



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월27일

(11) 등록번호 10-2137391

(24) 등록일자 2020년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61K 47/30 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0047380

(22) 출원일자 2018년04월24일

심사청구일자 2018년04월24일

(65) 공개번호 10-2019-0123824

(43) 공개일자 2019년11월04일

(56) 선행기술조사문헌

LANCASTER, L. E. et al., Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2007, Vol. 38, pp.15-18. (2007.12.31. 공개)\*

DE ZAMAROCZY, M. et al., Molecular Cell, 2001, Vol. 8, pp.159-168. (2001.12.31.공개)\*

GenBank Accession No. WP\_016245160 (2015.5.30.공개)\*

KIM, J., et al., Acta Biomaterialia, 2016년, 41권, 페이지 293-301. (2016.12.31.공개)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

동국대학교 산학협력단

서울특별시 중구 필동로1길 30 내 (필동3가, 동국대학교)

(72) 발명자

조승우

서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호 (연세대학교)

강택진

서울특별시 노원구 중계로14나길 25, 102동 1504호 (중계동, 삼성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 5 항

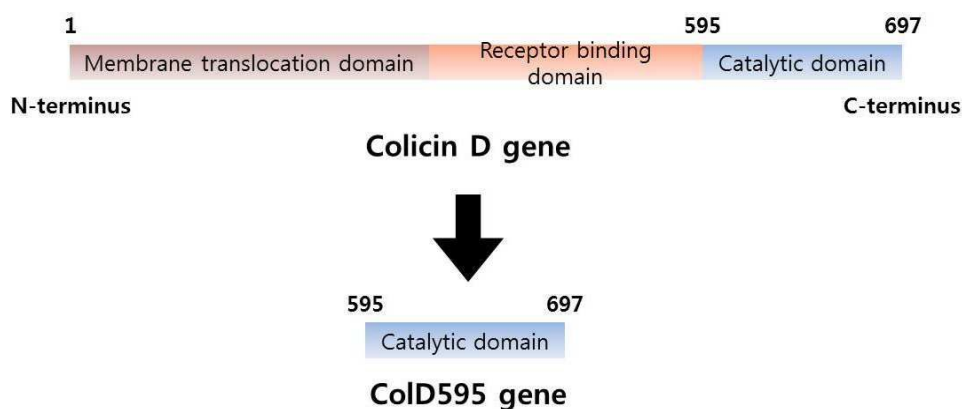
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 암 치료를 위한 Colicin D 단편의 용도

## (57) 요약

본 발명은 암 치료를 위한 Colicin D 단편의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 대장균에서 유래한 Colicin D 단백질 내 일부 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하며, 상기 단편은 암 세포만을 선택적으로 살상하여 유의적인 항암 효과를 나타내었다. 즉, 본 발명은 기존의 유전자 치료제의 한계로 지적되어 왔던 일반 세포에 대한 독성 문제를 해소한 것으로서, 암 치료를 위한 유전자 치료 분야의 핵심 기술로 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 47/30** (2013.01)

**A61P 35/00** (2018.01)

**A61K 2300/00** (2013.01)

(72) 발명자

**민성진**

경기도 의왕시 내손중앙로 11, 1110동 1702호(내손동, 의왕내손이편한세상)

**진윤희**

충청남도 천안시 동남구 충절로 42, 104동 1층 1002호(신부동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B3005994

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 삼차원 세포 패터닝 미세자극 기반 심장 및 골격 근육세포 리프로그래밍 효율 증진 연구(1/3)(2017.03.01~2020.02.29)

기 여 율 1/3

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3C9A4921712

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 포스트게놈 다부처유전체 사업

연구과제명 세포 특이적 후성유전체마커 발굴 및 검증(총괄: 국제 협력 기반 암 특이적 후성유전체 마커 개발)

기 여 율 1/3

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345264306

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)

연구과제명 번역 개시반응 조작을 통한 단백질 아미노말단의 선택적 수식

기 여 율 1/3

주관기관 동국대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.02.28

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 Colicin D 단백질 내 촉매 도메인 (catalytic domain)을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드; 및 생체적합성 고분자인 PBAE (Poly(beta-amino ester))가 혼합된 나노파티클을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 암은 흑색종, 자궁경부암, 대장암, 교모세포종, 위암, 간암 또는 유방암인 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 암 세포의 세포자멸 (apoptosis)을 활성화시키는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 암 세포 선택적인 살상 효능을 갖는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 PEG 수식된 PBAE (Poly(beta-amino ester))인, 약학적 조성물.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 조성물은 다른 항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용투여되는 것인, 약학적 조성물.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 암 치료를 위한 Colicin D 단편의 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 암은 우리나라 성인의 사망 원인 중 1위 또는 2위를 다투는 중요한 질병으로서, 많은 연구에도 불구하고 암 환자의 약 과반수 가량이 결국에는 사망에 이르고 있다(비특허문헌 1). 현재까지 널리 이용되고 있는 암의 치료법으로는 수술, 방사선 항암제 치료법이 있으며, 이 중에서 수술과 방사선 치료법은 절제 부위 또는 방사선 조사 부위에만 효과가 있는 국소 요법이고, 항암제 치료 요법은 전신에 효과를 나타내는 전신 요법이라는 점에서 차이가 있다.

[0003] 일반적으로, 암은 국소에서 발병하여 전신으로 전이되는 질환으로서, 초기에 발견되는 경우를 제외하고는 어느 정도의 전신 전이가 진행될 가능성이 존재한다. 따라서, 아무리 효과적인 국소 치료법을 사용한다 할지라도 다시 재발할 확률이 높다는 사실은, 대부분의 암 환자의 치료에 수술 및 방사선 치료와 같은 국소 치료법 뿐만 아니라, 전신 치료법인 항암제 치료법이 필요함을 말해준다. 따라서, 현재로서는 암에 대한 치료 효과를 향상시키기 위해서는 조기 진단에 의한 근치적 수술의 확대가 필요할 뿐만 아니라, 수술이 불가능한 환자 또는 수술 후 재발의 위험이 높은 환자에 대해 항암제 치료가 가장 널리 이용되고 있다. 그러나 현재까지 많은 항암제의 개발에도 불구하고, 항암제만으로 완치가 가능한 암은 백혈병, 악성 림프종, 고환암 등 소수의 암에 불과하며, 항암제에 암 세포가 반응하지 않거나 초기에는 효과적으로 종양이 줄어들지만 치료 도중 또는 치료 후에 항암제 치료에 대한 내성이 발생하는 등 많은 문제점을 야기하고 있다.

[0004] 이러한 기술적 배경하에서, 유전자를 분자 수준에서 교정하여 질병을 치료하는, 즉, 유전자 치료에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히, 유전자 치료제는 2012년 글리베라 (Glybera)와 2015년 임리직 (Imlygic)이 임상 허가가 승인되고, 2017년 백혈병 유전자 치료제인 킴리아 (Kimriah)가 미국 식품의약국 (FDA)의 승인을 받아 판매가 허가됨에 따라, cell suicide/cell death, growth inhibition/tumor suppression, 및 oncolysis 기반의 암 치료를 위한 유전자 치료제의 연구가 활발하게 연구 중에 있다. 다만, 종래의 기술들은 암 세포뿐만 아니라 일반 세포에도 독성을 나타내어, 우수한 항암 효과에도 불구하고 치료적 사용이 매우 제한적이었는바, 암 세포만을 선택적으로 살상할 수 있는 유전자 치료제에 대한 개발이 필요한 실정이다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) 2016년 사망통계원인, 특허청

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 암 세포를 선택적으로 살상할 수 있는 항암 유전자를 개발하기 위하여 노력한 결과, 대장균에서 유래한 Colicin D 단백질, 바람직하게는 Colicin D 단백질의 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 단편이 암 세포만을 선택적으로 살상하여 유의적인 항암 효과를 나타냄을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 이에, 본 발명의 목적은, 암 치료 효능 및 생체 내 안전성이 향상된 항암 유전자를 제공하는데 있다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 단백질은 Colicin D 단백질의 595번째부터 697번째 아미노산으로 이루어질 수 있다.

- [0012] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 암은 흑색종 또는 자궁 경부암일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 암세포의 세포자멸 (apoptosis)을 활성화시킬 수 있고, 암 세포 선택적인 살상 효능을 나타낼 수 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터에 포함되어 있거나 생체적합성 고분자와 혼합되어 제공될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 다른 항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용투여될 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은 치료학적 유효량의 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 조성물은 대장균에서 유래한 Colicin D 단백질 내 일부를 코딩하는 유전자 단편을 유효성분으로 포함하며, 상기 단편은 암 세포만을 선택적으로 살상하여 유의적인 항암 효과를 나타내었다. 즉, 본 발명은 기존의 유전자 치료제의 한계로 지적되어 왔던 일반 세포에 대한 독성 문제를 해소한 것으로서, 암 치료를 위한 유전자 치료 분야의 핵심 기술로 이용될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명에 따른 Colicin D 유전자의 단편 (ColD595)의 제조 과정 및 상기 ColD595 단편이 코딩하는 Colicin D 단백질 내 영역을 개략적으로 나타낸 도이다.
- 도 2는 PBAE 고분자와 ColD595 유전자를 혼합하여 제조한 나노파티클의 모양, 크기 및 안정성을 확인한 결과이다.
- 도 3은 (A) B16-F10 세포 및 (B) Hela 세포에 대한 ColD595 유전자 단편의 세포 살상 효능을 MTT 어세이를 통해 확인한 결과이다.
- 도 4는 (A) MEF 세포 및 (B) hADSC 세포에 대한 ColD595 유전자 단편의 세포 살상 효능을 MTT 어세이를 통해 확인한 결과이다.
- 도 5는 ColD595 유전자 전달에 의한 B16-F10 세포 내 caspase 3의 발현 변화를 qRT-PCR을 통해 확인한 결과이다.
- 도 6은 ColD595 유전자 전달에 의한 B16-F10 세포의 사멸을 Annexin V & Propidium iodide (PI) 염색을 통해 확인한 결과이다.
- 도 7은 A375 세포에 대한 ColD595 유전자 단편의 세포 살상 효능을 MTT 어세이를 통해 확인한 결과이다.
- 도 8은 흑색종 동물모델을 대상으로 Colicin D 유전자 전달에 의한 종양의 부피 변화를 시간의 경과에 따라 확인한 결과이다.
- 도 9는 흑색종 동물모델을 대상으로 Colicin D 유전자를 주입한지 12일째, 종양 조직을 적출한 후, 육안으로 확인한 결과이다.
- 도 10은 흑색종 동물모델을 대상으로 Colicin D 유전자를 주입한지 12일째, 종양 조직을 적출한 후, (A) H&E (hematoxylin and eosin) 염색, (B) Caspase 3 면역염색, 및 (C) TUNEL 염색을 실시하여 조직학적 변화를 확인한 결과이다.
- 도 11은 흑색종 동물모델의 종양 조직 절제 후, Colicin D 유전자 전달에 의한 암의 재발 억제 효과를 (A) 종양의 부피와 (B) 생존율 변화를 통해 확인한 결과이다.
- 도 12는 흑색종 동물모델의 종양 조직 절제 후, PEG로 수식된 고분자 나노입자를 이용한 Colicin D 유전자 전달에 의한 암의 재발 억제 효과를 (A) 종양의 부피와 (B) 완치율을 통해 확인한 결과이다.
- 도 13은 ColD595 유전자가 B16-F10 세포로 효과적으로 전달되는지 확인하기 위해 암세포 내로 PBAE 고분자 나노파티클을 이용하여 유전자 전달을 진행한 후 ColD595 mRNA 발현량을 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) 분석을 통해 확인한 결과이다.

도 14는 ColD595 유전자가 생체 내에서 암 조직에 효과적으로 전달되는지 확인하기 위해 암 조직에 PBAE 고분자 나노파티클을 이용하여 ColD595 유전자 전달을 진행한 뒤, 3일 후 조직에서 mRNA를 추출하여 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) 분석을 통해 ColD595 mRNA 발현양을 확인한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [0021] 본 발명은 Colicin D 단백질 내 촉매 도메인 (catalytic domain)을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 암을 치료하기 하기 위한 상기 폴리뉴클레오타이드의 의약적 용도; 및 치료학적 유효량의 상기 폴리뉴클레오타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0024] 본 발명에서, "개체"는 암 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류 등을 모두 포함한다.
- [0025] 본 발명의 조성물에 의한 예방 또는 치료 대상 질병인 "암 (cancer)" 은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적 (aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적 (invasive) 특성 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적 (metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다. 본 발명에서 암의 종류로는 흑색종, 자궁 경부암, 췌장암, 위암, 간암, 대장암, 뇌암, 유방암, 갑상선암, 방광암, 식도암, 자궁암, 폐암, 전립선암 및 신장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 해당할 수 있고, 예를 들어, 흑색종 또는 자궁 경부암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 Colicin D 단백질 내 촉매 도메인 (catalytic domain)은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 의미하며, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 Colicin D 단백질의 595번째부터 697번째의 아미노산을 의미하는 것이다.
- [0027] 본 발명에서, Colicin D는 대장균 유래 tRNase 중 하나로서, 세포 사멸에 관여하는 것으로 당업계에서 알려져 있으나, 암 세포에 대한 선택적 사멸 유도도 인한 치료 효과에 대해서는 보고된 바가 없는 실정이다. 따라서, 본 발명은 항암 유전자 치료를 위한 Colicin D 내 일부를 코딩하는 유전자 단편의 용도를 개시하고 있다는 점에 기술적 의의가 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 단백질은 상기 서열번호 2의 아미노산 서열과 각각 75% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, CPP(Cell Penetrating Peptide), NLS(Nuclear Localization Sequence), 표적화 서열, 태그 (tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 제조되어 통상적으로 사용되는 아미노산 서열도 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 단백질은 당해 분야에서 널리 공지된 다양한 방법으로 획득할 수 있다. 일례로서, 폴리뉴클레오타이드 재조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하거나, 펩타이드 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법, 및 무세포 단백질 합성법 등으로 제조될 수 있다.
- [0030] 아울러, 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성 (반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성 (예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 펩타이드의 N- 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 바람직하게, 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 펩타이드의 개질, 특히 펩타이드의 안정성 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서, 폴리뉴클레오타이드 (polynucleotide)는 뉴클레오타이드가 결합된 중합체로서, 유전 정보를 전달하는 역할을 한다. 본 발명의 목적상, 서열번호 2의 아미노산으로 이루어진 단백질을 코딩하며, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 각각 75% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.



- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어, "상동성"은 야생형 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 이러한 상동성의 비교는 당업계에서 널리 알려진 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있으며, 2개 이상의 서열간 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서는, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 코딩하는 유전자 단편 (CoID595)은 암 세포에 대한 선택적인 세포 사멸 (apoptosis)을 유도하여, 유의적인 항암 효과 (*in vitro*)를 나타내고 (실시예 2 참고), 흑색종 동물 모델에서도 우수한 항암 효능 (*in vivo*) 및 암의 재발 억제 효능 (*in vivo*)을 나타내었다 (실시예 3 및 실시예 4 참고). 따라서, 이러한 본 발명의 실시예를 통하여, 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 항암 유전자 치료의 유효물질로 이용될 수 있음을 실험적으로 확인할 수 있었다.
- [0034] 한편, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포좀, 미소구체 (microspheres), 또는 나노 구형입자와 같은 약학적으로 허용될 수 있는 담체에 운반될 수 있다. 이들은 운반 수단과 복합체를 형성하거나 관련될 수 있고, 지질, 리포좀, 미세입자, 금, 나노입자, 폴리머, 축합 반응제, 다당류, 폴리아미노산, 텐드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 생체 내 운반 또는 전달될 수 있다.
- [0035] 한 구체예로서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터에 포함되어 생체 내로 운반 또는 전달될 수 있다. 상기 바이러스성 벡터로는 예를 들어, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 등이 있고, 상기 비바이러스성 벡터로는 플라스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 리포솜, 세균인공염색체, 효모인공염색체, 고분자 나노입자 또는 무기 나노입자가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 또 다른 구체예로서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 생체적합성 고분자와 혼합 (mixed) 또는 생체적합성 고분자에 봉입되어 생체 내로 운반 또는 전달될 수 있다. 상기 생체적합성 고분자로는 생체 또는 세포로의 전달 이후 쉽게 분해될 수 있으면서, 복합체 형성을 위한 양이온을 포함하는 고분자라면 제한없이 본 발명에 사용될 수 있고, 예를 들어, PBAE (Poly(beta-amino ester)), PLL (Poly(L-Lysine)), PAA (Polyallylamine), Poly-L-ornithine, PAMAM (Polyamidoamine), PEI (Polyethyleneimines), PHP (Poly(4-hydroxy-L-proline ester)), PAGA (Poly(alpha-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid)), PPE-EA (Polyphosphoester), PPA (Polyphosphazene), PDMAEMA (Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylate)), PLHP (Poly(D,L-lactide-co-4-hydroxy-L-proline)), PAGA (Poly(gamma-4-aminobutyl)-1-glycolic acid), DEAE-dextran (Diethylaminoethyl-dextran), PVP (Polyvinylpyrrolidone), PHPMA (Poly(N-(2-hydroxypropyl)methylacrylamide)), GuaMA (3-Guanidinopropyl ester), PMP (Polyethylenimine-methyl acrylate-polyethylenimine), 키토산 (Chitosan), 콜라겐 (Collagen), 젤라틴 (Gelatin), 덱스트란 (Dextran), 사이클로덱스트란 (Cyclodextran), 셀룰로오스 (Cellulose), 풀루란 (Pullulan), 폴리알라닌 (Polyarginine) 또는 폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol)로 수식된 이들의 변형 물질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 한 구체예에서, 상기 생체적합성 고분자는 PBAE (Poly(beta-amino ester))일 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol)로 수식된 PBAE일 수 있다.
- [0037] 이 외에도, 약학적으로 허용되는 담체는 제제시 통상적으로 이용되는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아, 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여 (예를 들어, 근육 내, 정맥 내, 복강 내, 피하, 피내, 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 항암제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 항암제와는 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에

의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0040] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성율, 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라 증감될 수 있다.

[0041] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0043] [실시예]

[0044] 실시예 1. 암 치료를 위한 ColD595의 제작

[0045] Colicin D 단백질은 *E. coli* 유래 박테리오킨 중 하나로서, tRNA 분해를 통해 단백질 합성을 저해하는 독신으로 알려져 있다. 본 발명자들은 상기 Colicin D 단백질 중에서도 특정 단편의 항암 효과를 실험적으로 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 본 실시예에서는 통상의 유전자 클로닝 기술을 이용하여, 도 1에 나타난 바와 같이, 서열 번호 1의 Colicin D 아미노산 서열 중 595번째부터 697번째 아미노산 서열을 코딩하는 유전자 단편을 포함하는 플라스미드를 제작하였다 (본 실시예에서는 상기 단편을 ColD595로 명명하였음.). 구체적으로 ColD595에 해당하는 유전자 서열을 합성한 후 (바이오니아, 한국) 두 개의 프라이머 EGFP\_N1\_ColD595F와 EGFP\_N1\_ColD595R을 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 마찬가지로 EGFP\_N1\_VF와 EGFP\_N1\_VR 프라이머를 이용하여 pEGFP-N1 벡터에 포함된 녹색형광단백질 (GFP)를 제외한 벡터 부위만을 PCR로 증폭한 후 두 DNA 단편을 In-fusion (Takara, Japan) 방법으로 연결하여 pEGFP\_N1\_ColD595를 완성하였다. PCR에 사용한 프라이머의 5'에서 3'으로의 뉴클레오타이드 서열은 아래 표 1과 같다.

표 1

서열번호	염기서열(5'→3')
SEQ ID NO: 4(EGFP_N1_ColD595F)	CCGGTCGCCACCATGCTGGACTCTGGTCGTTTCT
SEQ ID NO: 5(EGFP_N1_ColD595R)	GTCGCGGCCGCTTTACAGTTCACCGGTTTCC
SEQ ID NO: 6(EGFP_N1_VF)	TAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCA
SEQ ID NO: 7(EGFP_N1_VR)	CATGGTGGCGACCGGTGGATC

[0048] 실시예 2. ColD595 유전자 단편을 포함하는 고분자 나노파티클

[0049] 1) 고분자 나노파티클의 제조

[0050] ColD595 유전자 단편을 안정하게 전달하기 위해 상기 단편을 포함하는 고분자 나노파티클을 제작하였다. 구체적으로, 상기 고분자 나노파티클은 양이온 고분자인 PBAE와 음이온을 띄는 상기 유전자를 NaAc 버퍼 상에서 혼합함으로써, 양이온 고분자와 DNA의 이온적 상호작용(electrostatic interaction)을 통해 응집시켜 제조하였다.

[0052] 2) 고분자 나노파티클의 특성 확인

[0053] 상기 1)에서 제조한 고분자 나노파티클의 모양과 안정성을 확인하였다.

[0054] 먼저, 투과 전자 현미경(TEM)을 통해 상기 나노파티클의 대략적인 크기와 모양을 관찰하고(도 2A), 아가로스 겔 지연 분석 실험을 통해 나노파티클의 형성 및 안정성을 확인하였다. 일반적인 유전자 플라스미드의 경우, 도 2B의 1번 lane과 같이 전기영동을 통해 아래로 내려가게 되어 있는데, 나노파티클이 형성된 3번 lane의 경우 겔 아래로 내려가지 않는 것을 확인하였다. 이를 통해 나노파티클의 정상적으로 형성된 것을 확인할 수 있었으며, 유전자 분해효소(DNase I)를 처리한 2번 lane의 경우, 유전자가 모두 분해되어 관찰되지 않았다. 3번과 4번 lane은 유사한 양상을 지니는 것을 보아 나노파티클이 유전자 분해효소로부터 유전자 플라스미드가 분해되는 것을 보호해주는 역할을 하는 것을 알 수 있었으며, 이로부터 나노파티클의 안정성을 확인할 수 있었다.

[0055] 다음으로, 동적 광 산란장치(DLS)를 이용하여 ColD595 유전자-고분자 나노파티클의 크기 분포도를 시간별로 확인하였다(도 2C). 나노파티클을 PBS 용액에서 배양한 뒤 바로 확인하였을 때(0hr)와, 1시간 후 확인하였을 때(1hr), 그 분포도나 파티클의 평균 크기가 큰 차이를 나타내지 않는 것을 통해 나노파티클의 안정성을 확인하였다.



[0057] **실시예 3. 암세포 선택적인 살상 효능 확인**

[0058] 본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 제작된 ColD595 유전자 단편의 암세포 선택적인 살상 효능 및 관련 기작을 확인하고자 하였다. 우선, ColD595 유전자를 각각 1) 마우스 흑색종 세포 (Mouse melanoma cell)인 B16-F10 세포, 2) 인간 자궁 경부암 세포 (Human cervical carcinoma cell)인 HeLa 세포, 3) 마우스 배아섬유아세포 (MEF) 세포, 4) 인간 지방유래 줄기세포 (hADSC), 5) 인간 흑색종 세포 (Human melanoma cell)인 A375 세포에 PBAE (Poly(beta-amino ester)) 고분자 나노파티클을 이용하여 전달하였다. 이후, 상기 ColD595 유전자가 전달된 각각의 세포를 대상으로 MTT 어세이를 실시하여 각 세포별 독성, 즉 살상 효능을 관찰하였다.

[0059] 또한, 상기 세포들 중에서 유의적인 살상 효능을 보인 B16-F10 세포에 ColD595 유전자를 상기와 동일한 방법으로 전달한 후, 이로부터 3일째, qRT-PCR을 실시하여 caspase 3의 발현 변화를 비교하였고, Annexin V & Propidium iodide (PI) 염색을 실시하여, 암세포 살상 효능의 메커니즘을 구체적으로 확인하였다. 한편, 본 실시예에서 대조군으로는 비처리군 (NT), 비교군으로는 항암 효능이 없는 형광 단백질에 대한 유전자 주입군인 pEGFP 처리군을 이용하였다.

[0060] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 두 종류의 암세포인 B16-F10 세포 및 HeLa 세포에서는 ColD595 유전자 주입에 의한 유의적인 살상 효능이 관찰되었으며, 이러한 효능은 ColD595 유전자의 주입 농도에 의존하는 경향을 보였다. 반면, 도 4에 나타난 바와 같이, 비-암세포인 MEF 세포 및 hADSC에서는 비교군의 생존율과 큰 차이를 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 또한, 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, ColD595 유전자를 주입한 경우, 대조군 및 비교군에 비해 Caspase3의 발현이 약 2배 가량 증가되었으며 (도 5 참조), viable stage의 세포 (Q4)가 감소되고 apoptotic state에 해당하는 세포 (Q2, Q3)의 세포가 현저하게 증가되었는바 (도 6의 A 및 B 참조), 세포 사멸 메커니즘을 통해 암세포의 성장 및 생존을 저해시킴을 확인할 수 있었다.

[0061] 또한, 도 7에서 보는 것과 같이, 마우스 세포뿐만 아니라 인간 흑색종 세포에서도 대조군 유전자 전달 (EGFP)에 비해 암 세포의 생존율을 유의미하게 감소시켰으며, 유전자 농도를 더 높게 처리할수록 높은 독성을 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0062] 즉, 이러한 실험 결과는 항암 치료를 위한 유효물질로서 본 발명에 따른 ColD595 유전자가 활용될 수 있으며, 특히, 상기 ColD595 유전자는 암세포만을 선택적인 살상할 수 있었는바, 기존의 유전자 암 치료제의 문제점으로 지적되어 왔던, 광범위한 세포 사멸에 따른 부작용 역시 해소될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0064] **실시예 4. 흑색종 동물 모델을 이용한 항암 효능 확인**

[0065] 본 실시예에서는 상기 실시예 3의 결과에 기초하여, 흑색종 동물모델을 대상으로 ColD595 유전자 단편의 항암 효능을 확인하고자 하였다. 우선, 마우스의 옆구리 쪽 피하에 B16-F10 세포를 주입하여 흑색종 동물 모델을 구축하였다. 이후, ColD595 유전자를 상기 동물 모델에 PBAE 고분자 나노파티클을 이용하여 주입한 뒤, 시간의 경과 (0, 2, 4, 6, 8, 10, 및 12일)에 따른 종양의 부피 변화를 관찰하였다.

[0066] 또한, ColD595 유전자를 주입한지 12일째, 종양 조직을 적출하여 이를 육안으로 확인하였으며, 상기 종양 조직을 대상으로 H&E (hematoxylin and eosin) 염색, Caspase 3에 대한 면역염색, 및 TUNEL 염색을 실시하여, 조직학적 변화를 비교하였다. 한편, 본 실시예에서 대조군으로는 비처리군 (NT), 비교군으로는 항암 효능이 없는 형광 단백질에 대한 유전자 주입군인 pEGFP 처리군을 이용하였다.

[0067] 그 결과, 도 8 및 도 9에 나타난 바와 같이, ColD595 유전자를 주입한 경우, 대조군 및 비교군에 비해 종양의 성장을 유의적으로 저해시킴을 알 수 있었으며, 파티클 또는 유전자를 주입한지 12일째, 이들간 종양의 부피 차이는 현저하였다 (도 9). 또한, 도 10에 나타난 바와 같이, ColD595 유전자가 주입된 종양 조직은 조직의 밀도가 크게 감소되었으며 (도 10의 A 참조), 종양 조직 내 caspase 3의 발현 (도 10의 A, B 참조), 및 세포 사멸 중인 암세포의 비율 (도 10의 A, C 참조)이 현저하게 증가됨을 확인할 수 있었다. 즉, 이러한 실험 결과는 생체 내 (in vivo) 실험을 통하여, ColD595 유전자 단편의 항암 효능의 유효성을 재차 검증한 것이다.

[0069] **실시예 5. 흑색종 동물 모델을 이용한 암의 재발 억제 효능 확인**

[0070] 본 실시예에서는 상기 실시예 4의 흑색종 동물모델을 대상으로 ColD595 유전자 단편의 암 재발 억제 효능을 확인하고자 하였다. 우선, 흑색종 동물 모델에서 종양 조직을 절제한 후, 이로부터 1일, 3일, 5일, 및 7일째, 상기 절제 부위에 실시예 3과 동일한 방법으로 ColD595 유전자를 주입한 뒤, 시간의 경과에 따른 종양의 부피 및 생존율의 변화를 관찰하였다. 한편, 본 실시예에서 대조군으로는 비처리군 (NT)을 이용하였다.

[0071] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, ColD595 유전자를 주입한 경우, 대조군에 비해 암의 재발을 현저하게 억제

시킬 수 있었고 (도 11의 A 참조), 이에 따라, 마우스의 생존율 역시 유의적으로 증가되었는바 (도 11의 B 참조), 본 발명은 암의 재발 억제에도 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0072] 추가적으로, 기존의 PBAE 고분자 (carrier A) 뿐만 아니라, PEG (polyethylene glycol)로 수식된 PBAE 고분자 (carrier B)를 이용하여, ColD505 유전자 주입에 따른 흑색종 마우스의 암 재발 억제 효과와 완치율을 확인하였다. 이때, PEG로 수식된 PBAE 고분자는 PBAE를 PEG로 수식하여 생체 내에서의 PBAE 고분자의 안정성을 증진시킴으로써 PBAE에 의한 유전자 전달 효율을 높이하고자 합성한 것이다.

[0073] 상기 종양 조직에 ColD595 유전자를 주입한 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, PEG로 수식된 carrier B에 의한 암의 재발 억제 효과가 가장 우수하였으며 (도 12의 A 참조), PEG로 수식된 carrier B에 의해 흑색종 마우스 11 마리 중 6마리가 완치되는 것을 확인하였는바 (도 12의 B 참조), 세포 내 전달 효율이 우수한 전달체를 이용함으로써, ColD595 단백질의 항암 효능을 보다 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

#### [0075] 실시예 6. ColD595 유전자 전달 효율 확인

##### [0076] 1) 암세포로의 유전자 전달 및 발현 확인

[0077] ColD595 유전자가 B16-F10 세포로 효과적으로 전달되는지 확인하기 위해, 암 세포 내로 PBAE 고분자 나노파티클을 이용하여 유전자 전달을 진행하였다. 이후 ColD595 mRNA 발현 양을 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 분석을 통해 확인하였다.

[0078] 먼저, RT-PCR 분석 후 겔 전기영동을 통해 PCR 생산물을 확인하였다 (도 13). ColD595를 전달해준 그룹에서 ColD595 mRNA가 잘 발현되고 있는 반면, EGFP 그룹과 NT 그룹에서는 ColD595 mRNA가 전혀 발현하지 않는 것을 확인하였다. 더욱이 겔 이미지를 이용하여 정량한 결과, 대조군들은 ColD595 유전자를 전혀 발현하지 않았으며, ColD595 유전자 전달 그룹에서만 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

[0079] 즉, ColD595 유전자가 PBAE 고분자 나노파티클에 의해 세포 내로 잘 전달되며 세포 내에서 ColD595 mRNA가 잘 발현되는 것을 확인하였다.

##### [0081] 2) 암조직으로의 유전자 전달 및 발현 확인

[0082] 1)과 마찬가지로 ColD595 유전자가 생체 내에서 암 조직에 효과적으로 전달되는지 확인하였다 (도 14). 암 조직에 PBAE 고분자 나노파티클을 이용하여 ColD595 유전자 전달을 진행하고, 3일 후에 조직에서 mRNA를 추출하여 RT-PCR 분석을 통해 ColD595 mRNA 발현량을 확인하였다.

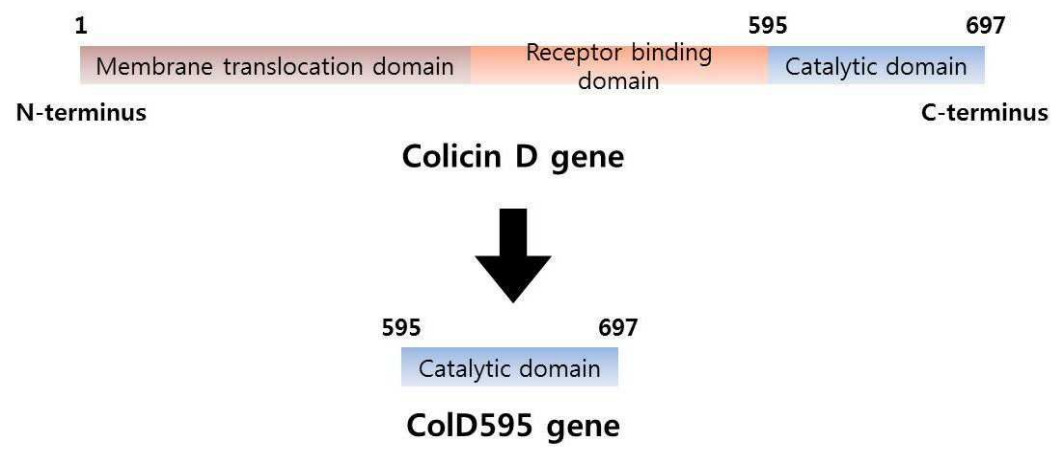
[0083] RT-PCR 분석 후 겔 전기영동을 통해 PCR 생산물을 확인한 결과, ColD595 유전자 전달을 해준 그룹에서만 ColD595 mRNA 발현이 확인되었으며, 대조군에서는 확인되지 않았다. 또한 겔 이미지 intensity를 기반으로 정량 분석한 결과, ColD595 유전자를 전달해준 그룹에서만 발현되는 것을 확인하였다.

[0084] 따라서, ColD595 유전자가 PBAE 나노파티클에 의해 암 조직내로 잘 전달되고, ColD595 mRNA가 잘 발현하는 것을 확인하였다.

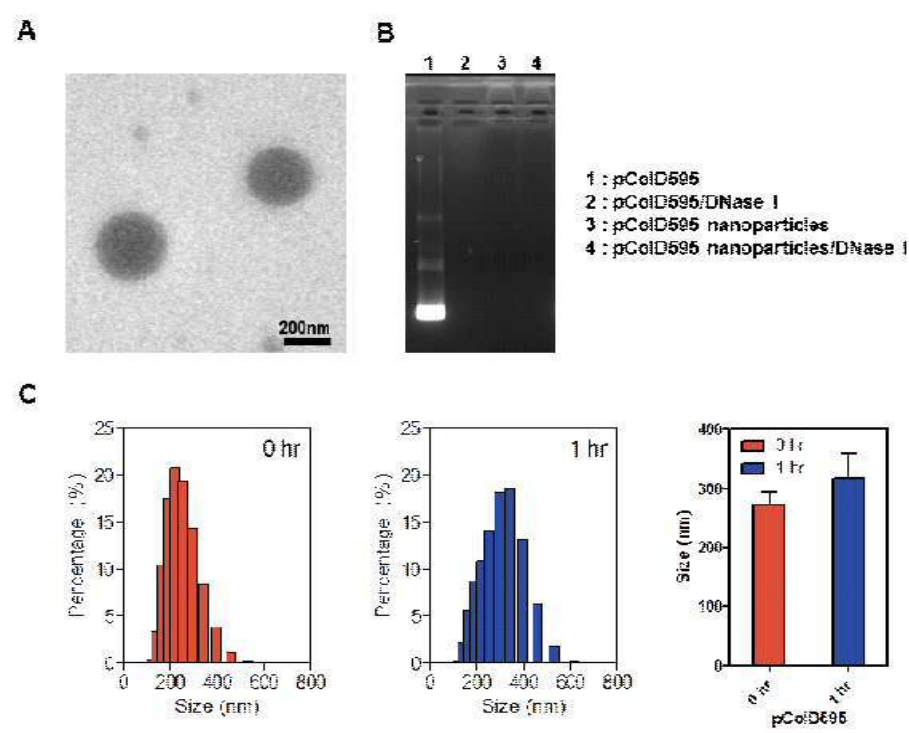
[0086] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

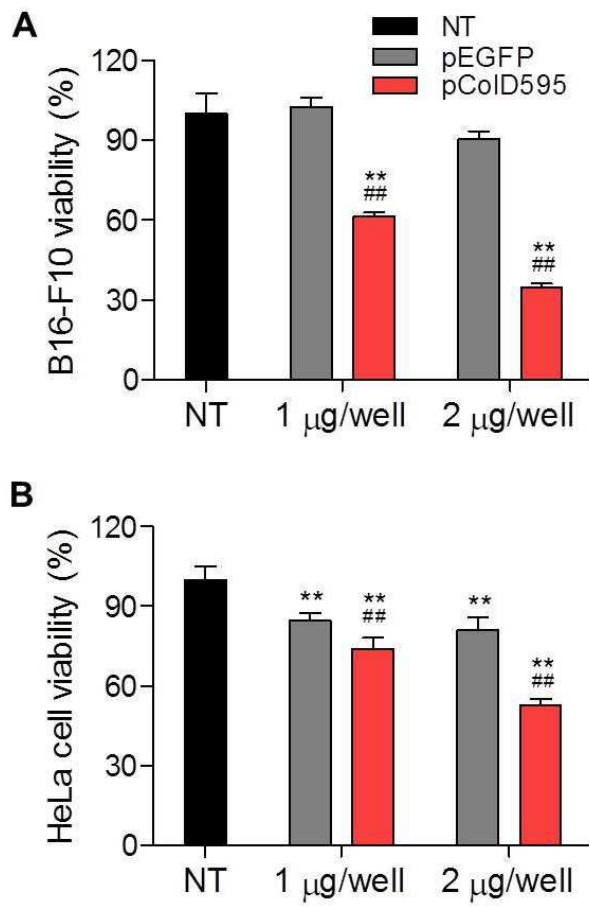
도면1



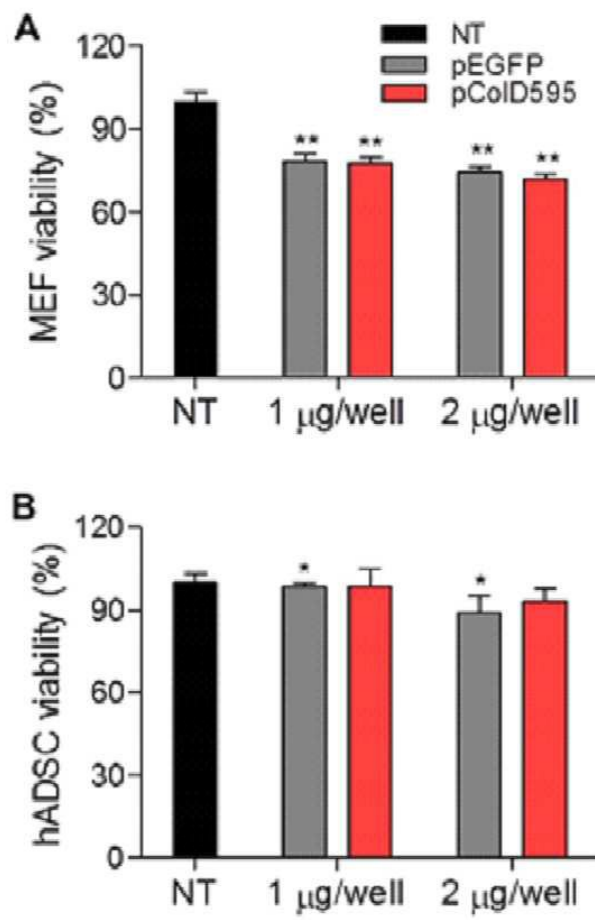
도면2



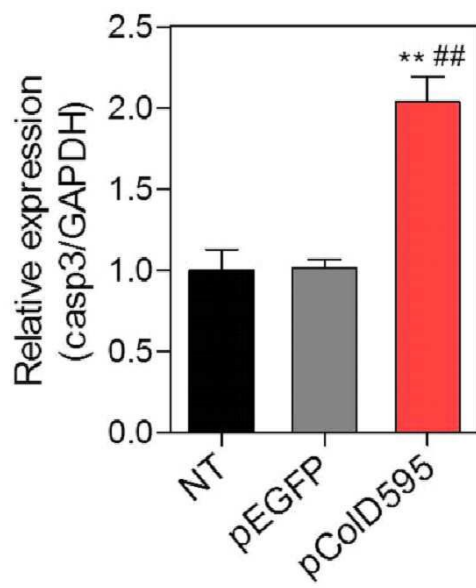
도면3



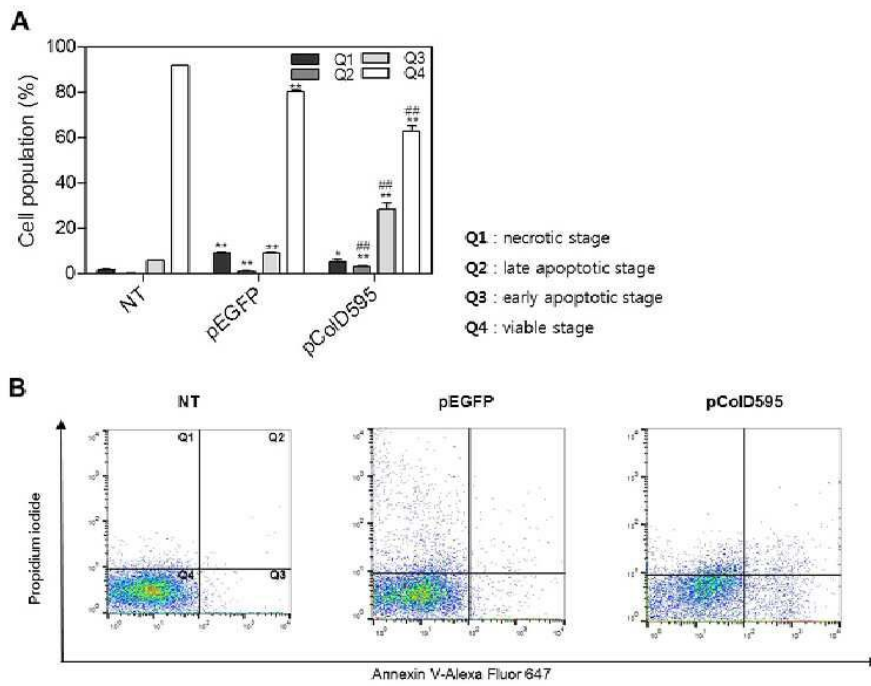
도면4



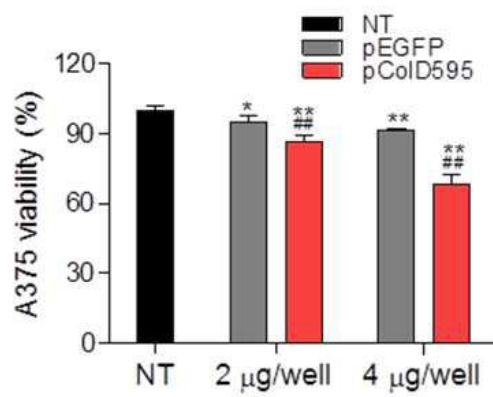
도면5



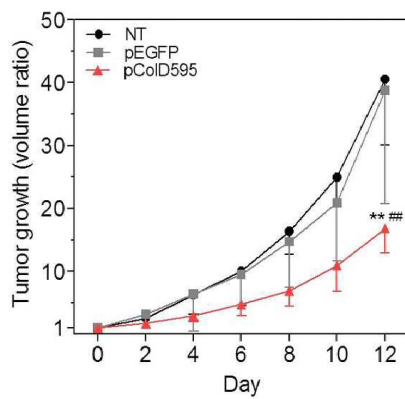
도면6



도면7

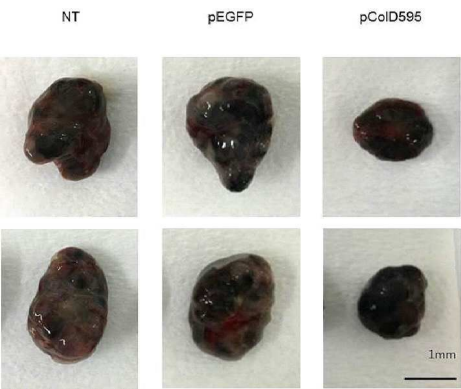


도면8

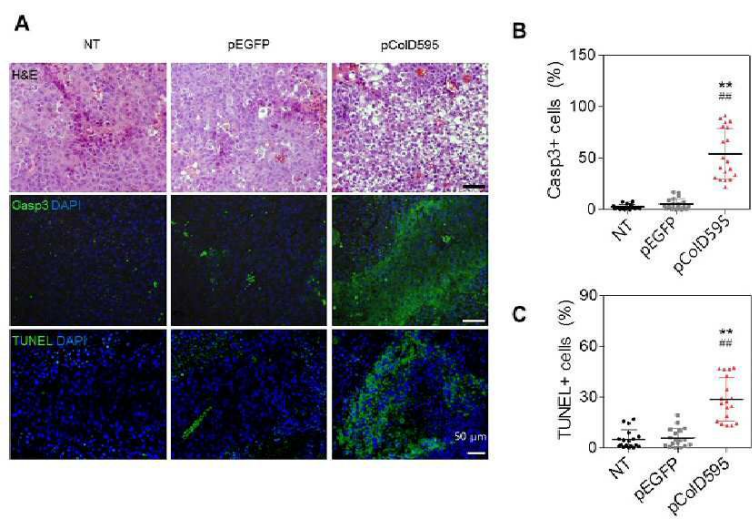




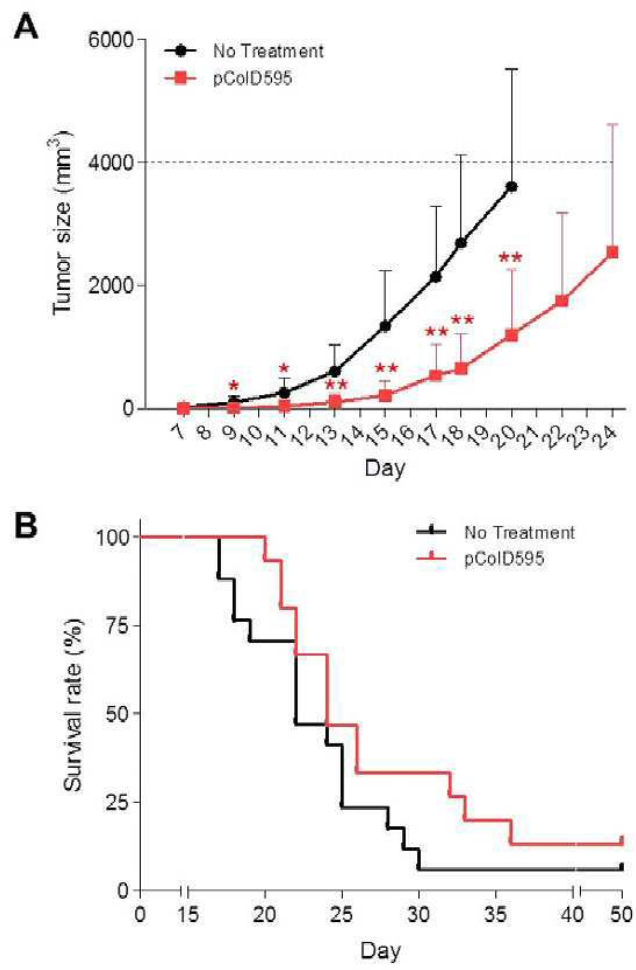
도면9



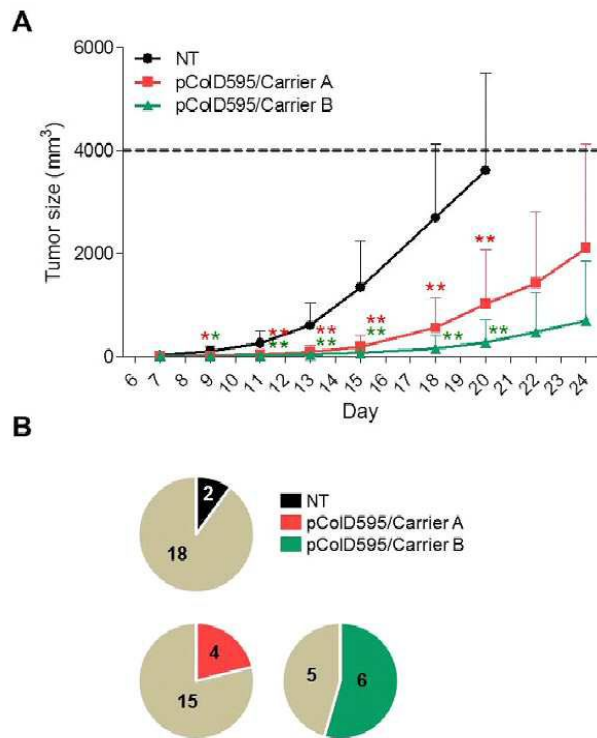
도면10



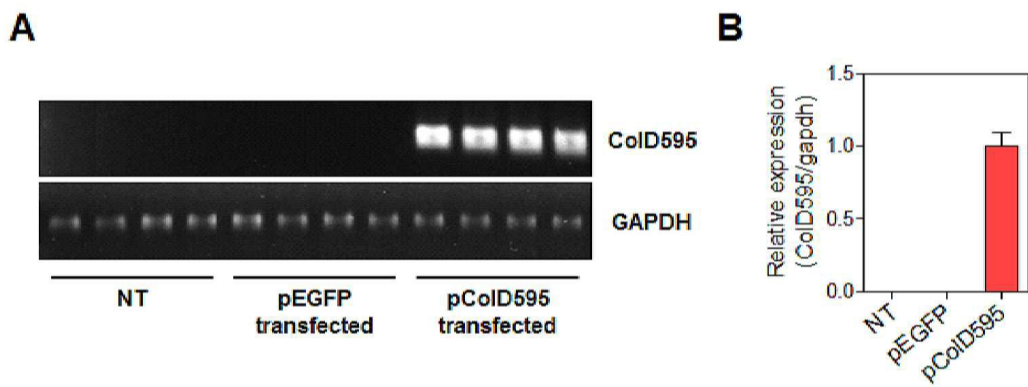
도면11



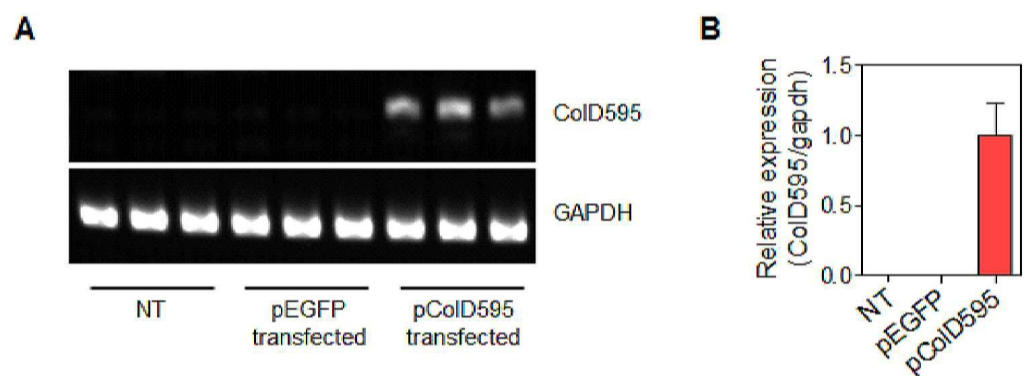
도면12



도면13



도면14



# 서열 목록

<110> University-Industry Foundation, Yonsei University  
Dongguk University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Use of Colicin D fragment for treating cancer

<130> P18U16C0041

<160> 7

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 697

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Colicin D

<400> 1

Met	Ser	Asp	Tyr	Glu	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr	Glu	Gly	Ile	Asp	Tyr	Gly
1				5				10						15	
His	Ser	Met	Val	Val	Trp	Pro	Ser	Thr	Gly	Leu	Ile	Ser	Gly	Gly	Asp
				20				25						30	
Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Ile	Ala	Pro	Ser	Met	Pro	Pro	Gly
			35					40						45	
Trp	Gly	Asp	Tyr	Ser	Pro	Gln	Gly	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Ser	Val	Leu
			50					55						60	
Phe	Pro	Gly	Ile	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Leu	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu
			65					70						75	
Gly	Asp	Trp	Ser	Gly	Trp	Ser	Val	Ser	Val	His	Ser	Pro	Trp	Gly	Asn
				85						90					95
Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Arg	Thr	Val	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Arg	Gly
				100						105					110
Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Ser	Arg	Pro	Ala	Ala	Val	Ser	Phe	Ala	Arg	Leu
				115						120					125
Glu	Pro	Ala	Ser	Gly	Asn	Glu	Gln	Lys	Ile	Ile	Arg	Leu	Met	Val	Thr
				130						135					140
Gln	Gln	Leu	Glu	Gln	Val	Thr	Asp	Ile	Pro	Ala	Ser	Gln	Leu	Pro	Ala
				145						150					155
															160

Ala Gly Asn Asn Val Pro Val Lys Tyr Arg Leu Met Asp Leu Met Gln

165 170 175

Asn Gly Thr Gln Tyr Met Ala Ile Ile Gly Gly Ile Pro Met Thr Val

180 185 190

Pro Val Val Asp Ala Val Pro Val Pro Asp Arg Ser Arg Pro Gly Thr

195 200 205

Asn Ile Lys Asp Val Tyr Ser Ala Pro Val Ser Pro Asn Leu Pro Asp

210 215 220

Leu Val Leu Ser Val Gly Gln Met Asn Thr Pro Val Leu Ser Asn Pro

225 230 235 240

Glu Ile Gln Glu Glu Gly Val Ile Ala Glu Thr Gly Asn Tyr Val Glu

245 250 255

Ala Gly Tyr Thr Met Ser Ser Asn Asn His Asp Val Ile Val Arg Phe

260 265 270

Pro Glu Gly Ser Asp Val Ser Pro Leu Tyr Ile Ser Thr Val Glu Ile

275 280 285

Leu Asp Ser Asn Gly Leu Ser Gln Arg Gln Glu Ala Glu Asn Lys Ala

290 295 300

Lys Asp Asp Phe Arg Val Lys Lys Glu Glu Ala Val Ala Arg Ala Glu

305 310 315 320

Ala Glu Lys Ala Lys Ala Glu Leu Phe Ser Lys Ala Gly Val Asn Gln

325 330 335

Pro Pro Val Tyr Thr Gln Glu Met Met Glu Arg Ala Asn Ser Val Met

340 345 350

Asn Glu Gln Gly Ala Leu Val Leu Asn Asn Thr Ala Ser Ser Val Gln

355 360 365

Leu Ala Met Thr Gly Thr Gly Val Trp Thr Ala Ala Gly Asp Ile Ala

370 375 380

Gly Asn Ile Ser Lys Phe Phe Ser Asn Ala Leu Glu Lys Val Thr Ile

385 390 395 400

Pro Glu Val Ser Pro Leu Leu Met Arg Ile Ser Leu Gly Ala Leu Trp

405                      410                      415  
 Phe His Ser Glu Glu Ala Gly Ala Gly Ser Asp Ile Val Pro Gly Arg  
 420                      425                      430  
 Asn Leu Glu Ala Met Phe Ser Leu Ser Ala Gln Met Leu Ala Gly Gln  
 435                      440                      445  
 Gly Val Val Ile Glu Pro Gly Ala Thr Ser Val Asn Leu Pro Val Arg  
  
 450                      455                      460  
 Gly Gln Leu Ile Asn Ser Asn Gly Gln Leu Ala Leu Asp Leu Leu Lys  
 465                      470                      475                      480  
 Thr Gly Asn Glu Ser Ile Pro Ala Ala Val Pro Val Leu Asn Ala Val  
 485                      490                      495  
 Arg Asp Thr Ala Thr Gly Leu Asp Lys Ile Thr Leu Pro Ala Val Val  
 500                      505                      510  
 Gly Ala Pro Ser Arg Thr Ile Leu Val Asn Pro Val Pro Gln Pro Ser  
 515                      520                      525  
  
 Val Pro Thr Asp Thr Gly Asn His Gln Pro Val Pro Val Thr Pro Val  
 530                      535                      540  
 His Thr Gly Thr Glu Val Lys Ser Val Glu Met Pro Val Thr Thr Ile  
 545                      550                      555                      560  
 Thr Pro Val Ser Asp Val Gly Gly Leu Arg Asp Phe Ile Tyr Trp Arg  
 565                      570                      575  
 Pro Asp Ala Ala Gly Thr Gly Val Glu Ala Val Tyr Val Met Leu Asn  
 580                      585                      590  
 Asp Pro Leu Asp Ser Gly Arg Phe Ser Arg Lys Gln Leu Asp Lys Lys  
  
 595                      600                      605  
 Tyr Lys His Ala Gly Asp Phe Gly Ile Ser Asp Thr Lys Lys Asn Arg  
 610                      615                      620  
 Glu Thr Leu Thr Lys Phe Arg Asp Ala Ile Glu Glu His Leu Ser Asp  
 625                      630                      635                      640  
 Lys Asp Thr Val Glu Lys Gly Thr Tyr Arg Arg Glu Lys Gly Ser Lys  
 645                      650                      655  
 Val Tyr Phe Asn Pro Asn Thr Met Asn Val Val Ile Ile Lys Ser Asn



660 665 670

Gly Glu Phe Leu Ser Gly Trp Lys Ile Asn Pro Asp Ala Asp Asn Gly

675 680 685

Arg Ile Tyr Leu Glu Thr Gly Glu Leu

690 695

<210> 2

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ColD595

<400> 2

Met Leu Asp Ser Gly Arg Phe Ser Arg Lys Gln Leu Asp Lys Lys Tyr

1 5 10 15

Lys His Ala Gly Asp Phe Gly Ile Ser Asp Thr Lys Lys Asn Arg Glu

20 25 30

Thr Leu Thr Lys Phe Arg Asp Ala Ile Glu Glu His Leu Ser Asp Lys

35 40 45

Asp Thr Val Glu Lys Gly Thr Tyr Arg Arg Glu Lys Gly Ser Lys Val

50 55 60

Tyr Phe Asn Pro Asn Thr Met Asn Val Val Ile Ile Lys Ser Asn Gly

65 70 75 80

Glu Phe Leu Ser Gly Trp Lys Ile Asn Pro Asp Ala Asp Asn Gly Arg

85 90 95

Ile Tyr Leu Glu Thr Gly Glu Leu

100

<210> 3

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ColD595

<400> 3

atgctggact ctggtcggtt ctctcgtaaa cagctggaca aaaaatacaa acacgtggt

gacttcggta tctctgacac caaaaaaac cgtgaaaccc tgaccaaatt ccgtgacgct 120

atcgaagaac acctgtctga caaagacacc gttgaaaaag gtacctaccg tcgtgaaaaa 180

ggttctaaag ttctattcaa cccgaacacc atgaacgttg ttatcatcaa atctaacggt 240

gaattcctgt ctggttgga aatcaaccgc gacgctgaca acggtcgtat ctacctggaa 300

accggtgaac tgtaa 315

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFP\_N1\_Co1D595F

<400> 4

ccggtcgcca ccatgctgga ctctggtcgt ttct 34

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFP\_N1\_Co1D595R

<400> 5

gtcgcggccg ctttacagtt caccggtttc c 31

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFP\_N1\_VF

<400> 6

taaagcggcc gcgactctag atca 24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFP\_N1\_VR

<400> 7

catggtggcg accggtggat c 21