

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0095179
(43) 공개일자 2023년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/195 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/195 (2013.01)

A61K 39/00 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2021-0184203

(22) 출원일자 2021년12월21일

심사청구일자 2021년12월21일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

김중명

부산광역시 수영구 남천동로 41(남천동, 남천동 코오롱 하늘채 골든비치)

실라디트야 다사르마

701 E. 프랫 스트리트, IMET, UMD, 볼티모어, MD 21202

프리야 다사르마

701 E. 프랫 스트리트, IMET, UMD, 볼티모어, MD 21202

(74) 대리인

위병갑

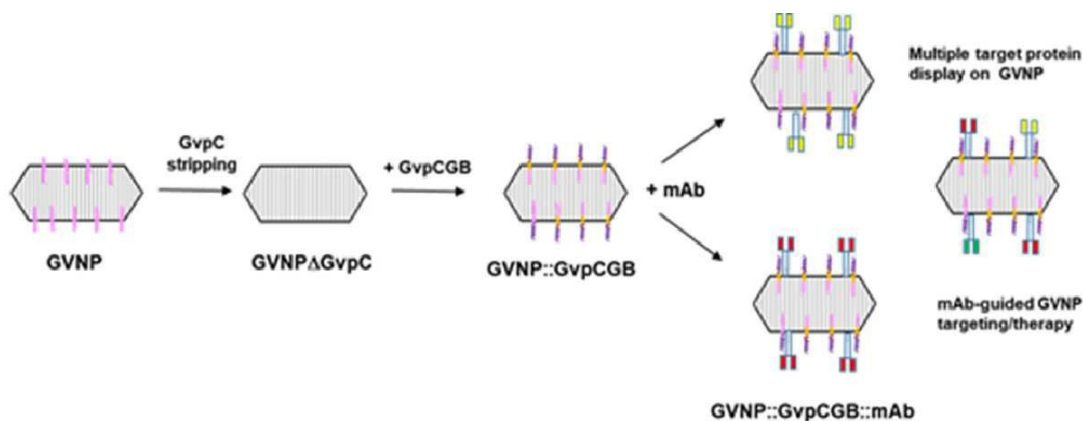
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 제조합 가스 소포 나노입자

(57) 요약

본 발명은 제조합 가스 소포 나노입자에 관한 것으로, 본 발명의 방법으로 제조된 제조합 가스 소포 나노입자는 나노 크기의 입자이면서 내부 유전자가 없어 생물학적으로 안전하며, 이의 외부 표면 단백질인 GvpC가 외인성 단백질을 포함하도록 제조합하여 외인성 단백질을 표면에 제시/탑재하는 가스 소포 나노입자를 재구성할 수 있으므로, 이를 생리 조건에서 활성을 가지는 다양한 항원 탑재 백신 조성물, 표적 특이적 운반체, 센서 또는 표적 특이적 치료 용도로 활용할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C07K 14/315 (2013.01)

C07K 16/00 (2013.01)

C12N 15/70 (2013.01)

C12P 21/00 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345262429
과제번호	2017R1D1A1A02019244
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)
연구과제명	Halobacterium Gas Vesicle 기반 다중형 어류 백신 플랫폼 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 할로박테리움 종(*Halobacterium* sp.)을 배양하는 단계;
- b) 가스 소포(Gas vesicles, GVs)를 수집하는 단계;
- c) 가스 소포에서 GvpC를 제거하는 단계;
- d) 외인성 재조합 단백질로서 GvpC의 전장 또는 이의 단편과 외인성 단백질이 융합된 재조합 단백질을 제작하는 단계; 및
- e) GvpC를 제거한 가스 소포와 외인성 재조합 단백질을 반응시켜 재조합 GVNP 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, 재조합 가스 소포 나노입자(GVNP)의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 할로박테리움 종은 *Halobacterium* sp NRC-1인, 재조합 가스 소포 나노입자의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 단계 c)에서 요소(urea)를 처리하고 투석하여 GvpC를 제거하는, 재조합 가스 소포 나노입자의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 외인성 단백질은 항원인, 재조합 가스 소포 나노입자의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 외인성 단백질은 GB(IgG-binding) 도메인인, 재조합 가스 소포 나노입자의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 재조합 GVNP 복합체에 한 가지 이상의 항체를 결합시키는 단계를 추가로 포함하는, 재조합 가스 소포 나노입자의 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 외인성 재조합 단백질은 대장균에서 발현 및 정제되는, 재조합 가스 소포 나노입자의 제조방법.

청구항 8

제 1항의 방법으로 제조된 재조합 가스 소포 나노입자.

청구항 9

제 4항의 방법으로 제조된 재조합 가스 소포 나노입자를 포함하는 백신 조성물.

청구항 10

제 6항의 방법으로 제조된 항체 탑재 재조합 가스 소포 나노입자.

청구항 11

제 10항에 있어서, 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체 또는 인간화 항체, 또는 이의 단편인, 항

체 탑재 재조합 가스 소포 나노입자.

청구항 12

제 10항에 있어서, 항체는 17-1A 항원, GD3 갱글리오시드 R24, EGFRvIII, PSMA, PSCA, HLA-DR, EpCAM, MUC1 코어 단백질, 이상 글리코실화 MUC1, ED-B 도메인을 함유하는 피브로넥틴 이형, HER2/neu, 암종배아성 항원(CEA), 가스트린-방출 펩티드(GRP) 수용체 항원, 뮤신(mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), HER3, HER4, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원, TAG 72, 탄산 무수화효소 IX(carbonic anhydrase IX), 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein), A3, A33 항체에 특이적인 항원, Ba 733, BrE3-항원, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD79a, CD80, CD138, 결장-특이적 항원-p(CSAp), CSAp, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, 폴산염 수용체(folate receptor), 인간 융모성 성선자극호르몬(HCG) 및 그 소단위체들, 저산소증 유도 인자(HIF-1), Ia, IL-2, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KSI-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, PAM-4 항체에 특이적인 항원, 태반 성장 인자, p53, 전립선 산성 포스파타제(prostatic acid phosphatase), PSA, RS5, S100, TAC, 테나신(tenascin), TRAIL 수용체들, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히(Thomson-Friedenreich) 항원들, 종양 괴사 항원들, VEGF, ED-B 피브로넥틴(fibronectin), 혈관형성 표지(angiogenesis marker), 종양유전자 표지(oncogene marker), 종양유전자 생성물, 세포 표면 항원 및 자가항원으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 표적 항원에 결합하는 항체인, 항체 탑재 재조합 가스 소포 나노입자.

청구항 13

제 10항의 항체 탑재 재조합 가스 소포 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암, 자가면역 질환, 퇴행성신경 질환(neurodegenerative disease), 알츠하이머병, 대사 질환(metabolic disease), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 기관 이식 거부반응, 진균, 바이러스, 박테리아 또는 기생충에 의하여 유발되는 질환 또는 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 가스 소포 나노입자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 가스 소포 단백질(Gas vesicle protein, GVP)은 시아노박테리아(cyanobacteria) 또는 고세균(archaeobacteria)에서 발견되며, 아주 작고 속이 비워져 있어 가스(gas)가 채워질 수 있는 구조를 가지고 있다. 수십 내지 수백 nm의 크기를 가져 GV 나노입자 (GVNP)로도 불리는 가스 소포(Gas vesicles, GVs)는 수중에서의 세포 부상을 촉진하여, 빛과 산소에 대한 가용성을 증가시켜 광합성 또는 광영양 능력을 향상시킴으로써 수중 환경에서 세포 생존을 유리하게 한다 (DasSarma and DasSarma 2021). 세포에 부력을 제공하는 GVNP는 소수성을 지닌 내부 표면이 원통형 막대형태로 연결되고 불룩한 뚜껑으로 양쪽 끝이 막혀져 있는 구조로 이루어져 있다. 단백질 복합체인 가스 소포의 주요 구성성분으로는 GvpA 및 GvpC라고 불리는 두 개의 다른 단백질이 알려져 있으며 그 중 GvpA 는 약 70개의 아미노산으로 구성되어 있는 가스 소포의 주요 구성성분으로서 구조의 핵심을 형성한다.

[0003] 호염성 고세균 (halophilic Archaeon) (haloarchaeon) 모델시스템의 하나인 *Halobacterium* sp. NRC-1에서는 12 개 이상의 단백질을 암호화하는 유전자 클러스터 (gvpMLKJIHGFEDACNO)가 GVNP 발생(biogenesis)에 관련된 것으로 밝혀졌다 (Jones et al. 1991; DasSarma and Arora 1997; DasSarma and DasSarma 2021). 각각의 gvp 유전자 돌연변이에 따른 GV-결핍 표현형 분석과 더불어 (DasSarma et al. 1994), 가스 소포 단백질 복합체의 주요골격인 GV 막을 형성하는 GvpA 단백질, GV 성장을 촉진하고 구조 강화 역할을 하며 외부에 위치한 GvpC 단백질, 그리고 기능이 밝혀지지 않은 5가지의 다른 유전자 산물들 (GvpF, GvpG, GvpJ, GvpL 및 GvpM)을 포함하는 7가지의 gvp 유전자 산물이 존재하는 것으로 밝혀졌다 (DasSarma et al. 1987; Halladay et al. 1993; Shukla and DasSarma 2004; Chu et al. 2011). 이 중, GV 표면에 존재하는 GvpC는 예상 분자량이 42,391인 고산성 (pI 3.57)의 친수성 단백질이며, *Halobacterium* sp. NRC-1에서 극도의 호염성 생물(halophile)의 세포질에서 발생

하는 고염에서 나노입자를 안정화 시키는 것으로 알려졌다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 목적은 재조합 가스 소포 나노입자(GVNP)의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0005] 또한, 본 발명의 목적은 재조합 가스 소포 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명의 목적은 백신 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 항체 탑재 가스 소포 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0008] 아울러, 본 발명의 목적은 질병 또는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 재조합 가스 소포 나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 재조합 가스 소포 나노입자를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 재조합 가스 소포 나노입자를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 항체 탑재 가스 소포 나노입자를 제공한다.
- [0013] 아울러, 본 발명은 항체 탑재 가스 소포 나노입자를 유효성분으로 포함하는 질병 또는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 방법으로 제조된 재조합 가스 소포 나노입자는 나노 크기의 입자이면서 내부 유전자가 없어 생물학적으로 안전하며, 이의 외부 표면 단백질인 GvpC가 외인성 단백질을 포함하도록 재조합하여 외인성 단백질을 표면에 제시/탑재하는 가스 소포 나노입자를 재구성할 수 있으므로, 이를 생리 조건에서 활성을 가지는 다양한 항원 탑재 백신 조성물, 표적 특이적 운반체, 센서 또는 표적 특이적 치료 용도로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 재조합 GvpC-IgG-binding(GB) domain 융합 단백질 GvpC4GB 및 GvpC3GB을 각각 포함하는 컨스트럭트의 모식도 및 이의 발현을 면역 블롯 분석으로 확인한 도이다.
- 도 2는 다양한 조건에서의 융합 단백질이 결합된 GVNP 복합체 제작 효율을 확인한 도이다.
- 도 3은 융합 단백질 GvpC3GB 및 GvpC4GB의 혼합 비율에 따른 GVNP 복합체 형성 (a) 및 GVNP에 대한 융합 단백질의 결합 안정성 (b)을 확인한 도이다:
- 라인 1: GvpC3GB 및 GvpC4GB을 5:1의 비율로 혼합한 GVNP 복합체의 부상분리액;
- 라인 2: GvpC3GB 및 GvpC4GB을 5:1의 비율로 혼합한 GVNP 복합체의 상부 분획;
- 라인 3: GvpC3GB 및 GvpC4GB을 1:1의 비율로 혼합한 GVNP 복합체의 부상분리액;
- 라인 4: GvpC3GB 및 GvpC4GB을 1:1의 비율로 혼합한 GVNP 복합체의 상부 분획;
- 라인 5: GvpC3GB 및 GvpC4GB을 1:5의 비율로 혼합한 GVNP 복합체의 부상분리액; 및
- 라인 6: GvpC3GB 및 GvpC4GB을 1:5의 비율로 혼합한 GVNP 복합체의 상부 분획.
- 도 4는 재조합 GvpCGB이 표면에 결합된 GVNP 복합체의 기능성을 확인한 도이다:
- a: 여러 염농도 조건에서 GvpC3GB와 GVNP 반응 후 원심분리에 의하여 GVNP층 분리 후 화학 발광 (chemiluminescence) 반응을 이용한 검출:
- 1: 1X PBS 조건의 부상분리액;

2: 1X PBS 조건의 상부 분획;

3: 3 M NaCl조건의 부상분리액; 및

4: 3 M NaCl조건의 상부 분획.

b: GvpC3GB 존재 유무에 따른 GVNP와 HRP-연결 2차 항체 혼합물에서의 화학 발광(chemiluminescence) 반응을 이용한 검출:

1: GVNPs + HRP-linked anti-rabbit antibodies 혼합물의 부상분리액;

2: GVNPs + HRP-linked anti-rabbit antibodies 혼합물의 상부 분획;

3: GVNPs + HRP-linked anti-rabbit antibodies + GvpC3GB 혼합물의 부상분리액; 및

4: GVNPs + HRP-linked anti-rabbit antibodies + GvpC3GB 혼합물의 상부 분획.

도 5는 본 발명에서 외인성으로 생성된 GvpCGB 융합 단백질을 GVNPs에 결합시켜 GVNP 복합체를 제작하고 이의 외부 표면에 IgG를 결합시켜 이용하는 과정을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0017] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0019] 일 측면에서, 본 발명은 a) 할로박테리움 종(*Halobacterium* sp.)을 배양하는 단계; b) 가스 소포(Gas vesicles, GVs)를 수집하는 단계; c) 가스 소포에서 GvpC를 제거하는 단계; d) 외인성 재조합 단백질로서 GvpC의 전장 또는 이의 단편과 외인성 단백질이 융합된 재조합 단백질을 제작하는 단계; 및 e) GvpC를 제거한 가스 소포와 외인성 재조합 단백질을 반응시켜 재조합 GVNP 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, 재조합 가스 소포 나노입자(GVNP)의 제조방법에 관한 것이다.

[0020] 일 구현예에서, 할로박테리움 종은 *Halobacterium* sp NRC-1일 수 있다.

[0021] 일 구현예에서, 단계 c)에서 요소(urea)를 처리하고 투석하여 GvpC를 제거할 수 있다.

[0022] 일 구현예에서, GvpC의 전장은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, GvpC의 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, GvpC의 전장은 서열번호 6의 염기서열로 코딩될 수 있고, GvpC의 단편은 서열번호 7의 염기서열로 코딩될 수 있다.

[0024] 일 구현예에서, 외인성 단백질은 한 종류 이상의 항원일 수 있으며, 상기 항원은 바이러스의 에피토프(epitope)일 수 있고, 어류 바이러스의 에피토프인 것이 더욱 바람직하다.

[0025] 일 구현예에서, 외인성 단백질은 GB(IgG-binding) 도메인일 수 있으며, 이 경우 상기 방법은 재조합 GVNP 복합체에 한 가지 이상의 항체를 결합시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0026] 일 구현예에서, GB(IgG-binding) 도메인은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 8의 염기서열로 코딩될 수 있다.

[0027] 일 구현예에서, 재조합 단백질은 GvpC의 전장과 GB(IgG-binding) 도메인이 융합된 재조합 단백질일 수 있으며,

서열번호 4의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 9의 염기서열로 코딩될 수 있다.

- [0028] 일 구현예에서, 재조합 단백질은 GvpC의 단편과 GB(IgG-binding) 도메인이 융합된 재조합 단백질일 수 있으며, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 10의 염기서열로 코딩될 수 있다.
- [0029] 일 구현예에서, 외인성 재조합 단백질은 대장균에서 발현 및 정제될 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 상기 단계 c)에서 GvpC를 제거한 가스 소포 (GVNP)와 단계 d)에서 제작한 재조합 GvpCGB를 3 M NaCl이 포함된 1 X PBS 에서 혼합하고, 실온에서 2시간 동안 반응시킨 뒤, 저속 (60 xg)에서 원심분리하며, 수거한 상층액을 3M NaCl이 함유된 1X PBS 용액과 혼합한 후 상기 방법을 반복하여 형성된 재조합 GVNP 복합체 (GvpCGB::GVNP)를 분리 및 정제하고, 분리 및 정제된 GVNP 복합체에 표적 항체를 혼합한 다음 상기 과정을 반복하여 항체가 결합된 GVNP를 제작할 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체 또는 인간화 항체, 또는 이의 단편일 수 있으며, 상기 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0032] 상기 항체는 전체(whole) 항체 형태일 뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(heavy chain)를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 항체 단편의 예는 (i) 경쇄의 가변영역(VL) 및 중쇄의 가변영역(VH)과 경쇄의 불변영역(CL) 및 중쇄의 첫번째 불변 영역(CH1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward ES et al., Nature 341:544-546 (1989)); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv 분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody) W094/13804) 등을 포함한다.
- [0033] 본 발명에서, 용어 "가스 소포(Gas vesicles, GVs)" 및 "가스 소포 나노입자(GVNP)"는 동일한 것을 지칭하며 혼용될 수 있다.
- [0034] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 재조합 가스 소포 나노입자에 관한 것이다.
- [0035] 일 구현예에서, 본 발명의 방법으로 제조된 재조합 가스 소포 나노입자는 GvpC의 전장 또는 이의 단편과 융합된 외인성 단백질에 따라 다양한 용도로 사용될 수 있으며, 그 일례로, 특정 바이러스의 에피토프를 포함하는 항원과 융합된 경우 백신 조성물로 사용될 수 있고, 이의 경우 투여가 용이하고 안정성이 증가하는 효과가 있다.
- [0036] 일 구현예에서, 본 발명의 방법으로 제조된 재조합 가스 소포 나노입자는 GvpC의 전장 또는 이의 단편과 GB(IgG-binding) 도메인을 융합한 재조합 단백질 GvpC-GB를 외인성 재조합 단백질로서 포함할 수 있으며, 이 경우 재조합 GVNP 복합체에 한 가지 이상의 항체를 결합한 항체 탑재 재조합 가스 소포 나노입자일 수 있다.
- [0037] 일 구현예에서, 상기 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 미니바디(minibody), 도메인 항체, 이중특이적 항체, 항체 모방체, 키메라 항체, 항체 접합체(conjugate), 인간항체 또는 인간화 항체, 또는 이의 단편일 수 있으며, 상기 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0038] 일 구현예에서, 항체는 17-1A 항원, GD3 갱글리오시드 R24, EGFRvIII, PSMA, PSCA, HLA-DR, EpCAM, MUC1 코어 단백질, 이상 글리코실화 MUC1, ED-B 도메인을 함유하는 피브로넥틴 이형, HER2/neu, 암종배아성 항원(CEA), 가스 트린-방출 펩티드(GRP) 수용체 항원, 뮤신(mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), HER3, HER4, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원, TAG 72, 탄산 무수화효소 IX(carbonic anhydrase IX), 알파-태아 단백질(alpha-fetoprotein), A3, A33 항체에 특이적인 항원, Ba 733, BrE3-항원, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD79a, CD80, CD138, 결합-특이적 항원-p(CSAp), CSAp, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, 폴산염 수용체(folate receptor), HLA-DR, 인간 융모성 성선자극호르몬(HCG) 및 그 소단위체들, 저산소증 유도 인자(HIF-1), Ia, IL-

2, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KS1-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, PAM-4 항체에 특이적인 항원, 태반 성장 인자, p53, 전립선 산성 포스파타제(prostatic acid phosphatase), PSA, RS5, S100, TAC, 테나신(tenascin), TRAIL 수용체들, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히(Thomson-Friedenreich) 항원들, 종양 괴사 항원들, VEGF, ED-B 피브로넥틴(fibronectin), 혈관형성 표지(angiogenesis marker), 종양유전자 표지(oncogene marker), 종양유전자 생성물, 세포 표면 항원 및 자가항원으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 표적 항원에 결합하는 항체일 수 있다.

[0039] 일 구현예에서, 본 발명의 재조합 가스 소포 나노입자를 코딩하는 단리된 핵산 분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.

[0040] 본 발명의 핵산 분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. 단리된 핵산은, 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 작동가능하게 연결된 것은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[0041] 본 발명의 재조합 가스 소포 나노입자를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 재조합 가스 소포 나노입자를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 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, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 핵산 분자는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 핵산 분자의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA)분자일 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 본 발명의 재조합 가스 소포 나노입자를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 단백질 발현을 위해 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 발현벡터는, 통상 조절 또는 제어(regulatory) 서열, 선별마커, 임의의 융합 파트너, 및/또는 추가적 요소와 작동가능하게 연결된, 즉, 기능적 관계에 놓인 단백질을 포함한다. 적절한 상태에서, 핵산으로 형질전환된 숙주세포, 바람직하게는, 본 발명의 재조합 가스 소포 나노입자를 코딩하는 단리된 핵산 분자 함유 발현벡터를 배양하여 단백질 발현을 유도하는 방법에 의해 본 발명의 재조합 가스 소포 나노입자가 생산될 수 있다. 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모를 포함하는 다양한 적절한 숙주세포가 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 외인성 핵산을 숙주세포에 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주세포에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는, 생산비가 저렴하여 산업적 이용가치가 높은 대장균을 숙주세포로 생산할 수 있다.

[0043] 본 발명에서, 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

[0044] 본 발명에서, 용어 "숙주세포"는 진핵생물, 원핵생물 및 고세균(아키아)을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.

- [0045] 일 측면에서, 본 발명은 상기 항체 탑재 제조합 가스 소포 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암, 자가면역 질환, 퇴행성신경 질환(neurodegenerative disease), 알츠하이머병, 대사 질환(metabolic disease), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 기관 이식 거부반응, 진균, 바이러스, 박테리아 또는 기생충에 의하여 유발되는 질환 또는 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 질병 또는 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0047] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질병 또는 질환 및 이로 인한 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0048] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 질병 또는 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질병 또는 질환의 종류, 질병 또는 질환의 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 체제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 체제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 체제화할 수 있다.
- [0051] 일 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 또는 주사 제형이 더욱 바람직하다.
- [0052] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 과라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링

겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 질병 또는 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 어류(양식 어류), 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 박쥐, 낙타, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, "검체"란 이로부터 분리한 비말, 가래, 전혈, 혈장, 혈청, 뇨 또는 타액일 수 있다.

[0054] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0058] 실시예 1. GvpC-IgG-binding domain (GB) 융합 단백질 제작

[0059] 서로 다른 길이의 GvpC를 포함하는 두 가지 버전의 GvpC-연쇄상구균(*Streptococcal*) IgG-binding (GB) 도메인 융합 단백질로서, 전체 길이의 GvpC를 포함하는 GvpC4GB 및 C-말단의 산성 테일이 결실된 GvpC3GB를 제작하였다. 구체적으로, 연쇄상구균 단백질 GB1 도메인을 융합 단백질로 발현시키기 위해 선택하고, IgG-binding (GB) 도메인의 54개의 아미노산과 양 말단에 *AfeI* 및 *BamHI*의 제한효소 자리에 상응하는 서열을 포함하는 4개의 올리고뉴클레오타이드(표 1)를 어닐링 후 GvpC4GB 및 GvpC3GB를 암호화하는 두 개의 융합 유전자를 구성하였다. 이를 *E. coli* 발현 플라스미드 pET19b에 삽입하여 발현 플라스미드 pET19b-GvpC3GB 및 pET19b-GvpC4GB의 컨스트럭트를 제작하였다(도 1A). 제작한 플라스미드들을 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하고 유도하여 발현시킨 후, 친화성 컬럼 크로마토그래피로 융합 단백질들을 정제하였다. 항-래빗 IgG 항체를 이용한 면역블롯 분석으로 60 kDa (GvpC3GB) 및 70 kDa (GvpC4GB)의 밴드를 확인함으로써 정제한 융합 단백질들을 확인하였다(도 1B). 참고로, 실제 GvpC4GB의 분자량은 48 kDa이고 GvpC3GB의 분자량은 37 kDa이나 상기의 분자량 변동은 고산성 *Halobacterium* 단백질이기 때문에 이전부터 관찰되는 현상이다(Halladay et al. 1993; Shukla and DasSarma 2004).

표 1

[0060]

프라이머 명	서열 (5'→3')
GB1F	GCT TAC AAG CTC ATC CTG AAC GGC AAG ACC CTC AAA GGG GAG ACC ACG ACC GAA GCC GTC GAC GCC GCG ACC GCC GAG
GB2F	AAG GTC TTC AAG CAG TAC GCG AAC GAC AAC GGC GTG GAC GGC GAA TGG ACG TAC GAC GAC GCC ACC AAG ACG TTC ACC GTC ACC GAA GCT TGA G
GB2R	GATCC TCA AGC TTC GGT GAC GGT GAA CGT CTT GGT GGC GTC GTC GTA CGT CCA TTC GCC GTC CAC GCC GTT GTC GTT CGC
GB1R	GTA CTG CTT GAA GAC CTT CTC GGC GGT CGC GGC GTC GAC GGC TTC GGT CGT GGT CTC CCC TTT GAG GGT CTT GCC GTT CAG GAT GAG CTT GTA AGC

[0062] 실시예 2. GVNP 정제 및 GvpC 제거

[0063] *Halobacterium* sp. NRC-1 (ATCC 700922/JCM11081)를 CM^+ 배지에서 배양한 뒤, CM^+ 아가 플레이트에 분주하여 핑크색의 탁한 군집(turbid lawns)이 형성될 때까지 37℃에서 3주 동안 배양하였다 (DasSarma et al. 1995). 그 후, *Halobacterium* sp. NRC-1의 군집에 1 mM $MgSO_4$ 및 1 mg/ml의 DNase I (Sigma Aldrich)를 함유하는 5 ml의 1X PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM sodium phosphate dibasic 및 2 mM potassium phosphate monobasic (pH 7.2))를 첨가하여 세포를 용해하고, 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 과쇄물을 60 x g에서 12시간 동안 원심분리하여 온전한 부력이 있는(buoyant) GVNPs를 수집하고 이의 2 내지 3배 부피의 1 x PBS에 재현탁한 뒤 원심분리하였다. 그 뒤, 유백색 현탁액의 정제된 GVNP를 수득할 때까지 가속 부유 과정을 추가로 4회 수행하였다. 정제된 GVNP에 5 M urea를 2시간 동안 처리한 후 투석을 진행하여 GvpC가 제거된 GVNP(DGvpC)를 제작하였다.

[0064]

[0065] 실시예 3. 융합 단백질이 결합된 GVNP 복합체 제작

[0066] 3-1. 염 농도에 따른 GVNP 복합체 형성 확인

[0067] 외인성 GvpC 융합 단백질과 Haloarchaeal GVNPs의 결합을 다양한 염 농도에서 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제작한 융합 단백질 GvpC4GB 및 GvpC3GB를 상기 실시예 2에서 제작한 GVNP(DGvpC)와 각각 혼합하고 0.7 M NaCl, 3.5 M NaCl, 0.07x BS(Basal Salts) (250 g NaCl, 20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g KCl, 및 3 g $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) 또는 0.7x BS의 조건으로, 25℃에서 1.5시간 동안 각각 인큐베이션한 후 300 x g에서 30분 동안 원심분리하여 2/3 부피의 부상분리액(subnatant) 및 나머지 GVNP-포함 상부/부유(top/floating) 층을 분리하였다. 분리한 GVNP를 함유하는 상부층과 부상분리액에서의 재조합 GvpCGB의 수준을 비교하기 위해, 각 분획을 100 mM Tris-Cl (pH 6.8), 4% (w/v) SDS, 20% glycerol 및 200 mM β -mercaptoethanol을 포함하는 동일한 부피의 2 x SDS-PAGE 젤 로딩 버퍼와 혼합하고, 4분 동안 가열한 뒤 SDS-PAGE 및 면역 블롯 분석을 수행한 뒤, ImageJ로 정량하였다. 그 결과, 부상분리액에 비해 GVNP가 포함된 상부층에서 GvpC 융합 단백질인 GvpCGBs가 현저히 많은 것으로 나타나, GvpC3GB 및 GvpC4GB 모두 정제된 야생형 GVNPs와 복합체를 형성할 수 있음을 확인하였다. 또한, 이와 같은 GVNP 복합체 형성 수준이 더 높은 염 농도에서 증가하는 것으로 나타나 (도 2), 재조합 GvpC의 GVNP 플랫폼과의 결합이 고염 조건에서 더 용이한 것을 알 수 있다.

[0069] 3-2. 융합 단백질 종류에 따른 GVNP 복합체 형성 확인

[0070] 외인성 GvpC 융합 단백질인 GvpCGB의 C-말단 영역 유무에 따른 Haloarchaeal GVNPs와의 경쟁적 결합을 확인하기 위해, 두 종류의 융합 단백질 GvpC3GB 및 GvpC4GB의 양을 다양한 비율로 구성하여 GVNP와 혼합하여 결합 정도를 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제작한 융합 단백질 GvpC3GB 및 GvpC4GB를 다양한 비율 (5:1, 1:1 및 1:5)로 혼합한 뒤, 각각 상기 실시예 2에서 제작한 GVNP(DGvpC)와 혼합하여 25℃에서 1.5시간 동안 인큐베이션 후 300 x g에서 30분 동안 원심분리하여 2/3 부피의 부상분리액 및 나머지 GVNP 포함 상부(top) 분획 (상부층)을 분리하였다. GvpC3GB 및 GvpC4GB의 비율에 따른 분리한 GVNP를 함유하는 상부층과 부상분리액에서의 재조합 GvpCGB의 수준을 비교하기 위해 상기 실시예 3-1에서와 같이 SDS-PAGE 및 면역 블롯 분석을 수행하였다. 그 결과, GVNPs에 비해 과량의 재조합 GvpCGBs으로 결합을 수행하였을 때, 부상분리액 및 상부층에서 검출된 GvpC3GB 및 GvpC4GB의 수준이 미리 정해진 비율대로 서로 유사한 것으로 나타났다 (도 3a). 상기에서 분리한 GVNP 포함 상부(top) 분획을 수집하여 5배 부피의 3M NaCl을 함유하는 1X PBS에 희석한 후 2 회 저속에서 원심분리하고 면역 블롯 분석을 수행하였다. 여기에서, 도 3b의 라인 2는 GvpC3GB 및 GvpC4GB을 5:1의 분자량으로 혼합한 상부층이고; 라인 4는 GvpC3GB 및 GvpC4GB을 1:1의 분자량으로 혼합한 상부층이며; 및 라인 6은 GvpC3GB 및 GvpC4GB을 1:5의 분자량으로 혼합한 상부층이고, 이들을 각기 다시 희석 후 원심분리하여 확보한 부상분리액 이 라인 1, 3 및 5 이며, 상부층이 라인 2, 4 및 6이다.

[0071] 그 결과, 부상분리액 (1, 3, 5)에 비해 GVNP-함유 상부층 (2, 4, 6)에서 융합 단백질이 더 많이 검출된 결과는 상당한 부분의 GvpC3GB가 GVNPs에 결합된 상태로 남아 있음을 나타냈다 (도 3b). 각 실험에서 GVNP가 포함된 상부층에서 검출된 GvpC3GB 융합 단백질 및 GvpC4GB 융합 단백질의 비율 (1:5 내지 5:1)은 원래 첨가한 혼합물의 비율과 유사한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 융합 단백질의 GvpC 길이에 따른 우선적인 결합이 없으며, GvpCGB의 C-말단의 산성 아미노산이 풍부한 테일이 GVNP에 대한 결합을 증가시키지 않음을 나타낸다.

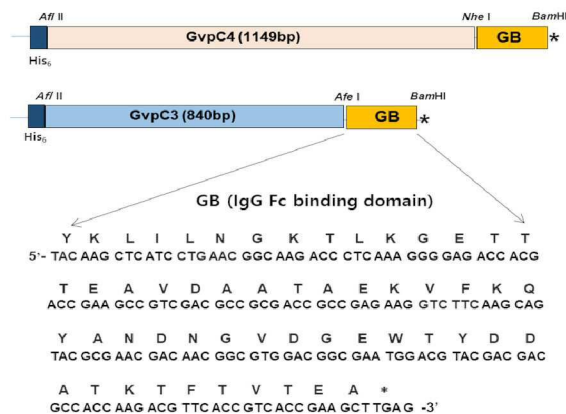
[0073] 실시예 4. 재조합 GvpC3GB이 결합된 GVNP 복합체의 기능성 확인

[0074] 상기 실시예 3에서 제작한 GB(IgG-binding) 도메인을 디스플레이하는 GVNP 복합체가 기능적인가를 HRP-linked anti-rabbit IgG 항체와의 결합을 이용하여 확인하였다. 결합 분석을 위해, GvpC3GB 융합 단백질과 과량의 GVNP를 이용하여 1x PBS 또는 3M NaCl PBS 버퍼에서 상기 실시예에서와 같이 GvpC3GB-GVNP 복합체를 제작한 뒤, GVNP-함유 상부층을 수집 후 동일한 염 농도에서 HRP-linked 이차 항체와 인큐베이션한 다음 원심분리하였다. 그 후 각 분획에서 GvpC3GB의 수준을 HRP-linked 항체로 촉매되는 화학 발광(chemiluminescence) 반응으로 확인하였다 (도 4a). 그 결과, 화학 발광이 GVNP-함유 상부층 (도 4a의 2 및 4)에서 부상분리액 (도 5a의 1 및 3)에 비해 현저히 높게 나타나, GvpC3GB가 GVNP 복합체와의 결합하고 있음을 확인하였다(도 4a). 또한, 3M NaCl 존재하에서의 화학발광 수준(도 4a의 4)이 1 X PBS (도 4a의 2)조건에 비해 더 높은 것으로 나타나, 높은 염농도에서 GvpC3GB와 GVNP 복합체 형성이 촉진됨을 확인하였다 (도 4a). 아울러, 야생형 GVNP의 구성 요소에 대한 HRP-linked 항체의 비-특이적 결합으로 인한 화학발광 수준을 확인하기 위해, 융합 단백질의 존재 유무에 따른 결합 분석을 수행하였다. 실험 결과는 GvpC3GB가 없는 상태에서 HRP-linked 항체가 GVNP에 약한 수준이나 비특이적 결합함을 보여주나(도 4b 1 및 2), GvpC3GB 존재하에서는 훨씬 더 높은 수준의 화학발광을 보여주었다. 실험결과는 GvpC3GB 융합 단백질이 GVNP에 결합하고, GVNP 복합체의 외부 표면에서 IgG에 결합하는 GB의 기능을 유지하는 것으로 나타났다 (도 4b).

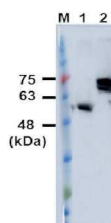
도면

도면1

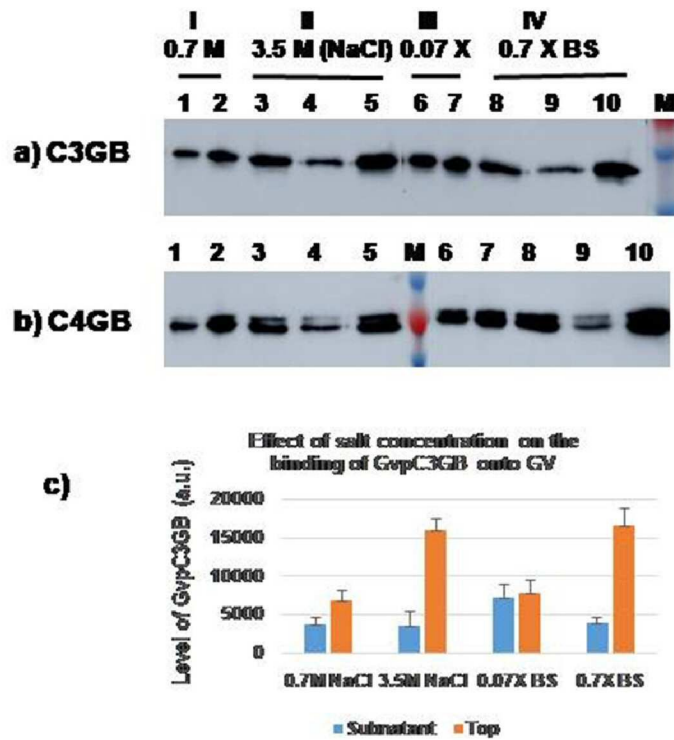
(A) Recombinant GvpC3::GB & C4::GB constructs



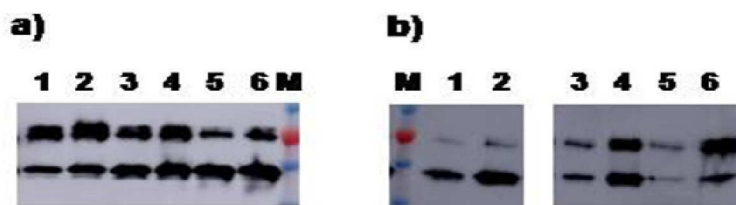
(B)



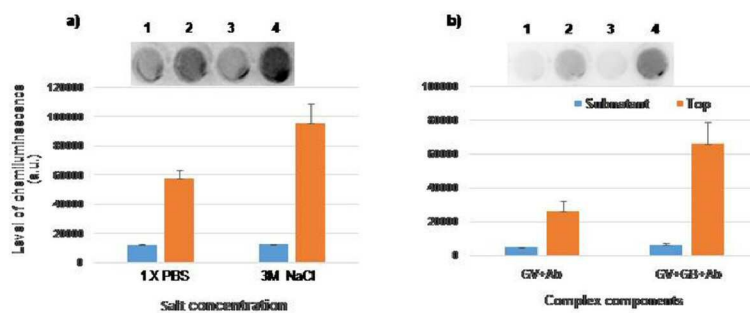
도면2



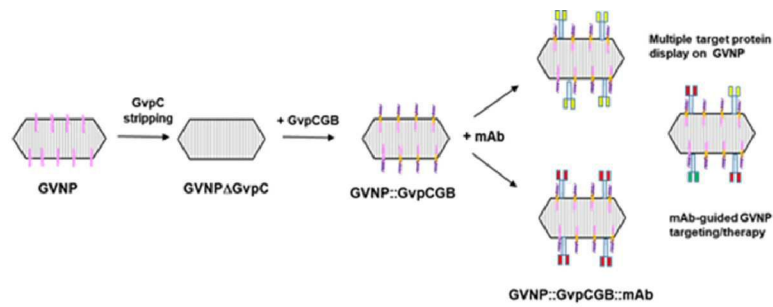
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Recombinant gas vesicle nanoparticles

<130> PN

<160> 10

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 382

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GvpC4

<400> 1

Met Ser Val Thr Asp Lys Arg Asp Glu Met Ser Thr Ala Arg Asp Lys

1 5 10 15

Phe Ala Glu Ser Gln Gln Glu Phe Glu Ser Tyr Ala Asp Glu Phe Ala

20 25 30

Ala Asp Ile Thr Ala Lys Gln Asp Asp Val Ser Asp Leu Val Asp Ala

35 40 45

Ile Thr Asp Phe Gln Ala Glu Met Thr Asn Thr Thr Asp Ala Phe His

50 55 60

Thr Tyr Gly Asp Glu Phe Ala Ala Glu Val Asp His Leu Arg Ala Asp

65 70 75 80

Ile Asp Ala Gln Arg Asp Val Ile Arg Glu Met Gln Asp Ala Phe Glu

85 90 95

Ala Tyr Ala Asp Ile Phe Ala Thr Asp Ile Ala Asp Lys Gln Asp Ile

100 105 110

Gly Asn Leu Gln Ala Ala Ile Glu Ala Leu Arg Thr Glu Met Asn Ser

115 120 125

Thr His Gly Ala Phe Glu Ala Tyr Ala Asp Asp Phe Ala Ala Asp Val

130 135 140

Ala Ala Leu Arg Asp Ile Ser Asp Leu Val Ala Ala Ile Asp Asp Phe

145 150 155 160

Gln Glu Glu Phe Ile Ala Val Gln Asp Ala Phe Asp Asn Tyr Ala Gly

165 170 175

Asp Phe Asp Ala Glu Ile Asp Gln Leu His Ala Ala Ile Ala Asp Gln

180 185 190

His Asp Ser Phe Asp Ala Thr Ala Asp Ala Phe Ala Glu Tyr Arg Asp

195 200 205

Glu Phe Tyr Arg Ile Glu Val Glu Ala Leu Leu Glu Ala Ile Asn Asp

210 215 220

Phe Gln Gln Asp Ile Gly Asp Phe Arg Ala Glu Phe Glu Thr Thr Glu

225 230 235 240

Asp Ala Phe Val Ala Phe Ala Arg Asp Phe Tyr Gly His Glu Ile Thr

245 250 255

Ala Glu Glu Gly Ala Ala Glu Ala Glu Ala Glu Pro Val Glu Ala Asp

260 265 270

Ala Asp Val Glu Ala Glu Ala Glu Val Ser Pro Asp Glu Ala Gly Gly

275 280 285

Glu Ser Ala Gly Thr Glu Glu Glu Glu Thr Glu Pro Ala Glu Val Glu

290 295 300

Thr Ala Ala Pro Glu Val Glu Gly Ser Pro Ala Asp Thr Ala Asp Glu

305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Glu Ala Glu Glu Glu Thr Glu Glu Glu Ala Pro Glu

325 330 335

Asp Met Val Gln Cys Arg Val Cys Gly Glu Tyr Tyr Gln Ala Ile Thr

340 345 350
 Glu Pro His Leu Gln Thr His Asp Met Thr Ile Gln Glu Tyr Arg Asp
 355 360 365
 Glu Tyr Gly Glu Asp Val Pro Leu Arg Pro Asp Asp Lys Thr
 370 375 380
 <210> 2
 <211> 284
 <212>
 PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GvpC3
 <400> 2
 Met Ser Val Thr Asp Lys Arg Asp Glu Met Ser Thr Ala Arg Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Ala Glu Ser Gln Gln Glu Phe Glu Ser Tyr Ala Asp Glu Phe Ala
 20 25 30
 Ala Asp Ile Thr Ala Lys Gln Asp Asp Val Ser Asp Leu Val Asp Ala
 35 40 45
 Ile Thr Asp Phe Gln Ala Glu Met Thr Asn Thr Thr Asp Ala Phe His
 50 55 60
 Thr Tyr Gly Asp Glu Phe Ala Ala Glu Val Asp His Leu Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Ile Asp Ala Gln Arg Asp Val Ile Arg Glu Met Gln Asp Ala Phe Glu
 85 90 95
 Ala Tyr Ala Asp Ile Phe Ala Thr Asp Ile Ala Asp Lys Gln Asp Ile
 100 105 110
 Gly Asn Leu Gln Ala Ala Ile Glu Ala Leu Arg Thr Glu Met Asn Ser
 115 120 125
 Thr His Gly Ala Phe Glu Ala Tyr Ala Asp Asp Phe Ala Ala Asp Val
 130 135 140
 Ala Ala Leu Arg Asp Ile Ser Asp Leu Val Ala Ala Ile Asp Asp Phe
 145 150 155 160
 Gln Glu Glu Phe Ile Ala Val Gln Asp Ala Phe Asp Asn Tyr Ala Gly

165 170 175
 Asp Phe Asp Ala Glu Ile Asp Gln Leu His Ala Ala Ile Ala Asp Gln
 180 185 190
 His Asp Ser Phe Asp Ala Thr Ala Asp Ala Phe Ala Glu Tyr Arg Asp

195 200 205
 Glu Phe Tyr Arg Ile Glu Val Glu Ala Leu Leu Glu Ala Ile Asn Asp
 210 215 220
 Phe Gln Gln Asp Ile Gly Asp Phe Arg Ala Glu Phe Glu Thr Thr Glu
 225 230 235 240
 Asp Ala Phe Val Ala Phe Ala Arg Asp Phe Tyr Gly His Glu Ile Thr
 245 250 255
 Ala Glu Glu Gly Ala Ala Glu Ala Glu Ala Glu Pro Val Glu Ala Asp
 260 265 270

Ala Asp Val Glu Ala Glu Ala Glu Pro Arg Ser Ala

275 280
 <210> 3
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GB(Ig-Gbindingdomain)
 <400> 3

Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys

35 40 45
 Thr Phe Thr Val Thr Glu Ala
 50 55
 <210> 4
 <211> 450
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GvpC4-GB

<400> 4

Met His His His His His His Leu Lys Met Ser Val Thr Asp Lys Arg

1 5 10 15

Asp Glu Met Ser Thr Ala Arg Asp Lys Phe Ala Glu Ser Gln Gln Glu

20 25 30

Phe Glu Ser Tyr Ala Asp Glu Phe Ala Ala Asp Ile Thr Ala Lys Gln

35 40 45

Asp Asp Val Ser Asp Leu Val Asp Ala Ile Thr Asp Phe Gln Ala Glu

50 55 60

Met Thr Asn Thr Thr Asp Ala Phe His Thr Tyr Gly Asp Glu Phe Ala

65 70 75 80

Ala Glu Val Asp His Leu Arg Ala Asp Ile Asp Ala Gln Arg Asp Val

85 90 95

Ile Arg Glu Met Gln Asp Ala Phe Glu Ala Tyr Ala Asp Ile Phe Ala

100 105 110

Thr Asp Ile Ala Asp Lys Gln Asp Ile Gly Asn Leu Gln Ala Ala Ile

115 120 125

Glu Ala Leu Arg Thr Glu Met Asn Ser Thr His Gly Ala Phe Glu Ala

130 135 140

Tyr Ala Asp Asp Phe Ala Ala Asp Val Ala Ala Leu Arg Asp Ile Ser

145 150 155 160

Asp Leu Val Ala Ala Ile Asp Asp Phe Gln Glu Glu Phe Ile Ala Val

165 170 175

Gln Asp Ala Phe Asp Asn Tyr Ala Gly Asp Phe Asp Ala Glu Ile Asp

180 185 190

Gln Leu His Ala Ala Ile Ala Asp Gln His Asp Ser Phe Asp Ala Thr

195 200 205

Ala Asp Ala Phe Ala Glu Tyr Arg Asp Glu Phe Tyr Arg Ile Glu Val

210 215 220

Glu Ala Leu Leu Glu Ala Ile Asn Asp Phe Gln Gln Asp Ile Gly Asp

225 230 235 240
 Phe Arg Ala Glu Phe Glu Thr Thr Glu Asp Ala Phe Val Ala Phe Ala
 245 250 255

 Arg Asp Phe Tyr Gly His Glu Ile Thr Ala Glu Glu Gly Ala Ala Glu
 260 265 270
 Ala Glu Ala Glu Pro Val Glu Ala Asp Ala Asp Val Glu Ala Glu Ala
 275 280 285
 Glu Val Ser Pro Asp Glu Ala Gly Gly Glu Ser Ala Gly Thr Glu Glu
 290 295 300
 Glu Glu Thr Glu Pro Ala Glu Val Glu Thr Ala Ala Pro Glu Val Glu
 305 310 315 320
 Gly Ser Pro Ala Asp Thr Ala Asp Glu Ala Glu Asp Thr Glu Ala Glu

 325 330 335
 Glu Glu Thr Glu Glu Glu Ala Pro Glu Asp Met Val Gln Cys Arg Val
 340 345 350
 Cys Gly Glu Tyr Tyr Gln Ala Ile Thr Glu Pro His Leu Gln Thr His
 355 360 365
 Asp Met Thr Ile Gln Glu Tyr Arg Asp Glu Tyr Gly Glu Asp Val Pro
 370 375 380
 Leu Arg Pro Asp Asp Lys Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Lys Leu Ile Leu
 385 390 395 400

 Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala
 405 410 415
 Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val
 420 425 430
 Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr
 435 440 445
 Glu Ala
 450
 <210> 5
 <211> 348
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GvpC3-GB

<400> 5

Met His His His His His His Leu Lys Met Ser Val Thr Asp Lys Arg

1 5 10 15
Asp Glu Met Ser Thr Ala Arg Asp Lys Phe Ala Glu Ser Gln Gln Glu

20 25 30
Phe Glu Ser Tyr Ala Asp Glu Phe Ala Ala Asp Ile Thr Ala Lys Gln

35 40 45
Asp Asp Val Ser Asp Leu Val Asp Ala Ile Thr Asp Phe Gln Ala Glu

50 55 60
Met Thr Asn Thr Thr Asp Ala Phe His Thr Tyr Gly Asp Glu Phe Ala

65 70 75 80

Ala Glu Val Asp His Leu Arg Ala Asp Ile Asp Ala Gln Arg Asp Val
85 90 95

Ile Arg Glu Met Gln Asp Ala Phe Glu Ala Tyr Ala Asp Ile Phe Ala
100 105 110

Thr Asp Ile Ala Asp Lys Gln Asp Ile Gly Asn Leu Gln Ala Ala Ile
115 120 125

Glu Ala Leu Arg Thr Glu Met Asn Ser Thr His Gly Ala Phe Glu Ala
130 135 140

Tyr Ala Asp Asp Phe Ala Ala Asp Val Ala Ala Leu Arg Asp Ile Ser

145 150 155 160
Asp Leu Val Ala Ala Ile Asp Asp Phe Gln Glu Glu Phe Ile Ala Val

165 170 175
Gln Asp Ala Phe Asp Asn Tyr Ala Gly Asp Phe Asp Ala Glu Ile Asp

180 185 190
Gln Leu His Ala Ala Ile Ala Asp Gln His Asp Ser Phe Asp Ala Thr

195 200 205
Ala Asp Ala Phe Ala Glu Tyr Arg Asp Glu Phe Tyr Arg Ile Glu Val

210 215 220

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

290 295 300
 Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val
 305 310 315 320
 Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr
 325 330 335
 Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Ala
 340 345

<210> 6
 <211> 1149
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GvpC4
 <400> 6

atgagtgtca cagacaaacg cgacgagatg agtactgccc gcgataagtt cgcagaatca	60
cagcaggagt tcgaatcata cgctgacgag ttgacgccc atatcacggc aaagcaagac	120
gatgtcagcg accttgtcga tgcgatcacc gacttcagg cggagatgac caacacgacg	180
gatgcatttc acacatatgg tgacgagttc gccgctgagg ttgaccacct ccgtgccgat	240
attgacgccc agcgggacgt gatccgtgag atgcaggatg cgttcgaggc atatgctgac	300
atcttcgcta cagatatcgc agacaaacaa gatatcggca atcttcaggc tgcgattgag	360
gcgctccgaa cagagatgaa ctcaaccac ggggcattcg aagcatatgc ggacgacttc	420
gcagccgatg tcgctgcgct ccgtgatata tctgatctgg ttgcagcaat cgacgacttc	480
caagaggaat tcatcgccgt gcaggacgca ttgacaact acgctggtga cttcgatgcg	540
gagatcgacc agctccacgc tgccatcgct gaccagcacg acagcttcga cgctaccgcg	600

gacgccttcg cagagtaccg agatgagttc tatcgcatag aggtggaagc actgcttgag	660
gcgatcaacg acttccagca ggacatcggg gacttccgag cggagtttga aacgactgag	720
gacgcgttcg ttgccttcgc ccgtgacttc tatggccacg agatcacggc cgaggaaggc	780
gccgccgaag cggaagccga acccgtcgag gctgacgcgg acgtcgaagc ggaagcagaa	840
gtctctccag acgaagctgg cggagaatcc gccggtaccg aggaagaaga gacagagccg	900
gccgaggtgg aaacagcggc tccagaagta gaggggagtc ctgcggacac ggcagacgaa	960
gcggaagata cggaagcaga ggaggagaca gaggaagagg caccggaaga catggtgcag	1020
tgccgggtgt gcggcgaata ctatcaggcc atcacggagc cccatctcca gacctatgat	1080
atgacgattc aggagtaccg cgacgagtac ggtgaggatg tcccccttcg gccggatgat	1140
aaaacatga	1149
<210> 7	
<211> 852	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GvpC3	
<400> 7	
atgagtgtca cagacaaacg cgacgagatg agtactgccc gcgataagtt cgcagaatca	60
cagcaggagt tcgaatcata cgctgacgag ttgacgccc atatacggc aaagcaagac	120
gatgtcagcg acctgttcca tgcgatcacc gacttccagg cggagatgac caacacgacg	180
gatgcatttc acacatatgg tgacgagttc gccgctgagg ttgaccacct ccgtgccgat	240
attgacgccc agcgggacgt gatccgtgag atgcaggatg cgttcgaggc atatgtgac	300
atcttcgcta cagatatcgc agacaaacaa gatatcggca atcttcaggc tgcgattgag	360
gcgctccgaa cagagatgaa ctcaaccac ggggcattcg aagcatatgc ggacgacttc	420
gcagccgatg tcgtgcgct ccgtgatata tctgatctgg ttgcagcaat cgacgacttc	480
caagaggaat tcatgccgt gcaggacgca ttgacaact acgtgggtga cttcgatgcg	540
gagatcgacc agtccacgc tgccatcgct gaccagcacg acagcttcga cgctaccgcg	600
gacgccttcg cagagtaccg agatgagttc tatcgcatag aggtggaagc actgcttgag	660
gcgatcaacg acttccagca ggacatcggg gacttccgag cggagtttga aacgactgag	720
gacgcgttcg ttgccttcgc ccgtgacttc tatggccacg agatcacggc cgaggaaggc	780
gccgccgaag cggaagccga acccgtcgag gctgacgcgg acgtcgaagc ggaagcagaa	840
cctaggagct ga	852

<210>	8	
<211>	168	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GB(Ig-G binding)	
<400>	8	
tacaagctca tctgaacgg caagaccctc aaaggggaga ccacgaccga agccgtcgac		60
gccgcgaccg ccgagaaggt cttcaagcag tacgcgaacg acaacggcgt ggacggcgaa		120
tggacgtacg acgacgccac caagacgttc accgtcaccg aagcttga		168
<210>	9	
<211>	1353	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GvpC4-GB	
<400>	9	
atgcaccacc accaccacca ccttaagatg agtgtcacag acaaacgcga cgagatgagt		60
actgcccgcg ataagttcgc agaatcacag caggagttcg aatcatacgc tgacgagttt		120
gcagccgata tcacggcaaa gcaagacgat gtcagcgacc ttgtcgatgc gatcaccgac		180
ttccaggcgg agatgaccaa cagcagcgat gcatttcaca catatggtga cgagttcgcc		240
gctgaggttg accacctccg tgccgatatt gacgccagc gggacgtgat ccgtgagatg		300
caggatgcgt tcgaggcata tgctgacatc ttctgtacag atatcgaga caaacaagat		360
atcggcaatc ttcaggctgc gattgaggcg ctccgaacag agatgaactc aaccacggg		420
gcattcgaag catatgcgga cgacttcgca gccgatgtcg ctgcgctccg tgatatatct		480
gatctggttg cagcaatcga cgacttccaa gaggaattca tcgccgtgca ggacgcattt		540
gacaactacg ctggtgactt cgatgcggag atcgaccagc tccacgtgc catcgctgac		600
cagcagcaca gcttcgacgc taccgcggac gccttcgcag agtaccgaga tgagttctat		660
cgcatagagg tggaagcact gcttgaggcg atcaacgact tccagcagga catcggtgac		720
ttccgagcgg agtttgaac gactgaggac gcgttcgttg ccttcgccg tgacttctat		780
ggccacgaga tcacggccga ggaaggcgcc gccgaagcgg aagccgaacc cgtcgaggct		840
gacgcggacg tcgaagcga agcagaagtc tctccagacg aagctggcgg agaaccgcc		900
ggtaccgagg aagaagagac agagccggcc gaggtggaaa cagcggtcc agaagtagag		960
gggagtcctg cggacacggc agacgaagcg gaagatacgg aagcagagga ggagacagag		1020

gaagaggcac cggaagacat ggtgcagtgc cgggtgtgcg gcgaatacta tcaggccatc	1080
acggagcccc atctccagac ccatgatatg acgattcagg agtaccgga cgagtacggt	1140
gaggatgtcc cccttcggcc ggatgataaa acagctagga gcgcttaca gctcatcctg	1200
aacggcaaga ccctcaaagg ggagaccacg accgaagccg tcgacgccgc gaccgccgag	1260
aaggtcttca agcagtacgc gaacgacaac ggcggtggacg gcgaatggac gtacgacgac	1320
gccaccaaga cgttcacggt caccgaagct tga	1353
<210> 10	
<211> 1047	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GvpC3-GB	
<400> 10	
atgcaccacc accaccacca ccttaagatg agtgtcacag acaaacgga cgagatgagt	60
actgcccgcg ataagttcgc agaatcacag caggagttcg aatcatacgc tgacgagttt	120
gcagccgata tcacggcaaa gcaagacgat gtcagcgacc ttgtcgatgc gatcaccgac	180
ttccaggcgg agatgaccaa cagcagggat gcatttcaca catatggtga cgagttcgcc	240
gtcgaggttg accacctcgc tgccgatatt gacgccagc gggacgtgat ccgtgagatg	300
caggatgcgt tcgaggcata tgctgacatc ttcgtacag atatcgaga caaacaagat	360
atcggaatc ttcaggctgc gattgaggcg ctccgaacag agatgaactc aaccacggg	420
gcattcgaag catatgcgga cgacttcgca gccgatgtcg ctgcgctccg tgatatatct	480
gatctggttg cagcaatcga cgacttcaa gaggaattca tcgccgtgca ggacgcattt	540
gacaactacg ctggtgactt cgatcgggag atcgaccagc tccacgtgc catcgctgac	600
cagcacgaca gcttcgacgc taccgcgac gccttcgcag agtaccgaga tgagttctat	660
cgcatagagg tggaagcact gcttgaggcg atcaacgact tccagcagga catcggtgac	720
ttccgagcgg agtttgaac gactgaggac gcgttcgttg ccttcgccg tgacttctat	780
ggccacgaga tcacggccga ggaaggcgcc gccgaagcgg aagccgaacc cgtcgaggct	840
gacgcggacg tcgaagcgga agcagaacct aggagcgtt acaagctcat cctgaacggc	900
aagacctca aaggggagac cacgaccgaa gccgtcgacg ccgcgaccgc cgagaaggtc	960
ttcaagcagt acgcgaacga caacggcgtg gacggcgaat ggacgtacga cgacgccacc	1020
aagacgttca ccgtcacgga agcttga	1047