



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0045160

(43) 공개일자

2016년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0139524

(22) 출원일자

2014년10월16일

심사청구일자

없음

(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

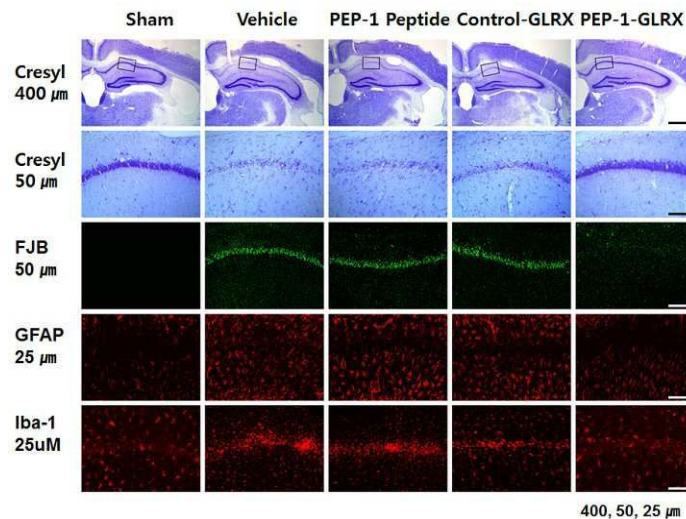
전체 청구항 수 : 총 2 항

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

(57) 요약

본 발명은 세포투과성 GLRX 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 GLRX 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 GLRX 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 GLRX 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

대표도 - 도7a



(72) 발명자

한규형

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

조윤신

강원도 강릉시 화부산로99번길 12 강릉교동롯데캐슬아파트 104동 802호

이근욱

서울특별시 동작구 동작대로39길 22, 113동 805호 (동작동, 이수힐스테이트)

음원식

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

김덕수

충남 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (다가동, 그린빌)

조성우

서울 송파구 양재대로 1218, 257동 704호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

권오신

대구 수성구 화랑로 26, 101동 1407호 (만촌동, 우방하이츠)

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 1/3

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A1A03006155

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업(도약과제)

연구과제명 유전체 분석을 통한 대사성 질환 유전요인 발굴 및 맞춤형 단백질 치료제 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A1076058

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자사업(신진)

연구과제명 간질성 뇌손상시 해마에서 PEA-15(Phosphoprotein enriched in strocytes 15)에 대한 기전
연구 및 치료제 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.01 ~ 2014.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

글루타레독신 (Glutaredoxin)의 N-말단에 PEP-1 펩타이드가 공유결합된 글루타레독신 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 글루타레독신 융합단백질은 서열번호 4임을 특징으로 하는 글루타레독신 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포투과성 GLRX (glutaredoxin) 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 GLRX 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 GLRX 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 GLRX 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

배경 기술

[0002] 산소의 신진 대사의 자연 부산물 중 하나는 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)이다. 활성산소종은 심혈관 질환, 허혈 손상 면역, 염증 반응을 포함한 다양한 세포활성의 증가에 중요한 역할을 담당한다. 활성산소종 증가는 허혈/재관류 신경 세포의 사멸과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 활성산소종 생성 조절은 뇌허혈 손상에 대해 보호 기능을 한다.

[0003] 뇌허혈은 뇌 저산소증, 뇌 조직 사멸, 뇌경색, 허혈성 뇌졸중 등을 일으킨다. 뇌허혈의 주요 증상은 시각, 신체의 움직임 저하 및 말하기 손상 등이 있다.

[0004] 단백질 전달 기술은 포유류 세포 내로 단백질을 효과적으로 전달할 수 있는 유용한 방법이다. CPP(Cell penetrating Peptide)라고도 불리는 PTD(Protein Transduction Domain)는 세포 안으로 단백질을 손쉽게 전달할 수 있는 새로운 개념의 전달 시스템이다. PTD는 일반적으로 인 비트로 및 인 비보에서 치료 단백질을 전달하기 위해 사용된다. PEP-1 펩타이드(KETWWETWWTEWSQPKKKRKV)는 가장 일반적으로 사용된 PTD이다.

[0005] 글루타레독신 (Glutaredoxins; GLRX)은 티올/이황화물 (disulfide) 교환 촉매인 티오레독신 슈퍼패밀리의 일원이며, 따라서 티올 전이효소로 알려져 있고, 환원 등가물을 리보뉴클레오타이드 환원효소 1에 제공하는 단백질-SG 혼합 이황화물의 환원제로 작용한다. 포유류에서 GLRX는 두 개의 주요 형태로 존재한다. GLRX-1은 세포질 내에 존재하고, GLRX-2는 주로 미토콘드리아에 위치지만, 핵에도 존재한다. GLRX-1과 GLRX-2는 모두 산화환원 조절에서 중요한 역할을 수행하며 세포자기사멸에 대하여 세포를 보호한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

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

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명에서 세포 내로 투과된 GLRX 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰으며, 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 GLRX 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 GLRX 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해주며, 세포 투과성 GLRX 융합단백질이 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물로 유용함을 말해준다.

[0008] 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명하면, 본 발명의 일 실시예에서 본 발명자들은 먼저 GLRX 융합단백질을 과대 발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 GLRX 발현 벡터를 개발하였다. 이 발현 벡터는 인간 GLRX 단백질, PEP-1 단백질 수송 도메인, 그리고 아미노산 말단부분에 6개의 히스티딘 잔기를 발현시킬 수 있는 cDNA를 포함하고 있다.

[0009] 이 발현벡터를 이용하여 GLRX 융합단백질을 대장균에서 과대 발현시켰으며 Ni-친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 배양된 세포에 GLRX 융합단백질이 시간 및 농도 의존적으로 세포에 운반되는 것을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 세포 내로 투과된 GLRX 융합단백질은 세포 내에서 최대 36시간 지속적으로 유지되었으며, 산화 스트레스에 의한 세포사멸을 억제하였다.

[0010] 이러한 결과는 GLRX 융합단백질이 세포 내로 투과가 잘 일어나고, 세포 내에서 GLRX 단백질의 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 이러한 GLRX 융합단백질은 활성산소종과 관련된 증세 또는 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 등의 뇌신경질환에 응용할 수 있는 가능성을 제시해 준다.

[0011] 세포 투과성 GLRX 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태 등으로 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.

[0012] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있으며, 천식에 적용하는 경우에는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 널리 알려진 바와 같이 흡입 방식이나 스프레이 방식의 제제로 제형화할 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.

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

[0014] 본 발명은 또한 GLRX 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 GLRX 단백질 분자의 세포 내 전달은 PEP-1 펩타이드를 비롯한 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 PEP-1 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 PEP-1 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, PEP-1의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결어로 PEP-1 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 7~15개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 다수

포함하는 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

- [0015] 구체적으로, 본 발명은 GLRX 융합단백질, 이 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료, 예방 목적의 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0017] "GLRX 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 GLRX 단백질을 포함하며, 수송 도메인과 목표 단백질 (즉, 본 명명에서는 GLRX 단백질을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "PEP-1-GLRX", "PEP-1-GLRX 융합단백질" 등과 혼용하였다.
- [0018] "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 GLRX 단백질을 의미한다.
- [0019] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.
- [0020] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0021] 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.
- [0022] 본 발명에서의 "단백질 수송 도메인"은 고분자 유기화합물, 예컨대 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, 단백질, 올리고당 또는 다당류 등과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 유기화합물들을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말한다.
- [0023] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0024] 본 발명의 GLRX 융합단백질은 9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 GLRX의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 GLRX 융합단백질을 말한다. 또한, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, PEP-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고 (라이신,아르기닌) 중의 1종 이상을 말한다.
- [0025] 또한, 본 발명의 상기 GLRX 융합단백질 아미노산 서열은 서열번호 4를 포함한다. GLRX 융합단백질 제조에서 제한부위 서열의 선택 등에 따라 다양한 서열의 융합단백질을 얻을 수 있으며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 보통의 지식을 가진 사람에게 자명하다. 위 아미노산 서열은 예시적인 것일 뿐 GLRX 융합단백질 아미노산 서열이 위의 서열로 한정되는 것이 아님은 자명하다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 GLRX 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 뇌허혈의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 GLRX 융합단백질을 유효성분으로 하며, 뇌허혈의 예방 및 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명은 9~15개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 GLRX 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포도입성 (cell-transducing) GLRX 융합단백질에 관한 것이다. 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.

[0029] 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

[0030] 본 발명에서 세포 내로 투과된 GLRX 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰다. 또한, 본 발명의 GLRX 융합단백질은 세포 내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰다. 또한, 동물모델에서 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 본 발명의 GLRX 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들로부터 본 발명의 세포 투과성 GLRX 융합단백질이 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물로 이용 가능함을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 세포 침투성 PEP-1-GLRX 융합단백질 벡터 제조 및 정제에 관한 것이다.
 도 2는 HT22 세포로의 PEP-1-GLRX 융합단백질의 투과에 관한 것이다.
 도 3은 PEP-1-GLRX 융합단백질의 과산화수소로 유도되는 세포 사멸 억제 효과에 관한 것이다.
 도 4는 PEP-1-GLRX 융합단백질의 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화 억제 효과에 관한 것이다.
 도 5는 PEP-1-GLRX 융합단백질의 과산화수소로 유도되는 활성산소종 억제 효과에 관한 것이다.
 도 6a는 PEP-1-GLRX 융합단백질의 인산화된 AKT의 감소 효과에 관한 것이다.
 도 6b는 PEP-1-GLRX 융합단백질의 인산화된 MAPK의 감소 효과에 관한 것이다.
 도 7a는 허혈 동물모델에서의 신경세포의 생존에 PEP-1-GLRX 융합단백질의 효과에 관한 것이다.
 도 7b는 신경세포 사멸에 대한 PEP-1-GLRX 융합단백질의 효과에 관한 것이다.

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.

[0033] 재료

[0034] Ni^{2+} -니트릴로삼초산 세파로즈 슈퍼플로우는 Qiagen에서 구매하였고, PD-10 컬럼 크로마토그래피(Amersham, Braunschweig, Germany)를 구매하였다. 마우스 해마신경 세포인 HT22 세포와 마우스의 신경 교종 C6 세포는 한국세포주연구재단(KCLF)에서 제공받았다. 2',7'-DCF-DA(Dichlorofluorescein diacetate)와 Akt, MPAK, 케스페이즈-3(caspase-3), 케스페이즈-12(caspase-12), 액틴, Bax, Bcl-2의 일차 항체는 Cell signaling Technology(Beverly, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. GLRX cDNA는 분리하여 중합효소 연쇄반응(PCR)에 이용하였다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

[0035] PEP-1-GLRX 융합단백질 발현 및 정제

[0036] GLRX 단백질 및 PEP-1-GLRX 융합단백질의 발현 벡터를 구축하였다. 인간의 유전자 중의 하나인 GLRX를 cDNA와 함께 2개의 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭시켰다. 센스 프라이머는 5'-

CTCGAGGGCAACGCGCAG-3'으로 구성되어 있고, *XhoI*이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재한다. 그리고 안티센스 프라이머는 5'-GGATCCTCAGGAATCTTCGGACTC-3'으로 구성되어 있고, *BamHI*이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재한다. PCR을 통하여 얻은 결과물을 TA 벡터에 연결하고 *XhoI*과 *BamHI*을 이용하여 자른 후에 발현 벡터에 연결하여 PEP-1-GLRX 융합단백질을 제조하였다. 이와 마찬가지로 대조군인 GLRX는 PEP 펩타이드가 결합된 벡터를 이용하여 제조하였다. 제조된 PEP-1-GLRX 플라스미드를 대장균인 BL21로 형질변환시킨 후 0.5mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactoside)로 유도하여 18℃에서 하룻밤 배양하였다. 배양한 세포를 초음파로 분쇄하여 PEP-1-GLRX 융합단백질을 얻기 위해 Ni^{2+} -니트릴로삼초산 세파로즈 슈퍼플로우 컬럼을 이용하여 정제하였다. 단백질 농도는 브래드포드 방법으로 우혈청 알부민을 표준물질로 이용하여 결정하였다.

[0037] **PEP-1-GLRX 융합단백질의 HT22 세포로의 도입**

[0038] 마우스 해마세포는 37℃, 95% 공기 및 5% CO₂의 조건을 유지해주며, 10% 우태혈청 (FBS) 및 5 mM NaHCO₃, 항생제 (100 mg/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린), 20 mM HEPES/NaOH (pH 7.4)로 구성된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 이용하여 37℃, 95% 공기, 5% 이산화탄소의 습한 조건에서 배양하였다.

[0039] PEP-1-GLRX 융합단백질 및 대조군 GLRX의 세포 내 도입에 대한 시간 의존성 및 농도 의존성을 평가하였다. 세포는 60 mm 접시에서, 시간(10~50분) 및 각 단백질의 투여량(0.5~2 μM)으로 처리하였다. 트립신-EDTA(Gibco)를 처리하고 PBS를 이용하여 세척한 다음 세포 내로 투과된 융합단백질을 브래드포드 방법으로 정량하고, 웨스턴블롯으로 분석하였다.

[0040] **웨스턴블롯 분석**

[0041] 웨스턴블롯 분석을 위해, 세포 분쇄액 내의 단백질을 10%, 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 웨스턴블롯 분석하였다. 결합한 항체 복합체는 강화 화학발광제제로 제조자 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)의 지시에 따라 탐지하였다.

[0042] **공초점 현미경 관찰**

[0043] HT22 세포 내의 PEP-1-GLRX 융합단백질과 GLRX 단백질을 탐지하기 위해 세포를 유리 커버슬립 상에 시드하고 PEP-1-GLRX 융합단백질과 GLRX 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, Germany)로 3분간 염색하였다. 염색된 HT22 세포는 Fv-300 공초점 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

[0044] **세포 생존율 분석**

[0045] 과산화수소로 처리한 HT22 세포의 생존율을 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide}를 이용하여 비색분석법으로 확인하였다. 세포를 1 mM의 과산화수소에 5시간 동안 노출하여 세포사멸을 유도하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0046] **세포 내 활성산소종 수준 측정**

[0047] 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 PEP-1-GLRX 융합단백질을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 활성산소종 수준을 비교해 보았다. PEP-1-GLRX 융합단백질은 한 시간 동안 처리하였고 후에 과산화수소를 1 mM의 농도로 15분 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.

[0048] TUNEL 분석

[0049] HT22 세포에 PEP-1-GLRX 융합단백질을 처리하지 않은 군과 3 μ M의 농도로 1시간 동안 처리한 군의 배양액에 과산화수소 (1 mM)를 가하여 6시간 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.

[0050] 실험동물

[0051] 한림대학교 실험동물센터에서 제공되는 저빌쥐 (Mongolian gerbils; Meriones unguiculatus)를 사용하였다. 23°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.

[0052] 실험동물에서 전뇌 허혈 유도

[0053] 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 PEP-1-GLRX 융합단백질의 보호효과를 실험하기 위해, 7일 후 허혈 재관류(ischemia-reperfusion)하고 삼 수술군, 담체 처리군, PEP-1-GLRX 융합단백질 처리군, GLRX 단백질 처리군 및 펩타이드 처리군으로 5개 그룹으로 나뉘, 허혈-재관류 후 복강 내에 30분을 투여하여 실험을 수행했다.

[0054] 삼 수술군, 담체 처리군, PEP-1-GLRX 융합단백질 처리군, GLRX 단백질 처리군 및 PEP-1 펩타이드 처리군 (1.5 μ M)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.

[0055] 결과 1: 세포 침투성 PEP-1-GLRX 융합단백질의 벡터 제조 및 정제

[0056] 세포 침투성 PEP-1-GLRX 융합단백질을 제조하기 위해 세포침투 효율을 갖는 PEP-1 펩타이드와 인간 GLRX 유전자를 융합하여 PEP-1-GLRX 융합단백질 발현벡터를 제조하였다. 제조한 PEP-1-GLRX 융합단백질 및 GLRX 단백질 발현벡터를 과대 발현시킨 뒤 이를 정제하여 SDS-PAGE를 이용한 겔 염색법과 웨스턴 블랏 분석을 통해 순수하게 분리 정제된 것을 히스티딘 항체를 통해 확인하였다(도 1).

[0057] 결과 2: 세포 침투성 PEP-1-GLRX 융합단백질의 농도 및 시간 의존적으로 세포 내로 침투 효능 확인

[0058] 정제된 침투성 PEP-1-GLRX 융합단백질이 세포 내로 잘 침투되는 지를 확인하기 위하여 단백질을 세포 내로 농

도 및 시간 의존적으로 침투시켜 그 효능을 확인하였다. 본 실험에서는 HT22 세포주를 사용하였다. 먼저, 세포 침투성 PEP-1-GLRX 융합단백질을 세포 내로 침투시킨 결과 농도(0.5~1.5 μ M) 및 시간 의존적으로 효과적으로 침투되는 것을 히스티딘 항체를 통해 웨스턴 블랏 분석으로 확인할 수 있었으며, PEP-1 펩타이드가 융합되지 않은 GLRX 단백질은 세포 내로 침투되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 공초점 현미경을 통해서 확인한 결과에서도 마찬가지로 PEP-1-GLRX 융합단백질(1.5 μ M)을 처리한 그룹에서는 녹색 형광이 강하게 발색되는 것을 확인함으로써 세포 내로의 침투가 잘 이루어진 것을 확인하였다(도 2).

[0059] **결과 3: HT22 세포에서 세포 침투성 PEP-1-GLRX 융합단백질의 HT22 세포에서 과산화수소로 유도된 세포사멸 억제 효과**

[0060] 침투성 PEP-1-GLRX 융합단백질의 세포 보호효능을 확인하기 위하여 살아있는 세포의 수를 측정하는 방법인 MTT 분석을 수행하였다. 과산화수소 1mM를 세포 내에 처리하였을 경우 살아있는 세포의 수가 약 48%로 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 세포 침투성 PEP-1-GLRX 융합단백질을 농도별(0.5~1.5 μ M)로 처리하였을 때 세포 활성도가 최대 73%까지 증가함을 확인할 수 있었다. 그러나 GLRX 단백질을 최대 1.5 μ M 까지 처리해서 확인해본 결과에서는 세포사멸을 억제하지 못함을 확인하였다. 이러한 세포 활성도 실험을 토대로 PEP-1-GLRX 융합단백질이 과산화수소에 의해 유도된 세포 사멸을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다(도 3).

[0061] **결과 4: 과산화수소로 유도된 DNA 단편화에 대해 PEP-1-GLRX 융합단백질의 보호 효과(TUNEL 염색)**

[0062] 과산화수소로 인해 생겨난 활성산소종이 DNA 단편화를 일으키게 되는데, TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase)라는 효소를 이용해 UTP(Uridine triphosphate)를 DNA 조각 말단에 붙여 DNA 단편화가 일어났는지 여부를 확인해 보았다.

[0063] 과산화수소만 처리한 그룹에서는 푸른색으로 염색된 강도가 매우 강하게 발색됨을 확인할 수 있었는데, 이는 과산화수소에 의해 생겨난 활성산소종이 DNA 단편화를 일으킨 것을 의미한다. 그러나 PEP-1-GLRX 융합단백질(1.5 μ M)을 처리한 그룹에서는 그 정도가 매우 감소하였고, GLRX 단백질을 처리한 그룹에서는 그 보호효과를 확인하지 못했다. 이런 결과를 통해 PEP-1-GLRX 융합단백질이 HT22 세포에서 DNA 단편화를 막아주는 역할을 하는 것을 알 수 있었다(도 4).

[0064] **결과 5: 과산화수소로 유도된 세포 내 활성산소종에 대한 PEP-1-GLRX 융합단백질의 보호 효과**

[0065] 활성산소종 표지자인 DCFH-DA는 비극성 분자로 세포 내로 들어가면서 DCFH로 분해되고, 세포 내 활성산소에 의해 녹색 형광을 나타내는 DCF로 변한다. 이로써 세포 내 활성산소종 수준을 확인해 보았다.

[0066] 과산화수소만 처리한 그룹에서는 푸른색으로 염색된 강도가 매우 강하게 발색됨을 확인할 수 있었는데, 이는 과산화수소에 의해 활성산소종이 생겨난 것을 의미한다.

[0067] 그러나, PEP-1-GLRX 융합단백질을 1.5 μ M 처리한 그룹에서는 그 정도가 매우 감소하였고, GLRX 단백질을 처리한 그룹에서는 그 보호효과를 확인하지 못했다. 이런 결과를 통해 PEP-1-GLRX 융합단백질이 HT22 세포에서 활성산소종 생성을 저해하는 역할을 하는 것을 알 수 있었다(도 5).

[0068] **결과 6: AKT와 MAPK 활성화에 대한 PEP-1-GLRX 융합단백질의 억제 효과**

[0069] PEP-1-GLRX 융합단백질로 인산화된 AKT, ERK, JNK를 조절함으로써, HT22 세포에서 산화로 유도된 세포사멸을 보호하는 효과를 확인해보았다.

[0070] 인산화된 AKT에 PEP-1-GLRX 융합단백질을 농도별로 0.5~1.5 μ M 처리했을 때 농도가 높아질수록 AKT가 감소하여 PEP-1-GLRX 융합단백질이 HT22 세포에서 보호 효과가 있음을 확인하였고, GLRX 단백질을 처리한 그룹에서는 그 효과를 확인하지 못했다(도 6a).

[0071] 마찬가지로 인산화된 MAPK(Mitogen-activated protein kinases)인 JNK와 ERK에 PEP-1-GLRX 융합단백질을 농도별로 0.5~1.5 μ M 처리했을 때, 농도가 높아질수록 MAPK가 감소하는 패턴을 확인하여 PEP-1-GLRX 융합단백질이 HT22 세포에서 보호효과가 있음을 확인하였고, GLRX 단백질을 처리한 그룹에서는 그 효과를 확인하지 못했다(도

6b).

[0072] **결과 7: 과산화수소로 유도된 허혈 동물 모델에서 PEP-1-GLRX 융합단백질의 보호 효능**

[0073] 저빌쥐 모델에 전뇌 허혈을 일으킨 후에 PEP-1-GLRX 융합단백질이 뉴런 세포생존력에 어떤 효과를 갖는지 알아 보았다. 허혈 손상을 일으키고, 7일 후에 조직을 면역 염색하여 삼 수술군, 담체 처리군, PEP-1 펩타이드 처리군, GLRX 단백질 처리군, PEP-1-GLRX 융합단백질 처리군을 각각 보았다.

[0074] 조직 염색은 크레실 바이올렛, F-JB(Fluoro-Jade B), Iba-1(ionized calcium-binding adapter molecule 1), NeuN(neuronal nuclei)로 면역 염색을 하였다.

[0075] 해마 CA1 지역에서 정상교 세포와 미세아교 세포의 활성을 알아보기 위해 GFAP 면역 염색을 수행하였다. 그 결과, PEP-1-GLRX 융합단백질 처리군은 GFAP-면역염색 정상세포가 담체 처리군에 비해 상당히 감소된 것을 확인할 수 있었다.

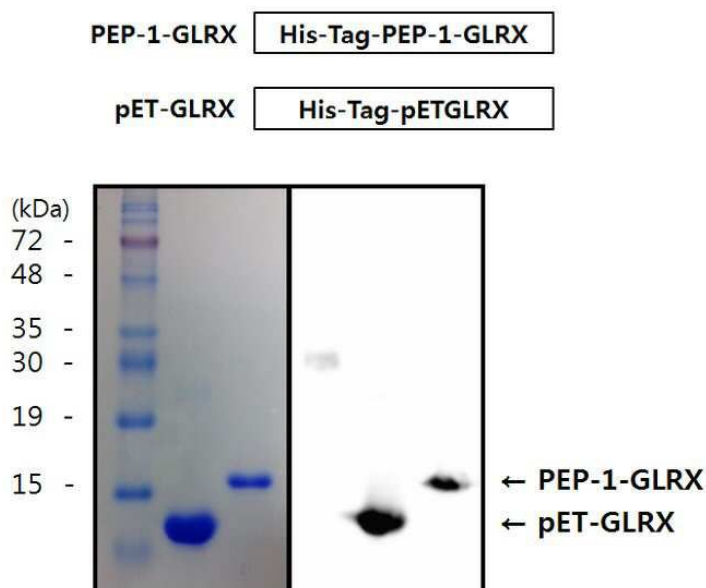
[0076] 마찬가지로 모든 염색에서 PEP-1-GLRX 융합단백질은 삼 수술군과 유사한 결과를 얻어 그 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 PEP-1-펩타이드, GLRX단백질은 효과가 없는 것을 확인할 수 있었다(도 7a).

[0077] 같은 조건 하에서 뉴런 손상에 대한 PEP-1-GLRX 융합단백질의 보호효과를 확인하기 위해 His 염색을 수행하였다. 세포 생존은 NeuN 면역조직화학으로 분석하였다.

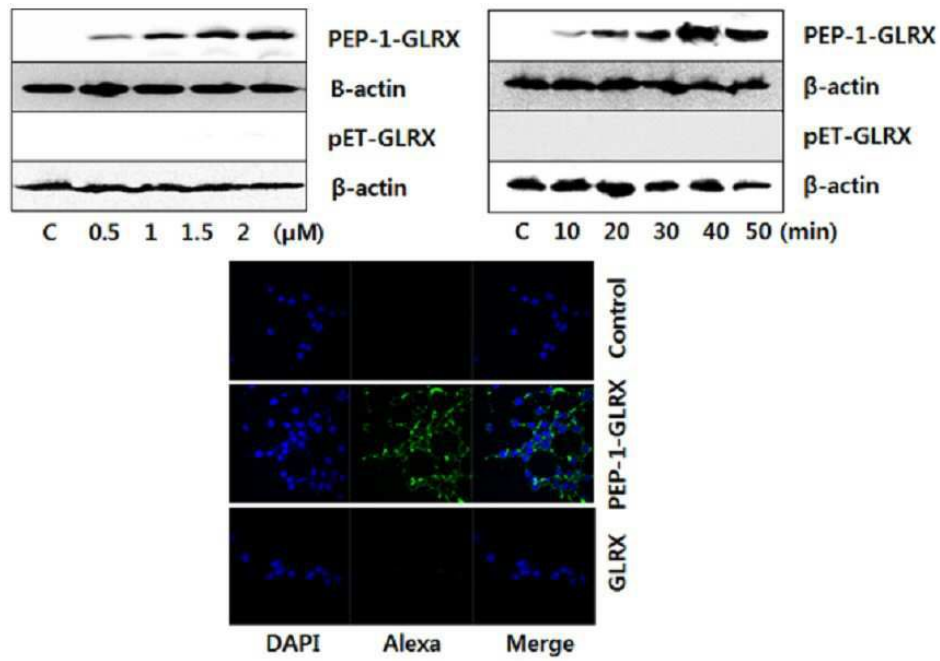
[0078] PEP-1-GLRX 융합단백질을 처리한 군은 해마 CA1 지역에서 뉴런 세포의 생존력이 증가한 것을 확인하였다. 그러나 PEP-1 펩타이드, GLRX 단백질 처리군에서는 그렇지 않은 것을 확인할 수 있었다(도 7b).

도면

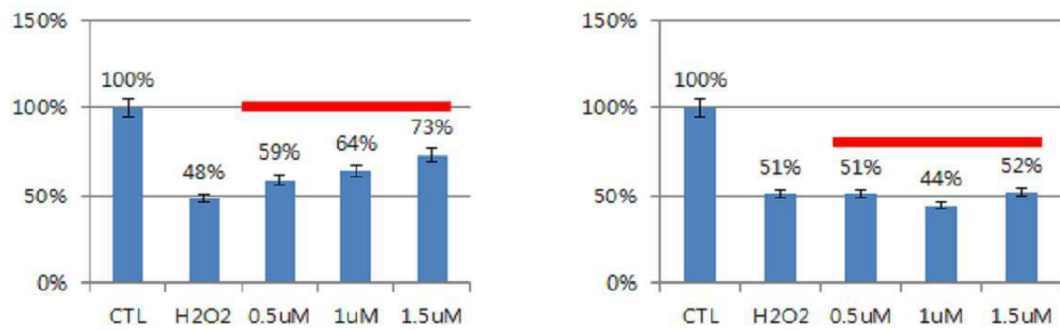
도면1



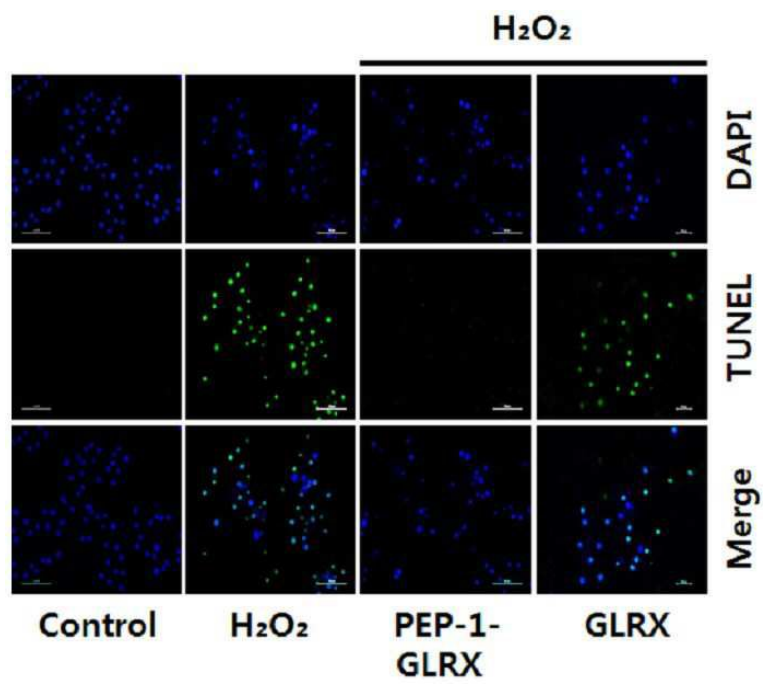
도면2



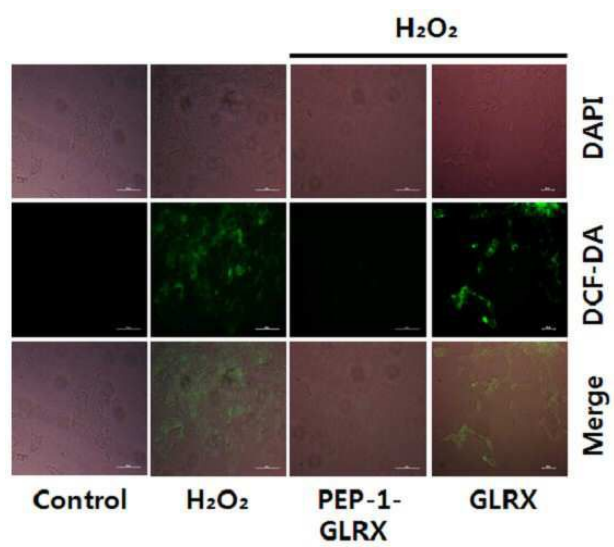
도면3



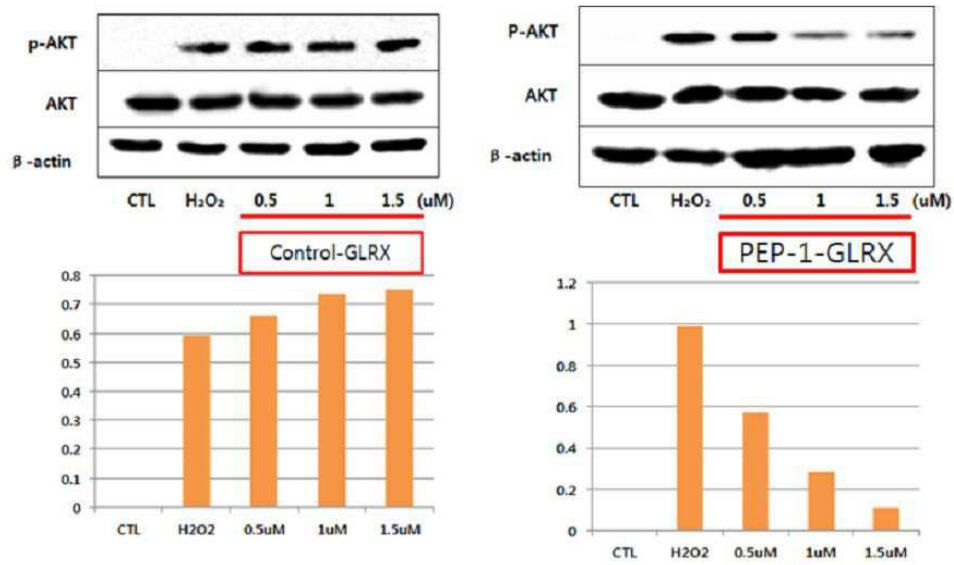
도면4



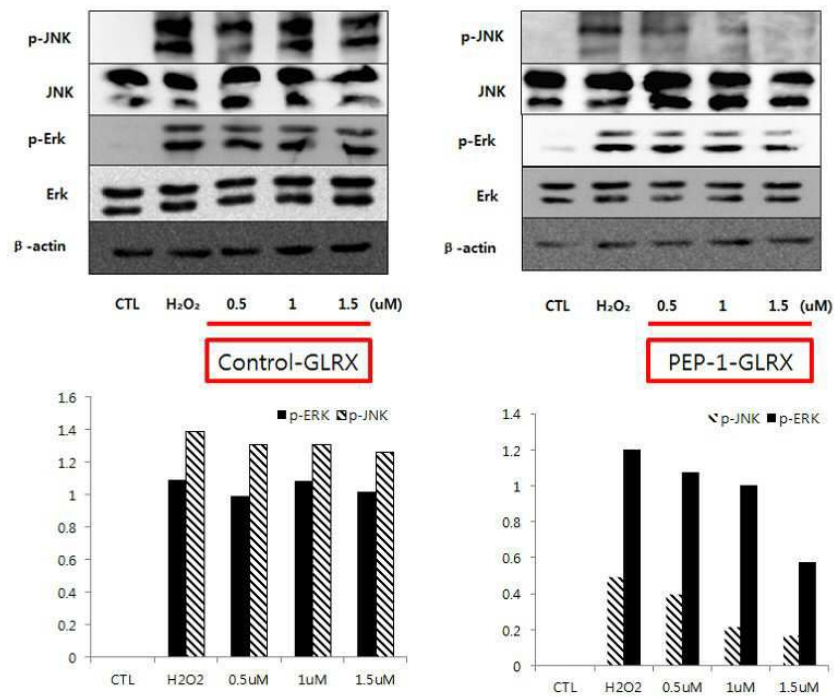
도면5



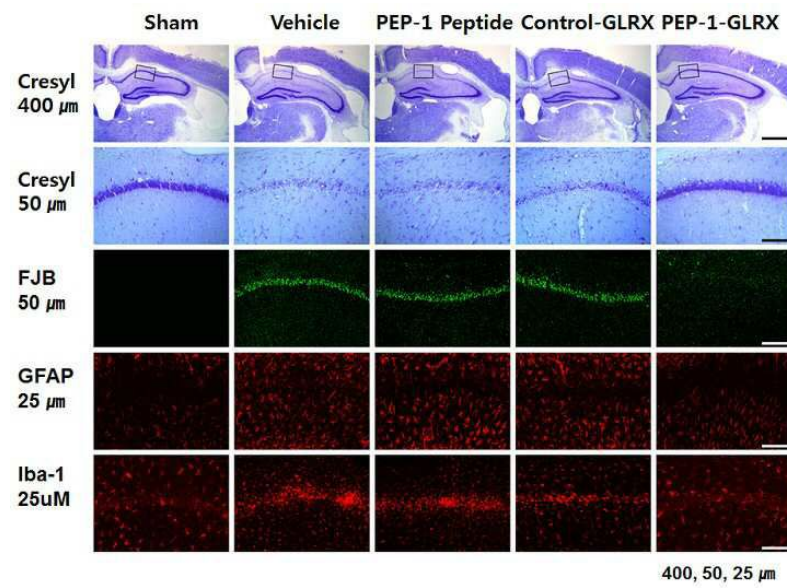
도면6a



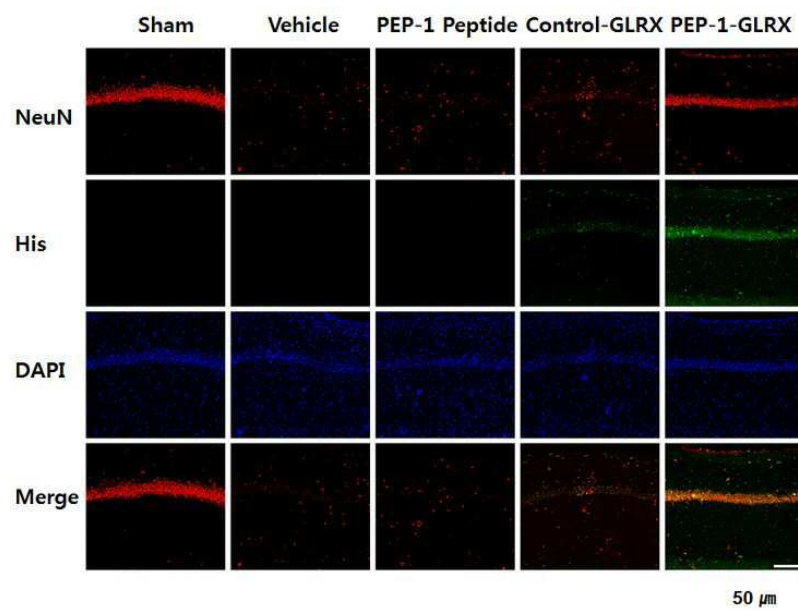
도면6b



도면7a



도면7b



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for treating ischemia containing glutaredoxin fusion protein
- <130> HallymU-sychoi-Glrx-ischemia
- <160> 4
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer of glutaredoxin
 <400> 1
 ctcgagggca acgcgcag 18
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense primer of glutaredoxin
 <400> 2
 ggatcctcag gaatcttcgg actc 24
 <210> 3
 <211> 398
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polynucleotide encoding PEP-1-GLRX fusion protein
 <400> 3
 taaaagaaac ctggtgggaa acctggtgga ccgaatggtc tcagccgaaa aaaaaacgta 60
 aagtgtctga gatggctcaa gagtttgtga actgcaaaat ccagcctggg aaggtgggtg 120
 tgttcatcaa gccacacctgc ccgtactgca ggaggggccca agagatcctc agtcaattgc 180
 ccatcaaaca agggcttctg gaatttgtcg atatcacagc caccaaccac actaacgaga 240
 ttcaagatta ttgcaacag ctcacgggag caagaacggt gcctcgagtc tttattggta 300
 aagattgtat aggcggatgc agtgatctag tctctttgca acagagtggg gaactgctga 360
 cgcggctaaa gcagattgga gctctgcagt aaggatcc 398
 <210> 4
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PEP-1-GLRX fusion protein
 <400> 4
 Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1	5	10	15
Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Ala Gln Glu Phe Val Asn Cys Lys			
20		25	30
Ile Gln Pro Gly Lys Val Val Val Phe Ile Lys Pro Thr Cys Pro Tyr			
35		40	45
Cys Arg Arg Ala Gln Glu Ile Leu Ser Gln Leu Pro Ile Lys Gln Gly			
50		55	60
Leu Leu Glu Phe Val Asp Ile Thr Ala Thr Asn His Thr Asn Glu Ile			
65	70	75	80
Gln Asp Tyr Leu Gln Gln Leu Thr Gly Ala Arg Thr Val Pro Arg Val			
85		90	95
Phe Ile Gly Lys Asp Cys Ile Gly Gly Cys Ser Asp Leu Val Ser Leu			
100		105	110
Gln Gln Ser Gly Glu Leu Leu Thr Arg Leu Lys Gln Ile Gly Ala Leu			
115		120	125
Gln			