



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월15일

(11) 등록번호 10-2265441

(24) 등록일자 2021년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/66 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01) G01N 21/76 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/66 (2013.01)

C07K 14/43595 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0182437

(22) 출원일자 2020년12월23일

심사청구일자 2020년12월23일

(56) 선행기술조사문헌

PLOS ONE 11(3): E0152134\*

JP2019215377 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

박정은

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 206동 901호(전민동, 엑스포아파트)

(74) 대리인

리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

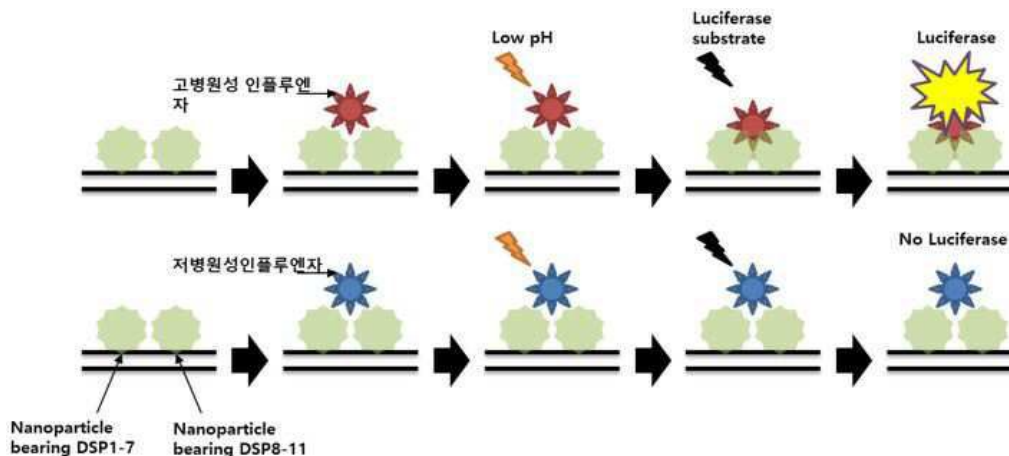
심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 화학 발광 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도

### (57) 요약

일 양상에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물, 키트 및 검출 방법에 따르면, 고병원성의 조류 인플루엔자 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있고, 화학 발광을 기반으로 검출을 수행하여, 고감도 및 저비용의 검출을 수행할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 9/0069** (2013.01)

**G01N 21/76** (2013.01)

**C12N 2740/16022** (2013.01)

**C12N 2740/16023** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 1545020865              |
| 과제번호        | 119057022SB010          |
| 부처명         | 농림축산식품부                 |
| 과제관리(전문)기관명 | 농림식품기술기획평가원             |
| 연구사업명       | 가축질병대응기술개발(R&D)         |
| 연구과제명       | 화학발광 기반 조류인플루엔자 진단기술 개발 |
| 기 여 율       | 1/1                     |
| 과제수행기관명     | 충남대학교 산학협력단             |
| 연구기간        | 2020.01.01 ~ 2020.12.31 |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

시알산(sialic acid) 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및

시알산 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며,

상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체, 단백분해효소, 및 제3 루시페레이스 단편이 발현된 제3 나노입자; 및

시알산 또는 시알릴락토스의 유도체, 단백분해효소, 및 제4 루시페레이스 단편이 발현된 제4 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 더 포함하며,

상기 제3 루시페레이스 단편 및 제4 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 검출용 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 루시페레이스 단편은 루시페레이스의 이중 분할 단백질(dual split protein: DSP)인 것인, 검출용 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 검출용 조성물 세트는 고위험군 조류 인플루엔자를 검출하는 것인, 검출용 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 더 포함하는 것인, 검출용 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1 또는 청구항 2의 검출용 조성물을 포함하는 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 진단 키트.

#### 청구항 7

시알산(sialic acid) 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계;

상기 생물학적 시료와 접촉된 검출용 조성물 세트에 염기성 버퍼를 첨가하는 단계; 및

상기 염기성 버퍼가 첨가된 검출용 조성물 세트에 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 첨가하는 단계를 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러스 검출 방법.

#### 청구항 8

청구항 7에 있어서, 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체, 단백분해효소, 및 제3 루시페레이스 단편이 발현된 제3 나노입자; 및

시알산 또는 시알릴락토스의 유도체, 단백분해효소, 및 제4 루시페레이스 단편이 발현된 제4 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계를 더 포함하는 것인, 검출 방법.

#### 청구항 9

청구항 7 또는 8에 있어서, 상기 루시페레이스 단편의 융합에 의한 화학 발광을 통해 조류 인플루엔자 바이러스를 검출하는 것인, 검출 방법.

#### 청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 방법은 개체의 조류 인플루엔자 바이러스 보유 여부 및 보유한 조류 인플루엔자 바이러스의 고병원성 여부를 동시에 확인하는 것인, 검출 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이며, 본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 가축질병대응기술개발사업의 지원을 받아 연구된 것이다(과제번호: 119057-02).

#### 배경 기술

[0002] 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)는 오르소믹소 계통(Family Orthomyxoviridae)에 속하는 RNA 바이러스로서 혈청형은 A형, B형, C형 등 3가지로 구분된다. 그 중 B형과 C형은 사람에서만 감염이 확인되고 있으며, A형은 사람, 말, 돼지, 기타 포유류 그리고 다양한 종류의 가금과 야생조류에서 감염이 확인되고 있다.

[0003] A형 인플루엔자 바이러스의 혈청형은 바이러스 표면의 두 가지 단백질인 혈구응집소(Hemagglutinin; HA)와 뉴라미니다제(Neuraminidase:NA)의 종류에 따라 구분되는데, 지금까지 144종류(HA 단백질 16종과 NA 단백질 9종)가 알려져 있다. HA는 바이러스가 체세포에 부착하는 역할을 하며, NA는 바이러스가 세포 내로 침투할 수 있도록 한다. 이러한 인플루엔자 바이러스는 매년 겨울이면 새로운 항원성을 지닌 인플루엔자 바이러스가 유행하며 사람을 포함한 가축, 조류에 거쳐 바이러스가 유행하며 이러한 바이러스의 모니터링은 매우 중요하다. 따라서 이에 따른 특이성과 민감성이 높은 프라이머와 프로브의 개발이 요구되고 있다.

[0004] 최근 관심이 집중되고 있는 조류 인플루엔자 바이러스(AIV)는 모두 A형에 속하는 바이러스로, 바이러스의 외막에 있는 HA와 NA의 유전자에 따라 HA는 16종류, NA는 9종류로 나누어지는 등 그 혈청형이 다양하며, 다른 혈청형 간에 교차방어가 되지 않는다고 알려져 있는데, AIV의 다양한 혈청형 중 현재까지 발생한 고병원성 조류 인플루엔자(HPAI)는 모두 H5 또는 H7 혈청형에 의한 것으로 알려져 있다. 조류 인플루엔자 바이러스 바이러스 중 H5형과 H7형에서 나타나는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스 바이러스(HPAI)는 가금류에 감염시 높은 폐사율을 보이며 국가적으로 많은 경제적 피해를 주는 것으로 알려져 있으며, HPAI와 더불어 H9형 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 바이러스(LPAI)는 산란계 농가 등에서 많은 피해를 일으킬 뿐 아니라 HPAI와 함께 사람으로의 감염에 대한 보고가 이루어지고 있다. 특히, 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스 바이러스 H5N1형은 아시아지역을 중심으로 인체감염이 이루어지고 있으며, 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 바이러스 H9N2형도 인수공통감염의 보고가 있어 공중보건학적인 위해가 큰 것으로 알려져 있다.

[0005] 이러한 조류 인플루엔자 바이러스의 감염으로 인한 피해를 감소시키기 위하여, 조류 인플루엔자 바이러스의 감염을 조기에 진단할 수 있는 방법을 개발하려는 연구가 활발히 진행되어왔다(한국특허공개 제2007-21690호). 그러나, 기존에 공지된 방법은 고병원성 조류 인플루엔자의 특이적인 감별 진단이 어렵고, 서열 분석, 동물 및 세포에서의 병원성 확인 등의 단계를 거쳐야 할 필요가 있어 진단에 시간 및 인력이 많이 소요되는 문제점이 있다.

[0006] 따라서, 본 발명자들은 적은 시간 및 비용으로 신속하게 고병원성의 인플루엔자를 진단할 수 있는 기술을 개발하여, 위와 같은 문제점을 해결하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 시알산(sialic acid) 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된

제1 나노입자; 및 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학발광 현상을 유도하는 것인, 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.

[0008] 다른 양상은 상기 검출용 조성물을 포함하는 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 진단 키트를 제공한다.

[0009] 다른 양상은 시알산(sialic acid) 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계; 상기 생물학적 시료와 접촉된 검출용 조성물 세트에 염기성 버퍼를 첨가하는 단계; 및 상기 염기성 버퍼가 첨가된 검출용 조성물 세트에 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 첨가하는 단계를 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러스 검출 방법을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 시알산(sialic acid) 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학발광 현상을 유도하는 것인, 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 명세서에서 용어 "조류 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus)"는 NP(nucleocapsid) 단백질과 M(matrix) 단백질을 포함하는 바이러스의 일종이다. 상기 조류 인플루엔자 바이러스는 상기 단백질의 항원성에 의해 A, B 또는 C형으로 구분된다. 상기 A형은 다시 HA(hemagglutinin) 단백질의 항원 특성에 따라 H1형에서 H15형의 아형으로 분류되며 NA(Neuraminidase) 단백질의 항원 특성에 따라 N1형에서 N9형의 아형으로 분류된다. 상기 조류 인플루엔자 바이러스는 숙주 세포의 표면에 있는 시알산과 결합함으로써, 감염을 수행하는 것일 수 있으며, 일 구체예에 따르면, 상기 조류 인플루엔자 바이러스를 검출하는 매개체로 적용될 수 있다.

[0012] 상기 조류 인플루엔자 바이러스는 고위험군 또는 저위험군일 수 있다. 상기 고위험군은 가끔류에 감염시 높은 폐사율을 보이는 고병원성의 조류 인플루엔자 바이러스를 총칭하며 이하에서 HPAI(Highly Pathogenic Avian Influenza)라고도 명명될 수 있다. 상기 고위험군 조류 인플루엔자는 H5형 또는 H7형일 수 있다.

[0013] 일 구체예에 있어서, 상기 조류 인플루엔자 바이러스는 인수공통 바이러스를 포함할 수 있다. 예를 들어, 인수공통 바이러스인 H5N1형 또는 H9N2형을 포함할 수 있다.

[0014] 본 명세서에서 용어 "검출용 조성물 세트"는 시료 내 조류 인플루엔자 바이러스의 존재를 판단하기 위한 복수의 나노입자를 의미하는 것일 수 있다. 상기 나노입자는 시알산 및 루시페레이스 단편을 포함하며, 2개의 나노입자가 융합되는 특징을 가질 수 있다.

[0015] 상기 검출용 조성물 세트는 고위험군 조류 인플루엔자를 검출하는 것일 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 용어, "나노입자(Nanoparticle)"은 막으로 구분된 내부를 포함하는 물질을 총칭할 수 있다. 구체적으로, 상기 나노입자는 바이러스 또는 유사바이러스(pseudoviruses)일 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 용어, "바이러스 유사 입자(Virus-Like Particle: VLP)"는 바이러스성 단백질을 수반하는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 바이러스 유사 입자는 바이러스와 유사한 형태를 띠고 있는 제조합 단백질을 의미하는 것일 수 있다. 또한, 상기 바이러스-유사 입자는 하기에서 "제1입자" 또는 "입자" 등으로 명명되기도 한다.

[0018] 일 구체예에 있어서, 상기 나노입자는 시알산(sialic acid) 또는 시알릴락토스의 유도체를 포함하는 것일 수 있다. 상기 입자는 표면에 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체를 포함하는 인플루엔자 바이러스 수용체를 포함함으로써, 조류 인플루엔자 바이러스와 접촉했을 때 바이러스와 결합을 이루는 것일 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 용어 "시알산(sialic acid)"은 시알린산 또는 뉴라민산 이라고도 호칭되며, 피루브산과 만노사민의 알돌축합체인 노이람산이 n-아세틸화, n-글리콜화 또는 o-아세틸화된 화학구조를 갖는 아미노당의 일종을 의미한다.

[0020] 상기 시알산은 바이러스의 헤마글루티닌(HA)과 결합하는 것일 수 있고, 그의 기능을 억제하는 리간드로서 사용되는 것일 수 있다. 상기 리간드로는 시알산 뿐만 아니라 그의 유도체가 사용될 수 있다. 상기 유도체는 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체일 수 있다.

- [0021] 본 명세서에서 용어 “유도체(derivative)”란, 화합물의 일부를 화학적으로 변화시켜서 얻어지는 유사한 화합물을 의미한다. 상기 유도체는 화합물 중의 수소원자 또는 특정 원자단이 다른 원자 또는 원자단에 의하여 치환된 화합물일 수 있다.
- [0022] 일 구체예에 있어서, 상기 시알산은 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid: Neu5Ac 또는 NANA), 2-케토-3-데옥시노산(2-keto-3-deoxynoic acid: Kdn), 알파 2,3 N-결합 시알산(Alpha-2,3 N-linked sialic acid) 및 알파 2,6 N-결합 시알산(alpha-2,6 N-linked sialic acid)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 것일 수 있다.
- [0023] 일 구체예에 있어서, 상기 시알릴락토스의 유도체는 3'-시알릴락토스(3'-Sialyllactose), 6'-시알릴락토스(6'-Sialyllactose), 시알릴락토-N-테트라오스(sialyl lacto-N-tetraose), 디시알릴락토-N-테트라오스(disialyl lacto-N-tetraose), 또는 이의 조합으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 "루시페레이스(luciferase)"는 생물적 또는 화학적 발광을 생성하는 산화 효소를 총칭하는 것이며, 루시페레이스 기질을 산화시켜 화학 발광을 유도하는 효소를 총칭할 수 있다.
- [0025] 상기 나노입자는 루시페레이스(luciferase) 단백을 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 일 구체예에 있어서, 상기 루시페레이스는 레닐라 루시페레이스(Renilla luciferase)일 수 있다.
- [0027] 일 구체예에 있어서, 상기 루시페레이스 단백질은 루시페레이스의 이중 분할 단백질(dual split protein: DSP)일 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 "이중 분할 단백질(dual split protein: DSP)"은, 온전한 1개의 단백질이 두 개의 구조로 나뉘어져 있는 것을 의미한다. 구체적으로, 제1 및 제2 나노입자는 루시페레이스(luciferase)단백을 포함하여, 상기 입자가 융합되는 경우 온전한 루시페레이스(luciferase)가 형성되는 것일 수 있다.
- [0029] 일 구체예에 있어서, 상기 검출용 조성물은 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 및 제2 나노입자가 융합되는 경우, 제1 및 제2 루시페레이스 단백질이 융합하여 온전한 루시페레이스가 생성되고, 상기 루시페레이스가 루시페레이스 기질과 접촉하는 경우 화학발광이 유도되는 것일 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 "화학발광(chemiluminescence)"은 화학반응을 이용하여 빛을 생성하는 것을 의미하여, 외부 광원을 필요로 하지 않을 수 있다. 또한, 용어 "형광(fluorescence)"은 외부 광원으로 인해 반응의 에너지 준위를 높여 빛을 방출하는 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 나노입자는 형광단백질(fluorescence protein)의 단백을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 형광단백질의 단백질은 상기 나노입자가 결합할 경우, 온전한 형광단백질을 생성하여, 형광 반응이 유도되는 것일 수 있다.
- [0033] 상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein: GFP), 플루오레세인(Fluorecein), 바이오디피-FL(Biodipy-FL), 알렉사 플루오로그린(Alexa Fluor Green), R-피코에리트린(R-phycoerythrin), 피코에리트린-텍사스 레드(Phycoerythrin-Texas Red), 피코에리트린-시아닌5(Phycoerythrin-cyanine5), 피코에리트린-시아닌7(Phycoerythrin-cyanine7), 페리딘-클로로필 단백질(Peridinin-chlorophyll protein), 알로피코시아닌(Allophycocyanin) 및 알로피코시아닌-시아닌7 (Allophycocyanin-cyanine7)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질일 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 "녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein: GFP)"은, 238 개의 아미노산 잔기(26.9 kDa)로 구성된 단백질로 청색에서 자외선 범위의 빛에 노출되었을 때 밝은 녹색 형광을 나타내는 단백질을 의미할 수 있다.
- [0035] 상기 나노입자는 공지된 조류 인플루엔자 바이러스 검출 항체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0036] 일 구체예에 있어서, 상기 시알산, 루시페레이스 단백질, 형광 단백질 단백질 또는 항체는 재조합 발현 벡터에 의해 도입 또는 형질감염된 것일 수 있다.
- [0037] 일 구체예에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 아데노연관 바이러스 벡터일

수 있다.

- [0038] 상기 검출용 조성물은 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체, 단백분해효소, 및 제3 루시페레이스 단편이 발현된 제3 나노입자; 및 시알산 또는 시알릴락토스의 유도체, 단백분해효소, 및 제4 루시페레이스 단편이 발현된 제4 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 더 포함하며, 상기 제3 루시페레이스 단편 및 제4 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것일 수 있다.
- [0039] 상기 단백분해효소는 바이러스의 막 단백질의 구조를 분해하는 효소를 총칭하는 것일 수 있다. 구체적으로, 단백분해효소는 바이러스의 막 구조를 분해함으로써, 바이러스가 숙주 세포 안으로 침입할 수 있게 돕는 역할을 하는 것일 수 있다.
- [0040] 상기 단백분해효소는 상기 나노입자에 발현되는 것일 수 있고, 추가적으로 첨가되는 것일 수 있다.
- [0041] 일 구체예에 있어서, 상기 단백분해효소는 TMPRSS2(transmembrane protease serine subtype 2), TMPRSS11a(transmembrane protease serine subtype 11a), TMPRSS11d(transmembrane protease serine subtype 11d) 및 트립신(Trypsin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 것일 수 있다.
- [0042] 상기 제3 및 제4 나노입자를 포함하는 검출용 조성물은 시료 내의 바이러스의 존재를 검출하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 검출용 조성물은 저위험군 조류 인플루엔자 바이러스를 검출하는 것일 수 있다.
- [0043] 일 구체예에 있어서, 고위험군 조류 인플루엔자는 세포를 감염시키는 데에 단백분해효소에 의한 막 단백질의 분해가 필수적이지 않기 때문에, 제1 및 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트로만 검출이 가능하나, 저위험군 조류 인플루엔자 바이러스는 단백분해효소에 의한 막 단백질의 분해가 필요하므로, 제3 및 제4 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 통해 검출이 가능한 것일 수 있다.
- [0044] 일 구체예에 있어서, 상기 검출용 조성물은 조류 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있으며, 동시에 고위험성 조류 인플루엔자 바이러스 여부 또한 확인할 수 있는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 검출은 제1 및 제2 입자에 의한 화학발광 및 제3 및 제4 입자에 의한 화학발광이 모두 유도된 경우 고위험군의 조류 인플루엔자 바이러스; 제3 및 제4 입자에 의한 화학발광만이 유도되는 경우 저위험군의 조류 인플루엔자 바이러스가 검출되는 것일 수 있다. 또한, 상기 제1 및 제2 입자에 의한 화학발광만이 검출되는 경우에는 검출 단계에 오류가 있는 것으로 해석할 수 있다.
- [0045] 일 양상은 시알산(sialic acid) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 시알산 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0046] 상기 검출용 조성물의 제조 방법에서, 검출용 조성물, 조류 인플루엔자 바이러스는 전술한 바와 같다.
- [0047] 상기 방법은, HEK293세포에 루시페레이스 단편 유전자를 PEI를 이용하여 나노입자를 형질전환시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0048] 상기 방법은, 상기 나노입자에 TMPRSS2 유전자를 추가로 형질전환시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 방법은, 형질전환 후 40 내지 50시간 또는 45시간 내지 50시간 후 상층액을 회수하고, 상층액을 10000 xg 에서 7시간 내지 12시간, 8시간 내지 11시간 또는 9시간 내지 10.5시간 원심분리한 후 침전물을 부유시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0050] 다른 양상은 상기 검출용 조성물을 포함하는 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 키트를 제공한다.
- [0051] 상기 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 키트에서, 검출용 조성물, 조류 인플루엔자 바이러스는 전술한 바와 같다.
- [0052] 상기 검출용 키트는 상기 검출용 조성물을 포함하는 진단 스트립 또는 웰(well)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0053] 도 7은 조류 인플루엔자를 검출하기 위한 진단 키트의 구조를 나타낸 도이다. 도 7에 나타낸 것과 같이, 상기 검출용 키트는 진단 스트립 및 상기 진단 스트립을 포함할 있는 하우징을 포함하는 디바이스 형태로 마련될 수 있다.
- [0054] 상기 진단 스트립은 시료 패드 및 루시페레이스 기질 패드를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 진단 스트립은

버퍼 로딩 패드를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다.

- [0055] 일 구체예에 있어서, 상기 시료 패드는 상기 검출용 조성물을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 시료 패드는 생물학적 시료를 투입하는 영역을 별도로 구비할 수도 있다.
- [0056] 상기 생물학적 시료는 개체는 인플루엔자 바이러스 감염이 의심되는 개체로부터 수득한 것일 수 있다.
- [0057] 일 구체예에 있어서, 상기 개체는 포유류 또는 조류일 수 있다. 구체적으로, 상기 개체는 인간, 개, 고양이, 페럿, 햄스터, 마우스, 말, 소, 원숭이, 닭, 참새, 비둘기, 앵무새, 칠면조, 오골계, 침팬치 등일 수 있다.
- [0058] 일 구체예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 적혈구, 백혈구, 유관액, 복수, 늑막 유출물 (pleural efflux), 수유관액(nipple aspirate), 림프액, 골수 흡인물, 타액, 소변, 대변(즉, 배설물), 가래, 기관지 세척액, 눈물, 기타 체액, 조직 시료일 수 있다.
- [0059] 상기 생물학적 시료는 오염물을 제거하는 전처리 과정을 거친 것일 수 있다.
- [0060] 상기 패드의 막(membrane)은 니트로셀룰로오즈(Nitrocellulose), 나일론(Nylon) 또는 PVDF(Polyvinylidene fluoride)일 수 있다.
- [0061] 상기 루시페레이스 기질 패드는 루시페레이스 기질을 포함하는 패드를 의미할 수 있다.
- [0062] 상기 버퍼 로딩 패드는 검출을 위한 버퍼를 부여하는 패드를 의미할 수 있다. 상기 버퍼는 염기성일 수 있다. 구체적으로, pH 1 내지 6, 2 내지 5.5 또는 3 내지 5.5일 수 있으며, 바람직하게는 약 pH 5 내지 5.5일 수 있다.
- [0063] 일 실시예에 있어서, 상기 시료 패드에 생물학적 시료를 투입하고, 상기 버퍼 로딩 패드에 버퍼를 부여하면, 시료 내에 고위험군 조류 인플루엔자 바이러스가 존재하는 경우에는 버퍼가 이동하면서 제1 입자; 제2 입자 및 시료의 복합체가 반응하고, 상기 반응체가 기질과 결합하여 형광 또는 화학 발광을 유도하는 것일 수 있다. 따라서, 상기 검출용 키트는 화학 발광(chemiluminescence) 또는 형광(fluorescence) 검출에 기반한 것일 수 있다.
- [0064] 다른 양상은 시알산(sialic acid) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 시알산 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계; 상기 생물학적 시료와 접촉된 검출용 조성물 세트에 염기성 버퍼를 첨가하는 단계; 및 상기 염기성 버퍼가 첨가된 검출용 조성물 세트에 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 첨가하는 단계를 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러스 검출 방법을 제공한다.
- [0065] 상기 조류 인플루엔자 바이러스, 검출, 인플루엔자 수용체, 나노입자, 루시페레이스, 생물학적 시료, 개체 등은 전술한 바와 같다.
- [0066] 상기 방법은, 조류 인플루엔자가 의심되는 개체에서 수득한 생물학적 시료에서 오염물을 제거하는 전처리를 선 순위로 수행하는 것일 수 있다.
- [0067] 상기 방법은, 상기 시알산(sialic acid) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 시알산 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0068] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 시알산, 단백분해효소, 및 제3 루시페레이스 단편이 발현된 제3 나노입자; 및 시알산, 단백분해효소, 및 제4 루시페레이스 단편이 발현된 제4 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 단계는 상기 유사 입자 및 생물학적 시료를 접촉시키는 단계를 포함함으로써, 상기 입자가 발현하는 시알산과 시료 내의 조류 인플루엔자 바이러스가 결합하는 것일 수 있다.
- [0069] 이후, 상기 방법은, 상기 결합된 검출용 조성물 세트에 염기성 버퍼를 첨가하여 양 입자의 결합으로 인해 입자 내부에 온전한 루시페레이스가 형성되는 단계를 포함한다.
- [0070] 이후, 상기 방법은, 상기 염기성 버퍼가 첨가된 검출용 조성물 세트에 루시페라아제 기질을 처리하여, 결합된 입자 내의 루시페레이스 및 루시페레이스 기질이 반응하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 반응은 산화 반응으로 인한 화학발광일 수 있다.
- [0071] 상기 방법은, 루시페레이스 단편의 융합에 의한 화학 발광을 통해 조류 인플루엔자 바이러스를 검출하는 것일

수 있다.

[0072] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편의 융합, 또는 상기 제3 루시페레이스 단편 및 제4 루시페레이스 단편의 융합에 의한 화학 발광 현상을 통해 조류 인플루엔자 바이러스를 검출하는 것일 수 있다.

[0073] 이후, 상기 방법은 조류 인플루엔자 바이러스 감염 여부를 판단하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0074] 일 구체예에 있어서, 상기 판단하는 단계는 상기 제1 및 제2 입자에 의한 화학발광 및 제3 및 제4 입자에 의한 화학발광이 유도된 경우 고위험군의 조류 인플루엔자 바이러스가 검출된 것으로 판단하는 단계; 제3 및 제4 입자에 의한 화학발광만이 유도되는 경우 저위험군의 조류 인플루엔자 바이러스가 검출된 것으로 판단하는 단계; 또는 상기 제1 및 제2 입자에 의한 화학발광만이 검출되는 경우에는 검출 단계에 오류가 있는 것으로 확인하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

### 발명의 효과

[0075] 일 양상에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물, 키트 및 검출 방법에 따르면, 고병원성의 조류 인플루엔자 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있고, 화학 발광을 기반으로 검출을 수행하여, 고감도 및 저비용의 검출을 수행할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0076] 도 1은 일 양상의 화학발광기반 조류 인플루엔자 진단 기술의 개요를 나타낸 이미지이다.

도 2는 루시페레이스의 이중 분할 단백질을 나타낸 도이다.

도 3은 루시페레이스 분석을 이용하여 이중 분할 단백질의 화학 발광 효과를 확인한 이미지이다.

도 4는 루시페레이스 분석을 이용하여 이중 분할 단백질의 화학 발광 효과를 확인한 것을 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 5는 HA를 발현하지 않는 군, 고위험군 조류 인플루엔자 바이러스 군, 저위험군 조류 인플루엔자 바이러스 군, 저위험군 조류 인플루엔자 바이러스 및 트립신을 처리한 군의 루시페레이스 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 HA를 발현하지 않는 군, 고위험군 조류 인플루엔자 바이러스 군 및 저위험군 조류 인플루엔자 바이러스 군에서 TMPRSS2를 발현시킨 경우(+)와 그렇지 않은 경우(-)의 루시페레이스 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 조류 인플루엔자를 검출하기 위한 진단 키트의 구조를 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 실시예 1. 이중 분할 단백질(DSP)를 포함하는 입자의 자가 조립 특성 확인

[0079] 1.1 이중 분할 단백질을 포함하는 나노입자의 제조

[0080] S15-DSP는 DSP의 N-terminal 에 S15 sequence를 추가하여 제조하였다.

[0081] 이중 분할 단백질(Dual split protein: DSP)을 발현하는 나노입자를 제작하기 위해, HEK293T 세포에 HIV 코어 단백질을 발현하는 플라스미드 및 DSP를 발현하는 플라스미드와 함께 형질감염(co-transfection)시켰다. S15-DSP1-7만을 포함하는 군, S15-DSP-8-11만을 포함하는 군 및 S15-DSP1-7 및 S15-DSP-8-11을 발현하는 군을 이용하여 형질감염을 수행하였다.

[0082] 도 2는 루시페레이스의 이중 분할 단백질을 나타낸 도이다.

[0083] 구체적으로, 상기 DSP를 발현하는 플라스미드는 도 2에 나타난 것과 같이, 루시페레이스 및 녹색 형광 단백질의 단편을 포함하였다. 상기 S15-DSP1-7(서열번호 1 및 2) 또는 S15-DSP-8-11(서열번호 3 및 4)는 레닐라 루시페레이스 및 녹색 형광 단백질의 단편을 발현하고 있는 이중 분할 단백질이다.

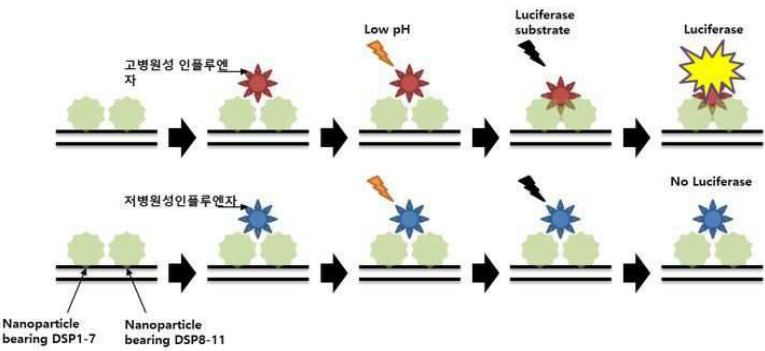
[0084] 1.2 상기 나노입자의 자가 조립 특성 확인

- [0085] 상기 실시예 1.1에서 제조한 유사-바이러스 입자의 화학 발광 효과를 확인하기 위하여, 형질감염후 48시간 후, 세포 내의 녹색형광단백질(GFP)의 발현을 확인하였다. 또한, 상기 유사-바이러스 입자의 세포 상층액을 이용하여 레닐라 루시페레이스 분석(renilla luciferase assay)을 수행하였다.
- [0086] 도 3은 루시페레이스 분석을 이용하여 이중 분할 단백질의 화학 발광 효과를 확인한 이미지이다.
- [0087] 도 4는 루시페레이스 분석을 이용하여 이중 분할 단백질의 화학 발광 효과를 확인한 것을 정량적으로 나타낸 그래프이다.
- [0088] 그 결과, 도 3 및 4에 나타낸 것과 같이, DSP1-7과 DP8-11을 함께 감염시킨 유사-바이러스 세포의 상층액에서 특이적으로 레닐라 루시페레이스 활성이 검출된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, DSP가 세포막 및 나노입자에 효과적으로 도입될 수 있으며, 자가 조립(self-assembly) 특성이 있고, 자가조립 후에만 특이적으로 형광 또는 화학 발광 반응을 보인다는 것을 나타낸다.
- [0089] **실시예 2. 시알산을 발현하는 DSP 나노입자를 이용한 조류 인플루엔자 검출 확인**
- [0090] **2.1 시알산을 발현하는 DSP 나노입자의 제조**
- [0091] DSP1-7 또는 DSP8-11 유전자를 HEK293세포에 PEI를 이용하여 형질전환시켰다. 다음으로, 48시간 후 상층액을 회수하였다. 이후, 상층액을 10000xg에서 10시간 동안 원심분리한 후 침전물을 PBS에 부유시켰다.
- [0092] **2.2 상기 나노입자를 이용한 조류 인플루엔자 바이러스의 검출 확인**
- [0093] 상기 실시예 2.1에서 제조한 시알산을 발현하는 나노입자의 조류 인플루엔자 검출 가부를 확인하기 위하여, 상기 나노입자를 고병원성 조류 인플루엔자바이러스의 HA를 발현하는 슈도바이러스(HPAI), 저병원성 조류 인플루엔자바이러스의 HA를 발현하는 슈도바이러스(LPAI)와 함께 반응시켰다. 이때, HA를 발현하지 않는 슈도바이러스(BALD)를 음성대조군으로 사용하였으며, LPAI는 트립신을 처리한 군과 그렇지 않은 군으로 분류하였다.
- [0094] 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, pH가 5.0인 버퍼와 레닐라 루시페레이스 기질(renilla luciferase substrate)를 차례로 처리한 뒤 레닐라 루시페레이스 활성(luciferase activity)을 측정하였다.
- [0095] 도 5는 HA를 발현하지 않는 군, 고위험군 조류 인플루엔자 바이러스 군, 저위험군 조류 인플루엔자 바이러스 군, 저위험군 조류 인플루엔자 바이러스 및 트립신을 처리한 군의 루시페레이스 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [0096] 그 결과, 도 5에 나타낸 것과 같이, HPAI의 경우, 높은 루시페레이스 활성을 보였으나, LPAI의 경우, 트립신(trypsin)을 처리한 경우에만 높은 루시페레이스 활성을 보였다. 이러한 결과는, 시알산(sialic acid)을 발현하는 나노입자를 이용한 진단법이 고병원성 조류 인플루엔자바이러스를 특이적으로 검출할 수 있음을 나타낸다.
- [0097] **실시예 3. 시알산을 발현하는 DSP 나노입자를 이용한 조류 인플루엔자 검출 확인**
- [0098] **3.1 시알산 및 TMPRSS2를 발현하는 DSP 나노입자의 제조**
- [0099] DSP1-7 또는 DSP8-11 유전자를 TMPRSS2유전자와 함께 HEK293세포에 PEI를 이용하여 형질전환시켰다. 다음으로, 시간 후 상층액을 회수하였다. 이후, 상층액을 10000xg에서 10시간 원심분리한 후, 침전물을 PBS에 부유시켰다.
- [0100] **3.2 상기 나노입자를 이용한 조류 인플루엔자 바이러스의 검출 확인**
- [0101] 상기 실시예 3.1에서 제조한, 시알산 및 TMPRSS2를 발현하는 나노입자 및 시알산만을 발현하는 나노입자의 조류 인플루엔자 검출 가부를 확인하기 위하여, 상기 나노입자를 고병원성 조류 인플루엔자바이러스의 HA를 발현하는 슈도바이러스(HPAI), 저병원성 조류 인플루엔자바이러스의 HA를 발현하는 슈도바이러스(LPAI)와 함께 반응시켰다. 이때, HA를 발현하지 않는 슈도바이러스(BALD)를 음성대조군으로 사용하였다. 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, pH가 5.0인 버퍼와 레닐라 루시페레이스 기질(renilla luciferase substrate)를 차례로 처리한 뒤 레닐라 루시페레이스 활성(luciferase activity)을 측정하였다.
- [0102] 도 6은 HA를 발현하지 않는 군, 고위험군 조류 인플루엔자 바이러스 군 및 저위험군 조류 인플루엔자 바이러스 군에서 TMPRSS2를 발현시킨 경우(+)와 그렇지 않은 경우(-)의 루시페레이스 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [0103] 그 결과, 도 6에서 나타낸 것과 같이, HPAI의 경우, TMPRSS2 존재여부에 상관없이 높은 루시페레이스 활성을 보였다. LPAI의 경우, TMPRSS2가 존재할 경우에만 높은 루시페레이스 활성을 보였다. 이러한 결과는 일 양상의 시알산 발현 나노입자를 이용한 진단법이 고병원성 조류 인플루엔자바이러스를 특이적으로 검출할 수 있음을 나타

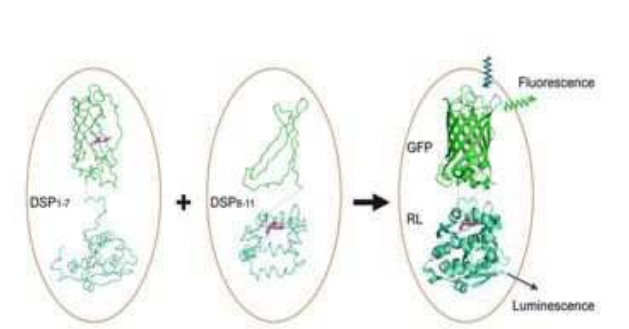
낸다.

도면

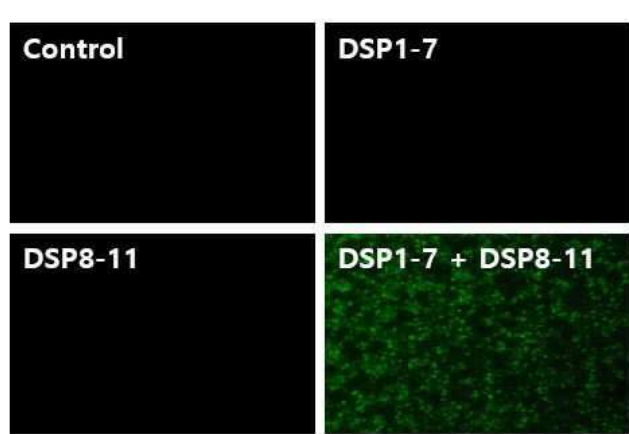
도면1



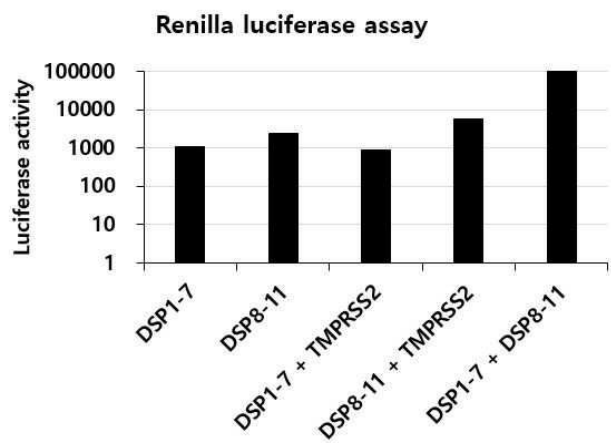
도면2



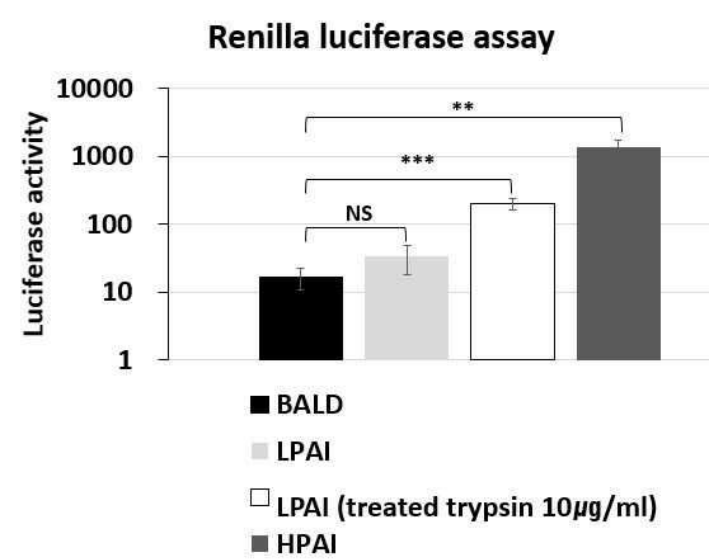
도면3



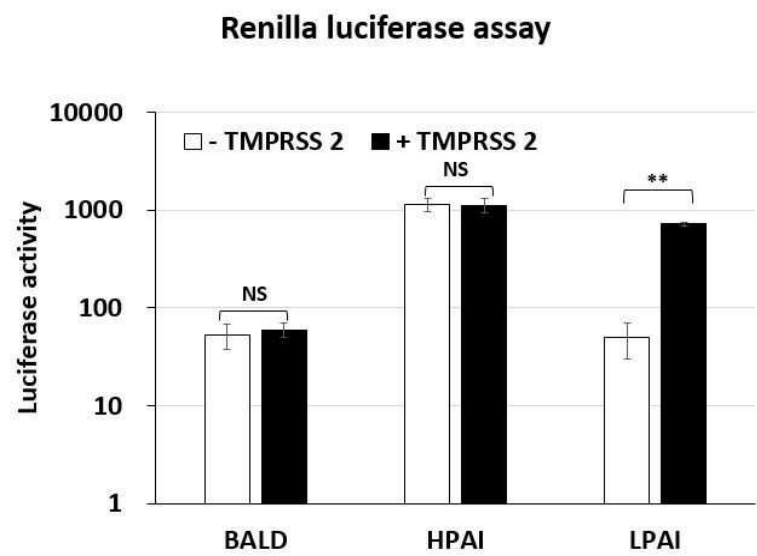
도면4



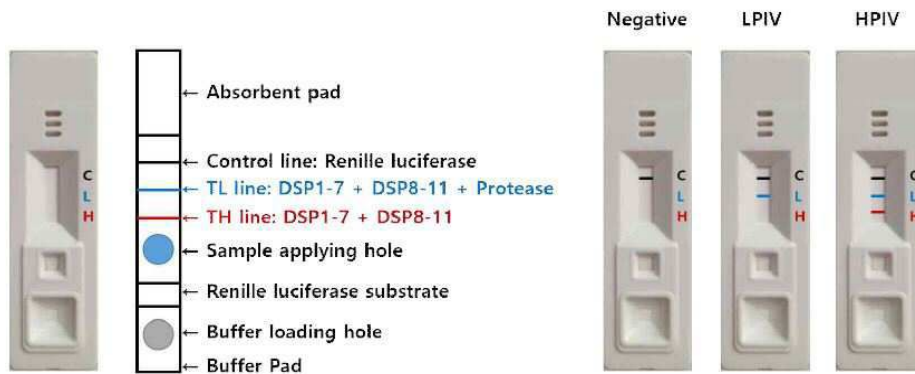
도면5



도면6



도면7



## 서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Composition for detecting avian influenza virus based on chemiluminescence and use thereof

<130> PN135815

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1014

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> the nucleotide of S15-DSP1-7

<400> 1

atggggagca gcaagagcaa gccaaggac cccagccagc gccggaacaa caacaacggg 60

caggtggctt ccaagggtga cgaccccgag caacgcaaac gcatgatcac tgggcctcag 120

tggtgggctc gctgcaagca aatgaacgtg ctggactcct tcatcaacta ctatgattcc 180

gagaagcacg ccgagaacgc cgtgatTTTT ctgcatggta acgctacctc cagctacctg 240

tggaggcacg tcgtgcctca catcgagccc gtggctagat gcatcatccc tgatctgac 300

ggaatgggta agtccggcaa gagcgggaat ggtcatatc gcctcctgga tcactacaag 360

tacctaccg ctgtgttcca gctgtgaac ctccaaaga aaatcatctt tgtgggccac 420

gactgggggg ctgctctggc ctttactac gcctacgagc accaagacag gatcaaggcc 480

atcgtccata tggagagtgt cgtggacgtg atcgagtcct gggacgagtc cggaggaggc 540

ggaatgagca agggcgagga gctgttcacc ggcgtggtgc ccatcctggt ggagctggac 600

ggcgacgtga acggccacaa gttagcgtg agaggcgagg gcgagggcga cgccaccatc 660

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 720  
ctggtgacca ccctgacctg cggcgtgcag tgcttcagca gataccccga ccacatgaag 780  
agacacgact tcttcaagag cgccatgcc gagggctacg tgcaggagag aaccatcagc 840  
ttcaaggacg acggcaagta caagaccaga gccgtggtga agttcgaggg cgacaccctg 900  
gtgaacagaa tcgagctgaa gggcaccgac ttcaaggagg acggcaacat cctgggccac 960

aagctggagt acaacttcaa cagccacaac gtgtacatca ccgccgacaa gtga 1014

<210> 2

<211> 337

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> the amino acid sequence of S15-DSP1-7

<400> 2

Met Gly Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys Asp Pro Ser Gln Arg Arg Asn

1 5 10 15

Asn Asn Asn Gly Gln Val Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg

20 25 30

Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met

35 40 45

Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala

50 55 60

Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr Leu

65 70 75 80

Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile

85 90 95

Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser

100 105 110

Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu

115 120 125

Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala

130 135 140

Ala Leu Ala Phe His Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala

145 150 155 160

Ile Val His Met Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu

165 170 175

Ser Gly Gly Gly Gly Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val

180 185 190

Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe

195 200 205

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

210 215 220

Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro

245 250 255

Asp His Met Lys Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly

260 265 270

Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys

275 280 285

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

290 295 300

Glu Leu Lys Gly Thr Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His

305 310 315 320

Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp

325 330 335

Lys

<210> 3

<211> 774

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> the nucleotide sequence of S15-DSP8-11

<400> 3

atggggagca gcaagagcaa gcccaaggac cccagccagc gccggaacaa caacaacggg 60

caggtgcaga agaacggcat caaggccaac ttcacctga gacacaacgt ggaggacggc 120

agcgtgcagc tggccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg 180  
ctgcccgcaca accactacct gagcaccag accgtgctga gcaaggaccc caacgagaag 240

agagaccaca tgggtgtgca cgagtacgtg aacgccgccg gcatcaccgg cgggtggcgga 300  
tcctggcctg acatcgagga ggatatgcc ctgatcaaga gcgaagaggg cgagaaaatg 360  
gtgcttgaga ataacttctt cgtcgagacc gtgtctccaa gcaagatcat gcggaaactg 420  
gagcctgagg agttcgctgc ctacctggag ccattcaagg agaagggcga ggtagacgg 480  
cctacctctt cctggcctcg cgagatccct ctctgtaagg gaggcaagcc cgacgtcgtc 540  
cagattgtcc gcaactacaa cgcctacctt cgggccagcg acgatctgcc taagctgttc 600  
atcgagtccg accctgggtt cttttccaac gctattgtcg agggagctaa gaagttccct 660

aacaccgagt tcgtgaaggt gaaggcctc cacttcctcc aggaggacgc tccagatgaa 720  
atgggtaagt acatcaagag cttcgtggag cgcgtgctga agaacgagca gtaa 774

<210> 4  
<211> 257  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> the amino acid sequence of S15-DSP8-11  
<400> 4

Met Gly Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys Asp Pro Ser Gln Arg Arg Asn  
1 5 10 15  
Asn Asn Asn Gly Gln Val Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Thr  
20 25 30

Val Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr  
35 40 45  
Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn  
50 55 60  
His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys  
65 70 75 80  
Arg Asp His Met Val Leu His Glu Tyr Val Asn Ala Ala Gly Ile Thr  
85 90 95  
Gly Gly Gly Gly Ser Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile  
100 105 110

Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val  
 115 120 125  
 Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu  
 130 135 140  
 Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg  
 145 150 155 160  
 Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys  
 165 170 175  
  
 Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala  
 180 185 190  
 Ser Asp Asp Leu Pro Lys Leu Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe  
 195 200 205  
 Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe  
 210 215 220  
 Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Leu Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu  
  
 245 250 255  
 Gln