(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0117748
(43) 공개일자 2016년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0044854
(22) 출원일자 2015년03월31일
심사청구일자 2015년03월31일

(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

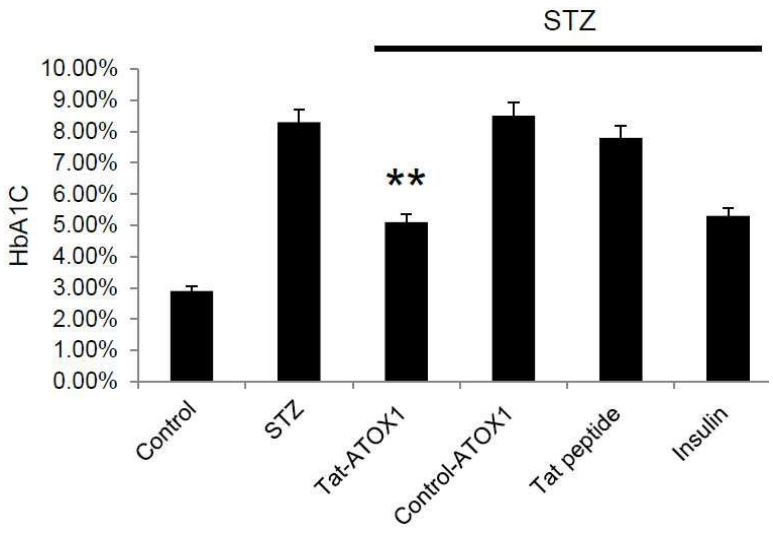
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **세포투과성 ATOX1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 ATOX1 (Antioxidant 1) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 ATOX1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5c



(72) 발명자

음원식

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

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가2길 8 301호 (다가동,그린빌)

김대원

강원도 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 신소재 물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A4A01008026

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자지원사업

연구과제명 췌장 및 간세포 사멸과정에서 DJ-1 단백질의 효능 및 기전 규명

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

ATOX1 (Antioxidant 1) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 ATOX1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 ATOX1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 융합단백질은 서열번호 4, 6, 또는 8인 것을 특징으로 하는 ATOX1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 조직 및 세포 내 투과가 가능한 ATOX1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당뇨병은 인슐린 감소로 고혈당이 지속되는 것으로 전 세계인구 중 약 3억 4천 7백만 명의 당뇨병 환자들이 있다[1]. 또한, 당뇨병은 암 및 간 글루코스 생성을 비롯한 다양한 합병증을 일으키는 중요한 대사 질환으로 잘 알려져 있다[2-4]. 당뇨병에 관련된 정확한 메카니즘은 아직 명확하게 밝혀지진 않았지만, 산화적 스트레스는 당뇨병의 주요 원인 중 하나인 것으로 여겨진다. 몇몇 연구 결과 지나친 산화 스트레스는 스트렙토조토신-유도 동물모델에서 췌장 베타세포 사멸에 대한 반응임이 밝혀졌다[5-7].

[0003] ATOX1 (Antioxidant 1 protein)은 대뇌 피질과 해마를 포함한 뇌 영역에서 구리 샤퍼론으로서 구리 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 또한, ATOX1은 산화 스트레스에 대하여 항산화제로 기능하고 세포 증식의 조절, 세포주기와 SOD3를 포함하는 구리-의존성 전사 조절자로서 기능을 하는 것으로 알려져 있다[8-10]. 구리는 다양한 생물학적 과정에 필요한 보조인자인 반면, 세포에 과량으로 투입되면 독성이 생긴다[11-13]. 최근 많은 연구에서 ATOX1은 암, 고혈압, 심혈관 질환 및 신경 질환을 포함한 다양한 질환에서 세포 생존에 중요한 역할을 한다는 것이 입증되었고, 이는 구리 대사 및 산화적 스트레스로 유발되는 질환의 잠재적인 치료 표적 분자라는 것을 암시한다[14-19].

[0004] ATOX1은 다양한 질환에 대해 치료제로서 가능성을 제공하지만, 이러한 가능성은 ATOX1이 세포 또는 조직으로 수송되지 못함으로 인해 제한된다. 단백질 수송 도메인(PTDs) 또는 세포침투 펩타이드(CPPs)는 타겟 분자가 세포 및 조직 내로 형질도입될 수 있도록 돕는다. Tat 펩타이드는 9 아미노산(RKKRRQRRR)이 뇌 세포에 단백질을 제공하는 기능을 포함하여 세포와 조직에 단백질을 제공하는 것으로 알려져 있다[20-22]. Tat 융합단백질이 세포로 형질도입 및 각종 질병의 세포 사멸을 보호하는 것을 여러 연구에서 알 수 있었다[23-29]. 그러나, ATOX1가 실제로 당뇨병에서 어떠한 기능을 수행하는지는 알려져 있지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Chen SC, Su YC, Lu YT, Ko PC, Chang PY, Lin HJ, Ho HN, Lai YP (2014) Defects in the acquisition of tumor-killing capability of CD8+ cytotoxic T cells in streptozotocin-induced diabetic mice. PLOS One 9: e109961

(비특허문헌 0002) Stattin P, Bjor O, Ferrari P, Lukanova A, Lenner P, Lindahl B, Hallmans G, Kaaks R (2007) Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. Diabetes Care 30: 561-567

(비특허문헌 0003) Connolly GC, Safadjou S, Chen R, Nduaguba A, Dunne R, Khorana AA, Hezel AF (2012) Diabetes mellitus is associated with the presence of metastatic spread at disease presentation in hepatocellular carcinoma. Cancer Invest 30: 698-702

(비특허문헌 0004) Li YG, Ji DF, Zhong S, Lin TB, Lv ZQ (2015) Hypoglycemic effect of deoxynojirimycin-polysaccharide on high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice via regulation of hepatic glucose metabolism. Chem-Biol Interact 225: 70-79

(비특허문헌 0005) Jin L, Xue HY, Jin LJ, Lin SY, Xu YP (2008) Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. Eur J Pharmacol 582: 162-167

(비특허문헌 0006) Kim MJ, Kim DW, Lee BR, Shin MJ, Kim YN, Eom SA, Park BJ, Cho YS, Han KH, Park J, Hwang HS, Eum WS, Choi SY (2013) Transduced Tat-glyoxalase protein attenuates streptozotocin-induced diabetes in a mouse model. Biochem Biophys Res Commun 430: 294-300

(비특허문헌 0007) Koroglu P, Senturk GE, Yucel D, Ozakpinar OB, Uras F, Arbak S (2015) The effect of oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. Peptides 63: 47-54.

(비특허문헌 0008) Montes S, Rivera-Mancia S, Diaz-Ruiz A, Tristan-Lopez L, Rios C (2014) Copper and copper proteins in Parkinson's disease. Oxid Med Cell Longev 2014: Article ID 147251

(비특허문헌 0009) Klomp LW, Lin SJ, Yuan DS, Klausner RD, Culotta VC, Gitlin JD (1997) Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. J Biol Chem 272: 9221-9226

(비특허문헌 0010) Liu YY, Nagpure BV, Wong PT, Bian JS (2013) Hydrogen sulfide protects SH-SY5Y neuronal cells against d-galactose induced cell injury by suppression of advanced glycation end products formation and oxidative stress. Neurochem Int 62: 603-609

(비특허문헌 0011) Cai H, Peng F (2013) Knockdown of copper chaperone antioxidant-1 by RNA interference inhibits copper-stimulated proliferation of non-small cell lung carcinoma cells. Oncol Rep 30: 269-275

(비특허문헌 0012) Uauy R, Olivares M, Gonzalez M (1998) Essentiality of copper in humans. Am J Clin Nutr 67: S952-S959

(비특허문헌 0013) Diez M, Arroyo M, Cerdan FJ, Munoz M, Martin MA, Balibrea JL (1989) Serum and tissue trace metal levels in lung cancer. Oncol 4: 230-234

(비특허문헌 0014) Ozumi K, Sudhahar V, Kim HW, Chen GF, Kohno T, Vogt S, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukai T (2012) Role of copper transport protein antioxidant 1 in angiotensin II-induced hypertension: a key regulator of extracellular superoxide dismutase. Hypertension 60: 476-486

(비특허문헌 0015) Lin SJ, Culotta VC (1995) The ATX1 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 92: 3784-3788

(비특허문헌 0016) Kelner GS, Lee MH, Clark ME, Maciejewski D, McGrath D, Rabizadeh S, Lyons T, Bredesen D, Jenner P, Maki RA (2000) The copper transport protein ATOX1 promotes neuronal survival. J

Biol Chem 275: 580-584

(비특허문헌 0017) Ito S, Ozumi K, Kim HW, Nakagawa O, McKinney RD, Folz RJ, Zelko IN, Ushio-Fukai M, Fukai T (2009) Novel mechanism for regulation of extracellular SOD transcription and activity by copper: Role of antioxidant-1. Free Radic Biol Med 46: 95-104

(비특허문헌 0018) Dolgova NV, Nokhrin S, Yu CH, George GN, Dmitriev OY (2013) Copper Chaperone ATOX1 interacts with the metal-binding domain of Wilson's disease protein in cisplatin detoxification. Biochem J 454: 147-156

(비특허문헌 0019) Zhang S, Liu H, Amarsingh GV, Cheung CC, Hogl S, Narayanan U, Zhang L, McHarg S, Xu J, Gong D, Kennedy J, Barry B, Choong YS, Phillips AR, Cooper GJ (2014) Diabetic cardiomyopathy is associated with defective myocellular copper regulation and both defects are rectified by divalent copper chelation. Cardiovasc Diabetol 13: 100-118

(비특허문헌 0020) Wadia JS, Dowdy SF (2002) Protein transduction technology. Curr Opin Biotechnol 13: 52-56

(비특허문헌 0021) Dietz GP (2010) Cell-penetrating peptide technology to deliver chaperones and associated factors in diseases and basic research. Curr Pharm Biotechnol 11: 167-174

(비특허문헌 0022) van den Berg A, Dowdy SF (2011) Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules. Curr Opin Biotechnol 22: 888-893

(비특허문헌 0023) Kubo E, Fatma N, Akagi Y, Beier DR, Singh SP, Singh DP (2008) TAT-mediated PRDX6 protein transduction protects against eye lens epithelial cell death and delays lens opacity. J Physiol Cell Physiol 294: C842-C855

(비특허문헌 0024) Kwon HY, Eum WS, Jang HW, Kang JH, Ryu J, Lee BR, Jin LH, Park J, Choi SY (2000) Transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells. FEBS Lett 485: 163-167

(비특허문헌 0025) Embury J, Klein D, Pileggi A, Ribeiro M, Jayaraman S, Molano RD, Fraker C, Kenyon N, Ricordi C, Inverardi L, Pastori RL (2001) Proteins linked to a protein transduction domain efficiently transduce pancreatic islets. Diabetes 50: 1706-1713

(비특허문헌 0026) Kim DW, Lee SH, Jeong MS, Sohn EJ, Kim MJ, Jeong HJ, An JJ, Jang SH, Won MH, Hwang IK, Cho SW, Kang TC, Lee KS, Park J, Yoo KY, Eum WS, Choi SY (2010) Transduced Tat-SAG fusion protein protects against oxidative stress and brain ischemic insult. Free Radic Biol Med 48: 969-977

(비특허문헌 0027) Shin MJ, Kim DW, Lee YP, Ahn EH, Jo HS, Kim DS, Kwon OS, Kang TC, Cho YJ, Park J, Eum WS, Choi SY (2014) Tat-glyoxalase protein inhibits against ischemic neuronal cell damage and ameliorates ischemic injury. Free Radic Biol Med 67: 195-210

(비특허문헌 0028) Kim HR, Kim DW, Jo HS, Cho SB, Park JH, Lee CH, Choi YJ, Yeo EJ, Park SY, Kim ST, Yu YH, Kim DS, Kim HA, Cho SW, Han KH, Park J, Eum WS, Choi SY (2015) Tat-biliverdin reductase A inhibits inflammatory response by regulation of MAPK and NF-kB pathways in Raw 264.7 cells and edema mouse model. Mol Immunol 63: 355-366

(비특허문헌 0029) Kim DW, Lee SH, Ku SK, Cho SH, Cho SW, Yoon GH, Hwang HS, Park J, Eum WS, Kwon OS, Choi SY (2013) Transduced PEP-1-FK506BP ameliorates corneal injury in Botulinum toxin A-induced dry eye mouse model. BMB Rep 46: 124-129

(비특허문헌 0030) Yoon JK, Kim DW, Kim ST, Park SY, Yeo EJ, Choi YJ, Lee HR, Kim DS, Cho SW, Han KH, Park J, Eum WS, Hwang HS, Choi SY (2014) PEP-1-HO-1 prevents MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in a Parkinson's mouse model. BMB Rep 47: 569-574

(비특허문헌 0031) Bradford MA (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254

(비특허문헌 0032) Melloul D (2008) Role of NF-kB in β-cell death. Biochem Soc Trans 36: 334-339

(비특허문헌 0033) Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res 50: 537-546

(비특허문헌 0034) Mo L, Yang C, Gu M, Zheng D, Lin L, Wang X, Lan A, Hu F, Feng J (2012) PI3K/Akt signaling pathway-induced heme oxigenase-1 upregulation mediates the adaptive cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against oxidative injury in PC12 cells. Int J Mol Med 30: 314-320

(비특허문헌 0035) Angeloni C, Motori E, Fabbri D, Malaguti M, Leoncini E, Lorenzini A, Hrelia S (2011) H2O2 preconditioning modulates phaseⅡ enzymes through p38 MAPK and PI3K/Akt activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 300: H2196-H2205

(비특허문헌 0036) Nishimoto T, Matsumoto A, Kihara T, Akaike A, Sugimoto H (2010) Protective effect of H2O2 against subsequent H2O2-induced cytotoxicity involves activation of the PI3K-Akt signaling pathway. Cell Mol Biol 56:OL1447-OL1452

(비특허문헌 0037) Jiang X, Tang X, Zhang P, Liu G, Guo H (2014) Cyanidin-3-O-β-glucoside protects primary mouse hepatocytes against high glucose-induced apoptosis by modulating mictochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway. Biochem Pharmacol 90: 135-144

(비특허문헌 0038) Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep 29: 91-98

(비특허문헌 0039) Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE (1969) Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. J Clin Invest 48: 2129-2139

(비특허문헌 0040) Bonnefont-Rousselot D (2004) The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. Treat Endocrinol 3: 41-52

(비특허문헌 0041) Samarghandian S, Borji A, Delkhosh MB, Samini F (2013) Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. J Pharm Pharm Sci 16: 352-362

(비특허문헌 0042) Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Corkey BE, Collins S, Andersen ME (2010) ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. Toxicol Appl Pharmacol 244: 77-83.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 췌장 베타세포 사멸과 인슐린 감소 억제 등의 활성을 통하여 효능이 우수한 당뇨병 예방 및 치료제를 제공하려는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 ATOX1 (Antioxidant 1) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 ATOX1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0008] 또한, 상기 단백질 수송 도메인은 HIV Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 ATOX1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0009] 또한, 상기 융합단백질은 서열번호 4, 6, 또는 8인 것을 특징으로 하는 ATOX1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010] ATOX1 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 0.01㎍~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] 본 발명에 따른 ATOX1 단백질 분자의 세포 내 전달은 ATOX1에 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 스페이서(spacer)로 구성된 수송 도메인이 공유결합된, Pep-1을 비롯한 세포투과성 수송도메인 또는 HIV Tat 세포투과성 도메인이 목표 단백질인 ATOX1의 N-말단 및/또는 C-말단과 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 Pep-1 펩타이드, HIV Tat 49~57 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 Pep-1 펩타이드, HIV Tat 49~57 잔기 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, Pep-1 또는 HIV Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 Pep-1 펩타이드 또는 HIV Tat 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 스페이서(spacer)로 구성된 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인, 또는 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 도메인도 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0013] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0014] "ATOX1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 ATOX1을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 ATOX1을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서 구체적인 일 실시예로서 "Tat-ATOX1"은 ATOX1 융합단백질 중 ATOX1의 N-말단에 Tat 단백질 수송 도메인이 결합한 것을 말한다.

[0015] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0016] 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 인간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물 세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다. 구체적으로 본 명세서에서 표적 세포는 뇌세포를 의미한다.

[0017] 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 HIV-1 Tat를 말한다.

[0018] 본 명세서의 "목표 단백질"은 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분

자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.

[0019] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0020] 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, 목표 단백질(화물 분자)은 ATOX1이다. 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. 음성 전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85~100% 범위 내에서 동일·유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 ATOX1 융합단백질은 세포 내로 농도 및 시간 의존적으로 투과하였다. 또 본 발명의 투과된 ATOX1 융합단백질은 세포 내 활성산소종 농도를 저하시켰다.

[0022] 또한, 본 발명의 ATOX1 융합단백질은 췌장 베타세포의 사멸을 효과적으로 억제하여 췌장 세포를 보호하였고, 혈당 및 인슐린 분비 감소를 억제하였다.

[0023] 뿐만 아니라, 스트렙토조토신(Streptozotocin)을 이용한 당뇨동물모델에서도 본 발명의 ATOX1 융합단백질은 효과적으로 당뇨를 억제함을 조직염색, 혈액 내 혈당 수준 및 혈액검사를 통하여 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 Tat-ATOX1 융합단백질의 정제를 나타낸다. Tat-ATOX1 융합단백질과 ATOX1 단백질의 발현벡터 모식도이다(A). 각각 여섯 개의 히스티딘 태그를 포함한다. 정제된 Tat-ATOX1 융합단백질 및 ATOX1 단백질은 15% SDS-PAGE로 분석하고(B), 항토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석하였다(C).

도 2는 RINm5F 세포로 Tat-ATOX1 융합단백질의 형질 도입을 나타낸다. Tat-ATOX1 융합단백질(0.5~3 μM) 및 대조군 ATOX1 단백질을 30분 동안 배양 배지에 첨가하고(A), Tat-ATOX1 융합단백질(3 μM) 및 대조군 ATOX1 단백질을 5~30분간 배양 배지에 첨가하여(B), 웨스턴 블랏 분석에 의해 분석하였다. Tat-ATOX1 융합단백질의 세포 내 분포는 형광 현미경으로 관찰하였다(C). 크기 막대= 20μm.

도 3은 RINm5F 세포에서 스트렙토조토신에 의한 세포 손상에 대한 Tat-ATOX1 융합단백질의 억제 효과를 나타낸다. RINm5F 세포에서 스트렙토조토신(3 mM)에 12시간 동안 노출한 후 Tat-ATOX1 융합단백질 및 ATOX1 단백질(1~3 μM)을 30분 동안 처리하였다. 세포생존율은 MTT 비색 분석법으로 분석하였다(B). **P <0.01은 스트렙토조토신 처리 RINm5F 세포와 비교한 것이다. 세포에 Tat-ATOX1 융합단백질(3 μM)을 30분 동안 첨가하고, 24시간 동안 스트렙토조토신(3 mM)에 노출시켰다. 이어서, RINm5F 세포에서 스트렙토조토신 유발 8-OHdG(B) 및 DNA 단편화(C)에 대하 Tat-ATOX1 융합단백질의 보호 효과는 염색으로 측정하였고 형광강도는 ELISA 플레이트 리더로 측정하였다. 크기 막대= 50μm. ** P <0.01은 STZ 처리된 세포와 비교한 값이다.

도 4는 RINm5F 세포에서 스트렙토조토신으로 유도된 Akt 및 MAPK의 활성화에 대한 Tat-ATOX1 융합단백질의 억제 효과를 나타낸다. Tat-ATOX1 융합단백질 및 대조군 ATOX1 단백질 3 μM을 30분 동안 전처리한 후, RINm5F 세포를 3 mM의 스트렙토조토신과 함께 8분(Akt), 35분(P38), 45분(JNK) 동안 각각 배양하였다. 이어서, Akt(A),

P38(B) 및 JNK(C) 인산화 수준을 웨스턴 블랏 분석으로 측정하고 밴드 강도는 밀도계로 측정하였다.

도 5는 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스에서 Tat-ATOX1 융합단백질의 개선효과를 나타내다. 마우스에 70 mg/kg 스트렙토조토신을 1회 복강 주입하여 당뇨병을 유도하였다. Tat-ATOX1 융합단백질 (2 mg/kg)을 매주 간격으로 스트렙토조토신 유발 당뇨 마우스에 6번 주입하였다. 혈당(A), 체중(B) 및 HbA1C의 수준(C) 변화를 측정하였다. **P <0.01은 관련 스트렙토조토신 유발 당뇨군과 비교한 값이다.

도 6은 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스에서 Tat-ATOX1 융합단백질의 보호 효과를 나타낸다. 마우스에 70 mg/kg 스트렙토조토신을 1회 복강 주입하여 당뇨병을 유도하였다. Tat-ATOX1 융합단백질(2 mg/kg)은 매주 간격으로 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스에 6번 주입하였다. 췌장 조직 절편은 항토끼 폴리히스티딘 항체(A), 항마우스 인슐린 항체(B)와 함께 배양하고, 퍼옥시다제/DAB 시스템 또는 헤마톡실린 및 에오신(C)으로 염색하였다. 크기 막대= 50 μm.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명의 구성을 아래의 실시예의 기재를 통하여 좀더 상세히 알아본다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재에만 한정된 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 자명하다.

[0026] **재료**

[0027] Tat 펩타이드는 펩트론(Daejeon, Korea)에서 합성하고, 쥐 췌장 인슐린종 세포주 RINm5F는 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 스트렙토조토신은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, Ni_2^+- 나이트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구매하였다. RPMI1640 배지 및 항생제는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로 부터 구입하였고, FBS는 Lonza (Basel, Switzerland)에서, 일차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)와 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 인간 ATOX1 cDNA를 PCR 기술로 분리하였다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

[0028] **Tat-ATOX1 융합단백질의 발현과 정제**

[0029] Tat-발현 벡터는 본 발명자들의 종래기술과 같이 제조하였다[24]. 간단히 설명하면, 인간 ATOX1 cDNA를 다음의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 사용한 ATOX1 센스 프라이머: 5'-CTCGAGATGCCGAAGCACG-3', ATOX1 안티센스 프라이머: 5'-GGATCCCTACTCAAGGCCAAGG-3'. PCR을 통하여 얻은 결과물을 TA 벡터에 서브클론하고 Tat 발현벡터에 연결하여 Tat-ATOX1 발현 벡터를 제조하였다. 이와 마찬가지로 대조군으로는 Tat 펩타이드를 연결하지 않은 ATOX1 단백질을 제조하였다. 재조합된 Tat-ATOX1 플라스미드를 대장균 BL21(DE3)으로 형질변환시킨 후 0.5mM IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactoside) (Duchefa, Haarlem, Netherlands)로 유도하여 18 ℃에서 밤새 배양하였다. 배양한 세포를 초음파 처리로 분쇄하여 Tat-ATOX1 융합단백질을 얻기 위해 Ni^{2+}-나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Pisctaway, NY, USA)를 이용하여 정제하였다[29,30]. 정제된 단백질의 농도는 Bradford 측정법으로 측정하였다[31].

[0030] **Tat-ATOX1 융합단백질의 RINm5F 세포 내 투과**

[0031] RINm5F 세포는 2 mM 글루타민, 10% 우태혈청 (FBS) 및 항생제 (100 μg/ml 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린)를 포함하는 RPMI 1640 배지에 37 ℃, 95% 공기 및 5% CO_2의 습한 조건에서 보관하였다.

[0032] Tat-ATOX1 융합단백질의 전달을 위해, 세포를 30분 동안 Tat-ATOX1 다양한 농도(0.5~3 μM)로 처리하였고, Tat-ATOX1를 3 μM의 농도로 다양한 시간(5~30분)으로 처리하였다. 그 후 세포를 PBS로 세 번 세척하였다. 세포는 모아 웨스턴 블랏 분석하였다.

[0033] **웨스턴 블랏 분석**

[0034] 동량의 단백질을 15% SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하였다. 전기영동 후, 젤은 나이트로셀룰로스 막으로 이동시켰다. 이 막은 5% 탈지유 또는 BSA가 포함된 TBS-T (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) 완충용액으로 블로킹하였다. 막은 일차 항체 또는 HRP-결합된 항체와 함께 배양하였다[26, 27]. 밴드는 제조사 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 지시한 대로 화학형광 시약을 이용하여 확인하였다.

[0035] **형광현미경 분석**

[0036] 종래 기술과 같이 공초점 형광 현미경을 수행하였다[27]. 간단히 설명하면, 커버슬립 상에서 배양한 RINm5F 세포에 3 μM의 Tat-ATOX1 융합단백질을 30분간 처리한 후 PBS로 두 번 세척하고 4% 파라포름알데하이드로 3분간 실온에서 고정하였다. 1차 항체 (anti-His, 1:2000)를 처리하고, Alexafluor 488-결합된 이차항체(1:15000; Invitrogen, CA, USA)를 처리하였다. 핵은 3분간 1 ㎍/㎖ DAPI (Roche applied Science, Germany)로 염색하고, 형광의 분포는 공촛점 형광현미경 (FV-300; Olympus, Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

[0037] **세포 생존율 분석**

[0038] RINm5F 세포를 80% 포화 상태가 되도록 96-웰 플레이트에서 배양하였다. 배양 후, 세포를 30분 동안 Tat-ATOX1 융합단백질(0.5~3 μM)로 전처리하고, 12시간 동안 3 mM 스트렙토조토신으로 배양하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포생존율은 무처리 대조군 세포에 대한 백분율로 나타내었다[30].

[0039] **TUNEL 분석**

[0040] 종래 기술과 같이 8-OHdG(8-hydroxydeoxy guanosine; Santa Cruz, CA, USA) 및 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick end labeling staining; Roche applied Science, Germany) 분석을 수행하였다[27].

[0041] RINm5F 세포를 3 uM의 Tat-ATOX1 융합단백질로 30분간 선처리하고 스트렙토조토신 3 mM로 24시간 동안 처리하였다. 이미지는 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 통해 확인하였다. 형광 강도는 Fluoroskan ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다(Labsystems Oy, Helsinki, Finland).

[0042] **동물모델 제조**

[0043] ICR 마우스(수컷 5주령)를 23℃, 습도 60% 그리고 고정적으로 12시간의 빛/12시간 어둠 주기로 음식물과 물을 자유롭게 섭취할 수 있는 곳에서 사육하였다. 동물 관리를 포함한 모든 실험 절차는 한림의료센터기관 동물 관리 및 사용위원회에서 국립수의과학검역원의 실험동물 관리 및 사용에 대한 가이드를 따라 실험하였다.

[0044] ICR 마우스(군당 n=10)는 다음 여섯 군으로 분류하였다. 1) 비처리 정상 대조군, 2) 스트렙토조토신 주사 당뇨병 마우스, 3) 스트렙토조토신 + Tat - ATOX1 융합단백질(2 mg/kg) 주입, 4) 스트렙토조토신 + ATOX1 단백질(2 mg/kg) 주입, 5) 스트렙토조토신 + Tat 펩타이드(2 mg/kg) 주입, 6) 스트렙토조토신 + 인슐린(0.02 IU) 주입. 당뇨병을 유도하기 위해, 마우스에 70 mg/kg 체중의 투여량으로 50 mM 시트르산 나트륨 완충액(pH 4.5)에 용해된 스트렙토조토신(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 복강 내 주사하였다. 또한, 치료하지 않은 정상 대조군 마우스에도 시트르산 나트륨 완충액을 동일한 양으로 주사하였다. 마우스는 Tat-ATOX1 융합단백질, 대조군 ATOX1 단백질, Tat-펩타이드 및 인슐린을 매주 간격으로 주사하였다. 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스는 8주 후 경추 탈구에 의해 희생시키고, 조직학적 검사를 위해 췌장 조직을 해부하였다. 췌장 베타세포의 분석을 위해, 조직 절편을 항-마우스 인슐린 IgG(Innogenex, USA; dilution 1:300), 항-His 항체(dilution 1:200)와 함께 배양하였다. 췌장 조직 절편은 퍼옥시다아제/DAB 시스템 키트 (Dako Envision kit, Glostrup, Denmark), 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다[6].

[0045] **생화학 분석**

[0046] 체중 및 혈당수치 변화는 실험 8주 동안 매주 조사하였다. 혈당 수준은 AccuChek 혈당 스트립 기계(Roche, Germany))를 사용하여 분석하였다. 혈액 당화 헤모글로빈(혈색소)의 변화를 확인하기 위해 8주 후 꼬리 정맥에서 혈액 시료를 채취하였다. 이어서 HbA1c 수준은 글리코헤모글로빈 분석기 HLCr-723GHb(Tosoh Corpartion, Kyoto, Japan)를 사용하여 측정하였다.

[0047] **통계 분석**

[0048] 데이타는 각각의 세번의 독립된 실험에서 얻은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 평균값 간의 차이는 일방 ANOVA를 이용하여 분석하였다. 차이는 $p < 0.05$일 때 유의미한 것으로 하였다.

[0049] **결과 1 : Tat-ATOX1 융합단백질의 구축 및 정제**

[0050] 세포침투성 Tat-ATOX1 융합단백질을 제조하기 위해 인간 ATOX1 유전자를 Tat 펩타이드 단백질 수송 도메인을 함유한 pET-15b 플라스미드에 삽입하였다. 그 결과 얻어진 Tat-ATOX1 융합단백질을 플라스미드 자동화 서열분석으로 확인하였다. 도 1A와 같이 Tat-ATOX1 융합단백질은 ATOX1 cDNA, Tat 펩티드 및 6개의 히스티딘으로 구성되어 있다. Tat 펩티드를 함유하지 않는 대조군 ATOX1 단백질 또한 제조하였다.

[0051] Tat-ATOX1 융합단백질 및 대조군 ATOX1 단백질은 밤새 18℃에서 0.5 mM의 IPTG로 과발현시킨 후 Ni^{2+}-나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 및 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 확인하였다. 우리는 또한 항 히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석하여 단백질을 확인했다(도 1B). 이러한 결과로부터 Tat-ATOX1 융합단백질 및 대조군 ATOX1 단백질을 성공적으로 발현하고 정제한 것임을 알 수 있다.

[0052] **결과 2 : RINm5F 세포로 Tat-ATOX1 융한단백질의 투과**

[0053] RINm5F 세포로 Tat-ATOX1 융합단백질의 투과 능력을 확인하기 위해 웨스턴 블랏 분석 및 공초점 현미경 분석을 하였다. RINm5F 세포를 다양한 농도(0.5~3 μM)로 30분 동안 처리하였고, Tat-ATOX1 융합단백질을 3 μM에서 다른 시간 (5~30분)으로 처리하였다. Tat-ATOX1 융합단백질의 전달 효율은 웨스턴 블랏 분석에 의해 평가하였다. 도 2A와 같이, 대조군 ATOX1 단백질은 세포로 형질 도입되지 않은 반면, Tat-ATOX1 융합단백질은 농도 및 시간 의존적으로 RINm5F 세포 내 투과가 효과적으로 일어남을 알 수 있었다. 나아가 세포 내 어디로 단백질이 투과되었는지 DAPI(4',6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)와 Alexa 488을 확인하기 위해 공촛점 현미경을 이용하였는데, Tat-ATOX1 융합단백질을 처리한 세포에서 녹색 형광이 핵과 세포질에 나타났다. 하지만, 대조군 ATOX1 단백질로 처리된 세포는 녹색 형광을 나타내지 않았다. 이러한 결과로부터 Tat-ATOX1 융합단백질이 RINm5F 세포로 투과되는 것을 알 수 있다.

[0054] **결과 3 : 스트렙토조토신에 의한 세포 손상에 대하여 투과된 Tat-ATOX1 융합단백질의 효과**

[0055] RINm5F 세포에서 Tat-ATOX1 융합단백질의 보호 효과를 확인하기 위해, 12시간 동안 스트렙토조토신(3 mM)에 노출한 다음, MTT 분석으로 세포생존율을 평가하였다. 대조군에 비하여 스트렙토조토신에 노출한 세포의 생존율은 52%로 현저히 가소하였으나, Tat-ATOX1 융합단백질을 처리한 세포는 76%까지 투여량-의존적으로 세포 생존율이 현저히 증가하였다. 그러나, 대조군 ATOX1 단백질은 동일한 조건에서 보호효과가 나타나지 않았다(도 3a).

[0056] 스트렙토조토신이 DNA 손상과 세포 사멸을 유도하기 때문에, DNA 단편화 및 DNA 산화의 주요 부산물 중 하나인 8-OHdG(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)에 대한 Tat-ATOX1 융합단백질의 억제 여부를 조사하였다. DNA 단편화는 TUNEL 염색으로 측정하였다. 도 3b와 같이, TUNEL 염색된 세포의 수는 대조군 세포에 비해 스트렙토조토신에 노출된 세포에서 현저히 증가하였다. 대조적으로, TUNEL 염색된 세포의 수는 Tat-ATOX1 융합단백질이 처리된 세포에서 현저히 감소하였다. 또한, 스트렙토조토신에 노출된 세포에서 8OHdG을 측정하였다. 투과된 Tat-ATOX1 융합단백질은 스트렙토조토신에 노출된 세포에서 DNA의 산화를 현저히 감소시켰다(도 3c). 이러한 결과는 Tat-ATOX1 융합단백질이 DNA 손상을 억제함으로써 세포 사멸로부터 세포를 보호함을 나타낸다.

[0057] **결과 4 : RINm5F 세포에서 스트렙토조토신으로 유도된 Akt와 MAPK 활성화에 미치는 Tat-ATOX1 융합단백질의 억제 효과**

[0058] 최근의 한 연구에서 스트렙토조토신으로 유도된 당뇨병 마우스가 JNK, P38 및 Akt의 활성화를 통해 세포사멸에 이르는 것이 밝혀졌다[32]. 스트렙토조토신 유도 RINm5F 세포에서 JNK, Akt 및 P38에 대한 Tat-ATOX1 융합단백질의 효과를 조사하기 위해, 세포에 스트렙토조토신(3 mM)을 노출시켜 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다(도 4). 스트렙토조토신에 노출된 세포에서 인산화된 JNK, P38 및 Akt의 발현 수준이 현저히 증가하였다. 그러나, Tat-ATOX1 융합단백질은 스트렙토조토신에 노출된 세포에서 인산화되 JNK, P38 및 Akt의 발현 수준을 현저히 감소시켰다. 이와 비교하여, 대조군 ATOX1 단백질은 이 단백질들의 발현 수준에 아무런 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 Tat-ATOX1 융합단백질이 JNK, P38 및 Akt의 세포 사멸 조절을 통해 세포를 보호하는 효과가 있음을 말해준다.

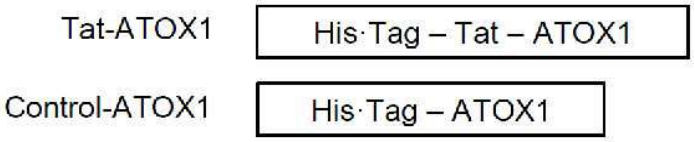
[0059] **결과 5 : 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스에 대한 Tat-ATOX1 융합단백질의 효과**

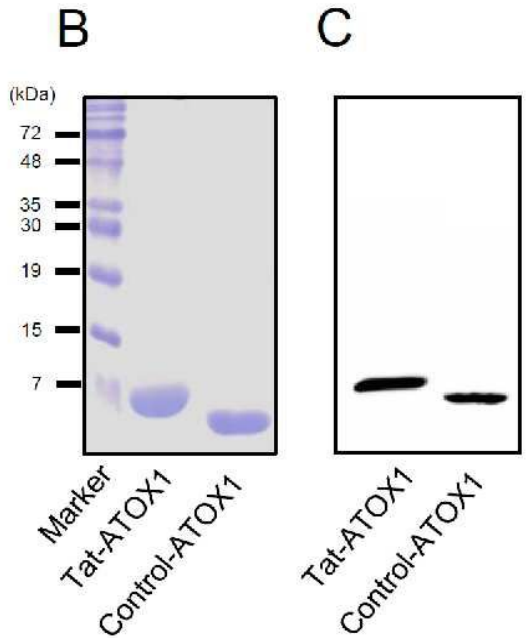
[0060] 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스에서 Tat-ATOX1 융합단백질의 효과를 알아보기 위해 혈당, 체중 및 당화 헤모글로빈(당화 혈색소)의 변화를 실험하였다. 스트렙토조토신 처리한 마우스의 혈당 및 HbA1C의 수준은 미처리 대조군에 비하여 현저하게 증가하였다. 대조적으로, 체중은 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스에서 많이 감소하였다. 그러나, Tat-ATOX1 융합단백질은 상기와 같은 효과를 현저히 정상화하거나 또는 완화하였다. Tat-ATOX1 융합단백질과 비교하기 위해 사용한 참고 약제인 인슐린을 처리한 마우스에서도 이러한 변화가 정상화되거나 완화되었다. 다른 군(ATOX1 단백질 처리군과 Tat 펩타이드 처리군)과 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스군 간의 차이는 없었다(도 5).

[0061] 또한, 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스의 췌장 조직에 Tat-ATOX1 융합단백질의 효과를 조사하였다. 도 6과 같이, 췌장 세포 내로 투과된 Tat-ATOX1 융합단백질은 스트렙토조토신 유발 당뇨 마우스의 췌장 베타세포 파괴에 대하여 보호효과를 나타낸다. 또한, Tat-ATOX1 융합단백질이 스트렙토조토신 유발 당뇨병 마우스에 비해 인슐린 수치를 현저하게 증가시키는 것으로 나타났다. 그러나, 대조군 ATOX1 단백질과 Tat 펩타이드는 보호 효과를 보이지 않았다. 이러한 결과는 Tat-ATOX1 융합단백질이 스트렙토조토신에 의한 췌장 베타세포 파괴를 방지하고, 마우스에서 스트렙토조토신 유발 당뇨병을 개선함을 말해준다.

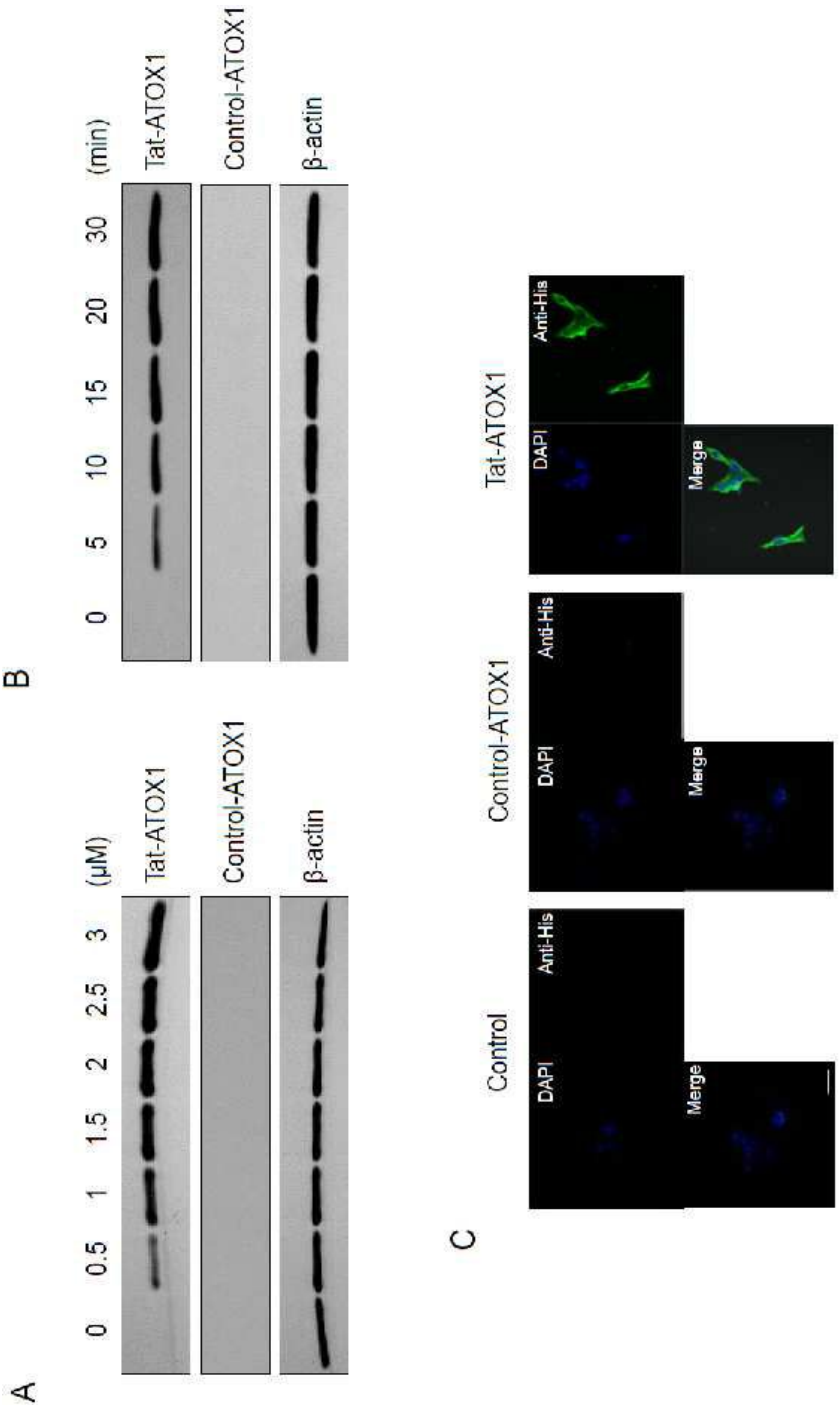
도면

도면1

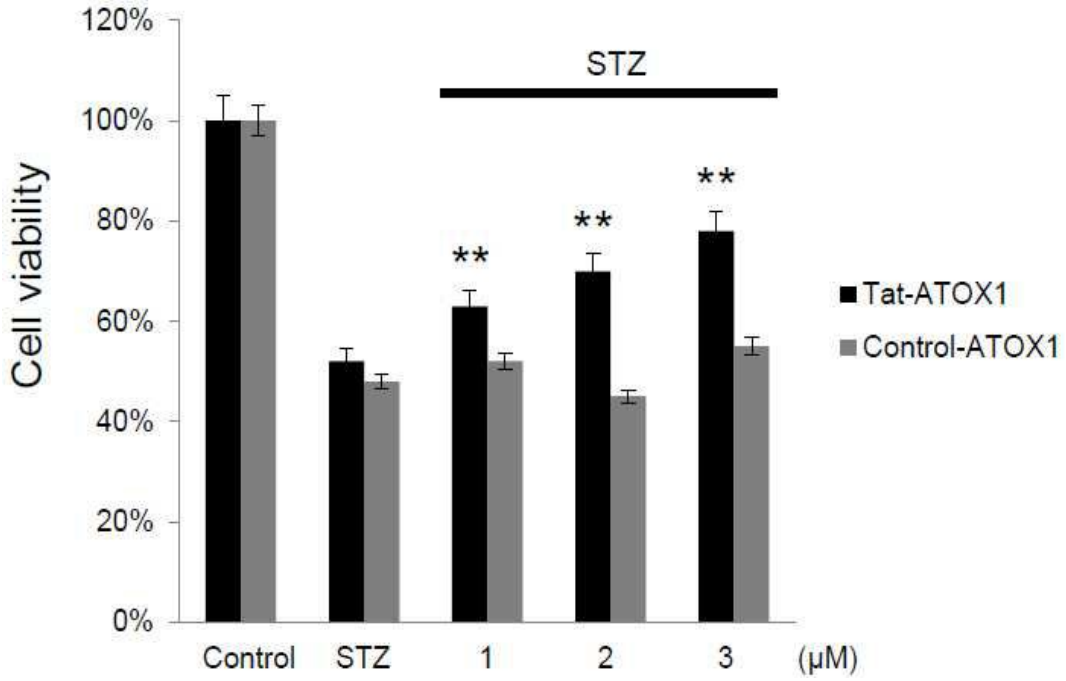

Tat-ATOX1
His·Tag – Tat – ATOX1
Control-ATOX1
His·Tag – ATOX1


B
C
(kDa)
72
48
35
30
19
15
7
Marker
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
Tat-ATOX1
Control-ATOX1

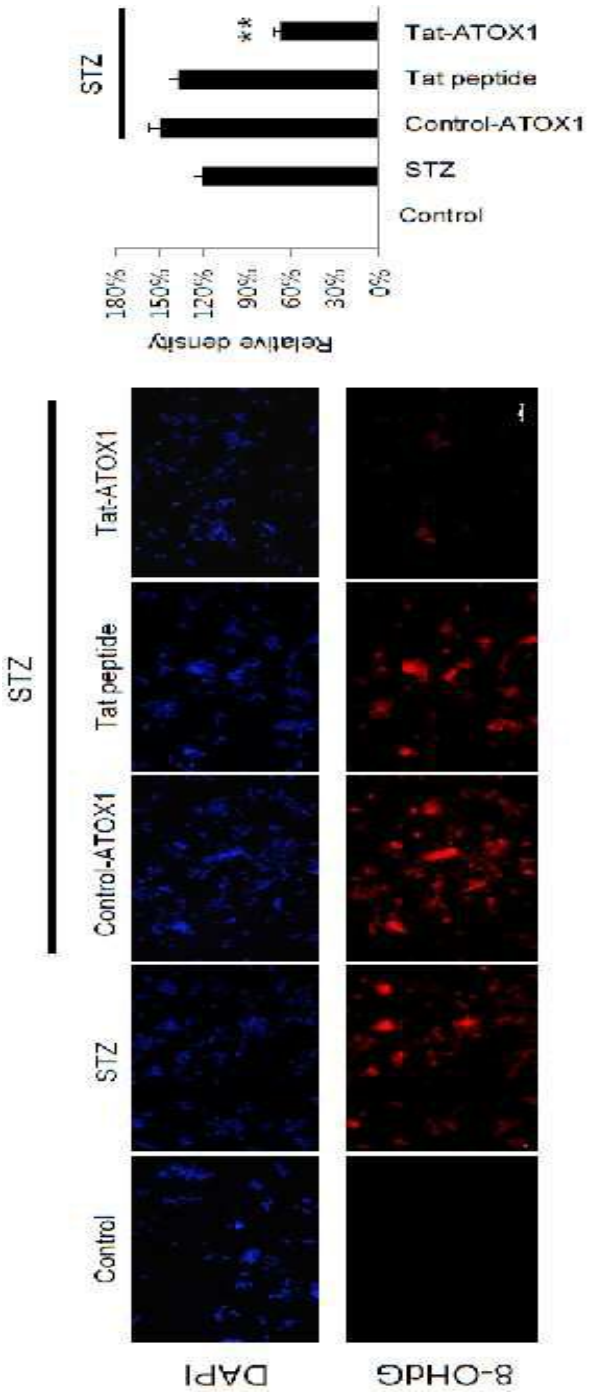
도면2


A
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 (μM)
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
β-actin
B
0 5 10 15 20 30 (min)
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
β-actin
C
Control
Control-ATOX1
Tat-ATOX1
DAPI
Anti-His
Merge

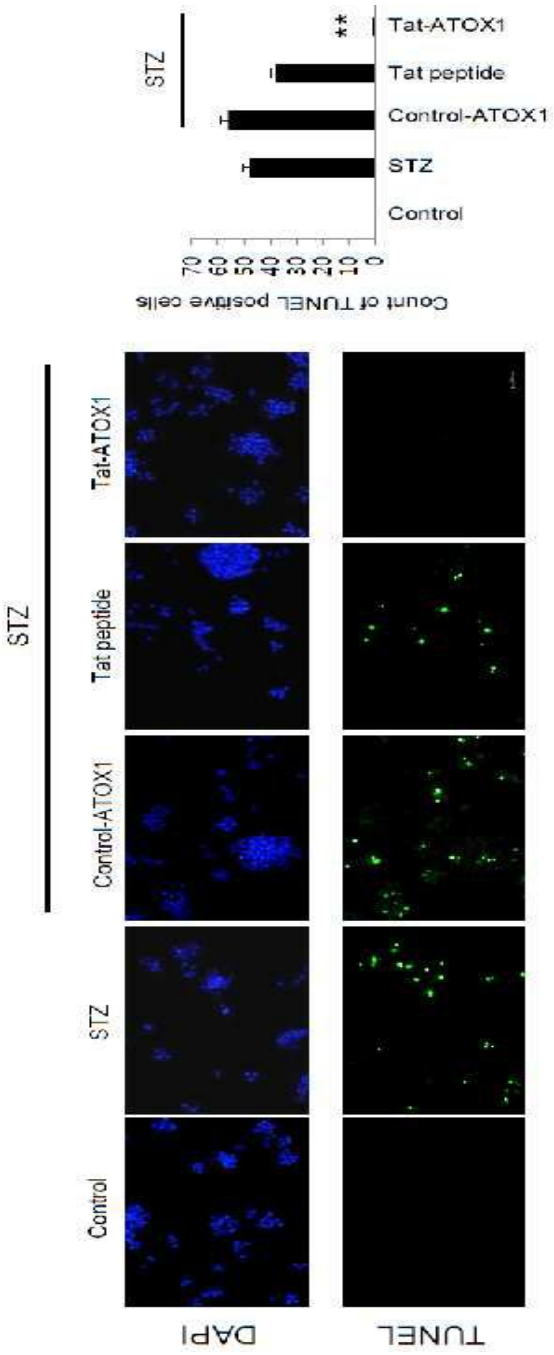
도면3a


120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Cell viability
STZ
**
**
**
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
Control
STZ
1
2
3
(μM)

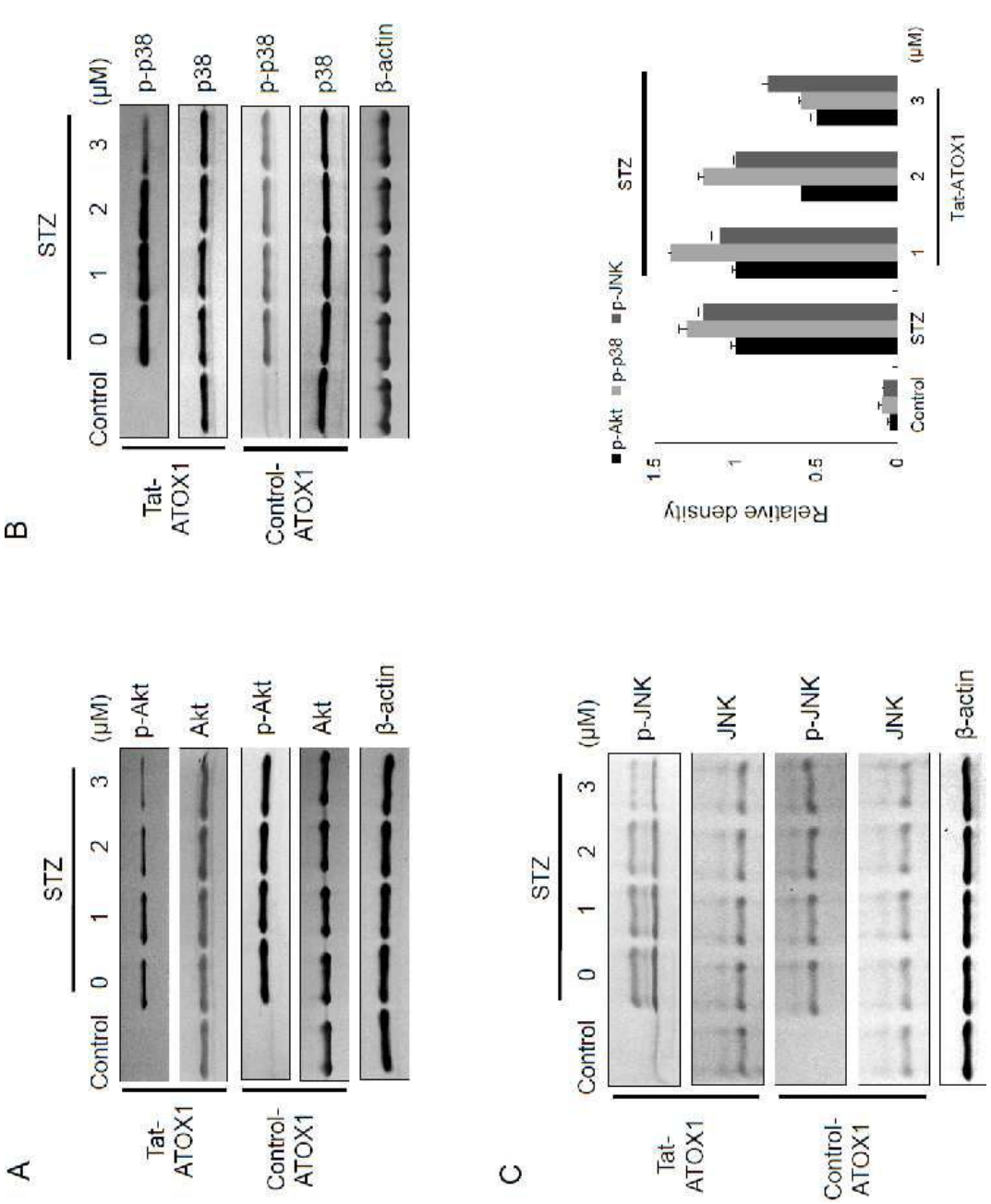
도면3b


STZ
**
Tat-ATOX1
Tat peptide
Control-ATOX1
STZ
Control
180%
150%
120%
90%
60%
30%
0%
Relative density
STZ
Tat-ATOX1
Tat peptide
Control-ATOX1
STZ
Control
DAPI
8-OHdG

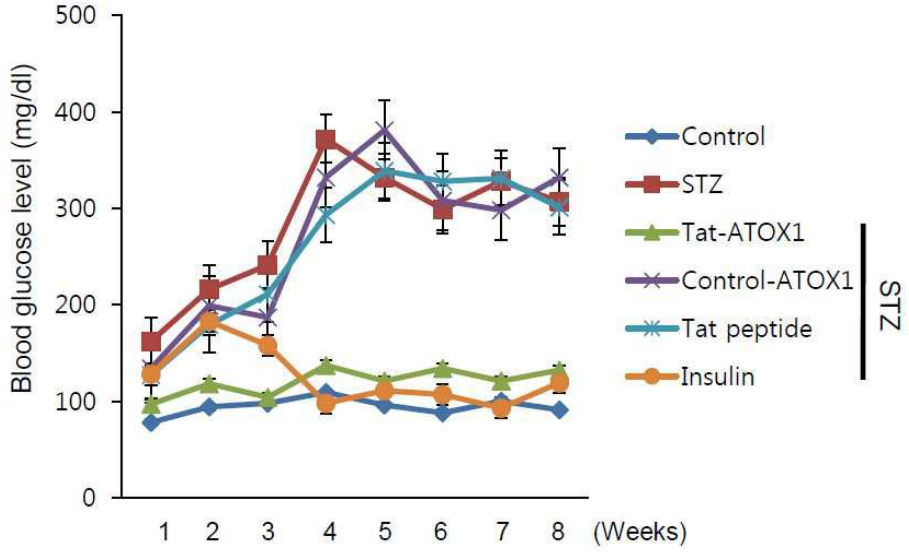
도면3c


STZ
**
Tat-ATOX1
Tat peptide
Control-ATOX1
STZ
Control
70
60
50
40
30
20
10
0
Count of TUNEL positive cells
STZ
Tat-ATOX1
Tat peptide
Control-ATOX1
STZ
Control
DAPI
TUNEL

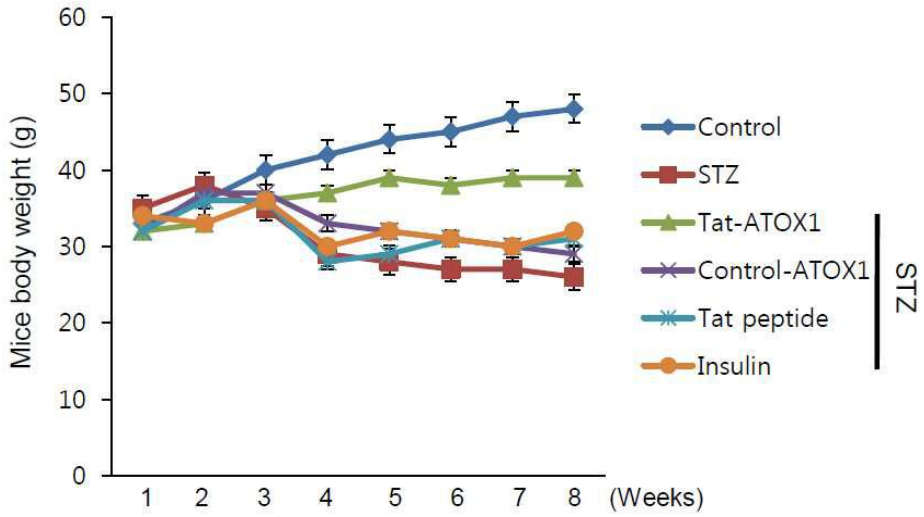
도면4


A
STZ
Control 0 1 2 3 (μM)
p-Akt
Akt
β-actin
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
B
STZ
Control 0 1 2 3 (μM)
p-p38
p38
β-actin
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
C
STZ
Control 0 1 2 3 (μM)
p-JNK
JNK
β-actin
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
p-Akt p-p38 p-JNK
Relative density
0 0.5 1 1.5
Control STZ 1 2 3 (μM)
STZ
Tat-ATOX1

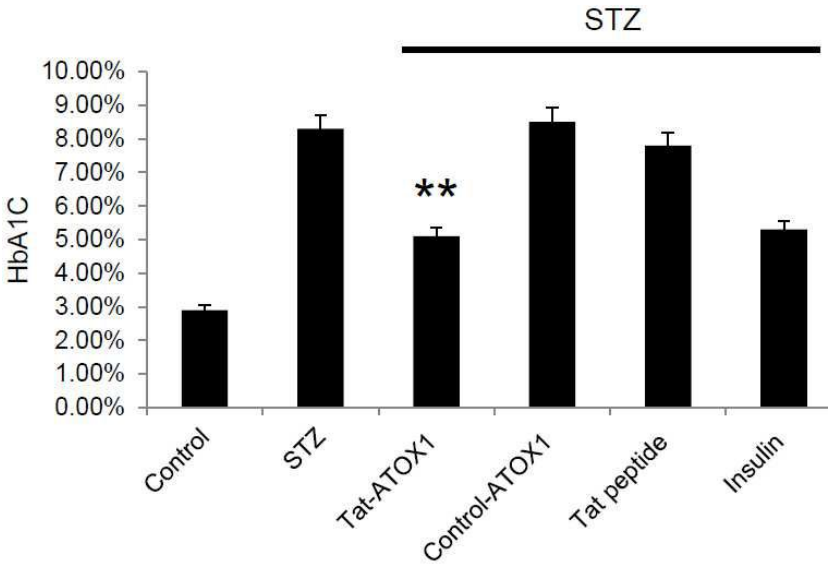
도면5a


Blood glucose level (mg/dl)
500
400
300
200
100
0
1 2 3 4 5 6 7 8 (Weeks)
Control
STZ
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
Tat peptide
Insulin
STZ

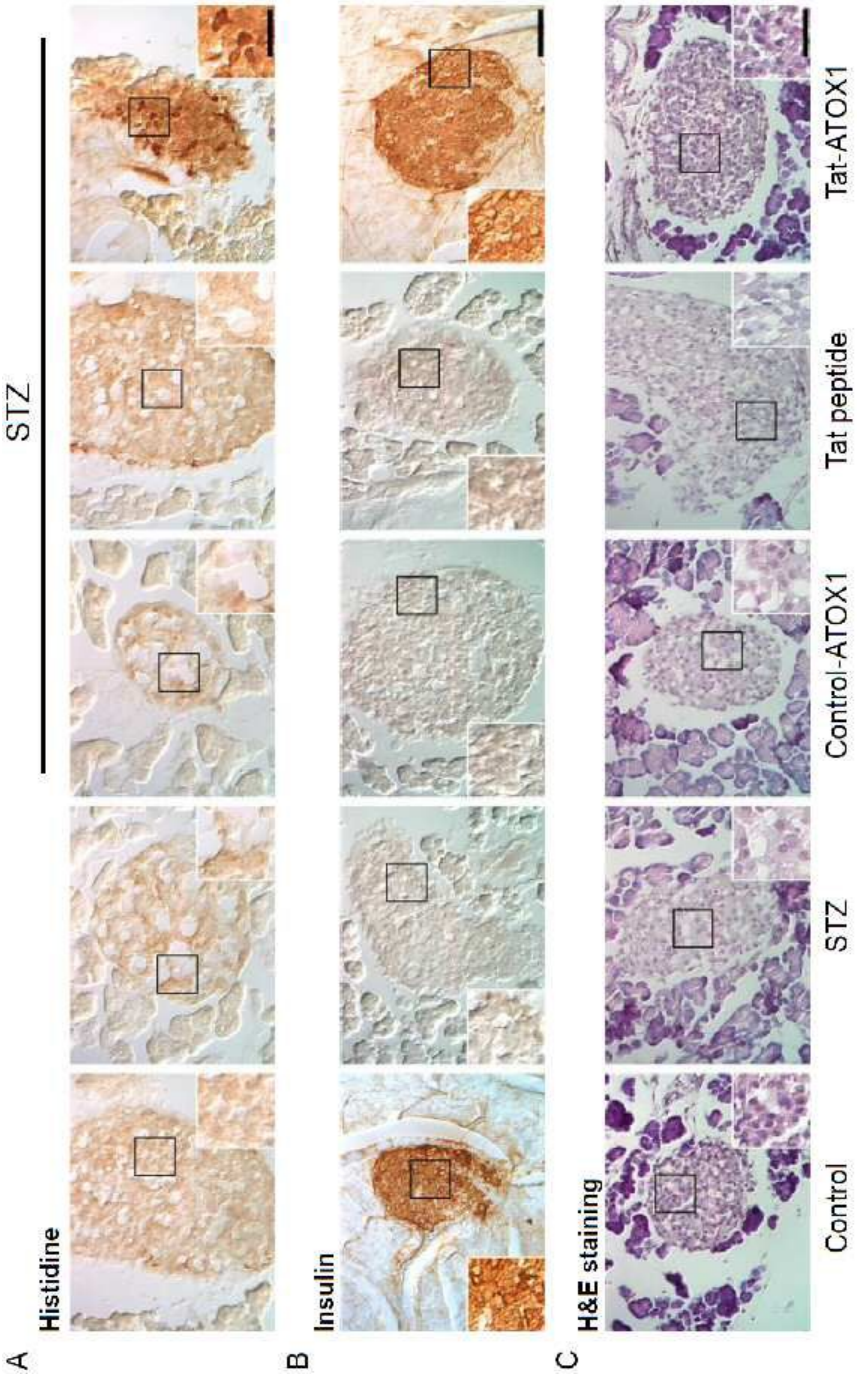
도면5b


Mice body weight (g)
60
50
40
30
20
10
0
1 2 3 4 5 6 7 8 (Weeks)
Control
STZ
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
Tat peptide
Insulin
STZ

도면5c


STZ
10.00%
9.00%
8.00%
7.00%
6.00%
5.00%
4.00%
3.00%
2.00%
1.00%
0.00%
HbA1C
**
Control
STZ
Tat-ATOX1
Control-ATOX1
Tat peptide
Insulin

도면6



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Pharmaceutical composition for autosomal dominant polycystic kidney disease containing cell-transducible Atox1 fusion protein

<130> HallymU-syCHOI-Atox1-PCKD

<160> 18

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ctcgagatgc cgaagcacg 19

<210> 2

<211> 22

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggatccctac tcaaggccaa gg 22

<210> 3

<211> 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding Tat-Atox1 fusion protein

<400> 3

agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat aggaagaagc ggagacagcg acgaagactc 60

gagatgccga agcacgagtt ctctgtggac atgacctgtg gaggctgtgc tgaagctgtc 120

tctcgggtcc tcaataagct tggaggagtt aagtatgaca ttgacctgcc caacaagaag 180

gtctgcattg aatctgagca cagcatggac actctgcttg caaccctgaa gaaaacagga 240

aagactgttt cctaccttgg ccttgagtag 270

<210> 4

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Atox1 fusion protein

<400> 4

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Pro Lys His Glu

1 5 10 15

Phe Ser Val Asp Met Thr Cys Gly Gly Cys Ala Glu Ala Val Ser Arg

20 25 30

Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Val Lys Tyr Asp Ile Asp Leu Pro Asn
35 40 45
Lys Lys Val Cys Ile Glu Ser Glu His Ser Met Asp Thr Leu Leu Ala
50 55 60
Thr Leu Lys Lys Thr Gly Lys Thr Val Ser Tyr Leu Gly Leu Glu
65 70 75

<210> 5
<211> 278
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> polynucleotide encoding Atox1-Tat fusion protein
<400> 5

agcagcggcc tggtgccggc ggcagccact cgagatgccg aagcacgagt tctctgtgga 60

catgacctgt ggaggctgtg ctgaagctgt ctctcgggtc ctcaataagc ttggaggagt 120
taagtatgac attgacctgc ccaacaagaa ggtctgcatt gaatctgagc acagcatgga 180
cactctgctt gcaaccctga agaaaacagg aaagactgtt tcctaccttg gccttgagta 240
gggatcctag gaagaagcgg agacagcgac gaagatag 278

<210> 6
<211> 77
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Atox1-Tat fusion protein
<400> 6

Met Pro Lys His Glu Phe Ser Val Asp Met Thr Cys Gly Gly Cys Ala
1 5 10 15

Glu Ala Val Ser Arg Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Val Lys Tyr Asp
20 25 30
Ile Asp Leu Pro Asn Lys Lys Val Cys Ile Glu Ser Glu His Ser Met
35 40 45
Asp Thr Leu Leu Ala Thr Leu Lys Lys Thr Gly Lys Thr Val Ser Tyr
50 55 60

Leu Gly Leu Glu Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

65 70 75

<210> 7

<211> 277

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding Tat-Atox1-Tat fusion protein

<400> 7

aggaagaagc ggagacagcg acgaagactc gagatgccga agcacgagtt ctctgtggac 60

atgacctgtg gaggctgtgc tgaagctgtc tctcgggtcc tcaataagct tggaggagtt 120

aagtatgaca ttgacctgcc caacaagaag gtctgcattg aatctgagca cagcatggac 180

actctgcttg caaccctgaa gaaaacagga aagactgttt cctaccttgg ccttgagtag 240

ggatcctagg aagaagcgga gacagcgacg aagatag 277

<210> 8

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Atox1-Tat fusion protein

<400> 8

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Pro Lys His Glu

1 5 10 15

Phe Ser Val Asp Met Thr Cys Gly Gly Cys Ala Glu Ala Val Ser Arg

20 25 30

Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Val Lys Tyr Asp Ile Asp Leu Pro Asn

35 40 45

Lys Lys Val Cys Ile Glu Ser Glu His Ser Met Asp Thr Leu Leu Ala

50 55 60

Thr Leu Lys Lys Thr Gly Lys Thr Val Ser Tyr Leu Gly Leu Glu Gly

65 70 75 80

Ser Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

85 90

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of COX-2

<400> 9

caaaggcctc cattgaccag a 21

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of COX-2

<400> 10

tggaccaggt ttttccaccg 20

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of IL-1b

<400> 11

tgcagagttc cccaactggt actc 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of IL-1b

<400> 12

gtgctgccta atgtcccttg aatc 24

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of IL-6

<400> 13

caagaaagac aaagccagag tcctt 25

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of IL-6

<400> 14

tggatggtct tggtccctta gcc 23

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of TNF-a

<400> 15

aagttcccaa atggcctccc 20

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of TNF-a

<400> 16

tggcaccact agttggttgt cttt 24

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of GADPH

<400> 17

tgaaggtcgg tgaacggatt tgg 23

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of GADPH

<400> 18

catgtaggcc atgaggtcca ccac 24