

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0134530
(43) 공개일자 2013년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0058107
(22) 출원일자 2012년05월31일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후
평동, 동아아파트)
김대원
강원도 춘천시 칠전동 칠전대우2차아파트 203동
701호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

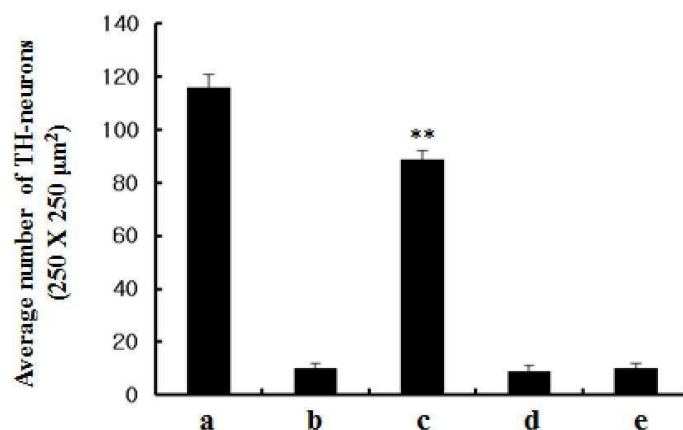
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 P E A -15 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

PEA-15 (Phosphoprotein enriched in astrocytes-15)는 뇌 전체에서 뉴런 및 성상세포에서 과발현되는 작은 단백질이다. 이 단백질은 항세포사멸 특성 및 친세포사멸 특성으로 세포 생존율을 증가시키는 능력을 가진 다기능성 단백질이다. 파킨슨병은 뇌의 흑색질 내에서 도파민 뉴런이 점차 상실되는 신경퇴행성 질환이다. 본 발명자들은 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 SH-SY5Y 신경아세포종 세포 및 파킨슨병 동물모델에서 산화 스트레스로부터 도파민 뉴런을 보호할 수 있음을 밝혀내었다. PEP-1-PEA-15 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 그리고 뇌의 흑색질 내로 잘 이동함을 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다. PEP-1-PEA-15 융합단백질은 MPP^+ 로 유도되는 활성산소종 생성 및 DNA 조각화를 현저히 저해하였으며, 결과적으로 SH-SY5Y 세포의 생존을 유도했다. 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질은 Bcl-2 단백질 및 캐스페이즈-3의 발현 수준을 증가시킨 반면, Bax와 절단된 캐스페이즈-3의 발현 수준은 저감시켰다. 또한, PEP-1-PEA-15 융합단백질은 흑색질 내로 투과되어 MPTP로 유도된 마우스 파킨슨병 모델의 흑색질 내에서 도파민 뉴런세포사멸을 저해하였다. 따라서, PEP-1-PEA-15 융합단백질은 파킨슨병의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

안은희

강원도 원주시 단구동 1501-1 동보노빌리티타워 703호

음원식

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

황현숙

경기도 파주시 교하읍 현대2차아이파크 210동 1404호

박진서

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

조윤신

강원도 강릉시 화부산로99번길 12 강릉교동롯데캐슬아파트 104동 802호

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가동 389-1 그린빌 301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010K000808

부처명 교육과학기술부

연구사업명 교육과학기술부 21C 프론티어연구개발사업(뇌기능 활용 및 뇌질환 치료기술 개발사업)

연구과제명 간질의 분자적기전 연구 및 새로운 치료제 개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교

연구기간 2012.04.01 ~ 2013.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 교육과학기술부

연구사업명 교육과학기술부 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환치료제 개발: 질환치료용 생리활성 고분자 신소재물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교

연구기간 2011.09.01 ~ 2012.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A1A03006155

부처명 교육과학기술부

연구사업명 교육과학기술부 중견연구자지원사업(도약연구과제)

연구과제명 유전체 분석을 통한 대사성 질환 유전요인 발굴 및 맞춤형 단백질 치료제 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

PEA-15 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인 PEP-1이 공유결합된 PEA-15 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 융합단백질은 서열번호 7, 서열번호 9 및 서열번호 11 중 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 PEA-15 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 PEA-15 (Phosphoprotein enriched in astrocytes-15) 융합단백질의 도파민 뉴런 보호에 관한 것으로서, 단백질 수송 도메인과 공유결합된 PEA-15 융합단백질은 뇌의 흑색질 내로 원활히 이동하며, 활성산소종 생성 및 DNA 조각화를 현저히 저해하였으며, 산화 스트레스에 대하여 흑색질 내의 도파민 뉴런을 현저히 보호하는 것으로 나타나 PEA-15 융합단백질은 파킨슨병의 예방 및 치료 용도로 이용 가능하다.

배경기술

[0002] 파킨슨병은 알츠하이머 병 다음으로 흔한 신경퇴행성 질환이며, 흑색질 내의 도파민 뉴런의 선택적 손실 및 선조체 (striatum) 내의 도파민 감소로 특징지어진다. 파킨슨병은 고령인구 중 약 2% 정도의 건강을 해치며, 전형적인 증상은 근육 경직, 운동완서 (bradykinesia) 및 떨림과 자세 불안정과 같은 운동 장애를 포함한다 [Damier et al., 1999; Dawson and Dawson, 2003; Eriksen et al., 2005; Morales-Garcia et al., 2011]. 파킨슨병 발병은 노화, 염증, 화학물질 및 유전인자를 포함한 많은 위험인자와 관계가 있다 [Dauer and Przedborski, 2003; Honot and Hirsch, 2003; Warner and Schapira, 2003]. 비록 신경세포 사멸의 정확한 메커니즘은 완전히 이해되지는 않았지만, 파킨슨병, 알츠하이머병 및 근위축성 측색경화증 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS)와 같은 신경퇴행성 질환에서 산화 스트레스가 중요한 역할을 한다는 것은 널리 알려져 있다 [Barnham et al., 2004]. 활성산소종은 정상적인 세포 과정 및 몇몇 환경 인자의 부산물이며, 세포 내에서 단백질, 지방 및 DNA와 같은 고분자의 구조 및 기능을 변화시켜 손상을 준다. 활성산소종의 축적은 증가하는 산화 스트레스에 의해 파킨슨병을 포함하는 많은 질병의 진행 원인이 된다 [Hald and Lotharius, 2005].

[0003] PEA-15 (Phosphoprotein enriched in astrocytes-15)는 정상세포 내의 인단백질로 확인되었다. 이 단백질은 다양한 조직에서 널리 발현되며 포유동물에서 잘 보존되어 있음이 알려졌다 [Danziger, 1995]. PEA-15 유전자와 단백질은 신경계, 특히 정상세포에서 많이 발현된다 [Araujo et al., 1993; Danziger, 1995; Estelles et al., 1996; Sharif et al., 2004]. PEA-15는 N-말단의 DED (death effector domain) 및 C-말단의 불규칙 구조 꼬리로 구성된다 [Renault et al., 2003; Fiory et al., 2009]. 몇몇 연구결과들은 PEA-15가 ERK1/2 (extracellular signal receptors, activated kinases) 및 ERK1/2의 기질인 RSK2 (ribosomal S6 kinase2)와의 상호작용을 통하여 다양한 종양세포 내에서 여러 가지 세포 기능을 조절함을 보여준다. 또한, PEA-15 과다 발현은 난소암에서 환자의 생존율을 높이는데 기여하는 반면, 신경교아세포종 (glioblastoma)에서는 종양의 생존율을 증가시켰다. 따라서, PEA-15는 항종양발생 및 친종양발생 특성을 포함하여 다양한 기능을 나타낸다 [Ramos et al., 2000; Formstecher et al., 2001; Xiao et al., 2002; Chou et al., 2003; Vaidyanathan and Ramos, 2003; Bartholomeusz et al., 2008]. 최근의 연구는 마우스에서 PEA-15 단백질을 제거하면 공간 학습 능력에서 특이한 결함을 나타냄을 밝혔다 [Ramos et al., 2009]. 그렇지만, 뉴런 세포에서 PEA-15 기능의 생리학은 명백하게 이해되지는 않았다.

[0004] 단백질 형질도입은 살아 있는 세포 내로 외래 단백질을 운반하는 능력이 있는 것으로 잘 알려진 단백질 수송 도메인을 이용하여 인비트로 및 인비보에서 단백질을 운반하는 확립된 수단이다. 비록 형질도입의 정확한 메커니즘은 분명하지 않지만, 본 발명자들을 비롯한 많은 연구 그룹들은 단백질 수송이 인비트로와 인비보에서 치료목적의 단백질 운반에 기여함을 밝혔다 [Morris et al., 2001; Wadia and Dowdy, 2002; Eum et al., 2004; Choi et al., 2006; An et al., 2008; Shin et al., 2010; Kim et al., 2011; Lee et al., 2011].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 세포침투성 PEA-15 융합단백질이 세포막과 뇌혈관장벽 (blood brain barrier)을 효과적으로 투과하여 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)로 유도된 파킨슨병 동물모델에서 신경보호효과를 나타내는지를 알아보고, 세포침투성 PEA-15 융합단백질을 포함하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 세포 내로 직접 투과되어 인비트로와 인비보에서 세포 사멸에 대해 세포를 보호하는지를 시험하였고, 그리하여 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 중양 및 파킨슨병과 같은 PEA-15와 관련된 다양한 질환에 대한 치료제가 될 수 있음을 제시하였다.

[0007] 본 발명자들은 세포 투과성 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 SH-SY5Y 세포 내에서 MPP^+ 에 의해 유도되는 신경손상 및 인비보에서 MPTP에 의해 유도되는 마우스 파킨슨병 모델에서의 신경손상에 대해 나타내는 보호효과를 연구하였다. 정제된 PEP-1-PEA-15 융합단백질은 항토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석하여 확인하였다. 정제된 PEP-1-PEA-15 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 시간 및 투여량 의존적으로 효과적으로 투과되었고, 세포 내에 12시간 동안 유지되었다. PEP-1-PEA-15 융합단백질의 세포내 분포를 밝히기 위해 DAPI 및 알렉사 형광을 이용하여 세포 내로 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질을 시험하였다. 이 결과는 PEP-1-PEA-15 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 효과적으로 투과됨을 나타내었다. 단백질 수송 도메인 매개 단백질 수송은 효과적인 방법으로 알려져 있고, 치료용 단백질 전략을 시험하기 위한 도구로 이용될 수 있다 [Wadia and Dowdy, 2002, 2003; Dietz, 2010]. 그러나, 단백질 수송 도메인의 단백질 수송 효율은 목표 단백질, 세포 타입 및 단백질 수송 도메인의 성질에 따라 달라진다 [Lim et al., 2010; Wang et al., 2010].

[0008] MPP^+ (1-methyl-4-phenylpyridinium ion)는 신경독성물질이고, 파킨슨병 실험에 널리 이용되는데, 활성산소종을 생성하여 신경세포사멸을 유도한다. 활성산소종은 산소와의 상호작용에 관련된 다양한 통상의 세포 과정의 부산물로서 불가피하게 생성된다. 활성산소종은 파킨슨병에서 신경세포사멸의 중요한 매개자이다 [Kim et al., 2007; Hald and Lotharius, 2005]. 그리하여, 본 발명자들은 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 MPP^+ 에 의해 유도된 산화 스트레스를 억제할 수 있는지를 MTT 분석 및 활성산소종에 민감한 안료인 DCF-DA를 이용하여 시험하였다. 세포를 2 mM MPP^+ 에 18시간 동안 노출하면, 세포 중 52%만이 생존하였다. MPP^+ 에 노출된 세포는 PEP-1-PEA-15 융합단백질로 선처리한 경우에 생존율이 75%까지 증가하였다. 본 발명자들은 또 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 MPP^+ 에 의해 유도된 산화 스트레스를 저해할 수 있는지를 활성산소종에 민감한 안료인 DCF-DA를 이용하여 시험하였다. 도 3과 같이, 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내에서 MPP^+ 로 유도되는 활성산소종 생성을 현저히 저해하였다.

[0009] 나아가 본 발명자들은 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 SH-SY5Y 세포 내에서 MPP^+ 로 유도된 세포자기사멸에 대해 보호효과를 나타냄을 밝혔다. 포유동물 세포에서 미토콘드리아의 기능 장애는 결정적인 역할을 수행한다고 보고되었다. 세포자기사멸 활성인자 Bax 및 세포자기사멸 저해인자 Bcl-2와 같은 Bcl-2 패밀리의 단백질들은 세포 사멸에서 중요한 역할을 수행하며 [Wang et al., 1997; Zong et al., 2001], Bcl-2에 대한 Bax의 비율은 세포 사멸을 조절하는데 중요한 포인트이다 [Kim et al., 2004]. 또한, 캐스페이즈-3 활성화는 세포자기사멸 마커로 널리 알려져 있다 [Park et al., 2010]. 본 발명에서는 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 Bcl-2 및 캐스페이

즈-3의 발현을 증가시킴으로써 세포 사멸에 대하여 세포를 보호함을 관찰하였다. 이러한 결과는 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 MPP^+ 로 유도된 산화 스트레스를 완화시키고 세포자기사멸을 조절하여 세포 생존을 돕는다는 것을 말해준다.

[0010] MPTP로 유도된 마우스 모델은 인간 파킨슨병과 유사한 병태생리를 유발하기 때문에, 이 모델은 파킨슨병의 병리학적 메커니즘을 연구하는데 널리 이용되어 왔다 [Camicioli et al., 2001; Park et al., 2004]. C57BL/6 마우스를 신경독성물질 MPTP에 노출시키는 것은 동물 모델에서 파킨슨병의 중요한 측면을 분석하는데 가장 가치 있는 접근법 중의 하나로 잘 알려져 있다. MPTP는 선택적인 신경독성물질로서 선조체 도파민을 고갈시키고, MPP^+ 에 의해 개시되는 것으로 알려져 있다 [Araki et al., 2001; Heikkila et al., 1984]. 도 6과 같이, PEP-1-PEA-15 융합단백질은 MPTP 노출로 유도되는 독성에 대해 세포를 효과적으로 보호하였다. 또한, PEP-1-PEA-15 융합단백질을 투과시킨 경우 뉴런의 수도 현저히 증가하였다. 이러한 결과는 파킨슨병에 걸린 이후 흑색질 부분에서 도파민 뉴런 세포사멸에 대하여 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 세포를 보호하며, 파킨슨병 외상 이후 신경 손상을 지연시킴을 나타낸다. 그러나, 정확한 메커니즘은 좀더 연구가 필요하다.

[0011] 결론적으로, 본 발명자들은 PEP-1 펩타이드와 융합된 사람 PEA-15 즉, PEP-1-PEA-15 융합단백질은 인비트로와 인비보에서 효과적으로 투과되며, 산화 스트레스로 인해 유도되는 신경세포 사멸에 대해 세포를 보호할 수 있음을 밝혔다. 자세한 메커니즘은 더 연구하여 밝혀내야 하지만, 세포 투과성 PEP-1-PEA-15 융합단백질은 신경 손상의 결과인 신경세포 파괴를 보호하는 새로운 전략을 제공하며, 파킨슨병을 비롯한 다양한 질병의 치료기회를 제공할 것이다.

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 PEA-15의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 PEP-1 단백질 수송 도메인이 공유결합되어 있는 PEA-15 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 PEA-15의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 융합단백질을 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 대한 것이다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질이 서열번호 7, 서열번호 9 및 서열번호 11 중 선택된 1종인 것을 특징으로 한다.

[0015] PEA-15 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, 텔크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 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.

[0016] 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 $0.01\mu\text{g}\sim 100\text{mg/kg}$ 을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 PEA-15 단백질 분자의 세포 내 전달은 PEA-15에 Pep-1 세포투과성 수송도메인이 목표 단백질인 PEA-15의 N-말단 및/또는 C-말단과 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 서열번호 3의 PEP-1 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, PEP-1의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결어로 PEP-1 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 이들 수송 도메인도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것

이다.

- [0018] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0019] "PEA-15 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 PEA-15를 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 PEA-15를 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서 구체적인 일 실시예로서 "PEP-1-PEA-15"는 PEA-15 융합단백질 중 PEA-15의 N-말단에 PEP-1 단백질 수송 도메인이 결합된 것을 말한다.
- [0020] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0021] 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.
- [0022] 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, 구체적으로는 PEP-1 펩타이드(서열번호 3)를 말한다.
- [0023] 본 명세서의 "목표 단백질"은 PEP-1 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.
- [0024] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0025] 본 발명에서 단백질 수송 도메인으로서는 PEP-1 수송 도메인을 들 수 있다. 또한, 목표 단백질(화물 분자)는 PEA-15이다. 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.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성 PEA-15 융합단백질이 서열번호 7, 서열번호 9 또는 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송도메인(protein transducing domain; "PTD")이 PEA-15 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 공유결합된 것을 특징으로 한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성(cell-transducing) PEA-15 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성 PEA-15 융합단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0030] PEP-1-PEA-15 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내로 그리고 뇌의 흑색질 내로 잘 이동함을 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다.

- [0031] 또한, PEP-1-PEA-15 융합단백질은 MPP^+ 로 유도되는 활성산소종 생성 및 DNA 조각화를 현저히 저해하였으며, 결과적으로 SH-SY5Y 세포의 생존을 유도했다.
- [0032] 또한, PEP-1-PEA-15 융합단백질은 흑색질 내로 투과되어 MPTP로 유도된 마우스 파킨슨병 모델의 흑색질 내에서 도파민 뉴런세포사멸을 저해하였다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 구축 모식도 및 정제사진이다. (A)는 벡터 pET-15b를 바탕으로 한 PEP-1-PEA-15 융합단백질 발현벡터 시스템 구축 모식도이다. 합성한 PEP-1 핵산 올리고머를 pET-15b의 *NdeI* 및 *XhoI* 제한부위 내에 클론하고 사람 PEA-15 cDNA를 *XhoI* and *BamHI* 제한부위 내로 클론하였다. (B)는 발현된 대조군 PEA-15 단백질 및 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 모식도이고, 각 단백질은 여섯 개의 히스티딘 잔기가 연속된 His 태그를 포함한다. 발현은 IPTG를 가하여 유도하였다. 세포 추출물 및 정제된 단백질을 12% SDS-PAGE로 분석하였고 (C), 토끼 폴리히스티딘에 대한 항체를 이용하여 웨스턴블랏 분석하였다 (D). 레인 1: 정제된 대조군 PEA-15 단백질, 레인 2: 정제된 PEP-1-PEA-15 융합단백질.
- 도 2는 SH-SY5Y 세포 내로 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 투과를 보여준다. (A)는 PEP-1-PEA-15 융합단백질 및 대조군 PEA-15 단백질을 각각 0.5~3 mM 농도로 배양 배지에 한 시간 동안 가하였다. (B) PEP-1-PEA-15 융합단백질 또는 대조군 PEA-15 단백질을 각각 3 mM씩 배양 배지에 10~60분 동안 가하였다. (C) 3 mM PEP-1-PEA-15 융합단백질로 미리 처리한 세포를 1~60시간 동안 배양하였다. PEP-1-PEA-15 융합단백질의 세포 내로 투과는 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. (D) PEP-1-PEA-15 융합단백질 (3 mM) 또는 대조군 PEA-15 단백질을 배양 배지에 한 시간 동안 가한 다음 투과된 단백질의 분포를 공촛점 현미경으로 관찰하였다. 막대는 50 μ m이다.
- 도 3은 SH-SY5Y 세포의 생존율 및 세포 내 활성산소종 생성에 미치는 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 영향을 나타낸다. (A) MPP^+ (2 mM)를 1~3 mM의 PEP-1-PEA-15 융합단백질 또는 대조군 PEA-15 단백질로 한 시간 동안 미리 처리한 SH-SY5Y 세포에 18 시간 동안 처리하였다. 세포 생존율은 MTT에 기초한 발색 분석으로 평가하였다. 각 막대는 다섯 번의 실험에서 얻은 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. * $P < 0.05$ 및 ** $P < 0.01$ 는 MPP^+ 처리한 세포와 비교한 것이다. (B) 세포를 PEP-1-PEA-15 융합단백질 (3 mM)로 한 시간 동안 처리한 후 MPP^+ (4 mM)에 40 분 동안 노출시켰다. 세포내 활성산소종 농도는 형광염료인 DCF-DA로 염색한 후 측정하였다. 형광 강도는 ELISA 플레이트 판독기로 측정하였다. ** $P < 0.01$ 은 MPP^+ 처리한 세포와 비교한 것이다. 크기 막대는 50 μ m이다. 레인 1: 대조군 세포, 레인 2: MPP^+ 처리한 세포, 레인 3: PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리한 세포, 레인 4: PEA-15 단백질 처리한 세포, 레인 5: PEP-1 펩타이드 처리한 세포.
- 도 4는 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 MPP^+ 로 유도된 DNA 조각화로부터 세포를 보호함을 나타낸다. 세포를 PEP-1-PEA-15 융합단백질 (3 mM)로 한 시간 동안 처리한 후 MPP^+ (4 mM)에 18 시간 동안 노출하였다. DNA 조각화는 TUNEL 염색으로 탐지하였다. 크기 막대는 50 μ m이다.
- 도 5는 SH-SY5Y 세포 내에서 Bcl-2, Bax, 캐스페이즈-3 및 절단된 캐스페이즈-3의 발현에 미치는 세포 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 효과를 나타낸다. 세포를 PEP-1-PEA-15 융합단백질 (1~3 mM)로 한 시간 처리하고, 각각 6, 8 및 24 시간 동안 MPP^+ (4 mM)에 노출시켰다. Bcl-2 (6 h), Bax (6 h), 캐스페이즈-3 (18 h) 및 절단된 캐스페이즈-3 (24 h)의 발현 수준을 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다.
- 도 6은 혈관-뇌 장벽을 가로지르는 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 투과와 도파민 뉴런 세포의 생존율에 미치는 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 영향을 나타낸다. (A)는 마우스 뇌에서 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 투과를 항히스티딘 항체를 이용한 면역조직화학방법으로 분석한 것이다. 동물에 PEP-1-PEA-15 융합단백질을 한 번 주사하고 8 시간 경과후 희생시켰다. 크기 막대는 100 μ m이다. (B)는 PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리한 마우스의 흑색질을 크레일 바이올렛 염색한 사진 및 TH-면역염색한 사진이다. 크기 막대는 50 μ m이다. a: 음성 대조군 (생리 식염수 처리), b: 양성 대조군 (MPTP 처리), c: PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리군, d: 대조군 PEA-15 단백질 처리군, e: PEP-1 펩타이드 처리군.
- 도 7은 MPTP 처리한 마우스의 흑색질 내의 TH 양성 뉴런을 보호하는 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 효과를

나타낸다. 마우스 흑색질 내의 TH 면역반응 뉴런의 수를 세었다. ** $P < 0.01$ 는 MPTP 처리한 마우스와 비교하였다. a: 음성 대조군 (생리식염수 처리), b: 양성 대조군 (MPTP 처리), c: PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리군, d: 대조군 PEA-15 단백질 처리군, e: PEP-1 펩타이드 처리군.

도 8은 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 행동 테스트에 미치는 영향을 나타낸다. 마우스를 로타로드 트레이드에 놓고 마우스가 떨어지지 않고 트레이드 상에 머무른 시간 (A) 및 총 거리 (B)를 기록했다. 레인 a: 대조군 마우스, 레인 b: MPTP 처리 마우스, 레인 c: PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리 마우스, 레인 d: 대조군 PEA-15 단백질 처리 마우스, 레인 e: PEP-1 펩타이드 처리 마우스. ** $P < 0.01$ 은 MPTP 처리한 마우스와 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 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 PEP-1-PEA-15 융합단백질을 시료로 한 데이터를 기재하였으나, 그 외의 PEA-15-PEP-1 융합단백질, PEP-1-PEA-15-PEP-1 융합단백질 또한 PEP-1-PEA-15 융합단백질을 시료로 한 시험 결과와 유사한 정도의 결과를 나타내었다.

[0035] 시료

[0036] Ni^{2+} -나이트로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였다. 사람 신경아세포종 (neuroblastoma) SH-SY5Y 세포는 한국세포주연구재단 (서울)에서 입수하였다. DCF-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 절단된 캐스페이즈-3 및 액틴에 대한 1차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) 및 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 각각 구입하였다. 사람 PEA-15 cDNA는 PCR을 이용하여 분리하였다. 합성 PEP-1 펩타이드는 PEPTRON (Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 다른 모든 화학약품은 최상급 분석등급을 사용하였다.

[0037] 실시예 1: PEP-1-PEA-15 융합단백질의 발현 및 정제

[0038] 세포 침투성 PEP-1 발현 벡터는 종래 기술에 따라 준비하였다 [Eum et al., 2004]. 사람 PEA-15의 cDNA 서열은 센스 프라이머 5'-CTCGAGATGGCTGAGTACGG-3'과 안티센스 프라이머 5'-GGATTCTCAGGCCTTCTCG-3'를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 얻어진 PCR 산물을 자르고 용출하고 TA 클로닝 벡터에 연결하였다. 사람 PEA-15 cDNA를 포함하는 정제된 TA 벡터를 PEP-1 발현 벡터에 연결하여 PEP-1-PEA-15 융합단백질 발현 시스템을 구축하였다. 이와 유사한 방법으로 대조군 PEA-15 단백질 발현 시스템을 구축하였다.

[0039] PEP-1-PEA-15 융합단백질 및 대조군 PEA-15 단백질을 생산하기 위해 플라스미드를 *E. coli* BL21 세포 내로 형질 전환시켰다. 형질전환된 세포를 100 mL의 LB 배지에서 37 °C로 D_{600} 값이 0.5~1.0이 되도록 배양하고 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside; Duchefa, Haarlem, Netherlands)로 18 °C에서 24 시간 동안 유도하였다. 수확한 세포는 초음파 처리로 용균한 다음 Ni^{2+} -나이트로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼 (Qiagen) 및 PD-10 컬럼 (Amersham, Braunschweig, Germany)으로 정제하였다. 내독소를 제거하기 위해 정제된 PEP-1-PEA-15 융합단백질 및 대조군 PEA-15 단백질을 Detoxi-Gel™ 내독소 제거 젤 (Pierce, Rockford, IL, USA)로 처리하였다. Limulus amoebocyte lysate assay (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)로 시험한 결과 단백질에 대한 내독소 수준은 탐지 한계 (< 0.1 EU/mL) 이하였다. 정제된 단백질의 농도는 표준물질로 소혈청 알부민을 사용하여 브래드포드 법으로 측정하였다 [Bradford, 1976].

[0040] 실시예 2: SH-SY5Y 세포 내로 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 투과

[0041] SH-SY5Y 사람 신경아세포종 세포는 가열 분활성화 우태혈청 (10% FBS) 및 항생제 (100 μg/mL 스트렙토마이신, 100 U/mL 페니실린)를 함유한 EMEM 배지 내에서 37 °C, 95% 공기 및 5% CO₂의 습한 환경 하에서 배양하였다. PEP-1-PEA-15 융합단백질을 투과시키기 위해 SH-SY5Y 세포를 60 mm 접시에서 배양하였다. 배양 배지는 2 mL의 신선한 용액으로 교체하였다. 세포는 다양한 농도의 PEP-1-PEA-15 융합단백질 (0.5~3 μM)로 시간을 달리 하여

(10~60 분) 처리하였다. 세포는 트립신-EDTA (Gibco)로 처리하고 PBS로 세척하였다. 세포는 하비스트하여 세포 추출물을 제조하였고, 웨스턴 블랏 분석에 사용하였다.

[0042] 실시예 3: 웨스턴 블랏 분석

[0043] 세포 용균액을 12% SDS-PAGE에 로딩하였다. 분리된 단백질들은 나이트로셀룰로스 막에 전기이동한 다음 5% 탈지유가 든 PBS로 블로킹시켰다. 막은 항체로 탐지하고, 면역반응 밴드는 화학형광 강도를 높여 시각화하였다 (Amersham, Buckinghamshire, UK).

[0044] 실시예 4: 형광 현미경 분석

[0045] SH-SY5Y 세포를 3 mM PEP-1-PEA-15 융합단백질로 처리한 커버슬립 상에서 배양하였다. 한 시간 동안 37 °C로 배양한 다음 세포를 PBS로 두 번 세척하고 4% 파라포름알데하이드로 5 분간 실온에서 고정하였다. 세포는 투과성을 높이고 30 분간 3% 우혈청 알부민, 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS (PBS-BT)로 블로킹하고 PBS-BT로 세척하였다. 그런 다음 세포를 실온에서 한 시간 동안 1차 항체 (His-probe, 1:2000; Santa Cruz Biotechnology)에 노출시켰다. 암실, 실온에서 45분간 2차 항체 (Alexa fluor 488, 1:15000; Invitrogen)에 노출시켰다. 핵은 5 분간 0.1 μM/ml 4'6-다이아미디노-2-페닐인돌 (DAPI; Roche, Basel, Switzerland)로 염색하였다. 형광 분포는 공초점 현미경 FV-300 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

[0046] 실시예 5: 세포 생존율 분석

[0047] 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 생물학적 역할은 MPP⁺ 처리한 SH-SY5Y 세포의 생존율을 측정함으로써 평가하였다. 세포는 96웰 플레이트에 시딩하여 70% 이상 자라도록 하였다. 세포는 PEP-1-PEA-15 융합단백질 (1~3 mM)로 한 시간 처리한 다음 2 mM MPP⁺(1-methyl-4-phenylpyridinium)로 18 시간 동안 배양배지에 가하였다. 세포 생존율은 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide}를 이용하여 발색 반응으로 평가하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 생존율은 융합단백질을 처리하지 않은 대조군 세포에 대한 백분율로 나타내었다.

[0048] 실시예 6: 활성산소종 측정

[0049] 활성산소종에 의해 DCF (2',7'-dichlorofluorescein)로 전환되는, 활성산소종에 민감한 안료 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 사용하여 SH-SY5Y 세포 내의 활성산소종 농도를 결정하였다. 활성산소종 생성에 대한 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 효과를 시험하기 위해 SH-SY5Y 세포에 PEP-1-PEA-15 융합단백질 (3 μM)을 한 시간 처리한 군과 처리하지 않은 군에 각각 MPP⁺ (4 mM)를 40 분 동안 가하였다. SH-SY5Y 세포는 PBS로 두 번 세척한 후 10 μM DCF-DA로 30분간 처리하였다. 세포의 형광 이미지는 MRC-1024ES 공초점 레이저-스캐닝 시스템 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 갖춘 Zeiss Axiovert S100 현미경 (Zeiss, Jena, Germany)으로 레이저 여기 파장인 494 nm로 촬영하였다. 동일한 실험 조건 하에서 형광 강도는 여기파장 485 nm 및 방출파장 538 nm에서 각각 Fluoroskan ELISA 플레이트 판독기 (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)를 이용하여 정량하였다.

[0050] 실시예 7: TUNEL 분석

[0051] SH-SY5Y 세포에 PEP-1-PEA-15 융합단백질 (3 mM)을 한 시간 동안 처리하거나 처리하지 않고 배양한 후 MPP⁺ (4 mM)로 18 시간 처리하였다. TUNEL {Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated biotinylated UTP nick end labeling} 염색은 세포사멸탐지키트 (Roche Applied Science)를 이용하여 수행하였다. 영상은 Eclipse 80i 형광 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)으로 촬영했다.

[0052] **실시예 8: 세포자기사멸 단백질 발현 측정**

[0053] SH-SY5Y 세포에 PEP-1-PEA-15 융합단백질 (1~3 mM)을 한 시간 동안 처리하거나 처리하지 않고 배양한 후 MPP⁺ (4 mM)로 처리 시간을 달리 하여 (6h, 18h 및 24h) 처리하였다. Bcl-2 (6 h), Bax (6 h), 캐스페이즈-3 (18 h) 및 절단된 캐스페이즈-3 (24 h)의 세포 용균액 내 발현을 특이 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다.

[0054] **실시예 9: 실험 동물**

[0055] 웅성, 6주령, 22~25 g, C57BL/6 마우스를 한림대 실험동물센터에서 구입하였다. 마우스는 일정 온도 (23 ℃)와 일정 상대습도 (60%)에서 12시간 사이클로 명암 조절하여 사육하였다. 물과 사료에는 자유롭게 접근 가능하였다. 동물과 관련된 모든 실험 절차와 관리는 국립수의과학검역원 (National Veterinary Research & Quarantine Service of Korea)의 실험동물 보호 및 이용에 관한 가이드를 따랐고, 이를 한림대학교 의과대학 동물 보호 및 이용 위원회가 입증한다. 마우스에는 MPTP를 20 mg/kg 투여량으로 두 시간 간격으로 네 번 주사하였다. PEP-1-PEA-15 융합단백질의 파킨슨병 보호효과를 확인하기 위해 MPTP 처리 12시간 전 2.0 mg/kg의 단백질을 한 차례 피하주사하였다. 마우스 (각 군마다 n=5)는 다음과 같이 다섯 개의 군으로 나누었다: 1) 무처리 대조군, 2) MPTP 처리군, 3) MPTP + PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리군, 4) MPTP + 대조군 PEA-15 처리군, 및 5) MPTP + PEP-1 펩타이드 처리군. 마우스는 마지막 주사로부터 일주일 후 희생시켰다.

[0056] **실시예 10: 면역조직화학 및 세포 계수**

[0057] 동물들은 우레탄 마취 (1.5 g/kg, i.p.) 하에 심장을 관통하여 PBS 및 4% 파라포름알데하이드 함유 0.1 M 인산 완충액 (pH 7.4)으로 관류하였다. 뇌는 제거하여 같은 고정제로 4시간 동안 고정시켰다. 뇌 조직은 오버나이트로 30% 수크로스를 침투시켜 동결방지시켰다. 그런 다음 전체 뇌를 동결시키고 저온유지장치에서 30 μm 두께로 절편화하여 연속되는 절편들은 PBS가 들어 있는 6웰 플레이트에 넣었다. 선택된 동물의 흑색질 전체를 통하여 연속되는 절편 중 여섯 번째 절편을 면역조직화학에 이용하였다. 절편들은 3% 우혈청 알부민 함유 PBS에서 실온으로 30분 배양하고 토끼 항-티로신 하이드록실레이즈 (TH) IgG (1:500, Santa Cruz Biotechnology) 1차 항체가 든 PBS와 0.3% Triton X-100으로 실온에서 오버나이트 배양하였다. 절편들은 PBS로 10분씩 세 번 세척하고, 바이오틴 결합된 염소 항토끼 IgG (Vector, Laboratories, Burlingame, CA, USA) 및 1차 항혈청으로서 같은 용액에 1:200 희석한 ABC 복합체 (Vector Laboratories)에서 순차적으로 배양하였다. 배양 사이에 조직들은 각 10분씩 PBS로 세 번 세척하였다. 절편들은 DAB (3,3'-diaminobenzidine) 함유 트리스 완충액으로 시각화하여 젤라틴 코팅된 슬라이드에 올려놓았다. 크레실 바이올렛은 니슬 소체의 역염색에 이용하였다. DP72 디지털 카메라 (Olympus, Tokyo, Japan)와 DP2-BSW 현미경 디지털 카메라 소프트웨어 (Olympus)로 영상을 캡처하고 분석하였다. 사진은 Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, CA, USA)을 사용하여 준비하였다. 영상 조직은 전체 영상에 대해 역치 및 밝기 조절로만 한정하였다. 세포 계수는 흑색질의 TH 면역활성 뉴런의 수를 세었다. 뉴런은 뉴런 크기, 형태 및 조직 내의 형태 변화에도 독립적인 불편(unbiased) 정량 방법인 광학 분획기 방법 (optical fractionator method)을 이용하여 계수하였다.

[0058] **실시예 11: 거동 시험 (BEHAVIOURAL TEST)**

[0059] 마우스의 행동 기능을 로타로드 시험 [Iwamoto et al., 2003]으로 측정하였다. 간단히 말하면 마우스를 일종의 트레드밀인 로타로드 (IITC Life Science, USA)에 올려 놓는다. 15분 동안 회전 속도를 5에서 30 rpm으로 점차 높였다. 가속되는 로타로드에 머무는 동안 움직인 거리와 시간은 자동 측정되었다.

[0060] **통계 분석**

[0061] 데이터는 각각의 독립된 실험에서 얻은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 평균값 간의 차이는 일방 ANOVA를 이용하여 분석하였다. Newman-Keuls post hoc 분석은 ANOVA 시험에서 차이가 관찰된 때 채용하였다 ($p < 0.05$).

[0062] **결과 1: PEP-1-PEA-15 융합단백질 구축과 정제**

[0063] 세포 침투성 발현 벡터 PEP-1-PEA-15를 제조하기 위해 사람 PEA-15 cDNA를 PEP-1 펩타이드를 포함하도록 구축된 pET-15b 플라스미드 내로 서브클론하였다. PEP-1-PEA-15 융합단백질 발현벡터는 N 말단에 사람 PEA-15, PEP-1 펩타이드 및 6개의 히스티딘 잔기를 코딩하는 cDNA 서열을 연이어 포함하고 있다. 본 발명자들은 PEP-1 펩타이드가 없는 대조군 PEA-15 단백질을 생산하는 PEA-15 발현 벡터도 구축하였다 (도 1의 A 및 B). 발현 유도 후 PEP-1-PEA-15 융합단백질은 Ni^{2+} -나이트로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼 및 PD-10 컬럼을 이용하여 정제하였다. 정제된 PEP-1-PEA-15 융합단백질에 대해 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 정제 결과 도 1의 C와 같다. 단백질은 항토킨 폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다. PEP-1-PEA-15 융합단백질은 도 1의 D에 해당 밴드에서 탐지되었다.

[0064] 결과 2: SH-SY5Y 세포 내로 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 투과

[0065] PEP-1-PEA-15 융합단백질이 SH-SY5Y 세포 내로 투과할 수 있는지를 알아보기 위해 다양한 농도 (0.5~3 mM)의 융합단백질을 다양한 시간 동안 (10~60 min) 배양배지에 가한 다음 투과 수준을 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. 농도를 달리 하여 PEP-1-PEA-15 융합단백질을 배지 내 세포에 60분간 가하고 웨스턴 블랏팅으로 투과한 단백질 농도를 측정된 결과, PEP-1-PEA-15 융합단백질은 농도 의존적으로 세포 내로 투과되었다 (도 2의 A). 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질 (3 mM)의 세포내 농도는 10분 이내에 탐지되었고, 60분까지 점차 증가하였다 (도 2의 B). 이러한 결과는 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 세포 내로 투여량 및 시간 의존적으로 투과함을 나타낸다. 그러나, 대조군 PEA-15 단백질은 세포 내로 투과하지 못했다. 또, 본 발명자들은 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 SH-SY5Y 세포 내에서 안정성을 시험하였다. 도 2의 C와 같이, 세포 내로 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 세포내 농도는 한 시간 후 처음 탐지되었고, 그 후 감소하였다. 그렇지만, 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 상당 수준은 세포 내에서 12시간 동안 유지되었다. SH-SY5Y 세포 내의 P-1-PEA-15 융합단백질의 세포내 분포를 밝히기 위해 융합단백질이 투과된 세포를 각각 핵 및 세포질 특이적 마커인 DAPI와 Alexa로 이중염색하였다. PEP-1-PEA-15 융합단백질은 투과된 세포 내의 세포질 및 핵에서 탐지되었다 (도 2의 D). 이러한 결과는 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 세포 내로 투과되어 최소 12시간 동안 안정적임을 말해준다.

[0066] 결과 3: MPP^+ 로 유도된 세포독성에 대한 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 효과

[0067] 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 신경독성물질에 의해 유도된 신경세포 사멸에 대해 세포를 보호하는지를 알아보기 위해 세포 생존에 대한 MPP^+ 의 효과를 시험하였다. PEP-1-PEA-15 융합단백질을 미리 처리한 경우 MPP^+ 처리한 세포의 생존율은 융합단백질 투여량 의존적으로 증가하였다. 세포를 2 mM MPP^+ 에 18시간 동안 노출시켰을 때 세포의 52%만이 생존했다. 그러나, PEP-1-PEA-15 융합단백질을 미리 처리한 세포의 생존율은 투여량 의존적으로 증가하여 최고 농도를 사용한 경우 75% 이상이었다. 반면, 대조군 PEA-15 단백질은 같은 조건 하에서 보호 효과를 나타내지 않았다 (도 3의 A). 또한, 본 발명자들은 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 MPP^+ 에 의해 유도되는 세포내 활성산소종 생성 및 DNA 조각화를 저해하는지를 시험하였다. 세포를 MPP^+ 에 40분간 노출시키면, MPP^+ 가 DCF 신호를 현저히 증가시켰다. 그러나, PEP-1-PEA-15 융합단백질이 있으면 활성산소종 생성이 감소하였다 (도 3의 B). 활성산소종 생성은 플루오로스칸 (Fluoroskan) ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 정량하였다. 도 3의 C와 같이, 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질은 SH-SY5Y 세포 내에서 활성산소종 생성을 현저히 억제하였다. 다음으로, 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 DNA 조각화에 미치는 영향을 TUNEL 염색으로 결정하였다. 도 4와 같이, 음성대조군 세포는 염색되지 않았다. 반면, MPP^+ 는 대조군과 비교하여 염색된 세포 수가 현저히 증가하였고, PEP-1-PEA-15 융합단백질을 투과시킨 세포는 약간만 염색되었다. 이러한 결과는 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 MPP^+ 에 의해 유도되는 활성산소종 생성 및 DNA 조각화를 효과적으로 억제함을 말해준다.

[0068] 다음으로, 본 발명자들은 항체를 이용하여 Bax, Bcl-2, 캐스페이즈-3 및 절단된 캐스페이즈-3 발현 수준에 대하여 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 그 결과, Bax와 절단된 캐스페이즈-3의 발현은 MPP^+ 처리한 세포에서 현저히 증가하였고, 반면, PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리한 세포에서는 Bax와 절단된 캐스페이즈-3의 발현이 눈에 띄게 감소하였다. 그렇지만, Bcl-2와 캐스페이즈-3의 발현은 Bax와 절단된 캐스페이즈-3의 발현과 반대의 패턴을 보여주었다 (도 5). 이러한 결과들은 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 MPP^+ 에 의해 유도되는 세포사멸에 대하여

방어 기능을 수행함을 나타낸다.

[0069] **결과 4: 흑색질 내로 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 투과 및 파킨슨병 동물모델에 대한 보호기능**

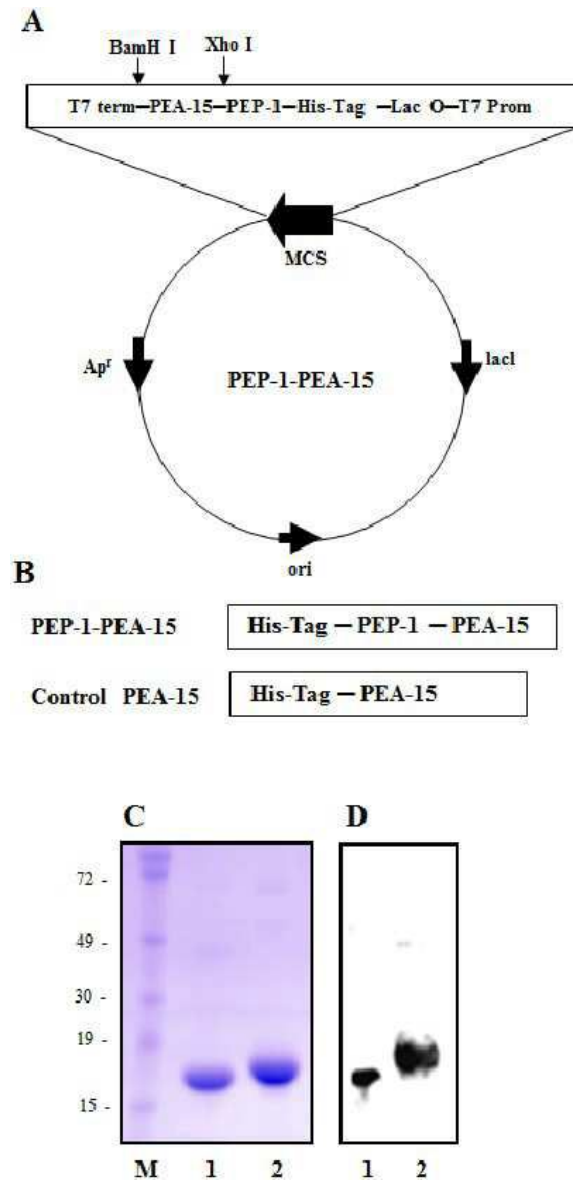
[0070] PEP-1-PEA-15 융합단백질이 혈관뇌장벽을 투과하는지를 알아보기 위해 PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리 마우스의 뇌 절편의 흑색질 상에서 면역조직화학 시험을 수행하였다. 도 6의 A와 같이, 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질 수준은 PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리 동물의 흑색질 전체에서 현저히 증가하였다. 그러나, 대조군 PEA-15 단백질은 흑색질 내로 투과되지 않았다. 이 결과는 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 효과적으로 마우스의 혈관뇌장벽을 넘어 흑색질 내로 투과됨을 보여준다.

[0071] 도파민 뉴런 손상에 대한 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질의 보호효과를 평가하기 위해 MPTP로 유도된 파킨슨병 마우스 모델을 이용하여 TH(Tyrosine Hydroxylase) 면역염색으로 도파민 뉴런 세포 수준을 평가하였다. 도 6의 B와 같이, PEP-1-PEA-15 융합단백질은 MPTP 처리로 유발된 도파민 뉴런 손상에 대해 세포를 효과적으로 보호하였다. 그렇지만, 대조군 PEA-15 단백질은 MPTP 처리 마우스와 비교하여 같은 보호효과를 나타내지 않았다. 본 발명자들은 스테레올로지 계수 (stereological count)로 TH-면역반응 뉴런을 직접 평가하였다 (도 7). MPTP 처리한 마우스에서 흑색질 내의 TH-양성 세포의 수는 대조군 마우스에 비해 현저히 감소하였다. 반면, MPTP 및 대조군 PEA-15 단백질 처리한 마우스와 비교하여 PEP-1-PEA-15 융합단백질에 의해 뉴런 수가 상당히 증가하였다. 이와 같은 결과들은 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 뇌 안으로 효과적으로 투과되며 MPTP에 의해 유도된 신경독성을 해독함으로써 뉴런세포 손상에 대해 강력한 보호효과를 나타냄을 말해준다.

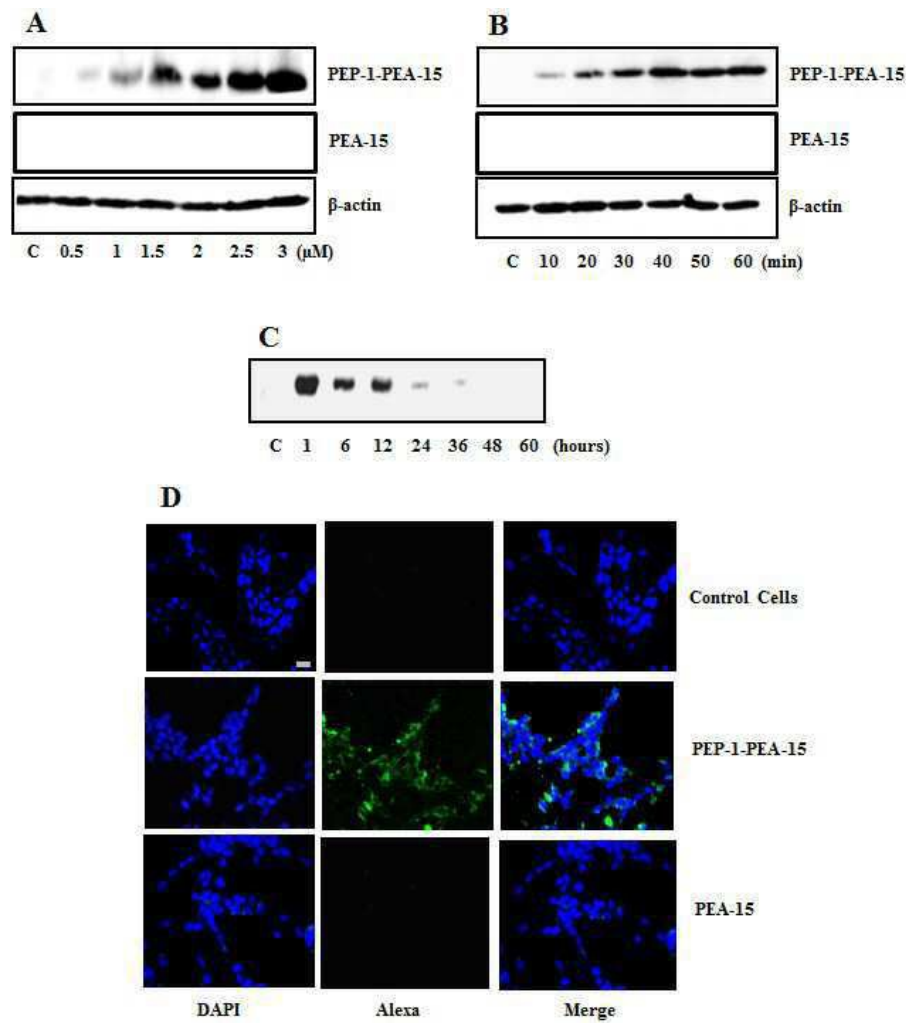
[0072] 투과된 PEP-1-PEA-15 융합단백질이 증상 개선에 미치는 영향을 평가하기 위해 로타로드 테스트를 수행하였다. 도 8과 같이, 가속하는 로타로드 상에서 소요되는 시간은 대조군 마우스와 비교하여 MPTP 처리한 마우스의 경우 상당히 감소하였다. 반면, PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리한 마우스는 MPTP 처리 마우스와 비교하여 시간이 회복되었다. 이 결과는 PEP-1-PEA-15 융합단백질 처리 마우스가 MPTP 처리 마우스와 비교하여 동작을 현저히 약화시켰음 (attenuate)을 보여준다.

도면

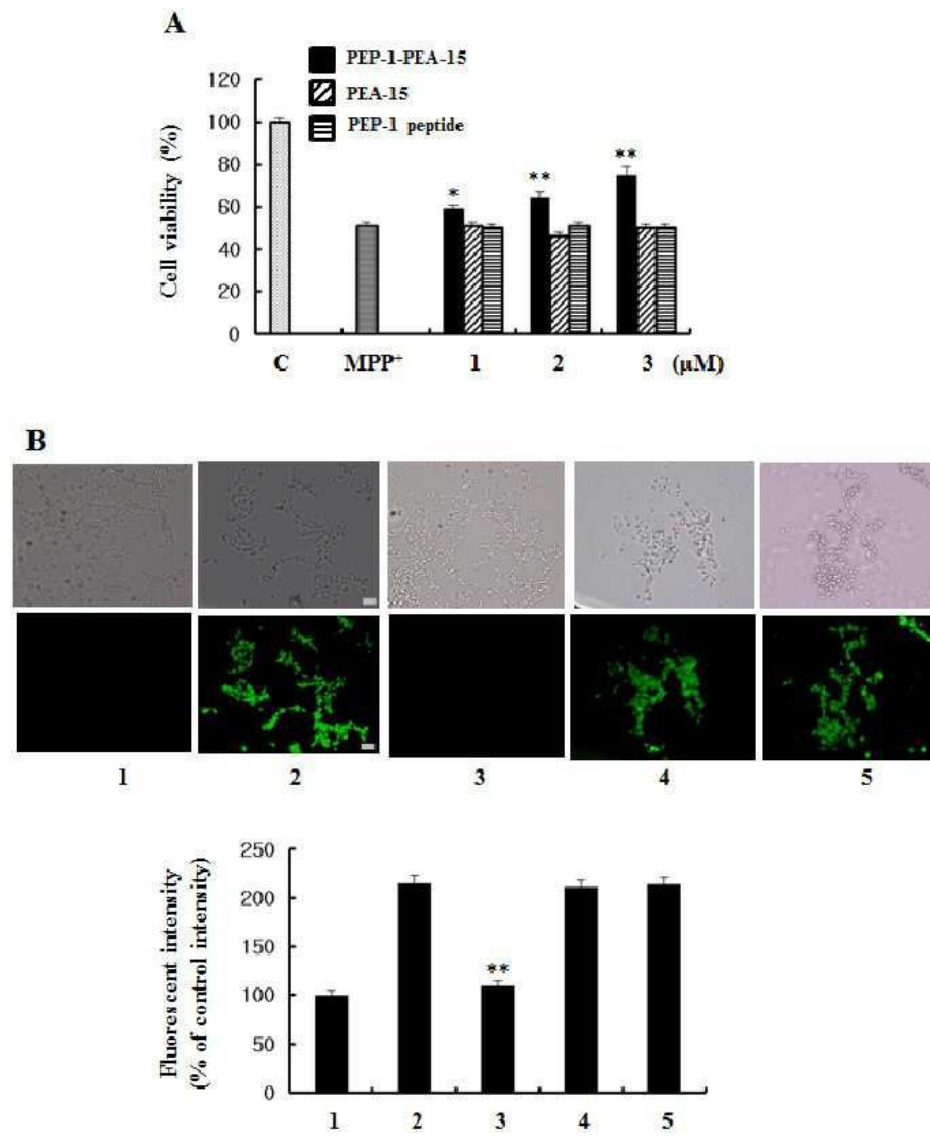
도면1



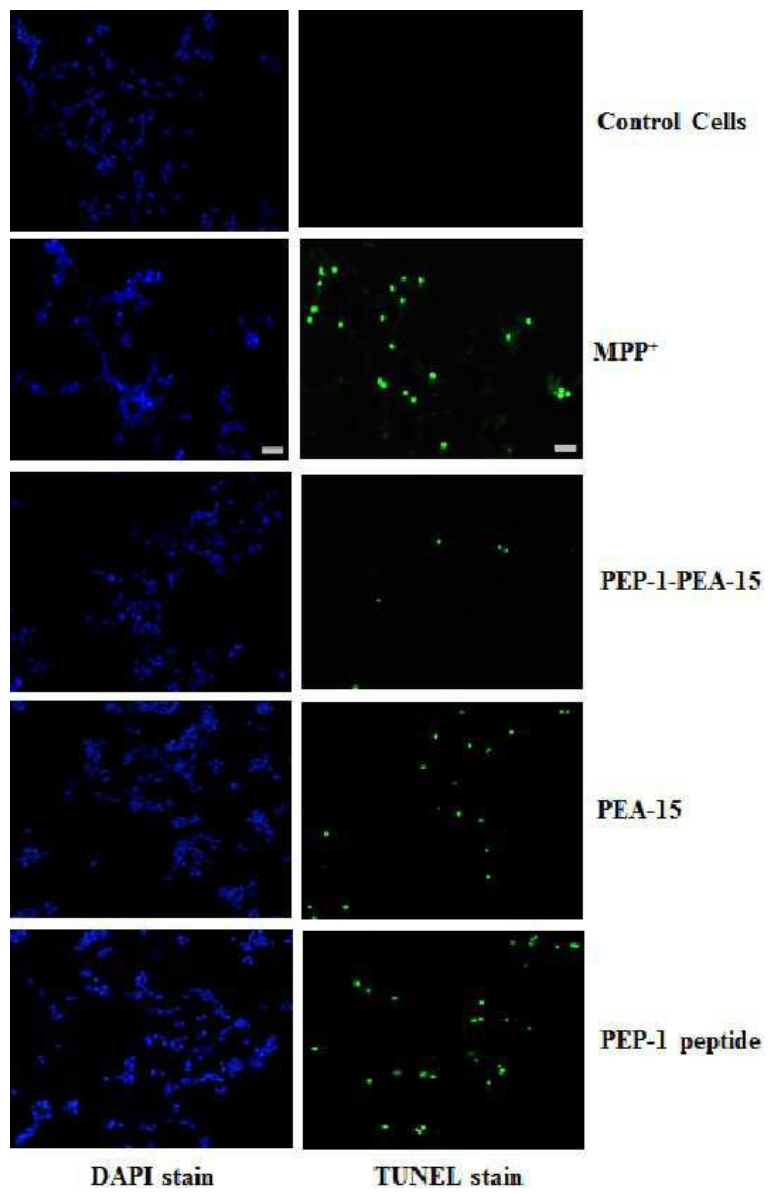
도면2



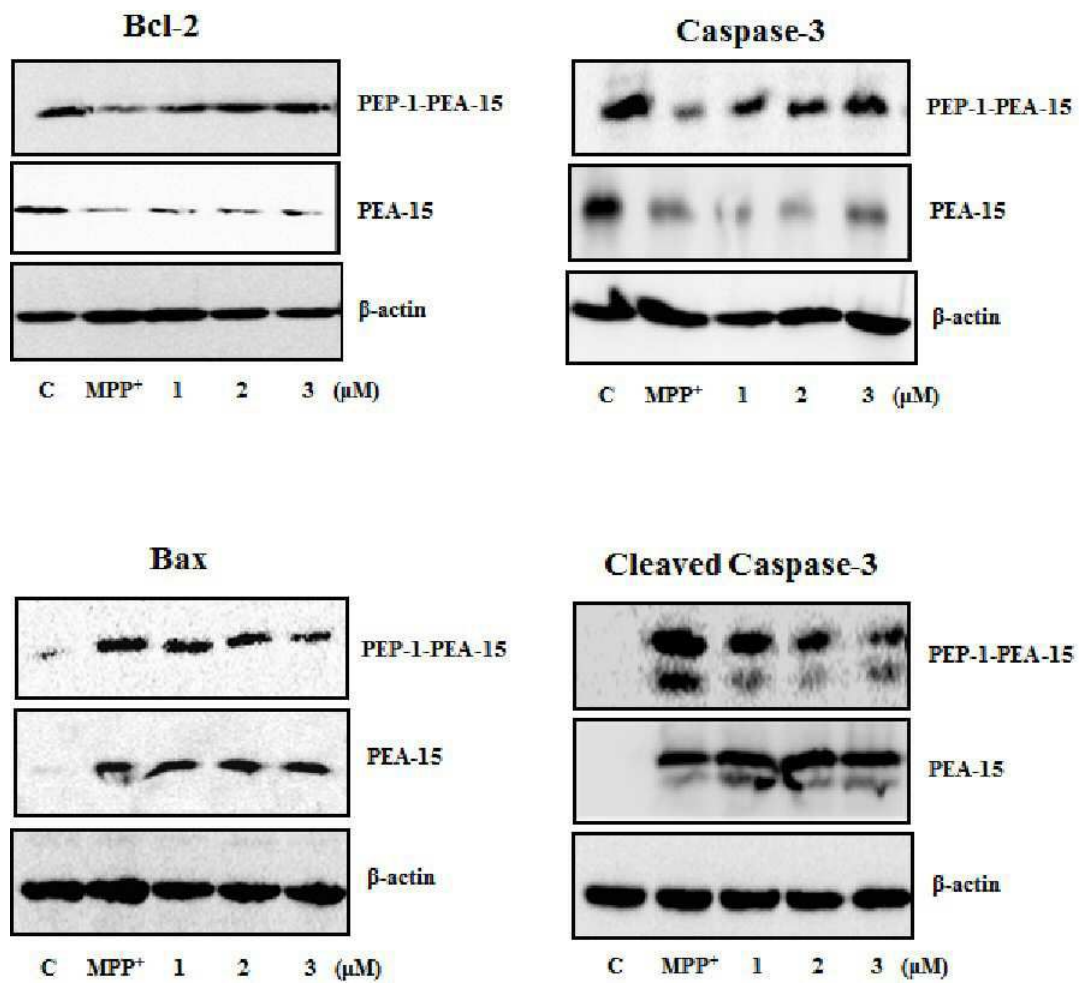
도면3



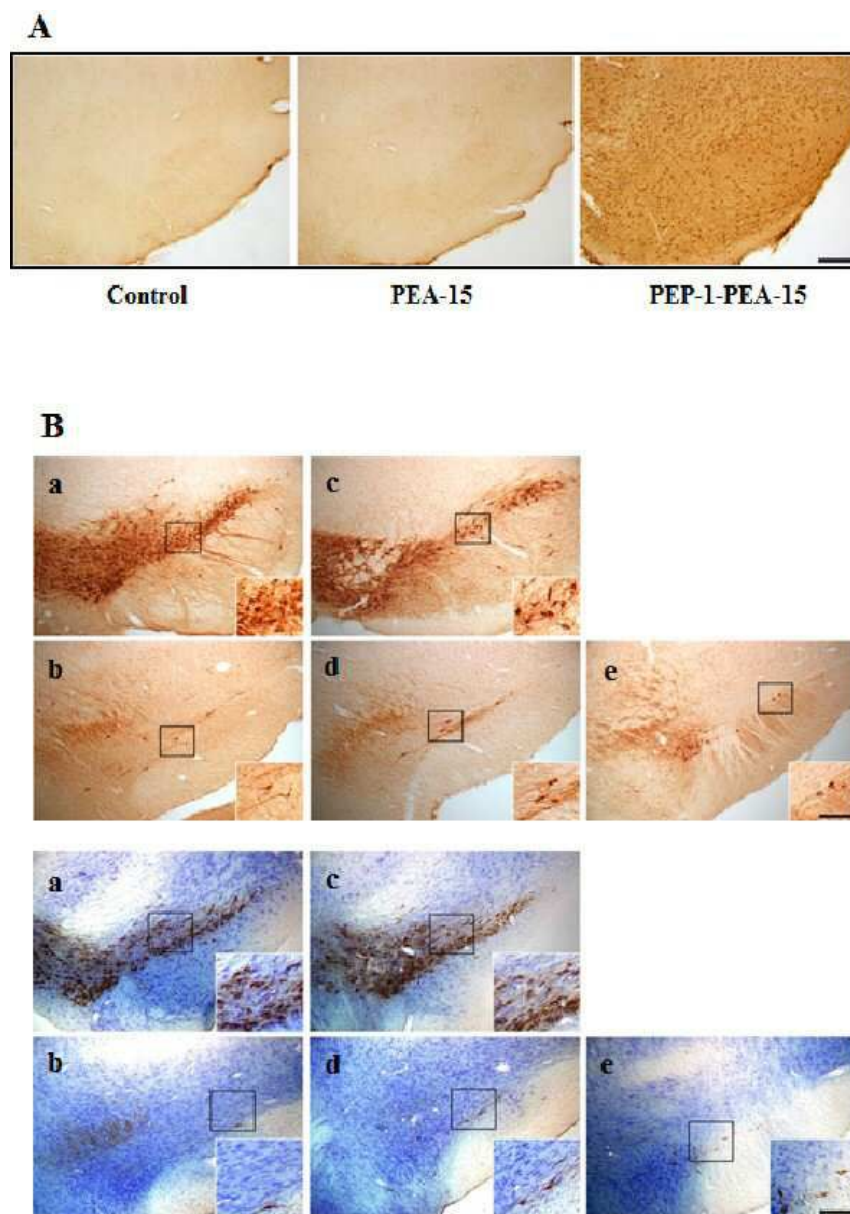
도면4



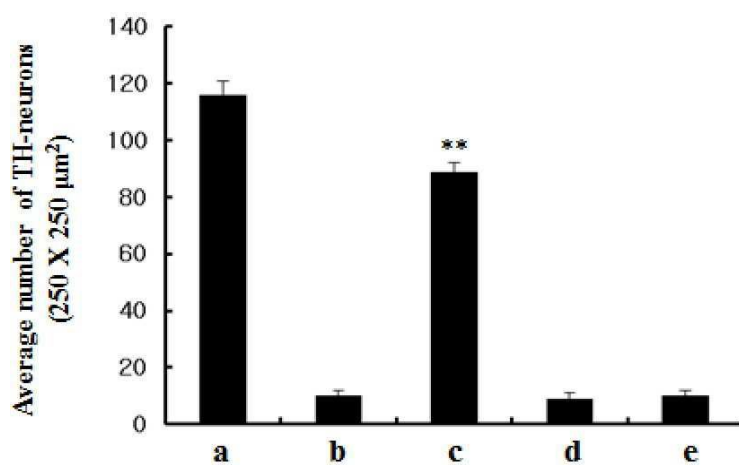
도면5



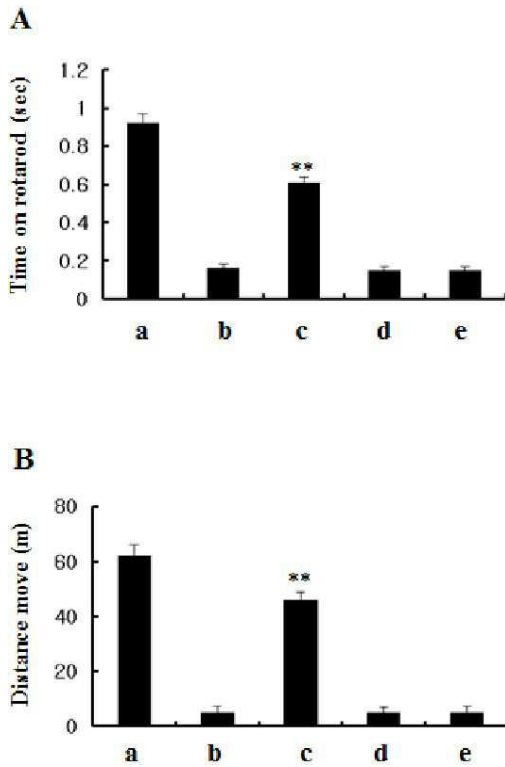
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Industry Academy Cooperation Foundation, Hallym University

<120> A pharmaceutical composition containing cell-transducing rps3
fusion protein for preventing and treating neurological disorders

<130> inipat-hallym-rps3

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> top strand oligonucleotide coding PEP-1

<400> 1

tatgaaagaa accctggtggg aaacctggtg gaccgaatgg tctcagccga aaaaaaacg 60

taaagtgc 68

<210> 2

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bottom strand oligonucleotide coding PEP-1

<400> 2

tcgagcactt tacgtttttt ttctggctga caccattcgg tccaccaggt ttcccaccag 60

gtttctttcc 70

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> protein transducing domain called PEP-1

<400> 3

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

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of human PEA-15

<400> 4

ctcgagatgg ctgagtacgg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of human PEA-15

<400> 5

ggattctcag gccttcttcg 20

<210> 6

<211> 464

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding PEP-1-PEA-15 fusion protein

<400> 6

taaaagaaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta	60
aagtgtctga gatggctgag tacgggaccc tctgcaaga cctgaccaac aacatcaccc	120
ttgaagatct agaacagctc aagtcggcct gcaaggaaga catccccagc gaaaagagt	180
aggagatcac tactggcagt gcctggttta gcttcctgga gagccacaac aagctggaca	240
aagacaacct ctctacatt gagcacatct ttgagatctc ccgccgtcct gacctactca	300
ctatggtggt tgactacaga acccgtgtgc tgaagatctc tgaggaggat gagctggaca	360

ccaagctaac ccgtatcccc agtgccaaga agtacaaga cattatccgg cagccctctg	420
aggaagagat catcaaattg gctccccac cgaagaaggc ctga	464

<210> 7

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-PEA-15 fusion protein

<400> 7

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 Ala Glu Tyr Gly Thr Leu Leu Gln

20	25	30
----	----	----

Asp Leu Thr Asn Asn Ile Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Leu Lys Ser

35	40	45
----	----	----

Ala Cys Lys Glu Asp Ile Pro Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Thr Thr

50	55	60
----	----	----

Gly Ser Ala Trp Phe Ser Phe Leu Glu Ser His Asn Lys Leu Asp Lys

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Asn Leu Ser Tyr Ile Glu His Ile Phe Glu Ile Ser Arg Arg Pro

85	90	95
----	----	----

Asp Leu Leu Thr Met Val Val Asp Tyr Arg Thr Arg Val Leu Lys Ile

100	105	110
-----	-----	-----

Ser Glu Glu Asp Glu Leu Asp Thr Lys Leu Thr Arg Ile Pro Ser Ala

115 120 125
Lys Lys Tyr Lys Asp Ile Ile Arg Gln Pro Ser Glu Glu Glu Ile Ile
130 135 140
Lys Leu Ala Pro Pro Pro Lys Lys Ala
145 150
<210> 8
<211> 464
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> polynucleotide coding PEA-15-PEP-1 fusion protein
<400>
> 8
atggctgagt acgggaccct cctgcaagac ctgaccaaca acatcaccct tgaagatcta 60
gaacagctca agtcggcctg caaggaagac atccccagcg aaaagagtga ggagatcact 120
actggcagtg cctggtttag ctctctggag agccacaaca agctggacaa agacaacctc 180
tcctacattg agcacatctt tgagatctcc cgccgtcctg acctactcac tatggtggtt 240
gactacagaa cccgtgtgct gaagatctct gaggaggatg agctggacac caagctaacc 300
cgtatcccca gtccaagaa gtacaaagac attatccggc agccctctga ggaagagatc 360
atcaaattgg ctccccacc gaagaaggcc ggatcctaaa agaaacctgg tgggaaacct 420

ggtggaccga atggtctcag ccgaaaaaaaa aacgtaaagt gtag 464
<210> 9
<211> 151
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> PEA-15-PEP-1 fusion protein
<400> 9
Met Ala Glu Tyr Gly Thr Leu Leu Gln Asp Leu Thr Asn Asn Ile Thr
1 5 10 15
Leu Glu Asp Leu Glu Gln Leu Lys Ser Ala Cys Lys Glu Asp Ile Pro
20 25 30
Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Thr Thr Gly Ser Ala Trp Phe Ser Phe

35 40 45
Leu Glu Ser His Asn Lys Leu Asp Lys Asp Asn Leu Ser Tyr Ile Glu

50 55 60
 His Ile Phe Glu Ile Ser Arg Arg Pro Asp Leu Leu Thr Met Val Val
 65 70 75 80
 Asp Tyr Arg Thr Arg Val Leu Lys Ile Ser Glu Glu Asp Glu Leu Asp
 85 90 95
 Thr Lys Leu Thr Arg Ile Pro Ser Ala Lys Lys Tyr Lys Asp Ile Ile
 100 105 110

 Arg Gln Pro Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys Leu Ala Pro Pro Pro Lys
 115 120 125
 Lys Ala Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln
 130 135 140
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 145 150
 <210> 10
 <211> 535
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polynucleotide coding PEP-1-PEA-15-PEP-1 fusion protein
 <400> 10
 taaaagaaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta 60

 aagtgcctga gatggctgag tacgggaccc tcctgcaaga cctgaccaac aacatcaccc 120
 ttgaagatct agaacagctc aagtcggcct gcaaggaaga catccccagc gaaaagagtg 180
 aggagatcac tactggcagt gcctggttta gcttcctgga gagccacaac aagctggaca 240
 aagacaacct ctctacatt gagcacatct ttgagatctc ccgccgtcct gacctactca 300
 ctatggtggt tgactacaga acccgtgtgc tgaagatctc tgaggaggat gagctggaca 360
 ccaagctaac ccgtatcccc agtgccaaga agtaciaaaga cattatccgg cagccctctg 420
 aggaagagat catcaaattg gctccccac cgaagaaggc cggatcctaa aagaaacctg 480

 gtgggaaacc tggtgaccg aatggtctca gccgaaaaaa aaacgtaaag tgtag 535
 <210> 11
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PEP-1-PEA-15-PEP-1 fusion protein

<400> 11

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 Ala Glu Tyr Gly Thr Leu Leu Gln

20 25 30

Asp Leu Thr Asn Asn Ile Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Leu Lys Ser

35 40 45

Ala Cys Lys Glu Asp Ile Pro Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Thr Thr

50 55 60

Gly Ser Ala Trp Phe Ser Phe Leu Glu Ser His Asn Lys Leu Asp Lys

65 70 75 80

Asp Asn Leu Ser Tyr Ile Glu His Ile Phe Glu Ile Ser Arg Arg Pro

85 90 95

Asp Leu Leu Thr Met Val Val Asp Tyr Arg Thr Arg Val Leu Lys Ile

100 105 110

Ser Glu Glu Asp Glu Leu Asp Thr Lys Leu Thr Arg Ile Pro Ser Ala

115 120 125

Lys Lys Tyr Lys Asp Ile Ile Arg Gln Pro Ser Glu Glu Glu Ile Ile

130 135 140

Lys Leu Ala Pro Pro Pro Lys Lys Ala Gly Ser Lys Glu Thr Trp Trp

145 150 155 160

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

165 170 175