(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0026382
(43) 공개일자 2009년03월13일

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0091301
(22) 출원일자 2007년09월10일
심사청구일자 2007년09월10일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39
(72) 발명자
최수영
강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105-706
음원식
강원 춘천시 후평2동 595번지 극동늘푸른아파트 101-301
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

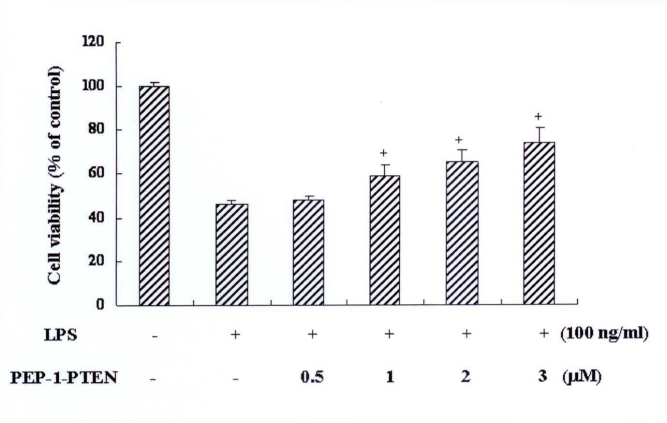
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 세포 도입성 ＰＴＥＮ 융합 단백질

(57) 요 약

본 발명은 PTEN 단백질과 단백질 수송도메인이 공유결합된 PTEN 융합 단백질을 제조함으로써 피부 표면에 적용시킬 때 용이하게 진피 내로 또는 세포 내로 도입(penetration) 가능한 PTEN 융합 단백질에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 본 발명의 단백질 수송 도메인은 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인(hydrophobic domain), 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인(hydrophilic domain) 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서(spacer)로 구성되어 있으며, 대조군과 비교할 때 원활히 세포 내로 농도 의존적, 시간 의존적으로 침투하며, 세포 내에서 48시간 이상 지속되었고 피부 세포사를 억제하는 효과를 나타내었다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

박진서

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105동 1404호

김대원

서울특별시 강남구 대치동 316 은마아파트 19동 103호

최진희

강원도 춘천시 옥천동 1-1 한림창업보육센터 (바이오셀트란)

장상호

강원도 춘천시 옥천동 1-1 한림창업보육센터 (바이오셀트란)

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 3의 PEP-1 단백질 수송 도메인이 PTEN(Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합되어 서열번호 7, 서열번호 9 또는 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 도입성(cell-transducing) PTEN 융합 단백질.

청구항 2

제1항의 세포 도입성 PTEN 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

제1항의 세포 도입성 PTEN 융합 단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 암 치료, 피부암 치료, 피부 세포사 억제, 아토피성 염증 치료 및 녹내장 여과 수술 후 섬유화 반흔 형성 억제용 약제학적 조성물.

청구항 4

PTEN cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 제1항의 세포 도입성 PTEN 융합 단백질을 코딩하는, 서열번호 6, 서열번호 8 또는 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

상기 제1항의 융합 단백질을 발현시키기 위하여 상기 제4항의 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포 도입성 PTEN 융합 단백질을 발현시키는 벡터.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 단백질의 세포 도입에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 PTEN 단백질의 말단에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 상태의 융합단백질에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 피부는 자외선(UV), 산화성 공기오염원 등의 유해한 환경에 계속 노출된다. 활성산소종(Reactive Oxygen Species)은 염증성 피부질환, 피부암, 피부 자가면역질환, 광독성, 감광성, 피부노화 등에 관여하고 있다고 알려져 있다[Cross, C.C., Halliwell, B. and Borish, E.T. (1987) Ann. Intern. Med., Davis Conference 107, 526-545].

<3> 활성산소종은 산소를 이용하여 에너지를 얻는 모든 생명체에서, 여러 세포 내 대사과정의 부산물로 필연적으로 생성된다. 이러한 활성산소종은 세포 내의 단백질, 핵산 및 지방과 같은 생체고분자에 손상을 입히며, 인체의 여러 질병의 진행과정과 깊게 관련되어 있다. 특히, 발암과정, 뇌졸중, 관절염, 동맥 경화, 방사선 손상 및 염증반응에 관여하며 정상적인 노화과정에서도 노화를 촉진하는 중요한 요인으로 작용한다[Floyd, R.A.(1990) FASEB J. 4, 2587-2597.Anderson, W. F.(1998) Nature 392, 25-30, Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Oxford].

<4> 크로모좀 10 상의 인산화효소 및 결손된 텐신 유사체(Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; 이하 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에서 "PTEN"으로 약칭함)은 MMAC-1(mutated multiple advanced cancers) 또는 TEP-1(TGF-β-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase)으로 불린다. 사람의 10번 염색체에 존재하는 PTEN 단백질은 암 세포의 이동, 생존 및 세포사멸에 중요한 역할을 하는 종양억제 단백질로 잘 알려져 있다. 최근 종양억제 단백질인 PTEN이 항암 작용뿐 아니라 염증반응을 억제한다는 사실이 밝혀지고 있다[Li, J. et al.(1997) Science 275, 1943-1947, Steck, P.A. et al.(1997) Nat.

Genet. 15, 356-362, Yamada, K.M. et al.(2001) J. Cell Sci. 114, 2375-2382, Lee, K.S. et al.(2006) Mol. Pharmacol. 69, 1829-1839, Kwak, Y.G. et al.(2003) J. Clin. Invest. 111, 1083-1092, Lee. Y.C. et al.(2004) Arch. Immunol. Ther. Exp. 52, 250-254.].

<5> 생체 내 고분자들 특히 피부는 이러한 염증 및 자유라디칼의 해로운 작용에 항상 노출되어 있기 때문에 다양한 피부질환에서 PTEN을 치료목적으로 이용하려는 관심이 매우 높아지고 있다. 현재 가장 주목을 받고 있는 것은 유전자 치료이다. 그러나 유전자 치료는 유전자의 운반방법이 용이하지 않고, 표적세포에서의 발현이 낮고, 세포에서 단백질이 발현되는 기간이 짧고, 인위적으로 표적세포에서 발현되는 단백질의 양을 인위적으로 조절하기가 매우 어려운 점 등 여러 가지 문제점이 있다[Del Zoppo, G.J., Wagner, S. and Tagaya, M. (1997) Drugs 54, 9-38].

<6> 치료를 위한 약물이나 단백질을 세포 내로 이동시키는 데 있어 목표 단백질을 세포막을 거쳐 직접 전달하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나 단백질은 크기나 여러 생화학적 성질 때문에 세포막을 통과하기가 매우 어렵다. 일반적으로 분자량 600달톤 이상의 물질은 세포막을 통과하기가 거의 불가능한 것으로 알려져 있다.

<7> 최근, 단백질의 운반 방법 중 하나로 PEP-1 펩타이드를 이용하여 자연상태의 이형단백질을 세포 내로 운반할 수 있다는 것이 밝혀졌다[Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. (2001) Nat. Biotech. 19, 1173-1176]. PEP-1 펩타이드는 21개의 아미노산(KETWWETWWTEW SQP KKKRKV)으로 이루어졌고, 3개의 도메인{소수성(hydrophobic), 스페이서(spacer), 친수성(hydrophilic) 도메인}을 갖고 있다. 지금까지, PEP-1 펩타이드를 이용한 연구에서는 PEP-1 펩타이드와 외부 단백질을 동시에 세포에 투여하였을 경우 자연상태로 단백질을 세포 내로 운반할 수 있다는 것만 밝혀졌다. 또한, PEP-1 펩타이드는 HIV-1 Tat 단백질에 비해 단백질 치료제로서의 여러 가지 장점 즉, 생리학적 완충액에서의 안정성, 독성의 결여, 혈청에 대한 민감성의 결여 등을 나타낸다. 그러나, PEP-1 펩타이드는 녹색형광단백질이나 β-갈락토시데이즈와 같은 외부 단백질과 일정한 비율로 맞추어 투여해야만 세포 내에 효과적으로 단백질이 운반되는 것으로 확인되었다. 그러나, 현재까지도 PEP-1 펩타이드가 치료 단백질이나 모든 단백질을 세포 내로 운반할 수 있는지는 아직까지 밝혀지지 않았다. 본 발명자들의 2007년 연구결과에서 PEP-1-α-락트알부민(α-lactalbumin) 융합단백질을 제조 및 정제하여 피부세포 및 조직 내 침투 효율을 측정한 결과, PEP-1-α-락트알부민 융합단백질은 배양한 피부세포에는 빠른 시간 내에 효과적으로 잘 침투되나, 실제 피부조직으로의 침투는 기존의 다른 단백질(예컨대, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈, 카탈레이즈 등)에서 보여준 것처럼 높게 나타나지 않고 피부 조직 내 침투효율이 현저히 떨어지는 것을 확인한바 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 본 발명의 목적은 PTEN의 세포 침투성을 높인 융합 단백질을 제공하려는 것이다.

<9> 또한, 본 발명의 목적은 PEP-1을 포함하여 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서로 구성된 단백질 수송 도메인을 PTEN의 적어도 일측 말단과 공유결합시킴으로써 세포 침투성을 극대화하려는 것이다.

과제 해결수단

<10> 그리하여, 본 발명자들은 자연상태의 단백질을 세포 내로 운반하는 PEP-1 펩타이드를 외부 단백질인 사람 PTEN에 융합시켰고, 융합 단백질을 대장균에서 과대발현시켰으며, 금속 킬레이팅 친화 크로마토그래피로 쉽고 편리하게 정제하였다. 정제된 융합 단백질이 효과적으로 생물학적인 활성을 지니고 세포 내로 운반되는 것을 배양된 피부 세포 및 조직실험을 통하여 확인하였다. 그리고, PEP-1-PTEN(이하 본 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에서 "PEP-PTEN"과 혼용함) 융합 단백질이 피부 세포 내로 운반되며 피부 세포사를 효과적으로 보호함을 밝혀냈다.

효 과

<11> 본 발명은 사람 PTEN(Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10)을 효과적인 방법으로 단백질 수준에서 세포 내로 직접 투과시키는 기술을 제공한다.

<12> 본 발명에 따르면, 아토피 피부 염증을 회복하는데 있어 PTEN을 자연상태로 세포 내 투여함으로써 피부질환을 치료하는 단백질 치료와 피부암에 PEP-1-PTEN이 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

<13> 본 발명을 바탕으로 PEP-1-PTEN을 세포 내로 직접 전달하여 아토피 피부염으로부터 피부세포 및 조직을 보호할 수 있기 때문에 질병 이외에도 항암제 및 기능성 화장품 산업 등 더욱 효과적으로 본 발명이 광범위하게 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<14> PEP-1 펩타이드가 이형 단백질을 자연상태 그대로 세포 내로 이동시키는데 운반체로서 이용될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 그러나, 아직까지 PEP-1 펩타이드를 이용한 실험은 매우 드문 실정이다. 따라서, 본 발명자들은 PEP-1 펩타이드를 비롯한 단백질 수송 도메인이 종양억제 단백질로 잘 알려진 PTEN 단백질을 세포 내로 운반시킬 수 있는지, 운반된 PEP-1-PTEN 단백질이 세포 내에서 단백질의 기능(항염증 기능)을 나타내는지를 알아보고자 연구를 수행하였다.

<15> 먼저, 본 발명자들은 PEP-1-PTEN, PTEN-PEP-1 및 PEP-1-PTEN-PEP-1 융합단백질을 과대발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 발현벡터를 개발하였다. 이 발현벡터는 인간 PTEN cDNA, PEP 펩타이드 (21 아미노산) 그리고 6개의 히스티딘이 연속적으로 연결되어 있다. 이 발현벡터를 이용하여 PEP-1-PTEN, PTEN-PEP-1 및 PEP-1-PTEN-PEP-1 융합단백질을 대장균에서 과대발현시켜 자연상태로 Ni^{2+}-친화 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 정제하였다. PEP-1-PTEN, PTEN-PEP-1 및 PEP-1-PTEN-PEP-1의 과대발현은 상당히 높게 나타났으며, 이런 결과로 정제된 단백질의 양도 높게 나타났다. 웨스턴 블랏 분석으로 배양된 피부 세포에 정제된 PTEN 융합단백질이 농도 및 시간 의존적으로 세포에 운반되는 것을 확인하였다. 세포 내로 투과된 PTEN 융합단백질은 최소 세포 내에서 48시간 지속적으로 유지되었으며 PTEN 융합단백질은 배양된 세포뿐 아니라, 마우스의 피부조직에도 효율적으로 투과되었다. 또한 세포 내로 투과된 PTEN 융합단백질은 LPS(Lipopolysaccharide)에 의한 세포사 및 COX-2(Cyclooxygenase-2) 발현을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

<16> 이러한 결과는 PTEN 융합단백질이 세포 내로 투과가 잘 일어나고, 세포 내에서 PTEN 기능을 잘 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 이러한 PTEN 융합단백질은 피부암 및 아토피 피부염 등 피부 질환 치료 분야에 다양하게 응용될 가능성을 제시해 준다.

<17> PTEN 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 주사형태 또는 도포제로 제형화할 수 있다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다. PTEN 융합단백질을 함유한 약제학적 조성물은 암치료제로서 유용하며 특히 피부암 치료제, 아토피성 염증 치료제, 녹내장 여과 수술 후 섬유화 반흔 형성 억제제로서 유용하다.

<18> 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 비경구 방식 즉, 피하 투여, 근육 투여 또는 국소적용(topical application)할 수 있으며, 용량은 일일 투여량이 0.001㎍~10㎎/㎏의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

<19> 또한, 본 발명의 융합 단백질을 유효성분으로 하는 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 PTEN 융합 단백질을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.

<20> 뿐만 아니라, 본 발명의 융합 단백질은 화장료로서 이용할 수 있는데, pH 조절제, 향료, 유화제, 방부제 등을 필요에 따라 부가하여 통상의 화장료 제조 방법으로 화장수, 젤, 수용성 파우더, 지용성 파우더, 수용성 리퀴드, 크림 또는 에센스 등으로 제형화될 수 있다.

<21> 본 발명자들은 PTEN 융합 단백질을 마우스의 피부에 침투실험한 결과 진피층까지 원활하게 침투하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, PTEN 융합 단백질을 약제 조성물 및/또는 도포제(본 명세서에서 "피부 외용제"와 동일한 의미로 사용함) 조성물의 주요성분으로 이용할 수 있음을 밝혔다.

<22> 본 발명은 PTEN 단백질을 세포 내 또는 피부 내부로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 PTEN 단백질 분자의 세포 내 전달은 PTEN에 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인(hydrophobic domain), 라이신을 4개 이상 다수 포함하는 친수성 도메인(hydrophilic domain) 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서(spacer)로 구성된 수송 도메인이 공유결합된 세포투과성 수송도메인이 공유결합된 형태의 융합 단백질을 구성하여 수행된다. 세포투과성 수송도메인은 PTEN 단백질의 양 말단 즉, N- 말단 및/또는 C- 말단에 결합시켰다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 21개의 아미노산으로 구성되고, 서열번호 3과 같은 아미노산 서열로 이루어진 PEP-1 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 서열번호 3의 PEP-1 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, PEP-1의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 PEP-1 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인(hydrophobic domain), 라이신을 4개 이상 다수 포함하는 친수성 도메인(hydrophilic domain) 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서(spacer)로 구성된 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합 단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

<23> 구체적으로, 본 발명은 PTEN 융합 단백질, 이 융합 단백질을 제조하기 위한 재조합 뉴클레오타이드와 벡터, 융합 단백질을 포함하는 치료, 예방 목적의 약학 조성물, 피부 외용제 조성물 등에 관한 것이다.

<24> 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

<25> "PTEN 융합 단백질"이란 단백질 수송 도메인과 PTEN을 포함하며, 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 PTEN을 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 PEP-1 수송도메인이 결합된 방향에 따라 "PEP-1-PTEN"("PEP-PTEN"과 혼용함), "PTEN-PEP-1" 또는 "PEP-1-PTEN-PEP-1" 융합 단백질을 제조하여 실험하였다.

<26> 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

<27> 또한, "표적 세포"란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 전달되는 세포를 의미하는 것으로서 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 즉, 표적 세포는 체내 세포, 다시 말하여 살아있는 동물 또는 인간의 장기 또는 조직을 구성하는 세포 또는 살아있는 동물 또는 인간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물 세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.

<28> 본 명세서의 "단백질 수송 도메인"은 펩타이드, 단백질과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 펩타이드나 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말하며, 예를 들면 PEP-1 펩타이드(서열번호 3)를 말한다.

<29> 본 명세서의 "목표 단백질"은 PEP-1 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미한다.

<30> 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

<31> 본 발명은 15~30개의 아미노산으로 구성되고, 5개 이상의 트립토판을 포함하는 비친수성 도메인, 라이신을 다수 포함하는 친수성 도메인 및 상기 두 도메인을 분리시켜 주는 스페이서로 구성된 단백질 수송 도메인이 PTEN 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 도입성(cell-transducing) PTEN 융합 단백질에 관한 것이다. 또한, silent change에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다. 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합 단백질과 아미노산 서열 간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

<32> 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성 PTEN 융합 단백질이 서열번호 7, 서열번호 9 또는 서열번호 11의 아미노산

서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

<33> 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송도메인(protein transducing domain; "PTD")이 PTEN 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 한 개 이상 공유결합된 것을 특징으로 한다.

<34> 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성(cell-transducing) PTEN 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

<35> 또한, 본 발명은 상기 세포 도입성 PTEN 융합 단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

<36> 또한, 본 발명은 PTEN cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 세포도입성 융합 단백질을 코딩하는 서열번호 6번, 8번, 10번을 비롯한 재조합 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명의 범위는 서열번호 6번, 8번, 10번의 재조합 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 유전암호의 codon degeneracy에 의한 서열을 갖는 핵산분자들에도 미친다.

<37> 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 융합 단백질을 발현시키기 위하여 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포 도입성 융합 단백질을 발현시키는 벡터에 관한 것이다.

<38> 아래에서는 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 한정되는 것은 아니다. 특별히 본 실시예에서는 PTEN 융합단백질 중 "PEP-1-PTEN" 융합단백질을 예로 들어 설명하였으나, "PTEN-PEP-1" 및 "PEP-1-PTEN-PEP-1" 융합단백질 또한 PEP-1-PTEN과 동일하거나 유사한 발현 양상, 세포 침투성, 안정성, 시간 및 농도 의존적 침투성, 피부 조직 침투성을 나타내었음을 밝힌다.

<39> **<재료>**

<40> 제한 효소와 T4 DNA 라이게이즈(ligase)는 Promega(USA)에서 구입하였고, Pfu 폴리머라아제(polymerase)는 stratagene(USA)에서 구입하였다. Tat 올리고뉴클레오타이드는 Gibco BRL custom primer(USA)에서 합성하였다. IPTG는 Duchefa(Netherland)에서 구입하였다. pET-15b와 BL21(DE3) 플라스미드는 Novagen(USA)에서 구입하였고, Ni-나이트릴로트리아세트산 세파로즈 수퍼플로우(nitrilo- triactic acid sepharose superflow)는 Qiagen(Germany)에서 구입하였다. 사람 PTEN cDNA는 PCR 방법으로 사람 간 cDNA 라이브러리에서 분리하였다. 이외 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

<41> **실시예 1: 재조합 PEP-1-PTEN 융합단백질의 발현벡터 제조 및 형질변환**

<42> 기능을 가진 단백질을 세포 내로 침투시키는 기술을 개발하기 위하여 세포 내로 목표 단백질을 전달할 수 있는 융합 단백질 발현벡터를 제조하였고, PEP-1 펩타이드가 단백질을 세포 내로 전달하는 능력을 용이하게 분석하기 위하여 인간 PTEN 단백질을 선택하였다.

<43> 먼저, PEP-1-PTEN 융합단백질을 생산하기 위해 PEP-1 펩타이드(KETWWE TWWTEW SQP KKKRKV; 21 아미노산)가 포함된 pET-PEP 발현벡터를 제조하였다. PEP-1 펩타이드에 해당하는 두 종류의 올리고뉴클레오타이드(상위 쇄, 5'-TATGAAAGAAACCTGGTGGGAAACCTGGTGGACCGAATGGTCTCAGCCGAAAAAAAAACGTAAAGTGC-3'; 하위 쇄, 5'-TCGAGCACTTTACGTTTTTTTTTCGGCTGACACCATTCGGTCCACCAGGTTTCCCACCAGGTTTCTTTCC-3')를 *Nde I-Xho I* 제한효소로 자른 pET-15b에 결찰(ligation)하여 삽입하였다. 이어, 사람 PTEN의 cDNA의 서열을 기본으로 하여 두 종류의 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다. 정방향 프라이머는 5'-CTCGAGATGGCAGCCATCATCAAAGAGATC-3'로 *Xho I* 제한부위를 지니고 있으며, 역방향 프라이머는 5'-GGATCCTCAGACTTTTGTAATTTGTGTATG-3'로 *BamH I* 제한부위를 갖고 있다.

<44> 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)은 온열 순환 반응기(Perkin-Elmer, model 9600)에서 수행하였다. 반응 혼합액을 50㎕ 실리콘 튜브에 넣고 94℃에서 5분간 가열하였다. PCR 반응을 수행하였다. PCR 수행 후 아가로즈 젤 전기영동으로 반응물을 분리하고 이것을 TA 클로닝 벡터(Invitrogen, Sandiego, USA)에 결찰(ligation)한 다음, 컴피턴트 세포(competent cell)에 형질변환시키고 형질변환된 박테리아로부터 플라스미드를 알칼리 용균법으로 분리하였다. 사람 PTEN cDNA가 포함된 TA 벡터를 *Xho I*과 *BamH I*로 절단한 다음 PEP 발현 벡터에 삽입하였다. PEP-1-PTEN으로 형질변환된 *E. coli* BL21 (DE3)를 선택한 다음, 콜로니를 100㎖ LB 배지에 접종하고 IPTG(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 0.5mM를 배지 내에 첨가하여 재조합된 PEP-1-PTEN의 과대발현을 유도하였다. 과대발현된 PEP-1-PTEN은 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동과 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다.

<45> **실시예 2: PEP-1-PTEN 융합 단백질의 발현 및 정제**

<46> 본 연구실에서 제조한 인간 PTEN cDNA가 포함되어 있는 *E. coli* BL21 (DE3) 세포 (PEP-1-PTEN)를 암피실린이 포함된 LB 배지에 넣고 37℃에서 200 rpm으로 교반하며 배양하였다. 배양액 내의 박테리아 농도가 $O.D_{600}$ = 0.5~1.0을 나타낼 때 IPTG를 배지 내에 첨가하여 최종농도가 0.5mM와 1mM가 되게 한 다음 30℃에서 12 시간을 더 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리하여 모은 뒤 5㎖ 결합 완충액(5mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)을 넣고 초음파 분쇄기로 분쇄(sonication)하였다. 원심분리하여 상층액을 즉시 Ni^{2+}-니트릴로 트리아세트산 세파로즈 슈퍼 플로우(Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid sepharose super flow) 컬럼에 부하하고 10배 부피의 결합 완충액과 6배 부피의 세척 완충액(60mM 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 세척한 다음 용출 완충액(1M 이미다졸, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 융합 단백질을 용출하였다. 이어, 융합 단백질이 포함된 분획들을 모아 PD-10 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분획 중에 포함된 염분을 제거하였다.

<47> 정제된 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준물질로 사용하여 브래드포드 방법으로 측정하였다.

<48> **실시예 3: 피부 세포배양 및 PEP-1-PTEN 융합 단백질의 세포 투과**

<49> 피부세포는 37℃에서 95% 공기와 5% CO_2를 공급해주며 20mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 5mM $NaHCO_3$, 10% FBS(fetal bovine serum) 및 항생제(100㎍/㎖ 스트렙토마이신, 100U/㎖ 페니실린)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 배양하였다.

<50> PEP-1-PTEN 융합 단백질의 세포 내 투과를 관찰하기 위하여, 피부 세포를 6-웰 플레이트에서 4~6시간 동안 키운 뒤 10% FBS가 포함된 신선한 DMEM 배양액으로 교체하고, 재조합 PEP-1-PTEN을 농도 및 시간별로 배양액 내에 처리하였다. 처리 후 세포를 트립신-EDTA(Gibco BRL)로 처리하고 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; "PBS")로 충분히 세척하고 세포를 분쇄한 다음 세포 내로 투과된 PTEN의 양을 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다.

<51> **실시예 4: 웨스턴 블랏 분석**

<52> PEP-1-PTEN의 세포 내 투과를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏 방법을 수행하였다. 먼저 단백질은 자연상태로 정제하였다. 준비된 피부 세포에 PEP-1-PTEN(3μM)의 융합 단백질을 처리한 다음 1시간 후, 세포들만 모아서 웨스턴 블랏을 수행하였다. 세포 분쇄액 내의 단백질을 12% SDS 폴리아크릴아마이드 젤로 분리한 다음 젤에 있는 단백질을 니트로셀룰로스 멤브레인(nitrocellulose membrane; Amersham, UK)으로 전기이동시켰다. 단백질이 이동된 니트로셀룰로스 멤브레인을 5% 탈분유(non-dry milk)가 들어 있는 PBS로 블로킹하였다. 이어 멤브레인은 래빗 항-히스티딘 폴리클론 항체(Santacruze, USA, 1:1,000)로 1시간 처리하였다. 세척 후, 호스래디쉬 퍼옥시다아제-결합된 마우스 항-래빗 IgG 항체(1:10,000 희석)와 한 시간 반응시켰다. 최종적으로 ECL 킷트(ECL; Amersham) 을 이용하여 사람 PTEN 모노클론 항체에 반응하는 단백질 띠를 확인하였다.

<53> **실시예 5: 피부세포로 투과된 PEP-1-PTEN 융합 단백질의 안정성**

<54> 세포 내로 투과된 PEP-1-PTEN 융합 단백질의 세포 내 안정성을 측정하기 위하여, 피부세포를 6-웰 플레이트에서 4~6시간 동안 키운 뒤 FBS가 포함되지 않은 1㎖의 신선한 배양액으로 교체하고 재조합 PEP-1-PTEN 융합 단백질을 배양액 내에 처리하였다. 처리 한 시간 후 세포를 트립신-EDTA로 처리하고 PBS로 충분히 세척하였다. 이어 FBS가 포함된 배지를 넣고 계속 배양하면서 시간별로 세포를 모아 세포 내에 남아 있는 융합 단백질의 양을 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다.

<55> **실시예 6: 면역반응 억제 효과**

<56> LPS(Lipopolysaccharide)로 유도한 면역억제 효과를 측정하기 위해서 피부세포를 6-웰 플레이트에서 키운 뒤 재조합 PEP-1-PTEN 융합 단백질을 배양액 내에 1시간 전에 처리한 후, LPS를 투여하였다. 투여 후 COX(Cyclooxygenase)-2의 발현과 세포사멸을 웨스턴 블랏팅과 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 분석을 통하여 확인하였다.

<57> **실시예 7: 면역조직염색(Immunohistochemistry)**

<58> PEP-1-PTEN 융합 단백질이 피부 조직 내로 투과되는지를 확인하기 위해서 면역조직염색을 실시하였다. 실험동물은 수컷 ICR 마우스를 사용하였다. 실험동물은 질소와 산소 혼합가스에 들어있는 3% 이소플루란스

(isoflurance)로 마취시켰으며, 피부에 있는 털을 제거한 다음 PEP-1-PTEN 융합 단백질을 피부에 발라 한 시간 동안 처리하였다. 그 후 피부 조직을 냉동조직 절편으로 만들었다.

<59> 면역조직염색에 앞서 냉동조직 절편을 상온에서 30분간 건조한 후 37℃에서 2시간 이상 완전히 말린 다음 실험을 시작하였다. 조직 절편은 0.01M PBS로 10분간 완충시킨 후 다시 증류수로 10분간 세척하였다. 이후 7분씩 2회 PBS로 세척한 다음 조직 내의 내인성 퍼옥시다제를 제거하기 위해서 0.5% 과산화수소가 함유된 PBS 용액에서 20분간 반응시켰다. 이후 PBS로 7분씩 2회 세척한 후 비-특이적 반응을 방지하기 위하여 조직을 PBS에 들어있는 5% 정상 염소 혈청과 30분간 반응시켰다. 이후 과정은 통상적인 스트렙타비딘-바이오틴 퍼옥시다제(Streptavidin- biotin peroxidase) 법을 이용한 면역조직화학반응을 실시하였다.

<60> 1차 항체는 토끼 항-마우스 히스티딘(Santa cruz, USA)을 사용하였다. 면역조직화학반응에 이용된 모든 항체는 2% 정상 염소 혈청 및 0.1% triton X-100이 함유된 0.1M PBS(pH 7.4)에 희석하여 사용하였다. 피부 조직은 1차 항체를 1:500으로 희석하여 4℃에서 48시간 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체로 바이오틴 결합된 토끼 항-마우스 IgG(Vector, USA)를 1:200으로 희석하여 상온에서 2 시간 반응시킨 후 1:200으로 희석한 퍼옥시다제-결합된 스트렙타비딘(Vector, USA)으로 상온에서 2시간 반응시켰다. 이상 각 단계의 반응 후에는 PBS 용액으로 4~5차례 세척하였다.

<61> 항원항체반응이 끝난 조직은 0.03% 과산화수소와 0.05% DAB(3,3´- diaminobenzidine tetrachloride; Sigma, USA)가 함유된 트리스 완충액(pH 7.4)에서 1~5분간 발색하였다. 발색반응이 끝난 조직은 수세 후 수용성 봉입제인 크리스탈 마운트(crystal mount; Biomeda, USA)를 이용하여 봉입한 다음 현미경 관찰 후 사진촬영(Axioscope microscope; Carl Zeiss, Germany)을 하였다.

<62> **결과 1: PEP-1-PTEN 융합 단백질의 과대발현 및 정제**

<63> PEP-1-PTEN 융합 단백질을 과대발현시키기 위해 사람 PTEN cDNA, PEP 펩타이드(KETWWETWWTEW SQP KKKRKV; 21아미노산) 및 6개의 히스티딘이 연속적으로 포함되어 있는 PEP-1-PTEN 발현 벡터를 개발하였다(도 1).

<64> IPTG로 융합 단백질의 과대발현을 유도한 대장균 세포를 4℃에서 초음파 분쇄기로 파쇄한 다음 원심분리하여 상층액의 단백질을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 분리하였다. 도 2는 PEP-1-PTEN의 과대발현과 정제된 단백질을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색한 단백질 띠(도 2A)와 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다(도 2B). 도 2A의 레인 2는 0.5mM IPTG를 처리하여 과대발현된 융합단백질을 나타내고 있다.

<65> PEP-1-PTEN 융합 단백질은 N-말단에 6개의 히스티딘을 포함하고 있기 때문에 고정 금속-킬레이트 친화 크로마토그래피(immobilized metal-chelate affinity chromatography) 단일 단계로 융합 단백질을 자연상태로 순수하게 정제하였다. 또한 정제된 PEP-1-PTEN 융합 단백질을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하여 확인한 결과이다.

<66> 과대발현 및 정제된 PEP-1-PTEN 융합 단백질을 웨스턴 블랏팅으로 다시 한번 확인하였다. 도 2B에 나타낸 바와 같이 6x 히스티딘 항체에 반응하는 PEP-1-PEN 띠는 도 2A의 단백질 띠와 동일한 위치에서 관찰되었다.

<67> **결과 2: PEP-1-PTEN 융합 단백질의 피부세포 투과**

<68> 자연 상태에서 정제한 PEP-1-PTEN 융합 단백질의 피부 세포 투과가 시간 및 농도에 따라 어떻게 변화되는지를 관찰하였다. 도 3에 나타낸 것처럼 자연 상태의 PEP-1-PTEN는 시간 및 농도 의존적으로 피부 세포 내로 투과되는 것을 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다. 도 3A는 3μM PEP-1-PTEN을 시간에 따라, 도 3B는 농도에 따라 PEP-1-PTEN을 1시간 동안 세포배양액 내에 처리하였을 때의 결과이다. PEP-1-PTEN의 세포 내 투과 정도를 농도별로 관찰했을 때, 농도 의존적으로 세포 내로 투과된 PEP-1-PTEN의 양이 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 시간별로 관찰하였을 경우 처리 시간에 비례하여 세포 내로 투과된 PEP-1-PTEN의 양이 증가함을 확인하였다. 이러한 결과는 PEP-1-PTEN 융합 단백질이 시간 및 농도 의존적으로 세포 내 투과가 일어남을 말해준다.

<69> 피부 세포 내로 투과된 PEP-1-PTEN은 상당한 기간 동안 세포 내에서 안정성을 유지해야만 효과적으로 단백질 치료에 응용할 수 있다. 도 3C에 나타낸 바와 같이 세포 내로 투과된 PEP-1-PTEN은 시간에 따라 분해되어 단백질의 양이 점차 감소하였으나, 최소 24시간 동안 세포 내에서 존재함을 알 수 있었다. 따라서, 세포 내로 투과된 PEP-1-PTEN은 최소 24시간은 안정성을 유지하고 있기 때문에 유용하게 단백질치료에 응용할 수 있으리라 사료된다.

<70> **결과 3: PEP-1-PTEN 융합 단백질의 마우스 피부로 투과**

<71> 마우스 피부에도 PEP-1-PTEN이 효과적으로 투과가 일어나는지 알아보기 위해서 면역조직염색을 이용하여 확인하

였다. 도 4는 마우스 피부 조직을 염색한 결과로 50㎍ PEP-1-PTEN을 1시간 피부에 발라주고 염색하였을 경우 PEP-1-PTEN이 피부조직 안으로 투과된 모습을 잘 보여주고 있다. 투과된 PEP-1-PTEN은 피부조직의 상피세포 및 진피세포까지 투과함을 확인하였다.

<72> **결과 4: PEP-1-PTEN 융합 단백질의 생물학적 기능**

<73> 피부 세포 내로 투과된 융합 단백질은 그 고유한 활성을 유지해야만 이를 단백질 치료에 응용할 수 있다. 따라서, 세포 내로 투과된 융합단백질이 어느 정도 생물학적인 활성을 지니는지는 매우 중요한 문제이다. 따라서 정제된 PEP-1-PTEN 단백질의 생물학적 기능을 알아보기 위해 LPS에 의해 유발되는 COX-2 발현과 세포사를 MTT 분석을 이용하여 확인하였다. 정제한 PEP-1-PTEN 재조합 단백질은 농도별로 LPS에 의한 세포사 및 COX-2 발현을 억제함을 확인하였다(도 5, 도 6). 세포 내로 투과된 PEP-1-PTEN 융합 단백질이 효과적으로 작용하고 있음을 알 수 있었다. 따라서, 상기 결과 3 및 결과 4로부터 PTEN 단백질이 PTEN 단백질의 효능으로 잘 알려진 항암제로서의 기능, 염증 억제 기능 등이 생체 내에서 원활히 수행될 수 있을 것으로 예측된다.

도면의 간단한 설명

<74> 도 1은 PEP-1-PTEN 융합 단백질 발현 벡터의 개략도. PEP-1-PTEN 융합 단백질 발현 벡터는 벡터 pET-15b를 바탕으로 하여 구성되었다. 합성 PEP-1 올리고머는 pET-15b의 *Nde I*, *Xho I* 제한부위에, 그리고 사람 PTEN cDNA는 pET-15b의 *Xho I*, *BamH I* 제한부위에 삽입되었다. 발현은 IPTG를 가하여 유도되었다.

<75> 도 2는 PEP-1-PTEN 융합 단백질의 발현과 정제에 관한 사진이다. 세포의 단백질 추출물과 정제된 융합 단백질이 12% SDS-PAGE(A)로 분석되었고 항-래빗 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석되었다(B).

<76> 레인 1: 비유도(non-induced) PEP-1-PTEN

<77> 레인 2: 유도된 PEP-1-PTEN

<78> 레인 3: 정제된 PEP-1-PTEN

<79> 도 3은 PEP-1-PTEN 융합 단백질의 세포 도입을 웨스턴 블랏팅한 사진이다.

<80> (A) 3μM의 PEP-1-PTEN 융합 단백질을 배양 배지에 10~60분간 가했다.

<81> (B) 0.5~3μM PEP-1-PTEN 융합 단백질을 배양 배지에 60분간 가했다.

<82> (C) 3μM PEP-1-PTEN 융합 단백질로 1~48시간 전처리한 세포.

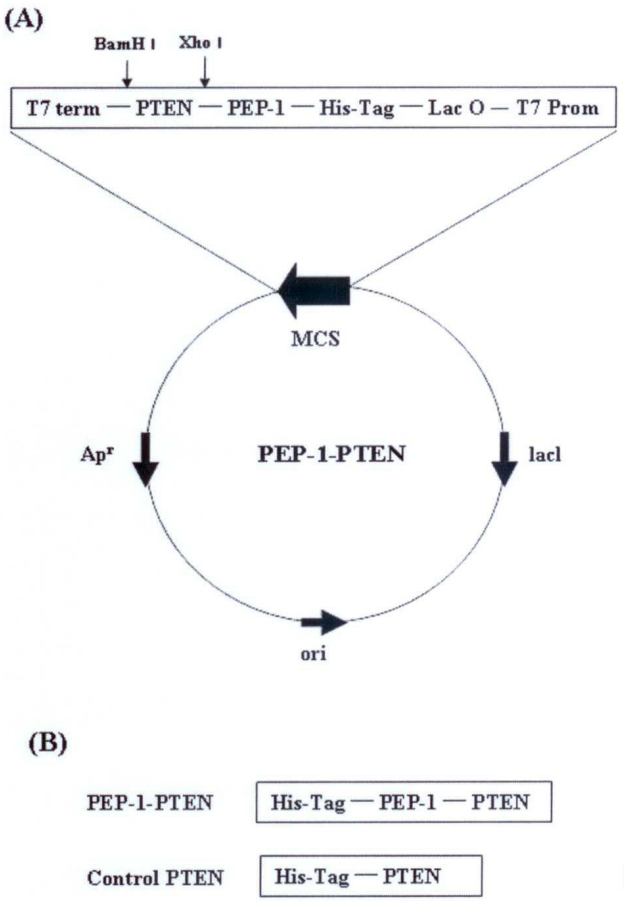
<83> 도 4는 PEP-1-PTEN 융합 단백질로 세포도입한 동물 피부를 조직화학 분석한 것이다. 50㎍의 PEP-1-PTEN 융합 단백질을 마우스 등 피부를 면도한 곳에 도포하고 60분간 처리하였다. 피부 조직의 동결 절편을 토끼 항-히스티딘 IgG(1:400)으로 면역염색한 후 바이오틴이 결합된 염소 항-토끼 IgG(1:200)로 염색하였다. 절편은 3,3'-다이아미노벤지딘(diaminobenzidine)으로 염색하여 액시오스코프 현미경으로 관찰하였다.

<84> 도 5는 세포로 투과된 PEP-1-PTEN 융합 단백질이 LPS로 유도된 COX-2의 발현을 억제하는 것을 나타내는 결과이다. 피부 세포를 3μM의 PEP-1-PTEN을 넣고 또는 넣지 않고 LPS에 노출시켰다.

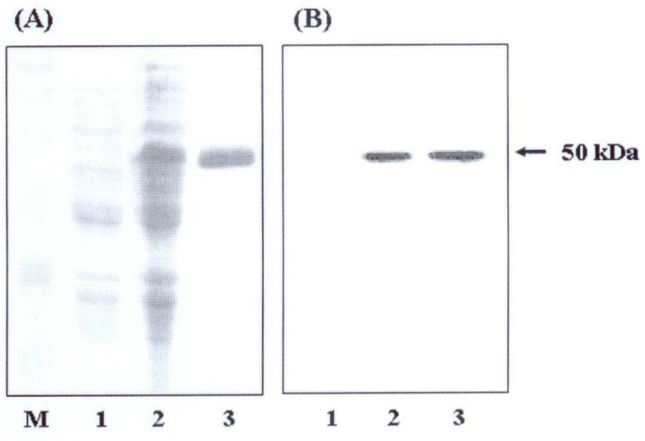
<85> 도 6은 피부 세포의 생존률에 대한 세포투과 PEP-1-PTEN 융합 단백질의 효과를 나타낸다. 한 시간 동안 0.5~3μM의 PEP-1-PTEN 융합 단백질로 전처리한 피부 세포를 LPS에 노출시켰다. 세포 생존률은 MTT를 이용하여 발색 분석으로 측정하였다.

도면

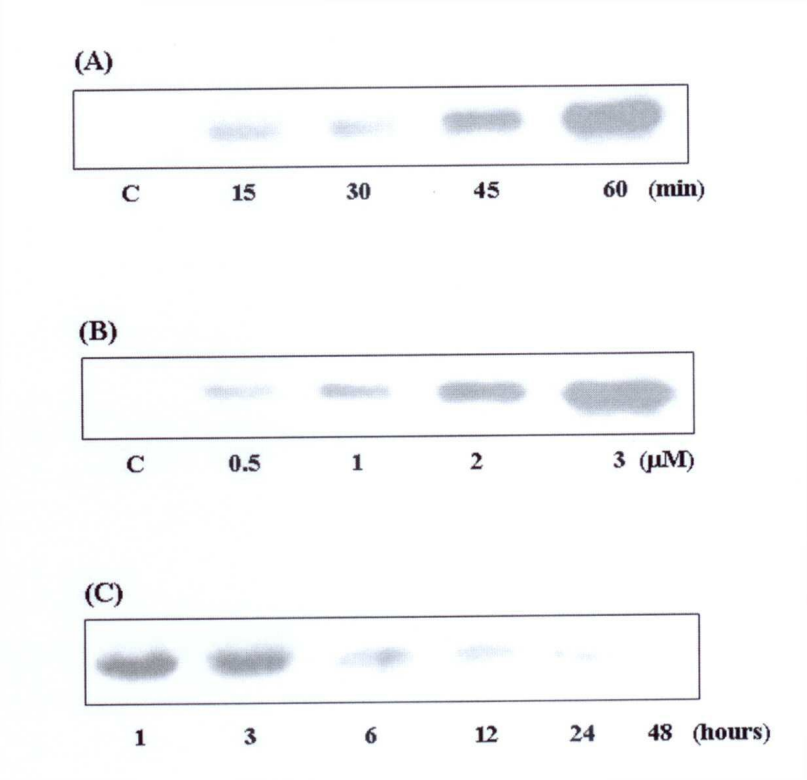
도면1


(A)
BamH I
Xho I
T7 term — PTEN — PEP-1 — His-Tag — Lac O — T7 Prom
MCS
Ap^r
PEP-1-PTEN
lacI
ori
(B)
PEP-1-PTEN
His-Tag — PEP-1 — PTEN
Control PTEN
His-Tag — PTEN

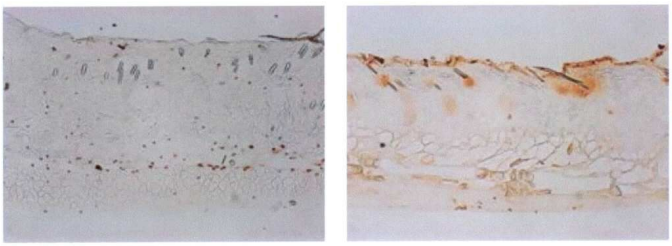
도면2


(A)
(B)
50 kDa
M
1
2
3
1
2
3

도면3


(A)
C
15
30
45
60 (min)
(B)
C
0.5
1
2
3 (μM)
(C)
1
3
6
12
24
48 (hours)

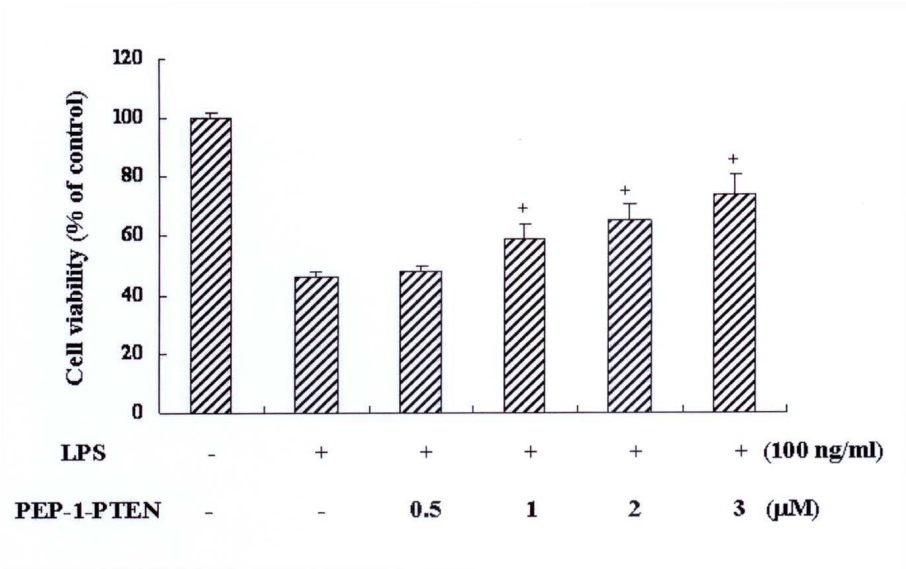
도면4


Control
PEP-1-PTEN

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
<120> Cell-transducing PTEN fusion protein

<130> hallymU-PEP-PTEN

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 68
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> top strand oligonucleotide coding PEP-1

<400> 1
tatgaaagaa acctggtggg aaacctggtg gaccgaatgg tctcagccga aaaaaaaacg 60

taaagtgc 68

<210> 2
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> bottom strand oligonucleotide coding PEP-1

<400> 2
tcgagcactt tacgtttttt tttcggctga caccattcgg tccaccaggt ttcccaccag 60

gtttctttcc 70

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> protein transducing domain called PEP-1

<400> 3
Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forwaed primer

<400> 4
ctcgagatgg cagccatcat caaagagatc 30

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 5
ggatcctcag acttttgtaa tttgtgtatg 30

<210> 6
<211> 1287
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant polynucleotide coding PEP-1-PTEN fusion protein

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1278)

<400> 6
atg aaa gaa acc tgg tgg gaa acc tgg tgg acc gaa tct cag ccg aaa 48
Met Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

```
aaa aaa cgt aaa gtg ctc gag atg aca gcc atc atc aaa gag atc gtt          96
Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val
             20                  25                  30

agc aga aac aaa agg aga tat caa gag gat gga ttc gac tta gac ttg         144
Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu
         35                  40                  45

acc tat att tat cca aac att att gct atg gga ttt cct gca gaa aga         192
Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg
     50                  55                  60

ctt gaa ggc gta tac agg aac aat att gat gat gta gta agg ttt ttg         240
Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu
 65                  70                  75                  80

gat tca aag cat aaa aac cat tac aag ata tac aat ctt tgt gct gaa         288
Asp Ser Lys His Lys Asn His Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu
                 85                  90                  95

aga cat tat gac acc gcc aaa ttt aat tgc aga gtt gca caa tat cct         336
Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro
            100                 105                 110

ttt gaa gac cat aac cca cca cag cta gaa ctt atc aaa ccc ttt tgt         384
Phe Glu Asp His Asn Pro Pro Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys
        115                 120                 125

gaa gat ctt gac caa tgg cta agt gaa gat gac aat cat gtt gca gca         432
Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala
    130                 135                 140

att cac tgt aaa gct gga aag gga cga act ggt gta atg ata tgt gca         480
Ile His Cys Lys Ala Gly Lys Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala
145                 150                 155                 160

tat tta tta cat cgg ggc aaa ttt tta aag gca caa gag gcc cta gat         528
Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp
                165                 170                 175

ttc tat ggg gaa gta agg acc aga gac aaa aag gga gta act att ccc         576
Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro
            180                 185                 190

agt cag agg cgc tat gtg tat tat tat agc tac ctg tta aag aat cat         624
```

```
Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His
        195                 200                 205

ctg gat tat aga cca gtg gca ctg ttg ttt cac aag atg atg ttt gaa          672
Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu
    210                 215                 220

act att cca atg ttc agt ggc gga act tgc aat cct cag ttt gtg gtc          720
Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val
225                 230                 235                 240

tgc cag cta aag gtg aag ata tat tcc tcc aat tca gga ccc aca cga          768
Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg
                245                 250                 255

cgg gaa gac aag ttc atg tac ttt gag ttc cct cag ccg tta cct gtg          816
Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val
            260                 265                 270

tgt ggt gat atc aaa gta gag ttc ttc cac aaa cag aac aag atg cta          864
Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu
        275                 280                 285

aaa aag gac aaa atg ttt cac ttt tgg gta aat aca ttc ttc ata cca          912
Lys Lys Asp Lys Met Phe His Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro
    290                 295                 300

gga cca gag gaa acc tca gaa aaa gta gaa aat gga agt cta tgt gat          960
Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp
305                 310                 315                 320

caa gaa atc gat agc att tgc agt ata gag cgt gca gat aat gac aag         1008
Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys
                325                 330                 335

gaa tat cta gta ctt act tta aca aaa aat gat ctt gac aaa gca aat         1056
Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn
            340                 345                 350

aaa gac aaa gcc aac cga tac ttt tct cca aat ttt aag gtg aag ctg         1104
Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu
        355                 360                 365

tac ttc aca aaa aca gta gag gag ccg tca aat cca gag gct agc agt         1152
Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser
```

```
    370                 375                 380

tca act tct gta aca cca gat gtt agt gac aat gaa cct gat cat tat        1200
Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr
385                 390                 395                 400

aga tat tct gac acc act gac tct gat cca gag aat gaa cct ttt gat        1248
Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp
                405                 410                 415

gaa gat cag cat aca caa att aca aaa gtc  tg aggatcc                    1287
Glu Asp Gln His Thr Gln Ile Thr Lys Val
            420                 425
```

<210> 7
<211> 426
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 7

```
Met Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Ser Gln Pro Lys
  1               5                  10                  15

Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val
             20                  25                  30

Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu
         35                  40                  45

Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg
     50                  55                  60

Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu
 65                  70                  75                  80

Asp Ser Lys His Lys Asn His Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu
                 85                  90                  95

Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro
            100                 105                 110

Phe Glu Asp His Asn Pro Pro Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys
        115                 120                 125
```

```
Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala
    130                 135                 140

Ile His Cys Lys Ala Gly Lys Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp
                165                 170                 175

Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro
            180                 185                 190

Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His
        195                 200                 205

Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu
    210                 215                 220

Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val
225                 230                 235                 240

Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg
                245                 250                 255

Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val
            260                 265                 270

Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu
        275                 280                 285

Lys Lys Asp Lys Met Phe His Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro
    290                 295                 300

Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp
305                 310                 315                 320

Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn
            340                 345                 350

Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu
```

```
        355                 360                 365

Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser
    370                 375                 380

Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr
385                 390                 395                 400

Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp
                405                 410                 415

Glu Asp Gln His Thr Gln Ile Thr Lys Val
            420                 425
```

<210> 8
<211> 1281
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide for PTEN-PEP-1 fusion protein

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1278)

<400> 8

```
atg aca gcc atc atc aaa gag atc gtt agc aga aac aaa agg aga tat          48
Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
  1               5                  10                  15

caa gag gat gga ttc gac tta gac ttg acc tat att tat cca aac att          96
Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile
             20                  25                  30

att gct atg gga ttt cct gca gaa aga ctt gaa ggc gta tac agg aac         144
Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn
         35                  40                  45

aat att gat gat gta gta agg ttt ttg gat tca aag cat aaa aac cat         192
Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His
     50                  55                  60
```

```
tac aag ata tac aat ctt tgt gct gaa aga cat tat gac acc gcc aaa          240
Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys
 65                  70                  75                  80

ttt aat tgc aga gtt gca caa tat cct ttt gaa gac cat aac cca cca          288
Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro
                85                  90                  95

cag cta gaa ctt atc aaa ccc ttt tgt gaa gat ctt gac caa tgg cta          336
Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu
            100                 105                 110

agt gaa gat gac aat cat gtt gca gca att cac tgt aaa gct gga aag          384
Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys
        115                 120                 125

gga cga act ggt gta atg ata tgt gca tat tta tta cat cgg ggc aaa          432
Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys
    130                 135                 140

ttt tta aag gca caa gag gcc cta gat ttc tat ggg gaa gta agg acc          480
Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr
145                 150                 155                 160

aga gac aaa aag gga gta act att ccc agt cag agg cgc tat gtg tat          528
Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr
                165                 170                 175

tat tat agc tac ctg tta aag aat cat ctg gat tat aga cca gtg gca          576
Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala
            180                 185                 190

ctg ttg ttt cac aag atg atg ttt gaa act att cca atg ttc agt ggc          624
Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly
        195                 200                 205

gga act tgc aat cct cag ttt gtg gtc tgc cag cta aag gtg aag ata          672
Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile
    210                 215                 220

tat tcc tcc aat tca gga ccc aca cga cgg gaa gac aag ttc atg tac          720
Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr
225                 230                 235                 240

ttt gag ttc cct cag ccg tta cct gtg tgt ggt gat atc aaa gta gag          768
```

```
Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu
                245                 250                 255

ttc ttc cac aaa cag aac aag atg cta aaa aag gac aaa atg ttt cac          816
Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His
            260                 265                 270

ttt tgg gta aat aca ttc ttc ata cca gga cca gag gaa acc tca gaa          864
Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu
        275                 280                 285

aaa gta gaa aat gga agt cta tgt gat caa gaa atc gat agc att tgc          912
Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys
    290                 295                 300

agt ata gag cgt gca gat aat gac aag gaa tat cta gta ctt act tta          960
Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu
305                 310                 315                 320

aca aaa aat gat ctt gac aaa gca aat aaa gac aaa gcc aac cga tac         1008
Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr
                325                 330                 335

ttt tct cca aat ttt aag gtg aag ctg tac ttc aca aaa aca gta gag         1056
Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu
            340                 345                 350

gag ccg tca aat cca gag gct agc agt tca act tct gta aca cca gat         1104
Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp
        355                 360                 365

gtt agt gac aat gaa cct gat cat tat aga tat tct gac acc act gac         1152
Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp
    370                 375                 380

tct gat cca gag aat gaa cct ttt gat gaa gat cag cat aca caa att         1200
Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile
385                 390                 395                 400

aca aaa gtc gga tcc atg aaa gaa acc tgg tgg gaa acc tgg tgg acc         1248
Thr Lys Val Gly Ser Met Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr
                405                 410                 415

gaa tct cag ccg aaa aaa aaa cgt aaa gtg  ta g                           1281
Glu Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
```

420 425

<210> 9
<211> 426
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 9
Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
1 5 10 15

Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile
20 25 30

Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn
35 40 45

Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His
50 55 60

Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys
65 70 75 80

Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro
85 90 95

Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu
100 105 110

Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys
115 120 125

Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys
130 135 140

Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr
145 150 155 160

Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr
165 170 175

Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala
180 185 190

Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly
195 200 205

Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile
210 215 220

Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr
225 230 235 240

Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu
245 250 255

Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His
260 265 270

Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu
275 280 285

Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys
290 295 300

Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu
305 310 315 320

Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr
325 330 335

Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu
340 345 350

Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp
355 360 365

Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp
370 375 380

Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile
385 390 395 400

Thr Lys Val Gly Ser Met Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr
405 410 415

Glu Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

420 425

<210> 10
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> polynucleotide for PEP-PTEN-PEP fusion protein

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1347)

<400> 10

```
atg aaa gaa acc tgg tgg gaa acc tgg tgg acc gaa tct cag ccg aaa          48
Met Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Ser Gln Pro Lys
  1               5                  10                  15

aaa aaa cgt aaa gtg ctc gag atg aca gcc atc atc aaa gag atc gtt          96
Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val
             20                  25                  30

agc aga aac aaa agg aga tat caa gag gat gga ttc gac tta gac ttg         144
Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu
         35                  40                  45

acc tat att tat cca aac att att gct atg gga ttt cct gca gaa aga         192
Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg
     50                  55                  60

ctt gaa ggc gta tac agg aac aat att gat gat gta gta agg ttt ttg         240
Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu
 65                  70                  75                  80

gat tca aag cat aaa aac cat tac aag ata tac aat ctt tgt gct gaa         288
Asp Ser Lys His Lys Asn His Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu
                 85                  90                  95

aga cat tat gac acc gcc aaa ttt aat tgc aga gtt gca caa tat cct         336
Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro
            100                 105                 110
```

```
ttt gaa gac cat aac cca cca cag cta gaa ctt atc aaa ccc ttt tgt          384
Phe Glu Asp His Asn Pro Pro Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys
        115                 120                 125

gaa gat ctt gac caa tgg cta agt gaa gat gac aat cat gtt gca gca          432
Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala
    130                 135                 140

att cac tgt aaa gct gga aag gga cga act ggt gta atg ata tgt gca          480
Ile His Cys Lys Ala Gly Lys Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala
145                 150                 155                 160

tat tta tta cat cgg ggc aaa ttt tta aag gca caa gag gcc cta gat          528
Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp
                165                 170                 175

ttc tat ggg gaa gta agg acc aga gac aaa aag gga gta act att ccc          576
Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro
            180                 185                 190

agt cag agg cgc tat gtg tat tat tat agc tac ctg tta aag aat cat          624
Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His
        195                 200                 205

ctg gat tat aga cca gtg gca ctg ttg ttt cac aag atg atg ttt gaa          672
Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu
    210                 215                 220

act att cca atg ttc agt ggc gga act tgc aat cct cag ttt gtg gtc          720
Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val
225                 230                 235                 240

tgc cag cta aag gtg aag ata tat tcc tcc aat tca gga ccc aca cga          768
Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg
                245                 250                 255

cgg gaa gac aag ttc atg tac ttt gag ttc cct cag ccg tta cct gtg          816
Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val
            260                 265                 270

tgt ggt gat atc aaa gta gag ttc ttc cac aaa cag aac aag atg cta          864
Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu
        275                 280                 285

aaa aag gac aaa atg ttt cac ttt tgg gta aat aca ttc ttc ata cca          912
```

```
Lys Lys Asp Lys Met Phe His Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro
    290                 295                 300

gga cca gag gaa acc tca gaa aaa gta gaa aat gga agt cta tgt gat          960
Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp
305                 310                 315                 320

caa gaa atc gat agc att tgc agt ata gag cgt gca gat aat gac aag         1008
Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys
                325                 330                 335

gaa tat cta gta ctt act tta aca aaa aat gat ctt gac aaa gca aat         1056
Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn
            340                 345                 350

aaa gac aaa gcc aac cga tac ttt tct cca aat ttt aag gtg aag ctg         1104
Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu
        355                 360                 365

tac ttc aca aaa aca gta gag gag ccg tca aat cca gag gct agc agt         1152
Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser
    370                 375                 380

tca act tct gta aca cca gat gtt agt gac aat gaa cct gat cat tat         1200
Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr
385                 390                 395                 400

aga tat tct gac acc act gac tct gat cca gag aat gaa cct ttt gat         1248
Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp
                405                 410                 415

gaa gat cag cat aca caa att aca aaa gtc gga tcc atg aaa gaa acc         1296
Glu Asp Gln His Thr Gln Ile Thr Lys Val Gly Ser Met Lys Glu Thr
            420                 425                 430

tgg tgg gaa acc tgg tgg acc gaa tct cag ccg aaa aaa aaa cgt aaa         1344
Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys
        435                 440                 445

gtg    tag      1350
Val
```

<210> 11
<211> 449

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 11

```
Met Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Ser Gln Pro Lys
  1               5                  10                  15

Lys Lys Arg Lys Val Leu Glu Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val
             20                  25                  30

Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu
         35                  40                  45

Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg
     50                  55                  60

Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu
 65                  70                  75                  80

Asp Ser Lys His Lys Asn His Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu
                 85                  90                  95

Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro
            100                 105                 110

Phe Glu Asp His Asn Pro Pro Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys
        115                 120                 125

Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala
    130                 135                 140

Ile His Cys Lys Ala Gly Lys Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp
                165                 170                 175

Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro
            180                 185                 190

Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His
        195                 200                 205

Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu
```

```
    210                 215                 220

Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val
225                 230                 235                 240

Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg
                245                 250                 255

Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val
            260                 265                 270

Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu
        275                 280                 285

Lys Lys Asp Lys Met Phe His Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro
    290                 295                 300

Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp
305                 310                 315                 320

Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn
            340                 345                 350

Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu
        355                 360                 365

Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser
    370                 375                 380

Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr
385                 390                 395                 400

Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp
                405                 410                 415

Glu Asp Gln His Thr Gln Ile Thr Lys Val Gly Ser Met Lys Glu Thr
            420                 425                 430

Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys
        435                 440                 445
```

Val