(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월07일
(11) 등록번호 10-1955882
(24) 등록일자 2019년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61K 47/62* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/4722 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0129296
(22) 출원일자 2017년10월11일
심사청구일자 2017년10월11일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130003243 A
GenBank: AAP36765.1
GenBank: AK290763.1

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
김대원
강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 김정아

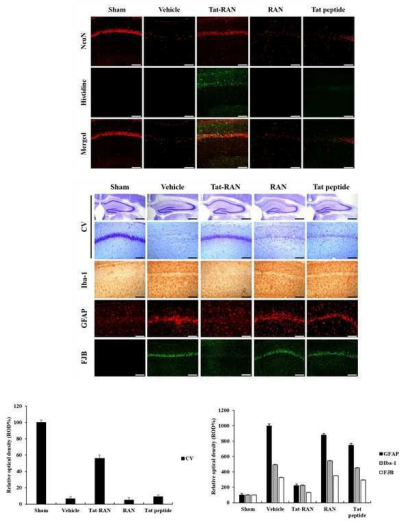
(54) 발명의 명칭 **RAN 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

과제: 부작용이 적거나 없으며, 효과가 우수한 뇌허혈 치료용 약제를 제공하는 것.

해결수단: 본 발명은 세포투과성 RAN 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 RAN 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰다. 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 RAN 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 RAN 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
A61K 47/62 (2017.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
C07K 2319/01 (2013.01)

(72) 발명자
음원식
강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)
신민재
인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)
조효상
경기도 구리시 체육관로 163-12
손은정
경기도 남양주시 비룡로116번길 35, 306동 404호 (마석역신도브래뉴 3차 아파트, 묵현리)
김덕수
충청남도 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (그린빌, 다가동)
박진서
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)
한규형
강원도 춘천시 새청말길 26, 107동 1402호 (강변코아루아파트, 우두동)
이근욱
서울특별시 동작구 동작대로39길 22, 113동 805호 (동작동, 이수힐스테이트)
조성우
서울 송파구 양재대로 1218, 257동 704호(올림픽선수촌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0093812
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소지원사업
연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발: 질환치료용 생리활성 고분자 신소재 물질 탐색 및 개발
기 여 율 1/4
주관기관 한림대학교
연구기간 2017.09.01 ~ 2018.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2016R1A2B4008356
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인연구지원사업(중견연구)
연구과제명 혈액뇌장벽 및 뇌조직 침투성 Glutaredoxin 1 융합단백질을 이용한 퇴행성신경질환 치료제 개발
기 여 율 1/4
주관기관 한림대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1D1A3B04032007
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 지역대학우수과학자
연구과제명 뇌질환 및 염증관련 질환에서 Tat-CIAPIN1 단백질의 효능연구
기 여 율 1/4
주관기관 한림대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2018.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1D1A3A01015668
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 지역대학우수과학자
연구과제명 도파민 세포 침투성 Antioxidant 1 융합 단백질을 통한 파킨슨병 보호 기전 연구
기 여 율 1/4
주관기관 강릉원주대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

HIV Tat 49-57 잔기로 이루어진 단백질 수송 도메인이 RAN (ras-related nuclear protein) 단백질의 N-말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 뇌허혈 치료용 RAN 융합단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 RAN 융합단백질은 그 아미노산 서열이 서열번호 2임을 특징으로 하는 RAN 융합단백질.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2의 RAN 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 뇌허혈 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2의 RAN 융합단백질을 유효성분으로 하는 뇌허혈 예방 또는 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포투과성 RAN (ras-related nuclear protein) 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 활성산소 화합물이라고 불리는 "자유 라디칼(free radicals)"은 산화 스트레스에 그 원인이 있으며, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산소와의 상호작용을 포함하는 다양한 세포과정에서 피할 수 없는 부산물이다. 만약 세포가 상대적으로 좀 더 활성화된 화합물에 노출된다면 이들은 산화 스트레스에 놓이게 되고 그 결과 단백질, DNA, 지방과 같은 중요한 요소들이 산화되어 손상을 입게 된다. 산화 스트레스는 암, 알츠하이머 등과

같은 많은 병의 원인이 되고 있으며 이러한 질환들은 노화와도 관련이 있다.

[0003] 비정상적인 세포 과정에서 발생하는 과도한 활성산소종은 염증, 허혈, 당뇨 및 파킨슨병 등 다양한 인간의 질병을 초래하는 것으로 알려져 있다. 활성산소종은 세포의 대사과정 중 세포 안의 DNA뿐만 아니라 단백질, 지질과 같은 고분자에 손상을 입히는 등 많은 영향을 미치게 되며 손상 시간이 점점 길어질수록 세포사멸을 일으켜 인간 질병에 많은 영향을 끼치게 된다. 그중에서도 뇌허혈은 뇌의 동맥이 차단될 때 뇌세포가 충분한 에너지를 만들지 못하고 그로 인해 세포사멸이 발생하는 질환으로 활성산소종의 발생량이 해마 CA1 지역에서 급격히 증가하게 되면서 신경세포의 사멸이 일어나게 된다. 뇌허혈과 같은 저산소증 상태는 세포질 Bax가 외막의 미토콘드리아로 전이되도록 유도한 다음 미토콘드리아 막 포텐셜의 감소와 함께 미토콘드리아에서 항-세포사멸 인자의 방출을 촉진한다. 대조적으로 Bcl-2는 미토콘드리아에서 시토크롬 c 방출을 막고 세포사멸을 예방하는 기능을 한다. 저산소증 상태에서 Bcl-2의 발현 수준이 굉장히 떨어지게 되어 세포사멸의 주요 원인이 된다. 그러므로 활성산소종에 대한 조절능력이 있는 물질이 밝혀진다면 뇌허혈 손상에 대해 보호효과를 나타낼 수 있을 것이라 예상한다.

[0004] RAN (ras-related nuclear protein)은 GTP 결합 핵단백질이다. RAN은 시토크롬 C의 방출 및 JNK 하향조절을 통해 세포사멸을 억제하는 주요 기능이 있다. 그러나, 활성산소종에 의한 신경 세포사멸에 대한 RAN 단백질의 기능에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 뇌허혈 손상 및 뇌허혈 손상에 의한 신경세포 손상과 사멸을 치료하기 위한 효과적인 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 PEP-1, HIV Tat 펩타이드와 같은 단백질 수송 도메인을 RAN 단백질과 결합시켜 신경세포와 뇌허혈 동물 모델에서 세포 내로 침투하는 것을 확인하였으며, 산화 스트레스에 대한 RAN 융합단백질의 보호효과에 대해 연구하였다.

[0007] 본 발명자들은 단백질 수송 도메인과 결합한 RAN 융합단백질이 시험관 내에서 산화 스트레스에 의해 유도된 신경세포사멸과 뇌허혈 동물모델에서 보호 효과가 있는지를 밝히고자 하였다. 허혈성 신경세포사멸에 대해 RAN 융합단백질의 잠재적인 효과를 연구하기 위해 본 발명자들은 세포 내로 투과할 수 있는 RAN 융합단백질을 제작하였다. RAN 융합단백질은 신경세포 내부로 농도 의존적 및 시간 의존적으로 효과적으로 투과하였다. 세포 내로 투과된 RAN 융합단백질은 과산화수소 독성에 대한 세포 생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성산소종 수준을 낮추었다. 그리고 세포 내로 투과된 RAN 융합단백질은 과산화수소에 의해 유도된 DNA 단편화 현상도 저하하였다. 동물모델에서 RAN 융합단백질은 전뇌의 해마 CA1 부분에서 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸로부터 세포를 보호하였다. 이러한 결과들은 RAN 융합단백질이 시험관 내와 생체 내에서 일어나는 세포사멸에 대해 보호효과를 나타내며, 산화 스트레스와 관련된 뇌허혈 손상에 대해 치료제로 이용될 수 있음을 말해준다.

[0008] 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명하면, 본 발명의 일 실시예에서 본 발명자들은 먼저 RAN 융합단백질을 과대발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 RAN 융합단백질 발현 벡터를 개발하였다. 이 발현 벡터는 인간 RAN 단백질, 7~21개 아미노산으로 이루어진 단백질 수송 도메인 하나 이상, 그리고 N 말단부분에 6개의 히스티딘 잔기를 발현시킬 수 있는 cDNA를 포함하고 있다.

[0009] 이 발현벡터를 이용하여 RAN 융합단백질을 대장균에서 과대 발현시켰으며 Ni-친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 배양된 세포에 RAN 융합단백질이 시간 및 농도 의존적으로 세포에 운반되는 것을 웨스턴블랏으로 확인하였다. 세포 내로 투과된 RAN 융합단백질은 세포 내에서 최대 12시간 동안 지속적으로 유지되었으며, 산화 스트레스에 의한 세포사멸을 억제하였다.

[0010] 이러한 결과는 RAN 융합단백질이 세포 내로 잘 투과되고, 세포 내에서 RAN 단백질의 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 이러한 RAN 융합단백질은 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 등의 뇌신경질환에 응용할 가능성을 제시해 준다.

[0011] 세포 투과성 RAN 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태 등으로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물

로는 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 폴리에틸렌글리콜)를 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 치료에 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0012] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100㎎/㎏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.

[0013] 나아가, 본 발명은 상기 RAN 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌허혈 예방 또는 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 RAN 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 RAN 단백질 분자의 세포 내 전달은 HIV Tat 펩타이드와 같은 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 단백질 수송 도메인의 일례로는 HIV Tat 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, HIV Tat 펩타이드의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 HIV Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 7~21개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 다수 포함하는 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인, 예컨대 Pep-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌, 올리고(라이신+아르기닌)을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0015] 구체적으로, 본 발명은 RAN 융합단백질, RAN 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드, RAN 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 이 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료 또는 예방 목적의 약학 조성물 및 이 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 예방 또는 개선 용도의 건강기능성 식품조성물에 관한 것이다.

[0016] 상기 RAN 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드는 구체적으로 서열번호 3, 5, 7, 9, 11 또는 13과 같은 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 상기 세포 투과성 RAN 융합단백질을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료 형태로 사용할 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 RAN 융합단백질의 양은, 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.2 내지 10중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100㎖를 기준으로 0.1 내지 30g, 바람직하게는 0.2 내지 5g의 비율로 가할 수 있다. 본 발명의 본 발명의 건강음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 RAN 융합단백질을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.상술한 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖ 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다. 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 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 중요하지는 않으나 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0018] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0019] "RAN 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 RAN 단백질을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 목표 단백질 (즉, 본 발명에서는 RAN 단백질을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 구체적인 실시예로 HIV-Tat 단백질 수송 도메인을 이용하였으므로 "RAN 융합단백질"을 "Tat-RAN", "Tat-RAN 융합단백질" 등과 혼용하였다.

[0020] "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 RAN 단백질을 의미한다.

[0021] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.

[0022] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0023] 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.

[0024] 본 발명에서의 "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 것을 말한다.

[0025] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0026] 본 발명의 RAN 융합단백질은 7 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 RAN의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 RAN 융합단백질을 말한다. 또한, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, Pep-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신,아르기닌) 중의 1종 이상을 말한다.

[0027] 또한, 본 발명의 상기 RAN 융합단백질 아미노산 서열은 서열번호 4, 6, 8, 10, 12 또는 14 등을 포함한다. RAN 융합단백질 제조에서 제한부위 서열의 선택 등에 따라 다양한 서열의 융합단백질을 얻을 수 있으며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람에게 자명하다. 위 아미노산 서열은 예시적인 것일 뿐 RAN 융합단백질 아미노산 서열이 위에 나열된 서열로 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 RAN 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 뇌허혈의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 RAN 융합단백질을 유효성분으로 하며, 뇌허혈의 예방 및 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명은 7~21개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 RAN 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성 (cell-transducing) RAN 융합단백질에 관한 것이다. 또한, RAN 융합단백질은 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.

[0031] 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 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.

발명의 효과

[0032] 본 발명에서 세포 내로 투과된 RAN 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰으며, 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 RAN 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 RAN 융합단백질이 뇌허혈에 의한 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해주며, 세포 투과성 RAN 융합단백질이 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물로 유용함을 말해준다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 Tat-RAN 융합단백질의 발현 및 정제를 설명한다. (A)는 Tat-RAN 융합단백질의 구조 개요도이다. Tat-RAN 융합단백질은 여섯 개의 히스티딘 잔기를 포함한다. 정제된 Tat-RAN 융합단백질은 12% SDS-PAGE를 이용하여 정제하고 항 토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴블랏하였다 (B).

도 2는 HT22 세포로의 Tat-RAN 융합단백질의 투과를 나타낸다. (A) 세포는 60mm 배양 접시에서 배양하였다. Tat-RAN 융합단백질(0.1~2μM) 및 RAN 단백질(0.1~2μM)은 1시간 동안 배양 배지에 처리하고, (B) Tat-RAN 융합단백질(2μM) 및 RAN 단백질(2μM)은 5~60분 동안 배양 배지에 처리하여 웨스턴블랏으로 분석하였다. (C) Tat-RAN 융합단백질의 안정성에 대하여 나타내었다. HT22 세포는 1~36시간 동안 2μM의 Tat-RAN 융합단백질을 전처리하여 웨스턴블랏으로 분석하였다. (D) Tat-RAN 융합단백질의 세포 내 분포를 공촛점 형광 현미경으로 가시화하였다. 크기 막대 = 20 ㎛.

도 3은 과산화수소 처리에 대한 세포생존율 및 DNA 단편화에 대한 Tat-RAN 융합단백질의 보호효과를 나타낸다. (A) 1시간 동안 Tat-RAN 융합단백질(0.5~2μM)로 전처리한 HT22 세포에 과산화수소(700μM)를 가하고 3시간 동안 두었다. 세포생존율은 WST-1을 사용하여 비색 분석법으로 측정하였다. (B) 과산화수소에 의한 활성산소의 생성에 대한 Tat-RAN 융합단백질의 효과를 나타낸다. 세포를 1시간 동안 Tat-RAN 융합단백질로 처리한 후, 세포를 40분간 700μM의 과산화수소로 자극하였다. 세포 내 활성산소종 수준은 DCF-DA 염색으로 측정하고, 형광 강도는 ELISA 플레이트 판독기로 측정하였다. 크기 막대 = 25 ㎛. (C) 세포를 1시간 동안 Tat-RAN 융합단백질(2μM)로 처리한 다음 과산화수소(700μM, 4시간)에 노출시켰다. DNA 단편화는 TUNEL 염색으로 측정하였다. 크기 막대 = 50 ㎛.

도 4는 산화 스트레스로 유도된 Bax/Bcl-2에 대한 Tat-RAN 융합단백질의 효과를 나타낸다. HT22 세포에 Tat-RAN 융합단백질(2μM) 및 RAN 단백질(2μM)을 각각 전처리한 후 각각 2시간 30분 동안 과산화수소(700μM)로 처리하여, (Bax/Bcl-2)를 각각 발현하였다. 과산화수소에 의해 유도된 Bax/Bcl-2 (A) 발현 수준을 웨스턴블랏 분석으로 평가하였고, 밴드 강도는 밀도계로 측정하였다.

도 5는 산화 스트레스로 유도된 MAPKs에 대한 Tat-RAN 융합단백질의 효과를 나타낸다. HT22 세포에 Tat-RAN 융합단백질(2μM) 및 RAN 단백질(2μM)을 전처리한 후 각각 과산화수소(700μM)를 45분 동안 처리하였다. 이어서, 세포 내 p38, ERK, JNK의 인산화 수준을 웨스턴블랏 분석으로 평가하고, 밴드의 강도는 밀도계로 측정하였다(A, B).

도 6은 신경세포 생존율을 NeuN 면역조직화학염색으로 분석한 결과이다. Tat-RAN 융합단백질이 혈관 뇌 장벽을 통과하는지를 히스티딘 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였다. 허혈/재관류 7일 후 샴군, 담체 처리군, Tat-RAN 융합단백질 처리군, RAN 단백질 처리군 및 Tat-펩타이드 처리군의 CA1 부위에서 CV, GFAP, Iba-1 및 FJB의 면역조직화학 반응 결과를 나타낸다. SP, 피라미드층 (stratum pyramidale); SO, 지향층 (stratum oriens); SR, 방사층 (stratum radiatum). 각 면역 반응성 뉴런 수에서 상대적 분석 값은 담체 처리군과 현저하게 다르다. * P<0.01은 담체 처리군과 비교한 값이다(B). 크기 막대 = 50 μm.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 본 발명의 실시예에서는 RAN 융합단백질을 구성하는 단백질 수송 도메인으로 HIV Tat 펩타이드를 이용하였으나, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 HIV Tat 펩타이드가 N-말단에 결합된 RAN 융합단백질을 응용하여, PEP-1 펩타이드, 올리고아르기닌, 올리고라이신 및 올리고(아르기닌+라이신) 등의 다양한 단백질 수송 도메인을 RAN의 N-말단 또는 C-말단 중 한 곳 이상에 결합시킨 융합단백질을 용이하게 형성할 수 있고, 이와 같은 융합단백질 간에 약간의 차이는 있을 수 있으나 유사한 활성을 나타냄을 용이하게

알 수 있다.

[0036] **재료**

[0037] Ni^{2+}-니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen에서 구매하였고, PD-10 컬럼 크로마토그래피(Amersham, Brauncschweig, Germany)를 구매하였다. 마우스 해마신경 세포인 HT22 세포는 한국세포주연구재단(KCLF)에서 제공받았다. 2',7'-DCF-DA(Dichlorofluorescein diacetate)와 Bcl-2, Bax, β-액틴, P-p53, p53, 캐스페이즈 3, 캐스페이즈 9, p-p38, p38, p-Erk, Erk, p-JNK 및 JNK의 일차 항체는 Cell signaling Technology(Beverly, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

[0039] **Tat-RAN 융합단백질의 발현 및 정제**

[0040] RAN 단백질 및 Tat-RAN 융합단백질의 발현 벡터를 구축하였다. 인간의 유전자 중의 하나인 RAN을 cDNA와 함께 2개의 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)으로 증폭시켰다. 센스 프라이머에는 Xho1이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재하고, 안티센스 프라이머에는 BamH1이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재한다. PCR을 통하여 얻은 결과물을 TA 벡터에 연결하고 Xho1과 BamH1을 이용하여 자른 후에 발현 벡터에 연결하여 Tat-RAN 융합단백질을 제조하였다. 이와 마찬가지로 대조군인 RAN 단백질은 Tat 펩타이드가 결여된 벡터를 이용하여 제조하였다. 재조합된 Tat-RAN 플라스미드를 대장균인 BL21로 형질변환시킨 후 0.5mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)로 유도하여 18℃에서 하룻밤 배양하였다. 배양한 세포를 초음파로 분쇄하여 Tat-RAN 융합단백질을 얻기 위해 Ni^{2+}-니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우 컬럼을 이용하여 정제하였다. 단백질 농도는 브래드포드 방법으로 우혈청 알부민을 표준물질로 이용하여 결정하였다.

[0042] **HT22 세포로 Tat-RAN 융합단백질 도입**

[0043] 마우스 해마 신경세포인 HT22 세포는 37℃, 95% 공기 및 5% CO2의 조건을 유지해주며, 10% 우태혈청 (FBS) 및 5 mM NaHCO3, 항생제 (100 mg/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린), 20 mM HEPES/NaOH (pH 7.4)로 구성된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 이용하여 습한 조건에서 배양하였다.

[0044] Tat-RAN 융합단백질 및 대조군 RAN 단백질의 세포 내 도입에 대한 시간 의존성 및 농도 의존성을 평가하였다. 세포는 60㎜ 접시에서 시간(5~60분, 1~36시간) 및 각 단백질의 투여량(0.1~2μM)을 달리하여 처리하였다. 트립신-EDTA(Gibco)를 처리하고 PBS를 이용하여 세척한 다음 세포 내로 투과된 융합단백질을 브래드포드 방법으로 정량하고, 웨스턴블랏으로 분석하였다.

[0046] **웨스턴블랏 분석**

[0047] 웨스턴블랏 분석을 위해 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 젤로 분리한 다음, 젤에 있는 단백질을 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane; Amersham, UK)으로 전기이동시켰다. 막은 TBS-T 완충액 (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)으로 블로킹하였다. 막은 제조업체에서 권장하는 일차 항체를 사용하여 웨스턴블랏 분석하였다. 결합한 항체 복합체는 강화 화학 발광제를 이용하여 제조자 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)의 지시에 따라 탐지하였다.

[0049] **공촛점 현미경 관찰**

[0050] HT22 세포 내의 Tat-RAN 융합단백질과 RAN 단백질을 탐지하기 위해 세포를 유리 커버슬립 상에 시드하고 Tat-RAN 융합단백질과 RAN 단백질을 2μM 농도로 1시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 다음 실온에서 5분간 4% 파라포름알데하이드로 고정하였다. HT22 세포는 실온에서 40분간 3% 우혈청 알부민과 0.1% Triton X-100이 함유된 PBS (PBS-BT)로 40분간 블로킹하고, PBSBT로 세척하였다. 일차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)는 1:10000 비율로 희석하고, 이차 항체 (Alexa fluor 488, Invitrogen)는 1:15000 비율로 희석한 후 어두운 곳에서 실온으로 1시간 동안 배양하였다. 세포핵은 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 1 mg/ml; Roche, Mannheim, Germnay)로 3분간 염색하였다. 염색된 HT22 세포는 Fv-300 공촛점 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

[0052] **세포 생존율 분석**

[0053] 과산화수소로 처리한 HT22 세포의 생존율을 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide}를 이용하여 비색분석법으로 확인하였다. 세포에 0.5~5μM의 Tat-RAN 융합단백질을 선처리하거나 또는 처리하지 않고, 세포를 700μM의 과산화수소에 2시간 30분 동안 노출하여 세포사멸을 유도하였다. ELISA 마이크

로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)로 570㎚에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0055] **세포 내 활성산소종 수준 측정**

[0056] DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하여 세포 내 활성산소종 수준을 측정하였다. DCF-DA는 활성산소종에 의해 세포 내에서 DCF로 전환되어 형광을 발한다. HT22 세포에 Tat-RAN 융합단백질을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 활성산소종 수준을 비교해 보았다. Tat-RAN 융합단백질은 2μM로 1시간 동안 처리하였고 후에 과산화수소를 700μM의 농도로 30분 동안 처리하였다. 그리고 PBS로 두 번 씻어주고 DCF-DA를 20μM의 농도로 30분 처리하였다. 형광 강도는 Fluoroskan ELISA plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland)를 이용하여 485㎚ 여기파장 (exitation), 538㎚ 방출파장 (emission)을 측정하였다.

[0058] **TUNEL 분석**

[0059] HT22 세포에 Tat-RAN 융합단백질을 처리하지 않은 군과 2μM의 농도로 1시간 동안 처리한 군의 배양액에 과산화수소 (700μM)를 가하여 2시간 30분 동안 처리하였다. 세포사멸을 측정하기 위해 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick end labeling staining) 기법은 세포사멸 탐지 킷트 (Roche Applied Science)를 사용하여 수행하였다. 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 결과를 분석하였다.

[0061] **실험동물**

[0062] 한림대학교 실험동물센터에서 제공되는 저빌쥐 (Mongolian gerbils; Meriones unguiculatus)를 사용하였다. 23℃, 습도 60% 그리고 고정적으로 12시간의 빛과 음식물이 제공되는 곳에서 사육하였다. 실험동물 취급 및 관리는 최근의 국제법과 정책에 따라 수행하였고 [NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1985, revised 1996], 서울대 연구동물 관리 및 사용에 관한 위원회 (IACUC)에서 승인받았다 (SNU-100611-1). 모든 실험에서는 이용되는 동물 수와 본 발명에서 사용되는 공정에 의한 고통을 최소화하기 위해 노력하였다.

[0064] **실험동물에서 전뇌 허혈 유도**

[0065] 실험동물에서 전뇌 허혈을 유도하였다. 온목동맥을 신경 섬유들로부터 격리시켜 폐색하고, 외상이 크게 남지 않게 하기 위해 동맥류 클립(aneurysm clips)을 이용하였다. 혈류를 폐색하였을 때, 검안경(ophthalmoscope)을 이용하여 혈압을 주의 깊게 관찰하였다. 그 후 5분 동안 폐색하고 동맥류 클립을 제거하였다. 그리고 폐색에 대해 혈압이 회복되는 것을 검안경으로 확인하였다. 또한, 샴 수술로 정상 경동맥을 폐색하지 않고, 외과적인 절차를 제외하고 얼마나 영향을 받는지 확인해 보았다. 허혈성 손상에 대한 Tat-RAN 융합단백질의 보호효과를 실험하기 위해, 허혈 재관류(ischemia-reperfusion)하고 30분 동안 복강 내에 샴 수술군, 담체 처리군, Tat-RAN 융합단백질 처리군, RAN 단백질 처리군 및 PEP-1-펩타이드 처리군 5개 군별로 나누어 각각 처리하고, 7일 후 면역조직화학 실험을 수행했다.

[0066] 샴 수술군, 담체 처리군, Tat-RAN 융합단백질 처리군, RAN 단백질 처리군, PEP-1-펩타이드 처리군(2mg/kg)을 7일 후에 마취를 수행하고, 뇌 조직을 적출하고 PBS(pH 7.4)로 처리하고, 4% 포름알데하이드를 포함한 0.1M PBS(pH 7.4)로 처리하였다. 뇌 조직은 30% 자당으로 침윤하여 하룻밤 사이에 동결보존하였다. 뇌 조직은 냉동한 다음 50㎛ 두께로 절편화하고, 연속되는 절편은 PBS를 함유하는 6-웰 플레이트에 수집하였다.

[0068] **결과 1: Tat-RAN 융합 단백질의 정제 및 세포 투과**

[0069] 본 발명자들은 침투성 Tat-RAN 융합단백질을 제조하기 위해단백질 수송 도메인 PTD (Protein Transduction Domain)의 일종인 Tat이 포함된 Tat-벡터와 RAN 유전자를 재조합하였다(도 1의 A). 대장균에서 과대발현시켜 Ni^{2+}-나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였고, SDS-PAGE와 웨스턴블랏 분석법을 이용하여 Tat-RAN 융합단백질이 정제된 것을 확인하였다(도 1의 A, B).

[0071] **결과 2: HT22 세포 내로 Tat-RAN 융합단백질의 투과**

[0072] Tat-RAN 융합단백질의 시간 및 농도별로 HT22 세포 내 투과 정도를 RAN 단백질은 투과가 일어나지 않았다(도 2a, 2b). 투과된 융합단백질들은 세포 내 12시간 동안 안정되게 유지되었다(도 2c). 또한, 공촛점 현미경을 이용하여 DAPI로 세포핵을 염색하고, Tat-RAN 융합단백질을 녹색 형광으로 염색하여 효과적으로 세포 내로 투과되

는 것을 확인하였다(도 2d).

[0074] **결과 3: 산화 스트레스로 인한 세포생존율 변화, 활성산소종 생성 및 DNA 단편화에 대한 Tat-RAN 융합단백질의 세포 보호효과**

[0075] 세포에 Tat-RAN 융합단백질을 농도별로 전처리 후 과산화수소로 산화 스트레스를 유도하였다. 세포 생존능력을 확인하기 위해 WST-1 분석을 수행하였다. HT-22 세포에 700㎛M 과산화수소를 단일 처리하였을 경우 생존한 세포 수가 약 40%로 감소하였으나, Tat-RAN 융합단백질을 선처리한 경우 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하였다(도 3a).

[0076] 또한, 과산화수소로 처리할 때 유도되는 활성산소종을 Tat-RAN 융합단백질이 효과적으로 억제하는지 확인하기 위해 8-OHdG 형광 염료를 사용하여 세포 내 산화 정도를 분석하였다. HT22 세포가 30분 동안 700㎛M의 과산화수소에 노출되었을 때, 과산화수소에 의해 현저하게 8-OHdG 신호가 증가하였다. 그러나 과산화수소에 의해 유도된 활성산소종은 Tat-RAN 융합단백질에 의해 감소하였다(도 3b).

[0077] 산화 스트레스로 인해 발생되는 DNA 단편화에 대한 융합단백질의 보호효과는 DNA 단편화 부위에 특이적으로 붙는 형광 염료를 이용한 TUNEL 염색 방법으로 알아보았다. 앞선 실험과 동일한 상태에서 수행하였고, Tat-RAN 융합단백질 DNA 단편화에 대해 보호효과가 있다는 결과를 확인하였다(도 3c).

[0079] **결과 4: 산화 스트레스에 의한 세포 사멸에 대한 Tat-RAN 융합단백질의 보호 기작**

[0080] Bcl-2는 세포 생존에 중요한 역할을 하고 세포 사멸을 방지한다. 산화스트레스로 유도된 Bcl-2의 감소는 세포사멸 및 신경 세포사멸을 일으킨다. 또한, 여러 연구에서 과산화수소로 유도된 산화 스트레스 세포 손상에 대하여 세포 보호는 다양한 세포 유형에서 Bax / Bcl-2 신호 경로의 활성화에 의해 매개되는 것으로 입증되었다. 따라서, 본 발명자들은 과산화수소 처리된 세포에서 유도된 활성산소종이 Bcl-2에 대한 PEP-1-RAN 융합단백질의 효과를 조사하였다. Bcl-2가 RAN 단백질 군에서는 감소하였지만, Tat-RAN 융합단백질 군에서는 과산화수소 처리된 세포에서 Bcl-2 감소를 일정 수준으로 저해하는 것을 확인하였고, 대조적으로 Bax는 그와 반대의 패턴임을 확인하였다(도 4).

[0082] **결과 5: 과산화수소로 유도된 MAPK 신호에 대한 Tat-RAN 융합단백질의 보호효과**

[0083] 과산화수소로 유도된 MAPK의 활성은 세포사멸을 진행시킨다. MAPK의 Erk, p38, JNK의 인산화를 웨스턴블랏 분석을 통해 확인하였다. 과산화수소를 처리하여 Erk, p38, JNK 모두 인산화의 활성화가 증가한 반면, Tat-RAN 융합단백질(2 ㎛M)을 처리한 그룹에서는 인산화 활성이 감소되는 것을 확인하였다(도 5a, 5b).

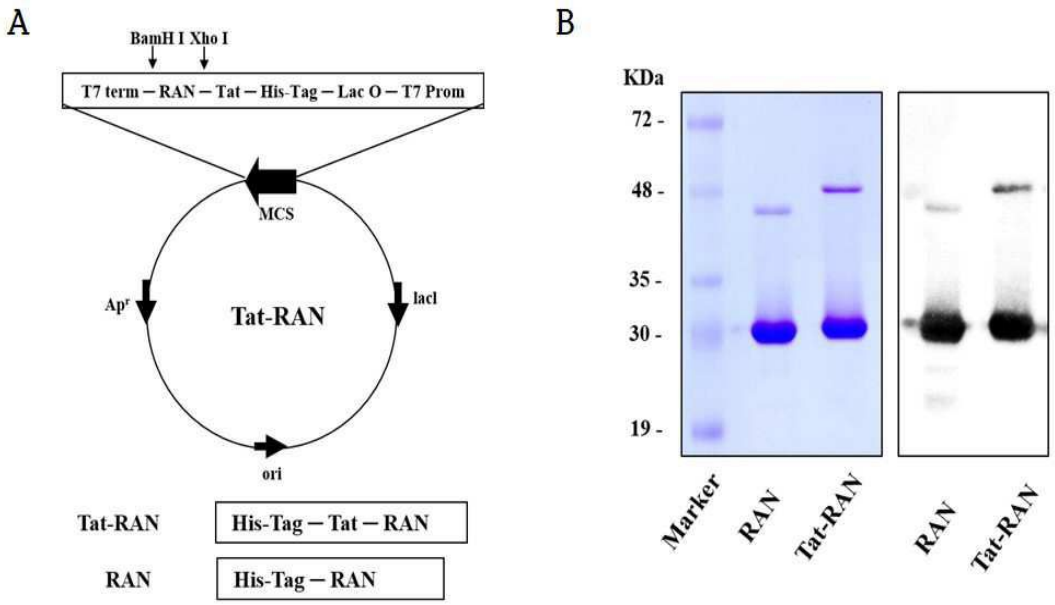
[0085] **결과 6: 뇌허혈성 손상에 대한 세포침투성 Tat-RAN 융합단백질의 보호효과**

[0086] 허혈성 손상에 대한 세포침투성 Tat-RAN 융합단백질의 보호효능을 알아보기 위해 저빌쥐(gerbil model)를 이용하여, 연속적으로 대뇌혈류(cerebral blood flow)를 감소시켜 뇌의 저산소증과 허혈을 유도함으로써 많은 양의 독성 활성산소종을 형성시켜 급성 뇌허혈 손상을 통해 신경세포 사멸을 유도하는 외과적 수술법으로 동물모델을 제작하였다. 침투한 Tat-RAN 융합단백질이 뇌허혈에 대해 보호효과가 있는지 살아있는 세포만을 염색하는 CV(Cresyl Violet) 염색과 손상 받은 뇌세포를 형광으로 염색하는 F-JB(Fluoro-Jade B)를 이용한 조직형광기법(histofluorescent) 염색으로 확인하였다. 뇌허혈을 유도한 동물 모델에서 모두 Tat-RAN 융합단백질을 처리한 동물에서는 세포사멸에 대한 보호효과를 나타냈으며, 반면, RAN 단백질을 처리한 동물에서는 세포사멸에 대한 보호효과가 전혀 나타나지 않았다. 또한, Iba-1(ionized calcium-binding adaptor molecule 1)은 새로운 Ca^{++} 결합 단백질(calcium-binding protein)이고, 특이하게 뇌의 활성화된 소교세포에서만 발현된다. 따라서 iba-1은 이러한 연구의 소교세포 지표로 이용되며, 신경세포 사멸로 인한 소교세포의 활성화를 확인할 수 있다. 그리고 중간 필라멘트(Intermediate filament)를 이루는 구성요소이면서 성상세포의 표지자인 GFAP(Glial fibrillary acidic protein)도 이용하였다. GFAP는 특히 신경세포에 손상을 받게 되면 성상세포가 손상 받은 부위를 보충하기 위해 활성화가 될 때 발현되는 단백질로 뇌손상시 활성화되어 응집하는 성상세포를 관찰할 수 있다. 뇌허혈 모델에서 Tat-RAN의 소교세포와 성상세포의 활성과 응집에 대해 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 뇌허혈이 유도된 경우 염색된 소교세포와 성상세포의 활성이 증가하고, 서로 응집된 것을 확인하였으며, 반면 Tat-RAN 융합단백질을 처리한 경우 활성화 그리고 응집 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 6의 B).

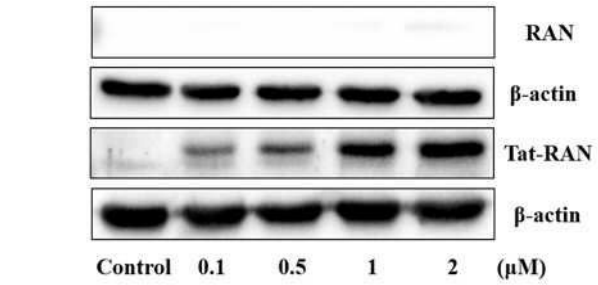
[0087] 따라서, 본 발명은 Tat-RAN 융합단백질이 뇌허혈 등의 신경퇴행성 질환 및 다양한 질환에 대하여 치료제로서 효과적으로 응용될 수 있다는 가능성을 제시한다.

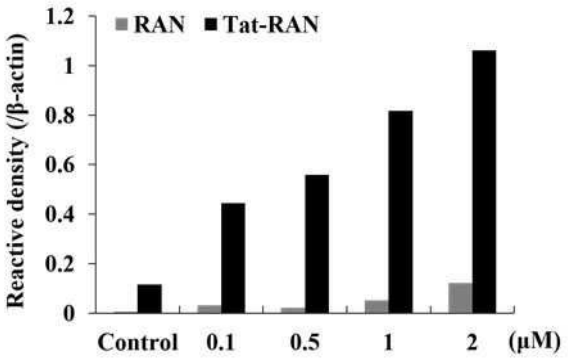
도면

도면1

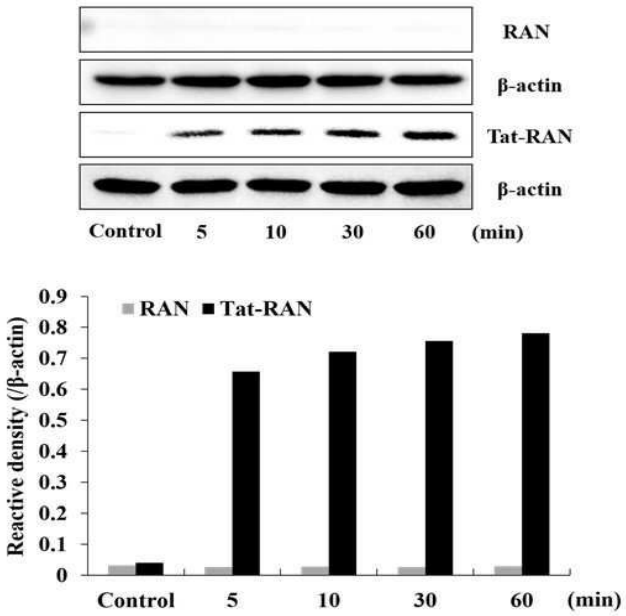

A
BamH I Xho I
T7 term – RAN – Tat – His-Tag – Lac O – T7 Prom
MCS
Ap^r
Tat-RAN
lacI
ori
Tat-RAN
His-Tag – Tat – RAN
RAN
His-Tag – RAN
B
KDa
72 -
48 -
35 -
30 -
19 -
Marker
RAN
Tat-RAN
RAN
Tat-RAN

도면2a

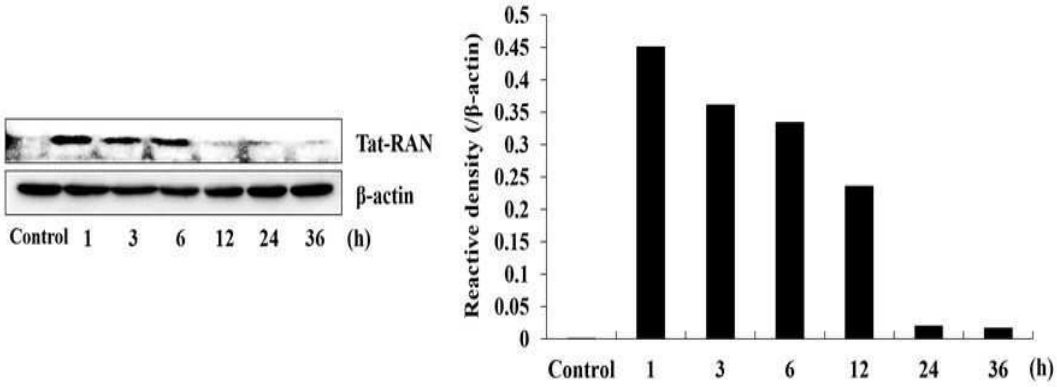

RAN
β-actin
Tat-RAN
β-actin
Control
0.1
0.5
1
2
(μM)


RAN
Tat-RAN
Reactive density (/β-actin)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
0.1
0.5
1
2
(μM)

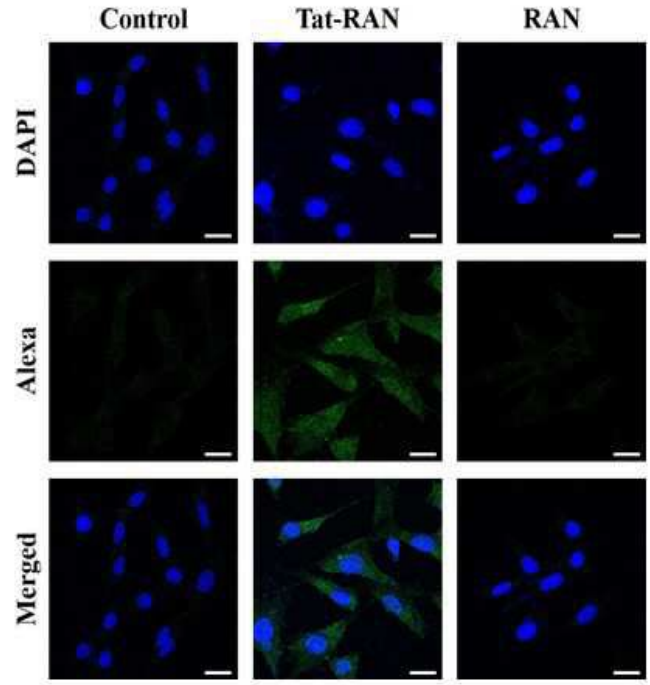
도면2b


RAN
β-actin
Tat-RAN
β-actin
Control 5 10 30 60 (min)
RAN Tat-RAN
Reactive density (/β-actin)
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control 5 10 30 60 (min)

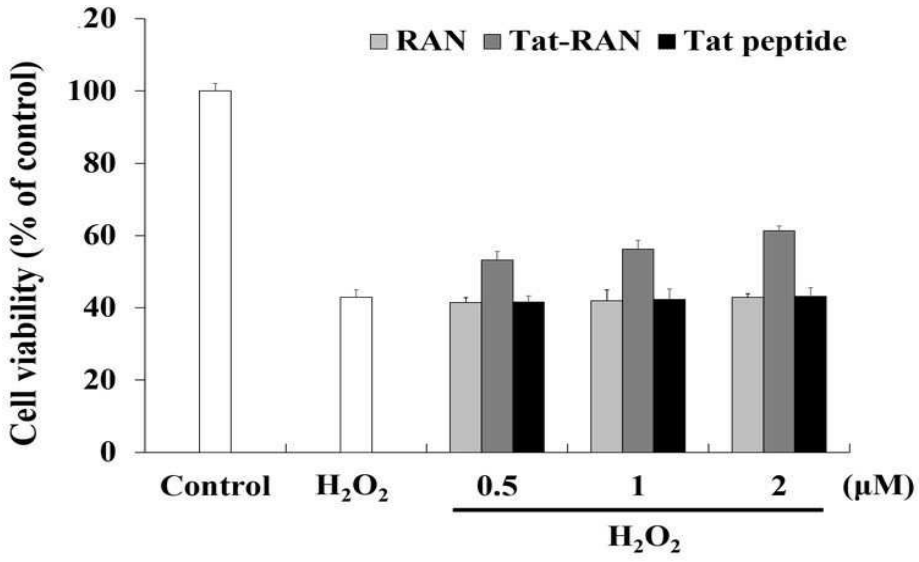
도면2c


Tat-RAN
β-actin
Control 1 3 6 12 24 36 (h)
Reactive density (/β-actin)
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Control 1 3 6 12 24 36 (h)

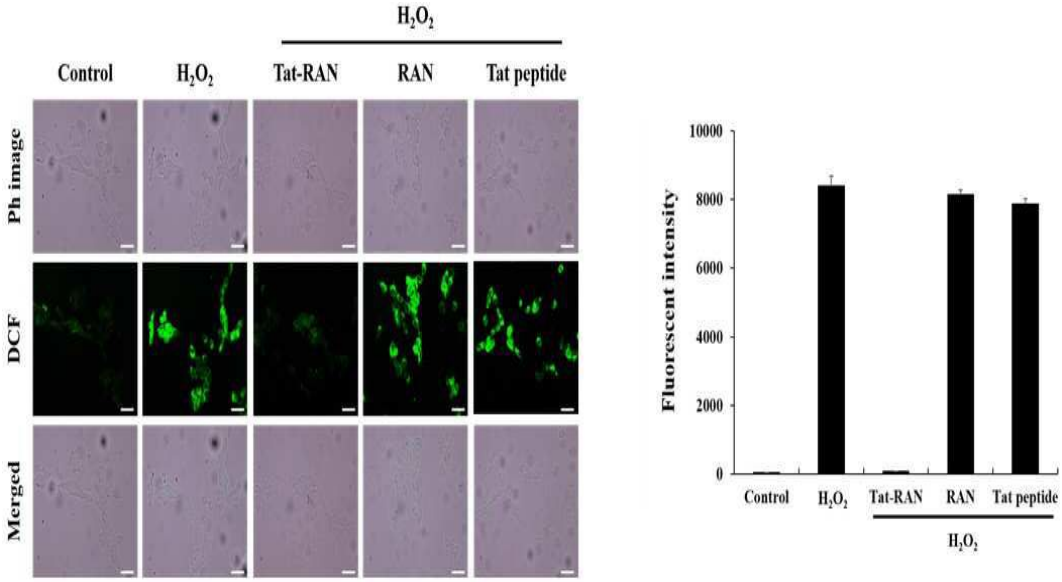
도면2d


Control
Tat-RAN
RAN
DAPI
Alexa
Merged

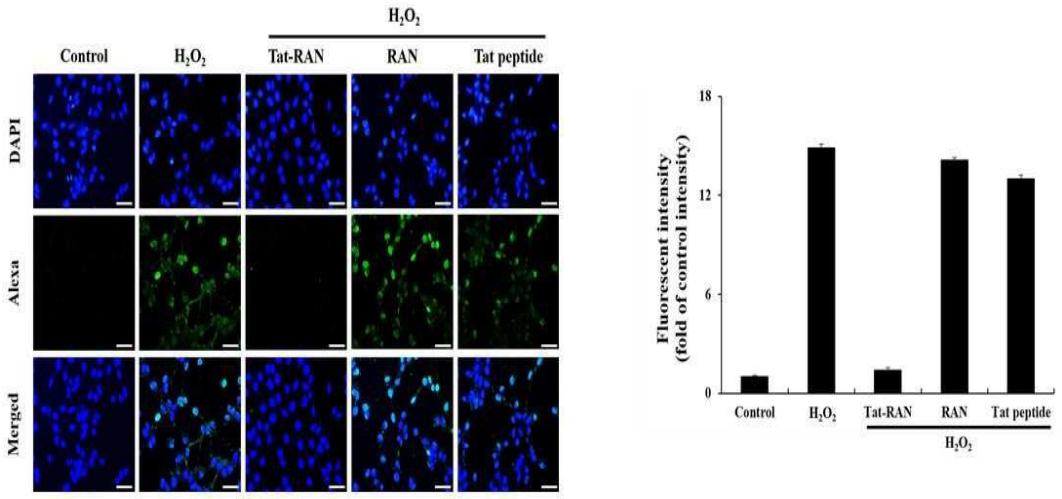
도면3a


RAN
Tat-RAN
Tat peptide
Cell viability (% of control)
20
100
80
60
40
20
0
Control
H2O2
0.5
1
2
(μM)
H2O2

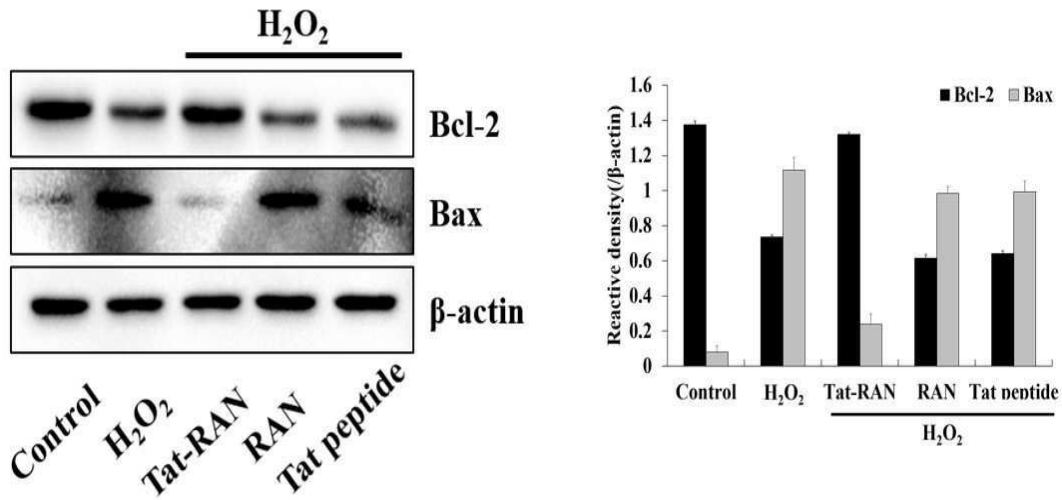
도면3b



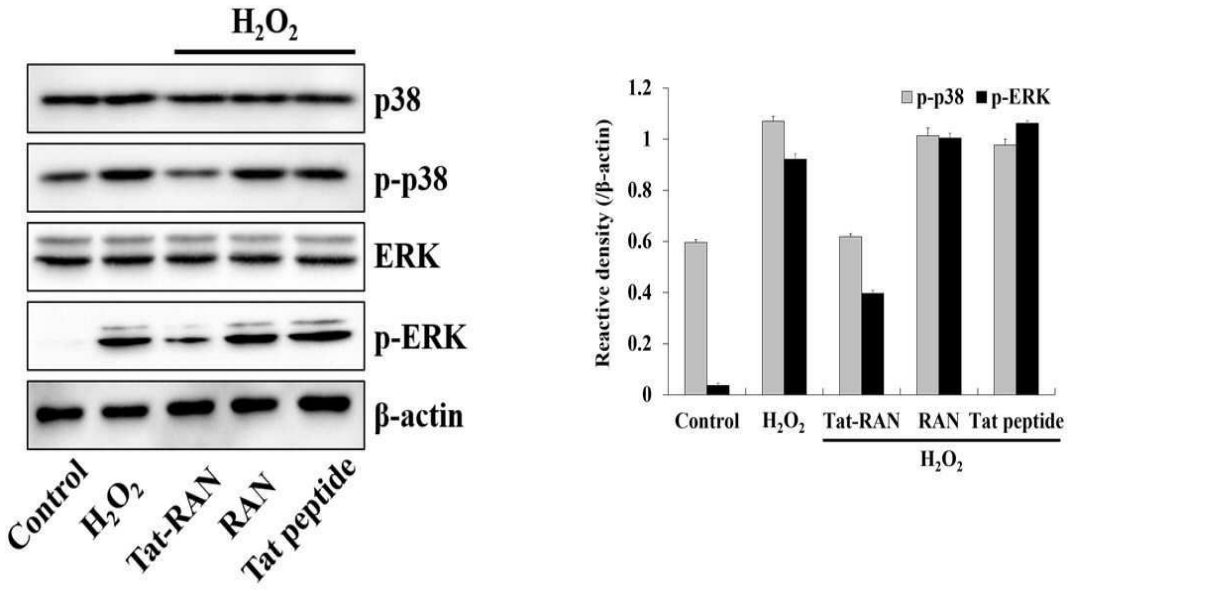
도면3c



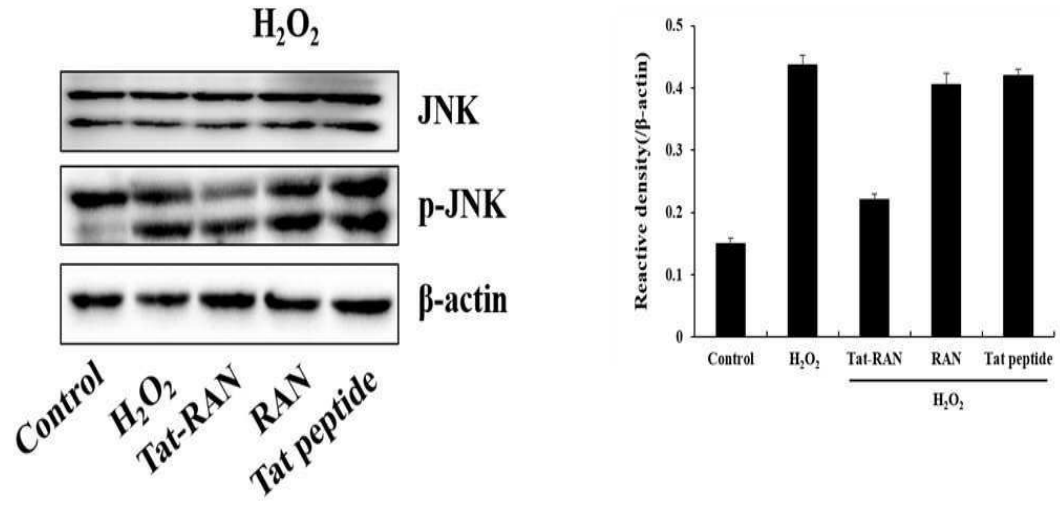
도면4



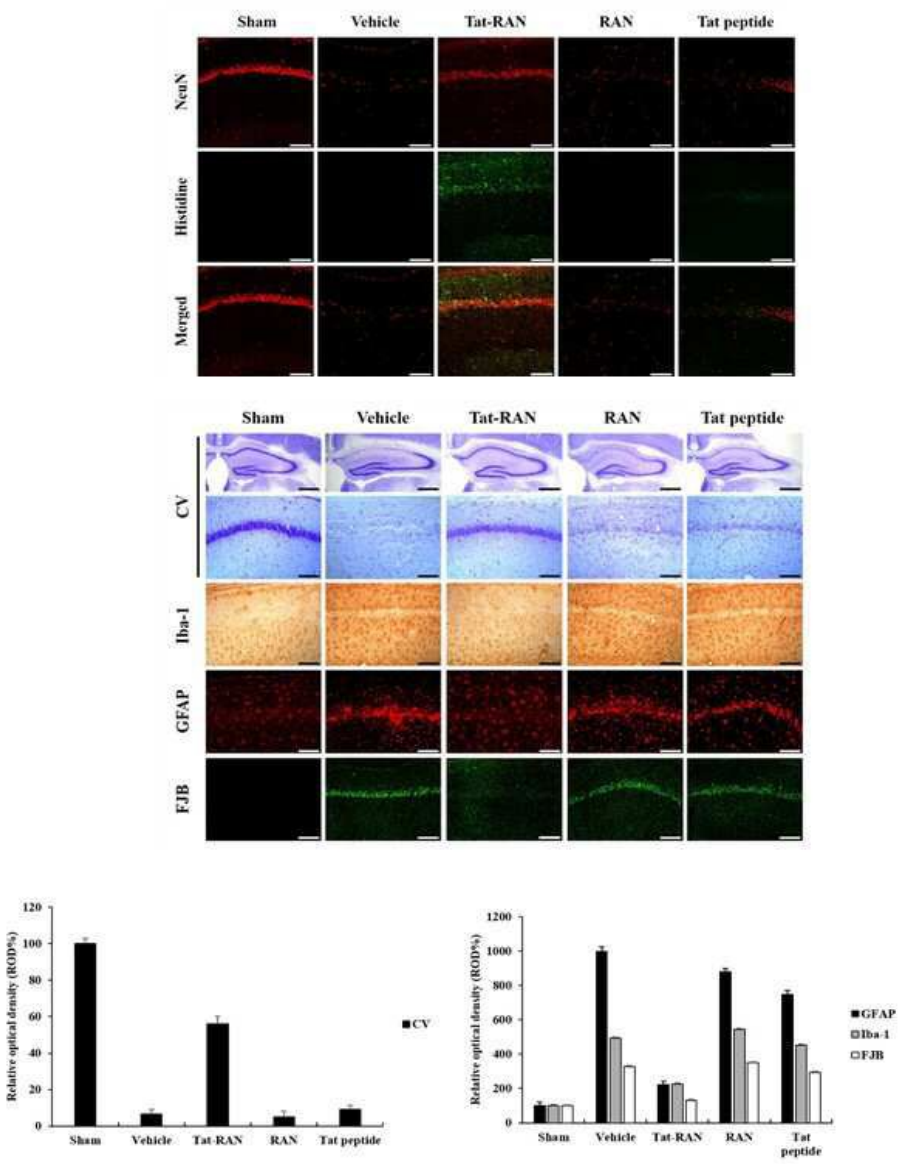
도면5a


H2O2
p38
p-p38
ERK
p-ERK
β-actin
Control
H2O2
Tat-RAN
RAN
Tat peptide
p-p38
p-ERK
Reactive density (/β-actin)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
H2O2
Tat-RAN
RAN
Tat peptide
H2O2

도면5b


H2O2
JNK
p-JNK
β-actin
Control
H2O2
Tat-RAN
RAN
Tat peptide
Reactive density(/β-actin)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control
H2O2
Tat-RAN
RAN
Tat peptide
H2O2

도면6



서 열 목 록

<110> Industry Academic Corporation Foundation, Hallym University

<120> Pharmaceutical composition for treating cerebral ischemia containing RAN fusion protein

<130> HallymU-sychoi-RAN-brainischemia

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 678

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

aggaagaagc ggagacagcg acgaagaatg gctgcgcagg gagagcccca ggtccagttc 60

aaacttgtat tggttggtga tggtggtact ggaaaaacga ccttcgtgaa acgtcatttg 120

actggtgaat ttgagaagaa gtatgtagcc accttgggtg ttgaggttca tcccctagtg 180

ttccacacca acagaggacc tattaagttc aatgtatggg acacagccgg ccaggagaaa 240

ttcggtggac tgagagatgg ctattatatc caagcccagt gtgccatcat aatgtttgat 300

gtaacatcga gagttactta caagaatgtg cctaactggc atagagatct ggtacgagtg 360

tgtgaaaaca tccccattgt gttgtgtggc aacaaagtgg atattaagga caggaaagtg 420

aaggcgaaat ccattgtctt ccaccgaaag aagaatcttc agtactacga catttctgcc 480

aaaagtaact acaactttga aaagcccttc ctctggcttg ctaggaagct cattggagac 540

cctaacttgg aatttgttgc catgcctgct ctcgccccac cagaagttgt catggaccca 600

gctttggcag cacagtatga gcacgactta gaggttgctc agacaactgc tctcccggat 660

gaggatgatg acctgtga 678

<210> 2

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-RAN fusion protein

<400> 2

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Ala Ala Gln Gly Glu Pro
1 5 10 15

Gln Val Gln Phe Lys Leu Val Leu Val Gly Asp Gly Gly Thr Gly Lys

20 25 30

Thr Thr Phe Val Lys Arg His Leu Thr Gly Glu Phe Glu Lys Lys Tyr
35 40 45

Val Ala Thr Leu Gly Val Glu Val His Pro Leu Val Phe His Thr Asn
50 55 60

Arg Gly Pro Ile Lys Phe Asn Val Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Lys
65 70 75 80

Phe Gly Gly Leu Arg Asp Gly Tyr Tyr Ile Gln Ala Gln Cys Ala Ile

85 90 95

Ile Met Phe Asp Val Thr Ser Arg Val Thr Tyr Lys Asn Val Pro Asn
100 105 110
Trp His Arg Asp Leu Val Arg Val Cys Glu Asn Ile Pro Ile Val Leu
115 120 125
Cys Gly Asn Lys Val Asp Ile Lys Asp Arg Lys Val Lys Ala Lys Ser
130 135 140
Ile Val Phe His Arg Lys Lys Asn Leu Gln Tyr Tyr Asp Ile Ser Ala
145 150 155 160
Lys Ser Asn Tyr Asn Phe Glu Lys Pro Phe Leu Trp Leu Ala Arg Lys

165 170 175
Leu Ile Gly Asp Pro Asn Leu Glu Phe Val Ala Met Pro Ala Leu Ala
180 185 190
Pro Pro Glu Val Val Met Asp Pro Ala Leu Ala Ala Gln Tyr Glu His
195 200 205
Asp Leu Glu Val Ala Gln Thr Thr Ala Leu Pro Asp Glu Asp Asp Asp
210 215 220
Leu
225

<210> 3
<211> 678
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> polynucleotide coding RAN-Tat fusion protein
<400> 3

atggctgcgc agggagagcc ccaggtccag ttcaaacttg tattggttgg tgatggtggt 60
actggaaaaa cgaccttcgt gaaacgtcat ttgactggtg aatttgagaa gaagtatgta 120
gccaccttgg gtgttgaggt tcatccccta gtgttccaca ccaacagagg acctattaag 180
ttcaatgtat gggacacagc cggccaggag aaattcggtg gactgagaga tggctattat 240
atccaagccc agtgtgccat cataatgttt gatgtaacat cgagagttac ttacaagaat 300
gtgcctaact ggcatagaga tctggtacga gtgtgtgaaa acatccccat tgtgttgtgt 360

ggcaacaaag tggatattaa ggacaggaaa gtgaaggcga aatccattgt cttccaccga 420

aagaagaatc ttcagtacta cgacatttct gccaaaagta actacaactt tgaaaagccc 480

ttcctctggc ttgctaggaa gctcattgga gaccctaact tggaatttgt tgccatgcct 540

gctctcgccc caccagaagt tgtcatggac ccagctttgg cagcacagta tgagcacgac 600

ttagaggttg ctcagacaac tgctctcccg gatgaggatg atgacctgtg aaggaagaag 660

cggagacagc gacgaaga 678

<210> 4

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAN-Tat fusion protein

<400> 4

Met Ala Ala Gln Gly Glu Pro Gln Val Gln Phe Lys Leu Val Leu Val
1 5 10 15

Gly Asp Gly Gly Thr Gly Lys Thr Thr Phe Val Lys Arg His Leu Thr
20 25 30

Gly Glu Phe Glu Lys Lys Tyr Val Ala Thr Leu Gly Val Glu Val His
35 40 45

Pro Leu Val Phe His Thr Asn Arg Gly Pro Ile Lys Phe Asn Val Trp

50 55 60

Asp Thr Ala Gly Gln Glu Lys Phe Gly Gly Leu Arg Asp Gly Tyr Tyr
65 70 75 80

Ile Gln Ala Gln Cys Ala Ile Ile Met Phe Asp Val Thr Ser Arg Val
85 90 95

Thr Tyr Lys Asn Val Pro Asn Trp His Arg Asp Leu Val Arg Val Cys
100 105 110

Glu Asn Ile Pro Ile Val Leu Cys Gly Asn Lys Val Asp Ile Lys Asp
115 120 125

Arg Lys Val Lys Ala Lys Ser Ile Val Phe His Arg Lys Lys Asn Leu
130 135 140

Gln Tyr Tyr Asp Ile Ser Ala Lys Ser Asn Tyr Asn Phe Glu Lys Pro
145 150 155 160

Phe Leu Trp Leu Ala Arg Lys Leu Ile Gly Asp Pro Asn Leu Glu Phe

165 170 175

Val Ala Met Pro Ala Leu Ala Pro Pro Glu Val Val Met Asp Pro Ala

180 185 190

Leu Ala Ala Gln Tyr Glu His Asp Leu Glu Val Ala Gln Thr Thr Ala

195 200 205

Leu Pro Asp Glu Asp Asp Asp Leu Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

210 215 220

Arg

225

<210> 5

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

aggaagaagc ggagacagcg acgaagaatg gctgcgcagg gagagcccca ggtccagttc 60

aaacttgtat tggttggtga tggtggtact ggaaaaacga ccttcgtgaa acgtcatttg 120

actggtgaat ttgagaagaa gtatgtagcc accttgggtg ttgaggttca tcccctagtg 180

ttccacacca acagaggacc tattaagttc aatgtatggg acacagccgg ccaggagaaa 240

ttcggtggac tgagagatgg ctattatatc caagcccagt gtgccatcat aatgtttgat 300

gtaacatcga gagttactta caagaatgtg cctaactggc atagagatct ggtacgagtg 360

tgtgaaaaca tccccattgt gttgtgtggc aacaaagtgg atattaagga caggaaagtg 420

aaggcgaaat ccattgtctt ccaccgaaag aagaatcttc agtactacga catttctgcc 480

aaaagtaact acaactttga aaagcccttc ctctggcttg ctaggaagct cattggagac 540

cctaacttgg aatttgttgc catgcctgct ctcgccccac cagaagttgt catggaccca 600

gctttggcag cacagtatga gcacgactta gaggttgctc agacaactgc tctcccggat 660

gaggatgatg acctgtgaag gaagaagcgg agacagcgac gaaga 705

<210> 6

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Ala Ala Gln Gly Glu Pro
1 5 10 15

Gln Val Gln Phe Lys Leu Val Leu Val Gly Asp Gly Gly Thr Gly Lys
20 25 30

Thr Thr Phe Val Lys Arg His Leu Thr Gly Glu Phe Glu Lys Lys Tyr
35 40 45

Val Ala Thr Leu Gly Val Glu Val His Pro Leu Val Phe His Thr Asn
50 55 60

Arg Gly Pro Ile Lys Phe Asn Val Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Lys
65 70 75 80

Phe Gly Gly Leu Arg Asp Gly Tyr Tyr Ile Gln Ala Gln Cys Ala Ile
85 90 95

Ile Met Phe Asp Val Thr Ser Arg Val Thr Tyr Lys Asn Val Pro Asn
100 105 110

Trp His Arg Asp Leu Val Arg Val Cys Glu Asn Ile Pro Ile Val Leu
115 120 125

Cys Gly Asn Lys Val Asp Ile Lys Asp Arg Lys Val Lys Ala Lys Ser
130 135 140

Ile Val Phe His Arg Lys Lys Asn Leu Gln Tyr Tyr Asp Ile Ser Ala
145 150 155 160

Lys Ser Asn Tyr Asn Phe Glu Lys Pro Phe Leu Trp Leu Ala Arg Lys
165 170 175

Leu Ile Gly Asp Pro Asn Leu Glu Phe Val Ala Met Pro Ala Leu Ala
180 185 190

Pro Pro Glu Val Val Met Asp Pro Ala Leu Ala Ala Gln Tyr Glu His
195 200 205

Asp Leu Glu Val Ala Gln Thr Thr Ala Leu Pro Asp Glu Asp Asp Asp
210 215 220

Leu Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
225 230

<210> 7

<211> 714

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide coding Pep-RAN fusion protein

<400> 7

aaagaaacct ggtgggaaac ctggtggacc gaatggtctc agccgaaaaa aaaacgtaaa 60

gtgatggctg cgcagggaga gccccaggtc cagttcaaac ttgtattggt tggtgatggt 120

ggtactggaa aaacgacctt cgtgaaacgt catttgactg gtgaatttga gaagaagtat 180

gtagccacct tgggtgttga ggttcatccc ctagtgttcc acaccaacag aggacctatt 240

aagttcaatg tatgggacac agccggccag gagaaattcg gtggactgag agatggctat 300

tatatccaag cccagtgtgc catcataatg tttgatgtaa catcgagagt tacttacaag 360

aatgtgccta actggcatag agatctggta cgagtgtgtg aaaacatccc cattgtgttg 420

tgtggcaaca aagtggatat taaggacagg aaagtgaagg cgaaatccat tgtcttccac 480

cgaaagaaga atcttcagta ctacgacatt tctgccaaaa gtaactacaa ctttgaaaag 540

cccttcctct ggcttgctag gaagctcatt ggagacccta acttggaatt tgttgccatg 600

cctgctctcg ccccaccaga agttgtcatg gacccagctt tggcagcaca gtatgagcac 660

gacttagagg ttgctcagac aactgctctc ccggatgagg atgatgacct gtga 714

<210> 8

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pep-RAN 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 Ala Gln Gly Glu Pro Gln Val Gln Phe
20 25 30

Lys Leu Val Leu Val Gly Asp Gly Gly Thr Gly Lys Thr Thr Phe Val
35 40 45

Lys Arg His Leu Thr Gly Glu Phe Glu Lys Lys Tyr Val Ala Thr Leu

50 55 60

Gly Val Glu Val His Pro Leu Val Phe His Thr Asn Arg Gly Pro Ile
65 70 75 80

Lys Phe Asn Val Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Lys Phe Gly Gly Leu
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Ile Gln Ala Gln Cys Ala Ile Ile Met Phe Asp
100 105 110

Val Thr Ser Arg Val Thr Tyr Lys Asn Val Pro Asn Trp His Arg Asp
115 120 125

Leu Val Arg Val Cys Glu Asn Ile Pro Ile Val Leu Cys Gly Asn Lys
130 135 140

Val Asp Ile Lys Asp Arg Lys Val Lys Ala Lys Ser Ile Val Phe His
145 150 155 160

Arg Lys Lys Asn Leu Gln Tyr Tyr Asp Ile Ser Ala Lys Ser Asn Tyr
165 170 175

Asn Phe Glu Lys Pro Phe Leu Trp Leu Ala Arg Lys Leu Ile Gly Asp
180 185 190

Pro Asn Leu Glu Phe Val Ala Met Pro Ala Leu Ala Pro Pro Glu Val

195 200 205

Val Met Asp Pro Ala Leu Ala Ala Gln Tyr Glu His Asp Leu Glu Val
210 215 220

Ala Gln Thr Thr Ala Leu Pro Asp Glu Asp Asp Asp Leu
225 230 235

<210> 9

<211> 714

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding RAN-Pep-1 fusion protein

<400> 9

atggctgcgc agggagagcc ccaggtccag ttcaaacttg tattggttgg tgatggtggt 60

actggaaaaa cgaccttcgt gaaacgtcat ttgactggtg aatttgagaa gaagtatgta 120

gccaccttgg gtgttgaggt tcatccccta gtgttccaca ccaacagagg acctattaag 180

ttcaatgtat gggacacagc cggccaggag aaattcggtg gactgagaga tggctattat 240

atccaagccc agtgtgccat cataatgttt gatgtaacat cgagagttac ttacaagaat 300

gtgcctaact ggcatagaga tctggtacga gtgtgtgaaa acatccccat tgtgttgtgt 360

ggcaacaaag tggatattaa ggacaggaaa gtgaaggcga aatccattgt cttccaccga 420

aagaagaatc ttcagtacta cgacatttct gccaaaagta actacaactt tgaaaagccc 480

ttcctctggc ttgctaggaa gctcattgga gaccctaact tggaatttgt tgccatgcct 540

gctctcgccc caccagaagt tgtcatggac ccagctttgg cagcacagta tgagcacgac 600

ttagaggttg ctcagacaac tgctctcccg gatgaggatg atgacctgtg aaaagaaacc 660

tggtgggaaa cctggtggac cgaatggtct cagccgaaaa aaaaacgtaa agtg 714

<210> 10

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAN-Pep-1 fusion protein

<400> 10

Met Ala Ala Gln Gly Glu Pro Gln Val Gln Phe Lys Leu Val Leu Val
1 5 10 15

Gly Asp Gly Gly Thr Gly Lys Thr Thr Phe Val Lys Arg His Leu Thr
20 25 30

Gly Glu Phe Glu Lys Lys Tyr Val Ala Thr Leu Gly Val Glu Val His
35 40 45

Pro Leu Val Phe His Thr Asn Arg Gly Pro Ile Lys Phe Asn Val Trp
50 55 60

Asp Thr Ala Gly Gln Glu Lys Phe Gly Gly Leu Arg Asp Gly Tyr Tyr
65 70 75 80

Ile Gln Ala Gln Cys Ala Ile Ile Met Phe Asp Val Thr Ser Arg Val
85 90 95

Thr Tyr Lys Asn Val Pro Asn Trp His Arg Asp Leu Val Arg Val Cys
100 105 110

Glu Asn Ile Pro Ile Val Leu Cys Gly Asn Lys Val Asp Ile Lys Asp
115 120 125

Arg Lys Val Lys Ala Lys Ser Ile Val Phe His Arg Lys Lys Asn Leu

130 135 140

Gln Tyr Tyr Asp Ile Ser Ala Lys Ser Asn Tyr Asn Phe Glu Lys Pro

145 150 155 160

Phe Leu Trp Leu Ala Arg Lys Leu Ile Gly Asp Pro Asn Leu Glu Phe

165 170 175

Val Ala Met Pro Ala Leu Ala Pro Pro Glu Val Val Met Asp Pro Ala

180 185 190

Leu Ala Ala Gln Tyr Glu His Asp Leu Glu Val Ala Gln Thr Thr Ala

195 200 205

Leu Pro Asp Glu Asp Asp Asp Leu Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp

210 215 220

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

225 230 235

<210> 11

<211> 777

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding Pep-1-RAN-Pep-1 fusion protein

<400> 11

aaagaaacct ggtgggaaac ctggtggacc gaatggtctc agccgaaaaa aaaacgtaaa 60

gtgatggctg cgcagggaga gccccaggtc cagttcaaac ttgtattggt tggtgatggt 120

ggtactggaa aaacgacctt cgtgaaacgt catttgactg gtgaatttga gaagaagtat 180

gtagccacct tgggtgttga ggttcatccc ctagtgttcc acaccaacag aggacctatt 240

aagttcaatg tatgggacac agccggccag gagaaattcg gtggactgag agatggctat 300

tatatccaag cccagtgtgc catcataatg tttgatgtaa catcgagagt tacttacaag 360

aatgtgccta actggcatag agatctggta cgagtgtgtg aaaacatccc cattgtgttg 420

tgtggcaaca aagtggatat taaggacagg aaagtgaagg cgaaatccat tgtcttccac 480

cgaaagaaga atcttcagta ctacgacatt tctgccaaaa gtaactacaa ctttgaaaag 540

cccttcctct ggcttgctag gaagctcatt ggagacccta acttggaatt tgttgccatg 600

cctgctctcg ccccaccaga agttgtcatg gacccagctt tggcagcaca gtatgagcac 660

gacttagagg ttgctcagac aactgctctc ccggatgagg atgatgacct gtgaaaagaa 720

acctggtggg aaacctggtg gaccgaatgg tctcagccga aaaaaaaacg taaagtg 777

<210> 12

<211> 258

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pep-1-RAN-Pep-1 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 Ala Gln Gly Glu Pro Gln Val Gln Phe
20 25 30

Lys Leu Val Leu Val Gly Asp Gly Gly Thr Gly Lys Thr Thr Phe Val
35 40 45

Lys Arg His Leu Thr Gly Glu Phe Glu Lys Lys Tyr Val Ala Thr Leu
50 55 60

Gly Val Glu Val His Pro Leu Val Phe His Thr Asn Arg Gly Pro Ile
65 70 75 80

Lys Phe Asn Val Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Lys Phe Gly Gly Leu
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Ile Gln Ala Gln Cys Ala Ile Ile Met Phe Asp
100 105 110

Val Thr Ser Arg Val Thr Tyr Lys Asn Val Pro Asn Trp His Arg Asp
115 120 125

Leu Val Arg Val Cys Glu Asn Ile Pro Ile Val Leu Cys Gly Asn Lys
130 135 140

Val Asp Ile Lys Asp Arg Lys Val Lys Ala Lys Ser Ile Val Phe His
145 150 155 160

Arg Lys Lys Asn Leu Gln Tyr Tyr Asp Ile Ser Ala Lys Ser Asn Tyr
165 170 175

Asn Phe Glu Lys Pro Phe Leu Trp Leu Ala Arg Lys Leu Ile Gly Asp
180 185 190

Pro Asn Leu Glu Phe Val Ala Met Pro Ala Leu Ala Pro Pro Glu Val

195 200 205

Val Met Asp Pro Ala Leu Ala Ala Gln Tyr Glu His Asp Leu Glu Val

210 215 220

Ala Gln Thr Thr Ala Leu Pro Asp Glu Asp Asp Asp Leu Lys Glu Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

Lys Val