



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0033557
(43) 공개일자 2017년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0131419
(22) 출원일자 2015년09월17일
심사청구일자 2015년09월17일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
김대원
강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

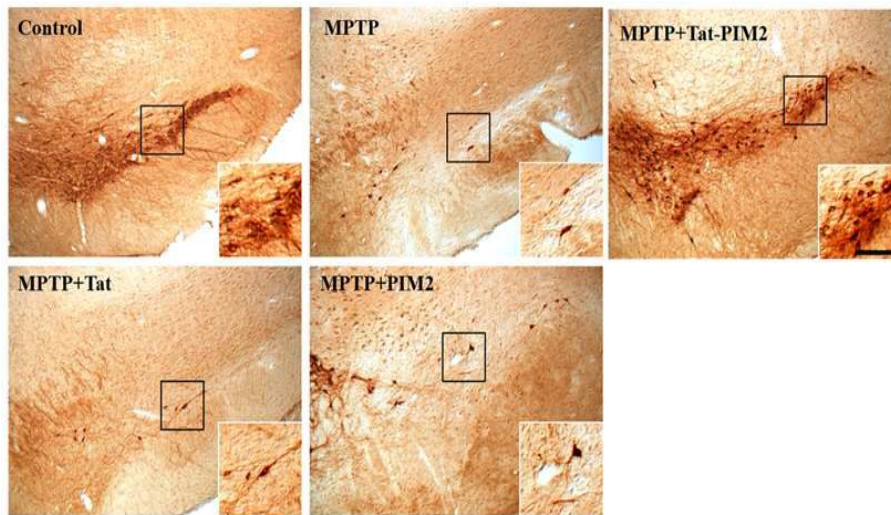
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 세포투과성 PIM2 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

파킨슨병은 뇌의 흑색질 내에서 도파민 뉴런이 점차 상실되는 신경퇴행성 질환이다. 본 발명자들은 PIM2 융합단백질이 SH-SY5Y 신경아세포종 세포 및 파킨슨병 동물모델에서 산화 스트레스로부터 도파민 뉴런을 보호할 수 있음을 밝혀내었다. PIM2 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 그리고 뇌의 흑색질 내로 잘 이동함을 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다. PIM2 융합단백질은 MPP^+ 로 유도되는 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 현저히 저해하였으며, 결과적으로 SH-SY5Y 세포의 생존을 유도했다. 나아가, TH 항체 및 크레실 바이올렛 염색을 이용한 면역조직화학 분석 데이터는 PIM2 융합단백질이 MPTP와 같은 산화 스트레스에 대하여 흑색질 내의 도파민 세포를 현저히 보호함을 나타낸다. 따라서, PIM2 융합단백질은 파킨슨병의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C07K 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

음원식

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

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대
림아파트)

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (그린빌, 다가동)

박진서

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

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

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A3A01015668

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자

연구과제명 도파민 세포 침투성 Antioxidant 1 융합 단백질을 통한 파킨슨병 보호 기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 강릉원주대학교

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

인간 PIM2 (Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus 2) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 PIM2 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV-Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 PIM2 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 융합단백질은 서열번호 6인 것을 특징으로 하는 PIM2 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PIM2 융합단백질의 도파민 뉴런 보호작용에 관한 것으로서, 단백질 수송 도메인과 공유결합된 PIM2 융합단백질은 뇌의 조직 내로 원활히 이동하며, 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 현저히 저해하였으며, 산화스트레스에 대하여 흑색질 내의 도파민 뉴런을 현저히 보호하는 것으로 나타나 PIM2 융합단백질은 파킨슨병의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병은 안정떨림, 경직, 느린 운동 및 자세불안정성 등의 징후를 보이는 대표적인 신경퇴행성 질환으로, 파킨슨병은 뇌의 흑질(Substantia Nigra)에 존재하는 도파민성 뇌세포가 특이적으로 사멸하는 형태학적 특징을 보인다. 활성세포종(ROS)의 생성, 산화적스트레스, 단백질의 비정상적인 구조형성, 미토콘드리아의 손상 등이 원인으로 밝혀지고 있지만 아직 정확한 원인은 밝혀지지 않았다.

[0004] PIM (Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus)은 세린/트레오닌 특이적 카이네이즈 (serine/threonine-specific kinase)로 분류되고, PIM1, PIM2 그리고 PIM3로 구성되어 있다. 그 중 PIM2 단백질은 전사 단계에서 조절되는 종양 유전자 카이네이즈 (oncogenic kinase)로서, 다양한 증식 신호에 대응하여 세포 생존을 촉진한다.

[0005] PIM2의 중요한 기능 중 하나는 세포 생존을 촉진하고 세포 자기사멸을 억제하는 것이다. PIM2는 112번 아미노산인 세린에서 친세포사멸 단백질 BAD (bcl-2 antagonist of cell death)를 인산화하여 BAD에 의하여 유도되는 세포사멸을 되돌린다.

[0007] 본 발명자들은 단백질 수송 도메인 (protein transduction domain; PTDs)을 이용하여 살아 있는 세포 내에 단백질이 운반되도록 하였다. 본 발명자들은 종래 연구에서 Tat-카탈레이즈를 다양한 세포에서 효과적으로 형질도

입하였으며, 정상교세포를 이용하여 실험한 결과 Tat-카탈레이즈가 증가하면 라디칼 제거제 (radical scavenger) 활성이 있는 것을 밝힌바 있다. 또한, 다양한 형질도입 융합단백질이 인비트로와 인비보 상에서 세포 사멸에 대하여 방어하는 기능을 한다는 것을 밝힌바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 PIM2 융합단백질이 세포막과 뇌혈관장벽을 효과적으로 투과하여 파킨슨병 동물모델에서 신경보호 효과를 나타내는지를 알아보고, PIM2 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 PIM2 단백질에 단백질 수송 도메인인 HIV-1 Tat 펩타이드를 융합시켜 세포 또는 조직으로의 침투를 가능하게 하였다. 침투성 Tat-PIM2가 파킨슨병 질환 세포 및 동물 모델에서 세포를 보호하는지를 연구하였다. 그 결과 침투성 Tat-PIM2 융합 단백질이 파킨슨병과 유사한 환경에서 특이적인 도파민성 신경세포의 사멸을 효과적으로 억제함을 확인했고, 나아가 Tat-PIM2 융합 단백질이 파킨슨병을 비롯한 다양한 신경퇴행성 질환에서 효과적인 단백질 치료제로서 작용할 가능성을 제시하였다.

[0012] 본 발명자들은 SH-SY5Y 세포와 파킨슨병의 동물모델에서 Tat-PIM2 융합단백질의 보호 효과를 살펴 보았다. 파킨슨병은 뇌의 흑색질 내에서 도파민 뉴런이 점차 상실되는 신경퇴행성 질환이다. 발명자들은 Tat-PIM2 융합단백질이 SH-SY5Y 신경아세포종 세포 및 파킨슨병 동물모델에서 산화 스트레스로부터 도파민 뉴런을 보호할 수 있음을 밝혀내었다. Tat-PIM2 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 그리고 뇌의 흑색질 내로 잘 이동함을 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다. Tat-PIM2 융합단백질은 MPP⁺로 유도되는 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 현저히 저해하였으며, 결과적으로 SH-SY5Y 세포의 생존을 유도했다. 나아가, TH 항체 및 크레실 바이올렛 염색을 이용한 면역조직화학 분석 데이터는 Tat-PIM2 융합단백질이 MPTP와 같은 산화 스트레스에 대하여 흑색질 내의 도파민 세포를 현저히 보호함을 나타낸다. 따라서, Tat-PIM2 융합단백질은 파킨슨병의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

[0014] Tat-PIM2 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, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탠크, 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 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0015] 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.

[0017] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0018] "Tat-PIM2 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 PIM2 단백질을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 PIM2를 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체

를 의미한다. 본 명세서와 도면에서 구체적인 일 실시예로서 "Tat-PIM2"은 PIM2 융합단백질 중 PIM2 단백질의 N-말단에 HIV-Tat 단백질 수송 도메인이 결합된 것을 말한다.

- [0019] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0020] 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 뇌세포 또는 신경세포를 의미한다.
- [0021] 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-Tat 펩타이드를 말한다.
- [0022] 본 명세서의 "목표 단백질"은 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.
- [0023] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0025] 본 발명은 인간 PIM2 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 PIM2 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV-Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 PIM2 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질이 서열번호 6인 것을 특징으로 하는 PIM2 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 PIM2 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 시간 의존적, 투여량 의존적으로 세포 내로 투과되었고, 나아가 세포 내 PIM2 융합단백질 수준이 상당 시간 동안 유지되었다.
- [0030] 또한, 본 발명의 PIM2 융합단백질은 MPP^+ 에 대한 반응인 활성산소종 생성을 현저히 억제하였다.
- [0031] 본 발명의 PIM2 융합단백질은 MPP^+ 로 유도되는 산화 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 PIM2 융합단백질은 뇌혈관장벽을 효과적으로 가로지를 수 있으며, MPTP로 유도되는 파킨슨병 마우스 모델에서 MPTP 독성에 대하여 도파민 뉴런을 보호하는 것으로 나타났고, MPTP에 의해 유도되는 흑색질에서의 도파민 뉴런의 사멸을 억제하여 운동기능 장애를 감소시킬 수 있을 것으로 예측된다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 PIM2 단백질과 Tat-PIM2 융합단백질 제작을 위한 벡터들을 각각 대장균에서 과발현 및 정제하여 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이다.
- 도 2는 Tat-PIM2 융합단백질의 세포침투 결과를 면역형광염색법으로 확인한 것이다.
- 도 3은 Tat-PIM2 융합단백질의 세포침투 결과를 면역형광염색법 및 공초점 현미경으로 확인한 것이다.
- 도 4는 Tat-PIM2 융합단백질의 활성산소종 생성 억제 효능을 확인한 DCF-DA 염색 결과를 형광현미경으로 촬영한 것이다.
- 도 5는 Tat-PIM2 융합단백질의 DNA 단편화에 대한 억제효능을 확인한 TUNEL 분석 결과이다.

도 6은 파킨슨병 동물 모델에서 Tat-PIM2 융합단백질이 조직으로 침투하여 세포 및 조직을 보호하는 효과를 면역형광조직염색법으로 확인한 것이다.

도 7은 파킨슨병 동물 모델에서 Tat-PIM2 융합단백질의 조직 보호효능을 CV 염색법으로 확인한 것이다.

도 8은 파킨슨병 동물 모델에서 Tat-PIM2 융합단백질의 조직 보호효능을 TH 면역화학염색법으로 확인한 것이다.

도 9는 파킨슨병 동물 모델에서 Tat-PIM2 융합단백질의 보호 기작을 면역형광조직염색법으로 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 각 실험예의 결과로서 구체적인 실시예에서 제조한 여러 가지 융합단백질 중 Tat-PIM2 융합단백질을 시료로 한 데이터를 기재하였으나, 그 외의 융합단백질들 또한 Tat-PIM2 융합단백질을 시료로 한 결과와 유사한 결과를 나타내었음을 밝힌다.

[0037] 재료

[0038] 제한효소와 T4 DNA 연결효소는 promega (USA)에서 구입하였고, Tat-올리고뉴클레오타이드는 Gibco BRL (USA)에서 합성하였다. IPTG는 Duchefa (Netherland)에서 구입하였다. pET15b 벡터와 BL21 (DE3) 플라스미드는 Novagen (USA)에서 구입하였으며, Ni^{2+} -니트릴로삼초산 세파로즈 슈퍼플로우 컬럼은 Qiagen (Germany)에서 구입하였다. 항-히스티딘 항체 및 항-PIM2 항체는 Santa Cruz(CA, USA)에서 구입하였다. 다른 기본 항체는 및 이차 항토끼 항체는 Santa Cruz Biotechnology (미국)에서 구입하였다. Tat-펩타이드 합성은 PEPTRON (Deajeon, Korea)에서 주문 제작하였다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다. 명시되지 않는 다른 화학 물질과 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 최상급으로 구입하였다.

[0040] 실험방법

[0041] Tat-PIM2 융합단백질의 발현과 정제

[0042] PIM2 단백질 및 Tat-PIM2 융합단백질 발현 벡터를 구축하였다. Tat 염기성 도메인에 해당하는 두 종류의 올리고뉴클레오타이드 (상위 쇠, 5'-TAGGAAGAAGCGGAGA CAGCGACGAGAC-3'; 하위 쇠, 5'-TCGAGTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTCTTCC-3')를 *NdeI-XhoI* 제한효소로 자른 pET15b에 연결하여 삽입하였다.

[0043] 인간 PIM2 cDNA 서열은 센스 프라이머 5' -CTCGAGATG TTGACCAAGCCTCTAC -3' 과 안티센스 프라이머 5' -GGATCCTTA GGGTAGCAAGGACCA -3' 를 이용하여 PCR로 증폭하였다.

[0044] 중합효소 연쇄반응(PCR)은 온열 순환기(Perkin-Elmer, model 9600)에서 수행하였으며, 반응 혼합액을 50 μ l 실리콘 튜브에 넣고 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하였다. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 40초간 30사이클의 연장(extension), 54 $^{\circ}$ C에서 1분간 변성(denaturation), 70 $^{\circ}$ C에서 3분간 어닐링(annealing), 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 10분, 20 $^{\circ}$ C에서 5분간 최종 연장(final extension)을 유도하였다. PCR 수행 후 아가로스 젤 전기영동으로 반응물을 분리하고 이것을 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, Sandiego, USA)에 연결한 후 벡터를 컴피턴트 세포에 형질변환시키고 형질변환된 박테리아로부터 플라스미드를 알칼리 용균법으로 분리하였다. 사람 PIM2 cDNA가 포함된 TA 벡터를 *XhoI* 과 *BamHI* 으로 절단한 다음 HIV-1 Tat 발현벡터에 삽입하였다. Tat-PIM2로 형질변환된 *E. coli* BL21(DE3)를 선택하여 암피실린이 포함된 LB 배지에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 200rpm으로 교반하며 배양하였다. 배양액 내의 박테리아 농도가 O.D₆₀₀ = 0.5~1.0을 나타낼 때 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside; Duchefa, Haarlem, The Netherlands)를 배지 내에 첨가하여 최종농도가 0.5mM 되게 한 다음 30 $^{\circ}$ C에서 12시간을 더 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리하여 모은 뒤 5ml 결합 완충액 (5mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)를 넣고 초음파 분쇄기로 분쇄하였다. 원심분리하여 상층액을 즉시 Ni^{2+} -니트릴로 트리아세트산 세파로즈 슈퍼플로우(Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid sepharose superflow) 컬럼에 부하하고 10배 부피의 결합 완충액과 6배 부피의 세척 완충액(60mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)로 세척한 다음 용출 완충액(1M 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 융합 단백질을 용출하였다. 융합 단백질이 포함된 분획들을 모아 PD-10 컬럼

(Amersham, Braunschweig, Germany)을 이용하여 분획 중에 포함된 염분을 제거하였다. 정제된 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준물질로 사용하여 Bradford 방법으로 측정하였다.

[0045] 유사한 방법으로 Tat 단백질 수송 도메인이 결합되지 않은 대조군 PIM2 단백질을 생산하였다.

[0046] Tat-PIM2 융합단백질의 효소 활성은 상업적으로 판매하는 Fluorimetric Drug Discovery kit (EnzoLifeSciences, Farmingdale, NY, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0048] Tat-PIM2 융합단백질의 SH-SY5Y 신경아세포종 세포 투과

[0049] SH-SY5Y 사람 신경아세포종 세포는 가열 불활성화 우태혈청 (10% FBS) 및 항생제 (100 μ g/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린)을 함유한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 내에서 37 °C, 95% 공기 및 5% CO₂의 습한 환경 하에서 배양하였다.

[0050] Tat-PIM2 융합단백질의 세포 내 투과를 관찰하기 위해 배양세포를 6-웰 플레이트에서 4~6시간 정도 자라도록 하였고, FBS가 포함되지 않은 1 ml의 신선한 미디어로 교체하고 여러 농도의 Tat-PIM2 융합단백질을 배지에 처리하여 농도별 세포 내 투과를 관찰하였고, 또 시간별 투과를 관찰하기 위하여 3 μ M의 Tat-PIM2 융합단백질을 10 분 내지 60분간 배지에 처리하였다. 처리 후 일정 시간이 경과한 뒤에 세포를 트립신-EDTA (Gibco Grand Island, NY, USA)로 처리하고 PBS(phosphate-buffered saline)로 충분히 세척한 다음 세포 내로 투과된 융합단백질의 양과 활성은 웨스턴블랏을 통해 분석하고 측정하였다.

[0051] 또한, 위 농도별 및 시간별 세포 내 투과 시험은 각각 37°C와 4°C에서 진행하여 Tat-PIM2 융합단백질의 세포 침투가 세포막 유동성 증가 때문인지를 확인하였다.

[0053] 형광현미경 분석

[0054] 커버슬립 상에서 SH-SY5Y 사람 신경아세포종 세포를 배양하고 3 μ M Tat-PIM2 융합 단백질을 처리하였다. 그 후에 37 °C로 2시간 동안 배양하고 PBS를 이용하여 2번 정도 씻어주고, 4% 파라포름알데하이드를 5분간 처리하여 세포를 상온에서 고정시켰다. 세포는 투과 가능하도록 만든 후 3% 우혈청 알부민, 0.1% Triton X-100 함유 PBS (PBS-BT)로 40분간 블로킹한 다음 PBS-BT로 세척하였다. 일차 항체 (His-probe, Santa Cruze Biotechnology)는 1:2000으로 희석하고, 4 °C에서 오버나잇 배양하였다. 2차 항체 (Alexa 488, Invitrogen)는 1:15000으로 희석하고 어두운 곳에서 상온으로 한 시간 배양하였다. 핵은 1 μ g/ml DAPI (Roche)로 2분간 염색하였다. 형광 분포는 공초점 레이저 스캐닝 시스템 (Bio-Rad MRC-1024ES)로 분석하였다.

[0056] 세포 내 활성산소종 측정

[0057] DCF-DA (2', 7' -dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하여 세포 안의 활성산소종 수준을 측정하였다. DCF-DA는 활성산소종에 의해 세포 안에서 DCF로 전환되어 녹색 형광을 발한다. SH-SY5Y 사람 신경아세포종 세포에 Tat-PIM2 융합단백질을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 활성산소종 수준을 비교해 보았다. Tat-PIM2 융합단백질은 1시간 동안 처리하였고 후에 과산화수소를 0.8 mM의 농도로 2시간 동안 처리해 주었다. 그리고 PBS로 두 번 씻어주고 DCF-DA를 20 μ M의 농도로 1시간 처리해 주었다. 형광 영상은 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 얻었다.

[0059] 웨스턴 블랏 분석

[0060] 웨스턴 블랏 분석을 위해, 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 겔로 분리한 다음 겔에 있는 단백질을 나이트로셀룰로스 막 (nitrocellulose membrane; Amersham, UK)으로 전기이동시켰다. 막은 TBS-T 완충액 (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)에 녹인 5% 탈지분유로 1시간 동안 블로킹하였고, 일차 및 이차항체로 반응시켰다. 토끼 항 히스티딘 항체, β -액틴 항체, 캐스페이즈-3 항체, 절단된 캐스페이즈-3 항체, Bax 항체, Bcl-2 항체 (1:10,000 희석) 및 호스래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 2차 항체 (1 : 10,000 희석)와 함께 배양하였다. 결합된 항체 복합체는 제조업체의 지침에 따라 화학발광 탐지 키트를 사용하여 탐지하였다 (Amersham, Piscataway, NJ, USA).

[0062] **공초점 현미경 관찰**

[0063] SH-SY5Y 세포 내의 Tat-PIM2 융합단백질과 PIM2 단백질을 탐지하기 위해 세포를 유리 커버슬립 상에 시드하고 Tat-PIM2 융합단백질과 PIM2 단백질을 각각 3 μ M 농도로 3시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 다음 실온에서 5분간 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고 항히스티딘 1차 항체 및 알렉사 플루오르 488 결합된 2차 항체 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 차례대로 배양하였다. 핵은 1 μ g/ml의 4',6-다이아미디노-2-페닐인돌 (4',6-diamidino-2-phenylindole; Roche Applied Science, Basel, Switzerland)로 5분간 염색하였다. 형광은 올림푸스 FV-300 공초점 형광현미경으로 분석하였다 (Olympus, Tokyo, Japan).

[0065] **TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling) 분석**

[0066] 유리 커버슬립 상의 SH-SY5Y 세포에 각각 Tat-PIM2 융합단백질과 PIM2 단백질 2mM씩을 가하여 37℃로 3시간 배양한 다음 MPP⁺ (4.0mM)에 14시간 30분 동안 노출하였다. TUNEL 염색은 세포 사멸 탐지키트 (Roche Applied Science, Basel, Switzerland)를 이용하여 수행하였다. 형광현미경 사진은 Eclipse 80i 형광현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)으로 찍었다. DAPI ((4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색도 진행하였다.

[0068] **실험 동물**

[0069] 수컷, 6주령, C57BL/6 마우스를 한림대 실험동물센터에서 구입하였다. 마우스는 일정 온도 (23℃)와 일정 상대 습도 (60%)에서 12시간 사이클로 명암 조절하여 사육하였다. 물과 사료에는 자유롭게 접근 가능하였다. 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. 이전의 연구대로 파킨슨병 모델을 제조하였다. 마우스에는 MPTP를 20mg/kg 투여량으로 두 시간 간격으로 주사하였다. Tat-PIM2 융합단백질의 파킨슨병 보호효과를 확인하기 위해 MPTP 처리 12시간 전 2.0 mg/kg의 단백질을 한 차례 피하주사하였다. 마우스 (각 군마다 n=5)는 다음과 같이 다섯 개의 군으로 나누었다: 1) 무처리 대조군, 2) MPTP 처리군, 3) MPTP와 Tat-PIM2 융합단백질 처리군, 4) MPTP와 Tat 펩타이드 처리군, 및 5) MPTP와 PIM2 단백질 처리군. 마우스는 마지막 주사로부터 일주일 후 희생시켰다.

[0071] **면역조직화학**

[0072] 면역염색은 이전의 연구와 같이 수행하였다. 3% 우혈청 알부민이 함유된 PBS로 실온에서 30분간 조직 절편을 처리하여 블로킹시키고 Tat-PIM2 융합단백질과 PIM2 단백질을 탐지하기 위해 히스티딘 항체 또는 도파민 뉴런을 탐지하기 위해 티로신 하이드록실레이즈 (tyrosine hydroxylase; TH) 항체를 넣어 배양하였다. 바이오틴이 결합된 염소 항토끼 항체를 2차 항체로 이용하였다. 살아 있는 뉴런에서 발견되는 과립체이고 조면 소포체 (rough endoplasmic reticulum)로 생각되는 니슬 소체 (Nissl bodies)를 염색하기 위해 크레실 바이올렛 역염색을 수행하였다. 절편은 DAB (3,3'-diaminobenzidine) 함유 0.1M 트리스 완충액으로 시각화하여 젤라틴 코팅된 슬라이드에 올려놓았다. 영상은 올림푸스 DP72 디지털 카메라 및 DP2-BSW 현미경 디지털 카메라 소프트웨어로 촬영 및 분석하였다. 도면은 Adobe Photoshop 7.0 (San Jose, CA, USA)을 이용하였다.

[0074] **통계 분석**

[0075] 데이터는 각각의 독립된 실험에서 얻은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 평균값 간의 차이는 일방 ANOVA를 이용하여 분석하였다. Newman-Keuls post hoc 분석은 ANOVA 시험에서 차이가 관찰된 때 채용하였다 ($p < 0.01$).

[0077] **결과 1: Tat-PIM2 융합단백질의 정제 및 세포 투과**

[0078] 세포 투과성 Tat-PIM2 융합단백질을 제조하기 위해 단백질 수송 도메인의 일종인 HIV-Tat 펩타이드 코딩 서열이

포함된 Tat 벡터와 PIM2 유전자를 재조합하여 대장균에서 과발현시켜 Ni^{2+} -나이트릴로아세트산 세파로즈 친화 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 이용해 정제를 수행하여 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다 (도 1).

[0079] Tat-PIM2 융합단백질이 세포 내로 원활히 침투하는지를 확인하기 위하여 도파민성 신경세포의 성질을 지닌 SH-SY5Y 사람 신경아세포종 세포에 처리하여 Tat-PIM2 융합단백질 특이적인 항체로 녹색 형광을 염색시키고, 세포 내부를 관찰할 수 있는 공초점 현미경으로 확인하였다. 그 결과, Tat-PIM2 융합단백질은 세포 내 투과가 효과적으로 일어났으며, 음성 대조군과 Tat이 없는 대조군 PIM2 단백질은 투과가 일어나지 않았다 (도 2). 또한, 4℃와 37℃ 환경에서 Tat-PIM2 융합단백질의 세포 침투를 실험한 결과, Tat-PIM2 융합단백질의 세포 침투가 세포막의 유동성 변화 때문이 아니라 융합단백질 자체의 기능으로 세포 내로 침투하는 것임을 확인하였다 (도 2).

[0081] 결과 2: MPP^+ 로 인한 세포사멸에 대한 Tat-PIM2 융합단백질의 억제효과

[0082] 파킨슨병 질환 모델에서 세포사멸 유도인자인 MPP^+ 를 처리하여 세포사멸을 유도하였고, 이때 생성되는 활성산소종을 Tat-PIM2가 효과적으로 억제하는지 확인하기 위하여 세포 내에 생성된 활성산소종과 H_2DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)가 세포 내에서 가수분해되어 불투과성의 H_2DCF (2',7'-dichlorofluorescein)가 반응하여 산화되면서 DCF (2',7'-dichloro-fluorescein)를 형성해 녹색 형광을 나타내는 원리의 DCF-DA 염색법을 수행했다. MPP^+ 를 단일 처리한 세포에서는 활성산소종이 생성되어 녹색 형광을 나타내는 반면, Tat-PIM2 융합단백질을 전처리하였을 경우 세포 내의 활성산소종 생성이 억제되는 것을 형광현미경을 통해 확인하였다 (도 4). 그리고, 활성산소종으로 인하여 유도되는 DNA 단편화를 확인하기 위해 잘려진 DNA 단편에 형광 안료를 부착함으로써 DNA 단편화를 확인하는 TUNEL 염색법을 수행하였다. DCF-DA 염색법과 마찬가지로 MPP^+ 를 단일 처리하여 증가한 DNA 단편화가 Tat-PIM2 융합단백질을 처리하였을 경우 매우 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다 (도 5).

[0084] 결과 3: 세포침투성 Tat-PIM2 융합 단백질의 파킨슨병 동물 모델에서의 보호효과

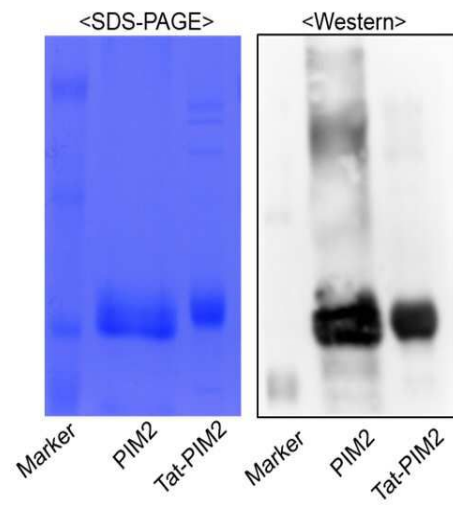
[0085] 파킨슨병에 대한 세포 침투성 Tat-PIM2 융합 단백질의 보호효능을 알아보기 위해 C57BL/6 수컷 마우스를 이용하여, 먼저 Tat-PIM2 융합단백질과 PIM2 단백질을 각각 2mg/kg 복강주사하고, 파킨슨병을 유도하는 MPTP를 복강주사해 파킨슨병 동물모델을 제작하였다.

[0086] 융합단백질이 혈관 뇌 장벽 (Blood brain barrier)을 통과해 도파민성 신경세포가 존재하는 흑질(SN) 지역에 침투하는지 확인하였다. 조직면역형광염색을 통해 확인한 결과, 대조군 PIM2 단백질은 침투하지 않았으나, Tat-PIM2 융합단백질을 처리한 경우 효과적으로 뇌 조직으로 침투하였음을 확인하였다 (도 6). 뇌 조직으로 침투한 Tat-PIM2 융합단백질이 파킨슨병에 대해 보호효과를 나타내는지 살아있는 세포만을 염색하는 CV (Cresyl Violet) 염색 (도 7)과 도파민성 신경세포의 표지자인 TH (Tyrosine Hydroxylase) 염색 (도 8)을 면역조직염색법으로 확인하였다. 파킨슨병을 유도한 후 4일간 Tat-PIM2 융합단백질을 처리한 동물에서는 도파민성 신경세포 사멸에 대한 보호효과가 나타났으며, 반면 대조군 PIM2 단백질을 처리한 동물에서는 세포사멸에 대한 보호효과가 전혀 나타나지 않았다 (도 7, 도 8). 이를 민감도가 뛰어난 면역형광조직염색법을 통하여 좀 더 확실하게 확인하였다 (도 9).

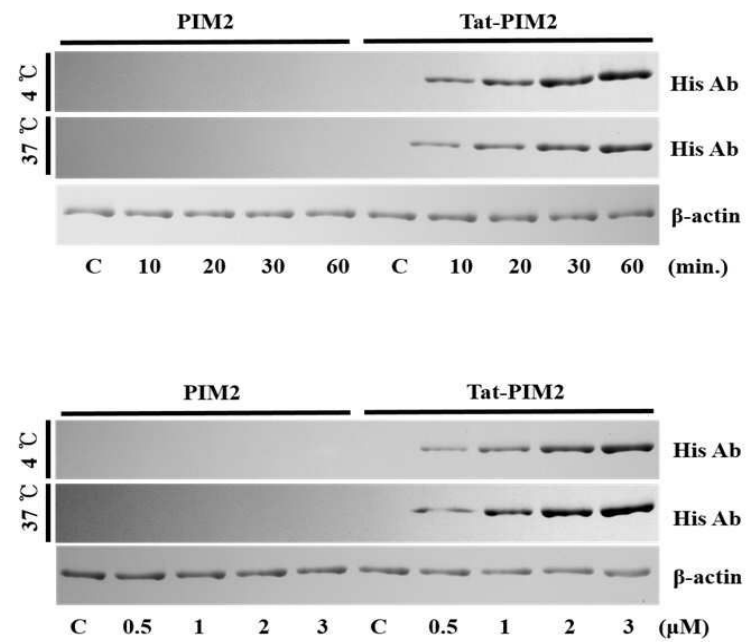
[0087] 이러한 결과로부터, Tat-PIM2 융합단백질이 세포 및 조직으로 효과적으로 침투하여 MPP^+ 와 MPTP로 인한 도파민성 신경세포사멸 및 파킨슨병에 대하여 보호효과가 있음을 확인하였고, 따라서 본 발명자들은 Tat-PIM2 융합단백질이 파킨슨병의 치료제로서 가능성이 있음을 제시한다.

도면

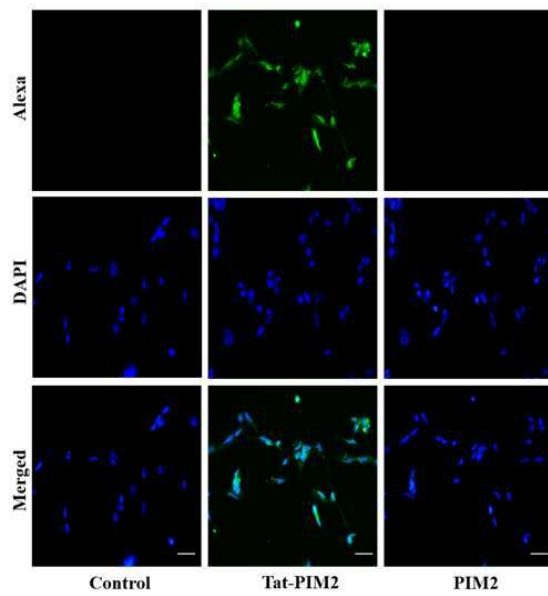
도면1



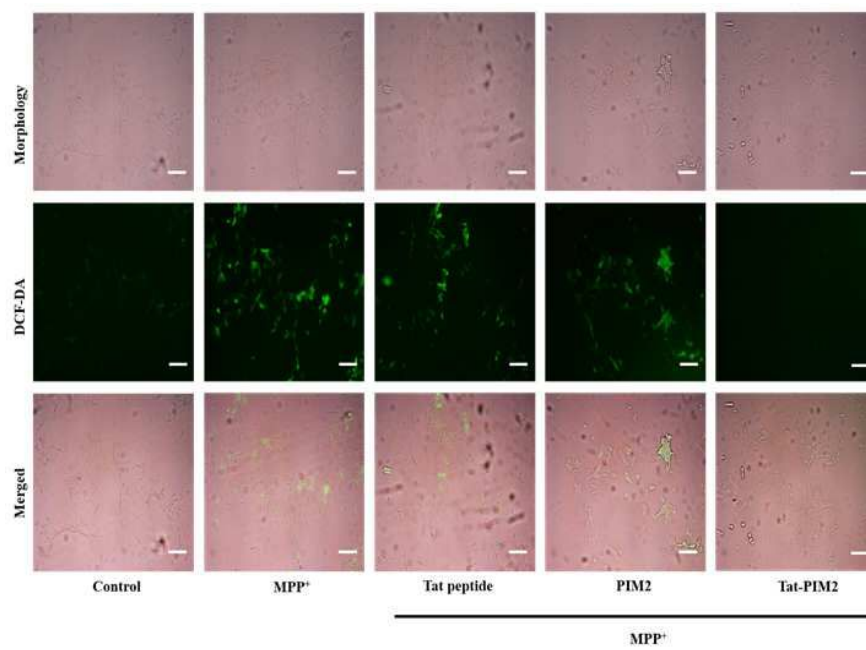
도면2



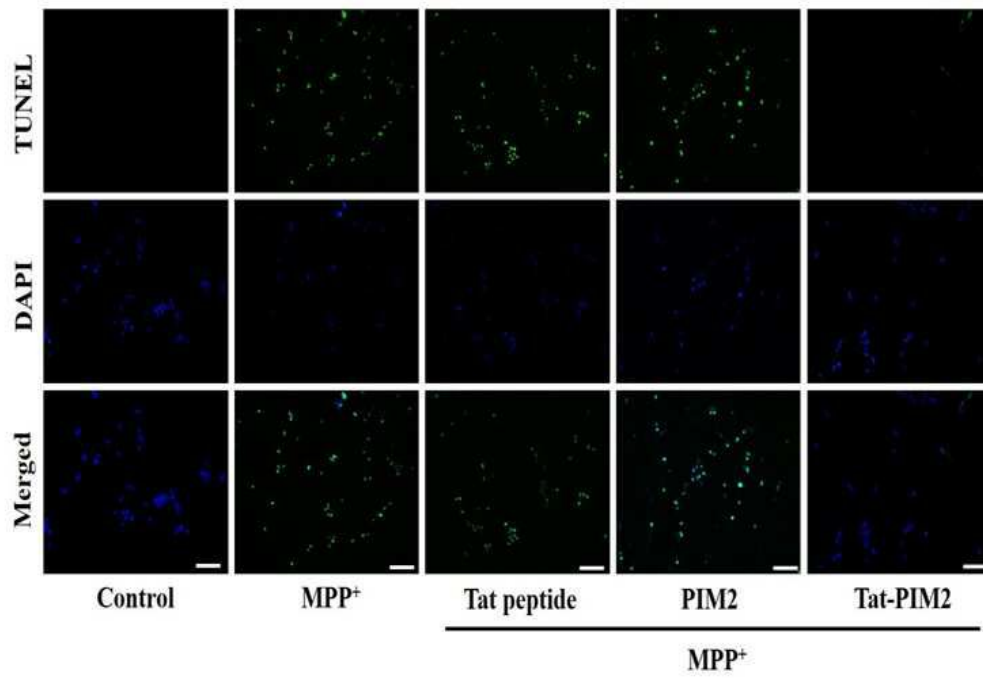
도면3



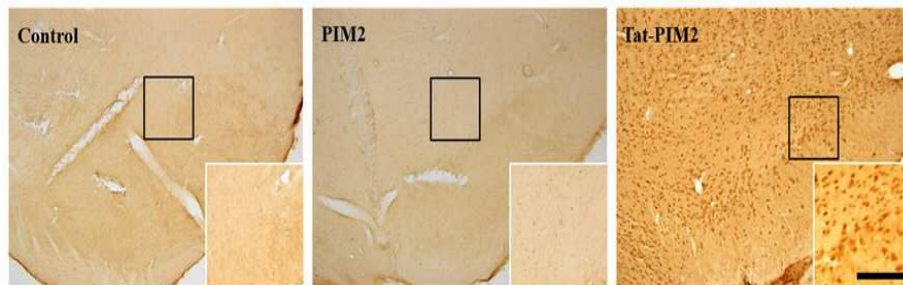
도면4



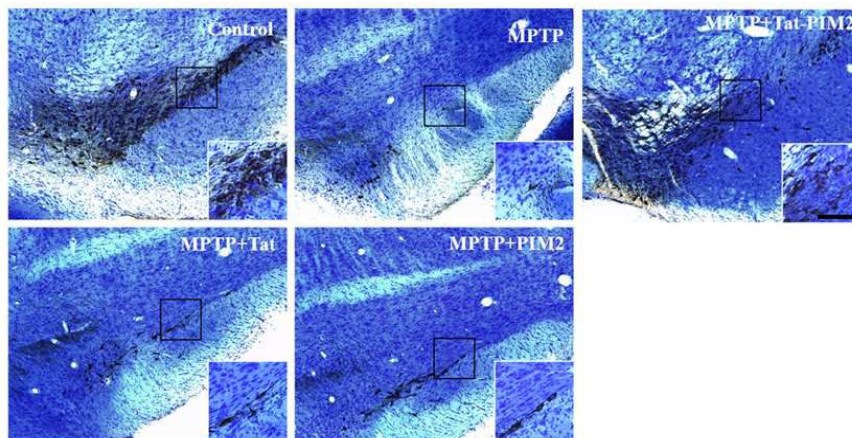
도면5



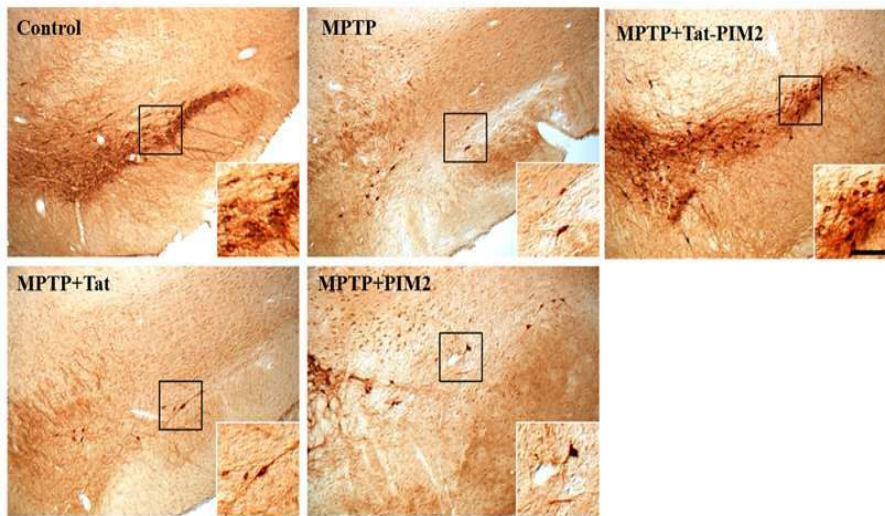
도면6



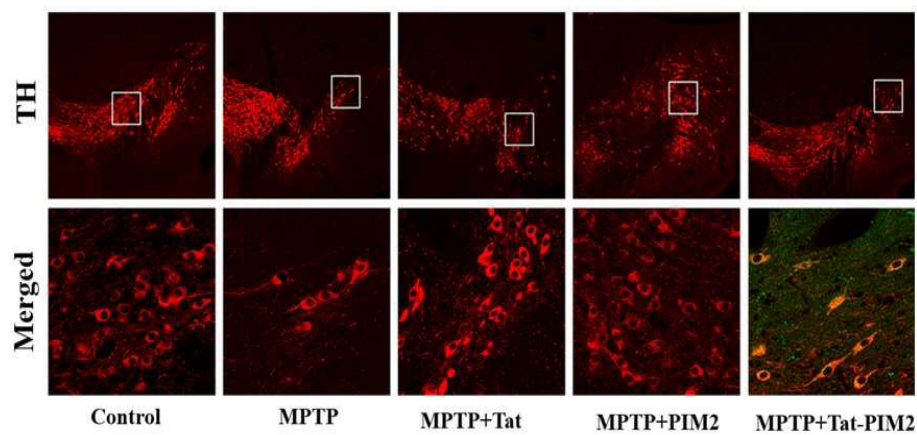
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for treating ischemia containing
cell-transducible PIM2 fusion protein
- <130> HallymU-20140417-SYCHOI-PIM2
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> human immunodeficiency virus
- <400> 1

taggaagaag cggagacagc gacgaagac	29
<210> 2	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Human immunodeficiency virus	
<400> 2	
tcgagtcttc gtcgctgtct ccgcttcttc c	31
<210> 3	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
ctcgagatgt tgaccaagcc tctac	25
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
ggatccttag ggtagcaagg acca	24
<210> 5	
<211> 1005	
<212> DNA	
<	
213> Artificial Sequence	
<220><223> polynucleotide encoding Tat-PIM2 fusion protein	
<400> 5	
agcagcggcc tggcgccg cggcagccat aggaagaagc ggagacagcg acgaagactc	60
gagatgttga ccaagcctct acaggggcct cccgcgcccc ccgggacccc cagccgcccg	120
ccaggaggca aggatcgga agcgttcgag gccgagtatc gactcgcccc cctcctgggt	180
aaggggggct ttggcacctt cttcgagga caccgcctca cagatcgact ccagggtggcc	240
atcaaagtga ttccccggaa tcgtgtgctg ggctgggtccc cttgtcaga ctcagtcaca	300

tgcccactcg aagtcgcact gctatggaaa gtgggtgcag gtgggtggca ccctggcgtg 360

atccgcctgc ttgactggtt tgagacacag gagggcttca tgctggtcct cgagcggcct 420

ttgcccgccc aggatctctt tgactatata acagagaagg gccactggg tgaaggccca 480

agccgctgct tctttggcca agtagtggca gccatccagc actgccattc ccgtggagtt 540

gtccatcgtg acatcaagga tgagaacatc ctgatatgac tacgccgtgg ctgtgccaaa 600

ctcattgatt ttggttctgg tgccctgctt catgatgaac cctacactga ctttgatggg 660

acaagggtgt acagccccc agagtggatc tctcgacacc agtaccatgc actcccggcc 720

actgtctggt cactgggcat cctctctat gacatggtgt gtggggacat tccctttgag 780

agggaccagg agattctgga agctgagctc cacttcccag cccatgtctc ccagactgc 840

tgtgccctaa tccgccgtg cctggccccc aaaccttctt cccgaccctc actggaagag 900

atcctgctgg acccctggat gcaaacacca gccgaggatg taccctcaa cccctccaaa 960

ggaggccctg cccctttggc ctggctcttg ctaccctaag gatcc 1005

<210> 6

<211> 322

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-PIM2 fusion protein

<400> 6

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Leu Thr Lys Pro

1 5 10 15

Leu Gln Gly Pro Pro Ala Pro Pro Gly Thr Pro Thr Pro Pro Pro Gly

20 25 30

Gly Lys Asp Arg Glu Ala Phe Glu Ala Glu Tyr Arg Leu Gly Pro Leu

35 40 45

Leu Gly Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Phe Ala Gly His Arg Leu Thr

50 55 60

Asp Arg Leu Gln Val Ala Ile Lys Val Ile Pro Arg Asn Arg Val Leu

65 70 75 80

Gly Trp Ser Pro Leu Ser Asp Ser Val Thr Cys Pro Leu Glu Val Ala

85 90 95

Leu Leu Trp Lys Val Gly Ala Gly Gly His Pro Gly Val Ile Arg

100	105	110	
Leu Leu Asp Trp Phe Glu Thr Gln Glu Gly Phe Met Leu Val Leu Glu			
115	120	125	
Arg Pro Leu Pro Ala Gln Asp Leu Phe Asp Tyr Ile Thr Glu Lys Gly			
130	135	140	
Pro Leu Gly Glu Gly Pro Ser Arg Cys Phe Phe Gly Gln Val Val Ala			
145	150	155	160
Ala Ile Gln His Cys His Ser Arg Gly Val Val His Arg Asp Ile Lys			
165	170	175	
Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Arg Arg Gly Cys Ala Lys Leu Ile			
180	185	190	
Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu His Asp Glu Pro Tyr Thr Asp Phe			
195	200	205	
Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp Ile Ser Arg His Gln			
210	215	220	
Tyr His Ala Leu Pro Ala Thr Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr			
225	230	235	240
Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu Arg Asp Gln Glu Ile Leu			
245	250	255	
Glu Ala Glu Leu His Phe Pro Ala His Val Ser Pro Asp Cys Cys Ala			
260	265	270	
Leu Ile Arg Arg Cys Leu Ala Pro Lys Pro Ser Ser Arg Pro Ser Leu			
275	280	285	
Glu Glu Ile Leu Leu Asp Pro Trp Met Gln Thr Pro Ala Glu Asp Val			
290	295	300	
Pro Leu Asn Pro Ser Lys Gly Gly Pro Ala Pro Leu Ala Trp Ser Leu			
305	310	315	320
Leu Pro			