



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월02일
(11) 등록번호 10-1671197
(24) 등록일자 2016년10월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0070951
(22) 출원일자 2015년05월21일
심사청구일자 2015년05월21일
(56) 선행기술조사문헌
US20140140975 A1

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
음원식
강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 2 항

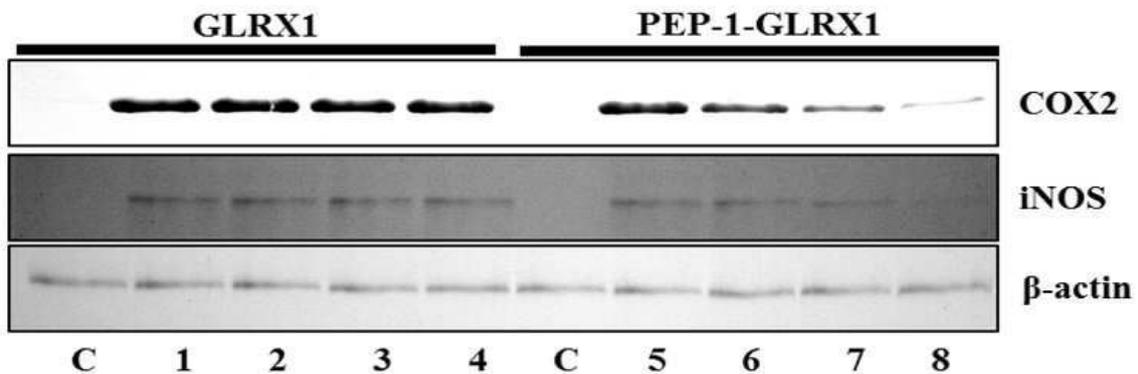
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 글루타레독신 1 융합단백질을 함유하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 염증성 관절염 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 연골조직 내로 투과가 가능한 글루타레독신 1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 염증성 관절염 예방 또는 질환 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

박진서

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

김현아

서울특별시 강남구 남부순환로 2803 102동 802호 (도곡동, 삼성래미안아파트)

손은정

경기도 남양주시 화도읍 묵현리 비룡로 116번지 35번지 마석역신도브레뉴 3차 아파트 306동 404호

손오라

경기도 양주시 백석읍 중앙로223번길 123-21 (가업리)

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

김대원

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

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

기여율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120960

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건복지부

연구사업명 보건의료연구기술개발사업

연구과제명 표적단백질 세포 및 연골조직 침투기술 개발

기여율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

글루타레독신1 (Glutaredoxin1)의 N-말단에 PEP-1 펩타이드가 공유결합된 글루타레독신1 융합단백질을 함유하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 글루타레독신1 융합단백질은 서열번호 4임을 특징으로 하는 글루타레독신1 융합단백질을 함유하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 연골 조직 내로 투과 가능한 GLRX1(glutaredoxin 1) 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 관절염 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증성 관절염은 유전, 환경 등 다양한 요인에 의해 면역체계에 이상이 발생하여 관절에 염증이 생기는 자가면역질환으로 류마티스 관절염과 강직성 척추염 등이 이에 해당된다.

[0003] 류마티스 관절염은 우리나라 인구 중 대략 1%가 환자군으로 추정되는 대표적인 만성질환이다. 류마티스 관절염의 병인은 세균 감염, 바이러스 감염 등 다양하지만, 정확한 발병기전은 아직 분명히 밝혀지지 않고 있다. 류마티스 관절염은 발병 초기에는 항원-특이적 또는 항원-비특이적 기전으로 중앙괴사인자 등의 사이토카인 분비에 의해 자극받은 T 림파구가 연골조직 주변의 활막 내 세포들을 활성화시켜 일어나는 염증반응이다.

[0004] 강직성 척추염은 척추와 천장관절의 골성 강직을 주요 병변으로 하는 염증성 관절염이다.

[0005] 이와 같은 염증성 관절염은 발병 기전 등이 다양하기 때문에 치료를 위해서 항염증제와 항류마티스 제제들이 적용되고 있지만, 치료효과는 불완전한 상태이다.

[0006] 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 GLRX는 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.

[0007] 치료를 위한 약물이나 단백질을 세포 내로 이동시키는데 있어서 목표 단백질을 세포막을 거쳐 직접 전달하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나 단백질은 크기나 여러 생화학적 성질 때문에 세포막을 통과하기가 매우 어렵다. 일반적으로 분자량 600 달톤 이상의 물질은 세포막을 통과하기가 거의 불가능한 것으로 알려져 있다.

[0008] 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, 스페이서, 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 장점을, 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 투여해야만 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

[0009] 위의 종래기술을 살펴볼 때 기존의 면역억제제보다 부작용이 적은 새로운 단백질 성분 치료제가 연골 내로 잘 통과할 수 있도록 하는 제형으로의 개발은 염증성 관절염 치료분야에서 매우 중요하다. 따라서, 본 발명은 GLRX1 단백질을 이용하여 세포침투가 용이하도록 개발하고 적용하여 염증성 관절염에 효과적인 약학 조성물을 제공하려는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 면역반응 억제 약물인 단백질을 연골 침투 능력을 높이는 제형으로 개발하고자 연구하였고, 단백질 제제의 연골 침투효과 및 염증을 유발한 연골세포에 GLRX1 융합단백질을 처리하였을 때 염증성 사이토카인 발현이 감소함을 단백질 수준 및 mRNA 수준에서 확인하여 GLRX1 융합단백질의 염증성 관절염 치료 효과를 규명함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 본 발명은 글루타레독신 1 (Glutaredoxin 1; GLRX1) 단백질의 N-말단에 단백질 수송 도메인 PEP-1이 공유결합된 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 함유하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0012] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 융합단백질이 서열번호 4인 것을 특징으로 하는 글루타레독신1 융합단백질을 함유하는 관절염 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0013] 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, 환천, 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 있다. 용량은 일일 투여량 0.01 μ g~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 GLRX1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 관절염 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한 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, 결여로 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.

- [0017] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0018] "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.
- [0019] "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.
- [0020] "융합단백질"이란 수송도메인 및 한 개 이상의 목표 단백질 부분을 포함하며, 수송도메인과 목표 단백질의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 복합체를 의미한다.
- [0021] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0022] 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.
- [0023] 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.
- [0024] 또한, 본 명세서에서는 단백질, 펩타이드, 유기화합물을 세포 내로 "도입"하는 것에 대하여 "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0025] 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.
- [0026] 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.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 GLRX1 융합단백질을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 관절염 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 GLRX1 융합단백질을 유효성분으로 하며, 관절염 예방 및 개선 효과가 있는 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0029] 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 것이

다. 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.

[0030] 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

- [0031] 본 발명에 따른 PEP-1-GLRX1 융합단백질은 시간 의존적 및 투여량 의존적으로 연골세포 내로 침투하였다.
- [0032] 또한, 본 발명에 따른 PEP-1-GLRX1 융합단백질은 연골세포 내로 침투하여 15시간 동안 안정적으로 유지되었다.
- [0033] 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 PEP-1-GLRX1 융합단백질은 염증 유발 연골세포 내에서 염증 마커의 단백질 및 mRNA 발현 수준을 저하시켰다.
- [0034] 또한, 본 발명에 따른 PEP-1-GLRX1 융합단백질은 염증 유발 연골세포 내에서 염증성 사이토카인의 발현을 저하시켰다.
- [0035] 따라서, 본 발명에 따른 PEP-1-GLRX1 융합단백질은 염증성 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서 유용할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 세포 침투성 PEP-1-GLRX1 융합단백질 벡터 제조 및 정제를 나타내는 젤 사진이다.
- 도 2는 SW1353 연골세포에 2 μ M의 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 15 ~ 60분간 처리한 후 웨스턴 블랏팅한 사진이다. 대조군으로서 단백질 수송도메인이 결합되지 않은 GLRX1 단백질을 사용하였다. "C"는 PEP-1-GLRX1 융합단백질 또는 GLRX1 단백질을 처리하지 않은 음성대조군을 말한다.
- 도 3은 SW1353 연골세포에 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리하는 농도를 달리하여 한 시간 동안 0.25 ~ 2 μ M 처리한 후 웨스턴 블랏팅한 사진이다. 대조군으로서 단백질 수송도메인이 결합되지 않은 GLRX1 단백질을 사용하였다. "C"는 PEP-1-GLRX1 융합단백질 또는 GLRX1 단백질을 처리하지 않은 음성대조군을 말한다.
- 도 4는 SW1353 연골세포에 2 μ M의 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 한 시간 처리한 후 시간 경과에 따라 웨스턴 블랏팅한 사진이다. 15시간까지는 융합단백질이 안정적으로 유지되었다.
- 도 5는 SW1353 연골세포에 TNF- α 를 가하여 염증을 일으킨 후 PEP-1-GLRX1 융합단백질 2 μ M을 처리하여 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 항염증 기능을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다. COX2와 iNOS는 대표적인 염증 마커이다 (레인 1: TNF- α 염증 유발군, 레인 2 : TNF- α + GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 3 : TNF- α + GLRX1 1 μ M 처리군, 레인 4 : TNF- α + GLRX1 2 μ M 처리군, 레인 5 : TNF- α 염증 유발군, 레인 6 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 7 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 1 μ M 처리군, 레인 8 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 2 μ M 처리군).
- 도 6은 SW1353 연골세포에 TNF- α 를 가하여 염증을 일으킨 후 PEP-1-GLRX1 융합단백질 2 μ M을 처리하여 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 항염증 기능을 RT-PCR로 확인한 것이다. COX2와 iNOS는 대표적인 염증마커이다 (레인 1: TNF- α 염증 유발군, 레인 2 : TNF- α + GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 3 : TNF- α + GLRX1 1 μ M 처리군, 레인 4 : TNF- α + GLRX1 2 μ M 처리군, 레인 5 : TNF- α 염증 유발군, 레인 6 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 7 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 1 μ M 처리군, 레인 8 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 2 μ M 처리군).
- 도 7은 SW1353 연골세포에 TNF- α 를 가하여 염증을 일으킨 후 PEP-1-GLRX1 융합단백질 2 μ M을 처리하여 PEP-1-GLRX1 융합단백질의 항염증 기능을 염증성 사이토카인 발현 억제로 알아본 사진이다 (레인 1: TNF- α 염증 유발군, 레인 2 : TNF- α + GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 3 : TNF- α + GLRX1 1 μ M 처리군, 레인 4 : TNF- α + GLRX1 2 μ M 처리군, 레인 5 : TNF- α 염증 유발군, 레인 6 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 7 : TNF- α

+ PEP-1-GLRX1 1 μM 처리군, 라인 8 : TNF-α + PEP-1-GLRX1 2 μM 처리군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 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.

[0038] **재료**

[0039] TPA는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Ni²⁺-니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였다. FBS 및 항생제는 Gibco BRL 제품이다. 합성 PEP-1 펩타이드는 PEPTRON (Daejeon, Korea)에서 구입하였고, 다른 모든 화학제품은 입수 가능한 최상급 제품을 이용하였다.

[0040] **PEP-1-GLRX1 융합단백질 발현 및 정제**

[0041] PEP-1 발현백터를 제조하였다 [Eum, W. S. et al., *Free Radic. Biol. Med.* 37: 1656-1669; 2004]. 인간 GLRX1 cDNA 서열은 센스 프라이머 5'-CTCGAGGCAGGCCAGACCC-3' 및 안티센스 프라이머 5'-GGATCCTCACT GGGGTTTCTCC-3'를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 얻어진 PCR 산물은 TA 클로닝 벡터에 서브클론하여 PEP-1-GLRX1 단백질을 제조하기 위해 PEP-1 발현백터 내로 연결되었다. 이와 유사한 방법으로 PEP-1이 없는 대조군 GLRX1 단백질을 발현하는 백터를 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].

[0042] **실험예 1: 시간 및 투여량에 따른 GLRX1 융합단백질의 세포내 침투효율**

[0043] **1-1. 연골세포**

[0044] HTB94라고도 하는 인간 연골육종 세포주 (chondrosarcoma cell line) SW1353 세포를 10% 우태혈청을 함유한 DMEM 배지에서 배양하여 실험에 사용하였다.

[0045] **1-2. 처리 시간에 따른 세포침투 효율**

[0046] 2 μM GLRX1 융합단백질을 SW1353 세포에 각각 15, 30, 45, 60분간 처리한 다음 웨스턴 블랏으로 세포 내 침투 효율을 확인하였다.

[0047] 결과는 도 2와 같이, GLRX1 융합단백질이 시간 의존적으로 SW1353 세포 내로 침투함을 확인하였다. 이와 대조적으로 수송도메인이 결합되지 않은 GLRX1 단백질은 세포 내로 침투되지 않았다.

[0048] **1-3. 처리 농도에 따른 세포침투 효율**

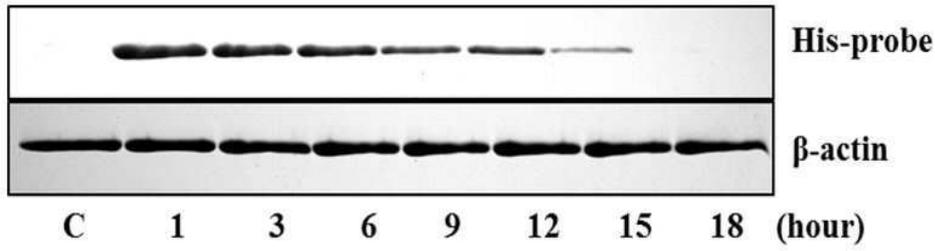
[0049] GLRX1 융합단백질을 SW1353 세포에 각각 0.25, 0.5, 1 및 2 μM 농도로 한 시간 처리한 다음 웨스턴 블랏으로 세포내 침투 효율을 확인하였다.

[0050] 결과는 도 3과 같이, GLRX1 융합단백질이 농도 (투여량) 의존적으로 SW1353 세포 내로 침투함을 확인하였다. 이와 대조적으로 수송도메인이 결합되지 않은 GLRX1 단백질은 세포 내로 침투되지 않았다.

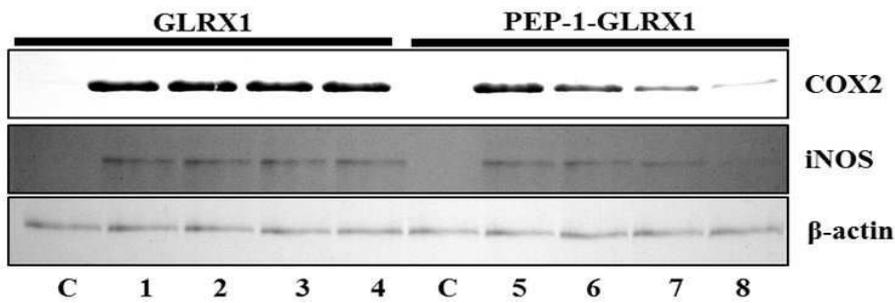
[0051] **실험예 2: 세포 내로 침투한 GLRX1 융합단백질의 안정성**

- [0052] SW1353 세포에 2 μ M GLRX1 융합단백질을 한 시간 동안 처리하였다. 침투한 GLRX1 융합단백질을 시간별로 각각 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 시간 경과 후 웨스턴 블랏팅을 수행하여 안정성을 확인하였다. 그 결과, 도 4와 같이, 15시간까지는 융합단백질이 안정적으로 유지되었다.
- [0053] **실험예 3: 염증유발 연골세포에서 GLRX1 융합단백질에 의한 염증저감효과**
- [0054] SW1353 세포에 TNF- α 를 가하여 염증을 유발하였다. 염증이 유발된 SW1353 세포에 2 μ M GLRX1 융합단백질을 처리한 후 염증 마커인 COX2 및 iNOS의 단백질 및 mRNA 발현을 웨스턴 블랏팅과 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과는 도 5 및 6과 같다 (레인 1: TNF- α 염증 유발군, 레인 2 : TNF- α + GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 3 : TNF- α + GLRX1 1 μ M 처리군, 레인 4 : TNF- α + GLRX1 2 μ M 처리군, 레인 5 : TNF- α 염증 유발군, 레인 6 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 7 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 1 μ M 처리군, 레인 8 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 2 μ M 처리군). TNF- α 처리 염증 유발군과 비교할 때 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리한 경우 COX2 및 iNOS의 단백질 발현과 mRNA 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 반면, GLRX1 단백질을 처리한 경우에는 변화가 없었다.
- [0055] 또한, SW1353 세포에 TNF- α 를 가하여 염증을 유발하면 염증성 사이토카인의 발현이 증가된다. 이때 2 μ M GLRX1 융합단백질을 먼저 처리한 후 염증을 유발하고 세포 내에서 염증성 사이토카인의 발현에 어떤 변화가 있는지를 웨스턴 블랏팅으로 관찰하였다.
- [0056] 그 결과는 도 7과 같다 (레인 1: TNF- α 염증 유발군, 레인 2 : TNF- α + GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 3 : TNF- α + GLRX1 1 μ M 처리군, 레인 4 : TNF- α + GLRX1 2 μ M 처리군, 레인 5 : TNF- α 염증 유발군, 레인 6 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 0.5 μ M 처리군, 레인 7 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 1 μ M 처리군, 레인 8 : TNF- α + PEP-1-GLRX1 2 μ M 처리군). TNF- α 처리 염증 유발군과 비교할 때 PEP-1-GLRX1 융합단백질을 처리한 경우 염증성 사이토카인 IL-6, IL-1 β 의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 반면, GLRX1 단백질을 처리한 경우에는 변화가 없었다.
- [0057] 이상과 같은 실험예의 결과들로부터, GLRX1 융합단백질을 연골세포 및 연골조직에 처리하는 경우 GLRX1 융합단백질이 세포 또는 조직 내로 원활히 침투하고 최소 15시간의 안정성을 나타내며, 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고 염증을 억제할 것으로 기대되며, 따라서 GLRX1 융합단백질은 염증성 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물로서 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

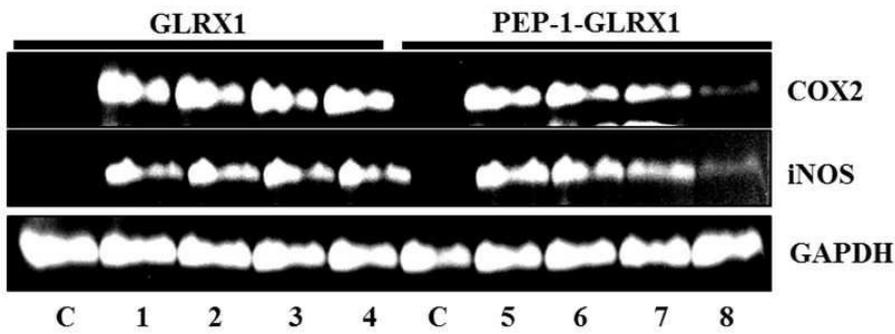
도면4



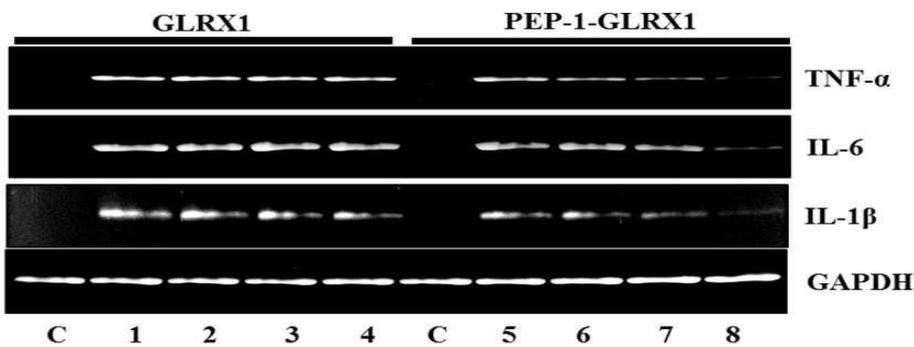
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <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 18

<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 gccacactgc ccgtactgca ggagggccca agagatcctc agtcaattgc 180

ccatcaaaca agggcttctg gaatttgtcg atatcacagc caccaaccac actaacgaga 240

ttcaagatta ttgcaacac ctcacgggag caagaacggt gcctcgagtc ttattggta 300

aagattgtat agcgggatgc 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