

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0141992  
(43) 공개일자 2022년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/64 (2017.01) A23L 33/17 (2016.01)

A61K 38/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/645 (2017.08)

A23L 33/17 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0048177

(22) 출원일자 2021년04월14일

심사청구일자 2021년04월14일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

최수영

강원도 춘천시 우석로101번길 86, 108동 1002호  
(석사동, 석사대우아파트)

음원식

강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 11  
2동 802호 (후평동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약  
학 조성물

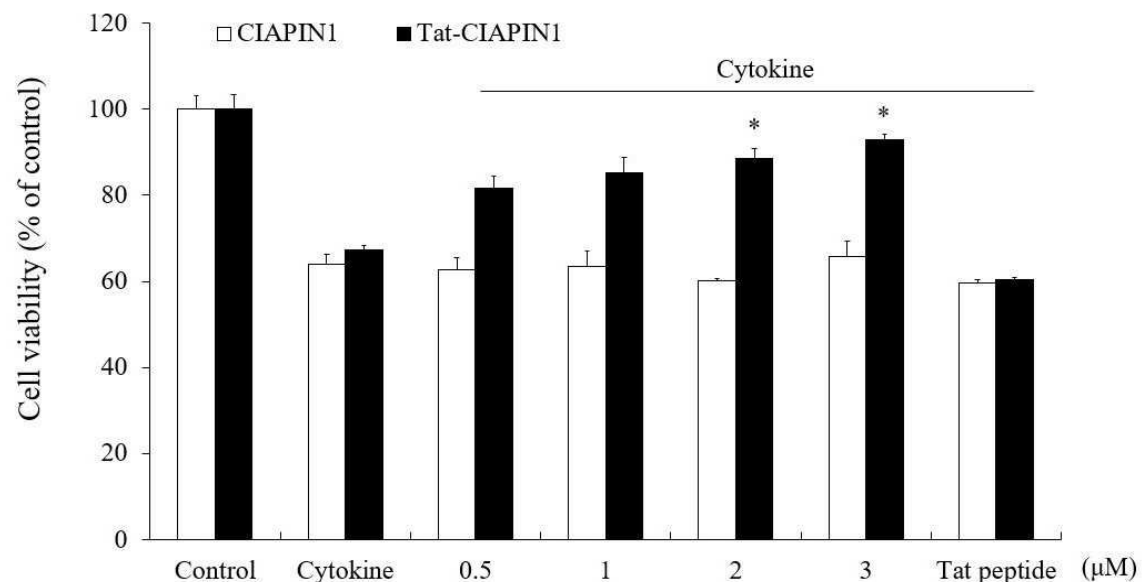
## (57) 요약

과제: 세포 내로 투과성이 우수하여 효과가 현저한 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것.

해결수단: 본 발명은 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1(CIAPIN1)의 N 말단 및 C 말단 중 한 곳 이상에 단  
백질 수송 도메인이 공유결합된 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 또

(뒷면에 계속)

## 대표도 - 도2a



는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 사이토카인으로 유도된 RINm5F  $\beta$ -세포에 형질 도입된 CIAPIN1 융합단백질은 세포 생존율을 높이고 활성산소종 및 DNA 단편화 수준을 감소시켰으며, MAPK(mitogen activated protein kinases) 및 NF- $\kappa$ B 활성화 수준을 감소시켰다. 또한, CIAPIN1 융합단백질은 Bcl-2 단백질을 증가시켰고, Bax 및 절단된 Caspase-3 단백질은 감소시켰다. 이는 CIAPIN1 융합단백질이 사이토카인에 의한 세포 독성으로부터 RINm5F  $\beta$ -세포를 보호한다는 것을 보여 주었고, CIAPIN1 융합단백질이 RINm5F  $\beta$ -세포 손상을 억제하는 예방 및/또는 치료효과가 있음을 말해준다.

(52) CPC특허분류

**A61K 38/00** (2013.01)

**A61K 38/1761** (2020.05)

**A61P 3/10** (2018.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/328** (2013.01)

(72) 발명자

**신민재**

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

**여현지**

서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호

**여은지**

서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호

**최연주**

충청북도 옥천군 청성면 궁촌길 20-16

**손은정**

경기도 남양주시 비룡로116번길 35, 306동 404호 (마석역신도브레뉴 3차 아파트, 묵현리)

**권현정**

강원도 강릉시 경강로2015번안길 7

**권혁일**

서울특별시 광진구 능동로1길 15 한강우성아파트 102동 1206호

**김대원**

강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1345318299

과제번호

2017R1D1A3B04032007

부처명

교육부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

개인기초연구지원사업

연구과제명

뇌질환 및 염증관련 질환에서 Tat-CIAPIN1 단백질의 효능연구

기 여 율

1/2

과제수행기관명

한림대학교

연구기간

2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1345332237

과제번호

2019R1A6A1A11036849

부처명

교육부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

대학중점연구소 지원사업

연구과제명

단백질 침투기술 기반 퇴행성 뇌질환 치료용 융합단백질 실용화 연구

기 여 율

1/2

과제수행기관명

한림대학교

연구기간

2021.03.01 ~ 2022.02.28

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1의 N 말단 또는 C 말단 중 한 곳 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV-Tat 펩타이드, Pep-1 펩타이드, 올라고라이신, 올리고아르기닌, 올리고(라이신, 아르기닌) 중 선택된 것임을 특징으로 하는, 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질은 아미노산 서열이 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12임을 특징으로 하는, 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 4

사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1을 코딩하는 cDNA의 적어도 일측 말단에 단백질 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합된 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV-Tat 펩타이드, Pep-1 펩타이드, 올라고라이신, 올리고아르기닌, 올리고(라이신, 아르기닌) 중 선택된 것임을 특징으로 하는, 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 재조합 폴리뉴클레오타이드의 염기 서열이 서열번호 1, 3, 5, 7, 9 또는 11임을 특징으로 하는 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 7

사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1을 코딩하는 cDNA의 적어도 일측 말단에 단백질 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합된 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드 함유 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질 발현 벡터를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

## 청구항 8

사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1의 N 말단 및 C 말단 중 적어도 어느한 쪽에 단백질 수송도메인이 공유 결합된 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방용 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

## 청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 융합단백질의 아미노산 서열이 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12임을 특징으로 하는 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방용 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 조직 및 세포 내 투과가 가능한 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1(Cytokine induced apoptosis inhibitor 1; CIAPIN1) 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 만성 자가면역질환인 제1형 당뇨병(T1DM)은 주로 유년기에 발생하며 췌장  $\beta$ -세포의 파괴를 통한 고혈당증이 특징이다. 제1형 당뇨병은 전 세계적으로 수백만 명의 사람들에게 영향을 미치고 있다(1-3). 환경 및 유전적 요인이 제1형 당뇨병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(4, 5). 제1형 당뇨병 초기에는 염증 세포의 침투를 통해 IL-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 및 INF- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ ) 등 사이토카인의 방출을 촉진하여 인슐린 분비를 저해하고, 췌장  $\beta$ -세포 사멸을 초래할 수 있다(6-8).

[0004] 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1(Cytokine induced apoptosis inhibitor 1; CIAPIN1)은 대사 조직을 포함한 다양한 조직에서 발현되며, 세포 자기사멸 및 Ras 신호전달에 관여한다(9, 10). 이전의 여러 연구에 따르면 CIAPIN1 단백질은 암 억제제로서 다양한 암세포의 증식을 억제하였다. 따라서 CIAPIN1 단백질은 새로운 항암제로 여겨진다(11-14). 또한, CIAPIN1 단백질 과발현은 쥐 뇌에서 도파민성 신경 세포 사멸을 감소시켰다(15). 이뿐만 아니라, 다른 연구에서는 CIAPIN1 단백질이 염증, 활성산소종 및 세포 내 신호 전달 경로에 관여한다고 보고했다(16-18). 또한, Tat-CIAPIN1 융합단백질은 산화 스트레스로 인한 해마 신경 세포에 대한 세포 사멸(19)과 지방다당류(Lipopolysaccharide)로 유도된 Raw 264.7 세포의 염증 반응을 감소시켰다(20). 그러나, CIAPIN1 단백질이 실제로 당뇨병에서 어떠한 기능을 수행하는지는 알려져 있지 않았다.

[0006] 단백질 수송 도메인 (Protein Transduction Domain; PTD) 또는 세포 침투성 펩타이드 (Cell penetrating Peptide; CPP)는 대개 5-30개의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 단백질이나 핵산 등의 고분자와 융합하여 포유류 세포, 조직, 혈액 등 생체 안으로 손쉽게 전달할 수 있는 새로운 개념의 전달 시스템이다. 비록 구체적인 기작은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만, 단백질 전달기술은 치료용 단백질을 인 비트로와 인 비보로, 세포 또는 조직 내로 전달하는데 이용되어 왔으며, 다양한 단백질 수송 도메인이 알려져 있다. 단백질 수송 도메인은 투과시키려는 생물학적 화물분자와의 융합이 편리하고 화물분자의 구조 또는 기능에 영향을 끼치지 않아 안정적이기

때문에, 의약품이나 화장품 등에 이용되고 있다.

- [0007] 수많은 단백질 수송 도메인 중 현재까지 널리 알려진 것은 세 가지로 분류할 수 있다. 첫째, 양친매성 펩타이드로서, Pep-1 펩타이드 등을 들 수 있는데, Pep-1 펩타이드는 21개의 아미노산(KETWWETWWTEWSQPKKKRKV)으로 이루어져 있고, 세 개의 도메인 즉, 소수성 도메인, 스페이서 및 친수성 도메인을 갖고 있다. 둘째, 양이온 펩타이드로서, HIV-Tat 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌, 올리고(라이신+아르기닌) 등을 들 수 있다. 세포 투과성 HIV-Tat 펩타이드의 서열은 RKKRRQRRR을 포함하며, 다양한 치료용 단백질의 연구에 사용되고 있다. 셋째, 소수성 펩타이드가 있다.
- [0008] 단백질 수송 도메인과 생물학적 화물분자 (예를 들면, 핵산, 단백질, 펩타이드, 작은 분자, 세포독성 약물 등) 간의 결합은 공유결합 외에도 이온결합, 정전기적 결합 등의 다양한 방법으로 이루어질 수 있다.
- [0009] 단백질 수송 도메인은 리포솜이나 폴리머 등 다른 전달체에 비하여 낮은 독성을 나타내고 면역거부반응이 적다는 장점이 있다. 그러나, 지금까지도 임상 등에 이용되는 단백질 수송 도메인은 극히 드물다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Welters A et al., (2014) Diabetes Mellitus. In: Lammert E, Zeeb M (eds) Metabolism of human diseases: organ physiology and pathophysiology. Springer, Vienna, 163-173
- (비특허문헌 0002) Katsarou A et al., (2017) Nat Rev Dis Primers 3, 17016.
- (비특허문헌 0003) Lukic ML et al., (2014) Diabetes 63, 835-837
- (비특허문헌 0004) Patterson CC et al., (2012) Diabetologia 55, 2142-2147
- (비특허문헌 0005) Patterson CC et al., (2009) Lancet 373, 2027-2033
- (비특허문헌 0006) Imai Y et al., (2013) Diabetes Obes Metab 15, S117-S129
- (비특허문헌 0007) Cnop M et al., (2005) Diabetes 54, S97-S107
- (비특허문헌 0008) Corbett JA et al., (1992) Diabetes 41, 897-903
- (비특허문헌 0009) Shibayama H et al., (2004) J Exp Med 199, 581-592
- (비특허문헌 0010) Hao Z et al., (2006) J Histochem Cytochem 54, 417-426
- (비특허문헌 0011) Li X et al., (2010) Expert Opin Ther Targets 14, 603-610
- (비특허문헌 0012) Hao Z et al., (2006) Cancer Biol Ther 5, 261-266
- (비특허문헌 0013) Li X et al., (2008) Mol Biol 42, 102-109
- (비특허문헌 0014) Wang X et al., (2015) Mol Med Res 12, 2056-2062
- (비특허문헌 0015) Park KA et al., (2011) J Neural Transm 118, 433-444
- (비특허문헌 0016) Sethi G et al., (2012) Biosci Rep 32, 1-15
- (비특허문헌 0017) Sethi G et al., (2009) Trends Pharmacol Sci 30, 313-321
- (비특허문헌 0018) Lemmon MA et al., (2010) Cell 141, 1117-1134
- (비특허문헌 0019) Yeo HJ et al., (2019) Free Radic Biol Med 135, 68-78
- (비특허문헌 0020) Yeo HJ et al., (2019) BMB Rep 52, 695-699
- (비특허문헌 0021) Moon JI et al., (2019) BMB Rep 52, 324-329
- (비특허문헌 0022) van den Berg A et al., (2011) Curr Opin Biotechnol 22, 888-893
- (비특허문헌 0023) Dietz GP (2010) Curr Pharm Biotechnol 11, 167-174

- (비특허문헌 0024) Gump JM et al., (2007) Trends Mol Med 13, 443-448
- (비특허문헌 0025) Kim DW et al., (2018) BMB Rep 51, 654-659
- (비특허문헌 0026) Shin MJ et al., (2013) Free Radic Biol Med 67, 195-210
- (비특허문헌 0027) Shin MJ et al., (2016) Free Radic Biol Med 97, 250-262
- (비특허문헌 0028) Cho SB et al., (2019) Exp Neurobiol 28, 612-627
- (비특허문헌 0029) Herbig ME et al., (2005) Biophys J 89, 4056-4066
- (비특허문헌 0030) Wadia JS et al., (2004) Nat Med 10, 310-315
- (비특허문헌 0031) El-Sayed A et al., (2009) AAPS J 11, 13-22
- (비특허문헌 0032) Frankel AD et al., (1988) Science 240, 70-73
- (비특허문헌 0033) Lei XG et al., (2011) Antioxid Redox Signal 14, 489-503
- (비특허문헌 0034) Lenzen S et al., (1996) Free Radic Biol Med 20, 463-466
- (비특허문헌 0035) Lundh M et al., (2013) Diabetes Obes Metab 15, 176-184
- (비특허문헌 0036) Rabinovitch A et al., (1998) Biochem Pharmacol 55, 1139-1149
- (비특허문헌 0037) Eldor R et al., (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103, 5072-5077
- (비특허문헌 0038) Grey ST et al., (2003) J Immunol 170, 6250-6256
- (비특허문헌 0039) Sakai N et al., (2002) Nephrol Dial Transplant 17, 998-1004
- (비특허문헌 0040) Shi Y et al., (2016) Mol Med Rep 14, 4849-4856
- (비특허문헌 0041) Zhang Y et al., (2016) J Cell Mol Med 20, 1803-1812
- (비특허문헌 0042) Riedl SJ et al., (2004) Nat Rev Mol Cell Biol 5, 897-907
- (비특허문헌 0043) Reed JC (2006) Cell Death Differ 13, 1378-1386
- (비특허문헌 0044) Zhang HJ et al., (2019) Mol Med Rep 20, 3113-3122.
- (비특허문헌 0045) Bradford M (1976) Anal Biochem 72, 248-254

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 췌장  $\beta$ -세포 사멸과 인슐린 감소 억제 등의 활성을 나타내는 효능이 우수한 당뇨병 예방 또는 치료제를 제공하려는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 PEP-1, HIV Tat 펩타이드와 같은 단백질 수송 도메인을 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1(Cytokine induced apoptosis inhibitor 1; 이하 발명의 설명, 도면에서 "CIAPIN 1"과 혼용함)과 재조합하여 RINm5F 세포 내로 침투하는 것을 확인하였으며, 사이토카인에 의해 유도되는 RINm5F 세포 사멸에 대한 세포 투과성 CIAPIN1 융합단백질의 보호효과에 대해 연구하였다.
- [0015] 본 발명자들은 단백질 수송 도메인과 결합한 CIAPIN1 융합단백질이 시험관 내에서 사이토카인에 의해 유도된  $\beta$ -세포 사멸에 보호효과가 있는지를 밝히고자 하였다. 이를 연구하기 위해 본 발명자들은 세포 내로 투과할 수 있는 CIAPIN1 융합단백질을 제작하였다. CIAPIN1 융합단백질은  $\beta$ -세포 내부로 농도 의존적 및 시간 의존적으로 효과적으로 투과하였다. 사이토카인에 노출된 RINm5F 세포의 활성산소종 생산 및 DNA 단편화 수준은 세포 내로

투과된 CIAPIN1 융합단백질에 의해 감소하였다. 이러한 결과는 CIAPIN1 융합단백질이 사이토카인에 의해 유도된 세포 독성에 대해 세포 보호기능을 가지고 있음을 나타낸다. 또한, 본 발명의 결과에서 사이토카인에 노출된 RINm5F 세포에서 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 활성화 수준이 현저하게 증가하였으나, 세포 내로 투과된 CIAPIN1 융합단백질은 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 활성화 수준을 감소시켰다. 사이토카인으로 유도된 RINm5F 세포에서 CIAPIN1 융합단백질은 절단된 Caspase-3 및 Bax 단백질 발현을 현저하게 감소시켰다. 대조적으로, Bcl-2 단백질 발현은 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 CIAPIN1 융합단백질이 사이토카인에 노출된 RINm5F 세포에서 신호 전달 경로를 조절하여 세포 생존에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[0016] 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명하면, 본 발명의 일 실시예에서 본 발명자들은 먼저 CIAPIN1 융합단백질을 과대 발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 CIAPIN1 융합단백질 발현 벡터를 개발하였다. 이 발현 벡터는 인간 CIAPIN1 단백질, 7~21개 아미노산으로 이루어진 단백질 수송 도메인 하나 이상, 그리고 N 말단부분에 6개의 히스티딘 잔기를 발현시킬 수 있는 cDNA를 포함하고 있다. 그 예시로 CIAPIN1 융합단백질의 아미노산 서열은 서열 목록의 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12임을 특징으로 한다.

[0017] 이 발현벡터를 이용하여 CIAPIN1 융합단백질을 대장균에서 과대 발현시켰으며 Ni-친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 배양된 세포에 CIAPIN1 융합단백질이 시간 및 농도 의존적으로 세포에 운반되는 것을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 세포 내로 투과된 CIAPIN1 융합단백질은 세포 내에서 최대 12시간 동안 지속적으로 유지되었으며, 사이토카인에 의해 유도되는 세포사멸을 억제하였다.

[0018] 이러한 결과는 CIAPIN1 융합단백질이 세포 내로 잘 투과되고, 세포 내에서 CIAPIN1 단백질의 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 이러한 CIAPIN1 융합단백질은 사이토카인에 의해 유도되는  $\beta$ -세포 손상 또는 사멸로부터 세포를 보호하는 등 당뇨병의 예방 및/또는 치료에 응용할 수 있을 것으로 예상된다.

[0020] 본 발명은 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1(CIAPIN1)의 N 말단 및 C 말단 중 한 곳 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV-Tat 펩타이드, Pep-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌, 올리고(라이신, 아르기닌) 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV-Tat 펩타이드인 것을 특징으로 하는 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질이 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0024] 또한, 본 발명은 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1을 코딩하는 cDNA의 적어도 일측 말단에 단백질 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합된 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV-Tat 펩타이드, Pep-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌, 올리고(라이신, 아르기닌) 중 선택된 것임을 특징으로 하는, 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드의 염기 서열이 서열번호 1, 3, 5, 7, 9 또는 11임을 특징으로 하는 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0027] 또한, 본 발명은 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1을 코딩하는 cDNA의 적어도 일측 말단에 단백질 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합된 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드 함유 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질 발현 벡터를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

- [0028] 이뿐만 아니라, 본 발명은 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1의 N 말단 및 C 말단 중 적어도 어느 한 쪽에 단백질 수송도메인이 공유결합된 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방용 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질의 아미노산 서열이 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12임을 특징으로 하는 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방용 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1(CIAPIN1) 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.
- [0032] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여 하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.01 $\mu$ 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.
- [0033] 나아가, 본 발명은 상기 CIAPIN1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 또는 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 또한 CIAPIN1 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 CIAPIN1 단백질 분자의 세포 내 전달은 HIV Tat 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, HIV Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결어로 HIV Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 7~15개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 다수 포함하는 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.
- [0035] 이뿐만 아니라, 본 발명의 CIAPIN1 융합단백질은 당뇨병 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 이용할 수 있으며, 해당 분야의 통상의 지식을 가진 자가 CIAPIN1 융합단백질에 일반적으로 건강기능성 식품 조성물에 널리 이용되는 곡물 분말, 채소, 해초, 과일 등의 분말, 기타 건강증진성분 및 필요에 따라 감미료 등을 가하여 분말상, 액상, 고형 등 다양한 제형의 건강기능성 식품 조성물을 제조할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0038] "CIAPIN1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 목표 단백질(즉, 본 발명에 서는 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1을 의미함)의 유전적 융합이나 화학결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서의 구체적인 실시예에서는 특별히 단백질 수송 도메인으로서 HIV-Tat 펩타이드를 사용하였으나, 단백질 수송 도메인이 HIV-Tat 펩타이드에만 한정되는 것이 아님은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 다만, 본 발명에서 모든 종류의 가능한 단백질 수송 도메인을 포함하는 CIAPIN1 융합단백질을 나열하는 것이 물리적으로 불가능하므로, 편의를 위하여 단백질 수송 도메인 중 HIV-Tat 펩타이드를 선택하여 실험을 수행하였으며, 본 발명의 범위가 이와 같은 예시로 인하여 한정되는 것이 아님을 명확히 밝힌다. 따라서, "CIAPIN1 융합단백질"은 본 발명의 설명 및 도면에서 "Tat-CIAPIN1",

"Tat-CIAPIN1 융합단백질", "CIAPIN1 융합단백질", "사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1 융합단백질"과 혼용된다.

- [0039] "목표 단백질"이란 본래 표적 세포로 들어갈 수 없거나, 본래 유용한 속도로 표적 세포로 들어갈 수 없는 수송 도메인 또는 이의 단편이 아닌 분자로서, 수송도메인과 융합되기 전의 분자 그 자체 또는 수송도메인-목표 단백질 복합체의 목표 단백질 부분을 의미한다. 목표 단백질로서는 폴리펩티드, 단백질, 펩타이드를 포함하며, 본 발명에서는 사이토카인 유도 세포자기사멸 저해제 1을 의미한다.
- [0040] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.
- [0041] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0042] 또한, "표적 세포"란 수송도메인에 의해 목표 단백질이 전달되는 세포를 의미하는 것으로서, 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 즉, 표적세포는 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 동물세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.
- [0043] 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 펩타이드를 말하며, 예를 들면 HIV-1 Tat를 말한다.
- [0044] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0045] 본 발명은 또한, 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.
- [0046] 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성 전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.
- [0047] 본 발명에 따른 단백질 수송 도메인은 특정 아미노산 잔기 위치에서 아미노산 잔기가 보존적으로 치환된 변이체 또는 이 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단에서 1~3개의 아미노산이 절단된 절편들 중 아미노산이 10개 이상인 절편도 포함하는 의미로 해석된다.
- [0048] 본 명세서에서 "보존적 치환"이란 1개 이상의 아미노산을 해당 단백질 수송 도메인의 생물학적 또는 생화학적 기능의 손실을 야기하지 않는 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 단백질 수송 도메인의 변형을 의미한다.
- [0049] 본 명세서에서 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체하는 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 부류는 해당 기술분야에 규정되어 있으며, 잘 알려져 있다. 이들 부류는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 대전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다.
- [0050] 본 발명의 단백질 수송 도메인 또는 이의 절편은 보존적 아미노산 치환을 갖더라도 여전히 활성을 보유할 수 있음이 예상된다.
- [0051] 또한, 본 발명에 따른 단백질 수송 도메인 변이체는 본 발명에 따른 단백질 수송 도메인과 실질적으로 동일한

기능 및/또는 효과를 가지며, 80% 또는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 아미노산 서열 상동성을 가지는 단백질 수송 도메인 변이체들 또는 이의 절편들도 포함하는 의미로 해석된다.

### 발명의 효과

- [0053] 본 발명의 CIAPIN1 융합단백질은 췌장  $\beta$ -세포 내로 농도 및 시간 의존적으로 투과하였다.
- [0054] 또한, 본 발명의 CIAPIN1 융합단백질은 사이토카인에 노출된 RINm5F 세포의 활성산소종 생산 및 DNA 단편화 수준을 감소시켰다.
- [0055] 또한, 본 발명의 CIAPIN1 융합단백질은 췌장  $\beta$ -세포의 사멸을 효과적으로 억제하여 췌장 세포를 보호하였다.

### 도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 Tat-CIAPIN1 융합단백질의 정제 및 RINm5F 세포로의 형질 도입을 나타낸다. 정제된 Tat-CIAPIN1 융합단백질 및 CIAPIN1 단백질은 12% SDS-PAGE와 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다(a). Tat-CIAPIN1 융합단백질 (0.5~3  $\mu$ M)을 1시간 동안 배양 배지에 처리하고(b), Tat-CIAPIN1 융합단백질(3  $\mu$ M)을 15~60분 동안 배양 배지에 처리하여 웨스턴 블랏 분석하였다(c). 또한, 세포를 1~24시간 동안 Tat-CIAPIN1 융합단백질 (3  $\mu$ M)로 처리하여 웨스턴 블랏 분석하였다(d).
- 도 2는 RINm5F 세포에서 사이토카인에 의한 세포 손상에 대한 Tat-CIAPIN1 융합단백질의 억제 효과를 나타낸다. RINm5F 세포는 Tat-CIAPIN1 융합단백질 (0.5~3  $\mu$ M)로 1시간 동안 전처리하고 사이토카인 (5 ng/ml IL-1, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  및 10 ng/ml IFN- $\gamma$ )을 가하였다. 이어서 세포 생존률(a), 활성산소종(ROS) 생산량 (b) 및 DNA 단편화 (c)를 측정하였다. \*P < 0.01은 사이토카인 처리한 세포와 비교한 값이다.
- 도 3은 RINm5F 세포에서 사이토카인으로 유도된 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 활성화에 대한 Tat-CIAPIN1 융합단백질의 억제 효과를 나타낸다. 세포를 Tat-CIAPIN1 융합단백질 (3  $\mu$ M)로 1시간 동안 전처리한 후, 사이토카인 (5 ng/ml IL-1, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  및 10 ng/ml IFN- $\gamma$ )으로 처리하였다. 그런 다음 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 활성화 수준을 웨스턴 블랏 분석하고, 밀도계로 밴드 강도를 측정하였다. \*P < 0.01은 사이토카인 처리한 세포와 비교한 값이다.
- 도 4는 RINm5F 세포에서 사이토카인으로 유도된 세포 사멸 신호에 대한 Tat-CIAPIN1 융합단백질의 억제 효과를 나타낸다. 세포를 Tat-CIAPIN1 융합단백질 (3  $\mu$ M)로 1시간 동안 전처리한 후, 사이토카인 (5 ng/ml IL-1, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  및 10 ng/ml IFN- $\gamma$ )으로 처리하였다. 그런 다음 표시된 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏 분석하고, 밀도계로 밴드 강도를 측정하였다. \*P < 0.01은 사이토카인 처리된 세포와 비교한 값이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 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.

### [0060] 재료

- [0061] CIAPIN1 융합단백질은 아래 기재와 같이 제조하였다. 사용한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 및 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 2',7'-DCF-DA(Dichlorofluorescein diacetate)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

### [0063] CIAPIN1 융합단백질 발현 및 정제

- [0064] 세포 침투성 HIV-1 Tat 발현 벡터는 종래 기술에 따라 본 연구실에서 제조하였다 (19). 인간 CIAPIN1 단백질은 PCR로 증폭하였다. PCR 산물은 절단하여 용출하고 TA-클로닝 벡터에 연결하였다. 인간 CIAPIN1 cDNA를 포함하는 정제된 TA 벡터는 여섯 개의 히스티딘 오픈리딩 프레임과 함께 발현 벡터 내로 연결되어 발현 벡터를 제조하였고, 이. 콜라이 DH5 $\alpha$  세포 내로 클로닝하였다. 유사한 방법으로 Tat 펩타이드를 융합하지 않은 대조군 CIAPIN1

단백질을 구축하고 발현하였다.

[0065] 재조합 Tat-CIAPIN1 플라스미드는 이.콜라이 BL21 세포 (Novagen)로 형질변환되어 0.1 mM의 IPTG (Duchefa, Haarlem, Netherlands)로 18℃에서 18시간 동안 발현을 유도하였다. 거둔 세포는 초음파 처리로 용균하고, Tat-CIAPIN1 융합단백질은  $\text{Ni}^{2+}$ -나이트릴로트리아세탄 산 세파로즈 친화 크로마토그래피로 정제하였다. 염은 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Braunschweig, Germany)로 제거하였다. 단백질 농도는 소 혈청 알부민을 표준물질로 이용하여 브래드포드법으로 측정하였다 (Bradford, 1976).

#### [0067] INm5F 세포에 CIAPIN1 융합단백질의 형질도입

[0068] RINm5F세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 얻었으며 10% 우태혈청 (FBS) 및 1% 항생제를 포함하는 RPMI 1640 배지에서 보관하였다.

[0069] CIAPIN1 융합단백질의 전달을 위해, RINm5F 세포를 다양한 농도(0.5~3  $\mu\text{M}$ )로 처리하였고, 또는 CIAPIN1 융합단백질 3  $\mu\text{M}$ 의 농도로 다양한 시간 (15~60분)으로 처리하였다. 그 후 세포를 PBS로 세 번 세척하였다. 세포는 모아 웨스턴 블랏 분석하였다.

#### [0071] 웨스턴 블랏 분석

[0072] 단백질 농도는 브래드포드 분석으로 측정하였다(45). 동량의 단백질을 12% SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하였다. 전기영동 후, 젤은 나이트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 이 막은 5% 탈지유에서 배양한 다음 일차 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양했다. 세척 후, 막을 호스 래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 ECL 시약 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)을 사용하여 단백질 밴드를 시각화하였다(19, 26).

#### [0074] 세포 생존율 분석

[0075] MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석법을 이용하여 세포 생존율을 분석하였다. 세포를 1시간 동안 Tat-CIAPIN1 융합단백질 (0.5~3  $\mu\text{M}$ )로 전처리하고, 12시간 동안 사이토카인 (5 ng/ml IL-1, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  및 10 ng/ml IFN- $\gamma$ )으로 배양하였다. 그런 다음 이전 연구에서 설명한 대로 세포 생존력을 분석하였다(19).

#### [0077] DNA 단편화 수준 측정

[0078] 단편화는 Cell Death Detection Kit (Roche Applied Science, Basel, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 세포를 1시간 동안 Tat-CIAPIN1 융합단백질 (3  $\mu\text{M}$ )로 전처리하고, 24시간 동안 사이토카인 (5ng / ml IL-1, 10ng / ml TNF- $\alpha$  및 10ng / ml IFN- $\gamma$ )으로 배양하였다. 그런 다음 이전 연구에서 설명한대로 DNA 단편화 수준을 측정하였다(19, 26).

#### [0080] 통계 분석

[0081] 데이터는 각각의 세번의 독립된 실험에서 얻은 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 평균값 간의 차이는 일방 ANOVA를 이용하여 분석한 후, GraphPad Prism 소프트웨어 (버전 5.01; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용한 Bonferroni의 사후 테스트를 수행하였다. 차이는  $p < 0.05$ 일 때 유의미한 것으로 하였다.

#### [0083] 결과 1: INm5F 세포로 CIAPIN1 융합단백질의 투과

[0084] 형질 도입된 융합단백질이 치료 단백질 적용을 위한 효과적인 도구로 사용될 수 있다(19-28). Tat-CIAPIN1 융합단백질은 종래 기술과 같이 정제하였다(19). 도 1a는 정제된 Tat-CIAPIN1 융합단백질 및 CIAPIN1 단백질을 보여준다. Tat-CIAPIN1 융합단백질의 투과 능력을 확인하기 위해 RINm5F 세포를 Tat-CIAPIN1 융합단백질(0.5~3  $\mu$

M)로 1시간 동안 처리하였고, 3  $\mu$ M Tat-CIAPIN1 융합단백질을 시간(15~60분)을 달리하여 처리하였다. 도 1b 및 도 1c와 같이, Tat-CIAPIN1 융합단백질은 농도 및 시간 의존적으로 RINm5F 세포 내로 효과적으로 투과함을 알 수 있었다. 또한, Tat-CIAPIN1 융합단백질 수준은 형질 도입 후 12시간까지 유지되었으며 이후 시간이 지나면서 사라졌다(도 1d). 이러한 결과는 Tat-CIAPIN1 융합단백질이 RINm5F 세포로 형질 도입되고 적어도 12시간 동안 세포에서 유지되었음을 나타낸다.

[0086] **결과 2: 투과된 CIAPIN1 융합단백질은 사이토카인에 의해 유도된 RINm5F 세포 손상을 억제한다.**

[0087] 사이토카인은 췌장  $\beta$ -세포에서 세포 독성을 촉진하고  $\beta$ -세포 사멸을 유도한다(6-8). 따라서, 본 발명자들은 CIAPIN1 융합단백질이 사이토카인에 의한 RINm5F 세포 사멸을 억제하는지를 평가하였다. 도 2a와 같이, 세포 내로 도입된 CIAPIN1 융합단백질은 사이토카인에 노출된 세포에 대해 농도 의존적으로 세포 생존을 향상시켰다. 다음으로 CIAPIN1 융합단백질이 활성산소종 생성과 DNA 단편화를 억제하는지를 확인하였다(도 2b 및 2c). 사이토카인에 노출된 RINm5F 세포의 활성산소종 생산 및 DNA 단편화 수준은 CIAPIN1 융합단백질에 의해 감소하였다. 이러한 결과는 CIAPIN1 융합단백질이 사이토카인에 의해 유도된 세포 독성에 대해 세포 보호기능을 가지고 있음을 나타낸다. 그러나 CIAPIN1 단백질 또는 Tat 펩타이드는 사이토카인에 의한 RINm5F 세포의 손상에 대하여 보호 효과를 나타내지 않는다.

[0088] 여러 연구에서 사이토카인과 산화 스트레스가 췌장  $\beta$ -세포 파괴의 주요 요인이라고 보고한 바 있는데, 랫트 모델에서  $\beta$ -세포는 다른 조직보다 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈, 카탈레이즈 및 글루타티온 퍼옥시데이즈를 포함한 항산화 단백질이 훨씬 적기 때문이다.

[0090] **결과 3: RINm5F 세포에서 사이토카인으로 유도되는 NF- $\kappa$ B, MAPK 및 세포 사멸 신호전달 경로에 미치는 CIAPIN1 융합단백질의 효과**

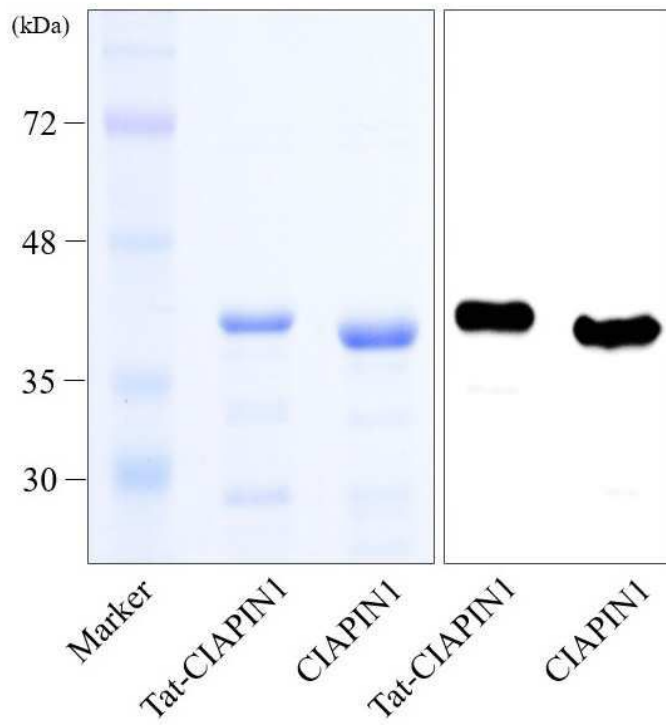
[0091] 일부 연구에서는 NF- $\kappa$ B가 사이토카인에 의한 췌장  $\beta$ -세포 손상의 핵심 인자임을 보여주었고, NF- $\kappa$ B 억제가 제1형 당뇨병의 진행을 지연시키는 새로운 전략이 될 수 있다고 제안한바 있다(37, 38). Sakai 등(2002)은 NF- $\kappa$ B 및 MAPK가 당뇨병 합병증, 당뇨병성 신장질환에 관여한다고 보고했다(39). 또 다른 연구에서는 MAPK 및 NF- $\kappa$ B 활성화가 스트렙토토신으로 유도된 쥐 또는 INS-1 세포에서 증가했다고 보고했다(40, 41). 본 발명의 결과에서는 사이토카인에 노출된 RINm5F 세포에서 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 활성화 수준이 현저하게 증가했음을 알 수 있었다. CIAPIN1 단백질은 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 활성화 수준에 영향을 끼치지 않았다. 그러나, CIAPIN1 융합단백질은 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 활성화 수준을 감소시켰다(도 3).

[0092] 과도한 사이토카인은 세포 사멸 신호 전달 경로를 통해 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한, Bcl-2 및 Bax 단백질 발현은 세포사멸과 관련이 있다 (40, 41). 그리하여 본 발명자들은 CIAPIN1 융합단백질이 세포사멸 신호를 조절하는지를 조사하였다(도 4). 사이토카인으로 유도된 RINm5F 세포에서 CIAPIN1 융합단백질은 절단된 Caspase-3 및 Bax 단백질 발현을 현저하게 감소시켰다. 대조적으로, Bcl-2 단백질 발현은 유의하게 증가하였다. 그러나 CIAPIN1 단백질은 사이토카인에 의해 유도된 RINm5F 세포에서 보호 효과를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 CIAPIN1 융합단백질이 사이토카인에 노출된 RINm5F 세포에서 신호 전달 경로를 조절하여 세포 생존에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다(도 4). Zhang 등(2019)은 CIAPIN1 단백질의 과발현이 Bcl-2 단백질 발현을 유의하게 증가시킨 반면, Bax 단백질 발현은 저산소증/재산소화로 손상된 H9c2 세포에서 유의하게 감소했으며, CIAPIN1 단백질의 과발현은 저산소증/재산소화 손상에서 세포 사멸 관련 단백질의 발현 변화에 의해 세포 사멸을 감소시켰음을 시사한다(44).

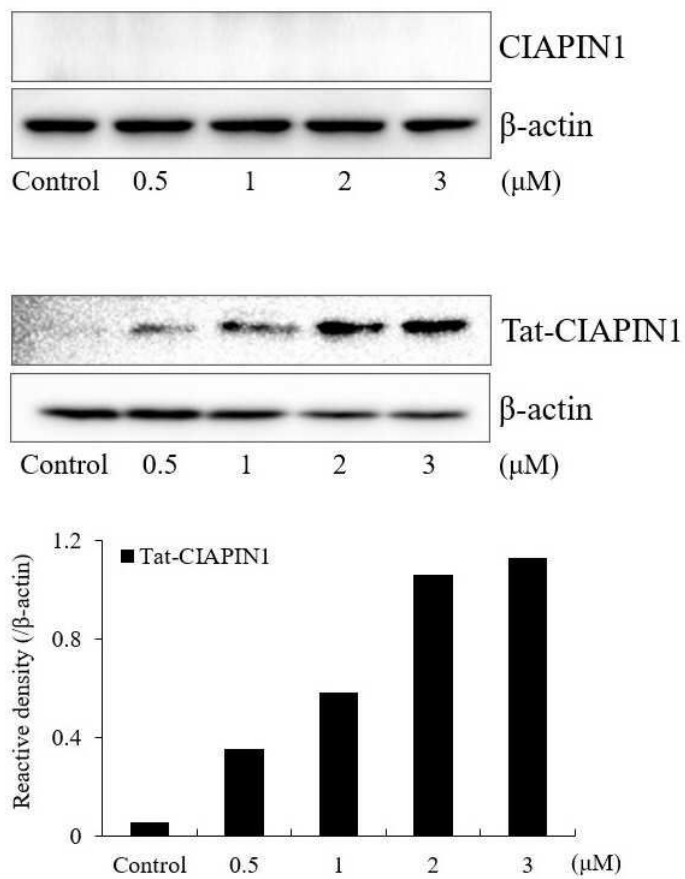
[0093] 요약하면, 본 발명자들은 CIAPIN1 융합단백질이 사이토카인 유도 RINm5F 세포에서 세포 사멸 관련 단백질 조절 뿐만 아니라, 활성산소종 생성 및 NF- $\kappa$ B 및 MAPK의 활성화 감소를 통하여 췌장  $\beta$ -세포 사멸을 억제한다는 것을 보여주었다. 이와 같이, CIAPIN1 융합단백질은 췌장  $\beta$ -세포에서 유익한 역할을 한다. 따라서 CIAPIN1 융합단백질은 제1형 당뇨병에 대한 예방 및/또는 치료 용도로 이용할 수 있다.

도면

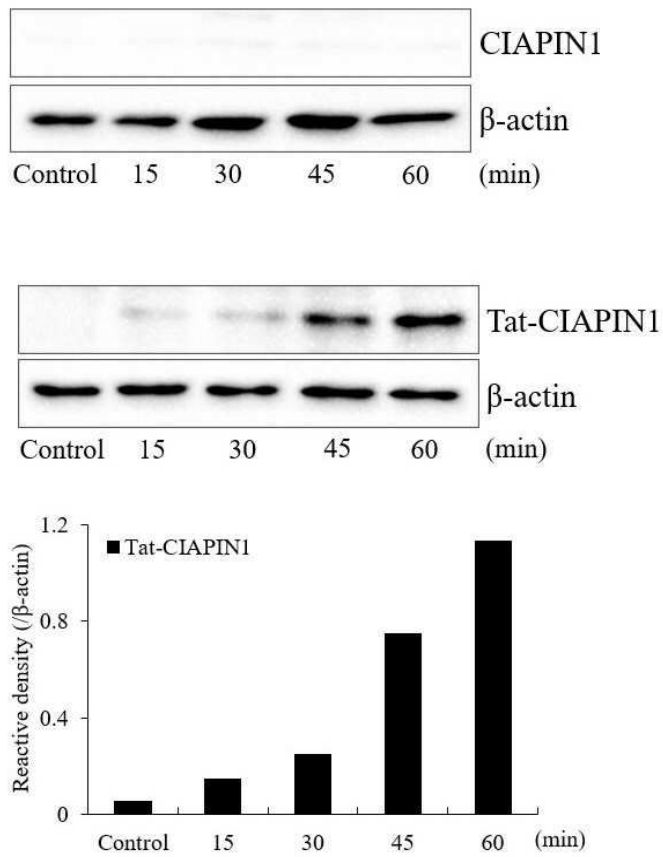
도면1a



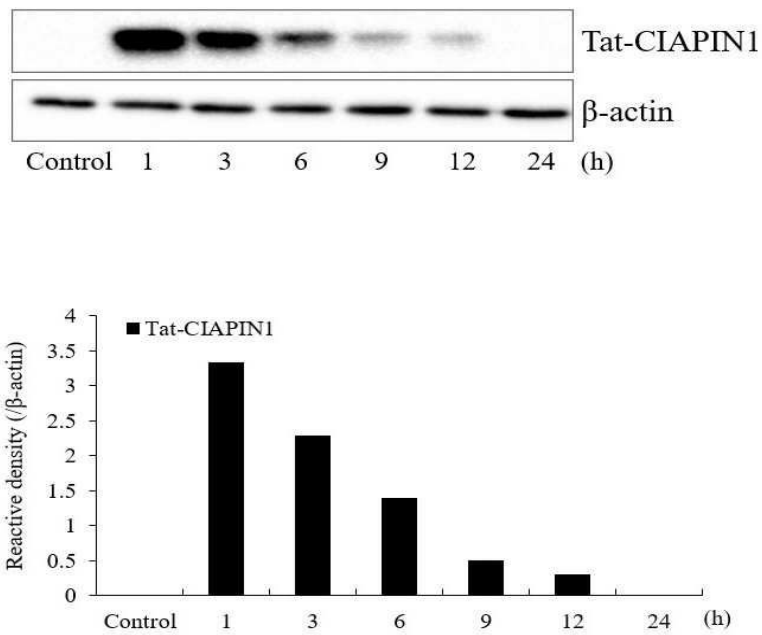
도면1b



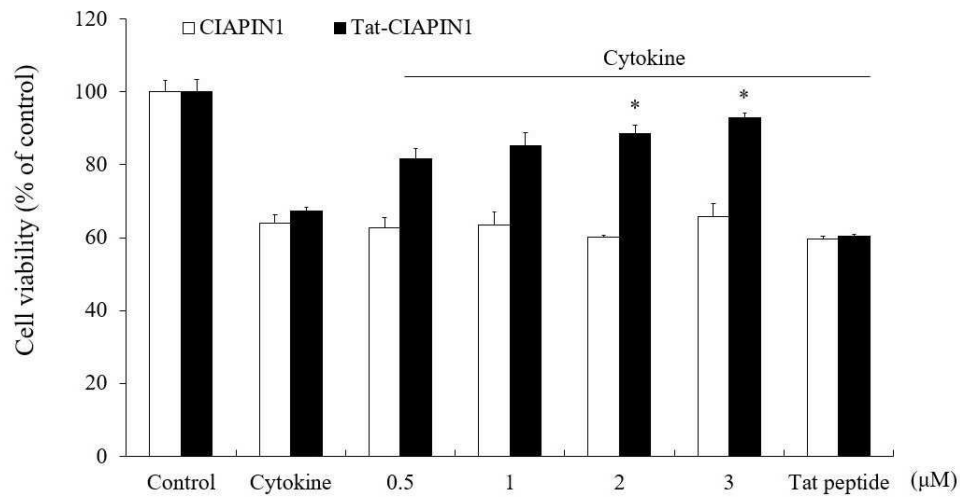
도면1c



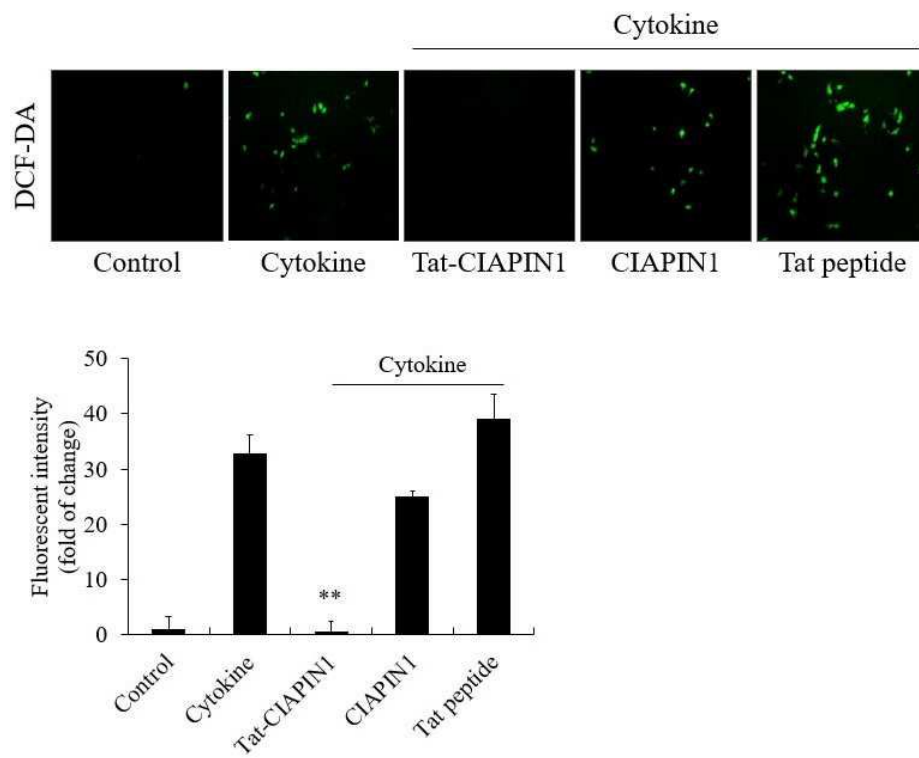
도면1d



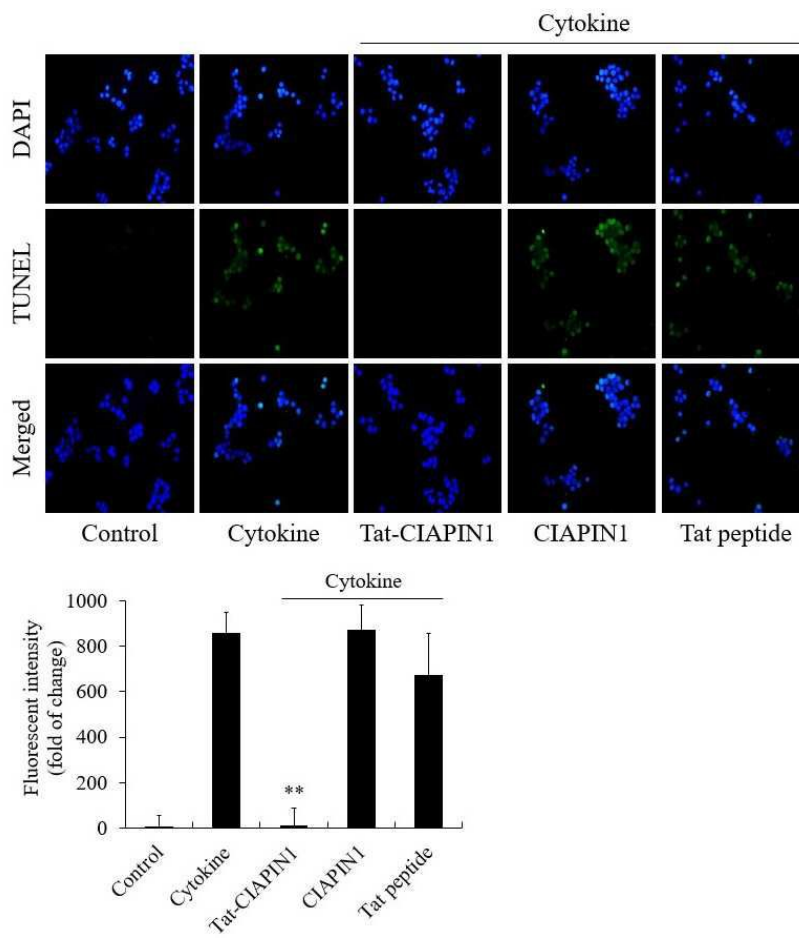
도면2a



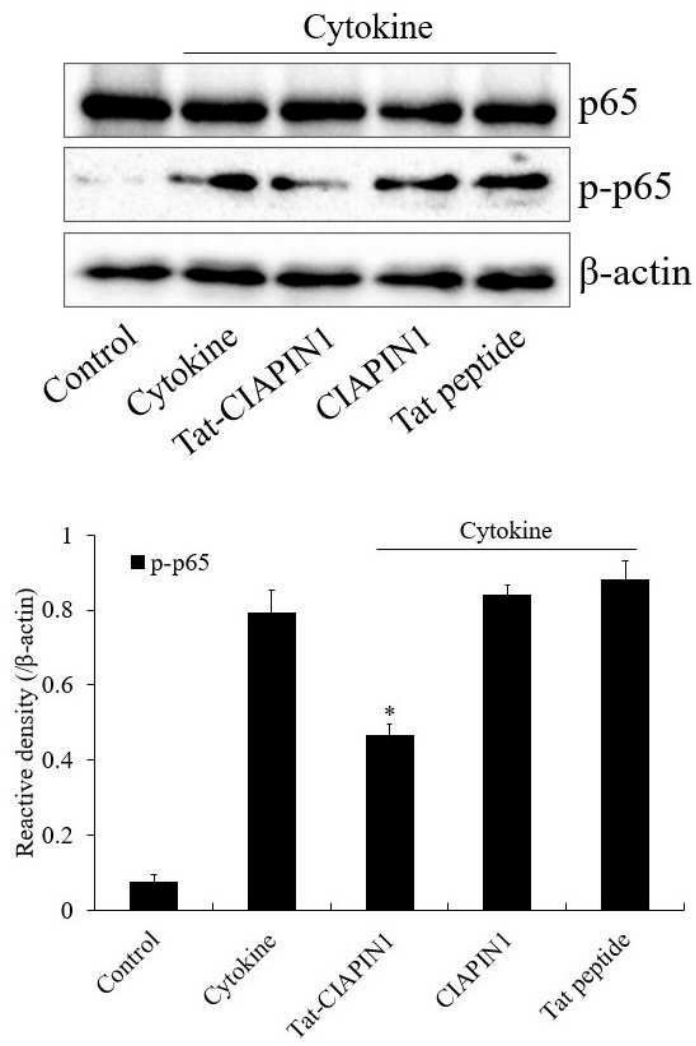
도면2b



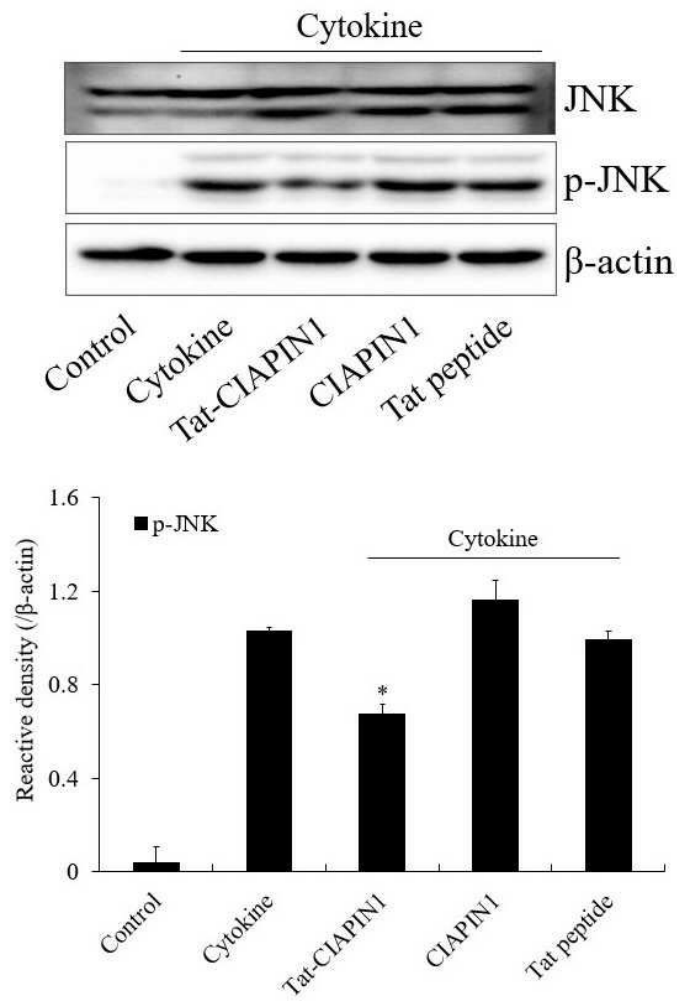
도면2c



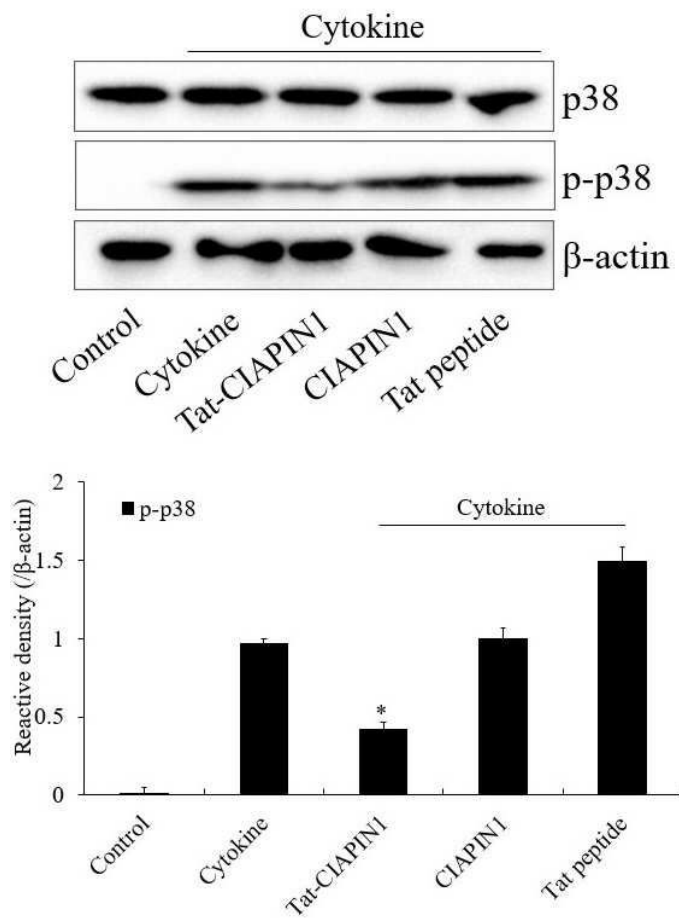
도면3a



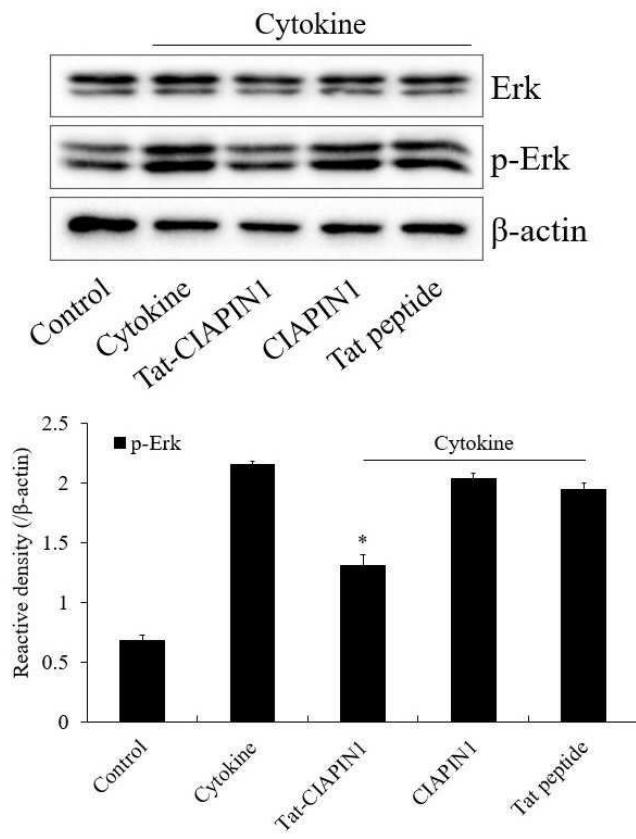
도면3b



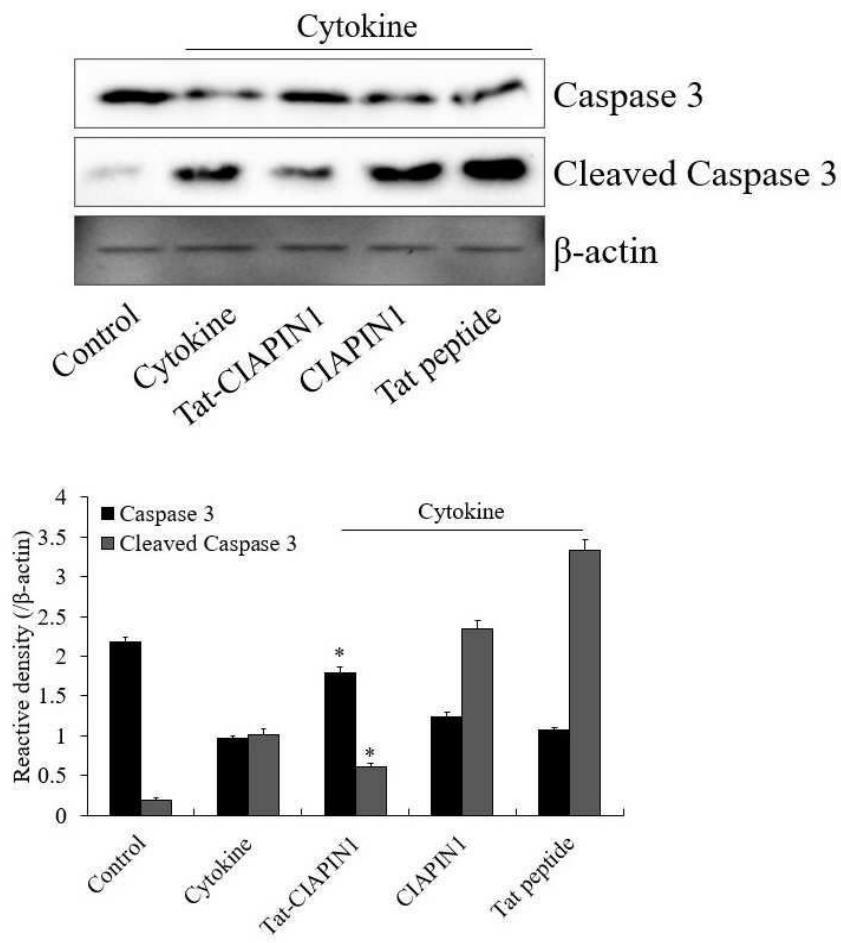
도면3c



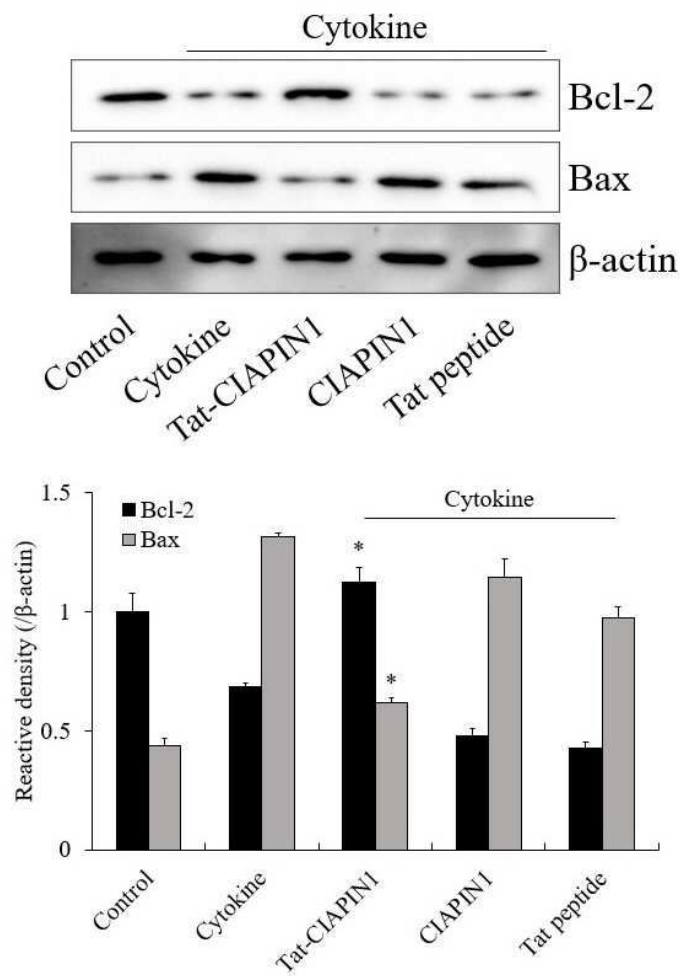
도면3d



도면4a



도면4b



## 서열 목록

- <110> Industry Academic Corporation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating diabetes  
containing Cytokine induced apoptosis inhibitor 1 fusion protein
- <130> HallymU-sychoi-CIAPIN1-diabetes
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 966
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> polynucleotide coding CIAPIN1 fusion protein
- <400> 1

aggaagaagc ggagacagcg acgaagaatg gcagattttg ggatctctgc tggccagttt

60

gtggcagtgg tctgggataa gtcacccca gtggaggctc tgaaaggtct ggtggataag 120  
 cttcaagcgt taaccggcaa tgagggccgc gtgtctgtgg aaaacatcaa gcagctgttg 180  
 caatctgccc acaaagaatc cagctttgac attattttgt caggtttagt cccaggaagc 240  
 accactctgc acagtgtga gattttggct gaaatcgccc ggatccttcg gcctgggtgga 300  
 tgtctttttc tgaaggagcc agtagagaca gctgtagata acaatagcaa agtgaagaca 360  
 gcatctaagc tgtgttcagc cctgactctt tctggtcttg tggaaagtga agagctgcag 420  
 cgggagcccc taaccctga ggaagtacag tctgttcgag aacaccttgg tcatgaaagt 480

gacaacctgc tgtttgttca gatcacaggc aaaaaaccaa actttgaagt gggttcttct 540  
 aggcagctta agctttccat caccaagaag tcttctcctt cagtgaacc tgctgtggac 600  
 cctgctgctg ccaagctgtg gaccctctca gccaacgata tggaggacga cagcatggat 660  
 ctcatgtact cagatgagct gctggatcca gaagatttga agaagccaga tccagcttcc 720  
 ctgcgggctg ctcttctgtg ggaagggaag aagaggaagg cctgtaagaa ctgcacctgt 780  
 ggccttgccg aagaactgga aaaagagaag tcaagggaac agatgagctc ccaaccaag 840  
 tcagcttgtg gaaactgcta cctgggcgat gccttcgct gtgccagctg cccctacctt 900

gggatgccag ccttcaaacc tggggaaaag gtgcttctga gtgatagcaa tcttcatgat 960  
 gcctag 966

<210> 2

<211> 321

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-CIAPIN1 fusion protein

<400> 2

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Ala Asp Phe Gly Ile Ser

1 5 10 15

Ala Gly Gln Phe Val Ala Val Val Trp Asp Lys Ser Ser Pro Val Glu

20 25 30

Ala Leu Lys Gly Leu Val Asp Lys Leu Gln Ala Leu Thr Gly Asn Glu

35 40 45

Gly Arg Val Ser Val Glu Asn Ile Lys Gln Leu Leu Gln Ser Ala His

50 55 60

Lys Glu Ser Ser Phe Asp Ile Ile Leu Ser Gly Leu Val Pro Gly Ser

65 70 75 80

Thr Thr Leu His Ser Ala Glu Ile Leu Ala Glu Ile Ala Arg Ile Leu  
85 90 95  
Arg Pro Gly Gly Cys Leu Phe Leu Lys Glu Pro Val Glu Thr Ala Val  
100 105 110  
Asp Asn Asn Ser Lys Val Lys Thr Ala Ser Lys Leu Cys Ser Ala Leu  
115 120 125  
Thr Leu Ser Gly Leu Val Glu Val Lys Glu Leu Gln Arg Glu Pro Leu  
130 135 140  
Thr Pro Glu Glu Val Gln Ser Val Arg Glu His Leu Gly His Glu Ser  
145 150 155 160  
Asp Asn Leu Leu Phe Val Gln Ile Thr Gly Lys Lys Pro Asn Phe Glu  
165 170 175  
Val Gly Ser Ser Arg Gln Leu Lys Leu Ser Ile Thr Lys Lys Ser Ser  
180 185 190  
Pro Ser Val Lys Pro Ala Val Asp Pro Ala Ala Ala Lys Leu Trp Thr  
195 200 205  
Leu Ser Ala Asn Asp Met Glu Asp Asp Ser Met Asp Leu Ile Asp Ser  
210 215 220  
Asp Glu Leu Leu Asp Pro Glu Asp Leu Lys Lys Pro Asp Pro Ala Ser  
225 230 235 240  
Leu Arg Ala Ala Ser Cys Gly Glu Gly Lys Lys Arg Lys Ala Cys Lys  
245 250 255  
Asn Cys Thr Cys Gly Leu Ala Glu Glu Leu Glu Lys Glu Lys Ser Arg  
260 265 270  
Glu Gln Met Ser Ser Gln Pro Lys Ser Ala Cys Gly Asn Cys Tyr Leu  
275 280 285  
Gly Asp Ala Phe Arg Cys Ala Ser Cys Pro Tyr Leu Gly Met Pro Ala  
290 295 300  
Phe Lys Pro Gly Glu Lys Val Leu Leu Ser Asp Ser Asn Leu His Asp  
305 310 315 320

Ala

<210> 3  
 <211> 966  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> polynucleotide coding CIAPIN1-Tat fusion protein  
 <400> 3

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| atggcagatt ttgggatctc tgctggccag tttgtggcag tggctctggga taagtcattcc | 60  |
| ccagtggagg ctctgaaagg tctggtggat aagcttcaag cgtaaacgg caatgagggc    | 120 |
| cgcgtgtctg tggaaaacat caagcagctg ttgcaatctg cccacaaaga atccagcttt   | 180 |
| gacattatct tgtcaggttt agtcccagga agcaccactc tgcacagtgc tgagattttg   | 240 |
| gctgaaatcg cccggatcct tcggcctggt ggatgtcttt ttctgaagga gccagtagag   | 300 |
|                                                                     |     |
| acagctgtag ataacaatag caaagtgaag acagcatcta agctgtgttc agccctgact   | 360 |
| ctttctggtc ttgtggaagt gaaagagctg cagcgggagc ccctaaccct tgaggaagta   | 420 |
| cagtctgttc gagaacacct tggatcatgaa agtgacaacc tgctgtttgt tcagatcaca  | 480 |
| ggcaaaaaac caaactttga agtgggttct tctaggcagc ttaagctttc catcaccaag   | 540 |
| aagtcttctc cttcagtga acctgctgtg gacctgtctg ctgccaagct gtggaccctc    | 600 |
| tcagccaacg atatggagga cgacagcatg gatctcattg actcagatga gctgctggat   | 660 |
| ccagaagatt tgaagaagcc agatccagct tcctgcggg ctgcttcttg tggggaaggg    | 720 |
|                                                                     |     |
| aaaaagagga aggcctgtaa gaactgcacc tgtggccttg ccgaagaact ggaaaaagag   | 780 |
| aagtcaaggg aacagatgag ctccaacc aagtcagctt gtggaaactg ctacctgggc     | 840 |
| gatgccttcc gctgtgccag ctgccctac cttgggatgc cagccttcaa acctggggaa    | 900 |
| aagtgcttc tgagtgatag caatcttcat gatgcctaga ggaagaagcg gagacagcga    | 960 |
| cgaaga                                                              | 966 |

<210> 4  
 <211> 321  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CIAPIN1-Tat fusion protein

<

400> 4  
 Met Ala Asp Phe Gly Ile Ser Ala Gly Gln Phe Val Ala Val Val Trp

1 5 10 15

Asp Lys Ser Ser Pro Val Glu Ala Leu Lys Gly Leu Val Asp Lys Leu  
 20 25 30  
 Gln Ala Leu Thr Gly Asn Glu Gly Arg Val Ser Val Glu Asn Ile Lys  
 35 40 45  
 Gln Leu Leu Gln Ser Ala His Lys Glu Ser Ser Phe Asp Ile Ile Leu  
 50 55 60  
 Ser Gly Leu Val Pro Gly Ser Thr Thr Leu His Ser Ala Glu Ile Leu  
  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Ile Ala Arg Ile Leu Arg Pro Gly Gly Cys Leu Phe Leu Lys  
 85 90 95  
 Glu Pro Val Glu Thr Ala Val Asp Asn Asn Ser Lys Val Lys Thr Ala  
 100 105 110  
 Ser Lys Leu Cys Ser Ala Leu Thr Leu Ser Gly Leu Val Glu Val Lys  
 115 120 125  
 Glu Leu Gln Arg Glu Pro Leu Thr Pro Glu Glu Val Gln Ser Val Arg  
 130 135 140  
  
 Glu His Leu Gly His Glu Ser Asp Asn Leu Leu Phe Val Gln Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Lys Pro Asn Phe Glu Val Gly Ser Ser Arg Gln Leu Lys Leu  
 165 170 175  
 Ser Ile Thr Lys Lys Ser Ser Pro Ser Val Lys Pro Ala Val Asp Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Ala Lys Leu Trp Thr Leu Ser Ala Asn Asp Met Glu Asp Asp  
 195 200 205  
 Ser Met Asp Leu Ile Asp Ser Asp Glu Leu Leu Asp Pro Glu Asp Leu  
  
 210 215 220  
 Lys Lys Pro Asp Pro Ala Ser Leu Arg Ala Ala Ser Cys Gly Glu Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Lys Arg Lys Ala Cys Lys Asn Cys Thr Cys Gly Leu Ala Glu Glu  
 245 250 255  
 Leu Glu Lys Glu Lys Ser Arg Glu Gln Met Ser Ser Gln Pro Lys Ser  
 260 265 270

Ala Cys Gly Asn Cys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe Arg Cys Ala Ser Cys  
275 280 285

Pro Tyr Leu Gly Met Pro Ala Phe Lys Pro Gly Glu Lys Val Leu Leu  
290 295 300

Ser Asp Ser Asn Leu His Asp Ala Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg  
305 310 315 320  
Arg

<210> 5

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding Tat-CIAPIN1-Tat fusion protein

<400> 5

aggaagaagc ggagacagcg acgaagaatg gcagattttg ggatctctgc tggccagttt 60

gtggcagtggt tctgggataa gtcattccca gtggaggctc tgaaaggctc ggtggataag 120

cttcaagcgt taaccggcaa tgagggccgc gtgtctgtgg aaaacatcaa gcagctgttg 180

caatctgccc acaagaatc cagctttgac attattttgt caggtttagt cccaggaagc 240

accactctgc acagtgtga gattttggct gaaatcgccc ggatccttcg gcctggtgga 300

tgtctttttc tgaaggagcc agtagagaca gctgtagata acaatagcaa agtgaagaca 360

gcattctaagc tgtgttcagc cctgactctt tctggtcttg tggaagtga agagctgcag 420

cgggagcccc taaccctga ggaagtacag tctgttcgag aacaccttgg tcatgaaagt 480

gacaacctgc tgtttgttca gatcacaggc aaaaaacaa actttgaagt gggttcttct 540

aggcagctta agctttccat caccaagaag tcttctcctt cagtgaacc tgctgtggac 600

cctgctgctg ccaagctgtg gacctctca gccaacgata tggaggacga cagcatggat 660

ctcattgact cagatgagct gctggatcca gaagatttga agaagccaga tccagcttcc 720

ctgcgggctg cttcttgggt ggaagggaaa aagaggaagg cctgtaagaa ctgcacctgt 780

ggccttgccg aagaactgga aaaagagaag tcaaggaac agatgagctc ccaaccaag 840

tcagcttgtg gaaactgcta cctgggcgat gccttccgct gtgccagctg ccctacctt 900

gggatgccag cttcaaac tggggaaaag gtgcttctga gtgatagcaa tcttcatgat 960

gcctagagga agaagcggag acagcgacga aga 993

<210> 6

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-CIAPIN1-Tat fusion protein

<400> 6

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Ala Asp Phe Gly Ile Ser

1 5 10 15

Ala Gly Gln Phe Val Ala Val Val Trp Asp Lys Ser Ser Pro Val Glu

20 25 30

Ala Leu Lys Gly Leu Val Asp Lys Leu Gln Ala Leu Thr Gly Asn Glu

35 40 45

Gly Arg Val Ser Val Glu Asn Ile Lys Gln Leu Leu Gln Ser Ala His

50 55 60

Lys Glu Ser Ser Phe Asp Ile Ile Leu Ser Gly Leu Val Pro Gly Ser

65 70 75 80

Thr Thr Leu His Ser Ala Glu Ile Leu Ala Glu Ile Ala Arg Ile Leu

85 90 95

Arg Pro Gly Gly Cys Leu Phe Leu Lys Glu Pro Val Glu Thr Ala Val

100 105 110

Asp Asn Asn Ser Lys Val Lys Thr Ala Ser Lys Leu Cys Ser Ala Leu

115 120 125

Thr Leu Ser Gly Leu Val Glu Val Lys Glu Leu Gln Arg Glu Pro Leu

130 135 140

Thr Pro Glu Glu Val Gln Ser Val Arg Glu His Leu Gly His Glu Ser

145 150 155 160

Asp Asn Leu Leu Phe Val Gln Ile Thr Gly Lys Lys Pro Asn Phe Glu

165 170 175

Val Gly Ser Ser Arg Gln Leu Lys Leu Ser Ile Thr Lys Lys Ser Ser

180 185 190

Pro Ser Val Lys Pro Ala Val Asp Pro Ala Ala Ala Lys Leu Trp Thr

195 200 205

Leu Ser Ala Asn Asp Met Glu Asp Asp Ser Met Asp Leu Ile Asp Ser  
 210 215 220  
 Asp Glu Leu Leu Asp Pro Glu Asp Leu Lys Lys Pro Asp Pro Ala Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Arg Ala Ala Ser Cys Gly Glu Gly Lys Lys Arg Lys Ala Cys Lys  
 245 250 255  
 Asn Cys Thr Cys Gly Leu Ala Glu Glu Leu Glu Lys Glu Lys Ser Arg  
 260 265 270  
 Glu Gln Met Ser Ser Gln Pro Lys Ser Ala Cys Gly Asn Cys Tyr Leu  
 275 280 285  
 Gly Asp Ala Phe Arg Cys Ala Ser Cys Pro Tyr Leu Gly Met Pro Ala  
 290 295 300  
 Phe Lys Pro Gly Glu Lys Val Leu Leu Ser Asp Ser Asn Leu His Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

325 330

<210> 7

<211> 1002

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding Pep-CIAPIN1 fusion protein

<400> 7

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| aaagaaacct ggigggaac ctggiggacc gaatggtctc agccgaaaa aaaacgtaaa   | 60  |
| gtgatggcag attttgggat ctctgctggc cagtttggc cagtggctcg ggataagtca  | 120 |
| tccccagtgg aggtcttgaa aggtctggcg gataagcttc aagcgtaac cggcaatgag  | 180 |
| ggccgcgtgt ctgtggaaaa catcaagcag ctgttgcaat ctgcccacaa agaatccagc | 240 |
| tttgacatta tttgtcagg tttagtcacca ggaagcacca ctctgcacag tgctgagatt | 300 |
| ttggctgaaa tcgcccggat ccttcggcct ggtggatgtc tttttctgaa ggagccagta | 360 |
| gagacagctg tagatacaa tagcaaagtg aagacagcat ctaagctgtg ttcagccctg  | 420 |
| actctttctg gtcttggga agtgaaagag ctgcagcggg agcccctaac ccctgaggaa  | 480 |
| gtacagtctg ttcgagaaca ctttggcat gaaagtgaca acctgctgtt ttttcagatc  | 540 |
| acaggcaaaa aaccaaactt tgaagtgggt tcttctaggc agcttaagct ttccatcacc | 600 |

aagaagcttt ctcttcagt gaaacctgct gtggacctg ctgctgcaa gctgtggacc 660  
ctctcagcca acgatatgga ggacgacagc atggatctca ttgactcaga tgagctgctg 720

gatccagaag atttgaagaa gccagatcca gcttcctgc gggtgcttc ttgtggggaa 780  
gggaaaaaga ggaaggcctg taagaactgc acctgtggcc ttgccgaaga actggaaaa 840  
gagaagtcaa gggaacagat gagctcccaa cccaagtcag cttgtggaaa ctgctacctg 900  
ggcgatgcct tccgctgtgc cagctgcccc taccttgga tgccagcctt caaacctggg 960  
gaaaagggtgc ttctgagtga tagcaatctt catgatgcct ag 1002

<210> 8  
<211> 333  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Pep-CIAPIN1 fusion protein  
<  
400> 8

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

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

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

210 215 220  
 Asp Met Glu Asp Asp Ser Met Asp Leu Ile Asp Ser Asp Glu Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Asp Pro Glu Asp Leu Lys Lys Pro Asp Pro Ala Ser Leu Arg Ala Ala  
 245 250 255  
 Ser Cys Gly Glu Gly Lys Lys Arg Lys Ala Cys Lys Asn Cys Thr Cys  
 260 265 270  
 Gly Leu Ala Glu Glu Leu Glu Lys Glu Lys Ser Arg Glu Gln Met Ser  
 275 280 285

Ser Gln Pro Lys Ser Ala Cys Gly Asn Cys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe  
 290 295 300  
 Arg Cys Ala Ser Cys Pro Tyr Leu Gly Met Pro Ala Phe Lys Pro Gly  
 305 310 315 320  
 Glu Lys Val Leu Leu Ser Asp Ser Asn Leu His Asp Ala  
 325 330

<210> 9

<211> 1002

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding CIAPIN1-Pep fusion protein

<400> 9

atggcagatt ttgggatctc tgctggccag tttgtggcag tggctctggga taagtcatcc 60

ccagtggagg ctctgaaagg tctggtggat aagcttcaag cgtaaccgg caatgagggc 120

cgcggtgtctg tggaaaacat caagcagctg ttgcaatctg cccacaaaga atccagcttt 180  
gacattatatt tgtcaggttt agtcccagga agcaccactc tgcacagtgc tgagattttg 240  
gctgaaatcg cccggatcct tcggcctggt ggatgtcttt ttctgaagga gccagtagag 300  
acagctgtag ataacaatag caaagtgaag acagcatcta agctgtgttc agccctgact 360  
ctttctggtc ttgtggaagt gaaagagctg cagcgggagc ccctaacccc tgaggaagta 420  
cagtctgttc gagaacacct tggatcatgaa agtgacaacc tgctgtttgt tcagatcaca 480

ggcaaaaaac caaactttga agtgggttct tctaggcagc ttaagctttc catcaccaag 540  
aagtctttct cttcagtga accgtctgtg gacctgtctg ctgccaagct gtggaccctc 600  
tcagccaacg atatggagga cgacagcatg gatctcattg actcagatga gctgctggat 660  
ccagaagatt tgaagaagcc agatccagct tcctgcggg ctgcttcttg tggggaaggg 720  
aaaaagagga aggcctgtaa gaactgcacc tgtggccttg ccgaagaact ggaaaaagag 780  
aagtcaaggg aacagatgag ctcccaaccc aagtcagctt gtggaaactg ctacctgggc 840  
gatgccttcc gctgtgccag ctgccctac cttgggatgc cagccttcaa acctggggaa 900

aaggtgcttc tgagtgatag caatcttcat gatgcctaga aagaaacctg gtgggaaacc 960  
tggtggaccg aatggtctca gccgaaaaaa aaacgtaaag tg 1002

<210> 10

<211> 333

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CIAPIN1-Pep fusion protein

<400> 10

Met Ala Asp Phe Gly Ile Ser Ala Gly Gln Phe Val Ala Val Val Trp

1 5 10 15

Asp Lys Ser Ser Pro Val Glu Ala Leu Lys Gly Leu Val Asp Lys Leu

20 25 30

Gln Ala Leu Thr Gly Asn Glu Gly Arg Val Ser Val Glu Asn Ile Lys

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Leu Val Pro Gly Ser Thr Thr Leu His Ser Ala Glu Ile Leu

65 70 75 80

Ala Glu Ile Ala Arg Ile Leu Arg Pro Gly Gly Cys Leu Phe Leu Lys

85 90 95  
 Glu Pro Val Glu Thr Ala Val Asp Asn Asn Ser Lys Val Lys Thr Ala  
 100 105 110  
 Ser Lys Leu Cys Ser Ala Leu Thr Leu Ser Gly Leu Val Glu Val Lys  
 115 120 125  
 Glu Leu Gln Arg Glu Pro Leu Thr Pro Glu Glu Val Gln Ser Val Arg  
 130 135 140  
 Glu His Leu Gly His Glu Ser Asp Asn Leu Leu Phe Val Gln Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Lys Pro Asn Phe Glu Val Gly Ser Ser Arg Gln Leu Lys Leu  
 165 170 175  
 Ser Ile Thr Lys Lys Ser Ser Pro Ser Val Lys Pro Ala Val Asp Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Ala Lys Leu Trp Thr Leu Ser Ala Asn Asp Met Glu Asp Asp  
 195 200 205  
 Ser Met Asp Leu Ile Asp Ser Asp Glu Leu Leu Asp Pro Glu Asp Leu  
 210 215 220  
 Lys Lys Pro Asp Pro Ala Ser Leu Arg Ala Ala Ser Cys Gly Glu Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Lys Arg Lys Ala Cys Lys Asn Cys Thr Cys Gly Leu Ala Glu Glu  
 245 250 255  
 Leu Glu Lys Glu Lys Ser Arg Glu Gln Met Ser Ser Gln Pro Lys Ser  
 260 265 270  
 Ala Cys Gly Asn Cys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe Arg Cys Ala Ser Cys  
 275 280 285  
 Pro Tyr Leu Gly Met Pro Ala Phe Lys Pro Gly Glu Lys Val Leu Leu  
 290 295 300  
 Ser Asp Ser Asn Leu His Asp Ala Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp  
 305 310 315 320  
 Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
 325 330

<210> 11  
 <211> 1065  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> polynucleotide coding Pep-CIAPIN1-Pep fusion protein

<400> 11  
 aaagaaacct ggigggaac ctggggacc gaatggctc agccgaaaa aaaacgtaaa 60  
 gtgatggcag attttgggat ctctgctggc cagtttggc cagtggctg ggataagtca 120  
 tccccagtgg aggtctgaa aggtctggg gataagctt aagcgtaac cggcaatgag 180  
 ggccgcgtgt ctgtggaaa catcaagcag ctgttgaat ctgccacaa agaatccagc 240  
  
 tttagacatta ttttgcagg tttagtcca ggaagcacca ctctgcacag tgctgagatt 300  
 ttggctgaaa tcgcccggat ctttcggcct ggtggatgtc ttttctgaa ggagccagta 360  
 gagacagctg tagatacaa tagcaaagt aagacagcat ctaagctgtg ttcagccctg 420  
 actctttctg gtcttggg agtgaaagag ctgcagcggg agcccctaac ccctgaggaa 480  
 gtacagtctg ttcgagaaca ctttggcat gaaagtgaca acctgctgtt tgttcagatc 540  
 acaggcaaaa aaccaaactt tgaagtggg tcttctaggc agcttaagct ttccatcacc 600  
 aagaagtctt ctcttcagt gaaacctgt gtggacctg ctgctgcaa gctgtggacc 660  
  
 ctctcagcca acgatatgga ggacgacagc atggatctca ttgactcaga tgagctgctg 720  
 gatccagaag atttgaagaa gccagatcca gcttcctgc gggctgctt ttgtggggaa 780  
 gggaaaaaga ggaaggcctg taagaactgc acctgtggc ttgccgaaga actggaaaaa 840  
 gagaagtcaa gggaacagat gagtcccaa ccaagtcag cttgtggaaa ctgctacctg 900  
 ggcatgcct tccgtgtgc cagctgccc taccttggga tgccagcctt caaacctggg 960  
 gaaaaggctg ttctgagtga tagcaatctt catgatgcct agaaagaaac ctgggtggaa 1020  
 acctgtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgt aagtg 1065

<210> 12  
 <211> 354  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Pep-CIAPIN1-Pep fusion protein

<400> 12  
 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 Met Ala Asp Phe Gly Ile Ser Ala Gly Gln Phe  
 20 25 30  
 Val Ala Val Val Trp Asp Lys Ser Ser Pro Val Glu Ala Leu Lys Gly  
 35 40 45  
 Leu Val Asp Lys Leu Gln Ala Leu Thr Gly Asn Glu Gly Arg Val Ser  
 50 55 60  
 Val Glu Asn Ile Lys Gln Leu Leu Gln Ser Ala His Lys Glu Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Phe Asp Ile Ile Leu Ser Gly Leu Val Pro Gly Ser Thr Thr Leu His  
 85 90 95  
 Ser Ala Glu Ile Leu Ala Glu Ile Ala Arg Ile Leu Arg Pro Gly Gly  
 100 105 110  
 Cys Leu Phe Leu Lys Glu Pro Val Glu Thr Ala Val Asp Asn Asn Ser  
 115 120 125  
 Lys Val Lys Thr Ala Ser Lys Leu Cys Ser Ala Leu Thr Leu Ser Gly  
 130 135 140  
 Leu Val Glu Val Lys Glu Leu Gln Arg Glu Pro Leu Thr Pro Glu Glu  
 145 150 155 160  
 Val Gln Ser Val Arg Glu His Leu Gly His Glu Ser Asp Asn Leu Leu  
 165 170 175  
 Phe Val Gln Ile Thr Gly Lys Lys Pro Asn Phe Glu Val Gly Ser Ser  
 180 185 190  
 Arg Gln Leu Lys Leu Ser Ile Thr Lys Lys Ser Ser Pro Ser Val Lys  
 195 200 205  
 Pro Ala Val Asp Pro Ala Ala Ala Lys Leu Trp Thr Leu Ser Ala Asn  
 210 215 220  
 Asp Met Glu Asp Asp Ser Met Asp Leu Ile Asp Ser Asp Glu Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Asp Pro Glu Asp Leu Lys Lys Pro Asp Pro Ala Ser Leu Arg Ala Ala  
 245 250 255  
 Ser Cys Gly Glu Gly Lys Lys Arg Lys Ala Cys Lys Asn Cys Thr Cys

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Gly Leu Ala Glu Glu Leu Glu Lys Glu Lys Ser Arg Glu Gln Met Ser |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Ser Gln Pro Lys Ser Ala Cys Gly Asn Cys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Arg Cys Ala Ser Cys Pro Tyr Leu Gly Met Pro Ala Phe Lys Pro Gly |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Glu Lys Val Leu Leu Ser Asp Ser Asn Leu His Asp Ala Lys Glu Thr |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Lys Val                                                         |     |     |