(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0109947
(43) 공개일자 2019년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/765 (2006.01) *C12N 15/67* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/765 (2013.01)
C12N 15/67 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0031683
(22) 출원일자 2018년03월19일
심사청구일자 2018년03월19일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
최한석
서울특별시 송파구 석촌호수로18길 9(석촌동)
응우엔민딴
서울특별시 광진구 광나루로 430-3(화양동), 102호
(74) 대리인
특허법인이룸리온

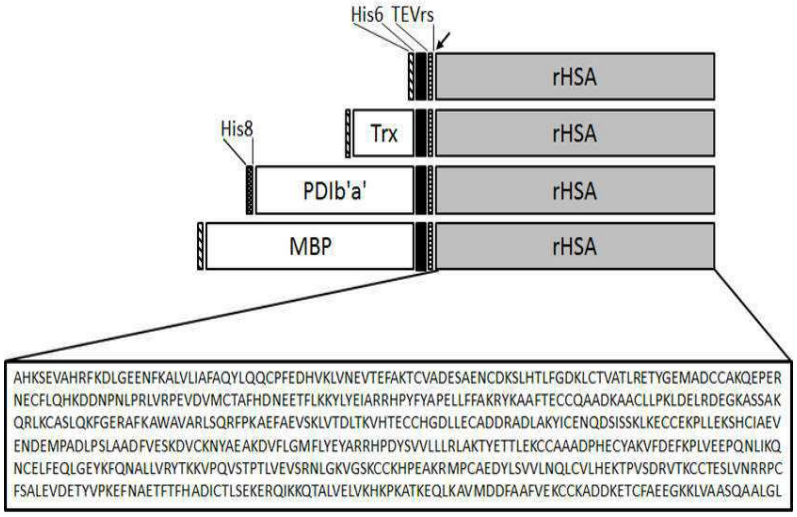
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 인간 혈청 알부민의 수용성 과발현 및 정제 방법**

(57) 요 약

본 발명은 재조합 인간 혈청 알부민의 수용성 과발현 및 정제 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag)를 코딩하는 유전자 및 인간 혈청 알부민 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포 및 이를 이용한 재조합 단백질의 생산 방법, 및 상기 방법으로 생산된 재조합 인간 혈청 알부민을 제공한다. 본 발명에 따른 재조합 발현벡터 또는 재조합 인간 혈청 알부민의 생산 방법은 재조합 인간 혈청 알부민(rHSA)의 수용성 발현 효율 및 생산성을 향상시킬 수 있으며, 이렇게 얻어진 재조합 인간 혈청 알부민은 혈액 관련 질병에 대한 광범위한 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 2319/20 (2013.01)
C07K 2319/21 (2013.01)
C07K 2319/24 (2013.01)
C07K 2319/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015K1A4A3046807
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 동북아RND허브기반구축사업
연구과제명 아산-미네소타 이식 이노베이션 센터
기 여 율 1/2
주관기관 서울아산병원
연구기간 2015.09.01 ~ 2017.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2008-0062286
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터(ACE)육성사업 기초의약학분야(MRC)
연구과제명 세포기능장애 치료개발연구
기 여 율 1/2
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2008.09.01 ~ 2017.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 단백질의 수용성 향상 태그를 코딩하는 유전자; 및 인간 혈청 알부민(human serum albumin; HSA) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간 혈청 알부민 유전자는 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 수용성 향상 태그는 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(protein disulfide isomerase b'a' domain; PDIb'a'), 말토스 결합 단백질(maltose binding protein; MBP), 헥사히스티딘(His6) 또는 티오레독신(Trx)인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 PDIb'a'유전자는 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열을 포함하고, 상기 MBP 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 핵산 서열을 포함하며, 상기 His6 유전자는 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하고, 상기 Trx 유전자는 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 수용성 향상 태그를 코딩하는 유전자와 인간 혈청 알부민 유전자 사이에 담배 식각 바이러스 프로테아제 인식 위치(tobacco etch virus protease recognition site, TEVrs)를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 담배 식각 바이러스 프로테아제 인식 위치는 서열번호 6으로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 7

제1항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 대장균은 BL21(DE3) 또는 Origami 2인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 10

제1항에 따른 재조합 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계;

상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 및

상기 재조합 단백질로부터 PDIb'a' 태그 또는 MBP 태그를 제거하는 단계를 포함하는 재조합 인간 혈청 알부민(rHSA)의 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 PDIb'a' 태그 또는 MBP 태그를 제거하는 단계는 재조합 단백질에 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제를 처리하는 것을 특징으로 하는 재조합 인간 혈청 알부민의 생산방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 PDIb'a' 태그 또는 MBP 태그가 제거된 재조합 인간 혈청 알부민을 정제하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 인간 혈청 알부민의 생산방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법으로 생산된 재조합 인간 혈청 알부민(rHSA).

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 재조합 인간 혈청 알부민의 수용성 과발현 및 정제 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 재조합 단백질의 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag)를 코딩하는 유전자 및 인간 혈청 알부민 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포, 및 이를 이용한 재조합 단백질의 생산 방법, 및 상기 방법으로 생산된 재조합 인간 혈청 알부민을 제공한다.

배 경 기 술

[0003] 인간 혈청 알부민(Human Serum Albumin, HSA)은 건강한 사람의 혈청 단백질 중 50% 이상을 차지하는 66.7 kDa의 비당화 단백질(non-glycosylated protein)이다. HSA는 많은 생리학적 과정에서 기초적인 다기능 혈장 단백질로 밝혀졌다. 혈액 순환에 있어서 HSA는 혈액 삼투압과 pH 조절에 핵심적인 역할을 하기 때문에, 저혈량증, 화상, 저알부민혈증, 수술 또는 중증외상, 심폐우회술, 급성 호흡곤란 증후군, 혈액투석 등의 응급 처치 시 지표로 나타난다. 몇몇 연구에 따르면 HSA는 또한 단백질의 접힘을 촉진하고, 질병과 관련된 단백질에서 항응집 효과를 나타내는 샤페론과 같은 활성이 있다고 알려졌다. 또한, HSA는 3차원 구조 및 긴 반감기(20년 이상) 때문에 호르몬, 활성 지방산, 약물과 같은 다양한 분자를 운반하는 단백질을 대표한다.

[0004] 사람에서 HSA 합성에 관여하는 기관은 간(liver) 뿐이다. 일반적으로 건강한 사람에서 HSA는 하루에 9 ~ 12 g씩 합성되며, 합성된 직후 문맥 순환(portal circulation)으로 분비된다. 인간의 혈장에 HAS가 많이 포함되어 있기 때문에 오랫동안 혈장이 HSA 생산의 원천으로 사용되었다. 그러나 이와 같은 생산 방법은 혈액 공급의 한계, 헌혈자로부터 병원균 전달의 위험성, 및 복잡한 정제 단계로 인한 문제점을 가지고 있었다. 따라서, 대용량, 저비용의 의약 수준 HSA를 생산하기 위해 비(非)-동물-유래 재조합 HSA(rHSA)가 알려졌다. 빠르게 성장하는 재조합 DNA 기술로 효모, 형질전환 식물 및 형질전환 동물과 같은 다양한 진핵 유기체에서 rHSA를 발현시키고 정제할 수 있었다. 많은 숙주세포로부터 rHSA를 생산하기 위한 시도에도 불구하고, 혈장-유래 rHSA와 함께 *P. pastoris*-유래 rHSA만이 유일하게 치료용 HSA의 생산 방법으로 승인 받았다.

[0005] 진핵 세포 발현 플랫폼과 함께 원핵 미생물 또한 rHSA의 발현 시스템으로 주목 받았다. 그러나, *B. subtilis*에서 rHSA를 발현시키면 재조합 단백질의 수율이 매우 낮고, *E. coli*에서 rHSA를 발현시키면 단백질의 불용성 응집이 나타나는 문제점이 있었다. 실제로 원핵 세포에서 재조합 단백질을 생산하는 데 있어서 가장 중요한 한계점은 과발현된 단백질이 응집되고, 봉입체(inclusion body)로 불리는 비활성 형태로 뭉쳐지는 것이다. 이와 같이 재조합 단백질이 *E. coli* 세포질에서 발현될 때 제대로 접히지 않기 때문에 활성 단백질을 얻기 위한 추가 공정이 필요하게 되고, 이는 고비용 저수율 생산 방법이 된다는 문제점을 낳는다. 그럼에도 불구하고 *E. coli* 시스템은 간단하고 저렴한 배지를 사용하고, 성장 속도가 빠르며, 전사 및 번역 메커니즘이 잘 알려져 있기 때문에, 여전히 많은 연구 및 치료 목적의 재조합 단백질 생산에서 뛰어난 숙주 세포 시스템으로 사용되고 있다.

[0006] 지금까지는 HSA의 분자량이 크고 이황화 결합의 농도가 높다는 이유로 *E. coli*에서 rHSA를 생산하려는 시도가 거의 없었다. 또한 재조합 HSA의 수용성 발현을 위해 여러 융합 태그들을 사용하여, 태그에 따른 용해도 및 발현 수준을 비교한 연구는 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 재조합 단백질의 수용성 향상 태그를 코딩하는 유전자; 및 인간 혈청 알부민(human serum albumin; HSA) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 수용성 향상 태그 및 인간 혈청 알부민 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계, 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질을 발현시키는 단계 및 상기 재조합 단백질로부터 PDIb'a' 태그 또는 MBP 태그를 제거하는 단계를 포함하는 재조합 인간 혈청 알부민의 생산방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 생산된 재조합 인간 혈청 알부민 단백질(rHSA)을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 대장균 세포질에서 수용성 형태로 단백질을 과발현시킬 수 있는 재조합 HSA(rHSA)를 다양한 태그-융합 형태로 제작하였다. 이 중에서, 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(protein disulfide isomerase b'a' domain; PDIb'a') 또는 말토스 결합 단백질(maltose binding protein;

MBP) 태그를 사용하였을 때 높은 수율로 생물학적 활성을 가지는 수용성 rHSA를 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 또한, TEV 단백질 분해효소(protease)를 태그 제거에 사용하였으며, 관심 표적 단백질은 여러 크로마토그래피를 조합하여 분리하였다.

[0014] 본 발명은 재조합 단백질의 수용성 향상 태그를 코딩하는 유전자; 및 인간 혈청 알부민(human serum albumin; HSA) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 양상에 따르면, 상기 인간 혈청 알부민 유전자는 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열을 포함한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 HSA 재조합 단백질을 수용성 형태로 발현시킬 수 있는 것이면 어느 것이든 제한 없이 이용 가능하다. 예를 들어, 상기 수용성 향상 태그는 단백질 이황화물 이성질화효소의 b'a' 도메인(b'a' domain of PDI; PDIb'a'), 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein; MBP), 헥사히스티딘(hexahistidine; His6), 티오레독신(thioredoxin; Trx), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 또는 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase; PDI) 중 어느 하나일 수 있다.

[0017] 본 발명의 구체적인 일 양상에 따르면, 상기 수용성 향상 태그는 단백질 이황화물 이성질화효소의 b'a' 도메인(PDIb'a'), 말토스 결합 단백질(MBP), 헥사히스티딘(His6) 또는 티오레독신(Trx)일 수 있다. 상세하게는, 상기 PDIb'a' 유전자는 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 상기 MBP 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 상기 His6 유전자는 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 상기 Trx 유전자는 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 용어 “벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[0019] 본 발명의 용어 “발현벡터”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 앰피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[0020] 본 발명에서 사용한 Gateway Vector system은 엔트리 벡터와 목적 벡터로 구성되며, 상기 엔트리 벡터는 목적 유전자의 양 말단에 attL1, attL2를 갖는 벡터이며, 목적 벡터는 attR1, attR2를 포함하는 벡터이다. 상기 엔트리 벡터와 상기 목적 벡터는 목적 벡터의 attR1 및 attR2가 엔트리 벡터의 attL1 및 attL2와 재조합 효소에 의해 LR반응을 일으키며, 이 과정에서 엔트리 벡터에 포함되어 있던 목적 유전자가 목적 벡터로 전달되고, attR1과 attR2 는 attB1과 attB2 서열로 치환된다.

[0021] 본 발명의 일 양상에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 상기 수용성 향상 태그를 용이하게 제거하기 위하여, 수용성 향상 태그를 코딩하는 유전자와 인간 혈청 알부민 유전자 사이에 담배 식각 바이러스 프로테아제 인식 위치(tobacco etch virus protease recognition site, TEVrs)를 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 TEVrs는 서열번호 6으로 표시되는 핵산서열을 포함할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 양상에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)일 수 있으며, 바람직하게 상기 대장균은 BL21(DE3) 또는 Origami 2일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 또한, 본 발명은 수용성 향상 태그를 코딩하는 유전자 및 HSA 유전자를 포함하는 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기와 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

[0026] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자 조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페

스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비(非)바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 상기 형질전환체를 배양하여 수용성 향상 태그-HSA 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 및 상기 재조합 단백질로부터 수용성 향상 태그를 제거하는 단계를 포함하는 재조합 인간 혈청 알부민(rHSA)의 생산방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 양상에 있어서, 상기 수용성 향상 태그를 제거하는 단계는 재조합 단백질에 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제를 처리하는 방법을 사용할 수 있다.

[0029] 한편, 본 발명의 실시예에서는 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 프로테아제(protease)를 사용했지만, 프로테아제(protease)는 당업계에서 통상적으로 사용될 수 있는 인자(Factor) Xa 단백질 분해효소, 트롬빈(Thrombin), 엔테로키나제(Enterokinase), 유비퀴틴-특이적 단백질 분해효소(Ubiquitin-specific protease), 푸린(Furin), 유전자 분해효소 I(Genease I) 또는 프로테이나제K(Proteinase K) 등을 적용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 일 양상에 있어서, 상기 생산방법은 수용성 향상 태그가 제거된 재조합 인간 혈청 알부민을 회수하고 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 생산방법에 의해 생산된 재조합 인간 혈청 알부민(rHSA) 단백질을 제공한다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 재조합 벡터 또는 생산방법은 재조합 인간 혈청 알부민(rHSA)의 수용성 발현 효율 및 생산성을 향상시킬 수 있으며, 이렇게 얻어진 재조합 인간 혈청 알부민은 혈액 관련 질병에 대한 광범위한 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 rHSA 융합 단백질 구조의 모식도이다. 화살표는 TEV 프로테아제 절단 위치를 나타낸다.

도 2는 BL21(DE3) 및 Origami 2에서 rHSA 융합 단백질의 발현을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다. 도 2A는 37℃에서, 도 2B는 18℃에서 배양한 결과이다. (M, 분자량 마커; C, 음성 대조군(total cell protein before IPTG induction); I, total cell protein after IPTG induction; S, soluble fraction after cell sonication)

도 3은 BL21(DE3) 및 Origami 2에서 펩타이드 태그에 따른 rHSA 단백질의 발현 수준(A) 및 수용성(B)을 나타낸 것이다.

도 4는 Origami 2에서 발현시킨 MBP-rHSA로부터 수용성 rHSA를 정제하는 과정(A) 및 SDS-PAGE로 확인한 결과(B)이다. (M, 분자량 마커; lane 1, 음성 대조군(total cell extract without IPTG induction); lane 2, total cell extract with IPTG induction; lane 3, soluble fraction after cell sonication; lane 4, MBP-rHSA fusion protein purified using MBP column (110.6 kDa); lane 5, MBP tag cleavage with TEV protease (28.6 kDa): MBP (43.9 kDa) and rHSA (66.7 kDa); lane 6, purified rHSA using SEC column)

도 5 는 HLA 단백질에 MBP 태그 또는 PDIb'a' 태그를 융합하여 발현시켰을 때 발현율 및 수용성을 확인한 결과이다.

도 6 는 (scFv)-Trap* 단백질에 MBP 태그 또는 PDIb'a' 태그를 융합하여 발현시켰을 때 발현율 및 수용성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0038] **실시예 1. 재조합 인간 혈청 알부민(rHSA) 발현 플라스미드 제작**

[0040] 서로 다른 재조합 인간 혈청 알부민(rHSA, recombinant Human Serum Albumin)-발현 벡터를 제조하기 위하여 BP 및 LR 재조합을 포함하는 게이트웨이 클로닝(Gateway cloning) 방법을 사용하였다(Nguyen, M. T. *et al., PLoS One* 9(3):e89038. doi: 10.1371/journal.pone.0089038; Nguyen, M. T. *et al. PLoS One* 12, e0170602, doi:10.1371/journal.pone.0170602).

[0041] 인간 혈청 알부민(human serum albumin)은 SYPRO Orange(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에서 구입하였다.

[0042] TEV 프로테아제 인식 위치(tobacco etch virus protease recognition site, TEVrs)에 상응하는 올리고뉴클레오티드 서열(ENLYFQ/G) 뒤에 성숙한 단백질(NCBI Reference Sequence: AAA98797.1)의 584개 아미노산 잔기가 이어지는 서열(서열번호 1)을 합성하였고, rHSA 번역 및 대장균 세포질(*E. coli* cytoplasm)에서의 발현을 촉진시키기 위해 코돈을 최적화하였다. 다음으로 타겟 유전자를 BP 반응을 통해 플라스미드 pDONOR207로 클로닝 하여 삽입 플라스미드(entry plasmid) pENTR-rHSA 를 얻었다. 융합형 발현을 위한 다른 재조합 플라스미드를 만들기 위해, 상기 삽입 플라스미드로부터 rHSA 유전자를 LR 반응을 사용하여 서로 다른 목적 벡터(destination vectors)로 서브클로닝 하였다. 구체적으로, rHSA를 대장균 세포질에서 발현시킬 때 발현 효율 및 수용성을 향상시키기 위해 타겟 유전자를 서로 다른 발현 벡터에 N-말단 펩타이드 수용성 태그와 함께 클로닝 시켰다. 상기 수용성 태그는 His6(hexahistidine), Trx(thioredoxin), MBP(maltose-binding protein) 및 PDIb'a'(b'a' domain of human protein disulfide isomerase)이 사용되었다.

[0043] 다양한 수용성 향상 태그가 융합된 rHSA 유전자를 포함하는 발현 벡터를 서열 분석(Macrogen, Daejeon, Korea)을 통해 확인하였다(도 1). T7 프로모터의 조절 하에서 융합 단백질의 발현을 유도하기 위해 IPTG(1-thio-β-d-galactopyranoside; Anaspec, Fremont, CA)를 사용하였다. 태그를 쉽게 제거하기 위해 rHSA 서열 바로 앞에 일반적으로 사용되는 TEV 프로테아제의 절단효소 인식자리를 삽입하였다. 또한 정제 단계에서 다른 전략을 쓸 수 있도록 N-말단 His6/His8 태그를 사용하였다. 제작한 모든 플라스미드는 숙주세포 시스템에서 발현 효율을 실험하기 위해 각각 BL21(DE3) 및 Origami 2(Novagen, Madison, WI)에 형질전환되었다.

[0045] **실시예 2. 융합 단백질 발현 및 수용성 실험**

[0047] 세포질에서 rHSA의 발현 및 수용성을 평가하기 위해 *E. coli* BL21(DE3)와 Origami 2 숙주가 사용되었다. BL21(DE3)에서 단백질 발현을 위해 밤새 배양한 접종원을 50 μg/mL 암피실린(ampicillin; Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)이 1:100 비율로 포함된 새로운 LB 배지로 옮겼다. Origami 2를 배양하기 위해서는 접종원을 50 μg/mL 암피실린 및 12.5 μg/mL 테트라사이클린(tetracycline)이 포함된 LB 배지를 사용하였다.

[0048] 세포는 37℃, 200 rpm에서 배양하였고, OD_{600}가 0.4 ~ 0.5 정도일 때 0.5 mM IPTG를 배양액에 첨가한 후 37℃에서 5시간 또는 18℃에서 18시간 동안 단백질 발현을 유도하였다. 다음으로 세포를 수확하고 분획한 후, 10% 트리신겔(tricine gel)을 사용한 SDS-PAGE에서 분석하였다(도 2).

[0049] 또한 융합 단백질의 발현 및 수용성 정도를 비교하기 위해 밀도측정 방법(densitometry)을 사용하여 단백질 밴드를 분석하였다(도 3). 융합 단백질의 발현 정도(%)는 전체 *E. coli* 발현 단백질에 대한 타겟 융합 단백질의 밀도 비율에 기초하여 계산하였다. 수용성 정도(%)는 발현된 전체 융합 단백질에 대한 수용성 융합 단백질의 밀도 비율을 기초로 계산하였다.

[0050] 그 결과, rHSA 융합 컨스트럭드는 BL21(DE3) 및 Origami 2 세포에서 모두 발현되었으나 두 가지 숙주 세포 시스템에서 융합 단백질의 발현 정도는 차이를 나타내었다. BL21(DE3)에서 발현시킨 MBP-rHSA 융합 단백질을 제외하고, BL21(DE3)에서는 18℃가 37℃보다 잘 발현되고, Origami 2에서는 37℃가 18℃보다 잘 발현되는 것을 확인하였다(도 3A). 이로부터 BL21(DE3)에서는 융합 단백질이 낮은 온도에서 더 잘 발현되는 반면, Origami 2에서는 높은 온도에서 더 잘 발현되는 경향이 있다는 것을 알 수 있었다.

[0051] 또한 두 가지 숙주세포 시스템에서 발현시킨 융합 단백질의 수용성을 비교한 결과, PDIb'a' 및 MBP 태그가 융합

된 형태에서 발현 유도 온도가 낮을 때 슈용성이 현저히 향상되는 것을 확인할 수 있었다(도 3B). 특히, PDIb'a' 및 MBP 컨스트럭트를 Origami 2 세포에서 발현시켰을 때 수용성이 95% 이상 현저히 증가하였다. 높은 발현 정도 및 수용성을 나타내는 융합 단백질의 경우 정제 과정이 용이하기 때문에 이후 실험에서는 Origami 2에서 발현된 MBP-rHSA를 사용하였다.

[0053] **실시예 3. MBP-rHSA 컨스트럭트로부터 ALB 정제**

[0055] rHSA를 정제하기 위하여, Origami 2를 배양하고 18℃에서 MBP-rHSA의 수용성 형태의 발현을 유도하였다. 다음으로 배양된 세포를 수확하고 3,800 ? g, 4℃에서 30분간 원심분리하고, 0.1% Triton X-100 (v/v)을 포함하는 50 mL 버퍼 A(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% glycerol (v/v), 250 mM NaCl)에서 재부유시킨 후 초음파 세포 분쇄기 JY99-IIDN(Ningbo Scientz Biotechnology, Guangdong, China)에서 초음파분해 하였다. 세포가 완전히 분해되었을 때 세포 용출물을 23,000 × g, 4℃에서 30분간 원심분리하여 불용성 세포 분획을 제거하였다. MBP-rHSA가 포함된 상등액을 0.4 μm 짜리 멤브레인으로 여과하고, 아밀로오스 친화성 크로마토그래피(amylose affinity chromatography)로 1차 정제하였다. 상기 여과된 상등액을 2 × 5 mL MBP Trap HP column에 로딩하고, 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하기 위해 컬럼을 버퍼 A로 충분히 세척하였다. 다음으로 컬럼을 20 mM 말토오스가 포함된 버퍼 A로 세척하여 융합 단백질을 용출시켰다.

[0056] 태그 제거 전에 버퍼 B(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% glycerol (v/v))를 혼합하여 용출액에 포함된 NaCl 성분을 제거하였다. 다음으로 1:240 (w/w) 비율로 희석된 시료에 TEV 프로테아제를 첨가하고, 상온에서 하룻동안 반응을 진행시켰다. 절단된 혼합물을 농축하고 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 컬럼(packed with 450 mL of Superdex 200 prep grade resin)에 로딩하였다. 컬럼 평형 및 정제에 사용된 버퍼는 PBS 1X, pH 7.4이다. rHSA가 포함된 단백질 분획을 모아서 농축한 후 이후 실험을 위해 -70℃에서 보관하였다. 정제 과정에서 단백질 시료를 수확한 후 10% 트리신 SDS-PAGE로 확인하였다. 단백질 농도를 측정할 때는 BSA를 기준으로 하는 브래드포드 분석(Bradford assay)을 사용하였다.

[0057] 도 1에 나타낸 바와 같이, MBP-rHSA는 His6 및 MBP 태그를 포함하며, 고정 금속이온 친화성 크로마토그래피 또는 MBP 친화성 크로마토그래피 방법을 이용하여 MBP-rHSA를 정제할 수 있다. 정제 단계가 단순하고 덱스트린 리간드 컬럼 레진에 대한 MBP 태그가 높은 친화도를 나타내기 때문에 융합 단백질을 얻기 위해 MBP 친화성 크로마토그래피를 사용하는 것이 더 좋다.

[0058] 융합 단백질 정제 결과를 도 4B에 나타내었다. 레인 2 및 3은 융합 단백질이 잘 발현되었고, 초음파 분해 버퍼에서 수용성 상태를 유지한다는 것을 나타낸다. 다른 *E. coli* 단백질로부터 MBP-rHSA를 분리하기 위해 상등액을 MBP 컬럼에 로딩하였다. 상기 컬럼을 세척하고 말토오스를 포함한 버퍼로 융합 단백질을 용출시켰다. 그 결과 도 4B의 레인 4에 나타난 바와 같이, MBP-VEGF에 해당하는 약 110.6 kDa의 단백질 밴드를 96% 순도로 확인할 수 있었다.

[0059] TEVrs가 MBP 태그와 rHSA 사이에 삽입되었기 때문에 정제된 융합 단백질을 TEV 프로테아제와 함께 배양하여 태그를 제거하였다. TEV 활성을 없앨 수 있는 NaCl 성분을 제거하기 위해 TEV 프로테아제로 융합 단백질을 자르기 전에 MBP-rHSA가 포함된 용출 시료를 두 차례 희석하였다. SDS-PAGE 결과 MBP-rHSA가 TEV 프로테아제에 의해 거의 완전히 절단된 것을 알 수 있었다(도 4B, 레인 5). MBP(28.6 kDa) 및 TEV 프로테아제(43.9 kDa)보다 태그가 없는 rHSA의 분자량(66.7 kDa)이 더 크기 때문에 SEC 컬럼을 사용하여 단백질 혼합물을 분리하였다. 그 결과 도 4B의 레인 6에 나타난 바와 같이, rHSA에 해당하는 약 66.7 kDa의 밴드가 두드러지게 나타났다.

[0061] **실시예 4. SDS-PAGE 및 단백질 발현과 수용성 정량 분석**

[0063] 단백질 분획을 10% 트리신 SDS-PAGE 겔에서 확인하기에 앞서, 시료를 5X 버퍼(312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50% glycerol, 5% SDS, 0.05% bromophenol blue, 100 mM DTT)와 혼합하였다. SDS-PAGE 수행 후, 단백질 밴드를 쿠마시 블루(Coomassie brilliant blue R-250)로 염색하였다. 융합 단백질의 상대적 발현량 및 수용성과 타겟 단백질의 순도를 평가하기 위하여 ImageJ 소프트웨어 (http://imagej.nih.gov/ij)를 사용하였다.

[0064] 단백질 농도 분석 결과 rHSA의 순도는 약 97%로 나타났고, 500 mL의 세포 배양액 중에서 62.2%의 높은 수율로 9.46 mg의 단백질을 얻을 수 있었다(표 1).

표 1

[0066]

정제 단계	총 단백질(mg)	순도(%)[a]	rHSA (mg)[b]	수율(%)
세균 배양(500 mL)	1,900 (pellet)	-	-	-
상등액	135.5	18.5	15.2	100
1차 MBP 용출물	24.2	96	14.1	92.8
2차 GPC 용출물	9.75	97	9.46	62.2

[0067] a. 농도측정계(ImageJ)로 축정한 관심 단백질의 순도

[0068] b. 관심 단백질의 순도와 rHSA 및 융합 단백질 사이의 크기 관계에 기초하여 계산된 rHSA의 양

[0070] **실시예 5. 내독소 제거(endotoxin removal)**

[0072] 내독소를 제거하기 위하여, Triton X-114 방법을 사용하였다(Song, J. A. *et al. PLoS One* 8, e83781, doi:10.1371/journal.pone.0083781). 내독소 농도를 측정하기 위하여 QCL-1000™ Endpoint Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Assay kit를 사용하였다. 37℃에서 미리 반응시킨 96 웰-플레이트를 측정에 사용하였다. 50 μL의 단백질과 표준물질을 50 μL의 LAL과 혼합하고, 10분 간 반응시켰다. 다음으로, 100 μL의 발색 용액(chromogenic substrate solution)을 각각의 웰에 투여하고, 플레이트를 37℃에서 6분간 반응시켰다. 다음으로 100 μL의 정지 시약(25% v/v glacial acetic acid)를 첨가하고 405 ~ 410 nm 파장의 분광광도계(spectrophotometer)로 측정하였다.

[0073] 내독소 분석 결과 Triton X-114 처리된 rHSA는 매우 낮은 농도의 내독소를 포함하며, 단백질 의약품으로서 허용한계 (<1 EU/μg)를 유지하는 수준인 것으로 확인되었다.

[0075] **비교예 1. HLA(Human Leukocyte Antigen) 단백질의 수용성 발현 여부 확인**

[0077] 본 발명의 수용성 태그로 사용된 MBP 및 PDIb'a' 태그를 융합하여 재조합 단백질을 발현시켰을 때, 다른 목적 단백질에서도 수용성 발현을 하는지를 확인하기 위하여, 서로 다른 목적 단백질에 각각의 태그를 융합하여 상기 실시예와 동일한 방법으로 발현시켰다.

[0078] 먼저, 4가지 목적 단백질 HLA_A, HLA_B, HLA_C, HLA_{DQ}에 MBP 태그를 융합하여 재조합 단백질을 발현한 결과, 대조군에 비하여 모두 높은 과발현율을 나타내었으나 수용도(solubility)는 서로 다르게 나타났으며, 대부분 수용성이 절반 이하로 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다(도 5A).

[0079] 또한, PDIb'a' 태그단백질을 융합한 5가지 서로 다른 단백질(HLA_A, HLA_B, HLA_C, HLA_{DR}, HLA_{DQ})을 발현시킨 결과, 역시 대조군에 비하여 모두 높은 과발현율을 보였으나, 낮은 온도(18)에서 발현시켰음에도 불구하고 모두 불용성으로 발현되었다(도 5B).

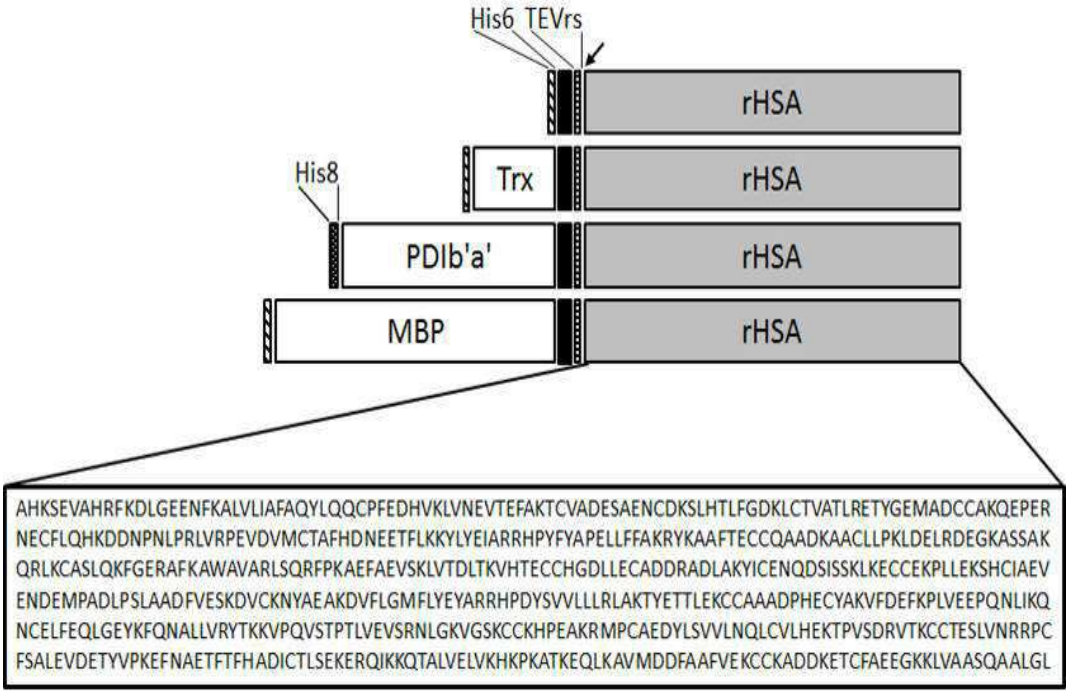
[0080] 또한, 서로 다른 두 가지의 단백질(BIi, BIi-Fc)에 MBP, PDIb'a' 태그 단백질을 융합하여 발현시킨 결과, 대조군에 비하여 과발현율이 매우 낮았고, 낮은 비율로 과발현된 단백질은 거의 대부분 펠렛(pellet)에 존재하였다. 이는 발현된 단백질이 대부분 불용성이라는 것을 나타낸다(도 5C).

[0082] **비교예 2. 다른 목적 단백질의 수용성 발현 여부 확인**

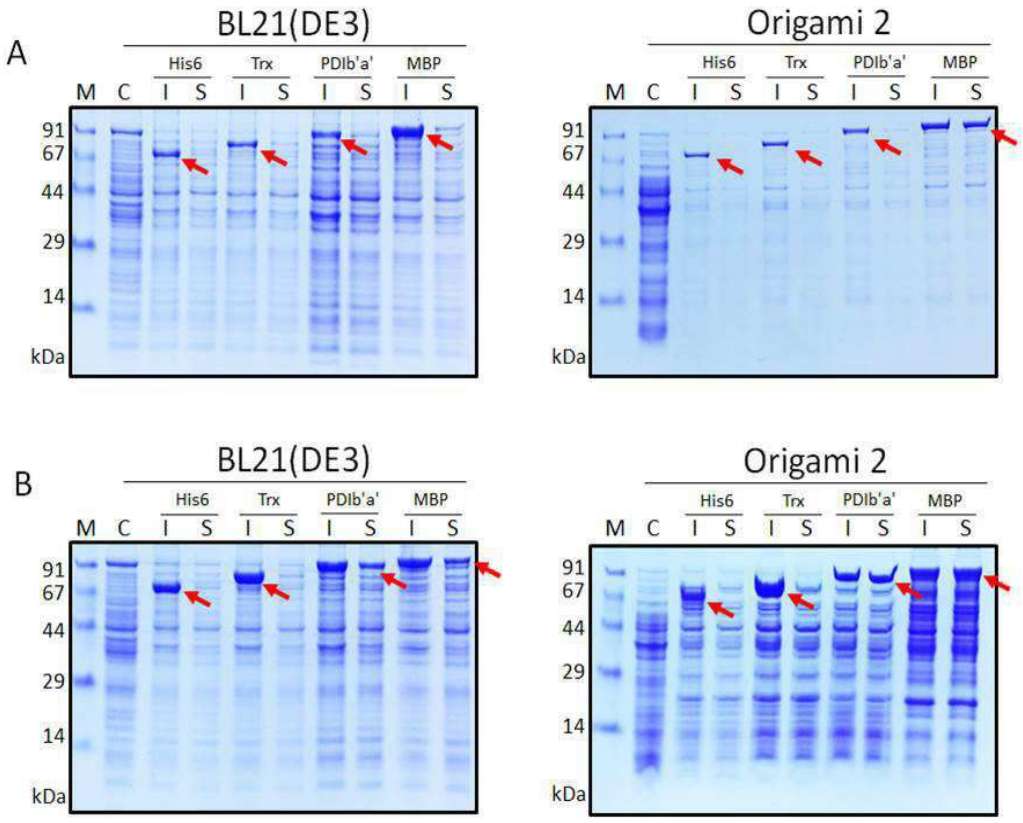
[0084] PSMA(scFv)-Trap* 단백질을 대장균에서 수용성 과발현하기 위하여 MBP 태그를 융합하여 발현시킨 결과, 높은 과발현율을 보였으나 37에서는 모두 불용성이었고, 18에서는 약간 수용도가 증가하였으나 대부분의 과발현 단백질이 여전히 불용성이었다. 또한 Hercept(scFv)-Trap*, CEA(scFv)-Trap* 및 CD22(scFv)-Trap* 단백질의 경우, MBP 태그를 융합하였음에도 불구하고 발현율이 매우 낮았으며, 대부분 불용성 형태로 발현되었다(도 6).

도면

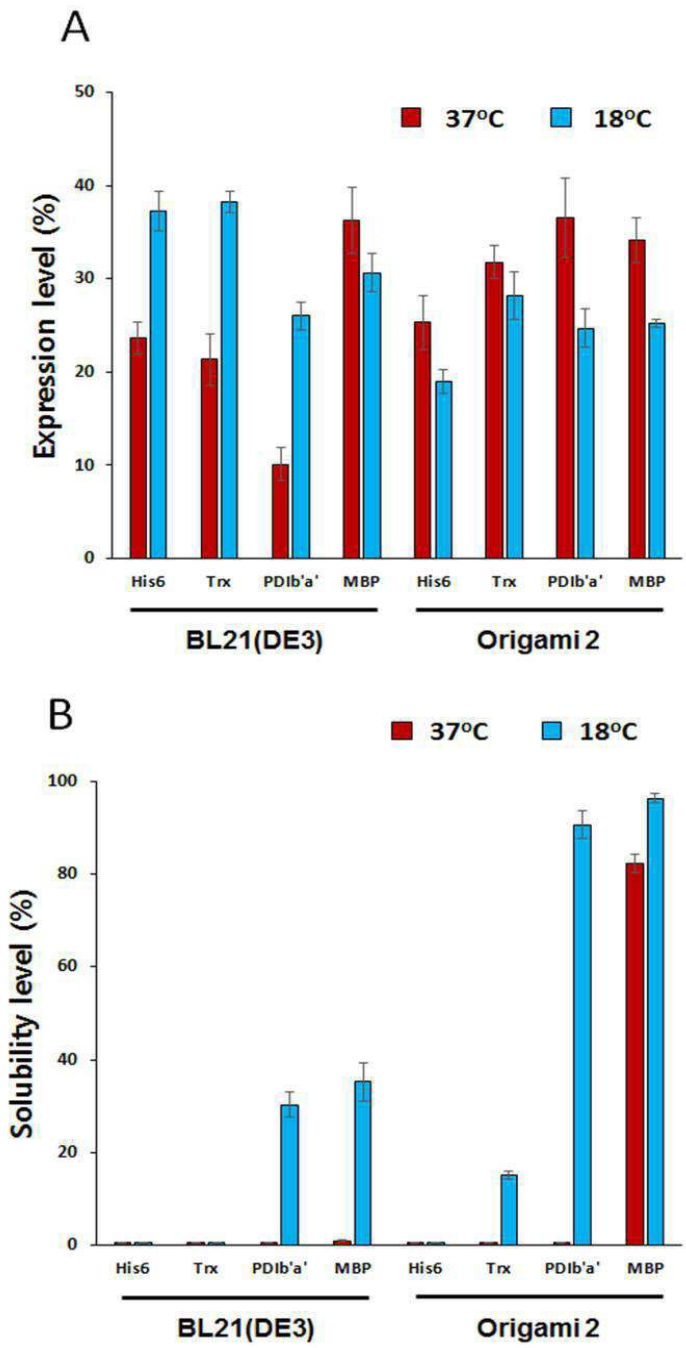
도면1



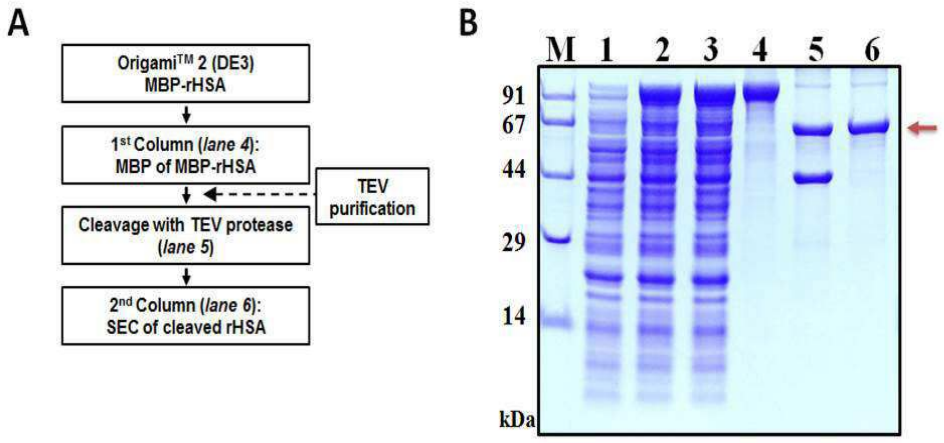
도면2


A
BL21(DE3)
Origami 2
His6
Trx
PDIb'a'
MBP
M C I S I S I S I S
91
67
44
29
14
kDa
B
BL21(DE3)
Origami 2
His6
Trx
PDIb'a'
MBP
M C I S I S I S I S
91
67
44
29
14
kDa

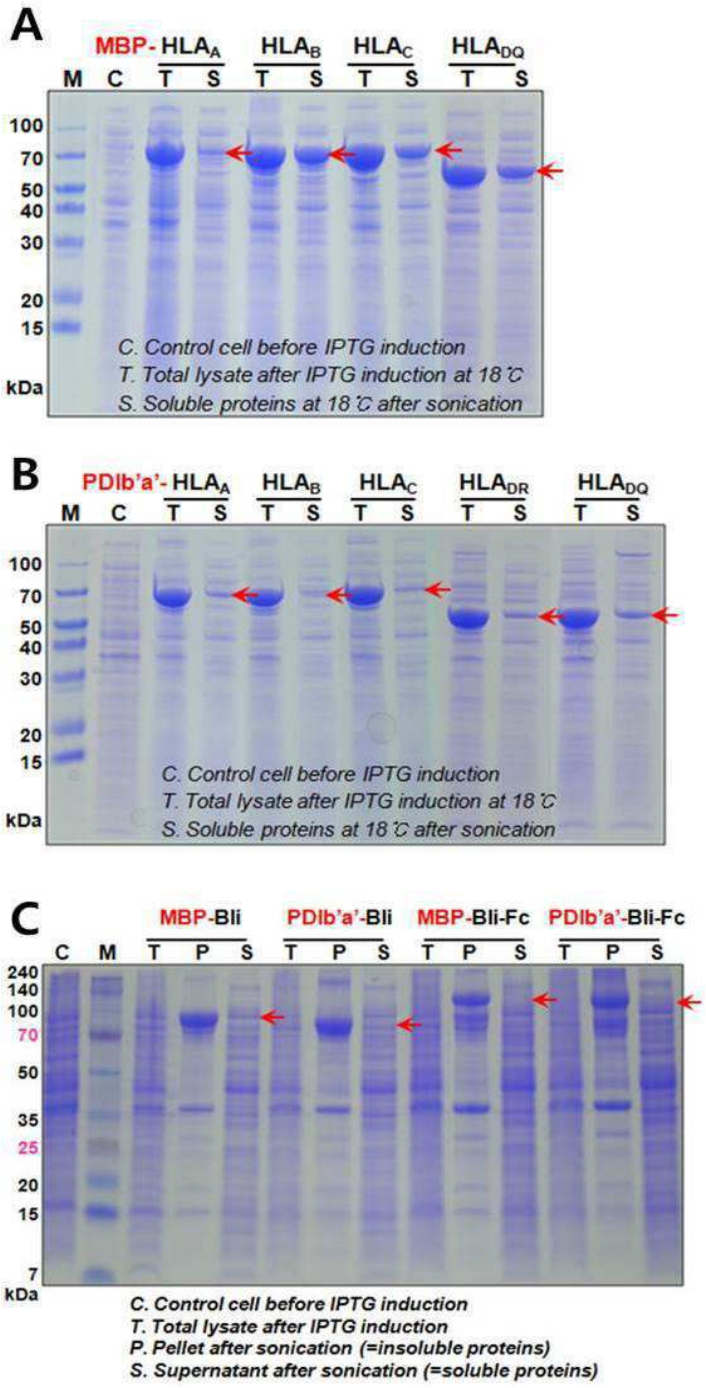
도면3


A
37°C
18°C
Expression level (%)
50
40
30
20
10
0
His6
Trx
PDIb'a'
MBP
His6
Trx
PDIb'a'
MBP
BL21(DE3)
Origami 2
B
37°C
18°C
Solubility level (%)
100
80
60
40
20
0
His6
Trx
PDIb'a'
MBP
His6
Trx
PDIb'a'
MBP
BL21(DE3)
Origami 2

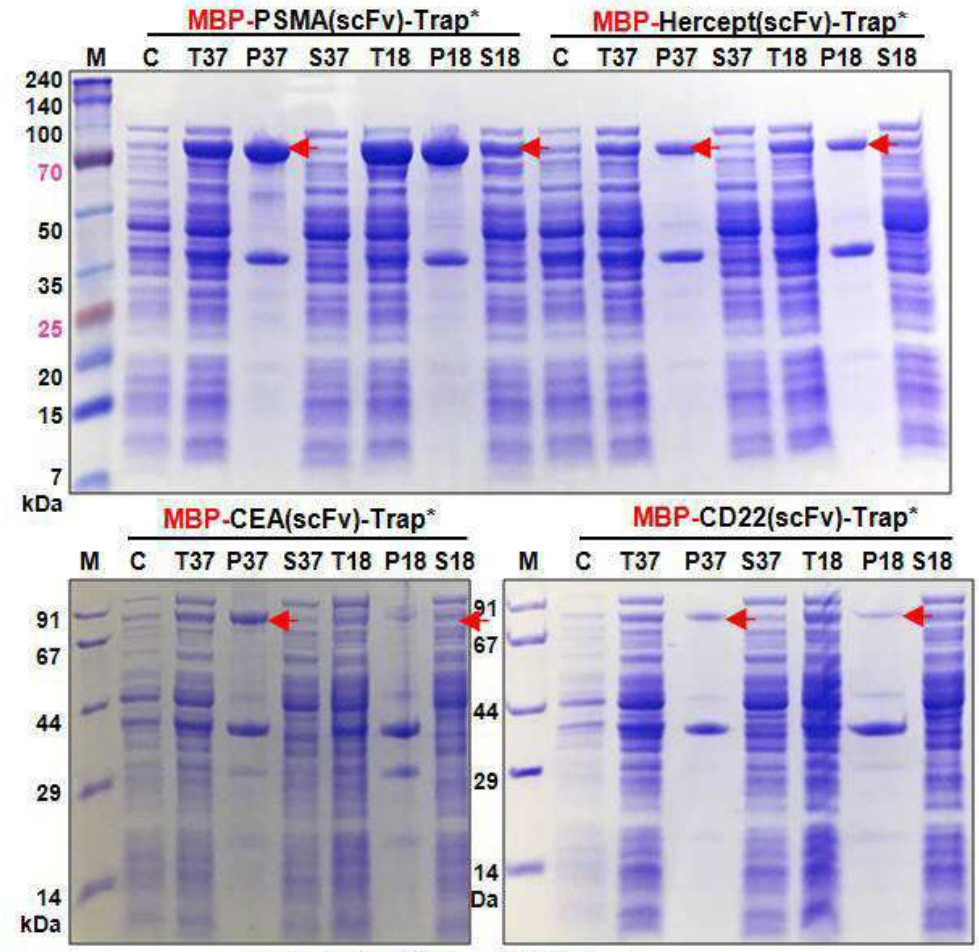
도면4


A
Origami™ 2 (DE3)
MBP-rHSA
1st Column (lane 4):
MBP of MBP-rHSA
TEV
purification
Cleavage with TEV protease
(lane 5)
2nd Column (lane 6):
SEC of cleaved rHSA
B
M 1 2 3 4 5 6
91
67
44
29
14
kDa

도면5


A
MBP- HLA$_A$ HLA$_B$ HLA$_C$ HLA$_{DQ}$
M C T S T S T S T S
100
70
50
40
30
20
15
kDa
C. Control cell before IPTG induction
T. Total lysate after IPTG induction at 18℃
S. Soluble proteins at 18℃ after sonication
B
PDIb'a'- HLA$_A$ HLA$_B$ HLA$_C$ HLA$_{DR}$ HLA$_{DQ}$
M C T S T S T S T S T S
100
70
50
40
30
20
15
kDa
C. Control cell before IPTG induction
T. Total lysate after IPTG induction at 18℃
S. Soluble proteins at 18℃ after sonication
C
MBP-Bli PDIb'a'-Bli MBP-Bli-Fc PDIb'a'-Bli-Fc
C M T P S T P S T P S T P S
240
140
100
70
50
35
25
20
15
7
kDa
C. Control cell before IPTG induction
T. Total lysate after IPTG induction
P. Pellet after sonication (=insoluble proteins)
S. Supernatant after sonication (=soluble proteins)

도면6



C. Control cell before IPTG induction
T37. Total lysate after IPTG induction at 37 ℃
P37. Insoluble proteins at 37 ℃ after sonication
S37. Soluble proteins at 37 ℃ after sonication
T18. Total lysate after IPTG induction at 18 ℃
P18. Insoluble proteins at 18 ℃ after sonication
S18. Soluble proteins at 18 ℃ after sonication

서 열 목 록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> METHOD FOR SOLUBLE OVEREXPRESSION and PURIFICATION OF RECOMBINANT HUMAN SERUM ALBUMIN

<130> 1062718

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1752

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSA

<400> 1

gcacataaaa gcgaagttgc acaccgtttc aaagacctgg gcgaagaaaa tttcaaagca 60

ctggttctga ttgcctttgc acagtatctg caacaatgcc cgttcgaaga tcatgtcaaa 120

ctggtgaacg aagttaccga atttgccaaa acgtgcgtcg cagatgaatc agctgaaaat 180

tgtgacaaat cgctgcacac cctgtttggc gacaaactgt gcaccgtggc aacgctgcgt 240

gaaacgtacg gtgaaatggc ggattgctgt gccaaacagg aaccggaacg caacgaatgc 300

tttctgcaac ataaagatga caatccgaat ctgccgcgtc tggtgcgtcc ggaagttgat 360

gtcatgtgta ccgcatttca tgacaatgaa gaaacgttcc tgaaaaaata tctgtacgaa 420

atcgcgcgtc gccacccgta tttttacgcg ccggaactgc tgtttttcgc caaacgttat 480

aaagcggcct tcaccgaatg ctgtcaggca gctgataaag cggcctgcct gctgccgaaa 540

ctggatgaac tgcgtgacga aggcaaagcg agcagcgcca aacagcgcct gaaatgtgca 600

tctctgcaaa aatttggtga acgtgctttc aaagcgtggg ccgttgcacg tctgtctcag 660

cgttttccga aagcagaatt tgctgaagtg agcaaactgg ttaccgatct gacgaaagtg 720

cataccgaat gctgtcacgg cgatctgctg gaatgtgccg atgaccgtgc ggacctggcc 780

aaatatattt gtgaaaacca ggattcgatc agttccaaac tgaaagaatg ctgtgaaaaa 840

ccgctgctgg aaaaatctca ttgcattgcc gaagttgaaa acgatgaaat gccggcagac 900

ctgccgagcc tggcagctga tttcgttgaa tctaaagacg tctgtaaaaa ttatgcagaa 960

gctaaagacg tgtttctggg catgttcctg tatgaatacg cgcgtcgcca tccggattat 1020

agcgtggttc tgctgctgcg tctggccaaa acctacgaaa ccacgctgga aaaatgctgt 1080

gcggcggccg atccgcatga atgctacgcg aaagtctttg atgaatttaa accgctggtt 1140

gaagaaccgc agaacctgat caaacaaaat tgtgaactgt ttgaacagct gggtgaatat 1200

aaattccaaa acgccctgct ggttcgctac accaagaaag tgccgcaggt gagtaccccg 1260

accctggtgg aagtgagccg taatctgggc aaagtgggtt caaaatgctg taaacatccg 1320

gaagcaaaac gtatgccgtg cgctgaagat tatctgtccg tcgtgctgaa tcaactgtgt 1380

gtgctgcacg aaaaaacccc ggtctcagat cgtgtgacca aatgctgtac ggaatcgctg 1440

gttaaccgtc gcccgtgctt tagcgcgctg gaagtggatg aaacgtacgt tccgaaagaa 1500

tttaatgcag aaacctttac gttccatgct gatatttgta ccctgagcga aaaagaacgc 1560

cagatcaaaa aacaaacggc gctggttgaa ctggtcaaac acaaaccgaa agcgaccaaa 1620

gaacagctga aagccgttat ggatgacttt gctgcgttcg tcgaaaaatg ctgtaaagcc 1680

gatgacaaag aaacgtgttt cgcggaagaa ggcaaaaaac tggtcgcagc atcgcaggcg 1740

gctctgggtc tg 1752

<210> 2

<211> 801

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDIb'a'

<400> 2

attgaattta cagaacaaac ggcgccgaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatatc 60

ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatggta aactgagtaa ttttaaaacc 120

gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac 180

aatcagcgta tcctggagtt ctttggtctg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg 240

attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa 300

cgtatcaccg aattttgtca tcgtttcctg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc 360

caggaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaaag ttctggtggg gaagaatttt 420

gaagatgtgg ccttcgatga gaagaagaat gtgtttgtgg agttctacgc cccgtggtgt 480

gggcactgta aacagctggc gccgatctgg gacaaactgg gcgaaacgta taaagatcac 540

gaaaatattg tgatcgcgaa aatggattct accgcgaatg aagtagaagc ggtaaaagta 600

cactcttttc cgacgctgaa attctttcca gcgagcgcgg atcgtactgt cattgattat 660

aatggcgaac gtactctgga cggctttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc 720

gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag 780

gatgacgacc agaaagcggt c 801

<210> 3

<211> 1098

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MBP

<400> 3

aaaactgaag aaggtaaact ggtaatctgg attaacggcg ataaaggcta taacggtctc 60

gctgaagtcg gtaagaaatt cgagaaagat accggaatta aagtcaccgt tgagcatccg 120

gataaactgg aagagaaatt cccacaggtt gcggcaactg gcgatggccc tgacattatc 180

ttctgggcac acgaccgctt tggtggctac gctcaatctg gcctgttggc tgaaatcacc 240

ccggacaaag cgttccagga caagctgtat ccgtttacct gggatgccgt acgttacaac 300

ggcaagctga ttgcttaccc gatcgctgtt gaagcgttat cgctgattta taacaaagat 360

ctgctgccga acccgccaaa aacctgggaa gagatcccgg cgctggataa agaactgaaa 420

gcgaaaggta agagcgcgct gatgttcaac ctgcaagaac cgtacttcac ctggccgctg 480

attgctgctg acgggggtta tgcgttcaag tatgaaaacg gcaagtacga cattaaagac 540

gtgggcgtgg ataacgctgg cgcgaaagcg ggtctgacct tcctggttga cctgattaaa 600

aacaaacaca tgaatgcaga caccgattac tccatcgcag aagctgcctt taataaaggc 660

gaaacagcga tgaccatcaa cggcccgtgg gcatggtcca acatcgacac cagcaaagtg 720

aattatggtg taacggtact gccgaccttc aagggtcaac catccaaacc gttcgttggc 780

gtgctgagcg caggtattaa cgccgccagt ccgaacaaag agctggcaaa agagttcctc 840

gaaaactatc tgctgactga tgaaggtctg gaagcggtta ataaagacaa accgctgggt 900

gccgtagcgc tgaagtctta cgaggaagag ttggcgaaag atccacgtat tgccgccacc 960

atggaaaacg cccagaaagg tgaaatcatg ccgaacatcc cgcagatgtc cgctttctgg 1020

tatgccgtgc gtactgcggt gatcaacgcc gccagcggtc gtcagactgt cgatgaagcc 1080

ctgaaagacg cgcagact 1098

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> His6

<400> 4

catcatcatc atcatcac 18

<210> 5

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trx

<400> 5

agcgataaaa ttattcacct gactgacgac agttttgaca cggatgtact caaagcggac 60

ggggcgatcc tcgtcgattt ctgggcagag tggtgcggtc cgtgcaaaat gatcgccccg 120

attctggatg aaatcgctga cgaatatcag ggcaaactga ccgttgcaaa actgaacatc 180

gatcaaaacc ctggcactgc gccgaaatat ggcatccgtg gtatcccgac tctgctgctg 240

ttcaaaaacg gtgaagtggc ggcaaccaaa gtgggtgcac tgtctaaagg tcagttgaaa 300

gagttcctcg acgctaacct ggcc 324

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TEVrs

<400> 6

gaaaacctgt attttcaggg c 21