

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 8월 11일 (11.08.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/096756 A9

(51) 국제특허분류:

A61K 38/16 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/000768

(22) 국제출원일: 2011년 2월 7일 (07.02.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2010-0010623 2010년 2월 4일 (04.02.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 이
화여자대학교 산학협력단 (EWhA UNIVERSITY -
INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)
[KR/KR]; 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교
내, 120-750 Seoul (KR).

(72) 발명자: 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 강상원 (KANG, Sang
Won) [KR/KR]; 서울 서초구 잠원동 53-15, 강변아파
트 4 동 1101 호, 137-030 Seoul (KR). 이수영 (LEE,
Soo Young) [KR/KR]; 서울 강남구 대치 2 동 은파아파
트 5 동 1111 호, 135-282 Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9
도심공향타워 6층 한얼국제특허사무소, 135-973
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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

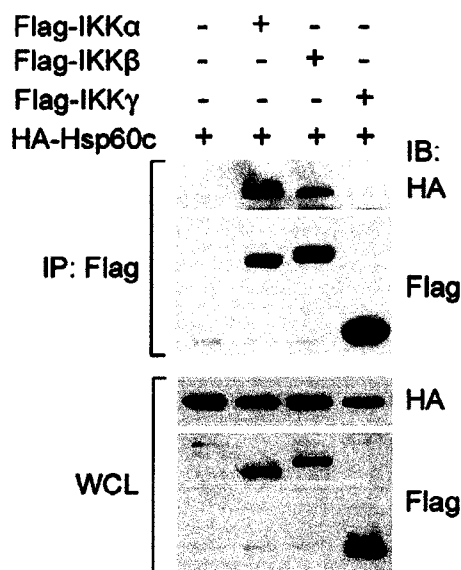
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR INHIBITING ABNORMAL PROLIFERATION OF CELLS

(54) 발명의 명칭: 비정상적 세포 증식 억제용 약제학적 조성물

[Fig. 8]



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating diseases related to abnormal proliferation of cells, comprising a cytoplasmic heat shock protein (Hsp)60 kDa inhibitor as an active ingredient, and to a screening method and a kit using the composition. According to the present invention, substances which inhibit expression of cytoplasmic Hsp 60 genes or inhibit activity of cytoplasmic Hsp 60 or inhibit binding between cytoplasmic Hsp 60 and IKK protein prevent interaction between cytoplasmic Hsp 60 and IKK complexes to make NF- κ B path inactive, and thus induce apoptosis. Therefore, the substances can be valuably used in preventing or treating diseases related to abnormal proliferation of cells, such as cancer, inflammatory diseases or hyperproliferative vascular diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 세포질 Hsp60(heat shock protein, 60 kDa)의 억제제를 유효성분으로 포함하는 비정상적 세포 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 이를 이용한 스크리닝 방법 및 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 세포질 Hsp60 유전자의 발현을 억제하거나, 세포질 Hsp60 단백질의 활성을 억제하거나, 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 단백질 사이의 결합을 억제하는 물질은 세포질 Hsp60과 IKK 복합체의 상호작용을 차단하여 NF- κ B 경로를 불활성화시키고, 그로 인해 세포 사멸을 유도함으로써 암, 염증성 질환 또는 이상증식 혈관 질환과 같은 비정상적 세포 증식 관련 질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 이용될 수 있다.

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에
관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일:

2011 년 12 월 15 일

(48) 본 정정판 공개일:

2012 년 3 월 8 일

(15) 정정사항에 관한 정보:

2012 년 3 월 8 일 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 비정상적 세포 증식 억제용 억제학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 세포질 Hsp60의 억제제를 포함하는 비정상적 세포 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물 및 세포질 Hsp60을 이용한 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 포유동물 세포는 카스파제 활성화의 억제, 해로운 산소 라디칼의 제거, 미토콘드리아 기능의 방어 및 세포주기의 조절(checking)을 담당하는 수많은 생존 유전자들을 발현한다. 생존 유전자의 유도를 책임지는 전사인자들 중에서, NF- κ B(nuclear factor- κ B)는 복잡한 세포 생존반응을 지휘하는 핵심 인자이다. 특히, NF- κ B-의존적 생존 유전자들은 c-IAPs 및 c-FLIP 같은 항-아파토시스성 유전자들, 그리고 MnSOD(manganese-superoxide dismutase) 및 Bcl-2 패밀리의 유전자들 같은 미토콘드리아 보호 유전자들을 포함한다.
- [3] NF- κ B 활성화 경로에서의 중추적 키나제는 κ B 억제인자의 키나제(I κ B kinase, IKK)인데, 이 단백질은 I κ B 단백질의 아미노 말단의 세린 잔기를 인산화시켜 유비퀴티네이션을 유도함으로써 프로테오좀 분해를 유발하여 NF- κ B 단백질을 유리(liberation)시킨다[Karin M et al., Annu Rev Immunol 18: 621-663 (2000)]. NF- κ B 경로를 활성화시키는 세포 외 자극들은 IKK로 전달된다[Hayden MS et al., Genes Dev 18: 2195-2224 (2004)]. 따라서, IKK 활성화의 조절을 이해하기 위한 수많은 노력들이 있었다.
- [4] 구체적으로, 인산화-의존적 IKK 활성화의 조절이 규명되었다. 활성화된 T-루프에 존재하는 두 개의 세린 잔기(인간 IKK β 에서 Ser171/Ser181)의 인산화가 활성화에 중요한 반면에, C-말단 세린 클러스터의 자가인산화는 활성화를 억제한다. 많은 키나제들이 상기 인산화 활성화에 관련되는 것으로 알려져 있다: NF- κ B-유도성 키나제(NIK), 미토젠-활성 단백질 키나제/ERK 키나제 키나제 1(MEKK1), MEKK2/3, 조혈전구세포 키나제-1(HPK1), MLK 3(Mixed-lineage kinase 3), TAK1(TGF- β activated kinase 1). 그러나, TAK1을 제외한 다른 업스트림 키나제들이 IKK 복합체를 어떻게 활성화시키는 지에 대해서는 불확실하다.
- [5] 또한, 유비퀴틴-의존적 IKK 활성화의 조절이 수년 동안 연구되었다. 최근에, IKK 복합체의 조절 서브유닛인 IKK γ (또는 NEMO)가 RIP 1(receptor-interaction protein 1)의 Lys63-연결된 폴리유비퀴티네이션 사슬을 인식할 뿐 아니라 유비퀴티네이션된다는 것이 알려졌다.
- [6] 또한, 상호작용하는 단백질을 통한 IKK 활성화의 조절이 규명되었다. 가장 훌륭한 예가 열충격 단백질들이다. 예를 들어, Cdc37 및 Hsp90은 IKK 복합체의 추가적인 구성요소들로 작용하며 이들이 복합체를 안정화시킨다는 것이

보고되었다[Broemer M et al., Oncogene 23: 5378-5386 (2004)]. Hsp27은 TNF- α -의존적으로 IKK β 와 상호작용하는 것으로 알려져있다[Park KJ et al., J Biol Chem 278: 35272-35278 (2003)]. Hsp70은 IKK γ 와 상호작용하지만 IKK 활성화를 저해한다[Ran R et al., Genes Dev 18: 1466-1481 (2004)]. 그 외, 단백질 포스파타제 2C β (PP2C β)와 IKK 복합체 간의 연관성이 확인되었으며, ELKs도 I κ B의 복합체로의 합류(recruitment)를 매개하는 IKK 복합체의 신규한 조절 서브유닛으로 동정되었다. 하지만, IKK/NF- κ B 활성화에 관련된 미토콘드리아 단백질은 동정된 바 없다.

- [7] 한편, 열충격 단백질 90 (Hsp90), Hsp60, 열충격 70kDa 단백질 9 (HSPA9/모르탈린)와 같은 분자 샤페론이 암세포의 미토콘드리아에서 높은 수준으로 발견되고, 상기 분자 샤페론의 "미토콘드리아-표적화"된 억제자가 원치 않은 세포 증식과 연관된 질환 치료를 위해 사용된다는 것이 알려진 바 있다[WO09/036092].

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 NF- κ B 경로의 활성화 기작을 이해하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 미토콘드리아 내 열충격 단백질로 작용하는 Hsp60이 세포질로 방출되어서 샤페론 활성화는 독립적으로 IKK α/β 와 직접적으로 상호결합하여 키나제의 인산화-의존적 활성화를 촉진시키고, 이로 인해 증가된 NF- κ B의 전사 활성을 통해 유도된 생존 유전자들에 의해 세포 내 ROS(reactive oxygen species)의 레벨을 감소시키며, 그에 따라 아폽토시스-유도 스트레스에 대한 세포 생존을 증가시킨다는 것을 밝혀내었다. 이에, 세포질 Hsp60의 발현 및/또는 활성을 억제하면 비정상적 세포 증식 관련 질환을 치료할 수 있음을 밝히고 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명의 목적은 비정상적 세포 증식 관련 질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법 및 키트를 제공하는 데 있다.
- [11] 상기 비정상적 세포 증식 관련 질환은 암, 염증성 질환 또는 이상증식 혈관 질환일 수 있다.
- [12] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 이해된다.

발명의 효과

- [13] 본 발명은 세포질 Hsp60의 억제제를 유효성분으로 포함하는 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료용 억제학적 조성물 및 이를 이용한 스크리닝 방법 및 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 세포질 Hsp60은 IKK 복합체와

상호작용하여 IKK 활성화 조절에 직접적으로 관여하며, 이를 통해 NF- κ B 경로가 활성화되어 세포 생존반응을 조절한다. 따라서, 세포질 Hsp60 유전자의 발현을 억제하거나 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 단백질 사이의 결합을 억제하여 암, 염증성 질환 또는 이상증식 혈관 질환과 같은 비정상적 세포 증식 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있고, 비정상적 세포 증식 관련 질환에 대한 신규한 치료제를 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1 내지 6은 IKK 복합체에서 Hsp60을 동정한 결과이다. 도 1. 친화성-정제된 IKK 복합체를 분리한 실버-염색 폴리아크릴아마이드 겔을 나타낸다. 도 2. Hsp60에 상응하는 단백질 밴드로부터 유래된 펩타이드들의 $[M + 2H]^{2+}$ 이온들에 대한 MS/MS 스펙트럼이다. 도 3. 친화성-정제된 IKK 복합체에서 IKK 서브유닛들 및 Hsp60의 면역블롯(IB) 분석 결과이다. 도 4. IKK α , IKK β 및 IKK γ -특이적 항체들을 이용하여 HeLa 세포 용해물(500 μ g의 총 단백질)로부터 IKK 복합체를 면역침전(IP)시켰다. IKK $\alpha/\beta/\gamma$ 서브유닛, Hsp60 및 Hsp90를 면역블롯하였다. WCL은 총 세포 용해물을 의미한다. 도 5. Hsp60과 IKK 복합체의 TNF- α -의존적 상호작용을 보여준다. 도 6. 세포질 분획에서 Hsp60과 IKK 복합체의 공동-면역침전 결과이다. 위쪽 패널은 HeLa 세포로부터 핵을 제거한 상층액(PNS), 세포질(Cyto) 및 미토콘드리아(Mito) 분획들을 면역블롯한 결과이다. COX4 및 튜블린은 각각 미토콘드리아 및 세포질 마커로 이용하였다. 아래쪽 패널은 대조군 염소 IgG 또는 항-Hsp60 항체(K-19 및 N-20)를 이용하여 세포질 분획으로부터 Hsp60을 면역침전시킨 결과이다. 대표적인 블롯이 보여진다($n = 3$).
- [15] 도 7은 단일-세포 레벨에서 Hsp60과 IKK 간의 상호작용을 시각화한 결과이다. HeLa 세포를 1차 항체 무처리(A), 항-Hsp60(B) 항-IKK α (C), 항-IKK β (D), 항-Hsp60/IKK α (E) 및 항-Hsp60/IKK β (F) 항체들과 면역반응시킨 후, 20 nm 또는 40 nm 골드 입자와 컨쥬게이션된 상응하는 2차 항체들로 표지하였다. 면역-골드 전자현미경을 이용하여 표지를 확인하였다. 핵(Nu) 및 미토콘드리아(M)가 표시되어 있다. 화살표는 Hsp60- 및 IKK-표지된 골드 입자들의 직접적인 부착을 나타낸다. 1차 항체를 처리하지 않은 시료(A)에서는 어떠한 면역반응성 신호도 나타나지 않았다. 실험은 동일한 결과로 두 번에 걸쳐서 반복되었고 대표적인 결과들이 제시된다.
- [16] 도 8 내지 12는 Hsp60이 IKK 복합체와 직접적으로 상호작용한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 8. Hsp60과 IKK 서브유닛들과 직접 결합한다는 것을 보여주는 결과이다. Hsp60c(HA tag)와 각 IKK 서브유닛 단백질(Flag tag)을 293T 세포에 24시간 동안 공동-트랜스펙션시켰다. 도 9. Hsp60이 IKK α 및 IKK β 와 시험관 내에서 결합한다는 것을 나타내는 결과이다. 글루타티온 세파로오스 비드에 결합되어 있는 GST-융합된 Hsp60 단백질은 His₆-태깅된 IKK

단백질을 발현하는 Sf9 곤충세포 용해물과 반응시켰다. Hsp60 및 IKK 단백질들은 각각 GST 및 HA 태그에 대한 면역블롯팅에서 검출되었다. 도 10. Hsp60의 결실 돌연변이들의 구조를 보여주는 모식도이다. PKA/PKG(1) 및 PKC(2)를 포함하는 키나제들의 잠재적인 인산화 위치가 표시되어 있다. 도 11 및 도 12. IKK α 를 이상 발현하는 293T 세포(도 11)의 IKK α 또는 HeLa 세포의 내인성 IKK 복합체(도 12)와 Hsp60 야생형(WT) 및 결실 돌연변이들 간의 상호작용을 보여주는 결과이다. 대표적인 블롯 및 이미지들이 제시된다(n = 3). 약어: C, 대조군 벡터; n.s, 비특이적(nonspecific).

- [17] 도 13 내지 17은 Hsp60-특이적 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드(AS-ODN)의 작용을 조사한 결과이다. 도 13. 두 개의 서로 다른 Hsp60 AS-ODNs을 보여주는 모식도이다. 도 14. ODN 처리 되지 않은(Mock) 또는 ODN-트랜스펙션된 HeLa 세포에서 Hsp60의 발현을 나타내는 결과이다. 도 15. ODN 처리 되지 않은(Mock) 또는 ODNs으로 트랜스펙션된 HeLa 세포에서 TNF- α -유도된 MAP 키나제 활성화를 조사한 결과이다. 포스포-특이적 항체를 이용하여 활성화 정도를 분석하였다. 동일 로딩량을 확인하기 위해 포스포블롯을 전체 단백질 항체로 재프로빙하였다. 도 16. ODN 처리 되지 않은(Mock) 또는 ODN-트랜스펙션된 HeLa 세포에서 다양한 전사인자들의 활성화를 보여주는 결과이다. AP-1 및 NF-AT 전사 활성화는 상피세포 성장인자(EGF, 100 ng/ml)에 의해 유도되었다. CRE 전사 활성화는 포스콜린(1 μ M)에 의해 유도되었다. 도 17. ODN 처리 되지 않은(Mock) 또는 ODNs으로 트랜스펙션된 293T 및 A549 세포에서 TNF- α -유도된 NF- κ B 전사 활성화를 측정된 결과이다. 도 16 및도 17 에서, 증가된 루시퍼라제 어레이 키트(Promega)를 이용하여 상대적인 루시퍼라제 활성을 측정하고 β -갈락토시다제 활성으로 표준화하였다. 데이터는 네 개의 독립적인 실험들의 평균값 $\pm$ 표준편차를 나타낸다(도 17에서, 자극된 S-ODN-트랜스펙션된 세포에 대하여 *P < 0.001 및 **P < 0.05).

- [18] 도 18 내지 23은 TNF- α 에 대한 반응에서 세포질 Hsp60의 손실은 IKK/NF- κ B 활성화를 감소시킨다는 것을 보여주는 결과이다. 도 18. 안티센스 ODNs에 의한 세포질 Hsp60의 제거를 보여준다. ODN 처리 되지 않은(Mock) 또는 ODN-처리된 HeLa 세포로부터 제조된 세포질 및 미토콘드리아 분획들을 면역블롯하였다: S, 센스 ODN; AS-1 및 AS-2, 안티센스 ODNs. 미토콘드리아 분획은 상응하는 세포질 분획의 1/5 용량으로 로딩하였다. 특히, 비특이적 미토콘드리아 파괴를 모니터링(watch)하기 위해, 미토콘드리아 매트릭스에 존재하는 항산화 효소인 Prx III를 미토콘드리아 마커로 이용하였다. 도 19. 사이클로헡사마이드로 단백질 합성을 억제한 후 이상-발현된 Hsp60c 단백질(HA tag)의 반감기를 측정한 결과이다. HA 밴드의 강도를 측정하고 IKK α 밴드의 양으로 표준화하였다. 그래프의 데이터는 두 개의 독립적인 실험의 평균값 $\pm$ 표준편차로 SigmaPlot 8.0 소프트웨어에 적용되었다. 도 20. 세포질 Hsp60c 단백질의 프로테아좀-의존적

턴오버를 보여주는 결과이다. 사이클로헥사마이드 처리 전, HeLa 세포가 MG132(5 μ M)로 30분 동안 전처리되거나 또는 전처리되지 않았다. 도 21. ODN 처리 되지 않은(Mock) 또는 ODN-트랜스펙션된 세포에서 TNF- α -유도된 IKK 및 JNK1 활성화를 보여주는 결과이다. 시험관 내 키나제 활성화(KA)은 두 개의 독립적인 실험으로부터 유래한 값들로 측정하였으며, 이는 자극되지 않고 ODN 처리 되지 않은(Mock) 세포(레인 1)와 비교하여 증가된 활성의 배수(fold increase)로서 표시되었다. 도 22. ODN 처리 되지 않은(Mock) 또는 ODN-트랜스펙션된 세포에서 NF- κ B 전사 활성을 측정한 결과이다. AS-ODN의 농도 증가(100 nM 또는 200 nM)에 따라 테스트되었다. 도 23. ODN 처리 되지 않은(Mock) 또는 ODNs으로 트랜스펙션된 세포에서 NF- κ B 전사 활성을 측정한 결과이다. 상대적인 루시페라제 활성을 β -갈락토시다제 활성으로 표준화하였으며 데이터는 네 개의 독립적인 실험들의 평균값 $\pm$ 표준편차를 나타낸다(자극된 S-ODN-트랜스펙션된 세포에 대하여 *P < 0.01, **P < 0.005).

[19] 도 24 내지 27은 Hsp60-특이적 항체가 IKK/NF- κ B 활성화를 차단한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 24. HeLa 세포의 세포질로 이동된 Hsp60-중화 항체(Hsp60N)를 나타내는 형광사진이다. 미토틱트랙커 레드(Molecular Probes, USA) 및 DAPI는 각각 미토콘드리아 및 핵을 나타낸다. 도 25. 운반된 Hsp60N 항체는 내인성 Hsp60에 결합한다. 항체 트랜스펙션 후, HeLa 세포 용해물을 단백질-A 세파로오스 비드로 면역침전시켰다. 침전된 단백질을 Hsp60에 대하여 면역블롯팅하였다. 도 26. 대조군 IgG 또는 Hsp60N 항체-트랜스펙션된 HeLa 세포에서 TNF- α 에 대한 반응으로 IKK 및 JNK1 활성화를 조사한 결과이다. 시험관 내 키나제 활성화(KA)은 두 개의 독립적인 실험으로부터 유래한 값들로 측정하였으며, 이는 자극되지 않고 대조군 IgG-트랜스펙션된 세포(레인 1)와 비교하여 증가된 활성의 배수로서 표시되었다. 도 27. 항체-트랜스펙션된 세포에서 TNF- α -유도된 NF- κ B 전사 활성화를 측정한 결과이다(자극된 IgG-트랜스펙션된 세포에 대하여 *P < 0.01).

[20] 도 28 내지 31은 Hsp60의 세포질-타겟된 발현이 TNF- α -유도된 IKK/NF- κ B 활성화를 촉진한다는 것을 보여주는 결과이다. 대조군(CGN) 또는 Hsp60c-인코딩 플라스미드(HA tag)를 세포에 24시간 동안 트랜스펙션시킨 후 TNF- α 를 처리하였다. 도 28. IKK 복합체에서 발견되는 이상-발현된 Hsp60c(HA tag)를 보여주는 결과이다. 도 29. HeLa 세포에서 TNF- α -유도된 IKK 활성화를 보여준다. 도 30. HeLa 세포에서 TNF- α -유도된 NF- κ B 활성화를 보여준다(n = 4; 자극되지 않은 대응자에 대하여 *P < 0.0001). 도 31. 트랜스펙션된 IKK $\beta^{-/-}$ 3T3 세포에서 TNF- α -유도된 NF- κ B 활성화를 보여준다(n = 4; 자극되지 않은 CGN-트랜스펙션된 세포에 대하여 *P < 0.0001; N.D, 검출되지 않음).

[21] 도 32 내지 35는 IKK/NF- κ B 신호전달에서 세포질 Hsp60(Hsp60c)의 선택적 기능을 보여주는 결과이다. 도 32. Hsp60c(HA tag)를 발현하는 HeLa 세포에서 TNF- α -유도된 JNK 활성화를 보여주는 결과이다. 도 33 내지 35. 대조군 벡터

또는 Hsp60c(HA tag)으로 트랜스펙션된 HeLa 세포에서 다양한 전사인자들의 활성화를 보여주는 결과이다. AP-1(도 33) 및 NF-AT(도 34) 전사 활성화는 상피세포 성장인자(EGF, 100 ng/ml)에 의해 유도하였다. CRE(도 35) 전사 활성화는 포스콜린(1 μ M)에 의해 유도되었다. 증가된 루시퍼라제 어세이 키트(Promega)를 이용하여 상대적인 루시퍼라제 활성을 측정하고 β -갈락토시다제 활성으로 표준화하였다. 데이터는 네 개의 독립적인 실험들의 평균값 $\pm$ 표준편차를 나타낸다.

- [22] 도 36 내지 41은 세포질 Hsp60이 샤페론 활성과는 독립적으로 IKK 인산화를 조절한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 36. IKK α 와 Hsp60c 야생형(WT) 및 돌연변이체들 간의 결합을 보여준다. 도 8에서 볼 수 있듯이, 지시된 단백질들을 293T 세포에서 공동-발현시켰다. 도 37 및 도 38. Hsp60c 야생형 및 샤페론-비활성 돌연변이들을 발현하는 세포에서 IKK 활성화(도 37) 및 NF- κ B 전사 활성화(도 38)를 보여주는 결과이다. 도 13 내지 17에서 기술된 바와 같이, 키나제 및 리포터 활성을 측정하였다(리포터 어세이를 위해, 자극되지 않은 대응자에 대하여 * $P < 0.0001$; $n = 6$). 도 39. 제조합 Hsp60 단백질의 존재 하에서 IKK의 시험관 내 키나제 활성을 보여주는 결과이다. IKK 복합체를 HeLa 세포 용해물로부터 면역침전시키고 키나제 반응 전에 지시된 GST 단백질(각각 20 μ g)과 함께 또는 GST 단백질 없는 상태로 키나제 반응 완충액에서 10분 동안 반응시켰다. 도 40. AS-1 ODN으로 트랜스펙션된 HeLa 세포에서 IKK α/β 의 세린 인산화를 측정한 결과이다. 그래프의 데이터는 평균값 $\pm$ 표준편차를 의미한다($n = 3$, * $P < 0.02$, ** $P < 0.001$). 도 41. Hsp60c-발현 HeLa 세포에서 IKK α/β 의 세린 인산화를 측정한 결과이다. 대표적인 블롯이 보여진다($n = 3$).

- [23] 도 42 내지 49는 세포질 Hsp60의 손실은 TNF- α 에 대한 반응에서 ROS 및 ASK-1 활성화를 유도함으로써 세포 사멸을 유도한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 42. ODN-트랜스펙션된 세포에서 항-아파토크 유전자들의 유도에 대한 RNase 보호 어세이 결과이다. 보여진 방사능 사진은 세 개의 독립적인 실험들의 대표적인 사진이다. 도 43 및 도 44. ODN-트랜스펙션된 세포(도 43) 및 항체-트랜스펙션된 세포(도 44)에서 내인성 NF- κ B 타겟 유전자들의 유도를 조사한 QPCR 결과이다($n = 3$, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$). 도 45. ODN-트랜스펙션된 세포에서 세포내 ROS의 TNF- α -매개된 생산을 보여주는 결과이다. 대표적인 이미지들이 보여진다. 데이터는 처리되지 않은(mock) 세포와 비교하여 상대적인 DCF 형광의 증가 배수를 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타낸 것이다($n = 4$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$). 도 46. ODN-트랜스펙션된 세포에서 JNK 및 p38 MAPK 활성화를 조사한 결과이다. 블롯들은 세 개의 독립적인 실험들의 대표적인 블롯이다. 도 47. ODN-트랜스펙션된 세포에서 ASK-1의 활성화를 나타내는 결과이다. 키나제 활성(KA)은 두 개의 독립적인 실험으로부터 유래한 값들로 측정하였으며, 이는 자극되지 않고 ODN 처리 되지 않은(Mock) 세포(레인 1)와 비교하여 증가된 활성의 배수로서 표시되었다. 도 48. ODN 처리 되지 않은(Mock) 또는

ODN-트랜스펙션된 HeLa 세포에서 TNF- α -유도된 세포 사멸을 보여주는 결과이다. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준편차를 나타낸다($n = 3$, $*P < 0.01$). 도 49. ODNs로 트랜스펙션된 대장암 세포에서 TNF- α -유도된 세포 사멸을 보여주는 결과이다. 세포내 분획들에서 Hsp60의 레벨이 측정되었다(위쪽 패널). 그래프 내의 데이터는 평균값 $\pm$ 표준편차를 나타낸다($n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$). 아넥신 V-플루오레신 이소티오사이네이트 및 프로피디움 이오다이드로 염색한 후 FACS를 이용하여 세포 사멸을 분석하였다.

- [24] 도 50 내지 55는 세포질 Hsp60은 IKK 활성화를 통해 스트레스-유도된 아폽토시스로부터 간세포를 생체 내에서 보호한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 50. HA-태깅된 인간 Hsp60c를 포함하는 트랜스제닉 벡터의 도식을 나타낸다. 도 51. 두 개의 트랜스제닉 마우스 라인(T4 및 T11)의 동정 결과이다. Hsp60 트랜스 유전자에 특이적인 두 개의 다른 세트의 PCR 프라이머를 이용하여 게놈 PCR을 실시하였다. 트랜스제닉 벡터(V) 및 C57BL/6j(B6) 마우스 게놈 DNA를 각각 양성 및 음성 대조군으로 이용하였다. 도 52. 트랜스제닉 마우스의 다양한 조직에서 Hsp60c 단백질의 발현을 조사한 결과이다. 항-HA 항체를 이용하여 조직 균질물(homogenates)을 면역블롯하였다. 도 53. TNF- α 가 정맥내 주입된 대조군 B6 마우스 또는 HA-Hsp60c-발현 트랜스제닉 마우스(T4 및 T11)의 간에서 IKK 활성화를 측정한 결과이다. 도 54 및 도 55. TUNEL 어세이에 의해 측정된 것과 같이, TNF- α 처리하거나 또는 처리하지 않은 대조군 및 트랜스제닉 마우스의 간에서 DEN-유도된 세포 사멸을 조사한 결과이다. 대표적인 이미지들(도 54)이 보여진다. 그래프 내의 정량적인 데이터(도 55)는 단위 면적 당 TUNEL-양성 세포의 수를 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타낸 것이다($n = 3$, 쌍으로 자극된 시료에 대하여 $*P < 0.01$).

- [25] 도 56 내지 57은 DEN이 간세포에서 아폽토시스를 유도한다는 것을 보여주는 결과이다. 4-주령 수컷 C57BL/6j 마우스에 DEN(10 mg/kg)을 복강내 주입하였다. 지시된 시간 동안 DEN을 처리한 후, 실험방법에 기술된 바와 같이 동물을 희생시켜 조직 절편 및 이미지들을 준비하였다. 마우스 당 세 개의 조직 절편들에서 TUNEL 양성 세포들을 카운팅하였다. 대표적인 이미지들(도 56)이 보여진다. 그래프 내의 정량적인 데이터(도 57)는 단위 면적 당 TUNEL-양성 세포의 수를 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타낸 것이다.

- [26] 도 58 내지 61은 세포질 Hsp60이 생물학적 시스템에서 생존에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 58 및 도 59. ODN-전처리된 BMM 세포를 M-CSF의 존재 하에서 RANKL(도 58) 또는 TNF- α (도 59)로 5일 동안 처리하였다. 실험방법에 기술된 바와 같이, TRAP-양성 다핵성 파골세포들을 카운팅하였다. 데이터는 두 개의 독립적인 실험 세트들 중 하나의 3중 실험군의 평균값 $\pm$ 표준편차를 나타내며, 두 개의 독립적인 실험 세트들은 유사한 결과를 보였다(도 58 및 도 59에서, 자극된 센스-ODN-트랜스펙션된 세포에 대하여 각각 $*P < 0.02$ 및 $*P < 0.001$). 대표적인 결과가 보여진다. 도 60. BMM 세포를 대조군

또는 Hsp60c-발현 레트로바이러스로 2일 동안 감염시켰다. 지정된 단백질의 발현을 면역블롯팅으로 분석하였다. 도 61. 실험방법에 기술된 바와 같이, BMM 세포를 지시된 레트로바이러스로 감염시킨 후, M-CSF의 존재 하에서 RANKL로 처리하였다. 데이터는 두 개의 독립적인 실험 세트들 중 하나의 3중 실험군의 평균값 $\pm$ 표준편차를 나타내며, 두 개의 독립적인 실험 세트들은 유사한 결과를 보였다(대조군 레트로바이러스 처리 세포에 대하여 $*P < 0.02$). 대표적인 결과가 보여진다.

- [27] 도 62 내지 64는 세포질 Hsp60의 결실은 풍선-손상된 혈관벽의 신생내막 층에서 평활근 세포의 아폽토틱 사멸을 초래한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 62. 손상된 경동맥 혈관벽에서 FITC-컨쥬게이션된 AS-ODN(AS-1)의 트랜스펙션 결과를 보여주는 사진이다. 화살표 머리는 신생내막 층에서 FITC 녹색 형광을 나타낸다. 혈관벽에서 탄력섬유(elastic fibers)가 자가-형광을 나타낸다. 도 63. 지시된 바와 같이, AS-ODN 처리되지 않은 군 또는 ODNs로 트랜스펙션된 풍선-손상된 경동맥 혈관벽에서 신생내막 두께 변화를 보여주는 결과이다. 실험재료 및 실험방법에 기술된 바와 같이, 경동맥 혈관을 절제하여 HE 염색으로 시각화하였다. 약자: L, 루멘; M, 중막; Av, 외막. 화살표는 신생내막 층을 나타낸다. 하단 그래프의 데이터는 중막층 면적에 대한 신생내막 두께의 백분율을 나타낸다(평균값 $\pm$ 표준오차; $n = 5$; $P < 0.01$). 대표적인 결과가 보여진다. 도 64. 손상된 경동맥 혈관의 신생내막 층에서 평활근세포의 아폽토틱 사멸을 보여주는 결과이다. 경동맥 혈관을 절제하여 α -평활근 액틴 및 TUNEL로 염색하였다. 세포 핵을 검출하기 위해 절편들을 DAPI로 카운터-염색하였다. 하단 그래프의 데이터는 중막층 면적에 대한 신생내막 두께의 백분율을 나타낸다(평균값 $\pm$ 표준오차; $n = 6$; $P < 0.0001$). 대표적인 결과가 보여진다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 세포질 Hsp60(heat shock protein 60 kDa)의 억제제를 유효성분으로 포함하는 비정상적 세포 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [29] 일반적으로, 열충격 단백질 60(Hsp60)은 미토콘드리아 샤페론으로서 세포질에서 미토콘드리아 매트릭스로 들어오는 단백질의 리폴딩에 관여한다. 즉, Hsp60은 선형 아미노산 사슬을 3차원적 구조로 폴딩시키는 데 도움을 주는 샤페로닌으로서 기능한다.
- [30] 본 발명자들은 Hsp60이 샤페론 활성과는 독립적으로 세포질 내에서 IKK α/β 와 직접적으로 상호결합하여 키나제의 인산화-의존성 활성화를 촉진시키고, 이로 인해 증가된 NF- κ B의 전사 활성을 통해 유도된 생존 유전자들에 의해 세포 내 ROS의 레벨이 감소됨에 따라 아폽토시스-유도 스트레스에 대한 세포 생존율이 증가되는 세포질 Hsp60의 신규한 생존 촉진(pro-survival) 기능을 확인하였다. 대부분의 미토콘드리아 열충격 단백질은 세포질로 나오면 세포 사멸을

유도하나, 본 발명자들은 세포질로 나온 Hsp60이 세포 생존을 촉진시킴을 밝혀내었다.

- [31] 본 발명은 IKK/NF- κ B 활성화에 포함된 미토콘드리아-유래 세포질 Hsp60 단백질의 기능을 규명한 최초의 보고이다. 본 발명에 따르면, 세포질 Hsp60은 IKK 복합체와 상호작용하여 IKK 활성화 조절에 직접적으로 관여하며, 이를 통해 NF- κ B 경로가 활성화되어 세포 생존반응이 활성화된다. 본 발명의 구체예에서, 본 발명자들은 심근세포, 간세포, 파골세포 등에서 세포질 Hsp60은 생존신호 기능을 수행한다고 알려진 IKK와 직접 상호작용하여 IKK를 활성화시킴으로써 NF- κ B 타겟 유전자 발현을 통해 미토콘드리아-유래 ROS를 감소시키는 생존 인자로서 기능한다는 것을 밝혀내었다. 따라서, 본 발명은 Hsp60과 IKK의 상호작용을 억제하거나 또는 세포질 Hsp60의 레벨을 감소시키는 세포질 Hsp60 억제제를 이용하여 비정상적 세포 증식 관련 질환을 치료하는 약제학적 조성물을 제공한다. Hsp60의 결핍이 미토콘드리아의 기능적 손상을 유발한다고 알려져 있기 때문에, 본 발명은 Hsp60의 미토콘드리아 레벨에는 영향을 미치지 않고 세포질 레벨만을 조절하는 세포질 Hsp60 억제제를 사용한다. 본 발명의 세포질 Hsp60 억제제는 미토콘드리아 레벨에는 영향을 미치지 않으므로 정상세포에는 영향을 미치지 않고, 비정상적으로 증식된 세포에서 세포질 내 Hsp60에만 선택적으로 영향을 미침으로써, 정상세포에서의 독성 부작용 없이 비정상적 증식 세포 선택적으로 세포 사멸을 유도할 수 있다.
- [32] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 세포질 Hsp60은 IKK 복합체와 상호작용하며, 보다 바람직하게는 IKK α 또는 IKK β 와 결합한다.
- [33] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 세포질 Hsp60은 IKK α/β T-루프의 세린-인산화(Ser178/181)를 촉진시켜 IKK 복합체를 활성화시킨다.
- [34] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 세포질 Hsp60은 NF- κ B 경로를 활성화시키며, 이러한 활성화는 NF- κ B-의존적 생존 유전자들의 발현을 유도하여 아폽토시스-유도 스트레스에 대한 세포 생존율을 증가시킨다. 보다 바람직하게는, 상기 스트레스는 TNF- α 또는 디에틸니트로사민(diethylnitrosamine, DEN)이다.
- [35] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 세포질 Hsp60의 억제는 스트레스(예컨대, TNF- α , DEN)에 의해 세포 내에서 촉발되는 ROS의 증가를 초래하여 ASK-1(Apoptosis signal-regulating kinase 1)을 통해 JNK(c-Jun N-terminal kinase)/p38의 지속적인 활성화를 야기시켜 세포사멸을 유발한다.
- [36] 본 명세서에서 용어 "세포질 Hsp60의 억제(inhibition of the cytosolic Hsp60)"는 세포질 Hsp60 유전자의 발현 억제 또는 세포질 Hsp60 단백질의 활성 억제를 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 세포질 Hsp60 단백질의 활성, 즉 세포질 Hsp60 단백질과 IKK와의 상호작용을 억제하는 것이다. 보다 상세하게는, 세포질 Hsp60의 억제는 IKK 복합체와의 상호작용을 억제하여 IKK α/β T-루프의

세린-인산화(Ser178/181)의 감소를 유발하고, 그로 인해 IKK 복합체의 활성화를 저해시켜 NF- κ B 신호전달을 억제 또는 감소시키는 것이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 세포질 Hsp60에 대한 안티센스

올리고데옥시뉴클레오타이드-1(AS-1 ODN, 서열번호 3)을 사용하여 세포질 Hsp60 단백질의 발현을 억제하였고, Hsp60 중화항체(Hsp60N)를 사용하여 세포질 Hsp60 단백질의 IKK 복합체와의 상호작용을 억제하였다. 그 결과, IKK 활성화 및 NF- κ B의 전사활성이 감소되고, JNK1이 활성화되었다(도 18 내지 27).

- [37] 본 발명에 따르면, 세포질 Hsp60의 억제는 IKK 복합체와의 상호작용을 통해 매개되는 NF- κ B 신호전달을 억제하고, 보다 바람직하게는 IKK α 또는 IKK β 와의 상호작용을 통해 매개되는 신호전달을 억제한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 세포질 Hsp60의 억제는 세포 내 NF- κ B 신호전달의 억제 또는 감소를 유발하여 다운스트림 신호전달 분자들의 발현 또는 활성을 감소시킨다. 이러한 NF- κ B 신호전달의 억제 또는 감소는 미토콘드리아 보호 유전자들의 발현 억제를 유발하여 세포 생존율을 감소시킨다.

- [38] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 세포질 Hsp60은 NF- κ B-의존적 생존 유전자들의 발현 유도를 통해 미토콘드리아-유래된 ROS 레벨을 감소시킨다. 본 발명의 구체예에서, 세포질 Hsp60의 제거는 TNF- α 에 대한 반응에서 세포 내 ROS의 증가를 초래하고 이는 ASK-1을 통한 JNK/p38의 지속적인 활성화로 이어져 결국 세포 사멸을 유발하였다.

- [39] 상술한 바와 같이, 본 발명의 세포질 Hsp60의 억제는 IKK/NF- κ B 활성화를 억제하여 세포 생존율을 감소시킨다. 이러한 IKK/NF- κ B 활성화의 억제는 NF- κ B에 의해 조절되는 생존 유전자들의 발현을 감소시킴으로써, 다양한 약리학적 활성을 발휘한다. 보다 상세하게는, 본 발명의 세포질 Hsp60의 억제는 IKK 활성화에 영향을 주어 NF- κ B 신호전달을 저해하고, 이에 따라 MnSOD 및 Bfl-1/A1 같은 생존 유전자들의 발현을 감소시켜 세포 내 ROS 레벨을 증가시킴으로써 이상 생존하는 세포의 사멸을 유도할 수 있다. Bfl-1/A-1는 tBid 및 Bak 길항제로 작용[Wang CY et al., Mol Cell Biol 19: 5923-5929 (1999)]하고 MnSOD는 미토콘드리아 내부의 과산화 음이온(superoxide anion)을 제거[Wong GH et al., Cell 58: 923-931(1989)]하기 때문에, 두 유전자는 미토콘드리아-유래된 ROS의 조절에 매우 중요하다.

[40]

- [41] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 포함되는 세포질 Hsp60의 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 올리고뉴클레오타이드, 항체, 단일사슬 가변영역 단편, 펩타이드, 앵타머, 저분자량의 화합물 또는 천연추출물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [42] 바람직하게는, 세포질 Hsp60 단백질의 발현 억제제는 Hsp60 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드이고, 보다 바람직하게는 안티센스

올리고뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 안티센스
올리고데옥시뉴클레오타이드(ODNs)이다.

- [43] 본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. Hsp60에 대한 안티센스 서열은 Hsp60 mRNA에 상보적이고 Hsp60 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, Hsp60 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 바람직하게는, 인간 Hsp60 ORF(open reading frame)의 서열(서열번호 1 또는 서열번호 2)에 상보적인 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드(AS-ODN)를 제작한다. 보다 바람직하게는 ORF의 출발코돈 주위를 포함하는 서열을 대상으로 하며, 필요에 따라서는 ORF 내의 모든 부위를 대상으로 T_m 값이 높은 서열을 포함하여 제작할 수 있다. 본 발명의 구체예에서는 ORF의 출발코돈에서부터 3' 말단까지 전 서열에 걸쳐 고르게 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 디자인하여 사용하였다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이며, 보다 더 바람직하게는 10-25 염기이고, 가장 바람직하게는 12-20 염기이다. 본 발명의 구체예에서 사용된 AS-1 ODN(서열번호 3)은 Hsp60 mRNA 전사체의 MTS(mitochondrial targeting signal)-코딩 부위를 타겟한다. 본 발명의 다른 구체예에서 사용된 AS-2 ODN(서열번호 4)은 오프 타겟 가능성을 배제하기 위하여, Hsp60 ORF의 MTS 서열 이후에 위치한 5'-말단 근처 부위(개시 코돈으로부터 +95 - +110 부위)를 타겟한다. 또한, ORF 내의 모든 부위를 타겟으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 모두 본 발명의 목적을 달성할 수 있음을 추가로 확인하기 위하여, AS-2 ODN 타겟 서열의 다운스트림 서열에 대하여 서열번호 5 (AS-3 ODN), 서열번호 6(AS-4 ODN) 및 서열번호 7(AS-5 ODN)의 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드를 제작하여 사용하였다.

- [44] 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드는 약한 번역 차단제로서 작용하기 때문에 총 Hsp60 레벨의 감소를 유발하지는 않지만, 세포질에 위치하는 Hsp60은 마이토콘드리아에 존재할 때와 비교하여 반감기가 짧아져, 더 빠른 턴오버를 나타내고, 결국 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 처리에 의해 세포질 Hsp60의 레벨이 감소된다.

- [45] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 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)). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수

있다. 또한, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 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-데아자구아닌, N6 (6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다멘탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[46] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA를 합성하는 한 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[47] 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 디자인은 당업계에 공지된 인간 Hsp60의 mRNA 서열을 참조하여 할 수 있다. 예를 들어, 상술한 바와 같이, 인간 Hsp60 mRNA의 CDS(coding sequence)에 상보적인 서열, 출발코돈과 그 주위 서열에 대한 상보적인 서열, 5'-UTR에 상보적인 서열, 3'-UTR에 상보적인 서열 등으로 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 디자인할 수 있다. 본 발명의 구체예에서는 ORF의 출발코돈에서부터 3' 말단까지 전 서열에 걸쳐 고르게 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 디자인하여 사용하였다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 디자인 및 합성에 대한 상세한 설명은 문헌 [Weiss, B. (ed.): Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA: Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Weiss, B., et al., Cell. Mol. Life Sci., 55: 334-358 (1999)]에

개시되어 있으며, 이 문헌은 참조로서 본 명세서에 포함된다.

- [48] 본 명세서에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 킥다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다.
- [49] 본 발명에서 siRNA 분자가 이용되는 경우, 센스 가닥, 즉 Hsp60 mRNA 서열에 상응하는(corresponding) 서열과 안티센스 가닥, 즉 Hsp60 mRNA 서열에 상보적인 서열이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다.
- [50] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(mismatch, 대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(bulge, 일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 인간 Hsp60 ORF의 시작 코돈 주위의 서열에 상보적인 siRNA를 제작한다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다.
- [51] siRNA 말단 구조는 Hsp60 유전자의 발현을 RNA 간섭(RNAi) 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.
- [52] 본 발명에서 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-엔드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-엔드-루프 구조는 시험관 내 또는 생체 내에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.
- [53] 본 발명에서 세포질 Hsp60의 억제제, 특히 활성 억제제는 바람직하게는 Hsp60에 특이적으로 결합하는 항체, 단일사슬 가변영역 단편, 펩타이드, 저분자량의 화합물 또는 천연추출물이다.
- [54] 본 발명에서 이용될 수 있는 Hsp60 단백질에 특이적으로 결합하여 활성을 억제하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이다. Hsp60 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler et al., European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해

제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 문헌[Harlow, E. et al., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991]에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 포함된다. 예를 들어, 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 Hsp60 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다. 본 발명의 구현예에서는, Hsp60 단백질에 특이적으로 결합하여 세포질 Hsp60 응집체를 형성하는 폴리클로날 중화항체를 이용하여 세포질 Hsp60이 IKK와 결합하는 것을 억제하였다.

- [55] 본 발명에서 항체는 단일사슬 가변영역 단편(scFv)을 포함할 수 있다. 상기 단일사슬 가변영역 단편은 "경사슬의 가변성 부위(VL)-링커-중사슬의 가변성 부위(VH)"로 구성될 수 있다. 상기 링커는 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위를 인위적으로 연결하는 작용을 하는 일정 길이의 아미노산 서열을 의미한다.
- [56] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형 또는 환형, 바람직하게는 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수 있다(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)). Hsp60에 특이적으로 결합하여 Hsp60의 활성을 억제할 수 있는 펩타이드는 당업계에 공지된 통상의 방법, 예를 들어 파아지 디스플레이 방식으로 얻을 수 있다(Smith GP, Science 228 (4705):1315-1317 (1985); Smith GP, Petrenko VA, Chem. Rev. 97(2):391-410 (1997)). 상기 펩타이드는 4-40, 바람직하게는 5-30, 보다 바람직하게는 5-20, 가장 바람직하게는 8-15 아미노산 잔기의 펩타이드일 수 있다. 상기 펩타이드는 선형 또는 환형일 수 있다.
- [57] 본 발명의 펩타이드는 아미노산 잔기를 변형시킴으로써 더욱 더 안정성을 향상시킬 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 펩타이드의 아미노산 서열에서 적어도 하나의 아미노산, 바람직하게는 N-말단에 Gly 잔기, 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 가장 바람직하게는 Gly 잔기가 결합되어, 펩타이드의 안정성을 증가시킨다.
- [58] 본 발명의 펩타이드의 N-말단에 Gly 잔기가 추가적으로 결합되는 경우, 추가적 Gly 잔기의 개수는 1-8개, 바람직하게는 2-6개, 보다 바람직하게는 2-4개, 가장

바람직하게는 3개이다.

- [59] 본 명세서에서 용어 "앱타머(aptamer)"는 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 올리고뉴클레오타이드 분자를 말한다. 앱타머는, 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앱타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 올리고뉴클레오타이드 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 본 발명의 앱타머는 또한, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 본 발명의 앱타머의 길이는 특별히 한정되지 않고, 통상 약 15~약 200 뉴클레오타이드일 수 있지만, 예컨대 약 100 뉴클레오타이드 이하이고, 바람직하게는 약 80 뉴클레오타이드 이하이며, 보다 바람직하게는 약 60 뉴클레오타이드 이하이고, 가장 바람직하게는 약 45 뉴클레오타이드 이하일 수 있다. 본 발명의 앱타머의 길이는 또한, 예컨대 약 18, 20 또는 25 뉴클레오타이드 이상일 수 있다. 총 뉴클레오타이드 개수가 적으면 화학합성, 화학수식 및 대량 생산이 보다 용이하고, 경제적이며, 생체 내 안정성은 높으면서 독성은 낮아 유리하다.

- [60] 본 발명의 앱타머는 SELEX법 및 그 개량법[예컨대 Ellington et al., Nature, 1990 346, 818-822; Tuerk et al., Science, 1990 249, 505-510]을 이용함으로써 제작할 수 있다. SELEX법이란, 10-14개 정도의 상이한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 풀로부터, 표적 물질에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 선별해오는 방법이다. 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 40잔기 정도의 랜덤 서열을 프라이머 서열로 끼운 구조를 하고 있다. 이 올리고뉴클레오타이드 풀을 표적 물질과 회합시켜, 필터 등을 이용하여 표적 물질에 결합한 올리고뉴클레오타이드만 회수한다. 회수한 올리고뉴클레오타이드를 RT-PCR로 증폭하고, 이것을 다음 라운드의 주형으로서 이용한다. 이 작업을 10회 정도 반복함으로써 표적 물질과 특이적으로 결합하는 앱타머를 취득할 수 있다. SELEX법으로는 라운드수를 늘리거나 경합 물질을 사용함으로써, 표적 물질에 대하여 보다 결합력이 강한 앱타머를 농축하고, 선별할 수 있다. 따라서, SELEX의 라운드수를 조절하고/하거나 경합 상태를 변화시킴으로써, 결합력이 상이한 앱타머, 결합 형태가 상이한 앱타머, 결합력이나 결합 형태는 동일하지만 염기 서열이 상이한 앱타머를 얻을 수 있다. 또한, SELEX법에는 PCR에 의한 증폭 과정이 포함되지만, 그 과정에서 망간 이온을 사용하는 등으로 변이를 부여함으로써, 보다 다양성이 풍부한 SELEX를 행하는 것이 가능해진다.

- [61] 또한, 앱타머는 종래 SELEX 기법 이외에, 복합 타겟, 즉 살아있는 세포 및 조직에 대해 Cell-SELEX 기법을 이용하여 얻을 수 있는데(Guo et al., Int. J. Mol. Sci., 9(4): 668, 2008), Cell-SELEX 기법은 표면 마커 타겟이 알려져 있지 않을 때조차도, 질환 세포에 대한 앱타머를 개발할 수 있게 하는 장점이 있다. 게다가, 분리된 상태에서는 그 본래의 특성을 나타내지 않을 수도 있어, 생리적 상태에 있는 타겟 단백질은 선별과정에서 더 기능적인 접근을 가능하게 하기 때문에,

Cell-SELEX 기법은 종래의 SELEX 과정에 비하여 장점을 가지고 있다.

- [62] 한편, 앵타머는, 인산기의 음전하를 이용한 이온결합, 리보오스를 이용한 소수성 결합 및 수소결합, 올리고뉴클레오타이드염기를 이용한 수소결합이나 스택킹(stackings)결합 등 다양한 결합 양식에 의해 표적 물질과 결합한다. 특히, 구성 뉴클레오타이드의 수만큼 존재하는 인산기의 음전하를 이용한 이온결합은 강하게 단백질의 표면에 존재하는 라이신이나 아르기닌의 양전하와 결합한다. 이 때문에, 표적 물질과의 직접적인 결합에 관련되어 있지 않은 올리고뉴클레오타이드염기는 치환할 수 있다. 특히, 스템 구조의 부분은 이미 염기쌍이 만들어져 있고, 또한 이중 나선 구조의 내측을 향하고 있기 때문에, 올리고뉴클레오타이드 염기는 표적 물질과 직접 결합하기 어렵다. 따라서, 염기쌍을 다른 염기쌍으로 치환하여도 앵타머의 활성은 감소하지 않는 경우가 많다. 루프 구조 등 염기쌍을 만들지 않은 구조에서도 올리고뉴클레오타이드 염기가 표적 분자와의 직접적인 결합에 관여하지 않는 경우에, 염기의 치환이 가능하다. 예컨대, 리보오스의 2' 위치에 있어서, 히드록실기가 임의의 원자 또는 기로 치환되어 있는 뉴클레오타이드일 수 있다. 이러한 임의의 원자 또는 기로서는, 예컨대, 수소 원자, 불소 원자 또는 -O-알킬기(예:-O-CH₃), -O-아실기(예, -O-CHO), 아미노기(예, -NH₂)로 치환되어 있는 뉴클레오타이드를 들 수 있다. 이와 같이 앵타머는 표적 분자와의 직접적인 결합에 관련되어 있는 관능기를 치환 또는 제거하지 않는 한 그 활성을 유지한다.
- [63] 또한, 앵타머는 화학 합성이 가능하기 때문에 개질이 용이하다. 앵타머는 MFOLD 프로그램을 이용하여 2차 구조를 예측하거나, X선 해석이나 NMR 해석에 의해 입체 구조를 예측함으로써, 어떤 뉴클레오타이드를 치환 또는 결손하는 것이 가능한지, 또한 어디에 새로운 뉴클레오타이드를 삽입 가능한지 어느 정도 예측할 수 있다. 예측된 새로운 서열의 앵타머는 용이하게 화학 합성할 수 있고, 그 앵타머가 활성을 유지하고 있는지의 여부를 기존의 분석계에 의해 확인할 수 있다.
- [64] 본 발명의 앵타머는, 결합성, 안정성, 약물 전달능 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오타이드의 당잔기(예, 리보오스)가 수식된 것일 수 있다. 당잔기에서 수식되는 부위로서는, 예컨대 당잔기의 2'위치, 3'위치 및/또는 4' 위치의 산소원자를 다른 원자로 치환한 것 등을 들 수 있다. 수식의 종류로서는, 예컨대 플루오로화, O-알킬화(예, O-메틸화, O-에틸화), O-알릴화, S-알킬화(예, S-메틸화, S-에틸화), S-알릴화, 아미노화(예, -NH)를 들 수 있다. 이러한 당잔기의 개질은, 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 행할 수 있다(예컨대, Sproat et al., Nucle. Acid. Res. 1991 19, 733-738; Cotton et al., Nucl. Acid. Res. 1991 19, 2629-2635; Hobbs et al., Biochemistry 1973 12, 5138-5145 참조).
- [65] 본 발명의 앵타머는 또한, 결합성 등을 높이기 위해, 올리고뉴클레오타이드염기(예, 푸린, 피리미딘)가 개질(예, 화학적 치환)된 것일 수 있다. 이러한 개질로서는, 예컨대 5위 피리미딘 개질, 6 및/또는 8위 푸린

개질, 환외(環外) 아민에서의 개질, 4-티오우리딘으로의 치환, 5-브로모 또는 5-요오드-우리실으로의 치환을 들 수 있다.

- [66] 또한 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성하도록, 본 발명의 앵타머에 포함되는 인산기가 개질될 수 있다. 예컨대 P(O)O기가, P(O)S(티오에이트), P(S)S(디티오에이트), P(O)NR₂(아미데이트), P(O)R, R(O)OR', CO 또는 CH₂(포름아세탈) 또는 3'-아민(-NH-CH₂-CH₂-)으로 치환될 수 있다 [여기서 각각의 R 또는 R'은 독립적으로, H이거나, 또는 치환되거나, 또는 치환되지 않은 알킬(예, 메틸, 에틸)이다]. 연결기로서는, -O-, -N- 또는 -S-가 예시되고, 이들의 연결기를 통하여 인접하는 뉴클레오타이드에 결합할 수 있다.
- [67] 개질은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 개질을 포함할 수 있다. 개질은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 올리고뉴클레오타이드, 뉴클레오시드, Myristoyl, Lithocolic-oleyl, Docosanyl, Lauroyl, Stearoyl, Palmitoyl, Oleoyl, Linoleoyl, 그 외 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 항암제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등을 말단에 부가함으로써 행해질 수 있다. 이러한 개질에 대해서는, 예컨대 미국특허 제5,660,985호, 미국특허 제5,756,703호를 참조한다.
- [68] 또한, 앵타머를 리포솜이나 나노입자의 표면에 부착함으로써, 리포솜이나 나노입자 내부에 탑재된 항암제, 독신, 암성장 저해 유전자, siRNA 등을 표적 세포로 선택적으로 전달할 수 있다.
- [69] Hsp60의 활성을 억제하는 저분자량의 화합물 또는 천연추출물은 후술하는 스크리닝 방법을 통하여 용이하게 얻을 수 있다.
- [70] 가장 바람직하게는, 본 발명의 조성물에서 이용되는 유효성분은 Hsp60에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 상세한 설명은 위에 기재된 것과 동일하다.
- [71] 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 목적의 질환을 치료하는 경우, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 내로 유입되어야 한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 세포 내로 유입시키는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 당업계에 공지된 다양한 물질을 이용하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 리포솜에 포집시켜 세포 내로 유입시킬 수 있다. 또한, 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 적합한 CPP(cell penetration peptide)에 연결하여 세포 내로 유입시킬 수 있다. 예컨대, 사용 가능한 CPP는 당업계에 공지된 다양한 CPP를 포함하며, 예를 들어, 페네트라틴(penetratin) 펩타이드, HIV-1의 Tat 펩타이드, 트랜스포탄(transportan) 펩타이드, 부포린(Buforin) II 펩타이드, MAP(모델 양친매성 펩타이드), k-FGF 펩타이드, 프라이온 펩타이드, pVEC 펩타이드, pep-1 펩타이드, SynB1 펩타이드, pep-7 펩타이드, HN-1 펩타이드, 아르기닌 폴리머를 포함하는 펩타이드, Antp(Antennapedia 또는 penetratin) 펩타이드, Mph-1 펩타이드, HSV-1의 VP22 펩타이드 및 청어 프로타민의 HP4 펩타이드를 포함하지만, 이에 한정되는 것은

아니다.

- [72] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 세포질 Hsp60의 억제제의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.
- [73] 본 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 상술한 억제제가 세포질 Hsp60의 발현 또는 활성을 억제하기에 충분한 양을 의미한다.
- [74] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [75] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 세포질 Hsp60의 억제제, 또는 이를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 비정상적 세포 증식 관련 질환의 치료방법에 관한 것이다. 상기에서 투여는 경구 또는 비경구 투여일 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 점막 투여, 점안 투여 등일 수 있다.
- [76] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg(체중)이다.
- [77] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [78] 본 발명에서 '비정상적 세포 증식 관련 질환'이란 세포의 비정상적 증식으로 인해 야기되는 질환을 의미하며, 이러한 질환으로는 암 질환, 염증성 질환, 이상증식 혈관 질환 등을 예로 들 수 있다.
- [79] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 '암 질환'은 생체 조직 안에서

세포가 무제한으로 증식하여 악성 종양을 일으키는 현상을 일컫는 용어로서, 본 발명의 조성물을 사용하여 예방 또는 치료될 수 있는 암은 뇌암, 신경내분비 암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 신장암, 방광암, 부신암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[80] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 '염증성 질환'은 염증을 유발하는 질환을 모두 포함하는 개념이며, 염증은 면역 적격 세포가 외부 개체 또는 항원성 단백질에 대한 반응에서 활성화되는 경우 일어난다. 염증성 과정은 침입 개체가 식세포화 되거나 중화되도록 하는 경우에서와 같이 유리할 수 있지만, 또한 골 및 연골의 파괴 및 결과적인 관절 기능의 제한을 야기하는 때의 관절염의 경우에서와 같이 해로울 수도 있다. 염증성 반응은 통상 외상 또는 항원, 예컨대 바이러스성, 박테리아성, 원생동물성, 또는 진균성 항원에 의해 유도된다.

[81] 본 발명에 의한 예방 또는 치료에 적합한 염증성 질환에는 염증-유도 골질환, 퇴행성 관절염, 당뇨병, 자가면역 근육염, 동맥경화, 뇌졸중, 간경화, 뇌막염, 염증성 위궤양, 담낭 결석, 신장 결석, 부비강염, 비염, 결막염, 천식, 피부염, 염증성 장질환, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 염증성 피부 질환, 및 유육종증 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 바람직하게 본 발명의 염증성 질환은 a) 류마티스 염증성 질환인 퇴행성 관절염(rheumatoid arthritis), 전신성 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus), 강직성 척추염(Ankylosing spondylitis), 베체트 병(Behcet's disease), 자가면역 근육염(inflammatroy mysitis), b) 장 염증성 질환인 궤양성대장염(ulcerative colitis), 크론병(Crohn disease), c) 피부염증성 질환인 건선(psoriasis), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염, 습진성 피부염, 지루성 피부염, 편평 태선(lichen planus), 만성 단순태선(lichen simplex chronicus), 천포창(pemphigus), 불러스 천포창, 표피 수포증(Epidermolysis Bullosa), 담마진(Urticaria), 혈관 부종(angioedema), 맥관염(vasculitis), 홍반 또는 피부 호산구증다증(Eosinophilia), 화폐상 피부염(nummular dermatitis), 전신성 박탈 피부염, 정체 피부염, 모낭 및 여드름과 같은 피지샘의 질환, 입 주위 피부염, 수염 가성모낭염 및 약물 발진, 다형 홍반(erythema multiforme), 결절홍반(Erythema nodosum), 및 환상 육아종(Granuloma annulare)과 같은 염증 반응, 및 d) 이외의 염증성 위궤양(ceciac disease), 뇌막염(encephalitis), 골반염증성질환(PID: Pelvic Inflammatory Disease) 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[82] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 '염증-유도 골질환'은 골 발생 질환, 골 골절, 골의 노인성 손실, 연골이영양증, 고칼슘혈증, 과골화증, 불완전골형성증, 골연화증, 골수염, 골다공증, 파젯병, 골관절염 또는 구루병을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[83] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 '이상증식 혈관 질환'은 혈관에

존재하는 세포, 특히 혈관 평활근 세포의 과도한 증식에 의해 야기되는 질환 또는 질병을 의미한다. 이상증식 혈관 질환은 다양한 질환을 포함하며, 예를 들어, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 재발협착증 및 협착증, 혈관 기형, 혈액투석과 관련된 혈관 통로 협착, 이식 후 동맥병증(transplant arteriopathy), 맥관염, 혈관염증질환, 디조지 증후군, 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT), 해면상혈관종, 켈로이드성 반흔, 화농성 육아종, 수포질환, 카포시 육종, 과증식성 유리체 증후군, 미숙아 망막증, 맥락막 신생혈관, 황반변성, 당뇨병성 망막증, 안내 신생혈관증식, 원발성 폐고혈압증, 천식, 비폴립(nasal polyps), 염증성 장 및 치주 질환, 복수, 복막 유착, 피임, 자궁내막증, 자궁출혈, 난소낭, 난소과자극증후군, 관절염, 류마티스성 관절염, 만성 관절류마티즘, 윤활막염, 골관절염, 골수염, 골증식, 폐혈증, 혈관누출 증후군, 암, 감염성 질환 또는 자가면역질환을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 이상증식 혈관 질환은 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 재발협착증 또는 협착증이다. 아테롬성 동맥경화증은 동맥의 내층에 지방 물질이 침착되거나 섬유화(fibrosis)되어 있는 질환이다. 한편, 재발협착증은 혈관벽이 손상(traumatization)된 후 혈관 통로가 좁혀지는 질환이다. 동맥경화 진행과 스텐트 삽입술 후에 발생하는 혈관 재발협착증은 혈관평활근 세포의 증식, 이동 그리고 세포외 기질(extracellular matrix)의 분비 등에 기인한다고 알려져 있다(Circulation, 1997, 95, 1998-2002; J. Clin. Invest. 1997, 99, 2814-2816; Cardiovasc. Res. 2002, 54, 499-502). 이에, 동맥경화의 진행과 혈관 재협착의 방지를 위해 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 약물에 대한 연구가 널리 진행되고 있다(J. Am. Coll. Cardiol., 2002, 39, 183-193).

- [84] 본 발명의 '예방 또는 치료'에서 '예방'이란 세포질 Hsp60 억제제를 포함하는 약제학적 조성물의 투여로 인한 세포질 Hsp60 단백질의 활성 증가에 따르는 모든 질환의 발병을 억제시키거나 발병을 지연하는 모든 행위를 말하며, '치료'란 상기 약제학적 조성물의 투여로 세포질 Hsp60 단백질의 활성 증가로 인한 모든 질병을 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [85] 본 발명의 구체예에서, 세포질 Hsp60 억제제로서 Hsp60 AS-ODN은 세포질 Hsp60의 레벨이 증가된 대장암 세포주에서 TNF- α -유도된 세포 사멸을 증가시켰다(도 49).
- [86] 또한, 본 발명의 구체예에서, 본 발명자들은 Hsp60 AS-ODN이 생체 내 NF-kB-의존적 염증 반응을 억제할 수 있는 지 여부를 실험하였다. 더욱 구체적으로, 최근에 IKK 복합체가 파골세포 형성과정 동안 RANKL로부터 NF-kB로의 생존 경로를 매개한다는 것이 보고되었는 바, 본 발명자들은 염증-유도 골 소실과 관련하여 파골세포 분화에서의 Hsp60 AS-ODN의 효과를 확인하였다.
- [87] 골재형성에는 크게 두 종류의 세포가 관여하는데, 두 세포 중 하나는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)이고, 다른 하나는 뼈를 파괴하는

파골세포(osteoclast)이다. 조골세포는 RANKL과 이것의 유도 수용체(decoy receptor)인 OPG(osteoprotegerin)를 생성한다. RANKL이 파골 전구세포(osteoclast progenitor cells) 표면에 있는 수용체인 RANK(receptor activator of nuclear factor- κ B)에 결합하면 파골 전구 세포가 파골세포로 성숙화(maturation)되어 골 흡수(bone resorption)가 일어난다. 하지만, OPG가 RANKL과 결합하면 RANKL과 RANK간 결합이 차단되어 파골세포의 형성이 억제되고 필요 이상의 골 흡수가 일어나지 않게 된다(Theill LE. 외, Annu Rev Immunol., 20, pp.795-823, 2002; Wagner EF. 외, Curr Opin Genet Dev., 11, pp.527-532, 2001). 오래된 뼈의 흡수 또는 파괴는 혈액세포(조혈모세포)에서 생기는 파골세포에 의해 이루어지며 이는 뼈에 구멍을 내어 적은 양의 칼슘이 혈류로 방출되어 신체기능을 유지하는데 사용되도록 한다(William J. 외, Nature., 423, pp.337342, 2003).

[88] 그 결과, IKK 복합체와 상호작용하는 본 발명의 세포질 Hsp60의 억제는 RANKL 또는 TNF- α -유도된 다핵성 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)-양성 파골세포의 형성을 현저하게 감소시켰다. 또한, 세포질 Hsp60의 이상 발현은 RANKL에 대한 반응에서 TRAP-양성 파골세포의 형성을 뚜렷하게 증가시켰다. 이러한 결과들은 세포질 Hsp60이 IKK/NF- κ B 신호전달을 통해 SOD2(superoxide dismutase 2) 발현을 유도하여 파골세포의 생존을 촉진하므로, 세포질 Hsp60을 억제하여 염증-유도 골 소실을 비롯한 골질환을 치료할 수 있다는 것을 의미한다(도 58 내지 61).

[89] 또한, 본 발명의 구체예에서, 본 발명의 Hsp60 AS-ODN에 의한 세포질 Hsp60의 억제는 손상된 경동맥에서 증식성 평활근 세포에 의한 신생내막 두께 증식을 약 50% 정도 감소시켰으며, 이러한 신생내막 층의 감소는 아팍토텍 세포 사멸에 의해 유발되었다(도 62 내지 64). 따라서, 혈관 평활근 세포의 증식을 매우 효율적으로 억제하는 본 발명의 세포질 Hsp60의 억제제는 이상증식 혈관 질환의 치료에 유효하다는 것을 알 수 있다.

[90]

[91] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은

[92] (a) 세포질 Hsp60 유전자를 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계;

[93] (b) 상기 세포질 Hsp60의 발현을 분석하는 단계; 및

[94] (c) 상기 시험물질이 세포질 Hsp60의 레벨을 감소시키면 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[95] 본 발명의 또다른 양태에 따르면, 본 발명은

[96] (a) 세포질 Hsp60 단백질, 또는 세포질 Hsp60 단백질과 IKK(I κ B 키나제)

단백질을 포함하는 세포 또는 세포 추출물(cell extract)에 시험물질을 처리하는 단계;

[97] (b) 상기 시험물질이 세포질 Hsp60 단백질에 결합하는지 여부, 또는 상기

시험물질이 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 단백질 사이의 결합을 억제하는지 여부를 분석하는 단계; 및

- [98] (c) 상기 시험물질이 세포질 Hsp60 단백질에 결합하거나 또는 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 사이의 결합을 억제시키면 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 세포는 세포 추출물(cell extract)일 수 있다. 이 경우, 세포질 Hsp60 단백질로서, 분리된 형태의 세포질 Hsp60 또는 세포 내에 포함되어 있는 세포질 Hsp60 단백질 등 어떠한 형태의 것도 사용할 수 있다.
- [99] 본 발명의 스크리닝 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 분석(binding assay)에 따라 고속(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다.
- [100] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질 또는 세포질 Hsp60 단백질은 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스레디쉬 퍼옥시다아제, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광 표지[예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM], 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.
- [101] 검출가능한 표지가 레이블링된 세포질 Hsp60 단백질 또는 시험물질을 이용하는 경우, 세포질 Hsp60 단백질과 시험물질 사이의 결합 발생 여부는 표지로부터 나오는 신호를 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 신호를 검출한다. 표지로서 호스 레디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 신호를 검출한다.
- [102] 택일적으로, 시험물질의 세포질 Hsp60 단백질로의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 분석할 수도 있다. 예를 들어,

마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 시험물질이 세포질 Hsp60 단백질에 결합하는지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 세포가 그의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는, 시험물질과 세포질 Hsp60 단백질 사이의 결합에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다(McConnell et al., Science 257:1906-1912 (1992)).

- [103] 시험물질의 세포질 Hsp60 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.
- [104] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은, 투-하이브리드 분석 또는 쓰리-하이브리드 분석 방법에 따라 실시할 수 있다(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 W0 94/10300). 이 경우, 세포질 Hsp60 단백질을 베이트(bait) 단백질로 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, 세포질 Hsp60 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, 세포질 Hsp60-코딩 폴리뉴클레오타이드를 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 생체 내에서 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 세포질 Hsp60 단백질과 결합할 수 있음을 나타내는 것이며, 결론적으로 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료용 물질로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다.
- [105] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 세포질 Hsp60 단백질에 분석하고자 하는 시험물질을 접촉시킨다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 세포질 Hsp60 유전자의 발현 또는 세포질 Hsp60 단백질의 활성화에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시료는

단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 시료는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt 외, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb 외 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann 외, J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho 외, Science 261, 1303, 1993; Carell 외, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell 외, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop 외, J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

- [106] 이어, 시험물질이 처리된 세포질 Hsp60 단백질의 활성을 측정한다. 측정 결과, 세포질 Hsp60 단백질의 활성이 감소-조절(down-regulation)되는 것이 측정되면, 상기 시험물질은 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제로 판정될 수 있다.
- [107] 또한, 본 발명을 이용하여 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 단백질 사이의 결합을 억제하는 물질을 스크리닝할 수 있다. 상술한 두 단백질 간의 결합을 억제하는 물질의 스크리닝은 당업계에 공지된 다양한 방법, 예를 들어 투-하이브리드 분석(Zervos et al., Cell 72, 223232, 1993), FRET(Fluorescence resonance energy transfer; Shyu et al., PNAS, 105:151-156(2008)), PCA(Protein Complementation Assay; Tarassov K., et al., Science, 320(5882): 1465-1470(2008)), PLA(Proximal Ligation Assay; Fredriksson S., et al., Nat Biotechnol., 20(5): 473-7(2002)) 등을 이용하여 실시할 수 있다.
- [108] 본 발명의 방법이 투-하이브리드 분석에 의해 실시되는 경우, 세포질 Hsp60을 베이트(bait) 단백질로, IKK- α 또는 IKK- β 를 프레이(pray) 단백질로 제작될 수 있다. 세포질 Hsp60 단백질과 IKK- α 또는 IKK- β 단백질 간의 상호작용을 통해 전사인자의 DNA-결합 및 활성화 도메인이 인접하게 되어 리포터 유전자(예컨대, LacZ)의 전사가 촉진된다. 이에 따라, 리포터 유전자의 발현을 통해 두 단백질 간의 상호작용을 검출할 수 있다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 세포질 Hsp60 단백질(베이트)과 IKK(I κ B 키나제) 단백질(프레이)을 포함하는 세포에 시험물질을 처리한다. 시험물질을 처리하기 전과 비교하여 처리 후 리포터 유전자의 발현이 억제된다면, 상술한 시험물질이 세포질 Hsp60 단백질과 IKK- α 또는 IKK- β 단백질 간의 상호작용을 억제한다는 것을 나타낸다.

- [109] FRET은 상호작용하는 단백질 쌍에 서로 다른 형광물질이 융합되어 공여자와 수용자 간의 밀접 또는 거리를 측정할 수 있는 어세이 방법이다. 여기된 공여자 플루오로포어는 수용자 분자로 에너지를 전이시킨다. 이 때, 에너지 전이 효율(FRET 효율)은 수용자로 에너지 전이를 초래하는 공여자 여기 상태의 정도(fraction)를 의미한다. 따라서, FRET 효율은 단백질-단백질 상호작용의 지시자로서 이용될 수 있다.
- [110] 본 발명의 방법이 FRET 분석에 의해 실시되는 경우, 세포질 Hsp60과 IKK- α 또는 IKK- β 를 각각 서로 다른 형광물질과 융합시켜 제작한다. 본 발명의 세포질 Hsp60과 플루오로포어(예: GFP, RFP, CFP, YFP, 등)의 융합 컨스트럭트는 공여자로, IKK- α 또는 IKK- β 와 플루오로포어의 융합 컨스트럭트는 수용자로 기능한다. 상술한 두 컨스트럭트 간의 상호작용을 통해 FRET 효율을 측정할 수 있다. 본 발명에 따르면, 플루오로포어(예: GFP, RFP, CFP, YFP, 등)가 융합된 세포질 Hsp60과 IKK- α 또는 IKK- β 컨스트럭트들을 포함하는 세포에 시험물질을 처리한다. 시험물질을 처리하기 전과 비교하여 처리 후 FRET 효율이 감소한다면, 상술한 시험물질이 세포질 Hsp60 단백질과 IKK- α 또는 IKK- β 단백질 간의 상호작용을 억제하는 기능을 한다는 것을 의미한다.
- [111] 본 발명의 방법이 PCA 분석에 의해 실시되는 경우, 형광물질의 N-말단 단편과 C-말단 단편을 각각 세포질 Hsp60과 IKK- α 또는 IKK- β 와 융합시킨 컨스트럭트를 제작한다. 예를 들어, 형광물질로서 이용될 수 있는 YFP를 N-말단 단편(N-YFP)과 C-말단 단편(C-YFP)으로 나누어서 각각 세포질 Hsp60과 IKK- α 또는 IKK- β 와 융합된 컨스트럭트(N-YFP-세포질 Hsp60 및 C-YFP-IKK- α 또는 C-YFP-IKK- β ; 또 다른 컨스트럭트로 C-YFP-세포질 Hsp60 및 N-YFP-IKK- α 또는 N-YFP-IKK- β 로 제작될 수도 있음)를 각각 제작한다. 이들 컨스트럭트 내의 세포질 Hsp60과 IKK- α 또는 IKK- β 이 상호작용함에 따라 YFP의 N-말단 단편과 C-말단 단편이 서로 결합하고 완전한 YFP를 형성하여 형광을 나타내게 되며, 이를 통해 두 단백질 간의 상호작용을 검출할 수 있다. 본 발명에서, 형광물질의 N-말단 단편 또는 C-말단 단편과 융합된 세포질 Hsp60과 IKK- α 또는 IKK- β 컨스트럭트들을 포함하는 세포에 시험물질을 처리한 후 형광을 검출한다. 이때, 시험물질을 처리하기 전과 비교하여 형광이 감소한다면, 상술한 시험물질이 세포질 Hsp60 단백질과 IKK- α 또는 IKK- β 단백질 간의 상호작용을 억제하는 기능을 한다는 것을 의미한다.
- [112] 세포질 Hsp60의 발현을 분석하여 본 발명의 스크리닝 방법을 실시하는 경우, 세포질 Hsp60 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 외, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufman 외, Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 외, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인

시투(in situ) 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.

- [113] RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시험물질을 처리한 세포에서 세포질 분획을 분리한 후 이로부터 총 RNA를 분리하고 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 제1쇄 cDNA를 제조한다. 이어, 제1쇄 cDNA를 주형으로 이용하고, 세포질 Hsp60 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 세포질 Hsp60 유전자의 발현량 변화를 측정한다.
- [114] 세포질 Hsp60 단백질의 양의 변화는 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, 세포질 Hsp60 단백질의 양의 변화는 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [115] 상기 세포질 Hsp60의 발현, 세포질 Hsp60 단백질에의 결합 또는 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 단백질 사이의 결합은 세포 내에서 또는 시험관 내에서 분석될 수 있다.
- [116] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 스크리닝 방법에 의하여 검색된 세포질 Hsp60 발현 억제제인 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제, 상기 스크리닝 방법에 의하여 검색된 세포질 Hsp60 단백질에 결합하는 세포질 Hsp60 단백질의 활성 억제제인 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제, 또는 상기 스크리닝 방법에 의하여 검색된 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 단백질 결합 억제제인 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제를 제공한다.
- [117] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 스크리닝 방법을 수행하기 위한 스크리닝 키트를 제공한다. 구체적으로, 세포질 Hsp60 단백질, 또는 세포질 Hsp60 단백질 및 IKK(IκB 키나제) 단백질을 포함하는 세포 또는 세포 추출물, 및 반응 완충액을 포함하는 스크리닝 키트이다.
- [118]
- [119] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 실시를 위한 형태

- [120] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [121]

- [122] 실시예
- [123] 실험방법
- [124] 시약
- [125] IKK α (B-8), IKK γ (FL-419), Hsp90(H-114), Hsp60(K-19 및 N-20), I κ B α (C-21), JNK1(C-17), ASK-1(H-300 및 F-9), 글루타티온 S-트랜스퍼라제(B14) 및 염소 IgG에 대한 항체들은 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, US)로부터 구입하였다. 항-Flag 항체(M2)는 Sigma로부터 구입하였다. 항-헥사히스티딘 항체는 Qiagen으로부터 구입하였다. 포스포-IKK, 포스포-IKK α 및 포스포-IKK β 에 대한 항체들은 Cell Signaling Technology로부터 구입하였다. 정상 마우스 및 래빗 IgG는 Amersham Bioscience로부터 구입하였다. 항-사이토크롬 c 항체는 BD Pharmingen로부터 구입하였다. 페록시레독신 III(Prx III), MnSOD(2AI), 헤마글루티닌 에피토프(Hemagglutinin epitope, HA) 및 GAPDH에 대한 항체들은 AbFrontier(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 재조합 인간 TNF- α 항체는 Invitrogen(Grand Island, USA)으로부터 구입하였다. 안티센스 및 센스 서열을 포함하는 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODNs)는 Hokkaido System Sciences Co.(Hokkaido, Japan)에서 합성하였다. 전장 인간 I κ B 단백질은 W. Jeong(Ewha Womans University, Korea)으로부터 제공받았다[Jung Y, Kim H, Min SH, Rhee SG, Jeong W (2008) Dynein light chain LC8 negatively regulates NF-kappaB through the redox-dependent interaction with I κ Balpha. J Biol Chem 283: 23863-23871].
- [126]
- [127] 플라스미드
- [128] 인간 Hsp60의 전장 cDNA를 국가유전체정보센터(National Genome Information Center; Daejeon, Korea)로부터 구입하였다. 마이토콘드리아 타겟팅 서열(MTS; 인간 서열에 기반된 1-26 아미노산 서열)이 결핍된 Hsp60의 절단된 형태인 Hsp60c를 PCR로 증폭하여 pCGN-HA(Cold Spring Harbor 연구실의 W. Herr 박사로부터 제공받음) 및 pGEX-4T1(Amersham) 벡터에 클로닝하여 각각 HA-태깅된 Hsp60c 발현벡터 및 GST-융합된 Hsp60c 발현벡터를 구축하였다.
- [129] CRE-, NF-AT- 및 AP1-의존적(pAP17x-Luc) 파이어플라이 루시퍼라제 리포터들은 Stratagene로부터 구입하였다. IFN β -유래된 NF- κ B 인핸서 서열을 포함하는 루시퍼라제 리포터 플라스미드들[Fujita T, Nolan GP, Ghosh S, Baltimore D (1992) Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B. Genes Dev 6: 775-787]은 S. Y. Lee(Ewha Womans University, Korea)으로부터 제공받았다. 인간 IKK α , β 및 γ cDNA는 pCMV2-FLAG 또는 바쿨로바이러스 발현벡터인 pFastBac-HTa(Invitrogen)로 클로닝하였다. IKK α , β 및 γ 를 각각 인코딩하는 pFastBac 컨스트럭트들은 제조자의 프로토콜에 따라 고-역가 재조합 바쿨로바이러스 스톡($\sim 1 \times 10^7$ pfu/ml)의 생산에 이용하였다. 인간 Bcl-2 또는 Bcl-XL을 인코딩하는 pPuro

플라스미드들은 D.Y. Shin(Dankook University, Korea)으로부터 제공되었다[Jung MS, Jin DH, Chae HD, Kang S, Kim SC, et al. (2004) Bcl-xL and E1B-19K proteins inhibit p53-induced irreversible growth arrest and senescence by preventing reactive oxygen species-dependent p38 activation. J Biol Chem 279: 17765-17771].

pGEX-4T1-SEK1 (K129R) 플라스미드[Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, et al. (1994) Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. Nature 372: 794-798]는

GST-SEK1(K129R) 재조합 단백질을 생산하기 위해 이용하였다. 위치-지정된 돌연변이 유발은 QuikChange 돌연변이유발 키트(Stratagene)를 이용하여 실시하였다.

[130]

[131] **IKK 복합체의 면역-친화성 정제 및 ESI-q-TOF 탠덤 질량분석법**

[132] HeLa S3 세포(201 현탁 배양액으로부터 20 ml로 패킹)를 200 ml의 용해 완충액 A(20 mM HEPES(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% 트라이톤 X-100, 10% 글라이세롤, 1 mM AEBSF, 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, 10 $\mu\text{g/ml}$ 아프로티닌 및 류펩틴)에서 서서히 용해시켰다. 용해물(2 g의 총 단백질을 아가로오스 비드만으로 1시간 동안 미리 깨끗하게 한 후, 항-IKK α -컨쥬게이션된 아가로오스 비드(2 mg/ml IgG; Santa Cruz Biotechnology)와 하룻밤 동안 반응시켰다. 용해 완충액으로 네 번에 걸쳐서 세척한 후, 비드들을 컬럼에 로딩하고 인산완충용액으로 두 번에 걸쳐서 린스하였다. 침전된 단백질을 1 ml의 0.1 M 글라이신 완충액(pH 2.5)으로 두 번에 걸쳐서 용출하였다. 단백질 용출액을 1 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 즉시 중화시킨 후 10% 변성 젤 상에서 분리하였다. 이후, 젤을 실버 니트레이트로 염색하고 실버-염색된 점들을 다음과 같이 약간의 변형을 주어 인-젤 트립신 처리(digestion)를 하였다. 간략하게는, 젤 점들을 외과용 메스로 절단하고 15 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 및 50 mM 소듐 티오설파이트로 세척하여 탈색하였다. 젤 조각들을 부수고 아세토니트릴을 첨가하여 탈수시킨 후, 10 ng/ μl 의 시퀀싱 등급 트립신(Promega)을 포함하는 10-20 μl 의 25 mM 암모늄 바이카보네이트를 첨가하여 다시 수화시키고 37°C에서 15-17시간 동안 반응하였다. 상층액의 펩타이드를 새로운 튜브로 옮겨 50 μl 의 용액(60% 아세토니트릴 및 0.1% 트리플루오로아세트산)을 첨가하여 두 번에 걸쳐 추출하였다. 건조를 위해 추출된 용액을 플링하여 고속 진공 원심분리기(SpeedVac vacuum centrifuge)를 이용하여 증발시켰다. 펩타이드 시퀀싱을 위해, 질량 분석기를 포함한 나노 플로우 역상(reversed-phased) HPLC/ESI/MS(Q-TOF UltimaTM global, Waters Co. UK)를 이용하여 탠덤 질량분석법을 실시하였다. 상술한 펩타이드들을 전기분무 이온화 SilicaTipTM($\pm 10 \mu\text{m}$; New Objective, USA)과 통합된 C18 역상 75 μm i.d. x 150 mm 분석 컬럼(3 μm 입자 크기; AtlantisTM dC18, Waters)을 이용하여 분리하였다. 보다 상세하게는, 5 μl 의 펩타이드 혼합물을 완충액 A(물/ACN/포름산 = 95:5:0.2, v/v)에 용해하고

컬럼에 주입한 후 5-80% 완충액 B(물/ACN/포름산 = 5:95:0.2, v/v)의 선형 농도 구배로 120분 동안 용출하였다. 트랩 컬럼(i.d. 0.35 x 50 mm, OPTI-PAK™ C18, Waters) 카트리지를 이용하여 분리하기 전에, 시료들을 동일하게(on a line) 탈염시켰다. 우선, 분무 전에 유량은 분리관 주입장치(split/splitless inlet)에 의해 200 nL/분으로 세팅되었으며 모세혈관 전압(3.0 keV)이 HPLC 이동상에 적용되었다. 크로마토그래피를 제조자의 Q-TOF Ultima™ global 조절 소프트웨어 MassLinx를 이용하여 온라인 상에서 실시하였다. 하나의 MS 스캔으로 구성된 스캔 사이클을 기록하고 각 MS 스캔에서 가장 풍부한 여덟 개의 이온에 대한 MS/MS 스캔을 실시하도록 질량분석기를 프로그래밍하였다. 효과적인 데이터-기반 결과획득을 위한 MS 파라미터들은 MS로부터 MS/MS 분석으로 스위치되는 강도(> 10) 및 구성성분들의 수(3-4)이다. 데이터베이스 분석(Mascot)으로부터 분리된 모든 펩타이드들에 대한 양성 동정을 실시하여 다음 라운드 분석에서 제거함으로써 전체 서열 범위(coverage)를 획득하였다. Mascot(global search engine), Proteinlynx 2.1(Waters Co., UK) 및 MODi(Korea, <http://modi.uos.ac.kr/modi/>)을 포함하는 데이터베이스 조사 프로그램을 이용하여 실시한 데이터베이스 분석은 선택적 제외 모니터링을 통해 거의 전체 서열 범위를 제공하였다. MS/MS 스펙트럼은 SwissProt의 아미노산 서열들과 잘 매치되었다. 선구이온 질량 보정 및 0.2 Da의 조각이온 질량 내성을 효소가 잘라내지 못한 지점들(2 missed cleavages)로 고려하여 이용하였다.

[133]

[134] 면역전자현미경(Immunoelectron microscopy)

[135] HeLa 세포(1×10^7)를 수득하여 상온에서 0.5% 글루타르알데하이드를 포함하는 0.1 M 카코딜레이트 완충액(pH 7.2)으로 1시간 동안 고정시켰다. 냉장 증류수로 린스한 후, 세포들을 4°C에서 에탄올을 농도 별로 처리하여 탈수시켰다. 세포들을 4°C에서 LR 백색 레진(London Resin, Berkshire, England)으로 여과한 후, 젤라틴 캡슐(Nisshin EM, Tokyo, Japan) 내 LR 백색 레진에 임베드시켰다. 레진의 폴리머라이제이션은 50°C에서 24시간 동안 실시하였다. 70 nm 두께의 연속 절편들(시료 당 120-200 절편들)을 포름바-코팅된 니켈 그리드에 부착시켰다. 절편들을 50 mM 글라이신과 상온에서 5분 동안 반응시켰다. PBS로 린스한 후, 절편들을 3% BSA와 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 이후, 절편들을 1차 항체(염소 항-인간 Hsp60(SC-1722), 마우스 항-인간 IKK α (SC-7606) 또는 마우스 항-IKK β (SC-8014); PBS에서 1:100으로 희석)와 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 트윈-PBS(0.5% 트윈-20을 포함하는 PBS)로 다섯 번에 걸쳐서 세척한 후, 절편들을 항-염소 및 항-마우스 IgG + IgM 항체들과 컨쥬게이션된 20 nm- 및 40 nm-직경의 콜로이달 골드(BB International, UK; PBS에서 1:20으로 희석)로 각각 상온에서 2시간 동안 처리하였다. 절편들을 트윈-PBS로 세 번에 걸쳐서 세척하고 증류수로 세 번에 걸쳐서 세척하였다. 절편들을 4% 우라닐 아세테이트로 5분 동안 염색하고 납으로 5분 동안 염색하였다. 1차 항체의

특이성을 조사하기 위해, 1차 항체의 처리 없는 절편을 상술한 과정과 동일하게 실시하였다. 이중 염색을 위해, 항체 반응을 1차 및 2차 항체의 두 번째 세트를 반복하였다. 마지막으로, 시료들을 Tecnai G2 Spirit Twin 투과전자현미경(TEI Co., USA) 및 JEM ARM 1300S 초고압 전자현미경(JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

[136]

[137] 세포내 분획

[138] 면역침전 실험을 위한 세포내 분획을 분별 원심분리로 얻었다. 간략하게는, HeLa 세포(2×10^7)를 수득하여 냉장 PBS로 두 번에 걸쳐서 린스한 후, 0.25 M 수크로오스를 포함하는 균질화 완충액(20 mM HEPES(pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 1 mM AEBSF, 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, 5 $\mu g/ml$ 아프로티닌 및 5 $\mu g/ml$ 류펩틴) 1 ml에 재현탁하였다. 세포를 글라스 다운스 균질기로 파괴시킨 후, 원심분리(750 g, 10분)를 통해 핵을 제거한 상층액(post-nuclear supernatants)을 균질액으로부터 얻었다. 상술한 상층액을 원심분리(15,000 g, 15분)로 펠렛(마이트콘드리아 분획) 및 상층액(세포질 분획)로 분리시켰다. ODN-형질전환된 세포들의 경우, 세포내 분획들을 ProteoExtract 세포내 프로테옴 추출 키트(Roche)를 이용하여 얻었다. 각 분획의 순도를 선택적 마커들을 이용하여 확인하였다: 세포질 마커, α -튜블린; 마이트콘드리아 마커들, 사이토크롬 c 옥시다제 4(COX4) 및 매트릭스 단백질 페록시레독신 III(Prx III)[Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, et al. (2004) Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. J Biol Chem 279: 41975-41984]. 최상의 비교를 위해, 마이트콘드리아 분획을 상응하는 세포질 분획의 1/5 용량으로 로딩하였다.

[139]

[140] 재조합 단백질들을 이용한 시험관 내 결합 어세이

[141] Sf9 곤충 세포를 $KK\alpha$ -, $IKK\beta$ - 및 $IKK\gamma$ -인코딩 백미드를 가지는 재조합 바쿠로바이러스 스톱으로 각각 감염시켰다. (His)₆-태깅된 IKKs을 발현하는 곤충 용해물을 글루타티온-세파로오스 비드(Amersham Pharmacia Biotech)로 전처리된 1.0 μg 의 GST-Hsp60 단백질과 4°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 비드를 냉장 용해 완충액 A로 세 번에 걸쳐서 세척하였다. 비드에 결합된 단백질을 SDS 샘플 완충액에서 끓여 용출한 후, 도 3에서와 같이 면역블롯 분석을 실시하였다.

[142]

[143] 형질전환(Transfection)

[144] 올리고펙타민™ 시약(Invitrogen, USA)을 이용하여 ODNs(200 nM; 다른 경우는 표기됨)를 24시간 동안 형질전환시켰다. 플라스미드 형질전환은 퓨진-6 시약(Roche, USA)을 이용하여 실시하였다. 항체는 제조자의 지시에 따라 Chariot™ 단백질 운반 키트(Active Motif Co., USA)로 형질전환시켰다.

[145]

[146] 면역침전 및 시험관 내 키나제 어세이

- [147] HeLa 세포를 지시된 시기에 TNF- α (10 ng/ml)로 처리하거나 또는 처리하지 않고 냉장 PBS로 한번 린스한 후, 용해 완충액 A로 용해시켰다. 세포 용해물을 10 μ l 단백질 A/G 아가로오스 비드(Amersham Biosciences)로 1시간 동안 전세척하였다. 전세척된 용해물을 2 μ g의 Hsp60, IKK α , IKK β 또는 IKK γ 항체와 3시간 동안 반응시키고 20 μ l 단백질 A/G 아가로오스 비드와 혼합하였다. 용해물을 4°C에서 하룻밤 동안 추가적으로 반응시켰다. 비드를 1 ml의 용해 완충액 A로 세 번에 걸쳐서 세척하였다. 최종 단백질 침전물로 면역블롯 분석을 실시하였다. 면역 복합체를 증진된 화학발광 키트(Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 시각화하였다.
- [148] 시험관 내 키나제 어세이를 위해, IKK, JNK1 또는 ASK-1가 각각 항-IKK γ (FL-419), 항-JNK1(C-17) 또는 항-ASK-1(H-300)으로 면역침전되었다. IKK 복합체 또는 JNK1을 포함하는 비드를 용해 완충액으로 두 번에 걸쳐서 세척하고 키나제 완충액(20 mM HEPES(pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 10 mM β -글라이세롤포스페이트, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM NaF 및 1 mM 디티오프로판)으로 두 번에 걸쳐서 추가적으로 세척한 후, 10 μ M ATP, 0.6 μ Ci[γ -³²P] ATP 및 2 μ g의 GST-IkB(1-54) 또는 GST-c-Jun 또는 GST-SEK1(K129R)을 포함하는 키나제 완충액과 30°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응을 20 μ l의 3 $\times$ SDS 샘플 완충액을 첨가하여 중지시켰다. 끓인 후, 반응 혼합물의 반을 10% 변성 젤에 분리하여 방사능을 자동방사능촬영으로 검출하였다. 반응 혼합물의 나머지 반을 면역침전된 키나제 단백질에 대한 면역블롯팅에 이용하였다(참고: ASK-1을 검출하기 위해 항-ASK-1 항체(F-9)를 이용).
- [149]
- [150] 세포 내 ROS 측정
- [151] 이전에 기재된 바와 같이, 산화 민감성 형광다이인 5,6-클로로메틸-2', 7'-다이클로로다이하이드로플루오레신 다이아세테이트(CM-H₂DCFDA, Molecular Probes, USA)을 이용하여 세포 내 ROS 발생을 평가하였다[Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, et al. (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. J Biol Chem 273: 6297-6302]. HeLa 세포(3 $\times$ 10⁵)를 35-mm 디쉬에 플레이트하고 ODNs로 24시간 동안 형질전환시켰다. 세포를 6시간 동안 혈청 결핍시킨 후, 지시된 시간에 페놀 레드-부재 배지에서 TNF- α 로 자극시켰다. 자극 후, 세포를 크랩스-링거(Krebs-Ringer) 용액으로 빠르게 린스하고 5 μ M CM-H₂DCFDA와 5분 동안 반응시켰다. DCF 형광을 도립(inverted) Axiovert200 형광현미경에서 10초 단위로 수집하였다. ImageQuantTM 소프트웨어(GE Healthcare)를 이용하여 각 이미지에서 60-80개 세포들의 형광 강도를 평균내어 상대적인 DCF 형광을 얻었다. 탈착된 라운드 세포들은 정량에서 제외시켰다.

[152]

[153] **RNase 보호 어세이**

[154] ODN-전처리된 HeLa 세포를 지시된 시기에 TNF- α (10 ng/ml)로 처리하거나 또는 처리하지 않았다. 총 RNA를 트라이졸(Invitrogen)로 추출하였다. 리보뉴클리아제(RNase) 보호 어세이를 제조자의 프로토콜(BD PharMingen)에 따라 실시하였다. 간략하게는, 인간 아팍토시스 템플레이트 세트인 hAPO-5를 [α - 32 P]-우리딘 트리포스페이트로 표지하였다. RNA(10 μ g) 및 6×10^5 cpm의 표지된 프로브를 혼성화시켰다. RNase 처리 후, 보호된 프로브를 5% 우레아-폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하여 자동방사능촬영으로 검출하였다.

[155]

[156] **정량적 PCR(Quantitative PCR, qPCR)**

[157] 지시된 시기에 TNF- α 로 처리된 HeLa 세포로부터 총 RNA를 트라이졸(Invitrogen)로 추출하였다. RNA(1.5 μ g)을 ImProm-II RT 시스템(Promega)을 이용하여 역전사하였다. 실시간 PCR을 형광오도사이클러(ABI Prism 7000 sequence detection system, Applied Biosystems)에서 SYBR 그린(Applied Biosystems)의 존재 하에 특이 프라이머들을 이용하여 실시하였다. 사이클 수를 비교하는 방법(comparative cycle threshold method)으로 형광 시그널을 정량화하였다. 액틴 mRNA를 내인성 대조군으로 이용하였다.

[158]

[159] **형질전환 마우스 제조**

[160] 미토콘드리아 시그널 서열이 없는 HA-태깅된 인간 Hsp60c를 PCR-증폭하여 치킨 β -액틴 프로모터를 포함하는 pCAGGS 트랜스제닉(Tg) 벡터에 NheI 및 EcoRV를 이용하여 클로닝하였다. HA-Hsp60c Tg 컨스트럭트를 SalI 및 PstI를 처리하여 선형화한 후, 암컷 C57BL/6j로부터 유래한 난자에 마이크로인젝션하였다. 형질전환된 마우스(transgenic founders)를 아래에 기재된 바와 같이 지노타이핑하였다. 여섯 개의 양성 형질전환체들 중 두 개(T4 및 T11)를 본 연구에서 선택하여 실험하였다. 꼬리 DNA를 이용하여 지노타이핑하였다. 간략하게는, 마우스 꼬리 DNA를 100 mM Tris(pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.2 % SDS 및 100 μ g 프로티나제 K와 55°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. DNA를 페놀:클로로포름:이소아밀 알코올(25:24:1)로 추출하여 이소프로판올로 침전시켰다. 다음의 프라이머 세트를 이용하여 지놈 PCR을 실시하였다: 세트 1, 5'-ATGGCTTCTAGCTATCCTTATG-3'(정방향, 서열번호 8) 및 5'-GTAGCAACCTGTGCAATTTCTTC-3'(역방향, 서열번호 9); 세트 2, 5'-CTGCTAACCATGTTTCATGCC-3'(정방향, 서열번호 10) 및 5'-ACAAGTTTAGCTCCAATGTTTTTGTA-3'(역방향, 서열번호 11). 모든 실험들은 4-주령 수컷으로 실시하였다.

[161]

[162] **DEN-유도된 간 손상에서 아팍토틱 세포 분석**

[163] 4-주령 수컷 마우스에 인산완충액(PBS, pH 7.4) 또는 TNF- α (6 μ g/kg)를 DEN4(10 mg/kg)의 복강내 투여 6시간 전에 측면 꼬리 정맥을 통해 정맥내 주입하였다. DEN 처리 48시간 후, 동물을 희생시키고 PBS로 신속하게 관류하고 4% 파라포름알데하이드를 처리하였다. 간을 적출하여 OCT 임베딩 배지에서 동결시킨 후, cryostat(Leica)를 이용하여 연속적인 조직 절편들(10 μ m의 두께)을 획득하였다. 절편들을 50 μ l의 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediate uridine 5'-triphosphate-biotin nick-end labeling) 형광 반응 혼합물(In situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics)과 37°C에서 60분 동안 암 조건에서 반응시킨 후 세척하고 DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole; 1 μ g/ml, Sigma)와 30분 동안 반응하였다. 절편들을 Vectashield 마운팅 배지를 이용하여 마운팅하고 LSM510 공초점 레이저 주사현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. TUNEL-양성 세포를 카운팅하여 마우스 당 세 개의 독립적인 절편들의 평균값을 계산하였다. 모든 동물 실험들을 실험실 동물의 보호 및 이용에 대한 임상시험위원회 지침서(institutional guidelines; Ewha Womans University, Korea)에 부합되도록 실시하였다.

[164]

[165] **랫 경동맥에서 풍선 손상**

[166] 본 실험에서 270-290 g의 수컷 Sprague-Dawley 랫(Charls River, USA)를 이용하였다. 랫를 물과 사료를 자유급이(ad libitum)하고 천연 빛-암 사이클 조건과 유사한 자동-시스템에서 사육하였다. 70% 아산화질소 및 산소 밸런스가 유지된 혼합물에 5% 이소플루란을 첨가하여 동물 마취를 유도한 후, 실험진행 동안 1-2% 이소플루란이 유지되었다. 이전에 기술된 바와 같이, 풍선 손상이 정상 랫 좌측 경동맥에서 여과 2F 포가티 풍선 카테터에 의해 실시되었다(Usui et al., 2002). 10-주령된 수컷 랫를 마취시키고 좌측 외경동맥을 노출시킨 후, 그 가지들이 전기-응집되었다. 카테터를 외경동맥의 횡단 동맥절개술을 통해 1 cm 정도 삽입되었으며 내피세포 노출(denudation)이 총경동맥을 따라 세 번에 걸쳐서 실시되었다. 손상 후 0h, 18h, 3일 5일 및 7일 쯤에 총경동맥이 3.7% 포름알데하이드를 포함하는 헤파린이 첨가된 증류수(heparinized saline)로 경심 관류-여과된 후 절개하여 파라핀 임베드되었다. 다섯 개의 연속 조직 절편들(100- μ m 간격 및 3- μ m 두께)이 총경동맥의 중간 부위에서 얻어졌다. 이후 모든 연구에서, 혈관의 중간 부위로부터 유래한 절편들이 분석되었다. 형태계측학적 분석을 위해, 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색된 각 슬라이드를 이용하였다.

[167]

[168] **시험관 내 파골세포 형성과정(osteoclastogenesis) 어세이**

[169] C57BL/6 마우스로부터 유래된 비-부착성(non-adherent) 골수-유래

단핵구/대식세포(bone marrow-derived monocytes/macrophages, BMM) 계통 세포들을 10% FBS 및 M-CSF(10 ng/ml, R&D systems)를 포함하는 α -MEM(Invitrogen)에 분주하여 배양하였다. 2일 후, 림프구를 포함하는 비부착성 세포를 BMMs로서 이용하였다. M-CSF의 존재 하에서 BMM에 수용성 RANKL(50 ng/ml, Peprotech) 또는 TNF- α (20 ng/ml)를 처리하여 파골세포로의 분화를 유도하였다. 레트로바이러스 감염을 위해, BMMs은 폴리브렌(10 μ g/ml)의 존재 하에서 대조군 또는 Hsp60c-발현 레트로바이러스를 포함하는 상층액과 반응하였다. 바이러스에 2일 동안 노출된 후, 세포를 상술한 바와 같이 RANKL과 반응시켰다. 유도 5일 후에, 세포를 고정하고 타트레이트-저항성 산 포스파타제(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP; Sigma Co.)로 염색하였다. 세포를 플란-네오플루오르 대물렌즈를 포함하는 Zeiss Axiovert 200 현미경(Carl Zeiss)에서 관찰하였다. AxioVision 3.1 소프트웨어(Carl Zeiss)를 이용하여 이미지를 분석하였다. TRAP-양성 다핵성 세포(>3 핵)를 파골세포-유사 세포로 카운팅하였다.

[170]

[171] 통계

[172] SigmaPlot 8.0 소프트웨어에서 Student's t 테스트로 데이터를 분석하였다. P 값은 통계적 유의성을 평가하기 위해 계산되었으며 각 도면의 패널에 기재되었다.

[173]

[174] 실험결과

[175] **Hsp60은 세포질에서 IKK 복합체와 상호작용한다.**

[176] 본 발명자들은 면역-친화성 정제 및 질량분석법과 연계된 프로테오믹스 기법을 이용하여 잠재적인 IKK 복합체의 분자적 성분을 조사하였다. 간략하게는, IKK 복합체를 항-IKK α 항체 비드를 이용하여 자극되지 않은 HeLa S3 세포의 용해물로부터 침전시키고 공동-침전된 단백질을 액체 크로마토그래피-탠덤 질량분석법으로 시퀀싱하였다. IKK 서브유닛 및 Hsp90의 동정을 통해 IKK 복합체의 면역침전이 올바르게 실시되었다는 것을 알 수 있었고(도 1), 침전물에서 열충격단백질 Hsp60을 동정하였다(도 1-2). 침전물에서 IKK 서브유닛 및 Hsp90의 존재는 면역블롯팅으로 확인하였다(도 3). 이후, 본 발명자들은 IKK-Hsp60 상호작용의 생물학적 의미를 조사하였다.

[177] 공동면역침전 실험을 통해, Hsp60과 IKKs의 내인성 상호작용을 먼저 검증하였다. 이중 IKK 복합체들을 IKK α , IKK β 및 IKK γ 에 대한 항체들로 침전시킨 경우, 각 IKK 서브유닛-특이적 항체들은 Hsp60을 유사하게 침전시켰다(도 4). 또한, Hsp90도 IKK 복합체와 공동-면역침전되었다. 이러한 상호작용은 TNF- α 처리에 의해 영향 받지 않았으며(도 5), 이는 Hsp60이 이중 IKK 복합체의 구성요소 단백질이라는 것을 나타낸다. 미토콘드리아 오염을 방지하기 위해, 세포질 분획으로 역 면역침전을 실시하였다. 항-Hsp60 항체는

IKK γ 와 Hsp60을 함께 침전시킨 반면에 대조군 염소 IgG는 그렇지 않았으며(도 6), 이는 IKK와 Hsp60의 세포질 내 상호작용을 확인시켜주는 결과이다.

세포질에서 IKK와 Hsp60의 실질적인 상호작용을 시각화하기 위해서, 전자현미경(EM) 과 결합된 면역골드 염색을 실시하였다. IKK와 Hsp60에 대한 특이 항체들과 결합된 그들의 면역 복합체를 20 nm- 및 40 nm-직경의 골드 입자로 표지된 2차 항체를 이용하여 각각 분별적으로 검출하였다. 그 결과, Hsp60-표지 골드 입자들은 매트릭스 및 미토콘드리아의 막간 공간 뿐 아니라 세포질 및 세포막(도 7B)을 비롯한 세포 내 구조체 전반에 걸쳐 분포되었다. 이와 대조적으로, IKK α - 및 IKK β -표지 골드 입자들은 주로 세포질에서 검출되었다(도 7C-7D). 한편, IKK α -표지 골드 입자는 핵에서도 검출되었는데 이는 이전 보고들과도 일치하는 결과이다[Anest V et al., Nature 423: 659-663 (2003)]. IKK α 가 핵에서 NF- κ B 전사 활성을 조절한다고 알려져 있다는 것을 고려해볼 때, Hsp60-IKK α 복합체는 핵으로 이동하여 특정 유전자 세트(예를 들어, MnSOD 및 Bfl-1/A1)의 프로모터에 관여할 수 있다. 본 발명의 데이터는 IKK 표지 골드 입자들이 미토콘드리아보다는 오히려 소낭 구조체에서 더 자주 관찰된다는 것을 보여줬다(도 7C-7D). Hsp60 및 IKKs의 공동-염색을 통해, 20 nm 및 40 nm 골드 입자들의 직접적인 결합이 세포질에서 명확하게 확인되었다(도 7E-7F). 모든 IKK α 및 IKK β 가 Hsp60과 연관되어 있지 않았다. 상술한 결과들은 Hsp60이 세포질에서 IKK 복합체와 직접적으로 상호작용한다는 것을 총체적으로 나타낸다.

[178]

[179] **Hsp60은 IKK γ 가 아니라 IKK α/β 와 직접적으로 상호작용한다.**

[180] 본 발명자들은 Hsp60과 IKKs의 분자적 상호작용을 분석하였다. 이를 위해, 세포질로 타겟팅되도록 미토콘드리아 타겟팅 서열이 제거된 Hsp60 형태인 Hsp60c을 구축하였다. Hsp60c가 IKK 핵심 서브유닛들과 각각 공동-발현된 경우, Hsp60c는 IKK α 와 상호작용하고 적은 양 일지라도 IKK β 와도 상호작용하지만, IKK γ 와는 상호작용하지 않는다(도 8).

글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST)-융합된 Hsp60 및 (His) $_6$ -태깅된 IKK 핵심 서브유닛의 재조합 단백질들을 이용한 시험관 내 결합 실험은 GST 폴-다운 어세이로 실시하였다. 그 결과, Hsp60이 IKK γ 를 제외한 IKK α 및 IKK β 와 직접적으로 결합한다는 것을 확인하였다(도 9).

[181] Hsp60과 IKKs의 분자적 상호작용은 도메인 맵핑 실험을 통해 추가적으로 규명되었다. C-말단 결핍은 이상(ectopic) 발현을 불가능하게 하기 때문에, 일련의 Hsp60c N-말단 소실 돌연변이들을 HEK293 세포에서 Flag-태깅된 IKK α 와의 공동-발현시켜 Hsp60c의 IKK 결합능을 테스트하였다(도 10). 그 결과, Hsp60 단백질의 N-말단 부위(N-말단으로부터 약 160개의 아미노산 서열)이 IKK와의 상호작용에 필수불가결하다는 것을 알 수 있었다(도 11). Hsp60c 컨스트럭트로 형질전환된 HeLa 세포로부터 내인성 IKK 복합체가 면역침전된

경우에도 동일한 결과가 얻어졌다(도 12). 상술한 결과들은 핵심 결합 도메인이 Hsp60 단백질의 중간 부위에 존재한다는 것을 명백하게 나타낸다.

[182]

[183] **Hsp60는 IKK/NF- κ B 활성화에 포함되어 있다.**

[184] 세포질 Hsp60-IKK 상호작용의 생물학적 효과는 TNF- α -매개된 NF- κ B 경로에서 조사되었다. 이를 위해, 미토콘드리아 레벨에 영향을 미치지 않고 세포질 Hsp60의 레벨을 조절하는 것이 중요한 단계인데, 이는 Hsp60의 결핍이 미토콘드리아의 기능적 손상을 유발한다고 알려져 있기 때문이다[Bozner P et al., J Alzheimers Dis 4: 479-486 (2002); Briones P et al., J Inherit Metab Dis 20: 569-577 (1997); Huckriede A et al., Virchows Arch 427: 159-165 (1995)].

흥미롭게도, 이전의 많은 연구들은 인간 Hsp60 ORF(open reading frame)의 시작 코돈 주위의 서열에 상보적인 안티센스

올리고데옥시뉴클레오타이드(AS-ODN)가 세포질 Hsp60 레벨을 감소시킨다는 것을 보고하였다[Park SG et al., J Biol Chem 278: 39851-39857 (2003); Kirchhoff SR et al., Circulation 105: 2899-2904 (2002); Steinhoff U et al., Proc Natl Acad Sci U S A 91: 5085-5088 (1994)]. 따라서, 본 발명자들은 선택적 녹-다운 효과를

조사하기 위해 AS-ODN(AS-1으로 명명됨; 서열번호 3)을 테스트하였다. 특정 ODN 서열의 비-특이적 활성을 보일 가능성을 배제하기 위하여, 본 발명자들은 Hsp60 ORF의 미토콘드리아 타겟팅 서열(MTS) 이후에 위치한 5'-말단 근처 부위(개시 코돈으로부터 +95 - +110 부위)에 상보적인 2차 AS-ODN(AS-2, 서열번호 4)을 제작하였다(도 13). 또한, ORF 내의 모든 부위를 타겟으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 모두 본 발명의 목적을 달성할 수 있음을 추가로 확인하기 위하여, AS-2 ODN 타겟 서열의 다운스트림 서열에 대하여 AS-3 ODN(서열번호 5), AS-4 ODN(서열번호 6) 및 AS-5 ODN(서열번호 7)을 제작하였다. AS-1에 상보적인 센스 ODN(S-ODN)은 대조군 ODN으로

이용하였다. 안티센스 ODN은 약한 번역 차단제로서 기능하기 때문에, 총 Hsp60 레벨의 감소를 유발하지는 않았다(도 14). 하지만, AS-ODNs의 트랜스펙션은 미토콘드리아 Hsp60 레벨의 변화 없이 AS-ODN 처리되지 않은 군 또는 대조군 S-ODN과 비교하여 세포질 Hsp60의 레벨을 매우 선택적으로 감소시켰다(도 18). 이러한 현상을 이해하기 위해, 본 발명자들은 두 분획에서 Hsp60 단백질의 반감기(half-life)가 다를 수 있다는 가설을 세우고, 이를 증명하기 위해, 단백질 합성을 억제한 후 세포질-타겟된 Hsp60(Hsp60c)의 반감기를 측정하였다.

놀랍게도, 세포질 Hsp60 단백질의 레벨은 빠르게 감소(계산된 $t_{1/2}$ = 3.2분)되는 반면에, 내인성 Hsp60 및 IKK α 단백질의 총 레벨은 변화가 없었다(도 19). 더 나아가, 이러한 감소는 프로테아좀 억제제인 MG132를 처리함으로써 완전히 차단되었다(도 20). 또한, MG132 처리는 Hsp60c 단백질의 기본 레벨의 현저한 증가를 초래한다. 따라서, 상술한 결과는 세포질 Hsp60의 레벨이 AS-ODN 처리에 더 민감한 이유를 적어도 부분적으로 설명해주며 세포질 Hsp60의 레벨이

프로테아좀에 의해 조절된다는 것을 추가적으로 제시해준다.

- [185] TNF- α -유도된 IKK/NF- κ B 활성화를 AS-ODN-트랜스펙션된 세포에서 조사하였다. 시험관 내 키나제 어세이는 AS-ODNs의 트랜스펙션은 TNF- α 에 대한 반응으로 IKK 활성화를 AS-ODN 처리되지 않은 군 또는 S-ODN의 트랜스펙션과 비교하여 60% 정도까지 현저하게 감소시켰다(도 21). 하지만, AS-ODNs는 TNF- α 에 대한 반응으로 MAP 키나제 활성화에 어떠한 영향도 주지 않았는데(도 21 및 도 15), 이는 Hsp60 AS-ODNs의 IKK 활성화 효과의 특이성을 나타낸다. 더욱이, AS-ODNs는 AS-ODN 처리되지 않은 세포와 비교하여 TNF- α 에 대한 반응으로 NF- κ B 전사 활성화를 거의 완벽하게 억제하는 반면에, S-ODN는 그렇지 않았다(도 22, 23). 넥-다운 효과가 더 큰 AS-1은 AS-2 내지 AS-5보다 더욱 강력한 효능을 보이고, AS-1보다는 약하지만 AS-2 내지 AS-5 모두 NF- κ B 전사활성을 억제하였다. 하지만, ODNs 자체의 트랜스펙션이 기본 NF- κ B 활성화를 유발하지 않았으며, 이는 ODNs의 부작용(off-target effects)이 없음을 나타낸다. 또한, AS-ODNs의 NF- κ B 전사 활성화에 대한 감소 효과는 293T 및 A549 세포에서 명확하였다(도 17). 추가적인 대조군 실험은 AS-ODNs이 AP-1, NF-AT 및 CRE 같은 다른 전사인자 활성화에는 아무런 효과가 없다는 것을 나타냈다(도 16). Hsp60의 면역침전 및 면역염색을 위해 이용된 특이 항체(Hsp60N)를 이용하여 세포질 Hsp60을 차단함으로써 유사한 실험(study)을 실시하였다(도 1). 항체 운반은 펩타이드-매개 단백질 운반 시스템으로 달성하였다[Morris MC et al., Nat Biotechnol 19: 1173-1176 (2001)]. 대조군 염소 IgG 및 Hsp60N 항체가 성공적으로 세포질로 운반되었는데, 이는 미토트랙커와 신호가 일치하지 않는 것으로 확인하였고(도 24), 대조군 IgG와 달리 Hsp60N은 Hsp60에 결합되어 있었다(도 25). 상술한 결과는 운반된 항체가 기능 차단제로서 기능할 수 있다는 것을 의미한다. 이후, 항체-전이된 세포에서 IKK/NF- κ B 활성화를 조사하였다. Hsp60N 항체는 TNF- α 에 대한 반응으로 대조군 IgG에서 얻어진 IKK 활성화 레벨의 50%까지 감소시켰다(도 26). 이와 대조적으로, TNF- α -유도된 JNK 활성화에는 아무런 영향을 미치지 않았으며, 이는 Hsp60의 기능이 IKK 활성화에 특이적이라는 것을 다시 한번 증명한다. 같은 맥락으로, Hsp60N 항체는 NF- κ B의 전사 활성을 현저하게 감소시켰다(도 27). 상술한 데이터를 종합하면, 세포질 Hsp60은 TNF- α -유도된 IKK/NF- κ B 신호전달을 촉진시킨다.

[186]

[187] 세포질-타겟된 Hsp60의 이상 발현이 IKK/NF- κ B 활성화를 충분히 촉진시킨다.

[188] 역으로, IKK/NF- κ B 경로에서 세포질 Hsp60의 기능이 세포질-타겟된 Hsp60c의 과다발현으로 조사되었다. 이상-발현된(ectopically-expressed) Hsp60c는 IKK 복합체와 관련되어 있었으며(도 28) TNF- α 에 대한 반응으로 IKK 및 NF- κ B 활성화를 현저하게 증가시켰다(도 29-30). Hsp60c의 이상-발현은 기본적인 IKK 및 NF- κ B 활성화를 약하게 유도하였다. NF- κ B 활성화 상에 Hsp60c 발현의

효과는 IKK β -결핍 세포에서 완전히 소멸되었는데(도 31), 이는 세포질 Hsp60의 조절 활성이 IKK-의존적이라는 것을 의미한다. 한편, Hsp60c의 이상-발현은 JNK 활성화 또는 AP-1, CRE 및 NF-AT 같은 다른 전사인자 활성화를 증가시키지 않았다(도 32 내지 35). 상술한 결과들은 세포질 Hsp60 레벨의 증가가 TNF- α -유도된 IKK/NF- κ B 활성화를 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[189]

[190] **Hsp60는 활성 T-루프에서 IKK 인산화를 조절한다.**

[191] Hsp60에 의한 IKK/NF- κ B 활성화의 조절 기작을 이해하기 위하여, 여러 가지 실험적 접근방법들을 시도하였다. Hsp60의 샤페론 활성이 필요한 지 여부를 조사함에 있어, Hsp60의 샤페론 활성에 필수적이라고 알려진 두 개의 아미노산 잔기를 고려하였다. 하나는 Hsp60 단백질의 올리고머화(oligomerization)에 포함된 라이신 잔기(K28)이다. 다른 하나는 ATPase 활성의 활성 위치 잔기인 아스파테이트 잔기(D423)이다. 이에, K28 및 D423이 각각 글루타메이트 및 알라닌으로 대체된 Hsp60c 돌연변이체들을 제작하였다. 공동-트랜스펙션 실험을 통해, 두 개의 돌연변이체들이 IKK α 와 결합할 뿐 아니라, 야생형에 비해 IKK α 와 더 우수하게 결합하는 것을 확인하였다(도 36). Hsp60 돌연변이-발현하는 세포에서 TNF- α 에 의해 야기된 IKK 활성화는 야생형과 유사하였는데(도 37), 이는 상술한 기능 상실(loss-of-function) 돌연변이가 Hsp60의 IKK-증가 활성화에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 더 나아가, 대조군 백터보다 Hsp60-발현 세포에서 TNF- α -유도된 NF- κ B 전사가 약 4-6배 정도 더 높게 증가하였다(도 38). IKK β -결핍 3T3 세포에서 테스트된 것과 같이, 상술한 돌연변이들의 증대 효과는 IKK β -의존적이었다. 따라서, 기능 상실 돌연변이체들을 이용한 실험 결과는 세포질 Hsp60은 샤페론 활성과 독립적으로 IKK/NF- κ B 활성화에 기능한다는 것을 강력하게 제시한다.

[192] IKK-상호작용 단백질 중 하나인 ELKS는 IKK 복합체로 I κ B의 합류(recruitment)를 매개한다고 알려져 있다. 이러한 활동 모드를 테스트하기 위해, 재조합 Hsp60 단백질을 활성화된 IKK 복합체가 기질로 전장 인간 I κ B와 반응하는 IKK 키나제 반응에 첨가하였다. I κ B에 대한 활성화된 IKK의 시험관 내 키나제 활성은 Hsp60 단백질의 존재에 의해 영향 받지 않았으며(도 39), 이는 Hsp60이 IKK와 기질인 I κ B의 상호작용에 관여하지 않는다는 것을 의미한다.

[193] 마지막으로, IKK α/β 의 T-루프에서 활성화-의존적 세린 인산화를 조사하여 IKK 활성화 과정에 세포질 Hsp60의 직접적인 관여에 대해 조사하였다. AS-ODN 트랜스펙션은 IKK의 Ser178/181에서 TNF- α -유도된 인산화를 현저하게 감소시켰는데, 이는 인산화-의존적 IKK 활성화가 손상되었음을 의미한다(도 40). 역으로, Hsp60c의 이상 발현은 IKK 인산화의 증가를 초래하였다(도 41). 종합하면, 본 발명의 데이터는 세포질 Hsp60이 샤페론-의존적 IKK 복합체의 안정화보다는 인산화-의존적 IKK 활성화에 포함된다는 것을 나타낸다.

[194]

- [195] 세포질 Hsp60은 NF- κ B 타겟 유전자 발현 및 세포 생존에 영향을 미친다.
- [196] IKK/NF- κ B 경로의 세포질 Hsp60-매개 조절의 중요성을 결정하기 위해, 본 발명자들은 ODN-트랜스펙션된 세포에서 NF- κ B 타겟 유전자의 발현을 조사하였다. RNase 보호 어세이를 이용하여 항-아팍토틱 유전자들의 발현을 스크리닝하였을 때, AS-ODN 트랜스펙션은 TRAF1, c-IAP1 및 c-IAP2의 발현에 영향을 끼치지 않았다(도 42). 흥미롭게도, AS-ODN은 TNF- α 에 대한 반응에서 MnSOD 및 Bfl-1/A1 발현의 유도만을 유의하게 감소시켰다(도 43). 또한, Hsp60N 항체는 이들 유전자의 유도를 현저하게 감소시켰다(도 44). 이에 반해, c-IAP2 발현 유도에는 아무런 영향이 없다. 따라서, 상술한 결과들은 세포질 Hsp60에 의한 IKK 활성화의 조절은 선택적 NF- κ B 타겟 유전자들의 발현에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.
- [197] 다음으로, 본 발명자들은 선택 타겟 유전자의 조절이 세포 생존에 중요한 지 여부를 조사하였다. MnSOD 및 Bfl-1/A1은 미토콘드리아-유래 활성산소종(ROS)을 억제할 가능성이 있기 때문에, 산화-민감성 형광다이인 CM-H₂DCFDA를 이용하여 ODN-트랜스펙션된 세포에서 세포내 ROS 레벨을 조사하였다. AS-ODN 트랜스펙션은 AS-ODN 처리되지 않은 군 또는 S-ODN 트랜스펙션과 비교하여 TNF- α 처리에 따라 시간-의존적으로 세포내 ROS 레벨의 현저한 증가를 유도하였다(도 45). 증가된 ROS 레벨은 지속적인 JNK 활성화를 통해 세포 사멸과 연결되기 때문에, 스트레스-활성화된 단백질 키나제들(JNK 및 p38 MAPK)의 지속적인 활성화를 조사하였다. 뜻밖에도, AS-ODN-트랜스펙션된 세포에서 JNK 및 p38 MAPK의 활성화가 더 지속되는 것을 발견하였다(도 46). ASK-1 MAP3K는 ROS-매개된 세포 사멸에서 JNK 및 p38의 활성화를 지속시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 확인 결과, AS-ODN-트랜스펙션된 세포에서 ASK-1 활성화가 현저하게 유도되었다(도 47). ASK-1 활성화를 포함하는 신호전달 경로의 활성화 결과로, AS-ODN는 HeLa 세포에서 TNF- α -유도된 세포 사멸의 뚜렷한 증가를 초래한 반면에, AS-ODN 처리되지 않은 군 또는 S-ODN는 전혀 증가를 유발하지 않았다(도 48). 또한, AS-ODN는 세포질 Hsp60의 레벨이 증가된 대장암 세포주에서 TNF- α -유도된 세포 사멸을 증가시켰다(도 49). AS-ODN 트랜스펙션은 그 자체로 ROS ASK1 및 세포 사멸의 기본적 활성화를 초래하였다. Hsp60c 과다발현이 기본적 IKK/NF- κ B 활성화를 유도시켰다는 증거와 함께(도 28 내지 31), 세포질 Hsp60이 휴지기 암 세포에서 세포 생존을 지시하는 것으로 생각된다. 종합해보면, 본 발명의 결과들은 세포질 Hsp60에 의한 MnSOD 및 Bfl-1/A1의 선택적 조절은 미토콘드리아 ROS 방출(burst)을 억제함으로써 세포 생존에 뚜렷한 영향을 미친다는 것을 제시해 준다.
- [198]
- [199] 세포질 Hsp60은 스트레스 조건에서 숙주세포를 보호한다.
- [200] 세포질 Hsp60의 생존 촉진 활성을 생체 내에서 조사하였다. 이를 위해,

Hsp60c를 발현하는 트랜스제닉 마우스를 생산하였다(도 50-51). Hsp60c 단백질은 간, 비장 및 폐를 포함하는 다양한 조직에서 성공적으로 발현하였다(도 52). TNF- α 가 정맥내 주입되었을 경우, 대조군 B6 마우스와 비교하여 Hsp60c-발현 트랜스제닉 마우스에서 IKK 활성화 정도가 현저하게 증가하였다(도 53). 이러한 결과는 세포질 Hsp60이 TNF- α -유도된 IKK 활성화를 생체 내에서 증가시켰다는 것을 나타낸다. 이후, 본 발명자들은 IKK/NF- κ B-의존적 세포 생존을 보이는 동물 모델을 찾았다: 디에틸니트로사민(diethylnitrosamine, DEN)-유도 간세포 사멸. 4-주령 수컷 마우스에서 DEN 주입 후, 간세포의 아폽토틱 세포 사멸은 실질적으로 증가하였다(도 56 내지 57). 따라서, TNF- α 로 처리되거나 또는 처리되지 않은 Hsp60c-발현 트랜스제닉 마우스에서 DEN-유도된 세포 사멸을 조사하였다. 간 조직 절편의 TUNEL 염색 결과, 간세포 사멸은 대조군 마우스와 비교하여 Hsp60c-발현 트랜스제닉 마우스에서 현저하게 감소하였다(도 54-55). 상술한 데이터는 세포질 Hsp60c가 IKK/NF- κ B 활성화를 촉진시킴으로써 스트레스-유도된 세포 사멸을 생체 내에서 억제한다는 것을 나타낸다.

[201]

[202] **Hsp60 AS-ODN은 염증-유도 골 소실을 억제한다.**

[203] Hsp60 AS-ODN이 IKK/NF- κ B 경로의 세포내 활성화에 음성적 효과가 명확하기 때문에, 본 발명자들은 AS-ODN이 생체 내 NF- κ B-의존적 염증 반응을 억제할 수 있는 지 여부를 테스트하였다. NF- κ B는 대식세포-콜로니 자극인자(macrophage-colony stimulating factor, M-CSF)의 존재 하에서 RANKL 또는 TNF- α 에 대한 반응으로 유도되는 파골세포 분화에 대한 핵심 생존 전사인자이다(Boyle WJ et al., *Nature*, 423(6937): 337-342 (2003); Kobayashi K et al., *J Exp Med.*, 191(2): 275-286 (2000)). 최근에, IKK 복합체가 파골세포 형성과정 동안 RANKL로부터 NF- κ B로의 생존 경로를 매개한다는 것이 보고되었다(Chaisson ML et al., *J Biol Chem.*, 279(52): 54841-8 (2004); Dai S, et al., *J Biol Chem.*, 279(36): 37219-22 (2004); Ruocco MG et al., *J Exp Med.*, 201(10): 1677-87 (2005)) 따라서, 본 발명자들은 파골세포 분화에서 Hsp60 AS-ODN의 효과를 테스트하였다. ODNs로 전처리되거나 되지 않은 골수-유래 단핵구/대식세포(BMM)를 대식세포-콜로니 자극인자의 존재 하에서 RANKL 또는 TNF- α 로 자극하였다. Hsp60 AS-ODN은 ODN 처리 되지 않은 또는 S-ODNs로 처리된 세포에 비해 RANKL 또는 TNF- α 로 유도된 다핵성 TRAP-양성 파골세포의 형성을 현저하게 억제하였는데(도 58-59), 이는 Hsp60 AS-ODN이 파골세포 생존을 감소시킨다는 것을 의미한다. 또한, 본 발명자들은 세포질 타겟된 Hsp60(Hsp60c)를 인코딩하는 레트로바이러스로 감염된 BMM 세포에서 동일한 실험을 반복하여 실시하였다. Hsp60c 발현은 대조군 바이러스-감염된 세포와 비교하여 RANKL-처리된 세포에서 SOD2 발현을 증가시켰다(도 60). 더 나아가, Hsp60c 발현은 RANKL에 대한 반응에서 TRAP-양성 파골세포의 형성을

뚜렷하게 증가시켰다(도 61). 상술한 결과들은 세포질 Hsp60이 IKK/NF- κ B 신호전달을 통해 SOD2 발현을 유도함으로써 파골세포의 생존에 도움을 준다는 것을 나타낸다.

[204]

[205] **Hsp60 AS-ODN**은 풍선 손상된 혈관에서 신생내막 두께를 감소시킨다.

[206] 혈관에 대한 풍선 손상은 내피세포의 노출을 야기하여 모집된 단핵구 및 혈소판으로부터 배출된 친-염증성 인자들에 의해 평활근의 활성화를 초래한다. 따라서, NF- κ B 활성화도 풍선-손상된 혈관벽에서 SMCs의 증식 및 생존에서 중요한 역할을 한다(Ohtani K et al., *Circulation*, 114(25): 2773-9(2006); Breuss JM et al., *Circulation*, 105(5): 633-8(2002); Autieri MV et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 213(3): 827-36(1995)). 이러한 측면에 대한 확인을 위해, 본 발명자들은 Hsp60 AS-ODN이 증식성 SMCs에 의한 신생내막 두께 증식을 억제하는 지 여부를 테스트하였다. 우선, 손상된 경동맥으로 ODNs의 운반을 FITC-컨쥬게이션된 ODN을 이용하여 테스트하였다. ODNs가 트랜스펙션 시약 올리고펙타민™의 존재 하에서 혈관 벽에 성공적으로 운반되었다(도 62). 래트 경동맥 혈관의 풍선 카테터-손상된 루멘이 AS-ODN 처리되지 않은 군 또는 ODNs와 반응되었을 경우, mock-처리된 경우와 비교하여 Hsp60 AS-ODN 처리는 신생내막 두께 증식을 두드러지게 억제한 반면에, S-ODN 처리는 아무런 효과가 없었다(도 63). 결정적으로, TUNEL 염색 결과는 AS-ODN 처리가 신생내막 층에서 아폽토틱 세포 사멸의 현저한 증가를 초래한다는 것을 나타냈는데(도 64), 이는 억제된 신생내막 두께가 SMCs의 아폽토틱 세포 사멸로부터 기인한다는 것을 의미한다.

[207]

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

[209]

청구범위

- [청구항 1] 세포질 Hsp60(heat shock protein, 60 kDa) 유전자의 발현 억제제 또는 세포질 Hsp60 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 비정상적 세포 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 억제제는 세포질 Hsp60에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 앵타머, 항체 및 단일사슬 가변영역 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 억제제는 서열번호 3 내지 서열번호 7로 구성된 군으로부터 선택되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 조성물.
- [청구항 4] 제 2 항에 있어서, 상기 억제제는 Hsp60에 특이적인 폴리클로날 항체인 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 세포질 Hsp60 단백질은 I κ B 키나제(IKK) 복합체와 상호작용하는 것인 조성물.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 IKK는 IKK α 또는 IKK β 인 조성물.
- [청구항 7] 제 5 항에 있어서, 상기 IKK는 NF- κ B 경로를 활성화시키는 것인 조성물.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 NF- κ B 경로의 활성화는 아팍토시스-유도 스트레스에 대한 세포 생존율을 증가시키는 것인 조성물.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 세포질 Hsp60 단백질은 MnSOD(manganese-superoxide dismutase) 또는 Bfl-1/A1의 발현을 유도하는 것인 조성물.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 세포질 Hsp60 단백질은 미토콘드리아-유래된 ROS(reactive oxygen species) 레벨을 감소시키는 것인 조성물.
- [청구항 11] 제 1 항에 있어서, 상기 세포질 Hsp60 단백질은 IKK α/β T-루프의 세린-인산화를 촉진시키는 것인 조성물.
- [청구항 12] 제 1 항에 있어서, 상기 비정상적 세포 증식 관련 질환은 암, 염증성 질환 또는 이상증식 혈관 질환인 조성물.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서, 상기 암은 뇌암, 신경내분비 암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 부신암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 또는 요관암인 조성물.
- [청구항 14] 제 12 항에 있어서, 상기 염증성 질환은 염증-유도 골질환, 퇴행성 관절염, 당뇨병, 자가면역 근육염, 동맥경화, 뇌졸중, 간경화,

뇌막염, 염증성 위궤양, 담낭 결석, 신장 결석, 부비강염, 비염, 결막염, 천식, 피부염, 염증성 장질환, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 염증성 피부 질환, 유육종증, 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 전신성 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus), 강직성 척추염(Ankylosing spondylitis), 베체트 병(Behcet's disease), 궤양성대장염(ulcerative colitis), 크론병(Crohn disease), 건선(psoriasis), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염, 습진성 피부염, 지루성 피부염, 편평 태선(lichen planus), 만성 단순태선(lichen simplex chronicus), 천포창(pemphigus), 불러스 천포창, 표피 수포증(Epidermolysis Bullosa), 담마진(Urticaria), 혈관 부종(angioedema), 맥관염(vasculitis), 홍반, 피부 호산구증다증(Eosinophilia), 화폐상 피부염(nummular dermatitis), 전신성 박탈 피부염, 정체 피부염, 피지샘의 질환, 입 주위 피부염, 수염 가성모낭염, 약물 발진, 다형 홍반(erythema multiforme), 결절홍반(Erythema nodosum), 환상 육아종(Granuloma annulare) 또는 골반염증성질환(PID: Pelvic Inflammatory Disease)인 조성물.

[청구항 15]

제 14 항에 있어서, 상기 염증-유도 골질환은 골 발생 질환, 골 골절, 골의 노인성 손실, 연골이영양증, 고칼슘혈증, 과골화증, 불완전골형성증, 골연화증, 골수염, 골다공증, 파제트병, 골관절염 또는 구루병인 조성물.

[청구항 16]

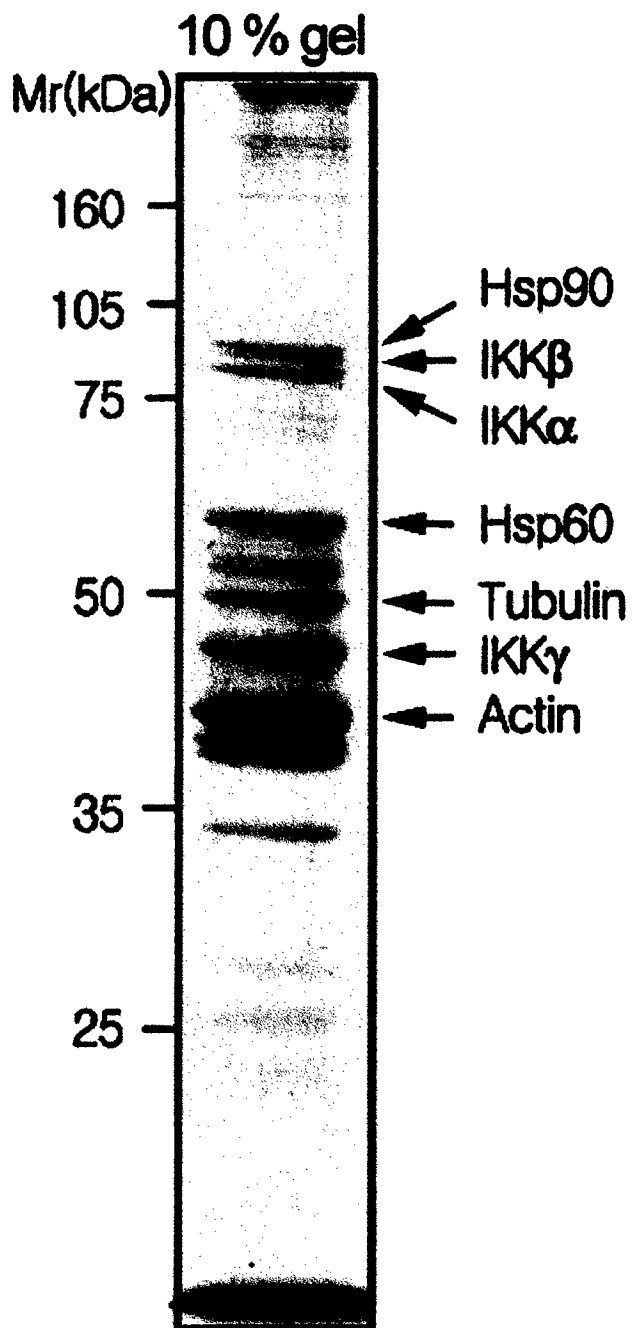
제 12 항에 있어서, 상기 이상증식 혈관 질환은 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 재발협착증 및 협착증, 혈관 기형, 혈액투석과 관련된 혈관 통로 협착, 이식 후 동맥병증(transplant arteriopathy), 맥관염, 혈관염증질환, 디조지 증후군, 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT), 해면상혈관종, 켈로이드성 반흔, 화농성 육아종, 수포질환, 카포시 육종, 과증식성 유리체 증후군, 미숙아 망막증, 맥락막 신생혈관, 황반변성, 당뇨병성 망막증, 안내 신생혈관증식, 원발성 폐고혈압증, 천식, 비폴립(nasal polyps), 염증성 장 및 치주 질환, 복수, 복막 유착, 피임, 자궁내막증, 자궁출혈, 난소낭, 난소과자극증후군, 관절염, 류마티스성 관절염, 만성 관절류마티즘, 윤활막염, 골관절염, 골수염, 골증식, 폐혈증, 혈관누출 증후군, 암, 감염성 질환 또는 자가면역질환인 조성물.

[청구항 17]

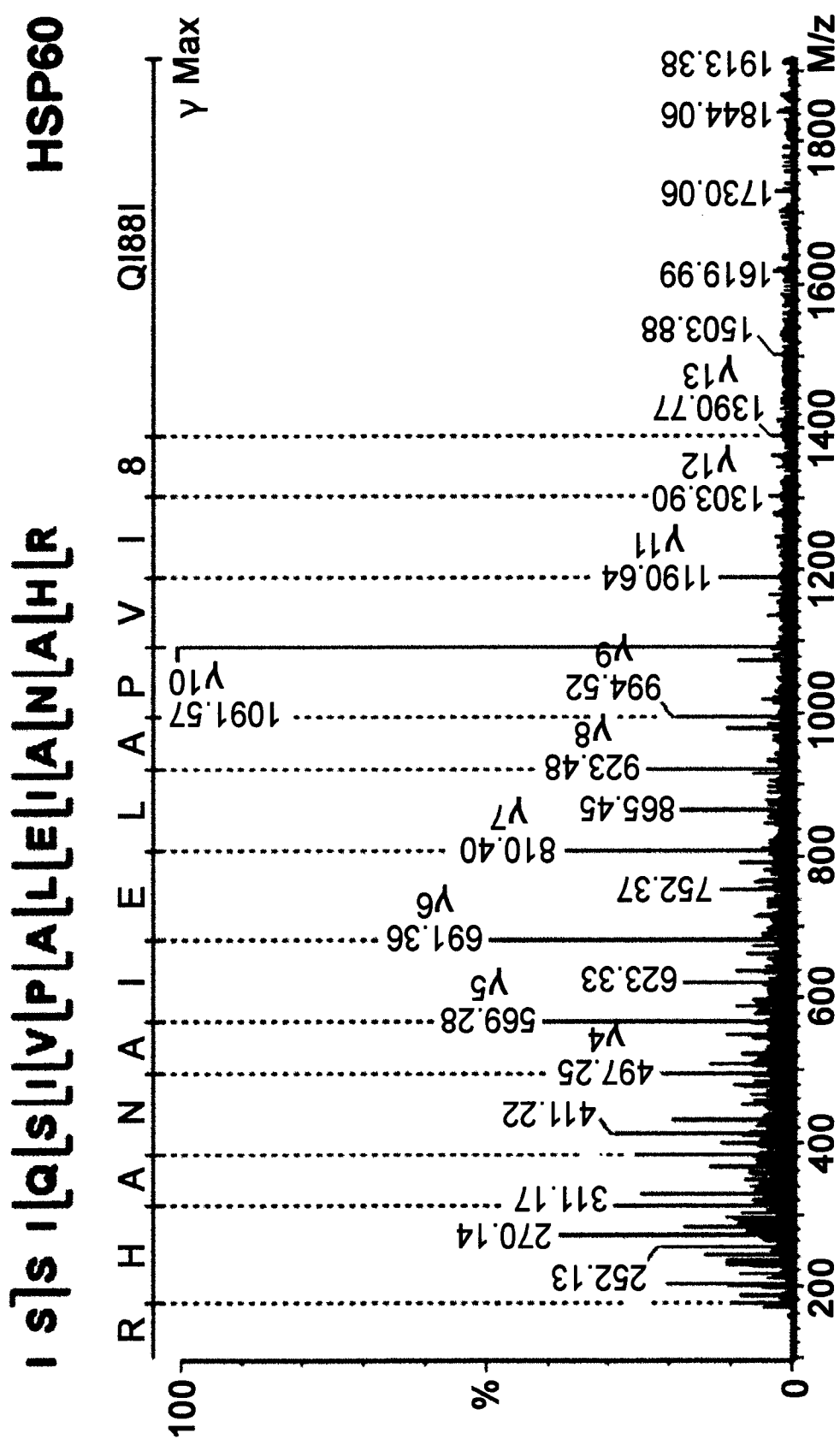
(a) 세포질 Hsp60 유전자를 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; (b) 상기 세포질 Hsp60의 발현을 분석하는 단계; 및 (c) 상기 시험물질이 세포질 Hsp60의 레벨을 감소시키면 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법.

- [청구항 18] (a) 세포질 Hsp60 단백질을 포함하는 세포 또는 세포 추출물(cell extract)에 시험물질을 처리하는 단계; (b) 상기 시험물질이 세포질 Hsp60 단백질에 결합하는지 여부, 또는 상기 시험물질이 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 단백질 사이의 결합을 억제하는지 여부를 분석하는 단계; 및 (c) 상기 시험물질이 세포질 Hsp60 단백질에 결합하거나 또는 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 사이의 결합을 억제시키면 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 19] 제 17 항 또는 제 18 항에 있어서, 상기 세포질 Hsp60의 발현, 세포질 Hsp60 단백질에의 결합 또는 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 단백질 사이의 결합을 세포 내에서 또는 시험관 내에서 분석하는 것인 방법.
- [청구항 20] 제 19 항에 있어서, 상기 분석은 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), 노던 블롯팅, cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 인 시투 혼성화 반응, 방사능면역분석, 면역침전 또는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법을 이용하여 수행되는 것인 방법.
- [청구항 21] 제 17 항의 스크리닝 방법에 의하여 검색된 세포질 Hsp60 발현 억제제인, 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제.
- [청구항 22] 제 18 항의 스크리닝 방법에 의하여 검색된 세포질 Hsp60 단백질에 결합하는 세포질 Hsp60 단백질의 활성 억제제 또는 세포질 Hsp60 단백질과 IKK 단백질의 결합 억제제인, 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제.
- [청구항 23] 세포질 Hsp60 단백질을 포함하는 세포 추출물, 및 반응 완충액을 포함하는, 비정상적 세포 증식 관련 질환 치료제의 스크리닝 키트.
- [청구항 24] 제 23 항에 있어서, 상기 세포 추출물은 IKK(IkB 키나제) 단백질을 추가로 포함하는 것인 키트.
- [청구항 25] 세포질 Hsp60 유전자의 발현 억제제 또는 세포질 Hsp60 단백질의 활성 억제제를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 비정상적 세포 증식 관련 질환의 치료방법.
- [청구항 26] 비정상적 세포 증식 관련 질환의 치료용 의약의 제조에 있어서, 세포질 Hsp60 유전자의 발현 억제제 또는 세포질 Hsp60 단백질의 활성 억제제의 용도.

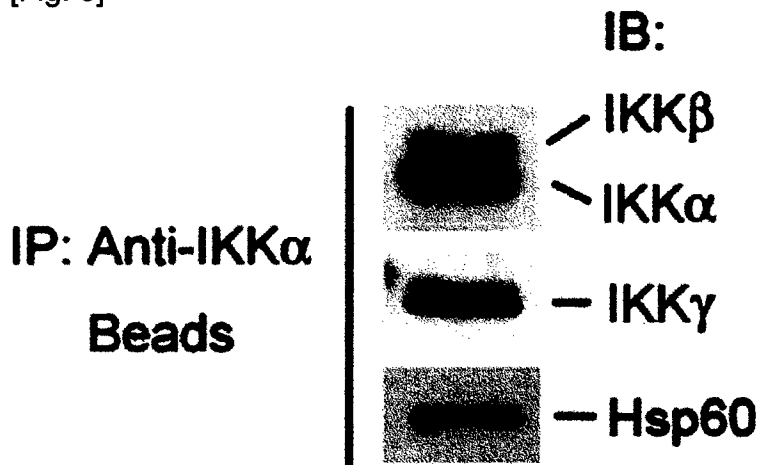
[Fig. 1]



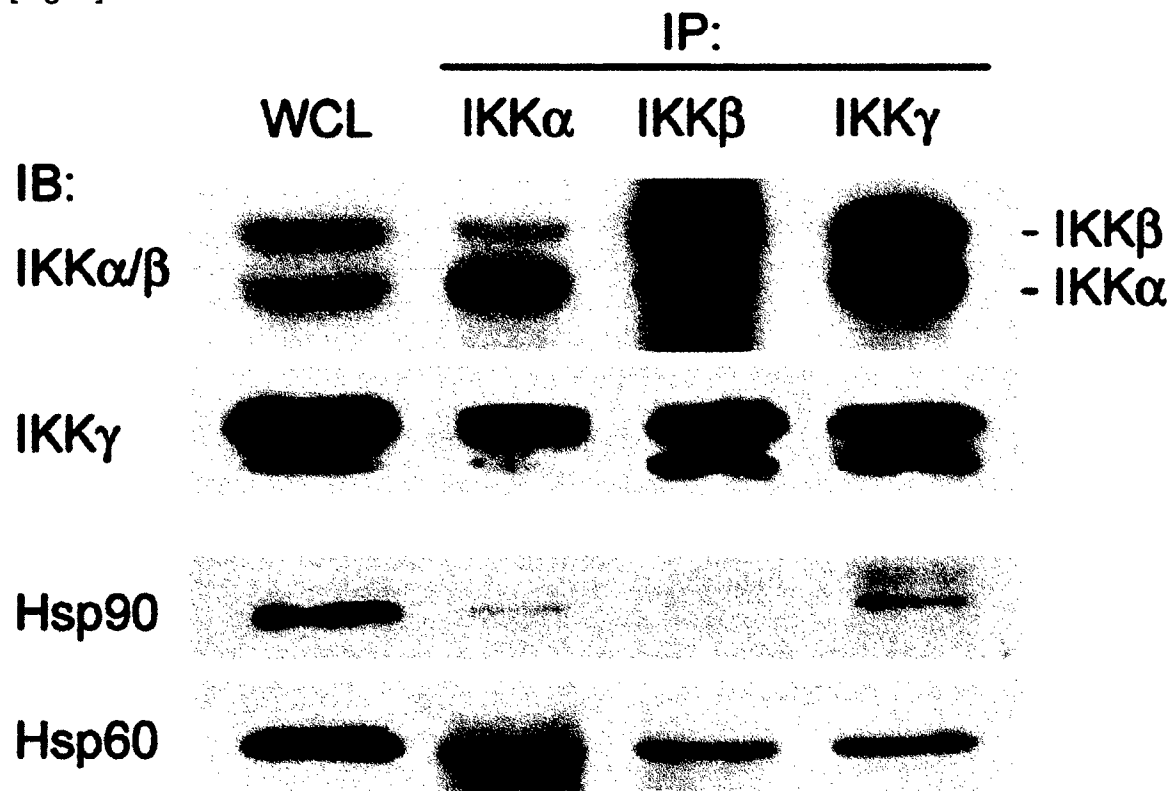
[Fig. 2]



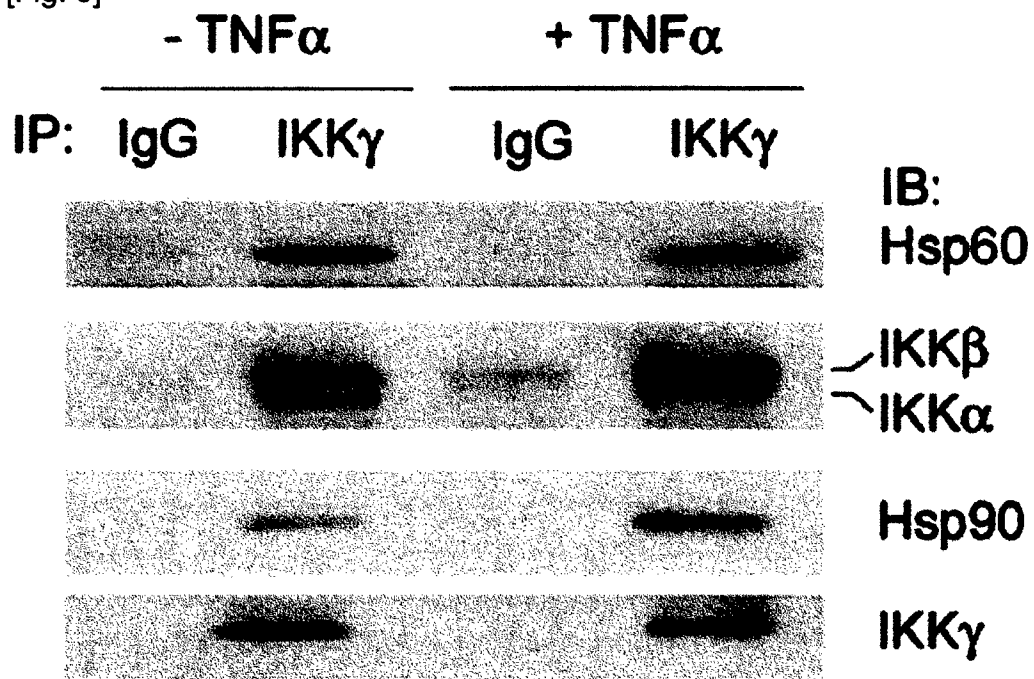
[Fig. 3]



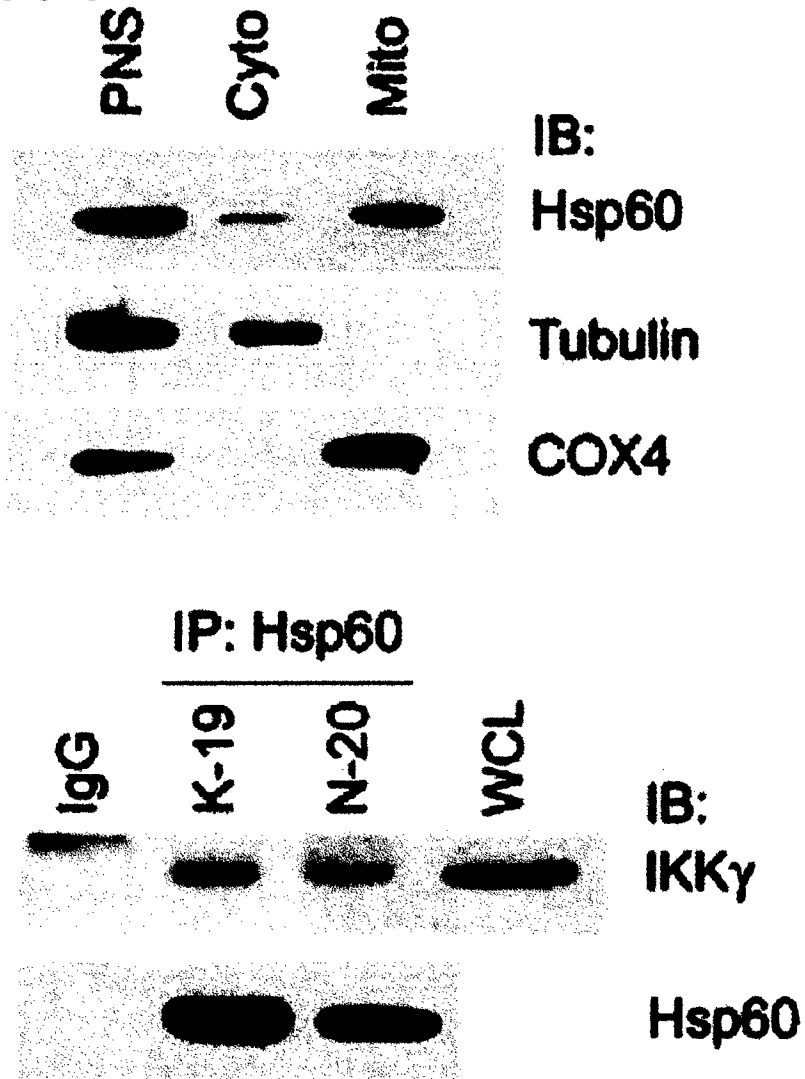
[Fig. 4]



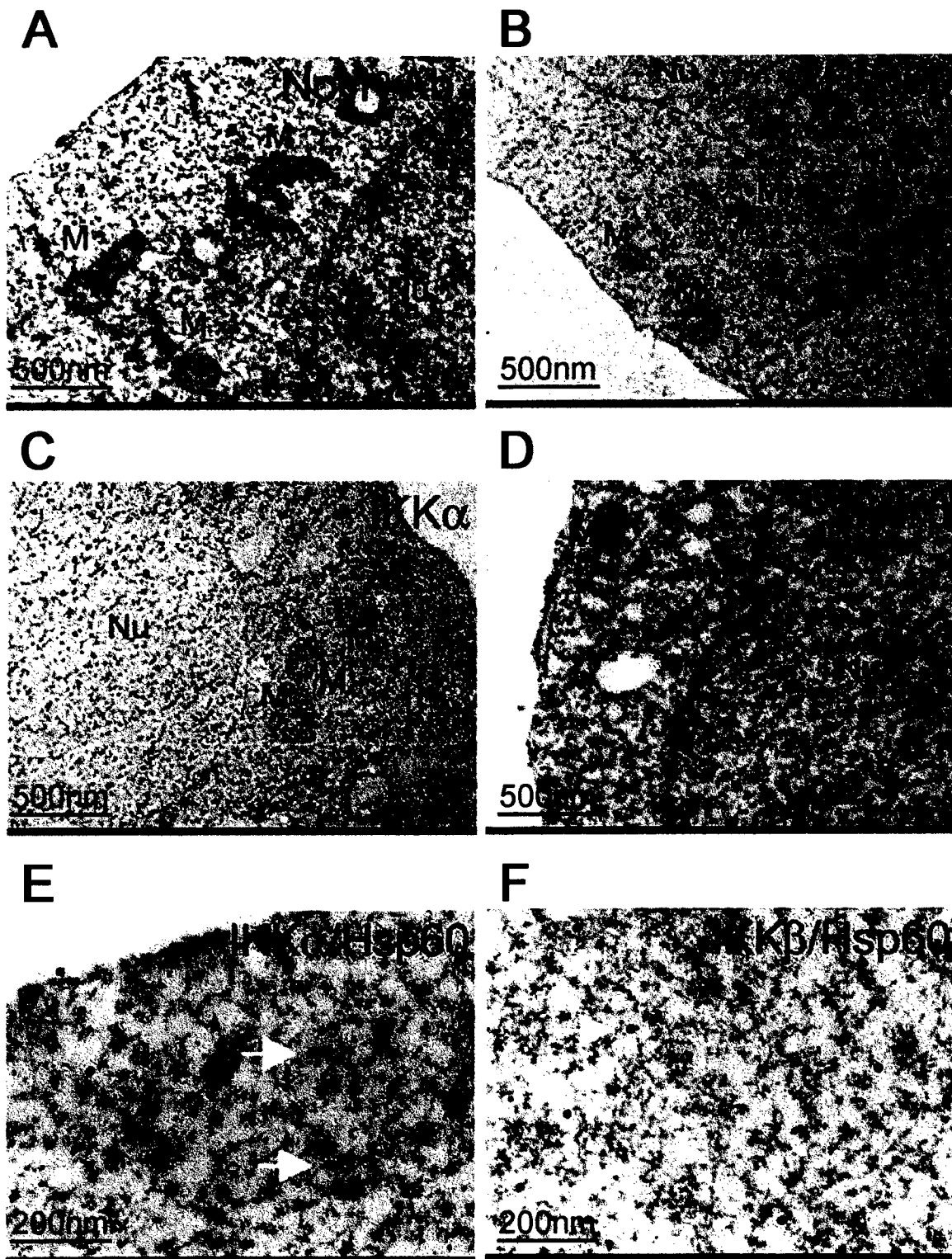
[Fig. 5]



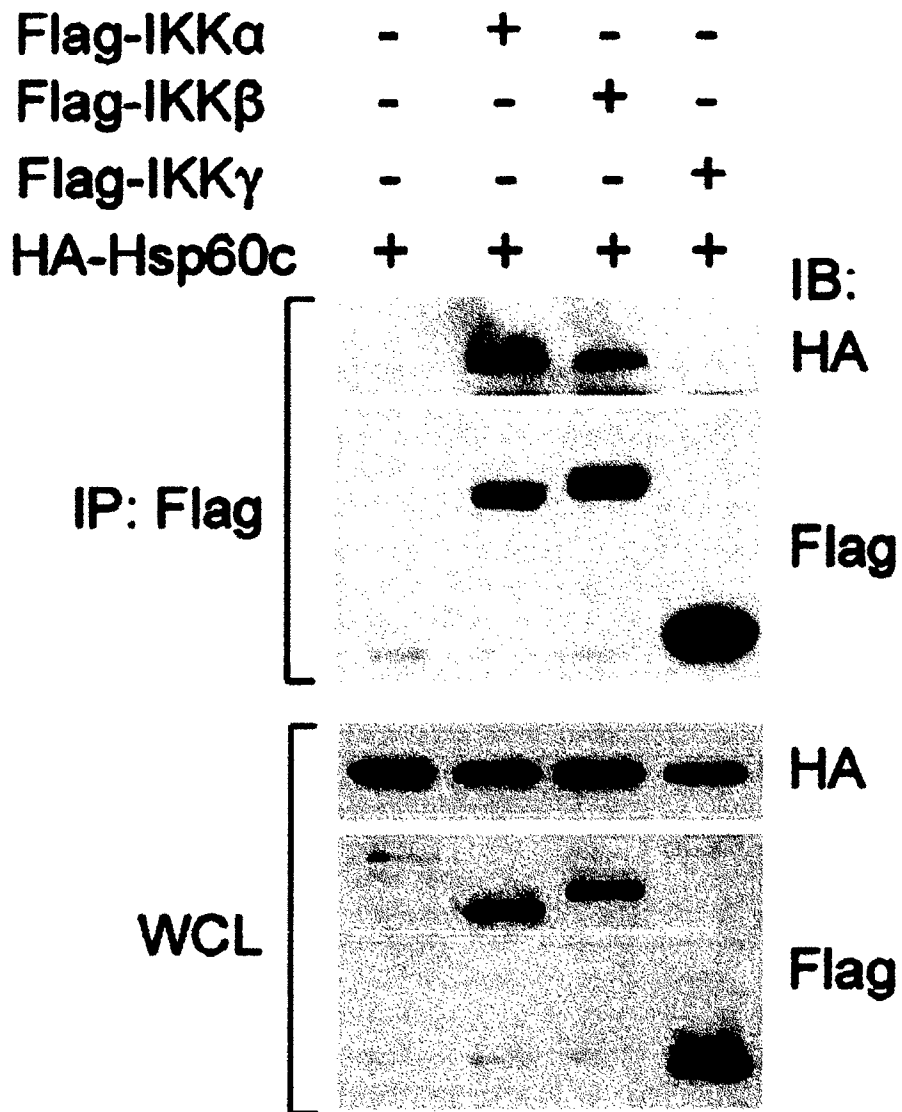
[Fig. 6]



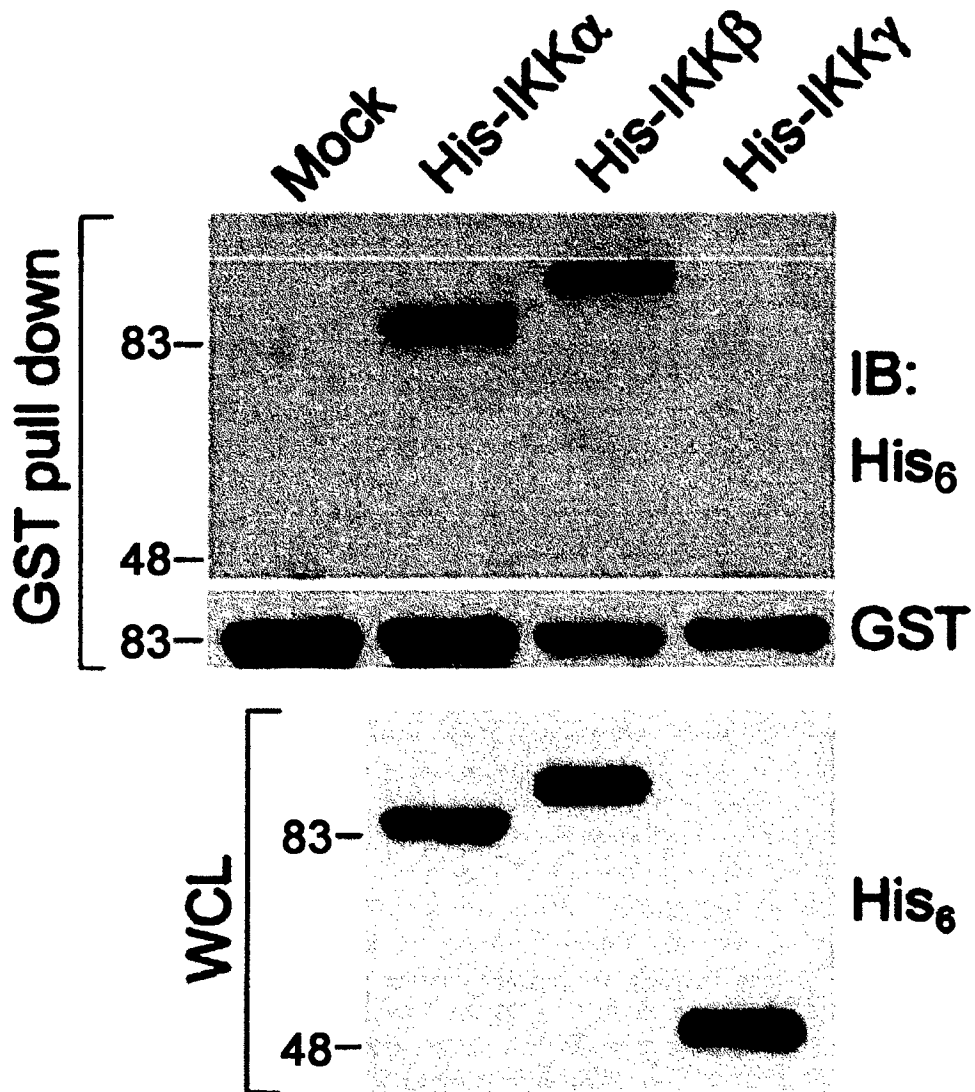
[Fig. 7]



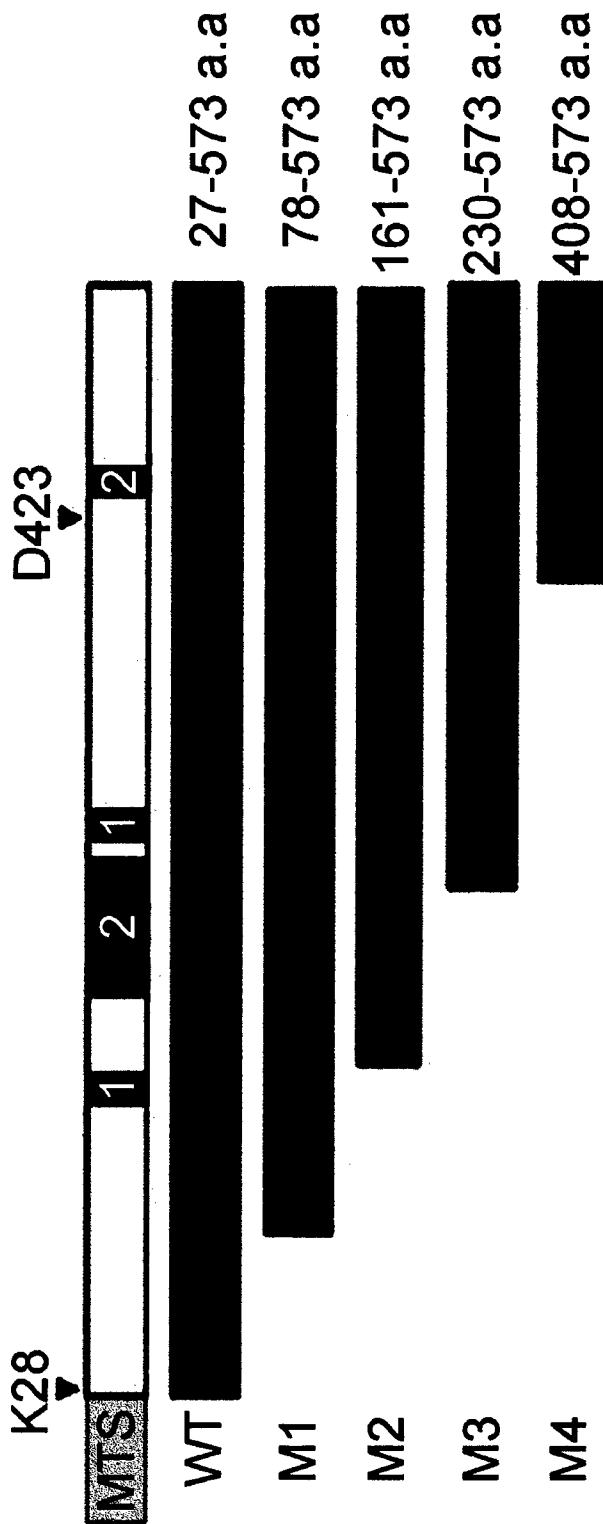
[Fig. 8]



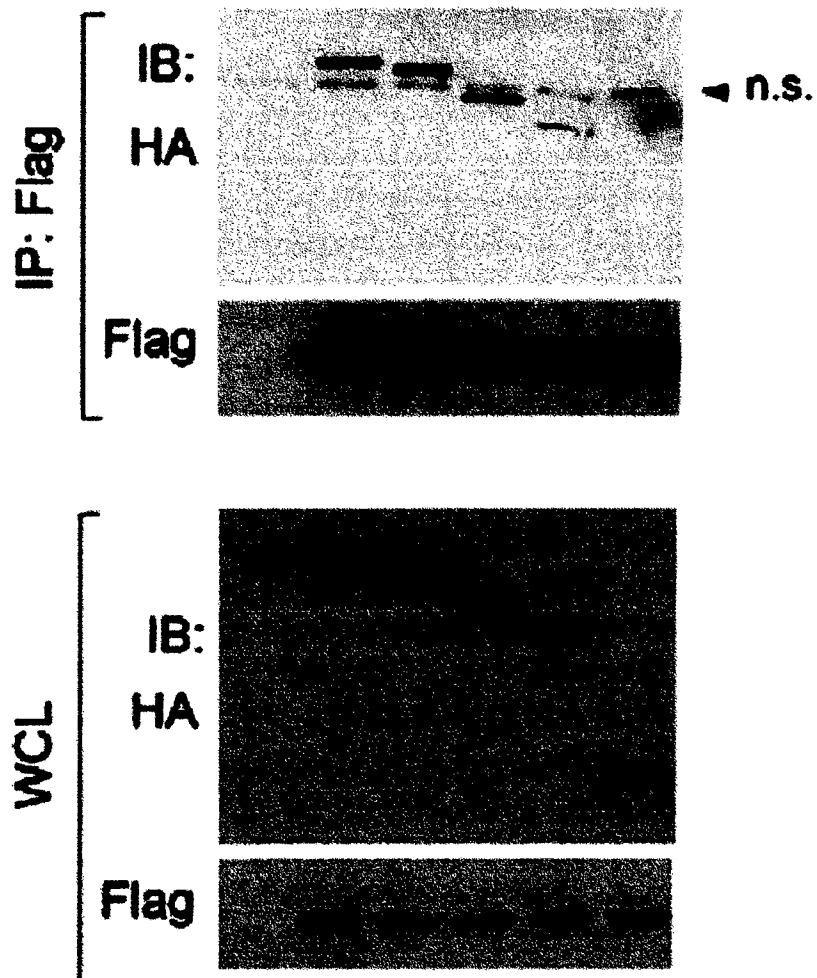
[Fig. 9]



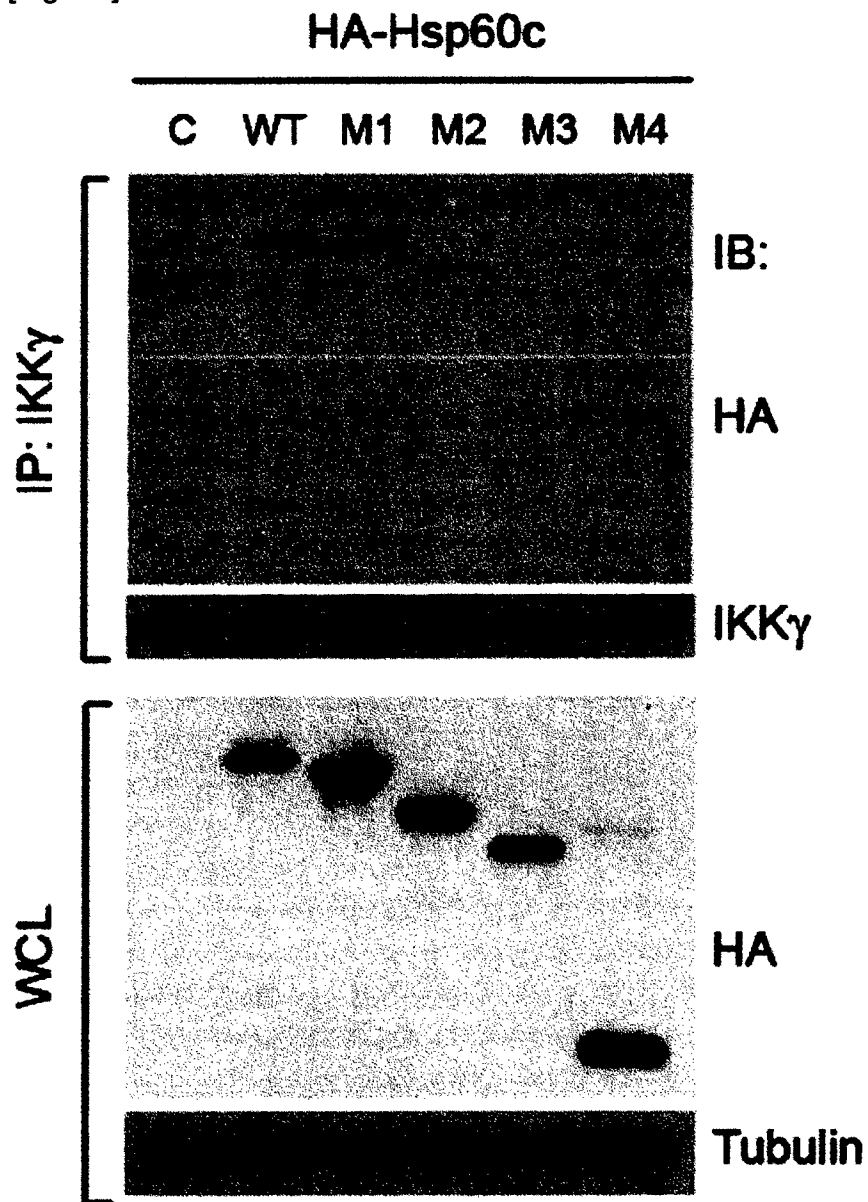
[Fig. 10]



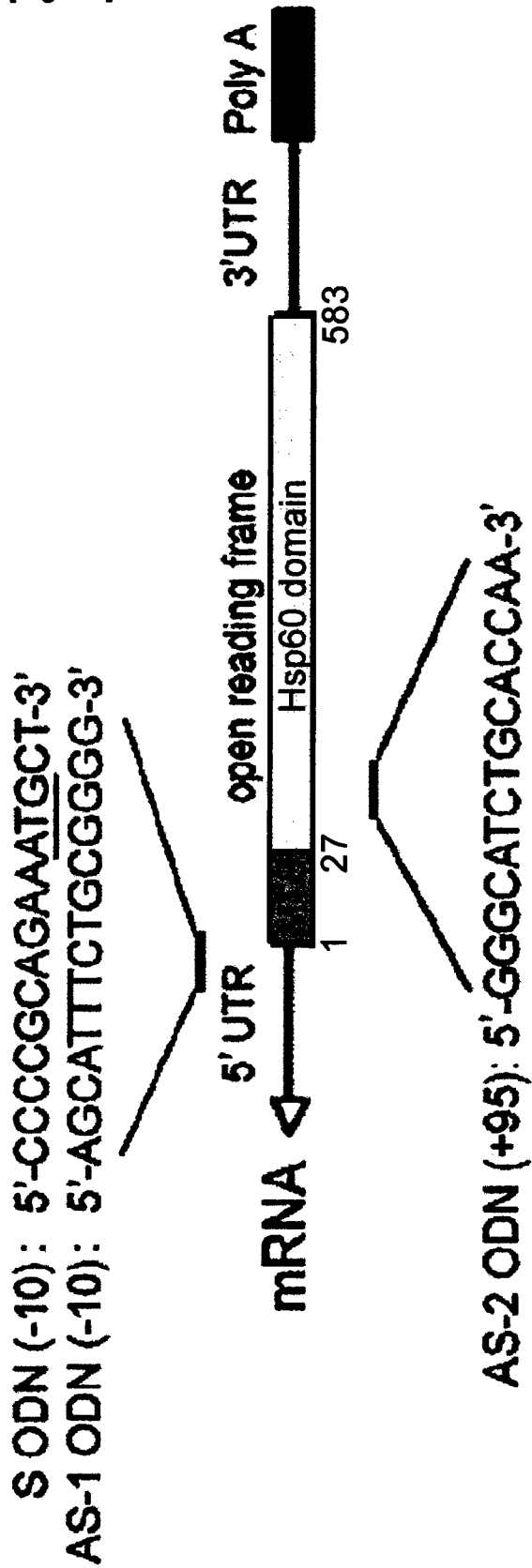
[Fig. 11]

HA-Hsp60c: WT WT M1 M2 M3 M4**Flag-IKK α : C + + + + +**

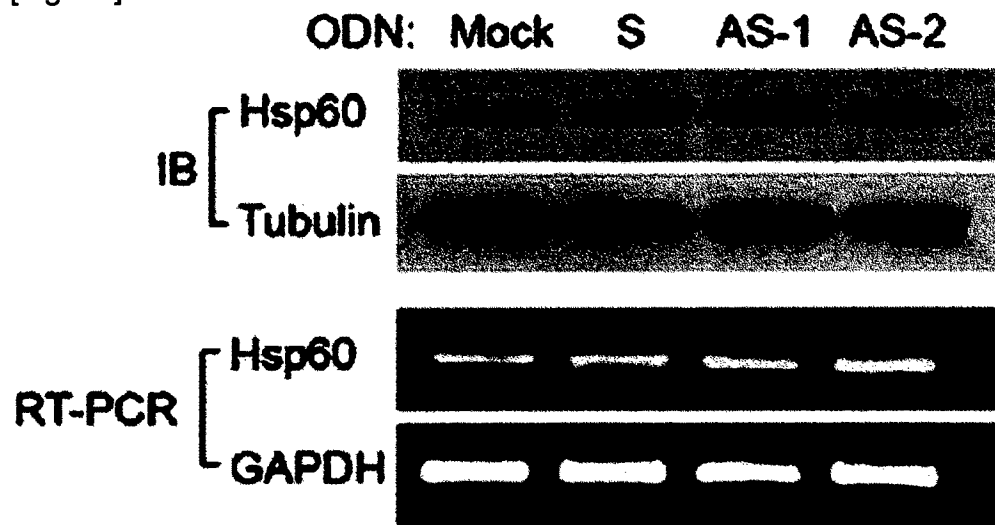
[Fig. 12]



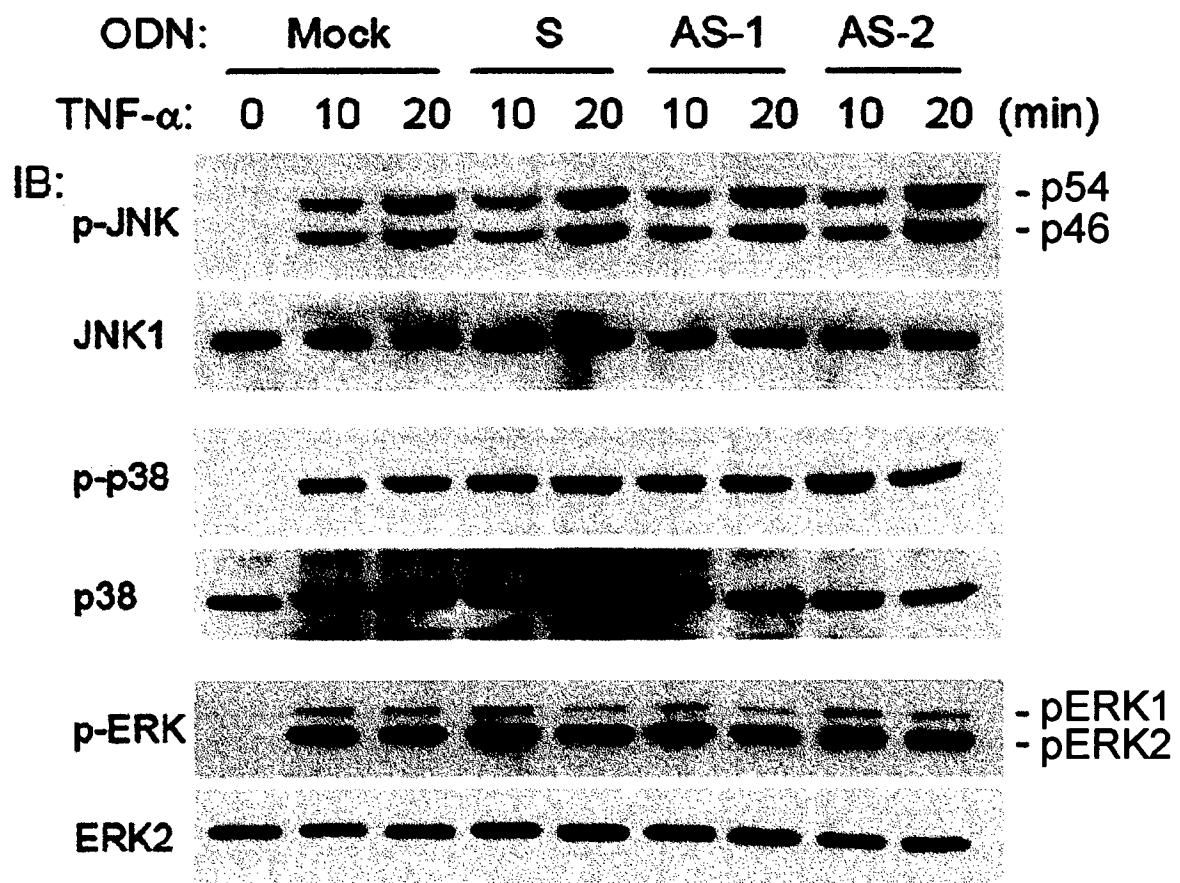
[Fig. 13]



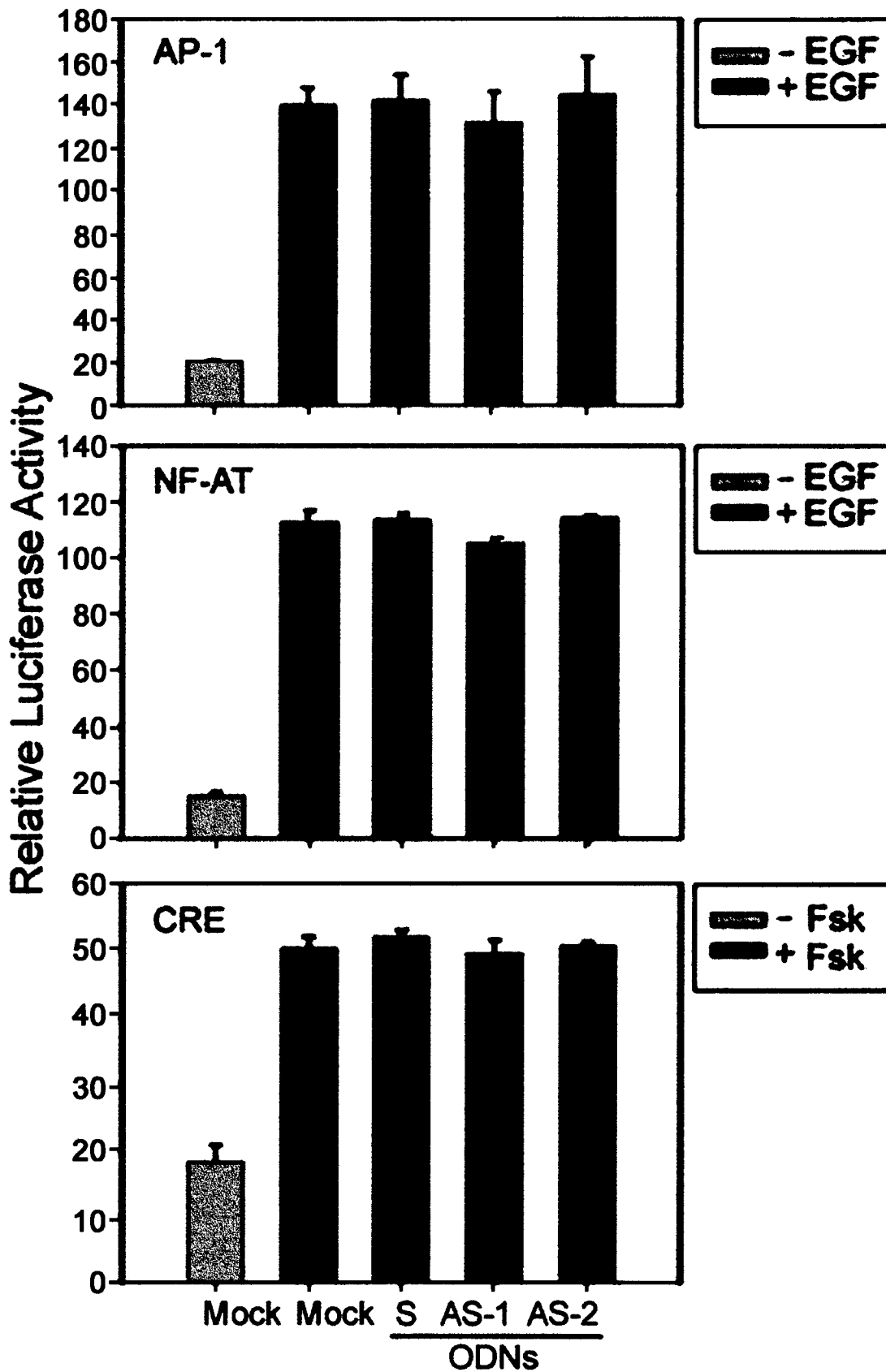
[Fig. 14]



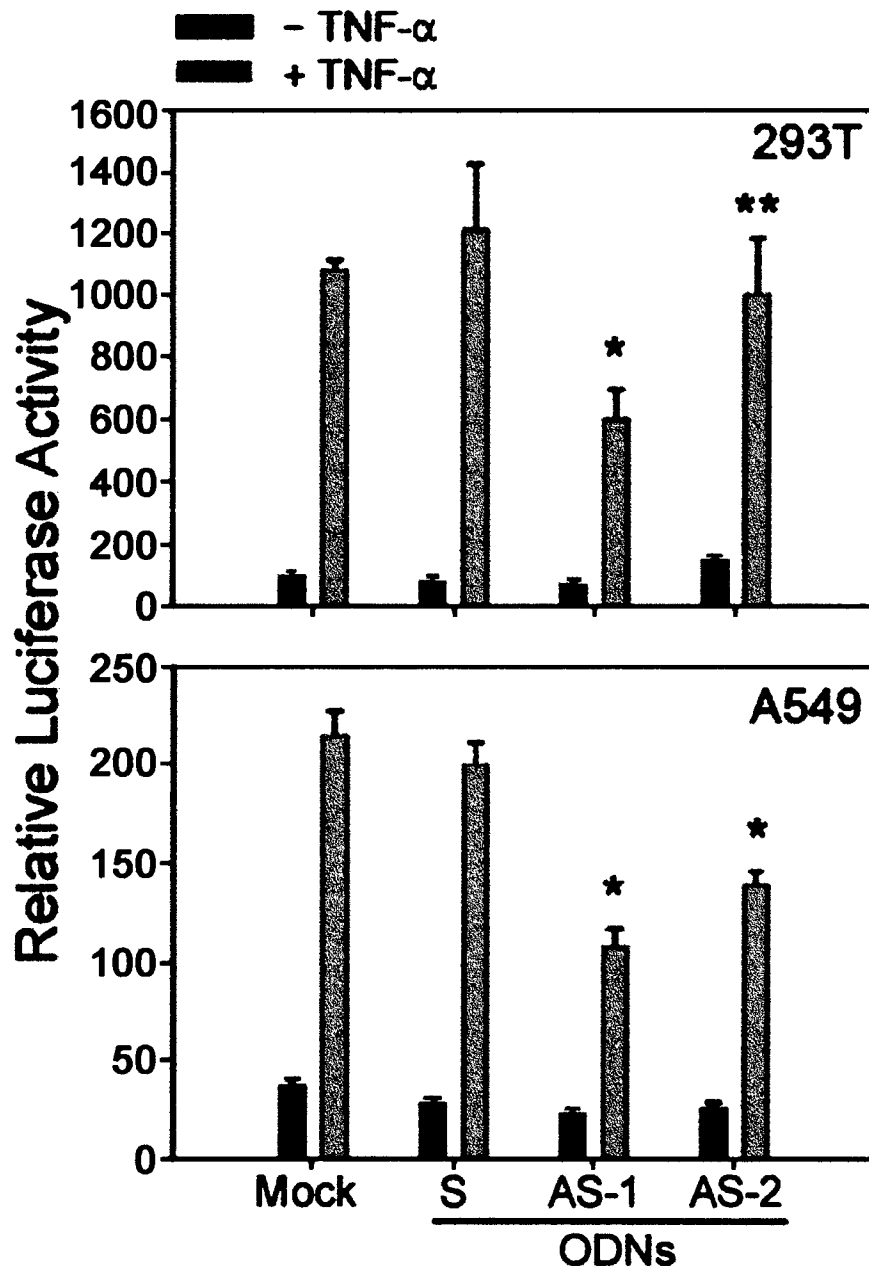
[Fig. 15]



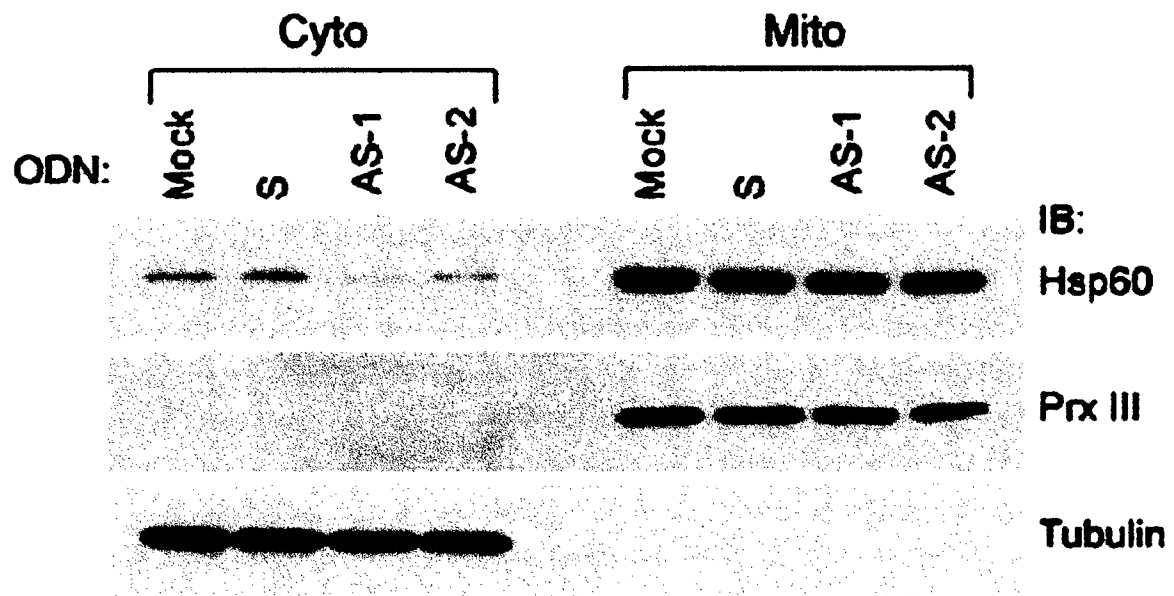
[Fig. 16]



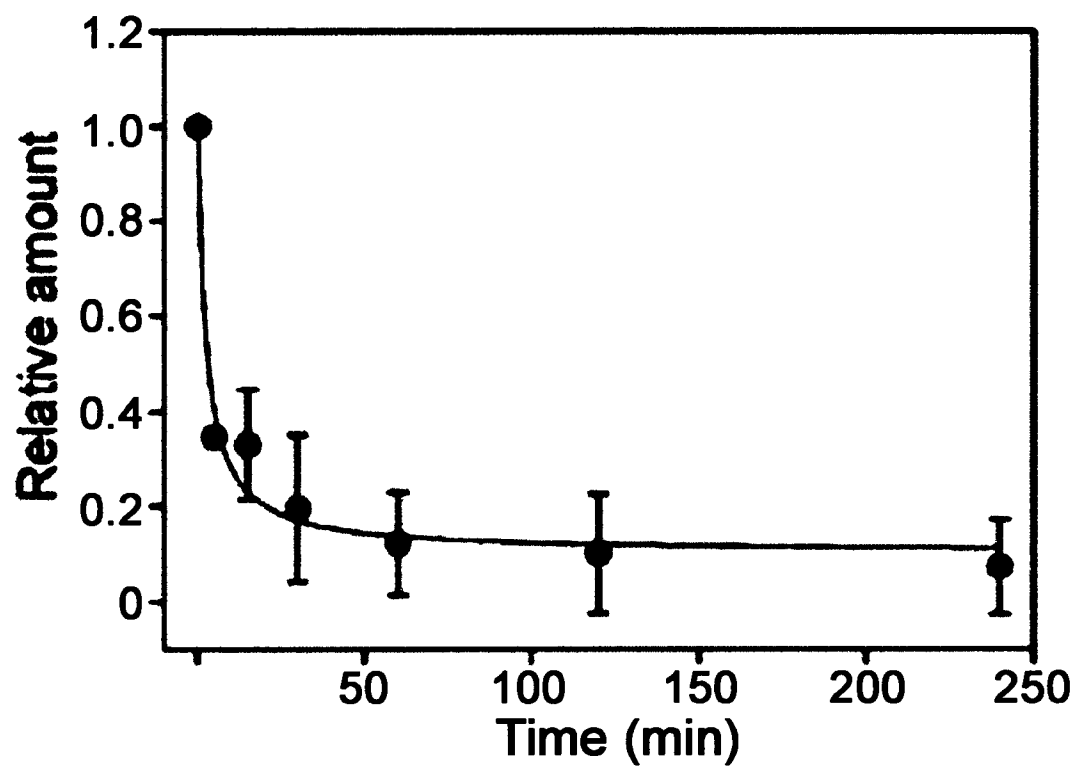
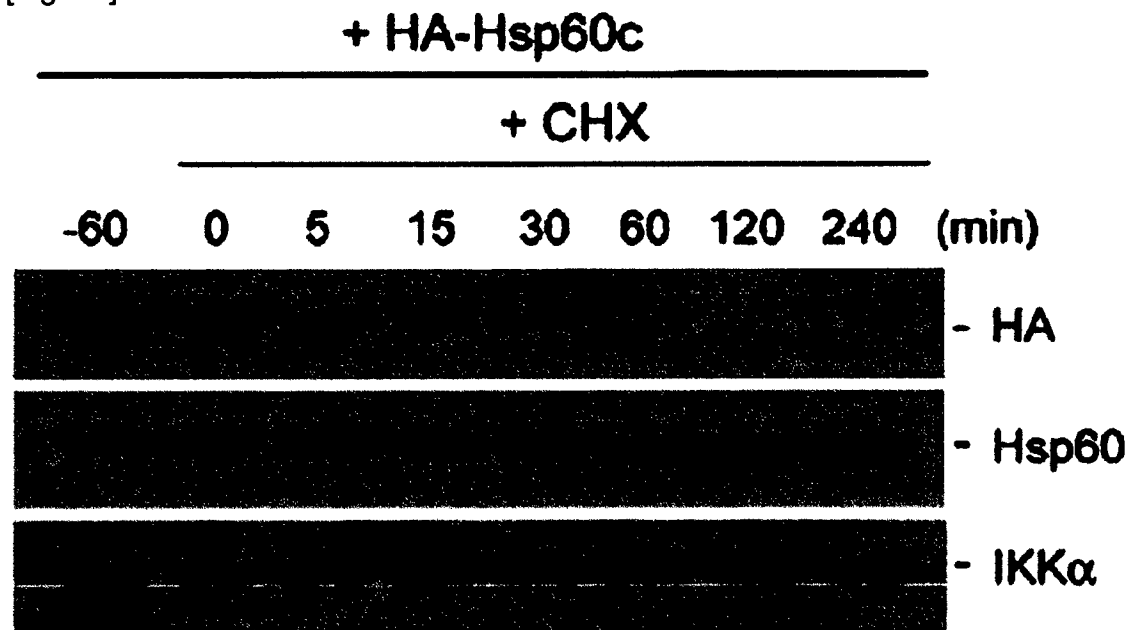
[Fig. 17]



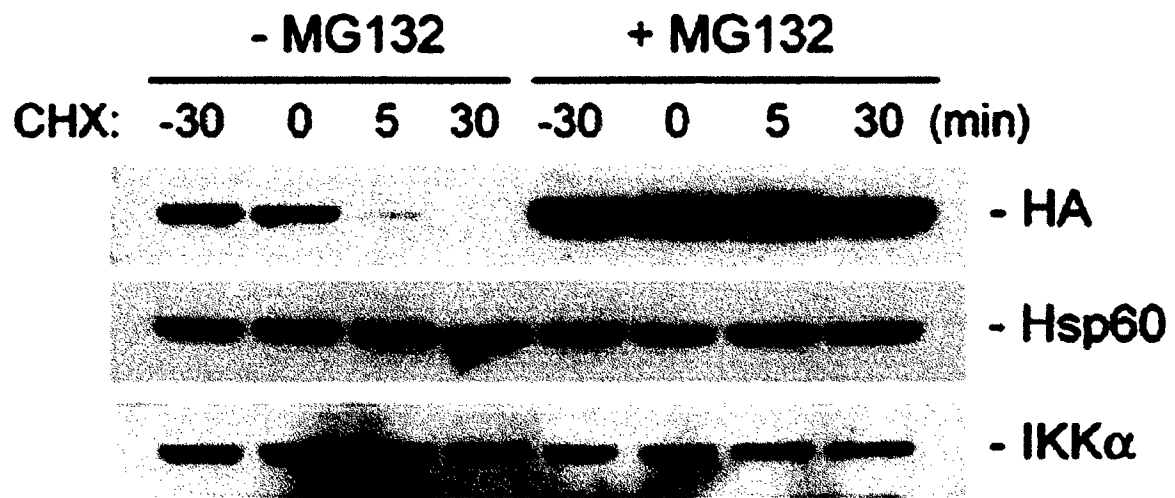
[Fig. 18]



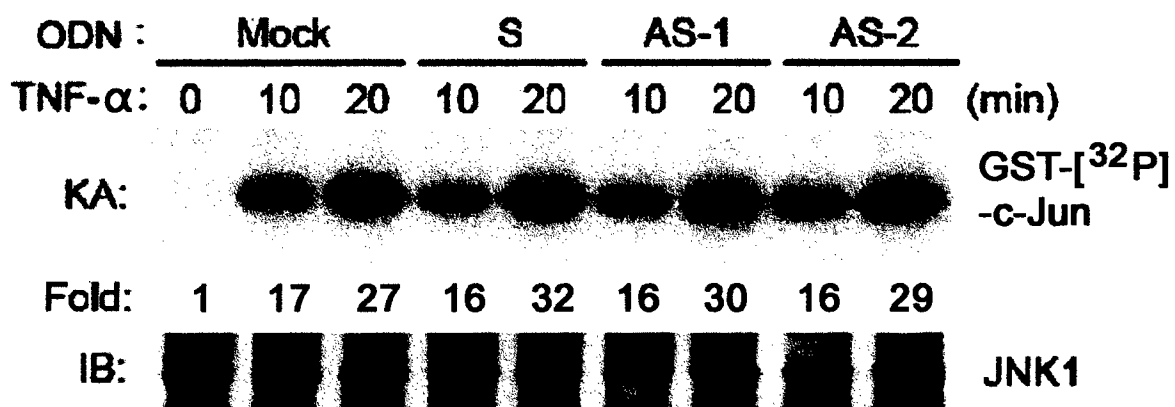
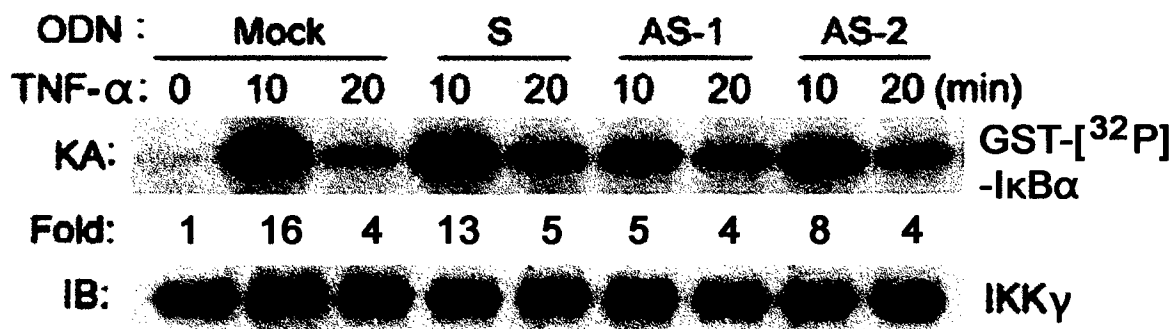
[Fig. 19]



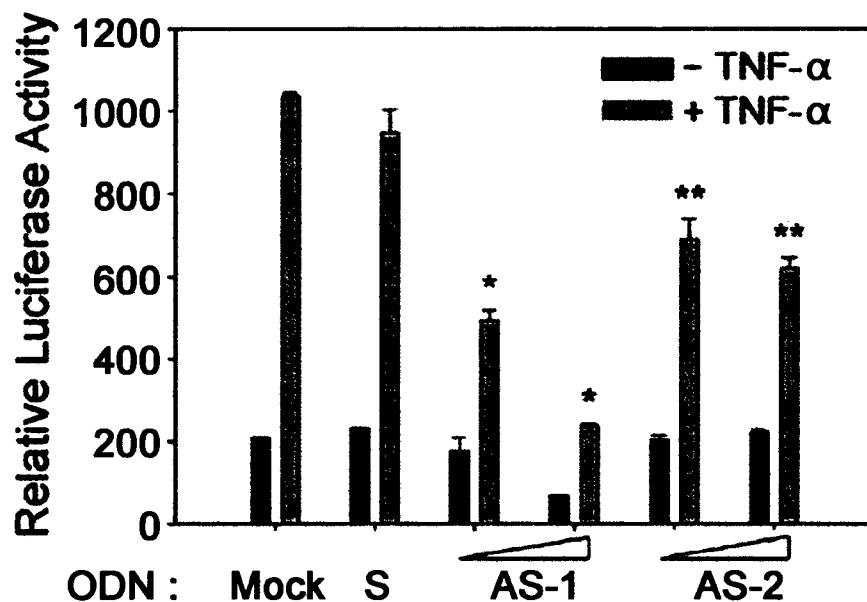
[Fig. 20]



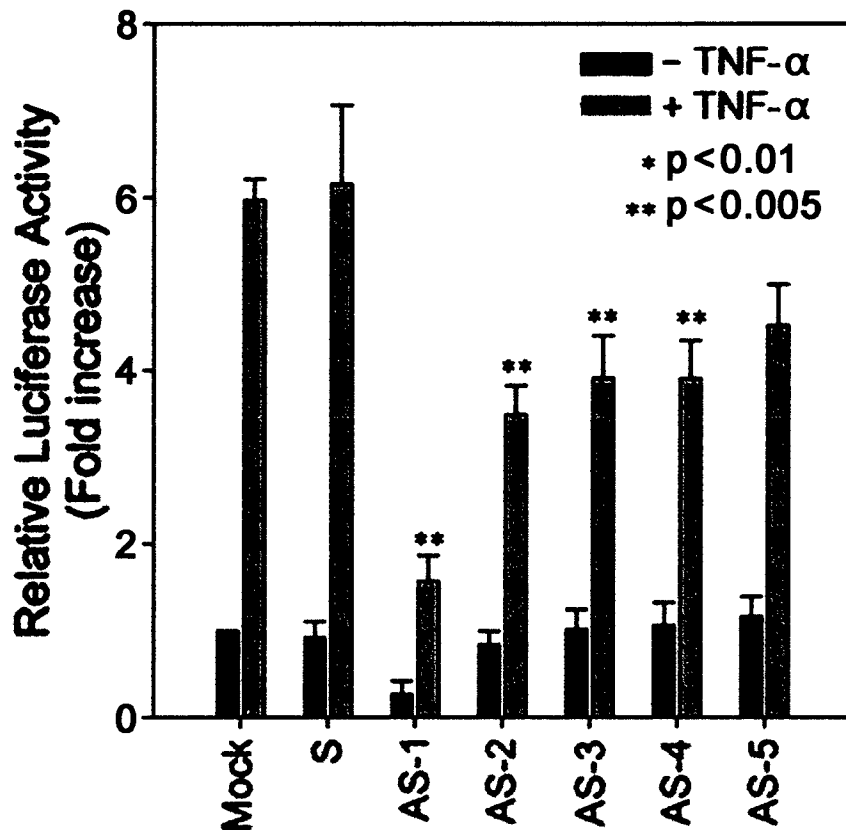
[Fig. 21]



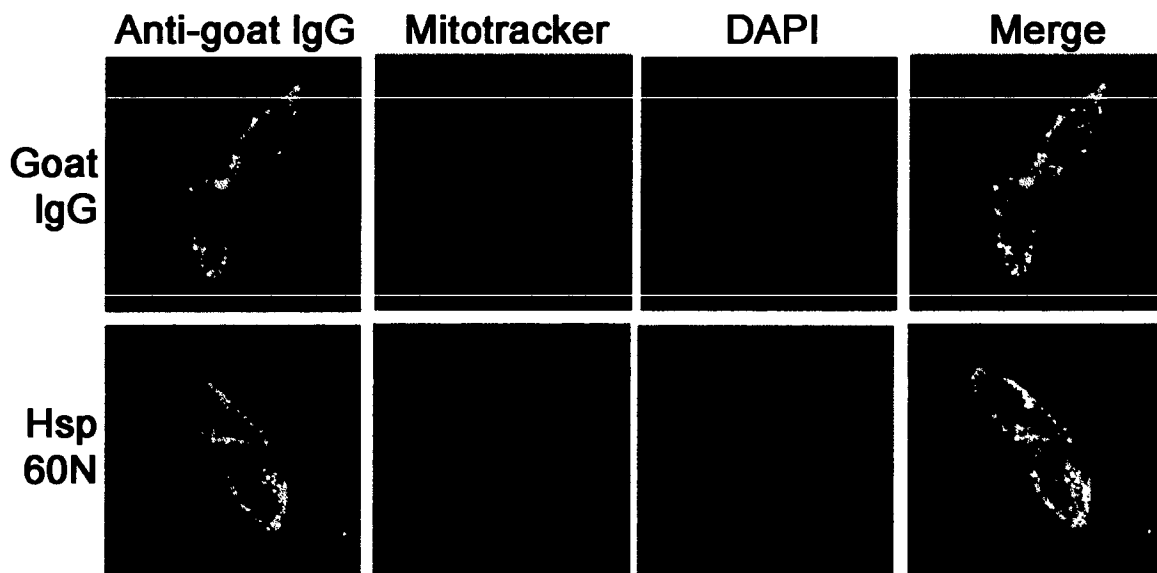
[Fig. 22]



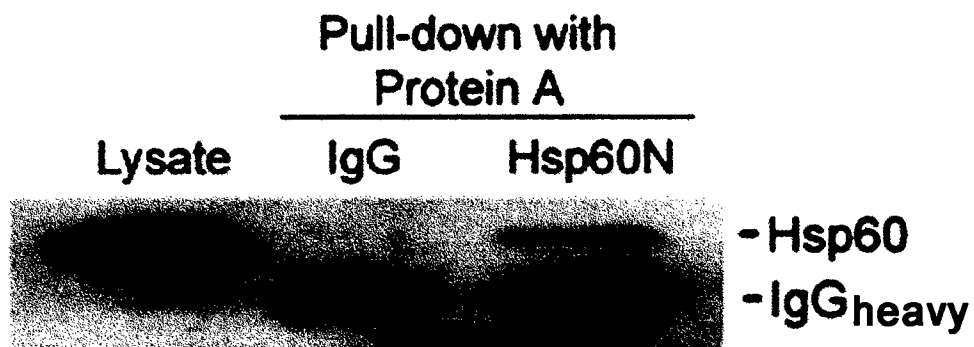
[Fig. 23]



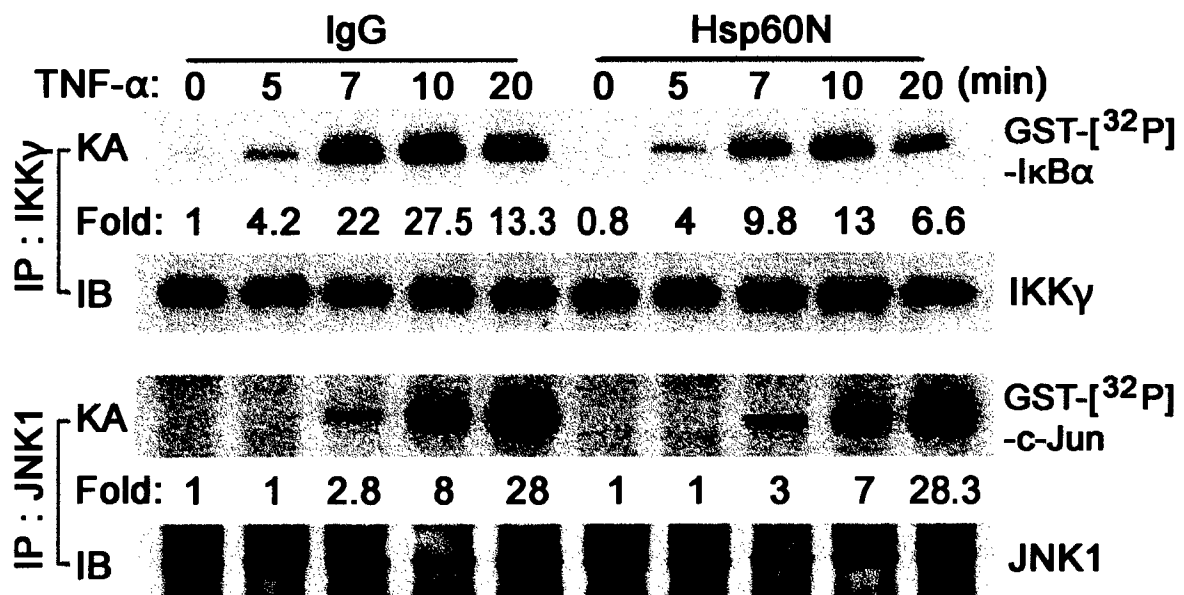
[Fig. 24]



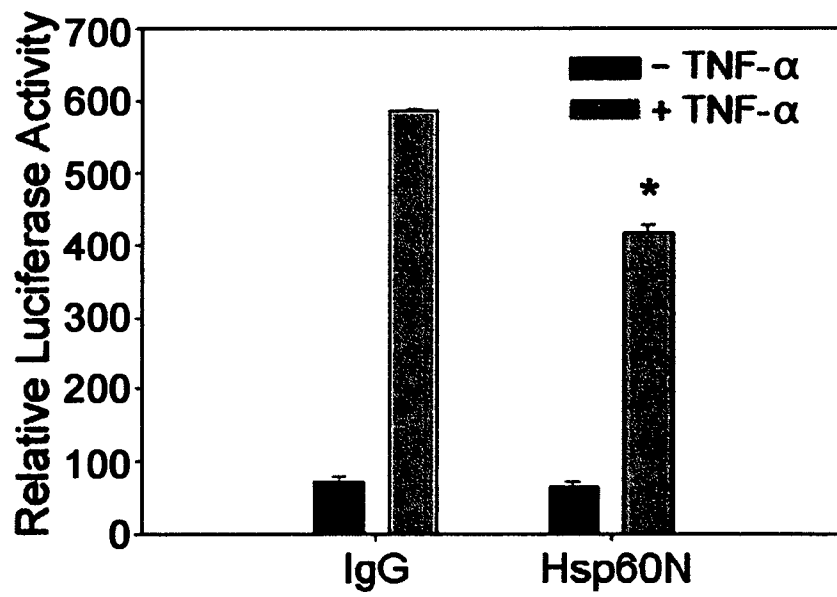
[Fig. 25]



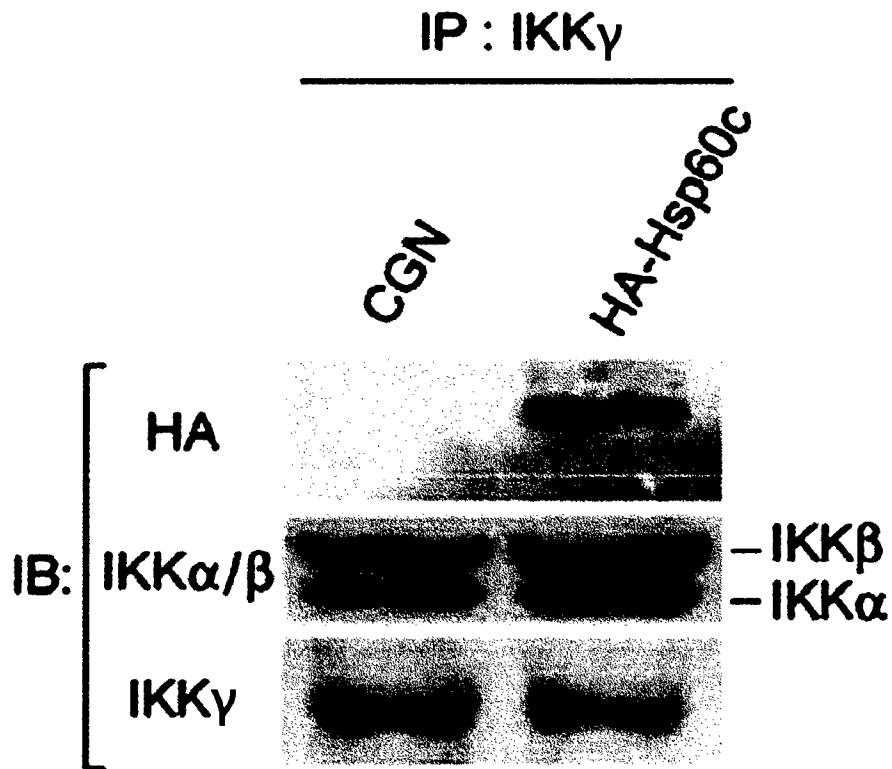
[Fig. 26]



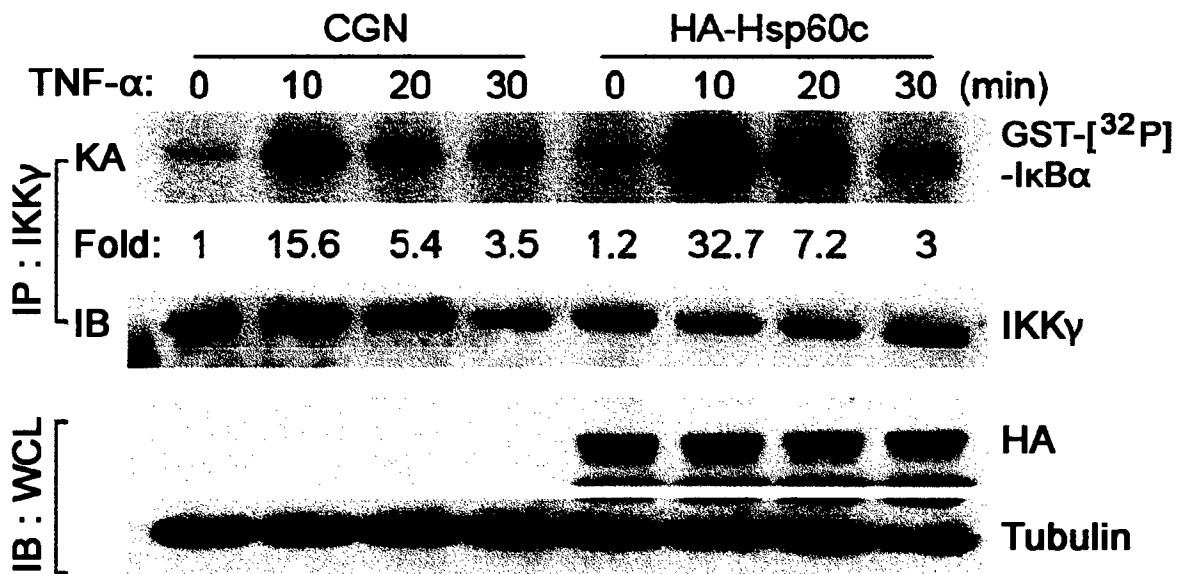
[Fig. 27]



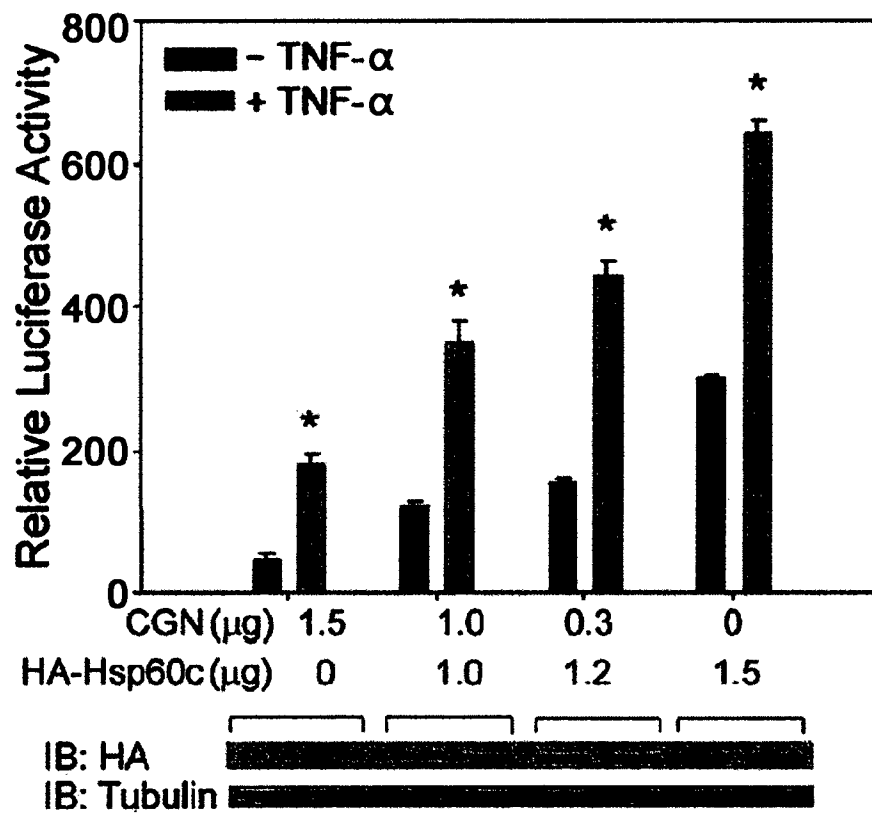
[Fig. 28]



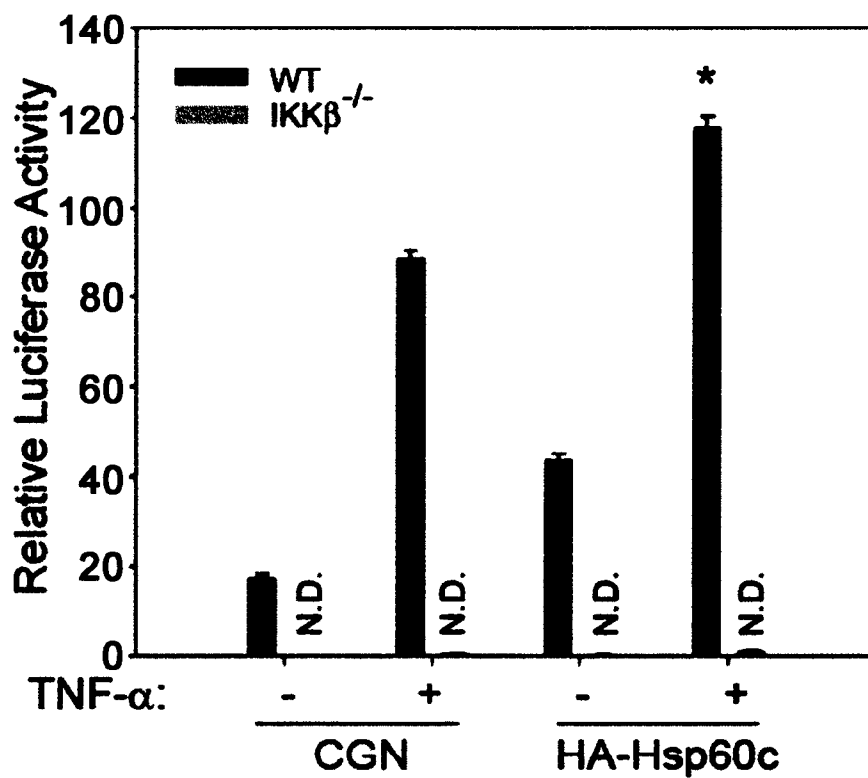
[Fig. 29]



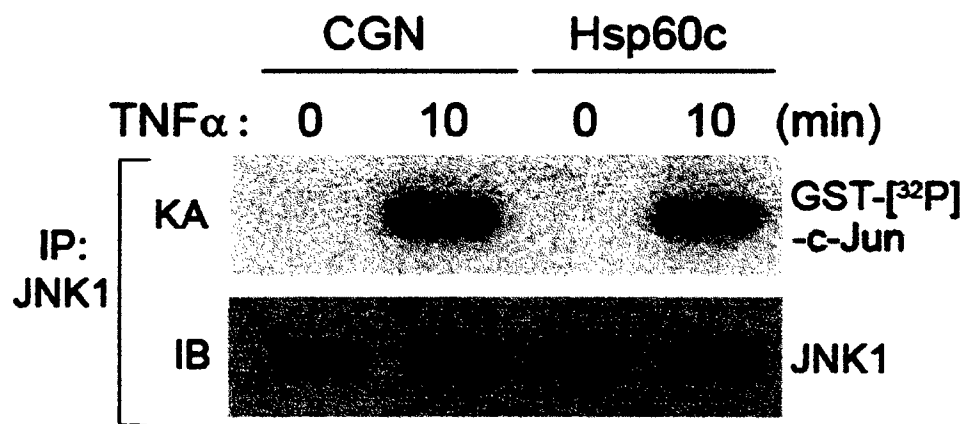
[Fig. 30]



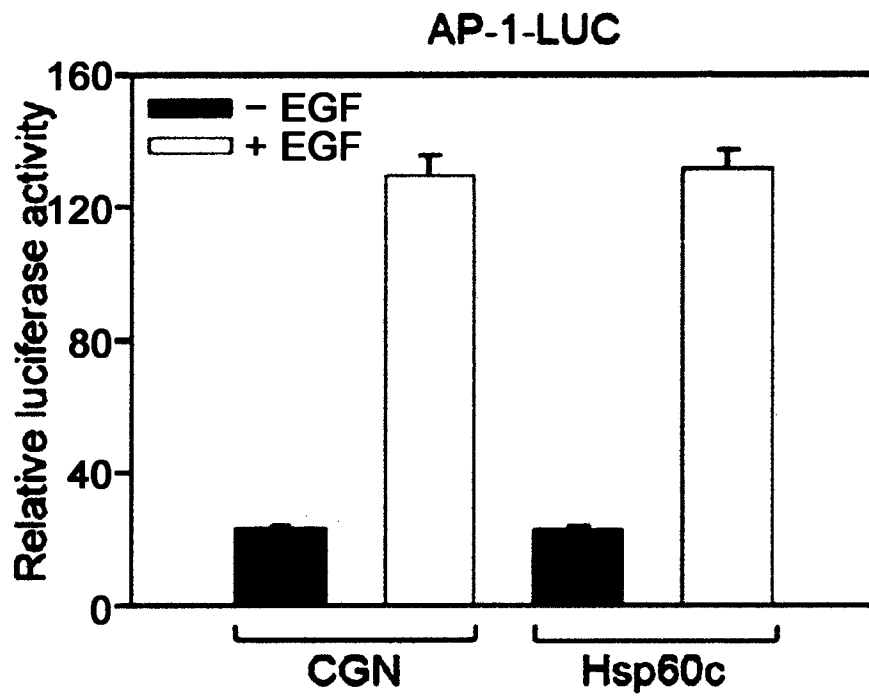
[Fig. 31]



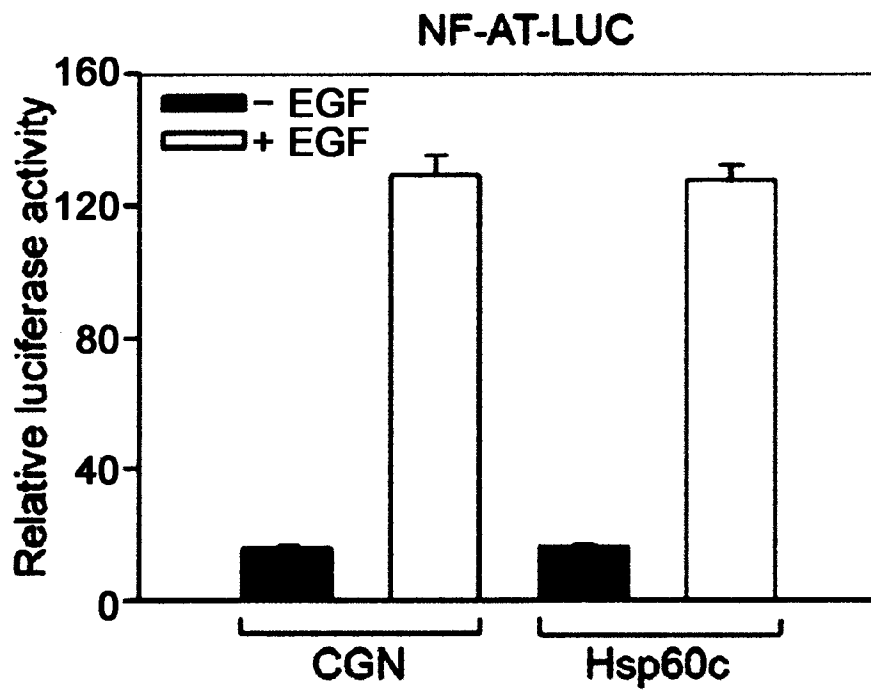
[Fig. 32]



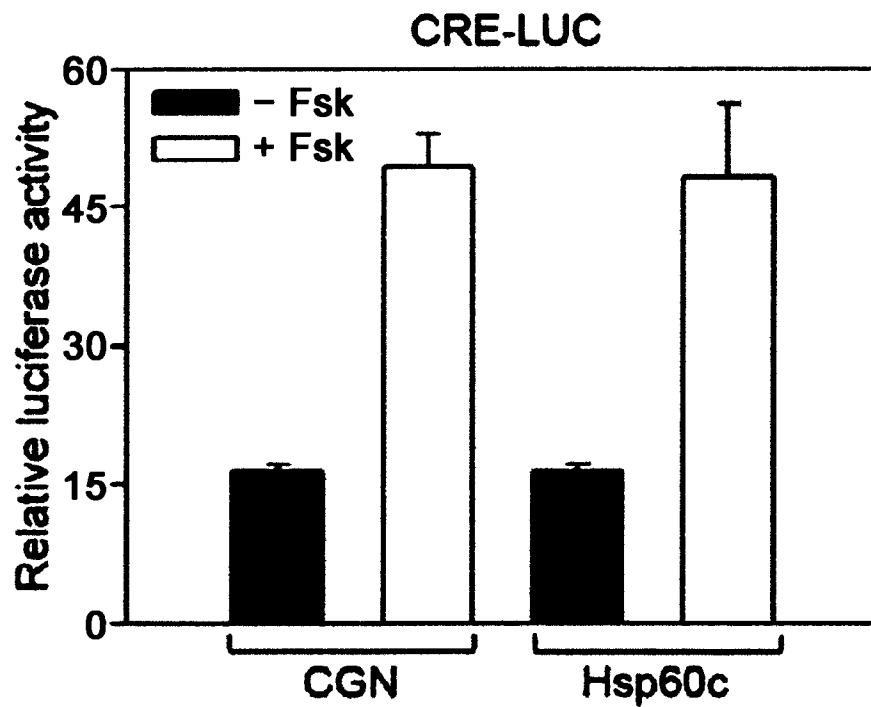
[Fig. 33]



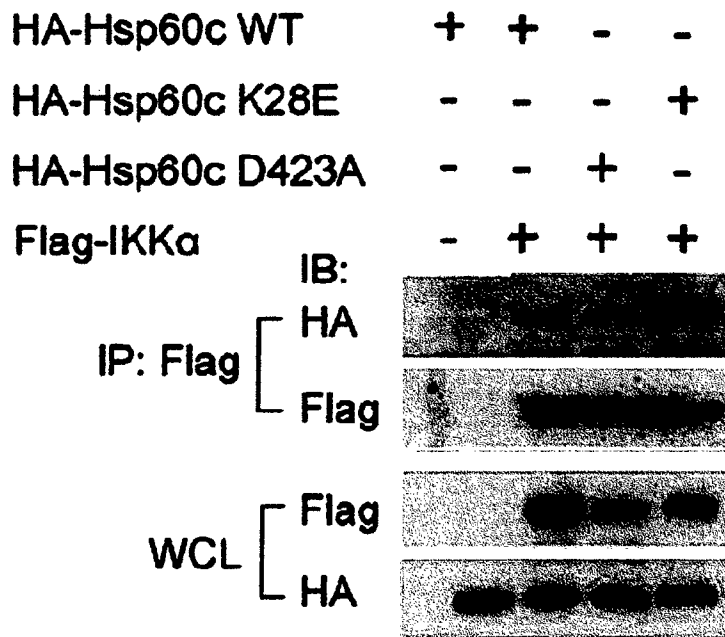
[Fig. 34]



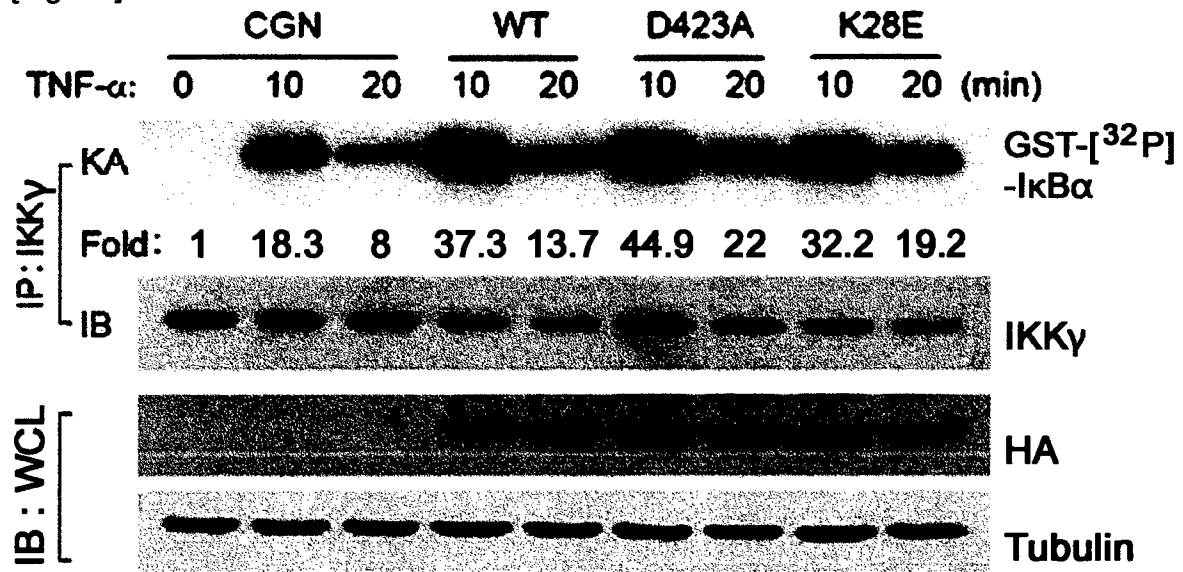
[Fig. 35]



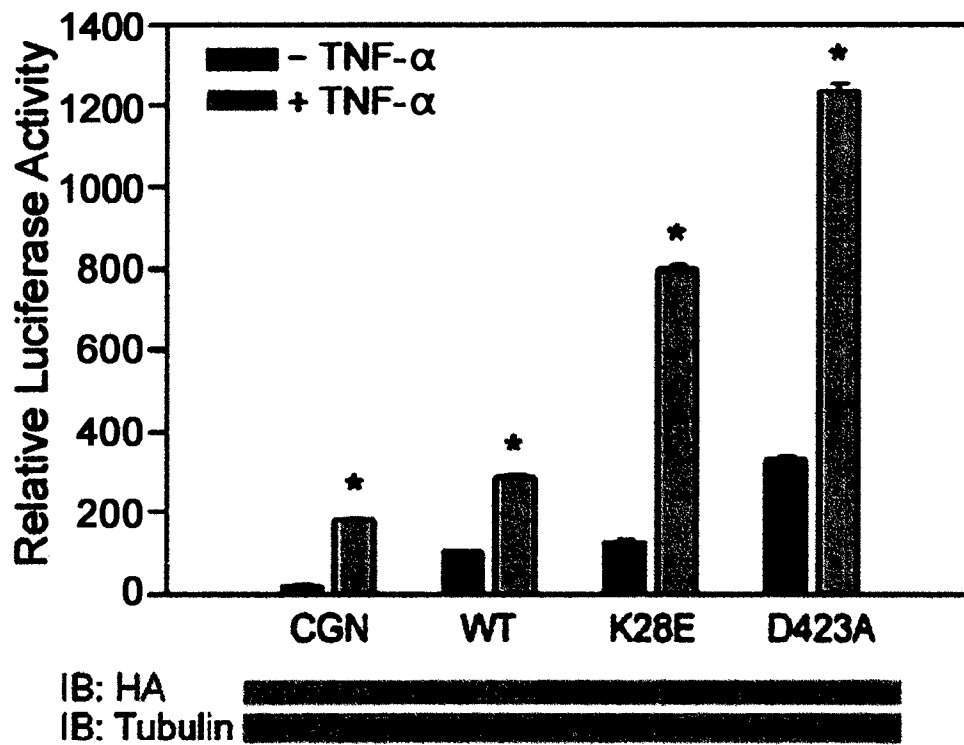
[Fig. 36]



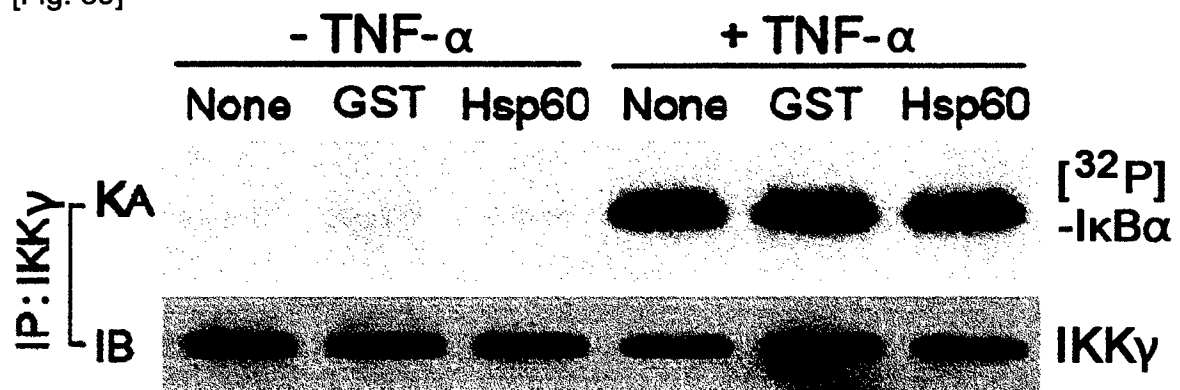
[Fig. 37]



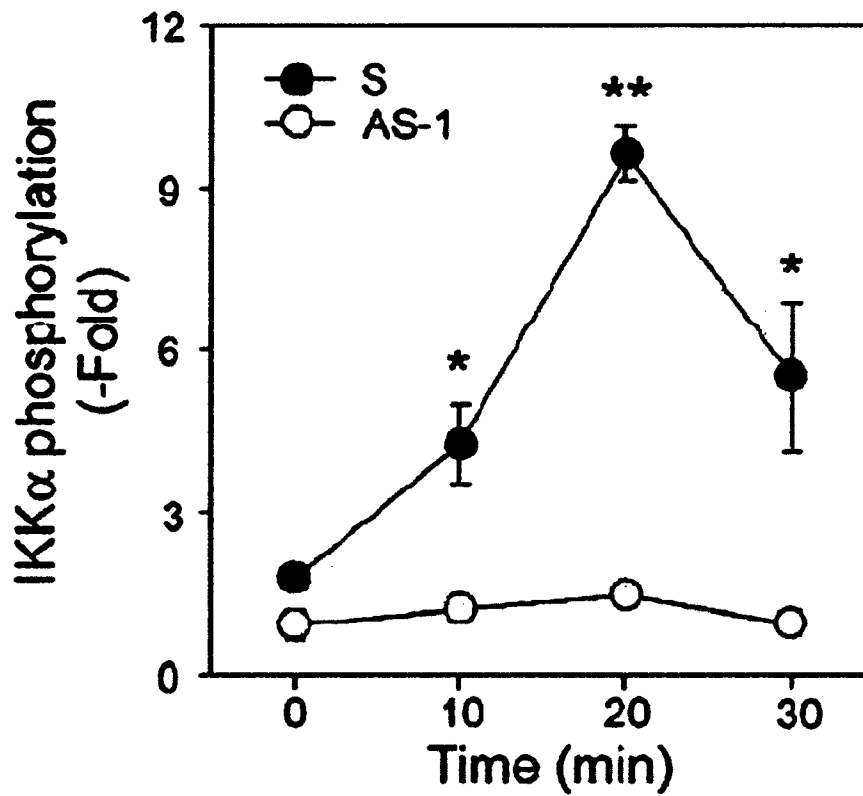
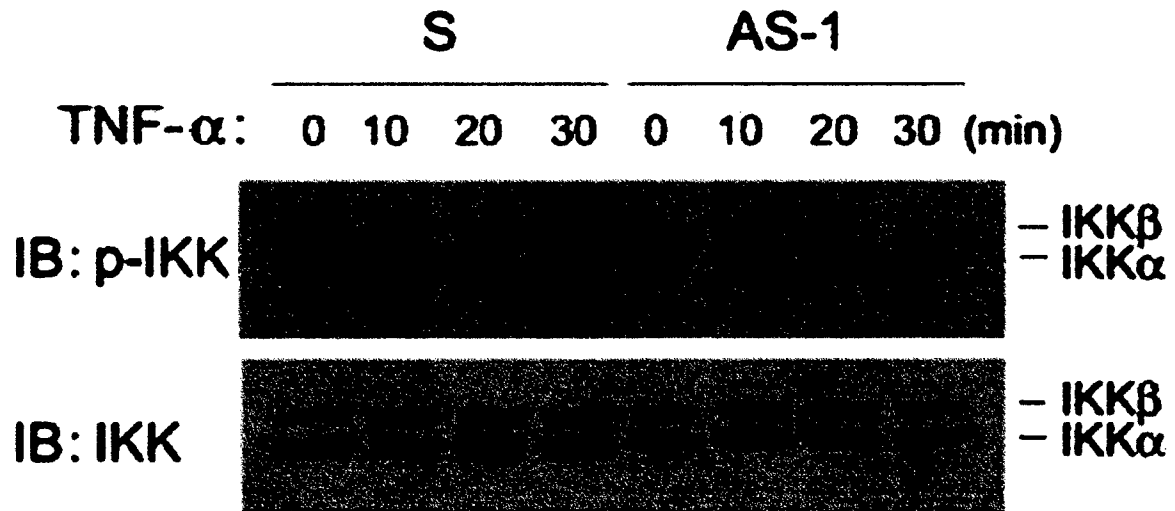
[Fig. 38]



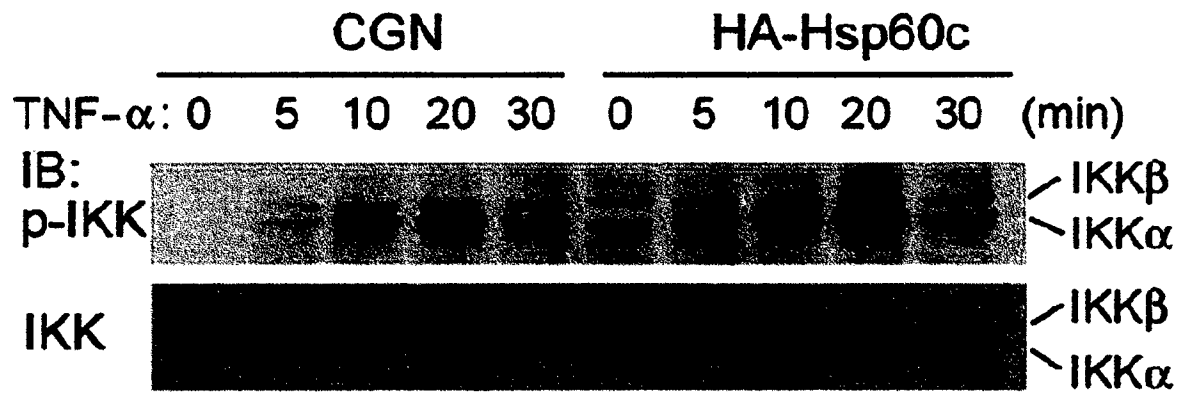
[Fig. 39]



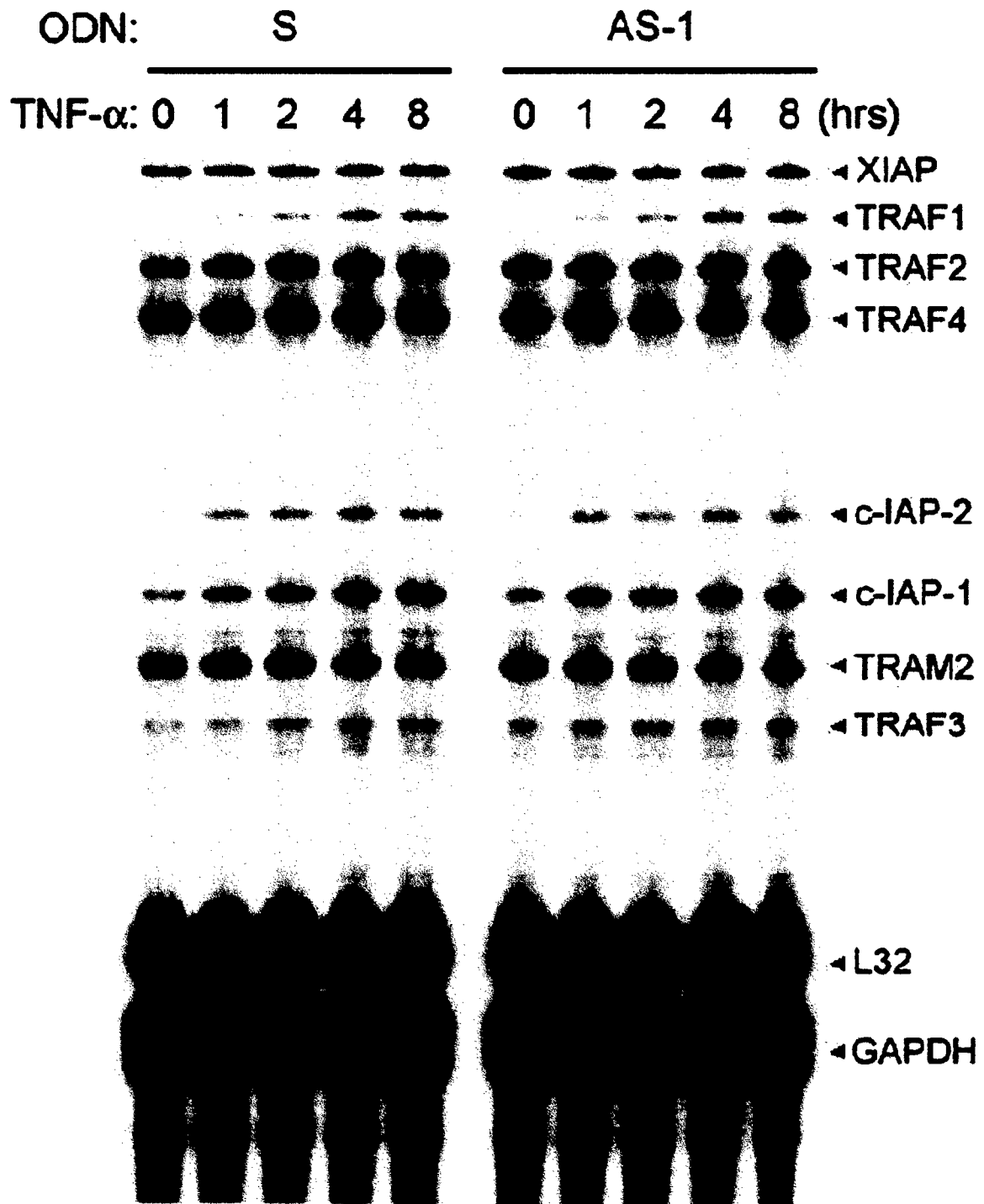
[Fig. 40]



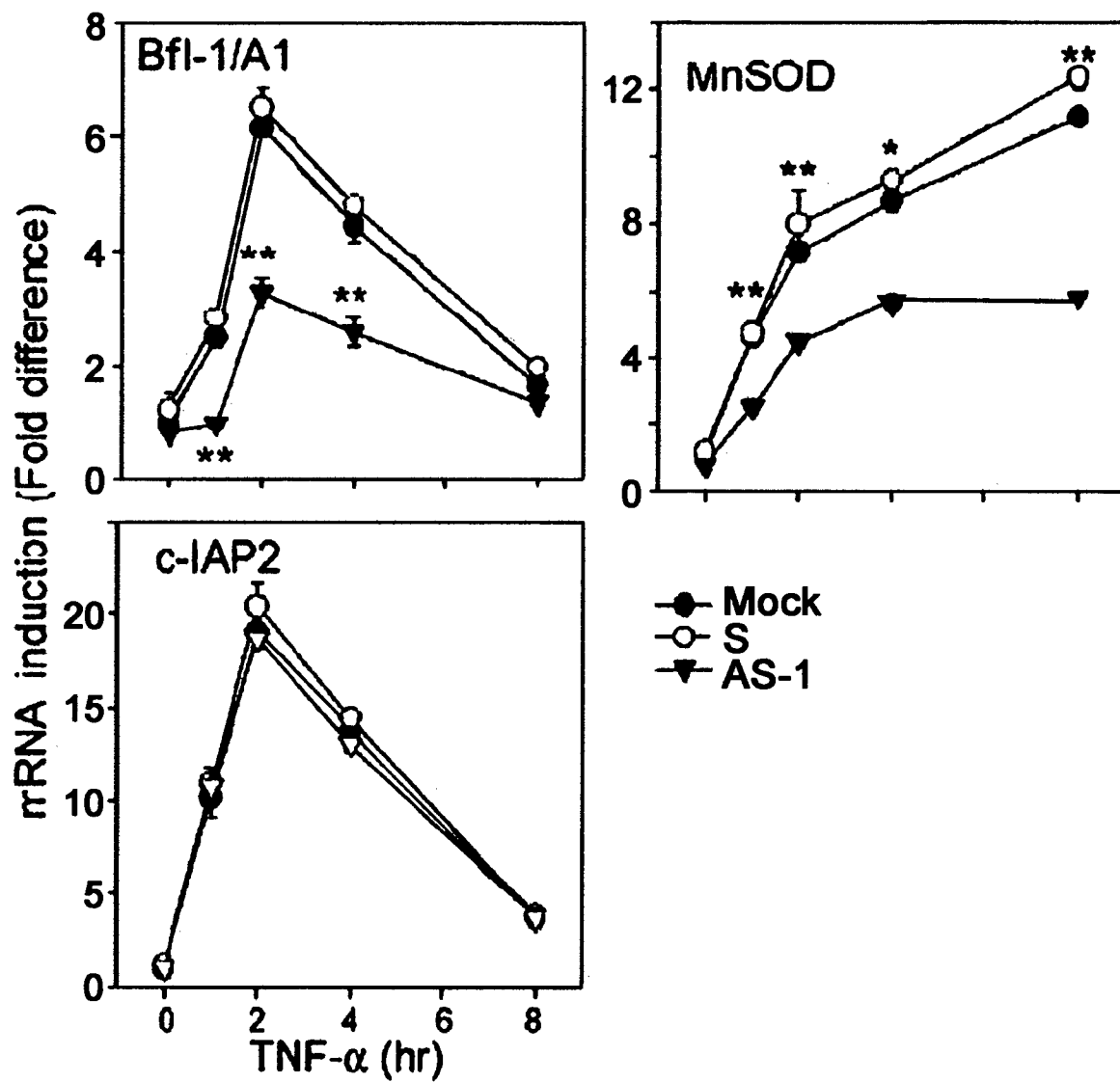
[Fig. 41]



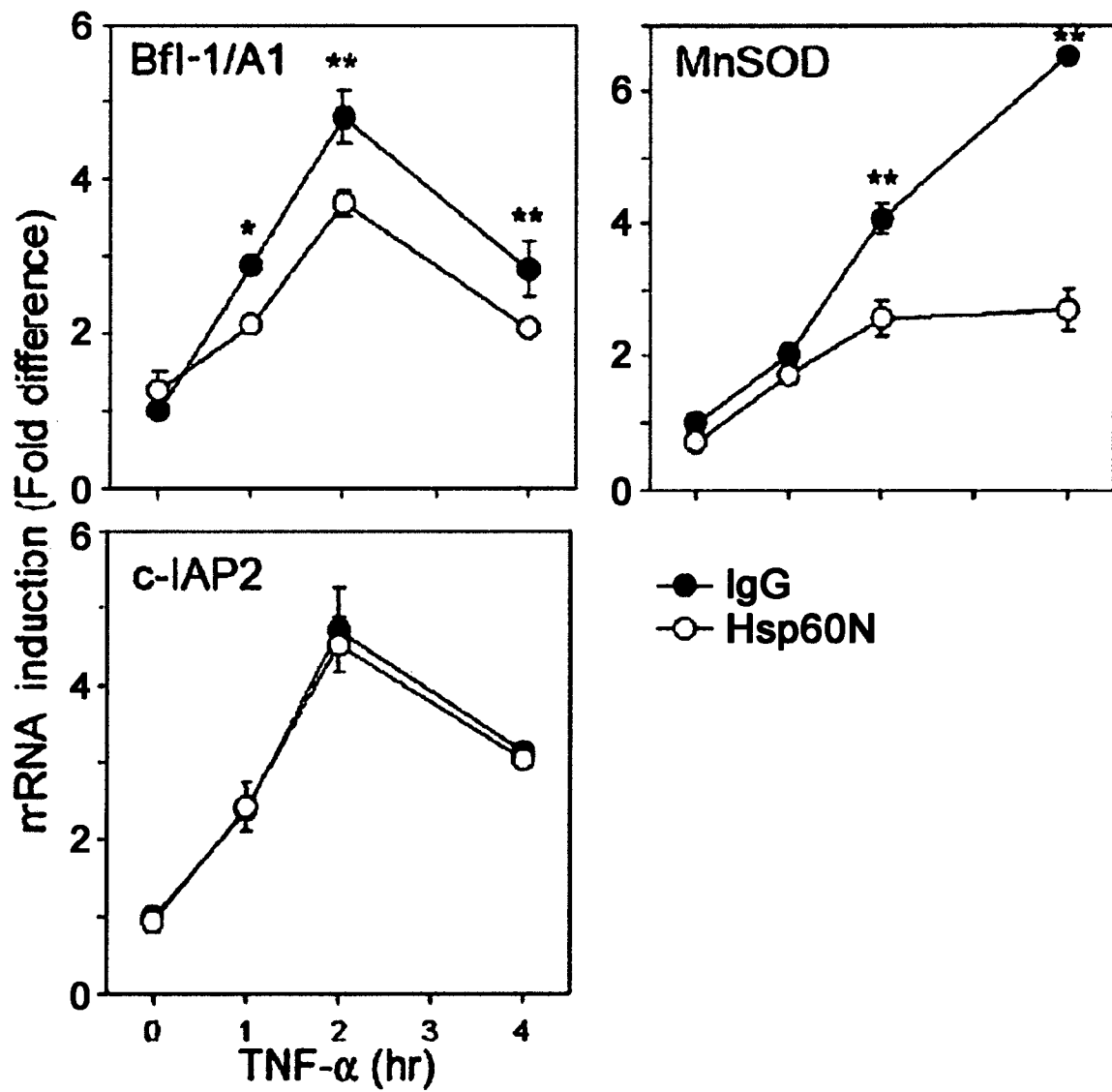
[Fig. 42]



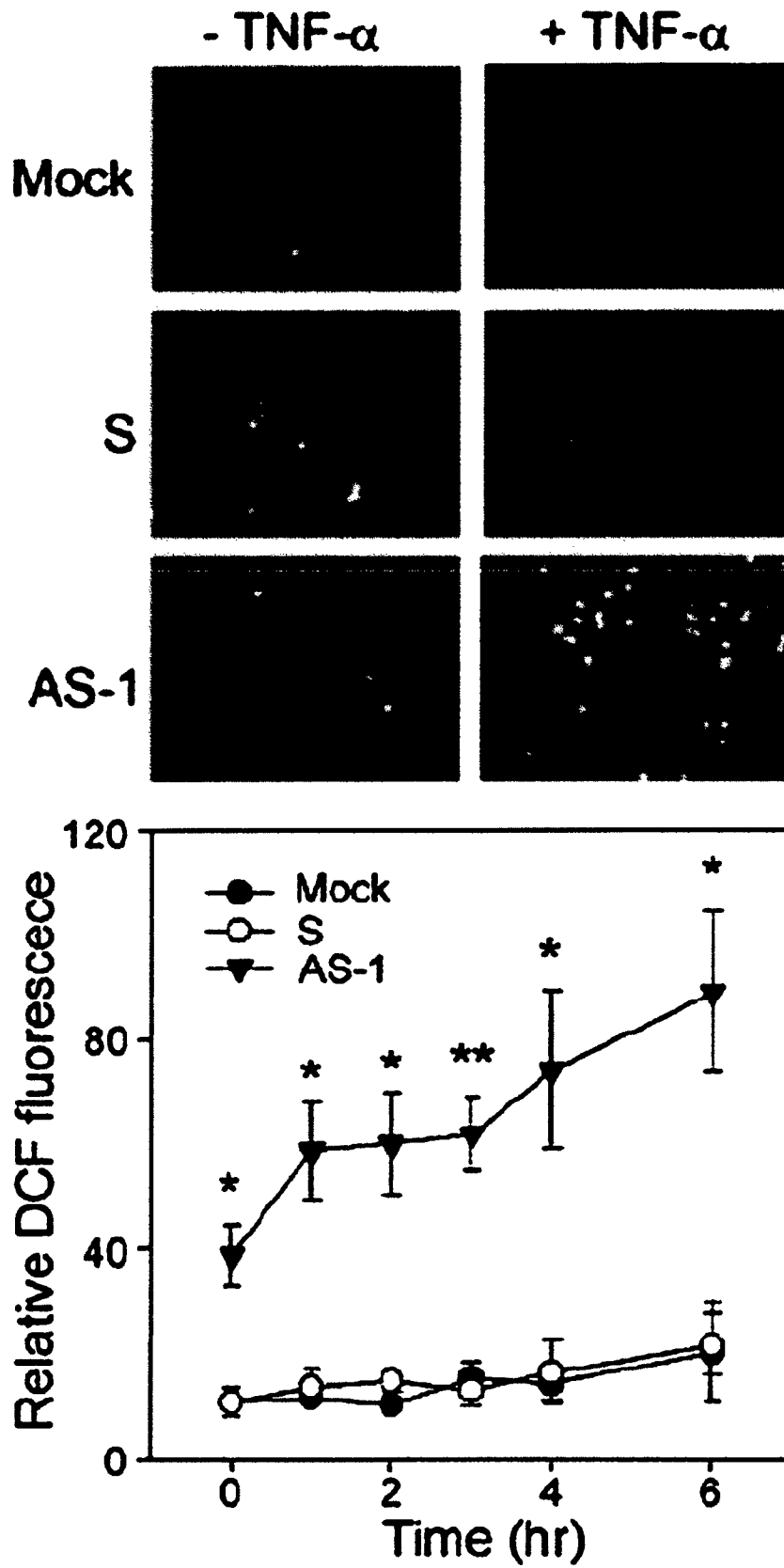
[Fig. 43]



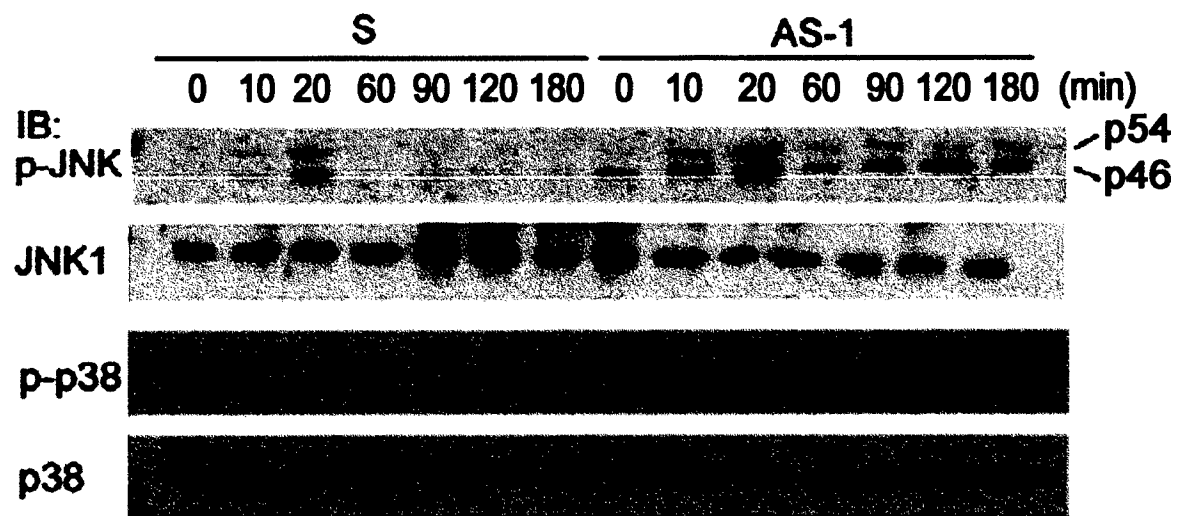
[Fig. 44]



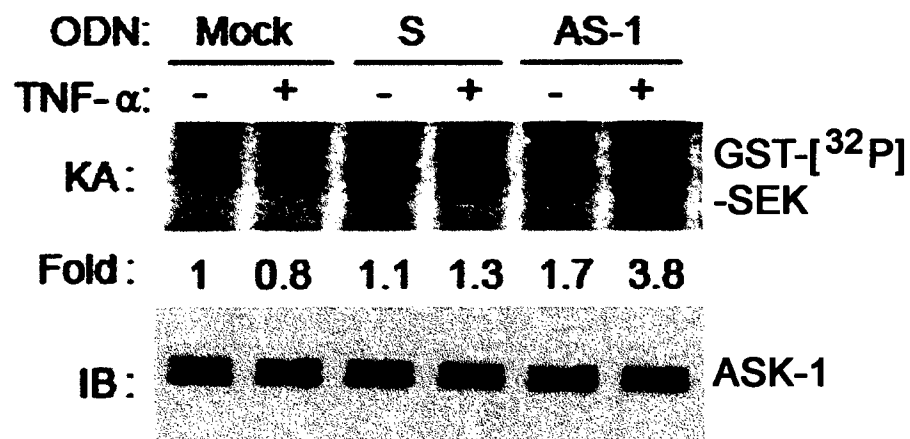
[Fig. 45]



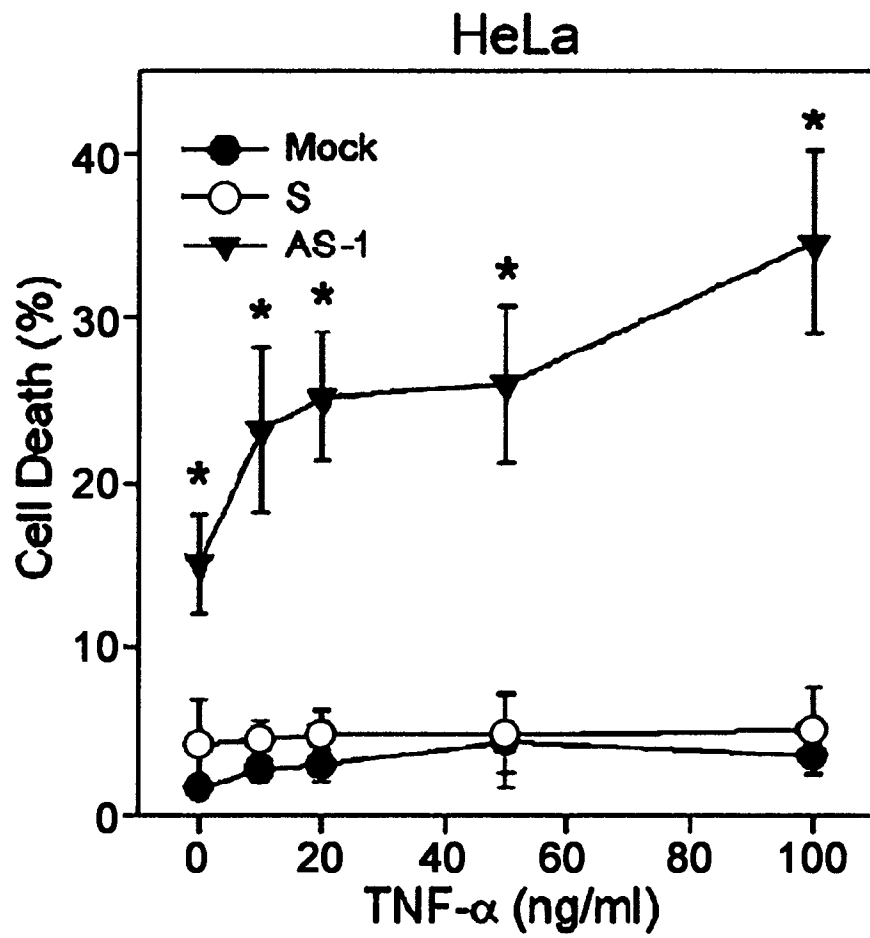
[Fig. 46]



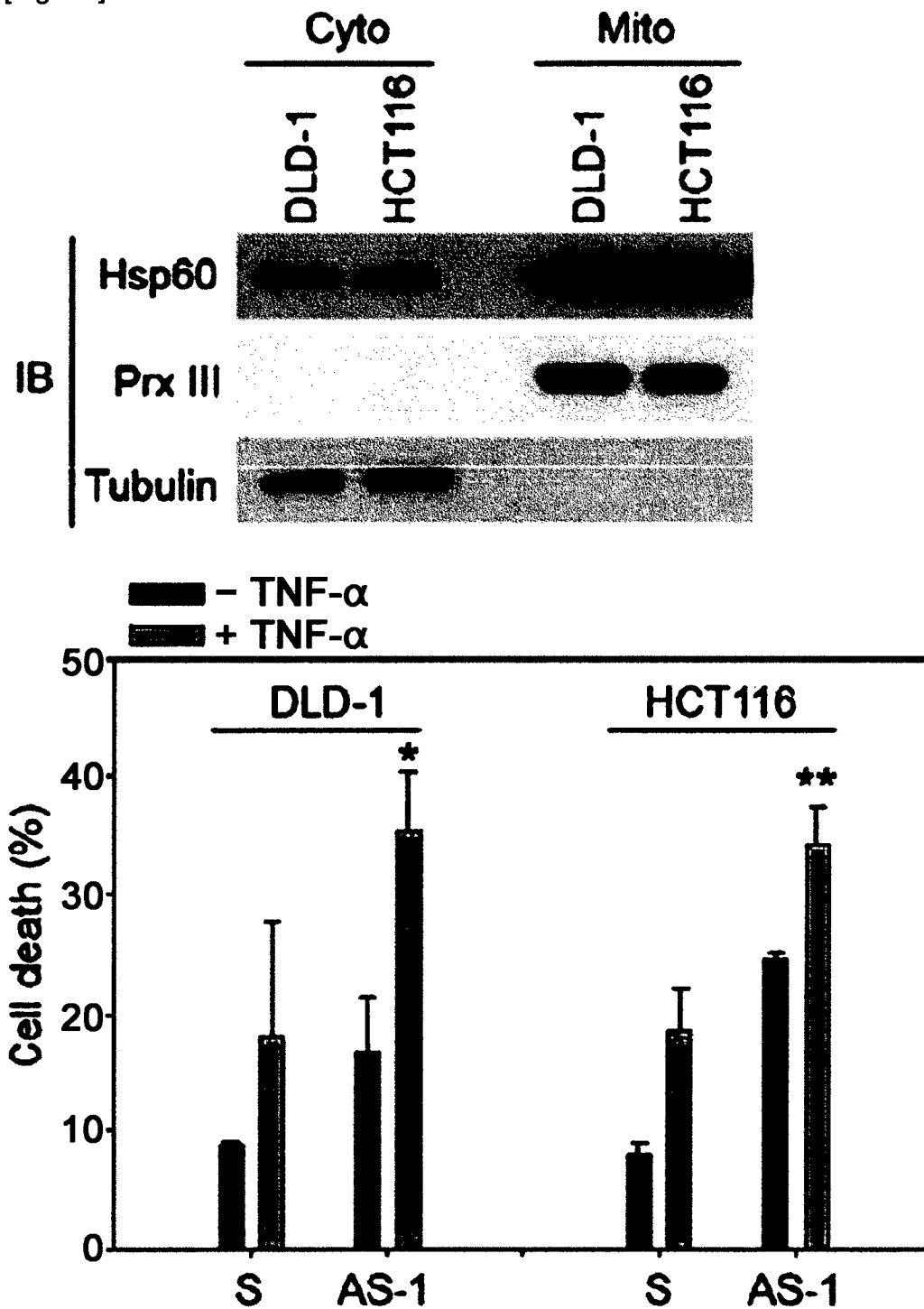
[Fig. 47]



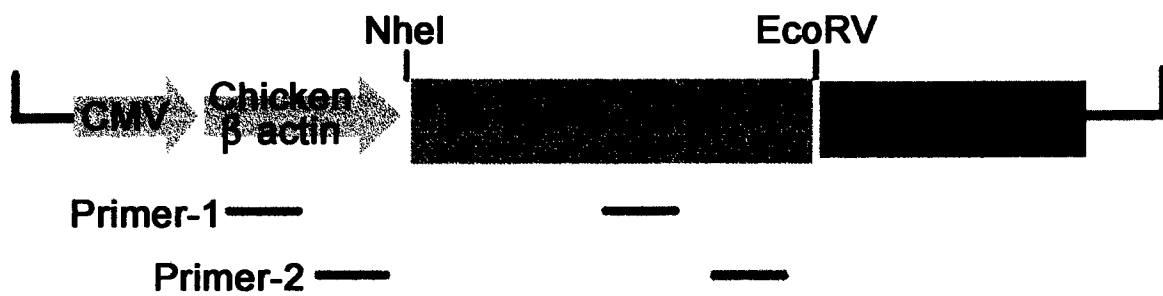
[Fig. 48]



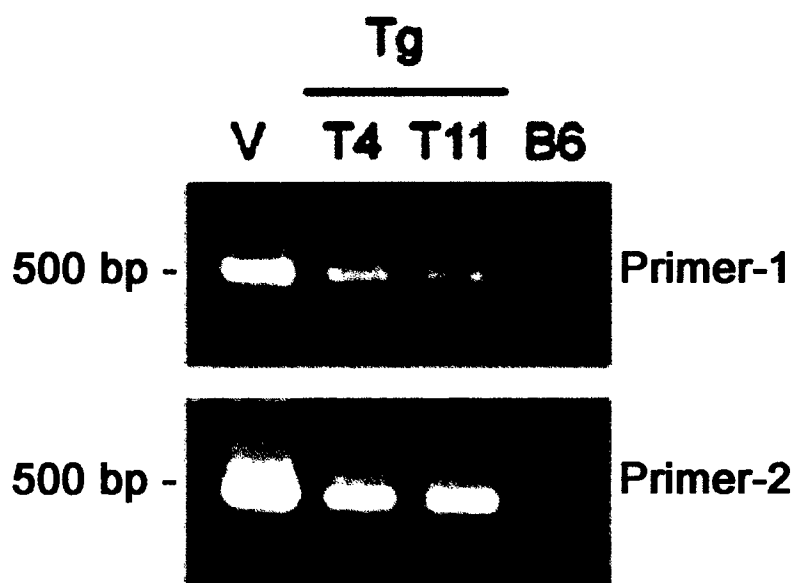
[Fig. 49]



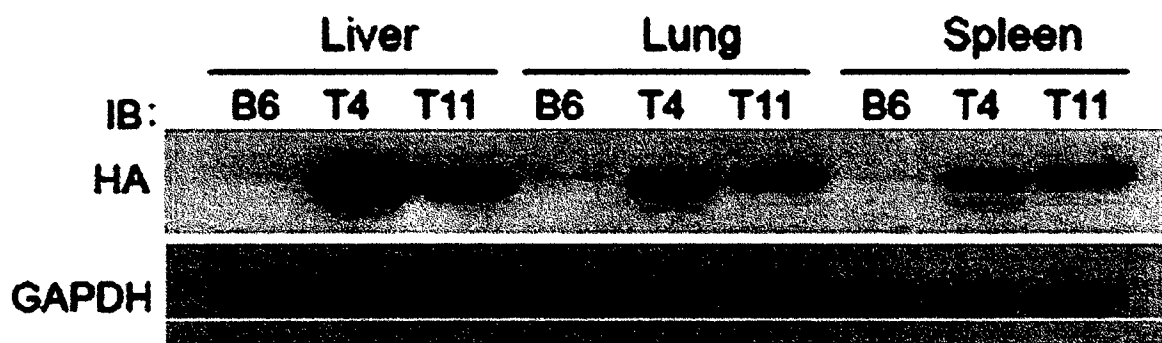
[Fig. 50]



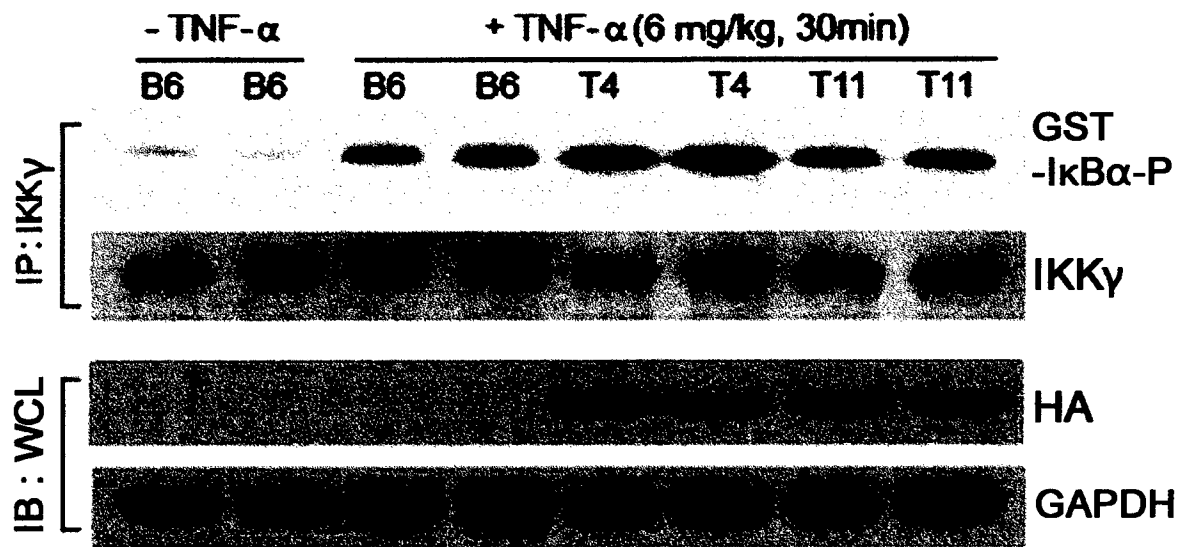
[Fig. 51]



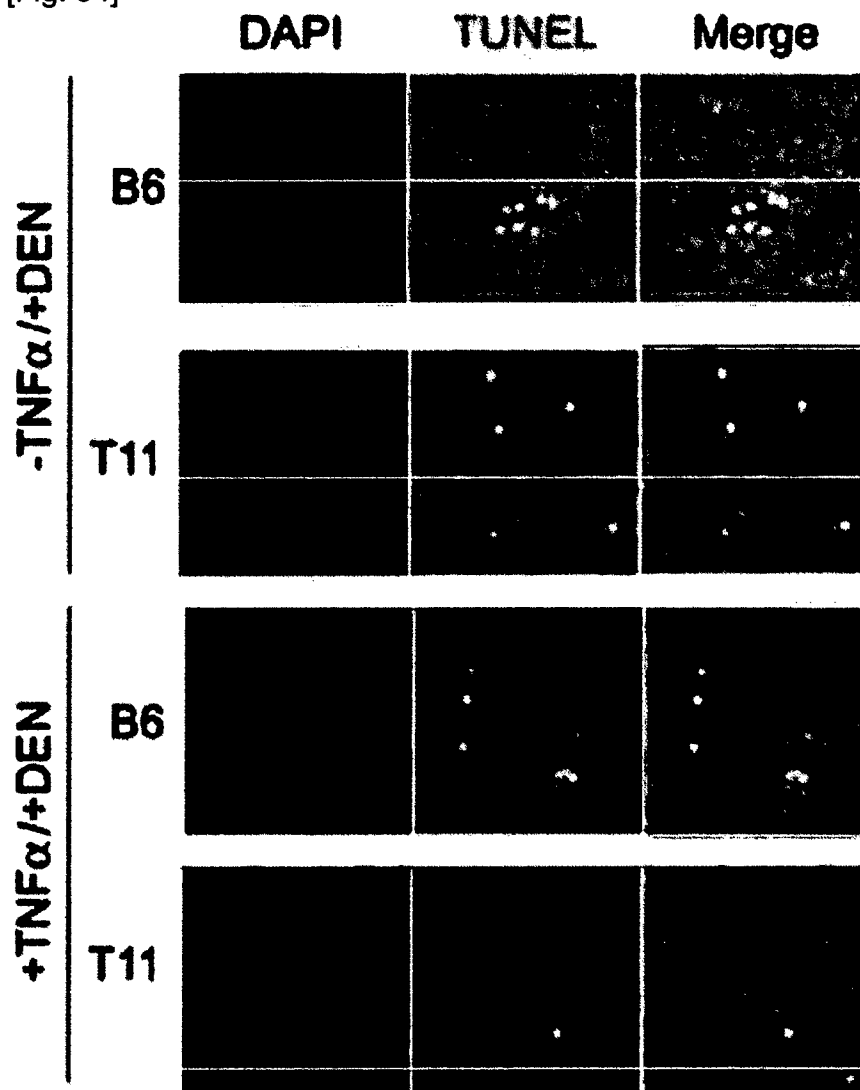
[Fig. 52]



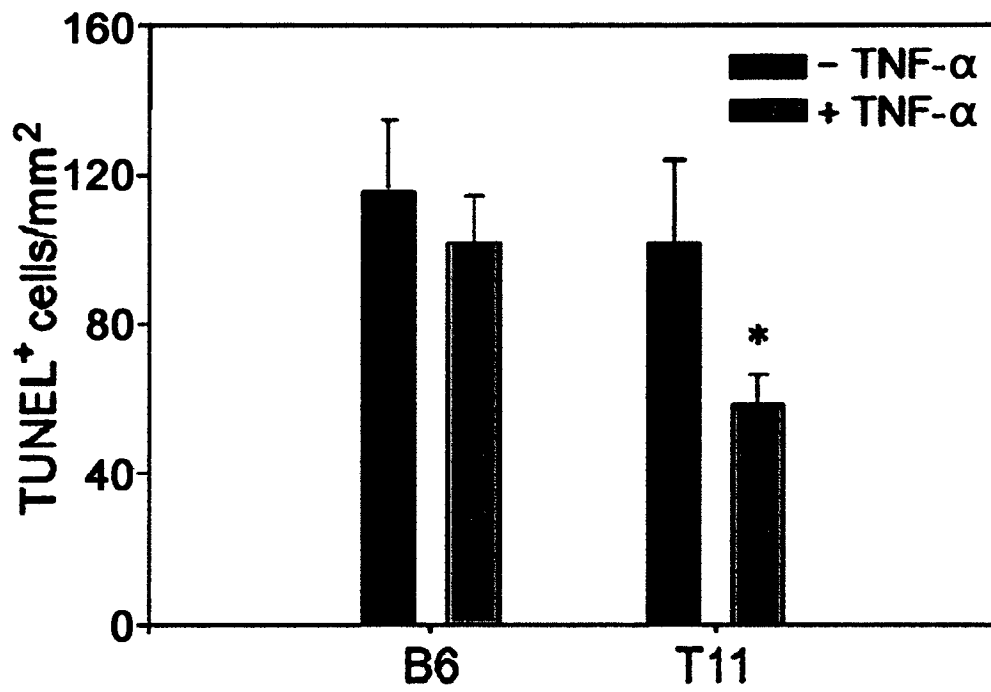
[Fig. 53]



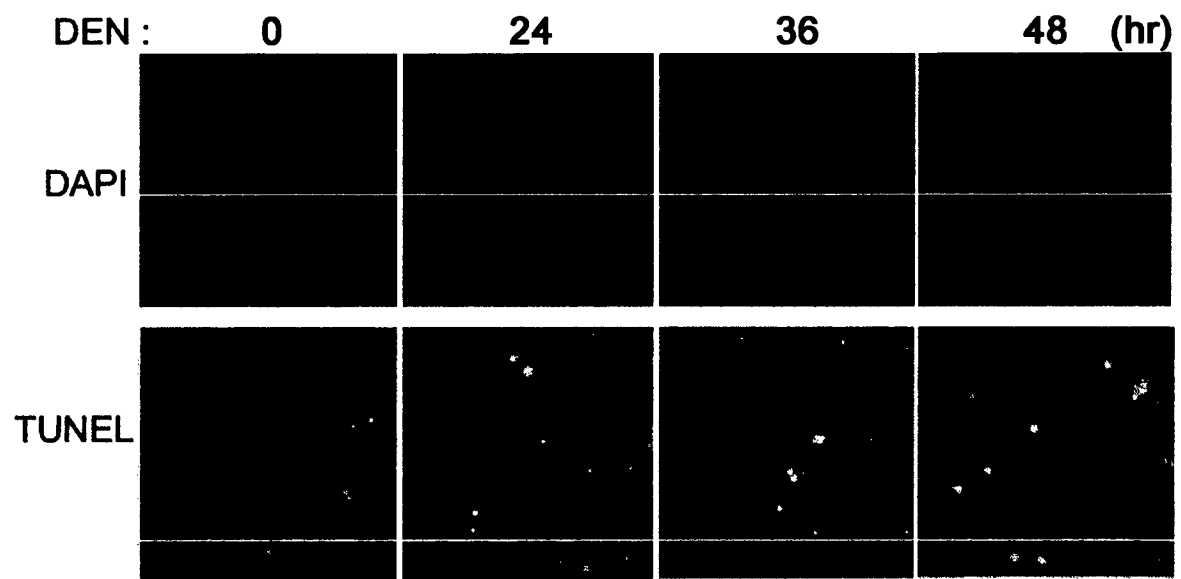
[Fig. 54]



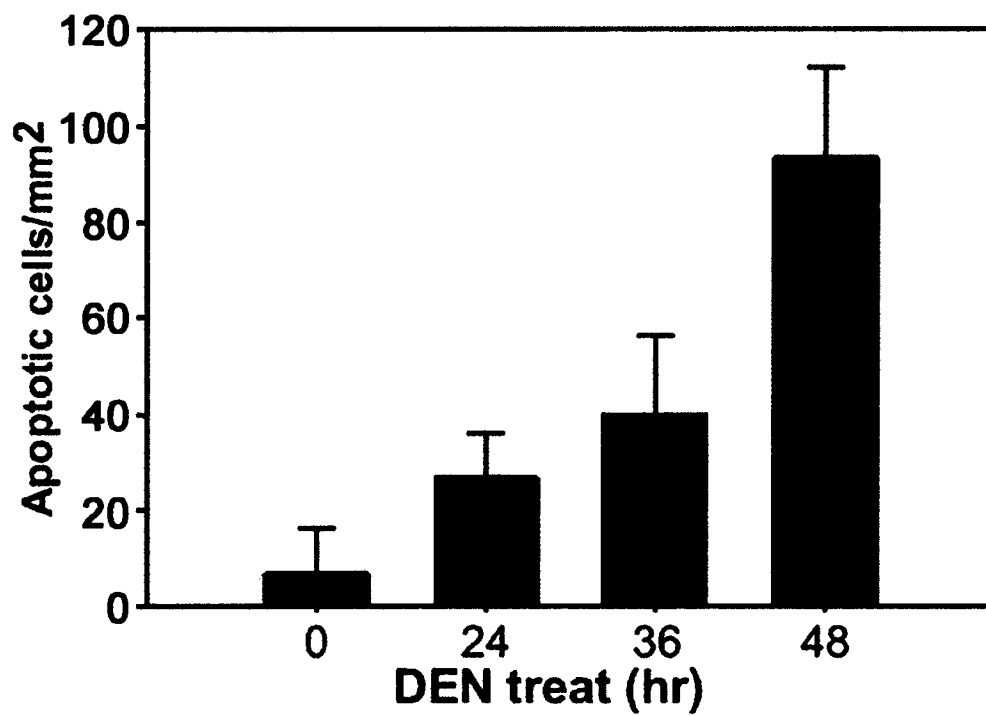
[Fig. 55]



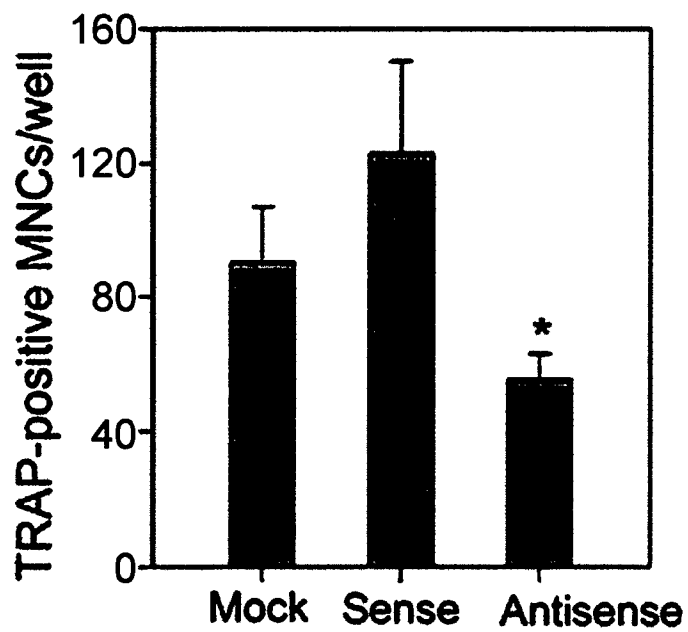
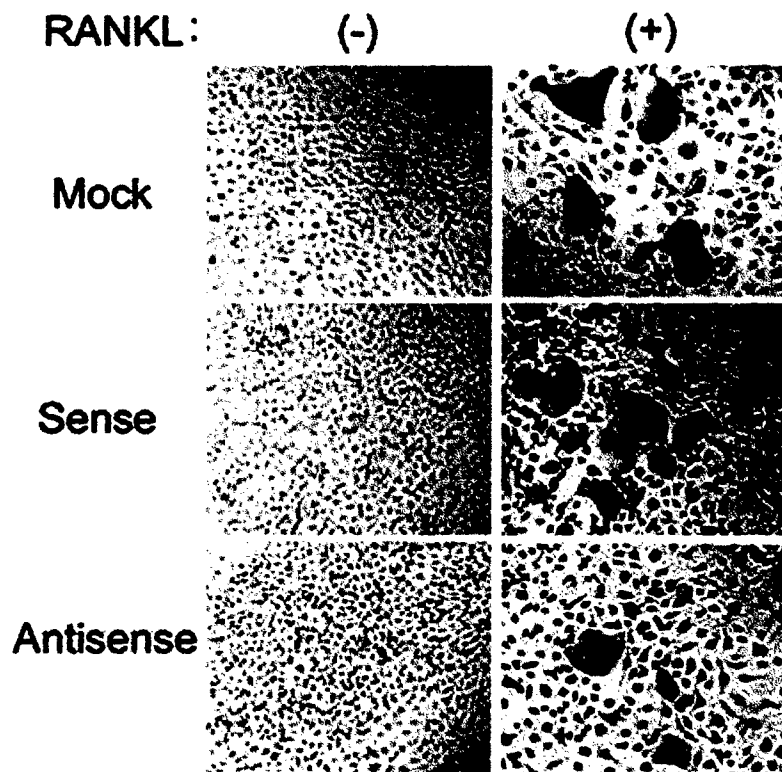
[Fig. 56]



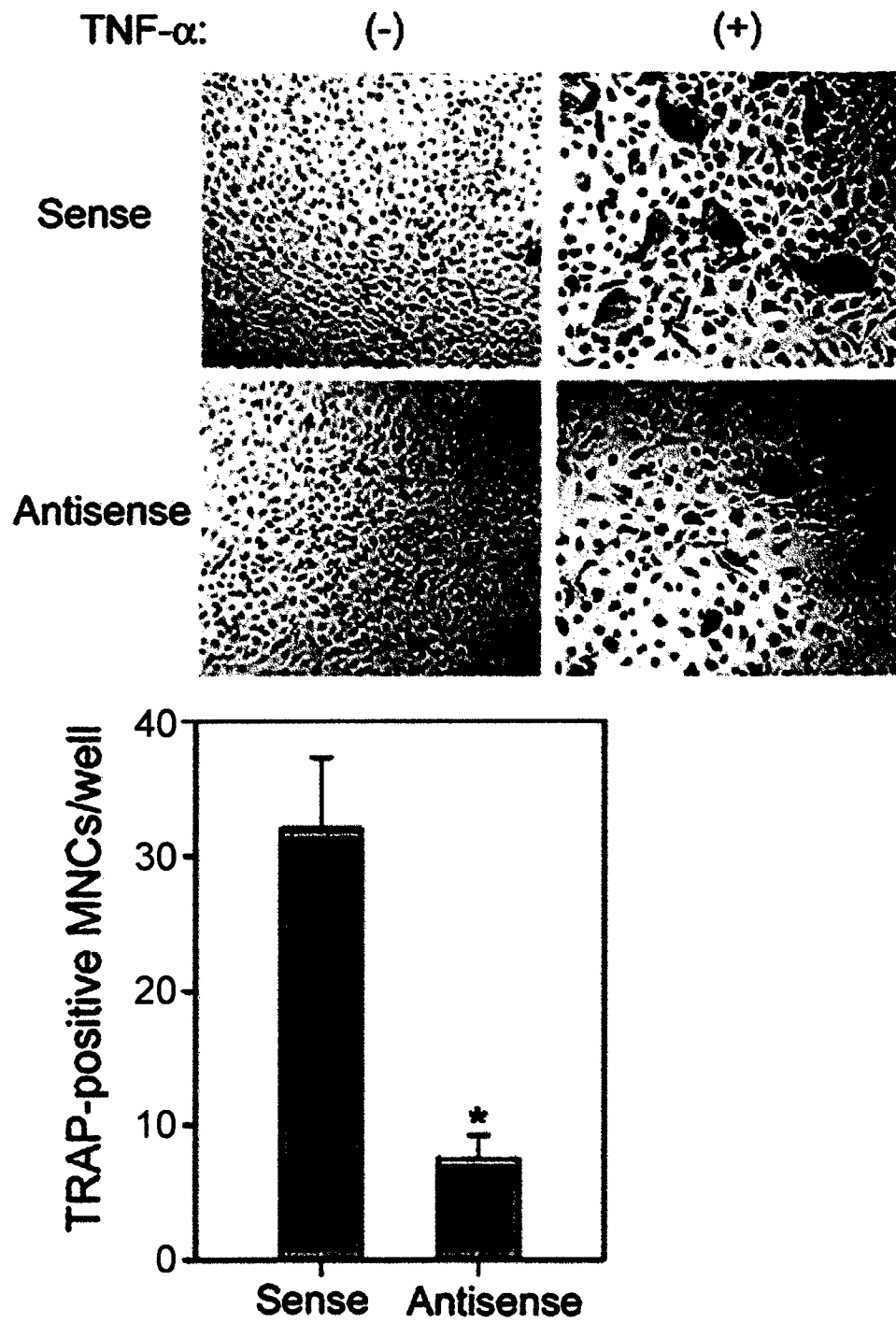
[Fig. 57]



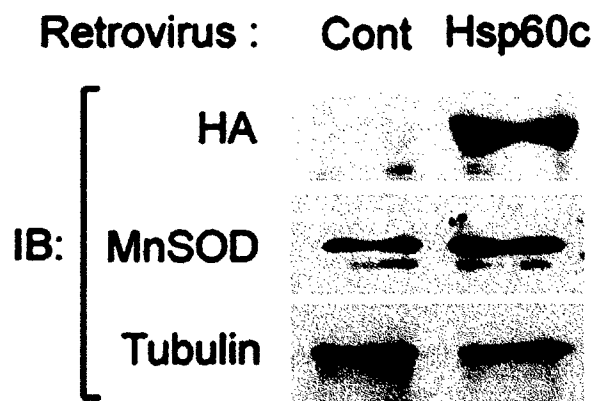
[Fig. 58]



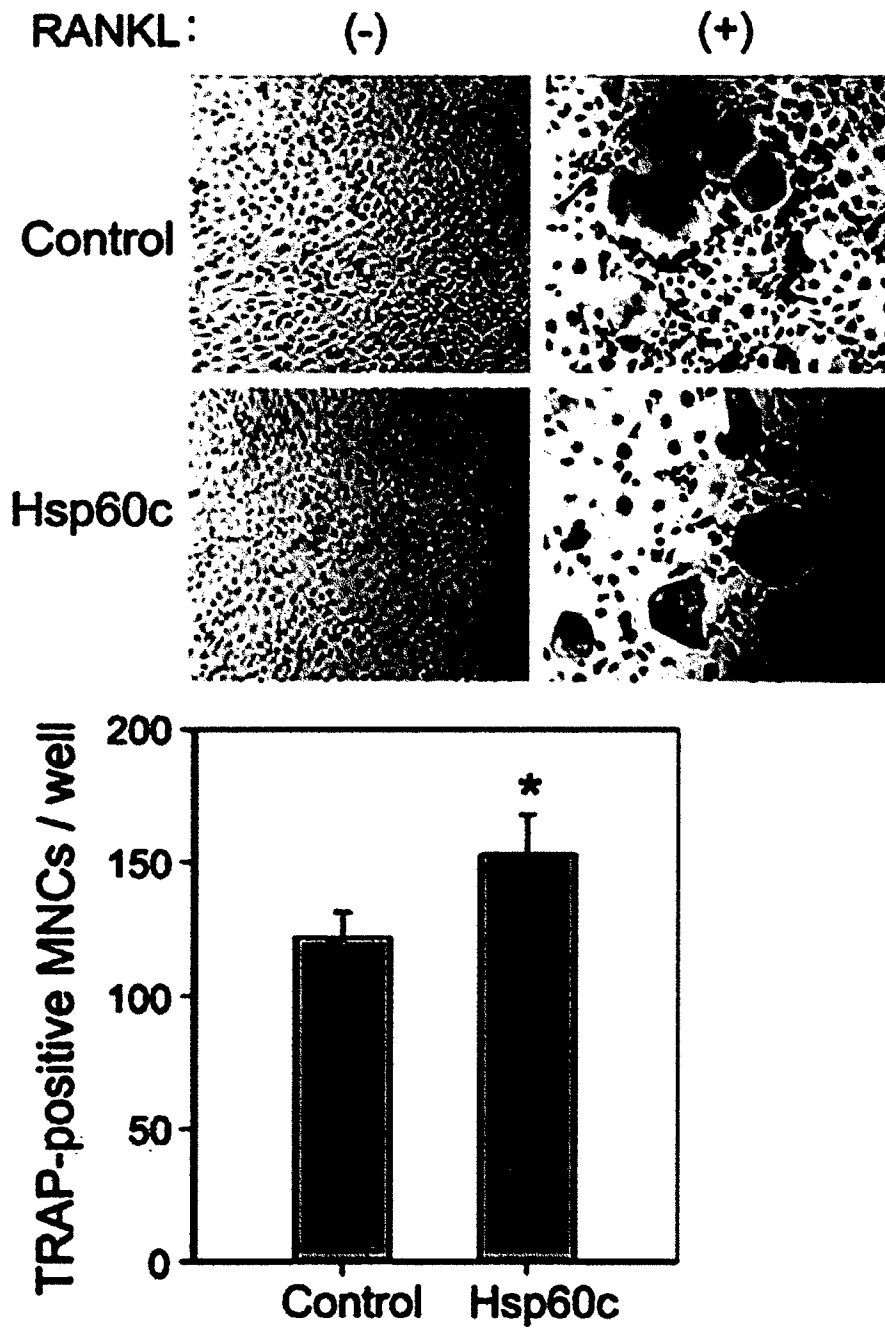
[Fig. 59]



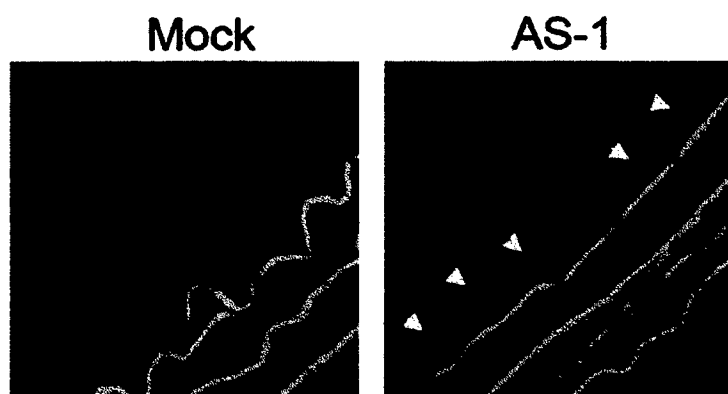
[Fig. 60]



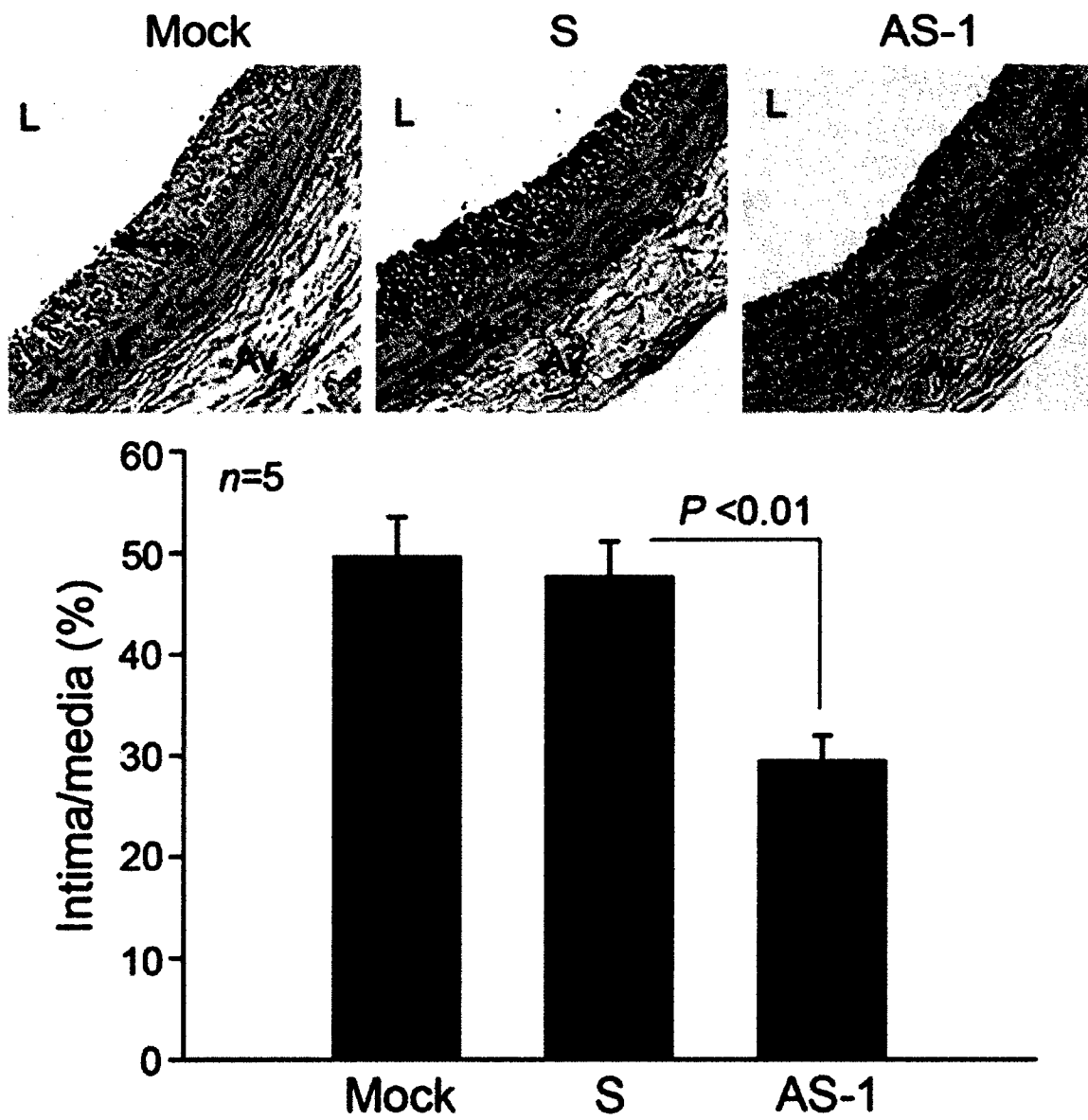
[Fig. 61]



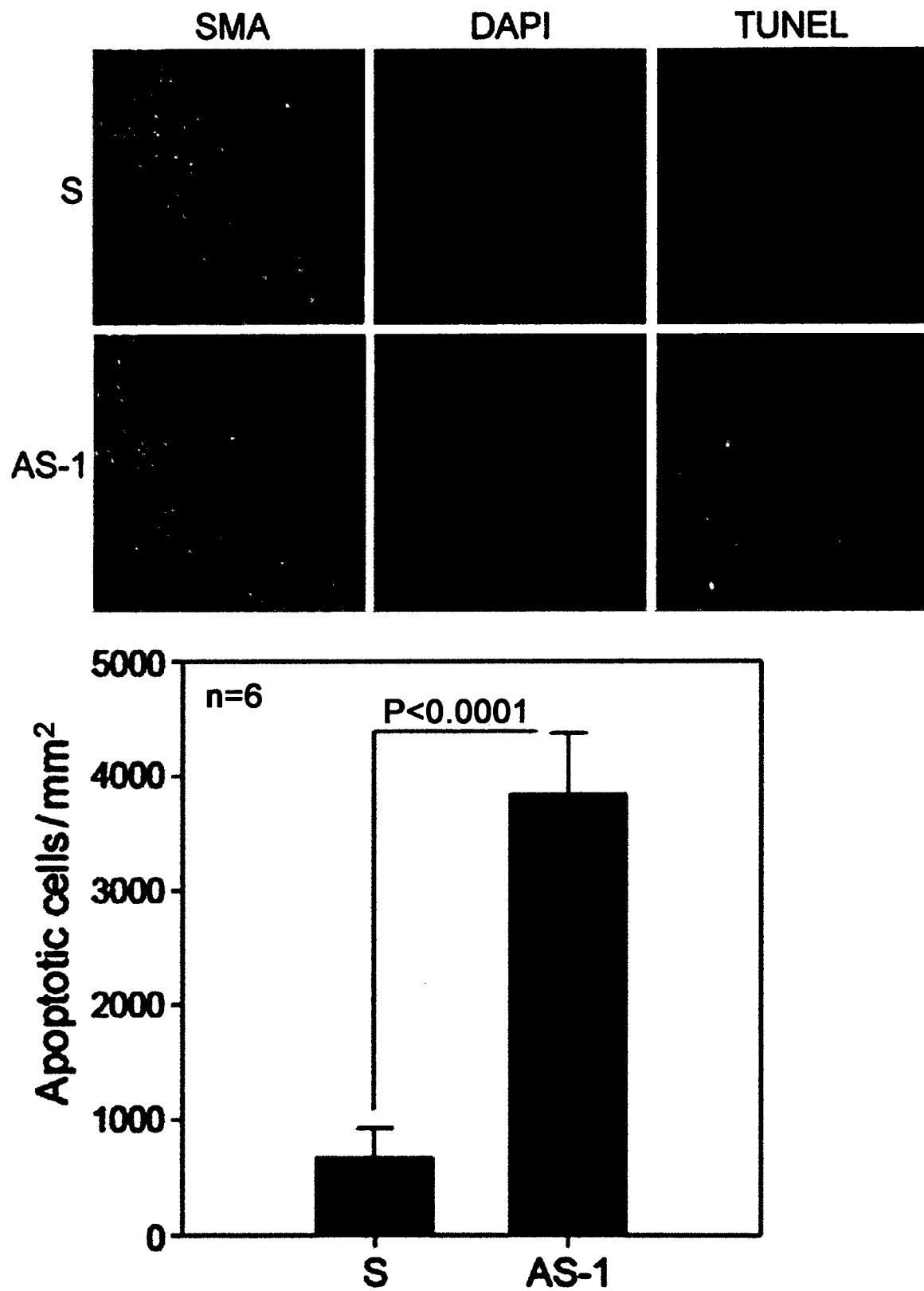
[Fig. 62]



[Fig. 63]



[Fig. 64]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/000768**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 38/16(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 15/11(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)

A61K 38/16; A61K 31/4965; A61K 31/325; A61F 2/00; C12N 9/16; C07K 2/00

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), PubMed, Google

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	KR 10-2009-0048403 A (VIROLOGIK GMBH) 13 May 2009 See claims 15 to 18, 35; paragraphs [0001], [0021]-[0023].	1-17,21-23,26 18-20,24
Y A	KR 10-0565437 B1 (CHUNG-ANG UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 30 March 2006 See abstract; examples 1-4.	1-17,21-23,26 18-20,24
A	KR 10-2008-0031474 A (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 08 April 2008 See abstract; the claims.	1-24,26
A	KR 10-0454554 B1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.) 06 April 2005 See abstract; the claims.	1-24,26



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

13 OCTOBER 2011 (13.10.2011)

Date of mailing of the international search report

13 OCTOBER 2011 (13.10.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 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/KR2011/000768

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **25**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 25 pertains to method for treating arthritis and relates to a method for treatment of the human body, and thus relates to the subject matter for which the International Searching Authority is not required to carry out a search under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/000768

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0048403 A	13.05.2009	AU 2007-267082 A1	06.12.2007
		CA 2654276 A1	06.12.2007
		CN 101453998 A	10.06.2009
		EP 2029125 A2	04.03.2009
		JP 2009-538881 A	12.11.2009
		US 2009-0156473 A1	18.06.2009
		WO 2007-138116 A2	06.12.2007
		WO 2007-138116 A3	06.12.2007
KR 10-0565437 B1	30.03.2006	NONE	
KR 10-2008-0031474 A	08.04.2008	AU 2006-272497 A1	01.02.2007
		AU 2006-272586 A1	01.02.2007
		CA 2616533 A1	01.02.2007
		CA 2616537 A1	01.02.2007
		CN 101267779 A0	17.09.2008
		CN 101600475 A	09.12.2009
		EP 1906874 A2	09.04.2008
		EP 1909812 A2	16.04.2008
		JP 2009-502954 A	29.01.2009
		JP 2009-507770 A	26.02.2009
		KR 10-2008-0033463 A	16.04.2008
		US 2010-0004156 A1	07.01.2010
		US 2010-0068141 A1	18.03.2010
		WO 2007-014323 A2	01.02.2007
		WO 2007-014323 A3	01.02.2007
		WO 2007-014327 A2	01.02.2007
		WO 2007-014327 A3	01.02.2007
KR 10-0454554 B1	06.04.2005	AU 1996-64845 B2	30.09.1999
		CA 2225675 A1	23.01.1997
		CA 2225675 C	21.09.2010
		CN 1102598 C	05.03.2003
		CN 1193889 A	23.09.1998
		CN 1193889 C0	23.09.1998
		EP 0845943 A1	10.06.1998
		EP 0845943 A4	10.04.2002
		EP 0845943 B1	09.03.2005
		JP 03-955627 B2	11.05.2007
		JP 03-955627 B6	11.05.2007
		JP 11-509196 A	17.08.1999
		JP 2007-119482 A	17.05.2007
		US 06110746A A	29.08.2000
		US 6682897 B1	27.01.2004
		WO 97-01959 A1	23.01.1997

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/16(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/16; A61K 31/4965; A61K 31/325; A61F 2/00; C12N 9/16; C07K 2/00 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), PubMed, Google		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y A	KR 10-2009-0048403 A (비톨로직 게엠베하) 2009.05.13 청구항 제15항 내지 제18항, 제35항; 단락 [0001], [0021]~[0023] 참조.	1-17, 21-23, 26 18-20, 24
Y A	KR 10-0565437 B1 (학교법인 중앙대학교) 2006.03.30 요약; 실험예 1~4 참조.	1-17, 21-23, 26 18-20, 24
A	KR 10-2008-0031474 A (유니버시티 오브 플로리다 리서치 파운데이션, 아이엔씨.) 2008.04.08 요약; 청구항 참조.	1-24, 26
A	KR 10-0454554 B1 (에다 리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드) 2005.04.06 요약; 청구항 참조.	1-24, 26
☐ 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 특허 문헌 “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 2011년 10월 13일 (13.10.2011)		국제조사보고서 발송일 2011년 10월 13일 (13.10.2011)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 박정웅 전화번호 82-42-481-8131 

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 25
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제25항은 관절염을 치료하는 방법을 청구하고 있으며, 이는 사람의 치료 방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0048403 A	2009.05.13	AU 2007-267082 A1 CA 2654276 A1 CN 101453998 A EP 2029125 A2 JP 2009-538881 A US 2009-0156473 A1 WO 2007-138116 A2 WO 2007-138116 A3	2007.12.06 2007.12.06 2009.06.10 2009.03.04 2009.11.12 2009.06.18 2007.12.06 2007.12.06
KR 10-0565437 B1	2006.03.30	없음	
KR 10-2008-0031474 A	2008.04.08	AU 2006-272497 A1 AU 2006-272586 A1 CA 2616533 A1 CA 2616537 A1 CN 101267779 A0 CN 101600475 A EP 1906874 A2 EP 1909812 A2 JP 2009-502954 A JP 2009-507770 A KR 10-2008-0033463 A US 2010-0004156 A1 US 2010-0068141 A1 WO 2007-014323 A2 WO 2007-014323 A3 WO 2007-014327 A2 WO 2007-014327 A3	2007.02.01 2007.02.01 2007.02.01 2007.02.01 2008.09.17 2009.12.09 2008.04.09 2008.04.16 2009.01.29 2009.02.26 2008.04.16 2010.01.07 2010.03.18 2007.02.01 2007.02.01 2007.02.01 2007.02.01
KR 10-0454554 B1	2005.04.06	AU 1996-64845 B2 CA 2225675 A1 CA 2225675 C CN 1102598 C CN 1193889 A CN 1193889 C0 EP 0845943 A1 EP 0845943 A4 EP 0845943 B1 JP 03-955627 B2 JP 03-955627 B6 JP 11-509196 A JP 2007-119482 A US 06110746A A US 6682897 B1 WO 97-01959 A1	1999.09.30 1997.01.23 2010.09.21 2003.03.05 1998.09.23 1998.09.23 1998.06.10 2002.04.10 2005.03.09 2007.05.11 2007.05.11 1999.08.17 2007.05.17 2000.08.29 2004.01.27 1997.01.23