

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0053986 (43) 공개일자 2009년05월29일
(51) Int. Cl. <i>A61K 38/17</i> (2006.01) <i>A61K 38/16</i> (2006.01) <i>A61P 25/28</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2007-0120615 (22) 출원일자 2007년11월26일 심사청구일자 2007년11월26일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내 (72) 발명자 전태훈 서울시 송파구 방이동 89 올림픽 아파트 236동 1802호 김상훈 경상북도 경주시 동천동 347-2번지 (74) 대리인 이문섭	

전체 청구항 수 : 총 11 항

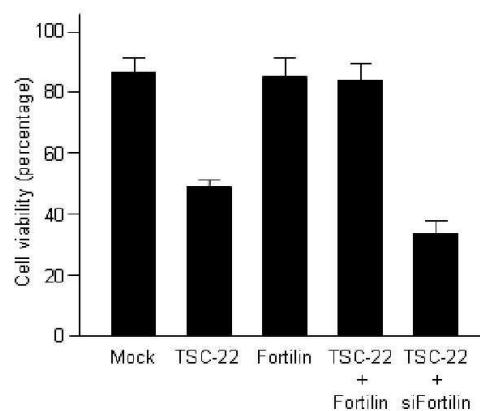
(54) 포틸린을 이용한 티에스씨-22 매개 세포사멸 억제 방법

(57) 요약

본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자 또는 그 발현 단백질을 함유하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 인간 포틸린(fortilin) 유전자의 발현 또는 그 발현 단백질의 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 세포사멸 촉진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 상기 인간 포틸린(fortilin) 유전자 또는 그 발현 단백질을 함유하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물을 이용하여 치매, 파킨슨병 등 각종 퇴행성 질환에 적용할 수 있고, 상기 인간 포틸린(fortilin) 유전자의 발현 또는 그 발현 단백질의 작용 저해제를 이용하여 백혈병, 암 및 건선 등의 질환에 적용할 수 있다.

대표도 - 도14



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0603083

부처명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술개발사업

연구과제명 이종이식장기 세포성 면역관용 유도 기술 개발

주관기관 생명자원연구소

연구기간 2007년 04월 01일 ~ 2008년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자 또는 그 발현 단백질을 함유하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 인간 포틸린 유전자는 동물세포 형질전환용 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 포틸린 단백질은 TSC-22(TGF β -stimulated protein) 단백질에 결합하여 TSC-22 단백질을 억제하는 것을 특징으로 하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자의 발현 또는 그 발현 단백질의 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 세포사멸 촉진용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 인간 포틸린(fortilin) 유전자의 발현 저해제는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 인간 포틸린(fortilin) siRNA(short interfering RNA) 또는 이를 전사하는 유전자인 것을 특징으로 하는 세포사멸 촉진용 약학적 조성물.

청구항 6

서열번호 3의 염기서열을 갖는 인간 포틸린(fortilin) 유전자에 대한 siRNA(short interfering RNA) 분자.

청구항 7

서열번호 1의 인간 포틸린(fortilin) 단백질 유전자 서열을 중합효소 연쇄반응(PCR) 시키기 위한 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트.

청구항 8

서열번호 6의 TSC-22(TGF β -stimulated protein) 단백질 유전자 서열을 중합효소 연쇄반응(PCR) 시키기 위한 서열번호 7 내지 서열번호 10의 프라이머 세트.

청구항 9

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자를 포함하는 도 10의 개열지도를 갖는 재조합 벡터 pcDNA4/HisMax-fortilin.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 세포사멸 유도제의 스크리닝 방법;

- (a) TSC-22(TGF β -stimulated protein) 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 동물세포에서 TSC-22 단백질과 포틸린 단백질의 상호작용이 감소하는지 여부를 결정하는 단계.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 세포사멸 저해제의 스크리닝 방법;

- (a) TSC-22(TGF β -stimulated protein) 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 동물세포에서 TSC-22 단백질과 포틸린 단백질의 상호작용이 증가하는지 여부를 결정하는 단계.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 포틸린을 이용한 티에스씨-22 매개 세포사멸 억제에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자 또는 그 발현 단백질을 함유하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 최근 연구에 의하면 다양한 질병의 발병 원인은 근원적으로 세포사멸 신호전달 기구의 비정상적인 기능에 기인한다(Nicholson, D.W., Nature, 407, 810-816, 2000). 세포사멸 조절요법은 세포사멸 유도 또는 세포사멸 억제를 통하여 비정상적인 세포의 성장과 사멸을 조절하는 것으로, 세포사멸 조절요법의 목적은 비정상적인 세포의 사멸에 의한 질병의 진행을 차단할 뿐만 아니라 비정상적인 세포를 정상 기능의 세포로 전환시킴으로써 근원적으로 질병을 치료하는데 있다. 따라서, 세포성장-사멸의 가역적 제어기술(cell survival-death reversible controlling technology)은 세포사멸 조절요법(apoptosis modulating therapy) 개발을 위한 차세대 핵심 기술이다.
- <3> 전세계에서 경쟁적으로 개발되고 있는 세포사멸 조절요법은 백혈병을 비롯한 암, 치매, 파킨슨병, AIDS 및 노화현상 등의 각종 노인성 및 퇴행성 질환에 적용할 수 있다. 그러나, 최근 연구 결과에서 대부분 질병의 발병이 궁극적으로 세포사멸 신호전달 기구의 비정상적 기능에 기인한다는 사실이 밝혀짐에 따라 세포사멸 조절요법은 더욱 다양한 영역의 질환 치료에 적용될 수 있는 기반 기술이 되고 있다.
- <4> 세포사멸 조절요법은 암세포와 같이 조절되지 않은 세포의 병리적 성장을 차단하거나, 치매나 파킨슨병에서와 같이 정상 세포가 과도한 세포사멸을 일으켜 퇴행성 질환이 발발하는 것을 억제함으로써 질병 치료에 이용될 수 있다. 암과 같은 질병의 경우 기존의 광범위한 세포괴사(necrosis) 약물요법은 병리 세포를 죽임과 동시에 병리 세포의 세포막이 파괴됨으로써 유출되는 세포 독성을 지닌 효소들(예, Lysozyme)이 주변의 정상 세포에까지 세포 독성을 나타내어 과도한 염증 발현을 필연적으로 수반하게 됨으로써 그 부작용이 커지게 된다. 그러나 세포사멸 조절요법은 병리 세포의 자발적인 사멸을 유도하거나 이러한 세포의 성장을 강하게 억제하기 때문에 암세포의 세포사멸에 의해 유도되는 염증성 부작용을 극복할 수 있다. 그 이유는 세포의 성장이 강력히 억제될 때는 세포 분열능이 정상세포보다 월등한 암세포가 상대적으로 더욱 큰 억제 효과를 보이며, 이러한 효과가 극대화되어 세포사멸이 유도되면 세포 독성을 지닌 세포내의 여러 물질들이 세포사멸 과정동안 카스파제(caspase)라는 효소들에 의해 대부분 절단되어 그 기능을 상실함과 동시에 이러한 물질이 아포토틱 바디(apoptotic body)에 싸여 매크로파지(macrophage)에 의해 파고사이토시스(phagocytosis)의 과정을 거치게 된다. 따라서, 세포 독성 물질들이 외부로 유출되지 않게 함으로써 주변 세포에 대한 독성을 나타내지 않도록 하는 것이다. 세포사멸(Programmed Cell Death, Apoptosis)은 능동적인 세포사멸 과정으로 에너지를 필요로 하며, 특징적인 세포 형태를 보인다. 세포사멸 신호가 전달되면 세포내에서는 세포사멸을 결정하고, 이를 실행되는 단계로 진행되며 실행 단계에서는 세포가 특징적인 생화학적, 형태학적 변화를 보인다. 세포사멸이 진행되면 세포가 수축(shrinkage)되면서 접하고 있던 주변 세포와 떨어지게 되고 세포막이 기포 모양(블레빙; blebbing)으로 변하게 되며, 더 나아가 핵이 응축(condensation)되고 핵 내의 DNA가 작은 올리고뉴클레오타이드 절편으로 잘려지며 아포토틱 바디를 형성한다. 이렇게 형성된 아포토틱 바디가 매크로파지에 의해 파고사이토시스되는 일련의 과정을 거쳐 세포사멸이 일어난다. 세포사멸은 복잡한 세포 내의 과정으로 세포사멸에 대한 세포 내에서의 결정은 쉽게 이루어지지 않지만, 일단 결정되면 세포사멸이 제대로 작동하기 위해 여러 하위 단계의 과정들이 진행되게 된다. 대부분의 형태학적 변화는 세포사멸 과정에서 활성화 효소인 아스파라긴산 특이적 시스테인 프로테아제(aspartic acid specific cysteine protease; caspase)들에 의해 이루어진다(Hengartner, M. O., Nature, 407, 770-776). 지금까지 알려져 있는 모든 카스파제는 특정 절단 부위, 즉 기질의 아스파라긴산(Aspartate)-X 결합 부위를 절단하는 것으로 알려져 있다(Thornberry, N. A., et al., J. Biol. Chem., 272, 17907-17911, 1997). 카스파제 3의 기질로서 폴리 ADP-리보스 폴리머라제(PARP)(Nicholson, D.W., et al. Nature 376, 37-43, 1995), 복제인자 C(replication factor C)의 큰 서브유닛(large subunit)(Rheume, E., et al., EMBO J., 16, 6346-6354, 1997), 진행 세포의 시작인자 2(initiation factor 2)(Marissen, W.E., et al., J. Biol. Chem., 275, 9314-9326, 2000), p21waf1(Park, J.A., et al., Eur. J. Biochem., 257, 242-248, 1998)과 Rb 단백질(Tan, X.Q.,

et al., J. Biol. Chem., 272, 9613-16, 1997) 등이 알려져 있는데, 이들 단백질들은 대부분 세포분열 및 세포주기와 관련된 단백질들이다. 따라서, 세포주기를 조절하는 단백질들은 세포사멸 과정에서 카스파제 효소의 중요한 타겟 분자인 것으로 보인다.

<5> TSC-22는 마우스의 조골세포종 세포에서 TGF- β 의 처리에 의해서 유도되는 하나의 유전자로 처음 확인되었다(Shibanuma M et al., 1992). TSC-22는 진화과정동안 초파리에서 포유류까지 잘 보존되어 있다(Kania A et al., 1995; Jay P et al., 1996). TSC-22의 구조는 TSC-22가 전사인자로 역할하는 것을 암시하는 류신지퍼유사모티프(leucine zipper like motif)를 포함하지만, N-말단지역에 보존된 DNA 결합 모티프가 결여되어 있다(Shibanuma M et al., 1992). 최근, 초파리의 발달조절(Kania A et al., 1995)과 몇몇 암세포에서 세포사멸의 전구인자로서의 역할(Nakashiro K et al., 1998; Ohta S et al., 1997; Uchida D et al., 2000)을 포함하여, TSC-22의 몇 가지 역할들이 제안되었다.

<6> TSC-22는 안정된 상태에서 세포질에 존재하고 핵으로 위치를 이동하여 자극신호를 TSC-22로 변환한다(Hino S et al., 2000). 핵으로의 위치이동 후, TSC-22는 동형이합체나, 또는 TSC-22 상동유전자-1(THG-1)와 이형이합체를 형성할 수도 있고, 몇몇 유전자들의 전사억제자로 작용할 수도 있다(Kester HA et al., 1999). 이 결과는 TSC-22가 caspase-3 의존경로를 통한 세포사멸을 매개한다는 것을 암시한다(S. Ohta, K. Yanagihara, K. Nagata, Mechanism of apoptotic cell death of human gastric carcinoma cells mediated by transforming growth factor beta. Biochem. J. 324 (1997) 777-782).

<7> 포틸린은 고도로 보존된 친수성의 핵단백질이고 다양한 세포의 세포질, 뭉소포체(multivesicular body), 세포외공간(extracellular space)에서 발견된다. 포틸린은 세포 내에서 또는 세포와 외부 환경 간에 Ca^{++} 이온의 대사, 이동, 수준의 조절에 관여하는 단백질이며, Ca^{++} 이온 저장 능력이 있는 Ca^{++} binding protein 이다. 그런데 포틸린 단백질과 TSC-22 단백질과의 상호작용에 의한 caspase-3 의존경로를 통한 TSC-22 매개 세포사멸에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다.

<8> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 세포사멸(apoptosis)에 관련된 인자인 티에스씨-22에 포틸린이 작용하는 경우, 세포사멸을 억제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<9> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 포틸린이 TSC-22와 결합하면 TSC-22를 불안정화하여 TSC-22 매개 세포사멸을 억제하는 것을 이용하여, 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자 또는 그 발현 단백질을 함유하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다. 또한 본 발명은 상기 인간 포틸린(fortilin) 유전자의 발현 또는 그 발현 단백질의 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 세포사멸 촉진용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

<10> 다양한 질병의 발병 원인은 근원적으로 세포사멸 신호전달 기구의 비정상적인 작동에 기원함을 고려할 때, 본 발명의 다른 목적은 치매 및 파킨슨병으로 구성된 퇴행성 질환, 또는 유방암, 직장암, 갑상선암을 포함한 각종 암 및 류마티스성 관절염의 예방 또는 치료에 이용될 수 있는 세포사멸 저해제 또는 세포사멸 유도제를 제공하는데 있다.

<11> 이와 더불어 본 발명의 다른 목적은 세포사멸에 관여하는 TSC-22 및 인간 포틸린(fortilin) 단백질의 상호작용을 이용하여 세포사멸 유도제 또는 저해제의 약물 스크리닝 시스템(drug screening system)을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<12> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자 또는 그 발현 단백질을 함유하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물은 과도한 세포사멸에 의해 유발되는 질환 치료용도로 사용될 수 있다.

<13> 본 발명의 세포사멸 억제용 약학적 조성물에서, 상기 인간 포틸린 유전자는 어떠한 발현벡터에 삽입될 수 있으나, 동물세포 형질전환용 발현벡터에 삽입된 것이 바람직하며, 구체적으로 도 10의 개열지도를 갖는

pcDNA4/HisMax-fortilin 벡터를 들 수 있다.

- <14> 본 발명의 세포사멸 억제용 약학적 조성물에서, 상기 포틸린 단백질은 TSC-22(TGF β -stimulated protein) 단백질에 결합하여 TSC-22 단백질을 억제하는 것을 특징으로 하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물인 것이 바람직하다.
- <15> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자의 발현 또는 그 발현 단백질의 작용 저해제를 유효성분으로 함유하는 세포사멸 촉진용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물은 과도한 세포사멸에 의해 유발되는 질환 치료용 세포사멸 유도제를 제공한다. 여기서 포틸린 유전자의 전사 또는 번역을 하향조절한다는 것은 포틸린 유전자의 프로모터에 결합하여 전사를 하향조절하거나, 전사후 mRNA를 분해하거나, 번역을 저해하는 등의 모든 하향 조절을 포함하나, 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 인간 포틸린(fortilin) siRNA(short interfering RNA) 또는 이를 전사하는 유전자에 의한 하향 조절인 것이 좋다. 상기 siRNA는 벡터에 삽입되어 트랜스팩션 되는 것이 좋다. 또한 포틸린 단백질의 작용을 억제한다는 것은 상기 단백질의 활성을 억제하거나, 상기 단백질의 리간드 결합부위에 경쟁적으로 결합하여 TSC-22의 작용을 방해하는 것 등을 포함한다.
- <16> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 갖는 인간 포틸린(fortilin) 유전자에 대한 siRNA(short interfering RNA) 분자를 제공한다.
- <17> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 인간 포틸린(fortilin) 단백질 유전자 서열을 증합효소 연쇄반응(PCR) 시키기 위한 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트를 제공하며, 서열번호 6의 TSC-22(TGF β -stimulated protein) 단백질 유전자 서열을 증합효소 연쇄반응(PCR) 시키기 위한 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 및 서열번호 10의 프라이머 세트를 제공한다. TSC-22 단백질 유전자 서열의 경우 CDS의 크기가 크기 때문에 한 번에 클로닝하기가 어려워 TSC-22의 중간에 위치한 AccI 제한효소자리를 포함한 앞쪽을 서열번호 7 및 8의 프라이머로, 뒤쪽을 서열번호 10의 프라이머로 나누어서 클로닝한 후, T-easy 벡터에서 조립을 하였다.
- <18> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자를 포함하는 도 10의 개열지도를 갖는 재조합 벡터 pcDNA4/HisMax-fortilin를 제공한다. 상기 벡터는 인간 포틸린 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 삽입 도입될 수 있는 어떤 플라스미드, 바이러스, 또는 기타 매개체도 될 수 있으나, 바람직하게는 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 벡터가 좋다. 본 발명의 구체적인 실시예 1 라에서는, 발현벡터 pcDNA4/HisMax에 포틸린(fortilin) 유전자를 삽입하여 인간 포틸린 단백질을 위한 재조합 벡터 pcDNA4/HisMax-fortilin을 제작하였다.
- <19> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포사멸 유도제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) TSC-22(TGF β -stimulated protein) 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및 (b) 상기 동물세포에서 TSC-22 단백질과 포틸린 단백질의 상호작용이 감소하는지 여부를 결정하는 단계. 상기 (a) 단계에서, 상기 동물세포는 의도적으로 TSC-22 단백질을 과발현하는 플라스미드(실시예 1 참조)로 트랜스팩션시킬 수도 있다. 상기 (b) 단계에서, 상호작용이 감소하는지 여부는 상호작용 감소 여부는 실시예1의 yeast two hybrid system, β -galactosidase의 상대적인 발현비교, In vitro pull-down assay, 또는 공동면역침전법, cell viability assay, apoptosis assay, In vitro caspase-3 activity assay, TSC-22 단백질의 안정성 결정 등을 통해 m-RNA 및 단백질 레벨에서 측정할 수 있다.
- <20> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포사멸 저해제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) TSC-22(TGF β -stimulated protein) 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및 (b) 상기 동물세포에서 TSC-22 단백질과 포틸린 단백질의 상호작용이 증가하는지 여부를 결정하는 단계. 상기 (a) 단계에서, 상기 동물세포는 의도적으로 TSC-22 단백질을 과발현하는 플라스미드(실시예 1 참조)로 트랜스팩션시킬 수도 있다. 상기 (b) 단계에서, 상호작용이 증가하는지 여부는 실시예1의 yeast two hybrid system, β -galactosidase의 상대적인 발현비교, In vitro pull-down assay, 또는 공동면역침전법, cell viability assay, apoptosis assay, In vitro caspase-3 activity assay, TSC-22 단백질의 안정성 결정 등을 통해 m-RNA 및 단백질 레벨에서 측정할 수 있다.
- <21> 이하, 본 발명의 포틸린을 이용한 티에스씨-22 매개 세포사멸 억제 방법을 단계별로 보다 구체적으로 설명한다.
- <22> 본 발명에서는 다음과 같이 포틸린이 TSC-22와 결합하며, 이 두 단백질간의 상호작용에 의해서 TSC-22를 불안정하게 하여 TSC-22 매개의 세포사멸을 억제한다는 것을 밝혔다. 우선 yeast two hybrid system, β -galactosidase의 상대적인 발현수준 비교, In vitro pull-down assay, 그리고 공동면역침전법을 통하여 TSC-22

결합단백질로서의 포틸린을 확인하였다. 다음으로 cell viability assay, apoptosis assay, In vitro caspase-3 activity assay, 및 TSC-22 단백질의 안정성 결정을 통하여 포틸린이 TSC-22을 불안정화하여 TSC-22 매개의 세포사멸을 방지함을 확인하였다.

- <23> 본 발명에서, 과도한 세포성장예에 의해 유발되는 질환은 백혈병, 암 및 건선으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 과도한 세포사멸예에 의해 유발되는 질환은 치매 및 파킨슨병으로 구성된 퇴행성 질환으로부터 선택될 수 있으나 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다.
- <24> 본 발명의 세포사멸 저해제는 caspase-3 의존경로를 통한 세포사멸을 매개하는 TSC-22를 강력히 억제하여 세포 성장을 억제한다. 또한 세포사멸을 조절할 수 있는 기능을 가지고 있기 때문에 치매(Leclerc S., Journal of Biological Chemistry, 276, 251-60, 2001) 또는 파킨슨병과 같이 정상세포의 과도한 세포사멸로 인해 유발되는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- <25> 본 발명의 세포사멸 유도제는 유방암(Parton, M., et al., British Medical Journal, 322, 1528-1532, 2001), 직장암(Rampino, N., et al., Science, 275, 967-969, 1997), 갑상선암(Lin, J.D., British Medical Journal, 322, 1525-1527, 2001)을 포함한 각종 암 및 류마티스성 관절염(Perlman, H., et al., Curr. Mol. Med., 5, 597-608, 2001)의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- <26> 본 발명의 상기 세포사멸 저해제 또는 유도제는 통상적으로 사용되는 부형제, 봉해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 의해 정제, 캡슐제, 산제, 과립제, 현탁제, 유제, 시럽제, 기타 액제로 제형화될 수 있다.
- <27> 구체적으로 본 발명의 세포사멸 저해제 또는 유도제는 경구 투여용 제형, 예를 들면 정제, 트로치제 (troches), 로젠지 (lozenge), 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 (elixirs)로 제제화된다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 봉해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유된다. 캡슐제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유한다. 또한, 본 발명의 세포사멸 저해제 또는 유도제는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 세포사멸 유도 단백질을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화를 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 하나의 예시로서, 약 0.01ug 내지 약 100ug/kg의 범위일 수 있다.
- <28> 본 발명의 발현벡터는 인간 포틸린 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)" 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. 상기 "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기 플라스미드의 예로는 대장균 유래 플라스미드 (pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119, pET-22b(+)), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스미드 (YEpl3, YEpl24 및 YCp50) 등이 있으며 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배콜로바이러스와 같은 곤충 바이러스가 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 숙주세포에 도입시키는데 적합한 벡터를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 벡터를 사용할 수 있다.
- <29> 본 발명에서 상기 siRNA는 센스 RNA 가닥과 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 이들 두 가닥은 표준 왓슨-크릭 염기쌍 상호작용에 의해서 서로 결합(annealing)한다(이하 "염기쌍을 형성한(base-paired)"으로 표현함). 상기 센스가닥은 표적 mRNA 내의 표적서열에 동일한 핵산서열을 포함한다. siRNA의 표적서열을 선택할 수 있는

기술은 예를 들면 문헌 (Tuschl T 등, "The siRNA User Guide" revised Oct. 11, 2002)에 기술되어 있다. 본 발명의 siRNA를 제조하는데 사용된 포틸린(fortilin) 유전자 mRNA 표적 서열은 5 '-AAGGTACCGAAAGCACAGT-3' 이다.

<30> 본 발명의 siRNA의 센스 및 안티센스 가닥은 두개의 상보적이고 단일쇄(single-stranded)의 RNA 분자를 포함하거나, 두 개의 상보적 부분이 염기쌍을 형성하고 단일쇄의 "머리핀(hairpin)" 영역에 의해서 공유결합된 단일 분자를 포함할 수 있다. 상기 후자의 경우를 shRNA(short hairpin RNA)라고 부르며, 상기shRNA는 single strand로 약 50-70 nucleotide 길이이며, in vivo상에서 stem-loop 구조를 이루고 있다. 5-10 nucleotide의 loop 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29 nucleotide의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 stem을 형성한다. shRNA는 일반적으로 in vivo상에서 Pol III promoter로부터 상보적인 DNA sequence의 전사에 의해 합성된다. Pol-III로 유도된 전사는 well-defined start site에서 시작되어 4개 이상의 thymidine으로 이루고 있는 선상(-TTTT-)의 second residue에서 종결되어 non-poly(A) transcript 생성한다. Pol III promoter는 모든 세포에서 활성화되며 shRNA의 발현이 가능하다. 전사 후 shRNA는 Dicer에 의해 loop가 절단되고 siRNA처럼 RISC와 작용하게 된다 (참조, Tuschl, T. (2002), Cell 110(5): 563 - 74).

<31> 본 발명의 siRNA는 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 알려진 많은 기술을 이용하여 획득될 수 있다. 예를 들면, siRNA는 본 발명이 속하는 분야에서 알려진 방법을 이용하여 화학적으로 합성되거나 재조합 방법에 의해서 생산될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 siRNA는 적절히 보호된 리보뉴클레오시드 포스포라미디트(ribonucleoside phosphoramidites)와 종래의 DNA/RNA 합성기를 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 본 발명의 실시예 2의 가에서 siRNA construction kit (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하여 siRNA를 합성하였다. siRNA는 상보적이고 분리된 두개의 RNA 분자 또는 두개의 상보적인 영역을 가지는 하나의 RNA 분자로서 합성될 수 있다. 다른 방법으로서, siRNA는 또한 적절한 프로모터를 이용하여 재조합 DNA 플라스미드로부터 발현될 수 있다. 플라스미드로부터 본 발명의 siRNA를 발현시키는 데 적절한 프로모터는 예를 들면 U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터 서열 및 거대세포바이러스 프로모터를 포함한다. 또한, 본 발명의 재조합 플라스미드는 특정 조직 또는 특정 세포내 환경에서 siRNA를 발현시키기 위해서 유도성 또는 조절가능한 프로모터를 포함할 수 있다.

<32> 본 발명의 siRNA는 재조합 플라스미드로부터 상보적이고 분리된 두 개의 RNA 분자 또는 두개의 상보적인 영역을 가지는 하나의 RNA 분자로서 발현될 수 있다. 본 발명의 siRNA를 발현시키는 데 적절한 플라스미드의 선택, siRNA를 발현시키기 위한 핵산서열을 플라스미드 내로 삽입하는 방법, 및 재조합 플라스미드를 목적하는 세포로 전달하는 방법은 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에 있다([Tuschl, T. (2002), Nat. Biotechnol. 20: 446-448]; [Brummelkamp TR 등 (2002), Science 296: 550- 553]; [Miyagishi M 등 (2002), Nat. Biotechnol. 20: 497-500]; [Paddison PJ 등 (2002), Genes Dev. 16: 948-958; Lee NS 등 (2002), Nat. Biotechnol. 20: 500-505]; 및 [Paul CP 등 (2002), Nat. Biotechnol. 20: 505-508]).

<33> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<34> 실시예 1. yeast two hybrid system을 통한 TSC-22 결합단백질로서의 포틸린의 발견 및 β -galactosidase의 발현비교, in vitro pull-down assay, 공동면역침전법을 통한 TSC-22와 포틸린 간의 상호작용 확인

<35> 가. yeast two hybride system

<36> 난소에서 mRNA를 분리하여 랜덤헥사머를 이용해 RT-PCR을 실시하였다. 인간 TSC-22의 미끼설계를 위해서 난소의 cDNA library에 포함된 인간의 TSC-22의 전체길이의 cDNA를 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과 TSC-22의 앞쪽부분을 포함하는 DNA 단편을 생산하였고, 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과 TSC-22의 뒷쪽부분을 포함하는 DNA 단편을 생산하였다. 상기 생산된 두개의 DNA 단편 모두 TSC-22에 존재하는 Acc I 제한효소자리를 공통으로 포함하고 있다. 그 후 증폭된 TSC-22 cDNA를 pGEM[®] T Easy Vector(회사 : Promega, USA)의 EcoR1 제한효소 부위에 T4 리가아제를 사용하여 도입하였다(도 1). 그 후 pGEM[®] T Easy vector에서 기인한 EcoR I과 Apa I 제한효소자리를 잘라서, pBluescript II KS vector의 EcoR I과 Apa I 제한효소자리에 삽입하여 TSC-22 cDNA를 pBluescript II KS 벡터에 도입하였다(도 2). 상기 pBluescript II KS(+)-TSC-22를 EcoRI와 XhoI 제한효소로 처리하여 pGilda 클로닝

벡터의 EcoRI와 XhoI 제한효소 부위로 클로닝하였다(도 3). 이렇게 생산한 재조합 벡터 pGilda-TSC-22를 효모의 종인 EGY48[MATa, his3, trp1, ura3-52, leu2; pLeu2-LexAop6/pSH18-34 (LexAop-lacZ reporter)]로 조절된 리튬 아세트산 방법으로 도입하였다(Ito H et al., 1983).

<37> 난소의 cDNA library를 B42 퓨전단백질(Clontech, Palo Alto, CA, USA)을 만들기 위해 pJG4-5(Clontech, Palo Alto, CA, USA)의 EcoRI과 XhoI 제한효소자리에 클로닝하여 설계하였다(도 4). B42 퓨전단백질을 암호화하는 cDNA를 이미 pGilda-TSC-22을 가지고 있는 competent 효모 세포로 도입하였고, 형질전환된 것을 2% (w/v)의 글루코오스를 포함한 합성배지(Ura, His, Trp)에서 트립토판 tryptophan prototrophy (plasmid marker)로 선택하였다. 그 결과 약 3×10^6 의 독립적인 형질전환물들이 집단을 이뤘고, cDNA의 발현을 유도하기 위해 다시 2% (w/v)의 갈락토오스를 포함하는 선택배지(Ura-, His-, Trp-, Leu-)에 도말하였다. 본 발명의 yeast two hybryde system에서, B42 꼬리표가 붙은 단백질이 TSC-22와 상호작용하면, LEU2 유전자의 전사가 활성화되어 호스트 세포가 류신이 결핍된 합성배지에서 자랄 수 있다. 선택배지에서 얻은 일곱 개의 콜로니 중에서, 다섯 개의 콜로니가 갈락토오스 의존성을 보였다. 선택된 효모세포에서 얻은 플라스미드를 pJG4-5-cDNA 삽입물을 운반하는 플라스미드를 분리하기 위해 E. coli KC8로 도입하였다. 플라스미드를 E. coli 숙주 안의 플라스미드 마커 트립토판에 의해서 분리하였고, 정제된 플라스미드를 염기서열분석했다. GenBank에서의 BLAST 프로그램을 이용한 상동성 조사 결과, 다섯 개 중 다섯 개의 플라스미드가 인간의 포틸린 (GenBank accession number: NM_003295)을 암호화한다는 것을 밝혔다. 포틸린을 암호화하는 플라스미드 전부가 인간 포틸린의 N-말단의 291 아미노산과 100% 동일한 cDNA를 포함했다(Met¹-Val⁷³, 도 5).

<38> 나. β -galactosidase의 상대적인 발현 비교

<39> TSC-22와 포틸린 간의 상호작용의 활성을 β -galactosidase의 상대적인 발현수준을 측정하여 확인하였다. β -galactosidase 방법을 기존의 방법(Guarente L et al., 1983)에 조금의 수정을 하여 결정하였다. 간단히 말하자면, 각각의 설계를 포함하는 효모세포들(EGY48 종)을 그들이 중간 성장 상태(mid-growth phase)에 이를 때까지 2% (w/v) 글루코오스를 포함하는 효모 합성배지 (Ura, His, Trp)에 배양하였다. 다음에, 세포들을 2%(w/v) 갈락토오스와 0.2% dimethyl sulfoxide (Me2SO) 를 포함한 효모배지 (Ura, His, Trp)로 옮겼다. pGilda-fortilin 및 pGilda-TSC-22재조합 벡터를 리튬 아세트산 방법으로 형질도입 후, 같은 수의 세포들을 0.7 ml의 50 ml의 0.1% SDS와 50 ml의 클로로포름을 포함하는 Z 버퍼 (60 mM (60 mM Na2HPO4, 40 mM NaH2PO4, 10mM KCl, 1 mM MgSO4, and 50 mM b-mercaptoethanol, pH 7.0)에서 30° C에서 30초간 용해하였다. 다음, β -galactosidase 활성을 140 ml의 4 mg/ml o-nitrophenyl b-D-galactopyranoside (ONPG)를 첨가하여 측정하였다. 반응을 노랗게 될 때까지 30° C에서 실행하였고, 0.4 ml의 1 M Na2CO3 를 첨가함으로써 종료하였다. 샘플을 세포 찌꺼기를 제거하기 위해 짧게 원심분리하고, 흡광도는 420 및 550nm에서 측정하였다. β -galactosidase 활성은 하기 식 1을 사용하여 측정하였다.

<40> [식 1]

<41> formula units = $[1000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{550})]/(\text{time} \times \text{volume} \times A_{600})$

<42> 그 결과 TSC-22와 포틸린 간의 β -galactosidase 활성이 있음을 충분히 관찰하였고, TSC-22와 빈 벡터(삽입물 없는 벡터) 사이에서 아주 적은 β -galactosidase 활성이 있음을 관찰하였다(도 6).

<43> 다. In vitro pull-down assay

<44> 인간TSC-22를 암호화하는 cDNA를 글루타티온 S-트랜스퍼라아제 (GST) 퓨전단백질(GST-TSC-22)를 만들기 위해서 pGEX4T-1 (GE healthcare, Piscataway, NJ, USA)의 EcoRI과 XhoI 제한효소자리에 재구축하여 pGEX4T-1-TSC-22 벡터를 생산하였다(도 7). 인간 포틸린 cDNA을 히스티딘 퓨전단백질(His-fortilin)을 만들기 위해 EcoRI과 XhoI 제한효소자리를 사용하여 pET28a(Novagen, Madison, WI, USA)에 접합하여 pET28a-fortilin를 생산하였다(도 8). GST와 히스티딘 퓨전단백질을 각각 GST column(GE healthcare)과 Ni²⁺ column(Novagen)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 정제하였다. 정제된 GST-TSC-22(2 mg)를 His-fortilin(2 mg)과 혼합하였다. 혼합물에 20 ml의 GST column matrix(glutathione sepharose 4B, GE healthcare)를 첨가하여 25° C 에서 30분간 배양하였다. 현탁액을 원심분리에 의해 펠렛화하고 세척하였다. 젤 매트릭스의 펠렛은 20 ml의 elution buffer(10 mM glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 잘 용해되었고, 결합한 GST 퓨전단백질을 추출하기 위해 25° C 에서 20 분간 배양하였다. 추출된 단백질을 젤 전기영동법에 의해 분리하였고, 단백질을 쿠마시 염색에 의해 탐지하였다. 약 25 kDa의 히스티딘-포틸린 퓨전단백질이 GST-TSC-22 퓨전단백질과 함께 정제되었다(도

9의 4열). GST column matrix에 아무것도 넣지 않았을 때에는 단백질 밴드가 탐지되지 않았다(도 9의 1열). GST-TSC-22 퓨전단백질을 GST column matrix에 첨가하였을 때 GST-TSC-22 퓨전단백질과 같은 약 45kDa의 단일 밴드를 발견하였다(도 9의 2열). 그러나 히스티딘-포틸린 퓨전단백질을 GST column matrix에 첨가하였을 때 밴드가 발견되지 않았다(도 9의 3열).

<45> 라. 공동면역침전법(immunoprecipitation)

<46> 인간 TSC-22를 암호화하는 cDNA를 BglIII 와 EcoRI 으로 절단한 pEGFPC1 (Clontech)에 클로닝하여 재조합 벡터 pEGFPC1-TSC-22를 생산하였다(도 10). 인간의 포틸린 cDNA를 EcoRI 과 XhoI 제한효소 자리를 이용하여 pcDNA4/HisMax (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에 도입하고, pcDNA4/HisMax-fortilin 재조합 벡터를 생산하였다(도 11). 공동면역침전법을 수행하기 위해서, SKOV-3 난소악성종양세포에 FuGENE6(Roche Applied Science, Basel, Switzerland)를 사용하여 pEGFPC1-TSC-22와 pcDNA4/HisMax-fortilin의 재조합 벡터로 함께 트랜스펙션 하였다. 트랜스펙션한지 사흘 후, 세포에 트립신을 처리한 후, 원심분리 하였다. 세포 펠렛을 PBS 버퍼로 씻고, 세포용해용액(50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml leupeptin ml, 1 mg/ml pepstatin ml, 2 mg/ml aprotinin, 200 mg/ml PMSF)으로 용해하였다. 생성된 용해물을 항-GFP 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 배양하였고, protein A-agarose(GE healthcare)로 침전하였다. 침전된 단백질을 SCS 젤 전기영동에 의해 분석하였고, 임포빌론 P 멤브레인 (Millipore corporation, Billerica, MA, USA)에 옮겨, 항-히스티딘 항체 (Santa Cruz)나 염소의 항-TSC-22 항체 (Santa Cruz)로 ECL 시스템 (GE healthcare)을 사용하여 이뮤노블랏팅을 수행하였다. pcDNA4/HisMax (빈 벡터)와 pEGFPC1-TSC-22 간에는 상호작용이 관찰되지 않았지만(도 12의 1열 위쪽), pcDNA4/HisMax-fortilin은 pEGFPC1-TSC-22 (도 12의 2열 위)와 공동침전되었다. 항-TSC-22 항체를 이용한 이뮤노블랏팅은 두 샘플에서 동량의 TSC-22가 침전했음을 확인했다 (도 12 중간). 항-β-액틴 항체를 사용하여 이뮤노블랏팅을 했을 때, 두 샘플로부터의 세포 전체의 용해물은 동량의 단백질을 포함하였다(도 12 아래). 이러한 결과는 TSC-22와 포틸린은 생리학적 단계에서 서로 상호작용함을 명백하게 증명한다.

<47> 실시예 2. 포틸린에 의한 TSC-22의 불안정화에 의한 TSC-22 매개의 세포사멸 방지

<48> 가. Cell viability assay (TSC-22 트랜스펙션)

<49> SKOV-3 난소악성종양세포를 six-well plate에 배양하였다. mock (삽입물을 포함하지 않고 벡터만 발현), pEGFPC1-TSC-22, pcDNA4/HisMax-fortilin, pEGFPC1-TSC-22 및 pcDNA4/HisMax-fortilin, 또는 TSC-22 및 포틸린 siRNA를 각각 invitrogen사의 oligofectamine을 사용하여 트랜스펙션하였다. 상기 siRNA는 siRNA construction kit (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하여 제작되었다. 트랜스펙션한지 사흘 후, 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 트리판블루로 염색하였고, 염색된 세포를 광학현미경 하에서 관찰하였다. SKOV-3 세포의 Cell viability는 트랜스펙션 된 TSC-22 cDNA의 농도에 의존적인 양상으로 점차적으로 감소하였고, 1 mg의 TSC-22 cDNA가 트랜스펙션 되었을 때에는 거의 50%의 세포가 사멸하였다(도 13). 따라서, 1 mg의 TSC-22 cDNA를 이후 발명의 실시예에 선택적으로 사용하였다.

<50> 나. Cell viability assay(포틸린 또는 si포틸린, 및 TSC-22의 트랜스펙션)

<51> TSC-22와 포틸린의 발현에 의한 추가적인 영향이나, 세포사멸에 있어서 서로 작용하는지를 조사하였다. FuGENE6(Roche Applied Science, Basel, Switzerland) 키트를 사용하여 mock (삽입물을 포함하지 않고 벡터만 발현), pEGFPC1-TSC-22, pcDNA4/HisMax-fortilin, 또는 pEGFPC1-TSC-22 및 pcDNA4/HisMax-fortilin으로 각각 형질전환한 SKOV-3 세포를 가지고 Cell viability를 측정했다. 기대한 바와 같이, 거의 50%의 세포가 TSC-22 cDNA로 트랜스펙션 한 경우 사멸하였고, 이는 mock 트랜스펙션과 비교되었다. 이에 반해, 포틸린 cDNA 단독으로 트랜스펙션 했을 때에는 Cell viability에 변화가 없었다. 흥미롭게도, 대부분의 Cell viability는 TSC-22와 포틸린 cDNA를 동시에 트랜스펙션 했을 때에 회복되었다. 상기 결과는 포틸린이 TSC-22 매개의 SKOV-3 세포의 세포사멸에 대항한다는 것을 나타내었다. 이 결과를 검증하기 위해, TSC-22 cDNA를 트랜스펙션 했을 때, 포틸린의 발현을 억제하였다. TSC-22와 si포틸린 (siRNA of fortilin)을 트랜스펙션 한 것은 Cell viability가 TSC-22와 포틸린을 함께 트랜스펙션 한 것에 비해 현저히 감소하였다(도 14).

<52> 다. Apoptosis assay - DAPI 염색법

<53> SKOV-3 난소암세포를 6-웰버 슬라이드에 배양하였다. mock (삽입물을 포함하지 않고 벡터만 발현), pEGFPC1-TSC-22, pcDNA4/HisMax-fortilin, pEGFPC1-TSC-22 및 pcDNA4/HisMax-fortilin, 또는 TSC-22 및 포틸린 siRNA를 각각 invitrogen사의 oligofectamine을 사용하여 트랜스펙션하였다. 핵형을 평가하기 위해서, 핵을 메탄올로

고정하였고, 4', 6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI, 1 µg/mL, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)로 15분간 염색하였다. 상기 염색된 핵을 PBS로 두 번 세척하였고, 형광현미경에서 검사하였다. TSC-22 cDNA 단독으로 트랜스펙션 했을 때는 mock 트랜스펙션에 비교하여 거의 60%의 세포가 분절된 핵을 보였다. 이와 비교하여 mock 또는 포틸린 cDNA의 단독 트랜스펙션의 경우는 Cell viability의 변화가 없었다. TSC-22 및 포틸린 cDNA를 함께 트랜스펙션 한 세포는 분절된 DNA를 포함하는 세포가 현저히 감소하였다. 그러나 TSC-22와 포틸린 siRNA를 함께 트랜스펙션 한 경우에는 분절된 DNA를 포함하는 세포가 관찰되었다(도 15).

<54> 라. In vitro caspase-3 activity assay

<55> 세포 용해물의 caspase-3 효소활성을 acetyl DEVD 7-amino 4-tri fluoromethyl coumarin (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라서 측정하였다. 활성을 400 nm에서의 자극과 505 nm에서의 방출을 이용해 형광모드의 마이크로 플레이트 리더(SpectraMax 340 microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 사용하여 측정하였다. 효소활성은 대조구와 비교하여 상대적인 흡광도에 따라서 계산하였다. 이때 사용되어진 음성대조구는 세포사멸이 안 일어난 인간 세포주(Daudi)를 사용하였고, 양성대조구는 세포사멸이 일어난 인간 세포주(Daudi)를 사용하였다. pcDNA4/HisMax-fortilin으로 트랜스펙션한 것은 mock과 비교했을 때 caspase-3의 활성에 현저한 변화가 없었다. pEGFPC1-TSC-22 단독으로 트랜스펙션했을 때에는 mock과 비교했을 때 caspase-3 활성의 현저한 상향조절이 발견되었다. 하지만, pEGFPC1-TSC-22를 단독으로 트랜스펙션 한 것과 비교했을 때 pEGFPC1-TSC-22 및 pcDNA4/HisMax-fortilin을 공동으로 트랜스펙션한 것은 caspase-3 활성이 절반으로 감소하였다. 또한 pEGFPC1-TSC-22와 si포틸린을 공동으로 트랜스펙션 한 경우, caspase-3의 활성은 현저하게 회복하였고, pEGFPC1-TSC-22 단독으로 트랜스펙션 했을 때와 거의 같은 수준이었다. 상기 결과들은 TSC-22가 caspase-3 의존적인 경로를 통해서 세포사멸을 유도하고, 인간의 난소악성종양세포인 SKOV-3에서 포틸린은 TSC-22 매개의 세포사멸을 방해하는 것을 증명한다(도 16).

<56> 마. TSC-22 단백질의 안정성 결정

<57> SKOV-3 난소암세포를 mock (삽입물 없이 벡터만 발현) 또는 포틸린 siRNA로 트랜스펙션 하였다. 트랜스펙션 사후 후, 세포를 싸이클로헥사마이드(Sigma)로 최종 농도 100 mg/ml로 처리하였다. 세포 용해물을 처리 과정의 순차적 시점에서 획득하였고, SDS 젤 전기영동법에 의해 분석하였다. 전기 영동된 단백질을 Immobilon P membrane (Millipore corporation, Billerica, MA, USA)으로 트랜스퍼하였고, 항-TSC-22 항체(sc-27844, Santa Cruz Biotechnology) 또는 염소 항-포틸린 항체 (sc-20426, Santa Cruz Biotechnology)로 ECL 시스템 (GE healthcare)을 사용하여 이뮤노블랏팅을 수행하였다. TSC-22 단백질의 수준은 포틸린이 상존하는 경우, 시간 의존적인 양상으로 현저하게 감소하였다. 반대로, TSC-22의 수준은 포틸린이 없는 경우에 5시간 경과 후에도 현저한 차이를 나타내지 않았다(도 17). 상기 결과들은 인간 난소악성종양세포인 SKOV-3에서 포틸린과 TSC-22가 상호작용하여 TSC-22의 불안정성을 가속화시킨다는 것을 증명한다.

<58> [참고문헌]

- M. Shibamura, T. Kuroki, K. Nose, Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta 1 and other growth factors. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10219-10224.
- A. Kania, A. Salzberg, M. Bhat, D. D'Evelyn, Y. He, I. Kiss, H.J. Bellen, P-element mutations affecting embryonic peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139 (1995) 1663-1678.
- P. Jay, J.W. Ji, C. Marsollier, S. Taviaux, J.L. Berge-Lefranc, P. Berta, Cloning of the human homologue of the TGF- β -stimulated clone 22 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222 (1996) 821-826.
- K. Nakashiro, H. Kawamata, S. Hino, D. Uchida, Y. Miwa, H. Hamano, F. Omotehara, H. Yoshida, M. Sato, Down-regulation of TSC-22 (transforming growth factor β -stimulated clone 22) markedly enhances the growth of a human salivary gland cancer cell line in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 58 (1998) 549-555.
- S. Ohta, K. Yanagihara, K. Nagata, Mechanism of apoptotic cell death of human gastric carcinoma cells mediated by transforming growth factor β . *Biochem. J.* 324 (1997) 777-782.
- D. Uchida, H. Kawamata, F. Omotehara, Y. Miwa, S. Hino, N.M. Begum, H. Yoshida, M. Sato, Over-expression of TSC-22 (TGF- β stimulated clone-22) markedly enhances 5-Fluorouracil-induced apoptosis in a human salivary gland cancer cell line. *Lab. Invest.* 80 (2000) 955-963.

<59>

- S. Hino, H. Kawamata, D. Uchida, F. Omotehara, Y. Miwa, N.M. Begum, H. Yoshida, T. Fujimori, M. Sato, Nuclear translocation of TSC-22 (TGF- β -stimulated clone-22) concomitant with apoptosis: TSC-22 as a putative transcriptional regulator. *Biochem Biophys Res Commun.* 278 (2000) 659-664.
- H.A. Kester, C. Blanchetot, J. den Hertog, P.T. van der Saag, B. van der Burg, Transforming growth factor- β -stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27439-27447.
- S. Ohta, K. Yanagihara, K. Nagata, Mechanism of apoptotic cell death of human gastric carcinoma cells mediated by transforming growth factor β . *Biochem. J.* 324 (1997) 777-782.
- H. Ito, Y. Fukada, K. Murata, A. Kimura, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153 (1983) 163-168.
- L. Guarente, Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* 101 (1983) 181-191.
- F. Li, D. Zhang, K. Fujise, Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic factor. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47542-47549.
- P. Graidist, A. Phongdara, K. Fujise, Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40868-40875.

<60>

산업이용 가능성

<61>

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 포틸린이 TSC-22와 결합하여 TSC-22를 불안정시켜 TSC-22 매개의 세포사멸을 억제하는 것을 이용하여, 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 포틸린(fortilin) 유전자 또는 그 발현 단백질을 함유하는 세포사멸 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

<62> 또한 다양한 질병의 발병 원인은 근원적으로 세포사멸 신호전달 기구의 비정상적인 작동에 기원함을 고려할 때, 본 발명은 치매 및 파킨슨병으로 구성된 퇴행성 질환, 또는 유방암, 직장암, 갑상선암을 포함한 각종 암 및 류마티스성 관절염의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

<63> 이와 더불어 본 발명은 세포사멸에 관여하는 TSC-22 및 인간 포틸린 (fortilin) 단백질의 상호작용을 이용하여 세포사멸 유도제 또는 저해제의 약물 스크리닝 시스템 (drug screening system)으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<64> 도 1은 TSC-22의 유전자를 T-easy 벡터에 도입하여 생성된 TSC-22/T-easy 벡터의 개열지도를 나타낸다.

<65> 도 2는 TSC-22의 유전자를 pBluescript II KS 벡터에 도입하여 생성된 pBluescript II KS(+)-TSC-22의 개열지도를 나타낸다.

<66> 도 3은 pBluescript II KS(+)-TSC-22를 EcoRI와 XhoI 제한효소로 처리하여 pGilda 클로닝 벡터의 EcoRI와 XhoI 제한효소 부위로 클로닝하여 생성된 재조합 벡터 pGilda-TSC-22를 나타낸다.

<67> 도 4는 난소의 cDNA library를 B42 퓨전단백질(Clontech, Palo Alto, CA, USA)을 만들기 위해 pJG4-5(Clontech, Palo Alto, CA, USA)의 EcoRI과 XhoI 제한효소자리에 클로닝하여 생산한 재조합 벡터 pGilda-fortilin를 나타낸다.

<68> 도 5는 인간의 포틸린 (GenBank accession number: NM_003295)을 암호화하는 서열을 나타낸다.

<69> 도 6은 베타갈락토시다아제의 상대적인 발현 수준을 측정함으로써 TSC-22와 포틸린의 결합 활성을 측정하는 도면이다.

<70> 도 7은 인간TSC-22를 암호화하는 cDNA를 글루타티온 S-트랜스퍼라아제 (GST) 퓨전단백질(GST-TSC-22)를 만들기 위해서 pGEX4T-1 (GE healthcare, Piscataway, NJ, USA)의 EcoRI과 XhoI 제한효소자리에 재구축하여 생성한 재조합 벡터 pGEX4T-1-TSC-22를 나타낸다.

<71> 도 8은 인간 포틸린 cDNA를 히스티딘 퓨전단백질(His-fortilin)을 만들기 위해 EcoRI과 XhoI 제한효소자리를 사용하여 pET28a(Novagen, Madison, WI, USA)에 접합하여 생성한 재조합 벡터 pET28a-fortilin를 나타낸다.

<72> 도 9는 GST column matrix를 이용한 in vitro pull-down analysis의 결과로 TSC-22와 포틸린 사이에 결합력이 있음을 나타내는 도면이다.

<73> 도 10은 인간 TSC-22를 암호화하는 cDNA를 BglII 와 EcoRI 으로 절단한 pEGFPC1 (Clontech)에 클로닝하여 생성된 재조합 벡터 pEGFPC1-TSC-22를 나타낸다.

<74> 도 11은 인간의 포틸린 cDNA를 EcoRI 과 XhoI 제한효소 자리를 이용하여 pcDNA4/HisMax (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에 도입하여 생성한 pcDNA4/HisMax-fortilin 재조합 벡터를 나타낸다.

<75> 도 12는 GST-22와 포틸린을 형질 도입한 세포의 용해물 이용하여 공동면역침전법을 실시하여 TSC-22와 포틸린 사이에 결합력이 있음을 나타내는 도면이다.

<76> 도 13은 SKOV-3의 cell viability가 형질 도입한 TSC-22 cDNA의 농도에 의존적으로 감소됨을 나타내는 도면이다.

<77> 도 14는 SKOV-3의 cell viability가 TSC-22와 포틸린 cDNA를 동시에 트랜스펙션 했을 때에 회복되었고, 반면에 TSC-22와 si포틸린을 동시에 트랜스펙션 했을 때에는 현저히 감소되었음을 나타내는 도면이다.

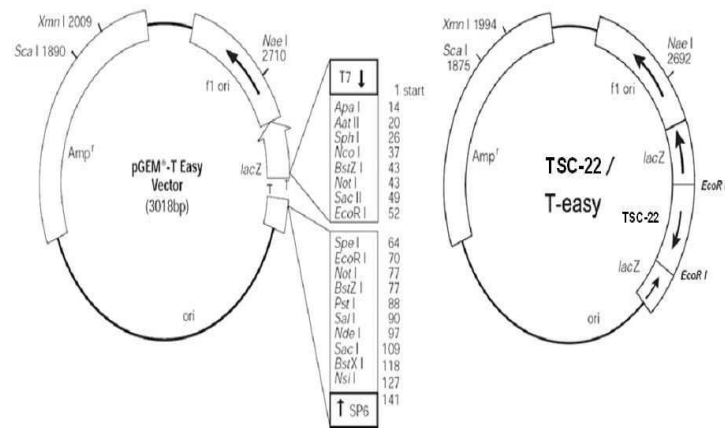
<78> 도 15는 세포사멸을 나타내는 세포의 감소를 비교하기 위해 트랜스펙션 된 SKOV-3에 DAPI 염색법을 실시한 결과, TSC-22와 포틸린을 공동으로 트랜스펙션 했을 때는 분절된 DNA를 포함하는 세포가 현저히 감소되었고, TSC-22와 si포틸린을 공동으로 트랜스펙션 했을 때는 변화가 없음을 나타내는 도면이다.

<79> 도 16은 트랜스펙션 된 SKOV-3 세포의 caspase-3의 활성을 측정하여 TSC-22를 트랜스펙션 했을 때는 활성이 현저히 상향조정 된 것에 반해, 포틸린을 함께 트랜스펙션 했을 때에는 활성이 현저히 회복이 되고, si포틸린을 함께 트랜스펙션 했을 때에는 변화가 없음을 나타내는 도면이다.

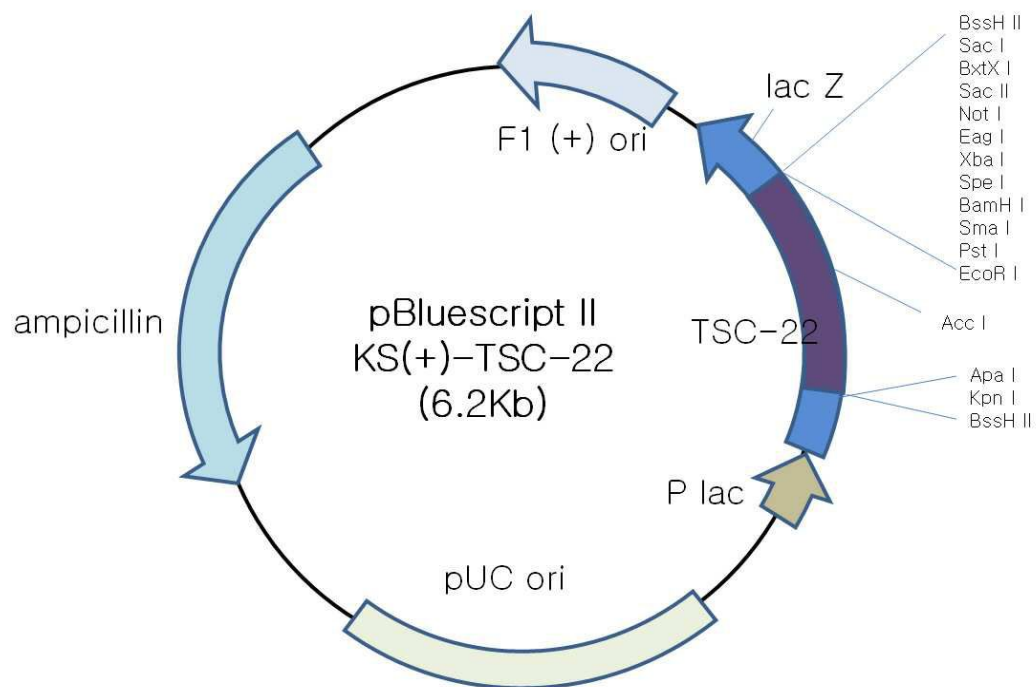
<80> 도 17은 포틸린이 있을 때와 없을 때 사이클로헡사민 처리 후의 TSC-22 단백질의 안정성을 측정한 결과, TSC-22 단백질의 수준은 포틸린이 있을 때, 시간 의존적인 양상으로 현저하게 감소함을 나타내는 도면이다.

도면

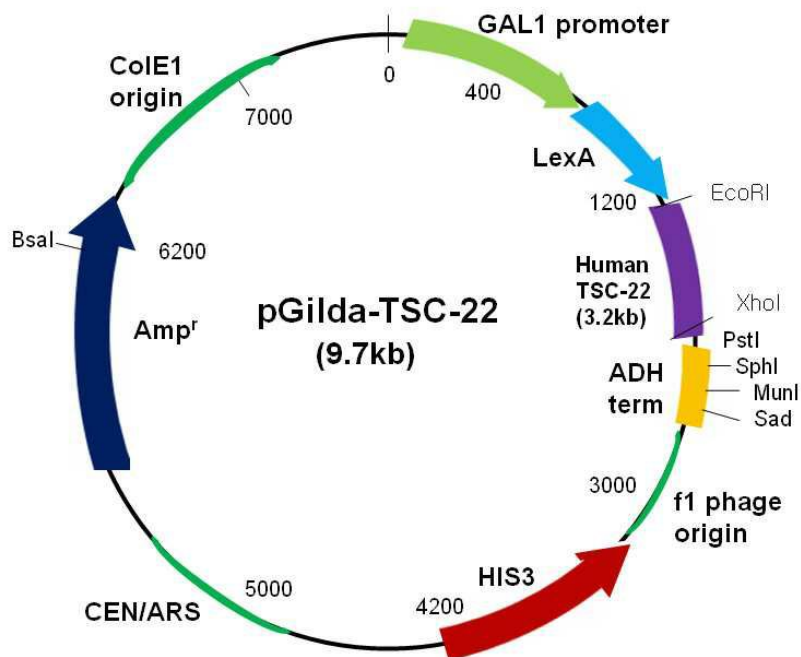
도면1



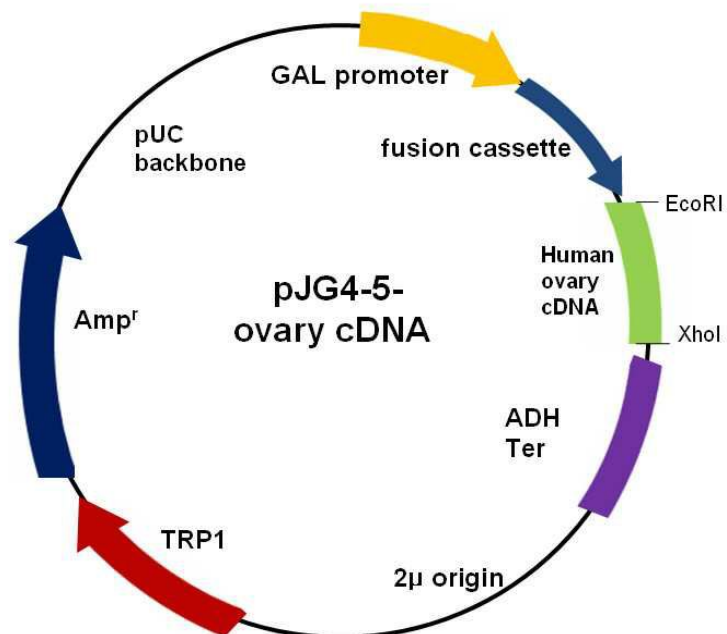
도면2



도면3



도면4



도면5

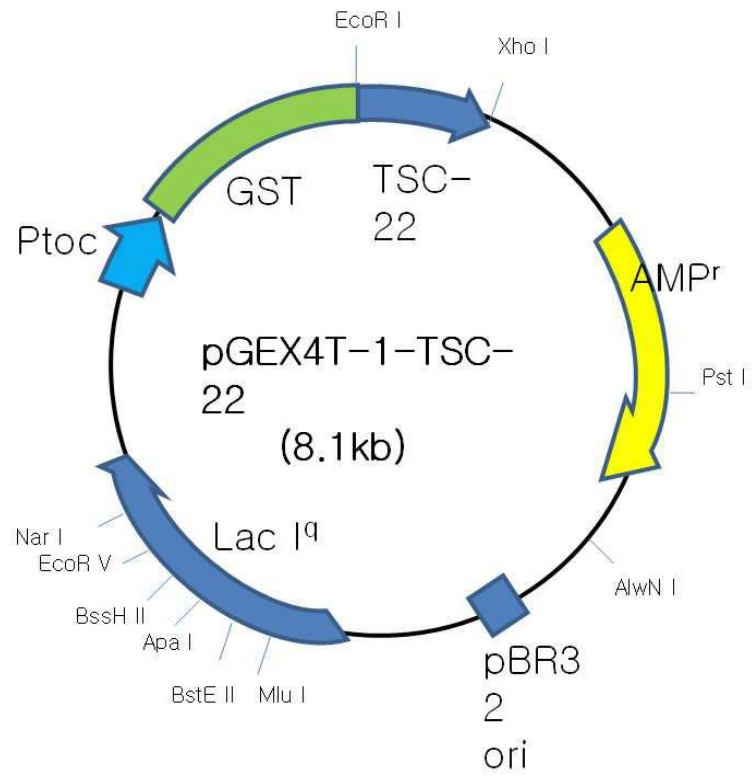
```

1
MIIYRDLISHDEMFSDIYKIREIADGLCLEVEGKMVSRTE
41
GNIDDSLIGNASAE GPEGTESTVITGVDIVMNHHLQE
81
TSFTKEAYKKYIKDYMKSIKGKLEEQRPERVKPFMTGAAE
121
QIKHILANFKNYQFFIGENMNPDGMVALLDYREDGVTPYM
161
IFFKDGLEMEKC
    
```

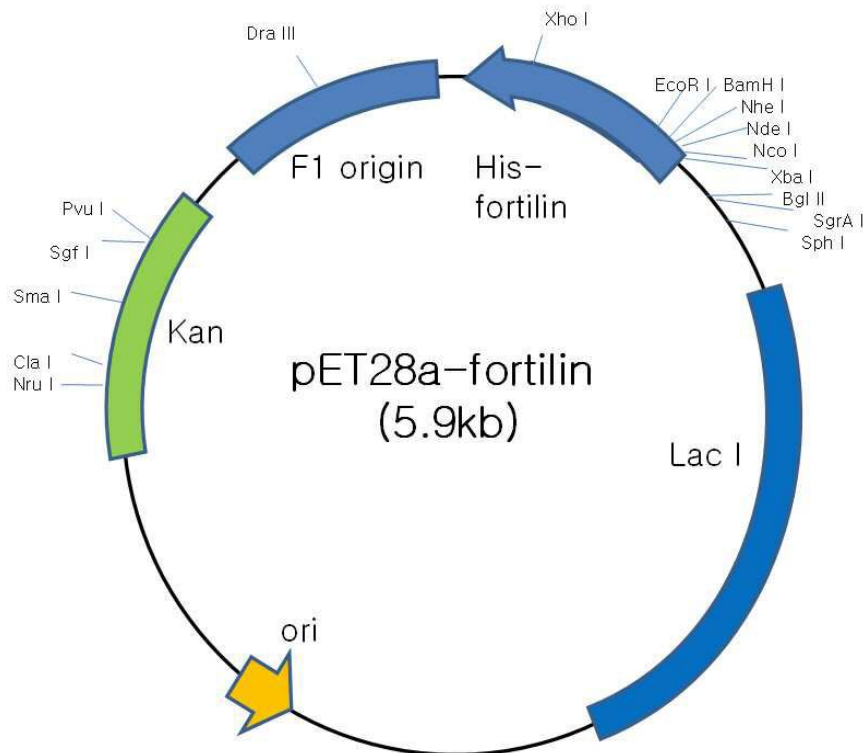
도면6



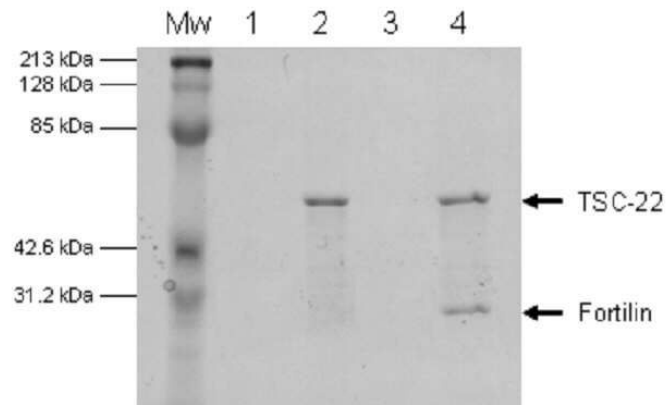
도면7



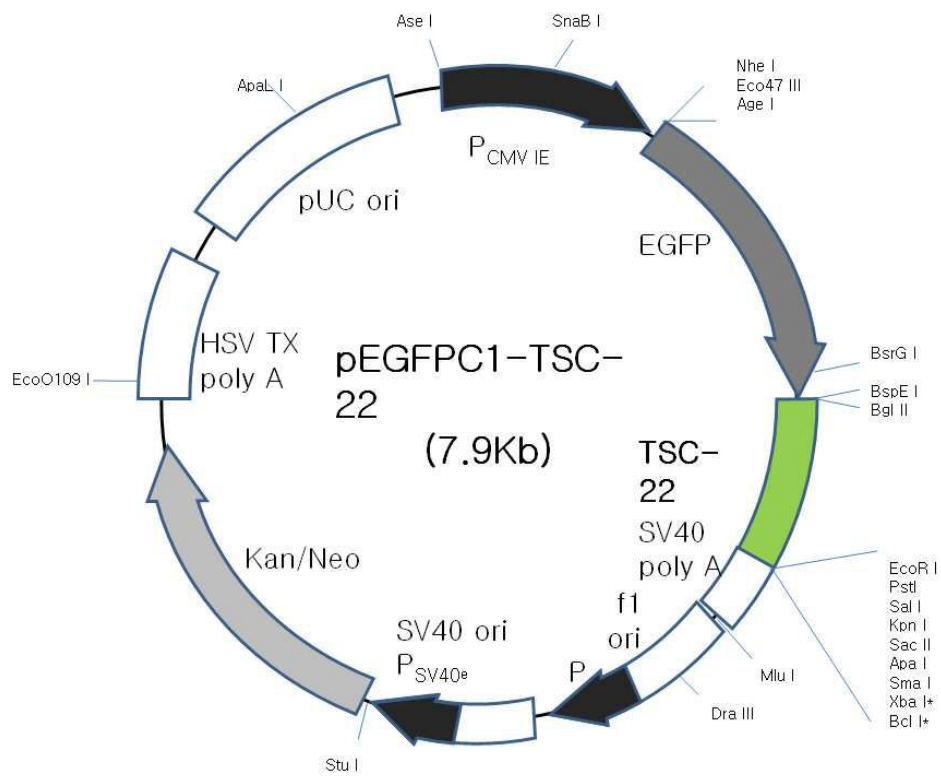
도면8



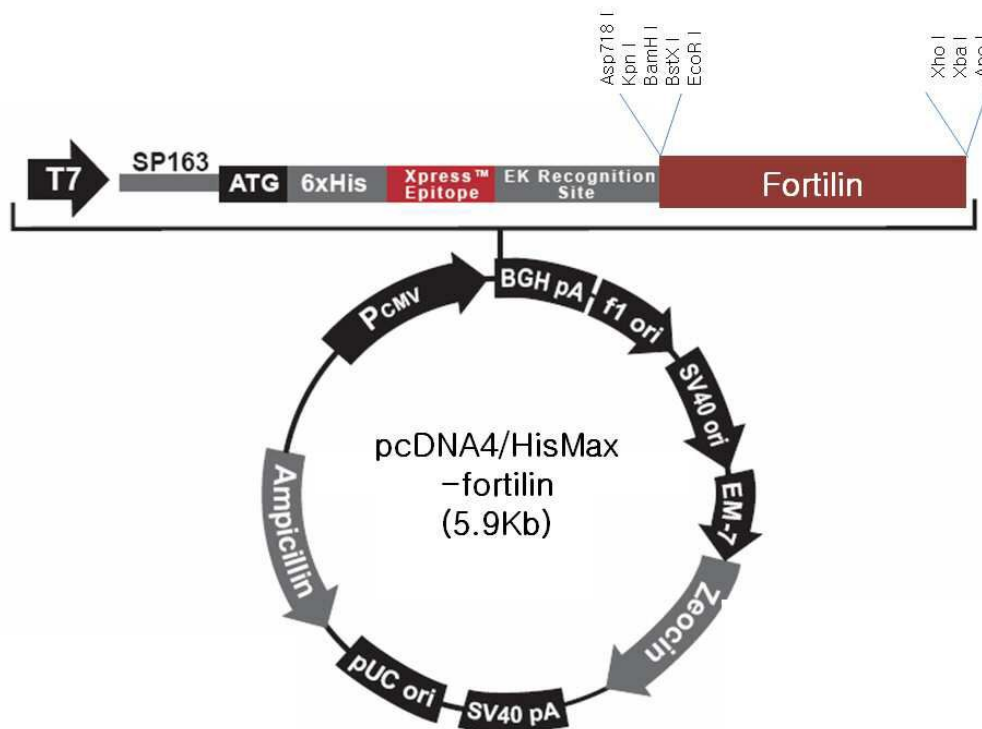
도면9



도면10



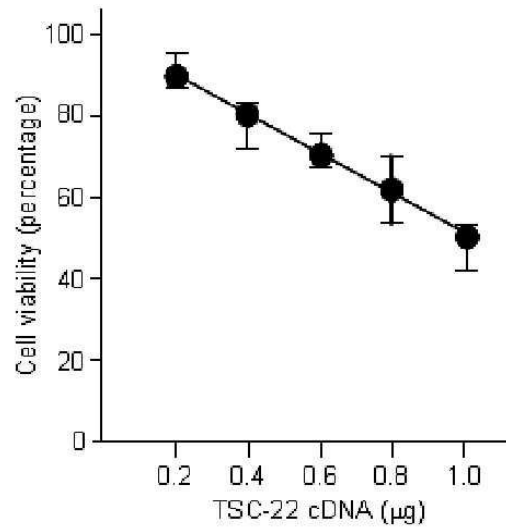
도면11



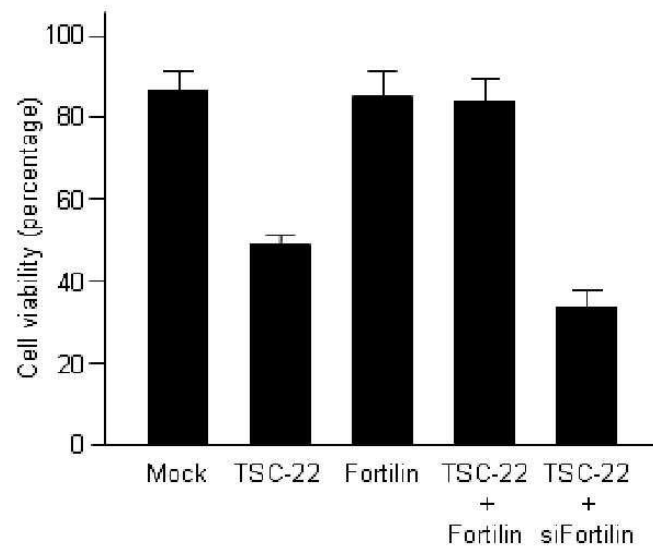
도면12



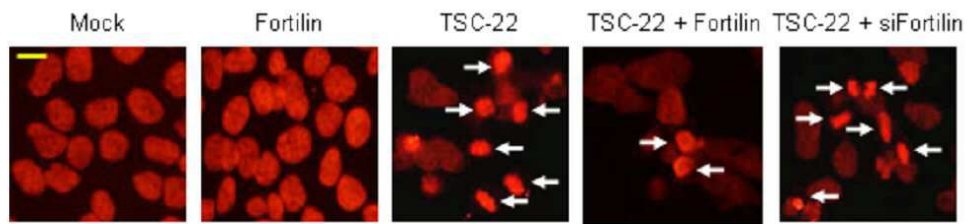
도면13



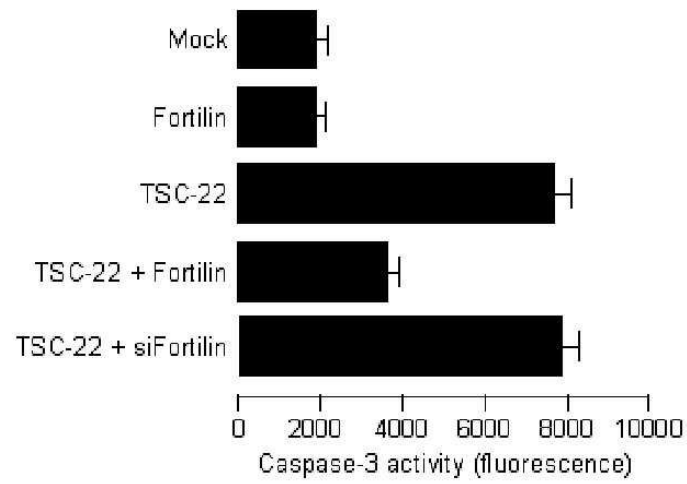
도면14



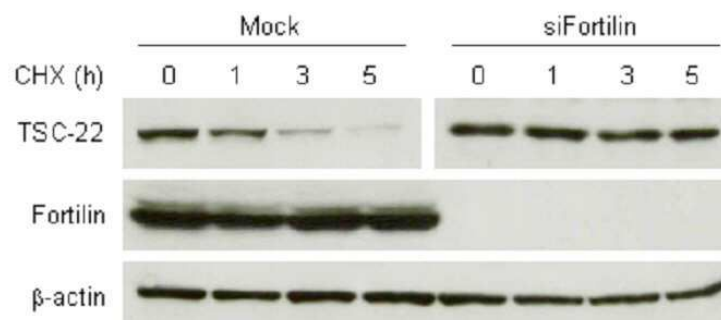
도면15



도면16



도면17



서열 목록

<110> Korea University Industry Academy Cooperation Foundation

<120> Method of Inhibition for TSC-22 mediated apoptosis by fortilin

<160> 10

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 519

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgattatct accgggacct catcagccac gatgagatgt tctccgacat ctacaagatc 60

cgggagatcg cggacgggtt gtgcctggag gtggagggga agatggtcag taggacagaa 120

ggtaacattg atgactcgct cattggtgga aatgcctccg ctgaaggccc cgagggcgaa 180

ggtaccgaaa gcacagtaat cactggtgtc gatattgtca tgaacatca cctgcaggaa 240

acaagtttca caaaagaagc ctacaagaag tacatcaaag attacatgaa atcaatcaaa 300

gggaaacttg aagaacagag accagaaaga gtaaaacctt ttatgacagg ggctgcagaa 360

caaatcaagc acatccttgc taatttcaaa aactaccagt tctttattgg tgaaaacatg 420

aatccagatg gcatggttgc tctattggac tacctgagg atggtgtgac cccatatatg 480

attttcttta aggatggttt agaaatggaa aaatgttaa 519

<210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp

1 5 10 15

Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu

20 25 30

Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile
35 40 45

Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser
50 55 60

Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu
65 70 75 80

Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met
85 90 95

Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys
100 105 110

Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn
115 120 125

Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly
130 135 140

Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met
145 150 155 160

Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys
165 170

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA for human fortilin

<400> 3
aaggtaccga aagcacagt

19

<210> 4
<211> 23

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5 prime PCR primer for fortilin

<400> 4
ctaagctagc gccgtcgtcg tct 23

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

<220>
<223> 3' PCR primer for fortilin

<400> 5
gtcttaagtc ctggtgttgt gtgg 24

<210> 6
<211> 3222
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
atgcaccagc cgctgagtc caccgccg cgccgccg ctgcagacat tagcgctagg 60

aagatggcgc acccggcaat gttccctcga aggggcagcg gtagtggcag cgcctctgct 120

ctcaatgcag caggtaccgg cgtcggtagt aatgccacat cttccgagga ttttcgcct 180

ccgtcgctgc ttcagccgcc gcccctgca gcatcttcta cgtcgggacc acagcctcgc 240

cctccacaaa gcctgaacct ctttcgcag gtcagctgc aggacagcc tcttgcgcca 300

ggcggaaactc aaatgaaaaa gaaaagtggc ttccagataa ctagcggttac tcctgctcag 360

atctccgcta gtatcagctc taacaacagt atagcagagg aactgagag ctatgatgat 420

ctggatgaat ctcacacgga agatctctct tcttcggaga tcttgatgt gtcactttcc	480
agggtactg acttagggga gcccgaacgc agtcctcag aagagaccct aaataacttc	540
caggaagccg agacacctgg ggcagtctct cccaaccagc cccaccttcc tcagcctcat	600
ttgcctcacc ttccacaaca gaatgttggt atcaatggga atgctcatcc acaccacctc	660
catcaccacc atcagattca tcatgggcac cacctccaac atggtcacca ccatccatct	720
catgttgctg tggccagtgc atccattact ggtgggccac cctcaagccc agtatctaga	780
aaactctcta caactggaag ctctgacagt atcacaccag ttgcaccaac ttctgctgta	840
tcatccagtg gttcacctgc atctgtaatg actaatatgc gtgctccaag tactacaggt	900
ggaataggta taaattctgt tactggcact agtacagtaa ataatgttaa cattactgct	960
gtgggtagtt ttaatcctaa tgtgacaagc agcatccttg gtaatgttaa tataagtaca	1020
agcaatattc ctagtgctgc tgggtgaggt gttgggcctg gagttaccag tgggtttaat	1080
gtgaatatct tgagtggcat gggcaatggt actatttctt cctctgctgc tgttagcagt	1140
gttcctaagc cagctgcagg gatgactggg ggatcggttt caagtcagca gcaacaacca	1200
acagttaaca cticgaggtt cagagttgtg aagttagatt ctagttctga gccctttaa	1260
aaaggtagat ggacttgac tgagttctat gaaaaagaaa atgctgtacc tgctacagaa	1320
ggtgtgctga taaataaagt ggtggagact gtaaagcaaa atccgataga agtgacttct	1380
gaaagggaga gcactagtg gagttcagt agcagtagtg tcagcacact gagtcactat	1440
acagagagtg tgggaagtgg agagatggga gcccctactg tgggtgtgca gcagcagcag	1500
cagcaacaac aacaacaaca gcaacaacca gctctccaag gtgtgacct ccaacagatg	1560

gatttttgta gcactgggcc acagagtatt ccagcagtta gtataccaca gagtatttct	1620
cagtcacaga tctcacagt acaattacag tctcaagaac tgagctatca gcaaaagcaa	1680
ggctttcagc cagtacctt gcaagccact atgagtgtg caactggat ccagccatcg	1740
cctgtaaatg tggttgggt aacttcagct ttaggtcagc agccttccat ttccagtttg	1800
gctcaacccc agctaccata ttctcaggcg gctcctccag tgcaaaactcc cttccaggg	1860
gcaccaccac cccaacagtt acagtatgga caacagcaac caatggtttc tacacagatg	1920
gccccaggcc atgtcaaatc agtgactcaa aatcctgctt cagagtatgt acaacagcag	1980
ccaattcttc aaacagcaat gtcctccgga cagcccagtt ctgcaggagt aggagcagga	2040
acaacagtga ttctgtggc tcagccacag ggtatccagc tgccagtga gccacagca	2100
gtcccagcac aacctgcagg ggcatctgtc cagcctgttg gccaggctcc ggcagcagtg	2160
tctgtgttac ctactggcag tcagattgca aatattggc agcaagcaaa catacctact	2220
gcagtgcagc agccctctac ccaggttcca cttcagtta ttacagcagg tgctcctcca	2280
tcctcgaag tggttccacc tgctcaaac gggattattc atcagggagt tcaaaactagt	2340
gtccaagcc ttctcaaca attggttatt gcatccaaa gttccttgtt aactgtgcct	2400
ccccagccac aaggagtaga accagtagct caaggaattg ttacacagca gttgcctgca	2460
gttagttctt tgcctctgc tagtagtatt tctgttaca gtcaggtag ttcaactggt	2520
ccttctggaa tgccttctgc cccaacaaac ttggttccac caaaaatat agcacaacc	2580
cctgctaccc aaaaaggtaa ttggttcaa agtgtagtc aacctcctt gatagcaact	2640
aatacaaatt tgcctttggc acaacagata ccactaagtt ctaccagtt ctccgcacaa	2700
tcattagctc aggcaattgg aagccaaatt gaagatgcca ggcgtgcagc ggagccctcc	2760

ttagttggct tacctcagac tatcagtggg gacagtgggg gaatgtcagc agtttcagat	2820
gggagtagca gcagcctagc agcctctgct tctcttttcc cgttgaaggt gctaccgctg	2880
acgacacccc tggcggatgg cgaggatgag agctcctctg gtgcaagtgt ggtagctatt	2940
gacaacaaaa tcgagcaagc tatggatcta gtgaaaagcc atttgatgta tgcggtcaga	3000
gaagaagtgg aggtcctcaa agagcaaac aaagaactaa tagagaaaaa ttcccagctg	3060
gagcaggaga acaatctgct gaagacactg gccagtcctg agcagcttgc ccagtttcag	3120
gcccagctgc agactggctc cccccctgcc accaccacgc cacagggcac cacacagccc	3180
ccccccagc cagcatcgca gggctcagga ccaaccgat ag	3222

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 5 prime PCR primer for TSC22

<400> 7	
aacacaatgc accagccgcc tgagt	25

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 3 prime PCR primer for TSC22

<400> 8	
gcttcagag gtactggctg aagac	25

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 5 prime PCR primer for TSC22

<400> 9
 ggtagcactg gtccacagag tattcc 26

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 3 prime PCR primer for TSC22

<400> 10
 ataggcagct atgcggttgg tcc 23