포 또는 조직 내 도입을 증가시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 레보설피라이드는 융합 단백질보다 먼저 생체 세포 또는 조직에 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 Tat, PEP-1, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신, 아르기닌)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 치료용 단백질은 rpS3임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

단백질 수송 도메인과 공유결합한 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보설피라이드를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 염증 치료용 단백질은 rpS3임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 Tat, PEP-1, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신, 아르기닌)임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 염증성 질환은 동맥경화증, 알러지 질환, 아토피, 비염, 천식, 급성통증, 만성통증, 치주염, 치은염, 염증

성 장질환, 통풍, 심근경색, 울혈성 심부전, 고혈압, 협심증, 위궤양, 뇌경색, 다운증후군, 다발성 경화증, 비만, 당뇨, 치매, 우울증, 정신분열증, 결핵, 수면장애, 패혈증, 화상, 피부염 또는 체장염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

단백질 수송 도메인과 공유결합한 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보셀피라이드를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 피부외용제 조성물.

청구항 10

단백질 수송 도메인과 공유결합한 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보셀피라이드를 포함하는 화장료 조성물.

청구항 11

단백질 수송 도메인과 공유결합한 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보셀피라이드를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강 기능성 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 단백질 수송 도메인과 치료용 단백질이 공유결합한 융합 단백질에 레보셀피라이드를 가하여 융합 단백질의 생체 세포 또는 조직 내 도입을 증가시키는 방법 및 단백질 수송 도메인과 공유결합한 활성산소종 제거 활성을 가진 효소의 융합 단백질 및 레보셀피라이드를 포함하는 염증성 질환 예방 및 치료제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증은 손상, 감염, 또는 면역계에 의해 외래 물질이라고 인식된 분자에 대한 체내 반응을 말하는 것이다. 염증은 조직의 통증, 충창 또는 기능 변화를 특징으로 한다. 염증성 질환은 조직 또는 기관에서 면역계가 이상 수준으로 활성화되는 것을 특징으로 하며, 이는 조직 또는 기관에서 기능 이상이나 질환을 유발할 수 있다.

[0003] 염증성 질환은 전세계에 걸쳐 사망의 주요 원인 중 하나이다. 염증성 질환은 여러 기관 및 조직, 예컨대 혈관, 심장, 뇌, 신경, 관절, 피부, 폐, 눈, 위장관, 신장, 갑상선, 부신, 체장, 간 및 근육에 침범한다. 염증성 질환의 치료는 제약 회사와 연구자들의 관심의 대상이다. 최근 가장 일반적인 염증성 질환의 치료에 대한 접근 방법은 염증성 질환을 일으키는 분자 또는 그 수용체에 결합하는 화합물과 사이토카인의 전-염증성 기능에 관한 것이다. 이 분야에서 최근의 많은 연구에도 불구하고 현재의 염증성 질환에 대한 요법은 비특이적 약물로 증상을 완화시키는 것과 염증을 감소시키는 것, 질병으로 진행되는 것을 늦추는 것 등이지만, 이러한 요법에는 약물 부작용 및 내성이라는 심각한 문제가 있다.

[0004] 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis), 죽상동맥경화증 (atherosclerosis) 및 건선 (psoriasis)과 같은 염증성 질환은 수많은 인자에 의해 순차적으로 유발된다(triggered) (Bertolini, A., Ottani, A. and Sandrini, M. (2002) *Curr. Med. Chem.* **9**, 1033-1043, Isomaki, P. and Punnonen, J. (1997) *Ann. Med.* **29**, 499-507, Libby, P., Ridker, P. M. and Maseri, A. (2000) *Circulation* **105**, 1135-1143, Nograles, K. E., Davidovici, B. and Krueger, J. G. (2010) *Semin. Cutan. Med. Surg.* **29**, 3-9). 염증성 질환 유발은 인터류킨-1 β (IL-1 β), 인터류킨-6 (IL-6) 및 종양괴사인자- α (TNF- α) 그리고, 사이클로옥시제네이스-2 (COX-2)와 유도성 산화질소 합성효소 (iNOS)와 같은 염증 매개자의 발현 증가로 특징지어진다 (Afaq, F., Saleem, M.,

Krueger, C. G., Reed, J. D. and Mukhtar, H. (2005) *Int. J. Cancer*. **113**, 423-433, Carey, M. A., Germolec, D. R., Langenbach, R. and Zeldin, D. C. (2003) *Essent. Fatty Acids* **69**, 157-162, Lowenstein, C. J. et al., (1996) *J. Clin. Invest.* **97**, 1837-1843, Qin, J. Z. et al., (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 37975-37964).

- [0005] 리보솜 단백질 S3 (rpS3)는 40S 리보솜 서브유닛의 구성요소이다. 번역 공정에서의 역할 외에도 rpS3는 DNA 재생 및 산화 스트레스 신호전달 과정과 같은 리보솜과 관련되지 않은 기능에 관여하고 있다 (Tolan, D. R., Hershey, J. W. and Traut, R. T. (1983) *Biochimie* **65**, 427-436, Wool, I. G. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 164-165). 또한, rpS3는 염증, 세포 증식, 세포 사멸 및 발달에서 주요 유전자를 조절하는 핵내 NF- κ B 복합체의 서브유닛이다 (Wan, F. and Lenardo, M. J. (2010) *Cell Res.* **20**, 24-33).
- [0006] Tat이나 PEP-1과 같은 단백질 수송 도메인은 치료용 단백질을 포함하여 다양한 친수성 고분자를 세포나 조직 내로 수송할 수 있다 (Dietz, G. P. (2010) *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**, 167-174, Wadia, J. and Dowdy, S. F. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 52-56). 본 발명자들은 Tat-수퍼옥사이드 디스무테아제(SOD)가 포유류 세포 내로 효율적으로 침투하며 스트렙토조토신으로 유도된 마우스 당뇨 모델의 당뇨 증세를 개선하였음을 보고한 바 있고 (Eum, W. S. et al., (2004) *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 339-349), PEP-1-rpS3를 세포에 도입시켜 동물 허혈 모델에서 신경세포 사멸을 방지하고 UV 조사로 유도되는 DNA 손상을 방어하였음을 보고하였다 (Hwang, I. K. et al., (2008) *J. Neurosci. Res.* **86**, 1823-1835).
- [0007] 특허 제472938호는 세포 침투 효율을 향상시킨 수송 도메인-목표 단백질-수송 도메인 융합 단백질 및 그 용도에 관한 것으로서, HIV-1 Tat 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌과 같은 단백질 수송 도메인이 목표 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 공유결합되어 세포 침투성을 향상시킨 융합 단백질에 대해 개시하고 있다.
- [0008] 또한, 특허 제490362호는 단백질 수송 도메인으로서 올리고라이신이 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 공유결합되어 세포 침투성을 향상시킨 기술에 대해 개시하고 있다.
- [0009] 상기 특허들을 비롯하여 많은 연구자들의 논문을 통해 HIV-a Tat 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌, 올리고(라이신, 아르기닌) 및 PEP-1 펩타이드 등이 단백질의 세포 침투성을 향상시킨다는 사실이 밝혀졌다.
- [0010] 레보설피라이드 {Levosulpiride, (S)-(-)-5-Aminosulfonyl-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl) methyl]-2-methoxybenzamide}는 구토억제 (anti-emetic), 소화불량 개선 (anti-dyspeptic), 항정신성 제제 및 항우울증제로서 알려져 있는 설피라이드의 좌선성 거울상 이성질체 (levorotatory enantiomer)이다 (Mucci, A., Nolf, G. and Maj, M. (1995) *Pharmacol. Res.* **31**, 96-101). 레보설피라이드는 중추 신경계 및 위장기관에서 D2 수용체를 특이적으로 저해한다 (Rossi, F. and Forgione, A. (1995) *Pharmacol. Res.* **31**, 81-94). 또한, 도파민 수용체는 상피 장벽 항상성 (epidermal barrier homeostasis)에 관여한다 (Fuziwara, S., Suzuki, A., Inoue, K. and Denda, M. (2005) *J. Invest. Dermatol.* **125**, 783-789).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 염증 치료용으로 사용될 수 있는 단백질에 단백질 수송 도메인을 결합한 융합 단백질을 생체 세포 또는 조직 내로 좀더 원활하게 침투시킬 수 있는 방법을 제공하려는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 종래 염증 치료에 이용 가능한 것으로 알려진 치료용 단백질의 융합 단백질에 레보설피라이드를 가함으로써 좀더 효과적인 항염증 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 세포 침투 효율이 낮은 많은 단백질들은 단백질 수송 도메인에 의해 세포 내로 운반될 수 있음이 알려져 있다.

본 발명자들은 HaCaT 인간 각질세포 및 마우스 피부로 PEP-1-rpS3 융합단백질의 세포침투에 대한 레보설피라이드 (Levosulpiride)의 영향 및 TPA에 의해 유도된 염증에 대한 PEP-1-rpS3의 치료 특성을 증진시키는 레보설피라이드의 영향을 시험하였다. 레보설피라이드는 직접적으로는 세포 생존율을 증대시키지 않으나, PEP-1-rpS3를 HaCaT 세포 내로 농도 및 시간 의존적으로 도입시켰다. 마우스 부종 모델에서 PEP-1-rpS3는 TPA에 의해 유도되는 사이클로옥시제네이스-2(cyclooxygenase-2), 유도성 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase), 인터류킨-6, 인터류킨-1 β 및 종양괴사인자 α 와 같은 염증 매개자 및 사이토카인의 발현 증가를 억제하였다. 반면, 레보설피라이드 단독으로는 항염증 효과에 효과를 나타내지 못하였다. 그러나, PEP-1-rpS3와 레보설피라이드를 함께 처리하면 항염증 효과가 PEP-1-rpS3를 단독 사용할 때보다 현저히 증가하였다. 이러한 결과는 레보설피라이드가 단백질 수송 도메인과 융합한 치료용 융합 단백질을 목표 세포나 목표 조직에 더 잘 침투하도록 작용하며, 다양한 질병에 대한 단백질 약제의 치료 효과를 높여주는 것으로 판단된다.

- [0014] 본 발명은 생체 세포 또는 조직에 레보설피라이드와 단백질 수송 도메인과 염증 치료용 단백질이 공유결합한 융합 단백질을 가하여 융합 단백질의 생체 세포 또는 조직 내 도입을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 염증 치료용 단백질은 생체의 염증성 질환이나 염증으로 인한 이상 상태를 개선하거나 치료하는 기능을 하는 단백질을 포괄적으로 칭하는 것으로서, 그 범위에 특별한 제한은 없으며, 다양한 효소 등을 포함하는 개념이다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 레보설피라이드를 융합 단백질보다 먼저 생체 세포 또는 조직에 처리하는 것을 특징으로 하는 방법에 관한 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 Tat, PEP-1, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신, 아르기닌)임을 특징으로 한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 치료용 단백질이 rpS3임을 특징으로 한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 단백질 수송 도메인과 공유결합한 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보설피라이드를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 염증 치료용 단백질이 rpS3임을 특징으로 하는 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 Tat, PEP-1, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신, 아르기닌)임을 특징으로 하는 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 염증성 질환이 동맥경화증, 류마티스 관절염, 죽상동맥경화증, 건선, 알러지 질환, 아토피, 비염, 천식, 급성통증, 만성통증, 치주염, 치은염, 염증성 장질환, 통풍, 심근경색, 울혈성 심부전, 고혈압, 협심증, 위궤양, 뇌경색, 다운증후군, 다발성 경화증, 비만, 당뇨, 치매, 우울증, 정신분열증, 결핵, 수면장애, 패혈증, 화상, 피부염 또는 궤창염인 것을 특징으로 하는 조성물에 관한 것이다. 이와 같은 염증성 질환은 공통적으로 IL-1 β , IL-6 등 염증 매개자의 발현 증가에 의하여 발생한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 단백질 수송 도메인과 공유결합한 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보설피라이드를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 피부외용제 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 단백질 수송 도메인과 공유결합한 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보설피라이드를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0024]
- [0025] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0026] "융합 단백질"이란 단백질 수송 도메인과 화물 분자를 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 rpS3를 비롯한 염증 치료용 단백질을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서는 구체적인 일 실시예로서 주로 언급된 "PEP-1-rpS3"는 융합 단백질 중 rpS3의 N-말단에 PEP-1 단백질 수송 도메인이 결합된 것을 말한다.
- [0027] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0028] 또한, "표적 세포"란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 전달되는 세포를 의미하는 것으로서 즉, 표적 세포는 체내 세포, 다시 말하여 살아있는 동물 또는 인간의 장기 또는 조직을 구성하는 세포 또는 살아있는 동물 또는 인

간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물 세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.

- [0029] 본 명세서의 "단백질 수송 도메인"은 화물 분자(목표 단백질) 펩타이드 또는 단백질과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 펩타이드나 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말하며, 예를 들면 PEP-1 펩타이드를 말한다.
- [0030] 본 명세서의 "목표 단백질"은 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자", "염증 치료용 단백질"과 동일한 의미이다.
- [0031] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0032] 본 발명에서 단백질 수송 도메인으로는 15?30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서로 구성된 단백질 수송 도메인, 6 내지 12개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인, 6 내지 12개의 라이신으로 구성되는 올리고라이신 수송 도메인, 6 내지 12개의 아르기닌으로 구성되는 올리고아르기닌 수송 도메인 또는 6 내지 12개의 라이신 또는 아르기닌으로 구성되는 올리고(라이신, 아르기닌) 수송 도메인을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 일 실시예에서 목표 단백질(화물 분자)은 치료용 단백질이고, 좀더 구체적으로는 활성산소종을 제거하는 효소를 말한다. 좀더 구체적으로는 카탈레이즈, 수퍼옥사이드 디스무테이즈, 글루타치온 퍼옥시데이즈 중 선택된 1종을 말한다. 상기 단백질 수송 도메인 및 목표 단백질은 silent change에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다. 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합 단백질과 아미노산 서열간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내에서 동일?유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.
- [0033] 또한, 본 발명의 융합 단백질은 상기 단백질 수송도메인(protein transducing domain; "PTD")이 염증 치료용 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 공유결합된 것을 특징으로 한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성(cell-transducing) 염증 치료용 융합 단백질 및 레보설퍼라이드를 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 염증성 질환 치료용 단백질과 단백질 수송 도메인이 공유결합한 융합 단백질 및 레보설퍼라이드를 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 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 보존제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.
- [0036] 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.
- [0037] 본 발명은 또한, 상기 염증성 질환 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보설퍼라이드를 유효성분으로 하는 다양

한 염증성 질환 예방과 개선에 유용한 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명의 상기 세포 도입성(cell-transducing) 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보설피라이드를 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료 형태로 사용할 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 세포 도입성 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보설피라이드의 양은, 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.2 내지 10중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100mℓ를 기준으로 0.1 내지 30g, 바람직하게는 0.2 내지 5g의 비율로 가할 수 있다. 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 세포 도입성 염증 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보설피라이드를 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mℓ 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다. 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함

[0039] 유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 중요하지는 않으나 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0040] 본 발명은 또한, 상기 염증성 질환 치료용 단백질의 융합 단백질 및 레보설피라이드를 유효성분으로 하는 화장품 조성물 또는 피부 외용제 조성물을 제공한다. 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 염증성 질환 치료용 단백질의 융합 단백질과 레보설피라이드를 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에서 레보설피라이드는 직접적으로는 세포 생존율을 증대시키지 않으나, PEP-1-rpS3를 HaCaT 세포 내로 농도 및 시간 의존적으로 도입시켰다.

[0042] 또한, 본 발명의 마우스 부종 모델에서 융합 단백질과 레보설피라이드를 함께 처리하면 TPA에 의해 유도되는 사이클로옥시제네이스-2(cyclooxygenase-2), 유도성 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase), 인터류킨-6, 인터류킨-1 β 및 종양괴사인자 α 와 같은 염증 매개자 및 사이토카인의 발현 증가를 융합 단백질 단독 처리의 경우보다 더욱 현저히 억제하였다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 인간 HaCaT 각질세포 생존율에 미치는 레보설피라이드의 효과를 나타낸다.

(A) 레보설피라이드 {levosulpiride; (S)-(-)-5-Aminosulfonyl-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl) methyl]-2-methoxybenzamide}의 화학 구조,

(B) 인간 HaCaT 각질세포 생존율에 미치는 레보설피라이드의 효과. 세포를 먼저 레보설피라이드 (250 ng/ml)로 처리한 후 PEP-1-rpS3와 함께 한 시간 배양하였다. 세포 독성은 TPA (4.0 μ g/ml)로 유발하였다. 세포 생존율은 MTT 어세이로 평가하였고, TPA 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 막대는 다섯 번의 실험에

서 얻은 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. C, 대조군; LS, 레보설퍼라이드.

도 2는 사람 HaCaT 각질세포 및 마우스 피부로 PEP-1-rpS3의 세포침투에 미치는 레보설퍼라이드의 영향을 나타내는 것이다.

(A) PEP-1-rpS3 및 (B) PEP-1-GFP의 세포침투를 나타낸다. 세포는 다양한 농도 (0.5-2 μ M)의 각 PEP-1 융합 단백질과 한 시간 동안 함께 배양하였다. 레보설퍼라이드 처리의 경우 세포는 먼저 레보설퍼라이드 (250 ng/ml)로 한 시간 처리한 다음 PEP-1 융합 단백질을 넣고 배양하였다. 세포도입된 PEP-1 융합 단백질은 웨스턴 블랏팅으로 분석한 다음 덴시토미터로 띠의 진한 정도를 측정하였다.

(C) PEP-1-rpS3 (3 μ M)를 60분간 면도한 마우스 등 피부에 국소 도포하였다. 피부 조직은 토끼 항히스티딘 IgG (1:400)으로 면역 염색한 다음 바이오틴과 결합된 염소 항토끼 IgG (1:200)로 염색하였다. 절편은 3, 3'-다이아미노벤지딘으로 시각화하여 현미경으로 관찰하였다. LS: 레보설퍼라이드.

도 3은 레보설퍼라이드 존재 하에 TPA로 유도된 귀 부종에 대한 PEP-1-rpS3의 저해 효과를 나타낸다. 마우스 귀는 TPA (1.0 μ g/ear)로 하루 한 번씩 3일간 처리하였다. 그 후 레보설퍼라이드를 마우스 귀에 국소 도포한 다음 PEP-1-rpS3 처리하였다.

PEP-1-rpS3 처리 후 (A) 귀 두께 및 (B) 귀 중량을 측정하였다.

(C) 마우스 귀 조직의 조직화학적 분석 결과이다. 데이터는 다섯 개의 시료로부터 얻은 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다.

각 레인은 다음과 같다.

레인 1, 무처리 대조군;

레인 2, TPA-처리 피부;

레인 3, TPA 처리 후 레보설퍼라이드 처리한 피부;

레인 4, TPA 처리 후 PEP-1-rpS3 처리한 피부;

레인 5, TPA 처리 후 레보설퍼라이드와 PEP-1-rpS3를 처리한 피부.

도 4는 TPA에 의해 유도된 마우스 염증 모델에서 친염증성 사이토카인과 매개자 (mediators)의 수준에 대한 PEP-1-rpS3의 저해 효과를 나타낸다. 마우스 귀를 TPA (1.0 μ g/ear)로 하루 한 번씩 3일간 먼저 처리하였다. 그 후 레보설퍼라이드를 마우스 귀에 국소 적용한 다음 PEP-1-rpS3로 처리하였다.

(A) COX-2 및 iNOS 발현 수준을 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

(B) 귀 생검 (ear biopsies)에서 총 RNA를 추출하였고, RT-PCR로 COX-2, iNOS, IL-6, IL-1 β , TNF- α 및 β 액틴 mRNA를 분석하였다.

레인 1, 무처리 대조군;

레인 2, TPA-처리 염증 유발 피부;

레인 3, TPA로 염증 유발 후 레보설퍼라이드 처리;

레인 4, TPA로 염증 유발 후 PEP-1-rpS3 처리;

레인 5, TPA로 염증 유발 후 레보설퍼라이드 및 PEP-1-rpS3 처리.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 특별히, 본 발명의 실시예에서 융합 단백질의 일 실시예로 PEP-1을 단백질 수송 도메인으로 선택하고, 염증 치료용 단백질로 rpS3를 선택하여 PEP-1-rpS3 융합 단백질에 대하여 설명하였으나, Tat, 올리고라아신, 올리고아르기닌 등 다양한 단백질 수송 도메인을 치료용 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 결합시킨 융합 단백질에 대해서도 본 발명의 명세서 및 도면에 제시된 결과와 유사한 세포침투 증대, 세포사멸 저해 등의 결과를 거둘 수 있었으며, 본 발명의 범위가 실시예의 기재 범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 또한, 염증 치료용 단백질의 예시로서 실시예에서는 rpS3를 선택하였으나, 염증으로 인한 기능의 이상 및 염증성 질병을 개선

[0044]

시키는 다양한 단백질을 염증 치료용 단백질로 선택할 수 있음은 당업자에게 자명하다.

[0045] **재료**

[0046] 레보설피라이드 및 TPA는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. COX-2, iNOS, IL-6, IL-1 β 및 β 액틴 각각에 대한 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 제한 효소와 T4 DNA 라이게아제는 Promega (미국)에서 구입하였고, Pfu 폴리머라아제는 stratagene (미국)에서 구입하였다. PEP-1 올리고뉴클레오타이드는 Gibco BRL custom primer (미국)에서 합성하였다. IPTG는 Duchefa (네덜란드)에서 구입하였다. pET-15b와 BL21 (DE3) 플라스미드는 Novagen (미국)에서 구입하였고, Ni-니트릴로-삼초산 세파로즈 수퍼플로우 (Ni-nitrilotriacetic acid sepharose superflow)는 Qiagen (독일)에서 구입하였다. 사람 리보솜 단백질 S3(이하 “rpS3”와 혼용함) cDNA는 PCR 방법으로 사람 간 cDNA 라이브러리에서 분리하였다. 기타 약품은 특별한 언급이 없는 경우 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 최고급 분석용으로 구입하였다.

[0047] **PEP-1-rpS3 융합 단백질의 발현벡터 제조 및 형질변환**

[0048] 공개특허 10-2007-67273호에 개시된 방법에 의하여 rpS3와 단백질 수송 도메인이 공유결합한 융합 단백질을 제조하였다. 좀더 자세히 설명하면, 세포 내로 목표 단백질을 전달할 수 있는 융합 단백질 발현벡터를 제조하였고, 목표 단백질로서 인간 리보솜 단백질 S3(rpS3)을, 단백질 수송 도메인으로서 PEP-1 펩타이드를 선택하였다. 먼저, PEP-1-rpS3 융합 단백질을 생산하기 위해 PEP-1 펩타이드 (KETWWE TWWTEW SQP KKKRKV; 21 아미노산)가 포함된 pET-PEP 발현벡터를 제조하였다. PEP-1 펩타이드에 해당하는 두 종류의 올리고뉴클레오타이드 (윗 사슬, 5'-TATGAAAGAAACCTGGTGGGAAACCTGGTGGACCGAATGGTCTCAGCCGAAAAACGTAAAGTGC-3'; 아랫 사슬, 5'-TCGAGCACTTTACGTTTTTTTCGGCTGACACCATTCGGTCCACCAGGTTCCACCAGGTTTCTTTCC-3')를 Nde I-Xho I 제한효소로 자른 pET-15b에 연결 (ligation)하여 삽입하였다. 이어 사람 rpS3의 cDNA의 서열을 기본으로 하여 두 종류의 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다. 정방향 개시체 (Forward primer)는 5' -CTCGAGATGGCAGTGCAAATATCCAAGAAG-3'로 Xho I 제한부위를 지니고 있으며 역방향 개시체 (reverse primer)는 5' -GGATCCTTATGCT GTGGGGACTGGCTGGG-3'로 BamH I 제한부위를 갖고 있다.

[0049] 중합효소 연쇄반응 (PCR)은 열온 순환기 (thermal cycler; Perkin-Elmer, model 9600)에서 수행하였다. 반응 혼합액을 50 μ l 실리콘 반응튜브에 넣고 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하였다. PCR 반응을 수행하였다. PCR 수행 후, 아가로스 젤 전기영동 방법으로 반응물을 분리하고 이것을 TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, 미국 샌디에고)에 연결한 다음, competent cell에 형질변환 시키고 형질변환된 박테리아로부터 플라스미드를 알칼리 용균 방법으로 분리하였다. 사람 rpS3 cDNA가 포함된 TA 벡터를 Xho I과 BamH I로 절단한 다음 PEP 발현벡터에 삽입하였다. PEP-1-rpS3로 형질변환된 E. coli BL21(DE3)를 선택한 다음, 콜로니를 100ml LB 배지에 접종하고 IPTG(0.5mM)를 배지 내에 첨가하여 재조합된 PEP-1-rpS3의 과발현을 유도하였다. 과대발현된 PEP-1-rpS3는 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다.

[0050] PEP-1-녹색형광 단백질도 위의 PEP-1-rpS3 제조방법을 응용하여 제조하였다 (Choi, S. H., et al., (2006) *FEBS Lett.* **580**, 6755-6762 참고).

[0051] **세포 배양과 세포 생존율 시험**

[0052] HaCaT 인간 각질세포 (keratinocytes)를 10% 우태혈청 및 항생제 (100 μ g/ml 스트렙토마이신 및 100 U/ml 페니실린)가 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 가하여 95% 공기, 5% CO₂의 습한 조건으로 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 세포를 먼저 레보설피라이드 (250 ng/ml)로 한 시간 동안 처리하였다. 레보설피라이드를 제거한 다음 세포를 다양한 농도의 PEP-1-rpS3 (0.5-2 μ M)로 한 시간 동안 처리하였다. 세포를 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세척한 다음 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (4.0 μ g/ml)로 열두 시간 동안 처리하였다. 세포 생존율 평가는 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} 어레이 프로토콜에 따라 수행하였다 [D.T. Vistica et al., *Cancer Res.* 51 (1991) 2515-2520]. 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0053] 인간 각질세포 내로 PEP-1 융합 단백질 세포 도입

[0054] HaCaT 세포 내로 PEP-1 융합 단백질의 침투를 탐지하기 위하여 세포를 6-웰 플레이트에서 배양하였다. 세포는 먼저 한 시간 동안 레보설퍼라이드 (250 ng/ml)로 처리한 다음 다양한 농도 (0.5-2 μ M)의 PEP-1 융합 단백질로 처리하였다. 세포와 세포 추출물을 하비스트하여 웨스턴 블랏에 시료로 이용하였다.

[0055] TPA에 의하여 유도된 피부 염증 및 조직학적 분석

[0056] 6주령 ICR 마우스를 한림대 실험동물센터에서 구입하였다. 동물은 일정 온도 (23 $^{\circ}$ C)와 60%의 상대습도로 12시간 명암 사이클로 배양하였고, 물과 사료를 자유롭게 섭취하였다. 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.

[0057] 피부 염증을 유발하기 위하여 각 마우스 (n=5)의 오른 쪽 귀 안쪽과 바깥쪽을 20 μ l의 아세톤에 녹인 TPA (1.0 μ M)로 처리하였다 (Song, H. Y. et al., (2008) *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1348-1357). 레보설퍼라이드 (250 ng/ear)을 동일한 피부 표면에 처리한 후 한 시간이 지난 다음 PEP-1-rpS3 (3 μ M)를 국소 도포하였다. 3일 동안 위의 처리를 반복하였다. 4일째에 오른 쪽 귀를 직경 5mm로 뚫어 각 그룹 귀의 두께와 중량을 측정하였다. 두께는 디지털 두께 측정기(Mitutoyo, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 조직학적 분석을 위해 귀 생검은 4% 파라포름알데하이드로 고정하고, 파라핀에 끼워 넣고, 5 μ m 두께로 절편을 만들어 헤마토자일린과 에오신으로 염색하였다. 웨스턴 블랏 분석을 위해 귀 생검은 단백질 분해효소 저해제 각테일 (Sigma-Aldrich)이 함유된 조직 단백질 추출용 완충액에 넣고 균질화하여 0.1% 트리톤 X-100 존재 하에 15 분간 얼음에 방치하였다. 각 균질액은 10,000 x g로 10 분간 원심분리하였다.

[0058] RT-PCR

[0059] 귀 생검 시료에서 총 RNA를 트리졸 제제 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 분리하였다. 역전사효소 (1,000 U)와 0.5 μ g/ μ l를 이용하여 총 RNA (2 μ g)로부터 cDNA를 합성하였다. cDNA는 다음의 특이적 프라이머로 PCR 증폭되었다. IL-6 안티센스 프라이머, 5'-TGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3'; IL-6 센스 프라이머, 5'-CAAGAAAGACAAAGCCAGAGTCCTT-3'; IL-1 β 안티센스 프라이머, 5'-GTGCTGCCTAATGTCCCTTGAATC-3'; IL-1 β 센스 프라이머, 5'-TGCAGAGTTCCCAACTGGTACATC-3'; TNF- α 안티센스 프라이머, 5'-TGGCACCAGTGTG GTTGCTTT-3'; TNF- α 센스 프라이머, 5'-AAGTTCCTCAATGGCCTCCC-3'; β 액틴 안티센스 프라이머, 5'-GGACAGTGAGGCCAGGATGG-3'; β 액틴 센스 프라이머, 5'-AGTGTGACGTTGA CATCCGTAAAGA-3'. PCR이 완료된 후 제조된 산물은 1% 아가로스 젤에서 분해되어 에티듐 브로마이드 염색 후 UV로 시각화되었다.

[0060] 결과 1: TPA로 유도된 세포 독성에 대한 PEP-1-rpS3와 레보설퍼라이드 처리 효과

[0061] 본 발명자들은 세포 내로 도입된 PEP-1-rpS3가 UV에 노출된 마우스 피부의 DNA 손상을 감소시키고, DNA 조각화 및 지방 과산화를 감소시켜 뇌혈 손상을 완화시키고, 인비트로와 인비보에서 다양한 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있음을 보고한바 있다 (Hwang, I. K. et al., (μ g2008) *J. Neurosci. Res.* **86**, 1823-1835, Choi, S. H. et al., (2006) *FEBS Lett.* **580**, 6755-6762, Ahn, E. H. et al., (2010) *Toxicol.* **276**, 192-197). 세포 생존율에 대한 레보설퍼라이드의 효과를 알아보기 위하여 MTT 어세이를 수행하였다. 레보설퍼라이드의 구조는 도 1의 A와 같다. 염증 유발제 TPA (4.0 μ g/ml)는 대조군과 비교하여 HaCaT 인간 각질세포의 생존율을 46%로 감소시켰다. 그러나, 레보설퍼라이드는 세포 독성에 영향을 미치지 못하였다. PEP-1-rpS3는 세포 생존율을 농도 의존적으로 증가시켰고, 레보설퍼라이드 (250 ng/ml)와 함께 처리한 경우 PEP-1-rpS3는 PEP-1-rpS3 단독 처리의 경우와 비교할 때 세포 생존율을 현저히 증가시켰다 (도 1의 B). 결국 이러한 결과는 레보설퍼라이드가 세포 생존율에 영향을 미치지 않지만 PEP-1-rpS3의 세포도입을 증대시킬 수 있고, PEP-1-rpS3와 함께 TPA에 의해 유도되는 세포 사멸을 보호할 수 있음을 의미한다.

[0062] 결과 2: PEP-1-rpS3 세포도입에 미치는 레보설퍼라이드의 영향

[0063] 본 발명자들은 레보설퍼라이드의 역할을 PEP-1-rpS3가 HaCaT 인간 각질세포 및 마우스 피부 내로 침투하는 것을

돕는 것으로 판단하였다. PEP-1-rpS3는 농도 의존적으로 세포 내로 침투하였다 (도 2의 A). 레보설피라이드 (250 ng/ml)는 레보설피라이드를 가하지 않은 시료와 비교할 때 PEP-1-rpS3가 HaCaT 세포 내로 들어가는 것을 현저히 증가시켰다. 뿐만 아니라, 레보설피라이드가 PEP-1-녹색형광 단백질(Green Fluorescence Protein; GFP)의 세포 도입에 어떠한 영향을 미치는지 시험한 결과, PEP-1-rpS3와 유사한 결과를 얻었다 (도 2의 C).

[0064] 레보설피라이드가 PEP-1-rpS3의 인비보 세포도입에 미치는 영향을 시험하기 위하여, 마우스 피부를 한 시간 동안 레보설피라이드로 먼저 처리한 후 PEP-1-rpS3를 가하였다. 그 결과, PEP-1-rpS3는 피하지방층의 표피층뿐만 아니라, 진피층에서도 발견되었고, 레보설피라이드로 선처리한 경우에는 피하지방의 진피 깊숙한 곳까지도 침투하였다 (도 2의 C). 이와 같은 결과들은 레보설피라이드가 인비트로뿐만 아니라 인비보에서도 PEP-1-rpS3의 세포도입을 강화함을 말해준다.

[0065] 결과 3: 레보설피라이드에 의한 인비보 PEP-1-rpS3 항염증 활성 강화

[0066] 마우스 피부 내로 PEP-1-rpS3 침투가 증가되면 TPA에 의해 유도되는 염증을 억제하는 효과가 증대되는지를 확인하기 위하여, TPA (1.0 μ g)로 염증을 유도하였다. 도 3의 A 및 B와 같이, 레보설피라이드를 도포한 경우 TPA에 의해 유도된 귀 염증의 중량과 두께는 거의 감소되지 않았다. 반면, PEP-1-rpS3를 국소도포한 경우 귀의 중량과 두께는 분명히 감소하였다. 나아가, PEP-1-rpS3를 단독 처리한 마우스와 비교할 때 레보설피라이드 존재 하에서 PEP-1-rpS3는 TPA에 의해 유도된 귀 부종을 좀더 현저히 억제하였다. PEP-1-rpS3와 레보설피라이드를 동시에 처리한 군은 조직학적으로 대조군과 유사한 결과를 나타내었다 (도 3의 C). 이러한 결과는 레보설피라이드가 인비보에서 TPA-유도 염증에 대한 PEP-1-rpS3의 저해 효과를 현저히 증대시킴을 의미한다.

[0067] 결과 4: 레보설피라이드 존재시 염증 매개자와 염증성 사이토카인 발현 수준에 대한 PEP-1-rpS3의 효과

[0068] TPA-유도 마우스 부종 모델에서 PEP-1-rpS3 및/또는 레보설피라이드 처리 하에 염증성 매개자와 염증성 사이토카인 발현 정도가 변화하는지를 시험하기 위하여 웨스턴 블랏과 RT-PCR로 발현 정도를 측정하였다. 도 4의 A와 같이, TPA에 노출되면 COX-2 및 iNOS의 발현 수준은 현저히 증가하였고, 반면 레보설피라이드는 염증성 매개자와 염증성 사이토카인 발현 정도에 아무런 영향을 미치지 않았다. 반면, PEP-1-rpS3와 레보설피라이드가 존재하는 경우에는 염증성 매개자와 염증성 사이토카인 유전자의 발현이 현저하게 저하되었다. 또한, RT-PCR 데이터는 TPA 처리 후 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 가 증가하였음을 말해준다 (도 4의 B). 레보설피라이드를 처리한 경우에는 아무런 변화가 없었다. PEP-1-rpS3 처리는 TPA에 의해 유도된 세 가지 사이토카인의 생산을 효과적으로 감소시켰다. 나아가 PEP-1-rpS3의 항염증 효과, 즉 염증성 사이토카인의 발현을 저해하는 효과는 레보설피라이드 존재 하에 현저히 향상되었다. 이러한 결과는 레보설피라이드가 마우스 피부 내로 PEP-1-rpS3의 침투를 증가시킬 것이라는 제안에 대한 뒷받침이 될 수 있다.

[0069] TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate)는 피부 암발생을 촉진시키고, 이는 염증성 사이토카인 유도, 활성산소종 생성 및 COX-2와 유도성 산화질소 합성효소 (iNOS)의 과발현뿐만 아니라 부종, 세포수 과형성 (hyperplasia) 및 다양한 질병 발생을 비롯한 염증 반응과 관련이 있다 (Afaq, F. et al., (2005) *Int. J. Cancer*. **113**, 423-433, Carey, M. A. et al., (2003) *Essent. Fatty Acids* **69**, 157-162, Song, H. Y. et al., (2008) *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1348-1357, Dhar, A. et al., (2002) *Mol. Cell. Biochem.* **234-235**, 185-193, Forstermann, U. (2010) *Eur. J. Physiol.* **459**, 923-939). 이러한 염증성 매개자들의 생산을 저해하는 것은 다양한 염증성 질환을 억제하는 새로운 패러다임이 될 수 있기 때문에, 많은 연구자들은 단백질의 이용을 포함하는 치료약제 개발과 적용에 초점을 맞추고 있다. 그러나, 치료용 단백질을 약제로 이용하는데에는 큰 분자량과 전하로 인하여 야기되는 바람직하지 않은 제약역학적 변수들 (pharmacokinetic parameters)을 포함하여 수많은 문제가 있다 (Egleton, R. D. and Davis, T. P. (1997) *Peptides* **18**, 1431-1439).

[0070] 리보솜 단백질 S3 (rpS3)는 DNA 디옥시리보포스포다이에스테라아제 (deoxyribo-phosphodiesterase) 활성 및 DNA 글라이코실라아제 (glycosylase) 활성이 있어 DNA 재생 (repair)에 관여한다 (Jang, C. Y. et al., (2004) *FEBS Lett.* **560**, 81-85). 앞서 본 발명자들은 PEP-1-rpS3 융합 단백질 발현 벡터 구조 및 인비보와 인비트로에서의 PEP-1-rpS3의 효과적인 세포 침투 활성에 대한 연구결과를 보고한바 있다 (Choi, S. H. et al., (2006) *FEBS Lett.* **580**, 6755-6762). 설피라이드는 구토억제 (anti-emetic), 소화불량 개선 (anti-dyspeptic) 및 항정신성 특징 (anti-psychotic attributes)으로 널리 알려져 있다 (Mucci, A., Nolf, G. and Maj, M. (1995)

Pharmacol. Res. **31**, 96-101, Rossi, F. and Forgione, A. (1995) *Pharmacol. Res.* **31**, 81-94). 특히 레보설피라이드는 설피라이드의 좌선성 거울상 이성질체 (levorotatory enantiomer)이고, D2 수용체의 매우 선택적인 길항제 (a highly selective antagonist)로 알려져 있다.

[0071] 본 발명은 PEP-1-rpS3의 세포침투 효율과 항염증 효능이 레보설피라이드에 의해 조절되는지에 관한 연구이다. PEP-1-rpS3는 농도 의존적으로 HaCaT 세포 생존율을 개선시켰다 (도 1의 B). TPA 처리된 세포에 레보설피라이드를 가하면 더이상의 세포독성은 없는 반면, PEP-1-rpS3 처리는 레보설피라이드가 없을 때와 비교하여 레보설피라이드 존재 하의 HaCaT 세포 생존율을 더욱 증가시켰다. HaCaT 세포 및 마우스 피부로 PEP-1-rpS3의 침투가 인 비트로와 인비트로 모두에서 레보설피라이드 존재 하에 증가하였다는 결과 (도 2)는 레보설피라이드의 존재가 PEP-1-rpS3의 침투를 증대시키고, 결과적으로 세포 생존율을 증대시킨다는 증거를 제시한다.

[0072] TPA에 의해 유도된 동물 염증 모델은 PEP-1-rpS3의 항염증 활성화에 대한 레보설피라이드의 영향을 평가하기 위해 이용되었다. PEP-1-rpS3는 귀 부종과 염증성 사이토카인 및 염증 매개자의 발현 증가를 억제하였다 (도 3 및 도 4). 레보설피라이드 존재 하에 PEP-1-rpS3에 의한 염증 저해 효과는 레보설피라이드가 없는 경우와 비교하여 좀 더 현저하였다. 이들 데이터는 PEP-1-rpS3의 항염증 활성이 레보설피라이드에 의한 PEP-1-rpS3의 세포침투 증가와 밀접하게 관련이 있음을 지지한다.

[0073] 상피세포 과형성 (epidermal hyperplasia)과 염증이 피부가 건조한 조건 또는 피부 장벽의 교란에서 유래하기 때문에 피부 장벽의 항상성을 유지하는 것은 매우 중요하다. 메타보트로픽 (Metabotropic) 및 이오노트로픽 (ionotropic) 수용체들은 세포 내 cAMP 농도를 조절함으로써 피부 장벽의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다 (Namkung, Y., Dipace, C., Urizar, E., Javitch, J. A. and Sibley, D. R. (2009) *J. Biol. Chem.* **49**, 34103-34115). 도파민 2-유사 수용체 패밀리는 도파민 D2, D3 및 D4 수용체 들로 구성되어 있고, 이는 메타보트로픽 G 단백질과 결합된 수용체의 한 분류이다. D2-유사 수용체 작용자들 (agonists)은 장벽 회복을 가속화하는 반면, D2-유사 수용체 길항제들 (antagonists)은 장벽 회복을 지연시킴으로써 도파민 수용체들이 상피 장벽 항상성에 관여한다는 의견이 설득력을 얻게 되었다 (Fuziwara, S., Suzuki, A., Inoue, K. and Denda, M. (2005) *J. Invest. Dermatol.* **125**, 783-789). 비록 레보설피라이드가 PEP-1-rpS3의 세포침투를 강화시키는 메커니즘은 불분명하지만, TPA의 국소 도포가 피부 장벽 항상성을 교란하고 그리하여 염증을 유발하며, 결과적으로 레보설피라이드가 교란된 피부 장벽 항상성의 회복을 지연시킨다는 것을 생각할 수 있다. 따라서, PEP-1-rpS3는 피부 피하지방층의 상피로 효과적으로 침투할 수 있을 것이다.

[0074] 결론적으로, 본 발명자들이 얻은 이상의 실험 결과들은 레보설피라이드가 단백질 수송 도메인과 결합된 다양한 치료 단백질의 세포 침투를 증대시키는 효율적인 증강제로 작용할 수 있다는 것이다.

[0075] <제형예 1: 정제의 제조>

[0076] rpS3 용합 단백질 20 mg

[0077] 레보설피라이드 20 mg

[0078] 옥수수전분 100 mg

[0079] 유당 100 mg

[0080] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0081] 상기 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0082] <제형예 2: 캡슐제의 제조>

[0083] rpS3 용합 단백질 20 mg

[0084] 레보설피라이드 20 mg

[0085] 옥수수전분 100 mg

[0086] 유당 100 mg

[0087] 스테아린산 마그네슘 2 mg

- [0088] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0089] <제형예 3: 주사제의 제조>
- [0090] rpS3 융합 단백질 0.2 mg
- [0091] 레보실피라이드 0.25 mg
- [0092] 주사용 멸균 증류수 적량
- [0093] pH 조절제 적량
- [0094] 통상의 주사제 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.
- [0095] <제형예 4: 액제의 제조>
- [0096] rpS3 융합 단백질 10 mg
- [0097] 레보실피라이드 12 mg
- [0098] 이성화당 10 g
- [0099] 만니톨 5 g
- [0100] 정제수 적량
- [0101] 통상의 액제 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.
- [0102] <제형예 5: 스프레이제 제조>
- [0103] rpS3 융합 단백질 10 w/v%(1 mg/ml)
- [0104] 레보실피라이드 10 w/v%(1 µg/ml)
- [0105] 점증제 0.05 w/v%
- [0106] AT ECO-cide(천연방부제) 0.7 w/v%
- [0107] 정제수 적량
- [0108] 통상의 스프레이제 제조방법에 따라 위 성분을 혼합하여 스프레이제를 제조하였다.
- [0109] <제형예 6: 로션타입 피부외용제 제조>
- [0110] rpS3 융합 단백질 10 w/v%(1 mg/ml)
- [0111] 레보실피라이드 10 w/v%(1 µg/ml)
- [0112] Olivem 600 0.6 w/v%
- [0113] 세틸 알코올 (Cetyl alcohol) 0.07 w/v%
- [0114] AT ECO-cide (천연방부제) 1.2 w/v%
- [0115] 정제수 적량
- [0116] 통상의 로션타입 피부외용제 제조방법에 따라 위 성분을 혼합하여 제조하였다.
- [0117] <제형예 7: 크림타입 피부외용제 제조>

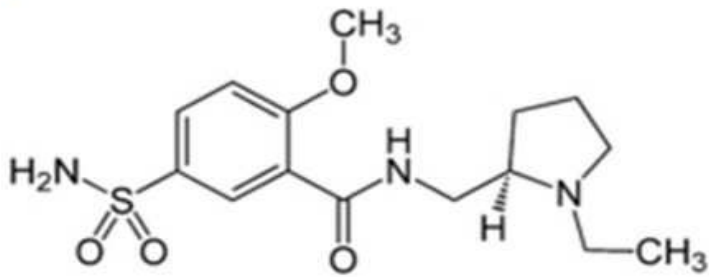
- [0118] rpS3 융합 단백질 10 w/v% (1 mg/ml)
- [0119] 레보셀피라이드 10 w/v% (1 μ g/ml)
- [0120] Olivem 600 0.6 w/v%
- [0121] 세틸 알코올 0.06 w/v%
- [0122] AT ECO-cide (천연방부제) 1.2 w/v%
- [0123] 정제수 적량
- [0124] 통상의 크림타입 피부외용제 제조방법에 따라 위 성분을 혼합하여 제조하였다.

- [0125] <제형예 8: 연고타입 피부외용제 제조>
- [0126] rpS3 융합 단백질 10 w/v% (1 mg/ml)
- [0127] 레보셀피라이드 10 w/v% (1 μ g/ml)
- [0128] Motanov 68 : 0.7 w/v%
- [0129] Motanov L : 0.7 w/v%
- [0130] Montanox 60 : 0.2 w/v%
- [0131] 세트스 KD : 0.5 w/v%
- [0132] AT ECO-cide (천연방부제) : 1.2 w/v%
- [0133] 정제수 적량
- [0134] 통상의 연고타입 피부외용제 제조방법에 따라 위 성분을 혼합하여 제조하였다.

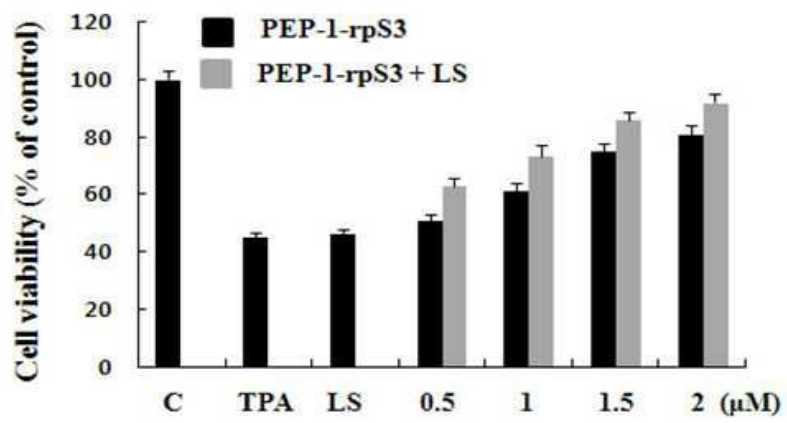
도면

도면1

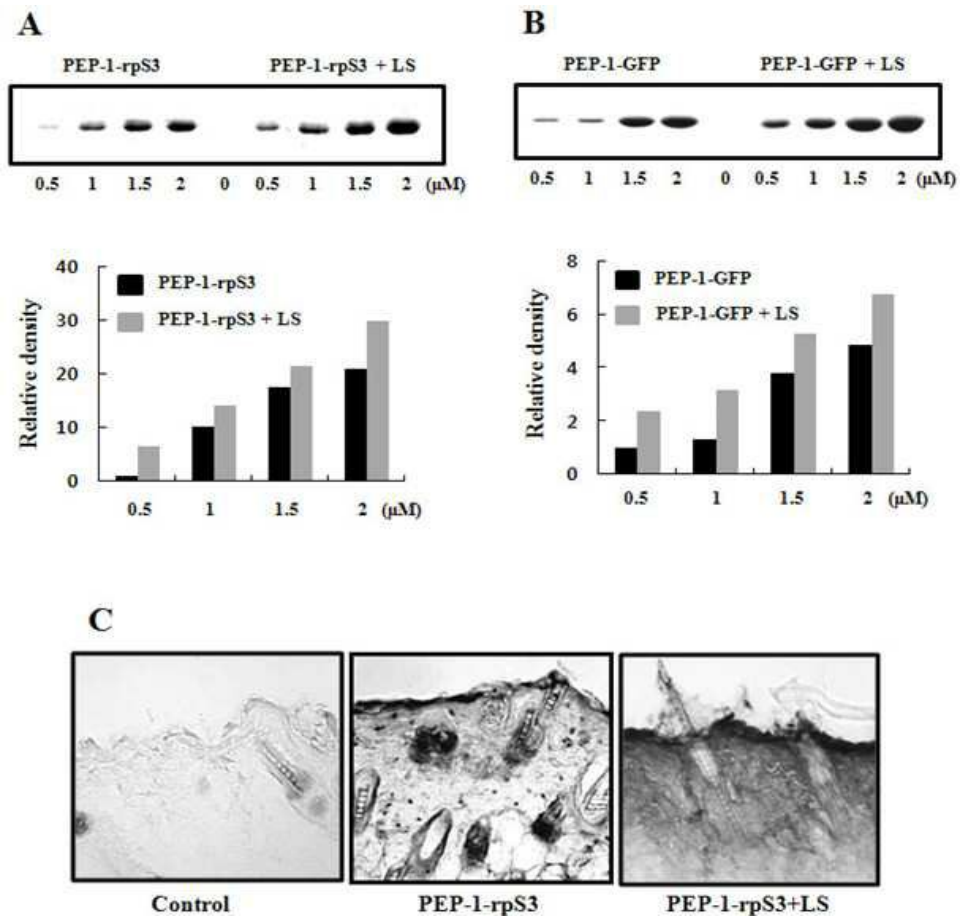
A



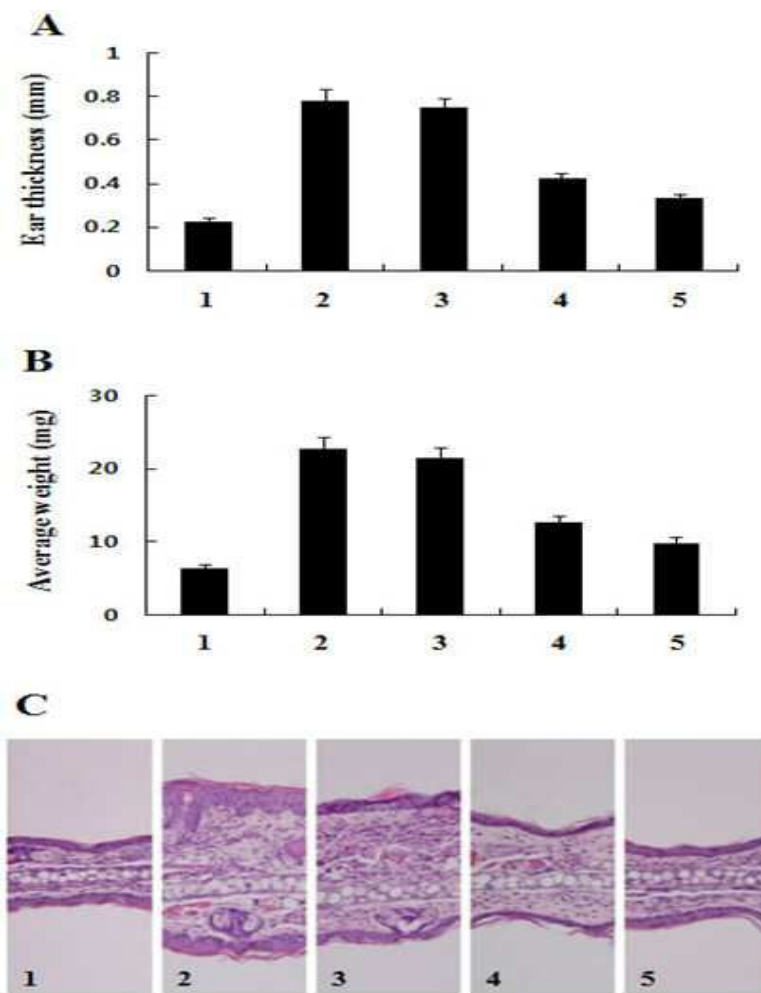
B



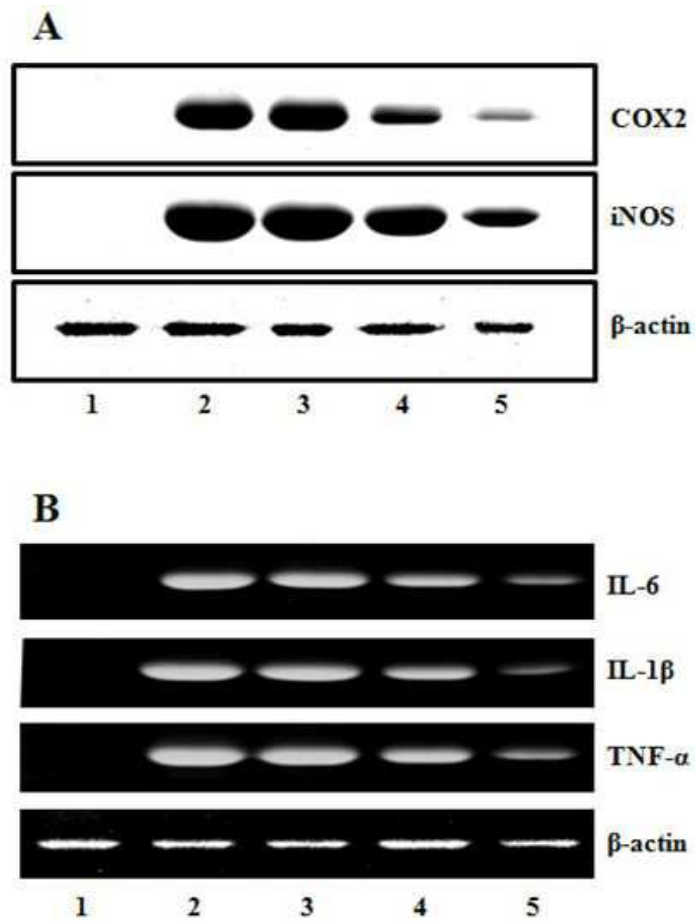
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Enhancing method for transduction of fusion protein by adding
levosulpiride
- <130> Hallym-SYCHOI-levosulpiride
- <160> 24
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 68
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> coding sequence for PEP-1 top strand
- <400> 1
- tatgaaagaa accctggtggg aaacctggtg gaccgaatgg tctcagccga aaaaaaacg 60
- taaagtgc 68

<210> 2
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> coding sequence for PEP-1 bottom strand
 <400> 2
 tcgagcactt tacgtttttt ttctggctga caccattcgg tccaccaggt ttcccaccag 60
 gtttctttcc 70
 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 ctcgagatgg cagtgcaaat atccaagaag 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 ggatccttat gctgtgggga ctggctgggg 30
 <210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6 antisense primer
 <400> 5
 tggatggtct tggtccttag cc 22
 <210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6 sense primer

<400>	6	
caagaaagac aaagccagag tcctt		25
<210>	7	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-1b antisense primer	
<400>	7	
gtgctgccta atgtcccctt gaatc		25
<210>	8	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-1b sense primer	
<400>	8	
tgcagagttc cccaactggt acatc		25
<210>	9	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNF-a antisense primer	
<400>	9	
tggcaccact agttggttgt cttt		24
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNF-a sense primer	
<400>	10	
aagttcccaa atggcctccc		20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin antisense primer

<400> 11

ggacagtgag gccaggatgg 20

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin sense primer

<400> 12

agtgtgacgt tgacatccgt aaaga 25

<210> 13

<211> 819

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for Tat-rpS3 fusion protein

<400> 13

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccatag gaagaagcgg 60

agacagcgac gaagactcga gatggcagtg caaatatcca agaagaggaa gtttgtcgt 120

gatggcatct tcaaagctga actgaatgag ttctttactc gggagctggc tgaagatggc 180

tactctggag ttgaggtgcg agttacacca accaggacag aaatcattat cttagccacc 240

agaacacaga atgttcttgg tgagaagggc cggcggattc gggaactgac tgctgtagtt 300

cagaagaggt ttggctttcc agagggcagt gtagagcttt atgctgaaaa ggtggccact 360

agaggtctgt gtgccattgc ccaggcagag tctctgcgtt acaaactcct aggagggctt 420

gctgtgcgga gggcctgcta tgggtgtgctg cgtttcatca tggagagtgg ggccaaaggc 480

tgcgaggttg tgggtgtctgg gaaactccga ggacagaggg ctaaatccat gaagtttgtg 540

gatggcctga tgatccacag cggagaccct gttaactact acgttgacac tgctgtgcgc 600

cacgtgttgc tcagacaggg tgtgtctggc atcaaggtga agatcatgct gccctgggac 660

ccaactggta agattggccc taagaagccc ctgcctgacc acgtgagcat tgtggaacct 720

aaagatgaga tactgcccac caccacctc tcagaacaga aggggtgggaa gccagagccg 780

cctgccatgc ccagccagt cccacagca taaggatcc 819

<210> 14

<211> 254
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tat-rpS3 fusion protein
 <400> 14
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Val Gln Ile
 1 5 10 15

 Ser Lys Lys Arg Lys Phe Val Ala Asp Gly Ile Phe Lys Ala Glu Leu
 20 25 30
 Asn Glu Phe Leu Thr Arg Glu Leu Ala Glu Asp Gly Tyr Ser Gly Val
 35 40 45
 Glu Val Arg Val Thr Pro Thr Arg Thr Glu Ile Ile Ile Leu Ala Thr
 50 55 60
 Arg Thr Gln Asn Val Leu Gly Glu Lys Gly Arg Arg Ile Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Thr Ala Val Val Gln Lys Arg Phe Gly Phe Pro Glu Gly Ser Val Glu

 85 90 95
 Leu Tyr Ala Glu Lys Val Ala Thr Arg Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gln
 100 105 110
 Ala Glu Ser Leu Arg Tyr Lys Leu Leu Gly Gly Leu Ala Val Arg Arg
 115 120 125
 Ala Cys Tyr Gly Val Leu Arg Phe Ile Met Glu Ser Gly Ala Lys Gly
 130 135 140
 Cys Glu Val Val Val Ser Gly Lys Leu Arg Gly Gln Arg Ala Lys Ser
 145 150 155 160

 Met Lys Phe Val Asp Gly Leu Met Ile His Ser Gly Asp Pro Val Asn
 165 170 175
 Tyr Tyr Val Asp Thr Ala Val Arg His Val Leu Leu Arg Gln Gly Val
 180 185 190
 Leu Gly Ile Lys Val Lys Ile Met Leu Pro Trp Asp Pro Thr Gly Lys
 195 200 205
 Ile Gly Pro Lys Lys Pro Leu Pro Asp His Val Ser Ile Val Glu Pro

210 215 220
Lys Asp Glu Ile Leu Pro Thr Thr Pro Ile Ser Glu Gln Lys Gly Gly

225 230 235 240
Lys Pro Glu Pro Pro Ala Met Pro Gln Pro Val Pro Thr Ala

245 250

<210> 15
<211> 815
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> coding sequence for rpS3-Tat fusion protein
<400> 15

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccggcgg cagccactcg agatggcagt 60
gcaaatatcc aagaagagga agtttgtcgc tgatggcatc ttcaaagctg aactgaatga 120
gtttcttact cgggagctgg ctgaagatgg ctactctgga gttgaggtgc gagttacacc 180

aaccaggaca gaaatcatta tcttagccac cagaacacag aatgttcttg gtgagaaggg 240
cgggcggatt cggaactga ctgctgtagt tcagaagagg tttggctttc cagagggcag 300
tgtagagctt tatgctgaaa aggtggccac tagaggctcg tgtgccattg cccaggcaga 360
gtctctgcgt tacaactcc taggagggct tgctgtgcgg agggcctgct atggtgtgct 420
gcggttcac atggagagtg gggccaaagg ctgcgaggtt gtggtgtctg ggaaactccg 480
aggacagagg gctaaatcca tgaagtttgt ggatggcctg atgatccaca gcggagacct 540
tgttaactac tacgttgaca ctgctgtgcg ccacgtgttg ctgagacagg gtgtgctggg 600

catcaaggtg aagatcatgc tgccctggga cccaactggt aagattggcc ctaagaagcc 660
cctgcctgac cacgtgagca ttgtggaacc caaagatgag atactgccca ccaccccat 720
ctcagaacag aagggtggga agccagagcc gcctgccatg cccagccag tccccacagc 780
aggatcctag gaagaagcgg agacagcgac gaaga 815

<210> 16
<211> 252
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> rpS3-Tat fusion protein
<400> 16

Met Ala Val Gln Ile Ser Lys Lys Arg Lys Phe Val Ala Asp Gly Ile

1 5 10 15
 Phe Lys Ala Glu Leu Asn Glu Phe Leu Thr Arg Glu Leu Ala Glu Asp
 20 25 30
 Gly Tyr Ser Gly Val Glu Val Arg Val Thr Pro Thr Arg Thr Glu Ile
 35 40 45
 Ile Ile Leu Ala Thr Arg Thr Gln Asn Val Leu Gly Glu Lys Gly Arg
 50 55 60
 Arg Ile Arg Glu Leu Thr Ala Val Val Gln Lys Arg Phe Gly Phe Pro
 65 70 75 80
 Glu Gly Ser Val Glu Leu Tyr Ala Glu Lys Val Ala Thr Arg Gly Leu

 85 90 95
 Cys Ala Ile Ala Gln Ala Glu Ser Leu Arg Tyr Lys Leu Leu Gly Gly
 100 105 110
 Leu Ala Val Arg Arg Ala Cys Tyr Gly Val Leu Arg Phe Ile Met Glu
 115 120 125
 Ser Gly Ala Lys Gly Cys Glu Val Val Val Ser Gly Lys Leu Arg Gly
 130 135 140
 Gln Arg Ala Lys Ser Met Lys Phe Val Asp Gly Leu Met Ile His Ser
 145 150 155 160

 Gly Asp Pro Val Asn Tyr Tyr Val Asp Thr Ala Val Arg His Val Leu
 165 170 175
 Leu Arg Gln Gly Val Leu Gly Ile Lys Val Lys Ile Met Leu Pro Trp
 180 185 190
 Asp Pro Thr Gly Lys Ile Gly Pro Lys Lys Pro Leu Pro Asp His Val
 195 200 205
 Ser Ile Val Glu Pro Lys Asp Glu Ile Leu Pro Thr Thr Pro Ile Ser
 210 215 220
 Glu Gln Lys Gly Gly Lys Pro Glu Pro Pro Ala Met Pro Gln Pro Val

 225 230 235 240
 Pro Thr Ala Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 245 250

<210> 17
 <211> 847
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> coding sequence for Tat-rpS3-Tat fusion protein
 <400> 17
 catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccatag gaagaagcgg 60
 agacagcgac gaagactcga gatggcagtg caaatatcca agaagaggaa gtttgtcgct 120
 gatggcatct tcaaagctga actgaatgag tttcttactc gggagctggc tgaagatggc 180
 tactctggag ttgaggtgcg agttacacca accaggacag aaatcattat cttagccacc 240
 agaacacaga atgttcttgg tgagaagggc cggcggattc gggaaactgac tgctgtagtt 300
 cagaagaggt ttggctttcc agagggcagt gtagagcttt atgctgaaaa ggtggccact 360
 agaggctctg gtgccattgc ccaggcagag tctctgcgtt acaaactcct aggagggtct 420
 gctgtgcgga gggcctgcta tgggtgtctg cggttcatca tggagagtgg ggccaaaggc 480
 tgcgaggttg tgggtgtctgg gaaactccga ggacagaggg ctaaatccat gaagtttgtg 540
 gatggcctga tgatccacag cggagaccct gttaactact acgttgacac tgctgtgcgc 600
 cacgtgttgc tcagacaggg tgtgtctggc atcaaggtga agatcatgct gccctgggac 660
 ccaactggta agattggccc taagaagccc ctgcctgacc acgtgagcat tgtggaaccc 720
 aaagatgaga tactgcccac caccctcatc tcagaacaga aggggtgggaa gccagagccg 780
 cctgccatgc ccagccagt cccacagca ggatcctagg aagaagcgga gacagcgacg 840
 aagatag 847

<210> 18
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tat-rpS3-Tat fusion protein
 <400> 18
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Val Gln Ile
 1 5 10 15
 Ser Lys Lys Arg Lys Phe Val Ala Asp Gly Ile Phe Lys Ala Glu Leu
 20 25 30
 Asn Glu Phe Leu Thr Arg Glu Leu Ala Glu Asp Gly Tyr Ser Gly Val

35 40 45
 Glu Val Arg Val Thr Pro Thr Arg Thr Glu Ile Ile Ile Leu Ala Thr
 50 55 60
 Arg Thr Gln Asn Val Leu Gly Glu Lys Gly Arg Arg Ile Arg Glu Leu

 65 70 75 80
 Thr Ala Val Val Gln Lys Arg Phe Gly Phe Pro Glu Gly Ser Val Glu
 85 90 95
 Leu Tyr Ala Glu Lys Val Ala Thr Arg Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gln
 100 105 110
 Ala Glu Ser Leu Arg Tyr Lys Leu Leu Gly Gly Leu Ala Val Arg Arg
 115 120 125
 Ala Cys Tyr Gly Val Leu Arg Phe Ile Met Glu Ser Gly Ala Lys Gly
 130 135 140

 Cys Glu Val Val Val Ser Gly Lys Leu Arg Gly Gln Arg Ala Lys Ser
 145 150 155 160
 Met Lys Phe Val Asp Gly Leu Met Ile His Ser Gly Asp Pro Val Asn
 165 170 175
 Tyr Tyr Val Asp Thr Ala Val Arg His Val Leu Leu Arg Gln Gly Val
 180 185 190
 Leu Gly Ile Lys Val Lys Ile Met Leu Pro Trp Asp Pro Thr Gly Lys
 195 200 205
 Ile Gly Pro Lys Lys Pro Leu Pro Asp His Val Ser Ile Val Glu Pro

 210 215 220
 Lys Asp Glu Ile Leu Pro Thr Thr Pro Ile Ser Glu Gln Lys Gly Gly
 225 230 235 240
 Lys Pro Glu Pro Pro Ala Met Pro Gln Pro Val Pro Thr Ala Gly Ser
 245 250 255
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 260 265

 <210> 19
 <211> 856
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> coding sequence for PEP-1-rpS3 fusion protein

<400> 19

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccataa aagaaacctg	60
gtgggaaacc tggtaggaccg aatggtctca gccgaaaaaa aaacgtaaag tgctcgagat	120
ggcagtgcaa atatccaaga agaggaagtt tgcgctgat ggcatcttca aagctgaact	180
gaatgagttt ctactcggg agctggctga agatggctac tctggagttg aggtgcgagt	240
tacaccaacc aggacagaaa tcattatctt agccaccaga acacagaatg ttcttggtga	300
gaagggccgg cggattcggg aactgactgc ttagttcag aagaggtttg gctttccaga	360
gggcagtgtg gagctttatg ctgaaaaggt ggccactaga ggtctgtgtg ccattgccca	420

ggcagagtct ctgcgttaca aactcctagg agggcttgct gtgcggaggg cctgctatgg	480
tgtgctgcgg ttcatcatgg agagtggggc caaaggctgc gaggttggtg tgtctgggaa	540
actccgagga cagagggcta aatccatgaa gtttgtggat ggcctgatga tccacagcgg	600
agacctgtt aactactacg ttgacactgc tgtgcgccac gtgttgctca gacagggtgt	660
gctgggcatc aagtgtaaga tcatgctgcc ctgggaccca actggttaaga ttggccctaa	720
gaagcccctg cctgaccacg tgagcattgt ggaacccaaa gatgagatac tgcccaccac	780
ccccatctca gaacagaagg gtgggaagcc agagccgcct gccatgcccc agccagtcctc	840

cacagcataa ggatcc	856
-------------------	-----

<210> 20

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-rpS3 fusion protein

<400> 20

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	Val	Gln	Ile	Ser	Lys	Lys	Arg
			20				25				30				
Lys	Phe	Val	Ala	Asp	Gly	Ile	Phe	Lys	Ala	Glu	Leu	Asn	Glu	Phe	Leu
			35				40				45				
Thr	Arg	Glu	Leu	Ala	Glu	Asp	Gly	Tyr	Ser	Gly	Val	Glu	Val	Arg	Val

50 55 60
 Thr Pro Thr Arg Thr Glu Ile Ile Ile Leu Ala Thr Arg Thr Gln Asn
 65 70 75 80
 Val Leu Gly Glu Lys Gly Arg Arg Ile Arg Glu Leu Thr Ala Val Val
 85 90 95
 Gln Lys Arg Phe Gly Phe Pro Glu Gly Ser Val Glu Leu Tyr Ala Glu
 100 105 110

 Lys Val Ala Thr Arg Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gln Ala Glu Ser Leu
 115 120 125
 Arg Tyr Lys Leu Leu Gly Gly Leu Ala Val Arg Arg Ala Cys Tyr Gly
 130 135 140
 Val Leu Arg Phe Ile Met Glu Ser Gly Ala Lys Gly Cys Glu Val Val
 145 150 155 160
 Val Ser Gly Lys Leu Arg Gly Gln Arg Ala Lys Ser Met Lys Phe Val
 165 170 175
 Asp Gly Leu Met Ile His Ser Gly Asp Pro Val Asn Tyr Tyr Val Asp

 180 185 190
 Thr Ala Val Arg His Val Leu Leu Arg Gln Gly Val Leu Gly Ile Lys
 195 200 205
 Val Lys Ile Met Leu Pro Trp Asp Pro Thr Gly Lys Ile Gly Pro Lys
 210 215 220
 Lys Pro Leu Pro Asp His Val Ser Ile Val Glu Pro Lys Asp Glu Ile
 225 230 235 240
 Leu Pro Thr Thr Pro Ile Ser Glu Gln Lys Gly Gly Lys Pro Glu Pro
 245 250 255

 Pro Ala Met Pro Gln Pro Val Pro Thr Ala
 260 265

 <210> 21
 <211> 855
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> coding sequence for rpS3-PEP-1 fusion protein

<400> 21

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgg cagccactcg agatggcagt 60

gcaaatatcc aagaagagga agtttgtcgc tgatggcatc ttcaaagctg aactgaatga 120

gtttcttact cgggagctgg ctgaagatgg ctactctgga gttgaggtgc gagttacacc 180

aaccaggaca gaaatcatta tcttagccac cagaacacag aatgttcttg gtgagaaggg 240

ccggcggatt cgggaactga ctgctgtagt tcagaagagg tttggctttc cagagggcag 300

tgtagagctt tatgctgaaa aggtggccac tagaggtctg tgtgccattg cccaggcaga 360

gtctctcgct tacaactcc taggagggct tgctgtgcgg agggcctgct atggtgtgct 420

gcggttcac c atggagagtg gggccaaagg ctgcgaggtt gtggtgtctg ggaaactccg 480

aggacagagg gctaaatcca tgaagtttgt ggatggcctg atgatccaca gcggagaccc 540

tgtaactac tacgttgaca ctgctgtgcg ccacgtgttg ctgagacagg gtgtgctggg 600

catcaaggtg aagatcatgc tgccctggga cccaactggt aagattggcc ctaagaagcc 660

cctgcctgac cactgagca ttgtggaacc caaagatgag atactgccca ccaccccat 720

ctcagaacag aagggtggga agccagagcc gcctgccatg cccagccag tccccacagc 780

aggatcctaa aagaaacctg gtgggaaacc tgggtggaccg aatggtctca gccgaaaaa 840

aaacgtaaag ttag 855

<210> 22

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rpS3-PEP-1 fusion protein

<400> 22

Met Ala Val Gln Ile Ser Lys Lys Arg Lys Phe Val Ala Asp Gly Ile

1	5	10	15
Phe	Lys	Ala	Glu
Leu	Asn	Glu	Phe
Leu	Thr	Arg	Glu
Leu	Ala	Glu	Asp
20	25	30	
Gly	Tyr	Ser	Gly
Val	Glu	Val	Arg
Val	Thr	Pro	Thr
Arg	Thr	Glu	Ile
35	40	45	
Ile	Ile	Leu	Ala
Thr	Arg	Thr	Gln
Asn	Val	Leu	Gly
Glu	Lys	Gly	Arg
50	55	60	
Arg	Ile	Arg	Glu
Leu	Thr	Ala	Val
Val	Gln	Lys	Arg
Phe	Gly	Phe	Pro

65					70				75				80			
Glu	Gly	Ser	Val	Glu	Leu	Tyr	Ala	Glu	Lys	Val	Ala	Thr	Arg	Gly	Leu	
				85				90				95				
Cys	Ala	Ile	Ala	Gln	Ala	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr	Lys	Leu	Leu	Gly	Gly	
				100				105				110				
Leu	Ala	Val	Arg	Arg	Ala	Cys	Tyr	Gly	Val	Leu	Arg	Phe	Ile	Met	Glu	
				115				120				125				
Ser	Gly	Ala	Lys	Gly	Cys	Glu	Val	Val	Val	Ser	Gly	Lys	Leu	Arg	Gly	
				130				135				140				
Gln	Arg	Ala	Lys	Ser	Met	Lys	Phe	Val	Asp	Gly	Leu	Met	Ile	His	Ser	
145				150				155				160				
Gly	Asp	Pro	Val	Asn	Tyr	Tyr	Val	Asp	Thr	Ala	Val	Arg	His	Val	Leu	
				165				170				175				
Leu	Arg	Gln	Gly	Val	Leu	Gly	Ile	Lys	Val	Lys	Ile	Met	Leu	Pro	Trp	
				180				185				190				
Asp	Pro	Thr	Gly	Lys	Ile	Gly	Pro	Lys	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	His	Val	
				195				200				205				
Ser	Ile	Val	Glu	Pro	Lys	Asp	Glu	Ile	Leu	Pro	Thr	Thr	Pro	Ile	Ser	
				210				215				220				
Glu	Gln	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Pro	Ala	Met	Pro	Gln	Pro	Val	
225				230				235				240				
Pro	Thr	Ala	Lys	Glu	Thr	Trp	Trp	Glu	Thr	Trp	Trp	Thr	Glu	Trp	Ser	
				245				250				255				
Gln	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val									
				260												
<210>	23															
<211>	921															
<212>	DNA															
<213>	Artificial Sequence															
<220><223>	coding sequence for PEP-1-rpS3-PEP-1 fusion prote															
<400>	23															

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccataa aagaaacctg 60

gtgggaaacc tggiggaccg aatggtctca gccgaaaaaa aaacgtaaag tgctcgagat 120

ggcagtgcaa atatccaaga agaggaagtt tgcgctgat ggcatcttca aagctgaact 180

gaatgagttt ctactcggg agctggctga agatggctac tctggagttg aggtgcgagt 240

tacaccaacc aggacagaaa tcattatctt agccaccaga acacagaatg ttcttggtga 300

gaagggccgg cggattcggg aactgactgc ttagttcag aagaggtttg gctttccaga 360

gggcagtgtg gagctttatg ctgaaaaggt ggccactaga ggtctgtgtg ccattgccca 420

ggcagagtct ctgcgttaca aactcctagg agggcttgct gtgcggaggg cctgctatgg 480

tgtgctgcgg ttcatcatgg agagtggggc caaaggctgc gaggttgtgg tgtctgggaa 540

actccgagga cagagggcta aatccatgaa gtttgtggat ggcctgatga tccacagcgg 600

agacctgtt aactactacg ttgacactgc tgtgcgccac gtgttgctca gacagggtgt 660

gctgggcatc aaggtaaga tcatgctgcc ctgggacca actggttaaga ttggccctaa 720

gaagcccctg cctgaccacg tgagcattgt ggaacccaaa gatgagatac tgcccaccac 780

ccccatctca gaacagaagg gtgggaagcc agagccgcct gccatgcccc agccagtccc 840

cacagcagga tcctaaaaga aacctggtgg gaaacctggt ggaccgaatg gtctcagccg 900

aaaaaaaaac gtaaagtgtg g 921

<210> 24

<211> 289

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-rpS3-PEP-1 fusion protein

<400> 24

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 Val Gln Ile Ser Lys Lys Arg

20 25 30

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

35 40 45

Thr Arg Glu Leu Ala Glu Asp Gly Tyr Ser Gly Val Glu Val Arg Val

50 55 60

Thr Pro Thr Arg Thr Glu Ile Ile Ile Leu Ala Thr Arg Thr Gln Asn

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