



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0010882
(43) 공개일자 2015년01월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0085513
(22) 출원일자 2013년07월19일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
삼성전자주식회사
경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)
(72) 발명자
김정민
서울 송파구 중대로 24, 225동 1102호 (문정동, 올림픽훼밀리타운)
이재일
경기 용인시 수지구 성북2로 86, 102동 703호 (성북동, 성동마을LG빌리지1차아파트)
이정민
경기 용인시 기흥구 용구대로 1890번길 49, 102호 (보라동, 보라그린빌)
(74) 대리인
팬코리아특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p18 단백질을 포함하는 융합 단백질 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p18 단백질이 결합된 융합 단백질, 및 상기 융합 단백질을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1

1. His6-A2BP-Ub-Ub (m1) -MTS-p18 (F71N) -Ub (m3) -Ub (m4) -p53F-NLS

2. His6-A2BP-Ub-Ub (m1) -MTS-p18 (F71N) -AAT-p53F-NLS

3. His6-Ub (m1) -Ub (m2) -MTS-p18 (F71N) -Ub (m3) -Ub (m4) -p53F-NLS

4. His6-A1BP-Ub-Ub (m1) -MTS-p18 (F71N) -Ub (m3) -Ub (m4) -p53F-NLS

5. His6-Ubm1-MTS-p18 (F71N) -AAT-p53F-NLS

6. His6-A1BP-Ub-Ubm1-MTS-p18 (F71N) -AAT-p53F-NLS

특허청구의 범위

청구항 1

아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 p53 단백질 단편, 및 p18 단백질을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 생체의 안정화 단백질 (in vitro stabilization protein), 막 투과 서열 (membrane transfer sequence, MTS) 도메인, 핵-세포질 신호 (nucleus-cytoplasm signal) 도메인, 및 생체내 안정화 단백질 (in vivo stabilization protein) 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생체의 안정화 단백질은 야생형 유비퀴틴, 돌연변이 유비퀴틴, 및 유비퀴틴-유사 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이고,

상기 야생형 유비퀴틴은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것이고,

상기 돌연변이 유비퀴틴은 상기 야생형 유비퀴틴의 아미노산 서열의 6, 11, 27, 29, 33, 48 및 63번째에 존재하는 Lys 중 하나 이상이 Arg으로 치환된 것, 상기 야생형 유비퀴틴의 76번째에 존재하는 Gly이 Ala으로 치환된 것, 또는 상기 야생형 유비퀴틴의 아미노산 서열의 6, 11, 27, 29, 33, 48 및 63번째에 존재하는 Lys 중 하나 이상이 Arg으로 치환되고 76번째에 존재하는 Gly이 Ala으로 치환된 것이고,

상기 유비퀴틴-유사 단백질은 Nedd8, SUMO-1, SUMO-2, NUB1, PIC1, UBL3, UBL5 및 ISG15로 구성된 군으로부터 선택된 것인,

융합 단백질.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 막 투과 서열 도메인은 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드인, 융합 단백질.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 핵-세포질 신호 도메인은 NLS(nucleus location sequence) 도메인 또는 NES(nucleus export sequence) 도메인인, 융합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 NLS 도메인은 서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 9로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드인, 융합 단백질.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 생체내 안정화 단백질 AAT(alpha 1 antitrypsin), 혈청 알부민, 혈청 알부민 결합 펩타이드(serum albumin binding peptide; SABP), Fc 및 PEG(polyethyleneglycol)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것인, 융합 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은

아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p18 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질;
 아넥신 A2 결합단백질, p18 단백질 및 p53 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질;
 p53 단백질, p18 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질; 및
 p18 단백질, p53 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질
 로 이루어진 군에서 선택된 것인, 융합 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 융합 단백질은

아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p18 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, p53 단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, p18 단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것인 융합 단백질;

아넥신 A2 결합단백질, p18 단백질 및 p53 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, p18 단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, p53 단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것인 융합 단백질;

p53 단백질, p18 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, 아넥신 A2 결합단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, 아넥신 A2 결합단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것인 융합 단백질; 및

p18 단백질, p53 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, 아넥신 A2 결합단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, 아넥신 A2 결합단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것인 융합 단백질

로 이루어진 군에서 선택된 것인, 융합 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 12

제11항의 재조합 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 13

제12항의 세포를 배양시키는 단계를 포함하는, 제1항의 융합 단백질을 제조하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암은 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프종, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 또는 두경부암인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p18 단백질이 결합된 융합 단백질, 및 상기 융합 단백질을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포가 증식하기 위해서는 G1기(G1 phase), DNA 복제기(S phase), G2기(G2 phase) 및 세포분열기(M phase)를 거치는 일련의 단계를 순환하는데, 이를 세포주기(cell cycle)라 한다. 세포분열기는 유사분열과 세포질분열을 거쳐 세포가 증식하는 실질적인 단계이고, DNA 복제기에서는 DNA가 복제되고 세포수는 변하지 않는다. 따라서, 세포주기에서 세포분열기를 제외한 DNA 복제기, G1기, G2기를 간기(interphase)라고 한다. G1기와 G2기는 세포 주기를 조절하는 체크포인트(checkpoint)를 포함하는데, 이는 세포가 비정상적으로 증식하지 않도록 하는 중요한 역할을 한다. 체크포인트에서 세포주기의 다음 단계로 넘어가기 위한 조건이 충족되었는지를 확인한 후, 모든 조건이 만족되면 DNA 복제기 또는 세포분열기가 진행된다. 이러한 체크포인트에서의 세포 증식 조절이 제대로 이루어지지 않으면 암과 같은 비정상적인 세포 증식을 유발한다.

[0003] G1 체크포인트를 지나고, DNA 복제기, G2 체크포인트를 지나서 유사분열을 하기 위해서는 CDK(cyclin-dependent kinase) 단백질의 활성이 필요하다. CDK는 단독으로 활성을 가질 수 없으며 Cyclin 단백질과 결합되어야 키나아제 활성을 갖게 된다. Cyclin-CDK 복합체는 세포증식에 관련된 단백질들을 인산화시켜 세포 분열을 유도한다. DNA 복제기를 유도하는 단백질들은 주로 Cyclin D/E, CDK 4/6이고, CDK 4/6은 Rb(Retinoblastoma) 단백질을 인산화시켜서 전사 인자인 E2F의 전사 활성을 갖게 한다. 세포분열기를 유도하는 단백질들은 주로 Cyclin A/B, CDK 2/1이며, 이들의 Cyclin-CDK 복합체는 MPF(M-phase promoting factor)라고 일컫는다. 유사분열이 완료되기

나 DNA 복제가 완료되면 더 이상의 키나아제 활성이 필요하지 않으므로 Cyclin-CDK 복합체의 Cyclin이 분해되어 CDK의 활성이 사라진다.

[0004] 세포 주기 조절을 위해 Cyclin-CDK 복합체의 활성을 조절하는 많은 인자들이 존재한다. 대표적인 것으로는 G1 체크포인트에서 DNA가 손상되었을 때 작용하는 p21 단백질이 있다. DNA가 손상되었을 시에 활성화되는 종양 억제 인자 유전자(tumor suppressor gene)인 p53에 의해 p21 유전자가 발현된다. p21은 DNA 복제를 유도하는 Cyclin-CDK 복합체에 결합하여 CDK4/6/2의 키나아제 활성을 저해함으로써, Rb 단백질의 인산화를 막는다. 그 결과, 세포는 G1기에 머물면서 손상된 DNA를 수리할 시간을 얻게 된다. 만일 DNA 손상이 세포가 수용하지 못할 정도로 심하면 p53은 아포토시스 유도 유전자(apoptosis-inducing gene)인 Bax 단백질의 유전자를 발현시킨다. 즉, 세포증식의 조절에 있어서 p53의 작용은 p21 유전자를 발현시켜 세포증식을 일시적으로 정지시키는 것(growth arrest), 또는 p53-결합 단백질인 ASPP 단백질과 결합한 p53 단백질이 Bax 유전자를 발현시켜 아포토시스를 유발하는 것(apoptosis inducing)의 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 아포토시스는 예정된 세포 죽음(programmed cell death)이라고도 하며 세포가 조직내에서 더 이상 필요 없을 때, 바이러스의 침입을 받았거나 암세포로 변환되었을 때 등, 개체수준에서 세포의 죽음이 오히려 도움이 되면 세포 스스로 자살하는 기작이다.

[0005] 세포주기를 조절하는 CDK 억제제는 크게 CIP(CDK inhibitor protein) family와 INK4(Inhibitors of cyclin-dependent kinase 4) 두 가지로 분류할 수 있다. CIP 에는 p21과 p27이 있다. INK4는 주로 CDK 4, 6의 활성을 저해하며 p18, p16, p8, p19가 있다.

[0006] 세포 증식을 조절하기 위해서는 종양 억제인자 유전자와 전암 유전자(proto-oncogene)와의 균형이 유지되어야 한다. 종양 억제인자 유전자인 p53 단백질의 유전자가 변이(mutation)되면, 비정상적인 세포의 아포토시스를 유도할 수 없으므로 비정상적 세포 증식을 유발한다. 또한 정상적인 세포 증식 인자인 전암유전자가 변이(바이러스에 의한 유전자 치환 등)되거나 과발현 되어 암유전자가 되어도 암세포와 같은 비정상적인 세포 증식을 유도한다. 암유전자는 비정상적인 활성을 갖는 성장인자, 세포내 신호전달 단백질을 만들어 잘못된 신호 전달을 유발하기 때문에 외부의 증식 신호가 없어도 세포증식이 일어난다.

[0007] 이러한 사실로 볼 때, 비정상적인 세포 증식으로 인한 암을 저해하기 위해 세포 주기를 조절하는 각종 인자들을 활용한 항암제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 구체에는 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 또는 그 단편, 및 p18 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0009] 다른 구체에는 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0010] 다른 구체에는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 다른 구체에는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0012] 다른 구체에는 상기 형질전환된 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 융합 단백질의 제조방법을 제공한다.

[0013] 다른 구체에는 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 다른 구체에는 상기 융합 단백질의 치료적 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 예는 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 또는 그 단편, 및 p18 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 상기 융합 단백질은 생체의 안정화 단백질 (in vitro stabilization protein), 막 투과 서열(membrane transfer sequence, MTS) 도메인, 핵-세포질 신호(nucleus-cytoplasm signal) 도메인, ATT 및 STOPx2 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 또 다른 예는 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0017] 또 다른 예는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0018] 또 다른 예는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

- [0019] 또 다른 예는 상기 형질전환된 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 융합 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 또 다른 예는 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 필요에 따라서 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 통상적으로 사용되는 양으로 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 앞서 설명한 바와 같이, CDK (Cyclin-dependent kinase) 단백질은 암 발생에 주요한 역할을 하고, 이의 억제제로서 CIP(CDK inhibitor protein) 계통 단백질과 INK4(Inhibitors of cyclin-dependent kinase 4) 계통 단백질들이 있다. 본 발명의 일 구체예에 따른 융합 단백질은 CIP 계통 단백질 발현을 조절하는 p53 단백질과 INK4 계통 단백질에 속하는 p18 단백질이 연결된 것으로, CIP 계통 단백질 활성화와 INK4 단백질 활성을 동시에 발휘하여 보다 우수한 암의 예방 및/또는 치료 효과를 얻을 수 있다.
- [0022] 일 구체예에 따르면, 상기 p53 단백질은 NCBI accession number NP_000537에 의하여 제공되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 또는 그 단편일 수 있다. 본 명세서에서 p53 단백질은 별도의 언급이 없는 한 전장 단백질과 그 단편을 모두 의미하는 것으로 사용된다.
- [0023] 또한, 상기 p53 단백질은 서열번호 1(Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn)의 아미노산 서열을 갖는 p53 단백질의 전사활성 도메인일 수 있다.
- [0024] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 p53 단백질 단편은 p53 단백질 중 Mdm2에 결합하는 부위인 인간 p53 단백질의 18 내지 26번째 아미노산 서열을 포함하는 전사활성 도메인을 의미한다. 상기 p53의 전사활성 도메인은 p53 분해 작용을 하는 Mdm2와 결합함으로써 생체 내에서의 p53의 안정성을 크게 증가시키며, p53의 작용으로 CDK 억제제 단백질을 암호화하는 p21 유전자를 발현시켜 세포증식을 일시적으로 정지시키고 p53-결합 단백질인 ASPP(apoptosis-stimulating protein of p53)와 결합한 p53이 Bax 유전자를 발현시켜 세포 죽음을 유발하는 역할을 한다. 또한, 중앙 억제제인 p18 단백질은 CDK 4, 6의 활성을 저해하는 역할을 한다. 따라서 p53의 전사활성 도메인과 p18 단백질이 결합된 융합 단백질과 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은 새로운 항암제로 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0025] 일 구체예에 따르면, 상기 p18 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 또한, p18 단백질은 용해도(solubility)를 개선하기 위한 목적으로, 전체 단백질 활성화에 영향을 미치지 않는 한 일부 아미노산 잔기를 변형(치환, 삭제, 부가, 결실 등)하여 사용할 수 있다.
- [0026] 상기 융합 단백질에서 p53 단백질과 p18 단백질의 연결되는 순서는 제한이 없으며, N 말단-p53 단백질-p18 단백질-C 말단 또는 N 말단-p18 단백질-p53 단백질-C 말단 형태 모두 포함된다. 일 구체예에서, 서열번호 1의 p53 단백질 단편과 서열번호 2의 p18 단백질이 결합된 융합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 융합 단백질은 아넥신 A2 결합단백질(Annexin A2 binding protein, Annexin A2BP)을 포함한다. 아넥신 A2 결합단백질은 암세포에 특이적으로 발현되는 아넥신 A2에 결합하므로, 융합 단백질이 암세포에만 선택적으로 작용할 수 있도록 암세포 타겟팅이 가능하게 한다. 아넥신 A2 단백질로는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 단백질을 예시할 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니며, 암세포 타겟팅 활성을 달성할 수 있는 한 아넥신 A2 결합단백질의 단편, 유사체 또는 변이체를 사용해도 무방하다.
- [0028] 상기 융합 단백질에서 아넥신 A2 결합단백질은 p53 및 p18 융합체의 N-말단 또는 C-말단에 위치할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질은 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p18 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질; 아넥신 A2 결합단백질, p18 단백질 및 p53 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질; p53 단백질, p18 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질; 및 p18 단백질, p53 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [0029] 바람직한 일 구체예에서, 상기 융합 단백질은 생체의 안정화 단백질 (in vitro stabilization protein), 막 통과 서열 (membrane transfer sequence, MTS) 도메인, 핵-세포질 신호 (nucleus-cytoplasm signal) 도메인, 및 생체내 안정화 단백질 (in vivo stabilization protein)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0030] 이 때, 추가되는 폴리펩타이드의 융합 단백질 내 위치는 제한이 없으며, 상기 추가되는 1종 이상의 폴리펩타이드는 각각 독립적으로 융합 단백질의 N 말단, C 말단, 또는 p53 단백질과 p18 단백질 사이에 포함될 수 있다.

- [0031] 바람직하게, 상기 융합 단백질은 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p18 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, p53 단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, p18 단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0032] 또한 바람직하게, 상기 융합 단백질은 아넥신 A2 결합단백질, p18 단백질 및 p53 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, p18 단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, p53 단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0033] 본원에서 용어, "생체의 안정화 단백질(*in vitro* stabilization protein)"은 상기 융합 단백질의 생체 외부에서, 즉, 상기 융합 단백질을 실험적으로 정제를 하는 경우, 상기 융합 단백질의 용해도 및 안정성을 증진시키기 위한 단백질을 의미한다. 상기 생체의 안정화 단백질은 상기 융합 단백질의 일부로써, 생체 내에서 면역원성을 유발하지 않아야 한다.
- [0034] 일 구체예에서, 생체의 안정화 단백질이 융합 단백질 내에 도입되는 경우, 융합 단백질의 N 말단 방향에 위치하는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 바람직하게, 생체내 안정화 단백질은 융합 단백질의 양 말단 외에 추가적으로 p18과 p53 사이에 위치할 수 있다.
- [0035] 일 구체예에 따르면, 상기 생체의 안정화 단백질은 유비퀴틴 또는 유비퀴틴-유사 단백질일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0036] 유비퀴틴(ubiquitin, Ub)은 자연계에서 발견되는 가장 보존적인 단백질로 76개의 아미노산 서열로 이루어져 있으며, 곤충, 송어 및 인간처럼 진화적으로 다양한 종들간의 완벽한 상동성을 보이는 수용성 단백질이다. 또한, 유비퀴틴은 pH의 변화에 대해 안정하고, 고온에서도 쉽게 변성되지 않으며, 프로테아제에 대해서도 안정성이 있는 단백질로 알려져 있다. 따라서, 유비퀴틴은 상기 융합 단백질의 불용성을 개선할 수 있다.
- [0037] 상기 유비퀴틴 또는 유비퀴틴-유사 단백질(ubiquitin-like protein, Ubl)은 야생형 유비퀴틴, 야생형 유비퀴틴-유사 단백질, 돌연변이 유비퀴틴 및 돌연변이 유비퀴틴-유사 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 돌연변이 유비퀴틴은 야생형 유비퀴틴의 아미노산 서열을 다른 아미노산 서열로 바꾼 것을 의미하며, 예를 들면, 야생형 유비퀴틴(서열번호 5)의 Lys을 Arg으로 치환한 유비퀴틴, 및/또는 야생형 유비퀴틴 C-말단 RGG를 RGA로 변경시킨 (즉 유비퀴틴 야생형 폴리펩타이드의 76번째에 존재하는 Gly이 Ala으로 치환된) 유비퀴틴을 포함한다. 일 구체예에 따르면, 상기 야생형 유비퀴틴의 Lys을 Arg으로 치환한 돌연변이형 유비퀴틴에서, 상기 치환은 야생형 유비퀴틴의 6, 11, 27, 29, 33, 48 및 63번째에 존재하는 Lys 중에서 선택된 1종 이상에서 이루어질 수 있으며, 치환은 상기 Lys의 위치에서 독립적으로 또는 조합하여 이루어질 수 있다.
- [0038] 일 구체예에 따르면, 상기 유비퀴틴-유사 단백질은 유비퀴틴과 그 특성이 유사한 단백질로, 예를 들어, Nedd8, SUMO-1, SUMO-2, NUB1, PIC1, UBL3, UBL5 및 ISG15로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0039] 일 구체예에 따르면, 상기 유비퀴틴 또는 유비퀴틴-유사 단백질은 C-말단에 프로테아제에 의해 절단 가능한 아미노산 서열 또는 프로테아제에 의해 절단되지 않는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 프로테아제에 의해 절단 가능한 아미노산 서열은 당업계에서 공지된 검색 데이터베이스를 통해 확인할 수 있다. 예를 들어, http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/peptidecutter_enzymes.html에서 검색되는 프로테아제 및 그의 절단 가능한 아미노산 서열을 이용할 수 있다. 상기 절단 가능한 아미노산 서열이 포함되는 경우, 상기 융합 단백질이 세포 내로 투과된 다음, 세포 내의 프로테아제에 의해 유비퀴틴 또는 유비퀴틴-유사 단백질은 절단이 되어, 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p16 단백질을 포함하는 융합 단백질이 세포 내에서 그 기능을 할 수 있게 된다. 상기 절단 후, 융합 단백질에는 막 투과 서열 도메인 및/또는 핵-세포질 신호 도메인 등이 포함되어 있을 수 있지만, 이들은 폴리펩타이드의 길이가 매우 짧으므로 융합 단백질의 기능에는 영향을 미치지 않는다. 또한, 세포 내의 프로테아제에 의해 유비퀴틴 또는 유비퀴틴-유사 단백질이 절단되지 않더라도 유비퀴틴 또는 유비퀴틴-유사 단백질은 면역원성이 없으므로 생체내에서 안전할 뿐 아니라, 시스테인을 포함하지 않아서 폴딩이 되지 않으므로 융합 단백질 구조 변화를 유발하지 않고 융합 단백질이 세포 내에서 그 기능을 발휘하는데 영향을 미치지 않는다.

- [0040] 용어, "막 투과 (membrane transfer)"는 인 비트로(*in vitro*) 및/또는 인 비보(*in vivo*) 상에서 운반 대상인 융합 단백질을 세포 내 또는 핵 내로 운반할 수 있는 능력을 의미한다.
- [0041] 또한, "막 투과 서열 (membrane transfer sequence, MTS) 도메인"은 그 자체로 인지질 이중막의 세포막을 통과할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 막 투과 서열 도메인은 그 N-말단에 단일 소수성 영역(single hydrophobic region)을 가지고, 헬릭스 구조(helix structure)를 형성하며, 유연성을 나타내고, 상대적으로 짧은 길이의 아미노산(7개 내지 17개 아미노산)을 갖는 것을 특징으로 한다. 따라서, 상기 막 투과 서열 도메인의 물성은 대개 소수성을 나타낸다. 일 구체예에 따르면, 상기 막 투과 서열 도메인은 그 자체로 인지질 이중막의 세포막을 통과할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이면 모두 가능하고 특별히 한정되지 않으나, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0042] 일 구체예에서, 상기 막투과 서열 도메인이 융합 단백질에 도입되는 경우에, 융합 단백질의 N 말단 방향에 위치하는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 용어, "핵-세포질 신호 (nucleus-cytoplasm signal) 도메인"은 융합 단백질을 핵의 내부로 수송하거나, 핵의 외부로 수송하기 위한 역할을 하는 폴리펩타이드 서열을 의미하는 것으로 해석된다. 일 구체예에 따르면, 상기 핵-세포질 신호 도메인은 NLS(nucleus location sequence) 도메인 또는 NES(nucleus export sequence) 도메인일 수 있다. 즉, 융합 단백질을 핵 내로 이송시키기 위해서는 상기 융합 단백질에 NLS를 포함시키고, 상기 융합 단백질을 세포질에 남아 있도록 하기 위해서는 상기 융합 단백질에 NES를 포함시킬 수 있다.
- [0044] NLS 도메인은 세포질에서 핵으로 수송되는 단백질들이, NES 도메인은 핵에서 세포질로 수송되는 단백질들이 특징적으로 가지고 있는데, 상기 도메인 모두 핵막을 통과할 수 있는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미하며, 상기 아미노산 서열이 특별히 한정되지는 않는다. 상기 NLS 도메인으로 사용될 수 있는 폴리펩타이드는 예를 들어, KKKRK(서열번호 7), PKKKRKV(서열번호 8), KRPAATKKAGQAKKKK(서열번호 9) 등일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0045] 상기 융합 단백질에서 핵-세포질 신호 도메인은 상기 융합 단백질을 핵 내외로 이동시키는 중요한 일을 하는 이외에도, 단백질의 용해도를 증가시키는데 중요한 역할을 하는데, 융합 단백질에서 C-말단에 가깝게 위치해 있는 경우, 용해도의 증가에 더욱 도움이 된다.
- [0046] 용어, "생체내 안정화 단백질(*in vivo* stabilization protein)"은 상기 융합 단백질이 실질적으로 작용하는 생체 내부에서, 상기 융합 단백질이 안정적으로 존재할 수 있도록 안정성을 부여하는 단백질을 의미한다. 상기 생체내 안정화 단백질은 상기 융합 단백질의 일부로써, 생체 내에서 면역원성을 유발하지 않아야 하며, 특히, 대상에 투여된 경우, 대상의 혈액 내에서 안정성을 획득할 수 있는 단백질이면 어떠한 단백질이라도 가능하다. 일 구체예에 따르면, 상기 생체내 안정화 단백질은 AAT (alpha 1 antitrypsin), 혈청 알부민, 혈청 알부민 결합 펩타이드(serum albumin binding peptide; SABP), 면역글로불린의 Fc 및 PEG(polyethyleneglycol)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0047] 일 구체예에서, 상기 생체내 안정화 단백질이 융합 단백질에 도입되는 경우, 융합 단백질의 N 말단, C 말단, 또는 p53 단백질과 p18 단백질 사이에 포함될 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명의 융합 단백질의 말단에는, 종결코돈(stop codon)이 추가로 포함될 수 있다. 종결코돈은 2회 이상 반복하여 삽입될 수 있으며, 예를 들어 TAA 서열이 2회 반복되어 삽입될 수 있다. 본 명세서 내에서는, 종결코돈이 2회 반복 삽입된 경우를 편의상 STOPx2 로 표시하기로 한다.
- [0049] 또한, 본 발명은 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 또는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 p53 단백질 단편, 및 p18 단백질을 포함하는 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0050] 상기 융합 단백질은 생체외 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인, 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 그 구체적 내용은 앞서 설명한 바와 같다.
- [0051] 일 구체예에 따르면, 상기 융합 단백질은 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p18 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질;
- [0052] 아넥신 A2 결합단백질, p18 단백질 및 p53 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질;

- [0053] p53 단백질, p18 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질; 및
- [0054] p18 단백질, p53 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [0055] 또한 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 융합 단백질은 아넥신 A2 결합단백질, p53 단백질 및 p18 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, p53 단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, p18 단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것인 융합 단백질;
- [0056] 아넥신 A2 결합단백질, p18 단백질 및 p53 단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, p18 단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, p53 단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것인 융합 단백질;
- [0057] p53 단백질, p18 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, 아넥신 A2 결합단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, 아넥신 A2 결합단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 STOPx2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것인 융합 단백질; 및
- [0058] p18 단백질, p53 단백질 및 아넥신 A2 결합단백질을 N-말단에서 C-말단의 순서로 포함하는 융합 단백질에 있어서, 아넥신 A2 결합단백질의 N-말단 방향에 생체의 안정화 단백질, 막 투과 서열 도메인 및 핵-세포질 신호 도메인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하거나, 아넥신 A2 결합단백질의 C-말단 방향에 막 투과 서열 도메인, 핵-세포질 신호 도메인 및 생체내 안정화 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 포함하는 것인 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [0059] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 융합 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0060] 용어 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)" 는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체를 말한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 RNA 게놈 서열, cDNA 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오티드의 유사체를 포함한다. 일례로, 본 발명의 단백질 복합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11의 핵산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0061] 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 융합 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함하며, 이는 당업계에서 공지된 엄격 조건(stringent conditions) 하에서, 예를 들어, 상기 융합 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 서열과 혼성화될 수 있는 서열을 의미한다.
- [0062] 상기 재조합 벡터는, 숙주 세포 내에서 안정적으로 상기 융합 단백질을 발현시킬 수 있는, 발현용 벡터일 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0063] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스

스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk(프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명에서 형질전환된 세포는 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈턴젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모 (*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주 등이 이용될 수 있다.

[0065] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0066] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

[0067] 형질 전환된 세포의 배양은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 형질 전환된 세포를 YT 액상 배지에 접종하여 배양을 실시한 다음, 세포 밀도가 일정 수준에 도달한 시점에서 IPTG를 배지에 첨가하여 *lacZ* 프로모터에 의한 단백질 발현을 유도하고 배양함으로써, 세포 내 또는 배지로 분비된 단백질을 얻을 수 있다.

[0068] 세포 내 또는 배지로 분비된 단백질은 당업계에 공지된 다양한 정제 방법에 따라 정제된 형태로 얻을 수 있다. 예를 들어, 암모늄 설페이트에 의한 용해도 분획화(solubility fractionation), 크기 분별 여과 및 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 정제 방법을 통하여 정제된 형태로 단백질을 얻을 수 있다. 예를 들어, 용합 단백질이 GST에 용합된 경우에는 글루타티온이 결합된 레진 칼럼, 6x His에 용합된 경우에는 Ni²⁺-NTA His-결합 레진 칼럼을 이용하여 원하는 단백질을 용이하게 얻을 수 있다.

[0069] 앞서 설명한 바와 같이, 상기 용합 단백질에 포함된 p53 및 p18의 용합체는 p53의 안정성을 크게 증가시키고, p21 유전자를 발현시켜 세포증식을 일시적으로 정지시키며, Bax 유전자를 발현시켜 세포 죽음을 유발하고, CDK 4, 6의 활성을 저해하는 역할을 하므로, 암의 예방 및/또는 치료에 있어서 유효성분으로 효과적이다. 또한, 상기 용합 단백질에 포함된 또 다른 성분인 아넥신 A2 결합단백질은 암세포에 특이적으로 발현되는 아넥신 A2에 결합하므로 용합 단백질이 암세포에만 선택적으로 작용할 수 있도록 암세포 타겟팅이 가능하게 한다. 따라서, 본 발명의 용합 단백질은 암의 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물로 제공될 수 있다.

[0070] 따라서, 다른 예에서, 상기 용합 단백질을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물이 제공된다. 상기 약학 조성물은 필요에 따라서 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 통상적으로 사용되는 양으로 추가로 포함할 수 있다.

[0071] 상기 약학적으로 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. 상기 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0072] 또 다른 예에서, 상기 용합 단백질의 치료적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료 방법이 제공된다. 상기 암의 예방 및/또는 치료 방법은 상기 투여 단계 이전에 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0073] 또 다른 예에서, 상기 용합 단백질의 암의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 용도, 또는 상기 용합 단백질의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 약물 제조에 사용하기 위한 용도가 제공된다.

[0074] 상기 용합 단백질 또는 이를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에

따라, 약학적으로 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 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0075] 상기 용합 단백질 또는 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화 가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 상기 조성물이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0076] 상기 용합 단백질 또는 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 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. 상기 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001 내지 100 mg/kg 범위 내이다. 용어 "약학적 유효량" 또는 "치료적 유효량"은 암의 예방 또는 치료에 효과를 나타낼 수 있는 양을 의미한다.

[0077] 상기 용합 단백질 또는 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 대상 환자는 포유류, 예컨대 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 래트, 마우스 등을 포함하는 설치류 동일 수 있다.

[0078] 일 구체예에 따르면, 상기 용합 단백질 또는 약학 조성물이 예방 또는 치료 대상으로 하는 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있으며, 예컨대, 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프종, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암 (triple negative breast cancer 포함), 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 이에 한정하지는 않는다.

발명의 효과

[0079] 일 구체예에 따른 용합 단백질 및 이를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 암의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용 가능하다. 또한 상기 용합 단백질은 면역원성이 없기 때문에, 안전한 항암 치료용 단백질로서 유용하고, 암세포만을 타겟팅하여 특이적으로 작용하여 부작용이 적을 뿐 아니라, 거의 모든 종류의 암의 예방 및/또는 예방에 적용 가능하고, 기존의 항암제가 효과를 발휘하지 못하는 고형암에도 우수한 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0080] 도 1은 일 구체예에 따른 단백질 복합체의 예를 모식적으로 나타낸 것이다.

도 2는 일 구체예에 따른 단백질 복합체가 암 세포에 작용하는 기전을 모식적으로 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 단백질 복합체 #1 및 #2 를 벡터로부터 발현시켜 정제한 결과를 SDS-PAGE를 통해 나타낸 것이다.

#1: A2BP-Ub-Ub(m1)-MTS-p18(F71N)-Ub(m3)-Ub(m4)-p53F-NLS

#2: A2BP-Ub-Ub(m1)-MTS-p18(F71N)-AAT-p53F-NLS

도 4는 본 발명에 따른 단백질 복합체 #1 및 #2 가 아넥신 A2 와 결합하는지를 확인한 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

#1: A2BP-Ub-Ub(m1)-MTS-p18(F71N)-Ub(m3)-Ub(m4)-p53F-NLS

#2: A2BP-Ub-Ub(m1)-MTS-p18(F71N)-AAT-p53F-NLS

도 3은 HCC1806 세포주에서 단백질 복합체 #2의 처리 농도에 따른 세포 성장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

#2: A2BP-Ub-Ub(m1)-MTS-p18(F71N)-AAT-p53F-NLS

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081] 이하, 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0082] 실시예 1: 융합 단백질의 발현 벡터의 제조

[0083] 본 실시예에서는 친수성 폴리펩티드의 한 종류인 유비퀴틴 야생형 단백질 또는 유비퀴틴 돌연변이형 단백질, 막 투과 서열 도메인(MTS: membrane translocation sequence), p18, 생체내 안정화 단백질(AAT: alpha 1 antitrypsin), p53 단편 및 핵 위치 신호 도메인(NLS: nucleus localization signal domain)의 순서로 연결된 세포 내 전달용 단백질 복합체를 생산하기 위한 상기 단백질 복합체의 발현 벡터를 제조하였다. 또한, 상기 단백질 복합체와의 비교 실험을 위해 상기 단백질 복합체에서 하나 이상의 구성 요소를 제외한 단백질 복합체를 생산하기 위한 발현 벡터를 제조하였다. 이하, 야생형 유비퀴틴을 이하 Ub7KR로 (서열번호 5), 야생형 유비퀴틴 C-말단의 RGG를 RGA로 변경시킨 돌연변이형 유비퀴틴을 Ub7KR(G76A) (서열번호 12) 라 명명하도록 한다. 또한, 상기 돌연변이형 유비퀴틴은 합성을 용이하게 하기 위하여, 아미노산 서열을 같으나 wobble sequence를 사용하여 핵산 서열이 서로 다른 4가지 핵산을 제조하였으며, 이를 Ub(m1), Ub(m3), Ub(m4)로 각각 명명하였다 (서열번호 13 내지 서열번호 16).

[0084] 총 6가지 종류의 발현 벡터를 (주) 제노텍에 의뢰하여 제조하였으며, 단백질 과발현을 위한 벡터는 pET-21b(+)(EMD Biosciences)를 사용하였다.

[0085] 한편, 상기 각각의 인서트 DNA 절편은 5' 말단에 NdeI으로 절단될 수 있는 뉴클레오티드 서열을, 3' 말단에 XhoI으로 절단될 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함함으로써, 상기 pET21b(+) 벡터의 NdeI-XhoI 절단 서열에 삽입될 수 있도록 하였다.

[0086] 일 구체예에 따른 단백질 복합체의 가능한 1차 구조를 나타내는 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0087] 실시예 2: 융합 단백질의 발현 및 정제

[0088] 상기 실시예 1에서 제조한 벡터를 이용하여 단백질 복합체를 과발현시키기 위해, 상기 벡터로 형질 전환된 *E. coli* BL21(DE3)에서 발현시켰다. 이 때, 배양액으로 YT 배지를 사용하였으며, 흡광도 600 nm에서 O.D. 값이 0.5 일 때 0.5 mM의 IPTG를 넣고 18 °C에서 16시간 동안 더 배양하였다. 상기 배양하여 얻은 세포를, 5% 글리세롤, 5 mM β-머캅토에탄올, 0.2% Triton X-100 및 0.2 M NaCl을 포함하는 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 하에서 초음파로 분쇄한 후, 원심분리기(10,000 g)를 이용하여 상층액을 얻었다. 상기 상층액을 상기 완충액으로 평형화된 Ni²⁺-NTA superflow 칼럼(Qiagen)에 적용하고, 컬럼 부피의 5배에 해당하는 세척 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% 글리세롤, 5mM β-머캅토에탄올, 0.2% Triton X-100 및 1 M NaCl)로 세척한 다음, 용출 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% 글리세롤, 5 mM β-머캅토에탄올, 0.2% Triton X-100 및 0.2 M NaCl)으로 상기 단백질 복합체를 용출하였다. 단백질 복합체가 포함된 분획들을 모아 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter(Milipore)를 이용하여 분획 중에 포함된 염을 제거하고 농축하였다. 정제된 단백질 농도는 BSA를 표준 물질로 사용하여 측정하였다.

[0089] 도 3은 실시예 1에서 제작한 벡터로부터 발현된 단백질 복합체들을 상기 방법에 의해 정제한 결과를 SDS-PAGE를 통해 나타낸 것이다. 도 3에서, 단백질 복합체 #1은 A2-Ub-Ub(m1)-p18-Ub(m3)-Ub(m4)-p53 의 순서로 결합된 단백질 복합체이고, 단백질 복합체 #2는 A2-Ub-Ub(m1)-p18-AAT-p53의 순서로 결합된 단백질 복합체이다. 아넥신 A2 단백질과의 결합 여부를 확인하기 위해, 아넥신 A2는 따로 정제하였다. M은 사이즈 마커를 의미한다.

[0090] 실시예 3: 융합 단백질의 아넥신 A2에 대한 결합성 확인

[0091] 우선 실시예 2에서 수득한 단백질 복합체가 실제로 아넥신 A2에 결합하는 지 알아보기 위해 in vitro에서 결합 테스트를 실시하였다. 먼저, 아넥신 A2 결합 펩타이드를 포함하는 단백질 복합체 #1인 A2-Ub-Ub(m1)-p18-Ub(m3)-Ub(m4)-p53, 단백질 복합체 #2인 A2-Ub-Ub(m1)-p18-AAT-p53(#2) 500 ug와 아넥신 A2 단백질 1500 ug을 1000 ul의 PBS 완충액(1 x PBS, 0.2 % Tween 20, 100 mM arginine, 0.2 % glutathione reduced) 에 18°C에서

120분 동안 방치하여 결합 시간을 충분히 제공한 다음, 이를 HiLoad Superdex S-75 16/60 컬럼 (GE healthcare)에 로딩하여 용출하였다. 이 때 용출 조건은 flow rate 1 ml/min, PBS 완충액 (1 x PBS, 0.2 % Tween 20, 100 mM arginine, 0.2 % glutathione reduced)이며, 2 ml fraction으로 120분 동안 수득하였다. 이후, 상기 용출액을 50 mM Tris 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 % 글리세롤, 5 mM β -머캅토에탄올, 0.2 % Triton X-100 및 1 M NaCl)로 평형화된 Ni²⁺-NTA superflow 컬럼(Qiagen)에 적용하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 단백질 복합체를 용출하였다.

[0092] 도 4은 상기 과정에 의해 용출된 단백질 복합체를 SDS-PAGE를 통해 나타낸 것이다. 도 4에서 보는 바와 같이, 아넥신 A2 결합 펩타이드를 포함하는 단백질인 단백질 복합체 #1, #2 모두 아넥신 A2 와 결합하였음을 확인할 수 있었다.

[0093] **실시예 4: 암세포주를 이용한 융합 단백질의 항암효과 확인**

[0094] 실시예 2에서 제조한 단백질 복합체 #2의 세포 내 투과 및 암세포의 치료 효능을 확인하기 위하여, 삼중음성 (triple negative) 유방암 세포주(HCC1806, ATCC)를 대상으로 상기 단백질 복합체의 투여에 의한 p18-p53 단백질의 항암 효과를 확인하였다.

[0095] 상기 세포들을 각각 웰당 5×10^3 개가 포함되도록 10%의 FBS가 포함된 RPMI 배지(Gibco BL)에 넣고, 단백질 복합체를 각각 0, 0.05625, 0.1125, 0.225, 0.45, 0.9 μ M의 농도로 처리한 다음, 96시간 동안 CO₂ 배양기에서 온도 37°C, 습도 85%, CO₂ 5%의 조건으로 배양하였다. 비교 실험으로는 상기 단백질 복합체 대신 단백질 복합체가 없는 buffer(0.1% arginine, 0.2% Tween20, 0.2% L-Glutathione, 1XPBS(pH 7.4))를 동일 양으로 처리하고 상기와 동일한 조건에서 배양하였다.

[0096] 그 결과, 도 5에서 나타낸 바와 같이, 핵 위치 신호 도메인(NLS) 및 인 비보 안정 단백질(AAT)을 모두 포함하는 단백질 복합체 #2는 0.9 μ M의 농도에서 상기 모든 세포주의 세포 성장을 50% 억제함을 확인할 수 있었다.

도면

도면1

1. His6-A2BP-Ub-Ub (m1) -MTS-p18 (F71N) -Ub (m3) -Ub (m4) -p53F-NLS

2. His6-A2BP-Ub-Ub (m1) -MTS-p18 (F71N) -AAT-p53F-NLS

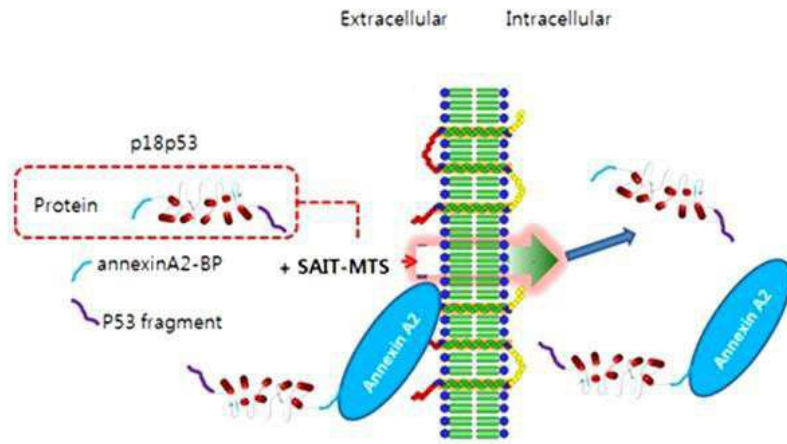
3. His6-Ub (m1) -Ub (m2) -MTS-p18 (F71N) -Ub (m3) -Ub (m4) -p53F-NLS

4. His6-A1BP-Ub-Ub (m1) -MTS-p18 (F71N) -Ub (m3) -Ub (m4) -p53F-NLS

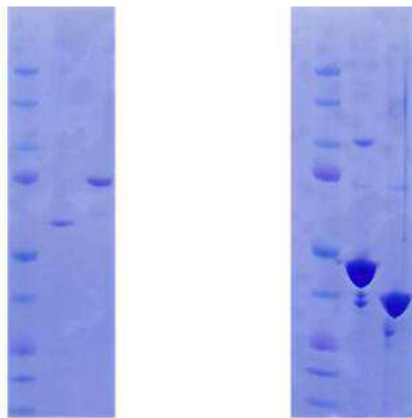
5. His6-Ubm1-MTS-p18 (F71N) -AAT-p53F-NLS

6. His6-A1BP-Ub-Ubm1-MTS-p18 (F71N) -AAT-p53F-NLS

도면2



도면3



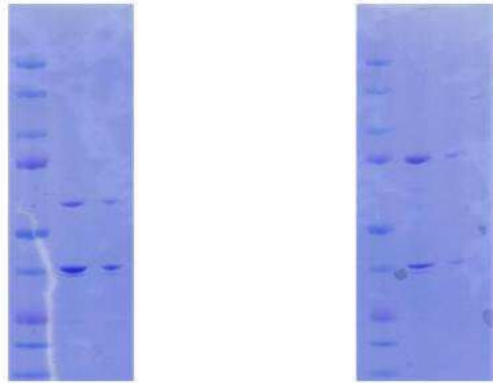
<purified #1 and #2>

Lane 1: Marker
Lane 2: #1
Lane 3: #2

<purified anxn A2>

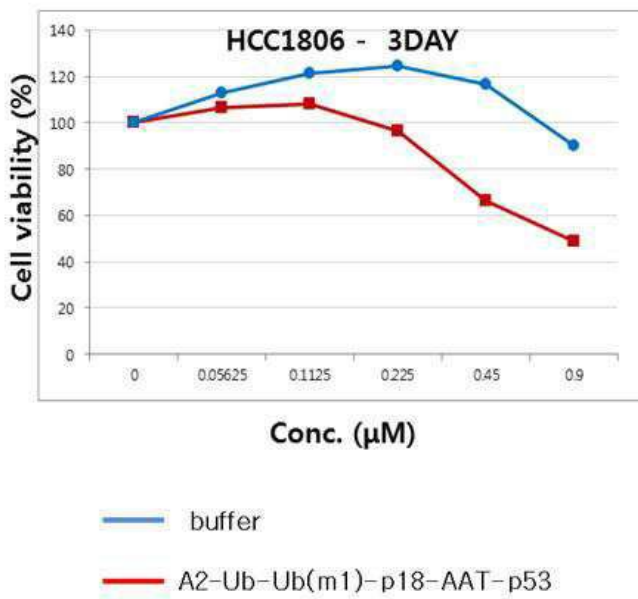
Lane 1: Marker
Lane 2: His-Ub-Annexin A2
Lane 3: Ub-AnnexinA2

도면4



< Anxn A2 binding with #1> < Anxn A2 binding w/ #2>
 Lane 1: Marker Lane 1: Marker
 Lane 2: fraction 1 Lane 2: fraction 1
 Lane 3: fraction 2 Lane 3: fraction 2

도면5



서열 목록

- <110> SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.
- <120> Fusion protein comprising annexin A2 binding protein, p53 and p18, and composition comprising the fusion protein for preventing or treating cancer
- <130> DPP20125838KR
- <160> 16
- <170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> p53 fragment
 <400> 1

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn
 1 5 10

<210

> 2

<211> 168
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P18 protein
 <400> 2

Met Ala Glu Pro Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Arg Gly
 1 5 10 15
 Asp Leu Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn Val Asn Val Asn
 20 25 30
 Ala Gln Asn Gly Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val Met Lys Leu Gly
 35 40 45
 Asn Pro Glu Ile Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly Ala Asn Pro Asp

50 55 60
 Leu Lys Asp Arg Thr Gly Asn Ala Val Ile His Asp Ala Ala Arg Ala
 65 70 75 80
 Gly Phe Leu Asp Thr Leu Gln Thr Leu Leu Glu Phe Gln Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ile Glu Asp Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His Leu Ala Ala Lys
 100 105 110
 Glu Gly His Leu Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys His Thr Ala Ser
 115 120 125
 Asn Val Gly His Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala Cys Asp Leu Ala
 130 135 140

Arg Leu Tyr Gly Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met Gln Ala Asn Gly
 145 150 155 160

Ala Gly Gly Ala Thr Asn Leu Gln

165

<210> 3

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> p18-p53 fragment fusion protein

<400> 3

Met Ala Glu Pro Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Arg Gly

1 5 10 15

Asp Leu Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn Val Asn Val Asn

20 25 30

Ala Gln Asn Gly Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val Met Lys Leu Gly

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Phe Leu Asp Thr Leu Gln Thr Leu Leu Glu Phe Gln Ala Asp Val

85 90 95

Asn Ile Glu Asp Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His Leu Ala Ala Lys

100 105 110

Glu Gly His Leu Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys His Thr Ala Ser

115 120 125

Asn Val Gly His Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala Cys Asp Leu Ala

130 135 140

Arg Leu Tyr Gly Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met Gln Ala Asn Gly

145 150 155 160

Ala Gly Gly Ala Thr Asn Leu Gln Gly Ser Glu Thr Phe Ser Asp Leu

165 170 175

Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn

180

<210> 4

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Annexin A2 binding protein

<400> 4

Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys Cys

1 5 10 15

Asp Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Arg Gly Lys Cys Thr Gly Pro Gln

20 25 30

Cys Leu Cys Arg

35

<210> 5

<211> 76

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wild type Ubiquitin

<400> 5

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu

1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp

20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys

35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu

50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly

65 70 75

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> membrane transfer sequence (MTS)

<400> 6

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS domain

<400> 7

Lys Lys Lys Arg Lys

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS domain

<400> 8

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NLS domain

<400> 9

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 10

<211> 337

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAT

<400> 10

Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu

1 5 10 15

Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser

20 25 30

Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys

35 40 45

Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr

50 55 60

Glu Ile Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg

65 70 75 80

Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly

85 90 95

Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp

100 105 110

Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp

115 120 125

Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr

130 135 140

Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val

145 150 155 160

Phe Ala Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro

165 170 175

Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val

180 185 190

Thr Thr Val Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile

195 200 205

Gln His Ala Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu

210 215 220

Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln

225 230 235 240

His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu
 245 250 255

Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile
 260 265 270

Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr
 275 280 285

Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala
 290 295 300

Pro Leu Lys Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp
 305 310 315 320

Glu Lys Gly Thr Glu Ala Ala Pro Asp Asp Asp Asp Glu Ala Ile Pro
 325 330 335

Arg

<210>

11

<211> 2327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding fusion protein (A2-Ub-Ub(m1)-p18-AAT-p53)

<400> 11

catatgagag gatcgcatca ccatcacat cagcattacg atatcccaac gaccgaaaac 60
 ctgtattttc agggatccgg cagcggcagc atgtgcatgc cgtgcttcac caccgaccac 120
 cagatggctc gtaaatgcga cgactgctgc ggtggtaaag gtcgtggtaa atgcaccggt 180
 cgcagtgcc tgtgccgtgg cagcatgcag atcttcgtta aaacctgac cggtaaaacc 240
 atcaccctgg aagttgaacc gtctgacacc atcgaaaacg ttaaagctaa aatccaggac 300

aaagaaggta tcccgccgga ccagcagcgt ctgatcttcg ctggtaaaca gctggaagac 360
 ggtcgtacc tgtctgacta caacatccag aaagaatcta cctcgcacct ggttctgcgt 420
 ctgcgtggtg gtatgcaaat cttgttctgt accctgaccg gtcgtacat cacctggaa 480
 gttgaaccgt cggataccat agaaaatgta cgtgcgcgta tccaggatcg tgaaggtata 540
 cgcgccgcatc agcagcgtct gatctttgcg ggtcgtcagc tggaagatgg tcgcaccctg 600
 tcggattaca atattcaacg tgaatcgacc ctgcactctg tgctgcgtct gcgcggtcgc 660

gaatttgcgc cggtagcgt gctcccggcg gtctctgtgg ccttctgtgg gcccggcagc 720

 atggccgagc cttgggggaa cgagttggcg tccgcagctg ccagggggga cctagagcaa 780
 cttactagtt tgttgcaaaa taatgtaaac gtcaatgcac aaaatggatt tggaaaggact 840
 gcgctgcagg ttatgaaact tggaaatccc gagattgcca ggagactgct acttagaggt 900
 gctaataccc atttgaaaga ccgaactggt aatgctgtca ttcattgatgc ggccagagca 960
 ggtttctctg acactttaca gactttgctg gagtttcaag ctgatgttaa catcgaggat 1020
 aatgaaggga acctgccctt gcaacttgct gccaaagaag gccacctccg ggtggtggag 1080
 ttctctgtga agcacacggc cagcaatgtg gggcatcgga accataaggg ggacaccgcc 1140

 tgtgatttgg ccaggctcta tgggaggaat gagtttcta gcctgatgca ggcaaacggg 1200
 gctgggggag ccacaaatct tcaaggcagc accttcaaca aatcacccc gaacctggct 1260
 gaattcgctt tctctctgta ccgtcagctg gctcaccagt ctaactctac caacatcttc 1320
 ttctctccgg tttctatcgc taccgcttcc gctatgctgt ctctgggtac caaagctgac 1380
 acccagcagc aatcctgga aggtctgaac ttcaacctga ccgaaatccc ggaagctcag 1440
 atccacgaag gtttccagga actgctgcgt acctgaacc agccggactc tcagctgcag 1500
 ctgaccaccg gtaacggctc gttctctgtc gaaggtctga aactggttga caaattctctg 1560

 gaagacgtta aaaaactgta ccaactctgaa gctttcaccg ttaacttcgg tgacaccgaa 1620
 gaagctaaaa aacagatcaa cgactacgtt gaaaaaggta cccagggtaa aatcgttgac 1680
 ctggttaaag aactggaccg tgacaccgtt ttcgctctgg ttaactacat cttcttcaaa 1740
 ggtaaatggg aacgtccgtt cgaagttaaa gacaccgaag aagaagactt ccacgttgac 1800
 caggttacca ccgttaaagt tccgatgatg aaacgtctgg gtatgttcaa catccagcac 1860
 gctaaaaaac tgtcttcttg ggttctgctg atgaaatacc tgggtaacgc taccgctatc 1920
 ttcttctgc cggacgaagg taaactgcag cacctggaaa acgaactgac ccacgacatc 1980

 atcaccaaat tcctggaaaa cgaagaccgt cgttctgctt ctctgcacct gccgaaactg 2040
 tctatcaccg gtacctacga cctgaaatct gttctgggtc agctgggtat caccaaagtt 2100
 ttctctaacg gtgctgacct gtctggtgtt accgaagaag ctccgctgaa actgtctaaa 2160
 gctgttcaca aagctgttct gaccatcgac gaaaaaggta ccgaagctgc tccggacgac 2220
 gacgacgaag ctatcccgcg tgaacaattt tcagacctat ggaaactact tcctgaaaac 2280
 aaaaagaaga gaaagtaata actcgagcac caccaccacc accactg 2327

 <210> 12
 <211> 76

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutant type Ubiquitin

<400> 12

Met Gln Ile Phe Val Arg Thr Leu Thr Gly Arg Thr Ile Thr Leu Glu

1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Arg Ala Arg Ile Gln Asp

20 25 30

Arg Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Arg

35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Arg Glu

50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Ala

65 70 75

<210> 13

<211> 228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ub(m1)

<400> 13

atgcaaatct ttgttcgtac cctgaccggt cgtacatca ccctggaagt tgaaccgtcg 60

gataccatag aaaatgtacg tgcgcgtatc caggatcgtg aaggtatacc gccggatcag 120

cagcgtctga tctttgctgg tgcgcagctg gaagatggtc gcaccctgtc ggattacaat 180

attcaacgtg aatcgaccct gcatctggtg ctgcgtctgc gcggtgcg 228

<210> 14

<211> 228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ub(m2)

<400> 14

atgcagatct tcgtgctcac gctgacgggc cgcacgatca cgctggaggt tgagccgtcc 60

gacacgatag agaacgtacg cgcccgcac caggaccgag agggcatacc gccggaccag 120

cagcgcctga tctttgccgg ccgccagctg gaggacggcc gtacgctgtc cgactacaac 180
 attcaacgcg agtccacgct gcatctgggtg ctgagactgc gtggcgcc 228
 <210> 15
 <211> 228
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 Ub(m3)
 <400> 15
 atgcagatct tcggtcgcac cctgaccggc cgtacgatca cgctggaggt tgagccgtcc 60
 gatacgatag agaatgtacg cgcgcgcatc caggatcgcg aaggcatacc gccggaccag 120
 cagcgtctga tctttgccgg ccgtcagctg gaagacggtc gtaccctgtc ggactacaac 180
 attcaacgtg agtcgacgct gcatctgggtg ctgagactgc gtggtgcc 228
 <210> 16
 <211> 228
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ub(m4)
 <400> 16
 atgcaaatTT ttgtgcgtac gctgaccgggT cgcacatca ccctggaagt tgaaccgtcg 60
 gacacatag aaaacgtacg tgcccgtatc caggaccgtg agggatatacc gccggatcag 120
 cagcgcctga tctttgccgg tcgccagctg gaggatggcc gcacgctgtc cgattacaat 180
 attcaacgcg aatccaccct gcatctgggtg ctgcgtctgc gcggcgcg 228