



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0136836
(43) 공개일자 2024년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70567 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2024-0021026
(22) 출원일자 2024년02월14일
심사청구일자 2024년02월14일
(30) 우선권주장
1020230028999 2023년03월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
오은택
인천광역시 미추홀구 인하로 100, 60주년기념관 1001호 (용현동, 인하대학교)
박현주
서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 502동 902호 (서초동, 우성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

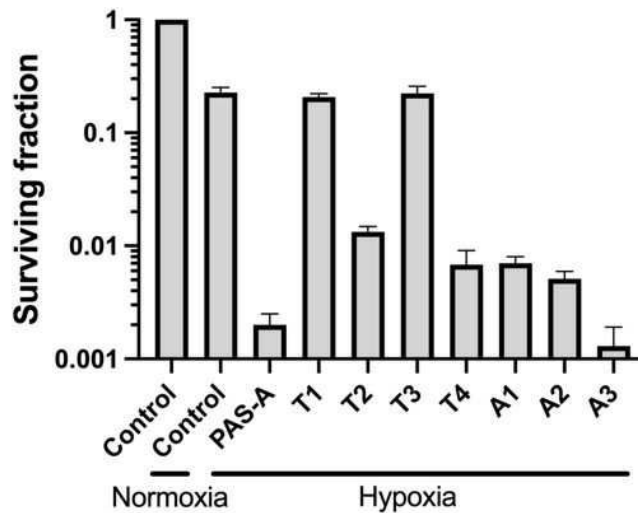
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 HIF-1 α 억제 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 HIF-1 α 억제 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로서, HIF-1 α 단백질의 N-말단 도메인에 결합하는 HIF-1 β 의 N-말단 도메인을 구성하는 펩타이드를 암세포 내에 과발현 하면 HIF-1 α 와 경쟁적으로 결합하여 HIF-1 α 와 HIF-1 β 간의 결합을 저해하고 이를 통해 HIF-1 α 단백질 안정성 저해와 저산소 환경에서 암세포 사멸이 가능한지 확인하였다. 본 발명을 토대로 HIF-1 α 를 표적하는 펩타이드 발현 플라스미드를 함유하는 암 치료용 조성물을 개발하면 효과적인 항암제로 활용 가능할 것으로 기대된다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 15/70 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자

김하경

경기도 수원시 권선구 당진로31번길 51-20, 104동
1502호 (당수동, 서수원1차쌍용스윗닷홈)

조윤미

인천광역시 미추홀구 용정공원로83번길 49, 2457호
(용현동, 인하대역 헤리움 메트로 타워)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711167800
과제번호	2019R1A2C1008142
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	NQ01에 의한 암줄기세포 형성 조절을 통한 암치료 효능 증진 연구
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711170205
과제번호	2020R1A2C2101772
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	췌장암 악성화에서의 NQ01/YAP 신호전달경로 조절과 기능 연구
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711155499
과제번호	2021R1A5A2031612
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	세포교신 제어 연구센터
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시된 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 HIF-1 α 억제 펩타이드.

청구항 2

제1항의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제2항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터.

청구항 4

제3항의 재조합백터로 형질전환된 재조합 균주.

청구항 5

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 펩타이드는 HIF-1 α 와 경쟁적으로 결합하여, HIF-1 α 및 HIF-1 β 간의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 조성물은 저산소 환경에서 HIF-1 α 단백질의 안정성을 저해시켜, 암세포를 사멸시키는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 암은 췌장암, 대장암, 폐암 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 HIF-1 α 억제 펩타이드 및 이의 용도에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] HIFs (hypoxia-inducible factors) 단백질은 종양조직환경 특이적인 저산소 환경에 의해 암세포에서 과발현되고 암세포의 증식과 전이에 관여한다. HIFs 단백질의 안정성이 증가할수록 암세포의 증식과 전이 속도가 증가되며 암치료 저항성 증가에 관여한다. 따라서 HIFs 단백질은 암악성화 진단의 중요한 바이오마커(biomarker)로서 대두되고 있으며, 전 세계적으로 HIFs 단백질을 억제하기 위한 약제 개발이 활발히 진행되고 있다.

[0003] HIFs 단백질은 3개의 α subunit (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α)과 1개의 β subunit (HIF-1 β)으로 구성되어 있다(도 1). HIFs는 반드시 α subunit과 β subunit의 결합을 통해 핵 내로 이동하여 전사인자로서의 역할을 수

행한다. α subunit과 β subunit이 결합하기 위해서 α subunit과 β subunit에 공통으로 보유하고 있는 N-말단 도메인 간의 결합이 필요하다(도 1). α subunit 중 HIF-1 α 가 가장 중요한 subunit이다. 따라서 전 세계적으로 HIF-1 α 를 표적으로 하는 약제의 개발에 관심이 집중되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) PCT 국제공개특허 WO 2017-129997 A1 (2017.08.03 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 HIF-1 α 억제 펩타이드 및 이의 용도에 대한 것으로, 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 HIF-1 α 억제 펩타이드, 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 HIF-1 α 억제 펩타이드를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터 및 상기 재조합백터로 형질전환된 재조합 균주를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 HIF-1 α 억제 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로서, HIF-1 α 단백질의 N-말단 도메인에 결합하는 HIF-1 β 의 N-말단 도메인을 구성하는 펩타이드를 암세포 내에 과발현 하면 HIF-1 α 와 경쟁적으로 결합하여 HIF-1 α 와 HIF-1 β 간의 결합을 저해하고 이를 통해 HIF-1 α 단백질 안정성 저해와 저산소 환경에서 암세포 사멸이 가능한지 확인하였다. 본 발명을 토대로 HIF-1 α 를 표적하는 펩타이드 발현 플라스미드를 함유하는 암 치료용 조성물을 개발하면 효과적인 항암제로 활용 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 HIFs 단백질의 구조를 나타낸다.

도 2는 HIF-1 β 단백질의 구조와 N-말단 도메인들의 염기 서열과 아미노산 서열을 나타낸다. A) HIF-1 β 의 도메인들을 도식화하였고, B) HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B domain들의 염기 서열과 아미노산 서열을 나타낸다.

도 3은 HIF-1 β 의 N-말단 도메인들의 발현되는 염기 서열과 아미노산 서열을 나타낸다.

도 4는 프라이머 서열을 나타낸다. ATG 및 TGA는 각각 시작 코돈 및 정지 코돈을 나타낸다.

도 5는 HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인들을 발현하는 플라스미드가 저산소 환경에서 암세포의 HIF-1 α 의 발현에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸다.

도 6은 PAS-A를 구성하는 펩타이드의 염기 서열과 아미노산 서열을 나타낸다.

도 7은 PAS-A를 구성하는 펩타이드의 발현되는 염기 서열과 아미노산 서열을 나타낸다.

도 8은 프라이머 서열을 나타낸다.

도 9는 HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 펩타이드들을 발현하는 플라스미드가 암세포의 HIF-1 α 의 발현에 미치는

영향 분석 결과를 나타낸다.

도 10은 HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 펩타이드들을 발현하는 플라스미드가 암세포의 세포생존에 미치는 영향 분석 결과를 나타낸다.

도 11은 PAS-A를 구성하는 세부적인 펩타이드의 염기 서열과 아미노산 서열을 나타낸다.

도 12는 PAS-A를 구성하는 세부적인 펩타이드의 발현되는 염기 서열과 아미노산 서열을 나타낸다.

도 13은 프라이머 서열을 나타낸다.

도 14는 HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 세부적인 펩타이드들을 발현하는 플라스미드가 암세포의 HIF-1 α 의 발현에 미치는 영향 분석 결과를 나타낸다.

도 15는 HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 세부적인 펩타이드들을 발현하는 플라스미드가 암세포의 세포생존에 미치는 영향 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 HIF-1 α 억제 펩타이드를 제공한다.
- [0013] 본 발명에서 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HIF-1 α 억제 펩타이드는 HIF-1 β 단백질의 N-말단 도메인 중, PAS-A 도메인의 A2 단편을 포함하고, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HIF-1 α 억제 펩타이드는 HIF-1 β 단백질의 N-말단 도메인 중, PAS-A 도메인의 A3 단편을 포함하며, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 HIF-1 α 억제 펩타이드는 HIF-1 β 단백질의 N-말단 도메인 중, PAS-A 도메인의 A2 및 A3 단편을 포함한다.
- [0014] 본 발명의 펩타이드는 유전공학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 우선, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 합성한다. DNA 서열은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 합성할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(예: Biosearch 또는 AppliedBiosystems사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 제작된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 의해 코딩된 실질적으로 순수한 펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 이 기술분야에서 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 '실질적으로 순수한 펩타이드'라 함은 본 발명에 따른 펩타이드가 숙주로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다.
- [0015] 또한, 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로서 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명에서 상기 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 이의 기능적 변이체를 포함하는 개념이다. “기능적 변이체”란 HIF-1 α 를 억제하는 본 발명의 펩타이드의 성질에는 영향을 미치지 않는 아미노산 위치에서 일부 아미노산의 치환이 발생된 모든 유사한 서열을 의미한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0018] 본 발명에서, 상기 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열, 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열 및 서열번호 3으로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 HIF-1 α 억제 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시하였다.
- [0019] 상기 “폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다.
- [0020] 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보

적인 서열도 포함한다.

- [0021] 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다. 상기 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 95%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터를 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 재조합백터로 형질전환된 재조합 균주를 제공한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, “백터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA 분자를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 있어서, “재조합백터”는 숙주 세포 내에서 삽입된 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하는 것으로서, 당업계에 공지된 통상의 발현백터에 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 상기 재조합백터는 일반적으로 숙주세포에서 증식할 수 있는 복제원점, 발현을 조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열(예, 프로모터, 인핸서 등), 선택 마커(selective marker) 및 발현 조절 서열과 작동가능하게 연결된 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 형질전환체는 상기 재조합백터에 의해 형질전환된 것일 수 있다.
- [0026] 바람직하게는 형질전환체는 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합백터를 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 텍스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침투법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 숙주세포에 도입하여 수득할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0028] 바람직하게는, 상기 펩타이드는 HIF-1 α 와 경쟁적으로 결합하여, HIF-1 α 및 HIF-1 β 간의 결합을 저해할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 바람직하게는, 상기 조성물은 저산소 환경에서 HIF-1 α 단백질의 안정성을 저해시켜, 암세포를 사멸시킬 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 바람직하게는 상기 암은 췌장암, 대장암, 폐암 또는 유방암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 약학 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 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 있다.
- [0032] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

- [0033] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0035] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0036] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0037] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.
- [0038] <실시예 1> HIF-1 α 의 N-말단 도메인에 결합하는 HIF-1 β 의 N-말단 도메인들을 발현하는 플라스미드의 제작
- [0039] HIF-1 β 의 N-말단 도메인들을 발현하는 플라스미드를 제작하기 위해 다음과 같이 연구를 수행하였다.
- [0040] 1) RNA 추출: HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인을 발현하는 플라스미드를 제작하기 위해 MIA-Paca-2 체장암 세포에서 Qiagen사의 RNeasy kits를 이용하여 RNA를 추출하였다. 연구순서는 RNeasy kits에 제공된 protocol을 따랐다.
- [0041] 2) cDNA 합성: 추출한 1 μ g의 RNA와 Thermofisher사의 SuperScript IV Reverse Transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 연구순서는 SuperScript IV Reverse Transcriptase에 제공된 protocol을 따랐다.
- [0042] 3) HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A, PAS-B 도메인들의 유전자 부위 증폭: 1 μ l의 cDNA를 주형으로 하고 HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인들의 유전자 부위를 증폭하기 위한 프라이머(primer)와 NEB사의 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase를 이용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 수행하였다. 연구순서는 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase에 제공된 protocol을 따랐다.
- [0043] 도 2B에 기술된 HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A, PAS-B 도메인들을 발현하는 플라스미드를 제작하기 위해서는 각 도메인의 염기서열과 아미노산 서열의 제일 앞에 메티오닌(methionine; ATG)의 추가가 필수적이다. 따라서, 도 3에 기술한 바와 같이 염기서열과 아미노산 서열을 결정하였다.
- [0044] PCR을 수행하기 위한 프라이머의 서열은 표 1에 기술하였다. 추가적으로 HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인들의 유전자 부위를 pCDNA3.1-myc-his6 A plasmid에 클로닝하기 위해 제한효소 서열을 각 primer의 5' -에 추가하였다. 제한효소 서열은 도 4에 빨강색으로 표시하였다.
- [0045] PCR을 수행한 조건은 다음과 같다.
- [0046] - PCR mixture 조성
- [0047] 1. cDNA: 1 μ l
- [0048] 2. forward primer: 20 pmol (0.2 μ l)
- [0049] 3. reverse primer: 20 pmol (0.2 μ l)
- [0050] 4. ddH₂O: 23.6 μ l
- [0051] 5. Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (pre-mix): 25 μ l
- [0052] - PCR step

- [0053] 1. Initial denaturation (1 cycle): 98℃, 2 min
- [0054] 2. Polymerization (30 cycles): 98℃, 10 sec, 55℃, 10 sec, 72℃, 1 min
- [0055] 3. Final extension (1 cycle): 72℃, 2 min
- [0056] 4. Hold: 4℃
- [0057] PCR을 수행 후 PCR 산물은 1% agarose gel에 로딩 후 Bioneer사의 Gel purification kit으로 정제하였다. 연구 순서는 Gel purification kit에 제공된 protocol을 따랐다. Gel purification한 PCR 산물은 도 4에 표기한 바와 같이 제한효소를 처리하고 각 PCR 산물에 해당하는 제한효소를 클로닝하기 위한 pCDNA3.1-myc-his6에 동일하게 처리하였다. 조건은 다음과 같다.
- [0058] -PCR 산물 또는 pCDNA3.1-myc-his6의 제한효소 처리 조성
- [0059] 1. DNA: 41 μ l (농도: 0.2 μ g/ μ l)
- [0060] 2. Restriction enzyme 1: 2 μ l
- [0061] 3. Restriction enzyme 2: 2 μ l
- [0062] 4. 10 X reaction buffer: 5 μ l
- [0063] 5. Incubation condition: 37℃, 16 hr
- [0064] 제한효소를 처리한 DNA는 1% agarose gel에 로딩 후 Bioneer사의 Gel purification kit으로 정제하였다. 연구 순서는 Gel purification kit에 제공된 protocol을 따랐다.
- [0065] 4) 형질전환(Transformation): 효소를 처리하고 정제를 수행한 insert (PCR 산물)와 효소를 처리하고 정제를 수행한 vector (pCDNA3.1-myc-his6)를 1:1의 비율로 ligation을 수행하고 *E. coli*에 형질전환을 수행하였다. Ligation은 NEB사의 T4 DNA ligase를 사용하고 연구순서는 제품에 제공된 protocol을 따랐다. 형질전환을 수행하기 위한 *E. coli*는 RBC사의 HIT Competent Cells-DH5alpha를 사용하였다. 연구순서는 제품에 제공된 protocol을 따랐다.
- [0066] - Ligation 조건
- [0067] 1. Insert DNA 3.5 μ l (농도: 0.2 μ g/ μ l)
- [0068] 2. Vector DNA 3.5 μ l (농도: 0.2 μ g/ μ l)
- [0069] 3. Ligase: 1 μ l
- [0070] 4. 10 X reaction buffer: 2 μ l
- [0071] 5. Incubation condition: 25℃, 16 hr
- [0072] - 형질전환 조건
- [0073] 1. Ligation mixture: 10 μ l
- [0074] 2. HIT Competent Cells-DH5alpha: 50 μ l
- [0075] 3. Ice에서 10분간 incubation
- [0076] 4. Ampicillin (70 μ g/ml)이 포함된 LB agar plate에 도말
- [0077] 5. Incubator에서 배양: 37℃, 16 hr
- [0078] *E. coli*에 형질전환 후 선별한 콜로니를 ampicillin이(70 μ g/ml) 포함된 LB 액체 배지에서 배양 후 Bioneer사의 plasmid preparation kit을 사용하여 플라스미드를 준비하였다. 연구순서는 plasmid preparation kit에 제공된 protocol을 따랐다. 각 플라스미드는 코스모진텍사의 nucleotide sequencing 서비스를 이용하여 insert 유전자가 정확히 클로닝이 되었는지 분석하였다.
- [0079] 분석을 통해 HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인들이 정확히 클로닝된 플라스미드를 체장암 세포인 MIA-Paca-2 cell에 형질감염한 후 HIF-1 α 의 발현양을 분석하였다.

- [0080] <실시예 2> HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인들을 발현하는 플라스미드가 암세포의 HIF-1 α 의 발현에 미치는 영향 분석
- [0081] HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인들이 정확히 클로닝 된 플라스미드를 채장암 세포인 MIA-Paca-2 cell에 형질감염한 후 HIF-1 α 의 발현양을 분석하였다.
- [0082] 5×10^5 의 MIA-Paca-2 cell을 T25 flask에서 DMEM medium을 이용하여 배양하였다. HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인들을 발현하는 플라스미드 (3 μ g)를 각각 FBS가 포함되지 않은 DMEM medium에 (100 μ l)에 첨가하고 Invitrogen사의 transfection reagent인 lipofectamin 2000을 9 μ l 첨가하였다. 30분 후에 세포가 배양되고 있는 T25 flask에서 DMEM을 Invitrogen사의 Opti MEM (2 ml)으로 교체하였다. Medium을 교체 후 DNA 혼합액을 첨가 후 1일 동안 배양한 후 FBS가 포함된 DMEM medium로 교체하였다 (4 ml).
- [0083] DNA가 형질감염된 세포주를 저산소 환경 (0.5% O₂)에 8시간 동안 노출한 후 수거하고 Western blot을 수행하였다.
- [0084] 그 결과, HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인 중에서 PAS-A에 의해서 HIF-1 α 가 저해됨을 관찰하였으며, 세포질과 핵내 모두에서 저해됨을 관찰하였다(도 5).
- [0085] <실시예 3> HIF-1 α 의 발현에 영향을 미치는 HIF-1 β 의 PAS-A를 구성하는 펩타이드들을 발현하는 플라스미드의 제작
- [0086] HIF-1 α 의 억제 가능한 HIF-1 β 의 PAS-A 도메인의 size 크기 때문에 PAS-A를 구성하는 펩타이드들을 발현하는 플라스미드를 제작하였다.
- [0087] PAS-A 유전자를 3등분으로 나누어서 pCDNA3.1-myc-his6에 클로닝하였다.
- [0088] 도 6에 유전자 서열 및 단백질 서열을 나타냈다.
- [0089] 도 6B에 기술된 HIF-1 β 의 PAS-A를 구성하는 펩타이드들을 발현하는 플라스미드를 제작하기 위해서는 각 도메인의 염기서열과 아미노산 서열의 제일 앞에 메티오닌(methionine; ATG)의 추가가 필수적이다. 따라서, 도 7에 기술한 바와 같이 염기서열과 아미노산 서열을 결정하였다.
- [0090] 도 8에 프라이머들을 기술하였다. 추가적으로 HIF-1 β 의 PAS-A를 구성하는 펩타이드들의 유전자 부위를 pCDNA3.1-myc-his6 A plasmid에 클로닝하기 위해 제한효소 서열을 각 프라이머의 5' -에 추가하였다. 제한효소 서열은 도 8에 빨강색으로 표시하였다.
- [0091] - HIF-1 β 의 PAS-A를 구성하는 펩타이드들의 유전자 부위 증폭: pCDNA3.1-myc-his6에 PAS-A가 클로닝 된 플라스미드를 주형으로 하고 PAS-A를 구성하는 펩타이드들의 유전자 부위를 증폭하기 위한 프라이머와 NEB사의 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase를 이용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 수행하였다. 연구순서는 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase에 제공된 protocol을 따랐다.
- [0092] PCR을 수행한 조건은 다음과 같다.
- [0093] - PCR mixture 조성
- [0094] 1. pCDNA3.1-myc-his6-PAS-A: 1 μ l (0.01 μ g)
- [0095] 2. forward primer: 20 pmol (0.2 μ l)
- [0096] 3. reverse primer: 20 pmol (0.2 μ l)
- [0097] 4. ddH₂O: 23.6 μ l
- [0098] 5. Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (pre-mix): 25 μ l
- [0099] - PCR step
- [0100] 1. Initial denaturation (1 cycle): 98 $^{\circ}$ C, 2 min
- [0101] 2. Polymerization (30 cycles): 98 $^{\circ}$ C, 10 sec, 55 $^{\circ}$ C, 10 sec, 72 $^{\circ}$ C, 1 min
- [0102] 3. Final extension (1 cycle): 72 $^{\circ}$ C, 2 min

- [0103] 4. Hold: 4℃
- [0104] PCR을 수행 후 PCR 산물을 도 8에 표기한 바와 같이 제한효소를 처리하고 각 PCR 산물에 해당하는 제한효소를 pCDNA3.1-myc-his6에 동일하게 처리하였다. 조건은 다음과 같다.
- [0105] - PCR 산물 또는 pCDNA3.1-myc-his6의 제한효소 처리 조성
- [0106] 1. DNA: 41 μ l (농도: 0.2 μ g/ μ l)
- [0107] 2. Restriction enzyme 1: 2 μ l
- [0108] 3. Restriction enzyme 2: 2 μ l
- [0109] 4. 10 X reaction buffer: 5 μ l
- [0110] 5. Incubation condition: 37℃, 16 hr
- [0111] 제한효소를 처리한 DNA는 2% agarose gel에 로딩 후 Bioneer사의 Gel purification kit으로 정제하였다. Gel purification kit에 제공된 protocol을 따랐다. 효소를 처리하고 정제를 수행한 insert (PCR 산물)와 효소를 처리하고 정제를 수행한 vector (pCDNA3.1-myc-his6)를 1:1의 비율로 ligation을 수행하고 *E. coli*에 형질전환을 수행하였다. NEB사의 ligase를 사용하고 연구순서는 제품에 제공된 방법을 따랐다. 형질전환을 수행하기 위한 *E. coli*는 RBC사의 HIT Competent Cells-DH5alpha를 사용하였다. 연구순서는 제품에 제공된 방법을 따랐다.
- [0112] - Ligation 방법
- [0113] 1. Insert DNA 3.5 μ l (농도: 0.2 μ g/ μ l)
- [0114] 2. Vector DNA 3.5 μ l (농도: 0.2 μ g/ μ l)
- [0115] 3. Ligase: 1 μ l
- [0116] 4. 10 X reaction buffer: 2 μ l
- [0117] 5. Incubation condition: 25℃, 16 hr
- [0118] *E. coli*에 형질전환 후 선별한 콜로니를 ampicillin이(70 μ g/ml) 포함된 LB media에서 배양 후 Bioneer사의 plasmid preparation kit을 사용하여 플라스미드를 준비하였다. 연구순서는 제공된 방법을 따랐다. 각 플라스미드는 코스모진텍사의 nucleotide sequencing 서비스를 이용하여 정확히 클로닝이 되었는지 분석하였다.
- [0119] 분석을 통해 PAS-A을 구성하는 펩타이드들이 정확히 클로닝 된 플라스미드를 채장암 세포인 MIA-Paca-2 cell에 형질감염한 후 HIF-1 α 의 발현양을 분석하였다.
- [0120] <실시예 4> HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 펩타이드들을 발현하는 플라스미드가 암세포의 HIF-1 α 의 발현에 미치는 영향 분석
- [0121] HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 펩타이드들이 정확히 클로닝 된 플라스미드를 채장암 세포인 MIA-Paca-2 cell에 형질감염한 후 HIF-1 α 의 발현양을 분석하였다.
- [0122] 5×10^5 의 MIA-Paca-2 cell을 T25 flask에서 DMEM medium을 이용하여 배양하였다. HIF-1 β PAS-A의 구성 펩타이드들을 발현하는 플라스미드 3 μ g을 각각 FBS가 포함되지 않은 DMEM medium에 (100 μ l)에 첨가하고 Invitrogen사의 transfection reagent인 lipofectamin 2000을 9 μ l 첨가하였다. 30분 후에 세포가 배양되고 있는 T25 flask에서 DMEM을 Invitrogen사의 Opti MEM (2 ml)으로 교체하였다. Medium을 교체 후 DNA 혼합액을 첨가 후 1일 동안 배양한 후 DMEM medium로 교체하였다(4 ml).
- [0123] DNA가 형질감염된 세포주를 저산소 환경 (0.5% O₂)에 8시간 동안 노출한 후 수거하고 Western blot을 수행하였다.
- [0124] 그 결과, HIF-1 β PAS-A 구성 펩타이드 중 A2와 A3에 의해서 HIF-1 α 가 급격히 저해됨을 관찰하였다(도 9).
- [0125] <실시예 5> HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 펩타이드들을 발현하는 플라스미드가 암세포의 저산소 환경에서 암세포의 생존에 미치는 영향 분석
- [0126] HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 펩타이드들이 정확히 클로닝 된 플라스미드를 채장암 세포인 MIA-Paca-2 cell에

형질감염하고 암세포를 저산소 환경에 노출한 후 암세포의 세포 생존을 관찰하였다.

- [0127] 5×10^5 의 MIA-Paca-2 cell을 T25 flask에서 DMEM medium을 이용하여 배양하였다. HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 펩타이드들을 발현하는 플라스미드 3 μ g을 각각 FBS가 포함되지 않은 DMEM medium에 (100 μ l)에 첨가하고 Invitrogen사의 transfection reagent인 lipofectamin 2000을 9 μ l 첨가하였다. 30분 후에 세포가 배양되고 있는 T25 flask에서 DMEM을 Invitrogen사의 Opti MEM (2 ml)으로 교체하였다. Medium을 교체 후 DNA 혼합액을 첨가 후 1일 동안 배양한 후 DMEM medium로 교체하였다(4 ml).
- [0128] DNA가 형질감염된 세포주를 100 ~ 1,000개를 6 well plate에 seeding하고 16시간 동안 배양 후 저산소 환경에 노출하였다. 8시간 또는 24시간 경과 후 일반 세포배양기로 옮겨서 2주간 배양 후 생존한 콜로니를 계수하였다.
- [0129] 도 10에 나타낸 바와 같이, HIF-1 β PAS-A 도메인과 A3 펩타이드에 의해 저산소 환경에서 암세포의 생존율이 A1, A2 펩타이드와 비교하여 감소됨을 관찰하였다.
- [0130] <실시예 6> HIF-1 α 의 발현에 영향을 미치는 HIF-1 β 의 PAS-A를 구성하는 세부적인 펩타이드들을 발현하는 플라스미드의 제작
- [0131] HIF-1 α 의 억제자가 가능한 HIF-1 β 의 PAS-A 도메인의 C-terminal region의 펩타이드를 발현하는 플라스미드를 암세포에 적용하였을 때 A3 부분이 저산소 환경에서 암세포 사멸 증가에 관여함을 관찰하였다. 본 연구결과를 검증하기 위해 HIF-1 β 의 PAS-A domain을 구성하는 펩타이드를 보다 세부적으로 나누어 발현하는 플라스미드를 제작하고 HIF-1 α 의 억제 효과와 저산소 환경에서 암세포 사멸 증가에 미치는 영향을 관찰하였다.
- [0132] PAS-A 유전자를 다양하게 나누어서 pCDNA3.1-myc-his6에 클로닝하였다.
- [0133] 도 11A에 PAS-A 부위를 도식화하고, 도 11B에서 PAS-A 부위를 도 6B에 나타낸 부위를 포함한 다양한 PAS-A 부위의 세부적인 펩타이드의 유전자 서열과 단백질 서열을 나타냈다.
- [0134] 도 11B에 기술된 HIF-1 β 의 PAS-A를 구성하는 세부적인 펩타이드들을 발현하는 플라스미드를 제작하기 위해서는 각 도메인의 염기서열과 아미노산 서열의 제일 앞에 메티오닌(methionine; ATG)의 추가가 필수적이다. 따라서, 도 12에 기술한 바와 같이 염기서열과 아미노산 서열을 결정하였다.
- [0135] 도 13에 프라이머들을 기술하였다. 추가적으로 HIF-1 β 의 PAS-A를 구성하는 세부적인 펩타이드들의 유전자 부위를 pCDNA3.1-myc-his6 A plasmid에 클로닝하기 위해 제한효소 서열을 각 프라이머의 5' -에 추가하였다. 제한효소 서열은 도 13에 빨간색으로 표시하였다.
- [0136] - HIF-1 β 의 PAS-A를 구성하는 세부적인 펩타이드들의 유전자 부위 증폭: pCDNA3.1-myc-his6에 PAS-A가 클로닝된 플라스미드를 주형으로 하고 PAS-A를 구성하는 세부적인 펩타이드들의 유전자 부위를 증폭하기 위한 프라이머와 NEB사의 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase를 이용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 수행하였다. 연구순서는 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase에 제공된 protocol을 따랐다.
- [0137] PCR을 수행한 조건은 다음과 같다.
- [0138] - PCR mixture 조성
- [0139] 1. pCDNA3.1-myc-his6-PAS-A: 1 μ l (0.01 μ g)
- [0140] 2. forward primer: 20 pmol (0.2 μ l)
- [0141] 3. reverse primer: 20 pmol (0.2 μ l)
- [0142] 4. ddH₂O: 23.6 μ l
- [0143] 5. Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (pre-mix): 25 μ l
- [0144] - PCR step
- [0145] 1. Initial denaturation (1 cycle): 98 $^{\circ}$ C, 2 min
- [0146] 2. Polymerization (30 cycles): 98 $^{\circ}$ C, 10 sec, 55 $^{\circ}$ C, 10 sec, 72 $^{\circ}$ C, 1 min
- [0147] 3. Final extension (1 cycle): 72 $^{\circ}$ C, 2 min
- [0148] 4. Hold: 4 $^{\circ}$ C

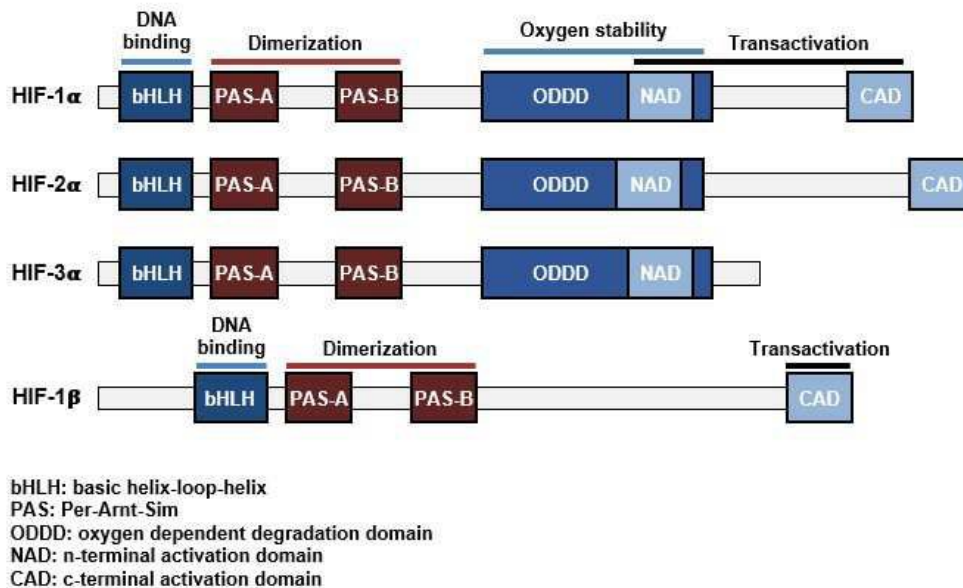
- [0149] PCR을 수행 후 PCR 산물을 도 13에 표기한 바와 같이 제한효소를 처리하고 각 PCR 산물에 해당하는 제한효소를 pCDNA3.1-myc-his6에 동일하게 처리하였다. 조건은 다음과 같다.
- [0150] - PCR 산물 또는 pCDNA3.1-myc-his6의 제한효소 처리 조성
- [0151] 1. DNA: 41 μ l (농도: 0.2 μ g/ μ l)
- [0152] 2. Restriction enzyme 1: 2 μ l
- [0153] 3. Restriction enzyme 2: 2 μ l
- [0154] 4. 10 X reaction buffer: 5 μ l
- [0155] 5. Incubation condition: 37°C, 16 hr
- [0156] 제한효소를 처리한 DNA는 2% agarose gel에 로딩 후 Bioneer사의 Gel purification kit으로 정제하였다. Gel purification kit에 제공된 protocol을 따랐다. 효소를 처리하고 정제를 수행한 insert (PCR 산물)와 효소를 처리하고 정제를 수행한 vector (pCDNA3.1-myc-his6)를 1:1의 비율로 ligation을 수행하고 *E. coli*에 형질전환을 수행하였다. NEB사의 ligase를 사용하고 연구순서는 제품에 제공된 방법을 따랐다. 형질전환을 수행하기 위한 *E. coli*는 RBC사의 HIT Competent Cells-DH5alpha를 사용하였다. 연구순서는 제품에 제공된 방법을 따랐다.
- [0157] - Ligation 방법
- [0158] 1. Insert DNA 3.5 μ l (농도: 0.2 μ g/ μ l)
- [0159] 2. Vector DNA 3.5 μ l (농도: 0.2 μ g/ μ l)
- [0160] 3. Ligase: 1 μ l
- [0161] 4. 10 X reaction buffer: 2 μ l
- [0162] 5. Incubation condition: 25°C, 16 hr
- [0163] *E. coli*에 형질전환 후 선별한 콜로니를 ampicillin이(70 μ g/ml) 포함된 LB media에서 배양 후 Bioneer사의 plasmid preparation kit을 사용하여 플라스미드를 준비하였다. 연구순서는 제공된 방법을 따랐다. 각 플라스미드는 코스모진텍사의 nucleotide sequencing 서비스를 이용하여 정확히 클로닝이 되었는지 분석하였다.
- [0164] 분석을 통해 PAS-A를 구성하는 세부적인 펩타이드들이 정확히 클로닝 된 플라스미드를 채장암 세포인 MIA-Paca-2 cell에 형질감염한 후 HIF-1 α 의 발현양을 분석하였다.
- [0165] <실시예 7> HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 세부적인 펩타이드들을 발현하는 플라스미드가 암세포의 HIF-1 α 의 발현에 미치는 영향 분석
- [0166] HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 세부적인 펩타이드들이 정확히 클로닝 된 플라스미드를 채장암 세포인 MIA-Paca-2 cell에 형질감염한 후 HIF-1 α 의 발현양을 분석하였다.
- [0167] 5×10^5 의 MIA-Paca-2 cell을 T25 flask에서 DMEM medium을 이용하여 배양하였다. HIF-1 β PAS-A의 구성 펩타이드들을 발현하는 플라스미드 3 μ g을 각각 FBS가 포함되지 않은 DMEM medium에 (100 μ l)에 첨가하고 Invitrogen사의 transfection reagent인 lipofectamin 2000을 9 μ l 첨가하였다. 30분 후에 세포가 배양되고 있는 T25 flask에서 DMEM을 Invitrogen사의 Opti MEM (2 ml)으로 교체하였다. Medium을 교체 후 DNA 혼합액을 첨가 후 1일 동안 배양한 후 DMEM medium로 교체하였다(4 ml).
- [0168] DNA가 형질감염된 세포주를 저산소 환경 (0.5% O₂)에 8시간 동안 노출한 후 수거하고 Western blot을 수행하였다.
- [0169] 그 결과, HIF-1 β PAS-A 구성 세부적인 펩타이드 중 A2, A3와 T4에 의해서 HIF-1 α 가 저해됨을 관찰하였다(도 14).
- [0170] <실시예 8> HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 세부적인 펩타이드들을 발현하는 플라스미드가 암세포의 저산소 환경에서 암세포의 생존에 미치는 영향 분석
- [0171] HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 세부적인 펩타이드들이 정확히 클로닝 된 플라스미드를 채장암 세포인 MIA-Paca-2

cell에 형질감염하고 암세포를 저산소 환경에 노출한 후 암세포의 세포 생존을 관찰하였다.

- [0172] 5×10^5 의 MIA-Paca-2 cell을 T25 flask에서 DMEM medium을 이용하여 배양하였다. HIF-1 β PAS-A 도메인의 구성 펩타이드들을 발현하는 플라스미드 3 μ g을 각각 FBS가 포함되지 않은 DMEM medium에 (100 μ l)에 첨가하고 Invitrogen사의 transfection reagent인 lipofectamin 2000을 9 μ l 첨가하였다. 30분 후에 세포가 배양되고 있는 T25 flask에서 DMEM을 Invitrogen사의 Opti MEM (2 ml)으로 교체하였다. Medium을 교체 후 DNA 혼합액을 첨가 후 1일 동안 배양한 후 DMEM medium로 교체하였다(4 ml).
- [0173] DNA가 형질감염된 세포주를 100 ~ 1,000개를 6 well plate에 seeding하고 16시간 동안 배양 후 저산소 환경에 노출하였다. 24시간 경과 후 일반 세포배양기로 옮겨서 2주간 배양 후 생존한 콜로니를 계수하였다.
- [0174] 도 15에 나타낸 바와 같이 HIF-1 β PAS-A 도메인과 A3 펩타이드에 의해 저산소 환경에서 암세포의 생존율이 PAS-A 도메인, T2, T4, A1, A2 펩타이드와 비교하여 감소됨을 관찰하였다.
- [0175] 그 결과, HIF-1 β 의 bHLH, PAS-A와 PAS-B 도메인 중 PAS-A의 A3 부위가 포함 되어 있어야 HIF-1 α 을 저해하고 저산소환경에서 암세포의 세포사멸 증가에 관여함을 검증하였다.
- [0176] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

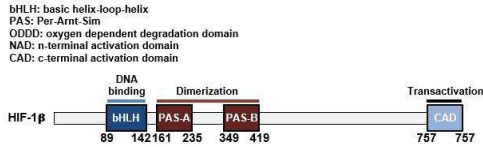
도면

도면1



도면2

A



B

Domain	Sequences
bHLH 89 142	Nucleotide CTTGCCAGGGAAATCACAGTGAATTTGAACGGCGGCGACGGAACAAGATGACAGCCTACATCACAGAACTGTCAGATATGGTACCCACCTGTAGTGGCCTGGCTCGAAACACAGACAAGCTAAGCATCTTACGCATGGCAGTTTCTCATGAAGTCCTTG
	Amino acid LARENHSEIERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKDLTILMAVSHMKSL
PAS-A 161 235	Nucleotide GATCAGGAACGAAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAGATGGCTTCTGTTTATTGTCTCATGTGAGACAGGCAGGGTGGTGTATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTGAACACAGCCAGCACTCTGAATGGTTTGGCAGCACACTCTATGATCAGGTGACCCAGATGATGTGGATAAATTCGTGAGCAGCTTCCACTTCAGAAATGCCCTGACAGGGCGT
	Amino acid DQELKHLILEAADGFLFIVSCETGRVYVSDSVTPVLNQPQSEWFGSTLYDQVHPDDVDKLREQLSTSENALTGR
PAS-B 349 419	Nucleotide TGTACAGACATGAGTAATGTTTCAACCAACAGAGTTTCATCTCCGACACAACATTGAGGGTATCTTCACTTTTGTGGATCACCCTGTGTGGCTACTGTTGGCTACCGCCACAGGAACCTTAGGAAAGAATATTGAGAATCTGTATCCTGAAGACAGCAGCTTCTAAGAGACAGCTTCCAACAAGTAGTGAATTAAGGCCAA
	Amino acid CTDMSNVCQPTFISRHNIEGIFTVDHRCVATVGYQPQELLGKNIVEFCHPEDQQLLRDSFQQVVKLGQ

도면3

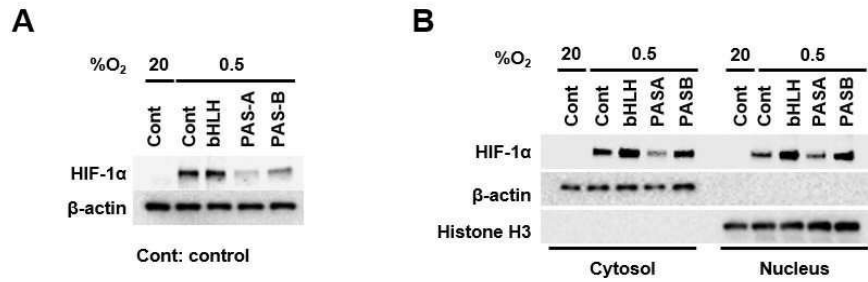
Domain	Sequences
bHLH 89 142	Nucleotide ATG CTTGCCAGGGAAATCACAGTGAATTTGAACGGCGGCGACGGAACAAGATGACAGCCTACATCACAGAACTGTCAGATATGGTACCCA CCTGTAGTGGCCTGGCTCGAAACACAGACAAGCTAAGCATCTTACGCATGGCAGTTTCTCATGAAGTCCTTGTGA
	Amino acid ML ARENHSEIERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKDLTILMAVSHMKSL
PAS-A 161 235	Nucleotide ATG GATCAGGAACGAAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAGATGGCTTCTGTTTATTGTCTCATGTGAGACAGGCAGGGTGGTGTATGTGTCTGAC TCCGTGACTCCTGTTTGAACACAGCCAGCACTCTGAATGGTTTGGCAGCACACTCTATGATCAGGTGACCCAGATGATGTGGATAAATTCGTGAG CAGCTTCCACTTCAGAAATGCCCTGACAGGGCGTTGA
	Amino acid MD QELKHLILEAADGFLFIVSCETGRVYVSDSVTPVLNQPQSEWFGSTLYDQVHPDDVDKLREQLSTSENALTGR
PAS-B 349 419	Nucleotide ATG TGTACAGACATGAGTAATGTTTCAACCAACAGAGTTTCATCTCCGACACAACATTGAGGGTATCTTCACTTTTGTGGATCACCCTGTGTG GCTACTGTTGGCTACCGCCACAGGAACCTTAGGAAAGAATATTGAGAATCTGTATCCTGAAGACAGCAGCTTCTAAGAGACAGCTTCCAACA ACAGGTAGTGAATTAAGGCCAATGA
	Amino acid MC TDMSNVCQPTFISRHNIEGIFTVDHRCVATVGYQPQELLGKNIVEFCHPEDQQLLRDSFQQVVKLGQ

도면4

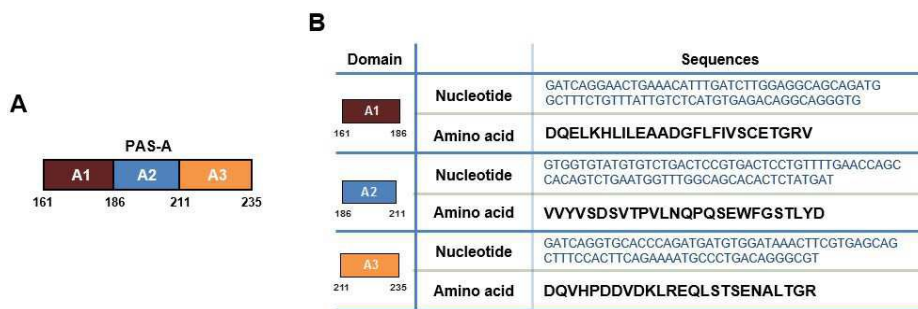
Domain	Sequences*	Restriction enzyme
bHLH 89 142	Forward primer 5'- CC GGATC CATGCTTGCCAGGGAAATCACAG -3'	Bam HI
	Reverse primer 5'- GGAATTC TCAACAAGGACTTCATGTGAGAAAC -3'	Eco RI
PAS-A 161 235	Forward primer 5'- GG GGTACC TGGATCAGGAACGAAACATTTG -3'	Kpn I
	Reverse primer 5'- GGAATTC TCAACGCCCTGTCAGGGCATTTC -3'	Eco RI
PAS-B 349 419	Forward primer 5'- GG GGTACC ATGTGTACAGACATGAGTAATG -3'	Kpn I
	Reverse primer 5'- CC GGATC TCATTGGCCTTTTAATTTCACTAC -3'	Bam HI

Sequences*: primer의 restriction enzyme sequence는 red color로 표시함.

도면5



도면6



도면7

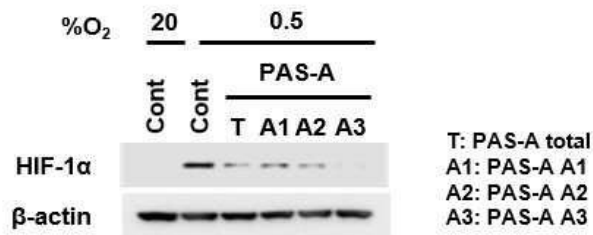
Domain	Sequences	
A1 161 186	Nucleotide	ATGGATCAGGAAGTAAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAGATGG CTTCTGTTTATTGTCTCATGTGAGACAGGCAGGGTGTGA
	Amino acid	MDQELKHLILEAADGFLFIVSCETGRV
A2 186 211	Nucleotide	ATGGTGGTGATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTGAACC AGCCACAGTCTGAATGGTTGGCAGCACACTCTATGATTGA
	Amino acid	MVVYVSDSVTPVLNQPQSEWFGSTLYD
A3 211 235	Nucleotide	ATGGATCAGGTGCACCCAGATGATGTGGATAAACTTCGTGAG CAGCTTCCACTTCAGAAAATGCCCTGACAGGGCGTTGA
	Amino acid	MDQVHPDDVDKLREQLSTSENALTGR

도면8

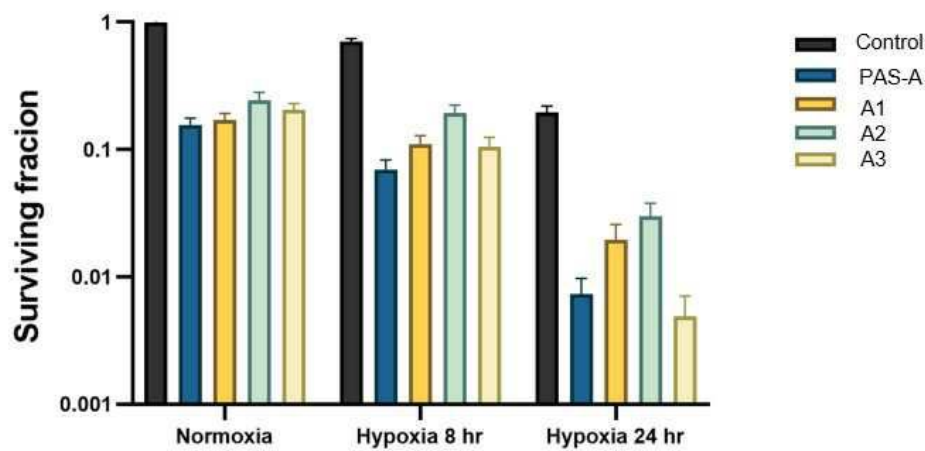
Domain	Sequences*		Restriction enzyme
A1 161 186	Forward primer	5'- GGGGATCCATGGATCAGGAAGTAAACATTTG -3'	BamHI
	Reverse primer	5'- GGAATTCACACCCCTGCCTGTCTCACATGAG-3'	EcoRI
A2 186 211	Forward primer	5'- GGGGTACCATGGTGGTGTATGTGTCTGACTCC -3'	KpnI
	Reverse primer	5'- GGAATTCATATCATAGAGTGTGCTGCCAAAC -3'	EcoRI
A3 211 235	Forward primer	5'- GGGGTACCATGGATCAGGTGCACCCAG -3'	KpnI
	Reverse primer	5'- GGAATTCACACGCCCTGTCAGGGCATTTC -3'	EcoRI

Sequences*: primer의 restriction enzyme sequence는 red color로 표시함.

도면9

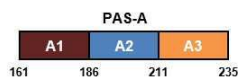


도면10

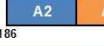


도면11

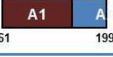
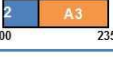
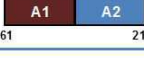
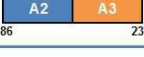
A



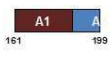
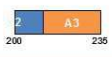
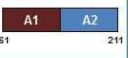
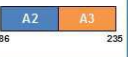
B

Domain	Sequences
 A1 161 186	Nucleotide GATCAGGAAGTGAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAGATG GCTTTCTGTTTATTGTCTCATGTGAGACAGGCAGGGTG
	Amino acid DQELKHLILEAADGFLFIVSCETGRV
 A2 186 211	Nucleotide GTGGTGATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTTGAACCAGC CACAGTCTGAATGGTTGGCAGCACACTCTATGAT
	Amino acid VVVYSDSVTPVLNQPSQSEWFGSTLYD
 A3 211 235	Nucleotide GATCAGGTGCACCCAGATGATGTGGATAAACTTCGTGAGCAG CTTCCACTTCAGAAAATGCCCTGACAGGGCGT
	Amino acid DQVHPDDVDKLREQLSTSENALTGR
 A1 A2 161 199	Nucleotide GATCAGGAAGTGAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAGATGGCTTCTGTTTATTGTCTC ATGTGAGACAGGCAGGGTGGTGATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTTGAACCAG
	Amino acid DQELKHLILEAADGFLFIVSCETGRVVVYSDSVTPVLNQ
 A2 A3 200 235	Nucleotide CCAGTCTGAATGGTTTGGCAGCACACTCTATGATGATCAGGTGCACCCAGATGAT GTGGATAAACTTCGTGAGCAGCTTCCACTTCAGAAAATGCCCTGACAGGGCGT
	Amino acid PQSEWFGSTLYDQVHPDDVDKLREQLSTSENALTGR
 A1 A2 161 211	Nucleotide GATCAGGAAGTGAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAGATGGCTTCTGTTTATTGTCTCATGTGAGACAGGCAGGGT GGTGATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTTGAACCAGCCACAGTCTGAATGGTTTGGCAGCACACTCTATGAT
	Amino acid DQELKHLILEAADGFLFIVSCETGRVVVYSDSVTPVLNQPSQSEWFGSTLY
 A2 A3 186 235	Nucleotide GTGGTGATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTTGAACCAGCCACAGTCTGAATGGTTTGGCAGCACACTCTATGA TCAGGTGCACCCAGATGATGTGGATAAACTTCGTGAGCAGCTTCCACTTCAGAAAATGCCCTGACAGGGCGT
	Amino acid VVVYSDSVTPVLNQPSQSEWFGSTLYDQVHPDDVDKLREQLSTSENALTGR

도면12

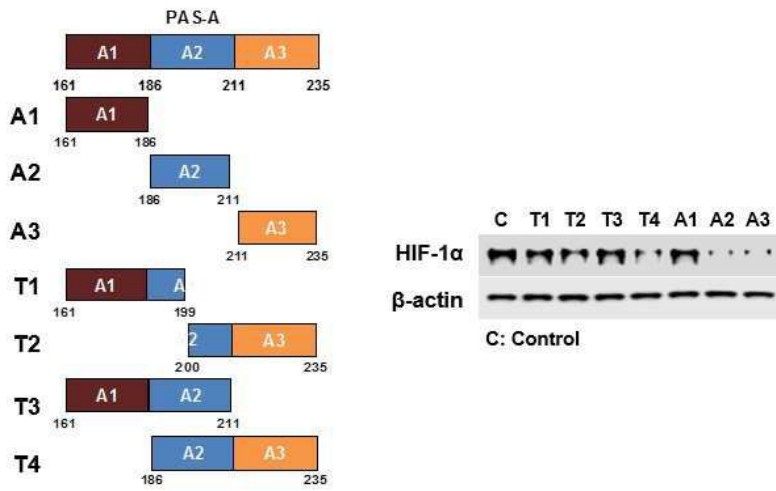
Domain		Sequences
	Nucleotide	ATGGATCAGGAAGTAAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAGATGGCTTTCTGTTTATTGTCTCATGTGAGACAGGCA GGGTGTGA
	Amino acid	MDQELKHLILEAADGFLFVSCETGRV
	Nucleotide	ATGGTGGTGTATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTTGAACAGCCACAGTCTGAATGGTTTGGCAGCACACTCT ATGATTGA
	Amino acid	MVVYVSDSVTPVLNQPSSEWFGSTLYD
	Nucleotide	ATGGATCAGGTGCACCCAGATGATGTGGATAAATTCGTGAGCAGCTTCCACTTCAGAAAATGCCCTGACAGGG CGTTGA
	Amino acid	MDQVHPDDVDKLRQLSTSENALTGR
	Nucleotide	ATGGATCAGGAAGTAAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAGATGGCTTTCTGTTTATTGTCTCATGTGAGACAGGCA GGGTGGTGTATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTTGAACAGTGA
	Amino acid	MDQELKHLILEAADGFLFVSCETGRVVYVSDSVTPVLNQ
	Nucleotide	ATGCCACAGTCTGAATGGTTTGGCAGCACACTCTATGATGATCAGGTGCACCCAGATGATGGATAAATTCGTG AGCAGCTTTCACCTTCAGAAAATGCCCTGACAGGGCGTTGA
	Amino acid	MPQSEWFGSTLYDQVHPDDVDKLRQLSTSENALTGR
	Nucleotide	ATGGATCAGGAAGTAAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAGATGGCTTTCTGTTTATTGTCTCATGTGAGACAGGCGGT GGTGTATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTTGAACAGCCACAGTCTGAATGGTTTGGCAGCACACTCTATGATTGA
	Amino acid	MDQELKHLILEAADGFLFVSCETGRVVYVSDSVTPVLNQPSSEWFGSTLY
	Nucleotide	ATGGTGGTGTATGTGTCTGACTCCGTGACTCCTGTTTTGAACAGCCACAGTCTGAATGGTTTGGCAGCACACTCTATG ATCAGGTGCACCCAGATGATGTGGATAAATTCGTGAGCAGCTTCCACTTCAGAAAATGCCCTGACAGGGCGTTGA
	Amino acid	MVVYVSDSVTPVLNQPSSEWFGSTLYDQVHPDDVDKLRQLSTSENALTGR

도면13

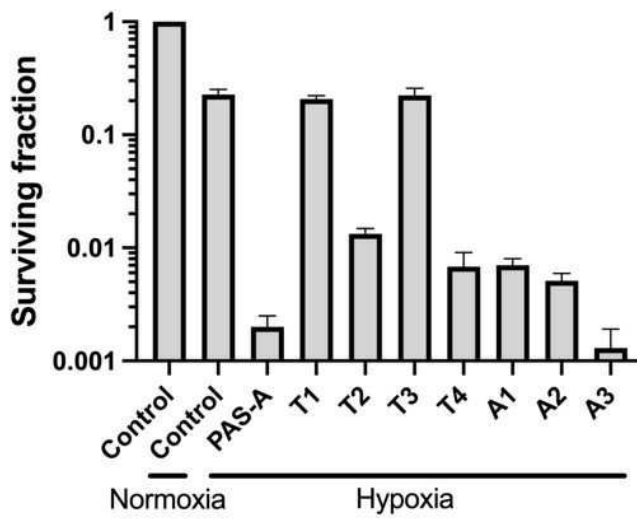
Domain		Sequences*	Restriction enzyme
	Forward primer	5'- GG GGATCC ATGGATCAGGAAGTAAACATTTG -3'	<i>Bam</i> HI
	Reverse primer	5'- GGAATTC TCACACCCTGCCTGTCTCACATGAG -3'	<i>Eco</i> RI
	Forward primer	5'- GG GGTACC ATGGTGGTGTATGTGTCTGACTCC -3'	<i>Kpn</i> I
	Reverse primer	5'- GGAATTC TCAATCATAGAGTGTGCTGCCAAAC -3'	<i>Eco</i> RI
	Forward primer	5'- GG GGTACC ATGGATCAGGTGCACCCAG -3'	<i>Kpn</i> I
	Reverse primer	5'- GGAATTC TCAACGCCCTGTCAGGGCATTTC -3'	<i>Eco</i> RI
	Forward primer	5'- GG GGATCC ATGGATCAGGAAGTAAACATTTG -3'	<i>Bam</i> HI
	Reverse primer	5'- GGAATTC TCACTGGTTCAAAACAGGAGTCACG -3'	<i>Eco</i> RI
	Forward primer	5'- GG GGTACC ATGCCACAGTCTGAATGGTTTGGC -3'	<i>Kpn</i> I
	Reverse primer	5'- GGAATTC TCAACGCCCTGTCAGGGCATTTC -3'	<i>Eco</i> RI
	Forward primer	5'- GG GGATCC ATGGATCAGGTGCACCCAG -3'	<i>Bam</i> HI
	Reverse primer	5'- GGAATTC TCAATCATAGAGTGTGCTGCCAAAC -3'	<i>Eco</i> RI
	Forward primer	5'- GG GGTACC ATGGTGGTGTATGTGTCTGACTCC -3'	<i>Kpn</i> I
	Reverse primer	5'- GGAATTC TCAACGCCCTGTCAGGGCATTTC -3'	<i>Eco</i> RI

Sequences*: primer의 restriction enzyme sequence는 red color로 표시함.

도면14



도면15



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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