



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월04일
(11) 등록번호 10-1764583
(24) 등록일자 2017년07월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0082193
(22) 출원일자 2016년06월30일
심사청구일자 2016년06월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160045160 A

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
박진서
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이수정

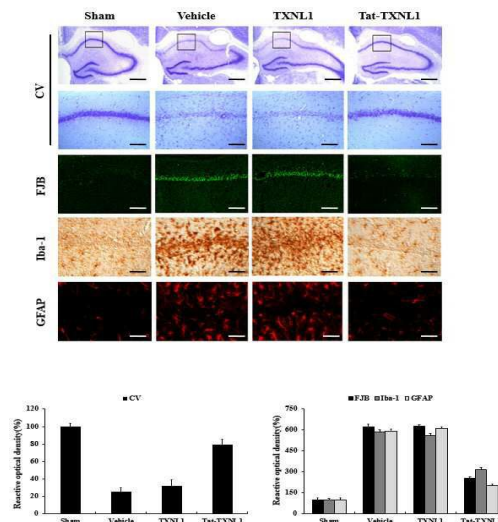
(54) 발명의 명칭 TXNL1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물

(57) 요약

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

해결수단: 본 발명은 세포투과성 TXNL1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 TXNL1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰다. 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 TXNL1 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 TXNL1 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C07K 14/47 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

한규형

강원도 춘천시 새청말길 26 107동 1402호 (우두동, 강변코아루아파트)

음원식

강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

조효상

경기도 구리시 체육관로 163-12 (교문동)

손은정

경기도 남양주시 화도읍 묵현리 비룡로 116번지 35번지 마석역신도브래뉴 3차 아파트 306동 404호

손오라

경기도 양주시 백석읍 중앙로223번길 123-21 (가업리)

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가6길 6 301호 (다가동, 그린빌)

김대원

강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발: 질환치료용 생리활성 고분자 신소재 물질 탐색 및 개발

기여율 1/2

주관기관 한림대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2B4008356

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원사업(중견연구)

연구과제명 혈액뇌장벽 및 뇌조직 침투성 Glutaredoxin 1 융합단백질을 이용한 퇴행성신경질환 치료제 개발

기여율 1/2

주관기관 한림대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

TXNL1의 N 말단에 단백질 수송도메인이 공유결합된 TXNL1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV Tat 펩타이드 또는 Pep-1 펩타이드임을 특징으로 하는, TXNL1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 TXNL1 융합단백질은 그 아미노산 서열이 서열번호 2임을 특징으로 하는, TXNL1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포투과성 TXNL1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

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

[0003] 비정상적인 세포 과정에서 발생하는 과도한 활성산소종은 염증, 허혈, 당뇨 및 파킨슨병 등 다양한 인간의 질병을 초래하는 것으로 알려져 있다. 활성산소종은 세포의 대사과정 중 세포 안의 DNA뿐만 아니라 단백질, 지질과 같은 고분자들에 손상을 입히는 등 많은 영향을 미치게 되며 손상 시간이 점점 길어질수록 세포사멸을 일으켜 인간 질병에 많은 영향을 끼치게 된다. 그중에서도 뇌허혈은 뇌의 동맥이 차단될 때 뇌세포가 충분한 에너지를 만들지 못하고 그로 인해 세포사멸이 발생하는 질환으로, 활성산소종의 발생량이 해마 CA1 지역에서 급격히 증가하게 되면서 신경세포의 사멸이 일어나게 된다. 그러므로, 활성산소종에 대한 조절능력이 있는 물질이 밝혀진다면 뇌허혈 손상에 대해 보호효과를 나타낼 수 있을 것이라 예상된다.

[0004] 단백질 전달기술은 PTD (Protein Transduction Domain) 또는 CPP (Cell penetrating Peptide)라 불리며 대개 5~30개의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 단백질이나 유전자 등의 고분자와 융합하여 포유류 세포 또는 조직 안으로 손쉽게 전달할 수 있는 새로운 개념의 전달 시스템이다. 비록 PTD 융합단백질의 구체적인 메커니즘은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만, 치료용 단백질을 인 비트로와 인 비보로 전달하는데 많이 사용되어 왔으며 매우 다양한 PTDs가 알려져 있다. 그중 본 발명에 사용한 것은 세포투과성 Tat 펩타이드이며, HIV-1 Tat 단백질 (RKKRRQRRR)의 기본 도메인으로서 다양한 연구에 사용되고 있다.

[0005] TXNL1 (Thioredoxin like protein 1)은 각종 질병에서 중요한 역할을 하는 항산화 효소이다. 그러나 TXNL1은 활성산소종에 대한 보호효과와 세포사멸에 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있을 뿐 뇌허혈에 대한 메커니즘

및 기능은 알려지지 않았다. 따라서 세포침투 도메인 중 하나인 Tat을 TXNL1 단백질과 재조합하여 신경세포와 뇌허혈 동물 모델에서 산화스트레스에 대한 Tat-TXNL1 융합단백질의 보호효과에 대해 연구하였다. 그 결과, Tat-TXNL1 융합단백질이 산화스트레스로 인한 세포사멸에 대해 보호효과를 나타냄을 확인하였으며 뇌질환과 같은 산화스트레스 관련 질환 치료에 유용하게 쓰일 수 있는 가능성을 탐색하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 뇌허혈 손상 및 뇌허혈 손상에 의한 신경세포 손상과 사멸을 치료하기 위한 효과적인 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 세포 투과 도메인 중 하나인 Tat을 TXNL1 단백질과 재조합하여 신경세포와 뇌허혈 동물 모델에서 세포 내로 침투되는 것을 확인하였으며, 산화 스트레스에 대하여 Tat-TXNL1 융합단백질의 보호효과에 대해 연구하였다.

[0008] 본 발명자들은 TXNL1 융합단백질이 인 비트로에서 산화스트레스에 의해 유도된 신경세포사멸과 인 비보 허혈동물모델에서 보호효과가 있는지를 밝히고자 하였다. 허혈성 신경세포사멸에 대해 TXNL1 융합단백질의 잠재적인 효과를 연구하기 위해 본 발명자들은 세포 내로 투과할 수 있는 Tat-TXNL1 융합단백질을 제작하였다. Tat-TXNL1 융합단백질은 신경세포 내부로 농도 의존적 및 시간 의존적으로 효과적으로 투과하였다. 세포 내로 투과된 Tat-TXNL1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대한 세포 생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성산소종 수준을 낮추었다. 그리고, 세포 내로 투과된 Tat-TXNL1 융합단백질은 과산화수소에 의해 유도된 DNA 단편화 현상도 저하시켰다. 동물모델에서 Tat-TXNL1 융합단백질은 전뇌의 해마 CA1 부분에서 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸로부터 세포를 보호하였다. 이러한 결과들은 Tat-TXNL1 융합단백질이 인 비트로와 인 비보에서 일어나는 세포사멸에 대해 보호효과를 나타내며, 산화스트레스와 관련된 뇌허혈 손상에 대해 치료제로 이용될 수 있음을 말해준다.

[0010] 본 발명은 TXNL1의 N 말단에 단백질 수송도메인이 공유결합된 TXNL1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0011] 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 TXNL1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0012] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 TXNL1 융합단백질의 아미노산 서열이 서열번호 2임을 특징으로 하는 TXNL1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0014] 상기 TXNL1 융합단백질 (이하 "Tat-TXNL1", "Tat-TXNL1 융합단백질"과 혼용함)을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제 (예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제 (예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제 (예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분, 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제 (예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보존제 (예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0015] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0016] 나아가, 본 발명은 상기 TXNL1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특

징으로 하는, 뇌허혈 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

- [0018] 본 발명은 또한 TXNL1 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 TXNL1 단백질 분자의 세포 내 전달은 HIV Tat 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, Tat 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.
- [0019] 구체적으로, 본 발명은 Tat-TXNL1 융합단백질, 이 융합단백질을 제조하기 위한 재조합 뉴클레오타이드와 벡터, 이 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료, 예방 목적의 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0021] "Tat-TXNL1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 TXNL1을 포함하며, 수송 도메인과 목표 단백질(즉, 본 발명에서는 TXNL1을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "Tat-TXNL1", "Tat-TXNL1 융합단백질", "TXNL1 융합단백질"과 혼용하였다.
- [0022] "목표 단백질"이란 본래 표적 세포로 들어갈 수 없거나, 본래 유용한 속도로 표적 세포로 들어갈 수 없는 수송 도메인 또는 이의 단편이 아닌 분자로서, 수송도메인과 융합되기 전의 분자 그 자체 또는 수송도메인-목표 단백질 복합체의 목표 단백질 부분을 의미한다. 목표 단백질로서는 폴리펩티드, 단백질, 펩타이드를 포함하며, 본 발명에서는 TXNL1을 의미한다.
- [0023] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.
- [0024] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0025] 또한, "표적 세포"란 수송도메인에 의해 목표 단백질이 전달되는 세포를 의미하는 것으로서, 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 즉, 표적 세포는 체내 세포, 다시 말하여 살아있는 동물 또는 인간의 장기 또는 조직을 구성하는 세포 또는 살아있는 동물 또는 인간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.
- [0026] 본 발명에서의 "단백질 수송 도메인"은 고분자 유기화합물, 예컨대 펩타이드, 단백질 등과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 유기화합물들을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말한다.
- [0027] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0029] 본 발명은 단백질 수송 도메인이 TXNL1의 N 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 TXNL1 융합단백질을 유효성분으로 하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 또한, 본 발명에서 상기 수송도메인은 HIV Tat 인 것을 특징으로 한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질의 그 아미노산 서열이 서열번호 2와 같은 것을 특징으로 한다.
- [0032] 본 발명은 또한, silent change에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다.
- [0033] 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성 전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에서 세포 내로 투과된 TXNL1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰으며, 동물모델에서는 뇌 허혈 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 TXNL1 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 TXNL1 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해주며, 세포 투과성 TXNL1 융합단백질이 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물로 유용함을 말해준다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 Tat-TXNL1 융합단백질의 발현 및 정제를 나타낸다. (A) Tat-TXNL1 융합단백질 구축 맵과 발현된 Tat-TXNL1 융합단백질의 다이어그램이다. (B) 정제된 Tat-TXNL1 융합단백질과 TXNL1 단백질은 12% SDS-PAGE를 이용하여, 그리고 (C) 토끼 항 폴리히스티딘 항체로 웨스턴블랏 분석으로 분석하였다.

도 2a 내지 도 2d는 HT22 세포의 Tat-TXNL1 융합단백질의 투과를 나타낸다. 세포는 60mm 배양 배지에서 배양하였다. (A) Tat-TXNL1 (0.5~7 μ M) 및 TXNL1 단백질을 1시간 동안 배양 배지에 처리하고, (B) Tat-TXNL1 (7 μ M) 및 TXNL1 단백질은 10~60분 동안 배양 배지에 처리하여 웨스턴블랏 분석으로 분석하였다. (D) Tat-TXNL1 융합단백질의 안정성에 대하여 나타내었다. HT22 세포는 1시간 동안 7 mM의 Tat-TXNL1 융합단백질을 전처리하여 웨스턴블랏 분석으로 분석하였다. (C) Tat-TXNL1 융합단백질의 세포 내 분포는 공초점 현미경으로 관찰하였다. 크기 막대 = 50 μ m.

도 3a 내지 도 3c는 산화 스트레스에 대한 세포 생존율, 세포 내 활성산소종 농도 및 DNA 단편화에 대한 Tat-TXNL1 융합단백질의 보호효과를 나타낸다.

과산화수소 (1 mM, 90 min)를 HT22 세포에 전처리하고 Tat-TXNL1 (7 mM)를 1시간 동안 처리하였다. 세포생존율은 MTT를 사용하여 비색 분석법으로 측정하였다 (A). ** $P < 0.01$ 은 과산화수소 처리군과 비교한 값이다. 과산화수소로 유도된 활성산소종 생성에 Tat-TXNL1 융합단백질의 효과를 나타낸다. 세포를 1시간 동안 Tat-TXNL1 융합단백질을 처리한 후, 10분 동안 1 mM 과산화수소로 자극하였다. 세포 내 활성산소종 수준은 DCF-DA 및 형광강도로 염색한 후 ELISA 플레이트 리더로 측정하였다 (B). 크기 막대 = 50 μ m. ** $P < 0.01$ 은 과산화수소 처리군과 비교한 값이다. 세포에 1시간 동안 Tat-TXNL1 융합단백질 (7 mM)을 처리한 후, 과산화수소 (1 mM, 4h)에 노출시켰다. DNA 단편화는 TUNEL 염색으로 측정하였다 (C). 크기 막대 = 50 μ m.

도 4는 HT22 세포에서 pAkt/Akt (ser-473) 활성화에 대한 Tat-TXNL1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다. HT22 세포를 30분 동안 과산화수소 (1 mM)로 자극하였다. 1시간 동안 Tat-TXNL1 융합단백질 (0.5~7 μ M)로 전처리하였다. p38, ERK 및 JNK 레벨을 웨스턴 블라팅으로 분석하고 밴드 강도는 농도계로 측정하였다 (A). HT22 세포 1 mM 과산화수소로 10분간 (pAkt/Akt) 자극하고, 그에 앞서 Tat-TXNL1 융합단백질 (0.5~7 μ M) 및 TXNL1 단백질로 처리하였다. pAkt/Akt의 발현은 웨스턴블랏으로 분석하고 밴드 강도는 농도계로 측정하였다 (B).

도 5는 허혈성 손상 이후 세포로 투과된 Tat-TXNL1 융합단백질의 신경보호효과를 면역조직화학으로 분석한 결과를 나타낸다. 허혈/재관류 7일 후 삼준, 담체 처리군, TXNL1 단백질 처리군 및 Tat-TXNL1 융합단백질 처리군의 CA1 부위에서 CV, GFAP, Iba-1의 면역조직화학 분석결과와 및 FJB 염색 결과이다. 각각의 면역 반응성 뉴런의 수의 상대적 분석 값은 담체 투여군과 현저하게 다르다. * $P < 0.01$ 은 담체 투여군과 비교한 값이다. 크기 막대 = 50 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0038] 재료

[0039] Ni^{2+} -니트릴로삼초산 세파로즈 슈퍼플로우는 Qiagen에서 구매하였고, PD-10 컬럼 크로마토그래피(Amersham, Braunschweig, Germany)를 구매하였다. 마우스 해마신경 세포인 HT22 세포는 한국세포주연구재단(KCLF)에서 제공받았다. 2',7'-DCF-DA(Dichlorofluorescein diacetate)와 MAPK, 액틴, p38, Erk의 일차 항체는 Cell

signaling Technology(Beverly, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

[0041] **Tat-TXNL1 융합단백질 발현 및 정제**

[0042] 세포 침투성 HIV-1 Tat 발현 벡터는 종래 기술에 따라 본 연구실에서 제조하였다 (Kwon et al., 2000). 인간 TXNL1 단백질은 PCR로 증폭하였다. PCR 산물은 절단하여 용출하고 TA-클로닝 벡터에 연결되었다. 인간 TXNL1 cDNA를 포함하는 정제된 TA 벡터는 여섯 개의 히스티딘 오픈리딩 프레임과 함께 발현 벡터 내로 연결되어 발현 벡터를 제조하였고, 이. 콜라이 DH5 α 세포 내로 클론되었다. 유사한 방법으로 Tat 펩타이드를 융합시키지 않은 대조군 TXNL1 단백질을 구축하고 발현하였다.

[0043] 재조합 Tat-TXNL1 플라스미드는 이.콜라이 BL21 세포 (Novagen)로 형질변환되어 0.1mM의 IPTG (Duchefa, Haarlem, Netherlands)로 18°C에서 18시간 동안 발현을 유도하였다. 하비스트한 세포는 초음파 처리로 용균하고, Tat-TXNL1 융합단백질은 Ni^{2+} -나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피로 정제하였다. 염은 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Braunschweig, Germany)로 제거하였다. 단백질 농도는 소 혈청 알부민을 표준물질로 이용하여 브래드포드법으로 측정하였다 (Bradford, 1976).

[0045] **HT22 세포로 Tat-TXNL1 융합단백질 도입**

[0046] 마우스 해마 및 정상세포는 37°C, 95% 공기 및 5% CO₂의 조건을 유지해주며, 10% 우태혈청 (FBS) 및 5 mM NaHCO₃, 항생제 (100 mg/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린), 20 mM HEPES/NaOH (pH 7.4)로 구성된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 이용하여 37°C, 95% 공기, 5% 이산화탄소의 습한 조건에서 배양하였다.

[0047] Tat-TXNL1 융합단백질 및 대조군 TXNL1 단백질의 세포 내 도입에 대한 시간 의존성 및 농도 의존성을 평가하였다. 세포는 60mm 접시에서, 시간(15~60분) 및 각 단백질의 투여량(0.5~3 μM)으로 처리하였다. 트립신-EDTA(Gibco)를 처리하고 PBS를 이용하여 세척한 다음 세포 내로 투과된 융합단백질을 브래드포드 방법으로 정량하고, 웨스턴블랏으로 분석하였다.

[0049] **웨스턴블랏 분석**

[0050] 웨스턴블랏 분석을 위해 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 겔로 분리한 다음, 겔에 있는 단백질을 나이트로셀룰로스 막 (nitrocellulose membrane; Amersham, UK)으로 전기이동시켰다. 막은 TBS-T 완충액 (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)으로 블로킹하였다. 막은 제조업체에서 권장하는 일차항체를 사용하여 웨스턴블랏 분석하였다. 결합한 항체 복합체는 강화 화학발광제로 제조자(Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)의 지시에 따라 탐지하였다.

[0052] **공초점 현미경 관찰**

[0053] HT22 세포 내의 Tat-TXNL1 융합단백질과 TXNL1 단백질을 탐지하기 위해 세포를 유리 커버슬립 상에 시드하고 Tat-TXNL1 융합단백질과 TXNL1 단백질을 3 μM 농도로 60분 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 다음 실온에서 5분간 4% 파라포름알데하이드로 고정시켰다. HT22 세포는 실온에서 40분간 3% 우혈청 알부민과 0.1% Triton X-100이 함유된 PBS (PBS-BT)로 40분간 블로킹하고, PBS-BT로 세척하였다. 일차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)는 1:10000 비율로 희석하고, 이차 항체 (Alexa fluor 488, Invitrogen)는 1:15000 비율로 희석한 후 어두운 곳에서 실온으로 한 시간 동안 배양하였다. 세포핵은 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 1 mg/ml; Roche, Mannheim, Germnay)로 3분간 염색하였다. 염색된 HT22 세포는 Fv-300 공초점 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

[0055] **세포 생존율 분석**

[0056] 과산화수소로 처리한 HT22 세포의 생존율을 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide}를 이용하여 비색분석법으로 확인하였다. 세포에 Tat-TXNL1 융합단백질을 선처리하거나 또는 처리하지 않고, 세포를 700 μM 의 과산화수소에 1시간 동안 노출하여 세포사멸을 유도하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0058] **세포 내 활성산소종 수준 측정**

- [0059] DCF-DA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하여 세포 내 활성산소종 수준을 측정하였다. DCF-DA는 활성산소종에 의해 세포 내에서 DCF로 전환되어 형광을 발한다. HT22 세포에 Tat-TXNL1 융합단백질을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 활성산소종 수준을 비교해 보았다. Tat-TXNL1 융합단백질은 한 시간 동안 처리하였고 후에 과산화수소를 700 μ M의 농도로 10분 동안 처리해 주었다. 그리고 PBS로 두 번 씻어주고 DCF-DA를 20 μ M의 농도로 30분 처리해 주었다. 형광 강도는 Fluoroskan ELISA plate reader (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)를 이용하여 485nm 여기파장 (excitation), 538nm 방출파장 (emission)을 측정하였다.
- [0061] **TUNEL 분석**
- [0062] HT22 세포에 Tat-TXNL1 융합단백질을 처리하지 않은 군과 3 μ M의 농도로 1시간 동안 처리한 군의 배양액에 과산화수소 (1mM)를 가하여 3시간 동안 처리하였다. 세포사멸을 측정하기 위해 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick end labeling staining) 기법은 세포사멸 탐지 키트 (Roche Applied Science)를 사용하여 수행하였다. 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 결과를 분석하였다.
- [0064] **실험동물**
- [0065] 한림대학교 실험동물센터에서 제공되는 저빌쥐 (Mongolian gerbils; Meriones unguiculatus)를 사용하였다. 23 $^{\circ}$ C, 습도 60% 그리고 고정적으로 12시간의 빛과 음식물이 제공되는 곳에서 사육하였다. 실험동물 취급 및 관리는 최근의 국제법과 정책에 따라 수행하였고 [NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1985, revised 1996], 서울대 연구동물 관리 및 사용에 관한 위원회 (IACUC)에서 승인 받았다 (SNU-100611-1). 모든 실험에서는 이용되는 동물 수와 본 발명에서 사용되는 공정에 의한 고통을 최소화하기 위해 노력하였다.
- [0067] **실험동물에서 전뇌 허혈 유도**
- [0068] 실험동물에서 전뇌 허혈을 유도하였다. 온목동맥을 신경 섬유들로부터 격리시켜 폐색하고, 외상이 크게 남지 않게 하기 위해 동맥류 클립(aneurysm clips)을 이용하였다. 혈류를 폐색하였을 때, 검안경(ophthalmoscope)을 이용하여 혈압을 주의 깊게 관찰하였다. 그 후 5분 동안 폐색하고 동맥류 클립을 제거하였다. 그리고 폐색에 대해 혈압이 회복되는 것을 검안경으로 확인하였다. 또한, 삼 수술로 정상 경동맥을 폐색하지 않고, 외과적인 절차를 제외하고 얼마나 영향을 받는지 확인해 보았다. 허혈성 손상에 대한 Tat-TXNL1 융합단백질의 보호효과를 실험하기 위해, 7일 후 허혈 재관류(ischemia-reperfusion)하고 삼 수술군, 담체 처리군, Tat-TXNL1 융합단백질 처리군 및 TXNL1 단백질 처리군으로 4개 군으로 나눠, 허혈-재관류 후 복강 내에 30분을 투여하여 실험을 수행했다.
- [0069] 삼 수술군, 담체 처리군, Tat-TXNL1 융합단백질 처리군 및 TXNL1 단백질 처리군(2mg/kg)을 7일 후에 마취를 수행하고, 뇌 조직을 적출하고 PBS(pH 7.4)로 처리하고, 4% 포름알데하이드를 포함한 0.1M PBS(pH 7.4)로 처리하였다. 뇌 조직은 30% 자당으로 침윤하여 하룻밤 사이에 동결보존하였다. 뇌 조직은 냉동한 다음 50 μ m 두께로 절편화하고, 연속되는 절편은 PBS를 함유하는 6-웰 플레이트에 수집하였다.
- [0071] **결과 1: Tat-TXNL1 융합단백질 발현과 정제**
- [0072] 본 발명자들은 세포 침투성 Tat-TXNL1 융합단백질을 제조하기 위해 PTD (Protein Transduction Domain)의 일종인 Tat이 포함된 Tat-백터와 TXNL1 유전자를 재조합하였다 (도 1a). 또한, 대장균에서 상기 재조합 유전자를 과대 발현시켜 Ni^{2+} -나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피와 PD-10 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였고, SDS-PAGE와 웨스턴블랏 분석법을 통하여 Tat-TXNL1 융합단백질이 정제된 것을 확인하였다 (도 1b, 1c).
- [0074] **결과 2: HT22 세포 내로 Tat-TXNL1 융합단백질의 투과**
- [0075] 시간 및 농도별로 Tat-TXNL1 융합단백질의 HT22 세포 내 투과 정도를 측정하였다. 그 결과, Tat-TXNL1 융합단백질은 시간 및 농도 의존적으로 세포 내 투과가 효과적으로 일어났으며, TXNL1 단백질은 투과가 일어나지 않았다 (도 2a 및 2b) 또한, 공초점 현미경을 이용하여 DAPI로 세포핵을 염색하고, Tat-TXNL1 융합단백질을 녹색 형광으로 염색하여 효과적으로 세포 내로 투과되는 것을 확인하였다 (도 2c). 그리고 투과된 Tat-TXNL1 융합단백질들이 세포 내에 36시간 동안 안정되게 유지되었다 (도 2d).
- [0077] **결과 3: 산화 스트레스로 인한 세포 생존력 및 DNA 단편화에 대한 Tat-TXNL1 융합단백질의 보호효과**

[0078] 세포에 Tat-TXNL1 융합단백질을 농도별로 전처리한 후 과산화수소로 산화 스트레스를 주었다. 세포 생존능력을 확인하기 위해 MTT 분석을 수행하였다. 해마 뉴런 세포인 HT22 세포에 1mM 과산화수소를 단일 처리하였을 경우 생존한 세포 수가 48%로 감소하였으나, Tat-TXNL1 융합단백질을 처리하였을 경우 농도 의존적으로 세포생존 능력이 증가하였다 (도 3a).

[0079] 또한, 과산화수소로 인하여 증가하는 활성산소종을 Tat-TXNL1 융합단백질이 효과적으로 억제하는지 확인하기 위하여, 세포 내에 생성된 활성산소종과 H₂DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)가 세포내에서 가수분해되어 생성되는 불투과성의 H₂DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)가 반응하여 산화되면서 DCF (2',7'-dichloro-fluorescein)를 형성해 녹색 형광을 나타내는 원리의 DCF-DA 염색법을 수행했다. 과산화수소를 처리한 세포에서 녹색 형광은 대조군 TXNL1 단백질에 비해 과산화수소에 의해 강하게 발색된 반면, 투과된 Tat-TXNL1 융합단백질은 형광신호를 감소시켰다 (도 3b).

[0080] 산화 스트레스로 인해 발생하는 DNA 단편화에 대한 Tat-TXNL1 융합단백질의 보호효과를 DNA가 잘려 단편화된 부위에 특이적으로 붙는 형광 염료를 이용한 TUNEL 염색 방법으로 알아보았다. 앞선 실험과 동일한 상태에서 실험하였고, Tat-TXNL1 융합단백질이 DNA 단편화에 대해 보호효과가 있다는 결과를 확인하였다 (도 3c).

[0082] 결과 4: 산화 스트레스에 의한 세포사멸에 Tat-TXNL1 융합단백질의 보호기작

[0083] Akt는 세포 생존에 중요한 역할을 하고 세포사멸을 방지한다. 산화 스트레스로 유도된 인산화된 Akt의 활성화는 세포사멸 및 신경 세포사멸을 일으킨다. 또한, 여러 연구에서 과산화수소로 유도된 산화 스트레스에 따른 세포 손상에 대하여 세포 보호는 다양한 세포 유형에서 PI3K / Akt 신호 경로의 활성화에 의해 매개되는 것으로 입증되었다. 따라서, 우리는 과산화수소 처리된 세포에서 유도된 활성산소종이 pAkt에 대한 Tat-TXNL1 융합단백질의 효과를 조사하였다. pAkt (s473)가 TXNL1 단백질 군은 변하지 않았지만 Tat-TXNL1 융합단백질 처리된 세포에서 감소하였다 (도 4b). 이러한 결과는 과산화수소로 유도된 HT22 세포에서 산화 스트레스에 의한 세포 사멸에 대한 Tat-TXNL1 융합단백질의 항산화 방어를 확인했다. 세포 생존 신호는 과산화수소와 같은 외부 스트레스와 성장 요인에 의해 활성화된다. 그 자극 가운데, MAPKs 허혈성 손상에 매우 중요한 역할을 한다. 우리는 MAPKs의 활성 산소에 의한 활성화에 대한 Tat-TXNL1 융합단백질의 효과를 조사하였다. Tat-TXNL1 단백질은 또한 산화 스트레스에 반응하여 SAPK / JNK, ERK와 p38에 대한 억제 효과를 입증하였다 (도 4a). 그러나, 대조군 TXNL1 단백질은 SAPK/JNK, ERK 및 p38의 활성화 수준에 영향을 미치지 않았다. 따라서 이러한 결과는 Tat-TXNL1 융합단백질이 MAPKs 활성화의 규제를 통해 과산화수소 자극에 의한 세포 사멸 억제를 나타낸다.

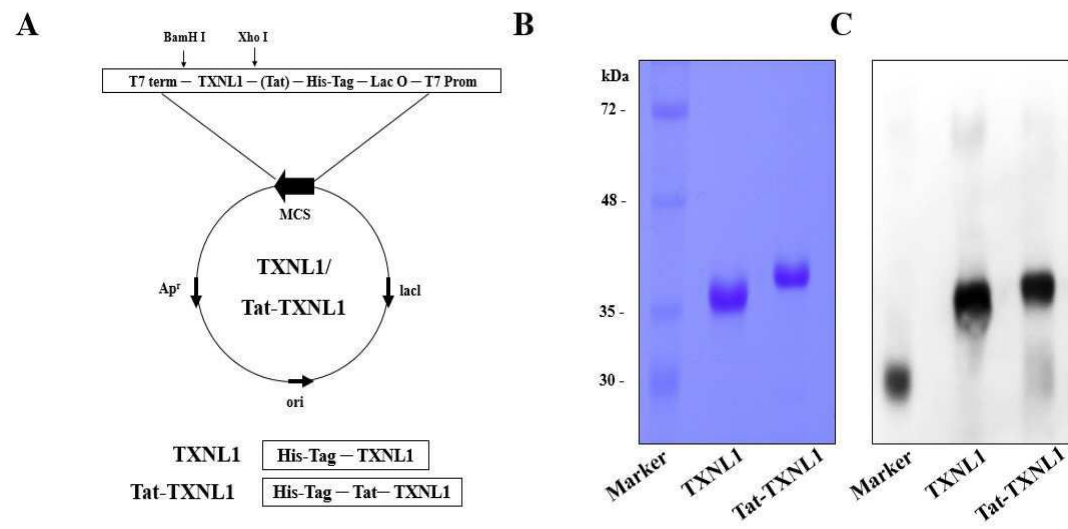
[0085] 결과 5: 뇌허혈성 손상에 대한 세포침투성 Tat-TXNL1 융합단백질의 보호효과

[0086] 허혈성 손상에 대한 세포침투성 Tat-TXNL1 융합단백질의 보호효과를 알아보기 위해 저빌 쥐를 이용하여, 연속적으로 대뇌혈류 (cerebral blood flow)를 감소시켜 뇌의 저산소증과 허혈을 유도함으로써 많은 양의 독성 활성산소종을 형성시켜 급성 뇌허혈 손상을 통해 신경세포 사멸을 유도하는 외과적 수술법으로 동물모델을 제작하였다. 침투한 Tat-TXNL1 융합단백질이 뇌허혈에 대해 보호효과가 있는지 살아있는 세포만을 염색하는 CV (Cresyl Violet) 염색과 손상 받은 뇌세포를 형광으로 염색하는 F-JB (Fluoro-Jade B)를 이용한 조직형광기법 (histofluorescent) 염색으로 확인하였다. 뇌허혈을 유도한 동물 모델에서 모두 Tat-TXNL1 융합단백질을 처리한 동물에서는 세포사멸에 대한 보호효과가 관찰되었으나, 대조군 TXNL1 단백질을 처리한 동물에서는 세포사멸에 대한 보호효과가 전혀 나타나지 않았다. 또한, Iba-1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1)은 새로운 Ca⁺⁺ 결합 단백질이고, 특이하게 뇌의 활성화된 소교세포에서만 발현된다. 따라서 Iba-1은 이러한 연구의 소교세포 지표로 이용되며, 신경세포사멸로 인한 소교세포의 활성화를 확인할 수 있다. 그리고 중간섬유를 이루는 구성요소이면서 정상세포의 표지자인 신경교섬유질산성단백질 (Glial fibrillary acidic protein; GFAP)도 이용하였다. GFAP는 특히 신경세포에 손상을 받게 되면 정상세포가 손상 받은 부위를 보충하기 위해 활성화가 될 때 발현되는 단백질로 뇌손상시 활성화되어 응집하는 정상세포를 관찰할 수 있다. 뇌허혈 모델에서 Tat-TXNL1의 소교세포와 정상세포의 활성화와 응집에 대해 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 뇌허혈이 유도된 경우 염색된 소교세포와 정상세포의 활성화가 증가 하고 서로 응집된 것을 확인하였으며, 반면 Tat-TXNL1 융합단백질을 처리한 경우 활성화 그리고 응집 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

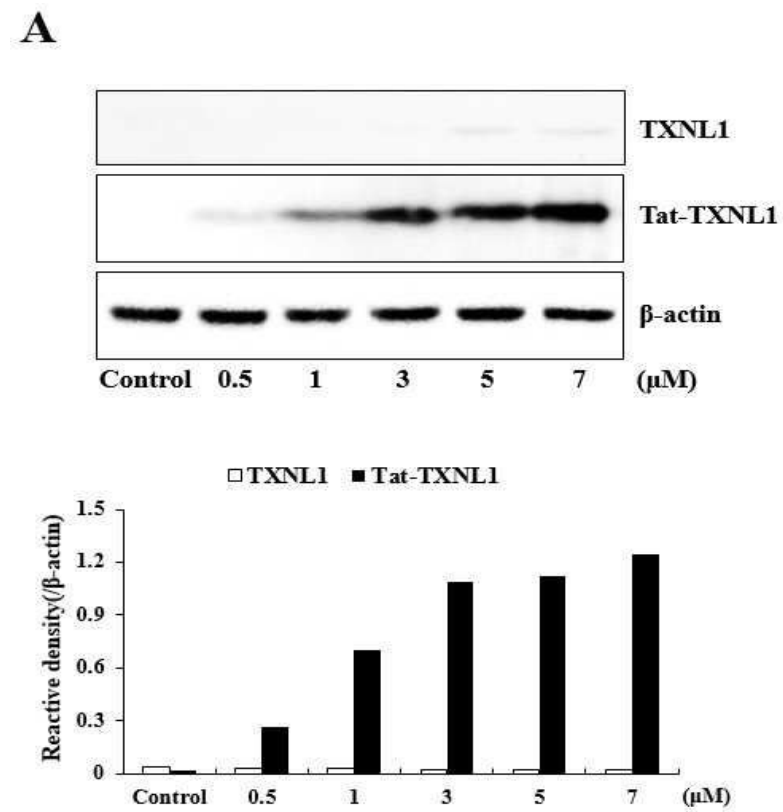
[0087] 따라서, 본 발명은 Tat-TXNL1 융합단백질이 산화 스트레스로 인한 뇌허혈 등의 신경퇴행성 질환 및 다양한 질환에 대하여 치료제로서 효과적으로 응용될 수 있다는 가능성을 제시한다.

도면

도면1

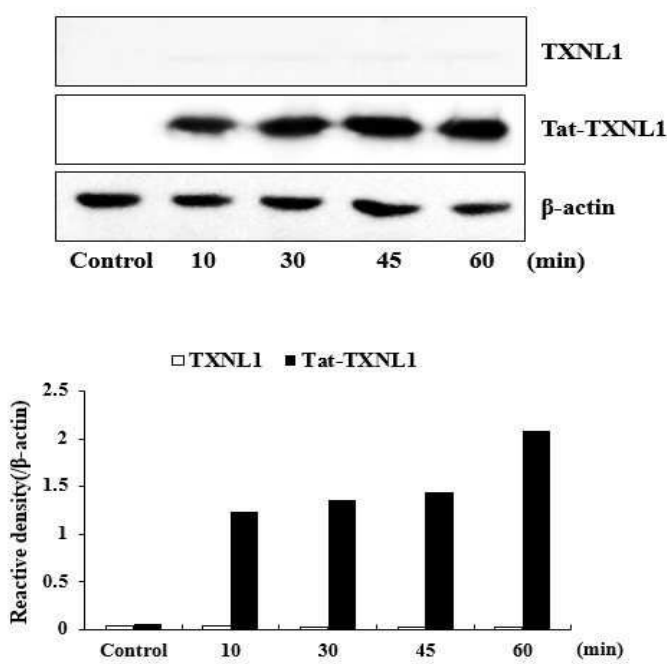


도면2a



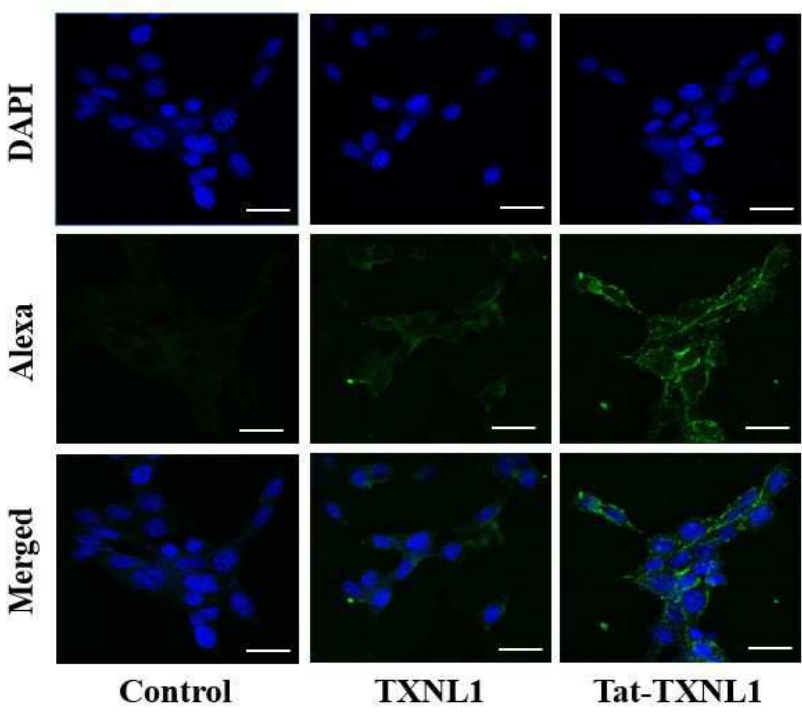
도면2b

B

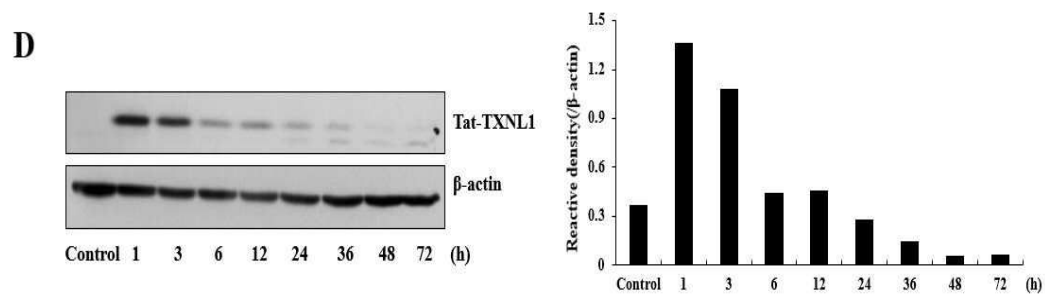


도면2c

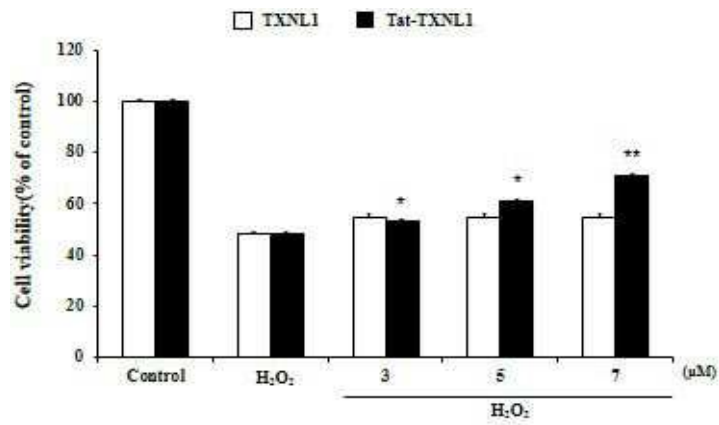
C



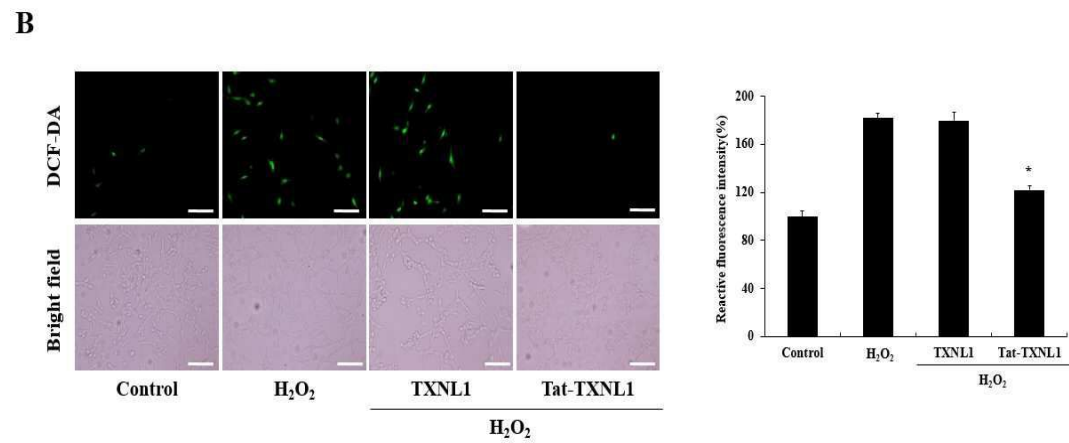
도면2d



도면3a

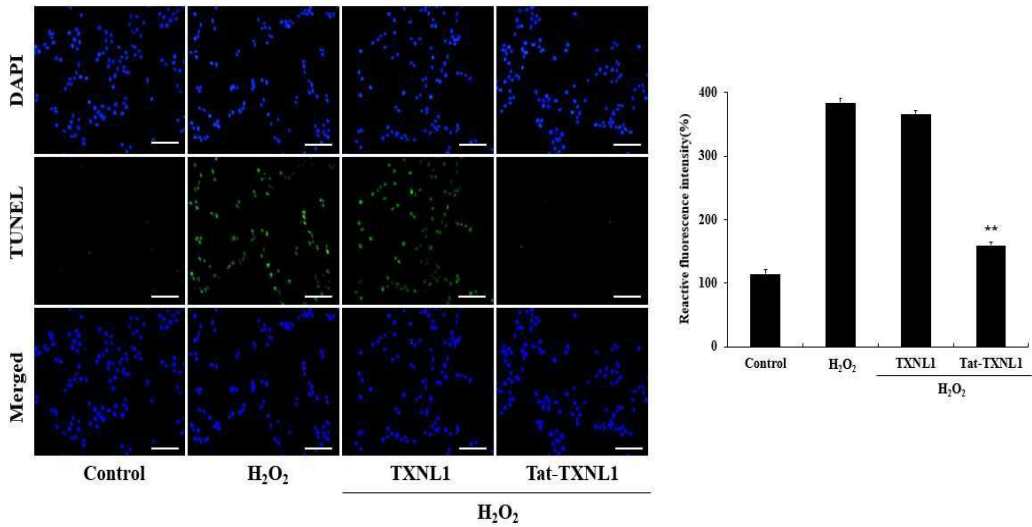


도면3b



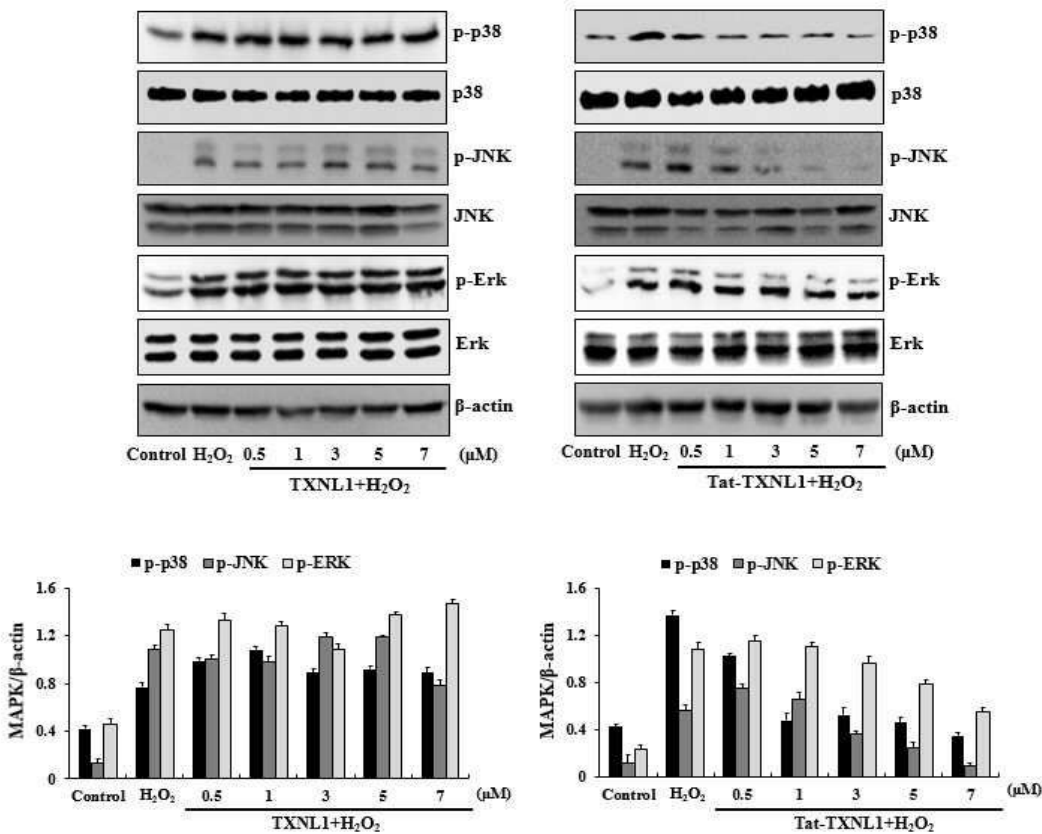
도면3c

C



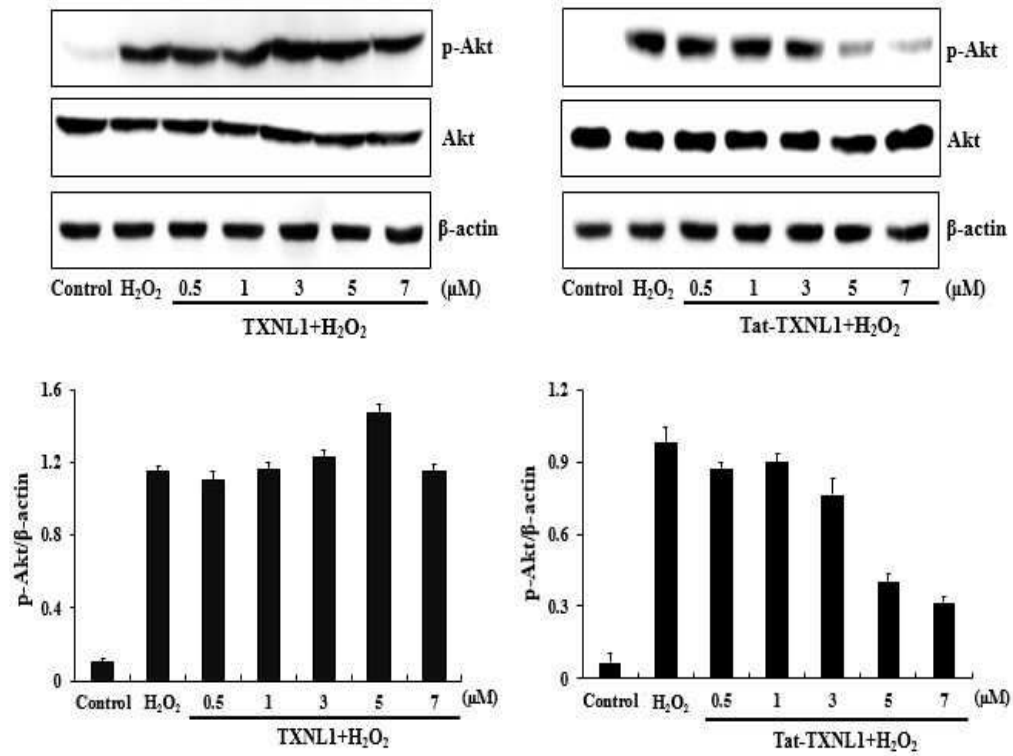
도면4a

A

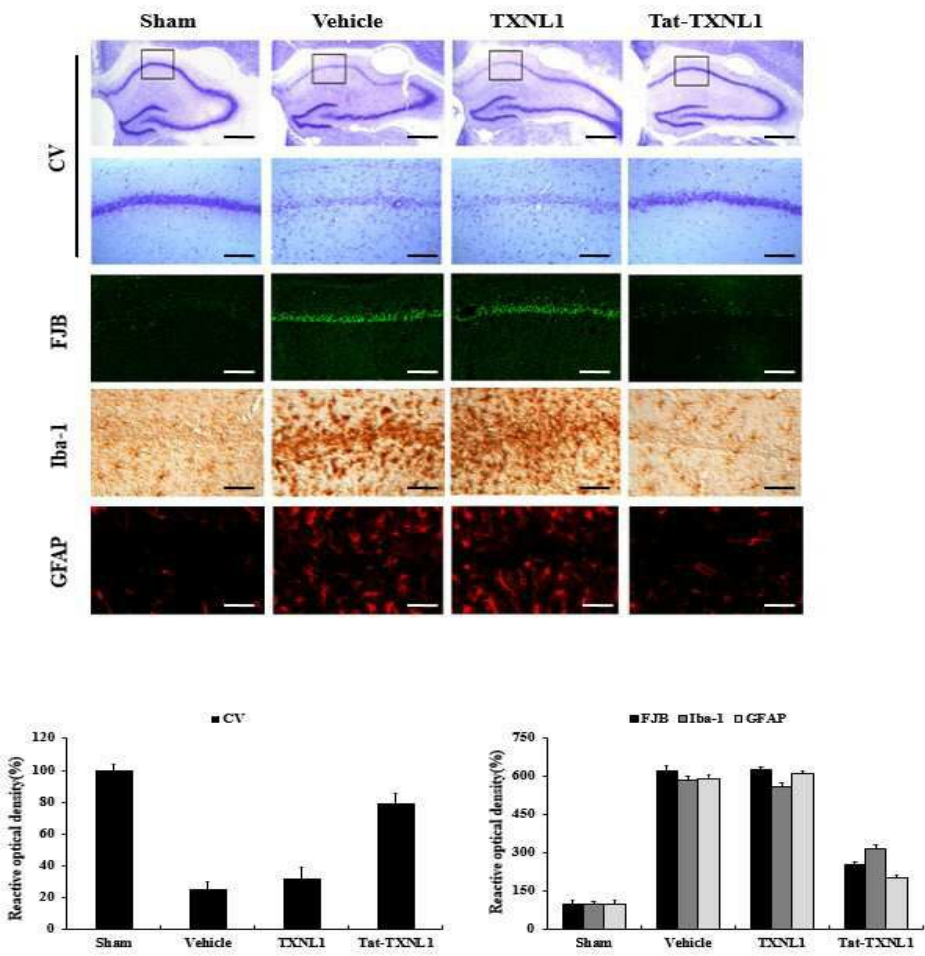


도면4b

B



도면5



서열 목록

- <110> Industry Academic Corporation Foundation, Hallym University
 - <120> Pharmaceutical composition for treating cerebral ischemia containing TXNL1 fusion protein
 - <130> HallymU-SYCHOI-TXNL1-Brainischemia
 - <160> 2
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 933
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> polynucleotide sequence coding Tat-TXNL1 fusion protein
 - <400> 1
- agcagcggcc tgggtgccgcg cggcagccat aggaagaagc ggagacagcg acgaagactc

gagatggtgg gggagaagcc cgtcgggagc gacccggatt tccagccaga gctgagcggc 120

gcgggctcca gactcgccgt ggtcaagttc accatgagag ggtgtgggcc atgtttgagg 180

attgccccag cattcagttc tatgagtaat aaatatccac aggcgtgtttt ctgggaagtc 240

gatgtacatc agtgtcaggg aacagctgcc accaacaata taccagcaac acctacattt 300

ttgttttttc gaaacaaagt gagaattgat caatatcaag gagcagatgc tgtgggatta 360

gaagaaaaaa tcaagcagca cttagaaaat gaccctggaa gcaatgagga cacagatatt 420

ccaaaaggct atatggattt aatgcctttt attaacaaag ctggttgtga atgtcttaat 480

gaaagtgatg agcatggatt tgacaactgt ttacgaaaag acacaacctt ctgggaatct 540

gactgtgatg aacagctgct tattactgtg gcattcaatc aacctgttaa gctttattcc 600

atgaaatttc aagggccaga taatggtcag ggccttaaat atgtaaaaat ttttatcaac 660

ctaccccgat ctatggattt tgaagaggca gaaagaagtg aaccaactca agctctggaa 720

ctgacagagg atgatattaa agaagatggc attgttcac ttcgttatgt taagtttcag 780

aatgttaaca gtgtaactat atttgttcag tcgaatcaag gtgaagagga aacaacaaga 840

atttcatatt ttacttttat tggtaactca gtccaggcaa caaatatgaa tgacttcaaa 900

cgagtagttg gcaaaaaagg agaaagccac taa 933

<210> 2

<211> 300

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-TXNL1 fusion protein

<400> 2

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Val Gly Val Lys

1 5 10 15

Pro Val Gly Ser Asp Pro Asp Phe Gln Pro Glu Leu Ser Gly Ala Gly

20 25 30

Ser Arg Leu Ala Val Val Lys Phe Thr Met Arg Gly Cys Gly Pro Cys

35 40 45

Leu Arg Ile Ala Pro Ala Phe Ser Ser Met Ser Asn Lys Tyr Pro Gln

50 55 60

Ala Val Phe Leu Glu Val Asp Val His Gln Cys Gln Gly Thr Ala Ala

65 70 75 80

Thr Asn Asn Ile Ser Ala Thr Pro Thr Phe Leu Phe Phe Arg Asn Lys
 85 90 95
 Val Arg Ile Asp Gln Tyr Gln Gly Ala Asp Ala Val Gly Leu Glu Glu
 100 105 110
 Lys Ile Lys Gln His Leu Glu Asn Asp Pro Gly Ser Asn Glu Asp Thr
 115 120 125

 Asp Ile Pro Lys Gly Tyr Met Asp Leu Met Pro Phe Ile Asn Lys Ala
 130 135 140
 Gly Cys Glu Cys Leu Asn Glu Ser Asp Glu His Gly Phe Asp Asn Cys
 145 150 155 160
 Leu Arg Lys Asp Thr Thr Phe Leu Glu Ser Asp Cys Asp Glu Gln Leu
 165 170 175
 Leu Ile Thr Val Ala Phe Asn Gln Pro Val Lys Leu Tyr Ser Met Lys
 180 185 190
 Phe Gln Gly Pro Asp Asn Gly Gln Gly Pro Lys Tyr Val Lys Ile Phe

 195 200 205
 Ile Asn Leu Pro Arg Ser Met Asp Phe Glu Glu Ala Glu Arg Ser Glu
 210 215 220
 Pro Thr Gln Ala Leu Glu Leu Thr Glu Asp Asp Ile Lys Glu Asp Gly
 225 230 235 240
 Ile Val Pro Leu Arg Tyr Val Lys Phe Gln Asn Val Asn Ser Val Thr
 245 250 255
 Ile Phe Val Gln Ser Asn Gln Gly Glu Glu Glu Thr Thr Arg Ile Ser
 260 265 270

 Tyr Phe Thr Phe Ile Gly Thr Pro Val Gln Ala Thr Asn Met Asn Asp
 275 280 285
 Phe Lys Arg Val Val Gly Lys Lys Gly Glu Ser His
 290 295 300