



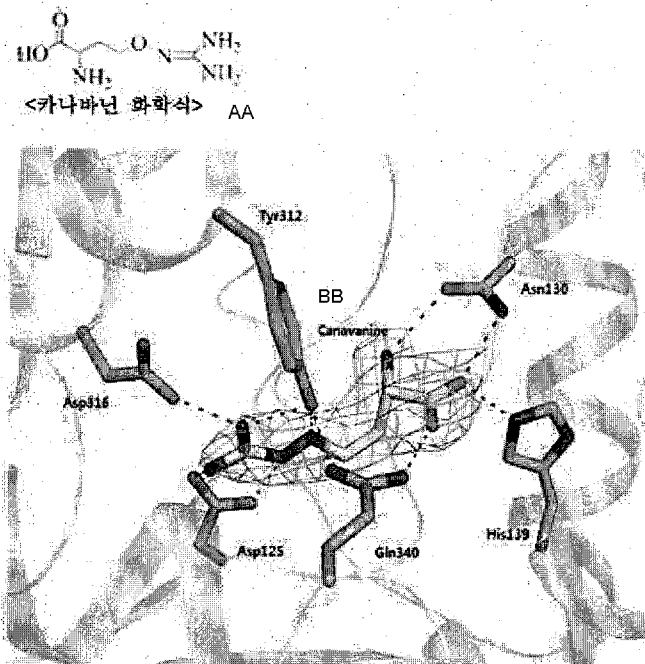
- (51) 국제특허분류:
C12N 9/00 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/006627
- (22) 국제출원일: 2014년 7월 22일 (22.07.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0087030 2013년 7월 23일 (23.07.2013) KR
- (71) 출원인: 고려대학교산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-701 서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 (안암동 5가), Seoul (KR). 계단범인 의약바이오 컨버전스연구단 (MEDICINAL BIOCONVERGENCE RESEARCH CENTER) [KR/KR]; 443-270 경기 수원시 영통구 광교로 145 차세대융합기술연구원 내 B동 8층 (이의동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 황광연 (HWANG, Kwang Yeon); 140-727 서울특별시 용산구 이촌로 81길 14 강촌아파트 102-1302, Seoul (KR). 김현숙 (KIM, Hyun Sook); 471-815 경기도 구리시 안골로 63번길 20-2 (수택동) 102호, Gyeonggi-do (KR). 김성훈 (KIM, Sunghoon); 135-859 서울특별시 강남구 남부순환로 365길 42, 4-1005 (도곡동, 도곡한신아파트), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook) 등; 135-915 서울특별시 강남구 테헤란로 33길 11 9층 (역삼동, JS빌딩) 시원 국제특허법률사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING CANCER THERAPEUTIC AGENT BY USING MODIFIED RARS PROTEIN

(54) 발명의 명칭: 변형된 RARS 단백질을 이용한 암 치료제 스크리닝 방법

【도 8】



AA ... Chemical formula of canavanine
BB ... Canavanine

(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening a cancer therapeutic agent by using a modified RARS protein, and more specifically, to a method for screening a cancer therapeutic agent by using a modified RARS protein represented by SEQ ID NO: 4 in which 72 amino acids are removed from the N terminal of human-derived arginyl tRNA synthetase (RARS) protein, and the location of an amino acid moiety at which the protein binds to L-canavanine. The amino acid moiety of the modified RARS protein of the present invention which binds to canavanine is effective for screening a material, that is, a cancer therapeutic agent, capable of acting as a competitive inhibitor of arginine, such as canavanine.

(57) 요약서: 본 발명은 변형된 RARS 단백질을 이용한 암 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간 유래 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질의 N 말단에서 72개의 아미노산이 제거된 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS 단백질 및 상기 단백질과 카나바닌 (L-canavanine)이 결합하는 아미노산 잔기 위치를 이용하여 암 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 카나바닌과 결합하는 변형 RARS 단백질의 아미노산 잔기를 이용하여 카나바닌처럼 아르기닌에 대한 경쟁적 저해제로 작용할 수 있는 물질, 즉 암치료제를 선별하는데 효과적이다.



SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】**【발명의 명칭】**

변형된 RARS 단백질을 이용한 암 치료제 스크리닝 방법

【기술분야】

본 출원은 2013년 07월 23일에 출원된 대한민국 특허출원 제 10-2013-0087030호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

본 발명은 변형된 RARS 단백질을 이용한 암 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간 유래 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질의 N 말단에서 72개의 아미노산이 제거된 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS 단백질 및 상기 단백질과 카나바닌(L-canavanine)이 결합하는 아미노산 잔기 위치를 이용하여 암 치료제를 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

최근 아미노아실 티 알엔에이 합성 효소 단백질의 기질인 아르기닌(arginine)과 비슷한 구조를 가진 카나바닌이 암세포 억제에 영향을 주는 것으로 보고 되고 있다 (Bence & Crooks 2003 J Enzyme inhib Med Chem 383:394). 카나바닌은 니구미어스 (leguminous) 식물에서 발현되는 자연 독소로 알지닌과 비슷한 구조를 가지는 물질로 알려져 있으며 세포내에서 아르기닌을 대신하여 그 기능을 할 수 있는 것으로 예상되고 있다. 따라서 아르기닌 대신 카나바닌이 아미노아실 티 알엔에이 합성 효소 단백질에 결합 할 수 있음으로써 세포 내 단백질 합성에 관여하여 돌연변이 단백질 생산, 단백질 합성 저해, 세포내 신호 전달 파괴 등을 초래함으로써 세포의 성장을 억제하는 것으로 생각 되고 있다. 최근 실험에서 여러 암세포와 정상세포에 카나바닌을 처리 했을 때 정상 세포의 경우 카나바닌에 저항성을 가지고 있는 반면, 암세포의 경우 카나바닌에 매우 취약한 것으로 확인 되고 있으며 특히 췌장암세포의 경우 매우 취약한 것으로 보고 되고 있다 (Vynnytska 등 2011 Anti-Cancer Drugs 148:157). 따라서 카나바닌이 췌장암세포의 억제물질로써 제기 되고 있다. 그러나 최근까지 실제로 카나바닌이 아미노아실 티 알엔에이 합성 효소 단백질과 결합하는지에 대한 명확한 사실들이 보고되고 있지 않다. 또한 인간에서 유래된 아미노아실 티 알엔에이 합성 효소의 3차 구조 역시 알려져 있지 않다.

【발명의 상세한 설명】

이에 본 발명자는 인간으로부터 유래된 알지닐 티 알엔에이 합성 효소 단백질의 N말단 부분 72개의 아미노산을 제거한 변형된 알지닐 티 알엔에이 합성 효소 단백질 (ArgRS-N73)을 대량 발현하고 이를 정제하여 카나바닌 (L-Canavanine)과 결합한 단백질을 결정화하였고, 상기 결정화된 단백질에서 카나바닌과 결합하는 ArgRS-N73의 아미노산 잔기들을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

본 발명의 목적은 인간 유래 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질의 N 말단에서 72개의 아미노산이 제거된 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS 단백질을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 변형 RARS 단백질을 암호화하는 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 변형 RARS 단백질에 특이적인 항체, siRNA 핵산 분자 및 안티센스 핵산분자를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은

(a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계;

(b) 후보물질을 상기 (a)단계에서 정제된 변형 RARS 단백질에 혼합하여 결합시키는 단계;

(c) 상기 (b) 단계에서 결합된 단백질을 결정화하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계에서 결정화된 단백질에서 후보물질이 변형 RARS 단백질과 결합하는지 여부를 모니터링하는 단계를 포함하는 암 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 본 발명의 목적을 달성하기 위해 본 발명은 인간 유래 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질의 N 말단에서 72개의 아미노산이 제거된 서열번호 4의 아

미노산 서열로 표시되는 변형 RARS 단백질을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 변형 RARS 단백질을 암호화하는 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 본 발명의 변형 RARS 단백질에 특이적인 항체, siRNA 핵산 분자 및 안티센스 핵산분자를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은

(a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계;

(b) 후보물질을 상기 (a)단계에서 정제된 변형 RARS 단백질에 혼합하여 결합시키는 단계;

(c) 상기 (b) 단계에서 결합된 단백질을 결정화하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계에서 결정화된 단백질에서 후보물질이 변형 RARS 단백질과 결합하는지 여부를 모니터링하는 단계를 포함하는 암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 인간 유래 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질의 N 말단에서 72개의 아미노산이 제거된 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS 단백질을 제공한다.

본 발명의 상기 RARS 단백질은 인간 유래 RARS 단백질의 N말단에서 72개의 아미노산을 제거하여 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖도록 제조하였다. wild type의 RARS 단백질의 N말단에서 72개의 아미노산이 다른 단백질과의 결합에 관여할 것으로 간주되어 매우 flexible 할 것으로 예상되었다. 따라서 보다 안정적인 결정을 얻기 위해 이 부분을 제거한 변형된 RARS를 제조하게 되었다. N말단을 제거하기 위해 단백질의 2차구조와 데이터베이스, 즉 Expasy, NCBI, ERGO(<http://wit.integratedgenomics.com/Igwit>)에서 얻은 단백질 도메인 분석 자

료 그리고 여러 균주에서 아미노산 유사성을 비교한 결과를 토대로 한다.

본 발명은 상기 변형 RARS 단백질을 암호화하는 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 결과적으로 본 발명의 상기 변형 단백질을 암호화할 수 있는 어떤 조합의 염기서열도 가능하다. 아울러, 본 발명은 본 발명의 변형 PRAS 단백질을 암호화하는 염기서열을 가지는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환 된 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 벡터는 통상의 클로닝 벡터 또는 발현벡터일 수 있으며, 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서(촉진유전자) 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충격유전자전달법(electroporation), 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection) 및 리포솜 매개법(liposome-mediated method)를 이용할 수 있으며, 문헌에 예시된 방법을 사용할 수 있다 (Horsch et al., Science;227:1229-1231, 1985). 상기 형질전환체는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 스탕필로코쿠스(*Staphylococcus*), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 본 발명의 변형 RARS 단백질에 특이적인 항체, siRNA 핵산 분자 및 안티센스 핵산분자를 제공한다.

본 발명에서 용어 “항체”란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 변형 RARS 단백질을 특이적으로 인지하는 항체를 의미하며, 다클론 항체 및 단클론 항체를 모두 포함한

다.

상기한 바와 같이 변형 RARS 단백질이 규명되었으므로 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

다클론 항체는 상기한 AIMP2DX2 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.

단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 융합 방법(fusion method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 재조합 DNA 방법(미국특허 제4,816,567호) 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

본 발명에서 용어 "siRNA"란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이의 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는, 유전자 치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 표적유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 본 명세서에서 siRNA의 전장은, 중앙의 이중사슬 부분의 길이와 양 말단의 단일사슬 돌출을 구성하는 길이의 합으로 나타내었다. 또한, siRNA는 표적유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구

조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

siRNA를 제조하는 방법은 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 뒤, 형질전환(transfection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입시키는 방법과 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-derived siRNA 발현 카세트를 세포 안으로 형질전환 또는 감염(infection) 시키는 방법이 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 실험의 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 siRNA는 변형 RARS 단백질의 mRNA를 특이적으로 감소시킬 수 있으면 서열과 길이는 특별히 제한되지 않는다.

본 발명에서 용어 "안티센스 핵산"이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 서열은 변형 RARS 단백질의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 본 발명의 변형 RARS 단백질 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다. 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55, 1995). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포 트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-테아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이

어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리 에틸렌 글리콜 사슬, 아다맨탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아 미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제 한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제 5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

안티센스 RNA의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여 하거나 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 RNA를 합성하는 한 예는 RNA 폴리머라제 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센 스 RNA가 합성되도록 하는 한가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서 열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

본 발명은

(a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계;

(b) 후보물질을 상기 (a)단계에서 정제된 변형 RARS 단백질에 혼합하여 결합 시키는 단계;

(c) 상기 (b) 단계에서 결합된 단백질을 결정화하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계에서 결정화된 단백질에서 후보물질이 변형 RARS 단백질과 결합하는지 여부를 모니터링하는 단계를 포함하는 암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

(a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계;

상기 (a) 단계는 변형 RARS 단백질을 제조하는 과정이다. 상기 변형 RARS 단백질의 아미노산 서열(서열번호 4)를 코딩하는 유전자를 증폭하기 위하여 ArgRS(arginyl-tRNA synthetase) 유전자의 5' -말단과 3' -말단에 대응하는 중합효 소 연쇄 반응(polymerase chne reaction, 이하 PCR이라 함)용 프라이머를 고안 합 성하였는데, ArgRS 유전자의 5' -말단에 대응하는 프라이머는 대장균 발현 벡터로

클로닝이 용이하도록 제한효소 인지 부위가 존재하도록 만들었고, 3' -말단에 대응하는 프라이머에는 제한효소 인지 부위와 종결코돈을 포함하도록 만들어 단백질 합성이 인위적으로 종료할 수 있도록 고안하였다. 이때 N73의 5' -말단에 대응하는 프라이머는 N-말단의 아미노산을 제거하도록 제조한다. 즉 ArgRS 유전자의 코돈을 토대로 메사이오닌- 아이소루신- 아스파라진으로 시작하도록 프라이머를 제조한다.

호모사피언스의 cDNA를 주형으로 하여 PCR반응에 의해 ArgRS 유전자를 증폭한다. 증폭된 유전자를 제한효소로 절단하여 얻은 유전자 단편을 적절한 대장균 발현 벡터에 삽입한다. 이렇게 하여 만든 재조합 벡터로 대장균을 형질전환 시킨 후 유전자의 발현에 적당한 조건에서 대장균을 배양한다. 단백질의 생성여부는 통상적으로 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동방법으로 확인 한다.

본 발명의 변형된 RARS 단백질의 발현은 당업계에 공지된 통상의 분자생물학 방법을 이용하여 실시할 수 있다. 당업계에서 통상적으로 이용되는 벡터, 예컨대 pGEM-T, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19 또는 pET 등에 PCR로 증폭한 유전자를 삽입한다. 상기 발현벡터는 옴피실린 저항 유전자, 테트라사이클린 저항 유전자, 가나마이신 저항 유전자, 클로람페니콜 저항 유전자 등과 같은 통상의 선별마크를 포함할 수 있다. 삽입 후 적합한 숙주 세포, 예컨대 E. coli JM109, E. coli, BL21(DE3), E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110과 같은 대장균, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 추린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등에 형질전환시키고, 형질전환된 세포를 배양하여 상기 변형된 EPRS 단백질을 대량으로 발현시킬 수 있다. 발현에 사용되는 벡터는 가장 바람직하게는 pET 일 수 있고, 숙주세포는 대장균일 수 있다.

단백질의 생성여부는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 웨스턴 블롯팅 방법 등과 같은 통상적인 방법으로 확인할 수 있다. 변형된 RARS 단백질(ArgRS-N73)의 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환 된 대장균을 옴피실린, 테트라사이클린, 카나마이신, 클로람페니콜 등 선별마커에 대응하는 항생제가 함유된 배지에서 진탕 배양하여 일정한 세포농도에 다다랐을 때, IPTG(isopropyl-D-galactopyranoside)를 첨가하여 ArgRS-N73의 발현을 유도한다. 상기 배양액을 원심 분리하여 대장균 세포를 침전시킨 후, 대장균을 적당한 완충 용액에 현탁한 후 파쇄한다. 상기 파쇄물을 원심분리하여, 단백질이 녹아있는 상층액을 분리한 후, 이온교환수지, 친화성 결합수지, 사이징(sizing) 등을 이용하여 ArgRS-N73를 분리 및 정제한다.

(b) 후보물질을 상기 (a)단계에서 정제된 변형 RARS 단백질에 혼합하여 결합시키는 단계;

상기 (b)단계는 카나바닌과 유사한 작용으로 암치료제로서 작용할 것으로 예상되는 후보물질을 변형 RARS 단백질(ArgRS-N73)과 결합시키는 단계이다. 상기 두 단백질을 혼합할 때, 카나바닌은 ArgRS-N73의 1배 내지 5배의 중량으로 혼합시킬 수 있고, 더 바람직하게는 1 배지 3배일 수 있다.

상기 혼합 과정은 수용액 상태에서 이뤄지고, 혼합 온도는 1 내지 10℃이며, 1 내지 5시간 동안 진행되며, 이로써 카나바닌과 ArgRS-N73가 결합을 하게 된다. 상기 결합은 비공유결합으로서, 바람직하게는 수소결합일 수 있다.

(c) 상기 (b) 단계에서 결합된 단백질을 결정화하는 단계;

상기 (c)단계는 (b)단계에서 후보물질과 ArgRS-N73이 결합한 단백질을 결정화하는 단계이다. 결정화를 위해 사용하는 보존용액에 첨가되는 침전제는 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol) 4000 일 수 있다. 전체 보존용액 내에서의 침전제의 농도는 사용되는 침전제의 종류에 따라서 달라지는데, 상기 폴리에틸렌글리콜 4000은 전체 보존용액에 대하여, 10 내지 30%(w/v)일 수 있고, 더 바람직하게는 13 내지 25%(w/v) 비율로 보존용액에 포함될 수 있다. 상기 보존용액은 상기 침전제 외에도 통상적으로 사용 가능한 염, 완충액 및 세정제 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 단백질 결정화는 pH 5.0 내지 7.0에서 수행되는 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 pH 5.6 내지 6.3일 수 있다. 상기 범위는 실험적으로 결정된 것이며, 상기 범위의 pH 조건에서 반응 시 가장 우수한 결정을 얻을 수 있다.

본 발명의 단백질 결정을 형성하기 위한 반응 온도는 15℃ 내지 25℃인 것이 바람직하고, 18℃ 내지 22℃인 것이 더욱 바람직하다. 반응 기간은 1일 내지 10일이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 2일 내지 5일일 수 있다. 상기 반응 온도 및 반응 기간 범위는 결정을 얻기 위해 실험적으로 찾아진 범위이다.

결정화 방법은 통상적인 농도 평형을 이용한 방법이다. 더 상세하게는 증기 평형법 또는 투석법일 수 있다. 상기 증기 평형법에는 시팅 드롭 증기 평형법 및 행잉 드롭 증기 평형법으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 가장 바람직하게는 행잉 드롭 증기 평형법 일 수 있다.

행잉 드롭 증기 평형법은 단백질의 결정화에 가장 많이 쓰이고 있는 방법이다. 단백질 용액과 보존용액이 섞인 시료를 순수 보존용액과 증기 평형 상태에 있

는 용기 상단에 부착시키면, 용기 내 보존용액에 비해 그 함량이 적은 시료가 평형 상태를 이루기 위해, 시료 내 수분이 아래로 떨어지게 된다. 평형 상태에 도달하게 되면 단백질 결정을 얻게 된다.

(d) 상기 (c) 단계에서 결정화된 단백질에서 후보물질이 변형 RARS 단백질과 결합하는지 여부를 모니터링하는 단계;

상기 (d) 단계는 변형된 RARS 단백질과 후보물질이 결합하는 것을 관찰함으로써 후보물질을 암 치료제로 선별하는 단계이다. 후보물질이 변형 RARS 단백질과 결합을 한다는 것은, 아르기닌에 대하여 길항적 저해제로 작용할 수 있는 것을 의미할 수 있으므로, 상기 후보물질은 카나바닌처럼 암 치료제로 사용될 수 있다.

상기 결합여부를 모니터링 하는 방법은 당업계에서 공지된 다양한 결합 분석(binding assay)에 따라 고속(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다.

후보물질 또는 변형 RARS 단백질을 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광 표지[예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxytetramethyl-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.

검출가능한 표지가 레이블링된 변형 RARS 단백질 또는 후보물질을 이용하는 경우, 변형 RARS 단백질과 후보물질 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-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페

녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.

택일적으로, 후보물질과 변형 RARS 단백질의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 분석할 수도 있다. 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 후보물질이 변형 RARS 단백질에 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, 후보물질과 변형 RARS 단백질 사이의 결합에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다(McConnell et al., Science 257:1906-1912(1992)).

후보물질의 변형 RARS 단백질과의 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.

또한, 본 발명의 스크리닝 방법은, 투-하이브리드 분석 또는 쓰리-하이브리드 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, 변형 RARS 단백질을 베이트(bait) 단백질로 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, 변형 RARS 단백질에 결합하는 물질, 특히 단백질을 스크리닝 할 수 있다. 투-하이브리드 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, 변형 RARS 단백질-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 변형 RARS 단백질과 결합할 수 있음을 나타내는 것이며, 결론적으로 혈관신생 억제제로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다.

상기 (d) 단계에서 후보물질은 변형 RARS 단백질과 결합할 때, 변형 RARS 단백질의 D125, N130, H139, Y312, D316 및 Q340로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기와 결합할 수 있고, 더 바람직하게는 본 발명의 변형 RARS 단백질의 D125, D316 및 Y312 잔기와 결합한다. 상기 세 잔기 외에 추가적으로 N130, H139 및 Q340로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 잔기와 결합할 수 있다.

본 발명의 상기 단백질은 결정화 상태에서 카나바닌이 변형된 RARS의 Rossmann fold로 이루어진 active site 에 결합하고 있다. 결합한 카나바닌은 active site 주변 잔기 중 D125, N130, H139, Y312, D316, Q340과 수소 결합을 이루고 있으며 특히 D125, D316, Y312 경우 카나바닌의 oxy-guanidino기와 결합에 관여함으로써 기질 식별 및 인식에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.(실시예 4 및 도 8 참조).

카나바닌은 아르기닌(arginine)과 유사한 구조를 가진 콩과 식물 유래 비단백성 아미노산 단백질이다. 카나바닌은 arginyl-tRNA synthetase에 아르기닌 대신 결합하여 단백질 합성 저해 등을 일으켜, 암세포의 성장을 억제한다. 따라서 변형 RARS 단백질의 상기 아미노산 잔기들에 카나바닌처럼 결합하는 물질은 아르기닌 대신 RARS에 결합하여 암세포의 성장을 억제할 수 있는 물질이다.

상기 잔기들이 후보물질과 결합(상호작용)하는지 여부를 모니터링 하는 방법은 단백질 결정의 전자밀도를 통해 확인할 수 있다.

【유리한 효과】

본 발명의 카나바닌과 결합하는 변형 RARS 단백질의 아미노산 잔기를 이용하여 카나바닌처럼 아르기닌에 대한 경쟁적 저해제로 작용할 수 있는 물질, 즉 암 치료제를 선별하는데 효과적이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 ArgRS-N73 단백질을 코딩하는 DNA를 PCR로 증폭한 후, 전기영동으로 추출한 결과이다.

도 2는 ArgRS-N73 단백질 코딩 유전자를 포함하는 대장균 발현벡터 pET28a-ArgRSN73로 형질전환 된 대장균을 배양하여 얻은 세포 침전물을 SDS-PAGE 한 결과이다.

도 3은 카나바닌과 ArgRS-N73가 반응하여 생성된 단백질을 니켈-니트릴로트리아세틱 액시드(Ni-NTA)칼럼으로 용출하여 SDS-PAGE 한 결과이다.

도 4는 젤 필터레이션 칼럼(superdex 200, 26/80, 파마시아)으로 용출한 카나바닌과 ArgRS-N73 결합 단백질의 SDS-PAGE 결과이다.

도 5는 카나바닌과 ArgRS-N73 결합 단백질의 단결정 사진이다.

도 6은 카나바닌과 ArgRS-N73 결합 단백질의 X-선 회절 데이터 이미지이다.

도 7은 카나바닌과 ArgRS-N73 결합 단백질의 3차원 구조이다.

도 8은 카나바닌과 ArgRS-N73 결합 단백질의 전자밀도 결과이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

【발명의 실시를 위한 형태】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예에는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

ArgRS-N73(변이 Arginyl tRNA synthetase) 유전자 증폭 및 발현

<1-1> ArgRS-N73 유전자의 증폭

Arginyl tRNA synthetase의 N 말단에서 72개의 아미노산이 제거된 ArgRS-N73(이하 N73) 단백질을(아미노산 서열-서열번호 4)을 생성할 수 있는 유전자(염기서열 - 서열번호 3)를 PCR을 통해 합성하고 증폭하기 위해 각각의 프라이머를 제작하였다. 프라이머 서열은 아래 표 1에 표시하였다.

【표 1】

서열번호 1의 염기서열을 가지는 시발체는 NheI 제한효소 인지부위(밑줄)에

해당하는 염기서열을 포함하고, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 시발체는 종결 코돈(박스), 제한효소 NotI 인지부위(밑줄)에 해당하는 염기서열을 포함한다.

호모사피언스의 RARS DNA(Genbank Accession No.NM 002887.3)를 주형으로 다음의 과정으로 PCR을 수행하였다. 호모사피언 DNA 1 μ l, 2 μ l의 10mM dNTP(최종농도:0.2mM), 각 3 μ l의 5uM 서열번호 1 및 서열번호 2의 시발체(최종농도: 0.3uM), Pyrobest DNA 중합효소 0.5 μ l (5U/ μ l, TaKaRa, Japan), 10 μ l PCR 완충용액(TaKaRa)에 80.5 μ l의 증류수를 넣어 반응액을 제조하였다. 상기 반응액을 95° C에서 15분; 94° C에서 1분 30초; 55° C 에서 1분; 72° C 에서 2분의 반응을 30회 반복하였다. 반응용액을 1% 아가로스 겔에서 전기영동법으로 분리하여 ArgRSF 유전자를 용출하여 얻었다. 이 용출액 16 μ l에 10배의 제한효소 반응 완충용액 2 μ l와 제한효소 NheI과 NotI을 1 μ l씩 첨가하여 37° C 에서 2시간 동안 반응시켰다. 다음 이 반응용액을 1% 아가로스 겔에서 전기영동법으로 분리하여 원하는 DNA 절편을 추출한 후 50ul의 증류수용액에 용존시켰다 (이하 ArgGRSN73-D Nh/N). 전기영동 결과는 도 1에 표시하였다.

<1-2> ArgRS-N73 유전자를 포함하는 발현벡터의 제조

Novagen에서 구입한 플라스미드 pET28a을 제한효소 NheI과 NotI를 이용하여 완전히 절단하고 1% 아가로스 겔 상에서 분리하였다(이하 pET28a Nh/N). ArgGRSN73-D Nh/N 6 μ g을 위의 플라스미드 벡터 pET28a Nh/N 3 μ g과 함께 반응튜브에 넣은 후 2 μ l의 10배 연결반응용액 (500mM 트리스-염산, pH 7.8, 100mM 염화마그네슘, 100mM DTT, 10mM ATP), 10U의 T4 DNA 리가제를 넣고 총 부피가 20 μ l가 되도록 증류수를 가한 다음 16° C에서 12시간 동안 반응시켰다. 이 반응용액을 대장균 DH5 α 컴피턴트 세포에 첨가하여 형질전환 시킨 다음 50 μ g/ml 농도의 LB-카나마이신 배지에 평판하여 대장균 형질전환체를 선별하였다. 이들로부터 플라스미드를 추출하고 제한효소 및 염기서열 분석에 의해 각각 pET28a- ArgRSN73을 얻은 것을 확인하였다. 상기에서 얻은 재조합 플라스미드에 클로닝된 ArgRSF 유전자의 염기서열 확인은 Sanger 등 (Sanger, F., et al. (1977). PNAS U.S.A 74, 5463)의 방법에 따라 Big-Dye Cycle Sequencing System (Applied Biosystems, U.S.A)을 이용하여 수행하였고 ABI 377 DNA 염기서열 분석기에 의해 분석하였다.

<1-3> ArgRS-N73의 대장균 내 발현

상기 단계2에서 얻은 발현 벡터 pET28a-ArgRSN73을 발현 숙주인 대장균

Rosetta(DE3) (Novagen Inc.)에 형질 전환시켰다.

형질전환된 대장균 균주를 100ug/ml의 카나마이신이 함유된 엘비 브로스 배지(1% 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 1% 염화나트륨)에서 12시간 동안 진탕 배양한 후 이중 1ml을 100ml의 엘비 브로스 배지(100ug/ml의 카나마이신 함유)에 옮겨 37° C에서 박테리아의 흡광도가 600nm에서 약 0.6 정도가 될 때 IPTG를 최종농도가 1mM이 되게 첨가한 후 18°C에서 배양하였다. IPTG 첨가전과 첨가한 후 18시간 후에 각각 1ml씩을 취하고 10,000g에서 2분간 원심분리하여 각각 세포 침전물을 수거하였다. 수거한 침전물을 램리등의 방법(Laemmli 등 1970 Nature 227: 680)에 따라 15% SDS-포리아크릴아미드 젤 전기영동시킨 후 쿠마지블루(Coomasie Brilliant Blue)로 단백질을 염색하여 분석하였다(도 2 참조).

<실시예 2>

ArgRS-N73의 정제

<2-1> 대장균 세포의 배양 및 파쇄

실시예 1-3에서 제조된 대장균세포를 실시예 1-3과 같은 방법으로 1리터 배양한 후, 원심 분리기를 이용하여 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 대장균 세포 침전물을 수거하고 50mM Tris pH 8.0, 100mM 염화나트륨, 3mM 마그네슘 글로라이드, 100 μ M ATP 조성의 완충용액에 현탁시킨 다음, 얼음중탕에서 초음파 분쇄기(Sonic Dismembrator, Fisher, 미국)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 이 용액을 원심분리기로 16000rpm에서 30분간 원심 분리한 후, 그 상층액을 다음 과정에 이용하였다.

<2-2> 단백질의 정제

상기에서 얻은 상층액을 완충용액(30mM Tris pH 8.0, 100mM 염화나트륨, 3mM 마그네슘 글로라이드)으로 미리 평형된 니켈-니트릴로트리아세틱 액시드(Ni-NTA)칼럼(파마시아, 미국)에 결합시킨 후 0-0.5M 이미다졸 농도구배를 이용하여 용출한 후 SDS-PAGE하여 ArgRS-N73 단백질 부분만 모았다. SDS-PAGE의 결과는 도 3에 표시하였다.

상기 모은 단백질 부분을 1ml 가량 농축한 후 상기 완충용액으로 평형된 젤 필트레이션 칼럼(superdex 200, 26/80, 파마시아)에 주입시킨 후 단백질의 분자량에 의해 분리하여 전기영동으로 확인하고 단백질 부분만 모았다. 전기영동 결과는

도 4에 표시하였다.

<실시예 3>

카나바닌 및 ArgRS-N73의 혼합 및 결정화

상기 얻은 단백질 부분을 30mg/ml로 농축한 후 수용액 상태의 단백질 농도의 2배에 해당하는 카나바닌(L-canavanine, Sigma-aldrich)과 혼합한 후, 4℃에서 1시간 가량 방치하여 원심 분리 후, 상층액을 취하여 결정화 단계에 이용했다. 행잉드롭 증기 평형법(Hanging-drop vapor diffusion method; Jancarik, J. et al.. J. Appl. Cryst; 24; pp409-411, 1991)을 응용하여 상기 카나바닌과 반응시킨 ArgRS-N73 단백질을 1 μ l을 염(0.17 M Ammonium acetate), 완충액(0.085 M Sodium citrate tribasic dihydrate (pH 5.6-6.3)), 침전제 (13-25% w/v Polyethylene glycol 4,000), 15% glycerol로 구성된 저수조 용액 1 μ l 의 혼합 용액에 접촉 시키고, 이 슬라이드를 저수조 용액 0.5ml가 들어 있는 플레이트 위에 덮어 18-22℃ 항온 상태에서 보관하였다. 2-3일 후에 결정이 생겼으며 획득한 결정은 카메라(SHW-M110S)로 찍어 도 5에 기재하였다.

제조된 결정성 카나바닌 결합 알지닐 티 알엔에이 합성 효소 단백질의 구조를 분석하기 위해 X-선 결정화 방법을 이용하였다. X-선의 높은 에너지로 인한 결정의 데미지를 막기 위해 단백질 결정을 고속으로 질소 냉각하는 고속 질소 냉각법(Garman E.F. et al.. J. appl. Cryst.. 30, pp221-237, 1997)을 수행하였다.

<실시예 4>

카나바닌 결합 ArgRS-N73 단백질 결정 구조 분석

*상기 실시예 3에서 얻어진 카나바닌 결합 알지닐 티 알엔에이 합성 효소 단백질 결정으로 방사광 가속기에서 데이터를 모으는 실험을 수행하였다. 가속기의 검출기는 Q210(Area Detector System Co. USA)으로서 카나바닌 결합 알지닐 티 알엔에이 합성 효소 단백질의 X-선 회절 데이터 이미지는 도 6에 나타내었다. 카나바닌 결합 알지닐 티 알엔에이 합성 효소 단백질 결정의 데이터 한계는 2.8Å 이고, 결정 공간군은 P2₁2₁2₁이며, 격자 단위는 a=77.622Å, b=105.233Å, c=172.259Å 및 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ 이다.

단백질 결정 구조는 분자치환방법 (Molecular replacement)를 이용하여 규명하였다. X-선 회절 데이터를 구조 프로그램 Phenix를 이용하여 3차원적 구조를 규명하였다. 단백질 구조 분석 결과, 2개의 단량체를 포함하는 다이머 (dimer) 구조인 것으로 확인되었다(도 7 참조). 또한, 알지닐 티 알엔에이 합성 효소 단백질에 결합한 카나바닌의 전자밀도 결과는 도 8에 표기하였다. 도 8에서 카나바닌과 알지닐 티 알엔에이 합성 효소 단백질이 상호 작용하는 잔기를 확인 할 수 있다. 아스파라진130, 히스티딘139, 글루타민340, 아스파테이트125, 타이로신312, 아스파테이트316이 카나바닌의 결합에 관여하고 있으며 특히, 아스파테이트125, 타이로신312, 아스파테이트 316의 경우 옥시구아니디노기 (oxyguanidine)과 상호 작용한다.

【산업상 이용가능성】

본 발명의 카나바닌과 결합하는 변형 RARS 단백질의 아미노산 잔기를 이용하여 카나바닌처럼 아르기닌과 경쟁적 저해제로 작용할 수 있는 물질, 즉 암 치료제를 선별할 수 있어 산업상 이용가능성이 높다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

인간 유래 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질의 N 말단에서 72개의 아미노산이 제거된 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS 단백질.

【청구항 2】

제1항의 단백질을 암호화하는 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 염기서열은 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드.

【청구항 4】

제2항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

【청구항 5】

제4항의 벡터로 형질전환된 형질전환체.

【청구항 6】

제1항의 변형 RARS 단백질에 특이적인 항체.

【청구항 7】

제1항의 변형 RARS 단백질에 특이적인 siRNA 핵산 분자.

【청구항 8】

제1항의 변형 RARS 단백질에 상보적인 서열을 갖는 안티센스 핵산 분자.

【청구항 9】

(a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 변형 RARS(Arginyl tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계;

(b) 후보물질을 상기 (a) 단계에서 정제된 변형 RARS 단백질에 혼합하여 결

합 시키는 단계;

(c) 상기 (b) 단계에서 결합된 단백질을 결정화하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계에서 결정화된 단백질에서 후보물질이 변형 RARS 단백질과 결합하는지 여부를 모니터링하는 단계를 포함하며, 후보물질이 변형 RARS 단백질과 결합했을 경우 암 치료제로 판별하는 것을 특징으로 하는 암 치료제 스크리닝 방법.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 (d)단계는 후보물질이 변형 RARS 단백질의 D125, 130, H139, Y312, D316 및 Q340으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기와 결합하는지 여부를 모니터링하는 것을 특징으로 하는 암 치료제 스크리닝 방법.

【청구항 11】

제9항에 있어서, 상기 (b) 단계의 후보물질은 변형 RARS 단백질의 1 내지 5 배 중량으로 혼합되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 12】

제9항에 있어서, 상기 (c) 단계의 결정화는 침전제인 폴리에틸렌글리콜 4000 을 전체 보존용액에 대하여 10 내지 30%(w/v) 비율로 포함하는 보존용액에서 수행되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 13】

제9항에 있어서, 상기 (c) 단계의 결정화는 행잉드롭 증기 평형법(Hanging-drop vapor diffusion method)을 수행되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 14】

제9항에 있어서, 상기 (c) 단계의 결정화는 pH 5.0 내지 7.0에서 수행되는 것을 특징으로 하는 단백질 결정화 방법.

【청구항 15】

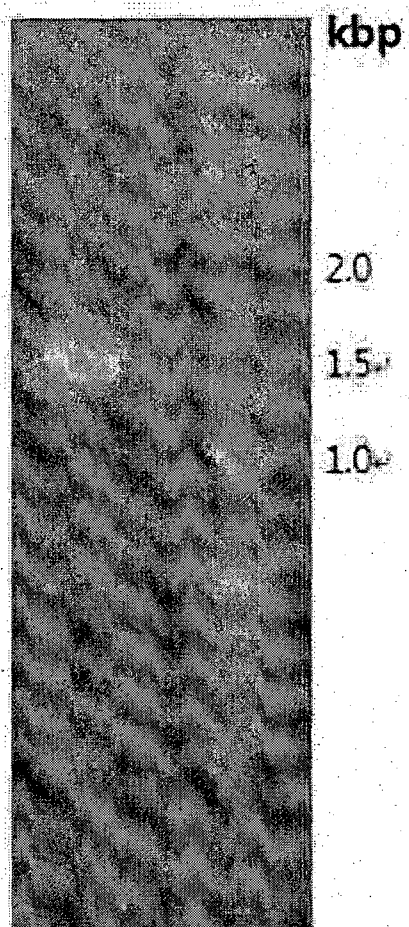
9항에 있어서, 상기 (c) 단계의 결정화는 15 내지 25℃의 온도에서 수행되는

것을 특징으로 하는 단백질 결정화 방법.

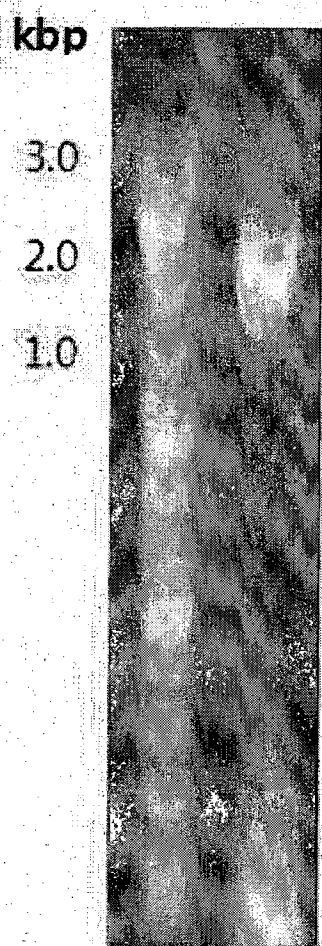
1/8

【도면】

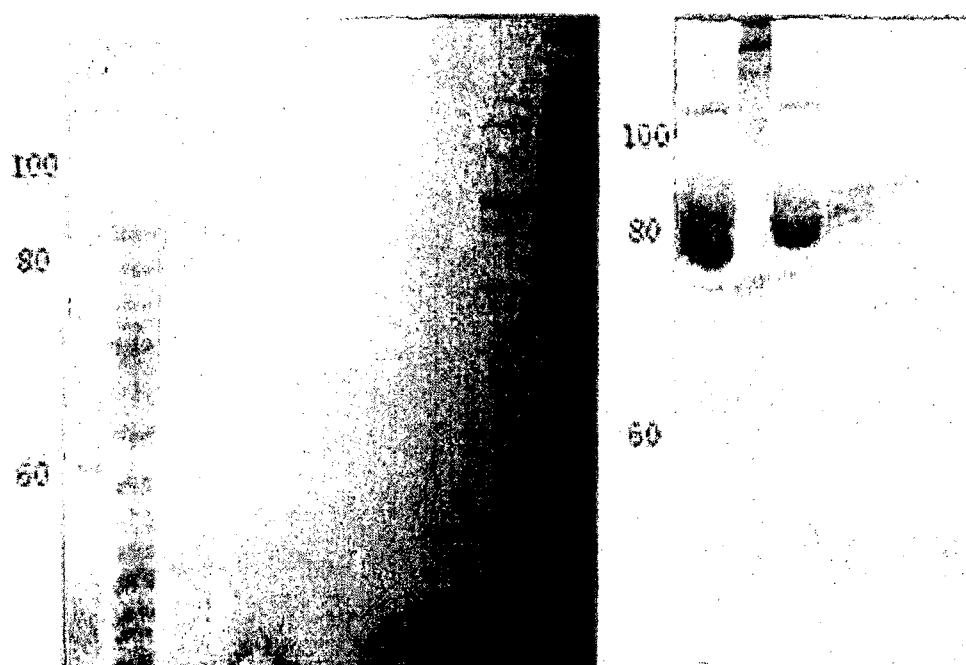
【도 1】



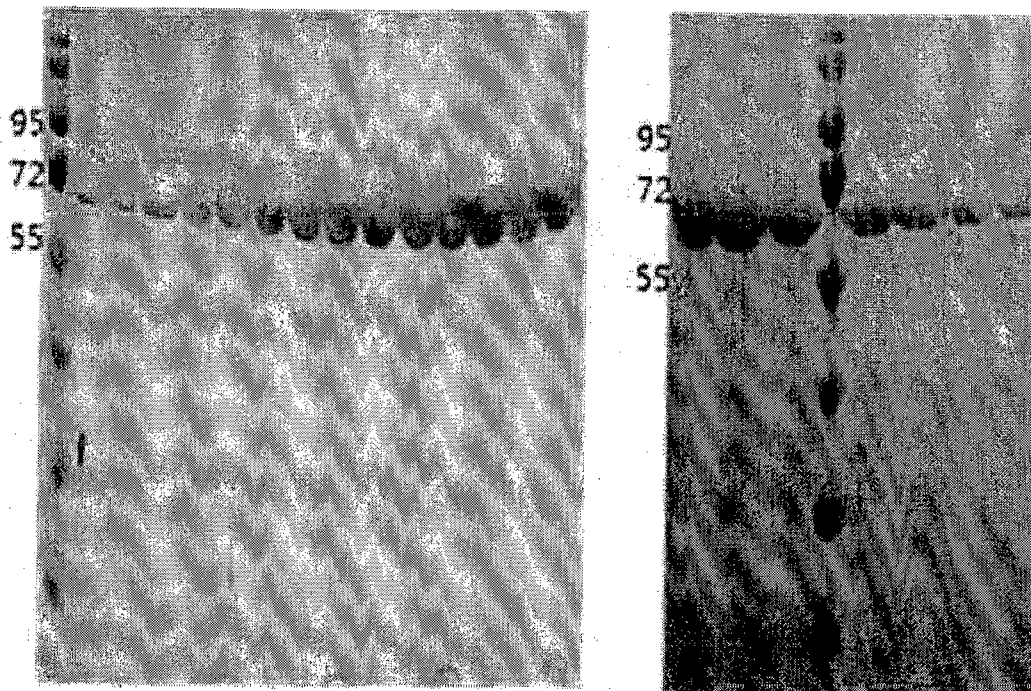
【도 2】



【도 3】



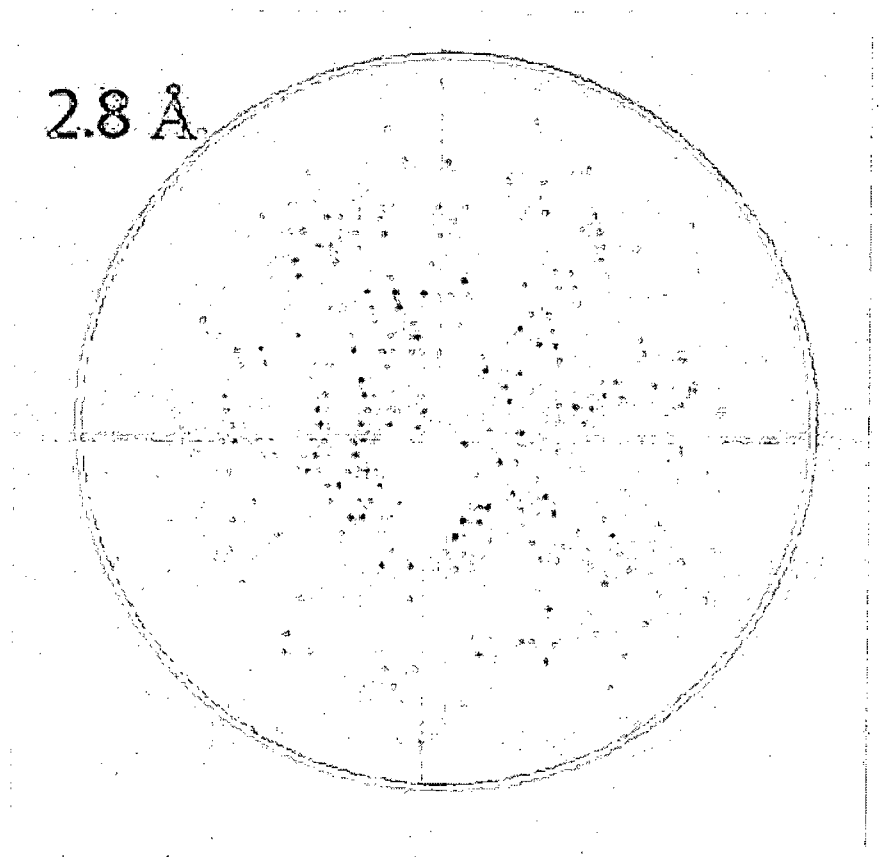
【도 4】



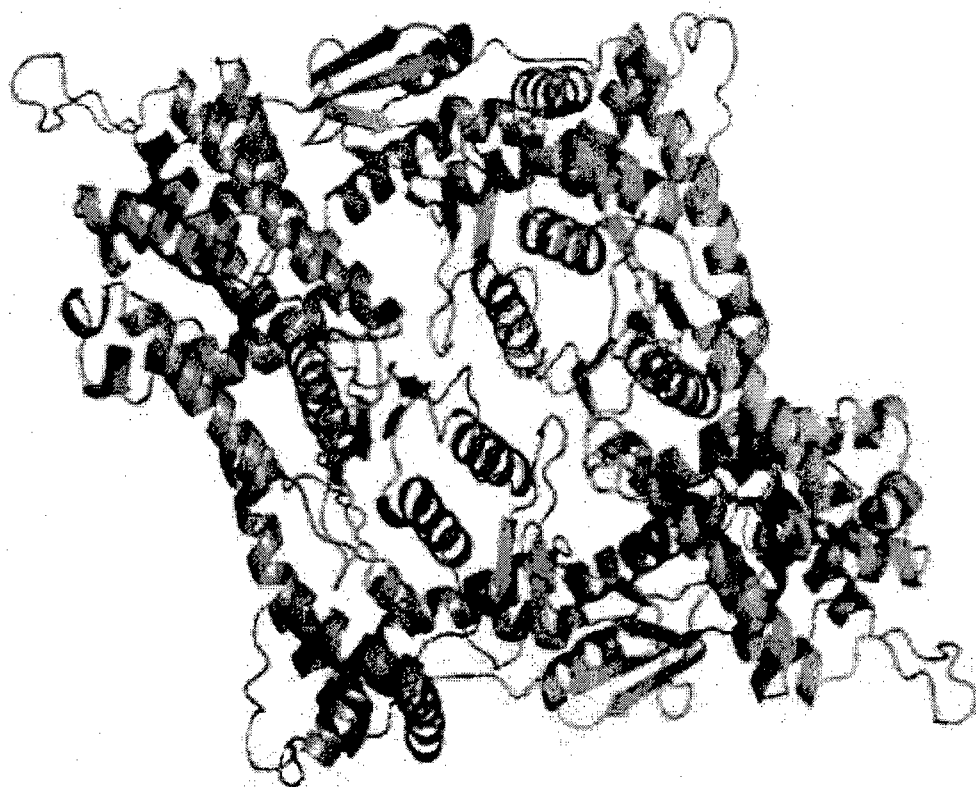
【도 5】



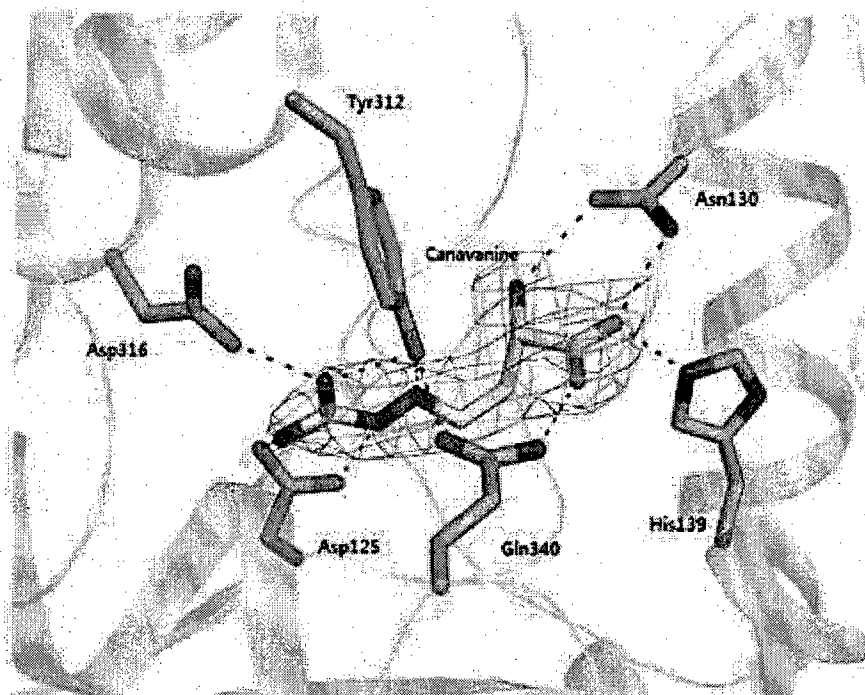
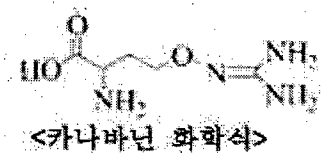
【도 6】



【도 7】



【도 8】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/006627**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 9/00(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C07K 16/40(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/00; C12N 15/52; C07K 16/40; G01N 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), google scholar & Keywords: Arginyl tRNA synthetase, RARS, 72 amino acid, deletion, truncation, X-ray crystallography, L-canavanine, Cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANG, F. et al. Hemin Binds to Human Cytoplasmic Arginyl-tRNA Synthetase and Inhibits its Catalytic Activity. Journal of Biological Chemistry, 10 December 2010, vol. 285, no. 50, Pages 39437-39446.	1-8
Y	- See abstract	
Y	- See abstract	9-15
Y	BENCE, A. K. et al. The Mechanism of L-Canavanine Cytotoxicity: Arginyl tRNA Synthetase as a Novel Target for Anticancer Drug Discovery. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, October 2003, vol. 18, no. 5, Pages 383-394.	9-15
	- See abstract	
X	ZHENG, Y. G. et al. Two Forms of Human Cytoplasmic Arginyl-tRNA Synthetase Produced from Two Translation Initiations by a Single mRNA. Biochemistry, 31 January 2006, vol. 45, no. 4, Pages 1338-1344.	1-8
	- See abstract	
Y	- See abstract	9-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 OCTOBER 2014 (30.10.2014)

Date of mailing of the international search report

30 OCTOBER 2014 (30.10.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/006627

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAZARD, M. et al. The tRNA-dependent Activation of Arginine by Arginyl-tRNA Synthetase Requires Inter-domain Communication. <i>Journal of Molecular Biology</i> , 29 September 2000, vol. 302, no. 4, Pages 991-1004. - See abstract	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006627

**Patent document
cited in search report**

**Publication
date**

**Patent family
member**

**Publication
date**

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/00(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C07K 16/40(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/00; C12N 15/52; C07K 16/40; G01N 33/15 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), google scholar & 키워드: Arginyl tRNA synthetase, RARS, 72 amino acid, deletion, truncation, X-ray crystallography, L-canavanine, Cancer		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	YANG, F. et al. Hemin Binds to Human Cytoplasmic Arginyl-tRNA Synthetase and Inhibits its Catalytic Activity. Journal of Biological Chemistry, 10 December 2010, Vol. 285, No. 50, Pages 39437-39446.	1-8
Y	- 요약 참고	9-15
Y	BENCE, A. K. et al. The Mechanism of L-Canavanine Cytotoxicity: Arginyl tRNA Synthetase as a Novel Target for Anticancer Drug Discovery. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, October 2003, Vol. 18, No. 5, Pages 383-394.	9-15
X	ZHENG, Y. G. et al. Two Forms of Human Cytoplasmic Arginyl-tRNA Synthetase Produced from Two Translation Initiations by a Single mRNA. Biochemistry, 31 January 2006, Vol. 45, No. 4, Pages 1338-1344.	1-8
Y	- 요약 참고	9-15
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 10월 30일 (30.10.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 10월 30일 (30.10.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김남경 전화번호 +481-5591 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LAZARD, M. et al. The tRNA-dependent Activation of Arginine by Arginyl-tRNA Synthetase Requires Inter-domain Communication. Journal of Molecular Biology, 29 September 2000, Vol. 302, No. 4, Pages 991-1004. - 요약 참고	1-15

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면

☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☒ 출원시 국제출원에 포함

☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음