(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0060819
(43) 공개일자 2023년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) *C07K 14/005* (2006.01)
C07K 14/45 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56905 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0145421
(22) 출원일자 2021년10월28일
심사청구일자 2021년10월28일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전복실
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 의과대학 126호 의동물학교실(회기동, 경희대학교)
김민주
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 의과대학 126호 의동물학교실(회기동, 경희대학교)
(74) 대리인
특허법인태백

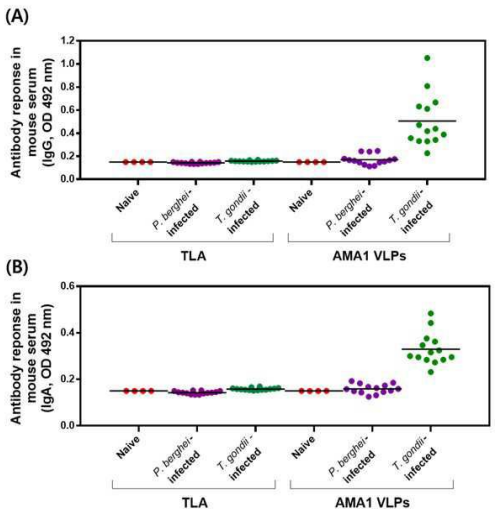
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **톡소포자충 정점막 항원 1을 포함하는 바이러스-유사입자의 톡소포자충증 혈청 진단 용도**

(57) 요 약

본 발명은 톡소포자충 정점막 항원 1을 포함하는 바이러스-유사입자의 톡소포자충증 혈청 진단 용도에 관한 것으로서, 톡소포자충 AMA1을 발현하는 바이러스 유사입자를 이용하여 감염 혈청과의 효소결합면역흡착측정법을 진행하였으며, 바이러스 유사입자를 이용하여 기존 톡소포자충 항원보다 높은 민감성을 확인하였고, 말라리아 감염 혈청과 반응시켜 위음성 및 위양성과 같은 잘못된 진단이 나타나지 않음을 보아 높은 특이성을 확인하였다. 본 발명의 바이러스 유사입자 단백질을 이용한 톡소포자충증 혈청 진단법은 기존 톡소포자충 항원을 이용한 진단법에 비해 민감성 및 특이성이 높아, 톡소포자충증 진단에 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C07K 14/45 (2013.01)
C12N 2760/16022 (2013.01)
C12N 2760/16023 (2013.01)
G01N 2333/45 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345331688
과제번호 2018R1A6A1A03025124
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 활성산소 조절을 통한 만성질환병 예방치료에 관한 연구
기 여 율 40/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465034272
과제번호 HV20C0142010021
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 감염병예방치료기술개발사업(R&D)
연구과제명 호흡기 세포융합 바이러스의 바이러스 유사입자 백신 플랫폼의 비임상시험 및 유효성 평가
기 여 율 30/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.07.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465033307
과제번호 HV20C0085010021
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 감염병예방치료기술개발사업(R&D)
연구과제명 인플루엔자 바이러스 유사입자 범용 백신 플랫폼 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.04.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 톡소포자충 정점막 항원 1(apical membrane antigen 1; AMA1)을 포함하는 톡소포자충 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs)를 유효성분으로 포함하는 톡소포자충증 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 M1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 AMA1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 톡소포자충증 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 M1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 AMA1은 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 톡소포자충증 진단용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 톡소포자충증 진단 키트.

청구항 5

(1) 환자에서 분리된 시료 및 제1항의 톡소포자충증 진단용 조성물을 접촉시켜 항원-항체 반응을 유도하는 단계; 및

(2) 상기 항원-항체 반응 수준 측정하여 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는 톡소포자충증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 시료는 혈액 또는 혈청인 것을 특징으로 하는 톡소포자충증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 항원-항체 반응 수준은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA(Radioimmnoassay), 샌드위치 측정법(Sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯(Western Blot), 면역블롯 분석(Immunoblot assay), 면역조직화학염색 방법(Immnohistochemical staining) 또는 표면증강라만분석법(Surface Enhanced Raman Spectroscopy assay)으로 확인하는 것을 특징으로 하는 톡소포자충증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 톡소포자충 정점막 항원 1(apical membrane antigen 1; AMA1)을 포함하는 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs)의 톡소포자충증(toxoplasmosis) 혈청 진단 용도에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 톡소포자충은 세포 내 기생충(obligare intercellular parasite)으로서 전 세계적으로 분포하는 인간 및 동물에 대한 톡소포자충증(Toxoplasmosis)을 야기하는 원인 원충이다. 전 세계 인구의 약 3분의 1 이상이 톡소포자충에 감염된 것으로 추정되며, 국내에서도 그룹에 따라 2 내지 25%의 감염율을 나타내는 것으로 보고된다.

[0003] 톡소포자충은 산모를 감염시켰을 때 톡소포자충의 영양형(trophozoite)은 태반을 거쳐 태아를 감염시킬 수 있다. 톡소포자충의 감염에 의해 초기의 태아는 유산 또는 사산에 이를 수 있으며, 중후기의 태아는 정상적 분만에도 불구하고 시력손상, 수두증, 정신박약 등의 선천적 기형이 야기될 수 있다. 또한, 건강한 개체를 감염시킨 톡소포자충은 면역계 세포, 망상내피계 세포 등을 파괴시켜 림프선염, 망막맥락막염, 뇌척수염 등의 질병을 유발할 수 있으며, 숙주의 면역부전시 뇌에서 증식된 낭포(Cyst)가 활성화 되어 뇌수막염 또는 망막맥락막염을 일으킬 수 있다.

[0004] 한편, 톡소포자충 치료제로 사용되는 피리메타민(pyrimethamine)이 톡소포자충증의 치료제로서 가장 널리 사용되고 있으나, 임신 중에는 치료 효과가 잘 나타나지 않으며, 그 외에 스피라마이신(spiramycin)은 약효가 크지 않아 예방용으로 쓰이고 있다. 또한, 피리메타민과 병용되는 설파제(sulfa drug)인 설파메톡사졸(sulfamethoxazole)은 골수억제를 일으켜 혈소판 수를 감소시킬 수 있으며, 엽산의 병용 투약에 의해 알러지반응, 신장장애, 혈액장애, 오심(惡心), 구토 등의 부작용을 유발할 수 있다.

[0005] 현재, 톡소포자충증 진단법에는 많은 진단법이 있으며, 제일 대중적으로 사용되고 있는 진단법은 톡소포자충 항원(Tachyzoite lysate antigen, TLA)-항체 반응을 이용한 효소결합면역흡착측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이 있다. 이에 사용되는 톡소포자충 항원은 쥐에 원충을 감염시켜 제조하며, 많은 쥐의 희생이 있어야 한다. 또한, 감염 진단 시 쓰이는 원충 항원과 감염 혈청 반응이 낮으며, 위음성, 위양성과 같은 잘못된 진단을 하는 단점이 있다. 이에, 보다 효과적인 톡소포자충증 진단법을 개발할 필요성이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1256181호(2013.04.12 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 톡소포자충 정점막 항원 1(apical membrane antigen 1; AMA1)을 포함하는 톡소포자충 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs)의 톡소포자충증 진단 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 톡소포자충 정점막 항원 1(apical membrane antigen 1; AMA1)을 포함하는 톡소포자충 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs)를 유효성분으로 포함하는 톡소포자충증 진단용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 조성물을 포함하는 톡소포자충증 진단 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 (1) 환자에서 분리된 시료 및 제1항의 톡소포자충증 진단용 조성물을 접촉시켜 항원-항체 반응을 유도하는 단계; 및 (2) 상기 항원-항체 반응 수준 측정하여 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는 톡소포자충증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 톡소포자충 정점막 항원 1을 포함하는 바이러스-유사입자의 톡소포자충증 혈청 진단 용도에 관한 것으로서, 톡소포자충 AMA1을 발현하는 바이러스 유사입자를 이용하여 감염 혈청과의 효소결합면역흡착측정법을 진행하였으며, 바이러스 유사입자를 이용하여 기존 톡소포자충 항원보다 높은 민감성을 확인하였고, 말라리아 감염 혈청과 반응시켜 위음성 및 위양성과 같은 잘못된 진단이 나타나지 않음을 보아 높은 특이성을 확인하였다. 본 발명의 바이러스 유사입자 단백질을 이용한 톡소포자충증 혈청 진단법은 기존 톡소포자충 항원을 이용한 진단법에 비해 민감성 및 특이성이 높아, 톡소포자충증 진단에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1 및 도 2는 톡소포자충 AMA1 바이러스 유사입자 단백질 항원을 이용하여 톡소포자충 (ME49 strain)을 10, 50, 100, 150, 300 cyst를 마우스에 경구감염시킨 후 혈청을 감염 후 1, 2, 4, 8주에 수득하여 항원-혈청 반응 확인한 결과를 나타낸다.

도 3 및 도 4는 톡소포자충 AMA1 바이러스 유사입자 단백질 항원을 이용하여 톡소포자충 (RH strain) 5×10^3, 1×10^4, 5×10^4를 마우스에 경구감염 시킨 후 혈청을 감염 후 1, 2, 4, 8주에 수득하여 항원-혈청 반응 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 말라리아 (*Plasmodium berghei*) 감염 후 수집한 마우스의 감염 혈청과 톡소포자충 항원, 톡소포자충 AMA1 바이러스 유사입자 항원과의 교차반응 확인 결과를 나타낸다.

도 6은 톡소포자충 감염된 환자의 혈청과 톡소포자충 항원 및 톡소포자충 AMA1 VLPs 간의 항원-항체 반응 확인 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein; M1) 및 톡소포자충 정점막 항원 1(apical membrane antigen 1; AMA1)을 포함하는 톡소포자충 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs)를 유효성분으로 포함하는 톡소포자충증 진단용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에서 "톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)"는 콕시디아아강(subclass of coccidia)에 속하는 첨복포자충이다. 톡소포자충은 세포 내 기생충(obligare intercellular parasite)으로서 전 세계적으로 분포하는 인간 및 동물에 대한 톡소포자충증(Toxoplasmosis)을 야기하는 원인 원충이다. 톡소포자충은 크게 난포낭(oocyst, 오시스트), 영양형(tachyzoit, 타키조이트), 감염형(bradyzoit, 브래디조이트), 분열체(schizont, 시존트) 및 생식모체(gametocyte, 거미토사이트) 단계의 5가지 발육 단계를 거친다. 톡소포자충은 종숙주인 고양이 분변의 난포낭(oocyst)에 의해 오염된 물 또는 야채를 섭취함으로써 감염되거나, 중간숙주인 돼지, 양, 소 등의 육류에 낭포로 존재하는 톡소포자충을 섭식할 때 감염될 수 있다. 예컨대, 상기 톡소포자충 원충은 *Toxoplasma gondii* ME49 strain일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명에서 "바이러스-유사입자(Virus-Like Particles, VLPs)"는 바이러스성 단백질을 수반하거나 수반하지 않는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미한다. 예컨대, 상기 바이러스-유사입자는 DNA 또는 RNA 게놈이 완전히 결여되어 있거나, 바이러스성 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자의 경우 자발적 자가 어셈블리를 진행할 수도 있다.

[0016] 본 발명에서 "톡소포자충 바이러스-유사입자"는 톡소포자충에 대한 특이적인 면역 반응을 유도하며, 바이러스와 유사한 형태를 가진 단백질 구조체(입자)를 의미한다.

[0017] 상기 톡소포자충 바이러스-유사입자는 바이러스에서 유래한 구조 단백질이 조립되어 바이러스와 유사한 형태의 입자를 생성함과 동시에 톡소포자충 원충으로부터 유래한 항원 결정 부위를 포함함으로써, 상기 톡소포자충 바이러스-유사입자를 특정 개체에 접종하였을 때 톡소포자충에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 구체적 일 예로서, 상기 단백질 구조체는 바이러스 유래의 구조 단백질 외부에 톡소포자충 원충 유래의 항원 결정 부위가 결합된 형태를 가질 수 있다.

[0018] 상기 바이러스 유래의 구조 단백질(core protein)은 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)일 수 있다.

[0019] 본 발명에서 "인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1)"은 인플루엔자 바이러스의 구조 단백질로서, 인플루엔자 바이러스의 외피(envelop)인 지방층 안쪽에 코트(coat)를 형성하는 기질단백질(matrix protein)을 의미한다. 상기 인플루엔자 바이러스는 8개의 분절된 음성가닥 RNA, 표면 단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, H), 뉴라미다제(neuraminidase, N), 뉴클레오프로테인(neucleoprotein, NP) 매트릭스(matrix, M1), 프로톤 이온-채널 단백질(proton ion-channel protein, M2), 중합효소 염기 단백질 1(polymerase acidic protein, PA), 중합효소 염기 단백질 2(PB2, polyMerase basic protein 2), 중합효소 산성 단백질(PA, polymerase acidic protein) 및 비구조 단백질 2(NS2, nonstructural protein 2)와 같은 단백질을 포함하는데, 이때 매트릭스 단백질 1은 외형을 층으로 둘러 쌓고 있음으로써 코어와 외피 간의 연결체로 작용한다. 상기 매트릭스 단백질 1은 바이러스-유사입자 생성에 있어, 바이러스-유사입자를 안정한 형태로 조립하는데 중요한 역할을 한다.

[0020] 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 A/Puerto Rico/8/34, A/Bangkok/163/2000, A/AA/Huston/1945, A/Berlin/6/2006, A/Brandenburg/1/2006, A/Brevig Mission/1/1918, A/Chile/8885/2001, A/DaNang/DN311/2008, A/FLW/1951, A/FW/1/1950, A/Fiji/15899/83, A/Fort Monmouth/1-MA/1947, A/HaNoi/TX233/2008, A/Iowa/CEID23/2005, A/Malaysia/35164/2006, A/Managua/4086.04/2008, A/Texas/VR06-0502/2007, A/WSN/1933, A/Colorado/18/2011, A/Kentucky/04/2010, A/Maryland/28/2009, A/New Mexico/05/2012, A/Philippines/TMC10-135/2010, A/Singapore/GP4307/2010, A/Singapore/GP489/2010, A/Boston/14/2007, A/Brisbane/09/2006, A/Hong Kong/CUH34175/2002, A/Kyrgyzstan/WRAIR1256P/2008, A/Malaysia/12550/1997, A/Nanjing/1663/2010, A/Wyoming/08/2010, A/Berkeley/1/1968, A/Korea/426/1968 등으로부터 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본 발명의 일 실시예에서는 A/Puerto Rico/8/34 유래 M1 단백질을 바이러스-유사입자의 구조 단백질로 활용하였다.

[0021] 상기 톡소포자충으로부터 유래한 항원 결정 부위는 톡소포자충 정점막 항원 1(apical membrane antigen 1; AMA1)일 수 있다.

[0022] 본 발명에서 용어 “항원 결정 부위(epitope)”는 각각의 항체 또는 T 세포 수용체에 의한 인식의 기본 요소 또는 최소 단위이며, 상기 항체 또는 T 세포 수용체가 결합하는 특정 도메인, 영역 또는 분자 구조를 의미한다. 상기 항원 결정 부위는 톡소포자충에서 유래할 수 있으며, 상기 톡소포자충에 대한 면역 활성을 유도할 수 있으면 특별히 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명에서 “정점막 항원 1(Apical membrane antigen 1, AMA1)”은 숙주 세포 침습에 중용한 역할을 하는 필수 미량 단백질이다. 이동 접합(moving junction, MJ) 복합체의 일부로서, 기생충의 정단부 팁의 원형질막과 표적 숙주 세포 사이에 고리형 구조를 형성하는 역할을 한다. 침습하는 동안, 이동 접합 복합체는 기생충의 전방에서 후방으로 이동하여, 기생충을 기생충 액포(parasitophorous vacuole, PV)로 내면화(internalization)시키는 역할을 한다. 이에 본 발명에서는 정점막 항원 1을 항원 결정 부위의 단백질로 활용하고자 한다.

[0024] 구체적으로 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 정점막 항원 1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 정점막 항원 1은 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 기능적 동등물을 포함한 것일 수 있다.

[0025] 본 발명에서 용어 “기능적 동등물"은 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 가장 구체적으로는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 가지는 단백질을 의미한다.

[0026] 본 발명에서 용어 "실질적으로 동등한 생리활성"은 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1 또는 정점막 항원 1과의 구조적, 기능적 상동성으로 인해 톡소포자충에 대한 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 바이러스-유사입자로서의 활성을 의미한다.

[0027] 보다 구체적으로 상기 인플루엔자 바이러스 메트릭스 단백질 1은 서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 정점막 항원 1은 서열번호 4의 핵산 서열에 의해 암호화 될 수 있다. 예컨대, 상기 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 M1은 Genebank Accession No. ABO21712 또는 Genebank Accession No. EF467824 로 표현되는 유전자일 수 있다. 상기 정점막 항원 1은 Genebank Accession No. AF010264.1로 표현되는 유전자일 수 있다.

[0028] 상기 바이러스-유사입자는 개체 내에서 항원으로 작용하며 수상돌기세포(dendritic cells)와 같은 항원 표지 세포와의 반응을 통해 T 또는 B 면역 세포에 항원을 표지할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 톡소포자충증 진단 키트를 제공한다.

[0030] 본 발명의 진단 키트는 항원-항체 반응을 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA(Radioimmnoassay), 샌드위치 측정법(Sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯(Western Blot), 면역블롯 분석(Immunoblot assay), 면역조직화학염색 방법(Immnohistochemical staining) 또는 표면증강라만분석법(Surface Enhanced Raman Spectroscopy assay)으로 측정할 수 있다.

[0031] 이 경우 상기 톡소포자충 바이러스-유사입자를 고정하기 위한 고정체; 상기 톡소포자충 바이러스-유사입자와 특이적으로 결합하는 발색표지체가 컨쥬게이션된 2차 항체 접합체(Conjugate); 상기 표지체와 발색반응할 발색기질 용액 세척액, 및 효소반응 정지용액을 포함할 수 있다.

[0032] 상기 항원-항체 결합 반응을 위한 고정체로는 니트로셀룰로오스 막, PVDF막, 폴리비닐 (Polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌 (Polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트 (Well plate) 및 유리로 된 슬라이드 글라스(Slide glass) 등이 사용될 수 있다.

[0033] 상기 2차 항체의 표지체는 발색반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(Horseradish peroxidase), 알칼리성 인산분해효소(Alkaline phosphatase), 콜로이드 골드 (Coloid gold), FITC (Poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC (Rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질 (Fluorescein) 및 색소 (Dye) 등의 표지체가 사용될 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 (1) 환자에서 분리된 시료 및 제1항의 톡소포자충증 진단용 조성물을 접촉시켜 항원-항체 반응을 유도하는 단계; 및 (2) 상기 항원-항체 반응 수준 측정하여 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는 톡소포자충증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0035] 바람직하게는, 상기 항원-항체 반응은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA(Radioimmnoassay), 샌드위치 측정법(Sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯(Western Blot), 면역블롯 분석(Immunoblot assay), 면역조직화학염색 방법(Immnohistochemical staining) 또는 표면증강라만분석법(Surface Enhanced Raman Spectroscopy assay)으로 확인할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에서 용어 “환자에서 분리된 시료”는 혈액 등을 포함한 생물의 모든 물질을 말하는 것이며, 본 발명의 생물학적 시료는 조직, 세포, 모발, 구강 조직, 구강 세포, 혈액, 림프, 골수 액, 타액, 유즙, 소변, 분변, 안구 액, 정액, 뇌추출액, 척수 액, 관절액, 복수, 양막액 또는 세포조직액이 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서, 바람직하게는 상기 시료는 혈액일 수 있고, 혈액은 전혈, 혈장, 및 혈청을 포함하며, 보다 바람직하게는 상기 시료는 혈청일 수 있다.

[0037] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0038] **<실시예 1> 톡소포자충 정점막 항원 1(apical membrane antigen 1; AMA1)을 포함하는 바이러스-유사입자(Virus-like particles, VLPs) 제조**

[0039] 인플루엔자 바이러스 매트릭스 단백질 1(Influenza virus matrix protein, M1) 및 톡소포자충 원충의 정점막 항원 1(Apical membrane antigen 1, AMA1)을 포함하는 바이러스-유사입자를 제조하기 위해, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)의 정점막 항원 1을 항원 유전자로 선정하였다.

[0040] 상기 인플루엔자 매트릭스 단백질 1(M1) 유전자는 한국 공개특허 10-2019-0009691호에 기재된 M1 유전자와 동일한 서열을 사용하였다(GenBank accession number: EF467824, 1027bp).

[0041] 이후, 상기 인플루엔자 M1 단백질 유전자를 AMA1 암호화 서열이 도입된 pFastBac 벡터에 도입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다. 이때, 상기 pFastBac 벡터에 도입된 M1 및 AMA1 유전자가 제대로 도입되었는지를 DNA 염기서열 결정법에 의해 확인하였다.

[0042] AMA1 및 M1을 발현하는 재조합 바큘로바이러스(recombinant BaculoViruses, rBVs)를 제조하기 위하여, cellfectin Ⅱ(Invitrogen) 및 SF9 세포를 이용하여 DNA 형질 감염을 수행하였다. AMA1 및 M1을 포함하는 pFastBac 벡터를 이용한 형질 전환은 white/blue 스크리닝에 의해 수행되었다. 재조합 바큘로바이러스는 Bacto-Bac 발현 시스템(Invitrogen)를 통해 제조사의 매뉴얼에 따라 제조되었다.

[0043] 톡소포자충의 바이러스-유사입자는 AMA1 및 M1을 발현하는 재조합 바큘로바이러스(rBVs)에 의해 공동-감염된 SF9 곤충 세포에서 생산하였다. 상청액 내의 바이러스-유사입자는 고속원심분리(30분, 45,000×g)를 사용해 펠렛화하였다.

[0044] 바이러스-유사입자를 4℃에서 인산완충식염수(PBS)에 하룻밤 동안 재현탁하였고, 불연속 수크로오스 구배(20-30-60%)를 통해 4℃, 45,000×g에서 1 시간 동안 수확하고 정제하였다. 단백질 농도는 QuantiPro BCA Assay Kit(Sigma-Aldrich)에 의해 결정하였다.

[0045] 한편, 본 발명에서 사용된 톡소포자충 AMA1을 포함하는 VLPs에 대해서는 본 발명자들이 이전에 출원한 한국특허출원 제10-2020-0013081호(출원일: 2020.02.04)에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0046] **<실시예 2> 동물모델에서 바이러스 유사입자 단백질 항원과 감염혈청 반응 검증**

[0047] **1. 톡소포자충 AMA1 바이러스 유사입자 단백질 항원을 이용한 항원-혈청 반응 확인**

[0048] 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 각각 톡소포자충을 10, 50, 100, 150, 300 cyst를 경구감염시켜 감염 후 1, 2, 4, 8주에 혈청을 수득하며 톡소포자충 항원 (TLA)과 톡소포자충 AMA1 바이러스 유사입자 (VLPs)를 각각 96well immunoplate에 코팅하였으며, 톡소포자충 (ME49 strain)을 10, 50, 100, 150, 300 cyst를 마우스에 경구감염 후 1, 2, 4, 8주에 수득한 혈청을 100배 희석한 1차 항체를 100 μl/well 분주하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체로 Goat anti-mouse IgG (도 1) 또는 IgM (도 2) 항체를 2000배 희석하여 100 μl/well 분주하였으며, 37℃에서 1시간 반응 후 H_2O_2, O-Phenylenediamine(OPD)를 첨가한 Substrate buffer를 100 μl/well 분주하여 반응시켰다. 과도한 반응을 방지하기 위하여 황산 50μl/well 분주하여 반응을 멈췄다. OD 값은 microplate reader를 사용하여 측정하였다. 감염 후 혈청들 모두 TLA와의 반응보다, AMA1 VLPs와의 반응이 유의하게 더 높게 확인됨 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

[0049] 도 3 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 각각 톡소포자충 (RH strain)을 5×10^3, 1×10^4, 5×10^4를 경구감염시켜 감염 후, 1, 2주에 혈청을 수득하며 톡소포자충 항원 (TLA)과 톡소포자충 AMA1 바이러스 유사입자 (VLPs)를 각각 96well immunoplate에 코팅하였다. 톡소포자충 (RH strain)을 5×10^3, 1×10^4, 5×10^4를 경구감염시켜 감염 후 1, 2주에 수득한 혈청을 100배 희석한 1차 항체로 사용하여 100 μl/well 분주하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체로 Goat anti-mouse IgG (도 3) 또는 IgM (도 4) 항체를 2000배 희석하여 100 μl/well 분주하였으며, 37℃에서 1시간 반응 후 H_2O_2, O-Phenylenediamine(OPD)를 첨가한 Substrate buffer를 100 μl/well 분주하여 반응시켰다. 과도한 반응을 방지하기 위하여 황산을 50μl/well 분주하여 반응을 멈추었다. OD 값은 microplate reader를 사용하여 측정하였다. 감염 후 혈청들 모두 TLA와의 반응보다, AMA1 VLPs와의 반응이 유의하게 더 높게 확인되었다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

[0050] **2. 말라리아 (*Plasmodium berghei*) 감염 후 수집한 마우스의 감염 혈청과 톡소포자충 항원, 톡소포자충 AMA1 바이러스 유사입자 항원과의 교차반응 확인**

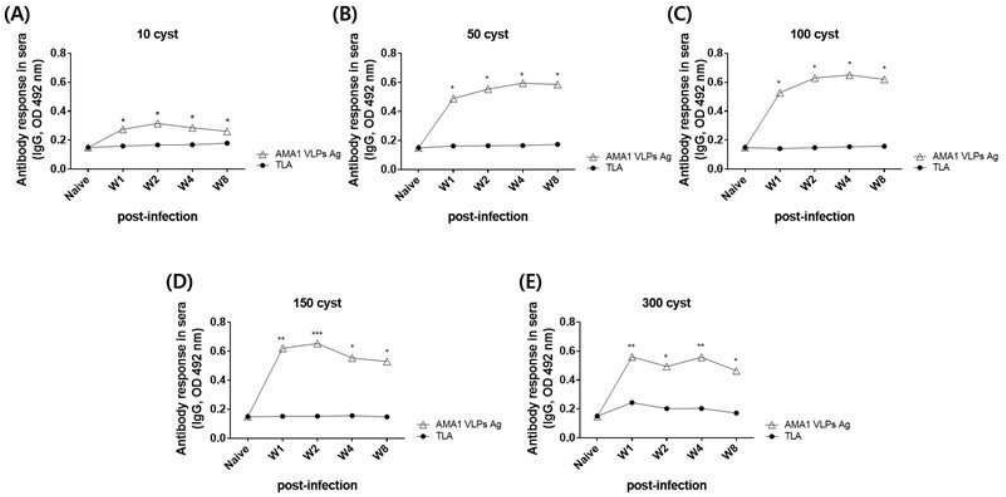
[0051] 톡소포자충 AMA1 유전자의 교차반응을 확인하고자, 말라리아 (*Plasmodium berghei*) 원충을 쥐에 근육내 접종시켜 수득한 혈청과 톡소포자충 원충 항원 (TLA), 톡소포자충 AMA1 VLPs 항원과 항원-항체 반응을 시켜 IgG 항체가(도 5A)와 IgA 항체가(도 5B)를 확인하였다(도 5). 톡소포자충 항원 (TLA)과 톡소포자충 AMA1 바이러스 유사입자 (VLPs)를 각각 96well immunoplate에 코팅하였으며, 톡소포자충 감염 혈청과 말라리아 감염 혈청을 100배 희석한 1차 항체로 100 μl/well 분주하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체로 Goat anti-mouse IgG 또는 IgA 항체를 2000배 희석하여 100 μl/well 분주하였으며, 37℃에서 1시간 반응 후 H_2O_2, O-Phenylenediamine(OPD)를 첨가한 Substrate buffer를 100 μl/well 분주하여 반응시켰다. 과도한 반응을 방지하기 위하여 황산을 50μl/well 분주하여 반응을 멈추었다. OD 값은 microplate reader를 사용하여 측정하였다. 말라리아 감염 혈청들과의 교차반응이 없음을 확인하였으며, 전 실험들과 동일하게 톡소포자충 감염혈청에서 더 높게 확인이 되었다. 이를 통해, 톡소포자충 AMA1 VLPs 항원의 민감성과 특이성을 확인하였다.

[0052] **3. 톡소포자충 감염된 환자의 혈청과 톡소포자충 항원 및 톡소포자충 AMA1 VLPs 간의 항원-항체 반응 확인**

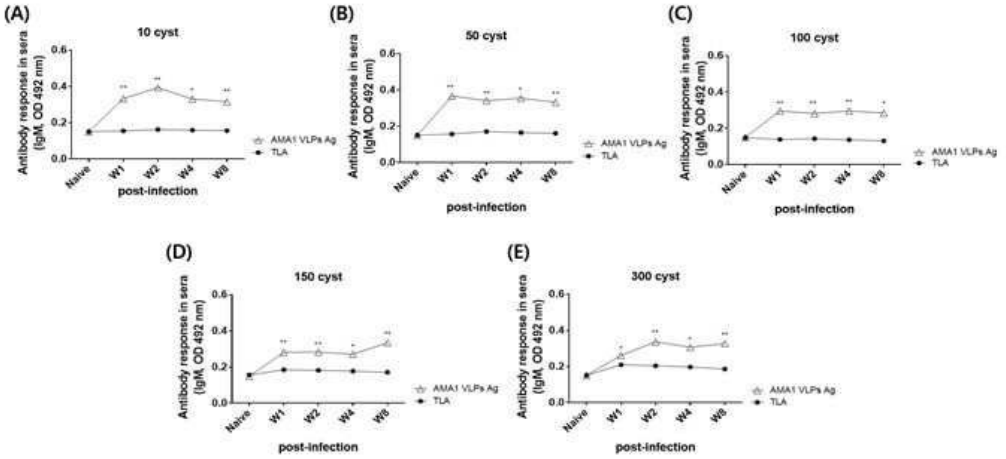
[0053] 톡소포자충 감염환자의 혈청을 충남대학교와 서울대학교에서 얻어, 각각 톡소포자충 항원과 톡소포자충 AMA1 VLPs간의 항원-항체 반응을 시켜 IgG 항체가를 확인하였다(도 6). 톡소포자충 항원 (TLA)과 톡소포자충 AMA1 바이러스 유사입자 (VLPs)를 각각 96well immunoplate에 코팅하였으며, 톡소포자충 감염 혈청을 100배 희석한 1차 항체로 100 μl/well 분주하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체로 Goat anti-human IgG 항체를 2000배 희석하여 100 μl/well 분주하였으며, 37℃에서 1시간 반응 후 H_2O_2, O-Phenylenediamine(OPD)를 첨가한 Substrate buffer를 100 μl/well 분주하여 반응시켰다. 과도한 반응을 방지하기 위하여 황산을 50μl/well 분주하여 반응을 멈추었다. OD 값은 microplate reader를 사용하여 측정하였다. 감염환자의 혈청임에도 불구하고 비감염혈청(naive)와 차이가 별로 나지 않는 결과를 톡소포자충 항원에서는 확인하였으나, 톡소포자충 AMA1 VLPs 항원에서는 모든 샘플이 비감염 혈청과 차이가 나는 결과를 보였다. 이를 통해, 톡소포자충 AMA1 VLPs 항원을 통한 진단법으로 기존의 진단법에서 나오는 위음성, 위양성 결과가 해결될 수 있음을 확인하였다.

도면

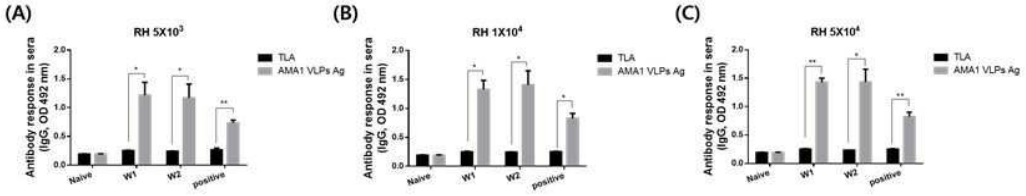
도면1



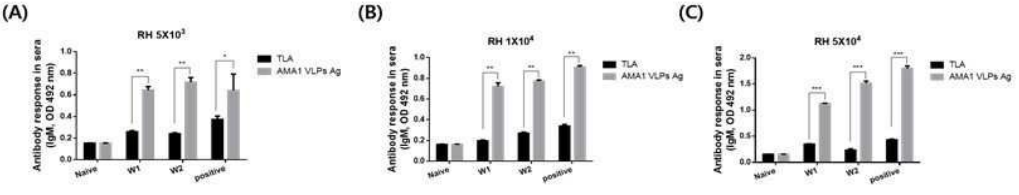
도면2



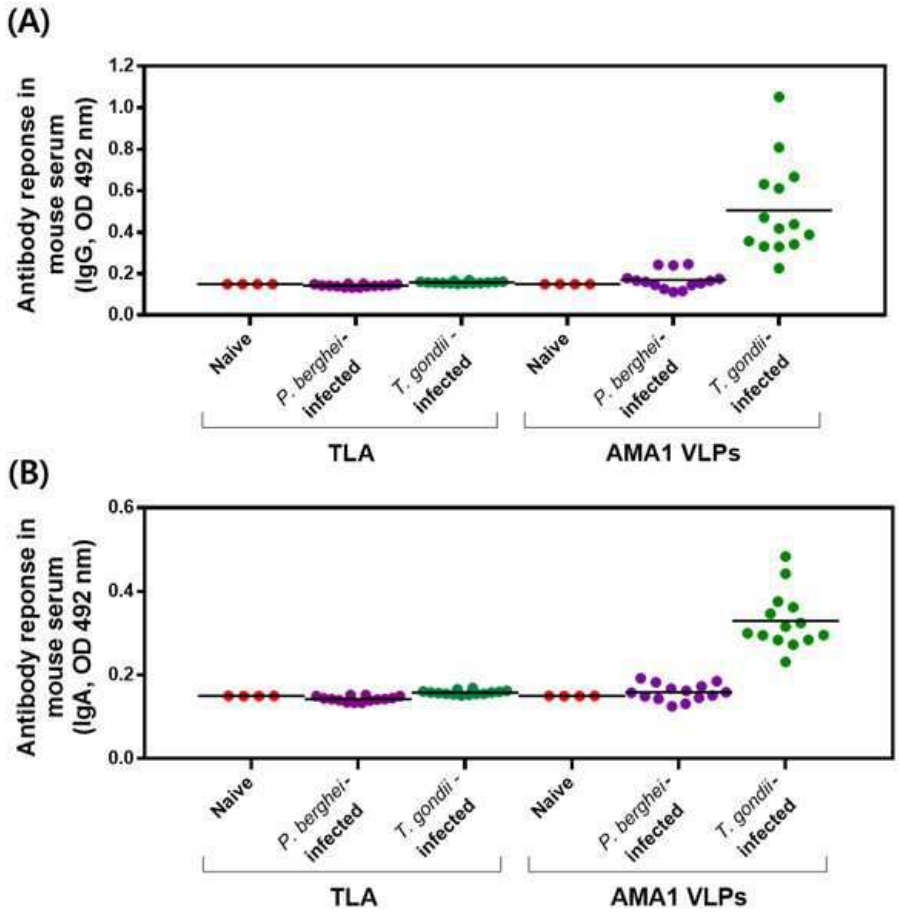
도면3



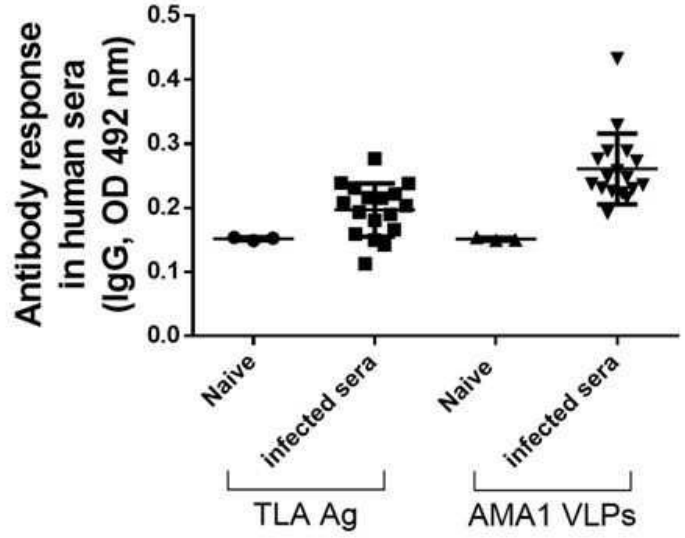
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Use for serodiagnosing toxoplasmosis of virus-like particles comprising Toxoplasma gondii apical membrane antigen 1

<130> ADP-2021-0630

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 618

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M1

<400> 1

Met Lys Ile Ser Ile Val Ala Phe Pro Leu Leu Met Ile Ala Leu Arg
1 5 10 15

Ser Lys Ser Thr Asn Ala His Lys Thr Asn Asn Leu Glu Ala Gln Ile
20 25 30

Asn Tyr Gly Ile Ile Asn Asn Tyr Asn Glu Leu Leu Lys Val Ala Lys
35 40 45

Cys Gln Tyr Cys Leu Thr Thr Thr Asn Pro Val Glu Glu Glu Asn Cys
50 55 60

Asp Glu Ile Met Glu Glu Cys Arg Gly Leu Leu Ser Asn Lys Asp Leu
65 70 75 80

Gly Phe Leu Leu Lys Ala Ile Thr Asp Glu Ser Met His Asn Lys Ser
85 90 95

Gln Tyr Ile His Gly Lys His Ser Asn Thr Leu Arg Arg Ile Ile Lys
100 105 110

Val Leu Glu Ala Gln Lys Lys Asn Ile Glu Ser Val Lys Asn Ile Val
115 120 125

Arg Asp Ile Lys Lys Ser Gly Asn Thr Gln Leu Arg Ser Ser Gly Thr
130 135 140

Ser Ile Ser Asp Leu Asp Lys Leu Asn Thr Ser Ile Lys Asn Ile Lys
145 150 155 160

Lys Gly Phe Gln Phe Leu Asn Asp Asn Tyr Ser Thr Ile Asn Lys His

165 170 175

Ile Asn Ile Pro Ser Gly Asp Met Asn Lys Ile Tyr Lys Arg Ile Val

180 185 190

Asn Thr Asn Asn Phe Asp Gly Leu Ser Lys Ser Gln Glu Lys Ile Cys

195 200 205

Ser Asn Glu Asp Asp Thr Asn Val Gly Ile Asp Asp Ile Ile Lys Ser

210 215 220

Ser Val Gln Asp Ile Phe Asp Glu Gly Glu Asn Ile Met Asn Val Val

225 230 235 240

Lys Thr Val Leu Val Gln Glu Ser Asp Gly Ile Gly Asn Glu Leu Ala

245 250 255

Gly Leu Ile Glu Lys Gly Lys Glu Ile Gly Glu Gln Ile Val Asn Ile

260 265 270

Glu Gly Leu Leu Ser Pro Lys Asn Gly Leu Phe Ser Gly Gly Leu Pro

275 280 285

Ser Leu Asn Lys Leu Tyr Glu Phe Thr Ser Asn Leu Ser Ser Tyr Glu

290 295 300

Tyr Leu Leu Val Lys Leu Lys Asp Ser Ile Ile Ser Lys Leu Lys Asp

305 310 315 320

Ile Leu Leu Arg Leu Leu Tyr Lys Ser Tyr Ile Thr Tyr Arg Lys Asn

325 330 335

Lys Ser Ile Glu Leu Gly Glu Glu Glu Ile Pro Met Val Ser Lys Asp

340 345 350

Glu Tyr Leu Asp Glu Leu Lys Lys Gly Val Ile Gln Leu Ser Met Lys

355 360 365

Leu Leu Tyr Ser Lys Ile Lys Arg Leu Leu Ile Lys Ile Lys Asn Lys

370 375 380

Met Ser Arg Lys Lys Lys Thr Glu Asn Ile Pro Asp Pro Leu Pro Val

385 390 395 400

Glu Ser Ser Ile Tyr Asp Tyr Asp Asp Asp Asp Ala Ile Val Asp Asp

405 410 415

Thr Ala Asp Asp Asp Ala Ala Asp Asp Asp Val Ala Asp Asn Asp Lys

420 425 430

Phe Ile Ser Phe Asn Lys Ser Ser Ser His Met Lys Leu Phe Arg Gly

435 440 445

Ile Leu Pro Gln Lys Lys Ser Ile Val Ser Thr Ile Asp Lys Met Ile

450 455 460

Ser Glu Ile Asp Leu Tyr Glu Gln Gly Leu Tyr Thr Asp Thr His Ala

465 470 475 480

Asp Tyr Glu Asn Asp Glu Ile Leu Ser Thr Val Glu Gly Met Asp Glu

485 490 495

Thr Glu Ser Asp Glu Ala Glu Leu Ser Asn Glu Cys Val Gln Lys Ile

500 505 510

Ile Asp Glu Asn Ile Ala Val Glu Ala Ile Asn Asn Leu Leu Lys Val

515 520 525

Asp Glu Ser Ala Val Glu Glu Arg Glu Asn Val Asn Asp Ser Glu Asn

530 535 540

Lys Ser Asn Asn Ser Ser Ile Asp Ile Glu Lys Gly Ala Ser Thr Pro

545 550 555 560

Ser Asp Ile Ser Glu Ile Pro Asn Ile Ile Lys Lys Ile Val Ile Tyr

565 570 575

Val Ile Lys Glu Arg Ile Tyr Asp Leu Ala Glu Glu Leu Ser Asp Asn

580 585 590

Lys Leu Glu Asp Glu Ser Lys Thr Ser Thr Pro Ser Asn Asn Ile Ile

595 600 605

Leu Glu Asp Thr Pro Ala Pro Asn Gln Ala

610 615

<210> 2

<211> 541

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AMA1

<400> 2

Met Gly Leu Val Gly Val Gln Val Leu Leu Val Leu Val Ala Asp Cys

1 5 10 15

Thr Ile Phe Ala Ser Gly Leu Ser Ser Ser Thr Arg Ser Arg Glu Ser

20 25 30

Gln Thr Leu Ser Ala Ser Thr Ser Gly Asn Pro Phe Gln Ala Asn Val

35 40 45

Glu Met Lys Thr Phe Met Glu Arg Phe Asn Leu Thr His His His Gln

50 55 60

Ser Gly Ile Tyr Val Asp Leu Gly Gln Asp Lys Glu Val Asp Gly Thr

65 70 75 80

Leu Tyr Arg Glu Pro Ala Gly Leu Cys Pro Ile Trp Gly Lys His Ile

85 90 95

Glu Leu Gln Gln Pro Asp Arg Leu Pro Tyr Arg Asn Asn Phe Leu Glu

100 105 110

Asp Val Pro Thr Glu Lys Glu Tyr Lys Gln Ser Gly Asn Pro Leu Pro

115 120 125

Gly Gly Phe Asn Leu Asn Phe Val Thr Pro Ser Gly Gln Arg Ile Ser

130 135 140

Pro Phe Pro Met Glu Leu Leu Glu Lys Asn Ser Asn Ile Lys Ala Ser

145 150 155 160

Thr Asp Leu Gly Arg Cys Ala Glu Phe Ala Phe Lys Thr Val Ala Met

165 170 175

Asp Lys Asn Asn Lys Ala Thr Lys Tyr Arg Tyr Pro Phe Val Tyr Asp

180 185 190

Ser Lys Lys Arg Leu Cys His Ile Leu Tyr Val Ser Met Gln Leu Met

195 200 205

Glu Gly Lys Lys Tyr Cys Ser Val Lys Gly Glu Pro Pro Asp Leu Thr

210 215 220

Trp Tyr Cys Phe Lys Pro Arg Lys Ser Val Thr Glu Asn His His Leu

225 230 235 240

Ile Tyr Gly Ser Ala Tyr Val Gly Glu Asn Pro Asp Ala Phe Ile Ser

245 250 255

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

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

Pro Glu Thr Ala Leu Gln Cys Thr Ala Asp Lys Phe Pro Asp Ser Phe
405 410 415
Gly Ala Cys Asp Val Gln Ala Cys Lys Arg Gln Lys Thr Ser Cys Val
420 425 430
Gly Gly Gln Ile Gln Ser Thr Ser Val Asp Cys Thr Ala Asp Glu Gln
435 440 445
Asn Glu Cys Gly Ser Asn Thr Ala Leu Ile Ala Gly Leu Ala Val Gly
450 455 460
Gly Val Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Gly Gly Cys Tyr Phe Ala Lys

465 470 475 480
Arg Leu Asp Arg Asn Lys Gly Val Gln Ala Ala His His Glu His Glu
485 490 495
Phe Gln Ser Asp Arg Gly Ala Arg Lys Lys Arg Pro Ser Asp Leu Met
500 505 510

Gln Glu Ala Glu Pro Ser Phe Trp Asp Glu Ala Glu Glu Asn Ile Glu
515 520 525

Gln Asp Gly Glu Thr His Val Met Val Glu Gly Asp Tyr
530 535 540

<210> 3

<211> 1857

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M1

<400> 3

atgaagataa gtatcgtggc attcccttta cttatgattg ctctcagaag caaatctacc 60

aatgctcata aaacaaataa tttggaagcc caaattaatt atggtattat aaataattat 120

aacgaattgt taaaagtagc aaaatgccaa tattgcttaa ctaccaccaa tcctgttgaa 180

gaagaaaatt gtgatgaaat aatggaagaa tgtagaggat tgttaagcaa taaagacctt 240

ggatttttat taaaagccat aacagatgag tctatgcata ataaatctca atatattcat 300

ggaaaacata gtaatacatt aagaagaatt attaaagttt tagaagcaca aaaaaaaaat 360

attgaatcag taaaaaatat tgtacgtgat attaaaaaaa gtggtaatac acagttaaga 420

agtagtggta caagtatttc agatttagat aaattaaaca caagcattaa aaatataaaa 480

aaaggtttcc aatttttaaa tgataattac agcacaatta ataaacacat aaatatacca 540

agtggtgata tgaataaaat ttataaaaga atagtaaaca caaataattt tgatgggtta 600

tcaaaatcac aagaaaaaat ttgttcaaat gaagacgaca ccaatgtagg tattgatgat 660

attataaaat caagtgttca agatattttt gatgagggag aaaatataat gaatgtagtt 720

aaaactgttt tagtacaaga aagtgatgga attggaaatg aattagcagg gttaattgaa 780

aaaggaaaag aaatcggaga acaaattgta aatattgaag gattgttatc tccaaaaaat 840

ggattattta gtggcggttt accatcatta aataagttgt atgaatttac aagtaattta 900

tcatcttatg aatatttgtt agttaagctc aaagattcaa taatatcaaa attaaaagac 960

atattattaa gattgttata taaatcatat ataacttaca gaaaaaataa atcaattgag 1020

ttaggagaag aagaaatacc aatggttagc aaggatgaat atttagatga attaaaaaaa 1080

ggtgtaatac aattaagtat gaaattatta tatagcaaaa tcaaaaggtt attaattaaa 1140

attaaaaaca aaatgtcccg taaaaagaaa acggaaaata ttcctgaccc attaccagtt 1200

gaatcctcaa tttatgatta tgatgatgac gatgcaattg tcgacgatac agctgatgat 1260

gatgcagctg atgatgatgt agctgataat gataaattta tttcatttaa taaatcctcg 1320

tcacatatga aattattcag aggtattttg ccccagaaaa aatctattgt atctaccatc 1380

gataagatga ttagtgaaat cgatttatat gaacaaggat tatatactga tacacatgca 1440

gattatgaaa acgatgaaat cttatctact gtcgaaggta tggatgaaac agaatctgat 1500

gaagctgaat tgtcaaatga gtgtgttcag aaaattatcg atgaaaacat tgccgtagaa 1560

gctatcaaca atttacttaa agtcgatgaa tctgcagtag aggaaaggga aaatgtaaat 1620

gattcagaaa ataaatcaaa taattcatcc attgacattg aaaagggtgc tagtactcct 1680

agtgacattt cagaaattcc taacatcata aaaaaaatcg ttatatatgt tataaaagaa 1740

agaatatatg atttagcaga agaattatca gacaataaac tcgaggatga atctaaaaca 1800

tcaacacctt caaacaatat aatcctagaa gatacaccag ctccaaacca agcataa 1857

<210> 4

<211> 1626

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AMA1

<400> 4

atggggctcg tgggcgtaca agttttgctg gttcttgtgg cggattgcac catattcgca 60

tcgggactca gctcaagcac aaggtctcgc gagtcgcaga cgctgagtgc tagcacgtcg 120

gggaatccct ttcaggcaaa tgtagagatg aaaaccttca tggaaagatt caacctaact 180

catcatcatc agtctggtat ttacgtcgac cttggacaag acaaggaagt tgatggcaca 240

ttataccggg agcctgcggg gttgtgtccc atttggggaa agcacatcga actccagcag 300

ccggaccggc ttccgtaccg taacaacttc ttggaagatg ttccgactga aaaagaatac 360

aaacagtcag ggaatccttt gcccggaggc ttcaacttga atttcgtgac gcctagcggg 420

cagcgaattt caccatttcc gatggaactt cttgaaaaaa atagcaacat caaggcgagt 480

acggatcttg ggaggtgcgc cgagtttgcc tttaagacgg tcgctatgga taaaaacaat 540

aaggcgacga agtaccgtta cccatttgtt tatgactcca agaagcgact gtgccacatc 600

ctctacgtat cgatgcagct gatggagggt aaaaagtact gttcagtcaa gggcgaacct 660

ccagatctca catggtattg cttcaagccc cgaaagagtg ttacggagaa tcatcatctc 720

atctacggat cggcctatgt tggagagaac ccagatgcgt tcatcagtaa atgcccaaat 780

caagctcttc gcgggtacag gttcggtgtt tggaagaaag gccgttgcct cgactacact 840

gaattgaccg acactgtgat agaacgtgtt gagtcaaagg cacagtgctg ggtgaaaacc 900

tttgaaaacg acggggtcgc gagtgaccaa ccccatacgt atccactgac gtcgcaagca 960

tcatggaacg attggtggcc tctccaccag agtgaccaac ctcactcagg tggcgttggg 1020

cgtaattacg gtttctacta cgtggacacg actggagagg gcaagtgtgc actctctgac 1080

caggtacccg actgcctggt gtcggattct gccgccgtgt cgtatacagc agcggggagt 1140

ttgtctgaag agacgccgaa tttcataatt ccgtcaaatc cctctgttac tccgccaacg 1200

cccgagacgg cacttcagtg cacggccgac aagttccccg actctttcgg tgcctgcgac 1260

gttcaagcct gtaaaagaca gaagacgtcc tgcgttggcg gacagattca aagtactagc 1320

gtcgactgca ccgcggacga acaaaatgaa tgtggctcta acactgcgtt gatcgctgga 1380

ctcgccgtag gaggggttct gctgttggct cttctaggag gaggctgcta cttcgcgaag 1440

aggttggaca gaaacaaagg cgtccaggcg gctcatcatg aacatgagtt tcagtcagac 1500

agaggtgctc gaaaaaagag gccaagcgat ctcatgcaag aggctgaacc gtcgttttgg 1560

gatgaggcag aggagaacat tgaacaagat ggggaaacac atgttatggt cgagggggat 1620

tactag 1626