



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0121754
(43) 공개일자 2015년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0047324

(22) 출원일자 2014년04월21일

심사청구일자 2014년04월21일

(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

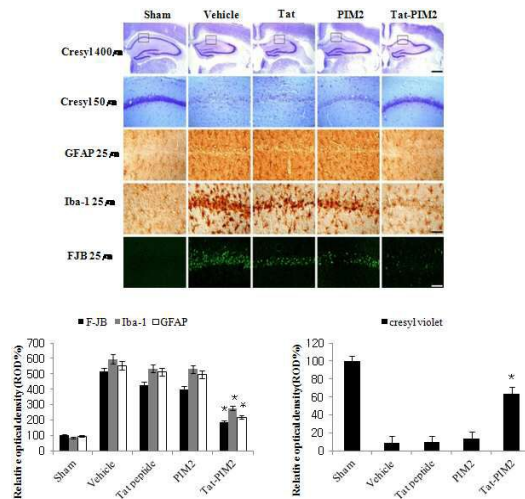
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 세포투과성 PIM2 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물

(57) 요약

PIM2는 일종의 카이네이스로서, 세포 생존에 중요한 역할을 하지만, 뇌허혈에 대한 생물학적 기능은 확실히 알려지지 않았다. 본 발명자들은 산화적 스트레스로 유도된 세포사멸과 뇌허혈에 대한 PIM2 융합단백질의 보호효과에 대하여 연구한 결과, 정제된 Tat-PIM2 융합단백질은 해마 HT22 세포 내로 시간, 농도 의존적으로 투과되었고, 산화적 스트레스에 의한 세포사멸에 대한 보호효과가 있다. 또한 투과된 Tat-PIM2 융합단백질은 DNA 단편화에 대하여 보호효과를 나타내었다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

한규형

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

음원식

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

조용준

강원 춘천시 우석로101번길 86, 110동 802호 (석사동, 석사대우아파트)

조성우

서울 송파구 양재대로 1218, 257동 704호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

김대원

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009051

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 농생명바이오신의약소재개발

연구과제명 누에고치 단백질을 이용한 의료용 실크 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

PIM (Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus)2 단백질의 N-말단에 단백질 수송 도메인 HIV-Tat이 공유결합된 PIM2 융합단백질을 함유하는 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

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

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 세포투과성 PIM2 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 PIM2 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰다. 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 PIM2 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 PIM2 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

배경 기술

[0002]

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 [1]. 그 중 PIM2 단백질은 전사 단계에서 조절되는 종양 유전자 카이네이즈 (oncogenic kinase)로서, 다양한 증식 신호에 대응하여 세포 생존을 촉진한다 [2,34]

[0003]

PIM2의 중요한 기능 중 하나는 세포 생존을 촉진하고 세포 자기사멸을 억제하는 것이다 [2]. PIM2는 112번 아미노산인 세린에서 친세포사멸 단백질 BAD (bcl-2 antagonist of cell death)를 인산화하여 BAD에 의하여 유도되는 세포사멸을 되돌린다 [3,35].

[0004]

뇌허혈 (cerebral ischemia)은 일시적, 혹은 영구적 뇌동맥 폐색에 의한 뇌혈류의 감소로 유발되며, 허혈 부위에서는 복잡한 병태 생리적 과정을 통하여 신경 세포사가 초래되어 비가역적인 신경학적 손상을 일으킨다 [4,5].

[0005]

또한, 활성 산소종(reactive oxygen species: ROS)은 직접 세포손상을 일으키거나, 간접 신호전달체계를 통해 세포손상을 일으킨다. 이와 같이 직·간접적으로 세포손상을 야기하는 활성산소종은 뇌졸중을 포함한 여러 중추신경계 질환에서 병인론적으로 중요한 역할을 하며 특히 과산화 음이온($O_2^{\cdot-}$)이 신경세포의 자기사멸 (apoptosis)을 유도하여 대뇌 허혈의 병태생리학에 중요한 역할을 하는 것으로 많은 연구들에서 보고되고 있다 [6,7].

[0006]

단백질 수송 도메인 (protein transduction domain; PTD)이라 불리는 전달시스템은 특별한 수용체의 도움 없이 자기 자신 혹은 자신과 결합하고 있는 단백질과 함께 세포막을 통과하여 세포 내에 침투한다 [8,9,36,37]. 여러 가지 단백질 수송 도메인 중 본 연구에서 사용한 것은 HIV-1 Tat이다. Tat은 HIV-1의 아미노산 서열 중 “RKRRRQRRR” 부분만을 사용한 것으로 효과적으로 단백질을 세포 내로 침투시킨다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007]

- (비특허문헌 0001) [1] Bachmann M, Moroy T. The serine/threonine kinase Pim-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:726-730.
- (비특허문헌 0002) [2] Jianfei Yang, Xiang Li, Adedayo Hanidu, Tin M. Htut, Rosemarie Sellati, Lian Wang, Huiping Jiang and Jun Li, Proviral integration site 2 is required for interleukin-6 expression induced by interleukin-1, tumour necrosis factor- α and lipopolysaccharide, *Immunology*, 2010, 131, 174-182.
- (비특허문헌 0003) [3] Yan B, Zemskova M, Holder S et al. The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *J Biol Chem* 2003; 278:45358-45367.
- (비특허문헌 0004) [4] Ronen R. Lekera, *, Esther Shohamib, Cerebral ischemia and trauma different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities, *Brain Research Reviews* 39 (2002) 55-73
- (비특허문헌 0005) [5] Ulrich Dirnagla, Costantino Iadecolab, Michael A. Moskowitzc, Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends Neurosci.* (1999) 22, 391-397
- (비특허문헌 0006) [6] Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:2-14.
- (비특허문헌 0007) [7] Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27:1124-9.
- (비특허문헌 0008) [8] J.S. Wadia, S.F. Dowdy, Protein transduction technology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 52-56.
- (비특허문헌 0009) [9] J.J. An, Y.P. Lee, S.Y. Kim, S.H. Lee, M.J. Lee, M.S. Jeong, D.W. Kim, S.H. Jang, K.Y. Yoo, M.H. Won, T.C. Kang, O.S. Kwon, S.W. Cho, K.S. Lee, J. Park, W.S. Eum, S.Y. Choi, Transduced human PEP-1-heat shock protein 27 efficiently protects against brain ischemic insult, *FEBS J.* 275 (2008) 1296-1308.
- (비특허문헌 0010) [10] Zhong-Yan Zhao,^{1,2} Ping Luan,³ Shi-Xiong Huang,² Song-Hua Xiao,¹ Jia Zhao,¹ Bei Zhang,¹ Bei-Bei Gu,¹ Rong-Biao Pi⁴ & Jun Liu¹, Edaravone Protects HT22 Neurons from H₂O₂-Induced Apoptosis by Inhibiting the MAPK Signaling Pathway, *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19 (2013) 163-169
- (비특허문헌 0011) [11] Sigurd Braun¹, Wolfgang Liebetrau², Barbara Berning, Christian Behl, Dexamethasone-enhanced sensitivity of mouse hippocampal HT22 cells for oxidative stress is associated with the suppression of nuclear factor- κ B, *Neuroscience Letters* 295 (2000) 101-104
- (비특허문헌 0012) [12] Casey J. Fox,^{1,2} Peter S. Hammerman,^{1,2} Ryan M. Cinalli,^{1,2} Stephen R. Master,^{1,3} Lewis A. Chodosh,^{1,2,3} and Craig B. Thompson^{1,2,3,4}, The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor, *GENES & DEVELOPMENT* (2003) 17:1841-1854
- (비특허문헌 0013) [13] Eileen White, The pims and outs of survival signaling: role for the Pim-2 protein kinase in the suppression of apoptosis by cytokines, *Genes Dev.* 2003 17: 1813-1816
- (비특허문헌 0014) [14] Lee, M.J.; Kim, D.W.; Sohn, E.J.; Jeong, H.J.; Shin, M.J.; Kang, H.W.; Ahn, E.H.; Kwon, S.W.; Kim, Y.N.; Won, M.H.; Kim, J.; Cho, S.W.; Kang, T.C.; Han, K.H.; Park, J.; Eum, W.S.; Choi, S.Y. Anti-inflammatory effect of transduced PEP-1-cyclophilinA in Raw264.7 cells and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced mice. *Life Sci.* 89:896-904;2011.
- (비특허문헌 0015) [15] Kim, S. Y.; Sohn, E. J.; Kim, D.W.; Jeong, H. J.; Kim, M. J.; Kang, H. W.; Shin, M. J.; Ahn, E. H.; Kwon, S.W.; Kim, Y. N.; Kwon, H. J.; Kim, T. Y.; Lee, K. S.; Park, J.; Eum, W.S.; Choi, S.Y. Transduced PEP-1-FK506BP ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J. Invest. Dermatol.* 131:1477-1485;2011.
- (비특허문헌 0016) [16] Li, Q.; Verma, I.M. NF- κ B regulation in the immunesystem. *Immunology* 2:725-

734;2002

(비특허문헌 0017) [17] David A. Patten; Marc Germain; Melissa A. Kelly; Ruth S. Slack. Reactive Oxygen Species: Stuck in the middle of Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*.20:S357-S367;2010.

(비특허문헌 0018) [18] Der-Fen Suen; Kristi L. Norris; Richard J. Youle. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes&Development*.22:1577-1590;2008.

(비특허문헌 0019) [19] P.H. Chan, Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21 (2001) 2-4.

(비특허문헌 0020) [20] Y. Numagami, S. Sato, S.T. Ohnishi, Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants, *Neurochem. Int.* 29 (1996) 135-143.

(비특허문헌 0021) [21] J.L. Pierre, M. Fontecave, Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry, *Biometals* 12 (1999) 195-199.

(비특허문헌 0022) [22] Floyd, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEBJ* 4:2587-2597;1990.

(비특허문헌 0023) [23] Ulrich Dirnagl, Costantino Iadecola and Michael A. Moskowitz, Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends Neurosci.* (1999) 22, 391-397

(비특허문헌 0024) [24] L. Philip, K. Shivakumar, cIAP-2 protects cardiac fibroblasts from oxidative damage: An obligate regulatory role for ERK1/2 MAPK and NF- κ B, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 62 (2013) 217-226

(비특허문헌 0025) [25] J.S. Wadia, S.F. Dowdy, Protein transduction technology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 52-56.

(비특허문헌 0026) [26] E.H. Ahn, D.W. Kim, H.W. Kang, M.J. Shin, M.H. Won, J. Kim, D.J. Kim, O.S. Kwon, T.C. Kang, K.H. Han, J. Park, W.S. Eum, S.Y. Choi, Transduced PEP-1-ribosomal protein S3 (rpS3) ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice, *Toxicol.* 276 (2010) 192-197.

(비특허문헌 0027) [27] Moistafa, M., Saleh, R., Oder, M., Sharma, R., Abdel-Hafez, M., Agarwal, A. Levels of seminal reactive oxygen species(ROS) are highly correlated with apoptosis in ejaculated spermatozoa from infertile men. *Fertil. Steril.*, Sep. 78(S1):S167, 2002.

(비특허문헌 0028) [28] Cheng, C. Y., S. Y. SY, N. Y. Tang, T. Y. Ho, S. Y. Chiang, and C. L. Hsieh. 2008b. Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats. *Brain Res.* 13: 136-150.

(비특허문헌 0029) [29] J.M. Ordy, T.M. Wengenack, P. Bialobok, P.D. Coleman, P. Rodier, R.B. Baggs, W.P. Dunlap, B. Kates, Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia, *Exp. Neurol.* 119 (1993) 1281-139.

(비특허문헌 0030) [30] Zong, W. X.; Lindsten, T.; Ross, A. J.; MacGregor, G. R.; Thompson, C. B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *GenesDev.*15:1481-1486;2001.

(비특허문헌 0031) [31] Kim, B. H.; Lee, H. G.; Choi, J. K.; Kim, J. I.; Choi, E. K.; Carp, R. I.; Kim, Y. S. The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondria dysfunction induced by serum deprivation. *Mol.BrainRes.*124:40-50;2004

(비특허문헌 0032) [32] Anke Post, Florian Holsboer, and Christian Behl ,Induction of NF- κ B Activity during Haloperidol-Induced Oxidative Toxicity in Clonal Hippocampal Cells: Suppression of NF- κ B and

Neuroprotection by Antioxidants, The Journal of Neuroscience, October 15, 1998, 18(20):8236-8246

(비특허문헌 0033) [33] Tiannan Wang^{1,2}, Wenju Cui^{1,2}, Yicheng Xie^{1,2}, Weiping Zhang^{2,3}, Shinghua Ding^{1,2}, Controlling the Volume of the Focal Cerebral Ischemic Lesion through Photothrombosis, Am. J. Biomed. Sci. 2010, 2(1), 33-42

(비특허문헌 0034) [34] Wang Z, Bhattacharya N, Weaver M, Petersen K, Meyer M, Gapter L, Magnuson NS. Pim-1: A serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. J Vet Sci 2001;2(3):167-169

(비특허문헌 0035) [35] Lilly M, Sandholm J, Cooper JJ, Koskinen PJ, Kraft A. The PIM-1 serine kinase prolongs survival and inhibits apoptosis-related mitochondrial dysfunction in part through a bcl-2-dependent pathway. Oncogene 1999;18:4022.

(비특허문헌 0036) [36] W.S. Eum, D.W. Kim, I.K. Hwang, K.Y. Yoo, T.C. Kang, S.H. Jang, H.S. Choi, S.H. Choi, Y.H. Kim, S.Y. Kim, H.Y. Kwon, J.H. Kang, O.S. Kwon, S.W. Cho, K.S. Lee, J. Park, M.H. Won, S.Y. Choi, In vivo protein transduction: biologically active intact PEP-1-superoxide dismutase fusion protein efficiently protects against ischemic insult, Free Radic. Biol. Med. 37 (2004) 1656-1669.

(비특허문헌 0037) [37] J. Wadia, S.F. Dowdy Protein transduction technology Curr. Opin. Biotechnol., 13 (2002), pp. 52-56

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 허혈손상 및 허혈손상에 의한 신경세포 손상 및 사멸을 치료하기 위한 효과적인 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] PIM (Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus) 카이네이즈는 PIM1, PIM2 및 PIM3 카이네이즈로 이루어진 세린/트레오닌-특이적 카이네이즈이다 [2]. 다양한 조혈성장인자의 전사 타겟 중 하나가 세린/트레오닌 카이네이즈인 PIM2이다 [12]. PIM2는 레트로바이러스에 의해 유도되는 쥐 백혈병에서 바이러스 삽입 부위로 확인되었다 [1]. PIM2의 세포 생존을 촉진하는 능력은 bcl-2 단백질 패밀리의 항-세포자기사멸 멤버에 의해 매개되는 것과는 메카니즘상 구별된다 [13].

[0010] 본 발명자들은 인 비트로와 인 비보 실험에서 세포 투과능이 있는 Tat-PIM2 융합단백질을 이용하여 이 융합단백질이 신경세포 손상에 대하여 보호효과가 있음을 밝혔다. BL21 (DE3)에서 과대발현한 후 정제한 Tat-PIM2 융합단백질은 SDS-PAGE와 항-토끼 폴리히스티딘 항체를 사용하여 웨스턴 블랏팅하여 확인하였다. Tat-PIM2 융합단백질은 95% 이상 정제되었고, SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였다. 정제된 Tat-PIM2 융합단백질은 농도 및 시간 의존적으로 헤마 신경세포인 HT22 세포 안으로 효과적으로 투과되었다.

[0011] 단백질 수송 도메인은 전체 길이의 단백질 기능을 촉진하고, 직접 다양한 세포주들과 조직 내로 단백질을 이동시킬 수 있는 작은 펩타이드이다. 우리는 DAPI ((4',6-diamidino-2-phenylindole)와 Alexa 형광물질을 사용하여 Tat-PIM2 융합단백질의 세포 내 위치를 확인하였다. 그 결과, Tat-PIM2 융합단백질은 세포 내로 효과적으로 투과됨을 확인할 수 있었다.

[0012] 산화 스트레스는 활성산소종 (Reactive Oxygen Species)의 증가와 항산화 방어시스템의 기능손상 사이에서의 불균형과 같이 정의된다. 활성산소종은 일반적으로 슈퍼옥사이드 음이온 (superoxide anion), 수산화 라디칼 (hydroxyl radicals), 과산화수소 (H_2O_2) 등과 같은 종류들이 있고, 이것들은 세포 내의 DNA, 단백질, 지방과 같은 다양한 분자들에 대해 반응하여 손상을 줄 수 있다 [27, 28].

[0013] 본 발명자들은 과산화수소를 처리하여 세포에 손상을 일으킨 후, 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질에 의한 HT22 세포의 생존율을 확인하였다. 1mM H_2O_2 에 의해 세포 사멸이 일어나지 않고 살아남은 세포는 45%였다. 하지만 Tat-PIM2 융합단백질을 먼저 처리한 다음 H_2O_2 에 노출된 세포의 생존율은 최대 78%까지 증가한 것을 확인할

수 있었다.

- [0014] 활성산소종은 다양한 세포의 신호전달 경로에서 신호전달 분자와 같은 역할을 하고 있다. MAPKs (Mitogen-activated protein kinases)는 구조적인 차이를 기본으로 하여 ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase), p38 카이네이즈의 세 가지로 구분된다. 이러한 MAPKs 경로와 Akt는 산화적 스트레스에 의해 활성화되어 세포자기사멸 (apoptosis)과 관련되어 있다 [24]. 그리하여 H₂O₂로 자극을 받아 세포자기사멸이 유도된 HT22 세포의 신호전달경로를 확인하였다. 그 결과, 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질이 p38, ERK, JNK, Akt의 활성을 억제하는 것을 확인함으로써 산화적 스트레스로 유도된 세포자기사멸을 억제한다는 것을 확인하였다.
- [0015] 또한, NF-κB는 활성산소종에 의해 유발되는 산화 스트레스에 의하여 활성화된다 [32]. 대부분의 세포에서 가장 흔한 이량체 (dimer)는 포유류 NF-κB 형태의 호모 이량체 및 헤테로 이량체, 그리고 p50/p65 헤테로 이량체이다. NF-κB는 자극 받은 세포에서 인산화-매개 분해되어 IκB가 생성된다. 본 발명에서 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질은 IκB 인산화 및 IκB 생성을 저해한다 [14-16].
- [0016] 산화 스트레스와 과도한 활성산소종의 발생은 미토콘드리아의 기능 장애를 일으킨다고 보고된바 있다. 미토콘드리아의 기능 장애는 신경퇴행성 질환의 중요한 병인으로 작용한다 [17,18]. 뿐만 아니라, Bax (apoptotic activator)와 bcl-2 (apoptotic inhibitor-2) 같은 Bcl-2 패밀리는 세포사멸에서 중요한 기능을 수행한다. bax 활성화는 세포사멸에서 미토콘드리아 기능장애에 필수적이다. 따라서, bax : bcl-2 비는 세포사멸을 조절하는 중요한 포인트이다 [30,31]. 흥미롭게도, 본 발명자들은 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질이 bcl-2를 활성화함으로써 세포사멸에 대하여 세포를 보호함을 밝혔다. 이 결과와 일치하게, 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질은 bcl-2 발현을 현저히 증가시켰고, 과산화수소에 의해 유도되는 신경독성에 대해 세포를 보호하였다.
- [0017] 우리는 활성산소종에 민감한 안료인 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 사용하여 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질이 H₂O₂에 의해 유도된 활성산소종 수준을 억제할 수 있는지 확인하였다. 또한, 우리는 세포 안에서의 DNA 단편화 (fragmentation) 정도를 확인하기 위하여 TUNEL 염색을 수행하였다. 과산화수소를 처리한 세포에서 TUNEL-양성 세포의 수는 대조군 세포에서보다 더 많았다. DNA 단편화는 산화 스트레스를 포함한 다양한 요소에 의해 일어난다. 이러한 결과는 산화 스트레스로 유도된 세포사멸이 투과된 Tat-PIM2 융합단백질에 의해 저해됨을 보여준다 [21,22].
- [0018] 뇌허혈 손상은 혈류의 감소, 산소 부족, 뇌허혈 재관류에 따른 연이은 재산화 때문에 일어난다 [19,23]. 허혈로 인한 신경세포의 손상에 대한 정확한 메카니즘이 정확히 알려진 바는 없지만, 신경세포 손상 메카니즘 중 하나는 신경퇴행을 일으키는 활성산소종에 의한 세포 내의 산화 손상이다 [20].
- [0019] 본 발명자들은 Tat-PIM2 융합단백질을 저빌 마우스에 복강주사하여 30분 후에 뇌혈관이 막힘으로써 일어나는 신경세포사멸에 대하여 Tat-PIM2 융합단백질에 의한 보호효과가 있는지 관찰하였다. 허혈 발생 4일 후에 Tat-PIM2 융합단백질에 의해 신경에 대한 보호효과가 있는지 면역조직화학으로 확인하였다. Tat-PIM2 융합단백질 처리군의 해마 CA1 부위의 신경세포는 담체 처리군, 대조군 PIM2 단백질 처리군, Tat 썬타이드 처리군, 삼 수술군과 비교했을 때 뚜렷하게 생존율이 증가하였다. 또한 Tat-PIM2 융합단백질 처리군에서 정상세포와 소교세포 (microglial cell)를 GFAP와 Iba-1, FJB 항체를 이용하여 염색을 실시한 결과, 허혈 손상으로 인한 정상세포와 소교세포의 분화 및 성장과 신경세포 손상이 Tat-PIM2 융합단백질에 의해 억제되는 것을 확인하였다 [29,33].
- [0020] 이러한 결과를 바탕으로, 우리는 Tat 단백질 수송 도메인을 융합한 Tat-PIM2 융합단백질을 제조하여 인 비트로와 인 비보에서 효과적으로 세포 및 조직에 전달하여 산화 스트레스와 뇌 허혈 손상에 의한 활성산소종을 억제함으로써 세포치료에 대한 가능성을 확인하였다. 따라서, Tat-PIM2 융합단백질은 뇌졸중을 포함한 다양한 질병에서 새로운 치료제로서의 역할을 할 것으로 기대된다.
- [0021] 본 발명은 PIM2 단백질의 N-말단에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 PIM2 융합단백질을 함유하는 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 융합단백질이 서열번호 6인 것을 특징으로 하는 PIM2 융합단백질을 함유하는 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

- [0023] 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, 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 봉해제(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 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.
- [0024] 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~10mg/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.
- [0025] 본 발명에 따른 PIM2 단백질 분자의 세포 내 전달은 PIM2에 HIV Tat 세포투과성 도메인이 목표 단백질인 PIM2의 N-말단과 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 수송도메인의 일례로는 HIV Tat 49~57 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 49~57 잔기 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, HIV Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결어로 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 스페이스(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.
- [0026] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0027] "PIM2 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 PIM2를 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 PIM2를 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서 구체적인 일 실시예로서 "Tat-PIM2"는 PIM2 융합단백질 중 PIM2의 N-말단에 Tat 단백질 수송 도메인이 결합한 것을 말한다.
- [0028] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0029] 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.
- [0030] 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.
- [0031] 본 명세서의 "목표 단백질"은 Tat 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.
- [0032] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0033]

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 PIM2이다. 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 융합단백질과 아미노산 서열간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내에서 동일·유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

발명의 효과

[0034]

본 발명에서 세포 내로 투과된 PIM2 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰으며, 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 PIM2 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 PIM2 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료 효과가 있음을 말해주며, 세포 투과성 PIM2 융합단백질이 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물로 유용함을 말해준다.

도면의 간단한 설명

[0035]

도 1은 Tat-PIM2 융합단백질 정제를 나타낸다. Tat-PIM2 융합단백질 구축을 위한 맵은 pET15-b 벡터를 기본으로 하여 단백질은 BL21(DE3)에서 IPTG로 유도하여 발현시켰다. (A) Tat 올리고뉴클레오타이드는 pET-15b 다중 클로닝 부위의 NdeI 부위와 XhoI 부위 사이에 삽입하였고, 인간 PIM2 cDNA는 XhoI 부위와 BamHI 부위 사이에 삽입하였다. 대조군 PIM2 단백질 구축을 위해서는 Tat 올리고머를 삽입하지 않았다. (B) 발현된 대조군 PIM2 단백질과 Tat-PIM2 융합단백질의 다이어그램이다. 각 단백질들은 N-말단에 여섯 개의 히스티딘 잔기를 갖고 있다. (C) E.coli 전체 추출물과 정제된 Tat-PIM2 융합단백질을 12% SDS-PAGE에서 분리하여 항-토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏팅하여 확인하였다. (D) 대조군 PIM2 단백질 또한 똑같은 방법으로 확인하였다.

도 2는 HT22 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질을 나타낸다. (A) Tat-PIM2 융합단백질과 대조군 PIM2 단백질을 60분간 0.2~0.8 μ M로 배양배지에 처리한 결과이다. (B) Tat-PIM2 융합단백질과 대조군 PIM2 단백질을 120분간 처리한 결과이다. (C) 투과된 융합단백질이 HT22 세포 내에 얼마나 오랫동안 잔존하는지를 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. (D) 투과된 융합단백질을 형광현미경으로 확인하였다. 크기 막대= 20 μ m.

도 3은 HT22 세포에서 AKT, MAPK 및 NF- κ B에 대한 Tat-PIM2 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. (A), (B) 세포를 Tat-PIM2 융합단백질 및 대조군 PIM2 단백질로 한 시간 동안 미리 처리 (0.2~0.8 μ M)하고 과산화수소에 20분간 노출하였다. 세포 추출물을 제조하여 웨스턴 블랏팅으로 MAP 카이네이즈와 Akt 활성을 분석하였다. (C) HT22 세포는 두 시간 동안 Tat-PIM2 융합단백질로 처리하거나 또는 처리하지 않고 20분간 과산화수소로 자극하였다. p65의 핵 내로의 전이와 인산화, 그리고 I κ B α 의 분해를 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다.

도 4는 Bcl-2에 대한 Bax의 비율에 미치는 Tat-PIM2 융합단백질의 효과를 나타낸다. (A) 세포는 Tat-PIM2 융합단백질 및 대조군 PIM2 단백질 (0.2~0.8 μ M)로 한 시간 동안 미리 처리한 후 과산화수소에 50분간 노출하였다. 동량의 세포 전체 추출물을 SDS-PAGE로 분리하고 Bax와 Bcl-2를 웨스턴 블랏 분석으로 탐지하였다. β -액틴은 대조군으로 이용하였다.

도 5는 생존율, 세포내 활성산소종 수준 및 DNA 단편화와 같은 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포 과정에 미치는 Tat-PIM2 융합단백질의 효과를 나타낸다. (A) Tat-PIM2 융합단백질을 HT22 세포에 미리 처리한 후 1mM 과

산화수소를 배양 배지에 가하였다. 세포 생존율은 MTT를 이용한 발색 분석으로 평가하였다. 이 결과들은 최소한 세 번의 독립적인 실험에서 얻어진 값이다. *P < 0.05, **P < 0.01은 과산화수소 처리 세포와 비교한 값이다. (B) 세포 내 활성산소종 증가로 DCF-DA가 산화되어 DCF-형광이 증가하였다. (C) DNA 단편화는 TUNEL 염색으로 탐지하였다. 사진은 형광현미경으로 촬영하였다. 이 결과들은 최소 세 번의 독립적인 실험결과에서 얻은 것이다. **P < 0.01은 과산화수소 처리 세포와 비교한 값이다. 크기 막대 = 50 μ m.

도 6은 뇌허혈 발작 후 Tat-PIM2 융합단백질에 의한 정상세포와 소교세포의 감소를 나타낸다. 허혈/재관류 7일 후 대조군 (A와 B), 허혈군 (C와 D), Tat 펩타이드 처리군 (E와 F), PIM2 단백질 처리군 (G와 H) 및 Tat-PIM2 융합단백질 처리군 (I와 J)의 CA1 부위에서 GFAP (A, C, E, G와 I) 및 Iba-1 (B, D, F, H와 J)과 FJB의 면역화학 결과이다. SP, 추체세포층 (stratum pyramidale); SO, 상행층 (stratum oriens); SR, 방사층 (stratum radiatum). 크기막대 = 50 μ m.

도 7은 Tat-PIM2 융합단백질이 조직 내로 효과적으로 침투하는지를 확인한 것이다. (A) 허혈/재관류 4일 후 NeuN, 히스틴 항체에 대해 면역조직화학 및 DAPI ((4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색을 함께하여 확인하였다. 대조군의 해마 CA1 부분 <A>, 뇌허혈군 , Tat 펩타이드 처리군 <C>, PIM2 단백질 처리군 <D>, Tat-PIM2 융합단백질 처리군 <E>. SP, 추체세포층 (stratum pyramidale); SO, 상행층 (stratum oriens); SR, 방사층 (stratum radiatum). 크기막대 = 50 μ m. <F>: 모든 군에서 절편당 NeuN-면역활성 뉴런의 상대적인 수 vs. 대조군을 비교한 것 (각 군의 n = 5; *P < 0.05는 대조군과 현저한 차이를 나타냄, #P < 0.05는 허혈군과 현저한 차이를 나타냄). 막대는 평균과의 표준편차를 나타낸다 (B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하에서는 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.

실시예 1: Tat-PIM2 융합단백질 발현과 정제

Tat-PIM2 융합 단백질을 생산하기 위하여 우선, HIV-1 Tat의 염기성 도메인 (아미노산 49-57)이 포함된 pET-Tat 발현벡터를 만들었다. Tat 염기성 도메인에 해당하는 두 종류의 올리고뉴클레오타이드 (상위 쇄, 5'-TAGGAAGAAGCGGAGA CAGCGACGAAGAC-3'; 하위 쇄, 5'-TCGAGTCTTCGTCGCTGTCT CCGCTTCTTC-3')를 *NdeI-XhoI* 제한효소로 자른 pET15b에 연결하여 삽입하였다.

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

중합효소 연쇄반응(PCR)은 온열 순환기(Perkin-Elmer, model 9600)에서 수행하였으며, 반응 혼합액을 50 μ l 실리콘 튜브에 넣고 94℃에서 5분간 가열하였다. PCR 반응은 94℃에서 40초간 30사이클의 연장(extension), 54℃에서 1분간 변성(denaturation), 70℃에서 3분간 어닐링(annealing), 그리고 72℃에서 10분, 20℃에서 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℃에서 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℃에서 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 Ni²⁺-니트릴로 트리아세트산 세파로즈 슈퍼플로우(Ni²⁺-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.

[0041] 유사한 방법으로 Tat 단백질 수송 도메인이 결합되지 않은 대조군 PIM2 단백질을 생산하였다.

[0042] Tat-PIM2 융합단백질의 효소 활성은 상업적으로 판매하는 Fluorimetric Drug Discovery kit (EnzoLifeSciences, Farmingdale, NY, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0043] **실시예 2: TAT-PIM2 융합단백질의 HT22 세포로의 도입**

[0044] 마우스 해마 신경세포 HT22는 37℃, 95% 공기 및 5% CO₂의 조건을 유지해주며, 10% 우태혈청 (FBS) 및 5 mM NaHCO₃, 항생제 (100 mg/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린), 20 mM HEPES/NaOH (pH 7.4)으로 구성된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 이용하여 37 °C, 95% 공기, 5% 이산화탄소의 습한 조건에서 배양하였다.

[0045] TAT-PIM2 융합단백질의 세포 투과를 시험하기 위하여, 세포에 다양한 농도의 TAT-PIM2 융합단백질 (0.2~ 0.8 μM)을 가하여 두 시간 동안 처리하였다. 그 후 세포는 트립신-EDTA가 포함된 PBS로 워싱하고 세포 추출물을 하비스트하여 웨스턴 블랏에 이용하였다.

[0046] **실시예 3: 웨스턴 블랏 분석**

[0047] 세포 용균액 내의 단백질은 12% SDS-PAGE로 분리한 다음 나이트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 막은 5% 탈지유가 함유된 PBS 완충액으로 블로킹하였다. 블로킹된 막은 지시된 일차항체와 HRP 결합된 이차항체로 면역블랏팅하였다. 타겟 단백질은 제조자 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)의 지시에 따라 화학발광으로 탐지하였다.

[0048] **실시예 4: 형광현미경 분석**

[0049] 현미경 분석은 종래기술과 같이 수행하였다 [Kim, M. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **63**: 432-445; 2013]. 0.8 μM Tat-PIM2 융합단백질로 처리한 HT-22 세포를 커버슬립 샌드에서 배양하였다 (12h). HT-22 세포를 37 °C에서 두 시간 동안 배양한 후, 세포는 PBS로 두 번 세척하고 4% 파라포름알데하이드로 5분간 실온에서 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 두 번 세척한 다음, 삼투가 용이하게 하고 3% 우혈청 알부민과 0.1% Triton X-100이 함유된 PBS (PBS-BT)로 40분간 블로킹하고, PBS-BT로 세척하였다. 일차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)는 1:2000 비율로 PBS-BT로 희석하여 3 시간 동안 실온에서 배양하였다. 이차항체 (Alexa fluor 488, Invitrogen)는 1:15000 비율로 희석한 후 어두운 곳에서 실온으로 한 시간 동안 배양하였다. 세포핵은 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 1 mg/ml; Roche, Mannheim, Germany)로 2분간 염색하였다. 모든 절차 사이에 세포는 PBS-BT로 세 번씩 세척하였다. 염색된 HT-22 세포는 FV-300 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

[0050] **실시예 5: 세포생존율 분석**

[0051] 과산화수소로 처리한 HT22 세포의 생존율을 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide}를 이용하여 비색분석법으로 확인하였다. 0.2~0.8 μM의 Tat-PIM2 융합단백질로 한 시간 동안 HT-22 세포를 선처리한 후, 세포를 1 mM의 H₂O₂에 1시간 30분 동안 노출시켜 세포사멸을 유도하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 무처리 대조군을 이용하여 백분율로 나타내었다.

[0052] **실시예 6: 세포 내 활성산소종 수준 측정**

[0053] DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하여 세포 안의 활성산소종 수준을 측정하였다. DCF-DA는 활성산소종에 의해 세포 안에서 DCF로 전환되어 형광을 발한다. HT22 세포에 Tat-PIM2 융합단백질을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 활성산소종 수준을 비교해 보았다. Tat-PIM2 융합단백질은 한 시간 동안 처리하였고 후에 과산화수소를 0.8 mM의 농도로 30분 동안 처리해 주었다. 그리고 PBS로 두 번 씻

어주고 DCF-DA를 20 μM 의 농도로 30분 처리해 주었다. 형광강도는 Fluoroskan ELISA plate reader (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)를 이용하여 485 nm 여기 (excitation), 538 nm 방출 (emission)을 측정하였다.

[0054] 실시예 7: TUNEL 분석

HT22 세포에 Tat-PIM2 융합단백질을 처리하지 않은 군과 0.2-0.8 μM 의 농도로 2시간 동안 처리한 군의 배양액에 과산화수소 (1 mM)를 가하여 18시간 동안 처리하였다. 세포사멸을 측정하기 위해 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick end labeling staining) 기법은 세포사멸 탐지 키트 (Roche Applied Science)를 사용하여 수행하였다. 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 결과를 분석하였다.

[0056] 실시예 8: 실험동물

한림대학교 실험동물센터에서 제공되는 저빌쥐 (Mongolian gerbils; Meriones unguiculatus)를 사용하였다. 23 $^{\circ}\text{C}$, 습도 60% 그리고 고정적으로 12시간의 빛과 음식물이 제공되는 곳에서 사육하였다. 실험동물 취급 및 관리의 최근의 국제법과 정책에 따라 수행하였고 [NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1985, revised 1996], 서울대 연구동물 관리 및 사용에 관한 위원회 (IACUC)에서 승인 받았다 (SNU-100611-1). 모든 실험에서는 이용되는 동물수와 본 발명에서 사용되는 공정에 의해 고통을 최소화하기 위해 노력하였다.

[0058] 실시예 9: Tat 펩타이드, PIM2 단백질 및 Tat-PIM2 융합단백질 처리

허혈손상에 대한 Tat-PIM2 융합단백질의 보호효과를 평가하기 위하여 실험동물을 다섯 개 군으로 나누었다: 허혈 수술을 하지 않은 대조군 ($n = 10$), 허혈군 ($n = 10$), Tat 펩타이드 처리군 (Tat, $n = 10$), PIM2 단백질 처리군 ($n = 10$) 그리고 500 μg Tat-PIM2 융합단백질 처리군 ($n = 10$). Tat 펩타이드, PIM2 단백질, Tat-PIM2 융합단백질은 재관류 30분 후 복강주사하였다.

[0060] 실시예 10: 일과성 전뇌허혈 유도

동물은 33% 산소, 67% 산화질소 하에서 2.5% 아이소플루란 (Baxter, Deerfield, IL) 혼합물로 마취시켰다. 양측 총경동맥을 분리하여 비외상성 동맥류 클립을 이용하여 폐색하였다. 혈류의 완전한 차단은 검안경을 이용하여 중앙 망막동맥을 관찰함으로써 확인하였다. 폐색 5분 후, 동맥류 클립은 총경동맥에서 제거되었다. 조절이 없는 상태에서의 체온 또는 정상체온 (37 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$) 조건은 직장 온도 탐침 (TR-100; Fine Science Tools, Foster City, CA)으로 모니터링하였고, 마취 전, 마취 동안 및 동물이 마취로부터 완전히 회복할 때까지 온열담요를 이용하여 유지하였다. 그 후 동물은 안락사할 때까지 체온 유지를 위해 온열 인큐베이터 (Mirae Medical Industry, Seoul, South Korea)에 두었다.

[0062] 실시예 11: 조직학적 분석을 위한 조직 가공

조직학적 분석을 위해 자율운동활성 평가에 이용되는 동물은 허혈/재관류 이후 7일째에 30 mg/kg Zoletil 50 (Virbac, Carros, France)으로 마취하고 0.1 M PBS (pH 7.4)로 심장을 관통하여 관류한 후 4% 파라포름알데하이드 함유 0.1 M 인산 완충액 (pH 7.4)으로 처리하였다. 뇌는 제거하여 같은 고정액에 6시간 동안 후고정하였다. 뇌조직은 30% 수크로스 용액으로 오버나잇 침윤하여 동결방지처리하였다. 그런 다음, 동결된 조직은 cryostat (Leica, Wetzlar, Germany) 상에서 순차적으로 절단하여 30 μm 의 환상 절편으로 만들고 PBS 함유 6-웰 플레이트에 수집하였다. 면역조직화학 데이터를 군 간에 비교가능하게 하기 위해 절편은 동일 조건 하에서 조심스럽게 처리하였다.

조직절편들은 각 동물에 대하여 저빌 아틀라스 [Loskota, W. A.; Lomax, P.; Verity, M. A. A stereotaxic atlas of the Mongolian Gerbil Brain (Meriones unguiculatus). Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers

Inc. 70-79; 1974]와 관련하여 브레그마 (bregma)에서 뒤쪽 -1.4 mm와 -2.0 mm 사이에서 선택하였다. 절편들은 수화되고 PBS 내에서 0.3% 과산화수소로 30분간 처리하였다. 세척 후 절편들은 30분간 PBS 내 10% 정상 염소혈청 내에서 연속적으로 배양하였다. 이들은 희석된 마우스 항-NeuN (anti-neuronal nuclei, 1:1,000, Chemicon International, Temecula, CA), 토끼 항-GFAP (rabbit anti-glial fibrillary acidic protein, 1:1,000, Chemicon International) 및 토끼 항-Iba-1 (rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1, 1:500, Wako, Osaka, Japan)으로 48시간 동안 4 °C로 배양하였다. 그런 다음, 이들은 바이오틴 결합된 염소 항-토끼 IgG 또는 염소 항-마우스 IgG, 스트렙타비딘 퍼옥시데이즈 복합체 (diluted 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA)에 노출된 후 0.1 M Tris-HCl 완충액 내의 3,3'-다이아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드로 시각화되었다.

[0065] 또한, 절편을 NaOH가 1% 되도록 80% 알코올과 혼합한 용액에 담그고 70% 알코올 용액에 담갔다. 그 후 0.06% 과망간산칼륨에 옮기고 0.004% FJB (fluoro-Jade Bh; histochem, Jefferson, AR, USA)의 염색용액을 스며들게 하였다. 그리고 절편을 씻어서 따뜻한 슬라이드 위에 올려놓고 epifluorescent microscope (Carl Zeiss, Germany)로 확인하였다.

[0066] 실시예 12: 정량 분석

[0067] 동물 한 마리당 10개의 절편에서 살아남은 뉴런 수를 세었다. 같은 수준의 선택된 해마에서 위와 같은 방법으로 측정하였다. 각각 절편 조직에서 모든 층에 해마 CA1 지역의 중간 부분이 포함된 것을 선택하였다. 조직의 이미지는 Axiophot 광학 현미경 (Carl Zeiss, Jena, Germany)의 CCD 카메라를 통하여 PC 모니터로 얻었다. 크레실 바이올렛으로 염색된 양성 뉴런의 이미지는 Applescanner로 얻었다. 뉴런의 수를 컴퓨터 기반 CCD 카메라 (software: Optimas 6.5, CyberMetrics, USA)를 갖춘 이미지 분석 시스템으로 측정하였다. 세포의 수의 계산은 각각의 동물에서 70개 절편 수의 평균값으로 하였다. 크레실 바이올렛으로 염색한 양성 뉴런 수는 삼 수술군과 비교하여 측정했다. 마지막으로 ANOVA 분석으로 Tat-PIM2의 보호효과를 조사하였다.

[0068] 결과 1: Tat-PIM2 융합단백질 발현과 정제

[0069] 본 발명자들은 세포 침투성이 있는 Tat-PIM2 융합단백질 발현 벡터를 제조하였다. 이 벡터는 인간 PIM2를 인코딩할 수 있는 cDNA와 단백질 수송 도메인인 Tat 펩타이드 코딩 서열, 아미노 말단의 6개의 히스티딘 코딩 서열을 가지고 있다. 또한, 본 발명자들은 단백질 수송 도메인 Tat 펩타이드가 결합되지 않은 대조군 PIM2 단백질을 생산하기 위해서 PIM2 발현벡터를 만들었다.

[0070] 과발현 유도 후, Tat-PIM2 융합단백질은 Ni^{2+} -나이틸로트리아세트산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.

[0071] SDS-PAGE와 웨스턴 블랏 분석법을 이용하여 Tat-PIM2 융합단백질이 정제된 것을 확인하였다. 정제된 Tat-PIM2 융합단백질의 분자량은 대략 37KDa이다. Tat-PIM2 융합단백질은 폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏으로 확인하였다.

[0072] 결과 2: HT22 세포 내로 Tat-PIM2 융합단백질의 투과

[0073] 웨스턴 블랏을 이용하여 Tat-PIM2 융합단백질을 0.8 μM 로 10~60분까지 시간별로 투과시켰을 때 투과된 단백질 수준을 측정한 결과, 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질 농도는 시간이 늘어날수록 증가하였다.

[0074] 또한, Tat-PIM2 융합단백질의 농도별 세포 내 투과 정도를 측정하였다. Tat-PIM2 융합단백질의 농도별 투과는 0.2~0.8 μM 로 다양한 농도 조건에서 진행하였고, 60분 동안 단백질을 세포에 처리한 후 웨스턴 블랏팅하였다. 그 결과, Tat-PIM2 융합단백질은 농도 의존적으로 세포 내로 침투된 것을 확인하였다. 그러나, 대조군인 PIM2 단백질은 세포 내로 침투되지 않았다.

[0075] 또한, 우리는 Tat-PIM2 융합단백질이 신경세포 안으로 투과된 후 세포 내에서 안정성을 나타내는지를 실험하였다. Tat-PIM2 융합단백질은 시간별로 0.8 μM 농도로 세포의 배지에 첨가하였으며, 웨스턴 블랏팅과 밀도계를 이용하여 세포 내로 투과된 단백질 수준을 분석하였다. 세포 내로 침투된 Tat-PIM2 융합단백질의 농도는 처음 한 시간 후에 나타난다. 비록 단백질 농도는 점차 줄어드는 것으로 관찰되지만, 침투된 Tat-PIM2 융합단백질은 세

포 안에서 48시간까지 유지되었다.

[0076] 좀더 명확하게 세포 내에 단백질이 투과된 것을 확인하기 위해서, 침투된 세포를 핵 표지자인 DAPI를 사용하여 이중염색한 결과, Tat-PIM2 융합단백질이 세포질 및 핵 내로 들어간 것을 확인하였고, Tat-PIM2 융합단백질이 세포 안으로 효율적으로 투과되었음을 알 수 있었다.

[0077] **결과 3: HT22 세포에서 H₂O₂로 유도되는 Akt, MAPK, NF-κB 활성화에 대한 Tat-PIM2 융합단백질의 효과**

[0078] 이 실험은 Akt, p38, JNK (c-Jun N-terminal Kinase), 그리고 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase)인 MAPKs와 MAPK 신호의 캐스케이드 단계에서 중요한 역할을 한다고 알려진 NF-κB의 활성화도에 대한 Tat-PIM2 융합단백질의 조절 효과를 확인하였다. 세포 내로 도입된 Tat-PIM2 융합단백질이 H₂O₂로 인해 활성화된 Akt와 MAPK 신호에 영향을 주는지 웨스턴 블랏팅을 통하여 확인하였다 [10]. 그 결과, Tat-PIM2 융합단백질은 ERK1/2, p38, JNK의 인산화 정도가 증가함에 따라 함께 감소하였음을 확인할 수 있었다. 또한, 우리는 H₂O₂로 유도된 IκBα 인산화와 IκBα 저하를 포함한, 활성화된 NF-κB의 신호전달 캐스케이드에 대한 효과를 확인하였으며 [11], Tat-PIM2 융합단백질이 세포 내에서 H₂O₂로 유도되는 IκBα 인산화와 분해를 저해하였다. 그러나, 대조군 PIM2 단백질은 NF-κB 활성화에 영향을 미치지 않았다.

[0079] **결과 4: Tat-PIM2 융합단백질에 의한 미토콘드리아 기능저하 보호**

[0080] 본 발명자들은 과산화수소로 세포사멸을 유도하였을 때 Tat-PIM2 융합단백질이 항-세포자기사멸 단백질 또는 친-세포자기사멸 단백질을 발현시키는지 확인하였다.

[0081] Bax와 bcl-2 단백질의 발현을 연구하기 위하여 우리는 bax와 bcl-2 항체를 사용하여 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 그 결과 H₂O₂ 처리된 세포는 bax 발현 정도가 현저히 증가하였고, Tat-PIM2 융합단백질을 처리한 세포의 bax 발현 정도는 두드러지게 감소하였다. 그러나, 세포 생존에 관여하는 신호인 bcl-2 발현 정도는 bax 발현패턴과 반대되는 양상을 보이고 있다.

[0082] **결과 5: 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질은 산화 스트레스 하에서 세포 생존율에 영향을 미친다.**

[0083] 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질이 산화 스트레스를 받은 세포를 보호할 수 있는지를 결정하기 위해서, H₂O₂를 처리한 후 MTT 분석법을 통하여 세포 생존율을 측정하였다. 세포를 1 mM H₂O₂로 처리한 결과, 오직 45%의 세포만 생존하였다. 반면, Tat-PIM2 융합단백질로 선처리한 군에서는 세포 생존율이 78%까지 증가하였다. 그러나, 대조군 PIM2 단백질은 세포 생존율을 증가시키지 않는 것을 확인하였다.

[0084] 또한, 본 발명자들은 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질이 활성산소종 생성에 미치는 억제 효과를 실험하였다. 세포에 H₂O₂를 처리했을 때 활성산소종 수준은 증가하였다. 대조군 PIM2 단백질을 처리한 세포에서 활성산소종 수준은 H₂O₂를 처리한 세포와 비슷하였다. 반면, Tat-PIM2 융합단백질을 처리한 세포에서는 활성산소종 수준이 뚜렷하게 감소하였다.

[0085] 다음으로, TUNEL 염색 방법으로 DNA 단편화에 대한 Tat-PIM2 융합단백질의 보호효과를 보았다. Tat-PIM2 융합단백질을 선처리하고, H₂O₂를 처리한 세포에서 TUNEL 염색된 세포 수를 센 결과, Tat-PIM2 융합단백질을 처리하지 않은 군의 세포 수보다 확연히 적은 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 대조군 PIM2 단백질을 처리한 세포는 PIM2 단백질이 세포 내로 침투하지 않아 DNA 손상에 효과가 없는 것을 확인하였다.

[0086] **결과 6: 뇌허혈에 의해 유도되는 신경교증에 미치는 Tat-PIM2 융합단백질의 영향**

[0087] 본 발명자들은 저빌 모델에서 일시적 전뇌 허혈 이후 신경 세포 생존율에 미치는 세포 내로 투과된 Tat-PIM2 융합단백질의 영향을 시험하였다. 허혈 외상 4일 후, 삼 수술 대조군, 담체 처리군, Tat 펩타이드 처리군, 대조군 PIM2 단백질 처리군 및 Tat-PIM2 융합단백질 처리군 동물들을 희생하여 크레일 바이올렛 (CV) 염색하였다. Tat-PIM2 융합단백질의 보호효과는 CV 조직화학방법으로 평가하였다 (도 8). 담체 처리군에서 양성 뉴런의 백분율은

삼 수술 대조군과 비교하여 12%였다. Tat-PIM2 융합단백질 처리군에서는 삼 수술 대조군과 비교하여 양성 뉴런이 68%였다. 그러나, Tat 펩타이드 처리군과 대조군 PIM2 처리군에서는 아무런 보호효과도 나타나지 않았다.

[0088]

대조군에서는, GFAP-면역반응성 정상세포가 해마 CA1 구역 작은 세포질 (small cytoplasm)과 실과 같은 돌기 (thread-like processes)에서 탐지되었다 (도 3A). 허혈군에서는 많은 GFAP-면역반응성 정상세포가 단속적인 세포질 (punctuated cytoplasm)과 비대한 돌기 (hypertrophied processes)에서 관찰되었다 (도 3C). Tat 펩타이드 처리군과 PIM2 단백질 처리군에서는 GFAP-면역반응성 정상세포의 형상과 분포가 허혈군과 유사하였다 (도 3E 및 도 3G). Tat-PIM2 융합단백질 처리군에서는 GFAP-면역반응성 정상세포의 형상이 휴지 상태 및 활성 상태가 혼합되어 있었다 (도 3I).

[0089]

대조군에서는 Iba-1-면역반응성 소교세포가 둥근 세포질 (round cytoplasm)과 긴 돌기를 가진 해마 CA1 구역에서 탐지되었다 (도 3B). 허혈군에서는, Iba-1-면역반응성 소교세포가 식세포 및 활성화된 형태로 현저히 변화하였다. Iba-1-면역반응성 소교세포는 비대하고 둥근 세포질 (식세포 형태)을 가진 피라미드층 (stratum pyramidale) 상에 집중되었다. 뿐만 아니라, Iba-1-면역반응성 소교세포는 지향층 (stratum oriens)과 방사층 (stratum radiatum)에서 오프라든 돌기 (활성화된 형태)를 가진 비대한 세포질을 가졌다 (도 3D). Tat 펩타이드 처리군 또는 PIM2 단백질 처리군에서 Iba-1-면역반응성 소교세포의 형태와 분포는 허혈군의 그것과 유사하였다 (도 3F 및 3H). Tat-PIM2 융합단백질 처리 허혈군에서는 Iba-1-면역반응성 소교세포의 식세포 형태가 피라미드층에서 감소하였고, 약간의 Iba-1-면역반응성 소교세포는 길고 가는 돌기를 가진 작은 세포질을 가졌다 (도 3J).

[0090]

또한, 손상된 신경을 염색하는 FJB로 염색하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 대조군은 염색되지 않았고, 허혈군은 신경이 손상되었기 때문에 염색이 되었다. Tat 펩타이드 처리군과 PIM2 단백질 처리군은 보호 효과가 없기 때문에 신경이 손상되어 있었고, Tat-PIM2 융합단백질 처리군은 면역조직염색법으로 신경보호 효과가 있음을 확인하였다.

[0091]

결과 7: 허혈 손상에 대한 Tat-PIM2 융합단백질의 보호효과

[0092]

대조군에서는 해마 CA1 구역에서 많은 NeuN-면역반응성 뉴런들이 탐지되었다 (도 2A). 허혈군에서 NeuN-면역반응성 뉴런의 수는 대조군과 비교하여 현저히 감소하였고 (도 2B), NeuN-면역반응성 뉴런의 평균 갯수는 대조군의 7.1%였다 (도 2F).

[0093]

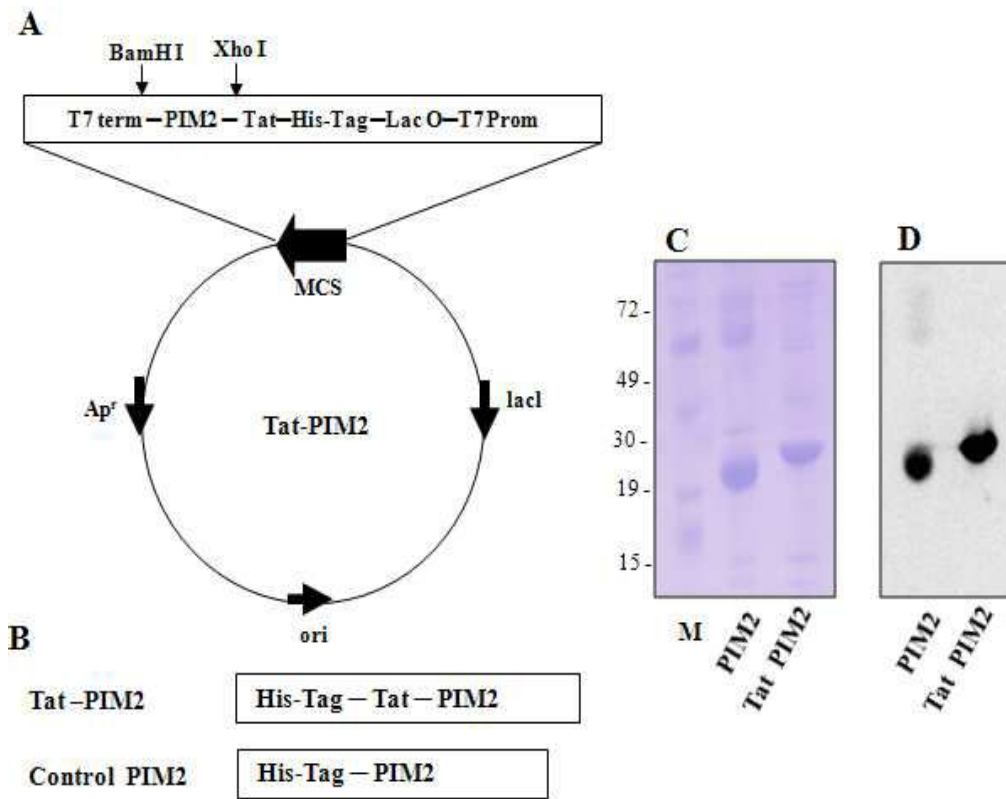
Tat 펩타이드 처리군에서 NeuN-면역반응성 뉴런은 거의 없었고 (도 2C), NeuN-면역반응성 뉴런의 수는 대조군의 11.3%였다 (도 2F). PIM2 단백질 처리군에서는 CA1 구역에서 약간의 NeuN-면역반응성 뉴런이 탐지되었고, NeuN-면역반응성 뉴런의 수는 대조군의 15.7%였다 (도 2F). Tat-PIM2 융합단백질 처리 허혈군에서는 NeuN-면역반응성 뉴런이 허혈군과 비교하여 CA1 구역에서 풍부하게 탐지되었고 (도 2E), NeuN-면역반응성 뉴런의 평균 수는 대조군의 49.8%였다 (Fig. 2F).

[0094]

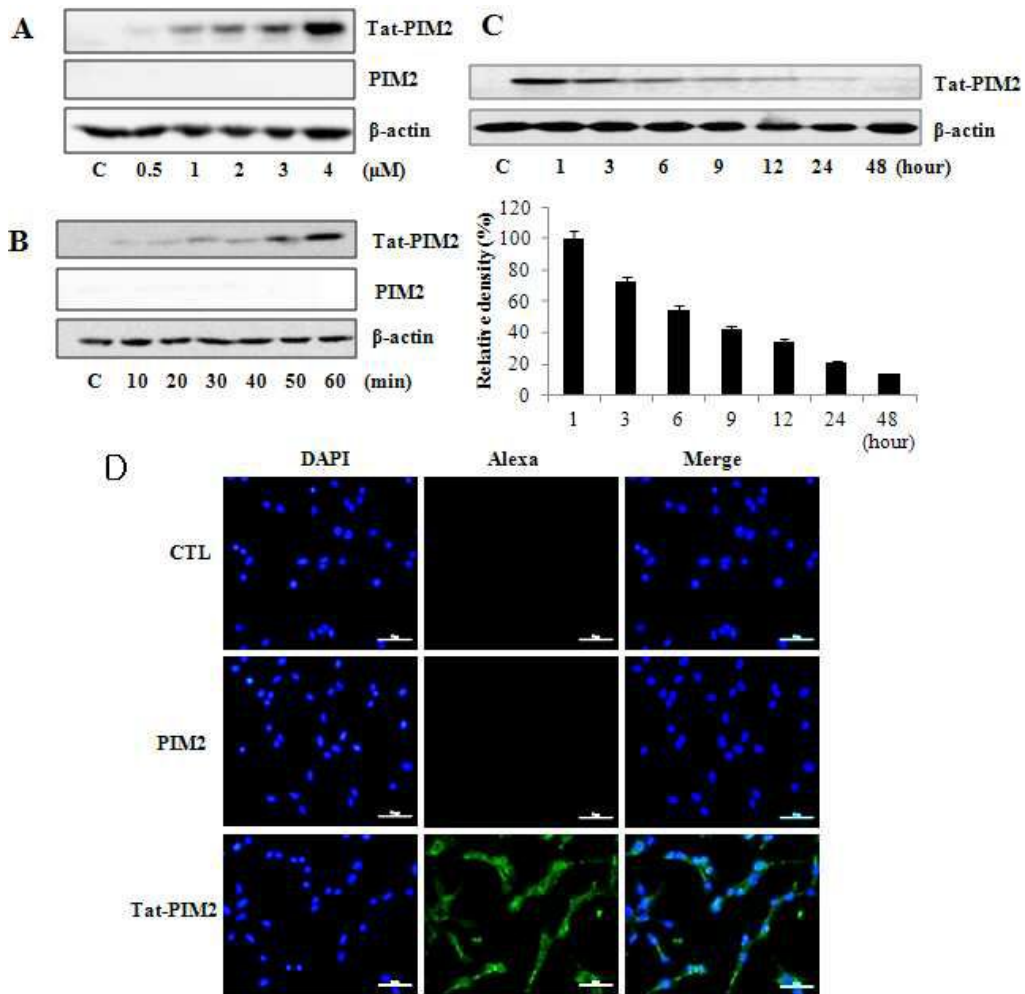
또한, 히스티딘 항체를 이용하여 형광표지를 하였고 DAPI 염색을 함께 하여 조직의 신경세포로 효과적으로 침투하였는지 형광현미경을 이용하여 확인했다.

도면

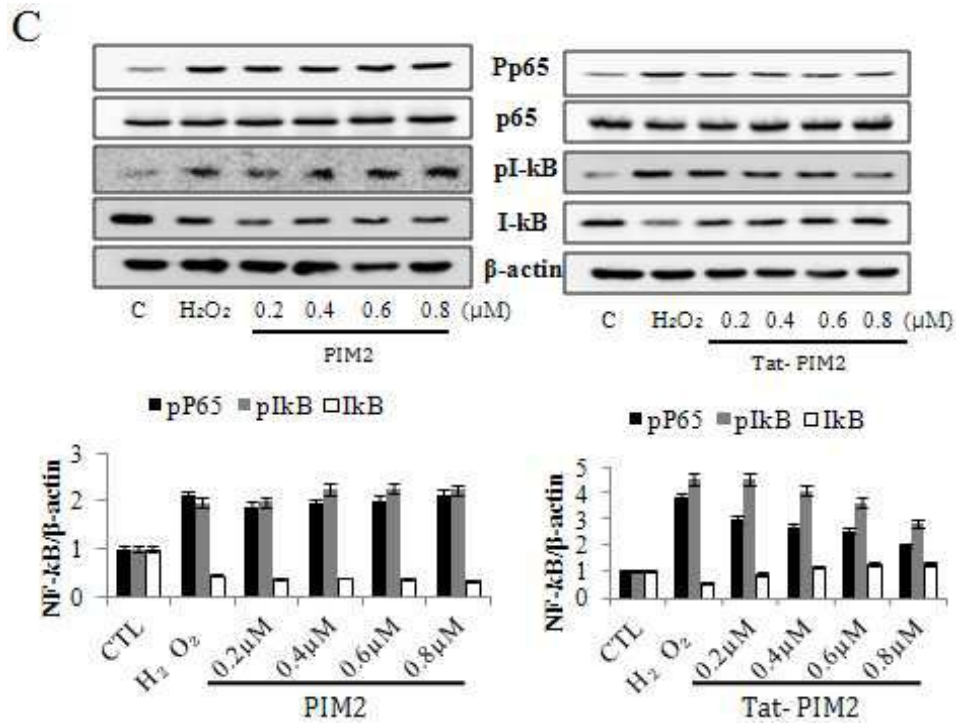
도면1



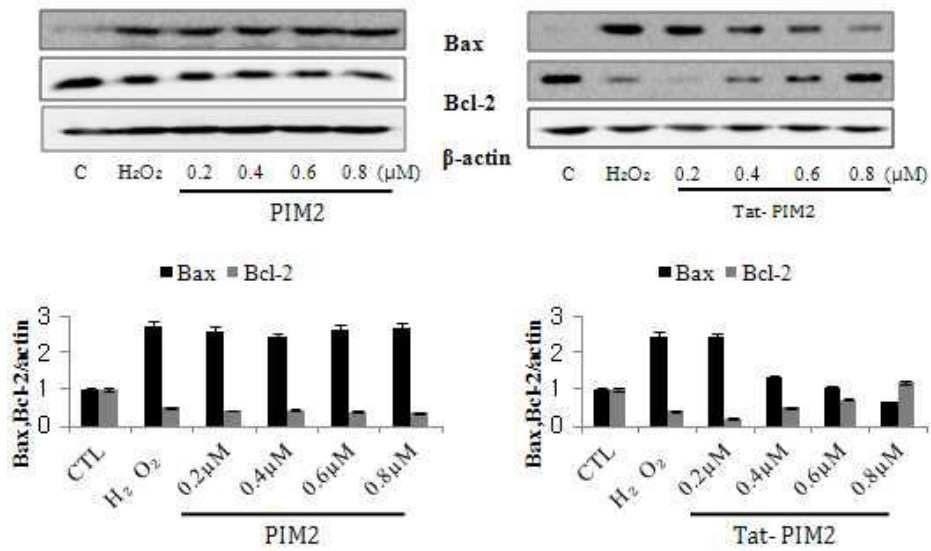
도면2



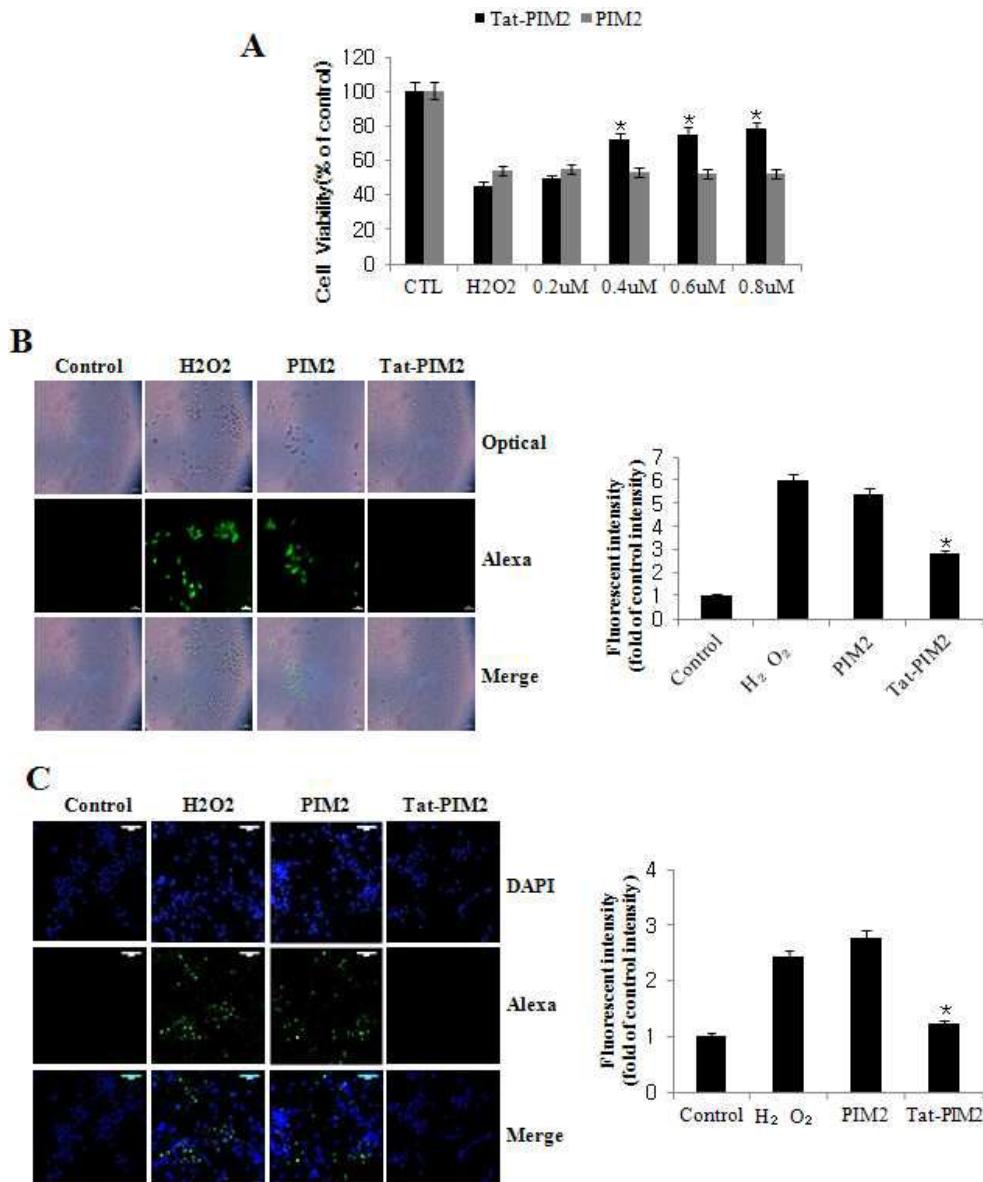
도면3



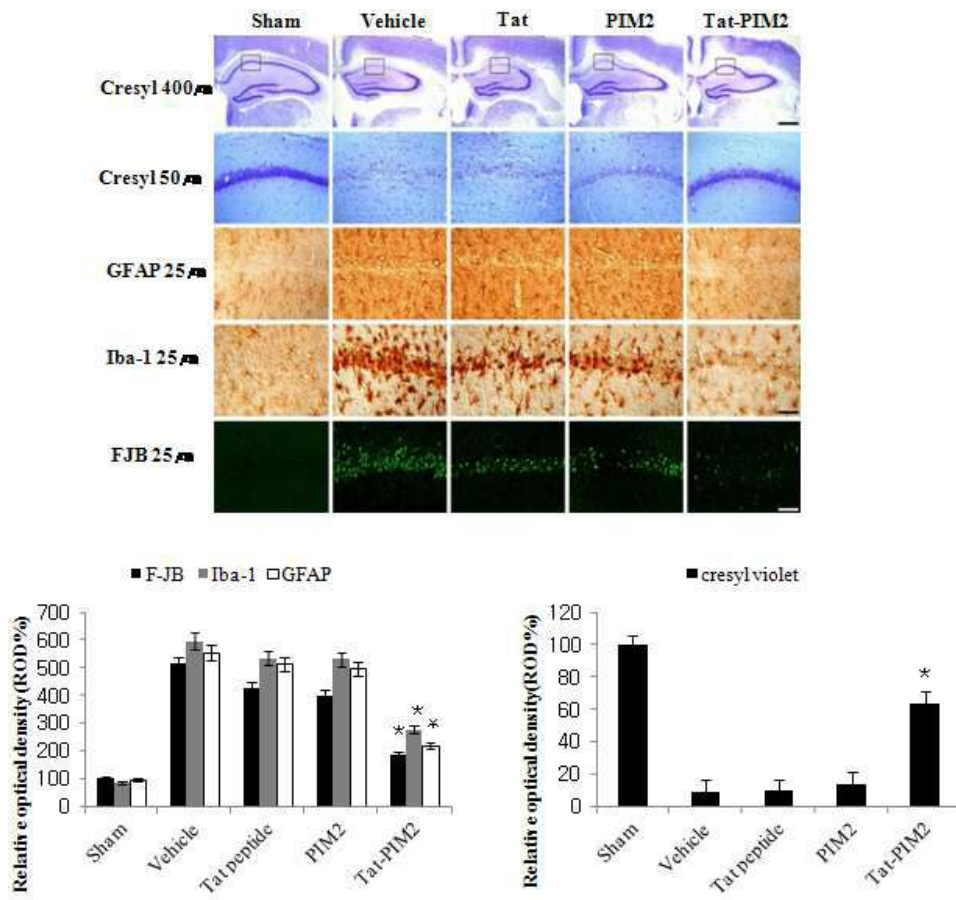
도면4



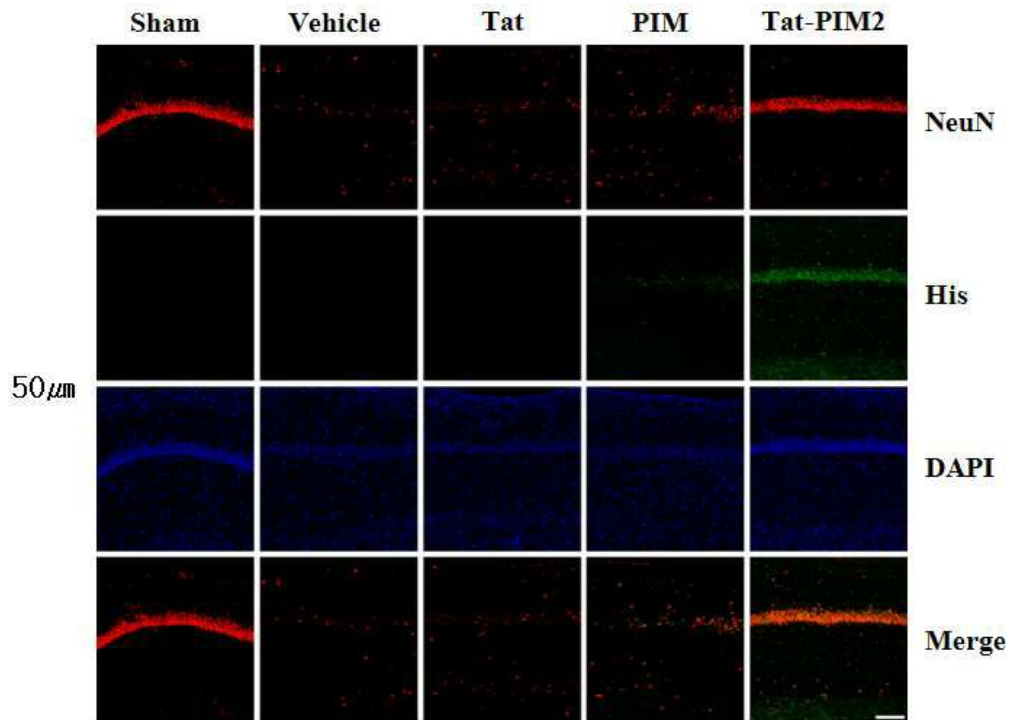
도면5



도면6



도면7



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 gtcgtgtctt 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 tggcgccgc cggcagccat aggaagaagc ggagacagcg acgaagactc	60
gagatgttga ccaagcctct acaggggcct cccgcgcccc ccgggacccc cagccgcgcg	120
ccaggaggca aggatcggga agcgttcgag gccgagtatc gactcggccc cctcctgggt	180
aaggggggct ttggcacctt cttgcagga caccgcctca cagatcgact ccaggtggcc	240
atcaaagtga ttccccgaa tcgtgtgctg ggctgggtccc cttgtcaga ctcagtcaca	300
tgccactcg aagtcgcact gctatggaaa gtgggtgcag gtggtgggca ccctggcgtg	360
atccgcctgc ttgactggtt tgagacacag gagggcttca tgctggctct cgagcggcct	420
ttgccccccc aggatctctt tgactatata acagagaagg gccactggg tgaaggccca	480
agccgctgct tctttggcca agtagtgga gccatccagc actgccattc ccgtggagtt	540
gtccatcgtg acatcaagga tgagaacatc ctgatagacc tacgccgtgg ctgtgccaaa	600
ctcattgatt ttggttctgg tgcctgctt catgatgaac cctacactga ctttgatggg	660
acaaggggtg acagcccccc agagtggatc tctcgacacc agtaccatgc actccccggc	720

actgtctggt cactgggcat cctcctctat gacatggtgt gtggggacat tccctttgag 780

agggaccagg agattctgga agctgagctc cacttcccag cccatgtctc cccagactgc 840

tgtgccctaa tccgccgtg cctggccccc aaaccttctt cccgaccctc actggaagag 900

atcctgctgg acccctggat gcaaacacca gccgaggatg taccctcaa cccctccaaa 960

ggaggccctg cccctttggc ctggtccttg 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 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