



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0117324
(43) 공개일자 2014년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0115369(분할)
(22) 출원일자 2014년09월01일
심사청구일자 2014년09월01일
(62) 원출원 특허 10-2013-0028118
원출원일자 2013년03월15일
심사청구일자 2013년03월15일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
김정호
경기 하남시 대청로116번길 30, 117동 1202호 (창우동, 은행쌍용아파트)
임보배
경기도 이천시 대월면 경충대로2003번길 25, A동 105호(유호아파트)
김아영
대전광역시 중구 산성동 323-32 동양그린빌 401호
(74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 6 항

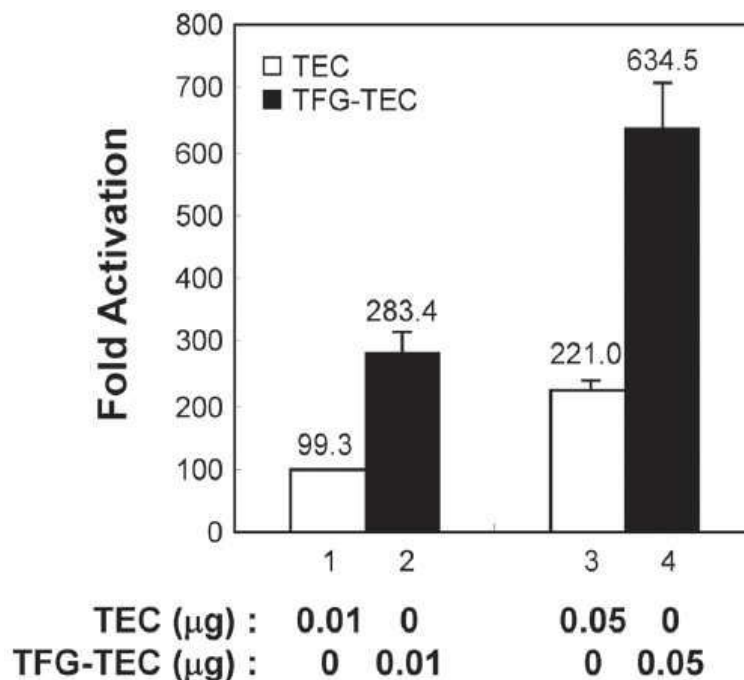
(54) 발명의 명칭 TFG-TEC 융합 컨스트럭트를 이용한 중앙 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 TFG-TEC 융합 단백질의 신규한 전사활성능 및 전이활성능을 이용한 중앙 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법 및 이의 약제학적 조성물, 그리고 TFG(NTD)를 이용한 전사활성 촉진용 발현 벡터 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질은 TEC와 동일한 서열 특이성을 가질 뿐 아니라, TEC보다 더욱 우

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5b



수한 전사활성 촉진능을 가진다. 또한, 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질 내 TFG(NTD)는 강력한 전이활성 도메인(transactivation domain)으로 기능하고, 상기 TFG(NTD)의 PB1 도메인 및 SPYGQ-풍부 부위(SPYGQ-rich regions)가 부분적인 전이활성(partial transactivation)을 가진다. 그 결과, 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질은 TEC에 의해 조절받는 것으로 알려진 다운스트림 유전자들(예컨대, *Skp2*, *L-Myc*, *SOCS2* 또는 *STAT-3*)의 발현을 촉진시킨다. 따라서, TFG-TEC 융합 유전자의 발현을 억제시키거나 또는 TFG-TEC 융합 단백질의 활성을 억제시키는 물질에 대한 스크리닝 방법 및 이를 이용한 약제학적 조성물은 종양 질환, 질병 또는 상태의 예방 또는 치료에 유용하게 적용될 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0012545

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자 지원사업

연구과제명 인간 extraskeletal myxoid chondrosarcoma 표적분자로서의 TFG-TEC 기능연구

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 프로모터; (b) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 서열목록 제4서열의 TFG(NTD)-인코딩 뉴클레오타이드 서열; (c) 상기 TFG(NTD)-인코딩 뉴클레오타이드 서열의 N-말단 또는 C-말단에 결합된 전사 활성인자(transcription activator)-인코딩 뉴클레오타이드 서열; 및 (d) 터미네이터(terminator)를 포함하는 전사활성 촉진용 발현 벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 전사 활성인자(transcription activator)는 DNA-결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 전사활성 촉진용 발현 벡터.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 DNA-결합 도메인은 TEC, GAL4, GCN4, HAP1, ADR1, SWI5, STE12, MCM1, YAP1, ACE1, CUP2, XYR1, PPR1, ARG81, LAC9, QA1F, VP16 또는 포유동물 핵 수용체 단백질의 DNA-결합 도메인인 것을 특징으로 하는 전사활성 촉진용 발현 벡터.

청구항 4

제 1 항의 발현 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 5

(a) (i) 프로모터; 및 (ii) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 서열목록 제4서열의 TFG(NTD)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 전이활성 모이어티(transactivation moiety); 및 (b) 상기 TFG(NTD)의 N-말단 또는 C-말단에 결합된 전사 활성인자(transcription activator)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA-결합 모이어티(DNA-binding moiety)를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 전사활성 촉진용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 전사 활성인자 내 DNA-결합 도메인에 의해 결합되는 보존 서열을 포함하는 프로모터를 가지는 유전자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 전사활성 촉진용 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 TFG-TEC 융합 단백질의 신규한 전사활성능 및 전이활성능, 그리고 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염색체 전좌(chromosome translocation)는 한 염색체의 단편이 떨어져 나와 다른 염색체로 이동하는 과정으로 종양 유전자(oncogenes)를 만들거나 암(human cancers)을 유발하는 주된 기작들 중 하나이다(1). 사람의 외골격 점액성 연골육종(extraskelatal myxoid chondrosarcomas, EMCs)은 특정 염색체 이상에 의해 나타나는 연부

조직 종양(soft tissue tumors)로, 조직학적으로 불분명한 기원이지만 주로 근육 조직(musculature)에서, 가장 빈번하게는 허벅다리 및 무릎의 근육 조직에서 발생한다(2-4). 대부분의 인간 EMC 환자들은 특징적인 염색체 전좌인 t(9;22)(q22;q12) 또는 t(9;17)(q22;q11.2)를 수반하는 데, 이는 9q22에 위치한 TEC(Translocated in Extraskelatal Chondrosarcomas) 유전자와 22q12에 위치한 EWS(Ewings sarcoma) 유전자 또는 17q12.2에 위치한 hTAF_{II}68(human TATA-binding protein-associated factor II 68) 유전자를 포함한다(5, 6). 최근에, 일부 EMC 환자들이 3q11-q12 위치 내 TFG(TRK fused gene) 유전자와 9q22 위치 내 TEC 유전자를 포함하는 t(3;9)(q11-q12;q22)의 염색체 전좌를 동반하는 것으로 밝혀졌다(7).

[0003] 원래 TFG 유전자는 사람의 갑상선 유두 암종(papillary thyroid carcinoma)에서 NTRK1 유전자의 융합 파트너로서 동정되었으며(8), 역형성 대세포 림프종(anaplastic large-cell lymphomas) 환자에서는 ALK 유전자와 함께 다른 염색체 전좌에도 포함된다(9). TFG 유전자는 사람의 3번 염색체의 장완(q-arm)에 위치하고 항상 발현되는 세포질 단백질을 인코딩한다(8). TFG cDNA의 총 길이는 1,677 bp로, Phox와 Bem1p(PB1) 같은 잠재적인 기능성 도메인들, 하나의 CC(coiled coil) 도메인 및 SPYQG(serine, proline, tyrosine, glycine, glutamine)-풍부 부위(rich region)을 포함하는 400개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 인코딩한다(10). 흥미롭게도, TFG 단백질은 NF- κ B 핵심 조절인자와 TRAF 패밀리의 멤버-관계된 NF- κ B 활성화단백질들과 상호작용하는 데, 이는 TFG 단백질이 NF- κ B 조절에 핵심 역할을 한다는 것을 의미한다(11). 하지만, 정상세포에서의 TFG 단백질 기능은 현재 알려져 있지 않다.

[0004] TEC 유전자는 래트 NOR-1 수용체 유전자의 인간 상동물(homologue)로(12), 스테로이드/갑상선 호르몬 수용체 유전자 슈퍼패밀리에 속하는 신규한 고아핵수용체(orphan nuclear receptor)를 인코딩한다(2, 4). 또한, TEC 유전자는 CHN(2) 및 MINOR(13)로도 불리며 9q22에 위치한다(14). TEC 유전자는 인간 EMC 환자들에서 EWS 유전자의 융합 파트너로서 초기에 동정되었다(4). TEC 유전자는 약 40 kb에 걸쳐 존재하며 8개의 엑손을 가지는데, 이중 엑손 1 및 엑손 2는 성숙한 TEC mRNA의 5'-UTS(untranslated sequence)에 해당한다(14). 비록 TEC 유전자의 생물학적 기능이 불명확할 지라도, 지속적인 TEC 유전자의 발현이 흉선세포들에서 현저한 세포 사멸을 초래(15)하는 데, 이는 상기 유전자가 다운스트림 타겟 유전자들의 조절을 통해 세포 증식에 포함될 수 있다는 것을 의미한다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 염색체 이상(예컨대, 염색체 전좌 또는 염색체 재배열)에 의해 유발되는 종양 질환(예를 들어, 외골격 점액성 연골육종(extraskelatal myxoid chondrosarcomas, EMCs))의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 TFG-TEC 융합 단백질이 모(parental) TEC 단백질의 DNA 결합 서열과 구별할 수 없을 정도의 서열 특이성을 가지는 DNA-결합 핵 단백질이며, 상기 TFG-TEC 융합 단백질 내 TFG(NTD)가 모 TEC 단백질보다 더욱 증가된 전사 활성화능(transcriptional activation potentials)을 유도하는 전이활성 도메인(transactivation domain)으로 기능한다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 종양 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 전사활성 촉진용 발현 벡터를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상술한 발현 벡터로 형질전환된 세포를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 전사활성 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 종양 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) TFG-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 TEC-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 세포에서 TFG-TEC 융합 유전자의 발현 또는 TFG-TEC 융합 단백질의 활성을 분석하는 단계로서, 상기 시험물질이 상기 TFG-TEC 융합 유전자의 발현 또는 상기 TFG-TEC 융합 복합체의 전사활성을 억제시키면 종양 질환의 치료제로 판단되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

[0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) (i) 프로모터에 작동적으로 연결된 TFG-TEC 융합 단백질-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터; 및 (ii) 상기 TFG-TEC 융합 단백질에 의해 양성적으로(positively) 조절되는 프로모터에 작동적으로 연결된 리포터 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 형질전환된 숙주 세포에서 상기 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계로, 상기 시험물질이 상기 TFG-TEC 융합 단백질에 의한 전사활성을 억제하면 종양 질환의 치료제로 판단되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

[0015] 본 발명자들은 염색체 이상(예컨대, 염색체 전좌 또는 염색체 재배열)에 의해 유발되는 종양 질환(예를 들어, 외골격 점액성 연골육종)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 TFG-TEC 융합 단백질이 모 TEC 단백질의 DNA 결합 서열과 구별할 수 없을 정도의 서열 특이성을 가지는 DNA-결합 핵 단백질이며, 상기 TFG-TEC 융합 단백질 내 TFG(NTD)가 모 TEC 단백질보다 더욱 증가된 전사 활성능을 유도하는 전이활성 도메인으로 기능한다는 사실을 발견하였다.

[0016] 염색체 전좌(chromosomal translocations)는 존재하는 유전자들의 활성화 또는 신규한 융합 단백질들의 창출을 통해 암을 야기한다. 즉, 균형성 재배열(balanced rearrangement; 예컨대, 전좌 또는 역위) 및 유전체 불균형(결실, 중복 또는 증폭)을 포함하는 대규모 유전체 이상은 암에서 통상적이며, 종양발생에서 중추적 역할을 한다.

[0017] 염색체 전좌에 의해 영향받는 유전자들은 크게 2개의 그룹으로 분류된다: (a) 이동된 염색체 상에서 더 강한 발현을 강제받는 원암유전자들(proto-oncogenes; Enforced gene product expression); 및 (b) 전좌점(breakpoint)이 2개의 염색체 상에 존재하는 영향받는 유전자들의 인트론에 존재하여 염색체 전좌에 의해 형성되는 유전자 융합체들(gene fusion expression). 특히, 후자의 경우가 염색체 전좌에서 더욱 보편적이다. 유전자 융합체들은 세포 형태에 따라 예외적이거나 또는 매우 빈번하게 발견되는 데, 예를 들어 MLL-MLLT3 융합 유전자 및 FUS-CHOP 융합 유전자는 각각 급성 골수성 백혈병의 골수성 세포들 및 지방육종의 지방세포들에 국한된다.

[0018] 통상적으로, 균형성 전좌 및 유전자 융합체는 육종, 백혈병 및 림프종을 포함하는 혈액 및 중간엽 종양에서 종종 관찰되었으며(Rabbits, T. H., Nature 372(6502): 143-149(1994)), 암종과 같은 상피 종양에서는 덜 관찰되었다. 최근 들어, 종양발생 유전자 융합체가 전립선(Tomlins, S. A., *et al.*, Science 310(5748): 644-648(2005)), 갑상선(Bongarzone, I., *et al.*, Cancer Res. 54(11): 2979-2985(1994); Kroll, T. G., *et al.*, Science 289(5483): 1357-1360(2000)), 및 폐(Soda, M., *et al.*, Nature 448(7153): 561-566(2007))의 암종에서 확인되었는데, 이는 상기 종양발생 유전자 융합체가 암종에서 매우 빈번하게 발생한다는 것을 보여준다. 예를 들어, 재발성 염색체 전좌는 많은 백혈병, 림프종 및 육종(예컨대, 간엽성 종양들)에서 특징적으로 발견된다. 백혈병 및 림프종에서의 염색체 전좌는 면역글로블린 또는 T-세포-수용체 유전자 재배열(rearrangement)의 정상 과정의 파괴로부터 초래되어 정상적인 염색체 내(intra-chromosomal) 재배열보다는 오히려 염색체 간(inter-chromosomal)의 재배열을 야기한다. 염색체 전좌는 비-림프구성 세포 형태들, 특히 육종들에서 높은 빈도로 발생하고 몇몇 염색체 전좌들은 상피성 종양에서 보고되었다.

[0019] 본 발명은 3q11-q12 위치 내 TFG(TRK fused gene) 유전자와 9q22 위치 내 TEC 유전자를 포함하는 t(3;9)(q11-q12;q22)의 염색체 전좌를 통해 발현되는 TFG-TEC 융합 단백질이 인간 EMC 환자들에서 자주 발견된다는 사실에 기초한다.

- [0020] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 상술한 TFG-TEC 융합 단백질은 TFG의 6번째 인트론과 TEC의 2번째 인트론 간의 염색체 전좌에 의해 ${}^1\text{TFG(NTD)}^{273}\text{-Asp-}{}^1\text{TEC}^{626}$ 로 이루어진다. 상술한 Asp(D) 아미노산 잔기는 염색체 전좌를 통해 TFG의 전좌점에서 유래된 G 뉴클레오타이드와 TEC의 전좌점에서 유래된 A 및 T 뉴클레오타이드가 만나면서 형성되는 아미노산 잔기이다.
- [0021] 본 발명자들은 상기 TFG-TEC 단백질이 모 TEC 단백질의 서열 특이성과 구별할 수 없는 서열 특이성으로 DNA에 결합하는 핵 단백질이고 상기 융합 단백질 내 TFG(NTD)가 강력한 전이활성인자(transactivator)로 기능한다는 사실을 발견하였으며, 이에 기초하여 상기 TFG(NTD)를 이용한 종양 질환의 예방 또는 치료용 물질의 개발에 적용하였다.
- [0022] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질 내 TFG(NTD)는 전이활성 도메인(transactivation domain)으로 기능하고, 상기 TFG(NTD)의 PB1 도메인 및 SPYGQ-풍부 부위(SPYGQ-rich regions)는 부분적인 전이활성(partial transactivation)을 가진다.
- [0023] 본 발명에 따르면, 우선 TFG-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 TEC-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을 접촉시킨다. 본 발명의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포는 특별하게 제한되지 않으며, 구체적으로는 293T 세포를 포함한다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 TFG-TEC 융합 유전자의 발현 또는 상기 융합 단백질의 활성화에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화학물질, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA), shRNA(small hairpin RNA 또는 short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험물질이 화학물질인 경우, 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 세포 또는 조직 배양물)일 수 있다. 시험물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann, *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carell, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop, *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 명세서에서 용어 "상보적(complementary)"은 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건, 바람직하게는 생리학적 조건 하에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 타겟(예컨대, TFG-TEC 융합 유전자)에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하는 것으로 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기 서열을 가질 수 있으며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 보다 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 보다 구체적으로는 8 내지 60 염기이고, 가장 구체적으로는 10 내지 40 염기이다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자 치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다(Degot S, *et al.*, 2002; Degot S, *et al.*, 2004; Ballut L, *et al.*, 2005).
- [0027] 본 발명에서 이용될 수 있는 siRNA 분자는, 센스 가닥(예를 들어, TFG-TEC 융합 유전자 mRNA 서열에 상응하는

(corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(예를 들어, TFG-TEC 융합 유전자 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 본 발명에서 이용될 수 있는 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다.

[0028] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 구체적으로는, 전체 길이는 10 내지 100 염기, 보다 구체적으로는 15 내지 80 염기, 그리고 보다 더 구체적으로는 20 내지 70 염기이다.

[0029] 본 발명에서 용어 "shRNA(small hairpin RNA 또는 short hairpin RNA)"는 견고한 헤어핀 턴을 만드는 RNA의 서열을 나타내며, 이는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 사일런스시키는 데 이용될 수 있다. shRNA는 세포 도입용 벡터를 이용하여 shRNA를 발현할 수 있는 U6 프로모터를 주로 이용한다. 이러한 벡터는 항상 딸세포로 전달되어 유전자 사일런싱이 유전될 수 있도록 한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 기작(machinery)인 siRNA로 분해되어 RNA-유도 사일런싱 복합체(RNA-induced silencing complex)에 결합된다. 상술한 복합체는 이에 결합된 siRNA에 상응하는(matched) mRNA에 결합하여 분해시킨다. shRNA는 RNA 폴리머라제 III에 의해 전사되며, 포유동물 세포에서 shRNA 생산은 세포가 shRNA를 바이러스 공격으로 인식하여 방어 수단을 찾는 것처럼 인터페론 반응을 야기시킬 수도 있다. 또한, shRNA는 식물 및 다른 시스템에서도 이용될 수 있으며 U6 프로모터가 반드시 필요한 것은 아니다. 식물의 경우에는 매우 강력한 연속적인 발현 능력을 보유한 전통적인 프로모터인 CaMV(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터가 이용될 수 있다.

[0030] 본 명세서의 용어 "마이크로RNA(microRNA, miRNA)"는 21-25개의 뉴클레오타이드의 단일가닥 RNA 분자로서 mRNA(messengerRNA)의 3-UTR에 결합하여 진행생물의 유전자 발현을 제어하는 물질을 나타낸다(Bartel DP, *et al.*, Cell, 23;116(2): 281-297(2004)). miRNA의 생성은 Drosha(RNaseIII type 효소)에 의해 스템-루프 구조의 전구체 miRNA(pre-miRNA)로 만들어지고, 세포질로 이동하여 다이서(Dicer)에 의해 절단되어 성숙한 miRNA로 만들어진다[Kim VN, *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol., 6(5): 376-385(2005)]. 상술한 바와 같이 제조된 miRNA는 표적단백질의 발현을 조절함으로써 발생, 세포증식 및 사멸, 지방대사, 종양형성 등에 관여한다[Wienholds E, *et al.*, Science, 309(5732): 310-311(2005); Nelson P, *et al.*, Trends Biochem Sci., 28: 534-540(2003); Lee RC, *et al.*, Cell, 75: 843-854(1993); 및 Esquela-Kerscher A, *et al.*, Nat Rev Cancer, 6: 259-269(2006)].

[0031] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수 있다(Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-54(1963); Stewart, *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).

[0032] 이어, 시험물질이 처리된 세포에서 TFG-TEC 융합 유전자의 발현 또는 TFG-TEC 융합 단백질의 활성을 측정한다. 발현량 및 활성의 측정은 하기 기재한 바와 같이 실시할 수 있으며, 측정 결과, 본 발명의 마커인 융합 유전자의 발현 또는 융합 단백질의 활성이 억제되는 경우에 상기 시험물질은 종양 질환의 예방 또는 치료용 물질로 판정될 수 있다.

[0033] 본 발명에서 이용되는 TFG-인코딩 뉴클레오타이드 서열, TEC-인코딩 뉴클레오타이드 서열, TFG-TEC 융합 유전자-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 TFG(NTD)-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열목록 제1서열(GenBank Accession No. NM_001007565.2), 서열목록 제2서열(GenBank Accession No. NM_006981.3), 서열목록 제3서열(GenBank Accession Nos. NM_001007565.2 및 NM_006981.3의 융합 서열) 및 서열목록 제4서열(GenBank Accession No. NM_001007565.2의 일부 서열)로 예시되어 있으며, 각 뉴클레오타이드 서열로부터 발현되는 단백질들의 아미노산 서열은 서열목록 제5서열(GenBank Accession No. NP_001007566.1), 서열목록 제6서열(GenBank Accession No. NP_008912.2), 서열목록 제7서열(GenBank Accession Nos. NP_001007566.1 및 NP_008912.2의 융합 서열) 및 서열목록 제8서열(GenBank Accession No. NP_001007566.1의 일부 서열)에 기재되어 있다.

[0034] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 융합 유전자의 발현은 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 검출될 수 있다. 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머는 유전자 증폭 반응(amplification reactions)에 이용된다.

[0035] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 본 명세서에 기재된 용어 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어

있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 멀티플렉스 PCR(McPherson and Moller, 2000), 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification, TMA; WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication; WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction, CP-PCR; 미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR; 미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification, NASBA; 미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호 및 제6,063,603호) 및 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)을 포함하나, 이에 한정되지는 않으며 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제 5,242,794호, 제5,494,810호, 제4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머"는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 구체적으로, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0037] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정된다. 본 명세서의 용어 "어닐링" 또는 "프라이밍"은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일 부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.

[0038] 본 발명의 방법을 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 분석 대상(예컨대, 293T 세포 또는 TFG-TEC 양성 EMC 세포)에서 mRNA를 추출하여 검출하는 것이다. 따라서, 본 발명은 원칙적으로 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다.

[0039] mRNA를 얻기 위하여, 시료(구체적으로는, 세포)에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C., *et al.*, Plant Mol. Biol. Rep., 9: 242(1991); Ausubel, F. M., *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P., *et al.*, Anal. Biochem. 162: 156(1987)). 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 진핵세포로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: PNAS USA, 85: 8998(1988); Libert F, *et al.*, Science, 244: 569(1989); 및 Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다.

[0040] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.

[0041] 본 명세서 용어 "혼성화(hybridization)"는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다.

혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다. 용어 "어닐링"과 "혼성화"는 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용된다.

- [0042] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I의 클레나우 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis*, *Pyrococcus furiosus*(Pfu), *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* 및 *Thermosipho africanus*의 DNA 중합효소를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 증폭 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서 어닐링은 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.
- [0045] 따라서, 본 발명의 방법을 cDNA를 이용하는 증폭반응에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) TFG-TEC 융합 유전자 내 TFG(NTD) 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프라이머 서열 및 TFG-TEC 융합 유전자 내 TEC 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프라이머 서열을 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계; 및 (ii) 상기 증폭 반응의 결과물을 분석하는 단계를 포함한다.
- [0046] 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 TFG-TEC 융합 유전자의 발현 및 존재 유무를 확인할 수 있다.
- [0047] 또한, TFG-TEC 융합 단백질 양의 변화는 면역염색, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 웨스턴 블랏팅, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0049] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명은 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 이차항체로서의 타겟에 대한 항체와 상기 세포 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0051] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 보다 구체적으로는 마이크로타이터 플레이트이다.
- [0052] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P₄₅₀을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-

B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), σ -페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate)와 같은 기질이 이용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 본 발명의 타겟(예컨대, TFG-TEC 융합 단백질)에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, TFG-TEC 융합 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

[0054] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화합물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P₄₅₀), 방사능물질(예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.

[0055] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 본 발명의 타겟의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

[0056] 한편, TFG-TEC 융합 단백질의 활성은 TEC에 의해 전사 조절을 받는 다운스트림 유전자의 발현을 측정함으로써 분석할 수 있다.

[0057] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질은 핵 단백질이다.

[0058] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질은 TEC 보존 서열(consensus sequence; 서열목록 제9서열)에 결합하여 다운스트림 유전자들의 전사를 촉진한다.

[0059] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질에 의해 전사가 촉진되는 다운스트림 유전자는 *Skp2*, *L-Myc*, *SOCS2* 및 *STAT-3*를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 한편, 본 발명의 방법은 리포터 유전자를 이용한 어세이 방법으로 실시될 수도 있다.

[0061] 우선, (a) (i) 프로모터에 작동적으로 연결된 TFG-TEC 융합 단백질-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터; 및 (ii) 상기 TFG-TEC 융합 단백질에 의해 양성적으로(positively) 조절되는 프로모터에 작동적으로 연결된 리포터 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 시험물질을 처리한다.

[0062] 본 명세서에서 용어 "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 발현 벡터에서 TFG-TEC 융합 단백질-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 상기 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 용어 "작동적으로 결합된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

[0063] 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pCMV, pGEX series, pcDNA series, pM, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19, pET 등), 파지(예: λ gt4 · λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 이용하여 제조될 수 있다.

[0064] 본 발명의 발현 벡터가 진핵세포에 적용되는 경우, 이용될 수 있는 프로모터는, 본 발명의 TFG-TEC 융합 유전자의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 및 효모 세포에서 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 *tk* 프로모터, RSV 프로

모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) TDH3(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3)의 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAL1 내지 GAL10 프로모터, 효모(*Pichia pastoris*) AOX1 및 효모 AOX2 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 구체적으로는, CMV(cytomegalo virus) 프로모터이다.

[0065] 또한, 본 발명에 이용되는 발현 벡터는 폴리 아네닐화 서열을 포함한다(예: ADH1 터미네이터, 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아테닐화 서열).

[0066] 또한, 본 발명의 벡터는 선택마커를 추가적으로 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 카나마이신, 하이그로마이신, 암피실린, 스트렙토마이신, 페니실린, 클로람페니콜, 겐타마이신, 카베니실린, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0067] 본 발명의 발현 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법들을 이용할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl_2 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 진핵세포인 경우, 트랜스덕션(transduction), 전기천공법(electroporation), 리포펙션(lipofection), 마이크로인젝션, 유전자총(particle bombardment), YAC에서 이용되는 효모 구형질체/세포 융합, 식물세포에서 이용되는 아그로박테리움-매개된 형질전환 등을 이용하여 실시할 수 있다.

[0068] 이어, 상기 단계 (a)의 형질전환된 숙주 세포에서 상기 리포터 유전자의 발현 수준을 측정한다.

[0069] 상기 시험물질이 상기 TFG-TEC 융합 단백질의 전사활성을 억제시켜 상기 리포터 유전자의 발현을 억제하면 종양 질환의 예방 또는 치료용 물질로 판단된다.

[0070] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용될 수 있는 리포터 유전자는 형광단백질, β -갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제, 인간성장호르몬, 우레아제(urease) 및 알칼린 포스파타제(alkaline phosphatase)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 리포터 유전자로서 이용될 수 있는 형광단백질은 루시페라아제, GFP(green fluorescent protein), RFP(red fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein) 및 이들의 변이체를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 상기 리포터 유전자의 발현 정도는 다양한 방법을 통하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 루시페라아제 유전자의 발현은 de Wet J. et al, *Mol. Cell Biol.*, 7: 725-737(1987)에 개시된 방법, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제 유전자의 발현은 Gorman C. et al, *Mol. Cell Biol.*, 2: 1044-1051(1982)에 개시된 방법, -갈락토시다아제 유전자의 발현은 Hall C.V. et al, *J. Mol. Appl. Genet.*, 2: 101-109(1983)에 개시된 방법, 인간성장호르몬 유전자의 발현은 Selden R. et al., *Mol. Cell Biol.*, 6: 3173-3179(1986)에 개시된 방법, 그리고 녹색형광 단백질 유전자의 발현은 Chalfie M. et al, *Science*, 263: 802-805(1994)에 개시된 방법에 따라 측정될 수 있다.

[0073] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 종양 질환은 EMC(extraskelatal myxoid chondrosarcoma), 자궁경부암, 고환 종양, 폐암종, 소세포 폐암종, 방광암종, 상피 암종, 신경교종, 대장선암, 전립선암종, 대장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평상피세포암, 기저세포암, 선암종(adenocarcinoma), 신세포암종, 간세포암, 담도암, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피세포육종(endotheliosarcoma), 림프관 육종, 림프관 혈관내피세포육종(lymphangioendotheliosarcoma), 윤활막종, 중피종, 유방 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 횡문근종, 땀샘암종, 피지샘 암종, 유두상암종, 유두상 선암, 낭선암종, 연수갑상선암종, 기관지암종, 용모상피암, 고환종, 배아성암종(embryonal carcinoma), 율름종양, 성상세포종, 카포시육종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 회돌기세포교종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함하지만, 이에 한정되는 것

은 아니다.

- [0074] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 프로모터; (b) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 서열목록 제4 서열의 TFG(NTD)-인코딩 뉴클레오타이드 서열; (c) 상기 TFG(NTD)-인코딩 뉴클레오타이드 서열의 N-말단 또는 C-말단에 결합된 전사 활성인자(transcription activator)-인코딩 뉴클레오타이드 서열; 및 (d) 터미네이터(terminator)를 포함하는 전사활성 촉진용 발현 벡터를 제공한다.
- [0075] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 발현 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) (i) 프로모터; 및 (ii) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 서열목록 제4서열의 TFG(NTD)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 전이활성 모이어티(transactivation moiety); 및 (b) 상기 TFG(NTD)의 N-말단 또는 C-말단에 결합된 전사 활성인자(transcription activator)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA-결합 모이어티(DNA-binding moiety)를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 전사활성 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0077] 본 발명의 발현 벡터의 구성성분인 TFG-TEC 융합 유전자의 발현 또는 TFG-TEC 융합 단백질의 활성을 분석하는 것은 상술한 본 발명의 스크리닝 방법과 동일한 것이므로, 본 명세서의 불필요한 반복 기재에 의한 과도한 복잡성을 피하기 위하여 공통 사항은 그 기재를 생략한다.
- [0078] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 전사 활성인자(transcription activator)는 DNA-결합 도메인을 포함한다.
- [0079] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터에서 이용될 수 있는 DNA-결합 도메인은 TEC, GAL4, GCN4, HAP1, ADR1, SWI5, STE12, MCM1, YAP1, ACE1, CUP2, XYR1, PPR1, ARG81, LAC9, QA1F, VP16 및 포유동물 핵 수용체 단백질의 DNA-결합 도메인을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 상기 전사 활성인자 내 DNA-결합 도메인에 의해 결합되는 보존 서열을 포함하는 프로모터를 가지는 유전자의 발현을 증가시킨다.
- [0081] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 TFG-TEC 융합 유전자에 특이적으로 결합하는 RNAi(RNA interference) 분자, 또는 상기 TFG-TEC 융합 단백질의 전사활성 촉진을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0082] 본 발명의 조성물은 RNAi 분자 또는 상기 TFG-TEC 융합 단백질의 전사활성 촉진을 억제하는 물질을 유효성분으로 이용하고, 이는 상술한 본 발명의 스크리닝 방법과 동일한 것이므로 본 명세서의 불필요한 반복 기재에 의한 과도한 복잡성을 피하기 위하여 공통 사항은 그 기재를 생략한다.
- [0083] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질의 전사활성 촉진을 억제하는 물질은 TFG-TEC 융합 단백질의 DNA-결합 서열 모티프에 대한 결합을 억제한다.
- [0084] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 구산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0085] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여 모두 가능하며, 비경구 투여는 두개강 내 주입, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등을 포함한다.
- [0086] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율, 병용되는 약물, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 1일 당 0.0001 ng/kg(체중) 내지 100 mg/kg(체중)이다.

[0087] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0088] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0089] (a) 본 발명은 TFG-TEC 융합 단백질의 신규한 전사활성능 및 전이활성능을 이용한 종양 질환의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법 및 이의 약제학적 조성물, 그리고 TFG(NTD)를 이용한 전사활성 촉진용 발현 벡터 및 조성물을 제공한다.

[0090] (b) 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질은 TEC와 동일한 서열 특이성을 가질 뿐 아니라, TEC보다 더욱 우수한 전사활성 촉진능을 가진다.

[0091] (c) 또한, 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질 내 TFG(NTD)는 강력한 전이활성 도메인(transactivation domain)으로 기능하고, 상기 TFG(NTD)의 PB1 도메인 및 SPYQG-풍부 부위(SPYQG-rich regions)가 부분적인 전이활성(partial transactivation)을 가진다.

[0092] (d) 그 결과, 본 발명의 TFG-TEC 융합 단백질은 TEC에 의해 조절받는 것으로 알려진 다운스트림 유전자들(예컨대, *Skp2*, *L-Myc*, *SOCS2* 또는 *STAT-3*)의 발현을 촉진시킨다.

[0093] (e) 따라서, TFG-TEC 융합 유전자의 발현을 억제시키거나 또는 TFG-TEC 융합 단백질의 활성을 억제시키는 물질에 대한 스크리닝 방법 및 이를 이용한 약제학적 조성물은 종양 질환, 질병 또는 상태의 예방 또는 치료에 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0094] 도 1은 인간 EMC에서 TFG-TEC 융합 단백질을 도식적으로 제시하는 도면이다. TFG 및 TEC 유전자들의 엑손/인트론이 보여진다. 엑손들은 박스들로 지시되고 TFG 및 TEC 유전자의 코딩 부위들이 각각 블랙 박스 및 그늘진 박스들로 제시되어 있다. 오픈 박스들은 상기 유전자들의 비-인코딩 부위들을 나타낸다. 숫자는 TFG 및 TEC 유전자의 엑손들을 의미한다. 또한, 아미노산 위치가 TFG-TEC 융합 단백질에 도식적으로 위 또는 아래에 지시되어 있다. TFG-TEC 융합 단백질은 TFG의 첫 번째 273개의 아미노산 잔기[1-273 잔기; TFG(N)]가 TFG의 엑손 6 끝의 하나의 뉴클레오타이드(G)와 TEC의 5'-UTR에 존재하는 2개의 뉴클레오타이드(A 및 T)의 조합을 통해 인코딩되는 하나의 추가적인 염기(아스파르트산)를 통해 TEC의 1-626 아미노산 잔기들과 융합된 형태로 구성된다. TFG-TEC 키메라 내 기능적으로 중요한 도메인들은 다음과 같다: PB1, Phox 및 Bem1p 도메인; CC, 코일-코일(coiled-coil) 도메인; SPYQG-풍부(rich), Ser, Pro, Tyr, Gly, Gln-풍부 도메인; AF1, N-말단 전이활성 도메인; DBD, DNA-결합 도메인; LBD, 리간드-결합 도메인; 및 AF2, C-말단 전이활성 도메인. TEC의 ATG 개시코돈 업스트림에 존재하는 2개의 뉴클레오타이드 서열은 소문자로 표시되고 TEC의 ATG 개시코돈은 TFG-TEC에서 밀줄 친 대문자로 지시된다.

도 2는 TFG-TEC 키메라에 의한 서열-특이적 DNA 결합을 보여주는 결과이다. 도 2a는 *in vitro*-번역된 TFG-TEC 및 TEC 단백질에 대한 웨스턴 블랏팅 결과이다. 토끼 망상적혈구 용해물이 벡터 mRNA(레인 1), Flag-TEC mRNA(레인 2) 또는 Flag-TFG-TEC mRNA(레인 3)로 프로그래밍되었다. 번역 반응 산물(5 μ l)이 8% SDS-PAGE 겔에 전기영동된 후, 항-Flag 항체(M2)를 이용한 웨스턴 블랏팅을 통해 분석되었다. 전-염색된 분자량 마커들(New England Biolabs, NEB)의 이동이 좌측에 지시되어 있다. 도 2b는 TFG-TEC 및 TEC의 DNA-결합 특성을 분석한 EMSA 결과이다. 실험재료 및 실험방법에 기재된 바와 같이, EMSA는 프로그래밍되지 않은 망상적혈구 용해물(레인 1), 벡터로 프로그래밍된 망상적혈구 용해물(레인 2, 2 μ l; 레인 3, 6 μ l; 및 레인 4, 10 μ l), Flag-TEC mRNA로 프로그래밍된 망상적혈구 용해물(레인 5, 2 μ l; 레인 6, 6 μ l; 및 레인 7, 10 μ l) 또는 Flag-TFG-TEC mRNA로 프로그래밍된 망상적혈구 용해물(레인 8, 2 μ l; 레인 9, 6 μ l; 및 레인 10, 10 μ l), 그리고 방사성 동위원소로 표지된(radiolabeled) 프로브를 이용하여 실시하였다. 각 EMSA에 이용된 *in vitro*

-변역된 단백질들은 젤 상단에 표시되어 있다. 단백질-DNA 복합체들은 0.5×TBE 완충액(44.5 mM Tris.HCl, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA) 내 비-변성 4% 폴리아크릴아마이드 젤(acrylamide:bisacrylamide ratio, 37:1)에서 4°C로 전기영동되어 분리되었다. 자유 프로브 및 단백질-DNA 복합체들의 위치들이 지시되어 있다.

도 2c는 TRF-TEC에 의한 서열-특이적 DNA 결합을 보여주는 결과이다. 경쟁 실험들은 5배(레인 2 및 레인 7) 또는 10배(레인 3 및 레인 8)의 과량의 비-표지된 야생형 TEC 올리고뉴클레오타이드, 또는 5배(레인 4 및 레인 9) 또는 10배(레인 5 및 레인 10)의 과량의 비-표지된 돌연변이된 TEC 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 실시하였다. 자유 프로브 및 단백질-DNA 복합체들의 위치들이 화살표로 지시되어 있다.

도 3은 TFG-TEC의 세포내 위치 및 DNA-결합 도메인에 대한 TFG-TEC의 핵 위치화 시그널의 맵핑을 보여주는 결과이다. 도 3a는 Flag-태깅된 TFG-TEC 유도체들을 도식적으로 보여주는 도면이다. TFG-TEC, TFG(NTD), TEC 및 TFG-TEC(AAAA) 컨스트럭트의 세포 내 위치는 N(핵 위치) 또는 C(세포질 위치)로서 지시된다. 도 3b는 TFG-TEC 유도체들의 세포내 분포를 보여주는 면역형광현미경 결과이다. 커버슬립 위에서 배양된 293T 세포들에 Flag-태깅된 TFG-TEC(a), TFG(NTD)(b), TEC(c) 또는 TFG-TEC(AAAA)(d)를 인코딩하는 포유동물 발현 벡터들을 트랜스펙션시켰다. Flag-태깅된 TFG-TEC 유도체 단백질들을 발현하는 세포들에서 항-Flag 항체(M2; Sigma)를 이용한 면역형광 현미경 분석을 실시하였다.

도 4는 U1C와 TFG(NTD) 간의 상호작용을 보여주는 웨스턴 블랏팅 결과이다. 도 4a는 U1C에 대한 EWS(NTD), hTAF_{II}68(NTD) 또는 TFG(NTD)의 다른 결합 친화성을 보여주는 결과이다. GST 폴-다운 실험들은 기본적으로 실험재료 및 실험방법에 기재된 바와 같이 실시하였다. 인풋(10%) 단백질(레인 1), GST 폴-다운 펠렛(레인 2), GST-EWS(NTD) 펠렛(레인 3), GST-hTAF_{II}68 펠렛(레인 4) 및 GST-TFG(NTD) 펠렛(레인 5)의 분취액이 15% SDS-PAGE 젤에서 분석되었으며, 결합된 U1C 단백질이 항-Xpress 항체(Invitrogen)를 이용하여 검출되었다. GST 융합 단백질들의 정제는 패널 상단에 지시되어 있다. 분자량 마커의 위치는 좌측에 지시되어 있다. U1C 단백질은 오른쪽에 화살표로 표시되어 있다. 3번의 독립적인 실험들이 실시되었으며, 모든 결과들이 유사한 결과를 나타냈다. 도 4b는 GST 폴-다운 어세이에 이용된 GST 융합 단백질들의 정량 결과이다. 상기 폴-다운 어세이에서 이용된 GST 융합 단백질들이 15% SDS-PAGE 젤에서 분리되어 쿠마시 블루 염색으로 시각화되었다. 3번의 독립적인 실험들이 실시되었으며, 모든 결과들이 유사한 결과를 나타냈다.

도 5는 TFG-TEC의 전이활성능을 조사한 결과이다. 도 5a는 발현 플라스미드 및 리포터 플라스미드를 도식적으로 나타내는 도면이다. TFG-TEC 또는 TEC의 생산을 유도하는 발현 벡터들이 보여진다. 첫 번째 아미노산 및 마지막 아미노산의 위치가 각 컨스트럭트의 아래에 지시되어 있다. p(B1a)8-Luc 리포터 플라스미드는 기본 프로모터-루시페라제 컨스트럭트의 업스트림에 8개의 TEC 인지 위치(NBRE)를 포함한다. 8개의 카피들은 작은 검은색 막대들로, TATA 박스는 오픈 박스로, 그리고 루시페라제 유전자는 긴 검은색 막대로 표시되어 있다. 도 5b는 TFG-TEC 및 TEC의 전사능을 측정된 결과이다. 293T 세포에 지시된 양의 TEC(흰색 막대) 또는 TFG-TEC(검은색 막대)를 인코딩하는 발현 벡터와 p(B1a)8-Luc 리포터 플라스미드, 그리고 레닐라 루시페라제를 공동-트랜스펙션시켰다. 리포터 활성은 레닐라 루시페라제 활성으로 표준화시켜 다른 트랜스펙션 효율을 보정하였다. 증가 배수(fold induction)은 공 발현벡터에 대한 상대적인 값으로 표시된다. 각 트랜스펙션은 3번 이상의 독립적인 실험들로 실시되었으며, 평균값은 표준오차(SEM, 수직 바)와 함께 플롯팅된다. 도 5c는 TFG-TEC에 의한 잠재적인 TEC 다운스트림 타겟 유전자들의 인 비보 유도를 보여주는 결과이다. 293T 세포를 pcDNA3-EGFP, pcDNA3-EGFP-TEC 또는 pcDNA3-EGFP-TFG-TEC로 일과성으로 트랜스펙션시킨 후, 상기 트랜스펙션된 세포들을 FACS로 분리하였다. Skp2, L-Myc, SOCS2 및 STAT-3 mRNA에 대한 RT-PCR 분석은 EGFP, EGFP-TEC 또는 EGFP-TFG-TEC 단백질을 발현하는 293T 세포에서 실시하였다. β-액틴은 표준화를 위해 이용하였다. 증폭 후, 각 산물의 분취액이 전기영동된 젤을 EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 분석하였다. pcDNA3-EGFP-TEC 및 pcDNA3-EGFP-TFG-TEC 벡터는 각각 TEC 및 TFG-TEC와 융합된 EGFP를 발현시키는 데 이용되었다. pcDNA3-EGFP 발현 벡터는 대조군으로서 이용되었다. RT 반응들에 이용된 인풋 RNAs이 유래된 일과성으로 트랜스펙션된 세포주들은 패널 상단에 보여진다.

도 6은 TFG(NTD)의 전이활성능을 보여주는 결과이다. 도 6a는 본 연구에서 이용된 GAL-TFG(NTD) 발현 플라스미드 및 리포터 플라스미드를 도식적으로 나타내는 도면이다. GAL4 DNA-결합 도메인(1-147 아미노산 잔기) 및 GAL4-TFG(NTD)의 생산을 유도하는 발현 벡터들이 제시된다. pG5 luc 리포터 플라스미드는 기본 프로모터-루시페라제 컨스트럭트의 업스트림에 5개 카피의 GAL4-결합 위치들을 포함한다. 5개의 카피들은 작은 검은색 막대들로, TATA 박스는 오픈 박스로, 그리고 루시페라제 유전자는 긴 검은색 막대로 표시되어 있다. 약어: GAL4, GAL4 DNA-결합 도메인; TFG(NTD), TFG-TEC의 TFG N-말단 도메인; PB1, Phox 및 Bem1p 도메인; CC, 코일-코일 도메인; 및 SPYQ-풍부, Ser, Pro, Tyr, Gly, Gln-풍부 도메인. 도 6b는 GAL4-TFG(NTD)에 의한 전사 활

성화 능력을 보여주는 결과이다. 293T 세포를 0.1 g의 pG5 luc 리포터 플라스미드, 2 ng의 레닐라 루시페라제, 그리고 0 µg(레인 1), 0.5 µg(레인 2), 1.0 µg(레인 3), 1.5 µg(레인 4) 또는 2.0 µg(레인 5)의 GAL4-TFG(NTD) 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 모든 실험들에서, 트랜스펙션된 총 DNA 양은 공 벡터 (GAL4 DNA)로 조정되었다. 리포터 활성은 레닐라 루시페라제 활성으로 표준화되어 다른 트랜스펙션 효율을 보정하였다. 루시페라제 활성은 리포터 플라스미드 및 GAL4 DNA-결합 도메인 단독(레인 1)에서 관찰되는 기본 레벨에 대한 상대적인 활성화 증가배수(fold activation)로서 표현되었다. 각 트랜스펙션은 3번 이상의 독립적인 실험들로 실시되었으며, 평균값은 표준오차(SEM, 수직 바)와 함께 플롯팅된다.

도 7은 TFG(NTD)의 기능성 부위들을 보여주는 결과이다. 좌측 패널은 TFG(NTD)의 결실 컨스트럭트들을 도식적으로 나타낸다. 숫자는 아미노산 잔기들을 의미한다. 리포터 플라스미드인 pG5 luc가 다양한 GAL4-TFG(NTD) 결실 돌연변이체들과 293T 세포에 공동-트랜스펙션되었다. 상대적인 전사 활성화 값은 GAL4-TFG(NTD)의 트랜스펙션 효율을 100%로 상정하고 이에 대한 상대적인 평균값±표준오차(SEM)으로서 오른쪽 패널에 제시된다. 상술한 결과들은 두 쌍으로 실시된 3번의 독립적인 실험들의 평균값을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0095] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0096] 실시예

[0097] 실험재료 및 실험방법

[0098] 실험재료 및 일반적인 방법

[0099] 제한 효소, CIP(calf intestinal alkaline phosphatase), DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편 및 T4 DNA 리가제는 NEB(New England Biolabs)로부터 구매하였다. PfuTurbo 폴리머라제는 Stratagene으로부터 구매하고 [γ -³²P] ATP(3000 Ci/mmol)는 PerkinElmer로부터 구매하였다. 플라스미드 DNA의 분리, 제한 효소 절단(digestion), DNA의 아가로스 젤 전기영동, DNA 라이게이션(ligation), 박테리아 형질전환(transformation) 및 단백질의 SDS-PAGE 전기영동은 표준 방법들에 따라 실시하였다(16). 변이체(mutant)의 존재 유무를 확인하기 위해, PCR 산물로부터 얻어진 서브클론들이 이중-가닥 DNA 템플레이트를 이용한 체인 종결법(chain termination method)으로 시퀀싱되었다.

[0100] 컨스트럭트의 제조

[0101] pCMV-Tag2A/TFG-TEC는 각 도메인들(TFG-NTD 및 TEC)이 PCR로 증폭된 후 이전에 공지된 바(17, 18)와 같이 중첩 연장 방법(overlap extension method)을 이용하여 각 부위들의 스플라이싱을 통해 제조되었다. pCMV-Tag2A/TFG-TEC의 구축에 대한 상세한 기제는 이전에 보고되었다(18). TFG-TEC 리포터 플라스미드인 p(Bla)8-Luc도 이전에 보고되었다(3).

[0102] pCMV-Tag2A/TFG(NTD)를 제조하기 위해, TFG(NTD)가 5'-TFGBamHI(5'-GATCGGATTCAATGAACGGACAGTTGGA-3'; BamHI 위치는 밑줄로 표시) 및 3'-TFGHindIII(5'-GATCAAGCTTATGGCGTCCACGGATTAC-3'; HindIII 위치는 밑줄로 표시) 프라이머 쌍을 사용한 PCR 방법에 의해 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 증폭되어 BamHI과 HindIII로 절단시킨 후 pCMV-Tag2A 벡터(Stratagene) 내로 클로닝하였다. pCMV-Tag2A/TFG-TEC(AAAA)를 제조하기 위해, pCMV-Tag2A/TFG를 AccI과 EcoRI으로 이중 절단시킨 후 pBluescript II KS+(Stratagene)의 대응 위치로 클로닝하여 pKSII(AccI-EcoRI)를 제조하였다. KRRR 아미노산 서열이 AAAA로 치환된 pKSII(AccI-EcoRI)(AAAA)를 제조하기 위해, 본 발명자들은 돌연변이 프라이머 세트(mutagenic primer set)인 5'-mNLS(5'-CTGCCAGTAGACGCGGCAGCTGCAAACCGATGTCAG-3'; 돌연변이 위치는 밑줄로 표시) 및 3'-mNLS(5'-CTGACATCGGTTTGACAGCTGCCGCTCATCTGGGCAG-3'; 돌연변이 위치는 밑줄로 표시)를 이용한 QuikChangeTM 위치-지정된 돌연변이 키트(Stratagene)를 사용하였다. pKSII/(AccI-EcoRI)(AAAA) 벡터를 AccI 및 EcoRI으로 절단하여 (AccI-EcoRI)(AAAA) 단편을 분리한 후, 이를 pCMV-Tag2A/TEC의 대응되는 위치에 클로닝하여 pCMV-Tag2A/TEC(AAAA)를 제조하였다. 이후, pCMV-Tag2A/TEC(AAAA)를 XhoI으로 절단하여 XhoI(AAAA)XhoI 단편을 분

리하고 이를 pCMV-Tag2A/TFG-TEC의 대응되는 위치에 클로닝함으로써 pCMV-Tag2A/TFG-TEC(AAAA)를 제조하였다.

[0103] pGEX(4T-1)-EWS(NTD) 컨스트럭트를 제조하기 위해, 하나의 EWS(NTD) 단편이 프라이머 5'-EcoRIEWS1(5'-GATCGAATTCATGGCGTCCACGGATTAC-3'; *EcoR* 위치는 밑줄로 표시) 및 3'-NotIEWS265(5'-GATCGCGGCCCTCAACTCTGCTGCCCGTA-3'; *NotI* 위치는 밑줄로 표시)를 이용한 PCR 방법에 의해 pcDNA3/Flag-EWS-TEC로부터 증폭되었다. 상기 PCR 산물을 *EcoRI*과 *NotI*으로 절단시켜 pGEX(4T-1) 벡터(GE Healthcare)의 동일 위치로 클로닝하여 pGEX(4T-1)-EWS(NTD)를 제조하였다. pGEX(4T-1)-hTAE_{II}68(NTD) 컨스트럭트는 이전에 보고되었다(19). pGEX(4T-1)-TFG(NTD) 컨스트럭트를 제조하기 위해, TFG(NTD) 단편이 프라이머 5'-BamHITFG(5'-GATCGGATCCATGAACGGACAGTTGGAT-3'; *BamHI* 위치는 밑줄로 표시) 및 3'-NotITFG274(5'-GATCGCGGCCCTCAATCTGAATACTGAATACC-3'; *NotI* 위치는 밑줄로 표시)를 사용하여 PCR 방법에 의해 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 증폭되었다. 상기 PCR 산물을 *BamHI*과 *NotI*으로 절단한 후 pGEX(4T-1) 벡터의 동일 위치로 클로닝하여 pGEX(4T-1)-TFG(NTD)를 제조하였다.

[0104] pcDNA3-EGFP를 제조하기 위해, EGFP 유전자가 프라이머 5'-HindIIIEGFP (5'-GATCAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'; *HindIII* 위치는 밑줄로 표시) 및 3'-BamHIEGFP(5'-GATCGGATCCGCTTACTTGTGCAGCTCGTC-3'; *BamHI* 위치는 밑줄로 표시)를 사용하여 PCR 방법에 의해 pEGFP-N1(Clontech)로부터 증폭되었다. 상기 PCR 산물을 *HindIII*와 *BamHI*으로 절단한 후 pcDNA3 벡터의 동일 위치로 클로닝하여 pcDNA3-EGFP를 제조하였다. pcDNA3-EGFP-TEC를 제조하기 위해, EGFP(no Stop)단편이 프라이머 5-HindIIIEGFP 및 3-BamHIEGFP(NoStop)(5'-GATCGGATCCGCTTGTACAGCTCGTC-3; *BamHI* 위치는 밑줄로 표시)를 사용하여 PCR 방법에 의해 pEGFP-N1으로부터 증폭하였다. 상기 PCR 산물을 *HindIII*와 *BamHI*으로 절단한 후 pcDNA3 벡터의 동일 위치로 클로닝하여 pcDNA3-EGFP(NoStop)를 제조하였다. pcDNA4/His-MaxB/TEC을 *BamHI*으로 절단하여 TEC 단편을 분리하였다. 이후, pcDNA3-EGFP (NoStop)의 대응되는 위치에 클로닝하여 pcDNA3-EGFP-TEC를 제조하였다. pCMV-EGFP-TFG-TEC를 다음과 같이 제조하였다: pCMV-Tag2A/TFG-TEC를 *BamHI*으로 절단하여 TFG-TEC 단편을 분리한 후, pcDNA3-EGFP(NoStop)에 대응되는 위치에 클로닝하여 pcDNA3-EGFP-TFG-TEC를 제조하였다.

[0105] GAL4-TFG(NTD) 결실 돌연변이체들은 다음과 같은 방법으로 제조하였다: (A) GAL4-TFG(NTD)의 경우, 상기 TFG(NTD) 단편이 프라이머 5'-BamHITFG-GAL4(5'-GATCGGATCCGAATGAACGGACAGTTGG-3'; *BamHI* 위치는 밑줄로 표시) 및 3'-HindIIITFG-GAL4(5'-GATCAAGCTTCTGAATACTGAATAC-3'; *HindIII* 위치는 밑줄로 표시)를 이용한 PCR에 의해 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 증폭된 후, *BamHI* 및 *HindIII*로 절단하여 pM 벡터(Clontech Laboratories)의 대응하는 위치 내로 클로닝하여 상기 GAL4-TFG(NTD) 단편을 제조하였다. (B) GAL4-TFG(1-124) 단편의 경우, TFG(1-124) 단편이 프라이머 5'-BamHITFG-GAL4 및 3'-HindIIITFGCC-GAL4 (5'-GATCAAGCTTTTCCAAGCTATCCAATAAC-3'; *HindIII* 위치는 밑줄로 표시)를 이용한 PCR에 의해 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 증폭된 후, *BamHI* 및 *HindIII*로 절단하여 pM 벡터의 대응하는 위치 내로 클로닝시켜 상기 GAL4-TFG(1-124) 단편을 제조하였다. (C) GAL4-TFG(97-273) 단편의 경우, TFG(97-273) 단편이 프라이머 5'-BamHITFGCC-GAL4(5'-GATCGGATCCGACTTGAATCAA-3'; *BamHI* 위치는 밑줄로 표시) 및 3'-HindIIITFG-GAL4를 이용한 PCR에 의해 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 증폭된 후, *BamHI* 및 *HindIII*로 절단시켜 pM 벡터의 대응하는 위치 내로 클로닝하여 상기 GAL4-TFG(97-273) 단편을 제조하였다. (D) GAL4-TFG(PB) 단편의 경우, TFG(PB) 단편이 프라이머 5'-BamHITFG-GAL4 및 3'-HindIIITFGPB-GAL4(5'-GATCAAGCTTGGTCTTGCTGGCCATT-3'; *HindIII* 위치는 밑줄로 표시)를 이용한 PCR에 의해 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 증폭된 후, *BamHI* 및 *HindIII*로 절단시켜 pM 벡터의 대응하는 위치 내로 클로닝하여 상기 GAL4-TFG(PB) 단편을 제조하였다. (E) GAL4-TFG(CC) 단편의 경우, TFG(CC) 단편이 프라이머 5'-BamHITFGCC-GAL4 및 3'-HindIIITFGCC-GAL4를 이용한 PCR에 의해 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 증폭된 후, *BamHI* 및 *HindIII*로 절단시켜 pM 벡터의 대응하는 위치 내로 클로닝하여 상기 GAL4-TFG(CC) 단편을 제조하였다. (F) GAL4-TFG(SPYGQ) 단편의 경우, TFG(SPYGQ) 단편이 프라이머 5'-BamHITFGSPYGQ-GAL4(5'-GATCGGATCCGACCACCTGGAGAACCAGGAC-3'; *BamHI* 위치는 밑줄로 표시) 및 3'-HindIIITFG-GAL4를 이용한 PCR에 의해 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 증폭된 후, *BamHI* 및 *HindIII*로 절단시켜 pM 벡터의 대응하는 위치 내로 클로닝하여 상기 GAL4-TFG(NTD) 단편을 제조하였다.

[0106] **인 비트로 전사(transcription) 및 번역(translation)**

[0107] Flag TFG-TEC와 Flag TEC의 인 비트로 전사 및 번역은 제조사(Promega)의 지시에 따라 각각 pCMV-Tag2A/TFG-TEC 또는 pCMV-Tag2A/TEC을 사용한 TNT 키트(Promega)를 이용하여 실시하였다. 인 비트로 번역 산물은 8 SDS-PAGE에 전기영동한 후, 항-Flag 항체(Sigma)를 사용한 웨스턴 블랏팅을 통해 분석하였다. 인 비트로-번역

된(*in vitro* translated) 단백질의 정량은 ChemiDoc™ XRS System(Bio-Rad)으로 실시하였다.

[0108] **EMSA(Electrophoretic mobility shift assay)**

[0109] EMSA 분석에 이용된 합성 올리고뉴클레오타이드 프로브의 서열은 이전 보고에 기재되어 있다(3). 프로브(각각 0.5 ng)는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제를 이용하여 [γ -³²P] ATP로 상보적 올리고뉴클레오타이드를 말단-표지하여 제조하였다. DNA 결합 반응은 인 *비*/트로-변역된 TFG-TEC 및 TEC를 이용하여 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 40 mM KCl, 6% 글라이세롤, 1 mM DTT, 0.05 NP-40 및 10 ng/l의 poly(dIdC)(dIdC)를 포함하는 결합 완충액에서 4℃로 30분 동안 실시하였다. 결합 반응 이후, 상기 혼합물을 0.5X TBE(44.5 mM Tris-HCl, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA) 완충액에서 4 폴리아크릴아마이드 젤(아크릴아마이드/비스아크릴아마이드 비율, 37:1)로 4℃에서 150 V로 2-3 시간 동안 분리하였다. 상기 젤을 건조시키고 -70℃에서 강화 스크린(intensifying screen)를 이용하여 Kodak X-Omat 필름에 노출시켰다.

[0110] **세포내 위치(Subcellular localization)**

[0111] 면역세포화학적 분석은 이전에 보고된 바와 같이 실시하였다(20). 간략하게는, 293T 세포들이 유리 커버슬립(cover slip) 상에 플레이팅된 후 VivaMagic Reagent(Vivagen)를 이용하여 각각의 플라스미드로 트랜스펙션(transfection)되었다. 48 시간 후, 상기 세포들이 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척되고, 아세톤 및 메탄올(1:1, v/v)의 혼합물로 -20℃에서 10분 동안 고정되었다. 항-Flag 항체(M2, Sigma)와 TRITC-컨쥬게이션된 2차 항체(Sigma)를 이용하여 Flag-태깅된(tagged) TFG-TEC 또는 TFG-TEC 돌연변이 단백질을 검출하고, 형광은 CoolSNAP 디지털 카메라(Olympus)가 장착된 형광 현미경(Olympus, IX71)로 관찰되었다.

[0112] **GST 융합 단백질의 정제, GST 풀-다운(pull-down) 어세이, 웨스턴 블랏팅 어세이(Western blot assay)**

[0113] 이전에 보고된 바(21)와 같이, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST)-EWS(NTD), GST-hTAF₁₁₆₈ 및 GST-TGE(NTD) 단백질은 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*)에서 발현시켰다. 글루타티온-세파로스(GE Healthcare)에 결합시키고 세척한 후, 상기 단백질들이 환원된 글루타티온(Sigma)으로 용출되었다. 단백질 농도는 브래드포드(Bradford; Bio-Rad) 방법을 통해 측정되었다. 용출된 단백질들의 순도 및 크기는 SDS-폴리아크릴아마이드 젤의 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색에 의해 확인하였다. GST 풀-다운 어세이는 이전에 보고된 바(20)와 같이 실시하였다. 웨스턴 블랏팅 분석은 항-Flag(M2) 혹은 항-Xpress(Invitrogen) 항체로 실시하였으며, 반응성 밴드들은 Western Lighning ECL 키트(PerkinElmer Life Sciences)을 사용하여 화학발광(chemiluminescence)으로 검출하였다.

[0114] **리포터 유전자 분석**

[0115] 세포들은 VivaMagic 시약을 이용한 플라스미드의 일과성 트랜스펙션(transfection)에 종속되었다. 루시퍼라제 분석은 이중-루시퍼라제(Dual-luciferase) 어세이 시스템(Promega)으로 실시하였다. 레닐라(Renilla) 루시퍼라제 활성은 트랜스펙션 효율의 표준화에 이용되었다.

[0116] **역전사-PCR**

[0117] EGFP, EGFP-TEC 또는 EGFP-TFG-TEC로 일과성으로 트랜스펙션된 293T 세포로부터 on-column DNase 처리와 함께 RNeasy mini kit(Qiagen)를 이용하여 총 RNA를 분리하였고, mRNA가 Oligodex-dT mRNA mini kit(Qiagen)로 정제된 후 RT-PCR을 위해 Superscript First-strand Synthesis System(Invitrogen)으로 cDNA를 합성하였다. *Skp2*, *L-Myc*, *SOCS2* 및 *STAT-3*에 대한 RT-PCR 반응은 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 세 쌍으로(triplicate) 실시하였다. 이용된 프라이머들은 다음과 같다: *Skp2* 정방향 프라이머, 5'-CTGTCTCAGTGTTCGAAGTTGCA-3' 및 *Skp2* 역방향 프라이머, 5'-CAGAACACCCAGAAAGGTTAAGT-3'(22); *L-Myc* 정방향 프라이머, 5'-CAGCTTCTGGAGGAAAACG-3' 및 *L-Myc* 역방향 프라이머, 5'-CAGCTTCTGGAGGAAAACG-3'(23); *SOCS2* 정방향

프라이머, 5'-CTCGGTCAGACAGGATGGTA-3' 및 SOCS2 역방향 프라이머, 5'-ACAGAGATGCTGCAGAGATG-3'(24); STAT-3 정방향 프라이머, 5'-TTGCCAGTTGTGGTGATC-3' 및 STAT-3 역방향 프라이머, 5'-AGAACCCAGAAGGAGAAGC-3'(25); 그리고 β -액틴 정방향 프라이머, 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3' 및 β -액틴 역방향 프라이머, 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'.

[0118] 실험결과

[0119] TFG-TEC 융합 단백질은 TEC 보존 서열(consensus sequence)에 결합한다

[0120] 인간 EMC 환자들은 22q12 기원의 EWS 유전자 또는 17q11.2 기원의 hTAF_{II}68 유전자를 9q22 위치의 TEC 핵 수용체 유전자와 융합시키는 재발성 염색체 전좌(recurrent translocations)를 공유한다. 최근 보고는 인간 EMC에서 염색체 전좌 이벤트들 중 하나가 TEC와 염색체 3q11-q12 내 TFG의 인-프레임(in-frame) 융합을 초래하여 t(3;9)(q11-q12;q22) 염색체 전좌를 보인다고 보고하였다(7). TFG 유전자의 전좌점(breakpoint)은 인트론 6에 존재하고 TEC의 전좌점은 ATG 개시 코돈의 업스트림에 위치하는 2개의 뉴클레오타이드(A 및 T)이다. TFG 단백질은 N-말단에 위치한 PB1 및 CC 도메인, 그리고 N- 및 C-말단에 위치하는 SPYQG-풍부 전사 활성인자-유사 도메인들을 포함하는 세포질 단백질이다(8, 10). 예상되는 키메라(chimeric) 단백질은 TFG의 N-말단 PB1, CC 및 SPYQG-풍부 도메인들이 전장 TEC와 융합된 단백질이다(도 1).

[0121] TFG-TEC 단백질의 DNA-결합 특성은 합성 올리고뉴클레오타이드 프로브와 인 비트로 전사/번역된 TFG-TEC 단백질을 이용한 EMSA로 분석하였다. TEC의 DBD(DNA-binding domain)은 NBRE(NGFI-B Response Element) 서열 모티프(5'-AAAAGGTCA-3')에 결합하는 보존된 DBD이다(3). TFG-TEC 단백질과 TEC 단백질 간의 유의한 구조적 차이(variation)가 있을 지라도, TEC의 DBD는 양쪽 단백질들에서 정상인 상태이다. TFG-TEC 단백질이 TEC의 생리학적 타겟들에 결합하는 지 여부를 결정하기 위해, 결합 반응에서 NBRE 서열 모티프를 이용한 EMSA를 실시하였다. 전장 Flag-태깅된 TFG-TEC 단백질 및 TEC 단백질의 인 비트로 전사에 의해 생산된 인 비트로 합성 RNA들이 세포-부재 토끼 망상적혈구 용해물을 프로그래밍하는 데 이용되었으며, 그 결과 인 비트로-번역된 Flag-태깅된 TFG-TEC 단백질 및 Flag-태깅된 TEC 단백질 산물들이 SDS-PAGE 및 항-Flag 항체(M2)를 이용한 웨스턴 블랏팅을 통해 정량되었다(도 2a). 동일 몰 농도(equimolar amounts)의 인 비트로-번역된 TFG-TEC 단백질 및 TEC 단백질이 각 어세이에 첨가되었다. 인 비트로-번역된 단백질들의 정량은 ChemiDocTM XRS System(Bio-Rad)을 이용하여 실시하였다. 동일한 농도의 프로브 및 증가하는 인 비트로-번역된 단백질의 양을 이용하여 EMSA를 실시하였다. 단백질-DNA 복합체들이 TFG-TEC 단백질(도 2b, 레인 8-10) 및 TEC 단백질(도 2b, 레인 5-7) 모두에서 형성되는 반면에, 프로그램되지 않은 망상적혈구 용해물은 매우 낮은 레벨의 결합을 보였다(도 2b, 레인 2-4). 상기 복합체가 TEC DBD에 의해 인지되지 않는 돌연변이된 NBRE 서열 모티프를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 아니라 5배 및 10배의 과량으로 첨가된 NBRE 서열 모티프를 포함하는 비표지된 올리고뉴클레오타이드에 의해서만 파괴된다는 점에서, 상기 상호작용은 특이적이었다(도 2c). 상술한 실험결과들로부터 본 발명자들은 TFG-TEC 단백질 및 TEC 단백질이 인 비트로에서 유사한 DNA-결합 활성을 보이고 유사한 특이성으로 DNA에 결합한다고 결론지을 수 있었다.

[0122] DBD 내 KRRR 서열은 TFG-TEC 단백질을 핵으로 타겟팅한다

[0123] TFG는 세포질 단백질(8)이고 TFG-TEC 단백질은 전장 TEC에 융합된 TFG의 NTD(N-terminal domain)를 포함하기 때문에, 본 발명자들은 비직접적 면역형광을 통해 TFG-TEC 단백질의 세포내 위치를 조사하였다. TFG-TEC-양성 인간 EMC 세포주 또는 이의 파생물(derivatives)이 현재 유용하지 않기 때문에 비직접적 면역형광 분석은 293T 세포를 이용하여 실시하였다. 293T 세포에 공 발현 벡터(pCMV-Tag2A; 결과를 보이지 않음) 또는 pCMVTag2A/TFG-TEC(도 3b(a))를 트랜스펙션시킨 후, 형광 면역조직화학 분석을 통해 조사하였다. 키메라 TFG-TEC는 핵에 위치하였는데(도 3b(a)), 이는 TFG-TEC 단백질이 핵 단백질이라는 것을 의미한다. 다음으로, 본 발명자들은 일련의 TFG-TEC 결실 돌연변이체들을 이용하여 TFG-TEC의 핵 위치화를 담당하는 부위를 맵핑하였다(도 3a). 293T 세포에 Flag-태깅된 TFG-TEC 절단 돌연변이체들에 대한 발현 벡터를 트랜스펙션시킨 후, 상기 Flag-태깅된 단백질들의 위치를 형광 면역조직화학 분석으로 조사하였다. Flag-태깅된 TFG(NTD)는 세포질에 위치(도 3b(b))한 반면에, Flag-태깅된 TEC는 핵에 위치하였다(도 3b(c)). TFG-TEC 단백질의 DBD에 존재하는 핵 위치화 시그널을 보다 한정하기 위해, 본 발명자들은 위치-지정된 돌연변이유발법을 이용하여 매우 높게 보

존된 염기성 아미노산 서열인 ⁶¹²KRRR⁶¹⁵이 알라닌 잔기들로 대체된 DBD 돌연변이체를 제조하였다. 알라닌에 의한 ⁶¹²KRRR⁶¹⁵ 서열의 대체는 Flag-태깅된 TFG-TEC의 세포질 축적을 초래하였다(도 3b(d)). 상술한 결과는 DBD 내 염기성 아미노산들의 클러스터가 TFG-TEC의 핵 위치화 시그널로서 기능한다는 것을 보여준다.

[0124] TFG(NTD)는 U1C에 결합할 수 없다

[0125] EWS(NTD)는 스플라이싱 인자인 U1C 단백질에 대한 상호작용 모티프(들)을 포함한다. EWS(NTD)와 U1C 간의 상호작용은 EWS-융합-매개된 전이활성(transactivation)을 음성적으로 조절한다(26). EWS NTD와 TFG NTD의 관계로 인해(7, 10), 본 발명자들은 TFG도 U1C와 상호작용할 수 있는지를 조사하였다. 이를 위해, 박테리아 발현된 GST 융합 EWS(NTD), hTAF_{II}68(NTD) 및 His₆-태깅된 전장 U1C 단백질을 이용한 인 비트로 GST 폴-다운 어세이를 실시하였다(도 4). 이전에 보고된 바와 같이(26), U1C 단백질은 GST-EWS(NTD)에 특이적으로 결합하였지만(도 4a, 레인 3), GST 단독에는 결합하지 않았다(도 4a, 레인 2). 흥미롭게도 U1C 단백질은 TET 패밀리의 다른 멤버인 hTAF_{II}68(NTD)와도 상호작용하였는데(도 4a, 레인 4), 이는 EWS(NTD)/U1C 상호작용이 hTAF_{II}68(NTD) 단백질에서 유의하게 유지되었다는 것을 나타낸다. 이와 대조적으로, TFG(NTD)는 U1C와 결합하지 않았으며(도 4a, 레인 5), 이는 U1C가 인간 EMCs에서 TFG-TEC 활성을 조절할 수 없다는 것을 보여준다. 상술한 어세이들에서 이용된 GST 융합 단백질의 양이 15% SDS-PAGE 겔에 분획되어 쿠마시 블루 염색을 통해 시각화되었다. 그 결과, 유사한 양의 단백질이 폴-다운 어세이에서 이용되었음을 확인하였다(도 4b).

[0126] TFG-TEC는 TEC보다 더욱 더 강력한 전사 활성인자이다

[0127] TFG-TEC와 TEC의 전사 특성이 리포터 플라스미드와 발현 벡터들을 공동-트랜스펙션(cotransfection)시켜서 연구되었다. EWS 및 hTAF_{II}68의 NTD들은 강력한 전이활성 도메인(transactivation domain)을 제공함으로써 EWS-또는 hTAF_{II}68-융합 단백질에 의한 전사 활성화에 기여하는 것으로 보인다(27). TFG-TEC 내 NTD-TFG의 전사활성 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 루시퍼라제 유전자의 업스트림에 8개 카피의 TEC 결합 위치(NBRES) 및 TATA 박스를 포함하는 리포터 플라스미드와 각각의 발현 벡터들을 공동-트랜스펙션시켜 TFG-TEC 및 TEC의 전사활성을 비교하였다(도 5a). 또한, 사이토메갈로바이러스-강제된(cytomegalovirus-driven) 레닐라 루시퍼라제 유전자를 포함하는 대조군 플라스미드도 포함되었다. TFG-TEC의 공동-트랜스펙션은 293T 세포에서 약 635배의 리포터 발현 증가를 유도(도 5b, 막대 2 및 4)한 반면에, TEC 단독에 의해서는 약 220배의 발현 증가가 유도되었다(도 5b, 막대 1 및 3). 따라서, TFG-TEC가 TEC보다 더욱 더 강력한 전사 활성인자라는 것이 명백하다. 이후, TFG-TEC가 TEC보다 더 우수한 전이활성능(transactivation activity)을 가진다는 리포터 어세이의 결과가 추가적으로 조사되었다. TFG-TEC의 인 비트로 전이활성능(transactivation potential)을 평가하기 위해, 본 발명자들은 pcDNA3-EGFP, pcDNA3-EGFP-TEC 및 pcDNA3-EGFP-TFG-TEC 컨스트럭트를 293T 세포에 일과성으로 트랜스펙션시키고(도 5c), 잠재적인 다운스트림 유전자들인 *Skp2*(28), *L-Myc*, *SOCS2* 및 *STAT-3*의 전사를 측정함으로써 TFG-TEC 및 TEC의 전사활성을 비교하였다. 도 5c에서 볼 수 있듯이, *Skp2*(28), *L-Myc*, *SOCS2* 및 *STAT-3*의 발현이 TEC로 트랜스펙션된 293T 세포보다 TFG-TEC로 트랜스펙션된 293T 세포에서 더 높은 정도로 상향-조절되었다(도 5c, 레인 2 및 레인 3). 종합해 보면, 상술한 데이터는 TFG-TEC가 인 비트로 및 인 비보 모두에서 TEC보다 더욱 강력한 전사 활성인자라는 것을 나타낸다. β-액틴은 대조군으로 이용하였다.

[0128] TFG(NTD)는 전이활성 도메인으로서 기능한다

[0129] 본 발명에 따르면, TFG-TEC는 TEC보다 더욱 더 강력한 전사 활성인자였다(도 5). TFG-TEC 키메라 단백질이 정상적인 TEC의 기능성 도메인들을 포함하고 있을 지라도(도 1), 단백질-DNA 복합체들은 TFG-TEC 및 TEC 단백질 모두에서 형성되었으며(도 4) 모두 핵에 위치하였다(도 3). 이는 양 단백질들의 NTDs의 차이에서 기인할 수 있다. 하지만, TFG(NTD)가 전사를 활성화시킬 수 있는 지 여부는 불명확한 상태이다. 따라서, GAL4-TFG 융합 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하여 NTD-TFG의 전사활성 효과를 조사하였다(도 6a). TATA 박스의 업스트림에 5개의 GAL4 DNA-결합 위치를 포함하는 pG5 luc 리포터가 리포터로서 이용되었다. pG5 luc 리포터에 대한 TFG(NTD) 반응성은 293T 세포에 증가하는 양의 GAL4-TFG(NTD) 발현 컨스트럭트와 함께 0.1 μg의 pG5 luc 컨스트럭트와 2 ng의 레닐라 플라스미드를 공동-트랜스펙션시켜 측정하였다. GAL4 DBD 단독(GAL4)의 합성을

촉진하는 발현 벡터는 293T 세포로의 트랜스펙션에서 pG5 luc에 의해 생산되는 루시페라제의 레벨 상에 유의한 효과를 나타내지 않았다(도 6b, 레인 1). 이와 대조적으로, pGAL4-TFG(NTD)는 투여량-의존적으로 루시페라제 생산을 활성화시켰다(12배까지; 도 6b, 레인 2-5). 상술한 결과들은 TFG(NTD)가 전이활성 도메인(들)을 포함한다는 것을 증명한다.

[0130] **2개의 기능성 도메인들이 TFG(NTD)에 의한 전이활성에 중요하다**

[0131] GAL4-융합 TFG(NTD) 기능성 도메인들을 이용한 일과성 트랜스펙션 실험들은 전이활성에 필수적인 TFG(NTD) 내 기능성 부위들을 규명하기 위해 실시하였다. TFG(NTD) 기능성 도메인들의 구조는 도 7에 도식적으로 보여진다. 오른쪽 패널 내 데이터는 GAL4-TFG(NTD)에 의해 얻어진 값을 100%로 상정하고 이에 대한 상대적인 전사 활성값(transcriptional activation values)을 나타낸다. SPYQ-풍부 부위(125-273)의 아미노산 잔기들이 결실된 폴리펩타이드[GAL4-TFG(1-123)]는 GAL4-TFG(NTD)의 전이활성 능력과 비교하여 약 75% 정도의 감소를 나타냈다. PB1 도메인이 결실된 폴리펩타이드[GAL4-TFG(97-273)]는 전이활성에서 약 50%의 더 적은 감소를 보였다. 상술한 결과들은 상술한 도메인들이 TFG(NTD)-매개된 전이활성에 중요하다는 것을 나타낸다. GAL4-TFG(SPYQ)로 명명된 SPYQ-풍부 부위와의 융합 컨스트럭트는 pG5 luc 벡터로부터 루시페라제 생산을 약 30%까지 증가시켰는데, 이는 TFG(NTD)의 SPYQ-풍부 부위가 내인성 전사 활성화 특징을 가진다는 것을 의미한다. 또한, TFG(NTD)의 PB1 도메인도 293T 세포에 트랜스펙션되는 경우 pG5 luc 벡터로부터 생산된 루시페라제의 레벨(약 13%)에 영향을 미쳤다. 한편, CC 도메인을 단독으로 포함하는 컨스트럭트는 GAL4-TFG(NTD)에 의해 생산된 폴리펩타이드의 전이활성능과 비교하여 약 6%의 폴리펩타이드만을 생산하였다. 따라서, 상술한 결과들은 TFG(NTD)의 PB1 도메인 및 SPYQ-풍부 부위가 부분적으로 전사를 활성화시킬 수 있고, 전체 TFG(NTD)의 통합이 완전한 전이활성능을 위해 필요하다는 것을 의미한다.

[0132] **추가논의사항**

[0133] 본래 TFG 유전자는 EWS 및 TLS/FUS 단백질들의 N-말단 부위들과 유사한 단백질 부위를 인코딩하는 유전자들을 동정하기 위한 연구에서 탐색 서열로 SPYQ-풍부 부위를 이용한 EST(Expressed Sequence Tag) 데이터베이스 내 상동성 조사(homology searches)에 의해 동정되었다(10). 상술한 아미노산 서열이 전사 활성화 도메인들에서 공통적으로 발견될 지라도(27), TFG-TEC 내 상기 부위의 기능은 아직까지 알려져 있지 않았다. 이에, 상기 키메릭 유전자의 생물학적 기능을 조사하기 위해, 본 발명자들은 TFG-TEC 융합 단백질의 특징을 규명하였다. 본 연구에서, 본 발명자들은 TFG-TEC가 모(parental) TEC 단백질의 서열 특이성과 구별할 수 없는 서열 특이성으로 DNA에 결합하는 핵 단백질이라는 것을 확인하였다. 상기 융합 유전자는 TEC보다 더 강력한 전이활성인자(tansactivator)를 인코딩한다.

[0134] 스플라이싱 인자로서 기능하고 스플라이소좀(spliceosome) 형성의 초기 단계에서 중요한 U1C 단백질은 EWS-Fli-1과 결합한다(26, 29). 상기 상호작용은 EWS의 NTD를 통해 매개되고 EWS-Fli-1-매개된 전사 활성화를 억제함으로써 EWS-Fli-1 활성을 조절한다(26). 흥미롭게도, U1C/EWS(NTD) 상호작용은 hTAF_{II}68(NTD)에서도 신뢰할만한 수준으로 유지된다(도 4). 하지만, TFG(NTD)는 U1C와 결합하지 않는데(도 4), 이는 TFG(NTD)의 상호작용 파트너들에 대한 스펙트럼이 EWS(NTD)-중심된(centered) 단백질 상호작용 네트워크의 스펙트럼과 동일하지 않다는 것을 보여준다. 따라서, TFG-TEC가 EWS(NTD)-상호작용 단백질들로 알려진 c-Abl(30), v-Src(31) 및 ZFM1(32)과 상호작용할 수 있는지를 테스트하고 이의 활성이 상술한 단백질들에 의해 조절되는지 여부를 조사하는 것은 매우 흥미로운 주제일 수 있다.

[0135] NIH3T3 세포에 형질전환시킬 수 있거나 또는 누드 마우스에서 증가된 종양 성장을 야기할 수 있는 EWS-Fli-1(33, 34), EWS-WT1(35) 및 EWS-Oct-4(36, 37) 같은 다른 융합 산물들과는 달리, TFG-TEC의 예상된 형질전환 활성은 아직까지 결정되지 않았다. TFG-TEC 유전자 산물의 종양형성능(tumorigenic potential)은 TFG-TEC가 인간 EMCs의 형성에 결정적인 역할을 한다는 아이디어와 일치한다. TFG-TEC 단백질의 DNA-결합 특이성이 TEC에서 이전에 보고된 것과 유사하고(도 2) TFG-TEC 유전자가 강한 전사 활성인자를 인코딩하기 때문에(도 5), TFG-TEC 융합 컨스트럭트가 TEC-반응성 유전자들의 발현을 이상조절함으로써 종양형성 과정에 기여한다고 생각할 수 있다. 하지만, TFG-TEC 융합 단백질이 인간 EMCs에서 다른 TEC 융합 단백질들의 부적절한 활성화와 유사하게 TEC 타겟 유전자들의 부적절한 활성화를 통해 종양원성 기능을 하는 것처럼 보일지라도, 핵심적인 타겟 유전자(들)의 명확한 동정이 여전히 필요하다.

- [0136] 도 5c에서 볼 수 있듯이, 이상-발현된 TFG-TEC 및 TEC 단백질은 Skp2, L-Myc, SOCS2 및 STAT-3 유전자의 발현을 상향-조절하였다. 또한, 본 발명자들은 상술한 잠재적인 타겟 유전자들이 TEC보다 TFG-TEC에 의해 보다 강하게 상향-조절된다는 것에 주목하였다(도 5c). NOR1 단백질은 마이토젠(mitogen)으로 기능하지만(38-40), 상기 단백질 활성화에 관여된 기작들은 아직까지 알려져 있지 않다. 최근에, NOR1 단백질이 사이클린-의존성 키나제 억제제(cyclin-dependent kinase inhibitor)인 p27(41, 42)의 분해를 담당하는 Skp2 유전자의 발현을 유도한다고 보고되었다(28). 이상-발현된 TFG-TEC도 *L-Myc*, *SOCS2* 및 *STAT-3*의 발현을 상향-조절하였다. 흥미롭게도, *L-Myc*, *SOCS2* 및 *STAT-3*의 발현도 인간 암의 발병에서 관찰되고 있다(43-46). TFG-TEC가 어떻게 사람의 외골격 점액성 연골육종(extraskelatal myxoid chondrosarcomas, EMCs)의 발병에서 종양원성 기능을 하는지를 설명할 수 있기 때문에, 상술한 발견들은 중요하다.
- [0137] 염색체 전좌에 의해 증가된 기능성을 가지는 신규한 키메라 전사인자의 제조는 인간 EMCs에서 EWS- 및 hTAF_{II}68-TEC 융합 단백질들에 대한 변하지 않는 흥미로운 주제이다(27). 본 발명자들의 이전 보고에 따르면, hTAF_{II}68-TEC의 hTAF_{II}68 NTD는 신규한 활성화 도메인을 제공함으로써 기능 활성화에 기여하는 데, 이는 hTAF_{II}68-TEC 및 TEC 간의 전이활성 능력에서의 차이가 이들의 NTDs의 차이에서 기인할 수 있다는 것을 의미한다. 상기 가설과 일치하게도, TFG-TEC의 TFG(NTD)는 GAL4 DBD와 함께 전사를 활성화시킬 수 있었다(도 6). 또한, 상술한 결과들은 TFG(NTD) 내 활성화 도메인(들)의 존재 하에서도 일치하였다. TFG(NTD)는 hTAF_{II}68 및 EWS 모두와 서열 상동성을 공유한다(7). 따라서, TFG(NTD)는 hTAF_{II}68에서 제안된 것(48)과 유사한 방식, 즉 밀폐 형태(closed conformation)에서 개방 형태(open conformation)로의 개시전 복합체(preinitiation complex)의 변형에 기능함으로써 전사를 자극할 수 있다. 추가적인 실험들이 상기 가능성을 탐구하기 위해 요구된다.
- [0138] 결론적으로, 본 연구의 발견들은 추가적인 유전자들이 TFG-TEC와 공동-작용하거나 또는 종양 진행(tumor progression)을 위해 필요할 지라도 TFG-TEC가 인간 EMCs에서 종양형성과정에 필요한 잠재적인 종양원성 유전자라는 증거를 제공한다. 아마도, TFG-TEC는 핵심적인 TEC 다운스트림 타겟 유전자들을 조절하여 종양발생(oncogenesis)에 기여한다. 따라서, 다운스트림 유전자가 종양형성과정에서 필수적인 지를 결정하고 TFG-TEC가 이/이들 유전자(들)과 협력하여 인간 EMCs를 발병시키는 지 여부를 조사하는 것은 매우 흥미로운 것이다. 향후 실험들에서, 본 발명자들은 인간 EMCs에서 TFG-TEC에 의해 조절되는 핵심적인 내인성 타겟들을 동정하는 것에 초점을 맞출 것이다.
- [0139] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 일 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0140] **참조문헌**
- [0141] 1. Rabbitts,T.H. et al. (2003) Chromosomal translocation products engender new intracellular therapeutic technologies. Nat. Med., 9, 383-386.
- [0142] 2. Clark,J. et al. (1996) Fusion of the EWS gene to CHN, a member of the steroid/thyroid receptor gene superfamily, in a human myxoid chondrosarcoma. Oncogene, 12, 229-235.
- [0143] 3. Labelle,Y. et al. (1999) The EWS/TEC fusion protein encoded by the t(9;22) chromosomal translocation in human chondrosarcomas is a highly potent transcriptional activator. Oncogene, 18, 3303-3308.
- [0144] 4. Labelle,Y. et al. (1995) Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. Hum. Mol. Genet., 4, 2219-2226.
- [0145] 5. Sjogren,H. et al. (1999) Fusion of the EWS-related gene TAF2N to TEC in extraskelatal myxoid chondrosarcoma. Cancer Res., 59, 5064-5067.
- [0146] 6. Attwooll,C. et al. (1999) Identification of a novel fusion gene involving hTAF_{II}68 and CHN from a t(9;17)(q22;q11.2) translocation in an extraskelatal myxoid chondrosarcoma. Oncogene, 18, 7599-7601.

- [0147] 7. Hisaoka,M. et al. (2004) TFG is a novel fusion partner of NOR1 in extraskelletal myxoid chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 40, 325-328.
- [0148] 8. Greco,A. et al. (1995) The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. *Mol. Cell Biol.*, 15, 6118-6127.
- [0149] 9. Hernandez,L. et al. (1999) TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood*, 94, 3265-3268.
- [0150] 10. Mencinger,M. et al. (1997) Characterization and chromosomal mapping of the human TFG gene involved in thyroid carcinoma. *Genomics*, 41, 327-331.
- [0151] 11. Miranda,C. et al. (2006) The TFG protein, involved in oncogenic rearrangements, interacts with TANK and NEMO, two proteins involved in the NF-kappaB pathway. *J. Cell Physiol.*, 208, 154-160.
- [0152] 12. Ohkura,N. et al. (1994) Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205, 1959-1965.
- [0153] 13. Hedvat,C.V. et al. (1995) The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor. *Mol. Endocrinol.*, 9, 1692-1700.
- [0154] 14. Maltais,A. et al. (2000) Structure and expression of the mouse gene encoding the orphan nuclear receptor TEC. *DNA Cell Biol.*, 19, 121-130.
- [0155] 15. Cheng,L.E. et al. (1997) Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.*, 16, 1865-1875.
- [0156] 16. Sambrook,J. et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- [0157] 17. Kim,J. et al. (1998) The DNA binding domains of the WT1 tumor suppressor gene product and chimeric EWS/WT1 oncoprotein are functionally distinct. *Oncogene*, 16, 1021-1030.
- [0158] 18. Lee,H.J. et al. (2004) Stimulation of hTAFII68 (NTD)-mediated transactivation by v-Src. *FEBS Lett.*, 564, 188-198.
- [0159] 19. Kim,S. et al. (2007) Regulation of oncogenic transcription factor hTAF(II)68-TEC activity by human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *Biochem. J.*, 404, 197-206.
- [0160] 20. Lee,J. et al. (2005) Stimulation of Oct-4 activity by Ewings sarcoma protein. *Stem Cells*, 23, 738-751.
- [0161] 21. Lee,J. et al. (2006) The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J. Biol. Chem.*, 281, 33554-33565.
- [0162] 22. Liu,W. et al. (2007) Cdh1-anaphase-promoting complex targets Skp2 for destruction in transforming growth factor beta-induced growth inhibition. *Mol. Cell Biol.*, 27, 2967-2979.
- [0163] 23. Paulson,K.G. et al. (2009) Array-CGH reveals recurrent genomic changes in Merkel cell carcinoma including amplification of L-Myc. *J. Invest. Dermatol.*, 129, 1547-1555.
- [0164] 24. Cheng,S.M. et al. (2009) HIV-1 transactivator protein induction of suppressor of cytokine signaling-2 contributes to dysregulation of IFNgamma
- [0165] signaling. *Blood*, 113, 5192-5201.
- [0166] 25. Zhang,L. et al. (2008) Effects of plasmid-based Stat3-specific short hairpin RNA and GRIM-19 on PC-3M tumor cell growth. *Clin. Cancer Res.*, 14, 559-568.
- [0167] 26. Knoop,L.L. et al. (2000) The splicing factor UIC represses EWS/FLI-mediated transactivation. *J. Biol. Chem.*, 275, 24865-24871.
- [0168] 27. Kim,J. et al. (1999) Molecular genetics of chromosome translocations involving EWS and related

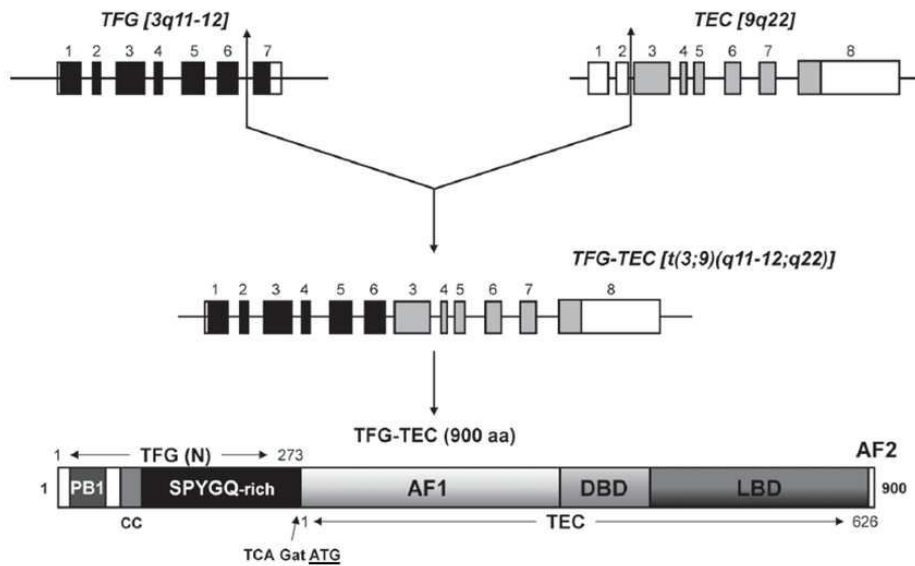
family members. *Physiol. Genomics*, 1, 127-138.

- [0169] 28. Gizard,F. et al. (2011) Transcriptional regulation of S phase kinase-associated protein 2 by NR4A orphan nuclear receptor NOR1 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 286, 35485-35493.
- [0170] 29. Kramer,A. (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 367-409.
- [0171] 30. Kim,J. et al. (1999) Modification of EWS/WT1 functional properties by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 14300-14305.
- [0172] 31. Kim,J. et al. (2000) Modulation of EWS/WT1 activity by the v-Src protein tyrosine kinase. *FEBS Lett.*, 474, 121-128.
- [0173] 32. Zhang,D. et al. (1998) The transcriptional repressor ZFM1 interacts with and modulates the ability of EWS to activate transcription. *J. Biol. Chem.*, 273, 18086-18091.
- [0174] 33. May,W.A. et al. (1993) Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 5752-5756.
- [0175] 34. May,W.A. et al. (1993) The Ewings sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol. Cell Biol.*, 13, 7393-7398.
- [0176] 35. Kim,J. et al. (1998) The desmoplastic small round cell tumor t(11;22) translocation produces EWS/WT1 isoforms with differing oncogenic properties. *Oncogene*, 16, 1973-1979.
- [0177] 36. Lee,J. et al. (2007) The EWS-Oct-4 fusion gene encodes a transforming gene. *Biochem. J.*, 406, 519-526.
- [0178] 37. Kim,S. et al. (2010) EWS-Oct-4B, an alternative EWS-Oct-4 fusion gene, is a potent oncogene linked to human epithelial tumours. *Br. J. Cancer*, 102, 436-446.
- [0179] 38. Martinez-Gonzalez,J. et al. (2003) Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.*, 92, 96-103.
- [0180] 39. Nomiya,T. et al. (2006) The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 281, 33467-33476.
- [0181] 40. Nomiya,T. et al. (2009) Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury. *Circulation*, 119, 577-586.
- [0182] 41. Carrano,A.C. et al. (1999) SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.*, 1, 193-199.
- [0183] 42. Nakayama,K. et al. (2004) Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev. Cell*, 6, 661-672.
- [0184] 43. Nesbit,C.E. et al. (1999) MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, 18, 3004-3016.
- [0185] 44. Eilers,M. et al. (2008) Mycs broad reach. *Genes Dev.*, 22, 2755-2766.
- [0186] 45. Rico-Bautista,E. et al. (2006) Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17, 431-439.
- [0187] 46. Aggarwal,B.B. et al. (2009) Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann. NY Acad. Sci.*, 1171, 59-76.
- [0188] 47. Kim,S. et al. (2008) The hTAF II 68-TEC fusion protein functions as a strong transcriptional activator. *Int. J. Cancer*, 122, 2446-2453.

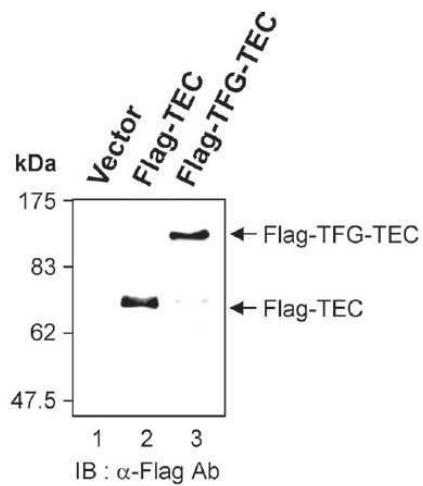
- [0189] 48. Bertolotti, A. et al. (1996) hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. EMBO J., 15, 5022-5031.

도면

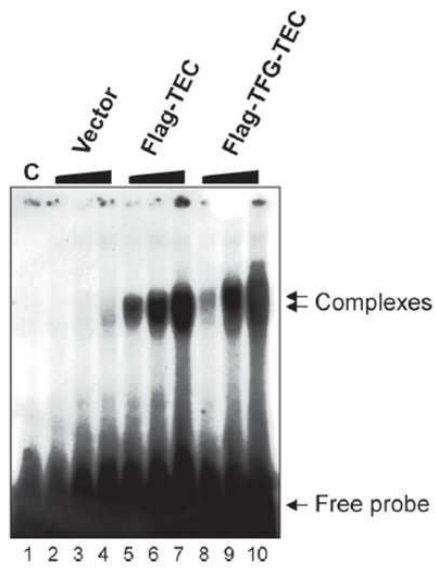
도면1



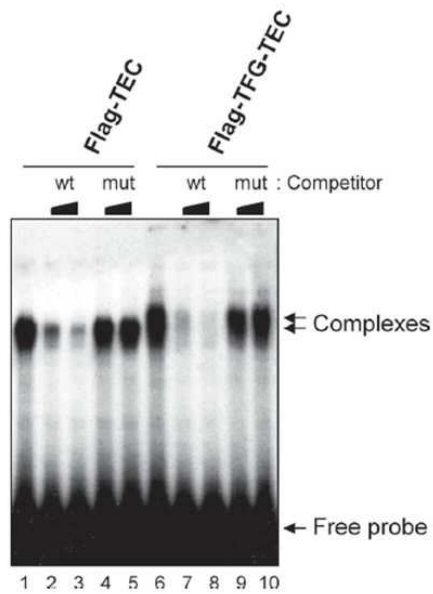
도면2a



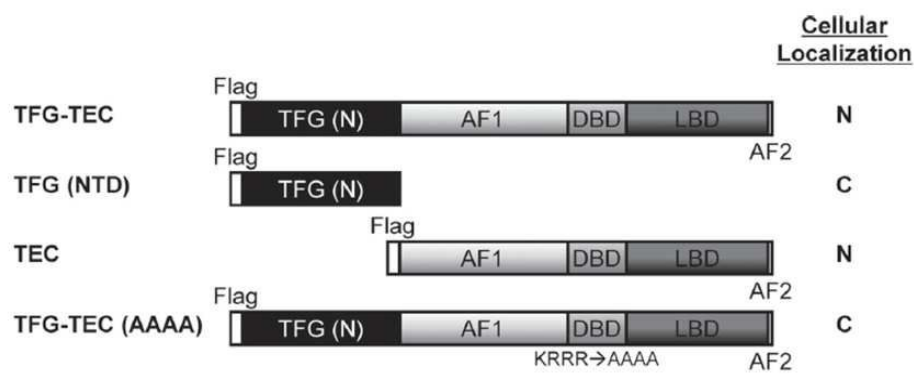
도면2b



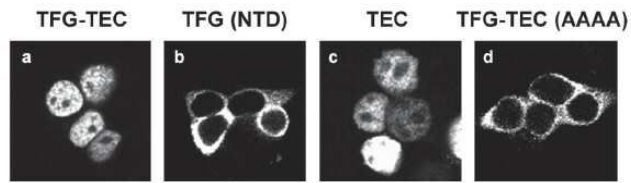
도면2c



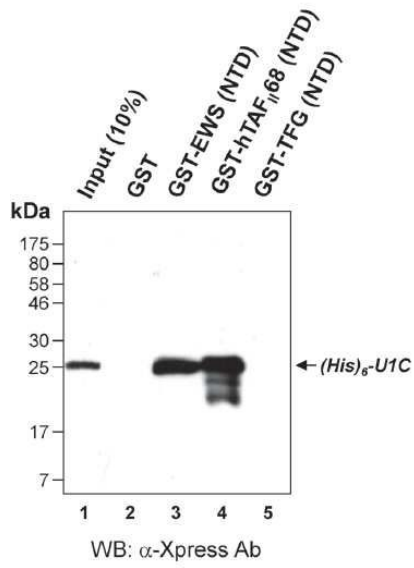
도면3a



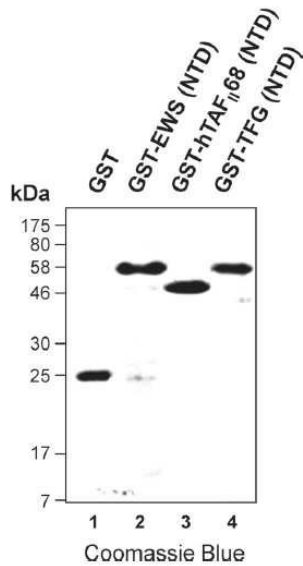
도면3b



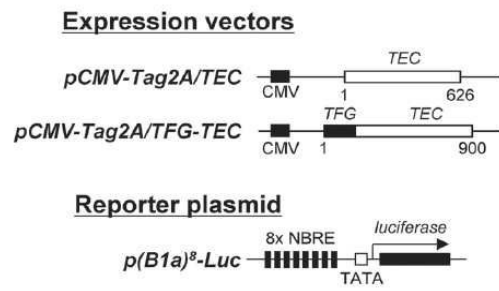
도면4a



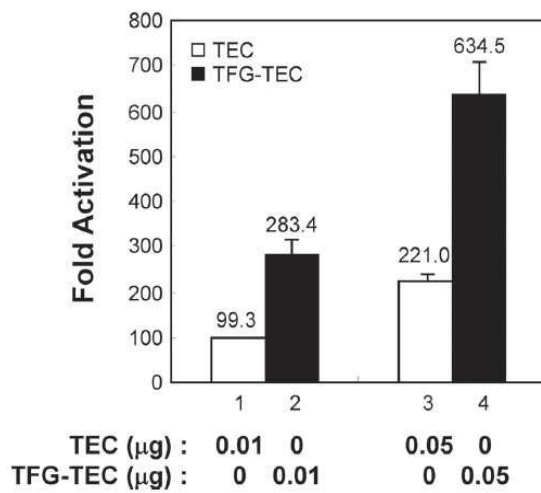
도면4b



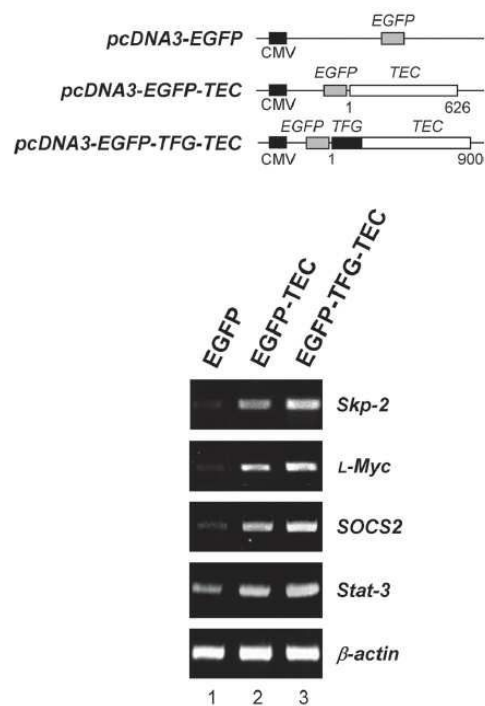
도면5a



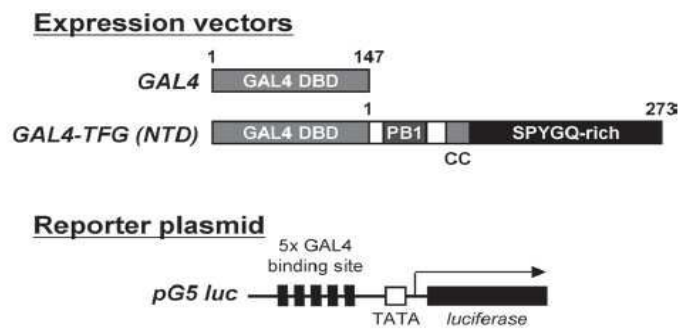
도면5b



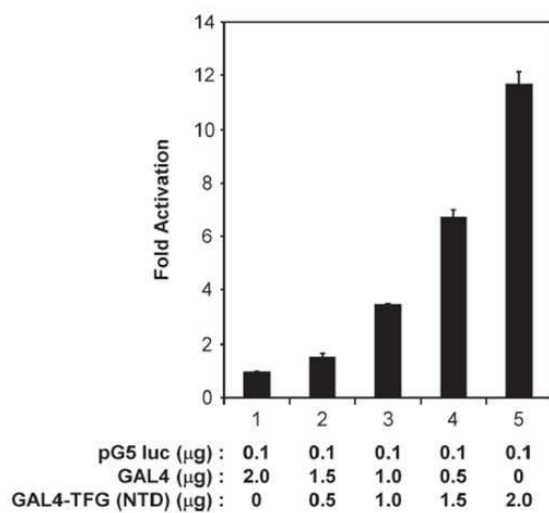
도면5c



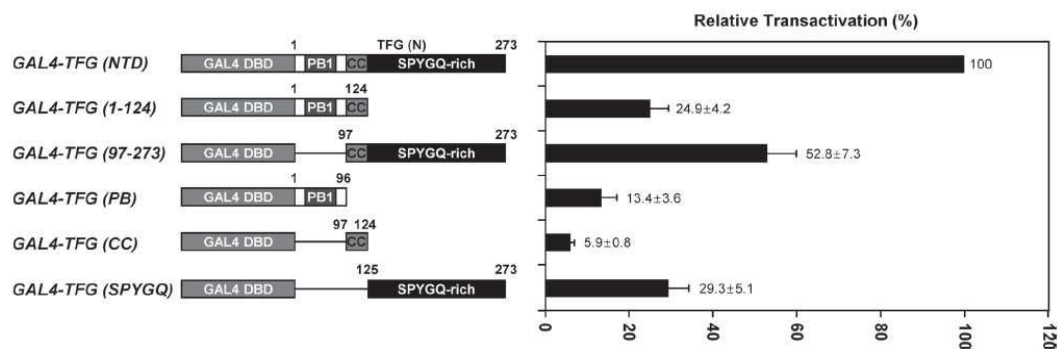
도면6a



도면6b



도면7



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Screening Methods of a Substance for Preventing or Treating a Tumor Disorder Using a TFG-TEC Fusion Construct and Uses Thereof
- <130> PN130091
- <160> 9
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgaacggac agttggatct aagtgggaag ctaatcgta aagctcaact tggggaggat 60

attcggcgaa ttctattca taatgaagat attacttatg atgaattagt gctaattgatg 120

caacgagttt tcagaggaaa acttctgagt aatgatgaag taacaataaa gtataaagat 180

gaagatggag atcttataac aatttttgat agttctgacc tttcctttgc aattcagtgc 240

agtaggatac tgaactgac attatttggt aatggccagc caagaccct tgaatcaagt 300

caggtgaaat atctccgtcg agaactgata gaacttcgaa ataaagtga tcgtttattg 360

gatagcttgg aaccacctgg agaaccagga cctccacca atattcctga aatgatact 420

gtggatggta gggaagaaaa gtctgcttct gattcttctg gaaaacagtc tactcaggtt 480

atggcagcaa gtatgtctgc ttttgatcct ttaaaaaacc aagatgaaat caataaaaat 540

gttatgtcag cgtttggctt aacagatgat caggtttcag ggccaccag tgctcctgca 600

gaagatcgtt caggaacacc cgacagcatt gcttctcct cctcagcagc tcaccacca 660

ggcgttcagc cacagcagcc accatataca ggagctcaga ctcaagcagg tcagattgaa 720

ggtcagatgt accaacagta ccagcaacag gccggctatg gtgcacagca gccgcaggct 780

ccacctcagc agcctcaaca gtatggtatt cagtattcag caagctatag tcagcagact 840

ggacctcaac aacctcagca gttccaggga tatggccagc aaccaacttc ccaggcacca 900

gctcctgcct tttctggta gcctcaacaa ctgctgctc agccgccaca gcagtaccag 960

gcgagcaatt atcctgcaca aacttacact gcccaaactt ctacgcctac taattatact 1020

gtggctcctg cctctcaacc tggaatggct ccaagccaac ctggggccta tcaaccaaga 1080

ccaggtttta cttcacttcc tggaagtacc atgacccctc ctccaagtgg gcctaactct 1140

tatgcgcgta accgtctctc ctttggtcag ggctataccc aacctggacc tggttatcga 1200

1200

<210> 2

<211> 1878

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgccctgcg tccaagccca atatagccct tcccctccag gttccagtta tgcggcgag	60
acatacagct cggaatacac cacggagatc atgaaccccg actacaccaa gctgaccatg	120
gaccttggca gcactgagat cacggctaca gccaccacgt ccctgcccag catcagtacc	180
ttcgtggagg gctactcgag caactacgaa ctcaagcctt cctgcgtgta ccaaatgcag	240
cggcccttga tcaaagtgga ggagggggcg gcgcccagct accatcacca tcaccaccac	300
caccaccacc accaccacca tcaccagcag cagcatcagc agccatccat tcctccagcc	360
tccagcccgg aggacgaggt gctgcccagc acctccatgt acttcaagca gtccccaccg	420
tccaccccca ccacgccggc cttccccccg caggcggggg cgttatggga cgaggcactg	480
ccctcggcgc ccggctgcat cgcacccggc ccgtctgtgg acccgccgat gaaggcggtc	540
cccacggtgg ccggcgcgcg cttcccgttc ttccacttca agccctcgcc gccgcatccc	600
cccgcccca gcccgccgg cggccaccac ctcggtacg acccgacggc cgctgccgag	660
ctcagcctgc cgctgggagc cgcagccgcc gcgggcagcc aggcgcggc gcttgagagc	720
caccgtacg ggctgccgt ggccaagagg gcggccccgc tggccttccc gcctctcggc	780
ctcagccct cccctaccgc gtccagcctg ctggcgagga gtccagcct gccgtcgccg	840
cccagcagga gctcgtcgtc tggcgagggc acgtgtgccg tgtgcgggga caacgccgc	900
tgccagcact acggcgtgag aacctgagag ggctgcaagg gctttttcaa gagaacagtg	960
cagaaaaatg caaaatatgt ttgcctggca aataaaaact gccagtaga caagagacgt	1020
cgaaacgat gtcagtactg tcgatttcag aagtgtctca gtgttggaat ggtaaaagaa	1080
gttgtccgta cagatagtct gaaagggagg agaggtcgtc tgccttcaa accaaagagc	1140
ccattacaac aggaaccttc tcagccctct ccaccttctc ctccaatctg catgatgaat	1200
gcccttgtec gagctttaac agactcaaca ccagagatc ttgattatc cagatactgt	1260
cccactgacc aggtctgtgc aggcacagat gctgagcatg tgcaacaatt ctacaacctc	1320
ctgacagcct ccattgatgt atccagaagc tgggcagaaa agattccggg atttactgat	1380
ctcccaaaag aagatcagac attacttatt gaatcagcct ttttgagct gtttgtctc	1440
agactttcca tcaggatcaa cactgctgaa gataagtttg tgttctgcaa tggacttgct	1500
ctgcatcgac ttcagtgcct tcgtggattt ggggagtggc tcgactctat taaagacttt	1560
tccttaaatt tgcagagcct gaaccttgat atccaagcct tagcctgcct gtcagcactg	1620
agcatgatca cagaaagaca tgggttaaaa gaaccaaaga gagtgaaga gctatgcaac	1680
aagatcaca gcagtttaaa agaccaccag agtaaggac aggccttgga gccaccgag	1740

tccaaggtcc tgggtgccct ggtagaactg aggaagatct gcacctggg cctccagcgc	1800
atcttctacc tgaagctgga agacttggtg tctccacctt ccatcattga caagctcttc	1860
ctggacaccc tacctttc	1878
<210> 3	
<211> 2700	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TFG-TEC fusion construct	
<400> 3	
atgaacggac agttgatct aagtgggaag ctaatcatca aagctcaact tggggaggat	60
attcggcgaa ttctattca taatgaagat attacttatg atgaattagt gctaattgatg	120
caacgagttt tcagaggaaa acttctgagt aatgatgaag taacaataaa gtataaagat	180
gaagatggag atcttataac aatttttgat agttctgacc tttcctttgc aattcagtgc	240
agtaggatac tgaactgac attatttggt aatggccagc caagaccct tgaatcaagt	300
caggtgaaat atctccgtcg agaactgata gaacttcgaa ataaagtga tcgtttattg	360
gatagcttgg aaccacctgg agaaccagga ccttcacca atattcctga aatgatact	420
gtggatggta gggaagaaaa gtctgcttct gattcttctg gaaaacagtc tactcaggtt	480
atggcagcaa gtatgtctgc ttttgatcct ttaaaaaacc aagatgaaat caataaaat	540
gttatgtcag cgtttggtt aacagatgat caggtttcag ggccaccag tgctcctgca	600
gaagatcgtt caggaacacc cgacagcatt gcttcctcct cctcagcagc tcaccacca	660
ggcgttcagc cacagcagcc accatataca ggagctcaga ctcaagcagg tcagattgaa	720
ggtcagatgt accaacagta ccagcaacag gccggctatg gtgcacagca gccgcaggct	780
ccacctcagc agcctcaaca gtatggtatt cagtattcag atatgccctg cgtccaagcc	840
caatatagcc ctccccctcc aggttccagt tatgcggcgc agacatacag ctcggaatac	900
accacggaga tcatgaaccc cgactacacc aagctgacca tggaccttgg cagcactgag	960
atcacggcta cagccaccac gtccttgccc agcatcagta ccttcgtgga gggtactcg	1020
agcaactacg aactcaagcc ttctgcgtg taccaaatgc agcggccctt gatcaaagt	1080
gaggaggggc gggcgcccag ctaccatcac catcaccacc accaccacca ccaccaccac	1140
catcaccagc agcagcatca gcagccatcc attcctccag cctccagccc ggaggacgag	1200
gtgctgccc gacctccat gtacttcaag cagtccccc cgtccacccc caccacgccg	1260
gccttcccc cgcaggcggg ggcgttatgg gacgaggcac tgcctcggc gcccggctgc	1320

atcgaccccg gcccgctgct ggacccgccg atgaaggcgg tccccacggt ggccggcgcg 1380

cgcttccgc tttccactt caagccctcg ccgccgcatc cccccgcgc cagcccggcc 1440

ggcggccacc acctcggtta cgaccgcagc gcgctgccc cgctcagcct gccgctggga 1500

gccgcagccg ccgcgggcag ccagccgcc gcgcttgaga gccacccgta cgggctgccg 1560

ctggccaaga gggcgccccc gctggccttc ccgctctcg gcctcagcc ctcccctacc 1620

gcgtccagcc tgctgggcga gagtcccagc ctgccgtcgc cgcgcagcag gagctcgtcg 1680

tctggcgagg gcacgtgtgc cgtgtgcggg gacaacgcc cctgccagca ctacggcgtg 1740

cgaacctgcg agggctgcaa gggctttttc aagagaacag tgcagaaaaa tgcaaatat 1800

gtttgcctgg caaataaaaa ctgcccagta gacaagagac gtcgaaaccg atgtcagtac 1860

tgtcgatttc agaagtgtct cagtgttga atggtaaaag aagtgtccg tacagatagt 1920

ctgaaaggga ggagaggctg tctgccttcc aaaccaaaga gccattaca acaggaacct 1980

tctcagccct ctccaccttc tctccaatc tgcatgatga atgcccttgt ccgagcttta 2040

acagactcaa caccagaga tcttgattat tccagatact gtccactga ccaggctgct 2100

gcaggcacag atctgagca tgtgcaacaa ttctacaacc tctgacagc ctccattgat 2160

glatccagaa gctgggcaga aaagattccg ggatttactg atctcccaa agaagatcag 2220

acattactta ttgaatcagc ctttttgag ctgtttgtcc tcagactttc catcaggtea 2280

aacactgctg aagataagtt tgtgttctgc aatggacttg tctgcatcg acttcagtgc 2340

cttcgtggat ttggggagtg gctcgactct attaaagact tttccttaa tttgcagagc 2400

ctgaaccttg atalccaagc cttagcctgc ctgtcagcac tgagcatgat cacagaaaga 2460

catgggttaa aagaaccaa gagagtcgaa gagctatga acaagatcac aagcagttta 2520

aaagaccacc agagtaagg acagctctg gagccaccg agtccaaggt cctgggtgcc 2580

ctggtagaac tgaggaagat ctgcacctg ggcctccagc gcatcttcta cctgaagctg 2640

gaagacttgg tgctccacc ttccatcatt gacaagctct tctggacac cctaccttc 2700

2700

<210> 4

<211> 820

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TFG(NTD) construct

<400> 4

atgaacggac agttgatct aagtgggaag ctaatcgtca aagctcaact tggggaggat 60

attcggcgaa ttcttattca taatgaagat attacttatg atgaattagt gctaattgatg 120
caacgagttt tcagaggaaa acttctgagt aatgatgaag taacaataaa gtataaagat 180

gaagatggag atcttataac aatttttgat agttctgacc tttcctttgc aattcagtgc 240
agtaggatac tgaactgac attatttggt aatggccagc caagaccct tgaatcaagt 300
caggtgaaat atctccgtcg agaactgata gaacttcgaa ataaagtga tcgtttattg 360
gatagcttgg aaccacctgg agaaccagga ccttcacca atattcctga aatgatact 420
gtggatggta ggaagaaaa gtctgcttct gattcttctg gaaaacagtc tactcaggtt 480
atggcagcaa gtatgtctgc ttttgatcct ttaaaaaacc aagatgaaat caataaaaat 540
gttatgtcag cgtttggtt aacagatgat caggtttcag ggccaccag tgctcctgca 600

gaagatcggt caggaacacc cgacagcatt gcttctcct cctcagcagc tcaccacca 660
ggcggtcagc cacagcagcc accatataca ggagtcaga ctcaagcagg tcagattgaa 720
ggtcagatgt accaacagta ccagcaacag gccggctatg gtgcacagca gccgcaggct 780
ccacctcagc agcctcaaca gtatggtatt cagtattcag 820

<210> 5
<211> 400
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

Met Asn Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Lys Leu Ile Val Lys Ala Gln

1 5 10 15

Leu Gly Glu Asp Ile Arg Arg Ile Pro Ile His Asn Glu Asp Ile Thr

20 25 30

Tyr Asp Glu Leu Val Leu Met Met Gln Arg Val Phe Arg Gly Lys Leu

35 40 45

Leu Ser Asn Asp Glu Val Thr Ile Lys Tyr Lys Asp Glu Asp Gly Asp

50 55 60

Leu Ile Thr Ile Phe Asp Ser Ser Asp Leu Ser Phe Ala Ile Gln Cys

65 70 75 80

Ser Arg Ile Leu Lys Leu Thr Leu Phe Val Asn Gly Gln Pro Arg Pro

85 90 95

Leu Glu Ser Ser Gln Val Lys Tyr Leu Arg Arg Glu Leu Ile Glu Leu

100	105	110	
Arg Asn Lys Val Asn Arg Leu Leu Asp Ser Leu Glu Pro Pro Gly Glu			
115	120	125	
Pro Gly Pro Ser Thr Asn Ile Pro Glu Asn Asp Thr Val Asp Gly Arg			
130	135	140	
Glu Glu Lys Ser Ala Ser Asp Ser Ser Gly Lys Gln Ser Thr Gln Val			
145	150	155	160
Met Ala Ala Ser Met Ser Ala Phe Asp Pro Leu Lys Asn Gln Asp Glu			
165	170	175	
Ile Asn Lys Asn Val Met Ser Ala Phe Gly Leu Thr Asp Asp Gln Val			
180	185	190	
Ser Gly Pro Pro Ser Ala Pro Ala Glu Asp Arg Ser Gly Thr Pro Asp			
195	200	205	
Ser Ile Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala His Pro Pro Gly Val Gln Pro			
210	215	220	
Gln Gln Pro Pro Tyr Thr Gly Ala Gln Thr Gln Ala Gly Gln Ile Glu			
225	230	235	240
Gly Gln Met Tyr Gln Gln Tyr Gln Gln Gln Ala Gly Tyr Gly Ala Gln			
245	250	255	
Gln Pro Gln Ala Pro Pro Gln Gln Pro Gln Gln Tyr Gly Ile Gln Tyr			
260	265	270	
Ser Ala Ser Tyr Ser Gln Gln Thr Gly Pro Gln Gln Pro Gln Gln Phe			
275	280	285	
Gln Gly Tyr Gly Gln Gln Pro Thr Ser Gln Ala Pro Ala Pro Ala Phe			
290	295	300	
Ser Gly Gln Pro Gln Gln Leu Pro Ala Gln Pro Pro Gln Gln Tyr Gln			
305	310	315	320
Ala Ser Asn Tyr Pro Ala Gln Thr Tyr Thr Ala Gln Thr Ser Gln Pro			
325	330	335	
Thr Asn Tyr Thr Val Ala Pro Ala Ser Gln Pro Gly Met Ala Pro Ser			
340	345	350	
Gln Pro Gly Ala Tyr Gln Pro Arg Pro Gly Phe Thr Ser Leu Pro Gly			

355 360 365
Ser Thr Met Thr Pro Pro Pro Ser Gly Pro Asn Pro Tyr Ala Arg Asn

370 375 380
Arg Pro Pro Phe Gly Gln Gly Tyr Thr Gln Pro Gly Pro Gly Tyr Arg
385 390 395 400

<210> 6
<211> 626
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Ser Pro Ser Pro Pro Gly Ser Ser
1 5 10 15
Tyr Ala Ala Gln Thr Tyr Ser Ser Glu Tyr Thr Thr Glu Ile Met Asn
20 25 30

Pro Asp Tyr Thr Lys Leu Thr Met Asp Leu Gly Ser Thr Glu Ile Thr
35 40 45
Ala Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Ile Ser Thr Phe Val Glu Gly
50 55 60
Tyr Ser Ser Asn Tyr Glu Leu Lys Pro Ser Cys Val Tyr Gln Met Gln
65 70 75 80
Arg Pro Leu Ile Lys Val Glu Glu Gly Arg Ala Pro Ser Tyr His His
85 90 95
His His His His His His His His His His His His Gln Gln Gln His

100 105 110
Gln Gln Pro Ser Ile Pro Pro Ala Ser Ser Pro Glu Asp Glu Val Leu
115 120 125
Pro Ser Thr Ser Met Tyr Phe Lys Gln Ser Pro Pro Ser Thr Pro Thr
130 135 140
Thr Pro Ala Phe Pro Pro Gln Ala Gly Ala Leu Trp Asp Glu Ala Leu
145 150 155 160
Pro Ser Ala Pro Gly Cys Ile Ala Pro Gly Pro Leu Leu Asp Pro Pro

165	170	175
Met Lys Ala Val Pro Thr Val Ala Gly Ala Arg Phe Pro Leu Phe His		
180	185	190
Phe Lys Pro Ser Pro Pro His Pro Pro Ala Pro Ser Pro Ala Gly Gly		
195	200	205
His His Leu Gly Tyr Asp Pro Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ser Leu Pro		
210	215	220
Leu Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gln Ala Ala Ala Leu Glu Ser		
225	230	235
His Pro Tyr Gly Leu Pro Leu Ala Lys Arg Ala Ala Pro Leu Ala Phe		
245	250	255
Pro Pro Leu Gly Leu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ser Ser Leu Leu Gly		
260	265	270
Glu Ser Pro Ser Leu Pro Ser Pro Pro Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly		
275	280	285
Glu Gly Thr Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln His Tyr		
290	295	300
Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val		
305	310	315
Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro Val		
325	330	335
Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys Cys		
340	345	350
Leu Ser Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu Lys		
355	360	365
Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro Leu Gln Gln		
370	375	380
Glu Pro Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Ile Cys Met Met Asn		
385	390	395
Ala Leu Val Arg Ala Leu Thr Asp Ser Thr Pro Arg Asp Leu Asp Tyr		
405	410	415

Ser Arg Tyr Cys Pro Thr Asp Gln Ala Ala Ala Gly Thr Asp Ala Glu
420 425 430

His Val Gln Gln Phe Tyr Asn Leu Leu Thr Ala Ser Ile Asp Val Ser
435 440 445

Arg Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Thr Asp Leu Pro Lys Glu
450 455 460

Asp Gln Thr Leu Leu Ile Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Val Leu
465 470 475 480

Arg Leu Ser Ile Arg Ser Asn Thr Ala Glu Asp Lys Phe Val Phe Cys
485 490 495

Asn Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Leu Arg Gly Phe Gly Glu
500 505 510

Trp Leu Asp Ser Ile Lys Asp Phe Ser Leu Asn Leu Gln Ser Leu Asn
515 520 525

Leu Asp Ile Gln Ala Leu Ala Cys Leu Ser Ala Leu Ser Met Ile Thr
530 535 540

Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Cys Asn
545 550 555 560

Lys Ile Thr Ser Ser Leu Lys Asp His Gln Ser Lys Gly Gln Ala Leu
565 570 575

Glu Pro Thr Glu Ser Lys Val Leu Gly Ala Leu Val Glu Leu Arg Lys
580 585 590

Ile Cys Thr Leu Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu Lys Leu Glu Asp
595 600 605

Leu Val Ser Pro Pro Ser Ile Ile Asp Lys Leu Phe Leu Asp Thr Leu
610 615 620

Pro Phe
625

<210> 7

<211> 900

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TFG-TEC fusion protein

<400> 7

Met Asn Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Lys Leu Ile Val Lys Ala Gln

1 5 10 15

Leu Gly Glu Asp Ile Arg Arg Ile Pro Ile His Asn Glu Asp Ile Thr

20 25 30

Tyr Asp Glu Leu Val Leu Met Met Gln Arg Val Phe Arg Gly Lys Leu

35 40 45

Leu Ser Asn Asp Glu Val Thr Ile Lys Tyr Lys Asp Glu Asp Gly Asp

50 55 60

Leu Ile Thr Ile Phe Asp Ser Ser Asp Leu Ser Phe Ala Ile Gln Cys

65 70 75 80

Ser Arg Ile Leu Lys Leu Thr Leu Phe Val Asn Gly Gln Pro Arg Pro

85 90 95

Leu Glu Ser Ser Gln Val Lys Tyr Leu Arg Arg Glu Leu Ile Glu Leu

100 105 110

Arg Asn Lys Val Asn Arg Leu Leu Asp Ser Leu Glu Pro Pro Gly Glu

115 120 125

Pro Gly Pro Ser Thr Asn Ile Pro Glu Asn Asp Thr Val Asp Gly Arg

130 135 140

Glu Glu Lys Ser Ala Ser Asp Ser Ser Gly Lys Gln Ser Thr Gln Val

145 150 155 160

Met Ala Ala Ser Met Ser Ala Phe Asp Pro Leu Lys Asn Gln Asp Glu

165 170 175

Ile Asn Lys Asn Val Met Ser Ala Phe Gly Leu Thr Asp Asp Gln Val

180 185 190

Ser Gly Pro Pro Ser Ala Pro Ala Glu Asp Arg Ser Gly Thr Pro Asp

195 200 205

Ser Ile Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala His Pro Pro Gly Val Gln Pro

210 215 220

Gln Gln Pro Pro Tyr Thr Gly Ala Gln Thr Gln Ala Gly Gln Ile Glu

225 230 235 240

Gly Gln Met Tyr Gln Gln Tyr Gln Gln Gln Ala Gly Tyr Gly Ala Gln

245 250 255

Gln Pro Gln Ala Pro Pro Gln Gln Pro Gln Gln Tyr Gly Ile Gln Tyr

260 265 270

Ser Asp Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Ser Pro Ser Pro Pro Gly

275 280 285

Ser Ser Tyr Ala Ala Gln Thr Tyr Ser Ser Glu Tyr Thr Thr Glu Ile

290 295 300

Met Asn Pro Asp Tyr Thr Lys Leu Thr Met Asp Leu Gly Ser Thr Glu

305 310 315 320

Ile Thr Ala Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Ile Ser Thr Phe Val

325 330 335

Glu Gly Tyr Ser Ser Asn Tyr Glu Leu Lys Pro Ser Cys Val Tyr Gln

340 345 350

Met Gln Arg Pro Leu Ile Lys Val Glu Glu Gly Arg Ala Pro Ser Tyr

355 360 365

His His His His His His His His His His His His His His Gln Gln

370 375 380

Gln His Gln Gln Pro Ser Ile Pro Pro Ala Ser Ser Pro Glu Asp Glu

385 390 395 400

Val Leu Pro Ser Thr Ser Met Tyr Phe Lys Gln Ser Pro Pro Ser Thr

405 410 415

Pro Thr Thr Pro Ala Phe Pro Pro Gln Ala Gly Ala Leu Trp Asp Glu

420 425 430

Ala Leu Pro Ser Ala Pro Gly Cys Ile Ala Pro Gly Pro Leu Leu Asp

435 440 445

Pro Pro Met Lys Ala Val Pro Thr Val Ala Gly Ala Arg Phe Pro Leu

450 455 460

Phe His Phe Lys Pro Ser Pro Pro His Pro Pro Ala Pro Ser Pro Ala

465 470 475 480

Gly Gly His His Leu Gly Tyr Asp Pro Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ser

485 490 495
 Leu Pro Leu Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gln Ala Ala Ala Leu
 500 505 510
 Glu Ser His Pro Tyr Gly Leu Pro Leu Ala Lys Arg Ala Ala Pro Leu
 515 520 525
 Ala Phe Pro Pro Leu Gly Leu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ser Ser Leu

 530 535 540
 Leu Gly Glu Ser Pro Ser Leu Pro Ser Pro Pro Ser Arg Ser Ser Ser
 545 550 555 560
 Ser Gly Glu Gly Thr Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln
 565 570 575
 His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg
 580 585 590
 Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys
 595 600 605

 Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln
 610 615 620
 Lys Cys Leu Ser Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser
 625 630 635 640
 Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro Leu
 645 650 655
 Gln Gln Glu Pro Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Ile Cys Met
 660 665 670
 Met Asn Ala Leu Val Arg Ala Leu Thr Asp Ser Thr Pro Arg Asp Leu

 675 680 685
 Asp Tyr Ser Arg Tyr Cys Pro Thr Asp Gln Ala Ala Ala Gly Thr Asp
 690 695 700
 Ala Glu His Val Gln Gln Phe Tyr Asn Leu Leu Thr Ala Ser Ile Asp
 705 710 715 720
 Val Ser Arg Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Thr Asp Leu Pro
 725 730 735
 Lys Glu Asp Gln Thr Leu Leu Ile Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe

740 745 750
 Val Leu Arg Leu Ser Ile Arg Ser Asn Thr Ala Glu Asp Lys Phe Val
 755 760 765
 Phe Cys Asn Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Leu Arg Gly Phe
 770 775 780
 Gly Glu Trp Leu Asp Ser Ile Lys Asp Phe Ser Leu Asn Leu Gln Ser
 785 790 795 800
 Leu Asn Leu Asp Ile Gln Ala Leu Ala Cys Leu Ser Ala Leu Ser Met
 805 810 815
 Ile Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu
 820 825 830
 Cys Asn Lys Ile Thr Ser Ser Leu Lys Asp His Gln Ser Lys Gly Gln
 835 840 845
 Ala Leu Glu Pro Thr Glu Ser Lys Val Leu Gly Ala Leu Val Glu Leu
 850 855 860
 Arg Lys Ile Cys Thr Leu Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu Lys Leu
 865 870 875 880
 Glu Asp Leu Val Ser Pro Pro Ser Ile Ile Asp Lys Leu Phe Leu Asp
 885 890 895
 Thr Leu Pro Phe
 900
 <210> 8
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TFG(NTD) protein
 <400> 8
 Met Asn Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Lys Leu Ile Val Lys Ala Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Glu Asp Ile Arg Arg Ile Pro Ile His Asn Glu Asp Ile Thr
 20 25 30
 Tyr Asp Glu Leu Val Leu Met Met Gln Arg Val Phe Arg Gly Lys Leu

35				40				45							
Leu	Ser	Asn	Asp	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Tyr	Lys	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp
50				55				60							
Leu	Ile	Thr	Ile	Phe	Asp	Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Phe	Ala	Ile	Gln	Cys
65				70				75				80			
Ser	Arg	Ile	Leu	Lys	Leu	Thr	Leu	Phe	Val	Asn	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro
85				90				95							
Leu	Glu	Ser	Ser	Gln	Val	Lys	Tyr	Leu	Arg	Arg	Glu	Leu	Ile	Glu	Leu
100				105				110							
Arg	Asn	Lys	Val	Asn	Arg	Leu	Leu	Asp	Ser	Leu	Glu	Pro	Pro	Gly	Glu
115				120				125							
Pro	Gly	Pro	Ser	Thr	Asn	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp	Thr	Val	Asp	Gly	Arg
130				135				140							
Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Ser	Gly	Lys	Gln	Ser	Thr	Gln	Val
145				150				155				160			
Met	Ala	Ala	Ser	Met	Ser	Ala	Phe	Asp	Pro	Leu	Lys	Asn	Gln	Asp	Glu
165				170				175							
Ile	Asn	Lys	Asn	Val	Met	Ser	Ala	Phe	Gly	Leu	Thr	Asp	Asp	Gln	Val
180				185				190							
Ser	Gly	Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	Ala	Glu	Asp	Arg	Ser	Gly	Thr	Pro	Asp
195				200				205							
Ser	Ile	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Ala	His	Pro	Pro	Gly	Val	Gln	Pro
210				215				220							
Gln	Gln	Pro	Pro	Tyr	Thr	Gly	Ala	Gln	Thr	Gln	Ala	Gly	Gln	Ile	Glu
225				230				235				240			
Gly	Gln	Met	Tyr	Gln	Gln	Tyr	Gln	Gln	Gln	Ala	Gly	Tyr	Gly	Ala	Gln
245				250				255							
Gln	Pro	Gln	Ala	Pro	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ile	Gln	Tyr
260				265				270							
Ser															

<210> 9

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TEC binding sequence

<400> 9

aaaaggtca