명세서

발명의 명칭: 2차원 겔 전기영동에서의 열 안정성 변화-기반 형광 차이를 이용한 표적 단백질의 규명 방법

기술분야

[1] 본 발명은 2차원 겔 전기영동에서의 열 안정성 변화-기반 형광 차이를 이용한 표적 단백질의 규명 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 특정 약물, 바람직하게는 생리활성 분자가 그 표적 단백질과 결합했을 때에 나타나는 단백질의 열 안정성 변화를 2차원 겔 전기영동의 형광 차이를 통해 분석함으로써 특정 약물의 표적이 되는 단백질을 규명(identification)하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 저분자 물질이 그 생리 활성을 나타내기 위해서는, 그들의 생체분자적 파트너와 결합하여야 한다. 이러한 현상을 표적 결합(target engagement)이라고 하며, 약물의 발견과 화학생물학적 연구에서 중요한 분야이다. 형질 스크리닝을 통한 전통적인 천연물 또는 힛컴파운드(hit compound)의 표적 단백질은 대부분의 경우 알려지지 않았기 때문에, 표적 단백질은 생리활성 저분자 물질의 활성 메커니즘을 정하기 위해 규명되어야 하며, 이는 신규한 치료제 또는 생물의학과학 분야의 리서치 툴 발전을 위해 중요하다.

[3] 표적 규명에 가장 일반적으로 사용되는 접근 방식에는 친화 크로마토그래피-풀 다운 어세이가 있다(Schenone *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* 2013., 9, pp. 232-240). 생리 활성 화합물이 아가로즈 비드에 고정됨에 따라, 세포 용해물이 비드와 함께 배양되고, 변형된 비드와 결합된 표적 단백질은 결합되지 않은 다른 단백질로부터 분리된다. 화학적 프로테오믹스에서 최근의 두 가지 접근법은, (i) 단백질 클래스의 효소 활성을 이용한 활성-기반 프로테옴 프로파일링으로, 활성부위에의 공유결합 라벨링을 이용한 것과(Simon *et al.*, *Nat.Chem. Biol.* 2013., 9, pp. 200-205), (ii) 비-효소 단백질의 결합 상호작용을 이용한 친화성-기반 프로테옴 프로파일링으로, 광친화성-기반 공유결합성 가교(covalent cross-linking)를 이용한 것(Pan *et al.*, *Nat. Prod. Rep.* 2015. 8. 24., doi:10.1039/c5np00101c)을 포함한다. 이러한 접근법들은 화학적 프로테오믹스의 범위를 성공적으로 확장시켰지만, 효소 반응에 필요한 친전자체, 클릭 화학에서의 알카인 모이어티(moiety), 표적 단백질에의 공유결합성 가교결합을 위한 광친화성 작용기 등의 기능 부위(functional handles)를 도입하기 위해 원래의 생리활성 화합물에 화학적 변형을 가해야만 한다. 이에, 기능 변화의 최소화, 광친화성 작용기의 최적화, 분자 구조 및 크기를 포함하는 입체적인 요소(conformational factors)의 고려 등을 통해, 표적 규명을 위한 프로브를 발전시키기 위한 지속적인 노력이 있어 왔다. 예를 들어, 한국등록특허

제10-1427328호에서는 단백질과 결합이 가능한 특정 광반응 작용기와 형광물질 표지용 작용기를 포함하는 프로브를, 생리활성 분자에 공유결합으로 표지함으로써 표적 단백질을 동정하고자 하였다.

[4] 그러나, 기능화를 위한 설계 및 합성은 표적 규명에 있어서 큰 장애물이 될 수 밖에 없다. 많은 유사체들을 합성하고 그들의 구조-활성 관계를 탐색하는 것은 상당히 많은 노력을 필요로 한다. 만약 표적 규명 프로브가 생리활성을 그대로 유지할 수 있도록 합성되었다고 해도, 화학적으로 변형된 프로브가 세포의 프로테옴과 비특이적인 상호작용을 하는 것은 여전히 피할 수가 없다. 복잡한 천연물의 전체적인 합성의 제한, 또는 이들을 천연 공급원으로부터 충분한 양으로 추출해 내는 것의 제한으로 인해 화학적 변형을 수행하기 어려울 뿐만 아니라, 약간의 변형만으로 본래 힛컴파운드가 가지고 있는 생물학적 활성을 잃을 수 있다. 예를 들어, 브리오스타틴 1(bryostatin 1)이라는 화합물의 경우 58단계의 합성 단계를 거쳐야 할 정도로 합성하기가 어려울 뿐만 아니라(Keck et al., *J.Am. Chem. Soc.* 133, 744-747 (2011)) 그 화학 구조식이 매우 복잡하여(도 7a), 종래의 표적 규명 방법을 이용하는 경우 적합하게 기능하는 프로브를 제작하기가 어렵다. 또한, 호르데닌(hordenine)의 경우 반대로 매우 단순한 구조로 되어 있어(도 13a), 프로브를 표지하기 위한 화학적 변화가 불가능한 대표적인 천연 생리활성 저분자 물질이다. 따라서, 어떤 구조적인 변화도 필요로 하지 않는 비표지 표적 규명 방법이 필요한 실정이다.

[5] 최근 보고된 세포내 열안정성 어세이(cellular thermal stability assay; CETSA)에서는, 표지가 없는 방식의 표적 결합(target engagement)이 온전한 세포 및 조직 내에서 관찰되었다(Martinez Molina, *et al.*, *Science. 2013.,* 341, pp. 84-87). 열 변성 후의 웨스턴 블럿을 통해, 용액 부분에 존재하는 표적 단백질의 양이 측정되었다. 생리활성 리간드의 결합이 표적 단백질을 열 변성에 대하여 안정화시키고, 단백질의 융해 온도(*T*m)를 증가시켰다. 이러한 CETSA의 견고함과 효율성 때문에, CETSA는 많은 연구원들에게 채택되어 표적 결합의 확인을 위해 사용되었다. 예를 들어, 국제공개공보 WO2015/145151호에서도, CETSA와 정량적 질량분석법을 이용하여 약물 저항성을 가진 환자에서 바이오마커를 찾고자 하였고, 한국 공개특허공보 제10-2014-0033366호에서도 단백질의 열적 변화를 이용하여 표적 단백질에 결합하는 리간드를 찾고자 하였다. 그러나, 상기 두 특허 모두 리간드와 표적 단백질의 결합으로 인한 융해 온도의 변화가 크지 않고 미미한 경우에는, 리간드와 표적 단백질의 결합 여부를 쉽게 검출할 수 없다는 단점이 있다. 뿐만 아니라, CETSA는 비편향적인(unbiased) 프로테옴-와이드 표적 규명에 적합하지 않은데, 그 이유는 이 방법이 사용 가능 항체를 이용한 가설 기반(hypothesis driven) 후보 단백질에만 적용 가능하기 때문이다. 반면, 비편향적 표적 규명은 성공적인 형질 스크리닝을 위한 필수조건이며, 혁신 신약 치료법의 개발로 이끈다.

[6] LC-MS 테크닉의 빠른 발전에 따라, 최근 겔-프리(gel-free) 프로테오믹스가

선호되고 있음에도 불구하고, 2차원 겔 전기영동(2-DE)은 비용, 견고성, 및 해상도의 측면에서 여전히 효과적인 프로테오믹스 접근법으로 남아 있다. 본 발명자들은 열 안정성 어세이를 2차원 겔 전기영동을 기반으로 하는 FITGE(fluorescence difference in two-dimensional gel electrophoresis) 기술과 결합하면, 단순히 Cy3 시그널과 Cy5 시그널 간의 형광 차이로 인한 적색 스팟 또는 녹색 스팟을 다른 노란색 스팟들과 구별함으로써, 열 안정성 변화가 일어난 단백질 스팟을 효과적으로 찾을 수 있다는 점에 착안하였다.

[7] 이에, 본 발명자들은 2차원 겔 전기영동에서의 열 안정성 변화-기반 형광 차이(thermal stability shift-based fluorescence difference in two-dimensional gel electrophoresis; TS-FITGE)를 이용한, 프로테옴-와이드 표적 규명을 위한 비표지 방법을 사용하여, 극단적인 화학 구조를 가지는 생리활성 천연물, 즉 합성이 어려운 복잡한 구조의 천연물과, 화학적 변형을 위한 공간이 부족한 작고 단순한 천연물의 표적을 규명하고, 이를 통해 TS-FITGE 방법의 견고함과 실용성을 입증하고자 하였다. 두 개의 형광 시그널은 열적으로 안정화되거나 불안정화된 단백질 스팟을 가시화하는데 사용되었고, 각각의 다양한 온도에서의 겔의 정량 이미지 분석을 통해 각 단백질 스팟에 대한 융해 곡선을 플로팅(plotting)하였다.

[8] 그 결과, TS-FITGE 방법은 성공적으로 메토트렉세이트(methotrexate) 및 브리오스타틴 1의 알려진 표적 단백질을 밝혀냈고, 특히 막-정착 단백질의 규명에 이 방법이 적용될 수 있음을 확인하였다. 더 나아가, 호르데닌의 알려지지 않은 표적 단백질로서, 인 비트로(*in-vitro*) 단백질 조절인자인 단순 천연물을 규명하고, 그 기능을 검증하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 따라서, 본 발명의 목적은 약물 분자, 바람직하게는 생리활성 분자의 표적 단백질을 동정하는 방법으로서, 2차원 겔 전기영동에서의 열 안정성 변화-기반 형광 차이(thermal stability shift-based fluorescence difference in two-dimensional gel electrophoresis; TS-FITGE)를 이용한 동정 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 약물 분자, 바람직하게는 생리활성 분자의 표적 단백질을 동정하는 방법을 제공한다:

[11] (a) 세포 용해물 또는 인체로부터 유래한 세포가 포함된 혼합물 A를 제조하는 단계;

[12] (b) 세포 용해물 또는 인체로부터 유래한 세포와, 약물 분자가 혼합되어 포함된 혼합물 B를 제조하는 단계;

[13] (c) 상기 혼합물 A와 상기 혼합물 B를 동일한 특정 온도로 변화시키는 단계;

[14] (d) 상기 (c) 단계에서 얻어진 특정 온도의 혼합물 A 및 혼합물 B에 서로 다른 파장의 형광물질을 각각 혼합하여, 혼합물 A 및 혼합물 B의 용액 부분에

존재하는 단백질에 상기 서로 다른 파장의 형광물질을 각각 표지하는 단계;

[15] (e) 상기 (d) 단계에서 얻어진 혼합물 A 및 혼합물 B를 혼합하여 혼합물 C를 제조하는 단계;

[16] (f) 상기 혼합물 C를 전기영동하는 단계; 및

[17] (g) 상기 (f) 단계의 전기영동으로 인해 겔에 나타나는 단백질 스팟에 대한 형광 파장을 분석하여, 상기 (c) 단계로 인해 열 안정성 변화(thermal stability shift)가 나타난 단백질을 확인하는 단계.

발명의 효과

[18] 본 발명에 따른 TS-FITGE를 이용한 표적 단백질 동정 방법을 사용하는 경우, 극단적인 화학 구조를 가지는 생리활성 천연물, 즉 합성이 어려운 복잡한 구조의 천연물과, 화학적 변형을 위한 공간이 부족한 작고 단순한 천연물에 프로브를 표지하지 않고도 그 표적 단백질을 쉽게 찾아낼 수 있으며, 이는 혁신적인 신약 및 치료법의 개발에 매우 효율적이다. 또한, 기존의 열 안정성 어세이가 FITGE 기술과 결합됨으로써, 단백질의 열 안정성 변화로 인한 융해온도의 변화가 미미하거나 융해곡선의 경사가 가파를 경우에도, 특정 온도에서의 현저한 색 변화를 통해 단백질의 열 안정성 변화를 쉽게 검출할 수 있다는 장점이 있다(도 16 참조).

도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 TS-FITGE 실험의 모식도이다. 마이크로튜브 내 노란색은 표적 단백질을 의미하고, 십자 모양은 약물을 의미한다.

[20] 도 2은 세 가지 형광염료 (Cy3-NHS 에스터, Cy5-NHS 에스터, 및 Cy2-NHS 에스터)의 화학 구조식, 화학식, 및 분자량을 나타낸다.

[21] 도 3은 세 가지 다른 염료와 각각 컨쥬게이션된 프로테옴의 동일한 이동성을 보여주는 대표 이미지이다. (a) Cy2, Cy3, 및 Cy5 시그널은 37℃ 겔에서 중첩되었고, 대부분의 스팟은 흰색으로 나타났다. (b) 57℃에서, 열적으로 불안정한 단백질은 침전되었고 용액 부분으로부터 제거되었다. 따라서, 이러한 스팟은 가열되지 않은 Cy2-표지된 내부표준에 의해 청색으로 나타났다.

[22] 도 4는 메토트렉세이트 (MTX)의 표적 단백질의 비편향 규명을 나타낸다. (a) TS-FITGE 실험의 대표적 이미지. Cy3 채널 (녹색, DMSO 처리된 프로테옴)과 Cy5 채널 (적색, MTX 처리된 프로테옴)의 이미지가 중첩되었다. (b) 53℃ 겔에서 각 스팟의 Cy5/Cy3 형광 비율의 분포를 보여주는 상자도면 (box plot). 위스커(whiskers)는 1-99 백분위를 표시한다. (a)에 있는 삼각형으로 표시된 스팟은 붉은 화살표로 표시되었다. (c) (b)에 표시된 스팟의 변성 패턴을 보여주는 융해 곡선. (d) 디히드로엽산환원효소 (DHFR) 항체를 이용한 세포 열적 변화 어세이로부터의 면역 블롯.

[23] 도 5는 메토트렉세이트 (MTX)를 이용한 TS-FITGE 실험으로부터 얻어진 전체 겔 이미지이다.

[24] 도 6은 메토트렉세이트 (MTX)의 다른 표적 단백질로서 티미딜산 합성효소의 규명을 나타낸다. (a) 메토트렉세이트 (MTX)를 이용한 TS-FITGE 실험으로부터 얻어진 전체 겔 이미지. 염기성 pH 범위에서의 더 좋은 해상도를 위해 pH 6 내지 9 구배 (gradient)의 스트립 겔이 사용되었다. (b) (a)에서 흰색 박스로 표시된 부분의 확대 이미지. (c) 48℃ 겔에서 각각의 스팟에 대한 Cy5/Cy3 시그널 비율의 분포를 나타낸 상자그림. 위스커는 1-99 백분위를 표시한다. (b)에서 삼각형으로 표시된 스팟은 붉은 화살표 **1**에 의해 표시된다. 붉은 화살표 **2**는 디히드로엽산환원효소 (DHFR)의 스팟이다. (d) (c)에서 화살표로 표시된 스팟 **1**의 변성 패턴을 나타내는 융해 곡선. (e) 티미딜산합성효소 (TYMS) 항체를 이용한 세포 열적 변화 어세이로부터의 면역 블롯.

[25] 도 7은 브리오스타틴 1(bryostatin 1)의 막 고정 된 표적 단백질의 열 불안정을 나타낸다. (a) 브리오스타틴 1(bryostatin 1)의 화학 구조. (b) 브리오스타틴 1(bryostatin 1)에 의한 PKC 동종 효소의 전위 및 PKC의 가용화에 대한 IGEPAL CA-630의 효과. (c) 브리오스타틴 1을 처리하는 TS-FITGE 실험의 대표 이미지. (d) 47℃ 겔에서 각각의 스팟에 대한 Cy5/Cy3 시그널 비율의 분포를 나타낸 상자그림. 위스커(whisker)는 1-99 백분위를 표시한다. (e) (d)에 표시된 스팟의 변성 패턴을 보여주는 융해 곡선. (f) PKCα 항체로 세포 열 이동 분석으로부터의 면역 블롯. (g) 브리오스타틴 1(bryostatin 1)에 의한 PKCα의 열 불안정성을 확인하는 등온 (48 ℃) 용량 - 반응 곡선.

[26] 도 8은 PKC들의 가용화에서 계면활성제의 효과를 나타낸 것이다. (a) 초기 스크리닝을 위해 PKCα를 대표적인 PKC로서 사용하여 용해 버퍼의 계면활성제 조건을 최적화. 1시간 동안 브리오스타틴 1으로 처리한 후 용액 부분에서 PKCα의 양이 웨스턴블롯에 의해 측정되었다. IGEPAL CA-630는 PKCα를 가장 효과적으로 가용화했다. PKCα 가용화를 위해, 0.4% (v/v)가 0.05% 보다 더 좋고 1%와는 유사했다. (b) 1시간 동안 브리오스탄틴 1의 처리에 의한 PKCμ 및 PKCζ의 이동(translocation) 및 그들의 가용화를 위한 0.4% IGEPAL CA-630의 효과.

[27] 도 9는 열 변성이 없는 경우의 브리오스타틴 1에 의한 적색 및 녹색 스팟의 발현을 보여준다. (a) 75분 동안 브리오스타틴 1을 처리하는 TS-FITGE 실험의 대표 이미지. (b) (a) 에서 흰색 박스로 표시된 부분의 확대 이미지.

[28] 도 10은 단백질 스팟 변화에 대한 처리 시간의 효과를 보여준다. (a) 열 변성이 없는 경우의 브리오스타틴 1의 처리에 의한 색변화의 2D 겔 분석. 처리 시간이 감소되면서, 단백질 *e*는 사라졌고, 단백질 *c* 및 *d*는 황색이 되었다. (b) 단백질 *d*의 Cy3에 대한 Cy5의 양적 비율. (c) PKCα의 총 양을 비교하기 위한, PKCα 항체를 이용한 1D 겔 상에서의 면역 블롯. PKCα의 총 양은 37℃에서 처리 시간에 관계없이 동일하였다. (d) PKCα 항체를 이용한 2D 겔 상에서의 면역 블롯. 75분 동안의 처리는 추가적인 PKCα 스팟의 발현을 유도했다. 추가적인 스팟은 적색으로 나타났고, 나머지 스팟들은 형광 이미지에서 녹색이 되었다.

[29] 도 11은 20분 동안 브리오스타틴 1으로 처리한 후의 TS-FITGE 실험으로부터 얻어진 전체 겔 이미지이다.

[30] 도 12는 PKC 동질효소에 대한 CETSA 분석을 보여준다. PKCβ 및 PKCθ는 열 불안정화를 나타내었지만, 다른 것들은 그렇지 않았다.

[31] 도 13은 호르데닌의 신규한 표적 단백질 규명을 보여준다. (a) 호르데닌의 화학 구조 (*N,N*-dimethyltyramine, HDN). (b) 루시페라아제 리포터 유전자 산물에 의해 측정된, HDN이 인 비트로 번역 어세이에 주는 상향조절 효과. 데이터는 평균(mean)±SEM (*n*=2)으로 나타내어졌다. (c) TS-FITGE 실험의 대표적 이미지. Cy3 채널(녹색, DMSO 처리된 프로테옴)과 Cy5 채널(적색, HDN 처리된 프로테옴)의 이미지가 중첩되었다. (d) 53℃ 겔에서 각 스팟의 Cy5/Cy3 형광 비율을 보여주는 상자 도면. 위스커는 1-99 백분위를 표시한다. (c)에서 삼각형으로 가리켜진 스팟은 붉은색 화살표로 표시되었다. (e) (d)에 표시된 스팟의 변성 패턴을 보여주는 융해 곡선. (f) HDN 항체를 이용한 세포 열적 변화 어세이로부터의 면역 블롯. 데이터는 평균(mean)±SEM (*n*=4)으로 나타내어졌다. (g) 고정화된 뉴클레오포스민(NPM)에 대한 HDN(1.56-37.5 μM)의 결합 역학(binding kinetics)을 보여주는, 표면 플라스몬 공명 어세이의 센서그램. 우측 상단의 삽도는 다양한 농도의 HDN에 대한 정상상태(steady-state)의 반응을 보여준다. (h) 단백질 G 비드에 결합된 항-NPM에 의한 NPM의 고갈을 보여주는, NPM 항체를 이용한 면역 블롯. (i) NPM 고갈 이후 번역 상향조절에 대한 NPM의 저하된 효과. 데이터는 평균(mean)±SEM (*n*=3)으로 나타내어졌다. *paired Student's *t*-test에 의한 $P < 0.05$.

[32] 도 14는 호르데닌으로 처리한 후의 TS-FITGE 실험으로부터 얻어진 전체 겔 이미지이다.

[33] 도 15는 열 안정화를 나타내는 표적 단백질을 확인하기 위한 면역 블롯 분석을 보여준다. (a) SET, RPSA, 및 EEF1d을 대조 단백질, GAPDH, 및 β-튜불린과 비교한 세포 열 변화 어세이. (b) 53℃에서 NPM 및 β-튜불린의 등온 용량 반응 분석. NPM 단백질은 HDN에 의해 용량 의존적 열 안정화를 나타냈다.

[34] 도 16은 TS-FITGE에서의 분석 절차를 나타낸다. TS-FITGE에서 각 온도에서의 형광 차이가 직접적으로 비교됨에 따라, *T*m 변화가 미미하더라도 특정 온도에서 현저한 색 변화가 검출될 수 있다. 이러한 특정 온도 포인트는 겔의 수를 증가시킴으로써 포착할 수 있다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[35] 본 명세서에서, "열 안정성 변화(thermal stability shift)"라는 개념은, 약물 분자와 그 표적 단백질의 결합으로 인해, 표적 단백질이 (i) 열적 안정화(thermally stabilized)되어 표적 단백질 본래의 융해 온도(*T*m)보다 더 높은 융해 온도 값을 갖게 되거나, (ii) 열적 불안정화(thermally destabilized) 되어 표적 단백질 본래의 융해 온도보다 더 낮은 융해 온도 값을 갖게 되는 것을 의미한다.

[36] 본 발명은 일 관점에서, (a) 세포 용해물 또는 인체로부터 유래한 세포가 포함된 혼합물 A를 제조하는 단계; (b) 세포 용해물 또는 인체로부터 유래한 세포와, 약물 분자가 혼합되어 포함된 혼합물 B를 제조하는 단계; (c) 상기 혼합물 A와 상기 혼합물 B를 동일한 특정 온도로 변화시키는 단계; (d) 상기 (c) 단계에서 얻어진 특정 온도의 혼합물 A 및 혼합물 B에 서로 다른 파장의 형광물질을 각각 혼합하여, 혼합물 A 및 혼합물 B의 용액 부분에 존재하는 단백질에 상기 서로 다른 파장의 형광물질을 각각 표지하는 단계; (e) 상기 (d) 단계에서 얻어진 혼합물 A 및 혼합물 B를 혼합하여 혼합물 C를 제조하는 단계; (f) 상기 혼합물 C를 전기영동하는 단계; 및 (g) 상기 (f) 단계의 전기영동으로 인해 겔에 나타나는 단백질 스팟에 대한 형광 파장을 분석하여, 상기 (c) 단계로 인해 열 안정성 변화(thermal stability shift)가 나타난 단백질을 확인하는 단계를 포함하는, 약물 분자의 표적 단백질을 동정하는 방법에 관한 것이다.

[37] 상기 "인체로부터 유래한 세포"는 소변, 변, 태반, 모발, 손톱 등 인간으로부터 배출된 것, 또는 혈액, 피부, 종양, 조직 등 인간으로부터 채취된 것으로부터 유래하는 세포를 의미한다.

[38] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 특정 온도는 37~70℃ 범위에 있는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 방법은 상기 (g) 단계의 각 단백질 스팟에 대한 융해 곡선 그래프를 플로팅(plotting)하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[39] 상기 융해 곡선은 S자 곡선(sigmoidal curve)이며, 약물 분자와 그 표적 단백질이 결합하여 단백질이 열적으로 안정화되었을 경우에는 S자 곡선이 그래프 상에서 오른쪽으로 이동하고, 열적으로 불안정화되었을 경우에는 S자 곡선이 그래프 상에서 왼쪽으로 이동하게 된다. 본 발명의 일 실시예에서, 생리활성 분자인 호르데닌이 표적 단백질인 뉴클레오포스민과 결합하여 단백질의 융해온도가 증가, 즉 열적으로 안정화됨을 확인할 수 있었고, 다른 실시예에서, 다른 생리활성 분자인 브리오스타틴 1이 표적 단백질인 PKCα와 결합하여 단백질의 융해온도가 감소, 즉 열적으로 불안정화됨을 확인할 수 있었다.

[40] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 (g) 단계의 열 안정성 변화는, 상기 혼합물 B에 존재하는 단백질이 상기 약물 분자와 결합함으로써 열 안정화되는 것임을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 생리활성 분자인 호르데닌(hordenine)이 표적 단백질인 뉴클레오포스민(nucleophosmin, NPM)과 결합하는 경우, 뉴클레오포스민은 열 안정화된다. 또한, 상기 (g) 단계의 열 안정성 변화는, 상기 혼합물 B에 존재하는 단백질이 상기 약물 분자와 결합함으로써 열 불안정화되는 것임을 특징으로 할 수도 있다. 예를 들어, 생리활성 분자인 브리오스타틴 1(bryostatin 1)이 표적 단백질인 PKCα(protein kinase Cα)와 결합하는 경우, PKCα는 열 불안정화된다.

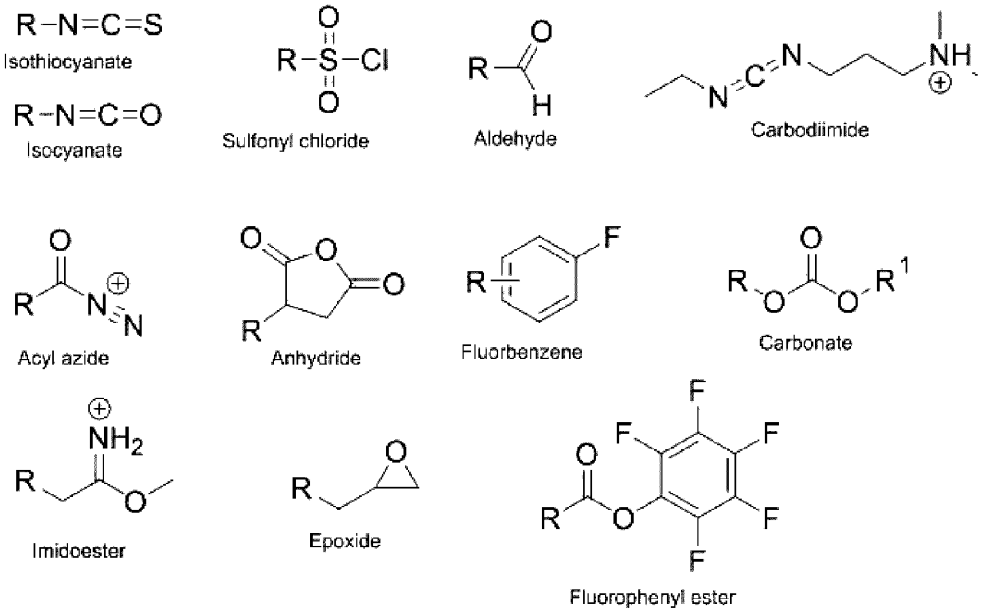
[41] 또한, 상기 (b) 단계의 약물 분자는 바람직하게는 생리활성 분자이고, 상기 (g) 단계에서 얻어진 표적 단백질의 종류는 특별히 한정되는 것은 아니나, 막

정착(membrane-anchored) 단백질일 수 있다.

[42] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 (d) 단계의 형광물질은 특별히 제한되는 것은 아니나, Cy2, Cy3, Cy5, fluorescein, Alexafluor488, R6G, HEX, AlexaFluor32, TAMRA, AlexaFluor546, EtBr, SYPRO Ruby 및 Blue FAM으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는, 상기 (d) 단계의 혼합물 A에 혼합되는 형광물질은 Cy3, 혼합물 B에 혼합되는 형광물질은 Cy5인 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 바람직하게는 상기 Cy3 및 Cy5에 각각 하기의 아민-반응성 작용기가 더 결합될 수 있다. 바람직하게는, N-하이드록시석신이미드 에스터(*N*-hydroxysuccinimide (NHS) ester)가 더 결합될 수 있다.

[43] <아민-반응성 작용기>

[44]



[45] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 (g) 단계의 형광 파장(시그널) 분석은, 상기 혼합물 A의 용액 부분에 존재하는 단백질에 표지되는 형광물질로부터 발생하는 형광 파장과, 상기 혼합물 B의 용액 부분에 존재하는 단백질에 표지되는 형광물질로부터 발생하는 형광 파장의 비율을 분석함으로써 이루어질 수 있다. 상기 비율은 본 발명이 속한 분야에서 일반적으로 사용되는 2D 겔 형광 측정 장치, 바람직하게는, DeCyder 2D 소프트웨어를 이용하여 계산될 수 있다.

[46] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 (f) 단계의 전기영동은 2차원(2D) 겔 전기영동인 것을 특징으로 할 수 있다. 기존 1차원(1D) 전기영동의 경우, 1 방향으로 전기영동하여 분자량 별로 단백질이 나뉘게 된다. 이 경우, 표적 단백질과 동일 또는 유사한 분자량의 단백질이 생리활성 분자와 결합하는 것을 구분해내기 어려운 경우가 많다. 따라서, 2 방향으로 분자량 및 전하량에 따라 단백질이 분리되므로 상기와 같은 문제를 해결하고 표적 단백질을 동정해낼 수 있다.

[47] [실시예]

[48] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[49] **열 안정성 변화를 이용한 프로테옴-와이드 표적 규명**

[50] CETSA는 지정된 항체를 이용하여 알려진 후보 단백질에 적용시킬 수 있고, 이에 따라, 열 안정성 변화를 본 발명자들이 개발한 FITGE 기술에 적용시켜 프로테옴-와이드 표적 규명을 하고자 하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, 세포들은 약물의 존재 또는 부존재 하에, 3분 동안 열 변성이 유도될 수 있는 온도 범위 내에서 가열되었다. 그 다음, 세포들을 PBS(phosphate-buffered saline) 용액에서 동결-융해 사이클을 통해 세척 및 용해시키고, 원심분리를 통해 변성된 단백질을 침전시켰다. 대부분의 단백질은 약물의 존재 또는 부존재 하에서 동일한 변성 패턴을 나타낸 반면, 열 안정성에 변화가 있었던 표적 단백질은 약물과의 결합으로 인해 용액 부분에 존재하는 양의 차이를 보였다. 용액 부분의 모든 단백질은 N-하이드록시석신이미드 (NHS) 에스터를 포함하는 두 개의 서로 다른 염료, 즉 음성대조군으로 운반체만 처리된 그룹에는 Cy3-NHS가, 약물 처리된 그룹에는 Cy5-NHS가 컨쥬게이션되었다. 염료가 컨쥬게이션된 두 그룹의 프로테옴들은 혼합된 후 2차원 겔 전기영동(2-DE)을 통해 분리되었고, 각 단백질 스팟의 Cy3 형광 시그널에 대한 Cy5 형광 시그널의 비율이 자동 이미지 분석에 의해 정량되었다.

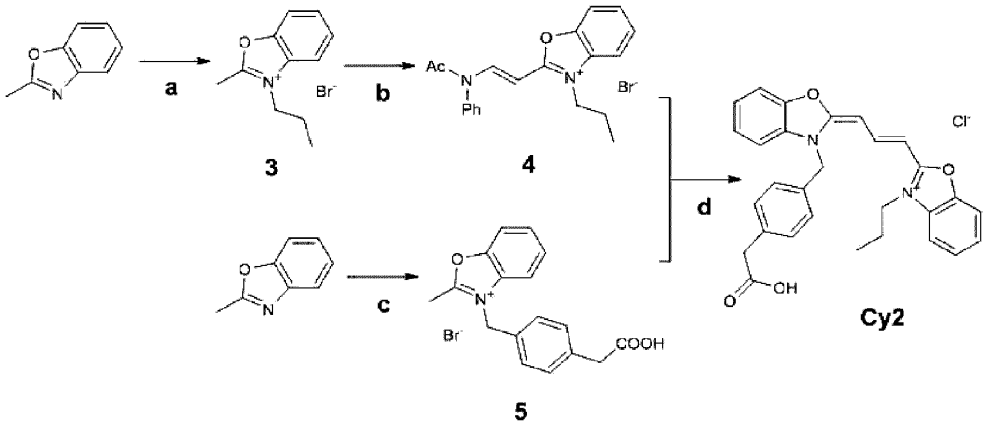
[51] 약물에 의한 열 안정성 변화가 일어나지 않은 단백질들은 황색 스팟을 나타낸 반면(Cy3와 Cy5의 합성 시그널), 약물 결합에 의해 열적으로 안정화되거나 불안정화된 단백질들은 각각 붉은 스팟과 녹색 스팟으로 나타났다. 또한, 가열되지 않은 프로테옴은 Cy2-NHS과 컨쥬게이션되었고, 같은 양의 Cy2-컨쥬게이션된 프로테옴이 각각의 겔 샘플에 첨가되어 인터-겔 정량의 내부표준(internal standard)이 되도록 하였다. 이로써, 각 단백질 스팟의 융해 곡선이 얻어졌다 (도 1).

[52] TS-FITGE에서 열적 변화된 스팟들은 잠재적인 표적 단백질로 여겨졌고, 질량분석법에 의한 규명을 위해 절제(excision)되었다.

[53] **실시예 1: 동일한 전기영동적 유동성(mobility)을 위한 세 가지 형광 염료 준비**

[54] 2차원 겔에서 Cy2-, Cy3-, Cy5- 컨쥬게이션된 단백질의 이동성 편차를 최소화하기 위해, 전하와(charge-matched) 질량이(mass-matched) 일치하는 염료를 준비하였다. 각 염료의 합성 과정은 아래와 같다.

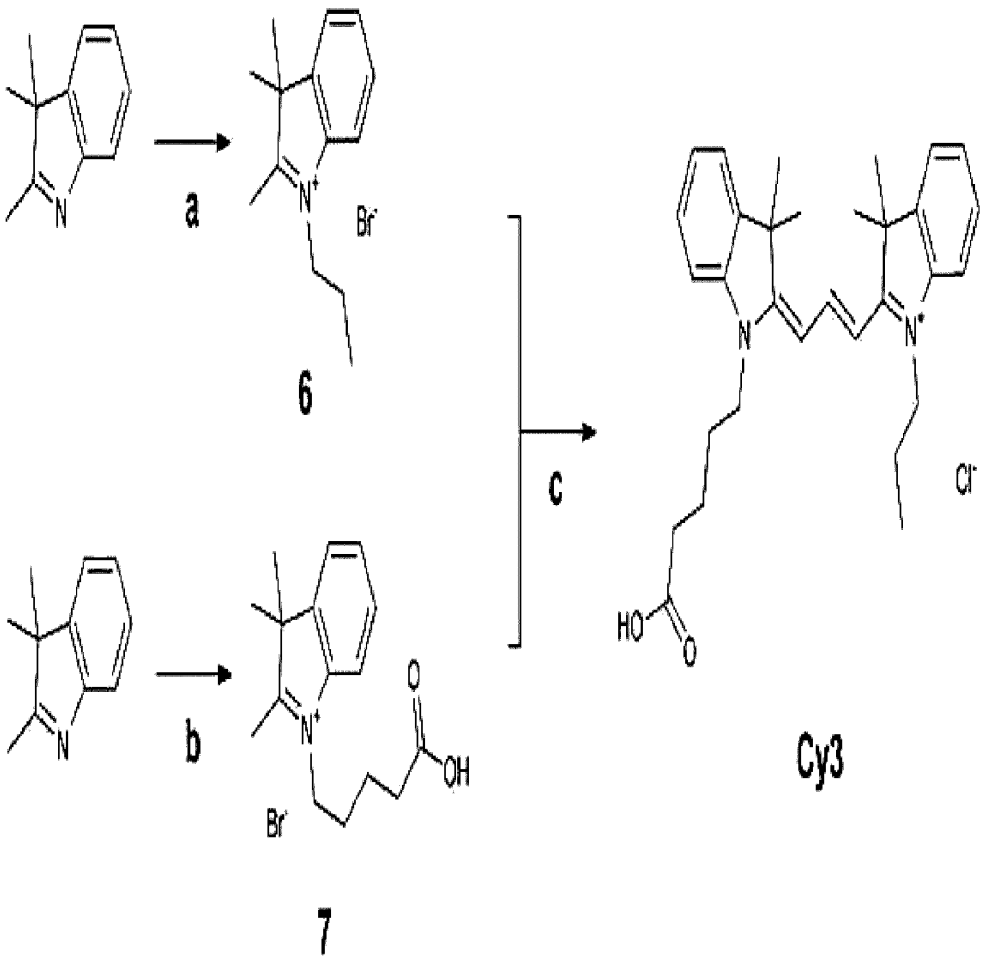
[55] <u>Cy2의 합성</u>

[56] 

[57] 시약 및 조건: (a) 1,2-디클로로벤젠 (10 mL) 내 *n*-프로필 브로마이드 (0.1 mmol, 1 equiv.) 및 2-메틸벤조옥사졸 (0.1 mmol, 1 equiv.)의 용액이 24h 동안 110℃로 교반되었다. 반응 혼합물은 에테르와 함께 분말화되었고, 상기 침전물은 얻고자 하는 생성물 **3**을 흰색 결정으로서 얻기 위해 에테르로 세척되었다. (b) 아세트산 무수물 (10 mL) 내 **3**의 용액 (0.1 mmol, 1 equiv.) 및 *N,N'*-디페닐포름아미딘 (0.1 mmol, 1.2 equiv.)의 용액이 30분 동안 120℃로 교반되었다. 용매는 감소된 압력 하에 제거되었고, 잔여물은 얻고자 하는 생성물 **4**를 노란색 결정으로서 얻기 위해 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 디클로로메탄/메탄올로 정제되었다. (c) 1,2-디클로로벤젠 (10 mL) 내 4-(브로모메틸)페닐아세트산 (0.1 mmol, 1 equiv.) 용액 및 2-메틸벤조옥사졸 (0.1 mmol, 1 equiv.)의 용액이 24h 동안 110℃에서 교반되었다. 반응 혼합물은 에테르와 함께 분말화되었고, 상기 침전물은 얻고자 하는 생성물 5를 노란 결정으로서 얻기 위해 에테르로 세척되었다. (d) 에탄올 (10 mL) 내 **4** (0.1 mmol, 1 equiv.) 및 **5** (0.1 mmol, 1 equiv)의 용액에 트리에틸아민을 첨가하였고, 30분 동안 80℃에서 교반되었다. 용매는 감소된 압력 하에서 제거되었고, 잔여물은 얻고자 하는 생성물 **Cy2**을 짙은 노란 결정으로서 얻기 위해 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 디클로로메탄/메탄올로 정제되었다.

[58] Cy3의 합성

[59]

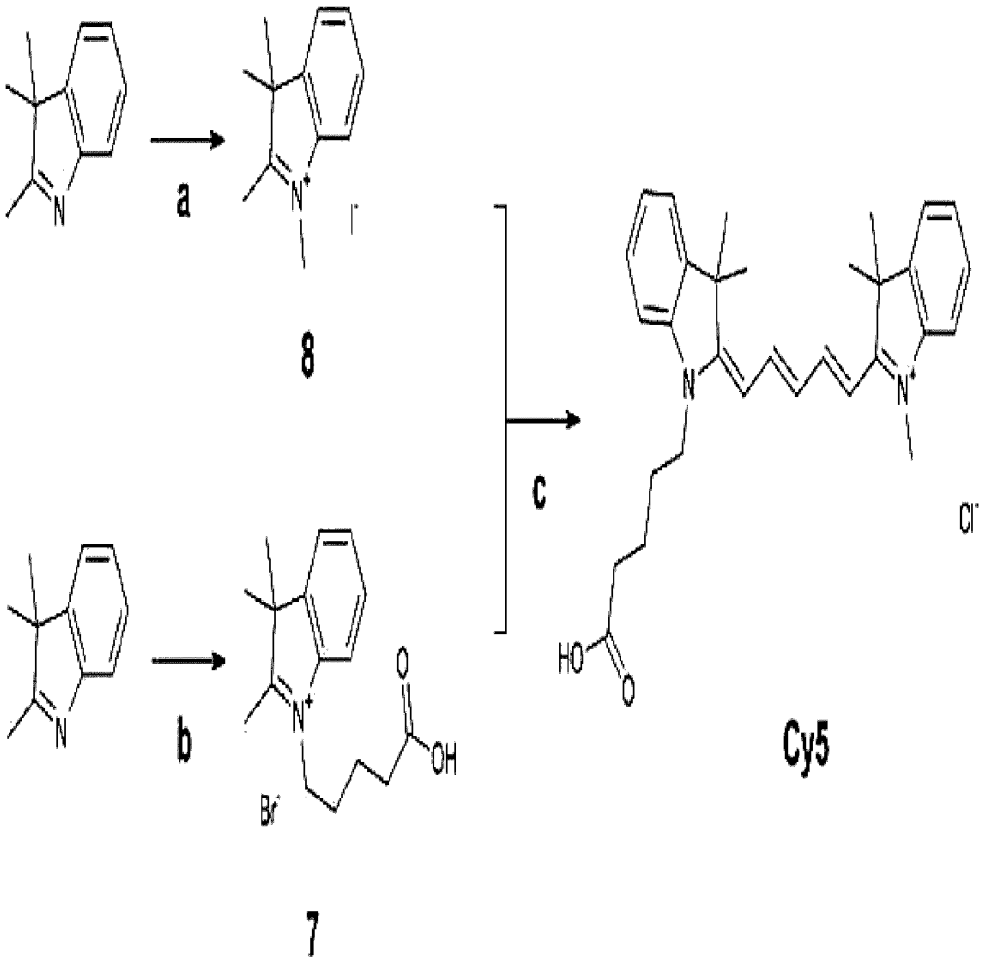


[60] 시약 및 조건: (a) 니트로메탄 (10 mL) 내 n-프로필 브로마이드 (0.1 mmol, 1 equiv.) 및 2,3,3-트리메틸인돌레닌 (0.1 mmol, 1 equiv.)의 용액이 6h 동안 80℃로 교반되었다. 반응 혼합물은 에테르와 함께 분말화되었고, 상기 침전물은 얻고자 하는 생성물 **6**을 분홍색 결정으로서 얻기 위해 에테르로 세척되었다. (b) 니트로메탄 (10 mL) 내 5-브로모발레르산 (0.1 mmol, 1 equiv.) 및 2,3,3-트리메틸인돌레닌 (0.1 mmol, 1 equiv.)의 용액이 6h 동안 80℃로 교반되었다. 반응 혼합물은 에테르와 함께 분말화되었고, 상기 침전물은 얻고자 하는 생성물 **7**을 보라색 결정으로서 얻기 위해 에테르로 세척되었다. (c) 아세트산 무수물 (10 mL) 내 **7** (0.1 mmol, 1 equiv.) 및 *N,N'*-디페닐포르아미딘 (0.12 mmol, 1.2 equiv.)의 용액이 30분 동안 120℃에서 교반되었다. 반응 혼합물은 실온에서 냉각되었다. 그 후 피리딘 (10 mL) 내에 **6**의 용액이 첨가되었다. 혼합물은 12시간 동안 실온에서 교반되었다. 용액은 클로로포름 내에 농축 및 용해되었고, 물 및 1N HCl 수용액으로 세척되었다. 유기 층은 그 후 $MgSO_4$와 함께 건조되고, **Cy3**를 짙은 분홍색 결정으로서 얻기 위해 플래시 컬럼

크로마토그래피에 의해 디클로로메탄/메탄올로로 여과, 증발, 및 정제되었다.

[61] Cy5의 합성

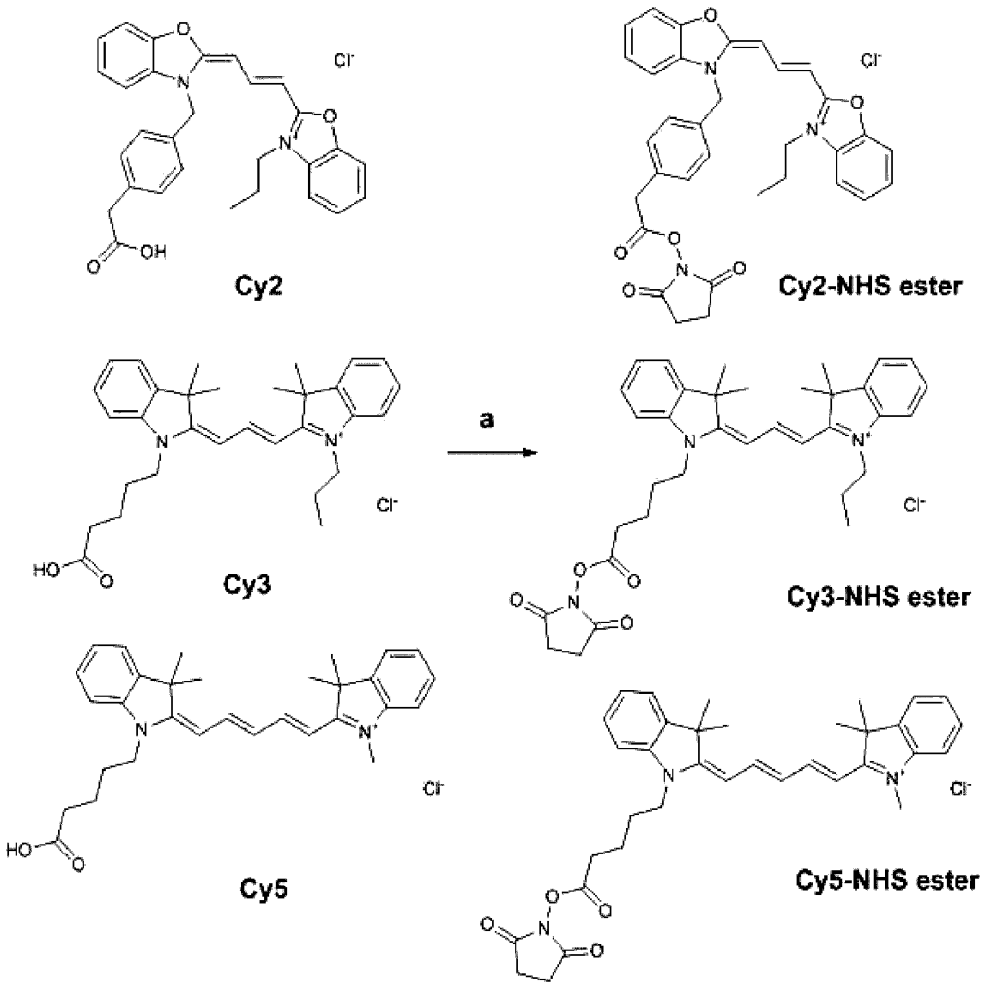
[62]



[63] 시약 및 조건: (a) 아이오도메탄, 니트로메탄, r.t., 12h. (b) 상기 Cy3의 합성 과정 중 (b)와 동일. (c) 아세트산 무수물 (10 mL) 내에 **7** (0.1mmol, 1 equiv.) 및 말론디알데하이드 비스(페닐이민) 모노하이드로클로라이드 (0.12 mmol, 1.2 equiv.)의 용액이 30분 동안 120℃로 교반되었다. 반응 혼합물은 실온에서 냉각되었다. 그 후 피리딘 (10 mL) 내에 **8**의 용액이 첨가되었다. 혼합물은 12시간 동안 실온에서 교반되었다. 용액은 클로로포름 내에 농축 및 용해되었고, 물 및 1N HCl 수용액으로 세척되었다. 유기 층은 그 후 $MgSO_4$와 함께 건조되고, **Cy5**를 짙은 청색 결정으로서 얻기 위해 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 디클로로메탄/메탄올로 여과, 증발, 및 정제되었다.

[64] Cy2, Cy3, Cy5-NHS 에스터의 합성

[65]



[66] 시약 및 조건: (a) DMF (5 mL) 내 Cy2, Cy3, 또는 Cy5 (0.1 mmol, 1.0 equiv.)의 용액에 피리딘 (0.2 mL) 및 *N,N*-디석시니미딜 카보네이트 (DSC, 0.15 mmol, 1.5 equiv.)가 첨가되었다. 혼합물은 2시간 동안 60℃로 교반되었다. 상기 용매는 감소된 압력 하에 제거되었고, 잔여물은 각각 얻고자 하는 생성물 Cy2-NHS 에스터, Cy3-NHS 에스터 또는 Cy5-NHS 에스터를 얻기 위해 플래시 컬럼 그로마토그래피에 의해 디클로로메탄/메탄올로 정제되었다.

[67] 상기 모든 염료는 +1의 전하를 띠었고 서로 2 Da 만큼의 차이만 보였다 (도 2). Cy2, Cy3, Cy5와 컨쥬게이션된 단백질들이 같은 이동성을 가짐에 따라, 37℃ 겔 안의 대부분의 단백질 스팟들이 융합(merging) 후 흰색으로 나타났다 (도 3). 더 높은 온도에서, 열적으로 불안정한 단백질(Cy3- 및 Cy5- 컨쥬게이션된 단백질)들은 변성되거나 사라졌다. 그러므로, 이 스팟들은 가열되지 않은 Cy2 염료와 결합한 내부표준(internal standard)으로 인해 청색으로 나타났다 (도 3b).

[68] **실시예 2: 메토트렉세이트(Methotrexate)에 대한 개념 입증(proof-of-concept) 표적 규명 연구**

[69] 메토트렉세이트는 주 표적 단백질인 디히드로엽산환원효소 (dihydrofolate reductase, DHFR)가 16℃의 현저하게 큰 T_m 이동이 있는 것으로 알려져 있기 때문에 (Martinez Molina, D. *et al.*, *Science.* 341, 84-87 (2013)), 개념 입증 연구를 위해 선택되었다. 다양한 변성 온도의 2차원 겔 시리즈 중, 37℃ 겔의 거의 모든 단백질 스팟들이 황색으로 나타났지만, 53℃ 겔에서는 뚜렷한 적색 스팟이 발견되었다 (도 4a와 도 5). 정량 분석을 위해, 53℃ 겔에 있던 모든 단백질 스팟에서 Cy3에 대한 Cy5 시그널의 비율을 계산하여 상자도면(box plot)에 나타내었다 (도 4b).

[70] 예상했던 대로, 도 4a에 표시된 적색 스팟은 가장 높은 비율을 보였으며 (도 4b에 화살표로 표시), 이 스팟에는 현저히 다른 Cy5 및 Cy3 형광 시그널이 있음을 제시하였다. 이 스팟의 융해 곡선은 Cy2 시그널을 내부표준으로 사용해 일정 온도 범위 내에서 그려졌고 S자 곡선의 이동을 보였으며, 메토트렉세이트의 잠재적 표적 단백질의 T_m 증가를 나타내었다 (도 4c).

[71] 마지막으로, 이 스팟을 절제하여 LC-MS/MS를 통해 분석한 결과, DHFR가 표적 단백질임을 알 수 있었다 (표 1). 단일 클론 DHFR 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 통해 TS-FITGE에 의해 나온 패턴과 비슷한 열적 변화 패턴임을 알 수 있었다.

[72] 또한, 티미딜산합성효소 (메토트렉세이트의 다른 표적 단백질)도 48℃ 겔에서 뚜렷한 적색을 보이는 열-안정 스팟으로 확인되었고, 이 스팟에서 티미딜산합성효소의 양적 형광 차이가 DHFR 스팟에 앞서 가장 크게 나타났다 (도 6 및 표 1).

[73] 이로써, 열 안정성 변화에 기반을 둔 TS-FITGE이 실현 가능하며 살아있는 세포 내에서 비편향(unbiased) 표적 규명을 위한 효율적인 방법임을 확인하였다.

[74] [표 1]

[75] 질량 분석법에 의한 2차원 전기영동 스팟의 단백질 규명. 100보다 큰 Mascot 스코어를 가진 단백질들은 재현 가능한 결과를 나타냈기 때문에 리스트되었다.

[76]

Compound	Protein spot	Match to	Molecular Weight	Mascot Score	Queries matched	Sequence Coverage (%)	Protein
Methotrexate	표 4a	DYR_HUMAN	21439	533	79	82	Dihydrofolate reductase
	표 6b	TYSY_HUMAN	35693	527	19	37	Thymidylate synthase
		PRPS1_HUMAN	34812	224	11	38	Ribose-phosphate pyrophosphokinase I
Bryostatin 1	표 7c, a	ELMO1_HUMAN	83776	210	19	21	Engulfment and cell motility protein 1
	표 7c, b	ELMO1_HUMAN	83776	267	27	30	Engulfment and cell motility protein 1
	표 7c, c	MCM7_HUMAN	81257	615	29	39	DNA replication licensing factor MCM7
		KPCA_HUMAN	76714	220	10	18	Protein kinase C alpha type
		SYTC_HUMAN	83382	183	12	20	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic
	표 7c, d	KPCA_HUMAN	76714	307	18	28	Protein kinase C alpha type
		SYTC_HUMAN	83382	135	11	18	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic
	표 9b, e	MCM7_HUMAN	81257	276	10	18	DNA replication licensing factor MCM7
		KPCA_HUMAN	76714	132	7	12	Protein kinase C alpha type
		EFG1_HUMAN	83418	109	5	8	Elongation factor G 1, mitochondrial precursor
	표 9b, f	DC1I2_HUMAN	71412	395	15	32	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2
		GRP78_HUMAN	72298	119	9	16	78 kDa glucose-regulated protein precursor
	표 9b, g	DC1I2_HUMAN	71412	469	12	26	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2
		GRP78_HUMAN	7228	195	13	24	78 kDa glucose-regulated protein precursor
	표 9b, h	HNRPK_HUMAN	50944	469	25	57	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
		HNRPK_HUMAN	50944	405	23	40	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K

[77]

	도 9b, j	PGTA_HUMAN	65030	144	11	22	Geranylgeranyl transferase type-2 alpha subunit
		HDAC1_HUMAN	55068	126	4	12	Histone deacetylase 1
	도 9b, j	HNRPK_HUMAN	50944	519	25	52	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
		PGTA_HUMAN	65030	399	15	29	Geranylgeranyl transferase type-2 alpha subunit
		CH60_HUMAN	61016	354	17	30	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor
		TCPQ_HUMAN	59583	173	10	21	T-complex protein 1 subunit theta
		TCPE_HUMAN	58633	153	14	33	T-complex protein 1 subunit epsilon
Hordenine	도 13c	NPM_HUMAN	32555	5562	175	87	Nucleophosmin
		EF1D_HUMAN	31183	1847	40	77	Elongation factor 1-delta
		SET_HUMAN	33469	1039	47	48	Protein SET
		TTC1_HUMAN	33585	888	45	75	Tetratricopeptide repeat protein 1
		RSSA_HUMAN	32833	347	11	29	40S ribosomal protein SA
		HS90B_HUMAN	83212	295	11	14	Heat shock protein HSP 90-beta
		HDGF_HUMAN	26772	285	9	51	Hepatoma-derived growth factor
		VA0D_HUMAN	40383	223	12	28	Vacuolar ATP synthase subunit d

[78] **실시예 3: 브리오스타틴 1의 막 정착(membrane-anchored) 표적 단백질 규명**

[79] TS-FITGE의 유용성을 확인하기 위해 복잡한 천연물인 브리오스타틴 1의 표적 단백질을 규명하였다. 브리오스타틴은 해양 생물인 큰다발이끼벌레(*Bugula neritina*)에서부터 처음 추출되었고 강한 항암 활성, 상승적 화학요법(synergistic chemotherapeutic) 활성, 기억력 향상 활성을 보여주었다 (Ruan *et al.*, *Curr. Med. Chem.* 19, 2652-2664 (2012)). 1982년, 브리오스타틴 1의 구조가 정확히 밝혀진 후, 2011년 58단계의 총 합성이 기록되었다 (Keck et al., *J.Am. Chem. Soc.* 133, 744-747 (2011)). 따라서, 브리오스타틴 1은 다른 표적 규명 방법을 위해 적합하게 기능하는 프로브를 만들기 어려운 복잡한 천연물의 예이다 (도 7a). 또한, 브리오스타틴은 단백질인산화효소 C (Protein kinase Cs, PKCs)를 조절해 원형질막으로 이동시켜 정착시키는 것으로 알려졌으며, 세포 신호과정에 중요한 역할을 하는 기질 단백질(substrate protein)을 인산화한다 (Sun *et al.*, *CNS Drug Rev.* 12, 1-8 (2006)).

[80] 세포막에 정착된 단백질이 본 발명의 TS-FITGE 방법에 적합한지를 연구하기

위해, 먼저 웨스턴 블롯을 통해 PKC를 가용화 하는 데 있어서의 계면활성제의 효과를 확인하였고, 여러 계면활성제 중 (도 8a) 비이온성, 비변성 계면활성제인 0.4%(v/v)의 IGEPAL CA-630을 포함하는 인산완충된 생리식염수에서의 용해(lysis) 조건을 최적화하였다. 도 7b에 나타난 대로, PKCα는 브리오스타틴 처리 전 주로 용액 부분에 존재하였지만, 약한 계면활성제가 포함되지 않은 용해 버퍼에서는 브리오스타틴 처리 후 불용성 부분으로 이동하였다. 그러나, 0.4%의 IGEPAL CA-630이 존재하는 경우, 브리오스타틴 처리 이후에도 PKCα는 용액 부분에 존재했다. PKCδ의 위치는 브리오스타틴에 영향을 받지 않았지만, 양쪽 모두의 경우에 가용화를 위해 비이온성 계면활성제가 반드시 필요하였다 (도 7b). 다른 PKC 동질 효소들의 가용화는 브리오스타틴과 계면활성제의 영향을 받지 않았다 (도 8b). 따라서, 0.4%의 IGEPAL CA-630은 PKC를 전체적으로 가용화하고 용액 부분의 열 안정성 변화를 감지하기 위해 필요함을 알 수 있다.

[81] 그 다음, 최적화된 용해 조건을 사용해 세포 프로테옴의 열 변성 패턴을 관찰하기 위해, 브리오스타틴에 대한 TS-FITGE 실험을 수행하였다. 흥미롭게도, 몇몇의 스팟들이, 가열된 샘플뿐만 아니라 가열되지 않은 샘플(37℃)에서도 적색 또는 녹색으로 나타났고, 이 스팟들의 색 차이는 열적 변화에 의한 것이 아님을 나타내며, (도 7c, 단백질 *a* 및 *b*; 도 9, 단백질 *c, d, e, f, g, h, I* 및 *j*). 또한, 대부분의 적색과 녹색 스팟들이 수평으로 서로의 옆에 쌍의 배열로 나타났다. 이 현상은 2차원 전기영동에서 관찰되는 전형적인 번역후변형(post-translational modification, PTM) 패턴이다. 따라서, 이 스팟들은 열적 변화된 표적 단백질이 아닌, 37℃에서 약물의 결합 후 번역후변형이 된 다운스트림 기질로 간주했다. PTM에 의해 발생한 적색과 녹색 단백질 스팟은, PTM이 일어날 시간이 충분하지 않도록 약물 처리의 시간을 줄임으로써 감소시킬 수 있다. 예상했던 대로, 처리 시간이 줄면서 *e*를 포함한 적색 스팟들은 사라졌지만, 녹색 스팟 *c*와 *d*는 37℃에서 황색 계열이 되었다 (도 10a 및 10b). 단백질 스팟 *c, d, e*가 PKCα로 규명된 후 (표 1), PKCα 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 37℃에서 PKCα의 총 양은 1차원 겔에서와 동일하였으나, 증가된 브리오스타틴 1 처리 시간을 적용한 2차원 겔에서는 PKCα가 수평의 적색과 녹색 스팟들로 분리되었다 (도 10c 및 10d). 이 결과들은 모두 37℃에서 적색과 녹색 스팟들이 PTM으로 인해 발생한다는 해석과 일관되었다.

[82] 20분간의 브리오스타틴 1 처리 이후, 가열된 샘플에서는 뚜렷한 녹색 스팟들을 관찰하였지만 가열되지 않은 샘플에서는 관찰하지 못했으며, 이는 표적 결합에 따른 열 불안정화를 나타내었다. (도 7c, 단백질 *c* 및 *d*; 도 11). 이 스팟들은 47℃ 겔에서 가장 낮은 Cy3에 대한 Cy5 시그널의 비율을 나타내었고, 이는 현저한 열 불안정화가 일어났다는 것을 보여주었다 (도 7d). 가열되지 않은 겔에서도 스팟들이 적색으로 나타났고, 따라서 시그널 차이가 열 안정성 변화로 인해 일어난 것이 아니라 PTM으로 인해 일어난 것이기 때문에 가장 높은 Cy5/Cy3 시그널 비율을 보인 스팟들은 제외되었다. 스팟 *c*와 *d* 모두 온도 의존적 열

불안정화 패턴을 보였고, 단백질 *d*의 융해 곡선은 도 7e에 나타내었다. 질량 분석을 통해 스팟 *c*와 *d*의 단백질 모두 브리오스타틴 1의 표적인 PKCα라는 것이 나타났다 (표 1). 일반적으로, 표적 단백질은 약물 결합에 의해 열 안정화가 되는 것으로 알려져 있다 (Niesen et al., *Nat. Protoc.* 2, 2212-2221 (2007)). 브리오스타틴 1에 의한 PKCα의 열 불안정화를 확인하기 위해 CETSA를 수행하였으며, 이는 PKCα의 열 불안정화를 확실하게 보여주었다 (도 7f). 또한, 48℃에서의 등온 용량-반응(isothermal dose-response) 곡선은 PKCα의 용량 의존적 열 불안정화를 나타내어 (도 7g), 전술한 내용을 뒷받침하였다. 브리오스타틴 1은 다른 동질효소와도 결합하는 것으로 알려져 있기 때문에 (Kazanietz *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 46, 374-379 (1994)), 다른 동질효소에도 CETSA를 수행하였다. PKCβI, PKCδ와 PKCε는 특별한 열 안정성 변화를 보이지 않았지만, PKCβII 와 PKCθ는 열 불안정화를 보였고, 예상되었던 PKCγ, PKCμ, PKCζ밴드는 발견할 수 없었다 (도 8b 및 도 12).

[83] **실시예 4: TS-FITGE를 이용한 호르데닌의 신규한 표적 단백질 규명**

[84] 마지막으로, 단순한 구조로 되어 있어 화학적 변화가 불가능한 천연 생리활성 저분자 물질에 TS-FITGE 방법을 적용하였다. 호르데닌 (N,N-dimethyltyramine, 도 13a)은 몇몇 식물, 특히 싹이 나고 있는 보리에서 발견할 수 있는 알칼로이드다 (Smith *et al.*, *Phytochemistry.* 16, 9-18 (1977)). 호르데닌은, 쥐들에게서 가스트린 분비의 자극, 정관에서 노르에피네프린의 흡수 억제나, 말의 혈관에 주사 되었을 시 호흡률과 심장 박동률의 증가 등 몇 가지의 생리활성을 가지고 있다 (Frank et al., *Equine Vet. J.* 22, 437-441 (1991)).

[85] 인 비트로 단백질 번역에 영향을 주는 화합물을 확인하기 위해 소형 분자 라이브러리를 스크리닝한 결과, 호르데닌이 루시페라아제 리포터 유전자의 번역을 증진시키는 것으로 나타났다 (도 13b). 그러나, 호르데닌의 생물학적 활성과 그의 단백질 번역에 연관된 결합 파트너를 분석한 이전 연구결과는 찾을 수 없었다.

[86] 호르데닌의 표적 규명을 위해, HEK293T 세포들을 이용해 TS-FITGE를 수행하였고, 54℃ 겔에서 가장 높은 Cy5/Cy3 비율을 보인 (도 13d) 붉은 계열의 스팟 (도 13c 및 도 14)을 검출하였다. 이 스팟은 S자형 융해 곡선을 그리기 위해 일정 온도 범위에서 정량되었고 (도 13e), 그 스팟은 표적 후보 리스트를 얻기 위한 LC-MS/MS 분석을 위해 절제되었다 (표 1). 결합 파트너를 결정하기 위해 단백질 번역과 연관되어있는 뉴클레오포스민(NPM), 연장 인자 1-delta (EEF1D), 단백질 SET (SET), 40S 리보솜 단백질 SA (RPSA)에 대하여 CETSA를 수행하였다 (도 13f 및 도 15a).

[87] NPM은 다른 후보 단백질과는 달리, β-튜불린과 GAPDH에 비교하여 현저한 열 안정화를 보였다. 호르데닌에 의한 NPM의 용량 의존적 열 안정화는 53℃, 7.6 mM의 EC_{50} 값에서 등온 용량 반응 그래프에 의해 확인되었다 (도 15b). 호르데닌의 NPM과의 직접적 결합을 확인하기 위해 표면 플라스몬 공명 분석을

수행하였으며, 이는 13.6mM의 K_D 값을 갖는 일반적인 일대일 결합 패턴의 농도 의존적 반응을 분명하게 보여주었다 (도 13g).

[88] 인 비트로 단백질 번역의 상향조절(uprgulation)이 호르데닌에 의한 NPM의 기능적 조절(modulation)에 의해 발생한 것인지 알아보기 위해, NPM을 인 비트로 번역 시스템으로부터 고갈시킴으로써 기능 상실 연구(loss-of-function study)를 통해 기능검증(functional validation)을 수행하였다. 요약하면, 아가로즈 비드에 있는 단백질 G에 결합된 NPM 항체는 NPM을 제거하기 위해 인 비트로 번역 시스템과 함께 배양되었다. 웨스턴 블롯 결과에서 관찰된 것과 같이, 아가로즈 비드를 제거한 뒤에는 용액에 남아 있던 NPM이 감소했다 (도 13h). NPM 감소 후 루시페라아제 유전자 번역에 대한 호르데닌 본래의 상향조절 효과는 72.7%가 감소하였으며 (도 13i), 이는 호르데닌이 직접적으로 NPM을 조절하며 루시페라아제 리포터 유전자의 인 비트로 단백질 번역을 상향조절 했다는 것을 검증하였다.

[89] **실시예에서 사용된 방법들**

[90] **화학물질 및 시약-** 메토트렉세이트(methotrexate), 브리오스타틴 1(bryostatin 1), 호르데닌(hordenine), 및 분지의 옥틸페녹시폴리(에틸렌옥시)에탄올(IGEPAL CA-630)을 포함하는 모든 화학물질을 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 배지, 소태아혈청(FBS), 및 항생제-항진균제 용액을 포함하는 세포 배양 시약은 Gibco [Life technologies]로부터 구입하였다. DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)는 Welgene으로부터 구입하였고, 완전 프로테아제 억제제 칵테일 (EDTA-free)은 Roche로부터 구입하였다.

[91] **세포 배양-** HEK293T 및 Jurkat 클론 E6-1 세포를 한국세포주은행으로부터 구입하였다. HEK293T세포는 10% (v/v) FBS 및 1% (v/v) 항생제-항진균제 용액이 보충된 DMEM에서 배양되었다. Jurkat 세포들은 10% (v/v) FBS 및 1% (v/v) 항생제-항진균제 용액이 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양되었다. 세포들은 습도가 있는 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃로 유지되었다.

[92] **세포 추출액의 준비**- Jurkat 세포는 브리오스타틴 1을 위해 사용되었고, HEK293T 세포는 메토트렉세이트 및 호르데닌을 위해 사용되었다. HEK293T 세포들은 트립신/EDTA 용액으로 얻어진 후 화합물 처리 전에 코니칼 튜브 내에 재분산(resuspended)되었다. 메토트렉세이트는 10μM의 농도로 3시간 동안 HEK293T 세포와 함께 배양되었고, 호르데닌은 20μM의 농도로 3시간 동안 HEK293T 세포와 함께 배양되었다. 상기 화합물들의 처리 후에, 세포들은 부분 표본화(aliquoted) 되어, 3분간 특정 온도 범위 내의 각 온도로 가열되었고, 다시 3분간 25℃에서 냉각되었다. 가열된 세포들을 얻은 후, PBS로 세척하고, 용해 버퍼 (프로테아제 억제제 칵테일이 보충된 PBS)에 재분산되었다. 세포 분산액은 세포 용해를 위해 액체 질소와 함께 3회 동결-융해시켰다. 용액 부분은 20,000g로 20분간 4℃에서 원심분리 시킴으로써 세포 용해물로부터 분리되었다. 등온 용량-반응 (isothermal dose-response, ITDR) 분석을 위한 절차는, 세포들이 다양한

농도의 화합물로 처리되고 고정된 온도에서 가열된다는 점을 제외하고, 전술한 절차와 동일하게 수행되었다.

[93] **웨스턴 블롯**- 용액 부분은 5× Laemmli 버퍼와 혼합된 후, 95℃에서 5분간 가열되었다. 단백질들은 SDS-PAGE에 의해 분리되고 PVDF 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 2% BSA가 포함된 TBST(tris-buffered saline with Tween-20)에서 1시간 동안 4℃의 온도에서, 1차 항체 (항-DHFR [ab133546, abcam], anti-TYMS [3766, Cell signaling], 항-PKCα [2056, Cell signaling], 항-PKCβI [ab195039, abcam], 항-PKCβII [ab32026, abcam], 항-PKCγ [402 ab131222, abcam], 항-PKCδ [9616, Cell signaling], 항-PKCε [ab124806, abcam], 항-PKCμ [2052, Cell signaling], 항-PKCθ [ab110728, abcam], 항-PKCζ [9368, Cell signaling], 항-NPM [ab52644, abcam], 항-RPSA [ab133645, abcam], 항-SET [ab176567, abcam], 항-EEF1D [ab88868, abcam], 항-GAPDH [2118, Cell signaling], and 항-β-tubulin [2146, Cell signaling]) 와 함께 하룻밤동안 배양되었다. 그 다음, 멤브레인은 TBST로 세척되고, 2차 항체 (항-토끼 IgG, HRP-linked [7074, Cell signaling]) 와 함께 상온에서 한 시간 동안 배양되었다. 상기 멤브레인은 아머샴(Amersham) ECL 프라임 웨스턴 블로팅 검출 시약 [GE Healthcare] 으로 강화(developed)되었고, ChemiDoc [Bio-Rad]에 의해 검출되었다. CETSA 곡선의 경우, 약물 처리된 그룹 및 대조군 그룹에서 각각 37℃에서와의 상대적인 밴드 강도가 계산되었다. ITDR 곡선의 경우, DMSO 그룹과의 상대적인 밴드 강도가 계산되었다. 데이터 분석 및 S자 곡선 맞춤(sigmoidal curve fitting)이 GraphPad Prism 5에 의해 수행되었다.

[94] **2D 겔 전기영동**- 세포 추출액의 용액 부분의 단백질 농도가 Bio-Rad 단백질 어세이에 의해 정량되었다. 아세톤이 50μg의 단백질에 첨가되고, -20℃에서 1시간 동안 배양되었다. 상기 혼합물을 20,000g로 20분 동안 4℃에서 원심분리시켰다. 상층액은 버리고, 펠릿(pellet)은 차가운 아세톤으로 2회 세척했다. 잔여 펠릿은 10μl의 컨쥬게이션 버퍼 (30 mM Tris-HCl (pH 8.6), 2M 티오요소, 7M 요소, 4% CHAPS (w/v))에 재분산시키기 위해 초음파파쇄 (sonication) 하였다. 1μl의 0.4mM Cy3-NHS 또는 Cy5-NHS는 재분산된 단백질과 혼합되었고, 4℃에서 50분간 배양되었다. 내부표준을 위한 320μg의 가열되지 않은 샘플을 침전시키고, 64μl의 컨쥬게이션 버퍼에 재분산시켰으며, 6.4μl의 Cy2-NHS와 혼합하였다. 컨쥬게이션 후, 차가운 아세톤을 첨가하고, -20℃에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 혼합물을 20,000g로 20분 동안 4℃에서 원심분리시켰다. 상층액은 버리고, 펠릿은 차가운 아세톤에 2회 세척했다. 가열된 샘플은 50μl의 재수화 버퍼 (7 M 요소, 2 M 티오요소, 2% CHAPS (w/v), 40 mM DTT, 및 1% IPG 버퍼) 및 표준 샘플 320μl에 재분산시키기 위해 초음파파쇄하였다. 50μl의 화합물 처리된 그룹 (Cy5와 컨쥬게이션 됨) 및 DMSO 처리된 그룹 (Cy3와 컨쥬게이션 됨)을 혼합하였다. 그 다음, 50 μl의 가열되지 않은 샘플 (Cy2과 컨쥬게이션 됨)을 내부표준으로 첨가하였다. 총 150μg (Cy2, Cy3, 및 Cy5 각각 50μg씩)의 단백질이

10시간 동안 재수화된 24-cm Immmobiline Drystrip gel [GE Healthcare]에 로딩되었고, Ettan IPGphor 3 [GE Healthcare]에 의해 등전점 전기영동이 수행되었다. 스트립 겔 내 단백질들은 Ettan DALTsix 전기영동 시스템 [GE Healthcare]에 의해 분리되었고, 겔은 Typhoon Trio [GE Healthcare]에 의해 스캔되었다.

[95] **겔 이미지 분석**- Cy2, Cy3 및 Cy5로부터의 형광 시그널은 DeCyder 2D 소프트웨어 버전 7.2 [GE Healthcare]에 의해 정량되었다. Cy3에 대한 Cy5의 시그널 비율 값은 정규화되어, 상기 비율의 로그값의 modal peak가 0이 되도록 설정되었다. 데이터는 상자도면(box-and-whisker diagram)에 나타냈고, 이상점(outliers)들은 열적으로 이동된 스팟으로 여겨졌다. 인터-겔 분석의 내부표준으로 사용된 Cy2 시그널은 모든 겔을 통틀어 스팟의 위치가 일치했고, Cy2에 대한 Cy3 및 Cy5 시그널의 상대적인 양은 융해 곡선을 플로팅하기 위해 계산되었다. 데이터 분석 및 S자 곡선 맞춤이 GraphPad Prism 5에 의해 수행되었다.

[96] **질량분석법**- 은-염색된 겔로부터 얻어진 단백질 스팟은 절제되어 탈색된 후 인-겔 트립신 분해(digestion)되었다. 추출물들은 SpeedVac에서 증발된 후 0.1% 포름산을 함유하는 10% 아세토니트릴에 용해되었다. 그 결과물로 얻어진 단백질들은 트랩 컬럼 (내부 직경 180 μm × 20mm, Symmetry C18) 카트리지에 의해 탈염되고, nanoAcquity UPLC-ESI-QTOF/MS [SYNAPT G2-Si HDMS, Waters]를 사용하는 통합 전기분자 이온화 (integrated electrospray ionization) PicoTip (±10 μm 내부직경, New Objective)과 함께, C18 역상 75μm 내부직경 × 200mm 분석 컬럼 (1.7 μm 입자크기, BEH130 C18, Waters) 에서 분리되었다. 얻어진 데이터는 Protein Lynx Global Server를 통해 .pkl 파일로 변환되고, MASCOT 검색을 이용하여 SwissProt 데이터베이스를 쿼리(query)하는 데 사용되었다.

[97] **인 비트로(*in vitro*) 단백질 번역**- TNT 퀵 커플된 전사/번역 시스템 [Promega]가 인 비트로 번역을 위해 사용되었다. TNT Quick Master Mix와 T7 루시퍼라아제 컨트롤 DNA가 제조자의 프로토콜에 따라 혼합되었고, 화합물과 함께 30℃에서 1시간 동안 배양되었다. 루시퍼라아제 어세이 시약[Promega]의 첨가 후에, 단백질 번역에 대한 화합물들의 효과를 측정하기 위해 Synergy HT [BioTek]로 대조 루시퍼라아제 상품의 발광(luminescence)을 분석하였다.

[98] **기능 검증(functional validation)을 위한 뉴클레오포스민 고갈(depletion)**- 프로테인 G 세파로오스 비드 [Sigma] 를 PBS로 세척하고, 항-NPM 항체와 함께 4℃에서 2시간 동안 배양되었다. 결합되지 않은 항체들은 씻겨나가고, 항-NPM 항체와 결합된 프로테인 G 비드들은 TNT Quick Master Mix와 혼합된 후 4℃에서 2시간 동안 배양되었다. 원심분리에 의해 상기 비드들은 제거되고, 상층액은 T7 루시퍼라아제 컨트롤 DNA 및 10 μM의 호르데닌과 함께 30℃에서 1시간 동안 배양되었다. 루시퍼라아제 어세이 시약을 첨가한 후 발광을 분석하였다.

[99] **표면 플라즈몬 공명 분석(Surface plasmon resonance assay)**- 결합 역학이 BIAcore T100 장비 [GE Healthcare] 에 의해 모니터되었다. 인간 뉴클레오포스민 전체 길이 단백질 [ab126664, abcam] 의 버퍼 컨디션이 10K Amicon 울트라 원심 여과기 [Millipore] 에 의해 PBS로 교환되었다. CM5 칩 표면의 카르복실기는 NHS와 EDC의 혼합물이 플로우셀 (flow cells) 1 및 2 모두에 주입됨에 따라 활성화되었다. 아세테이트 버퍼 (pH 4.0)에 포함된 뉴클레오포스민 단백질 (36μg/mL)은 플로우셀 2에 550초 동안 5μl/min의 유량으로 주입되었다. 에탄올아민-HCl은 플로우셀 1 및 2 모두에 소광(quenching)을 위해 주입되었다. 최종 고정 레벨은 두 개의 독립적인 실험에서 각각 9,400 RU 및 12,800 RU에 도달했다. 결합 연구를 위해, 다양한 농도 (1.56 μM~37.5 μM)의 호르데닌이 60초동안 30 μl/min의 유량으로 주입되었고, 러닝 버퍼(0.005% P20 및 2% DMSO가 보충된 PBS)의 400초 동안의 주입에 의해 (결합이) 분리되었다. 데이터는 BIAcore T100 Evaluation software [GE Healthcare]에 의해 분석되었고, 센서그램은 1:1 바인딩 모델에 맞추었다.

[100] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 다음 단계를 포함하는, 약물 분자의 표적 단백질을 동정하는 방법:
(a) 세포 용해물 또는 인체로부터 유래한 세포가 포함된 혼합물 A를 제조하는 단계;
(b) 세포 용해물 또는 인체로부터 유래한 세포와, 약물 분자가 혼합되어 포함된 혼합물 B를 제조하는 단계;
(c) 상기 혼합물 A와 상기 혼합물 B를 동일한 특정 온도로 변화시키는 단계;
(d) 상기 (c) 단계에서 얻어진 특정 온도의 혼합물 A 및 혼합물 B에 서로 다른 파장의 형광물질을 각각 혼합하여, 혼합물 A 및 혼합물 B의 용액 부분에 존재하는 단백질에 상기 서로 다른 파장의 형광물질을 각각 표지하는 단계;
(e) 상기 (d) 단계에서 얻어진 혼합물 A 및 혼합물 B를 혼합하여 혼합물 C를 제조하는 단계;
(f) 상기 혼합물 C를 전기영동하는 단계; 및
(g) 상기 (f) 단계의 전기영동으로 인해 겔에 나타나는 단백질 스팟에 대한 형광 파장을 분석하여, 상기 (c) 단계로 인해 열 안정성 변화(thermal stability shift)가 나타난 단백질을 확인하는 단계.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 특정 온도는 37~70℃ 범위에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 (g) 단계의 각 단백질 스팟에 대한 융해 곡선 그래프를 플로팅(plotting)하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 약물 분자는 생리활성 분자인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 (g) 단계에서 얻어진 단백질은 막 정착(membrane-anchored) 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (g) 단계의 열 안정성 변화는, 상기 혼합물 B에 존재하는 단백질이 상기 약물 분자와 결합함으로써 열 안정화되는 것임을 특징으로 하는 방법.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 단백질은 뉴클레오포스민(nucleophosmin, NPM)이고, 상기 약물 분자는 생리활성 분자인 호르데닌(hordenine)인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 (g) 단계의 열 안정성 변화는, 상기 혼합물 B에 존재하는 단백질이 상기 약물 분자와 결합함으로써 열 불안정화되는 것임을 특징으로 하는 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 단백질은 PKCα(protein kinase Cα)이고, 상기 약물

분자는 생리활성 분자인 브리오스타틴 1(bryostatin 1)인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 (d) 단계의 형광물질은 Cy2, Cy3, Cy5, fluorescein, Alexafluor488, R6G, HEX, AlexaFluor32, TAMRA, AlexaFluor546, EtBr, SYPRO Ruby 및 Blue FAM으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 (d) 단계의 혼합물 A에 혼합되는 형광물질은 Cy3이고, 혼합물 B에 혼합되는 형광물질은 Cy5인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 Cy3 및 Cy5는 아민-반응성 작용기가 더 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 (g) 단계의 형광 파장 분석은, 상기 혼합물 A의 용액 부분에 존재하는 단백질에 표지되는 형광물질로부터 발생하는 형광 파장과, 상기 혼합물 B의 용액 부분에 존재하는 단백질에 표지되는 형광물질로부터 발생하는 형광 파장의 비율을 분석함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 (f) 단계의 전기영동은 2차원 겔 전기영동인 것을 특징으로 하는 방법.