

M1-9911-00-0025

질환치료를 위한 생리활성단백질의
세포내 침투기술

Protein Penetration Technology for Clinical
Therapy of Human Disease

한림대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “질환치료를 위한 생리활성 단백질의 세포내 침투기술”
에 관한 연구 과제의 최종 결과보고서로 제출합니다.

2004. 11. 30

주관연구기관명 : 한림대학교

주관연구책임자 : 최 수 영

보고서 초록

| | | | | | |
|--|-----------------|---|-----------------------------------|-------------|--|
| 과제관리번호 | M1-9911-00-0025 | 해당단계 연구기간 | 2001.9.1-2004.8.31 | 단계 구분 | (해당단계) / (총단계) |
| 연구사업명 | 중 사업명 | 국가지정연구실사업 | | | |
| | 세부사업명 | | | | |
| 연구과제명 | 중 과제명 | | | | |
| | 단위과제명 | 질환치료를 위한 생리활성 단백질의 세포내 침투기술 | | | |
| 연구책임자 | 최수영 | 해당단계 참여연구 원수 | 총 : 55 명 내부 : 6 명 외부 : 49 명 | 해당단계 연구비 | 정부: 870,000 천원 기업: 천원 계: 870,000 천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | 한림대학교 유전공학과 | | 참여기업명 | | |
| 국제공동연구 | 상대국명 : | 상대국연구기관명 : | | | |
| 위탁연구 | 연구기관명 : | 연구책임자 : | | | |
| 요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내) | | | | | 보고서 면수 |
| | | | | | 135 |
| <p>자가침투신호 (penetratin)를 갖는 HIV-1 Tat 단백질이 자발적으로 세포내로 침투할 수 있다는 특성을 이용하여 다양한 생체기능 목표단백질들에 penetratin을 부착하여 세포내로 운반시키는 단백질 침투기술을 개발함으로써 많은 질환들에 직접적으로 효율적인 치료할 수 있는 단백질 치료법을 실용화하는 것이 본 연구의 목표이다.</p> <p>본 연구에서는 HIV-1 Tat 단백질에 대표적인 항산화효소인 Cu,Zn-SOD, catalase와 다양한 질환에 관련된 생리활성 단백질들을 융합시켜 세포 및 조직내로 침투시켰으며, 침투된 후 단백질의 생리활성으로인한 새로운 단백질 치료법을 실용화시키는데 필요한 정보를 제공할 수 있는 결과들을 얻었다.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 침투효율이 높은 다양한 penetratin을 개발하였고, penetratin과 목표단백질의 융합기술을 발전시켰다. - 융합단백질의 세포내 침투조건의 최적화 및 침투된 단백질의 생리활성 분석을 통해 침투된 후 단백질 고유의 활성이 유지되고 있음을 확인하였다. - 다양한 질환관련 생리활성 단백질들을 이용하여 세포 및 조직내로 활성을 유지하면서 침투되는 것을 확인하였고 이 기술을 이용하여 질환관련 모델동물 (예: 뇌허혈, 당뇨)을 이용한 단백질 치료법으로의 가능성을 확인하였다. <p>위의 연구결과를 통하여 다양한 질환 (노화, 암, 신경질환, 선천성대사이상 유전병, 심혈관질환, 당뇨병, 피부질환 등)과 관련된 생리활성 단백질을 세포침투 능력을 갖는 vector에 융합시킨 후, 단백질 치료법으로 이용할 수 있는 가능성을 제시하였고, 이 기술은 의료산업, 제약산업, 기능성 화장품 산업 등의 모든 생명공학 관련 산업에 기반기술로서 활용될 수 있는 기술이다.</p> | | | | | |
| 색인어 (각 5개 이상) | 한글 | 면역결핍바이러스 티에이티, 펩 펩타이드, 단백질 침투기술, 질환모델동물, 뇌허혈, 당뇨병, 단백질 치료 | | | |
| | 영어 | HIV-1 Tat, PEP-1 peptide, Protein transduction, Model animal, Ischemia, Diabetes mellites, Protein therapy, | | | |

요 약 문

I. 제 목 :

질환치료를 위한 생리활성단백질의 세포내 침투기술

II. 연구개발의 목적 및 필요성

인간의 질병을 전통적인 약제로 치료하는 대신 유전 물질이나 유전물질의 산물인 단백질을 세포내로 전달하여 치료하는 것이 유전자 치료법이나 단백질 치료법의 핵심이다. 최근에는 다양한 인체의 질환이 세포 단백질의 비정상적 활성화에 기인한다는 사실이 알려짐에 따라 이들 단백질의 활성을 조절함으로써 치명적인 인체질환을 치료할 수 있는 약제의 개발이 전세계적으로 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 펩타이드 및 단백질은 다른 화합물에 비하여 특정 생리작용에 대한 선택성 및 효능성이 탁월함에도 불구하고 세포 내부로 직접 전달될 수 없는 약점 때문에 효과적인 약제로서의 실용화가 현실적으로 어려운 실정이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 중요한 생리활성을 갖는 다양한 생체 기능 단백질들을 세포내로 효율적으로 침투시키는 기술 (Protein Penetration Technology)을 개발함으로써 많은 질환들을 직접적이고 효율적으로 치료할 수 있는 획기적인 단백질 치료법을 실용화하는 것이 본 연구의 목표이다.

이 단백질 침투기술은 자가침투신호 (penetratin)를 갖는 HIV (Human Immunodeficiency Virus) Tat (Transactivator) 단백질과 Antennapedia homeodomain 단백질이 자발적으로 세포내로 침투할 수 있다는 특성을 이용하여 다양한 생체 기능 목표단백질들에 penetratin을 부착하여 세포내로 운반시키는 단백질 침투 기술을 개발함으로써 많은 질환들 (예: 노화, 암, 신경질환, 선천성 대사이상유전병, 심혈관질환, 당뇨병, 피부질환 등) 에 직접적으로 효율적인 치료할 수 있는 단백질 치료법을 위한 원천기술이다. 또한, 이 기술은 단백질 뿐 아니라 peptide, DNA, antisense RNA 그리고 생리활성 효능이 있는 유기물질 (organic molecules)들, 예를 들면 항노화, 항주름에 효능이 있는 retinol, vitamin C, 미백효능이 있는 hydroquinone등과, Chemotherapy용 항암제, 피부질환 치료용 제재등을 penetratin을 부착시켜 세포 및 조직내로의 전달을 높이는 데도 이용할 수 있을 것이다. 그러므로, 이 기술이 개발의 성공은 향후 임상치료를 포함한 의료산업, 제약산업, 기능성화장품 산업 등의 모든 생명공학 관련 산업에 기반기술로써 활용될 수 있는 획기적인 기술이다.

III. 연구 개발의 내용 및 범위

1. 침투효율 높은 penetratin vector의 개발

2. Penetratin과 Reporter 및 생리활성 단백질의 융합기술 개발
3. 융합단백질의 발현 생산 및 분리 정제 기술 개발
4. 융합 단백질의 세포내 침투 조건의 최적화 및 침투된 단백질의 생리활성 분석
5. 세포내로 침투 성공한 목표단백질들의 질환치료를 위한 조직내 침투 조사
6. 조직침투 기술을 이용한 질환모델 동물에 대한 단백질 치료법 이용

IV. 연구 개발 결과

1. 침투율 높은 Penetratin의 개발 및 목표 단백질 유전자와의 융합기술 개발

가. HIV-Tat 발현 vector 개발 및 GFP 유전자와의 융합을 수행하였다.

- (1) Tat-GFP fusion protein expression vector 제작
- (2) HIV-1 Tat basic domain의 deletion, mutation으로부터 다양한 Tat-GFP 발현 vector 제작
- (3) HIV-Tat basic domain을 lys 또는 arginine으로 변형시킨 후 pLys-GFP, pArg-GFP 발현 vector 제작
- (4) HIV-1 Tat basic domain을 GFP의 N-terminal, C-terminal 양쪽에 붙은 Tat-GFP-Tat 발현 vector 제작

나. Homeodomain (HD) 발현 vector 개발 및 GFP 유전자와의 융합을 수행하였다.

- (1) His-Ftz HD-GFP 및 His-EnHD-GFP 발현 vector 제작
- (2) His-Ptn-GFP 발현 vector 및 deletion, mutation으로부터 다양한 HD 운반 vector의 개발

다. 질환관련(노화, 암, 신경질환, 선천성대사이상, 당뇨병 등) 생리활성단백질의 유전자 크로닝 및 위에서 개발한 다양한 발현 vector와의 융합을 수행하였다.

- 질환관련 생리활성물질의 종류 : 뒤의 Scheme 2 참조

2. 융합 단백질의 생산 및 분리 정제 기술 개발

가. 발현된 융합단백질의 확인을 위한 항체를 준비하였다.

나. 융합단백질의 발현, 분리 정제 및 확인을 하였다.

3. 융합 단백질의 세포 및 조직내 침투 조건의 최적화 및 침투된 단백질의 생리활성 분석

가. 융합단백질의 세포내 침투 확인 및 생리 활성 능력을 확인하였다.

나. 질환관련 생리활성 목표융합단백질들의 조직내 침투확인 및 생리활성을 분석하였다.

4. 융합단백질의 세포내 침투효율 증가 기술개발

- 가. 구리이온의 reconstitution을 이용하여 SOD의 세포내 침투효율을 증가시켰다.
- 나. 인삼 추출물인 ginsenoside을 이용하여 SOD의 세포내 침투효율을 증가시켰다.
- 다. GFP의 N-terminal과 C-terminal 양쪽에 Tat을 부착시킨 결과 GFP의 세포내 침투효율을 증가시켰다.

5. 질환모델 동물에 대한 단백질 치료법 이용

- 가. 당뇨, 뇌허혈 질환모델 동물을 제작하였다.
- 나. 생리활성 단백질을 조직침투 기술을 이용하여 당뇨 및 뇌허혈 동물모델에서 단백질 치료법의 가능성을 확인하였다.

V. 연구개발 결과의 활용 계획

1. 질환치료용 단백질들의 세포 또는 조직으로의 침투를 통한 직접적 질환치료 (노화, 암, 신경질환, 유전병, 당뇨병, 피부질환 등)의 실용화 및 기능성화장품 (노화예방, 주름제거, 미백용)등의 개발가능
2. 펩타이드, DNA, antisense RNA, Ab의 세포 및 조직 침투를 이용한 펩타이드 치료법, 유전자치료법, antisense RNA 치료법, 항체 치료법(Antibody therapy)의 활용가능성.
3. 생체에서 중요한 기능을 갖는 생체유기물질 (Bio-organic molecules)들의 조직 내로의 침투를 이용한 노화예방, 피부질환 치료제, 항암제, 노화예방용 기능성 화장품 등으로의 활용
4. 식물세포로의 생리활성단백질 침투를 통한 식물성장, 형태, 기능 등의 조절 현상 연구
5. 동/식물 세포내 단백질의 function (Proteomics)과 유전자의 function (Functional genomics) 확인에의 응용 가능성
6. Drug delivery 체계의 기술적 문제점의 해결
7. 단백질 치료분야에 있어서 국제적 선도역할 기대.

SUMMARY

I. Title

The protein penetration technology for clinical therapy of human disease

II. The purpose of research

Gene therapy and protein therapy are based on the delivery of target genes or proteins into cells instead of traditional chemotherapy to treat human diseases.

According to the recent findings that abnormal activity of cellular proteins is responsible for the generation of a variety of human diseases, it become a major concern that development of therapeutic agents against fatal human diseases could be achieved by regulating the biological activity of these proteins. Nevertheless peptides or proteins are superior to other chemicals in the selectivity and efficacy of their action mode, utilization of these peptides/proteins as the therapeutic drugs is severely limited due to the difficulty of delivery of therapeutic proteins into cells.

Several techniques have been developed to introduce proteins into cells, including physical treatments (microinjection, scrape loading, and biolistics), chemical or biological pore formation (digitonin, pore-forming proteins, and ATP treatment), the use of modified proteins or protein carriers (lipidated proteins and immunotoxins/related bioconjugates), and particle uptake or fusion (liposomes, cell-cell fusion, virus mimics, and induced pinocytosis). For any techniques to become generally applicable, several important questions about a fraction of cells affected, treatment period, the extent of uptake between cells, reproducibility, cell toxicity and the location of proteins within the cells should be addressed.

To solve this problem and improve protein therapy, the specific aim of this proposal is to develop a novel protein penetration technology by which a variety of biologically active proteins could be delivered into cells to directly and efficiently treat diseases.

This protein penetration technology is based on the previous findings that exogenous HIV-1 Tat protein was able to translocate through the plasma membrane and to reach both the cytosol and nucleus in the cell. A basic domain of Tat protein spanning from residue 49 to 57 has been identified to be responsible for this translocation activity. Other translocation domains

were identified that reside in the third helix of the Antennapedia protein homeodomain from *Drosophila*. This technology could be utilized as a reliable general technique for efficiently delivering a variety of biologically functional target proteins into large numbers of living cells or organisms for the treatment of aging, cancer, neurological diseases, genetic disorders, and diabetes as well as the study of cell biology and drug delivery.

This technology also would be utilized the delivery of peptide, DNA, antisense RNA and organic molecules which can be used as therapeutic and cosmetic effects. Therefore, the successful development of this protein penetration technology will contribute to the medicinal, pharmaceutical, and cosmeceutical industries.

III. The contents of experimental approach

1. Development of penetratin expression vector with high efficiency of translocation activity by utilization or modification of penetration domains which were previously defined from human immunodeficiency virus Tat or Antennapedia homeodomain.
2. Development of fusion techniques to produce fusion proteins containing penetratin and target protein
3. Development of protocols for expression and purification of penetratin fusion proteins
4. Optimization of conditions for transduction of purified fusion proteins into cells and analysis of biological activity of penetration fusion proteins in cells
5. The penetration of fusion proteins into tissues for protein therapy

IV. Results

1. Development of penetration expression vector and fusion technologies of target protein with penetration vector
 - 1) We developed the HIV-Tat expression vector and fused GFP gene into the vector
 - 2) We developed the homeodomain expression vector and fused GFP gene into the vector
 - 3) We cloned the genes of proteins related to the human diseases (aging, cancer, neurological disease, genetic disease, diabetes, skin diseases etc) and fused these genes into the penetration vector

2. Development of protocols for expression and purification of penetratin fusion proteins
 - 1) We produced the monoclonal antibodies of target proteins for detection of penetration into cells or tissues
 - 2) We expressed, purified and identified fusion proteins
3. Optimization of conditions for transduction of target proteins into cells and tissues and analysis of biological activity of the transduced proteins.
 - 1) We identified the transduction activity of Tat-GFP
 - 2) We performed the transduction of target proteins related to the human diseases into cells and skin and analyzed the biological activities of transduced proteins
4. Development of more efficient transduction technology for target proteins using metal ions, natural products and change of Tat-position into target proteins.
5. Search of possibilities for protein therapy with disease animal model such as ischemia or diabetes mellitus.

V. Application of Research

1. Practice of direct therapy by utilizing cell-permeable proteins to treat human diseases (Aging, cancer, neurological disease, genetic disease, diabetes, skin diseases etc.) and design of cosmetics for anti-aging
2. Synergic effect of therapeutic efficacy by complementation of current chemotherapy and gene therapy, peptide therapy, and antibody therapy
3. The utilization of organic molecules as cosmetics or anticancer drug
4. The utilization of regulation in the plant growth, shape and functionality by protein transduction into the plant tissues
5. This method of protein transduction could be applied to studies of various intracellular protein functions (genomic function) and cellular process
6. Solution of technical problems in drug delivery system
7. Playing a leading role in protein therapy in international society

CONTENTS

| | |
|--|-----|
| Chap. 1. The Purpose and Significance of Research Project ----- | 11 |
| Chap. 2. The Present State of Domestic and International Research and Development in This Area ----- | 14 |
| Chap. 3. The Experimental Approach and Results ----- | 16 |
| Chap. 4. The Achievement of Research Goal and Contribution to Related Fields ----- | 88 |
| Chap. 5. The Application of Experimental Results ----- | 96 |
| Chap. 6. International Scientific Informations Accumulated Durin the Research Processing ----- | 115 |
| Chap. 7. References ----- | 116 |

목 차

| | | |
|-------|-----------------------|----------|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 | -----11 |
| 제 2 장 | 국내외 기술개발 현황 | -----14 |
| 제 3 장 | 연구개발수행 내용 및 결과 | -----16 |
| 제 4 장 | 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | -----88 |
| 제 5 장 | 연구개발 결과의 활용계획 | -----96 |
| 제 6 장 | 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | -----115 |
| 제 7 장 | 참고 문헌 | -----116 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

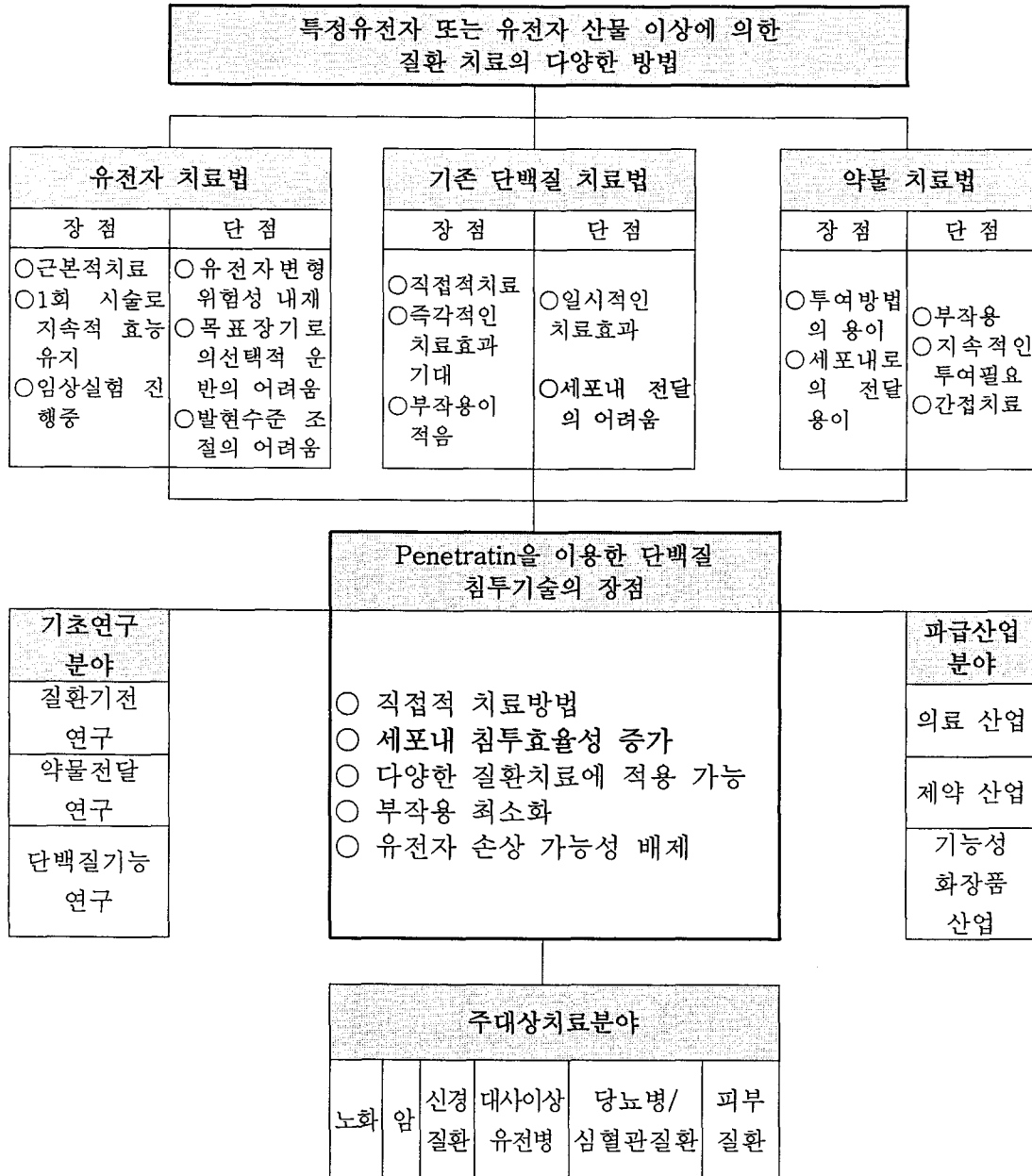
인간의 질병을 전통적인 약제로 치료하는 대신 유전 물질이나 유전물질의 산물인 단백질을 세포내로 전달하여 치료하는 것이 유전자 치료법이나 단백질 치료법의 핵심이다. 최근에는 다양한 인체의 질환이 세포 단백질의 비정상적 활성화에 기인한다는 사실이 알려짐에 따라 이들 단백질의 활성을 조절함으로써 치명적인 인체질환을 치료할 수 있는 약제의 개발이 전세계적으로 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 펩타이드 및 단백질은 다른 화합물에 비하여 특정 생리작용에 대한 선택성 및 효능성이 탁월함에도 불구하고 세포 내부로 직접 전달될 수 없는 약점 때문에 효과적인 약제로서의 실용화가 현실적으로 어려운 실정이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 중요한 생리활성을 갖는 다양한 생체 기능 단백질들을 세포내로 효율적으로 침투시키는 기술 (Protein Penetration Technology)을 개발함으로써 많은 질환들을 직접적이고 효율적으로 치료할 수 있는 획기적인 단백질 치료법을 실용화하는 것이 본 연구의 목표이다.

이 단백질 침투기술은 자가침투신호 (penetratin)를 갖는 HIV (Human Immunodeficiency Virus) Tat (Transactivator) 단백질과 Antennapedia homeodomain 단백질이 자발적으로 세포내로 침투할 수 있다는 특성을 이용하여 다양한 생체 기능 목표단백질들에 penetratin을 부착하여 세포내로 운반시키는 단백질 침투 기술을 개발함으로써 많은 질환들 (예: 노화, 암, 신경질환, 선천성 대사이상유전병, 심혈관질환, 당뇨병, 피부질환 등)에 직접적으로 효율적인 치료할 수 있는 단백질 치료법을 실용화하는 것이 본 연구의 목표이다.

또한, 이 기술은 단백질 뿐 아니라 peptide, DNA, antisense RNA 그리고 생리활성 효능이 있는 유기물질(organic molecules)들, 예를 들면 항노화, 항주름에 효능이 있는 retinol, vitamin C, 미백효능이 있는 hydroquinone등과, Chemotherapy용 항암제, 피부질환 치료용 물질 등을 penetratin을 부착시켜 세포 및 조직내로의 전달을 높이는 데도 이용할 수 있을 것이다.

그러므로, 이 기술이 개발의 성공은 향후 임상치료를 포함한 의료산업, 제약산업, 기능성화장품 산업 등의 모든 생명공학 관련 산업에 기반기술로써 활용될 수 있는 획기적인 기술이다 (Scheme 1).

Scheme 1. Penetratin을 이용한 단백질 침투기술 방법의 차이점



위의 scheme 1 에서 보듯이, 유전자치료법의 효율성과 응용분야의 다양성으로 인해 각종 질병의 치료에 있어 유전자치료법을 이용하려는 시도는 점차로 증가되고 있다. 그러나 유전자치료법은 유전자 변형을 야기하여 각종 부작용이 일어날 우려가 있어 실제 임상적 적용에는 많은 제약이 따른다. 따라서 단백질 침투기법을 이용한 본 연구가 소기의 성과를 얻는다면 유전자치료법의 단점을 극복할 수 있는 새로운 대체치료법 또는 복합치료법으로 임상에 즉시 적용될 가능성이 매우 높다. 따라서 본 연구에서 개발하고자 하는 penetratin을 이용하여 목표 단백질 또는 목표 유기물질들을 세포내로 성공적으로 침투시킬 수 있다면 많은 질병의 치료제로서 개발되어 수요가 급증할 것이다.

2. 최종목표

체내에 존재하며, 중요한 생리활성을 갖는 다양한 생체 기능 단백질들을 세포내로 효율적으로 침투시키는 기술 (Protein Penetration Technology)을 이용하여 많은 질병들을 직접적이고 효율적으로 치료할 수 있는 단백질 치료법을 실용화하는 것이 본 연구의 최종 목표이다.

3. 연구 개발 범위

- 가. 침투효율 높은 penetratin vector 개발
- 나. Penetratin 과 Reporter 및 목표단백질의 융합 기술 개발
- 다. 융합단백질의 발현 생산 및 분리 정제 기술 개발
- 라. 융합 단백질의 세포내 침투 조건의 최적화 및 침투된 단백질의 생리 활성 분석
- 마. 세포내로 침투 성공한 목표단백질들의 조직내 침투 조사
- 바. 조직침투 기술을 이용한 질환모델 동물에 대한 단백질 치료법 이용

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 현재 국내·외에서 이 분야 관련 연구 진행 상황을 살펴보면 다음과 같다.

최근 Tat을 이용한 DNA의 세포로의 delivery (Dowdy and suyder, 2001; eguchi et al, 2001), metabolic inhibitor의 delivery (torchilin et. al, 2001)가 발표되었고 Dowdy group에서 GTPase를 mamalian cells에 운반 (Dowdy et al, 2001)했다는 보고 등 다양한 생체고분자물질들의 세포내 침투 연구가 진행중이다.

HIV-1 Tat protein transduction domain (PTD)는 membrane을거쳐 직접 세포내로 침투되는것이 밝혀지면서 침투기전에 대한 많은 연구가 되었지만 아직까지 정확한 기전은 알려지지 않은 상태이며, receptor-, transporter-, edocytotic-independent하게 세포내로 침투된다는 것이 알려져 있는 상태이다. 최근에는 endocytosis-dependent or independent로 세포내 침투된다는 보고와함께 세포내 침투효율을 증가시키기 위해 HIV-1 Tat sequence를 arginine 및 lysine으로 변환시킨 vector가 발표되었다 (Lundberg et al., 2003; Cashman et al., 2003; Ho et al., 2001). 이러한 세포 침투용 vector를 이용하여 유전자 (DNA, oligopeptide 등)를 세포내 침투시키는 기술이 활발하게 진행중이다 (Morris et al., 1997; 2000; Tung et al., 2002). 이 외에 다양한 목표 물질의 세포내로의 침투기술이 진행중이다. 예를들면, organic molecule인 cyclosporine A를 피부세포 및 조직내 투과시켰으며(Rothbard et al., 2000), anticancer drug들을 liposome을 이용하여 cancer cell에 침투시킨다든가 또는 bone cell differentiation과 function을 연구하기 위해 hemagglutinin과 calcineurin을 osteoclasts와 osteoblasts에 침투시켜 anticancer 의 효능과 bone cell의 분화와 기능을 확인등의 연구가 진행되었다(Tsen et al., 2002; Dolgilevich et al., 2002). 이처럼 국외에서는 다양한 물질을 세포내 침투기술을 이용하여 침투시켜 치료용으로의 가능성을 탐색하는 시도단계에 있으며, 국내에서는 유일하게 본 연구진에서 단백질침투기술에 관한 연구를 수행하면서 이분야에서 국제적 leading group 의 역할을 하고있다.

2. 본 연구실의 기술개발현황

본 연구실에서는 생리활성 단백질을 이용하여 세포침투 효율을 증가시키는 기술 (Eum et al., 2002; Kim et al., 2003)과 질환모델 동물 (뇌허혈, 당뇨병)에서의 단백질 치료법의 가능성을 확인하였다 (Eum et al., 2004a, 2004b).

본 연구실에서의 연구결과로 항산화 효소인 SOD와 catalase를 세계 최초로 세포 및 피부조직을 비롯한 각종 조직에 침투시킴으로서 항노화 화장품의 개발이나 질환모델동물 (뇌허혈, 당뇨병)을 이용한 임상실험을 통한 새로운 치료법으로의 개발이 가능할 것이고 또한 암, 퇴행성신경질환 관련 단백질등의 세포내 침투 및 피부주름 치료제로 각광받고 있는 보톡스의 세포 및 피부조직으로의 침투 성공은 앞으로 이들을 이용한 산업적, 임상적으로 이용할 수 있는 기술을 성공시켰다.

그러므로 앞으로 국내에서 유일하게 본 연구진에서 수행하고 있는 침투기술을 발전시켜 질환치료 (노화, 암, 신경질환, 유전병, 당뇨병, 심혈관 질환, 피부질환 등) 및 제약산업, 신기능성 화장품 산업 등의 모든 생명공학 관련 산업에 기반기술로서 활용할 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

1. 연구목표 및 내용

| 연구목표 | 연구내용 |
|---|--|
| 1. 침투효율 높은 penetratin vector 개발 | (1) HIV-1 Tat 단백질의 발현 및 세포내 침투 능력 측정 (2) HIV-1 Tat 발현 vector 제조 (3) HIV-1 Tat의 basic domain의 deletion, mutation을 통한 변형된 발현 vector의 제조 (4) Homeodomain 발현 vector 제조 (5) C-terminal 쪽으로 Tat sequence를 삽입한 vector 및 N-terminal, C-terminal 양쪽으로 Tat sequence를 삽입한 침투 vector 개발 (6) 목표단백질을 3차구조 상태로 운반시킬 수 있는 침투 vector인 PEP-1 발현벡터의 제조 |
| 2. Penetratin과 Reporter 및 목표단백질의 융합 기술 개발 | (1) HIV-Tat과 Reporter gene (GFP)과의 융합 (2) Homeodomain과 Reporter gene (GFP)와의 융합 (3) HIV-Tat과 목표 단백질유전자 크로닝 및 유전자와의 융합 * 관련 질환 치료용 목표 단백질 1) 노화 관련 단백질 2) 암 관련 단백질 3) 신경질환 관련 단백질 4) 선천성대사이상 유전병 관련 단백질 5) 당뇨병 관련 단백질 6) 피부질환 관련 단백질 수행된 목표단백질 list 참조 (Scheme 2) |
| 3. 융합단백질의 발현 생산 및 분리 정제 기술 개발 | (1) 융합단백질의 발현 (2) 융합단백질의 분리, 정제 (3) 융합 단백질의 확인 (4) 융합 단백질 확인을 위한 목표 단백질들의 항체 생산 |
| 4. 융합 단백질의 세포내 침투 조건의 최적화 및 침투된 단백질의 생리 활성 분석 | (1) 융합단백질의 세포내 침투 및 확인 (2) 융합 단백질의 세포내 생리 활성 능력 확인 (3) 고효율 침투 조건의 탐색 |
| 5. 세포내로 침투 성공한 목표 단백질들의 피부 및 조직내 침투 조사 | (1) 질환관련 목표단백질들의 유전자와의 융합, 발현, 분리 정제 및 확인 (2) 질환관련 목표단백질들의 피부조직내 침투 및 생리 활성 측정 |
| 6. 질환모델 동물의 준비 및 단백질 치료법의 가능성 조사 | (1) 질환모델 동물 제작 (당뇨병, ischemia, 파킨슨씨병, 노화, 간질, 암) (2) 세포내로 침투하여 생리활성이 측정된 목표단백질들을 <i>in vivo</i> 상태에서 조직으로 침투 조사 (3) 질환모델동물에서 단백질 치료제로의 가능성 조사 |

Scheme 2. 세포내 침투를 위하여 수행중인 생리활성 목표 단백질

| Vector 및 질환명 | 목표 단백질 명 | 목표 단백질의 생물학적 활성 및 산업화 이용도 |
|--------------|---|--|
| 노화 | Superoxide Dismutase (SOD) Catalase (CAT) Cerulaplasmin <i>Botulinum</i> toxin (BTx) rpS 3 (UV endonuclease) DNA polymerase δ and ϵ Telomerase Organic molecules Retinoid & Retinol derivatives Vitamin C Collagenase inhibitor Hyaluronic acid Hydroquinone Tyrosinase inhibitor Caffeine or Theophylline 5-reductase inhibitor | 노화예방 기능성 화장품 및 식품 개발, 자외선손상 피부치료, 화상 치료, 아토피성 피부 질환 치료 항산화 효능 피부주름 치료용 자외선에 의한 손상 회복 자외선 관련 피부질환 예방 및 치료 수명연장 항노화, 항주름 보습제 미백효과 Slimming 효능 피지분비 억제 |
| 암 | p53, p21, p16, p27, p57 Nitroreductase (NR) Cytosine deaminase (CD) Arginine deiminase (ADI) | 암세포 성장 억제 암 치료용 Prodrug 암세포 성장 억제 |
| 신경질환 | GABA transaminase (GABA-T) Succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) Glutamate decarboxylase (GAD) Glutamate dehydrogenase (GDH) Pyridoxal kinase (PK) Pyridoxine-5-P oxidase (PO) Tyrosine hydroxylase (TH) GTP cyclohydrolase (GCH) α -synuclein Superoxide dismutase (SOD) Catalase (CAT) | 간질병 (Epilepsy) 치료 Choreoathetosis, Letargy, Nystagmus 간질병 (Epilepsy) 원인 규명 및 치료 Olivopontocerebellar atrophy Multiple sclerosis, Neurodegenerative disease Epilepsy, Seizure, Convulsion 치료 " 파킨슨 병 (Parkinson disease) 치료 " " Ischemia, Stroke 예방 및 치료, 파킨슨병 치료 |
| 선천성 대사이상 유전병 | Phenylalanine hydroxylase (PH) GABA-T SSADH GDH | Phenylketonuria (PKU) 치료 GABA-T deficiency disease 치료 SSADH deficiency disease 치료 GDH deficiency disease 치료 |
| 심혈관 질환 | Nitric-oxide synthase (NOS) | 심혈관 관련 질환 치료 |
| 당뇨병 | Superoxide dismutase (SOD) Catalase (CAT) | Type I Diabetes (IDDM) 치료 및 예방 |
| 신호전달 | C3 transferase (C3 TF) Human growth hormone | 신호 전달 체계 |

2. 연구범위 및 연구수행 방법

| 연구 범위 | | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|----------------------------|---|---|--|
| 1. 침투 효율 높은 penetratin의 개발 | 가. HIV-1 Tat 단백질의 발현 및 세포내 침투 능력 측정 | HIV-1 Tat 단백질의 발현을 위하여 HIV-1 Tat 유전자를 PCR 로 증폭시킨 후, 발현 vector 에 크로닝하여 <i>E.coli</i> 에서 발현시켰다. 발현된 단백질은 affinity 크로마토그래피에 의하여 분리정제한 후, 이를 포유동물의 세포내에서의 transactivating activity를 측정하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · HIV-1 Tat coding sequence의 PCR에 의한 증폭 · HIV-1 Tat coding sequence를 pET vector로 subcloning · Reconstituted vector를 <i>E.coli</i>로 transformation · 발현된 단백질의 Ni⁺⁺-nitritriacetate Sepharose 크로마토그래피에 의한 순수분리정제 · 분리정제된 단백질의 HeLa 세포내에서의 HIV-1 LTR promoter transactivation 확인과 human endothelial 세포에서의 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)의 발현조절을 분석하여 세포내 침투를 확인 |
| | 나. HIV-1 Tat 발현 vector 제조 | HIV-1 Tat 의 protein transduction domain (PTD) 이 포함된 (amino acid 47-57번) 다양한 pTat 발현 vector를 제조하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · PTD 47-57번 포함된 vector 제조 (ATG-His-YGRKKRRQRRR) · PTD 49-57번 포함 vector 제조 (ATG-His-RKKRRQRRR) · PTD이 10개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개 a.a가 되도록 deletion 된 다양한 vector 제조 · HIV-2 Tat vector 제조 · pGEX-4T-Tat vector 제조 |
| | 다. HIV-Tat basic domain의 deletion, mutagenesis를 이용한 침투 효율성 향상 | 침투 효율을 높일 수 있는 vector 개발을 위하여 HIV-1 Tat 의 PTD 9개 아미노산의 mutagenesis(deletion, addition, substitution)을 이용한 발현 vector를 제조하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · ATG-His-PTD-(proline)n 첨가한 발현 vector제조 · ATG-His-KKKKKKKKK 로 이루어진 발현 vector 제조 (9Lys-Tat vector) · ATG-His-RRRRRRRRR 로 이루어진 발현 vector 제조 (9Arg-Tat vector) · Mutant vector 제조 (10K, 9K, 8K, 7K, 9R, 8R, 7R, 6R, 5R, 4R, 3R) |
| | 라. Homeo-domain 발현 vector 제조 | 60개의 아미노산을 갖는 Antennapedia homeodomain (AntP)의 3rd helix 부분에 60여개의 아미노산과 16개 아미노산을 포함하는 발현 vector를 각각 제조하였으며, 침투효율이 높은 vector 개발을 위하여 Homeodomain 의 PTD 아미노산의 mutagenesis 나 deletion 를 이용한 발현 vector를 제조한후 reporter GFP 유전자를 각각의 vector에 융합시켰다. | <ul style="list-style-type: none"> · 60개 아미노산을 포함하는 vector 제조 (His-Fushi-trazu homeodomain; pFtzHD, His-Engrailed homeodomain; pEnHD) · 16개 아미노산을 포함하는 vector 제조 (PtnHD) · Ptn HD RQIKIWFQNRRMKWKK에서 C-말단 RRMKWKK를 포함하는 발현 vector 제조 (Ptn7C vector) · pEnHD vector에서 C-말단 7개의 아미노산 포함하는 vector (pEn 7C) 제조 (KRAKIKK) · pEve7C vector 제조 (RRMKDKR) · 제조된 vector들 과 GFP 유전자의 융합 ptn7C-GFP, pEn7C-GFP, pEve7C-GFP |

| 연구 범위 | | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|---------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| 1. 침투 효율 높은 penetratin의 개발 | 다. PEP-1 발현 vector 제조 | HIV-Tat 침투 vector는 목표 단백질을 변성(denaturation) 시킨 상태에서 침투시키는데 반해 목표 단백질이 3차구조를 유지시킨 상태에서 침투 될 수 있는 PEP-1 vector를 개발하였다. 제조된 vector에 항산화 효소인 SOD, Catalase를 삽입하여 발현 vector를 제조하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · PEP-1 vector의 제조 (KETWWETWWTEWSQPKKRKY) 21개의 아미노산 잔기로 이루어진 PEP-1 sequence는 다음의 세부분으로 이루어져 있다. · KETWWETWWTEW : hydrophobic trap motive · SQP : spacer arm · KKKRKY : hydrophilic lysine rich domain <p>이 sequence는 PTD domain을 함유하고 있는 signal peptide로서 세포내 침투를 위해서 SOD, Catalase 를 융합시켰다.</p> <ul style="list-style-type: none"> · PEP-1-SOD, PEP-1-Catalase |
| 2. Penetration과 목표단백질의 융합 기술 개발 | 가.HIV-Tat 과 reporter gene (GFP) 과의 융합 | <p>(1) His-Tat penetratin이 포함된 pET vector에 reporter 유전자인 GFP 단백질의 ORF를 삽입하여 His-tag의 융합된 pTat-GFP 발현 vector를 제조</p> <p>(2) 침투효율이 높은 vector 개발을 위하여 mutation, deletion, addition 등을 이용한 다양한 발현 vector 들을 제조</p> <p>(3) 침투 효율을 높일 수 있는 Tat의 PTD 9개 아미노산을 GFP의 C-terminal 부분과 N-terminal과 C-terminal 의 양쪽에 붙인 발현 vector를 제조</p> <p>(4) HIV-Tat 침투 vector는 목표 단백질을 변성(denaturation)시킨 상태에서 침투시키는데 반해 목표 단백질이 3차구조를 유지시킨 상태에서 침투 될 수 있는 PEP-1 vector의 제조</p> | <ul style="list-style-type: none"> · GFP의 cDNA 서열을 기본으로 2종류의 oligonucleotide 합성 * Forward primer: (XhoI site 함유) 5'-CTCGAGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3' * Reverse primer: (BamHI site 함유) 5'-GGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCATGCCGAG-3' · pEGFP-C2로부터 PCR 수행, DNA 절편 마련 · 아래의 다양한 pTat vector에 GFP 유전자 subcloning Tat(48-57)-GFP, Tat(49-59)-GFP, Tat(50-57)-GFP, Tat(51-57)-GFP, Tat(52-57)-GFP, Tat(50-53)-GFP, Tat(50-54)-GFP, Tat(50-55)-GFP, Tat(50-56)-GFP, Tat(49-57)-Pro-GFP, Tat(49-57)-Pro-Pro-GFP, Tat(49-57)-Pro-Pro-Pro-GFP, 10,9,8,7-Lys-GFP, 9~3Arg-GFP · Tat (49-57)-목표단백질 Tat-목표단백질-Tat Tat-목표단백질-Tat (사용된 단백질 GFP) · PEP-1-SOD, PEP-1-Catalase |

| 연구 범위 | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|--|--|--|
| <p>2. Penetration과 목표단백질의 융합 기술 개발</p> <p>나. HIV-Tat과 생리활성 단백질유전자 크로닝 및 유전자와의 융합</p> <p>* 질환관련 융합단백질명</p> <ul style="list-style-type: none"> · 노화관련 · 암관련 · 신경질환 관련 · 선천성 대사이상 유전병 · 심혈관 질환관련 등 | <p>다음의 각 질환관련 생리활성 단백질의 유전자를 크로닝하여 융합 시킨다.</p> <p>(1) 노화관련 유전자</p> <p>(i) 항산화효소 SOD, Catalase 인간 유전자 크로닝 및 pTat, 9Arg, 9Lys vector 로의 삽입</p> <p>(ii) <i>Botulinum toxin</i> 유전자 크로닝 및 pTat vector로의 삽입</p> <p>(iii) 자외선손상회복단백질 RPS3 (UV endoneuclease) 유전자 크로닝</p> <p>(iv) DNA polymerase δ 유전자 크로닝</p> <p>(2) 암관련 유전자</p> <p>(i) p53, p21, p16, p27, p57 유전자 크로닝 및 pTat vector로의 삽입</p> <p>(ii) Prodrug Nitroreductrase(NR), Cytosine deaminase(CD)의 유전자 크로닝 및 pTat vector로의 삽입</p> <p>(iii) Arginine deiminase(ADI) 유전자 크로닝 및 pTat vector로의 삽입</p> <p>(iv) Bax, HSP70 유전자 크로닝 및 Tat vector로 삽입</p> <p>(3) 신경질환관련 유전자</p> <p>(i) GABA-T, SSADH, GAD, GDH, PK, PO, IMPP 유전자 크로닝 및 pTat 및 PEP-1 vector 로의 삽입</p> <p>(ii) TH, GCH 유전자 크로닝 및 pTat vector로의 삽입</p> <p>(4) 선천성대사이상 유전병 관련 유전자</p> <p>(i) PH 유전자 크로닝 및 pTat vector 로의 삽입</p> <p>(ii) GABA-T, GDH 유전자 크로닝 및 PEP-1 vector 로의 삽입</p> <p>(iii) SSADH의 유전자 크로닝 및 PEP-1 vector 로의 삽입</p> | <ul style="list-style-type: none"> · 인간 SOD 유전자를 본연구실에서 크로닝하여 primer를 제작 후 PCR로 증폭 시킨 후 pTat vector에 삽입시켰다. · 인간 liver Catalase 유전자를 최초로 본연구실에서 크로닝 하였으며, primer를 제작 후 PCR로 증폭 후 pTat vector에 삽입시켰다. · <i>Botulinum toxin</i> 유전자는 (주)BioBud로부터 제공받아 pTat vector에 삽입하기 위한 primer를 제작한 후 PCR로 증폭 후 pTat vector에 삽입시켰다. · RPS3 유전자를 고려대 김준 교수로부터 제공받아 primer를 제작한 후 PCR로 증폭 후 pTat vector에 삽입시켰다. · p53, p21, p16, p27, p57 유전자를 한림대 이재용 교수로부터 제공받았다. · NR, CD 유전자를 본연구실에서 크로닝하였다. primer를 제작한 후 PCR로 증폭 후 pTat vector에 삽입시켰다. · ADI 유전자는 고려대 민본홍 교수로부터 제공받았다. · Bax, HSP70 유전자를 본 연구실에서 클로닝하여 PCR로 증폭 시킨 후 pTat vector에 삽입시켰다. · 인간 및 소 뇌조직 GABA-T 유전자를 본연구실에서 크로닝하였다. · 인간 뇌조직 SSADH 유전자 크로닝을 위하여 단항체 생산 및 효소활성부위 구조 탐색을 하였다. · 인간 GAD 유전자를 본 실험실에서 크로닝하였다. · 인간 뇌조직 GDH는 울산의대 조성우 교수로부터 제공받았다. · 소 뇌조직 GDH 유전자크로닝을 본 연구실에서 수행 하였다. |

| 연구 범위 | | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|--|--|--|--|
| 2. Penetration과 목표단백질의 융합 기술 개발 | <p>나. HIV-Tat 과 생리활성 단백질유전자 크로닝 및 유전자와의 융합</p> <p>* 질환관련 융합단백질명</p> <ul style="list-style-type: none"> · 노화관련 · 암관련 · 신경질환 관련 · 선천성 대사이상 유전병 · 심혈관 질환관련 등 | <p>(5) 심혈관질환관련유전자</p> <p>(i) iNOS 유전자 크로닝</p> <p>(6) 당뇨병관련유전자</p> <p>(i) SOD, Catalase</p> <p>(7) 신호전달관련유전자</p> <p>(i) C3 Transferase 유전자 크로닝 및 pTat vector로의 삽입</p> <p>(ii) hGH 유전자 크로닝 및 pTat vector로의 삽입</p> <p>(8) 생리활성 organic compound 들을 Tat 침투 domain 과의 cross-linking</p> | <ul style="list-style-type: none"> · 인간 뇌조직 PK, PO 유전자를 경북대 권오신 교수로부터 제공받았다. · TH 유전자를 울산의대 황은유 교수로부터 제공받았다. · GCH 유전자를 아주의대 진병관 교수로부터 제공받았다. · PH 유전자를 primer 제작 후 본 연구실에서 인간 간조직 cDNA library로부터 PCR 크로닝 하여 pTat vector에 삽입시켰다. · iNOS와 C3 Transferase 유전자를 강원대 김영명 교수 및 한림대 박재봉 교수로부터 각각 제공받았다. · hGH 유전자를 primer 제작 후 PCR 크로닝하여 pTat vector에 삽입시켰다. · Vitamin A, C를 침투domain 인 6-Lys-등과 cross-linking 시켰다. <p>제공받은 각 유전자의 primer를 제작한 후 PCR로 증폭시킨 다음 pTat vector에 삽입시켜 융합단백질을 제조하였다.</p> |
| 3. 융합 단백질의 생산 및 분리 정제 기술 개발 | <p>가. 융합 단백질의 발현</p> | <p>위에서 마련된 각 생리활성 단백질의 유전자가 insertion 된 발현 vector 들을 포함하는 <i>E.coli</i> BL21(DE3)를 선택 후 이를 LB media에서 IPTG 를 첨가하여 과대발현을 유도하였다.</p> | <p>위에서 기술한 reporter protein GFP 및 질환 관련 생리활성단백질들의 유전자를 포함하는 발현 vector들을 각각 <i>E. coli</i>에서 과대발현 시켰다.</p> <p>발현 vector 들</p> <ul style="list-style-type: none"> · 10K, 9K, 8K, 7K, 6K-GFP · 9R, 8, 7R, 6R, 5R, 4R, 3R-GFP · Ptn-GFP, Ptn7C-GFP, En7C-GFP, Eve7C-GFP, Ptn7MR-GFP, Ptn7MK-GFP, Ptn7WR-GFP, Ptn7WK-GFP, pEnHD-GFP, pFtzHD-GFP, pPtn-GFP · Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat · Tat-SOD, Tat-CAT, Tat-p53, Tat-NR, Tat-CD, Tat-GDH, Tat-PK, Tat-C3 TF · HIV-2 Tat-GFP, pGEX-4T-GFP · PEP-1-SOD, PEP-1-Catalase · PEP-1-BTx, PEP-1-GABA-T · PEP-1-SSADH, PEP-1-rpS3 · PEP-1-Ceruloplasmin · PEP-1-Synuclein · PEP-1-Telomerase |

| 연구 범위 | | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|--|-------------------------------|---|---|
| 3. 융합 단백질의 생산 및 분리 정제 기술 개발 | 나. 융합 단백질의 분리, 정제 | 발현된 융합단백질들은 각각 His (6개)이 붙어있어 이를 이용하여 Ni ⁺⁺ -nitriloacetate sepharose affinity column을 이용하여 분리정제하였고, desalting column을 이용하여 salt를 제거하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · 각각의 발현된 융합단백질을 포함하는 <i>E.coli</i> 세포획득 · 세포파쇄 후 원심분리하고 상층액을 Ni⁺⁺-nitrilotriacetate Sepharose column에 loading하여 binding시키고 washing 및 elution buffer를 이용해 정제하였다. · Salt 제거를 하여 PD-10 gel filtration 방법을 사용하였다. |
| | 다. 융합 단백질의 확인 | 융합단백질들의 확인은 각각의 단백질들의 항체들 (polyclonal 또는 monoclonal antibody)을 이용하거나 His-tag Ab를 이용한 분석 방법에 의하여 확인하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · 정제된 단백질의 SDS-PAGE 수행 · Nitrocellulose membrane으로 transfer · 항체를 이용한 Western blot분석으로 확인하였다. |
| | 라. 융합 단백질 확인을 위한 목표 단백질의 항체생산 | 융합단백질을 Western blot 분석으로 확인하기 위해 6His-에 대한 항체 및 각 목표 단백질들의 항체 (poly 또는 monoclonal)를 각각 구입하거나 직접 본 연구진에서 생산하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · 구입한 항체 6His, GFP, GAD · 본 연구진에서 생산했거나 생산중인 단항체 Tat(49-57), 9Lys, 9Arg, SOD, CAT, PK, PO, hGABA-T, bGABA-T, hSSADH, hGDH, bGDH, sGDH, IMPP, NR, rpS3, BTx, synuclein, Ceruloplasmin |
| 4. 융합 단백질의 세포내 침투조건 최적화 및 침투된 단백질의 생리활성 분석 | 가. 융합 단백질의 세포내 침투 및 확인 | 정제된 융합 단백질의 세포내 침투를 수행하기 위하여 각각 발현, 정제된 단백질을 시간/농도별로 각각 다양한 세포의 배양액에 처리하여 세포내 침투 실험을 수행하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · HeLa cell의 배양 및 cell 내로의 단백질 침투 (Tat-GFP, Tat-SOD, Tat-CAT, 9Arg-CAT, Tat-p53, Tat-NR, Tat-CD, Tat-ADI, PEP-1-SOD, PEP-1-CAT) · PC-12 cell의 배양 및 cell 내로의 단백질 침투 (Tat-CAT, Tat-PK, Tat-GDH) · Macrophage J774A. 1의 배양 및 cell 내로의 단백질 침투 (Tat-C3TF) · S2 cell의 배양 및 cell 내로의 단백질 침투 (Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat, Ptn-GFP, Ptn7C-GFP, En7C-GFP, Eve7C-GFP) · Insulinoma cell (RIN-5F, MIN-6N)의 배양 및 단백질 침투 (Tat-SOD) · 침투 완료된 세포를 trypsin-EDTA로 처리 후, 침투된 융합단백질은 SDS-PAGE와 Western blot 분석으로 확인 |

| 연구 범위 | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|---|--|--|
| 나. 융합 단백질의 피부 조직내 침투 확인 | 정제된 융합 단백질의 조직내 침투를 수행하기 위하여 털을 면도한 생쥐나 hairless mice에 Tat-SOD, Tat-CAT, PEP-1-BTx을 피부에 바른 후 침투여부를 확인 하였다. | · 생쥐의 면도된 피부 및 hairless mouse 피부에 Tat-SOD, Tat-CAT, PEP-1-BTx 융합단백질을 바른 후 시간에 따라 이들 단백질이 피부 조직내로 침투하는지를 조직면역염색 및 효소 활성도 측정으로 확인하였다. |
| 다. 융합 단백질의 효율 침투 조건의 확립 | (1) 항산화 효소인 SOD의 침투 효율을 증가시키기 위해서 구리이온을 공급하여 침투효율의 증가 여부를 측정하였다. (2) 인삼 추출물 (ginsenoside)을 이용하여 SOD 침투효율의 증가 여부를 측정하였다. (3) 목표단백질의 양쪽 말단에 Tat을 부착시켜 침투효율의 증가 여부를 측정하였다. | · Tat-SOD와 구리이온으로 reconstitution 된 CR-Tat-SOD 와의 침투효율을 HeLa 세포내로 침투 시킨후 Western blot과 효소 활성도 변화를 측정하였다. · 인삼추출물인 ginsenoside를 미리 세포내 처리한 다음 Tat-SOD를 처리하여 세포 및 조직내로의 침투를 조직면역염색 및 효소활성도 측정으로 확인하였다. · GFP의 N-terminal, C-terminal 양쪽 말단에 Tat을 부착시켜 세포내 침투 효율을 Western blot과 형광세기를 측정하였다. |
| 4. 융합 단백질의 세포내 침투조건의 최적화 및 침투된 단백질의 생리활성 분석 | 라. 융합 단백질의 세포내에서 안정성 유지 및 생리활성 능력 확인 (1) 세포내로 들어간 단백질들의 세포내에서의 안정성 실험과 생리활성능력을 각각의 단백질들의 특성에 따라 현미경을 이용한 형광 세기 정도, 효소의 활성도, 그리고 cell viability 정도 등으로 측정하였다. (2) 조직내로 침투된 단백질들도 활성도 측정을 수행하였다. | · 침투된 단백질들의 안정성유지는 시간에 따른 단백질의 degradation 여부를 시간에 따른 Western blot으로 확인하였다. · 침투된 단백질들의 생리활성 능력은 각각 다음과 같이 측정하였다. · GFP : 현미경을 이용한 형광의 세기 측정 · p53 : 세포의 Viability 및 p21 induction 측정 · p21 : 세포의 viability 측정 · NR : menadione의 분해를 550 nm 에서 측정, MTT assay · CD : 5-F-Cytosine 의 변화를 290 nm에서 감소하면서 255 nm 에서 증가 측정, MTT assay · ADI : Arginine 분해에 따른 활성을 530 nm에서 측정 · PK : pyridoxal로부터 PLP가 생성되는 388 nm에서의 증가 측정 · SOD : xanthine/xanthine oxidase 반응에 의한 ferricytochrome C 환원의 억제정도를 분광계로 측정 · CAT : H ₂ O ₂ 의 degradation을 240nm에서 측정 · GDH : 효소반응에 의해 생성된 NADH를 340 nm에서의 변화 측정 · C3 TF : macrophage의 탐식 작용 (phagocytosis) 능력 측정 (FITC-zymosan 의 형광의 정도 측정) |

| 연구 범위 | | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|---------------------------|------------------------------|---|--|
| 5. 질환 모델 동물에 대한 단백질치료법 이용 | 가. 융합 단백질의 조직내 침투 및 확인 | 정제된 융합 단백질의 세포내 침투를 수행하기 위하여 각각 발현, 정제된 단백질들을 복강 주사 후, 각각 다양한 조직의 면역염색 및 활성화 측정을 수행하였다. | 융합단백질을 복강주사후 농도 및 시간별로 각 조직을 적출하여 면역염색 및 단백질의 활성도를 측정하였다. |
| | 나. 질환모델 동물 제작 | 단백질 치료법의 실용화를 위하여 세포 및 조직으로 침투 성공된 단백질들을 질환을 유발시킨 모델 동물을 이용하여 질환 치료 효능을 검색 하고자 질환 모델 동물들을 제작 하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · Nude mice를 이용한 암 유발 모델 동물의 준비. · 뇌허혈(Brain ischemia)모델 동물 준비 · 당뇨병 모델 동물 준비 · 파킨슨병 모델 동물 준비 · 간질병 모델 동물 준비 |
| | 다. 모델 동물을 이용한 단백질 치료법 가능성 탐색 | 단백질 치료법의 실용화를 위하여 세포 및 조직으로 침투 성공된 단백질들을 질환을 유발시킨 모델 동물을 이용하여 질환 치료 효능을 검색 하고자 질환 모델 동물들을 제작하였다. 제작된 뇌허혈과 당뇨병, 파킨슨씨병 모델 동물에는 Tat-SOD, PEP-1-SOD, Tat-CAT, PEP-1-CAT들을 이용하였고, 암 모델 동물은 p53, NR, CD 를 이용하여 단백질 치료가능성을 탐색 하였다. | <ul style="list-style-type: none"> · 당뇨병 모델 동물 준비 (IDDM) Tat-SOD, PEP-1-SOD, Tat-CAT, PEP-1-CAT를 모델동물에 복강주사후 췌장 β-세포의 파괴 억제여부와 혈중 glucose level, islet cell의 보호효과를 조직염색과 혈당을 측정함으로써 단백질 치료제로서의 가능성을 확인하였다. · 뇌허혈(Brain ischemia)모델 동물 준비 Tat-SOD, PEP-1-SOD, Tat-CAT, PEP-1-CAT를 ischemia 유발 30분 전/후에 각각 복강주사하여 hippocampus 뇌세포의 세포사 억제를 측정함으로써 SOD, CAT의 단백질 치료제로서의 가능성을 조사하였다. · 파킨슨씨병 모델 동물 준비 Tat-SOD, PEP-1-SOD, Tat-CAT, PEP-1-CAT를 모델동물에 복강주사후 도파민 뇌신경세포의 보호효과를 조직염색으로 측정함으로써 단백질 치료제로서의 가능성을 확인중에 있다. · 암 모델 동물 준비 Tat-p53, NR, CD 등을 모델동물 피부암 부위에 주사후 암세포의 크기 및 진행정도를 측정함으로써 단백질 치료제로서의 가능성을 확인중이다. |

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 침투율 높은 Penetratin의 개발 및 목표 단백질 유전자와의 융합기술 개발

(1) HIV-Tat 단백질의 발현 및 세포내 침투 능력측정

HIV-Tat 의 two coding exon 을 포함하는 cDNA로부터 생산된 86 a.a 를 포함하는 HIV-Tat 단백질 유전자와 first coding exon 으로부터 생산된 72 a.a 를 포함하는 단백질을 pET vector 에 각각 subcloning 하여 pTat86과 pTat72 vector를 제조하였고 Tat86과 Tat72 단백질을 과발현시킨 후 정제하였다. 정제된 HIV-Tat 단백질은 Arginine과 Lysine 잔기를 많이 보유하고 있는 basic domain 에 의하여 세포내로 운반이 잘 된다는 것을 다음 두가지 실험을 통하여 확인하였다. 1) Tat 단백질을 HeLa cell 배지에 넣은 후 HIV-1 LTR의 transcriptional activation 을 CAT expression assay로 관찰한 결과 효율적으로 transactivation 시키는 것을 확인하였고 2) Tat 단백질을 human endothelial 세포에 침투시킨 결과 HIV-1 Tat이 Vascular adhesion molecule-1(VCAM-1)의 발현을 증가시킴을 확인하였다. (Data 생략) 따라서 이 결과는 정제된 Tat 단백질이 세포내 침투능력이 있으며 목표단백질의 세포내 전달체로 이용가능하는 것을 제시한다.

(2) HIV-Tat 발현 vector 개발 및 GFP 유전자의 융합

(가) Tat-GFP fusion protein expression vector 의 제작

HIV-1 Tat 의 basic domain (9개 a.a 49-57, RKKRRQRRR)을 GFP에 in frame fusion시킨 단백질을 발현시킬 수 있는 pTat-GFP vector를 제작하기 위해 HIV-1 Tat basic domain에 해당하는 9개의 a.a를 encoding 하는 double strand oligonucleotide를 제조한 후, 이를 NdeI-XhoI으로 digest한 6-His를 가지고 있는 pET-15b vector에 ligation 시켰다 (pHisTat vector). GFP는 GFP coding sequence를 가지고 있는 pEGFP-C2 plasmid로부터 PCR을 이용하여 GFP 유전자를 함유하는 절편을 얻은 후, XhoI-BamHI 으로 digestion 한후 pHisTat vector에 subcloning하여 Tat-GFP fusion 단백질을 생산을 위한 pTat-GFP vector를 제작하였다 (Fig. 1A).

(나) HIV-1 Tat basic domain의 deletion으로부터 다양한 Tat-GFP 발현 vector의 제작

HIV-1 Tat basic domain(a.a 47-57, YGRKKRRQRRR)을 다음과 같이 변형시켜 vector를 제작하였다 (Table 1).

| | | | |
|----|------------|----|---------------------|
| 48 | GRKKRRQRRR | 57 | : Tat (48-57) - GFP |
| 49 | RKKRRQRRR | 57 | : Tat (49-57) - GFP |
| 50 | KKRRQRRR | 57 | : Tat (50-57) - GFP |
| 51 | KRRQRRR | 57 | : Tat (51-57) - GFP |
| 52 | RRQRRR | 57 | : Tat (52-57) - GFP |
| 50 | KKRR | 53 | : Tat (50-53) - GFP |
| 50 | KKRRQ | 54 | : Tat (50-54) - GFP |
| 50 | KKRRQRR | 56 | : Tat (50-56) - GFP |

ptn: 5'-tatgcgccgcatgaaatggaaaaagcttc-3',
5'-tcgagaagcttttccatttcatgcgcgca-3'

- ② Tat PTD (49-57)을 목표단백질인 GFP의 N-terminal, C-terminal 그리고 양쪽 terminal에 부착시켜 Tat의 위치에 따른 다양한 발현 vector를 제작하였다 (Fig. 4).

Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat

(3) Homeodomain (HD) 발현 vector 개발 및 GFP 유전자와의 융합

(가) His-Ftz HD-GFP 및 His-EnHD-GFP 발현 vector 제작

60개의 a.a를 포함하는 Antennapedia (Antp) homeodomain을 갖는 His-Fushi-trazu homeodomain(22-81)과 Engrailed homeodomain(22-81)에 GFP 유전자를 붙인 pFtHD과 pEnHD vector를 제작하였다.

(나) His-Ptn-GFP 발현 vector 제작

16개의 a.a (22-37)를 포함하는 PtnHD 에 GFP 유전자를 붙인 PtnHD-GFP vector를 제작하였다.

(다) 다양한 발현 vector 제작

- ① homeodomain PTD RQIKIWFQNRRMKWKK에서 C-말단 RRMKWKK를 포함하는 발현 vector (Ptn 7C)를 제작하였다.
- ② pEnHD vector에서 C-말단 7개의 아미노산 KRAKIKK 을 포함하는 발현 vector (pEN 7C)를 제작하였다
- ③ Eve 7C vector (RRMKDKR)를 제작하였다.
- ④ Ptn 7C vector (RRMKWRR)에서 M, W를 R 또는 K로 mutation 시킨 발현 vector를 제조하였다.

RRRKWKK : Ptn 7MR
RRKKWKK : Ptn 7MK
RRMKRKK : Ptn 7WR
RRMKKKK : Ptn 7WK

(4) HIV Tat-2와 pGEX-4T-Tat 발현 vector 제작

- ① 화물 분자를 세포 또는 세포핵 내로 침투 가능하도록 하는 HIV-1 Tat 서열번호 48-57의 수송 도메인 보다 더욱 효과적인 수송 도메인을 찾아내고자 HIV-2 Tat 서열번호 78-88 에 대하여 녹색형광 단백질을 화물 분자로 하여 세포 침투실험을 한 결과 HIV-2 Tat 서열번호 78-88 수송 도메인도 세포 침투능을 가지고 있는 것으로 확인되었다.
- ② HIV-2 Tat을 이용하여 pGEX-4T 발현 vector에 융합시켜 pGEX-4T 발현 vector를 제작하였다.

(5) PEP-1 peptide를 이용한 발현 vector 개발

3차 구조를 가진 단백질을 자연상태로 세포내 침투시키기 위해 PEP-1 peptide

를 SOD에 in-frame fusion 시킨 단백질을 발현시킬 수 있는 PEP-1-SOD 벡터를 제작하기 위해 PEP-1 peptide ((KETWWETWWTEW SQP KKKRKV; 21 amino acid)을 encoding 하는 double strand oligonucleotide를 제조한 후, 이를 Nde I -Xho I 으로 digest한 6-His를 가진 pET-15b 벡터에 ligation 시켰다 (PEP-1 vector). SOD는 Tat-SOD와 같은 방법으로 PCR을 이용하여 SOD 유전자를 함유하는 절편을 얻은 후, Xho I -BamH I 으로 digestion한 후 pPEP-1 vector에 subcloning하여 pPEP-1-SOD fusion protein 생산을 위한 pPEP-1-SOD expression vector를 제조하였다 (Fig. 5).

나. 질환관련 생리활성단백질의 유전자 크로닝 및 위에서 개발한 다양한 발현 vector와의 융합

질환과 관련된 생리활성단백질들의 유전자를 크로닝한 후 위에서 개발한 다양한 발현 vector들 (예: HIV-Tat, 9Lys-, 9Arg-, PEP-1 등)과 생리활성을 갖는 아래의 목표단백질들을 융합시켜 발현 vector를 제작하였다.

(1) 노화관련 단백질의 유전자 크로닝 및 발현 vector 제작

(가) 항산화효소 Superoxide dismutase (SOD) 발현 vector 제작:

인간 SOD 유전자를 본연구실에서 크로닝하여 이 유전자를 pTat, pLys(9), pArg(9), PEP-1 vector에 fusion 시켜 pTat-SOD, 9Lys-SOD, 9Arg-SOD, PEP-1-SOD 발현 vector를 제작하였다.

(나) 항산화효소 Catalase (CAT) 발현 vector 제작

인간 간조직 catalase는 본연구실에서 유전자 크로닝을 성공적으로 수행하였고 (GeneBank™ AY028632), 이 유전자를 pTat, 9Arg, PEP-1 vector에 fusion 시켜 pTat-CAT, 9Arg-CAT, PEP-1-catalase 발현 vector를 제작하였다.

(다) Botulinum toxin (BTx) 발현 vector 제작

BTx 유전자는 (주)BioBud에서 제공받은 후 PEP-1 PTD에 BT의 light chain 유전자를 fusion 시켜 PEP-1-BTx 발현 vector를 제작하였다.

(라) 자외선에 의해 손상된 유전자 복구능력이 있는 rpS3 (UV endonuclease) 발현 vector 제작

자외선(UV)에 의하여 변형되는 유전자를 repair 시킬수 있는 UV endonuclease 유전자를 PEP-1 vector에 fusion 시켜 PEP-1-rpS3 발현 vector를 제작하였다.

(마) 항산화 단백질 Ceruloplasmin 발현 vector 제작

Cerularplasmin은 생체내에서 free radical을 제거해주는 항산화 효능이 있는 단백질이다. 이단백질의 세포 침투를 위해 유전자 크로닝 수행후 PEP-1 vector에 융합시키고, 발현 중에 있다.

(2) 암관련 단백질의 발현 vector 제작

(가) pTat-p53, pTat-p21, pTat-p16, pTat-p27, pTat-p57 발현 vector를 각 제작하였다.

(나) Cytosine deaminase (CD) 발현 vector 제작

CD는 *E. coli* genomic DNA를 template로하여 PCR cloning 하였으며, 이 유전자는 pTat vector에 fusion 시켜 pTat-CD 발현 vector를 제작하였다.

(다) Nitroreductase(NR) 발현 vector 제작

NR은 *E. coli* genomic DNA를 template로하여 PCR cloning 하였으며, 이 유전자는 Tat vector에 fusion 시켜 Tat-NR 발현 vector를 제작하였다.

(라) Bax 및 HSP70 발현 vector 제작

Bax 및 HSP70은 human cDNA library로부터 PCR cloning 하였으며, 이 유전자는 Tat vector에 fusion 시켜 Tat-Bax, Tat-HSP70 발현 vector를 제작하였다.

(3) 신경질환관련 단백질의 유전자 크로닝 및 발현 vector 제작

(가) 인간 뇌조직 glutamate decarboxylase (GAD) 발현 vector 제작

간질과 관련있는 신경전달물질인 GABA의 합성효소인 GAD (glutamate decarboxylase)의 유전자는 이미 본연구실에서 크로닝하여 발현한 바 있으며 이 유전자를 template로 하여 primer를 제작한 후 PCR 크로닝하여 PEP-1 vector에 fusion 시켜 PEP-1-GAD 발현 vector를 제작하였고, 이를 발현중에 있다.

(나) 인간 및 소 뇌조직 GABA-T 발현 vector 제작

GABA 분해효소인 인간 뇌조직 hGABA-Transaminase (hGABA-T)도 유전자 크로닝을 성공적으로 수행하여 논문을 발표하였고, (논문발표: *Eur. J.Biochem*, 267, 5601-5607, 2000), 이 유전자를 template로 하여 primer를 제작한 후 PCR로 다시 크로닝하여 PEP-1 vector에 fusion 시켜 (PEP-1-hGABA-T) 현재 세포내 침투를 위한 발현을 수행하고 있다.

(다) 인간 뇌조직 succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) 발현 vector 제작

인간뇌조직 SSADH 유전자 크로닝을 위하여 소 뇌조직의 활성화부위구조분석을 수행함으로써 (논문발표: *J. Neurochem*, 76, 919-925, 2001) probe를 제작하였고, 인간 뇌조직 DNA library와 이 probe를 이용하여 hybridization 방법으로 SSADH 유전자를 크로닝하는 과정에 있다. 또 다른 유전자 크로닝 방법으로 SSADH 단항체를 생산하여 immunoscreening 방법으로 크로닝을 수행하고 있다. PEP-1-SSADH vector를 제작하였고 이를 발현중에 있다.

(라) Tyrosine hydroxylase (TH) 및 GTP cyclohydrolase (GCH) 발현 vector 제작

파킨슨 병과 관련있는 신경전달물질인 도파민합성관련효소인 TH와 GCH도 primer 제작후 PCR로 크로닝하여 pTat-TH, pTat-GCH 발현 vector를 각각 제작하였고, 이를 발현중에 있다.

(마) Glutamate dehydrogenase (GDH) 발현 vector 제작

pTat-GDH 유전자를 본 연구자들이 기존에 화학적으로 합성하여 만든 인간 GDH 유전자를 변형시켜 제작하였는데, 우선 GDH 유전자를 EcoRI 에 NruI

으로 자르고 얻어진 plasmid 의 EcoR I / NruI 부분을 9개의 a.a를 발현시킬 수 있는 69 bp의 oligonucleotide로 대체시켜 pTat-GDH 발현 vector를 제조하여 발전시켰다.

(4) 선천성 대사이상 유전병관련단백질의 유전자 크로닝 및 발현 vector 제조

(가) Phenylalanine hydroxylase (PH)의 발현 vector 제조

Phenylketonuria (PKU) 질환의 원인은 PH 효소의 결핍으로 알려져 있다. PH의 단백질 치료를 위하여 PH 유전자를 PCR 방법으로 크로닝하여 pTat-PH vector를 제작하였고 이를 발현중에 있다.

(나) GABA-T, SSADH, GDH는 위에서 서술하였음.

(5) 심혈관질환관련단백질의 발현 vector 제조

(가) Nitric oxide synthase (NOS)의 발현 vector 제조

심혈관확장물질로 알려진 NO의 합성효소인 NOS의 단백질 침투를 위하여 PCR 방법으로 유전자 크로닝하여 pTat-NOS vector를 제작하였고 이를 발현중에 있다.

(6) 당뇨병 관련효소인 SOD, Catalase는 이미 앞에서 언급하였다.

(7) 신호전달 관련 C3 transferase의 발현 vector 제조

면역반응에서의 macrophage의 phagocytosis와 관련하여 Rho의 specific inhibitor인 C3 exoenzyme을 단백질 침투를 위해 Tat-C3 발현 vector를 제작하였다.

(8) Human growth hormone의 발현 vector 제조

Human growth hormone (hGH)은 뇌하수체에서 생산되며, 성장과 발생을 조절하는 hormone으로 단백질 침투를 위해 Tat-hGH 발현 vector를 제작하였다.

(9) Organic compound의 발현 vector 제조

생리활성 organic compound인 vitamin A와 C을 피부조직으로의 침투를 위하여 pTat-vector와 link 시켜 세포 및 조직내 침투하는가를 확인 중에 있다.

다. 융합 단백질의 생산 및 분리 정제 기술 개발

(1) 발현된 융합단백질의 확인을 위한 항체 준비

(가) 구입한 항체 : 6His, GFP, GAD

(나) 본연구실에서 세포융합방법에 의하여 생산한 단항체 :

SOD, catalase, hGABA-T, bGABA-T, SSADH, hGDH, bGDH, sGDH, PK, PO, IMPP, rpS3, ceruloplasmin, synuclein, BTx 등.

(다) 현재 생산중인 단항체 : Tat(49-57), CD

라. 융합단백질의 발현, 분리 정제 및 확인

(1) Tat-GFP fusion protein의 발현, 정제 및 확인

GFP가 fusion 되어있는 basic domain 9개 a.a가 포함된 Tat-GFP 발현 vector 들을 *E. coli* BL21에 transformation 시킨 후 융합단백질을 발현하였다. 발현된 융합단백질들은 nickel Sepharose affinity column 크로마토그래피에 의하여 순수분리 정제하였고, 이를 SDS-PAGE 와 GFP 항체를 이용한 Western blot 분석법으로 확인하였다. 그 외에 다양한 크기 및 sequence를 가진 basic domain 을 갖는 Tat-GFP 와 proline이 첨가된 Tat-GFP도 같은 방법으로 발현시켜 융합단백질들을 각각 순수 분리 정제하였다.

(2) pLys-GFP 및 pArg-GFP fusion protein의 발현, 정제 및 확인

Tat 의 basic domain의 a.a 를 lysine(6-9개) 및 arginine(3-9개) 으로 치환한 발현 vector를 GFP 와 각각 fusion 시켜 융합 단백질을 발현하여 순수 분리 정제하였고, 이를 Western blot 분석법으로 확인하였다. 또한 그 외에 10K ~ 6K, 9R ~ 3R의 sequence를 가진 Tat-GFP도 같은 방법으로 발현시켜 융합단백질들을 각각 순수 분리 정제하였다.

(3) Homeodomain-GFP fusion protein의 발현, 정제 및 확인

Ftz-HD-GFP, En-HD-GFP 및 PtnHD-GFP 발현 vector를 *E. coli*에서 발현 시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였다 (Data 생략). 또한 Ptn 7C-GFP, pEn7C-GFP, pEve 7C-GFP 및 Ptn 7MR(7MR, 7WR, 7WK)-GFP fusion protein의 발현, 정제 확인 Homeodomain을 deletion 및 mutation 시킨 위의 vector들은 각각 *E. coli*에서 발현시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였다 (Data 생략).

(4) 침투 signal sequence 위치에 따른 융합 단백질의 발현 정제 및 확인

침투 signal sequence가 N- 및 C-말단에 부착된 제작된 vector들을 사용하여 GFP와 융합된 단백질을 생산하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과 95%이상의 순도 였으며 예측된 분자량의 위치에서 확인 할 수 있었다 (Fig. 6).

(5) Tat-SOD, 9Lys-SOD, PEP-1-SOD fusion protein의 발현, 정제 및 확인

Tat-SOD 및 9Lys-SOD 발현 vector를 각각 *E. coli* 에서 transformation 시켜 발현시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였다 (Fig. 7). Tat 이 붙어있는 SOD 로부터 발현된 단백질과 Tat이 없는 SOD만 들어있는 vector로부터 발현된 단백질의 size가 다른 것을 확인 할 수 있었다. 또한 PEP-1-SOD fusion protein의 발현, 정제 및 확인을 위해 PEP-1-SOD 발현 vector를 각각 *E. coli* 에서 transformation 시켜 발현시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였다.

(6) Tat-CAT 및 9Arg-CAT, PEP-1-CAT fusion protein의 발현, 정제 및 확인

Tat-CAT 및 9Arg-CAT 발현 vector를 각각 *E. coli*에 transformation 시켜 발현시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였다 (Data 생략). 또한, PEP-1-CAT fusion protein의 발현, 정제 및 확인을 위해 PEP-1-CAT 발현 vector를 각각 *E. coli*에 transformation 시켜 발현시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였다 (Data 생략).

(7) HIV-2 Tat-GFP 및 pGEX-4T-Tat-GFP의 발현, 정제 및 확인

HIV-2 Tat-GFP 발현 vector를 *E. coli*에 transformation 시켜 발현시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였으며, pGEX-4T-Tat-GFP 발현 vector는 현재 발현 중에 있다.

(8) PEP-1-BTx fusion protein의 발현, 정제 및 확인

Botulinum toxin의 light chain을 포함하는 PEP-1-BTx fusion 단백질을 발현하여 Western blot으로 확인하였다.

(9) Tat-p53, Tat-p21, Tat-p16, Tat-p27, pTat-p57의 발현, 정제 및 확인

Tat-p53, Tat-p21, Tat-p16, Tat-p27, pTat-p57 발현 vector를 각각 *E. coli*에 transformation 시켜 발현시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였으며 (Data 생략), Tat-p16, Tat-p27, Tat-p57을 현재 발현 중에 있다.

(10) Tat-NR, Tat-CD, Tat-ADI fusion protein의 발현, 정제 및 확인

Prodrug 대사효소로 알려진 Tat-NR, Tat-CD, Tat-ADI 발현 vector를 각각 *E. coli*에 transformation 시켜 발현한 후 정제하여 Western blot으로 확인하였다 (Data 생략)

(11) PEP-1-GABA-T, PEP-1-GAD, Tat-GDH, PEP-1-SSADH fusion protein의 발현, 정제 및 확인

간질관련 효소인 PEP-1-GABA-T와 PEP-1-GAD, Tat-GDH, PEP-1-SSADH 발현 vector를 각각 *E. coli*에 transformation 시켜 발현시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였다 (Data 생략).

(12) Tat-TH, Tat-GCH, Tat-PH, Tat-C3TF fusion protein의 발현, 정제 및 확인

Tat-TH, Tat-GCH, Tat-PH, Tat-C3TF 발현 vector를 *E. coli*에 transformation 시켜 발현시킨 후 정제하여 Western blot으로 확인하였다 (Data 생략).

(13) 그 외 PEP-1-rpS3, PEP-1-Ceruloplasmin 등을 발현 중에 있다.

다. 융합 단백질의 세포 및 조직내 침투조건의 최적화 및 침투된 단백질의 생리 활성 분석

(1) GFP-융합 단백질의 세포내 침투 확인 및 생리 활성 능력의 확인

(가) Tat-GFP fusion protein의 세포내 침투 확인

다양한 형태의 Tat basic domain이 포함되어 있는 Tat-GFP fusion 단백질을 HeLa 세포에 침투시킨 결과 native 상태의 단백질 형태보다 denatured 된 Tat-GFP가 transduction efficiency가 높은 것을 확인할 수 있었다 (Data 생략). 침투된 Tat-GFP는 Western blot 분석에 의하여 확인되었으며, 이 침투는 GFP의 농도별, 그리고 시간별의 의존성을 가지고 있었다. 형광현미경으로 확인한 결과 본 연구진에서 개발한 단백질의 세포내 침투는 성공적으로 수행되어 활성을 갖는 것을 알 수 있었다. Tat PTD의 다양한 형태의 아미노산(10개-4개) 중에서 Tat(49-57)-GFP가 가장 효율이 높게 침투되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 8). 또한, a.a가 6개 이하로 되면 침투효율이 약해지는 것으로 보아 침투를 위한 최소한의 a.a는 6개인 것으로 생각된다. 또한 proline를 첨가시킨 Tat-GFP의 경우에도 9개인 경우보다 침투효율이 증가되지 않는 것을 관찰할 수 있었다 (Data 생략).

(나) 9Lys-GFP 및 9Arg-GFP fusion protein의 세포내 침투확인

Tat의 basic domain의 9개 a.a를 모두 lysine으로 치환한 발현 단백질 p9Lys-GFP의 침투는 시간 및 농도의 조성에 따라 침투가 일어나는 것을 Western blot으로 확인하였으며 (Fig. 9), 형광 현미경을 이용하여 9Lys-GFP 융합단백질이 전달되는 세포의 비율이나 전달된 융합단백질의 활성유무를 분석하였다. 변성된 Lys-GFP 융합단백질은 거의 100%에 달하는 HeLa cell에 침투되었고 HeLa cell 투과 이후 세포 조건에서 GFP 단백질 활성이 회복됨을 관찰하였다. 이러한 refolding은 아마도 세포내 HSP90 같은 chaperones이 관여하리라 추측된다. 마찬가지로 방법으로 9개 a.a를 모두 arginine으로 치환된 발현단백질 9Arg-GFP의 침투도 9Lys-GFP와 비슷한 침투효율을 보였다.

(다) Tat의 위치에 따른 GFP 융합단백질의 세포내 침투 확인

① 다양한 침투 signal의 종류에 따른 침투효율 비교

Cargo 단백질인 GFP의 아미노말단에 4종류의 PTD (R9, K9, Tat, ptn)를 각각 융합하여 HeLa 세포에 transduction 한 후 상대적인 transduction 효율을 Western blot 방법으로 비교하였다 (Fig. 10A). 그 결과 transduction 효율은 K9-GFP > Tat-GFP > R9-GFP, ptn-GFP 순으로 관찰되었다.

GFP의 카복시말단에 3종류의 PTD (R9, K9, Tat)를 각각 융합하여 위와 같은 방법으로 상대적인 transduction 효율을 비교한 결과 GFP-K9 > GFP-Tat > GFP-R9 순으로 관찰되었다 (Fig. 10B, C, D). 따라서 PTD가 융합된 위치에 상관 없이 동일한 패턴의 transduction 효율 차이를 발견하였다. GFP의 양말단에 PTD를 융합시킨 단백질의 transduction 효율을 비교하였다. 카복시말단에 공통적으로 Tat PTD를 융합시킨 경우 상대적인 transduction 효율은 K9-GFP-Tat > ptn-GFP-Tat > Tat-GFP-Tat > R9-GFP-Tat 순이었다 (Fig. 10B). 카복시말단에 공통적으로 R9 PTD를 융합시킨 경우 상대적인 transduction 효율은 K9-GFP-R9 > ptn-GFP-R9 > Tat-GFP-R9 > R9-GFP-R9 순이었다 (Fig. 10C). 마지막으로 카복시말단에 공통적으로 K9 PTD를 융합시킨 경우에는 상대적인 transduction 효율이 K9-GFP-K9 > ptn-GFP-K9 > R9-GFP-K9 > Tat-GFP-K9 순이었다 (Fig. 10D). 이상의 결과를 종합하면 K9-GFP-Tat, K9-GFP-R9, K9-GFP-K9 등이 HeLa 세포에 효율적으로 transduction 될 수 있는 단백질이며 이 규칙은 다른 단백질에도 일반적으로 적용될 가능성이 있다.

㉔ Tat-GFP-Tat 의 침투효율측정

㉕ Tat-GFP 와 Tat-GFP-Tat 융합단백질의 세포 내 전달 비교 실험

9개의 아미노산(49-57)으로 이루어진 HIV-1 Tat 단백질 수송 부분을 아미노산 말단과 카르복실 말단에 결합시킨 변이체 수송 도메인에 대한 화물 분자 세포 투과능을 관찰하였다. 즉, 1 μ M의 변성된 상태로 정제된 Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat 융합 단백질들은 HeLa 세포에서 37°C 에서 1 시간동안 처리하여, 세포를 파쇄한 후 Western blot 과 FACS 분석법으로 분석하였다 (Fig. 11). 그 결과에서 나타내듯이 Tat 수송도메인이 아미노산 말단에 있는 융합단백질과 Tat 수송도메인이 카복실말단에 있는 융합단백질은 서로 비슷하게 세포내로 이동하였다. 그러나 Tat 수송도메인이 양쪽 말단에 융합되어 있는 단백질은 한 개의 Tat 수송도메인이 연결되어 있는 융합단백질보다 더 효과적으로 세포내로 이동하였다. 이 결과는 Tat 수송도메인이 융합 단백질의 아미노산 말단과 카복실 말단 어느 쪽에 융합되어 있던지 그 효과는 비슷하지만, Tat 수송 도메인이 양쪽에 융합되어 있으면 세포내 이동 효과가 크게 향상됨을 나타내준다.

㉖ 공초점 형광 분석(confocal microscopy)에 의한 세포 도입 분석

목표세포에 융합 단백질을 전달하고자 할 때 전달되는 세포의 비율이 얼마나 되는지가 중요하다. 또한 세포 내로 투과된 융합단백질이 그 고유한 활성을 유지해야만 이러한 단백질 전달 기술이 응용될 수 있다. 따라서 본 실험에서 GFP 융합 단백질이 전달되는 세포의 비율이나 전달된 융합단백질의 활성 유무를 분석하였다. 변성된 GFP 융합 단백질을 처리한 HeLa 세포에서 GFP가 나타내는 형광도를 형광현미경으로 관찰하였다. 1 μ M 의 변성된 상태로 정제된 Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat 융합 단백질들은 HeLa 세포에서 37°C 에서 1 시간동안 처리한 후, 공초점 형광현미경을 이용하여 488 nm과 545 nm 형광필터로 세포 내 형광 유무를 관찰, 단백질의 세포 내 분포를 분석하였다. 그 결과는 Fig. 12에서 처럼 Tat 수송도메인이 아미노산말단에 융합되어있는 단백질과 카복실 말단에 융합되어있는 단백질은 거의 유사하게 세포질뿐 아니라 핵까지 도달하였다. 이것은 Western blot의 결과와 마찬가지로 Tat 수송도메인이 단백질의 어느 부분에 융합되어 있는지 그 효과는 비슷하다는 것을 보여준다. 반면, Tat 수송도메인이 양쪽에 붙은 융합단백질은 한쪽에만 존재하는 융합단백질보다 더욱 밝은 형광을 나타내었다. 그러나 많은 단백질 이 핵 내로 이동되었다.

㉗ FACS (flow cytometry)분석에 의한 Tat-GFP-Tat 융합단백질의 세포 도입 kinetics 분석

9개의 아미노산(49-57)으로 이루어진 HIV-1 Tat 단백질 수송 부분을 아미노산 말단과 카르복실 말단 양쪽에 결합시킨 변이체 수송 도메인에 대한 화물 분자 세포 투과능을 관찰하는 실험을 수행하였다 (Fig. 13). 즉, 수송도메인 -GFP-수송도메인 융합단백질의 세포내 투과를 관찰하기 위하여, HeLa 세포를 6-웰 플레이트에서 4~6시간 동안 키운 뒤 10% FBS가 포함된 신선한 DMEM 배양액으로 교체하고 여러 농도의 GFP 융합 단백질을 배양액 내에 처리하였다. 37°C에서 30 분동안 배양한 뒤, 세포를 PBS로 충분히 세척하고, 10 분동안 trypsin-EDTA로 처리하였다. 세포를 모아서 다시 PBS로 2번 씻은 다음 4% paraformaldehyed로 1시간동안 고정시킨다. 고정시킨 세포를 FACS 를 이용하여 세포내 형광을 분석하였다. 앞에서의 결과들과 마찬가지로 Tat

수송도메인이 한쪽에만 융합되어있는 단백질은 비슷한 양으로 세포내 도입되는 반면 양쪽에 Tat 수송도메인이 있는 융합단백질은 많은 양으로 세포 내로 도입됨을 알 수 있었다. Mean Fluorescence intensity (평균 형광도)는 수송도메인-GFP가 23.86, GFP-수송도메인이 17.21, 수송도메인-Tat-수송도메인은 204.52 로서 월등하게 Tat-GFP-Tat 융합단백질이 높은 수치를 나타내었다. 그 다음, Tat 수송도메인을 양쪽으로 융합된 단백질의 양에 의해 세포내 도입되는 메커니즘을 분석하기 위해 다양한 농도로 처리 하여 30분간 배양한 후 FACS 분석을 실시하였다. Tat 수송도메인을 양쪽으로 가지고 있는 융합단백질도 농도에 평균형광도가 증가하는 결과를 볼 수 있었다.

㉔ FACS 분석과 Western blot에 의한 native 융합단백질과 denatured 융합단백질의 세포 도입 비교 분석

자연상태로 수송도메인-GFP를 정제하여 세포내로 도입했을 때 변성시켜 정제한 수송도메인-GFP보다 도입되는 효과가 많이 제한 되어진다. 수송도메인이 양쪽 말단에 존재하는 GFP 융합단백질은 변성하여 정제하였을 때 한쪽에만 존재하는 GFP 보다 더 많은 효과를 나타내므로 Tat-GFP-Tat 융합단백질이 자연상태로 정제 되었을 때 세포내로 도입되는 효과를 알아보고자 실험을 수행하였다. 먼저 변성된 단백질과 자연상태로 정제한 단백질을 Western blot으로 분석해 본결과, 자연상태로 정제된 단백질도 수송도메인이 한 개 존재하는 GFP 만큼 세포내로 도입되는 결과를 나타내었다 (Fig. 14A).

또한 자연상태로 분리한 수송도메인-GFP-수송도메인 융합단백질의 세포내 도입효과를 알아보기 위해 FACS 분석법을 실시 하였다. 각각 자연상태와 변성된 상태로 정제된 단백질을 각각의 농도로 처리하여 1시간 배양하였다. 그 결과 Fig. 14B,C, 와 같이 변성된 상태의 Tat-GFP-Tat 융합단백질은 1 μ M 처리하였을 때 평균 형광도가 117인 반면 자연상태로 정제한 수송도메인-GFP-수송도메인은 54인 수치값을 나타내었다. 이는 변성된 상태의 융합단백질의 세포내 도입효과보다는 떨어지지만, Fig. 14C와 비교해볼 때 변성하여 정제한 수송도메인-GFP 융합단백질만큼 의 세포 내 도입능력을 갖고 있음을 알 수 있다. 결과적으로 Tat 수송도메인을 한쪽 말단에 가지고 있는 융합단백질 보다 Tat 수송도메인을 양쪽에 가지고 있는 변성하여 정제한 융합단백질이 효과적으로 세포 내 침투를 할 수 있으며, 자연상태로 정제한 수송도메인-GFP-수송도메인 융합단백질 또한 세포 내 침투가 가능함을 결론 내릴 수 있다.

㉕ 온도에 따른 Tat 융합단백질의 세포침투 메커니즘 분석

현재, Tat-GFP 융합단백질은 낮은 온도에서 그 침투 효과가 현저히 저하되는 반면 PTD peptide 는 낮은 온도에서도 상관없이 세포 침투 효과를 가지고 있다는 보고가 발표된 바 있다. 우리는 온도에 의한 Tat-GFP 융합단백질의 침투 효과를 분석하기 위해 1 μ M의 변성된 상태로 정제된 Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat 융합단백질들은 Hela 세포에서 37°C와 4°C 에서 1 시간 동안 처리한 후, FACS 분석법을 통해 분석 하였다 (Fig. 15). 그 결과 Tat-GFP, GFP-Tat 과 Tat-GFP-Tat은 에서 현저하게 침투 효과가 감소되었다. 이런 결과들은 Tat에 의한 세포의 침투는 온도에 의존적임을 제시 한다.

(다) Homeodomain-GFP fusion protein의 세포내 침투확인

Homeodomain의 Ftz-HD-GFP, En HD-GFP, Ptn HD-GFP 발현 단백질들을 각각 *Drosophila* S2 세포에 침투시킨 경과를 Western blot으로 분석하였다.

침투효율은 Ftz-HD, En HD, Ptn HD-GFP의 효율이 비슷하였고 이는 형광 현미경 분석에 의하여 Tat이 붙은 GFP의 침투 효율보다도 높은 것을 알 수 있었다 (Data 생략). 특히 Tat-GFP 단백질은 세포 내에서 원형 그대로 보존되었으나 다른 HD-GFP는 세포 내에서 일부 변화가 일어나 것으로 보인다. 따라서 homeodomain으로부터 유래된 protein transduction domain은 세포내로 투과된 후 융합 단백질로부터 제거됨으로서 이중 단백질이 붙어 있지 않은 자연 상태의 운송된 단백질이 세포 내에 생성되도록 하는 일종의 transient vector로 기능할 가능성도 있을 것으로 추측된다.

Ptn의 C-말단을 잘라 만든 Ptn 7C vector를 이용한 GFP 침투효율은 Ptn에 비하여 40-50% 감소하였으나, Tat에 비해서는 높은 활성을 보였고, EnHD 비해서는 30%감소하였으나 길이가 감소된 아미노산이므로 세포 내에서 비특이적 특성을 나타낼 확률이 줄어들 것으로 생각된다. 염기성 아미노산 5개로 같은 Ptn 7C, pEn7C, pEve 7C의 효율을 비교하여보면 pEve 7C가 제일 약했고, Ptn 7C가 pEve 7C에 비해 2배 높았는데 이는 1차 구조상의 문제인지는 연구해볼 문제이며, 이 결과에서 염기성아미노산의 중요성을 다시 확인할 수 있었다. Ptn 7C의 4가지 돌연변이를 시도하여 비교해본 결과 Ptn 7MR (M→R로 치환)이 7C보다 훨씬 침투효율이 높음을 알 수 있었고, 나머지 3가지 돌연변이는 7C에 비하여 활성이 감소하였다 (Fig. 16). 이 결과는 아미노산 1개의 변형이 침투효율을 높이는데 매우 중요한 역할을 한다는 것을 보여주는 결과이다.

(라) Tat PTD의 변형된 (mutagenesis, deletion) 아미노산 sequence를 갖는 GFP fusion protein의 세포내 침투 확인

Tat의 basic domain의 9개 아미노산을 모두 lysine 또는 Arg으로 치환된 9Lys-GFP, 9Arg-GFP는 세포내로 침투가 잘 일어난다는 보고는 1단계에서 발표하였다. 본 연구에서는 9Lys-GFP와 9Arg-GFP를 addition 또는 단계적으로 deletion 시킴으로서 침투에 필요한 가장 적합한 또는 최소의 아미노산의 수를 측정하고자 하였다. Fig. 17 및 Fig. 18에서 보듯이 단백질을 S2 cell에 침투시킨 결과 9개의 Arg이 8개~3개로 deletion 시킨 것에 비하여 최대의 침투 효과를 보였으며 Tat-GFP보다 8R-GFP, 9R-GFP는 더 높은 침투 효율을 보였다. 그러나 3R, 4R의 경우에는 침투 효율이 현저하게 감소되었다. Lys의 경우에는 Tat-GFP에 비해 8K-GFP, 9K-GFP, 10K-GFP가 더 높은 침투 효율을 보였고 6K-GFP에서도 침투가 잘 일어나고 있음을 알 수 있었다. 결론적으로 Arg이나 Lys이 부착된 단백질들의 Tat 보다 S2 cell에 더 효율적으로 침투되었고 적어도 침투 효율이 50%정도 되기 위해서는 최소한 5개 정도의 sequence가 필요함을 알 수 있었다.

(마) HIV-2 Tat-GFP의 세포내 침투 확인

HIV-2 Tat-2 염기성 도메인의 아미노산 잔기를 이용하여 목표단백질인 GFP의 염기서열에 해당하는 DNA 절편을 벡터에 삽입시켜 Tat-2-GFP 융합 단백질을 발현할 수 있는 vector를 제조하여 대장균에서 과발현시켜 정제하였다 (Fig. 19 and 20). 정제된 Tat-2-GFP 융합단백질의 세포 내 전달효과를 알아 보기 위하여 정제된 Tat-2-GFP 융합단백질을 세포배양액 내에 처리한 결과, HIV-1 Tat-GFP 융합단백질 처럼 단백질을 세포내로 효과적으로 침투시킬 수 있음을 Western blot을 통해 확인하였고 (Fig. 21 and 22), 투과된 융합단백질의 활성을 공초점 형광 현미경을 사용하여 분석하였다 (Fig. 23).

HIV-2 Tat-GFP 융합단백질은 HeLa 세포내로 투과되었고 세포질 뿐만 아니라 핵까지도 침투되었음을 확인하였다.

(2) 질환관련 생리활성 융합단백질들의 세포 및 조직내 침투확인 및 생리활성 분석

(가) 항산화효소 SOD의 세포 및 피부조직 침투확인 및 생리활성 분석

① 변성상태의 Tat-SOD 융합단백질의 HeLa 세포 투과는 시간 및 농도 의존적으로 HeLa 세포 내로 이동하였고 또한 투여한 융합단백질의 농도에 비례하여 세포 내로 투과된 Tat-SOD의 양이 증가됨을 확인하였다 (Data 생략).

세포 내로 투과된 융합단백질이 그 고유한 활성을 유지해야만 이를 단백질 치료 (protein therapy)에 응용할 수 있다. 따라서 세포 내로 투과된 융합 단백질이 어느 정도 생물학적 활성을 지니는지는 매우 중요한 문제이다. 발현시킨 Tat-SOD는 변성 상태의 SOD 활성도가 없는 융합 단백질을 이용하였지만 HeLa 세포 투과 이후 세포질 내에서 SOD의 활성도가 회복됨을 관찰하였다. **Fig. 24**에 나타난 바와 같이 변성상태의 Tat-SOD를 처리한 HeLa 세포 내의 Cu,Zn-SOD 활성도는 시간 및 농도 의존적으로 증가되었다.

침투된 Tat-SOD의 세포 내에서의 stability를 Western blot과 효소활성도 변화로 조사하였는데 12시간까지 stable 하게 유지되었으며 (Data 생략) oxidative stress 하에서의 cell-viability test를 해본 결과 0.25-2 μM 에서 40-80%의 viability 증가를 확인할 수 있었고, 이는 침투된 Tat-SOD의 질환 치료제로의 가능성을 확인 시켜주는 결과이다 (**Fig. 25**)

② 9Lys-SOD 융합단백질의 fibroblast 세포 침투도 조사하였는데 9Lys-SOD사 Tat-SOD보다 동일농도에서 침투율이 높았으며 효소활성도도 비례하여 높아졌음을 알 수 있었다 (**Fig. 26**).

③ Tat-SOD와 9Lys-SOD 융합단백질의 피부조직으로의 침투여부를 확인하기 위하여 쥐의 등부위의 털을 면도한 후 각각의 융합단백질을 발라주었다. 시간에 따라 피부조직을 section하여 immunohistochemistry를 수행한 결과 융합단백질이 epidermis 와 dermis까지 침투하였음을 확인할 수 있었으며 침투된 효소의 활성도도 증가함을 알 수 있었다 (**Fig. 27**). 이 침투결과는 SOD를 이용하여 이 효소와 관련 있는 질환의 단백질 치료뿐 아니라 피부노화예방 및 방지용 기능성화장품이나 아토피성 피부염치료 등에 사용할 수 있는 획기적이고 중요한 연구결과로 생각된다.

④ 침투 vector를 Tat-vector를 사용하게 되면 Tat-SOD, Tat-CAT 이 세포, 조직으로 침투하기 위해서는 denaturation 시켜야 하고 세포나 조직내로 들어가서 다시 refolding processing이 필요하였다. 이와같이 denaturation, renaturation 과정 때문에 침투 효율 및 세포내에서의 생리활성 회복효율이 낮은 단점이 있고 또한 단백질 치료를 위해서는 변형시킨 단백질 보다 3차구조를 가진 intact 단백질을 치료용으로 사용하는 것이 더 바람직 하리라 생각되었다. 그러므로 본 연구에서는 3차구조를 가진 단백질을 침투시킬수 있는 PEP-1-vector를 이용하여 PEP-1-SOD, PEP-1-CAT을 세포 및 조직에 침투시키는 연구를 수행하였다.

PEP-1 vector (KETWWETWWTEWSQPKKKRKV)는 21개의 아미노산 잔기와 KETWWETWWTEW : hydrophobic trap motive, SQP : spacer arm, 그리고 KKKRKV : hydrophilic lysine rich domain으로 이루어져 있다. 이 sequence는 PTD domain을 함유하고 있는 signal peptide로서 세포내 침투를 위해서 SOD, Catalase를 융합시켰다.

㉔ 자연상태에서 정제한 PEP-1-SOD 융합단백질의 HeLa 세포 내 투과가 시간 및 농도에 따라 어떻게 변화되는지를 관찰하였다. Fig. 28에 나타난 것처럼 PEP-1-SOD는 시간 및 농도 의존적으로 HeLa 세포 내로 투과 되는 것을 Western blotting으로 확인하였다. 이런 결과는 변성상태로 정제한 Tat-SOD가 시간 및 농도 의존적으로 세포 내 투과가 일어나는 것과 비슷하였다.

㉕ 세포 내로 투과된 융합단백질은 그 고유한 활성을 유지해야만 이를 단백질 치료 (protein therapy)에 응용할 수 있다. 따라서, PEP-1-SOD 융합단백질을 HeLa 세포 투과 이후 세포질 내에서 SOD 활성을 관찰하였다. Fig. 29에 나타난 바와 같이 자연상태인 PEP-1-SOD를 처리한 HeLa 세포 내의 SOD 활성은 농도 및 시간 의존적으로 증가되었다. PEP-1-SOD의 활성은 Tat-SOD의 세포 투과 후 활성을 비교했을 경우, Tat-SOD보다 3-4배 높은 것으로 나타났다. 따라서, PEP-1-SOD는 Tat-SOD보다 세포 내로의 투과는 비슷하게 일어나지만 활성도는 높게 증가되는 것을 알 수 있었다. 이는 PEP-1-SOD가 세포 내로 투과된 후 refolding이 필요없이 바로 활성을 유지하고 있음을 알 수 있었다.

㉖ 세포 내로 투과된 PEP-1-SOD 융합단백질을 형광면역염색으로 다시 한번 확인하였다. 2 μ M의 PEP-1-SOD를 1 시간 동안 세포배양액 내에 처리하였을 때에 융합단백질이 세포내 모든 영역으로 투과됨이 형광면역염색법을 이용한 형광현미경으로 확인할 수 있었다 (Fig. 30).

㉗ HeLa 세포 내로 투과된 PEP-1-SOD는 상당한 기간 동안 세포 내에서 안정성을 유지해야만 효과적으로 단백질 치료에 응용할 수 있다. Fig. 31에 나타난 바와 같이 세포 내로 투과된 PEP-1-SOD는 시간에 따라 분해되어 단백질의 양이 점차 감소되었으나, 최소 48 시간 동안 세포 내에서 존재함을 알 수 있었다. SOD 활성 역시 시간에 따라 점차 감소하였으나 투여 48 시간 후에도 대조군 (4.5 U/mg protein)의 1.5 (6.31 U/mg protein)배 이상의 효소의 활성을 유지하고 있었으며, 60시간에서는 대조군 보다 1.2 (5.12 U/mg protein)배의 효소 활성을 유지하고 있었다.

㉘ 마우스 피부에도 PEP-1-SOD가 효과적으로 투과가 일어나는지 알아보기 위해서 면역 조직염색을 이용하여 확인하였다. Fig. 32는 마우스 피부 조직을 염색한 결과로 3 μ M PEP-1-SOD를 1 시간 피부에 발라주고 염색하였을 경우 PEP-1-SOD가 피부 조직 안으로 투과된 모습을 잘 보여주고 있다. 투과된 PEP-1-SOD는 피부 조직의 상피세포 및 진피세포 까지 PEP-1-SOD의 투과가 일어나고 있음을 확인하였다. 또한, 피부 투과 후 SOD 활성은 5.92 U/mg protein에서 26.18 U/mg protein과 46.22 U/mg protein으로 시간에 따라 5-10배 이상 크게 증가하였다. 그러나, Tat-SOD의 경우도 마우스 피부 투과 후 시간에 따라 SOD 활성이 24.39 U/mg protein으로 5배 증가하

였다. PEP-1-SOD와 Tat-SOD 모두 피부 조직으로 투과 후 단백질의 활성이 증가하지만, PEP-1-SOD 융합 단백질이 Tat-SOD보다 더욱 효과적으로 단백질의 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

㉞ PEP-1-SOD 및 Tat-SOD 융합단백질을 마우스에 복강주사하고 8 시간 후 각 장기 (뇌, 간, 심장, 췌장, 비장, 폐, 신장)들을 면역조직염색으로 확인하였다. **Fig. 33**은 복강주사로 PEP-1-SOD 및 Tat-SOD 융합단백질이 각 장기 별로 고루 분포되며 투과가 일어 나고 있음을 알 수 있었다. **Fig. 34**는 장기 별로 투과된 PEP-1-SOD와 Tat-SOD단백질의 활성을 나타내고 있다. 이 결과로 각 장기별로 투과된 PEP-1-SOD 융합단백질에 의해 각 장기에서의 SOD 활성이 크게 증가되는 것을 확인 하였다. 따라서, PEP-1-SOD 융합단백질은 세포와 피부 그리고 각 장기에 효율적으로 투과가 잘 일어나고, SOD 활성을 유지하고 있음을 관찰하였다.

(나) 항산화효소 Catalase (CAT)의 유전자크로닝 및 세포와 피부조직 침투 확인 및 생리활성 분석

- ① Tat-CAT과 9Arg-CAT 융합단백질의 침투실험을 위하여 우선 인간 간조직 Catalase의 유전자를 PCR 방법에 의하여 최초로 크로닝한 후 염기서열을 밝혀내었다. (GenebankTM AY 028632)(Data 생략)
- ② 크로닝된 유전자를 primer를 이용한 PCR 크로닝 후 Tat 및 9Arg vector에 fusion 시켜 Tat-CAT, 9Arg-CAT 융합단백질을 발현한 후 이를 각각 정제하여 확인하고, 이를 HeLa 세포와 PC12 세포에 각각 침투시켰다. 농도 및 침투 시간에 따른 침투효율을 조사해보니 Tat-CAT 보다 9Arg-CAT이 침투효율이 높은 것을 알 수 있었고 (**Fig. 35**), 침투된 것을 형광현미경으로 확인하였다 (**Fig. 36**). 침투된 Tat-CAT의 stability는 60시간까지 안정하였으며, paraquat을 이용한 생리활성을 측정된 결과 oxidative stress에 대하여 protection 효과를 보였고 Tat-SOD와 함께 침투시켰을 때 protection의 synergic 효과를 볼 수 있었다 (Data 생략).
- ③ Tat-CAT과 9Arg-CAT의 피부조직 침투를 확인한 결과 Tat-SOD 와 마찬가지로 epidermis 와 dermis 까지 침투하였고, 활성도도 증가하였음을 관찰하였다 (**Fig. 37**). Tat-SOD 피부침투와 Tat-CAT의 피부침투 결과는 단백질 치료(노화, 당뇨병 등) 및 피부노화 방지용 기능성 화장품 개발에 사용할 수 있을 것이다.
- ④ 재조합 PEP-1-Catalase 융합단백질의 과대발현 및 정제
PEP-1-SOD와 같은 방법으로 PEP-1-Catalase의 발현벡터를 제조하였고 대장균에서 PEP-1-Catalase를 과대발현 및 순수하게 정제를 하였다. 과대발현 및 정제된 PEP-1-Catalase 융합단백질을 SDS-PAGE와 Western blot으로 확인하였다 (**Fig. 38**).
- ⑤ HeLa 세포로 재조합 PEP-1-Catalase 융합단백질의 투과 및 활성
PEP-1-Catalase도 배양된 HeLa 세포에 농도 및 시간 의존적으로 투과되는지, 투과된 후 세포내에서의 활성도 변화를 확인하였다. PEP-1-Catalase 융합단백질도 HeLa 세포에 농도 및 시간 의존적으로 투과되었고 (**Fig. 39**), 투과 된

세포 내에서의 활성도가 크게 증가되었다 (Fig. 40). 또한, 세포 내로 투과 된 후 48 시간 이상 높은 활성을 유지하며 안정성을 유지하고 있었다.

⑥ PEP-1-Catalase 융합단백질의 마우스 피부로 투과

PEP-1-Catalase 융합단백질도 마우스 피부조직으로 투과됨을 관찰하였다. Fig. 41에서 PEP-1-Catalase가 피부 조직으로 투과되는 정도를 잘 나타내고 있으며, 투과 된 후의 Catalase 활성은 32.1 U/mg protein으로 대조군에 비해 15배 이상 증가되었고, Tat-CAT (8.6 U/mg protein)에 비해 4-5배 이상 높게 나타났다.

⑦ PEP-1-Catalase 융합단백질의 마우스 각 장기별로의 투과

PEP-1-Catalase도 마우스에 복강주사하고 8시간 후 각 장기들을 면역조직염색과 활성을 측정중에 있다. SOD 와 마찬가지로 방법으로 연구를 수행한 결과 PEP-1-SOD와 PEP-1-Catalase는 Tat-SOD, Tat-Catalase보다 더욱 높음 활성을 가지고 각 조직에 투과되는 것을 확인하였다. 따라서, PEP-1-SOD, PEP-1-Catalase 융합단백질들은 활성산소종에 의한 각 세포의 손상과 SOD 및 Catalase와 관련된 질환에 대한 단백질 치료제로서의 가능성을 한 층 더 보여 주었다 (Data 생략).

(다) *Botulinum toxin* (BTx)의 유전자크로닝 및 발현

① BTx는 anaerobic, G⁺ bacteria 인 *Clostridium botulinum* 균에서 생산되는 neurotoxin 단백질로서 신경세포에서 acetylcholine의 분비를 저해함으로써 근신경의 전도를 차단시켜 근육마비를 초래시키는 신경독소이다. 80년대 들어 미국 FDA의 허가에 의해 안면근육, 안면경련, 사시들 각종 근육질환의 치료에 널리 사용되기 시작하여 90년대 초부터 주름살 치료제로 사용되고 있다. 그러나 주름살제거 치료시 (보톡스시술) 주사로 수술해야하기 때문에 매우 불편하게 시술되고 있다. 본 연구에서는 PEP-1을 BTx에 융합시켜 발현시킨 후 피부에 직접 바르는 방법으로 주름살제거 치료를 할 수 있을 것으로 생각되어 이 연구가 성공되면 획기적인 결과로 생각된다.

② BTx의 light chain 유전자를 primer 제작후 PCR로 크로닝하여 PEP-1-vector에 fusion 시켰으며 (PEP-1-BTx)이를 발현시켰고, 발현된 단백질을 정제하여 Western blot으로 확인하였다 (Fig. 42). PEP-1-BTx를 HeLa 세포내로 투과를 농도 및 시간별로 처리하여 Western blot으로 확인하였다 (Fig. 43). 또한 형광면역염색으로 세포내 투과를 다시 확인하였다 (Fig. 44).

③ PEP-1-BTx의 피부조직 투과 및 단항체 생산

마우스 피부에도 PEP-1-SOD가 효과적으로 투과가 일어나는지 알아보기 위해 면역 조직염색을 이용하여 확인하였다. Fig. 45는 마우스 피부 조직을 염색한 결과로 50 µg PEP-1-BTx를 1 시간 피부에 발라주고 염색하였을 경우 PEP-1-BTx가 피부 조직 안으로 투과된 모습을 잘 보여주고 있다. 투과된 PEP-1-BTx는 피부 조직의 상피세포 및 진피세포까지 투과가 일어나고 있음을 확인하였고, BTx에 대한 단항체를 생산하였다.

(라) 암관련 p53의 세포 침투확인 및 생리활성분석

① Tat-p53의 HeLa 세포내로의 침투

HPV-positive cervical cancer cell line인 HeLa은 normal RB and p53 functions이 결핍된 세포주로서 매우 낮은농도의 wild-type p53을 가지고 있다. Tat-p53 융합단백질을 세포내에 시간 및 농도별로 처리한 다음 Western blot으로 확인하였다. Tat-p53 융합단백질은 세포내에 농도 및 시간 의존적으로 투과되었다 (Fig. 46A and 46B). 세포내로 침투된 Tat-p53 fusion protein은 24시간 까지 존재하였다 (Fig. 46C). 또한, Tat-p53 fusion protein이 세포내로 침투 되는 것을 다시 확인 하기 위해 세포내 Tat-p53의 subcellular distribution을 confocal laser microscopy 와 subcellular fractionation 으로 확인 하였다 (Fig. 46D). 그 결과 Tat-p53은 핵 뿐아니라 세포질에서도 발견되었다. subcellular localization을 분석하기 위해 핵과 세포질 부분은 각각 분리 하여 anti-p53, anti-actin or anti-PARP antibodies 들을 이용하여 Western blot으로 분석 되었다. Fig. 46E에서 보듯, Tat-p53 은 핵뿐만 아니라 세포질 내에서도 확인되었다.

② Tat-p53의 세포내 침투로 인한 p21 유전자의 transactivations

침투된 Tat-p53 protein의 고유의 활성은 protein transduction technology 에서의 선제 조건이 된다. p53은 p21 유전자의 활성을 유도 한다고 알려져 있다. 세포내로 침투된 Tat-p53 fusion protein이 세포내에서 활성을 가지고 있는지 알아보기 위해 p21 protein의 발현 수준을 알아 보았다. 그 결과 Tat-p53 은 p21의 발현을 농도, 시간에 의존적으로 유도하였다 (Fig. 47A and B). 또한 Tat-p53에 의한 p21 promoter activity의 transactivation을 알아보기 위해 luciferase activity를 측정하였다 (Fig. 47C). 세포내 침투된 Tat-p53은 p21 promoter activity를 시간에 따라 증가 시켰다. 이런 결과는 Tat-p53 융합단백질이 활성을 갖고 세포내로 침투 한다는 것을 알 수 있었다.

③ Tat-p53에 의한 cell viability 측정

cell viability를 확인하기 위해 0.2 - 1 μ M Tat-p53을 HeLa cell에 매일 3일 동안 처리한 후 MTT assay를 수행하였다 (Fig. 48). Tat-p53은 농도에 의존적으로 세포사를 유도하였고, 1 μ M Tat-p53를 3일 동안 처리한 세포는 약 60%가 사멸 되었다.

④ Tat-p53에 의해 유도된 세포사 측정

Tat-p53으로 처리된 세포에서 DNA fragmentation와 apoptosis related molecules들의 변화를 측정하였다. Tat-p53을 처리한 세포에서 DNA fragmentation ladder가 나타났고 (Fig. 49A), caspase activation, Bcl-2 expression, and PARP cleavage 같은 apoptosis related molecules의 변화를 확인 하였다. Tat-p53을 처리한 세포에서 PARP cleavage가 나타났으며, Bcl-2 protein 수준이 낮아지는 결과를 얻었다 (Fig. 49B). 이런 결과 들은 Tat-p53이 apoptotic cell death가 유도 됨을 알 수 있었다.

⑤ Tat-p53의 암세포에 대한 효능 측정

침투된 Tat-p53의 효과를 여러 human cancer cell lines에서 알아 보았다. liver cancer cell lines인 Hep3B (null p53), HepG2 (wild-type p53)와 prostate cancer cell lines인 PC-3 (null p53), LN-Cap (wild type p53)을 사용하였다. 각각의 cell line은 1 μ M Tat-p53을 매일 4 일동안 처리 하였고, 세

포의 viability는 MTT assay로 측정 되었다 (Fig. 50). 세포의 viability는 처리된 Tat-p53 농도에 의존적으로 감소 되었다. 따라서 Tat-p53은 여러 암 세포에 대한 치료제로 사용될 수 있음을 확인하였다.

(마) 자외선에 의한 유전자손상회복단백질 rpS3 (Human UV endonuclease III)의 유전자 크로닝 및 PEP-1 vector로의 융합

피부세포가 자외선(UV light)에 노출되면 pyrimidine dimer, DNA-protein cross-links, thymine glycon 같은 유전자 손상을 받는다. 이때 손상된 유전자를 repair 해주는 효소 중 base excision 등 중요한 역할을 하는 UV endonuclease III와 중합효소인 DNA polymerase δ 등에 의하여 회복된다. 그러므로 본 연구에서는 이 두 효소를 이용하여 피부에 침투시킴으로서 자외선에 의한 유전자 손상에 대한 치료제로 사용할수 있도록 하고자 한다. 현재 rpS3와 DNA polymerase δ 유전자의 primer를 제작후 PCR로 크로닝하여 PEP-1-vector에 fusion 시켰으며 발현중에 있다.

(바) Prodrug 대사효소인 Nitroreductase(NR)의 세포내 침투 확인 및 생리활성 분석

① Nitrodeductase (NR)은 *E.coli*등의 하등생물이 가지고 있는 효소로서 CE1954라는 Chemical에 대해 특이적 반응을 보여 CB1954를 difunctional alkylating agent로 변화시켜 이 product가 DNA double strand의 cross-linking을 유도하여 암세포의 사멸을 유도함으로서 prodrug로 쓰이는 효소이다.

② Tat-NR의 세포내 침투 및 생리활성 측정

Tat-NR 융합단백질을 *E. coli*에서 발현하여 정제 하였다 (Fig. 51A,B). 정제된 단백질은 immunoblot으로 확인하였고 (Fig. 51C), 정제된 단백질은 활성을 가지고 있었다 (Fig. 51D).

③ Tat-NR의 세포내 침투 및 생체활성측정

Tat-NR 융합단백질의 세포내 침투능력을 시간 및 농도에 따른 Western blot으로 확인하였다. Tat-NR 융합단백질이 시간 및 농도 의존적으로 세포내 침투되는 것을 확인하였다 (Fig. 52). 단백질 치료 방법을 이용한 효과적인 protein therapy를 위해서는 융합단백질이 세포 안에서 오랜 시간동안 안정적으로 활성을 가지며 지속되어야 한다. 따라서, 세포내에서의 안정성과 활성을 측정해 보았다. Tat-NR은 세포내에서 2시간 유지되었다. 그러나 본 연구에서 NR 효소 활성은 HeLa cell 자체의 reductase 활성이 너무 높기 나와서 NR의 효소 활성을 측정할 수 없었다 (data 생략).

④ Nitrofurazone 존재하에 침투된 Tat-NR fusion protein의 cytotoxic effect 조사를 위한 MTT assay

Tat-PTD에 의한 PTD-DEPT의 anti-tumor effects를 확인하기 위해, MTT assay를 수행하였다. 우선 10 μ M nitrofurazone의 존재 하에서 세포에 다양한 농도의 단백질을 처리하였다. Fig. 53A에서 보는 것처럼 5 μ g/ml Tat-NR을 처리했을 때 처음으로 반응을 보였고, 20 μ g/ml을 처리할 때까지 단백질의 처리량과 반비례의 viability를 보였으며 20 μ g/ml 이상에서는 거의 같은 반

응을 보였다. 또한 transduction 된 세포가 얼마나 nitrofurazone에 대해 민감성을 보인가에 대해 관찰하였다. 5 µg/ml의 융합단백질을 처리하고, 각각의 다른 농도로 nitrofurazone를 처리하였다. **Fig. 53B**에서, Tat-NR는 약 0.5 µM 이상의 nitrofurazone 농도에서부터 반응을 보였다. nitrofurazone의 농도가 2 µM을 넘어서면 더 이상의 효과를 나타내지 못했다.

(사) Cytosine deaminase (CD)의 세포내 침투 확인 및 생리활성 분석

CD는 *E. coli*, yeast, fungi등의 하등생물이 가지고 있는 효소로 처음에는 fungi를 자라지 못하게 하기 위해 antimicrobial agent인 5FC를 사용하여 이때 관여하는 효소라는 것이 밝혀졌다. CD의 bystander effect를 보면 5-FC를 5-FU로 변환시켜주고 이 5-FU는 cells의 enzyme들에 의해 5-FdUMP로 바뀌고 이것이 thymidylate synthase를 inhibition하여 dUMP가 dTMP로 바뀌는 기작을 block 한다. 결국 DNA의 replication을 방해하므로 cell의 proliferation을 막는다.

① Tat-CD의 세포내 침투 및 생리활성 측정

Tat-yCD 융합단백질의 세포내 침투능력을 시간 및 농도에 따라 Western blot으로 확인하였다. Tat-yCD 융합 단백질은 시간 (15-90 분) 및 농도 의존적으로 세포내로 침투되는 것을 확인하였다 (**Fig. 54A and B**). 또한 융합단백질이 세포내에서 얼마나 안정적으로 유지되지를 측정하였다 (**Fig. 54C**). Tat-yCD는 24시간까지 세포내에서 안정하게 유지되고 있었다. 세포침투후 효소활성을 측정한 결과 Tat-yCD 융합단백질이 5-FC를 5-FU로 변환시켰고 단백질의 농도에 비례하여 CD의 활성이 증가하는 것을 확인하였다 (**Fig. 55**).

② 5-FC 존재하의 Tat-CD에 의한 MTT assay

Fig. 56A에서 보는 것처럼 HeLa cell의 5-FC에 대한 반응곡선을 확인하였다. 0.5 g/ml Tat-yCD를 처리했을 때 처음으로 반응을 보였고, 2g/ml을 처리할 때까지 단백질의 처리 양과 반비례의 viability를 보였으며 2 g/ml 이상에서는 같은 반응을 보였다. 또한 세포가 얼마나 5-FC에 대한 민감성을 확인하였다. 5g/ml의 융합 단백질을 처리하고, 각각의 다른 농도로 5-FC를 처리하면, Tat-yCD는 약 0.5-2 M 에서만 5-FC 효과를 나타내었다 (**Fig. 56B**).

③ 5-FC에 의한 bystander cytotoxic 효능

Transduction된 융합 단백질에 의해 활성화 되어진 drug에 의해 정상 세포의 사멸이 일어나는지 MTT assay로서 관찰하였다. **Fig. 57**에서 보면 일단 활성화된 drug는 transduction되지 않은 세포에 거의 비슷한 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다. 그러나 활성화된 drug에 의한 세포의 사멸은 직접 transduction을 한 세포의 사멸 기작 (cytotoxic effects)처럼 강력해 보이지는 않았다. Bystander cytotoxic effects의 결과를 보면 세포가 사멸하는 기작의 농도는 cytotoxic effects와 비슷하지만 최대의 효과를 나타내지는 못하는 것 같다.

(아) 간질관련 효소들의 유전자클로닝 및 Tat/PEP-1-vector로의 fusion

① GABA Transaminase (GABA-T)의 유전자클로닝, 유전자 구조연구

뇌 조직에서 중요한 신경전달물질로 알려져 있는 GABA의 분해대사인 GABA-T의 인간 유전자 클로닝을 수행하였다. 클로닝된 유전자는 Northern blot을 이용한 tissue distribution과 Southern blot을 이용한 genomic organization을 탐색하였으며 pGEM-T vector에서 발현시켜 활성이 있는 효소를 얻을 수 있었다. 또한 소뇌조직 GABA-T도 유전자 클로닝과 발현을 수행하였다. 클로닝된 인간 GABA-T효소를 세포침투를 위하여 primer를 제작하여 PCR cloning을 수행하였고 세포 침투실험을 수행중에 있다. GABA-T의 세포내 침투가 성공되면 간질 뿐 아니라 GABA-T deficiency 유전병을 치료할 수 있을 것이다.

② Succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH)의 유전자 클로닝

SSADH는 GABA Shunt에서 GABA 분해효소로서 간질병에 매우 관련이 크며 특히 최근 SSADH deficiency genetic disease에 대한 연구가 매우 활발하다. 그러므로 인간 SSADH를 세포내 침투시키기 위하여 유전자 클로닝을 수행하고 있다. SSADH의 유전자 클로닝을 위하여 SSADH 효소의 활성부위구조를 탐색하였으며 (논문발표 : *J. Neurochem.* 76, 919-925, 2001) 이를 이용하여 primer를 제작하여 DNA probe를 얻었다. 이 probe를 이용하여 인간 SSADH 유전자 클로닝을 현재 수행 중에 있으며 앞으로 클로닝된 유전자를 이용하여 단백질 침투실험을 수행할 예정이다.

③ Glutamate decarboxylase (GAD)의 유전자 클로닝 및 발현

GAD와 glutamate transporter는 간질병 및 신경질환에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 특히 GAD는 glutamate transporter에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. GABA 합성효소인 GAD는 primer를 이용하여 PCR 클로닝을 수행하였고 이를 Tat-vector에 넣어 fusion 단백질을 발현하였다. 현재 이 Tat-GAD 단백질을 세포 내로 침투시키는 과정에 있다.

④ Glutamate dehydrogenase (GDH)의 유전자 클로닝 및 발현

GDH는 glutamate metabolism의 조절에 매우 중요한 효소이며 최근 GDH에 대한 연구가 활발히 진행중이다. 그러므로 인간 GDH를 세포내 침투시키기 위해 유전자 클로닝을 수행하였고 이를 Tat-vector에 넣어 융합단백질을 발현 및 정제하였다. 정제된 Tat-GDH 융합단백질을 PC12 cell에 농도 및 시간의존적으로 침투 되었으며, 세포내에서 효소의 활성이 크게 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 58). 또한, cytotoxicity test결과 세포내에 전혀 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

(자) 파킨슨병 관련 Tyrosine hydroxylase (TH)와 GTP cyclohydrolase (GCH)의 유전자 클로닝 및 발현

TH는 뇌조직에서 신경전달물질인 dopamine합성의 rate limiting step을 촉매하는 중요한 효소이고 GCH는 TH, PH 등의 효소들이 활성을 위해 필요한 보조인자인 BH₄ (Tetrahydropterin)의 합성효소로서 이들 효소들의 이상이 파킨슨병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. TH와 GCH는 유전자를 이용하여 primer제작 후 PCR 클로닝을 수행하여 Tat-vector에 fusion시켰으며 현재 발현, 정제 중에 있다. 이 효소들의 세포내 침투 및 조직침투 실험이 성공되면 파킨슨 병의 모델 동물을 이용하여 단백질 치료의 가능성을 타진 할 예정이다.

(차) Phenylalanine hydroxylase (PH)의 유전자 클로닝

PH는 phenylalanine에서 tyrosine으로 hydroxylation을 촉진시키는 효소로써 주로 liver에 존재한다. PH의 결핍에 의해 phenylketonuria(PKU)가 일어나며 PKU는 대부분 태어날 때 amino acid 대사의 이상으로 일어난다. 최근의 연구는 이러한 PH조절을 통한 PKU 유전자치료에 많은 연구가 진행 중에 있으나 효과적인 치료법이 되지 못하고 있다. 그러므로 본 연구에서 단백질치료법을 유전자 치료와 병행한다면 이 유전병의 치료에 큰 효과를 볼 것으로 기대된다. PH의 유전자는 primer를 이용한 PCR 클로닝을 수행하여 Tat-vector에 fusion시켰으며 현재 융합단백질을 발현 중에 있다.

(카) Nitric oxide synthase (NOS)의 유전자 클로닝

NOS는 NO 합성효소로서 NO는 생체 내에서 신호전달, 혈관확장, 근수축조절, 염증반응 등 여러 가지 생리작용을 가지고 있는 중요한 물질이다. 본 연구에서는 NOS를 세포 내로 침투시키기 위하여 primer를 제작 후 PCR 클로닝을 수행 중에 있으며 이 연구 결과는 앞으로 신경세포 독성, 염증, 그리고 혈관계 질환에 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

(타) Human growth hormone (hGH)의 유전자 클로닝

Human growth hormone (hGH)은 성장과 발생을 조절하는 중요한 hormone이다. 본 연구에서는 hGH를 세포내로 침투시키기 위해 primer를 이용한 PCR 클로닝을 수행하여 Tat-vector에 fusion시켰으며 현재 융합단백질을 발현, 정제하여 세포 및 조직내 침투 중에 있다.

(파) Organic compound (Vitamin A, C)의 Tat vector와 link

항노화 및 항주름 효과가 있는 Vitamin A와 Vitamin C를 6Lys 과 유기합성 방법을 이용하여 conjugation 시켜 6K-Vit A, 6K-VitC를 각각 합성하였다 (Fig. 59-61). Tat-Vitamin 융합물질을 TLC를 이용하여 vitamin C가 link된 것을 확인하였으며, 이들 물질들이 피부조직으로 침투효능을 측정중에 있으며 이 연구 결과는 보습효과가 있는 hyaluronic acid, 미백효과가 있는 hydroquinone, 피비분비 억제효과가 있는 5- α -reductase inhibitor 등에 이 기술을 응용하여 제품화한다면 의료 및 미용, 제약산업에서 막대한 이익을 가져올 수 있을 것으로 사료된다.

라. 융합 단백질의 고효율 침투 조건의 확립

- (1) 구리이온 회복 방법에 의한 Tat-SOD 융합단백질의 세포 침투 효율증가
재조합 Tat-SOD는 정제과정에서의 구리이온 방출로 인한 융합단백질의 구조 변화로 세포내 침투에 대한 영향을 받을 것으로 추측되어 구리이온을 회복시킨 CR-Tat-SOD (Copper Reconstituted Tat-SOD)와 Tat-SOD와의 세포 침투 효율을 비교하였다.

(가) 구리이온 회복된 Tat-SOD의 제조 (CR-Tat-SOD)

Table 2에 나타난 바와 같이 정제한 Tat-SOD의 구리이온을 회복시킴으로써 소실되었던 효소 활성을 회복하였고, 구리이온이 Cu,Zn-SOD의 활성을 유지하는데 필수적으로 요구되는 것을 확인하였다.

(나) CR-Tat-SOD의 세포 침투성 확인

Fig. 62에서 보여주는 것처럼 CR-Tat-SOD가 ZR-Tat-SOD와 CZR-Tat-SOD보다 더욱 효율적으로 세포 내 침투가 일어남을 확인하였다. 구리이온 회복으로 SOD의 활성 뿐 아니라 세포 내 침투가 100% 증가되지만, 아연이온회복은 세포 내 침투가 Tat-SOD보다 15% 증가하였고 또한, 구리/아연 이온 회복한 Tat-SOD는 세포 내 침투가 95% 증가하여 구리이온만 회복한 Tat-SOD와 거의 같게 나타났다.

(다) CR-Tat-SOD의 HeLa 세포 내 침투

Fig. 63에 나타낸 바와 같이 두 종류의 융합단백질들은 모두 처리한 농도에 비례하여 세포에 침투되는 양이 증가되었으나, 같은 농도를 처리하였을 때 세포내로 침투된 융합단백질의 양은 CR-Tat-SOD가 Tat-SOD에 비하여 크게 증가하였다. 이러한 현상은 낮은 농도 (0.25-0.5 μM)의 융합단백질을 처리했을 때 현저하게 나타나 CR-Tat-SOD의 세포침투성은 Tat-SOD에 비해 4~5배 증가하였다. 또한, **Fig. 64**에 나타낸 바와 같이 1 μM 의 융합단백질을 처리하고 시간별로 세포내로 침투된 융합단백질의 양을 관찰한 결과, CR-Tat-SOD가 빠르게 (5-20 분) 세포내로 침투하는 것을 확인하였다 (rapid-saturation manner). 따라서, 구리이온 회복으로 낮은 농도와 빠른 시간에 세포 침투성이 증가된 Tat-SOD는 단백질 치료제로서의 가능성을 한층 더 높여준 결과로 판단되었다.

(라) CR-Tat-SOD의 생물학적 활성도

세포내로 침투된 CR-Tat-SOD가 세포사멸을 어느 정도 억제하는지를 측정하였다. **Fig. 65**에 나타낸 바와 같이 0.1~2 μM 의 처리했을 때 두 종류의 융합단백질은 모두 농도-의존적으로 세포사멸을 억제하였지만 CR-Tat-SOD이 Tat-SOD보다 낮은 농도 (0.25~0.5 μM)에서 높게 나타났다. 이는 CR-Tat-SOD가 Tat-SOD에 비하여 세포 내로 더 빠르게 침투하여 세포내의 유해산소를 제거시킴으로써 세포사멸을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타낸다.

(2) 천연물을 이용한 Tat-SOD 융합단백질의 세포 침투 효율 증가

본 연구에서는 천연물인 인삼 추출물 (ginsenosides)을 이용하여 Tat-SOD의 세포 및 조직 침투 효율을 비교하였다.

(가) 인삼에 의한 세포침투 효율의 증가

인삼이 세포침투 효율을 증가시키는 것을 확인하기 위해 인삼 추출물을 세포 배양액에 미리 12시간 전에 처리하였다. 그다음 Tat-SOD를 농도 및 시간별로 처리하여 western blotting으로 확인하였다 (**Fig. 66**). **Fig. 66**에 나타낸 바와 같이 Tat-SOD 및 인삼을 같이 처리한 Tat-SOD가 시간 및 농도에 따라 세포의 침투효율이 증가 되었다. 그러나, 인삼을 처리한 Tat-SOD의 세포침투 효율이 Tat-SOD만 처리한 것보다 크게 증가되는 것을 확인하였다.

(나) Tat-SOD 활성의 증가

세포 침투 후 단백질 활성을 확인하기 위해 단백질 활성도를 비교해 보았다. 인삼에 의해 세포 침투가 증가된 세포에서의 단백질 활성도는 농도 및 시간별로 단백질의 활성이 2-6배 증대되는 것을 확인하였다 (**Fig. 67**). 이러한 결과

는 인삼이 Tat-SOD의 세포 침투 효율을 크게 증가시키고 또한 단백질 활성을 높이는데 효과적으로 이용될 수 있음을 나타낸다.

(다) 피부조직으로 침투 효율 증가

세포 뿐 아니라 피부조직으로 Tat-SOD의 침투 효율이 증가되는 것을 확인하기 위해 마우스 피부에 인삼과 Tat-SOD를 같이 투여하였다. 인삼을 처리한 마우스의 피부조직에서 Tat-SOD의 침투 및 효소의 활성이 Tat-SOD만 처리한 경우보다 크게 증가되는 것을 조직면역염색과 효소 활성도 분석을 통해 확인하였다 (Fig. 68).

마. 질환모델 동물의 준비 및 모델동물을 이용한 단백질 치료법 가능성 탐색

(1) Ischemia model 동물의 준비

- ① 실험동물을 24시간 절식시킨다.
- ② 호흡마취기를 이용하여 3% isoflurane으로 전신마취 시킨 다음, 2.5% isoflurane (in 33% O₂ 및 67% N₂O)로 마취 상태를 유지한다.
- ③ 실험동물의 체온이 37-37.5°C가 되도록 hot pad와 heat light로 유지한다. 이때 체온은 직장 (rectum)을 통하여 계속 측정, 유지한다.
- ④ 목 부분을 소독하고, 양쪽 온목동맥 (common carotid arteries)을 노출시킨 다음 autoclamp를 이용하여 artery clip으로 5분 또는 10분간 ischemia를 유발한다.
- ⑤ Ischemia의 유발 여부는 망막동맥 (retinal arteries)을 관찰할 수 있는 ophthalmoscope 통하여 확인한다.
- ⑥ Ischemia 유발 후 수술 부위를 봉합하고, 항생제를 주사한 후 실험동물 사육 조건에 맞추어 일정 기간 생존시킨다.

(2) 당뇨병 유발 model 동물의 준비

- ① Tat-SOD가 streptozotocin (STZ)으로 유발된 당뇨병 마우스에 대한 효과를 관찰하기 위해 ICR 마우스를 이용하여 당뇨병을 유발시켰다. ICR 마우스에 STZ을 100 mg/kg로 0.1 M citrate buffer (pH 4.2)에 용해한 다음 한번의 복강주사로 당뇨병을 유발시킨다. STZ 투여 후 3-4일에 한번씩 혈당을 측정하여 200 mg/dl 이상의 혈당치를 보이는 개체를 당뇨병이 유발된 것으로 인정한다. 혈당 측정은 마우스를 16시간 절식시킨 후, 안와정맥총 채혈법으로 혈액을 채취하고 glucometer (Glucotrend, Germany)를 이용하여 혈당을 측정한다.
- ② 유전적 insulin dependent diabetes mellitus에 사용한 NOD (Non-obese diabetes mouse)는 본 대학 실험동물부에서 구입한다.

(3) 파킨슨씨병 유발 model 동물의 준비

- ① 파킨슨씨 병 유발은 수컷 C57BL/6 마우스에 herbicide 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium (paraquat; PQ)을 1주에 한번 10 mg/kg로 3주 동안 계속 복강주사하여 유발시킨다.
- ② 대조군으로 saline을 투여하여 비교한다.
- ③ 마우스를 희생시켜 대뇌의 흑질(substantia nigra)에 존재하는 dopaminergic neuron를 조직면역염색으로 확인한다.

(4) Ischemia model 에서의 SOD 및 Catalase 융합단백질의 효과

(가) PEP-1-SOD의 신경세포 침투효과

PEP-1-SOD가 신경세포 (Astrocyte cells)에 침투되는지를 확인하기 위해 농도 및 시간별로 신경세포에 PEP-1-SOD를 투여하고 western blotting과 단백질활성도 분석을 통해 확인하였다 (Fig. 69). Fig. 69에 나타난 바와같이 PEP-1-SOD는 농도 및 시간 의존적으로 신경세포에 침투됨을 알 수 있었고, 단백질의 활성 또한 2-10배 이상 증가되는 것을 확인하였다.

(나) Paraquat에 대한 신경세포 (astrocyte cells)의 보호효과

신경세포로 투과된 PEP-1-SOD가 paraquat (PQ)에 의한 세포사멸을 어느정도 보호하는지를 관찰하기 위해 신경세포에 PQ를 처리하였다. PQ를 처리한 세포는 60% 정도 세포사멸을 나타내었지만 PEP-1-SOD를 같이 처리한 경우 세포사멸이 90% 이상 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 70).

(다) Ischemia model에서 PEP-1-SOD 융합단백질의 효과

Ischemia를 유발시키기 30분 전, 후에 PEP-1-SOD와 Tat-SOD를 농도별 (100-500 µg)로 복강주사 하였고, ischemia 유발 4일 후에 면역조직염색으로 neuronal cell viability를 확인하였다 (Fig. 71). Control에 비해 ischemia를 유발한 gerbil의 neuronal cell은 대부분 (90% 이상) 파괴되었다. 그러나, PEP-1-SOD를 주사한 gerbil의 경우 control의 90% 이상 neuronal cell이 파괴되지 않는 것을 확인하였다. 특히, 낮은 농도에서도 neuronal cell 파괴를 효과적으로 보호하는 것을 알 수 있었다. 그러나, Tat-SOD의 경우에는 고농도에서 효과가 나타났다. 낮은 농도에서의 효과는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 PEP-1-SOD가 Tat-SOD에 비해 ischemia에서 낮은 농도로도 neuronal cell 파괴를 효과적으로 보호함을 알 수 있었다 (Fig. 72).

(라) Ischemia model에서 PEP-1-Catalase 융합단백질의 효과

PEP-1-SOD와 같은 방법으로 PEP-1-Catalase를 이용하여 ischemia 보호효과를 관찰하였다. PEP-1-Catalase는 ischemia의 보호작용에 효과를 나타내지 않음을 면역조직염색으로 확인하였다 (Data 생략).

(마) Ischemia model에서 PEP-1-SOD, Catalase 융합단백질의 효과

Ischemia에서 neuronal cell viability를 증가시키기 위해 PEP-1-SOD 및 PEP-1-Catalase 융합단백질을 같이 주사하여 neuronal cell viability를 확인하였다. SOD와 Catalase를 동시에 주사하면 ischemia에서 보호효과가 SOD만 주사한 것보다 더욱 효과적으로 나타났다.

(4) 인슐린 의존형 당뇨병 (IDDM) model에서의 Tat-SOD 융합단백질의 효과

(가) MIN6N 세포로의 침투 및 생리활성 측정

① MIN6N 세포로 Tat-SOD의 투과 및 활성화도

Fig. 73A에 나타난 바와 같이 Tat-SOD는 농도 의존적으로 인슐린 분비 MIN6N 세포내로 투과되었으며 Tat-SOD를 처리한 각 세포 내의 SOD 활성화도는 투과된 융합단백질의 양에 비례하여 농도 의존적으로 증가되었다. Tat-SOD의 투과는 confocal laser scanning microscope (Bio-Rad, MRC 1024 ES)을 이용하여 면역형광염색으로 다시 확인하였다 (Fig. 73C).

② MIN6N 세포로 투과된 Tat-SOD의 안정성

Fig. 73B에 나타난 바와 같이 세포 내로 투과된 Tat-SOD는 최소 48 시간 동안 세포내에 존재함을 알 수 있었고 SOD 활성화 역시 48시간 후에도 대조군보다 높은 효소활성을 유지하고 있었다.

③ Tat-SOD transduction이 STZ로 유도된 MIN6N 세포의 세포사멸에 미치는 영향

Streptozotocin (STZ)를 1-50 mM의 농도로 배지에 첨가하였을 때 농도 의존적으로 MIN6N 세포의 사멸을 유도하였다 (Fig. 74A). 그러나, STZ에 의한 세포사멸은 3 μ M의 Tat-SOD를 1시간 전에 전처리하였을 때 상승하였다. 특히 20 mM STZ 및 30 mM STZ 투여군에서 Tat-SOD의 투여는 세포의 사멸을 50%와 110% 유의하게 증가시켰다. 세포내 SOD의 활성화도 역시 Tat-SOD의 투여로 3-10배 유의하게 증가하였다 (Fig. 74B).

④ Tat-SOD transduction이 STZ로 증가된 MIN6N 세포내 superoxide anion radical (SAR)과 NO에 미치는 영향

STZ를 1-50 mM의 농도로 배지에 첨가하였을 때 농도 의존적으로 세포내 SAR과 NO의 농도가 증가되었다 (Fig. 75). 이러한 SAR의 증가는 3 μ M의 Tat-SOD를 1 시간 전에 전처리하였을 때 대조군과 비슷한 수준으로 유의하게 억제되었다 (Fig. 75A). 그러나, 이와는 대조적으로 STZ에 의해 상승된 NO는 Tat-SOD의 투여에 의하여 억제되지 않았다 (Table 3, Fig. 75B).

⑤ STZ에 의해 유도되는 DNA 절편화에 미치는 Tat-SOD 융합단백질 투여의 영향

세포 내에 축적된 free radical 들은 생체고분자, 특히 DNA를 공격하여 DNA의 절편화 (fragmentation)를 유도하는 것으로 알려져 있다. Fig. 76에 나타난 바와 같이 20 mM의 STZ를 처리하였을 때, 9 시간 이후에 DNA 절편화가 현저하게 관찰되었다. 그러나, 이러한 DNA 절편화는 3 μ M의 Tat-SOD를 전처리하였을 때 효과적으로 억제되었다.

⑥ Tat-SOD transduction이 STZ에 노출된 MIN6N 세포의 Bcl-2와 Heat shock protein (hsp70)의 발현에 미치는 영향

20 mM의 STZ를 처리한 세포에서 Bcl-2의 발현은 시간이 지남에 따라 감소하였으나, hsp70의 발현은 투여 1-3시간 사이에서 일시적으로 증가되었다가 다시 감소되는 양상을 나타내었다 (Fig. 77). 그러나 Tat-SOD가 투과된 세포에서는 12 시간이 지나도 Bcl-2와 hsp70 단백질의 발현이 계속 높은 수준으로 유지되고 있음을 알 수 있었다. 이런 antiapoptotic 단백질은 투과된 Tat-SOD에 의하여 발현이 증가되는 것을 확인하였다.

(나) 모델동물을 이용한 Tat-SOD 의 침투 및 효능측정

① ICR mouse에서 Tat-SOD in vivo transduction

정제된 Tat-SOD 500 µg/ml을 수컷 ICR 마우스에 복강주사하고 5시간 뒤에 췌장 조직을 분리하여 Western blot 을 수행한 결과, 복강주사한 Tat-SOD가 췌장조직 내로 투과되었음을 확인하였다 (Fig. 78A). 이에 따라 췌장조직의 SOD 활성도가 대조군에 비하여 2.2배 상승하였다. Tat-SOD의 in vivo transduction은 다시 한번 면역조직화학으로 확인하였다. Tat-SOD를 복강주사한 췌장조직은 Tat-SOD에 특이하게 반응하는 polyhistidine 항체에 양성 반응을 나타내었다 (Fig. 78B).

② STZ로 유도한 mice 췌장 β-세포의 파괴에 미치는 Tat-SOD in vivo transduction의 영향

ICR mice에 STZ를 주사하고 4시간, 1, 3, 5일에 정제된 Tat-SOD 500 µg/ml을 복강주사하였다. STZ를 주사 7주일 후에 췌장조직을 적출하여 insulin 면역조직화학으로 췌장 β-세포를 관찰하였다. Fig. 79에 나타난 바와 같이 STZ를 투여한 군에서는 대다수의 췌장 β-세포가 파괴된 반면 (평균, 21.1 cells/islet, n=12), STZ를 주사하고 4회에 걸쳐 Tat-SOD를 복강주사한 실험군에서는 이러한 β-세포의 파괴가 현저히 억제되었다 (Table 4; 평균, 45.8 cells/islet, n=12).

③ STZ로 유도한 mice의 혈당량에 미치는 Tat-SOD in vivo transduction의 영향

Fig. 80에 나타난 바와 같이 STZ 120 mg/kg를 주사한 후 1일부터 혈당량이 현저히 증가하였으며 3일 후에 530 mg/dl의 고혈당을 유지하였다. 이러한 혈당의 증가는 여러번 Tat-SOD를 복강주사함으로써 유의하게 감소되었다 (대조군의 55-75%).

(5) 파킨슨씨병, 암, 간질 모델동물에서의 융합단백질의 효과

파킨슨씨병에서는 SOD, CAT를 암에서는 p53, NR, CD, ADI를 간질에서는 GABA-T, SSADH, GAD 등 다양한 융합단백질들을 이용하여 단백질 치료제로서의 가능성을 확인중에 있다.

Table 1. 다양한 HIV-1 Tat 발현 Vector 개발 및 결과

| Deletion of HIV-1 Tat Basic Domain (47 YGRKKRRQRRR 57) | | | |
|--|------------|----------------------|---------------------|
| 48 | GRKKRRQRRR | 57 | : Tat (48-57) - GFP |
| 49 | RKKRRQRRR | 57 | : Tat (49-57) - GFP |
| 50 | KKRRQRRR | 57 | : Tat (50-57) - GFP |
| 51 | KRRQRRR | 57 | : Tat (51-57) - GFP |
| 52 | RRQRRR | 57 | : Tat (52-57) - GFP |
| 50 | KKRR | 53 | : Tat (50-53) - GFP |
| 50 | KKRRQ | 54 | : Tat (50-54) - GFP |
| 50 | KKRRQRR | 56 | : Tat (50-56) - GFP |
| Addition of Proline | | | |
| 49 | RKKRRQRRR | 57 - Pro | - GFP |
| 49 | RKKRRQRRR | 57 - Pro - Pro | - GFP |
| 49 | RKKRRQRRR | 57 - Pro - Pro - Pro | - GFP |
| Modification of HIV-1 Tat Basic Domain with polylysine or polyarginine | | | |
| 49 | KKKKKKKKK | 57 | : 9 Lys - GFP |
| 49 | RRRRRRRRR | 57 | : 9 Arg - GFP |

◦ 칩투 Vector 의 효율성 비교 (Tat, pK, pR) 결과 요약

Tat-GFP

- Tat(58-57) < Tat(49-57) > Tat(50-57) > Tat(50-56) > Tat(51-57) > Tat(50-55) > Tat(54-57) > Tat(52-57) > Tat(53-57)
- 9K > Tat(49-57) = 9R

HD-GFP

- Ptn-HD = En HD = Ftz HD > Tat(49-57)
- 9K-HD = Tat(49-57) > 8K-HD > 7K-HD > 6K-HD
- 9R-HD > 8R-HD > 7R-HD > Tat(49-57) > 5R-HD > 4R-HD > 3R-HD
- 9R-HD > 9K-HD = Tat(49-57)

SOD

- 9K > 9R > Tat(49-57)

CAT

- 9R > 9K > Tat(49-57)

Table 2. Copper ion content, dismutation activity and relative transduction efficacy of the Tat-SOD and metal ion recovered Tat-SODs.

| | Cu ²⁺ content (mol/subunit) | SOD S.A (U/mg protein) | Transduction efficacy |
|-----------------|---|---------------------------|--------------------------|
| Erythrocyte SOD | 1.00 ± 0.02 | 1.485 ± 24 | 0 |
| Tat-SOD | 0.27 ± 0.02 | 13 ± 5 | 1.0 |
| CR-Tat-SOD | 0.96 ± 0.03 | 804 ± 21 | 4.3 |
| ZR-Tat-SOD | 0.24 ± 0.07 | 17 ± 6 | 1.9 |
| CZR-Tat-SOD | 0.91 ± 0.08 | 788 ± 33 | 4.2 |

Table 3. Effects of transduced Tat-SOD on the tissue levels of superoxide anion radicals (SAR), nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), and SOD enzyme activity in the pancreas of STZ-induced diabetic mice.

| | Untreated Control | SODinjected Diabeticmice | Heat-inactivated Tat-SOD Diabeticmice | Tat-SODinjected Diabeticmice |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------------|--|---------------------------------|
| SAR (% of control) | 100.0±20.9 (5) | 197.3±6.9 (5)** | 202.6±8.5 (5) | 137.6±14.9 (4)+ |
| NO (µM) | 39.6±3.1 (5) | 79.5±13.3 (5)* | 86.2±4.7 (5) | 63.6±6.1 (4)* |
| MDA (nmol/mg protein) | 13.3±1.3 (5) | 20.1±4.7 (5) | 22.4±1.6 (5) | 17.3±2.8 (4) |
| SOD activity (U/mg protein) | 129.2±14.1 (5) | 38.1±16.0 (5)** | 29.6±13.4 (5)** | 135.4±21.1(4)+ |

Diabetes was induced by a single ip injection of 120 mg/kg STZ in male ICR mice. STZ-induced diabetic mice were injected 4 times (4 hours, 1, 3 and 5 days after STZ injection) with 500 g of control SOD, Heat-inactivated Tat-SOD, and Tat-SOD. Pancreas was dissected from mice 7 days after STZ injection, and was processed for biochemical analysis. Each value represents the mean±SEM (n). *, $P<0.05$ and **, $P<0.01$ versus untreated control group. +, $P<0.05$ versus the relevant SOD injected diabetes group.

Table 4. Number of insulin-positive cells per islet in the pancreas of untreated control mice, SOD, heat-inactivated Tat-SOD, and Tat-SOD injected STZ-induced diabetic mice.

| Group | Islet counted | Number of insulin-positive cells (cells/islet) |
|---|---------------|---|
| Control | 12 | 69.2±7.7 |
| Diabetes | 12 | 21.1±3.9** |
| SOD injected diabetes | 12 | 26.6±3.5** |
| Heat-inactivated Tat-SOD Injected diabetes | 12 | 22.3±5.2** |
| Tat-SOD injected diabetes | 12 | 45.8±5.9*,+ |

Insulin-positive cells were counted from the relatively large sized islets nearby periductal or perivascular regions. Each value represents the mean±SEM obtained from four animals for each group. *, $P<0.05$ and **, $P<0.01$ versus untreated control group. +, $P<0.05$ versus the relevant diabetes group.

Figure Legends

Fig. 1. (A) Schematic representation of Tat-GFP expression vector. A GFP-expression vector, pGFP, was constructed by inserting the coding sequence for GFP into pET15b, thereby generating a control GFP-fusion protein missing the basic sequence of HIV-1 Tat. The two oligonucleotides corresponding to a sequence to encode various forms of the HIV-1 Tat protein-transduction domain (PTD) were inserted downstream to the 6His tag sequence into pGFP by using *NdeI* and *XhoI* sites. The resulting vectors were designated pTat-GFP. The coding frame of the GFP is represented by an open box along with 6His and HIV-1 Tat PTD. ApR, ampicillin-resistance gene; ori, plasmid-replication origin; lac I, lac repressor-expressing gene; PT7, T7 promoter. **(B) Analysis of purified GFP-fusion proteins.** Purified fusion proteins by affinity chromatography on a nickel sepharose column were separated by 12% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie blue. Lane M, molecular weight markers; lane 1, GFP; lane 2, Tat(51-57)-GFP; lane 3, Tat(52-57)-GFP; lane 4, Tat(50-53)-GFP; lane 5, Tat(50-54)-GFP; lane 6, Tat(50-55)-GFP; lane 7, Tat(50-56)-GFP, lane 8, Tat(50-57)-GFP; lane 9, Tat(49-57)-GFP; lane 10, Tat(48-57)-GFP.

Fig. 2. The basic oligopeptide-GFP fusion proteins used in protein-transduction studies. The fusion proteins showing the positions of the His tag, and each protein transduction domain (PTD) are diagrammed. The numbers below the protein coding regions indicate the number of amino acids from the N-terminus of each fusion protein. All PTDs were cloned into pET15b-GFP plasmid containing the T7 promoter and lacO-operator. The expression is induced by the addition of IPTG.

Fig. 3. Schematic representation of the Tat-GFP fusion proteins. The fusion proteins showing the positions of the his tag and Tat PTD are diagrammed. The numbers below the protein coding regions indicate the number of amino acids from the N-terminus of each fusion proteins. DNA fragments coding for the Tat PTD were cloned into appropriate regions of pET15b-GFP plasmid.

Fig. 4. Schematic representation of the Tat-GFP fusion proteins. The fusion proteins showing the positions of the his tag and Tat PTD are diagrammed. The numbers below the protein coding regions indicate the number of amino acids from the N- or C-terminus and both terminus of each fusion proteins. DNA fragments coding for the Tat PTD were cloned into appropriate regions of pET15b-GFP plasmid.

Fig. 5. Construction of PEP-1-SOD. Construction of the PEP-1-SOD expression vector system based on the vector pET-15b. Synthetic PEP-1 oligomer was cloned with into the *Nde I*, *Xho I* sites, and human Cu,Zn-SOD

cDNA was cloned into the *Xho*I, *Bam*HI sites of pET-15b. Expression was induced by adding IPTG.

Fig. 6. Analysis of purified Tat-GFP fusion proteins. Two micrograms of each fusion protein purified by affinity chromatography on a nickel Sepharose column were separated by 12 % SDS-PAGE and stained with Coomassie blue.

Fig. 7. Expression and purification of Tat-SOD in *E. coli*. Protein extracts of cells (A) and purified fusion proteins (B) were analyzed by 15% SDS-PAGE gel and subjected to Western blot analysis with a monoclonal antibody to human Cu,Zn-SOD (C). Lanes in A are as follows: extracts of bacteria containing expression vector pET (lane 1), pTat-SOD (lane 2), and pSOD (lane 3). Lanes in B and C are as follows: lane 1, Tat-SOD; lane 2, SOD. **Transduction of Tat-SOD fusion proteins into cultured HeLa cells (D).** 1 μ M of Tat-SOD and control SOD were added to the culture media for 1h and analyzed by Western blot analysis. Lanes are as follows: lane 1, denatured Tat-SOD; lane 2, denatured SOD; lane 3, native Tat-SOD; lane 4, native SOD.

Fig. 8. Analysis of transduction efficiency of GFP-fusion proteins. (A) Different GFP fusion proteins were added at the concentration of 0.5 μ M to HeLa cells for 1 hr. Cells were harvested for the preparation of cell extracts. The presence of transduced protein was analyzed by Western blot analysis. lane 1, GFP; lane 2, Tat(51-57)-GFP; lane 3, Tat(52-57)-GFP; lane 4, Tat(50-53)-GFP; lane 5, Tat(50-54)-GFP; lane 6, Tat(50-55)-GFP; lane 7, Tat(50-56)-GFP, lane 8, Tat(50-57)-GFP; lane 9, Tat(49-57)-GFP; lane 10, Tat(48-57)-GFP. (B) The intensity of bands in panel (A) were measured and depicted. (c) Microphotography sections (original magnification, X 200) of HeLa cells treated under the same conditions in panel (A). At 1 h following treatment, the cells were washed with PBS and photographed using a fluorescent microscope. lane 1, GFP; lane 2, Tat(51-57)-GFP; lane 3, Tat(52-57)-GFP; lane 4, Tat(50-53)-GFP; lane 5, Tat(50-54)-GFP; lane 6, Tat(50-55)-GFP; lane 7, Tat(50-56)-GFP, lane 8, Tat(50-57)-GFP; lane 9, Tat(49-57)-GFP; lane 10, Tat(48-57)-GFP.

Fig. 9. Western blots of 9K-GFP fusion protein and control GFP. (A) purified 9K-GFP and control GFP. (B) dose dependence of transduction by 9K-GFP in HeLa cells. HeLa cells were washed with PBS and incubated in complete DMEM with increasing concentrations of 9K-GFP. Cell extracts were prepared after 1 h and assayed for western blot. lane 1, GFP; lane 2-6, 9K-GFP 0.1 μ M; 0.25 μ M; 0.5 μ M; 1 μ M; 1.5 μ M. (C) time dependence of transduction by Tat in HeLa cells were incubated with 0.5 μ M 9K-GFP for various time. lane 1, 5 min; lane 2, 30 min; lane 3, 1 h; lane 4, 2 h; lane 5, 4 h; lane 6, 6 h.

Fig. 10. The transduction efficiencies of fusion proteins were compared by Western blot analysis. Two μ M of each GFP fusion protein were added to a 6-well plate that contained HeLa cells. One hour later, the transduced cells were treated with trypsin, washed with PBS. About 70% of the cell lysate was loaded on each well and analyzed by Western blot.

Fig. 11. Analysis of transduction efficiency of GFP fusion proteins. (A) GFP fusion proteins were added at a concentration of 1 μM to HeLa cell for 1 h. The cellular uptakes of GFP fusion proteins were analyzed by Western blot analysis with polyclonal anti-GFP antibody. (B) The band intensity values in (A) were adjusted and depicted. (C) Comparison of internalization of GFP fusion proteins by flow cytometry. HeLa cells were incubated with the 2 μM with GFP, Tat-GFP, GFP-Tat or Tat-GFP-Tat fusion proteins. After 30 min, cells were extensively washed with trypsin and the uptake of GFP fusion proteins were monitored by flow cytometry. con, untreated cell; GFP, GFP fusion protein without Tat PTD; TG, Tat-GFP fusion protein; GT, GFP-Tat fusion protein; TGT, Tat-GFP-Tat fusion protein.

Fig. 12. Subcellular localization of the transduced GFP fusion proteins visualized by confocal microscopy. HeLa cells were treated with 0.5 μM GFP fusion proteins for 15 min. After the treatment, cells were washed quickly with PBS, were trypsinized with trypsin and fixed for 5 min in 3.7% formaldehyde before stained with PI to visualize the nuclei. Nuclear and cytosolic distribution of transduced GFP proteins (left panels) was observed by confocal laser scanning microscopy (magnification x 630). Corresponding images show the cell nuclei stained with PI (middle panels).

Fig. 13. Characterization of cellular uptake of Tat-GFP-Tat fusion protein. (A) Dose-dependent transduction of Tat-GFP-Tat into cells. HeLa cells were incubated with control GFP or Tat-GFP-Tat fusion proteins at the indicated concentration. After 30 min, cells were extensively washed with PBS, were trypsinized with trypsin and then analyzed for intensity of fluorescence by flow cytometry. (B) Time-dependent transduction of Tat-GFP-Tat into cultured HeLa cells. Denatured Tat-GFP-Tat 0.2 μM was added to culture media for indicated time, and then analyzed by flow cytometry.

Fig. 14. Analysis of transduction efficiency of native and denatured Tat-GFP-Tat proteins. HeLa cells were incubated for 1 h in the presence of 1 μM native or denatured Tat-GFP-Tat fusion protein. After the treatment, cells were washed with trypsin and PBS. The transduction activity of each GFP fusion protein was measured by analyzing the level of the transduced protein in the cells by Western blot analysis (A) and the band intensity in (A) was measured (B). And transduction efficiency of native and denatured Tat-GFP-Tat fusion proteins was analyzed by FACS analysis. HeLa cells were incubated for 1 h with 1 μM native (C) or denatured (D) Tat-GFP-Tat fusion proteins. After the treatment, cells were washed with trypsin and PBS, and then analyzed for intensity of fluorescence by flow cytometry.

Fig. 15. Comparison of cellular uptake of GFP fusion proteins at 37°C and 4°C. HeLa cells were incubated in the presence of 2 μM GFP, Tat-GFP, GFP-Tat or Tat-GFP-Tat fusion proteins at 37°C (left panels) or at 4°C (right panels) for 1 h. Cellular uptake of GFP fusion proteins was monitored by flow

cytometry.

Fig. 16. Deletion analysis of two PTDs and Comparison of transduction efficiencies of three heptapeptide-GFP proteins. (A) Transduction efficiencies of penetratin and a deletion product ptn7C were compared. The primary structures of penetratin and ptn7C are RQIKIWFQNRRMKWKK and RRMKWKK, respectively. The Tat-GFP and GFP were used as positive and negative controls, respectively. (B) Transduction efficiencies of Engrailed homeodomain and a deleted heptapeptide En7C were compared. The primary structure of En7C is KRAKIKK. (C) The heptapeptides ptn7C, En7C, and Eve7C are derived from homeodomains of Antennapedia, Engrailed, and Even-skipped, respectively. The primary structures of ptn7C, En7C, and Eve7C are RRMKWKK, KRAKIKK, and RRMKDKR, respectively.

Fig. 17. The transduction efficiency of basic oligopeptide-GFP fusion proteins was proportional to the number of basic amino acid residues. The effects of increasing the number of basic amino acid residues (A, arginines; B, lysine) and concentrations of the basic oligopeptide-GFP fusion proteins on transduction efficiency was analyzed with a fluorometer. Fifty, one hundred, and two hundred nM each of the basic oligopeptide-GFP fusion proteins was added to a 24-well plate containing *Drosophila* S2 cells. One hour later, the transduced cells were treated with trypsin, washed several times with PBS, and the fluorescence was measured with fluorometer. Standard deviations are shown by error bars.

Fig. 18. The PTD-GFP fusion proteins were transduced with similar efficiencies. One nmole each of the PTD-GFP fusion proteins at a concentration of 200 nM was added to a 60 mm culture dish containing 5 ml of *Drosophila* S2 cells. One hour later, the transduced cells were treated with trypsin, washed several times with PBS, and the harvested cells were mixed with one volume of 2X Laemmli buffer. The volumes of cell extracts, prepared from about one half of the harvested cells, were adjusted to contain the same amount of proteins in each well. To quantitate the efficiencies of transduction, known amounts of GFP were loaded in the same gel. In all cases, intact PTD-GFP fusion proteins, with expected molecular weights, were recovered from the S2 cell. The PTD regions of two PTD-GFP fusion proteins, the penetratin-GFP and the FtzHD-GFP, appeared to have been partially removed in the cell.

Fig. 19. Construction of HIV-2 Tat-GFP expression vector. The synthetic Tat oligomer was cloned and GFP cDNA was cloned into pET-15b. The expression vector is under the control of the T7 promoter and lacO-operator. The expression is induced by the addition of IPTG.

Fig. 20. Expression and purification of HIV-2 Tat-GFP fusion protein. Protein extracts of cells and purified fusion proteins were analyzed by 12%

SDS-PAGE gel and subjected to Western blot analysis.

Fig. 21. Analysis of transduction efficiency of HIV-2 Tat-GFP fusion protein. Denatured form and native form HIV-2 Tat-GFP fusion proteins were added into HeLa cells and the crude extracts were analyzed by Western blot and enzyme activities.

Fig. 22. Time- and dose-dependent transduction of HIV-2 Tat-GFP fusion protein. HIV-2 Tat-GFP fusion proteins were added to the culture media for various times and various concentration of fusion proteins were added to the culture media for 1 h. Transduced fusion protein into the cells was analyzed by Western blotting.

Fig. 23. Subcellular localization of the transduced GFP fusion proteins visualized by confocal microscopy. HeLa cells were treated with 0.5 μ M GFP fusion proteins for 15 min in 3.7% formaldehyde before staining with PI to visualize nuclei. The distribution of the transduced GFP proteins was observed by confocal laser scanning microscopy. Corresponding images show the cell nuclei stained with PI.

Fig. 24. The specific activities of SOD in cultured HeLa cells treated with Tat-SOD. 1 μ M of denatured Tat-SOD was added to the culture media for 5 min~1h (A), 0.25~2 μ M of denatured Tat-SOD was added to the culture media for 1h (B). Each bar represents the mean \pm SE obtained from 4 experiments.

Fig. 25. Effect of transduced Tat-SOD on cell viability of HeLa cells treated with Paraquat (Pq, 5 mM) was added to the HeLa cells pretreated with 0.1~2 μ M Tat-SOD, and control SOD for 1 h, respectively. Cell-viability was estimated by with a colorimetric assay using MTT. Each bar represents the mean \pm SE obtained from 5 experiments. Asterisks and crosses denote statistical significance at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. The statistical analysis was evaluated by the students t -test.

Fig. 26. Transduction of fusion proteins into cultured mammalian cells. Human fibroblast cells plated in a 6 well plate were treated with SOD, Tat-SOD and 9Lys-SOD at concentrations of 0.25~1 M for 1 h (A). The transduction activity of each protein was analyzed by measuring the level of the transduced proteins in the cells by Western blot and the specific enzyme activity (B). Each bar represents the mean \pm S.E.M. obtained from five experiments.

Fig. 27. Immunohistochemical analysis of animal skin transduced with Tat-SOD and 9Lys-SOD fusion proteins. 50 μ g of each fusion proteins were topically applied onto the shaved area of the mice dorsal skin for 1 h, respectively. Frozen sections of skin tissues were immunostained with a rabbit anti-histidine IgG, as described in Materials and Methods. The sections were visualized with 3,3-diaminobenzidine and observed under the Axioscope

microscope (A). Transduction efficiencies were analyzed by measuring specific enzyme activities of skin tissue (B). Each bar represents the mean \pm S.E.M. obtained from three experiments.

Fig. 28. Transduction of PEP-1-SOD in cultured cells. (A) Time-dependent transduction into HeLa cells. 2 μ M PEP-1-SOD was added to culture media for 5-30 min. (B) Dose-dependent transduction into HeLa cells. 0.25-2 μ M of PEP-1-SOD was added to the culture media for 30 min. Transduced PEP-1-SOD was identified by Western blot analysis.

Fig. 29. The specific activities PEP-1-SOD in cultured cells. Time-dependent transduction into HeLa cells. 2 μ M PEP-1-SOD was added to culture media for 5-30 min. (B) Dose-dependent transduction into HeLa cells. 0.25-2 μ M of PEP-1-SOD was added to the culture media for 30 min. SOD enzyme activity identified by enzyme activity assay.

Fig. 30. Transduction of PEP-1-SOD. HeLa cells were treated with 1 μ M PEP-1-SOD fusion proteins for 1 h, then incubated with anti-rabbit polyhistidine (1:400) and Cy-3 conjugated antibody (1:1000) for 1 h. Transduced proteins were identified by immunofluorescence microscopy.

Fig. 31. The stability of transduced PEP-1-SOD in HeLa cells. Cells pretreated with 2 μ M PEP-1-SOD were incubated for various times. Transduced PEP-1-SOD was identified by Western blot analysis (upper panel) and by enzyme activity assay (lower panel), respectively. Each bar represents the mean \pm SEM obtained from five experiments.

Fig. 32. Histochemical analysis of animal skin transduced with PEP-1 or Tat-SOD (upper panel) and enzyme activity assay (lower panel). Fifty μ g of PEP-1 or Tat-SOD were topically applied onto the shaved area of mouse dorsal skin for 30-60 min. Frozen sections of skin tissues were immunostained with anti-rabbit polyhistidine antibody (1:400) and then stained with biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:200). The sections were visualized with 3,3-diaminobenzidine and observed under an Axioscope microscope. Transduction efficiencies were analyzed by measuring specific enzyme activities in skin tissue. Each bar represents the mean \pm SEM from 7 mice.

Fig. 33. Transduction of Tat-SOD and PEP-1-SOD into mice. Male ICR mice were ip injected with a single dose of 300 μ g of PEP-1-SOD or Tat-SOD and control SOD proteins in 0.5 ml PBS and 10% glycerol. Various mouse

tissues (the brain, pancreas, heart, spleen, kidney, liver and lung) were dissected from 8 h after administering PEP-1-SOD or Tat-SOD and control SOD. Histochemical analysis of various mouse tissues. Frozen sections (the brain, 30 μ m and the others tissues 12 μ m) of mice tissues were immunostained with an anti-rabbit polyhistidine (1:400) and then stained with biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:200) antibody. The sections were visualized with 3,3-diaminobenzidine and observed under an Axioscope microscope.

Fig. 34. Activity of transduction of Tat-SOD and PEP-1-SOD into mice. Male ICR mice were ip injected with a single dose of 300 μ g of PEP-1-SOD or Tat-SOD and control SOD proteins in 0.5 ml PBS and 10% glycerol. Various mouse tissues (the brain, pancreas, heart, spleen, kidney, liver and lung) were dissected from 8 h after administering PEP-1-SOD or Tat-SOD and control SOD. Transduced SOD fusion protein activities were measured by SOD enzyme assay. Each bar represents the mean \pm SEM obtained from 7 mice.

Fig. 35. Transduction of fusion proteins into cultured mammalian cells. (A) PC12 cells plated in a 6 well plate were treated with 2 μ M of control CAT, Tat-CAT and 9Arg-CAT for 2 h, then harvested and washed (Con: PC12 cells extracts, CAT: cells treated with catalase fusion proteins). HeLa cells plated in a 6 well plate were treated with control CAT, Tat-CAT (B) and 9Arg-CAT (C) at concentrations of 0.5~4 μ M for 2 h. The transduction activity of each protein was analyzed by measuring the level of the transduced proteins in the cells by Western blot and the specific enzyme activity (D). Each bar represents the mean \pm S.E.M. obtained from five experiments.

Fig. 36. Visualization of Tat-CAT transduced into HeLa cells by immunofluorescence assay. HeLa cells treated with 2M Tat-CAT and control CAT fusion proteins for 2 h, and the transduced proteins were identified by immunofluorescence microscopy.

Fig. 37. Histochemical analysis of animal skin transduced with catalase fusion proteins. Fifty μ g of CAT fusion proteins were topically applied onto the shaved area of the rat dorsal skin for 1 h. Frozen sections of skin tissues were immunostained with rabbit anti histidine IgG (dilution 1:500) followed by staining with biotinylated goat anti-rabbit IgG (dilution 1:200), as described in Materials and Methods. The sections were visualized with 3,3-diaminobenzidine and observed under the Axioscope microscope (A). Transduction efficiencies were analyzed by measuring specific enzyme activities of skin tissue (B). Each bar represents the mean \pm S.E.M. obtained from three experiments.

Fig. 38. Expression and purification of PEP-1-CAT. Protein extracts of cells

(lane 2) and purified fusion proteins (lane 3) were analyzed by 10% SDS-PAGE (A) and subjected to Western blot analysis with an anti-rabbit polyhistidine antibody (B). Lanes in the panels are as follows: lane 1, non-induced pPEP-1-CAT; lane 2, induced pPEP-1-CAT; lane 3, purified pPEP-1-CAT.

Fig. 39. Transduction of PEP-1-CAT in cultured cells. Dose-dependent transduction into HeLa cells. 0.25-2 μ M of PEP-1-SOD was added to the culture media for 30 min. Time-dependent transduction into HeLa cells. 2 μ M PEP-1-SOD was added to culture media for 10-60 min. Transduced PEP-1-SOD was identified by Western blot analysis.

Fig. 40. The specific activities PEP-1-CAT in cultured cells. Dose-dependent transduction into HeLa cells. 0.25-2 μ M of PEP-1-SOD was added to the culture media for 30 min. Time-dependent transduction into HeLa cells. 2 μ M PEP-1-SOD was added to culture media for 5-30 min. SOD enzyme activity identified by enzyme activity assay.

Fig. 41. Histochemical analysis of animal skin transduced with PEP-1-CAT (upper panel) and enzyme activity assay (lower panel). Fifty μ g of PEP-1-CAT was topically applied onto the shaved area of mouse dorsal skin for 30-60 min. Frozen sections of skin tissues were immunostained with anti-rabbit polyhistidine antibody (1:400) and then stained with biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:200). The sections were visualized with 3,3-diaminobenzidine and observed under an Axioscope microscope. Transduction efficiencies were analyzed by measuring specific enzyme activities in skin tissue. Each bar represents the mean \pm SEM from 7 mice.

Fig. 42. Expression and purification of PEP-1-Botoxin. Protein extracts of cells and purified fusion proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE (A) and subjected to Western blot analysis with an anti-rabbit polyhistidine antibody (B).

Fig. 43. Dose-dependent transduction into HeLa cells. 0.25-2 μ M of PEP-1-Botoxin was added to the culture media for 30 min. Time-dependent transduction into HeLa cells. 2 μ M PEP-1-Botoxin was added to culture media for 10-60 min. Transduced PEP-1-SOD was identified by Western blot analysis.

Fig. 44. Visualization of PEP-1-Botoxin transduced into HeLa cells by immunofluorescence assay. HeLa cells treated with 2 μ M PEP-1-Botoxin and control Botoxin fusion proteins for 2 h, and the transduced proteins were identified by immunofluorescence microscopy.

Fig. 45. Histochemical analysis of animal skin transduced with PEP-1-Botoxin. Fifty μ g of PEP-1-Botoxin was topically applied onto the shaved area of mouse dorsal skin for 30-60 min. Frozen sections of skin tissues were immunostained with anti-rabbit polyhistidine antibody (1:400) and then

stained with biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:200). The sections were visualized with 3,3-diaminobenzidine and observed under an Axioscope microscope.

Fig. 46. Kinetics of transduction of p53 fusion proteins. (A) Dose-dependent transduction of Tat-p53 into cultured HeLa cells. Denatured Tat-p53 and p53 fusion proteins were added into the culture media for 1 h. Cellular lysates were then prepared for Western blot analysis for determining the levels of transduced Tat-p53 protein. (B) Time-dependent transduction of Tat-p53 into cultured HeLa cells. Denatured Tat-p53 1 μ M was added to culture media for indicated time. (C) Stability of Tat-p53 in the transduced HeLa cells. Denatured Tat-p53 and p53 fusion proteins were added into the culture media for 1 h. The cells were washed twice with serum free media and exchanged with new culture media for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western blotting using a monoclonal p53 antibody. (D) Subcellular localization of transduced Tat-p53 fusion proteins visualized by confocal microscopy. HeLa cells were treated with 0.5 μ M p53 or Tat-p53 fusion proteins for 4 h. The cells were fixed and the fusion proteins were visualized with rabbit anti-histidine antibody, followed by FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (left panels). The nucleus was stained with PI (middle panels). (a) untreated cells (b) p53 fusion protein (c) Tat-p53 fusion proteins. (E) Analysis of subcellular fractions of cells transduced with p53 fusion proteins. The nuclear and cytosolic extracts were prepared from transduced HeLa cells as described in Materials and Methods and analyzed by Western blot with a anti-p53 monoclonal antibody. The membrane was stripped and reprobated with anti-actin (cytosolic marker) or anti-PARP (nuclear marker) antibody.

Fig. 47. Activation of p21 expression by Tat-p53. (A) Dose dependency of p21 protein expression by Tat-p53. HeLa cells were treated with p53 or Tat-p53 fusion proteins at the indicated concentrations for 36 h. Transactivation activity of p53 fusion proteins were analyzed by measuring the levels of p21 protein using a monoclonal p21 antibody (B) Time-dependent analysis of p21 expression by Tat-p53. HeLa cells were treated with 1 μ M of p53 or Tat-p53 fusion proteins for the indicated periods. Cell lysates were prepared and levels of p21 protein were detected by Western blot analysis using a monoclonal p21 antibody. (C) Transcriptional activation of a p21 promoter by Tat-p53 fusion protein. HeLa cells were transiently transfected with a p21 promoter-luciferase construct and the beta-galactosidase construct (pCMV-lacZ). After 24 h, 1 μ M of Tat-p53 fusion proteins were added into transfected cells. The level of luciferase activity was determined at the indicated time. Luciferase activities of each sample were normalized to the beta-galactosidase activities and expressed as fold increase from the control. RLA, related luciferase activity. The results are expressed as the mean \pm SD of data from the five separate experiments.

Fig. 48. Analysis of cell viability of HeLa cells transduced with Tat-p53. HeLa cells were plated in 24 well (2 x 10⁴ per well) and transduced with

various concentrations of control p53 and Tat-p53 fusion proteins at every 24 h for 3 days. Percentage of viable cell was measured by MTT during 3 days. The results are the mean of three separate experiments and are shown with standard deviation.

Fig. 49. Biochemical analysis of cell death by transduced Tat-p53. (A) Analysis of DNA fragmentation in HeLa cells transduced with Tat-p53. HeLa cells were transduced with p53 fusion proteins at concentrations of 0.2 - 1 μ M for 48 h. DNA was extracted from the cells transduced with p53 fusion proteins, and analyzed by electrophoresis on a 2 % agarose gel. Lane M is DNA ladder marker. (B) Analysis of apoptosis related molecules in the Tat-p53 transduced HeLa cells. HeLa cells were transduced with p53 fusion proteins at concentrations of 0.2 - 1 μ M for 48 h. Cellular proteins were extracted, then separated by a SDS-PAGE, and subjected to immunoblot analysis with antibodies recognizing caspase-3, Bcl-2, PARP or actin. The same blot was immuno probed by individual antibody and then stripped and reprobed with indicated antibodies. Lane con, untreated cell.

Fig. 50. Analysis of cytotoxic effect of transduced Tat-p53 fusion protein in the cancer cells with different p53 status. (A) Liver cancer cell lines, HepG2 (w. t. p53) and Hep3B (null p53) were plated in 24 well (2×10^4 per well) and treated with 1 μ M p53 or Tat-p53 fusion proteins at every 24 h for 4 days. Percentage of viable cell was measured by MTT during 4 days after transduction of Tat-p53 proteins. (B) Prostate cancer cell lines, LN-Cap (w. t. p53) and PC-3 (null p53) were plated in 24 well (2×10^4 per well) and transduced with 1 μ M p53 or Tat-p53 fusion proteins. Percentage of viable cell was compiled from three independent experiments and is shown with standard deviation.

Fig. 51. Expression and purification of NR, Tat-NR fusion proteins in *E. coli*. Expressed Tat fusion proteins were denatured in 3 M urea, purified by Ni-NTA column. A) Expression of NR in *E. coli*. B) Expression of tNR in *E. coli*. C) Immunoblot with anti-histidine antibody. M; size marker. Lane 1; control. Lane 2; induced with 1mM IPTG for 3 hr. Lane 3; fraction eluted with binding buffer. Lane 4; fraction eluted wash buffer. Lane 5-9, proteins eluted with elution buffer containing 1M imidazole. D) Activity of purified tNR and NR in a native form tNR and NR are assayed spectrophotometrically in a reaction mixture containing 0.1M Tris buffer(pH7.5), 0.5 mM NADPH as cofactor, 70 M cytochrome C as electron acceptor and menadione as substrate. Activity of tNR and NR was measured at 550 nm.

Fig. 52. Transduction kinetics of denatured Tat-NR fusion protein. Tat-NR fusion protein were added to the culture media of HeLa cell. Cell lysates were analyzed by immunoblot with anti-histidine antibody. A) Transduction of various native and denature fusion proteins. B) Time dependency of transduction of Tat-NR. C) Concentration dependency of

transduction of NR and Tat-NR. D) stability of transduced Tat-NR. Con; Untreated cell lysates. c; purified Tat-NR.

Fig. 53. MTT assay to ascertain biological activity of transduced enzyme in the presence of 10 μ M nitrofurazone. A) Various concentration of fusion protein were transduced into HeLa cells for 2 hr in presence of nitrofurazone. After, the culture media was removed and fresh media were added for 48 hr, then MTT assay was performed. B) Bystander effects on the cell viability with supernatants obtained from panel.

Fig. 54. Transduction kinetics of denatured Tat fusion proteins. Fusion proteins added to culture media of HeLa cell at various conditions. We washed the cell twice with serum-free media before harvested the cells at various conditions, after the cell lysates were analyzed of immunoblot with a rabbit anti-histidine antibody. C, non-transduced cell lysates. (A), Time course of transduction. The cells were transduced with 1 μ M of the Tat-CD fusion proteins for indicated time. (B), Transduction in concentration dependent manner. The cells were treated with various indicated concentration of Tat-CD and CD fusion proteins for 2 hr under standard condition. (C), Stability of transduced Tat-CD fusion proteins. The cells were incubated with 1 μ M of the Tat-CD fusion proteins for 2 hr. After, the cell were washed serum-free media and added new media. And then, the treated cell were harvested at indicate time

Fig. 55. Activity of transduced Tat fusion proteins into HeLa cell. The cells were transduced with fusion protein and were harvested at identical condition with Figure 5. 100 ml of transduced cell lysates with Tat fusion proteins were added to described enzyme activity section and activity was measured of a UV spectrophotometer at 290 nm and 255 nm. C; HeLa cell lysates, PBS, 5-FC, and 0.1N HCl; others, PBS, 5-FC, transduced HeLa cell lysates and 0.1 N HCl, respectively. (A), Activity of transduced enzyme in a concentration dependent manner. The cells were transduced with the indicated fusion proteins for 2 hr under standard condition. (B), Activity of transduced enzyme in time course of manner. The cells were treated with 80 g, 50 g of the Tat fusion proteins for various times. (C), Stability of transduced enzyme activity.

Fig. 56. MTT assay to ascertain biological activity of transduced enzymes in the presence of 5-FC. The sensitivity of cells to a variety of drugs was determined using the MTT dye reduction assay. The cells were plated 1×10^4 cells/well in 24 well plates. The following day the medium removed and the cells were daily treated with either fusion proteins or 5-FC in 0.5 ml medium, respectively. The cell survival was estimated after 96hr utilizing ELISA reader at 570 nm and 550 nm. (A) The HeLa cells were transduced with the indicated fusion protein and were grown in presence of 100 μ M 5-FC. (b) The HeLa cells were transduced with 5 g/ml of the fusion protein and grown in presence of various concentration of 5-FC.

Fig. 57. MTT assay to certify bystander cytotoxic effect of activated drug, 5-FU, by transduced Tat-CD enzyme. As ascertain to biological activity, the cells were treated with various fusion proteins and prodrug, 5-FC for 24 hr. Another cells were duplicated in the wake of plating rules. The cells were not treated with any proteins or chemicals. The media of untreated cells exchanged for media that incubated with fusion protein and 5-FC for 24 hr. And then, the cell viability was estimated after 72 hr using ELISA reader at 570 nm and 550 nm. (A), (B) The HeLa cells were transduced with the indicated fusion protein and were grown in presence of 100 μ M 5-FC.

Fig. 58. Transduction of the recombinant Tat-GDH fusion protein into PC12 cells. Tat-GDH was added directly to PC12 cells in culture media and incubated for various time periods (4, 8, 12, and 24 h). At different time intervals, the cells were disrupted and the crude extracts were analyzed by SDS-PAGE and Western blot using monoclonal antibodies raised against bovine brain GDH. As a control, the crude extracts of PC12 cells transduced with human GDH without Tat fusion were used. M, marker proteins; C, control (GDH only); S, sample (Tat-GDH).

Fig. 59. Conjugation of 9-Lys and vitamin A

Fig. 60. Conjugation of 6-Lys and vitamin C

Fig. 61. Construction of pET31b-3Tat peptide expression vector system (KSI-3Tat) based on the vector pET31b (A). The synthetic Tat oligomer was cloned into the *Nde I*, *Xho I* sites of pET31b. The expression vector is under the control of the T7 promoter and lacO-operator. The expression is induced by the addition of IPTG. Diagram of expressed KSI-3Tat and control KSI fusion proteins (B).

Fig. 62. Effects of metal ion recovery on the transduction potential of Tat-SOD. To compare the transduction potentials of metal ion Tat-SODs with Tat-SOD, 0.5 μ M fusion proteins were added to the culture media of HeLa cells for 1 h at 37°C. Transduced fusion proteins into the cells were analyzed by western blotting (A). The relative magnitude of each band was calculated from the integrated area that was obtained from densitometry (B).

Fig. 63. Transduction levels of Tat-SOD and CR-Tat-SOD into cultured HeLa cells with treated dose. CR-Tat-SOD and Tat-SOD (0.25~2 μ M) were added to the culture media for 1 h. Transduced fusion proteins into the cells were analyzed by western blotting (A). The relative magnitude of each band was calculated from the integrated area that was obtained from densitometry (B).

Fig. 64. Transduction levels of Tat-SOD and CR-Tat-SOD into cultured HeLa cells at various transduction times. CR-Tat-SOD and Tat-SOD (1 μ

M) were added to the culture media for 5~60 min. Transduced fusion proteins into the cells were analyzed by western blotting (A). The relative magnitude of each band was calculated from the integrated area that was obtained from densitometry (B).

Fig. 65. Effects of transduced CR-Tat-SOD and Tat-SOD on the cell viability of HeLa cells treated with MV. MV (5 mM) was added to the HeLa cells that were pretreated with 0.1~2 μ M CR-Tat-SOD and Tat-SOD for 1 h. Cell viability was estimated with a colorimetric assay using MTT. Each bar represents the mean \pm S.E.M. that was obtained from five experiments. Asterisks and crosses denote that the value is significantly different than that of the MV and MV+Tat-SOD, respectively. The statistical analysis was evaluated by a Student's *t*-test.

Fig. 66. Dose- and time-dependent transduction of Tat-SOD into cultured HeLa cells. 0.5~3 μ M of Tat-SOD was added to the culture medium for 1 h (A), 3 μ M of Tat-SOD was added to the culture medium for 5 min~1 h (B). Cells were pretreated with ginsenosides for 12 h. Transduced Tat-SOD was analyzed by Western blotting.

Fig. 67. The specific activities of SOD in transduced HeLa cells. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of four experiments. Asterisks ($P<0.05$) and crosses ($P<0.01$) denote values that are significantly different from that of Tat-SOD on its own. Significance was evaluated by a Student's *t*-test.

Fig. 68. Immunohistochemical analysis of animal skin transduced with Tat-SOD proteins. Fifty μ g of Tat-SOD was applied topically onto a shaved area of the mice dorsal skin for 1 h. Frozen sections of the skin tissues were immunostained with a rabbit anti-histidine IgG. The sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine and observed with an Axioscope microscope (A). Transduction efficiencies analyzed by measuring the specific enzyme activities of the skin tissue (B). Crosses ($P<0.01$) denote values that are significantly different from the control and Tat-SOD, respectively as evaluated by Student's *t*-test. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of three experiments.

Fig. 69. Transduction of PEP-1-SOD fusion protein into cultured astrocyte cells. (A) 2 μ M of PEP-1-SOD and control SOD were added to the cultured media for 5~30 min, respectively. (B) 0.25~2 μ M of PEP-1-SOD and control SOD were added to the cultured media for 30 min, respectively. Transduced PEP-1-SOD into cells was analyzed by Western blotting (upper panel) and the specific enzyme activities (lower panel), respectively. Each bar represents the mean \pm S.E.M. obtained from five experiments.

Fig. 70. Effect of transduced PEP-1-SOD on cell viability of astrocyte cells. The paraquat (Pq, 5 mM) were added to the astrocyte cells pretreated with 0.5~2 μ M PEP-1-SOD and control SOD for 1 h, respectively. Cell viabilities were

estimated by with a colorimetric assay using MTT. Each bar represents the mean±S.E.M. obtained from five experiments. Asterisks and crosses denote statistical significance at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively. The statistical analysis was evaluated by Student's *t*-test.

Fig. 71. Effects of transduced PEP-1-SOD on neuronal cell viability of ischemic insults. Representative photomicrographs of the cresyl violet (CV)-stained hippocampus of the gerbil brain. Control (normal), ischemia insults, and PEP-1-SOD were pre- or post-ip injected as a single dose (300 µg) into the gerbil after ischemic insult. The relative percentage of viable neuronal cells compared to sham-operated animals in the hippocampus after ischemic insults is shown. Neuronal viabilities were higher in the groups treated with PEP-1-SOD than in the PC group. Each bar represents the mean±SEM obtained from 7 gerbils.

Fig. 72. Effects of transduced PEP-1-SOD and Tat-SOD on neuronal cell viability of ischemic insults. Representative photomicrographs of the cresyl violet (CV)-stained hippocampus of the gerbil brain. Negative control (NC; normal), positive control (PC; vehicle injected group), and Tat-SOD and PEP-1-SOD were pre- or post-ip injected as a single dose at various concentration (100-500 µg) into the gerbil after ischemic insult. The relative percentage of viable neuronal cells compared to sham-operated animals in the hippocampus after ischemic insults is shown. Neuronal viabilities were higher in the groups treated with PEP-1-SOD or Tat-SOD than in the PC group. In particular, low-dose treated PEP-1-SOD showed significantly more neuronal viability than Tat-SOD treated groups. Each bar represents the mean±SEM obtained from 7 gerbils.

Fig. 73. Transduction of Tat-SOD into cultured MIN6N cells. (A) Tat-SOD or control SOD (0.5-3 µM) was added to the culture media for 1 h. Stability of transduced Tat-SOD in MIN6N cells (B) Cells pretreated with 3 µM Tat-SOD were placed in fresh culture medium and further incubated for 3-48 h. The transduction activity was analyzed by Western blot and SOD enzyme assay. Immunofluorescence analysis of transduced Tat-SOD in MIN6N cells (C). MIN6N cells were transduced with 3 µM Tat-SOD for 1 h. Cells were fixed, and incubated with SOD monoclonal antibody/FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody, and transduced cells were identified by confocal laser microscopy. Each bar in A and B represents mean±SEM of four experiments. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ vs control group.

Fig. 74. Effects of Tat-SOD transduction on the viability (A) and intracellular SOD activity (B) of MIN6N cells exposed to STZ. After the cells were treated with 3 µM Tat-SOD for 1 h, 1-50 mM STZ was added to the culture medium for 12 h. Cell viability was estimated by colorimetric assay using MTT. Each bar represents mean±SEM of five experiments. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ vs control group. +; $P<0.05$, ++; $P<0.01$ vs corresponding STZ-treated

group.

Fig. 75. Effects of Tat-SOD transduction on the levels of superoxide anion radical (SAR) (A) and nitrite (B) in MIN6N cells exposed to STZ. After the cells were treated with 3 μ M Tat-SOD for 1 h, 1~50 mM STZ was added to the culture medium for 12 h. Each bar represents mean \pm SEM of five experiments. *; P<0.05, **; P<0.01 vs control group. ++; P<0.01 vs corresponding STZ-treated group.

Fig. 76. Effects of Tat-SOD transduction on STZ-induced DNA fragmentation in MIN6N cells. After the cells were treated with 3 μ M Tat-SOD for 1 h, 20 mM STZ was added to the culture medium for 1~12 h. The DNA samples were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. M; DNA molecular size marker (100 bp DNA ladder), C; control.

Fig. 77. Effects of Tat-SOD transduction on the expressions of Bcl-2 (A) and hsp70 (B) in MIN6N cells exposed to STZ. After the cells were treated with 3 μ M Tat-SOD for 1 h, 20 mM STZ was added to the culture medium for 1~12 h. The expressions of Bcl-2 and hsp70 were assessed from cell lysates by Western blotting. The nitrocellulose membrane was probed with primary monoclonal antibodies of Bcl-2 or hsp70, followed by incubation with goat anti-mouse IgG antibody. The bound antibodies were then visualized by enhanced chemiluminescence method.

Fig. 78. Transduction of Tat-SOD into the pancreas of mice. Mice were ip injected with a single dose of 500 μ g of Tat-SOD or SOD control protein in 0.5 ml PBS and 10% glycerol. Pancreas tissues were dissected from mice 5 h after injection with Tat-SOD and SOD, and were processed for Western blot analysis and SOD enzyme assay (A). Each bar in A represents the mean \pm SEM obtained from four experiments. Asterisks denote statistical significance from those of SOD-injected group at P<0.05. Histochemical analysis of rat pancreas injected with Tat-SOD (B). 3 μ M control SOD (a) or Tat-SOD (b) were ip injected. Frozen sections of pancreatic tissues were immunostained with an anti-polyhistidine antibody. The sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine and observed under light microscope (x 200).

Fig. 79. Light micrographs of rat pancreas showing insulin-positive cells of untreated control mice (a), STZ-induced diabetic mice (b), SOD injected STZ-induced diabetic mice (c), heat-inactivated Tat-SOD injected STZ-induced diabetic mice (d), and Tat-SOD injected STZ-induced diabetic mice (e). Tissue sections were incubated with an anti-mouse insulin antibody, stained with a peroxidase/DAB system, and observed under light microscopy (x 200). These are representatives of insulin immunohistochemistry obtained from four animals for each group.

Fig. 80. Effects of transduced Tat-SOD on blood glucose levels in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice. Diabetes was induced by a single ip injection of 120 mg/kg STZ in male ICR mice. STZ-induced diabetic mice were injected 4 times (4 hours, 1, 3 and 5 days after STZ injection) with 500 µg of control SOD, heat-inactivated Tat-SOD, and Tat-SOD. Symbols represent were untreated control mice (○), STZ-induced diabetic mice (●), SOD injected STZ-induced diabetic mice (□), heat-inactivated Tat-SOD injected STZ-induced diabetic mice (◇), and Tat-SOD injected STZ-induced diabetic mice (■). Each bar represents the mean±SEM obtained from four or five experiments. **, $P<0.01$ versus untreated control group. +, $P<0.05$ and ++, $P<0.01$ versus the relevant STZ-induced diabetes group.

Fig. 1

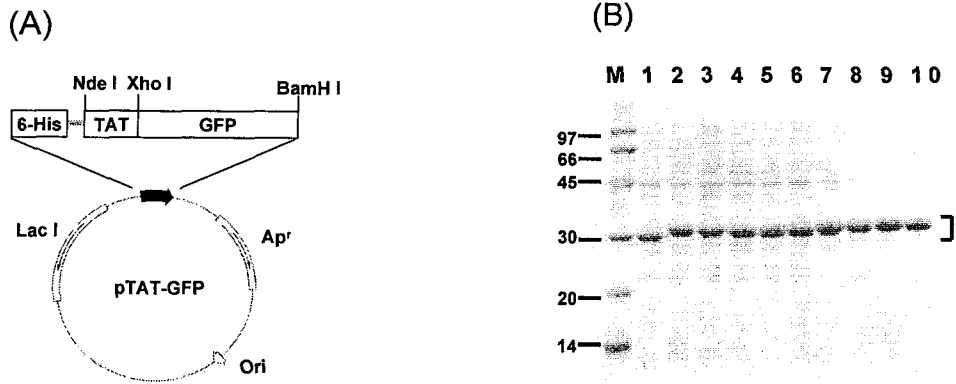


Fig. 2

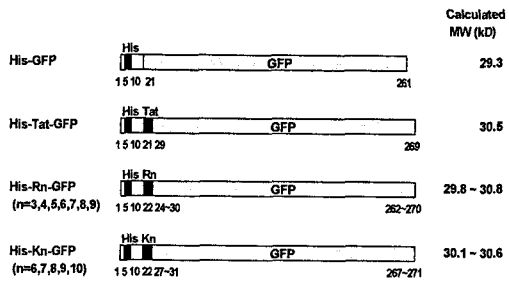


Fig. 3

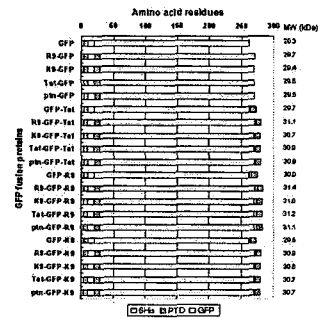


Fig. 4

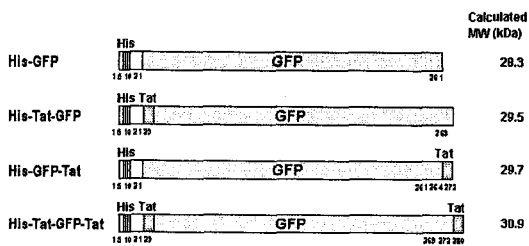


Fig. 5

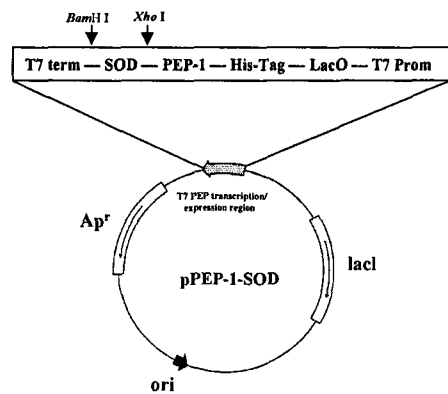


Fig. 6

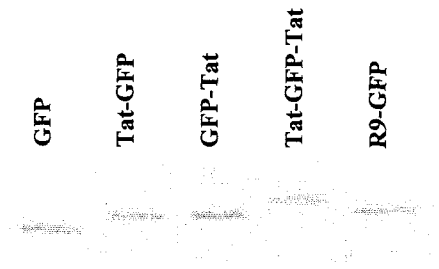


Fig. 7

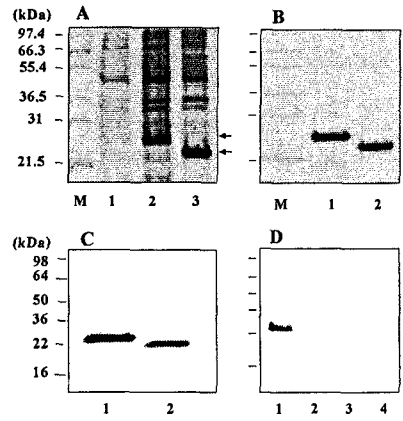


Fig. 8

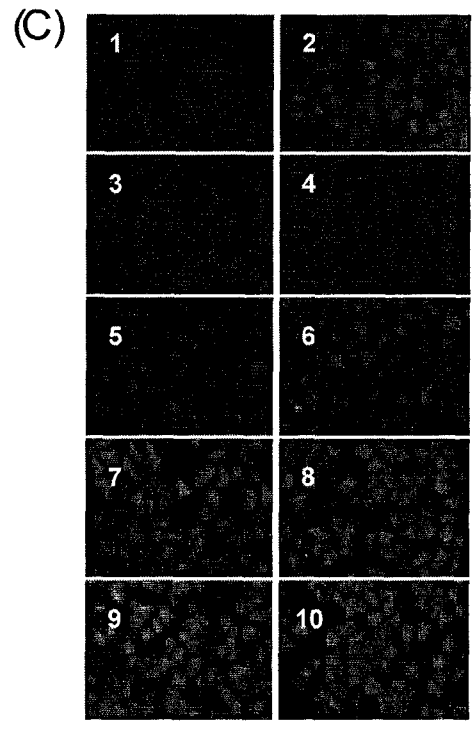
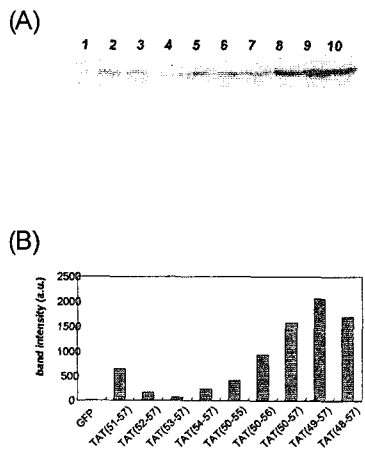


Fig. 9

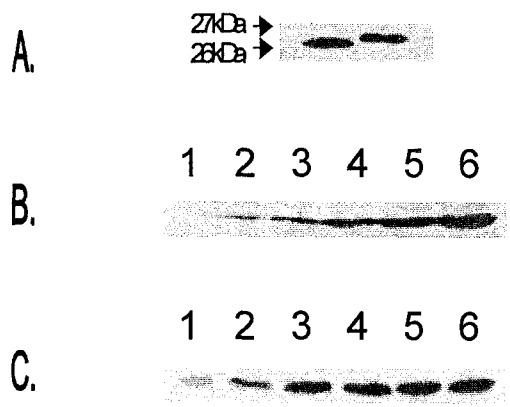


Fig. 10

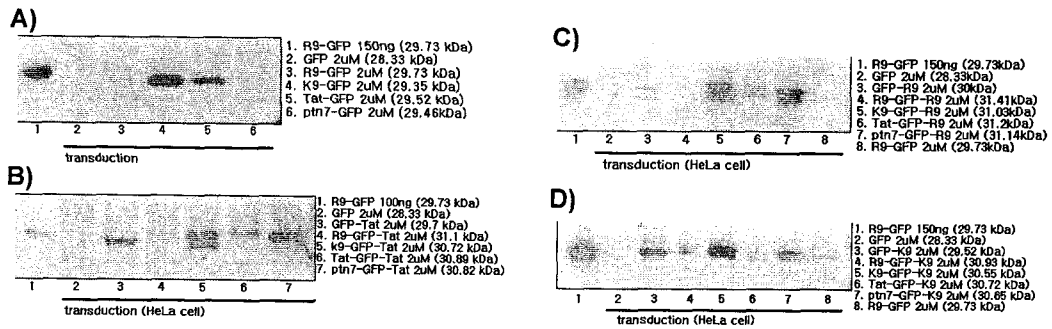


Fig. 11

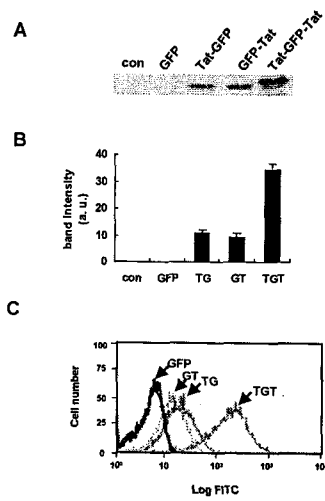


Fig. 12

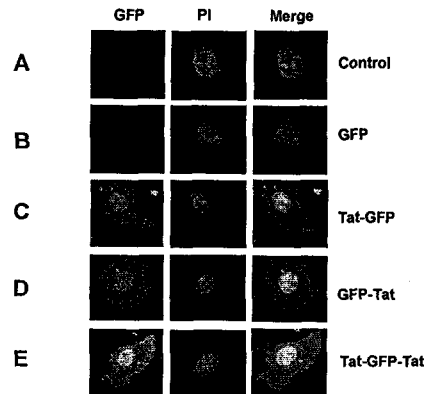


Fig. 13

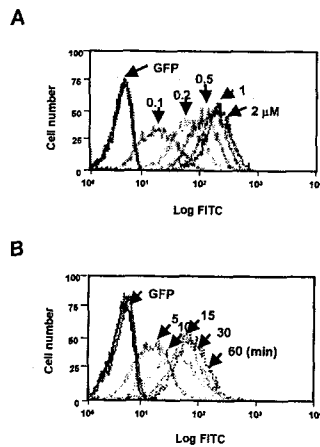


Fig. 14

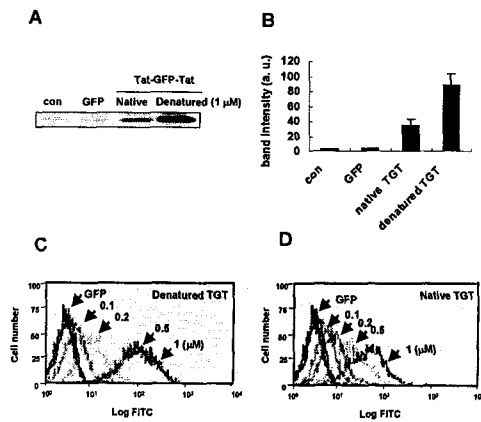


Fig. 15

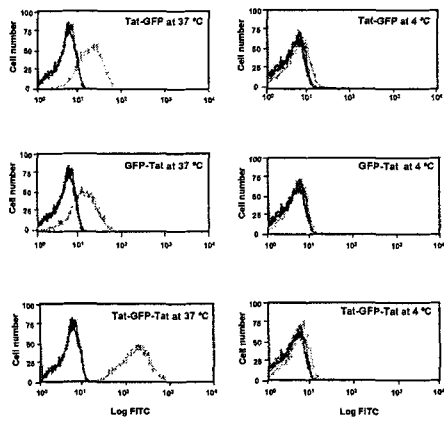


Fig. 16

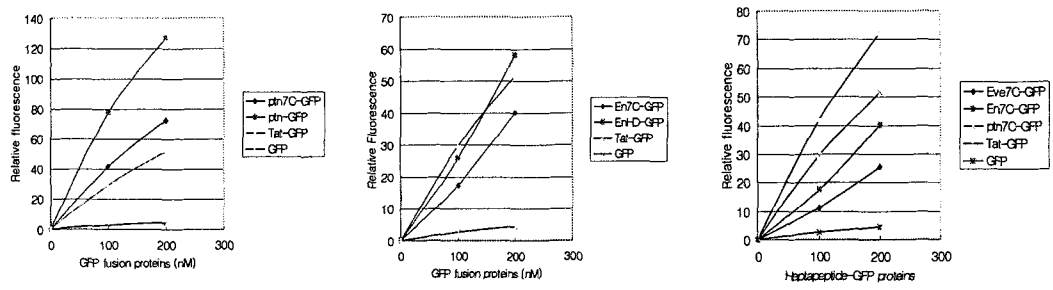


Fig. 17

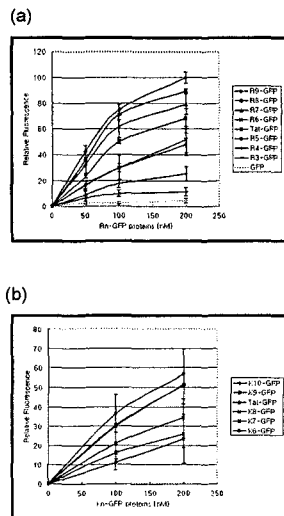


Fig. 18

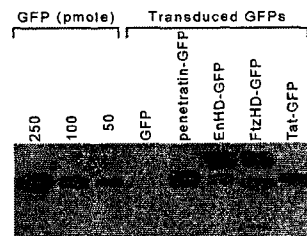


Fig. 19

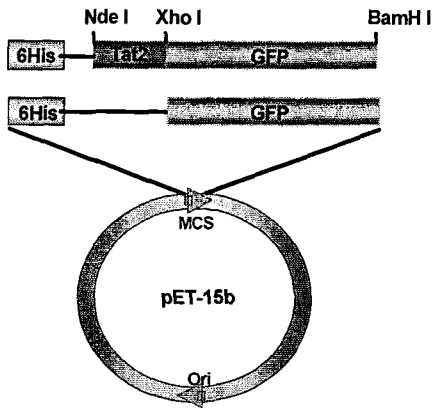


Fig. 20

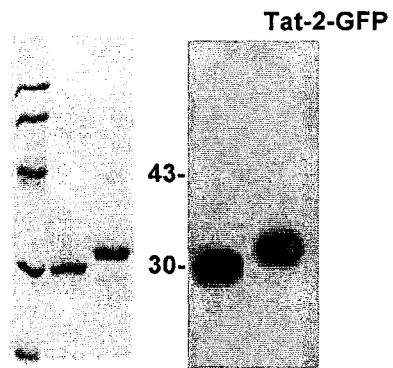


Fig. 21

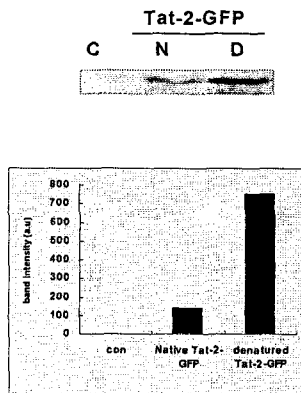


Fig. 22

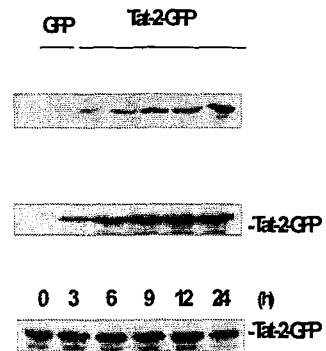


Fig. 23

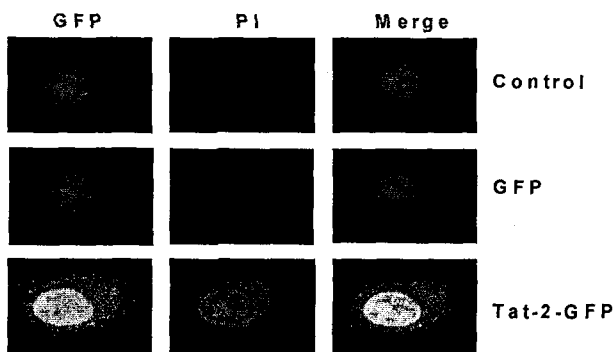


Fig. 24

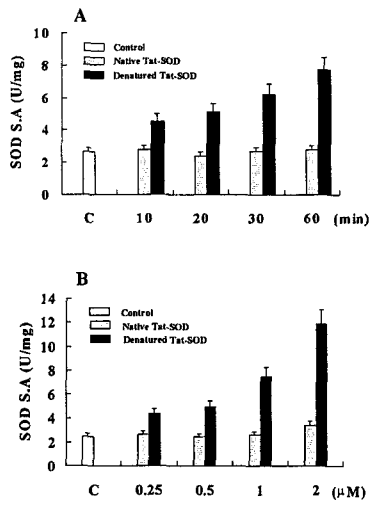


Fig. 25

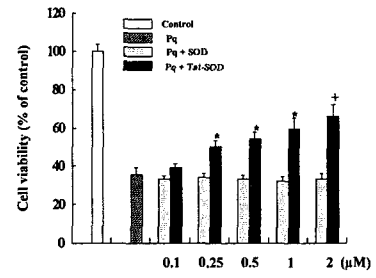


Fig. 26

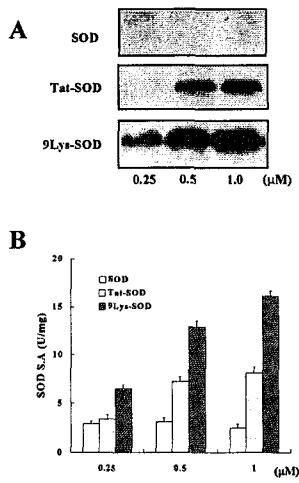


Fig. 27

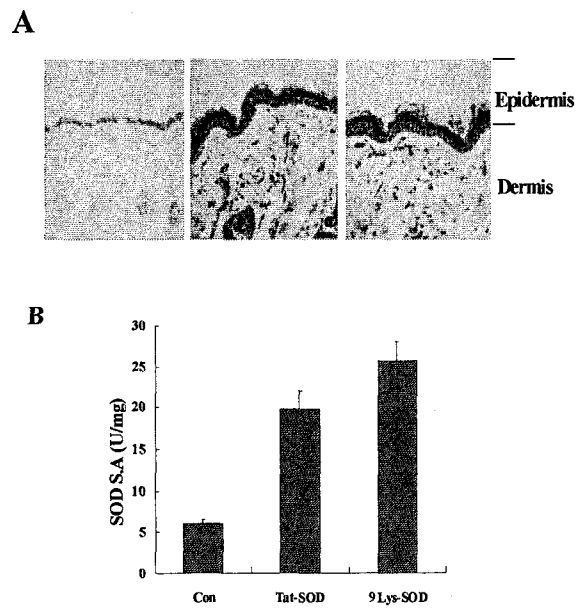


Fig. 28

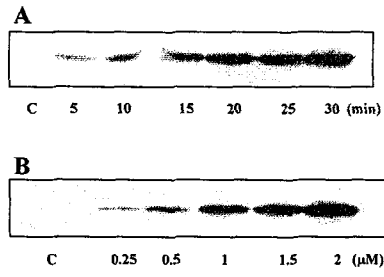


Fig. 30

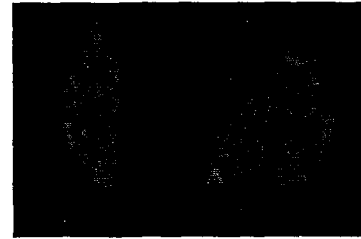


Fig. 29

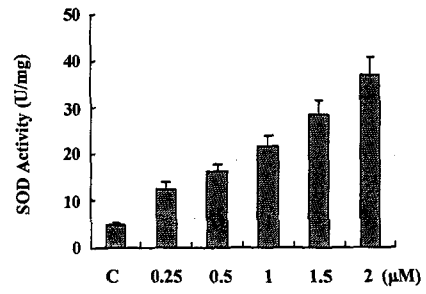
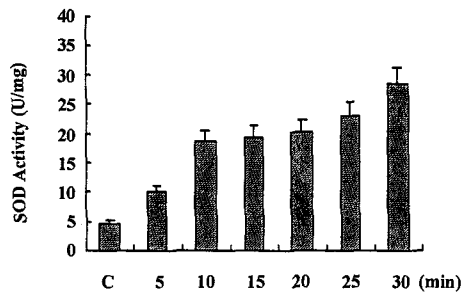


Fig. 31

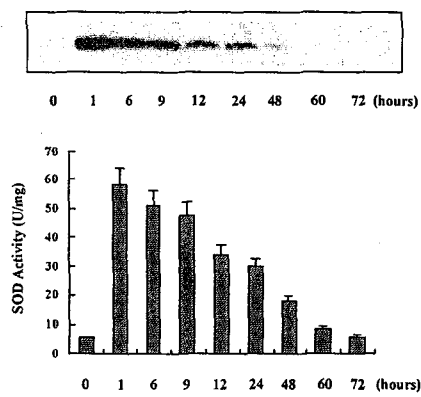


Fig. 32

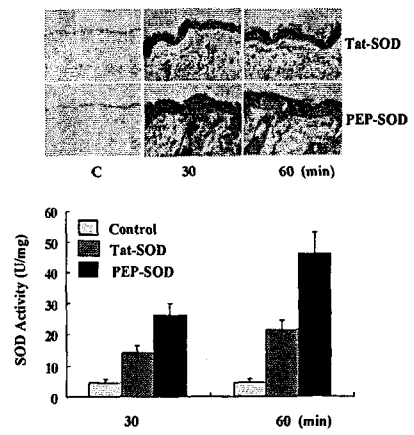


Fig. 33

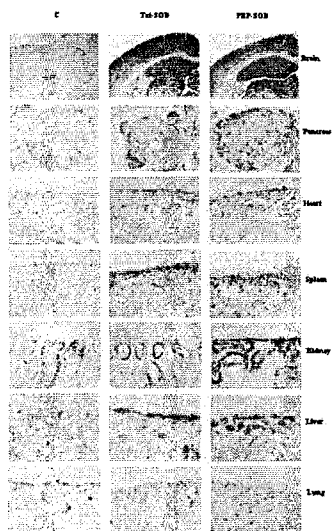


Fig. 34

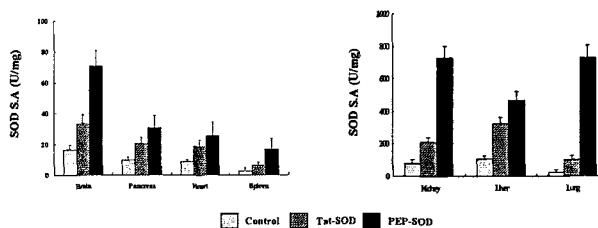


Fig. 35

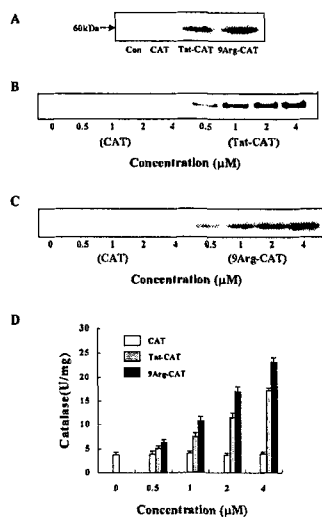


Fig. 36

Immunofluorescence microscopy

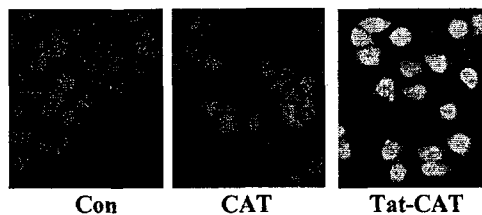


Fig. 37

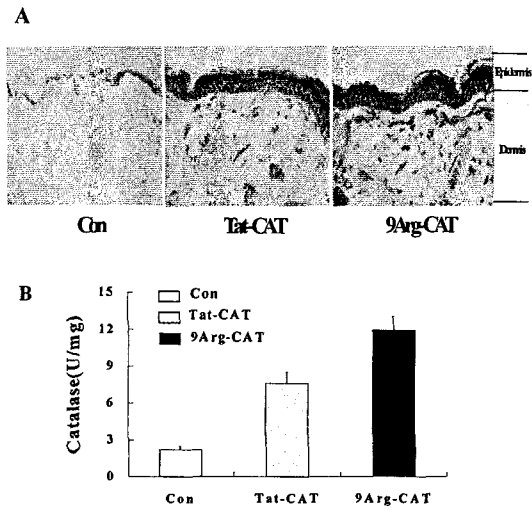


Fig. 38

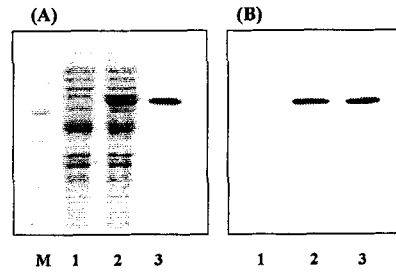


Fig. 39

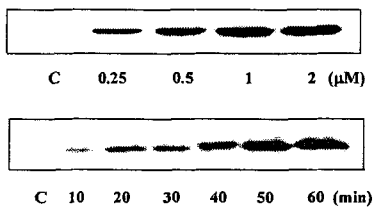


Fig. 40

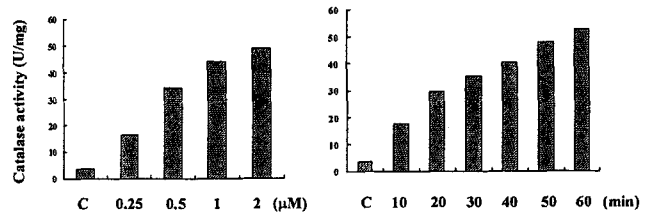


Fig. 41

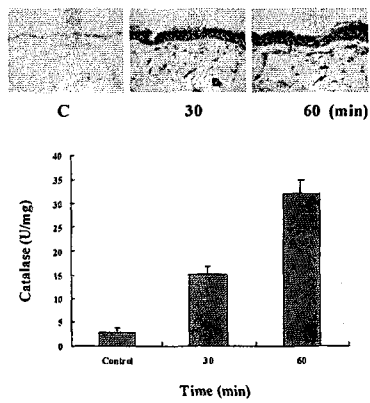


Fig. 42

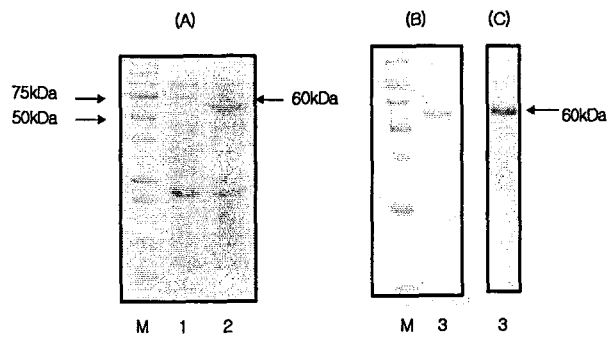


Fig. 43

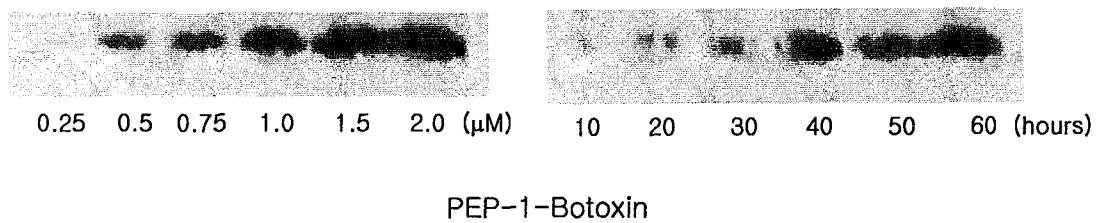


Fig. 44

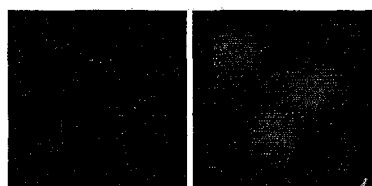


Fig. 45

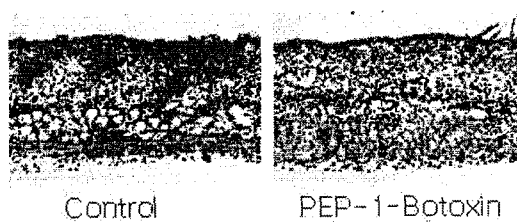


Fig. 46

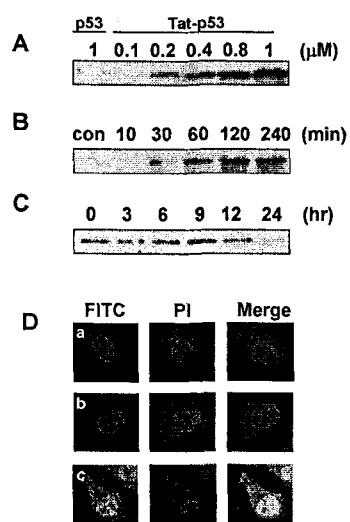


Fig. 47

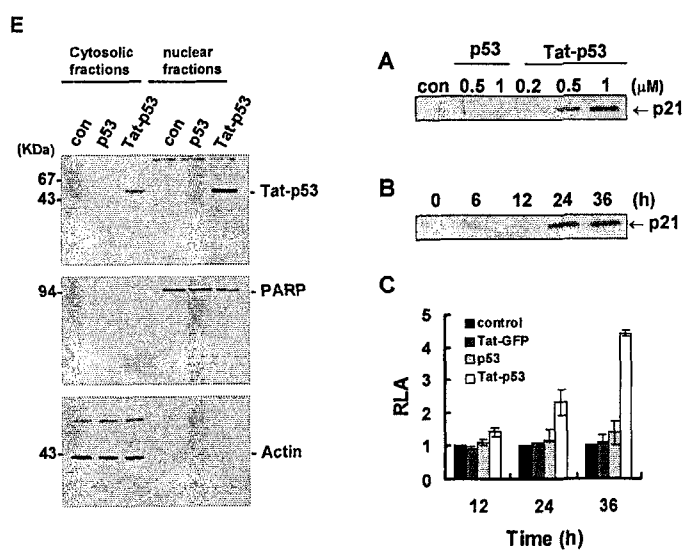


Fig. 48

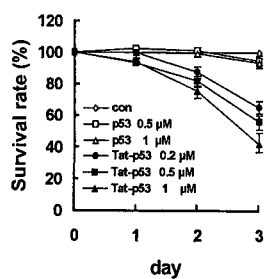


Fig. 49

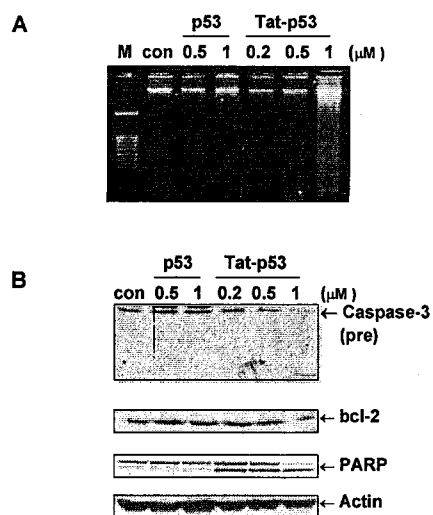


Fig. 50

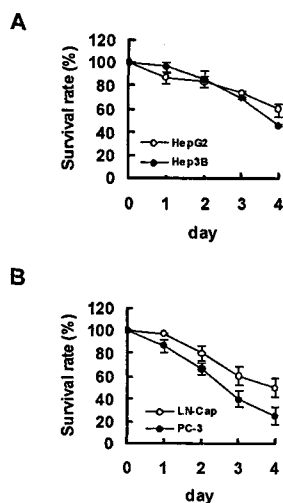


Fig. 51

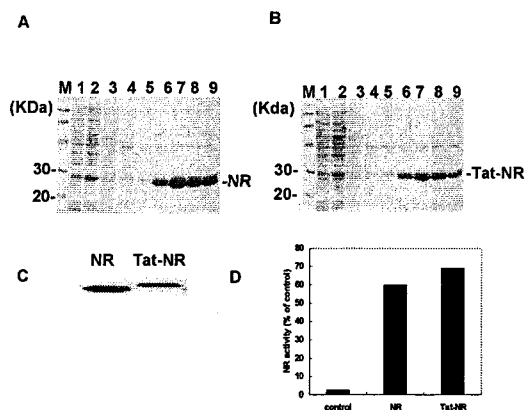


Fig. 52

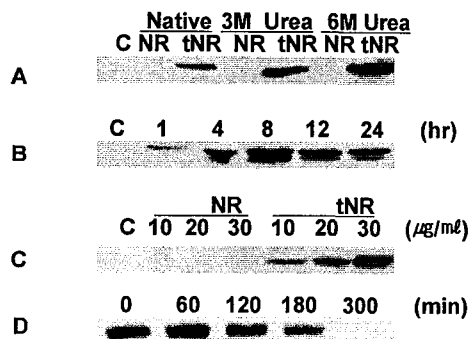


Fig. 53

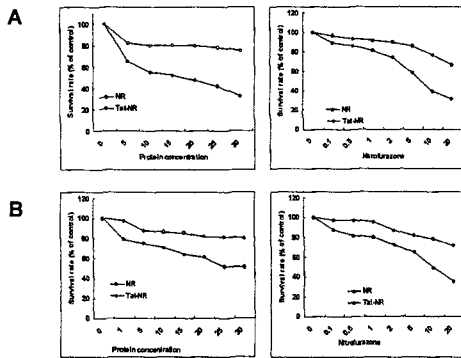


Fig. 54

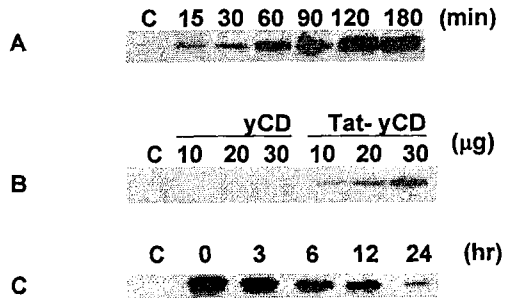


Fig. 55

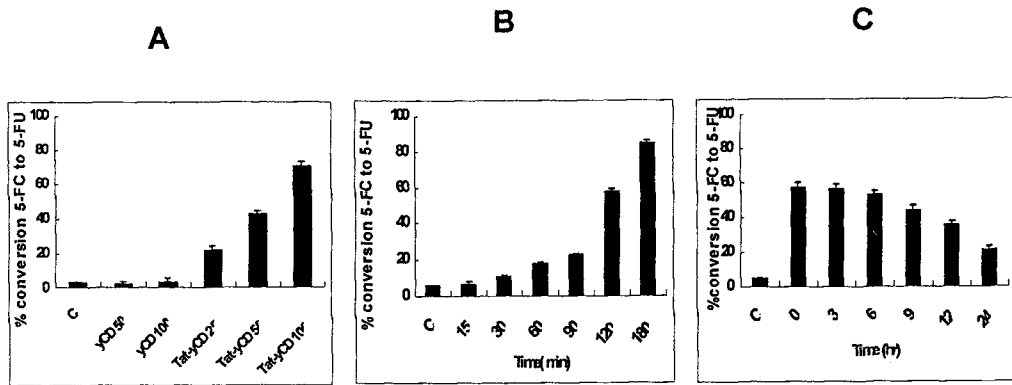


Fig. 56

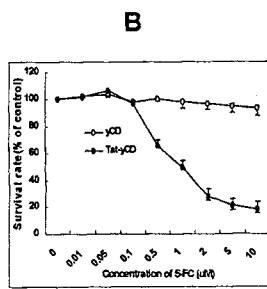
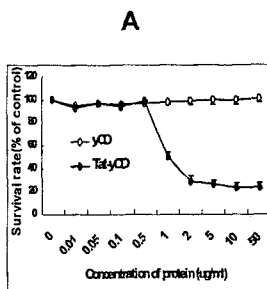


Fig. 57

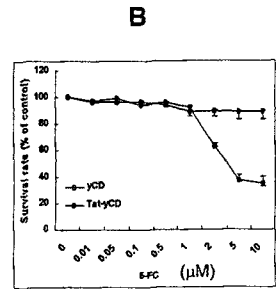
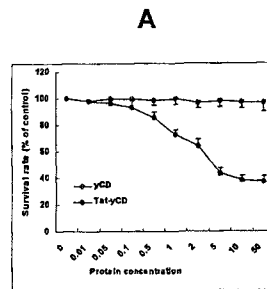


Fig. 58

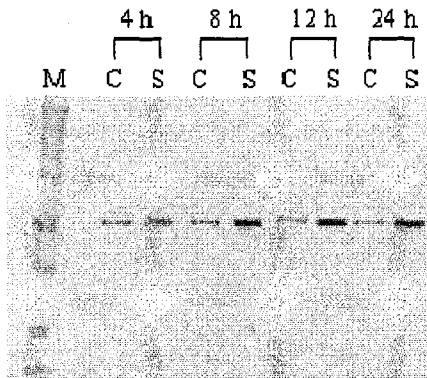


Fig. 59

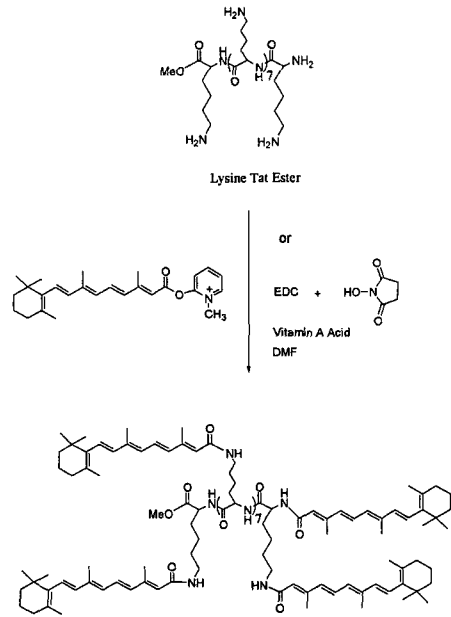


Fig. 60

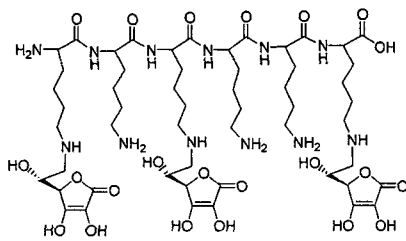


Fig. 61

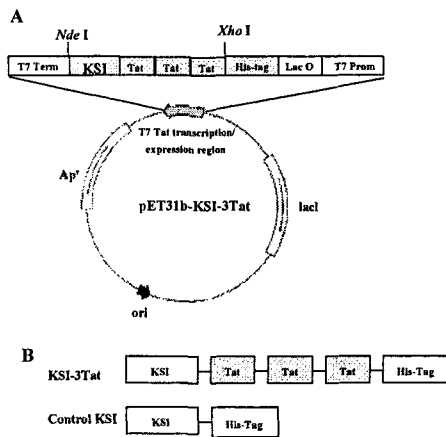


Fig. 62

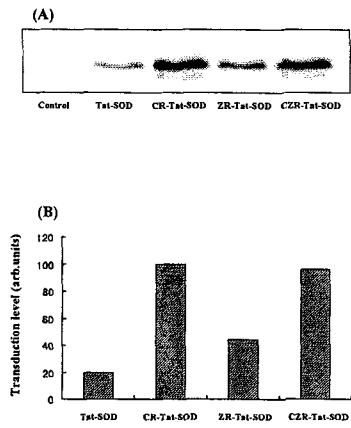


Fig. 63

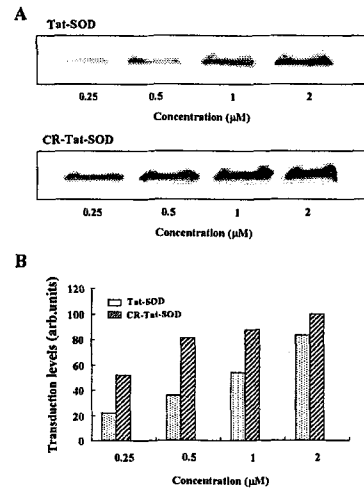


Fig. 64

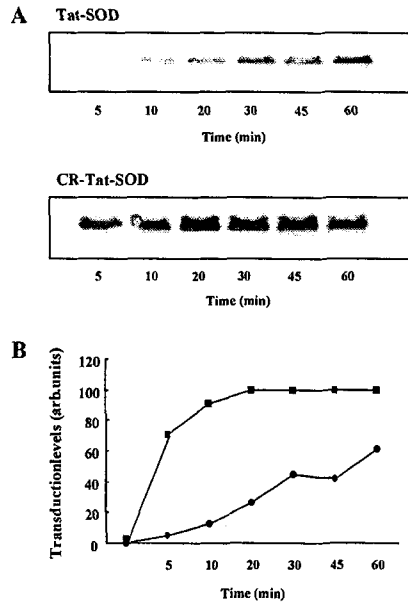


Fig. 65

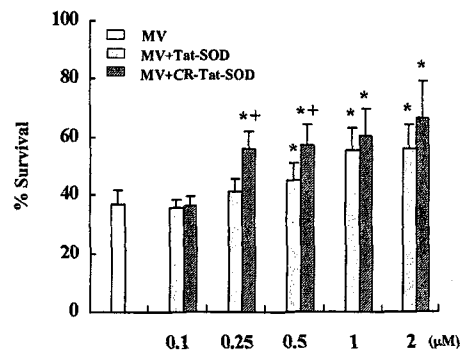


Fig. 66

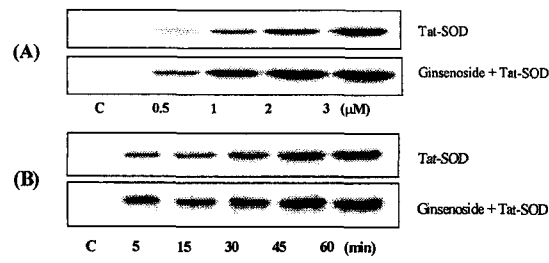


Fig. 67

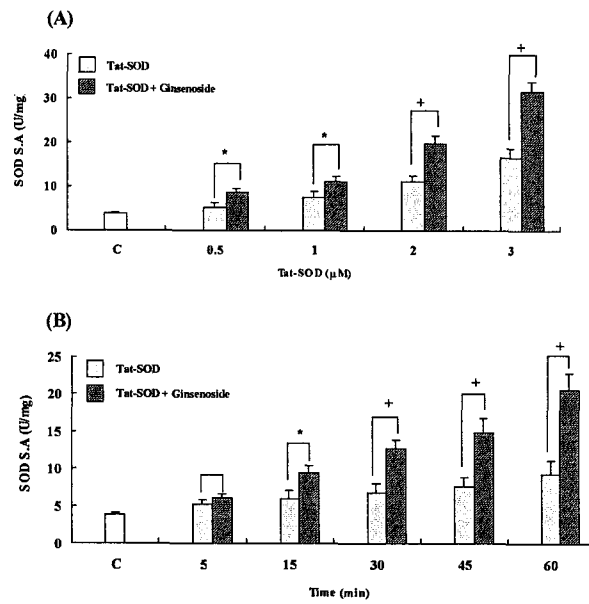


Fig. 68

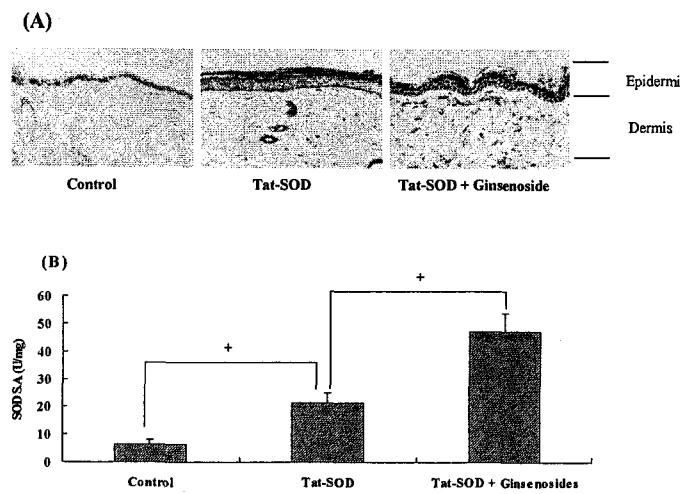


Fig. 69

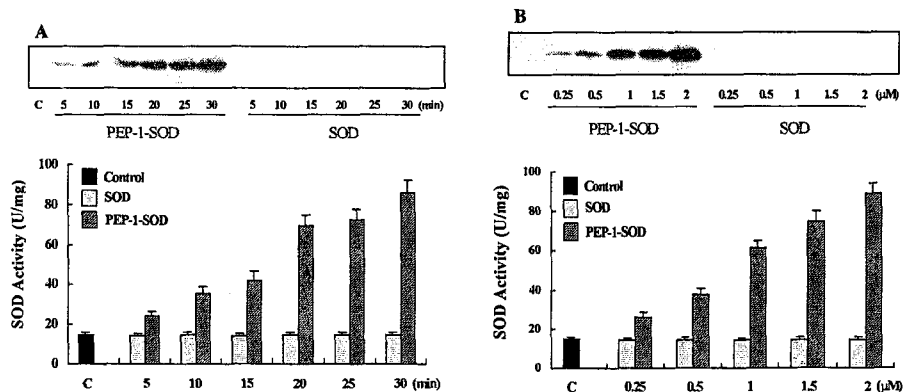


Fig. 70

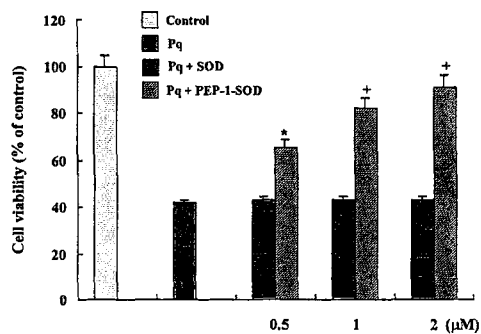


Fig. 71

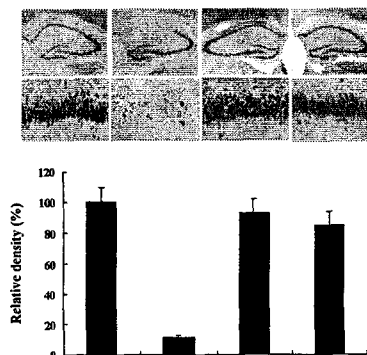


Fig. 72

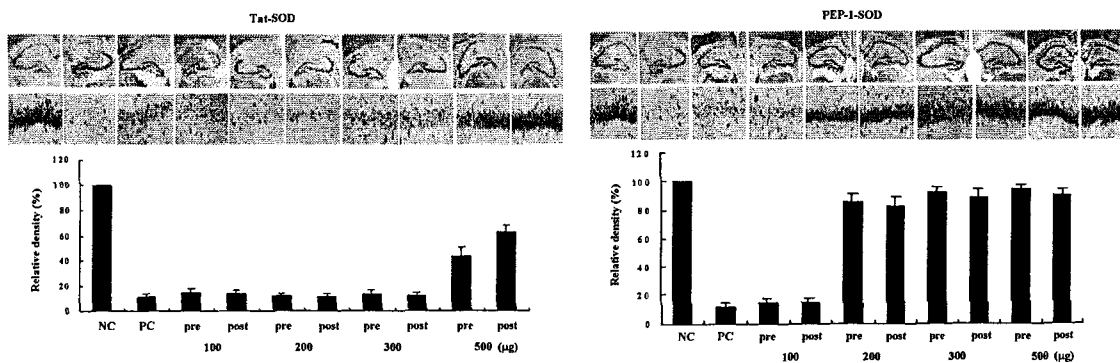


Fig. 73

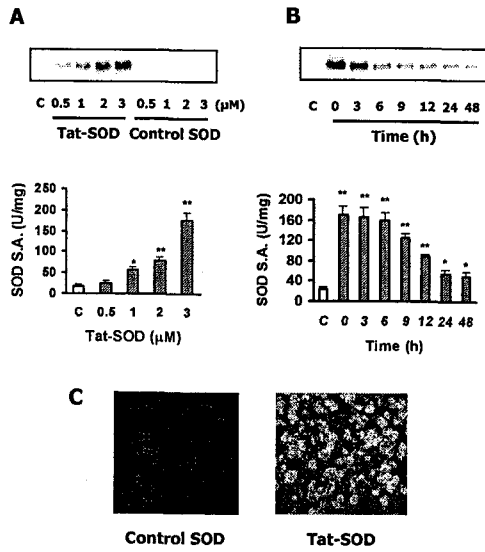


Fig. 74

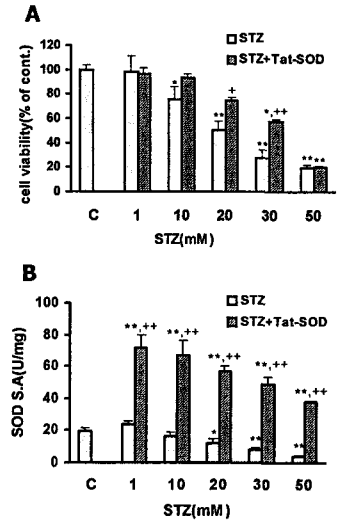


Fig. 75

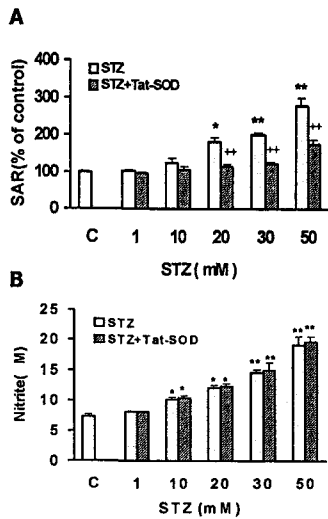


Fig. 76

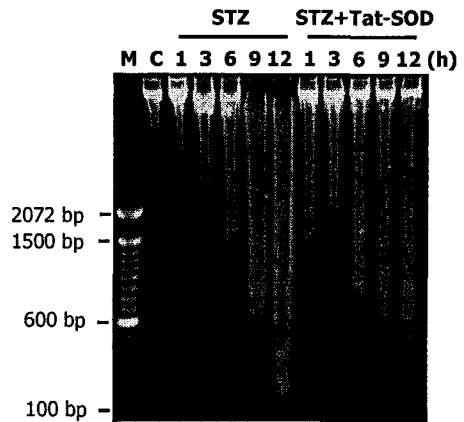


Fig. 77

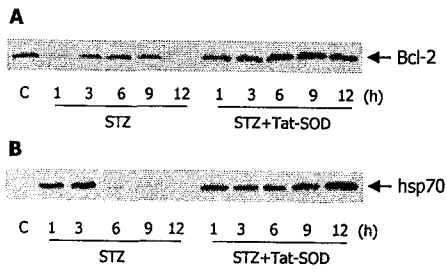


Fig. 78

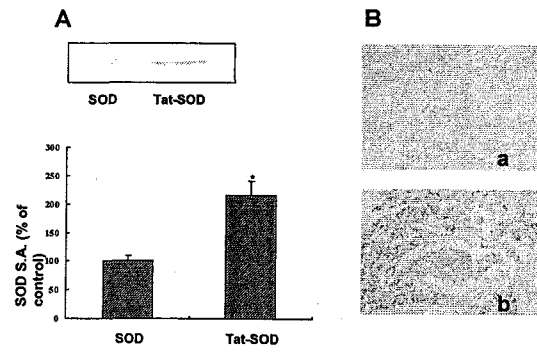


Fig. 79

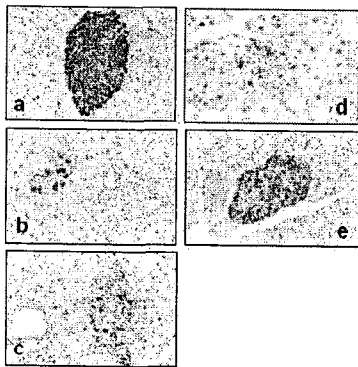
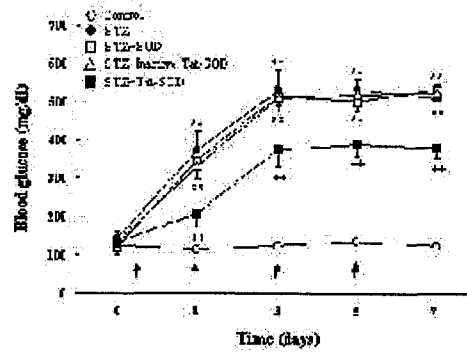


Fig. 80



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표

| 구분 | 연구개발목표 |
|-------------------------------|---|
| 1단계 (1999.9.1 - 2001.8.31) | <ul style="list-style-type: none"> ○ 침투효율 높은 penetratin vector의 개발 ○ Reporter 단백질 GFP의 유전자 클로닝 및 질환관련 목표단백질의 선정 및 유전자 클로닝 ○ Penetratin과 Reporter 및 목표단백질 유전자의 융합기술 개발 ○ 융합단백질의 발현 및 분리정제 기술 개발 ○ 정제된 융합단백질의 세포 및 조직내로 침투조건의 최적화 확립 ○ 세포 및 조직내로 침투된 융합단백질의 생리활성 분석 |
| 2단계 (2001.9.1 - 2004.8.31) | <ul style="list-style-type: none"> ○ 침투효율 높은 penetratin vector의 지속적인 개발 ○ 질환관련 목표단백질의 추가선정 및 유전자 클로닝 ○ 1단계에서 수행중인 질환관련 목표단백질 및 새로 선정된 질환관련 단백질들의 발현 정제 및 생리활성 분석 ○ 침투된 단백질의 활성구조로의 변환 및 안정성 유지 연구 ○ 질환모델동물을 통한 융합단백질의 효능 측정 ○ 융합단백질의 목표장기로 운반하는 방법의 탐색 ○ 질환치료제로서 융합단백질의 임상적 이용가능성 탐색 ○ 생리활성 효능이 있는 organic compounds 들의 침투 vector와의 융합 및 세포 또는 조직내로의 운반기술 개발 및 산업적 이용가능성 탐색 |

2. 관련분야에의 기여도

가. 생리활성 목표단백질의 세포내 침투 효율을 높이기 위한 새로운 다양한 자가 침투 신호(penetratin) vector를 개발함으로써 질환치료 등 목표단백질의 구조 및 성질에 맞는 적합한 vector를 선정할 수 있어 질환치료에 효율적으로 사용할 수 있는 결과로 각종 질환 (노화, 암, 신경질환, 유전병, 당뇨병, 피부질환 등)에 침투 vector를 융합시킴으로서 단백질 치료에 획기적인 토대를 마련하였고, 단백질 뿐 아니라 유전자 치료 및 유기물질을 link 시켜 암 및 기능성 화장품을 개발하는데도 큰 기여를 할 수 있다.

나. 노화억제와 관련 있는 대표적인 항산화효소인 Superoxide dismutase(SOD)와 Catalase를 세포내로 침투시키는데 성공하였고 침투된 SOD, Catalase는 산화적

스트레스 (Oxidative stress)를 유발시킨 세포의 생존률을 3배이상 높이는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 SOD, Catalase를 피부에 뿌려 피부세포층에 침투되는 것을 확인함으로써 피부노화를 사전에 방지할 수 있는 획기적인 **피부노화억제용 신기능성 화장품, 아토피성 피부염 치료제** 등을 개발할 수 있으리라 기대된다. SOD, Catalase의 세포 및 조직내 침투 성공은 ROS (Reactive oxygen species) 관련 각종 질환들 (예: Ischemia, 당뇨병(IDDM), 파킨슨병, 피부질환 등..)에 단백질 치료용으로 사용할 수 있는 획기적인 계기가 마련되어 **단백질치료의 가능성을 확인하는데 크게 기여하였다.**

3. 연구개발의 최종목표

생체내에 존재하며, 중요한 생리활성을 갖는 다양한 생체 기능 단백질을 세포내로 효율적으로 침투시키는 기술 (Protein transduction technology)을 이용하여 많은 질병들을 직접적이고 효율적으로 치료할 수 있는 단백질 치료법을 실용화하는 것이 본 연구의 최종 목표이다.

4. 단계/연차별 연구개발 목표 및 내용

[1 단계]

| 구분 | 연구개발 목표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|----------------|--|--|
| 1차년도 (1999) | ○ 침투효율 높은 penetratin vector의 개발 | 1. HIV-1 Tat 단백질의 발현 및 세포내 침투능력 측정 2. HIV-1 Tat 발현 vector 제조 3. Homeodomain 발현 vector 제조 |
| | ○ Penetratin과 Receptor 및 목표단백질의 융합 기술 개발 | 1. HIV-1 Tat과 GFP와의 융합 2. Homeodomain과 GFP와의 융합 3. HIV-1 Tat과 목표단백질 유전자 크로닝 및 융합 * 관련질환 치료용 목표단백질 - 노화, 암, 신경질환, 선천성 대사이상 유전병, 심혈관질환, 당뇨병 관련 단백질 들 |
| | ○ 융합단백질의 발현 생산 및 분리 정제 기술 개발 | 1. 융합단백질의 발현, 분리, 정제 및 확인 2. 융합단백질의 확인을 위한 목표단백질의 항체생산 |
| | ○ 융합단백질의 세포내 침투 조건의 최적화 및 침투된 단백질의 생리활성 분석 | 1. 융합단백질의 세포내 침투 확인 2. 융합단백질의 세포내 생리활성 능력 확인 |

| 구분 | 연구개발 목표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|----------------|--|--|
| 2차년도 (2000) | ○ 침투효율 높은 penetratin vector의 지속적인 개발 | 1. HIV-1 Tat의 basic domain의 deletion, addition 및 mutation을 통한 변형된 발현 vector 제조 2. Homeodomain의 3rd helix 부분의 deletion 및 mutation을 통한 reconstitute vector 제조 (추가 수행내용) |
| | ○ 질환관련 목표단백질 유전자클로닝 융합 및 발현, 분리, 정제 확인 | 1. 선정된 질환관련 목표단백질들 유전자와의 융합 2. 위 융합단백질의 발현, 분리, 정제 및 확인 3. 목표단백질들의 단항체 생산 (추가 수행내용) |
| | ○ 정제된 융합단백질의 세포내 침투조건의 최적화 및 생리활성 측정 | 1. 질환관련 목표단백질들의 세포내 침투 및 생리활성 측정 |
| | ○ 세포내 침투 성공한 목표 단백질들의 조직내 침투 조사 | 1. 세포내로 침투하여 생리활성이 측정된 목표단백질들을 in vivo 상태에서 조직으로 침투되는지를 조사 (추가 수행내용) |

[2 단계]

| 구분 | 연구개발 목표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|----------------|--|--|
| 1차년도 (2001) | ○ 침투효율 높은 penetratin vector의 지속적인 개발 | 1. Tat vector의 mutagenesis를 이용한 유전자 개선 2. Homeodomain의 mutagenesis를 이용한 유전자 개선 3. C-terminal 쪽으로 Tat sequence를 삽입한 vector 개발 4. HIV-2 Tat vector 개발 |
| | ○ 질환관련 목표단백질 유전자클로닝, 융합 단백질의 발현, 정제 및 생리활성분석 | 1. BTx : 세포내 침투, 피부조직내 침투 2. rpS3, DNA polδ : 유전자 클로닝, 발현, 정제 및 세포내 침투 3. p53, p21, p16, p27, p57, NR, CD, ADI : 발현, 정제, 세포 및 조직내 침투 4. GABA-T : 세포내 침투 5. SSADH : 유전자 클로닝, 발현, 정제 6. GAD, GDH, PK, PO, TH, GCH, PH : 발현, 정제 및 세포내 침투 7. NOS : 유전자 클로닝, 발현, 정제 |
| | ○ 질환관련 목표단백질의 단항체 생산 | 1. Tat-, 9K-, 9A-, NR, rpS3 등 |
| | ○ 새로운 목표단백질의 선정 및 융합단백질의 생산 및 분리정제 | 1. 새로운 목표단백질 (Bax, HSP70 등)의 선정 및 유전자 클로닝, 융합단백질의 발현, 정제 |

| 구분 | 연구개발 목표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|----------------|---|---|
| 1차년도 (2001) | ○ 침투 성공된 단백질의 침투 효율성 증가연구 | 1. 침투성공된 단백질 (예:SOD)의 고효율 침투조건외 탐색 |
| | ○ 침투된 단백질의 활성구조 등의 변환 확인 및 안정성 유지연구 | 1. 침투된 단백질들의 생리활성 측정 2. 침투된 단백질들의 세포내에서 안정성 측정 3. 침투된 단백질들의 refolding 조건확립 및 refolding factor 개발 |
| | ○ 융합단백질의 primary beta-cell로의 침투 | 1. 흰쥐 beta cell 배양후 Tat-SOD, Tat-CAT, HSP70의 세포내 침투 |
| | ○ 질환모델동물의 준비 | 1. 목표단백질의 모델동물을 준비 |
| | ○ 생리활성효능이 있는 organic compounds 들의 침투 vector와의 융합 및 세포 또는 조직내로의 운반 | 1. Tat, 9K, 9R vector와 vitamin A 또는 vitamin C 와의 결합 및 확인 2. 세포 또는 조직내로의 운반 |
| 2차년도 (2002) | ○ 침투효율 높은 penetratin vector의 지속적인 개발 | 1. Tat vector 및 homeodomain의 mutagenesis를 이용한 유전자 개선 2. pGEX-4T vector로 Tat 또는 9K, 9R sequence 삽입 |
| | ○ 질환관련 목표단백질의 세포 또는 조직내 침투 확인 및 생리활성 분석 | 1. 2001년 연구의 지속적 수행 -BTx, rpS3, DNA pol6, p53, p21, p16, p27, p57, NR, CD, ADI, GABA-T, SSADH, GAD, GDH, PK, PO, TH, GCH, PH, NOS : 세포 및 조직내 침투 - IMPP : 유전자 발현, 정제 및 세포, 조직내 침투 - SOD, CAT : 뇌 조직내 침투 |
| | ○ Tat-SOD, CAT의 primary beta-cell 파괴에 대한 보호작용 기전연구 | 1. Cytokine에 의해 유도되는 beta-cell 파괴에 대한 Tat-SOD, CAT 침투에 의한 보호작용 조사 2. Free radical에 의해 유도되는 beta-cell 파괴에 대한 Tat-SOD, CAT 침투에 의한 보호작용 조사 |
| | ○ BTx 효능 측정 | 1. 주름치료제 BTx의 피부침투를 이용한 항주름 효능 측정 |
| | ○ 새로운 organic compound 들의 침투 domain과 의 융합 | 1. Vitamin A 2. Vitamin C |
| | ○ 질환관련 목표단백질의 세포 및 조직내로의 침투 확인, 생리활성 분석 계속 | 1. 2002년도 연구의 지속적 수행 2. 목표단백질의 세포, 조직내로의 침투 |
| 3차년도 (2003) | ○ 질환모델을 통한 융합 단백질의 효능 측정 | 1. 목표단백질의 모델동물을 이용한 효능 측정 |
| | ○ 융합단백질의 목표장기로 운반하는 방법의 탐색 | 1. 융합단백질의 개체내 조직 침투 분포도 조사 2. 융합단백질의 동물로의 투여방법의 개발 |
| | ○ Tat과 융합된 organic compound의 조직으로 침투 | 1. Tat 등의 침투 vector와 link된 vitamin A와 C의 피부조직으로 침투확인 및 생리활성 조사 |
| | ○ 융합단백질의 독성, 안정성 평가 및 기초, 임상, 제약 등 관련연구진에 기술개발 이전 | 1. 동물실험용 융합단백질의 대량생산 및 정제후 실험 동물을 이용한 장기 독성측정 2. 질병치료를 위한 임상가능성 타진 및 기술개발 이전 |

5. 계획대비 달성도

| 번호/목표 | 세부 연구 목표 | 달성 내용 | 달성도 (%) |
|-----------------------------------|--|--|----------------------|
| <p>1. 침투 효율 높은 Penetratin의 개발</p> | <p>1. HIV-1 Tat 단백질 발현 및 세포내 침투능력 측정</p> | <p>1. HIV-Tat의 72개와 86개의 a.a를 포함하는 단백질 유전자를 pTat vector에 subcloning 한 후, 과발현 시켰으며 이를 정제하여 transactivation 활성도와 endothelial cell에서의 VCAM-1의 발현조절 양상을 관찰하여 세포내 침투능력을 확인하였다.</p> | <p>100% 이상 초과 달성</p> |
| | <p>2. HIV-1 Tat penetratin 발현 vector 제조</p> | <p>2. HIV-Tat의 basic domain (11개 a.a 47-57번)을 deletion 시켜 4-10개의 a.a를 갖는 Tat vector를 각각 제작하여 침투효율성을 비교하였다. 그 중 9개 a.a (49-57)를 갖는 vector를 주로 실험에 사용하였다.</p> | |
| | <p>3. HIV-Tat basic domain의 mutagenesis를 이용한 효율성 향상 vector 개발</p> | <p>3. HIV-Tat의 basic domain (9개 a.a 49-57)에 proline을 1개, 2개, 3개가 첨가된 vector를 제조하였고, 9개 모두 lysine 또는 arginine으로 치환하여 9Lys-, 9-Arg-Tat vector를 제조하였다.</p> | |
| | <p>4. Homeodomain 발현 vector 제조</p> | <p>4. Drosophila의 antennapedia homeodomain (Antp)을 갖는 pFtzHD와 pEn HD, ptnHD vector를 각각 제작하였다 pKnHD, pRnHD, Ptn7C, Ptn7MK, Ptn7WR, Ptn7WK, Ptn7WR</p> | |
| | <p>5. 다양한 단백질 침투 신호 peptide의 N-terminal, C-terminal 양쪽으로의 삽입에 의한 개선된 침투 vector의 개발</p> | <p>5. 다양한 vector에 reporter 유전자인 GFP를 삽입하였다. 또한 Tat의 위치에 따른 (N-, C- 또는 양쪽 terminal) vector를 제작하여 GFP를 삽입시켰다. R9-GFP-Tat, K9-GFP-Tat Tat-GFP-Tat, ptn-GFP-Tat R9-GFP-R9, K9-GFP-R9 Tat-GFP-R9, ptn-GFP-R9 R9-GFP-K9, K9-GFP-K9 Tat-GFP-K9, ptn-GFP-K9 Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat HIV-2 Tat, pGEX-4T-Tat</p> | |
| | <p>6. 목표단백질을 3차구조상태로 운반시킬 수 있는 침투 vector인 PEP-1 vector 개발</p> | <p>6. 3차 구조상태로 단백질 운반 vector인 PEP-1 vector의 제조: (KETWWETWWTEWSQPKKKRKV) 이 sequence는 PTD domain을 함유하고 있는 signal peptide로서 세포내 침투를 위해서 SOD, Catalase 및 다양한 목표단백질들을 융합시켰다.</p> | |

| 번호/목표 | 세부 연구 목표 | 달성 내용 | 달성도 (%) |
|---------------------------------|--|--|---------------|
| 2. Penetratin 과 목표 단백질의 융합기술 개발 | <p>1. HIV-Tat penetratin과 reporter gene인 GFP와의 융합</p> <p>2. Homeodomain과 GFP와의 융합</p> <p>3. 침투효율 높은 다양한 penetratin vector와 질환 관련 목표단백질 유전자와의 융합</p> <p>4. Organic compound와 Tat sequence의 link</p> | <p>1. 다양한 HIV-1 Tat vector들과 GFP gene을 융합시켜 pTat-GFP vector를 제작하였고, 또한 HIV-2 Tat-GFP 발현 vector를 제작하였다.</p> <p>2. FtzHD, EnHD, ptnHD 부분과 GFP gene을 융합시켜 pFtzHD-GFP, pEnHD-GFP, ptnHD-GFP vector 및 deletion, mutation을 이용한 다양한 vector를 제작하였다.</p> <p>3. 노화 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-SOD, 9Lys-SOD, Tat-CAT, 9Arg-CAT, Tat-BTx, PEP-1-SOD, PEP-1-CAT</p> <p>4. 암 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-p53, Tat-p21, Tat-NR, Tat-CD, Tat-ADI, PEP-1-rpS3, Tat-HSP70, Tat-Bax.</p> <p>5. 신경질환 관련 목표단백질 유전자와의 융합 PEP-1-GABA-T, PEP-1-GAD, Tat-GDH, PEP-1-SSADH</p> <p>6. 선천성 대사이상유전병 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-PH, Tat-SSADH, Tat-GCH PEP-1-SSADH</p> <p>7. 당뇨병 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-SOD, Tat-CAT, PEP-1-SOD, PEP-1-CAT</p> <p>8. 신호전달 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-C3 TF, Tat-hGH</p> <p>9. 뇌허혈 관련 표단백질 유전자와의 융합 Tat-SOD, Tat-CAT, PEP-1-SOD, PEP-1-CAT</p> <p>10. 생리활성 organic compound와 link 및 발현 vector 제작 Tat-vitamin A Tat-vitamin C</p> | 100% 이상 초과 달성 |

| 번호/목표 | 세부 연구 목표 | 달성 내용 | 달성도 (%) |
|--|--|---|---------------|
| 3. 융합 단백질의 생산 및 분리 정제기술 개발 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 융합단백질의 발현 2. 융합단백질의 발현최적조건 확립 및 발현된 융합단백질의 순수 분리 정제 및 확인 3. 융합발현단백질 확인을 위한 목표단백질에 대한 단항체 생산 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 융합된 목표단백질들을 <i>E. Coli</i>에서 과대 발현시켰다. 10K, 9K, 8K, 7K, 6K-GFP 9R, 8R, 7R, 6R, 5R, 4R, 3R-GFP Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat Tat-SOD, SOD-Tat, Tat-SOD-Tat Ptn 7C-GFP, pEn 7C-GFP, pEve 7C-GFP, Ptn 7MR-GFP, Ptn 7WR-GFP, Ptn 7WK-GFP Tat-SOD, Tat-Cat, 9Arg-Cat, Tat-Btx, Tat-CD, Tat-GDH, Tat-PK Tat-HSP70, Tat-Bax, Tat-hGH HIV-2 Tat-GFP, pGEX-4T Tat-GFP Tat-vitamin A and C 2. 융합된 목표단백질들은 <i>E. coli</i> cell에서 발현시킨 후 Ni^{++}-affinity column으로 순수 분리 정제하였으며 이들은 각각의 항체를 이용하여 확인하였다. 3. 융합 발현 단백질들을 확인하기 위하여 그들에 대한 다음의 단항체를 각각 생산하였으며, 일부 생산중에 있다 | 100% 이상 초과 달성 |
| 4. 융합 단백질의 세포 및 장기조직 내 침투 및 침투된 단백질의 생리활성 분석 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 융합 목표단백질들의 세포내 침투 확인 2. 융합단백질의 장기 조직내 침투 확인 3. 침투된 목표 단백질의 생리활성 분석 4. Organic compound의 세포 및 조직내 침투, 생리활성 분석 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 융합목표단백질들을 다양한 세포 (HeLa, PC12, S2, Insulinoma cell 등)로 각각 침투시킨 후 Western blot으로 확인하였다. 2. 항산화효소인 Tat-SOD, 9Arg-CAT, PEP-1-CAT을 쥐의 복강에 주사한 후 이들 단백질들의 장기조직 (뇌, 폐, 심장, 비장, 근육, 신장) 내로의 침투를 immunohistochemistry 및 활성도 변화로 확인하였다. 3. 생리활성 및 목표단백질들의 세포내에서의 안정화유지 정도를 모두 측정하여 목표단백질 침투를 성공적으로 수행하였다. 4. Tat-vitamin A, C를 세포 및 조직내로 침투시킨후 생리활성의 변화를 측정중에 있다. | 100% 이상 초과 달성 |

| 번호/목표 | 세부 연구 목표 | 달성 내용 | 달성도 (%) |
|--------------------------------|--|---|--------------------|
| 5. 융합 단백질의 고효율 침투조건 확립 | 1. Tat-SOD 구리이온 회복방법에 의한 세포침투 효율 증가 2. 천연물인 인삼을 이용한 Tat-SOD의 세포침투 효율증가 3. Tat의 위치 (N- and/or C-terminal 및 양쪽 terminal)에 따른 세포침투 효율증가 | 1. Tat-SOD의 세포침투 효율을 증가시키기 위해 Tat-SOD를 구리이온으로 reconstitution 시킨 후 세포침투 효율의 증가를 확인하였다. 2. 천연물인 인삼추출물을 이용하여 세포침투 효율의 증가를 확인하였다. 3. Tat의 위치 (N- and/or C-terminal 및 양쪽 terminal)에 융합된 GFP를 이용하여 세포침투 효율의 증가를 확인하였다. | 계획하지 않았던 연구로서 초과달성 |
| 6. 질환동물 모델을 이용한 단백질 치료법 가능성 탐색 | 1. 단백질 치료법의 실용화를 위한 질환모델 동물의 준비 2. SOD, CAT등의 융합단백질을 이용한 단백질 치료법 개발 가능성 탐색 | 1. 목표단백질을 이용한 단백질치료법의 실용화를 위하여 다음의 모델동물을 준비하였다. 당뇨병 모델동물 뇌허혈 모델동물 간질 모델동물 파킨슨씨병 모델동물 암유발 모델동물 2. 준비된 모델동물들을 이용하여 SOD 및 CAT이 당뇨병과 뇌허혈에 효능이 있다는 것을 확인하였다. 3. 파킨슨씨병, 암, 간질 동물모델을 이용하여 SOD, CAT, p53, NR, CD, GABA-T 등 융합단백질의 효능을 측정중에 있다. | 100% 이상 초과 달성 |

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

| 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서 | | | | |
|---|---------------------------------|---------------------------|------------------|----------------|
| 사업명 | 국가지정연구실 사업 | | | |
| 과제명 | 질환치료를 위한 생리활성 단백질의 세포내 침투기술 | | | |
| 연구기관 | 한림대학교 | 연구책임자 | 최수영 | |
| 총연구기간 | 2001년 9월 1일 ~ 2004년 8월 31일 (3년) | | | |
| 총 연구비 (단위 : 천원) | 정부출연금 | 민간부담금 | 합계 | |
| | 870,000 | 0 | 870,000 | |
| 기술분야 | | | | |
| 참여기업 | | | | |
| 공동연구기관 | | | | |
| 위탁연구기관 | | | | |
| 연구결과활용 (해당항목에(√) 표시) | 1. 기업화 () | 2. 기술이전 () | 3. 후속연구추진 (√) | 4. 타사업에 활용 () |
| | 5. 선행 및 기초연구 (√) | 6. 기타목적활용 (교육, 연구) (√) | 7. 활용중단(미활용) () | 8. 기타 () |
| <p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2004년 11월 30일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 최수영 (인) 연구기관장 : 이 상 우 (직인)</p> <p>과학기술부장관 귀하</p> | | | | |

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

이 단백질 침투기술은 자가침투신호 (penetratin)를 갖는 HIV (Human Immunodeficiency Virus) Tat (Transactivator) 단백질과 Antennapedia homeodomain 단백질이 자발적으로 세포내로 침투할 수 있다는 특성을 이용하여 다양한 생체 기능 목표단백질들에 penetratin을 부착하여 세포내로 운반시키는 단백질 침투 기술 (protein penetration technology)을 개발함으로써 많은 질환들 (예: 노화, 암, 신경질환, 선천성 대사이상유전병, 심혈관질환, 당뇨병, 피부질환 등)에 직접적으로 효율적인 치료할 수 있는 단백질 치료법 (protein therapy)을 실용화하는 것이 본 연구의 목표이다.

또한, 이 기술은 단백질 뿐 아니라 peptide, DNA, antisense RNA 그리고 생리활성 효능이 있는 유기물질(organic molecules)들, 예를 들면 항노화, 항주름에 효능이 있는 retinol, vitamin C, 미백효능이 있는 hydroquinone 등과, Chemotherapy용 항암제, 피부질환 치료용 제제 등을 penetratin을 부착시켜 세포 및 조직내로의 전달을 높이는데도 이용할 수 있을 것이다. 그러므로, 이 기술이 개발의 성공은 향후 임상 치료를 포함한 의료산업, 제약산업, 기능성화장품 산업 등의 모든 생명공학 관련 산업에 기반기술로써 활용될 수 있는 획기적인 기술이다

2. 연구수행 결과 현황 (연구종료시점까지)

가. 특허등록 및 출원 목록 (별지1 참조)

나. 발생품 및 시작품 내역

현재 LG 생활건강 화장품 (주)에서 Tat-SOD, PEP-1-SOD, Tat-catalase를 노화억제 기능성화장품의 제재로 첨가하기 KFDA 승인 신청중에 있다.

다. 논문게재 실적

(1) 논문게재 실적 (별지2 참조)

라. 수상실적

(1) 대통령 표창 수상 (2001년 4월 21일)

(2) 제 14회 과학기술 우수논문상 수상 (2004년 4월 28일)

| 연도 | 수상명 | 수상내용 |
|--------------|-----------------------------|--|
| 2001. 4. 21. | 대통령 표창 (제 131773 호) | ○ 제34회 과학의 날을 맞아 과학기술부에서 과학기술 진흥유공자 추천을 해주어 수상하게 되었음. ○ 업적내용: 노화, 암, 신경질환, 유전병 등 인체질환 치료를 위한 생리활성단백질의 세포 및 조직내 침투기술을 이용한 단백질 치료법을 개발하였고, 부작용없는 새로운 항간질 치료제 개발공적을 인정받아 수상하게 되었음. |
| 2004. 4. 28. | 과학기술 우수논문상 (제 2004-66 호) | ○ 제14회 한국과학기술총연합회에서 과학기술우수논문으로 선정되어 수상하게 되었음. ○ 업적내용: 천연물인 인삼추출물 (gesenosides)을 이용하여 Tat-SOD의 세포 및 조직내 침투와 활성을 크게 향상시켜 유해산소로부터 세포 및 조직 손상의 보호를 인정받아 수상하게 되었음. |

* 대통령 표창장, 조선일보 기사(2001.2.14), 도민일보 기사 (2004.4.22)

마. 공공기능수행실적 (별지3 참조)

- (1) 인터넷 홈페이지 운영 (<http://hallym.ac.kr/~sychoi>)
- (2) 기술이전 및 산업체와의 공동연구; 5개 업체와 기술이전 및 공동연구 협약
- (3) 국내외 연구자들과의 공동연구
- (4) 세미나 및 심포지움을 통한 개발기술의 전파

3. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 활용계획

계속적으로 세포침투성 vector를 이용하여 생리활성 단백질들의 각종 질환치료제로의 활용을 위한 단백질치료법의 개발과 이들을 이용한 피부관련 기능성 화장품개발에 활용할 계획임.

나. 활용방법

생리활성 단백질을 다양한 질환관련 동물모델에 이용하여 새로운 단백질 치료제 개발에 활용할 예정임

다. 이외의 다음과 같은 사항들에 대하여 활용 및 기대효과를 얻을 수 있다.

- (1) 질환치료용 단백질들의 세포 또는 조직으로의 침투를 통한 직접적 질환치료 (노화, 암, 신경질환, 유전병, 당뇨병, 피부질환 등)의 실용화 및 기능성 화장품 노화예방, 미백용)등 개발에 활용

- (2) 펩타이드, DNA, antisense RNA, Ab의 세포 및 조직 침투를 이용한 펩타이드 치료법, 유전자치료법, antisense RNA 치료법, 항체 치료법 (Antibody therapy)의 활용 가능성.
- (3) 생체에서 중요한 기능을 갖는 노화예방 및 치료관련 생체유기물질 (Bio-organic molecules)이나 항암효능이 있는 화합물 (anticancer chemical molecules, 피부질환 치료용 물질)들의 피부조직내로의 침투를 이용한 기능성화장품 및 항암제, 피부질환 치료제로의 활용
- (4) 식물세포로의 생리활성단백질 침투를 통한 식물성장, 형태, 기능 등의 조절
- (5) 질환치료에 있어서 단백질을 이용한 직접치료법의 실용화
- (6) 단백질 및 펩타이드 물질의 세포내로의 직접침투를 가능하게 하여 세포 생물학, 세포공학 분야의 기초연구 활성화
- (7) Drug delivery 체계의 기술적 문제점의 해결
- (8) 단백질 치료분야에 있어서 국제적 선도역할 기대

<별지 1> 특허등록 및 출원 목록 (본 과제와 직접 관련있는 특허현황)

| 발명명칭 | 특허공고번호 출원(등록)번호 | 공고일자 출원(등록)일자 | 발명자 (출원인) | 출원국 | 비고 |
|--|-------------------------|------------------|------------------|-----|----|
| 세포침투성 융합단백질, 이를 코딩하는 조합폴리뉴클레오타이드 및 발현벡터 | (등록) 374050호 | 2003년 2월 17일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-인간글루탐산 탈수소효소 융합단백질, 이 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 융합단백질을 세포내로 도입하는 방법 | (등록) 0379577호 | 2003년 3월 27일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-C3 트랜스페라제 융합단백질, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 Tat-C3 트랜스페라제를 이용한 단백질의 생리적 기능 분석방법 | (등록) 0379578호 | 2003년 3월 27일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 솔포르버스 솔파타리쿠스균의 글루탐산 탈수소효소에 대한 단일클론 항체 | (등록) 0412773호 | 2003년 12월 12일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 피리독신-5'-포스페이트옥시다아제에 대한 단일클론 항체 | (등록) 0412774호 | 2003년 12월 12일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 항이노시톨 일인산 포수파타제 단일클론 항체 | (등록) 0439586호 | 2004년 6월 29일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스 융합단백질의 세포내 침투능력을 증가시키는 방법 | (등록) 445186호 | 2004년 8월 10일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 폴리라이신 수송 도메인, 폴리라이신 융합단백질, 이 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 이 융합단백질의 발현벡터 및 폴리라이신 융합단백질을 세포 내로 도입시키는 방법 | (출원) 10-2000-43022호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-인간글루탐산 탈수소효소 융합단백질, 이 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 융합단백질을 세포내로 도입하는 방법 | (출원) 10-2000-43036호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 융합단백질, 이를 코딩하는 재조합폴리뉴클레오타이드 및 발현벡터 | (출원) 10-2000-43037호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-C3 트랜스페라제 융합단백질, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 Tat-C3 트랜스페라제를 이용한 로 단백질의 생리적 기능 분석방법 | (출원) 10-2000-43038 호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-슈퍼옥사이드 디스뮤테이스 융합단백질, 이 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 Tat-슈퍼옥사이드 디스뮤테이스 융합단백질을 세포 내로 도입하는 방법 | (출원) 10-2000-43039호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 피리독신-5'-포스페이트옥시다아제에 대한 단일클론 항체 | (출원) 10-2000-58574호 | 2000년 10월 5일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 솔포르버스 솔파타리쿠스균의 글루탐산 탈수소효소에 대한 단일클론 항체 | (출원) 10-2000-58575호 | 2000년 10월 5일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 수송도메인, 수송도메인-화물분자복합체 및 그용도 | (출원) 10-2001-7487호 | 2001년 2월 15일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |

| 발명명칭 | 특허공고번호 출원(등록)번호 | 공고일자 출원(등록)일자 | 발명자 (출원인) | 출원국 | 비고 |
|--|-----------------------------|------------------|---------------------|-----|----|
| 세포침투성 카탈라제 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2001-14147호 | 2001년 3월 19일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투효율이 높은 구리이온 회복 슈퍼옥사이드 디스무테이스 융합단백질 및 그 제조 방법 | (출원) 10-2001-22102호 | 2001년 4월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 올리고라이신 수송도메인, 올리고라이신-화물분자복합체 및 그 용도 | 국제출원; 제 PCT/ KR01/00835호 | 2001년 5월 21일 | 최수영 외 (한림대학교) | PCT | 국제 |
| 식물세포 투과 도메인 및 식물세포 투과 도메인-화물분자 복합체 | (출원) 10-2001-46176호 | 2001년 7월 31일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 티에이티-피리독살카이네즈 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2002-28940호 | 2002년 5월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 티에이티-사이토신 디아미네이즈 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2002-0043927호 | 2002년 7월 25일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 항이노시톨 일인산 포수파타제 단일클론 항체 | (출원) 10-2002-48952호 | 2002년 8월 19일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 올리고라이신 수송도메인, 올리고라이신-화물분자복합체 및 그 용도 | 국제출원; 10/333,578 | 2003년 1월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 미국 | 국제 |
| 세포침투효율을 향상시킨 수송도메인-목표단백질-수송도메인 융합단백질 및 용도 | 국제출원; PCT/KR03/00490 호 | 2003년 3월 13일 | 최수영 외 (한림대학교) | PCT | 국제 |
| 세포침투 효율을 향상시킨 수송도메인-니트로리덕타제 융합단백질 및 그 용도 (I) | (출원) 10-2003-0041158 호 | 2003년 6월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투 효율을 향상시킨 수송도메인-니트로리덕타제 융합단백질 및 그 용도 (II) | (출원) 10-2003-0045670 호 | 2003년 6월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 수송도메인- p53 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2003-0045671 호 | 2003년 7월 7일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| HIV-2 Tat 수송도메인, 수송도메인-화물분자 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2003-0066132 호 | 2003년 9월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 티에이티-박테리아 사이토신 디아미네이즈 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2003-0066620 호 | 2003년 9월 25일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 올리고라이신 수송도메인, 올리고라이신-화물분자복합체 및 그 용도 | (출원) P2004-548119 | 2004년 3월 25일 | 최수영 외 (한림대학교) | 일본 | 국제 |
| 세포도입성 보톡스 융합단백질 | (출원) 2004-66003호 | 2004년 8월 20일 | 최수영 외 (BioBud 외) | 한국 | |
| 계; 특허등록 7건, 특허출원 24건 | | | | | |

* 위의 특허등록 및 출원외에 본과제와 간접적으로 관련이 있는 특허출원이 10건 더 있음

<별지 2> 논문게재 및 학술대회발표 실적

○ 논문게재 실적 (NRL 지원 명기 되어있는 논문실적)

| 국내/ 외 구분 | 학술지명 | 논문제목 | 게재 연월 일 | 권(호) | 발 행 기 관 | 국명 | SCI 게재 여부 | IF | 교신 저자 여부 |
|----------------|----------------------------------|---|---------------|----------------|------------------|----|-----------------|-------|----------------|
| 국외 | <i>Eur. J. Biochem.</i> | Hman brain GABA transaminase; Genomic organization, Tissue distribution and Molecular expression | 2000 | 267, 5601-5607 | | 미국 | SCI | 3.001 | ○ |
| 국외 | <i>FEBS Lett.</i> | Transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells | 2000 | 485, 163-167 | | 미국 | SCI | 3.609 | ○ |
| 국외 | <i>Anatomia Histol. Embryol.</i> | Comparative studies on the distribution of glutamate transporters in the retinae of the Mongolian gerbil and the rat | 2000 | 29, 381-383 | | 미국 | SCI | 0.709 | ○ |
| 국내 | <i>J. Microbiol. Biotech.</i> | Production and characterization of monoclonal antibodies to glutamate dehydrogenase thermophile <i>Sulfolobus solfataricus</i> | 2000 | 10, 587-594 | | 한국 | SCI | 1.202 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Efficient intracellular delivery of GFP by homeodomains of <i>Drosophila</i> Fushi-tarazu and Engrailed proteins | 2000 | 10, 728-732 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>J. Microbiol. Biotech.</i> | Generation and characterization of the cell permeable green fluorescent protein mediated by a basic domain of human immunodeficiency virus type I Tat | 2000 | 10, 797-804 | | 한국 | SCI | 1.202 | ○ |
| 국내 | <i>J. Biochem. Mol. Biol.</i> | Expression of human immunodeficiency virus type I Tat proteins in <i>E.coli</i> and application to study Tat function | 2000 | 33, 337-343 | | 한국 | SCIE | 0.952 | ○ |
| 국외 | <i>J. Neurochem.</i> | Brain succinic semialdehyde dehydrogenase; identification of reactive lysyl residues labeled with pyridoxal-5'-phosphate | 2001 | 76, 919-925 | | 미국 | SCI | 4.825 | ○ |
| 국외 | <i>Free Radic. Biol. Med.</i> | Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain and arginine rich peptides into mammalian cells | 2001 | 31, 1509-1519 | | 미국 | SCI | 5.063 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Molecular cloning and functional expression of bovine brain GABA transaminase | 2001 | 12, 91-96 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Efficient intracellular delivery of an exogenous protein GFP with genetically fused basic oligopeptides | 2001 | 12, 267-271 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>J. Skin Barrier Res.</i> | Penetration of a Tat-superoxide dismutase fusion protein into skin | 2001 | 3, 55-61 | | 한국 | | | ○ |
| 국외 | <i>Brain Res.</i> | Immunohistochemical studies of brain pyridoxine-5-phosphate oxidase. | 2002 | 925, 159-168 | | 미국 | SCI | 2.474 | ○ |
| 국외 | <i>Neurochem. Int.</i> | TAT-Mediated Delivery of Human Glutamate Dehydrogenase into PC12 cells. | 2002 | 41, 37-42 | | 미국 | SCI | 3.261 | ○ |
| 국외 | <i>J. Gen. Virol.</i> | Mutational analysis of an HIV-1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. | 2002 | 83, 1173-1181 | | 미국 | SCI | 3.036 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Poduction of monoclonal antibodies and immunohistochemical studies of brain <i>myo</i> -Inositol monophosphate phosphatase | 2002 | 13, 21-27 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |

| 국내/ 외 구분 | 학술지명 | 논문제목 | 게재 연월 일 | 권(호) | 발 행 기 관 | 국명 | SCI 계 여부 | IF | 교 신 저 자 여부 |
|----------------|------------------------------------|--|---------------|------------------|------------------|----|----------------|-------|------------------------|
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | 9-polylysine protein transduction domain; Enhanced transduction efficiencies of superoxide dismutase into mammalian cells and skin | 2002 | 13, 202-208 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Transduction efficacy of HIV-1 Tat-superoxide dismutase is enhanced by copper ion recovery of the fusion protein | 2002 | 13, 334-340 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Human liver Catalase; Molecular Gene Cloning, Expression and Characterization of its Monoclonal Antibodies. | 2003 | 15, 381-386 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Kor. J. Physiol. Pharmacol.</i> | Transduction of Tat-Superoxide Dismutase into Insulin-producing MIN6N Cells Reduces Streptozotocin-induced Cytotoxicity | 2003 | 7, 163-168 | | 한국 | | | X |
| 국내 | <i>Exp. Mol. Med.</i> | Human glutamate dehydrogenase is immunologically distinct from that of other mammalian orthologues | 2003 | 35, 249-256 | | 한국 | SCI | 1.373 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Tat-C3 exoenzyme inhibits association of zymosan particles, phagocytosis, Adhesion, and complement binding in macrophage J774A.1 cells | 2003 | 16, 216-223 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>J. Biochem. Mol. Biol.</i> | Molecular Gene Cloning, Expression and Characterization of Bovine Brain Glutamate Dehydrogenase | 2003 | 36, 545-551 | | 한국 | SCIE | 0.952 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Ginsenosides enhance the transduction efficiency of Tat-superoxide dismutase into mammalian cells and skin | 2003 | 16, 402-406 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Enhanced transduction efficiency by fusing HIV-1 Tat protein transduction domain (PTD) at both ends of heterologous protein | 2003 | 16, 385-391 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국외 | <i>Free Radic. Biol. Med.</i> | HIV-1 Tat-Mediated Protein Transduction of Cu,Zn-Superoxide Dismutase into Pancreatic Cells <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i> | 2004 | 37, 339-349 | | 미국 | SCI | 5.063 | ○ |
| 국외 | <i>Free Radic. Biol. Med.</i> | <i>In Vivo</i> Protein Transduction: Biologically active PEP-1-superoxide dismutase fusion protein efficiently protects against ischemic insults | 2004 | 37, 1656-1669 | | 미국 | SCI | 5.063 | ○ |
| 국내 | <i>Exp. Mol. Med.</i> | Transduction of Yeast Cytosine Deaminase Mediated by HIV-1 Tat Basic Domain into Tumor Cells Induces Chemosensitivity to 5-Fluorocytosine | 2004 | 36, 43-51 | | 한국 | SCI | 1.373 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Intracellular delivery of p53 fused to the basic domain of HIV-1 Tat | 2004 | 17, 353-359 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Site-directed Mutagenesis of Human Brain GABA Transaminase: Lysine-357 involved in cofactor binding at the active site | 2004 | In press | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Human Brain GABA transaminase: Cysteine 321 residue involved in intersubunit cross-linkage between its two subunits | 2004 | 18, 214-219 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국외 | <i>Eur. J. Biochem.</i> | Brain succinic semialdehyde dehydrogenase; Reactions of sulfhydryl residues connected with catalytic activity | 2004 | In Press | | 미국 | SCI | 3.001 | ○ |
| | | 계 : 32 건수 | | | | | | | |

○ 학술회의 발표 실적

| 학술회의 명칭 | 제 목 | 계제연월일 | 호 | 발행기관 | 국명 |
|---|--|-------|-----|------------|----|
| Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology | Efficient intracellular delivery of an exogenous GFP fused with protein transduction domains at both termini | 2003 | 169 | 한국분자세포생물학회 | 한국 |
| 의 82 편 | | | | | |

○ NRL 최종평가대상 과제 연구성과자료 통계

| 연구책임자 | 기관명 | 연구비 (천원) | | | 기술이전 (건수) | | | 기술료수입 (건수/억원) | | | | | | |
|-------|-------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--|
| | | 1단계 계 | 2단계 계 | 총계 | 1단계 계 | 2단계 계 | 총계 | 1단계 건수 계 | 1단계 수입 계 | 2단계 건수 계 | 2단계 수입 계 | 총 건수 계 | 총 수입 계 | |
| 최수영 | 한림대학교 | 444,837 | 870,000 | 1,314,837 | 2 | 3 | 5 | | | | | | | |

| 연구책임자 | 기관명 | 특허출원 (건수) | | | 특허등록 (건수) | | |
|-------|-------|-----------|----------|----|-----------|----------|----|
| | | 1단계 계 | 2단계 계 | 총계 | 1단계 계 | 2단계 계 | 총계 |
| 최수영 | 한림대학교 | 12 | 12 | 24 | | 7 | 7 |

| 연구책임자 | 기관명 | 논문게재 (건수) | | | | | | 학술발표 (건수) | | | | | |
|-------|-------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
| | | 1단계 국내계 | 1단계 국외계 | 2단계 국내계 | 2단계 국외계 | 총 국내 계 | 총 국외 계 | 1단계 국내계 | 1단계 국외계 | 2단계 국내계 | 2단계 국외계 | 총 국내 계 | 총 국외 계 |
| 최수영 | 한림대학교 | 7 | 5 | 14 | 6 | 21 | 11 | 41 | 2 | 39 | 1 | 80 | 3 |

<별지 3> 공공기능수행 실적

1. 기술이전 및 산업체와의 공동연구

| 업체명 | 기술명 | 주요내용 |
|----------------------|--|---|
| (주)바이오버드 (주)셀텍코리아 | 보톡신A펩타이드를 세포 및 생체조직에 용이하게 침투시키는 기술 | 현재 주름 치료주사제로 많이 쓰이고 있는 보툴리눔 단백질을 Tat- 또는 PEP- 침투벡터와 유전자 재조합 시켜 피부침투 능력이 갖는 융합단백질을 생산함으로써 주사시술이 아닌 도포시술용 주름치료제로개발하고자 함. |
| (주)LG 생활건강 화장품 주식회사 | ·Tat fusion technology를 이용한 vitamine A와 C의 피부침투 및 효능개선연구를 통한 신규 미백, 주름개선물질 개발 ·Tat-SOD 및 Tat-Catalase의 피부침투효과와 산화효과기술 | 본연구실에서 개발한 단백질 및 생리활성 화합물의 세포 또는 피부조직으로의 침투기술을 이용하여 항노화, 항주름 효능이 있는 Vitamin A 와 C를 Tat 또는 9Lys, 9Arg에 fusion 시켜 침투효율이 더 높은 기능성화장품을 개발하고, SOD, Catalase의 피부침투를 이용한 항노화, 항산화 기능의 노화억제 기능성 화장품을 개발 하고자 함 |
| (주)셀텍코리아 | 세포침투성 신규 penetratin vector 개발 및 이를 이용한 화장품원료생산 개발 기술 | 본 연구실에서 수행하고있는 단백질 및 생리활성 화합물의 세포 또는 피부조직으로의 침투기술중 침투효율을 높이는 새로운 vector 의 개발과 특히 피부침투효능이 있는 생리활성 단백질들을 피부질환 치료제제나 기능성 화장품의 원료로 개발하고자 함. |
| (주)바디텍 | Penetratin을 이용한 항체치료제 개발기술 | 침투 vector인 Tat-, PEP-, 9Lys-, 9Arg에 치료용 항체 (recombinant humanized Ab)로 conjugation 하여 tissue 내에서의 항체치료가 가능하게 함. |
| (주)제일제당 | EPO 유래 당단백질에 대한 단일클론항체 개발 | 생리적으로 적혈구 생성에 중요한 단백질인 EPO (erythropoetin)의 단일클론항체 및 세포주 개발 |

2. 국내외 연구자들과의 협력요청 및 공동연구

가. 해외 연구기관으로부터의 협력 요청

| 기관 (국가) | 성명 | 요청 |
|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Brown Univ., USA | Dr. J. Yeh | Tat-Peroxidase fusion |
| Univ. Cal. SanDiego, USA | Dr. Dowdy | Tat-SOD |
| Karolinska Institute, Sweden | Dr. M. Williams | Tat-myc fusion |
| Okayama Univ. Japan | Dr. Wuhaiyan | Tat-protein purification protocol |
| c/o Cellomics, Inc., USA | Dr. K. Giuliano | Tat-GFP fusion |
| Univ. North Carolina, USA | Dr. K.C.Oh | Tat-GFP |
| France | Dr. M. Rolli-Derkinderen | Tat-SOD |
| Univ. Illinois, USA | Dr. A.M. Nardulli | Tat-SOD |
| Univ. South Alabama, USA | Dr. M.A. Alexeyev | Tat-SOD, Tat-Cat |
| Uni. Bath, UK | Dr. A. Jacoby | Tat-GFP, 9Lys-GFP |
| Kent State Univ. USA | Dr. Z.Huang | Tat-GFP |
| National Institute of Cancer, Spain | Dr. J.R. Iriesta | Tat-GFP |
| Northern Arizona Univ. USA | Dr. C.A.Dyer | 9Arg-GFP, Tat-GFP |
| Univ. of the Pacific, USA | Dr.K.A.Jensen | Tat-GFP |
| Shanghai Medical Univ. China | Dr. L.Wang | Tat-vector |
| Univ. Texas, USA | Dr. A.Miller | Tat- Arg- vector |
| Univ. Pittsburg, USA | Dr. D. Blumberg | Human catalase gene |
| Washington Univ. USA | Dr. J.Fujita | Tat-SOD, 9Lys-SOD |
| Okajama Univ. Japan | Dr. W.Haiyan | Tat-SOD |
| The Hospital of Sick Children, Canada | Dr. D.M. deAndrade | Tat- vector |

나. 국내 연구와의 공동연구 및 협력요청

| 기 관 | 성 명 | 내 | 용 |
|-------------|-----|--------------------------------|--|
| 성균관대 | 이우성 | 식물세포로의 필요한 생리활성 단백질 침투 | 공동연구에 의하여 최초로 식물세포 및 조직에 단백질 침투성공 (특허출원) |
| KAIST | 김은준 | Shank 관련 단백질 | 신경시냅스 연구 |
| 고려대 | 김 준 | RPS 3 (UV endonuclease) | 자외선관련피부질환치료(DNA Repair) |
| 고려대 | 안병윤 | Antisense RNA | Hanta virus 복제시스템 구축 |
| 고려대 | 민본홍 | Arginine deiminase | 항암치료 효능 |
| 카톨릭 의대 | 유지창 | HIV nucleocapsid (HIV-NC) | 항 HIV agent 개발 |
| 연세대 | 신인재 | Tat-biotin 을 이용한 단백질 칩 제작 | 단백질 칩 제작 |
| 연세대 | 이원재 | Endotoxin | Intracellular signaling 연구 |
| 청주대 | 강정훈 | Tat-SOD 발현 | Human SOD 생리적 기능 연구 |
| 울산의대 | 황은유 | Tyrosine hydroxylase | Parkinson disease 치료 |
| 울산의대 | 조성우 | GDH | Multiple sclerosis |
| 아주의대 | 진병관 | GTP Cyclohydrolase | Parkinson disease 치료 (모델동물) |
| 강원대 | 김영명 | Nitric oxide synthase (NOS) | NO 관련 심혈관 질환 치료 |
| 한림대 | 박재봉 | C3 Transferase, Liposome 과의 결합 | 신호전달 및 Phagocytosis 연구 |
| 한림대 | 이재용 | Bax 단백질 침투 | 암세포에서의 cell signaling 연구 |
| 한림대 | 전종갑 | Tat-Bio-organic molecules link | Bio-organic molecules의 침투 응용 |
| 경북대 | 권오신 | PK, PO | Vitamin B6 dependent enzyme의 작용기전 연구 |
| 한림대 | 원무호 | SOD, Catalase | Brain Ischemia 예방 및 치료 (모델동물) |
| 카톨릭의대 (피부과) | 김태윤 | Catalase, SOD | 아토피 피부질환 및 자외선에 의한 피부손상 protection 연구 |
| 서울대학교 | 강봉균 | RLLP | Tat-, PEP-RLLP 제작 및 세포내 침투 |
| 이화여대 | 배윤수 | AHNAK | Tat-, PEP-AHNAK 제작 및 세포내 침투 |
| 카톨릭의대 | 민도식 | PLD | Tat-, PEP-PLD 제작 및 세포내 침투 |
| 서울의대 (신경과) | 성정준 | Tat-SOD | Tat-SOD를 이용한 ALS 연구 |
| 이화여대 | 최철희 | Tat-, PEP-SOD | Tat-, PEP-SOD 제공 |

특히 성균관대 이우성 박사팀과 공동연구에 의하여 최초로 식물세포 및 조직에 Tat-GFP를 침투 시키는데 성공하였으며 이 단백질 침투기술로 다음의 연구를 추진 할 예정이다.

- (1) Cell cycle controlling 단백질을 식물의 뿌리에 cell culture를 통하여 투입시켜 식물에서는 존재가 가능한 4배수체를 유도
- (2) Anthocyanin 색소 합성에 관련된 master gene의 transcription factor 단백질을 역시 뿌리에 투과시켜 이 색소의 합성을 유도

3. 세미나 및 심포지움을 통한 개발기술의 전파

가. 세미나 수행

- 2001. 9. 13 숙명여자대학교 생명과학과
- 2001. 9. 20 강원대학교 심혈관센터 SRC
- 2001. 9. 21 피부장벽학회 학술대회
- 2001. 9. 25 아주대학교 의과대학
- 2001. 10. 10 조선대학교 단백질소재 연구센터 ERC
- 2001. 10. 18 한국생화학분자생물학회 학술대회
- 2001. 10. 31 성균관대학교 생명과학과
- 2001. 11. 21 경북대학교 생명과학부
- 2001. 11. 30 경희대학교 식물대사 연구센터 SRC
- 2001. 12. 3 연세대학교 생화학과
- 2001. 12. 12 성균관대학교 의과대학
- 2001. 12. 12 카톨릭대학교 의과대학
- 2002. 1. 9 Bio-NRL 우수사례 발표회
- 2002. 3. 22 서울대학교 생명과학부
- 2002. 4. 22 서울대학교 의과대학
- 2002. 7. 4 서울대학교 병원 신경과
- 2002. 7. 8 포항공과대학교 생명과학부
- 2002. 7. 11 SK 연구소 의약품 신약개발 사업부
- 2002. 9. 3 동국대학교 한의과대학
- 2003. 4. 10 중소기업청 산학연 컨소시엄 Conference
- 2003. 10. 9 한국분자세포생물학회 다카라심포지움 초청연사
- 2004. 4. 16 이화여자대학교 분자생명과학부
- 2004. 5. 24 카톨릭대학교 의과대학

나. 세미나 및 심포지움 개최

(1) 세미나 개최 현황

제1회 : 1999. 9. 9.

제 목: Neuronal Cell Death in the Ischemic Brain and Spinal Cord

연 사: 원 무호 박사(한림대학교 의대 해부학 교실)

제2회 : 1999. 11. 25.

제 목: Free Radical-Generating Function of Cu,Zn-Superoxide Dismutase

연 사: 강 정훈 박사 (청주대 유전공학과)

제3회 : 2000. 4. 13.

제 목: Chemical Synthesis of The Human Glutamate Dehydrogenase

연 사: 안 지인 박사 (울산대학교 아산생명과학연구소)

제4회 : 2000. 6. 15.

제 목: Mechanism for inactivation of the KIP family CDK inhibitor genes in gastric cancer cells

연 사: 이 재용 박사 (한림대학교 의과대학 생화학교실)

- 제5회 : 2000. 9. 21.
 제 목: Identification of GTP binding site of human glutamate dehydrogenase using cassette mutagenesis and photoaffinity labeling
 연 사: 조 성 우 박사 (울산대학교 의과대학)
- 제6회 : 2000. 11. 2.
 제 목: Characterization of *Mycoplasma* Arginine Deiminase Expressed in *E. coli* and Inhibitory Regulation of Nitric Oxide Synthesis
 연 사: 민 본 홍 박사 (고려대학교 의과대학 약리학교실)
- 제7회 : 2000. 12. 14.
 제 목: The coenzyme thiamine pyrophosphate inhibits self-splicing of primary transcripts of the phage T4 thymidylate synthase gene
 연 사: 박 인 국 박사 (동국대학교 응용생물학과)
- 제8회 : 2001. 4. 12.
 제 목: Transgenic tomato plants overexpressing both Cu/Zn superoxide dismutase and catalase in chloroplasts confer improved resistance against paraquat-induced oxidative stress
 연 사: 이 우 성 박사 (성균관대학교 생명과학과)
- 제9회 : 2001. 5. 24.
 제 목: Human rpS3/UV endonuclease III complements XP-D cells in vitro; Characterization of endonuclease activity of rpS3
 연 사: 김 준 박사 (고려대학교 생명공학원)
- 제10회: 2001. 7. 5.
 제 목: In vitro gene-transferring capability of noble cationic lipids
 연 사: 박 용 석 박사 (연세대학교 보건과학대학)
- 제11회: 2001. 9. 20.
 제 목: Development of an anti-angiogenic agent for the treatment of ocular diseases
 연 사: 이 성 호 박사 (주식회사 Eyegene 부설 연구소)
- 제12회: 2001. 11. 1.
 제 목: Next Generation Protein Drugs
 연 사: 오 명 석 박사 (제일제당 종합기술 연구소)
- 제13회: 2001. 11. 22.
 제 목: Microarrays as a systems related to functional genomics
 연 사: 박 종 훈 박사 (숙명여대 생명과학과)
- 제14회: 2001. 12. 6.
 제 목: Enhanced SMase and PLA2 activity with advancing age
 연 사: 김 성 수 박사 (중앙대학교 의과대학 해부학교실)
- 제15회: 2002. 9. 26.
 제 목: The Effects of ERK2 Residues on Differentiation in Response to

NGF Stimulation in PC12 Cells

연 사: 유 영 숙 박사 (KIST 생체대사연구센터)

제16회 : 2002. 10. 10.

제 목: The EphA8 Receptor Regulates the Boundary Formation, Cell Migration and Axon Guidance in the Developing Midbrain

연 사: 박 수 철 박사 (숙명여대 생명과학과)

제17회: 2002. 11. 7.

제 목: Human Papillomavirus E2 Downregulates the Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter

연 사: 최 준 호 박사 (KAIST 생물과학과)

제18회: 2002. 12. 5.

제 목: Identification of tumorigenesis and angiogenesis targets by functional proteomics and mass spectroscopy in Gastric cancer.

연 사: 고 정 현 박사(생명공학연구원)

제19회: 2003. 3. 20.

제 목: Beneficial Roles of Nitric Oxide in Human Diseases

연 사: 김 영 명 박사 (강원대학교 의과대학)

제20회: 2003. 4. 17.

제 목: Isolation and characterization of the HIV nucleocapsid protein variants

연 사: 유 지 창 박사 (카톨릭 의과대학)

제21회: 2003. 5. 22.

제 목: Capsaicin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis

연 사: 권 영 근 박사 (강원대학교 생명과학부)

(2) 심포지움 개최 현황

제1차 심포지움:

일시 : 2000년 1월 19일 (수) 오후 4시

장소 : 한림대학교 강의동 6층 노화생명과학세미나실

일정

4:00 - 4:30 Proteomics의 미래

김유삼 교수 (연세대 생화학과)

4:30 - 5:00 Functional Genomics를 이용한 신약개발의 추세

백용기 교수 (연세대 생화학과)

5:00 - 5:30 Small GTP-binding Proteins of Synaptic Vesicle Membranes

박재봉 교수 (한림대학교 의대 생화학교실)

5:30 - 5:40 종합 토론

제2차 심포지움:

일시 : 2001년 3월 16일 (수) 오후 4시

장소 : 한림대학교 강의동 6층 노화생명과학세미나실

일정

15:00 ~ 15:10 인사말 (최수영 교수 : 한림대학교 유전공학과)

- 심포지움 좌장 이 희 봉 교수(강원대학교 생화학과)
- 15:10 - 15:50 유전자 재프로그래밍
(임정빈 교수 : 서울대학교 미생물학과)
- 15:50 - 16:30 Reverse genetic approach for retinal degeneration in *Drosophila*
(윤재승 교수 : 경희대학교 유전공학과)
- 16:30 - 16:40 coffee Break
- 16:40 - 17:20 Requirement of mediator complex for gene-specific transcriptional activation during *Drosophila* larval brain development
(김영준 교수 : 연세대학교 생화학과)
- 17:20 - 18:00 종합토론

제3차 심포지움:

일시 : 2001. 12. 28. 금요일
장소 : 한림대학교 특성화사업단 세미나실
일정 : 심포지움 좌장; 이 희 봉 교수 (강원대학교 생명과학부)

- 15:00-16:00 Phagocytosis of apoptotic cells: role of avb5 integrin and the CrkII-Dock180-Rac1 complex.
김종일 교수 (한림대학교 의과대학 생화학교실)
- 16:00-17:00 Regulation of EphA8 expression by Pax5 in the mesencephalon.
박수철 교수 (한림대학교 환경생명과학 연구소)
- 17:00-18:00 Protein Penetration Technology for Clinical Therapy of Human Disease
최수영 교수 (한림대학교 유전공학과 단백질치료 국가지정연구실)
- 18:00-18:30 종합토론

제4차 심포지움 개최 현황:

일시; 2002 년 12월 19일 (목)
장소; 한림대학교 산학협력단 세미나실
일정;

- 16:00 - 16:10 ; 개회사 (최수영 국가지정연구실 연구책임자)
- 16:10 - 16:50 : Transduction of the p53 tumour suppressor protein mediated by HIV-1 Tat basic domain 발표 : 박 진 서 (한림대 생명과학부)
- 16:50 - 17:30 : Purification and characterization of a thermostable lipase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* 발표 : 이 희 봉 (강원대 생명과학부)
- 17:50 -18:30: Expression of endogenous insulin-like growth factor-1 immunoreactivity in the gerbil hippocampus after ischemic insult 발표 : 원 무 호 (한림대 의과대학)
- 18:30 - : 종합토론

기술 요약서

■ 기술의 명칭

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

■ 기술을 도출한 과제현황

| | | | | |
|----------|--|--------------------------------|--------|--|
| 과제관리번호 | 2000-N-NL-01-C-125 | | | |
| 과제명 | 질환치료를 위한 생리활성단백질의 세포내 침투기술 | | | |
| 사업명 | 국가지정연구실사업 | | | |
| 세부사업명 | | | | |
| 연구기관 | 한림대학교 | 기관유형 | 대 학 | |
| 참여기관(기업) | | | | |
| 총연구기간 | 2001년 9월 1일 ~ 2004년 8월 31일 (3년) | | | |
| 총연구비 | 정부 (870,000)천원 민간 (0)천원 합계 (870,000)천원 | | | |
| 연구책임자 1 | 성명 | 최 수 영 | 주민번호 | 531020-1047026 |
| | 근무기관 부서 | 한림대학교 유전공학과 | E-mail | sychoi@hallym.ac.kr |
| | 직위/직급 | 교 수 | 전화번호 | 033-248-2112 |
| 연구책임자 2 | 성명 | | 주민번호 | |
| | 근무기관 부서 | | E-mail | |
| | 직위/직급 | | 전화번호 | |
| 실무연락책임자 | 성명 | 최 수 영 | 소속/부서 | 한림대학교 유전공학과 |
| | 직위/직급 | 교 수 | E-mail | sychoi@hallym.ac.kr |
| | 전화번호 | 033-248-2112 | FAX | 033-241-1463 |
| | 주소 | (200 - 702) 강원도 춘천시 한림대학길 39 | | |

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

질환관련 생리활성 단백질을 세포 침투 vector에 융합시켜 세포 및 조직 (피부, 뇌, 각종 장기) 침투 후 이들이 질환 치료제 역할을 할 수 있는 단백질 치료기술로서 각종 피부질환 치료 효능이나 피부노화예방 효능이 있는 단백질을 치료제 또는 기능성화장품 제재로서 개발 할 수 있으며 각종질환 예를들어 당뇨병이나 뇌허혈시 단백질 치료법의 가능성을 제시해주고 있다. 또한, 수술시 출혈을 막기위해 혈관을 묶을 때 일어나는 허혈에 대한 조직손상을 사전에 차단할 수 있도록 예방조치를 할 수 있는 기술이다.

[기술적 특징]

- (1) 항산화효소인 SOD, catalase를 세포 침투 vector에 융합
- (2) 피부조직 침투 후 피부보호효과 및 단백질 활성의 증대
- (3) Tat-SOD, PEP-1-SOD, Tat-catalase의 피부침투 효과와 항산화효과를 확인하여 기능성화장품에 적용
- (4) Tat-SOD, PEP-1-SOD를 당뇨병이나 ischemia 치료 및 예방에 이용가능
- (5) PEP-1-BTx를 이용한 주사용이 아닌 도포용 주름제거 치료제로 개발가능

[용도 · 이용분야]

- (1) 기능성 화장품의 개발가능
- (2) 단백질 치료제로의 개발가능 (노화, 허혈, 당뇨병, 암, 피부질환 등...)
- (3) 도포용 피부주름 치료제로의 개발가능

■ 기술의 분류

[기술코드] 400 (3 Digit) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- | | | | | |
|-------------------------------|---|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 정보산업 | <input type="checkbox"/> 기계설비 | <input type="checkbox"/> 소재 | <input type="checkbox"/> 정밀화학·공정 | <input type="checkbox"/> 생명과학 |
| <input type="checkbox"/> 원자력 | <input type="checkbox"/> 자원 | <input type="checkbox"/> 에너지 | <input type="checkbox"/> 항공·우주 | <input type="checkbox"/> 해양 |
| <input type="checkbox"/> 교통 | <input checked="" type="checkbox"/> 보건·의료 | <input type="checkbox"/> 환경 | <input type="checkbox"/> 기초·원천 | <input type="checkbox"/> 기타 |

[기술의 활용유형] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- | | | | |
|---|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> 신제품개발 | <input type="checkbox"/> 신공정개발 | <input type="checkbox"/> 기존제품개선 | <input type="checkbox"/> 기존공정개선 |
| <input type="checkbox"/> 기 타 () | | | |

[기술의 용도] (복수 선택(√로 표시)가능합니다)

- | | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|--|--------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 기계설비 | <input type="checkbox"/> 부품소자 | <input checked="" type="checkbox"/> 원료재료 | <input type="checkbox"/> 소프트웨어 |
| <input type="checkbox"/> 가공처리기술 | <input type="checkbox"/> 자동화기술 | <input type="checkbox"/> 불량률 감소 등 현장애로기술 | |
| <input type="checkbox"/> 제품설계기술 | <input type="checkbox"/> 공정설계기술 | <input type="checkbox"/> 기 타 () | |

■ 산업재산권 보유현황 (기술과 관련한)

특허목록 (별지 1) 참조

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. SN-50 vectors

SN-50 vector는 HIV-1 Tat vector처럼 핵과 세포질에 침투되지만, 핵과 세포질에 각각 침투되는 protein transduction domain (PTD) sequence를 각각 가지고 있다. 따라서, 각 단백질의 특성에 따라 핵과 세포질에 단백질을 침투시키는데 큰 장점을 지니고 있는 vector이다.

SN-50 : AAVALLPAVLLALLAPVQRKRQKLMP

가. 핵으로 침투되는 (PTD) sequence : VQRKRQKLMP

나. 세포질로 침투되는 (PTD) sequence : AAVALLPAVLLALLAP

2. Cyclosporine A conjugated fusion protein

Cyclosporine A는 광범위한 염증관련 피부질환에 대한 치료제로서 널리 사용되고 있는 물질이지만 피부조직으로 침투가 안되어 직접적인 치료의 어려움을 지니고 있다. Rothbard 그룹은 Cyclosporine A에 HIV-1 Tat vector (7Arg)을 융합시켜 세포 및 조직내 침투함으로써 직접적인 치료제로의 anti-inflammation 효능을 확인하였다.

3. 이 외에 다양한 물질들을 HIV-1 Tat vector에 융합시켜 질환에 직접적인 치료제로서의 가능성을 확인하는 논문들이 발표되었다.

가. Tat-GDNF (Glial cell line-derived neurothrophic factor), Tat-Bcl-2 and FNK Ischemia 동물모델에서 세포사를 막아주는 다양한 물질들 중에서 GDNF, Bcl-2, FNK를 이용하여 확인한 결과 hippocampus에 존재하는 신경세포의 세포사를 protection 하거나 dealy하는 탁월한 결과들이 보고되어 단백질 치료제로서의 가능성을 제시하였다.

나. Tat-ARC (Apoptosis Receptor with Caspase recruitment domain)

Tat-ARC를 이용하여 ischemia 및 referfusion에 의한 심질환에 미치는 효과를 확인한 결과 brain에서 뿐 아니라 heart에서도 탁월한 보호효과가 관찰되어 다양한 질환에서의 단백질치료제로의 가능성을 제시하였다.

제 7 장 참고문헌

1. Ahn, J.Y., Cho, E.H., Lee, K.S., Choi, S.Y., Cho, S.W. *JBMB* 32, 515-520 (1999)
2. Anderson WF. Prospects for human gene therapy. *Science* 226, 401-409 (1984)
3. Choi, K.S., Lee, B.R., Sun, H.J., Kwon, H.Y., Park, J., Lee, K.S., Cho, J.H., Choi, S.Y. *The Korean Journal of Gerontology* 9, 1-6 (1999)
4. Choi, S.Y., Jin, L.H., Bahn, J.H., Kim, A.Y., Kim, H.S., Kim, J.A., Lee, Y.J., Jang, S.H., Ryu, J., Park, J., Eum, W.S., Kwon, H.Y., Kang, T.C., Won, M.H., Kang, J.H. *The Journal of Skin Barrier Research* 3, 55-61 (2001)
5. Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunisen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. *J Biol Chem* 271, 18188-18193 (1996)
6. Elliott, G., O'Hare, P. *Cell* 88, 223-233 (1997)
7. Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., Fujita, S., Hayakawa, T., Takeda, K., Hasegawa, M., Nakanishi, M. *J Biol Chem* 276, 26204-26210 (2001)
8. Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B., Barsoum, J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 664-8 (1994)
9. Fernandez, T., Bayley, H. *Nature Biotechnol.* 16, 418-420 (1998)
10. Giedroc, D.P., Keravis, T.M., Staros, J.V., Ling, N., Wells, J.N., Puett, D, *Biochemistry* 24, 1203-1211 (1985)
11. Hahn, K., Jeon, M.J., Kim, K.A., Park, J., Choi, S.Y. *Molecules and Cells* 10, 728-732 (2000)
12. Hahn, K., Jeon, M.J., Kim, S.H., Ki, D.W., Bahn, J.H., Lee, K.S., Park, J., Choi, S.Y. *Molecules and Cells* 12, 267-271 (2001)
13. Kock, H., Harris MP, Anderson SC, Machermer T, Hancock W, Sutjipto S, Wills KN, Gregory RJ, Shepard HM, Westphal M, Maneval DC, *Int J Cancer*, 67, 808-15 (1996)
14. Kwon, H.Y., Lim, B.H., Park, H.S., Lee, Y.L., Lee, E.H., Choi, S.Y., Park, H.J. *JBMB* 31, 274-280 (1998)
15. 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. *FEBS Letters*, 485, 163-167 (2000)
16. Li L, Li X, Francke U, Cohen SN. *Cell* 88, 143-54 (1997)
17. Loskota WJ, Lomax P, Rich ST, *Epilepsia*, 15, 109-19 (1974)
18. Mukhopadhyaya A, Barbieri AM, Funato K, Roberts R, Stahl PD, *J. Cell Biol.* 136, 1227-1237 (1997)

19. Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, Dowdy SF. *Nat Med* 4, 1449-1452 (1998)
20. Park, J., H. Lee, Y. Lee, Y.H. Kang, H. Rhim and S.Y. Choi *JBMB* 33, 337-343 (2000)
21. Park, J., Park, K.A., Ryu, J., Choi, E.Y., Lee, K.S., Choi, S.Y. *J. Microbiol. Biotech.* 10, 797-804 (2000)
22. Park, J.B., Farnsworth, C.C., Glomset, J.A., *J Biol Chem* 272, 20857-20865 (1997)
23. Park, J., Morrow, C.D. *J Virol* 66, 6304-6313 (1992)
24. Scopes, R.K., Protein purification, principle and practice, third ed., Springer-Verlag, New York, 1993.
25. Snyder, E.L, Dowdy, S.F. *Curr Opin Mol Ther.* 3, 147-152 (2001)
26. Torchilin, V.P., Rammohan, R., Weissig, V., Levchenko, T.S. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 8786-8791 (2001)
27. Vives, E., Brodin, P., Lebleu, B. *J Biol Chem* 272, 16010-16017 (1997)
28. Vocero-Akbani, A., Chellaiah, M.A., Hruska, K.A., Dowdy, S.F. *Methods Enzymol.* 332, 36-49 (2001)
29. Lee, W., Kwon, H.Y., Park, J., Choi, S.Y., Lee, K.S. *Journal of Toxicology and Public Health* 15, 363-367 (1999)
30. Lee, W.H., Lee, H.S., Kwon, H.Y., Park, J., Choi, S.Y., Lee, K.S. *Environmental Mutagens and Carcinogens* 19, 112-115 (1999)
31. Lee, H.J., Ryu, J., Kim, K.A., Lee, K.S., Lee, J.Y., Park, J.B., Park, J., Choi, S.Y. *Experimental Molecular Medicine* 36, 43-51 (2004)
32. Kilic, U., Kilic, E., Dietz, G.P.H., Bahr, M. *Stroke* 34, 1304-1310 (2003)
33. Asoh, S., Ohsawa, I., Mori, T., Katsura, K.I., Hiraide, T., Katayama, Y., Kimura, M., Ozaki, D., Yamamata, K., Ohta, S. *Proc Natl Acad Sci USA,* 99, 17107-12 (2002)
35. Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R., Hawiger, J. *J Biol Chem* 270, 14255-58 (1995)
36. Gustafsson, A.B., Sayen, M.R., Williams, S.D., Crow, M.T., Gottlieb, R.A. *Circulation* 106, 735-39 (2002)
37. Dolgilevich, S., Zaidi, N., Song, J., Abe, E., Moonga, B.S., Sun, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 505-509 (2002)
38. Tseng, Y.L., Liu, J.J., Hong, R.L. *Mol. Pharmacol.* 62, 864-872 (2002)
39. Tung, C.H., Mueller, S., Weissleder, R. *Bioorgan. Med. Chem.* 10, 3609-3614 (2002)
40. Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., Divita, G. *Nuclein Acid Res.*

- 25, 2730-2736 (1997)
41. Morris, M.C., Chaloin, L., Heitz, F., Divita, G. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 461-466 (2000)
 42. Lundberg, M., Wikstrom, S., Johansson, M. *Mol. Ther.* 8, 143-150 (2003)
 43. Cashman, S.M., Morris, D.J., Kumer-Singh, R. *Mol. Ther.* 8, 130-142 (2003)
 44. Ho, A., Schwarze, S.R., Mermelstein, S.J., Waksman, G., Dowdy, S.F. *Cancer Res.* 61, 474-477 (2001)
 45. Eum, W.S., Choung, I.S., Kim, A.Y., Lee, Y.J., Kang, J.H., Park, J., Lee, K.S., Kwon, H.Y., Choi, S.Y. *Mol. Cells* 13, 334-340 (2002)
 46. Kim, D.W., Eum, W.S., Jang, S.H., Yoon, C.S., et al. *Mol. Cells* 16, 402-406 (2003)
 47. Eum, W.S., Choung, I.S., Li, M.Z., Kang, J.H., Kim, D.W., Park, J., Kwon, H.Y., Choi, S.Y. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 339-349 (2004)
 48. Eum, W.S., Kim, D.W., Hwang, I.K., Yoo, K.Y., et al. *Free Radic. Biol. Med.* In press (2004)

양식 4-1

자체평가의견서

1. 과제현황

| | | | | | |
|---------------------|----------------------------|---------------|---------|-----------------|---------|
| | | 과제코드 | | M1-9911-00-0025 | |
| 사업구분 | 국가지정연구실사업 | | | | |
| 연구분야 | 400 | 411 | 과제구분 | | 단위 |
| 사업명 | 국가지정연구실사업 | | | | 주관 |
| 총괄과제 | | | 총괄책임자 | | |
| 과제명 | 질환치료를 위한 생리활성단백질의 세포내 침투기술 | | 과제유형 | (기초, 응용, 개발) | |
| 연구기관 | 한림대학교 | | 연구책임자 | 최수영 | |
| 연구기간 연구비 (천원) | 연차 | 기간 | 정부 | 민간 | 계 |
| | 1차년도 | 2001.9-2002.8 | 300,000 | | 300,000 |
| | 2차년도 | 2002.9-2003.8 | 285,000 | | 285,000 |
| | 3차년도 | 2003.9-2004.8 | 285,000 | | 285,000 |
| | 계 | | 870,000 | | 870,000 |
| 참여기업 | | | | | |
| 상대국 | | | 상대국연구기관 | | |

2. 평가일 : 2004년 11월 30일

3. 평가자(연구책임자) :

| | | |
|-------|----|-----|
| 소속 | 직위 | 성명 |
| 한림대학교 | 교수 | 최수영 |

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본자료가 전문가 및 전문기관 평가시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약

최수영

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

최근의 인체의 다양한 질환이 세포 단백질의 비정상적 활성화에 기인한다는 사실이 알려짐에 따라 이들 생리활성 단백질의 세포내로의 직접전달 기술이 매우 중요하고 개발되어야 할 과제이다. 그동안 물리적 처리방법이나 화학적이거나 생물학적으로 세포에 pore를 형성시키는 방법, 단백질 carrier를 이용하는 방법, 그리고 liposome, 세포-세포 융합방법 등이 있으나 모두 문제점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 다양한 단백질 침투 signal peptide를 목표단백질에 융합시켜 효율높은 침투 vector를 개발하였다. 또한 단백질 세포전달영역(Protein Transduction Domain)인 HIV-1 Tat 단백질의 basic domain을 침투 signal로 이용할때는 목표단백질을 denaturation 시켜서 침투 시켰으나 새로운 PEP-1 signal peptide를 개발하여 PEP-1-목표단백질의 경우 단백질의 3차구조를 유지시킨 상태의 intact protein을 침투시킬수 있는 획기적인 vector를 개발함으로써 단백질 치료법의 가능성을 더 높여준 결과를 얻을수 있었다. 개발된 침투 vector를 이용하여 다양한 질환 관련 목표 단백질들의 유전자를 조작하여 침투 vector와의 융합단백질을 발현 정제하였으며, 이 융합기술을 개발함으로써 노화관련 항산화 효소들, 신경질환인 간질병, 파킨슨병, Ischemia에 관련되는 효소들, 암관련 단백질들, 유전병, 당뇨병 등에 관련되는 단백질들의 유전자를 Tat 또는 PEP-1 vector에 융합시켜 단백질을 발현시킨 후 이를 세포 또는 조직내로 침투 시켰다. 특히 항산화 효소인 SOD, catalase의 복강주사를 통한 각 신체 장기(뇌, 폐, 신장, 비장, 근육, 피부 등)로의 침투와 침투된 효소가 활성화를 가지며 ischemia와 당뇨병 모델동물을 이용하여 이들 침투된 SOD, Catalase가 신경세포사와 췌장 β -세포의 파괴를 막아준다는 연구결과는 ROS 관련질환(노화, 신경질환, 당뇨병 등)치료에 획기적인 연구 결과로 평가된다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

인간의 질병을 전통적인 약제로 치료하는 대신 유전 물질이나 유전물질의 산물인 단백질을 세포내로 전달하여 치료하는 것이 유전자 치료법이나 단백질 치료법의 핵심이다. 최근에는 다양한 인체의 질환이 세포 단백질의 비정상적 활성화에 기인한다는 사실이 알려짐에 따라 이들 단백질의 활성을 조절함으로써 치명적인 인체질환을 치료할 수 있는 약제의 개발이 전 세계적으로 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 펩타이드 및 단백질은 다른 화합물에 비하여 특정 생리작용에 대한 선택성 및 효능성이 탁월함에도 불구하고 세포 내부로 직접 전달될 수 없는 약점 때문에 효과적인 약제로서의 실용화가 현실적으로 어려운 실정이다.

이러한 문제를 해결하기 위하여 중요한 생리활성을 갖는 다양한 생체 기능 단백질들을 세포내로 효율적으로 침투시키는 기술 (Protein Penetration Technology)을 개발함으로써 많은 질환들을 직접적이고 효율적으로 치료할 수 있는 획기적인 단백질 치료법을 실용화할 수 있는 파급효과가 있을 것으로 기대된다. 특히 항산화 효소들인 SOD와 catalase의 각 장기조직으로의 침투 성공 및 ischemia와 당뇨병 모델동물에 대한 효능 검증은 ROS (Reactive oxygen species)관련 각종 질환들(예: 뇌허혈, 파킨슨병, 당뇨병 등)에 대한 단백질 치료법 실용화에 파급효과가 클 것이다. 또한 피부로의 침투를 통하여 노화예방용 기능성 화장품 개발에도 상용화할 수 있을 것이다. 또한 피부주름 제거용 단백질(*Botulinum toxin*)의 연구결과는 앞으로 주사용 주름치료법을 도포용 치료법으로 전환시킬수 있을 것이며 피부 주름개선용 Vit C, Vit A 등의 Tat과의 link는 생리활성 유기화합물들의 기능성화장품 개발에 큰 파급효과를 줄 것이다. 또 다른 파급효과로 기초연구분야로서 질환의 기전연구, 약물전달연구 및 단백질의 기능연구에도 파급효과가 있을 것으로 기대된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구에서 개발된 단백질 침투기술은 안전성 및 효율성이 검증되지 않은 유전자 치료법과 많은 부작용을 안고 있는 간접적 약물 치료방법의 단점을 보완하는 직접적 치료방법이며 부작용을 최소화할 수 있는 핵심기술이다. 이 기술은 단백질뿐만 아니라 다른 생체분자 (organic compound, oligonucleotides, peptides 등)를 접합하여 세포내로 이동시킬 수 있다. 따라서 이러한 특성을 기초로 하여 세포내 침투효율성을 증가시키고, 대상세포를 다양화시킬 수 있는 기초연구가 필요하며, 동물 및 임상실험을 통한 응용 기술의 확립이 절실히 요구된다. 이 기술은 기존 또는 신생 단백질을 암, 신경질환, 유전병, 노화관련 질환치료에 응용시킬 수 있는 획기적인 핵심기술로서 질환 치료에 활용할 수 있을 것이다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구개발의 목표는 1) 침투효율 높은 Penetratin vector의 개발 2) Penetratin과 목표 단백질의 융합기술 개발 3) 융합 단백질의 생산 및 분리정제 기술 개발 4) 융합 단백질의 세포 및 조직내 침투 및 침투된 단백질의 생리활성 분석 5) 질환 모델동물을 이용한 침투된 단백질의 효능 검증 및 단백질 치료법의 가능성 탐색 부분으로 구성되어 있는데 모두 100% 달성하였고 특히 목표 단백질을 변성시키지 않고 3차구조를 유지시킨채 침투할수 있는 PEP-1 vector의 개발과 이를 이용한 PEP-1-SOD, PEP-Catalase의 ischemia 및 당뇨병 모델동물에서의 효능검증은 매우 획기적인 연구결과를 얻었으며 모든 연구 부분에 대해 초과달성을 이루었다. 이러한 연구수행 결과로 2001년에는 대통령 표창을 수상하였고 2004년 4월에 제14회 과학기술우수논문상을 수상하기도 하였다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 국가지정연구를 통해 특허등록 (7건), 특허출원 (24건) 및 국내외 논문 (32편)을 발표하였으며, 새로 개발된 기술의 상용화를 위하여 LG 생활건강화장품(주), (주) Cell Tech. Korea, (주) BodiTech Med. (주)BioBud, 등에서 세미나 및 기술자문을 수행하였으며 이 기술을 필요로 하는 국내의 많은 연구자들과 공동연구 및 vector 제공을 하였고 생명공학 회사들과 대학 및 연구소에서 본 기술의 상용화를 위한 세미나 초청을 받아 발표하였고 세미나 및 심포지움을 개최하는등 활발한 활동을 하였다. 또한 개발된 단백질 침투 vector 및 침투융합단백질을 국내의 많은 연구자들에게 제공하였다.

II. 연구목표 달성도

1. 특허등록 및 출원 목록 (본 과제와 직접 관련있는 특허현황)

| 발명명칭 | 특허공고번호 출원(등록)번호 | 공고일자 출원(등록)일자 | 발명자 (출원인) | 출원국 | 비고 |
|--|-------------------------|------------------|------------------|-----|----|
| 세포침투성 융합단백질, 이를 코딩하는 조합폴리뉴클레오타이드 및 발현벡터 | (등록) 374050호 | 2003년 2월 17일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-인간글루탐산 탈수소효소 융합단백질, 이 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 융합단백질을 세포내로 도입하는 방법 | (등록) 0379577호 | 2003년 3월 27일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-C3 트랜스페라제 융합단백질, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 Tat-C3 트랜스페라제를 이용한 단백질의 생리적 기능 분석방법 | (등록) 0379578호 | 2003년 3월 27일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 솔포로버스 솔파타리쿠스균의 글루탐산 탈수소효소에 대한 단일클론 항체 | (등록) 0412773호 | 2003년 12월 12일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 피리독신-5'-포스페이트옥시시다제에 대한 단일클론 항체 | (등록) 0412774호 | 2003년 12월 12일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 항이노시톨 일인산 포수파타제 단일클론 항체 | (등록) 0439586호 | 2004년 6월 29일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 슈퍼옥사이드 디스뮤티이스 융합단백질의 세포내 침투능력을 증가시키는 방법 | (등록) 445186호 | 2004년 8월 10일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 폴리라이신 수송 도메인, 폴리라이신 융합단백질, 이 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 이 융합단백질의 발현벡터 및 폴리라이신 융합단백질을 세포 내로 도입시키는 방법 | (출원) 10-2000-43022호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-인간글루탐산 탈수소효소 융합단백질, 이 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 융합단백질을 세포 내로 도입하는 방법 | (출원) 10-2000-43036호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 융합단백질, 이를 코딩하는 재조합폴리뉴클레오타이드 및 발현벡터 | (출원) 10-2000-43037호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-C3 트랜스페라제 융합단백질, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 Tat-C3 트랜스페라제를 이용한 로 단백질의 생리적 기능 분석방법 | (출원) 10-2000-43038 호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 Tat-슈퍼옥사이드 디스뮤티이스 융합단백질, 이 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 이 융합단백질의 발현벡터 및 이 Tat-슈퍼옥사이드 디스뮤티이스 융합단백질을 세포 내로 도입하는 방법 | (출원) 10-2000-43039호 | 2000년 7월 26일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 피리독신-5'-포스페이트옥시시다제에 대한 단일클론 항체 | (출원) 10-2000-58574호 | 2000년 10월 5일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 솔포로버스 솔파타리쿠스균의 글루탐산 탈수소효소에 대한 단일클론 항체 | (출원) 10-2000-58575호 | 2000년 10월 5일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 수송도메인, 수송도메인-화물분자복합체 및 그용도 | (출원) 10-2001-7487호 | 2001년 2월 15일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |

| 발명명칭 | 특허공고번호 출원(등록)번호 | 공고일자 출원(등록)일자 | 발명자 (출원인) | 출원국 | 비고 |
|--|-----------------------------|------------------|---------------------|-----|----|
| 세포침투성 카탈라제 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2001-14147호 | 2001년 3월 19일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투효율이 높은 구리이온 회복 슈퍼옥사이드 디스뮤티이스 융합단백질 및 그 제조 방법 | (출원) 10-2001-22102호 | 2001년 4월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 올리고라이신 수송도메인, 올리고라이신-화물분자복합체 및 그 용도 | 국제출원; 제 PCT/ KR01/00835호 | 2001년 5월 21일 | 최수영 외 (한림대학교) | PCT | 국제 |
| 식물세포 투과 도메인 및 식물세포 투과 도메인-화물분자 복합체 | (출원) 10-2001-46176호 | 2001년 7월 31일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 티에이티-피리독살카이네즈 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2002-28940호 | 2002년 5월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 티에이티-사이토신 디아미네이즈 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2002-0043927호 | 2002년 7월 25일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 항이노시톨 일인산 포수파타제 단일클론 항체 | (출원) 10-2002-48952호 | 2002년 8월 19일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 올리고라이신 수송도메인, 올리고라이신-화물분자복합체 및 그 용도 | 국제출원; 10/333,578 | 2003년 1월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 미국 | 국제 |
| 세포침투효율을 향상시킨 수송도메인-목표단백질-수송도메인 융합단백질 및 용도 | 국제출원; PCT/KR03/00490 호 | 2003년 3월 13일 | 최수영 외 (한림대학교) | PCT | 국제 |
| 세포침투 효율을 향상시킨 수송도메인-니트로리덕타제 융합단백질 및 그 용도 (I) | (출원) 10-2003-0041158 호 | 2003년 6월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투 효율을 향상시킨 수송도메인-니트로리덕타제 융합단백질 및 그 용도 (II) | (출원) 10-2003-0045670 호 | 2003년 6월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 수송도메인- p53 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2003-0045671 호 | 2003년 7월 7일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| HIV-2 Tat 수송도메인, 수송도메인-화물분자 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2003-0066132 호 | 2003년 9월 24일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 세포침투성 티에이티-박테리아 사이토신 디아미네이즈 융합단백질 및 그 용도 | (출원) 10-2003-0066620 호 | 2003년 9월 25일 | 최수영 외 (한림대학교) | 한국 | |
| 올리고라이신 수송도메인, 올리고라이신-화물분자복합체 및 그 용도 | (출원) P2004-548119 | 2004년 3월 25일 | 최수영 외 (한림대학교) | 일본 | 국제 |
| 세포도입성 보톡스 융합단백질 | (출원) 2004-66003호 | 2004년 8월 20일 | 최수영 외 (BioBud 외) | 한국 | |
| 계; 특허등록 7건, 특허출원 24건 | | | | | |

* 위의 특허등록 및 출원외에 본과제와 간접적으로 관련이 있는 특허출원이 10건 더 있음

2. 논문게재 및 학술대회 발표 실적 (NRL 지원 명기 되어있는 논문실적)

| 국내/ 외 구분 | 학술지명 | 논문제목 | 게재 연월 일 | 권(호) | 발 행 기 관 | 국명 | SCI 게재 여부 | IF | 교신 지자 여부 |
|----------------|----------------------------------|---|---------------|-------------------|------------------|----|-----------------|-------|----------------|
| 국외 | <i>Eur. J. Biochem.</i> | Hman brain GABA transaminase; Genomic organization, Tissue distribution and Molecular expression | 2000 | 267, 5601-5607 | | 미국 | SCI | 3.001 | ○ |
| 국외 | <i>FEBS Lett.</i> | Transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells | 2000 | 485, 163-167 | | 미국 | SCI | 3.609 | ○ |
| 국외 | <i>Anatomia Histol. Embryol.</i> | Comparative studies on the distribution of glutamate transporters in the retinae of the Mongolian gerbil and the rat | 2000 | 29, 381-383 | | 미국 | SCI | 0.709 | ○ |
| 국내 | <i>J. Microbiol. Biotech.</i> | Production and characterization of monoclonal antibodies to glutamate dehydrogenase thermophile <i>Sulfolobus solfataricus</i> | 2000 | 10, 587-594 | | 한국 | SCI | 1.202 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Efficient intracellular delivery of GFP by homeodomains of <i>Drosophila</i> Fushi-tarazu and Engrailed proteins | 2000 | 10, 728-732 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>J. Microbiol. Biotech.</i> | Generation and characterization of the cell permeable green fluorescent protein mediated by a basic domain of human immunodeficiency virus type I Tat | 2000 | 10, 797-804 | | 한국 | SCI | 1.202 | ○ |
| 국내 | <i>J. Biochem. Mol. Biol.</i> | Expression of human immunodeficiency virus type I Tat proteins in <i>E.coli</i> and application to study Tat function | 2000 | 33, 337-343 | | 한국 | SCIE | 0.952 | ○ |
| 국외 | <i>J. Neurochem.</i> | Brain succinic semialdehyde dehydrogenase; identification of reactive lysyl residues labeled with pyridoxal-5'-phosphate | 2001 | 76, 919-925 | | 미국 | SCI | 4.825 | ○ |
| 국외 | <i>Free Radic. Biol. Med.</i> | Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain and argine rich peptides into mammalian cells | 2001 | 31, 1509-1519 | | 미국 | SCI | 5.063 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Molecular cloning and functional expression of bovine brain GABA transaminase | 2001 | 12, 91-96 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Efficient intracellular delivery of an exogenous protein GFP with genetically fused basic oligopeptides | 2001 | 12, 267-271 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>J. Skin Barrier Res.</i> | Penetration of a Tat-superoxide dismutase fusion protein into skin | 2001 | 3, 55-61 | | 한국 | | | ○ |
| 국외 | <i>Brain Res.</i> | Immunohistochemical studies of brain pyridoxine-5-phosphate oxidase. | 2002 | 925, 159-168 | | 미국 | SCI | 2.474 | ○ |
| 국외 | <i>Neurochem. Int.</i> | TAT-Mediated Delivery of Human Glutamate Dehydrogenase into PC12 cells. | 2002 | 41, 37-42 | | 미국 | SCI | 3.261 | ○ |
| 국외 | <i>J. Gen. Virol.</i> | Mutational analysis of an HIV-1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. | 2002 | 83, 1173-1181 | | 미국 | SCI | 3.036 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Poduction of monoclonal antibodies and immunohistochemical studies of brain <i>myo</i> -Inositol monophosphate phosphatase | 2002 | 13, 21-27 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |

| 국내/외 구분 | 학술지명 | 논문제목 | 게재 연월 일 | 권(호) | 발행 기관 | 국명 | SCI 게재 여부 | IF | 교신 저자 여부 |
|---------|------------------------------------|--|---------|---------------|-------|----|-----------|-------|----------|
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | 9-polylysine protein transduction domain; Enhanced transduction efficiencies of superoxide dismutase into mammalian cells and skin | 2002 | 13, 202-208 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Transduction efficacy of HIV-1 Tat-superoxide dismutase is enhanced by copper ion recovery of the fusion protein | 2002 | 13, 334-340 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Human liver Catalase; Molecular Gene Cloning, Expression and Characterization of its Monoclonal Antibodies. | 2003 | 15, 381-386 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Kor. J. Physiol. Pharmacol.</i> | Transduction of Tat-Superoxide Dismutase into Insulin-producing MIN6N Cells Reduces Streptozotocin-induced Cytotoxicity | 2003 | 7, 163-168 | | 한국 | | | X |
| 국내 | <i>Exp. Mol. Med.</i> | Human glutamate dehydrogenase is immunologically distinct from that of other mammalian orthologues | 2003 | 35, 249-256 | | 한국 | SCI | 1.373 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Tat-C3 exoenzyme inhibits association of zymosan particles, phagocytosis, Adhesion, and complement binding in macrophage J774A.1 cells | 2003 | 16, 216-223 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>J. Biochem. Mol. Biol.</i> | Molecular Gene Cloning, Expression and Characterization of Bovine Brain Glutamate Dehydrogenase | 2003 | 36, 545-551 | | 한국 | SCIE | 0.952 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Ginsenosides enhance the transduction efficiency of Tat-superoxide dismutase into mammalian cells and skin | 2003 | 16, 402-406 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Enhanced transduction efficiency by fusing HIV-1 Tat protein transduction domain (PTD) at both ends of heterologous protein | 2003 | 16, 385-391 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국외 | <i>Free Radic. Biol. Med.</i> | HIV-1 Tat-Mediated Protein Transduction of Cu,Zn-Superoxide Dismutase into Pancreatic Cells <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i> | 2004 | 37, 339-349 | | 미국 | SCI | 5.063 | ○ |
| 국외 | <i>Free Radic. Biol. Med.</i> | <i>In Vivo</i> Protein Transduction: Biologically active PEP-1-superoxide dismutase fusion protein efficiently protects against ischemic insults | 2004 | 37, 1656-1669 | | 미국 | SCI | 5.063 | ○ |
| 국내 | <i>Exp. Mol. Med.</i> | Transduction of Yeast Cytosine Deaminase Mediated by HIV-1 Tat Basic Domain into Tumor Cells Induces Chemosensitivity to 5-Fluorocytosine | 2004 | 36, 43-51 | | 한국 | SCI | 1.373 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Intracellular delivery of p53 fused to the basic domain of HIV-1 Tat | 2004 | 17, 353-359 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Site-directed Mutagenesis of Human Brain GABA Transaminase: Lysine-357 involved in cofactor binding at the active site | 2004 | In press | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국내 | <i>Mol. Cells</i> | Human Brain GABA transaminase: Cysteine 321 residue involved in intersubunit cross-linkage between its two subunits | 2004 | 18, 214-219 | | 한국 | SCI | 1.128 | ○ |
| 국외 | <i>Eur. J. Biochem.</i> | Brain succinic semialdehyde dehydrogenase; Reactions of sulfhydryl residues connected with catalytic activity | 2004 | In Press | | 미국 | SCI | 3.001 | ○ |
| | | 계 : 32 건수 | | | | | | | |

3. 학술회의 발표 실적

| 학술회의 명칭 | 세 목 | 계재연 월일 | 호 | 발행기관 | 국 명 |
|---|--|-----------|-----|-------------|--------|
| Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology | Efficient intracellular delivery of an exogenous GFP fused with protein transduction domains at both termini | 2003 | 169 | 한국분자세포 생물학회 | 한국 |
| 의 82 편 | | | | | |

○NRL 최종평가대상 과제 연구성과자료 통계

| 연구책임자 | 기관명 | 연구비 (천원) | | | 기술이전 (건수) | | | 기술료수입 (건수/억원) | | | | | | |
|-------|-------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--|
| | | 1단계 계 | 2단계 계 | 총계 | 1단계 계 | 2단계 계 | 총계 | 1단계 건수 계 | 1단계 수입 계 | 2단계 건수 계 | 2단계 수입 계 | 총 건수 계 | 총 수입 계 | |
| 최수영 | 한림대학교 | 444,837 | 870,000 | 1,314,837 | 2 | 3 | 5 | | | | | | | |

| 연구책임자 | 기관명 | 특허출원 (건수) | | | 특허등록 (건수) | | |
|-------|-------|-----------|----------|----|-----------|----------|----|
| | | 1단계 계 | 2단계 계 | 총계 | 1단계 계 | 2단계 계 | 총계 |
| 최수영 | 한림대학교 | 12 | 12 | 24 | | 7 | 7 |

| 연구책임자 | 기관명 | 논문게재 (건수) | | | | | | 학술발표 (건수) | | | | | |
|-------|-------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
| | | 1단계 국내계 | 1단계 국외계 | 2단계 국내계 | 2단계 국외계 | 총 국내 계 | 총 국외 계 | 1단계 국내계 | 1단계 국외계 | 2단계 국내계 | 2단계 국외계 | 총 국내 계 | 총 국외 계 |
| 최수영 | 한림대학교 | 7 | 5 | 14 | 6 | 21 | 11 | 41 | 2 | 39 | 1 | 80 | 3 |

4. 수상실적

- (1) 대통령 표창 수상 (2001년 4월 21일)
- (2) 제 14회 과학기술 우수 논문상 수상 (2004년 4월 28일)

| 연도 | 수상명 | 수상내용 |
|--------------|-----------------------------|--|
| 2001. 4. 21. | 대통령 표창 (제 131773 호) | <ul style="list-style-type: none"> ○ 제34회 과학의 날을 맞아 과학기술부에서 과학기술 진흥유공자 추천을 해주어 수상하게 되었음. ○ 업적내용: 노화, 암, 신경질환, 유전병 등 인체질환 치료를 위한 생리활성단백질의 세포 및 조직내 침투기술을 이용한 단백질 치료법을 개발하였고, 부작용없는 새로운 항간질 치료제 개발공적을 인정받아 수상하게 되었음. |
| 2004. 4. 28. | 과학기술 우수논문상 (제 2004-66 호) | <ul style="list-style-type: none"> ○ 제14회 한국과학기술총연합회에서 과학기술우수논문으로 선정되어 수상하게 되었음. ○ 업적내용: 천연물인 인삼추출물 (gesenosides)을 이용하여 Tat-SOD의 세포 및 조직내 침투와 활성을 크게 향상시켜 유해산소로부터 세포 및 조직 손상의 보호를 인정받아 수상하게 되었음. |

5. 연구목표 달성도

| 목 표 | 세부 연구 목표 | 달성도 | 달 성 내 용 |
|---|--|-----------------------|--|
| <p>침투 효율 높은 Penetratin 의 개발</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. HIV-1 Tat 단백질 발현 및 세포내 침투능력 측정 2. HIV-1 Tat penetratin 발현 vector 제조 3. HIV-Tat basic domain의 mutagenesis를 이용한 효율성 향상 vector 개발 4. Homeodomain 발현 vector 제조 5. 다양한 단백질 침투 신호 peptide의 N-terminal, C-terminal, 양쪽으로의 삽입에 의한 개선된 침투 vector의 개발 6. 목표단백질을 3차구조상태로 운반시킬 수 있는 침투 vector인 PEP-1 vector 개발 | <p>100% 이상의 목표 달성</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. HIV-Tat의 72개와 86개의 a.a를 포함하는 단백질 유전자를 pTat vector에 subcloning 한 후, 과발현 시켰으며 이를 정제하여 transactivation 활성도와 endothelial cell 에서의 VCAM-1의 발현조절 양상을 관찰 하여 세포내 침투능력을 확인하였다. 2. HIV-Tat의 basic domain (11개 a.a 47-57번)을 deletion 시켜 4-10개의 a.a를 갖는 Tat vector를 각각 제작하여 침투효율성을 비교하였다. 그 중 9개 a.a (49-57)를 갖는 vector를 주로 실험에 사용하였다. 3. HIV-Tat의 basic domain (9개 a.a 49-57)에 proline을 1개, 2개, 3개가 첨가된 vector를 제조하였고, 9개 모두 lysine 또는 arginine으로 치환하여 9Lys-, 9-Arg-Tat vector를 제조 하였다. 4. Drosophila의 antennapedia homeodomain (Antp)을 갖는 pFtzHD와 pEn HD, ptnHD vector를 각각 제작하였다. pKnHD, pRnHD, Ptn7C, Ptn7MK, Ptn7WR, Ptn7WK, Ptn7WR 5. 다양한 vector에 reporter 유전자인 GFP를 삽입하였다. 또한 Tat의 위치에 따른 (N-, C- 또는 양쪽 terminal) vector를 제작하여 GFP를 삽입하였다. R9-GFP-Tat, K9-GFP-Tat Tat-GFP-Tat, ptn-GFP-Tat R9-GFP-R9, K9-GFP-R9 Tat-GFP-R9, ptn-GFP-R9 R9-GFP-K9, K9-GFP-K9 Tat-GFP-K9, ptn-GFP-K9 Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat HIV-2 Tat, pGEX-4T-Tat 6. 3차 구조상태로 단백질 운반 vector인 PEP-1 vector의 제조 (KETWWETWWTEWSQPKKKRKV) 이 sequence는 PTD domain을 함유하고 있는 signal peptide로서 세포내 침투를 위해서 SOD, Catalase 및 다양한 목표단백질들을 융합시켰다. |

| 목 표 | 세부 연구 목표 | 달 성 도 | 달 성 내 용 |
|---|---|-----------------------------------|--|
| <p>Penetratin 과 목표 단백질의 융합기술 개발</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. HIV-Tat penetratin과 reporter gene인 GFP와의 융합 2. Homeodomain과 GFP와의 융합 3. 침투효율 높은 다양한 penetratin vector와 질환 관련 목표단백질 유전자와의 융합 4. Organic compound와 Tat sequence의 link | <p>100% 이상의 목표 달성</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 다양한 HIV-1 Tat vector들과 GFP gene을 융합시켜 pTat-GFP vector를 제작하였고 또한 HIV-2 Tat-GFP 발현 vector를 제작하였다. 2. FtzHD, EnHD, ptnHD 부분과 GFP gene을 융합시켜 pFtzHD-GFP, pEnHD-GFP, ptnHD-GFP vector 및 deletion, mutation을 이용한 다양한 vector를 제작하였다. 3. 노화 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-SOD, 9Lys-SOD, Tat-CAT, 9Arg-CAT, Tat-BTx, PEP-1-SOD, PEP-1-CAT 4. 암 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-p53, Tat-p21, Tat-NR, Tat-CD, Tat-ADI, PEP-1-rpS3, Tat-HSP70, Tat-Bax. 5. 신경질환 관련 목표단백질 유전자와의 융합 PEP-1-GABA-T, PEP-1-GAD, Tat-GDH, PEP-1-SSADH 6. 선천성 대사이상유전병 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-PH, Tat-SSADH, Tat-GCH PEP-1-SSADH 7. 당뇨병 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-SOD, Tat-CAT, PEP-1-SOD, PEP-1-CAT 8. 신호전달 관련 목표단백질 유전자와의 융합 Tat-C3 TF, Tat-hGH 9. 뇌허혈 관련 표단백질 유전자와의 융합 Tat-SOD, Tat-CAT, PEP-1-SOD, PEP-1-CAT 10. 생리활성 organic compound와 link 및 발현 vector 제작 Tat-vitamin A Tat-vitamin C |

| 목 표 | 세부 연구 목표 | 달 성 도 | 달 성 내 용 |
|--|--|-----------------------|---|
| <p>융합 단백질의 생산 및 분리 정제기술 개발</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 융합단백질의 발현 2. 융합단백질의 발현최적조건 확립 및 발현된 융합단백질의 순수 분리 정제 및 확인 3. 융합발현단백질 확인을 위한 목표단백질에 대한 단항체 생산 | <p>100% 이상의 목표 달성</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 융합된 목표단백질들을 <i>E. Coli</i>에서 과대 발현시켰다. 10K, 9K, 8K, 7K, 6K-GFP 9R, 8R, 7R, 6R, 5R, 4R, 3R-GFP Tat-GFP, GFP-Tat, Tat-GFP-Tat Tat-SOD, SOD-Tat, Tat-SOD-Tat Ptn 7C-GFP, pEn 7C-GFP, pEve 7C-GFP, Ptn 7MR-GFP, Ptn7WR-GFP, Ptn 7WK-GFP Tat-SOD, Tat-Cat, 9Arg-Cat, Tat-Btx, Tat-CD, Tat-GDH, Tat-PK Tat-HSP70, Tat-Bax, Tat-hGH HIV-2 Tat-GFP, pGEX-4T Tat-GFP Tat-vitamin A and C 2. 융합된 목표단백질들은 <i>E. coli</i> cell 에서 발현시킨 후 Ni⁺⁺-affinity column으로 순수 분리 정제하였으며 이들은 각각의 항체를 이용하여 확인하였다. 3. 융합 발현 단백질들을 확인하기 위하여 그들에 대한 다음의 단항체를 각각 생산하였으며, 일부 생산중에 있다. |
| <p>융합 단백질의 세포 및 장기조직 내 침투 및 침투된 단백질의 생리활성 분석</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 융합 목표단백질들의 세포내 침투 확인 2. 융합단백질의 장기 조직내 침투 확인 3. 침투된 목표 단백질의 생리활성 분석 4. Organic compound의 세포 및 조직내 침투, 생리활성 분석 | <p>100% 이상의 목표 달성</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 융합목표단백질들을 다양한 세포 (HeLa, PC12, S2, Insulinoma cell 등)로 각각 침투시킨 후 Western blot으로 확인하였다. 2. 항산화효소인 Tat-SOD, 9Arg-CAT, PEP-1-CAT을 쥐의 복강에 주사한 후 이들 단백질들의 장기조직 (뇌, 폐, 심장, 비장, 근육, 신장) 내로의 침투를 immunohistochemistry 및 활성도 변화로 확인하였다. 3. 생리활성 및 목표단백질들의 세포내에서의 안정화유지 정도를 모두 측정하여 목표 단백질 침투를 성공적으로 수행하였다. 4. Tat-vitamin A, C를 세포 및 조직내로 침투시킨후 생리활성의 변화를 측정중에 있다. |

| 목 표 | 세부 연구 목표 | 달 성 도 | 달 성 내 용 |
|-------------------------------------|--|-----------------------|---|
| <p>융합 단백질의 고효율 침투조건 의 확립</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Tat-SOD 구리이온 회복방법에 의한 세포침투 효율 증가 2. 천연물인 인삼을 이용한 Tat-SOD의 세포침투 효율증가 3. Tat의 위치 (N- and/or C-terminal 및 양쪽 terminal)에 따른 세포침투 효율증가 | <p>100% 이상의 목표 달성</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Tat-SOD의 세포침투 효율을 증가시키기 위해 Tat-SOD를 구리이온으로 reconstitution 시킨 후 세포침투 효율의 증가를 확인하였다. 2. 천연물인 인삼추출물을 이용하여 세포침투 효율의 증가를 확인하였다. 3. Tat의 위치 (N- and/or C-terminal 및 양쪽 terminal)에 융합된 GFP를 이용하여 세포침투 효율의 증가를 확인 하였다. |
| <p>질환 동물 모델을 이용한 단백질 치료법 가능성 탐색</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 단백질 치료법의 실용화를 위한 질환모델 동물의 준비 2. SOD, CAT등의 융합단백질을 이용한 단백질 치료법 개발 가능성 탐색 | <p>100% 이상의 목표 달성</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 목표단백질을 이용한 단백질치료법의 실용화를 위하여 다음의 모델동물을 준비하였다. 당뇨병 모델동물 뇌허혈 모델동물 간질 모델동물 파킨슨씨병 모델동물 암유발 모델동물 2. 준비된 모델동물들을 이용하여 SOD 및 CAT이 당뇨병과 뇌허혈에 효능이 있다는 것을 확인하였다. 3. 파킨슨씨병, 암, 간질 동물모델을 이용하여 SOD, CAT, p53, NR, CD, GABA-T 등 융합단백질의 효능을 측정중에 있다. |

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

단백질의 세포내 침투를 향상시킬 수 있는 침투 penetratin vector 개발은 목표 단백질을 융합시킴으로써 임상적으로 질환치료를 위한 세포내로의 단백질 치료를 수행하기 위한 획기적인 연구결과로 평가된다. 본연구실에서 개발한 다양한 침투 signal peptide를 목표단백질의 N-과 C-말단 양쪽에 부착시킴으로써 침투 효율이 높게 증가된다는 결과와 단백질의 3차구조를 native한 상태로 유지시킨 채로 침투시킬 수 있는 새로운 PEP-1 vector의 개발은 단백질 치료법 개발에 매우 획기적인 연구 결과이다. 이러한 효율을 향상시킨 새로운 vector와 치료용 목표 단백질을 융합발현 시킨 세포내 침투 성공된 단백질 (예: 항산화효소 SOD, catalase)들을 이용하여 피부조직 및 장기조직(뇌, 폐, 신장, 비장, 근육 등...)으로의 침투를 성공시키고 ischemia 및 당뇨병 질환모델 동물을 이용하여 Tat-SOD, PEP-1-SOD 등이 뇌허혈에 의한 뇌세포사나 췌장 β -세포 파괴를 막아준다는 연구결과는 ROS 관련 각종 질환(허혈, 파킨슨병, 당뇨병 등)에의 단백질 치료에 획기적인 진전을 이루는 토대가 마련 되었다. 또한 이들의 피부 조직 침투성공은 항노화 기능성 화장품의 개발을 실용화할 수 있을 것으로 기대된다. 최근 피부주름제거수술시 주사제로 사용하는 *Botulinum toxin*도 침투 vector를 부착시켜 피부에 침투가 되는 것을 확인하였으며 이는 주사시술법에서 바르는 시술법으로 바뀌어 획기적으로 활용할 수 있을 것이며 암억제 단백질인 p53의 세포내 침투 성공으로 암의 유전적 치료와 더불어 단백질 치료에도 큰 진전이 있을것으로 생각되며 이와같이 본연구실에서 수행한 연구결과는 단백질 침투기술의 실용화 가능성을 앞당김으로서 각종 단백질 관련 질환 치료에 필요한 획기적인 연구결과로 평가된다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

단백질 침투 기술은 본 연구실이 국내에서 유일하게 집중연구하고 있으며 국가지정연구실 사업의 연구비 지원으로 국제적으로도 선두 group에 설 수 있는 계기를 마련해주어 감사히 생각하고 있습니다. 연구의 종류가 technology 개발이기 때문에 Impact factor 가 매우 높은 journal 에 실리기가 쉽지 않습니다. 그럼에도 불구하고 국내외 논문발표를 매우 활발히 하였으며 특히 특허관련 업적을 매우 중요하게 생각되어 많은 특허를 등록, 출원하였습니다. 아무쪼록 평가하실 때 국가지정 연구실 연구사업 목적에 부합되는 (Technology 개발) 연구개발의 적합성 및 중요성과 연구 개발성과의 우수성을 참조하여 주시기 바랍니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구에서 개발된 단백질 침투기술은 대부분의 의료 및 제약 분야에서 이용될 수 있기 때문에 그 잠재력은 대단히 크다고 판단된다. 궁극적으로 난치성 질환(노화, 암, 신경질환, 유전병, 당뇨병질환 등)을 다른 약물이나 유전자 치료법등과 병행한 복합치료법으로 단백질치료법을 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 앞으로 지속적인 연구개발로 인한 결과로 각종 질환에서의 단백질 치료법이 상용화된다면 본 기술은 그 적용범위가 매우 넓은 거대시장을 형성할 석으로 추정되며 따라서 경제적인 파급 효과 역시 지대할 것으로 생각된다. 또한 위에서 언급했듯이 질환에서 응용 뿐 아니라 도포용 주름치료제 Btx, 기능성 화장품 (예: 노화예방 기능성 화장품 SOD, catalase 등) 시장에도 막대한 부가가치를 줄 것으로 기대된다.

IV. 보안성 검토

- 특정연구개발사업보안관리지침에서 정하는 바에 따라 작성
- 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

| |
|--|
| |
|--|

2. 연구기관 자체의 검토결과

| |
|--|
| |
|--|