(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0109925
(43) 공개일자 2009년10월21일

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0035420
(22) 출원일자 2008년04월17일
심사청구일자 2008년04월17일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
최수영
강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105-706
음원식
강원 춘천시 후평2동 595번지 극동늘푸른아파트 101-301
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

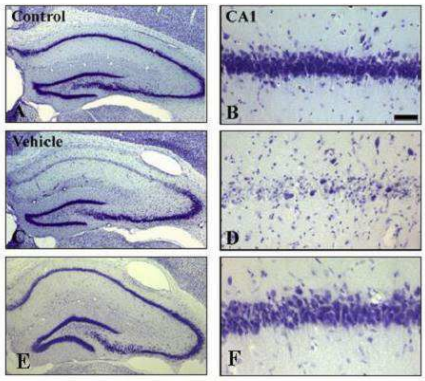
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 세포 투과성 ＳＡＧ 융합 단백질

(57) 요 약

본 발명은 SAG 융합 단백질에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 SAG 단백질의 일측 또는 양측 말단에 단백질 수송 도메인을 공유결합시킨 융합 단백질을 제조하여 폐 세포 또는 핵 내로 도입시키는 방법 및 융합 단백질을 이용한 약제학적 조성물, 피부 외용제 조성물, 화장료, 건강기능성 식품에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

장상호

강원도 춘천시 옥천동 1-1 한림창업보육센터 (바이오셀트란)

김대원

서울특별시 강남구 대치동 316 은마아파트 19동 103호

박진서

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105동 1404호

권형주

충북 청주시 상당구 용암동 2095 현대1차아파트 103-506

원무호

강원 춘천시 신북읍 용산리 147-2

특허청구의 범위

청구항 1

9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 SAG 단백질의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포투과성 SAG 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신,아르기닌) 중의 1종 이상인 것을 특징으로 하는 세포투과성 SAG 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 그 아미노산 서열이 서열번호 7과 같은 것을 특징으로 하는 세포투과성 SAG 융합 단백질.

청구항 4

SAG 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 상기 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 상기 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 세포 투과성 SAG 융합 단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드는 그 염기 서열이 서열번호 6과 같은 것을 특징으로 하는, SAG 융합 단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

상기 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 발현시키기 위하여 상기 제4항 또는 제5항의 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 SAG 융합 단백질 발현벡터.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 루게릭병, 당뇨, 뇌허혈, 파킨슨병, 치매, 중금속 중독, 심혈관 질환, 피부 염증, 가려움증 및 아토피 피부염 중 1 이상의 질병의 예방 및 치료제로서 사용되는 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하며, 루게릭병, 당뇨, 뇌허혈, 파킨슨병, 치매, 중금속 중독, 심혈관 질환, 피부 염증, 가려움증 및 아토피 피부염 중 1 이상의 질병의 예방 및 개선 효과가 있는 건강 기능성 식품 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하며, 아토피 피부염, 피부 질환 및 가려움증의 예방 및 개선 효과가 있는 피부 외용제 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 세포 투과성 SAG 융합 단백질에 관한 것으로서, SAG 단백질의 적어도 일측 말단에 HIV Tat 단백질 수송 도메인이 공유결합된 융합 단백질에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 활성산소종(reactive oxygen species)은 산소를 이용하여 에너지를 얻는 모든 생명체에서, 여러 세포 내 대사과정의 부산물로 필연적으로 생성된다. 이러한 활성산소종은 세포 내의 단백질, 핵산 및 지방과 같은 생체고분자에 손상을 입히며. 인체의 여러 질병의 진행과정과 깊게 관련되어 있다. 특히, 발암과정, 뇌졸중, 관절염, 동맥경화, 방사선 손상 및 염증반응에 관여하며 정상적인 노화과정에서도 노화를 촉진하는 중요한 요인으로 작용한다.

<3> 파킨슨병(Parkinson's diseases)은 대뇌의 흑질(substantia nigra)에 존재하는 도파민성 신경세포(dopaminergic neuron)가 소실되는 퇴행성 신경질환으로 점진적인 도파민의 결핍으로 인한 운동기능의 장애를 나타나게 되며 대표적으로 떨림(tremor), 경직(rigidity), 체위(postuer) 및 서행(bradykinesia) 등의 증상을 특징으로 한다. 파킨슨병은 인류복지 향상과 함께 인구의 노령화가 진행되면서 치매(Alzheimer's disease) 및 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)과 더불어 대표적인 퇴행성 신경질환으로 발병빈도가 점진적으로 높아지고 있는 실정이다.

<4> SAG(Sensitive to apoptosis gene) 단백질은 새로운 징크 링 핑거(zinc RING finger) 단백질로 산화 스트레스에 의한 아폽토시스로부터 세포를 보호하거나, 유해산소 제거 및 구리, 아연 등 금속이온의 킬레이터로 작용하여 세포사멸을 막아준다. SAG는 세포질 및 핵에 존재하는 작은 단백질로서, 아직까지 항산화 작용 기전 및 성질에 대해서는 많이 밝혀지지 않은 상태이다.

<5> 최근에는 질병을 예방하거나 치료하기 위한 목적으로 통상 사용되던 화학합성 약제 대신 유전자 치료가 주목받고 있다. 그러나 유전자 치료는 유전자의 운반방법이 용이하지 않고, 표적세포에서 유전자의 발현이 낮고, 세포에서 단백질이 발현되는 기간이 짧고, 표적세포에서 발현되는 단백질의 양을 인위적으로 조절하기가 매우 어려운 점 등 여러 가지 문제점이 있다.

<6> 그리하여 상기 유전자 치료 대신 단백질 치료법에 대한 관심이 높아지고 있다. 질병 치료를 위한 약물이나 단백질을 세포 내로 이동시키는데 있어서 세포막을 거쳐 목표 단백질을 직접 전달하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나 단백질은 크기나 여러 가지 생화학적 성질 때문에 세포막을 통과하기가 매우 어렵다. 일반적으로 분자량 600 달톤 이상의 물질은 세포막을 통과하기가 거의 불가능한 것으로 알려져 있다.

<7> 사람 면역결핍 바이러스(Hunan Immunodeficiency Virus type-1) 단백질의 일종인 Tat(transactivator of transcription) 단백질은 효율적으로 세포막을 통과하여 세포질 내로 쉽게 이동한다는 것이 밝혀졌다. 이러한 기능은 Tat 단백질의 중간부위인 단백질 형질도입 부위(Protein Transduction Domain; "PTD")의 특성 때문에 나타나며 아직 그 정확한 기전은 알려지지 않은 상태이다. 그러나 Tat 단백질의 세포막 통과에는 특정 수용체나 운반체가 관여하지 않는 것으로 보이며 단백질 형질도입 부위가 직접 막의 지질 이중층과 작용함으로써 일어나는 것으로 이해하고 있다.

<8> 그러나, HIV-Tat의 단백질 형질도입 부위와 융합한 모든 단백질이 세포 내로 원활히 도입되어 단백질 활성을 나타내는 것은 아니다. 즉, 세포 내로 도입되었으나 활성을 나타내지 못하는 Tat 융합 단백질에 대한 보고들이 있다.(Sengoku, T. et al., ***Experimental Neurology*** 188(2004) 161-170; Falnes P.O. et al. ***Biochemistry*** 2001 Apr 10;40(14):4349-4358).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<9> 본 발명의 목적은 천식, 아토피 등의 면역 및 염증질환의 치료 및 예방에 유용한 SAG 단백질을 세포 내로 효율적으로 도입할 수 있는 방법을 제공하려는 것이다.

<10> 또한, 본 발명의 목적은 피부 염증, 가려움증, 아토피 등의 면역 및 염증질환, 파킨슨, 치매. 뇌허혈 등의 뇌질환, 심혈관 질환, 중금속 중독의 예방 또는 치료제로서 사용가능한 SAG 융합 단백질을 제공하려는 것이다.

<11> 또한, 본 발명의 목적은 상기 세포 투과성 SAG 융합 단백질을 주요성분으로 포함하는 천식, 아토피 등의 면역 및 염증질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하려는 것이다.

<12> 뿐만 아니라, 본 발명의 목적은 상기 세포 투과성 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 건강기능성 식품 조성물을 제공하려는 것이다.

과제 해결수단

<13> 따라서, 본 발명자들은 Tat 단백질의 단백질 형질도입 부위를 외부단백질인 사람 SAG 단백질에 융합된 Tat-SAG 융합 단백질을 제조하였고, 제조된 융합 단백질을 대장균에서 과대발현시켰으며, 금속 킬레이팅 친화 크로마토그래피로 쉽고 편리하게 정제하였다. 정제된 융합 단백질이 효과적으로 세포 내로 투과되어 SAG 단백질의 발현을 증가시키는지를 신경세포 및 동물모델을 이용한 연구에서 확인하였다. 즉, SAG 융합 단백질을 증가시킴으로써 산화 스트레스에 의한 신경 세포사를 억제함을 밝혀냈다.

효 과

<14> 본 발명은 SAG 융합 단백질을 단백질 수준에서 세포 내로 운반하여 단백질 치료제로 응용 가능함을 최초로 밝힌 것이다.

<15> 유해산소는 세포 내 생체고분자에 손상을 입히며, 보고된 바로는 100여 종의 인간 질병의 진행과정과 깊게 관련되어 있다. 따라서 이러한 유해산소에 의한 손상을 보호 및 치료하는데 있어서 SAG를 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

<16> 본 발명을 바탕으로 Tat-SAG를 세포 내로 직접 전달하여 우리 인체에 해로운 유해산소로부터 세포 및 조직을 보호할 수 있기 때문에 루게릭, 당뇨, 뇌허혈, 파킨슨병과 같은 퇴행성 난치성 질환과 아토피 피부염 등의 병증을 예방 및/또는 치료하는 약제 또는 기능성 화장품 등으로 광범위하게 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<17> 본 발명자들은 먼저 Tat-SAG 융합 단백질을 과대발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 Tat-SAG 발현벡터를 개발하였다. 이 발현벡터는 인간 SAG cDNA, Tat 펩타이드 그리고 6개의 히스티딘이 연속적으로 연결되어 있다. 이 발현벡터를 이용하여 Tat-SAG 융합 단백질을 대장균에서 과대발현시켜 자연상태로 Ni^{2+}-친화 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 정제하였다. Tat-SAG 과대발현은 높게 나타났으며, 정제된 단백질의 양도 높게 나타났다. 웨스턴 블랏으로 배양된 신경세포에 정제된 Tat-SAG 융합 단백질이 농도 및 시간 의존적으로 세포에 운반되는 것을 확인하였고, 세포 내로 투과된 Tat-SAG는 세포 내에서 48시간 지속적으로 유지되었으며, 유해산소에 의한 세포사멸을 효과적으로 억제하였다. 또한, Tat-SAG는 뇌허혈 질환 동물모델의 조직에도 효율적으로 투과되어 산화 스트레스에 의한 신경세포의 사멸을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

<18> 이러한 결과는 Tat-SAG가 세포 내로 투과가 잘 일어나고, 세포 내에서 SAG 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 이러한 Tat-SAG 융합 단백질은 유해산소와 관련하여 뇌 질환 및 다양한 질환 치료 분야에 다양하게 응용될 가능성을 제시해 준다.

<19> 본 발명은 9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 SAG 단백질의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포투과성 SAG 융합 단백질을 제공한다.

<20> 본 발명은 상기 수송도메인이 HIV Tat 49-57 잔기, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신,아르기닌) 중의 1종 이상인 것을 특징으로 하는 세포투과성 SAG 융합 단백질을 제공한다.

<21> 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질의 아미노산 서열이 서열번호 7과 같은 것을 특징으로 하는 세포투과성 SAG 융합 단백질을 제공한다.

<22> 본 발명은 SAG 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 상기 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 상기 세포 투과성 SAG 융합 단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

<23> 본 발명은 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드의 염기 서열이 서열번호 6과 같은 것을 특징으로 하는, SAG 융합 단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

<24> 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 발현시키기 위하여 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 예컨대 도 1과 같은 구조의 SAG 융합 단백질 발현벡터를 제공한다.

<25> 또한, 본 발명은 상기 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 루게릭병, 당뇨, 뇌허혈, 파킨슨병, 치매, 중금속 중독, 심혈관 질환, 피부 염증, 가려움증 및 아토피 피부염 중 1 이상의 질병의 예방 및 치료제로서 사용되는 약제학적 조성물을 제공한다.

<26> 또한, 본 발명은 상기 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하며, 루게릭병, 당뇨, 뇌허혈, 파킨슨병, 치매, 중금속 중독, 심혈관 질환, 피부 염증, 가려움증 및 아토피 피부염 중 1 이상의 질병의 예방 및 개선 효과가 있는 건강

기능성 식품 조성물을 제공한다.

<27> 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하며, 아토피 피부염, 피부 질환 및 가려움증의 예방 및 개선 효과가 있는 피부 외용제 조성물을 제공한다.

<28> Tat-SAG 융합 단백질을 포함하여 수송도메인 융합 단백질을 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, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탤크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

<29> 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내 , 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있으며, 천식에 적용하는 경우에는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 널리 알려진 바와 같이 흡입 방식이나 스프레이 방식의 제제로 제형화할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.001~100㎎/㎏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.

<30> 본 발명은 또한, 상기 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하는 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 SAG 융합 단백질은 루게릭병, 뇌허혈, 파킨슨병, 치매와 같은 뇌 질환, 당뇨, 중금속 중독, 심혈관 질환, 피부염증, 가려움증 및 아토피 피부염의 예방 또는 치료의 효과를 위한 건강기능성 식품으로 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 SAG 융합 단백질을 첨가할 수 있는 식품으로는 분말, 과립, 정제, 캡슐형태의 각종 식품류, 음료, 차 등을 들 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양, 즉 일반적으로 본 발명의 건강기능성 식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 20% 중량으로 가할 수 있다. 본 발명의 음료 조성물은 지시된 비율로, 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당, 말토스, 슈크로스, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 및 합성 향미제를 가할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 10g이다.

<31> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 특별히 제한되어 있는 것은 아니나, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부당 0 내지 약 20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<32> 본 발명은 또한, 상기 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하는 화장료 조성물을 비롯한 피부 외용제 조성물을 제공한다. 본 발명의 융합 단백질을 유효성분으로 하는 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 SAG 융합 단백질을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.

<33> 뿐만 아니라, 본 발명의 융합 단백질은 화장료로서 이용할 수 있는데, pH 조절제, 향료, 유화제, 방부제 등을 필요에 따라 부가하여 통상의 화장료 제조 방법으로 화장수, 크림, 젤, 샴푸, 린스, 헤어 컨디셔너, 화장비누, 클렌저, 수용성 파우더, 지용성 파우더, 수용성 리퀴드, 크림 또는 에센스 등으로 제형화될 수 있다.

<34> 본 발명은 또한 SAG 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 SAG 단백

질 분자의 세포 내 전달은 HIV Tat 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합 단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 aa 49-57의 아홉 개의 아미노산으로 구성되고, 서열번호 1과 같은 아미노산 서열로 이루어진 HIV Tat 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 서열번호 1의 Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 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 융합 단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

<35> 구체적으로, 본 발명은 SAG 융합 단백질, 이 융합 단백질을 제조하기 위한 재조합 뉴클레오타이드와 벡터, 이 융합 단백질을 포함하는 치료, 예방 목적의 약학 조성물, 건강 기능성 식품 등에 관한 것이다.

<36> 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

<37> "SAG 융합 단백질"이란 단백질 수송 도메인과 SAG를 포함하며, 수송 도메인과 목표 단백질(즉, 본 발명에서는 SAG를 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "Tat-SAG" 또는 "Tat-SAG 융합 단백질"와 혼용하였다.

<38> "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 SAG 단백질을 의미한다.

<39> "융합 단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.

<40> 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

<41> 또한, "표적 세포"란 수송도메인에 의해 목표 단백질이 전달되는 세포를 의미하는 것으로서, 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 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 동물세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.

<42> 본 발명에서의 "수송 도메인"은 고분자 유기화합물, 예컨대 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, 단백질, 올리고당 또는 다당류 등과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 유기화합물들을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말한다.

<43> 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

<44> 본 발명은 9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 SAG의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 SAG 융합 단백질을 제공한다.

<45> 또한, 본 발명에서 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신,아르기닌) 중의 1종 이상인 것을 특징으로 한다.

<46> 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질의 그 아미노산 서열이 서열번호 7과 같은 것을 특징으로 한다.

<47> 또한, 본 발명은 SAG 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 상기 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 SAG 융합 단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

<48> 또한, 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드는 그 염기 서열이 서열번호 6과 같은 것을 특징으로 한다.

<49> 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 발현시키기 위한 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 SAG 융합 단백질 발현벡터를 제공한다.

<50> 또한, 본 발명은 상기 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 천식, 피부염, 아토피 피부염 등 면역성 질환 또는 염증질환의 예방 및 치료제로서 사용되는 약제학적 조성물을 제공한다.

<51> 나아가, 본 발명은 상기 SAG 융합 단백질을 유효성분으로 하며, 천식, 피부염, 아토피 피부염 등 면역성 질환

또는 염증질환의 예방 및 개선 효과가 있는 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

<52> 본 발명은 9~15개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 SAG 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포도입성(cell-transducing) SAG 융합 단백질에 관한 것이다.

<53> 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.

<54> 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. 음성 전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합 단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

<55> 또한, 본 발명은 SAG cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 세포도입성 융합 단백질을 코딩하는 서열번호 6번을 비롯한 재조합 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명의 범위는 서열번호 6번의 재조합 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 유전암호의 코돈 축퇴성(codon degeneracy)에 의한 서열을 갖는 핵산분자들에도 미친다.

<56> 이하, 본 발명의 구성을 아래의 실시예의 기재를 통하여 좀더 상세히 알아본다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재에만 한정된 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 자명하다.

<57> 특별히 아래 실시예에는 Tat 수송 도메인이 SAG 단백질의 N-말단에 융합된 단백질인 Tat-SAG 융합 단백질에 대한 실시예를 기재하였으나, 이 외에도 본 발명자들은 9개의 아르기닌으로 이루어진 수송 도메인이 SAG 단백질과 융합한 형태의 SAG 융합 단백질을 제조하여 아래 실시예와 동일한 실험을 수행한 결과 세포 침투성 및 활성에 있어서 Tat-SAG 융합 단백질의 90%에 육박하는 결과를 얻었다(데이터 미기재). 이로부터 본 발명의 범위가 시열번호 7의 Tat-SAG 융합 단백질에만 한정되는 것이 아님을 분명히 밝혀둔다.

<58> **재료**

<59> 제한 효소와 T4 DNA 리가아제는 Promega(USA)에서 구입하였고, Pfu 중합효소는 stratagene(USA)에서 구입하였다. Tat 올리고뉴클레오타이드는 Gibco BRL custom primer(USA)에서 합성하였다. IPTG는 Duchefa(Netherland)에서 구입하였다. pET-15b와 BL21(DE3) 플라스미드는 Novagen(USA)에서 구입하였고, Ni-니트릴로트리아세트산 세파로즈 슈퍼플로우는 Qiagen(Germany)에서 구입하였다. 사람 SAG cDNA는 PCR 방법으로 사람 간 cDNA 라이브러리에서 분리하였다. 이외 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

<60> **실시예 1: 재조합 Tat-SAG 융합 단백질의 발현벡터 제조 및 형질변환**

<61> Tat-SAG 융합 단백질을 생산하기 위하여 우선, HIV-1 Tat의 염기성 도메인(아미노산 49-57)이 포함된 pET-Tat 발현벡터를 만들었다. Tat 염기성 도메인에 해당하는 두 종류의 올리고뉴클레오타이드(상위 쇄, 5'-TAGGAAGAAGCGGAGA CAGCGACGAAGAC-3'; 하위 쇄, 5'-TCGAGTCTTCGTCGCTGTCT CCGCTTCTTCC-3')를 *NdeI-XhoI* 제한효소로 자른 pET15b에 연결하여 삽입하였다. 이어, 사람 SAG cDNA의 서열을 기본으로 하여 2종류의 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다. 정방향 프라이머는 5'-CTCGAGATGGCCGACGTGGAAGACGGAGAG-3'로 *Xho*I 제한 부위를 지니고 있으며 역방향 프라이머의 서열은 5'-GGATCC TCATTTGCCGATTCTTTGGACCAC-3'로 *Bam*HI 제한 부위를 갖는다.

<62> 중합효소 연쇄반응(PCR)은 온열 순환기(Perkin-Elmer, model 9600)에서 수행하였으며, 반응 혼합액을 50㎕ 실리콘 튜브에 넣고 94℃에서 5분간 가열하였다. PCR 반응은 94℃에서 40초간 30사이클의 연장(extension), 54℃에서 1분간 변성(denaturation), 70℃에서 3분간 어닐링(annealing), 그리고 72℃에서 10분, 20℃에서 5분간 최종 연장(final extension)을 유도하였다. PCR 수행 후 아가로즈 젤 전기영동으로 반응물을 분리하고 이것을 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, Sandiego, USA)에 연결한 후 벡터를 컴피턴트 세포에 형질변환시키고 형질변환된 박테리아로부터 플라스미드를 알칼리 용균법으로 분리하였다. 사람 SAG cDNA가 포함된 TA 벡터를 *Xho*Ⅰ과 *Bam*HⅠ으로 절단한 다음 HIV-1 Tat 발현벡터에 삽입하였다. Tat-SAG로 형질변환된 *E. coli* BL21(DE3)를 선택한 다음, 콜로니를 100㎖ LB 배지에 접종하고 IPTG(0.5mM)를 배지 내에 첨가하여 재조합된 Tat-SAG의 과대발현을 유도하였다. 과대발현된 Tat-SAG는 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다.

<63> **실시예 2: 재조합 Tat-SAG 융합 단백질의 발현 및 정제**

<64> 본 발명자들이 제조한 인간 SAG cDNA가 포함되어 있는 *E. coli* BL21(DE3) 세포를 암피실린이 포함된 LB 배지에 넣고 37℃에서 200rpm으로 교반하며 배양하였다. 배양액 내의 박테리아 농도가 $O.D_{600}$ = 0.5~1.0을 나타낼 때 IPTG를 배지 내에 첨가하여 최종농도가 0.5mM 되게 한 다음 30℃에서 12시간을 더 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리 하여 모은 뒤 5㎖ 결합 완충액(5mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)를 넣고 초음파 분쇄기로 분쇄(sonication)하였다. 원심분리하여 상층액을 즉시 Ni^{2+}-니트릴로 트리아세트산 세파로즈 슈퍼플로우(Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid sepharose superflow) 컬럼에 부하하고 10배 부피의 결합 완충액과 6배 부피의 세척 완충액(60mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)로 세척한 다음 용출 완충액(1M 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 융합 단백질을 용출하였다. 융합 단백질이 포함된 분획들을 모아 PD-10 컬럼을 이용하여 분획 중에 포함된 염분을 제거하였다. 정제된 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준물질로 사용하여 Bradford 방법으로 측정하였다.

<65> **실시예 3: 세포배양 및 SAG 융합 단백질의 세포 내 투과**

<66> 신경세포의 일종인 C6 성상세포(astrocyte)는 37℃에서 95% 공기와 5% CO_2를 공급해주며 10% FBS(fetal bovine serum) 및 항생제(100㎍/㎖ 스트렙토마이신, 100U/㎖ 페니실린)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 배양하였다.

<67> SAG 융합 단백질의 세포 내 투과를 관찰하기 위하여, 신경세포를 6웰 플레이트에서 4~6시간 동안 키운 뒤 10% FBS가 포함된 신선한 DMEM 배양액으로 교체하고, 재조합 Tat-SAG(1-3μM)를 배양액 내에 처리하였다. 1시간 뒤 세포를 트립신-EDTA(Gibco BRL)로 처리하고 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; "PBS")로 충분히 세척하였다. 세포를 분쇄한 다음 세포 내로 투과된 SAG의 양을 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였다.

<68> **실시예 4: 웨스턴 블랏 분석**

<69> SAG 융합 단백질의 세포 내 투과를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏 방법을 수행하였다. 세포에 Tat-SAG(1-3μM)의 융합 단백질을 처리한 다음 1시간 후, 세포들만 모아서 웨스턴 블랏을 수행하였다. 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 젤로 분리한 다음 젤에 있는 단백질을 니트로셀룰로스 멤브레인 (nitrocellulose membrane; Amersham, UK)으로 전기이동시켰다. 단백질이 이동된 니트로셀룰로스 멤브레인을 5% 탈지분유(non-dry milk)가 들어 있는 PBS로 블로킹하였다. 이어 멤브레인은 래빗 항-히스티딘 폴리클론 항체(polyclonal antibody; Santacruze, USA, 1:1,000)로 1시간 처리하였다. 세척 후, 호스래디쉬 퍼옥시다아제-결합된 마우스 항-래빗 IgG 항체 (1:10,000 희석)와 1시간 반응시켰다. 최종적으로 ECL 키트(ECL; Amersham)를 이용하여 단백질 띠를 확인하였다.

<70> **실시예 5: MTT 분석**

<71> 배양된 신경세포에 Tat-SAG(1-3μM)을 처리하고 세척한 다음 1.2mM H_2O_2을 12시간 동안 처리하여 배양하였다. 산화 스트레스에 의한 세포의 생존률은 MTT[3-(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]를 이용하여 측정하였다.

<72> **실시예 6: 면역조직염색 (Immunohistochemistry)**

<73> Tat-SAG 융합 단백질이 뇌 조직 내로 투과하여 신경세포를 보호하는지 확인하기 위해서 조직면역염색을 실시하였다. 실험동물은 수컷 저빌 마우스를 사용하였다. 실험동물은 질소와 산소 혼합가스에 들어있는 3% 이소플루란으로 마취시켰으며, 뇌 조직을 냉동조직 절편으로 만들었다.

<74> 면역조직화학 염색에 앞서 냉동조직 절편을 상온에서 30분간 건조한 후 37℃에서 2시간 이상 완전히 말린 다음 실험을 시작하였다. 조직 절편은 0.01M PBS(Phosphate Buffered Saline)로 10분간 완충시킨 후 다시 증류수로 10분간 세척하였다. 이후 7분씩 2회 PBS로 세척한 다음 조직 내의 내인성 과산화효소 (peroxidase)를 제거하기 위해서 0.5% 과산화수소가 함유된 PBS 용액에서 20분간 반응시켰다. 이후 PBS로 7분씩 2회 세척한 후 비-특이적 반응을 방지하기 위하여 조직을 PBS에 들어있는 5% 정상 염소 혈청에 30분간 반응시켰다. 이후 과정은 통상적인 스트렙타비딘-바이오틴 퍼옥시다제법을 이용한 면역조직화학반응을 실시하였다.

<75> 1차 항체는 토끼 항-마우스 히스티딘 항체(Santa cruz, USA)를 사용하였다. 면역조직화학반응에 이용된 모든 항체는 2% 정상 염소 혈청 및 0.1% triton X-100이 함유된 0.1M PBS(pH 7.4)에 희석하여 사용하였다. 피부 조직

은 1차 항체를 1:500으로 희석하여 4℃에서 48시간 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체로 바이오틴 결합된 토끼 항-마우스 IgG(Vector, USA)를 1:200으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 1:200으로 희석한 퍼옥시다제 결합된 스트렙타비딘(Vector, USA)에 상온에서 2시간 반응시켰다. 이상 각 단계의 반응 후에는 PBS 용액으로 4~5차례 세척하였다.

<76> 항원항체반응이 끝난 조직은 0.03% 과산화수소와 0.05% DAB(3,3´- diaminobenzidine tetrachloride; Sigma, USA)가 함유된 트리스 완충액(pH 7.4)에서 1~5분간 발색시켰다. 발색반응이 끝난 조직은 수세 후 수용성 봉입제인 크리스탈 마운트(Biomeda, USA)를 이용하여 봉입한 다음 현미경 관찰 후 사진촬영(Axioscope microscope; Carl Zeiss, Germany)하였다.

<77> 위 방법에 의하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

<78> **결과 1: 재조합 SAG 융합 단백질의 과대발현 및 정제**

<79> Tat-SAG 융합 단백질을 과대발현시키기 위하여 SAG, Tat의 형질 도입부위 (Tat49-57) 및 6개의 히스티딘에 대한 cDNA가 연속적으로 포함되어 있는 Tat-SAG 발현 벡터를 개발하였다(도 1).

<80> IPTG로 융합 단백질의 과대발현을 유도한 대장균 세포를 4℃에서 초음파 분쇄기로 파쇄한 다음 원심분리하여 상층액의 단백질을 12% SDS-PAGE로 분리하였다. 도 2는 Tat-SAG 과대발현과 정제된 단백질을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색한 단백질 띠(도 2A)와 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이다(도 2B). 도 2A는 0.5mM IPTG를 처리하여 융합 단백질이 과대발현된 것을 잘 보여주고 있다.

<81> Tat-SAG 융합 단백질은 N-말단에 6개의 히스티딘을 포함하고 있기 때문에 고정 금속-킬레이트 친화 크로마토그래피(immobilized metal-chelate affinity chromatography) 단일 단계로 융합 단백질을 자연상태로 순수하게 (순도 〉95%) 정제할 수 있었다(도 2A). 정제된 Tat-SAG 융합 단백질을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하여 확인하였다.

<82> 과대발현 및 정제된 Tat-SAG 융합 단백질을 웨스턴 블랏팅으로 다시 한 번 확인하였다. 도 2B에 나타낸 바와 같이 Tat-SAG 띠는 도 2A의 단백질 띠와 동일한 위치에서 관찰되었다.

<83> **결과 2: SAG 융합 단백질의 신경세포 투과**

<84> 정제한 Tat-SAG 융합 단백질의 신경 세포 내 투과가 농도에 따라 어떻게 변화되는지를 관찰하였다. 도 3에 나타낸 것처럼 Tat-SAG는 농도 의존적으로 신경 세포 내로 투과되는 것을 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다. 도 3A는 0.5-5μM Tat-SAG를 1시간 동안 세포배양액 내에 처리하였을 때의 결과이다. Tat-SAG의 세포 내 투과 정도를 농도별로 관찰했을 때, 농도 의존적으로 세포 내로 투과된 Tat-SAG의 양이 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 Tat-SAG 융합 단백질이 농도 의존적으로 세포 내로 투과함을 알 수 있었다. 또한, 시간별로 관찰하였을 경우 투여 10분 이내에 투과된 융합 단백질을 확인할 수 있었고, 처리 시간에 비례하여 세포 내로 투과된 Tat-SAG의 양이 증가함을 확인하였다(도 3B). 즉, Tat-SAG 융합 단백질은 시간 및 농도 의존적으로 세포 내로 투과한다는 것을 알 수 있었다.

<85> 신경세포 내로 투과된 Tat-SAG는 상당한 기간 동안 세포 내에서 안정성을 유지해야만 효과적으로 단백질 치료에 응용할 수 있다. 도 3C에 나타낸 바와 같이 세포 내로 투과된 Tat-SAG는 시간에 따라 분해되어 단백질의 양이 점차 감소하였으나, 최소 48시간 동안 세포 내에서 존재함을 알 수 있었다. 따라서 세포 내로 투과된 Tat-SAG는 최소 48시간은 안정성을 유지하고 있기 때문에 유용하게 단백질치료에 응용할 수 있으리라 사료된다.

<86>

<87> **결과 3: SAG 융합 단백질의 생물학적 기능**

<88> 신경 세포 내로 투과된 융합 단백질은 그 고유한 활성을 유지해야만 이를 단백질 치료에 응용할 수 있다. 따라서 세포 내로 투과된 융합 단백질이 어느 정도 생물학적인 활성을 지니는지는 매우 중요한 문제이다. 따라서 정제된 Tat-SAG 단백질들의 생물학적 기능을 알아보기 위해 H_2O_2에 의해 산화 스트레스가 유발된 세포의 생존율(cell viability)을 MTT 어세이로 확인하였다(도 4). 정제한 Tat-SAG 융합 단백질을 신경세포에 H_2O_2(1.2mM)과 Tat-SAG(0.5-5μM) 농도로 처리한 후 세포 생존율을 측정한 결과 융합 단백질이 농도별로 H_2O_2에 의한 세포사를 억제함을 확인하였다. SAG 융합 단백질이 침투된 세포의 생존율 증가는 이 융합 단백질이 H_2O_2에 의한 세포사멸을 효과적으로 억제함을 말해준다.

<89> **결과 4: 동물실험에서 SAG 융합 단백질의 세포 보호효과**

<90> 뇌허혈 동물모델에서 재조합 융합 단백질의 세포사 저해효과를 확인하기 위해서 SAG 융합 단백질 300㎍을 뇌허혈 유발 30분 전에 복강주사하고 4일 후 조직면역염색으로 확인하였다. 도 5와 같이, Tat-SAG 융합 단백질은 신경세포를 거의 완벽하게 보호함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 SAG 융합 단백질이 세포 내로 효과적으로 침투되며 신경 세포사멸을 억제함을 의미한다.

도면의 간단한 설명

<91> 도 1은 Tat-SAG 융합 단백질의 발현 벡터를 나타낸다.

<92> 도 2는 Tat-SAG 융합 단백질의 정제를 나타낸다. 발현되고 정제된 융합 단백질은 12% SDS-PAGE로 분석했고(A) 항래빗 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏팅하였다(B).

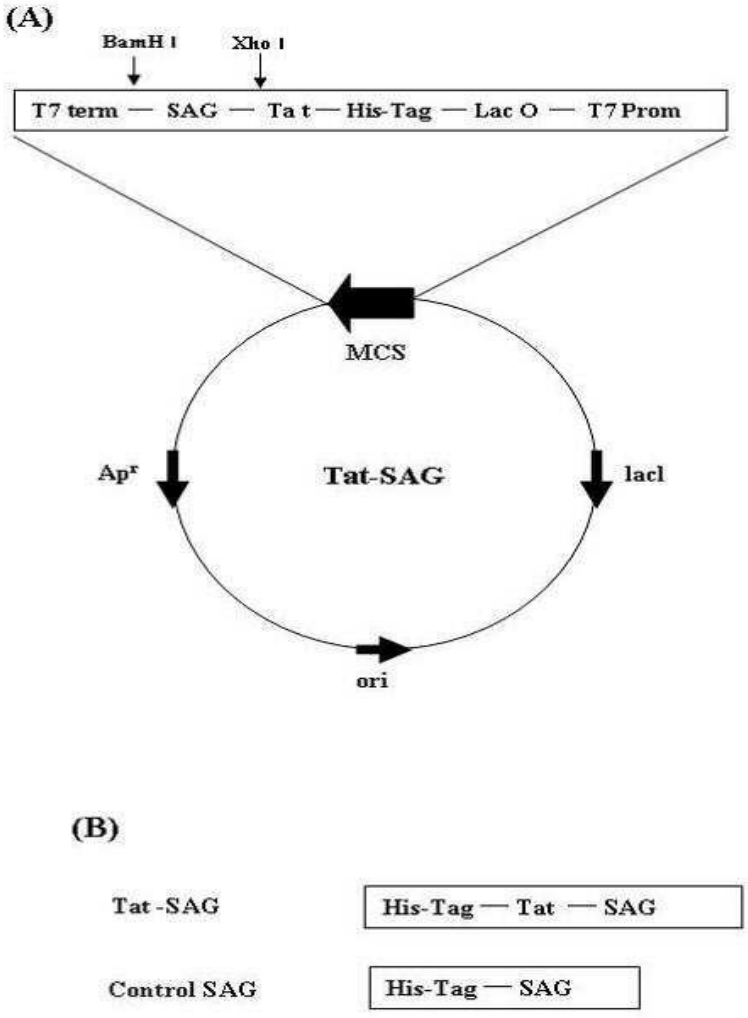
<93> 도 3은 Tat-SAG 융합 단백질이 배양한 성상세포 내로 도입되는 것을 나타낸다. 0.5-5㎛M의 Tat-SAG 융합 단백질을 60분간 배양배지에 가하였다(A). 5㎛M의 Tat-SAG 융합 단백질을 10-60분간 배양배지에 가하였다(B). 5㎛M의 Tat-SAG 융합 단백질을 도입시킨 세포를 1-60시간 동안 배양하였다(C). 분석은 웨스턴 블랏팅으로 하였다.

<94> 도 4는 성상세포의 생존율에 미치는 세포도입된 Tat-SAG 융합 단백질의 영향을 나타낸다. 0.5-5 ㎛M Tat-SAG 융합 단백질로 1시간 침투시킨 성상세포에 H_2O_2(1.2mM)를 가하여 세포 생존율을 MTT를 이용하여 측정하였다.

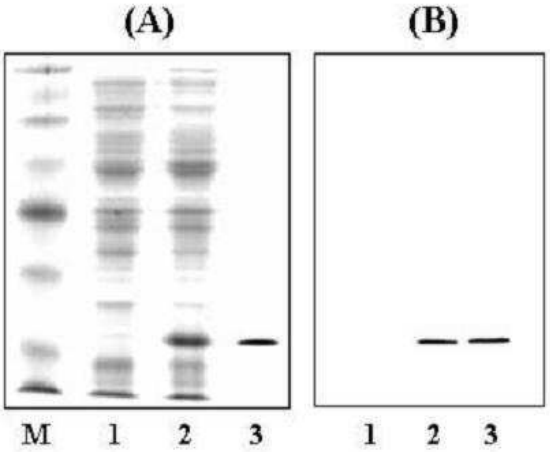
<95> 도 5는 허혈성 발작(ischemic insult) 이후 신경세포 생존율에 Tat-SAG 융합 단백질의 영향을 나타낸다. (A) 허혈성 발작 4일 후 저빌 뇌의 해마를 크리스탈 바이올렛 염색한 사진. 음성 대조군(A와 B, 정상), 양성 대조군(C와 D, 담체 주사 그룹), 발작 이후 300㎍ Tat-SAG 융합 단백질을 주사한 저빌(E와 F). 스케일 막대: a, b 및 c, 400㎛, d, e 및 f, 50㎛. (B) 신경세포 밀도. 막대는 7마리 저빌의 평균값 ± 표준편차임.

도면

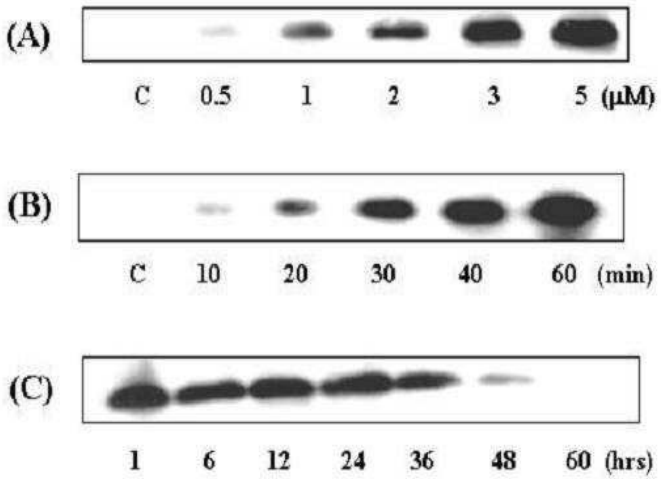
도면1


(A)
BamH I
Xho I
T7 term — SAG — Ta t — His-Tag — Lac O — T7 Prom
MCS
Ap^r
Tat-SAG
lacI
ori
(B)
Tat -SAG
His-Tag — Tat — SAG
Control SAG
His-Tag — SAG

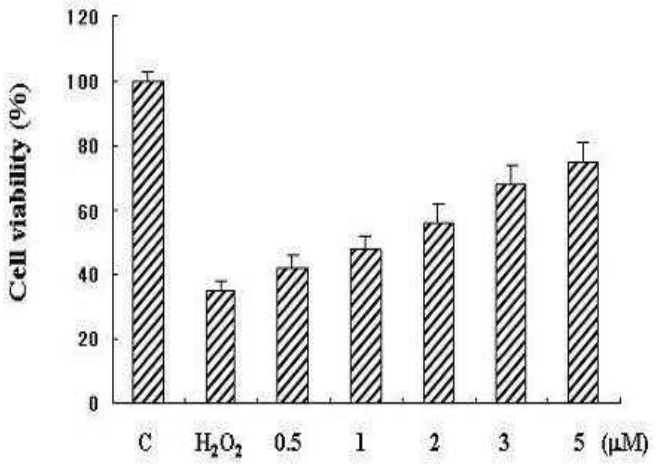
도면2


(A)
(B)
M
1
2
3
1
2
3

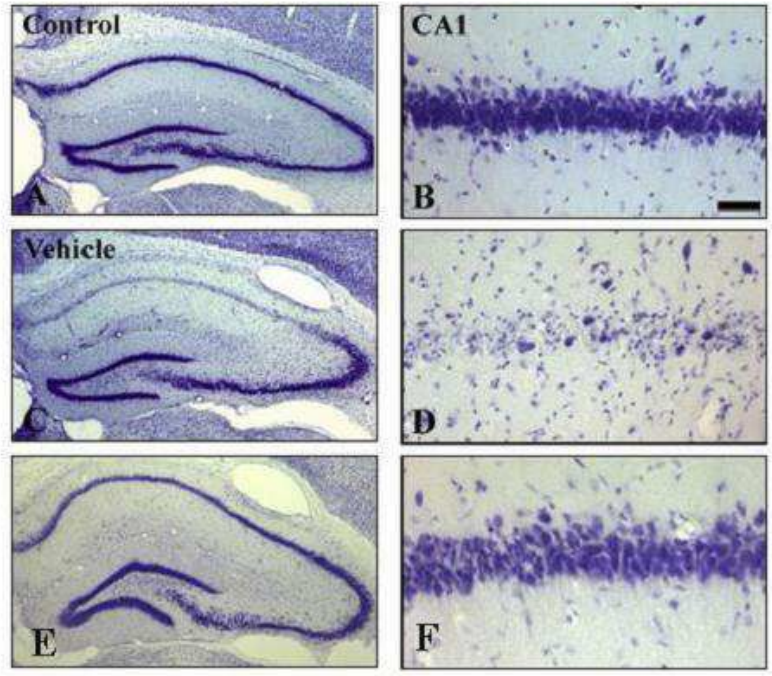
도면3


(A)
C
0.5
1
2
3
5 (μM)
(B)
C
10
20
30
40
60 (min)
(C)
1
6
12
24
36
48
60 (hrs)

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Industry Academic Foundation Corporation, Hallym University
<120> CELL-TRANSDUCING SAG FUSION PROTEIN

<130> hallymU-tatSAG

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 29
<212> DNA
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 1
taggaagaag cggagacagc gacgaagac 29

<210> 2
<211> 31
<212> DNA
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 2
tcgagtcttc gtcgctgtct ccgcttcttc c 31

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
ctcgagatgg ccgacgtgga agacggagag 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4
ggatcctcat ttgccgattc tttggaccac 30

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 5
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 6
<211> 381
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> coding sequence which consists of HIV Tat coding sequence and human SAG cDNA sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

<400> 6
agg aag aag cgg aga cag cga cga aga ctc gag atg gcc gac gtg gaa 48
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Asp Val Glu
1 5 10 15

gac gga gag gaa acc tgc gcc ctg gcc tct cac tcc ggg agc tca ggc 96
Asp Gly Glu Glu Thr Cys Ala Leu Ala Ser His Ser Gly Ser Ser Gly
20 25 30

tcc aag tcg gga ggc gac aag atg ttc tcc ctc aag aag tgg aac gcg 144
Ser Lys Ser Gly Gly Asp Lys Met Phe Ser Leu Lys Lys Trp Asn Ala
35 40 45

gtg gcc atg tgg agc tgg gac gtg gag tgc gat acg tgc gcc atc tgc 192
Val Ala Met Trp Ser Trp Asp Val Glu Cys Asp Thr Cys Ala Ile Cys

```
     50                  55                  60

agg gtc cag gtg atg gat gcc tgt ctt aga tgt caa gct gaa aac aaa          240
Arg Val Gln Val Met Asp Ala Cys Leu Arg Cys Gln Ala Glu Asn Lys
 65                  70                  75                  80

caa gag gac tgt gtt gtg gtc tgg gga gaa tgt aat cat tcc ttc cac          288
Gln Glu Asp Cys Val Val Val Trp Gly Glu Cys Asn His Ser Phe His
                85                  90                  95

aac tgc tgc atg tcc ctg tgg gtg aaa cag aac aat cgc tgc cct ctc          336
Asn Cys Cys Met Ser Leu Trp Val Lys Gln Asn Asn Arg Cys Pro Leu
            100                 105                 110

tgc cag cag gac tgg gtg gtc caa aga atc ggc aaa          tgaggatc      380
Cys Gln Gln Asp Trp Val Val Gln Arg Ile Gly Lys
        115                 120

c                                                                      381
```

<210> 7
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 7

```
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Asp Val Glu
  1               5                  10                  15

Asp Gly Glu Glu Thr Cys Ala Leu Ala Ser His Ser Gly Ser Ser Gly
             20                  25                  30

Ser Lys Ser Gly Gly Asp Lys Met Phe Ser Leu Lys Lys Trp Asn Ala
         35                  40                  45

Val Ala Met Trp Ser Trp Asp Val Glu Cys Asp Thr Cys Ala Ile Cys
     50                  55                  60

Arg Val Gln Val Met Asp Ala Cys Leu Arg Cys Gln Ala Glu Asn Lys
 65                  70                  75                  80

Gln Glu Asp Cys Val Val Val Trp Gly Glu Cys Asn His Ser Phe His
                85                  90                  95
```

```
Asn Cys Cys Met Ser Leu Trp Val Lys Gln Asn Asn Arg Cys Pro Leu
            100                 105                 110

Cys Gln Gln Asp Trp Val Val Gln Arg Ile Gly Lys
        115                 120
```