



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0135393
(43) 공개일자 2019년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) G01N 33/535 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
C07K 1/14 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0140340
(22) 출원일자 2018년11월14일
심사청구일자 2018년11월14일

(30) 우선권주장
1020180060502 2018년05월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 원진바이오테크놀로지
경기도 수원시 영통구 광교로 147, 13층(이의동, 경기바이오센터)

(72) 발명자
박성진
경기도 성남시 분당구 판교원로82번길 30, 1303동 1901호

(74) 대리인
이종승

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **폴리유비퀴틴 스캐폴드에 결합된 생체분자들의 선형 멀티머 중합체 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 유비퀴틴 C-말단 태그가 결합된 생체분자를 숙주세포로부터 재조합 발현하여 수득하고, 이를 유비퀴틴화에 관여하는 E1 (Activation enzyme), E2 (Conjugation enzyme), E3 (Ligase) 단백질 및 기질과 함께 in vitro 폴리유비퀴틴 화 하여, 2개 이상 유비퀴틴이 공유결합에 의해 형성된 폴리유비퀴틴 스캐폴드에 생체분자가 결합하여 형성된 선형 멀티머 생체분자 중합체를 제공한다. 본 발명에 따른 중합체는 생체분자의 분리 정제, 상기 생체분자와 결합하는 목적 물질의 분리 등에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/104 (2013.01)

C12Y 101/01009 (2013.01)

C12Y 101/01307 (2013.01)

C12Y 102/03003 (2013.01)

C12Y 203/02 (2013.01)

C12Y 401/01003 (2013.01)

G01N 33/535 (2013.01)

C07K 2319/95 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 유비퀴틴 C-말단 태그 (tag)가 융합 또는 링커에 의해 결합된 생체분자 (bio-molecules)를 원핵세포 또는 진핵세포를 포함하는 숙주세포로부터 재조합 발현시키고, 및

(ii) 상기 숙주세포의 용해물 (cell lysates)에 유비퀴틴화를 위한 E1, E2 및 E3 효소, 또는 E1 및 E2 효소를 가하고 반응시키는 것을 포함하여,

in vitro 에서 2개 이상 유비퀴틴의 공유결합에 의해 형성된 폴리유비퀴틴 스캐폴드 (polyubiquitin scaffold)에 생체분자가 결합된 선형 멀티머 생체분자 중합체 (linear or branched multimer biomolecules polymer)를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 E2 효소는 유비퀴틴의 라이신 중 48번 또는 63번에 결합하는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 E2 효소는 E2-25K 유비퀴틴 컨주게이션 (ubiquitin conjugating) 효소인 것인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 E2 효소는 유비퀴틴 컨주게이션 효소 복합체인 Ucb13-MMS2인 것인, 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생체분자가 효소, 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, 항체단편, DNA 및 RNA로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 생체분자는 단백질 A (protein A), 단백질 G (protein G), 리신 (lysin), 엔도리신 (endolysin), 프로테아제 (proteases), 히드롤라아제 (hydrolase), 산화환원효소 (oxidoreductase), 리아제 (lyase), 친화 리간드 (affinity ligand) 및 수용체 (receptor)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인, 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생체분자는 인슐린, 인슐린 유사체, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩타이드류 (GLP-1 등), GLP-1/글루카곤 이중 작용제, 엑센딘-4 (exendin-4), 엑센딘-4 (exendin-4) 유사체, 인슐린 분비 펩타이드 및 그 유사체, 인간 성장 호르몬 (human growth hormone), 성장 호르몬 방출 호르몬 (GHRH), 성장 호르몬 방출 펩타이드, 과립구집락자극인자 (G-CSF), 항비만 펩타이드, 지프로테인 관련 수용체 (G-protein-coupled receptor), 랩틴, GIP (Gastric inhibitory polypeptide), 인터루킨류, 인터루킨 수용체류, 인터루킨 결합 단백질류, 인터페론류, 인터페론 수용체류, 사이토카인 결합 단백질류, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T세포인자, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자 (TNF), 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자 (EPO), 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 크롬빈, 트롬빈 수용체 활성화 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성화인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 혈소판 유래 성장인자 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오테스틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펙틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포자극 호르몬 (FSH), 황체 형성 호르몬 (LH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH),

신경 성장인자, 부갑상선 호르몬 (PTH), 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 부신피질 호르몬, 콜레스티스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬 (TSH), 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 수용체류, 수용체 길항물질, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편류로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것인, 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 재조합 발현된 생체분자는 유비퀴틴 C-말단 태그의 76 글라이신의 C-말단부가 1 ~ 50개 아미노산으로 연장된 것이며,

(ii)의 반응 이전 또는 이후에 상기 재조합 발현된 생체분자에 DUB (Deubiquitinating enzyme)를 가하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 생체분자는 아스파르트산 (aspartate), 6xHis, 키틴바인딩도메인 (Chitin binding domain), GST, 트롬빈 (Thrombin), FLAG 태그에 의해 연장되는 것인, 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 DUB은 YUH1, YUH2, UCH-L1, UCH-L2 또는 UCH-L3인 것인, 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유비퀴틴 C-말단 태그는, 이것의 임의의 위치의 하나의 라이신을 제외한 다른 라이신이 삭제되거나 라이신이 아닌 다른 아미노산으로 치환된 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 유비퀴틴의 N-말단 Met1에서 시작하여 11번째, 48번째 또는 63번째 라이신을 제외한, 유비퀴틴의 모든 라이신이 아르기닌으로 치환된 것인, 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유비퀴틴 C-말단 태그는 2개 이상 의 유비퀴틴이 헤드-투-테일 (head-to-tail) 형태로 반복 연결된 것인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 헤드-투-테일 형태로 연결되는 유비퀴틴은, N 말단에서부터 75번째 및 76번째 글라이신이 발린을 포함한 다른 아미노산으로 치환된 것인, 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 유비퀴틴의 N말단에서부터 73번째 류신이 프롤린으로 치환된 것인, 방법.

청구항 16

폴리유비퀴틴 스캐폴드 및 생체분자로 구성된 선형 멀티머 생체분자 중합체로서, 상기 폴리유비퀴틴 스캐폴드는 2개 이상의 유비퀴틴이 공유결합을 통해 연결되어 형성되고, 상기 생체분자는 상기 유비퀴틴의 N-말단에 각각 결합된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 선형 멀티머 생체분자 중합체는 2 내지 20개의 생체분자로 구성된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 생체분자가 효소, 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, 항체단편, DNA 및 RNA 로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 생체분자는 단백질 A (protein A), 단백질 G (protein G), 리신 (lysin), 엔도리신 (endolysin), 프로테아제 (proteases), 히드롤라아제 (hydrolase), 산화환원효소 (oxidoreductase), 리아제 (lyase), 친화 리간드 (affinity ligand) 및 수용체 (receptor)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 20

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 생체분자는 인슐린, 인슐린 유사체, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩타이드류 (GLP-1 등), GLP-1/글루카곤 이중 작용제, 엑센딘-4 (exendin-4), 엑센딘-4 (exendin-4) 유사체, 인슐린 분비 펩타이드 및 그 유사체, 인간 성장 호르몬 (human growth hormone), 성장 호르몬 방출 호르몬 (GHRH), 성장 호르몬 방출 펩타이드, 과립구집락자극인자 (G-CSF), 항비만 펩타이드, 지프로테인 관련 수용체 (G-protein-coupled receptor), 랩틴, GIP (Gastric inhibitory polypeptide), 인터루킨류, 인터루킨 수용체류, 인터루킨 결합 단백질류, 인터페론류, 인터페론 수용체류, 사이토카인 결합 단백질류, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T세포인자, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자 (TNF), 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자 (EPO), 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 크롬빈, 트롬빈 수용체 활성화 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성화인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 혈소판 유래 성장인자 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오프에이틴, 안지오프에이틴, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펙틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포자극 호르몬 (FSH), 황체 형성 호르몬 (LH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH), 신경 성장인자류, 부갑상선 호르몬 (PTH), 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬 (TSH), 오토탁신, 락토펙틴, 미오스타틴, 수용체류, 수용체 길항물질, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편류로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 21

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 선형 멀티머 생체분자 중합체가 E3, E2, E1, 프리 유비퀴틴 (free ubiquitin), 또는 기질 (substrate)로부터 시작된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 E3는 Rsp5, WWP1, nedd4 또는 XIAP, 또는 이의 최소 활성 도메인 (minimal catalytic domain)이고, 상기 E2는 Ubc7, Ubch5a, E2-25K, Ubc13-MMS2 복합체, 또는 이의 최소 활성 도메인인 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 프리 유비퀴틴은 이의 임의의 위치의 하나의 라이신을 제외한 다른 라이신이 삭제되거나 라이신이 아닌 다른 아미노산으로 치환된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 프리 유비퀴틴은 이의 N말단에서부터 11번째, 48번째 또는 63번째 라이신을 제외한 모든 라이신이 아르기닌으로 치환된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 프리 유비퀴틴은 이의 N말단에서부터 76번째 글라이신의 C-말단부가 1 ~ 50개의 아미노산으로 연장된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 프리 유비퀴틴은 아스파르트산 (aspartate), 6xHis 태그, 또는 GST 태그에 의해 연장되

는 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 27

제23항에 있어서, 상기 프리 유티퀴틴의 N-말단 Met1에 생체분자가 연결된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 28

제23항에 있어서, 상기 생체분자의 일 말단에 이니시에이터로서 E3, E2, E1, 프리 유티퀴틴 (free ubiquitin) 또는 기질이 부착된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 29

제21항에 있어서, 상기 기질은 E3 리가아제를 인식하는 아미노산 서열을 포함하고 유티퀴틴이 결합할 수 있는 라이신을 하나 이상 포함하는 단백질인 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 단백질은 Rsp5 또는 Nedd4-1,2에 대해 PPPY를 가지는 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

청구항 31

제23항에 있어서, 상기 유티퀴틴은, 이것의 임의의 위치의 하나의 라이신을 제외한 다른 라이신이 삭제되거나 라이신이 아닌 다른 아미노산으로 치환된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질을 포함하는 생체분자를 멀티머 형태의 중합체로 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 숙주세포로부터 제조할 발현시킨 생체분자를 유티퀴틴화 시스템을 이용하여 선형 멀티머 생체분자 중합체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 (protein), 펩타이드 (peptide), 폴리펩타이드 (polypeptide), 항체 (antibody), DNA 및 RNA를 포함하는 생체분자 (biomolecules)를 멀티머 형태 (multimeric form)로 제작하는 것은 다양한 장점을 갖는다. 예를 들어, 2이상의 동종 또는 이종의 단백질을 융합 (fusion) 또는 가교제 (cross linker or cross-linking agent)를 사용하여 연결함으로써, 단백질의 용해성, 겔화, 열안정성 및 pH 안정성 등 물리화학적 특성을 개선할 수 있다. 예를 들어, 가교제를 통해 다중연결되어 형성된 라케이즈 (laccase), 클레아 (CLEA, cross-linked enzyme aggregate)는 전분 산화시 더욱 향상된 안정성과 성능을 보였으며, 또 다른 효소인 니트릴 하이드라타아제 (nitrile hydratase)의 클레아는 아크릴로니트릴 (acrylonitrile)의 아크릴아마이드 (acrylamide)로의 전환에 탁월한 활성 증가를 보이며 36번 재활용 되는 동안 활성을 잃지 않았다. 또한, 많은 단백질들은 세포 내에서 복합체 (complex)를 형성하여 복잡한 기능을 수행하며, 이는 단백질의 근접효과 (proximity effect)에 의한 것으로 알려졌다. 예를 들어, 리그노셀룰로오스 (lignocellulose) 분해에 필요한 효소인 셀룰라아제 (cellulase), 베타 글루코시다아제 (β -glucosidase), 헤미셀룰라아제 (Hemicellulase)를 스캐폴드 (scaffold)를 사용하여 복합 혼합물 형태로 제조된 셀룰라아제 (Novozymes Cellic® CTec3)는 리그노셀룰로오스 (lignocellulose) 분해에 있어 3.5배 이상 증가된 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 또한, 이와 같은 멀티머 형태의 단백질은 채널링 효과 (channeling effect)를 나타낸다. 즉, 커플링 반응 (coupled reaction)에 관여하는 효소들이 인접하여 존재하면 중간체의 전달이 효율적으로 이루어져 전체 반응의 효율이 크게 증가한다. 또한, 비드 (bead) 또는 기판 (substrate)에 고정화된 단백질을 이용하여 임의의 물질을 분석하거나, 검출대상 물질을 분리 및/또는 정제함에 있어서도, 동종 또는 이종의 단백질을 멀티머 형태로 사용하는 것은 이것의 효율성 증가를 위해 바람직한 것으로 제안되고 있다. 이와 같이, 멀티머 형태의 단백질이 산업적 및 의약적 용도에서 다양한 장점을 제공함에도 불구하고, 이러한 구조의 단백질을 제작하는 하는 것은 어려운 것으로 알려졌다. 예를 들어, 멀티머 단백질을 유전자 단계에서 인-프레임 (in-frame)으로 디자인하여 새로운 퓨전효소로서 개발,

생산하는 방법이 있다. 하지만 새로운 단백질을 창조하여 생산해야 하기 때문에 개발시간이 오래 걸리고 현실적으로 2개 이상의 효소를 퓨전하는 것은 어렵다. 또한 화학적 가교제 (chemical cross-linker)를 사용한 단백질 멀티머 구조체 (CLEA) 제작 방법의 경우에는 화학적 결합이 특정부위에서 일어나지 않고 단백질 표면 어디에서든 일어날 수 있기 때문에 활성을 저해할 수 있다. 멀티머 구조를 형성하는 단백질을 합성 또는 미생물 발현으로 제조할 수 있어야 하고, 이들 단백질의 활성부위 (active site)가 방해 받지 않아야 한다.

[0003] 목적하는 단백질을 분리 및/또는 정제하기 위한 방법으로서 유비퀴틴을 사용하는 방법이 제안된 바 있다. 먼저 유비퀴틴과 결합된 단백질을 엔코딩 (encoding) 하는 유전자를 원핵세포 (prokaryotic cells)에서 발현시켜 유비퀴틴과 연결된 융합단백질을 제조하고, 이를 유비퀴틴 절단효소로 처리하여 목적하는 단백질만을 유비퀴틴 융합단백질로부터 효과적으로 분리 및 정제 하고자 하는 방법이다. 미국특허출원 제10/504,785호는 재조합 유전자의 발현 및 발현된 단백질의 정제에 관한 것이며, 유비퀴틴 유사 단백질 (Ubl)의 C-말단 도메인을 엔코딩하는 뉴클레오티드가 목적하는 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드에 작동적으로 (operatively) 결합된 융합단백질을 제조하고, 이를 숙주세포에서 발현시키는 것을 기술한다. 한국특허출원 제10-2005-0050824호는 재조합 단백질을 발현함에 있어서 유비퀴틴을 융합파트너로 이용하는 것을 기술한다. 또한, 한국특허출원 제10-2015-0120852호는 단백질 정제에 유비퀴틴 컬럼을 이용하는 것에 관한 것이며, 폴리유비퀴틴 체인을 컬럼에 로딩하고, E2를 포함하는 in vitro 유비퀴틴화를 이용하여 단백질을 정제하는 것을 기술한다. 또한, 미국특허출원 제12/249,334호는 재조합 단백질을 발현시켜 재조합에 있어서의 문제점인 수용성과 폴딩 문제를 해결하기 위한 것이며, 재조합 단백질의 발현 및 분리, 정제를 용이하게 하고 단백질의 활성을 높이기 위해, Ulp1 프로테아제 (Ubl-specific protease 1)에 의해 인식되는 절단 부위를 지닌 SUMO를 이용하는 것을 기술한다. 그러나 이들 방법은 단백질 발현에 유비퀴틴을 이용하는 것을 기술하고 있을 뿐, 멀티머 형태의 단백질을 제조하는 것을 기술하거나 시사하고 있지 않으며, 분리 정제하고자 하는 단백질이 유비퀴틴과 무작위로 결합하므로, 여전히 분리 또는 분석효율에 한계를 갖는다.

[0004] 이에 본 발명자들은 단백질의 활성이 저해되지 않고 높은 집적도를 갖는 멀티머 형태의 단백질을 제조하는 방법을 개발하고자 부단히 노력하였다. 그 결과, 유비퀴틴과 결합된 생체분자를 숙주세포로부터 재조합 발현시키고, 이를 유비퀴틴화 관련 효소와 in vitro에서 반응시켜, 폴리유비퀴틴 스캐폴드에 결합된 선형 멀티머 생체분자 중합체를 형성시킴으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 유럽특허출원 제 11720157.4호
- (특허문헌 0002) 미국특허출원 제 12/249,334호
- (특허문헌 0003) 미국특허출원 제 10/504,785호
- (특허문헌 0004) 한국특허출원 제 10-2005-0050824호
- (특허문헌 0005) 한국특허출원 제 10-2009-7016018호
- (특허문헌 0006) 한국특허출원 제 10-2015-0120852호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이와 같이, 본 발명은 유비퀴틴 C-말단 태그 (UCT, Ubiquitin C-terminal Tag)를 이용하여 단백질 등 생체분자를 in vitro에서 고정화 또는 가교 (cross-link)하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 폴리유비퀴틴 스캐폴드에 목적 생체분자가 결합된 선형 멀티머 생체분자 중합체 (linear multimeric biomolecules polymer) 및 이를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 선형 멀티머 생체분자 중합체가 고정화된 구조체 및 이를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 선형 멀티머 생체분자 중합체를 이용하여 생체분자를 분리 정제하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 선형 멀티머 생체분자 중합체를 이용하여, 상기 생체분자와 결합하는 목적 물질을 분석하거나, 이를 분리 및 정제하는 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (i) 유비퀴틴 C-말단 태그 (UCT)가 용합 또는 링커에 의해 결합된 생체분자 (bio-molecules)를 원핵세포 또는 진핵세포를 포함하는 숙주세포로부터 재조합 발현시키고, 및 (ii) 상기 숙주세포의 용해물 (cell lysates)에 유비퀴틴화를 위한 E1, E2 및 E3 단백질을 가지고 반응시키는 것을 포함하여, *in vitro* 에서 2개 이상 유비퀴틴의 결합에 의해 형성된 폴리 유비퀴틴 스캐폴드 (polyubiquitin scaffold)에 생체분자가 결합된 선형 멀티머 생체분자 중합체 (linear multimer biomolecules polymer) 또는 선형구조체를 제조하는 방법을 제공한다. 이에 따라, 본 발명에서, 선형 멀티머 생체분자 중합체 또는 선형구조체의 형성을 개시하는 이니시에이터 (initiator)는 E3, E2, E1, 프리 유비퀴틴 (free ubiquitin), 또는 E3의 목적 기질 (substrate) 일 수 있다. 여기서, 상기 E2 효소는 유비퀴틴의 라이신 중 48번 또는 63번에 결합할 수 있으며, 상기 E2 효소는 E2-25K 유비퀴틴 컨주게이션 (ubiquitin conjugating) 효소이거나, 유비퀴틴 컨주게이션 효소 복합체 Ucb13-MMS2일 수 있다.

[0012] 이와 관련된 본 발명의 일 실시예에서, 상기 재조합 발현된 생체분자는 유비퀴틴 C-말단 태그의 76번째 아미노산인 글라이신의 C-말단부가 1 ~ 50개 아미노산으로 연장된 것이며, 상기 (ii)의 반응 이전 또는 이후에 상기 재조합 발현된 생체분자에 DUB (Deubiquitinating enzyme), 예를 들어, UH1, YUH2, UCH-L1, UCH-L2 또는 UCH-L3를 가하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0013] 이와 관련된 본 발명의 일 실시예에서, 상기 생체분자는 효소, 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, DNA 및 RNA로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상이며, 상기 (ii)에 ATP를 더 가하고 반응시킬 수 있다. 유리하게는, 상기 각각의 효소, 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, DNA 및 RNA는 동종 또는 이종일 수 있다. 즉, 본 발명의 선형 멀티머 중합체를 구성하는 모노머가 각각 동종 또는 이종의 단백질, 또는 단백질과 펩타이드 또는 항체일 수 있으며, 필요에 따라 다양한 종류의 생체분자의 모노머가 선형 멀티머 중합체로 형성될 수 있다. 여기서, 상기 생체분자는 단백질 A (protein A), 단백질 G (protein G), 리신 (lysin), 엔도리신 (endolysin), 프로테아제 (proteases), 히드롤라아제 (hydrolase), 산화환원효소 (oxidoreductase), 리아제 (lyase), 친화 리간드 (affinity ligand) 및 수용체 (receptor)성된 군으로부터 선택된 하나 이상 일 수 있다. 또한, 상기 생체분자는 인슐린, 인슐린 유사체, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩타이드류 (GLP-1 등), GLP-1/글루카곤 이중 작용제, 엑센딘-4 (exendin-4), 엑센딘-4 (exendin-4) 유사체, 인슐린 분비 펩타이드 및 그 유사체, 인간 성장 호르몬 (human growth hormone), 성장 호르몬 방출 호르몬 (GHRH), 성장 호르몬 방출 펩타이드, 과립구 집락자극인자 (G-CSF), 항비만 펩타이드, 지프로테인 관련 수용체 (G-protein-coupled receptor), 랩틴, GIP (Gastric inhibitory polypeptide), 인터루킨류, 인터루킨 수용체류, 인터루킨 결합 단백질류, 인터페론류, 인터페론 수용체류, 사이토카인 결합 단백질류, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T세포인자, 알리지 억제인자, 세포 피사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 피사인자 (TNF), 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α-락탈부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자 (EPO), 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 크롬빈, 트롬빈 수용체 활성화 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성화인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 혈소판 유래 성장인자 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포자극 호르몬 (FSH), 황체 형성 호르몬 (LH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH), 신경 성장인자류, 부갑상선 호르몬 (PTH), 킬렉신, 썬크레틴, 소마토메딘, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 체장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬 (TSH), 오토탁신, 락토펜, 미오스타틴, 수용체류, 수용체 길항물질, 아스파르트산염산 (aspartate), 6xHis, 키틴바인딩도메인 (Chitin binding domain), GST, 트롬빈 (Thrombin), FLAG tag, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편류로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0014] 이와 관련된 본 발명의 일 실시예에서, *in vitro* 유비퀴틴화에 사용 되는 E1, E2 및 E3는 임의의 조합이 선택되어 사용될 수 있다. 예를 들어, E2가 UBCH5A (UBE2D1)인 경우, RSP5 (UniProt ID. P39940), DTX2 (UniProt

ID. Q86UW9), DTX3 (UniProt ID. Q8N9I9), MID1 (UniProt ID. O15344), RING1 (UniProt ID. Q06587), RNF11 (UniProt ID. Q9Y3C5), RNF111 (UniProt ID. Q6ZNA4), RNF126 (UniProt ID. Q9BV68), RNF115 (UniProt ID. Q9Y4L5), RNF14 (UniProt ID. Q9UBS8), RNF185 (UniProt ID. Q96GF1), RNF2 (UniProt ID. Q99496), RNF5 (UniProt ID. Q99942), TRAF6 (UniProt ID. Q9Y4K3), TRIM8 (UniProt ID. Q9BZR9), ZNRF1 (UniProt ID. Q8ND25), XIAP (UniProt ID. P98170), 및 TRIM39 (UniProt ID. Q9HCM9)로부터 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 또한, E2가 UBC7인 경우, E3는 DOA10 (UniProt ID. P40318), UFD4 (UniProt ID. P33202), HRD1 (UniProt ID. Q08109) 또는 HRD3 (UniProt ID. Q05787) 일 수 있으며, E2가 UBE2W (UBC16)인 경우, 이와 상호작용하는 E3로서 MARCH5 (UniProt ID. Q9NX47) 또는 RNF5 (UniProt ID. Q99942)를 이용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는 것은 아니다.

[0015] 이와 관련된 본 발명의 다른 일 실시예에서, 유리하게는, 상기 유비퀴틴 C-말단 태그는, 이의 48번 라이신 또는 63번 라이신이 알라닌으로 치환되거나, 보다 더 유리하게는 임의의 위치의 하나의 라이신을 제외한 다른 라이신이 모두 삭제되거나 라이신이 아닌 다른 아미노산으로 치환된다. 또한, 유비퀴틴 N-말단 Met1에서 시작하여 11번째, 48번째 또는 63번째 라이신을 제외한 유비퀴틴의 모든 라이신이 아르기닌으로 치환될 수 있다. 또한, 상기 유비퀴틴 C-말단 태그는 2개 이상의 유비퀴틴이 헤드-투-테일 (head-to-tail) 형태로 반복 연결될 수 있다. 이 경우, 상기 헤드-투-테일 형태로 연결되는 유비퀴틴은, 75번째 및 76번째 글라이신이 발린을 포함한 다른 아미노산으로 치환되거나, 73번째 류신이 프롤린으로 치환될 수 있다.

[0016] 이와 관련된 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 상기 (ii)의 반응은 유비퀴틴의 고정화를 위한 기질 또는 기관, 또는 비드 (bead)의 존재 하에 수행되며, 상기 생체분자의 일 말단에 E3 리가아제 (ligase)가 부착될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 폴리유비퀴틴 스캐폴드 및 생체분자로 구성된 선형 멀티머 생체분자 중합체로서, 상기 폴리유비퀴틴 스캐폴드는 2개 이상의 유비퀴틴이, 예를 들어, 공유결합에 의해 연결되어 형성되고, 상기 생체분자는 상기 유비퀴틴에 각각 결합된 것인, 선형 멀티머 생체분자 중합체를 제공한다. 상기 생체분자는 바람직하게는 상기 유비퀴틴의 N-말단에 각각 결합한다. 선형 멀티머 생체분자 중합체의 형성을 개시하는 이니시에이터 (initiator)가 E3, E2, E1, 프리 유비퀴틴 (free ubiquitin), 또는 기질일 수 있다. 또한, 상기 선형 멀티머 생체분자 중합체는 2 내지 20개의 생체분자로 구성될 수 있다.

[0018] 이와 관련된 본 발명의 일 실시예에서, 상기 생체분자가 효소, 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, DNA 및 RNA, miRNA, siRNA, 및 소분자 화합물 (small molecule chemical compound)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 유리하게는 상기 각각의 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, DNA 및 RNA는 서로 다른 종류일 수 있다.

[0019] 이와 관련된 본 발명의 다른 일 실시예에서, 상기 선형 멀티머 생체분자 중합체는 E3, E2, E1, 프리 유비퀴틴 (free ubiquitin), 또는 기질 (substrate)로부터 시작된 것일 수 있으며, 상기 E3는 Rsp5, WWP1, nedd4 또는 XIAP, 또는 이의 최소 활성 도메인 (minimal catalytic domain)이고, 상기 E2는 Ubc7, Ubc5a, E2-25K (GenBank ID-U58522.1), , Ubc13-MMS2 (Unipot ID-P52490) 복합체, 또는 이의 최소 활성 도메인일 수 있다.

[0020] 이와 관련된 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 상기 유비퀴틴은, 이의 N-말단으로부터 48번째 또는 63번째 라이신이 알라닌으로 치환되거나, 보다 더 유리하게는, 이것의 임의의 위치의 하나의 라이신을 제외한 다른 라이신이 삭제되거나 라이신이 아닌 다른 아미노산으로 치환된다. 또한, 상기 프리 유비퀴틴은 이의 임의의 위치의 하나의 라이신을 제외한 다른 라이신이 삭제되거나 라이신이 아닌 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 11번째, 48번째 또는 63번째 라이신을 제외한 모든 라이신이 아르기닌으로 치환된 것일 수 있다. 또한, 상기 프리 유비퀴틴은 N-말단으로부터 76번째 글라이신의 C-말단부가 1 ~ 50개의 아미노산으로 연장된 것일 수 있으며, 상기 아미노산은 아스파르트산 (aspartate), 6xHis 태그, 또는 GST 태그일 수 있고, 상기 단백질은 Rsp5 또는 Nedd4-1,2에 대해 PPPY를 가지는 것일 수 있다. 상기 생체분자는 상기 프리 유비퀴틴의 N-말단 Met1에 연결될 수 있으며, 상기 생체분자의 일 말단에 이니시에이터, 예를 들어, E3, E2, E1, 프리 유비퀴틴 또는 기질이 부착될 수 있다. 또한, 상기 기질은 E3 리가아제를 인식하는 아미노산 서열을 포함하고 유비퀴틴이 결합할 수 있는 라이신을 하나 이상 포함하는 단백질일 수 있다.

[0021] 이와 관련된 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 본 발명은 또한, (i) 유비퀴틴 C-말단 태그가 융합 또는 링커에 의해 결합된 생체분자를 원핵세포, 진핵세포 또는 동물세포를 포함하는 숙주세포로부터 재조합 발현시키고; (ii) 상기 숙주세포의 용해물에 유비퀴틴화를 위한 E1, E2 및 E3 단백질을 가하고 반응시켜, 2개 이상 유비퀴틴의 공유결합에 의해 형성된 폴리유비퀴틴 스캐폴드에 분리 및 정제하고자 하는 생체분자가 결합된 선형 멀티머 생체분자 중합체를 형성하며; 및 (ii) 상기 선형 멀티머 생체분자 중합체를 분리하는 것을 포함하여, 숙주세포

에서 발현된 생체분자를 in vitro에서 분리하는 방법을 제공한다.

- [0022] 이와 관련된 본 발명의 일 실시예에서, 상기 생체분자는 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, DNA 및 RNA로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상이며, 상기 (ii)에 ATP를 더 가하고 반응시킨다. 유리하게는, 상기 각각의 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, DNA 및 RNA는 서로 다른 종류일 수 있다.
- [0023] 이와 관련된 본 발명의 다른 일 실시예에서, 유리하게는, 상기 유비퀴틴 C-말단 태그는, 이의 48번 라이신 또는 63번 라이신이 알라닌으로 치환되거나, 보다 더 유리하게는 임의의 위치의 하나의 라이신을 제외한 다른 라이신이 모두 삭제되거나 라이신이 아닌 다른 아미노산으로 치환된다.
- [0024] 이와 관련된 본 발명의 다른 일 실시예에서, 상기 (ii)의 반응은 유비퀴틴의 고정화를 위한 기질 (substrate), 기관 또는 비드 (bead)의 존재 하에 수행되며, 상기 생체분자의 일 말단에 E3 리가아제가 부착될 수 있다.
- [0025] 본 발명은 선형 멀티머 생체분자 중합체를 포함하는 분리 컬럼 (separation column)을 제공한다. 이와 관련된 일 실시예에서, 상기 생체분자는 단백질 또는 항체일 수 있다. 본 발명에서 링커는 3 ~ 50개의 아미노산으로 구성된 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따르면, 선형 멀티머 생체분자 중합체들 간의 연결은 UCT 에 의해 이루어지므로, UCT의 연결에 의해 형성되는 폴리유비퀴틴은 UCT에 결합된 생체분자들 사이의 간격과 방향성을 유지해 주는 견고한 스캐폴드 (rigid scaffold)로써 작용할 수 있다. 또한, UCT간의 결합에 효소반응 (enzymatic reaction) (E1-E2-E3)을 사용하므로, 숙주세포에서 발현된 생체분자-UCT를 별도의 분리와 정제 과정 단계 없이, 세포 용해물 (cell lysate mixture) 형태로 용이하게 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 생체분자는 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, 항체 단편, DNA 및 RNA로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 예를 들어, 이중 단백질을 사용하여 선형 멀티머 중합체에 모듈화 된 기능성을 부여할 수 있다. 효소근접효과 (enzyme proximity effects)에 의해 선형 중합체로 만들어진 효소들은 촉매기능성과 안정성에서 보다 더 향상된 효과를 보인다. 연결반응 (coupled reaction)을 구성하는 이중의 효소들을 선형 멀티머 구조로 만들면 채널링 효과 (channeling effect)에 의해 벌크에서 섞은 상태보다 전체 반응 효율이 높아지는 시너지 효과를 나타낸다. 또한 목적 생체분자-UCT를 효소반응을 사용해서 고정상에 붙일 수 있기 때문에 생체분자-UCT는 순수하게 정제 분리될 필요가 없다. 따라서 세포 용해물이나 배양 배지 (culture media)와 같이 생체분자-UCT를 포함하는 조혼합물 (crude-mixture)에서 선형멀티머 구조체가 합성되어 고정화 된다. 따라서 고정화 효소를 경제적으로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 본 발명의 선형 멀티머 융합 단백질 (Ubstac)을 제조하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 2 및 도 3은 본 발명의 Ubstac 반응에 의해 형성된 멀티머 형태의 UCT융합단백질을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 선형 멀티머 융합 단백질의 제조 및 이를 고정화 하여 이용하는 것을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 5는 E1-E2만을 이용한 Ubstac 제조 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 선형 멀티머 융합 단백질의 제조 및 이를 고정화 하여 이용하는 것을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 7은 헤드-투-테일 (Head-to-tail) UCT 및 UbStac 방법을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명에 따라 제조한 자일로스 환원효소 (Xylose Reductase) (XR)를 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- 도 9는 본 발명에 따라 제조한 옥살로아세테이트 디카르복실라아제 (Oxaloacetate decarboxylase) (OAC)을 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- 도 10은 본 발명에 따라 제조한 자일리톨 탈수소효소 (Xylitol dehydrogenase) (XDH)를 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- 도 11은 본 발명에 따라 제조한 Triose-phosphate isomerase (TIM)을 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결

과이다.

도 12는 본 발명에 따라 제조한 Aldolase (ALD)을 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.

도 13은 본 발명에 따라 제조한 Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP) 을 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.

도 14는 본 발명에 따라 제조한 피루베이트 옥시다아제 (Pyruvate oxidase) (POPG)를 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.

도 15는 자일로스 환원효소 활성을 분석한 결과이다.

도 16은 자일로스 환원효소 안정성을 분석한 결과이다.

도 17은 옥살로아세테이트 디카르복실라아제의 활성을 분석한 결과이다.

도 18은 옥살로아세테이트 디카르복실라아제의 안정성을 분석한 결과이다.

도 19는 자일리톨 탈수소효소의 활성을 분석한 결과이다.

도 20은 자일리톨 탈수소효소의 안정성을 분석한 결과이다.

도 21은 피루베이트 옥시다아제의 활성을 분석한 결과이다.

도 22는 3개의 효소, TIM, ALD 및 FBP가 결합된 구조의 Ubstac 결과물을 나타낸다.

도 23은 TIM, ALD 및 FBP 효소에 의한 시너지 효과를 나타낸 것이다.

도 24는 단백질 G (Protein A) 및 단백질 G (Protein G) 선형 멀티머 중합체를 제조하고 그 결과를 확인한 것이다.

도 25는 유비퀴틴 C-말단 태그의 76글라이신의 c-말단부에 아스파르트산 (aspartate)이 연결된 hGH를 제조하고 확인한 결과이다.

도 26은 E3로부터 시작된 중합체를 제조하고 이를 확인한 것이다.

도 27은 헤드-투-테일 형태로 반복 연결된 UCT의 C-말단에 아스파르트산으로 연장된 형태로 발현된 hGH의 중합체를 제조하고 이를 확인한 것이다.

도 28은 단백질 A 단위체가 고정화된 비드에 비해 단백질 A 중합체가 고정화된 비드에 대한 인간 유래 IgG의 결합 활성이 증가된 것을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

제조예

[0029]

제조예 1: C-말단 융합 단백질의 클로닝, 발현 및 정제

[0030]

본 발명의 실시예에서 사용된 UCT (Ubiquitin C-terminal Tag) (서열번호: 1) 단백질 융합체를 엔코딩하는 유전자는 Genscript Inc.사에 의뢰하여 제조하였다.

[0031]

C-말단에 유비퀴틴 태그를 포함하지 않는 Ub out 유전자 구조물을 제조하기 위해 패스트 클로닝 시스템 (fast cloning system) (Li C, Wen A, Shen B, Lu J, Huang Y, Chang Y (2011). Fast cloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. BMC Biotechnol 11, 92.)을 사용하였다. 이 방법은 제한효소 및 리가아제가 없는 조건에서 PCR 산물에 직접 Dpn1만 처리하면 Dpn1이 폴리머라제와 함께 아직 밝혀지지 않은 기전을 통해 제한효소 및 리가아제의 역할을 수행하여 유전자 연결 (삽입, 제거 또는 치환)이 가능한 기술이다. 이 방법에서, 퓨전 폴리머라제 (Phusion polymerase, Thermo Fisher Scientific)와 양말단이 오버랩핑 되도록 디자인된 프라이머를 사용하여, 삭제될 영역을 제외하고 모든 벡터 상에서 PCR (95° C 3분, 95° C 15초-55° C 1분-72° C 1분/kb 18회 반복, 72° C 5분, 12° C 20분)을 수행하였다. 다음, PCR 결과물에 대한 Dpn1 처리를 1시간 동안 37° C에서 수행하고, *E. coli* DH5α (Novagen)에 형질전환 한 후 목적하는 플라스미드를 수득하였다. 모든 유전자 구성물을 상업적인 DNA 시퀀싱으로 확인하였다.

[0032]

UCT 융합 단백질 과발현을 위해, 각 유전자 구성물을 *E. coli* BL21 DE3 (Novagen) (XR, TIM, ALD), *Rosetta* pLysS DE3 (Novagen) (XDH, OAC, POPG), *Origami2* DE3 (Novagen) (FBP) 균주에 형질전환 하였다. 단백질 발현

플라스미드 (pET21a, Genscript)를 포함하는 세포를 37° C, LB 배지 (Miller)에서 인큐베이션하였다. OD₆₀₀ 값이 약 0.6에 이르면, 단백질 발현을 250 μM의 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) (IPTG)를 사용하고 16° C에서 20시간 동안 유도하였다. 다음, 원심분리 (3,500 rpm으로 4° C에서 15분)한 후, 세포 펠릿을 용해 완충액 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl₂, 20 mM imidazole) 중에 재현탁하고 소니케이션 (50% amplitude, pluse on 3초-off 5초, 최종 15분)으로 용해시켰다. 이어서, 상기 용해물을 14,000 rpm으로 4° C에서 30분간 추가로 원심분리하였다. N-말단 His-tag를 포함하는 단백질의 수용성 분획을 니켈 친화 및 FPLC 완충액 (Ni-NTA Agarose, QIAGEN, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl₂)으로 사전 평형화한 Superdex 75 pg 겔 필터레이션 컬럼 16/600 (GE Healthcare)을 사용하는 겔여과 크로마토그래피로 정제하였다. 모든 UCT 단백질을 효소활성 분석을 위해 100 μM로 농축하였다. 모든 타겟 단백질을 SDS-PAGE로 평가하였다. 도 8 내지 도 14는 타겟 (목적) 단백질을 확인한 결과를 나타낸다. 본 발명에서 사용된 UCT 융합 단백질은 아래 표 1과 같다.

표 1

[0033]

UCT 단백질 융합체	분자량 (kDa)	서열번호
Xylose Reductase (XR)	57.382	서열번호: 2
Xylitol dehydrogenase (XDH)	59.1	서열번호: 3
Oxaloacetate decarboxylase (OAC)	44.6	서열번호: 4
Triose-phosphate isomerase (TIM)	47.6	서열번호: 5
Aldolase (ALD)	55.563	서열번호: 6
Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP)	49.3	서열번호: 7
Pyruvate oxidase (POPG)	86.032	서열번호: 8

[0035]

제조예 2: Ubstac 선형 구조체 제조

[0036]

본 발명에서 선형 멀티머 형태의 융합단백질을 Ubstac 선형구조체, 이를 제조하기 위한 반응을 Ubstac 반응으로 각각 명명하였다. Ubstac 반응 (전체 부피 50 μL)을 Ubstac 완충액 (25 mM HEPES (Sigma-aldrich), pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, Ubstac 반응을 위한 Ubstac 혼합물 (0.5 μM E1, 5 μM E2, 1 μM E3, 4 mM ATP)을 본 발명의 UCT 단백질 융합체에 첨가하여 반응을 시작하였다. 반응에 참여한 단백질의 비율은 1 μM E3 enzyme 당 10 μM ~ 20 μM UCT 단백질 융합체 (1:10 ~ 1:20 비율) 농도로 수행하였으며, Ubstac 반응을 통해 1시간 내에 최소 10개 이상의 융합체 모노머가 선형멀티머를 형성하기 위함을 목적으로 설정된 조건이다. 본 발명에서 사용한 E1, E2 및 E3는 각각 다음과 같다:

표 2

[0037]

구분	명칭	서열번호
E1	Yeast UBE1	서열번호: 9
E2	Ubch5a [<i>Homo sapiens</i>] (UniProtKB - P51668)	서열번호: 10
	Ubch7 [<i>Homo sapiens</i>] (UniProtKB - P68036)	서열번호: 11
	E2-25K [<i>Homo sapiens</i>] (UniProtKB - P61086)	서열번호: 12
	Ubc13 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] (UniProtKB - P52490)	서열번호: 13
	MMS2 (UEV - Ubiquitin-conjugating enzyme variant)	서열번호: 14
E3	RSP5 (UniProt ID. P39940)	서열번호: 15
	DOA10 (UniProt ID. P40318)	서열번호: 16
	MARCH5 (UniProt ID. Q9NX47)	서열번호: 17

[0038]

Ubstac 반응을 실온에서 1시간동안 세이킹 하여 수행하였다. 도 1은 본 발명의 Ubstac 반응을 개략적으로 나타낸 것이고, 도 2 및 도 3은 Ubstac 반응에 의해 형성된 멀티머 형태의 UCT 융합단백질을 확인한 결과를 나타낸다.

[0039]

도 4에서 제1 도면은 도 1과 같이 유비퀴틴 C 말단 태깅된 효소 (enzyme)와 Ubstac 혼합물을 반응시킨 후, 여과 (filtration) 하여 Ubstac 선형 효소 폴리머를 제조하는 과정을 개략적으로 도시한 것이다. 제2 도면은, 유비퀴틴 C 말단 태깅된 포함하는 효소와 Ubstac 혼합물을 반응시킨 후, 가교제 (crosslinker)와 함께 침전

(precipitation)시켜 Ubstac 효소응집체 (aggregate)를 제조하는 과정을 도시한 것이다. 제3 도면은 유비퀴틴 C 말단 태깅된 단백질을 기관 또는 비드 상에 고정화 하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

[0040] **제조예 3: E1-E2만을 이용한 Ubstac 제조 (E2 platform)**

[0041] E2-25K (GenBank ID-U58522.1) (human E2), Ucb13 (yeast E2)-MMS2 (GenBank ID-U66724.1) (yeast ubiquitin-conjugating enzyme variant) (GenBank ID-U66724.1)를 이용하여 E2-Ubstac를 제조하였다. 제조할 DNA plasmid를 Genscript에 합성 의뢰하였다. E2-Ubstac 반응 (전체 부피 50 μ l)을 E2-Ubstac 완충액 (50mM Tris pH8.0, 5mM MgCl₂) 조건 하에서, E2-Ubstac 혼합물 (1 μ M E1, 10 μ M E2, 4mM ATP)을 자유 유비퀴틴 (free ubiquitin) 용액 (20 μ M)에 첨가하여 반응을 시작하였다. E2-Ubstac 반응을 실온에서 1시간동안 셰이킹하여 수행하였다. 도 5에 그 결과를 나타냈다.

[0043] **실시예**

[0044] **실시예 1: 자일로스 환원효소 (XR, Xylose reductase) 활성 및 안정성 분석**

[0045] **1-(1) 자일로스 환원효소 활성 분석**

[0046] Ubstac 반응 (전체 부피 50 μ L)을 Ubstac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행 하였으며, Ubstac 혼합물 (0.5 μ M E1, 5 μ M E2, 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 XR 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. Ubstac 반응을 실온에서 1시간동안 셰이킹 하여 수행한 다음, 촉매 활성을 분석하였다. XR의 촉매 활성을 NADH 산화에 의해 유도되는 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 분석하였다. 촉매 활성 분석을 위한 반응은, 1 mM MgCl₂ 및 0.02% Tween-20을 함유하는 100 mM NaCl 완충액 (pH 7.0) 내의 XR (10 μ M) 및 xylose (200 mM) 혼합물에 NADH (2 mM)를 첨가하여 개시하였다. XR ub out은 XR c-말단에 유비퀴틴 태그 (tag)를 포함하지 않는 모노머 형태의 샘플이며, 동일한 Ubstac 혼합 조건에서 폴리머를 형성하지 않았다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software, Inc)를 사용하여 수행하였다. 그 결과를 도 15에 나타냈다. 도 15에 나타낸 것과 같이 본 발명에 따른 XR이 보조기질 (co-substrate)로써 NADH를 사용하여 D-xylose를 자일리톨 (xylitol)로 환원시키는 것을 촉진하였다. 흡광도 (absorbance)는 용액 중 NADH의 양을 나타낸다. XR의 Ubstac 폴리머 (빨간색)는 모노머 형태 (검은색)와 비교하여 보다 더 빠른 NADH 소모를 나타냈다. 두 개의 반응 모두 동일한 양의 모노머를 함유하였다. 따라서, 증가된 반응속도는 오로지 모노머 사이의 공유결합에 의존 하는 것이다. 본 실시예에서, XR Ubstac 폴리머의 활성이 유비퀴틴-태그가 없는 XR 모노머 (XR Ub out)와 비교 하여 10배 증가한 것이 확인되었다.

[0047] **1-(2) 자일로스 환원효소 pH 안정성 분석**

[0048] NADH 및 Xylose를 첨가하여 반응을 시작하기 전에 XR 모노머 및 Ubstac 폴리머 둘 모두를 30분간 지시된 pH에서 처리하였다. 도 16에 나타낸 것과 같이, pH 5.5 및 6.5에서, XR Ubstac 폴리머가 유비퀴틴-태그가 없는 모노머 XR (XR Ub out)과 비교하여 현저히 향상된 안정성을 보였다. 결과는 3회 실험의 평균값을 나타낸다.

[0049] **실시예 2: 옥살로아세테이트 디카르복실라아제 (Oxaloacetate decarboxylase) (OAC)의 활성 및 안정성 분석**

[0050] **2-(1) OAC의 활성 분석**

[0051] 포도당신생과정 (gluconeogenesis)에 관여하는 OAC는 AST-ALT와 함께 간 손상을 조사하는데 사용된다. Ubstac 반응 (전체 부피 50 μ l)을 Ubstac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂)에서 수행하였으며, Ubstac 혼합물 (0.5 μ M E1, 5 μ M E2, 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 OAC 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. Ubstac 반응을 실온에서 1시간동안 셰이킹 하여 수행한 다음, 촉매 활성을 분석하였다. OAC 활성 분석은 다음 조건 하에서 NADH 소모가 진행됨에 따른 흡광도(340 nm) 감소에 기초하였다: 45 mM TEA buffer pH8.0, 0.45 mM MnCl₂, 2 mM NADH, 11 U of LDH, 5 μ M OAC, 2.5 mM. OAC Ubout은 OACc-말단에 유비퀴틴-태그 를 포함하지 않는 모노머 형태의 샘플이며, 동일한 Ubstac 혼합 조건에서 폴리머를 형성하지 않았다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software, Inc)를 사용하여 수행하였다. 그 결과를 도 17에 나타냈다.

[0052] 도 17에 나타낸 것과 같이, C-말단에 Ub가 없는 모노머 (OAC Ub out)의 활성과 폴리머 (OAC Ubstac)의 활성을 비교한 결과, 폴리머의 활성이 9배 증가하였다. 흡광도 (absorbance)는 용액 중 NADH의 양을 나타낸다. OAC의 Ubstac 폴리머 (빨간색)은 모노머 형태 (검은색)와 비교하여 보다 더 빠른 NADH 소모를 나타냈다. 두개 반응 모두 동일한 양의 모노머를 함유하였다. 따라서 증가 된 반응속도는 오로지 모노머 사이의 공유결합에 의존하

는 것이다. 본 실시예, OAC Ubstac 폴리머의 활성이 유비퀴틴-태그가 없는 OAC 모노머 (OAC Ub out)와 비교하여 9배 증가한 것이 확인되었다.

[0053] 2-(2) OAC의 안정성 분석

[0054] NADH 및 oxaloacetate를 첨가하여 반응을 시작하기 전에 OAC 모노머 및 Ubstac 폴리머 둘 모두를 30분간 지시된 pH에서 처리하였다. 도 18에 나타난 것과 같이, pH 4.5 ~ 6.5의 낮은 pH에서, OAC Ubstac 폴리머가 유비퀴틴-태그가 없는 모노머 OAC (OAC Ub out)와 비교하여 현저히 향상된 pH 안정성을 보였다. 결과는 3회 실험의 평균값을 나타낸다.

[0055] 실시예 3: 자일리톨 탈수소효소 (XDH, Xylitol Dehydrogenase) 활성 및 안정성 분석

[0056] 3-(1) XDH 활성 분석

[0057] XDH는 D-Xylose catabolism 경로에 속하는 효소이며, XR의 결과물 인 자일리톨을 NAD^+ 를 사용하여 자일루로스 (xylulose)로 전환시키는 것으로 알려졌다. XDH 활성 분석을 위해, 먼저 Ubstac 반응 (전체 부피 50 μ l)을 Ubstac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂)에서 수행하였으며, Ubstac 혼합물 (0.5 μ M E1, 5 μ M E2, 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 XDH 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. Ubstac 반응을 실온에서 1 시간동안 세이킹 하여 수행한 다음, 촉매 활성을 분석하였다. XDH 활성을 340 nm에서 NAD^+ 환원을 모니터링 하여 측정하였다. 반응은, 1 mM MgCl₂ 및 0.02% Tween-20을 함유하는 100 mM NaCl 완충액 (pH 7.0) 중 의 XDH (20 μ M) 및 xylose (200 mM) 혼합물에 NADH (2 mM)를 첨가함에 의해 개시 하였다. XDH ub out은 XDH C-말단에 유비퀴틴-태그를 포함하지 않는 모노머 형태의 샘플이며, 동일한 Ubstac 혼합 조건에서 폴리머를 형성하지 않았다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software, Inc)를 사용하였다. 그 결과를 도 19에 나타냈다. 도 19에 나타난 것과 같이, pH 5.5에서 XDH Ubstac 폴리머 (빨간색)는 이것의 모노머 형태 (검은색)와 비교하여, 보다 더 높은 NADH+ 소모율을 보였다. 두개의 반응 모두 동일한 양의 모노머를 함유하였다. 따라서, 활성의 차이는 오로지 모노머 사이의 공유결합에 의존하는 것이다. 본 실시예에서, XDH UbStac 폴리머의 활성이 유비퀴틴-태그가 없는 OAC 모노머 (OAC Ub out)와 비교하여 10배 증가한 것이 확인되었다.

[0058] 3-(2) XDH 안정성 분석

[0059] NAD^+ 및 자일리톨을 가하여 반응을 시작하기 전에 XDH 모노머 및 Ubstac 폴리머 둘 모두를 30분간 지시된 pH에서 처리하였다. 도 20에 나타난 것과 같이, 측정된 모든 pH에서, XR Ubstac 폴리머가 OAC Ub out과 비교하여 현저히 증가된 pH 안정성을 보였다. 결과는 3회 실험의 평균값을 나타낸다.

[0060] 실시예 4: 피루베이트 옥시다아제 (Pyruvate Oxidase, POPG) 활성 분석

[0061] POPG는 포도당신생과정에 관여하는 효소인 AST-ALT와 같은 효소를 검출하여 간 손상을 조사하는데 이용되는 것으로 알려졌다. POPG 활성 분석을 위해, 먼저 Ubstac 반응 (전체 부피 50 μ L)을 Ubstac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂)에서 수행하였으며, Ubstac 혼합물 (0.5 μ M E1, 5 μ M E2, 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 POPG 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. Ubstac 반응을 실온에서 1시간동안 세이킹 하여 수행한 다음, 촉매 활성을 분석하였다. 촉매 활성을 분석하기 위해, ABTS에 의한 피루베이트의 POPG 산화 과정에 의해 생성 되는 H₂O₂ 양을 측정하였다. 반응은 소듐 포스페이트 (sodium phosphate) 완충액 중의 피루베이트 (pyruvate) (100 mM), 파이로포스페이트 (pyrophosphate) (6 mM), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (10 mM) 및 HRP (horseradish peroxidase) (0.2 U/mL) 혼합물에 POPG (5 μ M)를 첨가하여 개시하였다. POPG 모노머 (POPG ub out)은 POPG c-말단에 유비퀴틴 태그를 갖지 않는 모노머 형태의 샘플이며, 동일한 유비스택 (Ubstac) 혼합 조건에서 폴리머를 형성하지 않는다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software, Inc)를 사용하여 수행하였다. 도 21에 나타난 것과 같이, pH 5.5에서 POPG (빨간색)는 이것의 모노머 형태(검은색)와 비교하여 보다 더 높은 활성을 나타냈다. 두개의 반응 모두 동일한 양의 모노머를 함유하였다. 따라서, 상기 활성의 차이는 오로지 모노머 사이의 공유결합에 의존하는 것이다. 이러한 특정 예에서, POPG UbStac 폴리머의 활성이 유비퀴틴-태그가 없는 POPG 모노머 (POPG Ub out)와 비교하여 2배 증가하였다.

[0062] 실시예 5: 유비퀴틴 효소 시너지 효과 분석

[0063] 트리오세포스페이트 이소머라제 (triosephosphate isomerase) (TIM), 프룩토오스 비스포스페이트 알돌라아제 (fructose bisphosphate aldolase) (ALD) 및 프룩토오스 비스포스페이트 (fructose bisphosphatase) (FBP)은

DHAP (dihydroxyacetone phosphate)로부터 최종 산물로서 F6P를 생성하기 위한 캐스캐이드 반응을 형성하는 것으로 알려졌다. Ubstac 효소 시너지 효과 분석을 Fructose-6-Phosphate (F6P), TIM 생성물, ALD 및 FBP 효소 복합체를 측정하여 수행하였다. F6P는 포스포글루코오스 이소머라아제 (phosphoglucose isomerase) (PGI)에 의해 글루코오스-6-포스페이트 (Glucose-6-phosphate) (G6P)로 이성체화 되고, 기질로서 동량의 NAD⁺를 글루코오스-6-포스페이트 디하이드로게나아제 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) (G6PDH)에 의해 변형된다. 본 발명자들은 효소활성을, HEPES 완충액 조건 (200 mM HEPES pH7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) 중의 4 uM TIM, ALD 및 FBP 효소 복합체 혼합물에 2.5 mM의 효소 복합체 (Dihydroxyacetone phosphate, DHAP), 20 U/ml 분석 효소 (PGI 및 G6PDH) 및 2.5 mM NAD⁺ 효소 복합체를 첨가함에 의해 새롭게 생성된 NADH의 양을 340 nm에서 측정하여 결정하였다. Ub out 효소 복합체 혼합물은 효소 C-말단에 유비퀴틴 태그를 갖지 않고 동일한 Ubstac 혼합물 조건에서 폴리머를 형성하지 않는 모노머 형태의 샘플이다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software, Inc)를 사용하여 수행하였다.

[0064] 지시된 시점에서, 반응을 종료하고 F6P의 양을 F6P가 Glucose-6-phosphate (G6P)로 전환되는데 NAD⁺를 사용하는 phosphoglucose isomerase (PGI)를 이용하여 측정하였다. 흡광도는 F6P의 양을 나타낸다. 3개의 다른 효소의 Ubstac 폴리머 (빨간색)가 모노머 효소 혼합물 (검은색) 보다 5배 높은 활성을 보였다. 결과는 3회 실험의 평균값을 나타낸다. 도 23은 3개의 효소, TIM, ALD 및 FBP가 결합된 구조의 Ubstac 결과물을 나타낸 것이고, 도 12은 이들 효소에 의한 시너지 효과를 나타낸 것이다.

[0065] **실시예 9: 유비퀴틴 다단계 표지 (prosthetics) 방법**

[0066] 먼저 본 발명의 제조예에 따라 유비퀴틴 C말단 태깅된 생체분자를 합성하였다. 다음, 히드록실아민 (hydroxylamine)를 포함하는 폴리머 (폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol))를 상기 생체분자와 반응시켰다. 그 결과 폴리머가 옥심 링킹 (oxime linkage)에 의해 유비퀴틴에 의해 표지된 것을 확인하였다 (결과는 도시하지 않음).

[0067] **실시예 10: Protein A 및 Protein G 선형 멀티머 중합체 제조**

[0068] Ubstac 반응 (전체 부피 50 μl)을 Ubstac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, Ubstac 혼합물 (0.5 μM E1, 5 μM E2, 1 μM E3, 4 mM ATP)을 단백질 A (Protein A) 또는 단백질 G (Protein G) 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. 단백질 A (GenBank ID-AAB05743.1), 단백질 G (CAA27638.1)에 해당되는 서열을 포함한 재조합 DNA 플라스미드를 Genscript에 합성 의뢰하여 제조하였다. Ubstac 반응을 실온에서 1 시간 동안 세이킹 하여 수행한 다음, SDS-PAGE를 수행하였다. Ubstac 혼합물을 넣지 않은 샘플과 비교하여, Ubstac 혼합물을 넣어준 샘플에서 Protein A 또는 Protein G monomer band는 줄어들었으며, 고분자 질량의 밴드 (선형 멀티머 중합체)가 새롭게 나타난 것을 확인 하였다 (도 24 참조). 일부 선형 멀티머 중합체는 분자량이 수백 kDa까지 증가해 stacking gel을 통과하지 못한 것 또한 확인 하였다.

[0069] **실시예 11: 유비퀴틴 C-말단 태그의 76글라이신의 c-term에 아스파르트산이 연장된 hGH**

[0070] UCT 용합 의약품용 단백질 과발현을 위해, 각 유전자 구성물을 *E. coli* BL21 DE3 (Novagen) 균주에 형질전환 하였다. 단백질 발현 플라스미드 (pET21a, Genscript)를 포함하는 세포를 37°C, LB 배지 (Miller)에서 인큐베이션하였다. OD₆₀₀ 값이 약 0.6에 이르면, 단백질 발현을 250 μM의 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) (IPTG)를 사용하고 16°C에서 20 시간 동안 유도하였다. 다음, 원심분리 (3500 rpm으로 4°C에서 15분)한 후, 세포 펠릿을 용해 완충액 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl₂, 20 mM imidazole) 중에 재현탁하고 소니케이션 (50% amplitude, pluse on 3 초-off 5 초, 최종 15 분)으로 용해시켰다. 이어서, 상기 용해물을 14,000 rpm으로 4°C에서 30분간 추가로 원심분리하였다. N-말단 His-tag를 포함하는 단백질의 수용성 분획을 니켈 친화 및 FPLC 완충액 (Ni-NTA Agarose - QIAGEN, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl₂)으로 사전 평형화한 Superdex 75 pg 겔 필터레이션 컬럼 16/600 (GE Healthcare)을 사용하는 겔 여과 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 hGH는 100 μM로 농축하였다. 모든 타겟 단백질을 SDS-PAGE로 평가하였다 (도 25 참조).

[0071] **실시예 12: E3 (Rsp5)로 부터 시작된 폴리유비퀴틴 스캐폴드 제조**

[0072] Ubstac 반응 (전체 부피 50 μl)을 Ubstac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, Ubstac 혼합물 (0.5 μM E1, 5 μM E2 (Ubch5a 또는 Ubch7), 1 uM E3, 4 mM ATP)을 단백질 용액에

첨가하여 반응을 시작하였다. Ubstac 반응을 실온에서 1시간 동안 셰이킹한 다음, SDS-PAGE를 수행하였다. Ubstac 혼합물이 없는 샘플과 비교하여 Ubstac을 넣어준 샘플에서 E3의 양이 줄어든 것을 확인하였다 (도 26 참조). 이는 E3로부터 시작된 폴리유비퀴틴 스캐폴드 형성으로 인해 분자 질량이 증가한 E3의 밴드가 위쪽으로 이동되었기 때문이다. Ubch5a E2 보다 반응성이 약한 Ubch7 E2를 이용한 결과에서는 시간이 지남에 따라 Rsp5에 Ubiquitin이 하나씩 추가 연결되어 분자량이 증가되는 과정을 확인하였다.

[0073] 실시예 13: head-to-tail 형태로 반복 연결된 UCT의 C-말단에 aspartate로 연장된 형태로 발현된 hGH의 중합체 제조

[0074] 도 27에 나타난 것과 같이 DUB이 함께 존재하는 조건과 DUB이 제외된 조건에서 hGH의 Ubstac 반응을 비교하였다. 이때 사용된 hGH는 C-말단에 2개의 유비퀴틴 태그가 head to tail 형태로 반복 연결되어 있고, 그 유비퀴틴 태그의 C-말단은 aspartate로 연장된 형태이다. 따라서 DUB을 이용해 유비퀴틴 태그 C-말단의 aspartate를 잘라내지 않으면 Ubstac 반응이 일어나지 않는다. 의약품용 생체분자인 hGH의 중합체 형성을 확인하기 위한 Ubstac 반응은 (전체 부피 50 μ l)을 Ubstac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, Ubstac 혼합물 (1 μ M E1, 5 μ M E2 (ubch5a), 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 20 μ M hGH 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. E3가 제외된 E2-Ubstac 반응은 (전체 부피 50 μ L)을 E2-Ubstac 완충액 (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, E2-Ubstac 혼합물(1 μ M E1, 10 μ M E2(Ucb13-MMS2 complex), 4 mM ATP)을 20 μ M hGH 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. DUB의 활성을 함께 확인하기 위해 반응은 DUB (YUH1)이 없는 조건과 DUB (YUH1)이 2 μ M 들어간 조건에서 각각 동시에 진행 하였다. 모든 반응을 실온에서 1 ~ 4시간 동안 셰이킹하여 수행한 다음, SDS-PAGE로 확인하였다. 도 27에 나타난 것과 같이 DUB이 있는 조건하에서만 hGH의 중합체가 형성되는 것을 확인 하였고, DUB이 없는 조건에서는 hGH UCT C-말단의 아스파르트산이 잘려지지 않아 중합체 형성되지 않은 것을 확인하였다.

[0075] 실시예 13: head-to-tail 형태로 반복 연결된 UCT의 C-말단에 aspartate로 연장된 형태로 발현된 hGH의 중합체 제조

[0076] Protein A 중합체를 만들기 위한 Ubstac 반응 (전체 부피 50 μ l)을 Ubstac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였다. Ubstac 혼합물 (0.5 μ M E1, 5 μ M E2 (Ubch5a 또는 Ubch7), 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 Protein A 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. Ubstac 반응을 실온에서 1시간동안 셰이킹한 다음 50% 농도의 라텍스 비드 (Latex bead)와 함께 1:1 비율로 섞은 다음 상온에서 4시간동안 셰이킹하며 Protein A 중합체를 비드에 고정화 시키는 반응을 수행하였다. 고정화 반응 후, 고정화 되지 않은 단백질을 제거하기 위해 PBS 완충액 (10 mM Na₂HPO₄ pH 7.4, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)으로 3회 세척을 수행하였다. 세척 후, 인간의 혈청으로 부터 얻어진 면역글로불린G (IgG)를 2mg/ml 농도로 비드에 첨가하여 비드에 고정화된 Protein A 중합체의 결합 활성 분석을 진행하였다. 결합 반응은 상온에서 1시간 동안 셰이킹한 다음, 상기 세척 방법과 동일하게 PBS 완충액으로 3회 세척 후 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과 Ubstac mix를 첨가 하지 않고 나머지를 동일하게 진행하여 단백질 A 단위가 고정화된 비드에 비해 단백질 A 중합체가 고정화된 비드에 대한 인간 유래 IgG의 결합 활성이 15%이상 증가된 것을 확인 하였다 (도 28 참조).

산업상 이용가능성

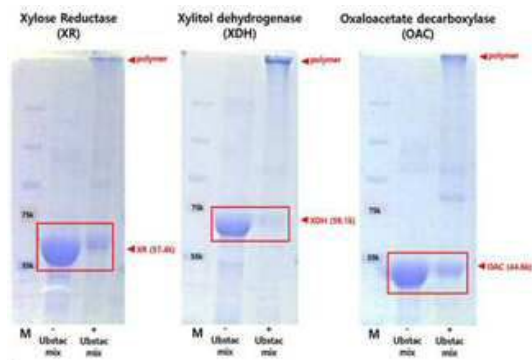
[0078] 본 발명은 생체 내 유비퀴틴-프로테아좀 단백질 분해작용에 관여하는 E1-E2-E3 시스템을 이용하여, in vitro에서 유비퀴틴 C-말단 태그 (UCT)-생체분자를 단위로 하는 선형 멀티머 생체분자 중합체를 제조하는 방법 및 이러한 방법으로 제조된 선형 멀티머 생체분자 중합체에 관한 것이다. 이와 같이, 본 발명의 선형 멀티머 생체분자 중합체 및 이를 제조하는 방법은 고정화 단백질의 생산, 물질의 분리 정제, 및 분석이 요구되는 산업분야 및 의료분야에서 폭넓게 이용될 수 있다.

도면

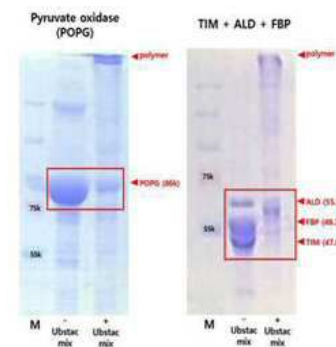
도면1



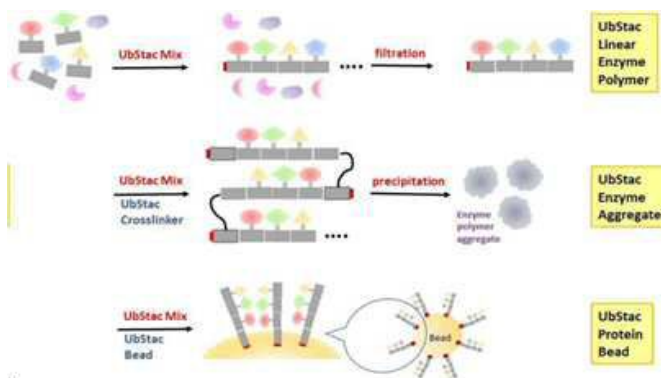
도면2



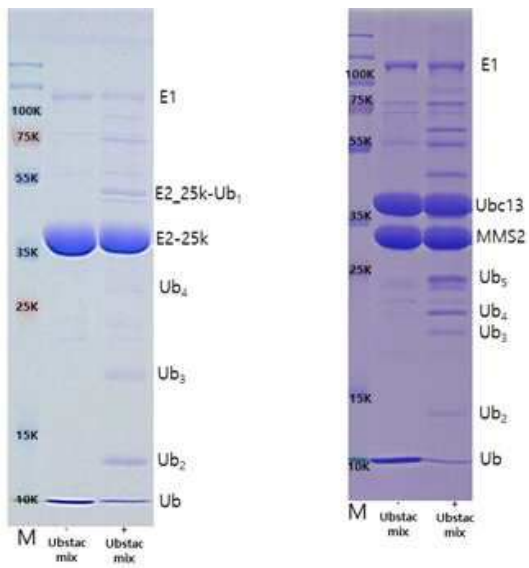
도면3



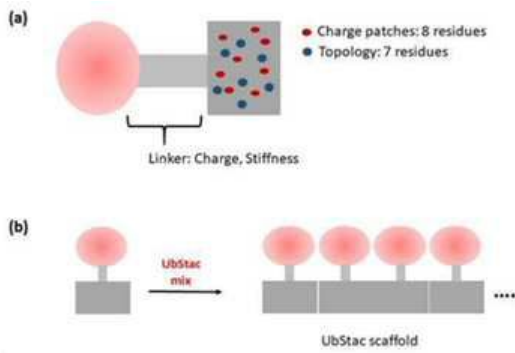
도면4



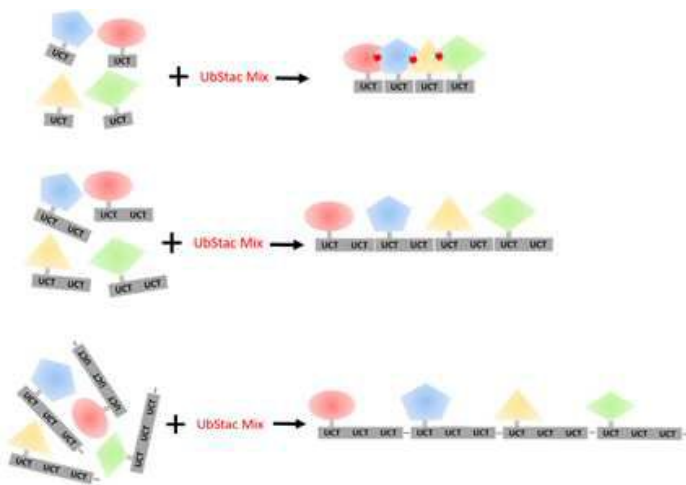
도면5



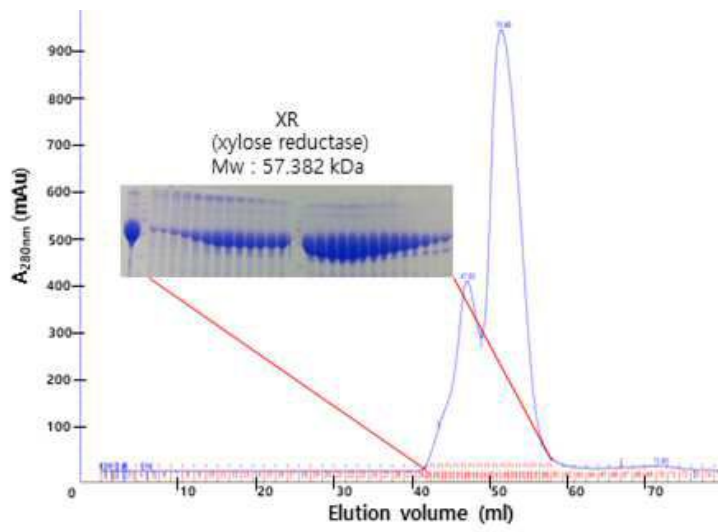
도면6



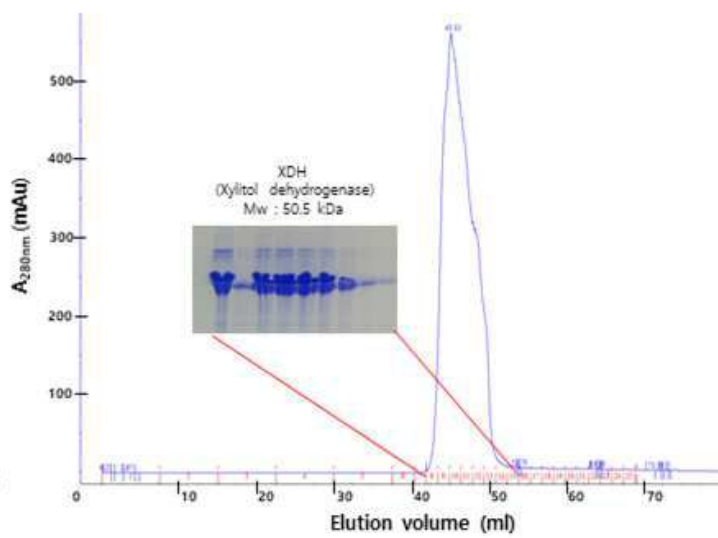
도면7



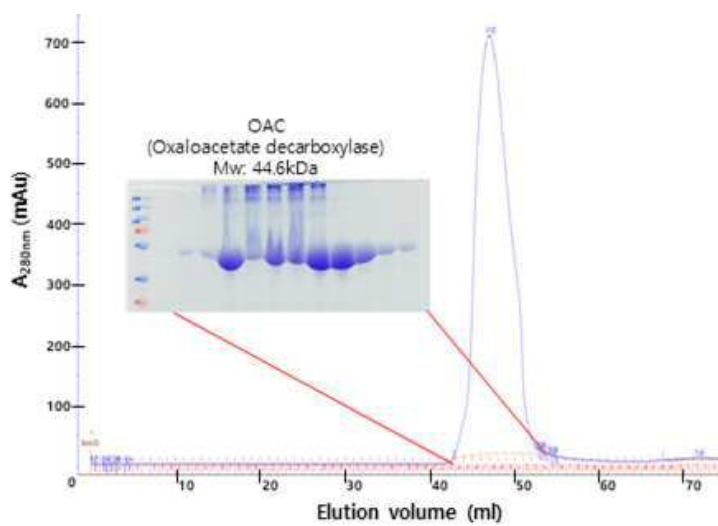
도면8



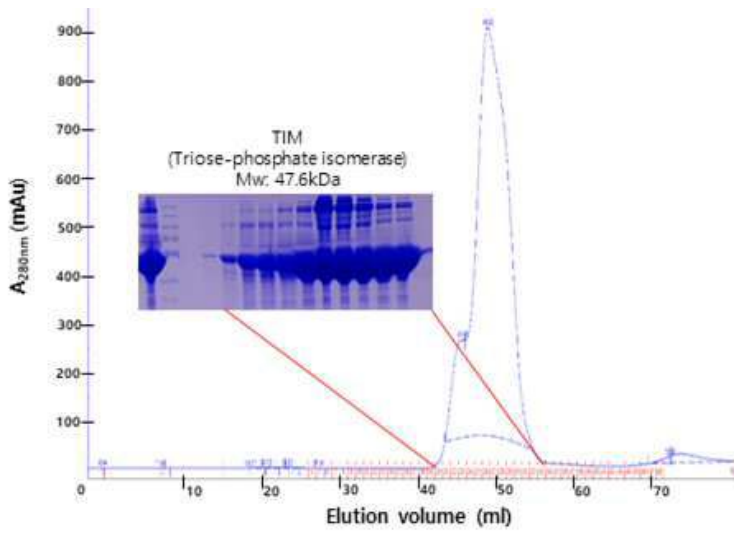
도면9



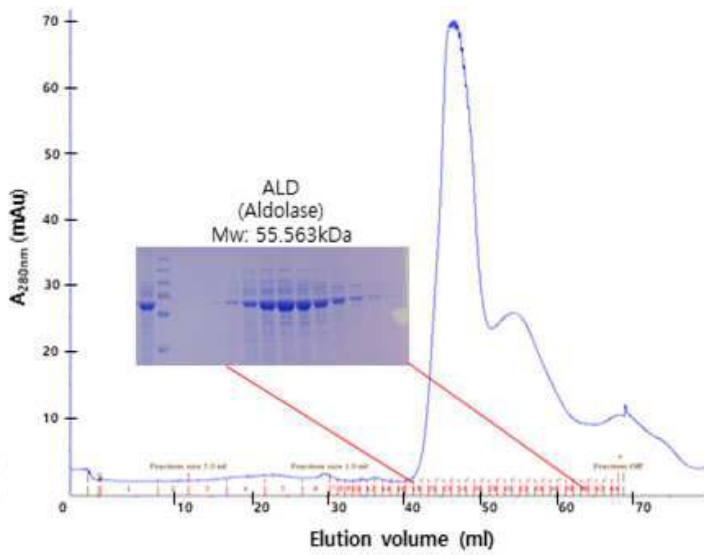
도면10



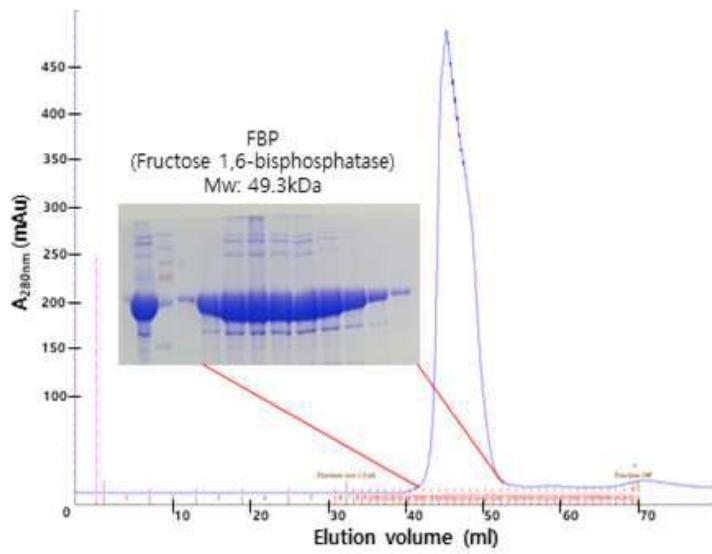
도면11



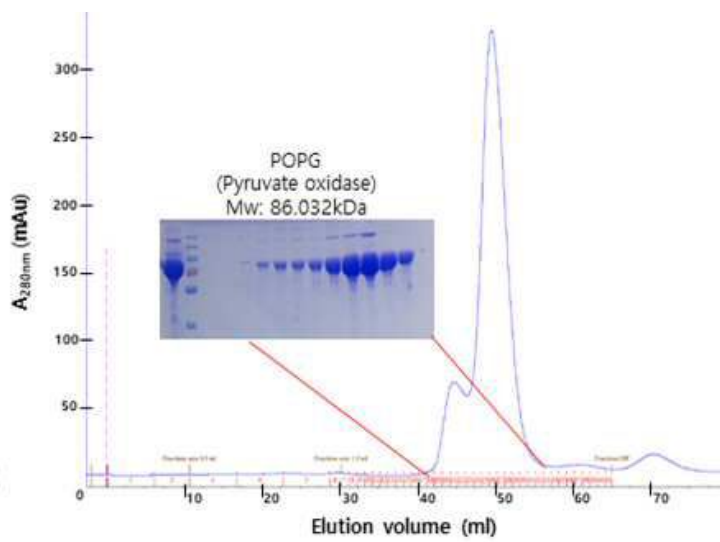
도면12



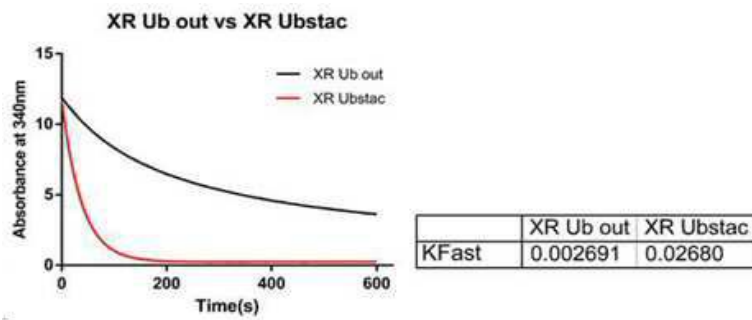
도면13



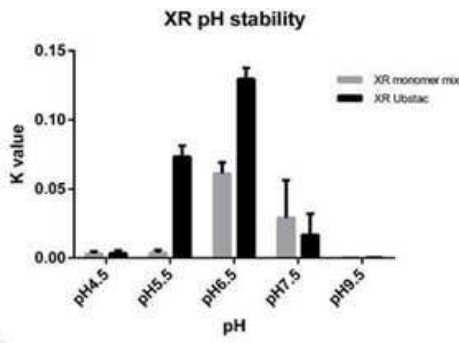
도면14



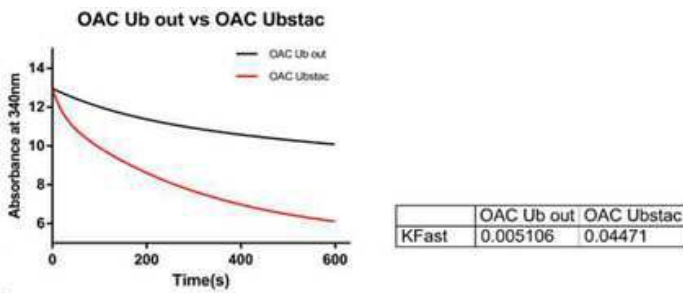
도면15



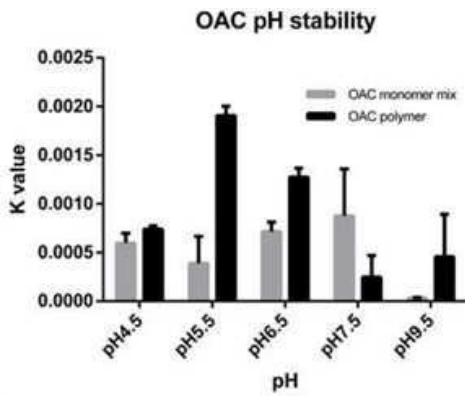
도면16



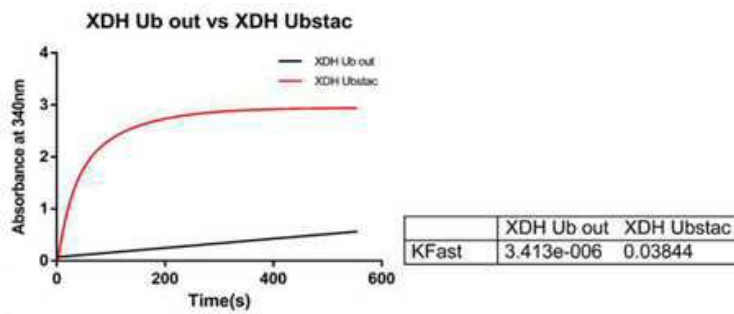
도면17



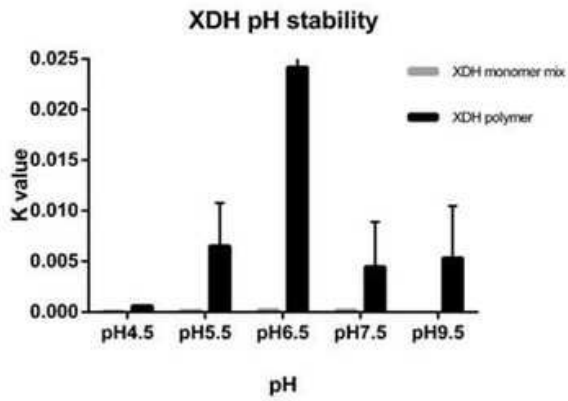
도면18



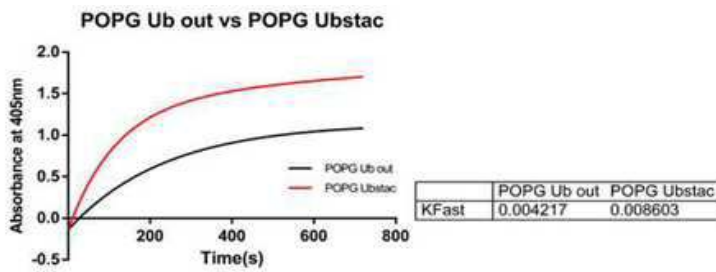
도면19



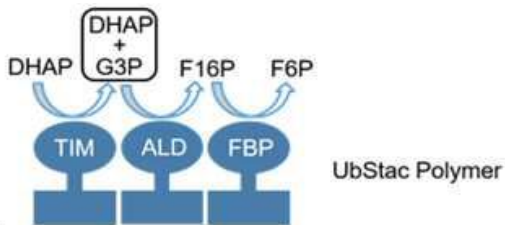
도면20



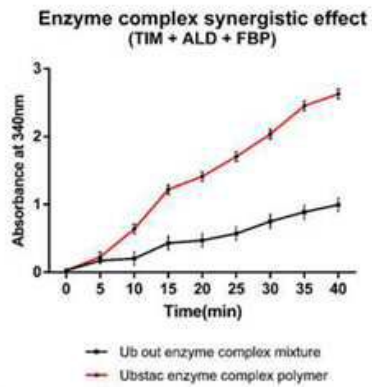
도면21



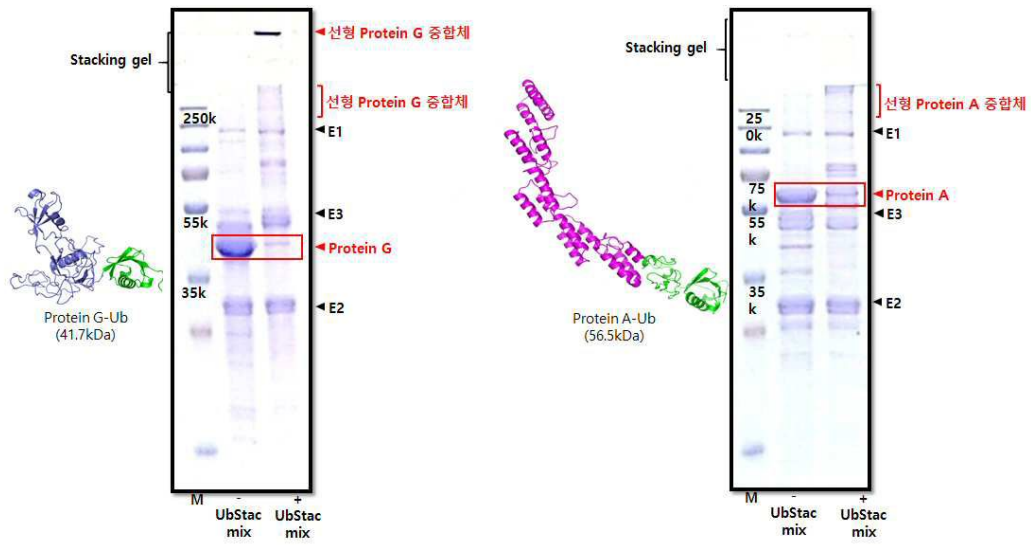
도면22



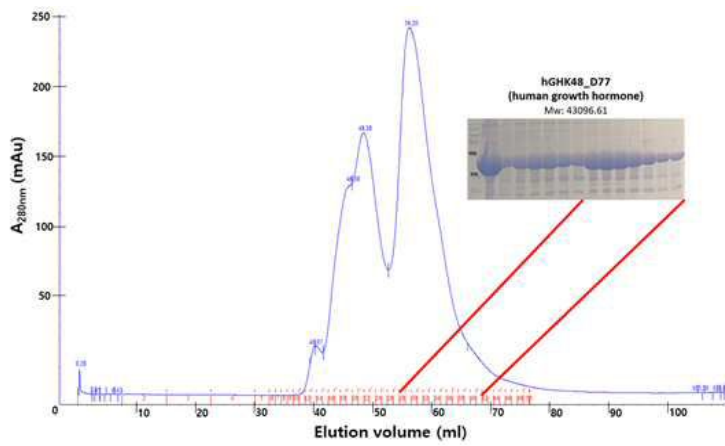
도면23



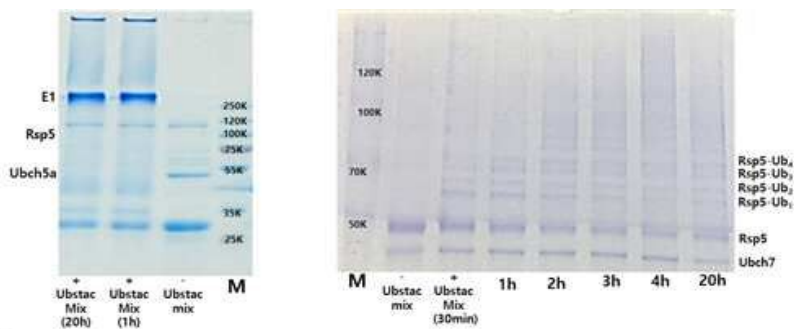
도면24



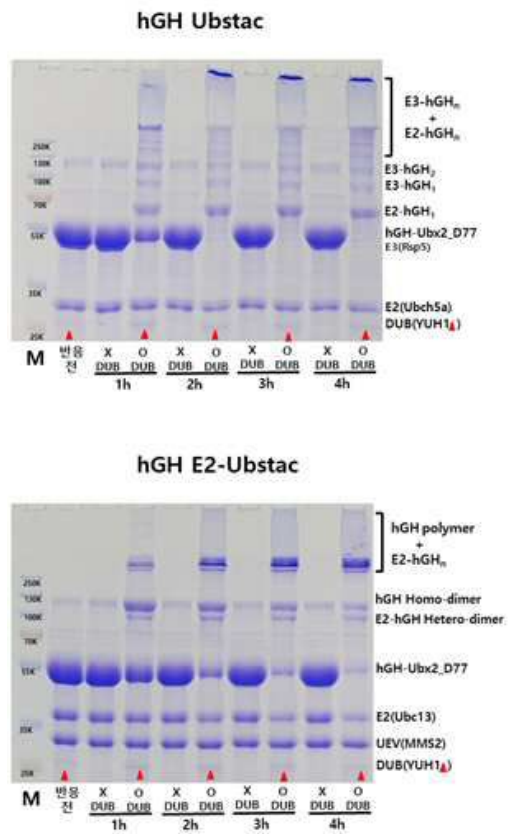
도면25



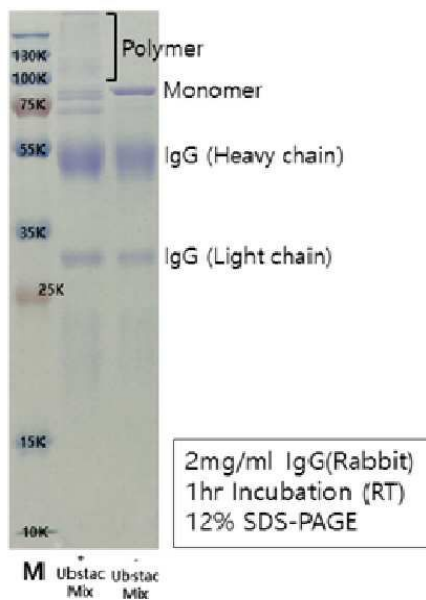
도면26



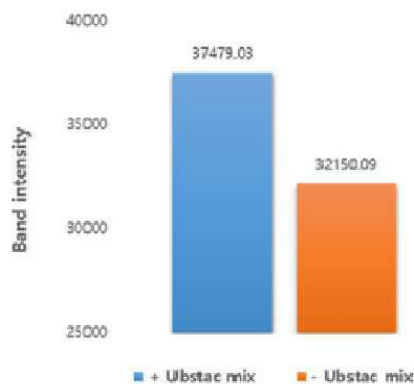
도면27



도면28



Sample	Band intensity	Relative intensity
+ Ubstac mix	37479	1.16
- Ubstac mix	32150.1	1



서열 목록

<110> ONEGENE

<120> A linear multimeric biomolecules bound to polyubiquitin scaffold and the use thereof

<130> OGB18P-0002-KR
 <150> KR 10-2018-0060502
 <151> 2018-05-28
 <160> 17
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Ubiquitin C-terminal Tag

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75

<210> 2

<211> 506

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Xylose Reductase

<400> 2

Met Gly His His His His His His Ser Asp Gln Glu Ala Lys Pro Ser

1 5 10 15

Thr Glu Asp Leu Gly Asp Lys Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Lys Leu Lys

20 25 30

Val Ile Gly Gln Asp Ser Ser Glu Ile His Phe Lys Val Lys Met Thr

35 40 45

Thr His Leu Lys Lys Leu Lys Glu Ser Tyr Cys Gln Arg Gln Gly Val
 50 55 60
 Pro Met Asn Ser Leu Arg Phe Leu Phe Glu Gly Gln Arg Ile Ala Asp
 65 70 75 80
 Asn His Thr Pro Lys Glu Leu Gly Met Glu Glu Glu Asp Val Ile Glu
 85 90 95
 Val Tyr Gln Glu Gln Thr Gly Gly Met Pro Ser Ile Lys Leu Asn Ser
 100 105 110
 Gly Tyr Asp Met Pro Ala Val Gly Phe Gly Cys Trp Lys Val Asp Val
 115 120 125
 Asp Thr Cys Ser Glu Gln Ile Tyr Arg Ala Ile Lys Thr Gly Tyr Arg
 130 135 140
 Leu Phe Asp Gly Ala Glu Asp Tyr Ala Asn Glu Lys Leu Val Gly Ala
 145 150 155 160
 Gly Val Lys Lys Ala Ile Asp Glu Gly Ile Val Lys Arg Glu Asp Leu
 165 170 175
 Phe Leu Thr Ser Lys Leu Trp Asn Asn Tyr His His Pro Asp Asn Val
 180 185 190
 Glu Lys Ala Leu Asn Arg Thr Leu Ser Asp Leu Gln Val Asp Tyr Val
 195 200 205
 Asp Leu Phe Leu Ile His Phe Pro Val Thr Phe Lys Phe Val Pro Leu
 210 215 220
 Glu Glu Lys Tyr Pro Pro Gly Phe Tyr Cys Gly Lys Gly Asp Asn Phe
 225 230 235 240
 Asp Tyr Glu Asp Val Pro Ile Leu Glu Thr Trp Lys Ala Leu Glu Lys
 245 250 255
 Leu Val Lys Ala Gly Lys Ile Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Phe Pro
 260 265 270
 Gly Ala Leu Leu Leu Asp Leu Leu Arg Gly Ala Thr Ile Lys Pro Ser
 275 280 285
 Val Leu Gln Val Glu His His Pro Tyr Leu Gln Gln Pro Arg Leu Ile

290 295 300
 Glu Phe Ala Gln Ser Arg Gly Ile Ala Val Thr Ala Tyr Ser Ser Phe
 305 310 315 320
 Gly Pro Gln Ser Phe Val Glu Leu Asn Gln Gly Arg Ala Leu Asn Thr
 325 330 335
 Ser Pro Leu Phe Glu Asn Glu Thr Ile Lys Ala Ile Ala Ala Lys His
 340 345 350
 Gly Lys Ser Pro Ala Gln Val Leu Leu Arg Trp Ser Ser Gln Arg Gly

 355 360 365
 Ile Ala Ile Ile Pro Lys Ser Asn Thr Val Pro His Leu Leu Glu Asn
 370 375 380
 Lys Asp Val Asn Ser Phe Asp Leu Asp Glu Gln Asp Phe Ala Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Lys Leu Asp Ile Asn Leu Arg Phe Asn Asp Pro Trp Asp Trp Asp
 405 410 415
 Lys Ile Pro Ile Phe Val Gly Gly His His His His His His Met Gln
 420 425 430

 Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu
 435 440 445
 Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu
 450 455 460
 Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu
 465 470 475 480
 Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr
 485 490 495
 Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly

500 505
 <210> 3
 <211> 542
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Xylitol dehydrogenase

<400> 3

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

 Thr His Leu Lys Lys Leu Lys Glu Ser Tyr Cys Gln Arg Gln Gly Val
 50 55 60
 Pro Met Asn Ser Leu Arg Phe Leu Phe Glu Gly Gln Arg Ile Ala Asp
 65 70 75 80
 Asn His Thr Pro Lys Glu Leu Gly Met Glu Glu Glu Asp Val Ile Glu
 85 90 95
 Val Tyr Gln Glu Gln Thr Gly Gly Met Thr Ala Asn Pro Ser Leu Val
 100 105 110
 Leu Asn Lys Ile Asp Asp Ile Ser Phe Glu Thr Tyr Asp Ala Pro Glu
 115 120 125
 Ile Ser Glu Pro Thr Asp Val Leu Val Gln Val Lys Lys Thr Gly Ile
 130 135 140
 Cys Gly Ser Asp Ile His Phe Tyr Ala His Gly Arg Ile Gly Asn Phe
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Lys Pro Met Val Leu Gly His Glu Ser Ala Gly Thr Val
 165 170 175
 Val Gln Val Gly Lys Gly Val Thr Ser Leu Lys Val Gly Asp Asn Val
 180 185 190

 Ala Ile Glu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Asp Glu Tyr Lys Ser
 195 200 205
 Gly His Tyr Asn Leu Cys Pro His Met Ala Phe Ala Ala Thr Pro Asn
 210 215 220
 Ser Lys Glu Gly Glu Pro Asn Pro Pro Gly Thr Leu Cys Lys Tyr Phe
 225 230 235 240
 Lys Ser Pro Glu Asp Phe Leu Val Lys Leu Pro Asp His Val Ser Leu

245 250 255
 Glu Leu Gly Ala Leu Val Glu Pro Leu Ser Val Gly Val His Ala Ser

260 265 270
 Lys Leu Gly Ser Val Ala Phe Gly Asp Tyr Val Ala Val Phe Gly Ala

275 280 285
 Gly Pro Val Gly Leu Leu Ala Ala Ala Val Ala Lys Thr Phe Gly Ala

290 295 300
 Lys Gly Val Ile Val Val Asp Ile Phe Asp Asn Lys Leu Lys Met Ala

305 310 315 320
 Lys Asp Ile Gly Ala Ala Thr His Thr Phe Asn Ser Lys Thr Gly Gly

325 330 335
 Ser Glu Glu Leu Ile Lys Ala Phe Gly Gly Asn Val Pro Asn Val Val

340 345 350
 Leu Glu Cys Thr Gly Ala Glu Pro Cys Ile Lys Leu Gly Val Asp Ala

355 360 365
 Ile Ala Pro Gly Gly Arg Phe Val Gln Val Gly Asn Ala Ala Gly Pro

370 375 380
 Val Ser Phe Pro Ile Thr Val Phe Ala Met Lys Glu Leu Thr Leu Phe

385 390 395 400
 Gly Ser Phe Arg Tyr Gly Phe Asn Asp Tyr Lys Thr Ala Val Gly Ile

405 410 415
 Phe Asp Thr Asn Tyr Gln Asn Gly Arg Glu Asn Ala Pro Ile Asp Phe

420 425 430
 Glu Gln Leu Ile Thr His Arg Tyr Lys Phe Lys Asp Ala Ile Glu Ala

435 440 445
 Tyr Asp Leu Val Arg Ala Gly Lys Gly Ala Val Lys Cys Leu Ile Asp

450 455 460
 Gly Pro Glu Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile

465 470 475 480
 Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys

485 490 495
 Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys

Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe
 500 505 510

Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile
 515 520 525

Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly
 530 535 540

<210> 4
 <211> 407
 <212>
 PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oxaloacetate decarboxylase
 <400> 4

Met Gly His His His His His His Ser Asp Gln Glu Ala Lys Pro Ser
 1 5 10 15

Thr Glu Asp Leu Gly Asp Lys Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Lys Leu Lys
 20 25 30

Val Ile Gly Gln Asp Ser Ser Glu Ile His Phe Lys Val Lys Met Thr
 35 40 45

Thr His Leu Lys Lys Leu Lys Glu Ser Tyr Cys Gln Arg Gln Gly Val
 50 55 60

Pro Met Asn Ser Leu Arg Phe Leu Phe Glu Gly Gln Arg Ile Ala Asp
 65 70 75 80

Asn His Thr Pro Lys Glu Leu Gly Met Glu Glu Glu Asp Val Ile Glu
 85 90 95

Val Tyr Gln Glu Gln Thr Gly Gly Met Tyr Glu Leu Gly Val Val Tyr
 100 105 110

Arg Asn Ile Gln Arg Ala Asp Arg Ala Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ala
 115 120 125

Leu Gly Ser Ala Thr Val His Glu Ala Met Gly Arg Val Gly Leu Leu
 130 135 140

Lys Pro Tyr Met Arg Pro Ile Tyr Ala Gly Lys Gln Val Ser Gly Thr
 145 150 155 160

Ala Val Thr Val Leu Leu Gln Pro Gly Asp Asn Trp Met Met His Val
 165 170 175

Ala Ala Glu Gln Ile Gln Pro Gly Asp Ile Val Val Ala Ala Val Thr
 180 185 190

Ala Glu Cys Thr Asp Gly Tyr Phe Gly Asp Leu Leu Ala Thr Ser Phe
 195 200 205

Gln Ala Arg Gly Ala Arg Ala Leu Ile Ile Asp Ala Gly Val Arg Asp
 210 215 220

Val Lys Thr Leu Gln Glu Met Asp Phe Pro Val Trp Ser Lys Ala Ile
 225 230 235 240

Ser Ser Lys Gly Thr Ile Lys Ala Thr Leu Gly Ser Val Asn Ile Pro
 245 250 255

Ile Val Cys Ala Gly Met Leu Val Thr Pro Gly Asp Val Ile Val Ala
 260 265 270

Asp Asp Asp Gly Val Val Cys Val Pro Ala Ala Arg Ala Val Glu Val
 275 280 285

Leu Ala Ala Ala Gln Lys Arg Glu Ser Phe Glu Gly Glu Lys Arg Ala
 290 295 300

Lys Leu Ala Ser Gly Val Leu Gly Leu Asp Met Tyr Lys Met Arg Glu
 305 310 315 320

Pro Leu Glu Lys Ala Gly Leu Lys Tyr Ile Asp Met Gln Ile Phe Val
 325 330 335

Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp
 340 345 350

Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro
 355 360 365

Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly
 370 375 380

Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu
 385 390 395 400

Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
 405

<210> 5

<211> 430

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Triose-phosphate isomerase

<400> 5

Met Gly His His His His His His Ser Asp Gln Glu Ala Lys Pro Ser

1 5 10 15

Thr Glu Asp Leu Gly Asp Lys Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Lys Leu Lys

20 25 30

Val Ile Gly Gln Asp Ser Ser Glu Ile His Phe Lys Val Lys Met Thr

35 40 45

Thr His Leu Lys Lys Leu Lys Glu Ser Tyr Cys Gln Arg Gln Gly Val

50 55 60

Pro Met Asn Ser Leu Arg Phe Leu Phe Glu Gly Gln Arg Ile Ala Asp

65 70 75 80

Asn His Thr Pro Lys Glu Leu Gly Met Glu Glu Glu Asp Val Ile Glu

85 90 95

Val Tyr Gln Glu Gln Thr Gly Gly Met Arg Arg Val Leu Val Ala Gly

100 105 110

Asn Trp Lys Met His Lys Thr Pro Ser Glu Ala Arg Val Trp Phe Ala

115 120 125

Glu Leu Lys Arg Leu Leu Pro Pro Leu Gln Ser Glu Ala Ala Val Leu

130 135 140

Pro Ala Phe Pro Ile Leu Pro Val Ala Lys Glu Val Leu Ala Glu Thr

145 150 155 160

Gln Val Gly Tyr Gly Ala Gln Asp Val Ser Ala His Lys Glu Gly Ala

165 170 175

Tyr Thr Gly Glu Val Ser Ala Arg Met Leu Ser Asp Leu Gly Cys Arg

180 185 190

Tyr Ala Ile Val Gly His Ser Glu Arg Arg Arg Tyr His Gly Glu Thr

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aldolase

<400> 6

Met Gly His His His His His His Ser Asp Gln Glu Ala Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Leu Gly Asp Lys Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Lys Leu Lys
 20 25 30
 Val Ile Gly Gln Asp Ser Ser Glu Ile His Phe Lys Val Lys Met Thr
 35 40 45
 Thr His Leu Lys Lys Leu Lys Glu Ser Tyr Cys Gln Arg Gln Gly Val
 50 55 60
 Pro Met Asn Ser Leu Arg Phe Leu Phe Glu Gly Gln Arg Ile Ala Asp
 65 70 75 80
 Asn His Thr Pro Lys Glu Leu Gly Met Glu Glu Glu Asp Val Ile Glu
 85 90 95
 Val Tyr Gln Glu Gln Thr Gly Gly Met Val Thr Met Pro Tyr Val Lys
 100 105 110
 Asn Thr Lys Glu Ile Leu Glu Lys Ala Ser Lys Glu Arg Tyr Ala Ile
 115 120 125
 Gly Ala Phe Asn Phe Asn Asn Met Glu Phe Leu Gln Ala Ile Leu Glu
 130 135 140
 Ala Ala Glu Glu Glu Lys Ala Pro Val Ile Val Ala Thr Ser Glu Gly
 145 150 155 160
 Ala Ile Lys Tyr Ile Gly Lys Gly Asp Ile Glu Thr Gly Ala Lys Leu
 165 170 175
 Ala Val Glu Met Val Arg Thr Tyr Ala Glu Lys Leu Ser Val Pro Val
 180 185 190
 Ala Leu His Leu Asp His Gly Arg Asp Phe Lys Val Ile Met Ala Ala
 195 200 205
 Ile Lys Ala Gly Tyr Ser Ser Val Met Ile Asp Ala Ser His Leu Pro
 210 215 220
 Phe Glu Glu Asn Leu Arg Glu Thr Lys Arg Ile Val Glu Ile Ala His

225 230 235 240
 Ala Val Gly Ile Ser Val Glu Ala Glu Leu Gly Lys Leu Lys Gly Ile
 245 250 255

 Glu Asp Asn Val Val Glu Lys Glu Ser Val Leu Val Asp Pro Glu Glu
 260 265 270
 Ala Lys Val Phe Val Lys Glu Thr Glu Val Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 275 280 285
 Ile Gly Thr Ser His Gly Ala Phe Lys Phe Lys Gly Glu Ala Gln Leu
 290 295 300
 Asp Phe Glu Arg Leu Lys Lys Val Lys Glu Tyr Thr Gln Ile Pro Leu
 305 310 315 320
 Val Leu His Gly Ala Ser Met Val Pro Gln Asp Ile Val Lys Leu Ala

 325 330 335
 Asn Glu Tyr Gly Ala Glu Leu Ser Gly Ala Lys Gly Val Pro Glu Asp
 340 345 350
 Met Leu Lys Lys Ala Ile Glu Leu Gly Ile Asn Lys Ile Asn Thr Asp
 355 360 365
 Thr Asp Leu Arg Ile Thr Phe Val Ala Tyr Leu Arg Lys Val Leu Ser
 370 375 380
 Glu Asp Lys Ser Gln Ile Asp Pro Arg Lys Ile Phe Lys Pro Val Phe
 385 390 395 400

 Glu Gln Val Lys Glu Ile Val Lys Glu Arg Ile Arg Ile Phe Gly Ser
 405 410 415
 Ser Gly Lys Ala Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr
 420 425 430
 Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala
 435 440 445
 Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile
 450 455 460
 Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn

 465 470 475 480

Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
 485 490 495

<210> 7
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fructose 1,6-bisphosphatase
 <400> 7

Met Gly His His His His His His Ser Asp Gln Glu Ala Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Leu Gly Asp Lys Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Lys Leu Lys
 20 25 30
 Val Ile Gly Gln Asp Ser Ser Glu Ile His Phe Lys Val Lys Met Thr
 35 40 45
 Thr His Leu Lys Lys Leu Lys Glu Ser Tyr Cys Gln Arg Gln Gly Val
 50 55 60
 Pro Met Asn Ser Leu Arg Phe Leu Phe Glu Gly Gln Arg Ile Ala Asp
 65 70 75 80
 Asn His Thr Pro Lys Glu Leu Gly Met Glu Glu Glu Asp Val Ile Glu
 85 90 95

Val Tyr Gln Glu Gln Thr Gly Gly Met Leu Asp Arg Leu Asp Phe Ser
 100 105 110
 Ile Lys Leu Leu Arg Lys Val Gly His Leu Leu Met Ile His Trp Gly
 115 120 125
 Arg Val Asp Asn Val Glu Lys Lys Thr Gly Phe Lys Asp Ile Val Thr
 130 135 140
 Glu Ile Asp Arg Glu Ala Gln Arg Met Ile Val Asp Glu Ile Arg Lys
 145 150 155 160
 Phe Phe Pro Asp Glu Asn Ile Met Ala Glu Glu Gly Ile Phe Glu Lys
 165 170 175
 Gly Asp Arg Leu Trp Ile Ile Asp Pro Ile Asp Gly Thr Ile Asn Phe
 180 185 190

Val His Gly Leu Pro Asn Phe Ser Ile Ser Leu Ala Tyr Val Glu Asn
 195 200 205

Gly Glu Val Lys Leu Gly Val Val His Ala Pro Ala Leu Asn Glu Thr
 210 215 220

Leu Tyr Ala Glu Glu Gly Ser Gly Ala Phe Phe Asn Gly Glu Arg Ile
 225 230 235 240

Arg Val Ser Glu Asn Ala Ser Leu Glu Glu Cys Val Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Ser Tyr Val Asp Phe Thr Gly Lys Phe Ile Glu Arg Met Glu Lys Arg
 260 265 270

Thr Arg Arg Ile Arg Ile Leu Gly Ser Ala Ala Leu Asn Ala Ala Tyr
 275 280 285

Val Gly Ala Gly Arg Val Asp Phe Phe Val Thr Trp Arg Ile Asn Pro
 290 295 300

Trp Asp Ile Ala Ala Gly Leu Ile Ile Val Lys Glu Ala Gly Gly Met
 305 310 315 320

Val Thr Asp Phe Ser Gly Lys Glu Ala Asn Ala Phe Ser Lys Asn Phe
 325 330 335

Ile Phe Ser Asn Gly Leu Ile His Asp Glu Val Val Lys Val Val Asn
 340 345 350

Glu Val Val Glu Glu Ile Gly Gly Lys Met Gln Ile Phe Val Lys Thr
 355 360 365

Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile
 370 375 380

Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp
 385 390 395 400

Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
 405 410 415

Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu
 420 425 430

Arg Leu Arg Gly Gly
 435

<210> 8
 <211> 772
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pyruvate oxidase

<400> 8
 Met Gly His His His His His His Ser Asp Gln Glu Ala Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Leu Gly Asp Lys Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Lys Leu Lys
 20 25 30
 Val Ile Gly Gln Asp Ser Ser Glu Ile His Phe Lys Val Lys Met Thr
 35 40 45
 Thr His Leu Lys Lys Leu Lys Glu Ser Tyr Cys Gln Arg Gln Gly Val
 50 55 60
 Pro Met Asn Ser Leu Arg Phe Leu Phe Glu Gly Gln Arg Ile Ala Asp
 65 70 75 80
 Asn His Thr Pro Lys Glu Leu Gly Met Glu Glu Glu Asp Val Ile Glu
 85 90 95
 Val Tyr Gln Glu Gln Thr Gly Gly Met Ser Asp Asn Lys Ile Asn Ile
 100 105 110
 Gly Leu Ala Val Met Lys Ile Leu Glu Ser Trp Gly Ala Asp Thr Ile
 115 120 125
 Tyr Gly Ile Pro Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Met Asp Ala Met Gly
 130 135 140
 Glu Glu Glu Asn Asn Val Lys Phe Leu Gln Val Lys His Glu Glu Val
 145 150 155 160
 Gly Ala Met Ala Ala Val Met Gln Ser Lys Phe Gly Gly Asn Leu Gly
 165 170 175
 Val Thr Val Gly Ser Gly Gly Pro Gly Ala Ser His Leu Ile Asn Gly
 180 185 190
 Leu Tyr Asp Ala Ala Met Asp Asn Ile Pro Val Val Ala Ile Leu Gly
 195 200 205

Ser Arg Pro Gln Arg Glu Leu Asn Met Asp Ala Phe Gln Glu Leu Asn
 210 215 220
 Gln Asn Pro Met Tyr Asp His Ile Ala Val Tyr Asn Arg Arg Val Ala
 225 230 235 240
 Tyr Ala Glu Gln Leu Pro Lys Leu Val Asp Glu Ala Ala Arg Met Ala
 245 250 255
 Ile Ala Lys Arg Gly Val Ala Val Leu Glu Val Pro Gly Asp Phe Ala
 260 265 270
 Lys Val Glu Ile Asp Asn Asp Gln Trp Tyr Ser Ser Ala Asn Ser Leu
 275 280 285
 Arg Lys Tyr Ala Pro Ile Ala Pro Ala Ala Gln Asp Ile Asp Ala Ala
 290 295 300
 Val Glu Leu Leu Asn Asn Ser Lys Arg Pro Val Ile Tyr Ala Gly Ile
 305 310 315 320
 Gly Thr Met Gly His Gly Pro Ala Val Gln Glu Leu Ala Arg Lys Ile
 325 330 335
 Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr Gly Lys Asn Phe Glu Thr Phe Glu Trp
 340 345 350
 Asp Phe Glu Ala Leu Thr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Gly Trp Lys Pro
 355 360 365
 Ala Asn Glu Thr Ile Leu Glu Ala Asp Thr Val Leu Phe Ala Gly Ser
 370 375 380
 Asn Phe Pro Phe Ser Glu Val Glu Gly Thr Phe Arg Asn Val Asp Asn
 385 390 395 400
 Phe Ile Gln Ile Asp Ile Asp Pro Ala Met Leu Gly Lys Arg His His
 405 410 415
 Ala Asp Val Ala Ile Leu Gly Asp Ala Gly Leu Ala Ile Asp Glu Ile
 420 425 430
 Leu Asn Lys Val Asp Ala Val Glu Glu Ser Ala Trp Trp Thr Ala Asn
 435 440 445
 Leu Lys Asn Ile Ala Asn Trp Arg Glu Tyr Ile Asn Met Leu Glu Thr

450 455 460
 Lys Glu Glu Gly Asp Leu Gln Phe Tyr Gln Val Tyr Asn Ala Ile Asn
 465 470 475 480
 Asn His Ala Asp Glu Asp Ala Ile Tyr Ser Ile Asp Val Gly Asn Ser
 485 490 495
 Thr Gln Thr Ser Ile Arg His Leu His Met Thr Pro Lys Asn Met Trp

 500 505 510
 Arg Thr Ser Pro Leu Phe Ala Thr Met Gly Ile Ala Ile Pro Gly Gly
 515 520 525
 Leu Gly Ala Lys Asn Thr Tyr Pro Asp Arg Gln Val Trp Asn Ile Ile
 530 535 540
 Gly Asp Gly Ala Phe Ser Met Thr Tyr Pro Asp Val Val Thr Asn Val
 545 550 555 560
 Arg Tyr Asn Met Pro Val Ile Asn Val Val Phe Ser Asn Thr Glu Tyr
 565 570 575

 Ala Phe Ile Lys Asn Lys Tyr Glu Asp Thr Asn Lys Asn Leu Phe Gly
 580 585 590
 Val Asp Phe Thr Asp Val Asp Tyr Ala Lys Ile Ala Glu Ala Gln Gly
 595 600 605
 Ala Lys Gly Phe Thr Val Ser Arg Ile Glu Asp Met Asp Arg Val Met
 610 615 620
 Ala Glu Ala Val Ala Ala Asn Lys Ala Gly His Thr Val Val Ile Asp
 625 630 635 640
 Cys Lys Ile Thr Gln Asp Arg Pro Ile Pro Val Glu Thr Leu Lys Leu

 645 650 655
 Asp Ser Lys Leu Tyr Ser Glu Asp Glu Ile Lys Ala Tyr Lys Glu Arg
 660 665 670
 Tyr Glu Ala Ala Asn Leu Val Pro Phe Arg Glu Tyr Leu Glu Ala Glu
 675 680 685
 Gly Leu Glu Ser Lys Tyr Ile Lys Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu
 690 695 700
 Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu

Val Glu Gln Thr Leu Lys Gln Ser Gly Asp Val Lys Gly Val Leu Glu
645 650 655
Ser Ile Ser Asp Ser Leu Ser Ser Lys Pro His Asn Phe Glu Asp Cys
660 665 670
Ile Lys Trp Ala Arg Leu Glu Phe Glu Lys Lys Phe Asn His Asp Ile
675 680 685
Lys Gln Leu Leu Phe Asn Phe Pro Lys Asp Ala Lys Thr Ser Asn Gly
690 695 700
Glu Pro Phe Trp Ser Gly Ala Lys Arg Ala Pro Thr Pro Leu Glu Phe
705 710 715 720
Asp Ile Tyr Asn Asn Asp His Phe His Phe Val Val Ala Gly Ala Ser
725 730 735
Leu Arg Ala Tyr Asn Tyr Gly Ile Lys Ser Asp Asp Ser Asn Ser Lys
740 745 750
Pro Asn Val Asp Glu Tyr Lys Ser Val Ile Asp His Met Ile Ile Pro
755 760 765
Glu Phe Thr Pro Asn Ala Asn Leu Lys Ile Gln Val Asn Asp Asp Asp
770 775 780
Pro Asp Pro Asn Ala Asn Ala Ala Asn Gly Ser Asp Glu Ile Asp Gln
785 790 795 800
Leu Val Ser Ser Leu Pro Asp Pro Ser Thr Leu Ala Gly Phe Lys Leu
805 810 815
Glu Pro Val Asp Phe Glu Lys Asp Asp Asp Thr Asn His His Ile Glu
820 825 830
Phe Ile Thr Ala Cys Ser Asn Cys Arg Ala Gln Asn Tyr Phe Ile Glu
835 840 845
Thr Ala Asp Arg Gln Lys Thr Lys Phe Ile Ala Gly Arg Ile Ile Pro
850 855 860
Ala Ile Ala Thr Thr Thr Ser Leu Val Thr Gly Leu Val Asn Leu Glu
865 870 875 880
Leu Tyr Lys Leu Ile Asp Asn Lys Thr Asp Ile Glu Gln Tyr Lys Asn

165 170 175
 Asn Ala Val Ile Val Ala Leu Ser Ser Lys Ser Trp Asp Val Glu Thr
 180 185 190

Ala Thr Glu Leu Leu Leu Ser Asn

195 200

<210> 13

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ubc13 (*Saccharomyces cerevisiae*)

<400> 13

Met Ala Ser Leu Pro Lys Arg Ile Ile Lys Glu Thr Glu Lys Leu Val

1 5 10 15

Ser Asp Pro Val Pro Gly Ile Thr Ala Glu Pro His Asp Asp Asn Leu

20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Val Thr Ile Glu Gly Pro Glu Gln Ser Pro Tyr Glu

35 40 45

Asp Gly Ile Phe Glu Leu Glu Leu Tyr Leu Pro Asp Asp Tyr Pro Met

50 55 60

Glu Ala Pro Lys Val Arg Phe Leu Thr Lys Ile Tyr His Pro Asn Ile

65 70 75 80

Asp Arg Leu Gly Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Thr Asn Trp Ser

85 90 95

Pro Ala Leu Gln Ile Arg Thr Val Leu Leu Ser Ile Gln Ala Leu Leu

100 105 110

Ala Ser Pro Asn Pro Asn Asp Pro Leu Ala Asn Asp Val Ala Glu Asp

115 120 125

Trp Ile Lys Asn Glu Gln Gly Ala Lys Ala Lys Ala Arg Glu Trp Thr

130 135 140

Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Lys Pro Glu

145 150

<210> 14

<211> 137

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMS2 (UEV - Ubiquitin-conjugating enzyme variant) (Saccharomyces cerevisiae)

<400> 14

Met Ser Lys Val Pro Arg Asn Phe Arg Leu Leu Glu Glu Leu Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Glu Lys Gly Phe Gly Pro Glu Ser Cys Ser Tyr Gly Leu Ala Asp
 20 25 30

Ser Asp Asp Ile Thr Met Thr Lys Trp Asn Gly Thr Ile Leu Gly Pro
 35 40 45

Pro His Ser Asn His Glu Asn Arg Ile Tyr Ser Leu Ser Ile Asp Cys
 50 55 60

Gly Pro Asn Tyr Pro Asp Ser Pro Pro Lys Val Thr Phe Ile Ser Lys
 65 70 75 80

Ile Asn Leu Pro Cys Val Asn Pro Thr Thr Gly Glu Val Gln Thr Asp
 85 90 95

Phe His Thr Leu Arg Asp Trp Lys Arg Ala Tyr Thr Met Glu Thr Leu
 100 105 110

Leu Leu Asp Leu Arg Lys Glu Met Ala Thr Pro Ala Asn Lys Lys Leu
 115 120 125

Arg Gln Pro Lys Glu Gly Glu Thr Phe
 130 135

<210> 15

<211> 807

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E3 RSP5

<400> 15

Met Pro Ser Ser Ile Ser Val Lys Leu Val Ala Ala Glu Ser Leu Tyr
 1 5 10 15

Lys Arg Asp Val Phe Arg Ser Pro Asp Pro Phe Ala Val Leu Thr Ile
 20 25 30
 Asp Gly Tyr Gln Thr Lys Ser Thr Ser Ala Ala Lys Lys Thr Leu Asn
 35 40 45
 Pro Tyr Trp Asn Glu Thr Phe Lys Phe Asp Asp Ile Asn Glu Asn Ser
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ile Gln Val Phe Asp Gln Lys Lys Phe Lys Lys Lys Asp
 65 70 75 80

 Gln Gly Phe Leu Gly Val Val Asn Val Arg Val Gly Asp Val Leu Gly
 85 90 95
 His Leu Asp Glu Asp Thr Ala Thr Ser Ser Gly Arg Pro Arg Glu Glu
 100 105 110
 Thr Ile Thr Arg Asp Leu Lys Lys Ser Asn Asp Gly Met Ala Val Ser
 115 120 125
 Gly Arg Leu Ile Val Val Leu Ser Lys Leu Pro Ser Ser Ser Pro His
 130 135 140
 Ser Gln Ala Pro Ser Gly His Thr Ala Ser Ser Ser Thr Asn Thr Ser

 145 150 155 160
 Ser Thr Thr Arg Thr Asn Gly His Ser Thr Ser Ser Thr Arg Asn His
 165 170 175
 Ser Thr Ser His Pro Ser Arg Gly Thr Ala Gln Ala Val Glu Ser Thr
 180 185 190
 Leu Gln Ser Gly Thr Thr Ala Ala Thr Asn Thr Ala Thr Thr Ser His
 195 200 205
 Arg Ser Thr Asn Ser Thr Ser Ser Ala Thr Arg Gln Tyr Ser Ser Phe
 210 215 220

 Glu Asp Gln Tyr Gly Arg Leu Pro Pro Gly Trp Glu Arg Arg Thr Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Gly Arg Thr Tyr Tyr Val Asp His Asn Thr Arg Thr Thr Thr
 245 250 255
 Trp Lys Arg Pro Thr Leu Asp Gln Thr Glu Ala Glu Arg Gly Gln Leu
 260 265 270

Asn Ala Asn Thr Glu Leu Glu Arg Arg Gln His Arg Gly Arg Thr Leu
 275 280 285
 Pro Gly Gly Ser Ser Asp Asn Ser Ser Val Thr Val Gln Val Gly Gly
 290 295 300
 Gly Ser Asn Ile Pro Pro Val Asn Gly Ala Ala Ala Ala Ala Phe Ala
 305 310 315 320
 Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ser Gly Leu Gly Glu Leu Pro Ser Gly Trp
 325 330 335
 Glu Gln Arg Phe Thr Pro Glu Gly Arg Ala Tyr Phe Val Asp His Asn
 340 345 350
 Thr Arg Thr Thr Thr Trp Val Asp Pro Arg Arg Gln Gln Tyr Ile Arg
 355 360 365

 Thr Tyr Gly Pro Thr Asn Thr Thr Ile Gln Gln Gln Pro Val Ser Gln
 370 375 380
 Leu Gly Pro Leu Pro Ser Gly Trp Glu Met Arg Leu Thr Asn Thr Ala
 385 390 395 400
 Arg Val Tyr Phe Val Asp His Asn Thr Lys Thr Thr Thr Trp Asp Asp
 405 410 415
 Pro Arg Leu Pro Ser Ser Leu Asp Gln Asn Val Pro Gln Tyr Lys Arg
 420 425 430
 Asp Phe Arg Arg Lys Val Ile Tyr Phe Arg Ser Gln Pro Ala Leu Arg
 435 440 445
 Ile Leu Pro Gly Gln Cys His Ile Lys Val Arg Arg Lys Asn Ile Phe
 450 455 460
 Glu Asp Ala Tyr Gln Glu Ile Met Arg Gln Thr Pro Glu Asp Leu Lys
 465 470 475 480
 Lys Arg Leu Met Ile Lys Phe Asp Gly Glu Glu Gly Leu Asp Tyr Gly
 485 490 495
 Gly Val Ser Arg Glu Phe Phe Phe Leu Leu Ser His Glu Met Phe Asn
 500 505 510

 Pro Phe Tyr Cys Leu Phe Glu Tyr Ser Ala Tyr Asp Asn Tyr Thr Ile

Asn Ala Pro Val Phe Ile Pro Pro Pro Ala Gln Asn Arg Ala Gly Asn
 420 425 430
 Val Asp Gln Asp Glu Gln Asp Phe Gly Ala Ala Val Gly Val Pro Pro
 435 440 445
 Ala Gln Ala Asn Pro Asp Asp Gln Gly Gln Gly Pro Leu Val Ile Asn
 450 455 460
 Leu Lys Leu Lys Leu Leu Asn Val Ile Ala Tyr Phe Ile Ile Ala Val
 465 470 475 480

 Val Phe Thr Ala Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Phe Pro Thr Phe
 485 490 495
 Ile Gly Phe Gly Leu Leu Lys Ile Tyr Phe Gly Ile Phe Lys Val Ile
 500 505 510
 Leu Arg Gly Leu Cys His Leu Tyr Tyr Leu Ser Gly Ala His Ile Ala
 515 520 525
 Tyr Asn Gly Leu Thr Lys Leu Val Pro Lys Val Asp Val Ala Met Ser
 530 535 540
 Trp Ile Ser Asp His Leu Ile His Asp Ile Ile Tyr Leu Tyr Asn Gly

 545 550 555 560
 Tyr Thr Glu Asn Thr Met Lys His Ser Ile Phe Ile Arg Ala Leu Pro
 565 570 575
 Ala Leu Thr Thr Tyr Leu Thr Ser Val Ser Ile Val Cys Ala Ser Ser
 580 585 590
 Asn Leu Val Ser Arg Gly Tyr Gly Arg Glu Asn Gly Met Ser Asn Pro
 595 600 605
 Thr Arg Arg Leu Ile Phe Gln Ile Leu Phe Ala Leu Lys Cys Thr Phe
 610 615 620

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

Phe Ser Leu Phe Val Tyr Trp Thr Ile Gly Thr Leu Tyr Met Tyr Trp
 675 680 685
 Phe Ala Lys Tyr Ile Gly Met Ile Arg Lys Asn Ile Ile Arg Pro Gly
 690 695 700
 Val Leu Phe Phe Ile Arg Ser Pro Glu Asp Pro Asn Ile Lys Ile Leu
 705 710 715 720
 His Asp Ser Leu Ile His Pro Met Ser Ile Gln Leu Ser Arg Leu Cys
 725 730 735
 Leu Ser Met Phe Ile Tyr Ala Ile Phe Ile Val Leu Gly Phe Gly Phe
 740 745 750
 His Thr Arg Ile Phe Phe Pro Phe Met Leu Lys Ser Asn Leu Leu Ser
 755 760 765
 Val Pro Glu Ala Tyr Lys Pro Thr Ser Ile Ile Ser Trp Lys Phe Asn
 770 775 780
 Thr Ile Leu Leu Thr Leu Tyr Phe Thr Lys Arg Ile Leu Glu Ser Ser
 785 790 795 800
 Ser Tyr Val Lys Pro Leu Leu Glu Arg Tyr Trp Lys Thr Ile Phe Lys
 805 810 815
 Leu Cys Ser Arg Lys Leu Arg Leu Ser Ser Phe Ile Leu Gly Lys Asp
 820 825 830
 Thr Pro Thr Glu Arg Gly His Ile Val Tyr Arg Asn Leu Phe Tyr Lys
 835 840 845
 Tyr Ile Ala Ala Lys Asn Ala Glu Trp Ser Asn Gln Glu Leu Phe Thr
 850 855 860
 Lys Pro Lys Thr Leu Glu Gln Ala Glu Glu Leu Phe Gly Gln Val Arg
 865 870 875 880
 Asp Val His Ala Tyr Phe Val Pro Asp Gly Val Leu Met Arg Val Pro
 885 890 895
 Ser Ser Asp Ile Val Ser Arg Asn Tyr Val Gln Thr Met Phe Val Pro
 900 905 910
 Val Thr Lys Asp Asp Lys Leu Leu Lys Pro Leu Asp Leu Glu Arg Ile

915 920 925
 Lys Glu Arg Asn Lys Arg Ala Ala Gly Glu Phe Gly Tyr Leu Asp Glu
 930 935 940
 Gln Asn Thr Glu Tyr Asp Gln Tyr Tyr Ile Val Tyr Val Pro Pro Asp
 945 950 955 960
 Phe Arg Leu Arg Tyr Met Thr Leu Leu Gly Leu Val Trp Leu Phe Ala
 965 970 975
 Ser Ile Leu Met Leu Gly Val Thr Phe Ile Ser Gln Ala Leu Ile Asn

 980 985 990
 Phe Val Cys Ser Phe Gly Phe Leu Pro Val Val Lys Leu Leu Leu Gly
 995 1000 1005
 Glu Arg Asn Lys Val Tyr Val Ala Trp Lys Glu Leu Ser Asp Ile Ser
 1010 1015 1020
 Tyr Ser Tyr Leu Asn Ile Tyr Tyr Val Cys Val Gly Ser Val Cys Leu
 1025 1030 1035 1040
 Ser Lys Ile Ala Lys Asp Ile Leu His Phe Thr Glu Gly Gln Asn Thr
 1045 1050 1055

 Leu Asp Glu His Ala Val Asp Glu Asn Glu Val Glu Glu Val Glu His
 1060 1065 1070
 Asp Ile Pro Glu Arg Asp Ile Asn Asn Ala Pro Val Asn Asn Ile Asn
 1075 1080 1085
 Asn Val Glu Glu Gly Gln Gly Ile Phe Met Ala Ile Phe Asn Ser Ile
 1090 1095 1100
 Phe Asp Ser Met Leu Val Lys Tyr Asn Leu Met Val Phe Ile Ala Ile
 1105 1110 1115 1120
 Met Ile Ala Val Ile Arg Thr Met Val Ser Trp Val Val Leu Thr Asp

 1125 1130 1135
 Gly Ile Leu Ala Cys Tyr Asn Tyr Leu Thr Ile Arg Val Phe Gly Asn
 1140 1145 1150
 Ser Ser Tyr Thr Ile Gly Asn Ser Lys Trp Phe Lys Tyr Asp Glu Ser
 1155 1160 1165
 Leu Leu Phe Val Val Trp Ile Ile Ser Ser Met Val Asn Phe Gly Thr

1170 1175 1180
 Gly Tyr Lys Ser Leu Lys Leu Phe Phe Arg Asn Arg Asn Thr Ser Lys
 1185 1190 1195 1200

 Leu Asn Phe Leu Lys Thr Met Ala Leu Glu Leu Phe Lys Gln Gly Phe
 1205 1210 1215
 Leu His Met Val Ile Tyr Val Leu Pro Ile Ile Ile Leu Ser Leu Val
 1220 1225 1230
 Phe Leu Arg Asp Val Ser Thr Lys Gln Ile Ile Asp Ile Ser His Gly
 1235 1240 1245
 Ser Arg Ser Phe Thr Leu Ser Leu Asn Glu Ser Phe Pro Thr Trp Thr
 1250 1255 1260
 Arg Met Gln Asp Ile Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Ala Leu Glu Ser Phe

 1265 1270 1275 1280
 Thr Phe Phe Phe Gln Ala Thr Val Leu Phe Ile Gln Trp Phe Lys Ser
 1285 1290 1295
 Thr Val Gln Asn Val Lys Asp Glu Val Tyr Thr Lys Gly Arg Ala Leu
 1300 1305 1310
 Glu Asn Leu Pro Asp Glu Ser
 1315
 <210> 17
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E3 MARCH5
 <400> 17
 Met Pro Asp Gln Ala Leu Gln Gln Met Leu Asp Arg Ser Cys Trp Val

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

