



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0084469

(43) 공개일자 2015년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0004515

(22) 출원일자 2014년01월14일

심사청구일자 2014년01월14일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

김정호

경기 김포시 고촌읍 수기로 8, 104동 502호 (오릉마을한화아파트)

임보배

경기 평택시 고덕면 서동대로 2651, 302동 601호 (태평아파트)

김아영

서울 강남구 삼성로85길 42, 208호 (대치동, 대우아이빌멤버스)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 9 항

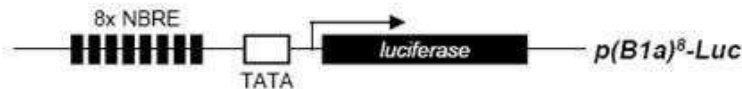
(54) 발명의 명칭 TFG-TEC 변이 단백질 또는 이를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

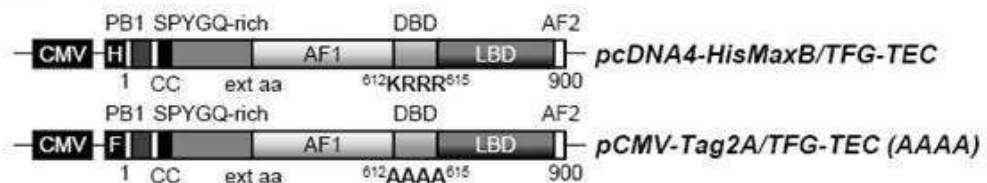
본 발명은 발암단백질인 야생형 TFG(TRK-fused gene)-TEC(Translocated in Extraskelatal Chondrosarcoma) 단백질의 활성을 억제하는 야생형 TFG-TEC에 대한 도미넌트 네거티브(dominant negative) TFG-TEC 변이 단백질, 이를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 유효성분으로 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 TFG-TEC 변이 단백질은 야생형 TFG-TEC 단백질의 전사 촉진 활성을 억제함으로써 TFG-TEC 단백질에 의한 종양 발생을 억제하는 항암 용도로 유용하게 적용될 수 있다.

대표도 - 도6a

Reporter plasmid



Expression vectors



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2009478

부처명 교육부

연구관리전문기관 연구재단

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 암 대사관련 TFG-TEC 타겟 유전자 발굴 연구

기 여 율 4/10

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9B4028763

부처명 교육부

연구관리전문기관 연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 리프로그래밍 과정에서 Cell Fate Determining Fator들의 기능 규명 연구

기 여 율 3/10

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2012.06.01 ~ 2017.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093822

부처명 교육부

연구관리전문기관 연구재단

연구사업명 대학중점연구소 지원사업

연구과제명 세포 손상 제어 소재 발굴

기 여 율 3/10

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 야생형 TFG(TRK-fused gene)-TEC(Translocated in Extraskelatal Chondrosarcoma) 단백질의 활성을 억제하는 야생형 TFG-TEC에 대한 도미넌트 네거티브(dominant negative) TFG-TEC 변이 단백질의 억제학적 유효량; 및
(b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 TEC의 DBD(DNA binding domain)의 NLS(Nuclear localization signal)에서 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입 변이된 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 TEC의 DBD(DNA binding domain)의 NLS(Nuclear localization signal)에서 아미노산이 치환 변이된 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 서열목록 제2서열의 612번째-615번째 아미노산 위치에서 최소 2개의 아미노산이 치환 변이된 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 서열목록 제2서열의 612번째-615번째 아미노산 위치에서 최소 2개의 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환된 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 서열목록 제2서열의 612번째-615번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환된 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 상기 야생형 TFG-TEC 단백질을 세포질 내에 머무르게(retain) 하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 종양 질환은 EMC(extraskelatal myxoid chondrosarcoma), 뇌암, 구강암, 위암, 폐암,

유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 요관암, 연조직암, 고환 종양, 소세포 폐암종, 상피 암종, 신경교종, 대장선암, 편평상피세포암, 기저세포암, 선암종(adenocarcinoma), 신세포암종, 간세포암, 담도암, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피세포육종(endotheliosarcoma), 림프관 육종, 림프관 혈관내피세포육종(lymphangioendotheliosarcoma), 윤활막종, 중피종, 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 횡문근종, 땀샘암종, 피지샘 암종, 유두상암종, 유두상 선암, 낭선암종, 연수 갑상선암종, 기관지암종, 융모상피암, 고환종, 배아성암종(embryonal carcinoma), 율름 종양, 성상세포종, 카포시육종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 회돌기세포교종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종 또는 백혈병인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

(a) 상기 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 야생형 TFG-TEC에 대한 도미넌트 네거티브(dominant negative) TFG-TEC 변이 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 억제학적 효율; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 야생형 TFG-TEC 발암단백질의 활성을 억제하는 TFG-TEC 변이 단백질 또는 이를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

반복적인 염색체 전좌(Recurrent chromosome translocations)는 인간 EMCs(Human extraskeletal myxoid chondrosarcomas)를 비롯한 많은 암에서 발견되는 특징이다. 인간의 외골격 점액성 연골육종(extraskeletal myxoid chondrosarcomas, EMCs)은 정확한 조직발생학적 기원과 분화 과정이 알려지지 않았으며, 드물게 발견되는 연조직 종양이다(주로 근육계에서 발생하며, 가장 빈번하게는 대퇴부와 무릎에서 발생한다)[1-3]. 인간 EMC에서 가장 많이 발견되는 특징적인 전좌는 t(9;22)(q22;q12) 또는 t(9;17)(q22;q11.2)이며, 이는 각각 9q22에 위치한 TEC(Translocated in Extraskeletal Chondrosarcoma) 유전자, 22q12에 위치한 EWS(Ewing's sarcoma) 유전자 또는 17q11.2에 위치한 hTAF68(human TATA-binding protein-associated factor II 68)와 관련이 있다[1, 3-6]. 또 다른 전좌인 t(9;15)(q22;q21) 또한 보고된 바 있으며, 이는 일반적이진 않으나 인간 EMCs의 TCF12-TEC 융합 단백질을 생산한다[7].

[0003]

최근, 일부 EMCs 환자들에서 3q11-12에 위치한 TFG(TRK-fused gene) 및 9q22에 위치한 TEC(Translocated in Extraskeletal Chondrosarcoma) 유전자를 포함하는 특징적인 전좌인 t(3;9)(q11-12;q22)가 발견되었다[8]. 원래 TFG는 인간 유두상갑상선암(human papillary thyroid carcinoma)에서 NTRK1 유전자의 융합 파트너로 동정되었으며[9], 또한 역형성 대세포 림프종(anaplastic large-cell lymphomas)에서 ALK 유전자와 함께 또 다른 염색체 전좌에 관련되어 있다[10]. TFG는 인간 3 번 염색체의 장완(q-arm)에 위치하고 있으며, 항상 발현되는 세포질 단백질(ubiquitously expressed cytoplasmic protein)을 코딩한다[9]. TFG cDNA의 총길이는 1,677 bp 이고, PBI(Phox and Bemlp) 도메인, CC(coiled coil) 도메인 및 SPYQG-풍부 부위(serine, proline, tyrosine, glycine, glutamine-rich region)와 같은 잠재적인 기능성 도메인들(putative functional domains)을 포함하는 400 아미노산(aa)으로 이루어진 단백질을 코딩한다[11]. TFG 단백질은 NEMO(NF- κ B Essential Modulator) 및 TANK(TRAF family member-associated NF- κ B activator) 단백질과 상호작용하며, 이는 TFG 단백질이 NF- κ B 조절에 있어 중요한 역할을 할 수 있다는 점을 제시한다[12]. 흥미롭게도, TFG 단백질의 일차 구조 분석 결과는 다양한 미리스틸레이션(myristylation) 위치들을 나타냈으며, 이는 세포막에 위치할 수 있다는 것을 가리킨다[11]. 그러나, 정상적인 세포에서의 TFG 유전자의 생물학적 기능은 크게 알려진 바가 없다.

[0004]

TEC는 랫트 NOR-1(neuron-derived orphan receptor 1)의 인간 동형체(homologue)이며[13], CHN[1] 및 MINOR[14]으로도 알려져 있다. 이것은 랫트 전뇌의 세포사멸된 신경세포의 일차 배양으로부터 최초로 분리되었고[13], 스테로이드/타이로이드 수용체 유전자 상과(superfamily)에 속하는 신규한 고아 핵 수용체(orphan

nuclear receptor)를 코딩한다[1,3]. 또한 인간 EMCs에서 EWS 유전자의 융합 파트너로 동정되었다[3]. TEC 유전자는 9q22에 위치하며[15], 대략 40 kb에 걸쳐 존재하고, 8 개의 엑손을 포함하며, 이중 엑손 1 및 2는 성숙 TEC mRNA의 5'-UTS(untranslated sequence)에 해당한다[15]. 비록 TEC의 생물학적인 기능이 밝혀져 있지 않으나, TEC의 지속적인 발현이 흉선세포들의 대량의 세포사를 유도한다는 것이 보고되었으며, 이는 TEC의 다운-스트림 타겟 유전자를 조절함으로써 세포 증식에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 제시한다.

[0005]

본 연구는 TFG-TEC 발암유전자 산물이 자기-결합할 수 있으며, CC 도메인(아미노산 97-124), AF1 도메인(아미노산 275-562) 및 DNA-결합 도메인(아미노산 563-655)이 관련 있는 부위로 나타났다. TFG-TEC NLS(⁶¹²KRRR⁶¹⁵)의 변이는 핵에 위치하지는 않으나 야생형 TFG-TEC에 결합할 수 있는 단백질을 생성하였다. 흥미롭게도, NLS(nuclear localization signal) 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 야생형 TFG-TEC의 핵 내 위치를 방해하였다. 또한, 인 비보(in vivo)에서 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA)의 동시-발현(co-expression)은 TFG-TEC-매개 전사 활성을 억제하였으며, 이는 우성적 네가티브(dominant negative) 방식으로 작용한다는 것을 나타낸다. 상술한 데이터들을 종합해 보면, TFG-TEC 발암유전자(oncogene)의 생물학적 기능이 변이체의 우성적 네가티브(dominant negative) 효과에 의해 조절될 수 있음을 나타낸다. TFG-TEC 유전자가 종양 형성에 필요한 특정 TEC 타겟 유전자들의 전사를 조절하여 인간 EMCs의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되기 때문에, 본 연구의 결과들은 TFG-TEC 융합 단백질이 발현되는 인간 EMCs의 치료를 위한 신규한 타겟들을 밝히는 데 도움이 될 것이다.

[0006]

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

[0007]

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 단백질이 자기-결합능을 가지고 있고, CC 도메인(아미노산 97-124), AF1 도메인(아미노산 275-562) 및 DNA-결합 도메인(DBD, 아미노산 563-655)이 관련 있는 부위라는 것을 발견하였다. 또한, 흥미롭게도 야생형 TFG-TEC의 DBD(DNA binding domain) 내 특정 부위를 변이시킨 TFG-TEC 변이 단백질은 야생형 TFG-TEC과 결합할 수 있는 능력을 보유하며, 우성적 네가티브(dominant negative) 방식으로 방해함으로써 야생형 TFG-TEC 단백질의 활성을 억제한다는 것을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008]

따라서, 본 발명의 목적은 야생형 TFG-TEC 발암단백질의 활성을 억제하는 TFG-TEC 변이 단백질을 이용한 종양 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009]

본 발명의 다른 목적은 야생형 TFG-TEC 발암단백질의 활성을 억제하는 TFG-TEC 변이 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 이용한 종양 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010]

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

과제의 해결 수단

[0011]

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 야생형 TFG(TRK-fused gene)-TEC(Translocated in Extraskelatal Chondrosarcoma) 단백질의 활성을 억제하는 야생형 TFG-TEC에 대한 도미넌트 네가티브(dominant negative) TFG-TEC 변이 단백질의 억제학적 유효량; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

- [0012] 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 약제학적 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 TFG-TEC 단백질이 자기-결합능을 가지고 있고, CC 도메인(아미노산 97-124), AF1 도메인(아미노산 275-562) 및 DNA-결합 도메인(DBD, 아미노산 563-655)이 관련 있는 부위라는 것을 발견하였다. 또한, 흥미롭게도 야생형 TFG-TEC의 DBD(DNA binding domain) 내 특정 부위를 변이시킨 TFG-TEC 변이 단백질은 야생형 TFG-TEC 단백질과 결합할 수 있는 능력을 보유하며, 우성적 네가티브(dominant negative) 방식으로 방해함으로써 야생형 TFG-TEC 단백질의 활성을 억제한다는 것을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0013] 본 발명의 약제학적 조성물에서 유효성분으로 이용되는 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 야생형 TFG-TEC 단백질에 작용하여 야생형 TFG-TEC의 활성(예컨대, 전사 활성)을 억제하는 어떠한(any) 변이 단백질도 포함한다.
- [0014] 본 명세서에서 사용되는 용어 "야생형 TFG-TEC 단백질"은 3q11-q12 위치 내 TFG(TRK fused gene) 유전자와 9q22 위치 내 TEC(Translocated in Extraskelatal Chondrosarcoma) 유전자가 종양-특이적 염색체 전좌 [t(3;9)(q11-q12;q22)]에 의해서 융합되어 형성된 TFG-TEC 유전자로부터 발현된 융합 단백질을 의미하며, 발암 단백질(oncoprotein)로 알려져 있다. 상술한 TFG-TEC 융합 단백질은 TFG의 6번째 인트론과 TEC의 2번째 인트론 간의 염색체 전좌에 의해 ¹TFG(NTD)²⁷³-Asp-¹TEC⁶²⁶로 이루어진다. Asp(D) 아미노산 잔기는 염색체 전좌를 통해 TFG의 전좌점에서 유래된 G 뉴클레오타이드와 TEC의 전좌점에서 유래된 A 및 T 뉴클레오타이드가 만나면서 형성되는 아미노산 잔기이다. 본 발명의 야생형 TFG-TEC 단백질은 서열목록 제 1 서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 단백질이다.
- [0015] 본 명세서에서 사용되는 용어 "도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질(dominant negative TFG-TEC mutant protein)" 또는 "TFG-TEC 변이 단백질(TFG-TEC mutant protein) 또는 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질"은 TFG-TEC 유전자 내 변이로부터 발현된 단백질을 의미한다.
- [0016] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적 유효량"은 (i) 종양 질환의 예방; (ii) 종양과 관련된 질병 또는 질환의 억제; 및 (iii) 종양과 관련된 질병 또는 질환의 경감되는 효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 TEC의 DBD(DNA binding domain)의 NLS(Nuclear localization signal)에서 아미노산 치환, 결실 또는 삽입 변이된 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0018] 본 발명에서 사용되는 용어 "변이(mutation)"는 표적 서열에서 단일 또는 하나이상의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 첨가로 이해될 수 있다. 구체적으로는, 본 발명에서 표적 서열의 돌연변이는 치환이다. 치환은 상이한 유전적으로 코딩되는 아미노산 또는 유전적으로 코딩되지 않는 아미노산(non-genetically encoded amino acid)에 의해 일어날 수 있다. 유전적으로 코딩되지 않는 아미노산의 예들은 호모시스테인, 히드록시프롤린, 오르니틴, 히드록시라이신, 시트룰린, 카르니틴 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 보다 구체적으로, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 TEC의 DBD(DNA binding domain)의 NLS(Nuclear localization signal)에서 아미노산 치환 변이된 폴리펩타이드를 포함한다. 보다 더 구체적으로, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 서열목록 제2서열의 612번째-615번째 아미노산 위치에서 최소 2개의 아미노산이 변이된 폴리펩타이드를 포함한다. 보다 더 구체적으로, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 서열목록 제2서열의 612번째-615번째 아미노산 위치에서 최소 2개의 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환된 폴리펩타이드를 포함한다. 보다 더욱 더 구체적으로, 상기 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 서열목록 제2서열의 612번째-615번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환된 폴리펩타이드를 포함한다. 가장 구체적으로, 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질은 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0020] 본 발명에서 이용되는 폴리펩타이드 변이체는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이에 의해 야생형 TFG-TEC의 아미노산과 상이한 돌연변이 단백질이다. 본 발명에서, 본 발명의 변이 단백질의 아미노산 서열은 표적 위치들 중 4개의 아미노산 변화에 의해 원형 단백질과 상이하게 하는 원형 단백질의 변형에 의해 수득된다. 그러나, 원형 단백질이 동일한 단백질 분자 상에서 복수 개, 예를 들면, 5개 이상의 표적 위치들의 치환에 의해 더 최적화될 수 있는 경우도 본 발명의 대상에 포함된다. 보다 많은 수의 아미노산 치환을 갖는 변형된 변이체는 구체적으로는 1개 내지 10개, 보다 구체적으로는 2, 3, 4, 5 및 6개, 가장 구체적으로는 4개의 아미노산 표적

위치 상에서의 아미노산 치환에 의해 야생형 단백질 서열과 상이할 수 있다.

- [0021] 또한, 본 발명에는 임의의 치료적 적용에 유용한, 이들 변이 중 임의의 하나 이상의 위치의 아미노산은 야생형 TFG-TEC 서열 중 상술한 위치에서 발생하는 아미노산과는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 TFG-TEC 변이 단백질은 (i) 야생형 TFG-TEC 단백질과의 결합능을 갖고; (ii) 야생형 TFG-TEC 단백질의 DNA 결합 활성 저해능을 갖고; (iii) 야생형 TFG-TEC 단백질의 전사 촉진 활성 억제능을 갖는다.
- [0023] 본 발명에서 TFG-TEC 변이 단백질은 야생형 TFG-TEC 단백질의 612번째-615번째 아미노산의 변이로 인해 야생형 TFG-TEC 단백질과의 결합능은 유지하되, 야생형 TFG-TEC 단백질의 DNA 결합 활성을 저해함으로써, TFG-TEC 단백질의 전사 촉진 활성을 억제한다.
- [0024] 본 발명에서 TFG-TEC 변이 단백질은 야생형 TFG-TEC 단백질에 대해 우성적 네가티브(dominant negative) 방식으로 작용함으로써 야생형 TFG-TEC 단백질 전사 촉진 활성을 억제한다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 도미넌트 네가티브 TFG-TEC 변이 단백질은 상기 야생형 TFG-TEC 단백질을 세포질 내에 머무르게(retain) 한다. 본 발명에 따르면, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 야생형 TFG-TEC을 세포질에서 포획하고 있다는 것을 의미한다. 따라서, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질의 결합에 따라 야생형 TFG-TEC의 비율을 세포질 내에서 유지 및 조절시킬 수 있다.
- [0026] 한편, 이러한 TFG-TEC 변이 단백질의 활성은 TEC에 의해 전사 조절을 받는 다운스트림 유전자의 발현을 측정함으로써 분석할 수 있다. 본 발명에 따르면, TFG-TEC 변이 단백질에 의해 전사가 억제되는 다운스트림 유전자는 Stat-3, Eno3, 및 Socs2을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명은 TFG-TEC 변이 단백질을 유효성분으로 포함하는, 종양 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. TFG-TEC 변이 단백질은 전사인자인 야생형 TFG-TEC 단백질의 전사 촉진 활성을 억제함으로써 종양의 발생 및 발달을 저해 할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 종양 질환은 EMC(extraskelatal myxoid chondrosarcoma), 뇌암, 구강암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 요관암, 연조직암, 고환 종양, 소세포 폐암종, 상피 암종, 신경교종, 대장선암, 편평상피세포암, 기저세포암, 선암종(adenocarcinoma), 신세포암종, 간세포암, 담도암, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피세포육종(endotheliosarcoma), 림프관 육종, 림프관 혈관내피세포육종(lymphangioendotheliosarcoma), 윤활막종, 증피종, 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 횡문근종, 땀샘암종, 피지샘 암종, 유두상암종, 유두상 선암, 낭선암종, 연수갑상선암종, 기관지암종, 용모상피암, 고환종, 배아성암종(embryonal carcinoma), 율름 종양, 성상세포종, 카포시육종, 수모세포종, 두개인두종, 상의 세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 회돌기세포교종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 골수종, 림프종 또는 백혈병이며, 가장 구체적으로는 EMC(extraskelatal myxoid chondrosarcoma)이다.
- [0029] 본 발명의 약제학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 암 치료를 할 수 있다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 화학요법제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 비술판(bisulfan), 니트로소우레아(nitrosourea), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 탁목시펜(tamoxifen), 택솔(taxol), 트랜스플라티늄(transplatinum), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토크렉세이트(methotrexate) 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상술한 야생형 TFG-TEC에 대한 도미넌트 네가티브(dominant negative) TFG-TEC 변이 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 두 번째 양태의 약제학적 조성물은 상술한 첫 번째 양태의 약제학적 조성물의 유전자 치료제에 해당

되는 것이다. 따라서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0032] 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 도미넌트 네거티브 TFG-TEC 변이 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0033] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 그 자체(naked form)로 투여될 수 있지만, 구체적으로는 적합한 벡터에 탑재되어 투여된다.

[0034] 본 발명에서 이용되는 벡터는, (a) 핵산발현 조절 서열 및 (b) 상기 핵산발현 조절 서열과 작동적으로 연결된(operatively linked) 상기 TFG-TEC 변이 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "작동적으로 연결된(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.

[0035] 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0036] 본 발명에서 이용되는 핵산발현 조절 서열은, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리 아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0037] 상술한 본 발명의 첫 번째 및 두 번째 양태의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 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.

[0039] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.

[0040] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.

[0041] 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 제제화 함으로써 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 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0042] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0043] (a) 본 발명은 발암단백질인 야생형 TFG(TRK-fused gene)-TEC(Translocated in Extraskelatal Chondrosarcoma) 단백질의 활성을 억제하는 야생형 TFG-TEC에 대한 도미넌트 네거티브(dominant negative)

TFG-TEC 변이 단백질, 이를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 유효성분으로 포함하는 종양 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0044]

(b) 본 발명의 TFG-TEC 변이 단백질은 야생형 TFG-TEC 단백질의 전사 촉진 활성을 억제함으로써 TFG-TEC 단백질에 의한 종양 발생을 억제하는 항암 용도로 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045]

도 1a-1b는 TFG-TEC의 자기-결합을 보여준다. 도 1a는 TFG, TEC, 및 TFG-TEC 유전자 산물들의 단백질 도메인들을 개략적으로 나타낸다. TFG, TEC, 및 TFG-TEC 단백질들을 개략적으로 나타낸다. 아미노산 위치는 상하에 나타내었다. TFG, TEC, 및 TFG-TEC 키메라 내의 기능적으로 중요한 도메인들을 다음과 같이 나타내었다: PB1(Phox and Bemlp domain); CC(coiled-coil domain); SPYQ-rich(Ser, Pro, Tyr, Gly, Gln-rich domain); ext aa(extra amino acid sequence); AF1(N-terminal transactivation domain); DBD(DNA-binding domain); LBD(ligand-binding domain); 및 AF2(C-terminal transactivation domain). 도 1b는 인 비보에서의 TFG-TEC의 자기-결합을 보여준다. 2.5 μ g의 pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC[His₆- 및 Xpress 에피토프-태깅 TFG-TEC(Xpress epitope-tagged TFG-TEC)] 및 2.5 μ g의 pEF-BOS/GST 또는 pEF-BOS/GST-TFG-TEC을 HEK 293T 세포에 형질주입한지 48 시간 후, 실시예에 기재된 바와 같이 세포 추출물을 준비하여, 글루타티온-세파로즈 비즈로 친화성-침강시켰다. 12% SDS-PAGE에 분리한 후, 상기 단백질들을 항-Xpress(Invitrogen) 또는 항-GST(B-14; Santa Cruz Biotechnology) 항체들로 웨스턴 블롯팅하였다. 형질주입된 DNAs는 패널에 나타내었다. 분자량 마커의 위치는 왼쪽에 나타내었고, (His)₆-태깅 TFG-TEC, GST, 및 GST-융합 TFG-TEC의 위치는 오른쪽에 화살표로 나타내었다. 세 개의 독립적인 실험들은 유사한 결과들을 나타내었다. AP(affinity precipitation); WB(Western blotting); Ab(antibody).

도 2a-2b는 시험관 내(in vitro) TFG(NTD) 및 TEC의 TFG-TEC와의 결합을 보여준다. 도 2a는 TFG-TEC 내 두 개의 독립적인 도메인들은 자기-결합에 있어 중요하다는 것을 보여준다. pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC(위쪽 패널), pcDNA4-HisMaxA/TFG(NTD)(중간 패널), 또는 pcDNA4-HisMaxA/TEC(아래쪽 패널) 플라스미드 DNAs를 HEK 293T 세포에 형질주입시킨 후, 재조합 (His)₆-태깅 TFG-TEC, (His)₆-태깅 TFG(NTD), 또는 (His)₆-태깅 TEC 단백질들을 포함하는 세포 용해물들을 글루타티온-세파로즈 비즈가 결합된 2 μ g의 GST(2 번 라인), GST-TFG(NTD)(3 번 라인), 또는 GST-TEC(4 번 라인)과 인큐베이션시켰다. GST 풀-다운 분석으로부터 얻은 결과물(2%; 1 번 라인) 및 펠렛들(2-4 번 라인)의 분액을 8%[(His)₆-TFG-TEC 및 (His)₆-TEC 용] 또는 12%[(His)₆-TFG(NTD) 용] SDS-PAGE 겔 상에서 확인하고, 항-Xpress 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 결합된 단백질들을 검출하였다. 분자량 마커들, (His)₆-TFG-TEC, (His)₆-TFG(NTD), 및 (His)₆-TEC의 위치를 나타내었다. 세 개의 독립적인 실험들을 실시하였고, 이것들은 모두 유사한 결과들을 나타내었다. WB(Western blotting); Ab(antibody). 도 2b는 GST 풀-다운 분석에 사용된 GST-융합 단백질의 정량을 보여준다. 풀-다운 분석에 사용된 GST-융합 단백질을 12% SDS-PAGE 겔에서 분획하여 코마시 블루 염색으로 가시화하였다. 세 개의 독립적인 실험들을 실시하였고, 이것들은 모두 유사한 결과들을 나타내었다. 1 번 라인, GST 단독; 2 번 라인, GST-융합 TFG N-말단 도메인; 3 번 라인, GST-융합 TEC 도메인.

도 3a-3c는 TFG-TEC 자기-결합에 관련된 도메인들의 맵핑을 보여준다. 도 3a는 GST-TFG-TEC 융합 단백질 및 이것들의 TFG(NTD) 또는 TEC 단편들과의 자기-결합능을 개략적으로 보여준다. 숫자들은 아미노산 잔기를 나타내며, 결합은 + 또는 -로 나타내었다. 도 3b는 TFG(NTD)에 대한 TFG-TEC CC 도메인의 결합을 보여준다. 재조합 (His)₆-TFG(NTD) 단백질을 글루타티온-세파로즈 비즈가 결합된 2 μ g의 GST(2 번 라인), GST-PB1(3 번 라인), GST-CC(4 번 라인), 또는 GST-SPYQ(5 번 라인)과 인큐베이션시켰다. GST 풀-다운 분석으로부터 얻은 결과물(2%; 1 번 라인) 및 펠렛들(2-5 번 라인)의 분액을 12% SDS-PAGE 겔 상에서 확인하고, 항-Xpress 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 결합된 단백질들을 검출하였다(위쪽 패널). 분자량 마커들 및 (His)₆-TFG(NTD)의 위치를 나타내었다. GST-융합 단백질을 12% SDS-PAGE 겔에 분리하고 코마시 블루 염색으로 가시화하여 GST-융합 단백질의 상대적인 양을 확인하였다(아래 패널). 1 번 라인, GST 단독; 2 번 라인, GST-PB1; 3 번 라인, GST-CC; 4 번 라인, GST-SPYQ. 세 개의 독립적인 실험들을 실시하였고, 이것들은 모두 유사한 결과들을 나타내었다. WB (Western blotting); Ab(antibody). 도 3c는 TEC와의 상호작용에 관련된 TFG-TEC의 두 개의 독립적인 도메인들을 보여준다. 재조합 (His)₆-태깅 TEC 단백질을 글루타티온-세파로즈 비즈가 결합된 2 μ g의

GST(2 번 라인), GST-AF1(3 번 라인), GST-DBD(4 번 라인), GST-LBD(5 번 라인), 또는 GST-AF2(6 번 라인)과 인큐베이션시켰다. GST 풀-다운 분석으로부터 얻은 결과물(2%; 1 번 라인) 및 펠렛들(2-6 번 라인)의 분액을 8% SDS-PAGE 겔 상에서 확인하고, 항-Xpress 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 결합된 단백질들을 검출하였다(위쪽 패널). 분자량 마커들 및 (His)₆-TEC의 위치를 나타내었다. GST-융합 단백질을 12% SDS-PAGE 겔에 분리하고 코마시 블루 염색으로 가시화하여 GST-융합 단백질의 상대적인 양을 확인하였다(아래 패널). 1 번 라인, GST 단독; 2 번 라인, GST-AF1; 3 번 라인, GST-DBD; 4 번 라인, GST-LBD; 5 번 라인, GST-AF2. 세 개의 독립적인 실험들을 실시하였고, 이것들은 모두 유사한 결과들을 나타내었다. WB (Western blotting); Ab(antibody).

도 4a-4b는 인 비보에서의 TFG-TEC(AAAA) 변이 단백질과 야생형 TFG-TEC간의 결합을 보여준다. 도 4a는 인 비보에서의 TFG-TEC와 TFG-TEC(AAAA) NLS 변이형간의 물리적 결합을 보여준다. 2.5 µg의 pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC(AAAA) 및 2.5 µg의 pEF-BOS/GST 또는 pEF-BOS/GST-TFG-TEC을 HEK 293T 세포에 형질주입한지 48 시간 후, 실시예에 기재된 바와 같이 세포 추출물을 준비하여, 글루타티온-세파로즈 비즈로 친화성-침강시켰다. SDS-PAGE에 분리한 후, 상기 단백질들을 항-Xpress 또는 항-GST 항체들로 웨스턴 블롯팅하였다. 형질주입된 DNAs는 패널에 나타내었다. 분자량 마커의 위치는 왼쪽에 나타내었고, (His)₆-태깅 TFG-TEC(AAAA), GST, 및 GST-융합 TFG-TEC의 위치는 오른쪽에 화살표로 나타내었다. 세 개의 독립적인 실험들은 유사한 결과들을 나타내었다. AP(affinity precipitation); WB(Western blotting); Ab(antibody). 도 4b는 야생형 TFG-TEC 단백질이 야생형 DBD 및 NLS 변이 DBD(AAAA) 단백질과 유사하게 결합한다는 것을 보여준다. 재조합 (His)₆-TFG-TEC 단백질을 글루타티온-세파로즈 비즈가 결합된 2 µg의 GST (2 번 라인), GST-DBD (3 번 라인), 또는 GST-DBD(AAAA)(4 번 라인)과 인큐베이션시켰다. GST 풀-다운 분석으로부터 얻은 결과물(2%; 1 번 라인) 및 펠렛들(2-4 번 라인)의 분액을 8% SDS-PAGE 겔 상에서 확인하고, 항-Xpress 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 결합된 단백질들을 검출하였다(위쪽 패널). 분자량 마커들 및 (His)₆-TFG-TEC의 위치를 나타내었다. GST-융합 단백질을 15% SDS-PAGE 겔에 분리하고 코마시 블루 염색으로 가시화하여 GST-융합 단백질의 상대적인 양을 확인하였다(아래 패널). 1 번 라인, GST 단독; 2 번 라인, GST-DBD; 3 번 라인, GST-DBD(AAAA). 세 개의 독립적인 실험들을 실시하였고, 이것들은 모두 유사한 결과들을 나타내었다. WB (Western blotting); Ab(antibody).

도 5a-5b는 HEK 293T 세포(도 5a) 및 C28/12 세포(도 5b)에서의 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA)에 의한 야생형 TFG-TEC의 핵 내 포획을 보여준다. HEK 293T 또는 C28/12 세포들을 글라스 커버슬립 위에 플레이팅하고, EGFP-태깅 야생형 TGF-TEC 또는 mCherry-태깅 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질들을 코딩하는 포유류 발현 벡터로 형질주입시켰다. 일시적으로 형질주입된 세포들을 아세톤/메탄올 혼합물로 고정시키고, 야생형 TFG-TEC 또는 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질의 세포 내 분포를 공초점 레이저 현미경(Leica TCS SPE, Leica Microsystems)로 확인하였다. 세포 핵들을 DAPI로 염색하였다. 합쳐진 이미지 또한 나타내었다. 세 개의 독립적인 실험들을 실시하였고, 이것들은 모두 유사한 결과들을 나타내었다.

도 6a-6c는 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 TFG-TEC-매개 트랜스활성(transactivation)을 방해한다는 것을 보여준다. 도 6a는 본 연구에 이용된 리포터 및 발현 플라스미드들을 개략적으로 보여준다. p(B1a)⁸-Luc 리포터 플라스미드는 기본적인 프로모터-루시페라제 유전자 컨스트럭트의 8 개의 NBREs 업스트림을 포함한다. 8 개의 TFG-TEC 인식부위들은 검정색 막대로 나타내었다. TATA 박스는 흰색 사각형으로 나타내었고, 루시페라제 유전자는 검정색 사각형으로 나타내었다. TFG-TEC 또는 TFG-TEC(AAAA)의 생성을 주도하는 발현 벡터도 표시하였다. 처음과 마지막 아미노산의 위치들을 각 컨스트럭트 밑에 표시하였다. CMV(cytomegalovirus promoter); H(six histidines-tag); F(FLAC-tag); PB1(Phox and Bemlp domain); CC(coiled-coil domain); SPYQG-rich(Ser, Pro, Tyr, Gly, Gln-rich domain); ext aa(extra amino acid sequence); AF1(N-terminal transactivation domain); DBD(DNA-binding domain); LBD(ligand-binding domain); 및 AF2(C-terminal transactivation domain). 도 6b-6c는 HEK 293T 세포(도 6b) 및 C28/12 세포(도 6c)에서 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 TFG-TEC-매개 트랜스활성을 억제한다는 것을 보여준다. HEK 293T 세포 또는 C28/12 세포에 0.5 µg의 TFG-TEC 및 NLS 변이 TGF-TEC(AAAA) 단백질의 증가량(0-4 µg)을 동시-형질주입시켰다. 모든 반응을 위하여, 형질주입된 DNA의 총량을 공 벡터(empty vector)의 양에 대하여 표준화하였다. 48 시간 후, 세포들을 회수하여 루시페라제 분석을 실시하였다. 실험을 두 번 반복하여 얻은 평균값 및 오차 막대(± S.E.)를 나타내었다. 통계적 유의성(p value)는 언페어드(unpaired) *t* 검정으로 결정하였다. #, *p* < 0.001 벡터 대조군 대비. *, *p* < 0.01 야생형 TFG-TEC 단복 대비(위쪽 패널). 루시페라제 분석용 추출물들을 SDS-

PAGE(위쪽 및 중간 패널은 8% 겔, 아래 패널은 15% 겔)로 분획하고, PVDF 막으로 옮겨서, 항-Xpress(Invitrogen; 두 번째 패널), 항-Flag(M2, Sigma-Aldrich; 세 번째 패널), 및 항-EGFP(Invitrogen; 아래 패널) 항체들로 면역 블롯팅하였다. 세 개의 독립적인 실험들을 실시하였고, 이것들은 모두 유사한 결과들을 나타내었다.

도 7a-7d는 인 비보에서 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 야생형 TFG-TEC의 트랜스활성 가능성을 억제한다는 것을 보여준다. 도 7a 및 b는 HEK 293T 세포(도 7a) 및 C28/I2 세포(도 7b)에서 TFG-TEC (AAAA)가 TFG-TEC 다운-스트림 타겟 유전자의 유도를 방해한다는 것을 보여준다. HEK 293T 또는 C28/I2 세포들에 EGFP, TFG-TEC-EGFP, mCherry, 또는 TFG-TEC(AAAA)-mCherry를 코딩하는 발현 벡터를 형질주입시켰다(각 패널에 표시). EGFP-양성 및 mCherry-양성인 형질주입된 세포들을 FACS로 분류하였다. EGFP 및 mCherry, TFG-TEC-EGFP 및 mCherry, 또는 TFG-TEC-EGFP 및 TFG-TEC(AAAA)-mCherry 단백질을 발현하는 HEK 293T 세포(도 7a) 및 C28/I2 세포(도 7b)에서의 *Stat-3*, *Eno3*, 및 *Socs2* mRNA 발현을 RT-PCR 분석으로 확인하였다. β -actin을 표준화에 이용하였다. 증폭 후, 에티디움 브로마이드로 겔을 염색하여 각 산물의 분액을 분석하였다. 벡터 pcDNA3-TFG-TEC-EGFP 및 pcDNA3-TFG-TEC(AAAA)-mCherry를 이용하여 EGFP 또는 mCherry가 융합된 TFG-TEC 또는 TFG-TEC(AAAA)를 각각 발현시켰다. pcDNA3-EGFP 또는 pcDNA3-mCherry 발현 벡터를 대조군으로 이용하였다. 일시적으로 형질주입된 세포주들(RT 반응에 이용된 RNA가 유래된)을 패널 위에 표시하였다. 세 개의 독립적인 실험들을 실시하였고, 이것들은 모두 유사한 결과들을 나타내었다. 한편, HEK 293T 세포(도 7c) 및 C28/I2 세포(도 7d)에서의 추정(putative) TFG-TEC 다운-스트림 타겟 유전자들의 발현을 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time PCR)으로 분석하였다. HEK 293T 및 C28/I2 세포들에서의 *Stat-3*, *Eno3*, 및 *Socs2* mRNA 발현을 실시예에 기재된 바와 같이 분석하였다. HPRT를 정량적 실시간 PCR 결과를 표준화하는 대조군으로 이용하였다. 각 형질주입은 최소 3 번 실시하였다. 상기 결과들은 평균 $\pm$ S.E.으로 나타내고, EGFP 및 mCherry-형질주입된 세포들에서의 *Stat-3*, *Eno3*, 및 *Socs2* 발현(이를 1로 설정)에 대하여 상대적으로 계산하였다. 통계적 유의성(p value)는 언페어드(unpaired) *t* 검정으로 결정하였다. *, $p < 0.01$ 벡터 대조군 대비. **, $p < 0.01$ 야생형 TFG-TEC 단백질 대비. N.S. = Not significant.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시 예를 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.

실시예

재료 및 방법

제한 효소(Restriction endonucleases), CIP(calf intestinal alkaline phosphatase), DNA 중합효소I(DNA polymerase I)의 클레노브 절편(Klenow fragment) 및 T4 DNA 리가아제(ligase)를 New England Biolabs로부터 구입하였다. PfuTurbo 중합효소는 Stratagene으로부터, [γ -³²P] ATP(3000 Ci/mmol)는 PerkinElmer Life Sciences로부터 구입하였다. 플라스미드 DNA의 제작, 제한 효소 작용, 아가로오즈 겔 전기영동, DNA 라이게이션(ligation), 박테리아 형질전환 및 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동은 일반적인 방법들을 이용하여 실시하였다[17]. PCR 산물로부터 생성된 아클론(Sub-clones)은, 연쇄 말단 방법 및 이중-가닥 DNA 주형을 이용하여 시퀀싱함으로써 변이가 없음을 확인하였다.

컨스트럭트

플라스미드 pEF-BOS/GST(Glutathione S-transferase)는 이전에 기재한 바 있다[18]. pEF-BOS/GST-TFG-TEC를 제작하기 위하여, pCMV-Tag2A/TFG-TEC[19]를 NotI으로 절단한 후, 상기 절단 단편을 pEF-BOS/GST에 클로닝하였다. pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC 컨스트럭트를 제작하기 위하여, pCMV-Tag2A/TFG-TEC를 NotI으로 절단한 후, 상기 절단 단편을 pcDNA4-HisMaxA(Invitrogen)에 클로닝하였다. pcDNA4-HisMaxA/TFG(NTD)를 제작하기 위하여, pCMV-Tag2A/TFG(NTD)[19]를 NotI으로 절단한 후, 상기 절단 단편을 pcDNA4-HisMaxA에 클로닝하였다. pcDNA4-HisMaxA/TEC 컨스트럭트를 제작하기 위하여, pCMV-Tag2A/TEC[20]를 NotI으로 절단한 후, 상기 절단 단편을 pcDNA4-HisMaxA에 클로닝하였다. pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC(AAAA) 컨스트럭트를 제작하기 위하여, pCMV-

Tag2A/TFG-TEC(AAAA)를 XhoI으로 절단한 후, 상기 XhoI(AAAA)XhoI 단편을 분리하였다. 상기 단편을 pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC에 클로닝하여 NLS 내로 상기 (KRRR→AAAA) 변이를 도입시켰다.

[0052]

GST-TFG-TEC 결실 변이체는 다음과 같이 제작되었다: (A) GST-TFG(NTD): TFG(NTD) 단편을 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 5'-TFGTEC_aa1_BamHI 프라이머(5'-GATCGGATCCATGAACGGACAGTTGGAT-3', BamHI 인식부위는 밑줄로 표시) 및 3'-TFGTEC_aa274_NotI 프라이머(5'-GATCGCGGCCGCTCAATCTGAATACTGAATACC-3', NotI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시키고, BamHI 및 NotI으로 절단한 후, pGEX(4T-1) 벡터(GE Healthcare)에 클로닝하여 GST-TFG(NTD)를 제작하였다. (B) GST-TEC: 상기 TEC 단편을 pCMV-Tag2A/TFG-TEC으로부터 5'-TFGTEC_aa275_BamHI 프라이머(5'-GATCGGATCCATGCCCTGCGTCCAAGCC-3, BamHI 인식부위는 밑줄로 표시) 및 3'-TFGTEC_aa900_NotI 프라이머(5'-GATCGCGGCCGCTTAGAAAGGTAGGTGTC-3, NotI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시키고, BamHI 및 NotI으로 절단한 후, pGEX(4T-1)에 클로닝하여 GST-TEC을 제작하였다. (C) GST-PB1: PB1 단편을 pCMVTag2A/TFG-TEC으로부터 5'-TFGTEC_PB1_BamHI 프라이머(5'-GATCGGATCCATGAACGGACAGTTGGAT-3', BamHI 인식부위는 밑줄로 표시) 및 3'-TFGTEC_PB1_NotI 프라이머(5'-GATCGCGGCCGCTCAGGGTCTTGGCTGGCCATT-3', NotI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시키고, BamHI 및 NotI으로 절단한 후, GEX(4T-1)에 클로닝하여 GST-PB1를 제작하였다. (D) GST-CC: CC 단편을 pCMV-Tag2A/TFG-TEC으로부터 5'-TFGTEC_CC_BamHI 프라이머(5'-GATCGGATCCCTTGAATCAAGTCAGGTG-3', BamHI 인식부위는 밑줄로 표시) 및 3'-TFGTEC_CC_NotI 프라이머(5'-GATCGCGGCCGCTTCCAAGCTATCCAATAA-3', NotI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시키고, BamHI 및 NotI으로 절단한 후, pGEX(4T-1)에 클로닝하여 GST-CC를 제작하였다. (E) GST-SPYQ: SPYQ 단편을 pCMV-Tag2A/TFG-TEC로부터 5'-TFGTEC_SPYQ_BamHI 프라이머(5'-GATCGGATCCCCACCTGGAGAACCAGGA-3, BamHI 인식부위는 밑줄로 표시) 및 3'-TFGTEC_SPYQ_NotI 프라이머(5'-GATCGCGGCCGCTCAATCTGAATACTGAATACC-3, NotI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시키고, BamHI 및 NotI으로 절단한 후, pGEX(4T-1)에 클로닝하여 GST-SPYQ를 제작하였다. (F) GST-AF1: AF1 단편을 pCMV-Tag2A/TFG-TEC으로부터 5'-TFGTEC_AF1_BamHI 프라이머(5'-GATCGGATCCATGCGCTGCGTCCAAGCC-3', BamHI 인식부위는 밑줄로 표시) 및 3'-TFGTEC_AF1_NotI 프라이머(5'-GATCGCGGCCGCTCAGCCAGACGACGAGTCTCT-3', NotI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시키고, BamHI 및 NotI으로 절단한 후, pGEX(4T-1)에 클로닝하여 GST-AF1를 제작하였다. (G) GST-DBD: DBD 단편을 pCMV-Tag2A/TFGTEC으로부터 5'-TFGTEC_DBD_BamHI 프라이머(5'-GATCGGATCCGAGGGCACGTGTGCCGTG-3', BamHI 인식부위는 밑줄로 표시) 및 3'-TFGTEC_DBD_NotI 프라이머(5'-GATCGCGGCCGCTCATGGGCTCTTTGGTTTGA-3', NotI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시키고, BamHI 및 NotI으로 절단한 후, pGEX(4T-1)에 클로닝하여 GST-DBD를 제작하였다. (H) GST-LBD: LBD 단편을 pCMV-Tag2A/TFGTEC으로부터 5'-TFGTEC_LBD_BamHI 프라이머(5'-GATCGGATCCCTTACAACAGGAACCTTCT-3', BamHI 인식부위는 밑줄로 표시) 및 3'-TFGTEC_LBD_NotI 프라이머(5'-GATCGCGGCCGCTCAAGACACCAAGTCTTCCAG-3', NotI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시키고, BamHI 및 NotI으로 절단한 후, pGEX(4T-1)에 클로닝하여 GST-LBD를 제작하였다. (I) GST-AF2: 이중-가닥 올리고머 AF2 DNA 단편을 어닐링하여 제작하였고 다음과 같은 프라이머 쌍을 이용하였다: 5'-TFGTEC_AF2(5'-pGATCCCCACCTTCCATCATTGACAAGCTCTTCTGGACACCCTACCTTTCTAAGC-3') 및 3'-TFGTEC_AF2(5'-pGGCCGCTTAGAAAGGTAGGTGTCCAGGAAGAGCTTGTCAATGATGAAGTGGG-3'). 상기 AF2 DNA 단편을 pGEX(4T-1) 벡터의 BamHI/NotI 부위에 삽입하여 GST-AF2를 제작하였다. (J) GST-DBD(AAAA): DBD(AAAA) 단편을 pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC(AAAA)으로부터 5'-TFGTEC_DBD_BamHI 프라이머 및 3'-TFGTEC_DBD_NotI 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시키고, BamHI 및 NotI으로 절단한 후, pGEX(4T-1)에 클로닝하여 GST-DBD(AAAA)를 제작하였다.

[0053]

플라스미드인 pcDNA3/EGFP 및 pcDNA3/EGFP-TFG-TEC는 이전에 기재한 바 있다[19]. pcDNA3-mCherry를 제작하기 위하여, mCherry 유전자를 pmCherry-N1 (Clontech)으로부터 5'-HindIIIImCherry 프라이머(5'-GATCAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAG -3'; HindIII 인식부위는 밑줄로 표시) 및 3'-BamHImCherry 프라이머(5'-GATCGGATCCGCTTACTTGTACAGCTCGTC -3'; BamHI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 상기 PCR 산물을 HindIII 및 BamHI으로 절단한 후, pcDNA3에 클로닝하여 pcDNA3-mCherry를 제작하였다. pcDNA3/mCherry-TFG-TEC 컨스트럭트를 제작하기 위하여, mCherry(NoStop) 단편을 pmCherry-N1으로부터 5'-HindIIIImCherry 프라이머 및 3'-BamHImCherry(NoStop) 프라이머(5'-GATCGGATCCGCTTGTACAGCTCGTC-3; BamHI 인식부위는 밑줄로 표시)를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 상기 PCR 산물을 HindIII 및 BamHI으로 절단한 후, pcDNA3에 클로닝하여pcDNA3-mCherry(NoStop)를 제작하였다. pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC(AAAA)를 BamHI 및 NotI으로 절단하여 TFG-TEC(AAAA) 단편을 분리한 후, pcDNA3-mCherry(NoStop)에 클로닝하여 pcDNA3/mCherry-TFG-TEC(AAAA)를 제작하였다. pcDNA4-HisMaxB/TFG-TEC 컨스트럭트를 제작하기 위하여, pCMV-Tag2A/TFG-TEC를 BamHI으로 절단하고, 상기 절단 단편을 pcDNA4-HisMaxB(Invitrogen)에 클로닝하였다.

- [0054] GST-융합 단백질의 정제, GST 풀-다운 분석, 및 웨스턴 블롯 분석
- [0055] GST-TFG-TEC 변이 단백질을 이전에 기재된 바와 같이 *Escherichia coli*(*E. coli*)에서 발현시켰다[21]. 글루타티온-세파로즈와의 결합 및 세척 후, 상기 단백질을 환원 글루타티온(Sigma)으로 용출시켰다. 단백질 농도는 브래드포드 방법을 기반으로 하는 단백질 분석(Bio-Rad)을 이용하여 확인하였다. 용출된 단백질들의 순도 및 크기는 SDS-PAGE 겔의 코마시(Coomassie) 염색으로 평가하였다. GST 풀-다운 분석(GST pull-down assay)을 이전에 기재된 바와 같이 실시하였다[22]. 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)은 항-GST(B-14, Santa Cruz Biotechnology) 또는 항-Xpress (Invitrogen) 항체들을 이용하여 실시하였고, 반응이 나타난 밴드들은 Western Lightening(PerkinElmer Life Sciences)을 이용한 화학 발광에 의하여 검출하였다.
- [0056] 세포 배양 및 세포내 위치 분석
- [0057] HEK(human embryonic kidney) 293T 세포주 및 C28/I2(juvenile costal chondrocyte cells) 세포주를 10% 가열 불활성화된 소혈청(Gibco), 페니실린 및 스트렙토마이신이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하였다. 세포내 발현 위치 확인 실험을 위하여, 세포들을 글라스 커버슬립 위에 플레이트하고, HEK 293T 세포주에는 VivaMagic Reagent(Vivagen Co. Ltd)를 이용하여 pcDNA3/EGFP-TFG-TEC 또는/및 pcDNA3/mCherry-TFG-TEC 플라스미드를 형질주입시키고, C28/I2 세포주에는 PolyExpress Transfection Reagent (Excelligen)를 이용하여 pcDNA3/EGFP-TFG-TEC 또는/및 pcDNA3/mCherry-TFG-TEC 플라스미드를 형질주입시켰다. 형질주입 48 시간 후, 세포들을 PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척하고, 아세톤/메탄올(1:1, v/v)에 10 분 동안 -20℃에서 고정시켰다. 야생형 TFG-TEC 또는 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질의 세포 내 분포를 공초점 레이저 현미경(Leica TCS SPE, Leica Microsystems)로 확인하였다.
- [0058] 리포터 유전자 분석
- [0059] 세포들에 VivaMagic 또는 PolyExpress Transfection Reagents를 이용하여 플라스미드를 일시적으로 형질주입시킨 후, Dual-luciferase Assay System (Promega)를 이용하여 루시페라제 분석(luciferase assay)를 실시하였다. 레닐라(Renilla) 루시페라제 활성은 형질주입 효율을 표준화하는데 이용하였다.
- [0060] RT-PCR 및 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR)
- [0061] EGFP-양성 및 mCherry-양성인 형질주입된 세포주들을 FACS(fluorescence-activated cell sorter)로 분류하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 TRIzol reagent(Life Technologies)를 이용하여 HEK 293T 및 C28/I2 세포주의 FACS-분류 세포들로부터 총 RNAs를 분리하였다. RNAs는 RT-PCR(Life Technologies)용 SuperScript First-strand Synthesis System을 이용하여 올리고(dT)프라이머로 역전사시켜서 제1가닥(first-strand) cDNAs를 합성한 후, PCR을 실시하여 *Stat-3*, *Eno3*, *Socs2*, 및 β -*actin*의 발현을 검출하였다. PCR 프라이머 서열은 다음과 같다: *Stat-3*의 경우 5'-TTGCCAGTTGTGGTGATC-3' 및 5'-AGAACCCAGAAGGAGAAGC-3'; *Eno3*의 경우 5'-GAAGAAGGCCTGCAACTGT-3' 및 5'-ACTTGCCTCCAGCAAAGATT-3'; *Socs2*의 경우 5'-CTCGGTCAGACAGGATGGTA-3' 및 5'-ACAGAGATGCTGCAGAGATG-3'; 및 *-actin*의 경우 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3' 및 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'. 상기 반응산물을 2% 아가로스 겔 상에 분리한 후, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하였다.
- [0062] 제조사의 프로토콜에 따라 Applied Biosystems 7500 Fast realtime PCR system(Applied Biosystems) 및 SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)를 이용하여 정량적 실시간 PCR을 실시하였다. 대조군으로서, HPRT mRNA의 수준을 측정하여 실험적 차이를 보정하는 데 이용하였다. 이용된 프라이머 서열들은 다음과 같다: *Stat-3*의 경우 5'-GCCCCGTACCTGAAGACCA-3' 및 5'-GACATCGGCAGGTCAATGG-3'; *Eno3*의 경우 5'-GAAGAAGGCCTGCAACTGT-3' 및 5'-ACTTGCCTCCAGCAAAGATT-3'; *Socs2*의 경우 5'-GGATGGTACTGGGGAAGTATGACTG-3' 및 5'-AGTCGATCAGATGAACCACACTCTC-3'; 및 *HPRT*의 경우 5'-GGACCCACGAAGTGTGG-3' 및 5'-CTGGCGATGTCAATAGGACTCCAG-3'. ΔC_T 방법을 이용하여 내생적 *HPRT*를 표준화함으로써 다운-스트림 타겟 유전자들의 상대적인 발현 수준을 정량하였다.

[0063]

실험 결과

[0064]

TFG-TEC는 인 비보에서 자기-결합할 수 있다

[0065]

키메릭 TFG-TEC 단백질은 900 aa으로 구성되어 있고, 7 개의 주요 기능적 도메인들(functional domains)을 형성한다(도 1a). 기능적으로 중요한 3 개의 도메인인 PB1 도메인(Phox and Bem1p domain, aa 10-91), CC 도메인(coiled-coil domain, aa 97-124), 및 SPYQG-풍부 도메인(Ser, Pro, Tyr, Gly, Gln-rich domain, aa 125-273)은 TFG-TEC 융합 단백질의 N-말단에 위치하고 있다. TFG-TEC의 C-말단 부분은 AF1(AF1 transactivation domain, aa 275-562), DBD(DNA binding domain, aa 563-655), LBD(ligand-binding domain, aa 656-885), 및 AF2(aa 886-900)를 포함한다.

[0066]

도 1a에 도시된 바와 같이, 전사 조절이나 단백질-단백질 상호작용에 필요한 몇몇 기능적으로 중요한 도메인들은 TFG-TEC 단백질에 존재하나; TFG-TEC가 자기-결합할 수 있는지의 여부는 확실하지 않다. TFG-TEC 단백질이 인 비보에서 자기-결합할 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 TFG-TEC를 합성할 수 있는 발현 벡터를 HEK 293T 세포주에 형질주입한 후 동시-친화성 침강 분석(co-affinity precipitation assay)을 실시하였다(도 1b). TFG-TEC-양성인 인간 EMC 세포주 또는 그의 동등 세포주를 획득할 수 없기 때문에, HEK 293T 세포주를 사용하였다. GST에 융합된 TFG-TEC(pEF-BOS/GST-TFG-TEC), GST 도메인 단독(pEF-BOS/GST), 또는 pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC[N-말단 (His)₆-태깅 및 Xpress 에피토프-태깅 TFG-TEC 단백질을 생성]를 포함하는 포유류 발현 벡터들을 HEK 293T 세포에 동시-형질주입(co-transfection)하였다. 형질주입 48 시간 후, 상기 세포들을 회수하여, 용해하고, 글루타티온 비드로 인큐베이션하였다. 용출액들을 항-Xpress 항체로 면역 블롯팅한 결과, (His)₆-TFG-TEC이 GST-TFG-TEC와는 동시-침강되었으나 GST 단독과는 동시-침강되지 않았음을 보여준다(도 1b, 위쪽 패널). 이러한 3 개의 단백질들을 형질주입된 세포내에서 GST(GST-TFG-TEC 및 GST; 도 1b, 중간 패널) 또는 Xpress 에피토프[(His)₆-TFG-TEC; 도 1b, 아래쪽 패널]에 대해 탐침함으로써 확인하였다. 이러한 결과들은 TFG-TEC가 인 비보에서 자기-결합할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0067]

TFG-TEC의 CC, AF1, 및 DBD 도메인이 자기-결합(self-association)에 관여한다.

[0068]

자기-결합에 관여하는 TFG-TEC 내 도메인들을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 GST-융합 TFG(NTD) 및 GST-융합 TEC 단백질을 이용하여 인 비트로 풀 다운 분석(*in vitro* pull-down assay)을 실시하였다(도 2a). PCR을 이용하여 TFG-TEC의 TFG(NTD) 및 TEC 단편을 제작하고 GST 도메인에 인-프레임(in-frame)으로 융합시켰다. 이러한 GST-융합 단백질들을 개별적으로 *E. coli*에 발현시키고 정제한 후, 글루타티온-세파로즈 비드에 결합시켰다. 제조합 (His)₆- 및 Xpress 에피토프-태깅 TFG-TEC 단백질들과 함께 인큐베이션 및 세척한 후, 본 발명자들은 TFG-TEC 단백질이 TFG(NTD) 또는 TEC 도메인들을 포함하는 GST-융합 단백질과 특이적으로 결합한다는 것을 발견하였다(도 2a; 위쪽 패널, 3 및 4 번 라인). 이와 대조적으로, TFG-TEC와 GST 단독 간의 상호작용은 없었다(도 2a; 위쪽 패널, 2 번째 라인). 이러한 결과들은, TFG-TEC와 상관없이 독립적으로 자기-결합할 수 있는 최소 2 개의 부위들[TFG(NTD) 및 TEC 도메인]을 TFG-TEC이 포함하고 있다는 것을 제시한다.

[0069]

이러한 결과들을 기반으로 하여, TFG-TEC의 단편[TFG(NTD) 또는 TEC]이 TFG(NTD) 및 TEC와의 상호작용에 관여한다는 점을 밝힐 필요가 있었다. 이 점을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 *E. coli*에서 (His)₆-포함 융합 단백질로써 제조합 TFG(NTD)를 발현시키고, Ni⁺²-NTA-아가로즈 레진을 이용하여 정제하였다. 그 후, 제조합 (His)₆-TFG(NTD)와 GST 또는 GST-TFG(NTD) 또는 GST-TEC 융합을 이용하여 GST 풀-다운 분석을 실시하였다. 도 2a(중간 패널)에 도시된 바와 같이, (His)₆-TFG(NTD)은 GST-TFG(NTD)와는 상호작용하였으나 GST-TEC 또는 GST 단독과는 상호작용하지 않았으며, 이는 TFG(NTD)가 TFG-TEC 융합의 TFG 단편과는 상호작용하고 TEC 단편과는 상호작용하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0070]

추가적으로, TEC와의 상호작용에 관여하는 TFG-TEC 내 도메인들을 확인하기 위하여, (His)₆-TEC 단백질을 이용하여 GST 풀-다운 분석을 실시하였다. 도 2a(아래쪽 패널)에 도시된 바와 같이, TFG-TEC 융합의 TEC 단편을 포함하는 GST-융합 단백질은 (His)₆-TEC 단백질과 결합할 수 있었다. 그러나, TFG(NTD)가 있는 GST-융합은 (His)₆-TEC과 결합하지 못하였다(도 2a; 아래쪽 패널, 3 번 라인). 이러한 결과들은 TFG-TEC의 자기-결합은 TFG-TEC의 TFG(NTD) 단편 또는 TEC 단편을 통하여 매개될 수 있다는 것을 제시한다. 이 분석에 이용된 GST-용

합 단백질의 분액을 12% SDS-PAGE 겔 상에서 분획하고 코마시 블루 염색으로 가시화하여, 각 풀-다운 분석에 유사한 양의 단백질을 이용하였음을 확인하였다(도 2b).

[0071]

자기-결합에 필요한 TFG(NTD) 내 도메인을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 일련의 TFG(NTD) 결실 변이를 이용하여 인 비트로 GST 풀-다운 분석을 실시하였다. 변이들의 구조는 도 3a에 개략적으로 나타내었다. 도 3b에서, TFG(NTD)가 GST-CC(도 3b; 위쪽 패널 4번 레인)에는 강하게 결합하지만, PB1의 GST-융합(도 3b; 위쪽 패널 3번 레인), SPYQ의 GST-융합(도 3b; 위쪽 패널 5번 레인) 및 GST 단독(도 3b; 위쪽 패널 2번 레인)에는 결합하지 못하였으며, 이는 TFG(NTD)와의 상호작용에 TFG-TEC의 aa 97-124가 필수적이고 충분하다는 것을 보여준다. 이 분석에 이용된 GST-융합 단백질의 분액을 12% SDS-PAGE 겔 상에서 분획하고 코마시 블루 염색으로 가시화하여, 각 풀-다운 분석에 유사한 양의 단백질을 이용하였음을 확인하였다(도 3b; 아래 패널).

[0072]

다음으로, 자기-결합에 필요한 TEC 내 도메인을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 TEC 결실 변이 셋트(GST-AF1, GST-DBD, GST-LBD 및 GST-AF2)를 이용하여 인 비트로 GST 풀-다운 분석을 실시하였다. 변이들의 구조는 도 3a에 개략적으로 나타내었다. 도 3c에서, (His)₆-태깅 TEC가 GST-AF1(도 3c; 위쪽 패널 3번 레인) 및 GST-DBD(도 3c; 위쪽 패널 4번 레인)에는 강하게 결합하지만, LBD의 GST-융합(도 3c; 위쪽 패널 5번 레인), AF2의 GST-융합(도 3c; 위쪽 패널 6번 레인) 및 GST 단독(도 3c; 위쪽 패널 2번 레인)에는 결합하지 못하였으며, 이는 TEC와의 상호작용에 TFG-TEC의 AF1 또는 DBD 도메인이 필수적이고 충분하다는 것을 보여준다. 이 분석에 이용된 GST-융합 단백질의 분액을 12% SDS-PAGE 겔 상에서 분획하고 코마시 블루 염색으로 가시화하여, 각 풀-다운 분석에 유사한 양의 단백질을 이용하였음을 확인하였다(도 3c; 아래 패널). 종합해보면, 이러한 결과들은 TFG-TEC가 최소 3 개의 도메인들(CC, AF1, 및 DBD)을 포함하고 있으며, 이에 의해 TFG-TEC와 독립적으로 자기-결합할 수 있음을 제시한다.

[0073]

NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질은 인 비보에서 야생형 TFG-TEC과 결합한다.

[0074]

본 발명자들은 DBD 내 KRRR 서열이 TFG-TEC 발암단백질을 타겟팅한다는 것을 이전에 보고한 바 있다[19]. NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 인 비보에서 TFG-TEC와 상호작용하는지의 여부를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 TFG-TEC(AAAA) 단백질을 포함하는 발현 벡터를 형질주입된 HEK 293T 세포들의 추출물을 이용하여 동시-친화성 침강(co-affinity precipitation)을 실시하였다(도 4a). 위치-지정 변이유발법(Site-directed mutagenesis)을 이용하여 TFG-TEC의 핵 내 위치에 영향을 미칠 것으로 예상되는 아미노산을 변경하였다. 특히, 변이를 DBD 내 고보존 아미노 서열(highly conserved basic amino sequence)인 ⁶¹²KRRR⁶¹⁵에 도입하여 (TFG-TEC에 대한 NLS의 역할을 할 것으로 예상된다)[19], 상기 아미노산들을 ⁶¹²AAAA⁶¹⁵로 변이시켰다(도 4a). TFG-TEC 변이 단백질[TFG-TEC(AAAA)]이 야생형 TFG-TEC과 결합하는지의 여부를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 두 개의 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터를 HEK 293T 세포에 일시적으로 형질주입시키고 친화성 침강 분석을 실시하였다. HEK 293T 세포들을 pcDNA4-HisMaxA/TFG-TEC(AAAA) 및 pEF-BOS/GST-TFG-TEC 또는 pEF-BOS/GST와 동시-형질주입시켰다. 형질주입 48 시간 후 세포들을 용해시키고, 글루타티온-세파로즈 비즈를 이용하여 GST-TFG-TEC 융합 단백질을 친화성-침강시켰다. 그 후, 항-Xpress 항체를 이용한 면역블롯팅을 실시하여 NLS 변이 (His)₆-TFG-TEC(AAAA) 단백질을 검출하였다. 상기 결과들은 NLS 변이 (His)₆-TFG-TEC(AAAA) 단백질이 GST-TFG-TEC에 특이적으로 동시-침강되었으나(도 4a; 위쪽 패널, 2번 레인), GST 단독에는 동시-침강되지 않았다(도 4a; 위쪽 패널, 1번 레인)를 나타냈다. GST(GST 및 GST-TFG-TEC; 도 4a, 중간 패널) 또는 Xpress 태그[(His)₆-TFG-TEC(AAAA); 도 4a, 아래쪽 패널]를 탐침하여, 형질주입된 세포들에서 상기 3 개의 단백질들을 확인하였다. 이러한 결과들은 인 비보에서 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 야생형 TFG-TEC과 이종이량체(heterodimer)를 형성할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0075]

도 3c의 데이터는 TFG-TEC의 DBD가 TEC와 이종이량체를 형성할 수 있다는 것을 가리킨다. TFG-TEC(DBD)의 NLS 변이형이 야생형 TFG-TEC과 결합할 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여, (His)₆-TFG-TEC 단백질을 이용하여 GST 풀-다운 분석을 실시하였다. 도 4b(위쪽 패널)에 도시된 바와 같이, (His)₆-TFG-TEC 단백질은 GST-DBD(AAAA) 및 GST-DBD 모두와 상호작용하였으나, GST 단독과는 상호작용하지 않았다. 이것은 변이 DBD(AAAA)의 결합능이 TFG-TEC 내 야생형 DBD와 유사한 수준임을 나타낸다. 이 분석에 이용된 GST-융합 단백질의 분액을 12% SDS-PAGE 겔 상에서 분획하고 코마시 블루 염색으로 가시화하여, 각 풀-다운 분석에 유사한 양의 단백질을 이용하였음을 확인하였다(도 4b; 아래 패널).

[0076] **NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질은 세포질에서 야생형 TFG-TEC을 포획한다.**

[0077] 야생형 TFG-TEC 단백질과 NLS 변이 TFG-TEC 단백질의 이중이량체 형성(Heterodimerization)은, NLS 변이[TFG-TEC(AAAA)]가 야생형 TFG-TEC 단백질의 세포 내 분포에 영향을 미칠 수 있다는 것을 제시한다. 이것을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 EGFP-융합 TFG-TEC(EGFP-TFG-TEC) 및 mCherry-융합 NLS 변이 TFG-TEC[mCherry-TFG-TEC(AAAA)]에 대한 포유류 발현 벡터를 HEK 293T 세포에 공동-형질주입시켰다. NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질을 발현하지 않는 대조군인 HEK 293T 세포들에서, EGFP-융합 TFG-TEC 단백질은 독점적으로 핵에 위치하고 있었다(도 5a, 패널 a-d). 예상한 바와 같이, 대조군 HEK 293T 세포의 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질은 세포질에 위치하고 있었다(도 5a, 패널 e-h). 흥미롭게도, 도 5a(패널 i-l)에서, EGFP-TFG-TEC이 NLS 변이 mCherry-TFG-TEC(AAAA)와 동시-발현된 경우, 야생형 TFG-TEC 단백질은 세포질과 핵 모두에서 발현되었으나[도 5a(패널 k), 별표]; 야생형 TFG-TEC 단백질은 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA)를 발현하지 않는 세포의 핵에 위치하고 있었으며[도 5a(패널 k), 화살표], 이는 야생형 TFG-TEC를 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 세포질에서 포획하고 있었다는 것을 제시한다. 인간 C28/I2 세포주에서도 유사한 결과들을 얻었다. 도 5b에 도시된 바와 같이, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질의 동시-발현은 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 야생형 TFG-TEC을 세포질에서 포획하고 있다는 것을 의미한다. 따라서, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질의 동시 발현에 따라 야생형 TFG-TEC의 비율이 세포질 내에서 유지된다고 본 발명자들은 결론을 내렸다.

[0078] **NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질은 TFG-TEC-의존적 트랜스활성(transactivation)을 조절한다.**

[0079] TFG-TEC와 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질 간의 이중이량체 형성의 결과를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 HEK 293T 세포에서, 야생형 TFG-TEC에 의하여 매개된 전사 활성 수준에서의 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질 발현 효과를 측정하였다. 이는 pcDNA4-HisMaxB/TFG-TEC, 또는 pCMV-Tag2A/TFG-TEC(AAAA)의 동시-형질주입, 또는 pCMV-Tag2A/TFG-TEC(AAAA)의 동시-형질주입 없이 세포 내로 형질주입된 루세퍼라제-기반 리포터 플라스미드의 발현을 조사하여 이루어졌다. 리포터 플라스미드 및 발현 벡터들의 구조는 도 6a에 나타내었다. HEK 293T 세포 내로의 TFG-TEC의 도입은 TATA 미니멀(minimal) 프로모터 서열 및 8 개의 NBREs(NGFI-B Response Elements)를 포함하는 리포터 플라스미드인 p(Bla)⁸-Luc의 전사를 활성화시켰으며(약 260 배)[23], 이는 레닐라 루시페라제가 합성되도록 한다(도 6b; 위쪽 패널 2번 막대). 흥미롭게도, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질의 동시-발현은 용량-의존적으로 야생형 TFG-TEC-매개 전사활성을 억제하였다(도 6b; 위쪽 패널 3-6번 막대). 이러한 결과들은 HEK 293T 세포에서 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 TFG-TEC-매개 트랜스활성을 억제한다는 것을 가리킨다. 세포주-특이 효과를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 인간 C28/I2 세포주로 동일한 실험을 실시하여 유사한 결과들을 얻었다(도 6c 위쪽 패널). 따라서, 본 발명자들은 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 우성적 네가티브(dominant negative) 방식으로 기능한다고 결론을 내렸다. 형질주입된 세포의 추출물의 웨스턴 블롯 분석은, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA)에 의한 TFG-TEC-의존적 트랜스활성의 조절이 TFG-TEC 단백질 양의 차이로 인한 것이 아님을 보여준다(도 6b 및 6c의 2 번째 패널). 또한, 웨스턴 블롯 분석은, 형질주입된 플라스미드의 양이 증가 될수록 많은 양의 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 합성된다는 것을 보여준다(도 6b 및 6c의 3 번째 패널). EGFP 플라스미드는 형질주입 효율을 확인하기 위한 내부 대조군으로 이용하였다(도 6b 및 6c의 아래 패널).

[0080] 다음으로, 인 비보에서 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA)와 야생형 TFG-TEC의 이소성(ectopic) 동시-발현이 TFG-TEC에 대한 내생적 다운-스트림 타겟 유전자들의 발현을 조절하는 지의 여부를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 TFG-TEC-EGFP 및 TFG-TEC(AAAA)-mCherry 컨스트럭트들을 HEK 293T 세포에 일시적으로 형질주입시켰다. 이전의 보고들과 마찬가지로[19, 24], TFG-TEC-EGFP가 형질주입된 HEK 293T 세포들에서 *Stat-3*, *Eno3*, 및 *Socs2*의 발현은 상향-조절(up-regulation)되었다(도 7a; 2번 레인). 그러나, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA)-mCherry 단백질을 야생형 TFG-TEC와 동시-발현시킬 경우, *Stat-3*, *Eno3*, 및 *Socs2*의 발현은 뚜렷하게 하향-조절(down-regulation)되었다(도 7a; 3번 레인). EGFP 및 mCherry를 발현하는 HEK 293T 세포들은 대조군으로 이용하였다(도 7a; 1번 레인). EGFP 및/또는 mCherry 벡터 단독으로 형질주입시킨 HEK 293T 세포에서 *Stat-3*, *Eno3*, 및 *Socs2* 유전자들의 발현은 영향을 받지 않았다(데이터 미도시). 인간 C28/I2 세포주에서도 유사한 결과들을 얻었다(도 7b).

[0081] 추가적으로 TFG-TEC 및 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질을 동시-발현하는 HEK 293T 세포의 특징을 조사하기 위하

여, 본 발명자들은 실시간 PCR을 이용하여 *Stat-3*, *Eno3*, 및 *Socs2* 유전자들의 발현을 확인하였다. 도 7c에 도시된 바와 같이, 이 유전자 모두는 TFG-TEC-EGFP를 발현하는 HEK 293T 세포에서 상향-조절되었으나; TFG-TEC-EGFP 및 TFG-TEC(AAAA)-mCherry를 동시-발현하는 HEK 293T 세포에서는 하향-조절되었다. EGFP 및 mCkarherry를 발현하는 HEK 293T 세포를 대조군으로 이용하였다. *Stat-3*, *Eno3*, 및 *Socs2* 유전자들의 발현은 EGFP 및/또는 mCherry 벡터 단독으로 형질주입시킨 HEK 293T 세포에 영향을 미치지 못했다(데이터 미도시). 인간 C28/I2 세포주에서도 유사한 결과들을 얻었다(도 7d). 이러한 결과들은, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 TFG-TEC-매개 트랜스활성을 하향-조절하며, 인 비트로 및 인 비보 모두에서 야생형 TFG-TEC 단백질에 대한 우성적 네가티브 조절자로 작용한다는 것을 강하게 제시한다.

[0082]

논의사항

[0083]

본 발명자들은 인간 EMCs의 염색체 전좌에 의하여 발생하는 TFG-TEC 키메라 분자의 포괄적인 분석을 제시한다. TFG-TEC 타겟팅은 이러한 공격적인 암에 대한 신규한 치료 전략의 개발을 이끌어 낼 수 있으므로, TFG-TEC의 생화학적 특성에 대한 이해는 TFG-TEC-매개 악성종양의 근원적인 메커니즘을 밝히는 데 도움이 될 수 있다. 본 연구는 TFG-TEC가 인 비트로 및 인 비보 모두에서 자기-결합하고, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질에 의해 TFG-TEC-매개 전사 활성이 길항작용될 수 있다는 것을 보여준다. 종합적으로, 이러한 정보는 TFG-TEC 키메라 단백질의 생물학적 활성이 그것의 우성적 네가티브 형태에 의해 조절될 수 있음을 나타낸다. 상기 결과들로 TFG-TEC 발암단백질의 기능적 조절을 확인하였다.

[0084]

NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질은 야생형 TFG-TEC의 활성을 효과적으로 저해시켰다(도 6 및 7). 따라서, 이러한 저해에 대한 근본적인 메커니즘을 검토할 필요가 있었다. NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 세포질 단백질이므로, 그것을 비정상적인 세포내 위치로 유도시킴으로써, TFG-TEC 발암단백질을 불활성화시킬 수 있다. 본 발명자들의 초기 접근법은 야생형 TFG-TEC 및 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질 간의 결합에 대한 특성을 밝히는 것을 포함했다. 이를 위해, 본 발명자들은 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 TFG-TEC-매개 전사 트랜스활성에 필요한 특이인 야생형 TFG-TEC의 핵 내 위치를 방해하는지의 여부를 확인하였다. 첫 번째로, 야생형 TFG-TEC와 NLS 변이 TFG-TEC 간의 결합을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 친화성 침강 분석에 이어 웨스턴 블롯 분석을 실시하여 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질을 검출하였다. TFG-TEC에 의한 전사 트랜스활성(transcriptional transactivation)은 TFG-TEC가 핵에 위치하고 있어야 하기 때문에[19], 다음으로 본 발명자들은 형질주입된 HEK 293T 및 C28/I2 세포에서 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 TFG-TEC의 세포 내 위치를 변경하는지의 여부를 조사하였다. 예상한 바와 같이, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 없을 때 발현되는 경우, 야생형 TFG-TEC은 HEK 293T 및 C28/I2 세포의 핵에 주로 위치하였다. 반면, 야생형 TFG-TEC이 없을 때 발현되는 경우, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질은 세포질에 주로 위치하였다(도 5).

[0085]

TFG-TEC 및 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 동시-발현되는 경우, NLS 변이는 세포질에 위치하나, 놀랍게도 야생형 TFG-TEC은 핵 및 세포질 모두에 존재하였다(도 5). 이는 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 야생형 TFG-TEC를 핵으로부터 세포질로 이동시킬 수 있다는 것을 제시한다. 따라서, NLS 변이 TFG-TEC(AAAA) 단백질이 야생형 단백질과 이종이량체를 형성하여 비-생산적인 복합체가 생성되도록 하는 것으로 보인다. 결과적으로 우성적 네가티브 메커니즘을 통해 야생형 TFG-TEC 활성의 길항작용을 한다. 도 5에서의 세포내 위치의 혼합 패턴은 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA)의 억제 효과가 완벽하지 않다는 것을 보여준다. 그러나, 세포질 및 핵 모두에서의 야생형 TFG-TEC의 이러한 혼합 패턴은 이러한 단백질들의 예상된 결합 특성과 일치한다. 동일한 세포에서 NLS 변이 TFG-TEC(AAAA)가 야생형 TFG-TEC와 동시-발현되는 경우, 이러한 두 단백질간의 시간-의존적 결합이 인 비보에서 일어난다. 도 1 및 4에 도시된 바와 같이, 야생형 TFG-TEC 단백질은 TFG-TEC(AAAA) 또는 TFG-TEC 단백질과 결합하였다. 따라서, 3 개의 단백질 복합체, 예컨대, 야생형 동형이량체(homodimer), 야생형-변이 이종이량체 및 변이 동형이량체가 이러한 세포에 존재한다고 예상할 수 있었다. 이러한 복합체들 중, NLS-변이 TFG-TEC와 야생형 TFG-TEC의 이종이량체 형성은 세포질에서 야생형 TFG-TEC 단백질을 포획할 수 있으나(도 5); 야생형 TFG-TEC 단백질의 동형이량체는 그들의 핵내 위치에 영향을 미칠 수 없었다. 이러한 이유로, 세포내 위치의 혼합 패턴은 인 비보에서 NLS 변이 TFG-TEC의 억제 효과가 불완전하기 때문이 아니라 이러한 단백질들의 이량체 형성 특성으로 인한 것이라고 추측하는 것이 합리적으로 보인다. 또한, 공격적인 EMCs에 대한 치료 개발을 위하여 야생형 TFG-TEC와 NLS-변이 TFG-TEC 간 결합의 열역학 및 운동학적 특성을 조사하는 것은 흥미로운 일이 될 것이다. TFG 폴리펩티드의 N-말단 단편은 EWS, TLS, 및 hTAF68 단백질들의 N-말단 단편과 강한 유사성을 보인다[8, 11]. 인간 암들에서 전좌-생성 융합 유전자의 아미노 말단 부위로 밝혀진 *EWS*, *TLS*, 및 *hTAFI168* 유전자들은 잠재적인 RNA 결합도메인 및 세 개의 글리신-, 아르기닌-, 및 프롤린-풍

부 모티브들을 코딩한다[25]. EWS, TLS, 및 hTAFII68-융합들과 달리, TFG-TEC의 조절에 대해 알려진 바가 거의 없다. 이러한 연구 과정 동안, 본 발명자들은 TFG-TEC 키메라 단백질이 자기-결합할 수 있다는 점을 발견하였다. 따라서, 본 발명자들의 초기 실험들은 GST 풀-다운 및 인 비보 친화성 침강 분석을 이용하여 TFG-TEC의 동형이량체 형성 가능성을 연구하였다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 세 개의 독립적인 도메인들인 CC, AF1, 및 DBD가 TFG-TEC의 자기-결합에 관여한다는 것을 발견하였다(도 3). 일부 세포내 단백질들의 생물학적 기능이 그들의 자기-결합 능력을 이용하여 조절되기 때문에, 이러한 독립적 상호작용하는 도메인들이 TFG-TEC 기능에 중요한 지의 여부를 조사하는 것 또한 흥미로운 일이 될 것이다.

[0086]

이전 연구에서, 본 발명자들은 TFG-TEC가 모(parental) TEC 단백질과 동일한 서열 특이성을 갖는 DNA에 결합하는 핵 내 단백질이란 것을 확인하였다[19]. 따라서, 본 발명자들은 인간 EMCs에서 TFG-TEC-매개 종양형성의 기초가 되는 분자적 메커니즘을 조사하였다. 본 발명자들은 TFG-TEC가 TEC에 대한 완전한 아미노산 서열을 포함함에도 불구하고, 증가된 전사 활성화(transcriptional activation) 가능성을 나타낸다는 것을 발견하였다. 이것은 TFG-TEC의 아미노 말단 부위가 추가적인 트랜스활성 특성을 제공한다는 것을 가리킨다. 이와 일관되게, GAL4 DNA-결합 도메인과 결합하는 경우, TFG(NTD) 부위가 전사 활성 도메인으로 작용하였다. TFG(NTD) 또한 자기-결합하며(도 2) TFG(NTD) 내 CC 도메인은 이에 필수적이다(도 3). 따라서, CC 도메인-매개 TFG(NTD) 자기-결합이 그것의 트랜스활성 특성에 있어 중요한 지의 여부를 조사하는 것은 흥미로운 일이 될 것이다.

[0087]

요약하자면, 본 연구는 신규한 TFG-TEC의 NLS 변이를 밝혀내고 그것이 어떻게 야생형 TFG-TEC의 세포 내 위치 및 전사 활성을 조절하는 지를 확인하였다. 비록 본 발명자들이 이미 (i) TFG-TEC가 모(parental) TEC 단백질과 동일한 서열 특이성을 갖는 DNA에 결합하는 핵 내 단백질이고; (ii) 융합 유전자가 TEC보다 강력한 전이활성제(transactivator)를 코딩하며; 그리고 (iii) 인간 EMCs에서의 종양 형성에 있어 TFG-TEC의 기능이 필수적일 수 있다는 것을 보고하였으나[19], 여전히 이러한 단백질의 기능적 조절은 알려지지 않았다. 따라서, TFG-TEC를 조절하는 메커니즘을 이해하는 것이 특징적인 t(3;9) 전좌를 갖는 공격적인 EMCs의 치료를 위한 신규한 치료 전략법 및 타겟의 개발로 이어질 수 있다.

[0088]

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.

[0089]

참조 문헌

[0090]

1. Clark, J., Benjamin, H., Gill, S., Sidhar, S., Goodwin, G., Crew, J., Gusterson, B. A., Shipley, J. and Cooper, C. S. (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.

[0091]

2. Labelle, Y., Bussieres, J., Courjal, F. and Goldring, M. B. (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.

[0092]

3. Labelle, Y., Zucman, J., Stenman, G., Kindblom, L. G., Knight, J., Turc-Carel, C., Dockhorn-Dworniczak, B., Mandahl, N., Desmaza, C., Peter, M. and et al. (1995) Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hum Mol Genet*. 4, 2219-2226.

[0093]

4. Sjogren, H., Meis-Kindblom, J., Kindblom, L. G., Aman, P. and Stenman, G. (1999) Fusion of the EWS-related gene TAF2N to TEC in extraskelatal myxoid chondrosarcoma. *Cancer Res*. 59, 5064-5067.

[0094]

5. Attwooll, C., Tariq, M., Harris, M., Coyne, J. D., Telford, N. and Varley, J. M. (1999) Identification of a novel fusion gene involving hTAFII68 and CHN from a t(9;17)(q22;q11.2) translocation in an extraskelatal myxoid chondrosarcoma. *Oncogene*. 18, 7599-7601.

[0095]

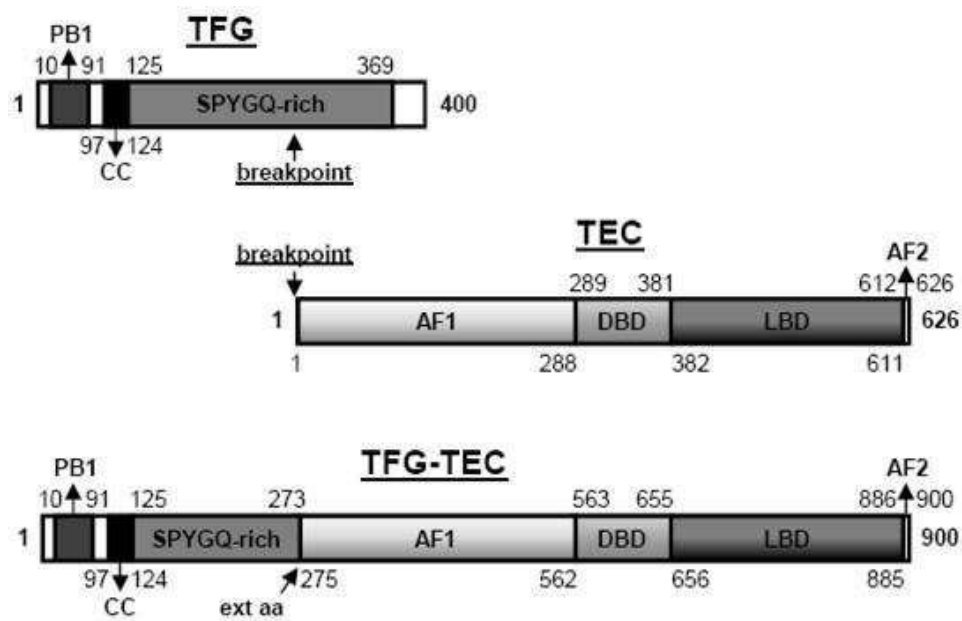
6. Panagopoulos, I., Mencinger, M., Dietrich, C. U., Bjerkehagen, B., Saeter, G., Mertens, F., Mandahl, N. and Heim, S. (1999) Fusion of the RBP56 and CHN genes in extraskelatal myxoid chondrosarcomas with translocation t(9;17)(q22;q11). *Oncogene*. 18, 7594-7598.

- [0096] 7. Sjogren, H., Wedell, B., Meis-Kindblom, J. M., Kindblom, L. G., Stenman, G. and Kindblom, J. M. (2000) Fusion of the NH2-terminal domain of the basic helix-loop-helix protein TCF12 to TEC in extraskeletal myxoid chondrosarcoma with translocation t(9;15)(q22;q21). *Cancer Res.* 60, 6832-6835.
- [0097] 8. Hisaoka, M., Ishida, T., Imamura, T. and Hashimoto, H. (2004) TFG is a novel fusion partner of NOR1 in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 40, 325-328.
- [0098] 9. Greco, A., Mariani, C., Miranda, C., Lupas, A., Pagliardini, S., Pomati, M. and Pierotti, M. A. (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. *Molecular and cellular biology.* 15, 6118-6127.
- [0099] 10. Hernandez, L., Pinyol, M., Hernandez, S., Bea, S., Pulford, K., Rosenwald, A., Lamant, L., Falini, B., Ott, G., Mason, D. Y., Delsol, G. and Campo, E. (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.
- [0100] 11. Mencinger, M., Panagopoulos, I., Andreasson, P., Lassen, C., Mitelman, F. and Aman, P. (1997) Characterization and chromosomal mapping of the human TFG gene involved in thyroid carcinoma. *Genomics.* 41, 327-331.
- [0101] 12. Miranda, C., Roccato, E., Raho, G., Pagliardini, S., Pierotti, M. A. and Greco, A. (2006) The TFG protein, involved in oncogenic rearrangements, interacts with TANK and NEMO, two proteins involved in the NF-kappaB pathway. *Journal of cellular physiology.* 208, 154-160.
- [0102] 13. Ohkura, N., Hijikuro, M., Yamamoto, A. and Miki, K. (1994) Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 205, 1959-1965.
- [0103] 14. Hedvat, C. V. and Irving, S. G. (1995) The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor. *Mol Endocrinol.* 9, 1692-1700.
- [0104] 15. Maltais, A. and Labelle, Y. (2000) Structure and expression of the mouse gene encoding the orphan nuclear receptor TEC. *DNA Cell Biol.* 19, 121-130.
- [0105] 16. Cheng, L. E., Chan, F. K., Cado, D. and Winoto, A. (1997) Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *The EMBO journal.* 16, 1865-1875.
- [0106] 17. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [0107] 18. Lee, J., Kim, H. K., Han, Y. M. and Kim, J. (2008) Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. *Int J Biochem Cell Biol.* 40, 1043-1054.
- [0108] 19. Lim, B., Jun, H. J., Kim, A. Y., Kim, S., Choi, J. and Kim, J. (2012) The TFG-TEC fusion gene created by the t(3;9) translocation in human extraskeletal myxoid chondrosarcomas encodes a more potent transcriptional activator than TEC. *Carcinogenesis.* 33, 1450-1458.
- [0109] 20. Lee, H. J., Kim, S., Pelletier, J. and Kim, J. (2004) Stimulation of hTAFII68 (NTD)-mediated transactivation by v-Src. *FEBS Lett.* 564, 188-198
- [0110] 21. Lee, J., Kim, H. K., Rho, J. Y., Han, Y. M. and Kim, J. (2006) The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem.* 281, 33554-33565.
- [0111] 22. Lee, J., Rhee, B. K., Bae, G. Y., Han, Y. M. and Kim, J. (2005) Stimulation of Oct-4 activity by Ewing's sarcoma protein. *Stem Cells.* 23, 738-751.
- [0112] 23. Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M. and Milbrandt, J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science.* 252, 1296-1300.

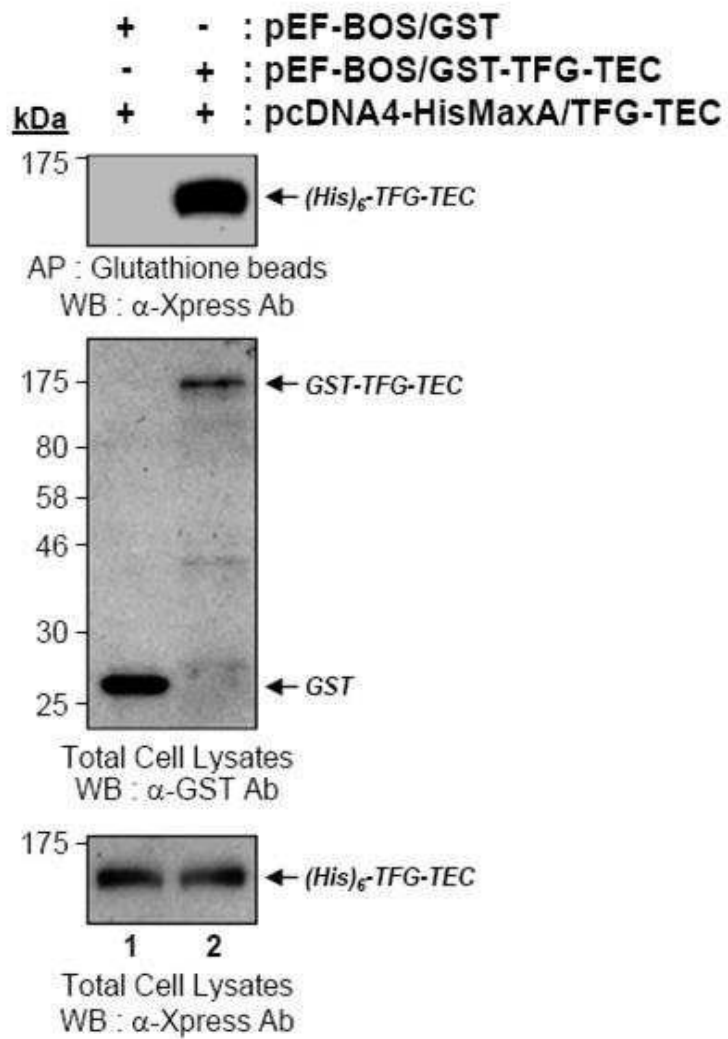
- [0113] 24. Ohkura, N., Nagamura, Y. and Tsukada, T. (2008) Differential transactivation by orphan nuclear receptor NOR1 and its fusion gene product EWS/NOR1: possible involvement of poly(ADP-ribose) polymerase I, PARP-1. Journal of cellular biochemistry. 105, 785-800.
- [0114] 25. Kim, J. and Pelletier, J. (1999) Molecular genetics of chromosome translocations involving EWS and related family members. Physiol Genomics. 1, 127-138.

도면

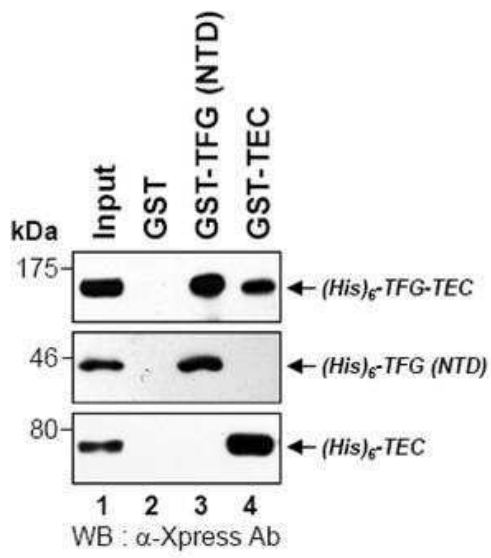
도면1a



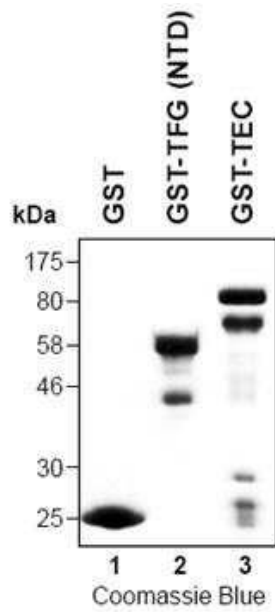
도면1b



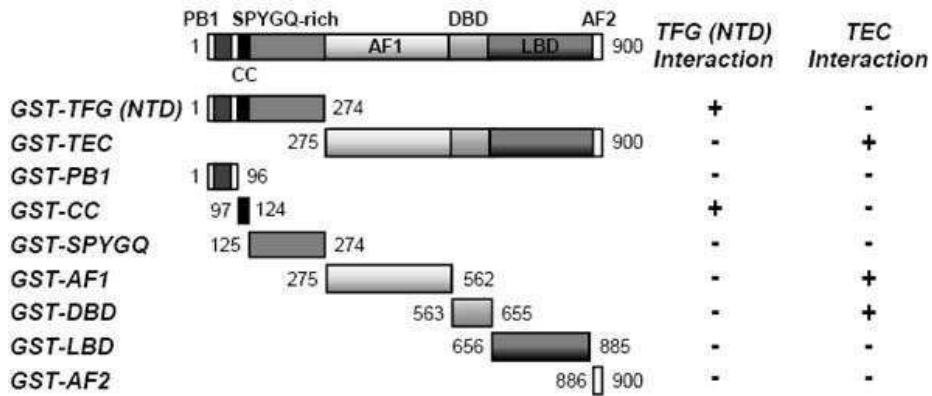
도면2a



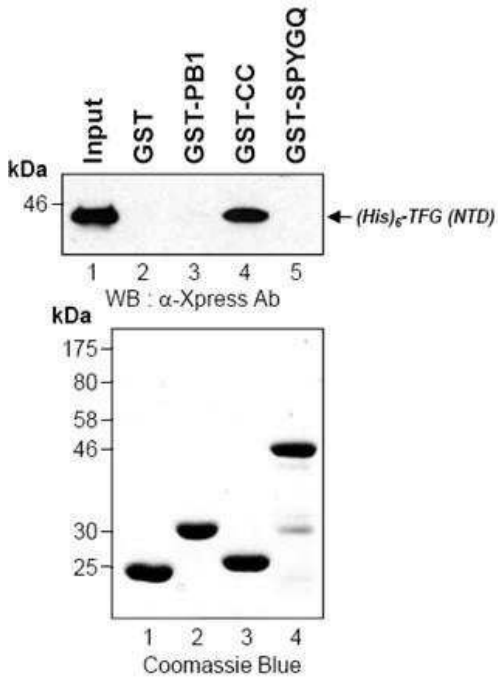
도면2b



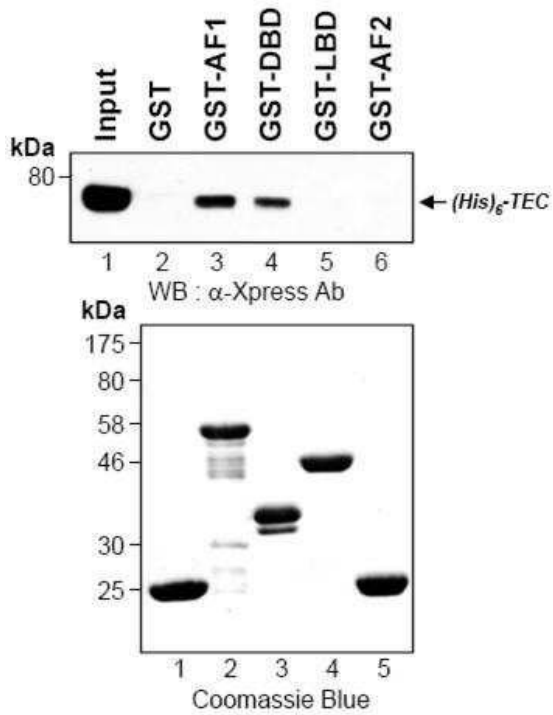
도면3a



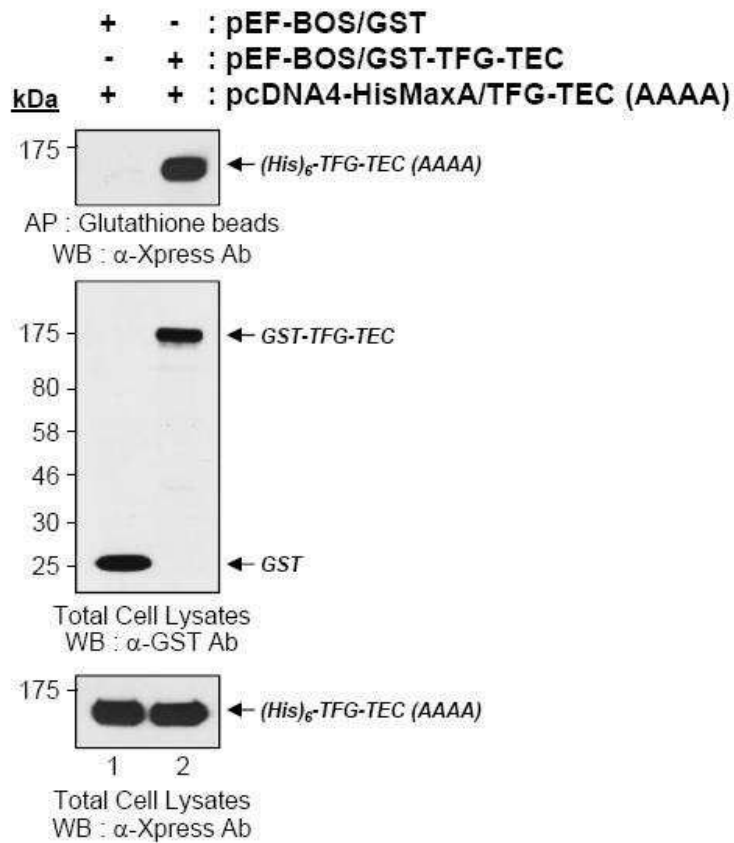
도면3b



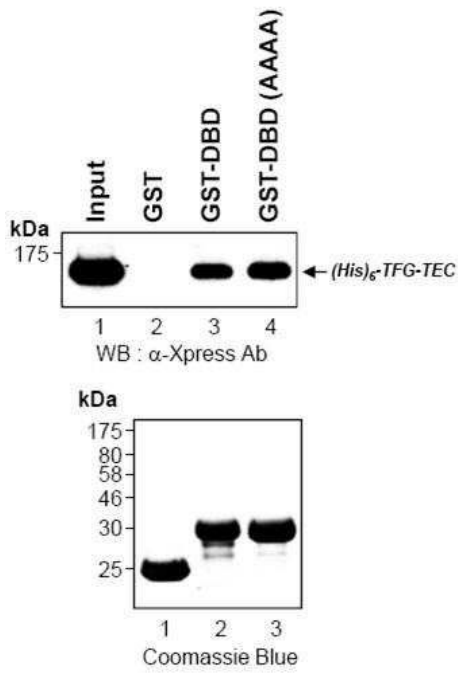
도면3c



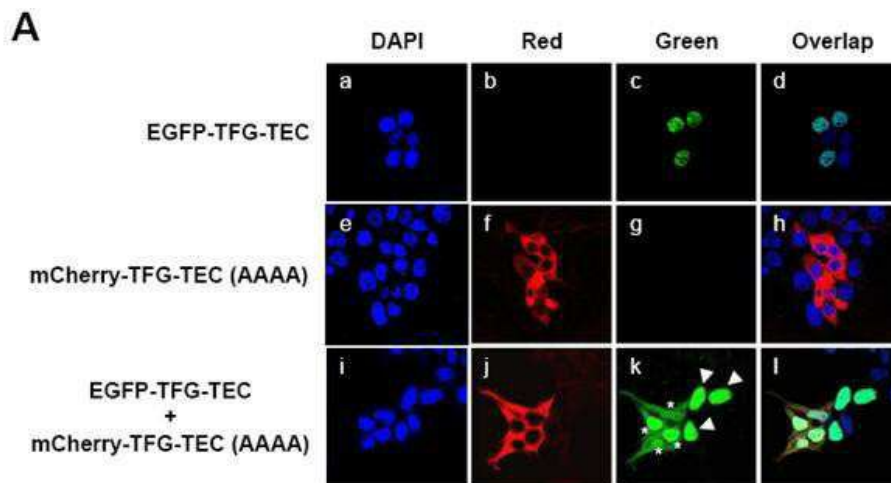
도면4a



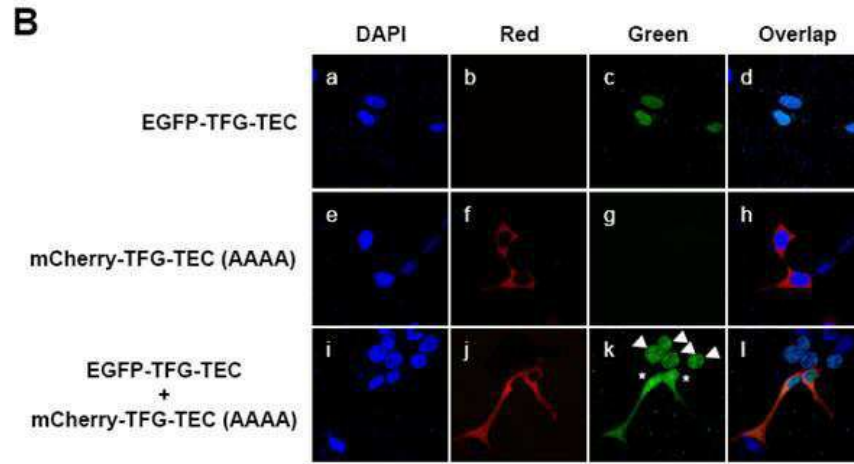
도면4b



도면5a



도면5b

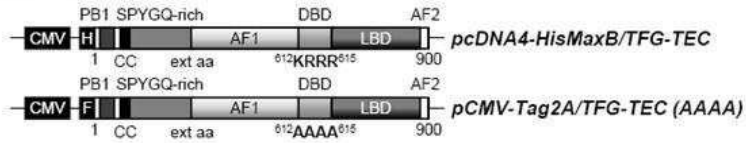


도면6a

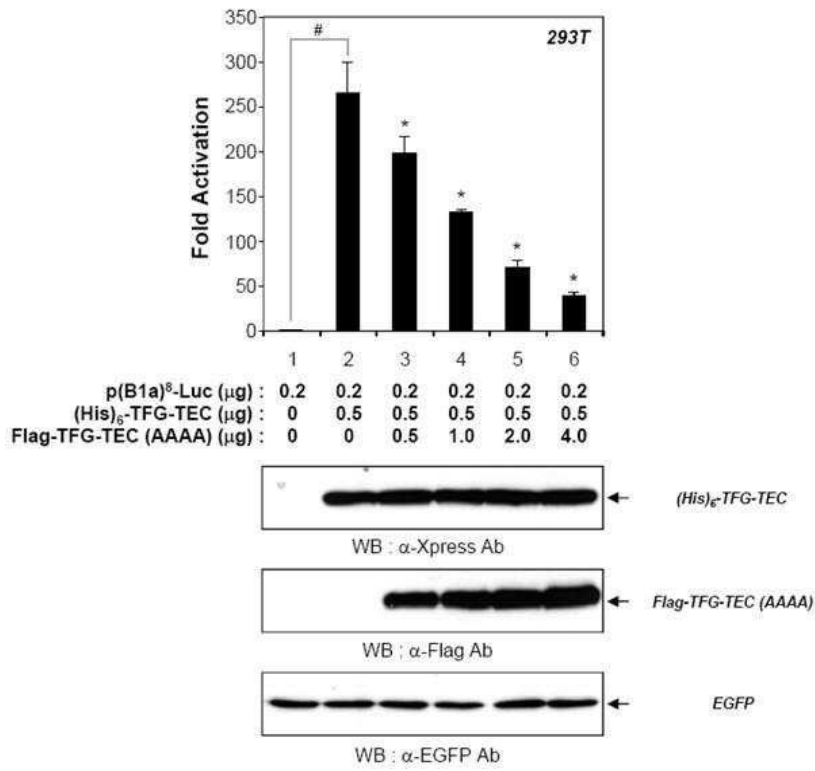
Reporter plasmid



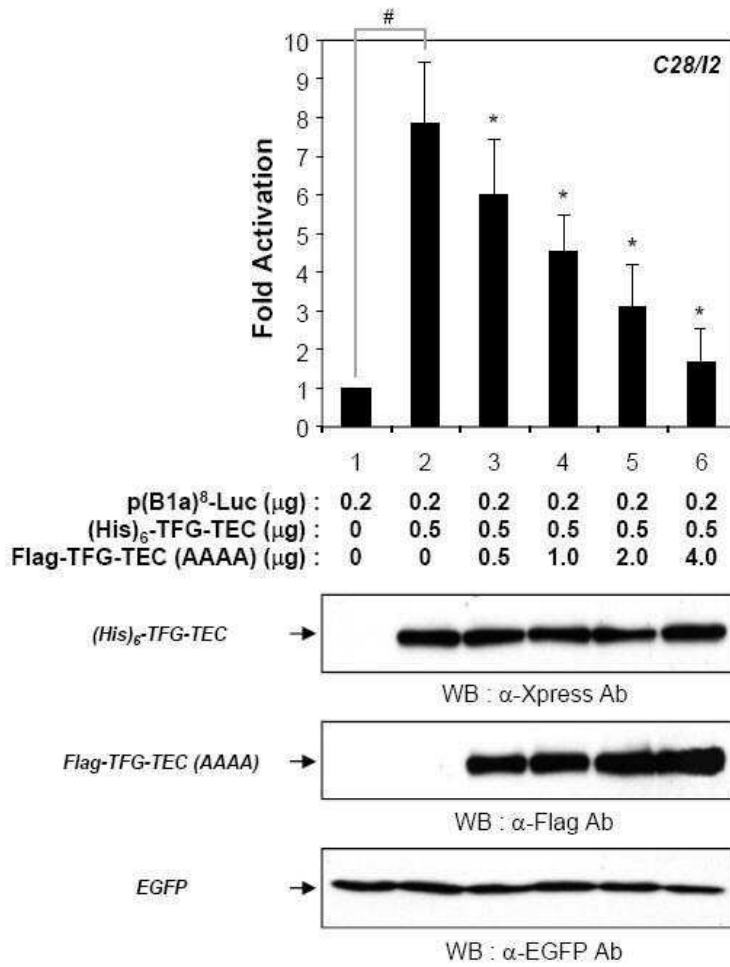
Expression vectors



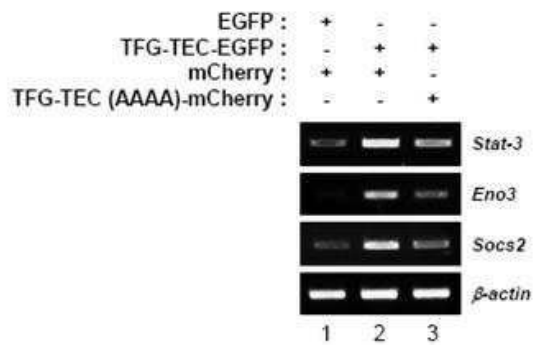
도면6b



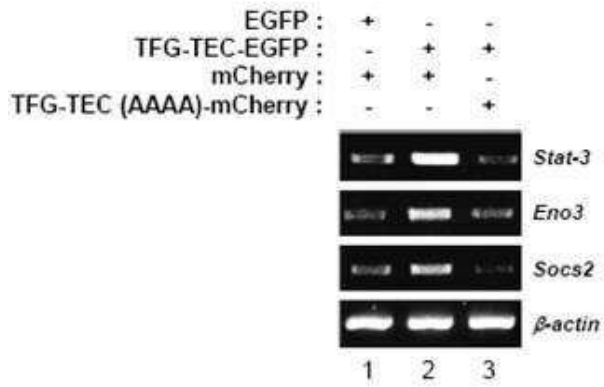
도면6c



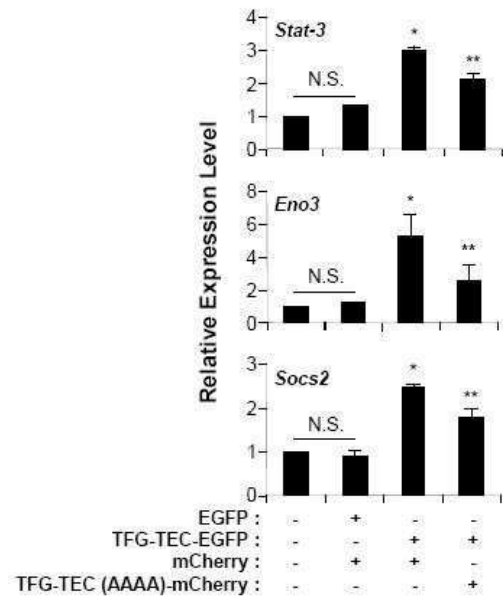
도면7a



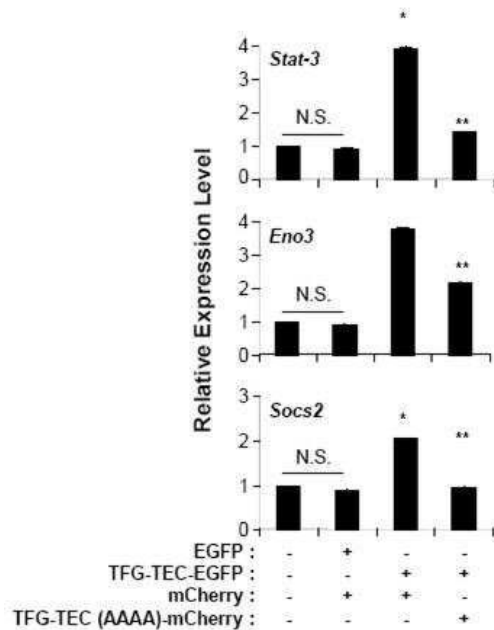
도면7b



도면7c



도면7d



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Compositions for Preventing or Treating a Tumor Disorder
 Comprising TFG-TEC Protein Mutant or Nucleotide Sequence Encoding
 the Same
- <130> PN130681
- <160> 4
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 2700
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> TFG-TEC fusion construct
- <400> 1

atgaacggac agttggatct aagtgggaag ctaatcatca aagctcaact tggggaggat 60

attcggcgaa ttctattca taatgaagat attacttatg atgaattagt gctaatgatg 120

caacgagttt tcagaggaaa acttctgagt aatgatgaag taacaataaa gtataaagat 180

gaagatggag atcttataac aatttttgat agttctgacc tttcctttgc aattcagtgc 240

agtaggatag tgaactgac attatttgtt aatggccagc caagaccct tgaatcaagt 300

cagtgaaat atctccgtcg agaactgata gaacttcgaa ataaagtga tcgtttattg 360

gatatgttgg aaccacctgg agaaccagga ccttccacca atattcctga aaatgatact	420
gtggatggta gggaagaaaa gtctgcttct gattcttctg gaaaacagtc tactcaggtt	480
atggcagcaa gtatgtctgc ttttgatcct ttaaaaaacc aagatgaaat caataaaaat	540
gttatgtcag cgtttggctt aacagatgat caggtttcag ggccaccag tgctcctgca	600
gaagatcggt caggaacacc cgacagcatt gcttctctct cctcagcagc tcaccacca	660
ggcgttcagc cacagcagcc accatatata ggagctcaga ctcaagcagg tcagattgaa	720
ggtcagatgt accaacagta ccagcaacag gccggctatg gtgcacagca gccgcaggct	780
ccacctcagc agcctcaaca gtatggtatt cagtattcag atatgccctg cgtccaagcc	840
caatatagcc cttccctcc aggttccagt tatgcggcgc agacatacag ctcggaatac	900
accacggaga tcatgaaccc cgactacacc aagctgacca tggaccttgg cagcactgag	960
atcacggcta cagccaccac gtccctgccc agcatcagta ccttcgtgga gggctactcg	1020
agcaactacg aactcaagcc ttctgcgtg taccaaatgc agcggccctt gatcaaagtg	1080
gaggaggggc gggcgcccag ctaccatcac catcaccacc accaccacca ccaccaccac	1140
catcaccagc agcagcatca gcagccatcc attcctccag cctccagccc ggaggacgag	1200
gtgtgtccca gcacctccat gtacttcaag cagtccccac cgtccacccc caccacgccg	1260
gccttccccc cgcaggcggg ggcgttatgg gacgaggcac tgccctcggc gcccggtgc	1320
atcgaccccg gcccgctgct ggacccgccg atgaaggcgg tccccagggt ggccggcgcg	1380
cgcttccgc tcttccactt caagccctcg ccgccgcac ccccgcgcc cagccggcc	1440
ggcgggccacc acctcggcta cgacccgacg gccgctgccg cgtcagcct gccgctggga	1500
gccgcagccg ccgcgggcag ccaggccgcc gcgcttgaga gccacccgta cgggctgccg	1560
ctggccaaga gggcgcccc gctggccttc ccgctctcg gcctcacgcc ctccctacc	1620
gcgtccagcc tgctgggcga gattcccagc ctgccgtcgc cgcccagcag gagctcgtcg	1680
tctggcgagg gcacgtgtgc cgtgtgcggg gacaacgccg cctgccagca ctacggcgtg	1740
cgaacctgcg agggctgcaa gggctttttc aagagaacag tgcagaaaaa tgcaaatat	1800
gtttgcctgg caaataaaaa ctgccagta gacaagagac gtcgaaaccg atgtcagtac	1860
tgtcgatttc agaagtgtct cagtgttggg atggtaaaag aagtgtccg tacagatagt	1920
ctgaaaggga ggagaggtcg tctgccttcc aaaccaaaga gccattaca acaggaacct	1980
tctcagccct ctccaccttc tctccaatc tgcatgatga atgcccttgt ccgagcttta	2040
acagactcaa caccagaga tcttgattat tccagatact gtccactga ccaggctgct	2100
gcaggcacag atgtgagca tgtgaacaa ttctacaacc tctgacagc ctccattgat	2160

gtatccagaa gctgggcaga aaagattccg ggatttactg atctcccaa agaagatcag 2220

acattactta ttgaatcagc ctttttgag ctgtttgtcc tcagactttc catcaggtca 2280

aacactgctg aagataagtt tgtgttctgc aatggacttg tectgcatcg acttcagtgc 2340

cttcgtggat ttggggagtg gctcgactct attaaagact tttccttaaa tttgcagagc 2400

ctgaaccttg atatccaagc cttagcctgc ctgtcagcac tgagcatgat cacagaaaga 2460

catgggttaa aagaacaaa gagagtcgaa gagctatgca acaagatcac aagcagttta 2520

aaagaccacc agagtaaggg acaggctctg gagcccaccg agtccaaggt cctgggtgcc 2580

ctggtagaac tgaggaagat ctgcacctg ggcctccagc gcattttcta cctgaagctg 2640

gaagacttgg tgtctccacc ttccatcatt gacaagctct tectggacac cctacctttc 2700

2700

<210> 2

<211> 900

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TFG-TEC fusion protein

<400> 2

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 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> 3

<211> 2700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TFG-TEC mutant construct

<400> 3

atgaacggac agttggatct aagtgggaag ctaatcatca aagctcaact tggggaggat 60
attcggcgaa ttcctattca taatgaagat attacttatg atgaattagt gctaatgatg 120
caacgagttt tcagaggaaa acttctgagt aatgatgaag taacaataaa gtataaagat 180
gaagatggag atcttataac aatttttgat agttctgacc tttcctttgc aattcagtgc 240
agtaggatac tgaaactgac attatttggt aatggccagc caagaccctt tgaatcaagt 300

caggtgaaat atctccgtcg agaactgata gaacttcgaa ataaagtgaa tcgtttattg 360
gatagcttgg aaccacctgg agaaccagga ccttcacca atattcctga aaatgatact 420
gtggatggtg ggggaagaaa gtctgcttct gattcttctg gaaaacagtc tactcaggtt 480
atggcagcaa gtatgtctgc ttttgatcct ttaaaaaacc aagatgaaat caataaaaat 540
gttatgtcag cgtttggctt aacagatgat caggtttcag ggccaccag tgctcctgca 600
gaagatcggt caggaacacc cgacagcatt gcttcctcct cctcagcagc tcaccacca 660
ggcggtcagc cacagcagcc accatataca ggagctcaga ctcaagcagg tcagattgaa 720

ggtcagatgt accaacagta ccagcaacag gccggctatg gtgcacagca gccgcaggct 780
ccacctcagc agcctcaaca gtatggtatt cagtattcag atatgccctg cgtccaagcc 840
caatatagcc cttccctcc aggttccagt tatgcggcgc agacatacag ctcggaatac 900
accacggaga tcatgaacce cgactacacc aagctgacca tggaccttgg cagcactgag 960
atcacggcta cagccaccac gtcctgccc agcatcagta ccttcgtgga gggctactcg 1020
agcaactacg aactcaagcc ttctgcgtg taccaaatgc agcggccctt gatcaaagtg 1080
gaggaggggc gggcgcccag ctaccatcac catcaccacc accaccacca ccaccaccac 1140

catcaccagc agcagcatca gcagccatcc attcctccag cctccagccc ggaggacgag 1200
gtgtgtccca gcacctcat gtacttcaag cagtccccac cgtccacccc caccacgccg 1260

gccttccccc cgcaggcggg ggcgttatgg gacgaggcac tgccctcggc gcccggtgc 1320
atcgaccccg gcccgctgct ggacccgccc atgaaggcgg tccccacggt ggccggcgcg 1380
cgcttcccg tcttccatt caagccctcg ccgcccgcac ccccgcgcc cagcccgcc 1440
ggcgccacc acctcggtta cgacccgacg gccgctgccg cgctcagcct gccgctggga 1500
gccgcagccg ccgcgggcag ccaggccgcc gcgcttgaga gccacccgta cgggctgccg 1560

ctggccaaga gggcgcccc gctggccttc ccgctctcg gcctcacgcc ctccctacc 1620
gcgtccagcc tgctggcgga ggtcccagc ctgccgtcgc cggccagcag gagctcgtcg 1680
tctggcgagg gcacgtgtgc cgtgtgcggg gacaacgcc cctgccagca ctacggcgtg 1740
cgaacctcg agggctgcaa gggctttttc aagagaacag tgcagaaaa tgcaaatat 1800
gtttgcctgg caaataaaaa ctgccagta gacaagcngc ngcngcncg atgtcagtac 1860
tgtcgatttc agaagtgtct cagtgttggg atggtaaaag aagtgtccg tacagatagt 1920
ctgaaaggga ggagaggtcg tctgccttcc aaaccaaaga gccattaca acaggaacct 1980

tctcagccct ctccaccttc tctccaatc tgcatgatga atgcccttgt ccgagcttta 2040
acagactcaa caccagaga tcttgattat tccagatact gtccactga ccaggctgct 2100
gcaggcacag atgtgagca tgtgcaaca tttacaacc tctgacagc ctccattgat 2160
gtatccagaa gctgggcaga aaagattccg ggattttactg atctcccaa agaagatcag 2220
acattactta ttgaatcagc ctttttggag ctgtttgtcc tcagactttc catcaggtca 2280
aacactgtcg aagataagtt tgtgttctgc aatggacttg tctgcatcg acttcagtgc 2340
cttcgtggat ttggggagtg gctcgactct attaaagact tttccttaa tttgcagagc 2400

ctgaaccttg atatccaagc cttagcctgc ctgtcagcac tgagcatgat cacagaaaga 2460
catgggttaa aagaacaaa gagagtcgaa gagctatgca acaagatcac aagcagttta 2520
aaagaccacc agagtaaggg acaggctctg gagccaccg agtccaaggt cctgggtgcc 2580
ctggtagaac tgaggaagat ctgcaccctg ggcctccagc gcattcttcta cctgaagctg 2640
gaagacttgg tgtctccacc ttccatcatt gacaagctct tctggacac cctaccttc 2700
2700

<210> 4
<211> 900
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> TFG-TEC mutant protein
<400> 4

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 Ala Ala Ala Ala 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