



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0127881
(43) 공개일자 2015년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0053965

(22) 출원일자 2014년05월07일

심사청구일자 없음

(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

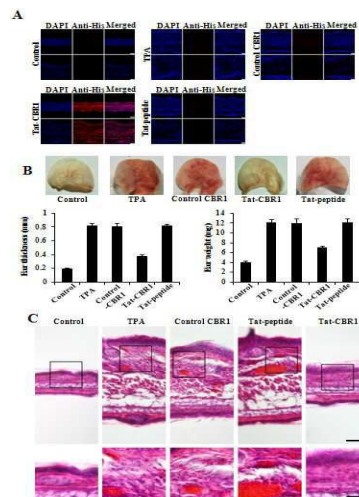
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 세포투과성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물

(57) 요약

인간 카보닐기 환원효소 1 (CBR1)은 NADPH-의존적 짧은 사슬 탈수소효소/환원효소 슈퍼패밀리의 구성원이며, 이 패밀리는 항산화 기능을 통하여 신경세포 생존에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 세포투과성 Tat-CBR1 융합단백질을 제조하여 LPS 또는 과산화수소로 처리된 Raw 264.7 세포 및 TPA 처리된 피부염증 동물모델에서 이 융합단백질이 염증에 대한 보호효과를 나타내는지 시험하였다. 그 결과, Tat-CBR1 융합단백질은 효과적으로 Raw 264.7 세포 내로 투과하여 LPS 또는 과산화수소로 유도되는 염증 및 세포사멸에 대해 현저한 세포 보호작용을 나타내었다. 뿐만 아니라, 국소적용된 Tat-CBR1 융합단백질은 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)로 유도된 귀 부종에 대해 현저한 개선효과를 유도함으로써 Tat-CBR1 융합단백질이 다양한 염증 및 산화 스트레스 관련 질병에 대한 치료제로 이용 가능함을 밝혔다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

한규형

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

권혁일

서울특별시 광진구 능동로1길 15 한강우성아파트 102동 1206호

음원식

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

김덕수

충남 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (다가동, 그린빌)

박종훈

서울특별시 강남구 남부순환로 2914, 10-601 (개포우성아파트)

박은영

서울 은평구 불광로8길 12, 101호 (불광동, 청송빌라)

김현아

서울 강남구 남부순환로 2803, 102동 802호 (도곡동, 삼성래미안아파트)

김대원

강원 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

기여율 1/3

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120960

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건복지부

연구사업명 보건의료연구기술개발사업

연구과제명 표적단백질 세포 및 연골조직 침투기술 개발

기여율 1/3

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A2A06043084

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 단백질침투기술을 이용한 다낭신 치료제 탐색 및 개발

기여율 1/3

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

카보닐기 환원효소의 C-말단과 N-말단 중 어느 한 곳 이상에 단백질 수송도메인이 공유결합된 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 Tat 펩타이드 또는 HIV-1 Tat 펩타이드임을 특징으로 하는, 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질은 서열번호 4, 6, 8, 10, 12 및 14 중 선택된 1종임을 특징으로 하는, 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 세포침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것으로, 카보닐기 환원효소의 C-말단 및/또는 N-말단에 단백질 수송도메인이 공유결합된 융합단백질이 인비보 및 인비트로에서 염증반응에 대해 세포 보호효과를 나타냄을 통하여 세포투과성 카보닐기 환원효소 융합단백질이 염증 관련 질환에 대한 치료제 용도로 이용 가능함을 밝혔다.

배경기술

[0002]

인간 카보닐기 환원효소 1 (carbonyl reductase 1; CBR1)은 NADPH-의존적이고, 모노머이며, 짧은 사슬 탈수소 효소/환원효소 슈퍼패밀리에 속하는 세포질효소이다. CBR1은 간, 신장 및 신경세포를 포함하는 다양한 인간 조직에 분포한다 [Forrest, G. L.; Gonzalez, B. *Chem. Biol. Interact.* **129**: 21-40; 2000, Rashid, M. A. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **49**: 1522-1533; 2010]. 몇몇 연구결과는 CBR1이 산화 스트레스, 신경퇴화 및 세포자기사멸에서 보호 역할을 수행함을 보여준다 [Ismail, E. et al., *Cancer Res.* **60**: 1173-1176; 2000, Botella, J. A. et al., *Curr. Biol.* **14**: 782-786; 2004]. 뿐만 아니라, CBR1은 세포에서 산화 스트레스를 받으면 지방 알데하이드를 불활성화한다. 따라서, CBR1은 산화 스트레스에서 유래하는 세포손상에 관한 보호역할을 수행하는 것으로 보인다 [Doorn, J. A. et al., *Biochem.* **43**: 13106-13114; 2004, Maser, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**: 1019-1022; 2006]. 그러나, 염증에서 CBR1 단백질의 생물학적 기능과 기작은 거의 알려지지 않았다.

[0003]

외부 거대분자들이 내부 세포막을 투과하기는 어렵다. 아미노산 서열 짧은 사슬로 이루어진 단백질 수송 도메인은 외부 거대분자들이 포유류 세포 내로 투과되는 것을 용이하게 해준다 [Wadia, J. S.; Dowdy, S. F. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 52-56; 2002, Schwarze, S. et al., *Science* **285**: 1569-1572; 1999]. 본 발명자들은 인비트로와 인비보에서 단백질 수송도메인과 융합된 다양한 재조합 단백질들을 세포 및 조직 내로 투과하는 것을 보고한바 있고, 이들 융합단백질들은 세포 사멸에 대응하여 세포를 효과적으로 보호하였다 [An, J. J. et al., *FEBS J.* **275**: 1296-1308; 2008, Ahn, E. H. et al., *Toxicol.* **276**: 192-197; 2010, Kim, S. Y. et al., *J. Invest. Dermatol.* **131**: 1477-1485; 2011, Eum, W. S. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **37**: 1656-1669;

2004, Ahn, E. H. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **55**: 36-45; 2013, Sohn, E. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1820**: 1647-1655; 2012, Kim, D. W. et al., *BMB Rep.* **46**: 124-129; 2013, Kim, M. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* **63**: 432-445; 2013].

[0004]

지다당 (Lipopolysaccharide; LPS)은 그람 음성균 외부 막 구성요소로 잘 알려져 있고, 이는 염증반응과 COX-2 (cyclooxygenase-2), 사이토카인 (인터루킨-1 β ; IL-1 및 IL-6), 종양괴사인자- α (TNF- α) 및 활성산소종 생산을 유도한다. 이러한 염증성 매개자들은 다양한 염증성 질환의 발병과 밀접하게 관련되어 있다 [Goraca A. et al., (2013) *Pharmacol Rep* 65: 179-186, Hewett J.A. et al., (1993) *Pharmacol Rev* 45: 382-411, Yoshino S. et al., (2000) *Immunobiol* 99: 607-614, Bertolini A. et al., (2002) *Curr Med Chem* 9: 1033-1043]. 또한, 생성된 활성산소종은 세포의 구조와 기능을 변화시켜 세포사멸에 기여한다 [Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, Hald A, Lotharius J. (2005) *Exp Neurol* 193: 279-290].

[0005]

단백질을 치료제로 사용하는 것은 분자량, 낮은 투과성 및 생화학적 특성으로 인해 한계가 있었다 [Van den Berg A, Dowdy SF. (2011) *Curr Opin Biotechnol* 22: 888-893, Zhao B, Guo Y, Fu A. (2012) *Appl Biochem Biotechnol* 166: 1463-1471]. 그러나, 많은 연구자들이 단백질 수송 도메인을 이용하여 치료용 단백질을 세포 및 조직 내로 전달하는 것이 가능하며 의료용으로 이용할 수 있음을 밝혔다 [van den Berg A, Dowdy SF. (2011) *Curr Opin Biotechnol* 22: 888-893, Zhao B, Guo Y, Fu A. (2012) *Appl Biochem Biotechnol* 166: 1463-1471, Wadia JS, Dowdy SF. (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13: 52-56, Morris MC et al. (2001) *Nat Biotechnol* 19: 1173-1176, Dietz GP. (2010) *Curr Pharm Biotechnol* 11: 167-174, Embury J et al. (2001) *Diabetes* 50: 1706-1713, Kubo E et al. (2008) *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C842-C855]. 본 발명자들은 단백질 수송 도메인과 융합된 단백질이 세포 및 조직 내로 잘 투과되며, 뿐만 아니라, 피부염증 및 신경질환을 포함하는 다양한 질환에 대해 보호기능을 함을 밝혔다 [Eum WS et al. (2004) *Free Radic Biol Med* 37: 1656-1669, Sohn EJ et al. (2012) *Biochim Biophys Acta* 1820: 1647-1655, Lee YP et al. (2012) *FEBS J* 279: 1929-1942, Ahn EH et al. (2013) *Free Radic Biol Med* 55: 36-45, Kim SY et al. (2011) *J Invest Dermatol* 131: 1477-1485, Kim MJ et al. (2013) *Free Radic Biol Med* 63: 432-445, Kim DW et al. (2013) *BMB Rep* 46: 124-129, Kim SY et al. (2011) *Immunobiol* 216: 771-781, Kim DS et al. (2012) *BMB Rep* 45: 532-537].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명은 피부염증을 비롯한 염증관련 질환에 유용한 치료용 약학 조성물을 제공하려는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0007]

본 발명자들은 CBR1 융합단백질이 세포 및 조직 내로 잘 투과하여 LPS 또는 과산화수소로 유도되는 염증 및 산화 스트레스에 보호작용을 나타내는지를 시험하였다. 그 결과, Tat-CBR1 융합단백질은 효과적으로 Raw 264.7 세포 내로 투과하여 LPS 또는 과산화수소로 유도되는 염증 및 세포사멸에 대해 현저한 세포 보호작용을 나타내었다. 뿐만 아니라, 국소적용된 Tat-CBR1 융합단백질은 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)로 유도된 귀 부종에 대해 현저한 개선효과를 유도함으로써 Tat-CBR1 융합단백질이 다양한 염증 및 산화 스트레스 관련 질병에 대한 치료제로 이용 가능함을 밝혔다.

[0008]

본 발명은 카보닐기 환원효소의 C-말단과 N-말단 중 어느 한 곳 이상에 단백질 수송도메인이 공유결합된 세포투과성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

[0009]

또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 PEP-1 펩타이드 또는 HIV-1 Tat 펩타이드임을 특징으로 하는, 세포투과성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010]

또한, 본 발명은 상기 세포투과성 카보닐기 환원효소 융합단백질이 서열번호 4, 6, 8, 10, 12 및 14 중 선택된 1종임을 특징으로 하는, 세포 침투성 카보닐기 환원효소 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

[0011]

CBR1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구, 주사 또는 연고제 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예

를 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 칼슘 염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 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.

[0012] 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.

[0013] 본 발명에 따른 CBR1 단백질 분자의 세포 내 전달은 CBR1에 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 수송 도메인이 공유결합된, Pep-1을 비롯한 세포투과성 수송도메인 또는 HIV Tat 세포투과성 도메인이 목표 단백질인 CBR1의 N-말단 및/또는 C-말단과 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 21개의 아미노산으로 구성되고 서열번호 3과 같은 아미노산 서열로 이루어진 PEP-1 펩타이드, HIV Tat 49~57 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 서열번호 3의 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.

[0014] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0015] "CBR1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 CBR1 단백질을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 CBR1을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서 구체적인 일 실시예로서 "PEP-1-CBR1"은 CBR1 융합단백질 중 CBR1의 N-말단에 PEP-1 단백질 수송 도메인이 결합된 것을 말한다.

[0016] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0017] 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.

[0018] 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 PEP-1 펩타이드를 말한다.

[0019] 본 명세서의 "목표 단백질"은 PEP-1 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타

내는 분자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.

[0020] 또한, 본 명세서에서는 단백질을 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0021] 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)는 CBR1이다. 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.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성 CBR1 융합단백질이 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12 또는 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송도메인(protein transducing domain; "PTD")이 CBR1 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 공유결합된 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 Tat-CBR1 융합단백질은 투여량 및 처리시간 의존적으로 세포 내로 투과하였고, 투과된 PEP-1-CBR1 융합단백질은 세포 내에서 48시간 동안 현저한 수준을 나타내었다.

[0025] 본 발명의 Tat-CBR1 융합단백질은 LPS-유도된 COX-2와 iNOS 단백질 발현 수준을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다. 또한, Tat-CBR1 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였다.

[0026] 또한, 본 발명의 Tat-CBR1 융합단백질은 LPS로 유도되는 MAPKs와 NF- κ B 활성화에 대해 세포 보호효과를 나타내었다. Tat-CBR1 융합단백질 처리세포에서는 인산화된 ERK1/2, p38 및 JNK 발현수준이 현저히 감소하였다. 또한, 투과된 Tat-CBR1 융합단백질은 LPS로 유도되는 세포내 p65와 I κ B α 인산화 수준을 현저히 저해하였다.

[0027] 또한, 본 발명의 Tat-CBR1 융합단백질은 세포로 투과되어 LPS 또는 H₂O₂ 처리한 세포에서 활성산소종 수준을 감소시킴으로써 세포 보호효과를 나타내었다.

[0028] 뿐만 아니라, H₂O₂ 처리한 세포에서 세포생존율은 투과된 Tat-CBR1 융합단백질에 의해 투여량 의존적으로 최대 74%까지 현저히 증가하였다. 투과된 Tat-CBR1 융합단백질은 생물학적으로 활성을 나타내며, 활성산소종 생성 및 DNA 단편화를 저해하여 H₂O₂로 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호한다. 또한, Tat-CBR1 융합단백질은 절단된 캐스페이즈-3 수준을 현저히 감소시켰다. 본 발명자들은 H₂O₂로 처리한 세포에서 인산화된 Akt와 p53 수준이 현저히 증가한 반면, Tat-CBR1 융합단백질 처리세포에서는 현저히 감소함을 밝혔다. 투과된 Tat-CBR1 융합단백질이 세포자기사멸 경로를 저해함으로써 H₂O₂로 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호함을 말해준다.

[0029] 뿐만 아니라, Tat-CBR1 융합단백질은 피부 염증에서 초기에 일어나는 단핵세포(monocyte)와 같은 염증세포의 침윤을 현저히 저해하였고, TPA로 유도되는 동물 염증모델에서 COX-2 발현 수준과 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성을 현저히 감소시켰고, TPA로 유도되는 피부염증 동물모델에서 TPA로 유도되는 p38, ERK1/2 및 JNK 인산화와 p65와 I κ B α 인산화를 저해하였다.

도면의 간단한 설명

[0030]

도 1은 Tat-CBR1 융합단백질 구축 및 정제에 관한 도면이다. A는 구축된 Tat-CBR1 융합단백질의 대표적인 다이어그램이다. Tat-CBR1 융합단백질은 여섯 개의 히스티딘 잔기로 이루어진 His 태그를 포함한다. 발현 및 정제 후 15% SDS-PAGE로 분석하였고 (B), 항-토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석하였다 (C).

도 2는 Raw 264.7 세포내로 Tat-CBR1 융합단백질의 투과를 나타낸다. 세포는 60 mm 배양접시에서 배양한 후 Tat-CBR1 융합단백질 (0.1 ~ 1.0 μ M)과 대조군 CBR1 단백질을 한 시간 동안 배양배지에 가하였고 (A), Tat-CBR1 융합단백질 (0.3 μ M)과 대조군 CBR1 단백질을 15 ~ 60분간 배양배지에 가하였으며 (B), 웨스턴 블랏으로 분석하였다. 투과된 Tat-CBR1 융합단백질의 안정성은 다양한 시간 경과 후 평가하였다 (1 ~ 48시간). 세포는 0.3 μ M Tat-CBR1 융합단백질로 한 시간 동안 선처리하고, 웨스턴 블랏으로 분석하였다 (C). 세포 투과된 Tat-CBR1 융합단백질의 세포내 분포는 공촛점 현미경으로 관찰하였다 (D). 크기 막대 = 20 μ m.

도 3은 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도한 염증반응에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. Raw 264.7 세포는 Tat-CBR1 융합단백질을 한 시간 동안 선처리하거나 처리하지 않고 12시간 동안 LPS (1 μ g/ml)로 자극하였다. COX-2와 iNOS 단백질 발현을 웨스턴 블랏팅과 밀도계로 분석하였다 (A). Raw 264.7 세포는 24시간 동안 1 μ g/ml의 LPS로 자극한 후 산화 질소 및 PGE2 합성 수준은 ELISA 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 분석하였다 ((B), (C)). 세포내 니트로타이로신 수준은 웨스턴 블랏 분석에 의해 분석하였다. 웨스턴 블랏 분석을 하기 전에, 세포 용해액을 제조하여 세포를 Tat-CBR1 융합단백질을 1시간 동안 선처리하거나 처리하지 않고 12시간 동안 LPS (1 μ g/ml)에 노출되게 하였다 (D). Raw 264.7 세포를 24시간 동안 1 μ g/ml의 LPS로 자극하였다. 전체 RNA를 세포로부터 추출하고, 다음의 mRNA를 RT-PCR에 의해 특이적 프라이머를 이용하여 사이토카인의 발현량을 측정하여 분석하였다 (E).

도 4는 Tat-CBR1 융합단백질이 활성산소종 생산 및 Raw 264.7 세포에서 MMP 변경을 저해함을 나타낸다. 세포를 1시간 동안 Tat-CBR1 융합단백질의 전처리 유무에 관계없이 3시간 동안 LPS (1 μ g/ml)로 자극하였다. 세포 내 활성산소종 수준 측정을 위해 세포는 DCF-DA로 염색하였다. 세포 내 활성산소종 수준은 형광현미경과 형광 플레이트 리더로 분석하였다 (A). 미토콘드리아 막 전위는 JC-1 미토콘드리아 막 전위 분석 키트를 사용하여 평가하였다 (B). 크기 막대 = 50 μ m.

도 5는 LPS로 유도되는 Akt, MAPK 및 NF- κ B 활성화에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. Raw 264.7 세포는 Tat-CBR1 융합단백질을 한 시간 동안 선처리하거나, 하지 않고 1 μ g/ml LPS로 15분간 자극하였다 (A). Tat-CBR1 융합단백질 전처리 후, Raw 264.7 세포 활성화 MAPKs 수준을 측정하기 위해 30분 동안 LPS (1 μ g/ml)로 자극하였다 (B). P65, 인산화 및 I κ B- α 의 저하를 평가하기 위해, 세포를 15분 동안 1 μ g/ml의 LPS에 노출시켰다 (C). Akt, MAPKs 및 NF- κ B의 세포내 수준은 웨스턴 블랏 분석 및 밀도계로 평가하였다.

도 6은 LPS 또는 H₂O₂로 유도된 활성산소종 생성에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 효과를 나타낸다. Raw 264.7 세포를 1시간 동안 Tat-CBR1 융합단백질로 전처리한 후, 세포를 20시간 동안 1 mM의 과산화수소로 자극하였다. 세포의 생존 정도는 WST-1을 사용하여 비색분석법으로 추정하였다 (A). 세포를 1시간 동안 Tat-CBR1 융합단백질의 전처리 유무에 관계없이 1시간 동안 과산화수소 (1 mM)로 자극하였다. 세포 내 활성산소종 수준을 측정하기 위해, 세포는 DCF-DA로 염색하였다. 세포 내 활성산소종 수준은 형광현미경과 형광 ELISA 플레이트 리더로 분석하였다 (B). * P < 0.05 및 ** P < 0.01, 과산화수소로 처리한 세포와 비교한 값.

도 7은 DNA 단편화와 미토콘드리아 막 전위에 Tat-CBR1 융합단백질의 효과를 나타낸다. Tat-CBR1 융합단백질 또는 대조군 CBR1 단백질을 1시간 동안 세포배양 배지에 처리하였다. 각 단백질을 처리한 세포는 18시간 동안 1 mM의 과산화수소에 노출되었다. DNA의 단편은 TUNEL 염색하였다. DNA 단편화는 형광현미경을 이용하여 검출하고, 형광 강도는 ELISA 플레이트 리더로 측정하였다 (A). 미토콘드리아 막 전위는 미토콘드리아 막 전위 분석 키트를 사용하여, JC-1로 평가하였다 (B). 크기 막대 = 50 μ m.

도 8은 투과된 Tat-CBR1 융합단백질이 TPA-유도된 귀 부종에 미치는 영향을 나타낸다. TPA (1 μ g/귀)는 3일간 하루에 한 번 마우스 귀에 처리하였다. 마우스 귀는 3일 동안 TPA 처리하기 전에 Tat-CBR1 융합단백질로 전처리하였다. Tat-CBR1 융합단백질, CBR1 단백질 및 Tat 펩타이드 처리군은 DAPI와 프로브로 염색하였다. 크기 막대 = 50 및 18.8 μ m (A). TPA에 의한 마우스의 귀 부종의 귀 두께와 무게의 변화를 측정하여 분석하였다 (B). 마우스 귀 피부의 섹션은 조직학적 분석을 위해 헤마토자일린과 에오신 면역염색으로 분석하였다. 크기 막대 = 50 및 25 μ m (C). * P < 0.05, ** P < 0.01, TPA 처리한 마우스와 비교함.

도 9는 부종 동물모델에서 TPA로 유도된 COX-2와 사이토카인 발현에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 저해효과를 나

타낸다. COX-2와 iNOS의 발현 수준을 분석하기 위해, 마우스는 TPA (1 μ g/귀)로 자극하고 마우스 귀에 Tat-CBR1 융합단백질을 국부처리하였다. 마우스 귀 추출물을 웨스턴 블랏 분석으로 COX-2와 iNOS를 측정 분석하였고, 락틴 밀도계를 사용하여 측정하였다 (A). 전체 RNA를 세포로부터 추출하고, 다음의 mRNA를 RT-PCR에 의해 특이적 프라이머를 이용하여 증폭하고 사이토카인의 발현량을 측정하였다 (B). *P < 0.05 및 ** P < 0.01, TPA 처리된 마우스와 비교함.

도 10은 귀 부종 모델에서 TPA로 유도된 MAPK와 NF- κ B 활성화에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. TPA (1 μ g/귀)는 3일간 하루에 한번씩 마우스 귀에 처리하였다. 마우스 귀는 3일 동안 TPA 처리하기 전에 Tat-CBR1 융합단백질로 전처리하였다. 귀 생검을 제조한 후 웨스턴 블랏팅과 밀도계 측정으로 MAPK 단백질 활성화를 분석하였다 (A). p65 및 I κ B α 의 분해와 인산화를 웨스턴 블랏팅과 밀도계로 분석하였다 (B). *P < 0.05 및 P < 0.01, TPA 처리한 마우스와 비교한 값임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031]

아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 Tat-CBR1 융합단백질에 대하여만 기술하였으나, Tat-CBR1 융합단백질, CBR1-Tat 융합단백질, Tat-CBR1-Tat 융합단백질, CBR1-PEP-1 융합단백질 및 PEP-1-CBR1-PEP-1 융합단백질도 PEP-1-CBR1 융합단백질과 같이 세포 투과성을 나타내며, 세포 및 모델동물 실험에서 Tat-CBR1 융합단백질과 유사한 정도의 결과를 나타낸다.

[0032]

재료

[0033]

12-O-TPA(tetradecanoylphorbol-13-acetate)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Ni²⁺ 나이트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우 (Ni²⁺-nitrilotri-acetic acid Sepharose superflow)는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였다. DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)은 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였고, FBS와 항생제는 Gibco BRL에서 구입하였다. 합성 Tat 펩타이드는 Peptron (Daejeon, Korea)에서 구입하였고, 기본 항체와 액틴은 각각 Cell Signaling Technology (Beverly MA, USA) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 다른 화학물질 및 시약들은 입수 가능한 최상급의 재료를 이용하였다.

[0034]

CBR1 융합단백질 발현 및 정제

[0035]

Tat 발현벡터는 종래기술과 같이 제조하였다 [Kim, M. J. et al., *J Neurol Sci.* **298**:64-69; 2010]. CBR1은 HepG2 세포주에서 올리고-dT 프라이머를 이용하여 역전사 PCR로 얻은 cDNA로 서브클론하였다. CBR1은 PCR을 통해 센스 프라이머 5'-CCG CTC GAG TCG TCC GGC ATC-3'과 안티센스 프라이머 5'-CGG GAT CCT TAT CAC CAC TGT TCA AC-3'을 이용하여 증폭하였다. PCR로 얻은 CBR1 산물은 TA 클로닝벡터로 *E. coli* 내에서 증폭하였고, Tat 발현벡터에 삽입하였다. Tat-CBR1 단백질을 발현하고 정제하기 위해, 플라스미드는 BL21 (DE3)에 형질변환되었고, 0.1 mM의 IPTG (isopropyl- β -D-thio-galactoside) (Duchefa, Haarlem, Netherlands)를 이용하여 18 °C에서 8시간 동안 과발현하였다. 하비스트한 세포는 초음파 처리로 용균한 다음, Ni²⁺-니트릴로삼초산 세파로즈 친화컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Braunschweig, Germany)를 이용하여 제조자의 지시대로 Tat-CBR1 융합단백질을 정제하였다. 정제된 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준으로 하여 브래드포드 방법으로 측정하였다[Bradford, M. A. *Anal Biochem.* **72**:248-254; 1976].

[0036]

Raw 264.7 세포 내로 PEP-1-CBR1 융합단백질의 투과

[0037]

뮤린 대식세포 Raw 264.7 세포는 20 mM Hepes/NaOH (pH 7.4), 5 mM NaHCO₃, 10% FBS 및 항생제 (100 μ g/ml 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's minimum essential medium; Lonza BioWhittaker, MD, USA) 내에서 95% 공기 및 5% CO₂의 습한 조건 하에서 37 °C로 배양하였다. Tat-CBR1 융합단백질의 세포투과가 투여량 및 농도 의존적임을 평가하기 위해, 다양한 농도의 Tat-CBR1 융합단백질 (0.1~1 μ

M)로 세포를 한 시간 동안 처리하였다. Tat-CBR1 융합단백질 처리 후 세포는 트립신-EDTA로 처리하고 PBS (phosphate-buffered saline)로 세척한 후 세포를 하비스트하고, 세포추출물은 웨스턴 블랏 분석에 이용하였다.

[0038]

웨스턴 블랏 분석

[0039]

용균된 단백질은 SDS-PAGE로 분리한 다음 나이트로셀룰로스 막 또는 PVDF 막으로 옮겼다. 막은 5% 저지방유와 0.1% Tween 20이 함유된 TBS 완충액 (TBS)으로 블로킹하였다. 블로킹된 막은 지시된 일차항체와 HRP 결합된 이차항체로 면역 블랏팅하였다. 타겟 단백질은 제조자 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)의 지시에 따라 화학 발광으로 탐지하였다 [Kim, M. J. et al., *J Neurol Sci.* **298**:64-69; 2010].

[0040]

형광 공초점 현미경 분석

[0041]

공초점 현미경 분석은 종래기술과 같이 수행하였다 [Kim, D. W. et al. *Free Radic Biol Med.* **48**:969-977; 2010, Sohn, E. J. et al., *Biochim Biophys Acta.* **1820**:1647-1655; 2012]. Raw 264.7 세포를 커버슬립에 시딩하고 좀 더 안전한 부착을 위해 오버나잇 배양하였다(12h). Tat-CBR1 융합 단백질 (1 μ M)로 처리한 Raw 264.7 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 한 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 블로킹하였다. 일차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)는 2000:1 비율로 PBS-BT로 희석하여 3시간 동안 실온에서 배양하였다. 이차항체 (Alexa fluor 488, Invitrogen)는 15000:1 비율로 희석한 후 어두운 곳에서 실온으로 한 시간 동안 배양하였다. 세포핵은 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 0.1 μ g/ml; Roche, Mannheim, Germany)로 2분간 염색하였다. 모든 절차 사이에 세포는 PBS-BT로 세 번씩 세척하였다. 염색된 Raw 264.7 세포는 FV-300 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

[0042]

세포 생존율 분석

[0043]

WST-1 분석은 과산화수소 처리된 Raw 264.7 세포의 생존율 평가에 이용되었다. 0.1~1 μ M의 Tat-CBR1 융합단백질 및 대조군 CBR1으로 한 시간 동안 Raw 264.7 세포를 선처리한 후, 세포를 200 μ M의 H₂O₂에 8시간 동안 노출시켜 세포사멸을 유도하였다. 세포생존율은 WST-1 키트 (Daeillab service, Seoul, South-korea)를 제조자의 지시에 따라 이용하여 평가하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 표준으로서 대조군을 이용하여 백분율로 나타내었다.

[0044]

Raw 264.7 세포내 활성산소종 수준 측정

[0045]

활성산소종은 DCF-DA를 형광 DCF로 변화시키며, 그리하여 세포 내 활성산소종 수준을 측정하는데 이용할 수 있다 Raw 264.7 세포는 PEP-1-CBR1, 대조군 CBR1 또는 Tat 펩타이드로 무혈청 배지에서 한 시간 동안 선처리한 후 LPS (1 μ M/ml)을 이용하여 3시간 동안 처리한 후, 1 mM의 과산화수소를 이용하여 1시간 동안 활성산소종을 유도하였다. 이 세포들은 PBS로 두 번 세척한 후 DCF-DA (20 μ M)를 이용하여 30분간 배양하였다. 형광 현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 사진을 촬영하였다. 세포내 형광강도는 Fluoroskan ELISA 플레이트 판독기 (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)를 이용하여 여기 485 nm 및 방출 538 nm에서 세포내 형광강도를 측정하였다.

[0046]

NO 분석

[0047]

세포를 Tat-CBR1 융합단백질, CBR1 및 Tat 펩타이드로 전처리 한 후 세포를 24시간 동안 1 μ g/ml의 LPS에 노출시켰다. NO 수준을 측정하기 위해 세포배양 배지 제조 업체의 지침(Griess reagent system; Promega San Luis Obispo, CA, USA)에 따라 NO 분석 키트를 사용하여 평가하였다.

[0048]

TUNEL 측정법

[0049]

DNA 단편화 (DNA fragmentation)를 시험하기 위해 Tat-CBR1 (4 μ M)으로 한 시간 동안 세포를 선처리한 후 1 mM의 H₂O₂로 18시간 동안 배양하였다. 제조자의 지시에 따라 세포 사멸 탐지 키트 (Roche Applied Science)를 이용하여 절단된 DNA 쇄를 탐지하기 위해 TUNEL (Biotinylated dUTP nick end labeling) 염색을 수행하였다. 염색 후, 세포핵은 0.1 μ g/ml의 DAPI로 염색하였고, PBS로 세 번 세척하였다. 세포시료 사진은 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)으로 촬영하였다.

[0050]

RNA 분리 및 RT-PCR 분석

[0051]

총 RNA는 제조자 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 지시에 따라 Easy blue kit를 이용하여 Raw 264.7 세포에서 분리하였다. 그런 다음 RNA (1.5 μ g)는 역전사효소 및 올리고-(dT) 프라이머를 이용하여 역전사하였다. cDNA에 대한 PCR 증폭은 다음의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 수행하였다. COX-2 안티센스 프라이머, 5'-TGGACGAGGTTTTTCACC AG-3'; COX-2 센스 프라이머, 5'-CAAAGGCCTCCATTGACCAGA-3'; TNF- α 안티센스 프라이머, 5'-TGGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTT-3' TNF- α 센스 프라이머, 5'-AAGTCCCAAATGGCCTCCC-3' IL-1 안티센스 프라이머, 5'-GTGCTGCCTAATGTCCCTTGAATC-3' IL-1 센스 프라이머, 5'-TGCAGAGTCCCAACTGGTACATC-3' IL-6 안티센스 프라이머, 5'-TGGATGGTCTTG GTCCTTAGCC-3' IL-6 센스 프라이머, 5'-CAAGAAAGACAAAGCCAGAGTCCTT-3' β -액틴 안티센스 프라이머, 5'-GGACAGTGAGGCCAGGATGG-3'; β -액틴 센스 프라이머, 5'-AGTGTG ACGTTGACATCCGTAAAGA-3'; 및 GAPDH 안티센스 프라이머, 5'-AGTGATGGCATGGA CTGTGGTCAT-3' GAPDH 센스 프라이머, 5'-ACCCCTTCATTGACCTCACTACA-3'를 이용하여 수행하였고, 각 프라이머는 PCR 프리믹스 키트 (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하였다. PCR 산물은 1% 아가로스 젤 상에서 분리하여 에티듐 브로마이드 염색 후 UV로 관찰하였고, 자외선 빛으로 시각화하였다.

[0052]

미토콘드리아 막 전위 측정(MMP)

[0053]

MMP 측정은 종래기술과 같이 수행하였다 [Sohn, E. J. et al., *Biochim Biophys Acta*. **1820**:1647-1655; 2012]. Raw 264.7 세포를 Tat-CBR1 융합단백질, CBR1 및 Tat 펩타이드로 전처리 한 후 세포를 1시간 동안 1 mM의 H₂O₂로 처리한 후, 1 μ g/ml의 LPS에 3시간 동안 노출시켰다. 미토콘드리아 막 전위를 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazoly-carbocyanine iodine) 분석 키트 (Cayman, MI, USA)로 분석하였다. 모든 과정은 제조자의 지시대로 수행하였고, 사진은 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)으로 촬영하였다.

[0054]

TPA로 유도된 피부염증 및 조직학적 분석

[0055]

6 ~ 8주령 수컷 ICR 마우스를 일정 온도 23 $^{\circ}$ C 및 일정 상대습도 60%로 12시간은 밝게, 12시간은 어둡게 조절하고, 사료와 물에 자유롭게 접근 가능하도록 하여 사육하였다. 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.

[0056]

TPA를 국부적용하여 피부염증을 유도하였다 [Lee, M. J. et al., *Life Sci*. **89**:896-904; 2011]. 다섯 마리의 마우스를 한 군으로 하였다. TPA (1.0 μ g)를 20 μ l 아세톤에 용해시켜 마우스 귀 안쪽 표면 및 바깥 표면에 3일 동안 매일 적용하였다. Tat-CBR1 융합단백질 (10 μ g)과 대조군 CBR1 단백질 (20 μ g)을 TPA 처리한 다음 한 시간 후 마우스 귀에 국부 적용하였다. 대조군도 20 μ l 아세톤에 용해시켜 마우스 귀 안쪽 표면 및 바깥 표면 적용하였다.

[0057]

융합단백질을 최종 처리하고 24시간이 경과한 후 마우스는 희생되어 5 mm 직경의 귀 생검을 펀치 (Kai Industries, Gifu, Japan)로 얻어 중량을 측정하였다. 귀 두께는 디지털 두께 측정기 (Mitutoyo Corporation, Toyko, Japan)로 측정하였다. 조직학적 분석을 위해 귀 생검은 4% 파라포름알데하이드로 고정시켰고, 파라핀에 포매하고 5 μ m 두께로 절편화한 후 헤마토자일린과 에오신으로 염색하였다.

[0058]

통계학적 분석

[0059]

데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 각 구간 비교는 Student's t-test와 일방 ANOVA를 이용하였다. 오차는 $P < 0.01$ 일 때 유의한 것으로 하였다.

[0060]

결과 1: Tat-CBR1 융합단백질 정제 및 Raw 264.7 세포로의 도입

[0061]

Tat-CBR1 융합단백질은 인간 CBR1 유전자와 단백질 수송 도메인 Tat 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 융합하여 제조하였다. Tat-CBR1 융합단백질은 IPTG를 가하여 *E. coli*에서 발현시켰다. Tat-CBR1 융합단백질의 경우, PET-15B 벡터를 발현하고 인간 CBR1 유전자에 사용하고 도 1과 같이, Tat-시퀀스를 MCS 내에 삽입하였다. Tat-CBR1 융합단백질은 Ni^{2+} -친화 크로마토그래피와 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 발현되고 정제된 단백질은 SDS-PAGE와 항-토끼 폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다 (도 1B, 1C).

[0062]

Tat-CBR1 융합단백질이 Raw 264.7 세포 내로 투과 가능한지를 알아보기 위해 세포를 다양한 농도 ($0.1 \sim 0.1 \mu M$, 1h)의 Tat-CBR1 융합단백질로 처리하였고, 또한, 다양한 시간 (10 ~ 60분, $0.1 \mu M$)으로 처리하였다. 그런 다음 세포 투과 수준은 항-폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏팅하여 분석하였다. 도 2A, 2B와 같이, 웨스턴 블랏 분석 결과 Tat-CBR1 융합단백질은 투여량 및 처리시간 의존적으로 세포 내로 투과하였다. 반면, CBR1 단백질은 세포내로 투과하지 않았다. 단백질 치료에서 안정성은 매우 중요한 요소이기 때문에, 투과된 Tat-CBR1 융합단백질의 안정성을 시험하였다. 세포에 처리시간을 달리하여 Tat-CBR1 융합단백질을 처리하고 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. 도 2C와 같이, 투과된 Tat-CBR1 융합단백질은 세포내에서 48시간 동안 현저한 수준을 나타내었다. 뿐만 아니라, 투과된 Tat-CBR1 융합단백질의 세포 내 분포는 면역형광염색법으로 관찰하였다. 형광신호는 Tat-CBR1 융합단백질을 처리한 세포에서 증가하였다. 반면, CBR1 단백질 처리군에서는 처리하지 않은 대조군과 비슷하였다 (도 2D).

[0063]

결과 2: LPS로 유도된 활성산소종 생성과 염증반응에 대한 투과된 Tat-CBR1 융합단백질의 저해효과

[0064]

NO 및 프로스타글란딘은 iNOS의 및 COX-2 효소에 의한 염증 반응의 주요 인자이다. LPS로 유도된 염증반응에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 보호효과를 시험하기 위해 COX-2, iNOS 및 사이토카인 (TNF- α , IL-1 β 및 IL-6) 발현수준을 평가하였다. Raw 264.7 세포를 한 시간 동안 Tat-CBR1 융합단백질로 처리한 후, 세포를 12시간 동안 $1 \mu g/ml$ LPS와 함께 배양하였다. Tat-CBR1 융합단백질로 처리한 세포에서, LPS-유도된 COX-2와 iNOS 단백질 발현수준은 투여량 의존적으로 현저히 감소하였다 (도 3A). 또한, NO 및 프로스타글란딘 E2의 분비 수준은 Tat-CBR1 융합단백질로 처리한 세포에서 감소하였다 (도 3B 및 도3C). 페록신아질산염(Peroxynitrite)은 ($ONOO^-$) 산화질소 및 수퍼옥사이드의 화학 반응에 의해 형성된다. 나이트로타이로신(nitrotyrosine)으로 증가 수정 단백질은 다양한 질병에 ($ONOO^-$) 액션의 마커이다. 따라서, 본 발명자는 웨스턴 블랏 분석을 사용하여 나이트로타이로신을 평가했다. 도 3D에 도시된 바와 같이 Tat-CBR1 융합단백질은 농도 의존적으로 세포내 나이트로타이로신의 생산을 억제하였다. 다음으로 Tat-CBR1 융합단백질의 역전사 PCR 분석을 사용하여 염증성 사이토카인 생성을 조사하였다. TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 수준은 LPS 유도에 의해 증가하였다. 그러나, Tat-CBR1 융합단백질을 처리한 것은 Raw 264.7 세포가 농도 의존적으로 전 염증성 사이토카인을 방출하여 감소한다 (도 3E).

[0065]

다음으로, 형광 현미경 및 ELISA 플레이트 리더를 사용하여 활성산소종 생성 수준을 평가하였다. LPS는 병원균 퇴치를 위해 강력한 염증 반응에 이르게 되고, 활성산소종과 NO를 생성한다. 과도한 병원균 제거과정에서 활성산소종이 증가하고, 이러한 산화스트레스는 조직 손상과 세포 사멸에 이르게 된다. LPS를 단독 처리한 경우 세포는 활성산소종 생성을 증가시킨다. 그러나 Tat-CBR1 융합단백질을 전처리한 세포는 LPS에서 DCF 형광 수준을 감소했다 (도 4A). 일반적으로 활성산소종 생산은 미토콘드리아의 기능 장애에서 발생한다. 그러므로 본 발명자는 LPS-유도의 조건에서 미토콘드리아 막 전위 (MMP)의 변화를 조사하였다. 세포는 LPS로 처리했을 때 세포가 JC-1 분석을 이용하여 MMP를 변경한 것을 관찰했다. 반면, Tat-CBR1 융합단백질 형질세포는 현저하게 미토콘드리아 막 전위 증가를 보여주었다 (도 4B). 이러한 결과에 근거하여 Tat-CBR1 융합단백질은 LPS로 유도된 활성산소종의 생성, COX-2와 iNOS 및 염증성 사이토카인의 합성 생산을 억제하는 것을 알 수 있다.

[0066] **결과 3: Tat-CBR1 융합단백질의 LPS로 유도되는 Akt와 MAPK 활성화 억제**

[0067] PI3K/Akt, NF- κ B 및 p38, c-JNK(Jun N-terminal kinase)와 ERK1/2(extracellular signal-regulated kinase)을 포함하는 MAPKs(mitogen-activated protein kinases)는 LPS 유도에 의해 활성화되고, 이 단백질들은 Raw 264.7 세포에서 염증 반응에서 중요한 역할을 수행한다. 그리하여, 본 발명자들은 이들 단백질의 활성화에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 억제 효과를 조사하였다. Raw 264.7 세포에서 15 ~ 30 분간 1 μ g/ml의 LPS로 처리할 때 MAPKs와 PI3K/AKT의 인산화가 증가하였다. 그러나, Tat-CBR1 융합단백질로 전처리한 세포는 투여량 의존적으로 Akt, p38, JNK 및 ERK1/2의 활성화가 감소하였다 (도 5A 및 B). 다음으로, I κ B- α 의 인산화 및 분해 등을 포함하여 NF- κ B 활성화에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 효과를 확인하였다. Raw 264.7 세포를 Tat-CBR1 융합단백질로 전처리할 경우, 세포로 투과된 Tat-CBR1 융합단백질에 의해 LPS로 유도된 NF- κ B의 인산화, I κ B- α 인산화 및 분해가 억제되었다 (도 5C). 그러나, CBR1 단백질로 처리된 세포는 LPS-유도 PI3K/AKT, MAPKs 및 NF- κ B의 활성화가 억제되지 않았다 (도 5).

[0068] **결과 4: Raw 264.7 세포에서 Tat-CBR1 융합단백질의 활성산소종 생성 및 신경세포에 대한 보호 효과 확인**

[0069] LPS는 활성산소종과 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)을 포함하는 산화 스트레스를 유도하여 세포와 조직에 손상을 일으킬 수 있다. 이러한 현상은 미토콘드리아의 손상과 기능 장애 염증의 영향에서 기인할 수 있다 [Bauerfeld, C. P. et al., J Immunol. **188**:2847-2857; 2012]. 따라서, 본 발명자들은 산화 스트레스의 조건에서 세포 생존 및 활성산소종 생성에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 효과를 조사하였다. Raw 264.7 세포는 H₂O₂에 노출한 후 세포사멸에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 보호 효과를 평가하였다. Raw 264.7 세포에 H₂O₂만을 처리하면, 세포는 대조군 세포와 비교하여 35%가 생존하였다. Tat-CBR1 융합단백질을 처리한 세포의 생존율은 투여량 의존적으로 74% 까지 증가하였다 (도 6A). 그러나, CBR1 단백질을 처리한 세포는 Tat-CBR1 융합단백질을 처리한 세포와 비교하여 동일한 조건에서 생존율이 변화되지 않았다. 또한, 본 발명자들은 활성산소종 생성에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 억제 효과를 조사하였다. Tat-CBR1 융합단백질을 처리한 세포는 과산화수소 처리된 세포에 비해 세포 내 활성산소종 수준이 감소하였다 (도 6B). 반면, CBR1 및 Tat 펩타이드 처리된 세포에서는 활성산소종 수준이 감소하지 않았다.

[0070] 활성산소종은 DNA 손상의 원인이며, 따라서 TUNEL 염색을 이용하여 DNA 단편화 정도를 조사하였다. Tat-CBR1 융합단백질로 전처리한 세포의 형광 수준의 정도가 감소한 반면, 과산화수소만 처리한 세포는 형광 수준이 증가하였다. 따라서, Tat-CBR1 융합단백질이 활성산소종 생성의 감소를 통해 DNA 단편화를 억제한다는 것을 알 수 있었다 (도 7A). 또한, 본 발명자들은 JC-1 미토콘드리아 특이적 양이온성 염료를 사용하여 산화 스트레스 조건하에 미토콘드리아 막 전위를 관찰하였다. 과산화수소 처리된 세포는 정상 세포에 비해 J-집단을 생성하지 않았다. 그러나 Tat-CBR1 융합단백질로 처리된 세포는 현저하게 미토콘드리아 막 전위를 증가시켰다. 이것은 Tat-CBR1 융합단백질이 미토콘드리아의 기능 장애로부터 미토콘드리아를 보호하는 것을 의미한다 (도 7B).

[0071] 이러한 결과는 Tat-CBR1 융합단백질이 산화 스트레스에 의한 세포 사멸에서 Raw 264.7 세포를 보호함을 나타낸다. 활성산소종과 활성질소종을 포함하여 산화 스트레스는 LPS에 의한 염증 반응에 의해 증가된다. 따라서, 이는 Tat-CBR1 융합단백질이 강력한 면역 반응으로부터 산화 스트레스의 증가에 의한 세포 사멸 또는 조직의 손상을 억제함을 의미한다.

[0072] **결과 5: TPA 유도 마우스 귀 부종에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 효과**

[0073] TPA 유도 마우스 귀 부종 모델은 일반적으로 피부 염증 실험에 사용된다. 마우스들은 10 μ g의 각 단백질로 처리한 후, 마우스 귀에 TPA 1 μ g를 도포하였다. 3일 후, 면역조직 화학분석을 사용하여 마우스의 귀에 Tat-CBR1 융합단백질을 관찰하였다 (도 8A). 또한, 마우스의 귀는 TPA-, 대조군 CBR1-, Tat 펩타이드 처리 대조군의 두께와 무게의 변화를 관찰하였다. Tat-CBR1 융합단백질 전처리군의 마우스에서 귀 부종의 두께와 무게는 감소하였다 (도 8B, C). 또한, H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색을 이용하여, TPA 처리된 마우스의 진피와 표피가 염증에 의해 두께가 증가한 것을 밝혔다. 그러나, Tat-CBR1 융합단백질 전처리군 마우스의 귀 두께는 현저하게 감소하였다 (도 8D). 다음으로 TPA에 의해 유도되는 COX-2, iNOS, 사이토카인 및 MAPKs 활성화에 대한 Tat-CBR1 융합단백질의 효과를 측정하였다. 마우스 귀는 TPA로 처리하면 COX-2 및 iNOS의 세포 내 수준이 현저하게 증가하였다. Tat-CBR1 융합단백질 처리군이 현저히 COX-2 및 iNOS의 수준을 감소시키고, 대응하는 밴드를 웨스턴 블롯

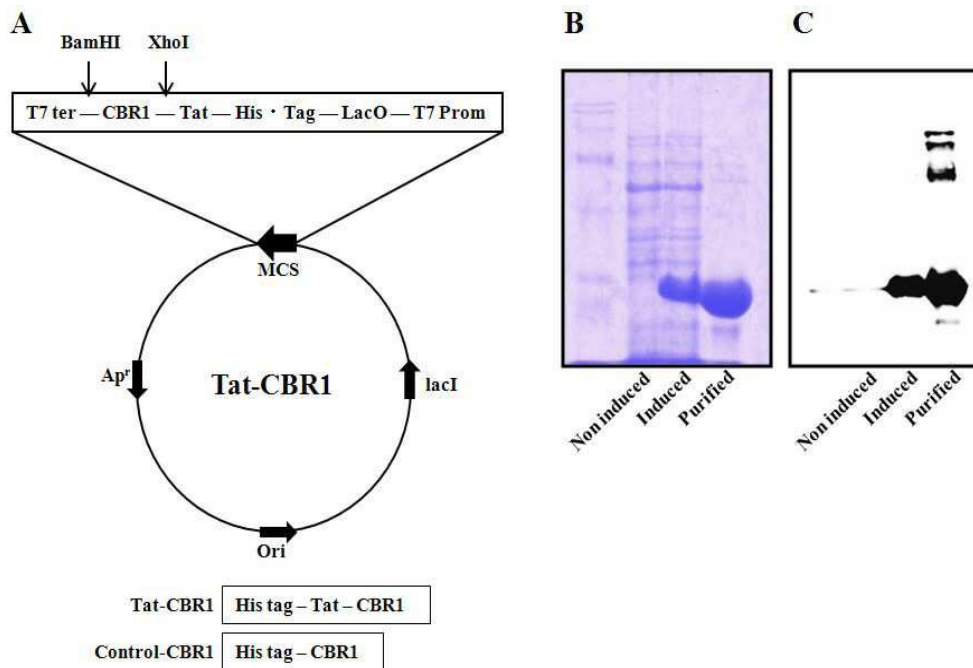
분석 및 RT-PCR을 사용하여 측정하였다 (도 9A 및 B). 또한, 사이토카인 생산은 마우스 귀에서 염증 반응에 의하여 유도되는 면역 세포에 의해 증가하였다. 도 9B에 도시된 바와 같이, Tat-CBR1 융합단백질을 처리한 마우스에서 현저하게 사이토카인이 억제된 반면, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 mRNA 수준은 TPA에 의한 마우스의 귀에 축적되었다. 그러나, 사이토카인 생산의 변화는 CBR1 단백질과 Tat 펩타이드를 처리한 마우스에서는 확인되지 않았다.

[0074]

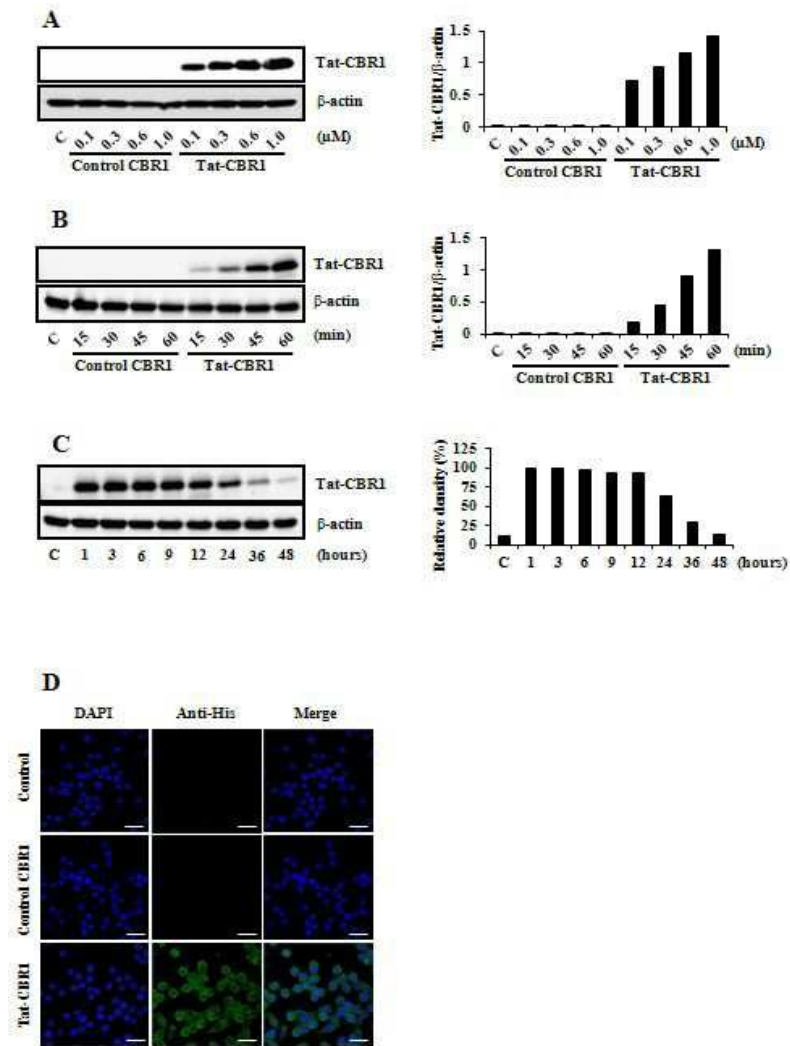
다음으로 TPA에 의해 유도된 마우스 귀 부종에서 Tat-CBR1 융합단백질이 NF- κ B 및 MAPKs 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다. 귀 생검 시료에서 NF- κ B 활성을 인산화 P65 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석으로 평가하였다. TPA로만 처리한 마우스의 귀는 P65의 인산화를 증가시켰다. Tat 펩타이드 및 CBR1 단백질을 처리한 마우스는 TPA 처리된 마우스의 귀와 비교하여 NF- κ B의 활성화에 변화가 없었다. 그러나, Tat-CBR1 단백질을 처리한 마우스의 귀는 P65 인산화 정도가 확연히 감소하였다. 또한, 본 발명자들은 I κ B α 의 인산화 및 분해를 측정하였다. TPA로 유도된 마우스는 I κ B α 의 인산화 및 분해가 증가한 반면, Tat-CBR1 융합단백질을 처리한 마우스의 세포 내 I κ B α 수준은 감소하지 않았다. 따라서, Tat-CBR1 융합단백질이 NF- κ B 활성화를 억제하는 것을 알 수 있었다. 또한, MAPKs (P38, JNK 및 ERK1/2)의 활성화는 TPA로 유도된 염증성 반응에 의해 증가하였다. 그러나, Tat-CBR1 융합단백질 처리군 MAPKs의 인산화를 억제하였다. 이러한 결과들은 마우스 귀 내로 투과된 Tat-CBR1 융합단백질이 인비보에서 TPA로 유도되는 염증성 반응에 대하여 세포를 보호함을 말해준다.

도면

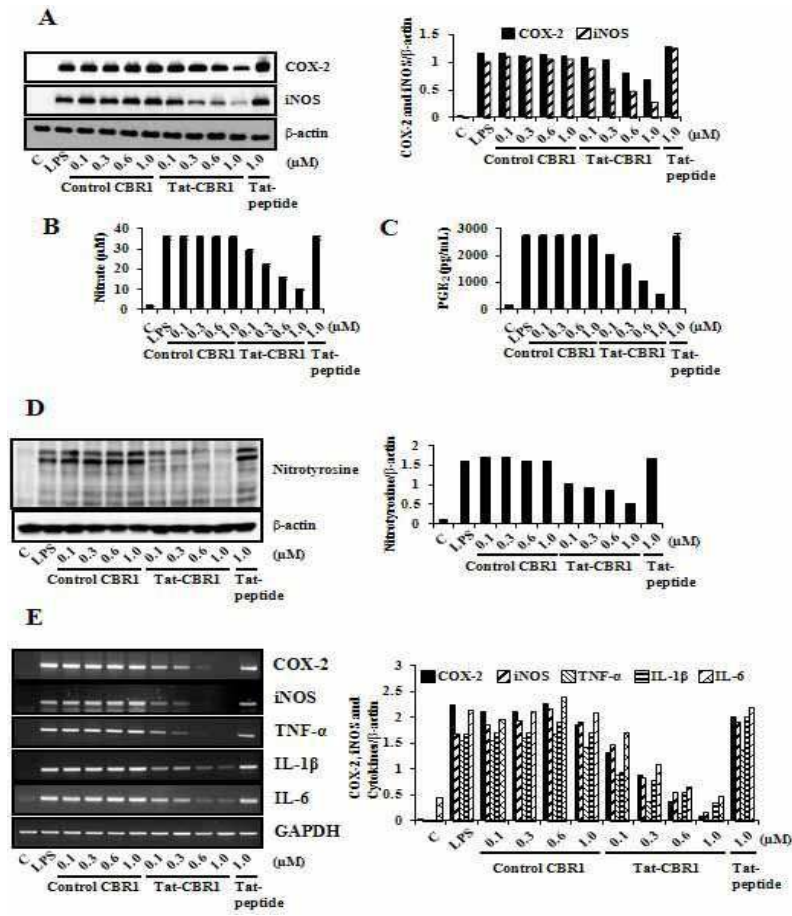
도면1



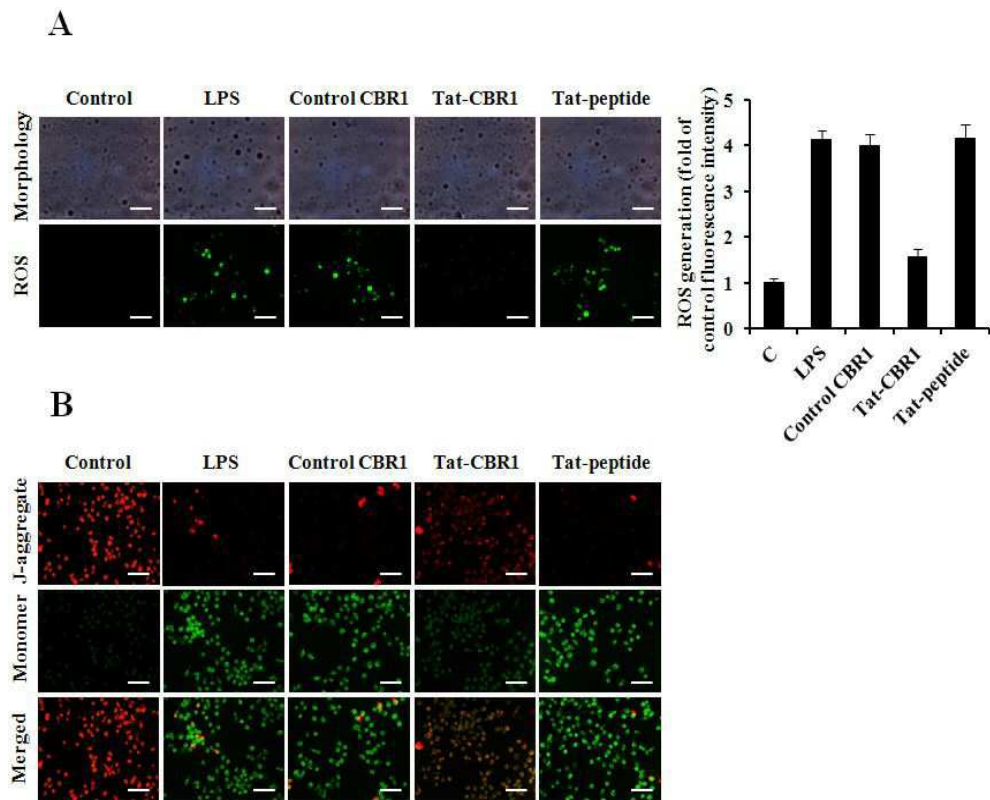
도면2



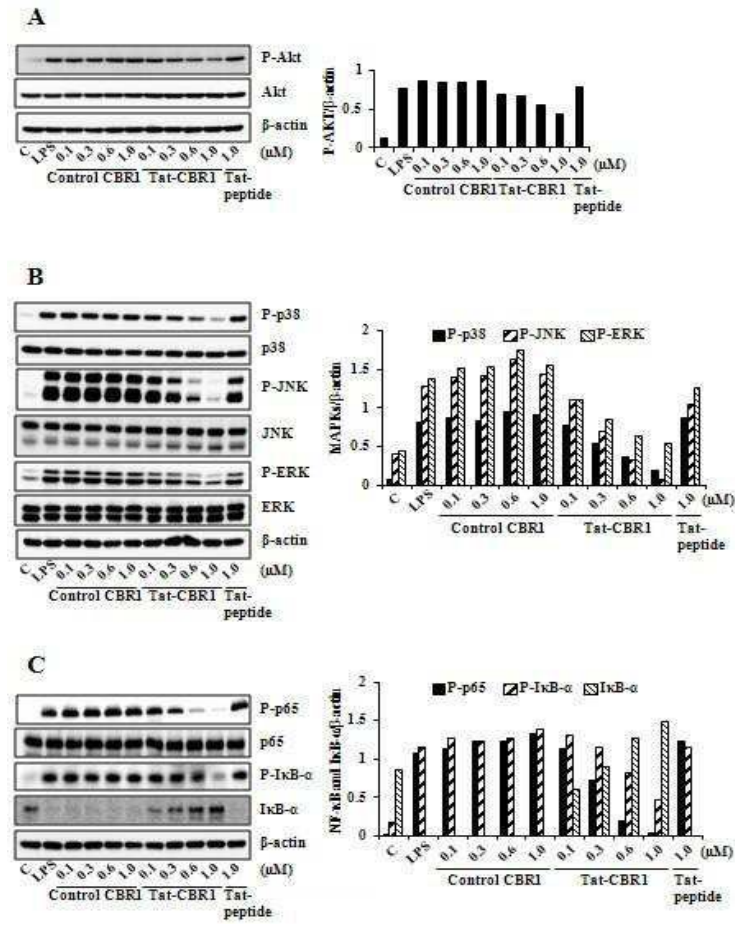
도면3



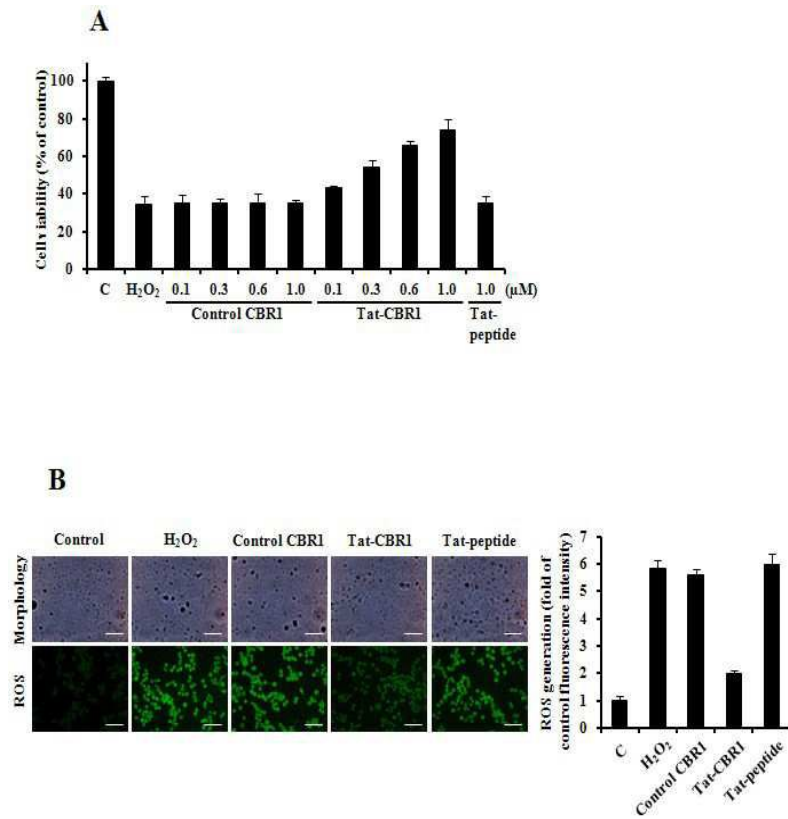
도면4



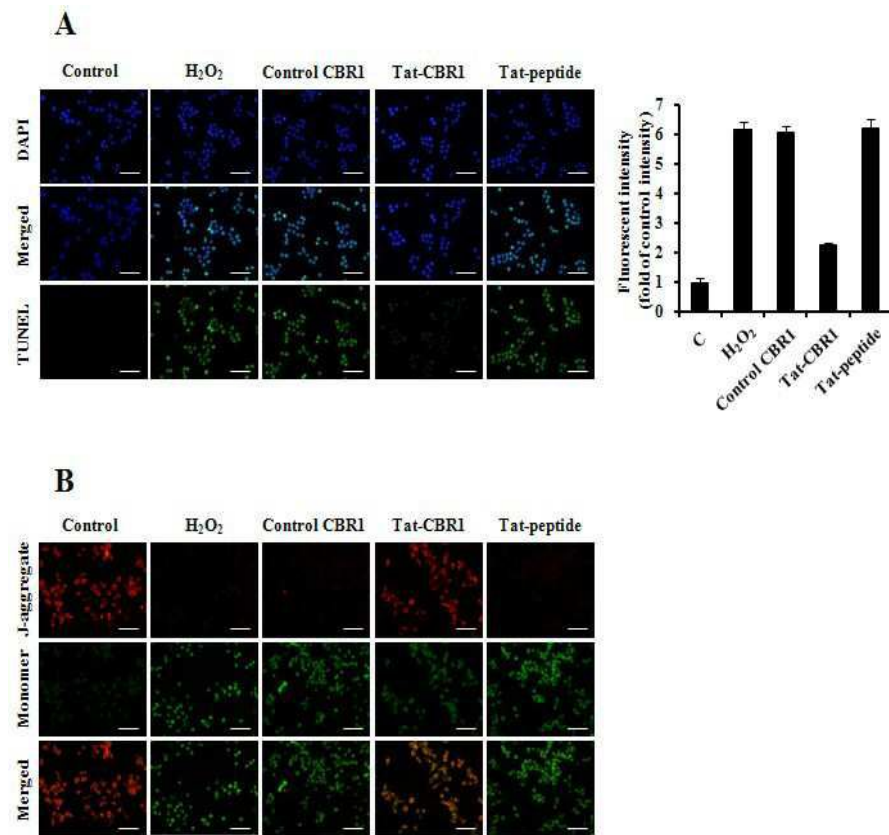
도면5



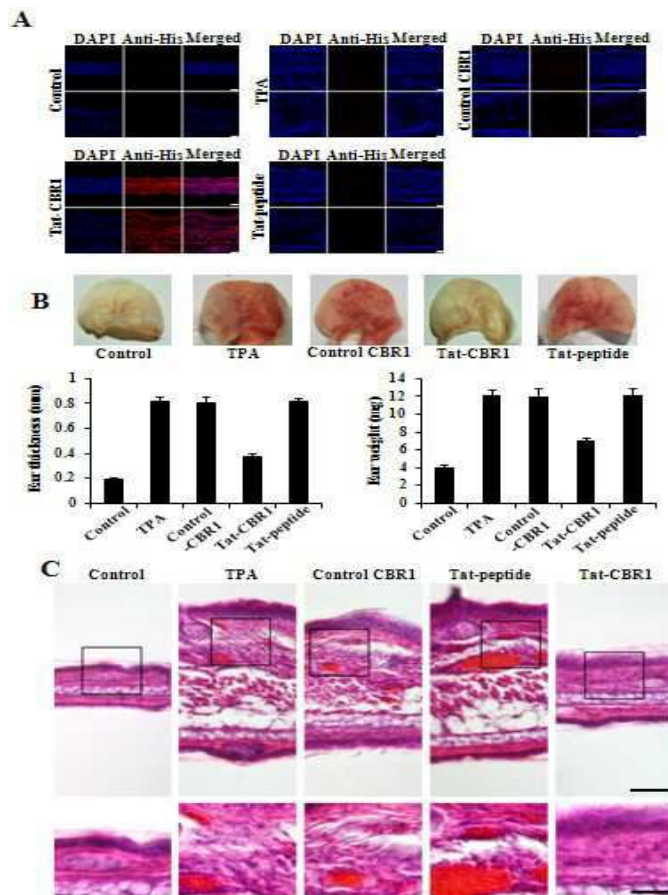
도면6



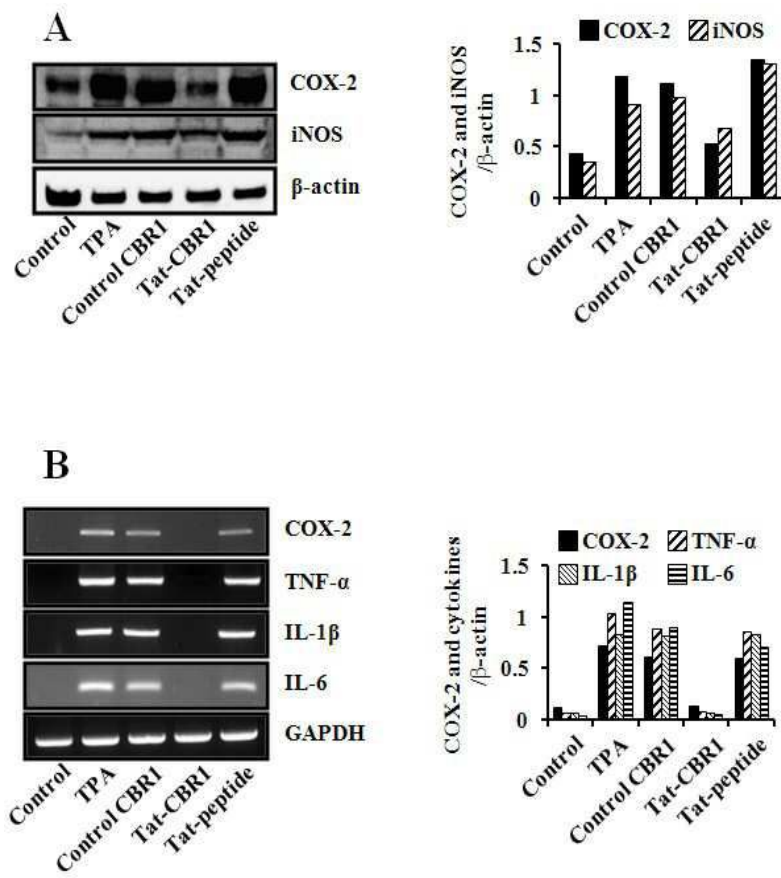
도면7



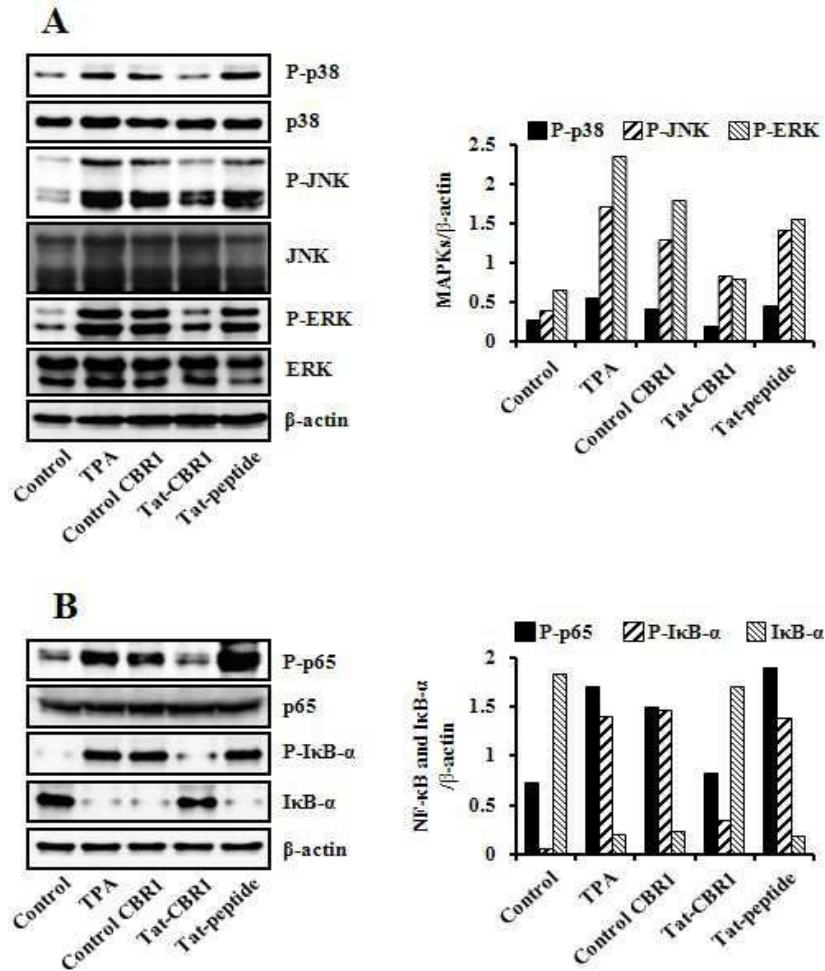
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
 - <120> Anti-inflammatory pharmaceutical composition containing
cell-trasnducible carbonyl reductase fusion protein
 - <130> HallymU-sychoi-CBR1-inflammation
 - <160> 14
 - <170> KopatentIn 2.0
 - <210> 1
 - <211> 21
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> primer
 - <400> 1
- ccgctcgagt cgtccggcat c

<210> 2
<211> 26
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

cgggatacctt atcaccactg ttcaac

26

<210> 3

<211> 868

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding Tat-Carbonyl Reductase 1 fusion protein

<400> 3

taggaagaag cggagacagc gacgaagact cgagatgtcg tccggcatcc atgtagcgct

60

ggtgactgga ggcaacaagg gcatcggctt ggccatcgtg cgcgacctgt gccggctgtt

120

ctcgggggac gtggtgctca cggcgcggga cgtgacgcgg ggccaggcgg ccgtacagca

180

gctgcaggcg gagggcctga gcccgcgctt ccaccagctg gacatcgacg atctgcagag

240

catccgcgcc ctgcgcgact tcctgcgcaa ggagtacggg ggccctggacg tgctgggtcaa

300

caacgcgggc atcgccctta aggttgctga tcccacaccc tttcatattc aagctgaagt

360

gacgatgaaa acaaatcttct ttggtaccg agatgtgtgc acagaattac tccctctaatt

420

aaaaccccaa gggagagtgg tgaacgtatc tagcatcatg agcgtcagag cccttaaaag

480

ctgcagccca gagctgcagc agaagttccg cagtgcagacc atcactgagg aggagctggt

540

ggggctcatg aacaagtttg tggaggatag aaagaaggga gtgcaccaga aggagggtctg

600

gcccagcagc gcatacgggg tgacgaagat tggcgtcacc gttctgtcca ggatccacgc

660

caggaaactg agtgagcaga ggaaagggga caagatcttc ctgaatgcct gctgcccagg

720

gtgggtgaga actgacatgg cgggacccaa ggccaccaag agcccagaag aaggtgcaga

780

gaccctgtg tacttggtccc ttttgccccc agatgctgag ggtcccatg gacaatttgt

840

ttcagagaag agagttgaac agtggtga

868

<210> 4

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Carbonyl Reductase 1 fusion protein

<400> 4

```

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ser Ser Gly Ile
  1           5           10           15
His Val Ala Leu Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly Ile Gly Leu Ala Ile
      20           25           30
Val Arg Asp Leu Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp Val Val Leu Thr Ala
      35           40           45
Arg Asp Val Thr Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln Gln Leu Gln Ala Glu
      50           55           60
Gly Leu Ser Pro Arg Phe His Gln Leu Asp Ile Asp Asp Leu Gln Ser

65           70           75           80
Ile Arg Ala Leu Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu Tyr Gly Gly Leu Asp
      85           90           95
Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys Val Ala Asp Pro Thr
      100          105          110
Pro Phe His Ile Gln Ala Glu Val Thr Met Lys Thr Asn Phe Phe Gly
      115          120          125
Thr Arg Asp Val Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu Ile Lys Pro Gln Gly
      130          135          140

Arg Val Val Asn Val Ser Ser Ile Met Ser Val Arg Ala Leu Lys Ser
145           150           155           160
Cys Ser Pro Glu Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser Glu Thr Ile Thr Glu
      165          170          175
Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Asn Lys Phe Val Glu Asp Thr Lys Lys
      180          185          190
Gly Val His Gln Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser Ala Tyr Gly Val Thr
      195          200          205
Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His Ala Arg Lys Leu Ser

210           215           220
Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn Ala Cys Cys Pro Gly

```

225 230 235 240
 Trp Val Arg Thr Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala Thr Lys Ser Pro Glu
 245 250 255
 Glu Gly Ala Glu Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu Leu Pro Pro Asp Ala
 260 265 270
 Glu Gly Pro His Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys Arg Val Glu Gln Trp
 275 280 285

<210> 5

<211> 871

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide encoding Carbonyl Reductase 1-Tat fusion protein

<400> 5

atgtcgtccg gcatccatgt agcgtggtg actggaggca acaaggcat cggttggcc 60
 atcgtgcgag acctgtgccg gctgttctcg ggggacgtgg tgctcacggc gcgggacgtg 120
 acgcggggcc aggcggccgt acagcagctg caggcggagg gcctgagccc gcgcttcac 180
 cagctggaca tcgacgatct gcagagcatc cgcgccctgc gcgacttctt gcgcaaggag 240
 tacgggggccc tggacgtgct ggtcaacaac gcgggcatcg ccttcaaggt tgctgatccc 300

acaccctttc atattcaagc tgaagtgcg atgaaaacaa atttctttgg taccagagat 360
 gtgtgcacag aattactccc tctaataaaa cccaaggga gagggtgaa cgtatctagc 420
 atcatgagcg tcagagccct taaaagctgc agccagagc tgcagcagaa gttccgcagt 480
 gagaccatca ctgaggagga gctgggtggg ctcatgaaca agtttgtgga ggatacaaag 540
 aaggaggtgc accagaagga gggctggccc agcagcgcag acggggtgac gaagattggc 600
 gtcaccgttc tgtccaggat ccacgccagg aaactgagtg agcagaggaa aggggacaag 660
 atcctcctga atgcctgctg ccaggggtgg gtgagaactg acatggcggg acccaaggcc 720

accaagagcc cagaagaagg tgcagagacc cctgtgtact tggccctttt gccccagat 780
 gctgagggtc cccatggaca atttgtttca gagaagagag ttgaacagtg gtgaggatcc 840
 taggaagaag cggagacagc gacgaagata g 871

<210> 6

<211> 286

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Carbonyl Reductase 1-Tat fusion protein

<400> 6

Met Ser Ser Gly Ile His Val Ala Leu Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly

1 5 10 15

Ile Gly Leu Ala Ile Val Arg Asp Leu Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp

20 25 30

Val Val Leu Thr Ala Arg Asp Val Thr Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln

35 40 45

Gln Leu Gln Ala Glu Gly Leu Ser Pro Arg Phe His Gln Leu Asp Ile

50 55 60

Asp Asp Leu Gln Ser Ile Arg Ala Leu Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu

65 70 75 80

Tyr Gly Gly Leu Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys

85 90 95

Val Ala Asp Pro Thr Pro Phe His Ile Gln Ala Glu Val Thr Met Lys

100 105 110

Thr Asn Phe Phe Gly Thr Arg Asp Val Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu

115 120 125

Ile Lys Pro Gln Gly Arg Val Val Asn Val Ser Ser Ile Met Ser Val

130 135 140

Arg Ala Leu Lys Ser Cys Ser Pro Glu Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser

145 150 155 160

Glu Thr Ile Thr Glu Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Asn Lys Phe Val

165 170 175

Glu Asp Thr Lys Lys Gly Val His Gln Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser

180 185 190

Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His

195 200 205

Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn

210 215 220

Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala

225	230	235	240
Thr Lys Ser Pro Glu Glu Gly Ala Glu Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu			
	245	250	255
Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys			
	260	265	270
Arg Val Glu Gln Trp Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg			
	275	280	285
<210>	7		
<211>	905		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Polynucleotide encoding Tat-Carbonyl Reductase 1-Tat fusion		

protein						
<400>	7					
taggaagaag	cggaagacagc	gacgaagact	cgagatgtcg	tccggcatcc	atgtagcgct	60
ggtgactgga	ggcaacaagg	gcatcggctt	ggccatcgtg	cgcgacctgt	gccggctgtt	120
ctcgggggac	gtggtgtctca	cggcgcgggga	cgtgacgcgg	ggccaggcgg	ccgtacagca	180
gctgcaggcg	gagggcctga	gccccgcgtt	ccaccagctg	gacatcgacg	atctgcagag	240
catccgcgcc	ctgcgcgact	tcctgcgcaa	ggagtacggg	ggcctggacg	tgctggtcaa	300
caacgcgggc	atgcgcttca	aggttgctga	tcccacaccc	tttcatattc	aagctgaagt	360
gacgatgaaa	acaaatttct	ttggtacccg	agatgtgtgc	acagaattac	tccctcta	420
aaaaccccaa	gggagagtgg	tgaacgtatc	tagcatcatg	agcgtcagag	cccttaaaag	480
ctgcagccca	gagctgcagc	agaagtccg	cagtgcagacc	atcactgagg	aggagctggt	540
ggggctcatg	aacaagtttg	tggaggatag	aaagaaggga	gtgcaccaga	aggagggtg	600
gcccagcagc	gcatacgggg	tgacgaagat	tggcgtcacc	gtttctgtcca	ggatccacgc	660
caggaaactg	agtgagcaga	ggaaagggga	caagatcttc	ctgaatgcct	gctgcccagg	720
gtgggtgaga	actgacatgg	cgggacccaa	ggccaccaag	agcccagaag	aaggtgcaga	780
gaccctgtg	tacttgcccc	ttttgcccc	agatgctgag	ggtccccatg	gacaatttgt	840
ttcagagaag	agagttgaac	agtggtaggg	atcctaggaa	gaagcggaga	cagcgacgaa	900
gatag						905
<210>	8					

<211> 299

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Carbonyl Reductase 1-Tat fusion protein

<400> 8

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ser Ser Gly Ile

1 5 10 15

His Val Ala Leu Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly Ile Gly Leu Ala Ile

20 25 30

Val Arg Asp Leu Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp Val Val Leu Thr Ala

35 40 45

Arg Asp Val Thr Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln Gln Leu Gln Ala Glu

50 55 60

Gly Leu Ser Pro Arg Phe His Gln Leu Asp Ile Asp Asp Leu Gln Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys Val Ala Asp Pro Thr

100 105 110

Pro Phe His Ile Gln Ala Glu Val Thr Met Lys Thr Asn Phe Phe Gly

115 120 125

Thr Arg Asp Val Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu Ile Lys Pro Gln Gly

130 135 140

Arg Val Val Asn Val Ser Ser Ile Met Ser Val Arg Ala Leu Lys Ser

145 150 155 160

Cys Ser Pro Glu Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser Glu Thr Ile Thr Glu

165 170 175

Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Asn Lys Phe Val Glu Asp Thr Lys Lys

180 185 190

Gly Val His Gln Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser Ala Tyr Gly Val Thr

195 200 205

Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His Ala Arg Lys Leu Ser

210 215 220
 Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn Ala Cys Cys Pro Gly
 225 230 235 240
 Trp Val Arg Thr Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala Thr Lys Ser Pro Glu

245 250 255
 Glu Gly Ala Glu Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu Leu Pro Pro Asp Ala
 260 265 270
 Glu Gly Pro His Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys Arg Val Glu Gln Trp
 275 280 285
 Gly Ser Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

290 295
 <210> 9
 <211> 905
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Polynucleotide encoding PEP-Carbonyl Reductase 1 fusion protein

<400> 9
 taaaagaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta 60
 aagtgtctga gatgtctgcc ggcatccatg tagcgctggt gactggaggc aacaagggca 120
 tcggcttggc catcgtgcgc gacctgtgcc ggctgttctc ggggggacgtg gtgctcacgg 180
 cgcgggacgt gacgcggggc caggcggccg tacagcagct gcaggcggag ggctgagcc 240
 cgcgcttcca ccagctggac atcgacgac tgcagagcat ccgcgccctg cgcgacttcc 300
 tgcgcaagga gtacgggggc ctggacgtgc tggtaacaa cgcgggcatc gccttcaagg 360
 ttgctgatcc cacacccttt catattcaag ctgaagtgc gatgaaaaca aatttctttg 420
 gtaccgaga tgtgtgcaca gaattactcc ctctaataaa accccaaggg agagtgggta 480
 acgtatctag catcatgagc gtcagagccc ttaaaagctg cagcccagag ctgcagcaga 540
 agttccgcag tgagaccatc actgaggagg agctgggtggg gctcatgaac aagtttgtgg 600
 aggatacaaa gaaggagtg caccagaagg agggctggcc cagcagcgca tacggggtga 660
 cgaagattgg cgtcaccgtt ctgtccagga tccacgccag gaaactgagt gagcagagga 720
 aaggggacaa gatcctctg aatgcctgct gcccagggtg ggtgagaact gacatggcgg 780
 gaccaaggc caccaagagc ccagaagaag gtgcagagac ccctgtgtac ttggcccttt 840

tgccccaga tgctgagggt ccccatggac aatttgtttc agagaagaga gttgaacagt

900

ggtga

905

<210> 10

<211> 300

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-Carbonyl Reductase 1 fusion protein

<400> 10

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ser Ser Gly Ile His Val Ala Leu

20 25 30

Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly Ile Gly Leu Ala Ile Val Arg Asp Leu

35 40 45

Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp Val Val Leu Thr Ala Arg Asp Val Thr

50 55 60

Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln Gln Leu Gln Ala Glu Gly Leu Ser Pro

65 70 75 80

Arg Phe His Gln Leu Asp Ile Asp Asp Leu Gln Ser Ile Arg Ala Leu

85 90 95

Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu Tyr Gly Gly Leu Asp Val Leu Val Asn

100 105 110

Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys Val Ala Asp Pro Thr Pro Phe His Ile

115 120 125

Gln Ala Glu Val Thr Met Lys Thr Asn Phe Phe Gly Thr Arg Asp Val

130 135 140

Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu Ile Lys Pro Gln Gly Arg Val Val Asn

145 150 155 160

Val Ser Ser Ile Met Ser Val Arg Ala Leu Lys Ser Cys Ser Pro Glu

165 170 175

Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser Glu Thr Ile Thr Glu Glu Glu Leu Val

180 185 190

Gly Leu Met Asn Lys Phe Val Glu Asp Thr Lys Lys Gly Val His Gln
195 200 205

Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val
210 215 220

Thr Val Leu Ser Arg Ile His Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys
225 230 235 240

Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr
245 250 255

Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala Thr Lys Ser Pro Glu Glu Gly Ala Glu
260 265 270

Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His
275 280 285

Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys Arg Val Glu Gln Trp
290 295 300

<210> 11

<211> 905

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide encoding Carbonyl Reductase 1-PEP-1 fusion protein

<400> 11

atgtcgtccg gcatccatgt agcgctgggtg actggaggca acaagggcat cggtttggcc 60
atcgtgcgcg acctgtgccg gctgttctcg ggggacgtgg tgctcacggc gcgggacgtg 120
acgcggggcc aggcggccgt acagcagctg caggcggagg gcctgagccc gcgcttcac 180
cagctggaca tcgacgatct gcagagcatc cgcgccctgc gcgacttcct gcgcaaggag 240
tacgggggcc tggacgtgct ggtcaacaac gcgggcatcg ccttcaaggt tgcgatccc 300
acacccttcc atattcaagc tgaagtgcg atgaaaacaa atttctttgg tacccgagat 360
gtgtgcacag aattactccc tctaataaaa cccaaggga gagggtgaa cgtatctagc 420

atcatgagcg tcagagccct taaaagctgc agcccagagc tgcagcagaa gttccgcagt 480
gagaccatca ctgaggagga gctggtgggg ctcatgaaca agtttgtgga ggatacaaag 540
aaggagtgcc accagaagga gggctggccc agcagcgcgt acggggtgac gaagattggc 600
gtcaccgttc tgtccaggat ccacgccagg aaactgagtg agcagaggaa aggggacaag 660
atcctcctga atgcctgtcg cccagggtgg gtgagaactg acatggcggg acccaaggcc 720

accaagagcc cagaagaagg tgcagagacc cctgtgtact tggccctttt gccccagat 780
gctgagggtc cccatggaca atttgtttca gagaagagag ttgaacagtg gtgaggatcc 840

taaaagaaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta 900
aagtg 905

<210> 12

<211> 300

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Carbonyl Reductase 1-PEP-1 fusion protein

<400> 12

Met Ser Ser Gly Ile His Val Ala Leu Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly

1 5 10 15

Ile Gly Leu Ala Ile Val Arg Asp Leu Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp

20 25 30

Val Val Leu Thr Ala Arg Asp Val Thr Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln

35 40 45

Gln Leu Gln Ala Glu Gly Leu Ser Pro Arg Phe His Gln Leu Asp Ile

50 55 60

Asp Asp Leu Gln Ser Ile Arg Ala Leu Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu

65 70 75 80

Tyr Gly Gly Leu Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys

85 90 95

Val Ala Asp Pro Thr Pro Phe His Ile Gln Ala Glu Val Thr Met Lys

100 105 110

Thr Asn Phe Phe Gly Thr Arg Asp Val Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu

115 120 125

Ile Lys Pro Gln Gly Arg Val Val Asn Val Ser Ser Ile Met Ser Val

130 135 140

Arg Ala Leu Lys Ser Cys Ser Pro Glu Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser

145 150 155 160

Glu Thr Ile Thr Glu Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Asn Lys Phe Val

165 170 175

Glu Asp Thr Lys Lys Gly Val His Gln Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser

180 185 190

Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val Thr Val Leu Ser Arg Ile His

195 200 205

Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn

210 215 220

Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys

260 265 270

Arg Val Glu Gln Trp Gly Ser Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp

275 280 285

Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

290 295 300

<210> 13

<211> 976

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide encoding PEP-1-Carbonyl Reductase 1-PEP-1 fusion

protein

<400> 13

taaaagaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta	60
aagtgtctga gatgtctgcc ggcatccatg tagcgctggt gactggaggc aacaaggcca	120
tcggcttggc catcgtgcgc gacctgtgcc ggctgttttc gggggacgtg gtgctcacgg	180
cgcgggacgt gacgcggggc caggcggccg tacagcagct gcaggcggag ggcctgagcc	240
cgcgcttcca ccagctggac atcgacgac tgcagagcat ccgcgccctg cgcgacttcc	300
tgcgaagga gtacgggggc ctggacgtgc tggtaacaa cgcgggcatc gccttcaagg	360
ttgtgatcc cacacccttt catattcaag ctgaagtgc gatgaaaaca aatttctttg	420

gtacccgaga tgtgtgcaca gaattactcc ctctaataaa accccaaggg agagtgtga 480
acgtatctag catcatgagc gtcagagccc ttaaaagctg cagcccagag ctgcagcaga 540
agttccgcag tgagaccatc actgaggagg agctggtggg gctcatgaac aagtttgtgg 600
aggatacaaa gaaggagtg caccagaagg agggctggcc cagcagcgca tacggggtga 660
cgaagattgg cgtcacggtt ctgtccagga tccacgccag gaaactgagt gagcagagga 720
aaggggacaa gatcctcctg aatgcctgct gcccaggtg ggtgagaact gacatggcgg 780
gaccaaggc caccaagagc ccagaagaag gtgcagagac ccctgtgtac ttggcccttt 840

tgccccaga tgctgagggt ccccatggac aattgtttc agagaagaga gttgaacagt 900
ggtgaggatc ctaaaagaaa cctggtggga aacctggtg accgaatggt ctcagccgaa 960
aaaaaacgt aaagtg 976

<210> 14

<211> 323

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-Carbonyl Reductase 1-PEP-1 fusion protein

<400> 14

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ser Ser Gly Ile His Val Ala Leu

20 25 30

Val Thr Gly Gly Asn Lys Gly Ile Gly Leu Ala Ile Val Arg Asp Leu

35 40 45

Cys Arg Leu Phe Ser Gly Asp Val Val Leu Thr Ala Arg Asp Val Thr

50 55 60

Arg Gly Gln Ala Ala Val Gln Gln Leu Gln Ala Glu Gly Leu Ser Pro

65 70 75 80

Arg Phe His Gln Leu Asp Ile Asp Asp Leu Gln Ser Ile Arg Ala Leu

85 90 95

Arg Asp Phe Leu Arg Lys Glu Tyr Gly Gly Leu Asp Val Leu Val Asn

100 105 110

Asn Ala Gly Ile Ala Phe Lys Val Ala Asp Pro Thr Pro Phe His Ile

115 120 125

Gln Ala Glu Val Thr Met Lys Thr Asn Phe Phe Gly Thr Arg Asp Val
130 135 140

Cys Thr Glu Leu Leu Pro Leu Ile Lys Pro Gln Gly Arg Val Val Asn
145 150 155 160

Val Ser Ser Ile Met Ser Val Arg Ala Leu Lys Ser Cys Ser Pro Glu
165 170 175

Leu Gln Gln Lys Phe Arg Ser Glu Thr Ile Thr Glu Glu Glu Leu Val
180 185 190

Gly Leu Met Asn Lys Phe Val Glu Asp Thr Lys Lys Gly Val His Gln
195 200 205

Lys Glu Gly Trp Pro Ser Ser Ala Tyr Gly Val Thr Lys Ile Gly Val
210 215 220

Thr Val Leu Ser Arg Ile His Ala Arg Lys Leu Ser Glu Gln Arg Lys

225 230 235 240

Gly Asp Lys Ile Leu Leu Asn Ala Cys Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr
245 250 255

Asp Met Ala Gly Pro Lys Ala Thr Lys Ser Pro Glu Glu Gly Ala Glu
260 265 270

Thr Pro Val Tyr Leu Ala Leu Leu Pro Pro Asp Ala Glu Gly Pro His
275 280 285

Gly Gln Phe Val Ser Glu Lys Arg Val Glu Gln Trp Gly Ser Lys Glu
290 295 300

Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys
305 310 315 320

Arg Lys Val