



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2011-0040371

(43) 공개일자

2011년04월20일

(51) Int. Cl.

A61K 36/45 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2009-0097602

(22) 출원일자

2009년10월14일

심사청구일자

2009년10월14일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

(72) 발명자

최수영

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105-706

박진서

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105동 1404호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

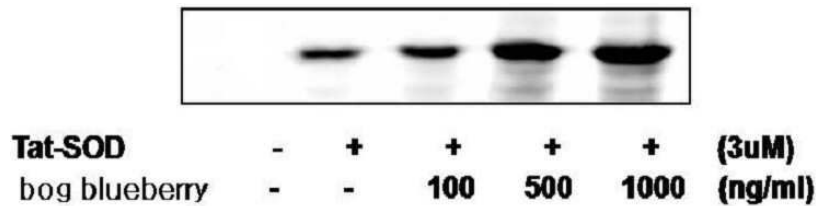
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질의 세포투과도를 증가시키는 들쭉 추출물

(57) 요약

본 발명은 재조합이나 화학적 결합 방법으로 단백질 수송 도메인과 결합된 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(SOD) 융합 단백질에 들쭉 추출물을 가함으로써 이 융합단백질의 세포내 도입능력을 증가시키는 방법을 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

임순성

강원도 춘천시 퇴계동 그린타운아파트 102-401

강일준

강원도 춘천시 퇴계동 주공2차아파트 209-403

음원식

강원 춘천시 후평2동 904번지 포스코더샵아파트
112동 802호

장상호

강원도 춘천시 옥천동 1-1 한림창업보육센터(바이오셀트란)

김대원

서울특별시 강남구 대치동 316 은미아파트 19동
103호

이전화

경기도 의정부시 의정부2동 343-62호 16/4

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 없음

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 지역거점연구단육성사업/의료·바이오신소재융복합연구사업단

연구과제명 세포침투성 기술을 활용한 다발성질환 치료용 신소재 개발

기여율

주관기관 강원대학교 산학협력단

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

단백질 수송 도메인과 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈가 공유결합된 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질의 세포투과도를 증가시키는 들쭉(*Vaccinium uliginosum* L.) 추출물

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 들쭉 추출물은 안토시아닌 분획인 것을 특징으로 하는 들쭉 추출물

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV-1 Tat(49-57), Tat(51-57), Tat(50-56), Tat(50-57), Tat(50-55), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성되는 올리고 아르기닌, 5~12개의 라이신 잔기로 구성되는 올리고라이신, 5~12개의 아르기닌 또는 라이신 잔기로 구성되는 올리고(A+L) 중의 하나인 것을 특징으로 하는 들쭉 추출물

청구항 4

단백질 수송 도메인과 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈가 공유결합된 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질과 들쭉 추출물을 함께 처리하여 세포 내로 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질의 세포투과도를 증가시키는 방법

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 들쭉 추출물은 안토시아닌 분획인 것을 특징으로 하는 방법

청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV-1 Tat(49-57), Tat(51-57), Tat(50-56), Tat(50-57), Tat(50-55), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성되는 올리고 아르기닌, 5~12개의 라이신 잔기로 구성되는 올리고라이신, 5~12개의 아르기닌 또는 라이신 잔기로 구성되는 올리고(A+L) 중의 하나인 것을 특징으로 하는 방법

청구항 7

단백질 수송 도메인과 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈가 공유결합된 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질 및 들쭉 추출물을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 사구체신염, 맥관염, 자가면역성 질환, 졸증, 심근경색, 부정맥, 협심증, 특발성 헤모크로마토시스, 방사선 치료에 의한 질병, 조로증, 질병 관련 노화, 겸상적혈구증, 말라리아, 폐기종, 심근증, 자가면역 신증후군, 베텔넷-관련 구강암, 고압산소증, 알츠하이머병, 파킨슨병 및 백내장 중 선택된 1종의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 의존성 질환에 유용한 약제학적 조성물

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV-1 Tat(49-57), Tat(51-57), Tat(50-56), Tat(50-57), Tat(50-55), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성되는 올리고 아르기닌, 5~12개의 라이신 잔기로 구성되는 올리고라이신, 5~12개의 아르기닌 또는 라이신 잔기로 구성되는 올리고(A+L) 중의 하나인 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 9

단백질 수송 도메인과 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈가 공유결합된 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질 및 들쭉 추출물을 유효성분으로 하고 활성산소종을 제거하는 기능을 가지는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV-1 Tat(49-57), Tat(51-57), Tat(50-56), Tat(50-57), Tat(50-55), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성되는 올리고 아르기닌, 5~12개의 라이신 잔기로 구성되는 올리고라이신, 5~12개의 아르기닌 또는 라이신 잔기로 구성되는 올리고(A+L) 중의 하나인 것을 특징으로 하는 조성물

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합이나 화학적 결합 방법으로 단백질 수송 도메인과 공유결합된 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스(SOD) 융합단백질에 들쭉 추출물을 가함으로써 이 융합단백질의 세포내 도입능력을 증가시키는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002] 피부는 자외선(UV), 공기 오염물질 등의 유해한 환경에 계속적으로 노출된다. 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)은 염증성 피부질환, 피부암, 피부 자가면역질환, 광독성, 감광성, 피부노화 등에 관여하고 있다고 알려져 있다.

[0003] 활성산소종은 산소를 이용하여 에너지를 얻는 모든 생명체에서, 여러 세포 내 대사과정의 부산물로 필연적으로 생성된다. 이러한 활성산소종은 세포내 단백질, 핵산 및 지방과 같은 생체고분자에 손상을 입히며, 인체의 여러 질병의 진행과정과 밀접하게 관련되어 있다. 활성산소종은 특히 발암과정, 뇌졸중, 관절염, 동맥경화, 방사선 손상 및 염증반응에 관여하며 정상적인 노화과정에서도 노화를 촉진시키는 중요한 요인으로 작용한다[Floyd, R.A. (1990) FASEB J. 4, 2587-2597; Anderson, W. F. (1998) Human gene therapy. Nature 392, 25-30; Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Oxford].

[0004] 인간의 질병을 약제로 치료하는 대신 유전 물질이나 유전물질의 산물인 단백질을 세포 내로 전달하여 치료하는 것이 유전자 치료법 또는 단백질 치료법이다. 최근에는 다양한 인체 질환이 세포 단백질의 비정상적 활성화에 기인한다는 사실이 알려짐에 따라 이들 단백질의 활성을 조절함으로써 인체 질환을 치료할 수 있는 약제의 개발이 전 세계적으로 관심의 대상이 되고 있다.

[0005] 들쭉은 *Vaccinium uliginosum* L. 라는 학명으로서, 산머루와 비슷한 열매이며 개마고원과 백두산 일대에서 자생하는 천연기념물 461호로 보호되는 진달래과의 낙엽 소관목이다. 들쭉은 높은 산에서 자라며, 잎은 어긋나고 난상 원형 · 도란형 · 타원형이며 길이 15~25mm, 나비 10~20mm이다. 잎 앞면은 녹색이고 뒷면은 녹색이며 털과 톱니는 없다. 가지는 갈색으로 어린 가지에 잔 털이 없는 것도 있다. 높이는 1m 정도이다. 5~6월에 향아리모양 꽃이 지난해 가지 끝에 녹색이 도는 흰색으로 1~4개씩 달린다. 꽃받침은 5개로 갈라지고 갈라진 조각은 삼각형이다. 화관은 끝이 얇게 5개로 갈라지고 수술은 10개이며 수술대에는 잔 털이 있다. 열매는 장과로 공 모양이거나 타원형이고 8~9월에 검은 자줏빛으로 익는다. 달고 신맛이 나며 흰 가루로 덮여 있다. 가을에 열매를 따서 날것으로 먹고 과즙이나 잼을 만든다. 북한에서는 천연기념물로 지정하고 있다. 한국(전남 · 강원 · 평북 · 함남 · 함북), 북반구 한대지방에 분포한다. 열매가 지름 14mm로서 편구형인 것을 굵은들쭉(for. depressum), 열매가 길이 13mm로서 긴 타원형인 것을 긴들쭉(for. ellipticum), 열매가 지름 6~7mm로서 원형인 것을 산들쭉(for. alpinum)이라고 한다. 들쭉에는 모세혈관 강화작용, 비타민 P 활성물질이 있으며, 열매는 즙을 짜서 식료품을 만들고 열매껍질은 당뇨 저당 약으로 쓰이며 특히 대장암 예방, 피로회복, 통풍 등에 효능이 있으며 특히 여성들이 산후에 먹으면 배앓이를 하지 않으며 정혈작용, 이뇨작용, 정력증강, 해열작용, 원기 재고, 류마티스 관절염 등에 좋다고 하여 민간요법으로 널리 사용되고 있다.

[0006] 생체 내 고분자들 특히 피부는 염증 및 자유라디칼의 해로운 작용에 항상 노출되어 있기 때문에 다양한 피부질환에서 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스(superoxide dismutase; SOD)를 치료목적으로 이용하려는 관심이 매우 높아지고 있다. 현재 가장 주목을 받고 있는 것은 유전자 치료이다. 그러나 유전자 치료는 유전자의 운반방법이 용이하지 않고, 표적세포에서의 발현이 낮고, 세포에서 단백질이 발현되는 기간이 짧고, 표적세포에서 발현되는 단백질의 양을 인위적으로 조절하기가 매우 어려운 점 등 여러 가지 문제점을 갖고 있다.

[0007] 최근에, 사람 면역결핍 바이러스(Human 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)의 특성때문에 나타나는 것으로서 아직 그 정확한 기전은 알려지지 않은 상태이다[Frankel, A.D. and Pabo, C.O. (1988) Cell 55, 1189-1193; Green, M. and Loewenstein, P.M. (1988) Cell 55, 1179-1188; Ma, M. and Nath, A. (1997) J. Virol. 71, 2495-2499; Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997) J. Biol. Chem. 272, 16010-16017]. Tat 단백질의 세포막 통과에는 특정 수용체나 운반체가 관여하지 않는 것으로 보이며 단백질 형질도입 부위가 직접 막의 지질 이중층과 작용함으로써 일어나는 것으로 이해하고 있다[Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997) J. Biol. Chem. 272, 16010-16017; Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1996) J. Biol. Chem. 271, 18188-18193]. 이것은 Tat 단백질이 세포막을 지닌 모든 종류의 세포에서 세포막을 통과하여 세포질 내로 투과할 수 있음을 의미한다.

[0008] 본 발명자들은 이미 Tat 단백질의 단백질 형질도입 부위를 외부단백질인 사람 Cu,Zn-SOD에 융합시켜 이 융합단백질이 효과적으로 세포 내로 투과되는지를 HeLa 세포를 이용한 실험에서 확인하였다[Kwon, H.Y., Eum, W.S., Jang, H. W., Kang, J.H., Ryu, J.Y., Lee, B.R., Jin, L.H., Park, J.S., and Choi, S.Y. (2000) FEBS Letters. 485, 163-167]. 또한, 본 발명자들은 Tat-SOD 융합단백질을 다량 제조하고 순수정제하기 위한 기술을 개발하였다[공개특허 제2002-10445호, 특허 제445186호]. 본 발명자들은 재조합된 Tat-SOD 융합단백질을 대장균에서 과대 발현시켰으며, 금속 킬레이팅 크로마토그래피(metal-chelating affinity chromatography) 법으로 쉽고 편리하게 정제하였다. 정제된 Tat-SOD 융합단백질은 배양된 HeLa 세포에 농도 및 시간 의존적으로 투과되었으며 이와 동시에 세포 내의 SOD 효소 활성도도 유의하게 증가함을 관찰하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포투과성을 지닌 SOD 융합단백질의 세포투과 효율을 증가시키려는 것이다.

과제 해결수단

- [0010] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0011] 본 명세서의 '단백질 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 수개 내지 십수개의 아미노산 잔기로 구성된 것을 말한다. 좀 더 구체적으로 단백질 수송 도메인은 HIV-1 Tat(49-57), Tat(51-57), Tat(50-56), Tat(50-57), Tat(50-55), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성되는 올리고 아르기닌, 5~12개의 라이신 잔기로 구성되는 올리고라이신, 5~12개의 아르기닌 또는 라이신 잔기로 구성되는 올리고(A+L) 중의 하나를 말한다.
- [0012] '단백질 수송 도메인-SOD 융합단백질'이란 단백질 수송 도메인과 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(SOD)의 DNA 재조합 방법에 의한 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서는 구체적으로 Tat-SOD 융합단백질을 말한다.
- [0013] 또한, '세포'란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 전달되는 세포를 의미하는 것으로서 표적세포는 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, 표적세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.
- [0014] 또한, 본 명세서에서는 융합단백질을 세포 내로 '도입'시키는 것에 대하여 '운반', '침투', '수송', '전달', '투과', '통과'한다는 표현들을 혼용하였다.
- [0015] 본 발명자들은 일 실시예에서 단백질 수송 도메인에 외부단백질인 사람 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(SOD)를 융합시킨 융합단백질을 대장균에서 과발현시켰으며, 이를 금속 킬레이팅 친화 크로마토그래피로 쉽고 편리하게 정제하였다. 또한, 들쭉 추출물이 정제된 융합단백질의 세포내 침투 및 활성화에 미치는 영향을 배양된 피부 세포와 피부조직 실험을 통하여 확인하였다. 본 발명은 들쭉 추출물이 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질의 세포내 운반과 활성을 증가시킴으로써 단백질 치료제 및 응용성에 있어서 천연물인 들쭉 추출물의 이용이 매우 효과적인 방법이라고 사료된다.
- [0016] 본 발명에서는 SOD 융합단백질의 세포 및 조직내 침투 효율을 증가시키는 다양한 천연물 중 들쭉 추출물을 확인하였다. 본 발명을 위해 먼저 들쭉 추출물을 정제된 SOD 융합단백질과 같이 세포에 처리하였을 경우 융합단백질이 농도 및 시간 의존적으로 SOD 융합단백질만 처리하였을 경우보다 더욱 효과적으로 세포에 운반되는 것을 확인하였다. 또한, 들쭉 추출물은 침투된 세포 및 조직 내에서 SOD 활성을 잘 나타내도록 한다. 따라서 이러한 들쭉 추출물은 Tat-SOD 융합단백질의 침투효율 증가시키는 보조제로서 다양한 질환 치료 분야 등에 이용할 수 있다.
- [0017] 본 발명은 단백질 수송 도메인과 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈가 공유결합된 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질의 세포투과도를 증가시키는 들쭉(*Vaccinium uliginosum* L.) 추출물에 관한 것이다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 들쭉 추출물이 안토시아닌 분획인 것을 특징으로 하는 들쭉 추출물에 관한 것이다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 단백질 수송 도메인이 HIV-1 Tat(49-57), Tat(51-57), Tat(50-56), Tat(50-57), Tat(50-55), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성되는 올리고 아르기닌, 5~12개의 라이신 잔기로 구성되는 올리고라이신, 5~12개의 아르기닌 또는 라이신 잔기로 구성되는 올리고(A+L) 중의 하나인 것을 특징으로 한다.
- [0020] 뿐만 아니라, 본 발명은 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질과 들쭉 추출물을 함께 처리하여 세포 내로 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질의 세포투과도를 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질 및 들쭉 추출물을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 사구체신염, 맥관염, 자가면역성 질환, 졸중, 심근경색, 부정맥, 협심증, 특발성 해모크로마토시스, 방사선 치료에 의한 질병, 조로증, 질병 관련 노화, 겸상적혈구증, 말라리아, 폐기종, 심근증, 자가면역 신증후군, 베텔넷-관련 구강암, 고압산소증, 알츠하이머병, 파킨슨병 및

백내장 중 선택된 1종의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 의존성 질환에 유용한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

- [0022] 본 발명의 들쭉 추출물 및 SOD 융합단백질은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의해 제제화할 수 있고, 들쭉 추출물과 SOD 융합단백질 자체 또는 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등과 혼합하여 통상의 약학적 제제, 예를 들면 액제, 시럽제, 캡슐제, 과립제, 분말, 연고, 에멀전, 젤, 크림 등으로 제제화할 수 있으며, 이를 여러 경로로 투여할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량에 특별한 제한은 없으나, 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 추출물은 통상 1일 0.0001~100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001~100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한 번 내지 수회 나누어 투여할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질 및 들쭉 추출물을 유효성분으로 하고 활성 산소종을 제거하는 기능을 가지는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물을 비롯한 피부 외용제 조성물을 제공한다. 본 발명의 세포투과성 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 융합단백질 및 들쭉 추출물을 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 천연물 조성물을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.
- [0025] 뿐만 아니라, 본 발명의 들쭉 추출물과 SOD 융합단백질은 화장료로서 이용할 수 있는데, pH 조절제, 향료, 유화제, 방부제 등을 필요에 따라 부가하여 통상의 화장료 제조 방법으로 화장수, 젤, 수용성 파우더, 지용성 파우더, 수용성 리퀴드, 크림 또는 에센스 등으로 제형화할 수 있다.
- [0026] 상기 단백질 수송 도메인은 HIV-1 Tat(49-57), Tat(51-57), Tat(50-56), Tat(50-57), Tat(50-55), 5~12개의 아르기닌 잔기로 구성되는 올리고 아르기닌, 5~12개의 라이신 잔기로 구성되는 올리고라이신, 5~12개의 아르기닌 또는 라이신 잔기로 구성되는 올리고(A+L) 중의 하나인 것을 특징으로 한다.

효 과

- [0027] 본 발명을 통하여 들쭉 추출물이 세포투과성 SOD 융합단백질의 세포 및 조직 내 침투효율을 효과적으로 증가시킬 수 있음을 실험적으로 확인할 수 있다.
- [0028] 활성산소 및 이와 관련된 다양한 질환에 SOD 융합단백질을 효과적으로 침투시키는 들쭉 추출물을 이용함으로써 다양한 질환에 대한 단백질 치료에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.
- [0029] 또한, 들쭉 추출물은 융합단백질의 침투효율 및 세포 내 활성을 증가시키므로 다양한 질병 외에도 기능성 화장품 산업 등에 광범위하게 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0031] 재료 및 방법

[0032] 실시예 1: 들쭉 추출물 제조

- [0033] 식용 가능한 들쭉 열매를 백두산에서 2005년 8월 10일 채취하였다. 신선한 열매(100g)에 100ml 물을 가하여 즙을 낸 후 와트만 No.2 거름종이로 걸렀다. 걸러진 용액(100ml)을 Diaion HP-20 수지 컬럼에 흡착시킨 후 물(약 1500 ml)로 세척하여 당분과 그밖의 불순물을 제거하였다. 그 후 에탄올(약 500ml)로 세척하여 안토시아닌이 풍부한 분획을 얻었다. 얻어진 안토시아닌 함유 분획은 동결건조하여 -20℃에 보관하였다.

[0034] **실시예 2: HPLC 분석**

[0035] 상기 실시예 6에서 얻은 안토시아닌 함유 분획을 RP YMC ODS H-80 컬럼(4.6×250mm id, S-4 μ m; YMC, 교토, 일본)에 부하하여 Finnigan Surveyor HPLC 시스템(Thermoquest, 산호세, CA, USA)을 이용하여 안토시아닌을 분리하였다. 이동상은 0.1% 포름산 함유 물(용매 A)과 0.1% 포름산 함유 100% ACN(용매 B)이었다. 용출을 위하여 다음의 농도구배를 이용하였다: 최초, 10% 용매 B; 23분, 40% 용매 B; 26분, 100% 용매 B; 29분, 100% 용매 B; 32분, 10% 용매 B. 용출 속도는 600 μ l/min, 주입부피는 10 μ l였다. 용출된 물질은 517nm에서 200~600nm 구간 PDA(photodiode-array detector)로 밴드 폭 1.0mm로 탐지되었다.

[0036] 주요 안토시아닌 분획을 확인하기 위하여 컬럼 용출물들을 나누어 0.2ml/min을 ESI 인터페이스를 갖춘 Finnigan LCQ Advantage IT mass spectrometer(ThermoQuest)에 주입하였다. 모세관 온도 250℃, 분사 볼트 5.5kV, 모세관 볼트 2.3V, 튜브 렌즈 오프셋 48V의 양이온 모니터링을 이용하여 분석하였다. 충돌 가스로는 N₂(28 임의단위의 순환가스(Sheath Gas))를 사용하여 흡광 데이터가 기록되었다. 각 화합물의 탐지는 m/z 값과 m/z 값의 MS/MS를 이용하여 수행하였다. MS/MS 충돌 에너지는 35%로 고정시켰다. HPLC 분석용으로 제조된 들쭉 추출물의 최종 농도는 5g/l 였다.

[0037] **실시예 3: Tat-SOD 융합단백질 제조**

[0038] 세포투과성 융합단백질 발현벡터 제조 및 형질전환은 본 발명자들이 개발한 방법을 기본으로 수행하였다. 세포투과성 SOD 융합단백질을 제조하기 위해 HIV-1 Tat 단백질 수송 도메인(protein transduction domain; PTD)을 갖는 HIV-1 Tat 발현벡터를 제조하였고, Tat PTD에 해당하는 두 종류의 올리고뉴클레오타이드를 *Nde*-*Xho* 제한효소로 자른 pET-15b에 연결(ligation)하여 삽입하였다. 이어서, 사람 SOD cDNA 서열을 기본으로 하여 두 종류의 올리고뉴클레오타이드를 합성하고, 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다. PCR 수행 후, 아가로스 젤 전기영동으로 PCR 산물을 분리하고 이것을 TA 클로닝 벡터에 연결하였다. 이 벡터를 컴피턴트 세포에 형질변환시키고 형질변환된 박테리아로부터 플라스미드를 알칼리 용균법으로 분리하였다. SOD cDNA가 포함된 TA 벡터를 *Xho*과 *Bam*H로 절단한 다음 대조군 발현 및 Tat 발현벡터에 삽입하여 형질변환된 *E. coli* BL21 (DE3)를 선택한 다음, 콜로니를 100ml LB 배지에 접종하고 IPTG(0.5mM)를 배지 내에 첨가하여 재조합된 융합단백질의 과대발현을 유도하였다. 과대발현된 각 융합단백질은 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다.

[0039] **실시예 4: 융합단백질 정제**

[0040] 형질전환된 이.콜라이 BL21 (DE3) 세포를 앰피실린이 포함된 LB 배지 100ml에 넣고 37℃에서 200rpm으로 교반하며 배양액 내의 박테리아 농도가 O.D₆₀₀=0.5~1.0을 나타낼 때 배지 내에 IPTG를 최종농도가 0.5~1mM 되게 첨가해 준 후 다시 37℃에서 3~4시간 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리하여 모은 뒤, 5ml 결합 완충액[5mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.9)]를 넣고 초음파 분쇄하였다. 원심분리 후, 상층액을 즉시 2.5ml Ni²⁺-니트로삼초산 세파로즈 컬럼에 부하하고 10배 부피의 결합완충액과 6배 부피의 세척완충액(60mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 세척한 다음 용출완충액(1M 이미다졸, 0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 융합단백질을 용출하였다. 이어, 융합단백질이 포함된 분획들을 모아 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분획 중에 포함된 염분을 제거하였다. 정제된 단백질 정량은 우혈청 알부민을 표준물질로 사용하여 브래드포드 방법으로 측정하였다.

[0041]

[0042] **실시예 5: 효소활성도 측정**

[0043] SOD의 활성도는 McCord와 Fridovich의 방법(1969)에 따라 잔틴(xanthine)/잔틴 산화효소(xanthine oxidase) 반응에 의한 페리사이토크롬 c(ferricytochrome c) 환원의 억제 정도를 분광광도계로 관찰함으로써 측정하였다.

[0044] 표준분석방법은 25℃에서 2ml의 0.1mM EDTA가 포함된 50mM 인산칼륨 완충용액(pH 7.8)에서 수행하였다. 반응혼합액에는 10 μ M 페리사이토크롬 c, 50 μ M 잔틴 및 충분한 양의 잔틴 산화효소를 함유하고 있으며, 550nm에서 페리사이토크롬 c의 환원 정도를 측정하였다. 상기 조건하에서 사이토크롬 c를 50% 감소시키는 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 양을 1유닛으로 정의하였다.

[0045] **실시예 6: 세포배양 및 SOD 융합단백질의 세포내 침투**

[0046] HeLa 세포는 37℃에서 95% 공기와 5% CO₂를 공급해주며 5% 우태혈청(fetal bovine serum; FBS), 항생제(100μg/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린) 및 3.7g/l NaHCO₃가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 배양하였다.

[0047] SOD 융합단백질의 세포내 투과를 관찰하기 위하여, 배양세포를 6-웰 플레이트에서 키운 뒤 FBS가 포함되지 않은 1ml의 신선한 배양액으로 교체하고 여러 농도의 융합단백질을 배양액에 처리하였다. 처리 1시간 뒤, 세포를 트립신-EDTA로 처리하고 인산완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)로 충분히 세척한 다음 세포 내로 투과된 융합단백질의 양과 활성을 웨스턴 블랏 분석과 효소 활성도 분석으로 측정하였다.

[0048]

[0049] **실시예 7: 웨스턴 블랏 분석**

[0050] 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 겔로 분리한 다음 겔에 있는 단백질을 나이트로셀룰로스 막으로 전기이동시키고 단백질이 이동된 나이트로셀룰로스 막을 5% 탈지분유가 들어있는 TBST 완충액으로 2시간 실온에서 블로킹시킨 후, 막을 1차 항체로 1시간 반응시켰다. 1차 항체를 TBST 완충액으로 세척한 다음 퍼옥시데이즈가 결합된 항마우스 IgG 항체(Sigma, 1:10,000 dilution)로 1시간 반응시키고 ECL 키트를 이용하여 단백질에 반응하는 단백질 띠를 확인하였다.

[0051] 들쭉 추출물(anthocyanin-rich extract from bog blueberry; 1000ng/ml)이 Tat-SOD 융합단백질의 세포내 투과에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 배양된 세포에 정제된 Tat-SOD 융합단백질을 농도별(0.5~3 μM)로 1시간 투여하여 웨스턴 블랏팅하였다.

[0052] 또한, 들쭉 추출물(1000ng/ml)을 1시간 미리 처리한 후 정제된 Tat-SOD 융합단백질(3 μM)을 시간별(10~60분)로 투여하고 웨스턴 블랏팅하였다.

[0053] 또한, 다양한 농도의 들쭉 추출물(100, 500, 1000ng/ml)을 Tat-SOD 융합단백질(3 μM)과 함께 처리한 후 세포내 침투 효율을 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다.

[0054] **실시예 8: 조직내 SOD 융합단백질의 투과 및 활성**

[0055] 본 발명에서는 한림대 실험동물센터에서 입수한 마우스를 이용하였다. 이 동물들은 일정 온도(23℃), 상대 습도 60%로 12시간의 빛/어둠 사이클로 고정하고 물과 사료에 자유롭게 접근할 수 있도록 하여 사육되었다. 실험동물들은 현재 국제 법률 및 정책(NIH의 실험동물 보호와 이용에 관한 가이드, NIH 공고 번호 85-23, 1985, 1996 개정) 준수 하에 사육 및 이용되었다.

[0056] 실제로 들쭉 추출물에 의하여 SOD 융합단백질이 조직 내로 투과가 일어나는지 알아보기 위해 들쭉 추출물(500ng/ml)과 Tat-SOD 융합단백질(3 μM)을 마우스 피부에 발라주고 한 시간 후 피부조직의 효소활성도를 분석하였다.

[0057] 2.5% 아이소플루란(Abbott Laboratories, 일리노이주, 미국) 함유 33% 산소 및 67% 산화질소 혼합물로 상기 실험 마우스를 일반 마취하고, 시험한 피부조직 부위를 떼어내어 상기 실시예 5의 방법으로 효소 활성도를 측정하였다.

[0058] 음성대조군으로서 Tat-SOD 융합단백질이 아닌 SOD(3 μM)를 처리하였고, 양성 대조군은 들쭉 추출물 없이 Tat-SOD 융합단백질(3 μM)만을 처리하였다.

[0059] **실시예 9: MTT 어세이**

[0060] 세포의 생존율은 세포에 지다당(Lipopolysaccharide; "LPS") 100ng/ml를 처리한 다음, 시료를 처리한 후 MTT[3-(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 활성을 측정하여 결정하였다.

[0061] 먼저, 세포를 96 웰 플레이트에 놓고 시료로서 다양한 농도의 들쭉 추출물(100, 500, 1000ng/ml)을 처리한 후

5mg MTT/PBS 1ml의 MTT 용액 20 μ l를 가하여 37℃로 CO₂ 배양기에서 4시간 가량 배양하였다. 배지를 제거하고 여기에 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 20 μ l 가하여 혼합한 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 1: 들쭉 추출물의 안토시아닌 분획 성분 확인

상기 실시예 1, 2의 결과 들쭉 추출물의 안토시아닌 분획 성분은 아래의 표 1과 같다.

표 1

Compounds	<i>R_t</i> (min)	UV/Vis λ max (nm)	LC-ESI-MS		Structure
			<i>m/z</i> [M + H] ⁺	MS/MS fragments ^{b)}	
1	9.21	233, 280, 517	449	448.76 (Cy + Glc) 286.99 (Cy) ⁺	Cyanidin-3-glucoside
2	9.81	233, 278, 521	479	478.74 (Pt + Glc) 316.96 (Pg) ⁺	Petunidin-3-glucoside
3	10.70	234, 278, 525	493	492.82 (Mv + Glc) 330.95 (Mv) ⁺	Malvidin-3-glucoside
4	17.12	253, 356	465	464.67 (Dp + Glc) 302.98 (Dp) ⁺	Delphinidin-3-glucoside
5	18.69	255, 356	435	434.66 (Dp + Ara) 302.97 (Dp) ⁺	Delphinidin-3-arabinoside

b) Cy: 시아니딘(Cyanidin); Glc: 글루코사이드(Glucoside); Pt: 페투니딘(Petunidin); Mv: 말비딘(Malvidin); Dp: 델피니딘(Delphinidin); Ara: 아라비노스(Arabinose)

결과 2: SOD 융합단백질의 과대발현, 정제 및 세포내 침투

Tat-SOD 융합단백질의 제조와 과대발현, 정제 그리고 세포내 침투는 이미 본 발명자들에 의해 세포와 조직에서 확인하였다[Kwon, H.Y., Eum, W.S., Jang, H.W., Kang, J.H., Ryu, J., Lee, B.R., Jin, L.H., Park, J., and Choi, S.Y. (2000) FEBS Lett. 163-167].

결과 3: 들쭉에 의한 Tat-SOD 융합단백질의 세포내 투과

최종 분리 동정한 들쭉 추출물(anthocyanin-rich extract from bog blueberry; 1000ng/ml)에 의한 Tat-SOD 융합단백질의 세포내 투과를 관찰하기 위해 배양된 세포에 정제된 Tat-SOD 융합단백질을 농도별(0.5~3 μ M)로 1시간 투여하여 웨스턴 블랏팅한 결과 Tat-SOD는 들쭉 추출물에 의해 농도별로 세포내 투과가 증진되는 것을 확인하였다.

또한, 들쭉 추출물(1000ng/ml)을 1시간 미리 처리한 후 정제된 Tat-SOD(3 μ M)를 시간별(10~60분)로 투여하고 웨스턴 블랏팅한 결과 Tat-SOD 융합단백질은 들쭉 추출물에 의해 시간별로 세포내 투과가 증진되는 것을 확인하였다.

또한, 세포 내로 투과된 후 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 활성을 측정한 결과, 농도 및 시간별로 효소의 활성도가 크게 증가되는 것을 확인하였다. 효소 활성은 Tat-SOD 융합단백질만 1시간 처리한 경우 2.5~3U/mg의 대조군에 비해 15~18U/mg으로 6배 정도 증가되었고, 들쭉 추출물과 Tat-SOD 융합단백질을 같이 처리한 경우 32~35U/mg으로 Tat-SOD 융합단백질 처리군에 비해 2~3배 이상 증가되었다.

결과 4: 들쭉 추출물 농도에 따른 Tat-SOD 융합단백질의 침투 효율

다양한 농도의 들쭉 추출물을 Tat-SOD 융합단백질과 함께 처리한 후 세포내 침투 효율을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과 들쭉 추출물은 농도의존적으로 단백질의 세포내 침투를 증진시켰다(도 2).

[0075]

[0076]

결과 5: 들쭉 추출물의 안전성

[0077]

들쭉 추출물의 안전성을 확인하기 위해서 세포에 들쭉 추출물을 농도별(100-1000ng/ml)로 처리한 후 24시간 후 MTT 어세이를 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. 도 3과 같이, 들쭉 추출물은 세포 내 독성을 나타내지 않아 세포 생존율의 변화가 없었다. 따라서, 이러한 결과는 들쭉 추출물이 안전하다는 것을 의미한다.

[0078]

결과 6: 피부 조직내 Tat-SOD 융합단백질의 투과 및 활성화

[0079]

마우스 피부조직으로 들쭉 추출물에 의한 Tat-SOD 융합단백질의 투과가 일어나는지 알아보기 위해 들쭉 추출물과 Tat-SOD 융합단백질을 마우스 피부에 발라주고 한 시간 후 피부조직의 효소활성도 분석을 통해 확인하였다. 확인 결과 들쭉 추출물은 Tat-SOD 융합단백질의 마우스 피부 조직 내로 침투효율을 증가시켜 효소 활성도를 크게 증가시키는 것을 확인하였다. 피부조직의 SOD 활성은 5~6U/mg에서 Tat-SOD 융합단백질만 처리한 경우 28~30U/mg으로 증가되었고, 들쭉 추출물과 같이 처리한 경우에는 57~60U/mg으로 증가되었다.

도면의 간단한 설명

[0080]

도 1은 Tat-SOD 융합단백질의 농도 및 처리 시간을 달리하여 들쭉 추출물이 Tat-SOD 융합단백질의 세포 투과에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블랏팅 사진이다.

[0081]

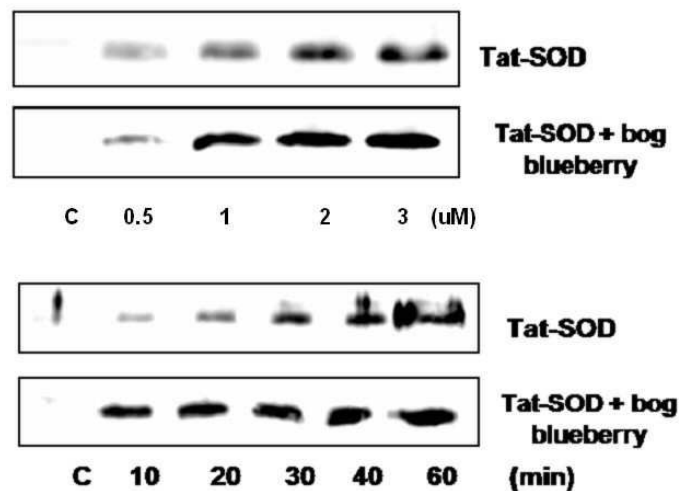
도 2는 들쭉 추출물 농도 변화에 따른 Tat-SOD 융합단백질의 세포 투과 정도를 보여주는 웨스턴 블랏팅 사진이다.

[0082]

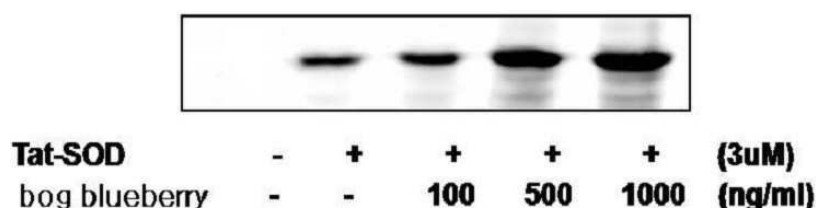
도 3은 들쭉 추출물에 의한 세포생존율을 나타내는 그래프이다.

도면

도면1



도면2



도면3

