

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0153572

(43) 공개일자 2024년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/47 (2006.01) A23J 3/08 (2006.01)

A23J 3/10 (2006.01) A23J 3/20 (2017.01)

C07K 14/43 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/4717 (2013.01)

A23J 3/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7030541

(22) 출원일자(국제) 2023년03월09일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년09월11일

(86) 국제출원번호 PCT/SG2023/050150

(87) 국제공개번호 WO 2023/172201

국제공개일자 2023년09월14일

(30) 우선권주장

10202202395T 2022년03월09일 싱가포르(SG)

(71) 출원인

피식스44 랩스 프라이빗 리미티드

인도 카르나타카 560103 방갈로르 크리슈비 가박
시 기어 로드 디 741

(72) 발명자

세티야 피유시

인도 마하라슈트라 뭄바이 400071 챔부르 챔부르
나카 알. 씨. 마르그 챔부르 굴마르그 씨에이치에
스 비2

바카라주 바라스

인도 카르나타카 방갈로르 560103 카두비자나할리
기어 로드 에이피티에스 크리슈비 가박시 디 741

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인와이에스장

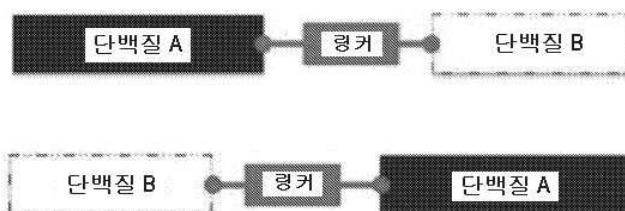
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 신규한 단백질 조성물 및 유제품 제형화에서의 그것의 용도

(57) 요약

본 발명은 적어도 하나의 우유 단백질; 적어도 제1 단백질; 적어도 제2 단백질; 및 적어도 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 및 서열 번호: 21로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 링커를 포함하는 우유 단백질 함유 조성물을 개시한다.

대표도



도 1

(52) CPC특허분류

A23J 3/10 (2013.01)

A23J 3/20 (2013.01)

C07K 14/43 (2013.01)

C07K 14/4732 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

우파다 바니타

인도 하이데라바드 50007 아이디에이-나차람 라헤
자 비스타스 아파트 넘버-디-407

바라바데카르 자예쉬 슈만

인도 타네 인도 편 421202 마하라슈트라 돔비블리
웨스트. 디스트. 타네 피. 던다알 로드 에베레스트
씨에이치에스 8/3

파텔 조사나

인도 자발푸르 인도 편 482002 마다야 프라데쉬 자
발푸르 다모나카 암베드카르 콜로니 에이치 넘버
109

차반 삼바지 발크루슈나

인도 푸네 푸네 411046 카트라즈 산토쉬나가르 에
스.넘버 120/1/1비 털시 비하르

명세서

청구범위

청구항 1

제조합 융합 단백질로서,

a.) 적어도 제1 단백질;

b.) 적어도 제2 단백질; 및

c.) 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 및 서열 번호: 21로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 적어도 링커

를 포함하는, 제조합 융합 단백질.

청구항 2

제조합 융합 단백질로서,

a. 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 및 서열 번호: 7로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 제1 단백질;

b. 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호: 10, 서열 번호: 11, 서열 번호: 12, 및 서열 번호: 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 제2 단백질;

c. 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 및 서열 번호: 21로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 링커

를 포함하는, 제조합 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1 단백질은 우유 단백질, 비-우유 소 단백질, 및 미생물, 동물성 및 식물성 기원의 비-소 단백질로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조합 융합 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 우유 단백질은 알파-락탈알부민, 베타-락토글로불린, 카파-카세인, 알파-카세인, 베타-카세인, 락토페린 등으로 구성되는 군으로부터 선택된 제조합적으로 발현된 단백질인 것을 특징으로 하는 제조합 융합 단백질.

청구항 5

제3항에 있어서, 우유 단백질은 제조합 베타-락토글로불린인 것을 특징으로 하는 제조합 융합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 제2 단백질은 저칼로리 비-탄수화물 감미료 또는 비-우유 소 단백질 또는 미생물, 동물성, 또는 식물성 기원의 비-소 단백질로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조합 융합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 저칼로리 비-탄수화물 감미료는 브라제인, 타우마틴, 모넨린, 커쿨린, 마빈린, 미라쿨린, 네오클린, 펜타딘 및 이것들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조합 융합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 저칼로리 비-탄수화물 감미료는 브라제인인 것을 특징으로 하는 제조합 융합 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서, 제1 단백질은 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 및 서열 번호: 21로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산을 포함하는 비활성 펩타이드 링커를 사용하여 제2 단백질과 융합되는 것을 특징으로 하는 제조합 융합 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서, 제1 단백질 및 제2 단백질의 방향은 상호 교환 가능한 것을 특징으로 하는 제조합 융합 단백질.

청구항 11

발현 벡터로서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 제조합 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 12

조성물로서,

- a) 적어도 하나의 제조합 융합 단백질;
- b) 적어도 하나의 비-융합 단백질; 및
- c) 적어도 하나의 첨가제를 포함하며,

여기서 적어도 하나의 제조합 융합 단백질은:

제1 단백질, 제2 단백질, 및 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 및 서열 번호: 21로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 링커를 포함하는, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

- a) 상기 적어도 하나의 제조합 융합 단백질은 0.1% 내지 8%의 범위로 있고;
- b) 상기 적어도 하나의 비-융합 단백질은 1% 내지 10%의 범위로 있으며; 그리고
- c) 상기 적어도 하나의 첨가제는 0.1% 내지 5%의 범위로 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 적어도 하나의 비-융합 단백질은 미생물, 동물성, 식물성 기원 단백질 또는 제조합적으로 발현된 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 제조합 융합 단백질의 제1 단백질은 우유 단백질, 비-우유 소 단백질, 및 비-소 단백질로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 제조합 융합 단백질의 우유 단백질은 알파-락트알부민, 베타-락토글로불린, 카파-카세인, 알파-카세인, 베타-카세인, 락토페린 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제12항에 있어서, 제2 단백질은 저칼로리 비-탄수화물 달콤한 단백질 또는 비-우유 소 단백질 또는 미생물, 동물성, 식물성 기원의 비-소 단백질 또는 재조합적으로 발현된 단백질로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 저칼로리 비-탄수화물 달콤한 단백질은 브라제인, 타우마틴, 모넨린, 커쿨린, 마빈린, 미라쿨린, 네오쿨린, 펜타딘 및 이것들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

제12항에 있어서, 적어도 하나의 첨가제는 지질, 지방, 회분, 미량 영양소, 비타민, 물, 등으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질 또는 조성물은 유제품 및 관련 제품의 제형화에 사용되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질 또는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원에 기술된 본 발명은 일반적으로 유제품 제형화에 사용될 수 있는 신규한 단백질 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 단맛을 가지며, 맛있고 동물성이 없는 유제품 대체품으로서 사용될 수 있는 재조합 융합 단백질, 및 그러한 재조합 단백질의 제조 방법에 관한 것이다.

[0002] 서열 목록에 대한 참조

[0003] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 출원되고 있다. Sequence.ST25.txt란 명칭으로 제출된 서열 목록은 2023년 3월 9일에 생성되었고 12,288 바이트의 크기를 가진다. 서열 목록의 전자 형식의 정보는 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

배경 기술

[0004] 우유는 영양소의 풍부한 공급원으로서 여겨지며 일반적으로 많은 우유 기반 음료 및 기타 식품 품목에서 설탕과 함께 소비되는 것이 바람직하다. 전 세계 인구는 2050년까지는 90억 명을 넘는 소비자가 될 것으로 추정되며(유엔, 2013년) 따라서 유제품이 주요 구성 요소를 구성하는 영양소에 대한 수요도 증가할 것이다.

[0005] 유제품에 대한 수요가 증가함에 따라 유제품 산업(다른 동물성 단백질 생성 산업과 함께)에 의해 유발된 환경적 악영향이 있다. 대부분의 경우 유제품에 대한 채식주의 식물성 단백질 기반 대체품은 유사한 정도로 단백질 요구 사항을 충족하지 못한다(Alcorta et al, 2021).

[0006] 동시에, 설탕은 보통 달콤한 맛과 원하는 향을 주기 위해 여러 가지 우유, 우유 기반 음료 또는 기타 식품에 첨가된다. 우유는 영양소의 풍부한 공급원인 것으로 여겨지는 한편, 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 우식증(caries) 및/또는 고지혈증(hyperlipemia)을 유발할 우려가 있는 탄수화물 설탕을 함께 섭취하는 것에 대한 우려가 전 세계적으로 커지고 있다. 락토스와 같은 천연 유제품에서 자연적으로 발생하는 설탕의 일부는 락토스 불내증과 같은 불내증의 원인이 된다.

[0007] 지난 십년 동안, 대체품으로서 사카린, 아스파탐, 사이클라메이트, 수크랄로스, 네오탐, 아세설팜 칼륨 등과 같은 인공 저칼로리 감미료를 사용하려는 증가된 경향이 전 세계적으로 관찰되었다. 그러나, 이들 인공 감미료조차도 현기증, 두통, 심리적 문제, 위장 문제, 및 기분 변화와 같은 특정한 건강 악영향을 가지는 것으로 증명되었다. 이것은 자연적으로 확인되고 얻어진 단맛 단백질에 대한 막대한 수요로 이어졌다.

[0008] 허에서 미각 수용체는 특정 구조(탄수화물 설탕, 인공 저칼로리 감미료 및 단맛을 내는 단백질에 공통적임)와 완벽하게 맞는 분자를 식별하여 그것이 '달콤한' 맛을 내는 화합물로서 식별되는 것을 나타내는 신호를 뇌로 보낸다.

[0009] 식용 설탕인 수크로스는 표준 관례에 따라 단맛 인지 등급이 1로 간주되며, 다른 단맛 물질은 이에 상대적으로

등급이 매겨진다. 단맛 단백질 중에서 크게 관심이 있는 것은 타우마틴, 모넨린 및 브라제인으로 이들은 수크로스보다 3000, 3000, 및 2000배 더 단 것으로 등급이 매겨진다(Ming and Hellekant, 1994). 이들 단백질 또는 유사한 구조의 단백질 또는 유사한 특성을 가진 단백질의 막대한 감미 능력은 또한 적절하게 사용될 때 이들의 잠재적 영향력이 두드러진다.

[0010] 이들 문제는 유단백질 및 탄수화물을 대체하고 영양 및 임상적 이득을 부여하는 융합 단백질의 개발을 촉진시켰다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 미생물 시스템에서 알려진 유전자 서열의 재조합 발현을 통해, 하나 이상의 링커를 연속적으로 또는 나란히 사용하여 하나 이상의 단백질이 하나 이상의 단맛 단백질과 함께 융합되는 융합 단백질을 발현시키는 것이 구상된다. 융합 단백질은 단백질의 풍부한 공급원으로서뿐만 아니라 달리는 관련된 건강 문제를 극복하는 저칼로리 비-탄수화물 감미료로서 작용할 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 주제가 융합된 단백질로 이루어지는 단백질 조성물에 관한 것이지만, 본 개시에서 분명하게 설명되지 않는 다수의 가능한 구체예가 있을 수 있기 때문에, 본 출원은 기술된 특정 조성물에 한정되지 않는 것이 이해되어야 한다. 또한 설명에서 사용된 용어는 단지 실행 또는 버전 또는 구체예를 기술할 목적이며 본 주제의 범주를 제한하려는 의도가 아닌 것이 이해되어야 한다.

[0013] 본 요약은 융합된 단백질로 이루어지는 단백질 조성물에 관련된 측면을 소개하기 위한 것이다. 본 요약은 청구된 주제의 본질적인 특징을 확인하거나 본 주제의 범주를 결정하거나 제한하는데 사용하기 위해 의도된 것이 아니다.

[0014] 본 발명은 식물로부터 자연적으로 유래하는 하나 이상의 단맛 단백질과 함께 우유에 존재하는 하나 이상의 단백질을 암호화하는 구성요소를 가진 융합 유전자를 구성하는 것이 단백질의 풍부한 공급원으로서뿐만 아니라 저칼로리 단맛 단백질로서 작용할 융합 단백질 분자를 초래함으로써 그렇지 않으면 현재 사용되고 있는 대체 감미료에 의해 유발된 건강상의 문제를 극복할 수 있다는 발견을 토대로 한다. 그로써 결과적으로 생성된 조성물은 목적인 유제품 기반 음료 및 식품의 천연 영양 특성을 보존할뿐만 아니라 원하는 맛 및/또는 향, 안정성 및 용해도를 부여하는 한편, 현재 전 세계적으로 만연된 가능한 건강상의 우려를 피하는 것을 보장한다. 결과적으로 융합된 단백질의 우유 단백질 부분은 동물 유래 우유 단백질에 의해 제공되는 것과 동일한 영양적 및 기능적 특성을 제공할 것이며 또한 그것의 모든 적용 및 그로부터 생성된 생성물에 대한 대체품으로서 작용할 것이다. 나아가, 결과적으로 융합된 단백질의 단맛 단백질 부분은 유제품 적용 및 그것으로부터 유래된 제품에서 락토스 또는 다른 설탕을 대체/감소시키는 작용을 하는 한편 그러한 제품의 전체 단백질 함량을 증가시키 것이다.

[0015] 한 구체예에서, 본 발명은 a) 적어도 제1 단백질; b) 적어도 제2 단백질; 및 c) 적어도 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호:5, 서열 번호: 6, 서열 번호:7, 서열 번호:8, 서열 번호:9, 및 서열 번호:10으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열에 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 링커를 포함하는 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0016] 한 구체예에서, 본 발명은: 서열 번호:1, 서열 번호:2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호:5 서열 번호:6, 및 서열 번호:7로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 적어도 제1 단백질; 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호:10, 서열 번호:11, 서열 번호:12, 및 서열 번호:13으로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 적어도 제2 단백질; 및 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호 :16, 서열 번호 :17, 서열 번호 :18, 서열 번호:19, 서열 번호:20, 및 서열 번호 :21로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열에 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 적어도 링커를 포함하는 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0017] 한 구체예에서, 본 발명은: 서열 번호:1에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 적어도 제1 단백질; 서열 번호:2에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는

적어도 제2 단백질; 및 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 및 서열 번호: 21로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열에 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 적어도 링커를 포함하는 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0018] 적어도 구체예에서, 링커는 비활성 펩타이드 링커이다.

[0019] 한 구체예에서, 본 발명은: 서열 번호: 1에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 제1 단백질; 서열 번호: 2에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 제2 단백질; 및 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 및 서열 번호: 21로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 링커를 포함하는 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0020] 한 구체예에서, 본 발명은: 서열 번호: 1에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 제1 단백질; 서열 번호: 2에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 제2 단백질; 및 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 및 서열 번호: 21로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함하는 링커를 포함하는 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0021] 한 구체예에서, 링커는 비활성 펩타이드 링커이고 아미노산의 각각의 서열로 이루어진다.

[0022] 한 구체예에서, 제1 단백질은 우유 단백질, 비-우유 소 단백질, 및 비-소 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0023] 한 구체예에서, 우유 단백질은 알파-락트알부민, 베타-락토글로불린, 카파-카세인, 알파-카세인, 베타-카세인, 락토펙틴 등으로 구성되는 군으로부터 선택된 재조합적으로 발현된 단백질이다.

[0024] 예시의 구체예에서, 우유 단백질은 재조합 베타-락토글로불린이다.

[0025] 한 구체예에서, 제2 단백질은 저칼로리 비-탄수화물 감미료 또는 비-우유 소 단백질 또는 미생물, 동물, 식물, 또는 재조합 유래 비-소 단백질로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0026] 한 구체예에서, 저칼로리 비-탄수화물 감미료는 브라제인(Brazzein), 타우마틴(Thaumatococcus), 모넨린(Monellin), 커쿨린(Curculin), 마빈린(Mabinlin), 미라쿨린(Miraculin), 네오쿨린(Neoculin), 펜타딘(Pentadin) 및 이것들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0027] 예시의 구체예에서, 저칼로리 감미료는 브라제인이다.

[0028] 한 구체예에서, 우유 단백질 및 저칼로리 비-탄수화물 감미료는 미생물 시스템에서 생성된다.

[0029] 한 구체예에서, 재조합 융합 단백질은 하나 이상의 링커를 사용하는 임의의 기원으로부터의 열거된 하나 이상의 제1 단백질 및 하나 이상의 제2 단백질의 임의의 조합을 포함한다.

[0030] 한 구체예에서, 융합 단백질은 하나 이상의 링커를 사용하는, 양 방향의, 임의의 기원으로부터의 열거된 하나 이상의 제1 단백질 및 하나 이상의 제2 단백질의 임의의 조합을 포함한다.

[0031] 한 구체예에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 우유 단백질; 적어도 하나의 저칼로리 단맛 단백질; 및 적어도 하나의 비활성 펩타이드 링커를 포함한다.

[0032] 또 다른 구체예에서, 적어도 하나의 우유 단백질은 비활성 펩타이드 링커를 사용하여 저칼로리 비-탄수화물 단맛 단백질과 융합된다.

[0033] 또 다른 구체예에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 비-우유 소 단백질; 적어도 하나의 저칼로리 단맛 단백질; 및 적어도 하나의 비활성 펩타이드 링커를 포함한다.

[0034] 또 다른 구체예에서, 적어도 하나의 비-우유 소 단백질은 비활성 펩타이드 링커를 사용하여 저칼로리 비-탄수화물 감미료와 융합된다.

[0035] 또 다른 구체예에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 비-우유 비-소 단백질; 적어도 하나의 저칼로리 단맛 단백질; 및 적어도 하나의 비활성 펩타이드 링커를 포함한다.

- [0036] 또 다른 구체예에서, 적어도 하나의 비-우유 비-소 단백질은 비활성 펩타이드 링커를 사용하여 저칼로리 비-탄수화물 감미료와 융합된다.
- [0037] 예시의 구체예에서, 우유 단백질 베타-락토글로불린을 포함하는 융합 단백질은 유연한 12개 아미노산 사슬 비활성 연결 펩타이드를 사용하여 브라제인과 융합된다.
- [0038] 또 다른 구체예에서, 비활성 펩타이드 링커는 유연한 링커 또는 단단한 링커 또는 이것들의 조합으로부터 선택된다.
- [0039] 또 다른 구체예에서, 유연한 펩타이드 링커는 $(SGG)_nSAG$ 성질의 것이며, 여기서 $n=1-10$ 이다.
- [0040] 또 다른 구체예에서, 유연한 펩타이드 링커는 $(G)_n$ 성질의 것이며, 여기서 $n=3-10$ 이다.
- [0041] 또 다른 구체예에서, 유연한 펩타이드 링커는 $(GGGGS)_n$ 성질의 것이며, 여기서 $n=1-10$ 이다.
- [0042] 또 다른 구체예에서, 단단한 펩타이드 링커는 $A(EAAAK)_nA$ 성질의 것이며, 여기서 $n=1-10$ 이다.
- [0043] 또 다른 구체예에서, 링커는 위에서 언급된 하나 이상의 유연한 비활성 링커 펩타이드 사슬 및 단단한 비활성 링커 펩타이드 사슬의 조합이다.
- [0044] 또 다른 구체예에서, 펩타이드 링커는 $(SGG)_nSAG-A(EAAAK)_nA-(GGGGS)_n$ 성질의 것이며, 여기서 $n=1-10$ 이다.
- [0045] 또 다른 구체예에서, 제1 단백질 및 제2 단백질은 역 방향의 비활성 링커에 의해 결합된다.
- [0046] 예시의 구체예에서, 우유 단백질 베타-락토글로불린을 포함하는 융합 단백질은 단단한 17개 아미노산 사슬 비활성 펩타이드 링커를 사용하여 브라제인과 융합된다.
- [0047] 한 구체예에서, 적어도 하나의 제1 단백질; 적어도 하나의 제2 단백질; 및 적어도 하나의 비활성 펩타이드 링커를 포함하는 재조합 융합 단백질이 제공되며, 여기서 적어도 하나의 제1 단백질은 비활성 펩타이드 링커를 사용하여 제2 단백질과 융합된다.
- [0048] 또 다른 측면으로, 본원에는 본원에서 기술된 재조합 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자가 제공된다.
- [0049] 또 다른 측면으로, 본원에는 본원에서 기술된 재조합 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터가 제공된다.
- [0050] 일부 구체예에서, 우유 단백질 및 단맛 단백질은 미생물 시스템에서 생성된다.
- [0051] 또 다른 구체예에서, 소 유제품 단백질 또는 비-소 단백질은 비활성 링커를 통해 단맛 단백질에 콘주게이션된다.
- [0052] 또 다른 측면으로, 본원에는:
- [0053] a) 0.1% 내지 8% 범위의 적어도 하나의 재조합 융합 단백질;
- [0054] b) 0.1% 내지 10% 범위의 적어도 하나의 비-융합 단백질; 및
- [0055] c) 0.1% 내지 5% 범위의 적어도 하나의 첨가제
- [0056] 를 포함하는 조성물이 제공되며,
- [0057] 적어도 하나의 재조합 융합 단백질은 제1 단백질, 제2 단백질, 및 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 및 서열 번호: 21로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열에 80% 유사한 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열을 가지는 링커를 포함한다.
- [0058] 한 구체예에서, 적어도 하나의 비-융합 단백질은 미생물, 동물성, 식물성 기원 단백질 또는 재조합적으로 발현된 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0059] 한 구체예에서, 재조합 단백질은 유사한 식감을 가진 유제품 대체 제품을 얻기 위해 탄수화물, 지질, 지방, 회분, 미량 영양소, 비타민, 등으로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 첨가제와 혼합된다.
- [0060] 한 구체예에서, 지방은 식물성 기원의 것이거나, 미생물에 의해 유래되거나, 발효 유래되거나 또는 이와 유사하다.

- [0061] 한 구체예에서, 식물성 기원 오일은 해바라기유, 옥수수유, 대두유, 야자 열매 오일, 팜핵유, 홍화유, 아마씨유, 미강유, 면실유, 올리브유, 카놀라유, 아마씨유, 코코넛 오일, 조류 오일, 및 미생물 생성 지방으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0062] 한 구체예에서, 지방은 미생물을 사용하는 식물성 기원 오일 기질의 발효로부터 유래된다.
- [0063] 한 구체예에서, 재조합 조성물은 3개의 단배질이 2개의 링커로 연결되어 있는 융합 단백질을 포함한다.
- [0064] 한 구체예에서, 재조합 융합 단백질 또는 조성물은 유제품 및 관련 제품의 제형화에 사용된다.
- [0065] 한 구체예에서, 재조합 융합 단백질은 식물성 기반 지방, 회분, 및 물과 혼합되어 맛있는 맛이 있는 유제품 대체 음료를 얻기 위해 식물성 기반 지방, 회분, 및 물과 혼합된다.
- [0066] 한 구체예에서, 재조합 융합 단백질은 아이스크림, 냉동 디저트, 케이크, 커피 크림과 같은 다른 유제품에 사용될 수 있다.
- [0067] 한 구체예에서, 재조합 융합 단백질은 채식주의의 단백질 보충제에 국한되지 않고 사용될 수 있다.
- [0068] 한 측면으로, 본원에는 상기 재조합 융합 단백질을 생성할 수 있는 재조합 숙주 세포를 발효시키는 단계를 포함하는, 재조합 융합 단백질을 제조하는 방법이 제공된다.
- [0069] 본 발명의 추가 측면, 장점, 특징 및 목적은 예시적인 구체예의 상세한 설명으로부터 분명해질 것이다. 본 발명의 특징은 아래에서 언급되는 상세한 설명에 의해 정의되는 것과 같이 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않으면서 다양한 조합으로 조합될 수 있다는 것이 인정될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0070] 발명의 구체예에 대한 이해를 제공하기 위하여, 첨부된 도면을 참조할 수 있으며, 도면은 반드시 일정 규모로 묘사되지 않고 참조 번호는 발명의 예시적인 구체예의 구성요소를 나타낸다. 본원에서 청구된 발명의 위 및 기타 특징, 그것의 본질 및 다양한 장점은 첨부되는 도면과 함께 취해지는 다음의 상세한 설명을 이해할 때 보다 분명해질 것이다:
- 도 1A 및 1B는 본 발명의 한 구체예에 따르는 대표적인 펩타이드 결합 C를 사용하는 대표적인 단백질 A 및 단백질 B의 융합을 도시한다;
- 도 2는 본 발명의 대표적인 구체예에 따르는 본원에 제공된 융합 단백질의 제조를 위해 사용된 통합 벡터의 벡터 지도이다;
- 도 3A-3D는 본 발명의 대표적인 구체예에 따르는 다양한 유전자 카세트 표시의 한 예이다;
- 도 4는 재조합 융합 단백질 베타 락토글로불린-L1-브라제인, 브라제인-L1-베타 락토글로불린, 베타 락토글로불린-L2-브라제인, 브라제인-L2-베타 락토글로불린의 발현에 대한 겔 이미지이다; 그리고
- 도 5는 재조합 융합 단백질 베타 락토글로불린-L3-브라제인, 베타 락토글로불린-L4-브라제인의 발현에 대한 겔 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0071] 발명은 이제 발명의 범주 및 영역을 제한하지 않는 첨부되는 구체예를 참조로 기술될 것이다. 제공된 설명은 순수하게 예와 예시에 의한 것이다.
- [0072] 본원의 구체예 및 그것의 다양한 특징 및 유리한 상세한 내용은 다음의 설명에서 비제한적인 구체예를 참조로 설명된다. 잘 알려져 있는 구성요소 및 처리 기법의 설명은 본원의 구체예를 불필요하게 모호하게 하지 않기 위해 생략된다. 본원에서 사용된 예는 단순히 본원의 구체예가 실시될 수 있는 방법에 대한 이해를 촉진하고 기술 분야에 숙련된 사람들이 본원의 구체예를 실시하는 것을 추가로 가능하게 하기 위하여 의도된다. 따라서, 예는 본원의 구체예의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0073] 특정 구체예의 진술한 설명은 다른 사람들이 본원의 지식을 적용함으로써 일반적인 개념으로부터 벗어나지 않으면서 그러한 특정 구체예를 다양한 적용에 대해 쉽게 변형 및/또는 적응할 수 있고, 그러므로, 그러한 적응 및 변형은 개시된 구체예의 등가물의 의미 및 범위 내에서 이해되도록 의도되어야 하고 의도되는 것인 본원의 구체예의 일반적인 본질을 완전히 드러낼 것이다. 본원에서 사용된 문구 또는 용어는 설명을 목적으로 하며 제한하

는 것이 아닌 것이 이해되어야 한다. 그러므로, 본원의 구체예는 바람직한 구체예의 관점에서 기술되었지만, 기술분야에 숙련된 사람들은 본원의 구체예가 본원에 기술된 구체예의 사상 및 범주 내에서 변형되어 실시될 수 있음을 인지할 것이다.

- [0074] 본 발명의 모든 특징을 설명하는 본 발명의 일부 구체예가 이제 상세하게 논의될 것이다. "포함하는", "가지는", "함유하는", 및 "포함되는"이란 단어와, 이들의 다른 형태는 의미가 동등한 것으로 의도되며 이들 단어 중 임의의 하나를 따르는 항목 또는 항목들은 그러한 항목 또는 항목들의 완전한 목록을 의미하는 것이 아니거나 열거된 항목 또는 항목들에만 제한되는 것을 의미한다는 점에서 개방된 단부인 것으로 의도된다.
- [0075] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적이고 과학적인 용어는 본 개시가 속하는 기술분야에서 통상적인 지식을 가진 사람에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에서 기술된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 개시의 실시 또는 교시에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 이제 기술된다.
- [0076] 본 발명의 한 측면으로, 선행 기술의 문제점을 극복하고 후속 단락에서 상술된 다양한 장점을 제공하기 위하여, 유제품 및 관련 제품을 제형화하기 위하여 융합 단백질질을 포함하는 단백질 조성물이 개시된다.
- [0077] 명세서 및 청구범위에서 사용될 때, 단수형을 나타내는 용어("a", "an" 및 "the"로 수식됨)에는 맥락이 분명하게 다른 것을 나타내지 않는 한 복수의 대상물이 포함된다. 예를 들어, 용어 "물품"에는 맥락이 분명하게 다른 것을 나타내지 않는 한 복수의 물품이 포함될 수 있다. 기술분야에서 통상적인 지식을 가진 사람들은 도면의 요소들이 간결성과 명료성을 위해 도시되며 반드시 축척대로 그려진 것이 아닌 것을 인정할 것이다. 예를 들어, 도면의 일부 요소의 치수는 본 발명의 이해를 개선하기 위하여 다른 요소에 비해 과장될 수 있다. 기술된 도면 중 어느 것에 도시되지 않은 전술한 출원에서 기술된 추가 구성요소가 있을 수 있다. 도면에는 도시되지 않지만, 그런 구성요소가 기술되어 있는 경우에, 그러한 도면의 부재는 명세서로부터 그러한 설계가 생략된 것으로서 간주되지 않아야 한다.
- [0078] 필요에 따라, 본 발명의 상세한 구체예는 본원에 개시된다; 그러나, 개시된 구체예는 단순히 발명을 예시하는 것이며, 다양한 형태로 구현될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 그러므로, 본원에서 개시된 특정 구조적 및 기능적 상세한 내용은 제한하는 것으로 해석되지 않아야 하고, 단순히 청구범위에 대한 기준으로서 그리고 실제로 임의의 적절하게 상세한 구조로 본 발명을 다양하게 사용하기 위하여 기술분야에 숙련된 사람에게 교시하기 위한 대표적인 기준으로서 해석되어야 한다. 추가로, 본원에서 사용된 용어 및 구절은 발명을 제한하려는 의도가 아니라 오히려 발명의 이해할 수 있는 설명을 제공하기 위하여 의도된다.
- [0079] 본 발명은 현재 전 세계적으로 만연하고 있는 가능한 건강 문제를 확실하게 피하면서, 결과적으로 단맛, 안정성 및 용해도를 가진 단백질을 달성하기 위하여 비활성 펩타이드 링커를 사용함으로써 선택된 단백질 및/또는 저칼로리 단맛 단백질을 사용하여 융합된 단백질을 생성하는 것에 초점을 맞춘다. 허에서 미각 수용체는 특정 구조(탄수화물 설탕, 인공 저칼로리 감미료 및 단맛 단백질에 공통적임)와 완벽하게 맞는 분자를 식별하여 그것이 단맛이라는 것을 나타는 신호를 뇌로 보낸다. 단맛 단백질은 일반적으로 약 6.5 내지 30 Kda의 분자량을 가지고 있는 약 50 내지 200개 아미노산 길이이다(Zhao et al, 2021).
- [0080] 따라서, 본원에는 적어도 하나의 제1 단백질; 적어도 하나의 제2 단백질; 및 적어도 하나의 비활성 펩타이드 링커를 포함하는 제조합 융합 단백질이 제공되며, 여기서 적어도 하나의 제1 단백질은 비활성 펩타이드 링커를 사용하여 제2 단백질과 융합된다. 개시는 또한 제조합 융합 단백질 및 그것을 포함하는 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0081] 우유는 단백질의 2가지 주요 부류 - 카세인(α S1-카세인, α S2-카세인, β -카세인 및 κ -카세인) 및 유장 단백질(β -락토글로불린 및 α -락트알부민)로 구성된다. 카세인은 서로 상호작용하여 우유의 안정성 및 영양적 특성에 중요한 역할을 하는 하위미셀 및 미셀을 제공하는 것으로 알려진다. α S1-카세인, α S2-카세인 및 β -카세인 분자는 내부에 포매된 상태로 유지되지만, κ -카세인은 부분적으로 미셀 구조 밖으로 돌출된다. 유장 단백질은 부유된 채로 유지되며 미셀 형성에 참여하지 않는다.
- [0082] 본원에서 사용되는 바, "우유 단백질"은 하나 이상의 포유류 우유에서 전형적으로 발견되는 임의의 단백질, 또는 그것의 단편 또는 변이체이다. 일부 구체예에서, 본원에서 기술된 우유 단백질은 카세인 단백질, 예컨대 카파 카세인, 파라-카파-카세인, 베타-카세인, 알파-S1-카세인, 및 알파-S2-카세인이다.
- [0083] 본 발명의 한 측면으로, 선행 기술의 문제점을 극복하고 후속 단락에서 상술된 다양한 장점을 제공하기 위하여,

유제품 및 관련 제품을 제형화하기 위하여 융합 단백질을 포함하는 단백질 조성물이 개시된다.

- [0084] 따라서, 본 발명은 한 구체예에서 단맛, 안정성 및 용해도와 같은 결과적으로 생성된 단백질의 목표 중 하나 이상을 달성하기 위하여 비활성 펩타이드 링커를 사용함으로써 선택된 단백질 및/또는 저칼로리 단맛 단백질을 사용하는 융합된 단백질 생성이 초점이 맞춰진다.
- [0085] 식물로부터 자연적으로 기원하는 하나 이상의 단맛 단백질과 함께 우유에 존재하는 하나 이상의 단백질을 암호화하는 구성요소로 융합 유전자를 구성하는 것은 나중에 단백질의 풍부한 공급원으로서뿐 아니라 저칼로리 단맛 단백질로서 작용함으로써 현재 사용되고 있는 대체 감미료에 의해 야기된 그렇지 않으면 관련된 건강상의 문제를 극복할 융합 단백질을 조래하게 될 것이다.
- [0086] 조성물은 그로써, 현재 전 세계적으로 만연된 가능한 건강상의 문제를 확실하게 피하면서 목표로 한 우유 기반 음료 및 식품의 천연 영양 특성을 보존할 뿐만 아니라 또한 바람직한 맛 및/또는 향, 안정성 및 용해도를 부여한다.
- [0087] 결과적으로 생성된 융합된 단백질의 우유 단백질 부분은 동물성 유래 우유 단백질에 의해 제공되는 것과 동일한 영양적 및 기능적 특성을 제공할 것이며 또한 모든 적용 및 이를 통해 파생된 모든 제품에 대한 적절한 대체재로서 작용할 것이다. 나아가, 결과적으로 융합된 단백질의 단맛 단백질 부분은 그러한 제품의 전체 단백질 함량을 증가시키면서 락토스 또는 다른 설탕을 대체/감소시키는 작용을 할 것이다.
- [0088] 다음의 설명에서, 설명의 목적으로, 특정 세부사항이 본 발명의 이해를 제공하기 위해 제시된다. 그러나, 기술 분야에 숙련된 사람에게 본 발명은 이들 세부사항 없이 실시될 수 있음이 분명할 것이다. 기술 분야에 숙련된 사람은 그것의 일부가 아래에서 기술되는 본 발명의 구체예가 많은 시스템에 포함될 수 있음을 인지할 것이다.
- [0089] 위의 관점에서, 본 발명은 2개의 단백질이 하나의 링커로 연결되어 있는 융합 단백질을 포함하는 단백질 조성물을 개시한다.
- [0090] 조성물은 2개의 단백질이 하나의 링커로 연결되어 있는 융합 단백질을 포함한다. 대안적으로, 조성물은 3개의 단백질이 2개의 링커로 연결되어 있는 융합 단백질을 포함한다. 대안적으로, 융합 단백질은 하나 이상의 링커를 사용하여 임의의 기원으로부터의 열거된 하나 이상의 제1 단백질 및 하나 이상의 제2 단백질의 임의의 조합을 포함한다.
- [0091] 식물로부터 자연적으로 기원하는 하나 이상의 단맛 단백질과 함께 우유에 존재하는 하나 이상의 단백질을 암호화하는 구성요소로 융합 유전자를 구성하는 것은 융합 단백질 분자를 조래한다. 그것은 번역 중에 필요한 원하는 수준의 유연성 및 안정성을 가진 비활성 펩타이드 링커의 사용을 포함하며 또한 융합 단백질로서 합성된 2개의 결과적으로 생성된 단백질을 연결시키는 가교로서 작용한다. 전형적으로, 비활성 펩타이드 링커는 다음 중 적어도 하나 이상을 부여하는 적어도 4개의 아미노산을 포함한다: A) 유연성, 또는 B) 견고성, 또는 C) 용해도를 개선시킴, 또는 D) 융합된 단백질의 안정성을 증가시킴.
- [0092] 그로써 조성물은 현재 전 세계적으로 만연된 가능한 건강상의 문제를 확실하게 피하면서, 목표로 한 우유 기반 음료 및 식품의 천연 영양 특성을 보존할 뿐만 아니라 또한 바람직한 맛 및/또는 향, 안정성 및 용해도를 부여한다. 결과적으로 생성된 융합된 단백질의 우유 단백질 부분은 동물성 유래 우유 단백질에 의해 제공되는 것과 동일한 영양적 및 기능적 특성을 제공할 것이며 또한 모든 적용 및 이를 통해 파생된 모든 제품에 대한 적절한 대체재로서 작용할 것이다. 나아가, 결과적으로 융합된 단백질의 단맛 단백질 부분은 그러한 제품의 전체 단백질 함량을 증가시키면서 락토스 또는 다른 설탕을 대체/감소시키는 작용을 할 것이다.
- [0093] 본 발명의 한 예시적인 구체예에서 유연한 12개 아미노산 사슬 비활성 연결 펩타이드를 사용하여 브라제인과 융합된 우유 단백질 베타-락토글로불린을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0094] 첨부되는 **도 1A 및 도 1B**는 본 발명의 한 구체예에 따라 대표적인 비활성 펩타이드 결합을 사용하는 대표적인 단백질 A와 단백질 B의 융합을 도시한다. 단백질 A는 미생물, 동물, 식물 기원 또는 재조합 단백질의 우유 단백질 또는 비-우유 소 단백질 또는 비-소 단백질일 수 있다. 단백질 B는 저칼로리 비-탄수화물 감미료 또는 미생물, 동물, 식물 기원 또는 재조합 단백질의 우유 단백질 또는 비-우유 소 단백질 또는 비-소 단백질이다.
- [0095] 첨부되는 **도 2**는 발현을 유도하기 위해 사용된 벡터의 예를 도시한다. 구체예에 따르면, 유전자는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 알코올 산화효소 프로모터, 알코올 산화효소 터미네이터, 제오신 내성 유전자를 함유하는 통합 벡터인 pPICZA에 클로닝되었다. 조사용 벡터는 메탄올 유도성 프로모터(AOX1, FLD1, MOX1, DAS1 등), 알과 접합 신호 인자, 제오신 내성 카세트, 터미네이터를 함유한다(도 2에 도시됨). 본원에서 사용된 벡터의 추

가 예는 구성성 프로모터, 알파 접합 신호 인자, 제오신 내성 카세트, 터미네이터를 함유하는 통합 벡터이다. 위의 것과 유사하게, 제오신은 카나마이신 내성으로 대체된다. 유사하게, 알파 접합 인자는 세포외 분획으로 발현을 유도하는 임의의 신호 인자에 의해 대체된다.

[0096] 발현 유기체: 위의 구체예에서 재조합 분자는 박테리아 - 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 시아노박테리아(*Cyanobacteria*) 등과 같은 재조합 분자에 사용된 미생물 시스템에서 발현될 수 있다. 진균 발현 숙주의 일부의 예 - 아스페르길루스 니거(*Aspergillus niger*), 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*), 페니실룸 종(*Penicillium* sps). 효모의 일부 예 - 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 야로위아 종(*Yarrowia* sps etc) 및 메틸로트로픽 효모 - 피키아 파스토리스, 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 칸디다 보이디니(*Candida boidini*).

[0097] 형질전환: 리튬 아세테이트 및 LiCl을 사용하는 화학적 형질전환, 형질감염, 전기천공, PEG 매개된 형질전환, 아그로박테리움 매개된 형질전환 등과 같은 형질전환 프로토콜이 사용될 수 있다.

[0098] 관심의 단백질:

[0099] 우유 단백질: 본 발명에서 사용된 우유 단백질의 일부 예에는 카파 카세인, 알파-S1-카세인, 알파-S2-카세인, 베타-카세인, 베타-락토글로불린, 알파 락트알부민, 트랜스페린이 포함된다.

[0100] 다른 동물성 단백질- 발명에서 다른 단백질의 일부 예에는 오브알부민, 오보트란스페린, 오보뮤코이드가 포함된다.

[0101] **베타 락토글로불린**

[0102] 소 베타 락토글로불린은 발명의 몇몇 구체예의 일부인 우유의 주요 유장 단백질이다. 유전자의 서열은 아래에서 제시된 것과 같다.

CTGATTGTTACCCAGACCATGAAGGGTCTGGACATTCAAAAAGTTG
CGGGCACCTGGTACAGCCTGGCGATGGCGGCGAGCGACATCAGCCT
GCTGGATGCGCAGAGCGCGCCGCTGCGTGTGTATGTTGAGGAAGT
AAGCCGACCCCGGAGGGCGACCTGGAAATTCTGCTGCAGAAATGGG
AGAACGATGAATGCGCGCAGAAGAAGATCATTGCGGAGAAAACCA
AGATCCCGGCGGTGTTCAAGATTGACGCGCTGAACGAAAACAAAGT
GCTGGTTCTGGACACCGATTACAAAAGTATCTGCTGTTTTGCATGG
AGAACAGCGCGGAGCCGGAACAGAGCCTGGTGTGCCAATGCCTGGT
TCGTACCCCGGAAGTGGACGATGAGGCGCTGGAAAAATTCGATAAG
GCGCTGAAAGCGCTGCCGATGCACATCCGTCTGAGCTTTAACCCGA
CCCAGCTGGAGGAACAATGCCACATT [서열 번호:1]

[0103]

[0104] **알파 락트알부민**

[0105] 알파 락트알부민은 발명의 몇몇 구체예의 일부인 우유의 유장 단백질이다. 유전자의 서열은 아래에서 제시된 것과 같다.

GAACAATTGACTAAGTGTGAAGTTTTAGAGAGTTGAAGGATTGGA
AAGGTTACGGTGGTGTCTTTGCCAGAGTGGGTTTGTACTACTTTC
CATACTTCTGGTTACGATACTCAAGCTATCGTTCAAAACAACGATTC
TACTGAATACGGTTTGTTCCAAATTAACAATAAGATTTGGTGTAAAG
ATGATCAAAACCCTCACTCTTCTAACATTTGTAACATCTCTTGTGAT
AAGTTCTTGGATGATGATTTGACTGATGATATTATGTGTGTTAAGAA
AATTTTGGATAAGGTTGGTATTAATTACTGGTTGGCTCATAAGGCTT
TGTGTTCTGAAAAATTGGATCAATGGTTGTGTGAGAAATTGTAA

[서열 번호:2]

카파 카세인

카파 카세인은 우유 미셀의 안정화에 포함되는 소 우유 단백질의 주요 카세인이다. 그것은 발명의 일부 구체예의 일부이다.

CAAGAACAAAACCAAGAGCAACCAATCAGATGTGAAAAGGATGAG
AGATTTTTCTCTGATAAGATCGCTAAGTACATCCCAATCCAATATGT
TTTGTCTAGATACCCTTCTTACGGTTTGAATTACTACCAACAAAAGC
CTGTTGCTTTGATTAACAACCAATTCTTGCCATACCCTTACTATGCTA
AACCAGCTGCTGTTAGATCCCCTGCTCAAATTTTGCAATGGCAAGTT
TTGTCTAACACTGTTCCAGCAAAGTCTTGTCAAGCTCAACCTACTAC
TATGGCTAGACATCCACACCCTCATTTGTCTTTCATGGCTATTCCAC
CTAAGAAAAACCAAGATAAGACTGAAATCCCAACTATTAATACTAT
TGCTTCTGGAGAGCCAACTTCTACTCCTACTATTGAAGCTGTTGAGT
CTACTGTTGCTACTTTGGAGGCTTCTCCTGAAGTTATTGAGTCTCCA
CCTGAGATTAATACTGTTCAAGTTACTTCTACTGCTGTTTAA

[서열
번호:3]

알파 S1 카세인

알파 S1 카세인은 또 다른 주요 카세인이며 소 우유의 주요 구성요소이다. 그것은 발명의 일부 구체예의 일부이다.

AGACCAAAACATCCAATTAAACATCAAGGTTTGCCACAAGAAGTTT
TGAACGAAAATTTGTTGAGATTTTTCGTTGCTCCATTTCCAGAAGTT
TTCGTTAAAGAAAAGGTTAACGAATTGTCAAAAGATATTGGTTCAG
AATCTACTGAAGATCAAGCTATGGAAGATATCAAGCAAATGGAAGC
AGAATCAATTTCTTCATCTGAAGAAATCGTTCCAAATCTGTTGAAC
AAAAGCATATCCAAAAGGAAGATGTTCCATCTGAAAGATATTTGGG
TTACTTAGAACAATTGTTGAGATTGAAGAAATACAAGGTTCCACAA
TTGGAATCGTTCCAAATTCAGCTGAAGAAAGATTGCATTCTATGA
AAGAAGGTATTCATGCACAACAAAAAGAACCAATGATCGGTGTAA
CCAAGAATTGGCATACTTCTACCCAGAATTGTTTAGACAATTTTATC
AATTGGATGCTTACCCATCTGGTGCATGGTATTACGTTCCATTAGGT
ACACAATACTGATGCTCCATCATTTTCTGATATCCCAAACCAAT
CGGTTCCAGAAAATTCTGAAAAGACTACTATGCCATTGTGGTAA

[서열
번호:4]

[0113] 알파 S2 카세인

[0114] 알파 S2 카세인은 카세인 단백질이며 소 우유의 구성요소이다. 그것은 발명의 일부 구체예의 일부이다.

AAGAACACTATGGAACATGTTTCTTCTTCTGAAGAGTCTATCATCTC
TCAAGAACTTACAAGCAAGAGAAAAACATGGCTATTAATCCATCT
AAGGAAAATTTGTGTTCTACTTTCTGTAAGGAGGTTGTTAGAAACGC
TAATGAAGAGGAATACTCTATTGGTTCTTCTTCTGAGGAATCTGCTG
AAGTTGCTACTGAGGAAGTTAAGATTACTGTTGATGATAAGCACTA
TCAAAAGGCTTTGAACGAGATTAATCAATTCTACCAAAGTTCCCTC
AATATTTGCAATACTTGTATCAAGGTCCAATTGTTTTGAACCCTTGG
GATCAAGTTAAGAGAAACGCTGTTCCAATCACTCCTACTTTGAACA
GAGAACAATTGTCTACTTCTGAGGAAAATTCTAAGAAAACCTGTTGA
TATGGAATCTACTGAGGTTTTCTACTAAGAAAACCTAAGTTGACTGAG
GAAGAGAAAAACAGATTGAACCTTTTTGAAGAAGATTCTCAAAGAT
ACCAAAGTTTCGCTTTGCCACAATACTTGAAGACTGTTTACCAACAT
CAAAAGGCTATGAAACCTTGGATTCAACCTAAGACTAAAGTTATTC
CTTACGTTAGATATTTGTAA [서열 번호:5]

[0115]

[0116] 베타 카세인

[0117] 베타 카세인은 주요 카세인 단백질이며 소 우유의 구성요소이다. 그것은 발명의 일부 구체예의 일부이다.

AGAGAATTGGAAGAGTTGAACGTTCCAGGTGAAATTGTTGAATCTT
TGTCTTCTTCTGAAGAGTCTATCACTAGAAATTAATAAGAAAATTGAG
AAGTTTCAATCTGAAGAGCAACAACAACTGAAGATGAGTTGCAAG
ATAAGATCCATCCATTTCGCTCAAACCTCAATCTTTGGTTTACCCATTC
CCTGGTCCAATTCCCTAACTCTTGCCTCAAAATATTCCACCTTTGACT
CAAACCTCCAGTTGTTGTTCCACCTTTCTTGCAACCTGAAGTTATGGG
TGTTTCTAAGGTTAAAGAAGCTATGGCTCCAAAGCATAAAGAGATG
CCATTTCTAAGTATCCAGTTGAACCTTTCCTGAGTCTCAATCTTTG
ACTTTGACTGATGTTGAGAAGTTGCACTTGCCATTGCCTTTGTTGCA
ATCTTGATGCATCAACCACACCAACCTTTGCCACCTACTGTTATGT
TTCCACCTCAATCTGTTTTGTCTTTGTCTCAATCTAAGGTTTTGCCAG
TTCCTCAAAAAGCTGTTCCATACCCTCAAAGAGATATGCCAATTCAA
GCCTTTTTGTTGTATCAAGAACCAGTTTTGGGTCCTGTTAGAGGTCC
ATTCCCTATTATTGTTTAA [서열 번호:6]

[0118]

[0119] 오브알부민

[0120] 오브알부민은 난백에서 발견되는 주요 단백질이며, 총 단백질의 대략 55%를 구성한다. 그것은 발명의 일부 구체예의 일부이다.

ATGGGTTCAATTGGAGCTGCATCTATGGAGTTCTGCTTCGACGTCTT
CAAGGAGTTGAAAGTACACCATGCCAACGAAAATATCTTCTATTGC
CCCATTGCTATTATGTCTGCCTAGCTATGGTATATTTAGGCGCAAAG
GATCTACAAGAACGCAAATTAATAAAGTTGTTAGGTTTGATAAGTT
ACCAGGTTTCGGCGACTCCATTGAGGCCCAGTGCGGTACTTCAGTTA
ATGTCCATTTCATCATTAAGGGACATCTTGAACCAGATTACTAAACCT
AATGACGTGTATTCTTTCTCTTTAGCAAGTAGGCTGTACGCCGAGGA
GAGGTATCCTATCTTACCCGAATATTTACAATGTGTAAAGGAGTTGT
ACCGTGGAGGTCTGGAACCCATAAATTTTCAGACGGCAGCCGATCA
GGCTAGAGAGCTAATTAATTCCTGGGTAGAATCACAAACGAATGGT
ATAATTAGGAATGTTCTTCAACCATCTAGTGTTGACTCCCAAACGGC
CATGGTTCTTGTC AATGCAATAGTTTTCAAGGGATTGTGGGAGAAG

[0121]

GCATTTAAGGACGAGGATACGCAGGCCATGCCCTCAGGGTACTG
AGCAGGAATCCAAGCCAGTGCAAATGATGTACCAGATAGGTCTATT
TCGTGTCGCCTCTATGGCTTCCGAGAAAATGAAGATTCTTGAGTTAC
CCTTCGCCTCCGGCACTATGTCAATGCTTGTACTGCTACCCGATGAG
GTATCCGGCTTAGAACAGCTAGAATCAATTATCAATTTGAGAAGCT
AACAGAGTGGACATCCTCAAACGTTATGGAGGAAAGGAAAATCAA
AGTTTACTTGCTAGGATGAAGATGGAAGAAAAGTATAATCTGACT
TCCGTCCTAATGGCTATGGGCATAACCGATGTTTTTCAGTTCCTCCGC
TAATTTGTCCGGAATATCCTCCGCAGAATCCCTGAAAATCTCTCAAG
CCGTCCATGCCGCACACGCAGAAATCAACGAAGCCGGACGTGAGGT
CGTAGGTAGTGCCGAGGCTGGTGTGATGCAGCTAGTGTATCCGAG
GAATTTAGGGCAGATCACCCCTTCCTTTTCTGCATAAAGCACATAGC
AACCAATGCAGTACTGTTCTTCGGAAGATGTGTATCCCCC [서열

[0122]

번호:7]

[0123]

단맛 단백질: 저칼로리 비-탄수화물 감미료의 예로는 브라제인, 타우마틴, 모넨린, 마빈린, 미라쿨린, 커쿨린, 네오쿨린 및 펜타딘 등을 들 수 있다. 브라제인은 본원에서 저칼로리 비-탄수화물 감미료로서 사용된다. 브라제인은 식물 중 펜타디플란드라 브라제아나(*Pentadiplandra brazzeana*)로부터 유래되는 단맛 단백질이며 몰 기준으로 수크로스보다 약 2000배 더 달다. 자연계에서는 2가지 형태로 발견된다. 주요 형태는 피로글루탐산 잔기로 시작하며 54개 아미노산 길이이고 마이너 형태는 다음 아미노산인 아스파르트산으로 시작되고 53개 아미노산 길이다. 마이너 형태는 더 단맛 용량을 가지는 것으로 기록되었고, 따라서 마이너 형태가 유니프롯(uniprot) ID P56552(서열은 아래에 제시됨)로부터 선택되며, 피키아 파스토리스에 대해 코돈 최적화되었고 합성되었다.

[0124]

브라제인

[0125]

브라제인은 펜타디플란드라 브라제아나(*Pentadiplandra brazzeana*) 식물의 추출물에서 발견된 단맛 단백질이다. 그것은 몰 기준으로 수크로스보다 2000배 더 달다. 그것은 발명의 일부 구체예의 일부이다.

GATAAGTGCAAGAAAGTCTATGAAAACCTACCCAGTATCCAAATGTC
AACTGGCTAACCAGTGCAATTATGACTGCAAGCTTGACAAGCACGC
GAGGAGTGGGGAGTGTTTTTACGACGAGAAACGCAATCTACAGTGT
ATTTGCGATTACTGTGAATAT [서열 번호:8]

[0126]

[0127]

타우마틴

[0128]

타우마틴은 타우마토코쿠스 다니엘리(*Thaumatococcus daniellii*)의 과실에서 발견된 달콤한 단백질이다. 그것은

몰 기준으로 수크로스보다 10000배 더 달다. 그것은 발명의 일부 구체예의 일부이다.

ATGGCCGCCACCACTTGCTTCTTCTTCCCTTCCCTCCTCCTC
CTCACGCTCTCCCGCGCTGCCACCTTCGAGATCGTCAACCGCTGCTC
CTACACCGTGTGGGCGGCCGCCTCCAAAGGCGACGCCGCCCTGGAC
GCCGGCGGCCGCCAGCTCAACTCGGGAGAGTCCTGGACCATCAACG
TAGAACCCGGCACCAACGGTGGCAAAATCTGGGCCCCGCACCGACTG
CTATTTCGACGACAGCGGCAGCGGCATCTGCAAGACCGGCGACTGC
GGCGGCCTCCTCCGGTGCAAGCGCTTCGGCCGGCCGCCACACGC
TGGCGGAGTTCTCGCTCAACCAGTACGGCAAGGACTACATCGACAT
CTCCAACATCAAAGGCTTCAACGTGCCGATGGACTTCAGCCCGACC
ACGCGCGGCTGCCGCGGGGTGCGGTGCGCCGCCGACATCGTGGGGC
AGTGCCCGGCGAAGCTGAAGGCGCCGGGGGGTGGTTGCAACGATGC
GTGCACCGTGTTCAGACGAGCGAGTACTGCTGCACCACGGGGAAG
TGCGGGCCGACGGAGTACTCGCGCTTCTTCAAGAGGCTTTGCCCCG
ACGCGTTTCAAGTTATGTCCTGGACAAGCCAACCACCGTCACCTGCCCC
GGCAGCTCCAACCTACAGGGTCACTTTCTGCCCTACTGCCCTTGAAC
TGAAGACGAGTAA [서열 번호:9]

모델린

ATGGGAGAGTGGGAAATTATCGATATTGGTCCCTTCACCCAAA
TGGGAAAGTTTGCTGTTGACGAGGAAAATAAAATCGGACAGTACGG
AAGACTCACTTTCAACAAGGTCATTAGGCCTTGTATGAAGAAAACA
ATCTACGAGAACGAAGGCTTTAGAGAGATTAAGGGGTACGAATATC
AACTGTACGTGTATGCTTCCGATAAACTTTTCAGAGCCGATATCTCT
GAGGACTACAAGACTAGAGGCAGGAAATTGCTCAGGTTTAACGGAC
CTGTTCTCCACCGTAG [서열 번호:10]

[0132]

미라쿨린

ACAACAATGAAGGAATTAACAATGCTCTCTCTCTCGTTCTTCTTCGT
CTCTGCATTGTTGGCAGCAGCGGCCAACCCACTGCTTAGTGACGCG
GATTCGGCACCCAATCCGGTTCTTGACATAGACGGAGAGAAACTCC
GGACGGGGACCAATTATTACATTGTGCGGGTGCTCCGCGACCATGG
CGGCGGCCTTACAGTATCCGCCACCACCCCCAACGGCACCTTCGTTT
GTCCACCCAGAGTTGTCCAAACACGAAAGGAGGTCGACCACGATCG
CCCCCTCGCTTTCTTTCCAGAGAACCCAAAGGAAGACGTTGTTCGAG
TCTCCACCGATCTCAACATCAATTTCTCGGCGTTTCATGCCCTGTCGTT
GGACCAGTTCCACCGTGTGGCGGCTCGACAAATACGATGAATCCAC
GGGGCAGTACTTCGTGACCATCGGCGGTGTCAAAGGAAACCCAGGT
CCCGAAACCATTAGTAGCTGGTTTAAGATTGAGGAGTTTGTGGTAG
TGTTTTTTACAAGCTTGTTTTCTGTCCCACCGTTTGTGGTTCCTGCAA
AGTAAAATGCGGAGATGTGGGCATTTACATTGATCAGAAGGGAAGA
AGGCGTTTGGCTCTCAGCGATAAACCATTTCGCATTTCGAGTTCAACAA
AACCGTATACTTCTAATTGGGTTTGGGGGTGGTTTTTCCAATCACAT
CTCATGTATGATCAGCTCCATTATCGATCTGCATAATTATAATTAAT
AAGGAAGCTTTT [서열 번호:11]

[0133]

[0134]

커쿨린

ATGGCGGCCAAGTTTCTTCTCACCATTCTTGTCACCTTTGCGGCCGT
CGTAGCCTTGGCATGGCCGACAGTGTCTCTCCGGGCAAACCTC
TGTATGCGGGCCACTCCCTCACGTCGGGCAGCTATACCTTAACCATA
CAAAACAACCTGCAACCTGGTGAAATACCAGCACGGGAGGCAGATCT
GGGCTAGCGACACTGACGGGCAGGGCTCCCAATGCCGCCTCACATT
GCGGAGTGACGGGAACCTCATTATCTACGACGACAACAACATGGTC
GTGTGGGGGAGCGACTGCTGGGGGAACAACGGCACGTATGCTCTTG
TTCTTCAGCAGGATGGCCTCTTTGTCATCTATGGCCCGGTTTTGTGG
CCCCTTGGCCTTAATGGGTGCCGACGTCTTAATGGTGAAATCACAGT
TGCTAAGGATTCTACTGAACCACAACATGAGGATATTAAGATGGTG
ATTAATAATTAA [서열 번호:12]

[0135]

[0136] 네오쿨린

ATGGCGGCCAAGTTTCTTCTCACCATTCTTGTCACCTTTGCGGCCGT
CGCTAGCCTTGGCATGGCCGACAGTGTCTGCTCTCCGGGCAAACCTC
TGTATGCCGGCCACTCCCTCACGTGCGGGCAGCTATACCTTAACCATA
CAAAACAACCTGCAACCTGGTGAAATACCAGCACGGGAGGCAGATCT
GGGCTAGCGACACTGACGGGCAGGGCTCCCAATGCCGCCTCACATT
GCGGAGTGACGGGAACCTCATTATCTACGACGACAACAACATGGTC
GTGTGGGGGAGCGACTGCTGGGGGAACAACGGCACGTATGCTCTTG
TTCTTCAGCAGGATGGCCTCTTTGTCACTATGGCCCGGTTTTGTGG
CCCCTTGGCCTTAATGGGTGCCGCAGTCTTAATGGTGAAATCACAGT
TGCTAAGGATTCTACTGAACCACAACATGAGGATATTAAGATGGTG
ATTAATAATTAATCAAGTGAGAGGATTGTTATGAGAATAATGAGGG
AATGGAAGACCAATCTCATGTCGGTGTGGCCTATCTCGACCTGTTTG
CAGTGCCTTTGTAAAATAACACATTGCTTAA [서열 번호:13]

[0137]

[0138] 링커: 링커는 용해도, 안정성 및/또는 발현을 개선하기 위하여 2개의 단백질 분자를 연결하는데 사용되는 펩타이드 분자이다. Enbrel®, Ontak®, Orencia®, Amevive®, Arcalyst®, 및 Nplate®과 같은 약물은 링커를 통해 연결된 다수의 단백질을 함유하며 FDA에 의해 승인되었다. 링커는 유연한 링커 또는 단단한 링커로 분류될 수 있다(Chen et al., 2013; Smith et al. 2003).

[0139] 유연한 링커는 주로 무질서한 루프를 형성함으로써 접힘에 대해 더 높은 자유를 제공하는 글리신, 알라닌 및/또는 세린과 같은 작은 크기의 아미노산으로 구성된다(Argos, 1990). 예를 들어, 본원에서 사용된 "L1 타입 링커"는 아미노산 (SGG)_nSAG[상응하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호: 14임]로 구성된다.

[0140] 유연한 링커의 주지된 제한은 견고성의 부족이다. 유연한 링커의 사용으로 상대적으로 더 낮은 수율/감소된 생물학적 활성이 유발되었다는 예가 문헌에 있다(Amet et al., 2009; Maeda et al., 1997). 문헌에서 링커를 형성하는 많은 알파 나선이 재조합 융합 단백질을 구성하기 위해 사용되었다(Amet et al., 2009; Bai and Shen, 2006). 예를 들어, 본원에서 사용된 "L2 타입 링커"는 아미노산A(EAAAK)_nA[상응하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호: 15임]로 구성된다.

[0141] 유연한 링커 및 단단한 링커의 추가 변형이 문헌에서 입증된 것과 같은 수율/생물학적 활성을 달성하기 위해 또한 사용될 수 있다(Chen et al., 2013). 예를 들어, 본원에서 사용된 "L3 타입 링커"는 아미노산 KKKR(SGG)_nSAGKREAEA[상응하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호: 16임]로 구성되고 본원에서 사용된 "L4 타입 링커"는 아미노산 (KKKR)_n(EAEA)_n[상응하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호: 17임]으로 구성된다.

[0142] L1 타입 링커

[0143] 서열 번호: 14

[0144] (TCTGGTGGG)_nAGCGCGGGT

[0145] 여기서 n=1-10이다.

[0146] L2 타입 링커

[0147] 서열 번호: 15

[0148] GCT(GAAGCAGCTGCGAAA)_nGCA

[0149] 여기서 n=1-10이다.

[0150] L3 타입 링커

[0151] 서열 번호: 16

- [0152] AAAAAAAAAAGA(TCTGGTGGG)_nAGCGCGGGTAAAAGA GAGGCTGAAGCT
- [0153] 여기서 n=1-10이다.
- [0154] L4 타입 링커
- [0155] 서열 번호: 17
- [0156] (AAAAAAAAAGA)_n(GAGGCTGAAGCT)_n
- [0157] 여기서 n=1-10이다.
- [0158] L5 타입 링커
- [0159] 서열 번호:18
- [0160] (GGG)_n
- [0161] 여기서 n=3-10이다.
- [0162] L6 타입 링커
- [0163] 서열 번호:19
- [0164] (GGGGGTGGGGTTCT)_n
- [0165] 여기서 n=1-10이다.
- [0166] L7 타입 링커
- [0167] 서열 번호:20
- [0168] GCT(GAAGCAGCTGCGAAA)₄GCTTTGGAAGCT(GAAGCAGCTGCGAAA)₄GCT
- [0169] L8 타입 링커
- [0170] 서열 번호:21
- [0171] (CCAGCT)_nCCA
- [0172] n=3-10이다.
- [0173] 위에서 언급된 링커로부터 분명한 것과 같이, 링커는 아미노산의 반복적인 서열로 이루어진다. 이런 특별한 반복적인 서열은 필요에 따라 링커 서열의 길이 및 특성을 변경시키기 위하여 "n"번 반복될 수 있고, 여기서 "n"은 1 내지 10의 범위일 수 있다. 최적 반복 횟수는 단백질의 기능 및 안정성을 유지하기 위해 필수적이다. 만약 단백질이 너무 가깝게 있으면 3D 구조에 영향을 미칠 것이고 따라서 기능에도 영향을 미칠 것이다. 너무 멀리 떨어져 있으면, 재조합 분자의 안정성이 영향을 받는다. 브라제인 단백질은 4개의 내부 이황화 가교 Cys4-Cys52, Cys16-Cys37, Cys22-Cys47, 및 Cys26-Cys49를 가지고 있다. 이들 내부 이황화 가교는 브라제인은 가장 열안정성 달콤한 단백질로 만들어준다. 이 특성은 인공 감미료의 대부분이 제빵 및 기타 조리 관행에서 사용된 고온을 견딜 수 없기 때문에 중요하다. 분명한 것은 이황화 가교 중 하나가 N 말단 모두에 가까이 있음으로써 단지 하나 또는 2개의 반복된 모티프로 된 매우 짧은 링커가 브라제인 단백질의 정확한 형태가 Cys4-Cys52 이황화 가교에 의해 안정화되도록 제1 단백질로부터 입체 장애를 유발할 것이라는 것이다. 이것은 재조합 분자의 양 방향에 모두 적용될 수 있다. 따라서 본 발명자들의 예에서 본 발명자들은 이황화 가교 형성에 영향을 미치지 않고 따라서 브라제인 단백질의 구조에 영향을 미치지 않기 위하여 적절한 분리를 유지하는 n=3을 사용하였다.
- [0174] 벡터: 유전자는 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 프로모터, 알코올 산화효소 터미네이터, 제오신 내성 유전자를 함유하는 통합 벡터인 pPICZA에 클로닝되었다.
- [0175] 신호 펩타이드: 알파 접합 신호 인자 - 효모 알파 접합 인자의 프로(pro) 영역은 세포외 분획에서 재조합 단백질의 발현에 광범위하게 사용된 분비 신호 인자이다. 몇몇 구체예에서 피키아 파스토리스에서 세포외 분비에 최적화된 신호 인자가 사용되었다. 서열은 아래에 제공된다:

- [0176] 서열 번호:22
- ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCG
CATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAA
ATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTC
GATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGT
TTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTAT
CTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT
- [0177]
- [0178] 인간 혈청 알부민 신호 인자
- [0179] 인간 혈청 알부민 신호 인자는 피키아 파스토리스에서의 단백질 발현을 위해 일반적으로 사용되는 또 다른 신호 펩타이드이다. 신호 인자 서열은 아래에 제공된다.
- [0180] 서열 번호:23
- ATGAAGTGGGTCACCTTCATTTCCTTGCTGTTCTTGTCTCTTCCGCT
TACTCT
- [0181]
- [0182] 프리(Pre)-Ost1-알파 신호 인자
- [0183] 일부 구체예에서 알파 접합 인자의 프로 영역은 Pre-Ost1과 융합되어 신호 펩타이드로서 사용된다.
- [0184] 서열 번호:24
- ATGAGGCAGGTTTGGTTCTCTTGGATTGIGGGATTGTTTCCTATGTTTT
TTCAACGTGTCTTCTGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGA
AACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTA
GAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAA
TAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTA
AAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT
- [0185]
- [0186] 도 3A-3D는 본 발명의 구체예에 따르는 다양한 유전자 카세트 표시를 도시한다.
- [0187] 도 3A는 AOX1이 벡터로서 사용되고 알파 접합 신호 인자가 재조합 단백질의 발현에서 신호 펩타이드로서 사용된 유전자 카세트 표시를 도시한다. 베타 락토글로불린(단백질 A)은 "L1 타입 링커"를 통해 브라제인(단백질 B)과 연결되고 그 역도 마찬가지이다. "L1 타입 링커"는 동일한 유전자 카세트에서 "L2 타입 링커"에 의해 대체될 수 있다.
- [0188] 도 3B는 AOX1이 벡터로서 사용되고 알파 접합 신호 인자가 재조합 단백질의 발현에서 사용된 신호 펩타이드인 유전자 카세트 표시를 도시한다. 베타 카세인(단백질 A)은 "L1 타입 링커"를 통해 브라제인(단백질 B)과 연결되고 그 역도 마찬가지이다. "L1 타입 링커"는 동일한 유전자 카세트에서 "L2 타입 링커"에 의해 대체될 수 있다.
- [0189] 도 3C는 AOX1이 벡터로서 사용되고 인간 혈청 알부민 신호 인자(HAS-SP)가 재조합 단백질의 발현에서 사용된 신호 펩타이드인 유전자 카세트 표시를 도시한다. 베타 락토글로불린(단백질 A)은 "L1 타입 링커"를 통해 브라제인(단백질 B)과 연결되고 그 역도 마찬가지이다. "L1 타입 링커"는 동일한 유전자 카세트에서 "L2 타입 링커"에 의해 대체될 수 있다.
- [0190] 도 3D는 AOX1이 벡터로서 사용되고 인간 혈청 알부민 신호 인자(HAS-SP)가 재조합 단백질의 발현에서 사용된 신호 펩타이드인 유전자 카세트 표시를 도시한다. 베타 카세인(단백질 A)은 "L1 타입 링커"를 통해 브라제인(단백질 B)과 연결되고 그 역도 마찬가지이다. "L1 타입 링커"는 동일한 유전자 카세트에서 "L2 타입 링커"에 의해 대체될 수 있다.
- [0191] 도 4는 본 발명의 구체예에 따르는 베타 락토글로불린-L1-브라제인, 브라제인-L1-베타 락토글로불린, 베타 락토글로불린-L2-브라제인, 브라제인-L2-베타 락토글로불린의 발현에 대한 겔 이미지를 도시한다. 도 4에서, 레인 1은 블랭크이고, 레인 2는 블랭크이며, 레인 3은 우유 단백질 표준이고, 레인 4는 베타 락토글로불린-L1-브라제인이며, 레인 5는 브라제인-L1-베타 락토글로불린이고, 레인 6은 베타 락토글로불린-L2-브라제인이며, 레인 7은

브라제인- L2-베타 락토글로불린이다.

[0192] 도 5는 본 발명의 구체예에 따르는 베타 락토글로불린-L3-브라제인, 베타 락토글로불린-L4-브라제인의 발현에 대한 겔 이미지를 도시한다. 도 5에서, 레인 1은 블랭크이며, 레인 2는 블랭크이고, 레인 3은 블랭크이며, 레인 4는 우유 단백질 표준이고, 레인 5는 베타 락토글로불린-L3-브라제인, 베타 락토글로불린-L4-브라제인이다.

[0193] 본 발명은 설명의 목적으로만 제시되며 발명의 범주를 제한하기 위해 해석되지 않아야 하는 다음의 예시적인 물질 및 방법에서 한층 더 설명된다. 다음의 실험은 산업/상업적 규모로 확장될 수 있고 얻어진 결과는 산업적 규모로 외삽될 수 있다. 임의의 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 추가 물질 및 방법이 또한 기술분야에 알려져 있다.

[0194] 조성물

[0195] 일부 구체예에서 다음의 조성물은 재조합 융합 단백질 분자를 사용하여 제조될 수 있다. 조성물의 비제한적인 예는 다음과 같이 열거된다:

[0196] 1. 우유 단백질은 달콤한 단백질에 연결되고 지방 및 회분과 조합되며, 여기서 회분은 필수 미네랄을 포함한다.

[0197] 2. 비-우유 단백질은 단맛 단백질에 연결되고 지방 및 회분과 조합되며, 여기서 회분은 필수 미네랄을 포함한다.

[0198] 3. 우유 단백질 및 비-우유 단백질은 단맛 단백질에 연결되고 지방 및 회분과 조합되며, 여기서 회분은 필수 미네랄을 포함한다.

[0199] 4. 우유 단백질은 또 다른 우유 단백질에 연결된다.

[0200] 5. 우유 단백질은 비-우유 단백질에 연결된다.

[0201] 6. 비-우유 단백질은 비-우유 단백질에 연결된다.

[0202] 단백질

[0203] 일부 구체예에서 다음의 단백질이 본 발명의 단백질 조성물에 사용된다. 단백질의 비제한적인 예는 다음과 같이 열거된다:

[0204] 1. 우유 단백질 카파 카세인, 알파 S1 카세인, 알파 S2 카세인, 베타 카세인, 베타 락토글로불린, 알파 락트알부민, 트랜스페린 및 오보알부민

[0205] 2. 달콤한 단백질 - 타우마틴, 모넨린, 마빈린, 미라쿨린, 커쿨린, 네오쿨린 및 펜타딘.

[0206] 지방

[0207] 일부 구체예에서 다음의 지방이 본 발명의 조성물에 사용된다. 지방의 비제한적인 예는 다음과 같이 열거된다:

[0208] 식물성 기반 오일, 예컨대 해바라기유, 옥수수유, 대두유, 야자 열매 오일, 팜핵유, 홍화유, 아마씨유, 미강유, 면실유, 올리브유, 카놀라유, 아마씨유, 코코넛 오일; 조류 오일, 미생물 생성 지방 및 식물성 기반 오일 기질의 미생물 발효로부터 유래된 지방.

[0209] 회분

[0210] 일부 구체예에서 식용 회분이 본 발명의 조성물에 사용된다.

[0211] 미네랄

[0212] 미네랄의 비제한적인 예는 칼슘, 인 및 마그네슘이다.

[0213] 벡터

[0214] 구체예에서 다음의 벡터가 본 발명의 단백질 조성물에 사용된다. 벡터의 비제한적인 예는 다음과 같이 열거된다:

[0215] 1. 메탄올 유도성 프로모터(AOX1, FLD1, MOX1, DAS1 등), 알파 접합 신호 인자, 제오신 내성 카세트, 터미네이터를 함유하는 통합 벡터.

[0216] 2. 구성성 프로모터, 알파 접합 신호 인자, 제오신 내성 카세트, 터미네이터를 함유하는 통합 벡터.

- [0217] 3. 제오신이 카나마이신 내성으로 대체된, 위의 1 및 2에서 언급된 벡터와 유사한 벡터.
- [0218] 4. 알파 접합 인자가 세포외 분획으로의 발현을 유도하는 임의의 신호 인자에 의해 대체된, 위의 1 내지 3에서 언급된 벡터와 유사한 벡터.
- [0219] **발현 유기체**
- [0220] 본 발명의 구체예에 따르면, 위의 구체예에서 재조합 분자는 다음과 같은 재조합 분자에 대해 사용된 미생물 시스템에서 발현될 수 있다:
- [0221] 박테리아 - 에세리키아 콜라이, 바실러스 서브틸리스, 시아노박테리아 등
- [0222] 진균 발현 숙주 - 아스페르길루스 니거, 아스페르길루스 니들란스, 트리코더마 리세이, 페니실륨 종
- [0223] 효모 - 사카로마이세스 세레비시에, 칸디다 알비칸스, 클루이베로마이세스 락티스, 클루이베로마이세스 마르시아누스, 야로위아 종
- [0224] 메틸로트로픽 효모 - 피키아 파스토리스, 한세놀라 폴리모르파, 칸디다 보이디니
- [0225] **형질전환**
- [0226] 리튬 아세테이트 및 LiCl을 사용하는 화학적 형질전환, 형질감염, 전기천공, PEG 매개된 형질전환, 아그로박테리움 매개된 형질전환 등과 같은 형질전환 프로토콜이 사용될 수 있다.
- [0227] **실시예**
- [0228] 본 개시의 특정 구체예를 설명하기 위하여 다음의 실시예가 포함된다. 실시예에서 개시된 기법은 본 개시의 방법 및 과정에서 잘 기능하도록 본 발명자들에 의해 발견된 기법을 나타낸다; 그러나, 기술분야에 숙련된 사람들은, 본 개시의 관점에서, 많은 변화가 개시된 특정 구체예에서 만들어질 수 있고 여전히 본 개시의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 비슷한 또는 유사한 결과를 얻을 수 있다는 것을 인정해야 한다. 그러므로, 실시예에서 제시되거나 제공된 모든 사항은 제한하는 의미가 아니라 예시하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0229] **재조합 벡터**
- [0230] 여기서 예시의 재조합 벡터 pPICZA-베타-락토글로불린-L1-브라제인, pPICZA-브라제인-L1-베타-락토글로불린, pPICZA-베타-락토글로불린-L2-브라제인, pPICZA-브라제인-L2-베타-락토글로불린, pPICZA-베타-락토글로불린-L3-브라제인, pPICZA-브라제인-L3-베타-락토글로불린, pPICZA-베타-락토글로불린-L4-브라제인, pPICZA-브라제인-L4-베타-락토글로불린의 일부를 간단하게 설명한다.
- [0231] 선택한 신호 펩타이드와 함께 관심의 유전자를 합성하였다. 2개의 유전자를 PCR을 중첩시킴으로써 링커를 사용하여 함께 융합시켰다. 링커용 서열을 중첩하는 PCR 프라이머 내에서 설계하였다. 융합된 구성물을 pPICZA의 EcoRI 및 NotI 부위에 클로닝하고 이. 콜라이 NEB5 유능한 세포로 표준 프로토콜을 통해 형질전환하였다. 형질전환체를 25 µg/ml 제오신 LB 아가 플레이트 상에서 선택하였다. 형질전환체를 제한 소화 및 서열분석을 통해 확인하였다.
- [0232] **숙주 유기체**
- [0233] 피키아 파스토리스 스트레인은 본원에서 PX-1로 지정되고 지칭되는 BG 16 스트레인의 유도체이다.
- [0234] **스트레인 구성**
- [0235] 피키아 형질전환을 위해 선택한 플라스미드를 미디-프렙(midi-prep)을 통해 대량으로 분리하였다. 40 µg의 플라스미드 DNA를 SacI/PmeI 효소로 선형화하고 5-10 µg의 선형화된 벡터를 사용하여 전기천공을 통해 위의 PX-1 스트레인을 형질전환시켰다. 형질전환 프로토콜은 간단하게 다음과 같다. 100 ml의 YPD 배지를 20-50 µl의 PX-1 스트레인 접종물로 접종하고 1-1.3의 O.D로 밤새 성장시켰다. 세포를 수득하고 저온 멸균된 밀리Q 물로 2회 세척하였다. 다음 단계로 세포를 2 ml의 1 M 소르비톨로 세척하고 최종적으로 200 µl의 1 M 소르비톨에 현탁하였다. 세포를 얼음에 넣고 같은 날에 전기천공에 사용하였다. 80 µl의 유능한 세포를 5-10 µg의 선형화된 DNA와 혼합하고 피키아 파스토리스 전기천공에 대해 사전 설정된 조건을 사용하여 Biorad 전기천공기에서 전기천공하였다. 전기천공 직후 1 ml의 1 M 소르비톨을 첨가하고 1시간 동안 30℃에서 인큐베이션하였다. 그 후에 1 ml의 YPD를 배양물에 첨가하고 추가로 2-3시간 동안 진동시키면서 30℃에서 인큐베이션하였다. 콜로니를 다양한 농도(100-2000 µg/ml)의 YPD-제오신 플레이트 상에서 선택하였다. 통합된 양성 콜로니를 콜로니 PCR을 통해 확인하

였다.

[0236] 발현

[0237] 단일 콜로니를 10 ml BMGY 배지(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 100 mM 인산 칼륨, pH 6.0, 1.34% 효모 질소 베이스, 4 x 10⁻⁵% 비오틴 1% 글리세롤)에 접종하고 24시간 동안 배양한 후 BMMY(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 100 mM 인산 칼륨, pH 6.0, 1.34% YNB, 4 x 10⁻⁵% 비오틴, 0.5% 메탄올) 배지로 유도를 위해 1-2의 최종 O.D로 옮겼다. 매 24시간 후 0.5% 메탄올을 배양에 첨가하였다. 샘플을 24, 48 및 72시간째에 수집하여 발현을 위해 SDS PAGE 상에서 시각화하였다. 그런 후 양성 샘플을 500 ml 플라스크, 1 ml 플라스크 및 8 L 발효기로 연속적으로 확장시켰다.

[0238] 발효기 조건

[0239] 스트레인의 글리세롤 스톱을 250 mL의 배플 플라스크 내 50 mL의 YPD 브로스에 접종하였다. 그런 후 이 접종물을 사용하여 적응 단계로서 100 ml의 GYP(효모 추출물 1%, 펩톤 2% 및 글리세롤 2%)를 접종하였다. 그런 후 이것을 250 ml의 BSM(글리세롤 4%, 오르토인산 2.7%, K₂SO₄ 1.8%, MgSO₄·7H₂O 1.4%, KOH 0.413%, CaSO₄·2H₂O 0.116%)에 접종하였다. 그런 후 배양물을 사용하여 BSM 배지가 들어 있는 8 L 발효기를 접종하였고, 성장 단계에 대해서는 pH를 5로 유지하였고 유도 단계에 대해서는 pH를 6으로 유지하였다. 온도를 성장 단계에 대해 30℃로 유지하였고 유도 단계에 대해 24℃로 유지하였다.

[0240] 단백질 정제

[0241] 배양 상층액을 마이크로여과를 통해 초기에 처리하여 세포 및 기타 미립자 물질을 제거하였다. 그런 후 투과물을 한외여과/정용여과를 사용하여 농축한 후 냉동 건조시켜서 분말 단백질을 얻었다.

[0242] 맛 테스트

[0243] 20명의 참가자를 이용하여 이중 맹검 연구를 수행하여 샘플의 단맛 지수를 분석하였다. 20℃에서 30 g/L의 수크로스 용액을 참조 용액으로서 택하여 1의 단맛 지수를 부여하였다. 참가자에게 맛을 보도록 샘플을 제공하고 수크로스 표준을 1로 하는 것을 기준으로 단맛 지수의 등급을 매기도록 요청하였다.

[0244] 실시예 1: 제조합 융합 단백질의 발현을 위한 제조합 벡터의 구성

[0245] 여기서 예시의 제조합 벡터 pPICZA-베타-락토글로불린-L1-브라제인, pPICZA-브라제인-L1-베타-락토글로불린, pPICZA-베타-락토글로불린-L2-브라제인, pPICZA-브라제인-L2-베타-락토글로불린, pPICZA-베타-락토글로불린-L3-브라제인, pPICZA-브라제인-L3-베타-락토글로불린, pPICZA-베타-락토글로불린-L4-브라제인, pPICZA-브라제인-L4-베타-락토글로불린의 일부를 간단하게 설명한다. 선택한 신호 펩타이드와 함께 관심의 유전자를 합성하였다. 2개의 유전자를 PCR을 중첩시킴으로써 링커를 사용하여 함께 융합시켰다. 링커용 서열을 중첩하는 PCR 프라이머 내에서 설계하였다. 융합된 구성물을 pPICZA의 EcoRI 및 NotI 부위에 클로닝하고 이. 콜라이 NEB5 유능한 세포로 표준 프로토콜을 통해 형질전환하였다. 형질전환체를 25 µg/ml 제오신 LB 아가 플레이트 상에서 선택하였다. 형질전환체를 제한 소화 및 서열분석을 통해 확인하였다.

[0246] 숙주 유기체

[0247] 피키아 파스토리스 스트레인 - Atum Biosciences로부터 입수한 BG 16 스트레인의 유도체.

[0248] 스트레인 구성 - 피키아 형질전환을 위해 선택한 플라스미드를 미디 프랩 프로토콜을 통해 대량으로 분리하였다. 40 µg의 플라스미드 DNA를 SacI/PmeI 효소로 선형화하고 5-10 µg의 선형화된 벡터를 사용하여 전기천공을 통해 위의 PPS-9016 스트레인을 형질전환시켰다. 형질전환 프로토콜은 간단하게 다음과 같다. 100 ml의 YPD 배지를 20-50 µl의 PX-1 스트레인 접종물로 접종하고 1-1.3의 O.D로 밤새 성장시켰다. 세포를 수득하고 저온 멸균된 밀리Q 물로 2회 세척하였다. 다음 단계로 세포를 2 ml의 1 M 소르비톨로 세척하고 최종적으로 200 µl의 1 M 소르비톨에 현탁하였다. 세포를 얼음에 넣고 같은 날에 전기천공에 사용하였다. 80 µl의 유능한 세포를 5-10 µg의 선형화된 DNA와 혼합하고 피키아 파스토리스 전기천공에 대해 사전 설정된 조건을 사용하여 Biorad 전기천공기에서 전기천공하였다. 전기천공 직후 1 ml의 1 M 소르비톨을 첨가하고 1시간 동안 30℃에서 인큐베이션하였다. 그 후에 1 ml의 YPD를 배양물에 첨가하고 추가로 2-3시간 동안 진동시키면서 30℃에서 인큐베이션하였다. 콜로니를 다양한 농도(100-2000 µg/ml)의 YPD-제오신 플레이트 상에서 선택하였다. 통합된 양성 콜로니를 콜로니 PCR을 통해 확인하였다.

[0249] 실시예 2: 재조합 융합 단백질의 발현

[0250] 단일 콜로니를 10 ml BMGY 배지(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 100 mM 인산 칼륨, pH 6.0, 1.34% 효모 질소 베이스, 4 x 10⁻⁵% 비오틴 1% 글리세롤)에 접종하고 24시간 동안 배양한 후 BMMY(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 100 mM 인산 칼륨, pH 6.0, 1.34% YNB, 4 x 10⁻⁵% 비오틴, 0.5% 메탄올) 배지로 유도를 위해 1-2의 최종 O.D로 옮겼다. 매 24시간 후 0.5% 메탄올을 배양에 첨가하였다. 샘플을 24, 48 및 72시간째에 수집하여 발현을 위해 SDS PAGE 상에서 시각화하였다. 그런 후 양성 샘플을 500 ml 플라스크, 1 ml 플라스크 및 8 L 발효기로 연속적으로 확장시켰다.

[0251] 발효기 조건: 스트레인의 글리세롤 스톱을 250 mL의 배플 플라스크 내 50 mL의 YPD 브로스에 접종하였다. 그런 후 이 접종물을 사용하여 적음 단계로서 100 ml의 GYP(효모 추출물 1%, 펩톤 2% 및 글리세롤 2%)를 접종하였다. 그런 후 이것을 250 ml의 BSM(글리세롤 4%, 오르토인산 2.7%, K₂SO₄ 1.8%, MgSO₄·7H₂O 1.4%, KOH 0.413%, CaSO₄·2H₂O 0.116%)에 접종하였다. 그런 후 배양물을 사용하여 BSM 배지가 들어 있는 8 L 발효기를 접종하였고, 성장 단계에 대해서는 pH를 5로 유지하였고 유도 단계에 대해서는 pH를 6으로 유지하였다. 온도를 성장 단계에 대해 30℃로 유지하였고 유도 단계에 대해 24℃로 유지하였다.

[0252] 실시예 3: 융합 단백질의 분리 및 정제

[0253] 배양 상층액을 마이크로여과를 통해 초기에 처리하여 세포 및 기타 미립자 물질을 제거하였다. 그런 후 투과물을 한외여과/정용여과를 사용하여 농축하고 냉동 건조시켜서 분말 단백질을 얻었다.

[0254] 실시예 4: 재조합 융합 단백질의 기호성 결정

[0255] 맛 테스트 - 20명의 참가자를 이용하여 이중 맹검 연구를 수행하여 샘플의 단맛 지수를 분석하였다. 20℃에서 30 g/L의 수크로스 용액을 참조 용액으로서 택하여 1의 단맛 지수를 부여하였다. 참가자에게 맛을 보도록 샘플을 제공하고 수크로스 표준을 1로 하는 것을 기준으로 단맛 지수의 등급을 매기도록 요청하였다.

[0256] 위의 설명은 본 발명의 바람직한 구체예일뿐이며 본 발명을 제한하려는 의도는 아니다. 본 발명의 사상 및 원리 내에서 만들어진 임의의 변형, 등가물 대체, 개선, 등은 본 발명의 범주 내에 포함되어야 한다.

[0257] 본 명세서 전체에서 단어"포함하다", 또는 "포함하다(복수형)" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 표시된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계들의 그룹을 포함하는 것을 함축하지만 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계들의 그룹을 배제하는 것은 아닌 것으로 이해될 것이다.

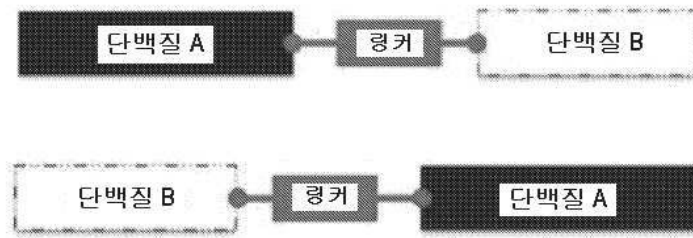
[0258] "적어도" 또는 "적어도 하나의"란 표현의 사용은 그 사용이 바람직한 목적 또는 결과의 하나 이상을 달성하기 위해 본 개시의 구체예에 있을 수 있기 때문에, 하나 이상의 요소 또는 성분 또는 양의 사용을 시사한다.

[0259] 다양한 물리적 매개변수, 크기 또는 양에 대해 언급된 수치는 대략적인 것일 뿐이며 매개변수, 크기 또는 양에 대해 할당된 수치보다 높거나/낮은 값은, 명세서에서 이와 반대되는 특정 표시가 없는 한, 본 개시의 범주 내에 속하는 것으로 예상된다.

[0260] 본원에서 본 개시의 특정 특징에 대해 상당한 강조가 이루어졌지만, 다양한 변형이 만들어질 수 있고, 본 개시의 원리로부터 벗어나지 않으면서 바람직한 구체예에서 많은 변화가 만들어질 수 있다는 것이 인지될 것이다. 본 개시 또는 바람직한 구체예의 본질에서의 이들 및 다른 변형은 본원의 개시로부터 기술분야에 숙련된 사람들에게 분명할 것이며, 그로써 전술한 기재 사항은 제한으로서가 아닌 단순히 본 개시를 설명하는 것으로서 해석되어야 한다.

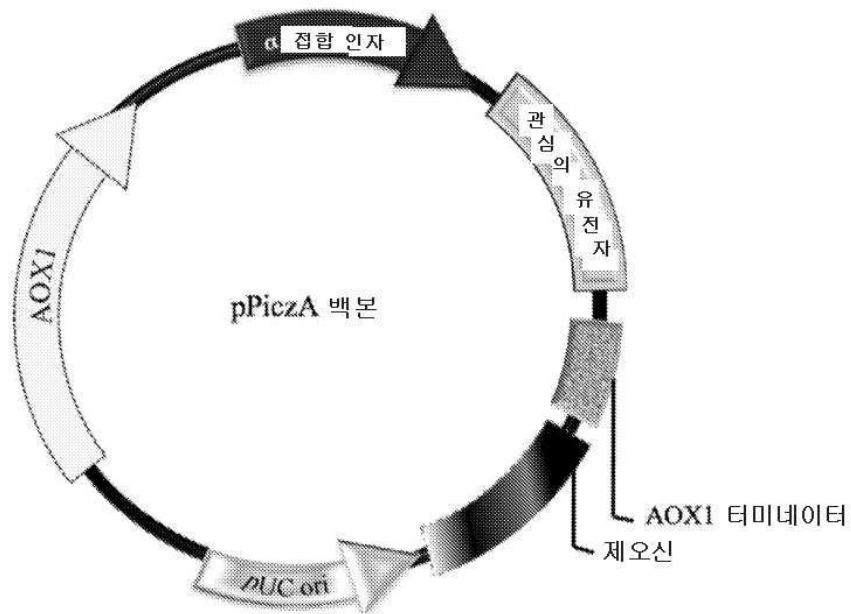
도면

도면1



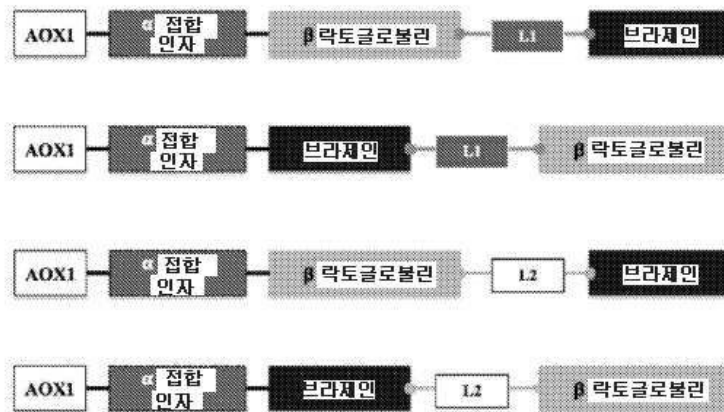
도 1

도면2

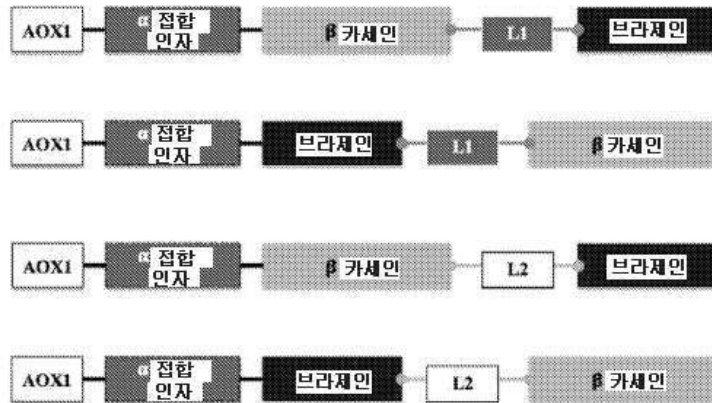


도 2

도면3ab

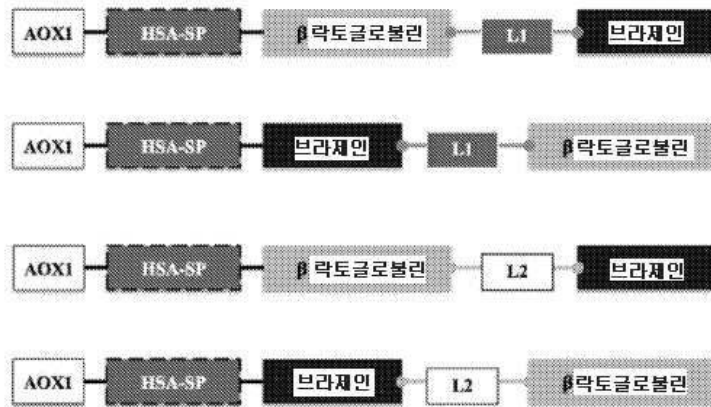


도 3A

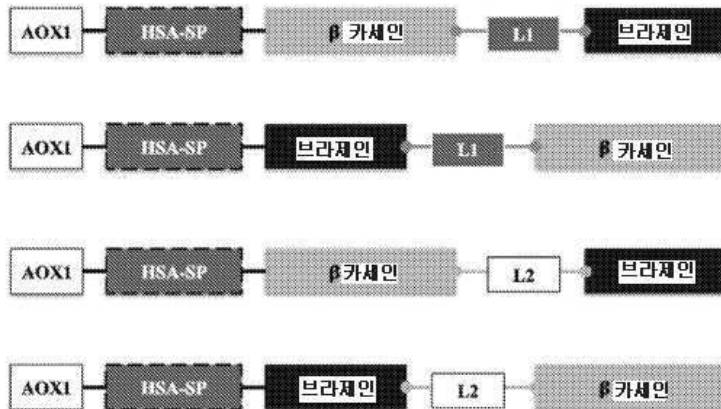


도 3B

도면3cd

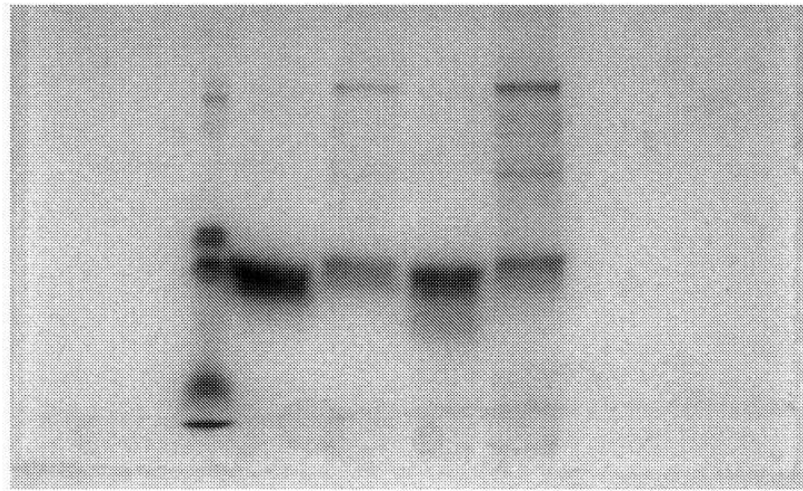


도 3C



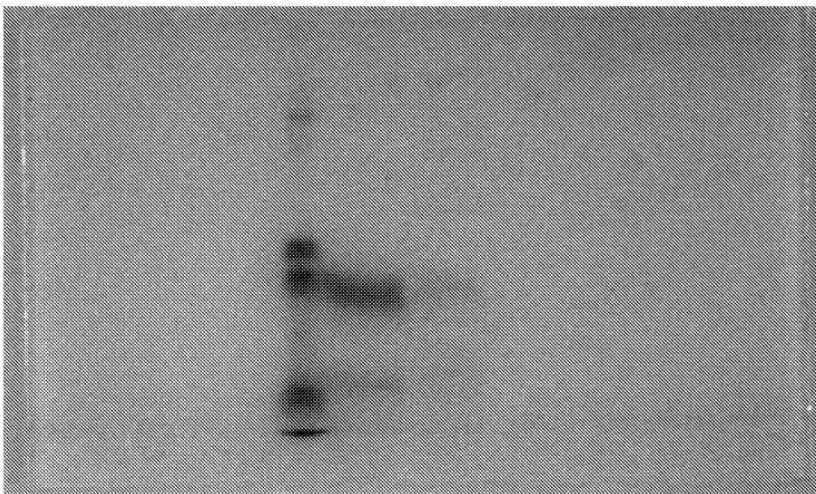
도 3D

도면4



도 4

도면5



도 5

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.