



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년04월01일
(11) 등록번호 10-0818752
(24) 등록일자 2008년03월26일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0095742

(22) 출원일자 2006년09월29일

심사청구일자 2006년09월29일

(56) 선행기술조사문헌

US5962652 A

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전 유성구 장동 100번지

(72) 발명자

김은희

대전 유성구 전민동 엑스포아파트 109동 1004호

이윤숙

대전 서구 도마1동 20-32번지 45통 1반

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이현실, 장성구

전체 청구항 수 : 총 3 항

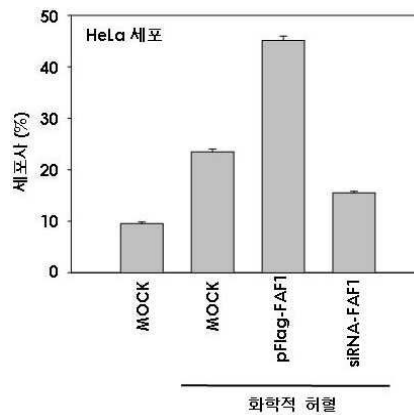
심사관 : 김윤경

(54) 인간 FAF1 단백질 억제제를 유효성분으로 함유하는허혈성 질환 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인간 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 억제하는 물질을 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 치료 또는 예방용 조성물, 및 FAF1 유전자 또는 FAF1 단백질에 대한 항체를 이용하여 허혈성 세포사를 억제하는 후보물질을 검색 (screening)하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 세포 내 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 효과적으로 억제하여 허혈성 세포사를 현저히 감소시킬 수 있으므로, 허혈성 세포사에 의해 매개되는 뇌허혈, 심장허혈, 당뇨병성 혈관심장질환, 심부전, 심근비대증, 망막허혈, 허혈성 대장염 및 허혈성 급성 신부전증 등의 허혈성 질환의 치료 및 예방에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

정용삼

대전 유성구 신성동 144-2번지 대원빌라 102호

유성은

충청남도 공주시 장기면 금암리 314-16번지

서지희

대전 유성구 어은동 한빛아파트 107동 603호

채순기

대전 서구 내동 맑은아침아파트 109동 1504호

이공주

서울 양천구 목6동 신시가지 아파트 203동 404호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 3의 염기서열을 갖는 정방향 단일가닥 siRNA(small interfering RNA) 및 서열번호: 4의 역방향 단일가닥 siRNA로 구성된 이중가닥 siRNA,

서열번호: 5의 염기서열을 갖는 정방향 단일가닥 siRNA 및 서열번호: 6의 역방향 단일가닥 siRNA로 구성된 이중가닥 siRNA, 및

서열번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는

인간 FAF1(Fas-associated factor 1, 파스 관련 인자 1) 단백질의 발현 또는 기능을 억제하는 물질을 유효성분으로 함유하는, 허혈성 질환의 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 허혈성 질환이 허혈성 세포사에 의해 매개되는 뇌허혈, 심장허혈, 당뇨병성 혈관심장질환, 심부전, 심근비대증, 망막허혈, 허혈성 대장염 및 허혈성 급성 신부전증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

서열번호: 3의 염기서열을 갖는 정방향 단일가닥 siRNA 및 서열번호: 4의 역방향 단일가닥 siRNA로 구성된 이중가닥 siRNA를 이용하여 FAF1 mRNA를 적중시키는 방법,

서열번호: 5의 염기서열을 갖는 정방향 단일가닥 siRNA 및 서열번호: 6의 역방향 단일가닥 siRNA로 구성된 이중가닥 siRNA를 이용하여 FAF1 mRNA를 적중시키는 방법, 및

서열번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 FAF1과 결합시켜 FAF1이 매개하는 생리 활성을 억제하는 방법으로 이루어진 군에서 선택되는,

허혈성 세포사 억제가 필요한 인간을 제외한 포유동물에서 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 억제하여 허혈성 세포사를 억제하는 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <16> 본 발명은 인간 FAF1 단백질 억제제를 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 치료용 조성물, 인간 FAF1 단백질을 억제하여 허혈성 세포사를 억제하는 방법 및 허혈성 세포사에 관련된 후보물질을 검색하는 방법에 관한 것이다.
- <17> 허혈 (ischemia)은 혈관의 수축 또는 폐색에 의해 유발되는 신체기관, 조직 또는 부위로의 혈액공급의 감소 상태를 말한다. 허혈 후에는 혈액의 재관류 (reperfusion)가 일어나더라도 신경세포가 손상되어 여러 가지 후유증이 야기된다. 이러한 허혈은 종종 관상동맥 질환, 심장혈관 질환, 협심증, 두통 또는 기타의 혈관 증상들과 관련된다. 이와 같은 허혈은 궁극적으로 비가역적인 손상, 즉 세포 및 조직의 괴사로 이어지게 된다.
- <18> 이러한 허혈/재관류시의 세포 손상과 기능 저하에 의해 발생하는 심근 경색, 부정맥, 부전증 등의 허혈성 질환은 유병률 및 사망률이 높고 완치가 어려워 지난 50년 동안 집중적인 기초 연구 및 임상 연구가 진행되어 왔다 (문헌 [Wang, Q. D. et al., *Cardiovasc. Res.* 55:25-37, 2002] 참조). 허혈/재관류 손상은 대사, 면역반응 및 이온항상성의 변화, 산소유리기 등 다양한 생리학적 기전이 관여되므로 면역조절 물질, 세포사멸 관련물질, 이온통로 조절물질 등 다양한 분야에서 연구가 이루어지고 있다 (문헌 [Hearse, D. J. et al., *Mol. Cell. Biochem.* 186:177-184, 1998] 참조). 현재까지 기전연구와 함께 새로운 작용점에 의한 치료제의 개발 및 외과적 시술의 개발 등이 활발히 이루어졌으나 허혈/재관류로부터 심근세포를 보호할 수 있는 기술이 아직 임상적으로 상용화되지 못하였다. 따라서, 허혈에 의한 심근세포 손상의 진행을 늦추고 재관류 손상을 완화시킬 수 있는 허혈성 심장 질환의 예방 및 치료제, 또는 심장 보호제의 개발이 요구되고 있다.
- <19> 또한, 허혈이 혈액 흐름의 복귀에 의해 없어질 경우, 활성산소종 (ROS)의 생성이 가속화되고, 이는 훨씬 더 현저한 글루타티온 (glutathione)의 감소를 야기하여 좀더 심각한 질환의 발생을 초래한다는 것이 점차 명백해지고 있다. 유사한 질환이 심장, 간, 폐, 췌장 및 혈관과 같은 각종 기관의 이식시 혈액 흐름의 정지 또는 복귀시에 관찰된다. 상기 질환은 또한 기관의 절개 및 제거시에도 문제가 된다. 질병을 야기하는 것으로 추정되는 활성산소 및 반응성 자유라디칼이, 조직을 구성하는 세포질 세포 및 세포 소기관, 특히 세포의 주 에너지원으로 기여하는 ATP를 생산하는 미토콘드리아 양자에서 검출된다. 미토콘드리아에서는 호흡 사슬이 상기 반응성 분자의 주 배출원이며 그 농도가 허혈 및 재관류 동안 현저하게 상승하게 된다는 것이 관찰되었다.
- <20> 허혈/재관류 손상은 본질적인 세포사의 원인인 세포질 내 Ca^{2+} 와 활성산소종 생성의 증가에 의한 것이다. 활성산소종에 의해 유도되는 DNA 가닥 분해는 세포사멸 (apoptosis)이나 세포괴사 (necrosis)시 에너지원인 NAD^+ 와 ATP의 과다한 소모로 인하여, 핵 효소인 폴리(ADP-라이보스)폴리머라아제-1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1)의 과활성화를 유도한다. PARP-1의 활성화는 AIF (apoptosis inducing factor)의 미토콘드리아에서 핵으로의 이동, DNA 응축과 절편화를 이루는 세포사를 유도하며, 이 경로는 NAD^+ 결핍과 캐스파아제 (caspase)에 비의존적이다 (문헌 [van Wijk, S. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* 39:81-90, 2005] 참조).
- <21> 허혈성 질환의 경우, 허혈에 의해 세포사멸 또는 세포괴사가 유발되며, 특히 재관류 후 세포사멸이 조직 손상의 주원인이 되므로, 허혈성 세포사가 뇌허혈, 심장허혈, 당뇨병성 혈관심장질환, 심부전, 심근비대증, 망막허혈,

허혈성 대장염 및 허혈성 급성 신부전증 등을 포함하는 다양한 허혈성 질환의 발병 원인으로 된다.

- <22> 허혈성 질환의 일종인 뇌허혈의 경우, 혈액 공급의 감소로 에너지원이 고갈되어 허혈성 세포사가 유발되고, 허혈성 세포사는 세포막 수용체를 과다하게 활성화시키고, 세포 외부에는 글루타민산을 축적하고 세포 내부에 칼슘이 축적하여 지질, 단백질 및 핵산을 손상시키는 등의 다양한 생화학적 변화를 수반하며, 결국 뇌조직의 손상을 초래한다 (문헌 [Liu, P. K., *J. Biomed. Sci.* 10:4-13, 2003; Lipton, P., *Physiol. Rev.* 79:1431-1568, 1999; 및 Renolleau, S. et al., *Stroke* 29:1454-1460, 1998] 참조).
- <23> 허혈성 심장 질환, 심근경색, 부정맥 및 심부전의 경우에는, 지질 효소 활성화에 의하여 세포막이 손상되고, pH 변화 및 칼슘 이동이 유발되어 허혈성 세포사가 발생한다고 보고되고 있고 (문헌 [Ferrari, R. *Rev. Port. Cardiol.* 5:7-20, 2000; Webster, K. A. et al., *J. Clin. Invest.* 104:239-252, 1999; Katz, A. M. et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2:11-20, 1985; 및 Vandeplasseche, G. et al. *Basic Res. Cardiol.* 85:384-391, 1990] 참조), 망막허혈의 경우에는 글루타민산염에 의해 매개 되는 망막세포 사멸과 허혈성 세포사가 연관되어 있음이 알려져 있으며 (문헌 [Napper, G. A. et al., *Vis. Neurosci.* 16:149-158, 1999] 참조), 대장의 불충분한 혈류공급으로도 허혈성 세포사가 일어나며, 세포괴사에 의해 동맥의 폐쇄 손상과 체액 이상에 의해 허혈성 질환인 허혈성 대장염이 나타난다 (문헌 [Saegesser, F. et al., *Pathobiol. Annu.* 9:303-337, 1979] 참조).
- <24> 또한, 허혈성 세포사를 억제하는 테트라사이클린 계열의 항생제인 미노사이클린이 뇌경색 (문헌 [Yrjanheikki, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13496-13500, 1999] 참조), 심근경색 (문헌 [Scarabelli, T. M. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 43:865-874, 2004] 참조) 및 허혈성 급성 신부전증 (문헌 [Wang, J. et al., *J. Biol. Chem.* 279:19948-19954, 2004] 참조) 등의 허혈성질환의 치료에도 효과가 있으므로, 허혈성 세포사상기 질병의 원인이 됨을 알 수 있다.
- <25> 한편, 허혈시 죽음유도리간드 (death inducing ligand, DIL)로 알려진 CD95L, TRAIL 및 TNF α 의 방출량이 증가하므로, 특히 허혈성 질환에서 세포사멸 과정의 조절은 매우 중요하다고 할 수 있다.
- <26> Fas (일명, CD95 또는 Apo1)는 잘 규명된 세포사멸 수용체들 중의 하나이다. Fas 및 Fas 리간드 (FasL)는 세포사멸에 중요한 역할을 한다. FasL 3개가 Fas 분자 3개에 결합되면, 데쓰 도메인 (death domain, DD) 및 데쓰 이펙터 도메인 (death effector domain, DED)으로 구성된 FADD (Fas-associated death domain)라 불리는 어댑터 (adaptor) 단백질이 DD를 통해 Fas의 DD에 결합한다. FADD의 DED가 비활성 캐스파아제-8 (일명, FLICE 또는 MACH)의 DED와 결합하면, 캐스파아제-8이 활성화되고, 활성화된 캐스파아제-8은 세포사멸을 일으키게 하는 하류의 이펙터 (effector) 캐스파아제를 활성화시킨다 (문헌 [Marsters, S. A. et al., *Curr. Biol.* 8:525-528, 1998] 참조).
- <27> FAF1은 효모 2-하이브리드 (yeast 2-hybrid) 시스템 스크리닝을 통해 Fas 수용체와 결합하는 단백질로 처음 보고되었다 (문헌 [Chu, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:11894-11898, 1995] 참조). FAF1은 Fas의 세포질 내 도메인과 결합하는 단백질이지만, 기존의 DD 없이 Fas와 결합하는 단백질 중 하나이다 (문헌 [Ryu, S. W. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 1027-1032, 2001] 참조). FAF1은 Fas에 의하여 유도되는 세포사멸을 증가시키는 능력을 가지며, Fas의 신호 없이도 BOSC 세포에서 FAF1의 과발현시 세포사를 일으킬 수 있는 세포사 촉진 단백질 (pro-apoptotic protein)이다. 또한 FAF1은 Fas, FADD, 캐스파아제-8과 Fas-죽음 유도 신호 복합체 (Fas-death inducing signaling complex, Fas-DISC)를 이루어 세포사를 유도한다 (문헌 [Ryu, S. W. et al., *J. Biol. Chem.* 278:24003-24010, 2003] 참조). 또한 수용체 비의존성 세포사 경로에도 관여하여, 기존의 항암제에 의한 암세포의 세포사 민감성을 증진시킬 수 있다고 보고되고 있다.
- <28> 데쓰 이펙터 필라멘트 (death effector filament, DEF)는 DED의 집합체 중의 하나인 새로운 세포골격 구조체로서, 이의 형성은 비수용체 세포사를 일으킨다. DEF를 형성하는 단백질로는 DED나 DD를 포함하는 FADD, TRADD, 캐스파아제-8, 캐스파아제-2, 캐스파아제-10 등이 보고되어 있다 (문헌 [Perez, D. et al., *J. Cell Biol.* 141: 1255-1266, 1998; Tsukumo, S. I. et al., *Genes Cells.* 4:541-549, 1999; 및 Shikama, Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:484-493, 2002] 참조).
- <29> 본 발명자들은 선행 연구에서, FAF1을 과발현시킨 세포에서 항암제 감수성이 증가됨을 관찰하였으며, FAF1이 DEF 집합체의 새로운 구성원으로서 항암제 유도 세포사를 증가시킴을 확인하였다 (문헌 [Park, M. Y. et al., *Int. J. Cancer.* 115:412-418, 2005] 참조).
- <30> 이에, 본 발명자들은 허혈성 세포사 활성의 조절자로서 작용하는 신규 단백질을 찾기 위해 연구를 계속한 결과, FAF1을 세포 내에서 과발현시키면 허혈성 세포사가 촉진되고, FAF1의 siRNA 또는 우성-음성 FAF1에 의한 FAF1의

발현 또는 기능 억제에 의해 허혈성 세포사가 억제됨을 밝힘으로써, FAF1이 허혈성 세포사 과정에서 필수적인 단백질임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

<31> 나아가, 본 발명자들은 허혈성 세포사의 여러 경로 중 FAF1이 캐스파아제 비의존적 세포사에서 필수적이며, 활성산소종의 생성, PARP-1 활성화, AIF의 핵 이동 경로를 통하여 허혈성 세포사 과정에서 중요한 역할을 수행함을 확인하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<32> 따라서, 본 발명의 목적은 허혈성 세포사를 효과적으로 억제할 수 있는 허혈성 질환 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

<33> 본 발명의 다른 목적은 허혈성 세포사를 효과적으로 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

<34> 본 발명의 또 다른 목적은 허혈성 세포사에 관련된 후보물질을 효과적으로 검색하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<35> 상기 목적에 따라, 본 발명은 인간 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 억제하는 물질을 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환의 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

<36> 상기 다른 목적에 따라, 본 발명은 허혈성 세포사 억제가 필요한 대상의 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 억제하여 허혈성 세포사를 억제하는 방법을 제공한다.

<37> 상기 또 다른 목적에 따라, 본 발명은 FAF1 유전자 또는 FAF1 단백질에 대한 항체를 이용하여 허혈성 세포사를 억제하는 후보물질을 검색하는 방법을 제공한다.

<38> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<39> 본 발명에 사용된 용어 'FAF1 단백질'은 허혈성 세포사 과정에서 필수적인 역할을 담당하여 허혈성 세포사를 강화시키는 단리된 (isolated) 천연 (native) 폴리펩타이드 (polypeptide)를 의미하며, 구체적으로 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 및 이들의 스플라이싱 및 대립형질 변이체를 포함한다.

<40> 상기 '천연 폴리펩타이드'는 사람 또는 사람이외의 포유동물 종의 모든 세포 유형에 존재하는 폴리펩타이드로서 개시 메티오닌이 존재하거나 존재하지 않는 모든 것을 포함할 뿐만 아니라 천연 공급원으로부터 정제, 화학적으로 합성 또는 DNA 재조합 기술에 의해 생성되거나, 이들 및/또는 기타 방법의 조합에 의해 제조된 모든 것을 포함한다. 이런 관점에서 사람은 물론, 돼지, 개, 말 등과 같은 다른 포유동물 종으로부터 수득된 천연 폴리펩타이드 또한 본 발명에 포함된다.

<41> 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 관련하여 사용된 용어인 '단리된'은 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 천연 환경에서 결합되어 있는 물질중 적어도 일부로부터 그 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산이 유리된 상태를 의미한다.

<42> 본 발명의 허혈성 질환 치료용 조성물은 인간 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 효과적으로 억제하는 물질을 유효성분으로 함유함을 특징으로 한다.

<43> 상기 인간 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 억제하는 물질로는, 통상적으로 mRNA 수준에서 FAF1 유전자를 적중 (knock-out)시키는 안티센스 (antisense) RNA, iRNA (interfering RNA) 및 siRNA (small interfering RNA), 및 상기 발현 억제 RNA들을 세포 내에 도입시킬 수 있는 RNA 발현벡터; 우성-음성 (dominant-negative, DN) FAF1 단백질; FAF1 유전자의 전사 (transcription) 억제제 (inhibitor); 전사된 FAF1 mRNA의 번역 (translation) 억제제; FAF1 단백질의 세포 내 특정 위치로의 이동 (localization) 억제제; 및 FAF1 단백질에 대한 항체 등이 사용될 수 있다. 이 중에서 적은 양으로도 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 특이적이면서 효과적으로 억제할 수 있는 siRNA 및 우성-음성 FAF1 단백질이 바람직하다.

<44> siRNA로 명명되는 작은 RNA 조각은 이중가닥 RNA (double-stranded RNA)가 다이스 (Dicer) 효소에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 단백질 발현을 억제하는데 사용할 수 있다. siRNA는 전사에 연루된 유전자의 영역에 상보되도록 설계되므로 FAF1 단백질의 전사 및 생성을 억제시킬 수 있다.

<45> 본 발명에서는, 인간 FAF1 단백질의 발현을 억제하는 물질로서 19 염기쌍으로 구성된 siRNA를 제공하며, 바람직

하계는 서열번호: 3의 염기서열을 갖는 정방향 단일가닥 siRNA 및 서열번호: 4의 역방향 단일가닥 siRNA로 구성된 이중가닥 인간 FAF1 siRNA, 및 서열번호: 5의 염기서열을 갖는 정방향 단일가닥 siRNA 및 서열번호: 6의 역방향 단일가닥 siRNA로 구성된 이중가닥 랫트 FAF1 siRNA를 제공한다.

- <46> 또한, 본 발명에서는, 인간 FAF1 단백질의 기능을 억제하는 물질로서 우성-음성 FAF1 단백질을 제공하며, 바람직하게는 서열번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 우성-음성 FAF1 단백질 FAF1[366-650] (FAF1- Δ FID·DEDID) (도 15 참조)을 제공한다. 상기 FAF1[366-650]은 서열번호: 1의 아미노산을 갖는 FAF1 단백질의 366 내지 650번째 아미노산을 포함하며 FAF1의 fas-결합영역 (fas-interacting domain, FID) 및 DED-결합영역 (DED-interacting domain, DEDID)이 결실된 돌연변이체이고 서열번호: 8의 염기서열을 갖는 DNA로 암호화된다 (문헌 [Ryu, S. W. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262:388-394, 1999; 및 Ryu, S. W. et al, *J. Biol. Chem.* 278:24003-24010, 2003] 참조).
- <47> 상기 우성-음성 FAF1 단백질에는 그의 기능적 유도체 (functional derivative)가 포함된다. 용어 '기능적 유도체'는 통상적으로 천연 폴리펩타이드와 실질적으로 대등한 생물학적 활성을 나타내는 화합물을 의미하며, 본 발명의 목적상, FAF1 단백질의 기능적 유도체가 허혈성 세포사를 억제하므로 FAF1과 동등한 생물학적 활성을 갖는다는 것은 상기 유도체가 FAF1과 결합하여 FAF1이 매개하는 생리 활성을 억제하는 것을 의미한다.
- <48> 본 발명에 따른 우성-음성 FAF1 단백질의 기능적 유도체는 천연 FAF1 단백질, 바람직하게는 사람 FAF1 단백질과 바람직하게는 약 60% 이상, 더욱 바람직하게는 약 70% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 약 80% 이상, 가장 바람직하게는 약 90% 이상의 아미노산 서열 유사성 (sequence homology)을 갖고, 고유의 생물학적 활성이 멸실되지 않는 천연 단백질의 아미노산 중 일부가 치환, 결실 또는 부가 등에 의해 변이된 아미노산 서열 변형체를 포함한다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예로는 지방족 아미노산 (Gly, Ala, Pro), 소수성 또는 방향족 아미노산 (Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산 (Asp, Glu), 염기성 아미노산 (His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황-함유 아미노산 (Cys, Met)이 있다.
- <49> 한편, 여러 포유동물 종으로부터 얻은 FAF1 단백질의 단편 (fragment)으로서 천연의 FAF1과 실질적으로 대등한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩타이드는 FAF1 단백질의 기능적 유도체의 또 다른 바람직한 그룹을 형성한다. 용어 '단편'은 단백질의 일부에 해당하는 아미노산 서열로서, 본 발명의 범위 내에 속하는 공통의 기원 요소, 구조 및 작용 메커니즘을 가진 것을 말하며 천연에 존재하는 것이거나, 프로테아제를 사용하여 절단한 것이거나 화학적으로 절단된 것이 모두 포함된다. 또한, 천연 FAF1 단백질의 안정성, 저장성, 용해도 등을 변경시키기 위한 변형 또는 예를 들어 FAF1과 상호작용하는 물질과의 관계를 변경시키기 위해 변형을 가한 기능적 유도체도 본 발명에 따른 FAF1 단백질의 기능적 유도체의 또 다른 바람직한 그룹을 형성한다.
- <50> 천연 단백질 또는 이의 기능적 유도체와 관련하여 사용되는 용어 '유사성' 또는 '상동성'은 천연 단백질 또는 이의 기능적 유도체의 아미노산 잔기와 동일한 상응하는 후보서열을 향온처리하고 필요한 경우 최대 상동성 비율을 얻기 위해 갭을 도입한 후, 본 발명에 따른 후보서열과 유사한 아미노산 잔기의 비율을 가리킨다. 서열 유사성의 수치에 대해서는 NCBI BLAST2.0 소프트웨어에 잘 정의되어 있다 (Altschul 등, 1997).
- <51> 본 발명의 우성-음성 FAF1 단백질, 이의 기능적 유도체, 단편 및 상기의 모든 변형체는 펩타이드 합성에 대한 공지된 유기화학적 방법 중 하나를 이용하여 제조할 수 있다. 펩타이드 합성의 유기화학적 방법은 균질상에서 또는 소위 고체상의 보조 하에 축합 반응에 의해 필요한 아미노산을 결합 (coupling)시키는 것을 포함한다. 축합 반응에 관한 가장 통상적인 방법으로는 카보다이이미드 방법, 아지드 방법, 혼합 무수물 방법 및 활성 에스테르를 사용한 방법이 있다 (문헌 [Gross, E. et al., *The peptides Analysis, Synthesis, Biology* Vol. 1-3, 1997-1981, Academic Press] 참조).
- <52> 펩타이드의 합성에 특히 적합한 고체상으로는 p-알콕시벤질 알코올 수지 (4-하이드록시-메틸-페녹시-메틸-코폴리스티렌-1% 다이비닐벤젠 수지)가 있으며 (문헌 [Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 132, 1974] 참조), 합성된 펩타이드는 온건한 조건하에서 트리아소프로필 실란, 아니솔 또는 에탄다이싸이올, 싸이오아니솔과 같은 스캐빈저를 함유하는 트리플루오로아세트산을 사용하여 상기 고체상으로부터 단리될 수 있다. 축합 반응에 관여할 수 없는 반응성 그룹은 산, 염기를 사용하여 가수분해시키거나 또는 환원시킴으로써 매우 용이하게 다시 제거될 수 있는 그룹에 의해 효과적으로 보호된다. 가능하게 사용될 수 있는 보호기에 대해서는 문헌 [Gross, et al., *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1-9, 1979-1987, Academic Press]에 보다 상세하게 기술되어 있다. 또한, 목적하는 완전한 길이의 서열을 얻기 위해서 단편으로 합성된 펩타이드 서열들이 서로 결합될 수 있다.

- <53> 또한, 본 발명에서는 인간 FAF1 단백질의 기능을 억제하는 물질로서 FAF1 단백질에 대한 단일 또는 다중클론 항체를 사용할 수 있다. 상기 항체는 공지 기술을 용이하게 이용하여 제조할 수 있으며 (문헌 [James W. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Second Ed., Academic Press, 1986] 참조), 항체의 단편 (예: Fab 단편), 인간화 항체 등 모든 형태의 항체가 본 발명의 항체 범위에 포함된다.
- <54> 본 발명의 허혈성 질환 치료용 조성물은 인간 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 효과적으로 억제하는 물질을 유효성분으로 함유하므로, 허혈성 세포사 활성을 선택적으로 저해할 수 있다.
- <55> 본 발명의 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 이를 위하여 상기 유효성분으로 사용되는 FAF1 단백질의 발현 또는 기능 억제물질 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 수용성 담체, 부형제 또는 경우에 따라 다른 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 제형은 정제, 환제, 분제, 새세이, 엘릭시르, 현탁제, 유제, 용액제, 시럽제, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀제, 멸균 주사제, 멸균 분제 등의 형태일 수 있으며, 유전자 치료용 등으로 사용하기 위해 정맥주사, 피하주사, 내피주사, 근육주사 등을 위한 주사제로 제제화하는 것이 바람직하다.
- <56> 구체적으로, 본 발명에 따른 이중가닥 siRNA 또는 이를 포함하는 조성물은 표적세포로 도입되는 알려진 방법에 의하여 수행될 수 있으며, 통상적인 유전자 전달 기법에는 칼슘 포스페이트법, DEAE-텍스트란법, 전기천공, 미세주입법, 바이러스법, 및 양이온성 리포솜을 사용하는 방법 등이 있다 (문헌 [Graham, F. L. et al., *Virology* 52, 456, 1973; McCutchan, J. H. et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 351, 1968; Chu, G. et al., *Nucl. Acids Res.* 15, 1311, 1987; Fraley, R. et al., *J. Biol. Chem.* 255, 10431, 1980; Capecchi, M. R. et al., *Cell*, 22, 479, 1980; 및 Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413, 1987] 참조). 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명의 siRNA를 전기천공용 완충액을 배합하여 Amaxa Nucleofector™ 전기천공 방법으로 투여하였다.
- <57> 본 발명의 siRNA는 대상 또는 샘플 용량당 밀리그램 또는 마이크로그램 양으로 투여될 수 있으며, 예를 들어 1 µg 내지 500 mg/kg, 바람직하게는 1 µg 내지 50 mg/kg, 더욱 바람직하게는 100 µg 내지 5 mg/kg의 양으로 1 내지 10 주 동안 1 주당 1 회 투여될 수 있다.
- <58> 또한, 본 발명의 양성-음성 FAF1은 용액 또는 미셀 형태로 직접 주입되거나 제제화하여 사용될 수 있으며, 임상적인 목적으로 환자에게 투여할 FAF1 단백질의 발현 또는 기능 억제물질의 1일 투여량은 0.05 내지 200 mg/kg 체중, 바람직하게는 0.05 내지 150 mg/kg 체중의 범위에서 FAF1 단백질의 발현을 억제하도록 사용될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <59> 본 발명에서는 또한 허혈성 세포사의 억제가 필요한 대상의 FAF1 단백질의 발현을 억제하여 허혈성 세포사를 억제하는 방법을 제공하며, 이때 상기 대상은 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.
- <60> 본 발명에서 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 억제하는 방법에는, 통상적인 유전자 적중법에 의해 DNA 상의 FAF1 유전자를 적중시키는 방법; 안티센스 RNA, iRNA 및 siRNA, 및 이러한 발현억제 RNA들을 세포 내에 도입시킬 수 있는 RNA 발현벡터를 이용하여 FAF1의 mRNA를 적중시키는 방법; 양성-음성 FAF1 단백질을 FAF1과 결합시켜 FAF1이 매개하는 생리 활성을 억제하는 방법; FAF1 유전자의 전사를 억제하는 방법; 전사된 FAF1 mRNA의 번역을 억제하는 방법; 항체 주입법 또는 FAF1 단백질의 세포 내 특정 위치로의 이동을 저해하는 방법 등이 있으나, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다.
- <61> 이러한 본 발명의 FAF1 단백질의 발현 또는 기능 억제 방법은 세포 내 허혈성 세포사를 효과적으로 억제하므로 뇌허혈, 심장허혈, 당뇨병성 혈관심장질환, 심부전, 심근비대증, 망막허혈, 허혈성 대장염 및 허혈성 급성 신부전증 등의 허혈성 질환의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.
- <62> 본 발명의 일실시예에서는 또한 FAF1이 DEF의 새로운 구성원으로서 DEF의 형성을 증가시켜 항암제-유도 세포사를 강화하고 (문헌 [Park, M. Y. et al., *Int. J. Cancer*. 115:412-418, 2005] 참조), 허혈 유도시 활성산소종이 생성되며 (문헌 [Bonne, C. et al., *Gen. Pharmacol.* 30:275-280, 1998] 참조), 활성산소종의 생성이 PARP-1의 활성화를 촉진하고 (문헌 [van Wijk, S. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* 39:81-90, 2005] 참조), PARP-1 활성 증가는 AIF 단백질을 미토콘드리아에서 방출시켜 핵으로 이동시킨다는 (문헌 [van Wijk, S. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* 39:81-90, 2005] 참조) 사실에 근거하여, FAF1의 과발현 및 FAF1의 siRNA를 이용하여 FAF1과 상기 사실과의 관계를 규명하였으며, 허혈성 세포사시 FAF1이 캐스파아제 세포사 경로를 경유하는

지도 조사하였다. 그 결과, FAF1이 DEF의 형성, 활성산소종의 생성, PARP-1 활성화, AIF의 핵 이동 경로를 통하여 허혈성 세포사 과정에 중요한 역할을 하며, 캐스파아제 비의존적 세포사 과정에서 필수적임을 확인하였다.

<63> 또한, 본 발명에서는 FAF1 유전자 또는 FAF1 단백질에 대한 항체를 이용하여 허혈성 세포사를 억제하는 후보물질을 검색하는 방법을 제공한다.

<64> 구체적으로 상기 검색 방법은, 허혈 유도시 FAF1 단백질의 허혈성 세포사를 조절하는 FAF1 단백질과 결합하는 또 다른 핵심 단백질을 검색하거나, FAF1 단백질의 기능을 조절하는 허혈성 질환의 치료학적 활성 물질의 후보물질, 또는 허혈시 FAF1에 의한 세포사 또는 활성산소종의 생성 등을 조절하는 후보물질을 검색함으로써 세포내 허혈성 세포사를 조절하는 후보물질을 검색하는 방법일 수 있다.

<65> 상기 검색 방법에서는 FAF1 단백질 발현 세포주, 조직 및 실험동물 등에 후보물질들을 처리한 후 FAF1 유전자 또는 FAF1 단백질에 대한 항체를 이용하여 FAF1 유전자 또는 단백질의 발현정도를 확인하거나, 허혈성 세포사를 억제하는 능력을 검정함으로써 FAF1 단백질의 발현을 효과적으로 억제하여 허혈성 세포사를 조절하는 후보물질을 검색할 수 있다.

<66> 상기 본 발명의 검색 방법에서 사용될 수 있는 FAF1 유전자 또는 FAF1 단백질의 발현정도 및 세포사 억제 능력을 검정하는 방법으로는 당분야에서 유전자 또는 단백질의 발현을 확인하기 위해 사용되는 일반적인 생화학적 기술들을 이용할 수 있다. 예를 들어, FAF1 유전자의 발현을 확인하는 방법에는 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR), 및 노던 블롯 (northern blot) 분석과 같이 FAF1 유전자 또는 그의 단편을 프로브 (probe)로 이용하는 각종 블롯 분석 등이 있으며, FAF1 단백질의 발현을 확인하는 방법에는 FAF1 단백질에 대한 항체를 이용한 효소 결합 면역흡착 분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선 면역측정법 (radio immuno assay, RIA), 샌드위치 측정법 (sandwich assay), 폴리아크릴 아마이드 겔 상의 웨스턴 블롯, 면역 블롯 분석 및 면역 조직화학 염색 (immunohistochemical staining) 등이 있다.

<67> 예를 들어, 허혈시 FAF1의 기능 억제제를 스크리닝하는 경우에는, FAF1 단백질을 세포에 과발현시키고 허혈을 유도하여 허혈성 세포사가 증가하는 최적의 조건을 만든 다음, 후보물질을 처리하고 이의 억제 활성을 ELISA 분석이나 세포염색분석 등의 통상적인 방법으로 확인할 수 있다.

<68> 또한, 본 발명에서는 FAF1과 선택적으로 결합하는 분자를 단리하는 방법을 제공할 수 있다. 이 방법은 FAF1과 후보 분자의 혼합물을 항온처리하고 복합체를 단리하며, 단리된 복합체로부터 FAF1 단백질을 유리 제거함을 포함한다. 복합체의 단리는 통상적인 다양한 단리 방법으로 수행할 수 있으며, 예를 들어 FAF1 단백질을 고정시킨 친화성 컬럼, 항-FAF1 항체를 이용한 면역침강법, 효모 2-하이브리드 시스템 등이 있다.

<69> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<70> **실시예 1: FAF1과 허혈성 세포사의 관계 확인**

<71> 허혈성 세포사 과정에서 FAF1이 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

<72> **(1-1) 형질전환 세포주의 준비**

<73> 랫트 심근세포주 H9c2 세포 (ATCC, CRL-1446)를 10% 우태아 혈청 (FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (100× 용액)이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, JBI사) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 다음, 1~2 × 10⁶의 H9c2 세포를 수집하여 PBS로 1 회 세척한 후, 100 μl의 전기천공용 완충액 (specified electroporation buffer, Amaxa사)에 재현탁시켰다. 상기 현탁액에 1 μg의 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA (문헌 [Ryu, S. W. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262:388-394, 1999; 및 Ryu, S. W. et al., *J. Biol. Chem.* 278:24003-24010, 2003] 참조) 및 MOCK (pFlag-CMV-5a 플라스미드 DNA, sigma사)를 각각 섞고, 큐벳에 옮겨 담은 후, Amaxa Nucleofector™ 장치 (Amaxa사)를 이용하여 형질전환된 세포주를 제조하였다.

<74> **(1-2) 허혈성 세포사 관찰**

<75> 화학적 허혈 (Chemical hypoxia, CH)을 유도하기 위하여, 상기 (1-1)의 형질전환된 H9c2 세포들을 37°C, CO₂ 배양기에서 48 시간 동안 배양한 다음, PBS로 1 회 세척하고 대사억제 완충액 (metabolic inhibition buffer; 106 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 38 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 20 mM 2-데옥시글루코스, 1 mM NaCN, pH 6.6)을 0 내지 2 시간으로 다양하게 처리하였다.

- <76> 상기와 같이 화학적 허혈을 유도하는 동안 수시로 현미경 하에서 세포 손상 정도를 관찰하면서 적정 손상이 일어난 시점의 세포를 1 ml의 PBS로 2 회 세척한 후, 1 ml의 3.7% 폼알데하이드를 이용하여 세포를 고정시켰다. 상기 고정된 세포를 1 ml의 PBS로 세척하고 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DAPI (Molecular Probes사)로 30분 동안 염색한 다음, PBS로 다시 3 회 세척하고 형광 현미경 (OLYMPUS 1X71, OLYMPUS사)으로 죽은 세포의 비율을 관찰하였으며, 화학적 허혈을 유도하지 않은 MOCK 세포도 상기와 동일한 방법으로 분석하였다. 상기 실험을 3번 이상 반복한 다음, 유도 90분 후 죽은 세포들의 평균 비율을 도 1에 나타내었다.
- <77> **(1-3) 세포 생존율 측정**
- <78> 화학적 허혈이 유도된 세포들의 세포 생존율을 측정하기 위하여 다음과 같은 XTT 분석을 수행하였다.
- <79> 상기 (1-1)의 형질전환된 H9c2 세포들을 96웰 플레이트에 옮기고 37 $^{\circ}\text{C}$, CO₂ 배양기에서 48 시간 동안 배양한 후 상기 (1-2)와 동일한 방법으로 화학적 허혈을 유도하였다. 90분 후 각 웰에 XTT 용액 (Promega사)을 가한 다음, 발색이 되면 ELISA 플레이트 리더 (Emax, Molecular Devices사)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 화학적 허혈을 유도하지 않은 MOCK 세포의 발색 정도를 100으로 하여 상대적인 발색정도를 비교하여 세포 생존율을 관찰하였으며, 3번 이상 수행한 평균값을 도 2에 나타내었다.
- <80> 도 1 및 2에 나타난 바와 같이, 허혈 유도시 FAF1이 과발현된 세포에서 허혈성 세포사는 MOCK 세포에 비하여 현저히 증가하고, FAF1의 과발현에 의해 세포 생존율이 감소하므로, FAF1이 허혈성 세포사를 활성화시킴을 알 수 있다.
- <81> **실시예 2: siRNA-FAF1의 FAF1 단백질 발현 억제 확인**
- <82> FAF1 유전자에 대한 siRNA가 FAF1 단백질의 발현을 억제함을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- <83> **(2-1) siRNA-FAF1의 제작**
- <84> 각각 인간 FAF1 단백질의 염기서열과 랫트 FAF1 단백질의 염기서열에 상응하는 siRNA-FAF1들을 다음과 같은 방법으로 제작하였다.
- <85> 먼저, QIAGEN사의 siRNA Design Tool 프로그램을 이용하여, 서열번호: 2의 염기서열을 갖는 인간 FAF1 단백질의 개시코돈의 첫 번째 염기로부터 526-544 위치에 해당하는 염기들에 상응하는 서열번호: 3 및 4의 염기서열을 갖는 인간 FAF1의 정방향 및 역방향 단일가닥 siRNA-인간 FAF1 (hFAF1) 서열들을 합성하였으며, 서열번호: 9의 염기서열을 갖는 랫트 FAF1 단백질의 개시코돈의 첫 번째 염기로부터 548-564 위치에 해당하는 염기들에 상응하는 서열번호: 5 및 6의 염기서열을 갖는 랫트 FAF1의 정방향 및 역방향 단일가닥 siRNA-랫트 FAF1 (rFAF1) 서열들을 고안하여 QIAGEN사에서 합성하였다.
- <86> 상기와 같이 합성된 40 μM 의 정방향 및 역방향 단일가닥 siRNA 쌍들을 각각 어닐링 완충액 (100 mM 아세트산 칼륨, 30 mM HEPES-KOH (pH 7.4) 및 2 mM 아세트산 마그네슘)에 첨가하여 90 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 분 동안 반응시킨 다음, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 추가 반응시켜 이중가닥 siRNA-hFAF1 및 siRNA-rFAF1을 제작하였다.
- <87> **(2-2) 웨스턴 블롯 분석**
- <88> 상기 (2-1)에서 제작한 이중가닥 siRNA-hFAF1 및 siRNA-rFAF1에 의한 FAF1 단백질의 발현 수준을 확인하기 위하여, 단일클론 항-FAF1 항체 (숙명여자대학교의 Dr. 임종석)를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 다음과 같이 수행하였다.
- <89> 인간 HeLa 세포 (ATCC, CCL-2)에 이중가닥 siRNA hFAF1 및 scRNA (scrambled RNA, QIAGEN사) (문헌 [Zhang, L. et al, *J. Biol. Chem.* 279:2053-2062, 2004] 참조)를 각각 상기 실시예 1의 (1-1)과 동일한 방법으로 형질전환시킨 다음, 형질전환된 세포들을 37 $^{\circ}\text{C}$, CO₂ 배양기에서 72 시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포들을 수집한 후, 초음파 분쇄과쇄기 (Sonic & Materials사)를 이용하여 Output 5, Duty cycle 30에서 1분간 초음파 분쇄를 실시한 다음, 13,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하여, 각각의 세포 용해물 분획 (30 μg)을 SDS-PAGE 겔에 전기영동한 후, 단일클론 항-FAF1 항체 및 항- β -튜블린 항체 (Sigma사)를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 FAF1 단백질의 발현 수준을 확인하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- <90> 또한, 랫트 H9c2 세포에 이중가닥 siRNA-rFAF1 및 scRNA를 각각 상기 실시예 1의 (1-1)과 동일한 방법으로 형질전환시킨 다음, 형질전환된 세포들을 24, 48, 72 및 96 시간 동안 배양한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

- <91> 도 3 및 4에 나타난 바와 같이, siRNA-hFAF1을 HeLa 세포에 처리하였을 때와 siRNA-rFAF1을 H9c2 세포주에 처리하였을 때 모두 FAF1의 발현이 감소하므로, siRNA-FAF1이 FAF1 단백질의 발현을 억제함을 알 수 있다.
- <92> **실시예 3: siRNA-FAF1의 허혈성 세포사 억제 확인**
- <93> siRNA-FAF1이 세포 내에서 허혈성 세포사를 억제하는지를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- <94> **(3-1) 허혈성 세포사 관찰**
- <95> HeLa 세포에 MOCK (pFlag-CMV-5a) 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 상기 실시예 2의 (2-1)에서 제작한 이중가닥 siRNA-hFAF1을 각각 형질전환시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 (1-1) 및 (1-2)와 동일한 방법으로 HeLa 세포를 형질전환시킨 후 화학적 허혈을 유도한 다음, 90분 후에 상기 실시예 1의 (1-2)와 동일한 방법으로 DAPI 염색을 실시하여 죽은 세포의 비율을 관찰하였으며, 3번 이상 실험한 평균값을 도 5에 나타내었다.
- <96> 또한, H9c2 세포에 각각 MOCK (pFlag-CMV-5a) 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 상기 실시예 2의 (2-1)에서 제작한 이중가닥 siRNA-rFAF1을 형질전환시킨 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 화학적 허혈에 의한 죽은 세포의 비율을 관찰하였으며, 3번 이상 실험한 평균값을 도 6에 나타내었다.
- <97> 도 5 및 6에 나타난 바와 같이, FAF1의 과발현은 허혈성 세포사를 강화시키는 반면, siRNA-FAF1에 의한 FAF1의 발현 억제는 허혈성 세포사를 억제하므로, FAF1 단백질이 허혈성 세포사에서 필수적임을 알 수 있다.
- <98> **(3-2) FACS 분석**
- <99> H9c2 세포에 MOCK (pFlag-CMV-5a) 플라스미드 DNA 및 상기 실시예 2의 (2-1)에서 제작한 siRNA-rFAF1을 형질전환시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 (1-1) 및 (1-2)와 동일한 방법으로 형질전환시킨 후 화학적 허혈을 유도하였다. 90분 후에 각각의 세포들을 PBS로 한번 세척한 후, 세포사멸을 구별하기 위한 FITC 결합-아넥신 V 항체 (BD사) 및 세포괴사를 구별하기 위한 프로피듐 요오드화물 (propidium iodide, PI, sigma사)로 염색한 다음, 유세포 분석기 (fluorescence activated cell sorter (FACS), BD사)를 이용하여 분석하고 PI-양성 세포수를 비교하였으며, 그 결과를 각각 도 7 및 8에 나타내었다.
- <100> 도 7 및 8에 나타난 바와 같이, 허혈성 세포사시 siRNA-FAF1은 세포사멸 및 세포괴사를 억제하므로, 허혈성 세포사 과정에 FAF1이 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다.
- <101> **실시예 4: 허혈성 세포사시 FAF1의 DEF의 형성 관찰**
- <102> FAF1은 DEF의 새로운 구성원으로서 DEF의 형성을 증가시킴으로써 항암제-유도 세포사를 강화한다는 기능이 보고되어 있다 (문헌 [Park, M. Y. et al, *Int. J. Cancer*. 115:412-418, 2005] 참조). 따라서 허혈성 세포사에서도 FAF1이 DEF의 형성 조절을 통하여 세포사를 강화시키는지를 다음과 같이 조사하였다.
- <103> H9c2 세포에 GFP-캐스파아제-8-DEDs (문헌 [Park, M. Y. et al, *Int. J. Cancer*. 115:412-418, 2005] 참조)와 함께 MOCK (pFlag-CMV-5a) 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 상기 실시예 2의 (2-1)에서 제작한 siRNA-rFAF1을 형질전환시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 (1-1) 및 (1-2)와 동일한 방법으로 H9c2 세포를 형질전환시킨 후 화학적 허혈을 유도하였다. 90분 후에 세포들을 1 ml의 PBS로 2 회 세척한 후, 1 ml의 3.7% 폼알데하이드를 이용하여 고정화하였다. 이들을 다시 1 ml의 PBS로 세척한 후, PI로 염색한 다음 PBS로 3 회 세척하고 공초점 형광 현미경 (confocal microscopy, Bio-rad사)으로 세포 내 DEF의 형성을 관찰하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- <104> 도 9에 나타난 바와 같이, 허혈성 세포사 과정에서 FAF1의 과발현은 GFP-캐스파아제-8-DEDs에 의해 형성되는 DEF의 응집을 증가시키는 반면, siRNA-FAF1은 DEF 형성의 증가를 억제하므로, 허혈성 세포사 과정에서 FAF1이 DEF의 형성을 조절하고 있음을 알 수 있다.
- <105> **실시예 5: 허혈성 세포사시 FAF1과 캐스파아제 세포사 경로의 관계 확인**
- <106> 허혈성 세포사시 FAF1이 캐스파아제 세포사 경로를 경유하는지를 조사하기 위하여, H9c2 세포에 MOCK (pFlag-CMV-5a) 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 상기 실시예 2의 (2-1)에서 제작한 siRNA-rFAF1을 각각 실시예 1의 (1-1)과 동일한 방법으로 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 세포들을 37°C, CO₂ 배양기에서 36 시간 동안 배양한 다음, 모든 캐스파아제들의 억제제인 z-VAD-fmk를 10 μM의 농도로 12 시간 동안 처리 또는 비처리하였다. 상기 세포들을 상기 실시예 1의 (1-2)와 동일한 방법으로 화학적 허혈을 유도한 다음, 90분 후에 상기 실시예 1의 (1-2)와 동일한 방법으로 DAPI 염색을 실시하여 죽은 세포의 비율을 관찰하였으며, 3번 이상 수행한 평균값

을 도 10에 나타내었다.

<107> 도 10에 나타난 바와 같이, FAF1의 과발현은 캐스파아제 활성 억제제의 처리여부와 상관없이 정상조건에서나 허혈시이나 세포사를 증가시키는 반면, siRNA-FAF1은 캐스파아제 활성 억제제의 처리여부와 상관없이 세포사를 억제하므로, FAF1이 캐스파아제 세포사 경로에 비의존적임을 알 수 있다.

<108> **실시예 6: 허혈성 세포사시 FAF1과 활성산소종 (ROS) 생성의 관계 확인**

<109> 허혈 유도시 활성산소종이 생성됨은 이미 보고되어 있다 (문헌 [Bonne, C. et al., *Gen. Pharmacol.* 30:275-280, 1998] 참조). 따라서 FAF1이 허혈성 세포사시 활성산소종의 생성을 조절하는지 조사하기 위하여, H9c2 세포에 MOCK (pFlag-CMV-5a) 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 상기 실시예 2의 (2-1)에서 제작한 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 (1-1) 및 (1-2)와 동일한 방법으로 H9c2 세포를 형질전환시킨 후 화학적 허혈을 유도하였다. 90분 후에 활성산소종 생성 지표인 5 μ M의 DCF-DA (2',7'-dihydrodichlorofluoresceinacetate, Molecular Probes사)을 30 분 동안 처리한 후, 분광형광검출기 (VICTOR3, Perkin Elmer사)로 분석하였으며, 3번 이상 수행한 평균값을 도 11에 나타내었다.

<110> 도 11에 나타난 바와 같이, 허혈성 세포사시 FAF1의 과발현은 세포 내 활성산소종의 생성을 유도하는 반면, siRNA-FAF1은 활성산소종의 생성을 억제하므로, 허혈성 세포사시 FAF1을 통하여 세포 내 활성산소종의 생성이 유도됨을 알 수 있다.

<111> **실시예 7: 허혈성 세포사시 FAF1과 PARP-1 활성화의 관계 확인**

<112> 활성산소종의 생성이 PARP-1의 활성화를 촉진한다는 것이 이미 보고되어 있고 (문헌 [van Wijk, S. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* 39:81-90, 2005] 참조), 도 11에 나타난 바와 같이, FAF1은 허혈시 세포 내 활성산소종의 생성을 증가시키므로, FAF1의 PARP-1 활성조절 여부를 다음과 같이 조사하였다.

<113> H9c2 세포에 MOCK (pFlag-CMV-5a) 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 상기 실시예 2의 (2-1)에서 제작한 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 (1-1) 및 (1-2)와 동일한 방법으로 H9c2 세포를 형질전환시킨 후 화학적 허혈을 유도하였다. 90분 후에 세포를 파쇄하여 각각의 세포 용해물 분획을 얻은 후, 상기 분획을 PARP-1이 결합하는 히스톤이 코팅되어 있는 플레이트에 첨가하였다. 상기 플레이트에 비색 정량 분석 키트 (Trevigen사)의 기질용액과 반응 완충액을 첨가하여 30 분 동안 반응시킨 후, ELISA 플레이트 리더 (Molecular Devices사)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정함으로써 PARP-1의 활성도를 평가하였으며, 3번 이상 수행한 평균값을 도 12에 나타내었다.

<114> 도 12에 나타난 바와 같이, 허혈성 세포사시 FAF1의 과발현은 PARP-1의 활성화를 유도하는 반면, siRNA-FAF1은 허혈시 PARP-1의 활성화를 억제하므로, 허혈성 세포사시 FAF1이 PARP-1 활성을 증가시킴을 알 수 있다.

<115> **실시예 8: 허혈성 세포사시 FAF1과 AIF의 핵 이동과의 관계 확인**

<116> PARP-1 활성 증가는 AIF 단백질을 미토콘드리아에서 방출시켜 핵으로 이동시킴이 보고되어 있고 (문헌 [van Wijk, S. J. et al., *Free Radic. Biol. Med.* 39:81-90, 2005] 참조), 도 12에 나타난 바와 같이, FAF1이 PARP-1 활성 증가에 관여하므로, FAF1이 AIF의 핵 이동에 관여하는지를 분별 (fractionation) 분석을 이용하여 다음과 같이 조사하였다.

<117> 허혈성 세포사시 PARP-1 하부지역에서 작용하는 AIF의 위치 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여, H9c2 세포에 MOCK (pFlag-CMV-5a), pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 (1-1) 및 (1-2)와 동일한 방법으로 H9c2 세포를 형질전환시킨 후 화학적 허혈을 유도하였다. 90분 후에 세포들을 5 ml의 PBS로 2 회 세척한 후, 분별 세포용해 완충액 (250 mM 수크로스, 20 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT 및 0.1 mM PMSF 포함)을 넣고 얼음에 15 분 동안 방치한 다음, 침전된 세포들을 1 ml 주사기를 이용하여 파쇄하였다. 이를 1,000 g에서 15 분간 원심분리한 후 침전물을 취하여 핵 분획을 얻고, 상등액은 다시 15,000 g에서 20 분간 원심분리한 후 침전물을 취하여 미토콘드리아 분획을 얻었다. 이들 핵과 미토콘드리아 용해물 (20 μ g)들을 8% SDS-PAGE 겔에서 전기영동한 후 단일 클론 항-AIF 항체 (monoclonal anti-AIF antibody, E1, Santa Cruz사)를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 이때, 핵과 미토콘드리아의 정확한 분획여부를 확인하기 위하여 각각의 마커 단백질인 PARP-1과 SOD-2의 항체인 다중클론 항-PARP-1 항체 (H-300, Santa Cruz사) 및 다중클론 항-SOD-2 (HL-222, Santa Cruz사)를 사용하였으며, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

<118> 도 13에 나타난 바와 같이, 허혈 유도시 세포질에 존재하던 AIF가 핵으로 이동하며, siRNA-FAF1에 의해 AIF의 핵 이동이 억제되므로, 허혈성 세포사시 FAF1이 AIF 핵 이동에 영향을 미침을 알 수 있다.

<119> **실시예 9: 우성-음성 FAF1의 허혈성 세포사 보호효과 확인**

<120> 허혈성 세포사 과정에서 우성-음성 (dominant negative, DN) FAF1의 영향을 확인하기 위하여, H9c2 세포에 발현 벡터 MOCK (pFlag-CMV-5a), pFlag-hFAF1 및 pFlag-hFAF1[366-650] (FAF1- Δ FID·DEDID, DN, 문헌 [Ryu, S. W. et al., *J. Biol. Chem.* 278:24003-24010, 2003] 참조) 플라스미드 DNA를 형질전환시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 (1-1) 및 (1-2)와 동일한 방법으로 H9c2 세포를 형질전환시킨 후 화학적 허혈을 유도한 다음, DAPI 염색을 실시하여 죽은 세포의 비율을 관찰하였으며, 3번 이상 수행한 평균값을 도 14에 나타내었다.

<121> 도 14에 나타난 바와 같이, 우성-음성 FAF1에 의한 FAF1의 기능 억제시 허혈성 세포사가 억제되었으므로, FAF1이 허혈성 세포사 과정에서 필수적인 단백질임을 알 수 있다.

<122> 상기 결과들로부터, FAF1이 캐스파아제 비의존적 세포사 경로에 작용하며, 허혈성 세포사시 FAF1은 활성산소종의 생성, PARP-1 활성화 및 AIF의 핵 이동 경로를 통하여 허혈성 세포사 과정에서 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다.

발명의 효과

<123> 상기한 바와 같이, siRNA 및 우성-음성 FAF1 단백질과 같은 본 발명의 인간 FAF1 단백질 억제제는 FAF1 단백질의 발현 또는 기능을 효과적으로 억제하고, 허혈성 세포사시 캐스파아제 비의존적 세포사 경로, 및 활성산소종의 생성, PARP-1 활성화 및 AIF의 핵 이동 경로에 작용함으로써 허혈성 세포사를 효과적으로 억제하므로, 상기 억제제를 유효성분으로 함유하는 본 발명에 따른 약학 조성물은 뇌허혈, 심장허혈, 당뇨병성 혈관심장질환, 심부전, 심근비대증, 망막허혈, 허혈성 대장염 및 허혈성 급성 신부전증 등의 허혈성 질환의 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다.

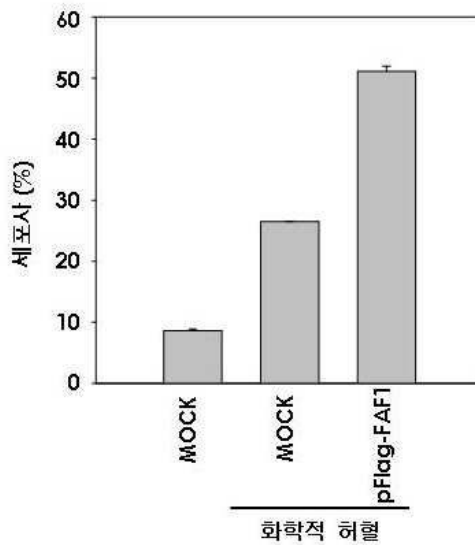
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 MOCK (pFlag-CMV-5a)과 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA를 각각 일시적으로 형질전환시킨 H9c2 세포에 90분 동안 화학적 허혈 (chemical hypoxia, CH)을 유도한 다음, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) 분석을 실시하여 죽은 세포의 비율을 평가한 것이고,
- <2> 도 2는 MOCK과 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA를 각각 일시적으로 형질전환시킨 H9c2 세포에 90분 동안 화학적 허혈을 유도한 다음, XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate) 분석을 실시하여 세포 생존율을 평가한 것이고,
- <3> 도 3은 scrRNA (scrambled RNA) 및 siRNA-hFAF1을 각각 형질전환시킨 HeLa 세포 및 항-FAF1 항체와 항- β -튜블린 (tubulin) 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석 (Western blot analysis)을 실시하여 FAF1 단백질의 발현수준을 확인한 것이고,
- <4> 도 4는 scrRNA 및 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 H9c2 세포 및 항-FAF1 항체와 항- β -튜블린 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 실시하여 FAF1 단백질의 발현수준을 확인한 것이고,
- <5> 도 5는 MOCK 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 siRNA-hFAF1을 각각 형질전환시킨 HeLa 세포에 90분 동안 화학적 허혈을 유도한 다음, DAPI 분석을 실시하여 죽은 세포의 비율을 평가한 것이고,
- <6> 도 6은 MOCK 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 H9c2 세포에 90분 동안 화학적 허혈을 유도한 다음, DAPI 분석을 실시하여 죽은 세포의 비율을 평가한 것이고,
- <7> 도 7은 MOCK 플라스미드 DNA와 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 H9c2 세포에 화학적 허혈을 유도한 다음, FACS (fluorescence activated cell sorter, BD사)를 이용하여 세포사멸정도를 관찰한 것이고,
- <8> 도 8은 상기 FACS 분석 후, 프로피듐 아이오다이드 (propidium iodide (PI))-양성 (positive) 세포수를 측정하여 세포괴사정도를 관찰한 것이고,
- <9> 도 9는 GFP-캐스파아제-8-DED와 함께 MOCK 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 H9c2 세포에 90분 동안 화학적 허혈을 유도한 다음, 세포면역염색분석 (immunocytochemical analysis)을 실시하여 데스 이펙터 필라멘트 (death effector filament, DEF)의 형성을 관찰한 결과를 나타낸 것이고,

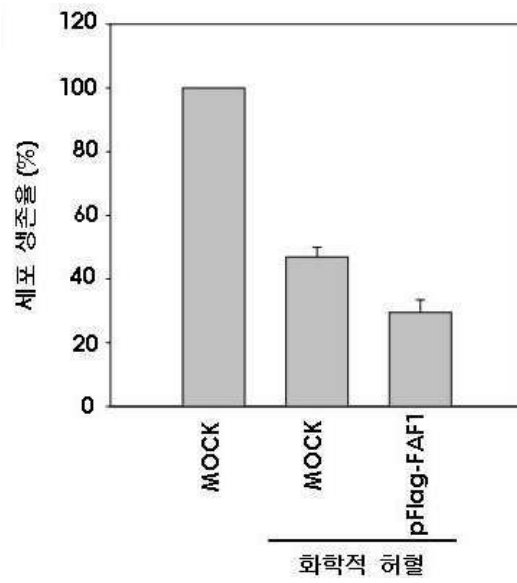
- <10> 도 10은 MOCK 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 H9c2 세포에 캐스파아제 억제제인 z-VAD-fmk를 처리 또는 비처리한 후, 90분 동안 화학적 허혈을 유도하고 DAPI 분석을 실시하여 죽은 세포의 비율을 평가한 것이고,
- <11> 도 11은 MOCK 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 H9c2 세포에 90분 동안 화학적 허혈을 유도한 다음, 활성산소종의 생성정도를 평가한 것이고,
- <12> 도 12는 MOCK 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 H9c2 세포에 90분 동안 화학적 허혈을 유도한 다음, PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase-1)의 활성도를 평가한 것이고,
- <13> 도 13은 MOCK 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA와 siRNA-rFAF1을 각각 형질전환시킨 H9c2 세포에 90분 동안 화학적 허혈을 유도한 다음, 세포를 수집하여 얻은 핵과 미토콘드리아의 분획, 및 항-AIF (apoptosis inducing factor) 항체, 항-PARP-1 항체 및 항-SOD-2 (superoxide dismutase-2) 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 실시하여 AIF의 핵 이동을 관찰한 것이고,
- <14> 도 14는 MOCK 및 pFlag-hFAF1 플라스미드 DNA, 및 pFlag-hFAF1[366-650]을 각각 형질전환시킨 H9c2 세포에 90분 동안 화학적 허혈을 유도한 다음, DAPI 분석을 실시하여 죽은 세포의 비율을 평가한 것이며,
- <15> 도 15는 pFlag-hFAF1[366-650](FAF1- Δ FID·DEDID, DN (우성-음성, dominant negative))의 도식이다 (FID: Fas-결합 영역 (Fas-interacting domain); 및 DEDID: DED-결합 영역 (DED-interacting domain)).

도면

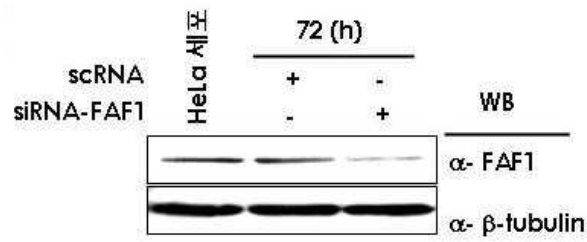
도면1



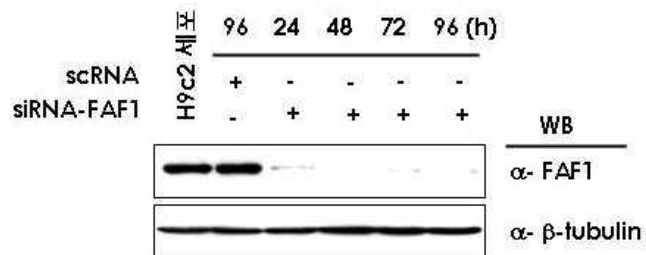
도면2



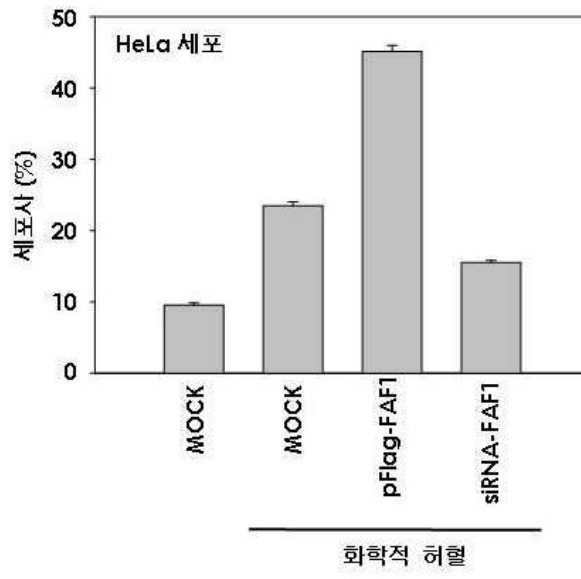
도면3



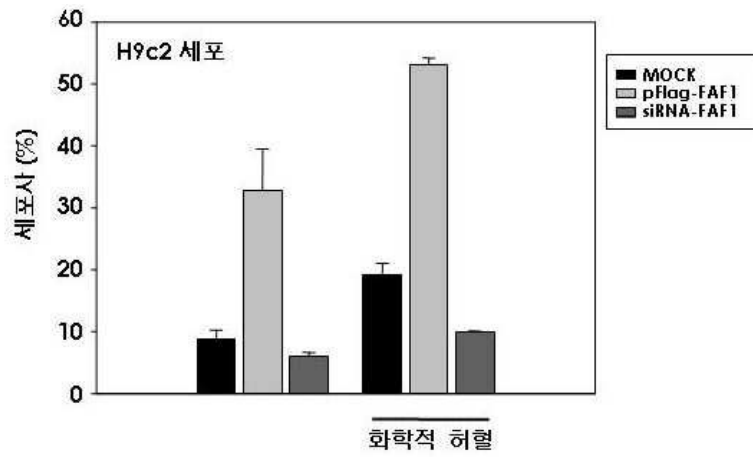
도면4



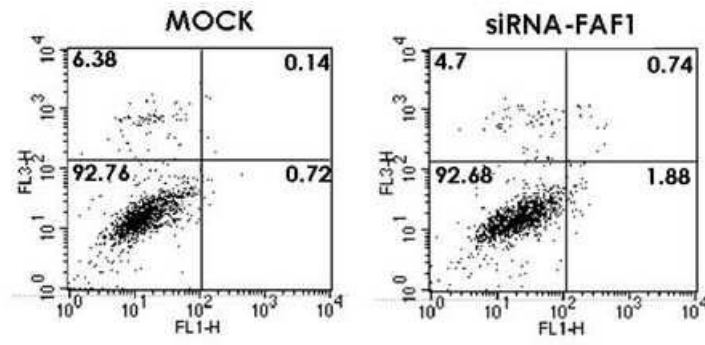
도면5



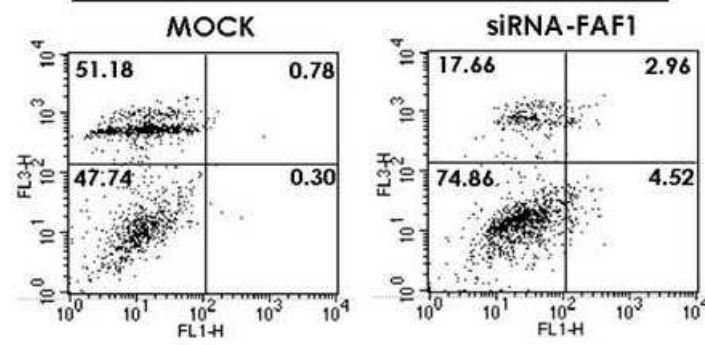
도면6



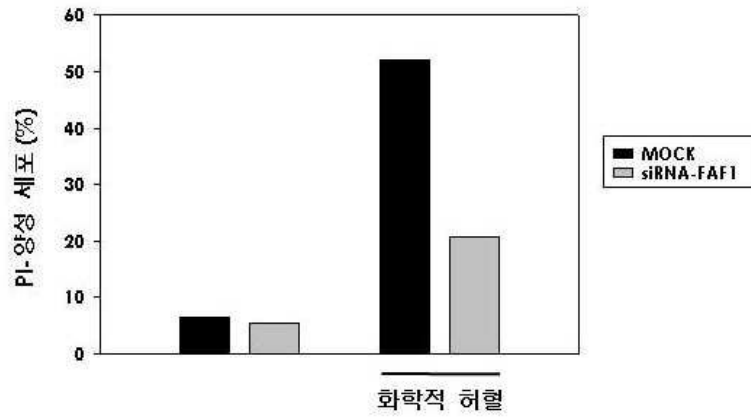
도면7



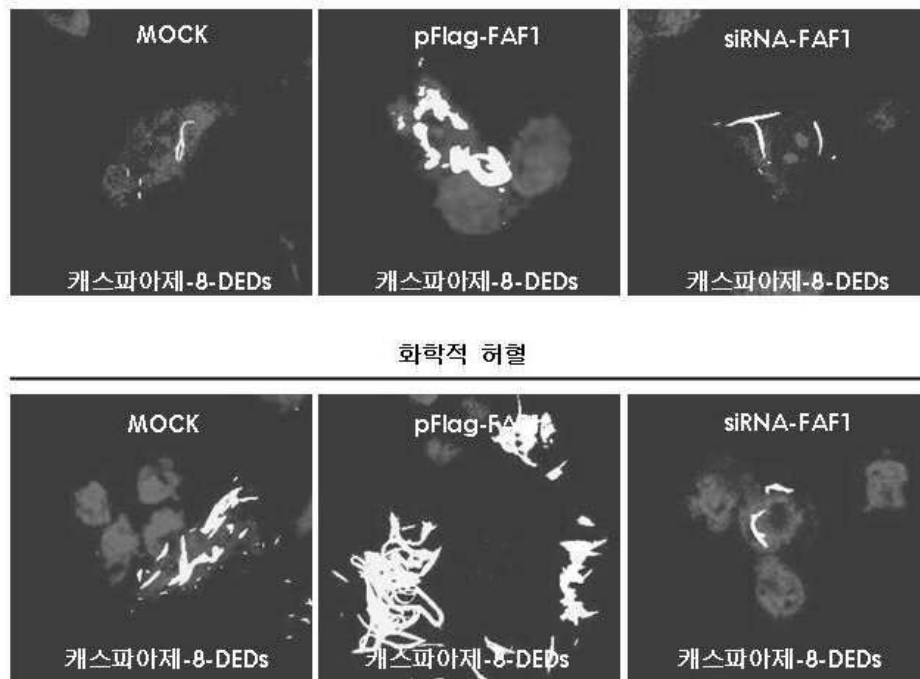
화학적 허혈



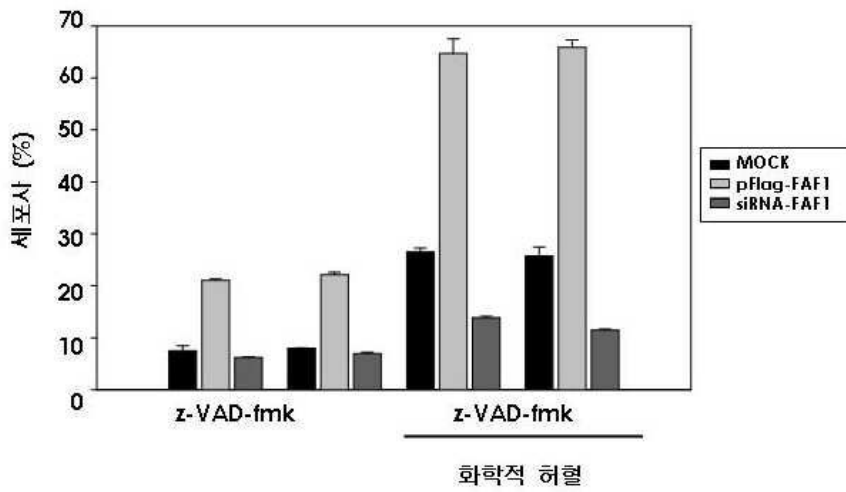
도면8



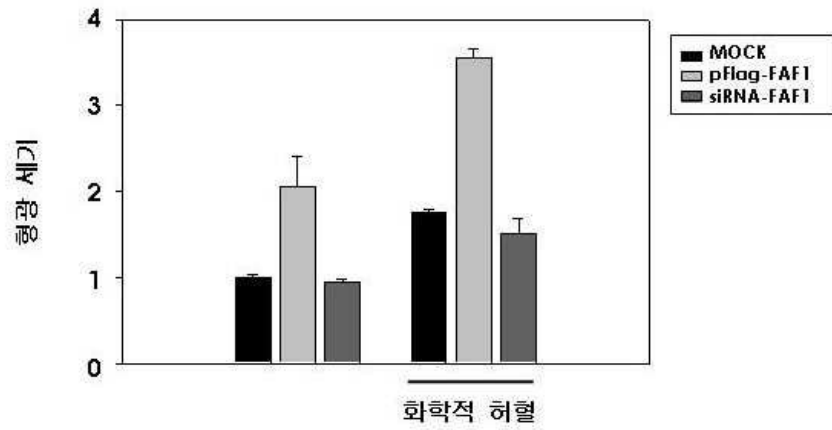
도면9



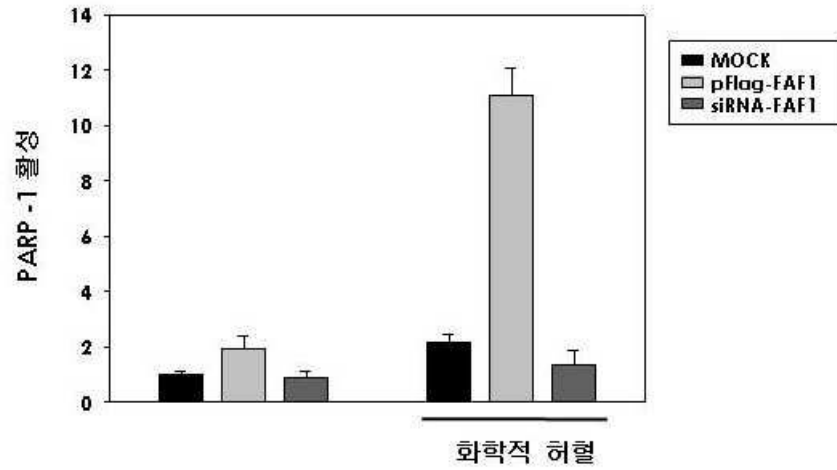
도면10



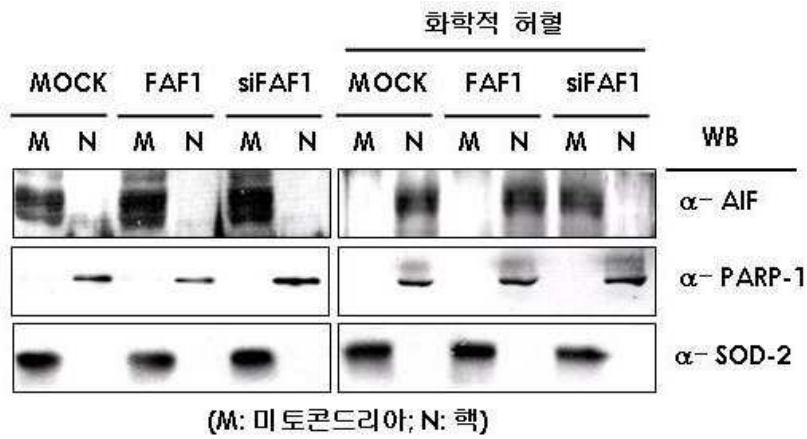
도면11



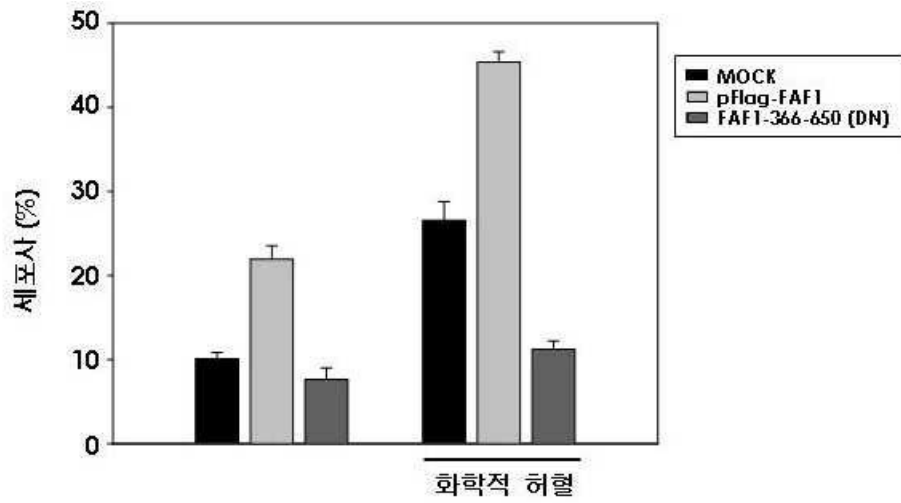
도면12



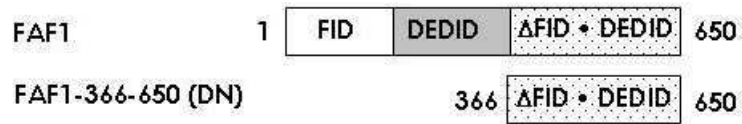
도면13



도면14



도면15



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)