(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0013428
(43) 공개일자 2021년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/00 (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61P 9/10 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
A61K 47/645 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2019-0089938
(22) 출원일자 2019년07월25일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
유대영
충청남도 천안시 동남구 봉서8길 13, 307동 1404동 (봉명동, 봉명청솔3차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 6 항

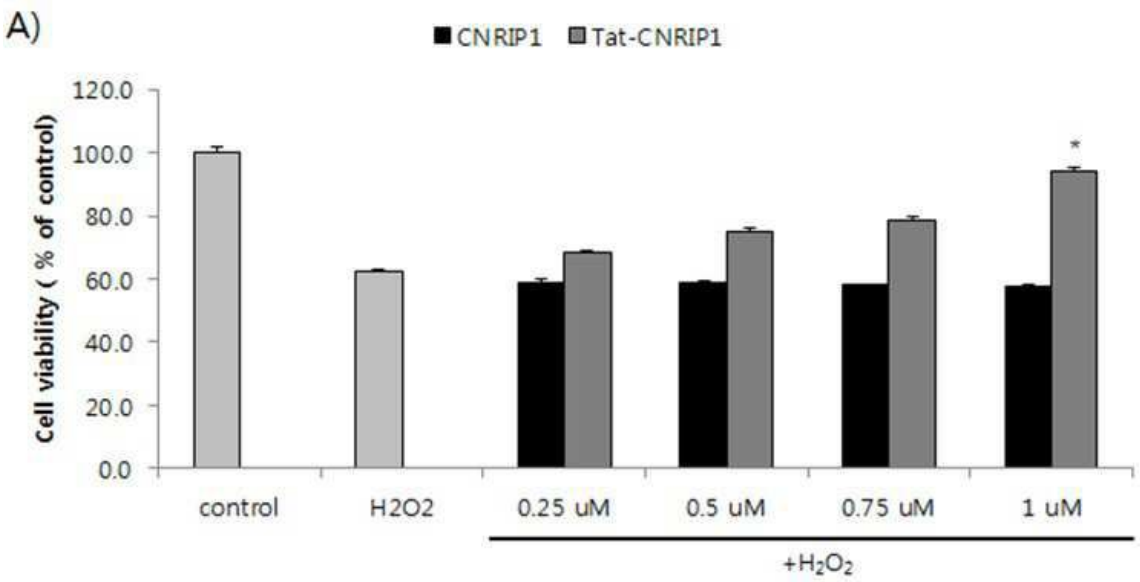
(54) 발명의 명칭 **세포투과성 CNRIP1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

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

해결수단: 본 발명은 세포투과성 CNRIP1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 CNRIP1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰다. 동물모델에 서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 CNRIP1 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 CNRIP1 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
A61P 9/10 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2740/16022 (2013.01)
(72) 발명자
음원식
강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)
신민재
인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)
최연주
충청북도 옥천군 청성면 궁촌길 20-16
여현지
서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호
여은지
서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호
황인구
서울특별시 관악구 관악로 1 C동 402호 (봉천동, 서울대교수아파트122)
김우석
서울특별시 관악구 관악로 285, 104동 706호 (봉천동, 성현동아아파트)
조용준
강원도 춘천시 우석로101번길 86, 110동 802호 (석사동, 대우아파트)
조성우
서울 송파구 양재대로 1218, 257동 704호(올림픽선수촌아파트)
권오신
대구 수성구 화랑로 26, 101동 1407호(만촌우방하이츠)
권현정
강원도 강릉시 경강로2015번안길 7
김대원
강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2019R1A6A1A11036849
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소 지원사업
연구과제명 단백질 침투기술 기반 퇴행성 뇌질환 치료용 융합단백질 실용화 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 한림대학교
연구기간 2019.06.01 ~ 2020.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1D1A1B03029765
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기본연구지원사업
연구과제명 해마의 신경세포재생에서 CB1 cannabinoid receptor signaling 및 CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1 (CRIP1)의 역할 규명
기 여 율 1/2
과제수행기관명 순천향대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

HIV-Tat 단백질 수송 도메인이 CNRIP1 단백질의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 CNRIP1 융합단백질을 함유하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 CNRIP1 융합단백질은 그 아미노산 서열이 서열 번호 2임을 특징으로 하는 CNRIP1 융합단백질을 함유하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

CNRIP1 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 HIV-Tat 단백질 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 CNRIP1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 재조합 폴리뉴클레오타이드는 그 염기 서열이 서열번호 1임을 특징으로 하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

CNRIP1 코딩 cDNA의 최소한 일측 말단에 HIV-Tat 단백질 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 CNRIP1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 CNRIP1 융합단백질 발현벡터 함유 뇌허혈 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1 또는 청구항 2의 CNRIP1 융합단백질을 유효성분으로 하는 뇌허혈 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 발명은 세포투과성 CNRIP1 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 활성산소 화합물이라고 불리는 "자유 라디칼(free radicals)"은 산화 스트레스에 그 원인이 있으며, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산소와의 상호작용을 포함하는 다양한 세포과정에서 피할 수 없는 부산물이

다. 만약 세포가 상대적으로 좀 더 활성화된 화합물에 노출된다면 이들은 산화 스트레스에 놓이게 되고 그 결과 단백질, DNA, 지방과 같은 중요한 요소들이 산화되어 손상을 입게 된다. 산화 스트레스는 암, 알츠하이머 등과 같은 많은 병의 원인이 되고 있으며 이러한 질환들은 노화와도 관련이 있다.

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

[0005] CB1R(cannabinoid 1 receptors)는 중추신경계에서 가장 풍부하게 발현되는 GPCR(G protein coupled receptors) 중 하나이며 다양한 신경 기능을 조절한다. CNRIP1a(Cannabinoid Receptor Interacting Protein 1a)는 CB1R의 원위 카복시 말단에 결합하고, CB1R 매개 신경 기능을 변화시키는 것으로 나타났다.

[0006] CNRIP1 단백질은 G 단백질이 결합된 수용체이며 시냅스 가소성, 통각 상실증, 식욕 및 신경 보호에 역할을 한다고 알려져 있다. CNRIP1의 아이소폼 중 하나인 CNRIP1a는 중추신경계에서 구성 CB1 수용체 활동을 조절하는 반면, 짧은 아이소폼 단백질인 CNRIP1b의 역할은 아직 알려지지 않았다. CNRIP1은 CNS 약물 발견의 잠재적 표적으로 제안되었다.

[0007] CRIP1a/b는 CB1 수용체의 세포 내 교환, 탈감작, 하향 조절, 신호 전달 및 구조적 활성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. CNRIP1 단백질은 인간 염색체 22에서 발견되는 Cnrip 유전자에 의해 코딩된다. CRIP1a는 CB1의 구조적 활성을 감소시키는 것으로 보인다. CB1 수용체의 그 부분은 CRIP 상호작용에 필요하다. CRIP1a는 고정화된 GST로 표지된 CB1 C-말단 꼬리에 특이적으로 결합한다.

[0008] CRIP1a는 CB1에 감염된 윗목 교감 신경절 뉴런에서 전압 의존성 칼슘 채널의 구조적 억제를 감소시키는 것으로 나타난 반면, 작용제(agonist)에 의해 유도되는 억제에 대해서는 효과가 없으므로 구조적 수용체 활성을 조절하는 역할을 하는 것으로 제안되었다.

[0009] 반면, 활성산소종에 의한 신경 세포사멸에 대한 CNRIP1의 기능 또는 효과에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 뇌허혈 손상 및 뇌허혈 손상에 의한 신경세포 손상과 사멸을 치료하기 위한 효과적인 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 PEP-1, HIV Tat 펩타이드와 같은 단백질 수송 도메인을 CNRIP1과 재조합하여 HT22 세포 내로 침투하는 것을 확인하였으며, 산화 스트레스에 대한 세포 침투성 CNRIP1 융합단백질의 보호효과에 대해 연구하였다.

[0012] 본 발명자들은 단백질 수송 도메인과 결합한 CNRIP1 융합단백질이 시험관 내에서 산화 스트레스에 의해 유도된 신경세포사멸에 보호효과가 있는지를 밝히고자 하였다. 허혈성 신경세포사멸에 대해 CNRIP1 융합단백질의 잠재적인 효과를 연구하기 위해 본 발명자들은 세포 내로 투과할 수 있는 CNRIP1 융합단백질을 제작하였다. CNRIP1 융합단백질은 신경세포 내부로 농도 의존적 및 시간 의존적으로 효과적으로 투과하였다. 세포 내로 투과된 CNRIP1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대한 세포 생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성산소종 수준을 낮추었다.

이러한 결과들은 CNRIP1 융합단백질이 시험관 내에서 일어나는 세포사멸에 대해 보호효과를 나타내며, 산화 스트레스와 관련된 뇌허혈 손상에 대해 치료제로 이용될 수 있음을 말해준다.

[0013] 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명하면, 본 발명의 일 실시예에서 본 발명자들은 먼저 CNRIP1 융합단백질을 과대 발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 CNRIP1 융합단백질 발현 벡터를 개발하였다. 이 발현 벡터는 인간 CNRIP1 단백질, 7~21개 아미노산으로 이루어진 단백질 수송 도메인 하나 이상, 그리고 N 말단부분에 6개의 히스티딘 잔기를 발현시킬 수 있는 cDNA를 포함하고 있다. 그 예시로 CNRIP1 융합단백질의 아미노산 서열은 서열목록의 서열번호 1임을 특징으로 한다.

[0014] 이 발현벡터를 이용하여 CNRIP1 융합단백질을 대장균에서 과대 발현시켰으며 Ni-친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 배양된 세포에 CNRIP1 융합단백질이 시간 및 농도 의존적으로 세포에 운반되는 것을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 세포 내로 투과된 CNRIP1 융합단백질은 세포 내에서 최대 12시간 동안 지속적으로 유지되었으며, 산화 스트레스에 의한 세포사멸을 억제하였다.

[0015] 이러한 결과는 CNRIP1 융합단백질이 세포 내로 잘 투과되고, 세포 내에서 CNRIP1 단백질의 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 이러한 CNRIP1 융합단백질은 활성산소종과 관련된 증세 또는 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 뇌허혈 예방 또는 치료제로 응용할 가능성을 제시해 준다.

[0016] 세포 투과성 CNRIP1 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, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탤크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고, 정제는 또한 결합제 (예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐 피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제 (예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제 (예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위함 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료에 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0017] 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 00001~100㎎/㎏을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여 방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0018] 나아가, 본 발명은 상기 CNRIP1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌허혈 예방 또는 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한 CNRIP1 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 CNRIP1 단백질 분자의 세포 내 전달은 HIV Tat 펩타이드와 같은 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 단백질 수송 도메인의 일례로는 HIV Tat 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 HIV Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니며, HIV Tat 펩타이드의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 HIV Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 7~21개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 다수 포함하는 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0020] 구체적으로, 본 발명은 CNRIP1 융합단백질, CNRIP1 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, CNRIP1 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 이 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료 또는 예방 목적의 약학 조성물 및 이 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 예방 또는 개선 용도의 건강기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

[0021] 상기 CNRIP1 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 구체적으로 서열번호 1임을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 상기 세포 투과성 CNRIP1 융합단백질을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료 형태로 사용할 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 CNRIP1 융합단백질의 양은, 일반적으로 본 발명의 건강식품

조성물의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량%, 바람직하게 는 0.2 내지 10중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물의 경우 100㎖를 기준으로 0.1 내지 30g, 바람직하게는 0.2 내지 5g의 비율로 가할 수 있다. 본 발명의 건강음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 CNRIP1 융합단백질을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다. 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 중요하지는 않으나 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0023] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0024] "CNRIP1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 CNRIP1 단백질을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 목표 단백질(즉, 본 발명에서는 CNRIP1 단백질을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 구체적인 실시예로 HIV-Tat 단백질 수송 도메인을 이용하였으므로 "CNRIP1 융합단백질"을 "Tat-CNRIP1", "Tat-CNRIP1 융합단백질" 등과 혼용하였다.

[0025] "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 CNRIP1을 의미한다.

[0026] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.

[0027] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0028] 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.

[0029] 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.

[0030] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0031] 본 발명의 CNRIP1 융합단백질은 7 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 CNRIP1의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 CNRIP1 융합단백질을 말한다.

[0032] 또한, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, Pep-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고 (라이신,아르기닌) 중의 1종 이상을 말한다.

[0033] 또한, 본 발명의 상기 CNRIP1 융합단백질 아미노산 서열은 서열번호 2와 같다. 그러나, 위 CNRIP1 융합단백질 아미노산 서열은 예시적인 것 일뿐 CNRIP1 융합단백질 아미노산 서열이 서열번호 2로 한정되는 것이 아니며, 예컨대 CNRIP1 융합단백질 제조에서 제한부위 서열의 선택 등에 따라 다양한 서열의 융합단백질을 얻을 수

있으며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람에게 자명하다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 CNRIP1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 뇌허혈 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 CNRIP1 융합단백질을 유효성분으로 하며, 뇌허혈 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명은 7~21개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 CNRIP1 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성 (cell-transducing) CNRIP1 융합단백질에 관한 것이다. 또한, CNRIP1 융합단백질은 silent change에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다.

[0037] 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

[0039] 발명에서 세포 내로 투과된 CNRIP1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰다. 이러한 결과는 CNRIP1 융합단백질이 활성산소종으로 인한 뇌허혈에 의한 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해주며, 세포 투과성 CNRIP1 융합단백질이 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물로 유용함을 말해준다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 pET-15b 벡터 상에 Tat-CNRIP1 발현 벡터를 구축하는 것을 도시한 것이다. 합성 Tat 올리고머는 NdeI 및 XhoI 부위에 클로닝하였고, 사람 CNRIP1 cDNA는 pET-15b의 XhoI 및 BamHI 부위에 클로닝하였다. (A)는 CNRIP1 및 Tat-CNRIP1 융합단백질의 발현 벡터를 구축하는 것을 도시한 것이다. Tat-CNRIP1 융합단백질은 여섯 개의 히스티딘 잔기를 포함한다. (B)는 IPTG를 첨가하여 발현하였다. 정제된 CNRIP1 및 Tat-CNRIP1 융합단백질은 15% SDS-PAGE를 이용하여 정제하고 항 토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴블랏하였다.

도 2는 HT22 세포로의 Tat-CNRIP1 융합단백질의 투과를 나타낸다. (A)는 Tat-CNRIP1 융합단백질(0.5~5μM) 및 CNRIP1 단백질(0.5~5μM)은 1시간 동안 배양 배지에 처리하고, (B)는 Tat-CNRIP1 융합단백질 및 CNRIP1 단백질을 15~60분 동안 배양 배지에 처리하여 웨스턴블랏으로 분석하였다. (C) Tat-CNRIP1 융합단백질의 세포 내 분포를 공촛점 형광 현미경으로 가시화하였다.

도 3a는 1시간 동안 Tat-CNRIP1 융합단백질 또는 CNRIP1 단백질로 각각 전처리한 HT22 세포에 과산화수소(100μM)를 가하고 1시간 동안 둔 다음 MTT를 사용하여 비색 분석법으로 측정한 세포생존율 그래프이다.

도 3b는 세포 내 활성산소종 수준을 DCF-DA 염색으로 측정한 결과이다.

도 3c는 DNA 단편화는 TUNEL 염색으로 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 본 발명의 실시예에서는 CNRIP1 융합단백질을 구성하는 단백질 수송 도메인으로 HIV Tat 펩타이드를 이용하였으나, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진자라면 PEP-1 펩타이드가 N-말단에 결합된 CNRIP1 융합단백질을 응용하여, PEP-1 펩타이드, 올리고아르기닌, 올리고라이신 및 올리고(아르기닌+라이신) 등의 다양한 단백질 수송 도메인을 CNRIP1의 N-말단 또는 C-말단 중 한 곳 이상에 결합시킨 융합단백질을

용이하게 형성할 수 있고, 이와 같은 융합단백질 간에 약간의 차이는 있을 수 있으나 유사한 활성을 나타냄을 용이하게 알 수 있다.

[0043] **재료**

[0044] $Ni2^{+-}$니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen에서 구매하였고, PD-10 컬럼 크로마토그래피(Amersham, Brauncschweig, Germany)를 구매하였다. 마우스 해마신경 세포인 HT22 세포는 한국세포주연구재단(KCLF)에서 제공받았다. 2',7'-DCF-DA(Dichlorofluorescein diacetate)와 Bcl-2, Bax, β-액틴, P-p53, p53, 캐스페이즈 3, 캐스페이즈 9, p-p38, p38, p-Erk, Erk, p-JNK 및 JNK의 일차 항체는 Cell signaling Technology(Beverly, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

[0046] **Tat-CNRIP1 융합단백질의 발현 및 정제**

[0047] CNRIP1 단백질 및 Tat-CNRIP1 융합단백질의 발현 벡터를 구축하였다. 인간의 유전자 중의 하나인 CNRIP1을 cDNA와 함께 2개의 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)으로 증폭시켰다. 센스 프라이머는 5'-CTCGAGGGCAACGCGCAG-3'으로 구성되어 있고, *Xho*1이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재한다. 안티센스 프라이머는 5'-GGATCCTCAGGAATCTTCGGACTC-3'으로 구성되어 있고, *BamH*1이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재한다. PCR을 통하여 얻은 결과물을 TA 벡터에 연결하고 *Xho*1과 *BamH*1을 이용하여 자른 후에 발현 벡터에 연결하여 Tat-CNRIP1 융합단백질을 제조하였다. 이와 마찬가지로 대조군인 CNRIP1 단백질은 Tat 펩타이드가 결여된 벡터를 이용하여 제조하였다. 재조합된 Tat-CNRIP1 플라스미드를 대장균인 BL21로 형질변환시킨 후 0.5mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)로 유도하여 18℃에서 하룻밤 배양하였다. 배양한 세포를 초음파로 분쇄하여 Tat-CNRIP1 융합단백질을 얻기 위해 Ni^{2+}-니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로 컬럼을 이용하여 정제하였다. 단백질 농도는 브래드포드 방법으로 우혈청 알부민을 표준물질로 이용하여 결정하였다.

[0049] **HT22 세포로 Tat-CNRIP1 융합단백질 도입**

[0050] 마우스 해마 신경세포인 HT22 세포는 37℃, 95% 공기 및 5% CO_2의 조건을 유지해주며, 10% 우태혈청 (FBS) 및 5 mM $NaHCO_3$, 항생제 (100mg/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린), 20 mM HEPES/NaOH (pH 7.4)로 구성된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 이용하여 습한 조건에서 배양하였다.

[0051] Tat-CNRIP1 융합단백질 및 대조군 CNRIP1 단백질의 세포 내 도입에 대한 시간 의존성 및 농도 의존성을 평가하였다. 세포는 60㎜ 접시에서 시간(15~60분) 및 각 단백질의 투여량(0.5~5μM)을 달리하여 처리하였다. 트립신-EDTA(Gibco)를 처리하고 PBS를 이용하여 세척한 다음 세포 내로 투과된 융합단백질을 브래드포드 방법으로 정량하고, 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

[0053] **웨스턴 블롯 분석**

[0054] 웨스턴 블롯 분석을 위해 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 젤로 분리한 다음, 젤에 있는 단백질을 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane; Amersham, UK)으로 전기이동시켰다. 막은 TBS-T 완충액(25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)으로 블로킹하였다. 막은 제조업체에서 권장하는 일차 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석하였다. 결합한 항체 복합체는 강화 화학 발광제를 이용하여 제조자 (Amersham, Franklin Lakes, NJ,

[0055] USA)의 지시에 따라 탐지하였다.

[0057] **공촛점 현미경 관찰**

[0058] HT22 세포 내의 Tat-CNRIP1 융합단백질과 CNRIP1 단백질을 탐지하기 위해 세포를 유리 커버슬립 상에 시드하고

Tat-CNRIP1 융합단백질과 CNRIP1 단백질을 5μM 농도로 1시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 다음 실온에서 5분간 4% 파라포름알데하이드로 고정하였다. HT22 세포는 실온에서 40분간 3% 우혈청 알부민과 0.1% Triton X-100이 함유된 PBS (PBS-BT)로 40분간 블로킹하고, PBSBT로 세척하였다. 일차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)는 1:10000 비율로 희석하고, 이차 항체 (Alexa fluor 488, Invitrogen)는 1:15000 비율로 희석한 후 어두운 곳에서 실온으로 1시간 동안 배양하였다. 세포핵은 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 1 mg/ml; Roche, Mannheim, Germnay)로 3분간 염색하였다. 염색된 HT22 세포는 Fv-300 공촛점 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

[0060] **세포 생존율 분석**

[0061] 과산화수소로 처리한 HT22 세포의 생존율을 MTT {3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide}를 이용하여 비색분석법으로 확인하였다. 세포에 0.5~5μM의 Tat-CNRIP1 융합단백질을 선처리하거나 또는 처리하지 않고, 세포를 100μM의 과산화수소에 1시간 동안 노출하여 세포사멸을 유도하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0063] **세포 내 활성산소종 수준 측정**

[0064] 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-CNRIP1 융합단백질을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 활성산소종 수준을 비교해 보았다. Tat-CNRIP1 융합단백질은 5μM로 1시간 동안 처리하였고 후에 과산화수소를 700μM의 농도로 30분 동안 처리하였다. 그리고 PBS로 두 번 씻어주고 DCF-DA를 20μM의 농도로 30분 처리하였다. 형광 강도는 Fluoroskan ELISA plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland)를 이용하여 485nm 여기파장 (exitation), 538nm 방출파장 (emission)을 측정하였다.

[0066] **TUNEL 분석**

[0067] HT22 세포에 Tat-CNRIP1 융합단백질을 처리하지 않은 군과 5μM의 농도로 1시간 동안 처리한 군의 배양액에 과산화수소 (100μM)를 가하여 1시간 동안 처리하였다. 세포사멸을 측정하기 위해 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick end labeling staining) 기법은 세포사멸 탐지 킷트 (Roche Applied Science)를 사용하여 수행하였다. 형광현미경(Nikon eclipse 80i, Japan)을 이용하여 결과를 분석하였다.

[0069] **결과 1: Tat-CNRIP1 융합단백질의 정제 및 세포 투과**

[0070] 본 발명자들은 침투성 Tat-CNRIP1 융합단백질을 제조하기 위해 단백질 수송 도메인 PTD (Protein Transduction Domain)의 일종인 Tat이 포함된 Tat-벡터와 CNRIP1 유전자를 재조합하였다(도 1의 A). 대장균에서 과대발현시켜 Ni^{2+}-나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였고, SDS-PAGE와 웨스턴 블롯 분석법을 이용하여 Tat-CNRIP1 융합단백질이 정제된 것을 확인하였다(도 1의 A, B).

[0072] **결과 2: HT22 세포 내로 Tat-CNRIP1 융합단백질의 투과**

[0073] Tat-CNRIP1 융합단백질의 시간 및 농도별로 HT22 세포 내 투과 정도를 측정하였다. 그 결과 시간 및 농도 의존적으로 세포 내 투과가 효과적으로 일어났으며, CNRIP1 단백질은 투과가 일어나지 않았다(도 2의 A, B). 또한, 공촛점 현미경을 이용하여 DAPI로 세포핵을 염색하고, Tat-CNRIP1 융합단백질을 녹색 형광으로 염색하여 효과적으로 세포 내로 투과되는 것을 확인하였다(도 2의 C).

[0075] **결과 3: 산화스트레스로 인한 세포생존율, 활성산소종 생성 및 DNA 단편화에 대한 Tat-CNRIP1 융합단백질의 세포 보호효과**

[0076] 세포에 Tat-CNRIP1 융합단백질을 농도별로 전처리 후 과산화수소로 산화스트레스를 유도하였다. 세포 생존능력을 확인하기 위해 MTT 분석을 수행하였다. HT22 세포에 100㎛M 과산화수소를 단일 처리하였을 경우 생존한 세포수가 약 40%로 감소하였으나, Tat-CNRIP1를 선처리한 경우 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하였다(도 3의 A).

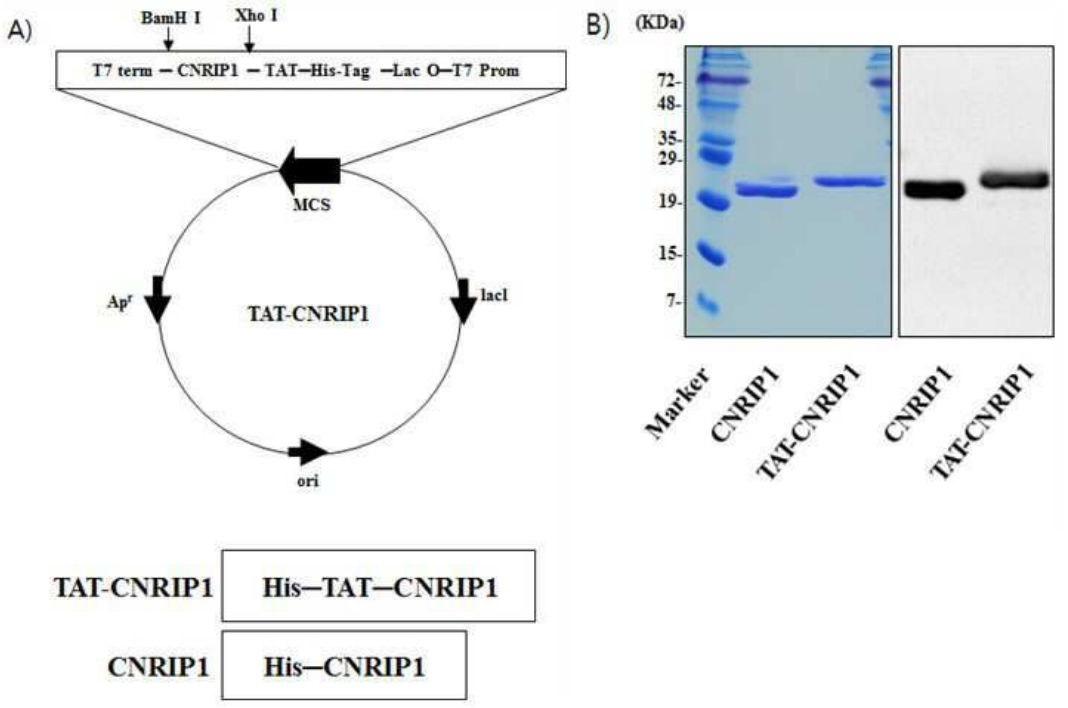
[0077] 또한, 과산화수소를 처리할 때 유도되는 활성산소종을 Tat-CNRIP1 융합단백질이 효과적으로 억제하는지 확인하기 위해 8-OHdG 형광 염료를 사용하여 세포 내 산화 정도를 분석하였다. HT22 세포가 1시간 동안 100㎛M의 과산화수소에 노출되었을 때, 과산화수소에 의해 현저하게 8-OHdG 신호가 증가하였다. 그러나 과산화수소에 의해 유도된 활성산소종은 Tat-CNRIP1 융합단백질에 의해 감소하였다(도 3의 B).

[0078] 산화 스트레스로 인해 발생되는 DNA 단편화에 대한 융합단백질의 보호효과는 DNA 단편화 부위에 특이적으로 붙는 형광 염료를 이용한 TUNEL 염색 방법으로 알아보았다. 앞선 실험과 동일한 상태에서 수행하였고, HT22 세포가 1시간 동안 100㎛M의 과산화수소에 노출되었을 때, Tat-CNRIP1 융합단백질이 DNA 단편화에 대해 보호효과가 있다는 결과를 확인하였다(도 3의 C).

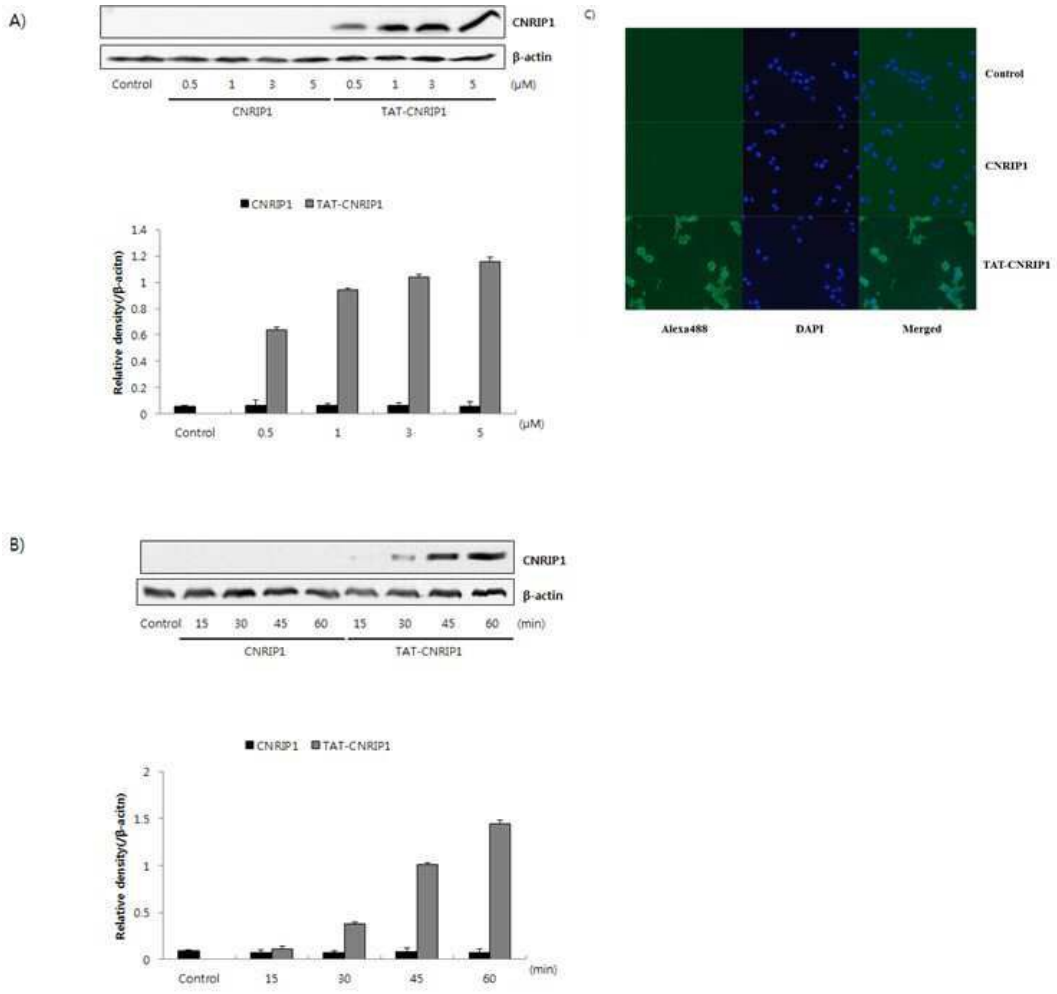
[0079] 따라서, 본 발명은 Tat-CNRIP1 융합단백질이 산화 스트레스로 인한 뇌허혈 등의 신경퇴행성 질환 및 다양한 질환에 대하여 치료제로서 효과적으로 응용될 수 있다는 가능성을 제시한다.

도면

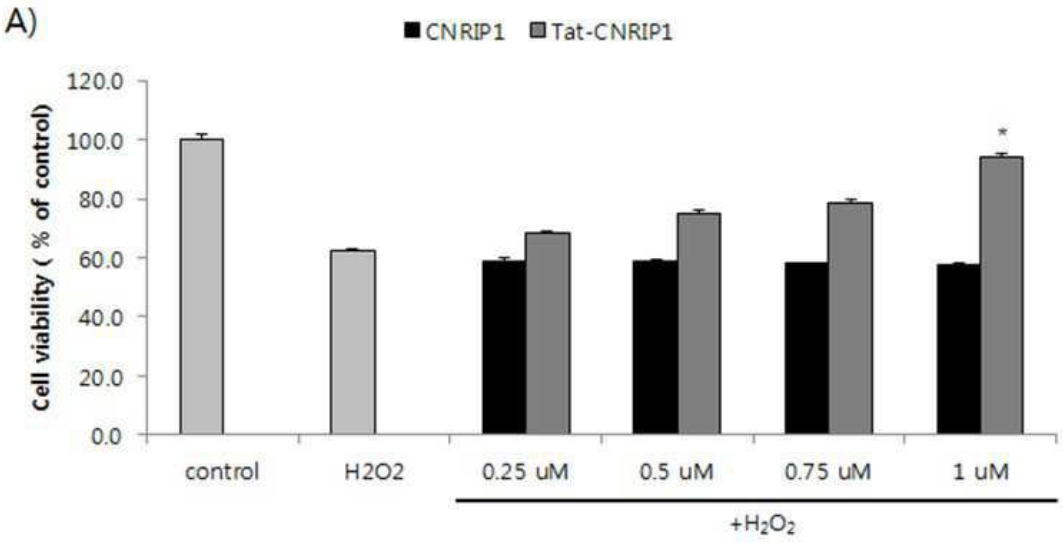
도면1



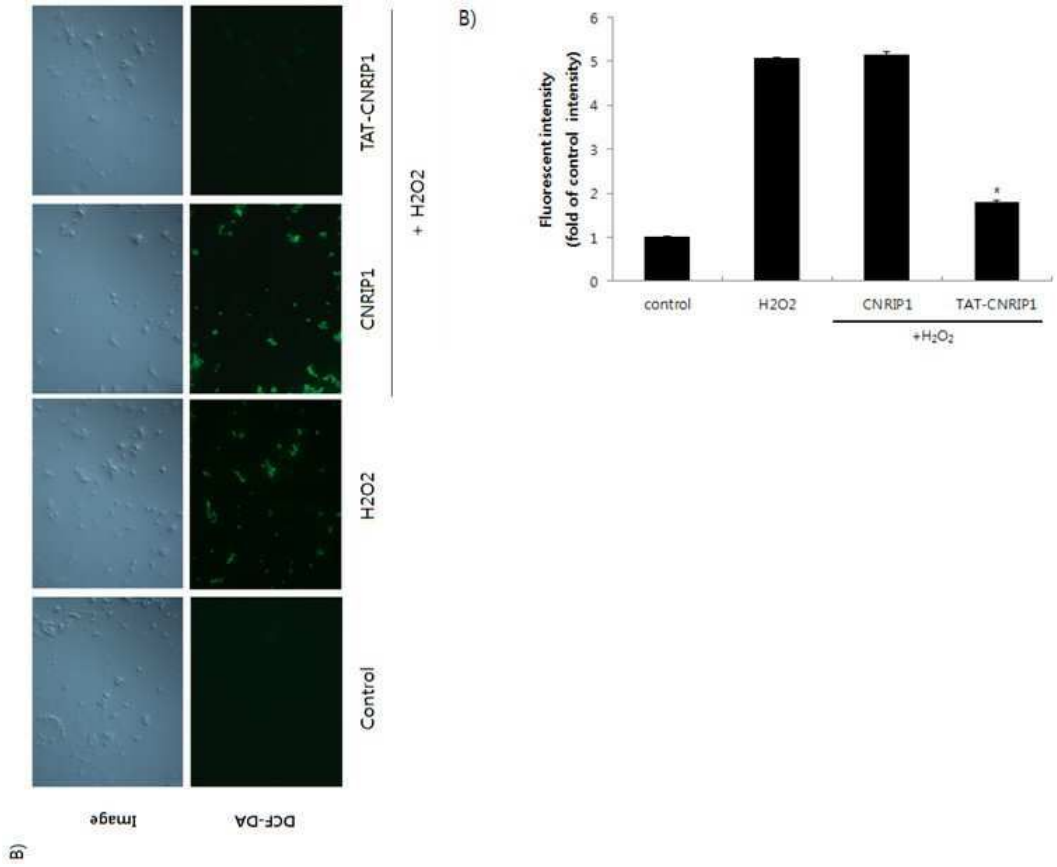
도면2


A)
CNRIP1
β-actin
Control 0.5 1 3 5 0.5 1 3 5 (μM)
CNRIP1
TAT-CNRIP1
CNRIP1 TAT-CNRIP1
Relative density/(β-actin)
Control 0.5 1 3 5 (μM)
C)
Control
CNRIP1
TAT-CNRIP1
Alexa488
DAPI
Merged
B)
CNRIP1
β-actin
Control 15 30 45 60 15 30 45 60 (min)
CNRIP1
TAT-CNRIP1
CNRIP1 TAT-CNRIP1
Relative density/(β-actin)
Control 15 30 45 60 (min)

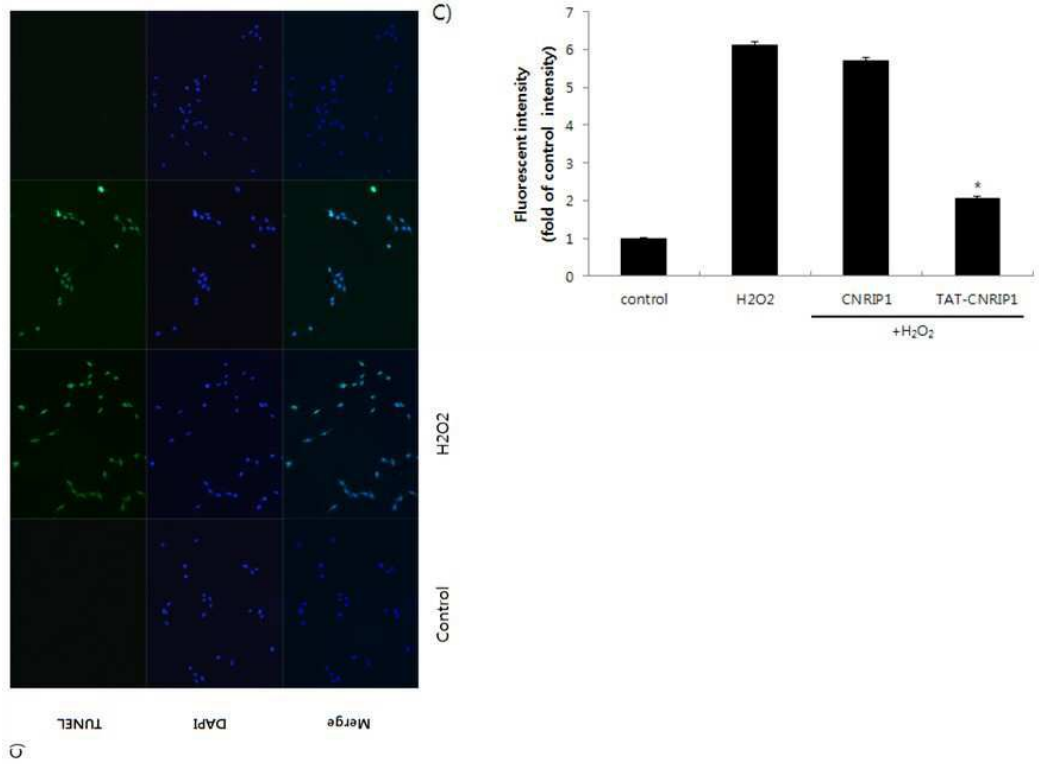
도면3a


A)
CNRIP1
Tat-CNRIP1
Cell viability (% of control)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
*
control
H2O2
0.25 uM
0.5 uM
0.75 uM
1 uM
+H2O2

도면3b



도면3c



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Pharmaceutical composition for treating cerebral ischemia containing CNRIP1 fusion protein

<130> HALLYMU-SYChoi-CNRIP1-brainischemia

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 522

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding Tat-CNRIP1 fusion protein

<400> 1

aggaagaagc ggagacagcg acgaagaatg ggggacctgc cgggcctcgt gcgcctctcc 60

atcgcgctgc gcatccagcc taatgacggc ccggtctttt acaaggtgga cgggcagcgc 120

ttcggccaga accgcaccat caagctgctc accggctcct cctacaaggt tgaggtgaag 180

attaaaccca gcacgctgca ggtcgagaat atttccattg gtggtgtgct tgtcccactg 240

gaactgaagt ctaaagagcc tgatggggac agagttgttt atacgggtac atatgacaca 300

gaaggtgtga ccccaacgaa gagtggagaa cggcaaccca tccagatcac catgccgttc 360

acagacattg ggaccttcga gacagtgtgg caagtcaagt tctacaatta ccacaagcgg 420

gatcactgcc agtggggaag ccccttctct gtcattgagt atgaatgcaa gcccaacgag 480

acacgcagtc tgatgtgggt gaacaaggag tccttcctct ga 522

<210> 2

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-CNRIP1 fusion protein

<400> 2

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Gly Asp Leu Pro
1 5 10 15

Gly Leu Val Arg Leu Ser Ile Ala Leu Arg Ile Gln Pro Asn Asp Gly
20 25 30

Pro Val Phe Tyr Lys Val Asp Gly Gln Arg Phe Gly Gln Asn Arg Thr
35 40 45

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

50 55 60

Pro Ser Thr Leu Gln Val Glu Asn Ile Ser Ile Gly Gly Val Leu Val
65 70 75 80

Pro Leu Glu Leu Lys Ser Lys Glu Pro Asp Gly Asp Arg Val Val Tyr
85 90 95

Thr Gly Thr Tyr Asp Thr Glu Gly Val Thr Pro Thr Lys Ser Gly Glu
100 105 110

Arg Gln Pro Ile Gln Ile Thr Met Pro Phe Thr Asp Ile Gly Thr Phe
115 120 125

Glu Thr Val Trp Gln Val Lys Phe Tyr Asn Tyr His Lys Arg Asp His
130 135 140

Cys Gln Trp Gly Ser Pro Phe Ser Val Ile Glu Tyr Glu Cys Lys Pro
145 150 155 160

Asn Glu Thr Arg Ser Leu Met Trp Val Asn Lys Glu Ser Phe Leu
165 170 175