

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0141873
(43) 공개일자 2024년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/45 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)

A61K 47/64 (2017.01) A61P 29/00 (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/45 (2013.01)

A23L 33/17 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0035637

(22) 출원일자 2023년03월20일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

최수영

강원도 춘천시 우석로101번길 86, 108동 1002호
(석사동, 석사대우아파트)

음원식

강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 11
2동 802호 (후평동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 세포투과성 GSTpi 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물

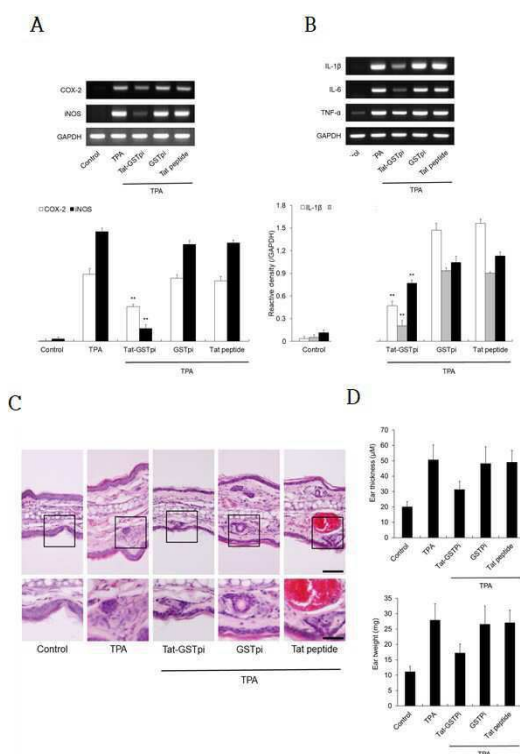
(57) 요약

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

해결수단: 본 발명은 세포투과성 GSTpi (Glutathione-s-transferase pi) 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 GSTpi 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시키고,

(뒷면에 계속)

대표도 - 도6



활성산소종 수준을 감소시켜 세포보호 작용을 하였다. LPS-유도된 COX2와 iNOS 단백질 발현 수준을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다. 또한, Tat-GSTpi 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였다. 뿐만 아니라, Tat-GSTpi 융합단백질은 피부 염증에서 초기에 일어나는 단핵세포 (monocyte)와 같은 염증세포의 침윤을 현저히 저해하였고, TPA로 유도되는 동물 염증모델에서 COX-2 발현 수준과 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성을 현저히 감소시켰고, TPA로 유도되는 피부염증 동물모델에서 TPA로 유도되는 p38, ERK 및 JNK 인산화와 p65와 I κ B α 인산화를 저해하였다. 이는 투과된 Tat-GSTpi 융합단백질이 세포자기사멸 경로를 저해함으로써 과산화수소로 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호효과가 있으며, 염증 치료효과가 있음을 말해준다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/64 (2017.08)

A61P 29/00 (2023.02)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/324 (2013.01)

(72) 발명자

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

윤기수

강원도 춘천시 지석로 64, 602동 1206호 (퇴계(6)주공아파트)

박정환

인천광역시 계양구 황어로 115번길 12, 7동 905호 (신동아 아파트)

여현지

서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호

여은지

서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 1301호

권현정

강원도 강릉시 경강로2015번안길 7

최연주

충청북도 옥천군 청성면 궁촌길 20-16

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (그린빌, 다가동)

김대원

강원도 강릉시

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1345362264

과제번호

NRF-2019R1A6A1A11036849

부처명

교육부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

대학중점연구소 지원사업

연구과제명

단백질 침투기술 기반 퇴행성 뇌질환 치료용 융합단백질 실용화 연구

기 여 율

1/1

과제수행기관명

한림대학교

연구기간

2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

9 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 GSTpi (Glutathione-s-transferase pi) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 적어도 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 GSTpi 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(라이신,아르기닌) 중 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 GSTpi 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 GSTpi 융합단백질은 그 아미노산 서열이 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12임을 특징으로 하는 GSTpi 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 4

GSTpi (Glutathione-s-transferase pi) 코딩 cDNA의 5' 말단 및 3' 말단 중 적어도 일측 말단에 상기 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합되어 상기 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 GSTpi 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 재조합 폴리뉴클레오타이드는 그 염기 서열이 서열번호 1, 3, 5, 7, 9 또는 11임을 특징으로 하는, GSTpi 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 6

9 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 GSTpi (Glutathione-s-transferase pi)의 N-말단 및 C-말단 중 적어도 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 GSTpi 융합단백질을 발현시키는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 GSTpi 융합단백질 발현백터를 포함하는 항염증 약학 조성물.

청구항 7

9 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 GSTpi (Glutathione-s-transferase pi) 단백질의 N-말단 및 C-말단 중 적어도 일측 말단에 공유결합되어 세

포침투 효율이 향상된 GSTpi 융합단백질을 포함하는 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

GSTpi (Glutathione-s-transferase pi) 코딩 cDNA의 5' 말단 및 3' 말단 중 적어도 일측 말단에 상기 수송 도메인 코딩 올리고뉴클레오타이드 서열이 결합된, GSTpi 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

9 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 GSTpi (Glutathione-s-transferase pi)의 N-말단 및 C-말단 중 적어도 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 GSTpi 융합단백질을 발현시키는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 GSTpi 융합단백질 발현벡터를 포함하는 염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포투과성 GSTpi 융합단백질을 포함하는 항염증 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 산화적 스트레스는 다양한 질환을 유발하는 주요 원인 중 하나로 여겨지고 있으며, 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)을 생성하여 세포 내 단백질, 핵산 및 지방과 같은 생체 고분자에 손상과 관련되어 있다. 생체고분자들이 활성산소종에 일정하게 노출이 되면 최종적으로 세포사멸을 유도하게 되며, 특이적인 조직에서의 세포사멸은 결국 뇌허혈(ischemia), 관절염(inflammation), 염증반응(immune unjury)등 다양한 인간의 질병에 기여한다.

[0003] 염증은 감염에 의한 면역 체계를 포함한 생리적 반응이다. 염증반응이 유도되면 대식세포는 활성화되어 COX-2, iNOS 및 ROS뿐만 아니라 IL-6, IL-1 β , TNF- α 와 같은 사이토카인이 분비되어 다양한 염증반응 관련질환을 유발한다.

[0004] GSTpi (Glutathione S-transferase pi)는 세포 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있지만 산화적 스트레스에 의해 유발된 염증반응에 대한 GSTpi의 보호 기작은 여전히 명확하지 않다.

[0005] 단백질 전달기술은 PTD (Protein Transduction Domain) 또는 CPP(Cell penetrating Peptide)라 불리며 대개 5~30개의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 단백질 혹은 유전자 등의 고분자와 융합하여 포유류 세포 또는 조직 안으로 손쉽게 전달할 수 있는 새로운 개념의 전달 시스템이다. 비록 PTD 융합단백질의 구체적인 메커니즘은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만, 치료용 단백질을 인비트로와 인비보로 전달하는데 많이 사용되어 왔으며 매우 다양한 PTDs가 알려져 있다.

[0006] 본 발명에서는 세포 침투 도메인인 PTD (protein transduction domain) 기술을 이용하여 GSTpi 융합단백질을 만들어 LPS (lipopolysaccharide)를 처리한 Raw264.7 세포와 TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate)로 유도된 마우스의 피부에서의 세포 사멸로부터 세포를 보호할 수 있는지를 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 염증 질환에 유용한 치료용 약학 조성물 및 염증 예방 또는 개선에 유용한 식품 조성물을 제공하려는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명자들은 과산화수소에 의한 산화 스트레스로 유도된 세포사멸에서 형질도입된 Tat-GSTpi 융합단백질의 기능을 조사하였다. GSTpi과 Tat 펩타이드를 융합하여 Tat-GSTpi 융합단백질을 제조하였고, Raw 264.7 세포 내에 효과적으로 형질도입되는 것을 확인하였다. 또한, Raw 264.7 세포에 산화 스트레스를 유도하였으며 LPS로 유도된 세포사멸에서 Tat-GSTpi 융합단백질의 세포보호 효과를 살펴보았다. 산화 스트레스가 유도된 Raw 264.7 세포에서 항 세포사멸 단백질의 발현을 확인한 결과, Tat-GSTpi 융합단백질의 농도에 비례하여 세포사멸이 억제되는 것을 알 수 있었다. 따라서, Tat-GSTpi 융합단백질은 Raw 264.7 세포 내로 잘 투과하고, 산화 스트레스로 유도된 활성산소종의 생성과 세포사멸을 억제하여 세포를 보호함을 알 수 있었다. 이것은 Raw 264.7 세포에 형질도입된 Tat-GSTpi 융합단백질이 세포사멸을 방지하고, 산화 스트레스로 인한 Raw 264.7 세포 염증질환의 치료제로 이용 가능함을 말해준다.
- [0012] 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명하면, 본 발명의 일 실시예에서 본 발명자들은 먼저 GSTpi 융합단백질을 과대 발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 GSTpi 융합단백질 발현 벡터를 개발하였다. 이 발현 벡터는 인간 GSTpi 단백질, 7~21개 아미노산으로 이루어진 단백질 수송 도메인 하나 이상, 그리고 N 말단부분에 6개의 히스티딘 잔기를 발현시킬 수 있는 cDNA를 포함하고 있다.
- [0013] 이 발현벡터를 이용하여 GSTpi 융합단백질을 대장균에서 과대 발현시켰으며 Ni-친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 배양된 세포에 GSTpi 융합단백질이 시간 및 농도 의존적으로 세포에 운반되는 것을 웨스턴블랏으로 확인하였다. 세포 내로 투과된 GSTpi 융합단백질은 세포 내에서 최대 12시간 동안 지속적으로 유지되었으며, 산화 스트레스에 의한 세포사멸을 억제하였다.
- [0014] 이러한 결과는 GSTpi 융합단백질이 세포 내로 잘 투과되고, 세포 내에서 GSTpi 단백질의 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 이러한 GSTpi 융합단백질은 활성산소종과 관련된 증세 또는 염증질환에 응용할 가능성을 제시해 준다.
- [0016] 세포 투과성 GSTpi 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), 활착제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌글리콜)를 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 위한 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 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.
- [0018] 나아가, 본 발명은 상기 GSTpi 융합단백질, 이 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 염증 치료제 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한 GSTpi 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 GSTpi 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 아니고, 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 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 GSTpi 융합단백질을 코딩하는 염증 치료용 제조합 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 GSTpi 융합단백질 발현백터를 포함하는 염증 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0022] 구체적으로, 본 발명은 GSTpi 융합단백질, GSTpi 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드, GSTpi 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 백터, 이 융합단백질 또는 이 올리고뉴클레오타이드 또는 이 백터를 포함하는 염증 치료 또는 예방 목적의 약학 조성물 및 이 융합단백질 또는 이 올리고뉴클레오타이드 또는 이 백터를 포함하는 염증 예방 또는 개선 용도의 건강기능성 식품조성물에 관한 것이다.

[0023] 상기 GSTpi 융합단백질을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드는 구체적으로 서열번호 1, 3, 5, 7, 9 또는 11을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명의 상기 세포 투과성 GSTpi 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 GSTpi 융합단백질의 양은, 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.2 내지 10중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100ml를 기준으로 0.1 내지 30g, 바람직하게는 0.2 내지 5g의 비율로 가할 수 있다. 본 발명의 본 발명의 건강음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 GSTpi 융합단백질을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml 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 증진제(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 주스 및 과일 주스 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 초과 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0025] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0026] "GSTpi 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 GSTpi 단백질을 포함하며, 단백질 수송 도메인과 목표 단백질(즉, 본 발명에서는 GSTpi 단백질을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 구체적인 실시예로 HIV-Tat 단백질 수송 도메인을 이용하였으므로 "GSTpi 융합단백질"을 "Tat-GSTpi", "Tat-GSTpi 융합단백질" 등과 혼용하였다. 그러나, 본 발명의 범위가 "Tat-GSTpi 융합단백질"에 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0027] "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 GSTpi를 의미한다.

[0028] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.

[0029] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0030] 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 조

직을 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

[0031] 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.

[0032] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0033] 본 발명의 GSTpi 융합단백질은 7 내지 21개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 GSTpi의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 GSTpi 융합단백질을 말한다. 또한, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, Pep-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고 (라이신,아르기닌) 중의 1종 이상을 말한다.

[0034] 또한, 본 발명의 상기 GSTpi 융합단백질 아미노산 서열은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 또는 12를 포함한다. GSTpi 융합단백질 제조에서 제한부위 서열의 선택 등에 따라 다양한 서열의 융합단백질을 얻을 수 있으며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람에게 자명하다. 위 아미노산 서열은 예시적인 것일 뿐 GSTpi 융합단백질 아미노산 서열이 위에 나열된 서열로 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 GSTpi 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 염증 치료제 조성물을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 GSTpi 융합단백질을 유효성분으로 하며, 염증 예방 및 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명은 7~21개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상, 바람직하게는 4개 이상 25개 이하 포함하는 단백질 수송 도메인이 GSTpi 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성 (cell-transducing) GSTpi 융합단백질에 관한 것이다. 또한, GSTpi 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.

[0038] 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

[0040] 본 발명의 GSTpi 융합단백질은 투여량 및 처리시간 의존적으로 세포 내로 투과하였고, 투과된 GSTpi 융합단백질은 세포 내에서 12시간 동안 현저한 수준을 나타내었다.

[0041] 본 발명의 GSTpi 융합단백질은 LPS로 유도된 COX2와 iNOS 단백질 발현 수준을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다. 또한, GSTpi 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였다.

[0042] 또한, 본 발명의 GSTpi 융합단백질은 세포로 투과되어 LPS 또는 H₂O₂ 처리한 세포에서 활성산소종 수준을 감소시킴으로써 세포 보호효과를 나타내었다.

[0043] 뿐만 아니라, 본 발명의 GSTpi 융합단백질은 피부 염증에서 초기에 일어나는 단핵세포 (monocyte)와 같은 염증세포의 침윤을 현저히 저해하였고, TPA로 유도되는 동물 염증모델에서 COX2 발현 수준과 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성을 현저히 감소시켰고, TPA로 유도되는 피부염증 동물모델에서 p38, ERK 및 JNK 인산화와 p65와 I κ B α 인산화를 저해하였다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 Tat-GSTpi 융합단백질의 발현 및 정제를 설명한다. (A) pET15-b 벡터 및 발현된 Tat-GSTpi 단백질의 다이어그램에 기초한 Tat-GSTpi 융합단백질의 구조 개요도이다. (B) 정제된 Tat-GSTpi 융합단백질은 15% SDS-PAGE를 이용하여 정제하고 항 히스티딘 항체로 웨스턴블랏하였다.
- 도 2는 Raw264.7 세포로의 Tat-GSTpi 융합단백질의 투과를 나타낸다. (A) 세포는 60mm 배양 접시에서 배양하였다. Tat-GSTpi 융합단백질(0.5~3 μ M) 및 GSTpi 단백질(0.5~3 μ M)은 1시간 동안 배양 배지에 처리하고 (B) Tat-GSTpi 융합단백질(3 μ M) 및 GSTpi 단백질(3 μ M)은 15~60분 동안 배양 배지에 처리하여 웨스턴블랏으로 분석하였다. (C) Tat-GSTpi 융합단백질 및 GSTpi 단백질을 1~24시간 동안 배양 배지에 처리하여 웨스턴블랏으로 분석하여 Tat-GSTpi 융합단백질의 안정성을 확인하였다. (D) Tat-GSTpi 융합단백질의 세포 내 분포를 공초점 형광 현미경으로 가시화하였다. 크기 막대 = 20 μ m.
- 도 3은 LPS로 유도된 활성산소종 생성 및 DNA 단편화에 대한 Tat-GSTpi 융합단백질의 효과를 나타낸다. 세포를 1시간 동안 Tat-GSTpi 융합단백질(3 μ M) 및 GSTpi 단백질(3 μ M)로 처리 한 후 3시간 또는 6시간 동안 1 μ g/ml의 LPS로 처리 하였다. 이어서, DCF-DA 염색 및 TUNEL 염색에 의해 (A) 세포 내 활성산소종 수준 및 (B) DNA 단편화를 측정 하였다. 형광 강도는 ELISA 플레이트 판독기로 측정하였다. 크기 막대 = 50 μ m. 세포에 대한 위상차 현미경 (x200 배율)에 의해 TUNEL- 양성 세포를 계수 하였다.
- 도 4는 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도된 MAPKs 활성화에 대한 Tat-GSTpi 융합단백질의 효과를 나타낸다. 세포를 Tat-GSTpi 융합단백질(3 μ M) 또는 GSTpi 단백질로 1시간 동안 처리 한 후 LPS (1 μ g/ml)에 노출시켰다. MAPK 활성화는 웨스턴블랏으로 분석하였다. 밴드 강도는 농도계에 의해 측정되었다.
- 도 5는 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도된 아포토시스에 대한 Tat-GSTpi 융합단백질의 효과를 나타낸다. 세포를 Tat-GSTpi 융합단백질 (3 μ M) 또는 GSTpi 단백질로 1시간 동안 처리 한 후 LPS (3 μ g/ml)로 처리 하였다. 웨스턴블랏 으로 (A) Bcl-2, Bax, (B) 카스파제-9 발현 수준을 확인 하였다. 밴드 강도는 농도계에 의해 측정되었다.
- 도 6은 (A) 및 (B) 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 Tat-GSTpi 융합단백질을 처리하고 사이토카인, TNF- α 를 RT-PCR을 통해 확인한 결과이다. (C) 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 Tat-GSTpi 융합단백질을 처리하고 H&E 염색을 수행한 결과이다. (D) 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 Tat-GSTpi 융합단백질을 처리하고 귀 두께와 무게를 측정한 결과이다. 크기 막대 = 50 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명 범위가 실시예의 기재에 의해 제한되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 본 발명의 실시예에서는 GSTpi 융합단백질을 구성하는 단백질 수송 도메인으로 HIV Tat 펩타이드를 이용하였으나, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 PEP-1 펩타이드가 N-말단에 결합된 GSTpi 융합단백질을 응용하여, PEP-1 펩타이드, 올리고아르기닌, 올리고라이신 및 올리고(아르기닌+라이신) 등의 다양한 단백질 수송 도메인을 GSTpi의 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.

[0048] 재료

- [0049] Ni²⁺-니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen에서 구매하였고, PD-10 컬럼 크로마토그래피(Amersham, Braunschweig, 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.

[0051] Tat-GSTpi 융합단백질의 발현 및 정제

[0052] GSTpi 단백질 및 Tat-GSTpi 융합단백질의 발현 벡터를 구축하였다. 인간의 유전자 중의 하나인 GSTpi를 cDNA와 함께 2개의 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)으로 증폭시켰다. 센스 프라이머는 5'-CTCGAGGGCAACGCGCAG-3'으로 구성되어 있고, Xho1이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재한다. 그리고 안티센스 프라이머는 5'-GGATCCTCAGGAATCTTCGGACTC-3'으로 구성되어 있고, BamH1이라는 제한효소 작용부위가 5' 쪽에 존재한다. PCR을 통하여 얻은 결과물을 TA 벡터에 연결하고 Xho1과 BamH1을 이용하여 자른 후에 발현 벡터에 연결하여 Tat-GSTpi 융합단백질을 제조하였다. 이와 마찬가지로 대조군인 GSTpi 단백질을 Tat 랩타이드가 결합된 벡터를 이용하여 제조하였다. 제조된 Tat-GSTpi 플라스미드를 대장균인 BL21로 형질변환시킨 후 0.5mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)로 유도하여 18℃에서 하룻밤 배양하였다. 배양한 세포를 초음파로 분쇄하여 Tat-GSTpi 융합단백질을 얻기 위해 Ni^{2+} -니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우 컬럼을 이용하여 정제하였다. 단백질 농도는 브래드포드 방법으로 우혈청 알부민을 표준물질로 이용하여 결정하였다.

[0054] Raw 264.7 세포에 Tat-GSTpi 융합 단백질의 형질도입 및 과산화수소 처리

[0055] 계대 배양한 Raw 264.7 세포를 60mm 접시에 분주하여 37℃, 95% 습도, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Tat-GSTpi 융합단백질 및 GSTpi 단백질의 세포투과 능력을 확인하기 위하여 1시간 동안 단백질을 다양한 농도 (0.5~3 μM)로 처리하였다. 또한, 단백질 (3 μM)을 처리 시간을 달리하여 15~60분간 처리하였다. Raw 264.7 세포 내에 Tat-GSTpi 융합단백질이 얼마 동안 남아있는지 알아보기 위해 3 nM Tat-GSTpi 융합단백질을 처리하고, 특정 시간 (1~24시간)이 지난 후에 세포를 회수하였다.

[0056] 또한, Raw 264.7 세포에 1시간 동안 농도별(0.5~3 μM)로 Tat-GSTpi 융합단백질과 GSTpi 단백질을 처리한 후, 1 mM 과산화수소를 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBS로 헹구어내고 트립신-EDTA를 처리하여 분리하였다. 분리된 세포의 단백질을 추출하기 위해 RIPA 용균완충액 (ELPIS BIOTECH, Daejeon, Korea)을 넣고 침전물을 녹인 후, 원심분리 (4℃, 12,000 rpm, 10 min)하여 상등액을 취해 단백질을 정량하였다.

[0058] 웨스턴블랏 분석

[0059] 30~50 μg의 단백질을 5X 시료 완충액과 혼합하여 2분간 끓여 단백질 시료를 준비한 다음 15% 미니젤 (Hoefer Scientific, San Francisco, CA, USA) SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분자량에 따라 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 나이트로셀룰로스 막으로 전기이동하고, 막은 0.1% Tween 20을 함유하는 TBS 완충액에 녹인 5% 탈지분유로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 단백질의 발현을 측정하기 위해 1차 항체를 1:500으로 PBS에 희석하여 상온에서 3시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 세정하였다. 2차 항체로는 호스래디쉬 퍼옥시데이즈가 결합된 항-토끼 IgG 또는 항-마우스 IgG를 1:10,000으로 PBS에 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. TBS-T로 세척 후에 탐지 시약을 이용하여 각 단백질의 발현량을 확인하였다.

[0061] 공초점 형광 현미경 관찰

[0062] 24 웰 플레이트에 커버 글라스를 각각 넣고 그 위에 세포를 분주하여 2시간 동안 배양하였다. 0.1 nM Tat-GSTpi 융합단백질과 GSTpi 단백질을 2시간 동안 Raw 264.7 세포에 형질도입한 후, PBS로 3번 세척하였다. 각 웰에 4% 파라포름알데하이드를 넣고 5분 동안 세포를 고정한 후, PBS를 넣어 짧게 세 번 세척하였다. 3% BSA, 0.1% Triton X-100이 함유된 PBS (PBS-BT)로 실온에서 40분간 블로킹하고, PBS-BT로 3번 세척하였다. 1차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)는 1:2,000 비율로 희석하고, 4℃에서 12시간 동안 배양하였다. 2차 항체 (Alexa Fluor 488)는 1:10,000 비율로 희석하고 어둡게 하여 1시간 동안 반응시키고, PBS-BT로 5분 동안 3번 세척하였다. 웰에서 커버 글라스를 분리하여 모서리 부분의 물기를 제거하고 마운팅하였다. 공초점 형광 현미경으로 관찰하고 영상분석기를 이용하여 형광 발현을 확인하였다.

[0064] 동물모델 제조

[0065] ICR 마우스(수컷 8주령)를 23℃, 습도 60% 그리고 고정적으로 12시간의 빛/12시간 어둠 주기로 음식물과 물을 자유롭게 섭취할 수 있는 곳에서 사육하였다. 동물 관리를 포함한 모든 실험 절차는 한림의료센터기관 동물 관리 및 사용위원회에서 국립수의과학검역원의 실험동물 관리 및 사용에 대한 가이드를 따라 실험하였다.

[0067] **통계 분석**

[0068] 모든 데이터는 실험 결과의 평균값이며, 통계학적인 차이는 student' t-test 분석법을 이용하여 비교하였고, $p < 0.05$ 일때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

[0070] **결과 1: Tat-GSTpi 융합단백질의 정제 및 세포 투과**

[0071] 본 발명자들은 침투성 Tat-GSTpi 융합단백질을 제조하기 위해 단백질 수송 도메인 PTD (Protein Transduction Domain)의 일종인 Tat이 포함된 Tat-벡터와 GSTpi 유전자를 재조합하였다(도 1A). 대장균에서 과발현시켜 Ni^{2+} -나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였고, SDS-PAGE와 웨스턴블롯 분석법을 이용하여 Tat-GSTpi 융합단백질이 정제된 것을 확인하였다(도 1B).

[0073] **결과 2: Raw 264.7 세포로 Tat-GSTpi 융합단백질의 침투성 확인**

[0074] Tat-GSTpi 융합단백질의 시간 및 농도별로 Raw 264.7 세포 내 투과 정도를 측정하였다. 그 결과 시간 및 농도 의존적으로 세포 내 투과가 효과적으로 일어났으며, GSTpi 단백질은 투과가 일어나지 않았다(도 2A, 2B). 또한, 투과된 융합단백질은 세포 내 12시간 동안 안정되게 유지되었다(도 2C). 또한, 공촛점 현미경을 이용하여 DAPI로 세포핵을 염색하고, Tat-GSTpi 융합단백질을 녹색 형광으로 염색하여 효과적으로 세포 내로 투과되는 것을 확인하였다(도 2D).

[0076] **결과 3: LPS로 유도된 활성산소종 생성 및 DNA 단편화에 대한 Tat-GSTpi 융합단백질의 세포 보호효과**

[0077] LPS로 인하여 증가되는 활성산소종을 Tat-GSTpi 융합단백질이 효과적으로 억제하는지 확인하기 위해 세포 내에서 생성된 활성산소종과 2',7'-H₂DCFDA(dichlorofluorescein diacetate)가 세포 내에서 가수분해 되어 불투과성의 2',7'-H₂DCFDA(dichlorofluorescein diacetate)가 반응하여 산화되면서 2',7'-H₂DCFDA(dichlorofluorescein diacetate)를 형성해 녹색 형광을 나타내는 원리의 DCF-DA 염색법을 수행했다. LPS를 처리한 세포에서 녹색 형광은 LPS에 의해 강하게 발색된 반면, 투과된 Tat-GSTpi 융합단백질은 형광신호를 감소시켰다(도 3A).

[0078] 또한, 산화스트레스로 인해 발생하는 DNA 단편화에 대한 융합단백질의 보호효과는 DNA 단편화 부위에 특이적으로 붙는 형광 염료를 이용한 TUNEL 염색 방법으로 알아보았다. 앞선 실험과 동일한 상태에서 하였고, Tat-GSTpi 융합단백질의 DNA 단편화에 대해 보호효과가 있다는 결과를 확인하였다(도 3B).

[0080] **결과 4: Raw264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 신호경로에 대한 Tat-GSTpi 융합단백질의 보호효과**

[0081] LPS에 의해 염증반응이 일어나면 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여 세포신호전달경로인 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성화를 유도하며 활성화된 신호전달경로는 염증사이토카인(pro-inflammatory cytokines), NO와 같은 여러 가지 염증성매개 인자들을 발현시킨다. LPS를 처리하여 MAPK 활성을 나타내는 인산화가 활성을 했는데, Tat-GSTpi를 처리한 경우 인산화 활성이 감소되는 것을 확인하였다(도 4).

[0083] **결과 5: LPS로 유도된 항-아포토시스 세포 신호에 대한 Tat-GSTpi 융합단백질의 보호효과**

[0084] LPS로 유도된 활성산소종에 의해 미토콘드리아에서 세포사멸이 진행된다. 세포 사멸 시 진행되는 Bcl-2, Bax, Caspase-9의 발현 정도를 확인하였다. LPS를 처리하여 Bcl-2가 감소되고 Bax가 크게 증가했는데, Tat-GSTpi를 처리한 경우 Bcl-2는 아무것도 처리하지 않은 대조군과 유사하게 증가하였고, Bax는 현저히 감소된 것을 확인하

였다(도 5B).

[0085] 또한 Caspase-9 levels이 LPS를 처리하였을 때 감소하였는데 Tat-GSTpi를 처리한 경우에서 Caspase-3 levels이 증가한 것을 확인하였다(도 5C).

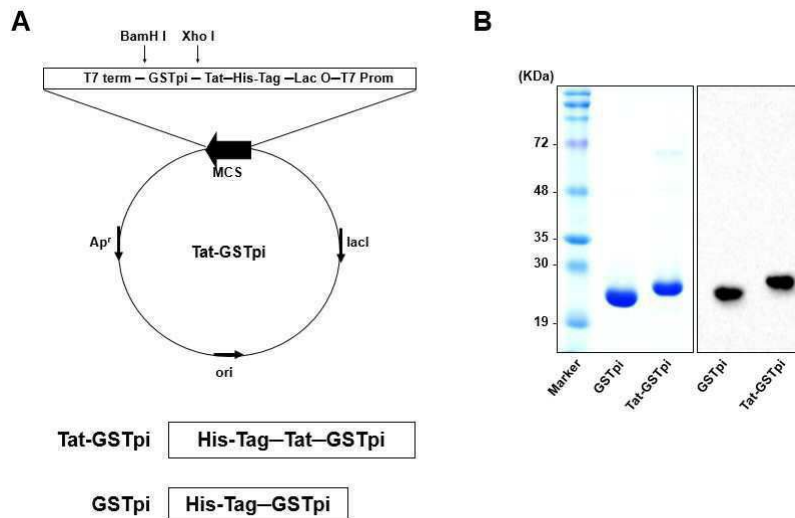
[0087] **결과 6: TPA로 유도된 귀 염증 동물모델에서의 Tat-GSTpi 융합단백질의 보호효과**

[0088] Tat-GSTpi 융합단백질이 피부 염증에 대하여 보호효과가 있는지를 알아보기 위해 TPA로 유도되는 마우스 귀 염증 모델을 이용하였다. TPA와 Tat-GSTpi 융합단백질을 처리한 후 마우스의 귀 두께와 무게를 측정하고 (도 6D) 면역조직화학적 분석을 수행하였다. 또한, Tat-GSTpi 융합단백질은 피부 염증에서 초기에 일어나는 단핵구와 같은 염증세포의 침투를 현저히 저해하였다. 그렇지만, 대조군 GSTpi 단백질은 이와 같은 효과를 나타내지 않았다 (도 6C).

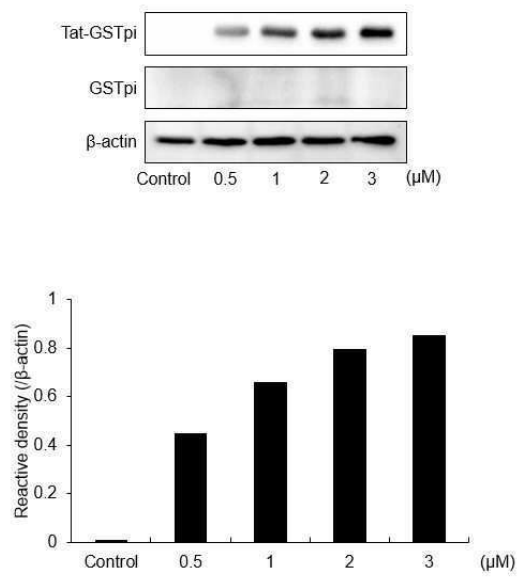
[0089] 또한, 귀 조직을 이용하여 사이토카인과 TNF- α 발현 정도를 확인하였다. TPA에 의해 사이토카인과 TNF- α 발현이 증가하였지만 Tat-GSTpi 융합단백질을 처리한 경우 발현이 감소된 것을 RT-PCR을 통해 확인하였다((도 6A, 6B).

도면

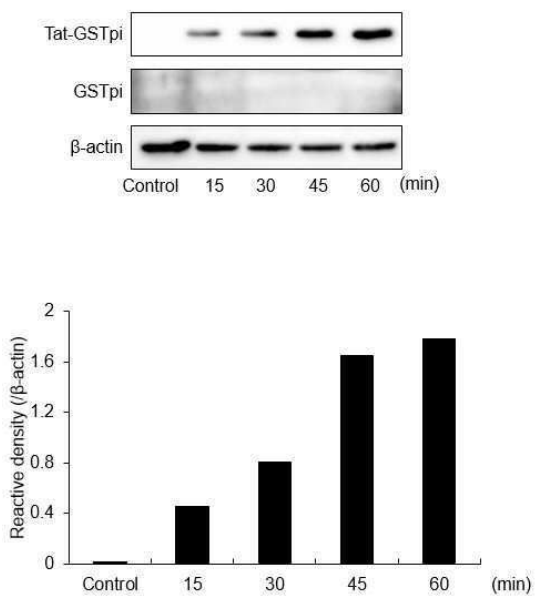
도면1



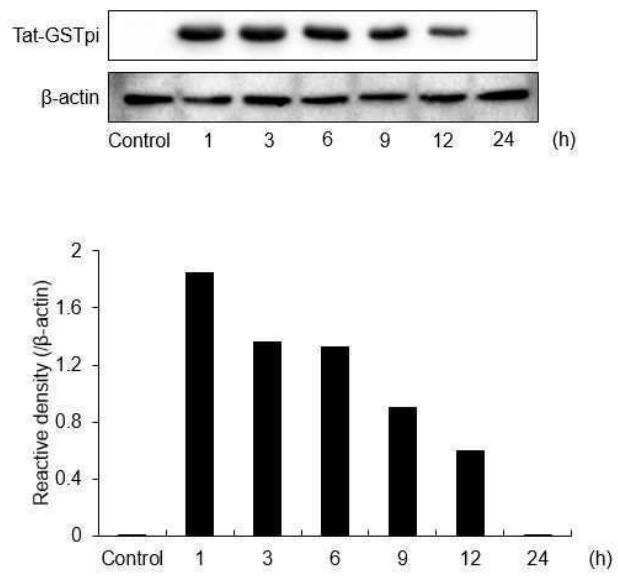
도면2a



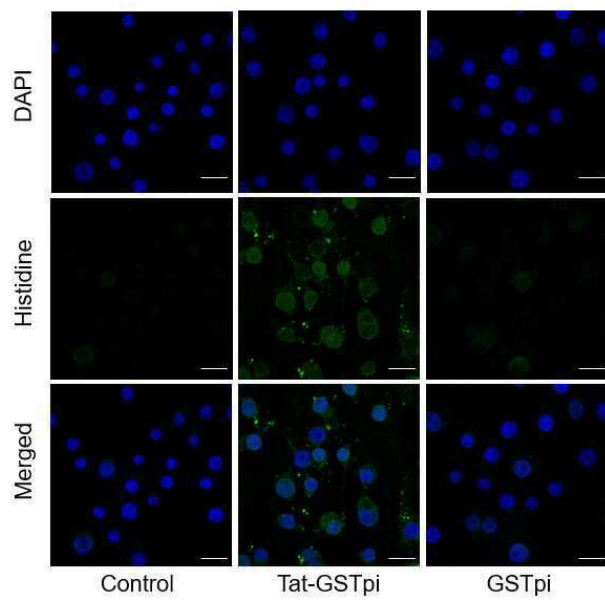
도면2b



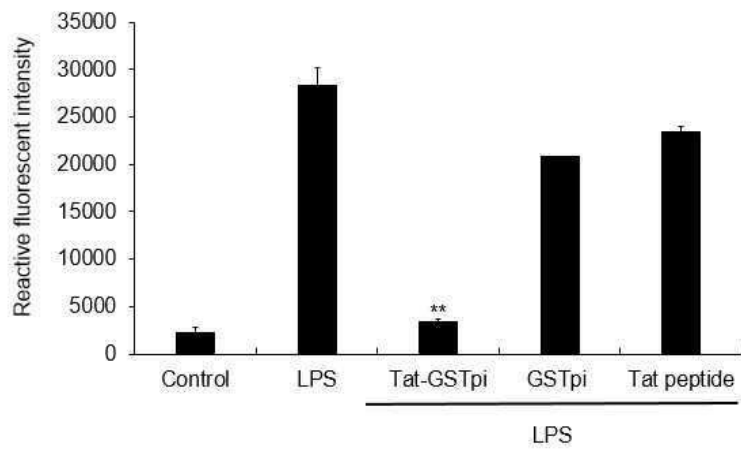
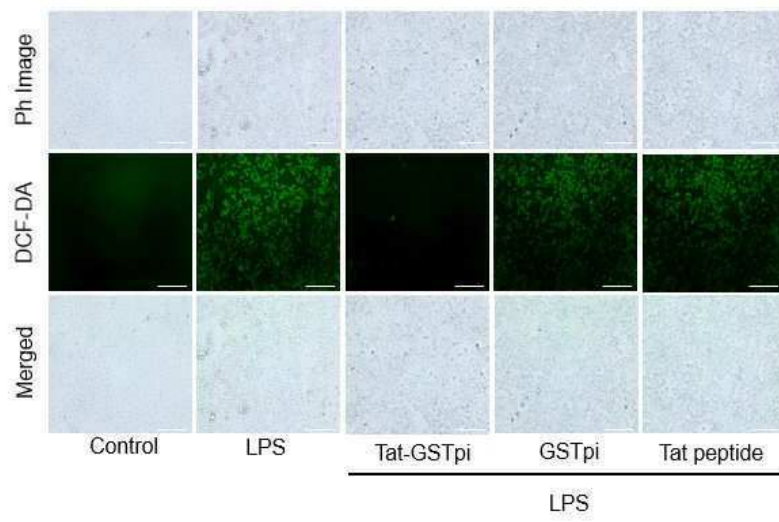
도면2c



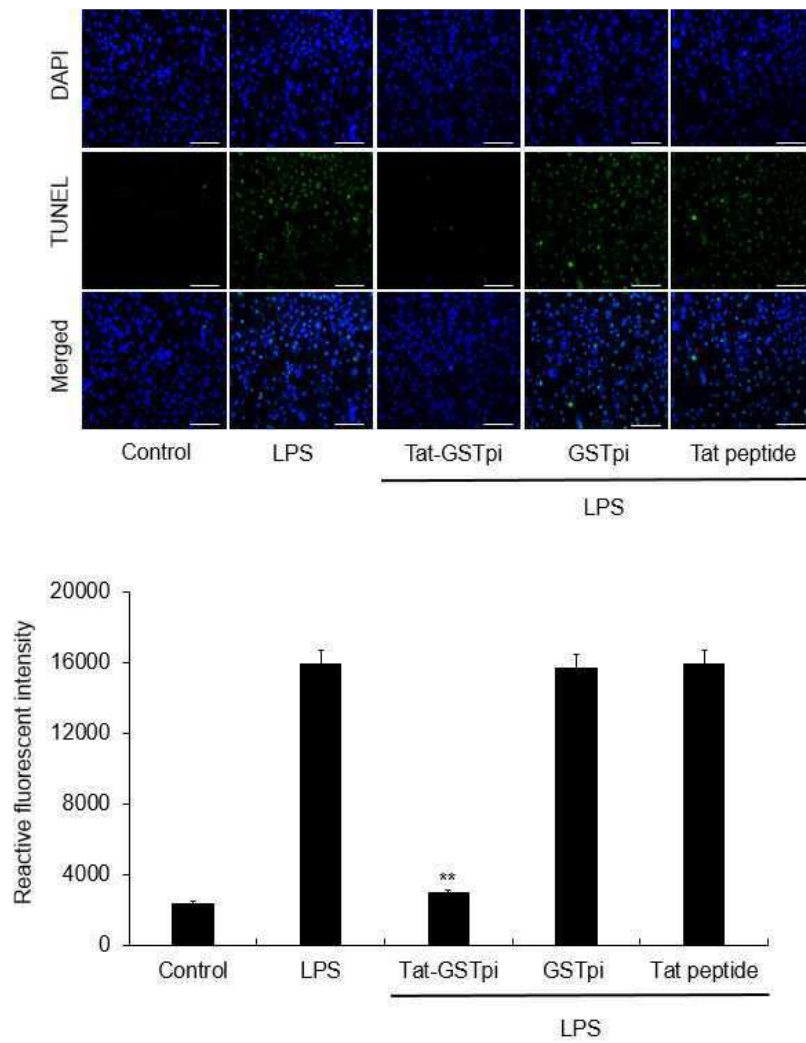
도면2d



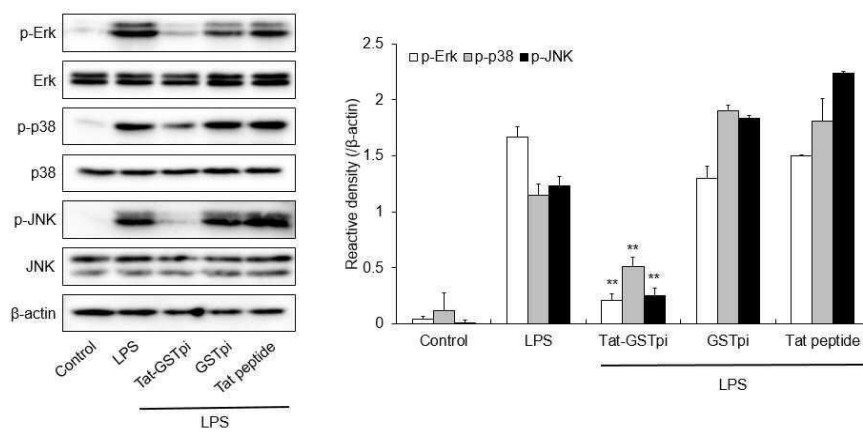
도면3a



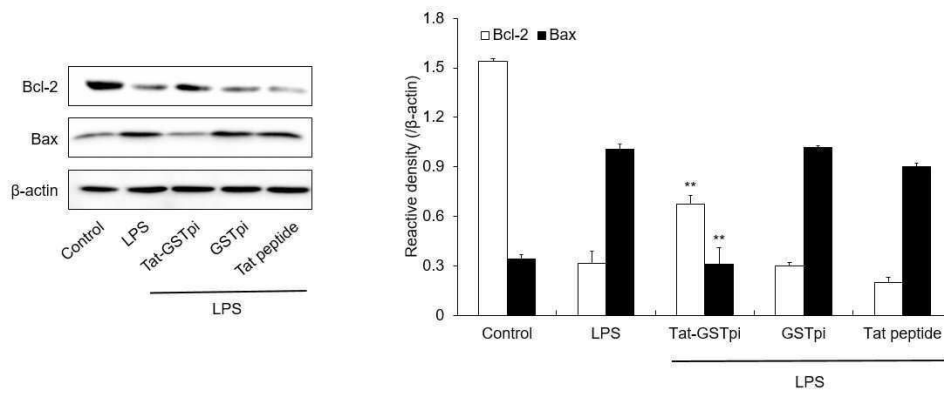
도면3b



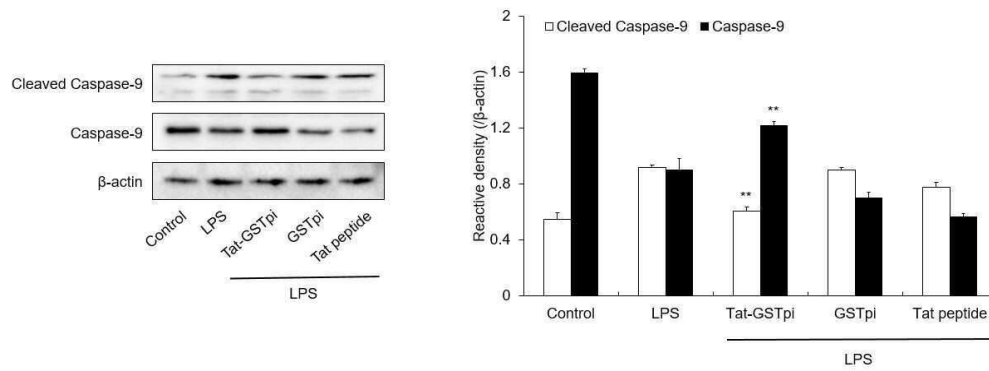
도면4



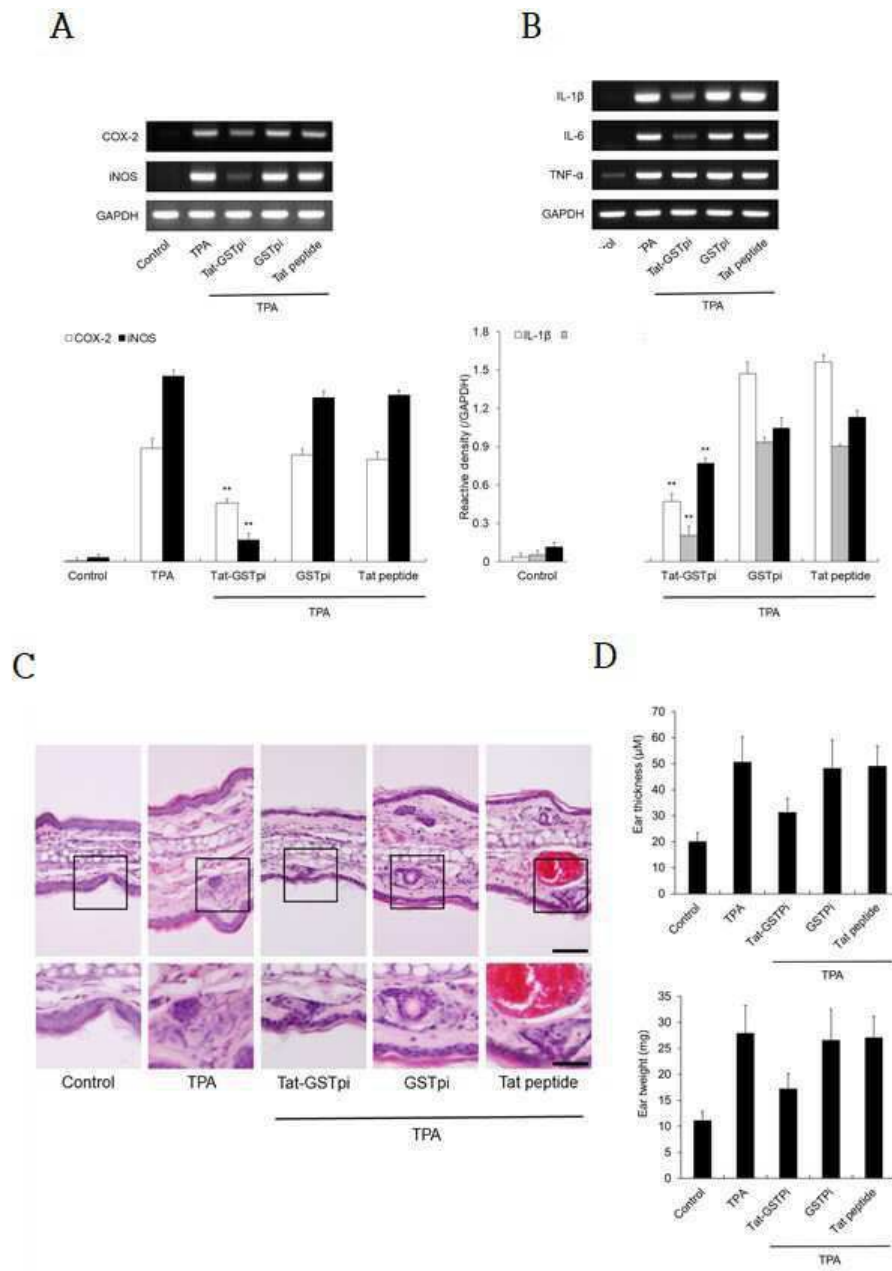
도면5a



도면5b



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.