(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0036908
(43) 공개일자 2009년04월15일

(51) Int. Cl.
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0102208
(22) 출원일자 2007년10월10일
심사청구일자 2007년10월10일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교
(72) 발명자
김두식
서울 서대문구 연희동 84의3
전옥희
서울 동대문구 제기동 한신아파트 102동 701호
이재원
서울 영등포구 여의도동 시범아파트 5-126
(74) 대리인
특허법인다나

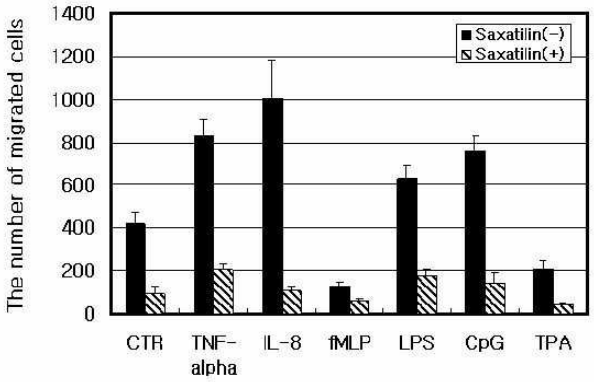
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 뱀독 유래의 디스인테그린인 삭사틸린을 포함하는동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 뱀독 유래의 디스인테그린인 삭사틸린을 포함하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 동맥경화 초기단계에서 단핵구 및 대식세포들의 혈관 내피세포로의 부착, 소환 및 이동을 억제하는 뱀독 유래의 디스인테그린인 삭사틸린의 동맥경화증 억제제로서의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2007-8-1099
부처명	과학기술부
연구사업명	국가지정연구실사업
연구과제명	새로운 혈소판 응집 억제 기술
주관기관	한국과학재단
연구기간	2007년 07월 08일 ~ 2008년 07월 07일

특허청구의 범위

청구항 1

뱀독 유래의 삭사틸린을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 삭사틸린은 한국산 칠점사(*Agkistrodon saxatilis* emelianov)의 독소에서 분리 정제한, 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것임을 특징으로 하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 삭사틸린은 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) Y/pPSAX KCCM-10201 균주 배양액에서 분리한 재조합 삭사틸린 단백질인 것을 특징으로 하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) Y/pPSAX KCCM-10201 균주는 RGD 루프내의 49번과 55번 아미노산이 메티오닌인 단백질 삭사틸린을 코딩하는 서열번호 2의 cDNA를 주형으로 하고 서열번호 3과 4에 기재된 프라이머를 이용하여 PCR 증폭된 산물을 포함하는 재조합벡터로 형질전환된 균주임을 특징으로 하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 재조합 삭사틸린 단백질은 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) Y/pPSAX KCCM-10201 균주 배양액을 원심분리하여 수득한 세포를 메탄올을 포함하는 배지에서 다시 배양하여 분리 정제한 것임을 특징으로 하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) Y/pPSAX KCCM-10201 균주는 pH 5.5~6.5의 배지에서 25~35℃에서 12~24시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) Y/pPSAX KCCM-10201 균주 배양액에서 수득한 세포는 0.5~1.5%(v/v)의 메탄올을 포함하는 pH 5.5~6.5의 배지에서, 25~35℃에서 72~120시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함함을 특징으로 하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 뱀독 유래의 디스인테그린인 삭사틸린을 포함하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 동맥경화 초기단계에서 단핵구 및 대식세포들의 혈관 내피세포로의 부착, 소환 및 이동을 억제하는 뱀독 유래의 디스인테그린인 삭사틸린의 동맥경화증 억제제로서의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 동맥경화는 세포의 이동이나 상호작용을 포함하는 복합적인 염증질환이며, 죽상판 (atheromatous plaque) 또는 섬유판 (fibrous plaque)을 형성하여 혈관의 내강을 좁히고, 중막을 약화시켜 각종 합병증을 유발시키는 질환이다. 일반적으로 각종 사이토카인 (cytokine), 박테리아 생성물질 (lipopolysaccharide, CpG DNA), 산소결핍, 또는 지질 등에 의해 유발되는 혈관 내피세포의 손상에 의해 시작되며, 손상된 부위는 지질을 포함한 혈장 성분의 투과성이 증가하게 되고, 혈관 내피세포에 혈소판과 단핵구가 부착되며, 단핵구가 혈류 (blood stream)에서 혈관내막 (vessel intima)으로 모여들게 되는 이러한 현상은 동맥경화를 심화시키는데 가장 중요한 단계이다 (Braunersreuther. V 외, *Cell. Mol. Life. Sci*. 2006, 63, 2079-2088). 이때 부착분자인 셀렉틴 (P-, L-, E-selectin), 세포부착분자 (VCAM, ICAM) 그리고 인테그린 등에 의해 부착된 단핵구가 혈관 내피 내로 들어가서 지질을 탐식하여 포말세포 (foam cell)가 된다. 지방을 담고 있는 포말세포는 완전한 자연세포사 (apoptosis) 과정으로 진행되지 못하고 (Mallat Z 외, *Circ Res*. 2001, 88, 998-1003) 세포괴사 (cell necrosis)를 초래하며 그 결과 세포내 물질들과 염증친화적인 물질들이 분비되어 염증 반응을 더욱 심화시키게 된다. 이러한 이유로 동맥경화 초기단계의 단핵구가 혈관 내피세포에 소환되어 부착되는 초기 과정에 관여하는 셀렉틴, 세포부착분자들 그리고 인테그린들과의 상호작용을 억제하는데 관여하는 새로운 약들이 개발 중에 있다 (Bianca C.H 외, *Curr Opin Lipidol*, 2004, 15, 545-552). 첫째로, 부착분자들에 대한 비특이적인 억제제로서 일반적으로 전사조절이나 세포내 신호를 전달하여 부착분자들의 발현 감소를 유도하는 경우가 있다. 둘째로, 셀렉틴 류, 특히 P-셀렉틴을 특이적으로 저해하는 억제제가 초점이 되고 있다 (Lefer DJ 외, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 2000, 283-294). 마지막으로 맥관의 세포유착분자 (VCAM, vascular cell adhesion molecule) 혹은 세포간 접착분자 (ICAM, intercellular adhesion molecule)에 특이적으로 반응하는 억제제나 이들 분자들과 결합하는 VLA-4 (Very Late Antigen-4, CD49d/CD29) 혹은 Mac-1 (αMβ2, CD11b/CD18)과 같은 인테그린들을 특이적으로 억제하는 약들이 개발 중에 있다.

<3> 이러한 관점에서, 본 발명자들은 혈관 내피세포에 있는 부착분자들에 특이적으로 결합하고, 부착분자들의 발현 감소를 유도하며, 인테그린들과의 결합을 저해하고, 단핵구의 혈관 내피세포로의 이동을 억제하는 뱀독 유래 디스인테그린인 삭사틸린의 동맥경화증 억제제로서의 가능성을 제시하고자 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<4> 본 발명의 목적은 동맥경화 초기단계에서 면역세포들의 혈관 내피세포로의 부착, 소환 그리고 이동에 대한 뱀독 유래 신규 디스인테그린인 삭사틸린의 억제제로서의 용도를 제공하고자 한다.

과제 해결수단

<5> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 초기 동맥경화 발생 유발인자들의 억제제를 제공한다.

<6> 또한 본 발명은 삭사틸린이 세포부착 및 세포이동을 억제함으로써 염증반응을 더욱 심화시키는 세포내 물질들과 염증친화적인 물질들의 억제제를 제공한다.

<7> 따라서, 본 발명은 뱀독 유래의 디스인테그린인 삭사틸린을 유효성분으로 함유하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

효 과

<8> 본 발명에 따르면, 뱀독 유래의 디스인테그린인 삭사틸린은 인간 유래의 혈관 내피세포가 혈액 내 존재하는 단핵구 및 대식세포를 염증부위로 소환하고, 소환된 단핵구 및 대식세포를 부착 이동시킴에 있어서, 부착인자

(adhesion molecule)와 화학(주성)유인물질 발현을 감소하고, 내피세포로의 이동을 저해함으로써 이를 억제하는 효과가 있다.

<9> 따라서, 뱀독 유래의 디스인테그린인 삭사틸린은 면역세포들의 혈관 내피세포의 부착, 소환 및 이동에 의한 초기 동맥경화 발생 유발인자들을 억제함으로써 동맥경화증의 예방 또는 치료에 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<10> 이하 본 발명을 구체적으로 설명한다.

<11> 본 발명은 뱀독 유래의 삭사틸린을 유효성분으로 함유하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물을 제공함을 특징으로 한다.

<12> 삭사틸린은 뱀독에 유래한 디스인테그린으로서, Arg-Gly-Asp (RGD) 서열을 가지며, 암세포의 성장과 혈관신생을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 삭사틸린은 특히 혈소판 혹은 혈관 내피세포 그리고 여러 가지 암세포들에서 많이 발현되는 alphaIIbbeta3와 avb3 인테그린과 결합하며, 인테그린 IIb3에 대항제로서 혈소판 응집을 억제하고, 혈관 내피세포 증식을 유발하는 bFGF와 평활근세포의 이동을 유발하는 비트로넥틴 (vitronectin)을 억제하는 것으로 알려져 있다.

<13> 본 발명의 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 삭사틸린은 한국산 칠점사 (*Agkistrodon saxatilis* emelianov)의 독소에서 분리 정제한 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것임을 특징으로 한다. 상기 야생형 삭사틸린은 대한민국 공개특허 제2002-0064787호에 기재된 방법에 따라 분리 정제하여 사용하였다.

<14> 본 발명의 동맥경화증 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 삭사틸린은 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) Y/pPSAX KCCM-10201 균주 배양액에서 분리한 재조합 삭사틸린 단백질인 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 상기 삭사틸린 재조합 단백질은 RGD 루프내의 49번과 55번 아미노산이 메티오닌인 단백질 삭사틸린을 코딩하는 서열번호 2의 cDNA를 주형으로 하고, 서열번호 3과 4에 기재된 프라이머를 이용하여 PCR 증폭된 산물이 삽입되어 있는 재조합벡터로 형질전환된 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) Y/pPSAX KCCM-10201 균주 배양액에서 분리한 것을 사용한다. 보다 구체적으로는, 상기 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) Y/pPSAX KCCM-10201 균주를 pH 5.5~6.5, 25~35℃에서 12~24 시간 동안 배양한 다음, 배양물을 원심분리하여 수득한 세포를 0.5~1.5%(v/v)의 메탄올을 포함하는 pH 5.5~6.5, 25~35℃에서 72~120시간 동안 다시 배양하는 단계와, 상기 배양액을 소수성컬럼과 고성능 액체 크로마토그래피에 적용하는 단계를 거쳐 분리 정제된 재조합 삭사틸린 단백질을 사용한다.

<15> 상기 메탄올을 포함하는 배지는 최소 글리세롤 배지에 탄소원으로서 배지에 대하여 0.1~1.0%(v/v), 바람직하게는 0.3~0.8%(v/v), 가장 바람직하게는 0.5%(v/v)의 메탄올을 함유한 배지이다. 또한, 최소 메탄올 배지에서 배양할 때, 배양 조건은 25~35℃, 바람직하게는 28~32℃, 가장 바람직하게는 72~120시간, 바람직하게는 84~108시간, 가장 바람직하게는 96시간 동안 배양한다.

<16> 또한, 본 발명의 삭사틸린을 유효성분으로 함유하고 약제학적으로 허용가능한 담체를 첨가한 약제학적 조성물은 주사 형태로 투여할 수 있다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

<17> 본 발명의 삭사틸린의 투여량은 환자의 연령, 체중 및 질환의 정도에 따라 차이가 있으나, 동맥경화증 치료제로 사용되는 경우, 통상 성인 (체중 60kg 기준)의 경우 비경구로 1일 1회 20~52mg으로 투여하는 것이 바람직하며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 경험에 의하여 적절히 결정될 수도 있다.

<18> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<19> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<20> <실시예 1> TNF-alpha에 의해 유도된 세포이동에 삭사틸린이 미치는 영향

<21> 디스인테그린인 삭사틸린이 단핵구의 인간의 혈관 내피세포로의 세포이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 96-well microchemotaxis assay system을 통해 수행하였다.

<22> 삭사틸린은 대한민국 공개특허 제2002-0064787호에 기재된 방법에 따라 분리 정제한 뱀독 유래의 야생형 삭사틸린 단백질, 또는 상기 특허에 기재된 방법에 따라 분리 정제한 재조합 삭사틸린 단백질을 사용하였다.

<23> 야생형 삭사틸린 단백질을 분리 정제하기 위해서는, 한국산 칠점사 (*Agkistrodon saxatilis* emelianov)로부터 채취한 조 (crude)독소 1mL (302.4mg)을 PBS로 평형화시킨 세파덱스 젤 여과 컬럼 (Sephadex G-75 gel-filtration column, 1.8×100cm)에 주입시킨 다음, 20mL/hour의 유속으로 용출시키며 삭사틸린의 활성분획을 수득하였다. 이중 혈소판 응집을 저해하는 활성분획 중 가장 주요한 분획이, Native-PAGE 젤 상에서 7,000 내지 10,000 달톤 (dalton)의 분자량으로 나타나는 단백질을 포함하는 분획임을 확인한 다음, 이 분획을 모아 0.1%(v/v) TFA (trifluoroacetic acid)를 포함하는 증류수로 평형화시킨 역상 HPLC 컬럼 (reverse-phase C18 HPLC column, 7.8×300mm)에 주입시키고, 0.1 %(v/v) TFA를 포함하는 아세토니트릴 (acetonitrile)로 5 내지 45%까지 선형구배 (linear gradient)를 걸어 단백질을 용출시킨 결과, 삭사틸린은 아세토니트릴의 농도가 21%되는 지점에서 용출되었다. 정제된 삭사틸린의 농도를 BCA 정량법을 통해 확인하고, 이를 전체 정제공정의 효율과 비교하였을 때, 전체 뱀독으로부터 얻어진 야생형 삭사틸린의 최종 정제효율은 0.2%임을 알 수 있었다. 야생형 삭사틸린의 아미노산 서열은 서열목록 서열번호 1에 기재하였다.

<24> 재조합 삭사틸린 단백질을 분리하기 위해서는, 제한효소(*Xho*I) 염기서열과 단백질 분해효소인 KEX2로 절단될 수 있는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하는 N-말단 프라이머인 5'-CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCCGGAGAAGAATGT-3' (서열번호 3), 두 개의 번역종결 코돈(stop codon)과 *Eco*RI 제한효소 부위를 포함하는 C-말단 프라이머인 5'-CGGAATTCTCATTAGGCATGGAAGGGA-3' (서열번호 4) 및 주형으로서 삭사틸린 cDNA (서열번호 2)를 사용하여 PCR 증폭 후 얻은 약 250bp의 DNA절편을 발현벡터 pPIC9 (8.0kbp)의 α-factor 분비신호단백질 C-말단부위에 삽입하여 삭사틸린의 발현벡터 pPSAX (8.3kbp)를 작제하였다(참조: 도 1). 이를 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) GS115 컴피턴트 세포에 도입하여 형질전환 균주, 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) Y/pPSAX KCCM-10201를 제조하였다. 상기 균주를 최소 글리세롤 배지 (100mM sodium phosphate pH 6.0, Yeast Nitrogen Base 1.34%, biotin 4×10^{-5} %, glycerol 1%) 1L에 접종한 다음, 30℃에서 세포농도가 O.D 600 1.0이 될 때까지 배양하고, 배양물을 3,000×g에서 원심분리하여 배지가 제거된 세포만을 수득하며, 수득한 세포를 최소 메탄올 배지 (100mM sodium phosphate pH 6.0, Yeast Nitrogen Base 1.34%, biotin 4×10^{-5}%, methanol 0.5%)에 현탁시키고, 30℃에서 배양하여 재조합 삭사틸린의 발현을 유도하였다. 이어, 24시간 간격으로 메탄올을 0.5%의 농도로 첨가하며 96시간 동안 배양하였다. 상기 균주 배양액을 5000×g에서 원심분리하여 수득하고, 이를 1.5M 암모늄 설페이트 용액으로 평형화시킨 페닐-세파로스(Phenyl-sepharose, Bio-Rad, U.S.A.)가 충진된 컬럼(1.3×20cm)에 주입한 다음, 1M 암모늄 설페이트 용액을 20mL/hour의 유속으로 용출시켜 삭사틸린 활성분획을 수득하였다. 이어, 활성분획을 0.1%(v/v) TFA를 포함하는 증류수로 평형화시킨 HPLC 컬럼 (source 30 RPC column, 7.8×300mm)에 주입시키고, 0.1%(v/v) TFA를 포함하는 0 내지 50%(v/v)의 아세토니트릴 선형구배 (linear gradient)를 걸어 단백질을 용출시켜, 순수분리된 삭사틸린을 수득하였다. 이때, 제조 수율은 배양액 1L당 107mg임을 알 수 있었다.

<25> 인간 단핵구 (Human monocyte)인 THP-1 (ATCC, Manassas,VA,USA)세포 2×10^{4}개를 위 챔버에 농도 별 (0~400nM)로 삭사틸린과 함께 로딩하고 아래 챔버에는 화학(주성)유인물질인 20ng/mL의 TNF-alpha를 넣고 5% 가습된 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃, 6시간 동안 배양하였다. 아래 챔버 바닥 필터에 위치한 세포를 PBS에 녹인 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)로 10분간 실온에서 고정시킨 후 헤마톡실린 (hematoxylin)과 에오신 와이 (eosin Y)로 염색하였다. 세포이동은 필터를 통과한 세포수로 확인하였다.

<26> 도 2에 나타난 바와 같이, 화학(주성)유인물질 처리에 의해 증가된 세포수가 삭사틸린을 농도별로 처리하였을 때 삭사틸린 의존적으로 80% 이상 감소되는 것을 확인하였다.

<27> 다음으로, TNF-alpha를 포함한 여러 가지 다른 화학(주성)유인물질로서 N-포밀 메티오닐-루실-페닐알라닌 (N-formyl methyonyl-leucyl-phenylalanine, fMLP), 리포폴리사카라아드 (lipopolysaccharide, LPS), CpG-DNA, PMA와 TPA를 처리하였고, 200nM의 삭사틸린을 위 판넬과 아래 판넬에 처리하여 화학(주성)유인물질에 의해 증가한 세포수가 어떻게 변화하는 가를 확인하였다.

<28> 도 3에 나타난 바와 같이, 아래 판넬의 무혈청RPMI 1640 배지에 화학(주성)유인물질과 삭사틸린을 같이 처리한 실험에서보다 위 판넬의 단핵구에 삭사틸린을 직접 처리하였을 때 세포이동이 급격히 감소하는 것을 확인하였다.

<29> 다음으로, 인간 유래의 혈관 내피세포(human umbilical vein endothelial cells: HUVEC)를 아교질분해효소(collagenase)를 처리하여 인간탯줄정맥(human umbilical cord vein)에서 분리하였고, 분리한 혈관 내피세포를 트랜스웰에 도포하여 세포이동 (transmigration) 실험을 실시하였다. 세포이동 실험은 폴리카보네이트 필터(8.0μm pore)를 가진 트랜스웰 챔버를 이용하여 실험하였다. HUVEC을 필터 윗부분에 도포하고 가습상태의 5% CO_2 인큐베이터에서 20% 우태아혈청 (fetal bovine serum), 5,000 유니트의 헤파린, 그리고 3ng/mL basic FGF가 포함된 M199 배지에서 2일 동안 배양하였다. HUVEC으로 가득 찬 필터를 혈청이 들어있지 않은 M199 배지로 세척한 후 2×10^4의 THP-1 세포를 로딩하고, 상기와 같은 방법으로 실험하였다.

<30> 도 4에 나타난 바와 같이, 여러 가지 화학(주성)유인물질에 의해 증가한 세포이동이 삭사틸린에 의해 감소하는 것을 확인하였다.

<31> <실시예 2> 삭사틸린에 의한 세포부착분자의 발현

<32> 동맥경화의 초기단계는 단핵구 혹은 백혈구들이 동맥혈관벽에 소환되는 염증반응에 의존한다. 따라서 위와 같은 반응을 디스인테그린인 삭사틸린을 처리하였을 때 단핵구가 내피세포로 이동하는데 관여하는 부착분자를 억제하는지를 조사하기 RT-PCR을 수행하였다.

<33> 세포부착분자의 발현은 삭사틸린을 200nM 농도로 THP-1 세포에 처리하고 8시간 후 총 RNA를 총 RNA 분리 키트를 사용하여 확인하였다. 7㎍의 총 RNA를 6㎍/mL oligo (dT) primer, 50U StrataScript™ reverse transcripatase, 2mM dNTP, 그리고 40U RNase Block Ribonuclease Inhibitor를 포함하는 퍼스트-스트랜드 버퍼(first-strand buffer)와 함께 역전사하였다. 반응은 42℃에서 1시간 수행하였다. cDNA 1㎕를 아래와 같은 프라이머를 이용하여 standard PCR을 수행하였다. PCR반응은 열변성(denaturation) 95℃, 1분, 주형과 프라이머 결합(annealing) 58℃, 1분 및 프라이머 연장반응(polymerization) 72℃, 1분을 1 사이클로 하여 25 사이클을 실시하였다:

<34> ① human E-slelctin:

<35> Forward primer(서열번호 5): 5'-GTT TTT CTA AAC AGC CTG ACA CTG-3'

<36> Reverse primer(서열번호 6): 5'-GCT GTA ATG ATA AGT CCA TGC TGC-3'

<37> ② human ICAM-1:

<38> Forward primer(서열번호 7): 5'-TCT CGT GCC GCA CTG AAG TCG AC-3'

<39> Reverse primer(서열번호 8): 5'-CCT TCT GAG ACA TCT GGC TTC GT-3'

<40> ③ human MCP-1:

<41> Forward primer(서열번호 9): 5'-AGC ATG AAA GTC TCT GCC GCC CTT CTG-3'

<42> Reverse primer(서열번호 10): 5'-ATT ACT TAA GGC ATA ATG TTT CAC A-3'

<43> ④ GAPDH:

<44> Forward primer(서열번호 11): 5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3'

<45> Reverse primer(서열번호 12): 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'

<46> PCR 단편은 1% 아가로스 젤을 이용하여 전기영동 하였고, 에티디움 브로마이드로 염색하여 UV에서 확인하였다.

<47> 도 5에 나타난 바와 같이, 세포부착분자인 P-셀렉틴과 ICAM-1의 mRNA 양이 감소하였고, 또한 화학(주성)유인물질인 MCP-1의 mRNA 양도 확연히 감소하였다.

<48> 상기 결과로부터, 삭사틸린을 처리하였을 때 세포의 이동이 감소하는 것은 위와 같은 세포부착분자와 화학(주성)유인물질의 변화에 기인하는 것이라고 사료된다.

<49> <실시예 3> 삭사틸린이 단핵구와 내피세포간 부착에 미치는 영향

<50> HUVEC 를 가습상태의 5% CO_2 인큐베이터에서 20% 우태아혈청, 5,000 유니트의 헤파린, 그리고 3ng/mL basic FGF가 포함된 M199 배지에서 2일 동안 배양하였다. 배양한 HUVEC에 200nM 삭사틸린을 2시간 처리한 후 TNF-alpha를 12시간 처리하였다. 지수기 (exponential growth phase)에 있는 THP-1을 무혈청 RPMI 1640 배지로 세척한 후

같은 배지에 THP-1 세포를 2×10^4만큼 현탁하였다. 100㎕의 THP-1 현탁액을 HUVEC 단층을 포함하는 웰에 첨가하고 37℃에서 20분간 배양하였다. HUVEC과 결합하지 않은 세포들을 무혈청 RPMI 1640 배지로 3번 씻어낸 후 HUVEC에 부착된 THP-1 세포를 웰 당 무작위적으로 4군데를 선정하여 세포의 총 개수를 계산하였다.

<51> 도 6에 나타난 바와 같이, 삭사틸린을 처리하였을 때 단핵구가 HUVEC 단층에 부착하는 것을 85% 정도가 감소되는 것으로 확인하였다.

<52> <실시예 4> 삭사틸린을 처리한 HUVEC에서 화학(주성)유인물질인 IL-8 단백질의 발현

<53> 삭사틸린에 의해 단핵구의 이동이 감소하는 메커니즘을 규명하기 위해 화학(주성)유인물질인 IL-8의 발현수준을 HUVEC에 삭사틸린을 처리한 후와 처리하지 않은 경우로 나누어서 조사하였다. 1×10^6개의 HUVEC에 200 nM의 삭사틸린을 2시간 먼저 처리한 후 20ng/mL TNF-alpha, fMLP, LPS, CPG, PMA, TPA를 처리하여 IL-8의 발현 수준을 효소면역측정법(ELISA)을 통하여 확인하였다.

<54> 도 7에 나타난 바와 같이, HUVEC을 TNF-alpha 를 포함한 여러 가지 화학(주성)유인물질 자극을 주기 2시간 전에 삭사틸린을 처리하였을 때 IL-8의 발현은 확연히 감소하였다.

<55> 상기 결과로부터, 세포 이동 시 분비되는 세포부착분자 (E-selectin, ICAM-1)의 mRNA 수준의 감소, 단핵구와 내피세포간의 부착 저해. 그리고 화학(주성)유인물질인 IL-8의 발현 감소들을 확인함에 따라 뱀독 유래의 삭사틸린은 초기동맥경화 억제제로서의 큰 효능을 보일 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

<56> 도 1은 삭사틸린의 발현벡터인 pPSAX의 유전자지도이다.

<57> 도 2는 뱀독 유래의 삭사틸린을 농도 별로 처리하여 단핵구의 이동을 억제하는 효과를 나타내는 그래프이다.

<58> 도 3은 젤라틴을 도포한 트랜스웰에서 여러 종류의 화학(주성)유인물질 자극에 의해 증가된 단핵구의 세포이동에 대한 삭사틸린의 억제효과를 나타내는 그래프이다.

<59> 도 4는 인간 유래의 혈관 내피세포를 도포한 트랜스웰에서 삭사틸린을 처리하였을 때 단핵구의 이동을 억제하는 효과를 나타내는 그래프이다.

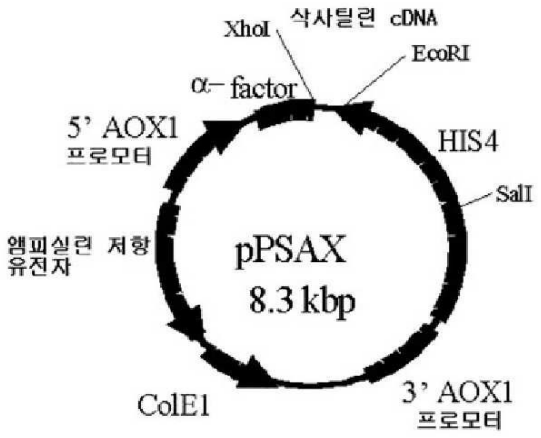
<60> 도 5는 삭사틸린에 의한 부착분자의 발현 억제를 나타내는 젤 사진도이다.

<61> 도 6은 삭사틸린을 처리에 의한 단핵구와 인간 유래의 혈관 내피세포 사이의 부착 억제를 나타내는 그래프이다.

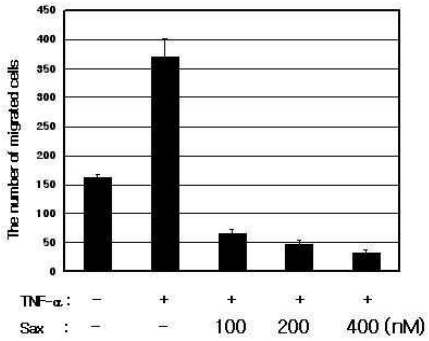
<62> 도 7은 삭사틸린에 의한 화학(주성)유인물질인 IL-8의 발현 억제를 나타내는 그래프이다.

도면

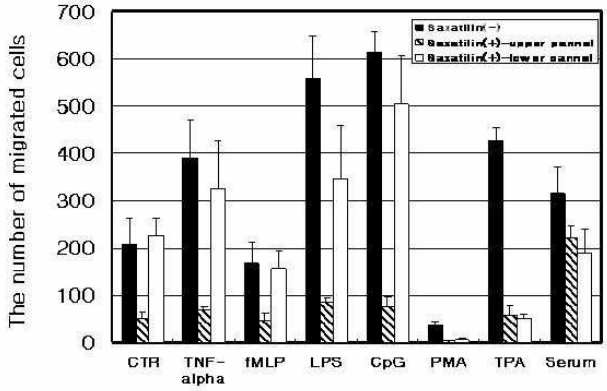
도면1



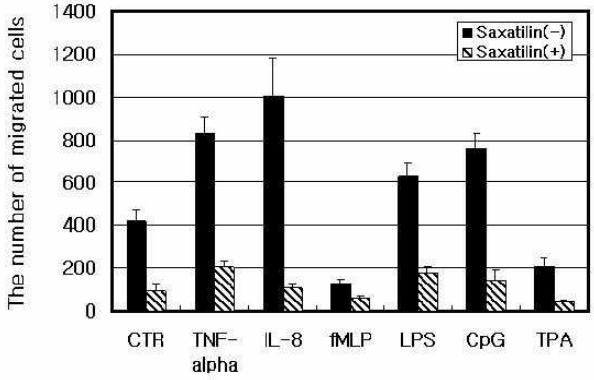
도면2


The number of migrated cells
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
TNF-α : − + + + +
Sax : − − 100 200 400 (nM)

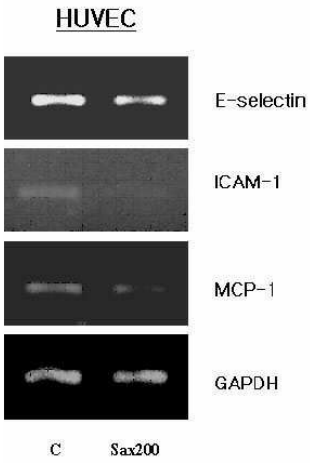
도면3


The number of migrated cells
700
600
500
400
300
200
100
0
Saxatilin(−)
Saxatilin(+)-upper pannel
Saxatilin(+)-lower pannel
CTR
TNF-alpha
fMLP
LPS
CpG
PMA
TPA
Serum

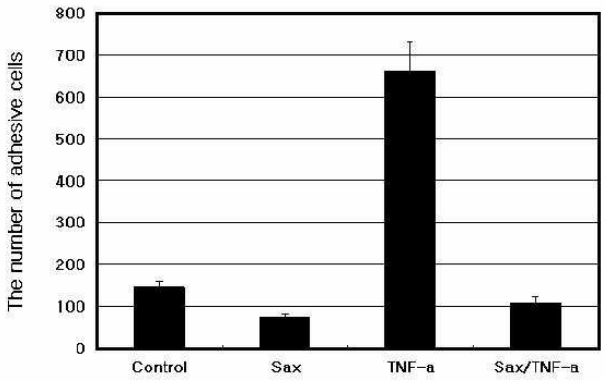
도면4


The number of migrated cells
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Saxatilin(−)
Saxatilin(+)
CTR
TNF-alpha
IL-8
fMLP
LPS
CpG
TPA

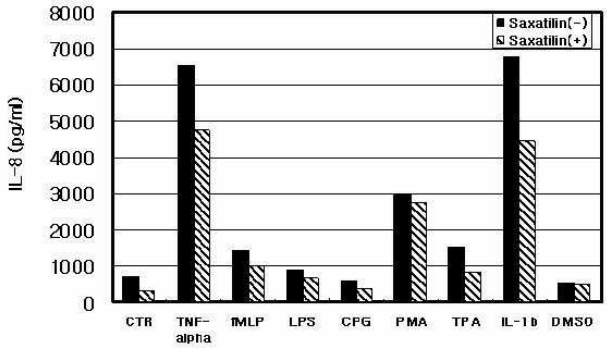
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> A composition for preventing or treating arteriosclerosis comprising saxatilin, a snake venom disintegrin

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 73
<212> PRT
<213> Agkistrodon saxatilis emelianov

<400> 1
Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ala Pro Ala Asn Pro Cys Cys
1 5 10 15

Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly
20 25 30

Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg
35 40 45

Met Ala Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala
50 55 60

Gly Cys Pro Arg Asn Pro Phe His Ala
65 70

<210> 2
<211> 213
<212> DNA
<213> Agkistrodon saxatilis emelianov

<400> 2
ggagaagaat gtgactgtgg cgctcctgca aatccgtgct gcgatgctgc aacctgtaaa 60

ctgagaccag gggcgcagtg tgcagaagga ctgtgttgtg accagtgcag atttatgaaa 120

gaaggaacaa tatgccggat ggcaaggggt gatgacatgg atgattactg caatggcata 180

tctgctggct gtcccagaaa tcccttccat gcc 213

<210> 3

<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer: saxatilin

<400> 3
ccgctcgaga aaagagaggc cggagaagaa tgt 33

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer: saxatilin

<400> 4
cggaattctc attaggcatg gaaggga 27

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer: human E-slelctin

<400> 5
gtttttctaa acagcctgac actg 24

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer: human E-slelctin

<400> 6
gctgtaatga taagtccatg ctgc 24

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer: human ICAM-1

<400> 7
tctcgtgccg cactgaagtc gac 23

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer: human ICAM-1

<400> 8
ccttctgaga catctggctt cgt 23

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward priemr: human MCP-1

<400> 9
agcatgaaag tctctgccgc ccttctg 27

<210> 10
<211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer: human MCP-1

<400> 10
attacttaag gcataatgtt tcaca 25

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer: GAPDH

<400> 11
ccacccatgg caaattccat ggca 24

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer: GAPDH

<400> 12
tctagacggc aggtcaggtc cacc 24