



등록특허 10-2297505



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월01일
(11) 등록번호 10-2297505
(24) 등록일자 2021년08월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/5011 (2013.01)
A61K 31/404 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0027077
- (22) 출원일자 2016년03월07일
심사청구일자 2019년09월26일
- (65) 공개번호 10-2017-0104263
- (43) 공개일자 2017년09월15일
- (56) 선행기술조사문현
KR101577315 B1
US20110117572 A1
KR1020090048382 A
KR1020140145895 A

- (73) 특허권자
재단법인 의약바이오컨버전스연구단
인천광역시 연수구 송도과학로 85, 4층(송도동, 연세대학교 국제캠퍼스 포스코그린빌딩)
- (72) 발명자
김성훈
서울특별시 강남구 남부순환로365길 42, 역삼한신아파트 4-1005 (도곡동)
김대규
서울특별시 강남구 삼성로57길 45, 108동 2406호 (대치동, 삼성아파트)
임세미
서울특별시 양천구 목동동로 100, 1313동 101호(신정동, 목동신시가지아파트13단지)
- (74) 대리인
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이민영

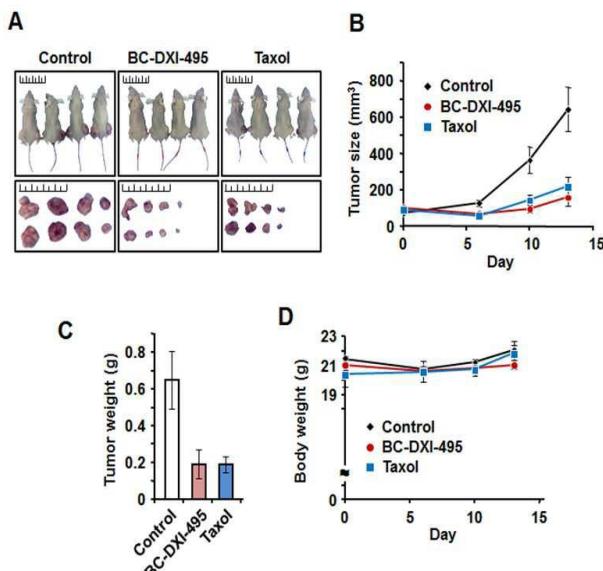
(54) 발명의 명칭 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 저해하는 항암제 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 저해하는 항암제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 시험 물질의 존재 또는 부존재 하에서 AIMP2-DX2 또는 이의 단편과 HSP70 또는 이의 단편을 접촉시키는 단계; AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 측정하는 단계; 시험 물질에 의한 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준의 변화를 판단하는

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도10



단계; AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계; 및 선별된 시험 물질의 항암 활성을 세포나 동물에서 확인하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법과 상기 방법으로 선별된 항암제를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 대한 것이다.

본 발명은 HSP70이 암 발생과 진행에 중요한 AIMP2-DX2와 직접 결합하여 안정화시키는 조절자라는 발견을 바탕으로 전혀 새로운 작용 기작의 항암제를 개발하는 데 유용하게 이용될 수 있다. 또한 본 발명의 방법에 따라 선별된 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 HSP70의 발현을 억제하거나 HSP70과 AIMP2-DX2의 결합을 억제하여 AIMP2-DX2 단백질의 수준을 낮추고, 암의 진행을 효과적으로 막을 수 있어, 암 치료제를 개발하는 데 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/5377 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

G01N 33/502 (2013.01)

G01N 33/574 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서 AIMP2-DX2 또는 이의 단편과 HSP70 또는 이의 단편을 접촉시키는 단계;
- (b) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 측정하는 단계;
- (c) 시험 물질 존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합과 시험 물질 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 비교하여 시험 물질에 의한 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준의 변화를 판단하는 단계;
- (d) AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계; 및
- (e) 선별된 시험 물질의 항암 활성을 세포 또는 인간을 제외한 동물에서 확인하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항암제 스크리닝 방법은 상기 (d)와 (e) 사이에

- (1) 시험 물질을 AIMP2-DX2를 발현하는 세포에 접촉시키는 단계;
- (2) 상기 세포와 시험 물질을 접촉하지 않은 대조군 세포에서 AIMP2-DX2 단백질 수준을 측정하는 단계; 및
- (3) 대조군 세포와 비교하여 AIMP2-DX2 단백질 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 AIMP2-DX2는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 AIMP2-DX2의 단편은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 HSP70은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 HSP70의 단편은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 단계 (b)의 결합을 측정하는 방법은 투-하이브리드 방법, 공동면역침강 방법(co-

immunoprecipitation assay), 공동-국소화 분석(co-localization assay), 섬광 근접 측정법(scintillation proximity assay: SPA), UV 또는 화학적 가교 결합 방법, 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis: BIA), 질량 분석법(massspectrometry: MS), NMR(nuclear magnetic resonance), 형광 편광 분석법(fluorescence polarization assays,FPA) 및 시험관내 풀-다운 에세이(in vitro pull-down assay)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 결장암, 항문암, 성상세포종, 백혈병, 림프종, 두경부암, 간암, 고환암, 자궁경부암, 육종, 혈관종, 식도암, 안암, 후두암, 경구암, 중피종, 골수종, 구강암, 직장암, 인후암, 방광암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 대장암, 췌장암, 신장암, 위암, 피부암, 기저세포암, 흑색종, 편평세포암종, 구강편평세포암종, 대장직장암, 교모세포종, 자궁내막암 및 악성뇌교종으로 이루어진 군에서 선택된 암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항암제는 siRNA, shRNA, miRNA, ribozyme, DNAzyme, PNA(peptide nucleic acid), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 항체, 앱타머, 웨티드, 천연추출물 및 화학물질로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 저해하는 항암제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (a) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서 AIMP2-DX2 또는 이의 단편과 HSP70 또는 이의 단편을 접촉시키는 단계;(b) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 측정하는 단계;(c) 시험 물질 존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합과 시험 물질 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 비교하여 시험 물질에 의한 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준의 변화를 판단하는 단계; (d) AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계; 및 (e) 선별된 시험 물질의 항암 활성을 세포 또는 동물에서 확인하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법과 상기 방법으로 선별된 항암제를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002]

암 특이적 마커의 개발은 암의 진단뿐만 아니라 암 특이적인 치료를 위해서도 요구되고 있다. 사이토톡신 치료(cytotoxic therapies)는 첫 항암 치료제로 사용된 이래 50여년 동안 암 치료에 광범위하게 쓰여 왔으나 암세포 외에 분열 속도가 비교적 빠른 다른 장기의 세포에 비특이적으로 작용하여 강한 독성을 나타내고, 심각한 부작용을 초래하는 문제가 있다. 이러한 기존 항암제의 부작용 및 내성을 극복하기 위하여 정상세포의 암화 과정에 나타나는 암 특이적 마커(cancer specific marker)를 이용하여 종양 세포 특이적으로 작용하는 치료제를 개발하고자 하는 연구가 진행되었다. 항암제에 의한 독성을 최소화하기 위한 방안으로 떠오르는 암 타겟팅 치료(cancertargeted therapy)의 핵심은 암세포 특이적인 유전자를 찾아내는 것이다.

[0003]

한편, 열 충격 단백질(Heat Shock Protein, HSP)이란 단백질의 항상성을 유지하는데 핵심적인 역할을 하는 분자

적 샤페론이다. HSP는 저산소증과 같은 스트레스 상황에서 세포의 생존에 있어 중요하다. HSP, 특히 HSP90과 HSP70는 광범위의 종양[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]에서 많이 발현된다. 몇몇 HSP의 발현은 몇몇 암에서 종양 세포의 증식, 분화, 아폽토시스(apoptosis)와 상관관계가 있음이 밝혀져 있고, 이는 HSP가 그 자신이 가지는 세포 보호 역할 때문에 암세포 생존에 중요한 역할을 할 수 있음을 보여준다. HSP70의 과다발현은 쥐 섬유육종 세포의 종양형성을 유발하고, 유전자 도입된 쥐의 T-세포내 HSP70이 과다 발현되면, 그 쥐의 T세포 림프종의 증가를 유발한다고 보고되고 있다[Jaattela M, International journal of cancer Journal international du cancer, 60:689-93, 1995 ; Seo JS et al, Biochemical and biophysical research communications, 218:582-7, 1996 ; Volloch VZ et al, Oncogene, 18:3648-51, 1999 ; Murphy ME, Carcinogenesis, 34:1181-8, 2013]. 특히, HSP70는 아폽토시스로부터 세포를 보호하는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[Calderwood SK et al, Trends in biochemical sciences, 31:164-72, 2006 ; Zhou J et al, The Journal of biological chemistry, 279: 13506-13, 2004 ; Bruns AF et al, PLoS one, 7:e48539, 2012 ; Sun J et al, Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology, 24:2238-44, 2004 ; Gong W, et al, Oncology reports, 2013 ; Eustace BK et al, Cell cycle, 3:1098-100, 2004 ; Eustace BK et al, Nature cell biology, 6:507-14, 2004].

[0004] AIMP2(ARS-interacting multi-functional protein 2)는 아미노아실-tRNA 합성효소 복합체(Aminoacyl-tRNAsynthetase: ARSs)의 형성에 관련된 단백질 중의 하나로, p38/JTV-1 또는 p38로 불려지기도 한다. AIMP2가 신규한 암 억제자(tumor suppressor)로 Smad2/3과 직접적 상호작용을 통하여 TGF- β 의 신호전달을 강화시키는 기능을 함이 보고된 바 있고, 암 세포주 및 조직에서 AIMP2의 엑손 2가 결손된 형태의 변이체인 AIMP2-DX2가 특이적으로 발현되는 것이 알려져 있다(한국 등록특허 10-0762995).

[0005] 이상과 같이, AIMP2-DX2 및 HSP70 각각이 종양세포의 분화 또는 생존과 관련이 되어 있다는 것은 알려져 있지만, 이들의 상호관계가 암에 어떠한 연관성이 있는지에 대해서는 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 AIMP2-DX2 및 HSP70의 상호작용을 연구하던 중 HSP70이 AIMP2-DX2에 직접 결합하여 AIMP2-DX2단백질을 안정화시키고, 결과적으로 암 세포의 생존과 분화에 결정적인 역할을 한다는 것을 확인하였다. 따라서, HSP70과 AIMP2-DX2의 결합을 억제하면 세포의 분열과 증식을 억제할 수 있음에 착안하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은

[0008] (a) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서 AIMP2-DX2 또는 이의 단편과 HSP70 또는 이의 단편을 접촉시키는 단계;

[0009] (b) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 측정하는 단계;

[0010] (c) 시험 물질 존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합과 시험 물질 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 비교하여 시험 물질에 의한 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준의 변화를 판단하는 단계;

[0011] (d) AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계; 및

[0012] (e) 선별된 시험 물질의 항암 활성을 세포 또는 동물에서 확인하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은

[0014] 상기 항암제 스크리닝의 방법으로 선별된 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

- [0016] (a) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서 AIMP2-DX2 또는 이의 단편과 HSP70 또는 이의 단편을 접촉시키는 단계;
- [0017] (b) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 측정하는 단계;
- [0018] (c) 시험 물질 존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합과 시험 물질 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 비교하여 시험 물질에 의한 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준의 변화를 판단하는 단계;
- [0019] (d) AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계; 및
- [0020] (e) 선별된 시험 물질의 항암 활성을 세포 또는 동물에서 확인하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0022] 상기 항암제 스크리닝의 방법으로 선별된 항암제를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.
- [0023] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명은,
- [0025] (a) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서 AIMP2-DX2 또는 이의 단편과 HSP70 또는 이의 단편을 접촉시키는 단계;
- [0026] (b) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 측정하는 단계;
- [0027] (c) 시험 물질 존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합과 시험 물질 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 비교하여 시험 물질에 의한 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준의 변화를 판단하는 단계;
- [0028] (d) AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계; 및
- [0029] (e) 선별된 시험 물질의 항암 활성을 세포 또는 동물에서 확인하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0030]
- [0031] 본 발명자들은 HSP70이 원래의 기능 외에, AIMP2-DX2에 결합하여 AIMP2-DX2 단백질을 분해되지 않도록 안정화시키고, AIMP2-DX2로 인한 종양세포의 분화와 성장을 촉진시키는 작용을 나타냄을 발견하였다. HSP70의 발현을 억제하여 AIMP2-DX2 와 반응할 수 있는 HSP70의 수준을 감소시키거나, HSP70과 AIMP2-DX2의 반응을 직접 저해할 수 있는 인자들은 AIMP2-DX2 단백질 수준을 감소시키며, 결과적으로 종양세포의 성장과 분화가 저해되도록 한다. 본 발명자들은 이 같은 HSP70과 AIMP2-DX2의 기능적인 관계에 대한 발견을 바탕으로 HSP70과 AIMP2-DX2의 결합을 저해할 수 있는 제제를 스크리닝하여 항암제로 선별할 수 있는 항암제 스크리닝 방법을 본 명세서에서 처음으로 공개한다.
- [0032]
- [0033] 상기 (a) 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서 AIMP2-DX2 또는 이의 단편과 HSP70 또는 이의 단편을 접촉시키는 단계이다.
- [0034] 본 발명에서 ‘단백질’은 ‘폴리펩타이드(polypeptide)’ 또는 ‘펩타이드(peptide)’ 와 호환성있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. 상기 ‘단편’은 단백질의 일부분을 의미한다. 또한 본 발명에서 ‘폴리뉴클레오티드(polynucleotide)’ 또는 ‘핵산’은 단일- 또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. ‘mRNA’는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자의 염기서열의 유전 정보를 폴리펩티드를 형성하는 리보솜으로 전달하는 RNA이다.
- [0035] 본 발명에서 상기 “AIMP2-DX2”는 AIMP2 단백질 서열(312aa version: AAC50391.1 또는 GI:1215669; 320aa version: AAH13630.1, GI:15489023, BC013630.1) 중 엑손 2의 영역이 결실된 변이체로서, AIMP2 등가물(아미노산 서열의 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의한 변형체로 AIMP2와 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 등가물, 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지나 AIMP2와 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 유도체)에서 엑손 2의 영역이 결실된 단백질을 포함한다. 본 발명에서 AIMP2 단백질 서열 중 “

엑손 2의 영역이 결실” 되었다는 것은 AIMP2 단백질에서 엑손 2 영역의 아미노산 서열이 부분적으로나 전체적으로 상실되어 생긴 변이체가 AIMP2 단백질과 헤테로다이머를 형성하여 AIMP2의 정상적인 기능을 방해하는 것을 의미한다. 따라서 AIMP2-DX2 단백질은 AIMP2 단백질의 엑손 2의 아미노산 서열이 모두 결실되거나 이 영역의 아미노산 서열을 포함하여 엑손 1, 엑손 3, 엑손 4 또는 이들 영역 모두에서 이들 영역의 일부도 결실되거나, 엑손 2의 아미노산 서열의 일부만이 결실된 단백질을 포함한다.

[0036] 본 발명의 방법을 실시하기 위한 AIMP2-DX2 단백질은 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 인간의 AIMP2-DX2 단백질 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0037] 또한 상기 AIMP2-DX2의 단편은 AIMP2-DX2에서 HSP70과의 결합에 필요한 부분을 포함하는 단편을 의미한다. 본 발명자들은 AIMP2-DX2의 단백질에서 AIMP2 부분이 아닌 DX2 부분이 HSP70과 결합하는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명을 실시하기 위한 AIMP2-DX2의 단편은 서열번호 1로 표시되는 인간의 AIMP2-DX2 아미노산 서열에서 1 내지 87번째 아미노산을 포함하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에서 ‘HSP70’은 열 충격 단백질 70(Heat Shock Protein, HSP)으로, 단백질의 항상성을 유지하는데 핵심적인 역할을 하는 분자적 샤페론이다. HSP70은 저산소증과 같은 스트레스 상황에서 세포의 생존에 있어 중요하다. 한편, HSP70은 광범위의 종양[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]에서 많이 발현된다. HSP70의 발현은 몇몇 암에서 종양 세포의 증식, 분화, 아폽토시스(apoptosis)와 상관관계가 있음이 밝혀져 있고, 이는 HSP70이 그 자신이 가지는 세포 보호 역할 때문에 암세포 생존에 중요한 역할을 함을 보여준다. HSP70의 과다발현은 쥐 섬유육종 세포의 종양형성을 유발하고, 유전자 도입된 쥐의 T-세포내 HSP70이 과다 발현되면, 그 쥐의 T세포 림프종의 증가를 유발한다고 보고되고 있다[Jaattela M, International journal of cancer Journal international du cancer, 60:689-93, 1995 ; Seo JS et al, Biochemical and biophysical research communications, 218:582-7, 1996 ; Volloch VZ et al, Oncogene, 18:3648-51, 1999 ; Murphy ME, Carcinogenesis, 34:1181-8, 2013].

[0039] 본 발명의 방법을 실시하기 위한 HSP70 단백질은 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에서 유래한 것일 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0040] 또한 상기 HSP70의 단편은 AIMP2-DX2와의 결합에서 필요한 부분을 포함하는 단편을 의미한다. 본 발명자들은 AIMP2-DX2의 HSP70의 기질결합도메인(Substring binding domain)부위에 결합하는 것을 확인하였다. 구체적으로는 인간 HSP70의 아미노산 서열(서열번호 3)에서 385내지 536번째 아미노산(서열번호 4)을 포함하는 단편이 AIMP2-DX2와 결합할 수 있음을 밝혔다. 따라서 본 발명을 실시하기 위한 HSP70의 단편은 서열번호 3에서 385내지 536번째 아미노산 서열(서열번호 4)을 포함하는 단편일 수 있다.

[0041] 또한 본 발명에 따른 AIMP2-DX2 또는 이의 단편, 그리고 HSP70 또는 이의 단편은 이들의 기능적 동등물을 포함한다. 상기 ‘기능적 동등물’이란 상기 AIMP2-DX2와 이의 단편, 그리고 HSP70 또는 이들의 단편의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 폴리펩티드를 말하는 것으로, 서열번호 1로 표시되는 AIMP2-DX2와, 서열번호 3으로 표시되는 HSP70의 폴리펩티드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서 ‘실질적으로 동질의 생리활성’이란 야생형 AIMP2-DX2와 야생형 HSP70 사이의 직접적이고 특이한 결합을 재현할 수 있는 것을 의미한다. 즉, AIMP2-DX2의 단편의 기능적 동등물은 전체 길이의 HSP70 또는 그 단편에 결합할 수 있는 활성을 갖는 것이며, HSP70의 단편의 기능적 동등물이란 전체 길이의 AIMP2-DX2 또는 AIMP2-DX2에서 HSP70에 결합하는 부위에 결합할 수 있는 활성을 의미한다. 상기 기능적 동등물은 아미노산 서열 중 일부가 부가, 치환 또는 결실된 결과 생성된 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 또한 상기 기능적 동등물에는 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 본 발명의 폴리펩티드의 생리활성에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해 있다. 또한 아미노산의 결실은 바람직하게는 AIMP2-DX2 또는 HSP70 폴리펩티드의 생리활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 아울러 상기 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다. 또한 본 발명의 기능적 동등물의 범위에는 본 발명에 따른 폴리펩티드의 기본 골격

및 이의 생리활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조 변경이 이에 포함된다.

[0042] 본 발명의 방법에서 ‘접촉(contacting)’은 일반적인 의미이며, 2개 이상의 제제(예를 들어, 2개의 폴리펩티드)를 결합시키거나, 제제와 세포(예를 들어, 단백질과 세포)를 결합시키는 것을 말한다. 접촉은 시험관 내(*in vitro*)에서 일어날 수 있다. 예컨대, 시험관(test tube) 또는 다른 컨테이너(container)에서 2개 이상의 제제를 결합시키거나 시험 제제와 세포 또는 세포 용해물과 시험 제제를 결합시키는 것이다. 또한 접촉은 세포 또는 인 시투(*in situ*)에서 일어날 수도 있다. 예컨대, 2개의 폴리펩티드를 암호화하는 제조합 폴리뉴클레오티드를 세포 내에서 공동발현(coexpression)시킴으로써 세포 또는 세포 용해물에서 2개의 폴리펩티드를 접촉시키는 것이다. 또한 테스트하고자 하는 단백질이 고정상의 표면에 배열된 단백질 칩(protein chip)이나 단백질 어레이(protein array)를 이용할 수도 있다.

[0043] 본 발명의 방법을 세포 안에서 실시할 때에는 AIMP2-DX2와 HSP70은 세포 내재적으로 발현되는 것을 이용하거나, AIMP2-DX2나 이의 단편, HSP70 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산을 세포 내에 도입하여 형질전환시킴으로써 과발현 되도록 하여 실시할 수 있다. 또한 본 발명의 방법을 시험관 내 또는 단백질 어레이와 같은 *in situ*로 실시할 때에는 AIMP2-DX2 또는 이의 단편, 그리고 HSP70 또는 이의 단편은 천연에서 추출하거나 유전공학적 방법에 의하여 제작하여 준비할 수 있다. 예를 들어 통상적인 방법에 따라 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 동등물을 암호화하는 핵산과 제조합 발현 벡터를 제작하고 적절한 숙주세포에서 발현시켜 수득할 수 있다. 또한 본 발명의 방법을 실시하는데 필요한 상기 폴리펩티드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법으로도 제작될 수 있다.

[0044] 또한 본 발명의 방법에서 ‘시험 물질’은 시험 제제(test agent) 또는 제제(agent)와 호환가능하게 사용할 수 있는 것으로, 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실재물(entity) 또는 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어 단백질, 폴리펩티드, 저분자 유기화합물(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함한다. 또한 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다.

[0045]

[0046] 구체적으로 본 발명의 방법을 통해 선별되는 항암제는 AIMP2-DX2와 HSP70의 단백질 결합을 저해하거나, HSP70과 결합할 수 있는 AIMP2-DX2 단백질 발현 수준을 낮출 수 있는 것이라면 물질의 특성에 제한 받지 않으며, 예를 들어 siRNA, shRNA, miRNA, ribozyme, DNAzyme, PNA(peptide nucleic acid), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 항체, 앱타마, 웨프티드, 천연추출물 및 화학물질 등일 수 있다. 바람직하게는 AIMP2-DX2의 발현을 낮출 수 있는 shRNA, siRNA 또는 화학물질일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 상기 (b) 단계는 (a) 단계에서 시험 물질의 존재 또는 부존재하에서 접촉시킨 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 측정하는 단계이다.

[0048]

[0049] 상기 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 측정하는 단계는 두 단백질의 결합 정도를 측정하기 위하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 것이라면 제한 없이 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 투 하이브리드(two hybrid) 방법, 공동면역침강 방법(co-immunoprecipitation assay, co-IP), 조직면역염색과 공동국소화 분석(co-localization assay), 섬광 근접 측정법(scintillation proximity assay, SPA), UV 또는 화학적 가교 결합 방법, 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis, BIA), 질량 분석법(mass spectrometry, MS), NMR(nuclear magnetic resonance), 형광 편광 분석법(fluorescence polarization assays, FPA) 및 시험관 내 풀-다운 에세이(*in vitro* pull-down assay), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 단백질 칩(protein chip) 또는 어레이(array), Venus BiFC(biomolecular fluorescence complementation, BiFC) 등에서 적절히 선택하여 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 측정할 수 있다.

[0050] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 세포 내에 HA, Strep, 방사성 동위원소 등으로 적절하게 표지된 DX2와 HSP70을 과발현시켜 co-IP 실험을 실시하거나, GST pull-down 실험을 이용하여 DX2에 결합하고 있는 HSP70 단백질의 수준을 측정하거나, 반대로 HSP70에 결합하고 있는 DX2의 단백질의 수준을 측정하였다.

[0051] 상기 (c) 단계는 (b)에서 측정한 시험 물질 존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합과 시험 물질 부존재하에서의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 비교하여 시험 물질에 의한 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준의 변화를 판단하는

단계이다.

[0052] 즉, (b) 단계에서 도출된 시험 물질 존재 또는 부존재하에서 접촉시킨 AIMP2-DX2와 HSP70의 단백질의 결합 수준의 차이를 파악하여 시험 물질이 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합에 미치는 영향을 판단하는 단계이다.

[0053] 상기 (d) 단계는 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계이다.

[0054] 본 발명자들은 구체적인 실시예에서 AIMP2-DX2와 HSP70는 세포 안에서 특이적으로 직접 결합하며, HSP70과의 결합을 통하여 AIMP2-DX2는 분해되지 않도록 안정화되고, 결과적으로 AIMP2-DX2에 의한 세포의 증식과 분화가 유지되는 것을 확인하였다. AIMP2-DX2 단백질의 안정화는 HSP70 단백질과의 직접적인 결합을 통하여 이루어지는 것으로, AIMP2-DX2 단백질이 HSP70 단백질에서 해리되면 AIMP2-DX2 단백질이 불안정해지고 분해되어 그 수준이 감소하게 되고, 결과적으로 AIMP2-DX2에 의한 세포의 증식과 분화가 저해된다. 이 같은 효과는 HSP70의 발현을 억제하는 siRNA 또는 HSP70 저해제를 이용하여 확인할 수 있었다. AIMP2-DX2와 HSP70 사이의 결합을 억제함으로써 비정상적으로 세포 분열하는 암세포의 발생과 증식을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0055] 또한 다른 실시예에서는 종양 발생 관련 세포 실험과 이종이식(xenograft)의 동물 실험을 통하여 AIMP2-DX2와 HSP70 사이의 결합을 억제하면, 암 세포의 증식, 종양의 형성과 성장이 억제되는 것을 확인하였다.

[0056]

[0057] 이상의 본 발명자들의 발견을 통하여 당업자는 AIMP2-DX2와 HSP70 사이의 결합을 억제 또는 결합 수준을 감소시키는 물질이 AIMP2-DX2를 불안정하게 암 세포의 증식과 분화를 억제할 수 있음을 알 수 있다. 상기 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 물질은 대표적으로 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 자체를 저해하는 물질 또는 AIMP2-DX2와 결합 가능한 HSP70 단백질의 양을 감소시키는 물질일 수 있다. 본 발명의 항암제 스크리닝 방법에 따라 선별된 항암제에 대한 구체적인 예는 본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 설명에서술되어 있다.

[0058] 상기 (e) 단계는 (d) 단계에서 선별된 물질의 항암 활성을 세포 또는 동물에서 확인하는 단계이다.

[0059] (e) 단계는 (d) 단계에서 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 것으로 선별된 시험 물질이 구체적으로 암 또는 종양 모델의 세포 또는 동물에서 AIMP2-DX2 단백질의 불안정화로 예측되는 항암 활성을 갖는지 확인하는 단계이다. 상기 항암 활성을 비정상적인 세포 분열의 증가, 정상 세포에서 암 세포로의 전환, 암 세포의 세포 분열과 증식, 종양의 발생과 성장 등을 억제하는 것을 의미한다.

[0060]

상기 암 또는 종양 모델의 세포 또는 동물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 것이면 적절히 선택하여 (d) 단계에서 선별된 물질의 항암 활성을 확인해 볼 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 인간의 암 세포주를 마우스에 주입하는 이종이식(xenograft)을 이용하여 체내 종양의 발생과 형성 과정을 관찰한 바 있다.

본 발명에 따른 항암제 스크리닝 방법은 상기 (d)와 (e) 단계 사이에 추가적으로

[0062] (1) 시험 물질을 AIMP2-DX2를 발현하는 세포에 접촉시키는 단계;

[0063] (2) 상기 세포와 시험 물질을 접촉하지 않은 대조군 세포에서 AIMP2-DX2 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

[0064] (3) 대조군 세포와 비교하여 AIMP2-DX2 단백질 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계를 실시할 수 있다.

[0065]

본 발명에 따르면 AIMP2-DX2가 분해되지 않도록 안정화하는 데에는 HSP70과의 직접적인 결합이 필요하기 때문에 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준이 감소하면 AIMP2-DX2의 단백질 수준이 감소할 것임을 이해할 수 있다. 상기 (1) 내지 (3)의 단계는 (d) 단계에서 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 것으로 선별된 시험 물질이 AIMP2-DX2 단백질 수준을 감소시키는지 여부를 추가적으로 확인하는 것이다. 상기 추가적인 단계는 (d) 단계에서 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 제제로서 선별되었으나 위음성(false-positive)인 경우, 또는 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 저해하는 수준이 AIMP2-DX2의 불안정화를 야기하는데 부족한 경우를 판단하여 제거하기 위하여 실시할 수 있다.

[0066] 상기 (1) 단계에서는 (d) 단계에서 선별된 시험 물질을 AIMP2-DX2를 발현하는 세포에 접촉시키는 단계이다.

[0067] 상기 AIMP2-DX2를 발현하는 세포는 AIMP2-DX2를 내재적으로 발현하는 세포일 수도 있고, AIMP2-DX2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환되어 AIMP2-DX2를 과발현하는 세포일 수도 있다. 예를 들어, AIMP2-DX2를 발현하는 다양한 암 세포주 중에서 적절하게 선택하여 시험 물질의 AIMP2-DX2 불안정화

효과를 검증할 수 있다. 상기 ‘접촉’의 의미는 앞서 설명한 바와 같다.

[0068]

상기 (2) 단계는 (1) 단계에서 시험 물질과 접촉한 세포와 시험 물질을 접촉하지 않은 대조군 세포에서 AIMP2-DX2 단백질 수준을 측정하는 단계이다.

[0070]

상기 AIMP2-DX2 단백질 수준을 측정하기 위하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 단백질 검출 방법을 제한없이 선택하여 사용할 수 있으며, 예를 들어, 웨스턴 블랏팅(western blotting), 닷 블랏팅(dot blotting), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사능 면역분석법(RIA), 방사면역화산법, 오우크테로니 면역화산법, 로켓트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침강법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법, 유세포 분석법(FACS) 또는 단백질 칩(chip) 방법 등을 사용할 수 있다.

[0071]

상기 (c) 단계는 대조군 세포와 비교하여 AIMP2-DX2 단백질 수준을 감소시키는 시험 물질을 선별하는 단계이다.

[0072]

상기 (c) 단계는 앞서 (b) 단계에서 측정한 시험 물질을 접촉한 세포와 접촉하지 않은 대조군 세포에서 측정한 AIMP2-DX2 단백질 수준을 비교하고, AIMP2-DX2 단백질 수준이 실제로 감소한 것으로 나타난 시험 물질을 추가적으로 선별하게 된다.

[0073]

본 발명에서 상기 암은 유방암, 폐암, 결장암, 항문암, 성상세포종, 백혈병, 림프종, 두경부암, 간암, 고환암, 자궁경부암, 육종, 혈관종, 식도암, 안암, 후두암, 경구암, 중피종, 골수종, 구강암, 직장암, 인후암, 방광암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 대장암, 췌장암, 신장암, 위암, 피부암, 기저세포암, 흑색종, 편평세포암종, 구강편평세포암종, 대장직장암, 교모세포종, 자궁내막암 및 악성뇌교종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074]

또한 본 발명은 본 발명에 따른 항암제 스크리닝의 방법으로 선별된 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0076]

본 발명의 방법에 따라 선별된 항암제는 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키고, AIMP2-DX2 단백질을 불안정화하여 암 세포의 증식과 분화를 억제할 수 있는 것이라면 물질의 특성에 특별한 제한을 받지 않으나, 작용기작에 따라 대표적으로 AIMP2-DX2와 HSP70 두 단백질의 결합 자체를 저해하는 물질 또는 HSP70의 발현을 억제하여 HSP70과 결합 가능한 AIMP2-DX2 단백질의 수준을 낮추는 물질을 생각해 볼 수 있다.

[0078]

본 발명의 방법으로 선별된 항암제는 구체적으로는 siRNA, shRNA, miRNA, ribozyme, DNAzyme, PNA(peptide nucleic acid), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 항체, 앱타머, 웨프티드, 천연추출물 및 화학물질로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0079]

본 발명자들은 HSP70에 특이적인 siRNA(si-HSP70) 또는 HSP70 저해제를 사용하여 암 세포에서 HSP70의 발현을 억제하면 HSP70에 결합한 AIMP2-DX2의 수준이 감소하고, AIMP2-DX2 단백질이 분해되어 감소하며, 결과적으로 AIMP2-DX2에 의한 암 세포의 증식과 분화가 억제된다는 것을 확인하였다.

[0081]

이는 siRNA 또는 HSP70 저해제 등 HSP70의 발현을 억제할 수 있는 제제는 암 질환의 예방과 치료에 효과적으로 이용될 수 있음을 보여주는 것이다.

[0082]

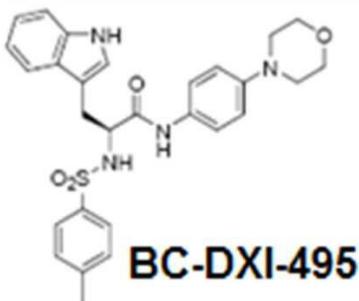
따라서 본 발명에 따른 항암제 스크리닝으로 선별된 항암제는 HSP70 특이적인 siRNA, shRNA 또는 HSP70 저해제 일 수 있다. 상기 siRNA 또는 shRNA는 HSP70 mRNA에 특이적으로 결합하여 mRNA의 분해를 유도할 수 있는 10 내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 당업계에서 공지된 방법에 따라 통상의 기술자가 용이하게 제작할 수 있다.

[0083]

본 발명의 구체적인 실시예에서는 하기 화학식 1의 화합물이 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 농도의존적으로 저해하며, 결과적으로 AIMP2-DX2가 불안정화하여 그 발현이 저해됨으로써 암 세포의 증식과 분화가 억제된다는 것을 확인하였다:

[0084]

[화학식 1]



[0085]

[0086]

본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 내 투여일 수 있으며, 바람직하게는 혈관 내 투여일 수 있다.

[0087]

[0088]

또한 본 발명에 따른 암 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. ‘약학적으로 허용되는’ 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성 성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 상기 담체로는 모든 종류의 용매, 분산매질, 수중유 또는 유중수 에멀젼, 수성 조성물, 리포좀, 마이크로비드 및 마이크로좀이 포함된다.

[0089]

[0090]

본 발명의 약학적 조성물을 비경구적으로 투여하는 경우, 본 발명의 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피투여제 및 비강흡입제의 형태로 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아, 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는 적합한 담체로는 헹크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.

[0091]

[0092]

경피투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 젤제, 외용액제, 파스타제, 리니멘트제, 에어롤제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 ‘경피투여’는 본 발명의 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다. 예컨대, 본 발명의 조성물을 주사형 제형으로 제조하여 이를 30 게이지의 가는 주사 바늘로 피부를 가볍게 단자(prick)하거나 피부에 직접적으로 도포하는 방법으로 투여될 수 있다. 이들 제형은 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania)에 기술되어 있다.

[0093]

[0094]

흡입투여제의 경우, 본 발명에 따른 조성물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 췌입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물 및 락토오즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다.

[0095]

[0096]

그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's

Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0097]

[0098] 또한 본 발명에 따른 약학적 조성물은 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 카보하이트레이트(예를 들어, 글루코스, 만노즈, 수크로즈 또는 텍스트란), 항산화제, 정균제, 퀼레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 아쥬반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 혼탁제, 농후제 및/또는 보존제를 추가로 포함할 수 있다.

[0099]

또한 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 다양하게 제형화될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 암 질환을 예방 또는 치료하는 효과가 있는 공지의 화합물과 병용하여 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0100]

따라서 본 발명은 HSP70이 암 발생의 주요 원인 단백질 중의 하나인 AIMP2-DX2와 직접 결합하여 안정화시킨다는 발견을 바탕으로 AIMP2-DX2 또는 이의 단편과 HSP70 또는 이의 단편을 이용하여 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 물질을 항암제로 선별하는 항암제 스크리닝 방법과 상기 방법으로 선별된 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 HSP70의 발현을 억제하는 siRNA, shRNA 등의 제제, 그리고 HSP70과 AIMP2-DX2의 결합을 억제하는 화합물 등을 암에서 AIMP2-DX2 단백질의 수준을 낮추고 암의 발생과 진행을 억제하는 효과가 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

[0101]

각 도면에 기재된 DX2는 AIMP2-DX2의 약어이다.

도 1A는 AIMP2-DX2와 AIMP2의 상호관계를 mass spectrometry 기법으로 분석한 모식도 및 결과를 나타낸 도면이다.

도 1B는 AIMP2-DX2 또는 AIMP2에 HSP70 isoform들이 결합하는 양상을 mass analysis로 검출한 결과이다(빨간막대: AIMP2-DX2, 파란막대: AIMP2).

도 2A는 EGF의 처리에 의해 endogenous HSP70이 AIMP2-DX2 단백질과 결합이 증가하는 것을 면역침강법(immuno-precipitation, IP) 및 웨스턴 블로트를 통해 확인한 결과이다(WCL: whole cell lysate).

도 2B는 EGF의 처리에 의해 endogenous AIMP2-DX2가 HSP70 단백질과 결합이 증가하는 것을 면역침강법 및 웨스턴 블로트를 통해 확인한 결과이다(WCL: whole cell lysate).

도 2C는 RFP-AIMP2-DX2, GFP-HSP70이 함께 과발현된 293T 세포에 EGF를 30분간 처리한 후, RFP-AIMP2-DX2 와 GFP-HSP70의 결합이 증가하는 것을 confocal microscopy로 확인한 결과이다.

도 2D는 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 KD 값을 SPR(surface plasmon resonance) 장비를 이용하여 평가한 결과이다.

도 3A는 AIMP2-DX2 단백질의 단편 및 이의 약어를 나타낸 모식도이다.

도 3B는 HSP70 isoform들(HSPA1A, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSPD1)이 AIMP2-DX2 각 단편에 결합하는 정도를 측정한 결과이다.

도 3C는 AIMP2-DX2 각 단편들이 HSP70과 결합하는 정도를 웨스턴 블로트를 통해 확인한 결과이다.

도 3D는 AIMP2-DX2와 HSP70이 결합하는 각 단백질 내 위치를 나타낸 모식도이다.

도 3E는 HSP70 단백질의 단편 및 이의 약어를 나타낸 모식도이다.

도 3F는 HSP70 단백질의 단편들 중 AIMP2-DX2와 결합하는 단편을 웨스턴 블로트를 통해 확인한 결과이다(WCL: whole cell lysate).

도 4는 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합관계에서 각 단백질 중 어느 위치에서 결합이 이루어지는지를 나타낸 모식도이다.

도 5A는 HSP70 단백질을 세포에 처리했을 때 또는 si-HSP70을 처리하여 HSP70의 발현을 저해하였을 때 각각

AIMP2-DX2의 발현 변화를 단백질 수준 및 유전자 수준에서 관찰한 결과이다(WB: 웨스턴 블롯, RT: RT-PCR).

도 5B는 H460 세포에 HSP70 저해제인 PES(Pifithrin-u), VER(VER155008)을 처리했을 때 또는 HSP90 저해제인 Gel(Geldanamycin), PU(PUH71)을 처리했을 때 AIMP2-DX2의 발현 변화를 단백질 및 유전자 수준에서 관찰한 결과이다(WB: 웨스턴 블롯, RT: RT-PCR).

도 6A는 AIMP2-DX2가 과발현되어 있는 293T 세포에 HSP70 저해제인 PES(Pifithrin-u), VER(VER155008)을 처리했을 때 또는 HSP90 저해제인 Gel(Geldanamycin), PU(PUH71)을 처리했을 때, 세포의 성장이 저해되는지 여부를 확인한 결과이다.

도 6B는 si-HSP70에 의해 HSP70의 발현이 저해된 세포에서 세포의 성장을 관찰한 결과이다.

도 6C는 si-RNA 기법을 통해 HSP70의 발현을 감소시킨 후, AIMP2-DX2에 의한 세포 성장의 결과물인 DNA 합성을 EdU assay를 통해 관찰한 결과이다.

도 7A는 AIMP2-DX2를 감소시키는 화합물을 탐색하기 위한 AIMP2-DX2 monitoring assay의 모식도를 나타낸 것이다.

도 7B는 AIMP2-DX2 monitoring assay를 통해 선별된 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 저해제인 BC-DXI-495 화합물의 구조식을 나타낸 도면이다.

도 8A는 BC-DXI-495 화합물 처리에 의해 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합이 저해되는지 여부를 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과이다.

도 8B는 AIMP2-DX2 또는 AIMP2가 과발현된 세포에 BC-DXI-495 화합물을 각 농도별로 처리한 후 AIMP2-DX2 또는 AIMP2의 발현변화를 luciferase assay를 통해 확인한 결과이다.

도 8C는 도 8B의 결과를 수치화하고 각 단백질의 발현을 50% 저해하는 농도(IC50)를 계산한 결과이다.

도 8D 및 8E는 BC-DXI-495 화합물을 H460 세포에 농도별 (2.5, 5, 10 uM)로 12시간 처리한 후, AIMP2-DX2, AIMP2, Actin 단백질 발현과, AIMP2-DX2, AIMP2, Actin mRNA 발현을 western blot과 RT-PCR로 관찰한 결과이다.

도 9A는 폐암 세포인 A549 세포주와 정상 폐 세포인 WI-26에 BC-DXI-495 화합물을 농도 의존적으로 처리한 후, 세포의 생존율을 평가한 결과이다.

도 9B는 Doxycycline(Sigma)에 의하여 AIMP2-DX2의 발현을 유도할 수 있는 폐암세포인 A549에 doxycycline (0.5 mg/ml)을 처리하여 AIMP2-DX2에 의한 세포 성장을 유도하고, 7일째 되는 날, BC-DXI-495 (40 uM)를 처리하여 96시간 동안 세포 성장 억제 및 사멸을 확인한 결과이다.

도 9C는 AIMP2-DX2 발현량이 다양한 2개 폐 정상세포 (WI-26, WI-38)와 7개 폐암세포 (NCI-H2087, HCC-1359, HCC-95, HCC-366, HCC-1438, HCC-1588, NCI-H460)에 BC-DXI-495 화합물을 농도별로 처리한 후, MTT assay를 수행하여, GI50를 계산한 결과이다.

도 10은 AIMP2-DX2 발현이 높은 H460 세포를 쥐에 이식(xenograft)한 후, BC-DXI-495 화합물 또는 Taxol을 투여한 후 종양의 크기 변화를 관찰한 결과이다(A: 종양의 육안관찰사진, B: 종양의 부피변화, C: 종양의 무게변화, D: 동물의 체중변화).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102]

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0103]

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

[0104]

<실시예 1>

[0105]

AIMP2-DX2 및 HSP70의 결합관계 분석

[0106]

Strep-AIMP2-DX2 strep-AIMP2를 각각 발현시킨 293T 세포의 lysate를 strep-tag column(GE Healthcare)을 이용하여 면역침강(immunoprecipitation, IP)한 후, 칼럼에 의해 침강된 단백질들을 SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질들은 trypsin(Hyclone)을 이용하여 in-gel digestion 방식으로 펩타이드 수준으로 분해하였고, 이 펩타이드들을 LC-mass spectrometry (Thermo) 장비를 통해 분석하였다(도 1A).

- [0107] 293T 세포는 ATCC에서 공급받아 사용하였으며, Strep-AIMP2-DX2 strep-AIMP2은 DX2, AIMP2 서열을 각각 pEXPR-IBA5 vector에 cloning하여 넣은 후, 293T 세포에 TurboFect (Thermo)라는 transfection reagent를 이용하여 과발현하였다.
- [0108] 세포의 lysis는 적정량의 lysis buffer(50mM Tris(pH7.4), 100mM NaCl, 10% Glycerol, 1mM EDTA, 0.5% TritonX-100, PBS)를 넣어 30분간 4° C에서 incubation 함으로써 수행하였고, Lysis 시킨 cell lysate를 13200 rpm에서 15분간 centrifuge를 돌린 후 cell lysate에서 분리된 상등액만 취한 후, 상등액을 strep-tag column (thermo)에 통과시켰다. 상등액을 통과시킨 후, 제공되는 elution buffer를 이용하여 column에 결합되어있는 단백질들을 elution하여 모은 후, 모여진 단백질을 SDS-PAGE로 분리하였다.
- [0109] 도 1A에 나타낸 바와 같이, AIMP2-DX2와 AIMP2의 상호작용을 mass spectrometry 기법으로 분석한 결과, AIMP2-DX2의 결합 단백질 107개, AIMP2의 결합 단백질 148개를 확인할 수 있었다. 그 중 45개의 결합 단백질이 겹치는 것을 확인하였다.
- [0110] 한편, 도 1B에 나타낸 바와 같이, AIMP2와 비교하여 AIMP2-DX2에 HSP70 단백질이 우세하게 결합하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0111] 보다 구체적으로, 도 1B의 붉은 색 그래프는 AIMP2-DX2, 파란 색 그래프는 AIMP2의 결합 단백질을 나타낸 그래프이다. mass analysis에서 많이 detection될수록 그래프의 가로축 왼쪽에 표시되게 되며, detection된 빈도수가 세로축으로 나타나게 된다. 도 1B의 붉은 색 그래프에서 AIMP2-DX2 결합 단백질로 표시된 HSPA8, HSPD1, HSPA5, HSPA9, HSPH1, HSPA2, HSPA1L, HSPA4, HSPA1A 는 모두 HSP70의 isoform이다. 반면 파란색 그래프의 AIMP2의 경우에는 HSP70의 isoform (HSPA4)이 하나만 detection되는 것을 확인하였다. 뿐만아니라 AIMP2의 경우에는 DX2에서는 관찰되지 않았던 HSP90의 isoform인 HSP90B1이 detection 되는 것을 확인하였다. 이상의 결과와 같이, HSP70이 AIMP2-DX2에 우세하게 결합한다는 결론을 얻을 수 있었다.
- [0112] <실시예 2>
- [0113] AIMP2-DX2와 HSP70의 결합관계의 확인
- [0114] H460세포에 내피성장인자(endothelial growth factor, EGF(Peprotech))를 30분간 처리한 후, IP buffer(50mM Tris(pH7.4), 100mM NaCl, 10% Glycerol, 1mM EDTA, 0.5% TritonX-100, PBS)로 30분간 4° C에서 세포를 용해시켰다. 세포의 Lysate를 HSP70 항체(Abcam)를 이용하여 IP 하였다. IP 후 SDS-PAGE와 웨스턴 블로트를 통해 DX2, AIMP2, HSP70 단백질을 확인하였다. Actin(Sigma)은 loading control을 의미하며, WCL은 whole cell lysate를 의미한다.
- [0115] 도 2A에 나타낸 바와 같이, EGF 처리에 의해 endogenous HSP70이 AIMP2-DX2단백질과 결합이 증가하는 것을 확인하였으며, 이때 AIMP2는 HSP70과 결합하지 않는다는 것을 알 수 있었다.
- [0116] Strep-AIMP2-DX2가 과발현된 293T 세포에 EGF를 30분간 처리하였다. 상기 실험방법과 동일하게 세포를 용해시킨 후, Strep-tag column(GE Helathcare)을 이용하여 IP를 진행하였다. IP 후 SDS-PAGE, 웨스턴 블로트를 진행하여 Strep-AIMP2-DX2, HSP70, HSP90의 양을 확인한다. 앞의 단백질들은 StrepMAB-Classic-HRP(IBA), HSP70 특이적 항체(Santa Cruz), HSP90 특이적 항체(Santa Cruz)를 이용하여 확인하였다.
- [0117] 도 2B에 나타낸 바와 같이, EGF 처리에 의해 exogenous AIMP2-DX2가 HSP70 단백질과 결합이 증가하는 것을 확인하였으며, 이때 HSP90은 AIMP2-DX2와 결합이 매우 약하며, EGF에 의해 결합이 증가하지 않는 것을 알 수 있었다.
- [0118] RFP-AIMP2-DX2, GFP-HSP70이 함께 과발현된 293T 세포에 EGF를 30분간 처리하였다. EGF 처리한 뒤 차가운 PBS를 이용하여 3회 washing한 후, 차가운 methanol을 사용하여 세포를 10분간 고정하였다. 고정 후, 차가운 PBS로 다시 3회 washing하였고, DAPI(Invitrogen) 용액을 이용하여 핵을 염색하였다. 염색이 끝난 후, confocal microscopy를 이용하여 각 형광을 관찰하였다.
- [0119] 도 2C에 나타낸 바와 같이, EGF 처리에 의해 RFP-AIMP2-DX2와 GFP-HSP70이 결합이 증가하는 것을 confocal microscopy로 확인할 수 있었다.
- [0120] HSP70 단백질과 AIMP2-DX2 단백질간의 결합을 SPR(surface plasmon resonance (GE))장비를 통해 분석하였다. HSP70 단백질을 고정시킨 후, AIMP2-DX2 단백질을 농도별로 흘려 각 단백질의 결합, 분리값을 얻은 후, KD 값을 계산하였다.

- [0121] 도 2D에 나타낸 바와 같이, 정제된 AIMP2-DX2, HSP70 단백질이 KD값 4.79×10^{-10} 수준으로 직접 결합하는 것을 SPR assay를 통해 관찰하였다.
- [0122] <실시예 3>
- [0123] **AIMP2-DX2와 HSP70의 결합구조 분석**
- [0124] GST-tag이 융합된 AIMP2-DX2 단백질 조각(DM1 내지 DM5)들과 293T 세포 lysate를 섞어주었다. 섞어준 후, glutathione-sepharose(GE Healthcare)를 이용하여, 각 AIMP2-DX2 단백질을 pull down 하였다. AIMP2-DX2 단백질과 함께 pull down된 HSP70 단백질들의 양은 mass spectrometry 기법을 이용하여 확인하였다. 실험에 사용한 AIMP2-DX2 단백질 조각들의 아미노산 위치를 도 3A에 나타내었다.
- [0125] 도 3B에 나타낸 바와 같이, AIMP2-DX2 단백질 조각 중 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 DM1 (서열번호 1의 아미노산 서열 중 1-87째 아미노산에 해당하는 단편)에 HSP70 family들이 우세하게 결합하는 것을 mass spectrometry 기법을 통해 확인할 수 있었다.
- [0126] 다음으로, AIMP2-DX2과 HSP70과의 결합구조를 보다 구체적으로 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0127] GST-EV, GST-AIMP2-DX2 full, GST-AIMP2-DX2 조각들(DM1~DM5)을 GFP-HSP70이 과발현된 293T 세포 lysate와 섞어주었다. 섞어준 후, GST 단백질은 glutathione-sepharose를 이용하여 pull down 하였고, pull down된 단백질들은 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯을 통하여 분석하였다. GFP 단백질은 GFP 특이적 항체를 이용하여 확인하였고, GST 단백질은 coomassie staining을 통해 확인하였다.
- [0128] 도 3C 및 도 3D에 나타낸 바와 같이, AIMP2-DX2 단백질 조각 중 1-87 아미노산을 포함하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 DM1 단편이 HSP70에 결합하는 것을 알 수 있다.
- [0129] 한편, HSP70 단백질 내에서 AIMP2-DX2에 결합하는 부분을 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0130] Strep-AIMP2-DX2와 함께, GFP-HSP70 full, GFP-HSP70 조각들(AD, SB, Lid)을 293T 세포에 과발현 시킨 후, 293T 세포의 lysate를 strep-tag column을 이용하여 IP하였다. Strep-AIMP2-DX2와 함께 IP된 단백질들은 SDS-PAGE를 통해 분리되었고, 각 GFP 단백질의 결합은 GFP 특이적 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. HSP70 단백질 내에서 실험에 사용된 각각의 조각들(AD, SB, Lid)의 아미노산 위치를 도 3E에 나타내었다.
- [0131] 도 3F 및 도 4에 나타낸 바와 같이, HSP70 단백질 조각 중 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 SB (substrate binding domain) 부분을 포함한 조각만이 AIMP2-DX2와 결합하는 것을 알 수 있다.
- [0132] <실시예 4>
- [0133] **HSP70에 의한 AIMP2-DX2의 안정화 증가**
- [0134] H460 세포에 GFP-EV, GFP-HSP70을 transfection을 통해 과발현시켰다. 또한, HSP70에 특이적인 si-RNA(si-HSP70, Santa Cruz)를 이용하여 HSP70의 발현을 감소시켰으며, 이때 대조군으로 si-control(Invitrogen)을 사용하였다. HSP70의 발현을 증가, 감소시킨 H460 세포의 단백질 발현량은 웨스턴 블롯, mRNA 발현량은 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. HSP70 특이적 primer 서열은 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 C을 이용하였다.
- [0135] 도 5A에 나타낸 바와 같이, HSP70 과발현에 의해 AIMP2-DX2 단백질이 증가하며, si-RNA 기법을 통한 HSP70의 감소에 의해 AIMP2-DX2 단백질이 감소하는 것을 확인하였다. 이때 AIMP2-DX2의 전사에는 영향이 없는 것을 보아, HSP70에 의한 AIMP2-DX2의 조절은 전사 이후의 조절, 즉 단백질 수준에서의 조절임을 알 수 있다.
- [0136] 한편, H460 세포에 HSP70 억제제인 Pifithrin-u(Tocris), VER155008(Sigma)와 HSP90 억제제인 Geldanamycin(Tocris), PUH71(Tocris)을 처리한 후, 웨스턴 블롯, RT-PCR을 기법을 통해 단백질, mRNA 발현량을 확인하였다. AIMP2-DX2 단백질의 발현량은 AIMP2-DX2 특이적 항체(Cell signaling)을 이용하여 확인하였다.
- [0137] 도 5B에 나타낸 바와 같이, HSP70 억제제인 PES (Pifithrin-u), VER (VER155008) 처리에 의해 AIMP2-DX2 단백질의 발현이 감소함을 알 수 있었다. HSP90 억제제 Gel (Geldanamycin), PU (PUH71) 처리에 의해서는 AIMP2-DX2 단백질 발현이 영향이 없음을 확인하였으며, HSP70, HSP90 억제제에 의해 AIMP2의 발현은 영향이 없음을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 각 억제제 처리에 의해 AIMP2-DX2의 전사에는 영향이 없는 것을 보아, HSP70 억제제 처리에 의한 AIMP2-DX2의 조절은 전사 이후의 조절, 즉 단백질 수준에서의 조절임을 알 수 있었다.

- [0138] 이상의 결과를 통해, HSP70은 AIMP2-DX2 단백질 특이적으로 안정화하는 것으로 판단되었다.
- [0139] <실시예 5>
- [0140] DX2를 경유한 HSP70의 세포 분열 조절
- [0141] Strep-AIMP2-DX2를 과발현한 293T 세포와 과발현하지 않은 293T 세포에 HSP70 저해제인 Pifithrin- α (PES), VER155008(PER) 및 HSP90 저해제인 Geldanamycin(Ge1), PUH71(Pu)을 12시간 처리한후 MTT(Amresco) assay를 수행하였다. 각 실험은 3회 독립적으로 수행하였으며, HSP70에 특이적인 si-RNA(si-HSP70)를 이용하여 HSP70의 발현을 감소시킨 293T 세포에 Strep-AIMP2-DX2를 과발현한 후 MTT assay를 수행하였다. 각 실험은 3회 독립적으로 수행하였다.
- [0142] 이에 대한 결과를 도 6A 및 6B에 나타내었다.
- [0143] 도 6A에 나타낸 바와 같이, HSP70 억제제 PES, VER, HSP90 억제제 Ge1, Pu를 처리한 후 AIMP2-DX2 의해 증가하는 세포 성장을 관찰한 결과, HSP70 억제제를 처리한 경우 AIMP2-DX2에 의한 세포 성장 증가가 관찰되지 않았다. 또한, 도 6B에 나타낸 바와 같이, si-RNA 기법을 통해 HSP70의 발현을 감소시킨 결과 AIMP2-DX2에 의한 세포 성장이 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 통해 HSP70이 DX2를 통해 세포의 성장을 조절하고 있음을 알 수 있었다.
- [0144] 한편, si-RNA 기법을 통해 HSP70의 발현을 감소시킨 후, AIMP2-DX2에 의한 세포 성장의 결과물인 DNA 합성을 EdU assay를 통해 관찰한 결과, HSP70의 발현이 감소되었을 때 AIMP2-DX2에 발현을 통해 증가되는 DNA 합성이 관찰되지 않는 것을 알 수 있다(도 6C).
- [0145] <실시예 6>
- [0146] AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 저해제의 탐색
- [0147] 도 7A에 나타낸 바와 같이 AIMP2-DX2 monitoring assay를 만든 후, 본 발명자의 화합물 라이브러리에 존재하는 화합물들을 처리하여 AIMP2-DX2를 감소시키는 화합물을 1차로 선별하였다. 1차로 선별된 화합물 중 AIMP2는 감소시키지 않으며, MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하여 정상세포에 영향을 주지 않고 암세포에만 영향을 주는 화합물을 최종적으로 선별하였다.
- [0148] 선별된 화합물을 BC-DXI-495로 명명하였으며, 이의 구조를 도 7B에 나타내었다.
- [0149] <실시예 7>
- [0150] BC-DXI-495의 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 저해능 및 DX2 발현 저해능
- [0151] 상기 실시예 6을 통해 선별된 BC-DXI-495가 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합을 저해할 수 있는지 여부를 평가하였다. Strep-DX2가 과발현된 293T 세포에 BC-DXI-495 화합물을 농도별 (2.5, 5, 10 μ M)로 12시간 처리한 후, 세포를 1 % triton X-100(BD Science)이 포함된 PBS로 용해하였다. Lysate를 13200rpm 속도로 원심분리한 후, 분리된 부유물과 침전물에서 웨스턴 블로트를 통해 AIMP2-DX2, AIMP2의 단백질 발현량을 확인하였다. AIMP2-DX2의 발현은 StrepMAB-Classic-HRP(IBA)을 이용하여 확인하였다.
- [0152] 이에 대한 결과를 도 8A에 나타내었다.
- [0153] 도 8A에 나타낸 바와 같이, BC-DXI-495 화합물을 농도의존적으로 처리할 경우, AIMP2-DX2와 HSP70의 결합이 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.
- [0154] BC-DXI-495 화합물에 의해 AIMP2-DX2, AIMP2의 감소를 확인하기 위해, A549 세포에 nanoluciferase-AIMP2-DX2, nanoluciferase-AIMP2를 각각 과발현한 후 BC-DXI-495 화합물을 농도의존적 (2.5, 5, 10, 20, 40 μ M)으로 4시간 처리하였다. 처리 후, 세포내에 있는 AIMP2-DX2, AIMP2 단백질의 양을 luciferase assay(cat#)를 통해 확인하였다. 각 농도에서의 luciferase 저해 정도를 측정하여 AIMP2-DX2, AIMP2를 50% 감소시키는 화합물 농도를 계산하였고, 이를 IC50로 나타내었다. 또한, BC-DXI-495 화합물을 H460 세포에 농도별 (2.5, 5, 10 μ M)로 12시간 처리한 후, AIMP2-DX2, AIMP2, Actin 단백질 발현과, AIMP2-DX2, AIMP2, Actin mRNA 발현을 western blot과 RT-PCR로 관찰하였다.
- [0155] 그 결과, 도 8B 및 8C에 나타낸 바와 같이 BC-DXI-495 화합물은 AIMP2 발현에 영향을 주지 않으며 (IC50 > 100 μ M), AIMP2-DX2 발현만을 특이적으로 감소시키는 것으로 확인되었으며 (IC50: 4.2 μ M), BC-DXI-495 화합물을 농도

의존적으로 처리할 경우, AIMP2에 영향없이 AIMP2-DX2 단백질만 특이적으로 감소시키는 것으로 확인되었다(도 8D). 또한, BC-DXI-495 화합물을 농도 의존적으로 처리할 경우, soluble AIMP2-DX2 단백질 (부유층 분획)이 감소하고 insoluble AIMP2-DX2 단백질 (침전물 분획)이 증가하는 것을 알 수 있었다(도 8E).

[0156] <실시예 8>

[0157] BC-DXI-495의 항암효능평가

[0158] <8-1> BC-DXI-495의 세포독성

[0159] BC-DXI-495 화합물에 의해 폐암, 정상 폐 세포의 세포활성이 어떻게 변화하는지 확인하기 위해, A549 (폐암세포), WI-26 (정상 폐 세포)에 BC-DXI-495 화합물을 농도의존적 (2.5, 5, 10, 20, 40 μ M)으로 처리하였다. 처리 후, MTT assay를 수행하여 각 세포의 활성을 측정하였다. 세포의 활성을 50% 감소시키는 화합물 농도를 계산하였고, 이를 GI50로 나타내었다.

[0160] 도 9A에 나타낸 바와 같이, 폐암세포인 A549와 정상 폐 세포인 WI-26에 BC-DXI-495 화합물을 농도 의존적으로 처리한 결과, 정상세포에는 아무런 영향 없이 폐암세포만 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있었다.

[0161] 또한, Doxycycline(Sigma)에 의하여 AIMP2-DX2의 발현을 유도할 수 있는 폐암세포인 A549에 doxycycline (0.5 mg/ml)을 처리하여 AIMP2-DX2에 의한 세포 성장을 유도하였다. 48시간마다 doxycycline을 처리하였고, 7일째 되는 날, BC-DXI-495 (40 μ M)를 처리하여 96시간 동안 세포 성장 억제 및 사멸을 확인하였다.

[0162] 도 9B에 나타낸 바와 같이, AIMP2-DX2 단백질의 발현을 유도할 경우 (분홍색 그래프), 그렇지 않은 경우에 비해 BC-DXI-495 화합물에 의한 세포 독성이 더 크게 유도되는 것을 알 수 있었다.

[0163] 또한, AIMP2-DX2 발현량이 다양한 2개 폐 정상세포 (WI-26, WI-38)와 7개 폐암세포 (NCI-H2087, HCC-1359, HCC-95, HCC-366, HCC-1438, HCC-1588, NCI-H460)에 BC-DXI-495 화합물을 농도별로 처리한 후, MTT assay를 수행하여, GI50를 계산하였다. 각 세포의 AIMP2-DX2 발현량은 웨스턴 블로트를 통해 확인하였다.

[0164] 도 9C에 나타낸 바와 같이, Endogenous AIMP2-DX2 단백질 발현 정도에 따라 폐암 세포를 3군 (Low, Median, High)으로 나눈 후 BC-DXI-495를 처리하여 세포 독성 정도 (GI50)를 측정한 결과, AIMP2-DX2 발현이 높은 세포에서 화합물에 의한 세포 사멸 효과가 우수한 것을 알 수 있었다.

[0165] <8-2> BC-DXI-495의 *in vivo* 항암효능 평가

[0166] H460 세포 5×10^6 개를 8주령 Balb/c nude mice 등의 표피에 주사하여 종양을 형성시킨후, BC-DXI-495 화합물을 50 mg/kg농도로 주 5회 주사하여 총 10회 주사하였으며, 양성대조물질인 taxol은 15 mg/kg 농도로 주 2회 총 5회 주사하였다. 실험 종료 후 종양을 분리하여 무게를 측정하였다. 실험동물의 체중 및 종양 크기는 주 2회 측정하였다.

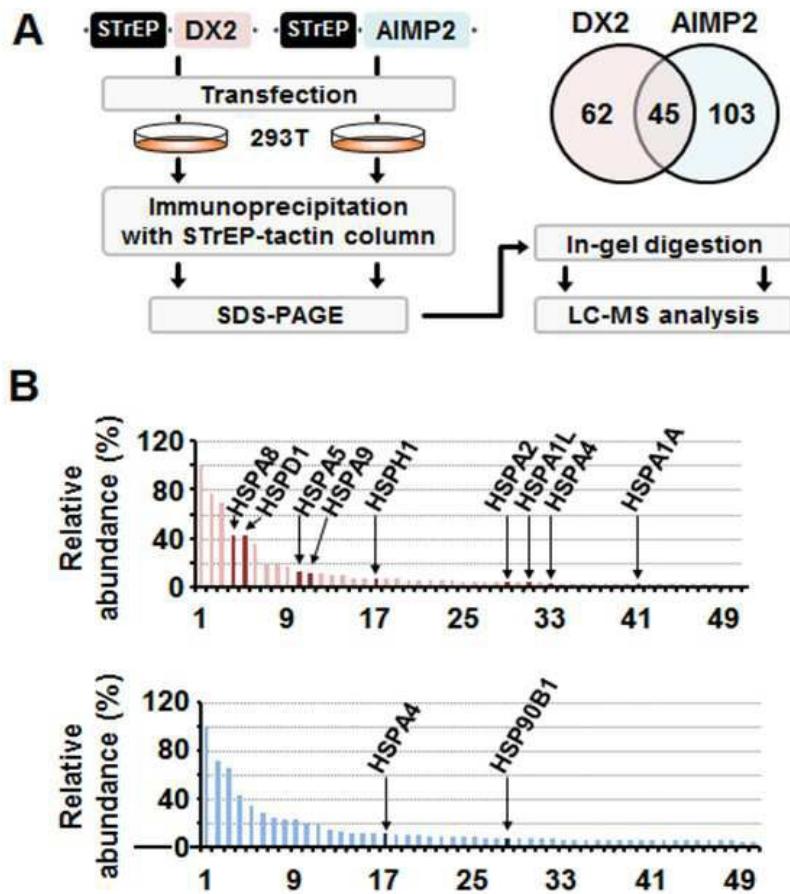
[0167] AIMP2-DX2 발현이 높은 H460 세포를 쥐에 이식(xenograft)한 후, BC-DXI-495 화합물을 50 mg/kg 으로 투여한 결과, 대조군인 Taxol (15 mpk)과 유사한 정도로 암세포의 성장을 억제하는 것을 알 수 있었다. 한편, 이러한 종양 억제효과는 종양의 무게에서도 동일하게 확인되었다(도 10A, 10B 및 10C). 실험 진행과정 동안에 쥐의 체중에는 아무런 영향이 없었다(도 10D).

산업상 이용가능성

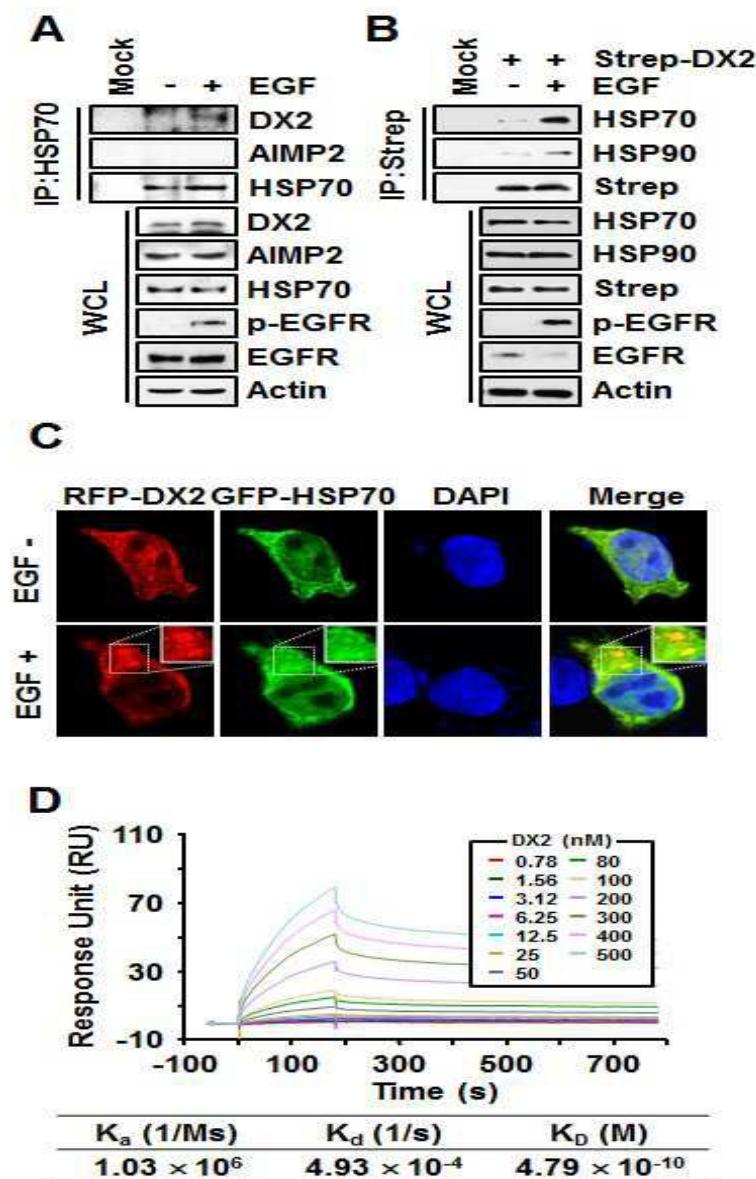
[0168] 본 발명은 HSP70이 암 발생의 주요 원인 단백질 중의 하나인 AIMP2-DX2와 직접 결합하여 안정화시킨다는 발견을 바탕으로 AIMP2-DX2 또는 이의 단편과 HSP70 또는 이의 단편을 이용하여 AIMP2-DX2와 HSP70의 결합 수준을 감소시키는 물질을 항암제로 선별하는 항암제 스크리닝 방법과 상기 방법으로 선별된 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 HSP70의 발현을 억제하는 siRNA, shRNA 등의 제제, 그리고 HSP70과 AIMP2-DX2의 결합을 억제하는 화합물 등은 암에서 AIMP2-DX2 단백질의 수준을 낮추고 암의 발생과 진행을 억제하는 효과가 뛰어나 산업상 이용가능성이 매우 우수하다.

도면

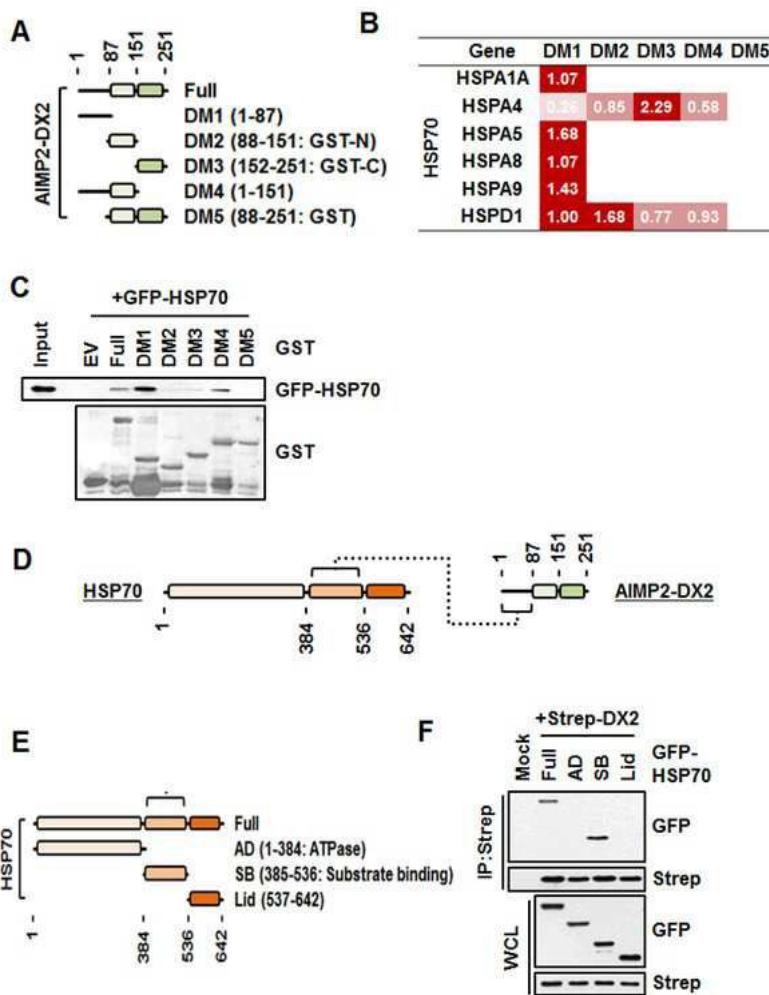
도면1



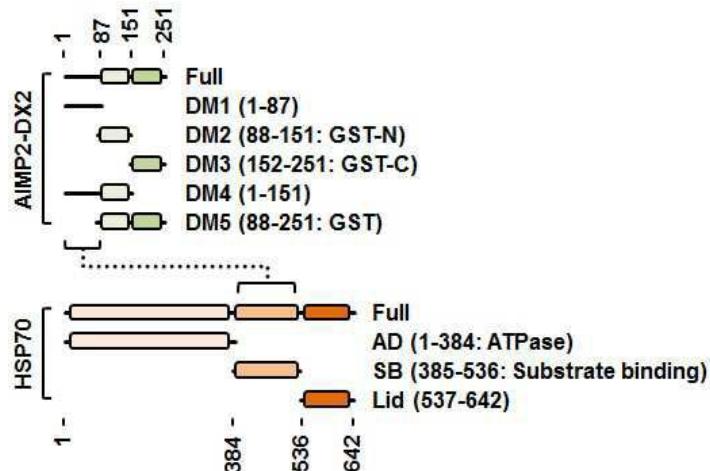
도면2



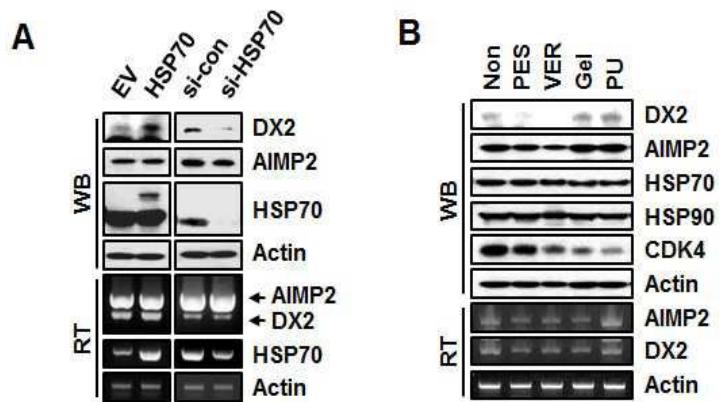
도면3



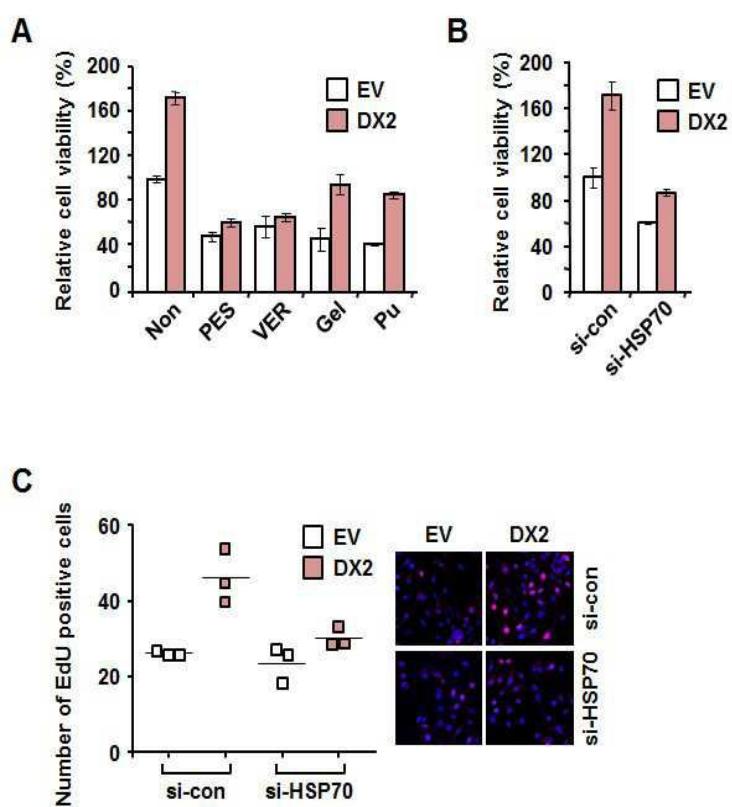
도면4



도면5

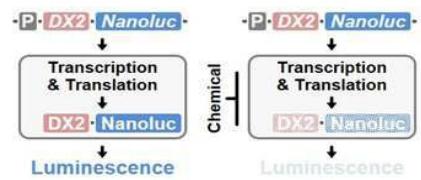


도면6

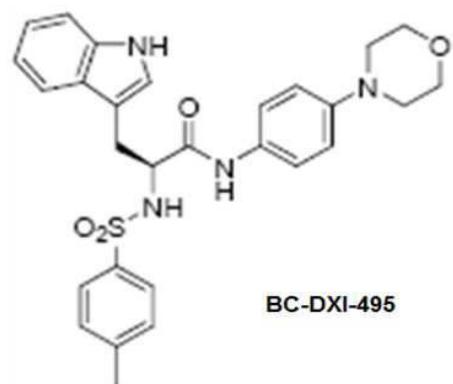


도면7

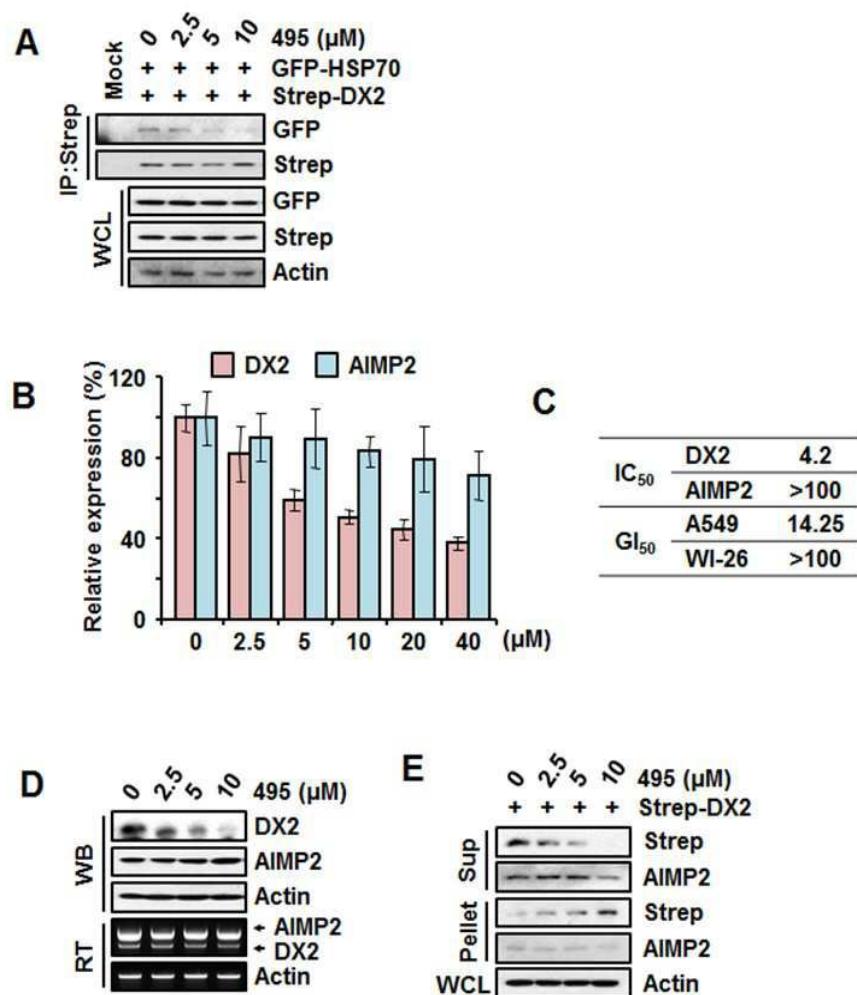
A



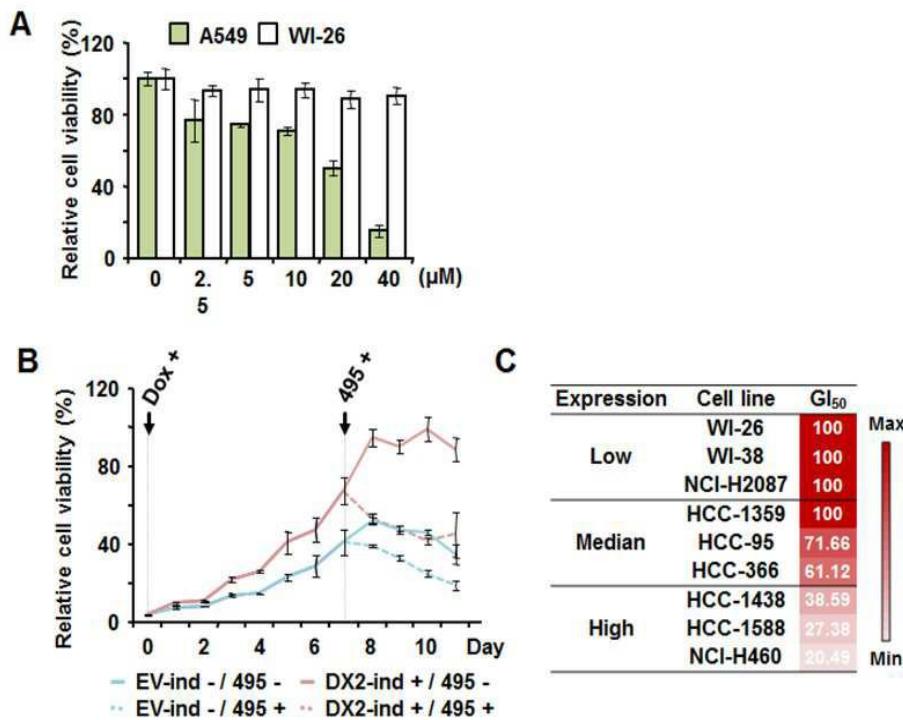
B



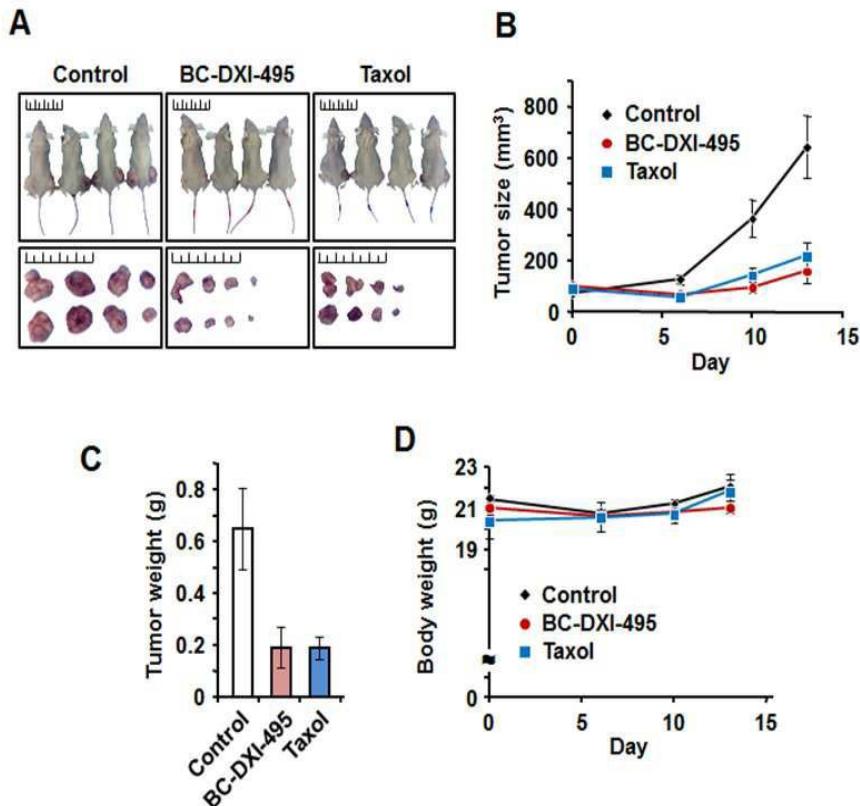
도면 8



도면9



도면10



서 열 목록

<110> Medicinal Bioconvergence Research Center
 <120> Methods for screening anti-cancer drugs inhibiting interactions
 between AIMP2-DX2 and HSP70
 <130> NP16-0010
 <160> 4
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Human AIMP2-DX2
 <400> 1

Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu

1 5 10 15

Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly
20 25 30

Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly
35 40 45

Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu
50 55 60

Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu
65 70 75 80

Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu
85 90 95

Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr

100 105 110

Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met
115 120 125

Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Asn Ile
130 135 140

Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn
145 150 155 160

Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys

165 170 175

Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser

180 185 190

Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala

195 200 205

Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val

210 215 220

Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu

225 230 235 240

Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys

245 250

<210> 2

<211> 87

<212> PRT

<213> Fragment of human AIMP2-DX2

<400> 2

Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu

1 5 10 15

Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly

20 25 30

Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly

35 40 45

Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu

50 55 60

Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu

65 70 75 80

Ser Thr Val His Thr His Ser

85

<210> 3

<211> 641

<212> PRT

<213> Human HSP70

<400> 3

Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser

1 5 10 15

Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp

20 25 30

Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu

35 40 45

Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Leu Asn Pro Gln

50 55 60

Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp

65 70 75 80

Pro Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn

85 90 95

Asp Gly Asp Lys Pro Lys Val Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys

100 105 110

Ala Phe Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys

115 120 125

Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile

130 135 140

Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp

145 150 155 160

Ala Gly Val Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro

165 170 175

Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu

180 185 190

Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser

195 200 205

Ile Leu Thr Ile Asp Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly

210 215 220

Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His

225 230 235 240

Phe Val Glu Glu Phe Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn
 245 250 255
 Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg
 260 265 270
 Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe
 275 280 285
 Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu
 290 295 300
 Leu Cys Ser Asp Leu Phe Arg Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu
 325 330 335
 Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp
 340 345 350
 Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala
 355 360 365
 Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys
 370 375 380
 Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser
 385 390 395 400
 Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg
 405 410 415
 Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser
 420 425 430
 Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala
 435 440 445
 Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile
 450 455 460
 Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile
 465 470 475 480
 Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly
 485 490 495

Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys

500 505 510

Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu

515 520 525

Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser

530 535 540

Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly

545 550 555 560

Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu

565 570 575

Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe

580 585 590

Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser

595 600 605

Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala

610 615 620

Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val

625 630 635 640

Asp

<210> 4

<211> 152

<212> PRT

<213> Fragment of human HSP70

<400> 4

Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser

1 5 10 15

Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg

20 25 30

Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser

35 40 45

Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala

50 55 60
Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile
65 70 75 80
Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile

85 90 95
Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly
100 105 110
Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys
115 120 125
Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu
130 135 140
Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val
145 150