

|                                                                                   |                                                                          |                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                                       | (11) 공개번호 10-2008-0113759<br>(43) 공개일자 2008년12월31일                                                                                                                                                       |
| (51) Int. Cl.<br><i>C07K 7/00</i> (2006.01)                                       | (21) 출원번호 10-2007-0062611<br>(22) 출원일자 2007년06월26일<br>심사청구일자 2007년06월26일 | (71) 출원인<br>울산대학교 산학협력단<br>울산 남구 무거2동 산29<br>(72) 발명자<br>권병세<br>울산광역시 울주군 청량면 삼정리 755 쌍용하나빌<br>리지 307-120<br>김정대<br>울산 남구 무거2동 517-3 새한원룸 105호<br>김창한<br>경북 경주시 충효동 대우2차아파트 203동 402호<br>(74) 대리인<br>신동인 |

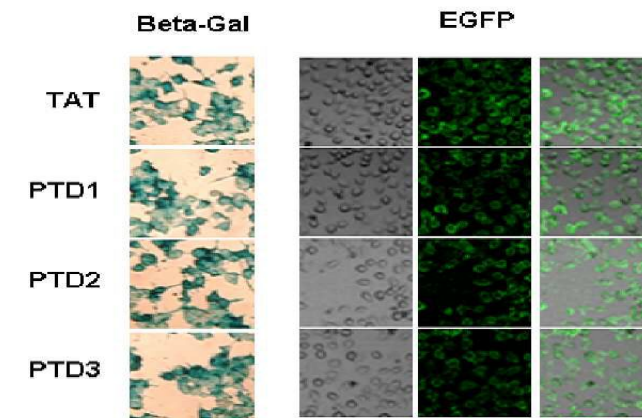
전체 청구항 수 : 총 14 항

#### (54) 신규한 단백질 유입 도메인 및 이의 용도

#### (57) 요약

본 발명은 신규한 단백질 유입 도메인(Protein transduction domain)에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 신규한 3가지의 단백질 유입 도메인들은 기존의 보고된 TAT 단백질 유입 도메인과 상이한 서열을 갖고, 쥐 및 인간에 공통적인 염기서열을 포함하며, 본 발명의 PTD가 세포내 단백질 유입을 유도함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

#### 대표도 - 도5



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 유전자 서열로 표기되는 신규한 단백질 유입 도메인.

### 청구항 2

서열번호 3의 아미노산 서열 또는 서열번호 4의 유전자 서열로 표기되는 신규한 단백질 유입 도메인.

### 청구항 3

서열번호 5의 아미노산 서열 또는 서열번호 6의 유전자 서열로 표기되는 신규한 단백질 유입 도메인.

### 청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신규 단백질 유입 도메인은 그 아미노산 또는 유전자 서열의 전체 또는 단편을 포함함을 특징으로 하는 신규 단백질 유입 도메인.

### 청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 신규 단백질 유입 도메인을 포함하는 벡터.

### 청구항 6

제 5항의 벡터를 포함하는 형질전환체.

### 청구항 7

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 신규 단백질 유입 도메인에 생물학적 활성 분자가 결합된 융합 단백질.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 생물학적 활성 분자는 조절인자, 효소 및 항체와 같은 단백질 또는 펩타이드; 약물과 같은 화학 물질; 탄수화물; 지질; 당지질; 또는 DNA (cDNA 또는 gDNA) 또는 RNA(mRNA 또는 안티센스 RNA)와 같은 뉴클레오타이드 서열임을 특징으로 하는 융합 단백질.

### 청구항 9

신규 단백질 유입 도메인(PTD)-생물학적 활성 분자 융합 단백질을 세포 또는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 생물학적 활성 분자를 세포내에 운반하는 방법.

### 청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 세포는 T세포, B세포, 대식세포, 수지상세포, 내피세포, 상피세포, 각질세포, 근육세포, 섬유아세포, 종양세포, 비장세포, 간세포, 신장세포, 심장조직세포, 비장세포, 임파절세포 또는 신경 세포임을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 11

신규 단백질 유입 도메인(PTD)-생물학적 활성 분자 융합 단백질을 포함하는 약학 조성물.

### 청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 생물학적 활성 분자는 약물임을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 신규 단백질 유입 도메인(PTD)-생물학적 활성 분자 융합 단백질은 조성물 총 중량에 대하여 신규 단백질 유입 도메인(PTD)-생물학적 활성 분자 융합 단백질을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는

약학조성물.

## 청구항 14

제 12항에 있어서, 상기 약물은 항생제, 항암제, 소염진통제, 항바이러스제, 항균제, 골다공증치료제 또는 호르몬임을 특징으로 하는 약학 조성물.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<9> 본 발명은 세포내로 단백질의 유입을 유도하는 3가지의 신규한 단백질 유입 도메인 및 이들의 용도에 관한 것이다.

<10> 1988년 처음으로 HIV-1의 Tat 단백질을 세포 배양액에 첨가시켜 주었을 때 능동적으로 세포 내로 수송되는 현상이 밝혀진 이후 (Green and Loewenstein, *Cell*, 55, pp.1179-1188, 1998), 세포 내로 단백질이 투과(transduction)되는 기전에 대한 연구가 집중되었다. 그 결과 Tat 단백질에 존재하는 단백질 투과 도메인(Protein transduction domain: PTD)의 9개의 염기성 아미노산(RKKRRQRRR)으로 이루어진 부분이 세포막을 통과하는데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (Vives et al., *J.Biol.Chem.*, 272, pp.16010-16017, 1997).

<11> 진핵세포는 외부의 물질이 쉽게 유입되지 않도록 인지질 이중층의 막으로 둘러싸여있다. 이막은 바깥쪽은 친수성이지만 안쪽은 소수성으로 되어있어 대부분의 펩타이드, 단백질, 뉴클레오타이드, 그리고 화합물 등이 세포내로 이동하는 것이 어렵다. 따라서 이러한 막의 성질 때문에 화합물 제제 약물이나 유전자치료제를 세포내로 이동 시켜서 효과를 보는 것은 쉽지가 않고 이 문제를 극복하는 것이 중요한 문제가 되고 있다. 최근 연구에서 이러한 문제점을 극복하기 위하여 PTDs(protein transduction domains)를 사용하여 특정단백질 또는 화합물 질들의 세포내 유입을 시도하는 보고가 많아지고 있다. 처음으로 TAT단백질의 특정부분인 9개 아미노산 염기서열(RKKRRQRRR)이 단백질 유입 부분(PTD)으로 작용한다는 것이 밝혀진 이후에, 이 부분을 여러 단백질에 연결하여 세포내 유입이 효과적으로 되며 이를 통해 세포내에 영향을 줄 수 있다는 보고가 많이 있었다. TAT의 특정 아미노산 염기서열이 PTD기능을 할 수 있는 특성은 양성전하를 띠는 아르기닌(Arg,R) 잔기 때문이며 아르기닌 잔기로만 이루어진 9개의 아미노산 염기서열은 TAT보다 약 20배 이상 높은 세포내 유입효과를 보인다는 보고가 있었다(Wender et.al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, pp.13003-13008, 2000). TAT의 PTD를 이용하여 PTD가 단백질, 화합물, 그리고 DNA의 세포내 유입에 효과적이며 이를 이용하여 질병치료를 위해 효과적인 투여 방법이 될 수 있음을 보여주는 실험결과가 보도되고 있다. 세포주기에 관련하는 단백질인 Cdk 에 대한 억제제인 p27 단백질을 TAT에 연결하여 HepG2 세포에 처리함으로써 세포의 이동성이 증가하는 실험보고가 있었으며(Hikaru nagahara et.al., *Nat. Med.*, 12, pp.1449-1452, 1998). 사멸 신호(death signal)와 관련된 카스파제-8(caspase-8)의 억제제인 FLIP단백질을 TAT와 연결하여 단백질을 획득하여 세포내로 유입시킴으로써 Fas에 의해 유도되는 아포토시스(apoptosis)가 억제되는 보고도 있었다(Stefan Krautwald et.al., *J. Biol. Chem.*, 42, pp.44005-44011, 2004). 그리고 키나제(Kinase) 기능 부분이 없는 Lck 단백질을 TAT 와 연결하여 획득한 후 T세포에 처리함으로써 T세포의 활성을 억제하는 것을 증명한 연구도 있으며(Marc Veldhoen et. al., *Eur J Immunol.*, 35, pp.207-216, 2005), PNP (purine nucleotide phosphorylase) 단백질이 없어서 T세포 결핍과 신경장애가 생기는 질병의 경우에 PNP 단백질을 TAT와 연결하여 획득한 후 처리함으로써 질병이 완화되는 연구결과도 보고되었다(Ana toro et. al., *Cell Immunol.*, 240, pp.107-115, 2006). 또한 TAT 이외에도 PTD의 기능을 하는 것으로 알려진 단백질로써는 초파리의 안타나페디아(antennapedia) 단백질과(Vives et.al., *J. Biol Chem.*, 272, pp.16010-16017, 1997) HSV의 VP22 단백질들이 보고되었다(Elliott et.al., *Cell.*, 88, pp.223-233, 1997). 이 이외에도 SWISS-PROT 데이터베이스(database)의 분석을 통해서 PTD의 기능의 주요 아미노산 염기서열인 Arg를 반복해서 7개이상을 가지는 단백질이 591개 찾아진 바 있다(Ferenc hudecz et.al., *Med Res Rev.*, 6, pp.679-736, 2005) 이러한 단백질들로는 프로타민(protamines), 분비단백질(secretory proteins), G-단백질 연관 수용체(G-protein-coupled receptors), 그리고 바이러스 외피 단백질(Viral coat protein)들이 찾아졌다. 최근에는 새로운 PTD 로써 Hph-1 단백질의 특정 염기서열이 TAT와 상당히 유사하며 동일한 PTD의 역할

을 하고 CTLA4와 연결하여 단백질을 획득하여 알레르기성 염증에 뚜렷한 치료효과를 보이는 것을 보고하였다 (Je-Min Choi et.al., *Nat. Med.*, 5, pp.574-579, 2006). 이는 PTD의 세포내 유입 기능을 이용한 질병 치료의 새로운 투여 방법을 제시하는 것이다. 특정 단백질 뿐만 아니라 항암에 효과적인 화합물을 공유결합으로써 제작함으로써 그 사용범위가 넓어지고 있다(Ferenc hudecz et.al., *Methods Mol. Biol.*, 298, pp.63-76, 2005). 대부분의 잘 알려진 PTD염기서열은 바이러스의 염기서열이기 때문에 최근에 알려진 인간의 hph-1의 PTD부분을 찾은 것은 인간에 투여한다는 관점에서 중요한 발견으로 사료된다. 따라서 인간의 질병 치료 목적에 맞는 투여를 위해서는 인간을 포함한 진핵세포에서 PTD의 기능을 하는 염기서열을 찾고 그 기능을 확인해야할 필요성이 대두되었다.

<12> 따라서 본 발명은 인간을 포함한 포유동물에서 특정 단백질, 화합물 및 DNA 등과 결합하여 세포내로 상기 단백질, 화합물 및 DNA 등의 효과적으로 유입할 수 있는 단백질 유입 도메인을 찾기 위한 노력 끝에, 마우스 및 인간에 존재하는 염기서열을 포함하는 신규한 단백질 유입 도메인들을 발견하였으며, 이들의 세포내 단백질 유입 효과를 확인하고, 유입된 단백질의 질병 치료 효과를 검증하여, 본 발명을 완성하였다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<13> 본 발명의 목적은 세포내 단백질 유입 효과를 갖는 신규한 단백질 유입 도메인(Protein transduction domain) 및 이의 생체내로의 단백질, 화합물 및 DNA 운반 용도를 제공하는 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

<14> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 유전자 서열로 표기되는 신규한 단백질 유입 도메인을 제공한다.

<15> 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열 또는 서열번호 4의 유전자 서열로 표기되는 신규한 단백질 유입 도메인을 제공한다.

<16> 또한, 본 발명은 서열번호 5의 아미노산 서열 또는 서열번호 6의 유전자 서열로 표기되는 신규한 단백질 유입 도메인을 제공한다.

<17> 상기 신규 단백질 유입 도메인들은 그 전체 아미노산 또는 유전자 서열 또는 그의 단편을 포함함을 특징으로 한다.

<18> 본 발명은 상기 신규 단백질 유입 도메인(PTD)들을 포함하는 벡터를 제공한다.

<19> 또한, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

<20> 본 발명의 신규 단백질 도메인(PTD)들은 쥐 및 인간에 존재하는 염기서열을 포함함을 특징으로 한다.

<21> 본 발명의 신규 단백질 유입 도메인(PTD)들은 특정 단백질, 화합물 및 DNA의 세포내 유입을 유도함을 특징으로 한다.

<22> 본 발명은 신규 단백질 유입 도메인(PTD)에 생물학적 활성 분자가 결합된 융합 단백질을 제공한다.

<23> 상기 신규 단백질 유입 도메인(PTD)에 결합 가능한 생물학적 활성 분자는 세포내로 유입되어 일정한 생물학적 효과를 나타내는 물질로서, 조절인자, 효소 및 항체와 같은 단백질 또는 펩타이드, 약물과 같은 화학 물질, 탄수화물, 지질, 당지질 및 DNA (cDNA 또는 gDNA) 또는 RNA(mRNA 또는 안티센스 RNA)와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

<24> 상기 생물학적 활성 분자는 신규 단백질 유입 도메인(PTD)의 N-말단 또는 C-말단에 결합됨을 특징으로 한다.

<25> 상기 결합은 생물학적 활성 분자의 종류에 따라 당업계에 공지된 방법을 이용하여 실시할 수 있으며, 예를 들어, 단백질이 생물학적 활성 분자로 이용되는 경우에는 유전자 재조합 기술을 이용하여 융합 유전자(PTD-단백질을 인코딩 하는 유전자)를 클로닝 및 세포 내 발현을 통해 PTD-단백질을 수득할 수 있다.

<26> 또한, 다양한 혼성 중합체(copolymer)를 이용하여 PTD-생물학적 활성 분자 컨쥬게이트를 수득할 수 있다. 이용 가능한 혼성 중합체는 PTD의 운반 능력 및 생물학적 활성 분자의 활성을 방해하지 않는 것이 이용될 수 있다. 예를 들어, N-숙시니미딜 요오드아세테이트, N-말레이미도부틸틸옥시숙신아미드 에스테르, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠, 디스디아조벤지딘, 3,3-디티오-비스-(설포숙시니미딜-프로피오네이트), 에틸렌 글리콜비

스(설포숙시니미딜숙시네이트), 디시클로헥실 카보디이미드 등이 이용될 수 있으나, 본 발명은 이에 그 범위를 한정하고자 함이 아님이 명백하다. 또한, 생물학적 활성 분자가 PTD로부터 해리되었을 때에만 활성을 나타내는 경우에는 혼성 중합체가 생체내에서 절단 가능한 것이 이용되는데, 예를 들어, 카복실산 에스테르 및/또는 디설파이드 결합이 있는 결합체가 이용될 수 있다.

<27> 본 발명은 상기 PTD-생물학적 활성 분자 융합 단백질을 세포 또는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 생물학적 활성 분자를 세포내에 운반하는 방법을 제공한다.

<28> 상기 방법이 적용될 수 있는 세포는 다양하며, T세포, B세포, 대식세포, 수지상세포, 내피세포, 상피세포, 각질세포, 근육세포, 섬유아세포, 종양세포, 비장세포, 간세포, 신장세포, 심장조직세포, 비장세포, 임파절 세포 및 신경세포를 포함한다.

<29> 본 발명의 신규한 PTD에 컨쥬게이션을 하고자 하는 분자의 분자량이 큰 경우에는 반응시간이 길어지며, 세포에 처리 시에는 대략 22℃ 내지 37℃가 바람직하며 처리 시간은 10분 내지 12시간이 바람직하다.

<30> 또한 본 발명은 상기 PTD-생물학적 활성 분자 융합 단백질을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

<31> 상기 생물학적 활성 분자는 약물임을 특징으로 한다.

<32> 상기 약물은 단백질, 펩타이드, 합성화합물, 추출물 및 핵산을 포함하며, 바람직하게는 항생제, 항암제, 소염진통제, 항바이러스제, 항균제, 골다공증치료제 및 호르몬제를 포함하고, 바람직하게는 항바이러스제임을 특징으로 한다.

<33> 예를 들어, 상기 항생제는 테트라사이클린, 미노사이클린, 독시사이클린, 오픈로록사신, 레보플록사신, 시프로플록사신, 클라리스로마이신, 에리쓰로마이신, 세파클러, 세프트악심, 이미페넴, 페니실린, 겐타마이신, 스트렙토마이신 및 반코마이신 등이 포함되며, 상기 항암제는 메토타렉세이트, 카보플라틴, 탁솔, 시스플라틴, 플루오로우라실, 독소루비신, 에토포사이드, 파클리탁셀, 캄토테신, 사이토신 및 아라비노스 등이 포함되고, 소염진통제는 인도메타신, 이부프로펜, 케토프로펜, 피록시카, 플루비프로펜 및 디클로페낙이 포함되며, 상기 항바이러스제는 아시클로버 및 로바빈 등이 포함되고, 상기 항균제로는 케토코나졸, 이트라코나졸, 플루코나졸, 암포테리신 및 그리세오펜 등이 포함되며, 상기 골다공 치료제는 이피프로펜 등이 포함되고, 그 외의 단백질 및 펩타이드 약물로는 소, 돼지 및 양 등의 동물 성장 호르몬, 인간 성장 호르몬 (hGH), 백혈구 성장 인자 (G-CSF), 상피세포 성장 인자 (EGF), 골 형성 단백질 (BMP), 적혈구 증강제 (EPO), 인터페론 (IFN), 인슐린, 글루카곤, 옥트레오타이드, 칼시토닌, 데카펩틸, 난포자극 호르몬 등의 합성 동족물 또는 변형물 및 이들의 약리학 적 활성 단편, 모노크로날 항체 및 가용성 백신이 포함된다.

<34> 본 발명의 PTD-생물학적 활성 분자 융합 단백질은 조성물 총 중량에 대하여 상기 PTD-생물학적 활성 분자 융합 단백질을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다.

<35> 본 발명의 PTD-생물학적 활성 분자 융합 단백질은 약학적으로 허용 가능한 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<36> 본 발명의 PTD-생물학적 활성 분자 융합 단백질을 포함하는 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 PTD-생물학적 활성 분자 융합 단백질을 포함하는 조성물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<37> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<38> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

#### <39> 실시예 1. 신규 PTD(protein transduction domain)의 탐색

<40> 신규 PTD를 찾기 위해 이전에 보고된 TAT의 PTD 염기서열을 주조로 하여, NCBI의 BLAST에서 비교분석을 수행하였다. 이를 통해 기존의 PTD와 유사한 염기서열을 가진 인간과 쥐의 특정유전자 부분을 확인하였고, 이를 PTD1, PTD2 및 PTD3으로 명명하였으며, 이들의 서열을 하기 표 1 및 도 1에 나타내었다. 이 염기서열들의 PTD 역할에 대한 보고가 없었으며 본 발명에서 이 염기서열들이 신규한 PTD들임을 확인하였다.

표 1

|      | 아미노산 서열            | 유전자 서열                                                  |
|------|--------------------|---------------------------------------------------------|
| PTD1 | GKKKRRQRRR(서열번호 1) | 5' -GGC AAG AAG AAG CGA AAG CAG AGG AGG AGG-3' (서열번호 2) |
| PTD2 | GRRRRRQRRR(서열번호 3) | 5' -GGA CGG CGG CGG CGG CGG CAG CGG CGG CGT-3' (서열번호 4) |
| PTD3 | GRRKRREKRR(서열번호 5) | 5' -GGT AGG AGG AAG AGG CGT GAG AAG CGG AGG-3' (서열번호 6) |

## 실험예 1. 신규 PTD의 클로닝(cloning)

### 1-1. 연쇄중합반응(polymerase chain reaction)

본 발명의 신규 단백질 유입 도메인인 PTD1, PTD2 및 PTD3을 얻기 위해서 서열번호 7 내지 23 및 도 2에 나타낸 서열의 프라이머(primer)를 제작하였으며, 중합효소연쇄반응의 조건은 전-변성(pre-denaturaton) 95℃에서 5분, 95℃ 1분, 55℃ 30초, 72℃ 1분을 35회 반복하였으며, 후-연장(post-elongation)은 72℃에서 5분간 진행하였다. 사용된 각 프라이머의 농도는 0.5pmol이며 디옥시뉴클레오티드(dNTP)는 0.25mM, MgCl<sub>2</sub>의 농도는 2.5mM이 되는 조건에서 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 연쇄중합반응을 수행한 반응액을 1% 아가로스 젤(agarose gel)에 100V로 20분간 전기영동 하였다.

### 1-2. 아가로스 젤에서 DNA분리

전기영동 후에 아가로스 젤은 EtBr용액에서 10분간 염색한 후 UV를 쏘여 생성된 DNA를 확인하고 생성된 DNA부분만을 오려낸다. 오려낸 젤 조각에서 DNA를 분리하기 위하여 키트(Qiagen Gel extraction kit, 제조사, 제품번호 기재 요망)를 사용하였다. 오려낸 젤의 3배 부피의 QC 용액을 첨가하여 50℃에서 10분간 둔 후, 녹은 젤 용액을 컬럼(Qiagen column, 제조사, 제품번호)에 넣고 14,000rpm에서 1분간 원심분리를 하여 통과된 용액은 버리고 다시 PE 용액 750μl를 첨가하여 14,000rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 통과된 용액은 버리고 컬럼에 남아있는 에탄올을 제거하기 위해서 14,000rpm에서 1분간 원심분리 후, 20μl의 용출 완충액(elution buffer)을 넣고 다시 14,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 통과된 용액의 일부분을 라이게이션(ligation) 반응에 사용하였다.

### 1-3. 라이게이션 반응(Ligation reaction)

라이게이션(ligation) 반응에서는 50ng의 분리된 DNA조각과 1μl(50ng)의 pGEM-T 이지 벡터(pGEM-T Easy vector, promega사)와 1μl의 라이게이즈 효소 및 2X 리가아제(ligase) 완충액 5μl를 넣고 전체 부피가 10μl가 되도록 증류수를 넣어 맞춘 후, 16° C에서 1시간 반응 후에 대장균(DH5α E. coli strain, Invitrogen)에 형질전환(transformation)을 수행하였다.

### 1-4. 형질전환(transformation)

형질전환을 하기 위해서 라이게이션 반응액 5μl를 형질전환용 대장균에 넣고 잘 섞은 후, 얼음에서 30분간 반응을 하고 42℃에서 90초간 열을 가하였다. 열을 가한 대장균에 LB배지 1ml를 넣고 37° C 배양기에서 200rpm의 조건에서 1시간 동안 배양하였다. 배양된 대장균은 항생제(ampicillin)가 들어있는 LB 플레이트에 깔고 16시간 동안 37° C 배양기에서 배양하였다.

### 1-5. 플라스미드 DNA분리

플라스미드 DNA를 분리하기 위해서 형질 전환된 콜로니를 항생제가 들어있는 액체 LB배지에 접종하여 37° C 배양기에서 200rpm의 속도로 흔들면서 16시간 동안 배양하였다. 충분히 배양된 형질 전환된 대장균을 14,000rpm에서 1분간 원심분리하여 침전시킨 후, 상층액은 버리고 침전물에 100μl의 용액 I(50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0)를 넣어 잘 섞고 5분간 실온에서 반응 후, 200μl의 용액 II(0.2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS)를 넣고 조심스럽게 5번 뒤집었다. 이 반응액에 150μl의 용액 III(5M Potassium acetate 60ml, Glacial acetic acid 11.5ml, H<sub>2</sub>O 28.5ml)를 넣고 조심스럽게 5번 뒤집은 후에 14,000rpm에서 10분간 원심 분리하여, 상층액을 새 튜브(tube)에 옮기고 450μl의 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 실온에서 10분간 두고 14,000rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상층액은 버리고 침전물을 RNase A가 들어있는 20μl의 TE 완충액을 처리하였다.

### 1-6. 제한효소 절단(restriction enzyme digestion)

단백질 발현용 플라스미드인 pET21a로 PTD 유전자부분을 옮기기 위해서 NheI과 BamH I의 제한효소로 절

단하여 플라스미드와 PTD 유전자들을 준비하여 상기 실시예 1-3에 기재된 방법으로 라이게이션 후, 형질전환용 대장균에 옮겨서 단백질 발현용 플라스미드를 준비하였다. 또한 CTLA4, EGFP, 그리고  $\beta$ -gal 은 EcoR I과 Xho I 으로 절단하여 PTD들이 들어있는 pET21a로 옮겼다. 준비된 플라스미드의 맵(map)을 도 3에 나타내었다.

## <55> 실험예 2. 신규 PTD 단백질들의 생성 및 분리

### <56> 2-1. PTD단백질의 유도

<57> PTD와 연결된 단백질들을 얻기 위해 PTD 1, PTD 2 및 PTD 3 유전자와  $\beta$ -Gal, EGFP, CTLA4 또는 CTLA4 변이체가 삽입된 pET21a 벡터를 포함한 BL21(DE3)pLysS를 우선 5ml의 LB에 접종하여 37° C에서 12시간 배양하였다. 배양된 세포를 50ml의 LB에 재접종하여 37° C에서 흡광도 값이 OD<sub>600</sub>에서 0.5가 될 때까지 배양하였다. 흡광도 값이 OD<sub>600</sub>에서 0.5가 되면 단백질의 생성을 유도하기 위해 IPTG의 농도가 0.5mM이 되도록 넣어 주고, 37°C에서 6시간 동안 배양하여 단백질 생성을 유도하였다. 6시간 후, 단백질의 생성을 유도한 세포를 원심분리 하여 모은 후, 5ml의 라이시스 완충액(lysis buffer, 6M urea, 20mM Tris-HCl(pH8.0))에 녹였다. 라이시스 완충액에 녹인 세포를 12,000rpm으로 4° C에서 20분간 원심분리 하여 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 옮긴 상층액을 His-tag 아가로스 비드(agarose bead, peptron)와 1시간 반응시킨 후 3000g에서 10초간 원심분리 후 상층액을 버렸다. 반응 후의 His-tag 아가로스 비드는 컬럼에 옮겨서 세척 용액 (6M urea, 20mM Tris-HCl(pH8.0), 300mM NaCl)을 넣고 씻은 후 리폴딩 용액 (refolding solution: 20mM Tris-HCl(pH8.0), 300mM NaCl, 20mM imidazole)으로 다시 세척하였다. 이후에 용출 완충액 (20mM Tris-HCl(pH8.0), 300mM NaCl, 250mM imidazole)을 넣고 His-tag 아가로스 비드에 붙어있던 단백질을 녹여냈다. 이렇게 정제된 단백질은 1xPBS를 이용하여 투석을 하고 농도를 확인하고 실험에 사용되었다. 순수 분리한 후 단백질 전기영동을 실시하여 정제된 단백질들을 확인하여 도 4에 나타내었다.

### <58> 2-2 순수 분리된 단백질의 전기영동

<59> 정제된 단백질을 확인하기 위해서 18% SDS-PAGE를 만들어 100V에서 2시간 동안 전기영동을 실시하였다. 18% 겔을 만들기 위해서 30% 아크릴아마이드 용액(아크릴아마이드: 비스아크릴아마이드, 29:1) 6ml과 2.5ml의 1.5M 트리스(Tris, pH8.8), 1.3ml의 dH<sub>2</sub>O, 100 $\mu$ l의 10% SDS, 100 $\mu$ l의 10% 과황산암모늄(ammonium persulfate) 및 40 $\mu$ l의 TEMED를 잘 섞은 후에 0.75nm의 콤(comb)이 끼워져 있는 유리판 사이에 용액을 부어 겔을 만들었다. 굳은 겔 위에 상층 겔을 만들기 위해서 30% 아크릴아마이드 용액 (아크릴아마이드: 비스아크릴아마이드=29:1) 0.33ml과 0.25ml의 1M 트리스(pH6.8), 1.4ml의 dH<sub>2</sub>O, 20 $\mu$ l의 10% SDS, 20 $\mu$ l의 10% 과황산암모늄 및 2 $\mu$ l의 TEMED를 넣고 잘 섞은 후에 굳은 겔 위에 붓고, 상층 겔까지 굳은 후에 정제된 단백질을 샘플버퍼와 섞은 후에 웰(well)에 로딩(loading)하여 100V에서 2시간 동안 전기영동 하였다.

### <60> 2-3. 순수 분리된 단백질의 정량

<61> 순수 분리된 단백질의 정량을 위해서 BCA 키트(제품 번호, Pierce사)를 사용하였으며 구체적인 방법으로는 BCA키트에 포함되어 있는 용액 A와 용액 B의 비율이 50:1이 되도록 잘 섞고 정제된 단백질 10 $\mu$ l에 90 $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응 후 VICTOR2(Chayun Lab)를 이용하여 575nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## <62> 실험예 3. PTD 단백질의 세포내 유입 실험

### <63> 3-1. 배양 세포의 배지에 PTD 단백질의 처리

<64> 293 세포주, Hela 세포주 (세포주 기탁 기관 및 기탁 번호 기재 요망)를  $2 \times 10^5$  웰/세포가 되도록 24 웰 플레이트에 갈아주고 12시간 후에 순수 정제된 TAT- $\beta$ -Gal, PTD1- $\beta$ -Gal, PTD2- $\beta$ -Gal, PTD3- $\beta$ -Gal, TAT-EGFP, PTD1-EGFP, PTD2-EGFP 및 PTD3-EGFP 단백질들을 각각 최종농도 10 $\mu$ M이 되도록 처리한 후, 12시간째에  $\beta$ -Gal 단백질을 처리한 세포주들은  $\beta$ -갈락토시다제 분석( $\beta$ -Galactosidase assay)을 수행하였고, EGFP 단백질을 처리한 세포주들은 형광현미경으로 형광을 띄는지 확인하였다. 형광현미경으로 관찰한 결과를 도 5에 나타내었다.

### <65> 3-2. $\beta$ -갈락토시다제 분석

<66>  $\beta$ -Gal 단백질을 처리한 세포주들에 각 단백질들이 세포내로 유입이 되었는지를 확인하기위하여  $\beta$ -갈락토시다제 분석을 수행하였다. 우선 플레이트에서 배지를 제거하고 1ml의 1X PBS를 이용하여 세포를 씻은 후, 2ml의 1X 고정액 (20% formaldehyde, 2% glutaraldehyde,가 녹아있는 1X PBS)을 첨가하여 10분간 세포를 고

정하였다. 10분 후에 고정액을 제거하고 1X PBS로 세척하고, 1mL의 염색액 (40mM potassium ferricyanide, 40mM potassium ferrocyanide, 20mM magnesium chloride)을 첨가하여 37°C에서 15분간 반응하였다. 염색 후에 1X PBS로 3번 씻은 후에 광학현미경으로 파랑색의 염색정도를 확인하였고, 상기 염색방법에 의한 PTD 1, PTD 2 및 PTD 3단백질의 유입을 확인하여 도 5에 나타내었다.

### 3-3. 쥐의 눈에 PTD 단백질의 처리

세포주 뿐만 아니라 쥐에도 단백질이 내부로 효율적으로 유입이 되는지를 확인하기 위해서 쥐의 눈에 5  $\mu$ g의 PTD3-EGFP 단백질을 5  $\mu$ L의 양으로 떨어뜨린 후 2시간, 12시간, 24시간째에 쥐를 희생하여 눈을 획득하여, 형광 현미경으로 관찰하였다.

### 3-4. 조직학적 분석

획득한 눈은 몰드(mold)에 넣고 눈이 덩어리도록 TSS 용액을 첨가하고 드라이아이스에서 순간적으로 얼렸다. 이렇게 준비된 눈 조직은 마이크로톰(microtome)을 이용하여 10  $\mu$ m의 두께로 절편 하여 슬라이드 글라스(slide glass)에 옮겨 실온에서 완전히 말린 후 형광현미경으로 관찰하였다. 관찰한 결과를 도 6에 나타내었다.

실험 결과, 본 발명의 PTD 단백질에 의해 세포주 뿐만 아니라 쥐의 내부에도 단백질이 유입됨을 확인하였다.

## 실험예 4. 순수 T 세포(Naive T cell)와 THP-1의 IL2생성에 대한 PTD-CTLA4의 억제효과

### 4-1. 순수 T 세포(Naive T cell)의 분리와 JURKAT(Jurkat) 세포주의 배양

세포 현탁액은 Balb/c 쥐의 림프절과 비장으로부터 준비하여 CD4+와 CD8+세포를 분리하였다. 분리방법은 미테니 바이오테크(Miteny Biotec)사의 실험방법(reference가 있으면 기재 요망)을 따라 수행하였다. 세포의 비 특이적인 결합을 제거하기 위하여 항-Fc  $\gamma$ R 항체(2.4G2 클론, BD Pharmingen)를 첨가하여 10분간 반응한 후 항-CD8 마이크로비드를 넣고 15분간 4°C에서 반응시킨 후 LS 컬럼을 사용하여 CD8+ 세포를 분리하였다. CD8+ 세포를 분리하고 남은 세포들에 항-CD25 마이크로비드를 첨가하여 15분간 반응시킨 후, LS 컬럼을 통해 조절 T세포인 CD4+CD25+를 제거하여 얻은 CD25- 세포들에 항-CD4 마이크로비드를 첨가하여 15분간 4°C에서 반응시킨 후 LS 컬럼을 사용하여 CD4+세포를 분리하였다. 분리된 CD8+와 CD4+세포의 순도는 유세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 >95%의 순도를 확인하였다. JURKAT 세포주는 10% FBS가 들어있는 DMEM 배지를 사용하여 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 4-2. 순수 T 세포(Naive T cell)와 THP-1에 PTD-CTLA4 단백질의 처리

$1 \times 10^6$ 의 CD4+와 CD8+세포를 0.1  $\mu$ g/mL의 항-CD3 항체(145-2C11 클론, BD Pharmingen)가 부착된 96웰 플레이트에 넣고 0.25  $\mu$ g의 항-CD28 항체를 용액의 상태로 첨가하였다.  $5 \times 10^5$ 의 JURKAT(Jurkat) 세포를 동일한 방법으로 준비하였다. 준비된 각 세포들에 CTLA4, PTD3-CTLA4 및 PTD-CTLA4 변이 단백질들을 최종농도 10pM이 되도록 처리하고 48시간 후에 배지를 획득하여 IL-2의 생성정도를 ELISA방법으로 측정하였다.

### 4-3. ELISA 분석법

세포 배양 상층액을 사용하여 IL-2의 생성정도를 측정하기 위해 ELISA를 제조사(R&D systems)의 방법에 따라 수행하였다. 단일 항-IL-2 항체를 96 웰 플레이트에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 1X PBS로 세척하고, 각 상층액 200  $\mu$ L를 웰에 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 5% BSA가 포함된 1X PBS를 첨가하여 2시간 동안 실온에서 반응 시키고, 비오틴(biotin)이 결합된 단일 항-IL-2 항체를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 각 반응 후에는 200  $\mu$ L의 PBS로 5번 세척하였다. 스트렙타비딘-HRP(streptavidin-HRP)를 첨가하여 실온에서 1시간 반응 후 발색 반응을 보기위해 기질인 TMB(pierce)시약을 첨가하여 실온에서 30분간 반응 후 0.2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣고 반응을 정지시킨 후, VICTOR2(제품번호, Chayoon Lab)를 이용하여 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. ELISA를 통한 IL-2의 생성정도를 측정한 결과를 도 7에 나타내었다.

실험 결과, PTD3-CTLA4 단백질의 처리로 IL2생성이 억제됨을 확인할 수 있었다.

## 실험예 5. 쥐에서 HSV의 감염에 의한 각막염의 유도

### 5-1. HSV 감염

8주된 Balb/c쥐를 마취시킨 후에 눈을 30 게이지의 바늘을 사용하여 격자모양으로 긁은 눈에,  $5 \times 10^3$  의 HSV-1 RE 세포주를  $5\mu\text{l}$ 의 양을 떨어뜨린 후에 눈 주변을 부드럽게 비벼주며 떨어뜨린 용액이 잘 마르도록 둔다.

#### 5-2. 각막염이 유도된 쥐에 PTD-CTLA4 단백질의 처리

HSV-1 RE 세포주의 감염 후 일주일 뒤에 각막염이 유도된 쥐의 눈에 CTLA4, PTD3-CTLA4 및 PTD3-CTLA4 변이 단백질을 매일 이틀 간격으로  $5\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ 씩 투여하였다. 실험대조군으로 PBS를  $5\mu\text{l}$  투여하였다.

#### 5-3. 조직학적 분석

HSV-1 RE 세포주의 감염 19일 후에 쥐를 희생하여 눈을 획득하였다. 획득한 눈은 폴드에 넣어 눈이 덥히도록 TSS 용액을 첨가하고, 드라이아이스에서 순간적으로 얼렸다. 이렇게 준비된 눈 조직을 마이크로톰을 이용하여  $10\mu\text{m}$ 의 두께로 절편 하여 슬라이드 글라스(slide glass)에 옮겨 실온에서 완전히 말렸다. 준비된 눈 절편은 H&E 염색을 한 후에 광학 현미경을 사용하여 관찰하였다. 관찰한 결과를 도 8에서 나타내었다.

실험 결과, 각막염이 유도된 쥐에서 본 발명의 PTD와 결합된 PTD-CTLA4 단백질이 세포내로 효과적으로 침투되어, 각막염의 치료 효과를 확인할 수 있었다.

[이 발명을 지원한 국가연구개발사업]

[과제고유번호]

R11-1999-057-01000-0

[부처명]

과학기술부

[연구사업명]

우수연구센터 육성사업

[연구과제명]

공동자극분자인 4-1BB에 의한 T-세포 활성화 기작연구

[주관기관]

울산대학교

[연구기간]

1999.07.01~2008.02.28

### 발명의 효과

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 신규한 3가지의 단백질 유입 도메인들은 쥐 및 인간에 공통적인 염기서열로서, 세포 투과력 및 조직 침투력이 우수하여, 세포내로 단백질 유입을 유도하므로, 본 발명의 신규한 단백질 유입 도메인들은 세포내로 전달하고자 하는 생물학적 활성 분자의 세포내 유입에 응용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

도 1 이전에 보고된 PTD인 TAT와 염기서열 비교 결과를 나타내는 도이며,

도 2는 본 발명에 사용된 프라이머들의 서열을 나타내는 도이고,

도 3은 제작된 플라스미드 맵(map)들을 나타내는 도이며,

도 4는 제작된 PTD 플라스미드들로부터 단백질로 발현됨을 확인한 도이고,

도 5는 PTD- $\beta$ -Gal 단백질이 세포내로 유입 되었는지를 확인한 도이며,

- <6> 도 6은 PTD3-EGFP 단백질이 쥐의 눈 안으로 단백질이 유입되었는지를 형광 현미경으로 관찰한 도이고,  
 <7> 도 7은 PTD3-CTLA4 단백질에 의해서 IL-2의 생성이 억제됨을 확인한 도이며,  
 <8> 도 8은 PTD-CTLA4 단백질 투여 후, 각막염 모델에서의 효과를 확인한 도이다.

## 도면

### 도면1

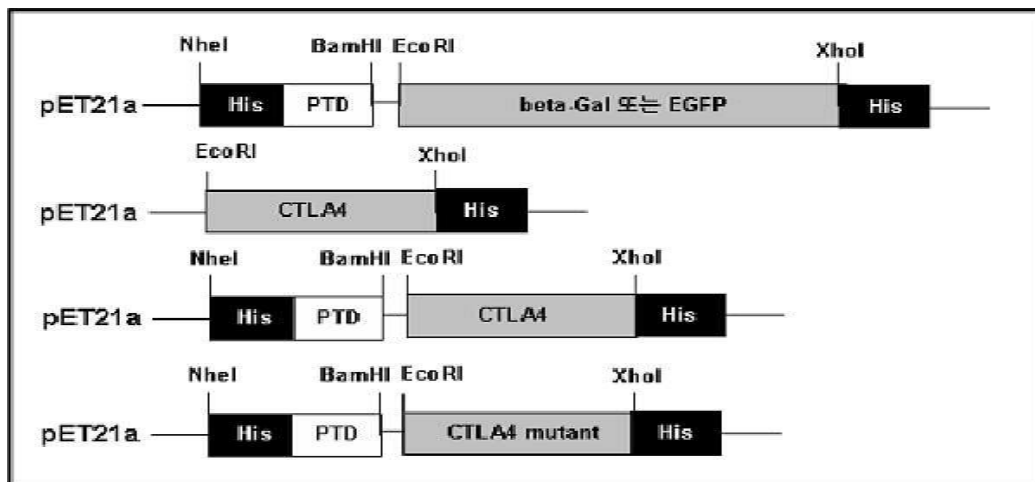
PTD1:GKKKKRQRRR (ACCESSION AL389875, fer-1-like 4 (C. elegans) (Homo sapiens))  
 PTD2:GRRRRRQRRR (ACCESSION NM\_176998, Golgi-localized syntaphilin-related protein isoform A (Mus musculus))  
 PTD3:GRRKKREKRR (ACCESSION NM\_004798, Homo sapiens kinesin family member 3B (KIF3B), mRNA)

|      |             |      |             |
|------|-------------|------|-------------|
| TAT  | YGRKKRQRRR  | TAT  | YGRKKRQRRR  |
| PTD1 | -GKKKKRQRRR | PTD1 | -GKKKKRQRRR |
|      | *:***:****  | PTD2 | -GRRRRRQRRR |
|      |             | PTD3 | -GRRKKREKRR |
|      |             |      | *::*:***    |
| TAT  | YGRKKRQRRR  |      |             |
| PTD2 | -GRRRRRQRRR |      |             |
|      | **::*****   |      |             |
| TAT  | YGRKKRQRRR  |      |             |
| PTD3 | -GRRKKREKRR |      |             |
|      | **::***:*** |      |             |

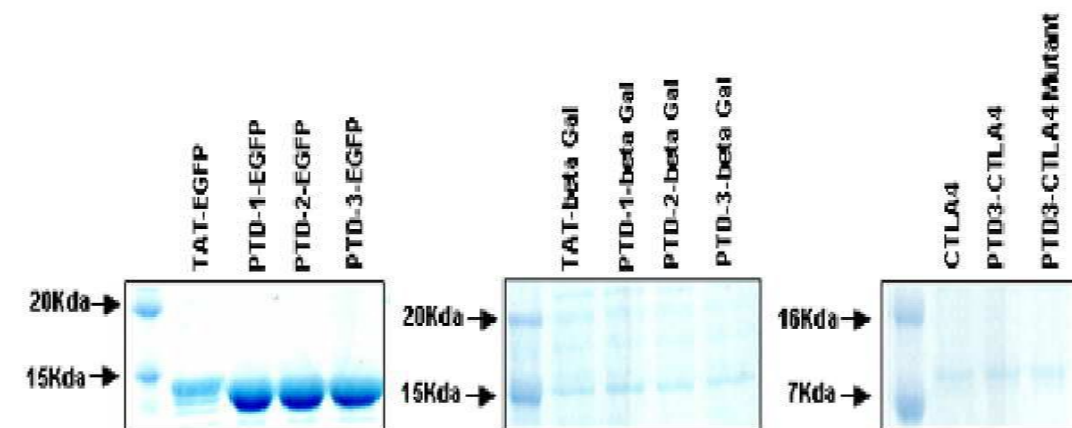
### 도면2

|    | 프라이머 명칭           | 염기서열                                                  |
|----|-------------------|-------------------------------------------------------|
| 1  | TAT-Forward       | 5'-cat atg cac cac cac cac cac tat ggc agg aag-3'     |
| 2  | TAT-Reverse       | 5'-gga tcc tgc tgc tgc ctg tct ccg ctt ctt cct gcc-3' |
| 3  | PTD1-Forward      | 5'-cat atg cac cac cac cac cac cac ggc aag aag aag-3' |
| 4  | PTD1-Reverse      | 5'-gga tcc gcc ctt cct cct cct ctg ctt tgc ctt ctt-3' |
| 5  | PTD2-Forward      | 5'-cat atg cac cac cac cac cac cac gga cgg cgg cgg-3' |
| 6  | PTD2-Reverse      | 5'-gga tcc ccc acc cgg cgg cgg ctg ccg ccg ccg ccg-3' |
| 7  | PTD3-Forward      | 5'-cat atg cac cac cac cac cac cac ggt agg agg aag-3' |
| 8  | PTD3-Reverse      | 5'-gga tcc acc ttc cct ccg ctt ctc tgc cct ctt cct-3' |
| 9  | EGFP-Forward      | 5'-gaa ttc atg gtg agc aag ggc-3'                     |
| 10 | EGFP-Reverse      | 5'-ctc gag tta ctt gta cag ctc-3'                     |
| 11 | betaGal-Forward   | 5'-gaa ttc atg agt att caa cat-3'                     |
| 12 | betaGal-Reverse   | 5'-ctc gag cca atg ctt aat cag-3'                     |
| 13 | mCTLA4-Forward    | 5'-gaa ttc aag atg cta aag aaa-3'                     |
| 14 | mCTLA4-Reverse    | 5'-ctc gag gtt gat ggg aat aaa-3'                     |
| 15 | mCTLA4Mu-Forward  | 5'-gtc ttt gtg aaa atg ccc-3'                         |
| 16 | mCTLA4Mu-Reverse1 | 5'-ggg cat ttt cac aaa gac-3'                         |
| 17 | mCTLA4Mu-Reverse2 | 5'-ctc gag gtt gat ggg aat aaa aaa-3'                 |

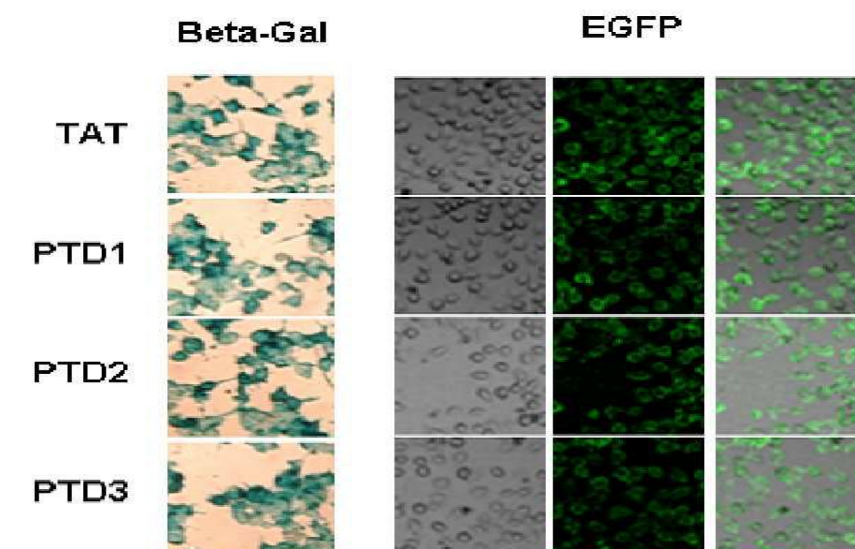
도면3



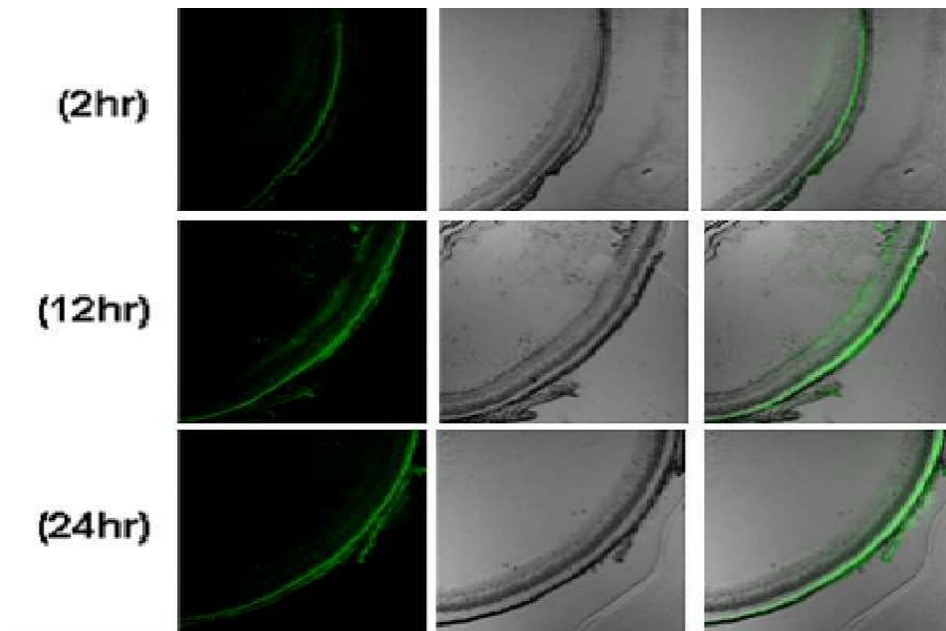
도면4



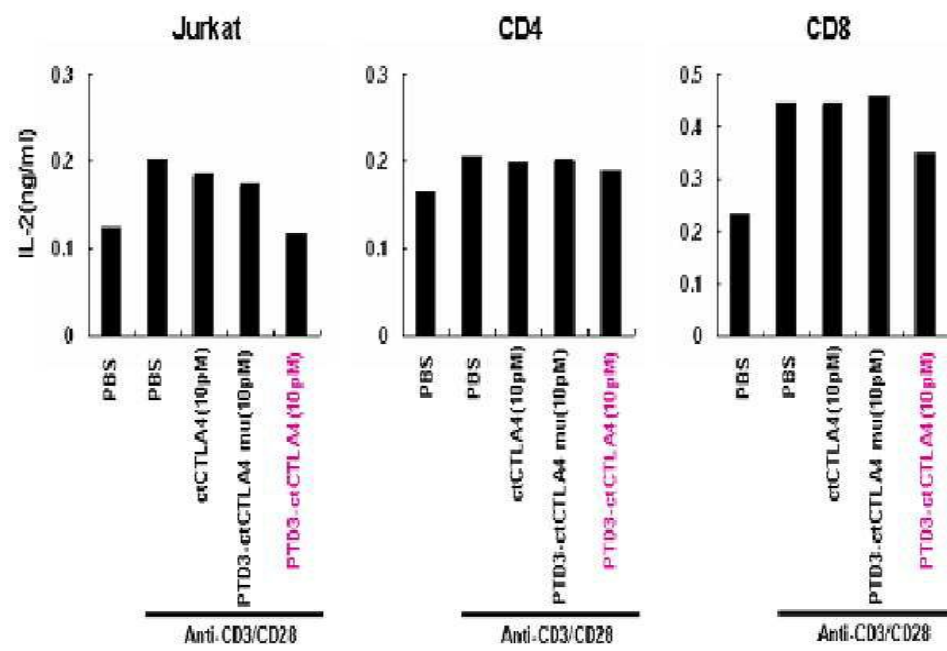
도면5



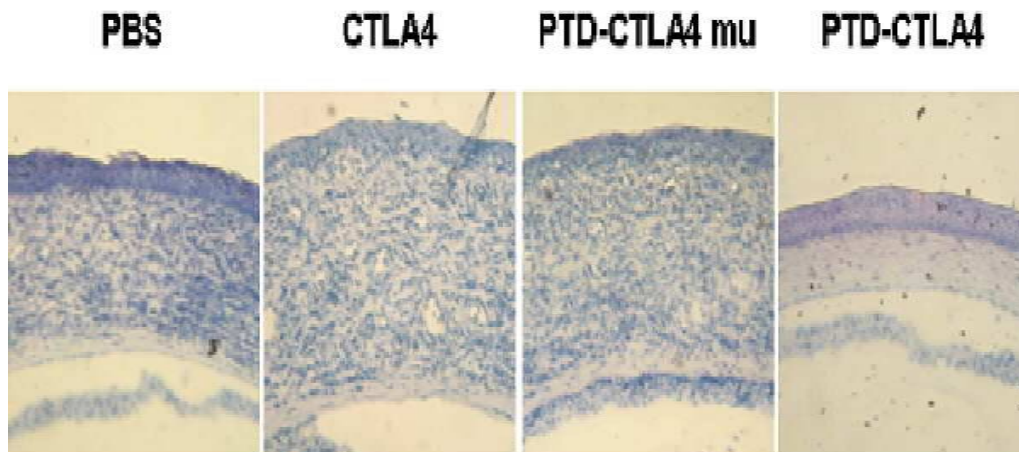
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> ULSAN INDUSTRIAL EDUCATION FOUNDATION  
<120> Novel protein transduction domain(PTD) and the use thereof

<130> DIF/070505/MR

<160> 23

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of PTD1

<400> 1

Gly Lys Lys Lys Arg Lys Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Gene sequence of PTD1

<400> 2

ggcaagaaga agcgaaagca gaggaggagg

30

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of PTD2

<400> 3

Gly Arg Arg Arg Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Gene sequence of PTD2

<400> 4

ggacggcggc ggcgcgaggca gcggcggcgt

30

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of PTD3

<400> 5

Gly Arg Arg Lys Arg Arg Glu Lys Arg Arg

1                      5                      10

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Gene sequence of PTD3

<400> 6  
 ggtaggagga agaggcgtga gaagcggagg 30

<210> 7  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TAT-Forward primer

<400> 7  
 catatgcacc accaccacca ccactatggc aggaag 36

<210> 8  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TAT-Reverse primer

<400> 8  
 ggatcctcgt cgtcgtgtc tccgcttctt cctgcc 36

<210> 9  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> PTD1-Forward primer

<400> 9

catatgcacc accaccacca ccacggcaag aagaag

36

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PTD1-Reverse primer

<400> 10

ggatccgcc ttctcctcc tctgctttcg cttctt

36

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PTD2-Forward primer

<400> 11

catatgcacc accaccacca ccacggacgg cggcgg

36

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PTD2-Reverse primer

<400> 12

ggatccccc cgccgccgct gccgccgccg ccgccg 36

<210> 13  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> PTD3-Forward primer

<400> 13  
 catatgcacc accaccacca ccacggtagg aggaag 36

<210> 14  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> PTD3-Reverse primer

<400> 14  
 ggatccacct tccctccgct tctctgcct cttcct 36

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> EGFP-Forward primer

<400> 15  
 gaattcatgg tgagcaaggg c 21

<210> 16  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> EGFP-Reverse primer

<400> 16  
ctcgagttac ttgtacagct c 21

<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Beta Galactosidase-Forward primer

<400> 17  
gaattcatga gtattcaaca t 21

<210> 18  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Beta galactosidase-Reverse primer

<400> 18  
ctcgagccaa tgcttaatca g 21

<210> 19  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> mCTLA4-Forward primer

<400> 19

gaattcaaga tgctaaagaa a 21

<210> 20  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> mCTLA4-Reverse primer

<400> 20  
 ctcgaggttg atgggaataa a 21

<210> 21  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> mCTLA4Mu-Forward primer

<400> 21  
 gtctttgtga aaatgccc 18

<210> 22  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> mCTLA4Mu-Reverse primer 1

<400> 22  
 gggcattttc acaaagac 18

<210> 23  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> mCTLA4Mu-Reverse primer 2

<400> 23

ctcgaggttg atgggaataa aaaa

24