

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0026389
(43) 공개일자 2020년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

A61K 39/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0102973

(22) 출원일자 2018년08월30일

심사청구일자 2018년08월30일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

황광연

서울특별시 용산구 이촌로 310 101동 3601호 (이촌동, 래미안첼리투스)

송문정

서울특별시 강남구 도곡로78길 22 103동 606호 (대치동, 삼성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

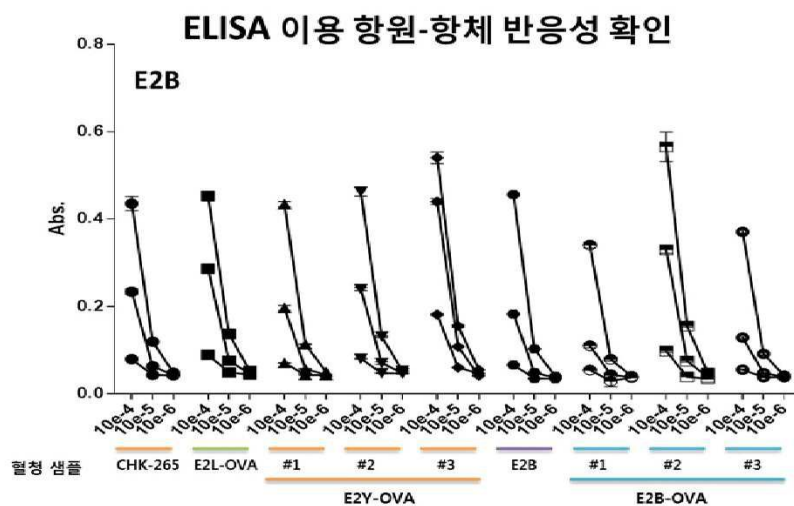
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 신규한 치쿤군야 바이러스 에피토프 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 치쿤군야 바이러스의 표준항원으로서 신규한 에피토프 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 항원 단백질은 당화 부위를 포함하지 않고, 우수한 수용성을 갖는바 산업적인 수준의 항원 단백질 및 항체의 대량생산에 매우 적합하고, 중화항체를 유도한다는 점에서 우수한 특성을 갖는다. 또한, 항체에 의한 검출 민감성이 우수하여 치쿤군야 바이러스에 대한 감염 확인, 감염 예방 또는 감염 치료에 매우 효과적으로 활용될 수 있다.

대표도 - 도19



(52) CPC특허분류

C07K 16/1081 (2013.01)

G01N 33/56983 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2319/21 (2013.01)

C12N 2770/36122 (2013.01)

G01N 2333/181 (2013.01)

(72) 발명자

손중현

서울특별시 강북구 삼양로27길 19 220동 202호 (미아동, 삼성래미안트리베라2차아파트)

김소은

경기도 성남시 분당구 동판교로 155 (삼평동 봇들마을7단지아파트) 704동 1402호

정우창

경기도 성남시 분당구 양현로94번길 29 601동 1703호 (이매동, 이매촌청구아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

치쿤군야 바이러스에 대한 중화항체 유도능을 갖는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열의 일 말단에 히스티딘 표지(Histidine tag)를 더 포함하는 폴리펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제3항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 5

제4항의 재조합 발현벡터를 포함하는 형질전환체.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 형질전환체는 대장균(*E-coli*)인 형질전환체.

청구항 7

제5항 또는 제6항의 형질전환체를 배양하는 것을 포함하는, 재조합 단백질 생산방법.

청구항 8

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 치쿤군야 바이러스 특이적 항체.

청구항 9

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프를 포함하는 치쿤군야 재조합 단백질을 인간을 제외한 동물에 주입하는 것을 포함하는, 치쿤군야 바이러스 특이적 항체를 생산하는 방법.

청구항 10

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프를 포함하는 재조합 단백질 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 치쿤군야 바이러스 검출용 조성물.

청구항 11

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프를 포함하는 재조합 단백질 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 치쿤군야 바이러스 검출용 키트.

청구항 12

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체와 시료를 접촉

시키는 것을 포함하는, 시료에서 치쿤군야 바이러스를 검출하는 방법.

청구항 13

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 치쿤군야 바이러스 감염 치료용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 항체는 중화항체인, 치료용 조성물.

청구항 15

제1항의 폴리펩티드를 포함하는 치쿤군야 바이러스에 대한 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치쿤군야 바이러스의 표준항원으로서 신규한 에피토프 및 이를 이용한 치쿤군야 바이러스를 검출과 같은 새로운 에피토프의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 치쿤군야 바이러스(Chikungunya virus, CHIKV)는 1952년 탄자니아의 마콘데 고원(Makonde Plateau)에서 처음 보고된 이래 동남아시아 지역에서 60-80년대 국지적인 유행을 보이다가, 2000년대에 들어와 케냐(2004), 코모도(2005), 인도(2005-2007), 프랑스(2006), 이탈리아(2007) 등 전 세계적으로 대규모 유행이 예상치 못하게 산발적으로 발생하고 있다.

[0003] 특히, 코모로 제도 인구의 70% 이상 감염, 프랑스 발생 지역 인구의 30% 감염 등과 같이 일부 지역에서는 감염자의 발생 정도의 규모가 상당히 컸고, 전세계적으로 매년 100만 명의 감염자가 발생하는 것으로 보고된 바 있고, 최근 들어 세계 여행의 증가로 인해 치쿤군야 바이러스 호발지역(인도, 아프리카, 인도양 섬 등)을 방문했던 여행자들이 지역 감염을 일으킨 사례가 2003년부터 발생하고 있다.

[0004] 점차 심각해지는 지구 온난화로 인해 치쿤군야 바이러스 전염 매개체인 모기의 활동 반경이 점차 확대되고 있어 열대성의 기존의 치쿤군야 바이러스 호발지역을 넘어서 비열대성의 새로운 지역에도 치쿤군야 바이러스 감염의 위험성이 증가하고 있다. 전세계적으로 2007년부터 치쿤군야 바이러스 감염은 더 이상 열대성 질환으로 분류하지 않으며 우리나라에서도 2010년 12월에 처음으로 법정감염으로 지정되었다. 2013-2015년 사이 5건의 치쿤군야 바이러스의 국내 감염사례가 보고된 바 있으며, 대부분의 감염자들은 치쿤군야 바이러스 호발지역을 방문한 전력이 있는 것으로 나타났다.

[0005] 치쿤군야 바이러스는 땡기 바이러스와 지카 바이러스의 매개체로도 알려진 이집트 숲모기(Aedes aegypti)와 흰줄 숲모기(Aedes albopictus)에 의해 전파되는 모기 매개성 아보바이러스(Arbovirus)에 해당하는 것으로, 급성 열성질환인 치쿤군야 열병을 일으키는 바이러스로 알려져 있다. 치쿤군야 바이러스가 감염되는 경우 10~15%는 무증상을 보이지만, 나머지 감염자는 1 ~ 12일의 잠복기를 거쳐 갑작스러운 고열, 간헐적 오한, 두통, 구역질, 구토, 극심한 관절통, 점상출혈 발진 및 구진발진 등의 증세를 보이며, 39~40℃에 이르는 고열이 수일 동안 지속되는 것으로 보고되어 있다. 특히, 관절통의 경우 감염자의 30~40%가 수년간 지속되는 만성질환으로 나타날 수 있을 뿐만 아니라, 신생아의 경우 뇌수막염으로까지 이어질 수 있는 질병으로 알려져 있다.

[0006] 치쿤군야 바이러스 감염이 1952년 최초로 보고된 이후부터 2000년대의 대유행을 거치면서 다양한 CHIKV의 변이주들이 임상환자에서 분리되었는데, 유전체 서열을 기준으로 작성한 계통학적 분류(phylogenetic tree)에 따르면 치쿤군야 바이러스는 인도양(Indian ocean) 변이주, ESCA(East/Central/South Africa) 변이주, 아시아(Asian) 변이주, 서아프리카 계통(West Africa lineage) 변이주로 총 4 종류의 변이주가 존재하는 것으로 알려져 있다. 최근의 대유행에서 나타난 인도양(Indian ocean) 변이주는 이전의 서아프리카 계통과 비교할 때 E1 단백질 아미노산의 치환으로 인해 흰줄숲모기(Aedes albopictus)에 대한 감염력이 증가하는 한편, 아시아 변이주는 흰줄 숲모기 감염에 저항성을 나타내도록 변이된 것으로 밝혀졌다.

[0007] 이러한 치쿤군야 바이러스 유행을 예방하기 위한 대비가 필요하다. 특히, 다양한 변이주에 대한 표준항원의 개발은 치쿤군야 바이러스의 예방, 진단 또는 치료에 매우 효과적일 것이다. 또한, 검출, 치료 등을 위해 대량생산이 가능한 시스템을 구축할 수 있다면, 치쿤군야 바이러스의 유행에 효과적으로 대비할 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기한 치쿤군야 바이러스 감염에 의한 문제를 신속히 해결하고, 의료 산업분야에서 효과적인 대비책을 마련하기 위한 목적으로, 본 발명은 다양한 변이주에 대한 항원 및 이에 의한 항원을 제공한다. 본 발명의 발명자는 본 발명의 신규 에피토프가 치쿤군야 바이러스에 대한 중화항체를 유도할 수 있고, 항체에 의하여 주요하게 인식되는 항원 부위임을 밝혔고, 당 수식 부위를 포함하지 않아 대장균 시스템을 이용에 유리하고 수용성을 가져 대량생산 시스템에 적합함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명은 신규 에피토프 및 이를 이용한 다양한 치쿤군야 바이러스 변이주에 대한 예방 및/또는 치료 효과를 갖는 중화항체의 제공, 또는 신규 에피토프를 포함하는 재조합 단백질 또는 이의 항체를 이용한 백신, 진단키트, 감염 진단 등을 위한 용도를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 상기한 목적을 달성하기 위하여, 치쿤군야 바이러스의 신규한 에피토프를 제공한다.
- [0011] 이와 관련하여, 본 발명은 치쿤군야 바이러스에 대한 중화항체 유도능을 갖는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 상기 재조합 발현벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 배양하는 것을 포함하는, 재조합 단백질 생산방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 치쿤군야 바이러스 특이적 항체를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프를 포함하는 치쿤군야 재조합 단백질을 인간을 제외한 동물에 주입하는 것을 포함하는, 치쿤군야 바이러스 특이적 항체를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프를 포함하는 재조합 단백질 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 치쿤군야 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프를 포함하는 재조합 단백질 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 치쿤군야 바이러스 검출용 키트를 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체와 시료를 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 치쿤군야 바이러스를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 치쿤군야 바이러스 감염 치료용 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명은 또한 제1항의 폴리펩티드를 포함하는 치쿤군야 바이러스에 대한 백신 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 치쿤군야 바이러스에 대한 신규한 에피토프는 다양한 치쿤군야 바이러스 변이주의 대하여 표준항원으로 이용될 수 있어, 다양한 변이주의 바이러스감염 여부 진단, 예방 또는 치료 효과를 제공할 수 있고, 수용성 특성을 가지며, 대장균 시스템에서 재조합 단백질 생산에 적합하므로, 본 발명의 에피토프를 포함하는 재조합

단백질을 이용한 백신 및 항체의 제조가 용이하다. 따라서, 치쿤군야 바이러스 검출 키트, 백신 및 항체 등과 같은 치쿤군야 바이러스의 예방 및 치료를 위한 산업분야에서 매우 효과적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1은 치쿤군야 바이러스의 변이주에 대한 유전적 관계도를 보여준다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 알파바이러스에 대한 범용 중화항체(CHK-48, CHK-88, CHK-124, CHK-265, CHK-65, CHK-98, CHK-187)들의 항원 인지부위를 맵핑한 결과를 나타낸다: 치쿤군야 바이러스(CHKV-LR2006-CPY1), O'nyong'nyong 바이러스(ONNV-IBH10964), Semliki Forest 바이러스(SFV-L10), Mayaro 바이러스(MAYV-MAYLC) 및 Ross river 바이러스(RRV-T48).

도 3a 및 3b는 치쿤군야 바이러스-단일 클론항체 복합체의 구조를 토대로 항원-항체 인터페이스의 표면 잔기 보존성을 구조생물학을 기반으로 분석한 결과이다.

도 4a, 4b 및 4c는 본 발명의 일 실시예에 따라 E2B-6xHis의 발현 테스트 결과를 나타내는 사진이다: 4a는 전기영동 SDS 젤 사진; 4b는 anti-6xHis 항체를 이용한 웨스턴블롯 결과; 4c는 E2B-6xHis_OVA의 발현테스트 결과, 도면에서 T는 전체(total) 레인, S는 상층액(supernatant) 레인, P는 펠렛(pellet) 레인을 의미한다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 설계한 E2 단백질 전체를 포함하는 항원 E2L-OVA와 E2Y-OVA의 구조단백질에서 위치 및 단백질의 특성을 보여준다.

도 6a 및 6b는 본 발명의 일 실시예에 따라 E2L-OVA와 E2Y-OVA 단백질의 E.coli 시스템을 이용한 발현을 확인한 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 결과로, 6a는 E2L-OVA의 대장균 시스템에서 발현을 확인한 것이고, 도 6은 E2Y-OVA의 대장균 시스템에서 발현을 확인한 결과이다. 도면에서 T는 전체(total) 레인, S는 상층액(supernatant) 레인, P는 펠렛(pellet) 레인을 의미한다.

도 7a, 7b 및 7c는 본 발명의 일 실시예에 따라 E2B 단백질의 정제 과정 및 결과를 나타내는 것으로, 7a는 친화도 크로마토그래피; 7b는 젤 여과 크로마토그래피(Gel filtration chromatography) 그리고 7c는 SCS-PAGE를 통해 확인한 최종 순도를 나타낸다.

도 8a 및 8b는 본 발명의 일 실시예에 따라 E2B-OVA의 정제 과정을 보여주는 것으로, 8a는 친화도 크로마토그래피; 8b는 젤 여과 크로마토그래피 결과를 나타낸다.

도 9a 및 9b는 본 발명의 일 실시예에 따라 E2L-OVA의 정제 과정을 보여주는 것으로, 9a는 친화도 크로마토그래피; 9b는 젤 여과 크로마토그래피 결과를 나타낸다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 E2Y-OVA의 정제 과정을 보여주는 친화도 크로마토그래피 결과를 나타낸다.

도 11a, 11b, 11c 및 11d는 본 발명의 일 실시예에 따른 E2B-6xHis-OVA, E2B-6xHis, E2Y-6xHis-OVA, E2L-6xHis-OVA 제조합 단백질의 대장균 시스템을 이용한 생산 결과를 나타낸다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 8종의 치쿤군야 바이러스 La reunion_05-115, India_KR51, DakArB16878, UgAg4155, SV0444, 070GaTv, ibH35 및 37997의 구조단백질의 다중서열배치(multiple sequence alignment) 결과를 나타낸다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 생산된 치쿤군야 바이러스의 E2 구조단백질의 아미노산 서열과 실제 발현되는 E2B-6xHis 서열을 나타낸 것이고, B 도메인 부분은 빨간색으로 나타내었다.

도 14는 본 발명의 E2B 표준 항원에 대한 항체 제작을 위한 접종 일정을 나타낸 것이다.

도 15a 및 15b는 본 발명의 일 실시예에 따른 플라크감소 중화항체가 측정법의 유효성을 검증하기 위해 치쿤군야 바이러스 중화항체(chk-265, Absolute Antibody Ltd. Oxford, UK)를 이용한 중화항체를 확인한 결과이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 E2B 표준 항원을 접종한 마우스의 혈장을 이용해서 본 발명의 일 실시예에서 마우스에 유도된 E2B에 대한 항체의 중화능을 확인한 결과이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따라 E2B, E2B-OVA, E2L-OVA, E2Y-OVA 4종의 치쿤군야 바이러스 항원을 주입한 마우스의 혈장 샘플을 이용한 항원-항체 반응성을 확인한 결과를 나타낸다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따라 E2B, E2B-OVA, E2L-OVA, E2Y-OVA 4종의 치쿤군야 바이러스 항원에 대한

항체의 반응성을 확인한 결과이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 따라 따라 E2B, E2B-OVA, E2L-OVA, E2Y-OVA 4 종의 치쿤군야 바이러스 항원을 주입한 마우스의 혈장 샘플에 포함된 항체에 대한 E2B 항원의 인지 가부를 ELISA로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명의 발명자들은 치쿤군야 바이러스의 다양한 변이주에 적용 가능한 표준항원 및 이에 대한 항체의 제작을 위하여 노력한 결과, 중화능을 유발할 수 있는 최소 범위의 항원 부위로 E2 단백질의 B 도메인을 특정하고, 치쿤군야 바이러스의 진단 및 치료에 매우 중요한 역할을 하는 에피토프임을 포함하는 재조합 단백질을 대량 생산할 수 있는 기술을 확보하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0026] 본 발명은 신규하게 규명된 에피토프를 이용하여 다양한 변종에 대해서 동시에 검출, 예방 및 치료효과를 갖는 표준항원으로서 재조합단백질 및 이에 대한 항체, 상기 항체 또는 재조합 단백질을 포함하는 바이러스 검출용 조성물 또는 키트, 그리고 이를 이용한 바이러스 검출방법 또는 항체 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 재조합 단백질 생산을 위한 표준항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 재조합 벡터, 이를 포함하는 형질전환체 그리고, 상기 형질전환체를 이용한 치쿤군야 항원 재조합 단백질 생산방법을 제공할 수 있다.
- [0029] 이하에서, 본 발명의 에 대하여 상세히 설명한다.
- [0030] 다만, 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는바, 이하에서 기술하는 특정 실시예 및 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0032] 본 발명은 치쿤군야 바이러스의 신규한 에피토프에 관한 것이다.
- [0033] 치쿤군야 바이러스(Chikungunya virus, CHIKV)는 양성단일가닥 RNA(+ssRNA)를 게놈(genome)으로 갖는 토가바이러스과(Togaviridae)로 분류되는 알파바이러스(Alphavirus)이며 모기를 매개로 하는 아보바이러스(arbovirus)에 속한다. 바이러스 입자의 크기는 지름 60-70 nm 정도의 크기로 외피보유(enveloped) 바이러스이며, 바이러스 게놈은 11.6 kb 뉴클레오타이드의 양성단일가닥RNA(+ssRNA) 형태로 5'말단 캡(5'-cap)과 3'말단 폴리(A)꼬리(3'-poly(A)tail)의 구조를 가지며 4개의 비구조단백질(nsP1-nsP4)과 4개의 구조단백질(캡시드와 3종의 외피단백질)을 암호화하여 2종의 폴리단백질(polyprotein)을 생산하는 특성을 갖는다. 치쿤군야 바이러스의 구조단백질은 캡시드(C)와 외피단백질인 E1, E2, E3을 포함하고, E1과 E2의 이질이합체(heterodimer)가 숙주세포 부착에 있어 핵심적인 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, E2 단백질은 숙주세포의 수용체와 결합하여 바이러스의 내포작용을 유도하며, E1 단백질은 낮은 pH 조건에서 숙주세포와의 융합(fusion)에 관여한다(J Viol 2013 7:3774).
- [0034] 치쿤군야 바이러스는 1248개의 아미노산으로 구성된 구조 단백질을 가지고 있는데, 이 단일 구조단백질에서 절단되어 캡시드(C)와 외피 단백질인 E1, E2, E3를 형성하며, E1-E2 이형이합체(heterodimer)는 바이러스의 외피 바깥 부위에 노출되어 숙주세포 부착에 관여하고, 캡시드는 E1-E2 이형이합체의 짧은 외피 안쪽 도메인과 상호작용하며 바이러스 게놈을 안정적으로 바이러스 입자에 패키징시키는 역할을 한다. 이러한 치쿤군야 바이러스의 구조 단백질에서 E2 단백질이 항원 부위로 예상되었으나, 구체적으로 중화항체 유도능을 갖는 에피토프에 대해서는 아직까지 밝혀진 바 없다. 특히 치쿤군야 바이러스는 4종의 변이종에 대해서 복수 개의 종이 포함되어 있어, 치쿤군야 바이러스에 대해 특이적이면서도, 각 변이종에 범용적으로 사용될 수 있는 표준항원은 아직 개발되지 못하였다. 더욱이 E2 단백질은 다양한 당 수식 부위를 포함하고 있기 때문에, 대장균 시스템을 통해서 항원성 또는 항체 유도능이 유지되는 재조합 단백질을 생산하는데 어려움이 있었다.
- [0035] 이러한 측면에서 본 발명에서 새롭게 밝힌 서열번호 1의 치쿤군야 바이러스의 신규한 에피토프는 바이러스가 인지할 수 있는 최소한의 중화항체 항원부위를 밝혔다는 점에서 특징이 있다. 특히, 서열번호 1의 항원 부위에는 당수식이 일어나지 않아, 대장균 시스템을 통한 재조합 단백질 대량 생산이 가능하며, 가용성(soluble) 단백질을 생산할 수 있다는 점에서 재조합 단백질, 항체, 키트 및 백신 등의 생산 측면에서 우수한 효과를 가지며, 특

히, 감염질환에 대한 의료산업 분야의 신속한 대응을 위한 대량생산에 매우 유리하다.

- [0036] 또한, 본 발명의 일 실시예에서, 다양한 부위의 항원 단백질을 이용해서 유도된 항체를 이용해서 본 발명의 E2B 항원 단백질과의 항원-항체 반응성을 확인한 결과, 다양한 항원에 대한 항체가 매우 우수한 효율로 본 발명의 E2B 단백질을 인지하여 검출할 수 있음을 보였다. 이는, 본 발명의 E2B 항원 단백질은 치쿤군야 바이러스 항체의 매우 중요한 인식부위이면서, 잘 인식할 수 있는 부위로서, 치쿤군야 바이러스의 감염 진단 등에서 높은 검출 효율을 갖는다는 것을 의미한다.
- [0037] 이러한 측면에서 본 발명은 치쿤군야 바이러스에 대한 중화항체 유도능을 갖는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드 에 관한 것이다. 상기 폴리펩티드는 재조합 단백질일 수 있다.
- [0038] 상기 재조합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열의 일 말단에 히스티딘 표지(Histidine tag)를 더 포함할 수 있다. 이 경우, 재조합 단백질 생산에 있어, 단백질의 분리/정제가 용이한 장점이 있다. 바람직하게는 상기 히스티딘 표지를 2개 이상, 포함할 수 있다. 상기 히스티딘 표지는 본 발명의 항원 단백질을 발현하는 벡터시스템 제작 시 항원단백질 코딩하는 유전자 서열의 일 말단에 서열번호 15의 히스티딘 코딩하는 서열을 반복적으로 포함시켜, 항원단백질에 히스티딘 표지가 포함되는 형태로 발현될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 재조합 단백질을 이용하면 치쿤군야 바이러스에서 변이주에 범용적으로 적용될 수 있는 항체를 제조할 수 있고, 특히, 중화능을 갖는 항체를 유도할 수 있다는 점에서 치쿤군야 바이러스의 치료 및 예방 측면에서 매우 매우 의미있다.
- [0040] 이러한 측면에서 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프 또는 상기 에피토프를 포함하는 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터; 그리고 상기 재조합 발현벡터를 포함하는 형질전환체에 관한 것이다.
- [0041] 단, 본 발명에서 상기 "폴리뉴클레오티드"란, 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬 모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 본 발명에 따른 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 본 발명의 상세한 설명 전체에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 유전자와 상호교환적으로 사용된다.
- [0042] 본 발명에 따른 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy), 또는 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 재조합 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 상기 변형 유전자 역시 본 발명의 보호범위 내에 포함된다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 본 발명에 따른 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 바람직하게는 상기 발현 벡터는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 유전자 절편을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명에 있어서 상기 "발현 벡터"란, 숙주세포에 DNA를 도입하여 본 발명의 재조합 단백질을 미생물에서 발현시키기 위한 수단으로서, 상기 발현 벡터의 제작 시에는 상기 재조합 단백질을 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터 (promoter), 종결자 (terminator), 인핸서 (enhancer) 등과 같은 발현 조절 서열 및 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 발현 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 및 바이러스 벡터 등을 포함할 수 있다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 발현 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.
- [0046] 상기 발현 벡터는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 이는 예를 들어, 발현벡터는 엠피실린 저항 유전자, 테트라사이클린 저항 유전자, 가나마이신 저항 유전자, 클로람페니콜 저항 유전자 등 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 재조합 발현 벡터는 당업계에서 통상적으로 이용되는 벡터를 이용할 수 있는데, 예를 들어 pGEM-T, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19 또는 pET를 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 바람직한 발현벡터는 pET, 특히 pET21a 일 수 있다.

- [0048] 본 발명의 상기 형질전환체는 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 이용할 수 있는 숙주세포를 모두 포함할 수 있고, 예를 들어 대장균(*E. coli*), 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주를 이용할 수 있다. 상기 대장균은 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, *E. coli* Rosetta 또는 *E. coli* BL21 일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 바람직한 실시예에서는 대장균에 발현 벡터를 삽입하여, 유전자를 발현시켜 본 발명의 재조합 단백질을 생산하였다. 특히, 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리펩티드는 당 수식 부위를 포함하지 않기 때문에 대장균 시스템을 통해서 매우 효과적으로 생산될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 대장균 시스템으로 생산된 재조합 단백질을 투여한 마우스 혈장에 포함된 항체가 중화능을 가짐을 실험적으로 확인했다.
- [0050] 본 발명에서 발현은 당업계에 공지된 통상의 분자생물학 방법을 이용하여 실시할 수 있다.
- [0052] 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 배양하는 것을 포함하는, 재조합 단백질 생산방법에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명의 실시예에서, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 치쿤군야 바이러스의 신규 에피토프를 코딩하는 유전자를 증폭하기 위하여 상기 유전자의 5'-말단과 3'-말단에 대응하는 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)용 프라이머를 고안하여 합성하였다. 유전자의 5'-말단에 대응하는 프라이머와 3'-말단에 대응하는 프라이머에는 대장균 발현 벡터로 클로닝이 용이하도록 제한 효소 인지 부위가 존재하도록 설계하였다. E2 단백질의 유전자를 주형으로 하고, 상기와 같이 제조된 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 수행하여 B 도메인 유전자를 증폭하였다.
- [0054] 당업계에서 통상적으로 이용되는 벡터, 예컨대 pET에 PCR로 증폭한 유전자를 삽입하고, 삽입 후 적합한 숙주 세포, 대장균에 형질전환시키고, 형질전환된 세포를 배양하여 본 발명의 E2B 단백질을 대량으로 발현시켰다. 단백질의 생성여부는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 웨스턴 블롯팅 방법 등과 같은 통상적인 방법으로 확인하였다.
- [0055] 일 실시예에서, 본 발명의 서열번호 2의 에피토프의 일 말단에 6개의 히스티딘 표지가 결합된 단백질을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 대장균을 엠프실린, 테트라사이클린, 카나마이신, 클로람페니콜 등 선별마커에 대응하는 항생제가 함유된 배지에서 진탕 배양하여 일정한 세포농도에 다다랐을 때, IPTG(isopropyl-β-D-galactopyranoside)를 첨가하여 E2B도메인 발현을 유도하였다. 상기 배양액을 원심분리하여 대장균 세포를 침전시킨 후, 대장균을 적당한 완충 용액에 현탁한 후 파쇄한다. 그 후 친화도 크로마토그래피와 사이즈 배제 크로마토그래피 과정을 통해 에피토프 단백질을 정제하여 순도를 높인 후 농축하여 원하는 농도의 항원을 생산하였다.
- [0057] 본 발명은 또한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 치쿤군야 바이러스의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체와 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리펩티드를 포함하는 재조합 단백질을 인간을 제외한 동물에 주입하는 것을 포함하는 치쿤군야 바이러스 특이적 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리펩티드는 당 수식 부위를 포함하지 않아 대장균 시스템을 이용한 대량생산에 매우 유리하며, 이를 통해서 항체의 대량생산도 가능하게 한다는 점에서 우수한 효과를 갖는다.
- [0058] 본 발명에서 항체는 특정 항원에 대하여 특이적으로 반응하는 단백질 분자를 의미하는 것으로, 특정 항원(하나의 항원 결정기)에 대해서 특이적으로 반응하는 단일클론항체 및 다중클론 항체를 모두 포함하는 의미이다. 또한, 본 발명의 항체는 바이러스의 감염능에는 전혀 변화를 주지 않는 비중화 항체와, 바이러스의 감염능을 억제, 즉 증식을 억제할 수 있는 중화항체를 모두 포함한다.
- [0059] 상기 서열번호 1의 에피토프에 의하여 유도된 항체는 바람직하게는 중화항체(neutralizing antibody) 일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 서열번호 2의 아미노산 일 말단에 6개의 히스티딘 표지가 결합된 E2B 재조합 단백질을 마우스에 접종하여, 마우스 혈액으로부터 치쿤군야 바이러스에 대한 항체가 잘 생성되었음을 확인하였다. 또한, 상기 항체의 중화능을 시험한 결과, 효과적으로 치쿤군야 바이러스의 감염가를 낮추는 중화능을 갖는 것을 확인하였다.
- [0060] 따라서, 본 발명의 서열번호 1 또는 2의 폴리펩티드는 치쿤군야 바이러스 감염에 대하여 예방 또는 치료 효과를

함께 제공할 수 있다는 점에서 의의를 갖는다.

- [0062] 이러한 측면에서, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 치쿤군야 바이러스 감염 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리펩티드는 당 수식 부위를 포함하지 않아 대장균 시스템을 이용한 대량생산에 매우 유리하며, 이를 통해서 항체의 대량생산도 가능하게 한다는 점에서 우수한 효과를 갖는다.
- [0063] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드를 포함하는 치쿤군야 바이러스에 대한 백신 조성물을 제공한다. 상기 백신 조성물은 치쿤군야 바이러스 감염 예방용 조성물로 표현될 수 있다. 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리펩티드는 당 수식 부위를 포함하지 않아 대장균 시스템을 이용한 대량생산에 매우 유리하며, 이를 통해서 백신의 대량생산도 가능하게 한다는 점에서 우수한 효과를 갖는다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에서, 서열번호 2의 아미노산 일 말단에 6개의 히스티딘 표지가 결합된 E2B 재조합 단백질을 마우스에 접종하여, 마우스 혈액으로부터 치쿤군야 바이러스에 대한 항체가 잘 생성되었음을 확인하였다. 또한, 상기 항체의 중화능을 시험한 결과, 효과적으로 치쿤군야 바이러스의 감염가를 낮추는 중화능을 갖는 것을 확인하였다.
- [0065] 따라서, 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리펩티드에 대한 항체를 이용해서 치쿤군야 바이러스 감염의 치료가 가능하며, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리펩티드를 이용해서 치쿤군야 바이러스에 대한 항체 생산의 유도가 가능하므로, 치쿤군야 바이러스 감염을 예방하기 위한 백신의 제조가 가능하다.
- [0066] 상기 치료용 조성물의 경우 약학적으로 허용되는 담체 외에, 약제학적으로 허용되는 부형제, 첨가제 등을 모두 포함할 수 있다.
- [0067] 상기 백신 조성물의 경우 백신에 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 이용되는 야주반트, 부형제 및 기타 약학적으로 허용되는 담체 또는 첨가제를 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리펩티드의 효과에 영향을 주지 않는 범위에서 제한없이 포함할 수 있다.
- [0068] 또한, 상기 치료용 조성물 또는 백신 조성물의 유효성분의 농도, 투여량, 제제의 형태 등을 결정하기 위해, 본 발명의 기술분야에서 바이러스 감염 치료 제제, 항체를 포함하는 약학적 제제 또는 백신 제제의 제조 및 사용시 적용될 수 있는 통상적인 구성 및 기술을 상기 치료용 조성물 또는 백신 조성물에 적용할 수 있다.
- [0070] 본 발명은 또한 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 치쿤군야 바이러스 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0071] 본 발명은 또한 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 치쿤군야 바이러스 검출용 키트를 제공하는 것이다.
- [0072] 본 발명에서 용어 "키트"란, 특정한 목적을 위해 필요한 조성물 및 부속품을 모아놓은 세트를 의미한다. 구체적으로 상기 키트에는 본 발명에 따른 치쿤군야 바이러스 검출용 조성물 뿐 아니라, 상기 항원-항체 복합체 형성 수준을 측정하는 분석에 사용되는 본 발명의 해당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [0073] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0074] 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0075] 본 발명에서 제공하는 키트를 이용하는 경우, 예를 들어, 개체로부터 얻은 시료와 본 발명의 서열번호 1 또는 2의 서열을 포함하는 재조합 단백질을 접촉하여, 시료 내의 항체와 본 발명의 재조합 단백질의 항원-항체 복합체 형성 수준을 비교하여, 개체의 치쿤군야 바이러스 감염 여부를 진단할 수 있다. 또는, 이와 반대로, 본 발명의

개체로부터 얻은 시료와 본 발명의 서열번호 1 또는 2의 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체를 접촉하여, 시료 내 치쿤군야 바이러스와 본 발명의 항체의 항원-항체 복합체 형성 수준을 비교하여, 개체의 치쿤군야 바이러스 감염 여부를 진단할 수 있다.

- [0076] 본 발명에서 "개체"란, 치쿤군야 바이러스 감염의 여부가 확실하지 않거나 감염 여부가 의심되는 개체를 의미한다.
- [0077] 또한 본 발명에서 "시료"란 개체의 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 체액 또는 객담을 포함하는 물질을 의미한다. 상기 시료는 바람직하게는 치쿤군야 바이러스 감염여부의 확인이 필요한 개체로부터 분리한 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 체액 또는 객담일 수 있다. 일 예로, 혈액, 혈청 또는 혈장은 IgG 또는 IgM 항체를 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 또한, 본 발명의 상기 키트는 단백질 칩 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트 또는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0079] 본 발명에 있어서, 상기 "단백질 칩 키트"란, 특정 단백질과 반응할 수 있는 항체 등을 단일 칩 상에 고정시켜 고정시킨 키트를 의미하며, 일 예로, 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 고정된 것 일 수 있다.
- [0080] 본 발명에 따른 상기 항원-항체 복합체 형성 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 완충용액, 발색효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기재로는 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소로는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있다. 또한, 형광물질로는 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질로는 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)), OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다. 또한, 상기 단백질의 항원-항체 복합체 형성 수준 측정은 본 발명의 기술분야에서 항체의 결합물을 계수하는 방법이 사용될 수 있다.
- [0081] 본 발명에 있어서, 상기 "ELISA 키트"란, 효소를 표식자로 하여 항원-항체 반응을 이용한 항원 또는 항체량 측정 방법을 일반적으로 효소면역분석법을 총칭하며, 본 발명의 목적상 상기 ELISA 키트는 본 발명에 따른 재조합 단백질을 포함한다. 또한, 상기 ELISA 키트는 상기 재조합 단백질에 결합된 목적하는 개체 내의 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 항체와 결합(link)되어 있는 효소 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0083] 본 발명은 또한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 시료와 접촉시키는 것을 포함하는, 시료에서 치쿤군야 바이러스를 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0084] 또한, 본 발명은 상기 검출 결과를 가지고 치쿤군야 바이러스 감염 여부에 대한 정보를 제공할 수 있다는 점에서, 본 발명은 치쿤군야 바이러스에 대한 감염 여부에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0085] 상기 치쿤군야 바이러스 검출 방법 또는 감염에 대한 정보 제공 방법은 개체로부터 얻은 시료와 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 에피토프를 포함하는 재조합 단백질; 또는 이에 특이적으로 결합하는 항체를 접촉시키는 것 이후에, 상기 시료에서 항원-항체 복합체 형성 수준을 측정하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [0086] 또한, 본 발명의 바이러스 검출방법 또는 감염에 대한 정보를 제공하는 방법은 정상 대조군의 시료에서의 항원-항체 복합체 형성수준과 상기에서 측정된 복합체 형성 수준을 비교하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [0087] 상기 복합체 형성 수준의 차이를 판단하여, 치쿤군야 바이러스 감염 여부를 예측할 수 있다. 바람직하게는, 상기 항원-항체 복합체 형성 수준이 치쿤군야 바이러스가 감염되지 않은 정상 대조군의 시료보다 높은 경우에 목적하는 개체가 치쿤군야 바이러스에 감염되었을 것으로 진단할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0088] 본 발명에서 상기 "항원-항체 복합체"란, 본 발명에 따른 항체와 개체로부터 얻어진 시료 내에 존재하는 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성 수준은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 세기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.
- [0089] 본 발명에서 상기 "항원-항체 복합체 형성 수준 측정"이란, 치쿤군야 바이러스를 검출 또는 감염 여부를 진단하

기 위하여, 본 발명에 다른 항체와 결합하는 시료 내 존재하는 항원 단백질의 존재 또는 존재하는 양을 확인하는 것을 의미한다.

[0090] 상기 항원-항체 복합체 형성 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩 (protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 본 발명에서 "검출 라벨"은 예를 들어, 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 검출 라벨로서 이용 가능한 효소에는 β -D-글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 형광물로서 이용 가능한 것에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0092] 또한, 상기 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있고, 이에 제한되지 않는다.

[0093] 또한, 상기 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0094] 또한, 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 또한, 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[Mo(CN)_8]^{4-}$ 등이 포함되며, 이에 제한되지 않는다.

[0095] 또한, 상기 방사선 동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0097] 이하, 본 발명을 제조예 및 실험예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0099] 실험예 1. 치쿤군야 바이러스에서 새로운 에피토프의 개발

[0100] 1.1. 치쿤군야 바이러스의 타겟 및 항원 선정

[0101] 중화항체 제작을 위해 Indian Ocean 변이종 중 La reunion_05-115(Indian Ocean strain, 도 1)를 선정하여 항원 선발에 사용하였다. 또한, X-선 결정학과 Cryo-EM 기법으로 규명된 총 9 종의 La reunion 변이주의 당단백질 구조를 표준 항원 선정을 위해 이용하였다.

[0102] 치쿤군야 바이러스는 1248개의 아미노산으로 구성된 구조 단백질을 가지고 있는데, 이 구조 단백질이 잘려나가 캡시드와 당단백질인 E1, E2 및 E3를 형성하는데, E1, E2가 바이러스의 표면을 구성하므로, E1과 E2를 항원 후보 단백질로 선정하였다. 또한, 종래의 중화항체들의 항원인지 부위 맵핑(mapping)한 결과, 마우스 유래 중화항체와 인간 유래 중화항체의 중화효능이 특정 잔기의 치환에 민감하게 나타남을 확인하였고, 이는 중화항체의 항원인지를 제시하는 것으로 해석할 수 있다. 도 2에 나타난 바와 같이, 항원 인지부위는 구조연구결과와 일치하게 주로 E2의 B도메인 메인 부위에 있음을 알 수 있었다.

[0103] 따라서, 상기한 분석 결과를 종합하여, 본 발명에서는 La reunion_05-115(Indian Ocean strain) 변이주에 대해 강력한 중화항체 에피토프를 가지고 있고 보존성이 높은 잔기 서열을 가지고 있는 E1, E2, E2_B를 후보 항원 부위로 선정하였다. 제조항 항원 정제의 용이성과 원활한 항체 형성을 위해 6xHis tag 등을 첨가하였고, 항원의 올바른 접힘을 위해 6xHis tag의 위치를 N말단, C말단에 첨가하는 2가지 방식을 이용하였다(표 1, 위치는 전체 구조단백질(NCBI accession number: CAJ90470)에 대한 아미노산의 위치로 기재).

표 1

항원	구조단백질 내 위치	분자량	등전점	불안정성
6xHis-E1	810aa-1190aa	41349.96	6.05	36.32
6xHis-E2	326aa-667aa	38485.6	7.13	37.48
6xHis-E2_B	498aa-556aa	6327.03	8.18	12.19
E1-6xHis	810aa-1190aa	41349.96	6.05	36.32
E2-6xHis	326aa-667aa	38485.6	7.13	37.48
E2_B-6xHis	498aa-556aa	6327.03	8.18	12.19

실험예 2. 항원 유전자의 증폭

E2B, E2L 및 E2Y 단백질을 코딩하는 유전자를 표 2의 프라이머들을 사용하여 PCR(증합효소 연쇄반응)로 증폭하였다. E2B 항원에 대한 정방향 프라이머(서열번호 5)는 BamHI 제한효소 인지부위(음영부분, ggatcc)에 해당하는 염기서열을 포함하고, 역방향 프라이머(서열번호 6)는 제한효소 HindIII 인지부위(음영부분, aagctt)에 해당하는 염기서열을 포함하도록 설계하였다. E2Y 항원에 대한 정방향 프라이머(서열번호 7)는 BamHI 제한효소 인지부위(음영부분, ggatcc)에 해당하는 염기서열을 포함하고, 역방향 프라이머(서열번호 8)는 제한효소 HindIII 인지부위(음영부분, aagctt)에 해당하는 염기서열을 포함하도록 설계하였다. 또한, E2L 항원에 대한 정방향 프라이머(서열번호 9)는 BamHI 제한효소 인지부위(음영부분, ggatcc)에 해당하는 염기서열을 포함하고, 역방향 프라이머(서열번호 10)는 제한효소 HindIII 인지부위(음영부분, aagctt)에 해당하는 염기서열을 포함하도록 설계하였다.

표 2

서열번호	방향성	서열	길이	비고
5	정방향	5'-cgggatccCCAGACACCCCTGATCGCA-3'	27 mer	E2B
6	역방향	5'-cccaagcttATTGGTGACCGCGGCAT-3'	26 mer	E2B
7	정방향	5'-cgGGATCC CCATACTAGCTCACTGTCCCG-3'	30 mer	E2Y
8	역방향	5'-CCAAGCTT ATGAGCTGTACCCCACTATGACT-3'	31 mer	E2Y
9	정방향	5'-cgGGATCC AGCACCAAGGACAATTCATGT-3'	31mer	E2L
10	역방향	5'-CCAAGCTT ATGAGCTGTACCCCACTATGACT-3'	35mer	E2L

PCR 반응액은 cDNA(200 ng/ul) 1 μ l, 10 mM dNTP 10 μ l(최종농도: 0.4 mM), 10pM 프라이머 1 μ l(최종농도: 0.2 uM), KOD FX Neo DNA 증합효소 1 μ l(1.0 U/ μ l), 25 $^{\circ}$ C PCR 완충용액에 11 μ l의 증류수를 넣어 제조하였다. 상기 반응액을 95 $^{\circ}$ C에서 10분; 94 $^{\circ}$ C에서 1분 30초; 59 $^{\circ}$ C에서 1분; 72 $^{\circ}$ C에서 30초의 반응을 28회 반복하였다. 반응용액을 1% 아가로스 겔에서 전기영동법으로 분리하여 약 300 염기쌍의 E2B 유전자를 용출하여 얻었다. E2L 유전자와 E2Y 유전자도 동일한 방법으로 용출하여 얻었다.

이 용출액 16 μ l에 10배의 제한효소 반응 완충용액 2 μ l와 제한효소 BamHI과 HindIII를 1 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 반응시켰다. 다음 이 반응용액을 1% 아가로스 겔에서 전기영동법으로 분리하여 원하는 DNA 절편(이하 E2B BamHI/HindIII; E2L BamHI/HindIII; 또는 E2Y BamHI/HindIII)을 추출한 후 50 μ l의 증류수 용액에 용존시켰다. E2Y 및 E2L에 대해서도 E2B와 동일한 방법으로 각 유전자를 얻고, 50 μ l의 증류수 용액에 용존시켜, 다음 실험에 사용하였다.

실험예 3. 항원 유전자를 포함하는 발현벡터 제조

E2B 단백질 발현벡터를 제조하기 위해서 플라스미드 pET21a(QuiaGen)를 제한효소 BamHI과 HindIII를 이용하여 완전히 절단하고 1% 아가로스 겔 상에서 분리하였다(이하 pET21a BamHI/HindIII). E2B BamHI/HindIII 6 μ l를 상기 플라스미드 벡터 pET21a BamHI/HindIII 3 μ l와 함께 반응튜브에 넣은 후 2 μ l의 10배 연결반응용액(500mM 트리스-염산, pH 7.8, 100mM 염화마그네슘, 100mM DTT, 10mM ATP), 10U의 T4 DNA 리가제를 넣고 총 부피가 20 μ l가 되도록 증류수를 가한 다음 상온에서 30분 동안 반응시켰다.

상기 반응용액을 대장균 DH5 α 컴피턴트 세포에 첨가하여 형질전환 시킨 다음 50 μ l/ml 농도의 LB-엠포실린 배지

에 평판하여 대장균 형질전환체를 선별하였다. 이들로부터 플라스미드를 추출하고 제한효소 및 염기서열 분석에 의해 각각 pET21a-E2B를 얻은 것을 확인하였다. 상기에서 얻은 재조합 플라스미드에 클로닝된 E2B 유전자의 염기서열 확인은 Sanger 등(Sanger, F., et al. (1977). PNAS U.S.A 74, 5463)에 개시된 방법에 따라 빅-다이 사이클 시퀀싱 시스템(Big-Dye Cycle Sequencing System, Applied Biosystems, U.S.A)을 이용하여 수행하였다.

[0116] 또한, E2B 부위 외의, E2 단백질의 다른 부위의 항원성을 무시할 수 없기 때문에, E2 단백질 전체를 포함하는 컨스트럭션을 대장균 시스템을 이용해서 발현하기 위해, E2L과 E2Y의 발현 벡터를 제조하였다. 구체적인 항원의 종류 및 특성은 표 3에 나타난 바와 같다(표 3, 위치는 전체 구조단백질(NCBI accession number: CAJ90470)에 대한 아미노산의 위치로 기재).

표 3

항원	AA 길이	위치	MW	pI	흡광계수	분취량 (aliquote)
E2B_6xHis	86	498-556aa	9227.30	8.46	1740, 1490(reduced)	20 mg/ml, 150 μ l
E2B_OVA_6xHis	119	498-556aa	12661.08	7.12	3230, 2980 (reduced)	10 mg/ml, 100 μ l
E2L_OVA_6xHis	427	326-691aa	47710.82	7.40	53580, 52830 (reduced)	8.7 mg/ml, 100 μ l
E2Y_OVA_6xHis	414	339-691aa	46185.13	6.99	52090, 51340 (reduced)	13.7 mg/ml, 100 μ l

[0118] OVA 단백질의 일부분을 포함하게 디자인된 플라스미드 pET21a-OVA를 제한효소 BamHI과 HindIII를 이용하여 완전히 절단하고 1% 아가로스 젤 상에서 분리하였다(이하 pET21a-OVA BamHI/HindIII). E2Y, E2L을 BamHI/HindIII 6 μ l를 상기 플라스미드 벡터 pET21a-OVA BamHI/HindIII 3 μ l와 함께 반응튜브에 넣은 후 2 μ l의 10배 연결반응용액(500mM 트리스-염산, pH 7.8, 100mM 염화마그네슘, 100mM DTT, 10mM ATP), 10U의 T4 DNA 리가제를 넣고 총 부피가 20 μ l가 되도록 증류수를 가한 다음 상온에서 30분 동안 반응시켰다.

[0119] 상기 반응용액을 대장균 DH5 α 컴피턴트 세포에 첨가하여 형질전환 시킨 다음 50 μ l/ml 농도의 LB-엠포실린 배지에 평판하여 대장균 형질전환체를 선별하였다. 이들로부터 플라스미드를 추출하고 제한효소 및 염기서열 분석에 의해 각각 pET21a-E2Y-OVA, pET21a-E2L-OVA를 얻은 것을 확인하였다. 상기에서 얻은 재조합 플라스미드에 클로닝된 E2L, E2Y 유전자의 염기서열 확인은 Sanger 등(Sanger, F., et al. (1977). PNAS U.S.A 74, 5463)을 이용하여 확인하였다. E2B_OVA 발현벡터 pET21a-E2B-OVA도 상기한 방법에 따라 제조하였다.

[0121] 실험예 4. 항원단백질의 정제

[0122] 4-1. 대장균 배양(E2B 발현) 및 파쇄

[0123] 상기 실험예 3에서 얻은 발현 벡터 pET21a-E2B를 발현 숙주인 대장균 Rosetta(DE3)pLysS(Novagen Inc.)에 형질전환시켰다. 형질 전환된 대장균 균주를 100 μ g/ml의 엠포실린이 함유된 루리아 배지(LB, 1% 박토틱톤, 0.5% 효모 추출물, 1% 염화나트륨)에서 12시간 동안 진탕 배양한 후 이중 1ml을 100ml의 루리아 배지(100 μ g/ml의 카나마이신 함유)에 옮겨 37 $^{\circ}$ C에서 박테리아의 흡광도가 600nm에서 약 0.6 정도가 될 때 IPTG(isopropyl- β -D-galactopyranoside)를 최종농도가 1mM이 되게 첨가하였다.

[0124] IPTG 첨가한 후 18시간 후에 5000rpm에서 10분간 원심분리하여 각각 세포 침전물을 수거하였다. 수거한 세포 침전물을 20mM Tris pH 8.0, 100mM 염화나트륨, 5mM MgCl₂ 조성의 완충용액에 현탁시킨 다음, 얼음중탕에서 초음파 분쇄기(Sonic Dismembrator, Fisher, 미국)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 이 용액을 원심분리기로 13000rpm에서 1시간 원심 분리한 후 그 상층액을 분리하여, 펠릿을 얻었다. pET21a-E2B-OVA도 상기와 동일한 방법으로 대장균 Rosetta(DE3) pLysS(Novagen Inc.)에 형질 전환하여 배양하여, 상층액을 분리하여 펠릿을 얻었다.

[0125] 발현 벡터 pET21a-E2Y-OVA를 발현 숙주인 대장균 BL21, 그리고 발현 벡터 pET21a-E2L-OVA를 대장균 BL21에 각

각 형질 전환시킨 것을 제외하곤, 상기 E2B와 동일하게 대장균을 배양하여, 상층액을 분리하여 펠릿을 얻었다.

[0127] **4-2. 파쇄된 대장균에서 단백질의 정제**

[0128] 상기 실험예 3-1에서 얻은 펠릿을 20 mM Tris pH 8.0, 500mM NaCl, 6M Urea, 5mM B-ME 조성의 변성(denaturation) 용액으로 녹인 뒤, 20 mM Tris pH 8.0, 100 mM 염화나트륨 조성의 완충용액으로 미리 평형된 니켈-니트릴로트리아세틱 액시드(Ni-NTA)칼럼(파마시아, 미국)에 결합시킨 후 0-0.5M 이미다졸 농도구배를 이용하여 용출한 후 SDS-PAGE(12% SDS 겔)하여 E2B 단백질 부분만 모았다.

[0129] 그 결과를, 도 4a, 4b 및 4c에 나타내었다. 특히, 도 4c를 확인하면, 37℃에서 발현된 상층액 레인(supernatant lane: S)에서 E2B 단백질이 확인되었는바, E2B 단백질이 수용성을 가짐을 확인 할 수 있다.

[0131] 또한, E2L-OVA, E2Y-OVA 단백질의 경우, 실험예 3-1에서 얻은 펠릿을 20 mM Tris pH 8.0, 500mM NaCl, 6M Urea, 5mM B-ME 조성의 변성(denaturation) 용액으로 녹인 후, 20 mM Tris pH 8.0, 500mM NaCl, 8M Urea, 5mM B-ME 조성으로 미리 평형된 니켈-니트릴로트리아세틱 액시드(Ni-NTA)칼럼(파마시아, 미국)에 결합시킨 후 0-0.5M 이미다졸 농도구배를 이용하여 용출한 후 SDS-PAGE하여 E2L-OVA, E2Y-OVA 단백질 부분만 모았다.

[0132] 도 6a 및 도 6b에서 각 단백질의 발현을 확인하였으나, T 레인(total lane)에서 확인된 타겟 단백질의 양이 S 레인(상층액 레인)에서는 확인되지 않고, P 레인(펠릿 레인)에서만 확인되는 것을 통해, E2L 및 E2Y 단백질 모두 수용성이 떨어짐을 확인하였다.

[0133] 따라서, 상기에서 제조한 E2B, E2Y 및 E2L 발현 벡터 각각에 대해서 대장균 시스템에서 발현을 시도한 결과, E2Y 및 E2L 단백질은 당수식이 되는 부분을 포함하나, 대장균 발현 시스템의 경우 당수식이 불가능하고, E2Y 및 E2L 단백질의 낮은 수용성을 보여, E2Y 및 E2L 단백질은 중화항체 스크리닝 또는 진단 키트를 위한 대량생산을 위한 항원으로서 적합하지 에 적합하지 않다고 판단하였다. 그에 반해 도 4a, 4b 및 4c에 나타낸 바와 같이 수용성이 우수하고, 당수식 부위를 포함하지 않아, 대장균 발현 시스템에 의한 대량생산이 가능한 E2B 단백질이 항원으로 매우 적합하다고 판단하였다.

[0135] E2B, E2B-OVA, E2L-OVA, E2Y-OVA 단백질 각각을 2ml 가량 농축한 후, 20mM Tris pH 8.0, 100mM 염화나트륨 조성의 완충용액으로 평형된 젤 필터레이션 칼럼(Superdex 75)에 주입시킨 후 단백질의 분자량에 의해 분리하여 SDS-PAGE로 확인하고 각 단백질을 정제하였다.

[0136] E2B-6xHis는 Ni 컬럼(column)을 이용한 친화도 크로마토그래피, 젤-여과크로마토그래피(Gel filtration chromatography) 과정을 거쳐서 0.35 mg/L의 수득률로 95 퍼센트 이상의 순도로 정제가 되었다(도 7a, 7b 및 7c).

[0137] E2B-6xHis-OVA는 발현 테스트에서 비수용성(insoluble)으로 발현되어 우레아 버퍼(Urea buffer)로 변성(denaturation) 과정을 거친 뒤 친화도 크로마토 그래피로 정제하였다. 그 후, 재접힘 과정을 통해 변성제(denaturant)로 작용하는 우레아(Urea)의 농도를 줄여 올바른 접힘을 유도하고 젤-여과크로마토그래피를 통해 단량체로 유지되는 부분만을 농축시켜 정제를 완료하였다(도 8a 및 8b).

[0138] E2L-OVA와 E2Y-OVA는 발현 테스트에서 비-수용성(insoluble)으로 발현되어 우레아 버퍼(Urea buffer)로 변성(denaturation) 과정을 거친 뒤 친화도 크로마토 그래피로 정제하였다. 그 후, 재접힘 과정을 진행하였지만, 수득률이 극히 낮아, 이후에는 재접힘 과정을 거치지 않고 우레아 버퍼(Urea buffer) 상태에서 항체 제작에 들어 갔다(도 9a 및 9b: 2L-OVA의 친화도 크로마토그래피와 젤-여과크로마토그래피 정제. 도 10: E2Y-OVA의 친화도 크로마토그래피).

[0140] 상기한 항원 후보 단백질 E2B_OVA, E2B, E2Y_OVA 및 E2L_OVA 각각을 대장균(E-coli) 시스템을 통해서 생산하였다. 총 생산량을 SDS-PAGE를 이용해서 UV 280nm에서 흡수도를 이용하여 정량하였다(도 11a 내지 11d).

[0142] **실험예 5. 표준 항원으로서 특성 검토**

[0143] 또한, 본 발명의 E2B 항원이 특정 치쿤군야 바이러스 변이주에 특이적인 것인지를 확인하기 위해, 변이주들의 당단백질 서열 비교를 통해서 변이주들 간의 당단백질 표면 잔기들의 보존성을 평가하였다. 유전체 서열을 기준으로 작성한 계통학적 분류(phylogenetic tree)에 따르면 치쿤군야 바이러스는 Indian ocean, ESCA(East/Central/South Africa), Asian, West Africa lineage로 총 4 종류의 변이주가 존재하므로, 각 변이주에 해당하는 서열정보 2개씩을 NCBI Gene Bank(Gene Bank 등록번호(accession code) CAJ90470.1, ACM00915.1, ADG95881.1, ADG95934.1, ADG95887.1, ABY57313.1, ADG95885.1, 및 AAU43881.1)에서 확보하여 분석하였다(도 12).

[0144] 또한, 변이주와 무관한 범용적인 중화항체 형성과 올바른 항원 선정을 위해 치쿤군야 바이러스 외피 단백질-단일 클론항체 복합체의 구조를 토대로 항원-항체 인터페이스의 표면 잔기 보존성을 구조생물학을 기반으로 분석하였다.

[0146] 그 결과, 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, E1 E2의 복합체 형성에 관여하는 인터페이스의 표면잔기들의 보존 정도가 높게 나타났으며, 이 사실은 E1-E2 이형 이합체(heterodimer)가 바이러스 입자 형성에 중요하다는 연구 결과와 일치한다는 것을 알 수 있다. 또한, 도 12에 나타난 바와 같이, 본 발명의 항원부위에서 항체와 직접적으로 상호작용하는 표면 잔기들은 예외없이 모든 변이주들에 대하여 잘 보존되어 있음을 확인하였는바, 이는 본 발명의 항원이 변이주의 종류와는 무관한 범용성 항체를 형성할 수 있음을 의미한다.

[0147] 따라서, 본 발명은 당 수식 부위를 포함하지 않아, 대장균 시스템을 통해서 대량생산이 가능하고, 우수한 수용성을 갖는 E2B 부위(서열번호 1)가 범용의 중화항체 에피토프로서 효과적일 것이라 판단하여, E2B 부위를 최종 항원 부위로 선정하였다. 이후, His 태그 서열을 더 포함하는 재조합 단백질을 이용하여 항체 생산, 중화항체 스크리닝 등을 수행하였다.

[0149] **실험예 6. 치쿤군야 바이러스 항원 주입을 통한 항체 유도**

[0150] 대장균에서 발현하고 정제한 재조합 E2B, E2B-OVA 단백질 50 μ g 을 각각 아췌반트로 명반(alum)과 1:1 부피비로 섞고 상온에서 회전시키면서 흡착시킨 후 마우스의 복강 내에 주입하거나, 다른 아췌반트로 TiterMax® Gold와 1:1 부피비로 섞고 현탁액으로 만들어 주사하였다. 이와 같은 항원을 도 14의 접종 일정에 따라, 약 7-14일 간격으로 총 3번 접종하였다.

[0151] 또한, 대장균에서 발현하고 정제한 재조합 E2L-OVA, E2Y-OVA 단백질 50 μ g 을 아췌반트로 명반(alum)과 1:1 부피비로 섞고 상온에서 회전시키면서 흡착시킨 후 마우스의 복강 내에 주입하거나, TiterMax® Gold와 1:1 부피비로 섞고 현탁액으로 만들어 주사하였고 도 14의 접종 일정에 따라 약 10일 간격으로 총 3번 접종하였다.

[0152] 마우스로는 OVA 펩타이드에 특이적으로 반응하는 형질전환 T세포(transgenic T cell)를 갖는 DO11.10 마우스에서 림프절을 분리하여 단일세포로 만들어 정맥 내에 약 1.5×10^6 또는 2.0×10^6 세포를 주입한 것과 주입하지 않은 마우스를 사용하였다.

[0153] 3회 접종 후, 3일 뒤인 최초 접종일 기준 24일 후에 헤파린이 코팅된 모세관을 사용하여 안와 채혈(eye bleeding)을 통하여 혈액을 얻었다. 혈액은 2,000 $\times$ g, 4℃에서 약 10분간 침강시키고 상층액 혈장을 얻었다.

[0155] **실험예 7. 치쿤군야 바이러스 중화항체가 확인**

[0156] **7-1. 치쿤군야 바이러스 플라크감소 중화항체가 측정법(plaque reduction neutralization test, PRNT) 구축**

[0157] 본 발명에서는 메틸셀룰로스(Methylcellulose)를 포함하는 오버레이(overlay) 배양액을 이용하여 Vero 세포배양 시스템을 기반으로 하는 플라크감소 중화항체가 측정법(plaque reduction neutralization test, PRNT)을 구축하였다. 양성대조군으로는 상업적으로 판매되는 치쿤군야 바이러스 중화항체(chk-265, Absolute Antibody Ltd. Oxford, UK)을 사용하여 중화효능을 분석하였다.

[0158] 우선, 중화항체가 측정 24 시간 전에 12웰 플레이트에 Vero 세포를 웰(well) 당 1.2×10^5 개 세포를 분주하고, 항

체가 측정 당일에는 각 웰(Well)에 세포가 70~90 % 정도로 도달되도록 세포를 준비하였다. 중화능 시험 회석용액으로 56℃에서 30분 동안 놓아두어 열 불활성화(heat inactivated) 처리시킨 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 준비하였다. 또한, 치쿤군야 바이러스 중화항체(chk-265)를 중화능 시험 회석용액으로 회석하여, 단계별로 회석된 항체 시료 회석용액을 준비하였다. 치쿤군야 바이러스 용액은 웰(well) 당 플라크의 개수가 100 개가 되도록 제 3(triplicate) 샘플에 대해 준비하였다(~100 PFU/ 25 μ l). 0.2% 크리스탈 바이올렛 용액은 크리스탈 바이올렛을 20% 에탄올 수용액에 0.2%(w/v)으로 녹인 후 0.2 μ m 필터로 여과하여 준비하였다. 오버레이 배지(overlay media)는 열 불활성화(heat inactivated) 처리시킨 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 1% 메틸-셀룰로오스(methyl-cellulose)가 첨가된 것을 사용하였다.

[0160] 회석된 항체시료와 치쿤군야 바이러스 용액을 1:1 부피비로 혼합하여 총 160 μ l 반응양으로 37℃에서 60분간 배양하고, 12 웰 플레이트에 도달된 Vero 세포의 배양액을 흡입·제거한 후, 웰(well) 당 중화능 시험 회석용액 200 μ l와 치쿤군야 바이러스-항체 혼합 용액 50 μ l씩을 3개의 well에 나누어 분주하였다. 상기 용액이 첨가된 플레이트는 37℃, 5% CO₂ 조건에서 90분간 배양하고, 배양시간 동안 10-15 분 마다 세포가 마르지 않도록 플레이트를 앞뒤로 흔들어 주었다.

[0161] 첨가한 혼합 용액을 흡입·제거하고 1% 메틸-셀룰로오스(methyl-cellulose)가 첨가된 오버레이 배지(overlay media)를 웰 당 2mL씩 넣고, 해당 플레이트를 37℃, 5% CO₂ 조건에서 4일간 배양하였다. 4일간의 배양으로 플라크가 형성된 Vero 세포 플레이트에서 오버레이 배지(Overlay media)를 흡입·제거하고, 0.2% 크리스탈 바이올렛 용액을 웰 당 2mL 첨가하여 약 6-8 시간 실온에서 세포를 염색하였다. 이후 염색약을 흐르는 물로 세척하고 건조시킨 후, 웰 당 관찰되는 플라크 개수를 측정하여 chk-265 중화항체 시험 용액의 중화항체가를 계산하였다.

[0163] 도 15a 및 도 15b에 나타난 바와 같이, 본 발명의 플라크감소 중화항체가 측정법(PRNT)을 이용한 chk-265 중화능 확인결과 EC₅₀=198ng/mL, EC₉₀=483ng/mL의 결과를 반복적으로 도출할 수 있었으며, 본 실험을 통해 구축된 Vero 세포배양 시스템 기반 중화항체가 측정법(PRNT)의 유효성을 확인할 수 있었다.

[0165] 7-2. 치쿤군야 바이러스 항원 주입 시 중화항체 형성 확인

[0166] 따라서, 상기 중화항체가 측정법에 따라, 본 발명의 항체 제작시스템을 이용해 본 발명의 서열번호 2의 E2B 치쿤군야 바이러스 항원을 Alum이나 TiterMax® Gold를 어쥬번트로 사용하여 실험예 6에서 설명한 바와 같이 접종한 마우스 혈장을 확보하였다. 상기 실험예 7-1의 중화항체가 측정법(PRNT)을 따라, chk-265 중화항체 대신 상기 마우스 혈장(plasma)의 중화능을 1:5 희석배율로 고정하여 스크리닝을 수행하였다.

[0167] 도 16에 나타난 바와 같이, 약 1000 PFU의 고정된 플라크(plaque) 수로 진행한 PRNT에서 총 3 마리 마우스의 혈청(Gold 어쥬번트와 함께 접종된 D011.10(+) 마우스에서 E2B#3, E2B#4, E2B#5 실험군)에서 유효한 중화능을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명의 E2B 항원은 중화항체를 유도하는 항원부위임을 알 수 있다.

[0169] 이후 추가로 E2B, E2B-OVA, E2L-OVA, E2Y-OVA 4 종의 치쿤군야 바이러스 항원을 Alum이나 TiterMax® Gold를 어쥬번트로 사용하여 실험예 6에서 설명한 바와 같이 접종한 마우스의 혈장을 확보하였으며 약 100 PFU의 고정된 플라크(plaque) 수로 진행한 플라크감소 중화항체가 측정 실험에서 총 8마리 마우스의 혈장(E2B, E2B-OVA#1, E2B-OVA#2, E2B-OVA#3와 E2L-OVA, E2Y-OVA#1, E2Y-OVA#2, E2Y-OVA#3)에서 유효한 중화능을 확인하였다(도 17).

[0171] 이들 혈장의 항원-항체 반응성을 선별하기 위해 ELISA를 수행하였다. 사용한 항원인 E2B 및 E2B-OVA, E2Y-OVA, E2L-OVA를 각각 0.1 μ g 항원/100 μ l PBS로 회석하여, 96웰 이뮤노플레이트(96 well immunoplate)에 웰 당 0.1 μ g씩 담은 후 4℃에서 14시간 이상 보관하였다. 항원이 담겨있던 웰을 180 μ l의 0.05% Tween-20를 포함하는 PBS로 4번 씻어낸 후, 100 μ l의 1% BSA를 포함하는 PBS(assay diluent)/well을 이용해 상온에서 1시간 배양하였다. 마우스에서 분리한 혈장(plasma)을 각각 1x10⁻³, 1x10⁻⁴, 1x10⁻⁵의 농도로 희석한 후 혈장(plasma)을 처리하고 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 분리한 마우스 혈장(plasma)에 특이적인 HRP-컨쥬게이트 Goat-anti-mouse 항체를

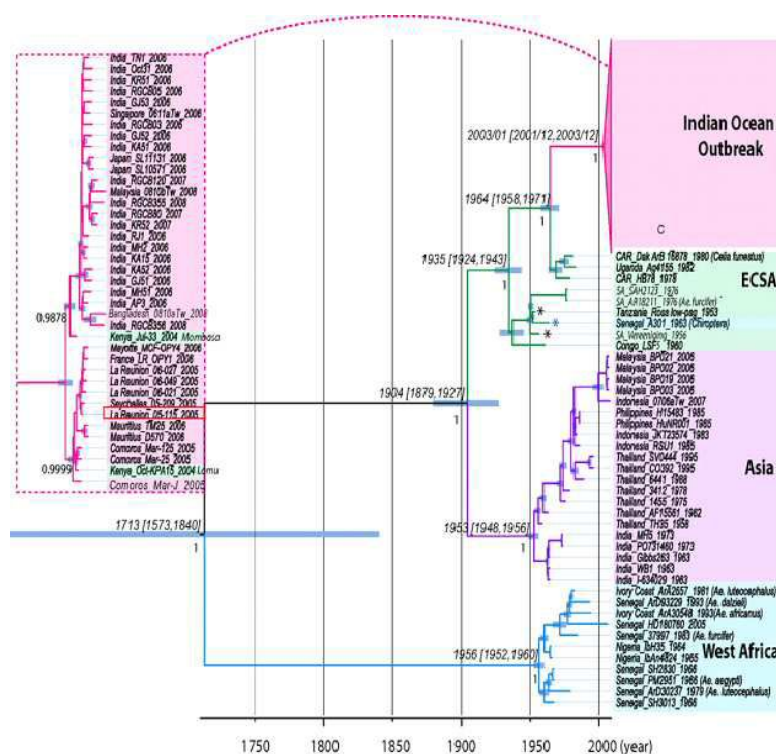
각 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} 으로 희석하여 처리하고, 상온에서 30분 배양하였다. 이후 웰 당 $100 \mu\text{l}$ TMB 기질을 10분 처리하고, 파란색을 띄게 되면 $50 \mu\text{l}/\text{well}$ 의 2N H_2SO_4 를 처리한 뒤, 플레이트 리더기(plate reader)를 이용해 450nm와 560nm에서 흡광율을 측정하였다. 이때 chk-265 항체를 대조군으로 사용하였다.

[0172] 도 18에 나타난 바와 같이, 마우스에 주입했던 항원에 대한 항체의 반응성은 농도 의존적인 반응으로 모두 양성으로 보였다. 특히, 대조군으로 사용한 chk-265 항체는 E2B에 대해서는 높은 항원 반응성을 보였으나, E2Y나 E2L에 대해서는 항원-항체 반응성이 높지 않았다. 이는 E2B가 E2Y나 E2L과 비교해서 더 우수한 항원능을 가지며, 더 높은 민감성으로 검출될 수 있음을 의미한다.

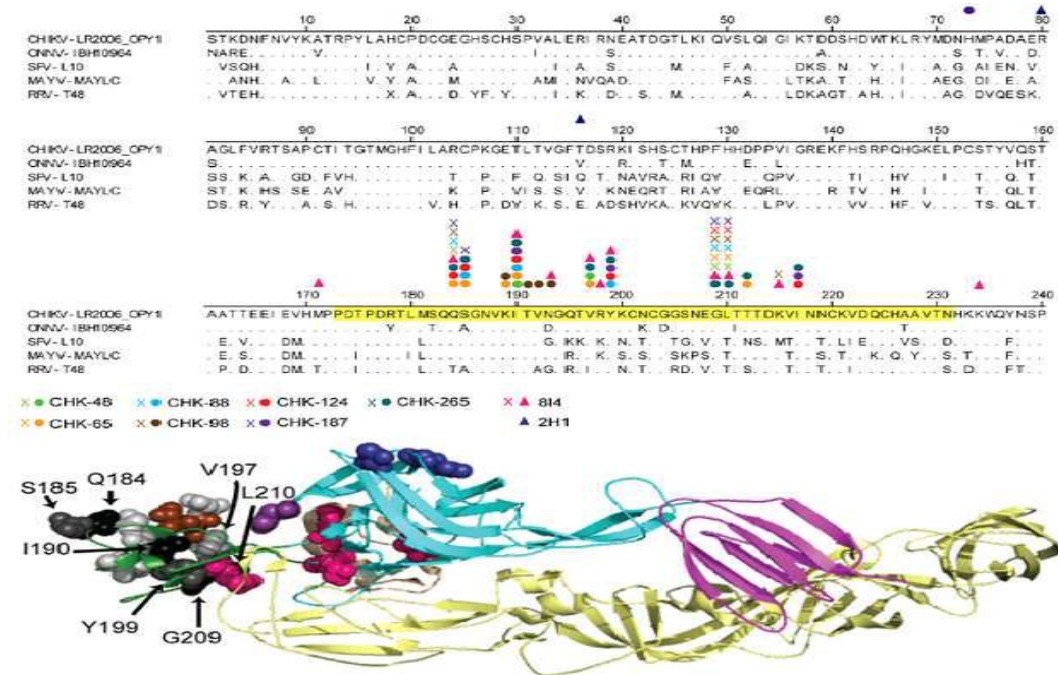
[0173] 이와 관련하여, 도 19에 나타난 바와 같이 E2B, E2B-OVA, E2Y-OVA 및 E2L-OVA 항원을 주입했던 각각 마우스의 혈장에 포함된 항체는, 항원의 종류와 관계없이 모두 E2B 항원을 인지 할 수 있음을 E2B를 ELISA 항원으로 사용한 분석을 통해 확인하였는바, 본 발명의 E2B 항원이 중화항체를 유도할 수 있으면서도, 치쿤균야 바이러스 검출, 항체 생산 등에 있어서 매우 중요한 인식 부위로 작용되는 에피토프임을 알 수 있다.

도면

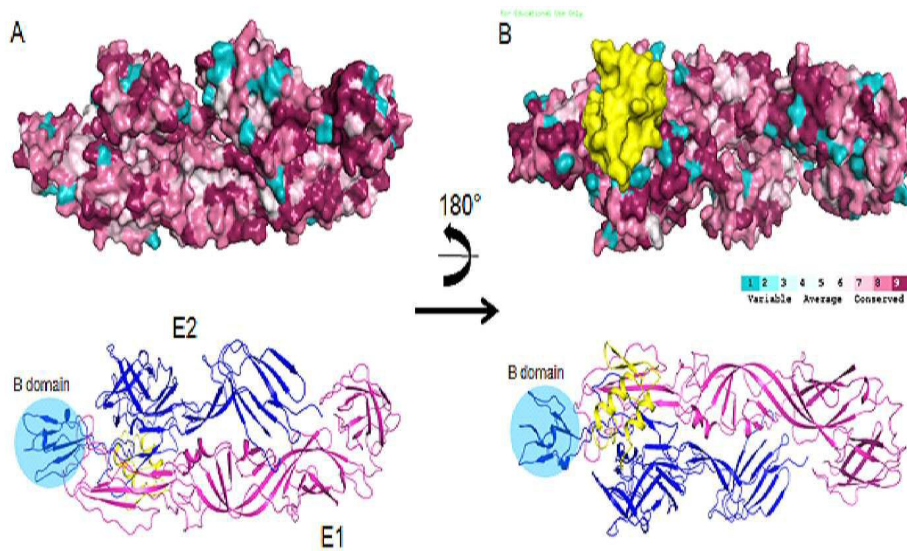
도면1



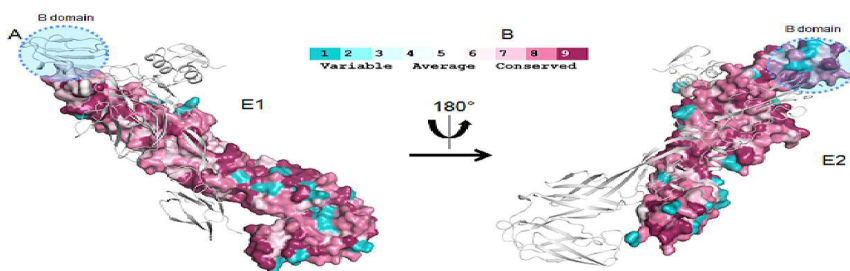
도면2



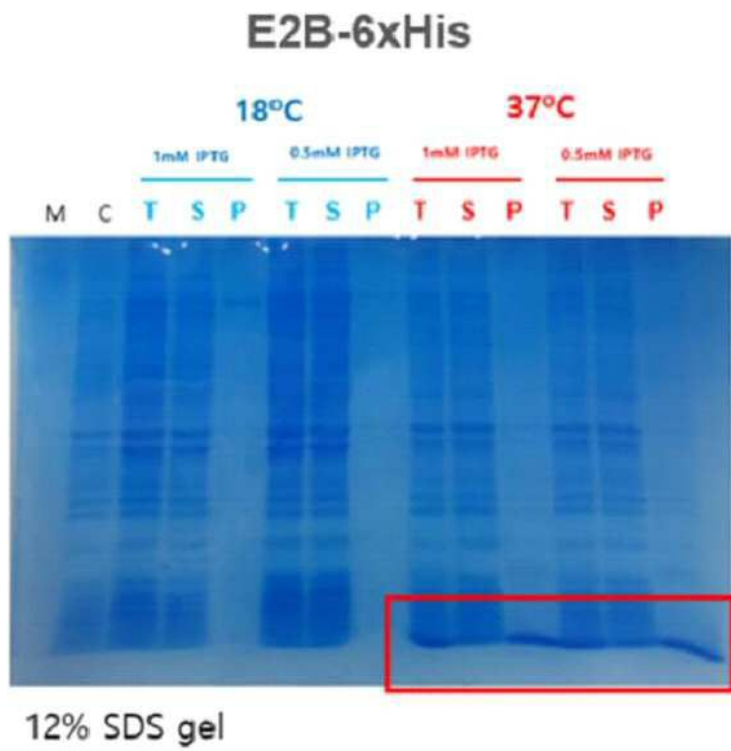
도면3a



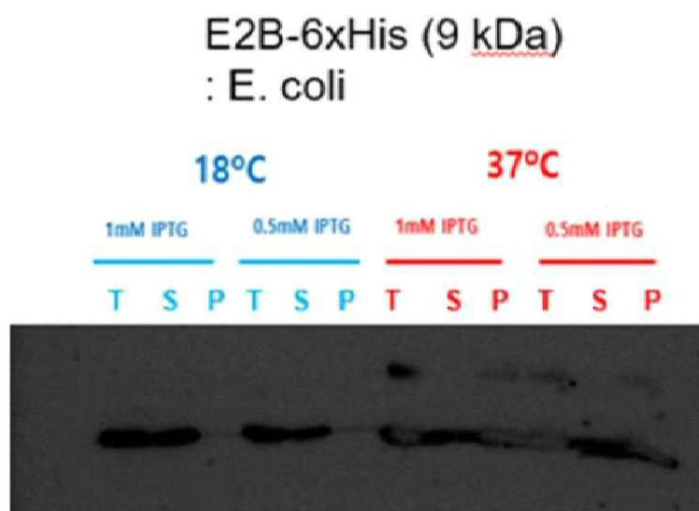
도면3b



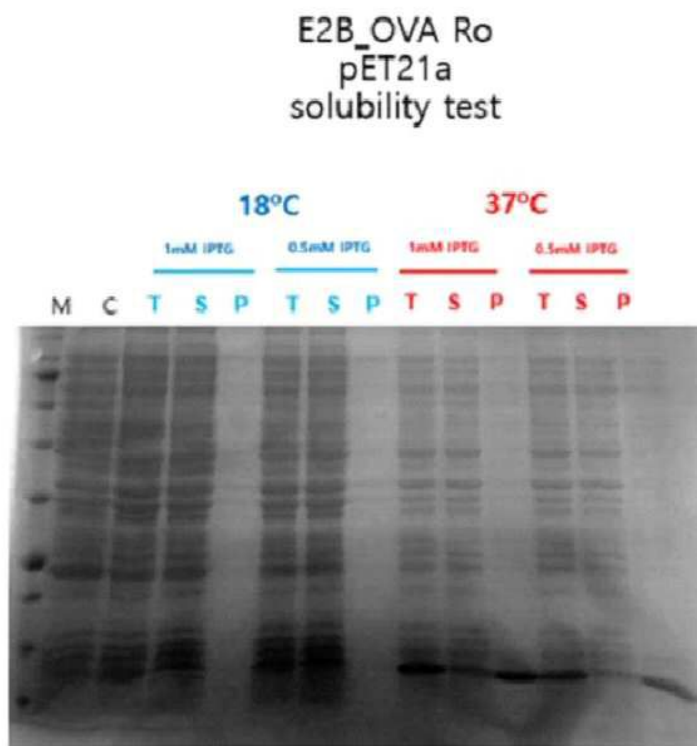
도면4a



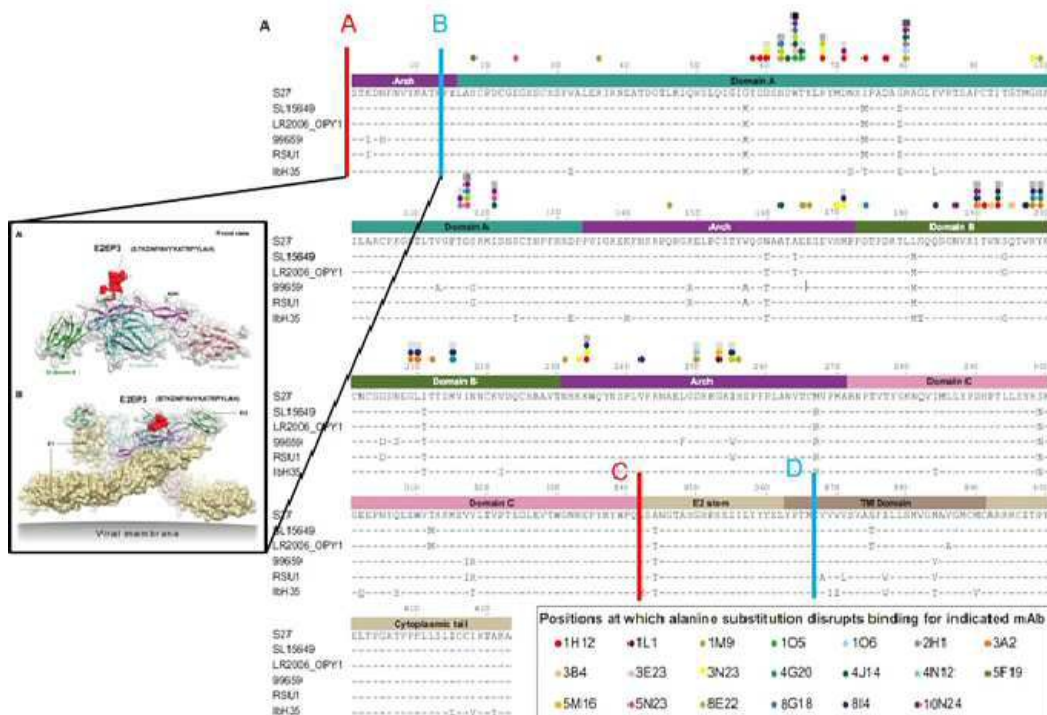
도면4b



도면4c



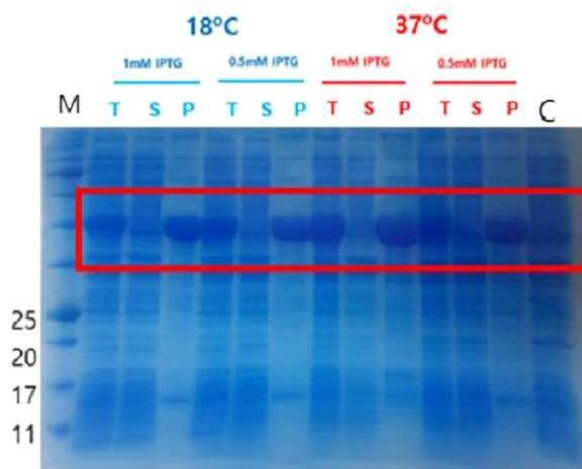
도면5



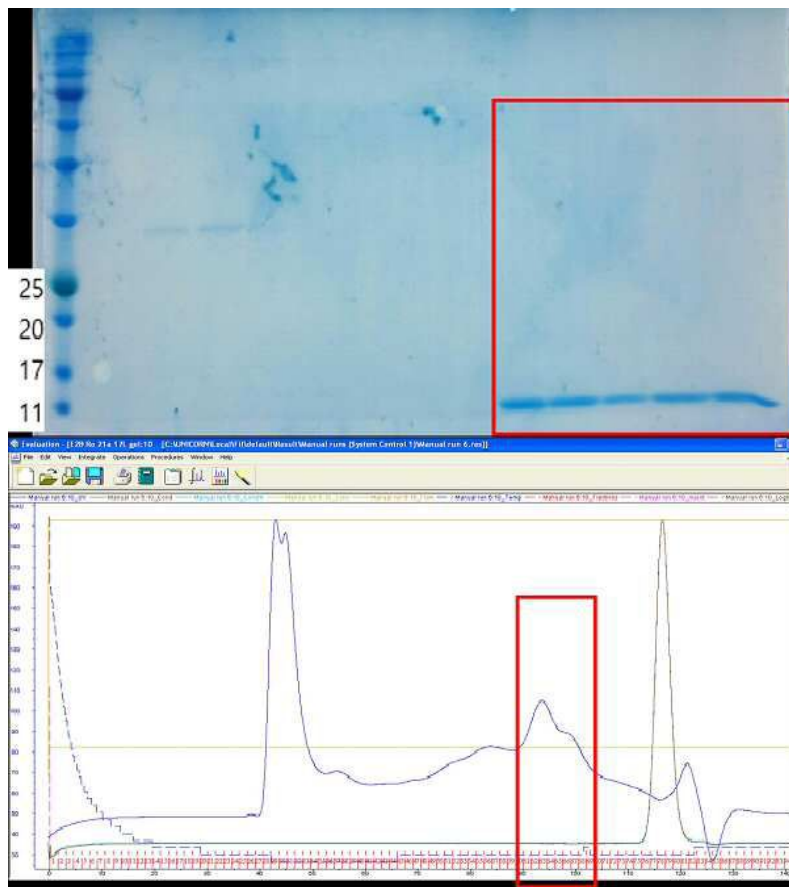
	region	AA	MW	pI	Extinction coefficient
E2L-OVA-6xHis	A - D	427	47710.82	7.40	53580, 52830 (reduced)
E2Y-OVA-6xHis	B - D	414	46185.13	6.99	52090, 51340 (reduced)

도면6a

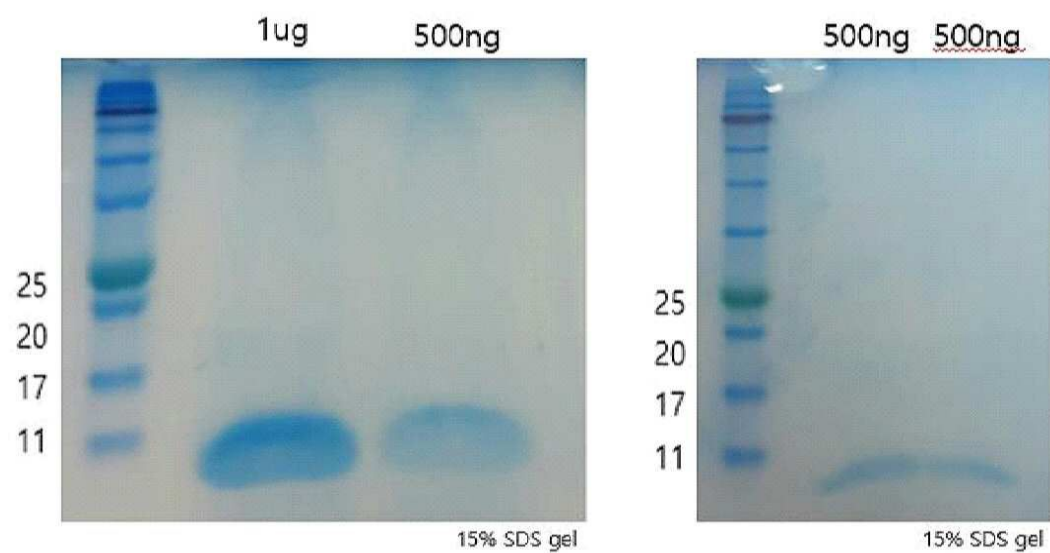
E2Y_OVA BL21
pET21a



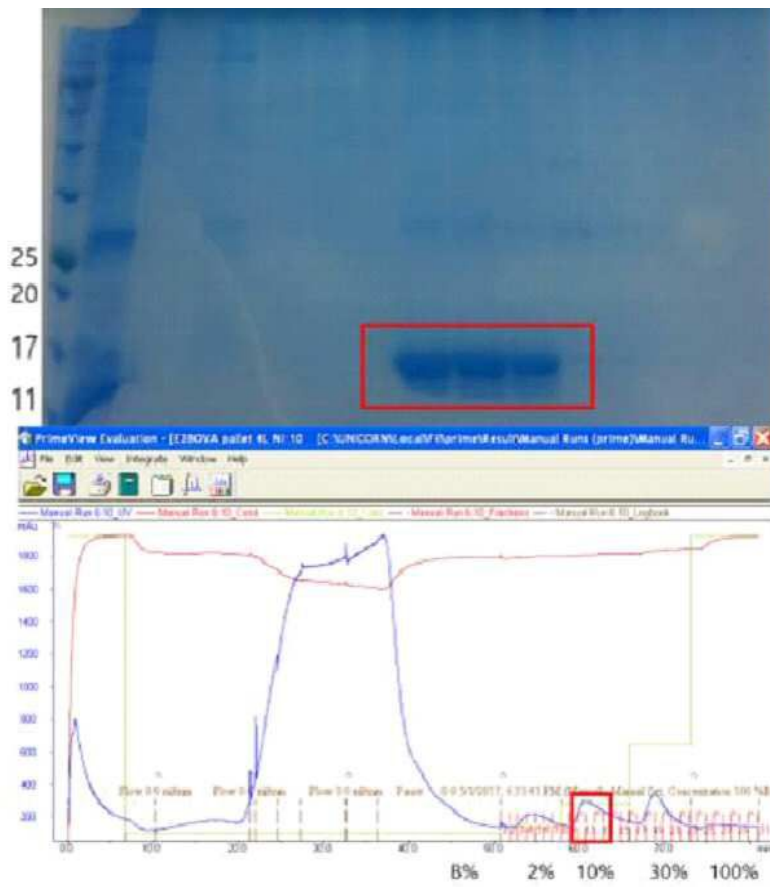
도면7b



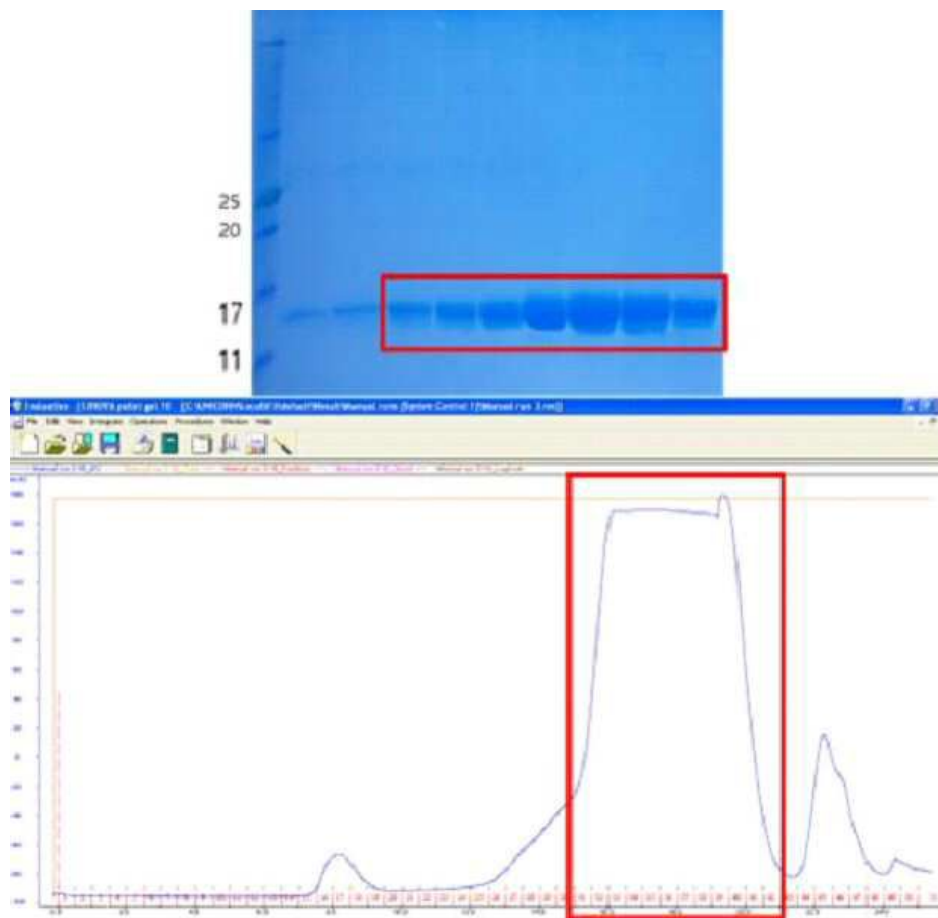
도면7c



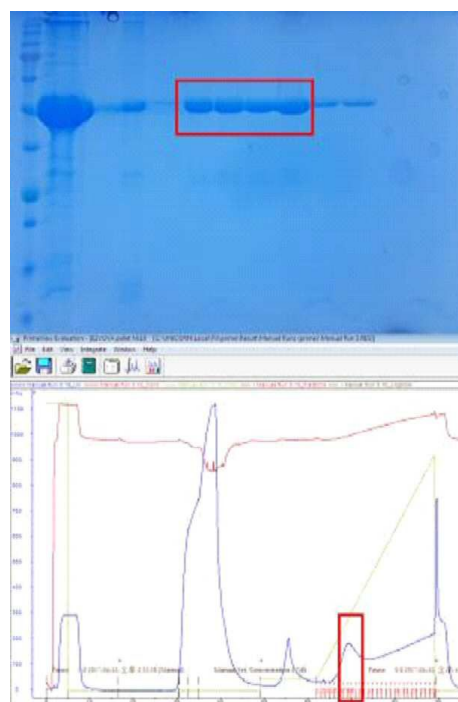
도면8a



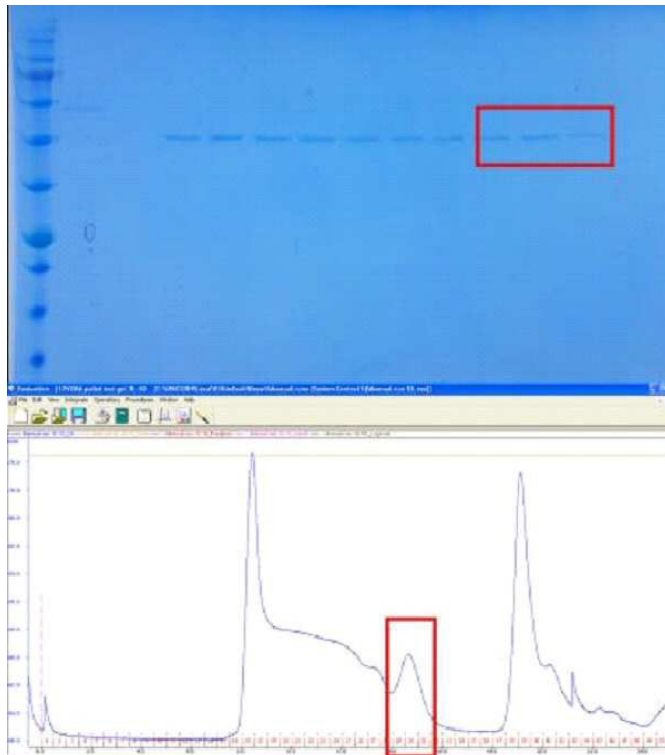
도면8b



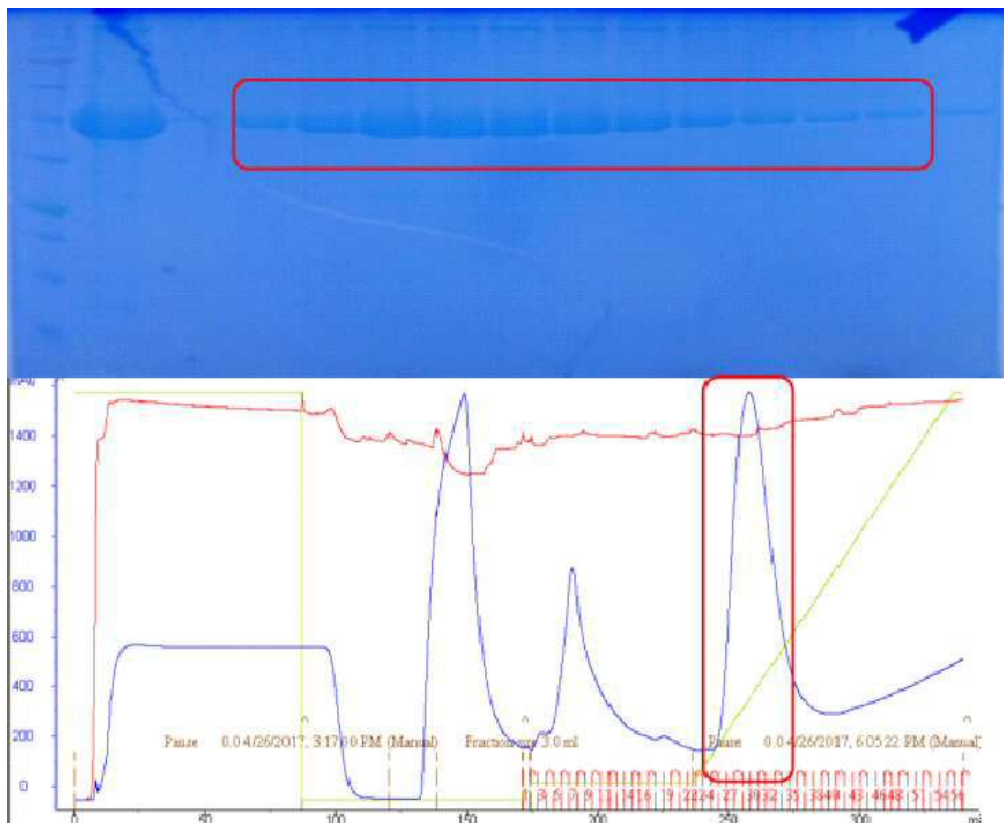
도면9a



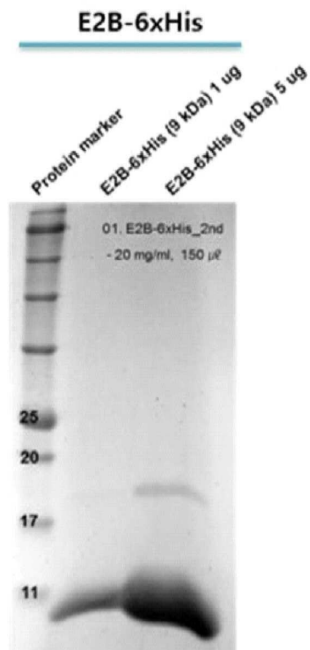
도면9b



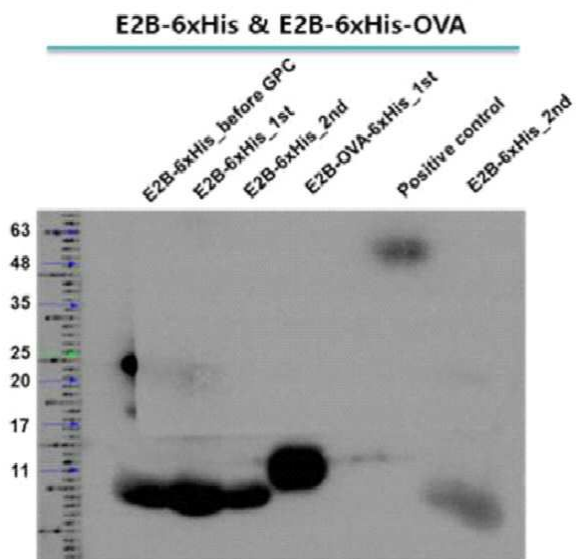
도면10



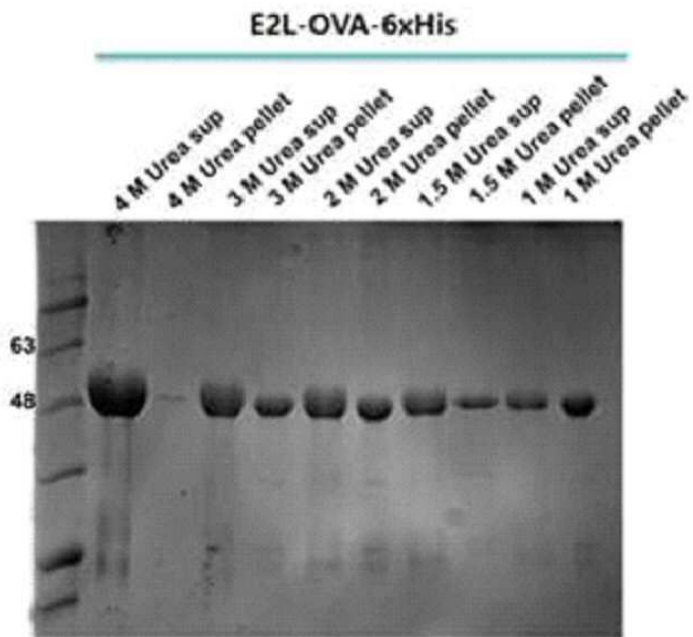
도면11a



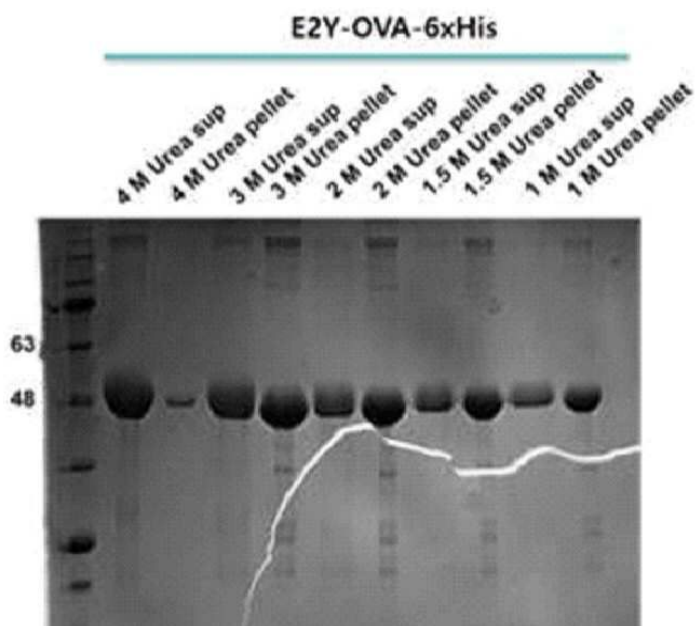
도면11b



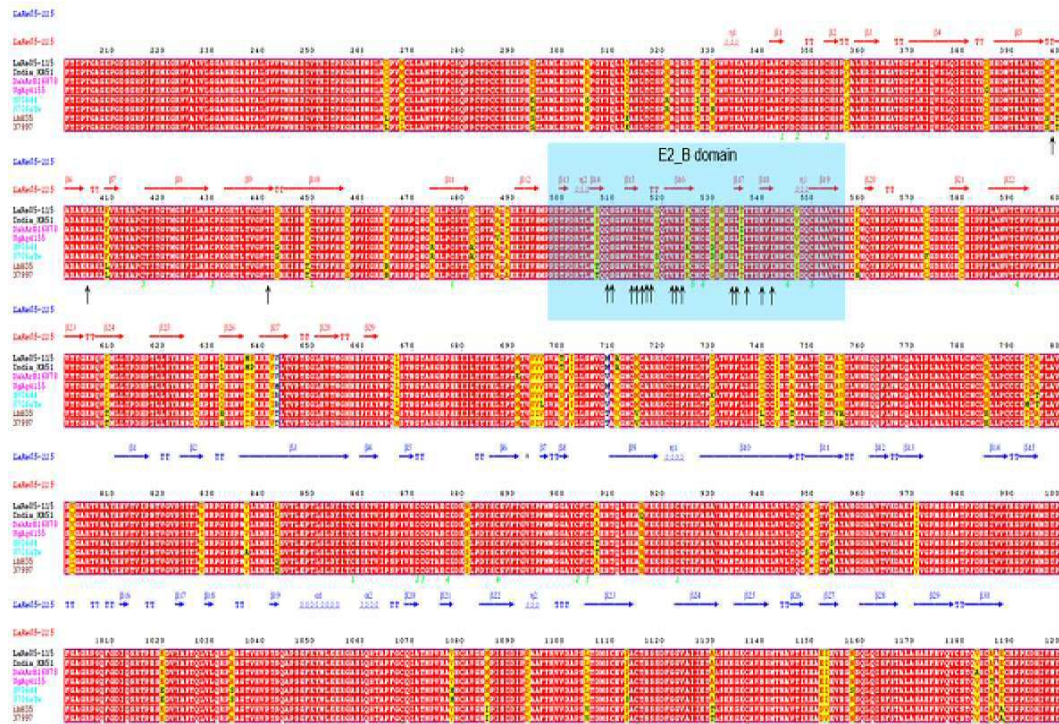
도면11c



도면11d



도면12



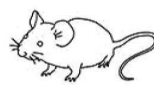
도면13

- E2B-6xHis

```

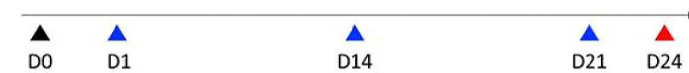
1 ATGGCTAGCATGACT GGAGACAGCAATG GGTGGCGGATGCCA GACACCCCTGATGCG ACATTAATGTCACAA
1 M A S M T G G Q Q M G R G S P D T P D R T L M S Q
76 CAGTCGGGCAACGTA AAGATCAGATCAAT GGCCACAGGTGCGG TACAAGTGTAAATGC GGTGGCTCAAATGAA
26 Q S G N V K I T V N G Q T V R Y K C N C G G S N E
151 GGACTACAACACTACA GACAAAGTGATTAAT AACTGCAAGGTTGAT CAATGTATGCGCGG GTCACCAAT AAGCTT
51 G L T T T D K V I N N C K V D Q C H A A V T N K L
226 GCGCGCGCACTCGAG CACCAACCAACAC CAC
76 A A A L E H H H H H H
    
```

도면14



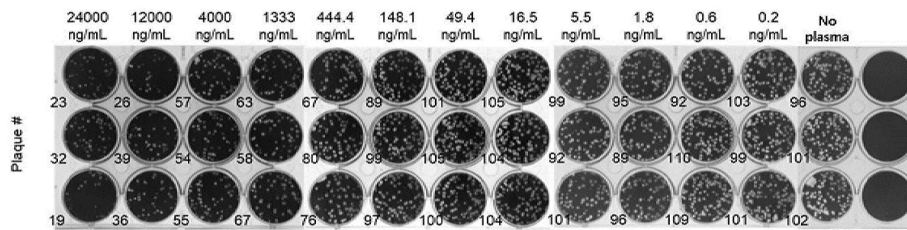
Mouse: Balb/c 6week female

Experiment Schedule

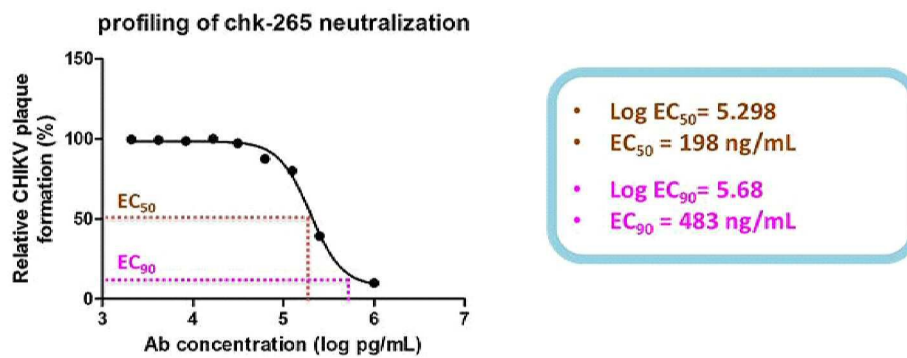


- ▲ Total LN (1.5x10⁶) of DO11.10 injection
- ▲ Days of Immunization; 1st, 2nd and 3rd
- ▲ Days of plasma collection through eye-bleeding

도면15a



도면15b

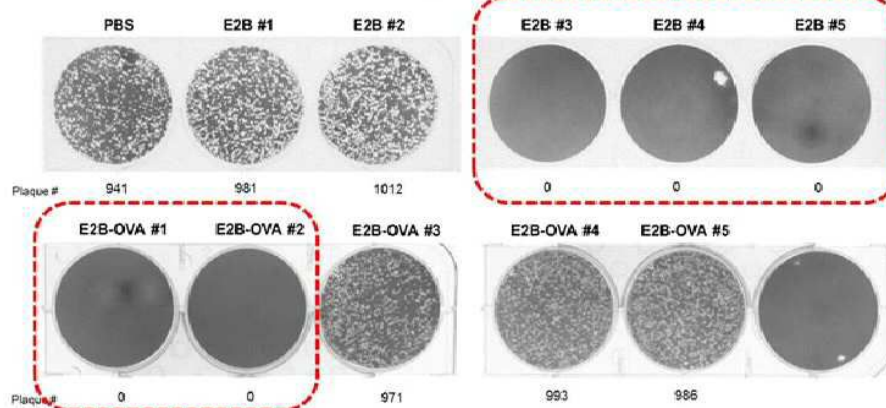


도면16

DO11.10	-				+			
Adjuvant	TiterMax® Gold		Alum		TiterMax® Gold		Alum	
Antigen	E2B	E2B-OVA	E2B	E2B-OVA	E2B	E2B-OVA	E2B	E2B-OVA
No. of mice	5	3*	5	5	5	5	5	5

1:5 Diluted serum

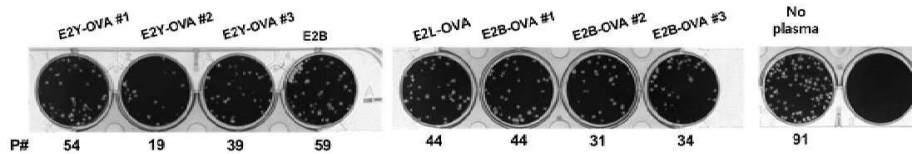
DO11.10(+)
Gold adjuvant



도면17

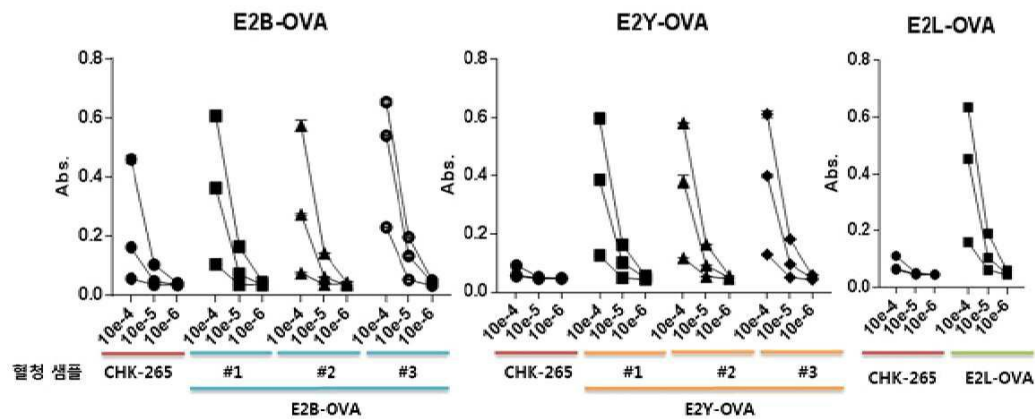
스크리닝 혈청 샘플													
DO11.10	(-)												
Adjuvant	Alum						Titer max® Gold						
Antigen	E2B	E2B-OVA	E2Y	E2Y-OVA	E2L	E2L-OVA	E2B	E2B-OVA	E2Y	E2Y-OVA	E2L	E2L-OVA	
Mouse #	5	5					15	11		13		11	
DO11.10	(+)												
Adjuvant	Alum						Titer max® Gold						
Antigen	E2B	E2B-OVA	E2Y	E2Y-OVA	E2L	E2L-OVA	E2B	E2B-OVA	E2Y	E2Y-OVA	E2L	E2L-OVA	
Mouse #	5	5					12	11					

PRNT 이용 유효 항원 선별



도면18

ELISA 이용 항원-항체 반응성 확인



35 40 45
 Lys Val Asp Gln Cys His Ala Ala Val Thr Asn
 50 55
 <210> 2
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Chikungunya virus
 <400> 2
 Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Pro Asp
 1 5 10 15
 Thr Pro Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile

20 25 30
 Thr Val Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser
 35 40 45
 Asn Glu Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val
 50 55 60
 Asp Gln Cys His Ala Ala Val Thr Asn Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu
 65 70 75 80
 <210> 3
 <211> 177
 <212> DNA
 <213> Chikungunya virus

<400> 3
 ccagacaccc ctgatcgac attaatgtca caacagtccg gcaacgtaaa gatcacagtc 60
 aatggccaga cggcgcggt caagtgtaat tgcggtggct caaatgaagg actaacaact 120
 acagacaaag tgattaataa ctgcaagggt gatcaatgtc atgccgcggt caccaat 177
 <210> 4
 <211> 240
 <212> DNA
 <213> Chikungunya virus
 <400> 4
 atggctagca tgactgggtg acagcaaatg ggtcgcggtat cccagacac cctgatcgc 60
 acattaatgt cacaacagtc cggcaacgta aagatcacag tcaatggcca gacggtgcgg 120

tacaagtgtg attgcggtgg ctcaaatgaa ggactaacia ctacagacaa agtgattaat 180

aactgcaagg ttgatcaatg tcatgccgcg gtcaccaata agcttgcggc cgcactcgag 240

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E2B forward primer

<400> 5

cgggatcccc agacaccct gatcgca 27

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E2B reverse primer

<400> 6

cccaagctta ttggtgaccg cggcat 26

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E2Y forward primer

<400> 7

cgggatcccc atacttagct cactgtcccg 30

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E2Y reverse primer

<400> 8

ccaagcttat gagctgtacc ccactatgac t 31

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E2L forward primer

<400> 9

cgggatccag caccaaggac aacttcaatg t 31

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E2L reverse primer

<400> 10

ccaagcttat gagctgtacc ccactatgac t 31

<210> 11

<211> 1224

<212> DNA

<213> Chikungunya virus

<400> 11

atggctagca tgactggtag acagcaaatg ggtcgcgat cccatactt agtcactgt 60

cccgactgtg gagaaggga ctcgtgccat agtcccgtag cactagaacg catcagaaat 120

gaagcgacag acgggacgct gaaaatccag gtctccttgc aaatcggaat aaagacggat 180

gacagccacg attggaccaa gctgcgttat atggacaacc acatgccagc agacgcagag 240

agggcggggc tatttgtaag aacatcagca ccgtgtacga ttactggaac aatgggacac 300

ttcatcctgg ccgatgtcc aaaaggggaa actctgacgg tgggattcac tgacagtagg 360

aagattagtc atcatgtac gcacccattt caccacgacc ctctgtgat aggtcgggaa 420

aaattccatt cccgaccga gcacggtaaa gagctacatt gcagcacgta cgtgcagagc 480

accgcccga ctaccgagga gatagaggta cacatgcccc cagacacccc tgatgcaca 540

ttaatgtcac aacagtccg caacgtaaag atcacagtca atggccagac ggtgcggtac 600

aagtgtaat gcggtggctc aaatgaagga ctaacaacta cagacaaagt gattaataac 660

tgcaaggttg atcaatgtca tgcccggtc accaatcaca aaaagtggca gtataactcc 720

cctctggtcc cgcgtaatgc tgaacttggg gaccgaaaag gaaaaattca catcccgttt 780

ccgctggcaa atgtaacatg cagggtgcct aaagcaagga accccaccgt gacgtacggg 840

aaaaaccaag tcacatgct actgtatcct gaccaccaa cactcctgtc ctaccggaat 900

atgggagaag aaccaaacta tcaagaagag tgggtgatgc ataagaagga agtcgtgcta 960

accgtgccga ctgaagggt cgaggtcacg tggggcaaca acgagccgta taagtattgg 1020
ccgcagttat ctacaaacgg tacagcccat ggccaccgc atgagataat tctgtattat 1080
tatgagctgt accccactat gactaagctt gtcgagaagt actcagcaga ggcctgaag 1140

atatctcaag ctgtccatgc agcacatgca gaaatcaatg aagcaggcag agagggtgta 1200
gggtcagcag cgccgcact cgag 1224

<210> 12

<211> 408

<212> PRT

<213> Chikungunya virus

<400> 12

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Pro Tyr

1 5 10 15

Leu Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro

20 25 30

Val Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys

35 40 45

Ile Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp

50 55 60

Trp Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu

65 70 75 80

Arg Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly

85 90 95

Thr Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu

100 105 110

Thr Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His

115 120 125

Pro Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr

165 170 175
 Pro Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr
 180 185 190
 Val Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser Asn
 195 200 205
 Glu Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp
 210 215 220
 Gln Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser

 225 230 235 240
 Pro Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile
 245 250 255
 His Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala
 260 265 270
 Arg Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu
 275 280 285
 Tyr Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu

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

 355 360 365
 Lys Leu Val Glu Lys Tyr Ser Ala Glu Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala
 370 375 380
 Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val
 385 390 395 400
 Gly Ser Ala Ala Ala Ala Leu Glu
 405

<210> 13

<211> 1368

<212> DNA

<213> Chikungunya virus

<400> 13

```

atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccagcaccaa ggacaattc      60

aatgtctata aagccacaag accatactta gtcactgtc ccgactgtgg agaagggcac      120
tcgtgccata gtcccgtagc actagaacgc atcagaaatg aagcgacaga cgggacgctg      180
aaaatccagg tctccttgca aatcggaata aagacggatg acagccacga ttggaccaag      240
ctgcgttata tggacaacca catgccagca gacgcagaga gggcggggct atttgaaga      300
acatcagcac cgtgtacgat tactggaaca atgggacact tcaccttggc ccgatgtcca      360
aaaggggaaa ctctgacggt gggattcact gacagtagga agattagtca ctcatgtacg      420
cacccatttc accacgaccc tcctgtgata ggtcgggaaa aattccattc ccgaccgcag      480

cacggtaaag agctaccttg cagcacgtac gtgcagagca ccgccgaac taccgaggag      540
atagaggtag acatgcccc agacacccct gatcgacat taatgtcaca acagtccggc      600
aacgtaaaga tcacagtcaa tggccagacg gtgcggtaca agtgaattg cgggtggctca      660
aatgaaggac taacaactac agacaaagtg attaataact gcaaggttga tcaatgtcat      720
gccgcggtca ccaatcaca aaagtggcag tataactccc ctctgggtccc gcgtaatgct      780
gaacttgggg accgaaaagg aaaaattcac atcccgtttc cgctggcaaa tgtaacatgc      840
agggtgccta aagcaaggaa cccacccgtg acgtacggga aaaaccaagt catcatgcta      900

ctgtatcctg accaccaac actcctgtcc taccggaata tgggagaaga accaaactat      960
caagaagagt gggatgatga taagaaggaa gtcgtgctaa ccgtgccgac tgaagggtc      1020
gaggtcacgt ggggcaacaa cgagccgtat aagtattggc cgcagttatc tacaaacggt      1080
acagcccatg gccaccgca tgagataatt ctgtattatt atgagctgta ccccatatg      1140
actaagcttg tcgagaagta ctcagcagag agcctgaaga tatctcaagc tgtccatgca      1200
gcacatgcag aaatcaatga agcaggcaga gaggtggtag ggtcagcaaa gcttgtcgag      1260
aagtactcag cagagagcct gaagatatct caagctgtcc atgcagcaca tgcagaaatc      1320

aatgaagcag gcagagaggt ggtaggggtca gcagcgcccg cactcgag      1368

```

<210> 14

<211> 456

<212> PRT

<213> Chikungunya virus

<400> 14

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Ser Thr
1 5 10 15

Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu Ala His
20 25 30

Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val Ala Leu
35 40 45

Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile Gln Val
50 55 60

Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp Thr Lys
65 70 75 80

Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg Ala Gly
85 90 95

Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr Met Gly
100 105 110

His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr Val Gly
115 120 125

Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro Phe His
130 135 140

His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg Pro Gln
145 150 155 160

His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr Ala Ala
165 170 175

Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro Asp Arg
180 185 190

Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val Asn Gly
195 200 205

Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser Asn Glu Gly Leu
210 215 220

Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln Cys His
225 230 235 240

Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro Leu Val
 245 250 255
 Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His Ile Pro
 260 265 270
 Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg Asn Pro
 275 280 285
 Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr Pro Asp
 290 295 300

His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro Asn Tyr
 305 310 315 320
 Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr Val Pro
 325 330 335
 Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr Lys Tyr
 340 345 350
 Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro His Glu
 355 360 365

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

Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu Val Val
 435 440 445
 Gly Ser Ala Ala Ala Ala Leu Glu
 450 455

<210> 15

<211> 3

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> his tag sequence

<400> 15

cac

3