



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2007-0054952

(43) 공개일자

2007년05월30일

(21) 출원번호 10-2005-0113101

(22) 출원일자 2005년11월24일

심사청구일자 2005년11월24일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

에스케이 주식회사

서울 종로구 서린동 99

(72) 발명자

이공주

서울 양천구 목6동 신시가지아파트 230동 404호

김현정

서울 강남구 청담2동 30-33 대림아파트 102-1102

조정우

대전 유성구 전민동 엑스포아파트 102-101

맹철영

대전 동구 용전동 176-15

남유경

서울 종로구 연건동 28번지 서울대학교병원 약제부병실조제계

임상미

서울 서대문구 연희동 연희소프트빌 612호

김영미

서울 은평구 응암2동 242-114 백상빌라 C동 402호

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 유비키티 C-말단 가수분해제-L1을 이용한 암전이 진단용조성물

(57) 요약

본 발명은 유비키티 C-말단 가수분해제-L1(Ubiquitin C-terminal hydrolase; UCH-L1)을 이용한 암전이 진단용 조성물 및 이를 이용한 암전이 진단방법, 암전이 억제용 조성물 및 이를 이용한 암전이 억제방법, 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용한 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 UCH-L1은 암전이의 원인적 표적 단백질로서, 이의 발현정도에 따라 세포이동도가 증가하므로, 이에 대한 모노클로날 항체, N-말단 펩티드에 대한 항체 또는 기질을 이용하여 암전이 진단에 사용할 수 있다.

또한, UCH-L1의 발현 또는 효소활성을 저해함으로써 암전이를 억제할 수 있으므로, UCH-L1의 억제제를 스크리닝하여 개발함으로써 항암치료의 보조제로서 암전이 억제용 약제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1(Ubiquitin C-terminal hydrolase;UCH-L1)을 포함하는 암전이 진단용 조성물.

청구항 2.

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 UCH-L1의 모노클로날 항체를 함유하는 암전이 진단용 조성물.

청구항 3.

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 UCH-L1의 N-말단 부위 11개 아미노산을 인식하는 펩타이드의 폴리클로날 항체를 함유하는 암전이 진단용 조성물.

청구항 4.

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 UCH-L1의 기질을 함유하는 암전이 진단용 조성물.

청구항 5.

서열번호 2에 기재된 염기서열을 갖는 UCH-L1 유전자에 대한 PCR 프라이머 또는 프로브를 포함하는 암전이 진단용 조성물.

청구항 6.

UCH-L1의 억제제를 함유한 암전이 억제용 조성물.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 상기 UCH-L1의 억제제는 UCH-L1의 shRNAi인 암전이 억제용 조성물.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 상기 UCH-L1의 shRNAi는 서열번호 4, 5 및 6 중 선택된 하나 이상인 암전이 억제용 조성물.

청구항 9.

제 6항에 있어서, 상기 UCH-L1의 억제제는 이사틴 옥심계열의 화합물인 암전이 억제용 조성물.

청구항 10.

제 6항에 있어서, 상기 UCH-L1의 억제제는 UCH-L1의 모노클로날 항체인 암전이 억제용 조성물.

청구항 11.

제 6항에 있어서, 상기 UCH-L1의 억제제는 UCH-L1의 N-말단 부위 11개 아미노산을 인식하는 펩타이드의 폴리클로날 항체인 암전이 억제용 조성물.

청구항 12.

서열번호 2에 기재된 염기서열을 갖는 UCH-L1 유전자를 포함하는 암전이 억제제 스크리닝용 조성물.

청구항 13.

제 12항의 조성물을 표적물질로 이용하여 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 상기 유전자의 발현을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 암전이 억제제 스크리닝 방법.

청구항 14.

서열번호 1에 기재된 아미노산서열을 갖는 UCH-L1 단백질을 포함하는 암전이 억제제 스크리닝용 조성물.

청구항 15.

제 14항의 조성물을 표적물질로 이용하여 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 상기 단백질의 기능을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 암전이 억제제 스크리닝 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 유비키티 C-말단 가수분해제-L1(UCH-L1)을 이용한 암전이 진단용 조성물 및 이를 이용한 암전이 진단방법, 암전이 억제용 조성물 및 이를 이용한 암전이 억제방법, 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용한 스크리닝방법에 관한 것이다.

유비키티 C-말단 가수분해제-L1(Ubiquitin C-terminal hydrolase; 이하 UCH-L1라고 한다.)은 신경 특이적 유비키티 재순환효소 (neuron-specific ubiquitin recycling enzyme)로 디유비키티 효소(deubiquitinating enzyme (DUB)) 중 하나이다.

in vitro 상에서 유비키티(ubiquitin)와 작은 부가물(small adducts) 또는 언폴디드 폴리펩타이드(unfolded polypeptide) 간의 결합을 가수분해하는 것으로 보고 되어 있으며 그 기질의 아미노산 서열 특이성과 UCH 집합체(family)의 이성질체 간의 관계는 아직 명확하게 규명되어 있지 않다[Christopher N. *et al.*, "substrate specificity of deubiquitinating enzymes; Ubiquitin C-terminal hydrolase", *Biochemistry*, **37**, 3358-3368, 1998].

UCH-L1는 신경세포분화 전 과정에서 신경조직에 특이적으로 발현되는 단백질로 알려져 있으며, 뉴런 및 신경내분비(neuroendocrine) 시스템의 세포 및 이들 종양에 매우 특이적으로 발현된다. 또한, 뇌의 대부분에서 발현되며, 특히 중뇌의 흑질(substantia nigra)에서 많이 발현된다.

상기 디유비키티 효소는 염기서열 유사성(sequence homology)에 따라 유비키티 C-말단 가수분해제-L1 (UCH)와 유비키티 프로세싱 프로테아제(ubiquitin processing protease (UBPs)) 또는 유비키티 특이적 프로테아제(ubiquitin specific protease (USPs)) 2종류로 분류된다. 염기서열 유사성에서의 분류에도 불구하고 아직까지는 그 기능에 있어서 두 종류의 효소활성은 크게 상이하지 않다.

UCH는 UBP보다 그 크기가 작고 약 200여개의 아미노산(amino acid)으로 구성되어 있으며 4개의 보존되는 염기서열단 (conserved sequence motif)을 가지고 있다. 시스테인, 옥시에나이온 홀 잔기 글루타민, 히스티딘, 아스파르트산(Cysteine, oxyanion hole residue glutamine, histidine, aspartic acid)을 가지고 있는 것은 전형적인 시스테인 프로테아제(cysteine protease)의 범위에 속한다 [Simon S. Wing. Deubiquitinating enzymes-the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **35**, 590-605, 2003].

이러한 유비키티 C-말단 가수분해제-L1는 알자이머 질병(Alzheimer's disease), 파킨슨 질병(Parkinson's disease)과 관련하여 산화되는 표적 단백질임이 보고되어 왔으나(J Biol Chem. 2004, Mar 26;279(13):13256-64, Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases), 최근 여러 논문의 보고와 같이 폐암(lung cancer), 직장암(colorectal cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 골수종(myeloma)에서도 특이적으로 그 발현이 증가되는 생물학적 표지자(biomarker)로 보고되고 있다[Otsuki T, *et al.*, "Expression of protein gene product 9.5(PGP9.5)/ubiquitin-C-terminal hydrolase 1 (UCH-L1) in human myeloma cells", *Br J Haematol.*, Nov;127(3):292-8, 2004; Guoan Chen *et al.*, "Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: Identification of highly expressed set of proteins in tumor", *Clinical Cancer Research*, Vol. **8**, 2298-2305, 2002; Taiji Yamazaki *et al.*, "PGP9.5 as a Marker for invasive colorectal cancer", *Clinical Cancer Research*, vol.**8**, 192-195, 2002; Hidefumi Sasaki, *et al.*, "Expression of the protein gene product 9.5, PGP9.5, is correlated with T-status in non-small cell lung cancer", *Jpn J Clin Oncol.*, **31(11)**, 532- 535, 2001].

특히 폐암세포주에 대한 유비키티 C-말단 가수분해제-L1의 발현정도는 각 암의 진행도와 그 hASH1 상태(status)에 따라 상이하게 발현된다고 보고되어 있으며[Kenji Hibi, *et al.*, "PGP9.5 As a Candidate Tumor Marker for Non-Small-Cell Lung Cancer" *American Journal of Pathology*, Vol. 155, No. 3, pp711-715, 1999], 특히 넌스몰셀 폐암(Non-small cell lung cancer; NSCLC)인 경우 T-status에 따라 발현정도가 상이한데 T3/T4인 경우 T1/T2 보다 우세하게 발현되는 것으로 보고되어 있다[Hidefumi Sasaki, *et al.*, "Expression of the protein gene product 9.5, PGP9.5, is correlated with T-status in non-small cell lung cancer", *Jpn J Clin Oncol.*, 31(11) 532- 535, 2001]. 폐암에서는 UCH-L1에 대한 자가항체(autoantibody)가 혈청(serum)에서 발견되었으며 그 항원(antigen)인 유비키티 C-말단 가수분해제-L1 또한 혈청상에 순환되고 있음이 확인되었다 [Franck Brichory, *et al.*, "Proteomics-based Identification of Protein Gene Product 9.5 as a Tumor Antigen That Induces a Humoral Immune Response in Lung Cancer", *CANCER RESEARCH*, Vol. 61, pp7908-7912, 2001].

한편, 미국공개특허공보 제2005-79560호 (2005.04.14 공개)에는 암표지자로서 UCH-L1의 이형체(isoform)인 UCH-L3을 이용한 결장암 치료 및 진단용 조성물 및 방법에 관한 발명이 개시되어 있는데, 자세하게는 다른 형태의 종양에서 발견되는 것의 3-5배로 콜론종양에 높게 발현되는 암항원인 UCH-L3, 이의 탐색을 위한 진단분석법, 및 이와 관련된 자동항체를 제공하고, UCH-L3을 이용한 면역역요법에 관하여 기재되어 있다.

위와 같이 현재 UCH-L1 단백질 및 이의 이형체는 암 표지자로 확인된 실례는 발표된 것이 있으나 세포 침투성과의 상관성은 아직 보고되지 않았다.

이를 근거로 하여 유비키티 C-말단 가수분해제-L1의 효소 활성을 조절하는 화합물질을 연구하는 중, 최근에는 고성능 작업처리 스크리닝 방법(high throughput screening; HTS)을 이용하여 이사틴 O-아실 옥심(isatin O-acyl oxime) 계열의 억제제를 찾은 것이 보고된 바 있다(Chem Biol. 2003 10:837-46. Discovery of inhibitors that elucidate the role of UCH-L1 activity in the H1299 lung cancer cell line).

이에 본 발명자는 세포내 여러 단백질을 대상으로 프로테오믹스(proteomics) 방법으로 스크리닝하여 유비키티 C-말단 가수분해제-L1이 암전이(metastasis와 invasion)에 관여하는 단백질을 확인하고, 암전이 억제제의 원인적 표적단백질이 될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 유비키티 C-말단 가수분해제-L1을 이용한 이의 항체 또는 이의 기질을 함유하는 암전이 진단용 조성물을 제공하고자 한다.

또한, 본 발명은 유비키티 C-말단 가수분해제-L1의 억제제를 함유한 암전이 억제 및 예방용 조성물을 제공하고자 한다.

또한, 본 발명은 유비키티 C-말단 가수분해제-L1을 함유한 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용한 암전이 억제제 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

발명의 구성

본 발명은 유비키티 C-말단 가수분해제-L1(Ubiquitin C-terminal hydrolase;UCH-L1)을 포함하는 암전이 진단용 조성물 및 이를 이용한 암전이 진단방법을 제공한다.

상기 유비키티 C-말단 가수분해제 UCH-L1은 서열번호 1의 아미노산 서열(NCBI accession No.:P09936)을 포함하고, 상기 서열번호 1의 아미노산은 서열번호 2의 염기서열을 포함한 서열로 암호화된다.

본 발명의 UCH-L1 는 전이성이 있는 암세포의 안팎에서 특이적으로 발현이 증가된 양상을 보이고, UCH-L1의 발현량과 비례하여 세포의 이동도도 증가한다.

따라서, 암전이 진단은 암세포 또는 조직에서의 UCH-L1의 발현정도를 정량분석함으로써 행해질 수 있다.

본 발명은 또한, (a) 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 단백질을 시료를 수득하는 단계, (b) 수득한 시료에서 UCH-L1을 확인하고 정량하는 단계를 포함하는 암전이 진단방법을 제공한다.

본 발명은 또한 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 UCH-L1 단백질의 모노클로날 항체를 포함하는 암전이 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 (a) 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 단백질을 시료를 수득하는 단계, (b) 수득한 시료를 UCH-L1의 모노클로날 항체와 반응시켜 UCH-L1의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함하는 암전이 진단방법을 제공한다.

상기 진단방법은, UCH-L1의 모노클로날 항체를 함유한 암전이 진단용 조성물을 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물이나 혈장 등)에 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay) 방법을 사용하여 발색반응시킴으로써 정량분석하여 수행할 수도 있고, 또는 생체로부터 배출된 암조직이나 세포에 UCH-L1 특이적 면역염색(histoimmunostaining)을 이용하여 암전이 여부를 진단할 수 있다. 또한 생체로부터 배출된 암조직이나 세포에 웨스턴 블롯분석을 이용하여 단백질 수준에서 UCH-L1 발현량을 정상군과 비교분석함으로써 암전이 여부를 진단할 수 있다.

또한, 상기 암전이 진단은, 예를 들어, (1) UCH-L1에 대한 모노클로날 항체를 겔형 지지체에 부착시켜 면역친화컬럼을 제조하고; (2) 상기 1단계의 면역친화컬럼을 사용하여 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물이나 혈장 등)에서 UCH-L1을 HPLC 방법으로 정량하고, (3) 상기 정량 결과를 비교분석하여 암전이 정도를 진단할 수 있다.

상기 UCH-L1의 모노클로날 항체는 당업계에 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

상기 UCH-L1의 모노클로날 항체에는 일반적으로 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 또는 호울스래디쉬 퍼록시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 컨주게이션된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색반응 시킴으로써 정량분석할 수도 있고, 아니면 직접 UCH-L1 모노클로날 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 컨주게이션된 것을 사용하여 정량분석할 수도 있다.

또한, 상기 UCH-L1 모노클로날 항체 대신에 UCH-L1 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.

또한, 본 발명은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 UCH-L1의 N-말단 부위 11개 아미노산을 인식하는 펩타이드의 폴리클로날 항체를 함유하는 암전이 진단용 조성물을 제공한다. 상기 UCH-L1 모노클로날 항체 대신에 UCH-L1 단백질의 N-말단 11개의 아미노산서열(서열번호 7)을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수 있고, 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.

본 발명은 또한, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 UCH-L1의 기질(substrate)을 포함하는 암전이 진단용 조성물을 제공한다.

상기 UCH-L1의 기질은 유비키틴화된 물질로, 바람직하게는 UB-AMC(유비키틴화된 아미노-4-메틸쿠마린)를 사용할 수 있다.

상기 UB-AMC는 유비키틴 C-말단 가수분해제-L1에 의하여 가수분해되고, 이때 나오는 형광을 감지함으로써 UCH-L1 효소를 정량분석할 수 있다.

상기 암전이 진단용 조성물을 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직의 단백질 추출물)에 처리하여 발광 반응을 감지하고 분석함으로써 수행할 수 있다.

또한, 본 발명은 (a) 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 단백질 시료를 수득하는 단계, (b) 수득한 시료를 UCH-L1의 기질과 반응시켜 형광을 감지하여 UCH-L1의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함하는 암전이 진단방법을 제공한다.

본 발명은 또한, 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 갖는 UCH-L1 유전자에 대한 PCR 프라이머 또는 프로브를 포함하는 암전이 진단용 조성물을 제공한다.

상기 UCH-L1 유전자에 대한 프라이머를 이용한 RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 등을 수행하여 UCH-L1의 발현량을 정상군과 비교함으로써 암전이를 진단할 수 있다. 또한, 상기 UCH-L1 유전자에 대한 프로브를 이용하여 노던 블롯 분석 등을 수행하여 UCH-L1의 발현량을 정상군과 비교함으로써 암전이를 진단할 수 있다.

상기 암전이 진단용 조성물을 생체로부터 배출된 물질(암세포 또는 조직에서 추출한 RNA)과 반응(RT-PCR 또는 정량적 RT-PCR 또는 노던블롯팅)시켜 정상군과 비교 분석함으로써 암전이 진단을 수행할 수 있다.

또한, 본 발명은 (a) 포유류의 조직 또는 세포시료로부터 발현된 RNA 시료를 수득하는 단계, (b) 수득한 시료를 UCH-L1의 프라이머 또는 프로브와 반응시켜 UCH-L1의 발현을 확인하고 정량하는 단계를 포함하는 암전이 진단방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 유비키틴 C-말단 가수분해제-L1(UCH-L1)의 억제제를 포함한 암전이 억제용 조성물을 제공한다.

본 발명의 암전이 억제제는 암전이의 경감 및 예방을 포함한다.

본 발명의 UCH-L1 가 암전이성이 높은 암세포에 많이 발현되므로, 이 UCH-L1의 발현 억제제를 투여함으로써 암전이의 억제용으로 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 UCH-L1의 억제제를 암전이를 억제하는데 유효한 양으로 암환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암전이 억제방법을 제공한다.

상기 UCH-L1의 억제제는 UCH-L1의 발현을 억제하는 물질 또는 효소활성을 저해하는 물질이 될 수 있는데, 구체적으로, UCH-L1의 shRNAi(short hairpin RNAi)가 될 수 있고, 또한, 종래기술에서 UCH-L1의 억제제로 알려진 이사틴 옥심 계열의 화합물(Chem. Biol., 10(9):837-846, 2003) 또는 UCH-L1 단백질의 모노클로날 항체 또는 UCH-L1의 N-말단 부위 11개 아미노산을 인식하는 펩타이드의 폴리클로날 항체가 될 수 있다.

도 13은 UCH-L1의 shRNAi제작에 사용된 렌티 바이러스의 도식도이다.

상기 본 발명의 UCH-L1의 shRNAi는 서열번호 4, 5, 6에서 선택된 하나 이상이 바람직하다.

서열번호 3~6의 염기서열은 shRNAi를 렌티 바이러스를 발현벡터로 사용할 경우를 위해 제작된 것이다.

서열번호 3은 scramble 서열을 포함하는 렌티 바이러스 대조군 shRNAi 염기서열이다.

서열번호 4는 shRNAi를 사용하여 UCH-L1 발현 저하(knock-down)를 유발하고자 할 때 사용되는 것으로, 인간과 마우스상의 shRNAi 공통 염기서열부위를 타겟으로 제작된 shRNAi이다(chemistry and biology, vol 10, 837-846, 2003).

서열번호 5 및 서열번호 6은 마우스 염기서열부분을 타겟으로 제작된 shRNAi이다.

사전실험을 거쳐 인간 염기서열상에서는 서열번호 4번 부위가 가장 UCH-L1 발현정도가 줄어들었으며 마우스상에서는 서열번호 4번과 6번이 가장 효과적으로 UCH-L1의 발현정도를 저하시킨다. 인간과 마우스의 염기서열은 clustalW multiple sequence alignment 프로그램상에서 95%의 아미노산 서열 상동성(homology)을 보인다. 발현 벡터로 렌티 바이러스를 제작시, GFP 또는 제오신 저항성 유전자를 함께 발현시킴으로써 렌티 바이러스의 감염여부를 확인할 수 있다(Nature genetics, vol.33, March 2003).

본 발명의 일 실시예에서는, UCH-L1의 발현을 저해하는 shRNAi를 마우스 멜라노마 세포에 발현시킨 결과, shRNAi는 RNAi(RNA interference)를 일으켜 UCH-L1을 발현을 저해한다. 이러한 UCH-L1 발현이 저해된 멜라노마 세포를 마우스에 미세정맥주사하였을 때, 폐로의 일차전이가 감소된 결과를 나타낸다.

본 발명의 암전이 억제용 조성물은 하나 또는 그 이상의 항암제도 또한 포함할 수 있다. UCH-L1 단백질의 억제제 또는 항체는 당업자에게 잘 알려진 화학요법약제(chemotherapeutic agent)와 함께 사용될 수 있으며, 예를 들어, 사이클로포스파마이드, 아지리딘, 알킬알콘설포네이트, 나이트로소우레아, 다카르바진, 카르보플라틴, 시스플라틴 등과 같은 알킬화제(alkylating agent), 마이토마이신 C, 안트라사이클린, 독소루비신(아드리아마이신) 등과 같은 항생제, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실, 시타라빈 등과 같은 항대사제(antimetabolite agent), 빈카 알칼로이드와 같은 식물유래 약제 및 호르몬 등이 될 수 있다.

본 발명의 UCH-L1의 억제제를 유효 성분으로 함유하는 조성물은 상기 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 UCH-L1의 억제제를 유효 성분으로 함유하는 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 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. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

본 발명의 UCH-L1의 억제제를 유효 성분으로 함유하는 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 UCH-L1의 억제제를 유효 성분으로 함유하는 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 UCH-L1의 억제제를 유효 성분으로 함유하는 조성물의 투여량은 암전이를 억제하는 효과를 이루는데 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. 성인의 경우, UCH-L1의 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, shRNAi 일 경우 0.01ng/kg~10mg/kg, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg, UCH-L1 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

본 발명은 UCH-L1 유전자 서열을 포함하는 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용한 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 조성물이 포함하는 UCH-L1 유전자 서열은 서열번호 2의 일부 또는 전체염기서열, 서열번호 2의 다형현상을 포함하는 염기서열 중 선택된 하나 이상이 될 수 있으며, 원핵생물 또는 진핵생물 발현벡터 시스템 내에 포함된 형태로 암전이 억제제 스크리닝 조성물에 포함된다.

또한, 본 발명은 상기 UCH-L1 유전자를 포함하는 암전이 억제제 스크리닝용 조성물을 표적물질로 이용하는 암전이 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명은 상기 UCH-L1 유전자를 포함하는 암전이 억제제 스크리닝용 조성물과 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 시험대상물질이 상기 조성물에 포함된 유전자의 발현을 억제하는 활성을 나타내는지를 결정하는 단계로 이루어지는 암전이 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 스크리닝 방법에서 UCH-L1 유전자를 포함하는 조성물과 시험대상물질 간의 반응 확인은, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질, DNA-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.

예를 들면, 생체 외부에서(in vitro) 상기 유전자와 시험대상물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류 세포와 시험대상물질을 반응시킨 후 노던 분석, 정량적 PCR, 정량적 실시간 PCR 등을 통한 상기 유전자의 발현을 측정 방법, 또는 상기 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 시험대상물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현을 측정하는 방법 등을 사용할 수 있다.

이러한 경우 본 발명의 조성물은 UCH-L1 유전자 외에도, 핵산의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.

본 발명은 UCH-L1 단백질을 포함하는 암전이 억제제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용한 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 조성물이 포함하는 UCH-L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 구조를 갖거나, 또는 서열번호 2의 염기서열, 서열번호 2의 다형현상을 포함하는 염기서열 중 선택된 하나로부터 발현된 단백질, UCH-L1과 동등한 생리적 활성을 나타내는 UCH-L1 폴리펩티드 단편 중 선택된 1종 이상일 수 있다.

본 발명의 스크리닝용 조성물은 암전이를 촉진시키는 효과가 있으므로, UCH-L1 유전자 염기서열에서 mRNA, 단백질로의 전사, 번역을 저해하는 물질 또는 UCH-L1 단백질의 활성을 억제하는 물질을 스크리닝하여 암전이 억제제로 선택할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 UCH-L1 단백질을 포함하는 암전이 억제제 스크리닝용 조성물을 표적물질로 이용하는 암전이 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명은 상기 UCH-L1 단백질을 포함하는 암전이 억제제 스크리닝용 조성물과 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 시험대상물질이 상기 조성물에 포함된 단백질의 기능을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지를 결정하는 단계로 이루어지는 암전이 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 스크리닝 방법에서 UCH-L1 단백질을 포함하는 조성물과 시험대상물질 간의 반응 확인은, 단백질-단백질, 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.

예를 들면, UCH-L1 유전자 또는 UCH-L1 단백질과 시험대상물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), UCH-L1 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS(drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다.

이러한 경우 본 발명의 조성물은 UCH-L1로부터 발현된 단백질 외에도, 단백질의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생체 내(in vivo) 실험을 위해, 상기 단백질을 발현하는 세포, 또는 전사율을 조절할 수 있는 프로모터 하에 상기 단백질을 발현하는 플라스미드를 함유하는 세포 등을 포함할 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법에서, 시험대상물질은 통상적인 선정방식에 따라 암전이 억제제로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.

본 발명의 도 18에는 UCH-L1를 이용하여 억제제를 스크리닝하는 방법의 구체적인 예가 제시되어 있는데, UCH-L1 효소 5~10nM을 기질인 UB-AMC 0~1000nM과 반응완충액(50mM Tris-HCl(pH 7.6), 0.5mM EDTA, 0.1mg/ml albumin, W/O or W/5mM DTT)에서 반응시킬 때, 동시에 UCH-L1 억제제 후보물질을 첨가하여 반응시키고, 이의 효소활성, 효소 반응속도 등 생화학적 특징분석 및 HTS 분석을 수행함으로써 UCH-L1 억제제를 스크리닝 할 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, 유전자 발현을 증진시키거나 단백질의 기능을 증진시키는 활성을 나타내는 시험대상물질 및 반대로 유전자 발현을 억제시키거나 단백질의 기능을 억제시키는 활성을 나타내는 시험대상물질은, 전자의 경우, 암전이 억제제 후보물질이 될 수 있고, 후자의 경우는 시험대상물질에 대한 억제제를 개발함으로써 암전이 억제제 후보물질이 될 수 있다.

이와 같은 암전이 억제제 후보물질은 이후의 암전이 억제제 개발과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 UCH-L1 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 억제효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 암전이 억제제를 개발할 수 있다.

이렇게 하여 얻어진 물질은 UCH-L1 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질에 대해 부분적 또는 완전한 활성 억제효과를 나타내게 되므로, UCH-L1 유전자 발현 억제 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 저하에 의하여, 암전이가, 그 이외 유발되는 질환들을 억제할 수 있다.

본 발명에서 유전공학 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 보다 명확하게 된다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예 I] 유비키티 C-말단 가수분해제(UCH-L1)를 이용한 암전이 진단, 암전이 억제 및 암전이 억제제 스크리닝

I-1. 암전이와 관련된 단백질 선정을 위한 스크리닝

암전이성에 관련된 세포내 표적 단백질을 스크리닝 하기 위해서, 암전이성을 갖는 폐암세포주(H157(squamous cell carcinoma))와 암전이성을 가지고 있지 않는 폐암세포주(NCI-H358(bronchi alveolar carcinoma)), 정상 세포주(WI-38 VA-13 subclone 2RA(fibroblast))의 세포질 안팎(intra or extracellular)에 존재하는 단백질을 조사하고, 차별적으로 발현되는 단백질을 분석하였다.

세포 배양에는 10%(v/v) fetal bovine serum (FBS)과 100 unit/ml 페니실린 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신, 3.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 탄산나트륨(sodium bicarbonate), 10mM HEPES를 첨가한 RPMI-1640 (pH 7.3 with 2 mM L-glutamine)을 배양액으로 사용하였다.

I-1-1) 매트릭젤을 이용한 세포 이동성 확인

먼저, 세포의 이동성을 알아보기 위하여 매트릭젤을 이용한 세포침투성 정량법(invasion assay)을 이용하였다.

EHS 마우스 암조직(EHS (Englebreth-Holm-Swarm) mouse tumor)으로부터 추출한 재조합된 기저막 매트릭스(reconstituted basement membrane matrix)인 매트릭젤(matrigel, Becton Dickinson(BD) company, Cat No.354234)을 이용하여 *in vitro* 세포이동 정량법(invasion assay)을 실시하였다.

매트릭젤은 미리 4 °C에서 녹여서 혈청을 포함하지 않는 차가운 배지로 희석하여 최종 농도가 1 mg/ml이 되게 준비해 둔 후, transwell invasion chamber의 upper chamber에 80 μl (약 80 μg)으로 얇게 코팅해서 37 °C 인큐베이터에서 약 1시간 건조시켰다. 이와 동시에 transwell invasion chamber의 lower chamber에는 배지 600 μl 를 넣어 미리 membrane을 평형화 시켜두었다. 1시간 후, 완전히 젤화되지 않은 매트릭젤은 혈청을 포함하지 않는 따뜻한 배지로 가볍게 씻어서 제거하였다.

H157, WI38, H358 세포는 트립신을 처리한 후, 혈청을 포함하지 않는 따뜻한 배지로 현탁해서 각 웰 당 $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ 농도로 150 μl 씩 분주하고, lower chamber에는 혈청을 포함한 배지 600 μl 를 넣고, 37 °C 인큐베이터에서 약 24시간 배양했다. 배양이 끝난 후, transwell invasion chamber의 upper chamber 남아있는 이동하지 않은 세포는 걷어내고, transwell의 아래쪽을 크리스탈 바이올렛(crystal violet 2.5 g, methanol 125 ml, d-H₂O 375 ml)으로 5분간 염색한 후, 1분간 증류수로 연속해서 3번 탈색했다. 탈색이 끝나면 면봉으로 웰의 안쪽을 조심스럽게 닦아낸 후, membrane이 완전히 건조되기를 기다렸다가 혈구계수기(hemocytometer)에 올려놓고 현미경으로 9구간을 잡아 transwell invasion chamber를 통과해서 염색이 된 세포의 수를 세고, 적어도 같은 실험을 3번 반복해서 평균을 구했다.

위의 방법에 의해 세 세포주간의 세포이동성 차이는 도 2에 제시한 바와 같이 H157이 가장 현저하게 컸으며 WI-38이 그 다음으로 컸고, H358은 폐암세포주임에도 불구하고 전혀 세포이동성을 보이지 않았다.

I-1-2) 자이모그래피를 이용한 MMP-2, MMP-9의 발현정도 확인

여러 암세포주에서 세포이동과 관련된 MMP-2, MMP-9의 발현정도를 자이모그래피를 이용하여 확인하였다.

자이모그래피(Zymography)는 젤라틴(gelatin)의 효소 활성을 측정하는 방법으로, 젤라틴을 포함한 폴리아크릴아마이드 젤 상에서 단백질을 분리한 후, 젤라틴네이즈(gelatinase)를 포함한 밴드를 37°C에서 15-20시간 동안 항온(incubation)시켜 분해된 젤라틴의 밴드를 쿠마시 블루(coomassie blue) 염색을 통하여 네가티브 밴드(negative band)를 확인하는 방법이다.

WI-38, H358, H157 세포 단백질을 추출한 다음, 상기 방법에 따라 자이모그래피를 수행하였다.

도 3의 결과를 보면, WI-38에서는 MMP 2 밴드만 약하게 나타났고, H358에서는 MMP 9 밴드만 나타났다. 반면, H157에서는 MMP 2 및 MMP 9 밴드가 동시에 나타나, MMP 2 및 MMP 9가 동시에 발현됨을 확인하였다.

상기 도 2 및 3에서 보여주듯이, 같은 농도의 매트릭젤을 코팅하고, 같은 수의 세포를 일정시간 배양했을 때, MMP 2만을 약하게 분비하는 WI-38은 세포들이 아주 조금 이동했고, MMP 9만을 분비하는 H358은 세포들이 전혀 이동하지 않았으며, MMP 2와 MMP 9를 동시에 분비하는 H157에서만 세포 침투(invasion)가 크게 일어남을 관찰할 수 있었다.

암세포가 원래의 발암장소에서 이동하여 다른 장기로 가서 퍼져 증식하려면 혈관내피세포 기저막을 분해시키는 과정이 필요한데, 이 과정에서 기존에 암전이와 관련해서 알려진 효소인 MMPs 중 특히 젤라틴네이즈(gelatinase)가 암전이와 밀접하게 연관되고, 그 중에서 MMP 2의 활성이 암세포의 이동 및 침투에 결정적이며 MMP 9는 MMP 2의 분비가 이뤄질 때 MMP 2에 의한 세포의 이동 침투성을 증가시키는 데 보조적으로 관여하며 MMP 9 단독으로는 이런 효과가 없음을 알 수 있었다.

I-1-3) 이차원 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 및 말디 토프 질량분석방법

여러 세포주에서 발현된 단백질을 대상으로 이차원 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(2D-PAGE)을 실시하여 차이를 보이며 발현된 단백질을 확인하였다.

2D-PAGE은 아마삼 파아시아 바이오텍(Amersham Pharmacia Biotech.)에서 나온 스트립 젤(strip gel)을 사용하여, 1차로 pIs값에 따른 등전기적 포커싱(isoelectric focusing)을 실시하였고, 2차로 PAGE를 실시하여 분자량에 따른 분리를 하였다.

우선, H358 및 H157 세포 pellet (1×10^6 개 :약 150-200 μg)에 일차원 샘플완충액(first dimensional sample buffer (8.4 M urea, 2.4 M thiourea, 5% CHAPS, 50 mM DTT, 1.6% 5-7 ampholyte, 0.4% 3-10 ampholyte, 1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 mM EDTA)) 30 μl 를 넣고, 1시간 방치하면서 세포를 분해시켰다. 단백질을 pIs값에 따라 분리할 수 있는 1차 전개를 위하여 스트립홀더(strip holder)에 리하이드레이션 완충액(rehydration buffer (8 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 0.5% IPG buffer, 1% bromophenol blue)) 125 μl 를 넣고, 앞에서 용해(lysis)시킨 세포 시료를 넣고 스트립 젤을 얹은 다음, 수분 증발을 방지하기 위해 미네랄 오일(mineral oil) 180 μl 를 넣어주고 홀더의 뚜껑을 닫은 후, 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 이상 리하이드레이션시켰다. 전개는 500 V에서 1시간, 1000 V에서 1시간, 8000 V에서 3시간동안 전개시켰다. 전개가 끝나면 단백질이 퍼지는 것을 막기 위해 스트립 젤을 신속히 -70°C 에 보관하였다.

2차 전개는 스트립 젤을 SDS 평형 완충액(equilibration buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 1% bromophenol blue, 100 mM DTT))에 담가 평형시키고 11% SDS-PAGE를 실시하여 단백질을 분리시켰다.

위의 방법에 의해 세 세포주간의 차별적으로 발현된 단백질 점들(spots)을 도 4에 나타내었다.

말디 토프 질량분석방법(MALDI-TOF Mass Spectrometry)에서는 먼저 시료를 이차원 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 분리한 후에 SDS-PAGE 젤을 겔어서 쿠마시염색법으로 염색하였다. 젤 상의 점(spot)들이 확인이 되면, 해부용 메스로 젤의 점들을 잘라내어서 에펜도르프관(ependorf tube)에 넣었다. 잘라낸 젤 조각들을 30% 메탄올 1ml 첨가 하에 완전히 분쇄시킨 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 항온반응(incubation)하였다. 이어 25mM 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3))/50% 아세토나이트릴(acetonitrile)용액 100 μl 를 넣고, 10분간 3회 반복하면서 탈색시킨 후, 100% 아세토나이트릴을 가해서 탈수시켰고, 스피드 백(speed vac.)을 이용해 다시 완전히 건조시켰다. 25mM 암모늄 바이카보네이트(NH_4HCO_3)가 포함된 10ng/ml 트립신(trypsin) 용액 10 μl 를 넣어주고, 상온에서 5-10분, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 두어 젤 안으로 트립신이 완전히 들어가게 한 후, 25mM 암모늄 바이카보네이트(NH_4HCO_3) 20 μl 를 더 첨가해 준 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12-16시간 흔들면서 항온반응하였다. 여기에 최종농도 60% 아세토나이트릴/0.1% TFA (1:1 v/v) 용액 30 μl 를 넣고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 흔들면서 항온반응한 후, 상등액을 취해서 합하는 과정을 3회 반복한 후, 100% 아세토나이트릴 20 μl 를 가한 후에 추출 용액을 합해서 스피드 백 진공 원심분리기(SpeedVac vacuum centrifuge)로 건조시켜 -70°C 에서 보관했다.

농축건조시켜 보관해둔 시료들을 60% 아세토나이트릴 /0.1% TFA (1:1 v/v) 용액 10 μl 에 녹인 후, 2분간 초음파분해(sonication) 해서 매트릭스(matrix) 용액(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile/0.1% TFA (1:1 v/v))과 1:1로 섞은 후 플레이트(plate)에 얹어 상온에서 건조시켰다. MALDI-TOF MS는 337 nm 나이트로젠 레이저(nitrogen laser)를 지닌 HP G2025A MALDI-TOF MS (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA)를 사용하였고, 이온 소스(ion source)에서 가속화된 전압(voltage)은 28 kV에 맞추어졌고, 스펙트럼(spectra)은 외부적으로 기질 P ($\text{MH}^+ = 1348.6$ Da)와 인슐린(insulin) ($\text{MH}^+ = 5778.6$ Da)을 사용하여 정량했다. 확인된 단백질의 질량 스펙트라(mass spectra)의 해석을 위해서 San Francisco의 California 대학의 World Wide Web site에서 제공하는 메스 핏 프로그램(MS-Fit program)을 사용하였고, 정량을 위해서는 아마삼 파아시아 바이오텍에서 제공하는 이미지 매스터(Image Master 2D gel analysis software)를 사용하였다.

위의 방법에 의해 세포주간의 차별적으로 발현된 단백질의 리스트를 표 1, 도 5에 제시하였다.

세포이동성을 현저하게 보인 H157과 H358 폐암세포주의 세포질내의 단백질 발현에 있어서, 유비키�틴 C-말단 가수분해제-L1이 그 발현의 정도에 있어 가장 큰 차이를 보였다. 또한 유비키�틴 C-말단 가수분해제-L1은 H157 세포에 있어서 세포질 안팎의 단백질 분석에서 모두 관찰되었다.

[표 1]

	Intracellular protein	NCBI #	Extracellular protein
1		4755085	Pro alpha 1 (I) collagen
2		1418930	Prote-alpha 2 (I) collagen
3	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	5410290	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
4	71Kd heat shock cognate protein	32467	71Kd heat shock cognate protein
5	Mitochondrial stress-70 protein precursor	P38646	Mitochondrial stress-70 protein precursor
6	Heavy metal binding protein	34707306890	Chaperonin (HSP 60)
7	T complex protein (TCP)	1351211/603955	KIAA0096 protein
8	Transformation sensitive protein IEF SSP	P31948	
9	Uvucitin	2119204	
10	Protein disulfide isomerase (PDI)	1085373	Protein disulfide isomerase (PDI)
11	T complex protein I	P76371	
12	Pyruvate kinase	266427	Pyruvate kinase
13	Alpha-enolase	4503571/1167648	Alpha-enolase
14	Actin	1070613/28252	Beta-actin
15	Phosphoglycerate kinase	387020	Phosphoglycerate kinase
16	Phosphoglycerate kinase	387020	Phosphoglycerate kinase
17	Aldolase A	28614	Aldolase A
18	Aldolase A	28614	Aldolase A
19	B23 nucleophosmin (280AA)	825671	B23 nucleophosmin (280AA)
20	Similar to trophomyosin 4	12653955	
21		4505751	Lipcartin V
22		7106894	HSPC2S2
23		6434861	Phosphatidylcholine transfer protein
24		2217923	Alpha (1,2) fucosyltransferase
25		4757756	Lipcartin II
26	Similar to ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	12653131	Similar to ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
27	Phosphoglycerate mutase 2	450571	Phosphoglycerate mutase 2
28	Triphosphate isomerase	37247	Triphosphate isomerase
29	Gluthione S-transferase (GST-P)	31946	Gluthione S-transferase (GST-P)
30	Tropomyosin	P07226/37424	Cytoskeletal tropomyosin
31		339958	Skeletal tropomyosin
32	Nm23H1g	468542	Nm23H1g
33	cyclophilin	181250	cyclophilin
34	Initiation factor 4B	181997/4691541	adeylate kinase 5
35	Calmodulin	179810	Calmodulin
36	Retionic acid binding protein II	181026	
37	Peptidyl isomerase	30168	Peptidyl isomerase
38	Peptidyl isomerase	30168	Peptidyl isomerase
39	Nm23H2 product	189240	Nm23H2 product

상기 결과로부터 유비키�틴 C-말단 가수분해제-L1가 암전이와 밀접한 관계가 있는 단백질로서 그 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

I-2. 유비키�틴 C-말단 가수분해제-L1의 암전이 표적 단백질로서의 가능성 확인

I-2-1) WI38 세포주에서의 UCH-L1 발현에 의한 세포이동성 변화 확인

암전이와 관련하여 표적단백질로 관찰된 유비키�틴 C-말단 가수분해제-L1의 암전이성을 확인하기 위하여, 세포이동성을 보이지 않은 정상 폐세포주 WI38에 순간적으로 유비키�틴 C-말단 가수분해제-L1의 유전자(pFlag-UCH-L1; pFlag-CMVTM-2 expression vector(sigma, saint louis, USA) 사용, 서열번호 2의 UCH-L1 full length cDNA 포함)를 각각 1, 2, 4, 6 μ g의 양으로 이식한 후(transient transfection), 세포이동성을 세포침투성 정량법(invasion assay)으로 정량하였다.

대조군으로 세포이동성이 뛰어난 세포주 H157을 양성대조군으로 사용하였다.

도 6에 나타난 결과, pFlag-UCH-L1 유전자를 이식한 경우에 있어서 세포이동성이 증가하며, 특히 WI38 세포주의 세포이동성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다.

I-2-2) HeLa 세포주에서의 UCH-L1 발현에 의한 세포이동성 변화 확인

또한, 자궁경부암 세포로서 세포이동성을 가지고 있으나 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1을 전혀 발현하지 않는 HeLa 세포주에 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1 유전자(pFlag-UCH-L1)를 각각 0.5, 1, 2, 4 μ g의 양으로 이식한 후(transient transfection), 세포이동성의 변화를 세포침투성 정량법으로 정량하였다.

도 7에 나타난 바와 같이, HeLa 세포주는 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1에 대하여 단백질 발현농도 의존적으로 세포이동성이 증가하는 것으로 관찰되었다.

따라서, 본 발명의 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1이 세포이동을 증가시키는 단백질임을 확인할 수 있다.

I-2-3) 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1와의 결합단백질 확인

가) 면역 침전법을 이용한 UCH-L1와의 결합단백질 확인

세포이동성에 관여하는 단백질로 관찰된 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1의 세포내 결합하는 단백질을 면역 침전법(immunoprecipitation)을 이용하여 단백질-단백질간 상호작용을 알아보았다.

HEK 293T 세포주에 순간적으로 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1 유전자(pFlag-UCH-L1)를 이식한 후, 면역침전법으로 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1에 결합하는 다른 단백질을 스크리닝하였다. 이의 결과로 이차원 PAGE 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8A를 보면, 대조군(control)에서는 1~5번의 스팟들이 pI에 따른 상이한 이동성(mobility) 차이를 나타내고, 이로부터 UCH-L1이 여러 이형체(isoform)가 존재하고 있음을 알 수 있었다.

이러한 여러 이형체들로 세포내에 존재하는 UCH-L1이 산화적 스트레스(oxidative stress)에 따라 그 결합하는 단백질을 알아보고자, 산화적 스트레스로 H_2O_2 를 세포에 처리하여 면역 침전법에 이어 이차원 PAGE를 수행하였고(도 8B), 그 결과 스팟들에서 UCH-L1과 결합한 결합단백질을 MALDI-TOF-MS로 분석하여 대조군과 비교하였다.

표 2는 상기 면역 침전법에 의해 수득된 UCH-L1과 결합하는 단백질을 MALDI-TOF-MS로 분석한 결과이다.

표 2에서 제시하고 있는 바와 같이, 베타-액틴(beta-actin), Hsp70, ERK와 같은 단백질이 세포내에서 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1과 결합하는 것으로 관찰되었고 특히 베타-액틴, ERK와 같은 세포 모양에 관여하는 단백질과 결합함으로써 세포이동성에 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1이 관여한다는 사실을 뒷받침하고 있다.

[표 2]

Spot	Identified protein	accession#	Mass (Da)	pI	%DC	Function
1	heat shock 70kDa protein 9B precursor; heat shock 70kDprtein 9	24234688M	73681	5.9	34	Chaperone
2	heat shock 70kDa protein 9B precursor; heat shock 70kDprtein 9	24234688M	73681	5.9	20	Chaperone
3	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1; heat shock cognate protein, 71-kDa; heat shock 70kd protein 10; heat shock cognate protein 54; constitutive heat shock protein 70; lipopolysaccharide-associated protein 1; LPS-associated protein 1 [Homo sapiens]	5729877 M	70899	5.4	28	Chaperone
4	keratin 1, type II, cytoskeletal	7428712	65494	6.0	33	Cytoskeletal protein
5	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H [Homo sapiens]	9624998 M	49264	5.9	50	Ribonucle Protein
6	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 [Homo sapiens]	5031753 M	49230	5.9	25	Ribonucle Protein
7	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 [Homo sapiens]	5031753 M	49230	5.9	20	Ribonucle Protein
8	44kDa protein kinase, mitogen-activated protein kinase	1335009 M	41001	6.3	23	signal-regulated kinase
9	murine mammary tumor integration site 6 (oncogene homolog); eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 (48kD) [Homo sapiens]	4503521 M	52221	5.7	19	translation factor
10	beta actin; beta cytoskeletal actin	4501895 M	41737	5.3	28	Cytoskeletal protein
11	actin, beta	14250401	41005	5.6	27	Cytoskeletal protein
12	BFNT1 protein	17389533	35772	5.5	18	Esterase
13	ACTB protein	15277503	40221	5.6	27	structural protein

도 9는 상기 표 2에서 제시하고 있는 결합단백질을 재확인하기 위하여 결합단백질로 밝혀진 것 중에서 대표적으로 베타-액틴, HSP70, ERK에 대해 각각의 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 통하여 이들 단백질이 UCH-L1과 결합하는 단백질임을 재확인하였다.

나) 세포에서의 UCH-L1와 베타-액틴의 결합 관찰

UCH-L1이 세포의 이동과 세포의 모양과는 매우 밀접한 관계가 있다. 세포의 모양변화에는 대표적으로 베타-액틴이 관여하고, UCH-L1이 거의 존재하지 않는 H358 세포에 UCH-L1이 과발현되면 세포의 모양이 현저하게 변화되며 이때의 모양변화는 세포의 이동과 밀접한 형태로 변화되는 것을 관찰한 바 있다. 그러므로 UCH-L1이 세포의 이동과 관련한다는 사실을 확인하기 위해 UCH-L1이 거의 존재하지 않는 H358 세포내에 UCH-L1을 과발현시켜 세포내에서, 액틴과 UCH-L1이 존재하는 위치를 각각 확인하고자 하였다.

H358세포에 flag과 flag-UCH-L1을 순간적으로 이식한 후, 액틴은 팔로딘 플로레신 이소티오시아네이트 (phalloidin fluorescein isothiocyanate)를 사용하여 염색하고, flag-UCH-L1은 flag 항체와 텍사스 레드(Texas red)로 태깅(tagging)된 2차 항체(Molecular Probes사)를 사용하여 염색하였다.

도 10은 공초점 마이크로스코피를 이용하여 유비키티 C-말단 가수분해제-L1이 베타-액틴과 결합하고 있음을 증명하였다. 특히 세포질 전체보다 세포막부위에서 공존함으로써 세포이동성에 영향을 주는 세포모양형성에 유비키티 C-말단 가수분해제-L1이 관여하고 있음을 설명해 주고 있다.

위의 결과를 통해, 본 발명의 유비키티 C-말단 가수분해제-L1이 세포이동성에 영향을 주는 암전이 표적 단백질임을 확인하였다.

[실시예 II] 마우스 멜라노마 세포주에서 발현 저하된 유비키티 C-말단 가수분해제-L1로 인한 암전이 저하현상 확인

본 실시예에서는 동물모델을 통하여 UCH-L1 단백질이 암전이 과정과 관련하여 원인적 표적단백질임을 확인하고자 하였다.

마우스 멜라노마 B16F10 세포주는 암전이성이 매우 강하며, 전이과정에서 폐로의 일차 전이를 유발하는 세포주이다. 이러한 동물모델을 이용하여 B16F10 세포주에 렌티 바이러스를 이용하여 유비키티 C-말단 가수분해제-L1 발현저하된 안정적 세포주(stable cell line)를 획득하고자 하였다.

그 후 이 세포주를 BALB c/ 누드 마우스(nude mouse)에 미세정맥주사하여 폐로의 일차전이 현상이 감소되는지 알아보고자 하였다.

도 11은 이러한 동물실험 실시예를 도식화한 그림이다.

II-1. UCH-L1을 발현저하시킨 마우스 멜라노마 B16F10 세포주 제작

먼저, 마우스 멜라노마 B16F10 세포주의 세포질 내에 존재하는 UCH-L1을 이 단백질이 과발현된 폐암세포주 H157과 비교하여 정량 비교분석하였고, 도 12에 그 결과를 나타내었다. 그 결과, B16F10 세포주에도 UCH-L1이 존재하고 있음을 확인하였다.

렌티 바이러스 감염(infection of lentivirus) 하루 전, 감염시킬 세포주를 당일 7-80% 세포밀도(confluency)로 세포배양 접시(cell culture dish)에 분주하였다. 세포배양액을 제거한 후 UCH-L1의 shRNAi를 발현하는 벡터인 VCA™ 렌티 바이러스((주)벡터코어에이, 한국, 도 13 참조) 1ml을 첨가하였다. 이 때 shRNAi인 서열번호 3, 4, 5, 6을 발현하는 렌티바이러스 감염(infection)시 2.5×10^5 cell당 바이러스 500 μ l(Virus Titer 1×10^7 IFU/ml)을 사용하였다.

이어서, 폴리부렌(polybrene) 4~8mg/ml을 첨가한 후 세포배양접시를 조심스럽게 위 아래로 흔들었다. 37℃, 5% CO₂ 항온조(incubator)에서 6시간 항온 배양한 후, 새로운 세포 배양액(culture medium)으로 교체하였다. 24시간이 지난 시점에서 렌티 바이러스를 같은 방법으로 2차 감염시켰다. 단, 감염시간은 6시간이 아닌 12시간으로 하였다. 2차 감염 후에 24시간 추가로 지난 시점에서 세포를 트립신으로 거두어 1/16의 비율로 100 mm 세포 배양접시에 다시 재 분주하였다.

24시간이 지나면 제오신(zeocin)을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 세포배양액에 첨가하여 세포를 배양하였다. 약 14일이 경과될 때까지 제오신을 같은 농도로 처리하여 3일마다 새롭게 교체해 주었다. 약 14일 경과되면 제오신에 저항능력이 있는 세포만이 살아남게 되는데, 이 세포는 유비키티 C-말단 가수분해제-L1 shRNAi(short hairpin RNA)가 감염된 세포이다. 14일이 경과된 시점에서는 저항 능력을 가진 세포들이 군체(colony)를 형성하게 되며 이 세포만을 선택하여 재 분주 및 배양하여 안정적 유비키티 C-말단 가수분해제-L1이 저발현된 세포주(stable cell line)를 확보할 수 있었다.

도 14는 위의 방법으로 확보한, UCH-L1이 저발현된 세포주(stable cell line)에 대한 항원항체 반응을 이용한 웨스턴 블롯 분석방법(analysis by western blot) 결과이다.

정상 B16F10 세포주와 렌티바이러스 대조군(cont, 서열번호 3)을 감염시킨 세포주에 비하여 UCH-L1 shRNAi가 감염된 세포주는 ha(서열번호 4)와 mb(서열번호 6)에서 UCH-L1이 현저하게 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. 같은 UCH-L1 shRNAi가 감염된 세포주이지만 ma(서열번호 4)의 경우에는 UCH-L1이 감소하지 않은 결과를 얻었다. GFP 항체로는 세포내 렌티바이러스의 도입, 발현정도를 측정하였다.

도 15는 위의 방법으로 확보한, UCH-L1이 저발현된 세포주에 대한 형광 유체 세포 분석기(FACS flow cytometry)를 이용하여 렌티 바이러스로 인한 GFP 발현을 확인한 결과이다.

GFP 발현 측정을 통해, 렌티바이러스 shRNAi 처리한 세포주 ha, ma, mb에 렌티 바이러스가 비슷한 정도로 도입되었음을 확인하였다.

따라서, ha와 mb인 경우를 선택하여 정상 B16F10 세포주와 렌티바이러스 대조군을 감염시킨 세포주와 비교하여 동물실험을 실시하였다.

II-2. 유비키티 C-말단 가수분해제(UCH-L1) 발현저하시킨 세포주를 이용한 암전이 동물실험

상기와 같이 UCH-L1을 현저하게 발현저하(knock-down)시킨 마우스 멜라노마 세포주(B16F10)를 제오신 항생제(zeocin antibiotics)로 선별하여, 1×10^6 개의 세포를 BALB c/누드 마우스(BALB c/nude mouse)에 미세정맥주사로 1회 주입한 후, 14일이 경과된 후에 폐로의 전이를 확인하였다. (대조군에는 정상 멜라노마 B16F10 세포주를 실험군과 동일한 양으로 주입하였다.)

도 16는 14일 경과 후의 마우스 폐조직 사진이다.

도 16에서 알 수 있듯이, 대조군(a)에 비해 검정색의 멜라노마 군체(colony)가 유비키티 C-말단 가수분해제-L1의 shRNAi를 주입한 쥐(b, c)에서는 현저하게 감소되어 있는 것을 확인하였다.

도 17은 상기 도 16의 폐 표면에 존재하는 검정색의 멜라노마 군체(colony)를 해부 현미경을 이용하여 정량적으로 표시한 것이다. 제시하고 있는 바와 같이 암전이성을 갖는 정상 마우스 멜라노마(B16F10)에 비하여 UCH-L1의 shRNAi를 마우스 멜라노마 세포주(B16F10)에 감염시켜 UCH-L1을 현저하게 발현저하(knock-down)시킨 ha와 mb 마우스인 경우는 각각 92%, 62%의 폐로의 B16F10 세포주의 전이성이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

결과적으로, 본 발명의 유비키티 C-말단 가수분해제-L1이 암전이성에 있어 원인적 표적 단백질이며, UCH-L1 단백질의 발현 및 활성을 억제함으로써 암전이를 억제시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[실시예 III] 유비키티 C-말단 가수분해제 L-1(UCH-L1)을 이용한 암전이 억제제 스크리닝

UCH-L1 단백질의 발현 및 활성을 억제할 수 있는 억제제를 고성능 작업처리 스크리닝(high throughput screening; HTS) 방법을 이용하여 그 암전이 억제제 후보물질로서 스크리닝한다(도 18, 도 19).

도 18과 같이 UCH-L1의 기질로는 UB-AMC(7-아미노-4-메틸쿠마린)를 사용하며, UCH-L1에 의하여 AMC부분이 가수분해되면 나오는 형광을 감지함으로써 억제제의 효능을 가늠한다.

구체적으로, UCH-L1 5~10nM을 UB-AMC 0~1000nM과 반응완충액(50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 0.5 mM EDTA, 0.1 mg/ml albumin, W/O or W/5mM DTT)에서 반응시킬 때, 억제제 후보물질을 첨가하여 반응시키고, 이의 효소활성, 효소 반응속도 등 생화학적 특징분석 및 HTS 분석을 수행함으로써 UCH-L1 억제제를 스크리닝한다(도 19).

상기와 같이 스크리닝하여 수득한 UCH-L1 억제제는 암전이의 억제 및 예방용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 UCH-L1은 암전이의 원인적 표적 단백질로서, 이의 발현정도에 따라 세포이동도가 증가하므로, 이에 대한 모노클로날 항체 또는 기질을 이용하여 암전이 진단에 사용할 수 있다.

또한, UCH-L1의 발현 또는 효소활성을 저해함으로써 암전이를 억제할 수 있으므로, UCH-L1의 억제제를 스크리닝하여 개발함으로써 항암치료의 보조제로서 암전이 억제용 약제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 암전이성이 상이한 두 세포주에서의 암전이와 관련된 표적단백질을 찾기 위한 전체적인 방법에 대한 도식도이다.

도 2는 세포이동성이 상이한 WI38, H358, H157 세포주에 대한 매트릭셀을 이용한 세포 이동성 정량 결과이다.

도 3은 세포이동성이 상이한 WI38, H358, H157 세포주에 대한 젤라티나제(gelatinase) 활성을 측정한 결과이다.

도 4는 세포이동성이 상이한 H358과 H157 세포주에 대한 이차원 PAGE를 이용한 세포질 안의 단백질 분석결과 및 H157 세포주에 대한 이차원 PAGE를 이용한 세포질 안팎의 단백질 분석결과이다.

도 5는 표 1에서 얻은 WI38, H358, H157 세포주에서의 세포질 안팎의 발현단백질들의 상대적 발현강도를 나타낸 도이다.

도 6은 정상 폐세포주 WI38에 순간적으로 유비키티 C-말단 가수분해제-L1 유전자를 이식한 후, 세포이동성을 세포침투성 정량법(invasion assay)으로 정량한 결과이다.

도 7은 유비키티 C-말단 가수분해제-L1이 발현되지 않는 자궁경부암 HeLa 세포주에 순간적으로 유비키티 C-말단 가수분해제-L1 유전자를 이식한 후, 세포이동성을 세포침투성을 정량한 결과이다.

도 8은 HEK 293T 세포주에 순간적으로 유비키티 C-말단 가수분해제-L1 유전자를 이식한 후, 면역침전법(immunoprecipitation)으로 유비키티 C-말단 가수분해제-L1에 결합하는 다른 단백질을 스크리닝하기 위한 이차원 PAGE 결과이다.

도 9는 도 8과 표 3에서 얻은 결과를 다시 항원항체 반응법인 웨스턴 블롯 분석법(western blot analysis)을 이용하여 확인한 결과이다.

도 10은 공초점 마이크로스코피 방법을 이용하여 확인된 세포질내에서 유비키티 C-말단 가수분해제-L1과 베타 액틴이 세포질내에서 같은 위치에 존재하고 있음을 나타내는 형광 이미지이다.

도 11은 동물실험 실시예를 도식화한 그림이다.

도 12는 마우스 펠라노마 B16F10세포주의 세포질 내에 존재하는 유비키티 C-말단 가수분해제-L1을 이 단백질이 과발현된 폐암세포주 H157과 비교하여 항원항체 반응법인 웨스턴 블롯 분석법을 이용하여 정량비교분석한 결과이다.

도 13은 shRNAi UCH-L1 제작에 사용된 렌티 바이러스 도식도이다.

도 14는 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1 shRNAi를 렌티바이러스로 감염시켜 확보된, 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1이 저발현된 세포주에 대한 항원항체 반응을 이용한 웨스턴 블롯 분석방법 결과이다.

도 15는 도 14와 같은 방법으로 확보한 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1가 저발현된 세포주에 대한 형광 유체 세포 분석기(FACS flow cytometry)를 이용하여 렌티 바이러스로 인한 GFP 발현을 확인한 결과이다.

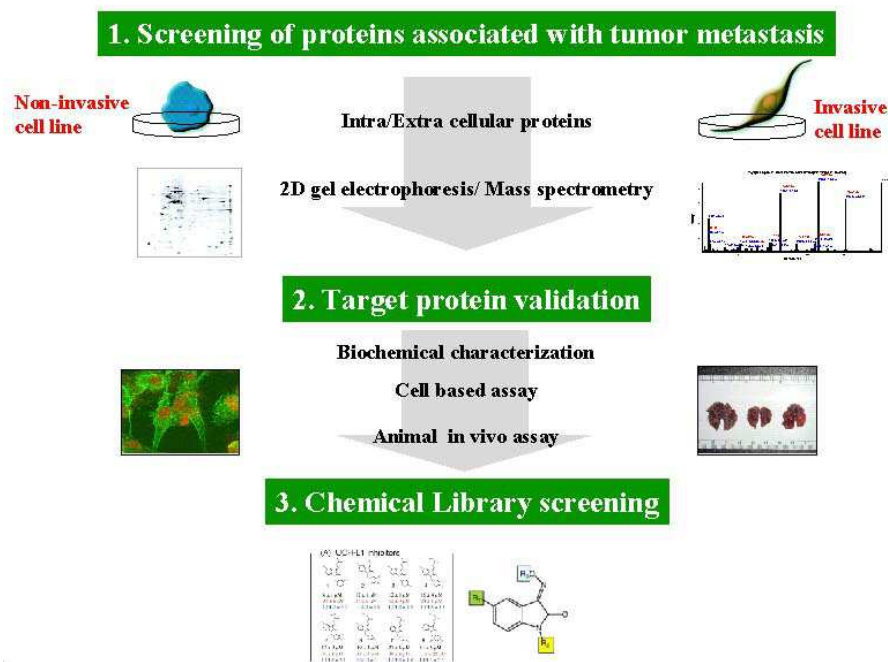
도 16은 렌티 바이럴 벡터를 이용하여 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1의 shRNAi를 마우스 멜라노마 세포주(B16F10)에 감염시켜 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1를 현저하게 발현저하(knock-down)시킨 후, 그 세포주를 제오신 항생제(zeocin antibiotics)로 선별하여 BALB c/누드 마우스에 미세정맥주사로 주입한 후 14일이 경과된 상황의 폐조직 사진이다.

도 17은 위의 도 16 사진의 폐 표면에 존재하는 검정색의 멜라노마 군체(colony)를 해부 현미경을 이용하여 정량적으로 표시한 것이다.

도 18 및 도 19는 유비키팀 C-말단 가수분해제-L1이 암전이과정의 원인적 표적 단백질을 확인한 결과로부터 이 단백질의 활성을 억제할 수 있는 억제제를 고성능 작업처리 스크리닝(high throughput screening) 방법을 이용하여 그 후보물질을 검색할 수 있는 간단한 방법을 도식화한 것이다.

도면

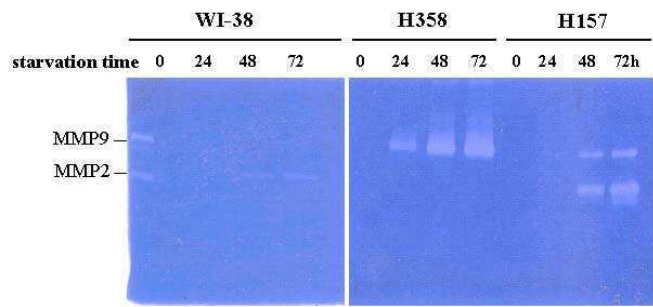
도면1



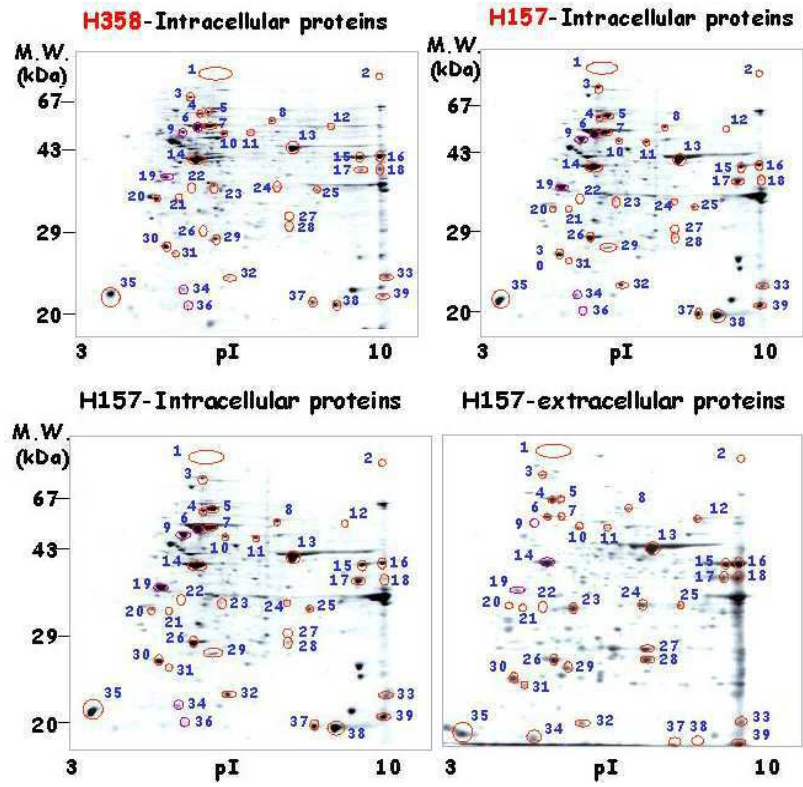
도면2



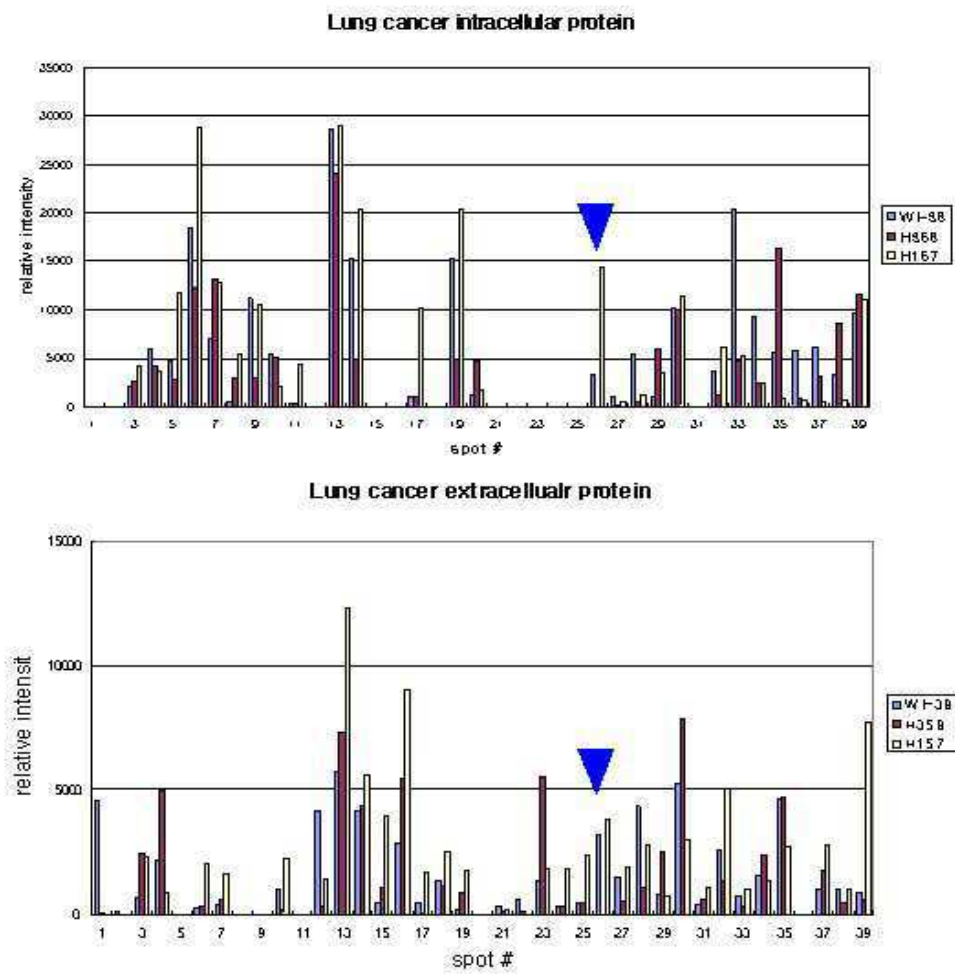
도면3



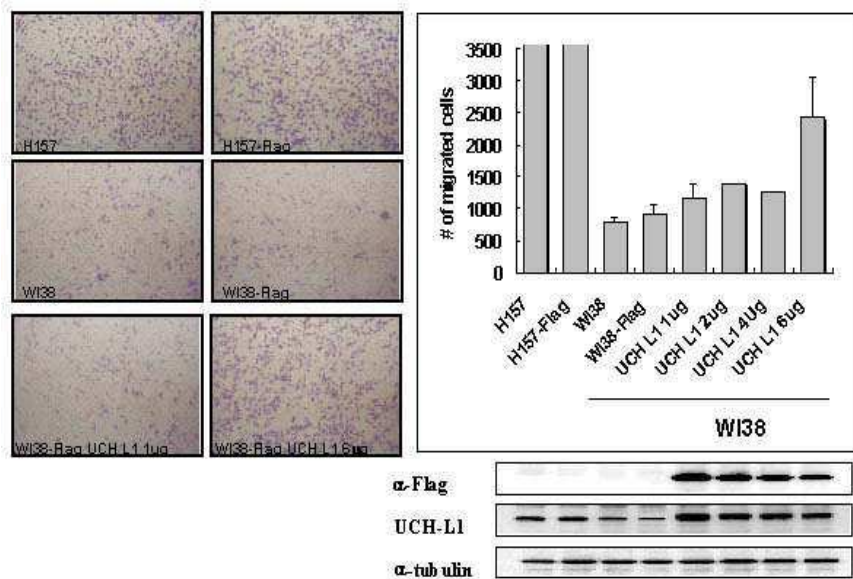
도면4



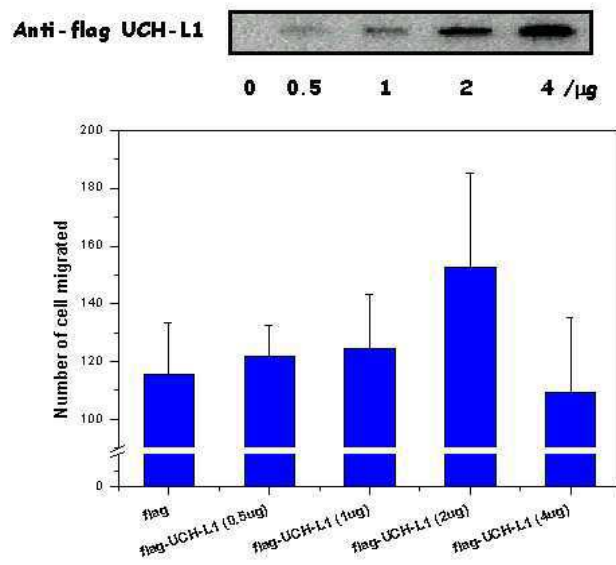
도면5



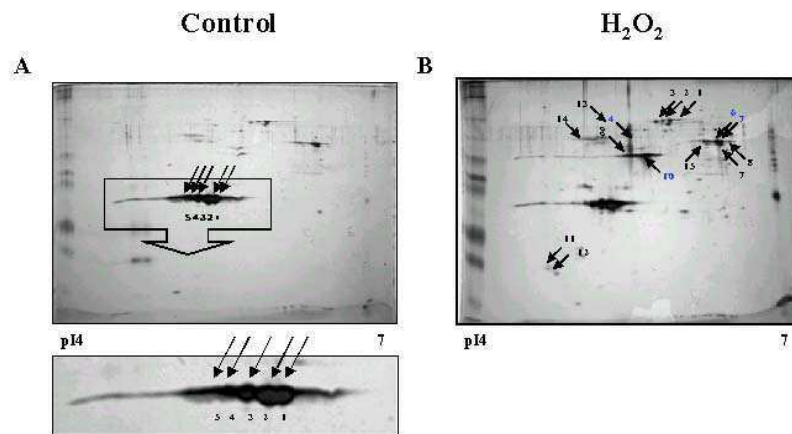
도면6



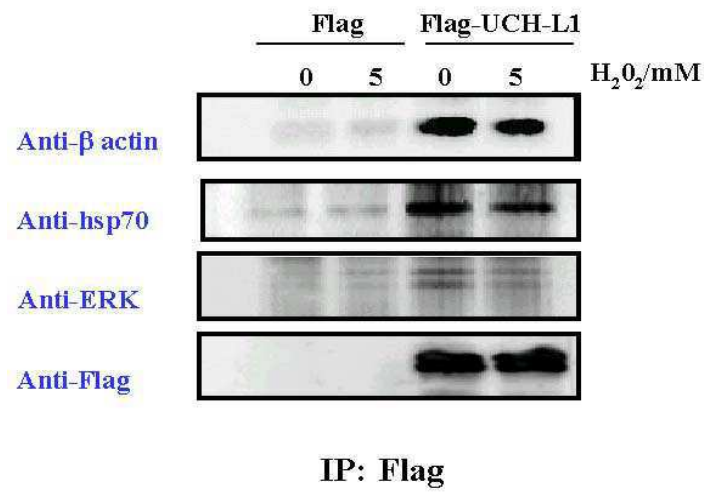
도면7



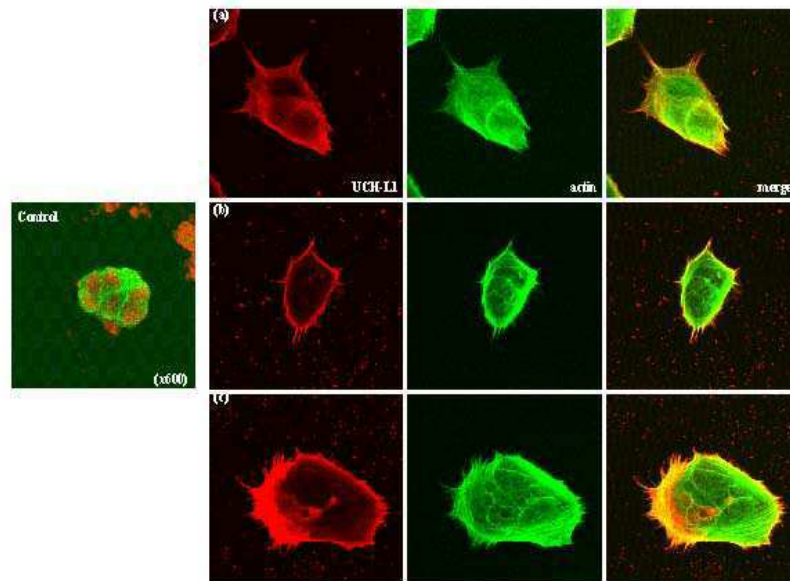
도면8



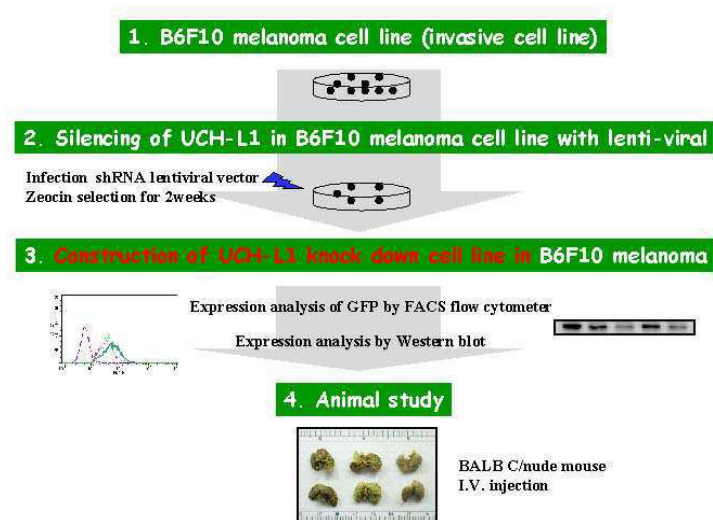
도면9



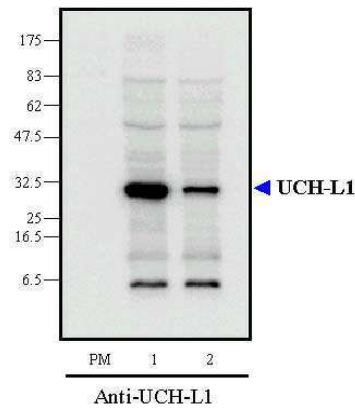
도면10



도면11



도면12

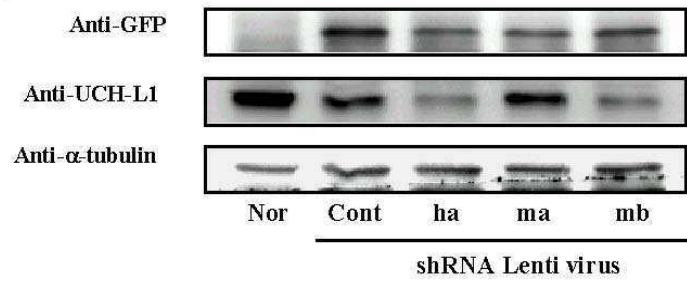


PM; prestained marker
1; H157
2; B16F10

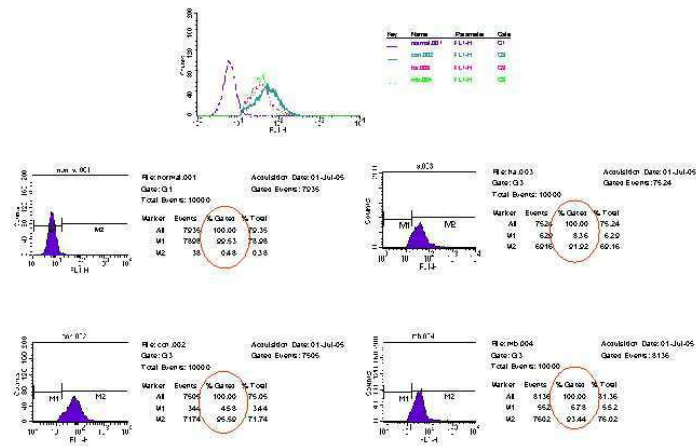
도면13



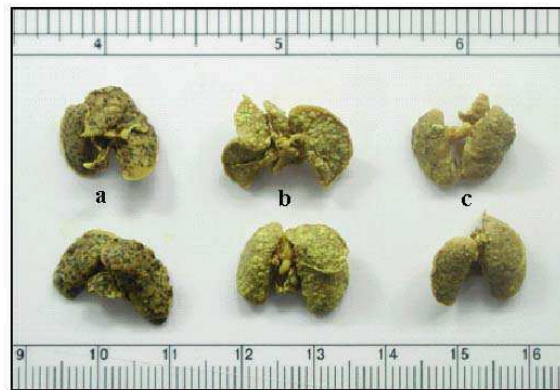
도면14



도면15

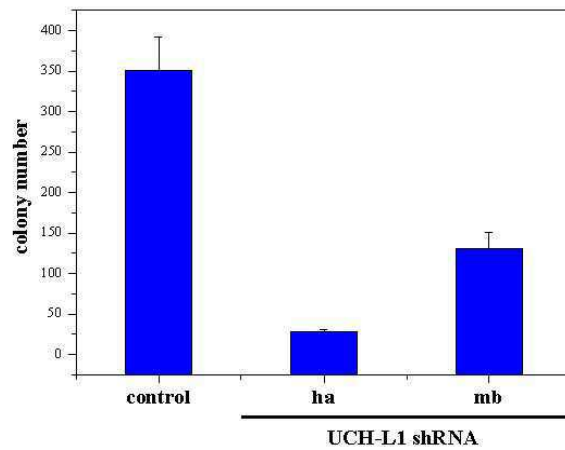


도면16

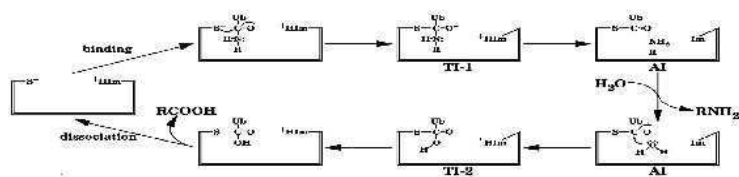


a; shLenti Cont
b; shLenti ha
c; shLenti mb

도면17



도면18

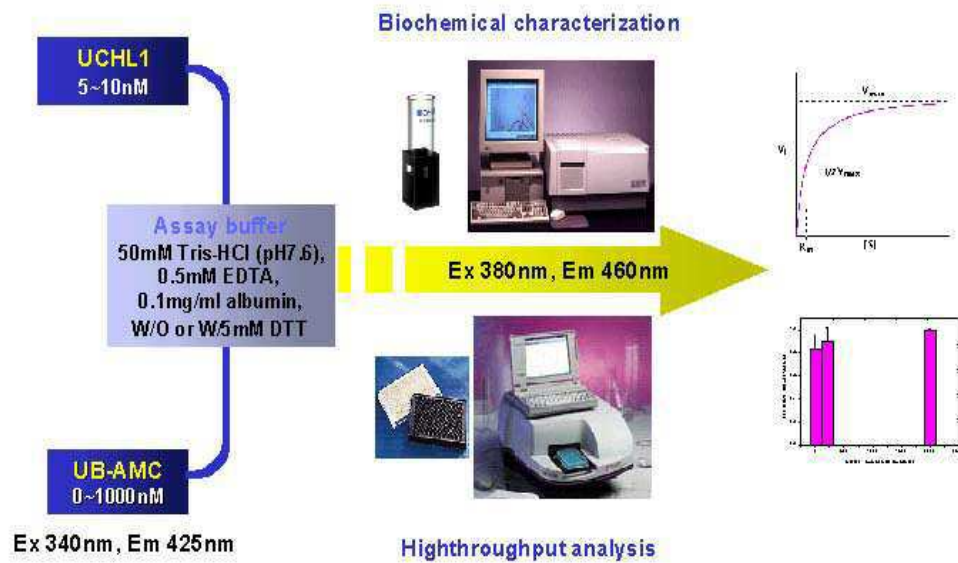


Schematic of the UCH/cysteine protease reaction cycle. TI-1 and TI-2 denote the high energy tetrahedral intermediates; AI, the acyl intermediate; S, a cysteine; and Im, a histidine.
The EMBO Journal Vol. 18, No. 14 pp3877-3887, 1999



Biochemistry Vol. 37, No. 7, 1868-1879, 1998

도면19



서열목록

- <110> EWHA University industry collaboration foundation
SK corporation
- <120> Composition for diagnosing cancer metastasis using ubiquitin
C-terminal hydrolase-L1
- <130> 05p-191
- <160> 7
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- <220>
<221> CHAIN
<222> (1) .. (223)
<223> Human Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1

<400> 1
Met Gln Leu Lys Pro Met Glu Ile Asn Pro Glu Met Leu Asn Lys Val
1 5 10 15
Leu Ser Arg Leu Gly Val Ala Gly Gln Trp Arg Phe Val Asp Val Leu
20 25 30
Gly Leu Glu Glu Glu Ser Leu Gly Ser Val Pro Ala Pro Ala Cys Ala

```

          35              40              45
Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Thr Ala Gln His Glu Asn Phe Arg Lys
  50              55              60

Lys Gln Ile Glu Glu Leu Lys Gly Gln Glu Val Ser Pro Lys Val Tyr
  65              70              75              80

Phe Met Lys Gln Thr Ile Gly Asn Ser Cys Gly Thr Ile Gly Leu Ile
          85              90              95

His Ala Val Ala Asn Asn Gln Asp Lys Leu Gly Phe Glu Asp Gly Ser
          100              105              110

Val Leu Lys Gln Phe Leu Ser Glu Thr Glu Lys Met Ser Pro Glu Asp
          115              120              125

Arg Ala Lys Cys Phe Glu Lys Asn Glu Ala Ile Gln Ala Ala His Asp
          130              135              140

Ala Val Ala Gln Glu Gly Gln Cys Arg Val Asp Asp Lys Val Asn Phe
          145              150              155              160

His Phe Ile Leu Phe Asn Asn Val Asp Gly His Leu Tyr Glu Leu Asp
          165              170              175

Gly Arg Met Pro Phe Pro Val Asn His Gly Ala Ser Ser Glu Asp Thr
          180              185              190

Leu Leu Lys Asp Ala Ala Lys Val Cys Arg Glu Phe Thr Glu Arg Glu
          195              200              205

Gln Gly Glu Val Arg Phe Ser Ala Val Ala Leu Cys Lys Ala Ala
          210              215              220

```

```

<210>      2
<211>      1110
<212>      DNA
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<221>      gene
<222>      (1)..(1110)
<223>      Human ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1

```

```

<400>      2
cctgggcggc tccgctagct gtttttcgtc ttccctaggc tatttctgcc gggcgctccg

```

60

cgaagatgca gctcaagccg atggagatca accccgagat gctgaacaaa gtgctgtccc 120
 ggctgggggt cgccggccag tggcgcttcg tggacgtgct ggggctggaa gaggagtctc 180
 tgggctcggg gccagcgcct gcctgcgcgc tgctgtgct gtttcccctc acggcccagc 240
 atgagaactt caggaaaaag cagattgaag agctgaaggg acaagaagtt agtcctaaag 300
 tgtacttcat gaagcagacc attgggaatt cctgtggcac aatcggactt attcacgcag 360
 tggccaataa tcaagacaaa ctgggatttg aggatggatc agttctgaaa cagtttcttt 420
 ctgaaacaga gaaaatgtcc cctgaagaca gagcaaaatg ctttgaaaag aatgaggcca 480
 tacaggcagc ccatgatgcc gtggcacagg aaggccaatg tcgggtagat gacaaggtga 540
 atttccattt tattctgttt aacaacgtgg atggccacct ctatgaactt gatggacgaa 600
 tgccttttcc ggtgaaccat ggcgccagtt cagaggacac cctgctgaag gacgctgcca 660
 aggtctgcag agaattcacc gagcgtgagc aaggagaagt ccgcttctct gccgtggctc 720
 tctgcaaggc agcctaatgc tctgtgggag ggactttgct gatttcccct cttcccttca 780
 acatgaaaat atataccccc ccatgcagtc taaaatgctt cagtacttgt gaaacacagc 840
 tgttcttctg ttctgcagac acgccttccc ctccagccaca cccaggcact taagcacaag 900
 cagagtgcac agctgtccac tgggccattg tgggtgtgagc ttcagatggg gaagcattct 960
 cccagtgta tgtcttgtat ccgatatcta acgctttaaa tggctacttt ggtttctgtc 1020
 tgtaagttaa gaccttggat gtgggttaat tgtttgtcct caaaaggaat aaaacttttc 1080
 tgctgataag ataaaaaaaa aaaaaaaaaa 1110

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> shLenti 1.1/scrambl: control virus shRNAi sequence

<400> 3
 aatcgcatag cgtatgccgt t 21

<210> 4
 <211> 72
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shLenti 1.1/UCHL_a

<400> 4

cggaattccc cgagatgctg aacaaagttc aagagacttt gttcagcatc tcggggtttt 60

gatatctaga ca 72

<210> 5

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shLenti 1.1/mUCHL_a

<400> 5

cggaattcag ctgaagccga tggagattat tcgtaatctc catcggcttc agcttttttg 60

atatctagac a 71

<210> 6

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shLenti 1.1/mUCHL_b

<400> 6

cggaattccc taaagtttac ttcatgaagt tcgcttcatg aagtaaactt taggtttttg 60

atatctagac a 71

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CHAIN

<222> (1) .. (11)

<223> UCH-L1 N-terminal amino acids

<400> 7

Met Gln Leu Lys Pro Met Glu Ile Asn Pro Glu
1 5 10