



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0083619
(43) 공개일자 2009년08월04일

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0009530

(22) 출원일자 2008년01월30일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

권호정

서울 서초구 잠원동 대림아파트 1-103

정혜진

서울 도봉구 창동 674-49 302호

(74) 대리인

양부현, 김승진

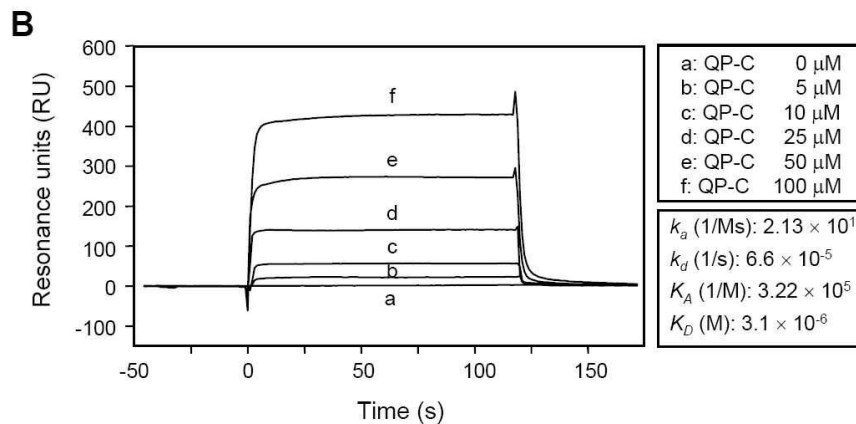
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 다음의 단계를 포함하는 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다: (a) 미토콘드리아 복합체 III의 유비퀴논-결합 단백질(QP-C)과 시험 물질을 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 시험 물질이 QP-C에 결합하는 지 여부 또는 시험물질이 QP-C의 기능을 억제하는 지 여부를 분석하는 단계; 상기 시험물질이 QP-C에 결합하거나 또는 QP-C의 기능을 억제하면 혈관신생 억제제로 판단한다. 본 발명에 따르면, 효과적인 혈관신생 억제제를 고속으로 그리고 대량으로 스크리닝할 수 있다. 또한, 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 발굴된 혈관신생 억제제는 세포사멸을 유도하지 않으면서 혈관신생 반응(angiogenic responses)을 억제하기 때문에, 안전성이 담보된 것이다.

대표도 - 도3b



특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법:

- (a) 미토콘드리아 복합체 III의 유비퀴논-결합 단백질(QP-C)과 시험 물질을 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 시험 물질이 QP-C에 결합하는 지 여부 또는 시험물질이 QP-C의 기능을 억제하는 지 여부를 분석하는 단계; 상기 시험물질이 QP-C에 결합하거나 또는 QP-C의 기능을 억제하면 혈관신생 억제제로 판단한다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 QP-C는 세포 표면, 바이러스 표면 또는 세포내에 존재하거나 분리된 형태(isolated form)로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a) 이전에 QP-C에 터페스타신(terpestacin)을 처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 시험 물질 처리된 QP-C에 터페스타신(terpestacin)을 처리하여 터페스타신이 QP-C에 결합하는 지 여부를 조사하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 QP-C는 세포내의 미토콘드리아 복합체 III에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 단계 (a) 이후에 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트를 시험물질 처리된 QP-C 함유 세포에 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트에 의한 세포질 염색 정도를 분석하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 혈관신생 억제제는 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경변증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방에 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.

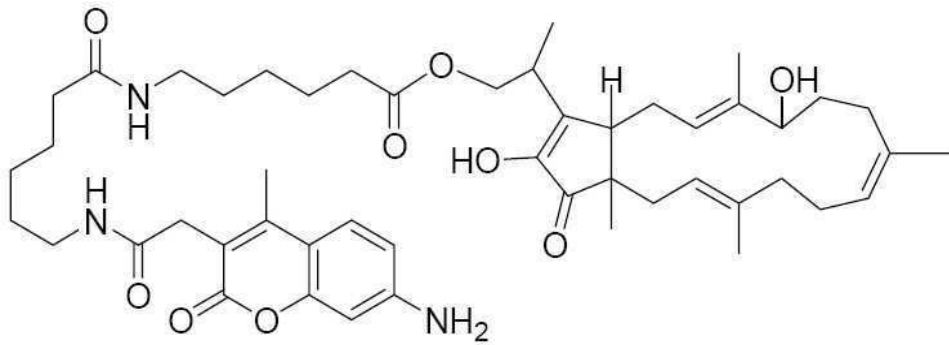
청구항 9

터페스타신에 쿠마린 화합물이 공유결합되어 있는 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트를 포함하는 미토콘드리아 염색용 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트는 하기 화학식 3으로 표시되는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 염색용 조성물:

화학식 3



명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법 및 미토콘드리아 염색용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 고형암의 발전은 혈관신생을 요구한다. 미토콘드리아 기능은 혈관신생과 연결이 되어 있으며, 이는 미토콘드리아가 산소 소비의 주요한 세포소기관이고 혈관신생은 산소 농도-민감성 과정이기 때문이다(Andreyev et al., 2005; Maulik and Das, 2002). 또한, 미토콘드리아 산화환원 상태의 변화는 저산소상태(hypoxia) 동안 활성 산소종(ROS)의 생성을 자극하며, 이는 친-혈관신생 단백질의 전사를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다(Chandel et al., 1998). 논문들에 따르면, 미토콘드리아 복합체 III에서의 ROS 생성은, 저산소상태 동안 HIF-1 α 안정화를 촉발하는 데 필요 충분 조건이며(Brunelle et al., 2005; Chandel et al., 2000; Guzy et al., 2005; Mansfield et al., 2005), 미토콘드리아 DNA 및 전자운반 활성(p° 세포)이 결여된 세포의 경우 저산소상태 동안 ROS의 증가 또는 HIF-1 α 타깃 유전자의 상향조절이 되지 않는다. 복합체 III의 억제제는 저산소 상태 동안 미토콘드리아 ROS 생성을 억제하며 HIF-1 α 의 안정화 및 전사 활성을 억제한다. 이러한 발견들은, 미토콘드리아 복합체 III에서부터의 ROS 생성은 세포 저산소증의 시그널링에서 주요한 이벤트라는 것을 보여준다. 복합체 III에서의 구성성분들이 세포 산소 감지에 관여한다는 사실로부터, 이러한 과정을 억제하는 저분자 화합물들은 저산소증-유도 혈관신생을 억제하는 유용한 수단일 것으로 판단된다.

<3> 미토콘드리아 복합체 III는 11개 단백질 서브유닛으로 구성되어 있다. 복합체의 필수적인 성분들, 예컨대, 사이토크롬 b, 사이토크롬 c1, Rieske 철-황 단백질 및 유비퀴논은 기능적으로 잘 연구되어 있다(Crofts and Berry, 1998; Smith et al., 2004). 특이적 억제제, 예컨대, 안티마이신 A, 스티그마텔린 및 믹소티아졸은 복합체 III의 기능 연구에 널리 이용되고 있다(Xia et al., 1997; Zhang et al., 1998). 그러나, 상기 화합물들은, 전자 운반을 억제하고, 산화성 인산화를 저해하여, 세포사멸을 유도하기 때문에 종양 혈관신생의 억제제로 적합하지 않다. 따라서, ATP 생성을 억제하지 않으면서도 복합체 III의 산소 감지 기능을 없애는 신규한 화합물에 대한 요구가 대두되며, 이는 저산소증에 대한 적응성 반응(예컨대, 혈관 성장인자의 발현)을 억제하는 새로운 혈관신생 저해제 개발에 활용될 수 있다.

<4> 생물학적 스크리닝 기법은 어떤 특정 표현형질의 변화를 유도할 수 있는 천연화합물이나 저분자 화합물을 동정하는 데 유용하다(Kwon, 2003; Liu et al., 1991). 본 발명자들은 혈관내피세포에서 저산소증과 같은 친-혈관신생 자극에 대한 혈관신생성 반응을 억제할 수 있는 화합물을 발굴하기 위하여, 미생물 추출물의 대규모 스크리닝을 실시하였다. 그 결과, 본 발명자들은 바이사이클로 세스테테르펜, 즉 터페스타신을 동정하였고, 이는 독성 역치 값 이하의 농도에서 혈관신생 반응을 억제할 수 있는 후보물질임을 규명하였다(Jung et al., 2003).

<5> 터페스타신은 인 비트로에서 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)의 혈관신생 반응을 강하게 억제하였고, 인 비보에서 배아 CAM(chick chorioallantoic membrane)의 혈관신생을 강하게 억제하였다. 또한, 터페스타신은 HIV 감염 동안 다핵세포질체(syncytium) 형성을 억제하는 것으로 알려져 있으며 화학적으로 합성이 가능하다(Chan and Jamison, 2004; Myers et al., 2002; Oka et al., 1993). 그러나, 상기 화합물의 분자 타겟

및 그의 항-혈관신생 활성의 세포 기전은 전혀 알려져 있지 않다.

- <6> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명자들은 혈관신생을 효과적으로 억제할 수 있는 물질을 스크리닝할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 미토콘드리아 복합체 III의 유비퀴논-결합 단백질(QP-C)이 혈관신생 억제제의 분자 타겟이 될 수 있음을 발견하였다. 더불어, 본 발명자들은 QP-C에 결합한 항혈관신생 후보물질(예컨대, 티페스타신)이 저산소-유도 활성산소 생성, HIF 활성화 및 종양 혈관신생을 억제함을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- <8> 따라서, 본 발명의 목적은 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- <9> 본 발명의 다른 목적은 세포질 미토콘드리아 염색용 조성물을 제공하는 데 있다.
- <10> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

- <11> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- <12> (a) 미토콘드리아 복합체 III의 유비퀴논-결합 단백질(QP-C)과 시험 물질을 접촉시키는 단계; 및
- <13> (b) 상기 시험 물질이 QP-C에 결합하는 지 여부 또는 시험물질이 QP-C의 기능을 억제하는 지 여부를 분석하는 단계; 상기 시험물질이 QP-C에 결합하거나 또는 QP-C의 기능을 억제하면 혈관신생 억제제로 판단한다.
- <14> 본 발명자들은 혈관신생을 효과적으로 억제할 수 있는 물질을 스크리닝할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 미토콘드리아 복합체 III의 유비퀴논-결합 단백질(QP-C)이 혈관신생 억제제의 분자 타겟이 될 수 있음을 발견하였다. 더불어, 본 발명자들은 QP-C에 결합한 항혈관신생 후보물질(예컨대, 티페스타신)이 저산소-유도 활성산소 생성, HIF 활성화 및 종양 혈관신생을 억제함을 발견하였다. HIF-매개 유전자 발현은 당분해 기능, 세포 증식, 세포 이동 및 혈관신생을 포함하는 종양 발전의 중요한 측면을 촉진하기 때문에, 본 발명의 세포 산소 센싱의 억제는 혈관신생을 저해할 수 있는 새로운 접근법이다.
- <15> 본 발명의 스크리닝 방법에 따르면, 미토콘드리아 복합체 III의 유비퀴논-결합 단백질(QP-C)과 시험 물질을 접촉시킨다.
- <16> 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 QP-C는 세포 표면에 전시(displaying)되어 있는 형태, 바이러스(예컨대, 박테리오파아지) 표면에 전시되어 있는 형태 또는 세포 내에 존재하는 것일 수 있다. 또는, QP-C는 분리된(isolated) 또는 정제된(purified) 형태일 수 있다.
- <17> 세포 표면 또는 바이러스 표면에 전시되어 있거나 세포 내에 존재하는 QP-C를 이용하는 경우, 스크리닝의 신속화 또는 자동화를 위하여 상기 세포 또는 바이러스는 고상의 기질에 고정화시키는 것이 바람직하다. 또한, 분리된(isolated) 또는 정제된(purified) 형태의 QP-C도 고상의 기질에 고정화시키는 것이 바람직하다. 기질로서 이용가능한 것은, 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 가능하며, 예를 들어, 폴리스틸렌과 폴리프로필렌과 같은 탄화수소 폴리머, 유리, 금속 및 젤을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 고상의 기질은 덩스틱, 마이크로타이터 플레이트, 입자(예컨대, 비드), 친화성 컬럼 및 면역블롯 막(예컨대, 폴리비닐리덴 플루오라이드 막)의 형태로 제공될 수 있다(참조: 미국 특허 제5,143,825호, 제5,374,530호, 제4,908,305호 및 제5,498,551호). 가장 바람직하게는, 상기 고상 기질은 마이크로타이터 플레이트이다.
- <18> 본 발명에서 이용되는 QP-C는 바람직하게는 인간 QP-C이며, 그의 아미노산 서열은 GenBank accession No. NM_006294 에 기재되어 있다.
- <19> 본 발명의 스크리닝 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 분석(binding assay)에 따라 고속(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다.

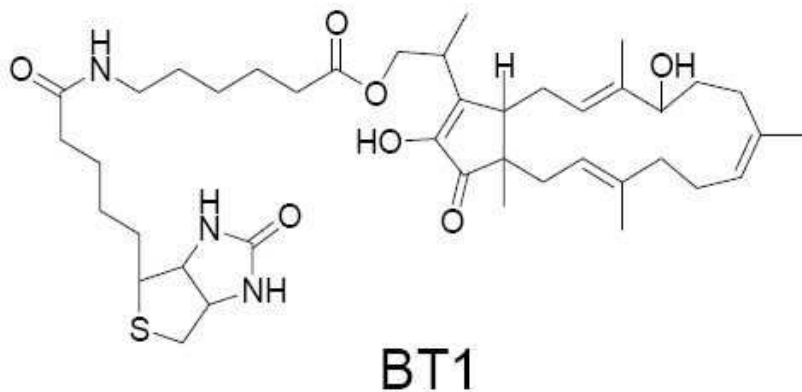
- <20> 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질 또는 QP-C 단백질은 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스라디쉬 퍼옥시다아제, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광 표지[예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM], 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.
- <21> 검출가능한 표지가 레이블링된 QP-C 또는 시험물질을 이용하는 경우, QP-C와 시험물질 사이의 결합 발생 여부는 표지로부터 나오는 시그널을 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-BI-포스페이트(naphthol-AS-BI-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스라디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), σ -페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌와 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.
- <22> 택일적으로, 시험물질의 QP-C로의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 분석할 수도 있다. 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 시험물질이 QP-C에 결합하는 지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 셀이 그의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는, 시험물질과 QP-C 사이의 결합에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다(McConnell et al., *Science* 257:1906-1912(1992)).
- <23> 시험물질의 QP-C와의 결합 능력은 실시간 이분자 상호작용 분석(BIA)를 이용하여 분석할 수 있다(Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63:2338-2345(1991), and Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705(1995)). BIA는 실시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술로서, 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 실시할 수 있다(예컨대, BIAcore™). 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.
- <24> 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은, 투-하ybrid 분석 또는 쓰리-하ybrid 분석 방법에 따라 실시할 수 있다(U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al., *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura et al., *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel et al., *BioTechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi et al., *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; 및 WO 94/10300). 이 경우, QP-C를 베이트(bait) 단백질로 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, QP-C에 결합하는 물질, 특히 단백질을 스크리닝 할 수 있다. 투-하ybrid 시스템은 분할 가능한 DNA-결합 및 활성화 도메인으로 구성된 전사인자의 모듈 특성에 기초한다. 간단하게는, 이 분석 방법은 두 가지 DNA 컨스트럭트를 이용한다. 예컨대, 하나의 컨스트럭트에서, QP-C-코딩 폴리뉴클레오타이드(예컨대, GenBank accession No. NM_006294)를 공지의 전사 인자(예컨대, GAL-4)의 DNA 결합 도메인-코딩 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 다른 컨스트럭트에서, 분석 대상의 단백질("프레이" 또는 "시료")을 코딩하는 DNA 서열을 상기 공지의 전사인자의 활성화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 만일, 베이트 및 프레이가 인 비보에서 상호작용하여 복합체를 형성하면, 전사인자의 DNA-결합 및 활성화 도메인이 인접하게 되며, 이는 리포터 유전자(예컨대, LacZ)의 전사를 촉발하게 된다. 리포터 유전자의 발현을 검출할 수 있으며, 이는 분석 대상의 단백질이 QP-C와 결합할 수 있음을 나타내는 것이며, 결론적으로 혈관신생 억제제로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다.
- <25> 본 발명의 스크리닝 방법을 몇 개의 구체적인 예로 상세히 설명하면 다음과 같다:
- <26> 첫 번째 예시적인 방법은 다음과 같다:
- <27> 첫 번째 예시적인 방법은 파아지 디스플레이 결합 분석에 따라 실시된다. QP-C-인코딩 파아지의 표면에는 QP-C가 전시되어 있다. 파아지(예컨대, T7) 표면에 전시되어 있는 QP-C에 시험물질을 접촉시켜 시험물질이 QP-C에 결합하는 지 여부를 측정함으로써, 혈관신생 억제제를 스크리닝한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (a) 이전에 QP-C에 터페스타신(terpestacin)을 처리하는 단계를 추가적으로 포함한다. 즉, QP-

C에 시험물질을 접촉시키기 전에, QP-C에 특이적으로 결합하는 터페스타신을 QP-C에 처리하여 미리 결합시킨 다음, 시험물질을 QP-C에 처리하여 QP-C 결합에 대하여 시험물질이 터페스타신과 경쟁하는 지 여부를 분석한다. QP-C에 결합하는 시험물질을 과량 처리하면, QP-C에 결합되어 있는 터페스타신이 QP-C로부터 떨어져 나오게 된다.

<28> 분석을 용이하게 하기 위하여, 터페스타신을 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링 할 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광 표지[예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM], 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.

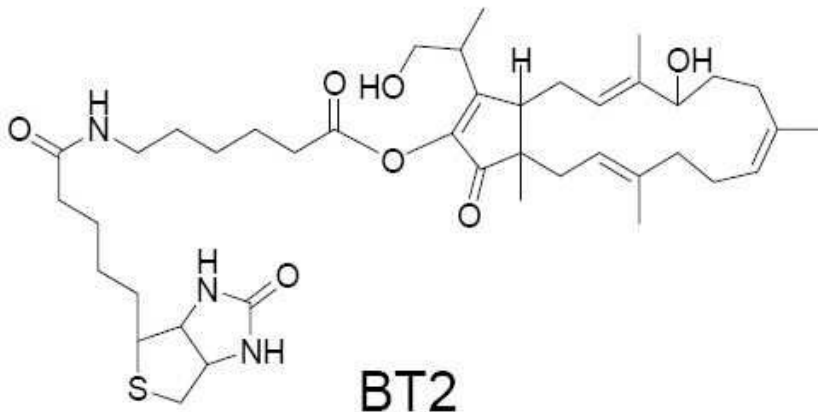
<29> 터페스타신을 바이오틴으로 레이블링 하는 경우, 바람직하게는 다음 화학식 1 또는 2로 표시되는 터페스타신-바이오틴 컨쥬게이트를 제조한다:

<30> 화학식 1



<31>

<32> 화학식 2



<33>

<34> 상기 두 터페스타신의 경우, C-24 (BT1) 또는 C-17 (BT2) 위치 하이드록실기에 바이오틴을 컨쥬게이션 시킨 것이다. BT1 및 BT2는 바이오틴이 컨쥬게이션 되어 있으면서도, 터페스타신의 고유한 생물학적 활성을 가지고 있다.

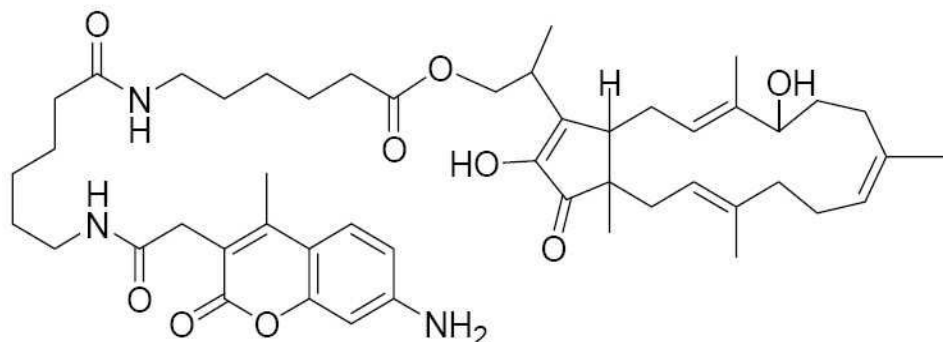
<35> 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 시험 물질 처리된 QP-C에 터페스타신(terpestacin)을 처리하여 터페스타신이 QP-C에 결합하는 지 여부를 조사하여 실시한다.

<36> 두 번째 예시적인 방법은 세포질 염색 방법에 따라 실시된다. 세포질 염색 방법은 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트를 이용한다.

- <37> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, QP-C는 세포내의 미토콘드리아 복합체 III에 존재한다. 보다 바람직하게는, QP-C는 미토콘드리아 복합체 III를 포함하는 세포 내에 존재하는 것이다.
- <38> QP-C 포함 세포를 가지고 본 발명의 스크리닝 방법을 실시하는 경우, 바람직하게는, 상기 단계 (a) 이후에 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트를 시험물질 처리된 QP-C 함유 세포에 처리한다. 바람직하게는, 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트는 시험물질보다 낮은 몰 비율로 첨가된다. 이 경우, 시험물질 처리된 QP-C 함유 세포의 세포질이 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트에 의해 염색이 되면, 시험물질은 QP-C에 결합 친화도를 갖지 않는 것으로, 즉 혈관신생 억제제의 후보물질이 아닌 것으로 판정한다. 세포질의 염색은 형광현미경으로 관찰할 수 있다.
- <39> 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 세포질 염색 방법은 우선 상기 단계 (a) 이전에 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트를 QP-C 함유 세포에 처리한다. 이어, 과량의 시험물질을 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트 처리된 QP-C 함유 세포에 처리한다. 이 경우, 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트에 의해 세포질 염색된 세포가 시험물질에 의해 탈색화 되면, 시험물질은 QP-C에 결합 친화도를 갖는 것으로, 즉 혈관신생 억제제의 후보물질로 판정된다.
- <40> 본 발명의 스크리닝 방법은, 시험물질이 QP-C의 기능을 억제하는 지 여부를 조사하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 시험물질의 미토콘드리아의 막전위를 감소시키거나, 저산소 조건 하에서의 미토콘드리아 ROS 생성 및 HIF-1 α 안정화를 억제하는 것으로 판정되면, 시험물질은 QP-C의 기능을 억제하는 것으로 판정되며, 결국 시험물질은 혈관신생 억제 후보물질로 결정된다.
- <41> 상기 QP-C의 기능 분석을 통한 스크리닝 방법은 바람직하게는, 상술한 결합 분석에 의한 스크리닝 방법과 병용하여 실시된다.
- <42> 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험 물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.
- <43> 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스를 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- <44> 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 QP-C에 결합하는 것으로 판정된 시험물질은 다양한 혈관신생-관련 질환 치료제의 후보물질로서 이용될 수 있다.
- <45> 하기의 실시예에서 입증한 바와 같이, QP-C에 작용하는 물질은 세포사멸을 유도하지 않으면서 혈관신생 반응(angio-genic responses)을 억제하기 때문에, 본 발명의 스크리닝 방법은 안전성이 확보된 혈관신생 억제제를 제공할 수 있다.
- <46> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 의해 스크리닝된 화합물은, 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경변증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방에 이용될 수 있다.
- <47> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 터페스타신에 쿠마린 화합물이 공유결합되어 있는 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트를 포함하는 미토콘드리아(또는 세포질) 염색용 조성물을 제공한다.
- <48> 본 발명의 미토콘드리아 염색용 조성물은 터페스타신이 미토콘드리아 복합체 III의 QP-C에 특이적으로 결합한다는 발견에 기초한 것이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 터페스타신-쿠마린 컨쥬게이트는 하기 화학식 3으로 표시된다:

화학식 3



효과

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- (i) 본 발명은 혈관신생 억제제가 작용하는 분자 타겟으로서 QP-C를 최초로 제시한다.
- (ii) 본 발명의 스크리닝 방법은 QP-C에 작용하는 물질을 발굴하여, 혈관신생 억제제를 제공한다.
- (iii) 본 발명에 따르면, 효과적인 혈관신생 억제제를 고속으로 그리고 대량으로 스크리닝할 수 있다.
- (iv) 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 발굴된 혈관신생 억제제는 세포사멸을 유도하지 않으면서 혈관신생 반응(angio-genic responses)을 억제하기 때문에, 안전성이 담보된 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험 재료 및 실험 방법

실험 재료

터페스타신은 진균류, *Embellisia chlamydospora*의 추출물로부터 정제하였다(Jung et al., 2003). 악티마이신 A, 믹소티아졸 및 로테논은 Sigma로부터 구입하였고, 스티그마텔린은 Fluka로부터 구입하였다.

인 비보 유방암 제노그래프트 모델 연구

C3H/HeJ(중양실험동물) 24 마리에 자연 발생 FM3A 유방암 세포를 피하 이식하였다. 12 마리 마우스를 0, 2, 4, 6 및 8일째에 터페스타신(2.5 μ M)을 복강 투여하였다. 다른 12 마리 마우스는 음성대조군으로서 염수를 주입하였다. 10일째, 종양-보유 마우스에 대하여 1.5 T 자기공명(MR) 스캐너에서 Gd-DTPA를 이용하여 다이내믹 T1-가중 시퀀스로 조사하였다. 조사 후, 종양을 수집하고 항-CD34 항체를 이용하여 종양 혈관을 면역염색하였다.

(1) MRI. 여기 및 시그널 수용을 위한 래디오주파수 코일을 이용하여 임상 1.5 T 전체 MR 시스템(Gyrosan, Philips)으로 MRI를 실시하였다. 모든 동물에 대하여, 다음의 이미징 변수를 이용하여 고해상도 T1 및 T2-가중 펄스 시퀀스 및 다이내믹 콘트라스트 강화 T1-가중 MRI로 조사하였다: TR/TE = 500/10 ms, 플립각 = 30°, acquisition = 8, 매트릭스 크기 = 256 x 198, 슬라이스 두께 = 1.5 mm, 및 인-플레인 해상 = 234 x 234 μ m.

(2) 면역조직화학염색. 4 μ m 파라핀 절단물을 항-CD34 마우스 단일클론 항체(1:80 희석, DakoCytomation)로 습윤 챔버에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 세척한 후, 슬라이드를 이차항체로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. LSAB2/HRP 염색 키트(DakoCytomation) 및 En Vision 키트(DakoCytomation)를 이차항체 반응에 이용하였다. 이어, 슬라이드를 세척하고 아비딘-바이오틴-퍼옥시다아제 복합체와 반응시키고, 그런 다음 DNBA(3, 3'-

DiaminobenzidineTetrahydrochloride) 발색 반응을 실시하였다. 헤마토자일린을 이용하여 카운터염색을 실시하였다.

<66> (3) VEGF-효소 연결 면역흡착 분석(ELISA). FM3A 유방암종을 갖는 C3H 마우스에 터페스타신 또는 부형제(염수)를 2일 간격으로 주입하였다. 7일째에 이식물을 수집하고, 종양조직 추출물에서 VEGF 단백질의 농도를 VEGF-ELISA(R&D Systems)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 결정하였다. VEGF 단백질 농도는 각각의 시료의 총 단백질 농도에 대하여 정규화 하였다.

<67> 터페스타신에 대한 분자 프로브의 합성

<68> (1) 바이오틴화 터페스타신. EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, 1.5 mg, 0.0078 mmol, Sigma-Aldrich) 및 DMAP (4-dimethylaminopyridine, 1.0 mg, 0.0082 mmol, Sigma-Aldrich)를 터페스타신(3.0 mg, 0.0075 mmol)의 교반 용액에 첨가하고, N-(+)-바이오티닐-6-아미노헥사노산 (2.7 mg, 0.0076 mmol, Pierce Biotechnology, Inc.) in DMSO (3 ml)를 0°C에서 첨가하였다. 실온에서 하룻밤 동안 반응시킨 다음, 반응결 과물을 에탄올(15 ml)로 추출하고, 정제용 TLC (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1)로 정제하여 2종의 바이오틴화 터페스타신 유도체(C-24 위치에서의 하이드록실기[BT1] 및 C-17 위치에서의 하이드록실기[BT2])를 얻었다. 수율은 75% 이었다. MALDI-MS for C₄₁H₆₃N₃O₇S m/z 764.5 [M+Na]⁺.

<69> (2) 쿠마린-컨쥬게이트 터페스타신. EDC (1.0 mg, 0.0052 mmol) 및 DMAP (0.64 mg, 0.0052 mmol)를 터페스타신 (2.0 mg, 0.005 mmol) 및 Boc-6-아미노헥사노산 (1.2 mg, 0.0052 mmol) in DMF (2 ml)의 교반된 용액에 0°C에서 첨가하였다. 실온에서 하룻밤 동안 반응시킨 다음, 반응산물을 에탄올(4 ml x 3)으로 추출하고, 20% TFA in CH₂Cl₂ (1 ml)로 처리한 다음 실온에서 2시간 동안 교반하였다. DIPEA (1.3 mg, 0.01 mmol) 및 6-((7-아미노-4-메틸쿠마린-3-아세틸) 아미노) 헥사노산 숙시니미딜 에스테르(2.2 mg, 0.005 mmol, Molecular Probes)를 0°C에서 첨가하였다. 실온에서 4시간 동안 교반한 다음, 반응산물을 에탄올 (20 ml)로 추출하고 정제용 TLC (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1)로 정제하여 쿠마린-컨쥬게이트 터페스타신을 61% 수율로 얻었다. MALDI-MS for C₄₉H₇₁N₃O₉ m/z 868.5 [M+Na]⁺.

<70> 미토콘드리아 막 전위($\Delta \Psi_m$)의 측정

<71> $\Delta \Psi_m$ 의 변화를 형광-기반 분석으로 측정하였다. 세포를 래디시콜 또는 터페스타신으로 4시간 동안 반응시킨 다음, 친유성 양이온성 프로브인 5,5',6,6'-테트라클로로-1,1',3,3'-테트라에틸벤즈이미다졸-카보사이어나인 요오다이드(JC-1, Molecular Probes) 0.25 μ g/ml로 15분 동안 염색시켰다. 과분극 막 전위(to -140 mV)에서, 상기 염색제는 적색 형광 J-응집체를 형성하고, 탈분극 막 전위(to -100 mV)에서 상기 염색제는 녹색 형광 모노모형을 유지한다. 이어, 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 2회 세척하였다. 이미지를 IX70 형광 현미경 (Olympus)으로 100 배 배율로 얻었다. 전위-의존성 형광 염색제인, 테트라메틸로다민 메틸 에스테르(TMRM, Molecular Probes)로 염색하여 $\Delta \Psi_m$ 의 변화를 측정하였다. 세포를 터페스타신, 래디시콜 또는 미토콘드리아 호흡사슬 억제제로 4시간 동안 처리하였다. 이어, 세포를 0.2 μ g/ml TMRM으로 10분 동안 염색하였다. PBS로 세척한 다음, 세포를 형광현미경 하에서 관찰하였다.

<72> 파아지 디스플레이 친화도 선별

<73> 바이오틴화 터페스타신은 스트렙타비딘-코팅 플레이트(Pierce)에 고정화 하고, 간 종양, 정상 간, 알쯔하이머 뇌, 정상 뇌 및 정상 위 조직의 인간 cDNA 라이브러리를 코딩하는 T7 파아지(Novagen)를 이용하여, 종래의 기술에 따라 파아지 디스플레이를 실시하였다(Shim et al., 2004). 특이적 터페스타신-결합 파아지를 분리하고, PRISM Dye Terminator 사이클 시퀀싱 Ready Reaction 키트(Applied Biosystems)를 이용하여 DNA 시퀀싱을 하였다. 얻어진 서열의 서열 상동성은 BLAST 프로그램(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)을 이용하여 GenBank에서 분석하였다.

<74> 인간 QP-C의 클로닝, 발현 및 정제

<75> 포유동물 발현을 위하여, pCDNA3.1-HA (Invitrogen)의 EcoRI/XhoI 위치에 PCR-증폭된 전장 QP-C cDNA (접근번호 NM_006294)를 서브클로닝 함으로써 전장 인간 QP-C 발현 벡터를 구축하였다. 박테리아로부터 재조합 QP-C 단백질을 얻기 위하여, QP-C cDNA를 pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia)의 EcoRI/XhoI 위치에 삽입 하였다. GST-QP-C 융합 단백질을 종래의 방법(Park et al., 2005)에 따라 정제하고, GST를 제거하기 위하여 트롬빈으로 처리

하였다(Amersham Pharmacia).

<76> SPR(Surface plasmon resonance) 분석

<77> 바이오틴 및 바이오틴화 터페스타신을 스트렙타비딘-코팅(SA) 센서 칩의 표면에 연속적으로 고정화 시켰다. 분자 상호작용 분석은 BIAcore 2000 (BIAcore AB)을 이용하여 종래의 방법 (Shim et al., 2004)에 따라 실시하였다. SPR 반응 곡선은 BIAcore 평가 소프트웨어 버전 3.1을 이용하여 분석하였다. 어페런트 결합 및 해리 상수는 속도론적 상수 공식으로부터 계산하였다: $K_A = k_a/k_d$, $K_D = k_d/k_a$.

<78> 세포 배양 및 저산소 상태

<79> HUVECs의 초기 패시지 (4-8 패시지)를 10% 우태아혈청(FBS, Invitrogen)이 보충된 내피세포 배지-2(EGM-2, Cambrex)에서 성장시켰다. HT1080 (섬유육종) 및 AGS (위암) 세포를 10% FBS를 포함하는 최소 필수 배지 (MEM, Invitrogen)에서 유지하였다. 세포를 습윤 5% CO₂ 항온기에서 유지시켰다. 저산소 조건을 위하여, N₂로 밸런스된 1% O₂ 및 5% CO₂ 대기 하에서 저산소 챔버(Forma)에서 세포를 배양하였다.

<80> 터페스타신의 세포내 위치 분석

<81> 형광 현미경 분석을 위하여, HT1080 세포를, 과량의 터페스타신의 존재 또는 부존 하에서 20 μM 쿠마린 또는 쿠마린-퀴누계이트 터페스타신(ter-쿠마린)으로 24시간 동안 처리하였다. PBS로 세척한 다음, 세포를 형광 현미경(Olympus)으로 관찰하였다. 터페스타신의 세포내 위치를 결정하기 위하여, HT1080 세포를 24-웰 플레이트의 유리 커버슬립 상에서 성장시키고, 50 μM 쿠마린 또는 ter-쿠마린으로 30분 동안 처리하였다. 미토콘드리아를 염색하기 위하여, 세포를 MitoTracker (100 nM, Molecular Probes)으로 37℃에서 15분 동안 처리하였다. PBS로 세척한 다음, 세포를 4% 포름알데하이드로 고정하고, 커버슬립을 ProLong Antifade 키트 (Molecular Probes)로 마운팅 하였다. 형광 이미지를 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Axiovert 100m, Carl Zeiss)으로 얻었다.

<82> ROS의 측정

<83> 세포내 ROS 농도는 DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, Sigma)를 이용하여 측정하였다. 세포 내 ROS는 DCFH의 산화를 유발하여, 형광성 산물 DCF(2',7'-dichlorofluorescein)를 생성한다. DCFH-DA (10 μM)로 10분 동안 반응시킨 다음, 세포를 파쇄하고 원심분리하여 데브리스를 제거하였다. 단백질-정규화 상등액에서의 형광은 FL600 마이크로플레이트 형광 리더(Bio-Tek)를 이용하여 결정하였으며, 이 경우 여기 및 방출 파장은 각각 485 nm 및 535 nm이다.

<84> 웨스턴 블롯팅 분석

<85> 6-웰 플레이트에서 성장시킨 HT1080 세포를 파쇄 하였다. 파쇄물을 10% SDS-PAGE에서 분리하고 일반적으로 전기블롯팅 방법에 따라 PVDF 막 (Milipore)으로 전이시켰다. 이어, 블롯들을 블로킹 하고, 항-HIF-1α (Santa Cruz), 항-VEGF (Santa Cruz), 및 항-튜불린 (Upstate) 일차항체로 4℃에서 하룻밤 동안 면역 레이블링 하였다. ECL(enhanced chemiluminescence) 키트(Amersham Pharmacia)를 이용하여 면역레이블링을 검출하였다.

<86> QP-C의 과발현 및 RNAi 연구

<87> QP-C 과발현을 위하여, HT1080 세포를 대조군(neo) 또는 QP-C 발현벡터(1 μg)로 SuperFect transfection 시약 (Qiagen)을 이용하여 형질전환 시켰다. 인간 QP-C-특이 siRNA를 StealthTM RNAi (Invitrogen)를 이용하여 구축하였다. QP-C mRNA의 녹다운을 위하여, HT1080 세포를 대조군 또는 QP-C siRNA (50-200 nM)으로 LipofectamineTM 2000 transfection 시약(Invitrogen)을 이용하여 형질전환 시켰다. QP-C mRNA의 방해는 QP-C에 대한 특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR로 조사하였다.

<88> 인 비트로 혈관신생 분석

<89> 내피세포 또는 종양세포의 침해는 8.0-μm 동공-크기 폴리카보네이트 필터 인서트 (Corning Costar)가 있는 Transwell 챔버 시스템을 이용하여 조사하였다. 튜브 형성 분석은 Matrigel에서 성장한 HUVECs를 이용하여 실시하였다(Jung et al., 2003).

<90> 전사 프로파일링

- <91> Trizol 시약(Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 HT1080 세포로부터 준비하였다. 프로브 준비 및 마이크로어레이 혼성화는 TwinChip Human-8K cDNA 마이크로어레이(Digital Genomics)를 이용하여 실시하였다(Shim et al., 2005). 마이크로어레이 데이터 분석은 GeneSight 데이터 분석 소프트웨어(v3.5, BioDiscovery)를 이용하여 실시하였다. 두 실험 조건 사이에서의 유의적 상관관계수 값(p)은 종래의 방법(Marton et al., 1998)에 따라 얻었다.
- <92> 통계적 분석
- <93> 실험 결과는 평균± 표준오차(SE)로 기재되어 있다. 스튜던트스 시험으로 대조군 및 시험군 사이의 통계적 유의성을 결정하였다. <0.05의 p 값은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 결정하였다.
- <94> 실험 결과
- <95> *터페스타신은 동물 모델 시스템에서 종양 혈관신생을 억제한다*
- <96> 터페스타신은 0.4-1 mM 농도 범위에서 HIV 감염에 대응하여 다핵세포질체(여러개의 핵을 갖는 원형질의 비분할 매스)의 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 최근에, 본 발명자들은 터페스타신이 인 비트로 및 인 비보에서 혈관신생을 억제하는 새로운 생물학적 활성을 갖는다는 것을 발견하였다(Jung et al., 2003). 터페스타신의 항-혈관신생 활성을 보다 정밀하게 평가하기 위하여, 본 발명자들은 이 화합물이 무라인 유방암 제노그라프트 모델에서 종양 혈관신생에 영향을 미치는 지 여부를 조사하였다. C3H/HeJ 마우스를 FM3A 유방암 세포로 접종하고, 이어 터페스타신을 복강으로 투여하였다. 종양-보유 마우스에 대하여 Gd-DTPA를 이용하여 1.5T MR 스캐너에서 다이내믹 T1-가중 시퀀스로 조사하였다. 플라스마 부피를 반영하는 MR 앰플리튜드, 그리고 혈관 투과성에 의해 영향을 받는 Kep 계수를 2-컴파트먼트 모델을 이용하여 계산 하였다. 실험 결과의 MR 시그널 세기는, 900 sec 시점에서 염수 대조군과 비교하여 터페스타신을 처리한 마우스에서 3배 약하게 나왔고(도 1의 패널 A), 이는 터페스타신이 종양 내에서 혈관 형성을 효과적으로 억제한다는 것을 나타내는 것이다.
- <97> 조사 후, 종양을 수집하여 항-CD34 항체를 이용하여 종양 혈관 밀도의 면역염색을 실시하였다. 혈관 고밀도가 대조군 종양 조직에서 관찰되었으나, 터페스타신을 처리한 동물에서는 혈관 밀도가 상당히 감소하였다(도 1의 패널 B). 이러한 데이터는 터페스타신이 인 비보에서 종양 혈관신생을 효과적으로 억제하는 것을 보여주는 것이다.
- <98> *터페스타신-결합 단백질로서 인간 QP-C의 동정*
- <99> 터페스타신에 의한 억제에 대한 분자 기전을 규명하기 위하여, 이 화합물과 상호작용하는 후보 세포 단백질을 규명하는 실험을 실시하였다. 결합 단백질을 분리하는 데 이용되는 친화성 리간드를 생성시키기 위하여, 터페스타신의 C-24 (BT1) 또는 C-17 (BT2) 위치 하이드록실기에 바이오틴을 컨쥬게이션 시켰다. BT1 및 BT2는 터페스타신의 생물학적 활성을 가지고 있으며, 이는 HUVECs에 대하여 항-증식 활성으로 확인하였다. BT1을 우선적으로 스트렙타비딘-코팅 웰 플레이트에 고정화 하였고, 최소 5종의 인간 조직으로부터 얻은 인간 cDNA 라이브러리를 발현하는 T7-과아지를 이용하여 과아지 바이오패닝의 4회를 실시하였다. 바이오패닝 4회 후, BT1에 특이적으로 결합한 과아지 입자를 분리하고 DNA 시퀀싱으로 분석하였다(도 2a). DNA 시퀀싱 하기 위하여 분리한 총 18종 과아지 플라크 중에서, 18 과아지 클론(100%)이 인간 QP-C-인코딩 과아지로 규명되었다. BT1에 대하여 적용된 동일한 과정에 따라, BT2 친화성 리간드를 이용하여 독립적인 실험을 실시하였다. BT2를 이용한 실험에서도 유사한 결과가 나왔으며, BT2-결합 과아지의 90% 이상(총 20 과아지 클론 중에서 18 과아지 클론)이 QP-C를 발현하였다. 나머지 BT2-결합 과아지 클론들은 비특이적 결합 양상을 나타내었다(도 2b). 상기 실험 결과에 따르면, QP-C가 인간 프로테오솜에서 터페스타신의 주요한 결합 단백질이라는 결론을 내릴 수 있다.
- <100> *터페스타신 및 QP-C 사이의 분자적 상호작용 분석*
- <101> 터페스타신이 QP-C에 특이적으로 결합하는 것을 인 비트로 분자 상호작용 분석 및 인 비보 세포 위치분석을 통하여 확인하였다. 우선, 과아지 디스플레이 결합 분석을 통하여, 미토콘드리아 복합체 III 억제제를 포함하는 생물학적 활성 화합물의 다양한 종류에 의해 터페스타신 및 QP-C 사이의 상호작용이 영향을 받는지 여부를 조사하였다. BT1에 대한 QP-C-코딩 과아지의 결합은 과량의 유리 터페스타신의 존재 하에서 완벽하게 제거되었으나, 다른 복합체 III 억제제들 또는 기능적으로 무관한 화합물들에 의해서는 방해받지 않았다(도 3a).
- <102> 이어, 터페스타신 및 인택트 인간 QP-C 사이의 상호작용을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 인간 cDNA로부터 전장 QP-C 유전자를 GST-융합 벡터에 클로닝 하였다. 제조할 융합 단백질을 박테리아에서 발현시킨 다음, GST-풀 다운 방법으로 정제하였다. 융합 단백질로부터 GST를 제거한 다음, 인택트 QP-C를 표면 플라즈몬 공명

(BIAcore) 분석을 실시하였다. 대조군 바이오틴 및 BT1을 스트렙타비딘-코팅 센서 칩의 표면에 고정화 한 다음, 정제된 다양한 농도의 QP-C를 센서 셀에 적용시켰다. BT1에 대한 QP-C 결합 공명 값으로부터 대조군 바이오틴에 대한 QP-C 결합 공명 값을 감하여 어패런트 결합 친화도를 계산 하였다. BIAcore 센서그래프로부터 BT1에 대한 QP-C의 특이적 결합 곡선을 얻었다(도 3b). BIAcore 평가 프로그램을 이용하여 k_a , k_d 및 K_D 의 속도론적 상수를 결정하였다. 터페스타신에 대한 QP-C 결합의 어패런트 해리상수(K_D)는 3.1×10^{-6} M이었다. 이 결과는, QP-C가 마이크로몰 수준에서 터페스타신의 직접적인 결합 단백질을 증명하는 것이다.

<103> 터페스타신 및 QP-C 사이의 상호작용을 추가적으로 연구하기 위하여, 본 발명자들은 터페스타신의 세포내 위치를 분석하였다. 터페스타신(ter-쿠마린)의 C-24 위치에 쿠마린을 공유결합시켜 터페스타신의 형광 컨쥬게이트를 합성하였고, ter-쿠마린의 생물학적 활성을 내피세포 증식 분석으로 확인하였다. 형광 현미경 분석에 따르면, ter-쿠마린은 HT1080 섬유육종 세포의 세포질을 강하게 염색하였으며, 대조군 쿠마린은 염색하지 않았다(도 3c, 상부 패널). 세포를 과량의 유리 터페스타신으로 전처리한 경우, ter-쿠마린의 형광세기가 농도-의존적으로 감소되었으며, 이는 프로브가 터페스타신 타겟 분자에 특이적으로 결합한다는 것을 입증하는 것이다. 결합 터페스타신의 세포내 위치를 조사하기 위하여, ter-쿠마린 및 미토콘드리아 특이 마커, MitoTracker를 이용하여 공초점 현미경관찰을 실시하였다. 이 분석에 따르면, ter-쿠마린의 형광 시그널은 MitoTracker의 형광 시그널과 정확하게 일치 하였다(도 3c, 하부 패널). 이 데이터는, 미토콘드리아 복합체 III에 있는 QP-C가 터페스타신의 주요한 결합 단백질을 보여주는 것이다.

<104> 터페스타신-처리 세포의 지놈-와이드 유전자 발현 프로파일 및 QP-C 녹-다운 발현 사이의 상관성

<105> 터페스타신의 QP-C에 대한 기능적 특이성을 추가적으로 규명하기 위하여, 본 발명자들은 터페스타신, 안티마이신 A 또는 인간 QP-C에 대한 siRNA(siQP-C)로 처리된 HT1080 세포에서의 전사적 변화를 조사하기 위한 cDNA 마이크로어레이 분석을 실시하였다. 마이크로어레이 혼성화 후, 유전자 발현 프로파일의 계층 클러스터링 및 시그네이처 상관 계수 값(ρ)을 이용하여 시그네이처 상관 분석을 실시하였다. 상이한 실험 조건들 사이의 유전자 발현 프로파일의 비교에 따르면, siQP-C 대 터페스타신의 시그네이처는 유의성 있게 상관관계가 있었으며($\rho = 0.62$), siQP-C 대 안티마이신 A의 시그네이처($\rho = -0.01$) 그리고 터페스타신 대 안티마이신 A의 시그네이처($\rho < 0.1$)은 유의적 상관관계를 나타내지 않았다(도 4a 및 4b). 상기 실험 결과는 터페스타신에 의해 유도된 세포 표현형질이 QP-C 녹-다운 세포의 표현형질과 유의적으로 상관성이 있다는 것을 보여 주는 것이며, 이는 결국 QP-C가 터페스타신의 생물학적 관련 타겟임을 증명하는 것이다.

<106> 또한, 터페스타신 및 QP-C siRNA에 의해 상향조절 또는 하향조절된 유전자의 50% 이상은 세포의 생리학적 과정에 관여하는 것들이었다(도 4c). 이들 유전자들 중에서, 몇 개의 미토콘드리아 성분들, 예컨대, F_0 복합체 ATP 켄타아제, NADH 디하이드로젠나아제 1 α 서브복합체 및 전압-의존성 음이온 채널 1은 터페스타신 및 QP-C siRNA에 반응하여 상당히 상향조절 되었다. 이들 유전자들은 산화성 인산화 및 미토콘드리아 막전위에 중요한 유전자들이며, 이는 QP-C의 기능부실이 미토콘드리아 기능을 유지하기 위한 미토콘드리아 단백질-코딩 유전자의 발현을 촉발할 수 있다는 것을 보여준다.

<107> 터페스타신은 미토콘드리아 막전위($\Delta \Psi_m$)를 감소시킨다

<108> 이어, 본 발명자들은 터페스타신의 QP-C에 대한 결합의 생물학적 중요성을 연구하였다. 상기 상호작용이 미토콘드리아 부전을 야기할 수 있는 지 여부를 확인하기 위하여, JC-1 형광 마커를 이용하여 미토콘드리아 막전위($\Delta \Psi_m$)를 측정하였다. JC-1은 전위-의존 방식으로 미토콘드리아에 축적되는 양이온성 형광 염색제이다. 막전하에서의 변화는 적색-오렌지색 형광의 소멸(큰 네가티브 $\Delta \Psi_m$) 및 녹색 형광의 증가($\Delta \Psi_m$ 의 손실)에 의해 명확하게 확인할 수 있다. 도 5a에서 볼 수 있듯이, 대조군 HT1080 세포 또는 구조적으로 관련이 있으나 기능적으로 차이가 있는 라디시콜로 처리한 세포는 녹색 형광의 낮은 수준을 나타내었고 적색-오렌지색 형광의 높은 수준을 나타내었다(큰 네가티브 $\Delta \Psi_m$). 그러나, 터페스타신으로 처리한 경우에는 처리량-의존적으로 녹색 형광이 증가하였고, 적색-오렌지색 형광은 감소하였다($\Delta \Psi_m$ 의 손실). 이 실험 결과와 일치되게, 터페스타신에 의한 $\Delta \Psi_m$ 의 파괴는, 전위-민감성 형광 염색제인 TMRM(tetramethylrhodamine methyl ester)의 염색에 의해 관찰되었다. 다른 미토콘드리아 호흡사슬 억제제들과 같이, 터페스타신은 AGS 위암세포에서 TMRM의 형광세기를 감소시켰다(도 5b). 터페스타신에 의한 $\Delta \Psi_m$ 의 감소는 내피세포와 같은 다른 세포주에서도 관찰할 수 있었다. 상기 실험 데이터는 터페스타신이 QP-C에 결합하면 미토콘드리아의 기능부전을 야기하며 이는 미토콘드리아의 막전위를 파괴한다는 것을 보여준다.

- <109> *터페스타신은 저산소 상태에서 미토콘드리아 ROS 생성 및 HIF-1 α 안정화를 억제한다*
- <110> 미토콘드리아 복합체 III은 저산소 조건 동안 세포 ROS 생성이 이루어지는 주 부분이며, 세포 산소 감지에 관여한다. 또한, 저산소 동안 ROS 생성의 증가는 HIF-1 α 단백질의 안정화를 촉발하며 VEGF와 같은 저산소-유도 유전자의 전사를 매개하는 것으로 알려져 있다. 터페스타신이 저산소 동안의 복합체 III-유도 ROS 생성에 영향을 미치는 지 여부를 조사하기 위하여, 산화제-민감성 형광 프로브인 DCFH(2',7'-dichlorofluorescein)를 이용하여 HT1080 세포에서 세포내 ROS 레벨을 분석하였다. DCFH의 세포 투과성 다이아세테이트 형태(DCFH-DA)는 세포에 들어가며 아세테이트기의 절단 이후에 트랩핑된다. 세포내 ROS에 의해 산화되면, 생성물, DCF의 형광 증가를 검출할 수 있다. 종전의 논문들과 일치되게, 저산소 상태는 ROS 레벨을 증가시켰고 이는 DCF 형광의 증가에 의해 확인하였다(도 6a). 터페스타신은 HT1080 세포에서 저산소-유도 ROS 생성을 크게 억제하였다. 믹소티아졸 및 스티그마텔린과 같은 다른 복합체 III 억제제도 저산소 상태에 의한 ROS 생성을 억제하였다. 그러나, 복합체 III의 다운스트림 말단의 억제제인 안티마이신 A는 ROS 생성의 감소를 초래하지 않았고, 오히려 저산소 동안 ROS 생성을 조금 증가시켰다. 상기 실험 결과는 Chandel et al. (2000)의 논문 결과와 완전히 일치하는 것이며, 상기 논문에 따르면 안티마이신 A는 복합체 III에서 O₂ 감지 지점의 말단에서 전자 흐름을 억제하며 저산소 조건 하에서 ROS 생성의 증가에 영향을 미치지 않는다.
- <111> 저산소 조건 하에서 HT1080 세포에서 HIF-1 α 안정화에 터페스타신 및 복합체 III 억제제가 영향을 미치는 지 여부를 조사하였다. 저산소-유도 HIF-1 α 단백질의 축적은 HT1080 세포에서 터페스타신에 의해 양-의존적으로 억제되었다(도 6b). 믹소티아졸 및 스티그마텔린은 저산소 조건 하에서 HIF-1 α 안정화를 감소시켰으나, 안티마이신 A는 그렇지 아니 하였다. 상기 실험 결과는, 터페스타신이 QP-C에 결합하고 미토콘드리아 복합체 III의 기능을 조절하여 저산소 동안 ROS 증가를 억제하며 이는 HIF-1 α 의 불안정화를 초래한다는 것을 증명한다.
- <112> HIF-1 α 안정화를 유도하는 것은 HIF-1 α 타겟 유전자들의 저산소-유도 전사를 활성화 하는 데 중요한 조절 단계이다. VEGF는 HIF-1 α 의 주요한 타겟 유전자이고, 저산소-유도 혈관신생에서 중요한 역할을 수행한다. 따라서, 본 발명자들은 무라인 종양 혈관신생 모델에서 터페스타신이 VEGF 발현에 영향을 미치는 지 여부를 분석하였다. FM3A 유방암 종 세포가 접종된 C3H 마우스에 2일 간격으로 터페스타신 또는 부형제(염수)를 투여하였다. 7일째에 이식물을 수집하고, 종양 조직 추출물에서 VEGF 단백질의 농도를 VEGF-ELISA로 결정하였다. 대조군과 비교하여, 터페스타신은 마우스 종양 추출물에서 VEGF 단백질 레벨을 크게 감소시켰다(도 6c). 상기 실험 데이터는, 터페스타신이 HIF-1 α 매개 VEGF 발현을 억제함으로써 저산소-유도 종양 혈관신생을 억제한다는 것을 보여준다.
- <113> *저산소-유도 혈관신생에서 QP-C의 관여*
- <114> QP-C는 미토콘드리아 복합체 III의 구성성분으로서 유비퀴놀이 복합체에 결합하는 위치이며 이는 전자전달에 필수적으로 요구되는 과정이며 저산소 동안 ROS 생성을 증가시킨다(Japa and Beattie, 1989). 터페스타신의 생물학적 활성에 대한 결과로부터 추론한 바, QP-C는 저산소 조건 동안 ROS- 및 HIF-매개 혈관신생을 조절하는 데 있어서 매우 중요한 역할을 수행하는 것으로 판단된다. 혈관신생에서 QP-C의 기능을 규명하기 위하여, 본 발명자들은 HT1080 세포에서 QP-C 과발현 및 녹-다운 실험을 실시하였고, 그 결과 관찰된 표현형질을 분석하였다. 우선, HT1080 세포를 전장 QP-C 유전자 또는 대조군을 포함하는 벡터로 일시적 형질전환시켰고, 정상산소 조건 하에서 이들의 침투능을 분석하였다. HT1080 세포에서 QP-C의 과발현은, 정상산소 조건 하에서 종양세포의 침투를 크게 증가시켰다(도 7a). QP-C에 의한 종양세포 침투의 촉진에 ROS가 관여하는 지 여부를 조사하기 위하여, 세포내 ROS 레벨을 DCF 형광분석을 이용하여 측정하였다. 증가된 DCF 형광이, 정상산소 조건 하에서 QP-C 형질전환 세포에서 관찰되었다(도 7b). 또한, 터페스타신은 HT1080 세포에서 QP-C-유도 ROS 생성을 양-의존적으로 억제하였으나, 안티마이신 A는 그렇지 아니 하였다. 또한, QP-C의 과발현은 정상산소 조건 하에서 HIF-1 α 의 단백질 안정성을 조금 재현성 있게 증가시켰다(도 7c). QP-C 과발현 동안 HIF-1 α 안정성의 증가는 코발트 클로라이드(CoCl₂)에 유도된 것과 유사하였으며, 코발트 클로라이드는 HIF-1 α 파괴를 억제하여 저산소 조건에 전사 수준에서 반응하는 것을 흉내 내는 것으로 알려져 있다. VEGF 발현은, 정상산소 조건 하에서 HT1080 세포에서 QP-C 과발현에 의해 증가된다. 그러나, Flt-1 및 KDR과 같은 VEGF 수용체의 발현은 QP-C 과발현에 의해 변화되지 않았다(도 7d).
- <115> 두 번째로, 본 발명자들은 저산소 조건 하에서 HT1080 세포의 혈관신생 촉진 능력에 대한 인간 QP-C 특이적 siRNA (siQP-C)의 효과를 분석하였다. HT1080 세포를 siQP-C 또는 대조군 siRNA로 형질전환 시키고, 저산소 챔버에서 항온처리 하였다. siQP-C에 의한 QP-C 유전자의 녹-다운을 RT-PCR 분석으로 확인하였다(도 8a). 우선, HT1080에서 HIF-1 α 단백질 안정성 및 VEGF 발현에 대한 QP-C 녹-다운의 효과를 조사하였다. 저산소 상

태는 HIF-1 α 의 단백질 안정성 및 VEGF 레벨을 크게 증가시켰다. 저산소 효과는 QP-C 녹-다운에 의해 상당히 블록킹 되었다(도 8b). 이어, 각각의 배양 조건에서 배양된 HT1080 세포로부터 얻은 조건화 배지(CM)를 수집하고 인 비트로 혈관신생 분석을 실시하였다. 저산소 챔버에서 배양한 HT1080 세포의 CM은 HUVECs의 침투 및 튜브 형성을 강하게 활성화 시켰다(도 8c). 그러나, siQP-C로 형질전환된 HT1080 세포로부터 얻은 CM은 HUVECs의 저산소-유도 종양 혈관신생을 완벽하게 블록킹 하였다. 상기 실험 결과는, 미토콘드리아 복합체 III에서 QP-C는 미토콘드리아 O₂ 센서로부터 유래된 ROS-매개 시그널링을 통하여 저산소-유도 종양 혈관신생의 주요한 매개자임을 입증하는 것이다.

<116> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

<117> 참조 문헌

- <118> Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., and Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 200-214.
- <119> Borisov, V.B. (2004). Mutations in respiratory chain complexes and human diseases. *Ital. J. Biochem.* 53, 34-40.
- <120> Brunelle, J.K., Bell, E.L., Quesada, N.M., Vercauteren, K., Tiranti, V., Zeviani, M., Scarpulla, R.C., and Chandel, N.S.(2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 1, 409-414.
- <121> Chan, J., and Jamison, T.F. (2004). Enantioselective synthesis of (-)-terpestacin and structural revision of siccanol using catalytic stereoselective fragment couplings and macrocyclizations. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 10682-10691.
- <122> Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., and Schumacker, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11715-11720.
- <123> Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., and Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 during hypoxia. *J. Biol. Chem.* 275, 25130-25138.
- <124> Chen, Q, Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 278, 36027-36031.
- <125> Crofts, A.R., and Berry, E.A. (1998). Structure and function of the cytochrome bcl complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 501-509.
- <126> Guzy, R.D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K.D., Simon, M.C., Hammerling, U., and Schumacker, P.T. (2005). Mitochondrial Complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 1, 401-408.
- <127> Guzy, R.D. and Schumacker, P.T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91, 807-819.
- <128> Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J.M., Boutron, A., Legrand, A., and Slama, A. (2003). A deletion in the human QP-C gene causes a Complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum. Genet.* 113, 118-122.
- <129> Hong, S.S., Lee, H.S., and Kim, K.W. (2004). HIF-1 α : a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Res. Treatment* 36, 343-353.
- <130> Japa, S., and Beattie, D.S. (1989). Electron transfer through center o of the cytochrome b-c1 complex of yeast mitochondria involves subunit VII, the ubiquinone-binding protein. *J. Biol. Chem.* 264, 13994-13997.

- <131> Jung, H.J., Lee, H.B., Kim, C.J., Rho, J.R., Shin, J., and Kwon, H.J. (2003). Anti-angiogenic activity of terpestacin, a bicyclo sesterterpene from *Embellisia chlamydospora*. *J. Antibiotics* 56, 492-496.
- <132> Kwon, H.J. (2003). Chemical genomics-based target identification and validation of anti-angiogenic agents. *Curr. Med. Chem.* 10, 717-726.
- <133> Liu, J., Farmer, J.D.Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- <134> Malaney, S., Trumppower, B.L., Deber, C.M., and Robinson, B.H. (1997). The N terminus of the Qcr7 protein of the cytochrome bclcomplex is not essential for import into mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* but is essential for assembly of the complex. *J. Biol. Chem.* 272, 17495-17501.
- <135> Mansfield, K.D., Guzy, R.D., Pan, Y., Young, R.M., Cash, T.P., Schumacker, P.T., and Simon, M.C. (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell Metab.* 1, 393-399.
- <136> Marton, M.J., DeRisi, J.L., Bennett, H.A., Iyer, V.R., Meyer, M.R., Roberts, C.J., Stoughton, R., Burchard, J., Slade, D., Dai, H., Bassett, D.E.Jr., Hartwell, L.H., Brown, P.O., and Friend, S.H. (1998). Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat. Med.* 4, 1293-1301.
- <137> Matsuno-Yagi, A., and Hatefi, Y. (2001). Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (Complex III). Effect of inhibitors on cytochrome b reduction in submitochondrial particles and the role of ubiquinone in Complex III. *J. Biol. Chem.* 276, 19006-19011.
- <138> Maulik, N., and Das, D.K. (2002). Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1047-1060.
- <139> Muller, F.L., Liu, Y., and Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49064-49073.
- <140> Myers, A.G., Siu, M., and Ren, F. (2002). Enantioselective synthesis of (-)-terpestacin and (-)-fusaproliferin: clarification of optical rotational measurements and absolute configurational assignments establishes a homochiral structural series. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4230-4232.
- <141> Oka, M., Iimura, S., Tenmyo, O., Sawada, Y., Sugawara, M., Ohkusa, N., Yamamoto, H., Kawano, K., Hu, S.L., Fukagawa, Y., and Oki, T. (1993). Terpestacin, a new syncytium formation inhibitor from *Arthrinium* sp. *J. Antibiotics* 46, 367-373.
- <142> Park, H.J., Cho, H.Y., and Kong, K.H. (2005). Purification and Biochemical Properties of Glutathione S-Transferase from *Lactuca sativa*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 232-237.
- <143> Satake, S., Kuzuya, M., Miura, H., Asai, T., Ramos, M.A., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., and Iguchi, A. (1998). Up-regulation of vascular endothelial growth factor in response to glucose deprivation. *Biol. Cell* 90, 161-168.
- <144> Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 721-732
- <145> Shim, J.S., Lee, H.K., Park, H.M., Kim, J.O., Kim, E.K., Hwang, K.H., Kim, K.T., Park, S.W., Lee, J.H., and Kwon, H.J. (2005). Development of an angiogenesis-focused cDNA chip and validation of its functionality. *Exp Mol Med.* 37, 365-370
- <146> Shim, J.S., Lee, J., Park, H.J., Park, S.J., and Kwon, H.J. (2004). A new curcumin derivative, HBC, interferes with the cell cycle progression of colon cancer cells via antagonization of the Ca²⁺/calmodulin function. *Chem. Biol.* 11, 1455-1463.
- <147> Smith, J.L., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G., and Cramer, W.A. (2004). Cytochrome bc complexes: a common core of structure and function surrounded by diversity in the outlying provinces. *Curr. Opin.*

Struct. Biol. 14, 432-439.

- <148> Spector, J.A., Mehrara, B.J., Greenwald, J.A., Saadeh, P.B., Steinbrech, D.S., Bouletreau, P.J., Smith, L.P., and Longaker, M.T. (2001). Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 280, C72-80.
- <149> Sun, J., and Trumpower, B.L. (2003). Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. Arch. Biochem. Biophys. 419, 198-206.
- <150> Suzuki, H., Hosokawa, Y., Toda, H., Nishikimi, M., and Ozawa, T. (1988). Cloning and sequencing of a cDNA for human mitochondrial ubiquinone-binding protein of complex III. Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 987-994.
- <151> Turrens, J.F., Alexandre, A., and Lehninger, A.L.(1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 237, 408-414.
- <152> Wakabayashi, S., Takao, T., Shimonishi, Y., Kuramitsu, S., Matsubara, H., Wang, T., Zhang, Z., and King, T.E. (1985). Complete amino acid sequence of the ubiquinone binding protein (QP-C), a protein similar to the 14,000-dalton subunit of the yeast ubiquinol-cytochrome c reductase complex. J. Biol. Chem. 260, 337-343.
- <153> Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. Science 277,60-66.
- <154> Zeviani, M., and Di Donato, S. (2004). Mitochondrial disorders. Brain 127, 2153-2172.
- <155> Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., and Kim, S.H. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. Nature 392, 677-684.

도면의 간단한 설명

- <156> 도 1은 인 비보 중앙 혈관신생에 대한 터페스타신의 효과를 보여준다. 패널 A 및 B: FM3A 유방암을 갖는 마우스에 염수(대조군) 또는 터페스타신(1/3 of LD₅₀, LD₅₀ = 4.9 mg/ml)을 처리하였다. (패널 A) 혈관신생 관련 하여 DCE-MR 시그널 세기(화살표)의 시간에 따른 변화. (패널 B) CD34에 대한 항체를 이용하여 종양조직의 파라핀 절편에 대하여 중앙 혈관신생에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였다(화살표로 표시됨).
- <157> 도 2a-2b는 파아지 디스플레이 친화성 선별을 이용한 터페스타신-결합 단백질의 동정 결과이다. 도 2a는 바이오패널의 각각의 라운드 후에 용출된 터페스타신-결합 파아지(Elute)의 수를 분석한 결과이다. "Wash"는 스트렙타비딘-코팅된 웰 상에 고정된 바이오틴화 터페스타신에 결합한 비특이적 파아지를 나타낸다. Pfu, phage plaque forming unit. 도 2b는 BT2 및 QP-C 발현 파아지 사이의 특이적 상호작용을 나타낸다. 대조군 바이오틴 및 비특이적 파아지(N1 및 N2)를 각각 BT2 및 QP-C 파아지에 대한 음성대조군으로 이용하였다. *p < 0.001 versus 대조군 바이오틴.
- <158> 도 3a-3c는 분자간 상호작용 및 터페스타신의 세포내 위치에 대한 실험 결과이다. 도 3a는 QP-C-파아지 및 고정화된 터페스타신 사이의 결합에 대한 다양한 경쟁자의 효과를 보여준다. 모든 경쟁자들은 100 μM의 농도로 사용되었다. Ter, 터페스타신; Ant, 안티마이신 A; Myx, 믹소티아졸; Stig, 스티그마텔린; Rot, 로테논; BetA, 베틀리닉산; Rad, 래디시콜; Cur, 쿠마린; Cel, 셀레코픽. *p < 0.001 versus 비 경쟁자 대조군. 도 3b는 터페스타신과 정제된 QP-C 사이의 상호작용에 대한 SPR 분석 결과이다. 바이오틴에 대한 QP-C의 결합 곡선을 바이오틴화 터페스타신에 대한 QP-C의 곡선으로 감하여, 결합 데이터를 얻었다. k_a, k_d, K_A 및 K_D의 속도론적 상수가 기재되어 있다. 도 3c에서 상부 패널은 과량의 터페스타신 존재 하에서 ter-터페스타신(20 μM)이 세포 내 특이적 타겟에 결합하는 것을 형광 현미경으로 관찰한 것이다. 크기 막대, 200 μm. 하부 패널은 ter-터페스타신(청색) 및 MitoTracker(적색)의 동시국소화를 공초점 현미경으로 관찰한 것이다. 크기 막대, 20 μm.
- <159> 도 4a-4c는 DNA 마이크로어레이로 분석한 지놈-와이드 유전자 발현 프로파일의 상관관계 분석 결과이다. 도 4a에서, 터페스타신 및 QP-C siRNA (siQP-C) 사이의 DNA 마이크로어레이 시그네이처의 상관관계를 계층 클러스터링으로 결정하였다. 도 4b는 두 시그네이처에 대한 스캐터 플롯 및 상관계수 값(ρ)을 보여준다. Log₁₀

R/G는 적색/녹색 비율의 \log_{10} 이다. 도 4c는 터페스타신 및 QP-C siRNA 처리에 의해 공통적으로 상향조절 또는 하향조절된 유전자의 기능적 그룹핑 결과이다.

<160> 도 5a-5b는 미토콘드리아 막전위($\Delta\Psi_m$)에 대한 터페스타신의 효과를 보여준다. 도 5a: HT1080 세포를 터페스타신(20 또는 50 μ M) 또는 라디시콜(10 μ M)로 4시간 동안 처리한 다음, 0.25 μ g/ml JC-1로 15분 동안 염색하였다. 형광 이미지를 형광현미경으로 얻었다. 도 5b: AGS 세포를 터페스타신, 라디시콜 또는 미토콘드리아 호흡사슬 억제제(10 μ M)로 4시간 동안 처리한 다음, 0.2 μ g/ml TMRM으로 10시간 동안 염색하였다. 이미지는 3번의 독립적인 실험들의 대표적인 결과이다. 크기 막대, 200 μ m.

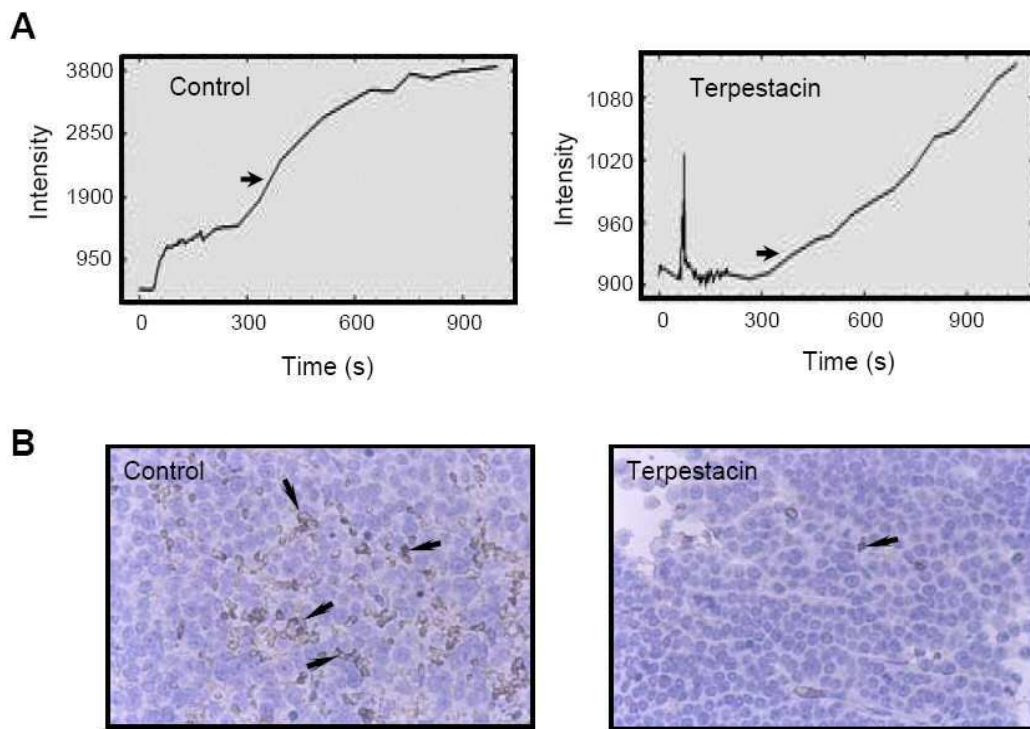
<161> 도 6a-6c는 미토콘드리아 ROS 생성 및 HIF-1 α 안정화에 대한 터페스타신의 효과이다. 도 6a: 세포내 ROS 레벨을 DCF 형광으로 결정하였다. 1% O_2 에 2시간 동안 노출시키기 전에, HT1080 세포를 터페스타신(30 μ M), 안티마이신 A(10 μ M), 믹소티아졸(10 μ M) 또는 스티그마텔린(2.5 μ M)으로 30분 동안 처리하였다. 정상산소 조건(21% O_2) 하에서 세포 내 DCF 형광의 레벨을 100%로 정의하였다. Nor, 정상산소 조건; Hyp, 저산소 조건. * $p < 0.01$ versus 정상산소 대조군; ** $p < 0.005$ versus 저산소 대조군. 도 6b: 1% O_2 에 4시간 동안 노출시키기 전에, HIF-1 α 단백질 레벨을, 터페스타신(20 및 40 μ M), 안티마이신 A(10 μ M), 믹소티아졸(10 μ M) 또는 스티그마텔린(2.5 μ M)로 30분 동안 처리된 HT1080 세포의 웨스턴 블롯 분석으로 평가하였다(상부 패널). 웨스턴 블롯 데이터를 덴시토미터로 정량화 하였다(하부 패널). 저산소 세포(1% O_2)에서의 HIF-1 α 단백질 레벨을 100%로 정하였다. * $p < 0.002$; ** $p < 0.001$ versus 저산소 대조군. 도 6c: 마우스 제노그래프트에서 VEGF 발현에 대한 터페스타신의 효과이다. 종양 조직 추출물에서 VEGF 단백질의 농도를 VEGF-ELISA로 결정하였다. * $p < 0.05$ versus 염수 대조군.

<162> 도 7a-7d는 혈관신생에서 QP-C의 기능을 보여준다(QP-C 과발현). 도 7a는 종양세포 침윤에 대한 QP-C 과발현의 영향을 보여준다. 막대 그래프는 침윤 분석에 대한 정량적 데이터를 보여준다. * $p < 0.007$ versus 대조군. 도 7b: 터페스타신(20 및 40 μ M), 안티마이신 A(10 μ M) 또는 라디시콜(5 μ M) 처리된 HT1080 세포에서 미토콘드리아 ROS 생성에 대한 QP-C 과발현의 영향을 보여준다. * $p < 0.001$ versus 대조군; ** $p < 0.006$ versus QP-C 과발현. 도 7c: 정상 산소 조건하에서 HIF-1 α 단백질 레벨에 대한 QP-C 과발현의 영향을 보여준다. $CoCl_2$ (100 μ M)를 양성 대조군으로 이용하였다. 도 7d: VEGF mRNA 레벨에 대한 QP-C 과발현의 영향을 보여준다.

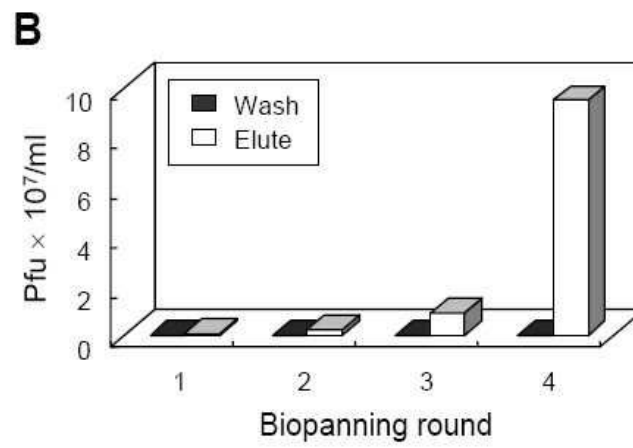
<163> 도 8a-8d는 혈관신생에서 QP-C의 기능을 보여 준다(QP-C 녹다운). 도 8a: RT-PCR 분석은 siRNA에 의한 QP-C mRNA의 녹다운을 보여준다. 도 8b: 저산소 조건 하에서, HIF-1 α 및 VEGF 단백질 레벨에 대한 QP-C siRNA 녹다운의 영향을 보여준다. 도 8c: 저산소 조건 하에서 HT1080 세포의 혈관신생-촉진 활성화에 대한 QP-C 녹다운의 영향을 보여 준다. 각각의 배양 조건에서 얻은 HT1080 세포의 조건화 배지(CM)를 내피세포 침윤(상부 패널) 및 튜브 형성(하부 패널) 분석에 이용하였다. 도 8d: 양성자-모티브 Q-사이클의 모델 및 복합체 III에서 터페스타신의 타겟 위치를 도식적으로 나타낸 것이다. 사이토크롬 bc1 복합체(복합체 III)의 산화환원 센터를 통하여 유비퀴놀로부터 사이토크롬 c로 전자가 운반되는 경로를 보여준다. 터페스타신의 타겟 위치는, O_2 -센싱 위치(Q_o 위치)의 업스트림이며, 따라서 본 발명에 의해 스크리닝된 물질들은 복합체 III으로부터 저산소-유도 ROS 생성을 억제할 수 있다.

도면

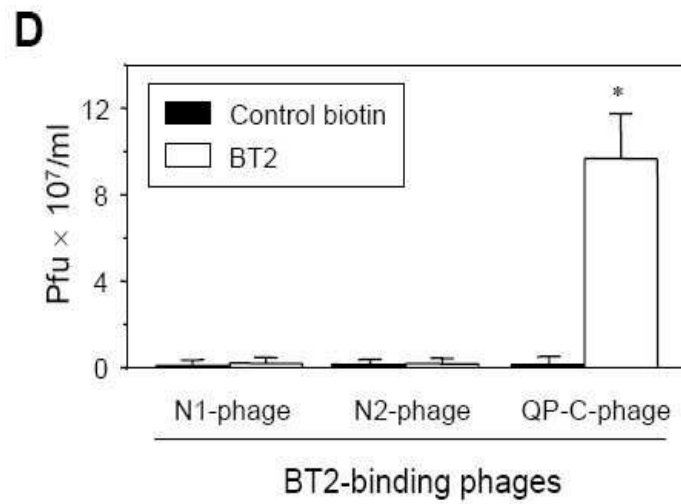
도면1



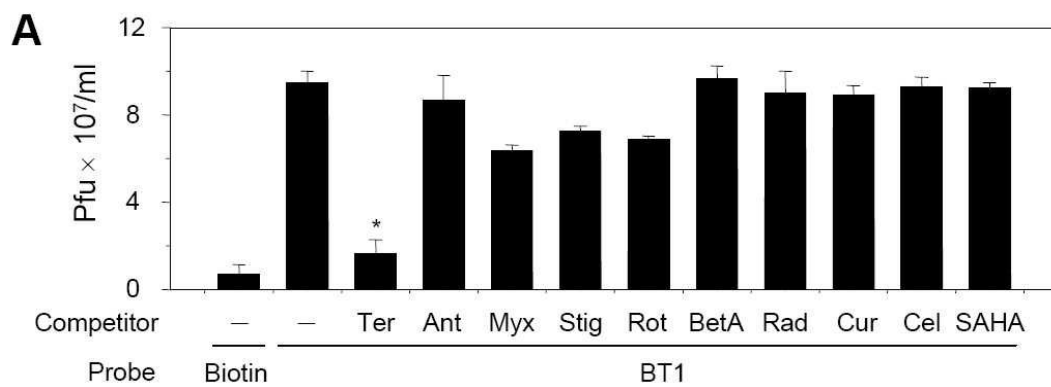
도면2a



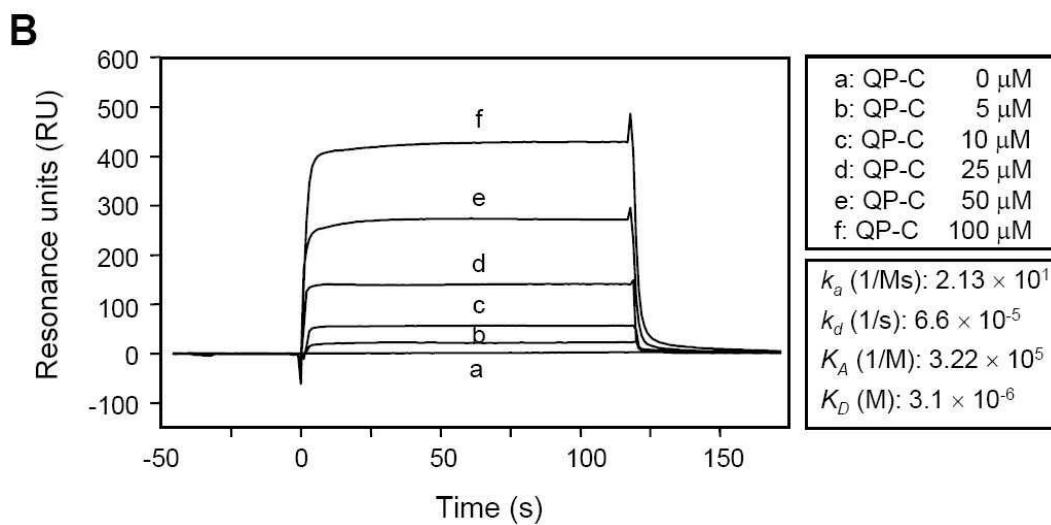
도면2b



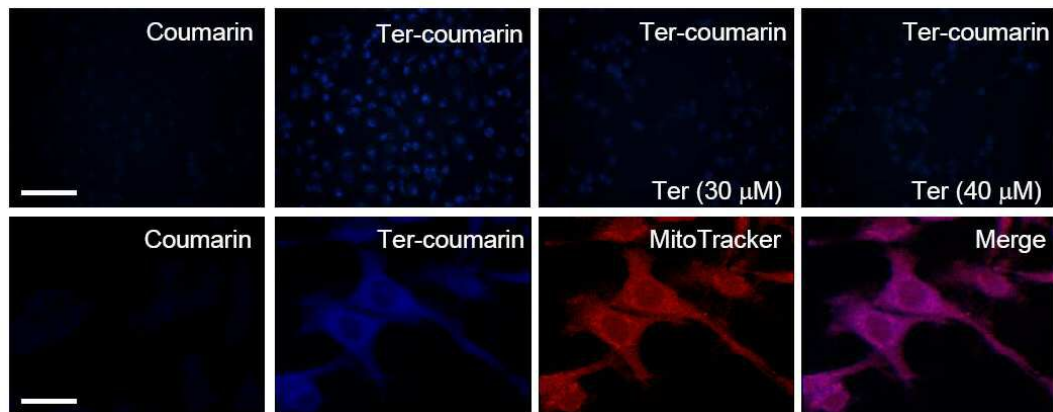
도면3a



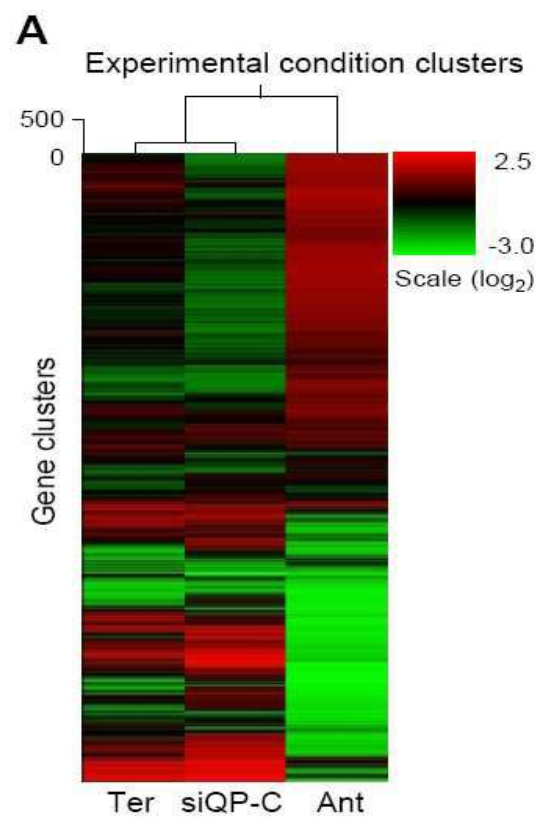
도면3b



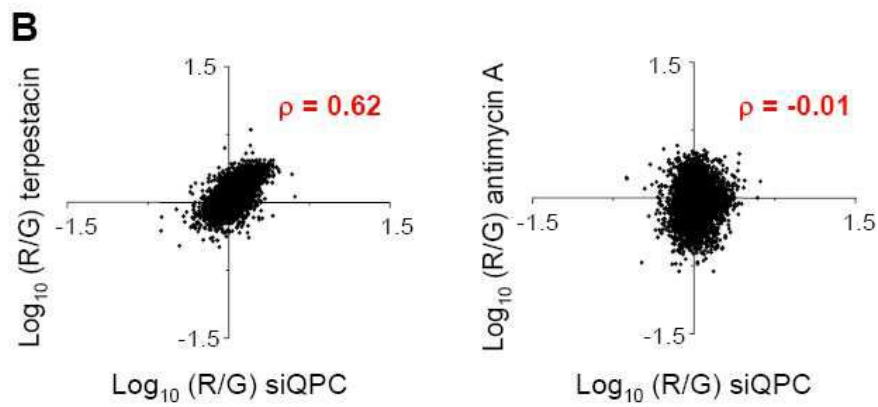
도면3c



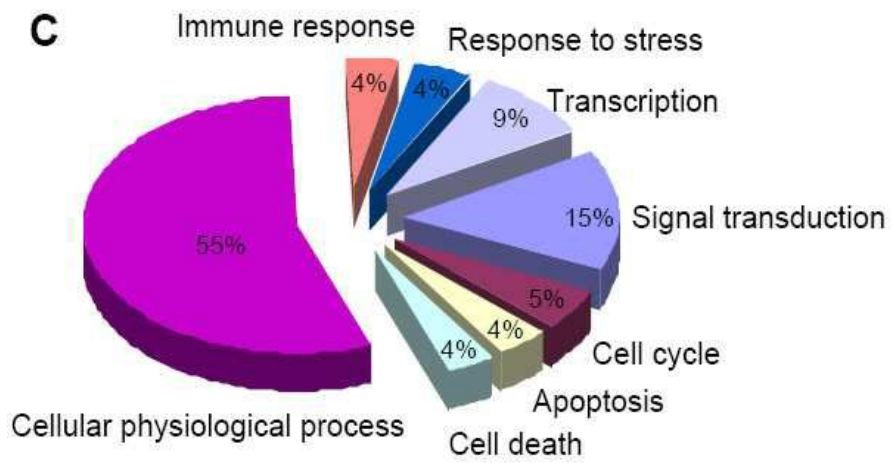
도면4a



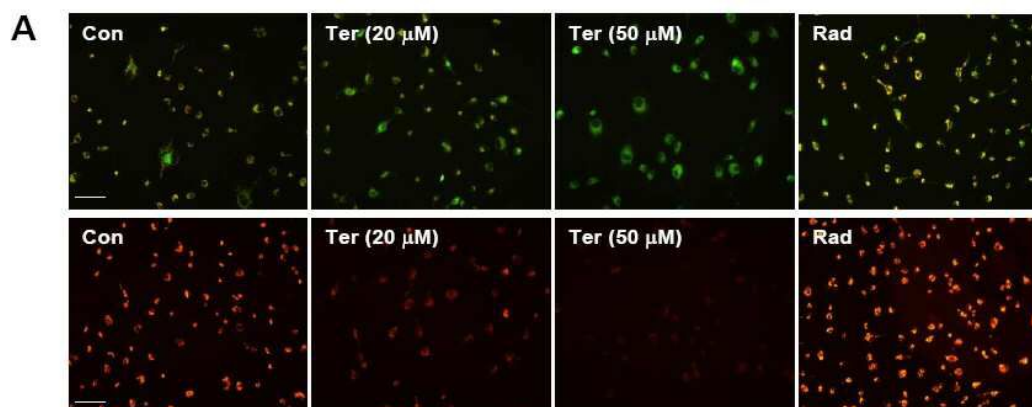
도면4b



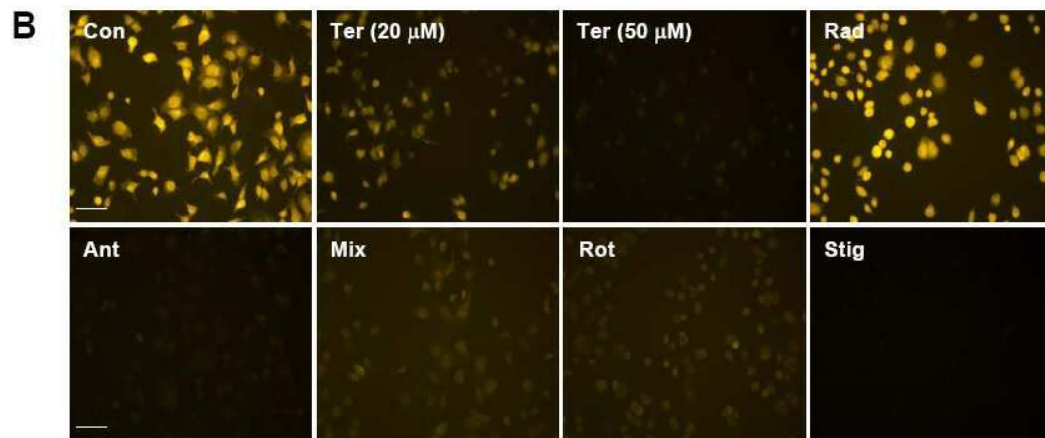
도면4c



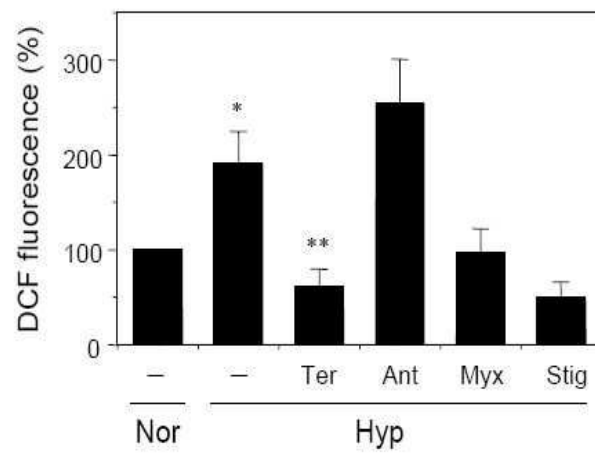
도면5a



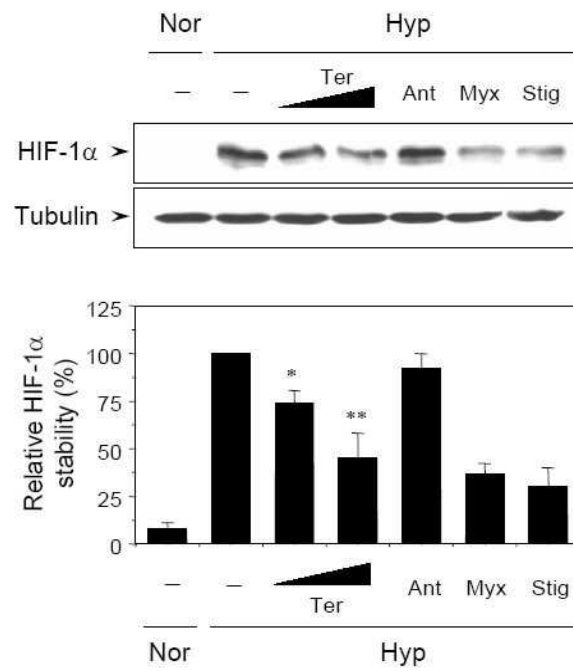
도면5b



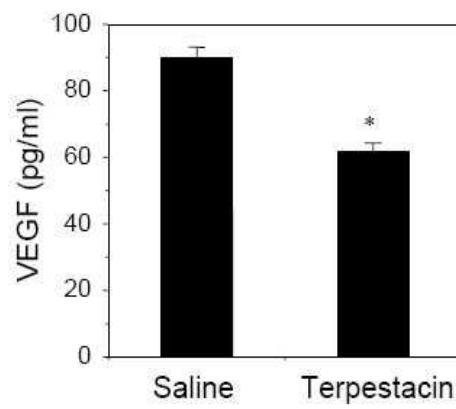
도면6a



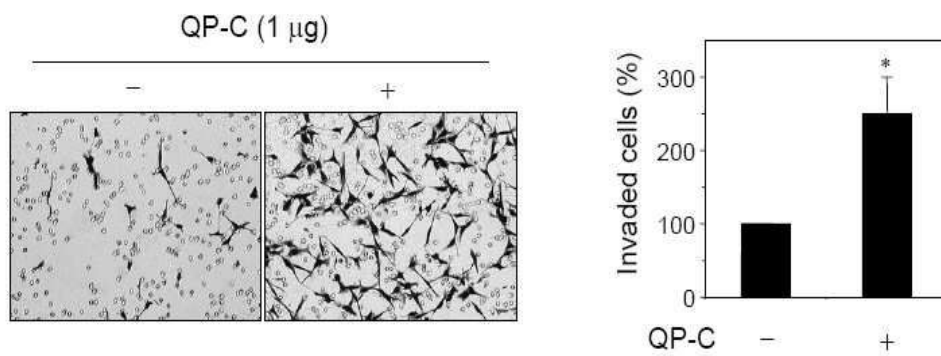
도면6b



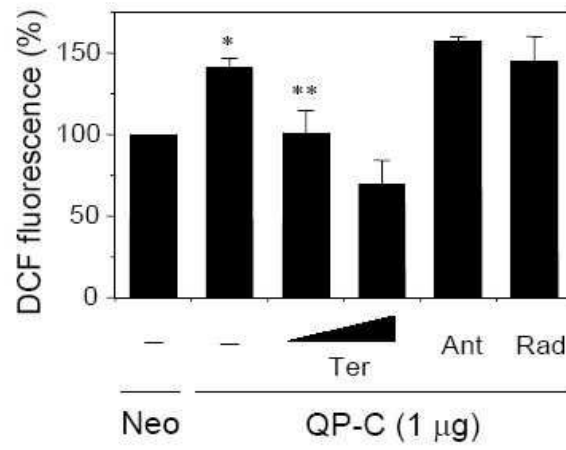
도면6c



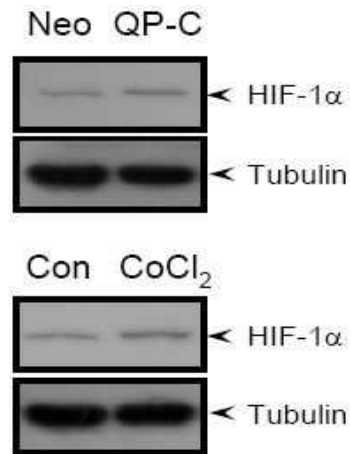
도면7a



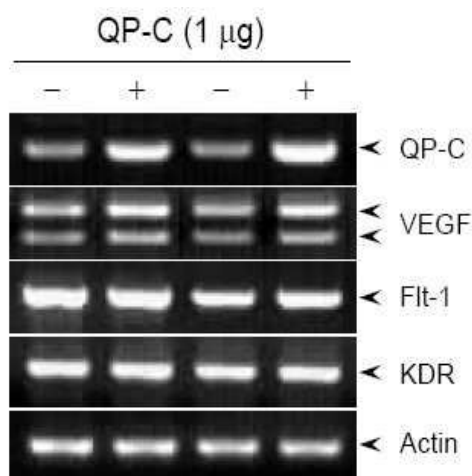
도면7b



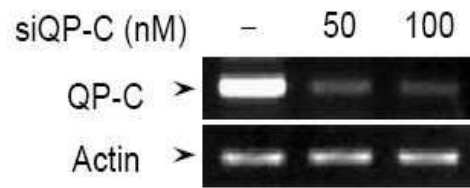
도면7c



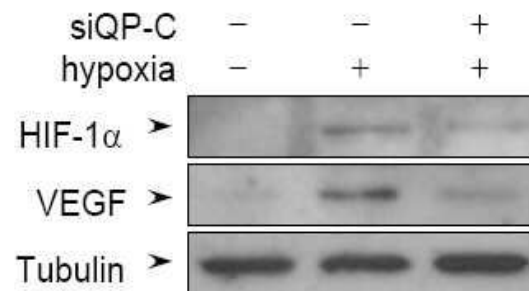
도면7d



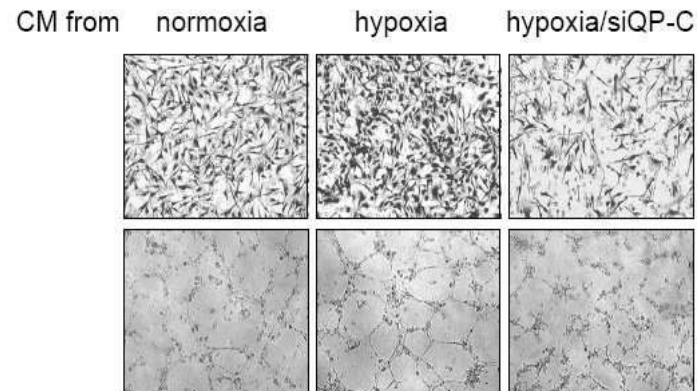
도면8a



도면8b



도면8c



도면 8d

