



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년01월12일
(11) 등록번호 10-0877824
(24) 등록일자 2009년01월02일

(51) Int. Cl.

C07K 1/00 (2006.01) C07K 1/06 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 15/867 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2005-0108014

(22) 출원일자 2005년11월11일

심사청구일자 2007년01월30일

(65) 공개번호 10-2007-0050611

(43) 공개일자 2007년05월16일

(56) 선행기술조사문헌

US 20030003564 A1

The Journal of Urology, 2003, vol. 170, pp 588-592.

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자

임동수

대전 유성구 신성동 한올아파트 107동 604호

정초록

대전 유성구 신성동 118-27번지 장방아트빌라 303호

황경선

대전 서구 만년동 281, 상록수아파트 108동 501호

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 26 항

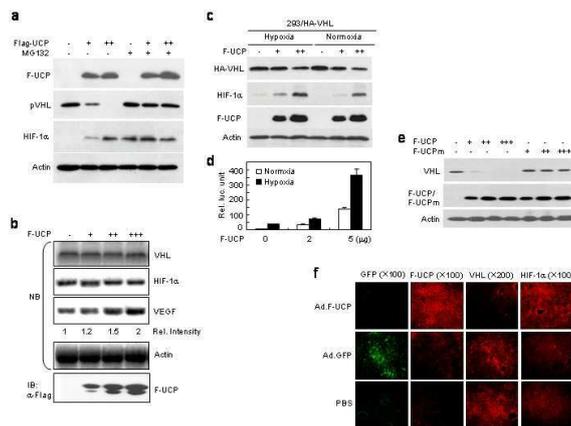
심사관 : 손영희

(54) E2EPF UCP-VHL 상호작용 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 E2^{EPF} UCP-VHL 상호작용 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 UCP의 활성조절을 통하여 VHL의 활성을 증가시키거나 감소시킴으로써 암세포의 증식을 저해시키거나 혈관의 생성을 증가시키는 방법에 관한 것으로서 UCP의 활성억제는 UCP의 mRNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA (RNAi), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, 저분자 화합물, UCP 단백질에 결합하는 펩타이드, 펩티드 미메틱스, 항체로 이루어진 군으로 부터 선택된 UCP의 활성억제제를 통해 이루어지고 혈관생성증가는 유전자 전달체를 이용한 UCP 유전자의 과발현을 통한 세포내 VHL농도의 감소를 통한 HIF-1 α 의 안정화에 따른 혈관생성인자(VEGF)의 발현 촉진을 통해 이루어진다. 본 발명의 UCP 활성조절 방법은 VHL의 활성을 증가시키거나 감소시켜 항암제 및 신혈관 생성 유도제의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

E2EPF UCP(ubiquitin carrier protein)의 활성 억제를 통하여 VHL(von Hippel-Lindau)의 활성을 증가시키는 방법.

청구항 2

E2EPF UCP의 활성 억제를 통하여 HIF의 안정성을 감소시키는 방법.

청구항 3

E2EPF UCP의 활성 억제를 통하여 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현을 억제하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 E2EPF UCP의 활성 억제는 E2EPF UCP의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 펩티드 미메틱스, 폴리뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA, RNAi, 화합물 및 E2EPF UCP 단백질에 결합하는 펩타이드, 항체 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 E2EPF UCP의 활성 억제제를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 작은 간섭 RNA는 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

E2EPF UCP의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 펩티드 미메틱스, 폴리뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA, RNAi, 화합물 및 E2EPF UCP 단백질에 결합하는 펩타이드, 항체 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 E2EPF UCP의 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 6항에 있어서, 작은 간섭 RNA는 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 하는 항암제.

청구항 9

E2EPF UCP의 활성 증가를 통하여 VHL의 활성을 감소시키는 방법.

청구항 10

E2EPF UCP의 활성 증가를 통하여 HIF의 안정성을 증가시키는 방법.

청구항 11

E2EPF UCP의 활성 증가를 통하여 VEGF의 발현을 촉진하는 방법.

청구항 12

제 9항에 있어서, E2EPF UCP의 활성 증가는 E2EPF UCP 프로모터에 작용하여 E2EPF UCP mRNA의 발현을 유도하는 제제, E2EPF UCP의 발현을 유도하는 플라스미드 또는 바이러스 유전자 전달체를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

E2EPF UCP의 활성 증가제, E2EPF UCP 유전자가 도입된 발현벡터 또는 E2EPF UCP 단백질을 유효성분으로

함유하는 VEGF 발현 촉진제.

청구항 14

E2EPF UCP의 활성 증가제, E2EPF UCP 유전자가 도입된 발현벡터 또는 E2EPF UCP 단백질을 유효성분으로 함유하는 신생혈관 촉진제.

청구항 15

제 13항에 있어서, E2EPF UCP의 활성 증가제는 E2EPF UCP 프로모터에 작용하여 E2EPF UCP mRNA의 발현을 유도하는 제제, E2EPF UCP의 발현을 유도하는 플라스미드 또는 바이러스 유전자 전달체인 것을 특징으로 하는 촉진제.

청구항 16

- 1) E2EPF UCP의 전사 조절에 관여하는 전사인자를 찾는 단계;
- 2) 상기 전사인자를 조절하는 물질을 선발(screening)하는 단계; 및
- 3) 상기 물질이 E2EPF UCP 유전자의 발현을 조절하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 구성된 E2EPF UCP 활성 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 17

암의 진단, 치료 결과 확인 또는 예후를 평가하기 위하여, E2EPF UCP와 반응하는 항체 또는 E2EPF UCP 유전자에 상보적인 핵산 중 어느 하나 이상을 사용하여 E2EPF UCP 발현을 측정하는 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

E2EPF UCP와 반응하는 항체 또는 E2EPF UCP 유전자에 상보적인 핵산 중 어느 하나 이상의 물질을 포함하는 암 진단키트.

청구항 20

삭제

청구항 21

- 1) 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 플라스미드에 클로닝하는 단계; 및
- 2) 상기 플라스미드를 바이러스성 발현벡터에 도입하는 단계로 구성된 E2EPF UCP-siRNA 발현벡터의 제조방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 상기 바이러스성 발현벡터는 아데노-부속 바이러스, 레트로바이러스, 백시니아바이러스 또는 암세포 용해성 바이러스로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 E2EPF UCP-siRNA 발현벡터의 제조방법.

청구항 23

제 2항에 있어서, 상기 E2EPF UCP의 활성 억제제는 E2EPF UCP의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 펩티드 미메틱스, 폴리뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA, RNAi, 화합물 및 E2EPF UCP 단백질에 결합하는 펩타이드, 항체 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 E2EPF UCP의 활성 억제제를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 작은 간섭 RNA는 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 3항에 있어서, 상기 E2EPF UCP의 활성 억제제는 E2EPF UCP의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 펩티드 미메틱스, 폴리뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA, RNAi, 화합물 및 E2EPF UCP 단백질에 결합하는 펩타이드, 항체 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 E2EPF UCP의 활성 억제제를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 작은 간섭 RNA는 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 10항에 있어서, E2EPF UCP의 활성 증가는 E2EPF UCP 프로모터에 작용하여 E2EPF UCP mRNA의 발현을 유도하는 제제, E2EPF UCP의 발현을 유도하는 플라스미드 또는 바이러스 유전자 전달체를 이용하는 것으로 하는 방법.

청구항 28

제 11항에 있어서, E2EPF UCP의 활성 증가는 E2EPF UCP 프로모터에 작용하여 E2EPF UCP mRNA의 발현을 유도하는 제제, E2EPF UCP의 발현을 유도하는 플라스미드 또는 바이러스 유전자 전달체를 이용하는 것으로 하는 방법.

청구항 29

제 14항에 있어서, E2EPF UCP의 활성 증가제는 E2EPF UCP 프로모터에 작용하여 E2EPF UCP mRNA의 발현을 유도하는 제제, E2EPF UCP의 발현을 유도하는 플라스미드 또는 바이러스 유전자 전달체인 것을 특징으로 하는 촉진제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<27> 본 발명은 E2_{EPF}UCP-VHL 상호작용 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 UCP의 활성조절을 통하여 VHL의 활성을 증가시키거나 감소시킴으로써 암세포의 증식을 저해시키거나 혈관의 생성을 증가시키는 방법에 관한 것으로서 UCP의 활성억제는 UCP의 mRNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA (RNAi), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 저분자 화합물, UCP 단백질에 결합하는 펩타이드, 펩티드 미메틱스, 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 UCP의 활성억제제를 통해 이루어지고 혈관생성증가는 유전자 전달체를 이용한 UCP 유전자의 과발현을 통한 세포내 VHL농도의 감소를 통한 HIF α의 안정화에 따른 혈관생성인자(VEGF)의 발현 촉진을 통해 이루어진다.

<28> E2_{EPF}-UCP(E2 Endemic pemphigus foliaceus ubiquitin carrier protein)는 사람의 각질세포에서 최초로 분리되었으며 E2 유비퀴틴 결합 효소군(ubiquitin conjugating enzyme family)에 속하는 단백질로, 시험관내에서 E3 유비퀴틴 리가제(ubiquitin ligase)의 E2 유비퀴틴 전달체(ubiquitin carrier) 단백질로 기능하기도 하고, UCP 단독으로 E3 유비퀴틴 리가제 활성을 나타내는 단백질로서 자가/다중유비퀴틴화(auto/multiubiquitination)를 일으키는 것으로 알려져 있다(Liu Z. et al., JBC 267, 15829-15835, 1992; Liu Z. et al., JBC 271, 2817-2822, 1996; Baboshina OV and Haas AL., JBC 271, 2823-2831, 1996). 또한, UCP의 염기서열은 유방암의 예후 인자로 보고되었고(Mutter GL and Baak JPA., J Clin Pathol. 58(1):1-6, 2005; 미국 특허 US 6703204), 난소암을 포함하는 각종 암 조직에서 정상조직에 비해 약 5배 정도 과발현되어 있는 것

으로 알려져 있다(Welsh JB et al., PNAS USA 98, 1176-81, 2001; Wagner KW, Oncogene 23, 6621-6629, 2004). 그러나, UCP의 특이적인 기질, 세포내 기능 및 암 발생, 진행, 전이, 혈관생성과의 상관성은 밝혀지지 않고 있다.

<29>

암 억제 유전자인 VHL(von Hippel-Landau)의 변이는 신장암, 중추신경계 및 망막의 혈관모세포종(hemangioblastoma)의 발생과 밀접하게 연계되어 있다(Kaelin WG Jr., Nat Rev Cancer 2, 673-682, 2002; Curr Opi Gen Dev 13, 56-60, 2003; Trends Mol Med 10, 146-149, 2004; Trends Mol Med 10, 466-472, 2004). 암 세포에 VHL을 과발현시키면, 암 세포의 성장이 저해된다(Gene Ther 10, 2081-2089, 2003). VHL 단백질은 Elongin B 및 C, Rbx1, Cullin2와 함께 다중 복합체(multiple complex)를 이루어 E3 유비퀴틴 리가제(ubiquitin ligase) 활성을 나타낸다(Nat Rev Cancer 2, 673-682, 2002; Curr Opi Gen Dev 13, 56-60, 2003; Trends Mol Med 10, 146-149, 2004; Trends Mol Med 10, 466-472, 2004). 이때 VHL은 기질을 인지하는 기능을 수행한다(Nat Rev Cancer 2, 673-682, 2002; Curr Opi Gen Dev 13, 56-60, 2003; Trends Mol Med 10, 146-149, 2004; Trends Mol Med 10, 466-472, 2004). VHL E3 리가제의 대표적인 기질은 HIF1 α 및 HIF2 α 인데 이들은 산소가 존재할 경우 프롤린 수산화효소(proline hydroxylase)에 의해 수산화(hydroxylation)되고 수산화된 HIF α 들은 VHL과 결합된 다음 VHL E3 리가제에 의해 유비퀴틴화(ubiquitylation)되고 26S 프로테아좀에 의해 분해된다(Nat Rev Cancer 2, 673-682, 2002; Curr Opi Gen Dev 13, 56-60, 2003; Trends Mol Med 10, 146-149, 2004; Trends Mol Med 10, 466-472, 2004). 또한, HIF1 α 혹은 HIF2 α 는 HIF1 β 와 결합하여 HIF1 혹은 HIF2 전사 조절인자로 작용하여 산소농도에 따른 세포의 항상성을 유지하는데, HIF1 α 혹은 HIF2 α 는 저산소 조건에서 활성화되며(HIF α 들의 프롤린 수산화가 일어나지 않아 VHL E3 유비퀴틴 리가제에 의해 분해되지 않기 때문임), 이들에 의해 전사가 활성화되는 유전자들은 VEGF, 안지오펜이에틴(angiotensin 2), 에리스로포이에틴(erythropoietin), glut1 등과 같은 유전자들이다(Nat Med 9, 677-684, 2003). VEGF는 혈관생성에 중요한 세포성장인자이다(Nat 359, 843-845, 1992; Nat 359, 845-848, 1992). 암세포는 혈관을 통한 산소와 영양분의 공급없이는 증식하지 못하므로 HIF-VEGF 경로는 암의 증식, 전이 및 혈관생성에 관여하며(PNAS USA 94, 8104-8109, 1997; Can Res 60, 4010-4015, 2000), HIF 저해제 및 VEGF의 경로를 차단하는 물질들은 항암제로서 개발되고 있으며(Ophthalmology 109, 1745-1751, 2002), 일부는 실제로 실용화(예, Avastin)되고 있다(Proc Am Soc Clin Oncol 21, 15, 2002).

<30>

상기와 같이 VEGF의 활성을 억제하는 물질로 항암제를 개발하는 것과 반대로 VEGF의 활성을 증가시켜 허혈성 질환(ischemic diseases) 등 혈관질환을 치료하는 연구도 활발히 진행중이다. 허혈성 질환은 혈류의 흐름이 막혀 일어나는 심혈관 질환을 포함하는 것으로 허혈성 심근경색(myocardial ischemia) 및 허혈성 말초혈관 질환(peripheral vascular disease)이 이에 해당한다. 막힌 혈류의 흐름을 원활하게 하기위해 VEGF 유전자 등 새로운 혈관을 유도하는 유전자들이 상기 허혈성 질환 치료에 이용되고 있고(Yla-Herttuala S and Alitalo K. Nat Med. 9(6):694-701, 2003; Khan TA et al., Gene Ther. 10(4):285-91, 2003) VEGF는 동물모델에서 새로운 혈관생성을 유도하는 것이 확인되었다(Leung DW et al., Science. 8; 246(4935):1306-9, 1989; Dvorak HF et al., Am J Pathol. 146(5):1029-39, 1995). 또한, VEGF가 도입된 아데노바이러스 유전자 전달체(Ad.VEGF)의 효능이 허혈성 심근 및 근육세포 모델을 대상으로 실험된 결과, 혈관이 크게 증가하는 것이 확인되었고(Mkinen K et al., Mol. Ther. 6, 127-133, 2002) 모델 동물에서 4 주간 VEGF 발현을 유도하였을 때 생성된 혈관은 그 이후, 다시 VEGF 발현을 유도하지 않더라도 소실되지 않고, 조직의 기능 또한 향상되는 것이 관찰되었다(Dor Y et al., EMBO J. 21, 1939-1947, 2002). VEGF가 도입된 아데노바이러스 벡터로는 심장 관상동맥폐색증 및 말초혈관부실증의 유전자 치료를 위한 임상 1-3 상 실험이 수행되고 있고(Maekinen K et al., Mol Ther 6, 127-133, 2002; Stewart DJ et al. Circulation 106, 23-26, 2002; Rajagopalan S et al., J Am Coll Cardiol 41, 1604, 2003) HIF1 α 가 도입된 아데노바이러스 벡터로는 심근허혈(myocardial ischemia)의 유전자 치료를 위한 임상 1상이 실시되고 있다(Vincent KA et al., Circulation 102, 2255-2261, 2000). 상기와 같이, HIF-1 α 및 VEGF 유전자를 이용한 허혈성 질환의 유전자 치료의 임상 시험이 실시되고 있으나 UCP를 이용하여 HIF-1 α 를 안정화시켜 VEGF 유전자 발현을 촉진하는 혈관생성촉진 실험에 대해서는 알려진 바가 없다.

<31>

암 생성 및 전이에 관여하는 유전자의 발현을 억제하는 방법에 관한 특허로는 세포에 펩타이드 또는 그의 기능적 유사체를 제공하여 암을 치료하는 내용이 기재된 국제공개특허 WO 2003/029292, VEGF에 결합하여 종양 성장을 억제하는 핵산 리간드에 관한 내용이 기재된 국제공개특허 WO 1998/18480, 항-VEGF 항체를 이용하여 VEGF의 작용을 억제하는 내용이 기재된 국제공개특허 WO 98/45331 등이 있다. 그러나 상기 방법들은 효율성 면에서 한계가 있기 때문에, 보다 효과적인 방법이 요구된다. 대한민국 공개특허 2005-0012082는 siRNA를 이용하여 노화세포의 기능을 회복하는 방법이 기재되어 있고 국제공개특허 WO 2003/006477와 WO2004/015107는 siRNA를

이용하여 유전자를 불활성화시키는 내용이 기재되어 있으나 siRNA의 구체적인 항암활성은 기재되어 있지 않다.

<32> 이에, 본 발명자들은 UCP가 VHL에 특이적으로 결합하고, UCP의 과발현이 암 억제 단백질인 VHL의 프로테아좀 매개 단백질 분해(proteasomal degradation)을 일으키고 이에 따른 HIF-1 α 의 안정화와 VEGF의 발현이 증가됨을 실험적으로 입증하였다. 더 나아가 UCP의 발현을 억제하는 siRNA를 사용하여 암세포의 성장, 침투 과정에서 UCP의 기능을 규명하고, 마우스 모델을 통해 상기 UCP 발현 억제 방법이 항암효과 및 암 전이 억제효과를 나타냄을 확인하였다. 다른 한편으로 UCP가 VEGF를 포함하는 혈관생성인자(angiogenic factor)들의 발현을 증가시켜 허혈성 혈관 질환의 유전자 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<33> 본 발명의 목적은 E2_{ub}UCP(ubiquitin carrier protein)의 세포내 기능과 암 발생, 진행 및 전이 과정, 혈관생성에서 상관성을 규명하고, UCP 활성을 감소시킴으로써 암 세포의 증식 및 전이를 유의성 있게 저해시키는 방법을 제공하는 것이다. 또한, UCP의 활성을 증가시켜 혈관생성인자인 VEGF의 발현을 유도하여 허혈성 질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <34> 상기 목적을 달성하기 위하여,
- <35> 본 발명은 UCP(ubiquitin carrier protein)의 활성 억제를 통하여 VHL(von Hippel-Lindau)의 활성을 증가시키고 HIF의 안정성을 감소시키며 VEGF의 발현을 억제하는 방법을 제공한다.
- <36> 또한, 본 발명은 UCP-siRNA 발현벡터 및 이를 제조하는 방법을 제공한다.
- <37> 또한, 본 발명은 UCP 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제를 제공한다.
- <38> 또한, 본 발명은 UCP(ubiquitin carrier protein)의 활성 증가를 통하여 VHL의 활성을 감소시키고 HIF의 안정성을 증가시키며 VEGF의 발현을 촉진하는 방법을 제공한다.
- <39> 또한, 본 발명은 UCP의 활성 증가제, UCP 유전자가 도입된 발현벡터 또는 UCP 단백질을 유효성분으로 함유하는 VEGF 발현 촉진제를 제공한다.
- <40> 또한, 본 발명은 UCP의 활성 증가제, UCP 유전자가 도입된 발현벡터 또는 UCP 단백질을 유효성분으로 함유하는 신생혈관 촉진제를 제공한다.
- <41> 또한, UCP 발현 또는 활성 조절제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- <42> 또한, 본 발명은 환자의 진단시료에서 UCP의 발현정도를 측정하여 암의 진단과 예후를 평가하는 방법과 이를 위한 진단키트를 제공한다.
- <43> 아울러, 본 발명은 UCP 유전자가 도입된 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 혈관 신생 촉진제를 제공한다.
- <44> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <45> 1. 본 발명은 UCP(ubiquitin carrier protein)의 활성 감소를 통하여 VHL(von Hippel-Lindau)의 활성을 증가시키고 HIF의 안정성을 감소시키며 VEGF의 발현을 억제하는 방법을 제공한다.
- <46> 본 발명자들은 UCP가 VHL, HIF-1 α 및 VEGF와 어떠한 연관성을 갖는지 관찰하였다.
- <47> 먼저, UCP가 VHL과 결합할 뿐 아니라(도 2a, b 및 c) VHL과 복합체를 이루는 Elongin B, Elongin C, Rbx1 및 Cullin 2과는 결합하지 않고 VHL과 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다(도 2d 참조). UCP 존재하에서 VHL, HIF-1 α 및 HIF-1 α 의 표적 분자인 VEGF mRNA의 발현 증감 여부를 조사한 결과, UCP가 과발현될 경우 VHL, HIF-1 α 의 mRNA 발현량엔 변화가 없었고 VEGF mRNA 발현량은 증가하였는데(도 3b 참조) 이는 UCP가 VHL과 HIF-1 α 의 번역 후(post-translation) 단계에 작용하여 VHL단백질 양을 감소시키고 이에 따라 VHL에 의한 HIF-1 α 의 분해 감소 및 세포내 HIF-1 α 단백질 농도증가로 VEGF의 전사가 활성화되었음을 나타낸다. 한편, 저산소 조건과 정상산소 조건에서 UCP 발현이 높을수록 VHL의 세포내 농도가 감소하고 이로 인해 HIF-1 α 가 안정화됨을 확인하였다(도 3c). HIF-1 α 의 영향을 받는 HRE(hypoxia response element)-luc를 이용한 리포터 분석 결과, 저산소 조건하에서 UCP 농도에 의존적으로 HRE-luc의 활성이 증가하는 것, 즉 HIF-1 α 가 안정화됨을 확인하였다

(도 3d).

<48> 이상에서 확인된 UCP에 의한 VHL의 세포내 농도 감소가 유비퀴틴-매개 단백질 분해(ubiquitin-mediated proteolysis)에 의한 것인지를 확인하기 위하여 VHL이 UCP에 의해 다중유비퀴틴화(multiubiquitination) 되는지를 조사하였다. 이를 위하여 유비퀴틴화 분석(ubiquitylation assay)을 실시하고 유비퀴틴 항체로 확인한 결과, UCP의 E3 유비퀴틴 리가제 활성에 의해 VHL이 다중유비퀴틴화됨을 관찰하였다(도3a, b 및 c 참조). 이와 더불어 UCP가 과발현되면 VHL의 단백질 농도는 현저히 감소하였으나, VHL과 결합하는 Elongin B 및 C, Rbx1의 단백질의 세포 농도에는 변화가 없었으며(도 5a 참조), Elongin B, C와 복합체를 이루어 VHL과 구조가 유사한 E3 유비퀴틴 리가제 활성을 나타내는 SOCS1의 경우 UCP에 의해 단백질 분해가 일어나지 않음을 확인하였다(도 5b 참조) 또한, MDM2의 단백질의 분해를 유도하는 E2 유비퀴틴 콘주게이션 효소(ubiquitin conjugating enzyme)인 UbcH5C와 달리 UCP는 MDM2의 단백질 분해를 유도하지 않았고(도 5c 참조), 시험관내에서 VHL 단백질 분해를 유도하는 Rbx1, UbcH5C 및 UCP와 유사한 E2 유비퀴틴 콘주게이션 효소인 CDC34를 과발현 시켜도 VHL 단백질의 안정성은 UCP에 의해서만 조절되는 것으로 나타났다(도 5d 참조). 이로써 UCP는 VHL에만 특이적으로 단백질 분해활성을 나타냄을 확인하였다.

<49> 즉, 본 발명자들은 UCP가 HIF1 α 및 HIF2 α 를 분해하는 VHL E3 유비퀴틴 리가제 복합체의 한 구성성분으로 기질을 인지하는 기능을 갖는 VHL(von Hippel-Landau) 단백질을 특이적으로 분해하는 E3 유비퀴틴 리가제임을 밝히고(도 3, 도 4, 도 5 참조), UCP가 과발현되면 VHL 단백질 분해를 유도하여(도 4 참조), VHL E3 유비퀴틴 리가제의 기질인 HIF1 α 및 HIF2 α 의 안정성을 증가시킴으로써(도 3 참조) HIF1 α 및 HIF2 α 에 의해 조절되는 혈관생성 인자인 VEGF(vescular endothelial growth factor)의 발현을 증가시킨다는 사실을 확인하였다(도 3b 및 도 6b 참조). 또한, UCP의 활성 억제제는 VHL의 세포내 농도를 증가시키고 HIF의 안정성을 감소시키며, 암세포의 증식 및 전이를 억제함을 확인하였다(도 6e, 6f, 6g, 도 7d, 7e, 7f 참조).

<50> UCP의 활성억제는 UCP 유전자의 전사를 억제하는 물질, 전사된 UCP mRNA의 번역을 억제하는 물질 또는 UCP 단백질의 기능을 억제하는 물질을 이용하여 이루어진다.

<51> 전사를 억제하는 물질로는 UCP 전사를 조절한다고 알려져 있는 프로모터, 인핸서(enhancer), 프로모터에 결합되는 전사조절인자에 결합하는 단백질 또는 화합물이 될 수 있다.

<52> mRNA의 번역을 억제하는 물질로는 저분자 화합물, 안티센스 핵산 서열의 제조나 RNAi 테크닉을 이용한 RNA, siRNA 등이 이용될 수 있다.

<53> 이를 구체적으로 살펴보면 하기와 같다.

<54> 1) RNAi

<55> RNA 간섭(RNAi)은 UCP 유전자에 대응하는 두 가닥 사슬 RNA(dsRNA)를 세포 또는 유기체에 도입함으로써 대응하는 mRNA의 분해가 일어나는 전사 후 유전자 사일런싱 메카니즘(post-transcriptional gene silencing mechanism)이다. 상기 RNAi 효과에 의해 유전자 발현이 복귀되기 전에 다중 세포 분열이 지속되므로 RNAi는 RNA 레벨에서 목표로 하는 녹아웃(knockout) 또는 '녹다운(knockdown)'을 만드는 매우 강력한 방법이다. RNAi는 인간의 배아 신장(embryonic kidney) 및 HeLa 세포를 포함한 인간 세포에서 성공적임이 확인되었다(Elbashir et al. Nature May 24;411(6836):494-8, 2001).

<56> 유전자 사일런싱에서의 RNAi 기술은 표준 분자 생물학 방법을 이용한다. 불활성화시킬 표적 유전자의 서열에 대응하는 dsRNA는 표준 방법, 예를 들면 T7 RNA 중합효소를 이용한 주형 DNA의 양 가닥 동시 전사에 의해 생성할 수 있다. RNAi에 사용되는 dsRNA의 생성 키트는 상업적으로 판매되는 제품(예를 들면, New England Biolabs, Inc.사의 제품)을 사용할 수 있다. dsRNA 또는 dsRNA를 제조하도록 처리된 플라스미드의 트랜스팩션 방법은 종래 공지 기술이다.

<57> 2) 안티센스 핵산 서열

<58> UCP를 코딩하는 핵산에 대해 안티센스인 핵산 분자를 저해제로 사용할 수 있다. '안티센스' 핵산은 UCP를 코딩하는 '센스' 핵산에 상보적인, 예를 들면 두 가닥 사슬 cDNA 분자의 코딩 가닥에 상보적이거나 mRNA 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함한다. 따라서, 안티센스 핵산은 센스 핵산과 수소 결합을 형성할 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 전체 UCP 코딩가닥 또는 단지 그들의 일부(예: 코딩영역)에 상보적일 수 있다. 상기 안티센스 핵산 분자는 UCP mRNA의 전체 코딩 영역에 상보적일 수 있으나, UCP mRNA의 코딩 또는 비코딩 영역의 단지 일부(예: 번역 개시부)에만 안티센스인 올리고뉴클레오티드가 더 바람직하다. 안티센스 올리고뉴클레오티드

는 예를 들면 약 5 내지 50 뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 안티센스 핵산은 공지의 방법을 이용한 화학 합성 및 효소 결합 반응을 이용하여 구성할 수 있다. 화학 합성법, 예를 들어 문헌 [Tetrahedron Lett., 1991, 32, 30005-30008]에 기재된 바와 같이 아세토니트릴 중에서 테트라에틸티우람 디숄파이드로 황화시키는 포스포아미다이트 화학과 같은 방법에 의해 매우 용이하게 제조할 수 있다. 상기 안티센스 핵산의 생성에 사용될 수 있는 변형 뉴클레오티드의 예로는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오드우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸사이토신, 5-(카복시히드록실메틸)우라실, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸사이토신, 5-메틸사이토신, N6-아데닌, 5-카복실메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 3-(3-아미노-3-N-2-카복시프로필)우라실, 5'-메톡시카복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노 메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실케오신, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산(v), 2,6-디아미노푸린, 5-메틸-2-티오우라실, 우라실-5-옥시아세트산(v), 슈도우라실, 퀘오신, 2-티오사이토신, 5-카복시메틸아미노메틸우라실, 디하이드로우라실, 베타-D-갈락토실케오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닐, 5-메틸-2-티오우라실, (acp3)w 및 와이부톡소신일 수 있다. 필요에 따라서, 상기 안티센스 핵산은 발현 벡터를 사용하여 생물학적으로 생성할 수 있다.

<59> UCP 단백질의 기능을 억제하는 물질로는 상기 단백질에 결합하는 펩타이드, 항체, 화합물 및 펩티드 미메틱스 등이 이용될 수 있다.

<60> 1) 펩티드 미메틱스(Peptide Mimetics)

<61> UCP 폴리펩티드의 단백질 결합 도메인을 억제한 미메틱스(예, 펩티드 또는 비펩티드성 약제)를 제작하여 원래의 UCP 폴리펩타이드가 VHL에 결합하는 것을 억제할 수 있다(유럽특허출원 EP 0412765 및 EP 0031080).

<62> 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β-턴 디펩티드 코어(Nagai et al. Tetrahedron Lett 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류(Ewenson et al. J Med Chem 29:295, 1986; 및 Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), 아제핀(Huffman et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 벤조디아제핀(Freidinger et al. in Peptides; Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), β-아미노알콜(Gordon et al. Biochem Biophys Res Commun 126:419 1985) 및 치환 감마 락탐환(Garvey et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988) 을 사용하여 생성할 수 있다.

<63> 2. 본 발명은 UCP-siRNA 발현벡터 및 이를 제조하는 방법을 제공한다.

<64> UCP-siRNA를 포함하는 플라스미드 형태의 발현벡터는 H1 프로모터, UCP-siRNA 및 전사종료 서열인 다섯 개의 T 염기(T₅)로 구성된다. RNA는 UCP mRNA 염기서열내에서 선택되는 17 내지 25머의 센스 서열에 상보적으로 결합되는 안티센스서열로 구성되며 서열번호 2로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

<65> 본 발명자들은 서열번호 1로 기재되는 UCP의 mRNA(도 2)에 상보적인 서열이며, 바람직하게는 서열번호 2로 기재되고 UCP mRNA 서열중 615-633에 해당하는 부분을 H1 프로모터에 의해 발현되도록 pSuper 플라스미드 벡터에 클로닝하여 재조합 벡터를 제작하였다. 세포 내로 전달 및 발현을 원하는 유전자를 제공하는 아데노바이러스 제작용 pShuttle 벡터에 상기 제작된 pSuper 플라스미드 벡터를 제한효소로 처리하여 H1 프로모터, UCP-siRNA, 전사종료 서열인 다섯 개의 T 염기(T₅)까지 함유하는 아데노바이러스 제작용 UCP-siRNA 발현벡터를 제작하였다. 본 발명에서 UCP-siRNA를 발현시키기 위한 벡터는 pSuper 벡터나 pShuttle 벡터에 제한되지 아니하며 UCP-siRNA를 발현시키기 위한 프로모터는 H1 프로모터에 제한되지 아니한다. 예를 들어 U6 프로모터, CMV 프로모터 등의 포유동물세포에서 유전자 발현을 유도할 수 있는 발현벡터들이 사용될 수 있다. 상기 발현벡터를 이용하여 아데노바이러스벡터를 재조합한 후 실시예 2와 같은 방법으로 아데노바이러스 입자를 만들고 이를 세포나 개체에 주입하여 siRNA가 발현되도록 하였다. 아데노 바이러스 벡터 뿐 아니라, 아데노-부속 바이러스, 레트로바이러스, 백시니아바이러스, 및 암세포 용해성 바이러스로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 바이러스성 벡터가 사용될 수 있다.

<66> 3. 본 발명은 UCP 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제를 제공한다.

<67> 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량 %로 포함한다.

<68> 본 발명의 조성물은 상기 유효성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상

함유할 수 있다.

- <69> 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- <70> 본 발명의 항암제의 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여가 바람직하며, 정맥내 주사에 의한 투여가 더욱 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 화합물의 경우 약 0.1 내지 100 mg/kg 이고, 바람직하게는 0.5 내지 10 mg/kg 이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- <71> 본 발명의 siRNA 또는 siRNA 발현벡터를 마우스에 정맥내 주사에 의하여 투여하여 독성 실험을 수행한 결과, 독성시험에 의한 50% 치사량(LD50)은 적어도 1,000 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단된다.
- <72> 본 발명의 UCP 활성 억제제를 이용하여 증식을 억제할 수 있는 암세포는 UCP가 과발현되어 있는 암세포이며, 바람직하게는 난소암, 담도암, 간암, 대장암, 위암, 유방암, 신장암, 전립선암 및 피부암 세포를 포함한다
- <73> 본 발명자들은 UCP의 mRNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(UCP-siRNA)를 제작하여 이를 암 세포주에 주입하고 이를 암 세포주에 주입하여 UCP의 발현을 억제한 결과, UCP-siRNA에 의해 UCP의 발현이 억제되면 VHL의 농도가 증가하고(도 6e) 세포의 성장율이 약 2.5배 감소하였으며(도 6f) 침투 분석(invasion assay)으로 세포주의 전이능력의 변화를 측정한 결과, 세포의 침투율이 4배 정도 감소한 것으로 나타났다(도 6g). 이와 더불어, 종양 세포를 nude 마우스의 피하에 주사하고 며칠 후 종양이 생성되었을 때 siRNA를 주입한 결과, 종양 성장 억제 효과가 현저하게 나타남을 확인하였다(도 7d).
- <74> 이로써, UCP가 암의 성장 및 전이에 중요한 역할을 수행하고 있으며, UCP의 발현을 저해함으로써 암의 성장 및 전이를 억제할 수 있음을 확인하였다.
- <75> 4. 본 발명은 UCP(ubiquitin carrier protein)의 활성 증가를 통하여 VHL의 활성을 감소시키고 HIF의 안정성을 증가시키며 VEGF의 발현을 촉진하는 방법을 제공한다.
- <76> 상기한 바와 같이, 본 발명의 UCP가 과발현되면 VHL 단백질 분해를 유도하여(도 4 참조), VHL E3 유비퀴틴 리가제의 기질인 HIF1 α 및 HIF2 α 의 안정성을 증가시키므로써(도 3 참조) HIF1 α 및 HIF2 α 에 의해 조절되는 혈관생성 인자인 VEGF(vescular endothelial growth factor)의 발현을 증가시킨다(도 3b 및 도 6b 참조). 따라서 UCP의 활성을 증가시키므로써 VEGF의 발현 역시 증가시킬 수 있고, 이는 UCP 프로모터에 작용하여 UCP mRNA의 발현을 유도하는 제제, UCP의 발현을 유도하는 플라스미드 또는 바이러스 유전자 전달체를 통하여 이루어진다.
- <77> 5. 본 발명은 UCP의 활성 증가제, UCP 유전자가 도입된 발현벡터 또는 UCP 단백질을 유효성분으로 함유하는 VEGF 발현 촉진제를 제공한다.
- <78> UCP 활성 증가제는 UCP 프로모터에 작용하여 UCP mRNA의 발현을 유도하는 제제(예: 대한민국 특허 2003-0013795 균주로부터 추출한 물질을 프로모터 발현 유도제로 이용), UCP의 발현을 유도하는 플라스미드(예: 대한민국 특허 10-0375890 유도성 징크핑거 발현 벡터 및 이를 이용한 표적 유전자 발현의 인위적 조절 방법) 또는 바이러스 유전자 전달체(예: 특2001-0006460 세포자멸사 유도 단백질을 발현시키는 유전자 전달 운반체)를 포함한다.
- <79> 상기와 같이, UCP 유전자가 과발현되면 VEGF의 발현을 촉진하므로 UCP 과발현과 유사한 효과를 나타낼 수 있는 방법, 즉 UCP 단백질을 직접 투입하거나 UCP 발현 플라스미드를 투입하여 개체 내에서 발현되도록 함으

로써 VEGF 발현을 촉진할 수 있다.

- <80> 6. 본 발명은 UCP의 활성 증가제, UCP 유전자가 도입된 발현벡터 또는 UCP 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈관신생 촉진제를 제공한다. 본 발명의 UCP는 과발현되면 HIF-1 α 및 CD31 단백질 양을 증가시키고(도 7c) VEGF의 발현을 증가시켜(도 3b 및 도 6b 참조) 신혈관 생성을 촉진한다. CD31은 VEGF와 같은 인자에 의해 혈관생성이 증가될 경우 나타나는 혈관세포의 마커이다.
- <81> VEGF의 발현 증가가 허혈성 혈관 질환(ischemic vascular disease)의 치료에 효과적이라는 사실은 잘 알려져 있으므로(Yla-Herttuala S and Alitalo K. Nat Med., 9(6):694-701, 2003; Khan TA et al., Gene Ther. 2003, 10(4):285-91), VEGF의 발현을 증가시키는 UCP 유전자가 도입된 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 촉진제는 혈관이 부실함에 기인하여 사지절단술을 받아야만 하는 심한 사지 허혈(critical limb ischemia, CLI) 환자들, 수술이 가능하지 않은 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD) 환자들에게서 일어나는 혈관계 질환을 치료하는데 이용될 수 있을 것이다. 또한 UCP는 혈류의 공급이 부실하여 생기는 치매, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 당뇨병 신경장애(diabetic neuropathy), 뇌졸중(stroke) 환자들을 포함하는 난치성 질환을 갖고 있는 사람들의 유전자 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- <82> 7. 본 발명은,
- <83> 1) UCP의 전사 조절에 관여하는 전사인자를 찾는 단계;
- <84> 2) 상기 전사인자를 조절하는 물질을 선발(screening)하는 단계; 및
- <85> 3) 상기 물질이 UCP 유전자의 발현을 조절하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 구성된 UCP 활성 조절제(활성 억제제 혹은 증가제)를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- <86> 상기 스크리닝 방법에서 UCP 활성 조절 후보물질이 UCP 유전자의 발현 또는 단백질 활성을 억제 혹은 증가하는지를 결정하는 단계에서 RNA-RNA, DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-단백질, RNA-화합물, DNA-단백질, DNA-화합물, 단백질-단백질 또는 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.
- <87> 예를 들면, RNA-RNA, DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-단백질, RNA-화합물, DNA-단백질, DNA-화합물간의 반응 확인은 생체 외부에서(in vitro) 상기 유전자와 활성조절 후보물질 간의 결합여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류 세포와 억제 후보물질을 반응시킨 후 노던 블롯 분석, 반정량적·정량적 PCR, 실시간 PCR 등을 통한 UCP 유전자의 발현을 측정방법 또는 UCP 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 억제 후보물질과 반응시키고 리포터 유전자의 발현율을 측정하는 방법 등을 사용할 수 있다.
- <88> 또한, 단백질-단백질, 단백질-화합물 간의 반응 확인은 생체 내·생체 외에서 UCP 단백질과 활성조절 후보물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), UCP 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening) 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝 방법들을 사용할 수 있다.
- <89> 상기 스크리닝 방법에서, UCP 발현 혹은 활성조절 후보물질은 통상적인 선정 방식에 따라 UCP 발현 억제 혹은 증가의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물 등이 될 수 있다.
- <90> 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 수득한, 유전자 발현 혹은 단백질 안정성을 억제 혹은 증가시키는 활성을 나타내는 후보물질은 항암제 또는 신생혈관 촉진제 후보물질이 될 수 있다. 이와 같은 후보물질은 이후의 항암제 또는 신생혈관 유도제 개발 과정에서 선도물질로서 작용하게 되며, 선도물질이 UCP 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 억제 혹은 증가 효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써 새로운 항암제 또는 신생혈관 촉진제를 개발할 수 있다.
- <91> 8. 본 발명은 환자의 진단시료에서 UCP의 발현정도를 측정하여 암의 진단과 예후를 평가하는 방법과 이를 위한 진단키트를 제공한다.
- <92> 1) 환자의 진단 시료에서 UCP의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 암 진단방법을 제공한다.
- <93> 상기 진단 시료에서 정상 이상으로 상승된 UCP의 발현 검출은 환자가 암에 걸렸음을 의미한다. 상기 진단방법에서 UCP의 발현을 측정하는 단계는 상기 스크리닝 방법에서 UCP 유전자의 발현 또는 단백질 활성을 결

정하는 단계와 동일한 방법이 사용될 수 있다.

<94> 2) 암으로 치료를 받았거나 받고 있는 개체의 진단시료에서 UCP의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 암 치료법의 효과를 평가하는 방법을 제공한다.

<95> 상기 진단시료에서 정상 UCP의 발현 검출은 암 치료가 성공적이었음을 의미하고 진단시료에서 정상 이상으로 상승된 UCP의 검출은 치료를 계속해야 한다는 것을 의미한다.

<96> 3) 개체의 진단시료에서 UCP의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 암에 걸린 개체에서 예후를 평가하는 방법을 제공한다.

<97> 상기 단계에서 정상 UCP의 발현 검출은 예후가 좋다는 것을 의미하고 진단시료에서 정상 이상으로 상승된 UCP의 검출은 예후가 좋지 않다는 것을 의미한다.

<98> 4) 본 발명의 암 진단키트는 UCP와 반응하는 하나 이상의 물질 및 반응 생성물 검출용 시약과 이에 대한 지시 사항을 부가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, UCP와 반응하는 하나 이상의 물질은 UCP의 RNA 또는 DNA에 상보적인 RNA 또는 DNA 및 UCP 단백질에 결합하는 항체일 수 있고 반응 생성물 검출용 시약은 핵산 또는 단백질 표지 및 발색시약일 수 있다.

<99> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<100> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<101> <실시예 1> 세포내에서 UCP와 VHL간의 상호작용 검증

<102> UCP와 VHL간의 상호작용 검증을 위하여 다음과 같은 발현백터를 제작하여 사용하였다. Flag-UCP는 인간유전체기능연구 사업단(한국생명공학연구원)으로부터 제공받은 UCP 함유 발현백터를 주형으로 하여 PCR방법으로 얻어진 절편을 *NotI/BamHI*으로 pCMV Tag1(Stratagene)에 클로닝하여 제작하였다. PCR 조건은 하기와 같다. DNA 중합효소(pfu polymerase (Vent), New England Bioscience, USA)를 사용하여 상기에 기재된 프라이머 쌍과 주형을 94°C에서 4분 동안 변성시키고, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 및 72°C에서 1분간 30회 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장(extension)시켜 반응을 종결하였다. GST-Rbx1, GST-Elongin B와 GST-Elongin C는 *BamHI/NotI*으로 pEBG 벡터에 클로닝되었으며, GST-VHL은 *BamHI/SpeI*으로 pEBG 벡터에 클로닝 하였다. Flag-VHL은 한국생명공학연구원의 조사연 박사로부터 제공받아 사용하였다.

<103> 본 발명에 사용된 항체중 마우스 항 UCP 항체는 본 발명자들이 직접 제작하여 사용하였다. 그 과정을 설명하면, pET28a 벡터에 UCP를 *BamHI/NotI*으로 클로닝하고 BL21 대장균에서 단백질을 합성하였다. His-Resin을 사용하여 대장균으로부터 His-UCP 만을 순수 분리하고 이를 Balb/c(암컷, 6주령)에 Fluid adjuvant(CHEMICON)와 함께 주 1회씩 총 4회 면역하여 혈청을 얻고, protein A(SIGMA)로 농축하여 이하 실험에 사용하였다.

<104> Flag-UCP를 항상 발현하는 HEK293 세포주(293/F-UCP)는 네오마이신 분해 유전자를 함유하는 Flag-UCP 발현백터(pCMV Tag1-Flag-UCP)를 칼슘-포스페이트 방법으로 세포내로 도입하고 1 mg/ml의 네오마이신이 포함된 LDMEM(10% 우태아 혈청, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 100 unit/ml 페니실린 포함)으로 선택배양하여 얻은 세포 집락에서 Flag-UCP 발현을 확인하고 사용하였다.

<105> <실시예 1-1> 과발현체계를 이용한 UCP와 VHL의 상호 결합 검증

<106> 과발현된 UCP와 내인성 VHL간의 결합 및 과발현된 VHL과 내인성 UCP간의 결합여부는 HEK293T 세포주에 Flag-UCP 및 Flag-VHL을 과발현 시키고 Flag-겔로 면역침강반응을 실시한 후 내인성 UCP와 VHL의 항체로써 웨스턴 블랏을 실시함으로써 확인하였다. 자세히 설명하면, HEK293T 세포주에 Flag-UCP와 Flag-VHL 발현 백터들을 칼슘-포스페이트 방법으로 각각 세포 내에 도입하였다. 수거 12시간 전에 10 µm의 MG132를 처리하고 세포들을 수거하여 -70°C에서 냉동 후 세포 파쇄 용액(50mM Tris, 0.5mM EDTA, 0.1% NP-40, 0.5mM PMSF)으로 파쇄하였다. 여기에 마우스 항 Flag 항체(Sigma)가 결합되어 있는 아가로스 겔을 첨가하여 면역침강반응을 4°C에서 2시간 동안 실시하였다. 이를 SDS-시료 완충액(62.5 mM Tris, 2% SDS, 5% 베타-머캅토에탄올, 10% 글리세롤, 0.01% 브로모페놀 블루)과 혼합하여 95°C에서 5분간 끓인 후 12.5% 폴리아크릴아마이드 전기영동을 수행하였다. 분리된 단백질을 PVDF 막으로 이동시킨 후, 막을 5% 탈지분유가 포함된 PBST(0.05% Tween20이 포함된 인산 완충용액)로 1시간 블로킹하고 마우스 항 플래그 항체(Sigma)와 마우스 항 UCP 항체 및 마우스 항 VHL 항체(Pharmingen)로써 각각 실온에서 한 시간 반응시켰다. 반응 후 잔여 항체는 PBST로써 충분히 세척하고 호

스 래디쉬 퍼옥시다제가 표지된 토끼 항 마우스 항체로 실온에서 한 시간 다시 반응시킨 후, ECL 용액으로 반응 여부를 확인하였다. 더불어 각 군의 세포 파쇄액도 함께 상기 방법과 같이 웨스턴 블랏을 실시하였다(도 2a). 그 결과 Flag-UCP와 VHL의 결합 및 Flag-VHL과 UCP간의 결합을 확인할 수 있었다.

<107> <실시예 1-2> 내인성 UCP와 VHL간의 결합여부 검증

<108> 내인성 UCP와 VHL 간의 결합 여부를 알아보기 위하여 VHL과 UCP의 발현이 두 분자 모두 존재하는 HLK3 간암 세포주에서 실시하였다. 5장의 100 mm 접시에 HDMEM(4.5g/l 글루코스, 10% 우태아 혈청, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 100 unit/ml 페니실린 포함)에서 배양된 HLK3 간암 세포주를 수거하여, -70°C에서 냉동 후 세포 파쇄 용액(50mM Tris, 0.5mM EDTA, 0.1% NP-40, 0.5mM PMSF)으로 파쇄하였다. 세포 파쇄액에 마우스 항 VHL 항체와 대조군으로써 마우스 면역글로불린을 각각 10 µg을 첨가하고 protein A 겔과 함께 4°C에서 2시간동안 면역침강반응 실시하였다. 이를 마우스 항 UCP 항체로써 상기 기술한 방법과 같이 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 세포 내에서 UCP와 VHL이 결합하고 있는 것을 알 수 있었다(도 2b).

<109> <실시예 1-3> UCP와 VHL간의 결합의 특이성 조사

<110> VHL은 Elongin B, Elongin C, Rbx1 Cullin 2등과 복합체를 이루어 E3 ubiquitin ligase활성을 나타내고 이 효소의 대표적인 기질은 HIF-1α이다(Nat Rev Cancer 2, 673-682, 2002). 상기 VHL과 결합하는 것으로 나타난 UCP가 VHL 복합체의 다른 분자들과 결합 가능성 여부를 시험하였다. Flag-UCP가 항상 발현되는 HEK 293 세포1(293/F-UCP)에 GST-Rbx1, GST-Elongin B, GST-Elongin C, GST-VHL 및 GST 발현 벡터들을 각각 갈슘-포스페이트 방법으로 각각 세포 내에 도입하였다. 수거 12시간 전에 10 µm의 MG132로 처리하고 세포들을 수거하여 -70°C에서 냉동 후 세포 파쇄 용액(50mM Tris, 0.5mM EDTA, 0.1% NP-40, 0.5mM PMSF)으로 파쇄하였다. 여기에 GST-세파로스(Amersham)를 첨가하여 GST pull-down을 4°C에서 2시간 동안 실시하고 마우스 항 플래그 항체로써 상기와 같은 방법으로 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 UCP는 VHL과 특이적으로 결합하는 것을 알 수 있었다(도 2c).

<111> 또한 세포내에서 UCP와 VHL간의 결합성은 수크로스 밀도 구배 원심분리법에 의하여 두 분자의 이동양상을 통해서도 확인되었다. 100 mm 배양 접시 10 장의 HLK3 간암 세포주를 수거하고 -70°C에 냉동시킨 후 0.5 ml의 세포 파쇄용액(50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 50 mM KCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF)에 녹여 준비하였다. 10 ml의 5%에서 20%까지의 수크로스 선형밀도구배 용액에 위 세포 파쇄액을 올리고 35000 rpm에서 16시간 동안 초고속 원심분리를 실시한 후 이를 각 0.5 ml씩 20개의 구획으로 나누어 마우스 항 UCP 항체, 마우스 항 VHL 항체, 토끼 항 Elongin B, Elongin C, Rbx1 항체(Santa Cruz)로써 상기 방법과 같이 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 UCP는 VHL E3 ligase 복합체(VHL, Elongin B, Elongin C, Rbx1등의 복합체, 분획 11)에는 존재하지 않았고, UCP는 VHL과 함께 침강되었다(도 2d, 분획 4-7). 이상의 결과는 UCP-VHL 결합체와 VHL E3 유비퀴틴 리가제 복합체가 서로 독립적으로 존재한다는 것을 제시해 주고 있다. 이 결과들은 UCP는 특이적으로 VHL과 결합함을 제시한다.

<112> <실시예 2> UCP가 VHL 단백질 안정성에 미치는 효과 조사

<113> UCP에 의한 VHL의 세포내 단백질 농도의 감소는 HIF-1α의 안정화를 초래하게 될 것으로 사료되어 이것을 검증하였다. 본 실험을 위하여 Flag-UCP의 활성부위인 95번째 시스테인을 세린으로 치환한 돌변변이 Flag-UCPm을 PCR법으로 제작하였다. PCR 반응조건은, DNA 중합효소 (pfu polymerase (Vent), New England Bioscience, USA)를 사용하여 상기에 기재된 프라미어 쌍과 주형을 94°C에서 4분 동안 변성시키고, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 및 72°C에서 1분간 30회 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장(extension)시켜 반응을 종결하였다. 또 HA-VHL을 항상 발현하는 세포주는 네오마이신분해 유전자를 함유하는 발현벡터(pCDNA/HA-VHL)를 갈슘-포스페이트 방법으로 세포내로 도입하고 1 mg/ml의 네오마이신이 포함된 LDMEM 배지에서 선택배양하여 얻은 세포집락에서 HA-VHL 발현을 확인하고 사용하였다.

<114> HRE-luc reporter 유전자는 VEGF 발현 조절부위에서 유래한 5개의 HRE를 SV40 TATA를 포함하는 pGL3-루시페레이즈 벡터(Promega)를 사용하였다(Mol Ther. 10, 938-949, 2004.)

<115> Flag-UCP를 발현하는 아데노 바이러스 유전자 전달체는 pCMV shuttle 벡터(QUANTUM biotechnology)에 Flag-UCP를 *NotI/XbaI* 부위에 클로닝하여 발현을 확인하고 아데노바이러스 유전자를 포함하고 있는 pAdEasy-1과 *E. coli* BJ5183 균주에 동시에 형질도입 함으로써 재조합을 수행하여 Ad.F-UCP바이러스를 제작하였다. 재조합 아데노바이러스를 제작하는 방법은 본 발명자들이 기출원한 특허 명세서에 상세히 기술되어 있다(발명의 명칭: 너허수체 중앙-형질전환 유전자 1 단백질의 합성을 차단할 수 있는 작은 간섭 RNA 및 이를 발현하는 벡터

를 이용한 암의 유전자 치료. 출원일: 2005. 03. 04. 출원번호: 2005-18140).

<116> <실시예 2-1> UCP에 의한 VHL의 안정성 감소 효과 검증

<117> HEK293T 세포주에 Flag-UCP를 10 µg, 15 µg 씩 각각 칼슘-포스페이트 방법으로 도입시키고 수거 12시간 전에 10 µM의 MG132(26S 프로테오좀 저해제)로 처리하거나 처리하지 않은 군을 각각 수거하여 -70°C에서 냉동 후 세포 파쇄 용액(50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 50 mM KCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF)에 녹여 준비하였다. 이를 마우스 항 플래그 항체, 마우스 항 VHL 항체, 마우스 항 HIF-1α(Phamingen) 항체 및 마우스 항 β-actin항체(Sigma)로써 상기 방법과 같이 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 UCP의 발현이 증가 할수록 VHL의 농도는 감소하였으며, 이 현상은 MG132에 의해 저해되었다(도 3a). 이 결과는 UCP가 VHL을 26S 프로테오좀 분해 경로로 분해시킨다는 것을 제시한다.

<118> UCP에 의한 VHL 발현량 감소가 단백질 수준(post-translation)인 것을 증명하기 위하여 Flag-UCP 존재 하에서 VHL의 mRNA 농도를 노던 블랏으로써 확인하였다. 동시에 HIF-1α 및 HIF-1α의 표적 분자인 VEGF의 mRNA의 발현 증감 여부도 조사하였다. F-UCP가 5, 10, 15 µg 씩 도입된 HEK293 세포주로부터 RNasey kit(Qiagen)을 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 각 25 µg의 RNA를 포르말린 아가로스 젤에서 전기영동 하여 분리 한 후 나일론 막에 옮겨 흡착시킨 후, 노던 블랏에 사용하였다. RNP1633(Amersham/ Pharmacia)으로 VHL, HIF-1α, VEGF, Actin을 [³²P]dCTP 방사능으로 각각 표지 시킨 후 65°C에서 16시간 RNA가 부착되어 있는 나일론 막과 각각 반응시키고 잔여 방사능 표지 프로브들은 충분히 세척하여 제거하였다. 상기의 막을 BAS1500(Fuji) 포스포 이미지 분석기로서 분석하였다. 그 결과 F-UCP는 VHL, HIF-1α의 전사(transcription)를 조절하지 않음을 알 수 있었으며, F-UCP에 의하여 VEGF의 전사가 증가되었음을 알 수 있었다(도 3b).

<119> 상기한 결과들은 번역후(post-translation) 단계에서 UCP가 HIF-1α를 분해시키는 VHL 단백질 양을 감소시키고, 결과적으로 세포내 HIF-1α 단백질 농도가 증가하여 VEGF의 전사를 활성화시킨다는 것을 제시한다.

<120> <실시예 2-2> Hypoxia 조건에서 UCP에 의한 VHL의 세포내 농도 변화 검증

<121> 저산소 조건(hypoxia; 1% O₂) 및 정상산소 조건(normoxia; 20% O₂) 에서 UCP에 의한 VHL의 단백질 농도 감소 현상을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

<122> 293/HA-VHL 세포주에 Flag-UCP를 발현하였을 때 VHL의 세포내 농도 변화를 Normoxia 조건과 Hypoxia 조건에서 검증하였다. 293/HA-VHL 세포주에 Flag-UCP를 10 µg, 15 µg 씩 각각 칼슘-포스페이트 방법으로 도입시키고 24시간 후 저산소 조건의 세포는 세포수거 전 약 12시간 동안 저산소 챔버에 방치한 후, 세포를 수거하고 -70°C에 냉동시킨 후 세포 파쇄용액(50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 50 mM KCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF)에 녹여 준비하였다. 이를 마우스 항 HA 에피토프프(Roche) 항체, 마우스 항 플래그 항체, 마우스 항 HIF-1α(Phamingen) 항체 및 마우스 항 β-actin항체(Sigma)로써 상기 방법과 같이 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 Flag-UCP의 발현이 높을수록 VHL의 세포내 농도는 정상산소 조건과 저산소 조건에서 공히 낮아지는 것을 알 수 있었으며, 이로 인한 HIF-1α의 안정화를 확인 할 수 있었다(도 3c).

<123> UCP에 의한 HIF-1α의 안정화 현상을 HRE-luc를 이용한 리포터 분석(reporter assay)으로 다시 확인하였다. 6 웰 플레이트에 배양된 HEK293 세포주에 HRE-luc와 각각 5 µg, 10 µg의 F-UCP를 함께 도입하고 Hypoxia 조건의 세포는 세포수거 전 약 16시간 동안 저산소 챔버에 방치한 후, 세포를 수거하였다. -70°C에 냉동시킨 후 리포터 세포 파쇄용액(Promega)에 녹인 후 루시페라제(luciferase)의 기질인 루미놀(luminol)을 첨가하여 루시페라제의 활성여부를 측정하였다. 그 결과 F-UCP의 농도에 의존적으로 HRE-luc의 활성이 높아짐을 알 수 있었다(도 3d). 위 결과들은 UCP가 세포내 HIF-1α를 조절하는 VHL의 세포내 농도를 저산소 및 정상산소 조건 모두에서 감소시킨다는 것을 제시한다.

<124> <실시예 2-3> UCP의 효소활성과 UCP에 의한 VHL 단백질 분해와의 관련성 조사

<125> UCP는 E2 유비퀴틴 콘주게이션 효소(ubiquitin conjugating enzyme)로써 알려져 있으며, E3 유비퀴틴 리가제 활성도 갖고 있다. UCP의 95번째 아미노산인 시스테인은 E2 패밀리에 잘 보존되어 있고, 효소의 활성에 중요한 것으로 보고되어 있다(EMBO J 22, 5241-5250, 2003). UCP에 의한 VHL의 세포내 농도 조절에서도 E2 효소활성이 중요한 역할을 담당하고 있는 지 알아 보고자 하였다. Flag-UCP와 Flag-UCPm이 각각 농도별로(5, 10, 15 µg) HEK293 세포주에 도입하고 48시간후 세포를 수거하고 -70°C에 냉동시킨 후 세포 파쇄용액(50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 50 mM KCl, 10% Glycerol, 1mM DTT, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF)에 녹여 준비하였다. 이를 마우스 항 VHL 항체, 마우스 항 Flag 항체 및 마우스 항 actin항체로써 상기 방법과 같이 웨스턴 블랏을 실시하였다.

그 결과 Flag-UCP에 의해서는 농도 의존적으로 VHL의 양이 감소하였으나, Flag-UCPm에 의해서는 변화가 없었다. 그러므로 UCP의 의한 VHL 단백질 분해에서 UCP의 효소활성이 필수적이라는 것을 알 수 있었다(도 3e).

<126> <실시예 2-4> 마우스에서 UCP에 의한 VHL의 발현 감소 현상 검증

<127> 배양 세포에서 확인된 UCP에 의한 VHL 단백질 분해가 생체내에서도 재현 되는 지 알아 보기 위하여 UCP 발현 아데노바이러스(Ad.F-UCP)를 제작하여 마우스의 꼬리 정맥 내로 주사하여 간에서 UCP, VHL 및 HIF-1 α 의 발현변화를 검토하였다. 각 2 X 10⁸ 개의 Ad.F-UCP 및 대조 바이러스로써 Ad.GFP를 6주령의 암컷 Balb/c 마우스의 꼬리 정맥내에 주사하고, PBS도 동일하게 주사하였다. 3일후 간을 적출하여 동결조직 블록을 만들어 절편을 준비하고 Flag, VHL 및 HIF-1 α 에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다. 각 조직 절편이 부착된 슬라이드를 1% 우태아 혈청이 들어있는 PBS로 실온에서 한시간 블로킹하고, 각 항체가 포함된 0.1% 우태아 혈청 PBS로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 시켰다. 이후 PBST로써 5분간 3번 세척하고 로다민이 결합되어 있는 항 마우스 IgG가 포함되어 있는 0.1% 우태아 혈청 PBS로 실온에서 30분간 반응 시키고, 다시 이후 PBST로써 5분간 3번 세척하여 잔여 항체를 충분히 제거하였다. 조직에서 각 항체의 반응여부는 형광현미경으로 확인하였다. 그 결과 Flag-UCP가 발현되었을 때 VHL의 발현이 감소되었으며, HIF-1 α 발현은 증가 되어 있음을 확인할 수 있었다(도 3f). 그러므로 Flag-UCP에 의한 VHL 단백질 감소는 배양 세포와 생체내에서 동일하게 나타남을 알 수 있었다.

<128> <실시예 3> UCP에 의한 VHL의 다중 유비퀴틴화(multiubiquitination) 검증

<129> 이상에서 확인된 UCP에 의한 VHL의 세포내 농도 감소가 유비퀴틴-매개 단백질 분해(ubiquitin-mediated proteolysis)에 의한 것인지를 확인하기 위하여 VHL이 다중 유비퀴틴화되는지를 조사하였다. 이를 위하여 His-Ub 발현백터를 이용한 In vivo 및 In vitro VHL 유비퀴틴화 분석(ubiquitylation assay)과 E1을 사용한 효소반응을 실시하였다. 이를 위해 UCP 및 UCPm를 EcoR1/NotI으로 pGEX4T-1 벡터에 클로닝하고 대장균 DH5 α 에서 발현시켜 GST-세파로스 컬럼을 이용하여 GST-UCP, GST-UCPm을 분리하였으며, Flag-VHL을 HEK293에 도입시켜 발현시킨 후 이로부터 Flag-아가로스 겔 면역침강법을 이용하여 Flag-VHL만을 순수 분리하였다.

<130> <실시예 3-1> UCP에 의한 In vivo VHL 유비퀴틴화 검증

<131> HEK293 세포주에 먼저 His-Ub 발현백터를 칼슘 포스페이트 방법으로 도입하여 배양시킨 후 동량의 세포를 100 mm 배양 접시에 나누어 배양한 다음 여기에 도 4a에 제시한 Flag-VHL, Flag-VHL과 GST-UCP, Flag-VHL과 GST 발현 백터들을 다시 칼슘 포스페이트 방법으로 도입시켰다. 수거 12시간 전에 10 μ M의 MG132를 처리하고 세포들을 수거하여 바로 denatured lysis buffer(50 mM Tris, 1% SDS, 4 M Urea)를 첨가하고 초음파 분쇄기로써 세포를 파쇄하였다. 준비된 세포파쇄용액에 플래그 항체가 결합된 아가로스 겔을 첨가하고 실온에서 2시간 면역침강반응을 실시하였다. 이를 마우스 항 Ub 항체로 상기 기술한바와 같이 웨스턴 블랏을 실시하고, 더불어 면역침강반응전의 세포 파쇄 용액의 일부를 취하여 마우스 항 GST 항체, 마우스 항 Flag 항체로써 동일한 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 UCP에 의한 Flag-VHL의 다중 유비퀴틴화를 관찰할 수 있었다(도 4a).

<132> <실시예 3-2> UCP에 의한 In vitro VHL 유비퀴틴화 검증

<133> His-Ub, Flag-VHL, GST-UCP, GST 발현 백터들을 각각 칼슘 포스페이트 방법으로 HEK293 세포주에 도입하고 24시간 후 세포를 수거하여 세포파쇄용액(50mM Tris, 0.5mM EDTA, 0.1% NP-40, 0.5mM PMSF)에 녹여 준비하였다. His-Ub 함유세포용액(100 μ l), GST-UCP 세포용액(100 μ l)이 혼합된 균(최종 혼합 반응액의 양을 300 μ l을 맞추기 위해 아무것도 처리하지 않은 HEK293 세포주의 세포 용액 100 μ l 첨가), 각 100 μ l의 His-ub 세포용액, GST-UCP 세포용액, Flag-VHL 세포용액이 혼합된 균, 각 100 μ l의 His-ub 세포용액, GST 세포용액, Flag-VHL 세포용액이 혼합된 균에 최종 농도 10 μ M의 MG132를 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고, 플래그 항체가 결합된 아가로스 겔을 첨가된 2 X denatured lysis buffer(50 mM Tris, 1% SDS, 4 M Urea)를 1:1로 넣어 실온에서 2시간 면역침강반응을 실시하였다. 이를 마우스 항 Ub 항체로 상기 기술한바와 같이 웨스턴 블랏을 실시하고, 더불어 반응전의 세포 파쇄 용액의 일부를 취하여 마우스 항 GST 항체, 마우스 항 Flag 항체로써 동일한 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 시험관내에서 GST-UCP에 의한 Flag-VHL의 유비퀴틴화를 관찰할 수 있었다(도 4b). 위 결과는 UCP가 존재할 때 VHL의 유비퀴틴화가 증가한다는 것을 제시해 준다.

<134> 1 μ g의 E1(Rabbit, Sigma)과 순수 분리된 GST-UCP 및 GST-UCPm, Flag-VHL 단백질들을 각각 유비퀴틴화 완충용액(50 mM Tris, 1 mM ATP, 10 mM creatine phosphate, 10 μ g creatine phosphokinase, 0.5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 μ g ubiquitin aldehyde, 1 μ g His-ubiquitin)에 섞고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 시킨 후 Ni²⁺-NTA resin으로써 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 침강 시키고 이를 각각 마우스 항 Flag 항체, 마우스 항 GST 항체로 웨스턴 블랏을

실시하였다. 또한 Ni²⁺-NTA(QIUAGEN, GERMANY) pull-down 시키기 전의 반응후 시료로부터 1/10을 취하여 항 플래그 항체, 마우스 항 GST 항체로 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 UCP에 의한 VHL의 직접적인 유비퀴틴화가 시험관내에서 일어남을 알 수 있었다(도3c).

<135> 상기한 결과들은 UCP가 E2 유비퀴틴 콘주게이션 효소 및 E3 유비퀴틴 리가제로서 기능하여 VHL의 유비퀴틴화를 증가시켜 단백질 분해를 유도한다는 것으로 보여준다.

<136> <실시예 4> VHL 안정성에서의 UCP의 특이성 검증

<137> UCP와 VHL의 상호작용에 따른 VHL의 단백질 농도 감소현상이 다른 단백질들에 의해서도 일어나는지 혹은 VHL의 경우에만 특이적으로 일어나는지를 검증하고자 하였다. 더불어 VHL은 그 복합체인 Elongin B, Elongin C와 결합하지 못할 때, UbcH5C 또는 CDC34와 같은 E2 효소와 Rbx1에 의해 시험관내에서 유비퀴틴화 된다고 보고된 바 있다(JBC 277, 30338-30393, 2002). 이에 근거하여 UCP외에 다른 E2 효소(UbcH5C 및 CDC34)와 Rbx1이 세포배양 수준에서 VHL의 농도를 조절할 수 있는지 시험하여 보았다. 또한 VHL와 구조가 유사하고 Elongin B, Elongin C와 결합하여 복합체를 이루는 SOCS1(suppressor of cytokine signaling 1: PNAS USA 95, 13130-13144, 1998)을 UCP가 조절할 수 있는지도 시험하여 보았다. 이를 위해 GST-UbcH5C와 GST-CDC34는 BamHI/NotI으로 pEBG 벡터에 클로닝 하여 제작하였다.

<138> <실시예 4-1> UCP가 Elongin B 및 C와 Rbx1의 안정성에 미치는 효과 조사

<139> 10 µg의 Flag-UCP 발현벡터를 칼슘-포스페이트 방법으로 도입시키거나 혹은 도입하지 않은 HEK293T 세포를 -70℃에서 냉동 후 세포 파쇄 용액(50 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 50 mM KCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF)에 녹여 준비하였다. 이를 마우스 항 플래그 항체, 마우스 항 VHL 항체, 토끼 항 Elongin B, 토끼 항 Elongin C 항체, 토끼 항 Rbx1 항체 및 마우스 항 β-actin항체로써 상기 방법과 같이 웨스턴 블랏을 실시하여 본 결과, VHL의 단백질 농도는 UCP에 의해 현저히 감소하였으며, Elongin C는 약간의 감소가 있는 것으로 보였으나, 그러나 다른 분자들의 농도는 변화가 없었다(도 5a). Elongin C의 농도가 약간 감소하는 현상은 VHL의 농도가 현저히 감소함으로써 유리 Elongin C의 반감기가 감소하여 나타나는 것으로 추정되었다.

<140> <실시예 4-2> UCP가 SOCS1 및 MDM2 안정성에 미치는 효과 조사

<141> HEK293 세포주에 Flag-VHL 및 Flag-SOCS1 발현벡터를 각각 칼슘 포스페이트 방법으로 도입시키고 이를 6 웰 플레이트에 각각 균일하게 나누어 배양하고 24시간 후 GST-UCP 및 GST 발현벡터를 다시 각각 동일방법으로 도입시켰다. 24시간 후에 세포를 수거하고 -70℃에 냉동시킨 후 상기한 세포 파쇄용액에 녹여 준비하였다. 이를 마우스 항 Flag 항체, 마우스 항 GST 항체, 마우스 항 액틴(actin) 항체를 이용하여 상기 기술한 웨스턴 블랏 방법을 실시하였다. 그 결과 UCP는 SOCS1의 농도에는 영향을 미치지 않았으며, VHL의 세포내 농도만을 감소시킨 것으로 나타났다(도 5b).

<142> UCP가 RING 핑거(finger) 구조를 가진 MDM2의 세포내 단백질 농도를 조절할 수 있는지를 JSHC 간암 세포주에서 UbcH5C를 양성 대조로하여 시험하여 보았다. 100 mm 배양접시에 준비된 JSHC에 GST-UbcH5c, GST-UCP 및 GST 발현벡터를 각 10 µg씩 칼슘 포스페이트 방법으로 도입시키고, 48시간 후 세포들을 수거하고 면역침전 완충액(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)으로 파쇄하였다. 이를 마우스 항 MDM2 항체(Pharmingen), 마우스 항 GST, 마우스 항 액틴을 이용하여 상기 기술한 웨스턴 블랏 방법을 실시하였다. 그 결과 UbcH5C는 MDM2의 농도를 감소시킨 반면, UCP는 MDM2의 농도에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(도 5c).

<143> <실시예 4-3> Ubiquitin 공여 E2 효소 및 Rbx1에 의한 VHL의 안정성 조사

<144> 293/HA-VHL 세포주에 GST-Rbx1, GST-UbcH5C, GST-CDC34, GST-UCP 발현벡터들을 각각 칼슘-포스페이트 방법으로 도입시키고 세포들을 수거하여 상기세포 파쇄 용액으로 파쇄하였다. 각각의 파쇄액을 마우스 항 HA 항체, 마우스 항 GST항체 로써 상기 방법과 기술한 방법과 같이 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 GST-Rbx1, GST-UbcH5C, CDC34등은 HA-VHL의 안정성에 아무런 영향도 미치지 않았으며, GST-UCP만이 HA-VHL의 세포내 농도를 감소시키는 것을 알 수 있었다(도 5d).

<145> 이상의 결과로부터 UCP는 적어도 본 발명자들이 검증한 시험군에서는 VHL의 유비퀴틴-매개 단백질 분해(ubiquitin-mediated proteolysis)를 유도하는 E3 유비퀴틴 리가제 활성을 갖는 단백질임을 확인하였다.

<146> <실시예 5> 암 세포 성장 및 침투(전이)에서 UCP의 기능 규명

<147> 이상에서 얻은 결과들은 UCP가 암 억제 단백질중의 하나인 VHL의 분해를 촉진 시킨다는 것을 보여준다. 이러한 현상은 암의 진행 및 전이에 UCP가 중요한 역할을 담당하고 있을 수 있다는 가설을 가능하게 하며 치료용 분자 표적으로 이용가능성도 함께 제시하여 준다. 그러므로 본 발명자들은 각종 암세포에서의 UCP 발현과 VHL 발현양상을 조사하고 UCP 과발현 및 억제에 따른 암 세포의 증식 및 침투(전이) 효과를 시험하여 보았다.

<148> <실시예 5-1> 각종 암세포에서 UCP와 VHL의 발현 양상 비교

<149> 담도암 세포주(CK-K1), 간암 세포주(Sk-hep1, Huh-7, HepG2, HLK3), 신장암 세포주(CAKI), 피부암 세포주(C8161)와 정상 섬유아 세포 MRC5 및 양성 대조군으로 Flag-UCP를 도입한 HEK293를 HDMEM(4.5g/l 글루코스, 10% 우태아 혈청, 100unit/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 함유)에 100 mm 배양접시에 세포 수 10⁶으로 24시간동안 배양하여 준비한 다음, 세포를 수거하고 -70℃에 냉동시킨 후 상기한 세포 파쇄용액에 녹여 준비하였다. 이를 마우스 항 UCP 항체, 마우스 항 VHL 항체, 마우스 항 액틴(actin) 항체를 이용하여 상기 기술한 웨스턴 블랏 방법을 실시하였다. 그 결과 담도암 세포주 CK-K1, 간암 세포주 Sk-hep1, Huh-7, 피부암 세포주 C8161에서는 UCP의 발현이 높은 반면 VHL의 발현은 실험에서 확인되지 않을 정도로 낮았다. 그리고 신장암 세포주 CAKI에서는 VHL의 발현이 높은 반면 UCP의 발현은 거의 감지되지 않았다. UCP 및 VHL의 발현이 모두 존재하는 세포주로는 간암 세포주 HepG2, HLK3 등이 있었다(도 6a).

<150> <실시예 5-2> UCP가 암 세포의 증식 및 침투에 미치는 영향

<151> 신장암 세포주 CAKI에 Flag-UCP를 함유하는 아데노바이러스(Ad.F-UCP, 50, 100 multiplicity of infection: MOI) 및 대조 바이러스로서 GFP를 함유하는 아데노바이러스(Ad.GFP, 100 MOI)를 감염시키고 48시간 후 세포를 수거하여 -70℃에 냉동시킨 후 상기한 세포 파쇄용액에 녹여 준비하였다. 이를 마우스 항 프래그 항체, 마우스 항 VHL 항체, 마우스 항 HIF-1α 항체, 마우스 항 액틴 항체를 이용하여 상기 기술한 웨스턴 블랏 방법을 실시하였으며, VEGF mRNA의 변화는 VEGF, Actin을 [³²P]dCTP 방사능으로 표지 시켜 상기 기술한 방법과 같이 노던 블랏을 실시함으로써 확인하였다. 그 결과 VHL의 발현이 높은 신장암 세포주 CAKI에서 UCP가 과발현 될 경우 VHL의 농도가 감소하였으며, 이에 따라 HIF-1α 과 VEGF의 농도는 증가하는 것으로 나타났다(도 6b).

<152> 신장암 세포주 CAKI에 각각 Ad.F-UCP 와 Ad.GFP를 50 MOI씩 감염시키고, 또 대조군으로 PBS를 처리하여 16시간 후 웰 플레이트에 100개씩의 세포를 심어 2일 간격으로 세포 수를 헤마사이토미터를 이용하여 측정하여 보았을 때, UCP가 과발현 됨에 따라 세포의 성장율이 약 2.5배 정도 증가하는 것으로 나타났다(도 6c). 더불어 CAKI 세포주의 전이능력의 변화를 침습도 분석(invasion assay)으로써 측정하여 보았다. 각각 Ad.F-UCP 와 Ad.GFP를 50 MOI씩 감염시키고, 또 대조군으로 PBS를 처리하여 16시간 후, 매트릭젤(Matrigel, BD)이 코팅된 트랜스웰(Trans well, Costar)에 10⁴ 개의 세포를 넣어 24시간 동안 HDMEM(4.5g/l 글루코스, 10% FBS, 100 µg penicillin/streptomycin)에서 배양한 후 Trans well을 통과한 세포를 헤마톡실린-에오신 염색법으로 염색하여 그 수를 측정하였다. 그 결과 UCP가 과량 존재할 경우 침투율이 대조군에 비하여 5배 정도 증가한 것으로 나타났다(도 6d).

<153> <실시예 5-3> siRNA를 이용한 UCP의 단백질 합성의 차단이 암세포의 증식 및 침투에 미치는 영향

<154> 폐에 전이를 유도하는 피부암 C8161 세포주는 UCP의 발현이 높은 것으로 앞 실험에서 나타났다(도 6a, 라인 8). 본 발명자들은 UCP의 발현을 억제하기 위하여 UCP에 대한 siRNA를 고안하고 UCP-siRNA를 함유하는 아데노바이러스를 제작하였다. UCP-siRNA염기서열은 UCP mRNA 서열중 서열번호 2로 기재되는 615-633 염기부분을 H1 프로모터에 의해 발현되도록 pSuper 플라스미드 벡터(OligoEngine)의 Hind III/Bgl II 부위에 클로닝하여 제작되었다. 세포 내로 전달 및 발현을 원하는 유전자를 제공하는 아데노바이러스 제작용 pShuttle(BD Bioscience) 벡터에 상기 제작된 pSuper 플라스미드 벡터를 Xba I/Hind III로 처리하여 H1 프로모터에서 T₅ 전사종료 서열을 함유하는 DNA 절편을 클로닝함으로써 제작하였다(pShuttle/UCP-siRNA). 이후 아데노바이러스 유전자를 포함하고 있는 pAdEasy-1과 E. coli BJ5183 균주에 동시에 형질도입 함으로써 재조합을 수행하였다. 만들어진 UCP-siRNA를 포함하는 아데노바이러스 벡터를 이용하여 실시예 2와 같은 방법으로 아데노바이러스 입자를 만들었다. 또한 대조 바이러스로서 서열번호 3(5'-GCUCACCCUGAAAUAUCAUC-3')으로 기재되는 GFP-siRNA를 위와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

<155> 피부암 세포주 C8161에 Ad.F-UCP, Ad.UCP-siRNA, 대조 바이러스로서 Ad.GFP, Ad. GFP-siRNA를 각각 50 MOI씩 감염시키고 48시간 후 세포를 수거하여 -70℃에 냉동시킨 후 세포 파쇄용액(50 mM Tris, 0.5 mM EDTA,

50 mM KCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF)에 녹여 준비하였다. 이를 마우스 항 플래그 항체, 마우스 항 VHL 항체, 마우스 항 HIF-1 α 항체, 마우스 항 actin 항체를 이용하여 상기 기술한 웨스턴 블랏 방법을 실시하였다. 그 결과 UCP의 발현이 높을수록 HIF-1 α 의 발현이 높아 졌으며, UCP의 발현을 억제하였을 경우 VHL의 농도가 증가하는 것으로 관찰할 수 있었다(도 6e). 피부암 세포주 C8161에 Ad.F-UCP, Ad.UCP-siRNA, 대조 바이러스로서 Ad.GFP, Ad. GFP-siRNA를 각각 50 MOI씩 감염시키고, 또 대조군으로 PBS를 처리하여 16시간 후 웰 플레이트에 100개씩의 세포를 심어 2일 간격으로 세포 성장수를 헤마사이토 미터를 이용하여 측정하여 보았을 때, UCP가 과발현 됨에 따라 세포의 성장율이 약 2 배 정도 증가하는 것으로 나타났으며, UCP의 발현억제는 세포의 성장율을 약 2.5배 정도 낮추는 것으로 나타났다(도 6f). 더불어 UCP에 의한 C8161 세포주의 전이능력의 변화를 invasion assay로서 측정하여보았다. 위와 동일하게 처리된 C8161 세포들을 16시간 후, Matrigel(BD)이 코팅된 Trans well(Costar)에 10⁴ 개의 세포를 넣어 24시간 동안 HDMEM(10% 우태아 혈청, 100 μ g 페니실린, 스트렙토마이신 첨가)에서 배양한 후 트랜스 웰을 통과한 세포를 헤마톡실린-에오신 염색법으로 염색하여 그 수를 측정하였다. 그 결과 UCP 과발현에 의하여 세포의 침투율이 대조군에 비하여 3배 정도 증가하였으며, UCP 발현을 억제한 경우는 4배 정도 감소한 것으로 나타났다(도 6g).

<156> 이상의 결과는 UCP는 암의 성장 및 전이에 중요한 역할을 수행하고 있으며, UCP의 발현을 저해함으로써 암의 성장 및 전이를 억제할 수 있을 것으로 사료되었다.

<157> <실시예 6> 마우스 종양 모델에서 UCP가 암 성장 및 암 전이에 미치는 효과 조사

<158> <6-1> 마우스 모델에서 UCP에 의한 C8161 암세포의 증식효과 조사

<159> 5 \times 10⁵개의 C8161 세포에 Ad.F-UCP와 Ad.GFP를 각 100 MOI씩 감염시키거나 인산완충액으로 처리한 후 각각의 C8161 세포를 6 주령의 암컷 누드마우스에 피하주사였다(각 군당 생쥐 6마리). 생쥐에 이식된 C8161 암세포의 성장변화를 21일 동안 종양의 크기를 측정하여 조사하였다. 종양의 크기는 ‘가로2 \times 세로2 / 2 = 종양 부피(mm³)’ 공식을 이용하여 계산하였다. 그 결과 UCP에 의해서 종양의 크기가 대조군에 비하여 약 4배 증가함을 알 수 있었다(도 7a 및 b). UCP에 의한 HIF-1 α 와 혈관 생성의 증가를 확인하기 위하여 적절한 종양을 동결조직 블록을 만들어 절편을 준비하고 마우스 항 Flag 항체, 마우스 항 HIF-1 α 항체, 마우스 항 CD31 항체(Phamingen)에 대한 면역조직화학염색을 상기 기술된 방법과 같이 실시하였다. Ad.F-UCP로 형질전환된 암피에서 HIF-1 α 와 CD31의 발현이 대조군에 비해 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 8c).

<160> <6-2> 종양이 형성된 누드마우스 모델에서 Ad.UCP-siRNA 바이러스의 항암효과

<162> UCP-siRNA에 의한 C8161 세포의 UCP 발현 저해가 종양의 성장에 미치는 효과를 검증하기 위하여 5 X 10⁵개의 C8161 세포를 누드마우스의 피하에 주사하고, 2주일 후 종양이 평균 직경 3 mm로 되었을 때 각각 10⁹ pfu(plaque-forming unit)의 정제된 Ad.UCP-siRNA 또는 Ad.GFP-siRNA 바이러스를 함유하거나 함유하지 않은 포스페이트 완충용액 100 μ l를 종양피에 직접 한번 주사하고 이후 종양의 크기를 17일 간 측정하였다. C8161에서 UCP의 발현에 저하에 따른 종양 성장 억제 효과가 현저하게 나타났다(도 8d).

<163> <실시예 5-3> 인간 흑색종 세포에서 UCP가 암 전이에 미치는 효과 조사

<164> 인간 흑색종 세포 C8161(5 \times 10⁵개)에 Ad.F-UCP, Ad.GFP, Ad.UCP-siRNA, Ad.GFP-siRNA를 100 MOI씩 감염시킨 후 인산완충액으로 처리한 각각의 C8161 세포를 6 주령의 암컷 누드마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. 이때 PBS만을 누드마우스의 꼬리 정맥에 주사한 것을 대조군으로 하였다.

<165> 암 세포를 생쥐에 주사한 지 4주후 생쥐의 폐를 적출하여 물로 세척하고, Bouin's solution(SIGMA)에서 고정하였다. 적출한 폐 기관의 모습(도 7f)과 폐의 표면에 전이된 암피(> 직경 2 mm)를 현미경하에서 카운팅한 후, 평균값을 도 7e에 나타내었다.

<166> 그 결과, PBS(C8161 포함), Ad.GFP, Ad.GFP-siRNA으로 처리한 암세포의 경우 폐에 전이된 전이암이 17, 22, 23개가 관찰된 반면, PBS만을 주사한 경우 전이암이 하나도 관찰되지 않았는데 이는 폐 전이암은 암세포 주입에 의해 발생하였음을 나타낸다.

<167> 한편, Ad.F-UCP를 이용하여 UCP를 과발현시켰을 경우 폐 전이암은 약 6-8배 증가한 반면에, Ad.UCP-siRNA를 이용하여 UCP의 발현을 억제하였을 경우에는 폐 전이암이 약 6-7배 정도 감소하였다. 상기 결과는 UCP

가 암 전이에 양성 인자로 작용하며 UCP 발현을 낮추거나, 활성을 제어하면 암의 전이를 억제할 수 있음을 나타낸다.

<168> 상기한 결과들은 UCP가 생쥐 종양모델에서 암 세포의 증식 및 전이를 증가시키고, UCP의 기능을 제어하면 암 세포의 증식 및 전이가 저해됨을 나타내므로 UCP가 암 치료를 위한 분자 표적으로 유용하게 활용될 수 있음이 확인되었다.

발명의 효과

<169> 상기에서 살펴본 바와 같이, UCP 발현이 증가하면 암 억제 단백질인 VHL에 다중유비퀴틴화가 되어 프로테아좀에 의하여 VHL이 분해되고, 이에 따라 HIF-1 α 가 안정화되어 혈관생성 촉진인자 VEGF의 증가가 유도됨을 알 수 있었다. 따라서 암세포에서 UCP 활성의 억제는 VHL의 세포내 농도를 증가시키고, HIF-1 α 의 분해를 촉진하여 암의 증식 및 전이를 억제하므로, 본 발명의 UCP의 활성 억제제는 항암제로 이용될 수 있다. 또한 UCP의 과 발현은 VHL을 분해시키고, 이에 따라 HIF-1 α 가 안정화되어 혈관생성 촉진인자 VEGF의 증가가 유도되므로 부실한 혈관생성에 기인하는 허혈성 질환, 예를 들어 현존하는 의약 수단으로 치료가 가능하지 않아 사지절단술을 받아야만 하는 심한 사지 허혈(critical limb ischemia, CLI) 환자들, 수술이 가능하지 않은 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD) 환자들, 혈류의 공급이 부실하여 생기는 치매, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 당뇨병 신경장애(diabetic neuropathy), 뇌졸중(stroke) 환자들을 포함하는 난치성 질환을 갖고 있는 사람들의 유전자 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

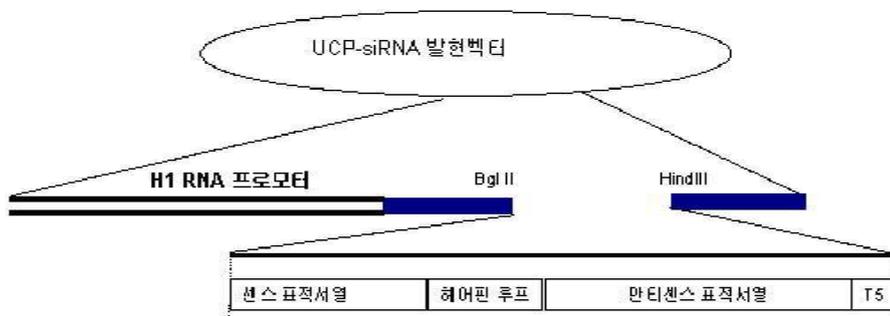
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1a는 플라스미드 형태의 UCP-siRNA 발현벡터의 개략도와 UCP-siRNA 서열이고,
- <2> 도 1b는 Ad.UCP-siRNA 벡터 제작 과정을 나타낸 모식도이고,
- <3> 도 1c는 Ad.F-UCP 제작 과정을 나타낸 모식도이고,
- <4> 도 2의 a, b 및 c는 UCP가 VHL과 세포 내에서 서로 특이적으로 결합하고 있음을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고,
- <5> 도 2d는 VHL이 Elongin B, C, Rbx1과 함께 VHL E3 유비퀴틴 리가제(ubiquitin ligase) 활성을 나타내는 복합체를 형성하나 UCP는 VHL E3 리가제 복합체에 존재하지 않고, VHL과 독립적인 복합체를 형성하고 있음을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고,
- <6> 도 3a는 UCP를 과발현시켰을 때 세포내 VHL 단백질이 26S 프로테아좀(proteasome)에 의해 분해되므로서 HIF-1 α 가 안정화되는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고,
- <7> 도 3b는 UCP가 VHL, HIF-1 α 의 mRNA 발현량에는 영향을 주지 않으나, HIF-1 α 단백질의 안정화를 통하여 혈관생성촉진인자(vascular endothelial factor, VEGF)의 발현을 증가시킴을 나타내는 노던 블롯 사진이고,
- <8> 도 3c는 UCP를 과발현시킨 세포를 정상산소 및 저산소 조건에서 배양하였을 때, UCP 발현량에 의존적으로 VHL 단백질은 감소하고 HIF-1 α 단백질은 증가됨을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고,
- <9> 도 3d는 도 3c의 조건에서 저산소 반응요소(hypoxia response element, HRE)의 조절하에 있을 때, 리포터 유전자의 활성을 조사한 것으로 UCP를 과발현시킨 세포에서 HIF-1 α 단백질 증가에 따라 HRE-리포터의 활성이 증가함을 나타내는 그래프이고,
- <10> 도 3e는 VHL 단백질의 감소가 UCP 효소 활성 의존적으로 나타난다는 것을 나타낸 웨스턴 블롯 사진이고,
- <11> 도 3f는 배양세포에서 아데노바이러스 유전자 전달체(Ad.F-UCP)를 이용하여 UCP를 생쥐 간에 전달하였을 때, VHL 단백질이 감소되고, HIF-1 α 단백질이 증가함을 나타내는 면역조직화학 염색사진이고,
- <12> 도 4는 UCP 단백질이 배양세포(도 4a) 및 시험관내(도 4b 및 c)에서 VHL 단백질의 다중 유비퀴틴화(multiubiquitination)를 유도함을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고,
- <13> 도 5a 내지 d는 UCP가 VHL 단백질만을 특이적으로 분해시킨다는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이며,
- <14> 도 6a는 각종 암세포주에서 UCP와 VHL 단백질의 발현량이 역비례함을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고,

- <15> 도 6b는 UCP 발현이 낮고 VHL이 과발현된 CAKI 신장암 세포에 Ad.F-UCP를 이용하여 UCP를 과 발현시켰을 때, VHL 단백질의 발현이 소실되고 HIF-1 α 단백질 발현량이 증가되고 이에 따라 VEGF의 발현이 증가됨을 나타내는 웨스턴 블롯 사진 및 노던 블롯사진이고,
- <16> 도 6c는 CAKI 신장암 세포에 Ad.F-UCP를 이용하여 UCP를 과발현시켰을 경우 암 세포의 증식이 촉진됨을 나타내는 그래프이고,
- <17> 도 6d는 CAKI 신장암 세포에 UCP를 과발현시켰을 경우 암 세포의 침투가 증가됨을 나타내는 그래프이고,
- <18> 도 6e는 UCP-siRNA를 발현하는 아데노바이러스 벡터를 이용하여 UCP 단백질의 발현을 차단하였을 경우 VHL 단백질의 발현이 증가되고, HIF-1 α 단백질 발현량이 감소됨을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이고,
- <19> 도 6f는 Ad. UCP-siRNA를 이용하여 UCP 단백질의 발현을 차단하였을 경우 사람의 흑색종 암세포(C8161)의 증식이 저해됨을 나타내는 그래프이고,
- <20> 도 6g는 UCP 단백질의 발현을 차단하였을 때 사람의 흑색종 암세포(C8161)의 침투가 저해됨을 나타내는 그래프이고,
- <21> 도 7a는 사람의 흑색종 암세포(C8161)에 Ad.F-UCP를 도입한 후 암세포를 누드 마우스의 피하에 이식하면 암 세포의 증식이 촉진됨을 나타내는 그래프이고,
- <22> 도 7b는 피하 이식 21일 후 생쥐에서 적출한 암괴(tumor nodule)를 나타내는 사진이고,
- <23> 도 7c는 적출한 암괴의 조직 섹션을 만든 후, Ad.F-UCP, HIF-1 α 및 혈관세포의 마커인 CD31의 발현을 면역 조직화학 염색법으로 나타낸 사진이고,
- <24> 도 7d는 사람의 흑색종 암세포(C8161)를 누드 마우스의 피하에 이식하고 암괴를 형성시킨 후 UCP의 발현을 차단하는 Ad.UCP-siRNA 아데노바이러스를 주입한 후, 암 세포의 성장이 유의하게 저해됨을 나타내는 그래프이다.
- <25> 도 7e는 사람의 흑색종 암세포에 Ad.F-UCP 혹은 Ad.UCP-siRNA를 도입한 후 암세포를 누드 마우스의 피하에 이식한 후 암 전이에서 UCP의 효과를 검증한 것으로 UCP가 과발현 되면 암의 폐 전이가 증가하고 UCP 단백질 발현을 차단하면 암의 폐 전이가 억제됨을 나타내는 그래프이고,
- <26> 도 7f는 사람의 흑색종 암세포에 Ad.F-UCP 혹은 Ad.UCP-siRNA를 도입한 후 암세포를 누드 마우스의 피하에 이식한 후 4 주만에 적출한 생쥐의 폐를 보여주는 사진이다.

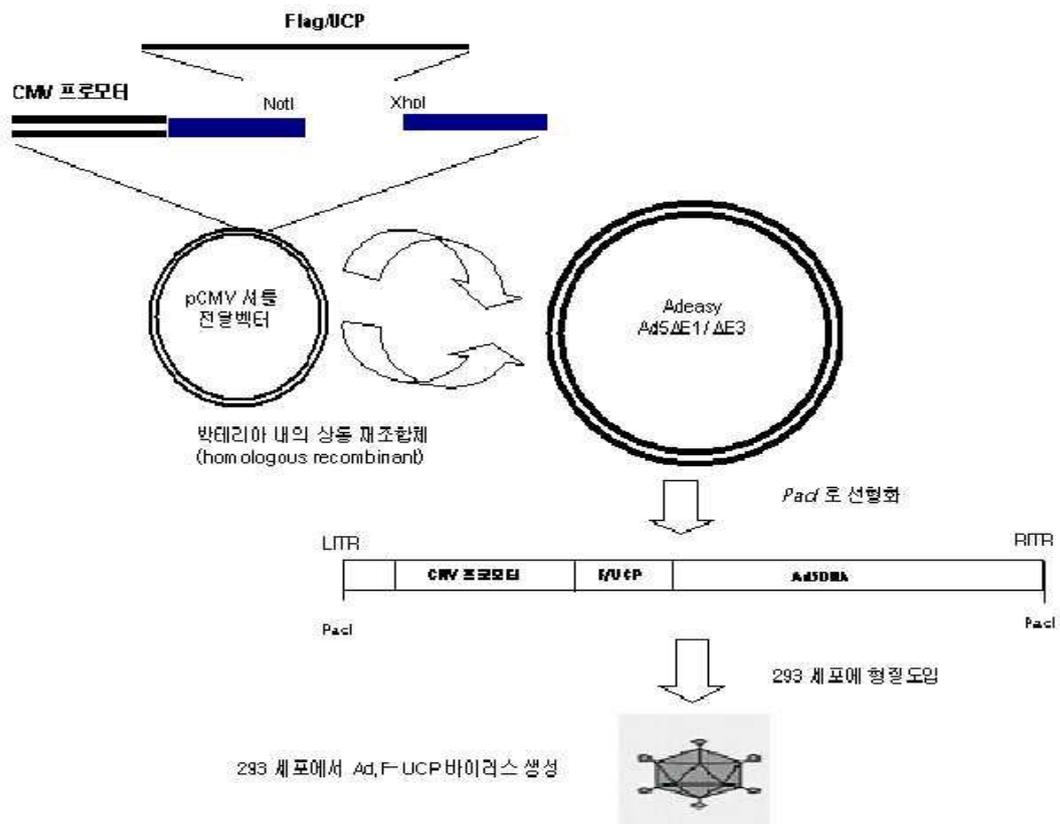
도면

도면1a

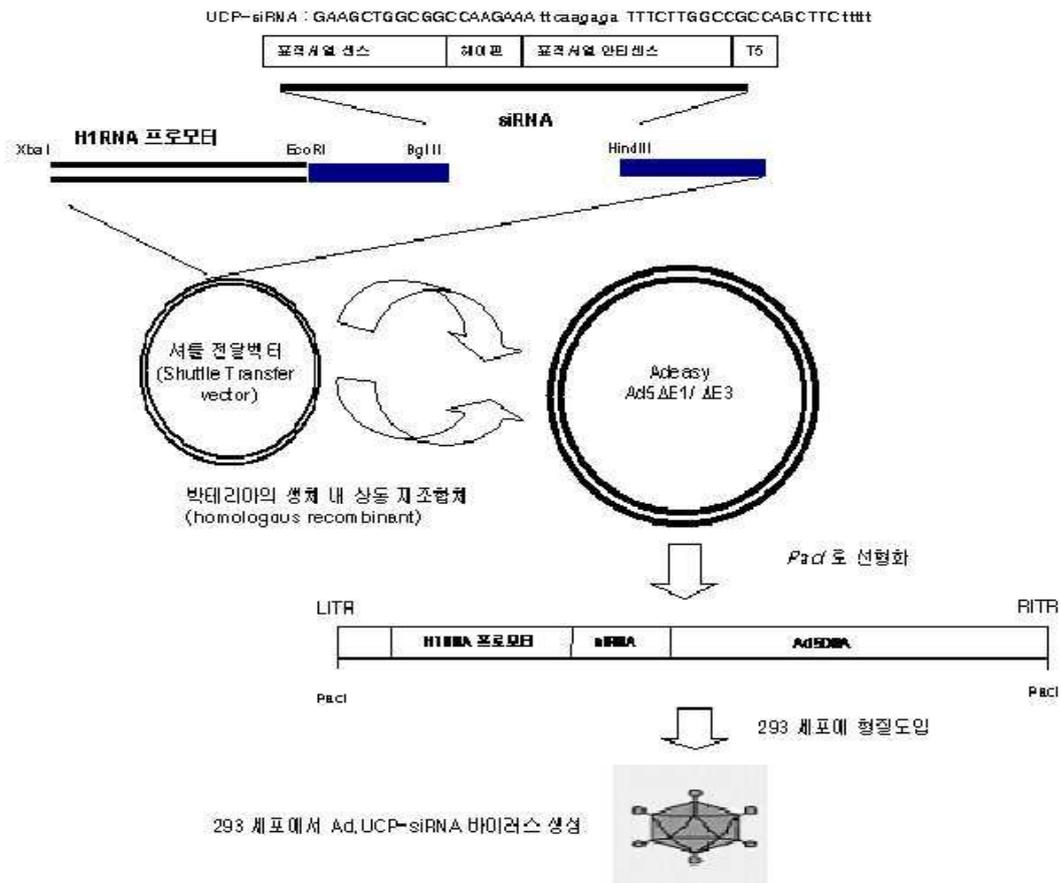


UCP-siRNA : GAAGCTGGCGGCCAAGAAA tcaagaga TTTCTTGGCCGCCAGCTTC tttt

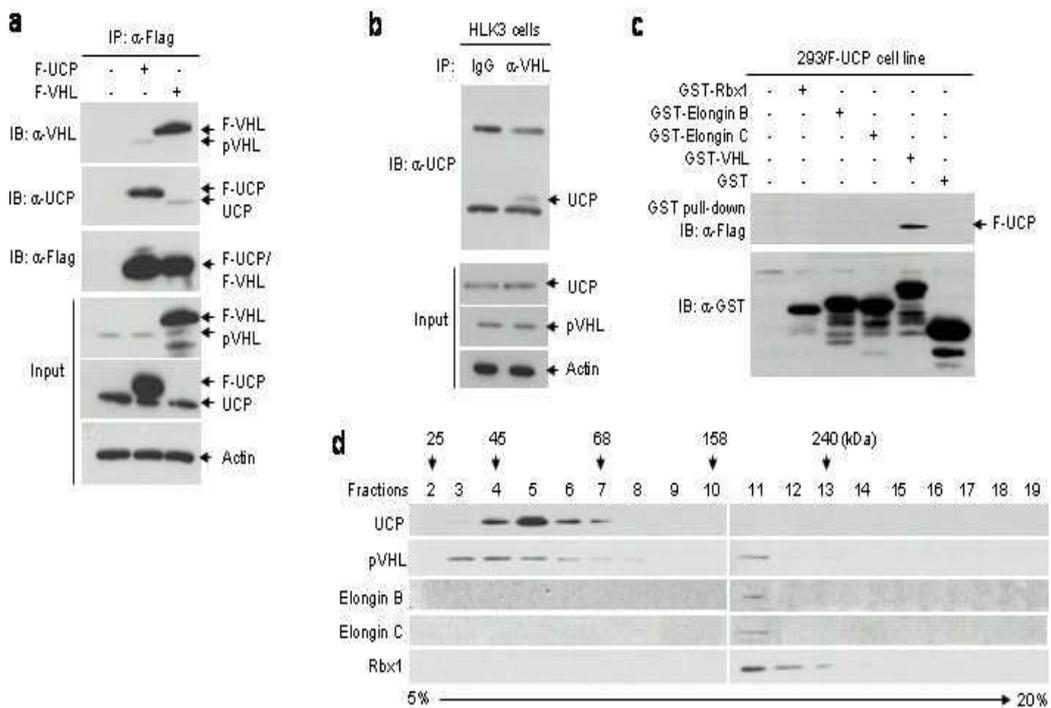
도면1b



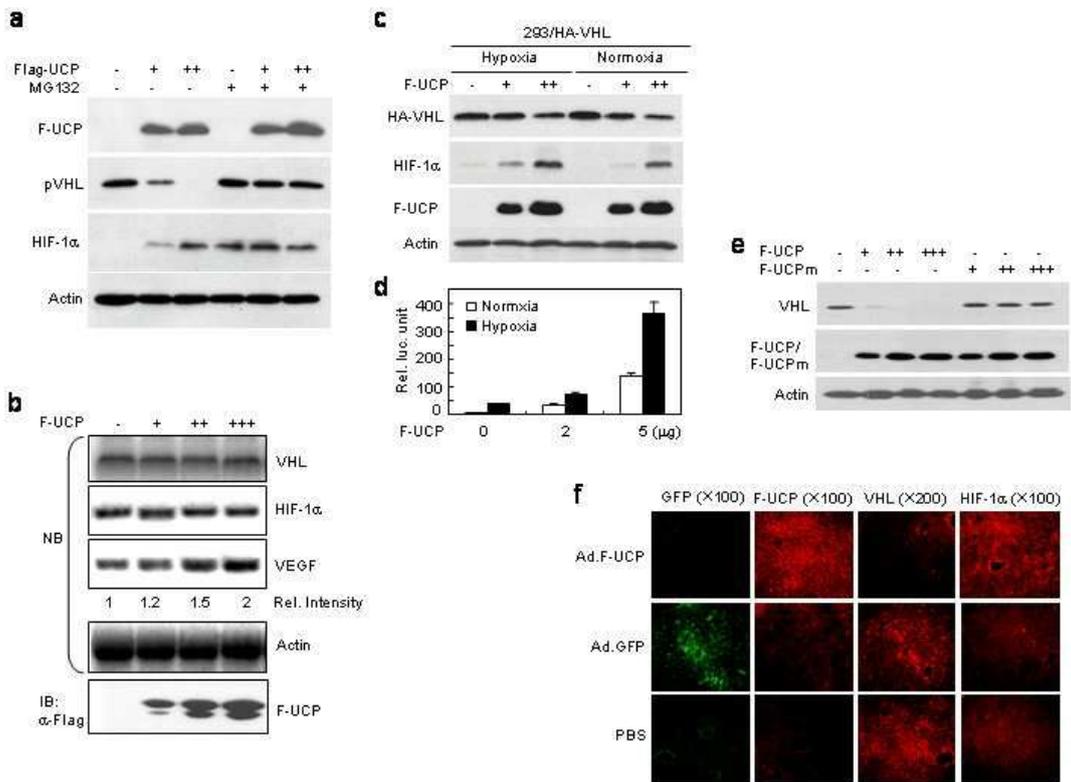
도면1c



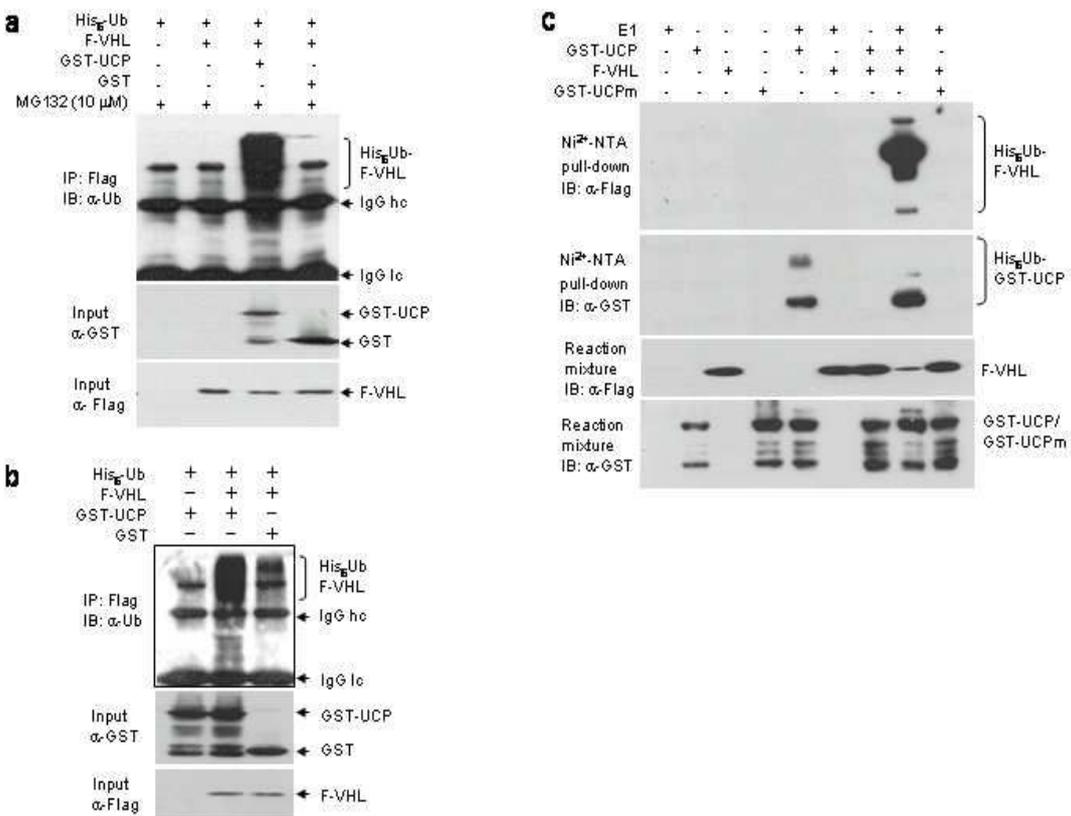
도면2



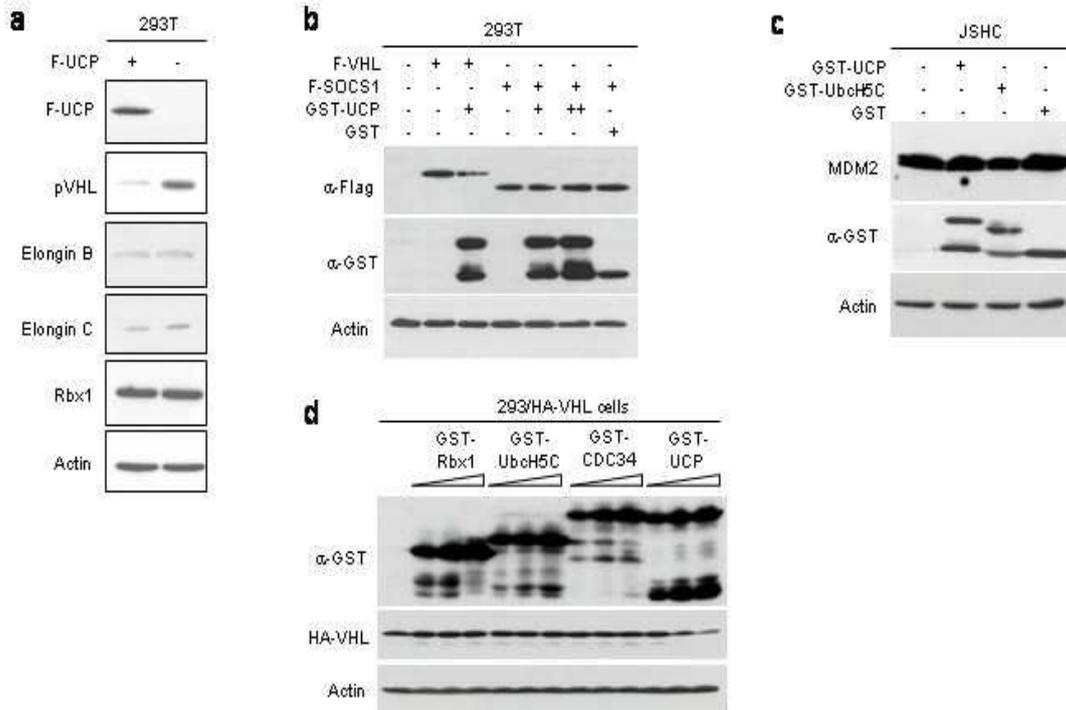
도면3



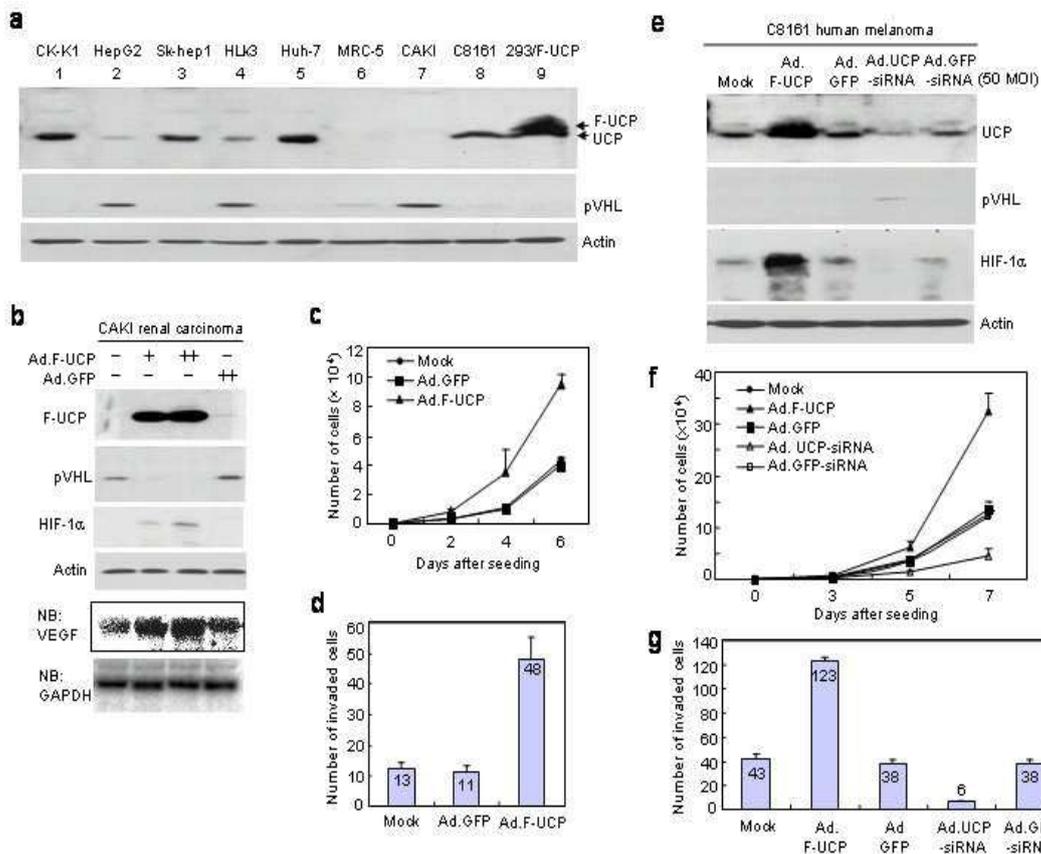
도면4



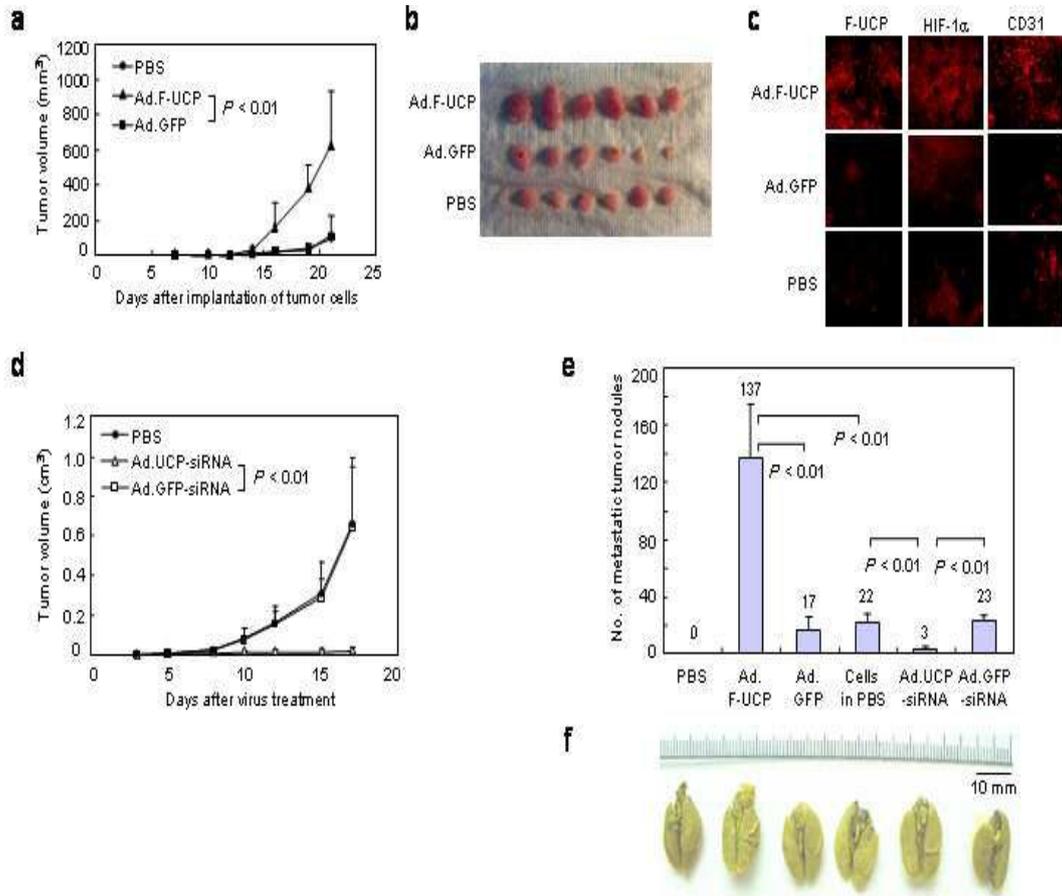
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
 <120> E2EPF ubiquitin carrier protein-von Hippel-Lindau interaction and uses of thereof

<160> 3

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 678

<212> DNA

<213> UCP cDNA sequence

<400> 1

atgaactcca acgtggagaa cctacccccg cacatcatcc gcctggtgta caaggaggtg

60

acgacactga ccgcagacc acccgatggc atcaaggtct tteccaacga ggaggacctc 120

accgacctcc aggtcaccaat cgagggccct gaggggaccc cataatgctgg aggtctgttc 180

cgcatgaaac tctgctggg gaaggacttc cctgcctccc cacccaaggg ctacttctg 240

accaagatct tccaccgaa cgtgggcgcc aatggcgaga tctgctcaa cgtgctcaag 300

agggactgga cggctgagct gggcatccga cacgtactgc tgaccatcaa gtgcctgctg 360

atccacccta accccgagtc tgcaactcaac gaggaggcgg gccgcctgct cttggagaac 420

tacgaggagt atgcggctcg ggcccgtctg ctcacagaga tccacggggg cgccgcggg 480

cccagcgga gggccgaagc cggctgggcc ctggccagtg gcaactgaagc ttctccacc 540

gaccctgggg ccccagggg cccgggaggg gctgagggtc ccatggcca gaagcatgct 600

ggcgagcgcg ataagaagct ggcgccaag aaaaagacgg acaagaagcg ggcgctgcgg 660

gcgctgcggc ggctgtag 678

<210> 2
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA sequence expressing UCP-siRNA

<400> 2
 gaagctggcg gccaaagaat tcaagagatt tcttgccgc cagcttcttt tt 52

<210> 3
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence expressing control-siRNA

<400> 3

gtcacctg aaattcatct tcaagagaga tgaatttcag ggtgagcttt tt

52