



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0053985
(43) 공개일자 2009년05월29일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 9/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0120614

(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

허유진

서울시 영등포구 당산동5가 삼성래미안아파트 40 8동 602호

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 11 항

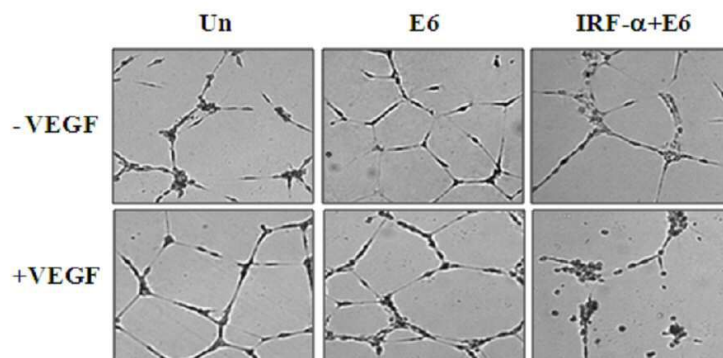
(54) 인간 파필로마 바이러스 16형 단백질 E6와 인터페론 조절인자 1 단백질과의 상호작용을 이용한 신생혈관 생성 억제방법

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자를 함유하는 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명에 따르면 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자를 함유하는 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물을 사용하여 신생혈관생성(angiogenesis)을 억제함으로써 암 전이를 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도11



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0603083

부처명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술개발사업

연구과제명 이중이식장기 세포성 면역관용 유도 기술 개발

주관기관 생명자원연구소

연구기간 2007년 04월 01일 ~ 2008년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 또는 그 발현 단백질, 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자 또는 그 발현단백질을 함유하는 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 인간 파필로마바이러스 16형 단백질 E6 유전자 및 인터페론 조절인자-1 단백질 유전자는 동물세포 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 인간 파필로마바이러스 16형 단백질 E6 유전자가 삽입된 동물세포 발현벡터는 도 6에 기재된 개열지도를 갖는 HPV16E6/pcDNA4/HisMAX 벡터 또는 도 14에 기재된 개열지도를 갖는 HPV16E6/pET29-a 벡터, 상기 인터페론 조절인자-1 단백질 유전자는 도 5에 기재된 개열지도를 갖는 hIRF-1/pEGFP-C1 벡터 또는 도 13에 기재된 개열지도를 갖는 hIRF-1/pGEX4T-1 벡터인 것을 특징으로 하는 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질 유전자가 삽입된 도 13에 기재된 개열지도를 갖는 hIRF-1/pGEX4T-1 벡터.

청구항 5

서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 단백질 E6 유전자가 삽입된 도 14의 개열지도를 갖는 HPV16E6/pET29-a 벡터.

청구항 6

서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자가 형질도입된 동물세포.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 동물세포는 제 4항에 따른 hIRF-1/pGEX4T-1 벡터와 제 5항에 따른 HPV16E6/pET29-a 벡터가 형질도입된 것을 특징으로 하는 동물세포.

청구항 8

서열번호 1의 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 서열을 중합효소 연쇄반응(PCR) 시키기 위한 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트.

청구항 9

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자 서열을 중합효소 연쇄반응(PCR) 시키기 위한 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 세트.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 폐암, 피부암 또는 뇌종양에서 선택된 암을 치료하기 위해 투여하는 약학적 조성물.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 신생혈관 억제제의 스크리닝 방법;

- (a) E6 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 동물세포에서 E6 단백질과 인터페론 조절인자-1 단백질의 상호작용이 촉진되는지 여부를 결정하는 단계.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 인간 파필로마 바이러스 16형 단백질 E6와 인터페론 조절 인자 1 단백질과의 상호작용을 이용한 신생혈관생성 억제 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마 바이러스 16형 E6 유전자 또는 그 발현 단백질, 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질 유전자 또는 그 발현단백질을 함유하는 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 인간 Papillomavirus (HPV)는 생식기 감염의 주요 원인이며 또한 피부나 구강의 경구 감염으로 인한 악성 종양의 발병 원인이다(Zhebe et al., 1997; Chrisofos et al., 2004). HPV로 인한 생식기 감염은 전 세계적으로 남성과 여성 모두에게 가장 흔하게 나타나는 성 접촉에 의한 질병이며, 최근 가장 빈번하게 나타나는 바이러스성 질병이기도 하다(Ho et al., 1998; Jung et al., 2004). 자궁경부에서 발견되는 암세포의 발생은 대부분이 HPV에 의한 것으로 이는 자궁경부의 암세포에서 HPV DNA가 발견되는 것으로 알 수 있다. 현재까지 100여 종이 넘는 HPV가 발견되었으며 이 중 특정 HPV 종이 자궁경부에 악성 종양을 발생시킨다. 이렇게 많은 종의 HPV는 발생시키는 종양의 위험도에 따라 고위험군(High-risk group), 중간위험군(intermediate-risk group), 저위험군(low-risk group)의 3가지로 분류되는데 이 중 고위험군에 속하는 HPV 16형과 18형은 자궁경부암을 일으키는 주요 원인이다(Scheurer et al., 2005).
- <3> HPV는 papovivirus로 분류되는 작고 외피가 없는 (non-enveloped) 바이러스로, 숙주세포 감염과 세포 주기에 관련하는 두 가지 종류의 단백질을 가진다. 한 종류는 숙주세포 감염 초기에 활동하는 단백질 종류이고, 다른 하나는 숙주세포 감염 말기에 바이러스의 세포 주기를 조절하는 단백질들이다. 이 중 초기에 활동하는 E6 단백질은 바이러스 유전물의 복제와 숙주세포에서의 종양형성에 중요한 역할을 하는 단백질이다. 기본적으로 HPV 감염은 상피세포(epithelial cell)의 손상에 의해 시작된다. 상피세포의 기저층이 손상되면 HPV의 유전물질은 복제 주기를 시작하는데 이 주기는 숙주세포의 물질과 HPV 유전체(genome)에 위치한 long control region (LCR)의 상호작용에 의해 시작된다. 이러한 상호작용은 HPV의 E6 및 E7 단백질 유전자의 복제를 주도한다. 이들 단백질은 종양단백질(oncoprotein)로서, 숙주세포의 종양억제유전자(tumor suppressor gene)인 p53 또는 pRb를 비활성화(inactivation) 또는 분해를 통해 숙주세포의 성장인자 조절경로를 교란시키거나 숙주세포 환경을 바이러스 유전물질 복제에 유리하도록 조절시킴으로써 종양단백질로서의 기능을 수행한다(Jung et al., 2004).
- <4> 앞서 밝혔듯이 HPV의 E6 단백질은 숙주세포의 종양억제단백질인 p53을 붙들어서 유비퀴틴(ubiquitin) 경로에 의해 분해되도록 하여 숙주세포의 세포주기에 영향을 준다. 이로 하여금 숙주세포가 자연사(apoptosis)하는 것을 방지하여 불멸하게 함으로써 암생성을 유도하는 것이다(Klingelutz et al., 1996). 이렇듯 HPV E6 단백질은 생식기의 암 발생에 결정적인 역할을 하며 이로 인해 E6 단백질의 기전은 의학적으로 매우 중요하게 여겨지고 있다.
- <5> 암세포의 발생 및 증식과정을 보면 우선 종양성장인자에 의한 증식기를 관찰 할 수 있다. 이 시기에는 여러 가지 종양성장인자, 혈관생성인자의 발현이 왕성해지면서 암세포 및 신생혈관이 발생한다. 이러한 시기를 거치고 나면 암세포의 침윤 이 시작하는 시기가 진행되는데, 이 시기에는 기저막과 세포외 기질을 용해하는 단백질 분해효소와 단백질 분해효소 억제물질 간의 불균형이 발생하여 단백질 분해효소인 MMP-2(Matrixmetalloproteinase-2), MMP-9(Matrixmetalloproteinase-9), uPA(Urokinase type plasminogen activator)등이 증가하고 단백질 분해효소 억제에 관여하는 PAI-1(Plasminogen activator inhibitor-1), TIMP(Tissue inhibitor of metalloproteinase)등이 감소하는 현상이 발생한다. 그리고 마지막으로 암의 전이가 발생하는 시기로 이 시기에는 세포 유착 분자의 활성이 증가되어 세포의 부착능이 증가하고 암세포의 전이가 본격적으로 발생하게 된다. 이러한 암 발생 및 전이과정에서 나타나는 여러 가지 변형된 생물학적 활성은 각각의 특이적 억제제를 사용하여 조절이 가능하므로 이러한 개념에 근거한 생물학적 치료에 대한 연구는 활발히 진

행되기 시작하였고, 선택적 치료를 통한 치료효과의 개선을 기대하게 되었다. 암의 발생기전은 여러 가지에 요인 한다고 알려져 있지만, 대부분의 경우 환자에서 문제가 되는 것은 특정 암의 전이(metastasis)에 의하여 암이 여러 다른 장기로 퍼져 나갈 때, 외과적 수술로는 완치가 될 수 없게 될 때이다. 이런 경우 항암치료요법을 사용하지만 대부분 높은 치사율을 보인다. 따라서, 암의 전이를 억제 할 수 있으면 외과적 수술로 완치할 수 있게 된다. 암 전이를 억제하는데 있어서 중요한 요인은 신생혈관생성(angiogenesis) 과정을 차단하는 것이다 (Pasquier et al., 2007).

<6> 최근 HPV의 E6 및 E7 단백질이 신생혈관생성(angiogenesis)에 관련된 인자들을 증가시킨다는 보고가 있다(Tang et al., 2007, Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells., Clin Cancer Res., 13:2568-76). 신생혈관생성은 종양의 진행에 있어 없어서는 안 될 영양분이나 산소 공급을 해주는 경로의 생성이라는 점에서 암 발생에 매우 필수적인 과정이다. 그러나 본 연구에서는 오히려 HPV의 E6 단백질이 인터페론 조절 인자 1 (IRF-1)와 결합하며, 이 둘의 상호작용이 신생혈관생성을 억제한다는 것을 밝혔다.

<7> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 신생혈관생성(angiogenesis)에 관련된 인자인 E6가 인터페론 조절 인자 1 (IRF-1)와 결합하는 경우, 상호 작용하여 신생혈관생성을 억제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 신생혈관생성을 억제할 수 있는 장점을 갖는 인간 파필로마 바이러스 16형 단백질 E6와 인터페론 조절 인자 1 단백질과의 상호작용을 이용하여 신생혈관생성 억제 방법을 제공하는 데 있다.

<9> 본 발명의 다른 목적은 상기 인간 파필로마 바이러스 16형 단백질 E6와 인터페론 조절 인자 1 단백질과의 상호작용을 이용한 신생혈관생성 억제 방법을 이용한 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질 (human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 또는 그 발현 단백질, 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자 또는 그 발현단백질을 함유하는 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<10> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 또는 그 발현 단백질, 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자 또는 그 발현단백질을 함유하는 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 상기 E6 유전자의 단독 발현만으로는 cell proliferation을 촉진하지 못하고, 또다른 oncoprotein인 E7 유전자와 함께 발현해야만 cell proliferation을 촉진할 수 있다. 그러나 본 발명에서는 상기 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질과 인터페론 조절인자-1 단백질은 서로 결합하여 상호작용하며(실시예 2), 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질과 인터페론 조절인자-1 단백질이 상호 작용하는 경우 신생혈관생성을 억제함을 밝혀냈다(도 11).

<11> 본 발명의 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물에서, 상기 인간 파필로마바이러스 16형 단백질 E6 유전자 및 인터페론 조절인자-1 단백질 유전자는 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 어떠한 동물세포 발현벡터에 삽입될 수 있으나, 상기 인간 파필로마바이러스 16형 단백질 E6 유전자는 도 6에 기재된 개열지도를 갖는 pcDNA4/HisMAX 벡터 또는 도 14에 기재된 개열지도를 갖는 pET29-a 벡터에 삽입되고, 상기 인터페론 조절인자-1 단백질 유전자는 도 5에 기재된 개열지도를 갖는 pEGFP-C1 벡터 또는 도 13에 기재된 개열지도를 갖는 pGEX4T-1 벡터에 삽입된 것이 바람직하다.

<12> 본 발명의 발현벡터는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질 또는 인터페론 조절인자-1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드 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 실시하기 위한 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 서브틸리스 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. 본 발명의 실시예 2의 다 및 실시예 3의 라에서는, 발현벡터(pEGFP-C1 벡터, pGEX4T-1 벡터, pcDNA4/HisMAX 벡터, 또는 pET29-a 벡터)에 재조합 유전자를 삽입하여 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질 또는 인터페론 조절인자-1 단백질을 발현하기 위한 재조합 벡터(도 5, 도 6, 도 13, 도 14)를 제작하였다.

<13> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자가 삽입된 도 14의 개열지도를 갖는 동물세포 발현벡터(HPV16E6/pET29-a 벡터), 및 서열번호 2의 인터페론 조절인자-1(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자가 삽입된 도 13의 개열지도를 갖는 동물세포 발현벡터(hIRF-1/pGEX4T-1 벡터)를 제공한다. 또한 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자가 삽입된 도 6의 개열지도를 갖는 동물세포 발현벡터(HPV16E6/pcDNA4/HisMAX 벡터), 및 서열번호 2의 인터페론 조절인자-1(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자가 삽입된 도 5의 개열지도를 갖는 동물세포 발현벡터(hIRF-1/pEGFP-C1 벡터)를 제공한다.

<14> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자가 형질도입된 동물세포를 제공한다. 본 발명의 동물세포는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질 및 인터페론 조절인자-1 단백질을 발현하여 분비할 수 있는 어떤 동물세포도 사용가능하나, 효모(yeast), SKOV-3 난소암 세포, 인간 태줄혈관내피세포(HUVECs), CHO 세포, COS-7 (Monkey, African green) 세포, NIH/3T3 (Mouse fibroblast) 세포, BHK-21 (Baby Hamster Kidney, Syrian golden) 세포, Hela (Human carcinoma) 세포, Vero (Monkey kidney, African green) 세포, 또는 C127 (Mouse) 세포를 사용할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 숙주 세포에 도입할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 재조합 벡터를 숙주 세포에 도입하는 방법으로는, 이에 한정되지는 않으나, 염화칼슘 (CaCl₂) 및 열쇼크 (heat shock) 방법, 입자 총 충격법 (particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스터 (Silicon carbide whiskers), 초음파 처리 (sonication), 전기천공법 (electroporation) 및 PEG (polyethyleneglycol)에 의한 침전법 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 상기 IRF-1 유전자 또는 파필로마 바이러스 E6 유전자가 도입된 각각의 발현벡터를 동시에 SKOV-3 난소암 세포 또는 인간 태줄혈관내피세포(HUVECs)에 도입하였다.

<15> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 7의 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 서열을 중합효소 연쇄반응(PCR) 시키기 위한 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트를 제공하며, 서열번호 8의 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자 서열을 중합효소 연쇄반응(PCR) 시키기 위한 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 세트를 제공한다. 상기 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머는 각각 *salI* 제한효소 인식부위를 포함하고, 서열번호 5의 프라이머는 제한효소 *EcoRI* 인식부위를 포함하며, 서열번호 6의 프라이머는 제한효소 *XhoI* 인식부위를 포함하여, 중합효소반응 수행 후 상기 제한효소를 처리하여 같은 제한효소 부위를 갖는 벡터로 용이하게 도입될 수 있다.

<16> 본 발명의 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물에서, 상기 약학적 조성물은 비조절성 혈관신생 관련 질환(unregulated angiogenesis associated diseases)을 치료하기 위해 투여 가능하고, 바람직하게는 폐암, 피부암, 뇌종양, 류마티스 관절염, 당뇨병 망막염, 종양, 혈관종 또는 건선을 치료하기 위해 투여 가능하고, 가장 바람직하게는 폐암, 피부암 또는 뇌종양을 치료하기 위해 투여 가능하다. 본 발명에서 신생혈관생성(angiogenesis)은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정을 말하며, 암세포가 1-2 mm³ 크기 이상의 조직으로 성장하거나 다른 장기로의 전이 및 전이된 암의 성장에는 반드시 신생혈관의 형성이 필요하다. 따라서, 암조직 내에 새로운 혈관의 형성을 억제함으로써 암의 성장과 전이를 차단하는 것은 당업계의 공지된 사실이며, 한편, 본 발명의 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 및

인터페론 조절인자-1 단백질은 상호작용하여 신생혈관생성을 효과적으로 저해함으로써 혈관신생을 현저하게 억제하므로, 혈관신생이 연관된 질병을 치료하거나 혈관신생 과정을 조절하는 데 유용하게 사용될 수 있다 (Bergers G et al., Tumorigenesis and the angiogenic switch, Nat Rev Cancer, 2003, 3th, 401-10). 본 발명의 약학적 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 인체에 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 조성물은 또한 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 상기 조성물은 항암 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있으며, 이런 담체로 생리학적 식염수를 예로 들 수 있다. 본 발명의 항암치료용 조성물은 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량은 질병의 중증도, 연령, 성별, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 함유되는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 또는 그 발현 단백질, 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자 또는 그 발현 단백질의 유효 투여량의 범위는 성별, 중증도, 연령, 투여방법, 표적 세포, 발현 수준 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 하나의 예시로서, 약 0.01ug 내지 약 100ug/kg의 범위일 수 있다.

<17> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 신생혈관 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) E6 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및 (b) 상기 동물세포에서 E6 단백질과 인터페론 조절인자-1 단백질의 상호작용이 촉진되는지 여부를 결정하는 단계. 상기 (a) 단계에서, 상기 동물세포는 의도적으로 E6 단백질을 과발현하는 플라스미드(실시예 2 참조)로 트랜스펙션 시킬 수도 있다. 상기 (b) 단계에서, 발현 감소여부는 상호작용 촉진 여부는 실시예1의 yeast two hybrid system, 면역침전법 등을 통해 단백질 레벨에서 측정할 수 있다.

<18> 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

<19> 실시예 1. 인간 IRF-1 또는 인간 파필로마 바이러스 E6 유전자를 코딩하는 재조합 벡터의 구축

<20> 말단에 각각 제한효소 SalI의 절단 부위 서열을 포함한 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트를 합성하였다. 상기 프라이머 세트와 Taq polymerase (Gene craft)를 사용하여 인간 IRF-1을 코딩하는 cDNA(서열번호 8)를 주형으로 연쇄중합반응하여 말단에 SalI 제한효소 부위를 갖는 DNA 절편을 생성하였다. 또한, 5' 말단에 제한효소 EcoRI 서열을 갖는 서열번호 5의 프라이머와 3' 말단에 제한효소 XhoI 서열을 갖는 서열번호 6의 프라이머 세트를 합성하였다. 상기 서열번호 5 및 6의 프라이머 세트와 인간 papillomavirus E6를 코딩하는 cDNA(서열번호7)를 주형으로 연쇄중합반응하여 말단에 EcoRI 서열과 XhoI 서열을 갖는 DNA 절편을 합성하였다. 각각의 제한효소로 절단하고, elution (Qiagen)하고, DNA binding domain을 가진 pGilda vector (CLONTECH)에 상기 제한효소 처리한 DNA를 ligase (promega)를 사용하여 삽입하여, 인간 IRF-1 유전자를 포함한 재조합 벡터(hIRF-1/pGILDA)를 제조하였다(도 1). 마찬가지로 방법으로 B42 단백질을 activation domain으로 도입한 pJG4-5 vector (Invitrogen)에 상기 제한효소 처리한 DNA 절편을 ligase (promega)를 사용하여 삽입하여, 인간 papillomavirus E6 유전자를 포함한 재조합 벡터(HPVE6/pJG4-5)를 제조하였다(도 2).

<21> 실시예 2. IRF-1 단백질과 papillomavirus E6 단백질의 상호작용 확인

<22> 가. yeast two hybrid assay

<23> 실시예 1의 재조합 벡터(hIRF-1/pGILDA) 및 재조합 벡터(HPVE6/pJG4-5)을 LiAc/TE buffer를 사용하여 효모 (EGY48 [MATa, his3, trp1, ura3-52, leu2, pLeu2-LexAop6/pSH18-34 (LexAop-lacZ reporter)])에 도입하였다. vortex를 이용하여 잘 섞은 후 30℃ 진탕 배양기에서 30분간 배양하였다. 배양한 반응물에 DMSO를 넣고, 42℃ 진탕 배양기에서 30분간 heat shock하였다. 형질 전환체를 2% glucose를 포함하고 uracil, histidine, tryptophan이 없는 선택배지(Ura-, His-, Trp-)에 도말한 후, 30℃ 배양기에서 3-4일간 배양하였다. 분리된 두 단백질의 상호작용에 의해 전사와 관련된 기능을 수행하여 효모 내에서 lacZ와 LEU2 두 개의 reporter 유전자가 발현 되었다. 세포에 Z-buffer(60 mM Na2HPO4, 40mM NaH2PO4, 10mM KCl, 1mM MgSO4, 50mM β-

mercaptoethanol, pH 7.0)를 넣어 잘 섞었고, 액체질소에 30초간 넣었다. 상기 세포를 37℃로 옮겨서 용해시켰다. 4mg/ml o-nitrophenyl β -D -galactopyranoside(ONPG)와 X-gal을 첨가하여 섞었고, 30℃ 배양기에 배양하면서 색깔 변화를 확인하였다. β -galactosidase activity assay를 통해 푸른색으로 변한 결과로 lacZ 유전자가 발현된 것을 확인할 수 있었고, leucine 유전자 발현 확인은 leucine이 없는 배지에서 형질 전환된 콜로니를 형성하는 것으로 알 수 있었다(도 3) 상기 yeast two hybrid assay 결과 IRF-1 단백질과 파필로마 바이러스 E6 단백질이 상호 결합함을 알 수 있었다.

<24> 나. β -galactosidase 활성 측정

<25> 인간 IRF-1과 HPV 16형 E6 단백질의 상호작용을 β -galactosidase의 상대적인 발현 수준을 측정하여 한층 더 확인하였다. 이를 위해 IRF-1 및 HPV 16형 E6 각각의 유전자가 형질 도입된 상기 실시예 1 가의 효모(EGY48)를 2%의 glucose를 포함하고 uracil, histidine, tryptophan이 없는 선택배지 (Ura⁻, His⁻, Trp⁻)에서 mid-log phase에 이를 때까지 배양하였다. 그 후 효모를 2% glucose와 0.2% Me₂SO를 포함하고 uracil, histidine, tryptophan이 없는 선택배지(Ura⁻, His⁻, Trp⁻)로 옮겨서 배양하였다. 세포에 50ul의 0.1% SDS와 50ul의 클로로포름을 포함한 0.7ml의 Z-buffer(60 mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 50mM β -mercaptoethanol, pH 7.0)를 넣고 30℃에서 30초간 용해시킨 후 140 μ l 의 4 mg/ml o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside(ONPG)를 넣고 β -galactosidase 의 활성도를 측정하였다. 이 반응을 30℃에서 노란색이 나타날 때까지 진행하였고, 0.4ml의 1M Na₂CO₃를 넣어 반응을 멈추고, 원심분리를 통해 세포 잔해를 제거하였다. 그리고 420nm와 550nm에서 흡광도를 측정하였으며, β -galactosidase의 활성도는 다음과 같은 식을 통해 계산하였다.

<26> [식 1]

<27> β -galactosidase의 활성도 = $[1000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{550})] / (\text{time} \times \text{volume} \times A_{600})$.

<28> 이 상대 활성도 분석을 통해 IRF-1과 HPV 16형 E6가 결합하였음을 대조구와 비교하여 확인할 수 있었다(도 4).

<29> 다. 면역침전법

<30> 상기 실시예 1의 SalI 제한효소 부위를 갖는 재조합 DNA를 SalI 제한효소로 절단하고, elution (Qiagen)하고, pEGFP-C1 벡터(Clontech)에 ligase (promega)를 사용하여 삽입하여, 인간 IRF-1 유전자를 포함한 재조합 벡터(hIRF-1/pGILDA)를 제조하였다(도 5). 또한 상기 실시예 1의 말단에 EcoRI 서열과 XhoI 서열을 갖는 재조합 DNA를 각각의 제한효소로 절단하고, elution (Qiagen)하고, pcDNA4 / HisMax (Invitrogen Life Technologies)에 ligase (promega)를 사용하여 삽입하여, 인간 IRF-1 유전자를 포함한 재조합 벡터(HPV16E6-pcDNA4/HisMax)를 제조하였다(도 6).

<31> 면역침전법을 위해, SKOV-3 난소암 세포에 IRF-1 발현벡터 hIRF-1/pGILDA와 HPV16E6 발현벡터 HPV16E6-pcDNA4/HisMax를 FuGENE6(Roche Applied Science)을 이용하여 동시에 형질도입하였다. 상기 세포를 3일간 배양하였고, 트립신을 처리하여 세포를 걷어내었고, 이를 원심분리하여 얻은 세포를 완충용액 (50mM Tris, pH 7.2, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 2 μ g/ml aprotinin, 200 μ g/ml PMSF)으로 용해시켰다. 용해한 세포를 녹색 형광단백질 항체(anti-GFP antibody, Zymed Laboratories)로 처리하였고, protein A-agarose와 함께 침전시켰다. 침전된 단백질은 SDS-PAGE로 분리하였고, Immobilon P membrane (Milipore corporation)으로 트랜스퍼했다. 상기 Immobilon P membrane에 anti-Histone(Amersham) 또는 anti-IRF-1을 처리하였고, ECL system (Amersham)을 이용하여 X-ray film으로 검사하여 단백질을 확인하였다(도 7). 그 결과 인간 IRF-1과 HPV 16형 E6 단백질이 상호작용함을 알 수 있었다.

<32> 실시예 3. 형질전환에 의해 단백질 발현 후 신생혈관생성 억제 측정

<33> 가. 세포 증식 검사

<34> 실시예 2의 다에서 제조한 IRF-1 발현벡터 hIRF-1/pGILDA와 HPV16E6 발현벡터 HPV16E6-pcDNA4/HisMax를 FuGENE6(Roche Applied Science)을 이용하여 인간 태줄혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVECs)에 동시에 형질도입하였다. 두개의 벡터를 모두 형질도입시킨 세포, HPV16E6-pcDNA4/HisMax를 형질도입시킨 세포, 및 벡터에 유전자를 삽입하지 않은 대조군 세포를 각각 세포 배양 접시에 접종하였다. 18시간 후, 이 세포들은 1% 숏아지 혈청이 포함된 M199 배지로 바꾸어 6시간동안 배양하였다. 그 후 10ng/ml의 혈관내피세포성장인자(VEGF) (R&D Systems)를 포함하는 또는 포함하지 않은 위와 동일한 배지에서 24시간 동안 배양

하였다. 그 후 배지에 0.5 μ Ci/ml의 [3H]methylthymidine (Amersham)을 첨가하여 배양하였다. 4시간 후 10%의 trichloroacetic acid를 이용하여 높은 분자량을 가지는 [3H]-radioactivity 세포만 4°C에서 18시간 동안 침전시켰다. 이 세포들은 0.2 N의 NaOH와 0.1%의 SDS에 녹여져 liquid scintillation counter (Beckman)을 이용하여 cpm 값을 얻었다. 이를 분석한 결과 untreated cell 과 E6 발현 cell 의 proliferation level은 통계적 유의성이 없었으나, 인간 IRF-1과 HPV 16형 E6 단백질을 동시에 발현하도록 형질 전환시킨 인간 태줄혈관 내피세포의 세포증식이 벡터만 있는 또는 HPV 16형 E6 단백질 하나만을 발현하도록 형질전환 시킨 대조 인간 태줄혈관 내피세포에 비해 감소하는 것을 알 수 있었다(도 8).

<35> 나. 세포의 이동 및 전이 검사

<36> 실시예 2의 다에서 제조한 IRF-1 발현벡터 hIRF-1/pGILDA와 HPV16E6 발현벡터 HPV16E6-pcDNA4/HisMax를 FuGENE6(Roche Applied Science)을 이용하여 인간 태줄혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVECs)에 동시에 형질도입하였다. 두개의 벡터를 모두 형질도입시킨 세포, HPV16E6-pcDNA4/HisMax를 형질도입시킨 세포, 및 유전자를 삽입하지 않은 벡터만 도입한 대조군 세포들의 이동을 검사하기 위해서 Transwells (Costar, 8 μ m pore size)의 여과지 아래쪽 표면을 10ug의 젤라틴으로 도료하였고, 아래쪽 well에는 25ng/ml의 혈관내피세포성장인자(VEGF)와 1%의 송아지 혈청을 포함하는 M199 배지를 담았다. 이동한 세포들은 고정 용액으로 고정시켜 Hematoxylin 및 Eosin (H&E)으로 염색하였다. 이동하지 않은 세포들은 여과지 위쪽 표면을 닦아내어 제거하였다. 광학 현미경을 이용하여 아래쪽으로 이동한 세포의 개수를 세었으며 8개 지역의 평균 개수로 구하였다(도 9).

<37> 세포 전이 분석을 위해서 Transwells (Costar, 8 μ m pore size) 여과지의 아래쪽과 위쪽 표면을 각각 10ug의 젤라틴과 10ug의 Matrigel (BD Bioscience)로 도료하였다. 세포 고정과 정량 방법은 위의 세포 이동 분석에서 사용된 것과 동일한 방법을 사용하였다(도 10). 그 결과 인간 IRF-1과 HPV 16형 E6 단백질을 동시에 발현하도록 형질 전환시킨 인간 태줄혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVECs)가 벡터만 있는 또는 HPV 16형 E6 단백질 하나만을 발현하도록 형질도입한 대조군 인간 태줄혈관내피세포와 비교하여 세포 이동 및 전이가 억제되었음을 확인하였다(도 9, 도 10).

<38> 다. 혈관 형성(Tube formation) 검사

<39> 성장 인자를 감소시킨 10mg/ml의 Matrigel 200ul를 24-well plate에 넣고 37°C에서 30분간 중합반응 시켰다. 실시예 2의 다에서 제조한 IRF-1 발현벡터 hIRF-1/pGILDA와 HPV16E6 발현벡터 HPV16E6-pcDNA4/HisMax를 FuGENE6(Roche Applied Science)을 이용하여 형질 전환시킨 인간 태줄혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVECs), HPV16E6 발현벡터 HPV16E6-pcDNA4/HisMax만 도입한 세포, 유전자를 삽입하지 않은 벡터만 도입한 대조군 세포를 각각 Matrigel의 표면 위에 접종하였고, 10ng/ml의 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 포함하는 또는 포함하지 않는 1% 송아지 혈청이 들어있는 M199 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 이 세포들의 모양 변화는 디지털 CCD 카메라(Zeiss)가 장착된 역광 현미경 (Inverted microscope)을 이용하여 40 배율로 확대하여 촬영하였다. 인간 IRF-1과 HPV 16형 E6 단백질을 동시에 발현하도록 형질 전환시킨 인간 태줄혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVECs)가 벡터만 있는 또는 HPV 16형 E6 단백질 하나만을 발현하도록 형질전환 시킨 대조 인간 태줄혈관내피세포와 비교하여 혈관 형성이 억제되었음을 확인하였다(도 11).

<40> 또한 이들 세포의 혈관 길이는 ImageLab imaging 소프트웨어(MCM Design)를 사용하여 분석하고 정량화하였다. 그 결과 인간 IRF-1과 HPV 16형 E6 단백질을 동시에 발현하도록 형질 전환시킨 인간 태줄혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVECs)는 HPV16E6 발현벡터 HPV16E6-pcDNA4/HisMax만 도입한 세포, 유전자를 삽입하지 않은 벡터만 도입한 대조군 세포와 비교하여 새로 형성된 혈관의 길이가 더 짧았음을 확인하였다(도 12).

<41> 라. 단백질 제조

<42> glutathione S-transferase (GST) fusion 단백질(GST-IRF-1)을 얻기 위해 상기 실시예 1의 SalI 제한효소 부위를 갖는 재조합 DNA를 SalI 제한효소로 절단하고, elution (Qiagen)하고, pGEX4T 벡터(Amersham Biosciences)에 ligase (promega)를 사용하여 삽입하여, 인간 IRF-1 유전자를 포함한 재조합 벡터(hIRF-1/pGEX4T-1)를 제조하였다(도 13). 또한 histidine fusion 단백질(His-HPV 16 E6)을 얻기 위해 상기 실시예 1의 말단에 EcoRI 서열과 XhoI 서열을 갖는 재조합 DNA를 각각의 제한효소로 절단하고, elution (Qiagen)하고, pET29-a에 ligase (Novagen)를 사용하여 삽입하여, 인간 HPV 16 E6 유전자를 포함한 재조합 벡터(HPV16E6/pET29-a)를 제조하였다

(도 14). 상기 벡터를 FuGENE6(Roche Applied Science)을 이용하여 E. coli 균주에 도입하였다. 상기 E. coli 균주에서 발현되는 GST와 histidine fusion 단백질들은 각각 GST column (Amersham) 과 Ni²⁺ column (Invitrogen)을 이용하여 공급사의 지침에 따라 분리 정제하였다.

<43> **마. 닭 배아의 용모막요막(Chick chorioallantoic membrane)에서의 신생혈관생성(angiogenesis) 검사**

<44> 수정된 닭의 배아를 용모막 요막 검사를 위해 본 실험에 앞서 미리 5일간 70% 습도, 37℃에서 배양하였다. 수정란의 끝 지점에서 공기 낭 위로 구멍을 뚫고 배아의 용모막요막 위에 혈관이 없는 지역을 만들고 수정란의 껍데기에 용모막요막을 밖으로 노출시키기 위해 1.5 × 1.5cm의 창을 만들었다. 6일 더 배양한 후, 실시예 3의 라에서 생산한 IRF-1과 HPV 16형 E6 단백질을 thermanox coverslip (Nunc)에 놓았고, 공기중에 건조시킨 후 수정란의 용모막요막 표면 위에 올려놓았다. 3일 후, 1-2ml의 10% fat emulsion (Intrapolis)을 용모막에 주사하여 새로 생성된 혈관이 보이도록 하였다. 이들을 칼라 CCD 카메라(ProgResC14)와 모니터가 장착된 Axioskope2 plus 현미경(Carl Zeiss)으로 관찰하고 분석 및 촬영을 하였다. 이를 통해 IRF-1과 HPV 16형 E6 단백질을 처리한 닭 배아의 용모막요막의 신생혈관생성이 대조구와 비교하여 억제되었음을 관찰하였다(도 15).

<45> [참고문헌]

- Chrisofos M, Skolarikos A, Lazaris A, Bozris S, Deliveliotis Ch. 2004. HPV 16/18-associated condyloma acuminatum of the urinary bladder: first international report and review of literature. *Int J STD AIDS*. 15:836-838
- Desaintes C, Hallez S, Van Alphen P, Burny A. 1992. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol*. 66:325-333
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 338:423-428
- Jung WW, Chun T, Sul D, Hwang KW, Kang HS, Lee DJ, Han IK. 2004. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol* 42:255-266
- Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79-82
- Pasquier E, Andre N, Braquer D. 2007. Targeting microtubules to inhibit angiogenesis and disrupt tumour vasculature: implications for cancer treatment. *Curr. Cancer Drug Targets* 7:566-581
- Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*. 12:2061-2072
- Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. 2005. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 15:727-746
- Tang X, Zhang Q, Nishitani J, Brown J, Shi S, Le AD. 2007. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 13:2568-76
- Zhebe I, Wilander E. 1997. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: A study of prevalence and morphology. *J Pathol*. 181:270-275

<46>

산업이용 가능성

<47> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 인간 파필로마바이러스 16형 E6 단백질(human papillomavirus 16 E6, HPV E6) 유전자 또는 그 발현 단백질, 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 인터페론 조절인자-1 단백질(Interferon Regulatory Factor 1, IRF-1) 유전자 또는 그 발현단백질을 함유하는 신생혈관생성 억제용 약학적 조성물을 사용하여 신생혈관생성(angiogenesis)를 억제함으로써 암 전이를 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

<48> 도 1은 인간 IRF-1 유전자를 클로닝한 벡터와 그 제한효소 부위를 나타낸다.

<49> 도 2는 인간 파필로마 바이러스 E6 유전자를 클로닝한 벡터와 그 제한효소 부위를 나타낸다.

<50> 도 3은 Yeast two hybrid system을 이용하여 인간 IRF-1과 HPV16형 E6단백질의 결합을 확인하는 도면이다.

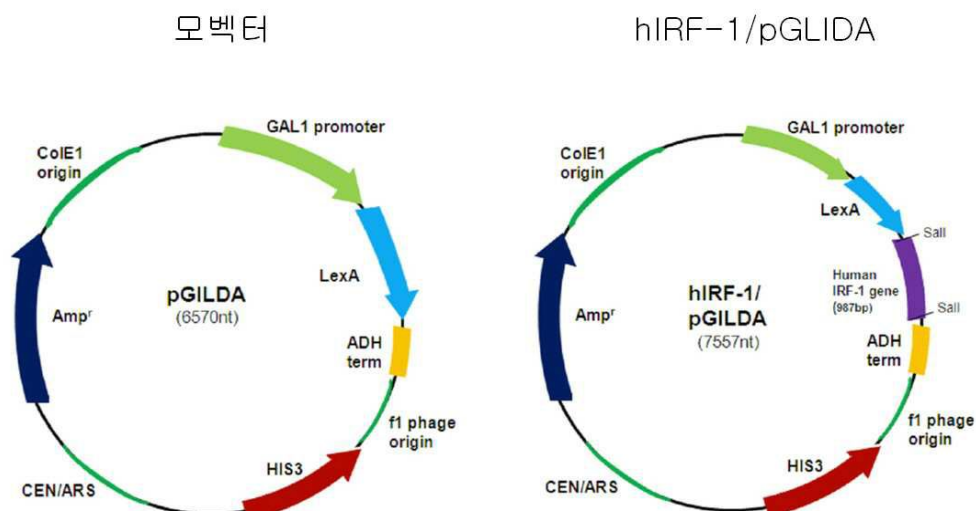
<51> 도 4는 HPV16형 E6 단백질이 인간 IRF-1에 결합하였음을 대조구와의 β-galactosidase 발광도 상대 활성(Relative activity) 비교를 통해 검증하는 도면이다.

<52> 도 5는 인간 IRF-1 유전자자의 발현벡터로 도입과 그 제한효소 부위를 나타낸다.

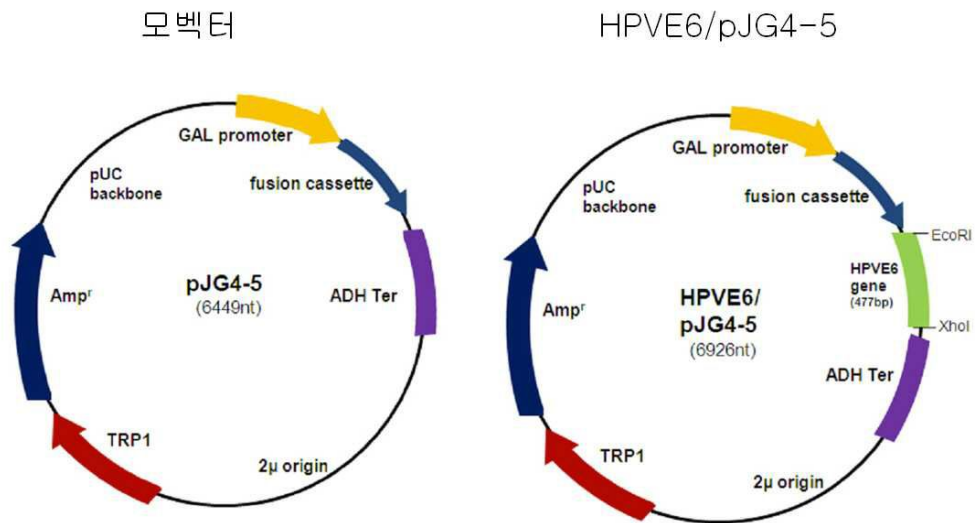
- <53> 도 6은 인간 파필로마 바이러스 E6 유전자의 발현벡터로 도입과 그 제한효소 부위를 나타낸다.
- <54> 도 7은 녹색형광단백질(GFP)과 연결시킨 HPV16형 E6 단백질과 결합한 인간 IRF-1를 녹색형광단백질의 항체(anti-GFP)를 이용하여 면역침전(immunoprecipitation)법과 Western-blot에 의해 확인하는 도면이다.
- <55> 도 8은 형질전환에 의해 인간 IRF-1와 HPV E6 단백질이 동시에 과발현된 인간 태줄혈관내피세포 (human umbilical vein endothelial cell)에 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 처리한 후 thymidine을 이용하여 인간 IRF-1와 HPV E6 단백질이 동시에 과발현된 인간 태줄혈관내피세포의 세포 증식이 대조구와 비교하여 감소함을 확인하는 도면이다.
- <56> 도 9는 형질전환에 의해 인간 IRF-1와 HPV E6 단백질이 동시에 과발현된 인간 태줄혈관내피세포 (human umbilical vein endothelial cell)의 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 처리한 후의 세포 이동(migration) 및 전이(invasion) 양상을 대조구와 비교하여 세포이동 및 전이가 감소됨을 확인하는 도면이다.
- <57> 도 10은 형질전환에 의해 인간 IRF-1와 HPV E6 단백질이 동시에 과발현된 인간 태줄혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cell)의 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 처리한 후의 이동(migration) 및 전이(invasion)된 세포 수를 대조구와 비교하여 이동 및 전이된 세포 수가 감소됨을 확인하는 도면이다.
- <58> 도 11은 형질전환에 의해 인간 IRF-1와 HPV E6 단백질이 동시에 과발현된 인간 태줄혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cell)의 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 처리한 후의 혈관형성(tube formation)이 대조구와 비교하여 억제됨을 확인하는 도면이다.
- <59> 도 12는 형질전환에 의해 인간 IRF-1와 HPV E6 단백질이 동시에 과발현된 인간 태줄혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cell)의 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 처리한 후 형성된 혈관 길이(tube length)가 대조구와 비교하여 감소됨을 확인하는 도면이다.
- <60> 도 13은 인간 IRF-1 유전자자의 발현벡터로 도입과 그 제한효소 부위를 나타낸다.
- <61> 도 14는 인간 파필로마 바이러스 E6 유전자의 발현벡터로 도입과 그 제한효소 부위를 나타낸다.
- <62> 도 15는 IRF-1와 HPV E6 단백질을 동시에 처리한 닭의 배아를 배양하였을 때 배아의 용모막요막 (Chick chorioallantoic membrane)의 신생혈관생성(angiogenesis)이 대조구와 비교하여 억제됨을 확인하는 도면이다.

도면

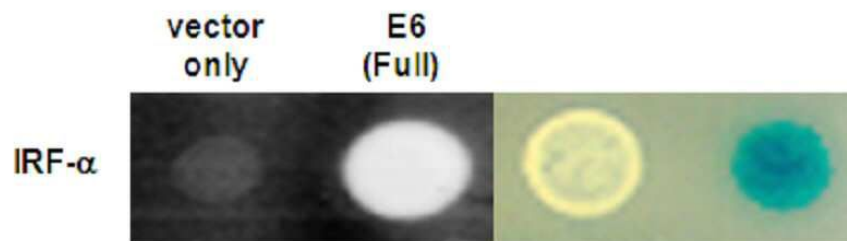
도면1



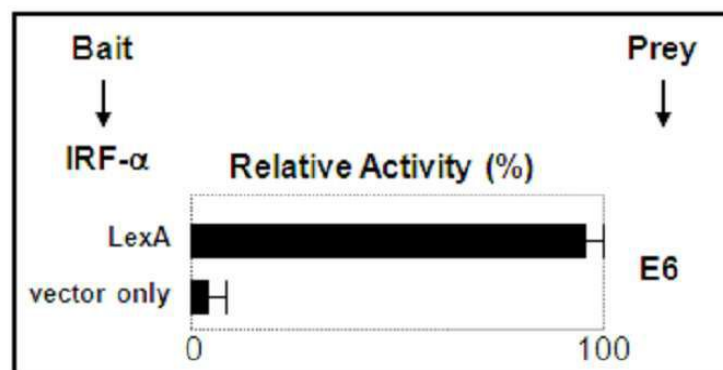
도면2



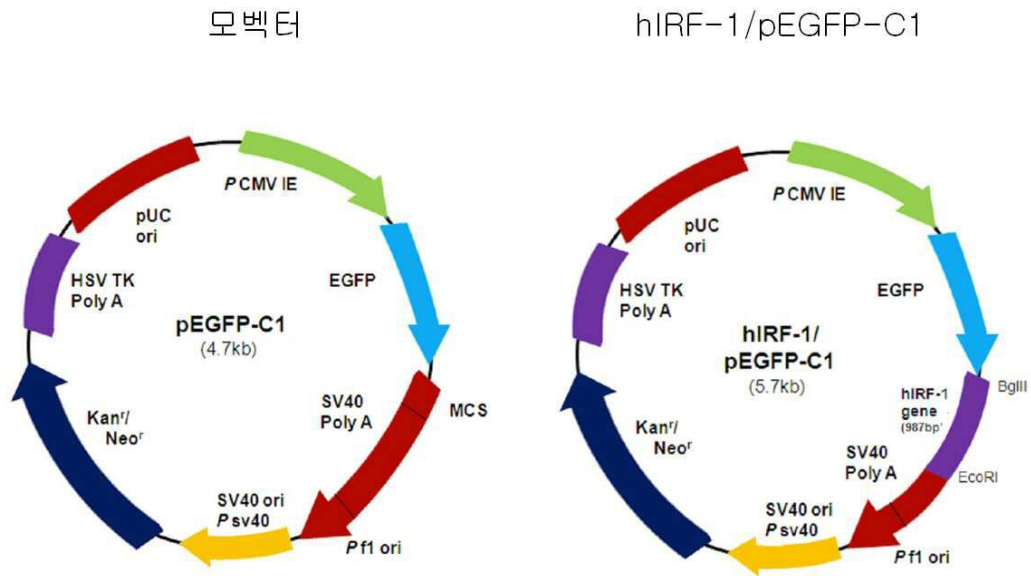
도면3



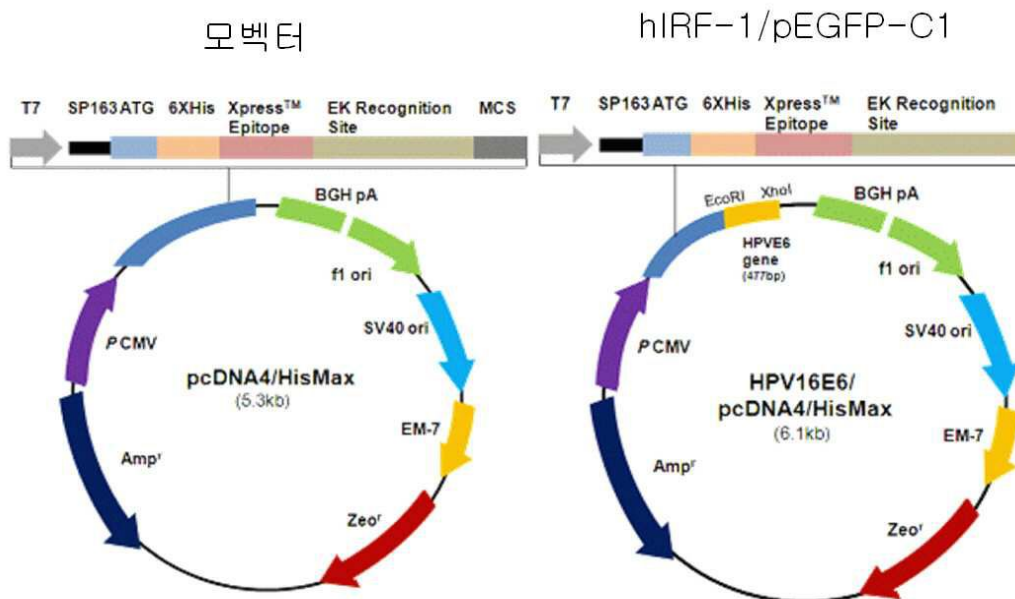
도면4



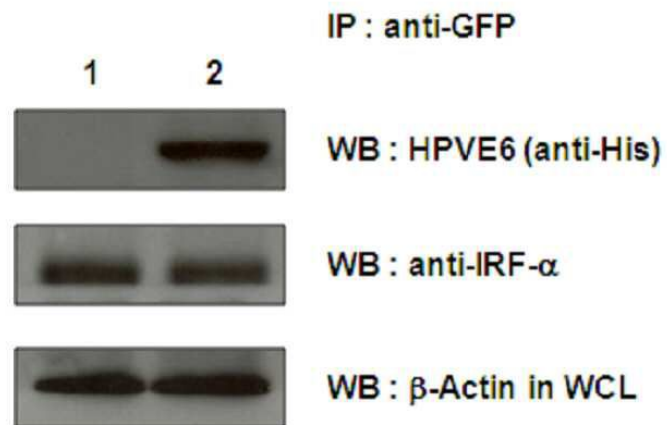
도면5



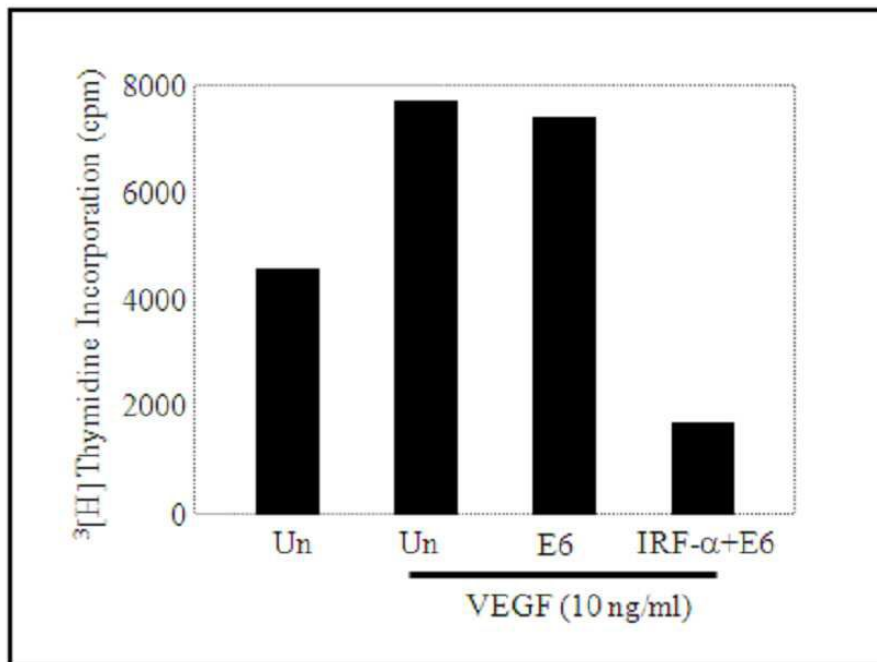
도면6



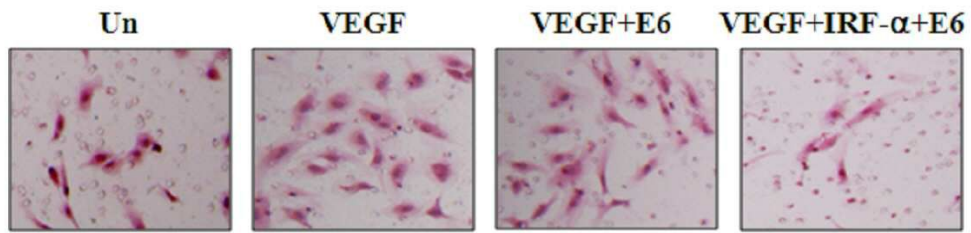
도면7



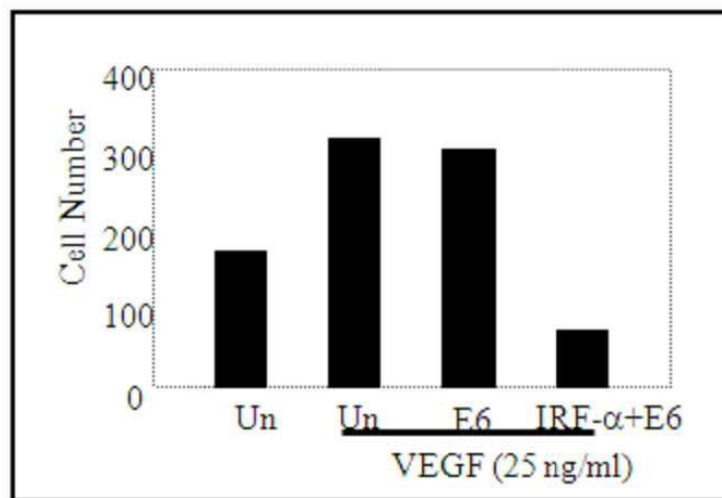
도면8



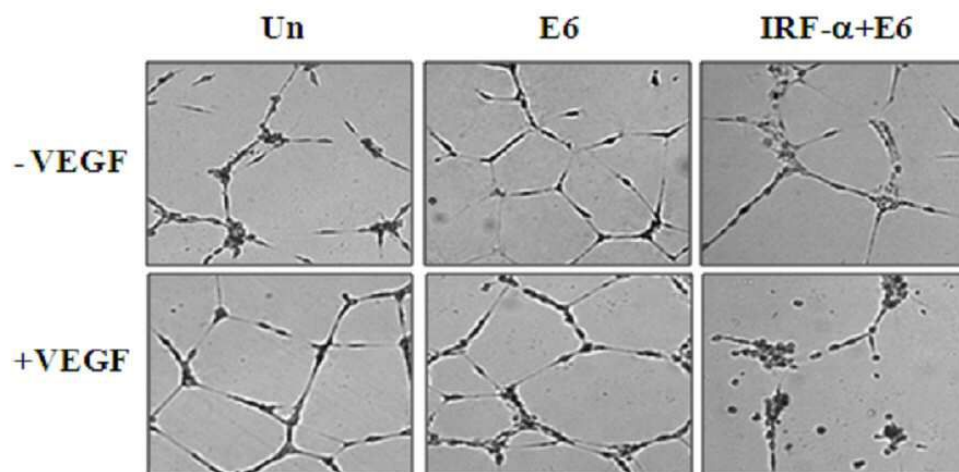
도면9



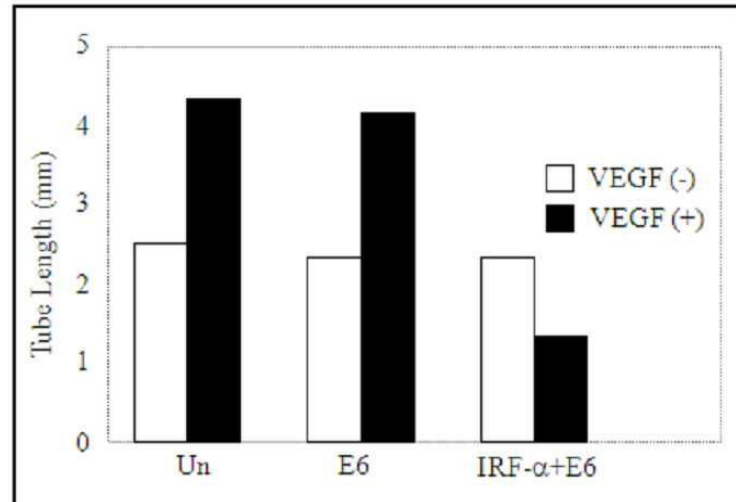
도면10



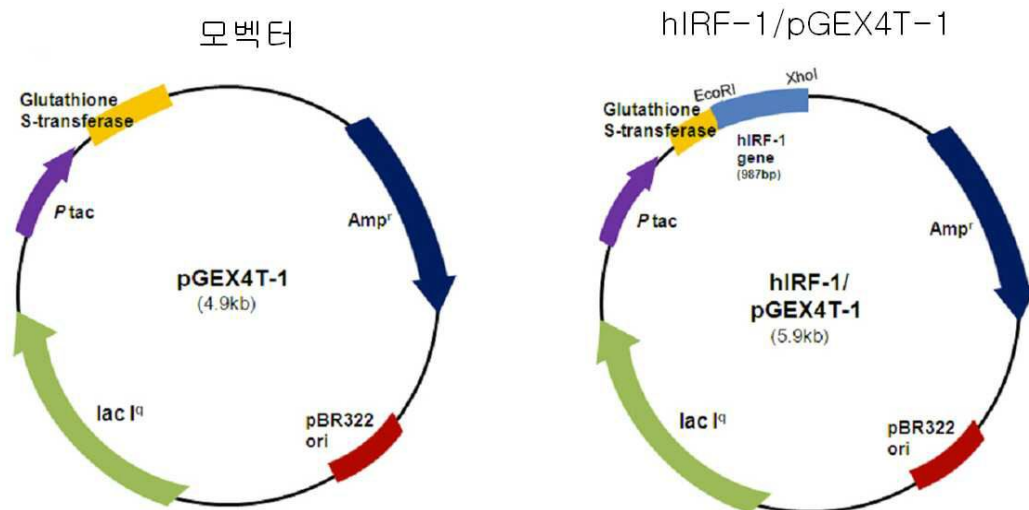
도면11



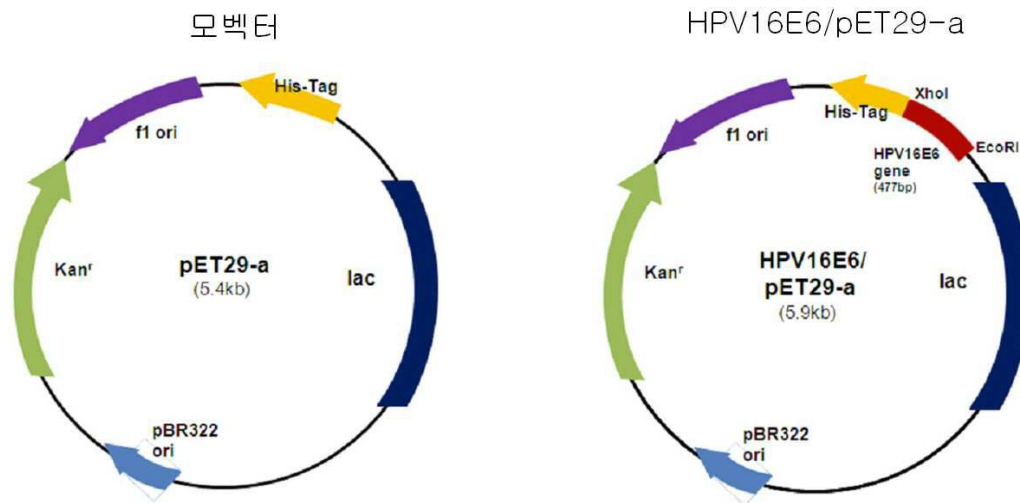
도면12



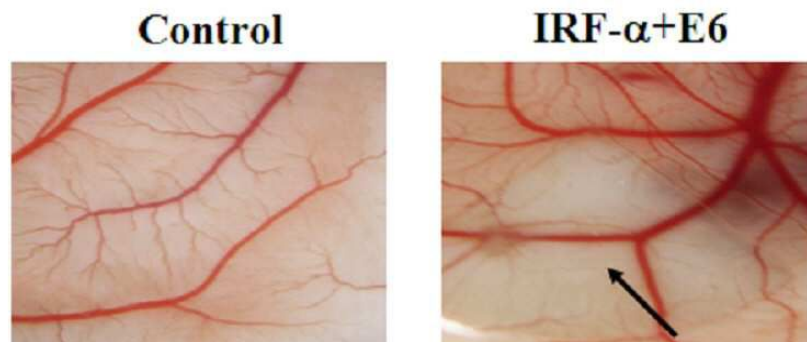
도면13



도면14



도면15



서 열 목 록

- <110> Korea University Industry Academy Cooperation Foundation
- <120> The Method of Inhibition for angiogenesis by interacting between Human papillomavirus 16 protein E6 and Interferon Regulatory Factor-1
- <160> 8
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 158
- <212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 1

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
20 25 30

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
35 40 45

Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
50 55 60

Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
65 70 75 80

Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
85 90 95

Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
100 105 110

Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
115 120 125

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
130 135 140

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150 155

<210> 2

<211> 325

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Ile Thr Arg Met Arg Met Arg Pro Trp Leu Glu Met Gln Ile
1 5 10 15

Asn Ser Asn Gln Ile Pro Gly Leu Ile Trp Ile Asn Lys Glu Glu Met

20	25	30
Ile Phe Gln Ile Pro Trp Lys His Ala Ala Lys His Gly Trp Asp Ile		
35	40	45
Asn Lys Asp Ala Cys Leu Phe Arg Ser Trp Ala Ile His Thr Gly Arg		
50	55	60
Tyr Lys Ala Gly Glu Lys Glu Pro Asp Pro Lys Thr Trp Lys Ala Asn		
65	70	75
80		
Phe Arg Cys Ala Met Asn Ser Leu Pro Asp Ile Glu Glu Val Lys Asp		
85	90	95
Gln Ser Arg Asn Lys Gly Ser Ser Ala Val Arg Val Tyr Arg Met Leu		
100	105	110
Pro Pro Leu Thr Lys Asn Gln Arg Lys Glu Arg Lys Ser Lys Ser Ser		
115	120	125
Arg Asp Ala Lys Ser Lys Ala Lys Arg Lys Ser Cys Gly Asp Ser Ser		
130	135	140
Pro Asp Thr Phe Ser Asp Gly Leu Ser Ser Ser Thr Leu Pro Asp Asp		
145	150	155
160		
His Ser Ser Tyr Thr Val Pro Gly Tyr Met Gln Asp Leu Glu Val Glu		
165	170	175
Gln Ala Leu Thr Pro Ala Leu Ser Pro Cys Ala Val Ser Ser Thr Leu		
180	185	190
Pro Asp Trp His Ile Pro Val Glu Val Val Pro Asp Ser Thr Ser Asp		
195	200	205
Leu Tyr Asn Phe Gln Val Ser Pro Met Pro Ser Thr Ser Glu Ala Thr		
210	215	220
Thr Asp Glu Asp Glu Glu Gly Lys Leu Pro Glu Asp Ile Met Lys Leu		
225	230	235
240		
Leu Glu Gln Ser Glu Trp Gln Pro Thr Asn Val Asp Gly Lys Gly Tyr		
245	250	255

Leu Leu Asn Glu Pro Gly Val Gln Pro Thr Ser Val Tyr Gly Asp Phe
260 265 270

Ser Cys Lys Glu Glu Pro Glu Ile Asp Ser Pro Gly Gly Asp Ile Gly
275 280 285

Leu Ser Leu Gln Arg Val Phe Thr Asp Leu Lys Asn Met Asp Ala Thr
290 295 300

Trp Leu Asp Ser Leu Leu Thr Pro Val Arg Leu Pro Ser Ile Gln Ala
305 310 315 320

Ile Pro Cys Ala Pro
325

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5 prime PCR primer for IRF1

<400> 3
acgcgtcgaa tgcccatcac tcggat 26

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3 prime PCR primer for IRF1

<400> 4
acgcgtcgac tacggtgcac aggga 25

<210> 5
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5 prime PCR primer for papillomavirus E6

<400> 5

cgaattatgc accaaaagag aact

24

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3 prime PCR primer for papillomavirus E6

<400> 6

cctcgattac agctgggttt c

21

<210> 7

<211> 477

<212> DNA

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 7

atgcacaaa agagaactgc aatgtttcag gaccacagg agcgaccag aaagttacca

60

cagttatgca cagagctgca aacaactata catgatataa tattagaatg tgtgtactgc

120

aagcaacagt tactgcgacg tgaggtatat gactttgctt ttcgggattt atgcatagta

180

tatagagatg ggaatccata tgctgtatgt gataaatggt taaagtttta ttctaaaatt

240

agtgagtata gacattattg ttatagtttg tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac

300

aaaccgttgt gtgatttggt aattaggtgt attaactgtc aaaagccact gtgtcctgaa

360

gaaaagcaaa gacatctgga caaaaagcaa agattccata atataagggg tcggtggacc

420

ggtcgatgta tgtcttgttg cagatcatca agaacacgta gagaaacca gctgtaa 477

<210> 8
 <211> 978
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 atgcccatca ctcgatgcg catgagacc tgctagaga tgcagattaa ttccaacaa 60

atccccgggc tcatctggat taataaagag gagatgatct tccagatccc atggaagcat 120

gctgccaagc atggctggga catcaacaag gatgcctgtt tgttcggag ctgggccatt 180

cacacaggcc gatacaaagc aggggaaaag gagccagatc ccaagacgtg gaaggccaac 240

tttcgtgtg ccatgaactc cctgccagat atcgaggagg tgaaagacca gagcaggaac 300

aagggcagct cagctgtgcg agtgtaccgg atgcttcac ctctaccaa gaaccagaga 360

aaagaaagaa agtcgaagtc cagccgagat gctaagagca aggccaagag gaagtcatgt 420

ggggattcca gccctgatac cttctctgat ggactcagca gctccactct gcctgatgac 480

cacagcagct acacagtcc aggctacatg caggacttgg aggtggagca ggccctgact 540

ccagcactgt cgccatgtgc tgtcagcagc actctccccg actggcacat cccagtggaa 600

gttgtgccgg acagcaccag tgatctgtac aacttcagg tgtcacccat gccctccacc 660

tctgaagcta caacagatga ggatgaggaa gggaaattac ctgaggacat catgaagctc 720

ttggagcagt cggagtggca gccacaacac gtggatggga aggggtacct actcaatgaa 780

cctggagtcc agcccacctc tgtctatgga gactttagct gtaaggagga gccagaaatt 840

gacagcccag ggggggatat tgggctgagt ctacagcgtg tcttcacaga tctgaagaac 900

atggatgcca cctggctgga cagcctgtctg acccagctcc ggttgccctc catccaggcc 960

attccctgtg caccgtag

978