



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0018225
(43) 공개일자 2017년02월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0111561
(22) 출원일자 2015년08월07일
심사청구일자 2015년08월07일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
조용준
강원도 춘천시 우석로101번길 86 110동 802호 (석사동, 대우아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

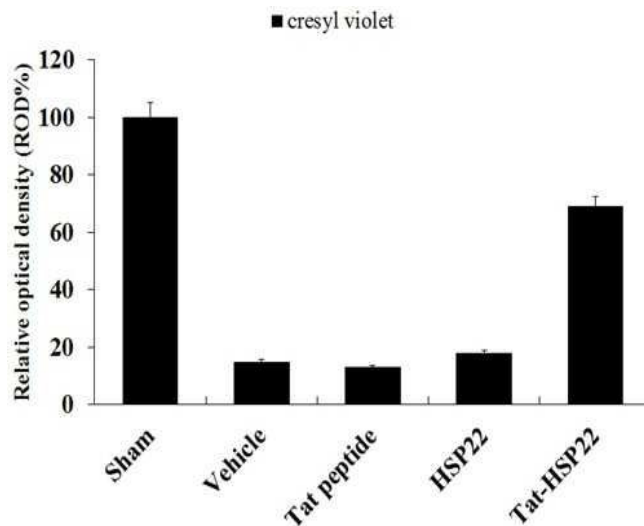
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 세포투과성 열충격단백질 22 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 세포투과성 열충격단백질 22 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 열충격단백질 22 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성 산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰다. 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 열충격단백질 22 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 열충격단백질 22 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

대표도 - 도6c



(52) CPC특허분류

A61K 2039/6043 (2013.01)

(72) 발명자

박진서

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)

한규형

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

조윤신

강원도 강릉시 화부산로99번길 12 강릉교동롯데캐슬아파트 104동 802호

이근욱

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

조효상

경기도 구리시 체육관로 163-12 (교문동)

음원식

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

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

조성우

서울특별시 송파구 양재대로 1218 257동 704호 (방이동, 올림픽선수촌아파트)

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가2길 8, 301호 (다가동, 그린빌)

김대원

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01121401

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업-농생명바이오 신의약소재개발사업

연구과제명 실크를이용한 외과 수술용 생체막 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.15 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

열충격단백질 22의 N-말단에 Tat 펩타이드가 공유결합된 열충격단백질 22 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 열충격단백질 22 융합단백질은 서열번호 2임을 특징으로 하는 열충격단백질 22 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포투과성 열충격단백질 22 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 열충격단백질 22 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰고, 세포 내 활성 산소종 수준 및 과산화수소로 유도되는 DNA 단편화를 감소시켰다. 동물모델에서는 전뇌 해마 CA1 부분에 일시적 허혈을 유도했을 때 일어나는 신경세포사멸에 대해 열충격단백질 22 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 열충격단백질 22 융합단백질이 세포사멸에 대해 보호효과가 있으며, 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 치료효과가 있음을 말해준다.

배경 기술

[0002] 다양한 원인으로 인하여 뇌로 향하는 혈관이 막힘으로써 뇌가 기능을 하는데 있어서 필수적인 포도당과 산소 등이 부족해진다. 지속적인 에너지 공급 및 산소 부족으로 인하여 산화 스트레스가 유도되어 뇌졸중, 전뇌허혈 또는 심각한 뇌 손상을 야기한다. 허혈성 재관류가 진행되면 뇌세포의 미토콘드리아에서 활성산소종을 생성한다. 생성된 활성산소종은 신경퇴행성 뇌질환인 알츠하이머, 파킨슨씨병, 헌팅턴질병 등을 유도하게 된다.

[0003] 치료를 위한 약물이나 단백질을 세포 내로 이동시키는데 있어서 목표 단백질을 세포막을 거쳐 직접 전달하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나, 단백질은 크기나 여러 가지 생화학적 성질 때문에 세포막을 통과하기가 매우 어렵다. 일반적으로 분자량 600 달톤 이상의 물질은 세포막을 통과하기가 거의 불가능한 것으로 알려져 있다.

[0004] 인간면역결핍 바이러스 (Human Immunodeficiency Virus type-1) 단백질의 일종인 Tat (Transactivator of transcription) 펩타이드는 효율적으로 세포막을 통과하여 세포질 내로 쉽게 이동한다는 것이 밝혀졌다. 이러한 기능은 Tat 펩타이드의 중간부위인 단백질 수송 도메인 (Protein transduction domain)의 특성 때문에 나타나며 아직까지 정확한 기전은 알려지지 않은 상태이다. 또한, PEP-1 단백질 수송 도메인도 타 단백질을 공유결합하여 타 단백질을 세포 내로 원활히 수송하는 것으로 알려져 있다. 최근의 많은 연구들은 타 단백질을 HIV-1 Tat 펩타이드, PEP-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고 아르기닌, 올리고(라이신+아르기닌) 등과 융합시켜 투여하였을 때 세포 및 조직 내로 직접 운반된다는 것을 보여 주었다.

[0005] 그러나, 모든 단백질이 단백질 수송 도메인과 융합단백질을 이루어 세포 내로 투과될 수 있는 것은 아니다. 2001년, 2004년 그리고 2007년에는 Tat 형질도입부위와 결합시킨 단백질이 세포 내로 도입은 되었으나 활성을 나타내지 않는 연구결과가 논문으로 발표된 사실이 있다(Sengoku, T. et al. *Experimental Neurology* 188(2004) 161-170, Falnes P.O. et al. *Biochemistry* 2001 Apr 10;40(14):4349-4358, Daniele Peroni et al., *Neuroscience letters* 421(2007) 110-114 등). 즉, 상기 참고논문들을 통하여 세포도입이 용이하지 않은 단백질에 단백질 수송 도메인을 융합시킨다고 해서 융합된 모든 단백질이 세포 내로 도입된 후 원활한 활성을

나타내지는 못하고 있음을 알 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 뇌 허혈손상을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 열충격 단백질 22 (Heat Shock protein22; HSP22)는 각종 질병에서 중요한 역할을 하는 항산화 효소이다. 그러나 HSP22는 몇몇 연구에서 미토콘드리아 내에서 활성산소종에 대한 세포 보호효과와 신경퇴행 그리고 세포사멸에 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있을 뿐 뇌허혈 예방 또는 치료에 대한 메커니즘 및 기능은 알려지지 않았다. 그리하여, 본 발명자들은 단백질 수송 도메인 중 하나인 HIV-Tat 펩타이드를 HSP22 단백질과 재조합하여 신경세포와 뇌허혈 동물 모델에서 산화 스트레스에 대하여 Tat-HSP22 융합단백질의 보호효과에 대해 연구하였다. 그 결과 Tat-HSP22 융합단백질이 산화 스트레스로 인한 세포사멸에 대하여 보호효과를 나타냄을 확인하였으며, 뇌질환과 같은 산화 스트레스 관련 질환에 대한 치료에 유용하게 쓰일 수 있는 가능성을 탐색하였다.

[0008] 본 발명은 열충격단백질 22의 N-말단에 Tat 펩타이드가 공유결합된 열충격단백질 22 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 열충격단백질 22 융합단백질이 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것임을 특징으로 하는 열충격단백질 22 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명하면, 본 발명의 일 실시예에서 본 발명자들은 먼저 HSP22 융합단백질을 과대 발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 HSP22 발현 벡터를 개발하였다. 이 발현 벡터는 인간 HSP22 단백질, Tat 단백질 수송 도메인, 그리고 아미노산 말단부분에 6개의 히스티딘 잔기를 발현시킬 수 있는 cDNA를 포함하고 있다.

[0011] 이 발현벡터를 이용하여 HSP22 융합단백질을 대장균에서 과대 발현시켰으며 Ni-친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 배양된 세포에 HSP22 융합단백질이 시간 및 농도 의존적으로 세포에 운반되는 것을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 세포 내로 투과된 HSP22 융합단백질은 세포 내에서 최대 24시간 지속적으로 유지되었으며, 산화 스트레스에 의한 세포사멸을 억제하였다.

[0012] 이러한 결과는 HSP22 융합단백질이 세포 내로 투과가 잘 일어나고, 세포 내에서 HSP22 단백질의 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 이러한 HSP22 융합단백질은 활성산소종과 관련된 증세 또는 뇌허혈 손상으로부터 신경세포를 보호하는 등의 뇌신경질환에 응용할 수 있는 가능성을 제시해 준다.

[0013] 세포 투과성 HSP22 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, 텔크, 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.

[0014] 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.

- [0015] 나아가, 본 발명은 상기 HSP22 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌허혈 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 HSP22 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 HSP22 단백질 분자의 세포 내 전달은 Tat 펩타이드를 비롯한 단백질 수송 도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 PEP-1 펩타이드, Tat 펩타이드, 올리고라이신 등을 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, Tat의 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 도메인 및 단백질 수송 도메인으로 알려진 펩타이드를 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.
- [0017] 구체적으로, 본 발명은 HSP22 융합단백질, 이 융합단백질을 포함하는 뇌허혈 치료, 예방 목적의 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0019] "HSP22 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 HSP22 단백질을 포함하며, 수송 도메인과 목표 단백질 (즉, 본 발명에서는 HSP22 단백질을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "Tat-HSP22", "Tat-HSP22 융합단백질" 등과 혼용하였다.
- [0020] "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 HSP22 단백질을 의미한다.
- [0021] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.
- [0022] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0023] 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.
- [0024] 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.
- [0025] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0026] 본 발명의 HSP22 융합단백질은 단백질 수송도메인이 HSP22의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 HSP22 융합단백질을 말한다. 또한, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, PEP-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고 (라이신,아르기닌) 중의 1종 이상을 말한다.
- [0027] 또한, 본 발명의 상기 HSP22 융합단백질 아미노산 서열은 서열번호 4를 포함한다. HSP22 융합단백질 제조에서 제한부위 서열의 선택 등에 따라 다양한 서열의 융합단백질을 얻을 수 있으며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야

에서 보통의 지식을 가진 사람에게 자명하다. 위 아미노산 서열은 예시적인 것일 뿐 HSP22 융합단백질 아미노산 서열이 위의 서열로 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 HSP22 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 뇌허혈의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 HSP22 융합단백질을 유효성분으로 하며, 뇌허혈의 예방 및 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명은 단백질 수송 도메인이 HSP22 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성 (cell-transducing) HSP22 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.

[0031] 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.

[0032] 아래 표 1의 핵산 서열과 아미노산 서열은 각각 Tat-HSP22 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열과 Tat-HSP22 융합단백질 아미노산 서열의 일 실시예를 예시한 것이나, Tat-HSP22 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열과 Tat-HSP22 융합단백질 아미노산 서열이 표 1에 제시된 서열로만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

표 1

[0033] Tat-HSP22 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열	CATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGGAGCCATAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACTCGAG atggctg acggtcagat gcccttctcc tgccactacc caagccgcct gcgccgagac cccttccggg actctccct ctcctctcgc ctgctggatg atggcttgg catggacccc ttccagacg acttgacagc ctcttggccc gactgggctc tgccctcgtc ctcctccgcc tggccaggca ccctaaggctc gggcatgggtg ccccggggcc cactgccac cgccagggtt ggggtgcctg ccgagggcag gacccccca cccttccctg gggagccctg gaaagtgtgt gtgaatgtgc acagcttcaa gccagaggag ttgatgggtga agaccaaaga tgatacgtg gaggtgtctg gcaaactga agagaaacag caagaagggtg gcattgttcc taagaacttc acaaagaaaa tccagcttcc tgcagagggtg gatcctgtga cagtatttgc ctcacttcc ccagagggtc tgctgatcat cgaagctccc caggctccct cttactcaac atttggagag agcagtttca acaacgagct tccccaggac agccaggaag tcacctgtac ctga GGATCC
Tat-HSP22 융합단백질의 아미노산 서열	H H H H H S S G L V P R G S H R K K R R Q R R R L E M A D G Q M P F S C H Y P S R L R R D P F R D S P L S S R L L D D G F G M D P F P D D L T A S W P D W A L P R L S S A W P G T L R S G M V P R G P T A T A R F G V P A E G R T P P P F P G E P W K V C V N V H S F K P E E L M V K T K D G Y V E V S G K H E E K Q Q E G G I V S K N F T K K I Q L P A E V D P V T V F A S L S P E G L L I E A P Q V P P Y S T F G E S S F N N E L P Q D S Q E V T C T

발명의 효과

[0034] 본 발명에서 세포 내로 투과된 Tat-HSP22 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시켰다. 또한, 본 발명의 Tat-HSP22 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 Tat-HSP22 융합단백질이 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과들로부터 본 발명의 세포 투과성 Tat-HSP22 융합단백질이 뇌허혈 예방 및 치료용 약학 조성물로 이용 가능함을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 Tat-HSP22 융합단백질의 구축 모식도 및 정제를 나타내는 사진이다. 도 1a는 구축된 Tat-HSP22 융합단백

질의 모식도이다. Tat-HSP22 융합단백질은 여섯 개의 히스티딘 잔기로 이루어진 His 꼬리표를 포함한다. 정제된 융합단백질은 12% SDS-PAGE로 분석하였고(도 1b의 왼쪽), 항-토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블롯 분석하였다(도 1b의 오른쪽).

도 2는 Tat-HSP22 융합단백질을 HT22 세포 내로 투과하는 실험결과이다. 세포를 60mm 배양접시에서 배양한 다음 농도별(0.5~5 μ M)로 Tat-HSP22 융합단백질을 처리하여 배양배지에 두 시간 동안 가하였다. 대조군은 단백질 수송 도메인이 결합되지 않은 HSP22 단백질을 사용하였다(도 2a). 또한, 5 μ M 농도의 Tat-HSP22 융합단백질을 10~120분 동안 배양배지에 가하였다(도 2b). 이를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 세포 내로 투과한 Tat-HSP22 융합단백질의 안정성은 5 μ M Tat-HSP22 융합단백질을 두 시간 동안 처리한 후 시간을 달리하여(1~60h) 웨스턴 블롯으로 평가하였다(도 2c). 세포 내로 투과된 Tat-HSP22 융합단백질의 세포 내 분포는 공초점 현미경으로 관찰하였다(도 2d). 크기막대=20mm.

도 3은 H_2O_2 를 가한 후 세포 생존율, DCF-DA, DNA 단편화에 미치는 Tat-HSP22 융합단백질의 세포 투과 효과를 나타낸다. H_2O_2 (1mM 12h)를 Tat-HSP22 (5 mM)로 두 시간 동안 선처리한 HT22 세포에 가하였다. 세포 생존율은 MTT를 이용한 발색분석법으로 평가하였다(도 3a). **P,0.01은 H_2O_2 로 처리한 세포와 비교한 값이다. H_2O_2 로 활성 산소종 생성을 유도한 세포에 대한 Tat-HSP22 융합단백질의 효과를 시험하였다. 두 시간 동안 세포를 Tat-HSP22 융합단백질로 처리한 후 1 mM H_2O_2 로 5분간 자극하였다. 세포 내 활성산소종 수준은 DCF-DA로 염색한 후 측정하였고, 형광 강도는 ELISA 플레이트 판독기로 측정하였다(도 3b). 크기 막대 = 25 mm. *P,0.01은 H_2O_2 로만 처리한 세포와 비교한 값이다. 세포를 Tat-HSP22 융합단백질 (5mM)로 두 시간 동안 처리한 후 H_2O_2 (1mM)에 네 시간 노출하였다. DNA 단편화는 TUNEL 염색으로 탐지하였다. 크기 막대 = 50 mm.

도 4는 H_2O_2 에 의해 유도되는 미토콘드리아 막전위 활성화에 대한 투과된 Tat-HSP22 융합단백질의 효과를 나타낸다. 미토콘드리아 막전위는 미토콘드리아 막전위 분석키트를 이용하여 탐지하였다 (도 4c). 크기 막대 = 50 mm. 세포를 두 시간 동안 Tat-HSP22 융합단백질 (5~0.3 mM)로 처리한 후 H_2O_2 (1mM)에 노출하였다. Bax와 Bcl-2는 웨스턴 블롯팅으로 탐지하였고, 락타아제는 밀도계로 측정하였다 (도 4b). *P,0.01은 H_2O_2 로만 처리한 세포와 비교한 값이다.

도 5는 신경세포 생존율을 NeuN 면역조직화학으로 분석한 결과이다. 히스티딘 항체를 이용한 면역조직화학으로 분석한 결과, Tat-HSP22 융합단백질은 혈관 뇌 장벽을 가로질러 투과하였다. 삼군, 담체군, Tat 펩타이드 처리군, HSP22 단백질로 처리한 대조군, Tat-HSP22 융합단백질 처리군을 7일 후 뇌허혈/재관류하여 면역조직화학으로 분석하였다. SP: stratum pyramidale, SO: stratum oriens, SR: stratum radiatum. 각 면역반응성 뉴런 수의 상대적 분석값은 담체군과의 유의한 차이이다. *P < 0.01은 담체군과 비교한 값이다. 크기 막대 = 50 μ m.

도 6은 세포로 투과된 Tat-HSP22 융합단백질의 신경보호효과를 면역조직화학으로 분석한 결과이다. 삼군, 담체군, Tat 펩타이드 처리군, HSP22 단백질로 처리한 대조군, Tat-HSP22 융합단백질 처리군의 CA1 구역에서 CV, GFAP, Iba-1 및 FJB에 대한 면역조직화학은 뇌허혈/재관류 7일 후에 수행하였다. SP: stratum pyramidale, SO: stratum oriens, SR: stratum radiatum. 각 면역반응성 뉴런 수의 상대적 분석값은 담체군과의 유의한 차이이다. *P < 0.01은 담체군과 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 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0037] 1) Tat-HSP22 융합단백질의 정제 및 세포 투과

[0038] 침투성 Tat-HSP22 융합단백질을 제조하기 위해 단백질 수송 도메인(Protein Transduction Domain; PTD)의 일종인 Tat이 포함된 Tat 벡터와 HSP22 유전자를 재조합하여(도 1a), 대장균에서 과다발현시켜 Ni^{2+} -나이트릴로아세트산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였고, SDS-PAGE와 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다(도 1b).

[0039] Tat-HSP22 융합단백질이 세포 내로 침투하는지를 알아보기 위하여 시간 및 농도별로 단백질을 해마 신경세포인

HT-22 세포에 처리하였다. 그 결과 시간 및 농도 의존적으로 세포 내 투과가 효과적으로 일어났으며, 음성 대조군(Control)과 단백질 수송 도메인 Tat이 결합되지 않은 HSP22 단백질은 투과가 일어나지 않았다(도 2a, 2b). 공초점 현미경을 이용하여 DAPI로 세포핵을 염색하고, Tat-HSP22 융합단백질을 녹색 형광으로 염색하여 효과적으로 세포 내로 투과되는 것을 확인했다(도 2d). 그리고, 투과된 융합단백질은 세포 내에서 24시간 동안 안정적으로 유지되었다(도 2c).

[0040] 2) 산화 스트레스로 인한 세포 생존력, 활성산소종 수준 및 DNA 단편화에 대한 Tat-HSP22 융합단백질의 보호효과

[0041] 세포에 Tat-HSP22 융합단백질을 농도별로 전처리한 후 H_2O_2 로 산화 스트레스를 주었다. 세포 생존능력을 확인하기 위해 MTT{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} 분석을 수행하였다. 해마 신경세포인 HT-22 세포에 1mM H_2O_2 를 단일 처리하였을 경우 생존한 세포 수가 56%로 감소하였으나, Tat-HSP22 융합단백질을 처리하였을 경우 농도 의존적으로 세포 생존능력이 증가하였다(도 3a).

[0042] 또한, H_2O_2 로 인하여 증가하는 활성산소종을 Tat-HSP22 융합단백질이 효과적으로 억제하는지 확인하기 위하여, 세포 내에 생성된 활성산소종과 $H_2DCFDA(2',7'$ -dichlorofluorescein diacetate)가 세포 내에서 가수분해되어 불투과성의 $H_2DCF(2',7'$ -dichlorofluorescein)가 반응하여 산화되면서 $DCF(2',7'$ -dichloro-fluorescein)를 형성해 녹색형광을 나타내는 원리의 DCF-DA 염색법을 수행했다. H_2O_2 를 처리한 세포에서 녹색형광은 대조군 HSP22 단백질에 비해 지다당(lipopolysaccharide; LPS)에 의해 강하게 발색된 반면, 투과된 Tat-HSP22 융합단백질은 형광신호를 감소시켰다(도 3b).

[0043] 산화 스트레스로 인해 발생하는 DNA 단편화에 대한 보호효과를 DNA의 단편화된 부위에 특이적으로 붙는 형광 안료를 이용한 TUNEL 염색방법으로 알아보았다. 앞선 실험과 동일한 상태에서 실험하였고, Tat-HSP22 융합단백질이 DNA 단편화에 대해 보호효과가 있다는 결과를 확인하였다(도 3c).

[0044] 3) 미토콘드리아 손상에 대한 Tat-HSP22 융합단백질의 보호효과

[0045] JC-1 염색법으로 미토콘드리아의 활성을 확인했다. JC-1 염색법은 산화 스트레스로 인하여 손상 받은 미토콘드리아의 MMP(Mitochondrial membrane permeabilization)를 측정하는 기법으로, 미토콘드리아 막 투과가 손상을 받게 되면 JC-1이 투과를 못하여 단일체(monomer)로 존재하여 녹색을 띄고, 반대로 막 투과가 정상적으로 진행되면 JC-1 염색 물질이 뭉쳐 j-집합체(aggregate)를 형성하여 빨간색 형광을 띄게 된다. H_2O_2 를 단일 처리한 경우 막 투과성이 손상을 입어 녹색을 띄는 반면, Tat-HSP22 융합단백질을 처리한 경우 산화 스트레스에 대한 손상이 보호됨에 따라 막 투과 손상이 줄어 빨간색 형광을 띄는 것을 확인하였다(도 4a).

[0046] 미토콘드리아에서 세포 사멸시 진행되는 Bcl-2, Bax의 발현 정도를 확인했다. H_2O_2 를 처리하면 Bcl-2 발현이 감소하고 Bax 발현이 많이 증가했는데, Tat-HSP22 융합단백질을 처리한 경우 Bcl-2의 발현은 농도 의존적으로 아무것도 처리하지 않은 음성대조군과 유사하게 증가하였고, Bax의 발현은 현저히 감소한 것을 확인하였다(도 4b).

[0047] 4) 뇌허혈 유도 동물 모델에서 Tat-HSP22 융합단백질의 침투 확인

[0048] Tat-HSP22 융합단백질의 신경세포 보호 효능을 확인하기 위하여 면역조직염색을 통해 실험을 진행하였다. Tat-HSP22 융합단백질을 복강 주사하지 않은 실험군에서는 저빌의 CA1 지역의 신경세포의 사멸이 진행되어 NeuN(neuronal nuclei) 항체로 염색된 세포의 수가 현저히 감소한 반면, Tat-HSP22 융합단백질을 전처리한 실험군은 CA1 지역 신경세포 사멸이 억제된 것을 NeuN 항체 염색을 통해 확인하였다. 또한, 항히스틴딘 항체로 Tat-HSP22 융합단백질의 조직 내 침투를 확인하였으며, DAPI로 핵을 염색하여 통합하여 확인하였다(도 5).

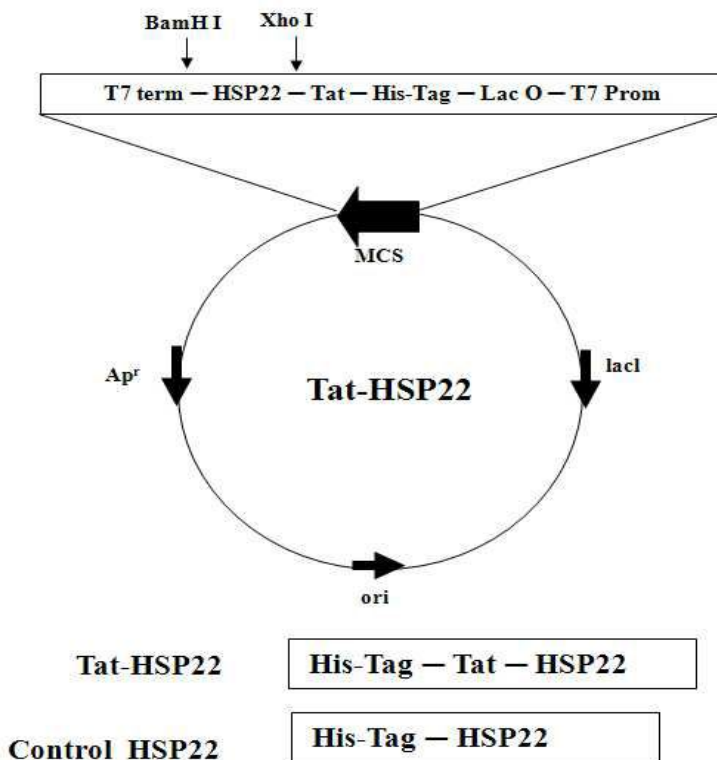
[0049] 5) 허혈성 뇌손상에 대한 Tat-HSP22 융합단백질의 세포 보호 효능

[0050] 허혈성 뇌손상에 대한 Tat-HSP22 융합단백질의 보호 효능을 알아보기 위해 저발취를 이용하여, 연속적으로 대뇌 혈류(cerebral blood flow)를 감소시켜 뇌의 저산소증과 뇌허혈을 유도함으로써 많은 양의 독성 활성산소종을 형성시켜 급성 뇌허혈 손상을 통해 신경세포 사멸을 유도하는 외과적 수술법으로 동물모델을 제작하였다. 침투한 Tat-HSP22 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 확인했다. 뇌허혈을 유도한 동물 모델 중 Tat-HSP22 융합단백질을 처리한 동물에서는 세포사멸에 대한 보호효과가 나타났으며, 반면 대조군 HSP22 단백질을 처리한 동물에서는 세포사멸에 대한 보호효과가 전혀 나타나지 않았다. 또한 Iba-1(ionized calcium-binding adaptor molecule 1)은 새로운 Ca^{++} 결합 단백질(calcium-binding protein)이고, 특이하게 뇌의 활성화된 소교세포(microglia)에서만 발현된다. 따라서 Iba-1은 이러한 연구에서 소교세포 마커로 이용되며, 신경세포 사멸로 인한 소교세포의 활성화를 확인할 수 있다. 그리고 중간 섬유(Intermediate filament)를 이루는 구성요소이면서 정상세포의 표지자인 GFAP(Glial fibrillary acidic protein)도 이용하였다. GFAP는 특히 신경세포에 손상을 받게 되면 정상세포가 손상 받은 부위를 보충하기 위해 활성화될 때 발현되는 단백질로 뇌 손상시 활성화되어 응집하는 정상세포를 관찰할 수 있다. 뇌허혈 모델에서 Tat-HSP22 융합단백질의 소교세포와 정상세포의 활성화와 응집에 대해 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 뇌허혈이 유도된 경우 염색된 소교세포와 정상세포의 활성이 증가하고 서로 응집된 것을 확인하였으며, 반면 Tat-HSP22 융합단백질을 처리한 경우 활성화 그리고 응집 현상 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

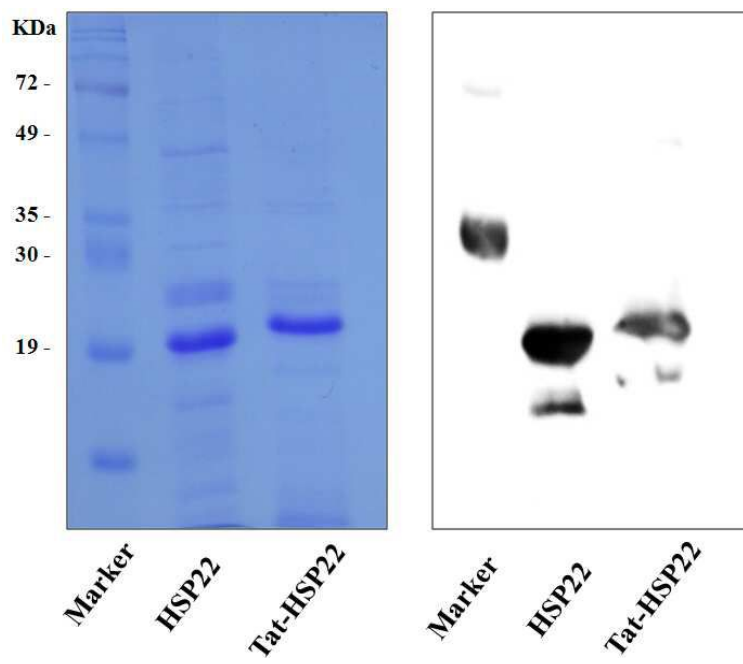
[0051] 따라서, 본 발명은 Tat-HSP22 융합단백질이 산화 스트레스로 인한 뇌허혈 등의 신경퇴행성 질환 및 다양한 질환에 대하여 치료제로서 효과적으로 응용될 수 있다는 가능성을 제시한다.

도면

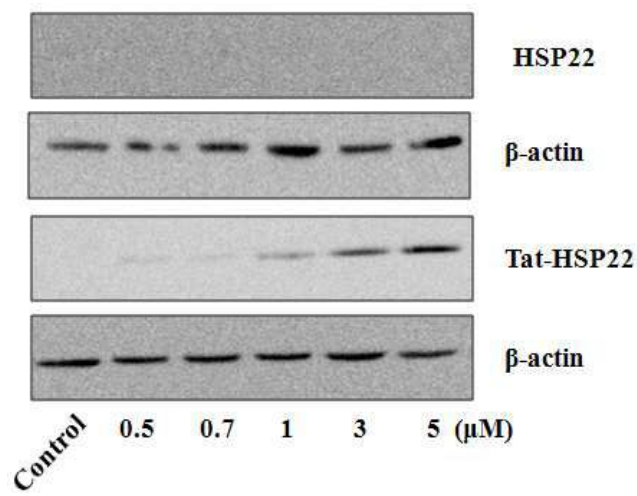
도면1a



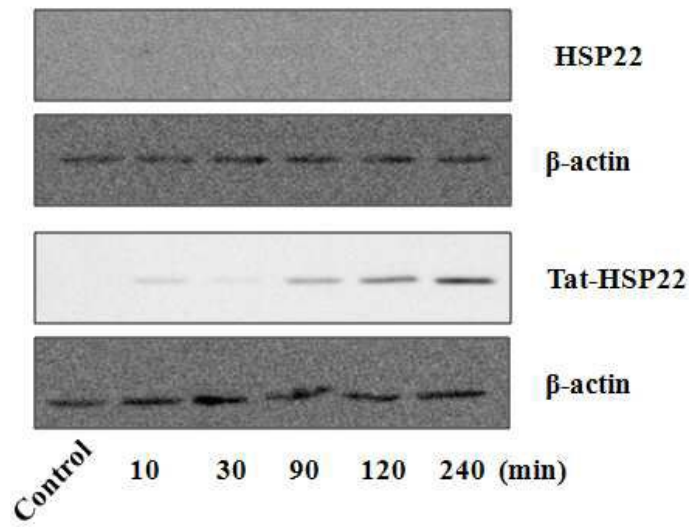
도면1b



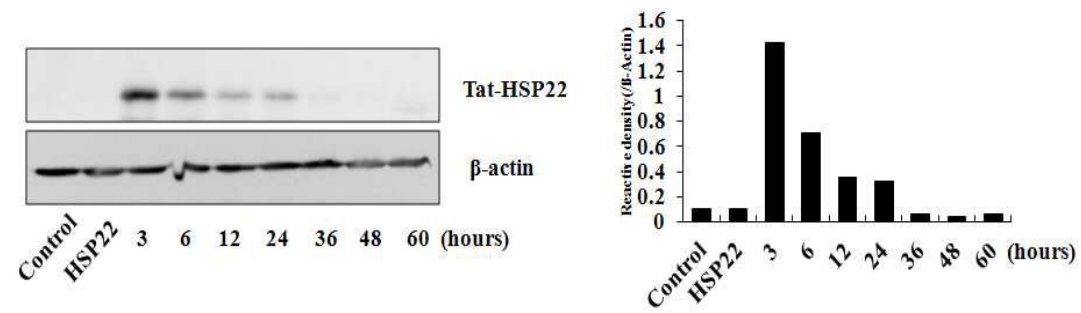
도면2a



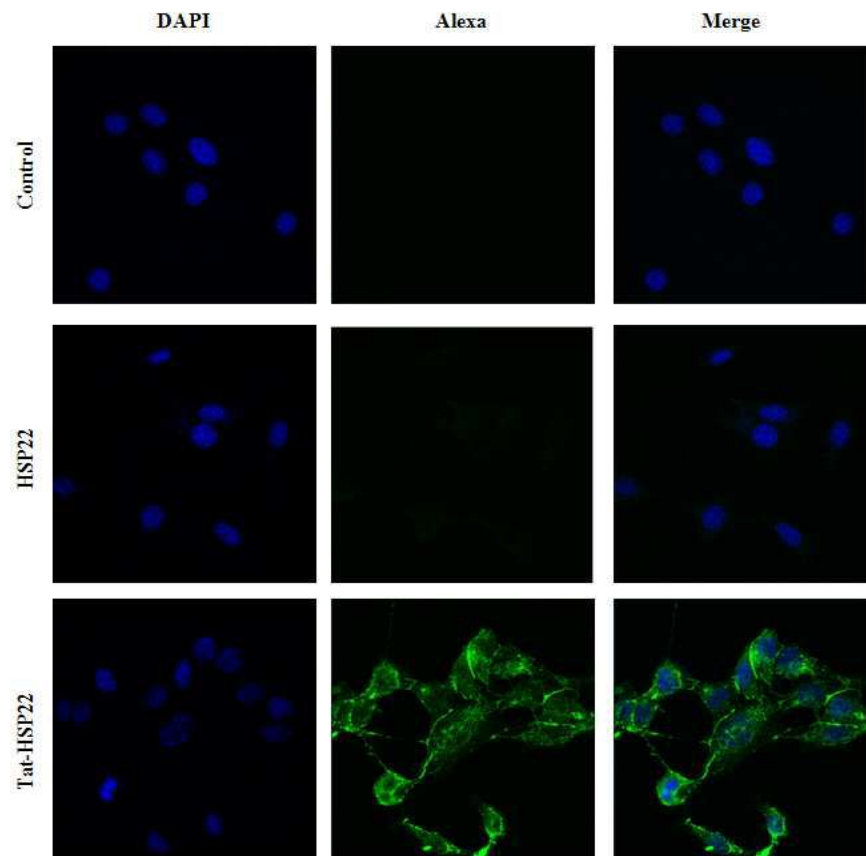
도면2b



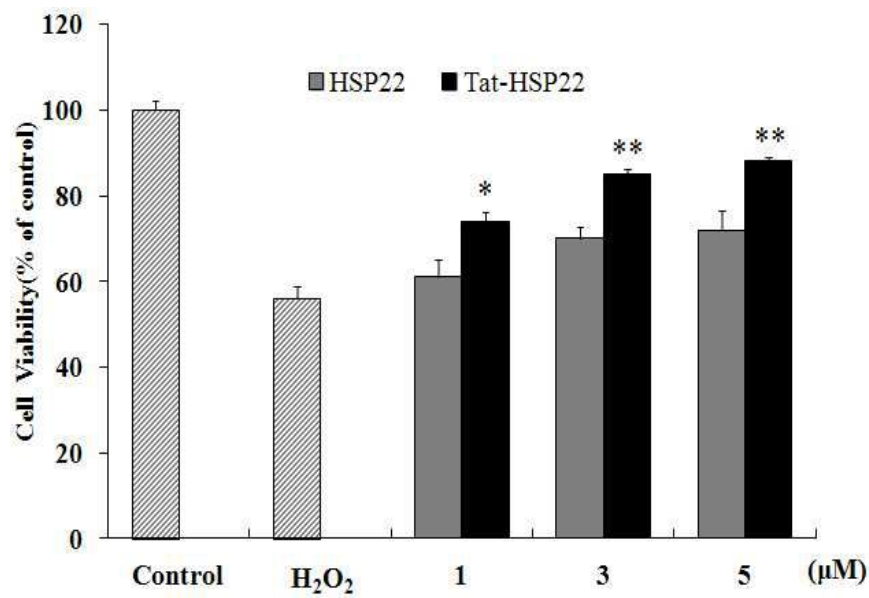
도면2c



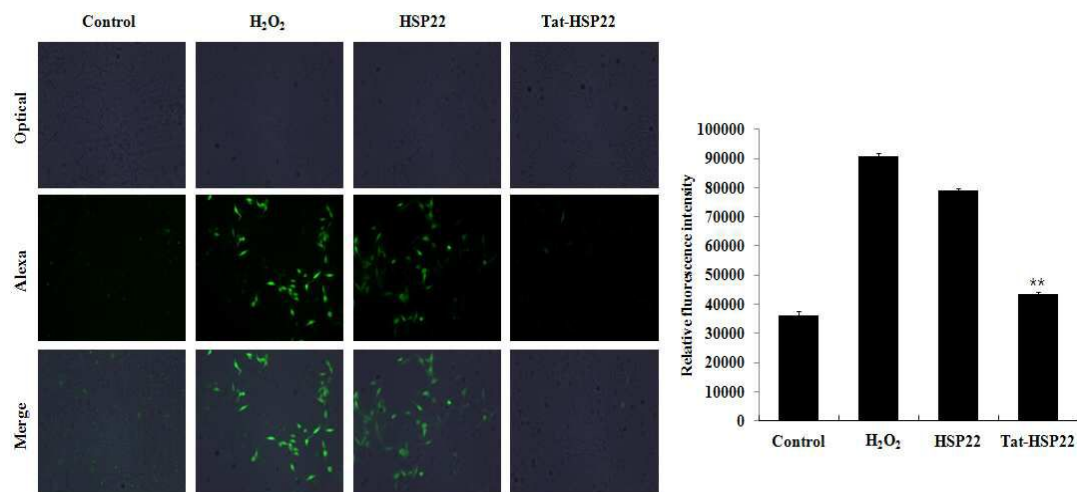
도면2d



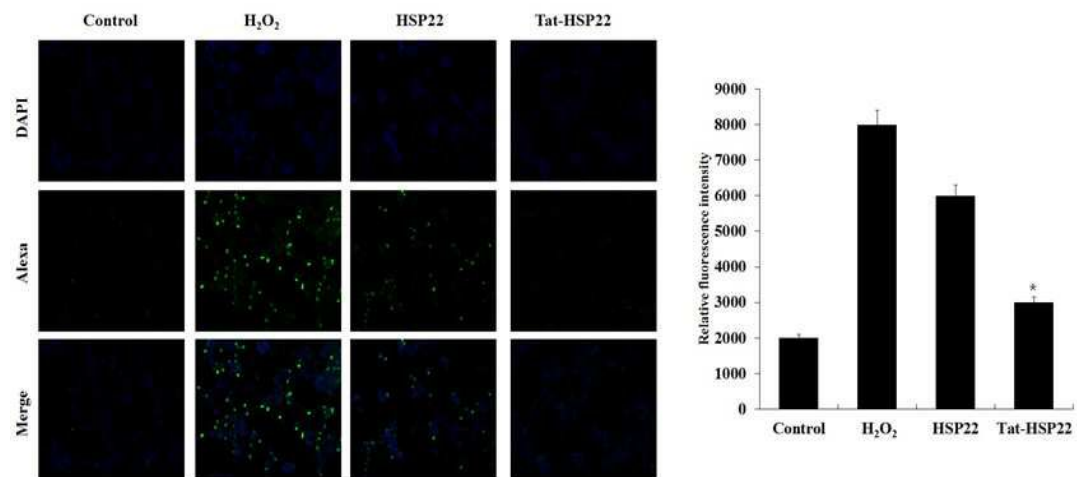
도면3a



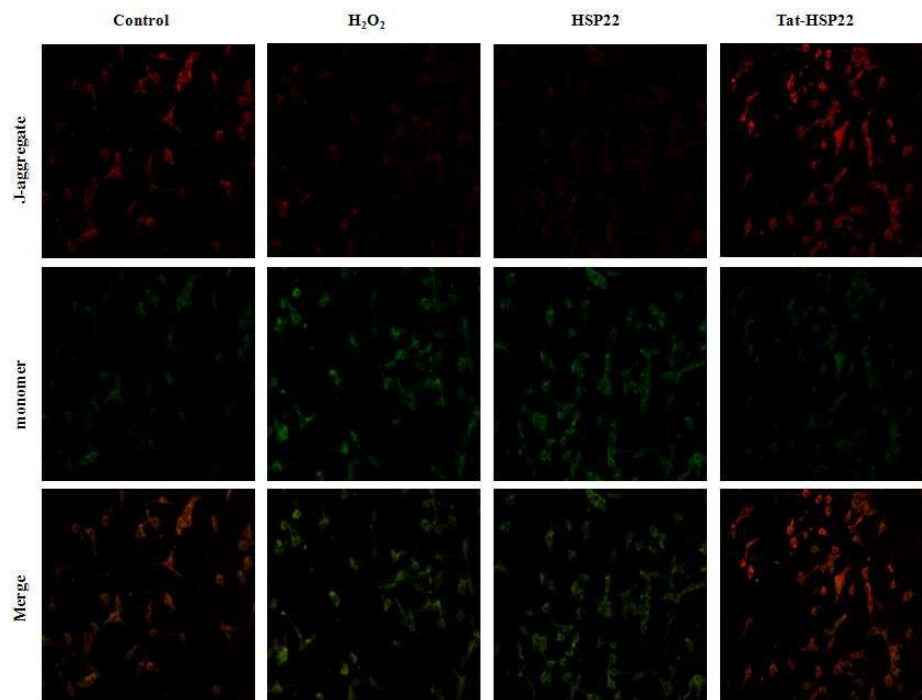
도면3b



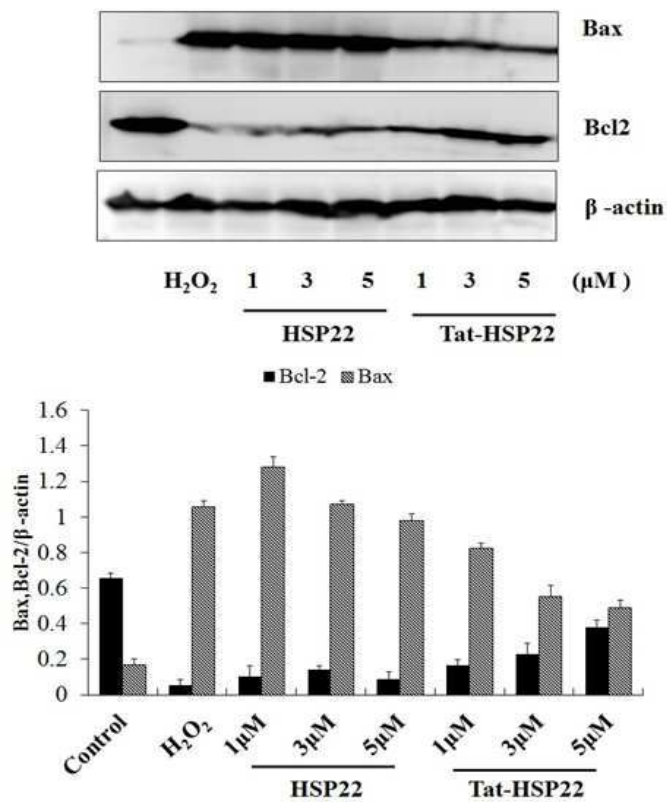
도면3c



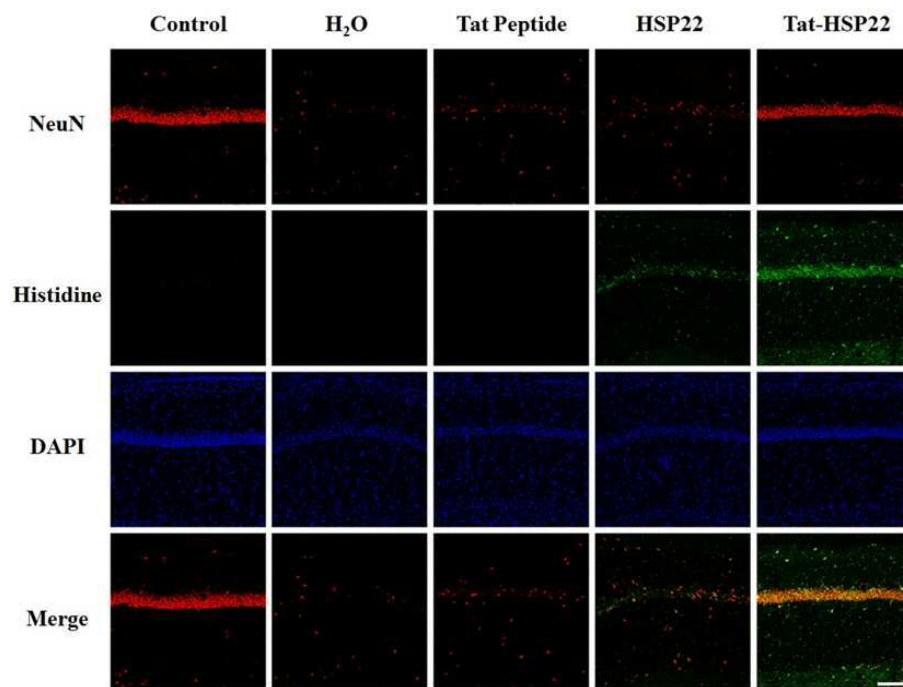
도면4a



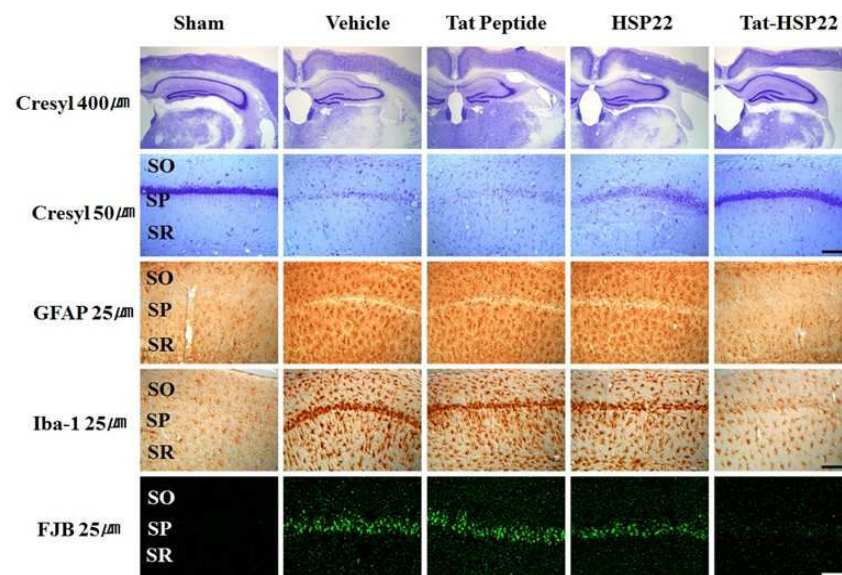
도면4b



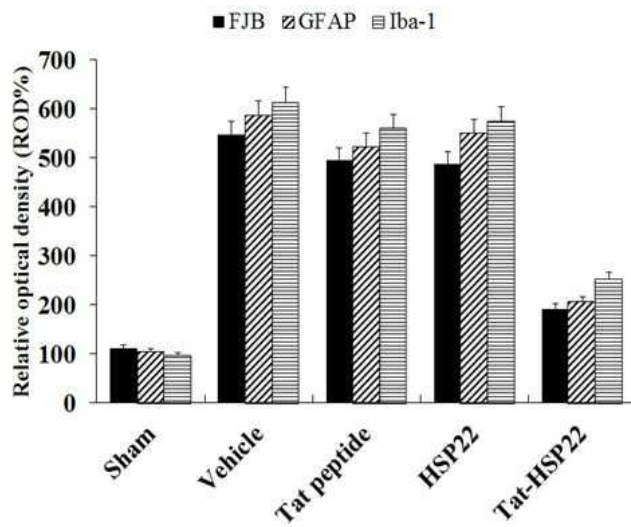
도면5



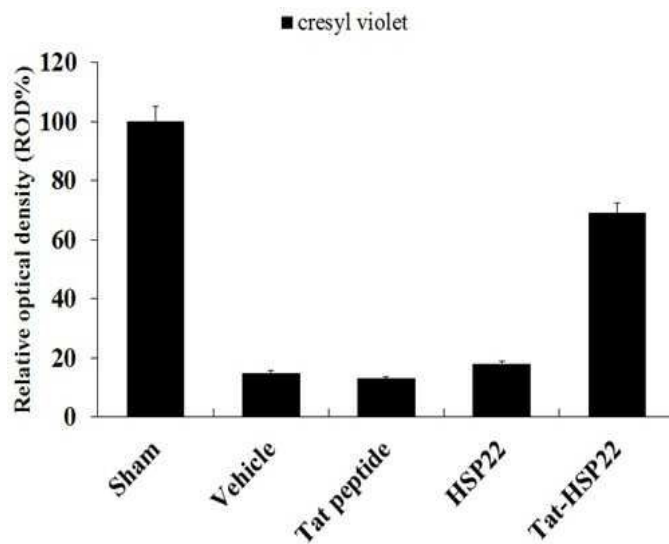
도면6a



도면6b



도면6c



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for treating ischemia containing cell-transducible Heat Shock Protein 22 fusion protein
- <130> HallymU-SYCHOI-HSP22-ischemia
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 678
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding Tat-HSP22 fusion protein

<400> 1

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccatag gaagaagcgg 60

agacagcgac gaagactcga gatggctgac ggtcagatgc cttctcctg ccactaccca 120

agccgcctgc gccgagaccc ctccgggac tctccctct cctctcgcct gctggatgat 180

ggctttggca tggaccctt cccagacgac ttgacagcct cttggcccga ctgggctctg 240

cctcgtctct cctccgcctg gccaggcacc ctaaggctcg gcatggtgcc ccggggcccc 300

actgccaccg ccaggtttgg ggtgcctgcc gagggcagga cccccccacc cttccctggg 360

gagccctgga aagtgtgtgt gaatgtgcac agcttcaagc cagaggagtt gatggtgaag 420

accaaagatg gatacgtgga ggtgtctggc aaacatgaag agaaacagca agaagtggtg 480

attgtttcta agaattcac aaagaaaatc cagcttctg cagaggtgga tcctgtgaca 540

gtatttgct cactttccc agagggtctg ctgatcatg aagctccca ggtccctct 600

tactcaacat ttggagagag cagtttcaac aacgagctt cccaggacag ccaggaagtc 660

acctgtacct gaggatcc 678

<210> 2

<211> 207

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-HSP22 fusion protein

<400> 2

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Asp Gly Gln

1 5 10 15

Met Pro Phe Ser Cys His Tyr Pro Ser Arg Leu Arg Arg Asp Pro Phe

20 25 30

Arg Asp Ser Pro Leu Ser Ser Arg Leu Leu Asp Asp Gly Phe Gly Met

35 40 45

Asp Pro Phe Pro Asp Asp Leu Thr Ala Ser Trp Pro Asp Trp Ala Leu

50 55 60

Pro Arg Leu Ser Ser Ala Trp Pro Gly Thr Leu Arg Ser Gly Met Val

65 70 75 80

Pro Arg Gly Pro Thr Ala Thr Ala Arg Phe Gly Val Pro Ala Glu Gly

85

90

95

Arg Thr Pro Pro Pro Phe Pro Gly Glu Pro Trp Lys Val Cys Val Asn

100

105

110

Val His Ser Phe Lys Pro Glu Glu Leu Met Val Lys Thr Lys Asp Gly

115

120

125

Tyr Val Glu Val Ser Gly Lys His Glu Glu Lys Gln Gln Glu Gly Gly

130

135

140

Ile Val Ser Lys Asn Phe Thr Lys Lys Ile Gln Leu Pro Ala Glu Val

145

150

155

160

Asp Pro Val Thr Val Phe Ala Ser Leu Ser Pro Glu Gly Leu Leu Ile

165

170

175

Ile Glu Ala Pro Gln Val Pro Pro Tyr Ser Thr Phe Gly Glu Ser Ser

180

185

190

Phe Asn Asn Glu Leu Pro Gln Asp Ser Gln Glu Val Thr Cys Thr

195

200

205