발명의 설명

발명의 명칭: SOX2 특이적으로 결합하는 단일 도메인 항체, 이를 포함하는 융합단백질 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 E3 유비퀴틴 리가제에 의한 SOX2에 특이적으로 결합하는 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이용한 단백질 분해 증진용 융합단백질 및 상기 융합단백질의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 SOX2를 표적으로 하는 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편 및 이의 변이체를 포함하는 융합단백질의 SOX2 매개 질환의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 현재까지 신약은 질병에 대한 표적 단백질의 활성 부위나 리간드 결합 부위를 저해하는 원리로 개발되었다. 약 2만 개의 인간 단백질 중에서 약 3%의 단백질만 FDA 승인을 받은 약물 타겟으로 알려져 있고, 대부분의 질병 표적 단백질에 해당하는 약 3,100 여개(16%)의 단백질은 현재의 신약개발 기술 적용이 불가능한 것으로 간주되고 있다. 또한 기존의 활성부위 지향성(active site-directed) 신약의 경우 종종 약물 내성에 대한 문제점이 보고되고 있다.

[3] 프로탁(proteolysis-targeting chimera, PROTAC)은 질환의 원인이 되는 단백질에 결합하여 프로테아좀을 통한 단백질 가수분해를 유도하는 이중 결합 분자이다. 프로탁은 세포가 단백질을 분해하기 위해서 사용하는 내재적인 단백질 분해 기작인 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(ubiquitin-proteasome system, UPS)을 사용함으로써 기존 기술로 분해가 불가능한 단백질의 분해 유도(induced proteolysis)가 가능하다. 따라서, 전통적인 신약기술개발의 한계를 극복하기 위한 새로운 패러다임으로 주목받고 있다.

[4] 프로탁은 2개의 단백질 결합분자로 구성되며, 상기 단백질은 각각 E3 유비퀴틴 리가아제 및 표적 단백질에 결합한다. 상기 결합을 통해 프로탁은 표적 단백질을 E3 리가아제로 근접시켜 유비퀴틴화를 유발한다. 유비퀴틴화는 유비퀴틴-활성화 효소(E1), 유비퀴틴-컨쥬게이션 효소(E2) 및 유비퀴틴 리가아제(E3)에 의해 수행되는 활성화, 컨쥬게이션 및 결합(ligation)의 3단계를 포함한다. 상기 케스케이드의 결과로 유비퀴틴이 표적 단백질에 공유결합하고, 유비퀴틴화된 단백질은 프로테아좀에 의해 분해된다.

[5] 프로탁 기술은 2001년에 처음 개시되었고, 현재 큰 주목을 받으며 관련 기술의 활발한 개발이 이루어지고 있다. 프로탁 약물은 대부분은 저분자 화합물로 이루어져 개발되어왔다. 공지된 프로탁 약물은 매우 유용하지만, 저분자 화합물의 낮은 용해도, 세포 내 투과 저하에 따른 내재된 단백질 분해 효율 저하 및 안전성에

대한 우려를 해결하기 위한 개선이 필요하며, 이러한 문제들을 개선한 프로탁 약물에 대한 필요성이 요구되고 있다.

발명의 내용

기술적 과제

[6] 이에, 본 발명자들은 SOX2(SRY-box transcription factor 2)를 특이적 표적화하여 SOX2의 분해를 유도하는 프로탁을 개발하기 위해 연구한 결과, 신규한 항-SOX2 단일 도메인 항체 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편을 포함하는 융합단백질이 SOX2를 특이적으로 표적화 하여 분해를 촉진하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 서열번호 56, 서열번호 63, 서열번호 69, 서열번호 73, 서열번호 78, 서열번호 82, 서열번호 87 및 서열번호 94로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; 서열번호 58, 서열번호 65, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 79, 서열번호 84 및 서열번호 89로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 60, 서열번호 67, 서열번호 81, 서열번호 85, 서열번호 91 및 서열번호 96으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[8] 본 발명의 다른 측면은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현벡터 및 상기 발현벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.

[9] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 형질전환 세포를 배양하는 단계 및 상기 배양액에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 수득하는 단계를 포함하는 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다.

[10] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 제공한다.

[11] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현벡터 및 상기 발현벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.

[12] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[13] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 융합단백질, 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[14] 본 발명의 또 다른 측면은, 암을 예방 또는 치료하기 위한 상기 융합단백질, 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[15] 본 발명의 항-SOX2 단일 도메인 항체 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질은 SOX2에 특이적으로 결합하여 SOX2를 분해하였다. 상기 융합단백질에 의한 SOX2 분해는 암세포주의 성장 저해 및 세포사멸을 촉진하였다. 또한, 항암제와 상기 융합단백질을 병용 시, 항암제 내성을 나타내는 암세포의 성장을 저해하였다. 나아가, 상기 융합단백질을 종양 마우스 모델에서 종양의 성장을 억제하였다. 따라서, 본 발명의 융합단백질은 암 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 본 발명의 일 구체예로 13종의 항-huSOX2 VHH 항체 클론의 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

[17] 도 2a 및 도 2b는 항-huSOX2 VHH 항체 클론의 huSOX2 단백질에 대한 결합력을 유세포 분석(Flow cytometry)을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[18] 도 3은 항-huSOX2 VHH 항체 클론의 huSOX2 단백질에 대한 결합력을 세포 수준에서 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[19] 도 4는 본 발명의 일 구체예인 S14(항-huSOX2 VHH 항체 클론) 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질에 의한 SOX2 단백질 특이적 분해능을 웨스턴 블롯을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면(a) 및 상기 결과를 정량하여 나타낸 그래프(b)이다.

[20] 도 5a 내지 도 5c는 본 발명의 일 구체예인 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 암세포에 대한 세포성장 저해 및 세포사멸 유도 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[21] 도 6은 본 발명의 일 구체예인 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 농도별 처리에 따른 암세포의 세포성장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[22] 도 7a 및 도 7b는 타목시펜(Tamoxifen) 내성 암세포주(MCF7-Tam^{R})에서 SOX2의 발현량(도 7a) 및 본 발명의 일 구체예인 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA 및 타목시펜 병용에 의한 세포성장 및 세포사멸 유도 효과(도 7b)를 확인한 결과를 나타낸 도면 및 그래프이다.

[23] 도 8a 및 도 8b는 독소루비신(Doxorubicin) 내성 암세포주(H69-Dox^{R})에서 SOX2의 발현량(도 8a) 및 본 발명의 일 구체예인 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA 및 독소루비신 병용에 의한 세포성장 및 세포사멸 유도 효과(도 8b)를 확인한 결과를 나타낸 도면 및 그래프이다.

[24] 도 9는 본 발명의 일 구체예인 3A2(항-huSOX2 VHH 항체 클론) 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 발현하는 발현벡터에 의한 SOX2 단백질 특이적 분해능을 확인한 결과를 나타낸 도면(a) 및 상기 결과를 정량하여 나타낸 그래프(b)이다.

[25] 도 10은 인간 암세포주(폐암, 간암)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2(항-huSOX2 VHH 항체 클론) 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 처리에 의한 SOX2 단백질 분해능을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[26] 도 11은 본 발명의 일 구체예인 3A2(항-huSOX2 VHH 항체 클론) 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 발현하는 발현벡터를 이용하여 SOX2 분해기작의 유비퀴틴-프로테아좀 의존성 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[27] 도 12는 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포)에서 SOX2 siRNA 또는 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA 처리 후, SOX2 발현 및 암세포의 세포성장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[28] 도 13a 및 도 13b는 인간 암세포주(폐암, 췌장암, 자궁경부암, 간암)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2(항-huSOX2 VHH 항체 클론) 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 처리에 의한 세포성장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[29] 도 14는 각각의 항암제 내성 암세포주(MCF7-Tam^{R}, H69-Dox^{R})에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA 및 항암제(타목시펜 또는 독소루비신) 병용에 의한 세포성장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. LipoMM: 리포펙타민-메신저맥스 시약만 처리

[30] 도 15는 인간 암세포주(A549 세포, BxPC 세포) 이식 종양 마우스 모델에서 본 발명의 일 구체예인 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 처리에 의한 종양 성장 억제 효과 및 체중 변화를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[31] 도 16은 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 처리에 의한 세포성장 저해 효과 및 세포사멸 유도 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[32] 도 17은 인간 신장 세포주(HEK293 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA를 처리한 뒤, 시간 경과에 따른 융합단백질(degraders)의 발현 및 SOX2 단백질 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[33] 도 18은 인간 비소세포성 폐암 세포주(SW900 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA 또는 SOX2 siRNA의 농도별 처리에 따른 SOX2 단백질의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[34] 도 19는 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포, SW900 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 농도별 처리에 의한 SOX2 발현의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[35] 도 20은 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포, SW900 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 농도별 처리에 의한 세포성장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[36] 도 21a는 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포, SW900 세포)에서 3A2 단일 도메인 항체(binder only), E3 유비퀴틴 리가제 단편(E3 only) 또는 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 처리에 의한 SOX2 단백질 발현을 비교한 결과를 나타낸 도면이다. LipoMM: 리포펙타민-메신저맥스 시약만 처리

[37] 도 21b는 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포, SW900 세포)에서 3A2 단일 도메인 항체(binder only), E3 유비퀴틴 리가제 단편(E3 only) 또는 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 처리에 의한 세포성장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. LipoMM: 리포펙타민-메신저맥스 시약만 처리

[38] 도 22는 인간 암세포주(A549 세포) 이식 종양 마우스 모델에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 처리에 의한 종양 조직 내 SOX2 단백질의 발현의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면 및 상기 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

[39] 도 23은 인간 비소세포성 폐암 세포주(SW900 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 처리 후, 시간 경과에 따른 상기 융합단백질(degrader) 및 SOX2 단백질의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면 및 상기 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다. MM only 또는 LipoMM: 리포펙타민-메신저맥스 시약만 처리

[40] 도 24a 및 도 24b는 인간 비소세포성 폐암 세포주(SW900 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA의 처리 후, 시간 경과에 따른 상기 융합단백질(degrader) 및 SOX2 단백질의 발현을 나타낸 그래프이다.

[41] 도 25는 각각의 항암제 내성 암세포주(MCF7-Tam^R 세포, H69-Dox^R 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA 및 항암제(타목시펜 또는 독소루비신) 병용에 의한 세포성

장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. LipoMM: 리포펙타민-메신저맥스 시약만 처리

[42] 도 26은 독소루비신 내성 암세포주(H69-Dox^R 세포) 또는 비내성 암세포(H69 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA 및 독소루비신 병용에 의한 세포성장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. LipoMM: 리포펙타민-메신저맥스 시약만 처리

[43] 도 27은 타목시펜 내성 암세포주(MCF7-Tam^R 세포) 또는 비내성 암세포(MCF7 세포)에서 본 발명의 일 구체예인 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 mRNA 및 타목시펜 병용에 의한 세포성장 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. LipoMM: 리포펙타민-메신저맥스 시약만 처리

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[44] **항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편**

[45] 본 발명의 일 측면은 서열번호 56, 서열번호 63, 서열번호 69, 서열번호 73, 서열번호 78, 서열번호 82, 서열번호 87 및 서열번호 94로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; 서열번호 58, 서열번호 65, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 79, 서열번호 84 및 서열번호 89로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 60, 서열번호 67, 서열번호 81, 서열번호 85, 서열번호 91 및 서열번호 96으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[46] 본 명세서에서 사용하는 용어, "SOX2(SRY-box transcription factor 2)"는 미분화 배아 줄기세포의 자가 재생 또는 다능성을 유지하는데 필수적인 전사인자로 알려져 있다. 또한, SOX2는 다양한 유형의 인간 암종에서 과발현되어 있으며, 상기 SOX2의 과발현은 암환자의 생존율 저하와 상관관계가 있는 것으로 보고되었다. SOX2는 암세포의 증식, 생존, 침윤/전이, 암줄기세포능(cancer stemness) 및 약물 저항성 발생을 촉진한다. 따라서, 최근 SOX2는 암 치료의 표적으로 주목받고 있다.

[47] 본 발명에서 상기 SOX2는 포유류의 SOX2이라면 제한없이 포함될 수 있으나, 바람직하게는 인간 SOX2 또는 유인원 SOX2를 의미할 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 SOX2 단백질은 천연형, 이의 단편 또는 변이체를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "천연형(wild type)"은 자연에서 발견되는 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 모두 포함하는 것으로 야생형과 혼용하여 기재할 수 있다. 상기 천연형 SOX2 단백질이란 천연형 SOX2 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 일반적으로 지칭하며, 상기 천연형 SOX2 단백질의 아미노산

서열이란 천연 발생 SOX2에서 발견되는 아미노산 서열을 일반적으로 지칭한다. 상기 SOX2에 대한 정보는 미국국립보건원의 GenBank 등 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 본 발명에서 상기 SOX2 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[48] 상기 단편은 천연형 SOX2 단백질의 N 말단 및/또는 C 말단의 일부가 결실된 (truncated) 단편을 의미하는 것이다. 구체적으로, 상기 SOX2 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 N 말단의 1번째 아미노산으로부터 연속적으로 110개, 111개, 113개 114개, 115개, 116개, 117개, 118개, 119개, 120개, 121개, 122개, 123개, 124개, 125개, 126개, 127개, 128개, 129개, 130개, 131개, 132개, 133개 또는 134개가 결실된 것일 수 있다. 일 구체예로 SOX2 단편은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[49] 본 명세서에서 사용하는 용어, "항-SOX2 단일 도메인 항체"는 단일 가변영역을 가지는 SOX2에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 지칭한다.

[50] 상기 "단일 도메인 항체(single domain antibody, sdAb)"는 일반적으로 단 하나의 중쇄 가변영역(heavy chain variable, VH)을 포함하는 항원에 대한 결합 활성을 가지는 항체를 지칭한다. 주로 중쇄로부터 유래한 sdAb가 사용되나, 경쇄로부터 유래한 단일 가변 영역 단편 역시 항원에 대하여 특이적 결합이 되는 것으로 보고되고 있다. 본 발명에서 상기 단일 도메인 항체는 경쇄는 포함하지 않고, N 말단에서 C 말단의 순서로 단일 사슬 FR1-VHHCDR1-FR2-VHHCDR2-FR3-VHHCDR3-FR4를 포함하는 항체일 수 있다. 상기 단일 도메인 항체는 중쇄 항체, 나노바디 VHH, 나노바디 또는 HCAb(heavy chain only antibody)와 상호교환적으로 사용되며, 경쇄가 없지만 HCAb는 확실한 항원 결합 기전 부분을 가지고 있다. 중쇄 항체의 가변영역(VHH 영역)은 적응 면역 반응에 의해 생성된 가장 작은 공지된 항원 결합 단위를 나타낸다. 상기 항체는 완전한 항체 형태 뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

[51] 본 명세서에서 사용하는 용어, "항원 결합 단편"은 주어진 항원, 즉, SOX2에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 무손상 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 본 발명에서의 항체의 단편은 단쇄 항체, 이중 특이적 항체, 삼중 특이적 항체, 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디와 같은 다중 특이적 항체, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fd, scFv, 도메인 항체, 미니바디, 스캡(sterol regulatory binding protein cleavage activating protein, scap), 킬레이팅 재조합 항체, 바이바디(bibodies), 인트라바디, 나노바디, SMIP(small modular immunopharmaceuticals), 결합 도메인 면역글로불린 융합단백질, 낙타 항체(camelized antibody), VHH 포함 항체, IgD 항체, IgE 항체, IgM 항체, IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, IgG4 항체, 항체 불변영역 유도체 및 SOX2에 결합능을 보유한 단백질 스캐폴드에 기반한 합성 항체를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[52] SOX2에 대한 결합 기능이 유지되는 한, 본 발명에 따른 어떠한 형태의 항체의 단편도 본 발명에 따른 항체와 동일한 특성을 나타낼 것이라는 점은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.

[53] 본 명세서에서 사용하는 용어, "중쇄(heavy chain, HC)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체 길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.

[54] 본 명세서에서 사용하는 용어, "가변(variable, V)"은 가변영역의 특정 부분이 항체들 사이에서 서열이 크게 상이함을 나타낸다. 가변 영역은 항원 결합을 매개하고, 이의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 규정한다. 가변성은 중쇄 가변영역 모두에서 초가변영역(hypervariable region, HVR) 즉, CDR로 불리는 3개의 세그먼트에 집중된다. 가변영역의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크(framework, FR) 구역으로 불리운다. 중쇄 가변영역은 N 말단에서 C 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 구조를 가진다.

[55] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로불린 중쇄의 초가변영역(HVR)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)에는 각각 3개의 CDR이 포함되어 있다. CDR은 항체가 항원 또는 에피토프(epitope)에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공한다.

[56] 본 발명에서 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 56, 서열번호 63, 서열번호 69, 서열번호 73, 서열번호 78, 서열번호 82, 서열번호 87 및 서열번호 94로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; 서열번호 58, 서열번호 65, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 79, 서열번호 84 및 서열번호 89로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 60, 서열번호 67, 서열번호 81, 서열번호 85, 서열번호 91 및 서열번호 96으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.

[57] 일 구체예에서, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[58] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[59] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[60] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[61] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[62] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 10 또는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[63] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[64] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 84의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[65] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 79의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 81의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[66] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 87의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함

하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[67] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[68] 일 구체예에서, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[69] 또한, 상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 5 내지 서열번호 17의 아미노산 서열과 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 동일성 또는 약 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[70] **항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드**

[71] 본 발명의 다른 측면은, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 101 내지 서열번호 113으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열을 포함할 수 있다.

[72] 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 및 항원 결합 단편은 상술한 바와 동일하다.

[73] 본 명세서에서 사용하는 용어, "폴리뉴클레오티드"는 "핵산"이라고도 지칭되며, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있다.

[74] 상기 폴리뉴클레오티드는 동일한 폴리펩타이드를 암호화한다면, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드 합성법 등을 들 수 있다.

[75] 또한, 본 발명에서 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 101 내지 서열번호 113의 염기서열과 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 적어도 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100%의 동일성을 가지는 염기서열을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다.

[76] 상기 폴리뉴클레오티드는 신호 서열 또는 선도 서열을 추가적으로 포함할 수 있다.

[77] **항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터**

[78] 본 발명의 또 다른 측면은, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현벡터를 제공한다. 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체, 항원 결합 단편 및 폴리뉴클레오티드는 상술한 바와 동일하다.

[79] 본 명세서에서 사용하는 용어, "벡터"는 본 명세서에 기재된 항-SOX2 단일 도메인 항체 변이체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열을 운반하거나 발현시키기 위한 물질을 의미한다.

[80] 구체적으로, 상기 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 플라스미드는 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커를 포함할 수 있고, 플라스미드를 유지하는 숙주세포는 선택적인 조건하에서 배양될 수 있다.

[81] 보다 구체적으로, 상기 벡터는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 상업적으로 개발된 플라스미드(예, pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(예, pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(예, pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(예, YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(예, Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 벡터(예, 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 백시니아 바이러스(Vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(Baculovirus) 등)이 될 수 있다. 상기 벡터는 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

[82] 또한, 본 발명의 벡터는 이로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, Flag(IBI, USA), 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), 6×His(Qiagen, USA), Halo 또는 Myc 등이 있다.

[83] 또한, 본 발명의 벡터에 의해 발현되는 단백질이 항체이기 때문에, 정제를 위한 추가적인 서열 없이도, 발현된 항체는 단백질 A(Protein A) 컬럼 등을 통하여 용이하게 정제할 수 있다.

[84] **항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하는 형질전환 세포**

[85] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현벡터가 도입된 형질전환

세포를 제공한다. 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체, 항원 결합 단편, 폴리뉴클레오티드 및 발현벡터는 상술한 바와 동일하다.

[86] 본 명세서에서 사용하는 용어, "형질전환 세포"는 재조합 발현벡터가 도입될 수 있는 원핵 세포 및 진핵 세포를 나타낸다. 상기 형질전환 세포는 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환시켜서 제작될 수 있다. 또한, 상기 벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 본 발명의 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산할 수 있다.

[87] 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있다. 본 발명의 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다, 구체적으로, 상기 형질전환 방법은 $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원 물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산 칼슘(calcium phosphate) 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등 이 사용될 수 있다. 또한, 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 입자를 사용하여 목적물을 세포 내로 전달시킬 수 있다. 또한, 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 도입할 수 있다.

[88] 또한, 상기 형질전환 세포의 제작에 사용되는 숙주세포 역시 본 발명의 항체를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 숙주세포는 원핵세포, 진핵세포, 포유동물, 식물, 곤충, 균류 또는 세포성 기원의 세포를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 상기 원핵세포의 일 예로는 대장균을 사용할 수 있다. 또한, 진핵세포의 일 예로는 효모를 사용할 수 있다. 또한, 상기 포유동물 세포로 CHO 세포, F2N 세포, COS 세포, BHK 세포, 바우스(Bowes) 흑색종 세포, HeLa 세포, 911 세포, AT1080 세포, A549 세포, SP2/0 세포, 인간 림프아세포(human lymphoblastoid), NSO 세포, HT-1080 세포, PERC.6 세포, HEK293 세포 또는 HEK293T 세포 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 당업자에게 알려진 포유동물 숙주세포로 사용 가능한 세포는 모두 이용 가능하다.

[89] 또한, 항체의 치료제로서의 특성을 최적화하거나 기타 다른 목적을 위해, 호스트 세포가 갖고 있는 당화(glycosylation) 관련 유전자를 당업자에게 알려져 있는 방법을 통해 조작하여 항체의 당쇄 패턴(예를 들어, 시알산, 퓨코실화, 당화)을 조정할 수 있다.

[90] **항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법**

[91] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 형질전환 세포를 배양하는 단계를 포함하는 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다.

[92] 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체, 항원 결합 단편, 형질전환 세포는 상술한 바와 동일하다.

[93] 구체적으로, 상기 항체 또는 이의 단편을 제조하는 방법은 형질전환 세포를 배양하여 항체를 생성하는 단계 및 상기 배양액으로부터 생성된 항체를 수득하는 단계를 포함할 수 있다.

[94] 상기 형질전환 세포를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양은 본 발명의 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[95] 또한, 배양액으로부터 상기 SOX2에 특이적인 항체 및 이의 단편을 수득하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 수득 방법은 생산된 본 발명의 항체 또는 이의 단편을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 수득 방법은 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면, 암모늄설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법일 수 있다.

[96] **항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질**

[97] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 제공한다.

[98] 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 및 항원 결합 단편은 상술한 바와 동일하다.

[99] 본 명세서에서 사용하는 용어, "유비퀴틴(ubiquitin, UB)"은 76개의 아미노산으로 구성된 단백질로, 거의 모든 진핵세포에 존재한다. 유비퀴틴은 ATP-의존성 반응을 통해 다른 단백질에 공유결합되는 특성을 가지며, 이를 유비퀴틴화(ubiquitination)라고 한다.

[100] 상기 유비퀴틴은 1)유비퀴틴-활성화 효소(E1), 유비퀴틴-컨쥬게이션 효소(E2) 및 유비퀴틴 리가아제(E3)에 의해 수행되는 활성화, 2)컨쥬게이션, 및 3)결찰(ligation)을 통해 표적 단백질(이하, 기질 단백질와 혼용)에 공유결합된다. 상기와 같이 유비퀴틴화(poly-Ub)된 표적 단백질은 프로테아좀에 의해 분해된다.

[101] 본 명세서에서 사용하는 용어, "E3 유비퀴틴 리가제(E3 ubiquitin ligase)"는 유비퀴틴을 기질에 붙게 하는 유비퀴틴화의 마지막 단계의 효소를 의미한다. E3 리가제는 표적 단백질과 E2-Ub에 결합하여 표적 단백질이 E2-Ub에 가깝게 위치하게 함으로써 표적 단백질의 유비퀴틴화(poly-Ub)를 유도한다. 본 발명에서 상기 E3 유비퀴틴 리가제는 E3 리가(아)제, E3 유비퀴틴 연결효소, E3 유비퀴틴 결합효소 또는 E3로 상호교환적으로 사용 가능하다.

[102] 본 명세서에서 사용하는 용어, "단편(fragment)"은 E3 유비퀴틴 리가제 복합체 내의 특정 기질 인식 도메인(domain), 유비퀴틴 전달 도메인 또는 이의 2가지 도메인을 의미할 수 있다.

[103] 하기 표 1에 CRL 종류에 따른 E3 유비퀴틴 리가제 복합체의 서브유닛 종류 및 그 예시를 나타낸다.

[104] [표1]

Cullin 단백질	어댑터	서브유닛	예시
Cul1	Skp1	F-box protein	Skp2, βFbw, Fbxo, Fbxl
Cul2	EloBC	VHL-box protein	VHL
Cul3	BTB	BTB domain protein	KLHL, SPOP
Cul4A	DDB1	DCAF/H-box protein	DCAF, DDB2, CSA, CDT2, CRBN
Cul4B	DDB1	DCAF/H-box protein	DCAF, DDB2
Cul5	EloBC	SOCS-box protein	SOCS1~SOCS7
Cul7	Skp1	F-box protein	Fbxw8

[105] 본 발명에서 상기 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체는 βTrCP(beta-transducin repeat-containing protein), SKP2(S-phase kinase-associated protein 2), VHL(von hippel-lindau), SPOP(speckle-type BTB-POZ), SOCS2(suppressor of cytokine signaling 2), CHIP(carboxy terminus of Hsp70-binding protein), DDB2(damage DNA binding protein 2), CRBN(cereblon), ASB1(ankyrin repeat and SOCS box protein 1), TRIM21(tripartite motif-containing protein 21), RNF4(RING finger protein), UBE2D1(ubiquitin conjugating enzyme E2 D1), UBE2D4 및 ZNFR1(zinc and ring finger 1) 및 이의 특정 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[106] 일 구체예에서, βTrCP의 변이체는 βTrCP의 전장(full-length, Uniprot ID: Q9Y297)의 $\beta TrCP_{2-263}$(2-263번 아미노산, 서열번호 206) 단편 또는 $\beta TrCP_{190-228}$(190-228번 아미노산, 서열번호 18) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, SKP2의 변이체는 SKP2 전장(Uniprot ID: Q13309)의 $SKP2_{2-176}$(2-176번 아미노산, 서열번호 19) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, VHL의 변이체는 VHL 전장(Uniprot ID: P40337)의 $VHL_{152-213}$(152-213번 아미노산, 서열번호 20) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, SPOP의 변이체는 SPOP 전장(Uniprot ID: O43791)의 $SPOP_{167-374}$(167-374번의 아미노산, 서열번호 21) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, SOCS2의 변이체는 SOCS2 전장(Uniprot ID: 014508)의 $SOCS2_{143-198}$(143-198번 아미노산, 서열번호 22) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, CHIP의 변이체는 CHIP의 전장(Uniprot ID: Q9UNE)의 $CHIP_{128-303}$(128-303번의 아미노산, 서열번호 23) 단편일 수 있다. 일 구체예에서,

DDB2의 변이체는 DDB2의 전장(Uniprot ID: Q92466)의 $DDB2_{2-114}$(2-114번의 아미노산, 서열번호 24) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, CRBN의 변이체는 CRBN의 전장(Uniprot ID: Q96SW2)의 $CRBN_{2-320}$(2-320번의 아미노산, 서열번호 25) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, ASB1의 변이체는 ASB1의 전장(Uniprot ID: Q9Y576)의 $ASB1_{266-335}$(266-335번의 아미노산, 서열번호 26) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, TRIM21의 변이체는 TRIM21의 전장(Uniprot ID: P19474)의 $TRIM21_{2-85}$(2-85번의 아미노산, 서열번호 27) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, RNF4의 변이체는 RNF4의 전장(Uniprot ID: P78317)의 $RNF4_{71-190}$(71-190번의 아미노산, 서열번호 28) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, UBE2D1의 변이체는 UBE2D1의 전장(Uniprot ID: P51668)의 $UBE2D1_{2-147}$(2-147번 아미노산, 서열번호 29) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, UBE2D4의 변이체는 UBE2D4의 전장(Uniprot ID: Q9Y2X8)의 $UBE2D4_{2-147}$(2-147번 아미노산, 서열번호 30) 단편일 수 있다. 일 구체예에서, ZNFR1의 변이체는 ZNFR1의 전장(Uniprot ID: Q8ND2)의 $ZNFR1_{138-227}$(138-227번 아미노산, 서열번호 31) 단편일 수 있다.

[107] 일 구체예에서, 상기 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체는 서열번호 18 내지 서열번호 31 및 서열번호 206으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[108] 상기 E3 유비퀴틴 리가제의 단편의 변이체는 상기 단편 또는 이의 단편의 아미노산 일부가 치환된 형태를 의미한다. 즉, 상기 단편의 변이체는 천연형의 단편 또는 이의 단편과 다른 서열을 가지며, 어댑터 단백질과 결합하는 기능을 보유한 펩타이드를 의미한다.

[109] 일 구체예에서, 상기 단편의 변이체는 천연형 βTrCP 단편에서 5 내지 18개의 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[110] 보다 구체적으로 상기 βTrCP 변이체는 서열번호 206의 아미노산 서열에서 8번째, 10번째, 11번째, 16번째, 18번째, 28번째, 33번째, 35번째, 38번째, 47번째, 91번째, 95번째, 98번째, 102번째, 105번째, 110번째, 114번째, 115번째, 120번째, 122번째, 124번째, 125번째, 127번째, 132번째, 144번째, 146번째, 148번째, 159번째, 170번째, 172번째, 173번째, 183번째, 185번째, 192번째, 197번째, 198번째, 202번째, 203번째, 204번째, 225번째, 234번째, 236번째, 240번째, 241번째, 242번째, 250번째, 251번째, 260 번째 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[111] 보다 더 구체적으로 상기 변이체는 서열번호 206의 아미노산 서열에서 L8, E10, K11, M16, S18, E28, I33, P35, N38, C47, S91, E95, K98, V102, F105, E110, V114, E115, L120, S122, M124, C125, Y127, I132, F144, T146, L148, N159, C170, A172, E173, T183, D185, L192, V197, R198, L202, W203, R204, N225, A234, Y236, I240, Q241, D242, W250, R251, I260 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.

[112] 이때, 상기 치환에 의해 도입되는 "아미노산"은 글라이신(glycine), 알라닌(alanine), 발린(valine), 류신(leucine), 이소류신(isoleucine), 세린(serine), 트레오닌(threonine), 시스테인(cysteine), 메티오닌(methionine), 아스파르트산(aspartic acid), 글루탐산(glutamic acid), 아스파라긴(asparagine), 글루타민(glutamine), 리신(lysine), 아르기닌(arginine), 페닐알라닌(phenylalanine), 티로신(tyrosine), 트립토판(tryptophan), 히스티딘(histidine) 및 프롤린(proline)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[113] 보다 더 구체적으로, 상기 변이체는 서열번호 206의 아미노산 서열에서 L8P, E10V, K11E, M16L, S18T, E28G, I33T, P35A, N38D, C47S, S91T, E95G, K98R, V102A, F105L, E110G, V114A, E115G, L120P, S122P, M124V, C125R, Y127C, I132T, F144S, T146P, L148P, N159K, C170R, A172V, E173V, T183S, D185G, D185E, L192P, V197A, R198G, L202Q, L202R, W203R, R204G, N225Y, A234V, Y236C, I240M, Q241R, D242E, W250R, R251G, I260S 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산으로 치환될 수 있다. 이때, D185가 치환되는 경우, D185G 또는 D185E로 치환될 수 있다. 또한, L202는 L202Q 또는 L202R로 치환될 수 있다.

[114] 상기 βTrCP 변이체는 서열번호 207 내지 서열번호 214로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진 것일 수 있다.

[115] 일 구체예에서, 상기 단편의 변이체는 천연형 SKP2 단편에서 7 내지 14개의 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[116] 보다 구체적으로 상기 SKP2 단편 변이체는 서열번호 19의 아미노산 서열에서 2번째, 4번째, 11번째, 12번째, 19번째, 24번째, 29번째, 33번째, 44번째, 59번째, 78번째, 98번째, 102번째, 107번째, 111번째, 112번째, 113번째, 124번째, 128번째, 130번째, 133번째, 135번째, 137번째, 138번째, 139번째, 148번째, 156번째, 161번째, 176번째 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산이 치환된 것일 수 있다.

[117] 보다 더 구체적으로 상기 변이체는 서열번호 19의 아미노산 서열에서 H2, K4, D11, L12, S19, W24, T29, L33, E44, L59, D78, D98, D102, G107, C111, L112, C113, C124, Y128, L130, D133, S135, W137, Q138, T139, H148, L156, I161, E176및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이때, 치환에 도입되는 아미노산은 상술한 바와 동일하다.

[118] 보다 더 구체적으로, 상기 변이체는 서열번호 19의 아미노산 서열에서 H2R, K4R, D11G, L12P, S19G, W24R, T29A, L33P, E44K, L59P, D78G, D98V, D102N, G107R, C111R, L112P, L112R, C113R, C124S, Y128C, L130Q, D133E, S135P, W137R, Q138K, T139S, H148R, L156Q, L156R, I161A, I161V, E176G 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산으로 치환되는 것일 수 있다. 이때, L112가 치환되는 경우, L112P 또는 L112R로 치환될 수 있다. L156이 치환되

는 경우, L156Q 또는 L156R로 치환될 수 있다. I161이 치환되는 경우, I161A 또는 I161V로 치환될 수 있다.

[119] 상기 SKP2 변이체는 서열번호 215 내지 서열번호 221로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 이들로 이루어진 것일 수 있다.

[120] 본 발명에서 상기 융합단백질은 링커를 포함할 수 있다. 이때, 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있다. 본 발명에서 상기 융합단백질의 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 E3 유비키틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체는 링커를 통해 연결될 수 있다.

[121] 융합단백질의 구조

[122] 구체적으로 상기 융합단백질은 하기의 구조식 (I) 또는 (II)로 이루어진 것일 수 있다.

[123] N'-TB-(L)n-SR-C' (I)

[124] N'-SR-(L)n-TB-C' (II)

[125] 이때, 상기 구조식 (I) 및 (II)에 있어서,

[126] 상기 N'은 융합단백질의 N 말단이며,

[127] 상기 C'은 융합단백질의 C 말단이며,

[128] 상기 TB는 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편이며,

[129] 상기 SR은 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체이고,

[130] 상기 L은 펩타이드 링커이고,

[131] 상기 n은 0 또는 1이다.

[132] 이때, 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체, 항원 결합 단편 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체는 상술한 바와 동일하다.

[133] 상기 펩타이드 링커는 1 내지 30개의 연속된 아미노산, 또는 2 내지 20개의 연속된 아미노산, 또는 2 내지 10개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 상기 펩타이드 링커는 (GS)n(이때, n은 1 내지 10의 정수)일 수 있다. 이때, (GS)n에서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다. 상기 펩타이드 링커는 특별한 제한 없이, 단백질 가수분해 효소에 의해 잘리지 않으면서 구조적 유연성을 부여하는 당업계에 공지된 GS, GGGGS, $(GGGGS)_2$, $(GGGS)_3$, ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP 등의 서열 링커를 사용할 수 있다. 일 구체예로 상기 펩타이드 링커는 서열번호 157(아미노산 서열: GS) 또는 서열번호 238의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[134] 일 구체예에서 상기 융합단백질은 서열번호 164 내지 서열번호 184로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[135] **항-SOX2 단일 도메인 항체 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드**

[136] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 구체적으로, 상기 융합단백질을

암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 185 내지 서열번호 205의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[137] 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체, 항원 결합 단편, E3 유비퀴틴 리가제 및 단편은 상술한 바와 동일하다.

[138] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 각각의 서열번호 185 내지 서열번호 205의 염기서열과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[139] 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있다.

[140] **융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터**

[141] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현벡터를 제공한다.

[142] 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체, 항원 결합 단편, E3 유비퀴틴 리가제, 단편, 융합단백질 및 폴리뉴클레오티드는 상술한 바와 동일하다.

[143] 일 구체예에서, 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 185 내지 서열번호 205의 염기서열을 포함할 수 있다.

[144] 구체적으로, 상기 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 플라스미드는 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커를 포함할 수 있고, 플라스미드를 유지하는 숙주세포는 선택적인 조건하에서 배양될 수 있다.

[145] 또한, 본 발명의 벡터는 이로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, Flag(IBI, USA), 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), 6×His(Qiagen, USA), Halo 또는 Myc 등이 있다.

[146] **융합단백질을 발현하는 형질전환된 세포**

[147] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.

[148] 상기 항-SOX2 단일 도메인 항체, 항원 결합 단편, E3 유비퀴틴 리가제, 단편, 변이체, 융합단백질, 폴리뉴클레오티드 및 발현벡터는 상술한 바와 동일하다.

[149] 상기 형질전환 세포는 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환시켜서 제작될 수 있다. 또한, 상기 벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 본 발명의 융합단백질을 생산할 수 있다.

[150] 상기 형질전환은 다양한 방법, 예컨대 $CaCl_2$ 침전법, Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법 등에 의하여 수행될 수 있다. 본 발명의 항-SOX2 단일 도메인 항체 변이체 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편의 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[151] 또한, 상기 형질전환 세포의 제작에 사용되는 숙주세포 역시 본 발명의 항-SOX2 단일 도메인 항체 변이체를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[152] **융합단백질의 제조방법**

[153] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 형질전환 세포를 배양하는 단계; 및 상기 세포의 배양액에서 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질을 수득하는 단계; 를 포함하는 상기 융합단백질의 제조방법을 제공한다.

[154] 상기 형질전환 세포를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch 또는 repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[155] 또한, 배양물로부터 상기 융합단백질을 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 생산된 본 발명의 융합단백질을 회수할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 회수 방법은 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법일 수 있다.

[156] **융합단백질, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터를 포함하는 약학 조성물**

[157] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 융합단백질, 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 이때, 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA, mRNA, 플라스미드 DNA 등일 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는(적재된) 벡터는 세포 투과 기능성 나노 담체에 의해 세포 내 전달되어 융합단백질과 동일한 표적 단백질 분해 효능을 나타낼 수 있다.

[158] 상기 융합단백질, 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 상술한 바와 동일하다.

[159] 본 명세서에서 사용하는 용어, "암"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 증식하는 공격적인(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적인(invasive) 특성 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적인(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하며, 악성 종양(tumor)과 동일한 의미로 사용된다.

[160] 상기 암은 이에 제한되지는 않으나, 유방암, 대장암, 식도암, 위암, 간암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 담낭암, 방광암, 신장암, 피부암, 직장암, 골육종, 다발성골수종, 신경교종, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 갑상선암, 후두암, 고환암, 중피종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막 모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[161] 본 명세서에서 사용하는 용어, "치료"는 치료학적 처리 및 예방적 처리를 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 이때, 예방은 개체의 병리학적 상태 또는 질환을 완화시키거나 감소시키는 의미로 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 용어 "치료"는 인간을 포함한 포유류에서 질환을 치료하기 위한 적용이나 어떠한 형태의 투약을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 질환의 진행을 억제하거나 늦추는 것을 포함하며; 손상되거나, 결손된 기능을 회복시키거나, 수리하여, 질환을 부분적이거나 완전하게 완화시키거나; 또는 비효율적인 프로세스를 자극하거나; 심각한 질환을 완화하는 의미를 포함한다.

[162] 본 명세서에서 상기 "암의 치료"는 암세포 또는 조직의 성장을 억제하거나 예방한다는 것을 의미하고, 이는 치료하거나 처리하지 않았을 때와 비교시에 암의 성장 및 암 전이를 감소시키고, 항암제에 대한 내성을 줄여 치료 효과가 더 발휘되도록 하는 것도 포함할 수 있다. 상기 암 전이(metastasis)는 종양(암) 세포가 신체의 멀리 떨어진 부분으로 확산되는 과정을 의미하고, "항암제에 대한 내성" 또는 "항암제 내성"은 항암제를 이용하여 암 환자를 치료할 때, 치료 초기부터 치료 효과가 없거나 초기에는 암 치료 효과가 있으나 계속적인 치료 과정에서 암 치료 효과가 상실되는 것을 의미한다. "예방"은 상기 약학 조성물의 투여에 의해 암의 발생을 억제하거나 그의 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[163] 생체이용률과 같은 약동학적 파라미터(pharmacokinetic parameters) 및 클리어런스율(clearance rate)과 같은 기본적인 파라미터(underlying parameters)도 효능에 영향을 줄 수 있다. 따라서, "향상된 효능"(예를 들어, 효능의 개선)은 향상된 약동학적 파라미터 및 향상된 효능에 기인할 수 있으며, 시험 동물 또는 인간 대상체에서 클리어런스율 및 종양 치료 또는 개선과 같은 파라미터를 비교하여 측정될 수 있다.

[164] 여기서 "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 화합물 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간,

투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일 구체예에 있어서, 치료학적으로 유효한 양은 질환을 치료하는데 효과적인 약물의 양을 의미한다.

[165] 이때, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 환자에게 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 증류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성 고체가 담체로 포함될 수 있다. 약물학적으로 허용되는 애쥬번트(완충제, 분산제) 또한 약학 조성물에 포함될 수 있다.

[166] 구체적으로, 상기 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.

[167] 본 발명에서 상기 약학 조성물은 비경구 투여를 통해 전신 투여될 수 있다. 비경구 투여는 비내, 비강내, 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 피내, 복강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 투여 형태로 투여될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[168] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물이 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 (적재된) 벡터를 유효성분으로 포함하는 경우, 상기 핵산은 기존에 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 효과적으로 전달하는 것으로 알려진 지질나노입자(LNP), 리포좀(liposome) 또는 소포(vesicle) 등의 다양한 전달체가 함께 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[169] 상기 약학 조성물은 예를 들면, 분말, 정제, 캡슐, 액체, 연고, 크림, 겔, 히드로겔, 에어로졸, 스프레이, 미셀 용액, 경피 패치, 리포좀 현탁액, 폴리플렉스, 에멀전, (표면에 RNA를 갖거나 캡슐화된)지질 나노입자(LNP)의 형태 또는 치료를 필요로 하는 인간 또는 포유동물에게 투여될 수 있는 임의의 다른 적합한 형태로 제조될 수 있다.

[170] 또한, 상기 약학 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.

[171] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg 내지 10 g/kg 범위 또는 0.01 mg/kg 내지

1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[172] 상기 약학 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 본원의 약학 조성물은 유효성분 이외에, 항암 활성을 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

[173] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 융합단백질, 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[174] 본 발명의 또 다른 측면은, 암을 예방 또는 치료하기 위한 상기 융합단백질, 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터의 용도를 제공한다.

[175] 상기 융합단백질, 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터, 투여, 예방 및 치료는 상술한 바와 동일하다.

[176] 이때, 상기 개체는 질환 등을 고 있는 개체일 수 있다. 또한 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[177] 상기 융합단백질 또는 핵산의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 개체에게 투여될 수 있고, 최적의 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 융합단백질 또는 핵산은 치료하고자 하는 질환에 대하여 치료 효과가 공지된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

[178] **E3 유비퀴틴 리가제의 단편의 변이체**

[179] 본 발명의 또 다른 측면은 βTrCP(beta-transducin repeat-containing protein) 단편 또는 이의 변이체를 제공한다. 또한, 본 발명의 또 다른 측면은 SKP2(S-phase kinase-associated protein 2) 단편 또는 이의 변이체를 제공한다.

[180] 상기 βTrCP(beta-transducin repeat-containing protein) 단편 또는 이의 변이체 및 SKP2(S-phase kinase-associated protein 2) 단편 또는 이의 변이체는 상술한 바와 동일하다.

발명의 실시를 위한 형태

[181] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[182] **실시예 1. 항-huSOX2 VHH 항체 선별**

[183] Human SRY-box transcription factor 2(huSOX2, UniProt: P48431, 서열번호 1), CynoSOX2(UniProt: A0A2K5UL35, 서열번호 2), huSOX3(UniProt: P41225, 서열

번호 3) 및 huSOX2의 135-317번 단편($huSOX2_{135-317}$, 서열번호 4)의 C 말단에 각각 6×His-tag 서열을 접합하여 Biointron에 생산을 의뢰하여 항원을 준비하였다.

[184] 구체적으로, 4 L로 배양된 대장균(E. coli)에서 단백질을 발현시킨 후 His-tag을 이용해 정제하여 단백질을 수확하였다. 그 외 항원은 해당 구매처에서 구매하여 사용하였다.

[185] huSOX2에 결합하는 나노바디 발굴은 엘피스바이오텍에 의뢰하여 huSOX2(Cusabio, Cat no. CSB-EP022426HU(M)) 항원을 이용해 4라운드 패닝을 진행하였다. 그 결과 huSOX2 특이적인 VHH 항체 S14(서열번호 5)를 확보하였다.

[186] VHH 파지 라이브러리로 패닝을 진행하였다. 면역시험관(immunotube)에 Biointron에서 생산한 $huSOX2_{135-317}$ 단백질을 20 ug/mL 농도로 첨가하여 1시간 동안 시험관 표면에 단백질을 흡착시켰다. 그리고, 3% non-fat milk 용액을 시험관에 첨가하여 $huSOX2_{135-317}$가 흡착되지 않도록 표면을 보호하였다. 시험관을 비운 후 여기에 3% non-fat milk 용액에 분산된 2×10^{11} CFU의 항체 파지 라이브러리를 첨가하여 항원과 반응시켰다. 비특이적으로 결합한 파지를 1×PBST(phosphate-buffered saline+tween20) 완충용액으로 3회 세척하였다. 남아있는 항원 특이적 파지 항체를 100 mM 트리에틸아민(Sigma, Cat no. 471283) 용액으로 용리하였다. 용리된 파지를 1.0 M 농도의 Tris-HCl(바이오세상, TR2016-050-75) 완충용액으로 중화시킨 후, TG1(Lucigen, Cat no. 60502-2) 대장균에 형질 도입하여 역가를 측정하였다. 상기 파지는 다음 라운드의 패닝 전에 동일한 숙주에서 증폭시켰다.

[187] 상기 증폭된 대장균을 5 mL의 SB 배지(20 g Yeast extract(Duchfa, Cat no. T1333), 30 g Trypton(Duchfa, Cat no. T1332), 10 g MOPS(Duchefa, Cat no. M1502), 및 100 ug/mL ampicillin(바이오세상, Cat no. AC1043-025-00)/1 L distilled water)에 현탁하였다. 상기 현탁액 50 uL를 20 mL의 SB-ampicillin 용액에 접종하여 37℃에서 배양하였다. 배양액의 흡광도(OD_{600})가 0.5가 되었을 때, 10^{10} PFU의 M13KO7 helper phage(Invitrogen, Cat no. 18311-019)를 첨가하여 37℃에서 서서히 교반하며 배양하였다. 1시간 후 kanamycin(Biosesang, Cat no. KC1001-025-02) 70 ug/mL을 첨가하고 30℃에서 빠르게 교반(220 rpm)하며 밤새 배양하였다.

[188] 다음날 배양액을 원심분리한 후, 파지 입자를 포함하는 상층액을 새로운 50 mL 튜브에 옮긴 뒤, 5 mL의 PEG/NaCl 용액을 첨가하여 ice에서 30분간 반응시켰다. 침전된 파지를 원심분리한 뒤, 1×PBS 완충용액에 녹였다. 상기 파지 용액을 라이브러리로 사용하여 상기 패닝 과정을 반복함으로써 항원 특이적 클론을 농축시켰다.

[189] 패닝을 거친 개별 콜로니는 10 ug/mL off-target 항원, 20 ug/mL huSOX2 및 $huSOX2_{135-317}$ 단백질에 대해 96-웰 ELISA screening을 진행하였다. off-target 항원 단백질에 대해 negative signal을 띄고, huSOX2 단백질(2종)에 대해 positive signal

을 가지는 클론들의 서열을 확인하여 서로 다른 서열을 가진 클론 9종(서열번호 6 내지 서열번호 14)을 도출하였다.

[190] Genscript Probio에 의뢰하여 Biointron에서 생산한 huSOX2(서열번호 1), cynoSOX2(서열번호 2) 및 huSOX3(서열번호 3)를 각각 항원으로 사용하여 sdAb(single domain antibody) 나이브 파지 디스플레이 라이브러리에서 항-huSOX2 VHH 항체의 선별하였다. 3라운드 패닝을 거쳐 huSOX2 및 cynoSOX2에는 결합하고, huSOX3에는 결합하지 않은 항-huSOX2 VHH 항체로 3F11(서열번호 15), 3A2(서열번호 16) 및 3H9(서열번호 17)(총 3종)를 선별하였다.

[191] 상기 3가지 방법의 항체 선별을 통해 수득한 항-huSOX2 VHH 항체의 서열을 분석한 결과, 도 1 및 표 2에 기재된 아미노산 서열을 가진 클론 13종을 최종적으로 도출하였다.

[192] [표2]

클론명	FR1	HCDR1	FR2	HCDR2	FR3	HCDR3	FR4
S14 (서열번호 5)	QVKLEESGG GSVQTGGSL RLTCAAS(서열번호 55)	GSIFSMNR(서열번호 56)	MGWFRQAP GKERELVA V(서열번 호 57)	IDSKRNKT(서열번호 58)	HYADSVKGRFT ISRDNAKNTVD LQMNSLKPEDT AIYYC(서열 번호 59)	TAWTGRPPR GY(서열번 호 60)	WGQGTQVT VSS(서열 번호 61)
1A5 (서열번호 6)	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS(서열번호 62)	GSTYTTYS(서열번호 63)	MGWFRQAP GKEREFVG A(서열번 호 64)	IHWSGGRT(서열번호 65)	YYADSVKGRFT ISADNSKNTAY LQMNSLKPEDT AVYYC(서열 번호 66)	ASRVDDRV(서열번호 67)	WGQGTLVT VSS(서열 번호 68)
1A9 (서열번호 7)	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS(서열번호 62)	GRTFSTYS(서열번호 69)	MGWFRQAP GKEREFVA A(서열번 호 70)	IRWTAGTT(서열번호 71)	YYADSVKGRFT ISADNSKNTAY LQMNSLKPEDT AVYYC(서열 번호 66)	ASRVDDRV(서열번호 67)	WGQGTLVT VSS(서열 번호 68)
1A11 (서열번호 8)	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS(서열번호 62)	GSTYTTYS(서열번호 63)	MGWFRQAP GKEREFVA A(서열번 호 70)	IHWSGGGT(서열번호 72)	YYADSVKGRFT ISADNSKNTAY LQMNSLKPEDT AVYYC(서열 번호 66)	ASRVDDRV(서열번호 67)	WGQGTLVT VSS(서열 번호 68)
1B9 (서열번호 9)	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS(서열번호 62)	GLTFSTYS(서열번호 73)	MGWFRQAP GKEREFVA A(서열번 호 70)	ITWNSGRRT (서열번호 74)	YYADSVKGRFT ISADNSKNTAY LQMNSLKPEDT AVYYC(서열 번호 66)	ASRVDDRV(서열번호 67)	WGQGTLVT VSS(서열 번호 68)
1C2 (서열번호 10)	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS(서열번호 62)	GSTYTTYS(서열번호 63)	MGWFRQAP GKEREFVA A(서열번 호 70)	IRWSGGTT(서열번호 75)	YYADSVKGRFT ISADNSKNTAY LQMNSLKPEDT AVYYC(서열 번호 66)	ASRVDDRV(서열번호 67)	WGQGTLVT VSS(서열 번호 68)
1C11 (서열번호 11)	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS(서열번호 62)	GSTYTTYS(서열번호 63)	MGWFRQAP GKEREFVG A(서열번 호 64)	IRWSGGTT(서열번호 75)	YYADSVKGRFT ISADNSKNTAY LQMNSLKPEDT AVYYC(서열 번호 66)	ASRVDDRV(서열번호 67)	WGQGTLVT VSS(서열 번호 68)
1C12 (서열번호 12)	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS(서열번호 62)	GSTYTTYS(서열번호 63)	MGWFRQAP GKEREFVA A(서열번 호 70)	IRWSGGST(서열번호 76)	HYADSVKGRFT ISADNSKNTAY LQMNSLKPEDT AVYYC(서열 번호 77)	ASRVDDRV(서열번호 67)	WGQGTLVT VSS(서열 번호 68)

[193]

2E8 (서열번호 14)	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS(서열번호 62)	GFTLDYYG(서열번호 78)	MGWFRQAP GKEREFVA A(서열번 호 70)	ISRSGGST(서열번호 79)	VYADSVKGRFT ISADNSKNTAY LQMNSLKPEDT AVYYC(서열 번호 80)	AREVVRGGI NY(서열번 호 81)	WGQGTLVT VSS(서열 번호 68)
1C4 (서열번호 13)	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS(서열번호 62)	GGGFRGNAV(서열번호 82)	MGWFRQAP GKERELVA A(서열번 호 83)	IRGSGEDT(서열번호 84)	YYADSVKGRFT ISADNSKNTAY LQMNSLKPEDT AVYYC(서열 번호 66)	AGGWRRGYF QD(서열번 호 85)	WGQGTLVT VSS(서열 번호 68)
3F11 (서열번호 15)	DVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCATS(서열번호 86)	GFTFSSST(서열번호 87)	MSWVRQVP GAGPEWVA V(서열번 호 88)	DNPGGKK(서열번호 89)	NYIDSVAGRFT IARDNDANSLS LVMNGLRPEDT ARYFC(서열 번호 90)	ARVLSFKIY EGDKWALEW DY(서열번 호 91)	RGPGTQVT VSS(서열 번호 92)
3A2 (서열번호 16)	EVQLVESGG EQVQPGSSL KLSCSVS(서열번호 93)	GLMISGHA(서열번호 94)	MSWVRQVP GAGPEWVA V(서열번 호 88)	DNPGGKK(서열번호 89)	NYIDSVAGRFT IARDNDANSLS LVMNGLRPEDT ARYFC(서열 번호 90)	ARVLSFKIY EGDKWALEW DY(서열번 호 91)	RGPGTQVT VSS(서열 번호 92)
3H9 (서열번호 17)	QVQLVESGG EQVQPGSSL KLSCSVS(서열번호 95)	GLMISGHA(서열번호 94)	MSWVRQVP GAGPEWVA V(서열번 호 88)	DNPGGKK(서열번호 89)	NYIDSVAGRFT IARDNDANSLS LVMNGLRPEDT ARYFC(서열 번호 90)	ARVLSFKIY GGDKWALEW DY(서열번 호 96)	RGPGTQVT VSS(서열 번호 92)

[194] **실시예 2. 선별된 항-huSOX2 VHH 항체 클론의 결합력 확인**

[195] 선별된 클론 13종 중 9종을 선택하여 논문(Wang Z *et al.*, "A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities". Protein Eng Des Sel. (2005) 18:337-343, doi:10.1093/protein/gzi036)을 참고하여 제작된 효모 표면 발현벡터인 pYD5에 삽입하였다.

[196] 상기 클론들은 SD-CAA 배지(20 g glucose(SIGMA, Cat no. G7528), 14.7 g sodium citrate(SIGMA, Cat no. C8532), 4.3 g citric acid monohydrate(SIGMA, Cat no. C0706), 6.7 g yeast nitrogen base(BD Difco, Cat no. 291940), 5 g bacto casamino acid(BD Difco, Cat no. 223050), 100 ug/mL kanamycin(Biosesang, Cat no. KC1001-025-02)/1 L distilled water)를 이용하여 약 16시간 동안 30℃에서 배양하였다. 상기 배양액을 SG-CAA 배지에 OD_{600}=1이 되도록 희석하여 18시간 동안 30℃에서 추가 배양한 뒤, 효모 표면에 항-huSOX2 VHH 항체가 발현되도록 유도하였다.

[197] 배양한 효모 0.5×10^7 개, 2 uM의 비오틴화된 huSOX2(Biointron) 또는 2 uM의 비오틴화된 off-target 항원(인간 재조합 SKP1 단백질, Sinobiological, Cat no. 14161-H40E-B) 및 1:500 비율의 항-V5 마우스 항체(Invitrogen, Cat no. R960-25)(1:500의 비율로 wash buffer((0.1% BSA를 포함하는 PBS)에 희석)를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시켜 1차 염색을 수행하였다.

[198] 그리고 1:100 비율로 wash buffer에 희석된 Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate(SAPE)(Invitrogen, Cat no. SA10044) 및 항-마우스 IgG(H+L)-FITC 항체(Invitrogen, Cat no. 11-4011-85)를 첨가하여 4℃에서 20분간 암반응 하였다(2차 염색). 상기 반응 결과물을 유세포분석기(SONY, SH800S)를 사용하여 분석함으로써 항-huSOX2 VHH 항체의 huSOX2 단백질에 대한 결합력을 확인하였다.

[199] 그 결과, 도 2a 및 도 2b에 나타낸 바와 같이, 상기와 같이 제작된 항-huSOX2 항체는 SOX2에만 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[200] **실시예 3. 항-huSOX2 VHH 항체의 생산 및 항원 결합력 분석**

[201] 상기 실시예 1의 방법으로 생산된 항-huSOX2 VHH 항체(3종; 3A2, 3F11, 3H9)에 대한 항원의 친화도를 평가하였다.

[202] 먼저 코돈 최적화 후 human Fc(서열번호 151)가 접합된 형태의 단일 도메인 항체(single domain antibody, sdAb)를 Expi-CHO-S 세포에서 발현시킨 뒤, Protein A 친화성 컬럼을 사용하여 sdAb-Fc를 정제하였다(표 3). huSOX2 단백질에 대한 각각의 상기 항체의 결합 친화도는 Surface Plasmon Resonance(SPR) 바이오센서(Biacore 8K)를 사용하여 확인하였다.

[203] [표3]

이름		서열	서열번호
3F11 2-Fc	Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	151
	linker	GGGGSGGGGSGGGGS	238
	3F11	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSSSTMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGGKKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWALEWDYRGPGTQVTVSS	15
3A2-Fc	Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC	151

		PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	
	linker	GGGGSGGGGSGGGGS	238
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSW VRQVPGAGPEWVAVDNPGGKKNYIDSVAGRFTIAR DNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGD KWALEWDYRGPGTQVTVSS	16
3H9-Fc	Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	151
	linker	GGGGSGGGGSGGGGS	238
	3H9	QVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMS WVRQVPGAGPEWVAVDNPGGKKNYIDSVAGRFTIA RDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYGG DKWALEWDYRGPGTQVTVSS	17

[204] 구체적으로, 항체는 Fc 캡처 방법을 통해 센서 칩 Protein A에 약 100 RU로 캡처되었다. huSOX2 단백질은 분석 물질로서 희석하여 flow 1 및 2의 표면에 주입한 다음 해리 단계로서 런닝 완충용액(running buffer)을 주입하였다. 해리 속도 상수(kd) 및 결합 속도 상수(ka)는 Biacore 8K evaluation software를 사용하여 분석하였다. 또한, 평형 해리 상수(KD)는 ka에 대한 kd의 비율로부터 계산하였다. 상기 분석 결과는 표 4에 기재하였다.

[205] [표4]

항체 종류	3F11	3A2	3H9
항원	huSOX2	huSOX2	huSOX2

ka(1/Ms)	1.75E+05	1.48E+05	2.13E+05
kd(1/s)	5.41E-04	3.52E-04	2.26E-04
KD(M)	2.12E-09	2.39E-09	1.06E-09

[206] **실시예 4. 항-huSOX2 VHH 항체 및 표적 단백질의 특이적 결합력 확인**

[207] 상기 실시예 1에서 선별된 단일 도메인 항체 클론 중 5종을 이용하여 huSOX2 단백질에 대한 특이적 결합력을 NanoBRET™Nano-Glo® substrate(Promega, Cat no. N1661)를 이용하여 측정하였다.

[208] 구체적으로, huSOX2 단백질의 발현벡터는 N 말단에서 순차적으로 Halo 태그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 154) 및 huSOX2를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 97)를 pHTN 벡터(Promega, Cat no. G7721)에 적재하여 제작하였다. 또한, 각각의 단일 도메인 항체 클론 5종의 발현벡터는 N 말단에서 순차적으로 NanoLuc 태그(서열번호 156) 및 단일 도메인 항체 클론 5종을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 101, 서열번호 110, 서열번호 111, 서열번호 112 또는 서열번호 113)를 각각 pNLF1 벡터(Promega, Cat no. N1351)에 적재하여 발현벡터(pNLF1-N-S14, pNLF1-N-2E8, pNLF1-N-3F11, pNLF1-N-3A2, pNLF1-N-3H9)를 제작하였다.

[209] 상기와 같이 제조한 발현벡터를 각각 비율별로 조합하여 리포펙타민 3000(Lipofectamine 3000, Invitrogen, Cat no. L3000001)을 이용하여 사람 신장 세포주(HEK293T 세포)에 형질 주입하였다. 형질 주입 24시간 뒤, HEK293T 세포에 Halo 태그에 결합하는 리간드인 HaloTag 618을 처리하고 6시간 추가 배양하였다. 그 뒤, Nano-Glo substrate를 처리하여 발광시킨 뒤 마이크로플레이트리더기(BioTek, Synergy HTX)를 사용하여 발광값을 측정하였다. 상기 결과값은 Graphpad prism 소프트웨어를 이용하여 그래프를 도출하였다.

[210] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 사용된 5종 항체 클론은 모두 huSOX2 단백질에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[211] **실시예 5. 항-huSOX2 VHH 항체를 포함하는 바이오프로탁 제작**

[212] **실시예 5.1. S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 제작**

[213] 선별된 단일 도메인 항체 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제(E3 ubiquitin ligase)를 포함하는 융합단백질의 SOX2 단백질 특이적 분해능을 확인하기 위하여 E3 유비퀴틴 리가제(E3 ubiquitin ligase) 단편 및 S14를 포함하는 융합단백질을 제작하였다. 이때, 사용된 유비퀴틴 리가제 단편(11종)의 아미노산 서열은 표 5에 기재하였다.

[214] 상기 융합단백질은 E3 유비퀴틴 리가제 단편(서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 24, 서열번호 25 또는 서열번호 27)-GS(서열번호 157)-S14(서열번호 5) 또는 S14(서열번호 5)-GS(서열번호 157)-E3 유비퀴틴 리가제 단편(서열번호 20 내지 서열번호 23, 서열번호 26 또는 서열번호 28)을 포함하고, 상기 N 말단에 위치한 E3 유비퀴틴 리가제 단편 또는 S14의 N 말단으로 Flag-tag(서열번호 162)이 포함된 형태로 제작되었다. 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오

티드(서열번호 129 내지 서열번호 139)는 각각 포유동물 세포 발현을 위하여 pCMV6(Origene, Cat no. PS100001) 벡터에 적재하여 사용하였다. 상기 융합단백질의 서열은 표 6에 기재하였다. 이하, 상기 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 "S14-E3 유비퀴틴 리가제"와 혼용하여 기재하였다.

[215] C 말단에 Myc 태그(서열번호 158)가 포함된 huSOX2.Myc(서열번호 32)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 128)도 상기 벡터에 적재하여 발현벡터를 제작하였다.

[216] [표5]

이름	UniProt ID.	위치	서열	서열번호
βTrCP 190-228	Q9Y297	190-228	DPAEAVLQEKALKFMNSSEREDCNNG EPPRKIIPEKNSLRQTYNSCARLCLNQE TVCLASTAMKTENCVAKTKLANGTSS MIVPKQRKLSASYEKEKELCVKYFEQ WSESDQVEFVEHLISQMCHYQHGHINS YLKPMLQRDFITALPARGLDHIAENILS YLDAKSLCAAELVCKEWYRVTSDGML WKKLIERMVRTDSLWRGLAERRGWG QYLFKNKPPDGNAPPNSFYRALYPKIIQ DIETIESNWRCGRHSLQRIHCR	18
$SKP2_{2-176}$	Q13309	2-176	HRKHLQEIPDLSSNVATSFTWGWDSSK TSELLSGMGVSALEKEEPDSENIPQELL SNLGHPESPPRKRLKSKGSDKDFVIVR RPKLNRENFPGVSWDSLPDELLLGIFSC LCLPELLKVSGVCKRWYRLASDESLW QTLDLTGKNLHPDVTGRLLSQGVIAFR CPRSFMDQPLAE	19
$VHL_{152-213}$	P40337	152-213	TLPVYTLKERCLQVVRSLVKPENYRRL DIVRSLYEDLEDHPNVQKDLERLTQER IAHQRMGD	20
$SPOP_{1}$ 67-374	043791	167-374	SVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGG LWENSRFTDCCLCVAGQEFQAHKAIL AARSPVFSAMFEHEMEESKKNRVEIND VEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMAD DLLAAADKYALERLKVMCEDALCSNL SVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFI	21

			NYHASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAE AYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQS	
SOCS $2_{143-198}$	O14508	143-198	PRNGTVHLYLTKPLYTSAPSLQHLCRL TINKCTGAIWGLPLPTRLKDYLEEYKF QV	22
$CHIP_{128-303}$	Q9U NE7	128-303	RLNFGDDIPSALRIAKKKRWNSIEERRI HQESELHSYLSRLIAAERERELEECQRN HEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYM ADMDELFSQVDEKRKKRDIPDYLCGKI SFELMREPCITPSGITYDRKDIEEHLQR VGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVI DAFISENGWVEDY	23
DDB2 2-114	Q92466	2-114	APKKRPETQKTSEIVLRPRNKRSRSPLE LEPEAKKLCAKGSGPSRRCDSDCLWV GLAGPQILPPCRSIVRTLHQHKLGRAS WPSVQQGLQQSFLHTLDSYRILQKAAP FDRRA	24
$CRBN_{2-320}$	Q96 SW2	2-320	AGEGDQQDAAHNMGNHLPLLPAESEE EDEMEVEDQDSKEAKKPNIINFDTSLPT SHTYLGADMEEFHGRTLHDDDSCQVIP VLPQVMMILIPGQTLPLQLFHPQEVSM VRNLIQKDRTFAVLAYSNVQEREAQFG TTAEIYAYREEQDFGIEIVKVKAIGRQR FKVLELRTQSDGIQQAKVQILPECVLPS TMSAVQLESLNKCQIFPSKPVSREDQC SYKWWQKYQKRKFHCANLTSWPRWL YSLYDAETLMDRIKKQLREWDENLKD DSLPSNPIDFSYRVAACLPIDDVLRIQLL KIGSAIQRLRCELDIMNKCTS	25
$ASB1_{266-335}$	Q9Y576	266-335	VKWESLGPESRGRRKVDPEALQVFKE ARSVPRTLLCLCRVAVRRALGKHRLH LIPSLPLPDPIKKFLLHE	26
TRIM 21_{2-85}	P19474	2-85	ASAARLTMMWEEVTCPICLDPFVEPVS IECGHSFCQECISQVGKGGGSVCPVCR QRFLLKNLRPNRQLANMVNNLKEISQE ARE	27

RNF4 71-190	P78317	71-190	DERRRPRRNARRLPQDHADSCVVSSD DEELSRDRDVYVTTHTPRNARDEGAT GLRPSGTVSCPICMDGYSEIVQNGRLIV STECGHVFCSQCLRDSLKNANTCPTCR KKINHKRYHPIYI	28

[217] [표6]

이름	융합단백질	서열	서열번호
S14.001 (서열번호 33)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	βTrCP$_{190-228}$	DPAEAVLQEKALKFMNSSEREDCNNGEPPRKIIPEKNSLRQTYNSCARLCLNQ ETVCLASTAMKTENCVAKTKLANGTSSMIVPKQRKLSASYEKEKELCVKYFEQ WSESDQVEFVEHLISQMCHYQHGHINSYLKPMLQRDFITALPARGLDHIAENI LSYLDAKSLCAAELVCKEWYRVTSDGMLWKKLIERMVRTDSLWRGLAERRGWG QYLFKNKPPDGNAPPNSFYRALYPKIIQDIETIESNWRCGRHSLQRIHCR	18
	linker	GS	157
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
S14.003 (서열번호 34)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	SKP2$_{2-176}$	HRKHLQEIPDLSSNVATSFTWGWDSSKTSELLSGMGVSALEKEEPDSENIPQE LLSNLGHPESPPRKRLKSKGSDKDFVIVRRPKLNRENFPGVSWDSLPDELLLG IFSCLCLPELLKVSGVCKRWYRLASDESLWQTLDLTGKNLHPDVTGRLLSQGV IAFRCPRSFMDQPLAE	19
	linker	GS	157
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
S14.004 (서열번호 35)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
	linker	GS	157
	VHL$_{152-213}$	TLPVYTLKERCLQVVRSLVKPENYRRLDIVRSLYEDLEDHPNVQKDLERLTQE RIAHQRMGD	20
S14.005 (서열번호 36)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
	linker	GS	157
	SPOP$_{167-374}$	SVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRFTDCCLCVAGQEFQAHKAILA ARSPVFSAMFEHEMEESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADD LLAAADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFI NYHASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQS	21

[218]

S14.006 (서열번호 37)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
	linker	GS	157
	$SOCS2_{143-198}$	PRNGTVHLYLTKPLYTSAPSLQHLCRLTINKCTGAIWGLPLPTRLKDYLEEYK FQV	22
S14.007 (서열번호 38)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
	linker	GS	157
	$CHIP_{128-303}$	RLNFGDDIPSALRIAKKKRWNSIEERRIHQESELHSYLSRLIAAERERELEEC QRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVDEKRKKRDIPDYLCG KISFELMREPCITPSGITYDRKDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAM KEVIDAFISENGWVEDY	23
S14.008 (서열번호 39)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	$DDB2_{2-114}$	APKKRPETQKTSEIVLRPRNKRSRSPLELEPEAKKLCAKGSGPSRRCDSDCLW VGLAGPQILPPCRSIVRTLHQHKLGRASWPSVQQGLQQSFLHTLDSYRILQKA APFDRRA	24
	linker	GS	157
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
S14.009 (서열번호 40)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	$CRBN_{2-320}$	AGEGDQQDAAHNMGNHLPLLPAESEEEDEMEVEDQDSKEAKKPNIINFDTSLP TSHTYLGADMEEFHGRTLHDDDSCQVIPVLPQVMMILIPGQTLPLQLFHPQEV SMVRNLIQKDRTFAVLAYSNVQEREAQFGTTAEIYAYREEQDFGIEIVKVKAI GRQRFKVLELRTQSDGIQQAKVQILPECVLPSTMSAVQLESLNKCQIFPSKPV SREDQCSYKWWQKYQKRKFHCANLTSWPRWLYSLYDAETLMDRIKKQLREWDE NLKDDSLPSNPIDFSYRVAACLPIDDVLRIQLLKIGSAIQRLRCELDIMNKCT S	25
	linker	GS	157
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
S14.010 (서열번호	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG	5

[219]

41)		YWGQGTQVTVSS	
	linker	GS	157
	$ASB1_{266-335}$	VKWESLGPESRGRRKVDPEALQVFKEARSVPRTLLCLCRVAVRRALGKHRLHL IPSLPLPDPIKKFLLHE	26
S14.011 (서열번호 42)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	$TRIM21_{2-85}$	ASAARLTMMWEEVTCPICLDPFVEPVSIECGHSFCQECISQVGKGGGSVCPVC RQRFLLKNLRPNRQLANMVNNLKEISQEARE	27
	linker	GS	157
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
S14.012 (서열번호 43)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	S14	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGSIFSMNRMGWFRQAPGKERELVAVIDS KRNKTHYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCTAWTGRPPRG YWGQGTQVTVSS	5
	linker	GS	157
	$RNF4_{71-190}$	DERRRPRRNARRLPQDHADSCVVSSDDEELSRDRDVYVTTHTPRNARDEGATG LRPSGTVSCPICMDGYSEIVQNGRLIVSTECGHVFCSQCLRDSLKNANTCPTC RKKINHKRYHPIYI	28

[220] **실시예 5.2. 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 제작**

[221] 상기 실시예 1에서 선별된 단일 도메인 항체 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 SOX2 단백질 특이적 분해능을 확인하기 위하여, E3 유비퀴틴 리가제 단편 및 3A2를 포함하는 융합단백질을 제작하였다. 이때, 사용된 유비퀴틴 리가제 단편(10종)의 아미노산 서열은 표 7에 기재하였다.

[222] 상기 융합단백질은 3A2(서열번호 16)-GS(서열번호 157)-E3 유비퀴틴 리가제 단편(서열번호 20 내지 서열번호 23, 서열번호 26 또는 서열번호 28 내지 서열번호 31), 또는 E3 유비퀴틴 리가제 단편(서열번호 27)-GS(서열번호 157)-3A2(서열번호 16)를 포함하고, 상기 N 말단에 위치한 3A2 또는 E3 유비퀴틴 리가제 단편의 N 말단으로 Flag-tag이 포함된 형태로 제작되었다.

[223] 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 140 내지 서열번호 149)는 각각 포유동물 세포 발현을 위하여 pCMV6(Origene, Cat no. PS100001) 벡터에 적재하여 사용하였다. 상기 융합단백질의 서열은 표 8에 기재하였다. 이하, 상기 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질을 "3A2-E3 유비퀴틴 리가제"와 혼용하여 기재하였다.

[224] C 말단에 V5-tag(서열번호 160)가 포함된 huSOX2.V5(서열번호 54)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 150)도 상기 벡터에 적재하여 발현벡터를 제작하였다.

[225] [표7]

이름	UniProt ID.	위치	서열	서열번호
VHL 152-213	P40337	152-213	TLPVYTLKERCLQVVRSLVKPENYRRLDIVRSLYEDLEDHPNVQKDLERLTQERIAHQRMGD	20
$SPOP_{67-374}$	043791	167-374	SVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRFTDCCLCVAGQEFQAHKAILAARSPVFSAMFEHEMEESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADDLLAAADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYHASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQS	21
$SOCS2_{143-198}$	O14508	143-198	PRNGTVHLYLTKPLYTSAPSLQHLCRLTINKCTGAIWGLPLPTRLKDYLEEYKFQV	22
CHIP 128-303	Q9UNE7	128-303	RLNFGDDIPSALRIAKKKRWNSIEERRIHQESELHSYLSRLIAAERERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACIEAKHDKYMADMDELFSQVDEKRKKRDIPDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVIDAFISENGWVEDY	23
ASB1 266-335	Q9Y576	266-335	VKWESLGPESRGRRKVDPEALQVFKEARSVPRTLLCLCRVAVRRALGKHRLHLIPSLPLPDPIKKFLLHE	26
$TRIM21_{2-85}$	P19474	2-85	ASAARLTMMWEEVTCPICLDPFVEPVSIECGHSFCQECISQVGKGGGSVCPVCRQRFLLKNLRPNRQLANMVNNLKEISQEARE	27
RNF4 71-190	P78317	71-190	DERRRPRRNARRLPQDHADSCVVSSDDEELSRDRDVYVTTHTPRNARDEGATGLRPSGTVSCPICMDGYSEIVQNGRLIVSTECGHVFCSQCLRDSLKNANTCPTCRKKINHKRYHPIYI	28

UBE2D1$_{2-147}$	P51668	2-147	ALKRIQKELSDLQRDPPAHCSAGPVGDDLFHWQATIMGPPDSAYQGGVFFLTVHFPTDYPFKPPKIAFTTKIYHPNINSNGSICLDILRSQWSPALTVSKVLLSICSLLCDPNPDDPLVPDIAQIYKSDKEKYNRHAREWTQKYAM	29
UBE2D4$_{2-147}$	Q9Y2X8	2-147	ALKRIQKELTDLQRDPPAQCSAGPVGDDLFHWQATIMGPNDSPYQGGVFFLTIHFPTDYPFKPPKVAFTTKIYHPNINSNGSICLDILRSQWSPALTVSKVLLSICSLLCDPNPDDPLVPEIAHTYKADREKYNRLAREWTQKYAM	30
ZNFR1$_{138-227}$	Q8ND25	138-227	SSHSGFKCPICSKSVASDEMEMHFIMCLSKPRLSYNDDVLTKDAGECVICLEELLQGDTIARLPCLCIYHKSCIDSWFEVNRSCPEHPAD	31

[226] [표8]

이름	구성	서열	서열번호
3A2.004 (서열번호 44)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16
	linker	GS	157
	$VHL_{152-213}$	TLPVYTLKERCLQVVRSLVKPENYRRLDIVRSLYEDLEDHPNVQKDLERLTQERI AHQRMGD	20
3A2.005 (서열번호 45)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16
	liner	GS	157
	$SPOP_{167-374}$	SVNISGQNTMNMVKVPECRLADELGGLWENSRFTDCCLCVAGQEFQAHKAILAAR SPVFSAMFEHEMEESKKNRVEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADDLLAA ADKYALERLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYHASD VLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSLASAQCPFLGPPRKRLKQS	21
3A2.006 (서열번호 46)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16
	linker	GS	157
	$SOCS2_{143-198}$	PRNGTVHLYLTKPLYTSAPSLQHLCRLTINKCTGAIWGLPLPTRLKDYLEEYKFQ V	22
3A2.007 (서열번호 47)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16
	liner	GS	157
	$CHIP_{128-303}$	RLNFGDDIPSALRIAKKKRWNSIEERRIHQESELHSYLSRLIAAERERELEECQR NIEGDEDDSIIVRAQQACIEAKIDKYMADMDELFSQVDEKRKKRDIPDYLCGKISF ELMREPCITPSGITYDRKDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVIDA FISENGWVEDY	23
3A2.010 (서열번호 48)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16

[227]

	linker	GS	157
	$ASB1_{266-335}$	VKWESLGPESRGRRKVDPEALQVFKEARSVPRTLLCLCRVAVRRALGKHRLHLIP SLPLPDPIKKFLLHE	26
3A2.011 (서열번호 49)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	$TRIM21_{2-85}$	ASAARLTMMWEEVTCPICLDPFVEPVSIECGHSFCQECISQVGKGGGSVCPVCRQ RFLLKNLRPNRQLANMVNNLKEISQEARE	27
	linker	GS	157
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16
3A2.012 (서열번호 50)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16
	linker	GS	157
	$RNF4_{71-190}$	DERRRPRRNARRLPQDHADSCVVSSDDEELSRDRDVYVTTHTPRNARDEGATGLR PSGTVSCPICMDGYSEIVQNGRLIVSTECGHVFCSQCLRDSLKNANTCPTCRKKI NHKRYHPIYI	28
3A2.018 (서열번호 51)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16
	linker	GS	157
	$UBE2D1_{2-147}$	ALKRIQKELSDLQRDPPAHCSAGPVGDDLFHWQATIMGPPDSAYQGGVFFLTVHF PTDYPFKPPKIAFTTKIYHPNINSNGSICLDILRSQWSPALTVSKVLLSICSLLC DPNPDDPLVPDIAQIYKSDKEKYNRHAREWTQKYAM	29
3A2.019 (서열번호 52)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16
	linker	GS	157
	$UBE2D4_{2-147}$	ALKRIQKELTDLQRDPPAQCSAGPVGDDLFHWQATIMGPNDSPYQGGVFFLTIHF PTDYPFKPPKVAFTTKIYHPNINSNGSICLDILRSQWSPALTVSKVLLSICSLLC DPNPDDPLVPEIAHTYKADREKYNRLAREWTQKYAM	30
3A2.020 (서열번호 53)	Flag-tag	DYKDDDDK	162
	3A2	EVQLVESGGEQVQPGSSLKLSCSVSGLMISGHAMSWVRQVPGAGPEWVAVDNPGG KKNYIDSVAGRFTIARDNDANSLSLVMNGLRPEDTARYFCARVLSFKIYEGDKWA LEWDYRGPGTQVTVSS	16

[228]

	linker	GS	157
	$ZNFR1_{138-227}$	SSHSGFKCPICSKSVASDEMEMHFIMCLSKPRLSYNDDVLTKDAGECVICLEELL QGDTIARLPCLCIYHKSCIDSWFEVNRSCPEHPAD	31

[229] **실시예 6. S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 SOX2 단백질 분해능 평가**

[230] S14와 SOX2의 결합을 통한 S14-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 SOX2 단백질 특이적 분해능을 확인하였다.

[231] 구체적으로, 상기 실시예 5.1의 방법으로 제작된 11종의 S14-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 발현벡터 및 huSOX2.Myc 단백질 발현벡터를 각각 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에 리포펙타민 3000(Lipofectamine 3000, Invitrogen, Cat no. L3000001)을 이용하여 형질도입 하였다. 형질도입 24시간 후, 상기 세포를 각각 차가운 PBS 완충용액(Gibco, Cat no. 10010-023)으로 2회 세척하고 단백질 분해효소 억제제 칵테일(Thermofisher, Cat no. 78440)을 포함하는 M-PER 단백질 추출액(M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermofisher, Cat no. 78505)을 처리하여 세포 추출물을 수득하였다. 상기 각각의 세포 추출물을 초음파 파쇄기(sonicator)를 이용하여 균일하게 파쇄한 뒤, 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 상기 각각의 상등액의 단백질량을 BCA 키트(ThermoFisher, Cat no. 23227)로 정량하고, 각 시료에 대하여 동량의 단백질(30 ug)을 4-12% SDS PAGE 겔(Invitrogen, Cat no. NW04125BOX)에서 전기영동 하였다.

[232] 상기와 같이 분리된 단백질을 PVDF 멤브레인(Invitrogen, Cat no. IB24002)에 옮긴 뒤, 상기 멤브레인에 블로킹 완충용액[5% skim milk(BD, Cat no. 232100)가 포함된 1×PBST 완충용액(1×PBS, 0.1% Tween 20)을 처리하여 60분간 블로킹하였다. 블로킹 후, 1차 항체를 처리하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. 이때, 1차 항체는 항-c-Myc 항체(SantaCruz, Cat no. sc-40, 1:5000), 항-FLAG 항체(Sigma, Cat no. F1804, 1:2500) 또는 항-α-tubulin 항체(GeneTex, Cat no. GTX628802, 1:3000)를 각각 블로킹 완충용액에 희석하여 사용하였다. 1차 항체 반응 후 상기 멤브레인을 1×PBST 완충용액에서 10분씩 3회 세척하였다. 그리고, 상기 멤브레인에 2차 항체를 각각 처리한 뒤, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때, 2차 항체는 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 항-마우스 항체(CST, Cat no. 7076)를 블로킹 완충용액에 희석하여 사용하였다. 2차 항체 반응 후, 상기 멤브레인을 1×PBST 완충용액에서 10분씩 3회 세척하였다.

[233] 각각의 단백질의 발현 정도는 ECL(Cytiva, Cat no. RPN2232 또는 Thermofisher, Cat no. 34096) 용액을 처리한 뒤 Imager(Invitrogen, iBright, CL1500)를 이용하여 확인하였다. 또한, 상기 단백질의 발현량을 α-tubulin 대비 SOX2 단백질량을 정량화하여 그래프(Graphpad prism 소프트웨어)로 나타내었다.

[234] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 총 11종 중 9종의 S14-E3 유비퀴틴 리가제 융합 단백질이 SOX2 단백질을 분해하는 것을 확인하였다. 특히, S14.010 및 S14.012의 경우 대조군(Mock) 대비 70% 이상의 SOX2 단백질 분해능을 나타내었다.

[235] **실시예 7. S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 암세포 성장 저해 및 세포사멸 유도 효과**

[236] **실시예 7.1. 인간 암세포주에서 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질에 의한 세포성장 저해 및 세포사멸 유도 효과 확인**

[237] S14-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 암세포 성장 저해 및 세포사멸 (apoptosis) 유도 효과를 확인하였다.

[238] 먼저, S14.010를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 137) 또는 S14.012를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 139)를 주형으로 하여 Genscript Probio에 의뢰하여 각각의 mRNA를 제작하였다.

[239] 상기와 같이 제작된 S14.010 mRNA 또는 S14.012 mRNA를 리포펙타민-메신저맥스(Lipofectamine MessengerMAX, Invitrogen, Cat no. LMRNA015)를 이용하여 인간 췌장암 세포주(BxPC3 세포) 또는 인간 비소세포성 폐암 세포주 (NCI-H1703 세포, A549 세포)에 형질도입 하였다. 이때, 양성 대조군으로 SOX2 siRNA(Origene, Cat no. SR321861-A)을 사용하였고, 대조군으로 siRNA(Santacruz, Cat no. sc-37007)를 사용하여 암세포주에서 SOX2 단백질 발현에 따른 세포사멸 유도 효과를 확인하였다.

[240] 또한, 세포사멸은 Caspase-3/7 Green Dye for Apoptosis(Satorius, Cat no. 4440)를 형질도입된 각 세포에 처리한 뒤, Incucyte(Satorius) 장비를 통해 위상 채널 및 형광 채널을 이용하여 3시간 간격으로 촬영한 이미지를 분석(Incucyte 소프트웨어를 이용)하여 확인하였다.

[241] 그 결과, 도 5a 내지 도 5c에 나타낸 바와 같이, SOX2 siRNA 처리군, S14.010 mRNA 처리군 및 S14.012 mRNA 처리군의 경우 각각 대조군과 비교하여 상기 3종의 암세포주에서 모두 세포사멸이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히, S14.010 mRNA 처리군 및 S14.012 mRNA 처리군에서 각각 세포사멸에 및 세포성장 저해 현상이 더 크게 일어남을 확인하였다.

[242] **실시예 7.2. 인간 암세포주에서 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 세포성장 저해 효과 확인**

[243] S14-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 농도에 따른 암세포의 성장 저해 효과를 확인하였다.

[244] 구체적으로, 상기 실시예 7.1의 방법으로 생산된 S14.010 mRNA 및 S14.012 mRNA를 각각 1/2씩 연속 희석한 뒤, 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포, NCI-H1703 세포) 및 인간 자궁경부암 세포주(SiHa 세포)에 각각 형질도입 하였다. 각 세포에 대한 세포성장 정도는 상기 실시예 7.1과 동일한 방법으로 Incucyte(Satorius) 장비를 이용하여 3시간 간격으로 위상 채널을 통한 이미지를 촬영하고, 이미지를 Incucyte 소프트웨어를 통해 분석함으로써 확인하였다.

[245] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, S14.010 mRNA 처리군 및 S14.012 mRNA 처리군에서 각각 모든 암세포주에 대해 세포성장 저해 효과를 확인할 수 있었다.

[246] **실시예 7.3. 항암제 내성 인간 암세포주에서 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 및 항암제의 병용에 의한 세포성장 저해 및 세포사멸 유도 효과**

[247] 암세포의 항암제 내성 획득에 SOX2 단백질이 관여한다는 보고가 있다. 항암제 내성 암세포에 대한 본 발명의 융합단백질의 항암 활성을 확인하였다.

[248] **실시예 7.3.1. 타목시펜 내성 암세포주에서 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 및 타목시펜 병용 효과 확인**

[249] 먼저, 상기 항암제 내성 및 SOX2 단백질의 상관성을 확인하기 위하여 MCF-7 세포(인간 유방암 세포) 및 타목시펜(Tamoxifen) 내성을 나타내는 MCF7-Tam^R 세포 내 SOX2 발현량을 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 확인하였다. 이때, 1차 항체는 항-SOX2 항체(CST, Cat no. 3579, 1:1000)를 사용하였다.

[250] 그 결과, 도 7a에 나타낸 바와 같이, MCF7 세포와 비교하여 MCF7-Tam^R 세포에서 SOX2 단백질이 약 6배 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[251] 다음으로 본 발명의 융합단백질인 S14.010 또는 S14.012가 MCF7-Tam^R 세포에서 각각 SOX2 단백질 분해를 유도함으로써 타목시펜 치료 효과를 높일 수 있는지 확인하였다.

[252] 구체적으로, 리포펙타민-메신저맥스를 상기 실시예 7.1의 방법으로 생산된 S14.010 mRNA 및 S14.012 mRNA를 각각 1/2씩 연속 희석하여 MCF7-Tam^R 세포에 형질도입 하였다. 형질도입 후, 각각의 세포에 Caspase-3/7 Green Dye for Apoptosis(Satorius, Cat no. 4440)를 처리하고 24시간 추가 배양한 뒤 타목시펜(20 uM)을 처리하였다. 세포사멸은 Incucyte(Satorius) 장비를 이용하여 상기 실시예 7.1과 동일한 방법으로 확인하였다. 마지막 촬영 시점에서의 세포성장 정도 및 세포사멸 신호를 Incucyte 소프트웨어를 이용하여 분석하였고, 그 결과값을 Graphpad prism 소프트웨어를 이용하여 그래프로 나타내었다.

[253] 그 결과, 도 7b에 나타낸 바와 같이, MCF7-Tam^R 세포에서 타목시펜 단독 처리군과 비교하여 타목시펜 및 S14.010 mRNA 또는 S14.012 mRNA 병용 처리군에서 암세포의 세포사멸 유도 및 세포성장 저해 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[254] **실시예 7.3.2. 독소루비신 내성 인간 암세포주에서 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 및 독소루비신의 병용 효과 확인**

[255] H69 세포(인간 비소세포성 폐암 세포주) 및 독소루비신 내성 획득 H69-DOX^R 세포에서 SOX2 단백질 발현량을 비교하였다.

[256] 구체적으로, 상기 각각의 세포를 PBS 완충용액으로 2회 세척 후, 각각의 세포에 단백질 분해효소 억제제 칵테일(Thermofisher, 78440)을 포함하는 세포 용해 완충액(50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1% SDS)을 처리하여 세포 추출물을 수득하였다. 상기 세포 추출물을 vortex를 이용하여 균일하게 혼합한 후, 95℃에서 10분간 가열하였다. BCA 키트(ThermoFisher, 23227)로 세포 추출물의 단백질량을

정량하고 10X 샘플 버퍼(Proteinsimple, Cat no. 042-195), 400 mM DTT 용액 및 Fluorescent 5X Master Mix(Proteinsimple, Cat no. PS-ST01EZ)와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열하여 단백질 시료를 준비하였다.

[257] SOX2는 항-SOX2 항체(CST, Cat no. 3579) 및 항체 항-토끼 2차 검출 모듈(Protein simple, Cat no. DM-001)을 이용하여 Fluorescence Separation Module(Proteinsimple, Cat no. SM-FL004)로 검출하였다. 상기 검출된 결과는 Protein Normalization Module(Proteinsimple, Cat no. DM-PN02)을 이용하여 정량하였다. 검출은 JESS(Proteinsimple) 장비를 이용하여 수행하였으며, 분석은 Compass for SW 소프트웨어의 Gaussian Fit으로 진행하였다.

[258] 그 결과, 도 8a에 나타낸 바와 같이, H69 세포와 비교하여 H69-DOX^R 세포에서 SOX2 단백질 발현이 약 2배 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[259] 다음으로 본 발명의 융합단백질인 S14.010 또는 S14.012가 H69-DOX^R 세포에서 각각 SOX2 단백질 분해를 유도함으로써 독소루비신의 치료 효과를 높일 수 있는지 확인하였다. 이때, 실험은 상기 실시예 7.3.1과 동일한 방법으로 실시하였으며, 독소루비신은 10 uM의 농도로 처리하였다.

[260] 그 결과, 도 8b에 나타낸 바와 같이, H69-DOX^R 세포에서 독소루비신 단독 처리군과 비교하여 독소루비신 및 S14.010 mRNA 또는 S14.012 mRNA 병용 처리군에서 암세포의 세포사멸 유도 및 세포성장 저해 효과가 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[261] **실시예 8. 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 SOX2 단백질 분해능 평가**

[262] **실시예 8.1. 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 SOX2 단백질 분해능 확인**

[263] 3A2와 SOX2의 결합을 통한 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합 단백질의 SOX2 단백질 특이적 분해능을 확인하였다.

[264] 상기 실시예 5.2의 방법으로 제작된 10종의 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 발현벡터 및 huSOX2.V5 단백질 발현벡터를 각각 인간 신장 세포주(HEK-293 세포)에 리포펙타민 3000(Lipofectamine 3000, Invitrogen, Cat no. L3000001)을 이용하여 형질도입 하였다. 형질도입된 세포에서의 SOX2 단백질 발현은 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 확인하였다. 이때, 항-V5 항체(Invitrogen, Cat no. 46-1157), 항-Flag 항체(Sigma, cat no. F1804), Fluorescence Separation Module(Proteinsimple, Cat no. SM-FL004) 및 항-마우스-HRP 항체(Proteinsimple, Cat no. 042-206)를 추가로 사용하였다.

[265] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 총 10종 중 6종의 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합 단백질이 SOX2 단백질을 분해하는 것을 확인하였다. 특히, 3A2.005 처리군, 3A2.007 처리군, 3A2.011 처리군 및 3A2.012 처리군의 경우, 각각 대조군(Mock)과 비교하여 약 70% 이상의 SOX2 분해능을 나타내었다.

[266] **실시예 8.2. 인간 암세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 농도에 따른 SOX2 단백질 분해능 평가**

[267] 인간 암세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 농도에 따른 세포 내 SOX2 단백질 분해능을 확인하였다.

[268] 먼저, 3A2.005를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 141) 또는 3A2.012를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 146)를 TAKARA Cloning Kit for mRNA Template(TAKARA, Cat no. 6143)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 Linearized pIVT 벡터(TAKARA, Cat no. 6143)에 클로닝을 수행하였다. 상기 벡터를 주형으로 Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit(TAKARA, Cat no. 6144), CleanCap Reagent AG(TriLink, Cat no. N7113-10) 및 N1-Methyl-Pseudouridine-5'-Triphosphate(TriLink, Cat no. N1081-10)를 사용하여 3A2.005 및 3A2.012를 각각 암호화하는 mRNA를 제조하였다.

[269] 상기 3A2.005 mRNA 및 3A2.012 mRNA를 각각 리포펙타민-메신저맥스(Lipofectamine MessengerMAX, Invitrogen, Cat no. LMRNA015)를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(NSCLC)(A549 세포, NCI-H1703 세포, HCC827 세포, SK-MES-1 세포, SW900 세포) 및 인간 간암 세포주(HCC)(Hep3B 세포)에 형질도입 하였다. 상기 형질도입된 세포 내 SOX2 단백질의 발현은 상기 실시예 7.3.2와 동일한 방법으로 확인하였다.

[270] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 3A2.005 mRNA 처리군 또는 3A2.012 mRNA 처리군은 모든 암세포주에서 처리 농도 의존적으로 SOX2 분해가 증가된 것을 확인하였다. 상기 각각의 암세포주에 대한 SOX2 단백질의 최대 분해의 50% 농도(DC_{50}, nM)는 표 9에 기재하였다.

[271] [표9]

암세포주		DC_{50} (nM)	
		3A2.005	3A2.012
NSCLC	A549	0.04	0.02
	NCI-H1703	0.03	0.05
	HCC827	0.01	0.05
	SK-MES-1	0.03	0.13
	SW900	0.12	0.57
HCC	Hep3B	0.05	0.03

[272] **실시예 8.3. 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 유비퀴틴-프로테아좀 의존적 SOX2 단백질 분해능 확인**

[273] 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질에 의해 유도되는 SOX2 단백질의 분해가 세포 내 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(UPS)을 통해 이루어지는지 확인하였다.

[274] 구체적으로, 상기 실시예 5.2의 방법으로 제조된 3A2.005 발현벡터, 3A2.012 발현벡터 및 huSOX2.V5 발현벡터를 리포펙타민 3000(Lipofectamine 3000, Invitrogen, Cat no. L3000001)을 이용하여 인간 신장 세포주(HEK-293 세포)에 형질도입 하였다. 형질도입 18시간 후, 유비퀴틴 E1 활성화 효소 억제제인 MLN7243 또는 프로테아좀 억제제인 MG132를 각각 1 uM 및 20 uM의 농도로 처리하여 6시간 추가 배양하였다. 이때, 대조군에는 DMSO를 처리하였다. 상기와 같이 처리된 세포 내 SOX2 단백질 발현량은 상기 실시예 7.3.2와 동일한 방법으로 통해 확인하였다. 이때, 항체는 항-V5 항체(Invitrogen, Cat no. 46-1157) 및 항-Flag 항체(Sigma, cat no. F1804)를 사용하였다.

[275] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 MLN7243 처리군 및 MG132 처리군에서 각각 3A2.005 또는 3A2.012의 발현에 의해 SOX2 단백질 분해 효과가 현저히 감소하였다. 따라서, 상기 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 발현에 의한 SOX2 단백질의 분해는 유비퀴틴-프로테아좀 의존적으로 유도되는 것임을 확인할 수 있었다.

[276] **실시예 9. 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 암세포에 대한 세포성장 저해 효과**

[277] **실시예 9.1. SOX2 siRNA 및 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 암세포에 대한 세포성장 저해 효과 비교**

[278] 리포펙타민-RNAi맥스(Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen, Cat no. 13778150) 및 리포펙타민-메신저맥스(Lipofectamine MessengerMAX, Invitrogen, Cat no. LMRNA015)를 이용하여 SOX2 siRNA(Origene, Cat no. SR321861-A) 및 3A2.005 mRNA 또는 3A2.012 mRNA를 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포)에 형질도입 한 뒤, 세포성장 저해 정도를 확인하였다. 이때, 상기 3A2.005 mRNA 및 3A2.012 mRNA는 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다. 또한, 세포 내 SOX2 단백질 발현량 검출 및 암세포의 성장 저해 정도는 상기 실시예 7.3.2 및 실시예 7.2와 동일한 방법으로 확인하였다.

[279] 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, SOX2 siRNA 처리군과 비교하여 3A2.005 mRNA 처리군 및 3A2.012 mRNA 처리군에서 각각 SOX2 단백질 분해 및 암세포 성장 저해 효과가 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[280] **실시예 9.2. 인간 암세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제를 포함하는 융합단백질의 농도에 따른 효능 확인**

[281] 인간 암세포주에서 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질 처리 농도에 따른 암세포의 성장 저해 효과를 확인하였다.

[282] 구체적으로, 3A2.005 mRNA 및 3A2.012 mRNA를 연속 희석하여 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포, NCI-H1703 세포, Calu-1 세포, HCC15 세포, SW900 세포, SK-MES-1 세포), 인간 췌장암 세포주(BxPC3 세포, CFPAC-1 세포), 인간 자궁경부암 세포주(Cervical cancer)(SiHa 세포) 또는 인간 간암 세포주(HepG2 세포)에 형질도입 하였다. 형질도입된 세포의

세포성장 정도는 Incucyte(Satorius) 장비로 3시간 간격으로 위상 채널을 이용하여 이미지 촬영한 뒤, 마지막 촬영시점에서의 Incucyte 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 상기 3A2.005 mRNA 및 3A2.012 mRNA는 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

[283] 그 결과, 도 13a 및 도 13b에 나타낸 바와 같이, 3A2.005 mRNA 처리군 및 3A2.012 mRNA 처리군은 모든 암세포주에 대하여 세포성장 저해 효과를 나타내었다. 상기 암세포주의 최대 세포 증식의 50% 억제 농도 GI_{50}(nM) 값을 표 10에 기재하였다.

[284] [표10]

암세포주		GI_{50} (nM)	
		3A2.005	3A2.012
NSCLC	A549	0.43	1.16
	NCI-H1703	0.11	0.15
	Calu-1	0.51	1.26
	HCC15	0.33	0.84
	SW900	0.14	0.45
	SK-MES-1	0.45	0.57
Pancreatic cancer	CFPAC-1	<0.01	0.94
	BxPC3	0.45	0.48
Cervical cancer	SiHa	0.19	0.25
HCC	HepG2	0.43	0.93

[285] **실시예 9.3. 항암제 내성 인간 암세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 및 항암제의 병용에 의한 세포성장 저해 및 세포사멸 유도 효과**

[286] 타목시펜 내성 유방암 세포주 MCF7-Tam^R 세포 및 독소루비신 내성 폐암 세포주 H69-Dox^R 세포에서 타목시펜 또는 독소루비신, 및 3A2.005 mRNA 또는 3A2.012 mRNA를 각각 1 nM로 형질도입하여 병용 효과를 상기 실시예 7.2와 동일한 방법을 통해 확인하였다. 이때, 타목시펜은 100 uM부터 2/3로 연속 희석하여 각각의 농도로 처리하였고, 독소루비신은 150 uM부터 1/2로 연속 희석하여 각각의 농도를 처리하였다.

[287] 그 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, MCF7-Tam^R 세포에 타목시펜 단독 처리군과 비교하여 타목시펜 및 3A2.005 mRNA 또는 3A2.012 mRNA 병용 처리군에서 세포사멸 유도 및 세포성장 저해 효과가 높게 나타났다. 또한, H69-Dox^R 세포에서도 독소루비신 단독 처리군과 비교하여 독소루비신 및 3A2.005 mRNA 또는

3A2.012 mRNA 병용 처리군에서 세포사멸 유도 및 세포성장 저해 효과가 높게 나타났다.

[288] **실시예 10. 인간 암세포주 이식 종양 마우스 모델에서 S14 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 종양 성장 억제 효과 평가**

[289] S14-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 종양 억제 효능을 확인하기 위하여 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포) 또는 췌장암 세포주(BxPC3 세포)를 이식한 마우스 종양 모델을 제작하였다.

[290] 구체적으로, 6~8주령의 암컷 M-NSG 마우스(Shanghai Model Organisms Center, Inc.)에 5.0×10^6 세포(A549 세포) 또는 1.0×10^7 세포(BxPC3 세포)를 피하 이식하였다. 이후, 각 개체의 종양 크기가 약 150 mm^3 근처에 도달하였을 때, 각 군 당 5마리씩 무작위로 그룹화하였다. 이후 S14.012 mRNA를 포함하는 지질나노입자를 2 mg/kg의 농도로 1주에 1회씩 총 3회 정맥 내 투여하였다. 이때, 대조군에는 PBS를 정맥 내 투여하였다.

[291] 종양의 부피는 일주일에 2회 측정된 값을 바탕으로 하기의 <수학식 1>을 이용하여 산출하였다. 이때 각 개체의 몸무게도 함께 측정하였다.

[292] <수학식 1>

[293] 종양 부피(mm^3)=0.5×(장축)×(단축)^2

[294] 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, S14.012 mRNA 투여군은 A549 세포 또는 BxPC3 세포를 이식한 마우스 종양 모델에서 모두 종양 성장 억제 효과를 나타내었다. 이때, 대조군과 비교하여 S14.012 mRNA 투여군에서는 뚜렷한 몸무게 변화가 관찰되지 않았다.

[295] **실시예 11. 인간 비소세포성 폐암 세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 암세포 성장 저해 및 세포사멸 유도 효과 확인**

[296] 3A2.005 mRNA 또는 3A2.012 mRNA를 리포펙타민-메신저맥스(Lipofectamine MessengerMAX, Invitrogen, Cat no. LMRNA015)를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포)에 형질도입 하였다. 이때, 양성 대조군으로 SOX2 siRNA(Origene, Cat no. SR321861-A), 독소루비신(Doxorubicin)을 사용하였고, 대조군으로 control siRNA(Santacruz, Cat no. sc-37007)를 사용하여 암 세포주에서 SOX2 단백질 발현 조절에 따른 세포사멸 유도 효과를 확인하였다. 상기 3A2.005 mRNA 또는 3A2.012 mRNA는 상기 실시예 8.2의 방법과 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

[297] 또한, 세포사멸은 Caspase-3/7 Green Dye for Apoptosis(Satorius, Cat no. 4440)를 형질도입된 각 세포에 처리한 뒤, Incucyte(Satorius) 장비를 통해 위상 채널 및 형광 채널을 이용하여 3시간 간격으로 촬영한 이미지를 분석(Incucyte 소프트웨어를 이용)하여 확인하였다.

[298] 그 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이, SOX2 siRNA 처리군, 독소루비신, 3A2.005 mRNA 처리군 및 3A2.012 mRNA 처리군의 경우 대조군과 비교하여 상기 암 세

포주에서 세포성장이 저해되고 세포사멸이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히, 3A2.005 mRNA 처리군 및 3A2.012 mRNA 처리군에서 세포성장 저해 및 세포사멸 현상이 양성 대조군인 독소루비신과 유사한 수준으로 확인되었다.

[299] **실시예 12. 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 발현 및 SOX2 단백질 분해능의 지속성 평가**

[300] 세포 내에서 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 발현 및 상기 융합단백질의 SOX2 단백질 분해능 지속 시간을 확인하였다.

[301] 구체적으로, 상기 실시예 5.2의 방법으로 제작된 3A2.005 융합단백질 또는 3A2.012 융합단백질의 발현벡터를 각각 huSOX2.V5 단백질 발현벡터와 함께 인간 신장 세포주(HEK-293 세포)에 리포펙타민 3000(Invitrogen, Cat no. L3000001)을 이용하여 형질도입 하였다. 그 뒤, 72시간 경과 후부터 168시간까지 24시간 간격으로 세포 추출물을 수득하였다. 상기 세포 추출 내 SOX2 단백질량은 상기 실시예 7.3.2와 동일한 방법으로 확인하였다. 이때, SOX2는 1차 항체 항-V5 항체(Invitrogen, Cat no. 46-1157)를 이용하여 검출하였고, 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질은 항-Flag 항체(Sigma, cat no. F1804)를 사용하여 검출하였다. 2차 항체는 항-마우스-HRP 항체(Proteinsimple, Cat no. 042-206)를 사용하였다.

[302] 그 결과, 도 17에 나타낸 바와 같이, 72시간부터 168시간까지 3A2.005 및 3A2.012 융합단백질의 발현, 및 상기 융합단백질의 SOX2 단백질 분해 효과가 지속되는 것을 확인하였다.

[303] **실시예 13. 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 및 SOX2 siRNA의 처리 농도에 따른 SOX2 단백질 분해능 비교**

[304] SOX2 siRNA(Origene, Cat no. SR321861-A) 또는 3A2.012 mRNA를 각각 리포펙타민-RNAi맥스(Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen, Cat no. 13778150) 또는 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(SW900 세포)에 형질도입 한 뒤, 상기 실시예 7.3.2와 동일한 방법으로 세포 내 SOX2 단백질량을 검출하였다. 상기 결과값은 Graphpad prism 소프트웨어를 이용하여 그래프로 나타내었다. 3A2.012 mRNA는 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

[305] 그 결과, 도 18에 나타낸 바와 같이, SOX2 siRNA 처리군과 비교하여 3A2.012 mRNA 처리군에서 mRNA의 처리 농도에 의존적으로 SOX2 단백질 분해능이 크게 증가하는 것을 확인하였다.

[306] **실시예 14. 인간 암 세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 처리 농도에 따른 SOX2 단백질 분해능 확인**

[307] 인간 암 세포주에서 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 처리 농도에 따른 세포 내 SOX2 단백질 분해능을 확인하였다.

[308] 3A2.005 mRNA 및 3A2.007 mRNA를 각각 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(NSCLC)(A549 세포, SW900 세포)에 각 농도별로 연속희석하여 형질도입 하였다. 이때, 3A2.007 mRNA는 3A2.007를 암호화하는

폴리뉴클레오티드(서열번호 143)를 이용하여 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다. 또한, 3A2.005 mRNA도 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다. 24시간 후, 각각의 세포 추출물을 수득하여 SOX2 단백질량을 상기 실시예 7.3.2와 동일한 방법으로 확인하였다.

[309] 그 결과, 도 19에 나타낸 바와 같이, 3A2.005 mRNA 처리군 및 3A2.007 mRNA 처리군은 각각 모든 암 세포주에서 mRNA의 처리 농도 의존적으로 SOX2 분해가 증가된 것을 확인할 수 있었다. 상기 각각의 암 세포주에 대한 SOX2 단백질의 최대 분해의 50% 농도(DC_{50}, nM)를 표 11에 기재하였다.

[310] [표11]

암세포주		DC_{50} (nM)	
		3A2.005	3A2.007
NSCLC	A549	0.10	0.03
	SW900	0.29	0.18

[311] **실시예 15. 인간 암 세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 농도에 따른 세포 성장 저해 효능 평가**

[312] 인간 암 세포주에서 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 농도에 따른 세포 성장 저해 효능을 확인하였다.

[313] 3A2.005 mRNA 또는 3A2.007 mRNA를 각각 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(NSCLC)(A549 세포, SW900 세포)에 각 농도별로 연속희석하여 형질도입 하였다. Incucyte(Satorius) 장비를 통해 위상 채널을 이용하여 3시간 간격으로 촬영한 이미지를 분석(Incucyte 소프트웨어를 이용)하여 세포성장 저해 정도를 분석하고, 72시간 후의 세포성장 저해 결과를 Graphpad prism 소프트웨어를 이용하여 그래프로 나타내었다. 3A2.005 mRNA 및 3A2.007 mRNA는 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

[314] 그 결과, 도 20에 나타낸 바와 같이, 3A2.005 mRNA 처리군 및 3A2.007 mRNA 처리군은 각각 모든 암 세포주에서 mRNA의 처리 농도 의존적으로 세포성장 저해 효과를 나타내었다. 상기 각 암 세포주의 최대 세포 증식의 50% 억제 농도(GI_{50}, nM)를 표 12에 기재하였다.

[315] [표12]

암세포주		GI_{50} (nM)	
		3A2.005	3A2.007
NSCLC	A549	1.58	0.37
	SW900	0.34	0.21

[316] **실시예 16. 인간 비소세포성 폐암 세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 특이적 SOX2 단백질 분해능 및 세포성장 저해 효과 확인**

[317] 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포, SW900 세포)에서 3A2 단일 도메인 항체, E3 유비퀴틴 리가제 단백질 단편(단독) 또는 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 SOX2 단백질 분해 효과 및 세포성장 저해 효과를 비교하였다.

[318] 3A2 단일 도메인 항체, E3 유비퀴틴 리가제 단백질(단독)(3A2.005 E3 only, 3A2.007 E3 only) 또는 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질(3A2.005, 3A2.007)을 각각 암호화하는 mRNA를 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포, SW900 세포)에 형질도입 하였다. 이때, A549 세포는 0.3 nM의 mRNA를 처리하였고, SW900 세포에는 1 nM의 mRNA를 각각 처리하였다. 상기 3A2 단일 도메인 항체의 mRNA 및 E3 유비퀴틴 리가제 단백질 단편의 mRNA는 각각 서열번호 112(3A2), 서열번호 117($SPOP_{167-374}$) 및 서열번호 119($CHIP_{128-303}$)의 폴리뉴클레오티드를 이용하여 상기 실시예 8.2의 방법으로 제작하여 사용하였다. 또한, 3A2.005 mRNA 및 3A2.007 mRNA도 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

[319] 형질 도입된 세포 내 SOX2 단백질의 발현 및 암 세포 성장 저해 효과는 각각 상기 실시예 7.3.2 및 실시예 7.2와 동일한 방법으로 확인하였다. 단일 도메인항체, E3 유비퀴틴 리가제 단편 및 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 검출을 위하여 1차 항체로 항-FLAG 항체(Sigma, Cat no. F1804)를 사용하였고,2차 항체로 항-마우스-HRP 항체(Proteinsimple, Cat no. 042-206)를 사용하였다.

[320] 그 결과, 도 21a 및 도 21b에 나타낸 바와 같이, 단일 도메인 항체(binder only) mRNA 처리군 및 E3 유비퀴틴 리가제 단백질 단편(단독)(E3 only) mRMA 처리군에서는 SOX2 단백질의 분해(도 21a) 및 암 세포 성장 저해 효과(도 21b)가 관찰되지 않았다. 반면, 3A2.005 mRNA 처리군 및 3A2.007 mRNA 처리군에는 모두 SOX2 단백질의 분해 및 암 세포 성장 저해 효과가 관찰되었다.

[321] **실시예 17. 인간 암세포주 이식 종양 마우스 모델에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 SOX2 단백질 분해능 확인**

[322] 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 종양 억제 효능을 비소세포성 폐암 세포주(A549 세포)를 이식한 마우스 종양 모델을 이용하여 확인하였다. 이때, 상기 마우스 종양 모델은 상기 실시예 10과 동일한 방법으로 제작하였다.

[323] 상기 종양 모델 마우스의 각 개체별 종양 크기가 약 150-200 mm^3 근처에 도달하였을 때, 각 군 당 3마리씩 무작위로 그룹화하였다. 이후 3A2.012 mRNA를 포함하는 지질나노입자를 2 mg/kg의 농도로 단회 정맥 내 투여한 뒤, 16시간 후 마우스로부터 종양 조직을 적출하였다. 이때, 대조군에는 PBS를 정맥 내 투여하였다. 3A2.012 mRNA는 상기 실시예 8.2의 방법으로 제조하여 사용하였다.

[324] 적출된 종양 조직에 세포 용해 완충액을 처리하고 TissueLyser를 이용하여 잘게 분쇄하였다. 그리고, 상기 분쇄물에 대하여 초음파 분쇄(10초, 10번)를 수행한 뒤 원심분리(15,000 rpm, 10분)하여 종양 조직 추출물을 수득하였다. 종양 조직 내 SOX2 단백질량은 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 확인하였다. 이때, 1차 항체는 항-SOX2 항체(CST, Cat no. 3579) 또는 항-GAPDH 항체(Abcam, Cat no. 8245)를 사용하였다.

[325] 그 결과, 도 22에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 3A2.012 mRNA 처리군의 모든 개체(3마리)의 종양 조직에서 SOX2 단백질이 감소된 것을 확인하였다.

[326] **실시예 18. 인간 비소세포성 폐암 세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 처리 시간에 따른 SOX2 단백질 분해능 평가**

[327] 인간 비소세포성 폐암 세포주에서 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질의 발현 후, 시간의 경과에 따른 SOX2 단백질의 분해 정도를 확인하였다.

[328] 구체적으로, 3A2.005 mRNA 및 3A2.012 mRNA를 각각 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(SW900 세포)에 2 nM의 농도로 형질도입 하였다. 상기 형질 도입된 세포를 각 시간별로 배양한 뒤(4, 8, 24시간), 세포 추출물을 수득하여 상기 실시예 7.3.2와 동일한 방법으로 SOX2 단백질의 발현을 확인하였다. 상기 결과값은 Graphpad prism 소프트웨어를 이용하여 그래프로 나타내었다. 3A2.005 mRNA 및 3A2.012 mRNA는 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

[329] 그 결과, 도 23에 나타낸 바와 같이, 3A2.005 mRNA 또는 3A2.012 mRNA 처리하고 4시간 경과 후부터 SOX2 단백질이 분해가 관찰되었으며, 시간이 지날수록 SOX2 단백질의 분해 정도가 증가하는 것을 확인하였다.

[330] **실시예 19. 인간 비소세포성 폐암 세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질의 발현 및 SOX2 단백질 분해능 지속성 평가**

[331] 인간 비소세포성 폐암 세포주에서 3A2-E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질을 암호화하는 mRNA를 처리한 뒤, 상기 융합단백질의 SOX2 단백질의 분해능 지속 시간을 확인하였다.

[332] 구체적으로, 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 및 3A2.012 mRNA를 각각 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 인간 비소세포성 폐암 세포주(SW900 세포)에 1 nM의 농도로 형질도입 하였다. 상기 형질 도입된 세포를 각 시간별(0, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168시간)로 배양하여 세포 추출물을 수득하였다. 각 처리군별 세포 내 SOX2 단백질은 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 확인하였고, Graphpad prism 소프트웨어를 이용하여 그래프로 나타내었다. 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 및 3A2.012 mRNA는 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

[333] 그 결과, 도 24a 및 도 24b에 나타낸 바와 같이, 3A2.005, 3A2.007 및 3A2.012를 처리하였을 경우, 처리 후 24시간이 경과된 시점에 SOX2 분해능이 가장 높았고, 7일차까지 분해 효능이 지속되는 것을 확인하였다. 이와 반비례하게 융합단백질

의 발현정도는 24시간 또는 48시간에서 가장 높았으며 이후부터 감소하는 것을 확인하였다.

[334] **실시예 20. 독소루비신 내성 폐암 세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 및 독소루비신 병용에 의한 암세포 성장 저해 유도 효과**

[335] 인간 비소세포성 폐암 세포주 H69 세포와 독소루비신(Doxorubicin) 내성을 나타내는 폐암 세포주 H69-DoxR 세포에서 3A2- E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질이 SOX2 단백질 분해를 유도함으로써 표준치료제 약물의 치료 효과를 높일 수 있는지 병용효과를 확인하였다.

[336] 구체적으로, 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 및 3A2.012 mRNA를 각각 5 nM의 농도로 H69 세포주 또는 H69-Dox^R 세포에 형질 도입하였다. 형질도입과 동시에 H69-Dox^R 세포에는 독소루비신을 50 uM부터 1/4씩 연속 희석하여 처리하고, H69 세포에는 30 uM부터 1/4씩 연속 희석하여 처리한 후에 배양하였다. 세포성장 저해 정도를 확인하기 위하여, 배양이 끝난 시점에 Cell Counting Kit-8 시약(Dojindo, CK04)을 처리하여 반응시킨 뒤, 마이크로플레이트 리더기(BioTek, Synergy HTX)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 상기 결과값은 Graphpad prism 소프트웨어를 이용하여 그래프로 나타내었다. 그래프에 표기된 임상용량은 세포면적기준으로 환산한 값을 해당 농도 구간에 표기하였다. 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 및 3A2.012 mRNA는 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

[337] 그 결과, 도 25 및 도 26에 나타낸 바와 같이, H69-Dox^R 세포에서는 독소루비신 내성을 획득하여 암세포의 성장 저해가 일어나지 않는 농도 구간(단독 처리 용량 구간: 8.3 uM ~ 10.3 uM; 병용 처리 용량 구간: 5.5 uM ~ 10.3 uM)에서 독소루비신 및 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 또는 3A2.012 mRNA를 병용 처리한 경우, 암세포의 성장이 저해되는 것을 확인하였다.

[338] 또한, 내성이 없는 H69 세포에서는 임상용량 구간의 최저 농도인 5.5 uM 이하의 독소루비신을 단독 처리한 경우와 비교하여, 독소루비신 및 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 또는 3A2.012 mRNA를 병용 처리한 경우 암세포의 성장이 더욱 저해된 것을 확인할 수 있었다.

[339] 상기 결과를 통해, 본 발명의 융합단백질 및 독소루비신 병용 투여는 독소루비신의 효능을 개선(상승)시킬 수 있음을 확인하였다.

[340] **실시예 21. 타목시펜 내성 유방암 세포주에서 3A2 및 E3 유비퀴틴 리가제 단편을 포함하는 융합단백질 및 타목시펜 병용에 의한 암 세포성장 저해 유도 효과**

[341] 인간 유방암 세포주 MCF7과 타목시펜 내성 유방암 세포주 MCF7-Tam^R 세포에서 3A2- E3 유비퀴틴 리가제 융합단백질이 SOX2 단백질 분해를 유도함으로써 표준치료제 약물의 치료 효과를 높일 수 있는지 병용효과를 확인하였다.

[342] 구체적으로, 리포펙타민-메신저맥스를 이용하여 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 및 3A2.012 mRNA를 각각 5 nM의 농도로 MCF7 세포 또는 MCF7-Tam^R 세

포에 형질 도입하였다. 형질도입 후 24시간 배양한 뒤, 타목시펜을 27 uM부터 3 uM까지 3 uM 간격으로 희석하여 각 세포에 처리하고 48시간 추가 배양하였다. 세포성장 저해 정도는 상기 실시예 20과 동일한 방법으로 측정하였다. 표기된 임상용량은 세포면적기준으로 환산하여 해당 농도 구간에 표기하였다. 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 및 3A2.012 mRNA는 상기 실시예 8.2와 동일한 방법으로 제작하여 사용하였다.

[343] 그 결과, 도 25 및 도 27에 나타낸 바와 같이, MCF7-Tam^R 세포에서는 타목시펜 내성으로 인한 세포성장 저해가 일어나지 않는 농도 구간(2.01 uM ~ 4.08 uM)에서 타목시펜 및 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 또는 3A2.012 mRNA를 병용 처리한 경우, 세포성장이 저해되는 것을 확인하였다.

[344] 또한, 내성이 없는 MCF7 세포에 임상용량 농도 구간(2.01 uM ~ 4.08 uM)에서 타목시펜 단독 처리군과 비교하여 타목시펜 및 3A2.005 mRNA, 3A2.007 mRNA 또는 3A2.012 mRNA의 병용 처리군에서 세포성장이 50% 이상 더 저해되는 것을 확인하였다.

[345] 상기 결과를 통해, 본 발명의 융합단백질 및 타목시펜 병용 투여는 타목시펜의 효능을 개선(상승)시킬 수 있음을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 56, 서열번호 63, 서열번호 69, 서열번호 73, 서열번호 78, 서열번호 82, 서열번호 87 및 서열번호 94로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; 서열번호 58, 서열번호 65, 서열번호 71, 서열번호 72, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 79, 서열번호 84 및 서열번호 89로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 60, 서열번호 67, 서열번호 81, 서열번호 85, 서열번호 91 및 서열번호 96으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 항원 결합 단편은 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 8] 제1항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 항체 또는 이의 단편.항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 74의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 단편.

[청구항 15] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 76의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 84의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 85의 아미노산 서

열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 19] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 78의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 79의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 81의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 21] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 87의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 22] 제21항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 23] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 24] 제23항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 25] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3;를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[청구항 26] 제25항에 있어서,
상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 단편.

[청구항 27] 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 28] 제27항의 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현벡터.

[청구항 29] 제28항의 발현벡터가 도입된 형질전환 세포.

[청구항 30] i) 제29항의 형질전환 세포를 배양하는 단계; 및
ii) 상기 배양액에서 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 수득하는 단계;를 포함하는 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법.

[청구항 31] 제1항의 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질.

[청구항 32] 제31항에 있어서,
상기 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체는 β-TrCP(Beta-transducin repeats-containing protein), SKP2(S-phase kinase-associated protein 2), VHL(von hippel-lindau), SPOP(speckle-type BTB-POZ), SOCS2(suppressor of cytokine signaling 2), CHIP(carboxy terminus of Hsp70-binding protein), DDB2(damage DNA binding protein 2), CRBN(cereblon), ASB1(ankyrin repeat and SOCS box protein 1), TRIM21(tripartite motif-containing protein 21), RNF4(RING finger protein), UBE2D1(ubiquitin conjugating enzyme E2 D1), UBE2D4 및 ZNFR1(Zinc and ring finger 1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 융합단백질.

[청구항 33] 제31항에 있어서,
상기 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체는 서열번호 18 내지 서열번호 31로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합단백질.

[청구항 34] 제31항에 있어서,
상기 융합단백질은 링커를 포함하는 것인, 융합단백질.

[청구항 35] 제34항에 있어서,
상기 융합단백질은 하기 구조식 (I) 또는 (II)를 갖는 것인, 융합단백질:
N'-TB-(L)n-SR-C' (I)
N'-SR-(L)n-TB-C' (II)
이때, 상기 구조식 (I) 및 (II)에 있어서,
상기 N'은 융합단백질의 N 말단이고,
상기 C'은 융합단백질의 C 말단이며,
상기 TB는 항-SOX2 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고,
상기 SR은 E3 유비퀴틴 리가제의 단편 또는 이의 변이체이며,
상기 L은 펩타이드 링커이고,
상기 n은 0 또는 1이다.

[청구항 36] 제31항 내지 제35항 중 어느 한 항의 융합단백질은 서열번호 164 내지 서열번호 184로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합단백질.

[청구항 37] 제31항 내지 제36항 중 어느 한 항의 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 38] 제37항의 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현벡터.

[청구항 39] 제38항의 발현벡터가 도입된 형질전환 세포.

[청구항 40] 제39항의 형질전환 세포를 배양하는 단계를 포함하는 융합단백질의 제조방법.

[청구항 41] 제31항 내지 제36항 중 어느 한 항의 융합단백질; 제37항의 폴리뉴클레오티드; 또는 제38항의 벡터를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 42] 제41항에 있어서,
상기 암은 유방암, 대장암, 식도암, 위암, 간암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 담낭암, 방광암, 신장암, 피부암, 직장암, 골육종, 다발성골수종, 신경교종, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 갑상선암, 후두암, 고환암, 중피종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막 모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 43] 제31항 내지 제36항 중 어느 한 한의 융합단백질; 제37항의 폴리뉴클레오티드; 또는 제38항의 벡터의 암 예방 또는 치료용 용도.

[청구항 44] 제31항 내지 제36항 중 어느 한 한의 융합단백질; 제37항의 폴리뉴클레오티드; 또는 제38항의 벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법.