



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0072113

(43) 공개일자 2015년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0159413

(22) 출원일자 2013년12월19일

심사청구일자 2013년12월19일

(71) 출원인

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)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 3 항

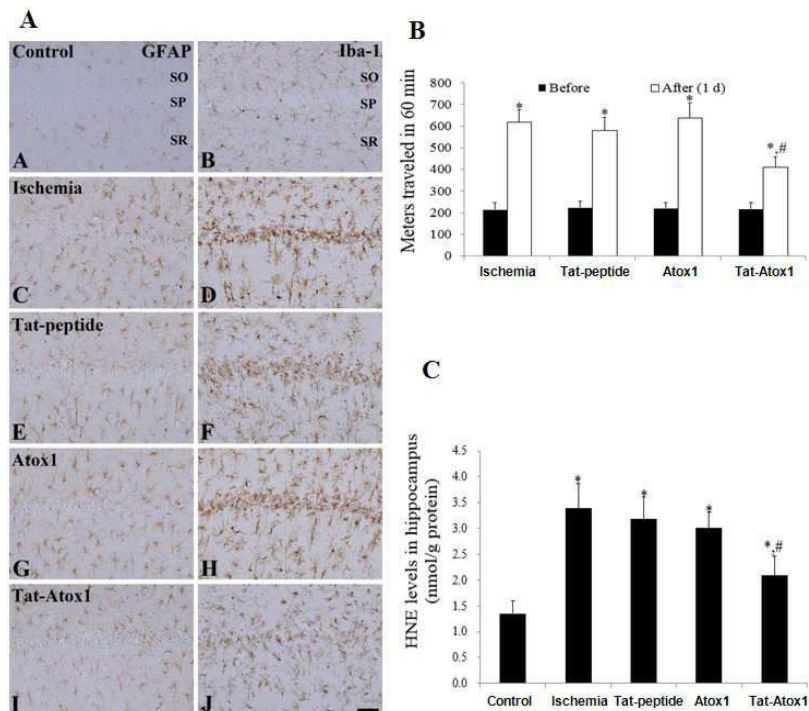
(54) 발명의 명칭 세포투과성 A t o x 1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물

### (57) 요약

Atox1(Antioxidant-1)은 HAH1으로도 불리며 구리의 항상성을 조절하고, 수퍼옥사이드 음이온과 과산화수소에 의해 생성된 독성으로부터 세포를 보호하는 항산화 보호기능이 있다. 그러나 전뇌허혈에서 Atox1의 생물학적 기능은 알려져 있지 않다. 본 발명자들은 Atox1 융합단백질이 인비트로에서 산화 스트레스로 유도된 신경세포사멸에

(뒷면에 계속)

대표도 - 도11



대한 세포 보호효과와 인비보에서 뇌허혈 동물모델 보호효과가 있음을 밝혔다. Atox1 융합단백질은 신경세포 내로 농도 및 시간 의존적으로 효과적으로 투과하였다. 세포 내로 투과된 Atox1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰다. 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 Atox1 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 Atox1 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

(72) 발명자

**한규형**

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

**조윤신**

강원도 강릉시 화부산로99번길 12 강릉교동롯데캐슬아파트 104동 802호

**음원식**

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

**황인구**

서울 관악구 관악로 1, C동 402호 (봉천동, 교수아파트)

**김대원**

강원 춘천시 칠전서길 15-2, 203동 701호 (칠전동, 칠전대우2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 : 질환치료용 생리활성

고분자 신소재 물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A1A03006155

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업(도약연구:전략)

연구과제명 유전체분석을 통한 대사성질환 유전요인 발굴 및 맞춤형 단백질치료제 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

Atox1 (Antioxidant 1) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 Atox1 융합단백질을 함유하는 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 수송 도메인은 HIV Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 융합단백질은 서열번호 4, 6, 또는 8인 것을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술분야

[0001]

본 발명은 세포투과성 Atox1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 Atox1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰다. 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 Atox1 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 Atox1 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

#### 배경기술

[0002]

Atox1 (Antioxidant 1 protein)은 HAH1, ATX1이라고도 알려져 있으며, 68 개의 아미노산으로 이루어져 있다. 또한 이 단백질은 구리 새퍼론으로서 구리 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 구리는 살아 있는 모든 유기체에서 필수적인 요소이다. 진핵생물에서 구리는 효소 촉매작용의 조효소 (cofactor)로서, 호흡, 항산화 방어 및 철 (iron) 대사 등 세포에서 생화학적으로 중요한 역할을 수행한다. 특히 사람의 철 항상성, 세포 호흡, 항산화 방어, 신경전달물질 생합성, 결합조직 형성, 색소 생성, 그리고 내분비조직 조절과 같은 작용에 대해 여러 효소가 관여하면서 전자전달 반응이 일어나게 된다. 이 과정에서 산화 촉매작용에 대해 구리가 중요한 역할을 수행하는 것이다. 구리가 과하게 축적되거나 또한 소량만 존재하여도 여러 가지 질병에 걸리기 때문이다. Atox1 단백질은 세포질의 구리가 결합하면 트랜스-골지 네트워크에 존재하는 ATPase 단백질로 전달되어 세룰로플라스민 (ceruloplasmin)을 생성하게 된다.

[0003]

활성산소종 (Reactive oxygen species; ROS)은 세포의 대사과정 중에서 산소와 함께 상호작용하는 여러 산물에 의해 발생하는데 이는 자연스럽고 당연한 결과이다. 활성산소종은 세포의 구성성분에 많은 영향을 끼치는데, 특히 세포 구성성분의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시킨다. 따라서 세포 안의 DNA 뿐만 아니라 단백질, 지방과 같은 거대분자가 손상을 입게 된다. 활성산소종에 대한 노출 시간이 점점 길어질수록 세포사멸과 병리학적 진행과정에 관련된 여러 가지의 인간질병에 많은 영향을 끼치게 된다. 그 중에서도 뇌 혈류의 차단

(interruption)과 재관류 (reperfusion)를 통해 뇌에서 발생하는 활성산소종에 관한 연구가 많이 진행되고 있다. 해마 CA1 부분에서 활성산소종 발생량이 급격히 증가하게 되면 신경세포의 사멸이 일어나게 된다. 그러므로 활성산소종 산물을 조절할 수 있게 된다면, 뇌 허혈손상을 효과적으로 보호할 수 있을 것이다.

[0004]

단백질 수송 기술은 단백질을 포유류 세포 또는 조직 내로 안정적으로 전달하는 데에 있어서 유용하다. 단백질 수송 도메인 (protein transduction domain; PTD) 또는 세포 침투 펩타이드 (cell penetrating peptide; CPP) 라고 불리기도 하는 펩타이드를 이용하는 이 기술은 세포의 단백질을 세포 내로 전달할 수 있다. 비록 단백질 수송도메인의 수송 메카니즘은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만 치료용 단백질을 인비트로와 인비보로 전달하는데 많이 이용되어 왔다. Tat 펩타이드는 HIV-1 Tat 단백질의 염기성 도메인이며, 단백질 수송 도메인으로 널리 알려져 있다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0005]

(비특허문헌 0001) 1. Hung IH, Casareno RLB, Labesse G, Mathews FS, Gitlin JD. (1998) HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. J Biol Chem 273, 1749-1754.

(비특허문헌 0002) 2. Itoh S, Kim HW, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner SM, Aoki H, Aktam K, McKinney RD, Fukai MU, Fukai, T. (2008) Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. J Biol Chem 283, 9157-9167.

(비특허문헌 0003) 3. Palm-Espling ME, Niemiec MS, Wittung-Stafshede P. (2012) Role of metal in folding and stability of copper proteins in vitro. Biochim Biophys Acta, 1823, 1594-1603.

(비특허문헌 0004) 4. Ozumi K, Sudhakar V, Kim HW, Chen GF, Kohno T, Finney L, Vogt S, McKinney RD, Fukai MU, Fukai T. (2012) Role of Copper Transport Protein Antioxidant 1 in Angiotensin II Induced Hypertension A Key Regulator of Extracellular Superoxide Dismutase. Hypertension, 1524-4563.

(비특허문헌 0005) 5. Moore SDP, Helmle KE, Prat LM, Cox DW. (2002) Tissue localization of the copper chaperone ATOX1 and its potential role in disease. Mamm Genome, 13, 563-568.

(비특허문헌 0006) 6. Kelner GS, Lee MH, Clark ME, Maciejewski D, McGrath D, Rabizadeh S, Lyons T, Bredesen D, Jenner P, Maki RA. (2000) The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival. J Biol Chem, 275, 580-584.

(비특허문헌 0007) 7. Lin S J, Culotta VC. (1995) The ATX1 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. PNAS, 92, 3784-3788.

(비특허문헌 0008) 8. Klomp LW, Lin SJ, Yuan DS, Klausner RD, Culotta VC, Gitlin JD. (1997) Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. J Biol Chem, 272, 9221-9226.

(비특허문헌 0009) 9. Floyd RA. (1990) Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J, 4, 2587-2597.

(비특허문헌 0010) 10. Li PA, He QP, Nakamura L, Csiszar K. (2001) Free radical spin trap- $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl-nitron inhibits caspase-3 activation and reduces brain damage following a severe forebrain ischemic injury. Free Radic Biol Med, 31, 1191-1197.

(비특허문헌 0011) 11. Frantseva MV, Carlen PL, Perez Velazquez JL. (2001) Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. Free Radic Biol Med, 31, 1216-1227.

(비특허문헌 0012) 12. Alexandrova M, Bochev P, Markova V, Bechev B, Popova M, Danovska M, Simeonova V. (2004) Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological

status and outcome. J Clin Neurosci, 11, 501-506.

(비특허문헌 0013) 13. Ginsberg MD, Becker DA, Busto R, Belayev A, Zhang Y, Khoutorova L, Ley JJ, Belayev L. (2003) Stilbazulenyl nitron, a novel antioxidant, is highly neuroprotective in focal ischemia. Ann Neurol, 54, 330-342.

(비특허문헌 0014) 14. Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait, MJ, Chernomordik LV, Lebleu B. (2003) Cell-penetrating peptides A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. J Biol Chem, 278, 585-590.

(비특허문헌 0015) 15. Console S, Marty C, Garcia-Echeverria C, Schwendener R, Ballmer-Hofer K. (2003) Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) protein transduction domains promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. J Biol Chem, 278, 35109-35114.

(비특허문헌 0016) 16. Wadia JS, Dowdy SF. (2002) Protein transduction technology. Curr Opin Biotechnol, 13, 52-56.

(비특허문헌 0017) 17. Lee SH, Back SS, Park EY, Kwon OS, Cho SW, Park JS, Choi SY. (2011) Transduced Tat-Annexin protein suppresses inflammation-associated gene expression in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw 264.7 cells. BMB Rep, 44, 484-489.

(비특허문헌 0018) 18. Eum WS, Kim DW, Hwang IK, Yoo KY, Kang TC, Jang SH, Choi HS, Choi SH, Kim YH, Kim SY, Kwon HY, Kang JH, Kwon OS, Cho SW, Lee KS, Park J, Won MH, Choi SY. (2004) In vivo protein transduction: biologically active intact PEP-1-superoxide dismutase fusion protein efficiently protects against ischemic insult, Free Radic Biol Med, 37,1656-669.

(비특허문헌 0019) 19. Xiao Z, Brose J, Schimo S, Ackland SM, La Fontaine S, Wedd AG. (2011) Unification of the Copper (I) Binding Affinities of the Metallo-chaperones Atx1, Atox1, and Related Proteins DETECTION PROBES AND AFFINITY STANDARDS. J Biol Chem, 286, 11047-11055.

(비특허문헌 0020) 20. Kim SY, Sohn EJ, Kim DW, Jeong HJ, Kim MJ, Kang, Kang HW, Shin MJ, Ahn EH, Kwon SW, Kim YN, Kwon HJ, Kim TY, Lee KS, Park J, Eum WS, Choi SY. (2011) Transduced PEP-1-FK506BP ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice. J Invest Dermatol, 131, 1477-1485.

(비특허문헌 0021) 21. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem, 72, 248-254.

(비특허문헌 0022) 22. Sohn EJ, Kim DW, Kim MJ, Jeong HJ, Shin MJ, Ahn EH, Kwon SW, Kim YN, Kim DS, Han KH, Park JS, Hwang HS, Eum WS, Choi, S. Y. (2012) PEP-1-metallothionein-III protein ameliorates the oxidative stress-induced neuronal cell death and brain ischemic insults. Biochim Biophys Acta, 1647-655

(비특허문헌 0023) 23. Kim DW, Lee SH, Jeong MS, Sohn EJ, Kim MJ, Jeong HJ, An JJ, Jang SH, Won MH, Hwang IK, Cho SW, Kang TC, Lee KS, Park JS, Yoo KY, Eum WS, Choi, SY. (2010) Transduced Tat- $\alpha$ AG fusion protein protects against oxidative stress and brain ischemic insult. Free Radic Biol Med, 48, 969-977.

(비특허문헌 0024) 24. An JJ, Lee YP, Kim SY, Lee SH, Lee MJ, Jeong MS, Kim DW, Jang SH, Yoo KY, Won MH, Kang TC, Kwon OS, Cho SW, Lee KS, Park JS, Eum WS, Choi, S. Y. (2008) Transduced human PEP-1-heat shock protein 27 efficiently protects against brain ischemic insult. FEBS J, 275, 1296-1308.

(비특허문헌 0025) 25. Loskota WA, Lomax P, Verity MA. (1974) A stereotaxic atlas of the Mongolian Gerbil Brain (Meriones unguiculatus). Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers Inc, 70-79

(비특허문헌 0026) 26. Hwang IK, Yoo KY, Li H, Park OK, Lee CH, Choi JH, Jeong YG, Lee YL, Kim YM, Kwon YG, Won MH. (2009) Indole-3-propionic acid attenuates neuronal damage and oxidative stress in the ischemic hippocampus. J Neurosci Res, 87, 2126-2137

- (비특허문헌 0027) 27. Wang Q, Tompkins KD, Simonyi A, Korthuis RJ, Sun AY, Sun GY. (2006) Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. *Brain Res*, 1090, 182-189.
- (비특허문헌 0028) 28. McCracken E, Graham DI, Nilsen M, Stewart J, Nicoll JA, Horsburgh K. (2001) 4-Hydroxynonenal immunoreactivity is increased in human hippocampus after global ischemia. *Brain Pathol*, 11, 414-421.
- (비특허문헌 0029) 29. Merry DE, Korsmeyer SJ. (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 20, 245-267.
- (비특허문헌 0030) 30. Ferrer I, Lopez E, Blanco R, Rivera R, Ballabriga J, Pozas E, Marti E. (1998) Bcl-2, Bax, and Bcl-x expression in the CA1 area of the hippocampus following transient forebrain ischemia in the adult gerbil. *Exp Brain Res*, 121, 167-173.
- (비특허문헌 0031) 31. Buschmann T, Yin Z, Bhoomik A, Ronai ZE. (2000) Amino-terminal-derived JNK fragment alters expression and activity of c-Jun, ATF2, and p53 and increases H2O2-induced cell death. *J Biol Chem*, 275, 16590-16596.
- (비특허문헌 0032) 32. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Iivötsky B. (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12, 913-922.
- (비특허문헌 0033) 33. Yano S, Morioka M, Fukunaga K, Kawano T, Hara T, Kai Y, Hamada J, Miyamoto E, Ushio, Y. (2001) Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 351-360.
- (비특허문헌 0034) 34. Rafiq K, Guo J, Vlasenko L, Guo X, Kolpakov MA, Sanjay A, Houser SR, Sabri A. (2012) c-Cbl ubiquitin ligase regulates focal adhesion protein turnover and myofibril degeneration induced by neutrophil protease cathepsin G. *J Biol Chem*, 287, 5327-5339.
- (비특허문헌 0035) 35. Danial NN. (2008) BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene*, 27, S53-S70.
- (비특허문헌 0036) 36. Aikawa R, Komuro I., Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki, Y. (1997) Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest*, 100, 1813.
- (비특허문헌 0037) 37. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. (1997) Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci*, 110, 357-368.
- (비특허문헌 0038) 38. Crossthwaite AJ, Hasan S, Williams RJ. (2002) Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca<sup>2+</sup> and PI3-kinase. *J Neurochem*, 80, 24-35.
- (비특허문헌 0039) 39. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 285, 1569-1572.
- (비특허문헌 0040) 40. Noguchi H, Ueda M, Matsumoto S, Kobayashi N, Hayashi S. (2007) BETA2/NeuroD protein transduction requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Hum Gene Ther*, 18, 10-17.
- (비특허문헌 0041) 41. Pierre JL, Fontecave M. (1999) Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biometals*, 12, 195-199.
- (비특허문헌 0042) 42. Chan, PH. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 2-14.
- (비특허문헌 0043) 43. Kim DW, Jeong HJ, Kang HW, Shin MJ, Sohn, EJ, Kim MJ, Ahn EH, An JJ, Jang SH, Yoo KY, Won MH, Kang TC, Hwang IK, Kwon OS, Cho SW, Park JS, Eum WS, Choi, S. Y. (2009) Transduced human PEP-1 $\alpha$ atalase fusion protein attenuates ischemic neuronal damage. *Free Radic Biol Med*, 47, 941-

952.

(비특허문헌 0044) 44. Pekny M, Nilsson M. (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50, 427-434.

(비특허문헌 0045) 45. Kato H, Kogure K, Araki T, Itoyama Y. (1994) Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res*, 664, 69-76.

(비특허문헌 0046) 46. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. (2001) Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*, 32, 1208-1215.

(비특허문헌 0047) 47. Wang Y, Chang CF, Chou J, Chen HL, Deng X, Harvey BK, Cadet JL, Bickford, PC. (2005) Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage. *Exp Neurol*, 193, 75-84.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 허혈손상 및 허혈손상에 의한 신경세포 손상 및 사멸을 치료하기 위한 효과적인 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0007] Atox1 (Antioxidant-1)은 HAH1으로도 불리며 구리의 항상성을 조절하고, 수퍼옥사이드 음이온과 과산화수소에 의해 생성된 독성으로부터 세포를 보호하는 항산화 방어 기능이 있다. 그러나, 전뇌 허혈 (Ischemia)에서 Atox1의 생물학적 기능은 알려져 있지 않다. 본 발명자들은 Atox1 융합단백질이 인비트로에서 산화 스트레스에 의해 유도된 신경세포 사멸과 인비보 허혈동물모델에서 보호효과가 있는지를 밝히고자 하였다. 허혈성 신경세포 사멸에 대해 Atox1 융합단백질의 잠재적인 효과를 연구하기 위해 본 발명자들은 세포 내로 투과할 수 있는 Tat-Atox1 융합단백질을 제작하였다. Tat-Atox1 융합단백질은 신경세포 내부로 농도 의존적 및 시간 의존적으로 효과적으로 투과하였다. 세포 내로 투과된 Tat-Atox1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대한 세포 생존율을 증가시켰고, 세포내 활성산소종 수준을 낮추었다. 그리고, 세포 내로 투과된 Tat-Atox1 융합단백질은 과산화수소에 의해 유도된 DNA 조각화 현상도 저하시켰다. 동물모델에서 Tat-Atox1 융합단백질은 전뇌의 해마 CA1 부분에서 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸로부터 세포를 보호하였다. 이러한 결과들은 Tat-Atox1 융합단백질이 인비트로와 인비보에서 일어나는 세포사멸에 대해 보호효과를 나타내며, 산화 스트레스와 관련된 허혈손상에 대해 치료제로 이용될 수 있음을 말해준다.

[0008] Atox1(Antioxidant-1) 단백질은 구리의 항상성 유지와 항산화 방어 기능을 갖는 것으로 알려져 있다. 구리는 살아있는 모든 유기체에서 필수적인 요소로, 세포에서 생화학적으로 중요한 기능을 수행한다. 철 항상성, 세포 호흡, 항산화 방어, 신경전달물질 생합성, 결합조직 형성, 색소 생성 및 내분비 기관 조절과 같은 작용에 여러 효소가 관여하면서 전자전달반응이 잘 일어나게 된다. 이 과정에서 생성되는 산화 촉매에 대해 구리가 중요한 역할을 수행한다. Atox1은 체내에 적절한 양의 구리가 존재하도록 항상성을 유지한다. 비록 세포질의 구리가 수송되는 과정의 기작은 정확히 밝혀지지 않았지만, 인간 Atox1 유사체인 HAH1뿐만 아니라, 효모의 용해성 인자인 Atox1은 구리 항상성 인자로서, 수퍼옥사이드와 과산화수소의 독성으로부터 세포를 보호하는 효과가 있다. 그러나, 전뇌허혈에서 Atox1 자체의 생물학적 기능은 알려져 있지 않다.

[0009] 본 발명자들은 Atox1 단백질이 인비트로에서 산화 스트레스에 의해 유도된 신경세포 사멸과 인비보에서 허혈동물모델에서 보호 효과가 있는지 입증하였다. 허혈성 세포사멸에 대해 Atox1 단백질의 잠재적인 효과를 연구하기 위해 우리는 세포 내로 투과할 수 있는 Tat-Atox1 융합단백질을 제작하였다.

[0010] 활성산소종은 단백질, 지질, 핵산과 같은 세포내 거대분자에 손상을 입힌다. 본 발명자들은 과산화수소를 처리한 뒤 세포 내로 형질 도입된 Tat-Atox1 융합단백질이 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하였다. 1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 경우 세포 생존율이 54%였다. 반면, Tat-Atox1 융합단백질을 선처리한 경우에는 세포 생존율이 84%로 증

가하였다. 본 발명자들은 과산화수소로 유도되는 산화 스트레스에 대해 Tat-Atox1 융합단백질이 세포를 보호하는 효과가 있는지를 활성산소종에 민감한 안료인 DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate)를 이용하여 시험하였다. 나아가, 본 발명자들은 Atox1 단백질이 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈와 연관되어 항산화 방어효과를 나타내는 것이 아니라, 그 자체만으로도 신경독성에 대한 보호효과를 나타낸다. 또, 세포에서 DNA 조각화에 대한 세포 보호효과를 확인하기 위해 TUNEL 염색을 수행하였다. 대조군 세포와 비교하여 과산화수소를 처리하였을 때 TUNEL 양성 세포의 양이 현저히 많았다. DNA 조각화도 산화 스트레스를 포함한 다양한 인자들이 원인이 되어 발생한다. 이러한 결과를 토대로 하여 세포 내로 투과된 Tat-Atox1 융합단백질이 산화 스트레스로 인한 세포사멸에 대해 방어적인 역할을 하는 것으로 확인되었다. Atox1 단백질이 수퍼옥사이드와 과산화수소의 독성으로부터 항산화 방어효과를 나타낸다는 다른 연구자들의 결과와 마찬가지로, Atox1 단백질이 활성산소종-매개 세포사멸을 억제함으로써 세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있다. 이와 같이, 본 발명자들은 Atox1 단백질이 산화 라디칼과 함께 DNA 손상과 수퍼옥사이드 라디칼에 대해 세포를 보호함을 밝혔다. 산화 스트레스와 과다한 활성산소종에 의해 미토콘드리아 막의 분열이 발생하고, 이에 따른 미토콘드리아 기능 손실에 대해 많은 연구가 진행되고 있다. 포유류 세포에서 미토콘드리아 기능 손실은 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 더욱이 세포사멸 활성인자인 Bax 및 Bad와 세포사멸 저해인자인 Bcl-2 패밀리는 세포사멸에서 중요한 역할을 수행한다. 흥미롭게도 본 발명자들은 형질도입된 Tat-Atox1 융합단백질이 세포사멸에 의한 Bcl-2 패밀리 활성화와 함께 미토콘드리아 막에 대해 보호효과를 나타냄을 확인하였다. 이 결과를 토대로 Tat-Atox1 융합단백질이 Bcl-2 발현을 증가시키며, 과산화수소에 의해 유도된 신경독성에 대해 보호효과를 나타냄을 확인하였다. 마찬가지로 Tat-Atox1 융합단백질이 과산화수소로 유도되는 활성산소종에 의한 세포사멸과정에서 세포를 보호하는 것도 확인하였다. 세포사멸 단백질인 캐스페이즈 3와 Akt 모두 형질도입된 Tat-Atox1 융합단백질에 의해 발현량이 감소하는 것으로 보아 산화스트레스에 대한 보호효과가 있음을 알 수 있다. 그리고, p21 단백질도 외부 스트레스로 인해 활성화되어 허혈을 유발시킨다는 연구 결과가 발표된바 있다. 그리하여 본 발명자들은 과산화수소를 이용하여 활성산소종을 유도한 후 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과를 확인하였는데, p53 단백질 활성이 감소함을 관찰할 수 있었다. p21 단백질 발현량도 감소하는 것으로 확인되었다. 외부 스트레스로 p53 단백질에 의해 p21 단백질이 활성화된다는 논문을 토대로 두 단백질 모두 과산화수소에 의해 유도된 활성산소종에 대해 보호효과가 있고, 두 단백질 간의 활성화도 연관이 있다는 것을 입증하였다.

[0011]

MAPs 단백질도 허혈과 관련되어 많은 연구가 진행되고 있다. MAPs 단백질은 산화 스트레스, DNA 손상, 감염과 같은 자극으로 유해한 결과를 초래한다. 그래서, 본 발명자들은 과산화수소에 의해 유도된 산화 스트레스와 형질도입된 Tat-Atox1 융합단백질의 관계를 알아보았다. 과산화수소를 처리하여 산화 스트레스를 유도한 다음 MAPKs 중 p38, Erk의 활성도를 확인하였다. Tat-Atox1 융합단백질을 처리하였을 때 상기 MAPKs의 활성도가 감소하는 것으로 보아 산화 스트레스에 대한 MAPKs에서도 항산화 방어효과를 나타냄을 확인하였다.

[0012]

허혈손상은 뇌허혈-재관류 후에 혈류 흐름을 방해하거나 산소화 (oxygenation) 부족, 이어서 발생하는 재산소화 (reoxygenation) 때문에 발생한다. 비록 허혈에서 신경손상 기작은 정확히 밝혀지지 않았지만, 활성산소종으로 인한 신경퇴화에 의해 세포내 산화 스트레스가 증가하여 허혈 신경 손상이 일어나는 기작은 밝혀져 있다. Tat-Atox1 융합단백질이 일시적인 허혈을 일으킨 후 허혈성 신경손상에 대해 보호효과가 있는지를 확인하기 위해 본 발명자들은 허혈을 유도하기 전, 먼저 Tat-Atox1 융합단백질을 저밀의 복강 내에 주사하여 30분간 처리하였다. Tat-Atox1 융합단백질이 뇌 해마 CA1 부위에 형질도입되었는지 확인한 다음, 허혈 유도 4일 후 면역조직화학 방법을 이용하여 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과를 입증하였다. NeuN은 뉴런의 바이오마커로 이용되는데, Tat-Atox1 융합단백질 처리군의 해마 CA1 부위에서 Tat 펩타이드 처리군과 비교했을 때 뉴런세포 양이 많이 존재함을 확인하였다. Tat-Atox1 융합단백질 처리군을 제외하고 다른 군에서는 아무런 보호효과가 없는 것으로 보아 Tat-Atox1 융합단백질이 허혈손상으로 인하여 해마 CA1 부위에서 발생한 뉴런 세포사멸에 대해 보호효과를 나타내며, 뉴런 손상을 감소시킴을 알 수 있었다.

[0013]

그리고, 허혈에 의해 유도된 신경아교증 (gliosis) 반응에서 별아교세포 (astroglial cell)가 손상되었을 때 나타나는 GFAP-면역반응성 정상세포를 통해 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과를 확인해 본 결과, 위에서와 마찬가지로 Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서는 GFAP-면역반응성 정상세포의 양이 감소하였고, 나머지 시험군에서는 좀 더 많은 양의 GFAP-면역반응성 정상세포가 관찰되었다. 또한, 소교세포 (microglia)의 마커인 Iba-1을 이용하여 허혈에 의해 유도된 신경아교증에 대한 효과도 확인해 보았다. Iba-1은 면역을 담당하며 노폐물 처리 및 활성산소 등을 제거하는 역할을 하는데, 평소에는 휴지기의 상태로 존재하다가 상황에 따라 활성화된다. 따라서, 허혈을 유도하여 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서는 Iba-1의 활성도가 낮은 반면, Tat 펩타이드 처리군, Atox1 단백질 처리군에서는 Sp 지역에서 많은 양의 Iba-1이 발현됨을 관찰하였다. 따라서, 위의 결과를 토대로 Tat-Atox1 융합단백질이 항산화 방어효과를 나타내어 신경퇴행성 질환에 대한 치료제로 이용할 수 있음

을 확인하였다.

[0014] 또한, 본 발명자들은 허혈/재관류에 대한 신경보호효과를 운동활성 시험을 통해 확인하였다. 허혈/재관류로 인해 동물 운동활성이 증가한다는 연구결과를 바탕으로 본 발명자들은 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과를 확인해 보았다. Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서 운동활성이 감소함을 밝힘으로써 Atox1 단백질이 항산화 방어기능이 있음을 증명하였다. 산화 스트레스는 허혈성 외상에 의해 유도되는 뉴런 사멸에 관해 중요한 인자이다. 우리는 허혈 유도 후 지질 과산화의 마커인 HNE 단백질 수준이 증가함을 확인하였다. 그러나, Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서는 HNE 수준이 현저히 감소하였다. 이러한 결과를 토대로 우리의 연구는 Atox1 단백질이 세포 내 여러 과정에 관여하며 저산소증/허혈에 대해 신경보호효과가 있음을 밝혔다.

[0015] 결론적으로, 본 발명자들은 Tat 단백질 수송도메인과 함께 사람 Atox1 단백질을 융합하여 인비트로와 인비보에서 원활히 형질전환되도록 제작하였고, 산화 스트레스로 유도되는 세포사멸과 허혈성 외상에 대해 보호효과가 있음을 입증하였다. 세포 투과성 Tat-Atox1 융합단백질은 허혈손상으로부터 세포를 보호하여 신경퇴행성 질환 치료제로 이용할 수 있다.

[0016] 본 발명은 Atox1 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 한 군데 이상에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 Atox1 융합단백질을 함유하는 허혈 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0017] 본 발명은 상기 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 펩타이드임을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 허혈 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0018] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 융합단백질이 서열번호 4, 6 또는 8인 것을 특징으로 하는 Atox1 융합단백질을 함유하는 허혈 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0019] Atox1 융합단백질을 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, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보존제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0020] 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 0.01 $\mu$ g~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.

[0021] 본 발명에 따른 Atox1 단백질 분자의 세포 내 전달은 Atox1에 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인(hydrophobic domain), 라이신을 4개 이상 다수 포함하는 친수성 도메인(hydrophilic domain) 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이스(spacer)로 구성된 수송 도메인이 공유결합된, Pep-1을 비롯한 세포투과성 수송도메인 또는 HIV Tat 세포투과성 도메인이 목표 단백질인 Atox1의 N-말단 및/또는 C-말단과 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 PEP-1 펩타이드, HIV Tat 49~57 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 PEP-1 펩타이드, HIV Tat 49~57 잔기 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, PEP-1 또는 HIV Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 PEP-1 펩타이드 또는 HIV Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인(hydrophobic domain), 라이신을 4개 이상 다수 포함하는 친수성 도메인(hydrophilic domain) 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이스(spacer)로 구성된 단백질 수송 도메

인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인, 또는 6 내지 12개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인, 6 내지 12 개의 라이신으로 구성되는 올리고라이신 수송 도메인, 6 내지 12개의 아르기닌으로 구성되는 올리고아르기닌 수송 도메인 또는 6 내지 12개의 라이신 또는 아르기닌으로 구성되는 올리고(라이신,아르기닌) 수송 도메인도 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0022] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0023] "Atox1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 Atox1을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 Atox1을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서와 도면에서 구체적인 일 실시예로서 "Tat-Atox1"은 Atox1 융합단백질 중 Atox1의 N-말단에 Tat 단백질 수송 도메인이 결합된 것을 말한다.

[0024] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0025] 또한, "표적 세포"란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 전달되는 세포를 의미하는 것으로서 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 동물 세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다. 구체적으로 본 명세서에서 표적 세포는 뇌세포를 의미한다.

[0026] 본 명세서의 "단백질 수송 도메인"은 화물 분자(목표 단백질) 펩타이드 또는 단백질과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 펩타이드나 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말하며, 예를 들면 HIV-1 Tat를 말한다.

[0027] 본 명세서의 "목표 단백질"은 Tat 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다. "화물 분자"와 동일한 의미이다.

[0028] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0029] 본 발명에서 단백질 수송 도메인으로는 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서로 구성된 단백질 수송 도메인, 6 내지 12개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인, 6 내지 12개의 라이신으로 구성되는 올리고라이신 수송 도메인, 6 내지 12개의 아르기닌으로 구성되는 올리고아르기닌 수송 도메인 또는 6 내지 12개의 라이신 또는 아르기닌으로 구성되는 올리고(라이신,아르기닌) 수송 도메인을 들 수 있다. 또한, 목표 단백질(화물 분자)은 Atox1이다. 상기 단백질 수송 도메인 및 목표 단백질은 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. 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. 음성전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내에서 동일·유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

### 발명의 효과

[0030] 본 발명의 세포 투과성 Tat-Atox1 융합단백질은 세포 및 동물 조직 내로 효과적으로 침투하여 활성을 나타내므로, 허혈손상으로부터 세포를 보호하여 신경퇴행성 질환 치료 용도로 이용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0031]

도 1은 Tat-Atox1 융합단백질의 개략 구조와 정제 데이터를 나타낸다. 15% SDS-PAGE와 항-토끼 폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석을 통해 Tat-Atox1 융합단백질, Atox1 단백질의 발현 및 정제를 확인하였다.

도 2는 HT22 세포에서 Tat-Atox1 융합단백질, Atox1 단백질의 형질도입을 나타내는 그래프와 데이터이다. 60분 동안 배양배지에서 Tat-Atox1 융합단백질 (0.5~3  $\mu$ M)과 대조군 Atox1 단백질을 처리한 것 (A), 배양배지에 10~60분 동안 Tat-Atox1 융합단백질 (3  $\mu$ M)과 대조군 Atox1 단백질을 처리한 것 (B), Tat-Atox1 융합단백질을 세포에 미리 처리한 후 36시간까지 배양한 것(C).

도 3은 HT22 세포 내부로 Tat-Atox1 융합단백질의 투과를 나타낸다. 형광현미경을 이용하여 형질 도입된 Tat-Atox1 융합단백질을 관찰한 것이다. 크기 막대 = 20  $\mu$ m.

도 4는 HT22 세포에서 미리 Tat-Atox1 융합단백질 (0.5~3  $\mu$ M) 과 Atox1 단백질 (0.5~3  $\mu$ M)을 처리한 다음 과산화수소 (1 mM)를 두 시간 동안 처리하고 세포의 생존력을 MTT를 사용하여 발색 분석한 결과이다.

도 5는 세포에서 과산화수소의 처리로 인해 생성된 활성산소종에 대해 형질 도입된 Atox1 융합단백질의 효과를 나타낸다. 먼저 1시간 동안 HT22 세포에 처리된 3 $\mu$ M Tat-Atox1 융합단백질을 대조군 Atox1 단백질과 함께 과산화수소를 처리하였다. 세포 내 활성산소종 수준은 DCF-DA로 염색한 후 ELISA 플레이트 판독기로 형광도를 측정하였다. 크기 막대 = 20  $\mu$ m.

도 6은 과산화수소로 유도된 DNA 단편화 (fragmentation)에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과를 나타낸다. 세포에 Tat-Atox1 융합단백질 (3 $\mu$ M)을 한 시간 동안 처리한 후 과산화수소 (1mM)를 4시간 처리하였다. DNA 단편화 (frgmentaion)는 TUNEL 염색과 ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 형광강도로 나타내었다.

도 7은 과산화수소로 유도된 친세포사멸성 단백질과 항세포사멸성 단백질에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 효과를 나타낸다. HT22 세포에 Tat-Atox1 융합단백질 (0.5-3 $\mu$ M)과 대조군 Atox1 단백질 (0.5-3 $\mu$ M)을 한 시간 동안 형질도입시킨 후 과산화수소(1mM)를 처리하였다. Tat-Atox1 융합단백질에 의해 Bcl-2의 발현량은 증가하고, Bax와 절단된 캐스페이즈-3 (caspase-3)의 발현량은 감소하였다 (A). 위와 같이 단백질 형질도입 후, 과산화수소로 인해 유도된 세포사멸 단백질인 pAkt와 pBad가 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과로 발현량이 감소하였다 (B).

도 8은 산화 스트레스로 인한 p53 단백질과 p21 단백질에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과를 나타낸다. HT22 세포에 Tat-Atox1 융합단백질 (0.5-3 $\mu$ M)과 대조군 Atox1 단백질 (0.5-3 $\mu$ M)을 한 시간 동안 형질도입시킨 후 과산화수소(1mM)를 처리하였다.

도 9는 과산화수소로 유도된 MAPKs에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 효과를 나타낸다. 과산화수소 (1mM)를 처리하여 HT22 세포 내에 MAPKs인 p38, pErk를 유도하였다. 미리 형질도입된 Tat-Atox1 융합단백질이 각각에 대해 보호효과를 나타내었다. 즉, P38, pErk 발현량이 모두 감소하였다.

도 10a는 뇌허혈에 대한 보호효과를 확인하기 전에 먼저 Tat-Atox1 융합단백질이 저밀도의 해마 CA1 구역으로 침투했는지 확인해야 하므로, 해마 CA1 구역에 항 히스티딘 항체를 이용한 조직 웨스턴 블랏 분석법을 통해 확인한 것이다.

도 10b는 Tat-Atox1 융합단백질이 해마 CA1 구역에 형질전환된 것을 나타낸다.

도 11의 A는 뇌 허혈에 의해 유도된 신경아교증 (gliosis) 반응에서 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과를 GFAP-면역반응성 정상세포를 통해 CA1 구역의 모든 층을 확인해본 결과이다. B는 뇌 허혈손상에 대하여 Tat-Atox1 융합 단백질의 신경보호 효과를 확인하기 위한 운동 활성 (locomotor activity)을 측정한 결과이다. C는 Tat-Atox1 융합단백질이 뇌 허혈을 일으키는 지질 과산화를 억제하는지 해마에서 지질 과산화 마커인 HNE의 수준을 측정한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032]

아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 Tat-Atox1 융합단백질에 대하여만 기술하였으나, CBR1-Tat 융합단백질, Tat-CBR1-Tat 융합단백질도 Tat-Atox1 융합단백질과 같이 세포 투과성을 나타내며, 세포 및 모델 동물 실험에서 Tat-Atox1 융합단백질과 유사한 정도의 결과를 나타낸다.

[0033]

## 재료

[0034]

HT22 세포는 쥐 해마 신경세포로서, 한국, 서울에 있는 한국세포주연구재단 (Korean cell line research foundation)에서 입수하였다. 세포는 10%의 FBS (fetal bovine serum)와 항생제 (100 µg/ml 스트렙토마이신 및 100 U/ml 페니실린)를 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 그리고 HT22 세포를 6웰에 깔고 37 °C를 유지해주는 습도조절장치에서 95% 산소, 5% 이산화탄소의 조건에서 배양하였다. 플라스미드 pET-15b 벡터와 Escherichia coli BL21 (DE3)은 Novagen에서 구입하였다. FBS와 항생제는 Gibco BRL에서, Ni<sup>2+</sup>-나이트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen에서 구매하였다. Tat 펩타이드는 PEPTRON(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

[0035]

## 실험방법

[0036]

### Tat-Atox1 융합단백질의 발현과 정제

[0037]

Tat-발현 벡터는 실험실에서 사전에 준비해두었다. 인간의 유전자 중의 하나인 Atox1을 cDNA와 함께 2개의 프라이머를 이용한 PCR 기술로 증폭시켰다. 센스 프라이머는 5'-CTCGAGATGCCGAAGCAGC-3'과 같이 구성되어 있고, Xho1이라는 제한효소 작용부위가 존재한다. 그리고 안티센스 프라이머는 5'-GGATCCCTACTCAAGGCAAGG-3'으로 구성되어 있고 BamH1이라는 제한효소의 작용부위가 있다. PCR을 통하여 얻은 결과물을 TA 벡터에 연결하고 Xho1과 BamH1을 이용하여 자른 후에 발현벡터에 연결하여 Tat-Atox1 플라스미드를 제조하였다. 이와 마찬가지로 대조군으로는 Tat 펩타이드를 연결하지 않은 Atox1을 이용하였다. 재조합된 Tat-Atox1 플라스미드를 대장균인 BL21으로 형질변환 시킨 후 0.5mM IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactoside) (Duchefa, Haarlem, Netherlands)로 유도하여 18 °C에서 하루 넘게 배양하였다. 배양한 세포를 초음파 처리로 분쇄하여 Tat-Atox1 융합단백질을 얻기 위해 Ni<sup>2+</sup>-나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Braunschweig, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질의 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준 물질로 사용하여 Bradford 측정법으로 측정하였다.

[0038]

### Tat-Atox1 융합단백질의 HT22 세포 내 투과

[0039]

Tat-Atox1 융합단백질의 세포 내 투과를 관찰하기 위해 한 시간 동안 다양한 농도로 처리하였다. 그 후에 트립신-EDTA를 처리하고 PBS (phosphate-buffered saline)를 이용하여 세척한 다음 세포 내로 투과된 융합단백질의 양과 활성을 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였다.

[0040]

## 웨스턴 블랏 분석

[0041]

세포의 용해물인 단백질은 15% SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분석하였다. 단백질은 전압차이에 의해 나이트로셀룰로스 막으로 이동하게 되고, 이 막을 PBS에 5% 탈지유 용액을 만들어서 담가두었다. 막은 먼저 제조업체에서 권장하는 일차 항체를 사용하여 면역블랏 기법을 통해 확인하였다. 단백질은 제조사 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 지시한 대로 화학형광을 통해 알아내었다.

[0042]

## 형광현미경 분석

[0043]

플레이트에 커버슬립을 깔고 그 위에 배양세포를 깔고 3µM Tat-Atox1 융합단백질을 처리하였다. 그 후 37 °C에서 1시간 동안 배양하고 PBS를 이용하여 2번 정도 씻어주고, 4% 파라포름알데하이드를 5분간 상온에서 고정시켰다. 그 다음 PBS에 3%의 BSA (bovine serum albumin), 0.1% Triton X-100이 되도록 첨가하여 PBS-BT 완충액을 만들고, 상온에서 30분간 세포에 처리한 후 다시 한 번 PBS-BT로 씻어주었다. 일차항체 (His-probe, Sadnta Cruz Biotechnology)는 1:2000로 희석하여 상온에서 4시간 처리하였다. 이차항체 (Alexa fluor 488, Invitrogen)는 1:15000로 희석하여 빛이 차단된 환경에서 1시간 동안 처리하였다. 또한, 핵을 염색하기 위해 2분 동안 1µg/ml DAPI (Roche)를 사용하였다. 후에 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 형광분석을

하였다.

[0044] **MTT 분석**

[0045] Tat-Atox1 융합단백질의 생물학적 활성도는 과산화수소를 세포에 처리하여 얼마만큼 세포가 생존하고 있는지 알아봄으로써 측정할 수 있다. HT22 세포를 96웰 플레이트에 70% 되게 깔아주고 먼저 Tat-Atox1 융합단백질을 처리하였다. 그리고, 과산화수소를 1mM 농도로 배양액에 처리해 주고 2시간 동안 배양하였다. 후에 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide}를 이용하여 540 nm에서의 ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)를 통해 측정하였다. 세포 생존율은 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포와 비교하여 백분율로 나타내었다.

[0046] **세포 내 활성산소종 측정**

[0047] DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하여 세포 안의 활성산소종 수준을 측정하였다. DCF-DA는 활성산소종에 의해 세포 안에서 DCF를 형광으로 변화시켜 준다. HT22 세포에 Tat-Atox1 융합단백질을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 활성산소종을 측정해 보았다. Tat-Atox1 융합단백질은 1시간 동안 처리하였고 후에 과산화수소(1mM)를 10분 동안 처리하였다. 그 후 PBS로 씻어 준 다음 DCF-DA를 20uM의 농도로 30분간 처리해 주었다. 세포의 형광도는 485nm 여기 파장과 538nm 방출 파장에서 Fluoroskan ELISA 플레이트 판독기 (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)를 이용하여 측정하였다.

[0048] **TUNEL 분석**

[0049] HT22 세포에 Tat-Atox1 융합단백질을 처리하지 않은 군과 3uM의 농도로 1시간 동안 처리한 군의 배양액에 과산화수소(1mM)를 가하여 4시간 동안 처리하였다. 세포사멸을 측정하기 위해 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick end labeling staining) 기법으로 세포사멸 탐지 키트 (Roche Applied Science)를 사용하였다. 이미지는 형광현미경 (Nikon eclipse 80i, Japan)을 통해 확인하였다.

[0050] **동물실험에서 뇌 허혈 유도**

[0051] 저빌쥐를 사용하였다. 23 ℃, 습도 60% 그리고 고정적으로 12시간의 빛과 음식물이 제공되는 곳에서 사육되었다. 이것은 세계에서 현재 통용되고 있는 동물보호법에 따른 것이다. 수컷 저빌쥐의 무게가 65-75g일 때 일반적으로 2.5% 아이소플루란 (Abbott Laboratories, USA)에 33% 산소 그리고 67% 아산화질소를 섞은 것으로 마취했다. Tat-Atox1 융합단백질을 도입하여 뇌 허혈에 의한 손상에 대해 얼마나 보호효과가 있는지 알아보았다. Tat-Atox1 융합단백질을 5mg/kg의 농도로 도입한 후 저빌쥐의 온목동맥을 30분간 폐색시켰다. 이것은 목의 정중양을 절개하고 그 안에 존재하는 혈관을 폐색한 것이다. 온목동맥을 신경 섬유들로부터 격리시켜 폐색시켰다. 혈류를 폐색시켰을 때 혈압을 주의 깊게 관찰하였다. 그 후 5분 동안 폐색하고 동맥류 클립 (aneurysm clips)을 제거하였다. 그리고, 폐색에 대해 혈압이 회복되는 것을 확인하였다. 외과적인 수술 후 국소 마취로부터 완전히 회복될 때까지 직장내 온도를 37로 유지 및 관찰하였다. 4일과 7일 후 허혈 재관류하고 여러 그룹으로 나누어 안락사시켰다.

[0052] **면역조직염색**

[0053] Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 후에 신경교종 반응과 신경보호효과를 면역조직염색 방법으로 확인하였다. 절편에 대해 Iba-1 항체와 GFAP 항체를 사용하여 면역조직염색하였다.

[0054] **뇌의 해마 부분에서 지질 과산화 측정**

[0055] 뇌 상층액을 100 uL씩 나눈 것에 8.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 750 uL의 20% 아세트산 (pH 3.5), 750 uL의 0.8% 티오바비투릭산 (thiobarbituric acid) 그리고 300 uL의 증류수로 구성된 혼합물을 반응시켰다. 이

시료를 95 °C에서 한시간 동안 끓인 후 10분간 4000 g로 원심분리하고 분광광도계로 흡광도를 측정하였다.

[0056]

### **결과 1: Tat-Atox1 융합단백질의 발현과 정제**

[0057]

세포에 침투 가능한 Atox1의 과대발현 조절을 위해 인간 Atox1 유전자에 박테리아 발현벡터인 Tat 펩타이드를 융합하여 Tat-Atox1 융합단백질과, 대조군으로 Tat 단백질 수송 도메인이 결여된 Atox1 단백질을 제조하였다. IPTG로 과대발현을 유도한 뒤에 Tat-Atox1 융합단백질을  $Ni^{2+}$ -나이트릴로삼초산 세포파조 친화 크로마토그래피로 정제하였다. SDS-PAGE와 웨스턴 블랏 분석법으로 정제된 Tat-Atox1 융합단백질을 확인하였다. 도 1B와 C는 Tat-Atox1 융합단백질, Atox1 단백질의 발현과 정제 후 15% SDS-PAGE와 항 토끼 폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏 결과이다.

[0058]

### **결과 2: HT22 세포로 Tat-Atox1 융합단백질의 투과**

[0059]

Tat-Atox1 융합단백질의 세포투과능력을 확인하기 위해 60분 동안 HT22 세포에 Tat-Atox1 융합단백질을 다양한 농도로 처리하였다. 후에 단백질이 투과된 정도를 웨스턴 블랏 분석법을 이용하여 측정해보았다. 단백질은 농도 의존적으로 HT22 세포 내부로 투과되었다 (도 2A). 또한, Tat-Atox1 융합단백질이 시간 의존적으로 투과되는지 확인하기 위해 동일한 농도인 3 $\mu$ M로 단백질을 처리한 후 일정한 시간 간격을 두고 확인해 보았다. 투과된 단백질의 정도는 웨스턴 블랏을 통해 분석하였다 (도 2B). 세포 내부로 투과된 Tat-Atox1 융합단백질은 60분까지 점진적으로 증가함을 확인하였다. A와 B를 보면 Tat-Atox1 융합단백질이 시간 및 농도 의존적으로 세포 내 투과가 효과적으로 일어남을 알 수 있었다. 그러나 대조군인 Atox1 단백질은 세포 내부로 투과하지 못했다. 도 2C는 HT22 세포 내부로 투과된 Tat-Atox1 융합단백질이 얼마 동안 안정적으로 존재하는지 보여준다. 3 $\mu$ M의 일정한 농도로 여러 기간 동안 Tat-Atox1 융합단백질을 세포배양액 내에 처리한 결과는 웨스턴 블랏 분석법을 통해 확인하였고, 밴드의 밀집도가 단백질의 농도를 의미한다. 세포 내부의 Tat-Atox1 융합단백질은 처리 1시간 후부터 투과된 것을 확인할 수 있다. 세포 내로 투과된 Tat-Atox1 융합단백질은 시간이 지남에 따라 분해되어 단백질의 양이 점차 감소하였으나, 최소 36시간 동안 세포 내에 존재함을 알 수 있었다.

[0060]

나아가 세포 내 어디로 단백질이 투과되었는지 DAPI (4',6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)와 Alexa 488을 확인하기 위해 공초점 현미경을 이용하였는데, 단백질이 세포의 세포질과 핵 내부에 존재하는 것을 볼 수 있다. 이 결과를 토대로 Tat-Atox1 융합단백질이 세포 내부로 효과적으로 투과됨을 확인하였다.

[0061]

### **결과 3: 산화 스트레스를 받은 세포에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 영향**

[0062]

Tat-Atox1 융합단백질이 산화 스트레스를 받은 세포에 어떤 작용을 하는지 알아보기 위해 과산화수소를 처리한 후 MTT 분석을 수행하였다. 1mM의 과산화수소를 처리한 세포는 처리하지 않은 세포에 비해 54%만이 생존하는 것을 확인하였다. 도 3A를 보면 과산화수소를 처리하기 전 먼저 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 세포에서는 최대 84%까지 생존하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 대조군인 Atox1 단백질을 처리한 세포에서는 보호효과가 없었다 (도 3A). 또한, 본 발명자들은 Tat-Atox1 융합단백질이 활성산소종 억제 효과를 나타내는지 알아보았다. 도 3B는 세포에 과산화수소를 처리하였을 때 활성산소종 수준을 측정한 것이다. 과산화수소를 처리한 후 활성산소종이 유발된 세포를 DCF-DA로 염색한 후 활성산소종에 의해 나타난 형광을 관찰하였다. 대조군 세포 (Tat 펩타이드 또는 Atox1 단백질만 처리한 세포)에서 활성산소종 수준은 과산화수소만을 처리하였을 때의 결과와 비슷한 양상을 나타내었다. 이와는 반대로 Tat-Atox1 융합단백질이 처리된 세포에서 활성산소종 수준은 감소하였다 (도 3B).

[0063]

본 발명자들은  $H_2O_2$ 를 처리함으로써 유도된 활성산소종에 대해 Atox1 단백질 자체가 항산화 방어 효과가 있는지 확인해 보았다. Tat-Atox1 융합단백질 처리군과 Atox1 단백질 처리군에  $H_2O_2$ 를 처리한 후 SOD1 항체를 사용하였다. 두 그룹 모두 SOD1의 발현량에 아무런 변화가 없었다. 따라서 결과적으로 Atox1 단백질 자체만으로도 활성산소종에 대한 세포 보호효과가 있다는 것을 확인하였다.

[0064]

그 다음으로, 투과된 Tat-Atox1 융합단백질이 DNA 조각화 (fragmentation)에 대하여 보호효과가 있는지 TUNEL 염색 방법으로 확인해보았다. 도 4A에서는 과산화수소를 처리한 세포에서 처리하지 않은 대조군보다 많은 양의 형광도가 보이고 과산화수소와 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 세포에서 형광도가 많이 감소하는 것을 확인할

수 있다. 이와는 반대로, 대조군인 Atox1 단백질 처리군과 Tat 펩타이드 처리군에서는 과산화수소만 처리한 세포와 비슷한 형광도를 보였다.

**결과 4: 산화 스트레스에 의해 유도된 세포사멸에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과**

세포는 산화 스트레스와 같은 외부의 자극에 많이 노출되면 세포사멸로 이어진다. Tat-Atox1 융합단백질이  $H_2O_2$ 에 의해 유도되는 세포사멸 과정 중에서 항산화 단백질과 산화 단백질의 발현에 대해 미치는 효과를 확인해 보았다. 우리는  $H_2O_2$ 로 유도되는 활성산소종 신호에 의해 친-세포사멸 마커 단백질 및 항-세포사멸 마커 단백질을 이용하여 Tat-Atox1 융합단백질이 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포사멸에 대해 보호 효과를 가지는지 확인해 보았다. 먼저  $H_2O_2$ 를 처리한 다음, 항-세포사멸 마커 단백질인 Bcl-2 및 친-세포사멸 단백질인 Bax와 caspase 3의 발현을 확인하였다 (도 5A). 각각 Bcl-2, Bax, caspase 3 항체를 사용하여 웨스턴 블랏 분석법을 통해 알아보았다. Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 Bcl-2의 수준이 점차 증가하였지만, 이에 반하여 Atox1 단백질 처리군에서는 아무런 효과가 없었다. 또 Bax와 caspase 3의 수준은 Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서 두드러지게 억제되는 것을 확인하였다. 그러나 Atox1 단백질 처리군에서는 Bax와 caspase3의 수준이 억제되지 않았다.

활성산소종에 의해 유도된 세포사멸 (Apoptosis)은 신경세포사멸을 억제하는 데에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 산화 스트레스로 인하여 인산화된 Akt (ser-473)의 활성이 증가되면 세포사멸이 활성화되어 신경세포사멸이 일어난다. 그리고, 인산화된 Akt는 친-세포사멸 단백질인 Bad(s112)를 인산화시킨다. 그래서, 본 발명자들은  $H_2O_2$ 로 유도된 활성산소종에 의해 pAkt(s473)와 pBad(s112)에 대하여 Tat-Atox1 융합단백질이 보호효과가 있는지 확인해 보았다 (도 5B). Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서는 농도 의존적으로 pAkt와 pBad가 점차 감소하는 것을 확인하였지만, Atox1 단백질 처리군에서는 감소하지 않았다. 따라서, 이러한 결과는 Tat-Atox1 융합단백질이 HT22 세포에서  $H_2O_2$ 로 인해 유도된 산화 스트레스로 인한 세포사멸 과정에서 항산화 방어효과가 있음을 보여준다.

**결과 5: Tat-Atox1 융합단백질이  $H_2O_2$ 로 유도된 p21(WAF1/CIP1/SDI1)과 p53에 미치는 효과**

산화 스트레스로 인해 유도된 활성산소종은 DNA 손상을 포함하여 여러 기작으로 세포사멸을 일으킨다.  $H_2O_2$ 로 유도된 p53은 세포 성장에 관여하며, p21/WAF1을 활성화시켜 결국 세포사멸이 일어나게 된다. 본 발명자들은 Tat-Atox1 융합단백질이 산화 스트레스에 대해 세포사멸로부터 세포를 보호하는 효과가 있는지 확인하였다 (도 6A). Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서는 p21과 p53 모두 눈에 띄게 감소하였지만, Atox1 단백질 처리군에서는 전혀 효과가 없었다. 따라서, Tat-Atox1 융합단백질은 활성산소종에 의한 신경세포사멸로부터 친-세포사멸 단백질인 p21과 p53 생성을 억제한다.

**결과 6: Tat-Atox1 융합단백질의 P38 인산화 및 활성화 억제와 허혈-유도 세포사멸 억제효과**

세포 생존신호는  $H_2O_2$ 의 처리와 같은 외부적인 스트레스, 성장인자에 의해 시작되어 활성을 나타낸다. 그 중에서 MAPKs (Mitogen-activate protein kinase)는 허혈 손상에서 아주 중요한 역할을 한다. 우리는 위에서와 같이 Tat-Atox1 융합단백질이  $H_2O_2$ 로 인한 활성산소종 신호에 의해 활성화된 MAPKs에 대해 세포 보호효과가 있는지 확인해 보았다 (도 6B). 먼저 웨스턴 블랏 분석법을 이용하여 Tat-Atox1 융합단백질을 처리한 후  $H_2O_2$ 를 처리한 다음, p38의 활성화를 확인해본 결과 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. Tat-Atox1 융합단백질은 산화 스트레스에 의한 SAPK/JNK (Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase)와 ERK (Extracellular signal-regulated kinase) 활성수준에 대해서도 세포 보호효과가 있음을 확인하였다. 그러나 Atox1 단백질을 처리한 경우 p38, JNK와 ERK의 활성수준을 효과적으로 감소시키지 못하는 것을 알 수 있다. 결과적으로 Tat-Atox1 융합단백질이  $H_2O_2$  처리로 활성화된 활성산소종 신호에 의한 허혈-유도 세포사멸에 보호효과가 있음을 보여준다.

[0072] **결과 7: Tat-Atox1 융합단백질의 뇌 허혈 손상에 대한 보호효과**

[0073] 뇌허혈에 대한 보호효과를 확인하기 전에 먼저 Tat-Atox1 융합단백질이 저빌의 해마 CA1 부위로 침투했는지 확인해야 한다. 해마 CA1 부위에 따른 히스티딘 항체를 이용한 조직 웨스턴 분석법을 통해 확인하였다. 도 10a를 보면 Tat-Atox1 융합단백질이 해마 CA1 부위에 형질전환된 것을 알 수 있다. 따라서 Tat-Atox1 융합단백질의 형질도입이 생체 안에서의 생물학적 역할을 알아보기 위해 Tat-Atox1 융합단백질을 신경세포에 형질도입 후 일시적으로 저빌에서 뇌 허혈을 일으켰다. 아무것도 처리하지 않은 대조군에서는 해마 CA1 부위에서 많은 양의 NeuN-면역반응성 뉴런이 관찰되었다 (도 10b). 대조군으로 허혈군에서는 적은 양의 NeuN-면역반응성 뉴런을 확인하였고, 대조군의 7.9%만이 존재하였다. Tat-펩타이드 처리군과 Atox1 단백질 처리군에서도 NeuN-면역반응성 뉴런이 소량으로 확인되었다. 그리고, Tat-펩타이드 처리군과 Atox1 단백질 처리군의 NeuN-면역반응성 뉴런은 대조군과 비교했을 때 각각 17.9%, 14.2%로 존재하였다. Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서는 담체 처리 허혈군과 비교했을 때 해마 CA1 부위에서 많은 양의 NeuN-면역반응성 뉴런이 관찰되었고, 대조군의 53.7%만큼 존재하는 것을 관찰함으로써 Tat-Atox1 융합단백질이 뇌 허혈 손상에 대한 보호효과가 있음을 확인하였다.

[0074] **결과 8: 허혈에 의해 유도된 신경아교증 반응에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과**

[0075] 도 9의 왼쪽 데이터는 허혈에 의해 유도된 신경아교증 반응에서 Tat-Atox1 융합단백질의 보호효과를 GFAP-면역반응성 정상세포를 통해 CA1 부위의 모든 층을 확인해본 결과이다. 신경아교증 반응에 의해 별아교세포가 손상되면 GFAP-면역반응성 정상세포의 양이 급격히 증가한다. 대조군에서는 GFAP-면역반응성 정상세포가 작은 사이즈의 세포질과 함께 실과 같은 가느다란 돌기 모양을 나타내었다. 허혈군에서는 GFAP-면역반응성 정상세포가 많은 양의 세포질과 비정상적으로 발달한 돌기들과 함께 해마 CA1 부위 여러 곳에서 관찰되었다. 그리고, Tat-펩타이드 처리군과 Atox1 단백질 처리군 또한 대부분의 GFAP-면역반응성 정상세포 형태가 허혈군과 비슷한 것을 확인하였다. 그리고, Tat-펩타이드 처리군과 Atox1 단백질 처리군 또한 대부분의 GFAP-면역반응성 정상세포 형태가 허혈군과 비슷한 것을 확인하였다. 그러나, Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서는 단지 몇 개의 GFAP-면역반응성 정상세포가 세포질과 함께 비정상적으로 발달한 돌기가 확인되었을 뿐 나머지 GFAP-면역반응성 정상세포에서는 작은 세포질과 가느다란 돌기가 확인되었다.

[0076] 도 11의 오른쪽 그림은 소교세포의 마커인 Iba-1을 이용하여 Iba-1-면역반응성 소교세포에서 허혈에 의해 유도된 신경아교증에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 효과를 CA1 모든 지역에서 확인한 결과이다. 아무것도 처리하지 않은 대조군에서는 Iba-1-면역반응성 소교세포가 so와 sr에서 관찰되었다. Iba-1-면역반응성 소교세포는 둥근 모양의 세포질과 돌기가 가늘고 긴 형태를 띠는 것을 확인하였다. 허혈군에서는 Iba-1-면역반응성 소교세포가 so, sr뿐만 아니라 sp에서도 관찰되었다. sp에서는 돌기가 형성되지 않은 비정상적인 모양을 지닌 세포질을 확인하였고, 그 외 나머지 지역에서 또한 두껍고 움츠러든 돌기를 가진 비정상적인 세포질을 관찰할 수 있었다. Iba-1-면역반응성 소교세포가 거대한 지질 층이 집합을 이루고 면역반응이 매우 강하게 일어남을 보여준다. 그리고, Tat-펩타이드 처리군과 Atox1 단백질 처리군에서는 Iba-1-면역반응성 소교세포의 형태와 분포도가 허혈군과 비슷한 패턴을 보였다. Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서는 sp 지역에서 소량의 Iba-1-면역반응성 소교세포가 관찰되었는데 두껍고 움츠러든 돌기를 가진 세포질뿐만 아니라 길고 가느다란 돌기를 가진 세포질도 함께 관찰되었다. 이는 Iba-1-면역반응성 소교세포의 면역반응이 CA1 지역에서 현저히 감소함을 보여준다.

[0077] **결과 9: 자발 운동 활성**

[0078] 허혈손상에 대하여 Tat-Atox1 융합단백질의 신경보호 효과를 확인하기 위해 운동활성을 측정하였다. 허혈손상을 유발하기 전과 유발시킨 다음 하루가 지난 후에 측정하였다. 운동활성은 허혈/재관류를 유도하였을 때 아무것도 처리하지 않은 대조군보다 2.9배 증가하는 것을 볼 수 있다. 그리고, Tat-펩타이드 처리군과 Atox1 단백질 처리군에서도 운동활성이 허혈군과 유사하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나, Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서는 운동활성이 허혈을 유도하기 전보다 약 1.9배로 증가하는 것을 확인하였다.

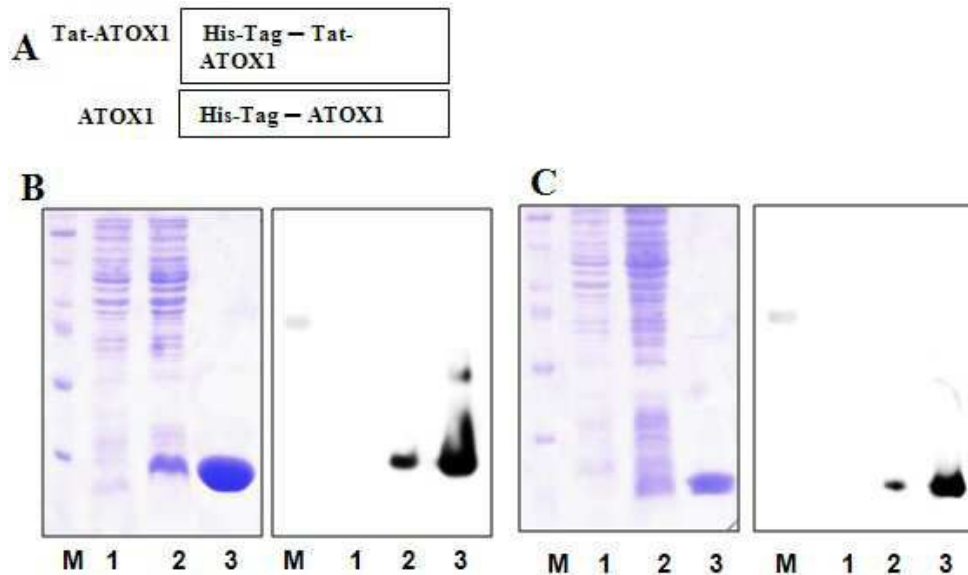
[0079] **결과 10: 해마에서 지질과산화에 대한 Tat-Atox1 융합단백질의 효과**

[0080] Tat-Atox1 융합단백질이 허혈을 일으키는 지질 과산화를 억제하는지 해마에서 지질 과산화 마커인 HNE (4-hydroxy-2-nonenal)의 수준을 측정하였다. 대조군에서는 HNE 수준이 1.35 mmol/g protein이었다. 허혈/재관류

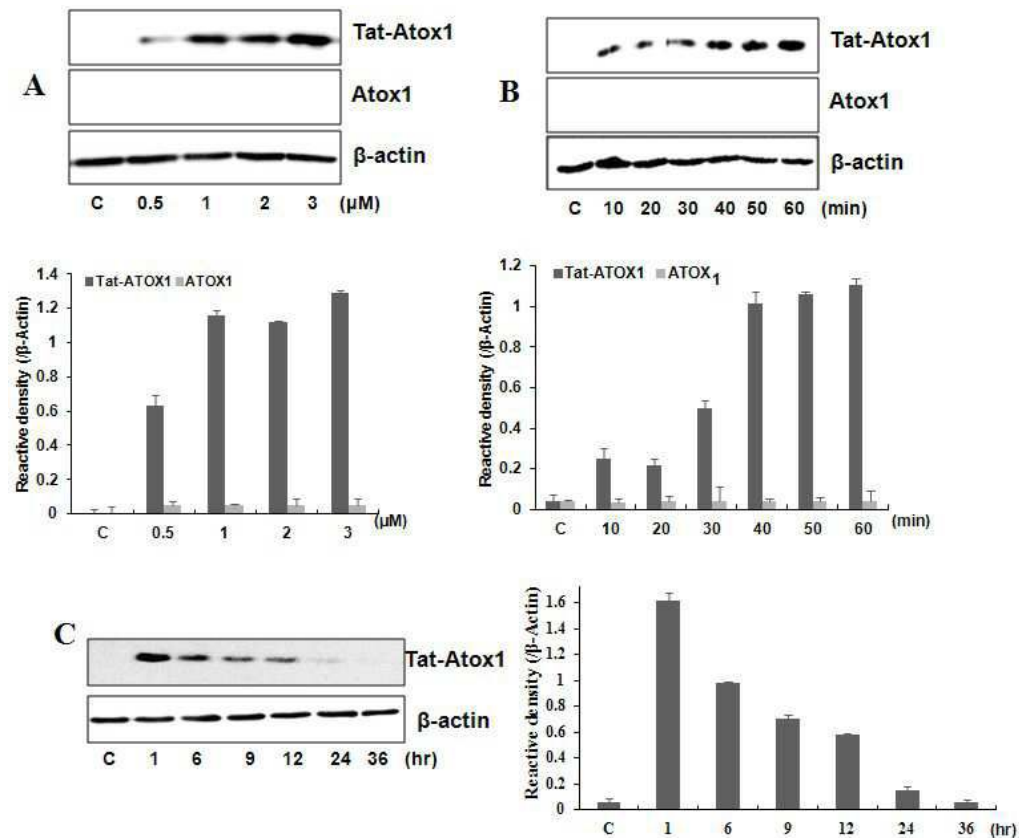
를 일으킨 다음 3시간 후 측정된 모든 시험군에서 HNE 수준은 대조군과 비교했을 때 모두 증가하였다. 허혈군에서는 HNE 수준이 대조군보다 2.51배 증가하였고, Tat-펩타이드 처리군, Atox1 단백질 처리군 또한 허혈군과 비슷한 양상을 보였다. 그러나, Tat-Atox1 융합단백질 처리군에서 HNE 수준은 뇌 허혈군보다 현저히 감소함을 확인하였다. 이 그룹에서의 HNE 수준은 대조군의 1.55배만 증가함을 알 수 있다.

## 도면

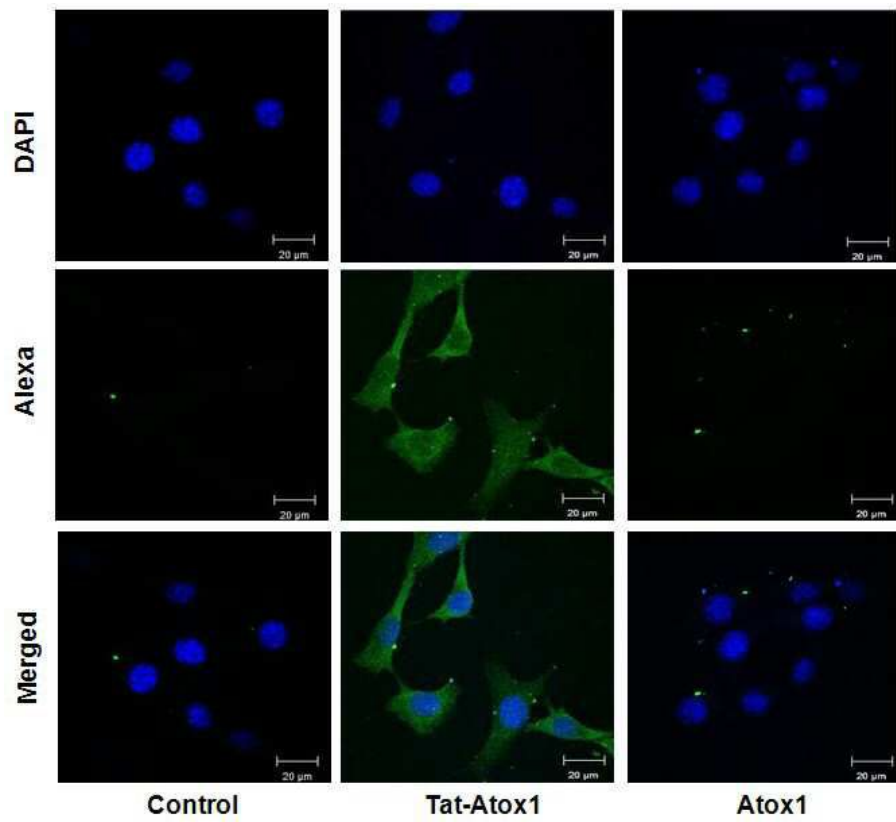
### 도면1



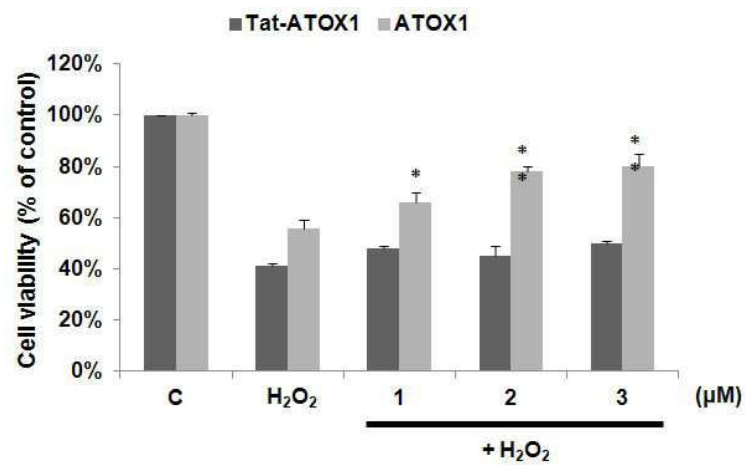
### 도면2



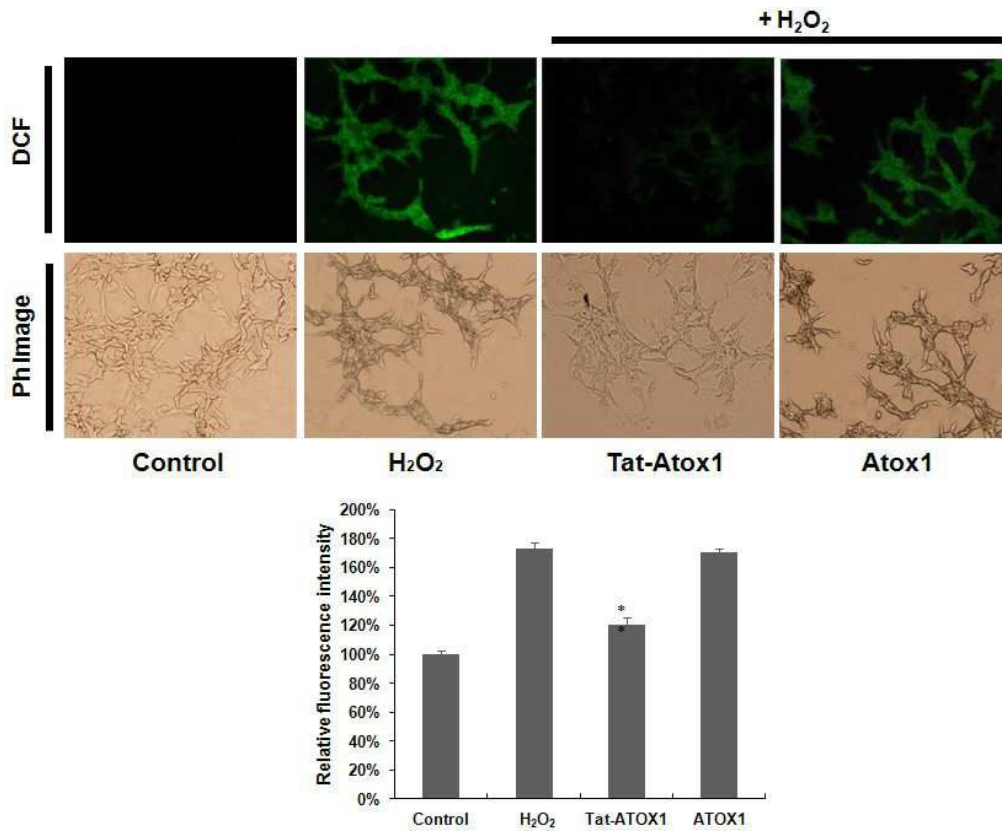
도면3



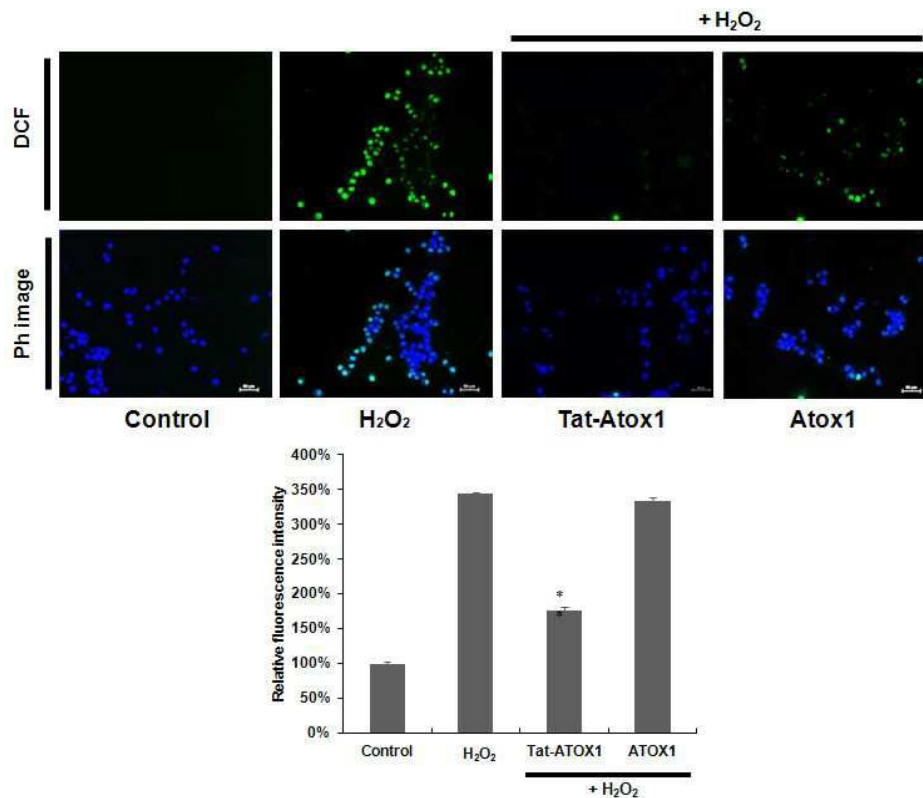
도면4



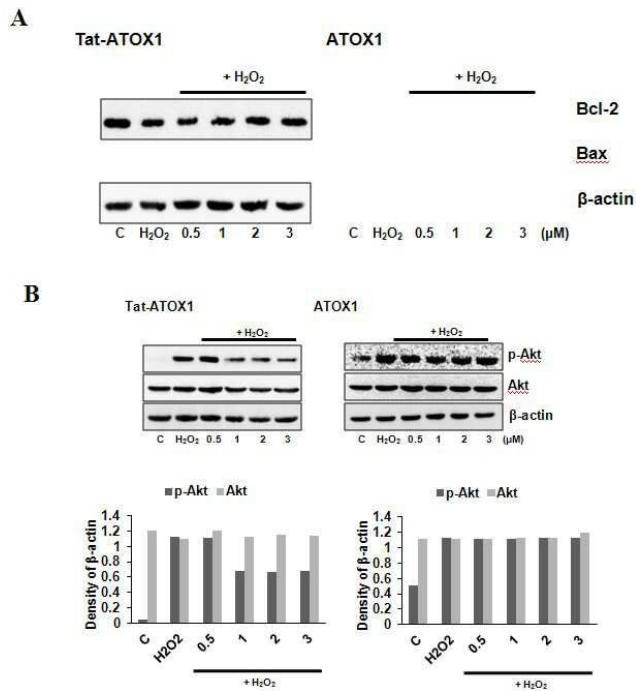
도면5



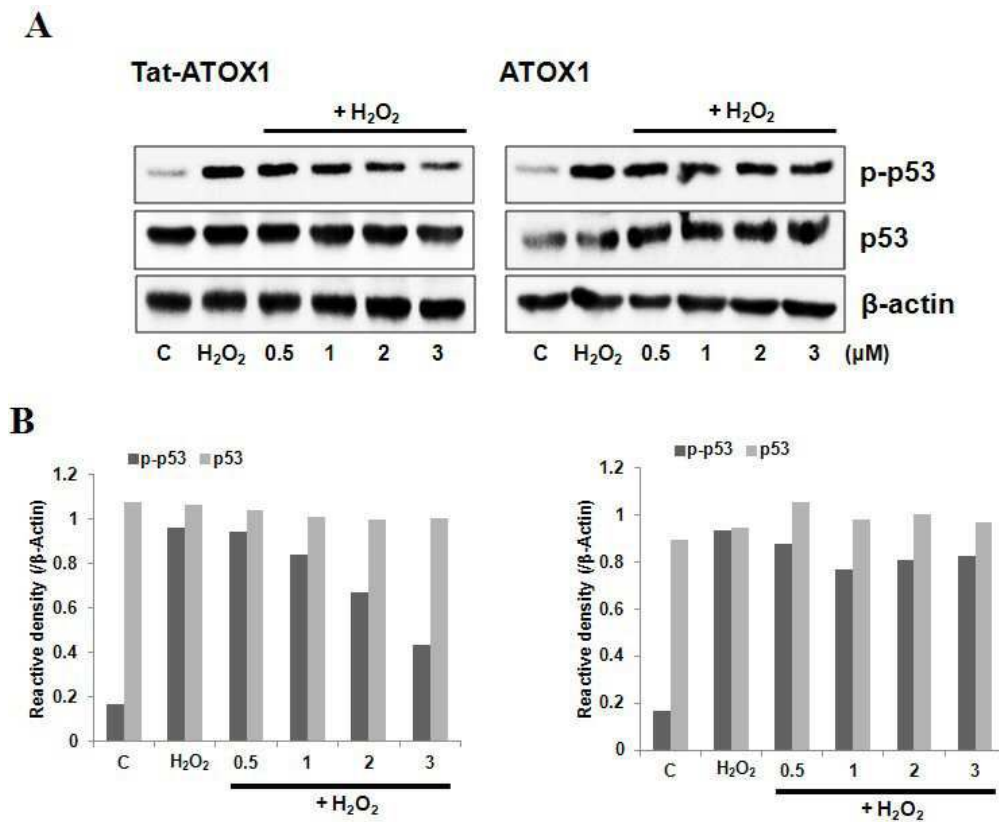
도면6



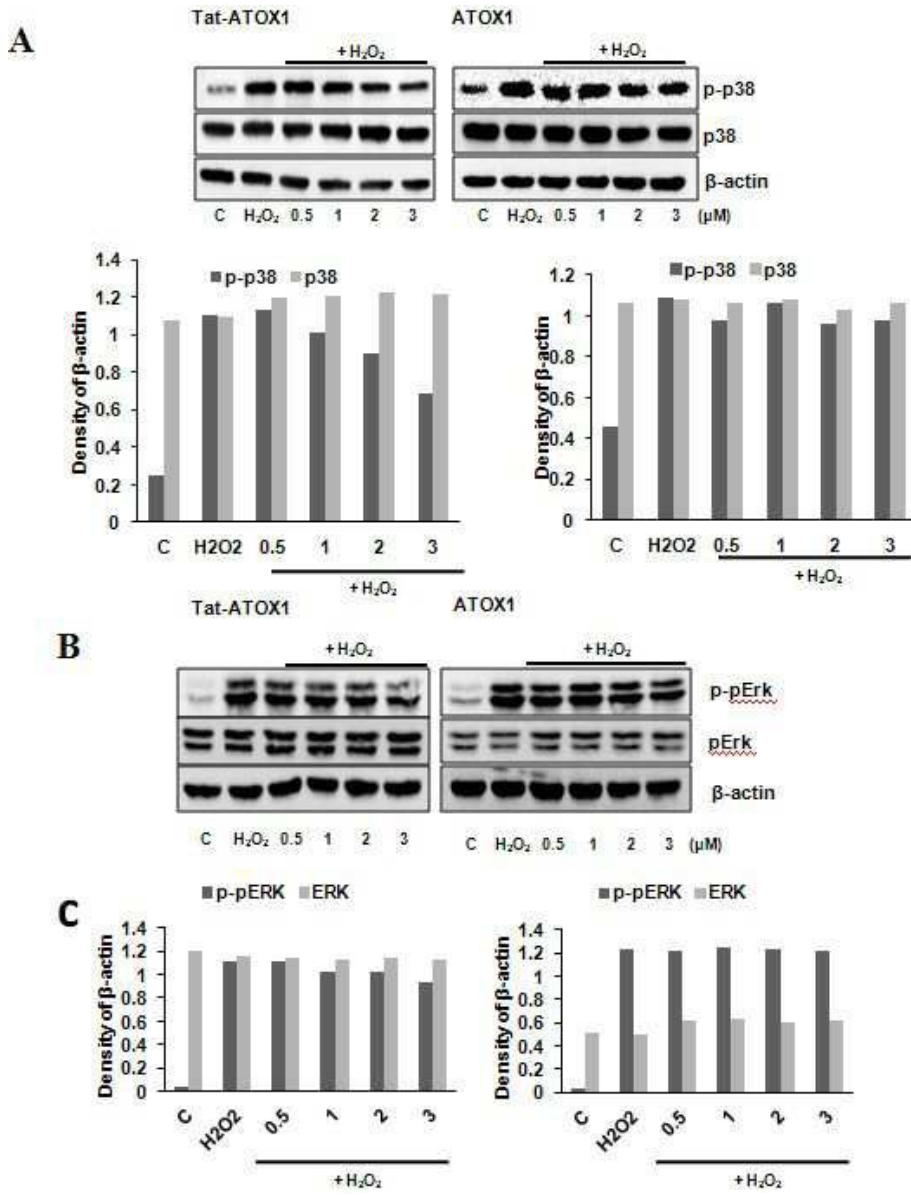
도면7



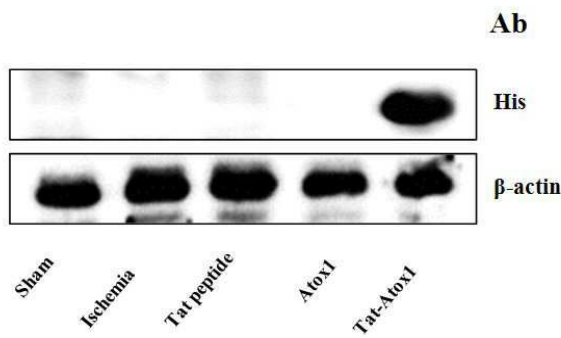
도면8



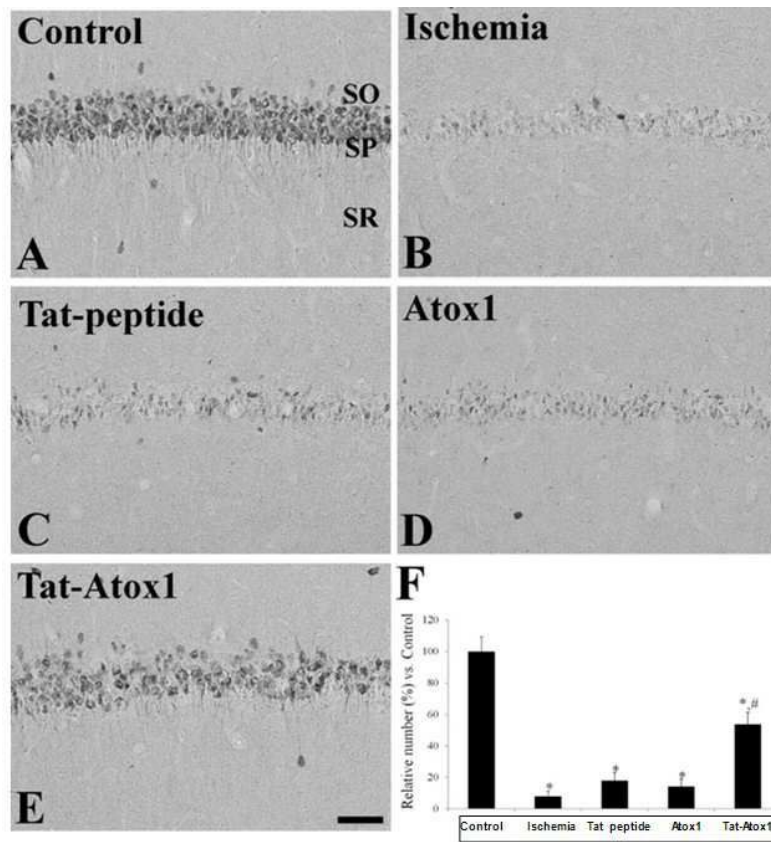
도면9



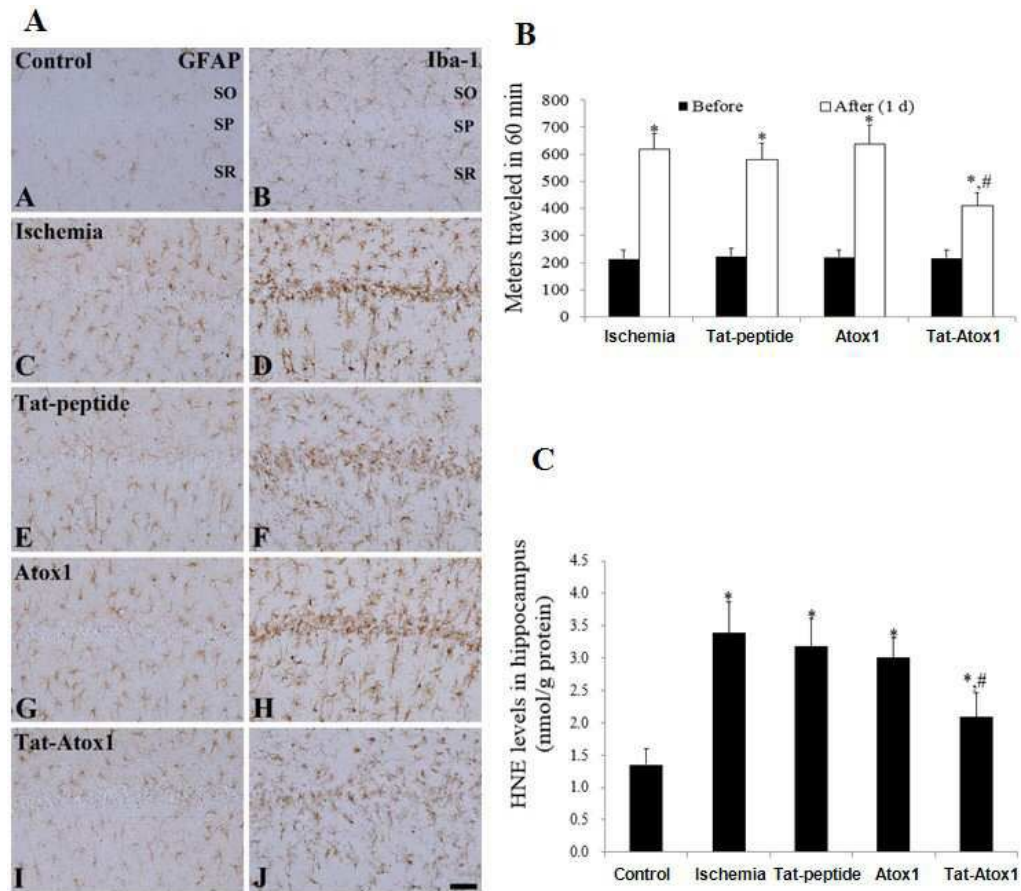
도면10a



도면10b



도면11



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for treating ischemia containing cell-transducible Atox1 fusion protein
- <130> HallymU-syCHOI-Atox1-Ischemia
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- ctcgagatgc cgaagcacg
- <210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggatccctac tcaaggccaa gg

22

<210> 3

<211> 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding Tat-Atox1 fusion protein

<400> 3

agcagcggcc tgggtccgcg cggcagccat aggaagaagc ggagacagcg acgaagactc

60

gagatgccga agcagcagtt ctctgtggac atgacctgtg gaggctgtgc tgaagctgtc

120

tctcgggtcc tcaataagct tggaggagtt aagtatgaca ttgacctgcc caacaagaag

180

gtctgcattg aatctgagca cagcatggac actctgcttg caaccctgaa gaaaacagga

240

aagactgttt cctaccttgg ccttgagtag

270

<210> 4

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Atox1 fusion protein

<400> 4

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Pro Lys His Glu

1 5 10 15

Phe Ser Val Asp Met Thr Cys Gly Gly Cys Ala Glu Ala Val Ser Arg

20 25 30

Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Val Lys Tyr Asp Ile Asp Leu Pro Asn

35 40 45

Lys Lys Val Cys Ile Glu Ser Glu His Ser Met Asp Thr Leu Leu Ala

50 55 60

Thr Leu Lys Lys Thr Gly Lys Thr Val Ser Tyr Leu Gly Leu Glu

|                                                                   |                                                  |       |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|
| 65                                                                | 70                                               | 75    |
| <210>                                                             | 5                                                |       |
| <211>                                                             | 278                                              |       |
| <212>                                                             | DNA                                              |       |
| <213>                                                             | Artificial Sequence                              |       |
| <220><223>                                                        | polynucleotide encoding Atox1-Tat fusion protein |       |
| <400>                                                             | 5                                                |       |
| agcagcggcc tggtgccggc ggcagccact cgagatgccg aagcacgagt tctctgtgga |                                                  | 60    |
| catgacctgt ggaggtctgt ctgaagctgt ctctcgggtc ctcaataagc ttggaggagt |                                                  | 120   |
| taagtatgac attgacctgc ccaacaagaa ggtctgcatt gaatctgagc acagcatgga |                                                  | 180   |
| cactctgctt gcaacctga agaaaacagg aaagactgtt tcctaccttg gccttgagta  |                                                  | 240   |
| gggatcctag gaagaagcgg agacagcgac gaagatag                         |                                                  | 278   |
| <210>                                                             | 6                                                |       |
| <211>                                                             | 77                                               |       |
| <212>                                                             | PRT                                              |       |
| <213>                                                             | Artificial Sequence                              |       |
| <220><223>                                                        | Atox1-Tat fusion protein                         |       |
| <400>                                                             | 6                                                |       |
| Met Pro Lys His Glu Phe Ser Val Asp Met Thr Cys Gly Gly Cys Ala   |                                                  |       |
| 1                                                                 | 5                                                | 10 15 |
| Glu Ala Val Ser Arg Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Val Lys Tyr Asp   |                                                  |       |
| 20                                                                | 25                                               | 30    |
| Ile Asp Leu Pro Asn Lys Lys Val Cys Ile Glu Ser Glu His Ser Met   |                                                  |       |
| 35                                                                | 40                                               | 45    |
| Asp Thr Leu Leu Ala Thr Leu Lys Lys Thr Gly Lys Thr Val Ser Tyr   |                                                  |       |
| 50                                                                | 55                                               | 60    |
| Leu Gly Leu Glu Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg               |                                                  |       |
| 65                                                                | 70                                               | 75    |
| <210>                                                             | 7                                                |       |
| <211>                                                             | 277                                              |       |
| <212>                                                             | DNA                                              |       |
| <213>                                                             |                                                  |       |
| >                                                                 | Artificial Sequence                              |       |

<220><223> polynucleotide encoding Tat-Atox1-Tat fusion protein

<400> 7

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| aggaagaagc ggagacagcg acgaagactc gagatgccga agcacgagtt ctctgtggac | 60  |
| atgacctgtg gaggctgtgc tgaagctgtc tctcgggtcc tcaataagct tggaggagtt | 120 |
| aagtatgaca ttgacctgcc caacaagaag gtctgcattg aatctgagca cagcatggac | 180 |
| actctgcttg caaccctgaa gaaaacagga aagactgttt cctaccttgg ccttgagtag | 240 |
| ggatcctagg aagaagcgga gacagcgacg aagatag                          | 277 |

<210> 8

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-Atox1-Tat fusion protein

<400> 8

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Pro Lys His Glu

1 5 10 15

Phe Ser Val Asp Met Thr Cys Gly Gly Cys Ala Glu Ala Val Ser Arg

20 25 30

Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Val Lys Tyr Asp Ile Asp Leu Pro Asn

35 40 45

Lys Lys Val Cys Ile Glu Ser Glu His Ser Met Asp Thr Leu Leu Ala

50 55 60

Thr Leu Lys Lys Thr Gly Lys Thr Val Ser Tyr Leu Gly Leu Glu Gly

65 70 75 80

Ser Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

85 90