(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [7]
A61K 38/00
A61K 45/05

(45) 공고일자 2001년10월23일
(11) 등록번호 10-0291964
(24) 등록일자 2001년03월19일

(21) 출원번호 10-1995-0702130
(22) 출원일자 1995년05월26일
번역문 제출일자 1995년05월26일
(86) 국제출원번호 PCT/GB1993/02438
(86) 국제출원출원일자 1993년11월26일

(65) 공개번호 특1995-0703986
(43) 공개일자 1995년11월17일

(87) 국제공개번호 WO 1994/12202
(87) 국제공개일자 1994년06월09일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 일본, 대한민국, 미국,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

(30) 우선권주장 9224784.0 1992년11월26일 영국(GB)

(73) 특허권자 유니버시티 오브 던디
죠지 데이비드 알 더블유
영국 던디디디14에이치엔

(72) 발명자 레인,데이비드,필립
영국,화이프케이와이1608엔,세인트앤드류스,발물로,매직웰하우스
허프,테오도어,로버트
영국,던디디디21피에이,스코츠우드테라스2

(74) 대리인 나영환
이상섭

심사관 : 조명선

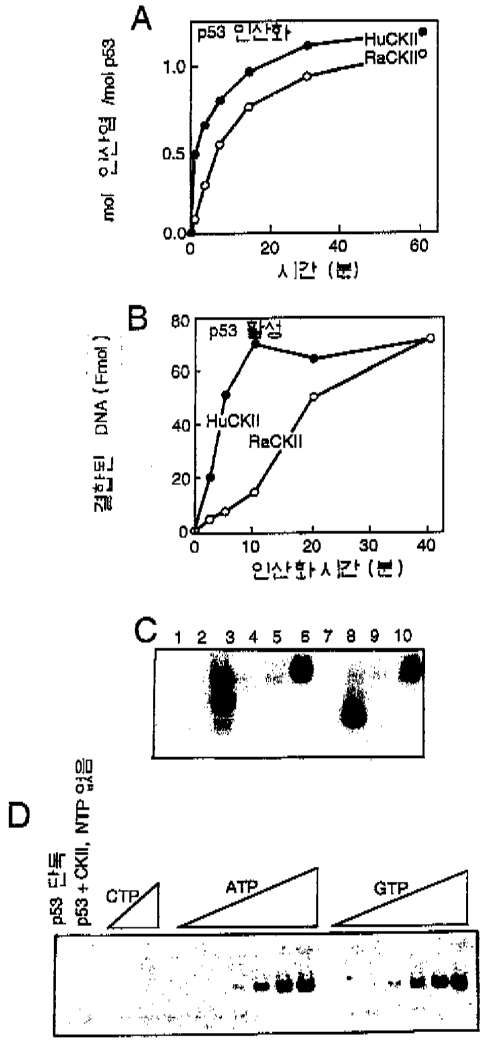
(54) P53단백질의활성화법

요약

본 발명은 카제인 키나제 II에 의한 잠재상태에서 활성화된 상태로의 전환에 결합이 있으나, 특이성 DNA 결합을 위해 단일클론 항체 PAb421 및 열충격 단백질 DnaK같은 리간드의 작용에 의해 활성화되는 능력을 보유하는 p53 단백질의 돌연변이형의 한 종에 관한 것이다. 임의 유형의 종양에서 높은 수준으로 발견되는 이들 단백질의 활성화는 종양 세포의 선택적인 성장 정지 및 고사의 유도를 잠재적으로 초래할 수 있다. 또한, p53은 C-말단의 30개 아미노산의 결손에

의해 구성적으로 활성화될 수 있다. 이 방법 또는 리간드 결합에 의해 활성화된 p53은 종양 또는 세포 성장 억제 목적으로 투여될 수 있다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

p53 단백질의 활성화법

[발명의 분야]

본 발명은 p53 종양 억제 인자 단백질, 구체적으로는 특정 유형의 종양과 관련이 있는 것으로 생각되고, 일반적으로 이러한 종양 세포 내에서 증가된 양으로 발견되는 p53 단백질의 돌연변이형에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 야생형 p53을 구조적 활성형으로 전환시키는 방법을 제시한다.

[발명의 배경]

p53의 돌연변이는 인간의 암에서 매우 흔한 유전자 변형이다[1]. p53 종양 억제 인자 활성의 손실은 G1-S 체크포인트의 손실에 따르는 DNA 손상[2], 게놈불안정성의 증가 및 선택성 유전자 종폭[3,4] 을 동시에 일으키기 쉽다. 또한, p53의 돌연변이형은 우성의 성장 촉진 기능을 획득하는 것으로 보인다[5,6]. 이러한 형질 전환 활성에 관련된 영역은 작은 C-말단 분역(分域; domain)에 편재되어 있다. 야생형 p53 좌위(locus)가 없는 마우스는 정상적으로 발육하나, 높은 빈도로 조직 이상증식이 발생하기 쉬운데[8], 이는 야생형 p53이 정상 발육 및 세포분화를 조절하는 데 불필요하지만, 자발적인 종양 형성을 예방하는 데에는 필수적이라는 것을 나타낸다. 이 자료는 p53의 유전되는 생식세포주(germline) 점 돌연변이가 인간에게 암에 걸리기 쉬운 소인을 초래한다는 사실과 일치한다[9].

야생형 p53 단백질의 양은 DNA 손상제인 미토마이신 C[56], 자외선[10,11] 및 v선 조사[2]에 반응하여 급격히 증가한다. 야생형 단백질의 생화학적 규명에 따르면, p53은 서열 특이적 DNA 결합 단백질[12,13] 및 전사 인자[14-16]로서 작용할 수 있다. 이러한 결과는, 야생형 p53의 기능이 DNA 손상 후에 번역 이후 활성화되어 조절 유전자 생성물의 발현을 조절함으로써 DNA 복구가 가능하다는 모델을 지지하는 것이다[18]. 이들은 DNA 손상에 의한 유도 유전자 gadd45[19] 및 종양원성 숙주 단백질 mdm-2[20]를 포함할 수 있다.

풍부한 단백질 공급원인 단백질 발현 시스템의 사용으로 인하여, 최근에 p53을 생화학적으로 규명하게 되었다. 면역 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제된 p53은 서열 $(Pu)_3C(A/T)(A/T)G(Py)_3$의 인접한 2개의 단량체를 함유하는 모티프를 인식하는 서열 특이적 DNA 결합 단백질로 밝혀졌다[21]. 서열 특이적 DNA 결합의 활성은 SV40 복제 개시점에 결합시키는 p53의 능력[13] 및, 상기 DNA 결합 서열을 보유하는 주형으로부터 시험관내 전사를 활성화시키는 능력[22]에 의해 확인된다. p53의 돌연변이형은 비특이적 DNA 결합[23], 서열 특이적 DNA 결합[21] 및 전사 활성화[14]에 결함이 있으며, 이는 이러한 활성이 일반적으로 종양형성을 억제하기 위해 필요하다는 것을 시사하는 것이다.

핵 DNA 결합 단백질의 인산화는 유전자 발현이 외부 신호에 반응하여 조절되는 효과적인 기작이다[24]. 단백질 인산화 효소에 의한 p53의 다-위치 인산화[25-27] 는 종양 억제 인자의 활성이 복잡한 시그날 트랜스덕션(Signal transduction) 경로에 의해 엄격히 조정될 수 있다는 것을 시사하고 있다.

카제인 인산화 효소 Ⅱ(CasKⅡ)는 전사 인자 및 DNA 결합 단백질을 비롯하여 광범위한 기질을 인산화하는 보존성이 높은 칼슘 및 뉴클레오티드 비의존성 효소이다[28]. 인산화 효소의 활성은 각종 변이 유발 물질 및 성장 인자에 노출된 세포에서 자극된다[29]. 마우스[25] 및 인간의 p53[17] 은 시험관내에서 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의해 C-말단의 2번째 아미노산에서 인산화된다. 마우스 p53의 보존성이 높은 C-말단의 세린 잔기를 알라닌으로 돌연변이시키면, 포유동물 세포에서 단백질의 성장 억제 기능이 상실되며, 이는 상기 위치에서의 인산화가 p53의 종양 억제 인자 기능을 활성화시키기 위해 필요한 하나의 중요한 변형이라는 것을 시사하는 것이다[30]. 생화학적 및 생리학적 자료에 기초하여, 카제인 인산화 효소 Ⅱ는 P53 활성의 직접적이고 양성적인 조절에 관련된, 유일하게 공지된 효소이다.

p53 활성의 조절을 이해하는 단계는 형질 전환된 세포에서 단백질의 종양억제 활성을 복원하도록 고안된 치료 계획의 개발에 있어서 중요한 단계이다. 시험관내 시스템을 이용하여, 야생형 p53 활성이 바이러스 종양 유전자, T-항원[22] 및 숙주에 결합된 종양 유전사 mdm-2[31]에 의해 시험관내에서 음성적으로 조절된다는 것은 이미 확인되었다.

서열 특이성 DNA 결합은 종양 억제 인자 기능을 위해 필요한 p53의 한가지 활성으로 생각된다. 현재까지, p53의 모든 돌연변이형, 예컨대 돌연변이 다발점 (hotspot) 대립 유전자에 의해 암호화되는 돌연변이형, His175, Trp248 및 His273은 서열 특이성 DNA 결합[21] 및 그것의 공통(consensus) DNA 결합 위치[14] 를 보유하는 주형으로부터의 전사 활성화에 결함이 있는 것으로 밝혀졌다.

[발명의 요약]

p53의 효소적 조절은 DNA 손상에 대한 p53 반응을 시그널 트랜스덕션 경로에 결합시키는 기본 골격을 제공하여 궁극적으로 성장을 조절할 수 있다. 상기 단백질의 활성에 대한 p53 인산화의 효과를 연구하기 위해서, 본 발명자들은 종래의 크로마토그래피법을 사용하여 박테리아로부터 변형되지 않은 재조합 p53을 정제하고, 그것이 서열 특이성 DNA 결합을 위한 잠재능이 있는 다량체 단백질임을 확인하였다[17] . C-말단 30개 아미노산 내의 모티프는 이 분역의 결실이 구조적으로 p53을 활성화하기 때문에, p53 기능을 음성적으로 조절한다. 토끼 근육 카제인 인산화 효소II, 단일클론 항체 PAb421 및 대장균(E, coli) Hsp70을 비롯하여 p53 활성화 단백질 세트는 상기 C-말단 분역을 표적화한다. 따라서, 본 발명자들은 서열 특이적 DNA 결합 활성이 잠복되어 있지만, 카제인 인산화 효소 II [17] 를 비롯한 효소 및 단백질에 의하여, 그리고 C-말단 결실에 의해서도 상기 활성이 발현될 수 있음을 확인하였다.

p53이 카제인 인산화 효소 II에 의해 양성적으로 조절된다는 관찰에 기인하여, 본 발명자들은 p53의 일부 돌연변이형이 잠재 상태에서 활성화 상태로 전환시의 결함으로 인해 DNA 결합을 불활성화시키는지 측정하기 위한 시도를 행하였다.

통상의 "다발점(hotspot)" 대립 유전자에 의해 암호화되는 p53의 돌연변이형을 정제하여, 그의 활성을 생화학적 수준에서 규명하였다. 본 발명자들이 밝혀낸 바로는, His273 및 Lys285 대립 유전자에 의해 암호화되는 p53의 2개의 돌연변이형은 서열 특이적 DNA 결합에 본질적인 결함이 있는 것이 아니라, 잠재 상태로 존재하는 것을 선호하는 것으로 보인다.

단일 클론 항체 및 대장균 DnaK는 상기 p53 돌연변이형에 의해 서열 특이적 DNA 결합을 촉진할 수 있으나, 가장 유효한 생리적 활성 인자인 카제인 인산화 효소 II는 DNA 결합 기능을 효과적으로 밝힐 수 없다.

따라서, 성장 조절 효소 카제인 인산화 효소 II에 의해 번역 이후에 변형된 후 DNA 결합에 결함이 있는 새로운 생화학적 부류의 p53 돌연변이형을 확정하였다. 잠재 상태에서 활성화 상태로의 전환에 결함이 있는 이러한 부류의 돌연변이 p53은 돌연변이 p53의 종양 억제 인자 기능을 재활성화하고, 따라서 종양 세포 내에서 선택적인 성장 정지 및 고사의 유도를 효과적으로 이끌어내는 능력을 보유하는 분자를 작제(作製)하기 위한 본 발명자들의 표적이었다[32,33] .

본 발명의 제1 양태는 (ⅰ) 종양 내에서 높은 수준으로 발생하고, (ⅱ) 종양 성장을 실질적으로 억제하지 않으며, (ⅲ) 카제인 인산화 효소 II에 의해 매개되는 인산화에 의해 실질적으로 활성화되지 않는 특성을 갖는 돌연변이 p53 단백질에 결합하는 리간드의 작용에 의하여 특이적 DNA 결합용 돌연변이 p53 단백질을 활성화시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

돌연변이 p53은 C-말단 30개 아미노산 외부에 야생형 p53의 아미노산 치환을 수반하는 것 같다. 예를 들어, 통상 his273 및 lys285를 생성하는 273 위치 및 285 위치의 양쪽 둘다 또는 그중 하나의 위치에서 치환된 돌연변이가 있다.

활성화는 통상 C-말단 30개 아미노산 내에서 돌연변이 p53에 결합하는 리간드의 작용에 의해 매개된다. 적절한 리간드는 단일 클론 항체 PAb421 또는 박테리아 열충격 단백질 DnaK이지만, 이러한 활성화는 돌연변이 p53의 동일 위치에 효과적으로 결합하는 리간드에 의해서 매개될 수 있다. 이러한 등가 리간드는 PAb421 또는 DnaK의 결합 펩티드 단편을 포함하거나, 또는 이것의 분자 "의형(mimetic)"일 수 있다.

알려진 약학적 활성 화합물에 대한 의형을 고안해내는 것은 "유도" 화합물에 기초하는 약제의 개발에 대한 공지된 접근 방법이다. 전형적으로, 리간드의 3차원 구조 및 수용체에 대한 결합은 통상 컴퓨터를 이용하여 모델화하고, 대체 분자는 동일하거나 등가인 결합 영역을 보유하는 리간드에 대하여 고안되었으나, 여러 관점에서 원래의 리간드와 현저히 다를 수가 있다. 예를 들어, 원래의 리간드는 단백질 또는 펩티드이지만, 그 의형은 수용체 결합 위치에서 원래의 리간드의 상응하는 부분과 동일한 종류의 특성, 예를 들어 크기, 전하량, 소수성 등이 있는 원자 또는 기들을 보유하나 골격이 상당히 다른 비(非)펩티드 분자일 수도 있다. 이 방법에 있어서, 원래의 리간드와 동일한 결합 및 약리적 작용을 수행하는 의형을 고안할 수 있으나, 예컨대 약제로서 제조 및 제형화하는 것이 더 용이하다.

본 발명의 제2 양태는, (ⅰ) 종양 내에서 높은 수준으로 발생하고, (ⅱ) 종양 성장을 실질적으로 억제하지 않으며, (ⅲ) 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의해 매개되는 인산화에 의해 실질적으로 활성화되지 않는 특성을 갖는 특이적 DNA 결합용 돌연변이 p53을 활성화시키는 약학적 조성물을 제공한다.

상기 조성물은 돌연변이 p53에 결합하여 활성화시킬 수 있는 리간드와 적합한 부형제를 포함한다.

상기 조성물에서 적절하게 사용되는 리간드는 전술한 특성이 있다.

본 발명의 또 다른 양태는, 종양 또는 세포 성장 억제와 같이 치료 목적을 위한 구조적으로 활성화한 야생형 p53 또는 돌연변이 p53의 사용 방법을 제공하는 것이다. PAb421 또는 DnaK와 같은 리간드의 결합, 또는 C-말단 영역, 전형적으로 전장(全長) 분자의 C-말단의 30개의 아미노산의 결실에 의해 구조적으로 활성화 할 수 있는데, 효과를 얻기 위해 결실시킬 수 있는 정확한 한계는 물론 통상적인 실험에 의해 결정할 수 있다.

[정의]

PAb421은 공지된 단일 클론 항체 [참조: Harlow 등, J Virol(1981), vol 37, 564~573]이며, 미국 뉴욕주에 소재한 온코젠 사이언시스(Oncogene Sciences)에서 시판한다. PAb는 p53의 C-말단 영역 내의 아미노산 모티프 SKKGQS TSRHK에 결합한다는 것이 발견되었다. PAb421은 상기 모티프에 결합하고 돌연변이 p53을 활성화하기 위해 PAb421과 경쟁할 수 있는 천연 또는 합성의 기타 항체, 이것의 결합 단편 또는 비항체 리간드도 포함된다. 동일한 위치를 인식하고 돌연변이 p53을 활성화할 수 있는 또 다른 단일 클론 항체는 PAb122 [참조: Gurney 등, J Virol(1980), vol 34, 752-763]인데, 이것은 기탁 번호 ATCC TIB 116으로 ATCC를 통해 입수할 수 있다.

DnaK는 공지된 단백질 [참조: Huang 등, J Biol Chem(1991), vol 266, 7537~7541]이며 캐나다, 브리티시 콜롬비아주, 빅토리아에 소재하는 스트레스겐 바이오테크놀로지스 코포레이션으로부터 입수할 수 있다. 이는 대장균에서 발련되는 박테리아 열충격 단백질이며, p53의 C-말단 영역에서 아미노산 모티프 RHKKLMFTKTE에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 상기 모티프에 결합하며 돌연변이 p53을 활성화하기 위해 DnaK와 경쟁할 수 있는 천연 또는 합성의 기타 리간드도 상기 용어에 속한다.

DO-1은 공지된 단일클론 항체이다[참조 : Vojtisek 등, J Immunol Meth(1992), vol 151, 237-244].

[도면의 설명]

제1도 : (A) 천연 및 재조합 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의한 p53의 인산화 속도. p53(50 ng)을 재조합 인간 카제인 인산화 효소 Ⅱ(HuCKⅡ; 125 ng) 또는 천연 토끼 근육 카제인 인산화 효소 Ⅱ(RaCKⅡ, MonoQ 분율; 375 ng)를 사용하여 지정 시간 동안(ATP 재생 시스템 및 DNA의 부재하에) DNA 결합용 완충액중에서 30℃하에 인산화시켰다. 반응 생성물을 SDS 겔 전기영동에 의해 분리하였다. 방사능 표지된 p53을 상기 겔로부터 절개하고 방사성 인산염을 섬광 계수기로 정량하였다. 활성은 p53 단량체 1 몰당 삽입된 인산의 몰로 표시한다.

(B) 토끼 근육 카제인 인산화 효소 Ⅱ 또는 재조합 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의한 p53 DNA 결합의 활성 속도. p53(50 ng)을 토끼 근육 카제인 인산화 효소 Ⅱ(RaCKⅡ; MonoQ 분율, 375 ng) 또는 재조합 카제인 인산화 효소 Ⅱ(HuCKⅡ, 125 ng)을 사용하여 지정 시간 동안(ATP 재생 시스템 및 DNA의 부재하에) 30℃에서 인산화 시켰다. 방사능 표지가 된 DNA를 첨가하고 반응물을 0℃에서 5분간 배양시킨 후 겔 전기 영동시켰다. 방사능 표지가 된 p53-DNA 복합체는 포스포이메져 (phosphoimager)로 스캐닝하여 정량하였다. 활성은 (A) 및 (B)에서와 같이 토끼 근육 카제인

인산화 효소 II 또는 재조합 카제인 인산화 효소 II의 다른 양을 사용하여 40분 동안 인산화 시간의 함수로서 50 ng의 p53에 의해 결합된 DNA의 F몰로서 표현한다.

(C) 반응 생성물을 4% 폴리아크릴아미드 겔상에서 전기 영동시켜 분리하였다; 레인 1 (p53 + HuCKII 1.2 ng), 레인 2 (p53 + HuCKII 12.5 ng), 레인 3 (p53 + HuCKII 125 ng), 레인 4-6 (레인 1~3에서와 같지만, DNA 결합 후 DO-1을 첨가함), 레인 7(p53 + RaCKII 37 ng), 레인 8(p53 + RaCKII 375 ng), 레인 9 및 10(레인 8 및 9와 같지만, DNA 결합의 활성후 DO-1을 첨가함).

(D) p53의 활성화시의 ATP의 GTP 전환, 뉴클레오티드를 사용하지 않고 50 ng의 p53 및 천연 카제인 인산화 효소 II 375 ng을 함유하는 완전한 반응물(ATP 재생 시스템 및 DNA를 사용하지 않음)을 조합하였다. 지정된 뉴클레오티드를 첨가하고 30분간 40℃에서 배양하였다. DNA 결합 혼합물의 첨가 후, 반응 생성물을 분석하였다. 좌에서 우로 판독하였다; 레인 1(p53, 1mM ATP 사용), 레인 2(p53 및 CKII, NTP 사용하지 않음), 레인 3-5(p53 및 CKII; 각각 62,250 및 1000 μM의 ATP를 사용), 레인 6-12 (p53 및 CKII, 각각 0.24, 0.97, 3.4, 15, 62, 250 및 100 μM의 ATP를 사용), 레인 13-19(6-12에서와 같지만, ATP 대신 GTP를 사용).

제2도 : 야생형 및 돌연변이 53의 서열 특이적 DNA 결합의 활성화.

활성화 반응은 2 단계이다. 제1 단계에서는 야생형 p53(60 ng) 또는 p53의 돌연변이형(180 ng)을 ATP 및 지정된 활성 단백질과 함께 30℃에서 30분간 배양하였다. 제2 단계에서는, 공통 위치 올리고뉴클레오티드를 상기 반응물에 첨가하여 서열 특이적 DNA 결합에 대해 분석하였다.

(A) PAb421; 레인 1,3 및 5(각각 p53, p53 His273 및 p53 Lys285), 레인 2, 4 및 6 (각각 PAb421 및 p53, p53 His273, 및 p53 Lys 285).

(B) DnaK, 레인 1, 5 및 9(각각 p53, p53 His273 및 p53 Lys285), 레인 2, 6 및 10 (각각 DO-1 및 p53, p53 His273, 및 p53 Lys285), 레인 3, 7 및 11(각각 DnaK와 p53, p53 His273 및 p53 Lys285), 레인 4, 8 및 12 (각각 DnaK와 p53, p53 His273 및 p53 Lys285, 이후 DO-1이 뒤따름)

(C) 카제인 인산화 효소 II ; 레인 1, 5 및 9(각각 p53, p53 His273, 및 p53 Lys285), 레인 2, 6 및 10(각각 DO-1과 p53, p53 His273 및 p53 Lys285), 레인 3, 7 및 11 (각각, 카제인 인산화 효소 II와 p53, p53 His273, 및 p53 Lys285), 레인 4, 8 및 12 (각각 카제인 인산화 효소 II 및 p53, p53 His273 및 p53 Lys285), 이후에 DO-1이 뒤따름). $p53^{*}$은 활성화된 p53-DNA 복합체의 이동을 표시한 것이다.

(D) 야생형 및 돌연변이 p53의 특이 활성, PAb421-활성화 p53(■), DnaK-활성화 p53(□), 카제인 인산화 효소 II-활성화 p53(▩), 야생형, His273 및 Lys285의 특이적 활성을 보여준다.

제3도 : PAb421 및 DnaK 활성화된 p53의 NEM 감도.

(A) PAb421 활성화 p53의 NEM 감도. 전술한 방법에 따라 야생형 p53(60 ng; 레인 2-4), p53 His273(60 ng; 레인 5-7) 및 p53 Lys285 (60 ng; 레인 8-10)의 PAb421 활성화 후 산화 환원제를 첨가하고(DTT; 2 mM 또는 NEM; 1 mM), 30℃에서 10 분간 배양하였다. 레인 1(단백질을 함유하지 않음), 레인 2, 5 및 8(p53's-PAb421), 레인 3, 6 및 9(p53's-PAb421 및 NEM, 이후 DTT가 뒤따름), 레인 4, 7 및 10(p53's-PAb421 및 DTT, 이후 NEM가 뒤따름). 그 후, 반응물을 공통 DNA 올리고뉴클레오티드와 함께 항온 처리하여 전술한 방법대로 서열 특이적 DNA 결합에 대해 분석하였다.

(B) DnaK 활성화 p53의 NEM 감도. 전술한 바와 같이 p53 His273(180 ng; 레인 1-3) 및 p53 (60 ng; 레인 4-6)의 활성화 후, 산화환원제를 가하고 30℃에서 10분간 항온 처리하였다. 레인 1 및 4(p53s), 레인 2 및 5(DnaK 활성화 p53과 DTT 후 NEM을 사용), 레인 3 및 6(DnaK 활성화 p53과 NEM 후 DTT를 사용). 그 후, 공통 DNA 올리고 뉴클레오티드와 함께 항온 처리하여 전술한 바와같이 DNA 결합에 대해 분석하였다. p53*은 활성화 p53-DNA 복합체의 위치를 표시한다.

제4도 : p53△30 DNA 서열 특이적 DNA 결합 활성은 설프하이드릴 변형제에 감응성이 있다. (A) 산화에 대한 p53△30의 감도, 먼저, p53△30(60 ng)을 산화 환원제로 처리하였다. 레인 1(PAb421에 의해 활성화된 전장 p53), 레인 2(p53△30), 레인 3 (p53△30 및 2 mM DTT), 레인 4 (p53△30 및 2 mM DTT, 이후 1mM NEM이 뒤따름), 레인 5(p53△30 및 1 mM NEM 이후 2 mM DTT), 레인 6 (p53△30 및 0.5 mM 디아미드) 및 레인 7 (p53△30 및 0.5 mM 디아미드, 이후 2mM DTT가 뒤따름).

(B) PAb421-활성화된 전장 p53은 디아미드에 의한 가역 산화 반응에 민감하다. 먼저, p53(60 ng)을 전술한 PAb421에 의해 활성화시킨 후 지정된 산화 환원제로 처리하였다. 레인 1-4(각각, 0.1mM, 0.4mM, 1.6mM, 및 5.4mM의 디아미드) 및 레인 5-8(1-4와 같지만 그 후 DTT를 6mM 첨가함). 변형 후, p53을 서열 특이성 DAN 결합에 대해 분석하였다.

제5도 : (A) 엑손 11 내에서의 p53 결합 단백질의 C-말단 결합 부위 [45] 및 (B) 잠재성 또는 활성화 상태에서의 p53 이량체 분자 사이의 평형 이동을 상술한 모델.

(A). 363 내지 393의 30개의 C-말단 아미노산 [46] , 중요한 모티프에는, 고차(高次) 더 높은 정도의 올리고 중합에 요하는 01 분역[38] , CKII 인산화 영역 (--▷) [47] , PAb421 결합 부위 [48] , Hsc70 결합 부위 [36] 및 p53△30의 종점(--▶)[17] 이 있다.

(B). 굵은 화살표는 야생형 또는 돌연변이 p53에 대한 평형상태의 우세한 방향을 나타낸다. 야생형 p53은 카제인 인산화 효소 II, PAb421 또는 DnaK에 의해 활성형으로 효과적으로 전화시킬 수 있다. 활성화 단백질에 의해 변형 후에 일어나는 구조 변화는 PAb421 결합 부위(점각된 장방형 또는 타원)에 이웃하는 C-말단 아미노산과 관련된 DNA 결합 억제를 경감시킨다. 이러한 구조 변화는 서열 특이적 DNA 결합 기능을 활성화시킨다. 야생형 단백질과 대조적으로 활성화 단백질의 존재하에서도 돌연변이 p53은 잠재 상태로 고정될 수 있다. p53과 활성화 단백질의 상호 작용을 도우며, C-말단 내의 구조 변화를 유발하는 조건은 p53의 돌연변이형의 종양 억제 인자 기능을 활성화할 수 있다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명자들은 종양 억제 인자 기능에 필요한 p53의 DNA 결합 활성이 알려져 있지 않으나, p53의 C-말단 조절 분역상에서 작용하는 세포 인자들에 의해 활성화 할 수 있다는 것을 이미 입증하였다[참고 문헌 17; Hupp 등, Cell, Vol 71, 875~886, 1992년 11월 27일]. 겔 이동도 분석으로 재조합 야생형 인간 p53은 약한 특이성으로 DNA 서열에 결합하지만, C-말단 부근의 단일 클론 항체 PAb421 결합은 상기 잠재적 DNA 결합 활성을 화학양론적으로 활성화시킨다는 것을 입증하였다. 또한, p53 DNA 결합은 p53의 30개 아미노산 C-말단 결실(90개의 아미노산을 결실시키면 불활성화함), 전장 p53의 온화한 단백질 분해(트립신 사용), 대장균 DnaK(단백질-단백질 복합체를 파괴함) 또는 카제인 인산화 효소 II(및 p53의 C-말단 위치의 동시 인산화)에 의해 활성화시킬 수 있다. 전술한 모든 것은 상기 후프(Hupp)등의 논문에 더 자세히 기술되어 있으며 본원에 참고 인용할 수 있다.

서열 특이적 DNA 결합의 활성화에 야생형 p53의 번역 후 변형을 연결시키는 시험관내 시스템을 사용하여, p53의 잠재성 DNA 결합 작용에 대한 돌연변이 효과를 조사하였다. 박테리아 발현계로부터 돌연변이형 p53의 정제 및 생화학적 규명은 1조(一組)의 돌연변이체가 야생형 단백질과 기본적 특성을 공유한다는 것을 입증하였다.

야생형 p53과 같이 His273 및 Lys285 대립 유전자에 의해 암호화된 정제 돌연변이는, (ⅰ) 잠재적 다중 단백질 복합체로서 존재하는 것으로 보이며, PAb421 및 DnaK에 의해 활성 DNA 결합형으로 전환될 수 있고; (ⅱ) 천연 p53-DNA 복합체 중의 단일 클론 항체 DO-1에 의해 인식되는 N-말단 에피토프를 발현시키며; (ⅲ) 서열 특이적 DNA 결합을 촉진시키기 위해 반응성 설프하이드릴을 요하고; (ⅳ) 시험관내에서 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의해 효과적으로 인산화한다.

그러나, 상기 2종의 돌연변이 단백질 및 야생형 p53 사이에는 주목할만한 한 가지 차이점이 있다. 돌연변이는 세포 효소 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의한 서열 특이적 DNA 결합의 GTP 또는 ATP 의존 활성화에 대해 심각한 결함이 있다. 야생형 p53이 인산화에 의해 양성적으로 조절되면, 즉 p53 경로[52] 에 카제인 인산화 효소 Ⅱ가 관여하고 있음을 의미하고, 이러한 조절 중 상기 결합이 p53 종양 억제인자 활성의 총체적 손실을 야기할 것이라는 예측은 당연하다. 이 결함은 카제인 인산화 효소 Ⅱ 시그널 트랜드덕션 경로에 혼란을 야기하므로, 인산화 p53는 종양 억제 인자로서 불활성화된다. 세포 형질 전환의 과정중 돌연변이의 선택에 있어서, 다음과 같이 선택할 수 있다. 즉, (ⅰ) 인산화 효소에 의한 번역 후 변형을 방지하는, C-말단내의 카제인 인산화 효소 Ⅱ 인지 부위에서의 p53 돌연변이, (ⅱ) 잠재 상태로 p53을 효과적으로 고정시키는, 음성적 조절 분역의 활성을 강화시키는 엑손 11에서의 우세한 p53 돌연변이, 또는 (ⅲ) 인산화 반응 후 활성화에 면역성을 부여하는 C-말단 영역을 제외한 p53 돌연변이. 본 발명에 예시한 상기 2개의 돌연변이는 후자의 군에 포함된다. C-말단 내에 위치하는 돌연변이는 존재할 수 있으나, 이 영역의 보존성이 높지 않기 때문에, 이 음성 조절 분역 내에서의 돌연변이에 대한 p53 대립 유전자 검색시 거의 주의를 요하지 않는다.

[실험 방법]

[A. 재료 및 방법]

[효소 및 시약]

재조합 인간 야생형 p53과 박테리아 발현계에서 취한 p53△30, p53 특이적 단일 클론 항체들 PAb421 및 DO-1의 정제된 분획물을 전술한 바와 같이 얻었다[17] . Lys285 및 His273 대립 유전자에 의해 암호화한 p53의 돌연변이형들은 야생형 p53에 대하여 전술한 바와 같이 헤파린 세파로스 및 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 박테리아 발현계로부터 정제하였다. 겔 여과시 대략 440 Kd(표준 단백질에 비교)에서 용출되는 돌연변이 p53을 함유하는 분획물은 PAb421에 의해 서열 특이적 DNA 결합에 대하여 활성화할 수 있으며, 센트리콘(Centricon)-30(아메르샴)을 사용하여 0.5 mg/ml로 농축시키고, -70℃에서 냉각 저장하였다. 상기 방법에 의해 정제된 p53의 돌연변이형은 SDS 폴리아크릴아미드 겔에서 쿠마시 블루를 사용하여 염색시키는 경우에 순도가 90% 이상이었다.

대장균 Hsp70 상동물(DnaK)을 간행물에 공개된 프로토콜의 변법에 의하여 과다 생산 균주로부터 정제하였다[49] . MonoQ[49] 로부터 용출시킨 DnaK의 활성 분획물은 10 mM $MgCl_2$를 함유한 완충액 P(10% 글리세롤, 25 mM HEPES(pH 7.6), 0.1 mM EDTA 및 1 mM DTT) 중의 ATP-아가로스 컬럼에 적용하였다. 1.0 M KCl + 10 mM $MgCl_2$를 함유한 완충액 P로 10 컬럼 부피를 세척하고 10 mM KCl + 10 mM $MgCl_2$를 함유한 완충액 P로 5 컬럼 부피를 세척한 후, 결합된 DnaK를 10 mM $MgCl_2$ +5 mM ATP를 함유한 완충액 P로 용출시켰다. ATP 아가로스로부터 용출된 DnaK의 분획물은 2 mM EDTA 및 0.25M KCl을 함유한 완충액 P에 대하여 3℃에서 밤새 투석하였다. DnaK를 0.25M KCl을 함유한 완충액 P에서 평형화된 수퍼로스-12 겔 여과에 의해 추가 정제하였다. NEM과 디아미드는 시그마(Sigma)에서 입수하였다.

[카제인 인산화 효소 Ⅱ의 제공원]

토끼 근육에서 유래한 카제인 인산화 효소 II를 다음과 같이 변형하여 문헌에 기재된 방법[17] 으로 정제하였다. 토끼에서 유래한 근육을 2ℓ의 균질화 완충액(4 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM 벤즈아미딘)에서 분쇄하고 4000xg으로 45분간 원심 분리시켰다. 27.5g의 단백질을 함유한 가용성 상징액을 완충액 P중의 포스포셀룰로오스 수지 200ml에 2시간 동안 회분식(回分式)으로 흡착시켰다. 컬럼을 0.35 M KCl을 함유한 완충액 P로 세척하고, 카제인 인산화 효소 II 활성을 1.2 M KCl과 0.1% 트리톤 X-100을 함유한 완충액 P로 단계적으로 용출시켰다. 포스포셀룰로오스에 흡착시킨 후, 카제인 인산화 효소 II을 함유한 분획물을 헤파린 세파로스 컬럼에 적용하고 0.1% 트리톤 X-100을 함유한 완충액 P중에 0.05 내지 1 M KCl로 선형 구배로 용출시켰다. 활성 분획물을 MonoQ 컬럼에 도포하고 0.1% 트리톤 X-100을 함유한 완충액 P에서 KCl 선형에 의해 구배로 용출시켰다. 활성 카제인 인산화 효소 II는 센트리콘-30을 사용하여 0.75 mg/ml로 농축하고 4℃에서 보관하였다. 인산화 효소 활성을 [17] 에 기재된 바와 같이 p53과 카제인 내로 혼입된 방사능 포스페이트를 분석함으로써 모니터하였다. 카제인과 p53 인산화 효소 활성은 헤파린 세파로스 및 MonoQ 크로마토그래피 후에 일치하였다. 대장균에서 발현된 재조합 인간 카제인 인산화 효소 II 홀로효소(holoenzyme)는 순도가 95%이었는데, 뵈링거 만하임에서 얻었다.

〈올리고뉴클레오티드의 합성 및 이중 기질의 제조〉

20량체 p53 공통 DNA 결합 위치(PG) [22] 와 Hind III 상용성 말단을 함유한 올리고뉴클레오티는 5' AGC TTA GAC ATG CCT AGA CAT GCC TA 3' 및 5' AGC TTA GGC ATG TCT AGG CAT GTC TA 3'이었다. 공통 서열(TL)이 없는 올리고뉴클레오티드는, 5' TAT GTC TAA GGG ACC TGC GGT TGG CAT TGA TCT TG 3' 및 5' GTG CCA AGA TCA ATG CCA ACC GCA GGT CCC TTA GAC A 3' 이었다. 상보성 올리고뉴클레오티드를 하이브드리화하고, 문헌[참조: Maniatis 등, 1982]에 기재된 바와 같이 ^{32}P-γ-ATP로 말단 표지를 붙이고, 4℃에서 저장하였다.

[겔 이동성 변위 분석법을 이용한 p53 서열 특이적 DNA 결합]

20 μl의 반응 용량은 DNA 결합 완충액[20% 글리세롤, 25 mM HEPES(pH 7.6), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mg/ml BSA 및 0.1% 트리톤 X-100]을 함유하였는데, 이것을 PG 방사능 표지된 DNA [별도의 언급이 없는 한, 1~5 ng], 경쟁 DNA(p블루스크립트 II 20~100 ng), 지정량의 p53(분획nIII) 및 지정된 p53-특이적 단일 클론 항체와 혼합하였다. 이어서, 별도의 지시가 없는한 0℃에서 30분간 항온 처리하였다. 반응 생성물을 0.33 × TBE와 0.1% 트리톤 X-100을 함유한 4% 폴리아크릴아미드 겔상에 옮기고, 3℃, 100V에서 15분간 예비 전기 영동시켰다. 전기 영동은 3℃, 200V에서 30 내지 90분간 계속하였다. 상기 겔은 X선 필름에 노출시키기 전에 건조시켰다.

[p53의 인산화 반응]

반응물(10 μl)은 ^{32}P-γ-ATP를 함유하는 100 μM ATP 외에 125 ng의 p53(분획 III)이 보충된 DNA 완충액(DNA 없음)을 함유하였다. 겔 여과 후, 카제인 인산화 효소 II(80 ng)을 첨가하고 30℃에서 지정된 시간 동안 항온 처리한 다음, 반응물을 SDS-PAG 시료 완충액의 첨가로 급속 냉각시켰다. 생성물은 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔상에서 전기 영동에 의해 분리하였다. p53을 쿠마시블루로 염색하여 정위하고, 밴드는 절취하여 액체 섬광 계수기(베크만 LS 1801)를 사용하여 계수하였다.

[카제인 인산화 효소 II 및 DnaK에 의한 p53의 활성화]

반응물(10 μl)은 30 ng의 p53(분획 III), 1 mM ATP와, 0.1 mg/ml 크레아틴 인산화 효소 II 및 20 mM 포스포크레아틴을 함유하는 ATP 재생계가 보충된 DNA 결합 완충액(DNA 없음)을 함유하였다. 지정량의 카제인 인산화 효소 II 또는 정제된 DnaK를 첨가한 후, 반응물을 30℃에서 30분간 항온 처리하였다. 방사능이 표지된 DNA, 경쟁 DNA 및 지정 단일 클론 항체(10 μl)를 함유하는 2배 농축 혼합물을 첨가하고, 21℃에서 10분간 항온 처리하였다. 반응 생성물은 전술한 바와 같이 분석하였다.

[p53의 야생형 또는 돌연변이형의 활성화]

p53의 야생형 및 돌연변이형의 서열 특이적 DNA 결합 기능의 활성화는 하기와 같이 변형시킨 전술한 분석 조건을 사용하여 수행하였다. 20% 글리세롤, 25 mM HEPES(pH 7.6), 0.05% 트리톤 X-100, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml 크레아틴 인산화 효소, 20 mM 포스포크레아틴, 1 mM ATP, 지정량의 야생형 또는 돌연변이 p53 및 지정된 활성화 단백질이 함유된 반응물 10 μl을 30℃에서 30분간 항온 처리하였다. 경쟁 플라스미드 DNA와 함께 El-Deiry[21] 에 의해 정의된 방사성 표지가 있는 공통 DNA 결합 올리고뉴클레오티드(5' AG-CTT AGACATGCCT AGACATGCCT A 3' 및 5' AGCTTAGGCATGTCT AGGCATGTCT A 3')가 함유된 10 μl 분액을 첨가하고, 반응물을 30℃에서 5분간 항온처리하였다. 별도의 지시가 없는 한, PAb421(400 ng), DnaK(2 μg), 카제인 인산화 효소 II(240 ng), 또는 DO-1(400 ng)을 첨가하였다. 반응 생성물은 3℃에서 0.1% 트리톤 X-100과 0.33 X TBE를 함유한 천연 4% 폴리아크릴아미드 겔 중에서 전기 영동하여 분리하였다.

B. 결과

p53의 박테리아 및 포유류 세포 발현은 PAb421, DnaK 또는 카제인 인산화 효소 II 및 제한 트립신 분해 또는 C-말단 결실에 의해 야생형 p53의 활성화와 서열 특이적 DNA 결합을 나타낸다.

이러한 결과 및 실험의 상세한 설명은 본 발명자들의 논문[참조; Hupp 등, [17]]에 제시되어 있다.

[PAb421 및 DnaK에 의한 p53 돌연변이형의 활성화]

최근 야생형의 p53의 잠재 생화학적 표현형의 동정(同定)[17] 은, 일부의 돌연변이 p53이 번역 후 변형에 의한 DNA 결합 활성화의 상대적 결여로 인하여 불활성일 수 있다는 가능성을 지지한다(제5도). 이러한 부류의 돌연변이 p53의 동정은 세포 내에서 카제인 인산화 효소 II 시그널 경로의 중요성에 대한 암시적 증거를 제공하고, 별법(別法)에 따른 번역 후 변형에 의해 재활성화된 종양 억제 인자 기능을 가지는 p53의 부류를 규정한다.

이러한 가능성을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 서열 특이적 DNA 결합 분석에서 돌연변이형 p53의 행동을 조사하였다. His175, Trp248, His273 및 Lys285 대립 유전자들로 암호화된 p53의 돌연변이형은, 야생형 p53에 대해 설명한 바와 같이, 헤파린 세파로스와 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 겔 여과시 약 440 kd의 다(多)단백질 복합체로서 용출된 돌연변이 단백질은 야생형 p53에서 관찰된 것과 유사하였다[17] . 이 결과는 돌연변이가 단량체간의 안정한 결합을 방해하지 아니 하였다는 것을 의미하다.

야생형 p53은 단일 클론 항체 PAb421 (제2a도, 레인 2 대 레인 1)에 의해 활성화하지 않는 한 서열 특이적 DNA 결합을 나타내지 않았다. PAb421은 p53의 C-말단에 결합하여, 음성 조절 분역의 기능을 중화시키는 구조 변화를 유발하는 것 같다(제5a도). His273 및 Lys285 대립 유전자에 의해 암호된 고순도로 정제된 돌연변이형 p53은 DNA 서열에 특이적으로 결합되지 않지만, PAb421에 의한 DNA 결합을 효과적으로 활성화시켰다 (제2a도, 레인 4 및 6 대 레인 3 및 5). 돌연변이 단백질에 대한 특이 활성은 야생형 p53보다 6 내지 8배 더 적다(제2d도 및 하기 표 참조)

[표 1]

활성화 야생형 p53과 돌연변이 p53의 특이 활성

(결합된 DNA(Fmol)/단백질(μg))

p53	PAb421	DnaK	카제인 인산화 효소 II
야생형	166	57	64
His273	55	31	3.8
Lys285	47	14	2.6

p53의 상기 점 돌연변이는 잠복 기능이 활성화될 수 있으므로, 서열 특이적 DNA 결합을 해지하지 못한다는 것이 명백하다. 기타 검토된 2가지 일반적인 돌연변이인 His175 및 Trp248은 이러한 조건하에서 PAb421에 의한 DNA 결합시 활성화할 수 없는데, 이는 잠복 활성이 영구적으로 잠재 상태로 있을 수 있다는 것을 시사하는 것이다(제5b도).

p53은 생체내에서 DnaK 및 Hsc70에 결합할 수 있다. Hsc 70은 망상 적혈구 용해물에서 합성된 p53의 C-말단에 결합하는데[36] , 이는 이러한 군의 단백질이 PAb421 및 카제인 인산화 효소 II와 같은 동일한 분역을 표적으로 한다는 것을 의미한다(제5a도). 본 발명자들은, 이러한 상호 작용은 정제된 재조합 DnaK가 야생형 p53의 서열 특이적 DNA 결합을 활성화시킬 수 있기 때문에, 기능적으로 중요할 수 있다는 것을 발견하였다. His273 및 Lys285 돌연변이 p53은 DnaK에 의해 활성화하여 활성화한 야생형 p53에 대한 이동성이 유사한 생성물을 생성하였다(제2b도, 레인 3, 7 및 11 대 레인 1, 5 및 9), p53의 N-말단에 특이적인 단일 클론 항체, DO-1은 DnaK 활성화 야생형 p53 및 돌연변이 p53(레인 4, 8 및 12 대 레인 3, 7 및 11)을 초변위(supershift) 시킬 수 있었다. DO-1에 의해 결합된 DnaK 활성화된 돌연변이 p53은 열충격 단백질에 의해 활성화 야생형 p53보다 활성이 4 내지 6배 적었다(제2d도). DnaK 활성화 돌연변이 p53 DNA 결합 기능의 보강은 DO-1의 혼입시 발견되었다(제2b도), 활성화 상태이긴 하지만, 돌연변이 p53은 잠재 상태로의 평형화를 선호하고(제5도), DO-1의 혼입은 단백질을 친화성이 높은 DNA 결합 구조로 만드는 것을 도와줄 수 있다.

[p53의 돌연변이형은 카제인 인산화 효소 II의 활성화에 심각한 결함이 있다]

야생형 p53의 활성화에 사용되는 것으로서, 최근에 생리학적 연관성이 가장 큰 제3 단백질은 카제인 인산화 효소 Ⅱ이다. C-말단 카제인 인산화 효소 Ⅱ 인산화 위치는 포유 동물 세포에서 종양 억제 인자 작용에 필요하다[30] . 시험관내에서 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의한 야생형 p53의 공유 결합적 변형은 GTP 또는 ATP의존성이며, p53의 잠복 서열 특이적 DNA 결합 작용을 활성화시킨다(제1도). 야생형 p53이 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의해 효과적으로 활성화하지만, p53의 잠재 돌연변이형(제2c도, 레인 3, 7 및 11 대 레인 1, 5 및 9; 제2d도)은 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의해 매우 낮은 정도로 활성화하는데, 이는 단백질-DNA 복합체를 초변위시킨 DO-1을 첨가한 후에 더 뚜렷하다(레인 4, 8 및 12 대 레인 2), DNA 결합 생성물의 정량 분석으로 카제인 인산화 효소 Ⅱ가 p53의 2가지 돌연변이형의 활성화에서 PAb421보다 20~30배 효과가 적다는 것을 알았다. 돌연변이 단백질은 시험관내에서 카제인 인산화 효소에 의해 야생형 p53과 같이 효과적으로 인산화하였다. 이와 같은 변형은 PAb421에 의해 억제되었으며, 인산화가 야생형 p53에서 관찰되는 바와 같이 C-말단에서 발생되었다는 것을 의미한다.

[p53의 활성화 야생형 및 돌연변이형은 모두 서열 특이적 DNA 결합에 반응성 설프하이드릴을 요한다]

야생형 p53의 독립적인 생화학 분석에 의하여, 야생형 p53은 효과적인 서열 특이적 DNA 결합에 반응성 설프하이드릴을 요한다는 사실을 알게 되었고, p53의 활성화 돌연변이형의 변경된 구조는 상기 생화학적 표현형을 발현시킬 수 있느냐의 여부를 결정하는 것에 관심의 대상이 되었다. PAb421에 의한 p53의 돌연변이형 및 야생형의 활성화 단계에 있어서, 활성화 단계 후에 NEM을 함유하면 서열 특이적 DNA 결합을 억제하였다(제3a도, 레인 3, 6 및 9 대 레인 2, 5 및 8), 야생형 p53을 사용할 경우, 상기 DTT를 포함한 후 NEM을 첨가하면 p53의 PAb421 활성화된 돌연변이형의 DNA 결합 억제를 예방한다(레인 4, 7 및 10 대 레인 3, 6 및 9).

DnaK 활성화 p53 His273 및 야생형 p53을 사용하여 유사한 분석을 수행하였다(제3b도). DnaK에 의한 활성화 후에(레인 2 및 5 대 레인 1 및 4), NEM은 돌연변이형 및 야생형 p53의 서열 특이적 DNA 결합을 억제하는 반면(레인 3 및 6), 과량의 DTT 를 함유하는 대조 반응물은 NEM에 의해 영향받지 않았다(레인 2 및 5), 상기 결과는 산화 환원 기작을 통한 반응성 설프하이드릴기의 번역 후 조절이 p53 기능에 크게 영향을 미친다는 것을 시사하는 것이며, 돌연변이 p53 단백질은 상기 설프하이드릴기가 산화 상태로 존재하려는 경향 때문에 DNA 결합이 없다는 것을 의미한다.

[구조적으로 활성인 p53△30은 DNA 결합에 반응성 설프하이드릴을 요한다]

반응성 설프하이드릴이 p53의 야생형 또는 돌연변이형의 활성화 과정에 일부 검출되지 않은 상태를 필요로 함에도 불구하고, 본 발명자들은 설프하이드릴 변형제의 p53△30 활성에 대한 효과를 연구하였다. 상기 재조합 효소는 서열 특이적 DNA 결합에 대해 구조적으로 활성 상태이며, 이는 비변형 상태에서 활성을 억제하는 음성 조절 모티프를 함유하는 C-말단의 30개의 아미노산이 결실되어 있기 때문이다. NEM 함유물은 상기 단백질의 DNA 결합을 억제하며, 이는 전장 활성화 야생형 p53이기 때문이다(제4a도, 레인 5 대 레인 2~4), NEM과는 달리, 디아미드는 설프하이드릴 잔기를 가역적으로 산화시켰고, 또한 p53△30 활성을 불활성시켰다(레인 6 대 레인 2~4), 디아미드로 산화 처리한 p53△30에 DTT를 첨가하면, 단백질의 기능이 재활되었다(레인 7).

또한, 전장 야생형 p53은 디아미드에 유사하게 응답한다. 디아미드의 함량이 증가된 함유물은 PAb421-활성화 전장 p53의 DNA 결합 활성을 제거시켰다(제4b도, 레인 1~4), 과량의 DTT로 상기 반응물을 차후에 처리하는 것은 디아미드에 의해 촉진된 산화 반응을 역전시켰다(레인 5~8).

[PAb421 및 카제인 인산화 효소 Ⅱ의 위치와 관련한 DnaK 결합용 표적 위치 결정]

p53 C-말단의 30개의 아미노산 영역을 아미노산 잔기 363~393으로 표시한다. 본 발명자들은 p53의 C-말단에서 유

도된 일련의 합성 펩티드를 단백질의 DnaK 활성화와 경쟁하는 능력에 대해 검사하였다. 펩티드의 부재하에 PAb421, DnaK 및 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의한 DNA 결합을 위해 야생형 p53을 우선 활성화시켰다. 펩티드 C379~393은 PAb421 및 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의한 활성화와 효과적으로 경쟁할 수 없었다. PAb421 에피토프에는 상기 펩티드가 결여되어 있어서, p53의 활성화를 방해하지 않을 것으로 예상되었다. 반대로, 500 μM 내지 5 μM 농도의 펩티드 C379-393은 DnaK 활성화를 차단하였다. 펩티드 C369-383은 p53에 의한 PAb421 활성화를 억제하는 반면, p53 결합의 DnaK 또는 카제인 인산화 효소 Ⅱ 활성화를 억제하는 데는 효과가 없었다. 이는 DnaK가 PAb421 에피토프 및 카제인 인산화 효소 Ⅱ 인산화 위치에 인접한 p53 C-말단의 15개의 아미노산을 표적화한다는 것을 암시하는 것이다. 펩티드 C374~388은 펩티드 C379~393과 마찬가지로 DnaK 활성화를 차단하며, 이는 카제인 인산화 효소 Ⅱ 인산화 위치를 비롯한 C-말단의 5개의 아미노산은 DnaK에 의해 인식되지 않는다는 것을 의미한다. PAb421 에피토프를 비롯한 펩티드 C369~383은 DnaK 결합의 중요한 결정기를 제거하였다.

[요약]

본 발명자들은 연구를 통하여 카제인 인산화 효소 Ⅱ에 의한 서열 특이적 DNA 결합 작용의 GTP 또는 ATP 의존성 번역 후 활성화에 결함이 있는 종류의 돌연변이 p53을 동정하기에 이르렀다. 그러나, 상기 돌연변이체는 PAb421 및 대장균 Hsp70(DnaK)을 비롯하여 별개의 단백질에 의해 활성화한 상태로 전환될 수 있다. 이와 같은 전환에는 2 가지 중요한 기준이 필요한 것으로 보인다. 상기 변형은 세포내에서 관련되어 있으며, (ⅰ) C-말단 음성 조절 분역의 중화에 연루된 "활성화" 폴리펩티드(또는 의형)의 특이적이고 친화력이 높은 결합과 (ⅱ) 활성화 상태로 p53을 유지시킬 수 있는 매우 환원된 환경을 포함한다. 단일클론 항체 및 열충격 단백질에 의한 잠복 상태로부터 돌연변이 p53의 활성화는 거대한 치료학적 의미를 내포하고 있다. p53의 종양 억제 인자 작용 및 DNA 결합 활성 사이의 명백한 관련성이 제공될 경우, 상기 결과는 수 많은 종양 세포내에서 다량의 돌연변이 p53이 유효하게 활성화하여 중요한 야생형 기능을 회복할 수 있다는 것을 의미한다.

본 발명의 치료학적 응용은 p53 에 대한 활성화 리간드의 투여, 또는 구조적으로 활성인 p53, 즉, C-말단 30개 아미노산이 결실된 p53의 투여를 포함한다. 후자는 야생형 p53에 대해 Hupp 등의 문헌 [17] 에 개시된 것에 기초하고 있지만, 유사한 효과는 돌연변이 p53을 사용하여 얻을 수 있다. 또한, C-30 결실형이 PAb421 활성화 전장 분자보다 DNA 결합에 대해 활성이 더 클 수 있다는 증거이다.

상기 제제를 직접 투여하는 대신에, 세포에 도입된 암호 유전자, 예컨대 바이러스 벡터로부터 발현시켜 표적 세포 내에서 생성시킬 수 있다(VDEPT 기법의 변형, 하기 참조). 벡터는 처리하고자 하는 특정 세포에 표적화할 수 있거나, 또는 다소 선택적으로 표적 세포내에서 교체되는 조절 인자를 포함할 수 있다.

또는, 제제(구조적으로 활성인 p53 또는 p53 활성화 리간드)는 처리할 세포 내에서 생성된 활성화 제제에 의해 활성 형태로 전환되거나 또는 처리할 세포에 표적화시키기 위한 전구체 또는 형태로 투여할 수 있다. 상기와 같은 형식의 접근 방법은 때때로 ADEPT 또는 VDEPT로 알려져 있는데, ADEPT는 세포 특이성 항체 또는 리간드에 접합시켜 세포에 활성화 제제를 표적화시키는 것을 포함하는 반면, VDEPT는 표적 세포 내에서 바이러스 벡터내의 암호 DNA로부터 발현시켜 효소와 같은 활성화제를 생성하는 것을 포함한다(예를 들어, 유럽 특허 출원 제415731호 및 국제 공개 제90/07936호 참고).

공지된 제형 및 방법에 따라 다양한 치료제 투여 방법을 이용할 수 있다. 통상의 실험에 의해 투여량을 측정할 수 있다. 전술한 바와 같이, 전신에 또는 표적화 부위에 투여할 수 있는데, 후자는 제제를 표적 세포에 직접 투여할 수 있거나, 항체나 세포 특이적 리간드와 같은 표적계(標的系)를 사용할 수도 있다. 표적화가 여러 가지 이유로 인해서 바람직할 수 있다. 예를 들어, 제제가 허용할 수 없는 독성이 있거나, 너무 과다한 투여량을 필요로 하거나, 표적 세포에 유입될 수 없는 경우이다.

정상적인 세포 환경은 p53이 활성을 띠기에 충분할 만큼 환원성이지만(상기 (ii) 참고), 환원제의 투여로부터 상승된 효과가 있을 수 있는데, 이는 본 발명자에 의해 조직 배양물내에서 야생형 p53이 배양 배지에 환원제(디티오트레이톨)를 세포외 첨가하면 활성화할 수 있다는 것이 발견되었다.

참고문헌

하기 문헌들은 본 명세서에서 참고로 인용한 것들이다.

1. Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1992) *Cell* **70**, 523–526.
2. Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R. W. (1991) *Cancer Res.* **51**, 6304–6311.
3. Livingstone, L. R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T. and Tlsty, T. D. (1992) *Cell* **70**, 923–935.
4. Yin, Y., Tainsky, M. A., Bischoff, F. Z., Strong, L. C. and Wahl, G. M. (1992) *Cell* **70**, 937–948.
5. Lane, D. P. and Benchimol, S. (1990) *Genes Dev.* **4**, 1–8.
6. Levine, A. J., Momand, J. and Finley, C. A. (1991) *Nature* **351**, 453–456.
7. Shaulian, E., Zauberman, A., Ginsberg, D. and Oren, M. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5581–5592.
8. Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery Jr, C. A., Butel, J. S. and Bradley, A. (1992) *Nature* **356**, 215–221.
9. Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Nelson, C. M., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A. and Friend, S. H. (1990) *Science* **250**, 1233–1238.
10. Maltzman, W. and Czyzyk, L. (1984) *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1689–1694.
11. Hall, P. A., McKee, P. H., Menage, H. D., Dover, R. and Lane, D. P. (1992) *Oncogene* **8**, 203–207.
12. Kern, S., Kinzler, K., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991) *Science* **252**, 1708–1711.
13. Bargonetti, J., Friedman, P. N., Kern, S. E., Vogelstein, B. and Prives, C. (1991) *Cell* **65**, 1083–1091.
14. Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1992) *Science* **256**, 827–830.
15. Scharer, E. and Iggo, R. (1992) *Nucl. Acids Res.* **20**, 1539–1545.
16. Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E. and Shay, J. W. (1992) *Mol. Cell Biol.* **12**, 2866–2871.
17. Hupp, T. R., Meek, D. M., Midgley, C. A. and Lane, D. P. (1992) *Cell* **71**, 875–886.
18. Lane, D. P. (1992) *Nature* **358**, 15–16.
19. Kastan, M. B., Zhan, Q., El-deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W., Plunkett, B. S., Vogelstein, B. and Fornace Jr, A. J. (1992) *Cell* **71**, 587–597.
20. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. and Oren, M. (1993) *EMBO J.* **12**, 461–468.
21. El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1992) *Nature Genetics* **1**, 45–49.
22. Farmer, G., Bargonetti, J., Zhu, H., Friedman, P., Prywes, R. and Prives, C. (1992) *Nature* **358**, 83–86.
23. Kern, S. E., Kinzler, K. W., Baker, S. J., Nigro, J. M., Rotter, V., Levine, A. J., Friedman, P., Prives, C. and Vogelstein, B. (1991) *Oncogene* **6**, 131–136.
24. Hunter, T. and Karin, M. (1992) *Cell* **70**, 375–387.
25. Meek, D. W., Simon, S., Kikkawa, U. and Eckhart, W. (1990) *EMBO J.* **9**, 3253–3260.

26. Milne, D. M., Palmer, R. H., Campbell, D. G. and Meek, D. W. (1992) *Oncogene* 7, 1361-1370.
27. Lees-Miller, S. P., Chen, Y., and Anderson, C.W. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 6472-6481.
28. Meisner, M. and Czech, M. P. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 474-483.
29. Carroll, D., Santoro, N. and Marshak, D. R. (1988) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 53, 91-95.
30. Milne, D. M., Palmer, R. H. and Meek, D. W. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20, 5565-5570.
31. Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L. and Vogelstein, B. (1992) *Nature* 358, 80-83.
32. Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., Costa, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4495-4499.
33. Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J.J., May, P., and Oren, M. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 1415-1423.
34. Pinna, L. A. (1990) *Biochem. Biophys. Acta* 1054, 267-284.
35. Clarke, C. F., Cheng, K., Frey, A. B., Stein, R., Hinds, P. W. and Levine, A. J. (1988) *Mol.Cell.Biol.* 8, 1206-1215.
36. Hainaut, P. and Milner, J. (1992) *EMBO J.* 11, 3513-3520.
37. Kraiss, S., Quaiser, A., Oren, M. and Montenarh, M. (1988) *J. Virol.* 62, 4737-4744.
38. Sturzbecher, H.-W., Brain, R., Maimets, T., Addison, C., Rudge, K. and Jenkins, J. R. (1992) *Oncogene* 7, 1515-1523.
39. Milner, J. and Medcalf, E. A. (1991) *Cell* 65, 765-774.
40. Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A. J. and Shenk, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12028-12032.
41. Xanthoudaxis, S., Miao, G., Wang, F., E.Pan, Y. C. and Curran, T. (1992) *EMBO J.* 11, 3323-3335.
42. McBride, A. A., Klausner, R. D. and Howley, P. M. (1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7531-7535.
43. Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J. III, and Curran, T. (1990) *Science* 249, 1157-1161.
44. Xanthoudakis, S. and Curran, T. (1992) *EMBO J.* 11, 653-665.
45. Lamb, P. and Crawford, L. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 1379-1385.
46. Soussi, T., Caron de Fromentel, C., and May, P. (1990) *Oncogene* 5, 945-952.
47. Bischoff, J. R., Casso, D. and Beach, D. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 1405-1411.
48. Wade-Evans, A. and Jenkins, J. R. (1985) *EMBO J.* 4, 699-706.
49. Hwang, D.S. and Kaguni, J.M. (1991) *J. Biol. Chem.* 265, 19244-19248.
50. Mutner-Lorillon, O., Cormier, P., Labbe, J., Doree, M., Poulhe, R., Osborne, H., and Belle, R.(1990) *Eur. J. Biochem.* 93, 529-534.
51. Kandror, K., Benumov, A., and Stepanov, A. (1989) *Eur. J. Biochem.* 180, 441-448.
52. Lane, D.P. (1993) *Nature* 362, 386-387.
53. Baudier, J, Delphin, C., Grunwald, D., Khochbin, S., and Lawrence, J.J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11627-11631.
54. Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J., and Prives, C. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 3319-3323.
55. Borellini, F., and Glazer, R.I. (1993) J. Biol. Chem. 268, 7923-7928.
56. Lu, X., Park, S.H., Thompson, T.C., and Lane, D.P. (1992) Cell 70, 153-161.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(ⅰ) 종양 내에서 증가된 수준으로 발생하고, (ⅱ) 종양 성장을 실질적으로 억제하지 않으며, (ⅲ) 카제인 인산화 효소 Ⅱ로 매개되는 인산화에 의하여 거의 활성화되지 않는 특성을 갖는 돌연변이 p53 단백질의 C-말단 30개 아미노산 내에 결합하는 리간드의 작용에 의하여, 특정 염기 서열의 DNA에 결합하는 돌연변이 p53 단백질을 활성화시키는 단계를 포함하는 돌연변이 p53 단백질의 시험관내 활성화 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 리간드는 단일 클론 항체 PAb421 또는 박테리아 열충격 단백질 DnaK, 또는 돌연변이 p53의 동일 위치에 효과적으로 결합하는 리간드인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 돌연변이 p53은 C-말단 30개 아미노산 외에 야생형 p53의 아미노산 치환을 포함하는 방법.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 치환은 273 위치와 285 위치의 양쪽 또는 그 중 어느 하나의 위치에서 이루어지는 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 치환은 His273과 Lys285의 양쪽 또는 그 중 어느 하나를 제공하는 방법.

청구항 6.

(ⅰ) 종양 내에서 증가된 수준으로 발생하고, (ⅱ) 종양 성장을 실질적으로 억제하지 않으며, (ⅲ) 카제인 인산화 효소 Ⅱ로 매개되는 인산화에 의하여 실질적으로 활성화되지 않는 특성을 갖는 돌연변이 p53 단백질의 C-말단 30개 아미노산 내에 결합하는 리간드 및 적절한 부형제를 포함하는, 특정 염기 서열의 DNA에 결합하는 돌연변이 p53 단백질의 활성화에 의한 종양 또는 세포 성장억제용 약학 조성물.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 리간드는 단일 클론 항체 PAb421 또는 박테리아 열충격 단백질 DnaK, 또는 돌연변이 p53의 동일 위치에 효과적으로 결합하는 리간드, 또는 이의 결합 단편 또는 분자 의형(mimetic)인 약학 조성물.

청구항 8.

제6항에 있어서, 상기 돌연변이 p53은 C-말단 30개 아미노산 외에 야생형 p53의 아미노산 치환을 포함하는 약학 조성물.

청구항 9.

제8항에 있어서, 상기 치환은 273 위치와 285 위치 양쪽 또는 그 중 어느 하나의 위치에서 이루어지는 약학 조성물.

청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 치환은 His273 및 Lys285 양쪽 또는 그 중 어느 하나를 제공하는 약학 조성물.

청구항 11.

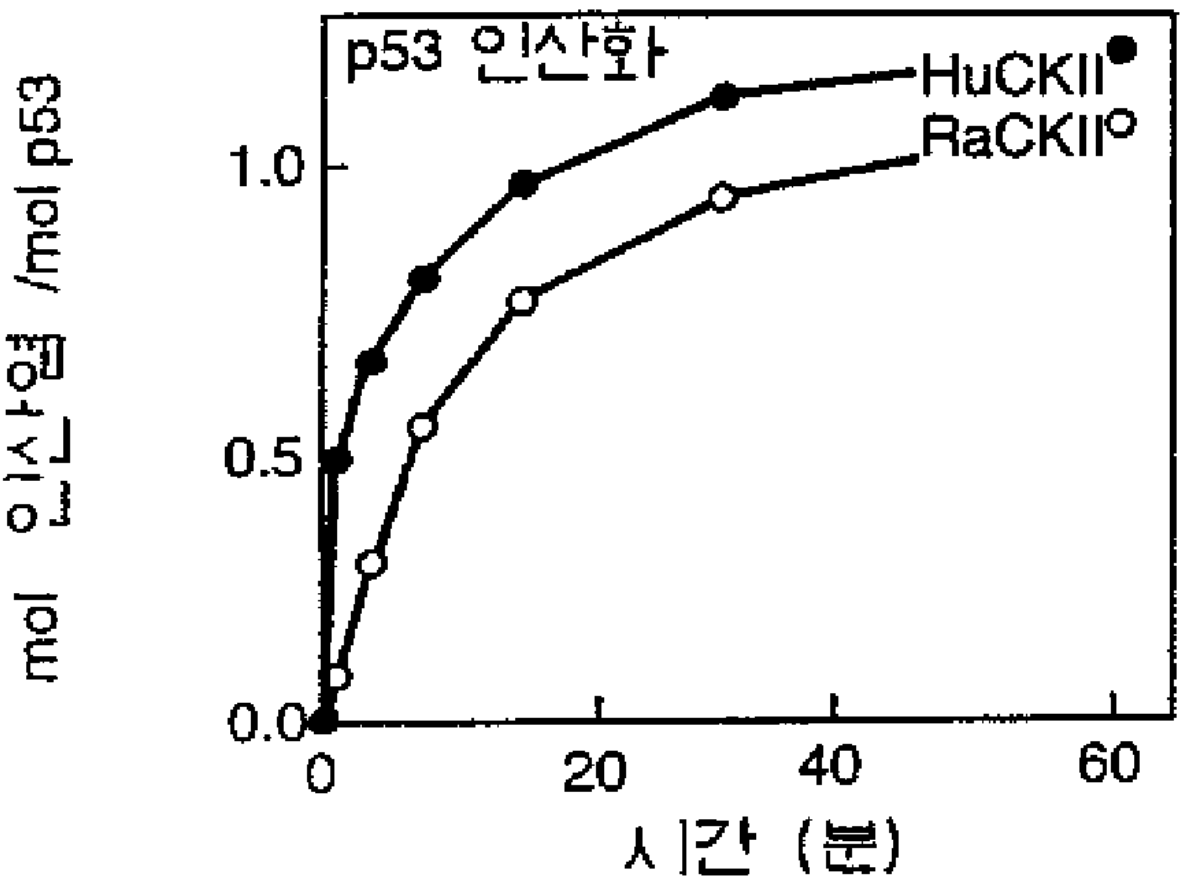
p53을 투여하기 전에 p53의 C-말단 30개 아미노산 내에 리간드의 결합에 의하여 활성화되는 치료용 p53의 활성형.

청구항 12.

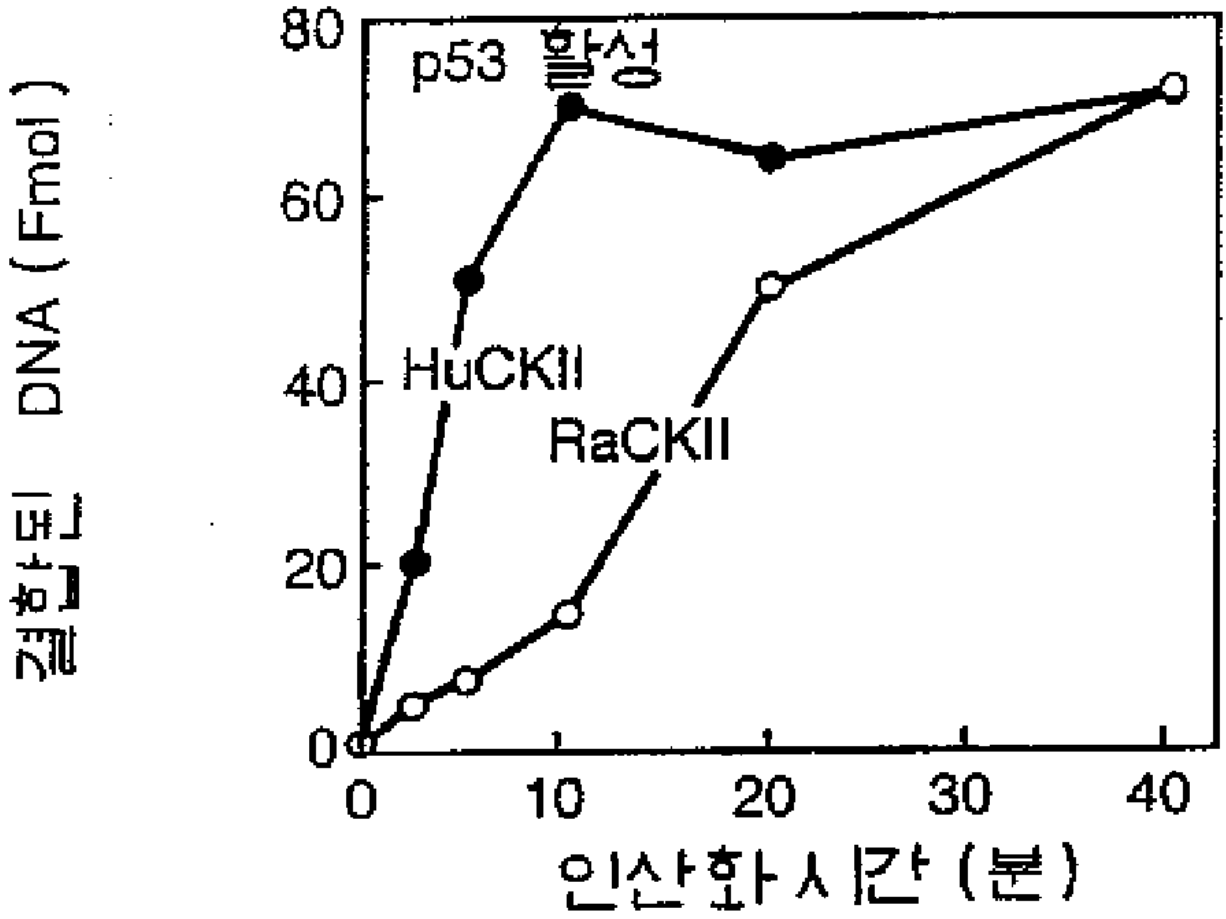
p53을 투여하기 전에 p53의 C-말단 30개 아미노산 내의 결실에 의하여 활성화되는 치료용 p53의 활성형.

도면

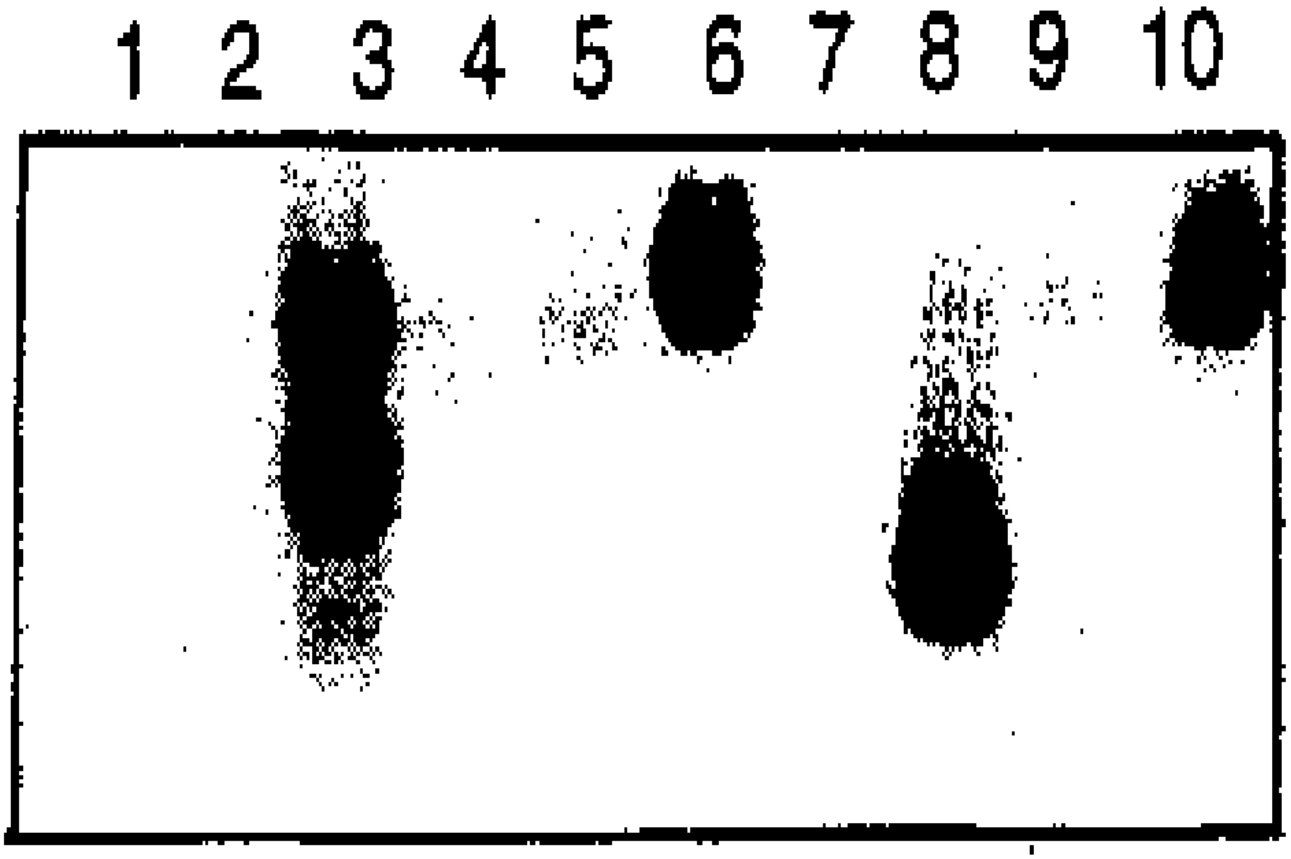
도면 1a



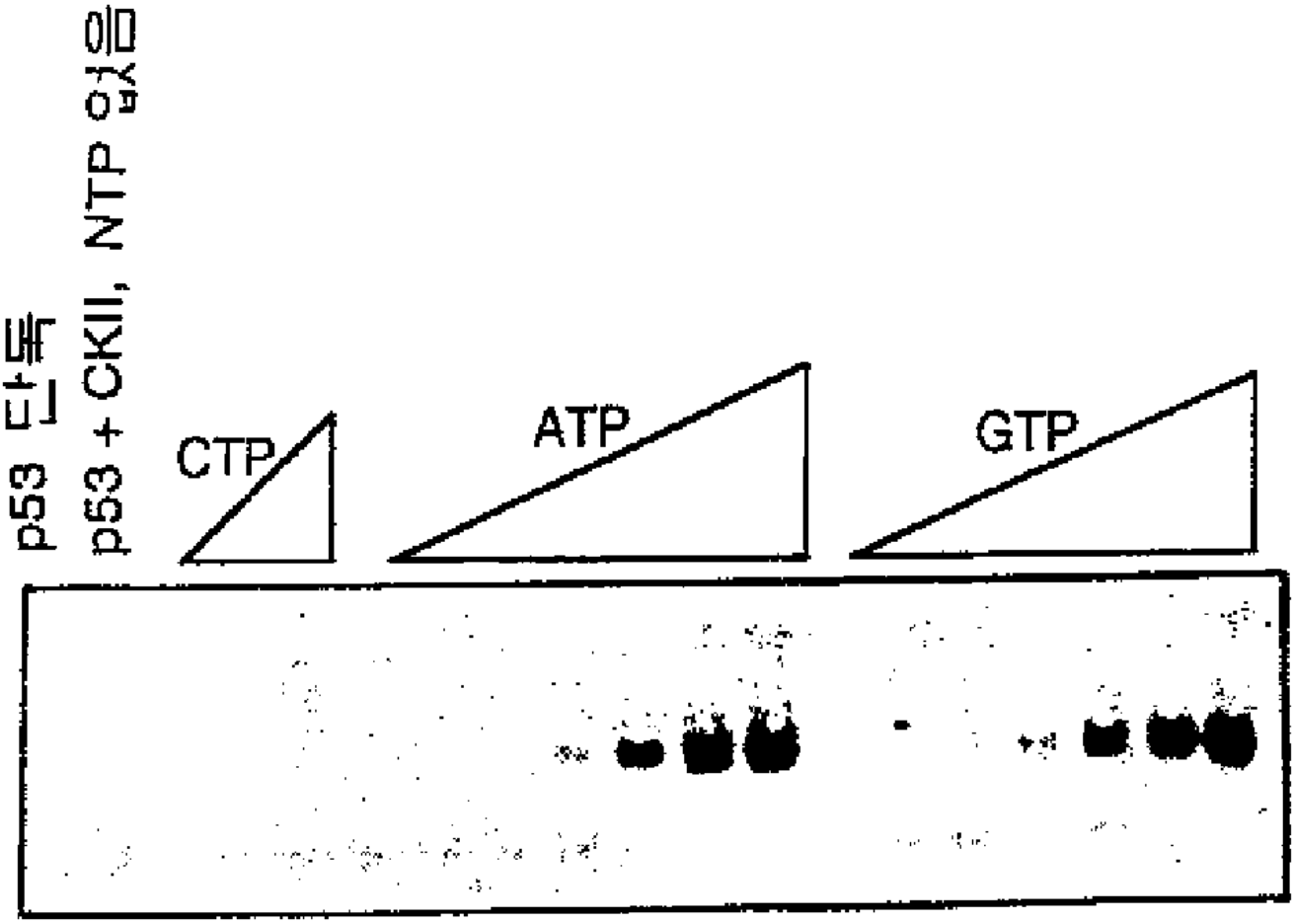
도면 1b


p53 활성
HuCKII
RaCKII
결합된 DNA (Fmol)
인산화시간 (분)
0
20
40
60
80
0
10
20
30
40

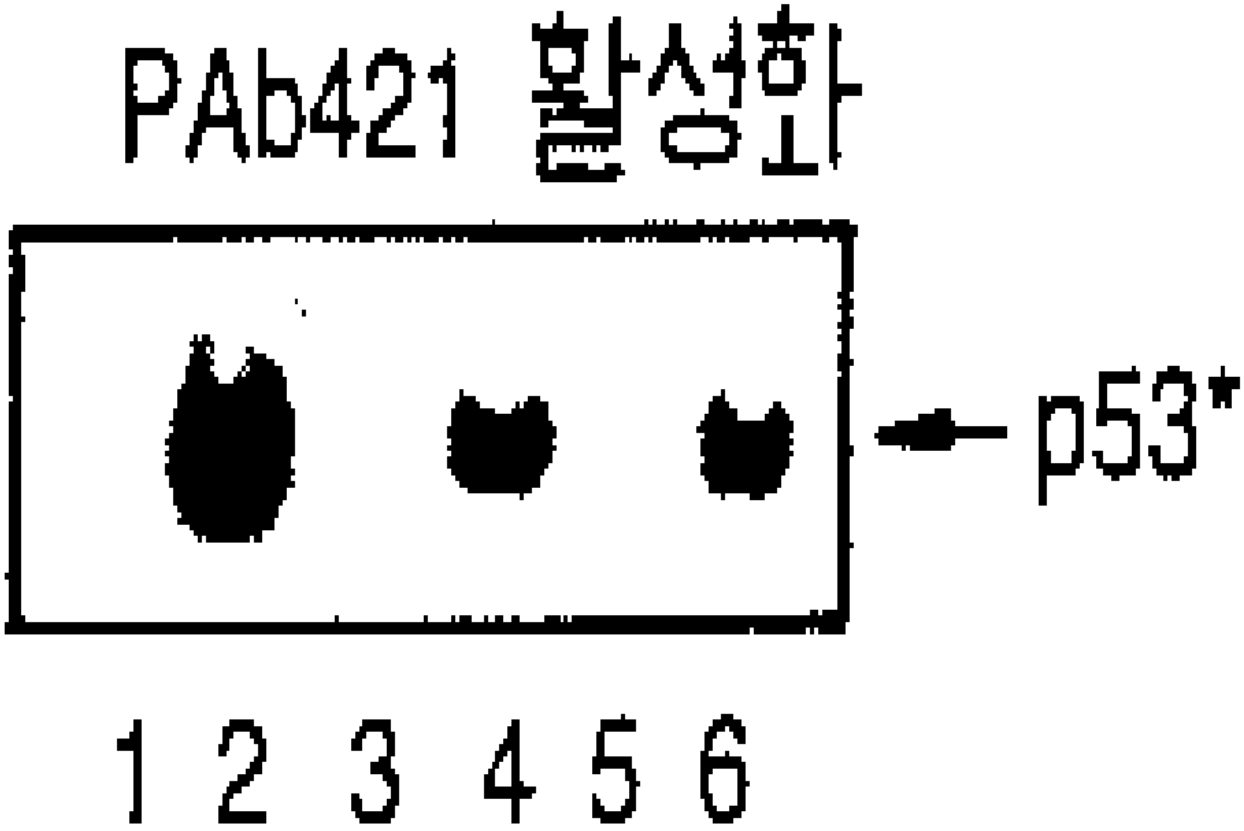
도면 1c



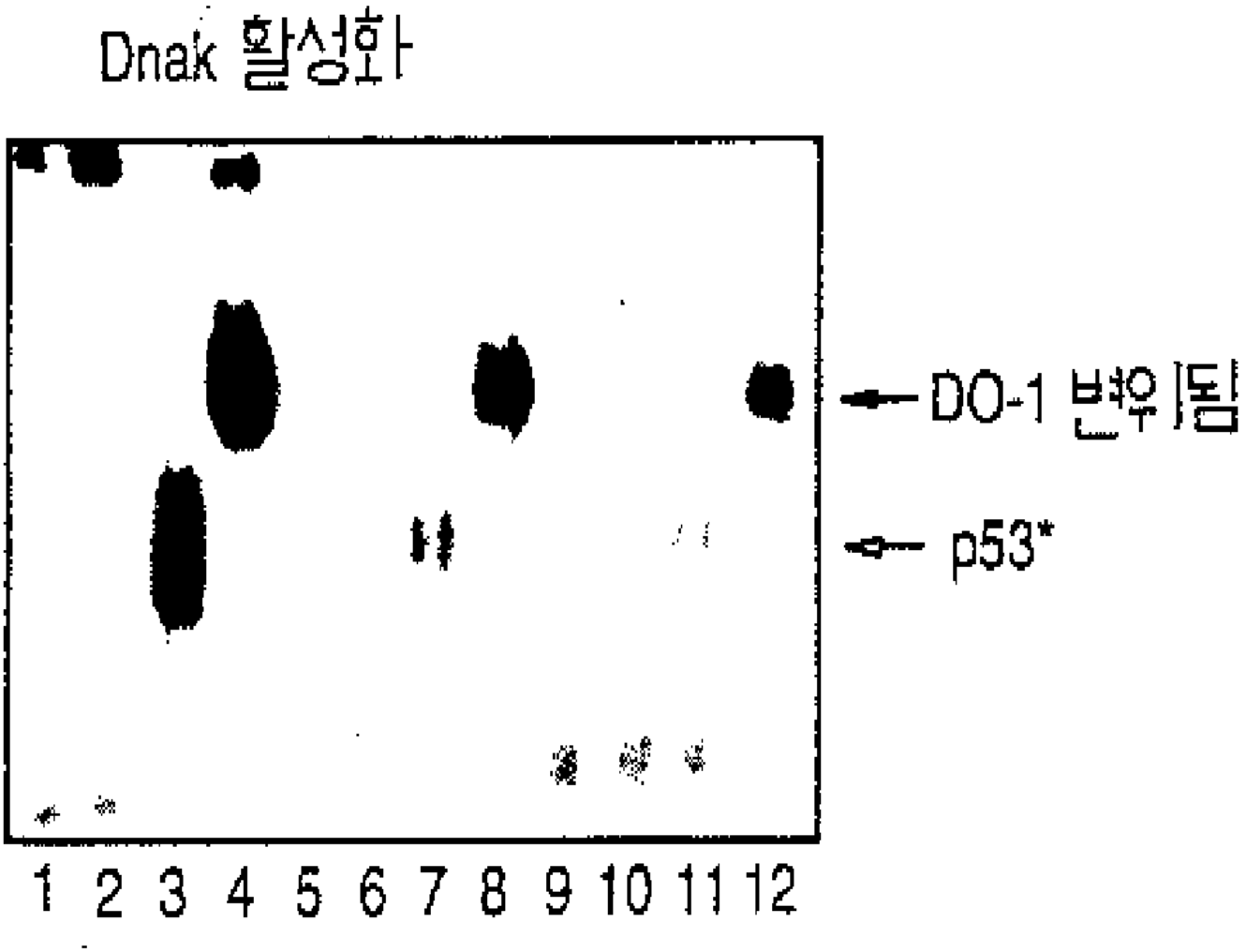
도면 1d



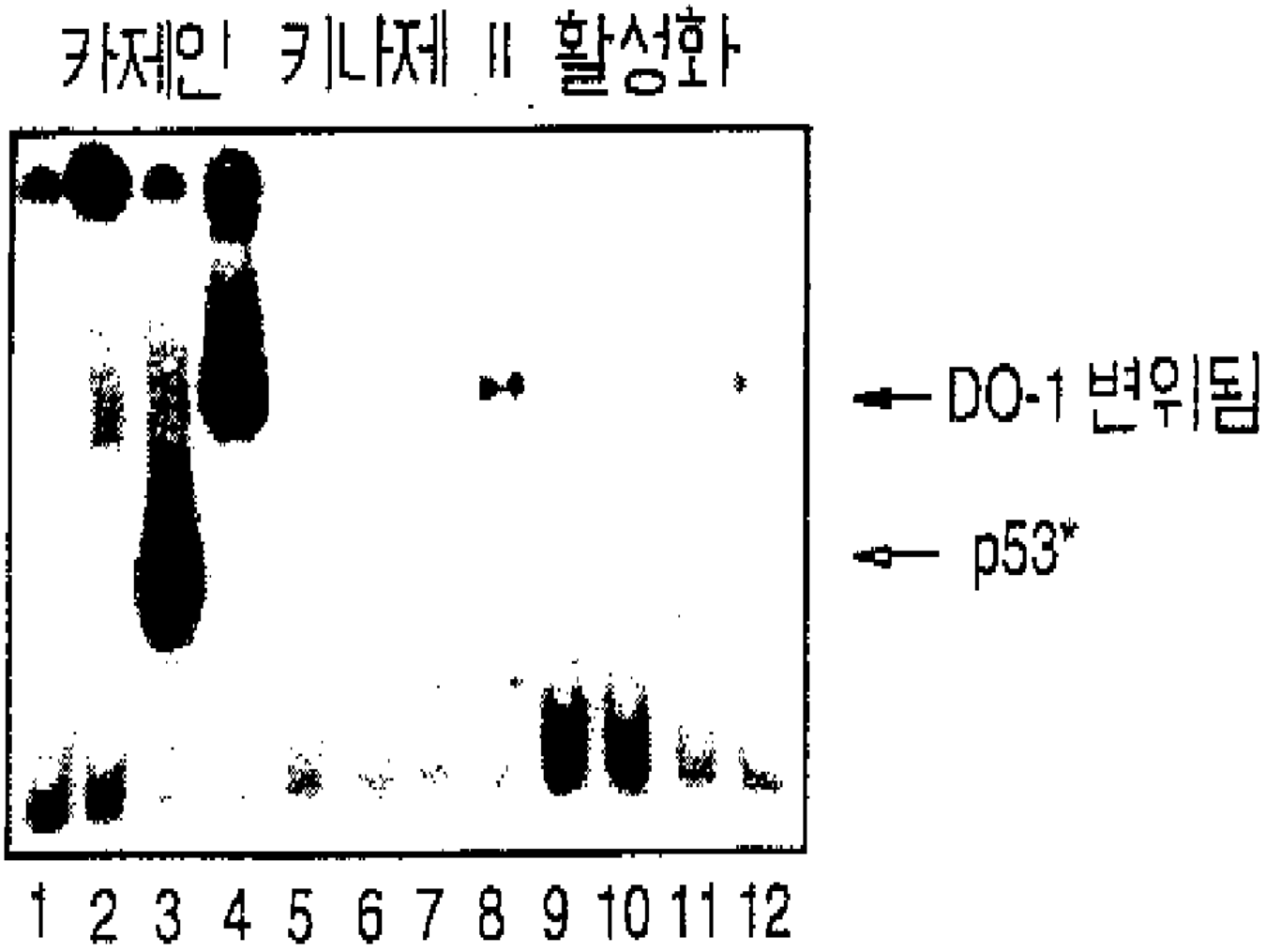
도면 2a



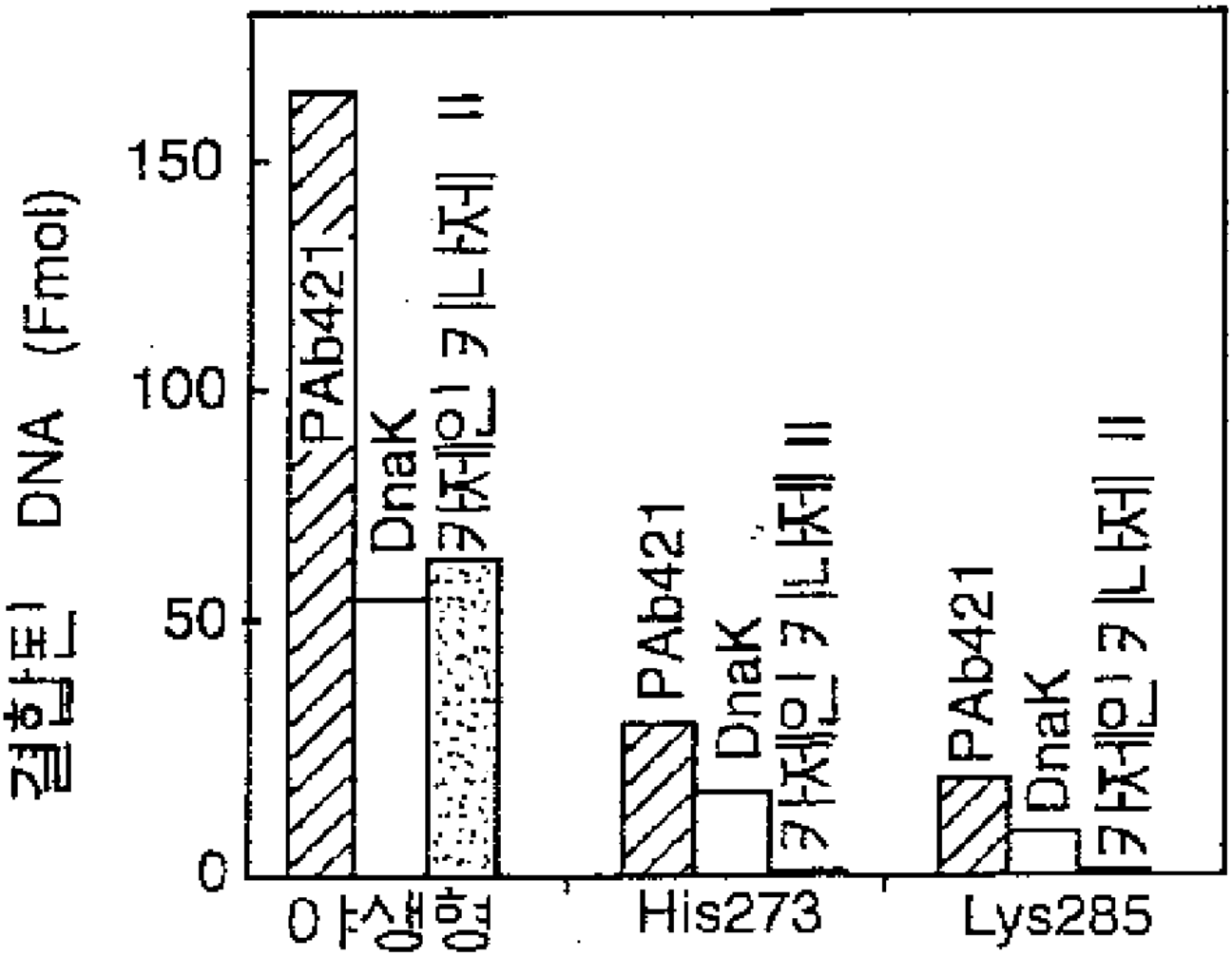
도면 2b



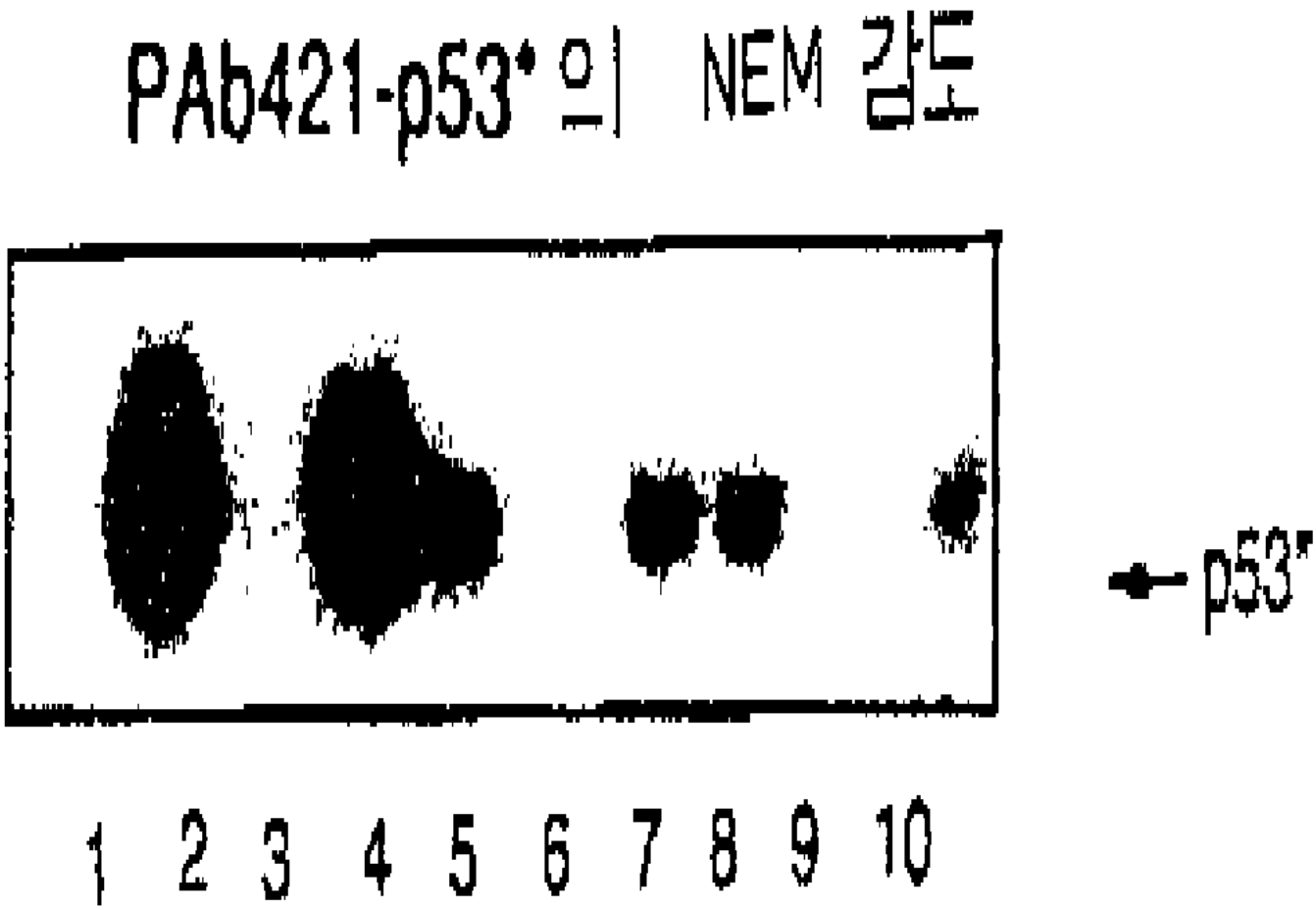
도면 2c



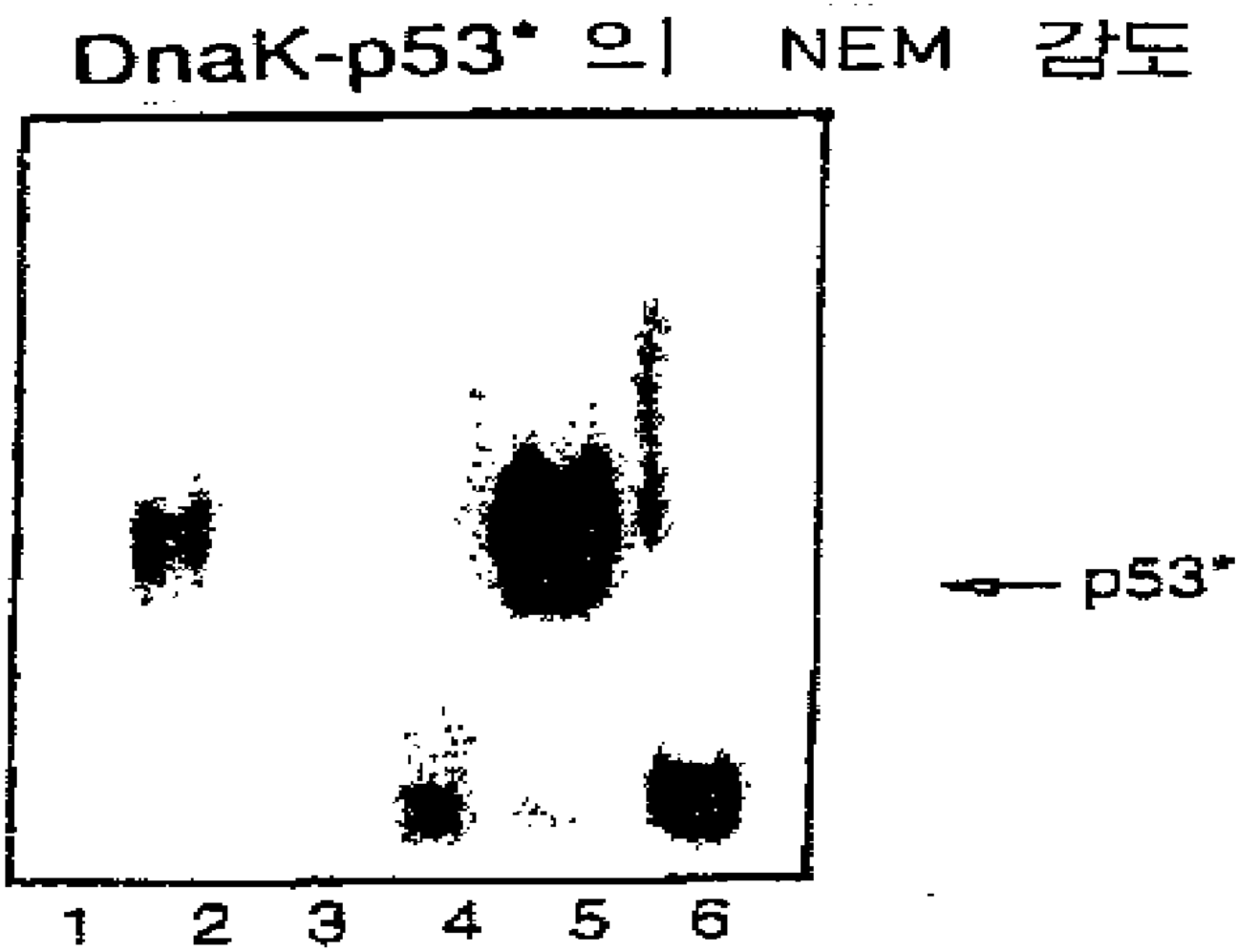
도면 2d


결합된 DNA (Fmol)
150
100
50
0
PAb421
DnaK
카세인 키나제 II
PAb421
DnaK
카세인 키나제 II
PAb421
DnaK
카세인 키나제 II
0 h 상형
His273
Lys285

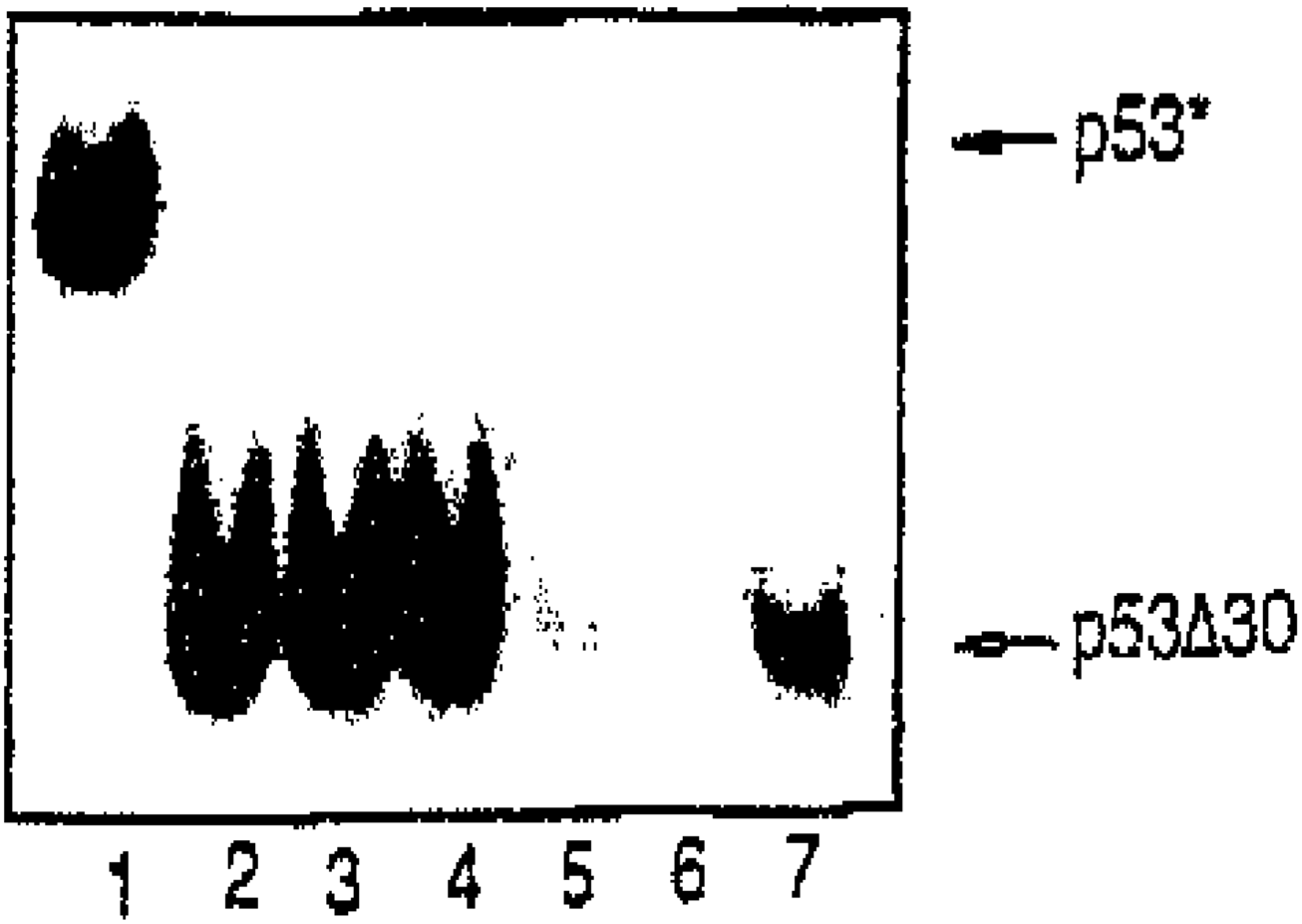
도면 3a



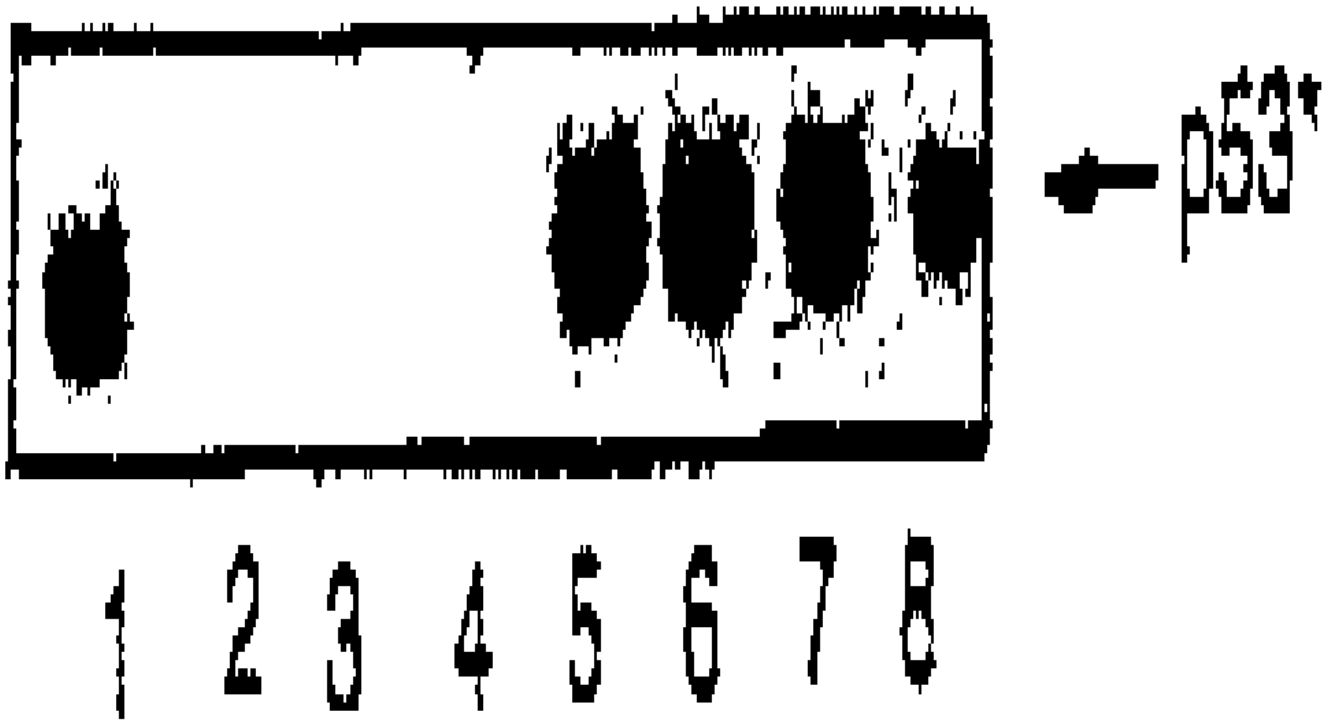
도면 3b



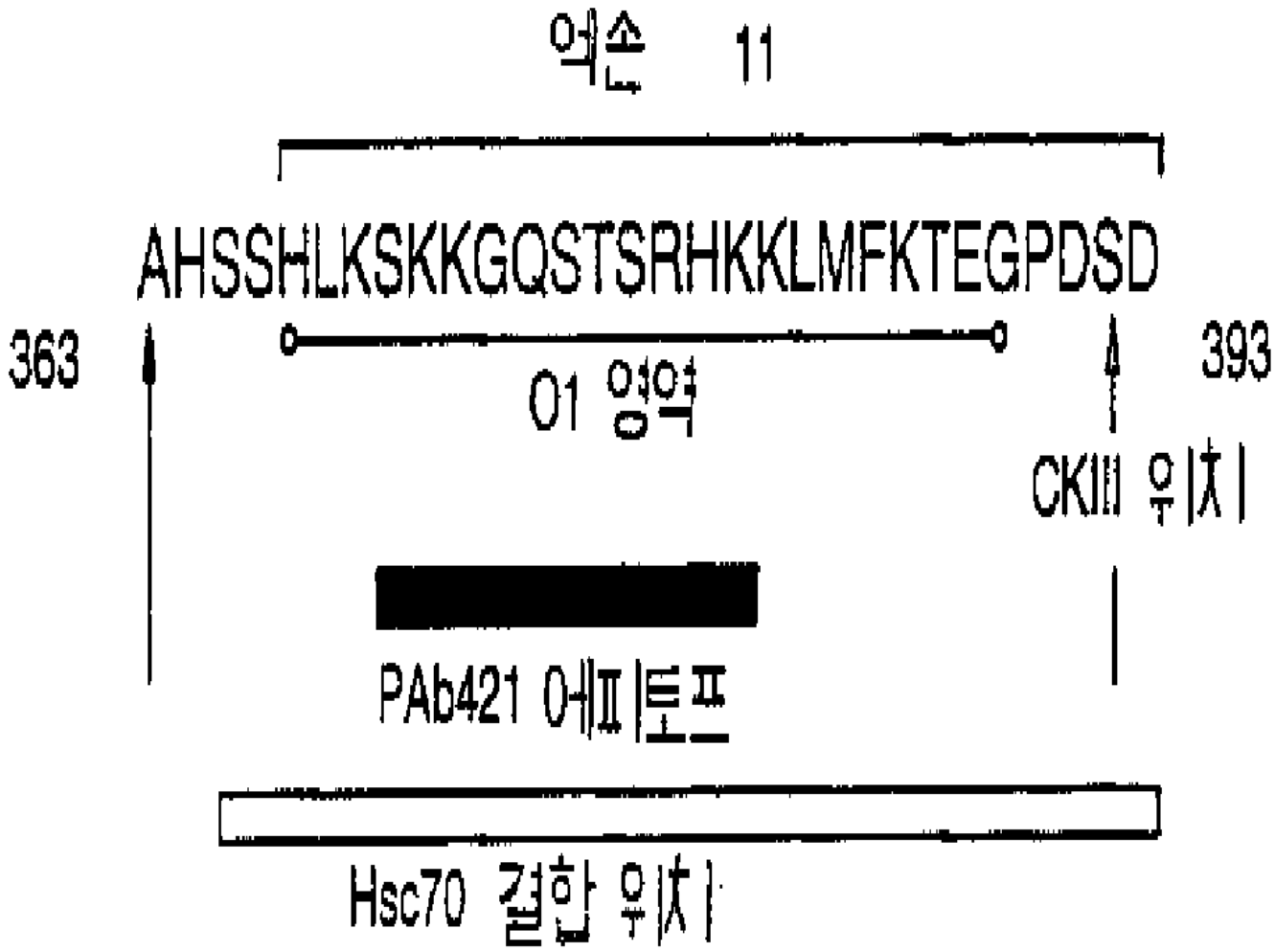
도면 4a



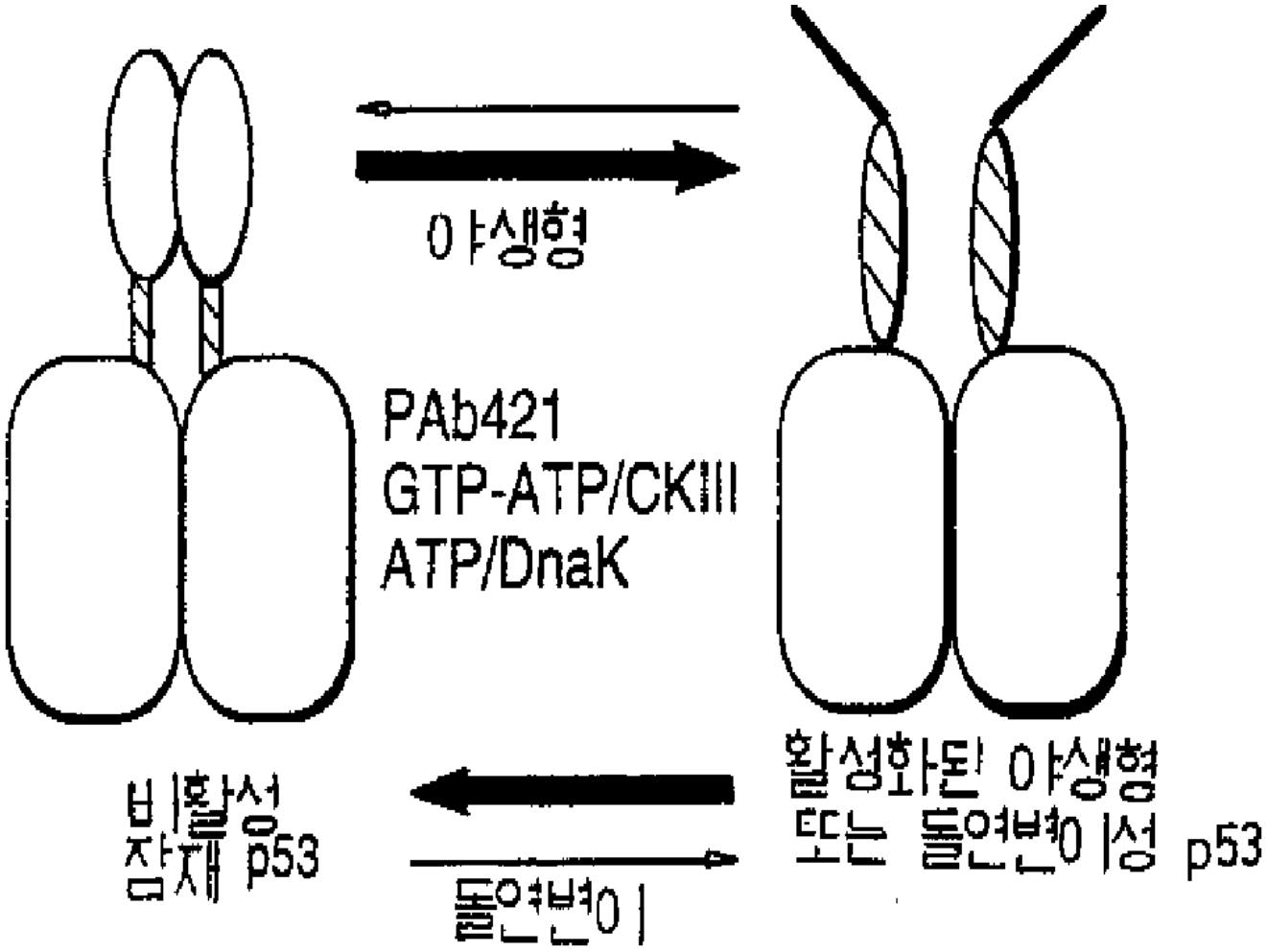
도면 4b



도면 5a


엑손 11
AHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD
363
393
01 영역
CKIII 위치
PAb421 에피토프
Hsc70 결합 위치

도면 5b


야생형
PAb421
GTP-ATP/CKIII
ATP/DnaK
비활성
잠재 p53
활성화된 야생형
또는 돌연변이성 p53
돌연변이