



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년01월07일
(11) 등록번호 10-0877151
(24) 등록일자 2008년12월26일

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/64* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0067150

(22) 출원일자 2007년07월04일

심사청구일자 2007년07월04일

(56) 선행기술조사문헌

논문1: Circ. Res.

논문2: Cardiovasc. Res.

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

전병화

대전 서구 둔산동 목련아파트 105-101

송윤정

대전 중구 태평동 버드내마을 아파트 118-1804

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 홍성란

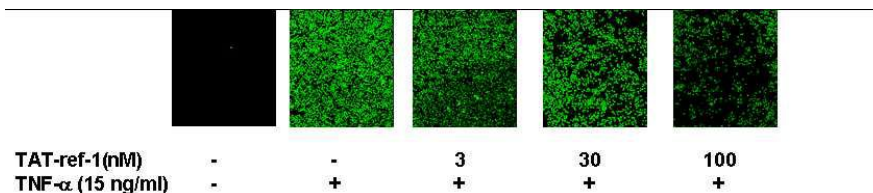
(54) 항염증 활성을 갖는 세포투과성 산화환원인자-1 융합단백질

(57) 요약

본 발명은 항염증 활성 및 세포 투과 기능을 갖는 융합단백질에 관한 것으로, 보다 상세하게는 항염증 활성을 갖는 산화환원인자-1 단백질과 Tat (transactivator of transcription) 단백질의 형질도입부위가 융합된 서열번호 1의 세포 투과성 Tat-ref-1 융합단백질에 관한 것이다.

본 발명에 의한 Tat-ref-1 융합단백질은 혈관세포의 염증매개물질의 발현을 효율적으로 억제할 수 있어, 염증매개물질의 발현과 관련한 폐혈증 및 타 염증질환의 억제물질로 활용 및 응용될 수 있다. 특히, 혈관내피세포에 염증 단백질 유착반응에 있어 Tat-ref-1 융합단백의 억제효과는 혈관염증의 억제물질활용 및 염증과 관련한 혈관염증 및 동맥경화증등의 치료물질로 활용될 수 있다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

이상기

대전 유성구 상대동 평화이지아파트 101-503

이상도

대전 서구 복수동 초록마을아파트 204-1105

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 E00174 / R01-2004-000-10045

부처명 한국학술진흥재단 / 한국과학재단

연구사업명 기초연구지원(기초과학 I) / 특정기초연구지원사업

연구과제명 세포내 단백질도입기술 및 산화환원조절단백을이용한 혈관염증제어기술개발 / 혈관세포의산화
환원조절 시스템 연구

주관기관 충남대학교

연구기간 2004년 09월 01일 ~ 2007년 10월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

인간 산화환원인자-1 단백질과 Tat 단백질의 단백질 형질 도입부위가 융합된 서열번호 1의 세포 투과성 융합단백질 Tat-ref-1.

청구항 2

제 1 항의 융합단백질 Tat-ref-1을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 유전자의 서열이 서열번호 4인 것을 특징으로 하는 융합단백질 Tat-ref-1을 코딩하는 유전자.

청구항 4

제 1 항의 융합단백질을 발현시키는 제 2 항 또는 제 3 항의 유전자를 포함하는 발현벡터.

청구항 5

제 4 항의 발현벡터에 의해 형질전환된 대장균 형질전환체(기탁번호 KCTC-11139BP).

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1 항의 Tat-ref-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 항염증질환 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 항염증질환은 동맥경화 또는 혈관염증질환인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 9

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 항염증 활성 및 세포 투과 기능을 갖는 융합단백질에 관한 것으로, 보다 상세하게는 항염증 활성을 갖는 산화환원인자-1 단백질과 Tat (transactivator of transcription) 단백질의 형질도입부위가 융합된 Tat-ref-1 융합단백질에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 산화환원인자-1(redox factor-1, ref-1)은 다기능 단백질로서, DNA의 손상시 손상부위를 복구하는 어퓨리닉/어피리미디닉 엔도뉴클레아제(apurinic/aprimidinic endonuclease)의 기능 및 AP-1, NF- κ B와 같은 전사인자의 환원성 조절기능(redox function) 등을 갖는 것으로 알려져 있다. 전사인자에 대한 환원성 조절은 여러 전사인자(transcription factor)의 DNA 결합 영역(binding domain)에서 산화형 시스테인(cysteine) 잔기를 환원시키는 것에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다(Xanthoudakis, G.G. Miao and T. Curran, The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by non-overlapping domains. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91

(1994), pp. 23-27).

- <3> 최근에는 산화환원인자-1의 기능이 추가적으로 밝혀지고 있는데, 혈관내피세포에서 산화환원인자-1은 일산화질소의 생성을 증가시켜 혈압을 조절한다는 것 (Jeon et al., Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 regulates endothelial NO production and vascular tone. Circ Res. 2004 Oct 29;95(9):902-10) 및 항염증기전(Kim et al, Apurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 inhibits monocyte adhesion in endothelial cells. Cardiovasc Res. 2006 Feb 1;69(2):520-6)이 보고된 바 있다. 즉, 재조합아데노바이러스를 이용하여 산화환원인자-1을 혈관내피세포에 과발현시키면 일산화질소의 생성이 증가되고 활성산소의 생성이 감소되는 것이 보고되었으며, 이러한 작용에 의해 혈압 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 아데노바이러스를 이용하여 산화환원인자-1을 혈관내피세포에 과발현시킨 경우, tumor-necrosis factor- α 에 의해 유도되는 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)의 발현이 억제되고 혈관내피세포에 단백질의 유착도 억제된다는 것이 밝혀진 바 있다.
- <4> 동맥경화와 같은 혈관질환의 초기병변은 주로 혈관내피세포의 염증반응이 원인이 되고 있다 (Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26). 정상 혈관내피세포들은 염증세포와 상호작용이 일어나지 않고 혈류를 따라 흘러갈 뿐이므로 혈관벽과의 접촉이 거의 일어나지 않는 반면, 혈관내피세포에 염증이 일어나면, 염증세포와 상호작용이 일어나 염증세포가 혈관벽에 달라붙어 염증반응이 일어나게 된다. 이러한 염증반응은 혈관내피세포의 VCAM-1 단백질의 발현이 주요 매개체로 알려져 있어, VCAM-1의 발현억제물질은 염증으로 인한 혈관질환의 치료물질로 활용되고 있다 (Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis; Int J Clin Pract. 2007 Apr;61(4):697-701). 따라서, 산화환원인자-1 (ref-1)이 세포내로 용이하게 이동하여 VCAM-1의 발현을 억제할 수 있도록 한다면 혈관질환의 치료에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.
- <5> 아직까지 정확한 세포내 도입기전이 밝혀져 있지는 않으나 Tat (transactivator of transcription) 단백질은 이 단백질 중 단백질 형질도입부위 (protein transduction domain)가 존재하기 때문에 효율적으로 세포막을 통과하여 세포내로 이동하는 것으로 알려져 있다(Murriel CL, Dowdy SF. Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules. Expert Opin Drug Deliv. 2006 Nov;3(6):739-46). Tat 단백질의 단백질 형질도입부위를 이용하여 단백질을 융합시키는 경우 세포 내로 단백질이 용이하게 도입되며 단백질의 기능 및 활성을 나타내는 것이 보고되고 있고 최근 동물실험에서도 그 효과가 보고되고 있다 (Cai SR, Xu G, Becker-Hapak M, Ma M, Dowdy SF, McLeod HL. The kinetics and tissue distribution of protein transduction in mice. Eur J Pharm Sci. 2006 Mar;27(4):311-9).
- <6> 따라서 항염증 기전을 갖는 산화환원인자-1과 Tat 단백질의 융합단백질은 세포내로의 도입이 용이함과 동시에 산화환원인자-1의 VCAM-1 발현 억제 기능으로 인한 혈관염증 억제기능을 나타낼 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명은 VCAM-1 발현 억제 효과가 있는 산화환원인자-1 단백질이 세포 내로 용이하게 도입될 수 있는 융합단백질을 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.
- <8> 또한 본 발명의 또 다른 목적은 상기 Tat-ref-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 염증질환의 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <9> 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 융합단백질은 인간 산화환원인자-1 단백질과 Tat 단백질의 단백질 형질도입부위가 융합된 서열번호 1의 세포 투과성 융합단백질 Tat-ref-1인 것을 특징으로 한다.
- <10> Tat-ref-1 융합단백질을 만들기 위하여 pTat2.1 벡터에 인간의 ref-1유전인자를 삽입하기 위하여 ref-1의 시작 코돈에 EcoRI 제한효소 사이트를 연결한 primer와 정지 코돈에 HindIII 제한효소 사이트를 연결한 primer를 제작하여 (서열번호 2 및 3) 인간 ref-1 cDNA를 분리하였다. 분리한 ref-cDNA(957bp)를 pTat2.1에 삽입하여 pTat-ref-1 발현벡터를 제작하여 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하고 그 형질전환체 대장균 BL21(DE3)/pTat-ref-1를 2007년 06 월 19일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KCTC 11139BP). 상기 형질전환체를 이용하여 Tat-ref-1 융합단백질을 과발현 시킨 후 변성상태(denature condition)에서 분리하고 정제

하였다. 상기 Tat-ref-1 융합단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

- <11> 센스프라이머 : 5'-cgg aat tcc atg ccg aag cgt ggg aaa aag gga g-3' (서열번호 2)
- <12> 안티센스프라이머: 5'-cgc aag ctt tca cag tgc tag gta tag ggt a-3' (서열번호 3)
- <13> Tat-ref-1 융합단백질을 코딩하는 유전자는 단백질정제를 위한 6개의 히스티딘(histidine) 및 Tat형질도입부위의 9개 아미노산 RKRRQRRR을 코딩하는 유전인자, 그리고 인간의 ref-1 유전인자를 포함하고 있는 것을 특징으로 한다. 상기 유전자는 특히 서열번호 4의 서열을 갖는 것이 바람직하다.
- <14> Ref-1 단백질을 혈관내피세포에 처리하였을 경우 세포내 투과가 관측되지 않은데 반하여, 본 발명에 의한 Tat-ref-1 융합단백질은 30 nM 농도에서부터 세포내 투과가 일어나는 것을 관측할 수 있었다. 상기 세포내 투과는 Tat-ref-1 융합단백질을 처리한 후 1분 후부터 감지되었으며 15분 후에는 내재성 ref-1 단백질의 약 70%의 발현을 보였다. 또한, 세포내로 투과된 Tat-ref-1 융합단백질은 투과 후 약 12시간까지는 60% 정도가 지속되었으나, 18시간 이후 현저히 감소하여 최대 발현 단백질량의 20% 수준까지 감소하였다.
- <15> 혈관내피세포내로 투과된 Tat-ref-1 융합단백질은 TNF- α 를 매개로 하는 VCAM-1의 발현 및 혈관염증 초기인자인 염증세포의 유착을 효과적으로 억제하여 항염증질환의 치료제로서의 효용성을 확인하였다. 본 발명에 따른 Tat-ref-1 융합단백질은 본 발명의 실시예에서는 혈관내피세포만을 대상으로 하였으나, 혈관염증질환 뿐 아니라 VCAM-1의 발현에 기인하는 폐혈증과 같은 다른 염증질환의 치료에도 유용하게 사용될 수 있음은 당연하다.
- <16> Tat-ref-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 피부도말제제, 경구, 정맥주사 및 근육주사형태로 제형화할 수 있다. 또한 피부의 염증이 발생 시 바르는 소염제나 캡슐로 만들어 경구투여제제로 만들어 염증질환치료 및 예방용 약으로 이용될 수 있다.
- <17> Tat-ref-1 융합단백질을 유효성분으로하는 약제학적 조성물은 생체내 기능조절 특히 활성산소 및 유전인자복구, 혈관염증치료제등의 모든 치료법에 응용될 수 있으며 그 기법은 향후 세포내 유전질환의 치료 및 새로운 질환치료법으로 활용될 수 있다.
- <18> 본 발명에 의한 Tat-ref-1 융합단백질의 약제학적 유효량은 3~100 nM이 바람직하다.
- <19> 또한 본 발명에 의한 Tat-ref-1 융합단백질은 약제학적 조성물로서 염증질환의 치료에 이용될 뿐 아니라, 상기 융합단백질을 유효성분으로 하는 화장품 조성물로서 사용될 수 있다. 상기 화장품 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않으며, 구체적으로 유연화장수, 영양화장수, 영양크림 또는 마사지크림 등의 제형을 가질 수 있다. 또한 그 구체적인 조성물의 성분은 제형에 따라, 목적하는 효과에 따라서 당업자가 적절하게 선정하여 배합할 수 있을 것이다.

효 과

- <20> 이상과 같이 본 발명에 의한 Tat-ref-1 융합단백질은 Tat와 인간 산화환원인자-1의 성질을 동시에 갖고 있으므로, 유전인자복구 기능, 항산화 기능 및 염증 억제 기능을 갖는 인간 산화환원인자-1를 단백질 수준에서 세포내로 직접 도입시키는 효과를 얻을 수 있다.
- <21> 본 발명에 의한 Tat-ref-1 융합단백질은 혈관세포의 염증매개물질의 발현을 효율적으로 억제할 수 있어, 염증매개물질의 발현과 관련한 폐혈증 및 다 염증질환의 억제물질로 활용 및 응용될 수 있다. 특히, 혈관내피세포에 염증 단백질 유착반응에 있어 Tat-ref-1융합단백의 억제효과는 혈관염증의 억제물질활용및 염증과 관련한 혈관염증 및 동맥경화증등의 치료물질로 활용될 수 있다.
- <22> 또한 본 발명의 Tat-ref-1 융합단백질은 질병의 치료 이외에도 화장품 및 건강식품등의 제품개발에 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <23> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- <24> 실시예
- <25> 실시예 1 : Tat-ref-1 발현벡터의 제조 및 형질전환

- <26> Tat-ref-1 융합단백질을 과발현시키기 위하여 pTat2.1백터를 이용하여 6개의 히스티딘과 Tat 형질도입부위 (RKKRRQRRR)와 인간의 Ref-1 cDNA가 포함되어 있는 Tat-ref-1 발현백터를 제조하였다. 도 1은 Tat-ref-1 발현 백터의 개열지도(cleavage map)를 나타낸다.
- <27> 먼저, 인간의 ref-1 cDNA는 ref-1의 시작코돈에 EcoRI 제한효소 사이트를 연결한 primer와 정지코돈에 HindIII 제한효소 사이트를 연결한 하기 primer를 이용하여 pDsRed-Ref-1(Jeon et al, Circ Res, 2004, 95(9): 902-10)으로부터 중합효소연쇄반응을 이용하여 분리하였다. 분리된 인간 ref-1 cDNA는 957 bp로 염기서열은 서열 번호 5와 같다.
- <28> 센스프라이머 : 5'-cgg aat tcc atg ccg aag cgt ggg aaa aag gga g-3' (서열번호 2)
- <29> 안티센스프라이머: 5'-cgc aag ctt tca cag tgc tag gta tag ggt a-3' (서열번호 3)
- <30> EcoRI, HindIII 제한효소를 사용하여 pTat-2.1 백터(5368 bp, 캘리포니아대 Steven Dowdy 교수로부터 기증받 음)를 절단한 다음, ref-1 cDNA를 pTat2.1 백터에 삽입하여 Tat-ref-1백터를 완성하였다. 상기 백터를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21(DE3)/pTat-ref-1을 제조하고 2007년 06 월 19일자로 한국생 명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KCTC 11139BP).
- <31> **실시예 2 : 제조한 Tat-ref-1 융합단백질의 분리 및 정제**
- <32> 실시예 1에서 제조한 대장균 형질전환체 BL21(DE3)/pTat-ref-1을 50 µg/ml kanamycin이 포함된 LB배지에 도 말하여 37℃에서 14~16시간 배양하였다. 형질전환된 콜로니를 선택하여 상기 kanamycin이 포함된 LB 배지 10ml 에 첨가하여 37℃에서 종균배양(seed-culture)한 후 역시 상기 50 µg/ml kanamycin이 포함된 LB 배지 1 L에서 A₆₀₀ 값이 0.4~0.6될 때까지 37℃에서 배양하였다. OD 값이 0.4~0.6이 되면 1 mM IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside)를 첨가하고 37℃에서 4시간 동안 추가로 배양하여 발현을 유도하였다.
- <33> 배양한 세포를 원심분리하여 모은 뒤 10 ml의 완충용액 Z(8M Urea, 100mM NaCl, 20mM HEPES pH8.0)를 첨가한 후 초음파처리하였다. 상기 혼합물을 다시 원심분리한 후 상층액을 취해서 2~3ml의 Ni-NTA(Qiagen, Cat No : 30210)가 첨가된 단백질결럼(Bio-rad, Cat No : 731-1550)에 부하하였다. 10 mM 이미다졸이 포함되어 있는 완 충용액 Z로 세척한 다음, 각 용출완충액(이미다졸이 각각 100mM, 250mM, 500mM 또는 1M이 포함되어 있는 완충용 액 Z)으로 융합단백질을 각각 용출하였다. 도 2는 각 용출완충액을 사용하여 발현된 Tat-ref-1 융합단백질을 정제한 결과를 보여주는 코마시블루 염색사진으로, 이미다졸 100mM이 포함되어 있는 완충용액 Z에서 가장 많은 Tat-ref-1 융합단백질이 용출되어 이미다졸 농도 100mM인 완충용액 Z가 본 융합단백질의 용출에 가장 적합한 용 출완충액인 것을 확인할 수 있었다. 또한 Tat-ref-1 융합단백질의 분자량이 약 41 kDa인 것을 알 수 있었다.
- <34> 실시예 1에서 제조된 형질전환체에 의해 발현된 융합단백질은 아미노기 말단에 6개의 히스티딘을 포함하고 있어 Ni-NTA결럼을 이용하여 순수하게 정제할 수 있었다. 정제된 융합단백은 웨스턴블롯분석(도 3의 A)을 통하여 다 시 한번 tat-ref-1 융합단백질임을 확인하였으며, 코마시블루 염색(도 3의 B)의 결과와도 일치하였다. 도 3에 서 라인 1은 단백질 사이즈 마커, 라인 2는 Tat-ref-1 융합단백질(41 kDa), 라인 3은 ref-1단백질(41 kDa)의 분석 결과이며 도 3의 A는 웨스턴블롯, 도 3의 B는 코마시블루 염색의 결과를 각각 나타낸다.
- <35> 용출된 융합단백질은 PD10 column kit (GE Healthcare Bio Sciences AB, Cat No : 17-0851-01)를 이용하여 염 분을 제거하였다. 염분을 제거한 정제된 Tat-ref-1융합단백질에 10%글리세롤을 첨가하여 -70℃에 보관하며 사용 하였다. SDS-PAGE를 이용하여 코마시블루 염색(coomassie blue staining)을 하여 우혈청 알부민과 비교함으로써 단백질의 농도를 계산한 후 실시예에 사용되는 농도에 따라 희석하여 사용하였다.
- <36> **실시예 3 : 혈관내피세포에서 Tat-ref-1 융합단백질의 세포내 투과**
- <37> 본 발명의 하기 실시예에서 웨스턴블롯 분석(western blot analysis)은 다음같이 행하였다. 세포균질액은 10% SDS폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법으로 분리하여 겔에 니크로셀룰로스막으로 전기이동시켰다. 단백질을 이 동된 막을 5% 스킴유유로 처리한 후 인간 Ref-1항체(1:1000희석), VCAM-1항체(1:1000희석) 또는 His항체 (1:1000)로 2시간 처리하였다. Horseradish peroxidase-conjugated 2차항체 (1:2000희석)으로 1시간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence kit를 이용하여 단백질의 발현량을 확인하였다.
- <38> **1) Tat-ref-1 융합단백질과 ref-1 단백질의 혈관내피세포 투과 비교**
- <39> 혈관내피세포(HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells)는 EGM-2 배지를 사용하여 5%의 이산화탄소와 95%의 공기가 혼합된 37℃수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 1×10⁵ 세포/ml의 농도로 EGM-2

(Clonetics, USA)에 회식하여 사용하였다.

<40> 상기 회식된 배양세포를 2 ml씩 6 well에 분주하고, Tat-ref-1 융합단백질 또는 ref-1 단백질을 3, 10, 30, 100nM 농도로 각각 추가하여 18시간 동안 37℃수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 상기 혼합물을 인산완충액 식염수로 3회 세척한 후 초음파분쇄기를 이용하여 1초씩 10회정도 분쇄하고 이를 12000 rpm에서 20분정도 원심 분리시켜 상층액만 획득했다. 획득한 상층액을 BIO-Rad protein assay를 이용하여 단백질 정량을 하고, 15 µg의 단백질을 sampling하였다. 이렇게 sampling된 것을 Laemmli 샘플완충액과 혼합하여 100℃에서 10분정도 열을 가해주고, 얼음에서 10분정도 열을 식혀준 후 SDS-PAGE를 실시했다. 세포내로 투과된 Tat-ref-1 융합단백질 또는 ref-1 단백질을 웨스턴블롯으로 측정하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<41> 도 4는 함께 처리한 Tat-ref-1 융합단백질(도 4의 A)또는 ref-1 단백질(도 4의 B)의 농도별 세포내 단백질의 투과 결과를 보여주는 웨스턴블롯 결과로서, 도 4에서 endogenous ref-1은 세포내에 존재하고 있는 내재성 ref-1 단백질을 나타낸다. Tat이 붙어있는 Tat-ref-1 융합단백질의 경우에는 융합단백질의 농도가 30 nM부터 세포내 투과가 일어나고, 100nM 농도에서는 30nM과 비교해봤을 때 두 배 이상 세포내 투과가 일어남을 확인할 수 있었다(도 4의 A). 반면, Tat이 붙어있지 않는 Ref-1단백의 경우에는 100 nM 농도에서도 세포내 투과가 일어나지 않음을 알 수 있었다(도 4의 B).

<42> 2) Tat-ref-1 융합단백질의 시간에 따른 혈관내피세포 투과

<43> HUVEC 세포에 대한 Tat-ref-1 융합단백질의 세포내 투과를 시간별로 관찰하기 위하여 1)에서 1×10^5 /ml의 개수로 회식된 배양된 세포를 2ml씩 6 well에 분주하고, Tat-ref-1 융합단백질 또는 ref-1 단백질을 100nM 농도로 추가하여 각각 1, 5, 15, 30, 60분간 37℃수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 처리 후 혼합물을 인산완충액 식염수로 3회 세척한 후 초음파분쇄기를 이용하여 이를 원심분리하여 상층액을 획득했다. 획득한 상층액을 실시예 3-1)에서 같은 방법으로 SDS-PAGE를 실시하고 세포내로 투과된 Tat-ref-1 융합단백질의 양을 웨스턴블롯 분석으로 측정하고 그 결과를 도 5에 도시하였다.

<44> 도 5에서 확인할 수 있듯이 혈관내피세포에서 Tat-ref-1은 투여한지 1분에 감지될 수 있었으며 15분후에는 내재성 ref-1단백의 약 70%수준의 발현을 보였다.

<45> 3) Tat-ref-1 융합단백질의 혈관내피세포 투과 후 지속 시간

<46> HUVEC세포에 Tat-ref-1융합단백의 세포내 투과후 지속시간을 알아보기 위하여 1) 및 2)의 실험과 동일한 방법에 의해 1×10^5 /ml의 개수로 회식된 HUVEC 배양 세포에 100 nM의 Tat-ref-1융합단백을 1~24시간 동안 처리하고, 인산완충액식염수로 3회 세척한 후 세포를 분쇄하여 세포내로 투과된 Tat-ref-1융합단백의 양을 웨스턴블롯분석으로 측정하였다.

<47> 도 6에서 확인할 수 있듯이 세포내로 유입된 Tat-ref-1융합단백은 18시간이후 truncated현상이 일어나 단백질 양이 현저히 감소하여 최대로 발현된 단백질량의 20%수준까지 감소하였다. 도 6에서 표시된 truncated Tat-ref-1은 세포내의 분해효소들에 의하여 Tat-ref-1이 분해된 것으로 정상적인 Tat-ref-1의 분자량보다 작은 형태이다.

<48> 본 실시예를 통해 본 발명에 의한 Tat-ref-1 융합단백질이 성공적으로 혈관내피세포에 도입됨을 확인 할 수 있었다.

<49> 실시예 4 : Tat-ref-1 융합단백질의 VCAM-1 발현 억제 효과 측정

<50> 배양혈관내피세포에서 Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)에 의하여 유도발현되는 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) 발현에 Tat-Ref-1 융합단백질이 미치는 영향을 규명하였다.

<51> 1×10^5 /ml의 개수로 회식된 HUVEC 배양 세포를 2 ml씩 6 well에 분주하고, 도 7에 도시된 바와 같이 Tat-GFP(켈리포니아대 Steven Dowdy 교수로부터 플라스미드를 제공받음) 100nM 또는 Tat-ref-1융합단백을 3, 30, 100 nM을 1시간동안 전처리한 후 TNF-α (15ng/ml)를 처리하여 18시간동안 37℃수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 이후 실시예 3)에서와 같은 방법에 의해 15 µg 단백질을 sampling하여 SDS-PAGE를 실시하고 VCAM-1, Ref-1 및 β-actin의 양을 웨스턴블롯에 의해 측정하였다. 녹색형광단백이 결합된 Tat-GFP는 Tat-ref-a의 VCAM-1 발현 억제 효과 측정에 대한 대조군으로 사용하였으며, β-actin 정량은 단백질 정량이 정상적으로 이루어졌는지 확인하기 위하여 실시하였다.

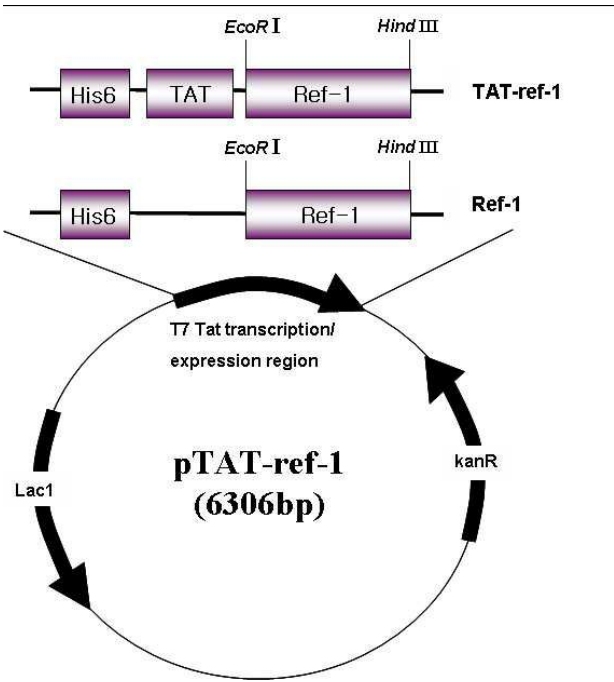
- <52> 도 7에서 보는 바와 같이 혈관내피세포에서 안정 시(TNF- α 무처리구) VCAM-1은 발현되지 않았으나 15 ng/ml TNF- α 의 처리는 혈관염증의 주요표적단백인 VCAM-1의 발현을 현저히 증가시켰다. 또한 대조군으로 사용한 Tat-GFP는 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의한 VCAM-1의 발현에 영향을 주지 않았으나, Tat-ref-1처리구는 농도의 존적 (3 ~ 100 nM)으로 VCAM-1 발현량이 감소함을 알 수 있었다.
- <53> 이로부터 Tat-ref-1이 혈관내피세포내로 도입되어 TNF- α 에 의한 염증신호전달을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었으며 TNF- α 에 의한 VCAM-1의 발현을 억제하는 유효억제농도는 3 ~ 100 nM이었다.
- <54> **실시예 5 : Tat-ref-1 융합단백질에 의한 단백질 유착 억제 효과 측정**
- <55> Tat-ref-1 융합단백질을 혈관내피세포(HUVEC)에 농도별로 처리한 후 혈관염증 억제효과를 혈관내피세포에 단백질의 유착정도로 파악하였다.
- <56> U937세포는 10% Fetal Bovine Serum과 penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml을 보충한 RPMI1640배지에서 배양했다. 세포주는 5%의 이산화탄소와 95%의 공기가 혼합된 37 $^{\circ}$ C수분 공급형 배양기에서 유지·배양하였다.
- <57> 1×10^5 /ml의 개수로 희석된 HUVEC 배양 세포를 0.5 ml씩 24well에 분주하고, Tat-ref-1융합단백을 3, 30, 100nM 농도로 1시간 동안 전처리한 후 TNF- α (15 ng/ml)를 처리하여 18시간동안 37 $^{\circ}$ C수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 18시간 후 단백질 유착분석을 1 μ M BCECF-AM으로 형광염색시킨 U937세포(KCTC-HC18105, 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 구입)를 50분동안 반응시킨 후 Hanke's 완충식염수로 세척하고 혈관내피세포에 부착한 U937세포의 수를 공초점현미경을 통하여 분석하였다.
- <58> 도 8에서 확인할 수 있듯이 혈관내피세포에 단백질의 유착은 TNF- α 에 의하여 유도되었으며 Tat-ref-1 융합단백질의 전처리는 이러한 단백질의 유착을 현저히 억제하였다. 따라서, Tat-ref-1 융합단백질은 혈관내피세포에서 염증 사이토카인의 일종인 TNF- α 에 의한 혈관염증반응을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인할 수 있었으며 유효농도는 3 ~ 100 nM이었다.

도면의 간단한 설명

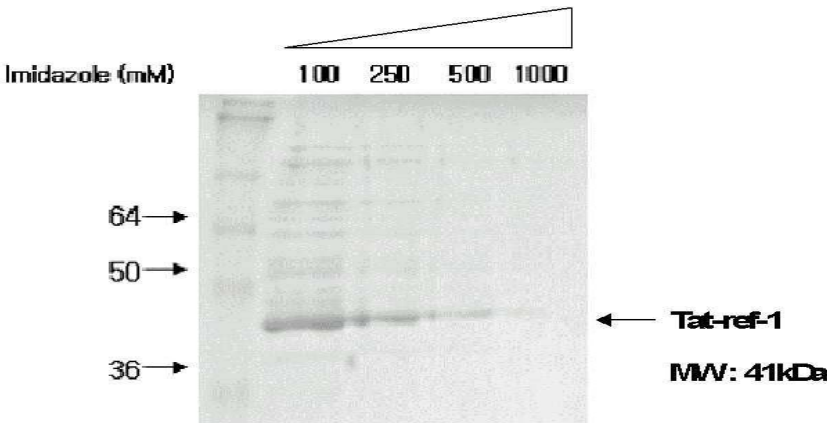
- <59> 도 1은 Tat-ref-1 융합단백질(A) 및 Ref-1 단백질(B)의 설계도면.
- <60> 도 2는 여러 가지 농도의 imidazole을 포함한 용출완충액에 의해 Tat-ref-1 융합단백질을 정제한 결과를 보여주는 코마시블루 염색 결과 사진.
- <61> 도 3은 Tat-ref-1융합단백과 Tat-ref-1대조군으로 사용되는 ref-1단백의 웨스턴블롯(A) 및 코마시블루염색(B) 결과를 보여주는 사진.
- <62> 도 4는 Tat-ref-1 융합단백질(A) 및 ref-1 단백질(B)의 농도별 혈관내피 세포내 투과 정도를 웨스턴블롯으로 확인한 결과를 보여주는 사진.
- <63> 도 5는 시간에 따른 Tat-ref-1 융합단백질의 혈관내피 세포내 도입을 웨스턴블롯으로 확인한 결과를 보여주는 사진.
- <64> 도 6은 Tat-ref-1 융합단백질의 혈관내피 세포내 투과 후 지속 시간을 웨스턴블롯으로 확인한 결과를 보여주는 사진.
- <65> 도 7은 Tat-ref-1를 농도별로 혈관내피세포에 처리한 후 혈관내피세포에서 VCAM-1 발현량을 웨스턴블롯을 이용하여 확인한 결과를 보여주는 사진.
- <66> 도 8은 Tat-ref-1를 농도별로 혈관내피세포에 처리한 후 단백질의 유착 정도를 공초점현미경으로 관측한 결과를 보여주는 사진.

도면

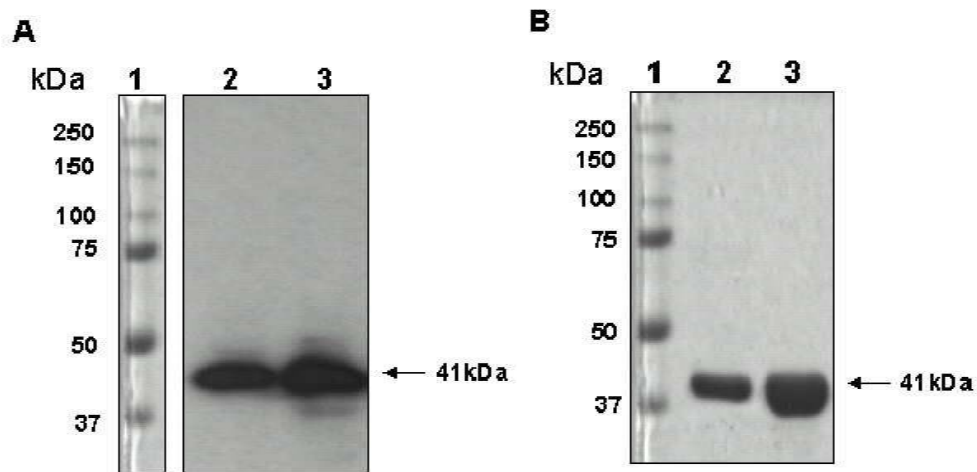
도면1



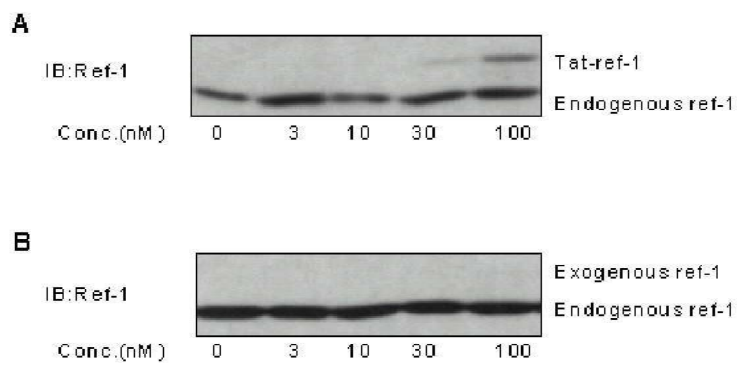
도면2



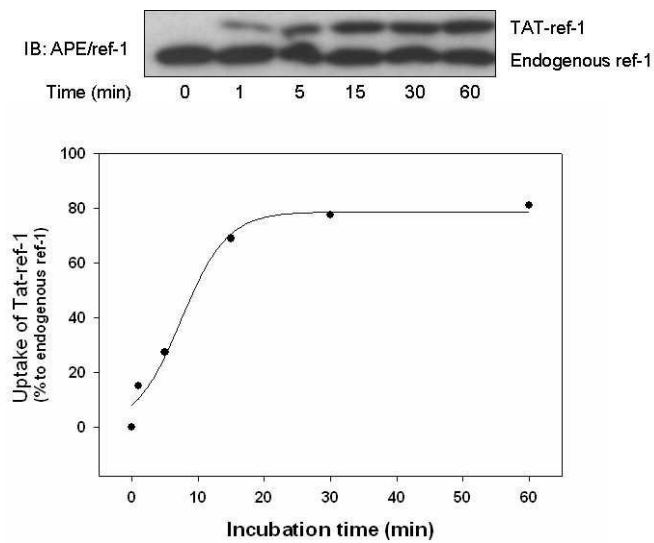
도면3



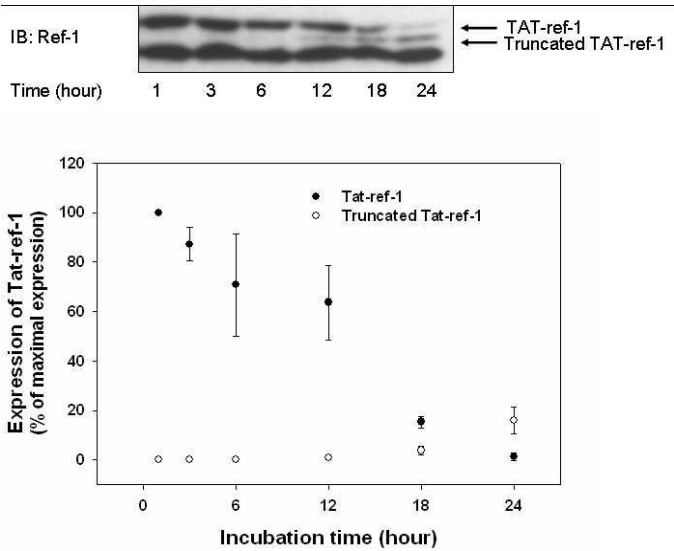
도면4



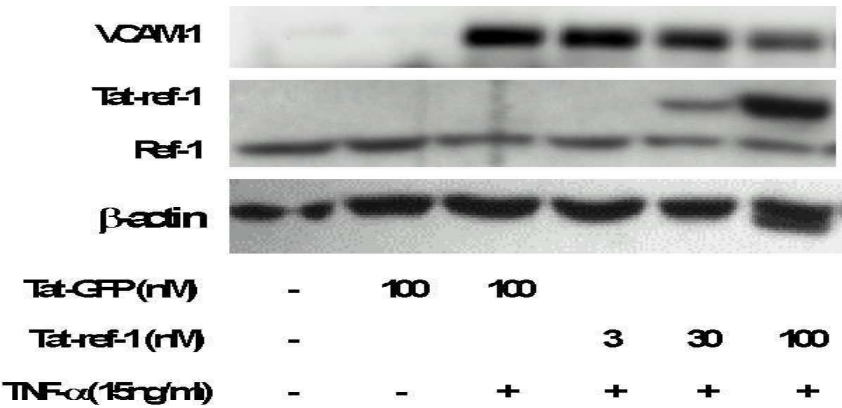
도면5



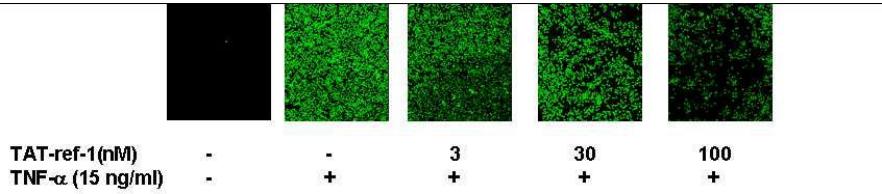
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Cell permeable redox Factor-1 fusion protein having anti-inflammatory activity

<160> 5

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tat-ref-1

<400> 1

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser
20 25 30

Asp Pro Asn Ser Met Pro Lys Arg Gly Lys Lys Gly Ala Val Ala Glu
35 40 45

Asp Gly Asp Glu Leu Arg Thr Glu Pro Glu Ala Lys Lys Ser Lys Thr
50 55 60

Ala Ala Lys Lys Asn Asp Lys Glu Ala Ala Gly Glu Gly Pro Ala Leu
65 70 75 80

Tyr Glu Asp Pro Pro Asp Gln Lys Thr Ser Pro Ser Gly Lys Pro Ala
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Cys Ser Trp Asn Val Asp Gly Leu Arg Ala Trp Ile
100 105 110

Lys Lys Lys Gly Leu Asp Trp Val Lys Glu Glu Ala Pro Asp Ile Leu
115 120 125

Cys Leu Gln Glu Thr Lys Cys Ser Glu Asn Lys Leu Pro Ala Glu Leu
130 135 140

Gln Glu Leu Pro Gly Leu Ser His Gln Tyr Trp Ser Ala Pro Ser Asp
145 150 155 160

Lys Glu Gly Tyr Ser Gly Val Gly Leu Leu Ser Arg Gln Cys Pro Leu
165 170 175

Lys Val Ser Tyr Gly Ile Gly Glu Glu Glu His Asp Gln Glu Gly Arg
180 185 190

Val Ile Val Ala Glu Phe Asp Ser Phe Val Leu Val Thr Ala Tyr Val
195 200 205

Pro Asn Ala Gly Arg Gly Leu Val Arg Leu Glu Tyr Arg Gln Arg Trp
210 215 220

Asp Glu Ala Phe Arg Lys Phe Leu Lys Gly Leu Ala Ser Arg Lys Pro
225 230 235 240

Leu Val Leu Cys Gly Asp Leu Asn Val Ala His Glu Glu Ile Asp Leu
245 250 255

Arg Asn Pro Lys Gly Asn Lys Lys Asn Ala Gly Phe Thr Pro Gln Glu
260 265 270

Arg Gln Gly Phe Gly Glu Leu Leu Gln Ala Val Pro Leu Ala Asp Ser
275 280 285

Phe Arg His Leu Tyr Pro Asn Thr Pro Tyr Ala Tyr Thr Phe Trp Thr
290 295 300

Tyr Met Met Asn Ala Arg Ser Lys Asn Val Gly Trp Arg Leu Asp Tyr
305 310 315 320

Phe Leu Leu Ser His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Cys Asp Ser Lys Ile
325 330 335

Arg Ser Lys Ala Leu Gly Ser Asp His Cys Pro Ile Thr Leu Tyr Leu
340 345 350

Ala Leu ***
355

<210> 2
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense primer

<400> 2
cggaattcca tgccgaagcg tgggaaaaag ggag 34

<210> 3
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> anti-sense primer

<400> 3
cgcaagcttt cacagtgcta ggtatagggt a 31

<210> 4
<211> 1065
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene coding Tat-ref-1 protein

<400> 4
atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggcgccg cgagccat 60

atgaggaaga agcggagaca gcgacgaaga ggctcggatc cgaattccat gccgaagcgt 120

gggaaaaagg gagcgggtggc ggaagacggg gatgagctca ggacagagcc agaggccaag 180

aagagtaaga cgcccgcaaa gaaaaatgac aaagaggcag caggagaggg cccagccctg 240

tatgaggacc ccccatatca gaaaacctca cccagtggca aacctgccac actcaagatc 300

tgctcttgga atgtggatgg gcttcgagcc tggattaaga agaaaggatt agattgggta 360

aaggaagaag cccagatat actgtgcctt caagagacca aatgttcaga gaacaaacta 420

ccagctgaac ttcaggagct gcctggactc tctcatcaat actggtcagc tccttcggac 480

aaggaagggt acagtggcgt gggcctgcct tcccgccagt gccactcaa agtttcttac 540

ggcataggcg aggaggagca tgatcaggaa ggccgggtga ttgtggctga atttgactcg 600

tttgtgctgg taacagcata tgtacctaat gcaggccgag gtctggtacg actggagtac 660

cggcagcgct gggatgaagc ctttcgcaag ttctgaagg gcctggcttc ccgaaagccc 720

cttgtgctgt gtggagacct caatgtggca catgaagaaa ttgaccttcg caacccaag 780

gggaacaaaa agaattgctgg cttcacgcca caagagcgcc aaggcttcgg ggaattactg 840

caggctgtgc cactggctga cagctttagg cacctctacc ccaacacacc ctatgcctac 900

accttttggc cttatatgat gaatgctcga tccaagaatg ttggttggcg ccttgattac 960

tttttgtgt cccactctct gttacctgca ttgtgtgaca gcaagatccg ttccaaggcc 1020

ctcggcagtg atcactgtcc tatcacccia tacctagcac tgtga 1065

<210> 5
 <211> 957
 <212> DNA
 <213> human

<400> 5
 atgccgaagc gtgggaaaaa gggagcgggt gcggaagacg gggatgagct caggacagag 60

ccagaggcca agaagagtaa gacggccgca aaaaaaatg acaaagagc agcaggagag 120

ggcccagccc tgtatgagga cccccagat cagaaaacct caccagtgg caaacctgcc 180

acactcaaga tctgctcttg gaatgtggat gggcttcgag cctggattaa gaagaaagga 240

ttagattggg taaaggaaga agccccagat atactgtgcc ttcaagagac caaatgttca	300
gagaacaaac taccagctga acttcaggag ctgcctggac tctctcatca atactggtea	360
gtccttctgg acaaggaagg gtacagtggc gtgggcctgc tttcccgcca gtgccactc	420
aaagtttctt acggcatagg cgaggaggag catgatcagg aaggccgggt gattgtggct	480
gaatttgact cgtttgtgtt ggtaacagca tatgtaccta atgcaggccg aggtctggta	540
cgactggagt accggcagcg ctgggatgaa gcctttcgca agttcctgaa gggcctggct	600
tcccgaagc ccttgtgtgt gtgtggagac ctcaatgtgg cacatgaaga aattgacctt	660
cgcaacccca aggggaacaa aaagaatgct ggcttcacgc cacaagagcg ccaagcttc	720
ggggaattac tgcaggctgt gccactggct gacagcttta ggcacctcta cccaacaca	780
ccctatgcct acaccttttg gacttatatg atgaatgctc gatccaagaa tgttggttgg	840
cgcttgatt actttttgtt gtccactct ctgttacctg cattgtgtga cagcaagatc	900
cgttccaagg cctcggcag tgatcactgt cctatcaccc tatacctagc actgtga	957