



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109073638 B

(45) 授权公告日 2022.04.26

(21) 申请号 201780027761.8

(22) 申请日 2017.03.07

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109073638 A

(43) 申请公布日 2018.12.21

(30) 优先权数据  
10-2016-0027077 2016.03.07 KR(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.11.05(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/KR2017/002442 2017.03.07(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/155277 KO 2017.09.14(73) 专利权人 医药生命融合研究团  
地址 韩国京畿道水原市灵通区逛桥路145,  
次世代融合技术研究院B栋8层(二仪洞)

(72) 发明人 金圣勋 金吴圭 任世美

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236  
代理人 庄文莉(51) Int.Cl.  
G01N 33/50 (2006.01)  
G01N 33/574 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)  
A61K 31/5377 (2006.01)  
A61K 31/404 (2006.01)(56) 对比文件  
WO 2016003158 A2, 2016.01.07  
KR 20130118671 A, 2013.10.30  
KR 20150104719 A, 2015.09.16  
KR 20090048382 A, 2009.05.13 (续)

审查员 盛志

权利要求书1页 说明书16页  
序列表5页 附图19页

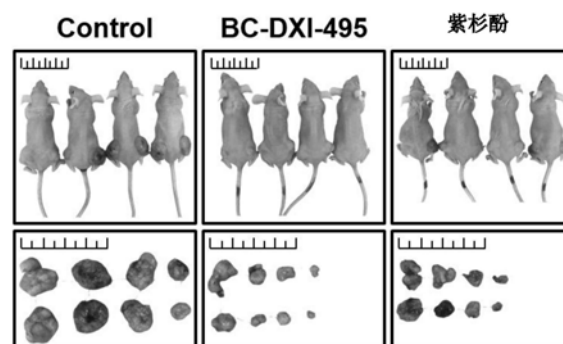
## (54) 发明名称

抑制AIMP2-DX2和HSP70结合的抗癌剂的筛选方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种抑制AIMP2-DX2和HSP70结合的抗癌剂的筛选方法。具体而言,这种抗癌剂筛选方法包括在存在或不存在受试物的情况下,使AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段接触的步骤;在存在或不存在受试物的情况下,测定AIMP2-DX2和HSP70的结合水平的步骤;比较受试物存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平与受试物不存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平,以判断受试物引起的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平的变化的步骤;筛选降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的受试物的步骤;和确认所选受试物在细胞或动物中的抗癌活性的步骤,以及含有用所述方法筛选的抗癌剂这一有效成分的一种抗癌用组合物。HSP70是一种能与在癌的发生和发展中具有关键作用的AIMP2-DX3

直接结合并使其稳定的调节剂,基于这一发现,本发明可以有效地用于开发具有全新作用机制的抗癌剂。此外,含有根据本发明方法筛选的抗癌剂这一有效成分的一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,可有效抑制HSP70的表达或抑制HSP70和AIMP2-DX2的结合,从而降低AIMP2-DX2的水平且有效预防癌症的发展,因此可有效地应用于癌症治疗剂的研发。



[转续页]

[接上页]

**(56) 对比文件**

KR 20140060184 A, 2014.05.19

CN 102985103 A, 2013.03.20

CN 104379565 A, 2015.02.25

KR 101577315 B1, 2015.12.15

CN 101087804 A, 2007.12.12

EP 1814909 A1, 2007.08.08

WO 2014196784 A1, 2014.12.11

WO 2014142619 A1, 2014.09.18

US 2009156536 A1, 2009.06.18

Seung-Hee Chang, et al..Lentiviral  
Vector-Mediated shRNA against AIMP2-DX2  
Suppresses Lung Cancer Cell Growth  
through Blocking Glucose Uptake.《Mol  
Cells》.2012, 第33卷(第6期),

1. 一种抗癌剂筛选方法,包括以下步骤:

(a) 在存在或不存在受试物的情况下,使AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段接触;

(b) 在存在或不存在受试物的情况下,测定AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段的结合水平;

(c) 比较受试物存在情况下的AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段的结合水平与受试物不存在情况下的AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段的结合水平,以判断受试物引起的AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段的结合水平的变化;

(d) 筛选降低AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段结合水平的受试物;和

(e) 确认所选受试物在细胞中的抗癌活性;

所述抗癌剂针对的癌症是表达AIMP2-DX2的癌症,

所述AIMP2-DX2是以序列号1表示的氨基酸序列,所述AIMP2-DX2的片段是以序列号2表示的氨基酸序列;

所述HSP70是以序列号3表示的氨基酸序列,所述HSP70片段是以序列号4表示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗癌剂筛选方法,其特征在于,在所述(d)和(e)步骤之间还包括以下步骤:

(1) 使受试物与表达AIMP2-DX2的细胞接触;

(2) 测定细胞和受试物未接触的对照组细胞中的AIMP2-DX2的蛋白质水平;以及

(3) 筛选与对照组细胞相比更能降低AIMP2-DX2蛋白质水平的受试物。

3. 根据权利要求1所述的抗癌剂筛选方法,其特征在于:所述步骤(b)中测定结合的方法选自双杂交法、共同免疫沉淀试验法、组织免疫染色和共定位分析法、闪烁逼近分析法、UV或化学交联法、双分子相互作用分析法、质谱分析法、核磁共振、荧光偏振分析法或体外下拉试验中任何一个或一个以上的方法。

4. 根据权利要求1所述的抗癌剂筛选方法,其特征在于:抗癌剂针对的癌症为乳腺癌、肺癌、肛门癌、星形细胞瘤、白血病、淋巴瘤、头颈部癌、肝癌、睾丸癌、宫颈癌、肉瘤、血管瘤、食道癌、眼癌、喉癌、口部癌、间皮瘤、骨髓瘤、喉咽癌、膀胱癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、皮肤癌、基底细胞癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、结肠直肠癌、胶质母细胞瘤或恶性胶质瘤。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的抗癌剂筛选方法,其特征在于:所述抗癌剂是siRNA、shRNA、miRNA、核酶、DNA酶、肽核酸、反义寡核苷酸、抗体、适体。

6. 根据权利要求1-4中任意一项所述的抗癌剂筛选方法,其特征在于:所述抗癌剂是肽。

7. 根据权利要求1-4中任意一项所述的抗癌剂筛选方法,其特征在于:所述抗癌剂是天然提取物。

8. 根据权利要求1-4中任意一项所述的抗癌剂筛选方法,其特征在于:所述抗癌剂是化学物质。

## 抑制AIMP2-DX2和HSP70结合的抗癌剂的筛选方法

### 技术领域

[0001] 本申请主张2016年3月7日提交的大韩民国专利申请第10-2016-0027077号的优先权,该说明书的全部内容作为本申请的参考文献。

[0002] 本发明涉及一种抑制AIMP2-DX2和HSP70结合的抗癌剂的筛选方法,具体来说,本发明涉及一种抗癌剂的筛选方法以及含有使用该方法筛选的抗癌剂作为有效成分的抗癌用组合物,包括以下步骤:(a)存在或不存在受试物的情况下,使AIMP2-DX2或其片段与HSP70或其片段接触;(b)存在或不存在受试物的情况下,测定AIMP2-DX2和HSP70的结合水平;(c)比较受试物存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平与受试物不存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平,以判断受试物引起的AIMP2-DX2和HSP70结合水平的变化;(d)筛选降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的受试物;以及(e)确认所选受试物在细胞或动物中的抗癌活性。

### 背景技术

[0003] 癌症特异性标志物的开发不仅需要用于癌症诊断,也需要用于癌症特异性治疗。自从细胞毒性疗法(Cytotoxic therapies)最初被用作抗癌剂以来,已在癌症治疗中广泛使用了50多年,然而,除了癌细胞以外它们对其他分裂速度相对较快的器官细胞也起到非特异性的作用,表现出强烈的毒性,并带来严重的副作用。为了克服这种传统抗癌药物的副作用和耐受性,已有研究如何利用正常细胞癌变过程中出现的癌症特异性标记(cancer specific markers)来开发对肿瘤细胞有特异性作用的治疗药物。为了最大程度地降低抗癌药物的毒性,新兴的癌症靶向治疗(cancertargeted therapies)的关键就是寻找癌细胞特异性基因。

[0004] 同时,热休克蛋白质(Heat Shock Protein,HSP)是一种对维持蛋白质稳态起到关键作用的分子伴侣。HSP对于细胞在诸如缺氧等应激状态下的存活至关重要。HSP,尤其是HSP90和HSP70在多种肿瘤中高度表达[Morano KA,Annals of the New York Academy of Sciences,1113:1-14,2007;Calderwood SK et al,Trends in biochemical sciences,31:164-72,2006]。一些HSP的表达已经被证明与一些癌症中肿瘤细胞的增生、分化和凋亡(apoptosis)有关,表明HSP由于其自身的细胞保护作用而在癌症细胞的存活中发挥着重要作用。据报道,HSP70的过表达诱发小鼠纤维肉瘤细胞中形成肿瘤,而转基因小鼠T-细胞内HSP70的过表达导致小鼠的T细胞淋巴瘤增加[贾亚特拉·M,国际癌症杂志,国际癌症杂志,60:689-93,1995;JS徐等人,《生物化学和生物物理研究通讯》,218:582-7,1996年;Volloch VZ等人,癌基因,18:3648-51,1999;墨菲·梅,《致癌作用》,34:1181-8,2013年]。尤其是已知HSP70在保护细胞免于凋亡方面发挥着重要作用。不仅如此,还已知HSP的表达增加与血管的生成、侵袭、转移等有关。[卡尔德伍德·斯克等人,《生化科学的趋势》,31:164-72。2006年;周J等人,《生物化学杂志》,279:13506-13,2004;Bruns AF等人,《PloS one》,7:e48539,2012;孙J等人,《动脉硬化,血栓形成和血管生物学》。24:2238-44,2004年;龚W等人,《肿瘤学报告》,2013年;Eustace BK等人,《细胞周期》,3:1098-100,2004年;尤斯塔斯·

贝克等人,《自然细胞生物学》,6:507-14,2004年]。

[0005] AIMP2(氨酰-tRNA合成酶复合物相互作用多功能蛋白质2,ARS-interacting multi-functional protein 2)是参与氨酰-tRNA合成酶复合物(Aminoacyl-tRNA synthetase:ARSs)形成的蛋白质之一,也被称为p38/JTV-1或p38。有报告称AIMP2作为一种新型的肿瘤抑制剂(tumor suppressor),具有通过与Smad2/3直接的相互作用增强TGF- $\beta$ 信号传输的功能,已知AIMP2-DX2是AIMP2的外显子2缺失状态下的变异体,在癌细胞株和组织中特异性表达(韩国注册专利第10-0762995)。

[0006] 如上所述,虽然已知AIMP2-DX2和HSP70分别与肿瘤细胞的分化或存活有关,但不知道它们的相互关系与癌症有着何种相关性。

## 发明内容

### [0007] 【技术课题】

[0008] 因此,本发明的发明人研究了AIMP2-DX2和HSP70之间的相互作用,结果确认HSP70直接与AIMP2-DX2结合后可使AIMP2-DX2蛋白质稳定,在癌细胞的存活和分化中发挥决定性的作用。因此,鉴于对抑制AIMP2-DX2和HSP70的结合可以抑制细胞分裂和增生的发现,完成了本发明。

[0009] 因此,本发明的目的是提供一种抗癌剂的筛选方法,该方法包括以下步骤:

[0010] (a) 在存在或不存在受试物的情况下,使AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段接触;

[0011] (b) 在存在或不存在受试物的情况下,测定AIMP2-DX2和HSP70的结合水平;

[0012] (c) 比较受试物存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平与受试物不存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平,以判断受试物引起的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平的变化;

[0013] (d) 筛选降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的受试物;和

[0014] (e) 确认所选受试物在细胞或动物中的抗癌活性。

[0015] 本发明的另一目的是提供一种含有用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂这一活性成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0016] 此外,本发明的另一目的是提供一种由用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂这一活性成分构成的用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0017] 本发明的另一目的是提供一种须由用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂这一活性成分构成的用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0018] 本发明的另一目的是提供用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂在制备预防或治疗癌症的试剂时的用途。

[0019] 本发明的另一个目的是提供一种预防或治疗癌症的方法,其特征是向有需要的个体施用有效量的用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂。

### [0020] 【技术解决方案】

[0021] 为了达到上述目的,本发明提供一种抗癌剂的筛选方法,包括以下步骤:

[0022] (a) 在存在或不存在受试物的情况下,使AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段接触;

[0023] (b) 在存在或不存在受试物的情况下,测定AIMP2-DX2和HSP70的结合水平;

[0024] (c) 比较受试物存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平与受试物不存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平,以判断受试物引起的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平的变化;

[0025] (d) 筛选降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的受试物;和

[0026] (e) 确认所选受试物在细胞或动物中的抗癌活性。

[0027] 为了达到本发明的另一目的,本发明提供一种含有用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂这一活性成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0028] 此外,为了达到本发明的另一目的,本发明提供一种由用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂这一活性成分构成的用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0029] 此外,为了达到本发明的另一目的,本发明提供一种须由用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂这一活性成分构成的用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0030] 为了达到本发明的另一目的,本发明提供用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂在制备预防或治疗癌症的试剂时的用途。

[0031] 为了达到本发明的另一个目的,本发明提供一种预防或治疗癌症的方法,其特征是向有需要的个体施用有效量的用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂。

[0032] 以下将对本发明进行具体说明。

[0033] 本发明提供了一种抗癌剂的筛选方法,包括以下步骤:

[0034] (a) 在存在或不存在受试物的情况下,使AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段接触;

[0035] (b) 在存在或不存在受试物的情况下,测定AIMP2-DX2和HSP70的结合水平;

[0036] (c) 比较受试物存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平与受试物不存在情况下的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平,以判断受试物引起的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平的变化;

[0037] (d) 筛选降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的受试物;和

[0038] (e) 确认所选受试物在细胞或动物中的抗癌活性。

[0039] 本发明的发明人发现,HSP70除了其原有的功能之外,还表现出其与AIMP2-DX2结合后使AIMP2-DX2蛋白质稳定而不降解,促进肿瘤细胞因AIMP2-DX2而分化和生长的作用。抑制HSP70的表达以降低能与AIMP2-DX2反应的HSP70的水平,或者能直接抑制HSP70与AIMP2-DX2反应的各个因子降低AIMP2-DX2蛋白质水平,最终抑制肿瘤细胞的生长和分化。本发明的发明人基于这种对HSP70和AIMP2-DX2之间的功能性关系的发现,首次在本说明书中公开了筛选能够抑制HSP70和AIMP2-DX2结合的试剂并从中筛选出抗癌剂的一种抗癌剂的筛选方法。

[0040] 所述(a)是在存在或不存在受试物的情况下,促使AIMP2-DX2或其片段与HSP70或其片段接触的步骤。

[0041] 本说明书中的术语“蛋白质”可与“多肽(polypeptide)”或“肽(peptide)”替换使用,比如说可以是指天然存在的蛋白质中常见的氨基酸残基聚合物。所述“片段”是指蛋白质的一部分。此外,本发明中“多核苷酸(polynucleotide)”或“核酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸(DNA)或核糖核苷酸(RNA)。除非另有限制,还包括以类似于天然生成核

苷酸的方式与核酸杂交的已知的天然核苷酸类似物。“mRNA”是在蛋白质合成过程中将特定基因的氨基酸序列的遗传信息传递至形成多肽的核糖体的一种RNA。

[0042] 本发明中所述“AIMP2-DX2”作为AIMP2蛋白质序列(312aa版本:AAC50391.1或GI:1215669;320aa版本:AAH13630.1,GI:15489023,BC013630.1)中外显子2的区域缺失的变异体,包括AIMP2等价物(作为氨基酸序列的替换、缺失、插入或这些组合的变异体,具有与AIMP2实质等同的活性的功能性等价物,或是具有导致理化性质增加或降低的修饰但具有与AIMP2实质等同的活性的功能性衍生物)中外显子2的区域缺失的蛋白质。本发明中,AIMP2蛋白质序列中“缺失了外显子2的区域”是指在AIMP2蛋白质中外显子2区域的氨基酸序列部分或全部缺失后产生的变异体与AIMP2蛋白质形成异二聚体,干扰AIMP2的正常功能。因此,AIMP2-DX2蛋白质包括AIMP2蛋白质的外显子2的氨基酸序列全部缺失或包括该区域的氨基酸序列,在外显子1、外显子3、外显子4或所有这些区域中的区域部分缺失,或者外显子2的氨基酸序列部分缺失的蛋白质。

[0043] 用于实施本发明方法的AIMP2-DX2蛋白质来源于包括人类在内的哺乳动物较为理想,最理想的是包括用序列号1标示的人类的AIMP2-DX2蛋白质氨基酸序列。

[0044] 此外,所述AIMP2-DX2的片段是指包含AIMP2-DX2中与HSP70结合所必需部分的片段。本发明的发明人已经证实,AIMP2-DX2的蛋白质中与HSP70结合的是DX2部分,而非AIMP2部分。因此,用于实施本发明的AIMP2-DX2片段包括用序列号1标示的人类的AIMP2-DX2蛋白质氨基酸序列中的第1至87号氨基酸较为理想,而最理想的是用序列号2标示的氨基酸序列,但不限于此。

[0045] 本说明书中“HSP70”是指HSP70(Heat Shock Protein,HSP),是一种在维持蛋白质稳态中发挥关键作用的分子伴侣。HSP70对细胞在缺氧等应激状态下的存活至关重要。另一方面,HSP70在大范围的肿瘤[莫雷诺KA,《纽约科学院年鉴》,1113:1-14,2007;Calderwood SK等人,《生化科学趋势》,31:164-72,2006年]中高度表达。已经发现HSP70的表达与某些癌症中肿瘤细胞的增生、分化和凋亡(apoptosis)有关,这表明HSP70由于其自身的细胞保护作用而在癌细胞存活中发挥着重要作用。据报道,HSP70的过表达诱使小鼠纤维肉瘤细胞中形成肿瘤,而HSP70在转基因小鼠的T-细胞中的过表达导致该小鼠的T-细胞淋巴瘤的增加[加特拉·M,《国际癌症杂志》,国际癌症杂志,60:689-93,1995年;SEO JS等人,《生物化学和生物物理研究通讯》,218:582-7,1996年;Volloch VZ等人,《癌基因》,18:3648-51,1999年;墨菲·ME,《致癌作用》,34:1181-8,2013年]。

[0046] 用于实施本发明方法的HSP70蛋白质可以优选来源于包括人类在内的哺乳动物,最理想的是包含序列号为3的氨基酸序列。

[0047] 此外,所述HSP70的片段是指包含与AIMP2-DX2结合时所必需的部分片段。本发明的发明人已经确认AIMP2-DX2结合到HSP70的底物结合域(Substrate binding domain)。具体而言,公开了包括人类HSP70的氨基酸序列(序列号3)中第385至536个氨基酸(序列号4)的片段可以结合到AIMP2-DX2上。因此,用于实施本发明的HSP70的片段可以是包含序列号3中第385至536个氨基酸序列(序列号4)的片段。

[0048] 此外,本发明涉及的AIMP2-DX2或其片段,以及HSP70或其片段包括它们的功能性等同物。所述“功能性等同物”是指分别与AIMP2-DX2及其片段以及HSP70或它们的片段的氨基酸序列具有至少70%以上、优选80%以上、最佳为90%以上的序列同源性(即序列同一

性)的多肽,也是指表现出与以序列号1标示的AIMP2-DX2多肽和以序列号3标示的HSP70多肽实质上同质的生理活性的多肽。这里,“基本上同质的生理活性”意味着野生型AIMP2-DX2和野生型HSP70之间的直接且特异性结合可以再现。也就是说,AIMP2-DX2片段的功能性等同物是指具有能够结合全长HSP70或其片段的活性的,而HSP70片段的功能性等同物是指具有能够结合全长AIMP2-DX2或是能够结合在AIMP2-DX2上与HSP70结合位点的活性的。所述功能性等同物可以是由氨基酸序列中部分添加、取代或缺失而生成的。以上氨基酸的取代最好是保守性取代。天然存在的氨基酸的保守性取代的例子如下:脂肪族氨基酸(Gly、Ala、Pro)、疏水性氨基酸(Ile、Leu、Val)、芳香族氨基酸(Phe、Tyr、Trp)、酸性氨基酸(Asp、Glu)、碱性氨基酸(His、Lys、Arg、Gln、Asn)和含硫氨基酸(Cys、Met)。此外,所述功能性等同物还包括氨基酸序列中部分氨基酸缺失的变异体。所述氨基酸的缺失或取代最好是位于和本发明的多肽的生理活性没有直接关联的区域。此外,氨基酸的缺失最好是位于和AIMP2-DX2或HSP70多肽的生理活性没有直接关联的区域。同时还包括所述氨基酸序列的两端或序列内一些氨基酸被添加的变异体。此外,本发明的功能性等同物还包括保持本发明涉及的多肽的基本骨架及其生理活性的同时,多肽的部分化学结构被修饰的多肽衍生物。例如,改变本发明的多肽的稳定性、储存性、挥发性或溶解性等的结构变化也包括在内。

[0049] 在本发明的方法中,“接触(contacting)”具有普遍意义,是指使两种以上的试剂(例如两种多肽)结合,或是使试剂和细胞(例如蛋白质和细胞)结合。接触可以在试管内(in vitro)发生。例如,使两种以上的试剂在试管(test tube)或其他容器(container)中结合,或者使实验试剂和细胞或使细胞裂解物和实验试剂结合。此外,接触也可以发生在细胞中或原位(in situ)。例如,使编码两种多肽的重组多核苷酸在细胞内共表达(coexpressed),从而使两个多肽在细胞或细胞裂解物中结合。此外,待测试的蛋白质可以是排列在固相表面上的蛋白质芯片(protein chip)或蛋白质阵列(protein array)。

[0050] 当本发明的方法在细胞中得以实施时,可以利用AIMP2-DX2和HSP70在细胞内递归表达,或者将编码AIMP2-DX2或其片段、HSP70或其片段的核酸导入细胞并形质转换后完成过表达来进行。此外,当本发明的方法在试管内或蛋白质阵列等原位实施时,可以通过天然提取或通过基因工程方法进行制备来准备AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段。例如,可以用常规方法制备编码多肽或其功能性等同物的核酸和重组表达载体,并使它们在合适的宿主细胞中表达后获取。此外,在实施本发明的方法时所需的多肽也可以通过本领域已知的化学合成方法制备。

[0051] 此外,在本发明的方法中,“受试物”是互换使用实验试剂(test agent)或试剂(agent),包括任意物质(substance)、分子(molecule)、元素(element)、化合物(compound)、实体(entity)或它们的组合。例如蛋白质、多肽、低分子有机化合物(small organic molecules)、多糖(polysaccharides)、多核苷酸等。此外,也可以是天然产物(natural products)、合成化合物或化学化合物或两种以上物质的组合。

[0052] 具体而言,通过本发明的方法筛选的抗癌剂只要能够抑制AIMP2-DX2和HSP70的结合,或者是能够降低与HSP70结合的AIMP2-DX2的蛋白质表达水平即可,不受物质特性的限制,例如siRNA、shRNA、miRNA、核酶、脱氧核酶、肽核酸(PNA,peptide nucleic acid)、反义寡核苷酸、抗体、适配体、肽、天然提取物和化学物质等。最好是能够降低AIMP2-DX2表达的shRNA、siRNA或化学物质等,但并不限于此。



[0053] 所述步骤(b)是在步骤(a)中受试物存在或不存在的条件下测定经接触的AIMP2-DX2和HSP70的结合水平的步骤。

[0054] 测定所述AIMP2-DX2和HSP70的结合水平的步骤是用来测定两种蛋白质结合程度的本领域所常规使用的,可不受限制地筛选使用,例如可适当选择双杂交法two-hybrid、共同免疫沉淀试验法(co-immunoprecipitation assay,co-IP)、组织免疫染色和共定位分析法(co-localization assay)、闪烁逼近分析法(scintillation proximity assay,SPA)、UV或化学交联法、双分子相互作用分析法(bimolecular interaction analysis,BIA)、质谱分析法(mass spectrometry,MS)、核磁共振(nuclear magnetic resonance,NMR)、荧光偏振分析法(fluorescence polarization assays,FPA)和体外下拉试验(in vitro pull-down assay)、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)、蛋白质芯片(protein chip)或阵列(array)、金星生物分子荧光互补(Venus biomolecular fluorescence complementation,BiFC)等来测定AIMP2-DX2和HSP70的结合水平。

[0055] 在本发明的一个具体例子中,通过使细胞中用HA、Strep、放射性同位素等适当标记的DX2和HSP70过表达来进行co-IP实验,或者使用GST下拉实验来测定与DX2结合的HSP70的蛋白质水平,或者测定相反的与HSP70结合的DX2的蛋白质水平。

[0056] 所述步骤(c)是将步骤(b)中所测定的受试物存在条件下的AIMP2-DX2与HSP70的结合水平与受试物不存在条件下的AIMP2-DX2与HSP70的结合水平进行比较的步骤,以判断AIMP2-DX2和HSP70的结合水平因受试物变化的步骤。

[0057] 即,找出步骤(b)中所获受试物存在或不存在的条件下经接触的AIMP2-DX2和HSP70的蛋白质结合水平的差异,从而判断受试物对AIMP2-DX2和HSP70结合所产生的影响。

[0058] 步骤(d)是筛选降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的受试物的步骤。

[0059] 本发明的发明人通过具体的实施例证实:AIMP2-DX2和HSP70在细胞中特异性直接结合,并且AIMP2-DX2通过其与HSP70的结合稳定化而不会降解,从而通过AIMP2-DX2维持细胞的增生和分化。AIMP2-DX2蛋白质通过与HSP70蛋白质的直接结合实现稳定化,而当AIMP2-DX2蛋白质与HSP70分离时,AIMP2-DX2蛋白质会变得不稳定而降解,其水平降低,结果因AIMP2-DX2抑制细胞的增生和分化。这种效果可以通过使用抑制HSP70表达的siRNA或HSP70抑制剂加以证实。不难发现通过抑制AIMP2-DX2和HSP70之间的结合可以抑制细胞异常分裂的癌细胞的生成和增生。

[0060] 在另一个实施例中,通过与肿瘤生成相关的细胞实验和异种移植(xenograft)动物实验证实:只要抑制AIMP2-DX2和HSP70之间的结合就可以抑制癌细胞增生、抑制肿瘤形成和生长。

[0061] 通过本发明的发明人的上述发现,本领域的技术人员可以了解,可以抑制或降低AIMP2-DX2和HSP70之间结合水平的物质能够通过使AIMP2-DX2不稳定来抑制癌细胞的增生和分化。所述降低AIMP2-DX2和HSP70之间结合水平的物质可以是典型的抑制AIMP2-DX2和HSP70结合水平的物质,或是减少与AIMP2-DX2结合的HSP70的蛋白质量的物质。根据本发明的抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂的具体实例在本发明所涉及的用于预防或治疗癌症的药物组合物的描述中进行陈述。

[0062] 所述步骤(e)是确认(d)步骤中所选的受试物在细胞或动物中的抗癌活性的步骤。

[0063] 具体而言,步骤(e)是确定在步骤(d)中所选的降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的

受试物具体在癌或肿瘤样本的细胞或动物中是否具有预测AIMP2-DX2蛋白质不稳定性的抗癌活性的步骤。所述抗癌活性意味着抑制异常细胞分裂的增加、从正常细胞向癌细胞的转化、癌细胞的细胞分裂和增生,肿瘤的发生和发展等。

[0064] 所述癌或肿瘤样本的细胞或动物可使用本领域常用的细胞或动物并从中选择合适的,然后可以确认步骤(d)中所选物质的抗癌活性。在本发明的一个具体实施例中通过将人类癌细胞株注射到小鼠体内的异种移植(xenograft)来观察体内肿瘤的发生和形成过程。

[0065] 本发明所涉及的筛选抗癌剂的方法还可以在步骤(d)和(e)之间插入实施以下步骤;

[0066] (1) 使受试物与表达AIMP2-DX2的细胞接触;

[0067] (2) 测定所述细胞和受试物未接触的对照组细胞中的AIMP2-DX2的蛋白质水平;以及

[0068] (3) 筛选与对照组细胞相比更能降低AIMP2-DX2蛋白质水平的受试物。

[0069] 基于本发明可以理解,要使AIMP2-DX2变得稳定而免于降解需要与HSP70的直接结合,因此降低AIMP2-DX2和HSP70的结合水平,那么AIMP2-DX2的蛋白质水平也会降低。所述步骤(1)至(3)中进一步确认在步骤(d)中被筛选为降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的受试物是否降低了AIMP2-DX2蛋白质水平。当步骤(d)中被筛选为降低AIMP2-DX2和HSP70的结合水平的试剂呈现出假阳性,又或者抑制AIMP2-DX2与HSP70结合的水平不足以引起AIMP2-DX2的不稳定性时,可以实施所述追加步骤。

[0070] 步骤(1)是使步骤(d)中筛选的受试物与表达AIMP2-DX2的细胞接触的步骤。

[0071] 所述表达AIMP2-DX2的细胞可以是内在表达AIMP2-DX2的细胞,也可以是含有编码AIMP2-DX2的多核苷酸的形质转换为重组表达载体后过表达AIMP2-DX2的细胞。例如,可以在表达AIMP2-DX2的各种癌细胞株中适当选择来验证受试物的AIMP2-DX2不稳定的效果。所述“接触”的意思与前文所述相同。

[0072] 步骤(2)是测定步骤(1)中与受试物接触的细胞以及未与受试物接触的对照组细胞中的AIMP2-DX2的蛋白质水平的步骤。

[0073] 为了测定所述AIMP2-DX2的蛋白质水平可以选用本领域常用的蛋白质检测方法,但并不限于此。例如,可以使用蛋白质印迹法(western blotting)、斑点印迹法(dot blotting)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、放射免疫扩散法、Ouchterlony免疫扩散法、火箭免疫电泳、免疫组织化学染色、免疫沉淀法、补体固定分析法、流式细胞术分析法(FACS)或蛋白质芯片(chip)法等。

[0074] 所述步骤(3)是筛选出与对照组细胞相比更能降低AIMP2-DX2蛋白质水平的受试物的步骤。

[0075] 所述步骤(3)是比较前一步骤(2)中所测定的与受试物接触的细胞中以及未接触的对照组细胞中测定的AIMP2-DX2蛋白质水平,进一步筛选出实际上降低了AIMP2-DX2蛋白质水平的受试物。

[0076] 本发明中的所述癌症可选乳腺癌、肺癌、结肠癌、肛门癌、星形细胞瘤、白血病、淋巴瘤、头颈部癌、肝癌、睾丸癌、宫颈癌、肉瘤、血管瘤、食道癌、眼癌、喉癌、口部癌、间皮瘤、骨髓瘤、口腔癌、直肠癌、喉咽癌、膀胱癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、大肠癌、胰腺癌、肾癌、

胃癌、皮肤癌、基底细胞癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、口腔鳞状细胞癌、结肠直肠癌、胶质母细胞瘤、子宫内膜癌与恶性胶质瘤,但并不限于此。

[0077] 同时,本发明还提供了一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其含有通过本发明的筛选方法筛选出的抗癌剂这一活性成分。

[0078] 同时,本发明还提供了一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其由通过本发明的筛选方法筛选出的抗癌剂这一活性成分组成。

[0079] 同时,本发明还提供了一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其须由通过本发明的筛选方法筛选出的抗癌剂这一活性成分组成。

[0080] 根据本发明的方法筛选的抗癌剂只要是能够降低AIMP2-DX2和HSP70的结合水平并破坏AIMP2-DX2蛋白质的稳定以抑制癌细胞的增生和分化,对该物质的特性并没有特别限制,不过根据作用机制可以考虑典型的自身能够抑制AIMP2-DX2和HSP70两种蛋白质结合的物质,或者能够抑制HSP70的表达并降低能与HSP70结合的AIMP2-DX2蛋白质水平的物质。

[0081] 通过本发明的方法筛选的抗癌剂具体来说可选自siRNA、shRNA、miRNA、核酶、脱氧核酶、核酸肽(peptide nucleic acid,PNA)、反义寡核苷酸、抗体、适体、肽、天然提取物和化学物质。

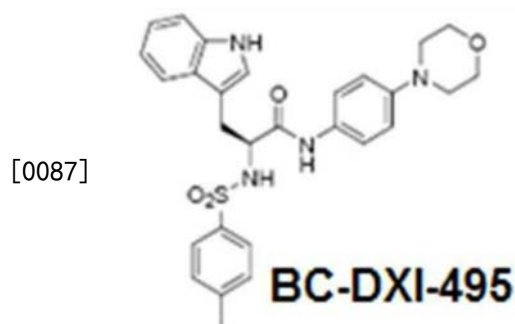
[0082] 本发明的发明人发现,使用特异于HSP70的siRNA (si-HSP70) 或HSP70抑制剂来抑制HSP70在癌细胞中的表达降低了结合于HSP70的AIMP2-DX2的水平,同时AIMP2-DX2蛋白质降解后水平降低,结果证实通过AIMP2-DX2抑制了癌细胞的增生和分化。

[0083] 由此看出,siRNA或HSP70抑制剂等能够抑制HSP70表达的试剂可以有效地用于预防和治疗癌症疾患。

[0084] 因此,用本发明涉及的筛选方法筛选的抗癌剂可以是HSP70特异性的siRNA、shRNA或HSP70抑制剂。所述siRNA或shRNA特异性地结合于HSP70mRNA,由能够诱导其降解的10-30个核苷酸序列组成,本领域的一般技术人员容易按照本领域已知的方法制备。

[0085] 在本发明的具体实施例中,证实下列化学式1的化合物以浓度依赖性的方式抑制AIMP2-DX2和HSP70的结合,最终导致AIMP2-DX2不稳定并抑制其表达,从而抑制癌细胞的增生和分化:

[0086] [化学式1]



[0088] 本发明涉及的用于预防或治疗癌症的药物组合物可以口服或非口服给药。非口服给药并没有限制,可以是静脉、肌内、动脉、骨髓内、硬脑膜内、心脏内、皮内、皮下、腹腔内、鼻腔内、肠道、局部、舌下或直肠内给药,最好是血管内给药。

[0089] 此外,可以使用本领域已知的方法并根据给药途径,与药学上可接受的载体一起配制各种剂型的本发明涉及的用于预防或治疗癌症的药物组合物。“药学上可接受的”是指

生理学上可接受的,当给药于人体时,不会抑制活性成分的作用,并且通常不会引起肠胃不适和眩晕等过敏反应或类似反应的无毒组合物。所述载体包括所有种类的溶剂、分散介质、水包油或油包水乳液、水性组合物、脂质体、微珠和微粒体。

[0090] 当本发明的药物组合物非口服给药时,本发明的组合物可以用本领域已知的方法与适当的非口服载体一起配制成注射剂、透皮剂及鼻腔吸入剂等剂型。所述注射剂必须灭菌,以保护其免受真菌等微生物的污染。用于注射剂的适当的载体并没有限制,可以是包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液体聚乙二醇等)、它们的混合物及/或植物油等溶剂或分散介质。具体来说所使用的载体最好是Hanks溶液、Ringer溶液、含有三乙醇胺的磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)或注射用无菌水以及10%乙醇、40%丙二醇和5%葡萄糖等等渗溶液。为了保护所述注射剂免受微生物污染,还可含有羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸和硫柳汞等各种抗生素和抗真菌剂。在大多数情况下,所述注射剂还可以进一步含有糖或氯化钠等渗剂。

[0091] 透皮剂包括软膏、霜剂、乳剂、凝胶、外用溶液、糊剂、搽剂和气雾剂等形态。上述“透皮给药”是指将本发明的组合物局部给药至皮肤,使药物组合物内有效量的活性成分传送到皮肤内。例如,本发明的组合物配制成注射型剂型,然后通过用30号针轻微刺破(prick)皮肤或直接涂敷至皮肤的方式给药。这些剂型在制药化学中常见的处方集文献(《Remington的药物科学》,第15版,1975年, Mack出版公司,宾夕法尼亚州伊斯顿)中有所描述。

[0092] 当本发明涉及的组合物为吸入剂剂型时可使用合适的推进剂,例如二氯氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体,可以方便地以气溶胶喷雾的形式从加压包或喷雾器输送。当使用加压气溶胶时,给药的剂量单位可以通过提供输送定量的阀门来定。例如,吸入器或摄入器中使用的凝胶胶囊和药筒可以配制成含有化合物和乳糖或淀粉等合适的粉末材料的粉末混合物。

[0093] 其他药学上可接受的载体可参考下述文献所记载的(《Remington的药学科学》,第19版,麦克出版公司,宾夕法尼亚州伊斯顿,1995年)。

[0094] 此外,本发明所涉及的药物组合物可以进一步包含一种或多种缓冲液(例如盐水溶液或PBS)、碳水化合物(例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖)、抗氧化剂、抑菌剂、螯合剂(例如EDTA或谷胱甘肽)、佐剂(例如氢氧化铝)、悬浮剂、增稠剂和/或防腐剂。

[0095] 此外,本发明的药物组合物可以用本领域已知的方法配制成各种剂型,以在给药至哺乳动物体内之后提供活性成分的快速、持续或延迟释放。本发明的组合物还可以与具有预防或治疗癌症作用的已知化合物组合给药。

[0096] 本发明提供了通过所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂的用途以制备用来预防或治疗癌症的试剂。

[0097] 本发明提供了一种治疗癌症的方法,其特征是向个体施用其所需的有效量的用所述抗癌剂筛选方法筛选的抗癌剂。

[0098] 本发明的所述“有效量”是指向个体给药时能体现出缓解、治疗、预防、检测或诊断癌症或抑制、减少癌细胞转移的效果的量,所述“个体”指动物,优选哺乳动物,特别是包括人类在内的动物,也可以是源自动物的细胞、组织和器官等。所述个体可以是需要所述效果的患者(patient)。

[0099] 本发明的所述“治疗”广义上指缓解癌症、癌症相关疾病或癌症相关疾病的症状，其可以包括治愈、实质上预防或缓解这些疾病的症状，并且还可以包括缓解、治愈或预防癌症或癌症相关疾病导致的一种或多种症状，但并不限于此。

[0100] 本发明的术语“~包含 (comprising)”在使用时与“含有”或“特征是…”同义，并不排除组合物和方法中未提及的其它成分要素或方法步骤等。术语“由~组成 (consisting of)”是指未另加描述的除了附加元素、步骤或成分等以外的。术语“必须组成 (consisting essentially of)”是指在组合物或方法的范围内，包括对所描述的成分要素或步骤以及其基本特性不产生实质影响的成分要素或步骤等。

[0101] 【有益效果】

[0102] 因此，基于本发明发现了HSP70直接结合并稳定诱发癌症的主要致病蛋白质之一的AIMP2-DX2，提供了用AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段来筛选降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的物质作为抗癌剂的一种抗癌剂筛选方法，以及含有通过所述方法筛选的抗癌剂这一活性成分的用来预防或治疗癌症的组合物。本发明涉及的抑制HSP70表达的siRNA和shRNA等的试剂，以及抑制HSP70与AIMP2-DX2结合的化合物等在降低癌细胞中的AIMP2-DX2蛋白质水平并抑制癌症的发生和发展的效果上十分优异。

## 附图说明

[0103] 每张附图中标记的DX2是AIMP2-DX2的缩写；

[0104] 图1A是质谱分析AIMP2-DX2和AIMP2之间相互关系的模式图和结果的示意图；

[0105] 图1B是质谱分析检测出的AIMP2-DX2或HSP70异构体结合于AIMP2的型态 (图中从上至下，第一幅图为:AIMP2-DX2，第二幅图为:AIMP2) 的结果；

[0106] 图2A是使用免疫沉淀 (immuno-precipitation, IP) 和蛋白质印迹法所证实的经由EGF的处理内源性HSP70与AIMP2-DX2蛋白质的结合增加的结果 (WCL:全细胞裂解物)；

[0107] 图2B是使用免疫沉淀 (immuno-precipitation, IP) 和蛋白质印迹法所证实的经由EGF的处理内源性AIMP2-DX2与HSP70蛋白质的结合增加的结果 (WCL:全细胞裂解物)；

[0108] 图2C显示了，证实RFP-AIMP2-DX2和GFP-HSP70在过表达的293T细胞内用EGF处理30分钟后，用共聚焦显微镜确认RFP-AIMP2-DX2和GFP-HSP70的结合增加的结果；

[0109] 图2D是使用表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 装置评估AIMP2-DX2和HSP70的结合KD值的结果；

[0110] 图3A显示的是AIMP2-DX2蛋白质片段及其缩写的模式图；

[0111] 图3B是各HSP70异构体 (HSPA1A、HSPA4、HSPA5、HSPA8、HSPA9、HSPD1) 与AIMP2-DX2的每个片段结合程度的测定结果；

[0112] 图3C是使用蛋白质印迹法确认AIMP2-DX2的每个片段与HSP70的结合程度的结果；

[0113] 图3D显示的是AIMP2-DX2和HSP70的结合在各蛋白质中位置的模式图；

[0114] 图3E显示的是HSP70的片段及其缩写的模式图；

[0115] 图3F显示的是使用蛋白质印迹法确认各HSP70蛋白质片段中结合到AIMP2-DX2的片段的结果 (WCL:全细胞裂解物)；

[0116] 图4显示的是在AIMP2-DX2和HSP70的结合关系中在各蛋白质中的任意位置结合的模式图；

[0117] 图5A显示的是在细胞中处理HSP70蛋白质时或当si-HSP70被处理以抑制HSP70的表达时,分别在蛋白质水平和基因水平下观察AIMP2-DX2的表达变化的结果(WB:蛋白质印迹法,RT:逆转录-聚合酶链反应);

[0118] 图5B显示的是H460细胞分别用HSP70抑制剂PES (Pifithrin-u)、VER (VER155008)或用HSP90抑制剂凝胶(格尔德霉素)和PU (PUH71)处理时,在蛋白质水平和基因水平下观察AIMP2-DX2表达变化的结果(WB:蛋白质印迹法,RT:逆转录-聚合酶链反应);

[0119] 图6A显示的是用HSP70抑制剂PES (Pifithrin-u)和VER (VER155008)或用HSP90抑制剂凝胶(格尔德霉素)和PU (PUH71)处理AIMP2-DX2过表达的293T细胞时,确认细胞生长是否受到抑制的结果;

[0120] 图6B显示的是通过si-HSP70抑制HSP70的表达的细胞中细胞生长的观察结果;

[0121] 图6C显示的是用si-RNA法降低HSP70的表达后,通过EdU测定观察细胞生长导致DNA合成的结果;

[0122] 图7A是用于搜索降低AIMP2-DX2的化合物的AIMP2-DX2监测分析的示意图;

[0123] 图7B显示的是通过AIMP2-DX2监测分析筛选的AIMP2-DX2和HSP70结合的抑制剂BC-DXI-495化合物的结构式的示意图;

[0124] 图8A显示的是通过蛋白质印迹法确认BC-DXI-495化合物处理是否抑制了AIMP2-DX2和HSP70结合的结果;

[0125] 图8B显示的是在AIMP2-DX2或AIMP2过表达的细胞中,将BC-DXI-495化合物处理为不同浓度后,通过荧光素酶分析法确认AIMP2-DX2或AIMP2的表达变化的结果;

[0126] 图8C显示的是图8B的结果数字化并计算抑制各蛋白质50%表达的浓度(IC50)的结果;

[0127] 图8D和8E分别显示的是在H460细胞中各浓度(2.5、5、10 $\mu$ m)下处理BC-DXI-495化合物12小时后,AIMP2-DX2、AIMP2和肌动蛋白质表达的结果,以及通过蛋白质印迹法和逆转录-聚合酶链反应观察AIMP2-DX2、AIMP2和肌动蛋白质mRNA表达的结果;

[0128] 图9A显示的是在肺癌细胞A549细胞株和正常肺细胞WI-26中以浓度依赖性方式处理BC-DXI-495化合物后,评估细胞存活率的结果;

[0129] 图9B显示的结果是在能诱导多西环素(Sigma)引起的AIMP2-DX2表达的肺癌细胞A549中处理多西环素(0.5mg/ml),诱导由AIMP2-DX2引起的细胞生长,等到第7天处理BC-DXI-495(40 $\mu$ m),确认96小时期间细胞生长的抑制和杀灭情况;

[0130] 图9C显示的是在AIMP2-DX2表达量各不相同的两个正常肺细胞(WI-26、WI-38)和七个肺癌细胞(NCI-H2087、HCC-1359、HCC-95、HCC-366、HCC-1438、HCC-1588、NCI-H460)中将BC-DXI-495化合物处理为不同浓度后,进行MTT分析操作,计算GI50的结果;

[0131] 图10显示的是将AIMP2-DX2高水平表达的H460细胞异种移植(xenograft)入小鼠后,施用BC-DXI-495化合物或紫杉醇,然后观察肿瘤大小变化的结果(图中,图A:肿瘤的肉眼观察影像、图B:肿瘤的体积变化、图C:肿瘤的重量变化、图D:动物的体重变化)。

## 具体实施方式

[0132] 以下将详细描述本发明。

[0133] 不过,以下实施例仅仅是对本发明的举例说明,本发明的内容并不仅限于以下实

施例。

[0134] <实施例1>

[0135] 分析AIMP2-DX2和HSP70的结合关系

[0136] 使用strep-tag色谱柱 (GE生命科学公司) 免疫沉淀 (immunoprecipitated, IP) 分别表达strep-AIMP2-DX2和strep-AIMP2的293T细胞的裂解物, 然后用SDS-PAGE分离由该柱沉淀的蛋白质。使用胰蛋白酶 (Hyclone) 以胶内酶解的方式将分离的蛋白质降解到它们的肽水平, 并且通过LC-质谱法 (Thermo) 装备分析这些肽 (图1A)。

[0137] 所使用的293T细胞来自ATCC, Strep-AIMP2-DX2和strep-AIMP2将DX2和AIMP2序列分别克隆并置入pEXPR-IBA5载体, 并使用293T细胞中被称为TurboFect (Thermo) 的转染试剂过表达。

[0138] 细胞的裂解是在4℃的温度下放入适量的裂解缓冲液 (50毫米Tris (pH7.4)、100毫米的氯化钠、10%甘油、1毫米的EDTA、0.5%的TritonX-100、PBS) 培养30分钟而完成的, 被裂解的细胞裂解物以13,200rpm的转速离心15分钟后, 从细胞裂解物中获取上清液, 再使上清液通过strep-tag色谱柱 (Thermo)。上清液通过色谱柱后, 用所提供的洗脱缓冲液洗脱结合在色谱柱上的蛋白质, 然后用SDS-PAGE分离所收集的蛋白质。

[0139] 如图1A所示, 通过质谱分析法分析了AIMP2-DX2和AIMP2之间的相互作用, 结果确认了AIMP2-DX2的结合蛋白质有107个、AIMP2的结合蛋白质有148个。并且确认了其中45个结合蛋白质重叠。

[0140] 同时, 如图1B所示, 可以确认HSP70蛋白质在AIMP2-DX2的结合优于AIMP2。

[0141] 更具体地, 图1B中自上而下的第一幅图表显示的是与AIMP2-DX2结合的蛋白质, 第二幅图表显示的是与AIMP2结合的蛋白质。在质谱分析中, 检测越多的被标记在图表水平轴的越左侧, 而纵轴显示的是检测的频率。在图1B的第一幅图表中, 被标示为AIMP2-DX2结合蛋白质的HSPA8、HSPD1、HSPA5、HSPA9、HSPH1、HSPA2、HSPA11、HSPA4和HSPA1A都是HSP70的亚型。另一方面, 在第二幅表的AIMP2的情况下只检测到一种HSP70的亚型 (HSPA4)。不仅如此, 在AIMP2的情况下检测到了在DX2中未观察到的HSP90的亚型HSP90B1。从上述结果可以得出结论, 即HSP70优先与AIMP2-DX2结合。

[0142] <实施例2>

[0143] 确认AIMP2-DX2和HSP70的结合关系

[0144] 在H460细胞中, 处理内皮生长因子 (endothelial growth factor, EGF (Peprotech)) 30分钟, 然后用IP缓冲液 (50毫米Tris (pH7.4)、100毫米氯化钠、10%甘油、1毫米EDTA、0.5% TritonX-100、PBS) 在4℃的温度耗时30分钟使细胞溶解。使用HSP70抗体 (Abcam) 对细胞裂解物进行了IP。在IP后通过SDS-PAGE和蛋白质印迹法鉴定了DX2、AIMP2和HSP70蛋白质。肌动蛋白质 (Sigma) 是指负载控制, WCL是指全细胞裂解物。

[0145] 如图2A所示, 证实了经过EGF处理后内源性HSP70与AIMP2-DX2蛋白质的结合增加了, 同时也知道此时AIMP2不与HSP70结合。

[0146] 在Strep-AIMP2-DX2过表达的293T细胞中耗时30分钟进行了EGF处理。使用相同的所述实验方法溶解细胞后, 使用Strep-tag色谱柱 (GE生命科学公司) 进行了IP。IP后, 使用SDS-PAGE和蛋白质印迹法确认了Strep-AIMP2-DX2、HSP70和HSP90的量。这些蛋白质用StrepMAB-Classic-HRP (IBA)、HSP70特异性抗体 (圣克鲁斯, Santa Cruz) 和HSP90特异性抗



体(圣克鲁斯,Santa Cruz)进行了确定。

[0147] 如图2B所示,证实了经过EGF处理的外源性AIMP2-DX2与HSP70的结合增加,而此时HSP90与AIMP2-DX2的结合非常弱,结合并未因EGF而增加。

[0148] 在RFP-AIMP2-DX2和GFP-HSP70同时过表达的293T细胞中耗时30分钟进行了EGF处理。EGF处理后,用冷PBS洗涤细胞3次,再用冷甲醇固定10分钟。固定后,用冷PBS再洗涤细胞3次,细胞核用DAPI (Invitrogen) 溶液染色。完成染色后,用共聚焦显微镜观察了各个荧光。

[0149] 如图2C所示,通过共聚焦显微镜证实:经过EGF处理,RFP-AIMP2-DX2和GFP-HSP70的结合增加。

[0150] 使用表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR, GE公司) 设备分析了HSP70和AIMP2-DX2蛋白质之间的结合。固定HSP70蛋白质后,获取AIMP2-DX2蛋白质在各种浓度流动下各蛋白质的结合和分离值,并计算出KD值。

[0151] 如图2D所示,通过SPR分析观察到当KD值为 $4.79 \times 10^{-10}$ 时经纯化的AIMP2-DX2和HSP70蛋白质直接结合。

[0152] <实施例3>

[0153] 分析AIMP2-DX2和HSP70的组合结构

[0154] 将与GST-tag融合的AIMP2-DX2蛋白质片段(DM1至DM5)与293T细胞裂解物混合。混合后,用谷胱甘肽-琼脂糖凝胶(GE生命科学公司)将每一种AIMP2-DX2蛋白质拉下。用质谱分析法确认了和AIMP2-DX2蛋白质一起降低的HSP70蛋白质的量。实验中使用的AIMP2-DX2蛋白质片段的氨基酸位置如图3A所示。

[0155] 如图3B所示,通过质谱分析法确认了:在AIMP2-DX2蛋白质片段中具有序列号2氨基酸序列的DM1(对应于序列号1的氨基酸序列中第1-87个氨基酸的片段)中,HSP70家族优先结合。

[0156] 接下来,进行了一项实验来具体确认AIMP2-DX2和HSP70的结合结构。

[0157] 将GST-EV、GST-AIMP2-DX2全片段和GST-AIMP2-DX2片段(DM1~DM5)与过表达GFP-HSP70的293T细胞裂解物混合。混合后,使用谷胱甘肽-琼脂糖凝胶将GST蛋白质下拉,并通过SDS-PAGE和蛋白质印迹法分析下拉的蛋白质。使用GFP特异性抗体鉴定了GFP蛋白质,且通过考马斯染色鉴定了GST蛋白质。

[0158] 如图3C和图3D所示,可以发现AIMP2-DX2蛋白质片段中具有包括1-87氨基酸的序列号2氨基酸序列的DM1片段与HSP70结合。

[0159] 另外,为了确认HSP70蛋白质内与AIMP2-DX2结合的那一部分而进行了实验。

[0160] 将GFP-HSP70全片段和GFP-HSP70片段(AD、SB、Lid)同Strep-AIMP2-DX2一起在293T细胞中过表达,然后用strep-tag色谱柱对293T细胞的裂解物进行IP。与Strep-AIMP2-DX2一同IP的蛋白质用SDS-PAGE分离,并使用GFP特异性抗体通过蛋白质印迹法确认了各GFP蛋白质的结合。HSP70蛋白质中的实验中使用的各个片段(AD、SB、Lid)的氨基酸位置如图3E所示。

[0161] 如图3F和图4所示,发现HSP70蛋白质片段中仅有包括具有序列号4氨基酸序列的SB(底物结合结构域)部分的片段与AIMP2-DX2结合。

[0162] <实施例4>

[0163] HSP70增强了AIMP2-DX2的稳定性



[0164] 在H460细胞中,通过转染使GFP-EV和GFP-HSP70过表达。此外,在HSP70中使用特异性si-RNA (si-HSP70, 圣克鲁斯) 降低HSP70的表达,此时将si-control (英杰公司, Invitrogen) 作为对照组使用。用蛋白质印迹法确认增加或降低HSP70表达的H460细胞的蛋白质表达水平,用RT-PCR确认mRNA的表达水平。HSP70特异性引物序列使用的是F:GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAA TGC CCC CAG CTA CGT GGC CTT C,R:GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT AAA GCT TGG CGT CGC GCA GAG C。

[0165] 如图5A所示,确认了HSP70的过表达使得AIMP2-DX2蛋白质升高,而经si-RNA的HSP70的减少使得AIMP2-DX2蛋白质降低。此时,鉴于AIMP2-DX2的转录没有受到影响,发现HSP70对AIMP2-DX2的调节发生在转录后,即蛋白质水平上的调控。

[0166] 另外,在H460细胞中处理HSP70的抑制剂Pifithrin-u (Tocris)、VER155008 (Sigma) 以及HSP90的抑制剂格尔德霉素 (Tocris) 和PUH71 (Tocris) 后,用蛋白质印迹法和RT-PCR方法确认蛋白质和mRNA表达水平。用AIMP2-DX2特异性抗体 (细胞信号) 确认AIMP2-DX2蛋白质的表达水平。

[0167] 如图5B所示,可以发现HSP70的抑制剂PES (Pifithrin-u) 和VER (VER155008) 的处理可以降低AIMP2-DX2蛋白质的表达水平。通过确认HSP90抑制剂凝胶 (格尔德霉素) 和PU (PUH71) 的处理不影响AIMP2-DX2蛋白质的表达水平,发现HSP70和HSP90抑制剂对AIMP2的表达水平不产生影响。不仅如此,鉴于AIMP2-DX2的转录不受各种抑制剂处理的影响,可以发现HSP70抑制剂处理对AIMP2-DX2的调节是发生在转录后的调节,即蛋白质水平上的调节。

[0168] 根据以上结果,确定了HSP70是使AIMP2-DX2蛋白质特异性稳定的物质。

[0169] <实施例5>

[0170] 通过DX2调控HSP70的细胞分裂

[0171] HSP70的抑制剂Pifithrin-u (PES)、VER155008 (PER) 和HSP90的抑制剂格尔德霉素 (凝胶)、PUH71 (Pu) 分别在Strep-AIMP2-DX2过表达和未过表达的293T细胞中处理12小时后,进行MTT (美国Amresco公司) 分析。每个实验独立操作三次,使用HSP70特异性si-RNA (si-HSP70) 降低HSP70的表达,在293T细胞中过表达strep-AIMP2-DX2,并进行MTT分析。每个实验独立操作三次。

[0172] 以上结果如图6A和6B所示。

[0173] 如图6A所示,在对HSP70的抑制剂PES和VER、HSP90的抑制剂凝胶和Pu进行处理后,观察AIMP2-DX2增加细胞生长的结果。处理HSP70抑制剂的情况下,没有观察到AIMP2-DX2增加细胞生长。另外,如图6B所示,在通过si-RNA方法降低HSP70的表达后,并未观察到AIMP2-DX2引起的细胞生长。这些结果表明HSP70通过DX2调节细胞生长。

[0174] 另一方面,在通过si-RNA方法降低HSP70的表达后,通过EdU分析法观察AIMP2-DX2引起的细胞生长产生的DNA合成,结果发现HSP70的表达降低时,并未观察到通过AIMP2-DX2的表达增加的DNA合成 (图6C)。

[0175] <实施例6>

[0176] 探索AIMP2-DX2和HSP70的结合抑制剂

[0177] 如图7A所示,在进行AIMP2-DX2监测分析之后,对存在于本发明的发明人化合物库中的化合物进行处理后,初选出减少AIMP2-DX2的化合物。在最初筛选的化合物中,不降低

AIMP2,用MTT方法测定细胞活力后,最终筛选出不影响正常细胞但能影响癌细胞的化合物。

[0178] 筛选出的化合物被命名为BC-DXI-495,其结构如图7B所示。

[0179] <实施例7>

[0180] BC-DXI-495抑制AIMP2-DX2和HSP70结合的功能以及抑制DX2表达的功能

[0181] 评估通过所述实施例6筛选的BC-DXI-495是否能够抑制AIMP2-DX2和HSP70的结合。Strep-DX2过表达的293T细胞中在不同浓度(2.5、5、10 $\mu$ m)下处理BC-DXI-495化合物12小时,然后用含有1%triton X-100的PBS裂解细胞(BD Science)。将裂解物以13,200rpm的转速离心后,通过蛋白质印迹法确认经分离的悬浮液和沉淀物中AIMP2-DX2和AIMP2的蛋白质表达量。使用StrepMAB-Classic-HRP(IBA)确认了AIMP2-DX2的表达。

[0182] 以上结果如图8A所示。

[0183] 如图8A所示,当以浓度依赖性方式处理BC-DXI-495化合物时,确认了AIMP2-DX2和HSP70的结合浓度依赖性降低。

[0184] 为了确认BC-DXI-495化合物引起的AIMP2-DX2和AIMP2的减少,在A549细胞中分别用纳米荧光素酶-AIMP2-DX2和纳米荧光素酶-AIMP2过表达,然后将BC-DXI-495化合物浓度依赖性(2.5、5、10、20、40 $\mu$ m)处理4小时。处理后,细胞中AIMP2-DX2和AIMP2蛋白质的量通过荧光素酶分析(cat#)得以确认。测定各浓度下的荧光素酶抑制程度,测算导致AIMP2-DX2和AIMP2减少50%的化合物浓度,用IC50表示。此外,在H460细胞内将BC-DXI-495化合物以不同浓度(2.5、5、10 $\mu$ m)处理12小时,然后通过蛋白质印迹法和RT-PCR观察AIMP2-DX2、AIMP2和肌动蛋白质表达以及AIMP2-DX2、AIMP2和肌动蛋白质mRNA表达。

[0185] 结果,如图8B和8C所示,确认了BC-DXI-495化合物并不影响AIMP2的表达(IC50>100 $\mu$ m),而只是特异性降低了AIMP2-DX2的表达(IC50:4.2 $\mu$ m),在浓度依赖性处理BC-DXI-495化合物的情况下,确认只是降低了AIMP2-DX2蛋白质而并不影响AIMP2(图8D)。此外还发现当浓度依赖性处理BC-DXI-495化合物时,可溶性AIMP2-DX2蛋白质(悬浮层部分)减少,而不溶性AIMP2-DX2蛋白质(沉淀物部分)增加(图8E)。

[0186] <实施例8>

[0187] 评估BC-DXI-495的抗癌功效

[0188] <8-1>BC-DXI-495的细胞毒性

[0189] 为了研究BC-DXI-495化合物如何改变肺癌和正常肺细胞的细胞活性,在A549(肺癌细胞)和WI-26(正常肺细胞)中浓度依赖性(2.5、5、10、20、40 $\mu$ m)处理BC-DXI-495。处理后,进行MTT分析以测定每个细胞的活性。测算导致细胞活性降低50%的化合物的浓度,用IC50表示

[0190] 如图9A所示,在肺癌细胞A549和正常肺细胞WI-26中浓度依赖性处理BC-DXI-495化合物,结果发现仅仅诱导肺癌细胞凋亡,对正常细胞没有任何影响。

[0191] 此外,用多西环素(Sigma)可以诱导AIMP2-DX2的表达,对肺癌细胞A549进行多西环素(0.5mg/ml)处理,诱导AIMP2-DX2表达引起的细胞生长。然后通过AIMP2-DX2诱导细胞生长。每48小时处理一次多西环素,在第7天,BC-DXI-495(40 $\mu$ m)处理96小时后确认细胞生长的抑制和凋亡。

[0192] 如图9B所示,发现在诱导AIMP2-DX2蛋白质的表达时(图9B中从上至下的第一条曲线),与其他情况相比,能诱导BC-DXI-495化合物引起更大的细胞毒性。

[0193] 此外,在AIMP2-DX2表达量各不相同的两个正常肺细胞(WI-26,WI-38)和七个肺癌细胞(NCI-H2087,HCC-1359,HCC-95,HCC-366,HCC-1438,HCC-1588,NCI-H460)中在不同浓度下处理BC-DXI-495化合物,并进行MTT分析,测算GI50。通过蛋白质印迹法确认每个细胞的AIMP2-DX2表达量。

[0194] 如图9C所示,根据内源性AIMP2-DX2蛋白质表达的程度,将肺癌细胞分成3组(低、中、高),处理BC-DXI-495后测定细胞毒性程度(GI50),结果发现在AIMP2-DX2表达水平高的细胞中该化合物带来的细胞杀灭效果很好。

[0195] <8-2>评估BC-DXI-495的体内抗癌作用

[0196] 将 $5 \times 10^6$ 个H460细胞注射到8周大的Balb/c小裸鼠等的表皮,待形成肿瘤后每周注射5次浓度为50毫克/千克的BC-DXI-495化合物,共注射10次,每周注射2次浓度为15毫克/千克的阳性对照物质紫杉醇,共注射5次。实验结束后,分离出肿瘤并称重。每周测量两次实验动物的体重和肿瘤大小。

[0197] 将具有高水平表达AIMP2-DX2的H460细胞异种移植(xenografted)到小鼠,然后给药50mg/kg的BC-DXI-495化合物,结果发现对癌细胞生长的抑制程度与对照组紫杉醇(15mpk)相似。另外,这种肿瘤抑制作用在肿瘤的重量上也同样得到了证实(图10A、10B和10C)。在实验过程中对小鼠体重没有任何影响(图10D)。

[0198] 【工业利用的可能性】

[0199] 基于HSP70与癌症的主要致病蛋白质之一的AIMP2-DX2直接结合并使其稳定的这一发现,本发明提供了一种抗癌剂筛选方法,即通过使用AIMP2-DX2或其片段和HSP70或其片段来筛选出能降低AIMP2-DX2和HSP70结合水平的物质作为抗癌剂,并且还提供了含有用所述方法筛选的抗癌剂这一活性成分的一种预防或治疗癌症的组合物。本发明所涉及的抑制HSP70表达的siRNA和shRNA等试剂,以及抑制HSP70与AIMP2-DX2结合的化合物等能十分有效地降低癌细胞中AIMP2-DX2蛋白质的水平并抑制癌症的发生和发展,在工业上具有很高的利用可能。

[0001]	<110>	医药生命融合研究团
[0002]	<120>	抑制AIMP2-DX2和HSP70结合的抗癌剂的筛选方法
[0003]	<130>	DAG37825
[0004]	<150>	KR 10-2016-0027077
[0005]	<151>	2016-03-07
[0006]	<150>	PCT/KR 2017/002442
[0007]	<151>	2017-03-07
[0008]	<160>	4
[0009]	<170>	KopatentIn 2.0
[0010]	<210>	1
[0011]	<211>	251
[0012]	<212>	PRT
[0013]	<213>	Human AIMP2-DX2
[0014]	<400>	1
[0015]	Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu	
[0016]	1 5 10 15	
[0017]	Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly	
[0018]	20 25 30	
[0019]	Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly	
[0020]	35 40 45	
[0021]	Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu	
[0022]	50 55 60	
[0023]	Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu	
[0024]	65 70 75 80	
[0025]	Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu	
[0026]	85 90 95	
[0027]	Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr	
[0028]	100 105 110	
[0029]	Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met	
[0030]	115 120 125	
[0031]	Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile	
[0032]	130 135 140	
[0033]	Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn	
[0034]	145 150 155 160	
[0035]	Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys	
[0036]	165 170 175	
[0037]	Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser	
[0038]	180 185 190	

[0039]	Ala	Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Trp	Leu	Ala	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Val	Ala
[0040]			195					200					205			
[0041]	Asp	Val	Val	Leu	Trp	Ser	Val	Leu	Gln	Gln	Ile	Gly	Gly	Cys	Ser	Val
[0042]			210					215					220			
[0043]	Thr	Val	Pro	Ala	Asn	Val	Gln	Arg	Trp	Met	Arg	Ser	Cys	Glu	Asn	Leu
[0044]	225						230					235				240
[0045]	Ala	Pro	Phe	Asn	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys					
[0046]						245						250				
[0047]	<210> 2															
[0048]	<211> 87															
[0049]	<212> PRT															
[0050]	<213> Fragment of human AIMP2-DX2															
[0051]	<400> 2															
[0052]	Met	Pro	Met	Tyr	Gln	Val	Lys	Pro	Tyr	His	Gly	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu
[0053]	1				5					10					15	
[0054]	Arg	Val	Glu	Leu	Pro	Thr	Cys	Met	Tyr	Arg	Leu	Pro	Asn	Val	His	Gly
[0055]				20						25					30	
[0056]	Arg	Ser	Tyr	Gly	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	His	Val	Gln	Asp	Tyr	Gly
[0057]				35						40					45	
[0058]	Ala	Leu	Lys	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	Ala	Asn	Pro	Ala	Ser	Pro	Pro	Leu
[0059]			50					55					60			
[0060]	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	His	Arg	Leu	Leu	Cys	Glu	His	Phe	Arg	Val	Leu
[0061]	65						70					75				80
[0062]	Ser	Thr	Val	His	Thr	His	Ser									
[0063]							85									
[0064]	<210> 3															
[0065]	<211> 641															
[0066]	<212> PRT															
[0067]	<213> Human HSP70															
[0068]	<400> 3															
[0069]	Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ser
[0070]	1				5					10					15	
[0071]	Cys	Val	Gly	Val	Phe	Gln	His	Gly	Lys	Val	Glu	Ile	Ile	Ala	Asn	Asp
[0072]				20						25					30	
[0073]	Gln	Gly	Asn	Arg	Thr	Thr	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Phe	Thr	Asp	Thr	Glu
[0074]				35						40					45	
[0075]	Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn	Gln	Val	Ala	Leu	Asn	Pro	Gln
[0076]			50					55					60			
[0077]	Asn	Thr	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Phe	Gly	Asp

[0078]	65	70	75	80
[0079]	Pro Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn			
[0080]		85	90	95
[0081]	Asp Gly Asp Lys Pro Lys Val Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys			
[0082]		100	105	110
[0083]	Ala Phe Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys			
[0084]		115	120	125
[0085]	Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile			
[0086]		130	135	140
[0087]	Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp			
[0088]	145	150	155	160
[0089]	Ala Gly Val Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro			
[0090]		165	170	175
[0091]	Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu			
[0092]		180	185	190
[0093]	Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser			
[0094]		195	200	205
[0095]	Ile Leu Thr Ile Asp Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly			
[0096]		210	215	220
[0097]	Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His			
[0098]	225	230	235	240
[0099]	Phe Val Glu Glu Phe Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn			
[0100]		245	250	255
[0101]	Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg			
[0102]		260	265	270
[0103]	Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe			
[0104]		275	280	285
[0105]	Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu			
[0106]		290	295	300
[0107]	Leu Cys Ser Asp Leu Phe Arg Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala			
[0108]	305	310	315	320
[0109]	Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu			
[0110]		325	330	335
[0111]	Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp			
[0112]		340	345	350
[0113]	Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala			
[0114]		355	360	365
[0115]	Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys			
[0116]		370	375	380

[0117]	Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser
[0118]	385 390 395 400
[0119]	Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg
[0120]	405 410 415
[0121]	Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser
[0122]	420 425 430
[0123]	Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala
[0124]	435 440 445
[0125]	Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile
[0126]	450 455 460
[0127]	Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile
[0128]	465 470 475 480
[0129]	Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly
[0130]	485 490 495
[0131]	Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys
[0132]	500 505 510
[0133]	Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu
[0134]	515 520 525
[0135]	Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser
[0136]	530 535 540
[0137]	Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly
[0138]	545 550 555 560
[0139]	Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu
[0140]	565 570 575
[0141]	Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe
[0142]	580 585 590
[0143]	Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser
[0144]	595 600 605
[0145]	Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala
[0146]	610 615 620
[0147]	Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val
[0148]	625 630 635 640
[0149]	Asp
[0150]	<210> 4
[0151]	<211> 152
[0152]	<212> PRT
[0153]	<213> Fragment of human HSP70
[0154]	<400> 4
[0155]	Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser

[0156]	1	5	10	15
[0157]	Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg			
[0158]	20	25	30	
[0159]	Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser			
[0160]	35	40	45	
[0161]	Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala			
[0162]	50	55	60	
[0163]	Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile			
[0164]	65	70	75	80
[0165]	Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile			
[0166]	85	90	95	
[0167]	Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly			
[0168]	100	105	110	
[0169]	Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys			
[0170]	115	120	125	
[0171]	Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu			
[0172]	130	135	140	
[0173]	Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val			
[0174]	145	150		



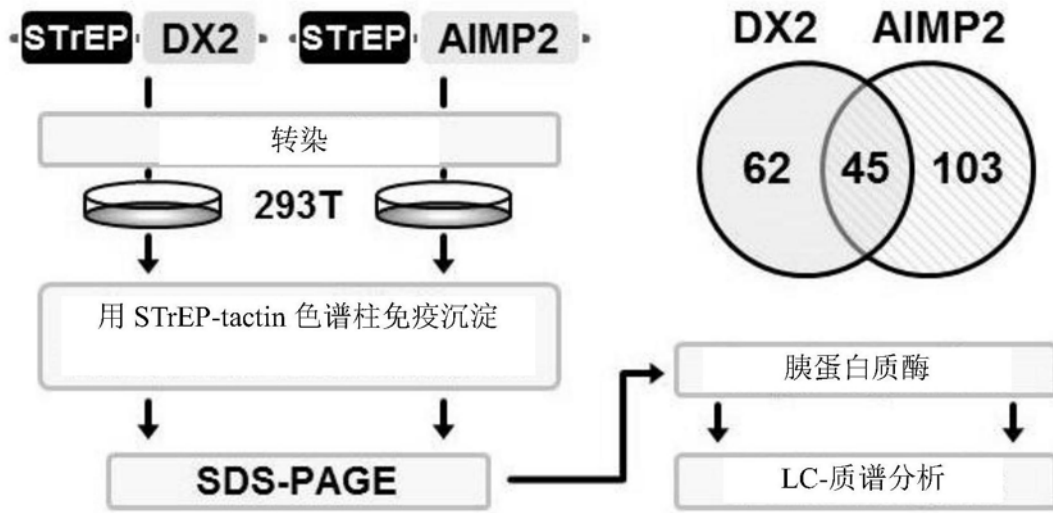


图1A

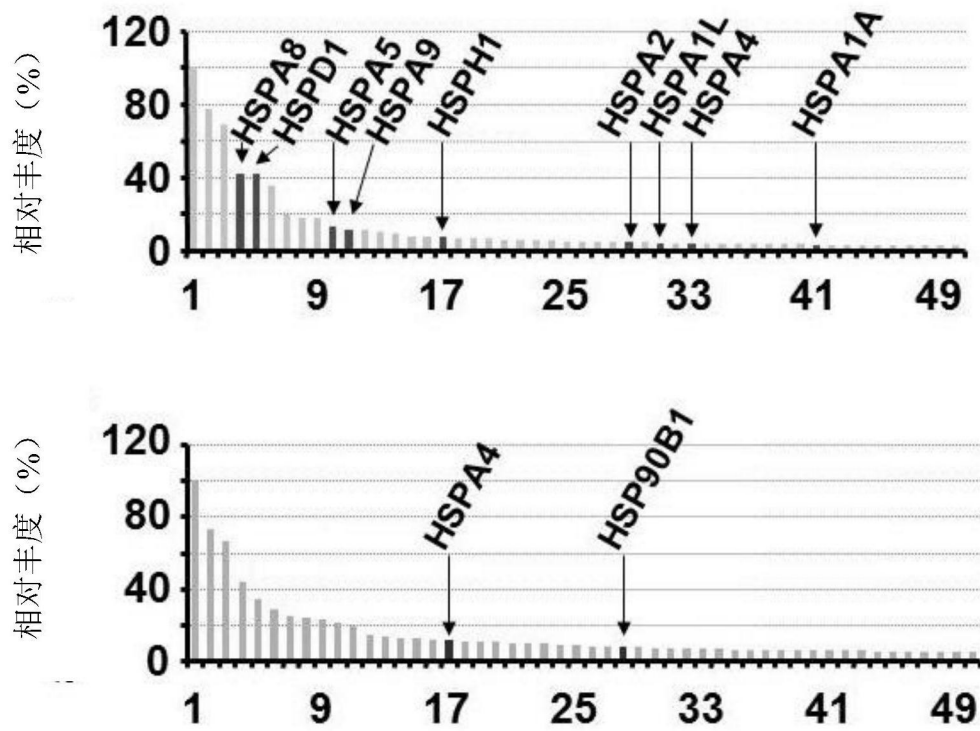


图1B

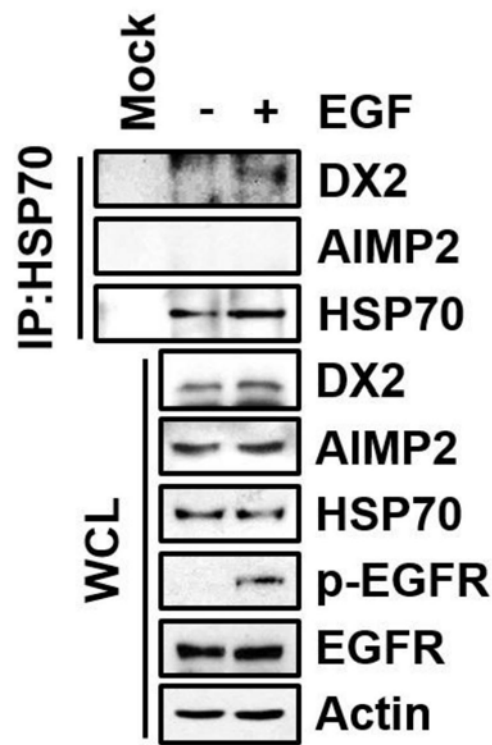


图2A

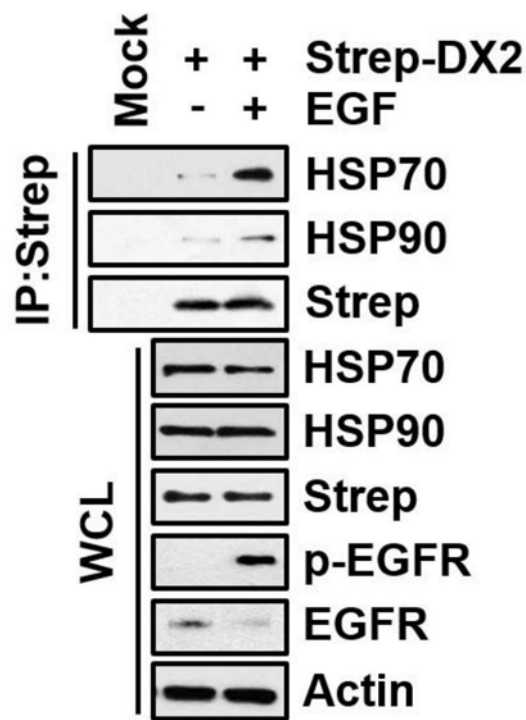


图2B

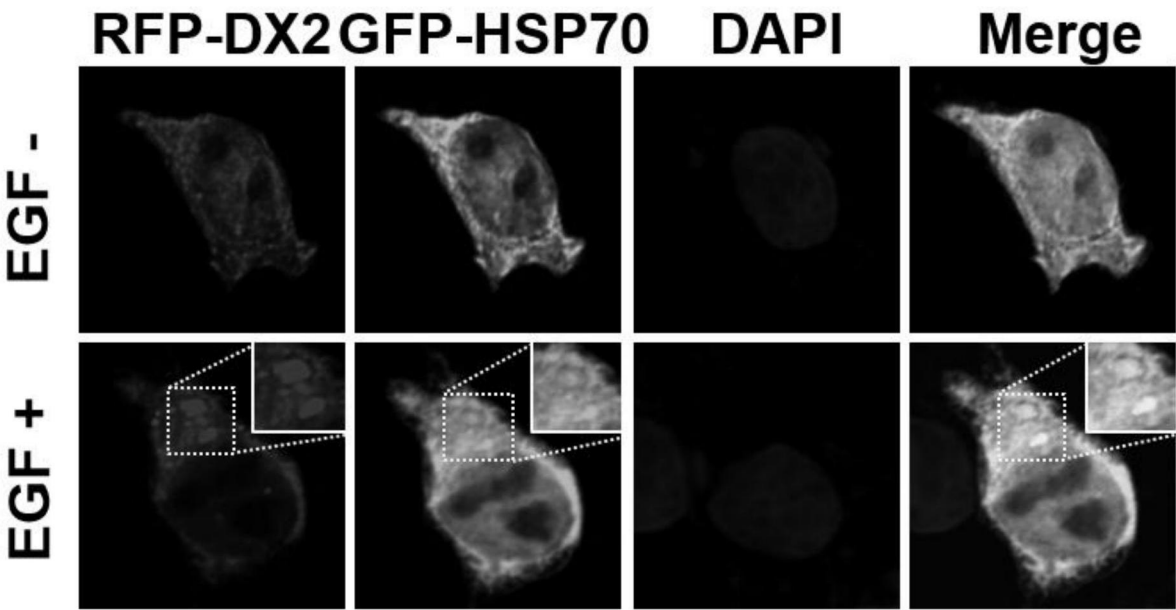
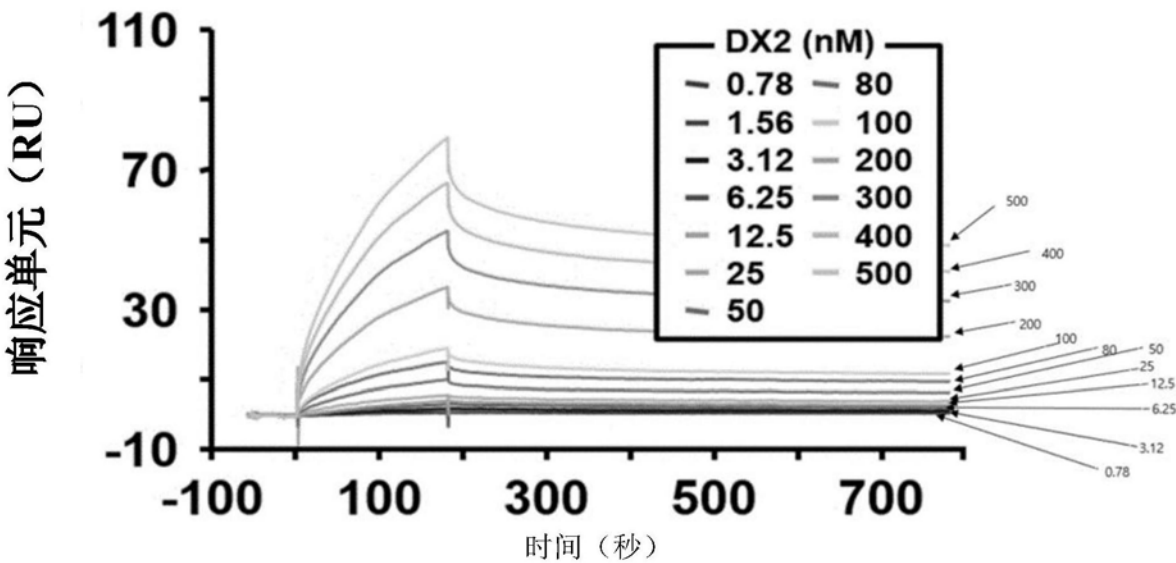


图2C



$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
$1.03 \times 10^6$	$4.93 \times 10^{-4}$	$4.79 \times 10^{-10}$

图2D

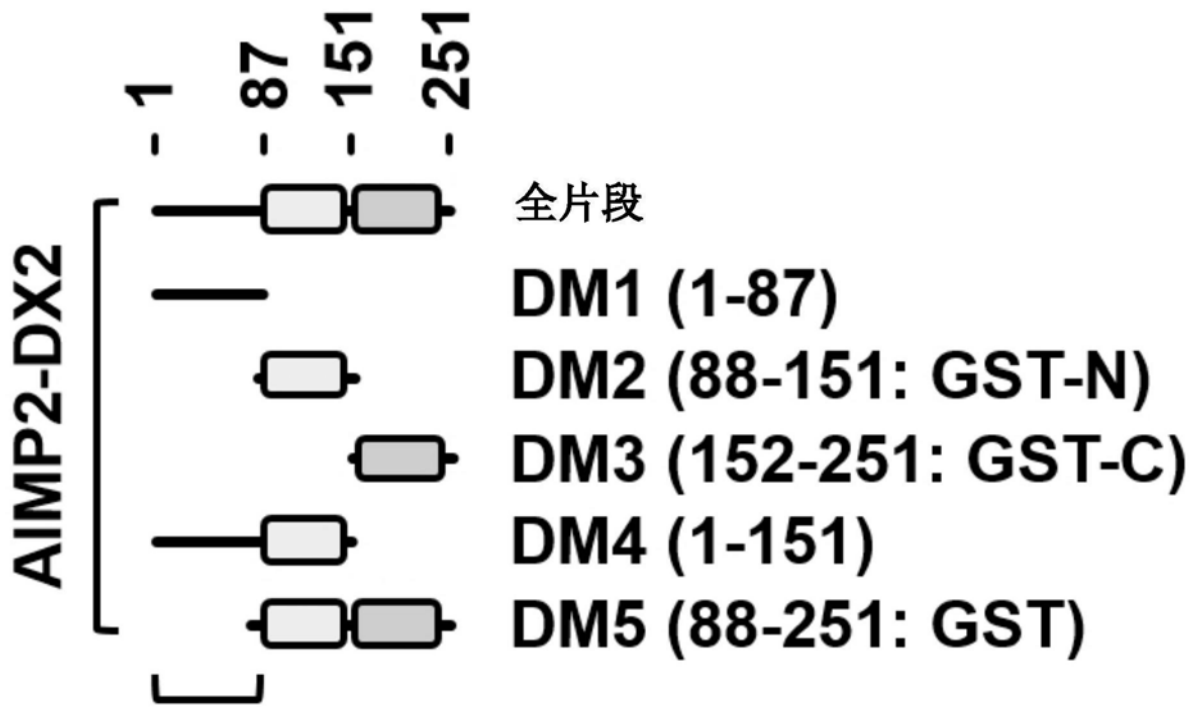


图3A

Gene		DM1	DM2	DM3	DM4	DM5
HSP70	HSPA1A	1.07				
	HSPA4	0.26	0.85	2.29	0.58	
	HSPA5	1.68				
	HSPA8	1.07				
	HSPA9	1.43				
	HSPD1	1.00	1.68	0.77	0.93	

图3B

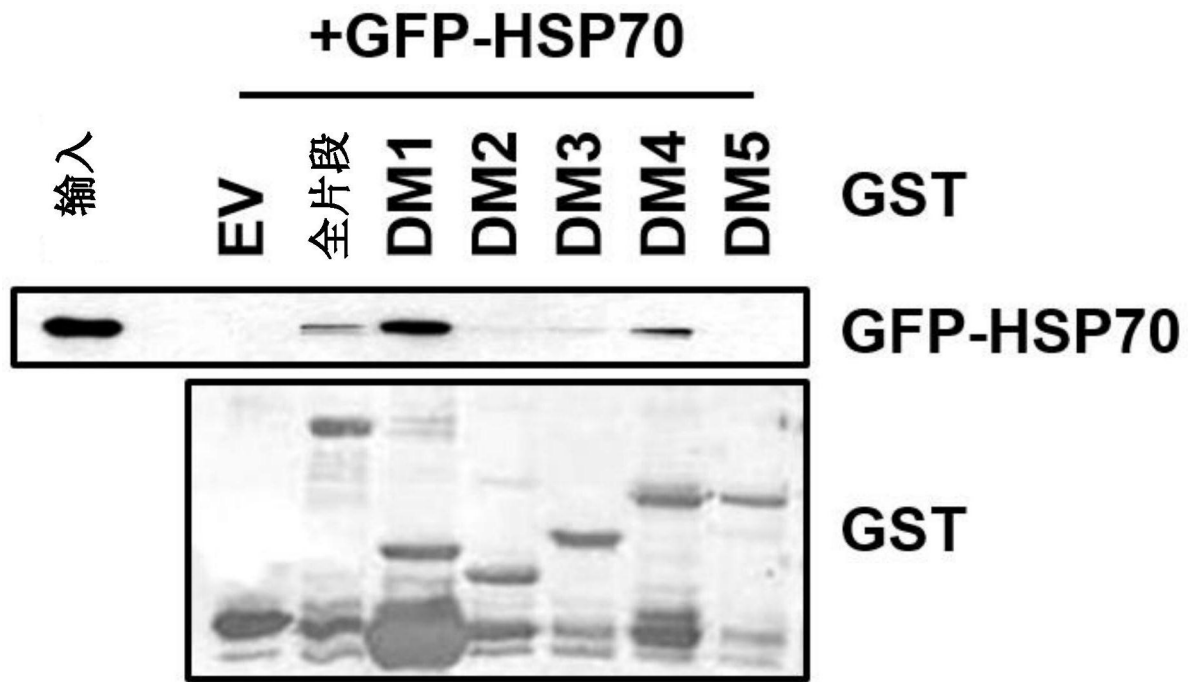


图3C

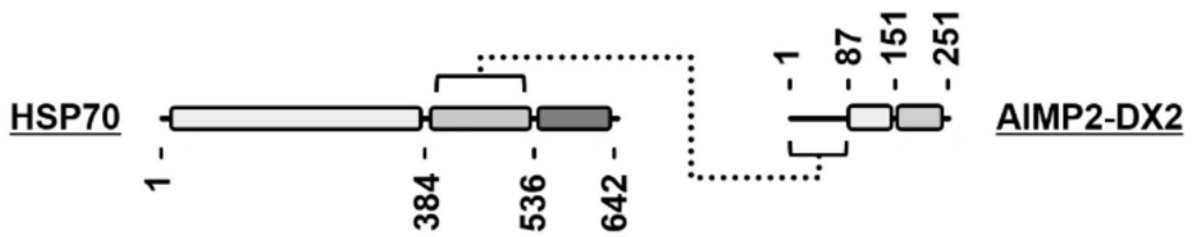


图3D

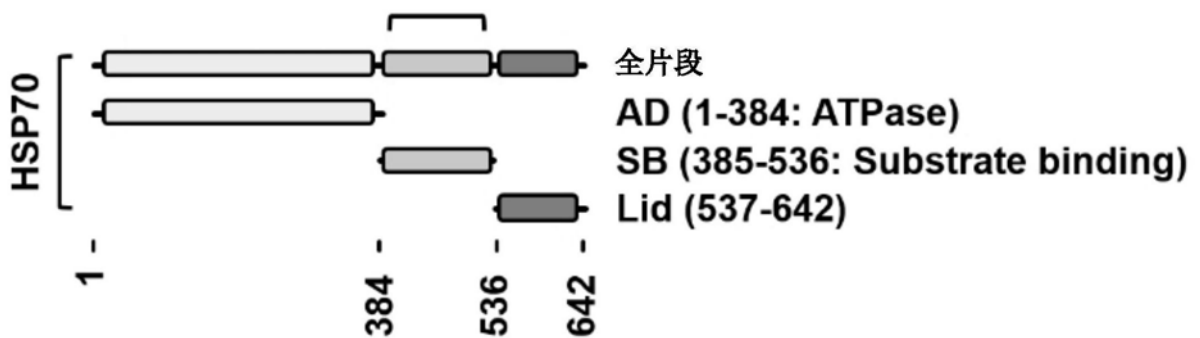


图3E

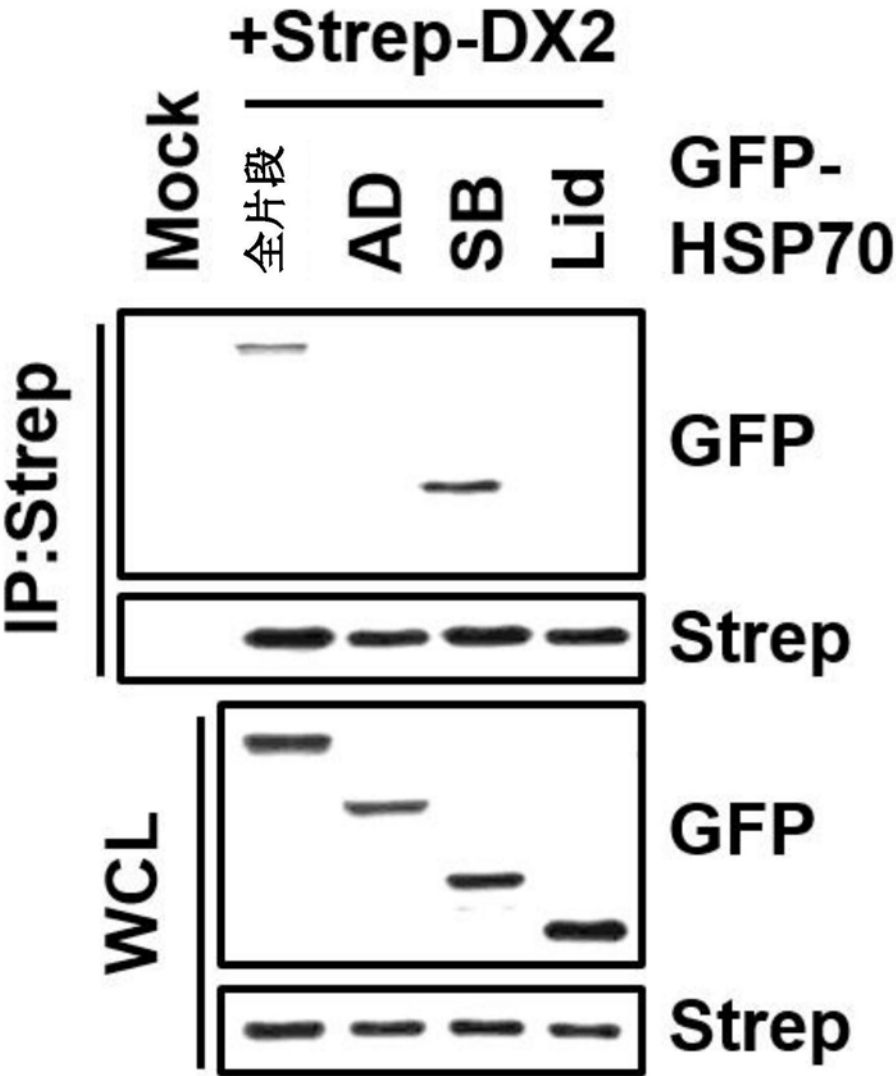


图3F

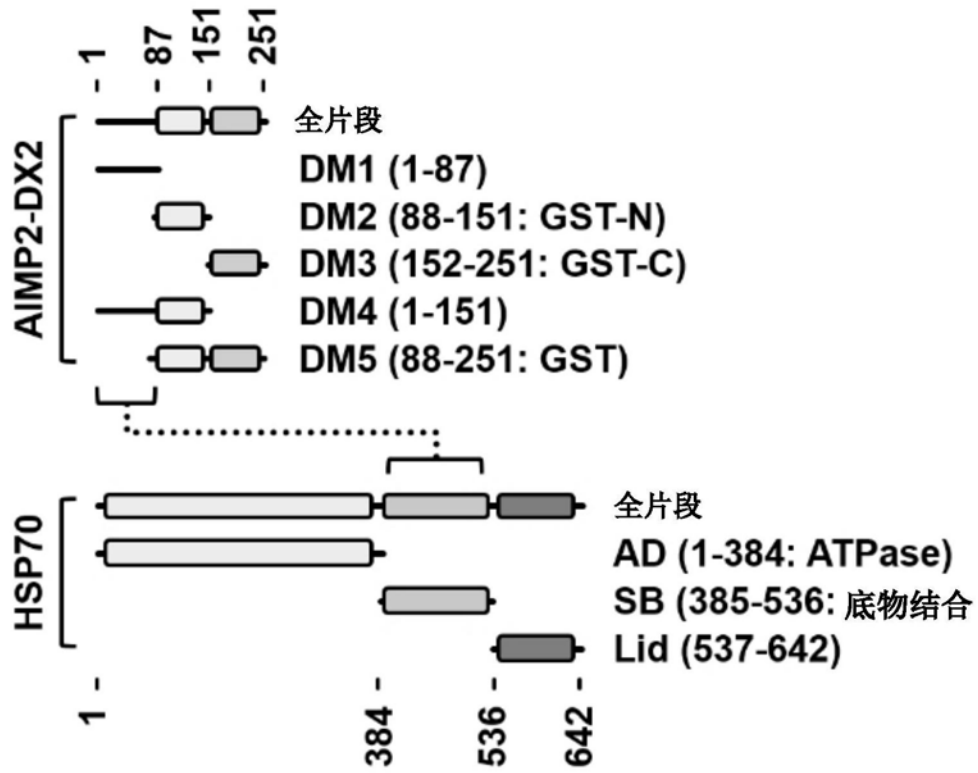


图4

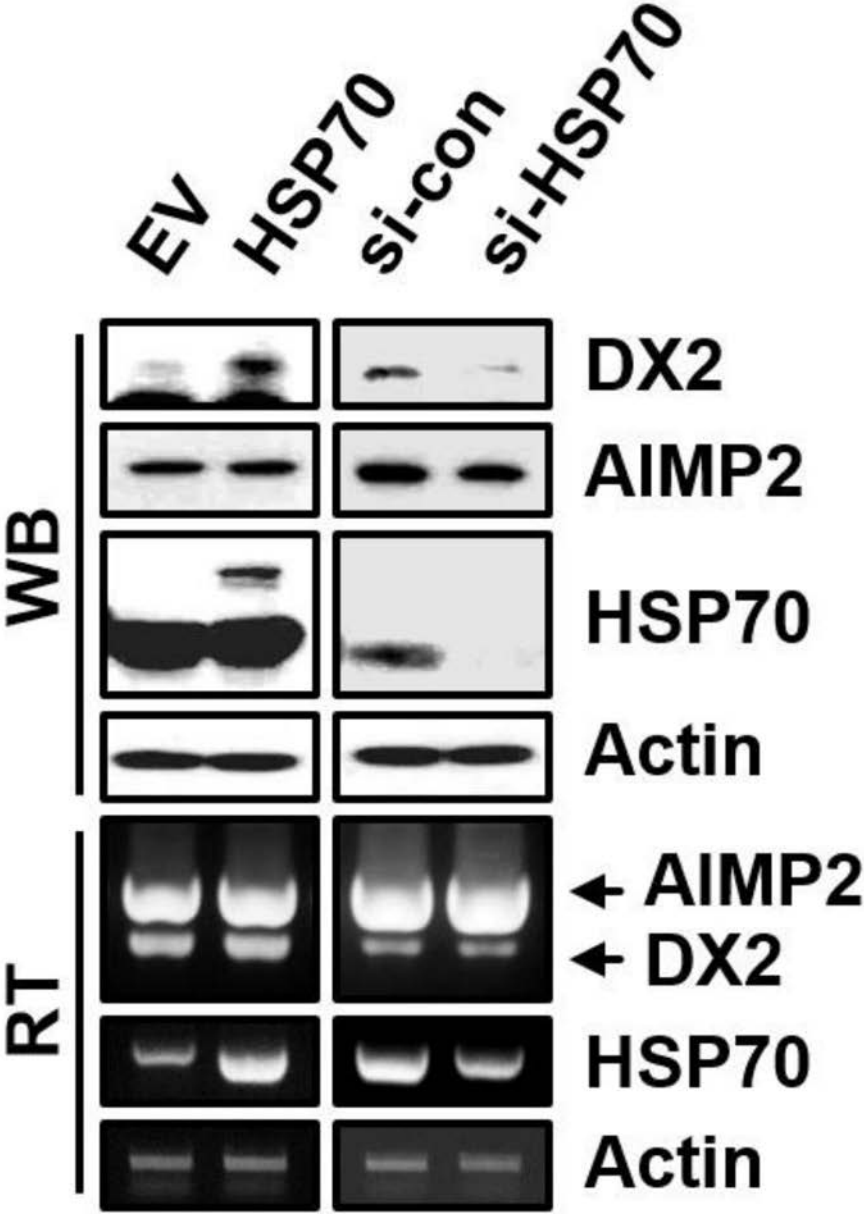


图5A



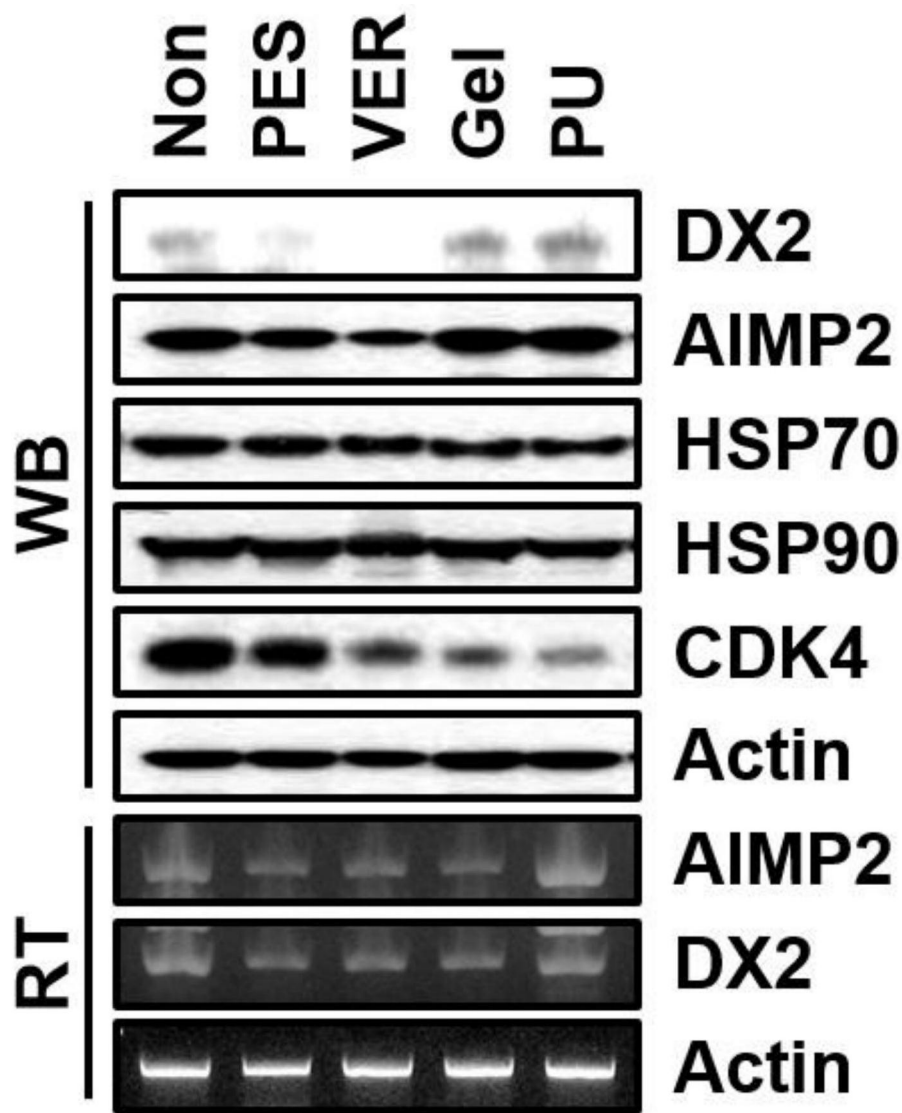


图5B

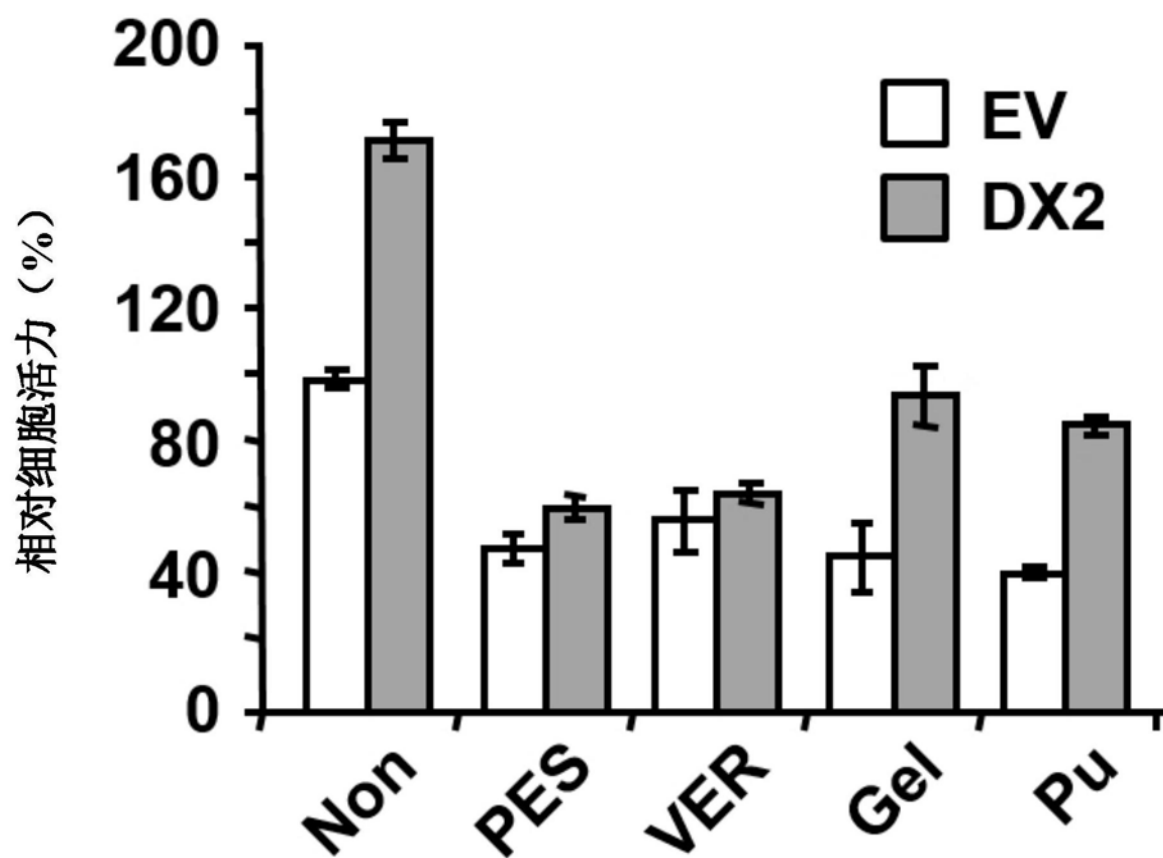


图6A

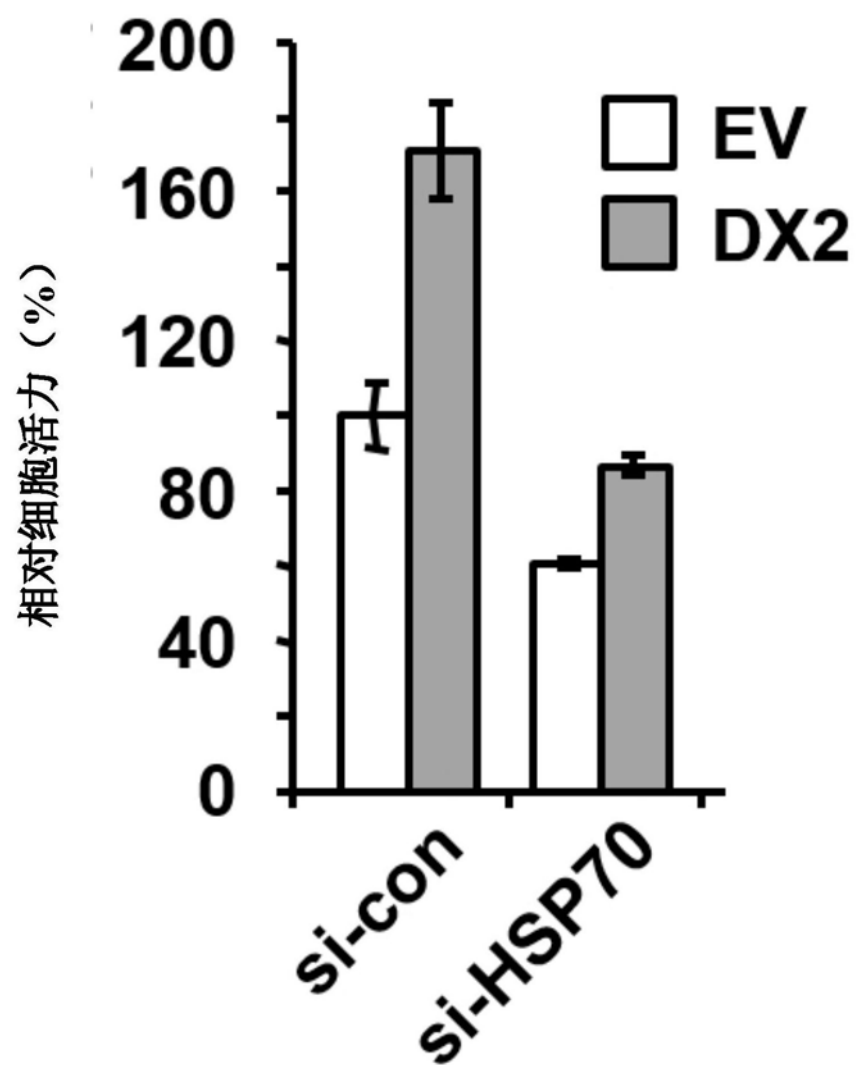


图6B

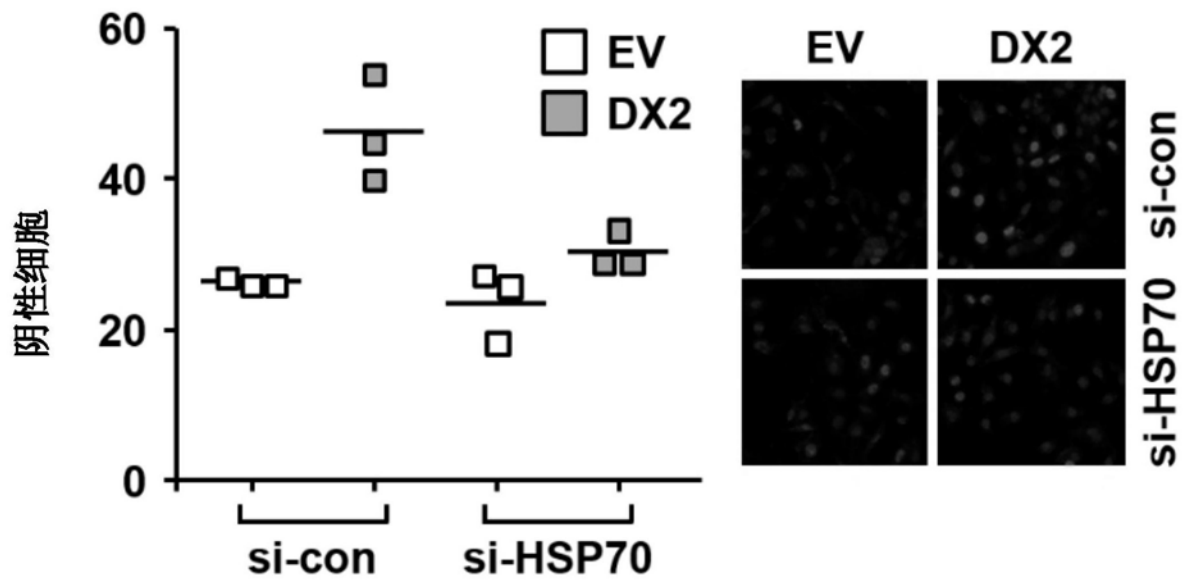


图6C

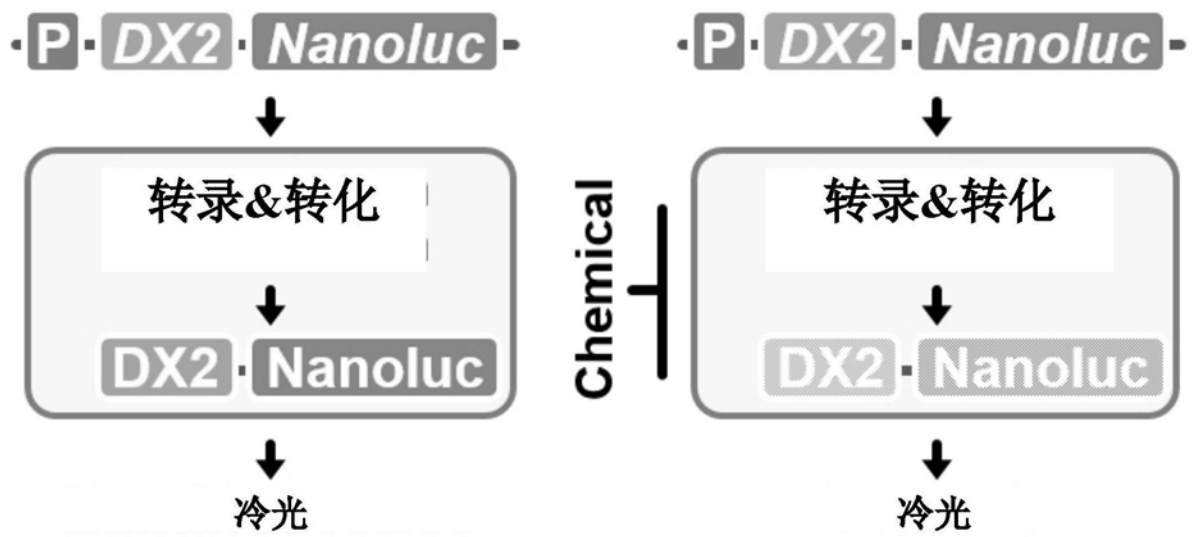
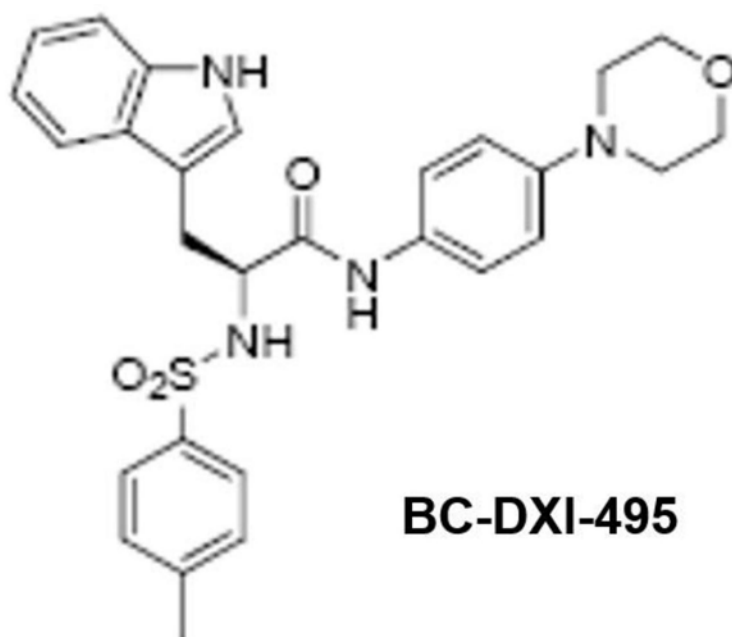


图7A



BC-DXI-495

图7B

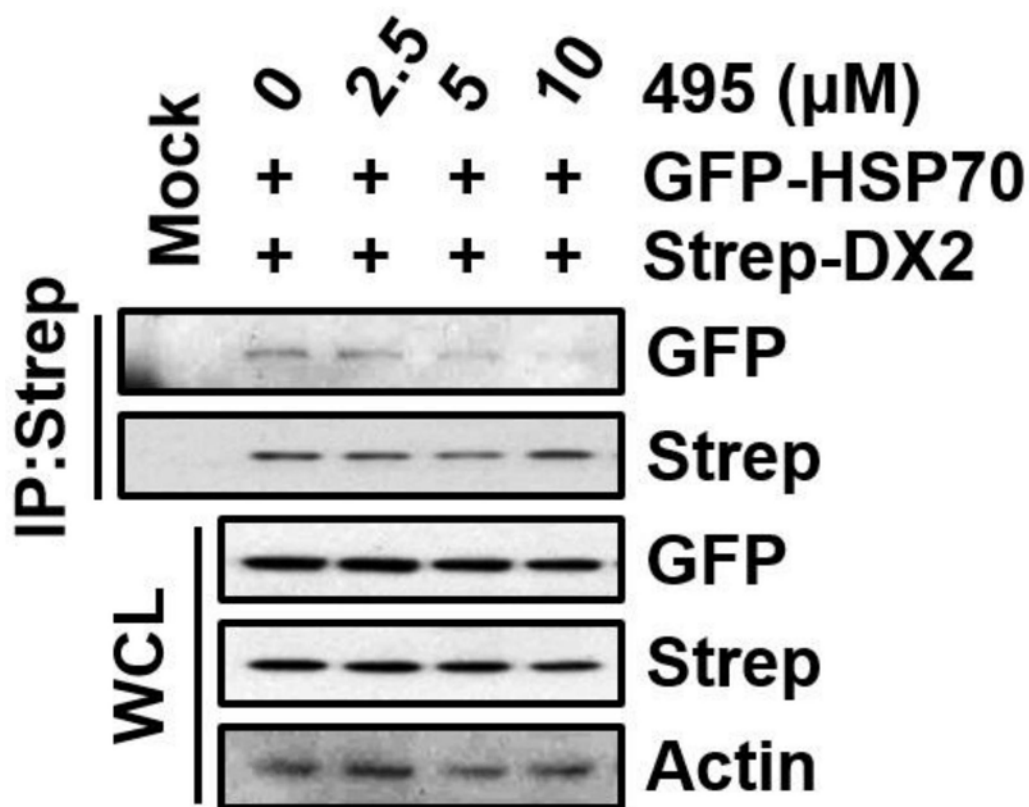


图8A

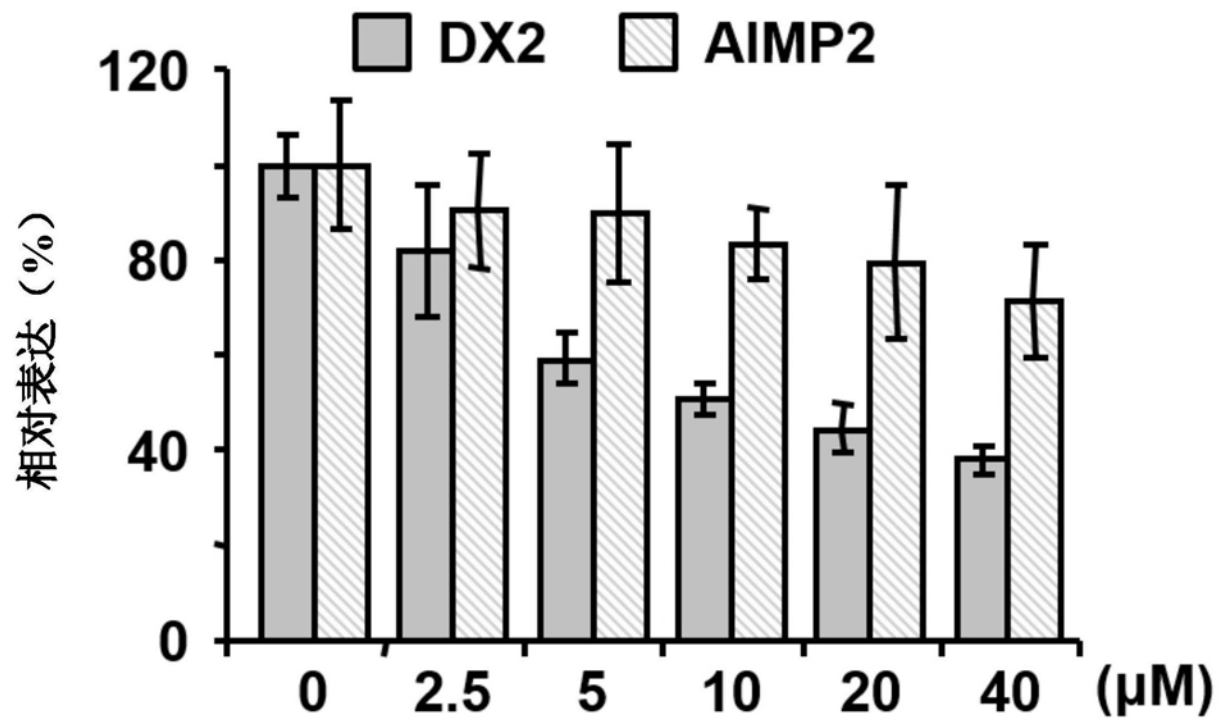


图8B

<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>DX2</b>	<b>4.2</b>
	<b>AIMP2</b>	<b>&gt;100</b>
<b>GI<sub>50</sub></b>	<b>A549</b>	<b>14.25</b>
	<b>WI-26</b>	<b>&gt;100</b>

图8C

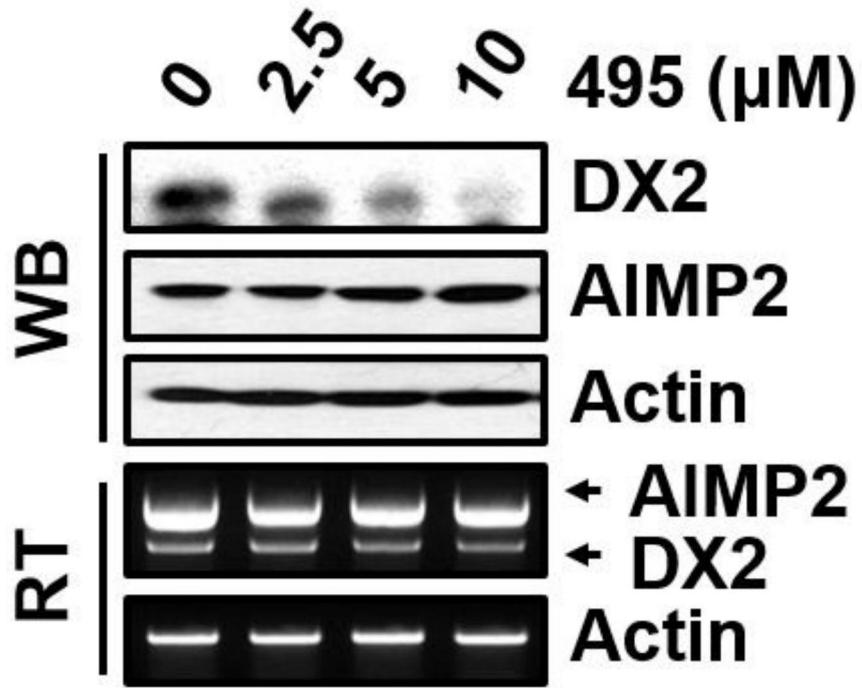


图8D

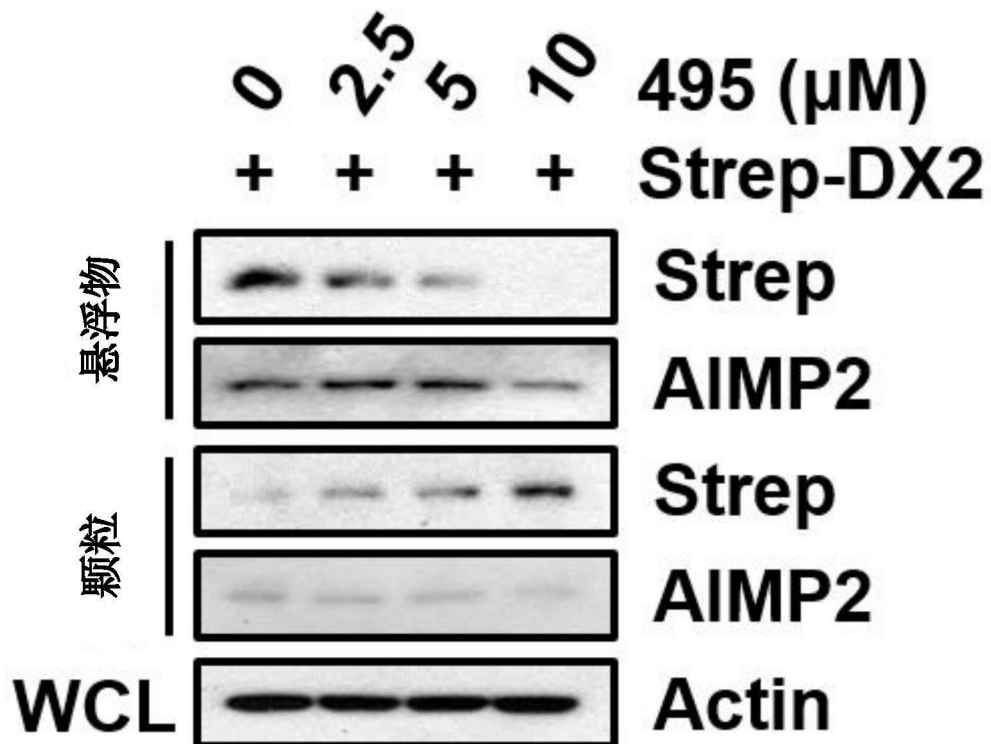


图8E

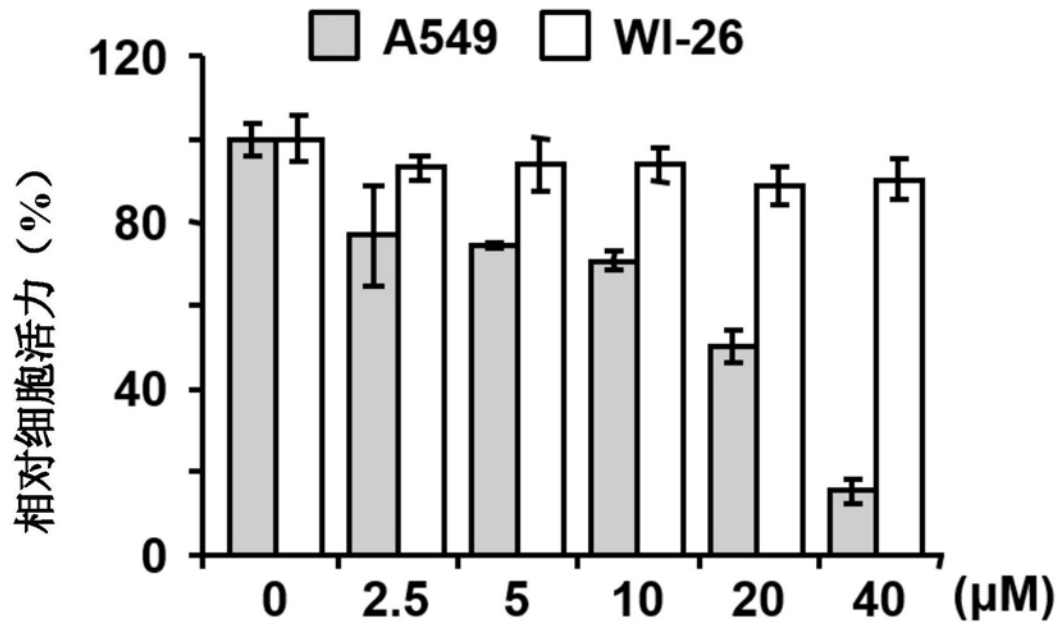


图9A

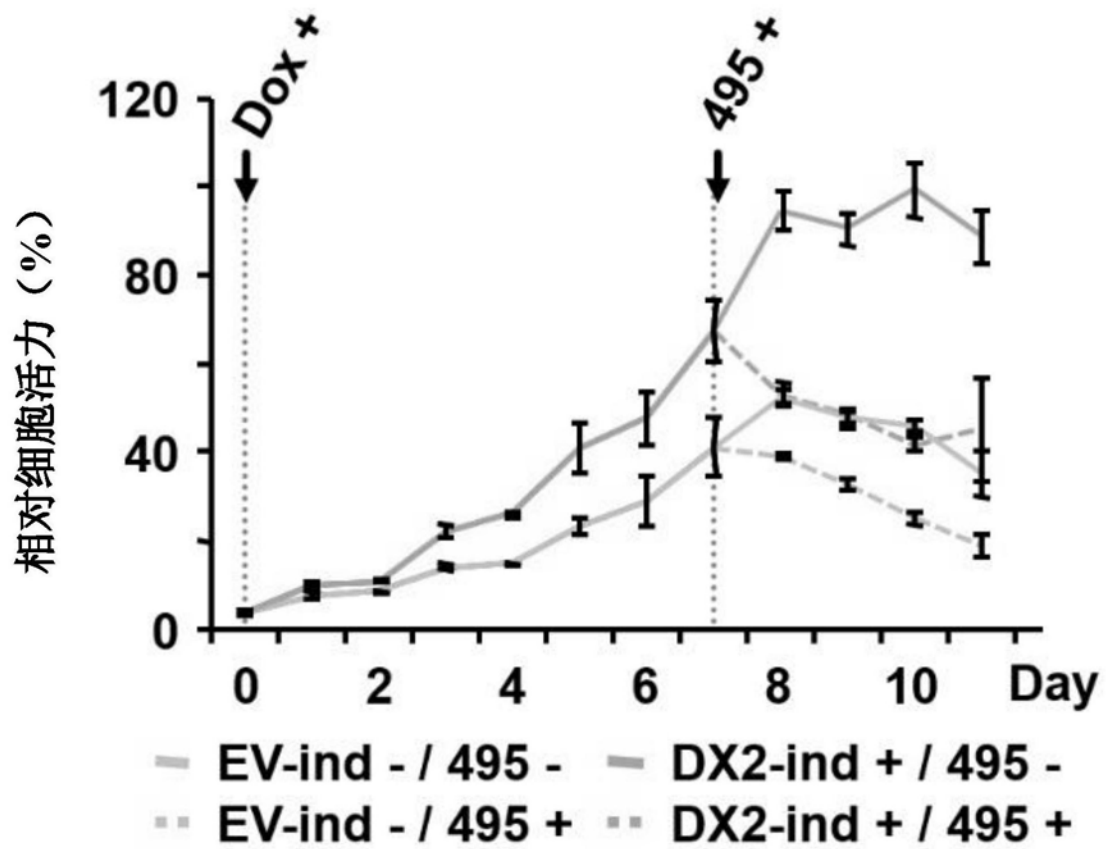


图9B



表达	细胞株	GI <sub>50</sub>	
低	WI-26	100	
	WI-38	100	
	NCI-H2087	100	
中	HCC-1359	100	
	HCC-95	71.66	
	HCC-366	61.12	
高	HCC-1438	38.59	
	HCC-1588	27.38	
	NCI-H460	20.49	

图9C

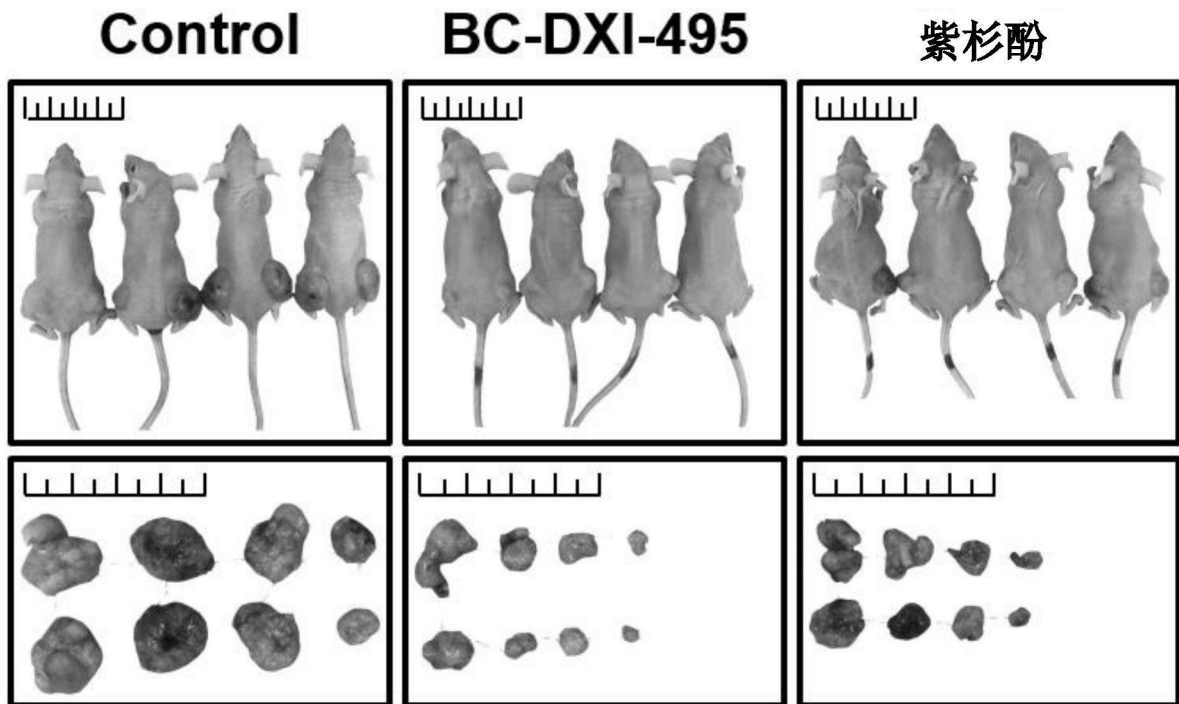


图10A

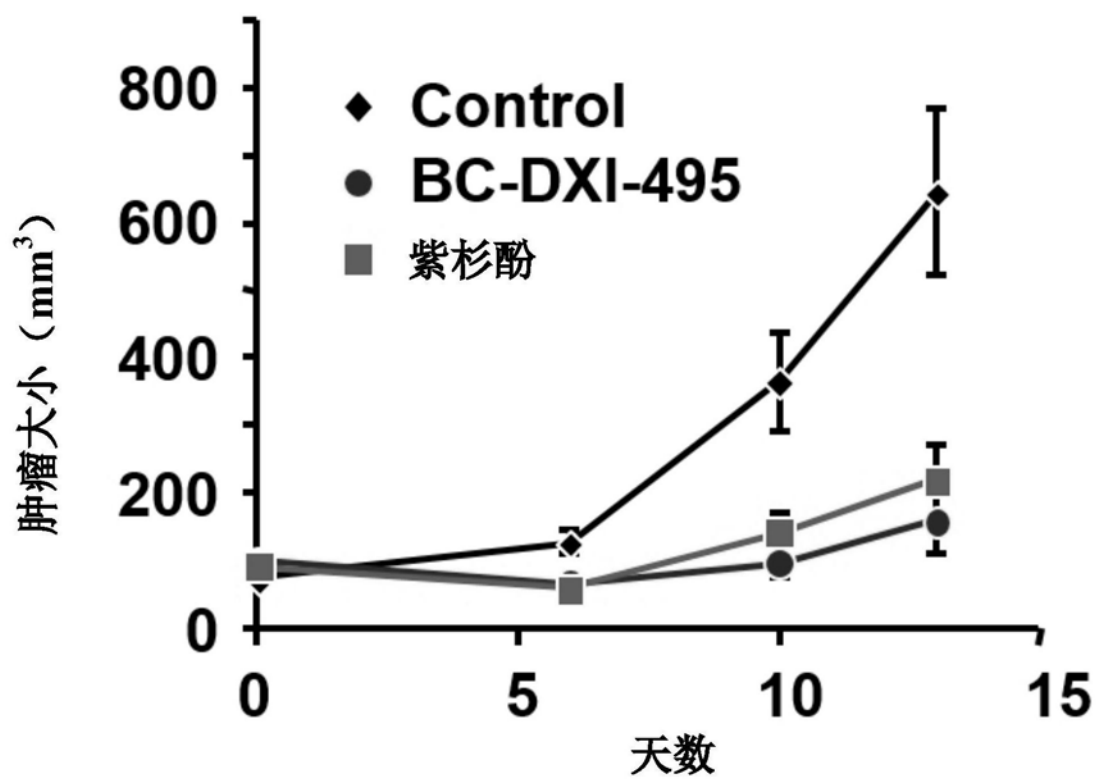


图10B

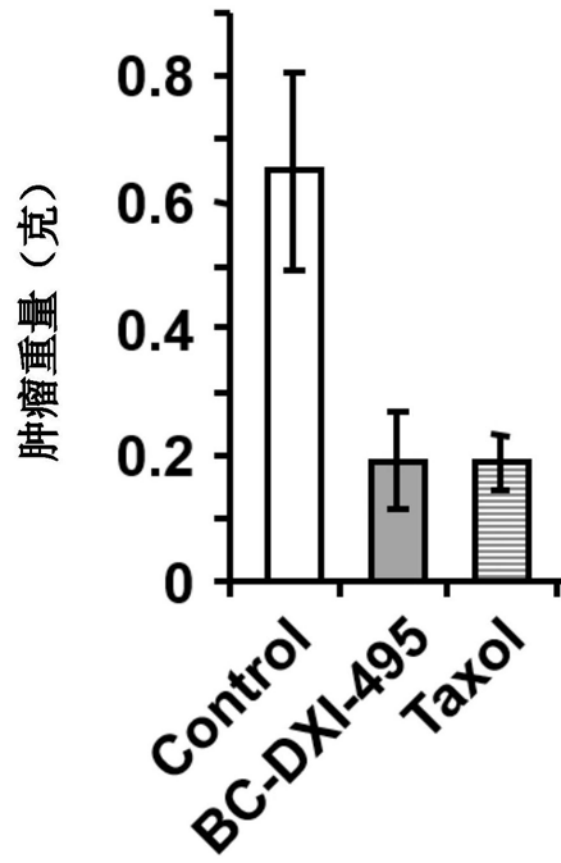


图10C

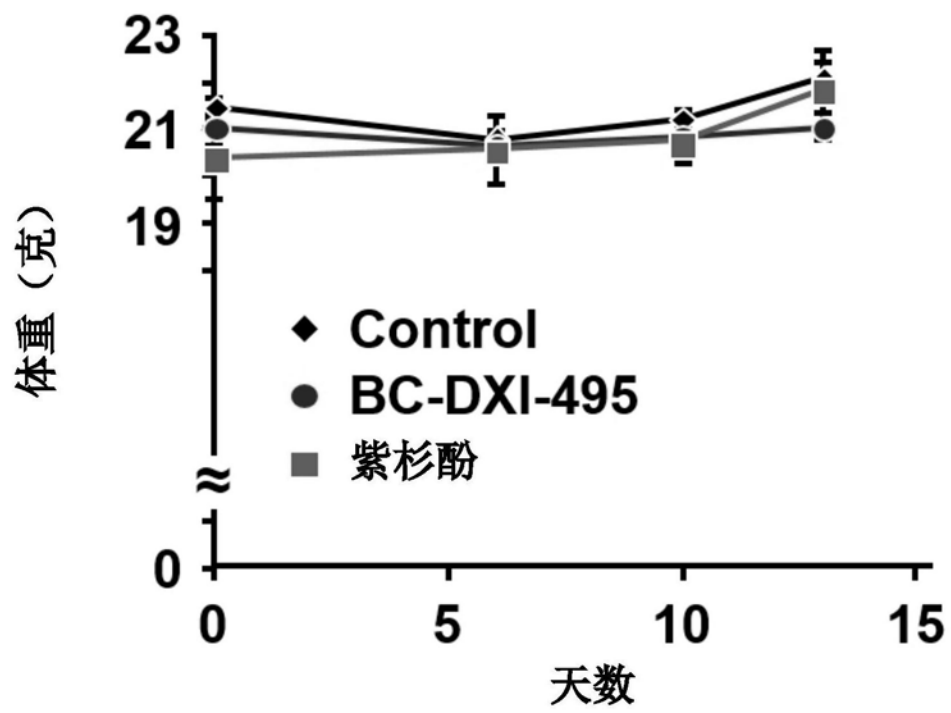


图10D