



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0094547
(43) 공개일자 2018년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0020790
(22) 출원일자 2017년02월16일
심사청구일자 2017년02월16일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
김대원
강원도 강릉시 교동광장로 138-12, 302동 201호 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 8 항

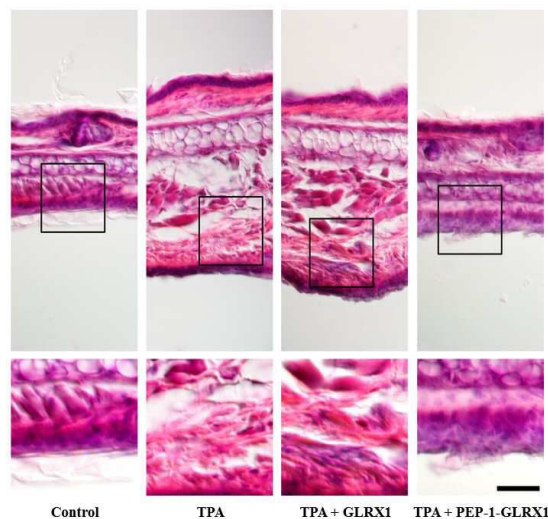
(54) 발명의 명칭 글루타레독신 1 융합단백질을 포함하는 피부 염증 치료용 약학 조성물

(57) 요약

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

해결수단: 본 발명은 세포투과성 글루타레독신1 융합단백질을 포함하는 항염증 약학조성물에 관한 것으로서, 세포 내로 투과된 글루타레독신1 융합단백질은 과산화수소 독성에 대해 세포생존율을 증가시키고, 활성산소종 수준을 감소시켜 세포보호 작용을 하였다. LPS-유도된 COX2와 iNOS 단백질 발현 수준을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다. 또한, PEP-1-GLRX1 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였다. 그뿐만 아니라, PEP-1-GLRX1 융합단백질은 COX-2 발현 수준과 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성을 현저히 감소시켰고, p38, ERK 및 JNK 인산화와 p65와 I κ B α 인산화를 저해하였다. 또한, 동물모델에서 피부세포 염증을 현저히 개선하였다. 이는 투과된 PEP-1-GLRX1 융합단백질이 세포사멸로부터 세포를 보호효과가 있으며, 피부 염증 치료효과가 있음을 말해준다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
Y10S 514/857 (2013.01)

(72) 발명자

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가6길 6, 301호 (그린빌, 다가동)

음원식

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

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

조효상

경기도 구리시 체육관로 163-12

박진서

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

한규형

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

이근욱

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

손오라

경기도 양주시 백석읍 중앙로223번길 123-21

손은정

경기도 남양주시 비룡로116번길 35, 306동 404호 (마석역신도브레뉴 3차 아파트, 묵현리)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 : 질환치료용 생리활성 고분자 신소재 물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교

연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2B4008356

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원사업(중견연구)

연구과제명 혈액뇌장벽 및 뇌조직 침투성 Glutaredoxin 1 융합단백질을 이용한 퇴행성신경질환 치료제 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 GLRX1의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 GLRX1 융합단백질을 포함하는 피부 염증 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 글루타레독신1 융합단백질은 서열번호 4임을 특징으로 하는 글루타레독신1 융합단백질을 포함하는 피부 염증 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 수송도메인은 PEP-1 펩타이드, HIV Tat 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 및 올리고(아르기닌, 라이신) 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 글루타레독신1 융합단백질을 포함하는 피부 염증 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 피부 염증은 아토피 피부염임을 특징으로 하는 피부 염증 치료용 약학 조성물.

청구항 5

9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 GLRX1의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 GLRX1 융합단백질을 포함하는 피부 염증 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 글루타레독신1 융합단백질은 서열번호 4임을 특징으로 하는 글루타레독신1 융합단백질을 포함하는 피부 염증 개선용 화장료 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 수송도메인은 PEP-1 펩타이드, HIV Tat 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 및 올리고(아르기닌, 라이신) 중 선택된 1종임을 특징으로 하는 글루타레독신1 융합단백질을 포함하는 피부 염증 개선용 화장료

조성물.

청구항 8

9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 GLRX1의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 GLRX1 융합단백질을 포함하는 피부 염증 개선 효과를 나타내는 건강 기능성 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포투과성 GLRX1 (glutaredoxin 1) 융합단백질을 포함하는 피부 염증 치료용 약학 조성물, 피부 염증 개선용 화장료 조성물 및 피부 염증 개선용 건강 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 활성산소종 (Reactive Oxygen Species; ROS)은 산소와의 상호작용 및 거대분자의 손상을 포함한 다양한 세포 대사과정의 부산물로 자연스럽게 생성된다. 활성산소종의 생성과 소멸 과정의 불균형으로 세포의 구조와 기능을 바꿈으로써 세포는 손상을 받으며, 장기간 활성산소종에 노출되면 과산화 지방질 생성, DNA 손상, 세포의 염증 및 사멸, 더 나아가 암, 알츠하이머, 파킨슨병, 헌팅턴병 등 여러 가지 질환이 발병한다. 세포의 산화반응 조절 기능을 하는 활성산소종은 그것의 생성과 소멸이 균형을 맞추면서 면역 체계에 중요한 역할을 한다. 많은 연구자는 활성산소종에 의해 나타나는 염증 및 노화에 초점을 맞추고 있다.

[0004] 글루타레독신 (Glutaredoxins; GLRX)은 티올/이황화물 (disulfide) 교환 촉매인 티오레독신 수퍼패밀리의 일원이며, 따라서 티올 전이효소로 알려져 있고, 환원 등가물을 리보뉴클레오타이드 환원효소 1에 제공하는 단백질-SG 혼합 이황화물의 환원제로 작용한다. 포유류에서 글루타레독신은 두 개의 주요 형태로 존재한다. GLRX-1은 세포질 내에 존재하고, GLRX-2는 주로 미토콘드리아에 위치하지만, 핵에도 존재한다. GLRX-1과 GLRX-2는 모두 산화환원 조절에서 중요한 역할을 수행하며 세포자기사멸에 대하여 세포를 보호한다.

[0006] 최근, 단백질의 운반 방법 중 하나로 PEP-1 펩타이드를 이용하여 자연상태의 이형 단백질을 세포 내로 운반할 수 있음이 밝혀졌다. PEP-1 펩타이드는 21개의 아미노산(KETWWETWWTEW SQP KKKRKV)으로 이루어졌고, 세 개의 도메인(소수성 도메인, 스페이스, 친수성 도메인)을 갖고 있다. 지금까지, PEP-1 펩타이드를 이용한 연구에서는 PEP-1 펩타이드와 외부 단백질을 동시에 세포에 투여하였을 경우 자연상태로 단백질을 세포 내로 운반할 수 있다는 것만 밝혀졌다. 또한, PEP-1 펩타이드는 HIV-1 Tat 단백질에 비해 단백질 치료제로서의 여러 가지 장점 즉, 매우 효율적으로 단백질을 세포 내로 투과시키고, 생리화학적 완충액에서의 안정성, 혈청에 대한 민감성의 결여 등을 나타낸다. 그러나, PEP-1 펩타이드는 외부 단백질 즉, 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP), 베타갈락토시데이즈(β -galactosidase, β -Gal) 등과 일정한 비율로 맞추어 투여해야 세포 내에 효과적으로 단백질이 운반되는 것으로 확인되었다. 그러나 치료 단백질을 비롯한 모든 단백질이 PEP-1 펩타이드에 의해 세포 내로 운반 가능한지는 아직까지 명확히 밝혀지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 피부 염증 질환에 유용한 치료용 약학 조성물, 피부 염증 개선용 화장료 조성물 및 피부 염증 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공하려는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명자들은 자연상태의 단백질을 세포 내로 운반하는 PEP-1 펩타이드를 사람 GLRX1 단백질에 융합하였고, 융합단백질을 대장균에서 과대발현하였으며, 금속 킬레이팅 친화 크로마토그래피로 쉽고 편리하게 정제하였다. 정제된 융합단백질이 효과적으로 생물학적인 활성을 지니고 세포 내로 운반되는 것을 배양된 Raw264.7 세포 및 조직 실험을 통하여 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 세포 투과성 GLRX1 융합단백질이 세포 내로 운반되며 생물학적인 활성 즉, 염증에 의하여 피부가 붓는 현상을 효과적으로 억제함을 밝혀냈다.
- [0011] 좀 더 구체적으로 설명하면, 본 발명자들은 먼저 세포 투과성 GLRX1 융합단백질을 과대발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 GLRX1 융합단백질 발현백터를 제조하였다. 이 발현백터는 인간 GLRX1 cDNA, PEP-1 펩타이드 (21 아미노산) 그리고 6개의 히스티딘이 연속적으로 연결되어 있다. 이 발현백터를 이용하여 세포 투과성 GLRX1 융합단백질을 대장균에서 과대발현시켜 자연상태로 Ni^{2+} -친화 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 정제하였다. 과대발현 및 정제된 GLRX1 융합단백질을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 정제된 세포 투과성 GLRX1 융합단백질이 배양된 세포에 원활하게 운반되는 것을 형광염색으로 확인하였고, 세포 내로 투과된 GLRX1 융합단백질은 세포 내에서 최소 13시간 지속적으로 유지되는 것을 알 수 있었다. 또한, 세포 내로 투과된 GLRX1 융합단백질은 피부 두께 및 중량을 효과적으로 감소시키고 있음을 알 수 있었다.
- [0012] 이러한 결과는 세포 투과성 GLRX1 융합단백질이 세포 내로 투과가 잘 일어나고, 세포 내에서 GLRX1 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서, 본 발명의 세포 투과성 GLRX1 융합단백질은 염증과 관련하여 피부 세포의 보호 등에 다양하게 응용될 가능성을 제시해 준다.
- [0014] 또한, 세포 투과성 GLRX1 융합단백질을 처리한 Raw264.7 세포에 지다당 (Lipopolysaccharide; LPS)을 이용하여 염증을 유발하고, 세포 투과성 GLRX1 융합단백질의 염증 억제 효능을 알아보기 위하여 COX2와 iNOS에 대해 웨스턴 블롯으로 확인하였고, mRNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과, 세포 투과성 GLRX1 융합단백질 처리군에서는 LPS로 유발된 염증에 대하여 세포를 보호하는 효과를 관찰할 수 있었다. 또한, 친염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현 변화를 RT-PCR로 mRNA 수준에서 확인한 결과, GLRX1 융합단백질 처리군에서는 LPS로 유발된 염증에 대하여 세포 보호 효과를 나타내었다. 또한, PEP-1-GLRX1 융합단백질은 동물실험을 통하여 마우스 조직 내로 잘 투과하고, TPA로 유발된 염증과 부종을 억제하여 염증질환의 치료제로 이용 가능함을 알 수 있다.
- [0016] 본 발명은 글루타레독신 1 (Glutaredoxin 1; GLRX1) 단백질의 N-말단 또는 C-말단 중 한 곳 이상에 PEP-1, HIV Tat, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고(아르기닌, 라이신) 등의 단백질 수송 도메인이 공유결합된 GLRX1 융합단백질을 포함하는 아토피 염 등의 피부 염증 치료제 조성물, 피부 염증 개선용 화장품 조성물 및 피부 염증 개선용 건강 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질이 서열번호 4인 것을 특징으로 하는 글루타레독신1 융합단백질을 포함하는 염증 치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 피부 염증 치료제 조성물이 아토피 피부염 치료제 조성물임을 특징으로 한다.
- [0020] 글루타레독신 1 (Glutaredoxin 1) 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구, 외용제 또는 주사 형태로 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, 탬크, 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 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.

- [0021] 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 $0.01\mu\text{g}\sim 100\text{mg/kg}$ 을 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.
- [0022] 나아가, 본 발명은 상기 GLRX1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 염증 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 GLRX1 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 GLRX1 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, 겔여로 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.
- [0026] 또한, 본 발명은 세포 투과성 rpS3 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물을 비롯한 피부 외용제 조성물을 제공한다. 본 발명의 세포 투과성 rpS3 융합 단백질을 유효성분으로 하는 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 세포 투과성 rpS3 융합 단백질을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.
- [0027] 그뿐만 아니라, 본 발명의 세포 투과성 rpS3 융합 단백질은 화장품로서 이용할 수 있는데, pH 조절제, 향료, 유화제, 방부제 등을 필요에 따라 부가하여 통상의 화장품 제조 방법으로 화장수, 젤, 수용성 파우더, 지용성 파우더, 수용성 리퀴드, 크림 또는 에센스 등으로 제형화할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0030] "GLRX1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 GLRX1 단백질을 포함하며, 수송 도메인과 목표 단백질 (즉, 본 발명에서 목표 단백질은 "GLRX1 단백질"을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "PEP-1-GLRX1", "PEP-1-GLRX1 융합단백질" 등과 혼용하였다.
- [0031] "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 "GLRX1 단백질"을 의미한다.
- [0032] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.
- [0033] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0034] 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.
- [0035] 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 유기

화합물들을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말한다.

[0036] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0038] 본 발명의 GLRX1 융합단백질은 9 내지 15개의 아미노산 잔기로 구성되며 아르기닌 또는 라이신 잔기를 3/4 이상 포함하는 수송도메인이 GLRX1의 최소한 일측 말단에 공유결합되어 세포침투 효율이 향상된 GLRX1 융합단백질을 말한다. 또한, 상기 수송도메인은 HIV Tat 49-57 잔기, PEP-1 펩타이드, 올리고라이신, 올리고아르기닌 또는 올리고 (라이신,아르기닌) 중의 1종 이상을 말한다.

[0039] 또한, 본 발명의 상기 GLRX1 융합단백질 아미노산 서열은 서열번호 4를 포함한다. GLRX1 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 GLRX1 융합단백질 아미노산 서열이 위의 서열로 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0041] 본 발명은 9~15개의 아미노산으로 구성되고, 라이신 또는 아르기닌을 4개 이상 포함하는 단백질 수송 도메인이 GLRX1 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포도입성 (cell-transducing) GLRX1 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.

[0042] 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.

[0043] 본 발명에서 정의되는 피부염증질환이란 아토피 피부염, 피부 소양증 등을 포함하는 피부염증질환을 말한다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 GLRX1 융합단백질은 투여량 및 처리시간 의존적으로 세포 내로 투과하였고, 투과된 GLRX1 융합단백질은 세포 내에서 13시간 동안 현저한 수준을 나타내었다.

[0046] 본 발명의 GLRX1 융합단백질은 LPS-유도된 COX2와 iNOS 단백질 발현 수준을 투여량 의존적으로 현저히 감소시켰다. 또한, GLRX1 융합단백질은 고농도 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였다.

[0047] 또한, 본 발명의 GLRX1 융합단백질은 세포로 투과되어 LPS 처리한 세포에서 염증을 완화하여 세포 보호효과를 나타내었다.

[0048] 그뿐만 아니라, 본 발명의 GLRX1 융합단백질은 동물모델에서 TPS로 유발된 피부 부종을 저해하여 피부 염증을 개선하였다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 PEP-1-GLRX1 융합단백질 구축 및 정제에 관한 도면이다.

도 2는 Raw264.7 세포 내로 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 투과를 나타낸다. 세포는 60 mm 배양접시에서 배양한 후 PEP-1-GLRX1 융합단백질 (0.01 ~ 0.4 μ M)과 대조군 GLRX1 단백질을 한 시간 동안 배양배지에 가하여 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

도 3은 Raw264.7 세포 내로 PEP-1-GLRX1 융합단백질 (0.4 μ M)과 대조군 GLRX1 단백질을 15 ~ 60분간 배양배지

에 대하여 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.

도 4는 세포 투과된 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 세포 내 분포를 공촛점 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 5는 Raw264.7 세포 내로 투과된 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 안정성을 다양한 시간 경과 후 평가한 것이다 (1 ~ 13시간). 세포는 0.4 μ M PEP-1-GLRX1 융합단백질로 한 시간 동안 선처리하고, 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

도 6은 Raw264.7 세포에서 LPS로 유도한 염증반응에 대한 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 저해효과를 나타낸다.

도 7은 Raw264.7 세포 내로 GLRX1 융합단백질 (0.01 ~ 0.4 μ M)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 웨스턴 블롯 분석으로 COX-2와 iNOS를 측정된 결과이다.

도 8은 Raw264.7 세포 내로 GLRX1 융합단백질 (0.01 ~ 0.4 μ M)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 RT-PCR 분석으로 TNF- α , IL-1 β , IL-6를 측정된 결과이다.

도 9는 Raw264.7 세포 내로 GLRX1 융합단백질 (0.01 ~ 0.4 μ M)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 웨스턴 블롯 분석으로 p65, I κ B α 를 측정된 결과이다.

도 10은 Raw264.7 세포 내로 GLRX1 융합단백질 (0.01 ~ 0.4 μ M)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 웨스턴 블롯 분석으로 p38, JNK, ERK를 측정된 결과이다.

도 11은 Raw264.7 세포 내로 GLRX1 융합단백질 (0.01 ~ 0.4 μ M)을 1시간 동안 처리하고 LPS로 염증을 유발하여 웨스턴 블롯 분석으로 Akt를 측정된 결과이다.

도 12는 8주령 마우스 수컷 귀에 TPA로 염증을 유발하여 PEP-1-GLRX1 융합단백질 0.4 μ M을 처리하고 H&E 염색을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0053] 재료

[0054] 12-*O*-TPA (tetradecanoylphorbol-13-acetate)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Ni²⁺ 나이트릴로트리아세트산 세파로즈 수퍼플로우 (Ni²⁺-nitrilotri-acetic acid Sepharose superflow)는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였다. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)은 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였고, FBS와 항생제는 Gibco BRL에서 구입하였다. 합성 Tat 펩타이드는 Peptron (Daejeon, Korea)에서 구입하였고, 기본 항체와 액틴은 각각 Cell Signaling Technology (Beverly MA, USA) 및 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 다른 화학물질 및 시약들은 입수 가능한 최상급의 제품을 이용하였다.

[0056] PEP-1-GLRX1 융합단백질 발현 및 정제

[0057] PEP-1 발현벡터를 제조하였다 [Eum, W. S. et al., *Free Radic. Biol. Med.* 37: 1656-1669; 2004]. 인간 GLRX1 cDNA 서열은 센스 프라이머 5'-CTCGAGGCAGAGCCAGACCC-3' 및 안티센스 프라이머 5'-GGATCCTCACT GGGGTTTCTCC-3'를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 얻어진 PCR 산물은 TA 클로닝 벡터에 서브클로닝하여 PEP-1-GLRX1 단백질을 제조하기 위해 PEP-1 발현벡터 내로 연결되었다. 이와 유사한 방법으로 PEP-1이 없는 대조군 GLRX1 단백질을 발현하는 벡터를 구축하였다. PEP-1-GLRX1 플라스미드는 *E. coli* BL21 세포 내로 형질전환되어 0.5 mM IPTG (isopropyl- β -D-thio-galactoside; Duchefa, Haarlem, Netherlands)로 37 °C에서 6시간 동안 유도되었다. 하비스트한 세포는 용균하여 PEP-1-GLRX1 융합단백질은 Ni²⁺-니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우 친화 크로마토그래피 및 PD-10 크로마토그래피 (Amersham, Braunschweig, Germany) 컬럼으로 정제하였다. 단백질 농도는 표준 물질로서 우혈청 알부민을 이용하여 브래드포드 방법으로 측정하였다 [Bradford, M. A. *Anal. Biochem.* 72: 248-254; 1976].

[0059] **Raw264.7 세포에 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 형질도입 및 과산화수소 처리**

[0060] 계대 배양한 Raw264.7 세포를 60mm 접시에 분주하여 37℃, 95% 습도, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. PEP-1-GLRX1 융합단백질 및 GLRX1 단백질의 세포투과 능력을 확인하기 위하여 1시간 동안 단백질을 다양한 농도 (0.001~0.4 μM)로 처리하였다. 또한, 단백질 (0.4 μM)을 처리 시간을 달리하여 15~60분간 처리하였다. Raw264.7 세포 내에 PEP-1-GLRX1 융합단백질이 얼마 동안 남아있는지 알아보기 위해 0.4 μM PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리하고, 특정 시간 (1~13시간)이 지난 후에 세포를 회수하였다.

[0061] 또한, Raw264.7 세포에 1시간 동안 농도별(0.01~0.4 μM)로 PEP-1-GLRX1 융합단백질과 GLRX1 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.

[0063] **웨스턴 블롯 분석**

[0064] 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 세척하였다. 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.

[0066] **공촛점 형광 현미경 관찰**

[0067] 24 웰 플레이트에 커버 글라스를 각각 넣고 그 위에 세포를 분주하여 2시간 동안 배양하였다. 0.1 nM PEP-1-GLRX1 융합단백질과 GLRX1 단백질을 2시간 동안 Raw264.7 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. 공촛점 형광 현미경으로 관찰하고 영상분석기를 이용하여 형광 발현을 확인하였다.

[0069] **동물모델 제조**

[0070] 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.

[0072] **통계 분석**

[0073] 모든 데이터는 실험 결과의 평균값이며, 통계학적인 차이는 student' t-test 분석법을 이용하여 비교하였고, $p < 0.05$ 일때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

[0075] **결과 1: PEP-1-GLRX1 융합단백질 제조**

[0076] 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 제조하기 위해 GLRX1 유전자를 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통해

획득하였고, 이를 pET 벡터 시스템에 클로닝하였다. 이렇게 만들어진 단백질 발현 유전자를 BL21에 형질전환하였다. 형질전환된 단백질을 과대발현하고, 정제하였다 (도 1).

[0078] 결과 2: Raw264.7 세포로 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 침투성 확인

[0079] Raw264.7 세포로 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 투과 능력을 확인하였다. Raw264.7 세포를 다양한 농도의 GLRX1 융합단백질로 처리하였고, 그 결과, 농도 의존적으로 침투됨을 확인하였다. 이를 His Ab을 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다 (도 2).

[0080] 또한, PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.4 μ M로 고정하여 Raw264.7 세포에 다양한 시간 동안 처리한 결과, GLRX1 융합단백질은 Raw264.7 세포에 시간 의존적으로 침투되었다. 이를 His Ab을 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다 (도 3).

[0081] 또한, PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.4 μ M로 고정하여 Raw264.7 세포에 다양한 시간 동안 처리한 결과, GLRX1 융합단백질은 Raw264.7 세포에 시간 의존적으로 침투되었다. 이를 His Ab을 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다 (도 4).

[0083] 결과 3: PEP-1-GLRX1 융합단백질의 Raw264.7 세포 내 안전성 확인

[0084] 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.4 μ M로 고정하여, Raw264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 침투된 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 안전성을 확인하였고, 처리 후 13시간까지 안정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0086] 결과 4: PEP-1-GLRX1 융합단백질의 Raw264.7 세포 보호 효능

[0087] 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.4 μ M로 고정하여 Raw264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 효능을 DCF-DA를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리한 군에서 항염증 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 6).

[0088] 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.1 μ M ~ 0.4 μ M로 Raw264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때, 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 효능을 COX2와 iNOS를 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다. 또한, mRNA 수준도 RT-PCR을 통해 동시에 확인하였다. 그 결과, 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리한 군에서 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 7).

[0089] 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.1 μ M ~ 0.4 μ M로 Raw264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때, 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 효능을 TNF- α , IL-1 β , IL-6를 이용하여 mRNA 수준에서 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리한 군에서 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 8).

[0090] 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.1 μ M ~ 0.4 μ M로 Raw264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때, 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 효능을 p65, I κ B α 를 이용하여 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다. 그 결과, 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리한 군에서 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 9).

[0091] 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.1 μ M ~ 0.4 μ M로 Raw264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때, 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 효능을 p38, JNK, ERK를 이용하여 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다. 그 결과, 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리한 군에서 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 10).

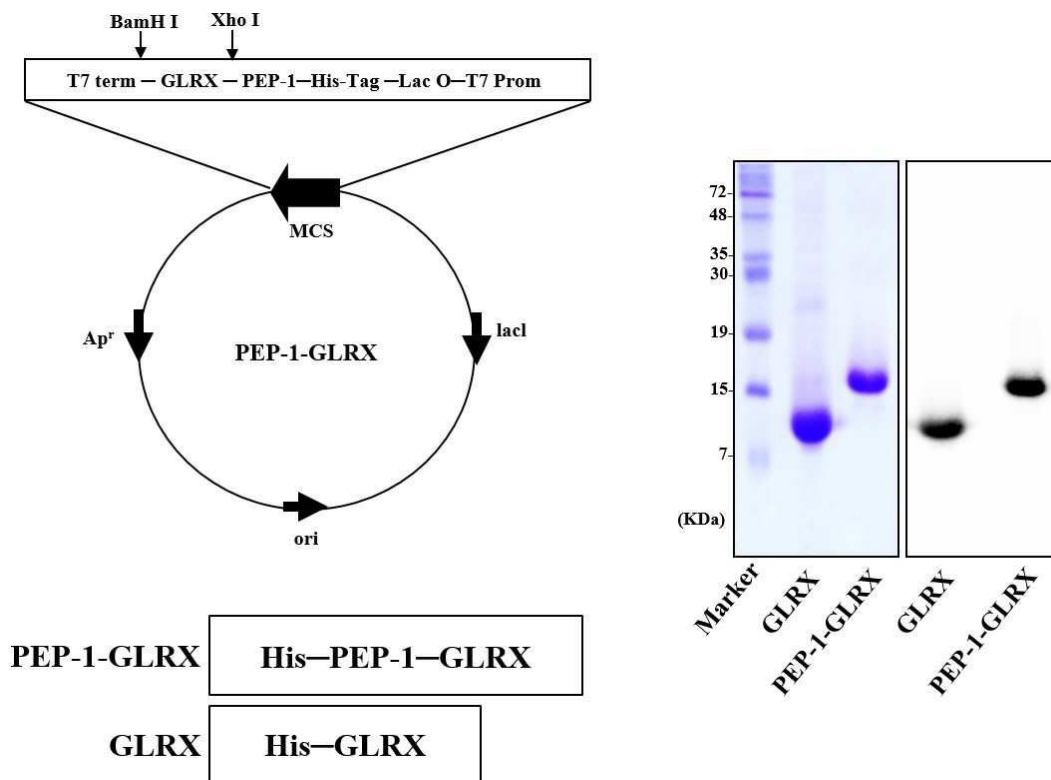
[0092] 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.1 μ M ~ 0.4 μ M로 Raw264.7 세포에 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 이후 LPS를 처리하여 세포에 염증을 유발하였다. 이때 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 효능을 Akt를 이용하여 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다. 그 결과, 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리한 군에서 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다 (도 11).

[0094] **결과 5: 동물실험을 통한 염증 기전 연구**

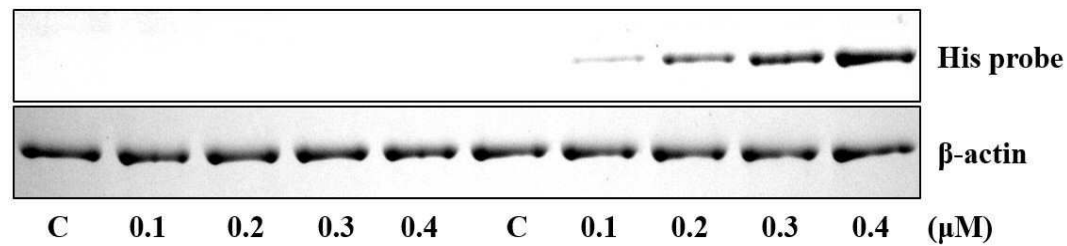
[0095] 8주령 ICR 마우스 수컷의 귀에 TPA를 바르고 염증을 유발하였다. 이후, PEP-1-GLRX1 융합단백질을 0.4 μM 로 처리하고 효능을 평가하였다. 조직을 잘라 H&E 염색을 수행하였다. 그 결과, 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리한 군에서 보호 효과가 있음을 확인하였다. (도 12).

도면

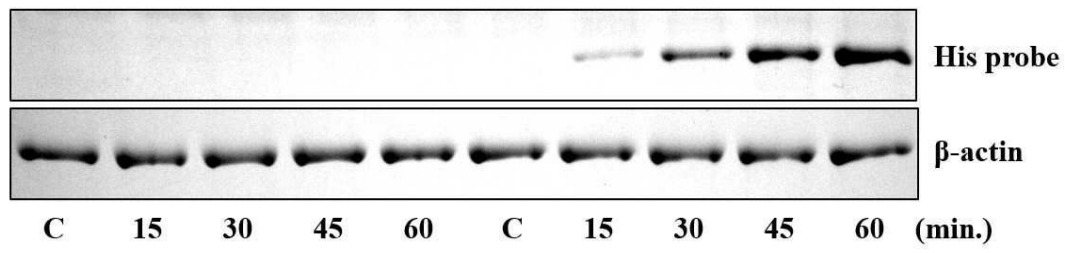
도면1



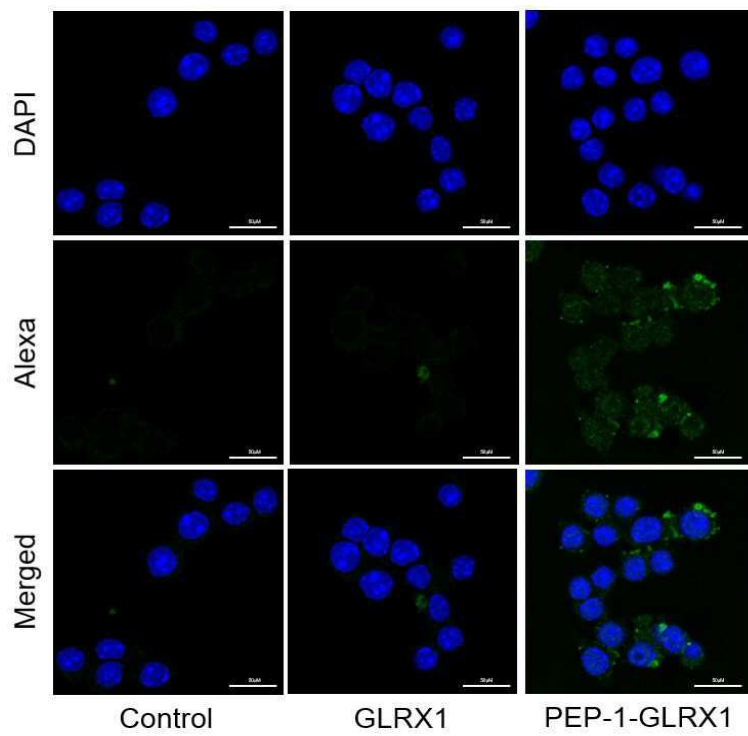
도면2



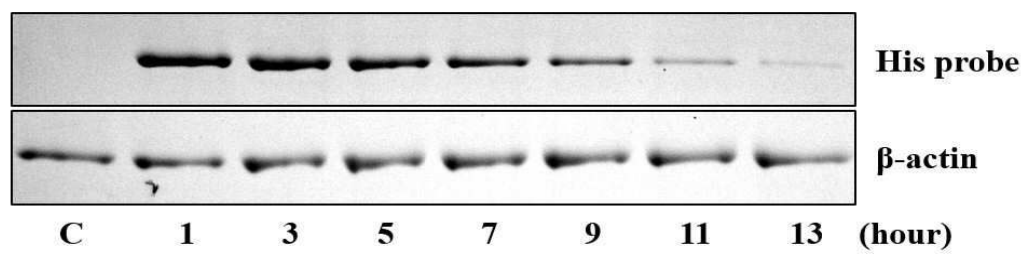
도면3



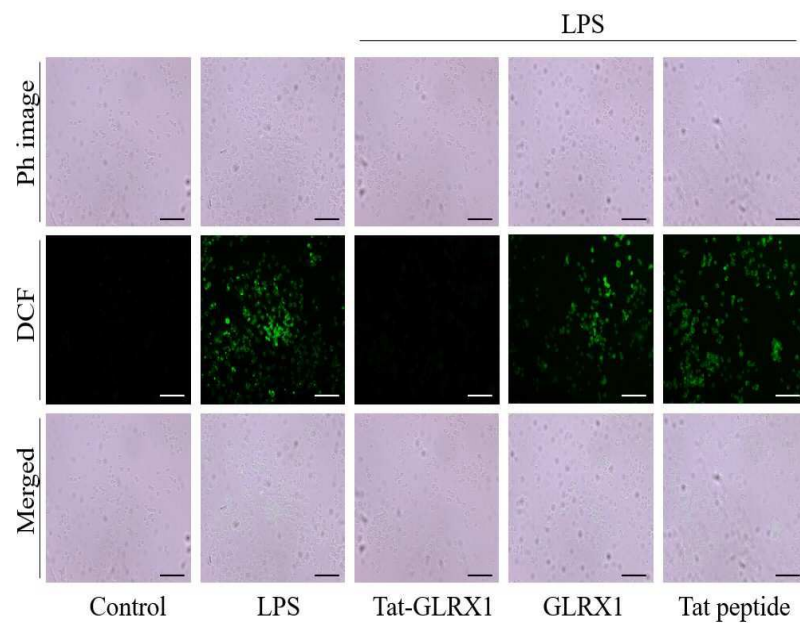
도면4



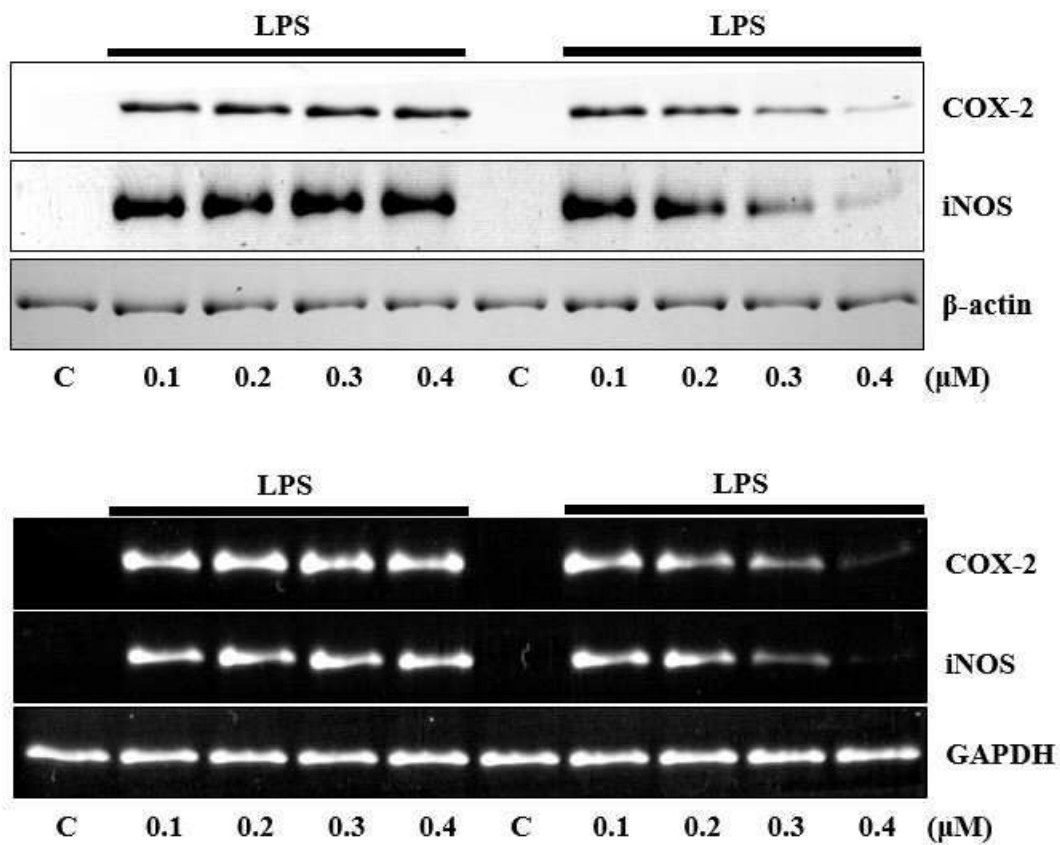
도면5



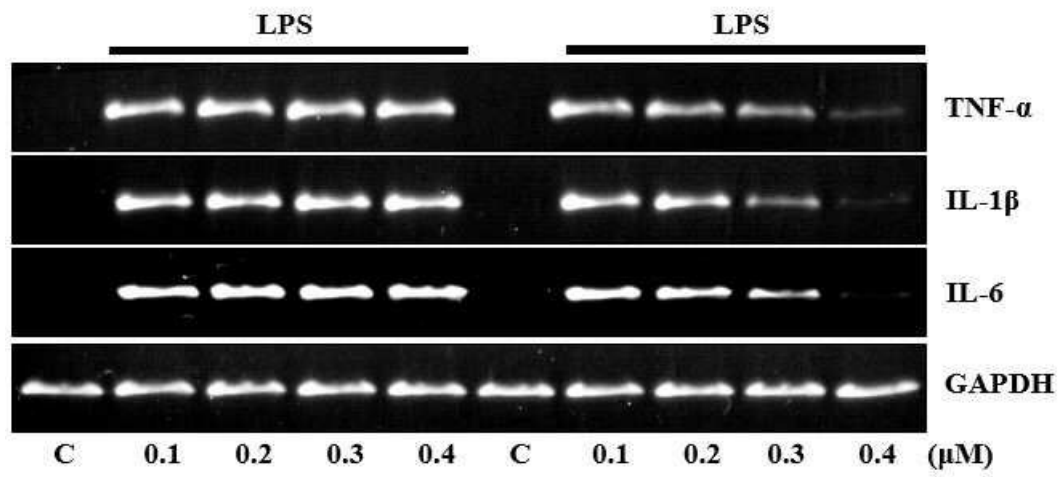
도면6



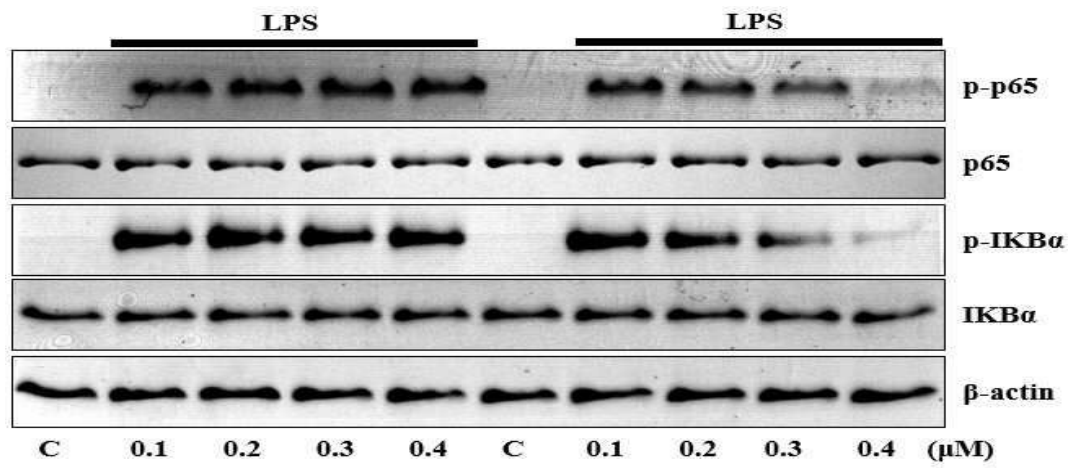
도면7



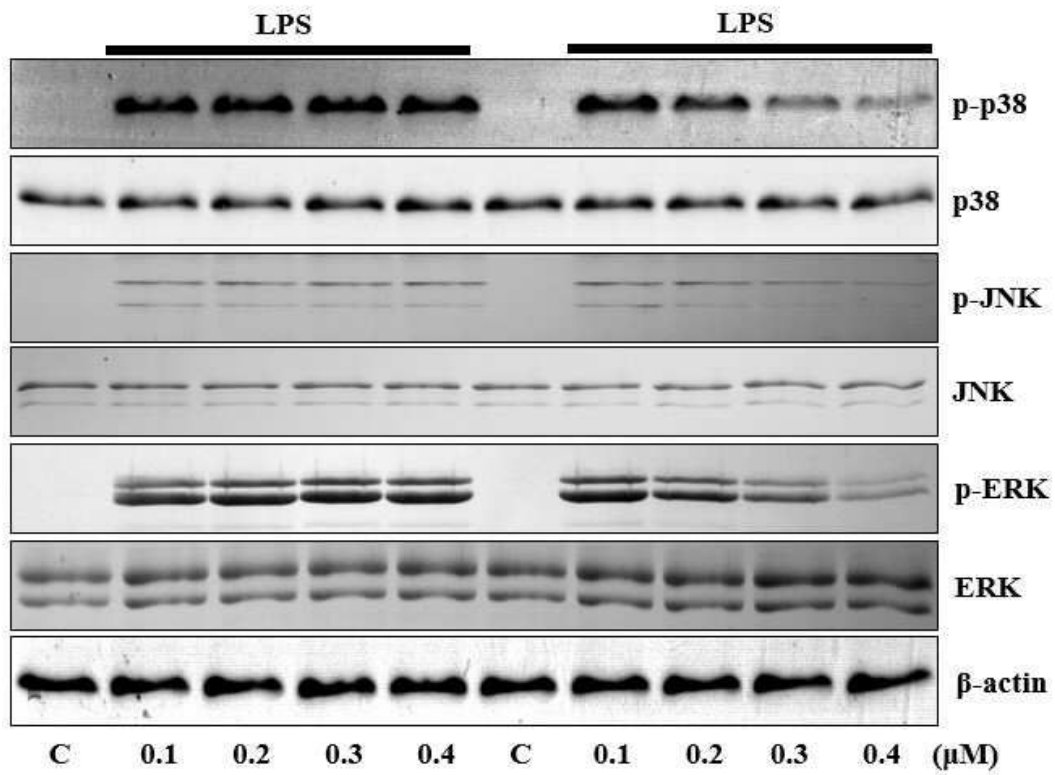
도면8



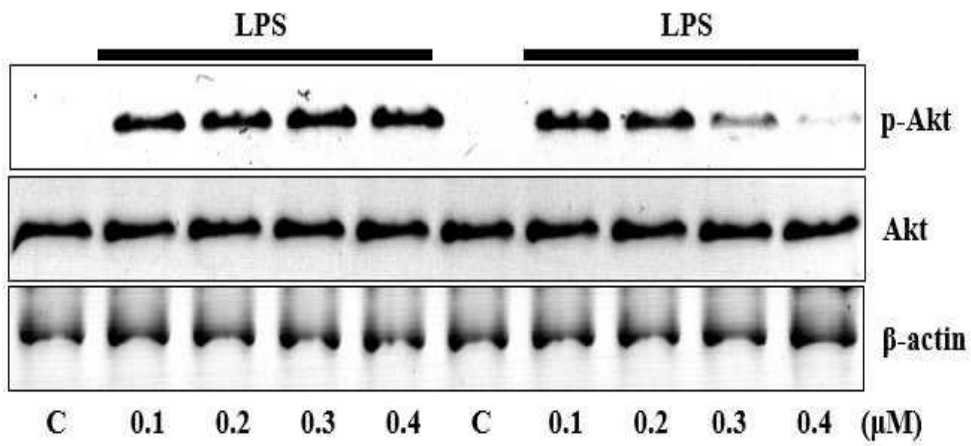
도면9



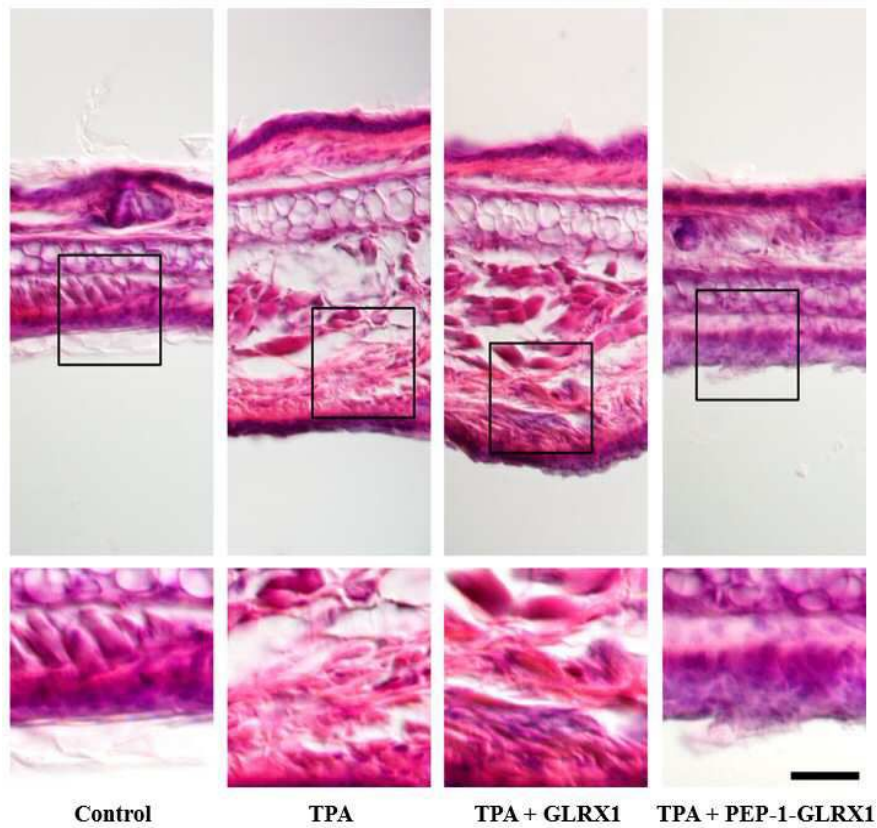
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for treating arthritis containing glutaredoxin 1 fusion protein
- <130> HallymU-sychoi-Glrx-arthritis
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> sense primer of glutaredoxin
- <400> 1
- ctcgagggca acgcgcag
- <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 aaggtggttg 120

tgttcatcaa gccacacgc ccgtactgca ggagggccca agagatcctc agtcaattgc 180

ccatcaaaca agggcttctg gaatttgtcg atatacagc caccaaccac actaacgaga 240

ttcaagatta ttgcaacag ctcacgggag caagaacggg gcctcgagtc tttatttgta 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															