



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0053929
(43) 공개일자 2018년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/52 (2006.01) A61K 38/19 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/521 (2013.01)

A61K 38/195 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0151098

(22) 출원일자 2016년11월14일

심사청구일자 2016년11월14일

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

이준행

서울특별시 강남구 삼성로 649, 2동 408호 (삼성동, 상아아파트)

류정목

대전광역시 유성구 상대남로 26, 915동 504호

(74) 대리인

특허법인태백

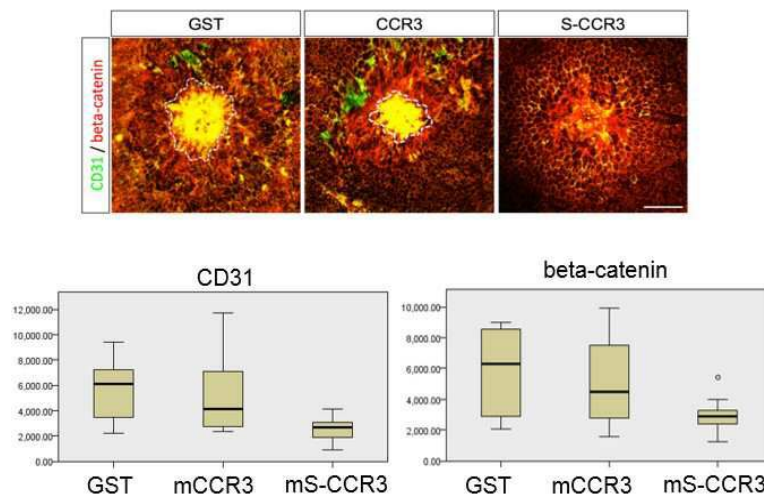
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 N-말단 도메인 변이체 및 이를 포함하는 황반 변성 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 N-말단 도메인 변이체 및 이를 포함하는 황반 변성 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 황산화된 케모카인 수용체 3(S-CCR3) 펩타이드는 신생혈관에 의해 망막색소상피 퇴화가 일어나는 황반변성 병리현상을 억제하는 효과, 즉 망막색소상피세포의 수복과 신생혈관의 억제에 대한 효과가 있는 것으로 나타났다. CCR3 단일클론 항체 치료제는 CCR3의 구조상 (7 membrane spanning region을 포함한 구조) 전체 구조를 결정화(crystalize)하기 힘들고 이에 따라 다른 종류의 수용체와 다르게 아직 항체 치료제가 나오지 못하고 있는데, 본 발명의 경우, 단일클론 항체 보다 경제성이 훨씬 뛰어나고, 천연 펩타이드로써 면역 저항성과 독성이 거의 없다고 사료되므로 황반변성 질환 치료시장에서 신약개발에 대한 강력한 경쟁력을 가지고 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12P 21/00 (2013.01)

C12N 2511/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1의 아미노산 서열 중 타이로신이 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1의 아미노산 서열은 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 타이로신은 서열번호 1의 20번째 아미노산 또는 22번째 아미노산인 것을 특징으로 하는 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 암호화하는 유전자.

청구항 5

제4항에 따른 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제5항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제6항의 형질전환된 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및

상기 배양된 재조합 미생물로부터 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 분리하는 단계를 포함하는 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체 생산방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 황반변성은 습성 황반변성인 것을 특징으로 하는 황반변성 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 황산화된 케모카인 수용체 3(chemokine receptor 3)의 세포 외 N-말단 도메인 변이체 및 이를 포함하는 황반 변성 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0002] 케모카인(Chemokine)은 크기가 8 내지 15 Kd의 비교적 작은 분비성 단백질로서 임파구, 중성구 등의 혈액세포와 혈관내피세포의 증식, 이동, 활성화를 일으키는 물질들을 통칭한다. 케모카인은 현재 약 40 여종이 발견되어 있으며 이들은 각각의 수용체를 통해 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 케모카인은 여러 자가면역질환(e.g., RA, SLE, Sjogren), 자가 염증성질환(ulcerative colitis, Crohn's Ds)과 같은 많은 질병의 발생과 진행에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이 외에도 당뇨병 동맥경화의 발생에도 관련된 것으로 알려져 있다. 또한, 장기나 조직의 이식에 있어서 치명적인 거부반응도 케모카인에 의해 매개된다. 이에 따라 케모카인의 활성을 억제할 수 있는 다양한 종류의 억제제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

[0003] 황반변성, 특히 나이 관련 황반변성(Age-related Macular Degeneration; AMD)은 망막상피세포(RPE; retinal pigment epithelium), 망막 및 맥락막 모세혈관층의 점진적인 변성으로 인해 고령자들에게 돌이킬 수 없는 시력 상실을 가져오는 질환이다. 초기 단계의 황반변성은 브르크막(Bruch's membrane)과 망막상피세포 사이에 드루젠(drusen)이라 불리는 세포 외 침착이 형성되는 비정상적인 망막상피세포가 관찰되는 것이 특징이다. 황반변성의 후기 단계는 삼출성황반변성(exudative / 습성 황반변성; wet form)과 위축성황반변성(geographic atrophy / 건성 황반변성; dry form)으로 나뉜다. 삼출성황반변성은 망막상피세포로부터 혈관내피성장인자(VEGF)와 같은 혈관신생인자가 분비되고 맥락막으로부터 새로운 혈관신생을 촉진하여, 망막하액(subretinal fluid)의 축적, 출혈 및 상처 등을 유도한다(Smith et al., Expert Opin Emerg Drugs. 19:157-164, 2014). 위축성황반변성은 황반부에서 망막상피세포 및 광수용체 세포의 점진적인 변성으로 인해 시력 상실을 가져온다. 산화 스트레스 및 염증이 황반변성의 병인으로 알려졌으나, 아직까지 정확한 메카니즘은 규명된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 미국공개특허 2007-0190055(2007.08.16 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1의 아미노산 서열 중 타이로신이 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체 또는 이를 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1의 아미노산 서열 중 타이로신이 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 암호화하는 유전자, 이를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물 및 이를 이용한 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체 생산방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 N-말단 도메인 변이체 및 이를 포함하는 황반 변성 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 황산화된 케모카인 수용체 3(S-CCR3) 펩타이드는 신생혈관에 의해 망막색소상피 퇴화가 일어나는 황반변성 병리현상을 억제하는 효과, 즉 망막색소상피세포의 수복과 신생혈관의 억제에 대한 효과가 있는 것으로 나타났다. CCR3 단일클론 항체 치료제는 CCR3의 구조상 (7 membrane spanning region을 포함한 구조) 전체 구조를 결정화(crystalize)하기 힘들고 이에 따라 다른 종류의 수용체와 다르게 아직 항체 치료제가 나오지 못하고 있는데, 본 발명의 경우, 단일클론 항체 보다 경제성이 훨씬 뛰어나고, 천연

펩타이드로써 면역 저항성과 독성이 거의 없다고 사료되므로 황반변성 질환 치료시장에서 신약개발에 대한 강력한 경쟁력을 가지고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 오버래핑 중합효소 연쇄반응에 의하여 증폭된 DNA를 확인한 결과 및 그 DNA가 벡터 안에 정상적으로 삽입된 것을 전기영동으로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 mCCR3의 세포 외 도메인 1의 야생형(wild)이 정상적으로 제조된 결과를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 mCCR3의 세포 외 도메인 1이 정상적으로 황산화된 것을 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 습성 황반변성 모델에서 S-CCR3 펩타이드의 효능을 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명은 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1의 아미노산 서열 중 타이로신이 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 제공한다.
- [0012] 바람직하게는, 상기 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1의 아미노산 서열은 서열번호 1로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 타이로신은 서열번호 1의 20번째 아미노산 또는 22번째 아미노산일 수 있고, 또는 이들의 조합일 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 암호화하는 유전자를 제공한다. 상기 유전자 서열은 등가의 핵산서열들도 포함된다.
- [0015] "등가의 핵산서열"에는 상기 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체 유전자 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다. "코돈 축퇴성 서열"이란 본 발명에 개시된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 의미한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [0017] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 바람직하게는 상기 미생물은 대장균일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 재조합 미생물로부터 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 분리하는 단계를 포함하는 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체 생산방법을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체를 유효성분으로 포함하는 황반변성 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 바람직하게는 상기 황반변성은 습성 황반변성일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 황반변성, 특히 나이 관련 황반변성(Age-related Macular Degeneration; AMD)은 망막상피세포(RPE; retinal pigment epithelium), 망막 및 맥락막 모세혈관층의 점진적인 변성으로 인해 고령자들에게 돌

이킬 수 없는 시력상실을 가져오는 질환이다. 황반변성에서 약 90% 까지 설명되는 원인은 맥락막 신생혈관(choroidal neovascularization; CNV)에 의한 것이다. 이는 망막색소상피나 망막하 공간의 Bruch's 막으로의 새로운 혈관세포가 맥락막(choroid)으로부터 자라 들어오는 것이다.

[0023] 현재 황반변성 표준 치료방법은 anti VEGF antibody 제제를 유리체내(intravitreal)로 반복투여하는 것이다. 그러나 상기 방법의 제한점은 약물 저항성(drug resistance), 속성 내성(tachyphylaxis), 빈번한 재발(frequent recurrences) 또는 장기적인 시력 회복 불가 등이다. 또한 상기 제제의 주입이 CNV 발전을 막을 수는 없다. 그 이유는 CNV의 근본적인 원인을 제거할 수 없기 때문이다.

[0024] 케모카인 수용체 3(chemokine receptor 3; CCR3)는 CNV에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. CCR3는 AMD의 표적인자로 제안되었으며, CCR3와 그 리간드(ligand)인 CCL11, CCL24, 그리고 CCL26가 AMD 환자의 맥락막 신생혈관 내피세포(choroidal neovascular endothelial cells)에서 발현되고, CCR3는 인간 AMD 조직과 mouse AMD model에서 맥락막에 과발현되어 있고, CCR3의 억제(blockade)가 동물모델에서 효과가 있는 것으로 보고되었다.

[0025] 하지만, 이러한 CCR3에 대한 여러 연구에도 불구하고, 제2상 임상시험(phase II trial)까지 진행된 후보약물은 없다. 현재 황반변성 치료제로 사용되고 있는 anti VEGF antibody는 VEGF 수용체(receptor)를 표적으로 한다. 또한, CCR3 수용체를 표적으로 하는 여러 small molecule 약물 개발이 시도되었지만, 황반변성 치료제로 사용될 만한 약물을 개발되고 있지 않은데, 이는 독성이 크기 때문인 것으로 판단된다.

[0026] 한편, CCR3 단일클론 항체 치료제는 CCR3의 구조상(7 membrane spanning region을 포함한 구조) 전체 구조를 결정화(crystallize)하기 힘들고, 이에 따라 다른 종류의 수용체와 다르게 아직 항체 치료제가 나오지 못하고 있다.

[0027] 이에 비해, 본 발명의 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체는 CCR3 리간드(ligand)를 표적으로 한다는 점에서 기존의 치료제와 다르다. 일반적으로 수용체(receptor)의 리간드 결합 도메인(ligand binding domain)을 이용하여 리간드를 억제하는 방법의 약점은 항체의 수용체 결합 보다 약하다는 것이다. CHO cell에서 발현된 수용체의 리간드 결합 도메인은 충분한 황산화가 일어났는지 효과를 알기가 어렵다. 또한 화학합성으로 만든 황산화 펩타이드는 효율이 떨어져 대량생산이 불가능하다. 반면 본 발명의 박테리아 시스템에서는 표적 타이로신(tyrosine)의 황산화를 표적으로 해서 생산한다. 그러므로 이렇게 생산된 황산화 CCR3 peptide trap의 결합 친화도(binding affinity)는 리간드에 대해 강력하다는 것을 확인하였다.

[0028] 본 발명의 약학 조성물은 상기 황산화된 케모카인 수용체 3의 세포 외 도메인 1 변이체 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 약품 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 약학적 조성물은 첨가제로서 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 상기 약학 조성물은 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 통상적으로는 국소 투여 방식이 바람직하다. 또한, 상기 약학적 조성물 중 유효성분의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중 등에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0030] 상기 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

[0031] 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때, 제형은 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엘렉시르제, 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 경고제, 로션제, 연고제 등의 형태일 수 있다.

[0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0033] <실시예 1> mCCR3의 세포 외 도메인 1의 야생형(wild) 및 변이체 제조

1. 프라이머 합성

mCCR3의 세포 외 도메인 1 야생형(서열번호 1: MAFNTDEIKT VVESFETTPY EYEWAPPCEK VRIKELGS) 및 상기 아미노산 서열 중에 존재하는 두 개의 타이로신기를 황산화시킨 변이체를 11개의 프라이머로 합성하였다. 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

명칭	염기서열
1.1F	AAA GGA TCC ATG GCA TTC AAC ACA GAT GAA ATC AAG
1.2F	ACT GTG GTT GAA AGC TTT GAG ACC ACA CCG TAT GAA
1.3F	TAT GAG TGG GCA CCA CCG TGT GAA AAA GTC CGT ATC
1.4F	AAA GAG CTG GGC TCA CTC GAG TTT TTT TTT TTT
1.1R	AAA CTC GAG TGA GCC CAG CTC TTT GAT ACG GAC TTT
1.2R	TTC ACA CGG TGG TGC CCA CTC ATA TTC ATA CGG TGT
1.3R	GGT CTC AAA GCT TTC AAC CAC AGT CTT GAT TTC ATC
1.4R	TGT GTT GAA TGC CAT GGA TCC TTT TTT TTT TTT
2.2F	ACT GTG GTT GAA AGC TTT GAG ACC ACA CCG TAG GAA
2.3F	TAG GAG TGG GCA CCA CCG TGT GAA AAA GTC CGT ATC
2.2R	TTC ACA CGG TGG TGC CCA CTC CTA TTC CTA CGG TGT

2. mCCR3의 세포 외 도메인 1의 야생형(wild) 및 변이체 제조

mCCR3의 세포 외 도메인 1의 야생형(wild) 및 이의 변이체를 제조하기 위하여 1차적으로 오버래핑 중합효소연쇄반응(overlapping polymerase chain reaction)을 수행하였다. mCCR3의 세포 외 도메인 1의 야생형(wild)을 제조하기 위해서는 1.1F, 1.1R, 1.2F, 1.2R, 1.3F, 1.3R, 1.4F, 1.4R 프라이머 세트를 사용하였다. mCCR3의 세포 외 도메인 1의 변이체를 제조하기 위해서는 1.1F, 1.1R, 2.2F, 2.2R, 2.3F, 1.3R, 1.4F, 1.4R 프라이머 세트를 사용하였다. 각각의 프라이머를 10pmole의 농도로 혼합하여 준비하고, 혼합된 프라이머 4μl에 dNTP 5μl, 10X Taq buffer 5μl, Ex Taq 0.5μl, 3차 증류수 35.5μl를 혼합하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 중합효소연쇄반응은 1차 DNA 변성 단계(94℃, 5분) 후, 94℃에서 30초(DNA 변성 단계), 52℃에서 30초(DNA 어닐링 단계), 및 72℃에서 30초(DNA 연장)를 55회 반복하고 72℃에서 5분 동안 반응시켜 수행하였다.

오버래핑 중합효소연쇄반응에 의하여 증폭된 DNA를 주형(template)으로 사용하여 2차 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 2차 중합효소연쇄반응은 증폭된 DNA 1.25μl, 1.1F 프라이머 10pmol 0.5μl, 1.1R 프라이머 10pmol 0.5μl, dNTP 5μl, 5X band 10μl, 10X taq buffer 5μl, Ex Taq 0.5μl, 및 3차 증류수 27.25μl를 혼합하고, 1차 DNA 변성 단계(94℃, 5분) 후, 94℃에서 30초(DNA 변성 단계), 50℃에서 30초(DNA 어닐링 단계), 및 72℃에서 30초(DNA 연장)를 23회 반복하고 72℃에서 5분 동안 반응시켜 수행하였다.

증폭된 DNA는 1.5% 아가로스겔 전기영동(agarosegel electrophoresis)을 이용하여 DNA 크기를 확인하였다. 그리고 DNA 서열을 확인하기 위하여 겔 추출(gel extraction)한 후 pGEM T easy vector에 삽입하고 대장균 DH5a에 형질전환시킨 후, 증폭된 벡터를 추출하여 전기영동을 이용하여 증폭된 DNA가 삽입되었는지 크기를 확인하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, 벡터 안에 증폭된 DNA가 정상적으로 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

증폭된 DNA가 삽입된 것이 확인된 벡터를 이용하여 염기서열 분석(DNA sequencing)을 수행하였다. 염기서열 분석 결과, 각각의 타이로신 위치의 TAT 서열이 TAG 서열로 변환된 변이체가 정상적으로 제조되었다는 것을 확인하였다.

<실시예 2> mCCR3의 야생형(wild) 제조방법

1. 단백질 발현용 균주 제작

CCR3 전체 유전자 벡터를 구입하여 CCR3 세포 외 도메인 1에 해당하는 펩타이드 서열을 확인한 후, 이 펩타이드 서열을 코딩하는 DNA를 식별하여 프라이머를 제작하고 (TRENDS in Immunology Vol.22 No.6 June 2001), CCR3 전체길이 유전자를 주형으로 하여 Pfu DNA polymerase를 이용하여 PCR를 수행하였다. 1.5% 아가로스겔 전기영동(agarose electrophoresis)을 통해 PCR 산물의 크기를 확인하고, 겔 추출(gel extraction)한 후 pGEM T easy

vector에 넣고 DH5a에 형질전환하였다. 그 다음 화이트 콜로니를 선택하고 플라스미드를 준비하여 DNA 서열을 확인하고, 확인된 CCR3 세포의 도메인을 GST-His tag를 포함한 발현벡터(pET41a)에 삽입하여 확인 후 최종적으로 BL21에 형질전환하였다.

[0046] **2. mCCR3의 세포 외 도메인 1 발현 및 분리**

[0047] 500ml LB에 형질전환된 셀을 키워 OD 값이 0.6에 도달했을 때 0.1mM IPTG를 최종 농도로 맞추어 IPTG를 넣고 37℃ 진탕배양기(shaking incubator)에서 5시간 동안 키운 후 10000g-5분씩 원심분리를 실시하였다. 세포 재서스펜션 버퍼(cell resuspension buffer, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 0.1% Triton X-100)의 적정량(4ml buffer per 1g cell)을 세포에 넣고 재서스펜션을 한 다음, 소니케이션(1ml버퍼 당 30초 깨고 2분 쉬고 2회 실시)을 실시하였다. 그 다음, 14000g-20분 동안 원심분리를 실시하고, 상층액과 펠렛을 분리하고 상층액을 0.45μm 필터에 여과하였다.

[0048] His Bind kit(novagen, 미국)를 이용하여 설명 내용에 따라 정제를 실시하였다. bradford test로 500μl씩 받은 샘플의 대략적인 농도를 체크하고, 가장 색상이 많이 변한 부분을 선택하여 투석을 시행하였다. 그 다음, 투석한 샘플을 4℃, 14000rpm-10분을 돌린 후 상층액을 빼낸 다음, 200μl씩 분주하고 정량을 시행하였다. 10% SDS-PAGE에 샘플을 10μl씩 걸어 전기영동 실행하고, His-프로브 안티바디를 이용하여 웨스턴 블롯을 시행하여 예상된 단백질의 크기를 도 2에서 확인하였다.

[0049] **<실시예 3> mCCR3의 세포 외 도메인 1 변이체의 황산화(sulfation)**

[0050] **1. 단백질 발현용 균주 제작**

[0051] 실시예 1의 방법으로 제조된 mCCR3의 세포 외 도메인 1의 변이체 DNA를 GST-His tag를 포함한 발현벡터(pET41a)에 각각 삽입하고, 전기영동을 통하여 크기를 확인하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다. 제조된 벡터는 최종적으로 대장균 BL21에 형질전환시켰다.

[0052] 도 2에 나타난 바와 같이, 제조된 mCCR3의 세포 외 도메인 1의 변이체 DNA가 pET41a 벡터에 정상적으로 삽입된 것을 확인하였다.

[0053] 그리고 타이로신기를 황산화시키기 위하여 각각의 변이체 DNA가 삽입된 pET41a 벡터를 각각 대장균 BL21에 형질전환시키고, pSUPAR6-L3-3SY 벡터를 형질전환된 대장균 BL21에 각각 추가 형질전환(co-transformation)시켰다. pSUPAR6-L3-3SY 벡터는 스크립스(Scripps) 연구소에서 분양받아 사용하였다.

[0054] **2. 황산화된 mCCR3의 세포 외 도메인 1 발현 및 분리**

[0055] 형질전환된 대장균은 5mL의 2YT 액체배지에 접종하여 37℃ 진탕배양기(shaking incubator)에서 18시간 동안 진배양한 후, 10mM의 sulfotyrosine이 첨가되어 있는 YT 액체배지에 1%가 되도록 접종하고 37℃ 진탕배양기에서 본배양하였다. 그리고 OD값이 1.0에 도달했을 때 IPTG를 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하고, 다시 25℃에서 20시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리(13,000g, 1분)하여 상층액을 제거하고, 상층액을 제거한 세포는 리서스펜션 버퍼(cell resuspension buffer, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 0.1% Triton X-100) 1mL을 첨가하여 잘 혼합하였다. 그리고 초음파 처리(sonication, 1ml 버퍼 당 30초 깨고 2분 쉬고 2회 실시)하여 세포를 깨고, 원심분리(14,000g, 20분)하여 단백질이 포함된 상층액만 회수하였다. His column을 이용하여 회수한 상층액으로부터 단백질을 분리하였다.

[0056] 분리된 단백질은 정량 후, 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동하여 확인하였다. 대조군으로는 황산화가 되지 않은 mCCR3를 이용하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0057] 도 3에 나타난 바와 같이, mCCR3의 세포 외 도메인 1 변이체는 정상적으로 황산화된 것을 확인하였다.

[0058] **<실시예 4> 습성 황반변성 모델에서 S-CCR3 펩타이드의 효능 분석**

[0059] 상기 실시예 3을 통하여, 합성한 S-CCR3의 황반변성에 대한 치료효과를 확인하기 위하여, 황반변성 마우스 모델에서 S-CCR3의 안구내 주입 후 혈관신생의 정도를 분석하였다.

[0060] 우선, 황반변성 마우스 모델은 C57 블랙 마우스의 한쪽 안구에 100um spot size/200mW intensity/0.1 s 조건의 레이저를 Bruch's membrane의 7-8 부위에 조사하여 제작하였다. 그 다음, 상기 레이저를 조사한 후 5일째에, 안구에 안내주사요법(intravitreal injection)을 통하여 4ug/ml 농도의 S-CCR3 용액 1ul를 주사하였다. 대조군으로 같은 농도의 GST와 CCR3 펩타이드를 주사하였다. GST, CCR3, S-CCR3 주사 후 5일째에 안구들을 적출하여 신

생혈관의 분포를 분석하였다. 이를 위해 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 12시간 동안 고정된 후 PBS로 세척하고, 각막, 수정체, 신경망막을 제거한 후 망막색소상피, 맥락막, 공막이 포함된 안구조직을 편평하게 펼쳐 CD31와 베타-카테닌(beta-catenin)에 대한 항체를 12시간 동안 4℃에서 반응하였다. CD31은 혈관내피세포 마커로써 신생혈관 분포를 분석하기 위해, 베타-카테닌(beta-catenin)은 망막색소상피세포의 위치와 손상 후 증식에 대한 활성 정도를 분석하기 위해 사용하였다. 반응 후, 각 형광물질이 부착된 2차 항체를 1시간 동안 실온에서 반응시키고, PBS로 세척하고 mount solution와 커버글라스로 염색조직을 덮고 공초점 형광현미경을 사용하여 관찰하였다.

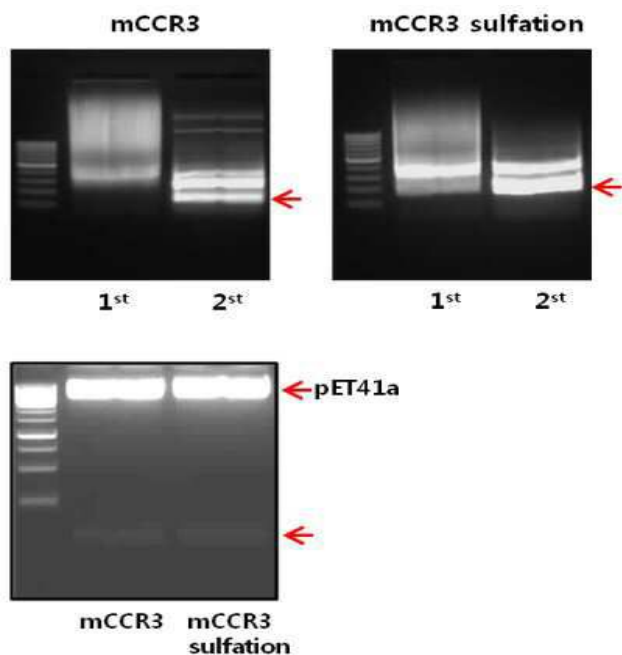
[0061] 그 결과, 도 4에서 보여지는 바와 같이 베타-카테닌(beta-catenin)의 발현 (Red)은, GST와 CCR3를 주사한 안구의 망막색소상피세포에서는 세포질과 핵에서 (화살표), 그리고 S-CCR3를 주사한 안구의 망막색소상피세포에서는 세포막에서(화살표) 주로 나타났다. 망막색소상피세포에서 베타-카테닌(beta-catenin)의 발현 위치에 따라 정상 성체 세포에서는 세포막, 레이저 손상 후 이동이나 증식이 일어나는 세포에서는 세포질과 핵에 위치하는 것으로 알려져 있다. 따라서 레이저에 의해 손상된 부위에서 망막색소상피세포는 GST, CCR3를 처리한 안구 보다 S-CCR3를 처리한 안구에서 정상적인 세포들이 많으며, 이는 손상된 부위에서 망막색소상피조직 회복이 효과적으로 일어난 것을 의미한다.

[0062] 특히, 혈관내피세포 마커인 CD31의 발현(green, yellow)은 S-CCR3를 처리한 안구의 망막색소상피조직에서 GST와 CCR3를 처리한 그것들과 비교시 현저히 감소하였다. 따라서 S-CCR3는 망막색소상피조직으로의 혈관침투를 억제하거나, 또는 신생된 혈관 감소에 효과가 있는 것으로 보여진다.

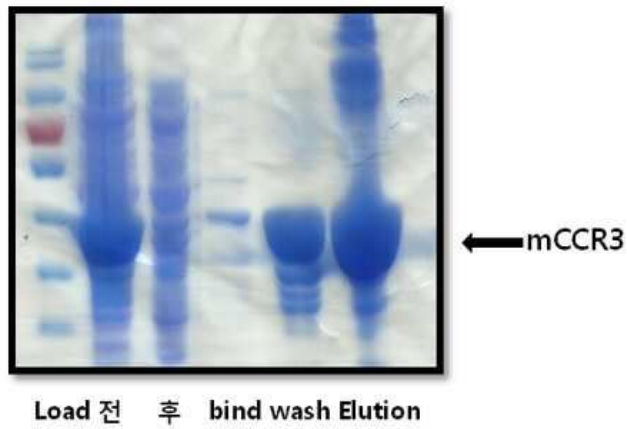
[0063] 종합적으로 S-CCR3는 신생혈관에 의해 망막색소상피 퇴화가 일어나는 황반변성 병리현상을 억제하는 효과, 즉 망막색소상피세포의 수복과 신생혈관의 억제에 대한 효과가 있는 것으로 나타났다.

도면

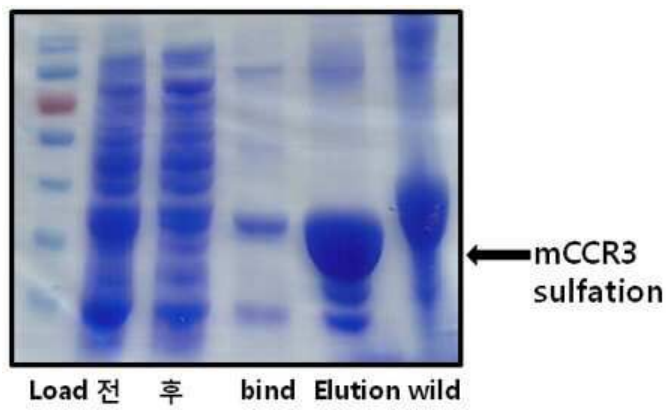
도면1



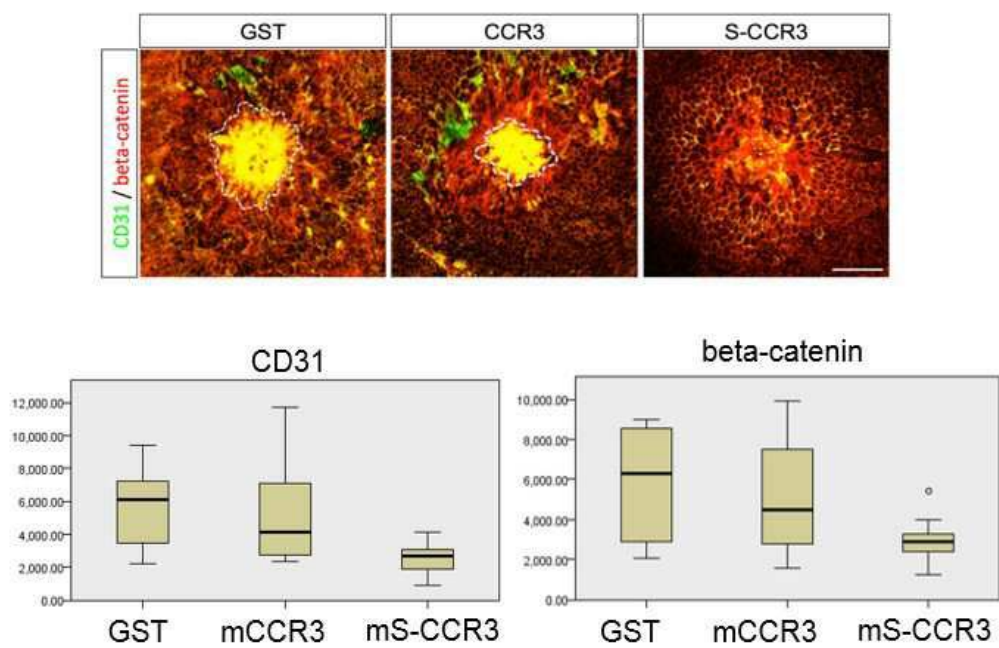
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> KONYANG UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION GROUP
- <120> Sulfated extracellular N-terminal domain variants of chemokine receptor 3 and composition for preventing or treating aged-related macular degeneration comprising the same
- <130> ADP-2016-0459
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 38
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 1

Met Ala Phe Asn Thr Asp Glu Ile Lys Thr Val Val Glu Ser Phe Glu

1 5 10 15

Thr Thr Pro Tyr Glu Tyr Glu Trp Ala Pro Pro Cys Glu Lys Val Arg

20 25 30

Ile Lys Glu Leu Gly Ser

35