



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0087010

(43) 공개일자

2016년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/16 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

(21) 출원번호

10-2015-0004031

(22) 출원일자

2015년01월12일

심사청구일자

2015년01월12일

(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

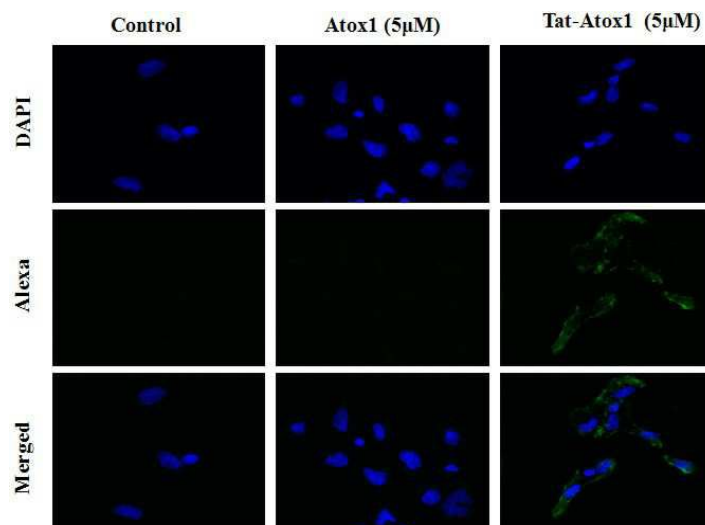
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 세포투과성 A t o x 1 융합단백질을 함유하는 다당신 예방 및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 상염색체 우성 다당신 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 다당신 세포 내로 투과가 가능한 Atox1 단백질의 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 다당신 예방 또는 질환 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 9/0053 (2013.01)

(72) 발명자

조효상

경기도 구리시 체육관로 163-12 (교문동)

음원식

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

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

박중훈

서울특별시 강남구 남부순환로 2914, 10-601 (개포우성아파트)

박은영

서울특별시 은평구 불광로8길 12 101호 (불광동, 청송빌라)

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 2012R1A2A2A06043084

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 단백질침투기술을 이용한 다낭신 치료제 탐색 및 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

Atox1 (Antioxidant 1) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 Atox1 융합단백질을 함유하는 다낭신 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 다낭신 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 융합단백질은 서열번호 4, 6, 또는 8인 것을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 다낭신 예방 및 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다낭신 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 조직 및 세포 내 투과가 가능한 Atox1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 다낭신 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 상염색체 우성 다낭신 (Autosomal dominant polycystic kidney disease : ADPKD)은 500~1,000명당 최소 1명의 발병률을 나타내는 가장 흔한 유전병이다. 상염색체 우성 다낭신은 건강한 사람과 비교할 때 양쪽 신장에 액체가 찬 낭포가 많이 형성되고 신장이 4~8배 커지는 것으로 특징지을 수 있다. 현재까지는 다낭신에 효과적인 임상 치료방법이 없어 대부분의 다낭신은 말기 신장질환으로 진행된다 (Gabow, 1993; Grantham, 1996). 인간 다낭신에서 낭포 형성은 낭포 표피세포의 세포증식 증가 및 자기세포사멸을 수반한다.

[0003] 지금까지 많은 다낭신 치료약제들이 개발되고 있지만, 부정적인 피드백 저해로 인해 실망스러운 임상결과들이 보고되었다.

[0004] WT 9-7 세포는 기본적으로 mTOR 신호가 활성화되어 있는 다낭신 세포이다. 그래서 치료제를 사용할 경우 WT 9-7 세포는 사멸해야 한다. 현재 다낭신 치료제로 가장 많이 알려져 있는 치료제는 라파마이신 (Rapamycin)이다. 라파마이신은 WT 9-7 세포에 활성화되어 있는 mTOR의 아래 신호인 S6을 p-S6로 바꾸어 다낭신 치료제로 많이 알려져 있지만, 대조적으로 염증 인자인 Erk 신호를 활성화시키는 부작용을 나타낸다.

[0005] 생체 내 고분자를 치료목적으로 이용하려는 관심이 매우 높아지고 있다. 현재 가장 주목을 받고 있는 것은 유전자 치료이다. 그러나 유전자 치료는 유전자의 운반방법이 용이하지 않고, 표적세포에서의 발현이 낮고, 세포에서 단백질이 발현되는 기간이 짧고, 표적세포에서 발현되는 단백질의 양을 인위적으로 조절하기가 매우 어려운 점 등 여러 가지 문제점을 가진다.

[0006] 치료를 위한 약물이나 단백질을 세포 내로 이동시키는데 있어서 목표 단백질을 세포막을 거쳐 직접 전달하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나 단백질은 분자 크기나 여러 가지 생화학적 성질 때문에 세포막을 통과하기가 매우

어렵다. 일반적으로 분자량 600달톤 이상의 물질은 세포막을 통과하기가 거의 불가능한 것으로 알려져 있다.

[0007] 최근, 단백질의 운반 방법 중 하나로 Pep-1 펩타이드를 이용하여 자연상태의 이형 단백질을 세포 내로 운반할 수 있음이 밝혀졌다. Pep-1 펩타이드는 21개의 아미노산 (KETWWETWWTEW SQP KKKRKV)으로 이루어져 있고, 세 개의 도메인 (소수성 도메인, 스페이서, 친수성 도메인)을 갖고 있다. 지금까지, Pep-1 펩타이드를 이용한 연구에서는 Pep-1 펩타이드와 외부 단백질을 동시에 세포에 투여하였을 경우 자연상태로 단백질을 세포 내로 운반할 수 있다는 것만 밝혀졌다. 또한, Pep-1 펩타이드는 Tat 단백질에 비해 단백질 치료제로서의 여러 가지 장점 즉, 매우 효율적으로 단백질을 세포 내로 투과시키고, 생리화학적 완충액에서의 안정성, 혈청에 대한 민감성의 결여 등을 나타낸다. 그러나, PEP 펩타이드는 외부 단백질 즉, 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP), 베타갈락토시데이즈(β -galactosidase, β -Gal) 등을 세포 내로 운반할 때 일정한 비율로 맞추어 투여해야만 세포 내에 효과적으로 단백질이 운반되는 것으로 확인되었다. 또한, 치료 단백질을 비롯한 모든 단백질이 Pep-1에 의해 세포 내로 운반 가능한지는 아직까지 명확히 밝혀지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 다낭신의 효과적인 예방 및 치료제를 제공하는 것을 목표로 한다.

[0009] 본 발명은 다낭신 치료의 타겟이 되는 Erk를 억제하는 단백질들을 선택하여 단백질 침투기술을 이용하여 다낭신에 대한 기전 규명 및 보호효과를 확인하여 좀 더 효과적인 단백질 치료제를 제공하는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 면역반응 억제 약물인 단백질 제제를 침투 능력을 높이는 제형으로 개발하고자 연구하였고, 단백질 제제의 침투효과, 다낭신 세포주에 Atox1 융합단백질을 처리하였을 때 Erk 및 Akt의 신호 발현이 감소함을 확인하여 Atox1 융합단백질의 다낭신 치료 효과를 규명함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 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, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 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 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0012] 나아가, 본 발명은 상기 Atox1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 상염색체 우성 다낭신 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 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.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 Atox1 융합단백질을 유효성분으로 하며, 상염색체 우성 다낭신 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 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 공유결합

된, 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 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.

- [0016] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0017] "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.
- [0018] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0019] 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.
- [0020] 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.
- [0021] 본 명세서의 "목표 단백질"은 Tat 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.
- [0022] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0023] 본 발명에서 단백질 수송 도메인으로서는 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이스로 구성된 단백질 수송 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. 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

- [0024] 본 발명에 따른 Atox1 융합단백질은 시간 의존적 및 투여량 의존적으로 다낭신 신장세포 내로 침투하였다.
- [0025] 또한, 본 발명에 따른 Atox1 융합단백질은 세포 내로 침투하여 15시간 이상 안정적으로 유지되었다.
- [0026] 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 Atox1 융합단백질은 다낭신 신장세포 내에서 Erk 신호 및 Akt 신호를 저하시켰다.
- [0027] 따라서, 본 발명에 따른 Atox1 융합단백질은 상염색체 우성 다낭신의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서 유용할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 Atox1 단백질과 Tat-Atox1 융합단백질을 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 것이다. 또한, Atox1 단백질과 Tat-Atox1 융합단백질을 웨스턴블랏 분석하여 Atox1 단백질과 Tat-Atox1 융합단백질이 정제된 것을 확인한 사진이다.
- 도 2는 WT 9-7 세포에 3 μ M의 Tat-Atox1 융합단백질을 처리하는 시간을 달리하여 0 ~ 40분간 처리한 후 웨스턴블랏 분석한 사진이다. 대조군으로서 단백질 수송도메인이 결합되지 않은 Atox1 단백질을 사용하였다.
- 도 3은 WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질을 처리하는 농도를 달리하여 1시간 동안 0.5 ~ 3 μ M 처리한 후 웨스턴블랏 분석한 사진이다. 대조군으로서 단백질 수송도메인이 결합되지 않은 Atox1 단백질을 사용하였다.
- 도 4는 WT 9-7 세포에 3 μ M의 Tat-Atox1 융합단백질을 1시간 처리한 후 시간 경과에 따라 웨스턴 블랏 분석한 사진이다. 15시간까지는 융합단백질이 안정적으로 유지되었다.
- 도 5는 WT 9-7 세포에 3 μ M의 Tat-Atox1 융합단백질을 1시간 처리한 후 공초점 현미경으로 촬영한 사진이다. "Control"은 무처리 대조군이다.
- 도 6은 WT 9-7 세포에 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 Tat-Atox1 융합단백질의 p38, ERK 신호기전 억제효과를 본 것이다.
- 도 7은 WT 9-7 세포에 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 Tat-Atox1 융합단백질의 Akt 신호기전 억제효과를 본 것이다.
- 도 8은 WT 9-7 세포에 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 Tat-Atox1 융합단백질의 p65, I κ B α 신호기전 억제효과를 본 것이다.
- 도 9는 WT 9-7 세포에 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 Tat-Atox1 융합단백질의 COX2, iNOS, IL-6, IL-1 β , TNF- α 신호기전 억제효과를 본 것이다.
- 도 10은 WT 9-7 세포에 RT-PCR을 수행하여 Tat-Atox1 융합단백질의 COX2, iNOS, IL-6, IL-1 β , TNF- α 신호기전 억제효과를 본 것이다.
- 도 11은 WT 9-7 세포에 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 Tat-Atox1 융합단백질의 캐스페이즈 3, 절단된 캐스페이즈 3 신호기전 억제효과를 본 것이다.
- 도 12는 WT 9-7 세포에 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 Tat-Atox1 융합단백질의 S6K, p-S6K 신호기전 억제효과를 본 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 각 실험예의 결과로서 구체적인 실시예에서 제조한 여러 가지 융합단백질 중 Tat-Atox1 융합단백질을 시료로 한 데이터를 기재하였으나, 그 외의 융합단백질들 또한 Tat-Atox1 융합단백질을 시료로 한 결과와 유사한 결과를 나타내었음을 밝힌다.

- [0030] **재료**
- [0031] 제한 엔도뉴클레이즈 (Restriction endonuclease) 및 T4 DNA 연결효소는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 플라스미드 pET-15b 및 *Escherichia coli* strain BL21 (DE3)는 Novagen (Hilden, Germany)에서 구입하였다. 올리고뉴클레오타이드는 Bioneer (Dajeon, Korea)에서 합성하였다. Ni^{2+} -니트릴로삼초산 세파로즈 슈퍼플로우 컬럼은 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 입수하였다. 우태혈청과 항생제는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 다른 화학약품은 특별한 언급이 없으면 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것이고 입수 가능한 최상의 분석등급 제품을 사용하였다.
- [0032] **세포 배양 및 Atox1 융합단백질 도입**
- [0033] WT 9-7 세포는 20 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 5 mM NaHCO_3 , 10% 우태혈청 (FBS) 및 항생제 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린)를 포함하는 EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) 배지에 37 °C, 95% 공기 및 5% CO_2 의 습한 조건에서 보관하였다.
- [0034] Tat-Atox1 융합단백질의 전달을 위해, 세포를 1시간 동안 Tat-Atox1 다양한 농도(0.5~3 μM)로 처리하였다. 그 후 세포를 트립신-EDTA로 처리하고 PBS로 세척하였다. 세포는 하비스트하여 세포 추출물을 제조한 후 웨스턴블롯 분석하였다.
- [0035] **웨스턴 블롯 분석**
- [0036] 세포의 용해물인 단백질은 15% SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분석하였다. 단백질은 전압 차이에 의해 나이트로셀룰로스 막으로 이동하게 되고, 이 막을 PBS에 5% 탈지유 용액을 만들어서 담가두었다. 막은 먼저 제조업체에서 권장하는 일차 항체를 사용하여 면역블롯 기법을 통해 확인하였다. 단백질은 제조사 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 지시한 대로 화학형광을 통해 알아내었다.
- [0037] **공초점 형광현미경**
- [0038] WT 9-7 세포를 유리 커버슬립에 올려놓고 Atox1 및 Tat-Atox1 융합단백질 (3 μM)과 함께 37 °C에서 한 시간 동안 배양하였다. PBS로 두 번 세척한 다음 세포를 4% 파라포름알데하이드로 실온에서 3분간 고정시켰다. 세포는 3% 소 혈청 알부민, 0.1% TritonX-100을 포함하는 PBS로 고정하고, PBS-BT로 세척하였다. 항-히스티딘 1차 항체를 1:2,000으로 희석하고 각 시료와 함께 실온에서 한 시간 반 동안 배양하였다. Alexa fluor 488이 결합된 2차 항체 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 1:15,000으로 희석한 다음 암조건으로 실온에서 1시간 배양하였다. 핵은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 1:3,000으로 희석한 4'6-다이아미디노-2-페닐인돌 (4'6-diamidino-2-phenylindole : Roche Applied Science, Basel, Switzerland)로 3분간 염색하였다. 형광은 Olympus FV-300 공초점 형광 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 분석하였다.
- [0039] **iNOS 및 COX-2 발현 수준 측정**
- [0040] WT 7-9 세포를 70% 포화 상태가 되도록 12시간 동안 6-웰 플레이트에서 배양하였다. 배양 후, 세포를 2시간 동안 Tat-Atox1 융합단백질 (0.5~2 μM)로 전처리하고, 배양 배지를 수확하였다. iNOS 및 COX-2 단백질 발현뿐만 아니라 RNA 수준의 발현을 웨스턴블롯 분석 및 RT-PCR로 측정하였다.
- [0041] **RT-PCR 분석**
- [0042] 총 RNA는 제조사 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 지시에 따라 Easy blue kit를 이용하여 Raw 264.7 세포에서 분리하였다. 그런 다음 RNA (2 μg)는 역전사효소 및 올리고-(dT) 프라이머를 이용하여 역전사하였다. cDNA에 대한 PCR 증폭은 다음의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 수행하였다.
- [0043] COX-2 센스 프라이머, 5'-CAAAGGCCTCCATTGACCAGA-3';

- [0044] COX-2 안티센스 프라이머, 5'-TGGACCAGGTTTTTCCACCG-3';
- [0045] IL-1 β 센스 프라이머, 5'-TGCAGAGTTCCCCAACTGGTACTC-3';
- [0046] IL-1 β 안티센스 프라이머, 5'-GTGCTGCCTAATGTCCTTGAATC-3';
- [0047] IL-6 센스 프라이머, 5'-CAAGAAAGACAAAGCCAGAGTCCTT-3';
- [0048] IL-6 안티센스 프라이머, 5'-TGGATGGTCTTGGTCCCTTAGCC-3';
- [0049] TNF- α 센스 프라이머, 5'-AAGTTCCCAAATGGCCTCCC-3';
- [0050] TNF- α 안티센스 프라이머, 5'-TGGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTT-3'; 및
- [0051] GAPDH 센스 프라이머, 5'-TGAAGGTCGGTGAACGGATTGG-3';
- [0052] GAPDH 안티센스 프라이머, 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCAC CAC-3'.
- [0053] PCR 수행에는 PCR 프리믹스 키트 (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하였고, 각 프라이머는 5분 동안 72℃로 가열하여 반응을 종결하였다. PCR 산물은 1% 아가로스 젤 상에서 분리하여 에티뮴 브로마이드 염색 후 UV로 관찰하였다.

[0054] **결과 1: Tat-Atox1 융합단백질의 발현과 정제**

- [0055] 대조군 Atox1 단백질과 Tat-Atox1 융합단백질을 제작하기 위해 Atox1 유전자를 조작하여 대장균 세포에 형질전환시켜 과대발현시키고 이를 Ni²⁺-나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피로 정제한 후 SDS-PAGE를 통해 단백질의 크기와 순도를 확인하였다. 또한, 웨스턴 블랏 분석법으로 히스티딘 항체를 이용하여 대조군 Atox1 단백질과 Tat-Atox1 융합단백질을 확인하였다. 이를 통해 목표 단백질이 발현, 정제된 것을 확인하였다 (도 1).

[0056] **결과 2: WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질 침투성 확인**

- [0057] WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질 3 μ M을 처리하여 침투시간에 변화를 준 후 웨스턴 블랏 분석법을 통해 히스티딘 항체를 이용하여 분석해본 결과 시간-의존적으로 Tat-Atox1 융합단백질이 WT 9-7 세포에 침투함을 확인하였다. 이와 대조적으로 Atox1 단백질은 세포 내로 침투하지 않는 것을 확인할 수 있었다 (도 2).
- [0058] 또한, WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질을 농도별로 처리한 후 침투시간을 1시간으로 고정하였다. 이를 웨스턴 블랏 분석법을 통해 히스티딘 항체를 이용하여 분석해본 결과 WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질이 농도-의존적으로 침투함을 확인하였다. 이와 대조적으로 Atox1 단백질은 세포 내로 침투하지 않는 것을 확인할 수 있었다 (도 3).

[0059] **결과 3: WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질 침투 후 안전성 확인**

- [0060] WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질 3 μ M을 처리하고 침투시간을 1시간으로 고정하였다. 이후 처리한 Tat-Atox1 융합단백질을 모두 제거하고 세포 내에 침투한 Tat-Atox1 융합단백질이 세포 내에서 얼마나 오랜 시간 유지되는지를 확인하기 위해 히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다. 실험 결과, 침투 후 약 15시간까지 Tat-Atox1 융합단백질이 WT 9-7 세포 내에 존재함을 확인하였다 (도 4).

[0061] **결과 4: WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질 침투 후 침투 형태 확인**

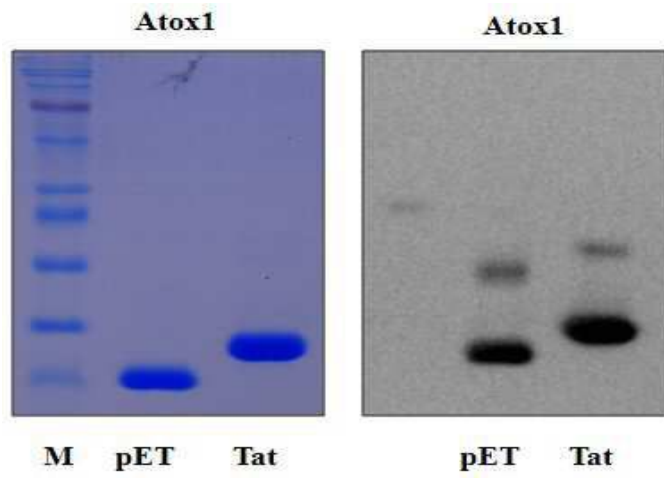
- [0062] WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질을 3 μ M을 처리하고 침투시간을 1시간으로 고정하였다. 이를 공촛점 현미경으로 확인하였다. 그 결과, Tat-Atox1 융합단백질이 WT 9-7 세포에 성공적으로 침투함을 확인하였다. 이와 대조적으로 Atox1 단백질은 세포 내로 침투하지 않는 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0063] **결과 5: WT 9-7 세포에 Tat-Atox1 융합단백질의 기전연구**

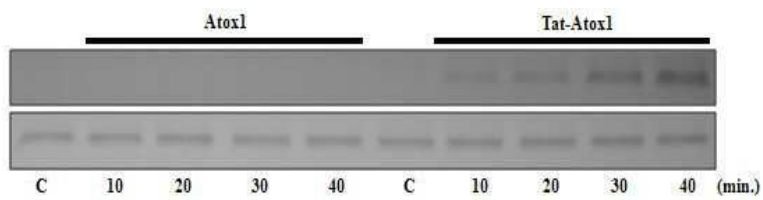
- [0064] 1) p38, ERK 신호 기전
- [0065] WT 9-7 세포에서 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 각각의 항체를 이용하여 p38, ERK 신호 기전을 확인해본 결과, Tat-Atox1 융합단백질이 농도 의존적으로 p38, ERK 신호 기전 억제함을 확인할 수 있었다 (도 6).
- [0066] 2) Akt 신호 기전
- [0067] WT 9-7 세포에서 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 항체를 이용하여 Akt 신호 기전을 확인해본 결과, Tat-Atox1 융합단백질이 농도 의존적으로 Akt 신호를 억제함을 확인할 수 있었다 (도 7).
- [0068] 3) p65 및 I κ B α 신호 기전
- [0069] WT 9-7 세포에서 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 각각의 항체를 이용하여 p65, I κ B α 신호 기전을 확인해본 결과, Tat-Atox1 융합단백질이 농도 의존적으로 p65, I κ B α 신호를 억제함을 확인할 수 있었다 (도 8).
- [0070] 4) COX2, iNOS, IL-6, IL-1 β 및TNF- α 신호 기전
- [0071] WT 9-7 세포에서 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 각각의 항체를 이용하여 COX2, iNOS, IL-6, IL-1 β , TNF- α 신호 기전을 확인해본 결과, Tat-Atox1 융합단백질이 농도 의존적으로 COX2, iNOS, IL-6, IL-1 β , TNF- α 신호를 억제함을 확인할 수 있었다 (도 9).
- [0072] 5) COX2, iNOS, IL-6, IL-1 β 및TNF- α 신호 기전
- [0073] WT 9-7 세포에서 RT-PCR을 수행하여 각각의 프라이머를 이용하여 COX2, iNOS, IL-6, IL-1 β , TNF- α 신호 기전을 확인해본 결과, Tat-Atox1 융합단백질이 농도 의존적으로 COX2, iNOS, IL-6, IL-1 β , TNF- α 를 억제함을 확인할 수 있었다 (도 10).
- [0074] 6) 캐스페이즈 3, 절단된 캐스페이즈 3 신호 기전
- [0075] WT 9-7 세포에서 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 각각의 항체를 이용하여 캐스페이즈 3, 절단된 캐스페이즈 3 신호 기전을 확인해본 결과, Tat-Atox1 융합단백질이 농도 의존적으로 캐스페이즈 3 및 절단된 캐스페이즈 3를 억제함을 확인할 수 있었다 (도 11).
- [0076] 7) S6K, p-S6K 신호 기전
- [0077] WT 9-7 세포에서 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 mTOR 항체를 이용하여 S6K와 p-S6K 신호 기전을 확인해본 결과, Tat-Atox1 융합단백질이 농도 의존적으로 S6K와 p-S6K를 억제함을 확인할 수 있었다 (도 12).
- [0078] 이상과 같은 결과들로부터, Atox1 융합단백질을 다낭신 세포에 처리하는 경우 세포 내로 원활히 침투하고 15시간 이상의 안정성을 나타내며, Erk 신호 및 Akt 신호를 감소시키므로, Atox1 융합단백질은 다낭신 예방 또는 치료용 약학 조성물로서 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면

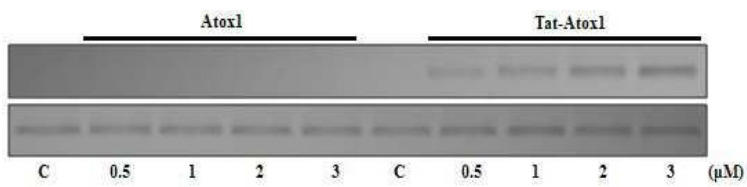
도면1



도면2



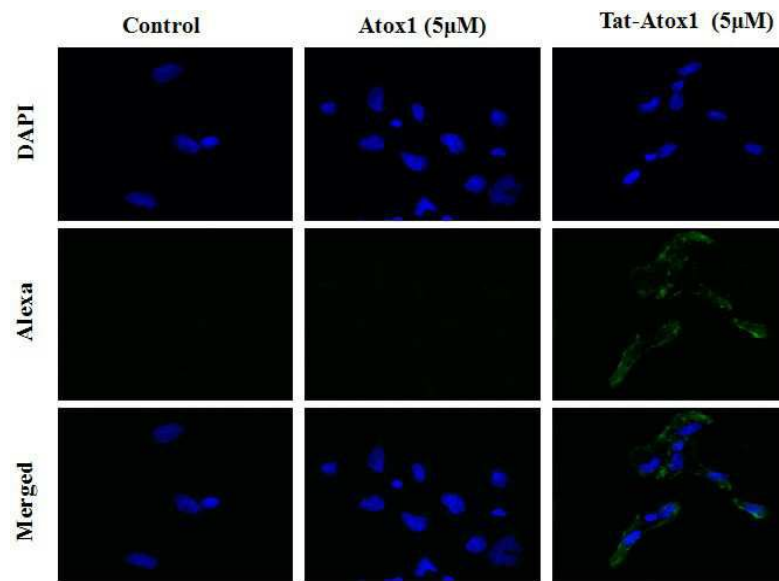
도면3



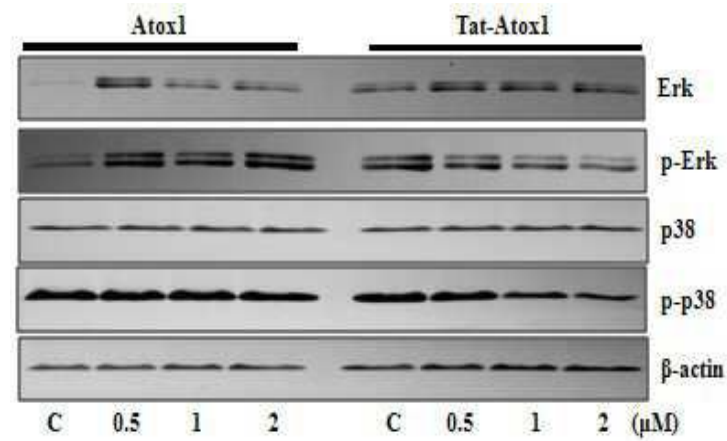
도면4



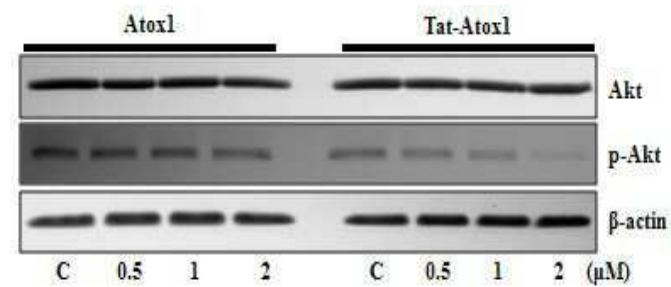
도면5



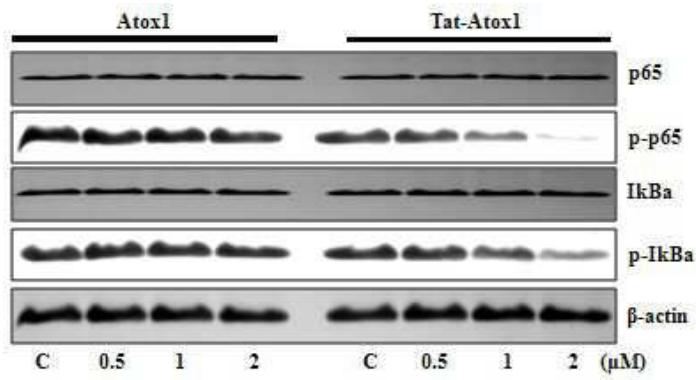
도면6



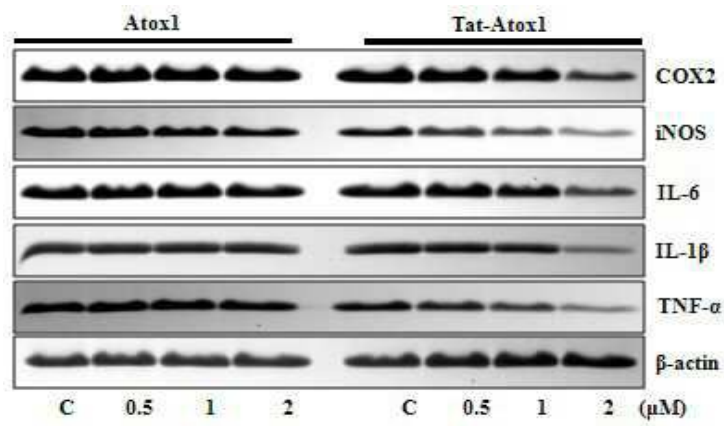
도면7



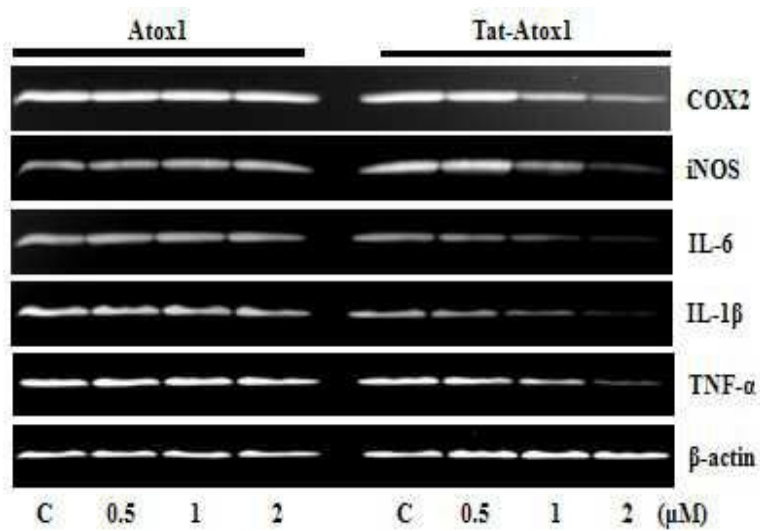
도면8



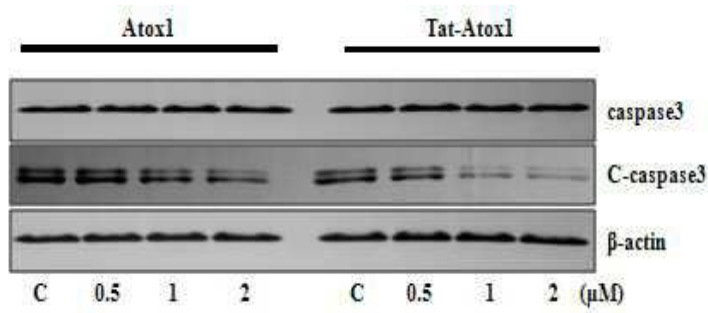
도면9



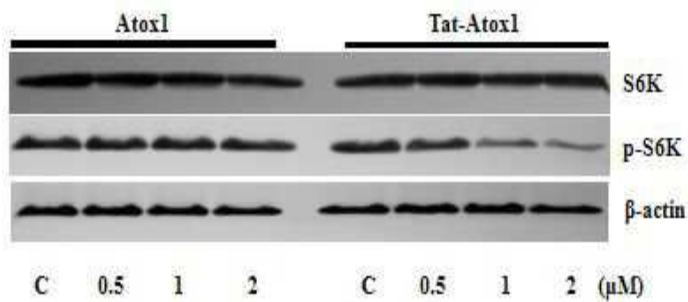
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <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> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- ctcgagatgc cgaagcacg
- <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 tgggtccgcg 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 gcaacctga 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 caacctgaa 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 tttccaccg		20
<210>	11	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sense primer of IL-1b	
<400>	11	
tgcagagttc cccaactggg 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 tggccctta 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

tgaagtcgg tgaacggatt tgg 23

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of GADPH

<400> 18

catgtaggcc atgaggtcca ccac 24