



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0051393
(43) 공개일자 2016년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/65* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0151305

(22) 출원일자 2014년11월03일

심사청구일자 2014년11월03일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이지원

서울특별시 서초구 남부순환로309길 38, 5동 522호 (방배동, 서초중앙하이츠빌라)

송종암

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교자연계 캠퍼스 제2공학관 251호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 26 항

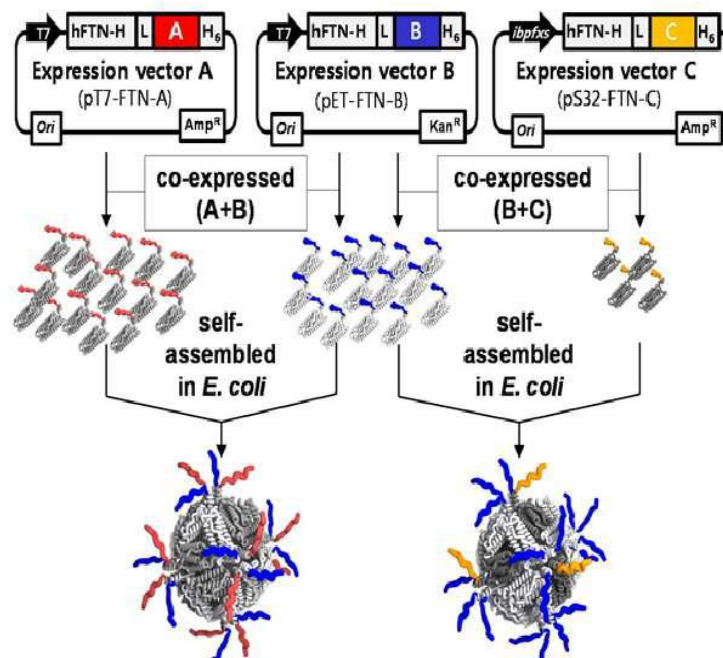
(54) 발명의 명칭 다양한 질병마커 인지 에피토프와 연결된 단백질 나노입자 및 이를 이용한 고민감도 질병마커 검출방법

(57) 요약

본 발명은 다양한 질병마커 인지 에피토프가 표면에 융합 • 발현된 단백질 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 이용한 고민감도 질병마커 검출방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 Strong 또는 Weak 프로모터, 인간 웨리틴 중쇄 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제1벡터;와 Strong

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



또는 Weak 프로모터, 인간 웨리틴 중쇄 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제2벡터(단, 제1벡터와 제2벡터의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자는 상이함)가 도입되어 있는 재조합 미생물, 인간 웨리틴 중쇄 단백질의 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 서로 상이한 비율로 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자와 이의 제조방법, 상기 단백질 나노입자를 포함하는 하이드로젤 및 이를 활용한 질병마커 검출방법에 대한 것으로서, 본 발명에 따른 단백질 나노입자는 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프들이 다양한 비율로 올바른 배향성을 갖고, 고집적으로 표출이 가능하며, 이를 이용한 질병마커의 검출방법은 다양한 질병마커 특이적 에피토프가 단백질 나노입자의 표면에 표출되어 있어, 민감도와 정확성이 매우 뛰어나다.

(72) 발명자

이중환

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교자연계캠퍼스 제2공학관 251호

서혁성

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013035113

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공)중견연구자지원_도약연구

연구과제명 의료기능 맞춤형 단백질 나노입자 기반 차세대 나노의료 혁신기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제1백터;와 Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제2백터(단, 제1백터와 제2백터의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자는 상이함)가 도입되어 있는 재조합 미생물.

청구항 2

Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제1구역;과 Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제2구역(단, 제1구역과 제2구역의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자는 상이함)을 포함하는 백터가 도입되어 있는 재조합 미생물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 Strong 프로모터는 Trc 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터, Lac 프로모터, Trp 프로모터, $P_L(\lambda)$ 프로모터, $P_R(\lambda)$ 프로모터, lac(TS) 프로모터 및 P_{SPA} 프로모터, recA 프로모터, lacUV5 프로모터, TRE 프로모터, argC 프로모터, ermE 프로모터, SF14 프로모터, tcp830 프로모터, tipA 프로모터, amyP 프로모터, pilA 프로모터, Ras2 프로모터, Tor1 프로모터, Sch9 프로모터, HXT7 프로모터로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 Weak 프로모터는 ibpfxs 프로모터, groES 프로모터, groEL 프로모터, clpB 프로모터, dnaK 프로모터 및 dnaJ 프로모터, tetR 프로모터, PSE 프로모터, pPRM2 프로모터, araBAD 프로모터, liaG 프로모터, ade6 프로모터, rtTA 프로모터, AtZFP1 프로모터, vWF 프로모터, $P_{RM}(\lambda)$ 프로모터, SI 프로모터, IS10 프로모터, ftsA 프로모터로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 속(*Bacillus sp.*), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium sp.*), 에스케리치아 속(*Escherichia sp.*), 피치아 속(*Pichia sp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas sp.*) 및 사카로마이세스 속(*Saccharomyces sp.*)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 인간 웨리틴 중쇄 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 벡터는 자가조립(self-assembly) 단백질과 질병마커 특이적 에피토프 사이에 링커 서열이 추가적으로 작동가능하게 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 링커 서열은 $G_3SG_3TG_3SG_3$ 인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 질병마커 특이적 에피토프는 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프는 c22p, c33c, 5-1-1p, c100p, 및 이들이 2이상 융합된 에피토프로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33c, c22p-5-1-1p, c22p-c100p, c33c-5-5-1p, c33c-c100p, 5-1-1p-c100p 및 c22p-5-1-1p-c100p로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 12

자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 서로 상이한 비율로 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 인간 웨리틴 중쇄 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 단백질 나노입자의 직경이 1-20nm인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 질병마커 특이적 에피토프는 c22p, c33c, 5-1-1p, c100p, 및 이들이 2이상 융합된 에피토프로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33c, c22p-5-1-1p, c22p-c100p, c33c-5-5-1p, c33c-c100p, 5-1-1p-c100p 및 c22p-5-1-1p-c100p 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프는 상기 단백질 나노입자의 표면에 2:8~8:2의 비율로 융합 • 발현되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 18

제1항 또는 제2항의 재조합 미생물을 배양하여 자가조립(self-assembly) 단백질 나노입자의 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 표현되어 있는 단백질 나노입자를 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 단백질 나노입자를 회수하는 단계를 포함하는, 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자의 제조방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 인간 웨리틴 중쇄 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 제조방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 질병마커 특이적 에피토프는 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 제조방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프는 c22p, c33c, 5-1-1p, c100p, 및 이들이 2이상 융합된 에피토프로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 제조방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33c, c22p-5-1-1p, c22p-c100p, c33c-5-5-1p, c33c-c100p, 5-1-1p-c100p 및 c22p-5-1-1p-c100p 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자의 제조방법.

청구항 23

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항의 단백질 나노입자를 포함하는 하이드로젤.

청구항 24

다음의 단계를 포함하는 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자를 이용한 질병마커 검출방법:

(a) 제23항의 하이드로젤과 검출 대상 시료를 반응시킨 다음, 이차항체를 처리하는 단계; 및

(b) 형광을 측정하는 단계.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 단계 (a)의 질병마커 특이적 에피토프는 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프인 것을 특징으로 하는 질병마커의 검출방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 이차항체는 퀴텀 닷과 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 질병마커의 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다양한 질병마커 인지 에피토프와 연결된 단백질 나노입자 및 이를 이용한 고민감도 질병마커 검출방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 Strong 또는 Weak 프로모터, 인간 웨리틴 중쇄 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제1백터;와 Strong 또는 Weak 프로모터, 인간 웨리틴 중쇄 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제2백터(단, 제1백터와 제2백터의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자는 상이함)가 도입되어 있는 재조합 미생물, 인간 웨리틴 중쇄 단백질에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자와 제조방법 및 이를 포함하는 질병마커 검출방법에 대한 것으로서, 본 발명에 따른 단백질 나노입자를 이용한 질병마커의 검출방법은 둘 이상의 에피토프를 단백질 나노입자의 표면에 다양한 비율로 표출시킨 단백질 나노입자를 사용함으로써, 민감도와 정확성이 매우 뛰어나다.

배경 기술

[0002] 웨리틴(Ferritin)은 무거운 사슬과 가벼운 사슬로 구성된 24개의 동일한 단백질 서브유닛(subunit)으로 구성되며 생체내에서 중공 외피(hollow shell)를 형성한다. 철분과 결합하는 상기 단백질은 철 저장 기능을 가지며, 철 해독(iron detoxification) 기능을 한다(Harrison et al., Biochim Biophys Acta., 1275(3): 161-163, 1996). 상기 단백질은 대부분의 조직의 성장과 생존을 위해 세포 내의 철 균형을 유지하고, 세포 내의 철의 결합으로 인한 산소-자유 라디칼 형성을 최소화시키는 세포 보호 단백질로서 기능을 한다(Lawson et al., Nature, 349: 541-544, 1991). 웨리틴의 분자량은 약 500.000Da으로, 무거운 사슬(Heavy chain)과 가벼운 사슬(Light chain)로 구성되어 있고, 자가 조립 능력이 있어 구형 입자를 형성하는 독특한 특성을 나타낸다.

[0003] *ibpfxs* 프로모터는 RNA중합효소를 이루는 시그마 32(sigma 32)가 인지하는 스트레스 반응성 프로모터 *ibpAB*와 *fxsA*가 일렬로 연결된 것으로서 이 프로모터는 각각 작은 열충격 단백질 IbpA, IbpB와 세포내막단백질 FxsA의 전사에 관여한다(Kraft, M. et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., 75: 397-406, 2007). *ibpfxs* 프로모터는 스트레스에 반응하여 전사가 활성화 되기 때문에 T7에 비해 상대적으로 Weak 세기를 나타내는 프로모터이다. 기존 연구 문헌에 따르면 재조합 단백질이 세포 내에서 과생산(overproduction) 될 경우 세포는 열충격과 유사한 스트레스 반응을 나타내고 시그마32 생산이 증가하여 스트레스 반응성 단백질의 합성을 유도한다. 따라서 T7 프로모터와 *ibpfxs* 프로모터가 있는 벡터를 동시에 발현할 경우, T7 프로모터에 의한 재조합 단백질의 생산량은 *ibpfxs* 프로모터에 의한 재조합 단백질의 생산량 보다 항상 많게 된다(Lee JW. et al, ACS Nano, 7(12): 10879-10886, 2013).

[0004] C형 간염은 C형 간염 바이러스(HCV)에 감염된 환자의 혈액이나 체액을 통해 전염되는 일종의 감염병으로, 감염 시 70~80%의 환자가 만성 간염으로 진행하고 이 가운데 30~40%는 간경변증, 간암으로 진행하며, 특히 B형 간염과 달리 백신이 개발되어 있지 않고 면역글로불린도 없다. 때문에 조기에 감염여부를 정확하게 진단하는 것이 매우 중요시 되고 있다. 또한 조기에 C형 간염 진단을 받고 치료 시 완치 확률이 현저히 증가하는 것으로 알려

져 있기 때문에 조기진단의 중요성에 따른 조기진단 시스템의 개발이 중요시되고 있다.

[0005] C형 간염의 진단은 혈액 검사를 통해 C형 간염 바이러스 항체(anti-HCV)를 검출하거나, 혹은 C형 간염 바이러스를 직접 확인 하는 검사(HCV RNA 검사)를 통해 진행되고 있다. 또한 염증 수치나, 간손상을 나타내는 대표적인 CRP(C-reactive protein)농도 측정 및 간기능 검사(ALT, alanine aminotransferase)는 대부분의 환자의 일반화학 검사에 포함되어 있다. 이 또한 ALT의 경우 채혈 검사를 통해 진행되며 혈액 내에 존재하는 효소(ALT)와 기질(alanine, alpha-ketoglutaric acid)의 반응에 의한 부산물을 통한 발색반응을 거쳐 정량하고 있다. CRP는 anti-CRP antibodies가 고정된 latex particles의 응집을 이용하는 라텍스 응집법이나, 적혈구 침강법, 모세관 면역침전법 등으로 측정되고 있다. 상기 상용화 된 방법은 모두 혈액 시료 대상, 광학적 측정방법을 통해 이루어지고 있으며 전문장비를 통해서만 측정이 가능하다.

[0006] C형 간염 바이러스는 크게 3종류의 구조 단백질 (core, envelope protein 1, envelope protein 2)과 5종류의 비구조 단백질(NS1, NS2, NS3, NS4, NS5)로 구성되어 있으며, 현재까지 다양한 연구들로부터 core 부분의 c22p(K10~S53), NS3 부분의 c33c(A1192~C1457), NS4 부분의 5-1-1p(I1694~L1735)와 c100p(I1920~V1935) 부위가 anti-HCV 항체가 결합하는 4종류의 HCV 중요 항원성 에피토프로 알려져 있다.

[0007] 감염질환에 대한 고감도 진단을 위해 나노소재 기반 생체분자검지 기술이 주목받고 있으나, 기존 인공 합성 유/무기 나노소재의 경우 나노독성, 합성과정의 복잡성, 크기 및 입도분포의 불균일성, 추가적 화학적 개질의 필요성, 배향성 및 집적도 제어 등의 많은 한계를 나타내고 있다. 반면 단백질 나노입자는 여러 개의 단량체가 생명체의 세포 내에서 단백질 고유의 자가조립(self-assembly)특성에 의해 자연 생합성되는 생체 나노 소재로서, 안정성이 탁월하며 간단한 유전자 조작으로 입자의 표면 기능/특성을 용도에 따라 자유자재로 변화시킬 수 있다. 따라서 각기 다른 외래 단백질을 단량체에 융합한 후 동시에 세포내에서 발현하면 이중 외래 단백질을 포함하는 하나의 단백질 나노입자의 제조가 가능하며 단백질 나노입자를 이루는 단량체의 구조에 따라 단백질 아미노 말단, 카르복실 말단 등 입자표면 표출이 가능한 다양한 위치에 외래 단백질의 융합이 가능할 뿐 아니라, 외래 단백질이 융합되어도 단백질 나노입자 본래의 구조적 특성을 유지할 수 있다. 또한 항생마커가 다른 두 종류의 발현벡터를 이용하여 한 세포 안에서 동시발현 했을 경우 두 종류 이상의 외래단백질이 표출되는 단백질 나노입자를 합성할 수 있으며 강도가 다른 프로모터를 지니는 다른 두 개의 발현벡터를 이용할 경우 한 세포 안에서 이중 융합 단백질의 발현 및 발현 효율을 조절 할 수 있기 때문에 단백질 나노입자 표면에 표출되는 두 종류 이상의 외래단백질의 상대적인 비율을 조절할 수 있다.

[0008] 조기진단이 중요한 만성 질병 및 바이러스 감염 질병은 동일한 질병이라 하더라도 다양한 질병 표지 인자를 포함하고 있으며 환자 개별 간 체내 질병 표지 인자의 분포 정도가 상이하여 정확한 진단의 어려움이 있다. 또한 대다수의 질병자에 존재하는 민감도와 특이도가 높은 질병 표지 인자가 발견되지 않은 경우 여러 질병 관련 표지 인자의 발견 빈도에 따라 질병을 진단하기도 한다. 따라서 정확한 조기 진단을 위해서는 체내의 다양한 질병 표지 인자를 동시에 검출할 수 있는 multi-epitope을 동시에 갖으며, 그 비율 또한 중요도에 따라 조절 가능한 동시 다중 질병 표지 인자 검출 시스템의 개발이 요구된다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 민감도와 정확성이 높은 질병마커의 검출방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 서로 다른 에피토프를 융합한 인간 헤리틴 단백질 단량체를 암호화 하는 발현벡터를 각각 설계, 제작하여 대장균 내에서 동시발현 할 경우, 질병마커 측정에 유용한 민감도 높은 여러 중요 항원성 에피토프를 하나의 단백질 나노입자 표면에 동시에 표출하는 동시 다중 질병마커 검출이 가능한 고기능성 단백질 나노입자의 합성이 가능할 뿐만 아니라, 유전자 조작을 통해 세기가 다른 두 종류의 프로모터를 포함하는 각각의 발현벡터를 제작하고 이 발현벡터의 동시발현을 통하여 단백질 나노입자 표면에 각각 중요 항원성 에피토프의 표면 표출 빈도 조절이 가능해진 단백질 나노입자를 개발하였다. 또한 본 발명의 동시 다중 질병마커 검출이 가능한 고기능성 단백질 나노입자를 이용하여 C형 간염 마커의 검출에 이용한 결과, 민감도와 정확도가 매우 뛰어남을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 발현강도가 상이한 자기조립 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전

자가 작동가능하게 연결된 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 인간 웨리틴 중쇄 단백질에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자 및 상기 단백질 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조된 단백질 나노입자를 포함하는 하이드로젤 및 이를 이용한 질병마커의 검출방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제1벡터;와 Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제2벡터(단, 제1벡터와 제2벡터의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자는 상이함)가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[0014]

[0015] 본 발명은 또한, Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제1구역;과 Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제2구역(단, 제1구역과 제2구역의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자는 상이함)을 포함하는 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 자가조립(self-assembly) 단백질에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 자가조립(self-assembly) 단백질 나노입자의 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 표현되어 있는 단백질 나노입자를 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 단백질 나노입자를 회수하는 단계를 포함하는, 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 자가조립(self-assembly) 단백질에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자를 포함하는 하이드로젤을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, (a)자가조립(self-assembly) 단백질에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 표면에 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤과 검출 대상 시료를 반응시킨 다음, 이차항체를 처리하는 단계; 및 (b)형광을 측정하는 단계를 포함하는 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자를 이용한 질병마커 검출방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 단백질 나노입자는 세포 내에서 자연 생합성되는 3차원 나노구조체로서 항상 정확한 4차 구조와 입자 topology를 유지하며 합성되고, 표면에 표출되는 항원성 에피토프의 방향성을 일정하게 유지시킬 수 있으며, 프로모터 세기가 다른 두 종류의 발현벡터의 동시발현을 통하여 발현 시간차에 따라 단백질 나노입자의 표면에 표출되는 항원성 에피토프의 비율 조절이 가능하고, 나노독성 문제가 없는 안전한 3차원 생체 나노입자로

서 하이드로젤에 고정하였을 경우 온전한 3차원형태를 유지하여 고민감도, 고특이도를 구현할 수 있는 장점이 있다.

[0021] 본 발명에 따른 단백질 나노입자를 이용한 질병마커 검출방법은 질병마커 검출의 민감도 및 특이도가 현격하게 향상되어, 감염질병에 대한 고감도 진단을 위한 기능성이 향상된 나노소재로서 감염질병의 조기진단을 위해 널리 활용 가능한 신소재로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 대장균내에서 각각 다른 종류의 에피토프를 동시에 복합적으로 단백질 나노입자 표면에 표출시키며 각각의 에피토프의 표면 표출 빈도를 조절한 단백질 나노입자를 합성하기 위해 사용된 두 개의 발현벡터를 기본으로 하는 동시발현 시스템의 모식도이다(발현벡터에 표시된 L 은 링커 시퀀스($G_3SG_3TG_3SG_3$)를 나타냄).

도 2는 인간 웨리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자 제조를 위한 발현벡터의 모식도이다.

도 3의 (A)는 (A) 한 종류의 항원성 에피토프(mono-epitope)만 표출된 단백질 나노입자의 SDS-PAGE 분석을 통한 수용성 발현을 확인 한 것이고, (B)는 3가지 항원성 에피토프가 복합적(multi-epitope)으로 표출되며 표면 표출 빈도를 조절한 단백질 나노입자의 SDS-PAGE 분석을 통한 수용성 발현을 확인 한 것이다(S는 Soluble(수용성), IS는 Insoluble(불수용성), M은 단백질 크기 마커를 나타냄).

도 4는 단일- 또는 복합적-항원성 에피토프가 표출된 인간 웨리틴 중쇄 유래의 단백질 나노입자를 합성하기 위해 사용된 대장균 유전자 발현 시스템 그리고 한 종류의 항원성 에피토프(mono-epitope)만 표출된 단백질 나노입자, 3가지 항원성 에피토프가 복합적(multi-epitope)으로 표출되며 표면 표출 빈도를 조절한 단백질 나노입자의 대장균에서 발현/정제 후 SDS-PAGE 분석결과이다.

도 5의 (A)는 한 종류의 항원성 에피토프(mono-epitope)만 표출된 단백질 나노입자의 투과전자현미경 촬영 결과이고, (B)는 3가지 항원성 에피토프가 복합적(multi-epitope)으로 표출되며 표면 표출 빈도를 조절한 단백질 나노입자의 투과전자현미경 촬영 결과이며, (C)는 동적광산란법 분석 결과이다.

도 6은 대장균 내에서 동시발현시스템에 의해서 합성된 단백질 나노입자의 시간에 따른 발현 양상 SDS-PAGE 분석 결과이다(막대그래프는 각각 단백질 구성-단백질 나노입자를 이루는 (hFTN-H)-EB 또는 (hFTN-H)-EC-EA-의 시간에 따른 변화를 나타냄).

도 7은 하이드로젤의 주사전자현미경 (SEM, Scanning Electron Microscope) 촬영사진이다.

도 8은 인간 웨리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자를 이용한 C형 간염 질병 진단 및 민감도 분석 결과이다(P: 환자(patients), H: 건Strong(healthy) 사람 대조군임).

도 9는 인간 웨리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자를 이용한 C형 간염질병 진단의 분석 성능을 나타내는 수신자 동작 특성 곡선(ROC(Receiver operating characteristic) curve)이다.

도 10의 (A)는 96-well plate의 2차원 표면에 고정화한 합성한 단일 항원성 에피토프 펩타이드의 혼합물(에피토프 B와 에피토프 C-A가 80% : 20%되도록 섞은)을 이용한 C형 간염 질병 환자의 진단 및 민감도 분석 결과이고, (B)는 수신자 동작 특성 곡선이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0024] 인간 웨리틴은 중쇄(heavy chain, 21kDa) 및 경쇄(light chain, 19kDa) 웨리틴 단량체 24개가 세포 내에서 4-3-2 symmetry 위상으로 자가조립(self-assembly)되어 만들어지는 단백질 나노입자인데, 인간 중쇄 웨리틴 단량체는 대장균 세포 내에서도 높은 발현율과 수용도로 생합성 되면서도 자가조립 특성에 의해 약 12nm 직경의 나노입자를 형성한다. 나노입자를 형성하고 있는 활성형의 인간 중쇄 웨리틴은 아미노 말단(N-term.)이 입자 외부로 표출되어 있고, 카르복실 말단(C-term.)은 외래 단백질 또는 펩타이드를 융합시킬 경우 입자 외부로 쉽게 표출될 수 있는 구조적 flexibility를 가지고 있기 때문에 검출 프로브 기능의 펩타이드 또는 단백질을 아미노-

또는 카르복실 말단에 유전자 재조합 기술을 이용하여 융합시키면 웨리틴 나노입자의 표면특성 개질을 수행할 수 있다.

[0025] 본 발명에서는 인간 중쇄 웨리틴의 카르복실 말단에 HCV의 항원 결정부위(immunodominant epitope)를 포함하는 특정 아미노산 배열에 대한 합성 펩타이드를 융합○발현시킴으로써 C형 간염 특이적 에피토프가 나노입자 표면에 융합○발현되는 단백질 나노입자의 대량생산의 용이성, 균일한 입도 분포, 에피토프 밀도/구조/방향성 제어의 용이성 및 안정성을 확인하고자 하였다.

[0026] 본 발명에서는 4종류의 HCV 중요 항원성 에피토프인 core 부분의 c22p(K10~S53), NS3 부분의 c33c(A1192~C1457), NS4 부분의 5-1-1p(I1694~L1735) 및 c100p(I1920~V1935) 부위 유래의 펩타이드/단백질의 크기 및 구조를 고려하여, 에피토프 A [c22p(K10~S53), EA], 에피토프 B [c3-3c(A1192~C1457), EB], 에피토프 C [5-1-1p(I1694~L1735)-c100p(I1920~V1935), EC] 3가지로 분류하였으며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 발현 강도가 서로 다른 프로모터를 가지고, 에피토프 B가 웨리틴 단백질과 융합되어 발현되는 벡터와 에피토프 A 및 C가 웨리틴 단백질과 융합되어 발현되는 벡터를 이용한 대장균에서의 동시발현 시스템을 구축하였다(도 1, 2). 이를 이용하여 단백질 나노입자의 표면에 anti-HCV 항체가 결합하는 총 4종류의 중요 항원성 에피토프가 복합적(multi-epitope)으로 표출된 단백질 나노입자를 제조하였다. 그 결과, 상기 단백질 나노입자가 대장균에서 수용성으로 발현되는 것을 확인하였고(도 3), Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 이용하여 정제한 결과, 수용성 상태로 존재하는 것을 확인하였다(도 4). 또한 정제된 단백질 나노입자를 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, TEM)을 이용하여 촬영한 결과, 구형의 단백질 나노입자가 형성됨을 확인하였고(도 5), 동적광산란법(Dynamic Light Scattering, DLS)을 이용하여 분석한 결과, 일정한 단백질 나노입자의 크기분포를 확인하였다(도 5). 또한 발현 강도가 다른 프로모터를 조합함으로써 단백질 나노입자의 표면에 에피토프 B와 에피토프 A 및 C가 서로 다른 비율로 융합● 발현 될 수 있음을 확인하였다(도 6).

[0027] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 동시발현 시스템에서 C형 간염 특이적 에피토프가 나노입자 표면에 융합○발현되는 단백질 나노입자의 대량생산의 용이성, 균일한 입도 분포, 에피토프 밀도/구조/방향성 제어의 용이성 및 안정성을 확인할 수 있었다.

[0028] 따라서 본 발명은 일 관점에서, Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제1벡터;와 Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제2벡터(단, 제1벡터와 제2벡터의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자는 상이함)가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 또한, Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제1구역;과 Strong 또는 Weak 프로모터, 자가조립(self-assembly) 단백질의 유전자 및 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 제2구역(단, 제1구역과 제2구역의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자는 상이함)을 포함하는 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0030] 본 발명에 있어서, 제1벡터와 제2벡터의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 상이하다는 것은, 제1벡터의 프로모터가 Strong 프로모터일 경우, 제2벡터의 프로모터는 Weak 프로모터이고, 제1벡터의 프로모터가 Weak 프로모터일 경우, 제2벡터의 프로모터는 Strong 프로모터인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 제1구역과 제2구역의 프로모터와 질병마커 특이적 에피토프를 코딩하는 유전자가 상이하다는 것은, 제1구역의 프로모터가 Strong 프로모터일 경우, 제2구역의 프로모터는 Weak 프로모터이고, 제1구역의 프로모터가 Weak 프로모터일 경우, 제2구역의 프로모터는 Strong 프로모터인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 Strong 프로모터는 trc 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터, lac 프로모터, trp 프로모터, P_L(λ) 프로모터, P_R(λ) 프로모터, lac(TS) 프로모터 및 P_{SPA} 프로모터, recA 프로모터, lacUV5 프로모터, TRE 프로모터, argC 프로모터, ermE 프로모터, SF14 프로모터, tcp830 프로모터, tipA 프로모터, amyP 프로모터, pilA 프로모터, Ras2 프로모터, Tor1 프로모터, Sch9 프로모터, HXT7 프로모터로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 Weak 프로모터는 시그마 32(sigma 32)가 인지하는 스트레스 반응성 프로모터이면 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 ibpfxs 프로모터, groES 프로모터, groEL 프로모터, clpB 프로모터, dnaK

프로모터 및 dnaJ 프로모터, tetR 프로모터, PSE 프로모터, pPRM2 프로모터, araBAD 프로모터, liaG 프로모터, ade6 프로모터, rtTA 프로모터, AtZFP1 프로모터, vWF 프로모터, $P_{RM}(\lambda)$ 프로모터, SI 프로모터, IS10 프로모터, ftsA 프로모터로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 미생물은 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 속(*Bacillus sp.*), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium sp.*), 에스케리치아 속(*Escherichia sp.*), 피치아 속(*Pichia sp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas sp.*) 및 사카로마이세스 속(*Saccharomyces sp.*)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 세포 내에서 자가조립(self-assembly) 할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용가능하나, 바람직하게는 인간 웨리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 벡터는 자가조립(self-assembly) 단백질과 질병마커 특이적 에피토프 사이에 링커 서열이 추가적으로 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 한다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 링커 서열은 에피토프에 유연성을 부여하여 단백질 나노입자 표면 표출성을 높이기 위한 서열이면 제한이 없으나, 바람직하게는 $G_3SG_3TG_3SG_3$ 인 것을 특징으로 한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 질병마커 특이적 에피토프는 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프인 것을 특징으로 한다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프는 c22p, c33c, 5-1-1p, c100p, 및 이들이 2이상 융합된 에피토프로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33c, c22p-5-1-1p, c22p-c100p, c33c-5-5-1p, c33c-c100p, 5-1-1p-c100p 및 c22p-5-1-1p-c100p 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0041] 본 발명은 또한, 자가조립(self-assembly) 단백질의 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 서로 상이한 비율로 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자에 대한 것이다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 세포 내에서 자가조립(self-assembly) 할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용가능하나, 바람직하게는 인간 웨리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 기능성 단백질 나노입자는 직경이 1-20nm인 것을 특징으로 한다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 질병마커 특이적 에피토프는 c22p, c33c, 5-1-1p, c100p, 및 이들이 2이상 융합된 에피토프로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33c, c22p-5-1-1p, c22p-c100p, c33c-5-5-1p, c33c-c100p, 5-1-1p-c100p 및 c22p-5-1-1p-c100p 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프는 상기 단백질 나노입자의 표면에 2:8~8:2의 비율로 융합 • 발현되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [0047] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 자가조립(self-assembly) 단백질 나노입자의 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 표현되어 있는 단백질 나노입자를 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 단백질 나노입자를 회수하는 단계를 포함하는, 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 자가조립(self-assembly) 단백질 표면에 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자의 제조방법에 대한 것이다. 상기 생산 방법은 미생물을 이용함으로써 비용 면에서 효율적이며, 단백질 나노입자의 대량생산이 가능하게 한다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 세포 내에서 자가조립(self-assembly) 할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용가능하나, 바람직하게는 인간 웨리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 질병마커 특이적 에피토프는 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프인 것을 특징으로 한다.

- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프는 C형 간염바이러스의 c22p, c33c, 5-1-1p, c100p 및 이들이 2이상 융합된 에피토프로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33c, c22p-5-1-1p, c22p-c100p, c33c-5-1-1p, c33c-c100p, 5-1-1p-c100p 및 c22p-5-1-1p-c100p 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0052] 한편, 본 발명에서 제작한 단백질 나노입자를 하이드로젤에 고정할 경우, 온전한 3차원형태를 유지하고, 표면에 다양한 질병마커 특이적 에피토프가 발현되어 있으므로, 질병마커 검출의 고민감도 및 고특이도를 구현할 수 있을 것으로 예측하였다.
- [0053] 즉, 본 발명의 다른 실시예에서는 다공성 3차원 구조체로, 내부에 수분이 많아 물질이 쉽게 퍼지고, 고정된 나노입자의 검지활성을 장기간 안정적으로 유지할 수 있으며(상온에서 10일간 활성을 100% 유지), 2차원 평면소재에 비해 표면적이 크게 확장되어 많은 양의 나노입자를 고정시킬 수 있는 것으로 확인된(도 7), 하이드로젤에 상기 단백질 나노입자를 융합하여, C형 간염 질환 환자와 대조군으로서 건강한 사람을 대상으로 C형 간염 마커의 검출을 실시하여, 상기 단백질 나노입자를 이용한 C형 간염 마커의 검출 민감도가 획기적으로 증가하는 것을 확인하였으며(도 8), 이것을 수신자 동작 특성 곡선 분석(Receiver Operating Characteristic, ROC curve)을 통하여 명확하게 확인하였다(도 9). 또한, 하이드로젤이 아닌 96-well plate의 2차원 표면에 상기 단백질 나노입자를 고정화하여 C형 간염 마커의 검출을 실시한 결과, 그 민감도가 상기의 방법의 63% 밖에 되지 않는 것을 확인하였다(도 10).
- [0054] 따라서 본 발명은 다른 관점에서, 자가조립(self-assembly) 단백질의 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 서로 상이한 비율로 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자를 포함하는 하이드로젤에 대한 것이다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 세포 내에서 자가조립(self-assembly) 할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용가능하나, 바람직하게는 인간 웨리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0056] 본 발명은 또한, (a) 인자가조립(self-assembly) 단백질의 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 서로 상이한 비율로 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자를 포함하는 하이드로젤과 검출 대상 시료를 반응시킨 다음, 이차항체를 처리하는 단계 및; (b) 형광을 측정하는 단계를 포함하는 표면에 둘 이상의 질병마커 특이적 에피토프가 융합 • 발현되어 있는 단백질 나노입자를 이용한 질병마커 검출방법에 관한 것이다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 자가조립(self-assembly) 단백질은 세포 내에서 자가조립(self-assembly) 할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용가능하나, 바람직하게는 인간 웨리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (a)의 질병마커 특이적 에피토프는 C형 간염바이러스(HCV) 항체 특이적 에피토프인 것을 특징으로 한다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 이차항체는 퀀텀 닷과 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [0060] 위와 같이 본 발명에서는 인간 웨리틴 중쇄를 기초한 하나의 단백질 나노입자 표면에 C형 간염 바이러스 항체 측정에 유용한 민감도 높은 여러 중요 항원성 에피토프가 복합적(multi-epitope)으로 동시에 표출된 단백질 나노입자를 제조하였고 단순히 여러 종류의 항원성 에피토프를 동시에 표출시키는 것으로 끝나는 것이 아니라, 전사 유도 세기가 다른 두 종류의 프로모터가 삽입된 각각의 발현벡터를 이용한 동시발현 시스템을 구축하여 항원성의 중요도에 따라서 표면 표출 빈도 또한 효과적으로 조절할 수 있는 시스템을 구축하였다. 본 발명에서 개발한 동시 다중 질환 표지 인자 검출이 가능한 고기능성 단백질 나노입자를 미생물 내에서 효과적으로 합성하였으며 이를 이용하여 C형 간염 마커의 검출에 활용하여 초고감도 C형 간염 마커의 검출방법을 개발하였다.
- [0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

- [0062] 실시예 1. 시그마 32 의존성 프로모터 *ibpfxs*가 삽입된 발현벡터 제작
- [0063] 기존 문헌을 참고하여 시그마 32 의존성 프로모터 '*ibpfxs* 프로모터'의 염기서열(5'-TTCAAGACCATAAACTGCAAAAAAAGTCCGCTGATAAGGCTTGAAAAGTTTCATTCCAGACCCATTTTACATCGTAGCCGATGAGGACGCGCTGATGGGTGTTCTGGCTACCTGACCTGTCCATTGTGGAAGGTCTTACATTCTCGTGATTGTGCGACAAATTCTGGGGATTACTACCAAAAATAGTTGCGCAAACATCTTGAAAATTTTGCTAATGACCACAATATAAGCTAAACGCGATTTCGCAACCCATTCAGGTAGCCGGGGTTAACCGGCTGCTATTAATAAAGGAGATATACATATG-3': 서열번호 1)을 pUC57((주)COSMO Genetech, Korea)을 도입하여 pUC57-시그마32 벡터를 제작하였다. pUC57-시그마 32 벡터에서 *ibpfxs* 유전자의 5' 부위에 BstBI 제한효소 인식서열을, 3' 부위에 NdeI 제한효소 인식서열 포함하도록 하였다. pT7-7(Novagen, USA) 발현벡터의 T7 프로모터 앞쪽부위(upstream)에 BstBI 제한효소 부위와 라이보솜 결합 부위 뒤쪽부위(downstream)의 NdeI 제한효소 부위를 절단한 후에 pUC57-시그마 32 벡터에 동일한 제한효소를 처리하여 *ibpfxs* 부위를 절단하고, 절단된 BstBI-*ibpfxs*-NdeI를 pT7-7 발현벡터의 BstBI/NdeI 자리에 삽입하여 p32벡터를 제작하였다.
- [0064] 실시예 2. 항원성 에피토프가 표출된 단백질 나노입자의 생합성을 위한 발현벡터 제작
- [0065] 하기 표 1에 기재된 프라이머를 사용한 PCR 또는 assembly PCR 후에,
- [0066] N-NdeI-(hFTN-H)-G₃SG₃TG₃SG₃(linker)-XhoI-C,
- [0067] N-XhoI-(K10-S53)₂-H₆-HindIII-C,
- [0068] N-XhoI-(A1192-C1457)-H₆-HindIII-C,
- [0069] N-XhoI-[(I1694-L1735)-G₃SG₃TG₃SG₃-(I1920-V1935)]₂-H₆-HindIII-C
- [0070] N-XhoI-(I1694-L1735)-G₃SG₃TG₃SG₃-(I1920-V1935)-(K10-S53)-HindIII-C
- [0071] 의 합성을 코드하는 5개의 유전자 클론을 얻었다. 플라스미드 pT7-7, pET28a(+), p32에 상기 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여, A) N-(hFTN-H)-linker-(EA)₂-H₆-C, B) N-(hFTN-H)-linker-EB-H₆-C, C) N-(hFTN-H)-linker-(EC)₂-H₆-C, 및 D) N-(hFTN-H)-linker-EC-EA-C 의 합성을 코딩하는 7개의 플라스미드 발현벡터 pT7-FTN-EA, pT7-FTN-EB, pT7-FTN-EC, pET-FTN-EB, pET-FTN-ECA, p32-FTN-EB, p32-FTN-ECA를 구축하였다 (도 2). 제작된 모든 플라스미드 발현벡터는 젤-정제 후 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.
- [0072] 인간 웨리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자 합성을 위한 발현벡터 제조와 이와 관련된 프라이머 서열 및 주형에 대한 정보 및 이에 대한 좀 더 상세한 기재는 아래와 같다.
- [0073] 1) 인간 웨리틴 중쇄 유전자 서열 (NCBI Nucleotide accession number: M97164 서열 중 130-681 서열)을 주형으로 하여 제한효소 NdeI이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 1과 XhoI과 링커서열 (아미노산 서열 G3SG3TG3SG3)을 포함하고 있는 프라이머 서열 2, 3을 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 5'-NdeI-(hFTN-H)-G₃SG₃TG₃SG₃(linker)-XhoI-3' 으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소 NdeI과 XhoI으로 처리하여 pT7-7(Novagen, USA), pET28a(+)(Novagen, USA), p32의 제한효소 NdeI과 XhoI자리에 삽입하여 pT7-FTN-H, pET-FTN-H 및 p32-FTN-H를 각각 제작하였다.
- [0074] 2) 4종류의 프라이머(프라이머 서열 4-7)를 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 Taq DNA 중합효소를 이용하여 94℃/1분30초(변성), 54℃/2분(어닐링), 72℃/3분(신장)로 총 8회 assembly PCR을 수행하였다. 상기 PCR 증폭 산물을 주형으로 하여 프라이머쌍(프라이머 서열 8, 9)을 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 Taq DNA 중합효소를 이용하여 94℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/30초(신장)로 총 25회 PCR을 수행하여 최종 표2의 5'-(K10-S53)₂-3'로 이루어진 PCR 산물을 얻었다.
- [0075] ① 상기 최종 PCR 산물을 주형으로 하여 제한효소 XhoI이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 10과 EcoRI을 포함

하고 있는 프라이머 서열 11를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 5'-XhoI-K10-S53-EcoRI-3'으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0076] ② 상기 최종 PCR 산물을 주형으로 하여 제한효소 EcoRI이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 12과 HindIII 와 hexahistidine을 포함하고 있는 프라이머 서열 13를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 5'-EcoRI-K10-S53-H6-HindIII-3'으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0077] ③ 상기 최종 PCR 산물을 주형으로 하여 제한효소 EcoRI이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 14과 HindIII 을 포함하고 있는 프라이머 서열 15를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 5'-EcoRI-K10-S53-HindIII-3'으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0078] 증폭된 ①의 PCR 산물을 제한효소 XhoI과 EcoRI으로 처리하여 상기 제조한 pT7-FTN-H 의 제한효소 XhoI과 EcoRI자리에 삽입하였다. 증폭된 ②의 PCR 산물을 제한효소 EcoRI과 HindIII으로 처리하여 상기 제작된 벡터의 제한효소 EcoRI과 HindIII자리에 삽입하여 pT7-FTN-EA를 제작하였다.

[0079] 3) 16종류의 프라이머(프라이머 서열 16~31)를 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 Taq DNA 중합효소를 이용하여 94℃/1분30초(변성), 54℃/2분(어닐링), 72℃/3분(신장)로 총 8회 assembly PCR을 수행하였다. 상기 PCR 증폭 산물을 주형으로 하여 프라이머쌍(프라이머 서열 32, 33)을 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 Taq DNA 중합효소를 이용하여 94℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/30초(신장)로 총 25회 PCR을 수행하여 최종 표2의 5'-(A1192-C1457)-3'로 이루어진 PCR 산물을 얻었다.

[0080] 상기 최종 PCR 산물을 주형으로 하여 제한효소 XhoI이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 34과 HindIII 와 hexahistidine을 포함하고 있는 프라이머 서열 35를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 5'-XhoI-(A1192-C1457)-H₆-HindIII-3' 으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0081] 증폭된 PCR 산물을 제한효소 XhoI과 HindIII으로 처리하여 상기 제작된 pT7-FTN-H, pET-FTN-H 및 p32-FTN-H의 제한효소 XhoI과 HindIII자리에 삽입하여, pT7-FTN-EB, pET-FTN-EB 및 p32-FTN-EB를 각각 제작하였다.

[0082] 4) 6종류의 프라이머(프라이머 서열 36~41)를 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 Taq DNA 중합효소를 이용하여 94℃/1분30초(변성), 54℃/2분(어닐링), 72℃/3분(신장)로 총 8회 assembly PCR을 수행하였다. 상기 PCR 증폭 산물을 주형으로 하여 프라이머쌍(프라이머 서열 42, 43)을 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소 반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 Taq DNA 중합효소를 이용하여 94℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/30초(신장)로 총 25 회 PCR을 수행하여 최종 5'-(I1694-L1735)-G₃SG₃TG₃SG₃-(I1920-V1935)-3'로 이루어진 PCR 산물을 얻었다.

[0083] ① 상기 최종 PCR 산물을 주형으로 하여 제한효소 XhoI이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 44과 EcoRI을 포함하고 있는 프라이머 서열 45를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 5'-XhoI-(I1694-L1735)-G₃SG₃TG₃SG₃-(I1920-V1935)-EcoRI-3'으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0084] ② 상기 최종 PCR 산물을 주형으로 하여 제한효소 EcoRI이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 46과 HindIII 와 hexahistidine을 포함하고 있는 프라이머 서열 47를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 5'-EcoRI-(I1694-L1735)-G₃SG₃TG₃SG₃-(I1920-V1935)-H6-HindIII-3'으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0085] 증폭된 ①의 PCR 산물을 제한효소 XhoI과 EcoRI으로 처리하여 상기 제조한 pT7-FTN-H 의 제한효소 XhoI과 EcoRI자리에 삽입하였다. 증폭된 ②의 PCR 산물을 제한효소 EcoRI과 HindIII으로 처리하여 상기 제작된 벡터의 제한효소 EcoRI과 HindIII자리에 삽입하여 pT7-FTN-EC를 제작하였다.

[0086] 5) 상기 2)-③에서 제작한 5'-EcoRI-K10-S53-HindIII-3'으로 이루어진 PCR 증폭 산물을 EcoRI/HindIII 제한효소로 처리한 후 상기 제작한 발현벡터 pT7-FTN-EC의 제한효소 EcoRI/HindIII 자리에 삽입하여 pT7-FTN-ECA를 구축하고 이 발현벡터를 제한효소 XhoI/HindIII를 처리하여 절단된 5'-XhoI-(I1694-L1735)-G₃SG₃TG₃SG₃-(I1920-V1935)-(K10-S53)-HindIII-3'를 상기 제작된 pET-FTN-H 및 p32-FTN-H의 XhoI과 HindIII 자리에 삽입하여,

pET-FTN-ECA 및 p32-FTN-ECA를 각각 제작하였다.

표 1

프라이머 서열

서열번호	서열
서열번호 1	TTCAAGACCATAAACTGCAAAAAAGTCCGCTGATAAGGCTTGAAAAGTTCATTTCCAGACCCATTTTACATCGTAGCCGATGAGGACGCGCTGATGGGTGTTCTGGCTACCTGACCTGTCCATTGTGGAAGGTCTTACATTCTCGCTGATTGTGCGACAAATCTGGGGATTACTACCAAAAATAGTTGCGCAACATCTTGAAATTTTGCTAATGACCACAATATAAGCTAAACGCGATTGCAACCCATTCAGGTAGCCGGGGTTAACCGGCTGCTATTAATAAAGGAGATATACATATG
서열번호 2	cat atg acg acc gcg tcc acc tcg
서열번호 3	ctc gag agt gcc tcc ccc act tcc gcc acc gct ttc att atc
서열번호 4	ctc gag ccc acc gcc gct gcc acc tcc agt gcc tcc ccc act
서열번호 5	aaa aac aaa cgt aac acc aac cgc cgc cca cag gat att aag tt
서열번호 6	taa act cca cca acg atc tga cca ccg ccc ggg aac tta ata tcc tgt ggg cgg c
서열번호 7	gtc aga tcg ttg gtg gag ttt act tgt tgc cgc gca ggg gcc cca ggt tgg
서열번호 8	gga agt ctt cct agt cgc gcg cac acc caa cct ggg gcc c
서열번호 9	aaa aac aaa cgt aac acc aac cg
서열번호 10	gga agt ctt cct agt cgc g
서열번호 11	ctc gag aaa aac aaa cgt aac
서열번호 12	gaa ttc gga agt ctt cct agt
서열번호 13	gaa ttc aaa aac aaa cgt aac
서열번호 14	aag ctt tta gtg atg gtg atg gtg atg gga agt ctt cct agt cgc gcg
서열번호 15	gaa ttc aaa aac aaa cgt aac
서열번호 16	aag ctt tta gga agt ctt cct agt
서열번호 17	gcg gtg gac ttt atc cct gtg gag aac cta gag aca acc atg agg tcc ccg gtg ttc a
서열번호 18	tga gcc acc tgg aag ctc tgg ggc act act ggt gga gag gag tta tcc gtg aac acc ggg gac ctc a
서열번호 19	gag ctt cca ggt ggc tca cct cca tgc tcc cac agg cag cgg caa aag cac caa ggt ccc ggc tgc
서열번호 20	gca gca aca gag ggg ttg agt act agc acc tta tag ccc tga gct gca tat gca gcc ggg acc ttg
서열번호 21	tca acc cct ctg ttg ctg caa cac tgg gct ttg gtg ctt aca tgt cca agg ctc atg gga tcg atc cta a
서열번호 22	gtg atg ggg ctg cca gtg gta att gtt ctc acc ccg gtc ctg atg tta gga tcg atc cca tga gcc ttg
서열번호 23	ctg gca gcc cca tca cgt act cca cct acg gca agt tcc ttg ccg acg gcg ggt gct cgg ggg g
서열번호 24	gat gtg gca tcc gtg gag tgg cac tcg tca caa att att atg tca taa gcg ccc ccc gag cac c
서열번호 25	ctc cac gga tgc cac atc cat ctt ggg cat cgg cac tgt cct tga cca agc aga gac tgc ggg ggc
서열번호 26	cac agt gac gga gcc cgg agg ggt ggc ggt ggc gag cac aac cag tct cgc ccc cgc agt ctc t
서열번호 27	ggg ctc cgt cac tgt gcc cca tcc caa cat cga gga ggt tgc tct gtc cac cac cgg aga gat ccc
서열번호 28	gag atg tct ccc ccc ctt gat tac ttc gag ggg gat agc ctt gcc gta aaa agg gat ctc tcc ggt ggt
서열번호 29	taa tca agg ggg gga gac atc tca tct tct gtc att caa aga aga agt gcg acg aac tcg ccg caa agc
서열번호 30	cgt caa gac cgc ggt agt agg cca cgg cat tga tgc cca atg cga cca gct ttg ccg cga gtt cg
서열번호 31	acc gcg gtc ttg acg tgt ccg tca tcc cga cca gcg ccg atg ttg tcg tcg tgg caa ccg atg c
서열번호 32	aca cgt att gca gtc tat cac cga gtc gaa gtc gcc ggt ata gcc ggt cat gag ggc atc ggt tgc cac g
서열번호 33	gcg gtg gac ttt atc cct g
서열번호 34	aca cgt att gca gtc tat cac c
서열번호 35	ctc gag gcg gtg gac ttt atc cct
서열번호 36	aag ctt tta gtg atg gtg atg gtg atg aca cgt att gca gtc tat cac cga gtc
서열번호 37	atc atc ccc gat agg gaa gtt ctc tac cag gag ttc gac gag atg g
서열번호 38	cct gtt cga tgt aag gga ggt gtt ggg aac act cct cca tct cgt cga act cct gg
서열번호 39	cct ccc tta cat cga aca ggg aat gat gct cgc cga gca att caa aca gaa ggc gc
서열번호 40	cca gtg cct ccc cca ctt ccg cca ccc aac ccg agc gcc ttc tgt ttg aat tgc
서열번호 41	tgg ggg agg cac tgg agg tgg cag cgg cgg tgg gat agc gtt cgc ctc gcg
서열번호 42	cac ata gtg cgt ggg gga gac gtg gtt acc ccg cga ggc gaa cgc t
서열번호 43	atc atc ccc gat agg gaa gtt

서열번호 44	cac ata gtg cgt ggg gg
서열번호 45	ctc gag atc atc ccc gat
서열번호 46	gaa ttc cac ata gtg cgt ggg
서열번호 47	gaa ttc atc atc ccc gat
서열번호 48	aag ctt tta gtg atg gtg atg gtg atg cac ata gtg cgt ggg

실시예 3. 인간 웨리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자의 생합성

한 종류의 항원성 에피토프(mono-epitope)만 표출된 단백질 나노입자를 제조하기 위하여, 대장균 BL21(DE3)[F-ompThsdSB(rB-mB-)]에 실시예 2에서 제작된 발현벡터 pT7-FTN-EA, pT7-FTN-EB 및 pT7-FTN-EC를 각각 도입하였다(Hanahan D, *DNA Cloning* vol.1:109-135, 1985). 구체적으로 CaCl₂로 처리한 대장균 BL21(DE3)((주) iNtRON biotechnology, Korea)에 상기 벡터들을 각각 열충격 방법으로 형질전환시킨 후, 앰피실린(ampicillin)이 포함된 배지에서 배양하여 상기 발현벡터가 형질전환되어 앰피실린 저항성을 나타내는 콜로니를 선별하였다. 상기 콜로니를 하룻밤 동안 LB 배지에서 배양한 종균 배양액의 일부를 100mg/ml 앰피실린을 포함하는 LB(Luria-Bertani) 배지에 접종한 다음 37℃에서 130 rpm으로 배양하였다. 배양액의 배지탁도(OD₆₀₀)가 0.5~0.6에 이르렀을 때 IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)를 첨가(1 mM)하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다.

3가지 항원성 에피토프가 복합적(multi-epitope)으로 표출된 단백질 나노입자를 제조하기 위하여 대장균 균주 BL21(DE3)[F-ompThsdSB(rB-mB-)]를 상기 제조된 발현벡터 쌍 pT7-FTN-EB/pET-FTN-ECA, p32-FTN-EB/ pET-FTN-ECA, pET-FTN-EB/p32-FTN-ECA로 동일한 방법으로 형질전환시킨 후, 앰피실린과 카나마이신(Kanamycin)이 포함된 배지에서 배양하여 상기 발현벡터가 형질전환되어 앰피실린과 카나마이신 저항성을 동시에 나타내는 콜로니를 선별하였다. 상기 콜로니를 하룻밤 동안 LB 배지에서 배양한 종균 배양액의 일부를 앰피실린(100mg/ml)과 카나마이신(50mg/ml)을 포함하는 LB 배지에 접종한 다음 37℃에서 130 rpm으로 배양하였다. 배양액의 배지탁도(OD₆₀₀)가 0.5~0.6에 이르렀을 때 IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)를 첨가(1 mM)하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다.

한 종류의 항원성 에피토프(mono-epitope)만 표출된 단백질 나노입자를 제조할 경우 20℃에서 16~18 시간 더 배양, 3가지 항원성 에피토프가 복합적(multi-epitope)으로 표출된 단백질 나노입자를 제조할 경우 37℃에서 8 시간 더 배양 후 배양한 대장균을 4,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후, 7 ml의 파쇄 용액(10 mM Tris-HCl 완충액, pH 7.5, 10 mM EDTA)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액을 이용하여 정제를 진행하였다. 또한, 상등액과 불용성 응집체를 각각 5xSDS(0.156M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)과 1:4로 섞어 100℃에서 10분간 끓였다. 끓인 시료를 12% SDS-PAGE겔의 웰에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 시료를 전개한 다음 겔을 쿠마시 염색 방법으로 염색한 후 탈색하여 각각의 재조합 단백질의 발현량 및 수용도를 농도계(Densitometer, Bio-Rad, USA)로 확인하였다(도 3).

실시예 4. 인간 웨리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자의 정제

실시예 3에서 발현된 자가조립된 항원성 에피토프 융합 단백질 나노입자를 정제하기 위하여, 2단계의 정제 과정을 거쳐 진행하였다. 먼저 1) 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 2) 재조합 단백질의 자가 조립 시 구조유지 안정성을 향상 시키기 위하여 Ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA)를 이용하여 재조합 단백질이 포함된 수용액을 조성이 다른 PBS 버퍼 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4)로 변경해 줌과 동시에 재조합 단백질을 농축 하였다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.

1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피

재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 명시된 동일한 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 7 mL 라이시스 버퍼(pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후 각

제조합 단백질을 Ni^{2+} -NTA 컬럼(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다 (세척 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 80 mM imidazole / 용출 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300mM NaCl, 200 mM imidazole).

2) 자가 조립 촉진을 위한 버퍼 변경 및 농축

Ni^{2+} -NTA affinity 크로마토그래피를 거쳐 용출된 3ml의 제조합 단백질을 Ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA) 에 담아 5,000 g로 10분간 원심 분리 한 후 column 상부를 단백질 구조유지 안정용 PBS 버퍼 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4 , pH 7.4)로 가득 채운 후 column 안에 500 μl 의 용액이 남을 때까지 5,000 g 로 원심 분리를 진행하였다. 이를 3회 반복한 후 최종 부피를 1ml 로 맞춘 후 아래 단계를 진행하였다. 농축된 용액 일부를 5% SDS(0.156M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)과 1:4로 섞어 100℃에서 10분간 끓였다. 끓인 시료를 12% SDS-PAGE 겔의 웰에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 시료를 전개한 다음 겔을 쿠마시 염색 방법으로 염색한 후 탈색하여 정제되고 농축된 단백질 나노입자를 확인하였다(도 4).

실시예 5. 제조된 인간 웨리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자의 구조 분석

실시예 4에서 정제된 제조합 단백질 나노입자의 구조 분석을 위하여 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 제조합 단백질을 촬영하였다. 먼저 염색하지 않은 정제한 단백질 샘플을 탄소 코팅된 구리 전자 현미경 그리드(grid) 올린 후 자연 건조하였다. 단백질 나노입자의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2% (w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 10분 동안 실온에서 배양하고, 증류수로 3-4회 세척하였다. 단백질 나노입자 이미지를 Philips Technai 120 kV 전자 현미경을 이용하여 관찰한 결과 15-20nm 의 구형 나노입자가 형성된 것을 확인하였으며(도 5A, B), 또한 동적광산란법(Dynamic Light Scattering, DLS)을 이용하여 분석한 결과 일정한 단백질 나노입자의 크기분포를 확인하였다(도 5C).

실시예 6. 동시발현 시스템에 의해서 발현된 단백질 나노입자의 시간에 따른 발현양상 및 항원 에피토프의 표출 빈도 비율 확인을 위한 SDS-PAGE 분석

본 발명에서 두 개의 발현백터를 기초한 동시발현 시스템을 이용하여 3가지 항원성 에피토프가 복합적(multi-epitope)으로 표출된 단백질 나노입자의 경우를 포함하여 실시예 1에서 설명한 시그마 32 의존성 프로모터 *ibpfxs*를 활용하여 항원성 에피토프의 비율 조절이 가능해진 단백질 나노입자는 총 3종류이며 이를 위한 발현백터 쌍은 다음과 같다.

1) pT7-FTN-EB + pET-FTN-ECA,

2) p32-FTN-EB + pET-FTN-ECA,

3) pET-FTN-EB + p32-FTN-ECA

실시예 3의 과정을 통해 각각 형질전환시킨 후 배양한 다음 배양액의 배지탁도(OD_{600})가 0.5~0.6에 이르렀을 때 IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)를 첨가하지 않은 배양액을 0h로 하여 IPTG첨가(1mM) 후 1시간 단위로 배양액을 회수하여 실시예 4의 방법으로 모두 동일한 조건에서 정제하였다.

시간에 따른 각각 정제한 용액은 5% SDS(0.156M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)과 1:4로 섞어 100℃에서 10분간 끓였다. 끓인 시료를 12% SDS-PAGE 겔의 웰에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 시료를 전개한 다음 겔을 쿠마시 염색 방법으로 염색한 후 탈색하여 정제된 단백질 나노입자의 시간에 따른 발현양상 및 단백질 나노입자 표면 표출 빈도를 확인하였다. 농도계(Densitometer, Bio-Rad, USA)로 확인한 결과, pT7-FTN-EB 와 pET-FTN-ECA 발현백터를 동시발현하여 합성하였을 경우 hFTN-H-에피토프 B : hFTN-H-에피토프 C-A가 40% : 60%, p32-FTN-EB 와 pET-FTN-ECA 경우 20% : 80%, pET-FTN-EB 와 p32-FTN-ECA 경우 80% : 20% 의 비율로 시간이 지나도 일정하게 발현이 유지됨을 확인하였다(도 6). 또한 세기가 Strong T7이 IPTG에 의해 먼저 발현 유도된 다음 시그마 32 의존성 프로모터 *ibpfxs*가 그 후에 발현 유도됨을 확인할 수 있다.

각각의 용액 안에는 인간 웨리틴 중쇄의 단량체가 자가조립하여 나노입자를 이루고 있지만 이후 SDS-PAGE 분석 준비 과정에서 다시 단량체로 분리된 것이기 때문에 SDS-PAGE에서 확인된 발현 비율은 하나의 단백질 나노입자

표면에 분포되어 있는 항원성 에피토프의 비율과 동일하다. 즉, pT7-FTN-EB 와 pET-FTN-ECA의 동시발현을 통해 만들어진 단백질 나노입자 표면에는 에피토프 B : 에피토프 C-A가 40% : 60%의 비율로 표출되어 존재한다고 할 수 있다. p32-FTN-EB와 pET-FTN-ECA를 동시발현 할 경우 20% : 80%, pET-FTN-EB와 p32-FTN-ECA의 경우 80% : 20% 의 비율로 에피토프가 표면 분포되어 있으며 시그마 의존성 프로모터 *ibpfxs*를 발현 조절을 의도하는 벡터에 삽입함으로 인해 인위적으로 발현율을 조절할 수 있고 결론적으로 단백질 나노입자 표면의 항원 표출 빈도를 효과적으로 조절할 수 있음을 확인하였다(도 6).

[0108] 실시예 7. 제조된 인간 헤리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자의 3차원 표출을 위한 하이드로젤 융합

[0109] 상기 실시예 4에서 제조된 단백질 나노입자 10mg을 N-석신이미딜아크릴레이트(N-succinimidylacrylate, NSA) 0.01mg과 PBS버퍼 내에서 1시간 동안 37℃에서 배양하여 결합시켜준 후, 결합되지 않은 NSA는 ultrafiltration (Amicon Ultra100K)으로 제거하여, 최종 중합반응이 가능한 화학 구조를 가진 단백질 나노입자를 제조하였다. 문헌에 따르면, 폴리아크릴아마이드 기반 하이드로젤은 높은 안정성, 낮은 비특이적 결합, 낮은 형광 백그라운드(background)와 같은 장점이 있다. 따라서, 상기 합성된 단백질 나노입자 30 μ g과 0.9% 폴리아크릴아마이드 (29:1 W/W 아크릴아마이드:비스-아크릴아마이드)를 0.125% w/v 암모늄 퍼설페이트(amonium persulphate, APS)와 0.125%w/v 테트라메틸에틸렌디아민 (tetramethyl -ethylenediamine, TEMED) 존재 하에 혼합하여 96-well plate 속에 50 μ 씩 위치시킨 후, 25℃에서 16시간 동안 중합 반응을 진행하여 단백질 나노입자가 융합된 하이드로젤을 제조하였다. 그 결과 주사전자현미경(SEM, Scanning Electron Microscope) 사진을 통해 단백질 나노입자 융합 하이드로젤이 매우 균일한 다공성의 3차원 구조를 가지는 것을 확인하였다 (도 7).

[0110] 또한, 기관에 고정된 검출용 탐침의 양은 검출시스템의 민감도를 결정하는 핵심 요소이므로 신뢰도 높은 진단 시스템을 구축하기 위해서는 밀도 높은 검출용 탐침을 균일하게 고정하는 기술이 요구된다. 일반적으로 기관의 2차원 표면에 검출용 탐침을 단순 흡착 고정화할 경우 실제 기관에 고정된 검출용 탐침의 양을 정량화하는데 어려움이 있으나 단백질 나노입자 융합 하이드로젤은 제조 시 단백질 나노입자의 양 조절이 가능하고, 하이드로젤에 융합되어 고정화되므로 기관에 존재하는 검출용 탐침의 정확한 정량 측정이 가능하다는 장점이 있다. 따라서 단백질 나노입자가 하이드로젤에 고르게 분산되어 고정화 되어 있는지 확인하기 위하여 바이오틴이 표출된 단백질 나노입자 융합 하이드로젤에 금 나노입자(20 nm)가 결합된 항-바이오틴 항체와 반응 후 silver enhancement kit를 이용하여 금 나노입자를 증폭하였다. SEM 촬영 시 하이드로젤 내 단백질 나노입자의 위치를 금 나노입자를 통해 명확하게 확인할 수 있다. 하이드로젤에 금 나노입자가 고르게 분산되어 있는 것을 확인하였으며 이는 단백질 나노입자가 하이드로젤 전체 면적에 고르게 분산되어 고정되어 있음을 보여준다. 질한 진단 시스템 실용화를 위해서는 기관에 고정된 단백질 검출용 탐침의 장기 안정성 유지가 필수적이다. 일반적으로 2차원 평면에 고정된 단백질은 별도의 안정제 처리 없이는 공기에 노출되기 쉽고 수분 유지가 어려우므로 단백질의 장기보존이 어렵다. 2차원 평면에 비해 하이드로젤이 뛰어난 수분 유지 능력을 가지고 있기 때문에 단백질의 변성을 최소화 시키며, 앞으로 구축할 실용화 가능한 진단 시스템의 검출용 탐침 고정용 플랫폼으로써 하이드로젤이 매우 우수한 장점을 가지고 있다.

[0111] 실시예 8. 제조된 인간 헤리틴 중쇄 유래 단백질 나노입자의 C형 간염 질환 진단 민감도 및 특이도 검증

[0112] 단백질 나노입자 융합 하이드로젤 3차원 검출시스템의 효용성 및 우수성을 확인하고자 민감도 분석을 실행하였다. 민감도 분석은 단백질 나노입자 6종류 [hFTN-H-에피토프 B (100 %), hFTN-H-에피토프 A (100 %), hFTN-H-에피토프 C (100 %), hFTN-H-에피토프 B (20 %)+ hFTN-H-에피토프 CA (80 %), hFTN-H-에피토프 B (40 %) + hFTN-H-에피토프 CA (60 %), hFTN-H-에피토프 B (80 %)+ hFTN-H-에피토프 CA (20 %)] 와 펩타이드 모노머 1종류[에피토프 B 모노머 (80 %) + 에피토프 CA 모노머 (20 %)]로 진행 되었다. C형 간염 환자 30명의 혈청 시료를 사용하여 수행하였다. 각각의 단백질 나노입자 검출용 탐침이 융합되어 있는 하이드로젤에 시료(C형 간염환자 혈액 샘플)를 반응 시킨 후 퀴팅 닷(이하 Q-dot)이 결합되어 있는 2차 항체를 사용하여 형광도를 측정하였다.

[0113] 또한, 나노입자화시키지 않은 에피토프의 펩타이드 모노머를 폴리스틸렌(PS) 2차원 평면에 고정화되어 있는 검출시스템과 비교 분석하였다. 이를 위해, 상기 실시예 3, 4에 의하여 제조된 단백질 나노입자를 함유하고 있는 하이드로젤을 PBS 버퍼를 사용하여 세척한 후, PBS 버퍼를 사용하여 C형 간염 환자 혈청을 1/100희석한 시료 100 μ 를 첨가하고, 상온에서 2시간 교반시켜 배양하였다. PBS 버퍼를 사용하여 세척 후, 100 μ 의 Q-dot 컨쥬게이트 시약을 각 웰에 첨가 후, 1시간 상온에서 교반시켜 배양한 후, PBS 버퍼로 세척하였다. 모든 실험은 3번

씩 진행 되었으며, 그 평균값으로 그 값을 정했다. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)의 정의에 따라 Limit of detection (이하 LOD)를 정하였다. 각각의 실험의 LOD 값은 정상인 혈청 30개 시료의 형광도 값의 평균 + 표준편차 값의 세배를 LOD로 정하였다. LOD 이상의 값을 양성(positive), 그 이하의 값을 음성(negative)으로 판정하였으며, 민감도는 number of true positive/total number of sample로 정의 되었다.

[0114] 나노입자화 된 단독 에피토프 실험의 민감도는 hFTN-H-에피토프 C, hFTN-H-에피토프 A, hFTN-H-에피토프 B 가 각각 33%, 87%, 90%가 나왔으며, 이 결과를 통해 C형 간염 질환 진단에 있어서, 에피토프 B의 중요도가 높으며 또한 다양한 종류의 C형 간염 특이적 항체의 다중진단이 중요함을 다시 한 번 확인 하였다(도 8). 나노입자화 된 멀티 에피토프 실험의 경우, hFTN-H-에피토프 C-A : hFTN-H-에피토프 B = 8 : 2, hFTN-H-에피토프 C-A : hFTN-H-에피토프 B = 6 : 4, hFTN-H-에피토프 C-A : hFTN-H-에피토프 B = 8 : 2로 실험이 수행 되었으며, 각각의 민감도는 77%, 93%, 100%로 나타남을 확인하였다(도 8).

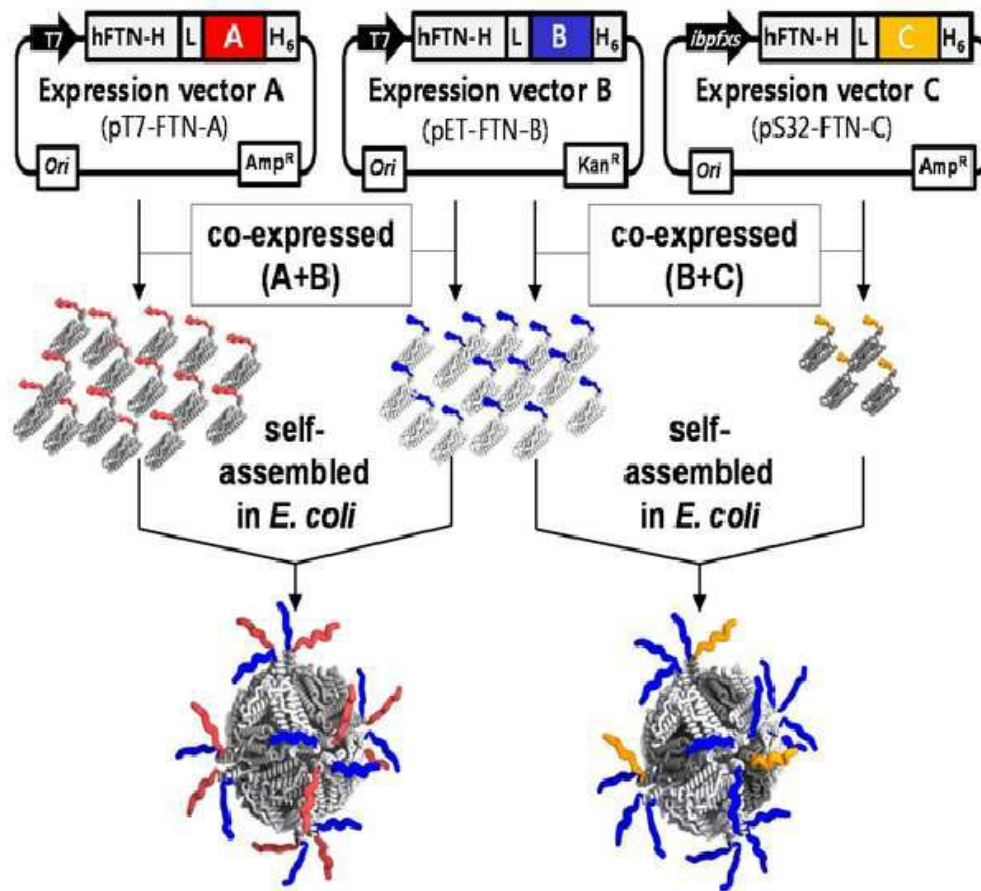
[0115] 수신자 동작 특성 곡선 분석(Receiver operating characteristic), ROC curve)을 통해 보다 명확하게 본 발명의 단백질 나노입자를 이용한 C형 간염 마커의 검출법의 획기적인 성능을 확인 할 수 있었다. ROC 곡선 분석은 주로 임상 화학, 약리학, 생리학 진단 검사에 사용되는 것으로서 true positive (= sensitivity, 민감도)와 true negative (= specificity, 특이도)를 동시에 나타내는 그래프이다. 이때, x축은 false positive rate (= 1 - true negative), y축은 true positive rate가 되며 ROC curve는 그래프가 왼쪽 꼭대기에 가깝게 그려질수록 분류 성능이 우수하다고 보는데, 이는 ROC 곡선 면적이 1에 가까울수록 성능이 좋다는 것을 의미하는데 도 9에서 나타난 바와 같이 hFTN-H-에피토프 C-A : hFTN-H-에피토프 B = 8 : 2의 경우에 ROC 곡선이 1에 가장 가깝다는 것을 확인 할 수 있었다.

[0116] 에피토프 펩타이드 모노머(나노입자화 된 멀티 에피토프 실험에서 민감도 100 %가 나온 에피토프의 비율을 사용하였음(에피토프 B : 에피토프 CA = 8 : 2))를 PS 2차원 평면에 고정화 시킨 후 민감도를 측정해본 결과, 민감도는 63 %에 그쳤다(도 10). 본 발명을 통한 단백질 나노입자는 세포 내에서 자연 생합성되는 3차원 나노구조체로서 항상 정확한 4차 구조와 입자 topology를 유지하고 있으며, 고정화 플랫폼인 하이드로젤의 경우, 다량의 수분을 함유하고 있으며, 부피대비 표면적 또한 매우 크기 때문에 단백질 나노입자의 3차원 구조를 적절히 유지하고, 높은 밀도로 고정화 하는 것을 가능하게 한다. 그 결과 C형 간염 특이적 마커의 고민감도, 고특이도 검출이 가능함을 확인하였다(도 8)

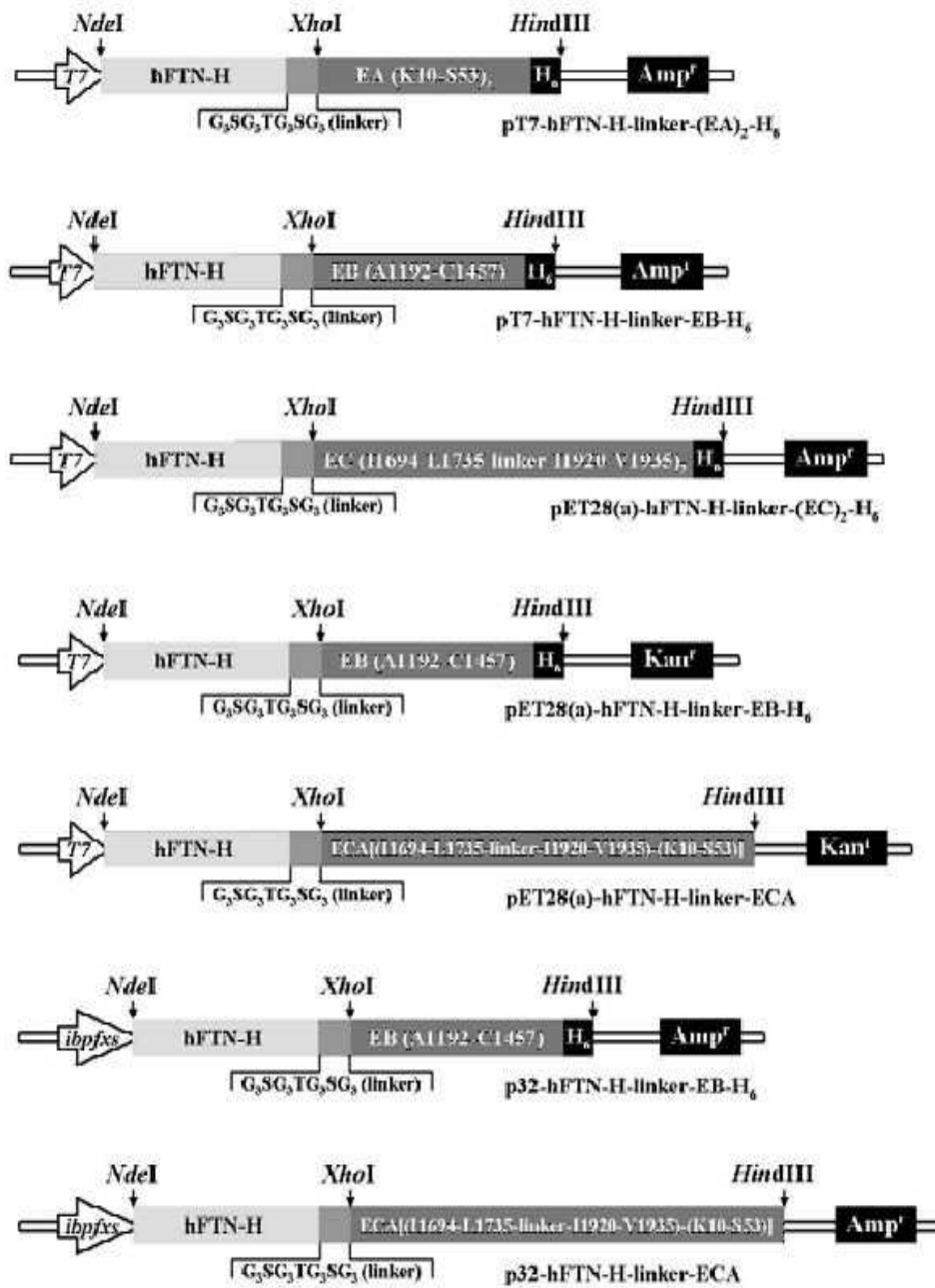
[0117] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

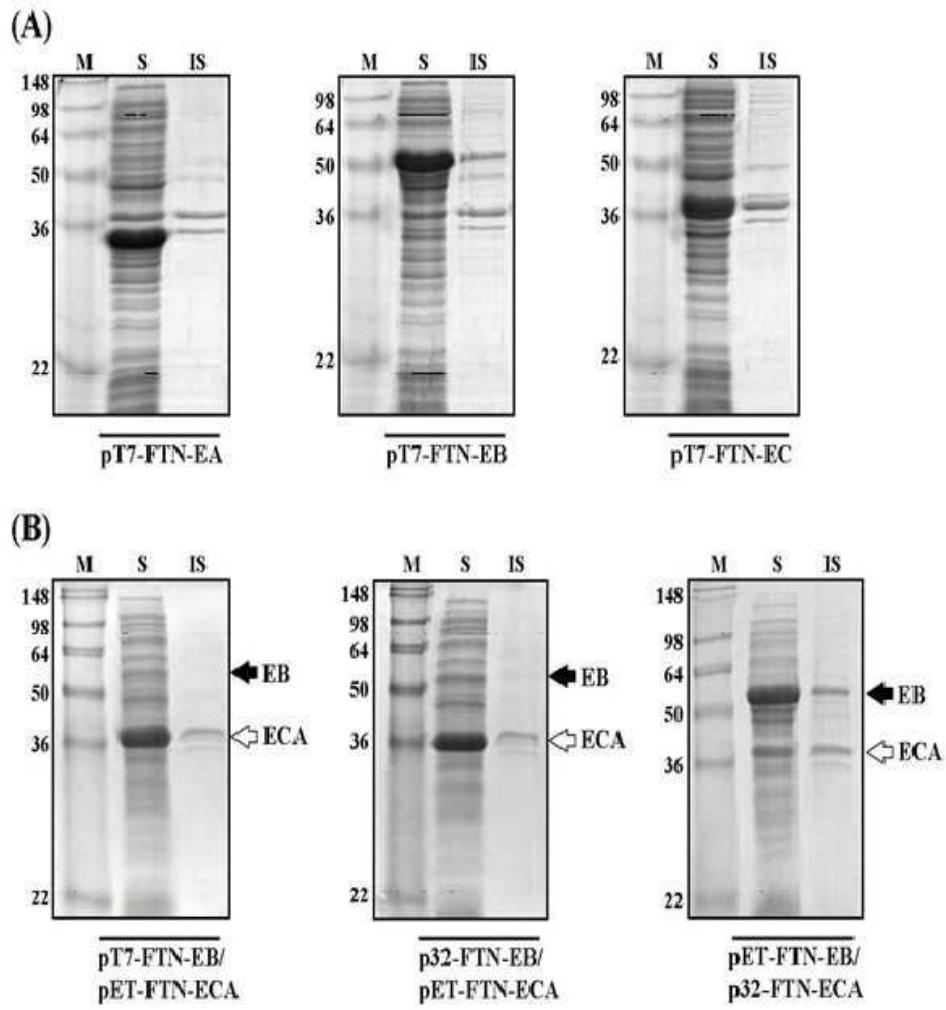
도면1



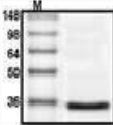
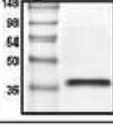
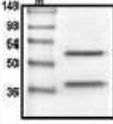
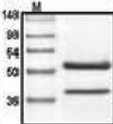
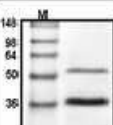
도면2



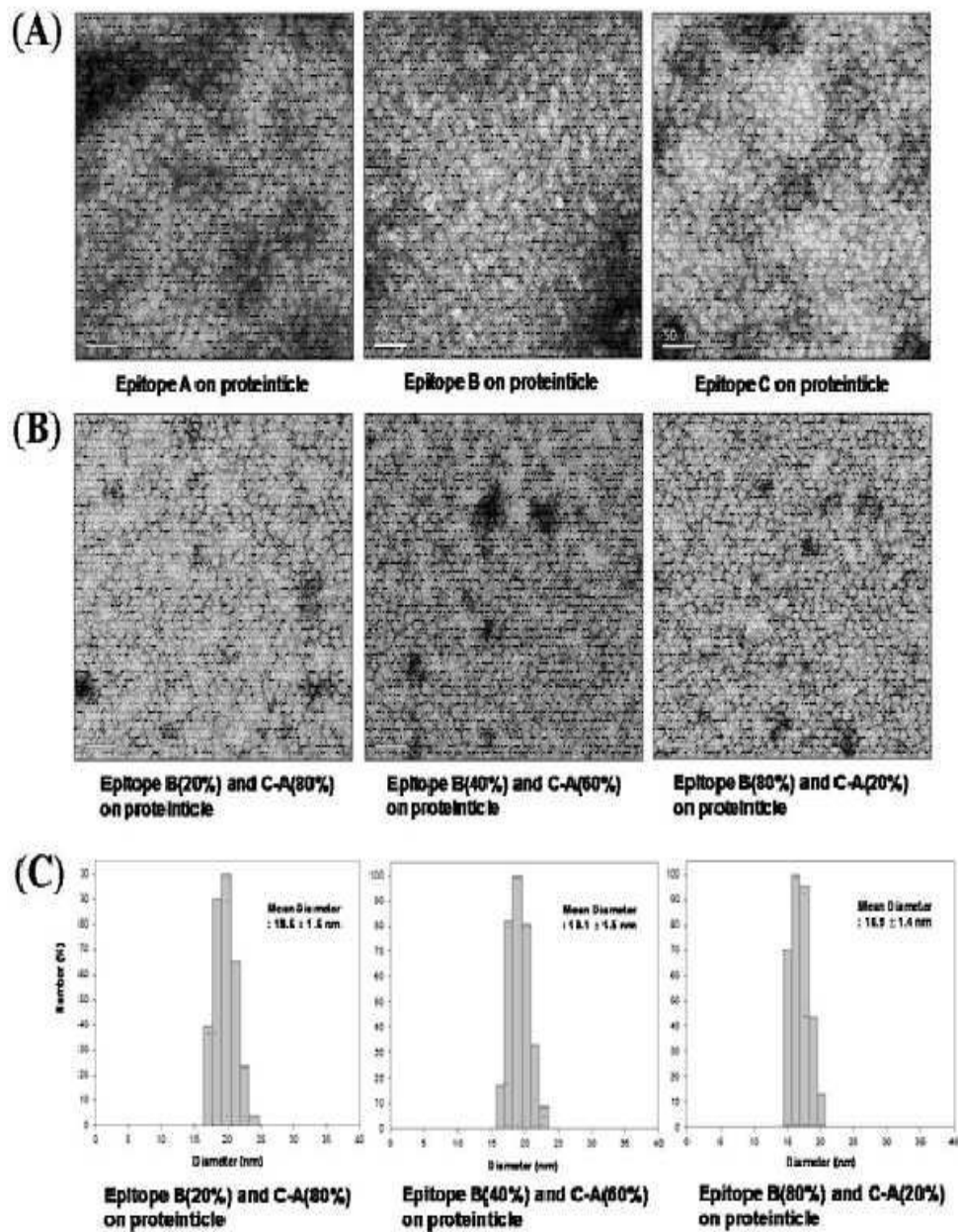
도면3



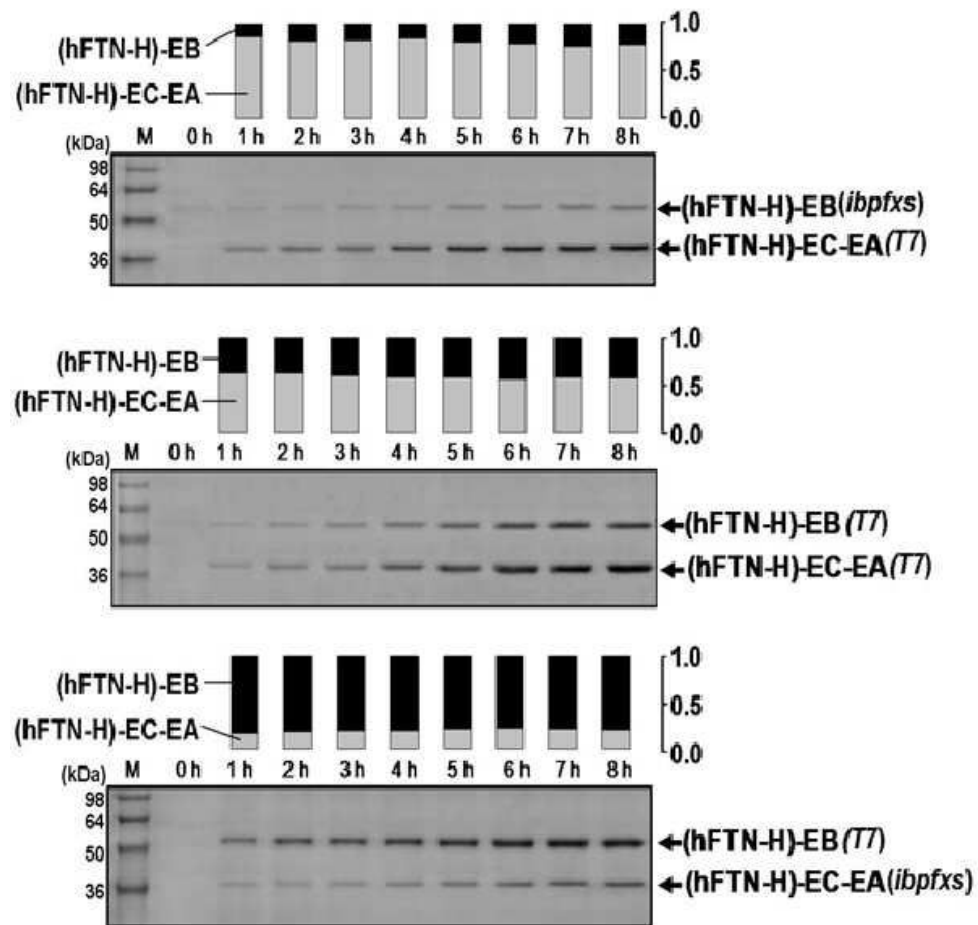
도면4

Epitope(s)	Gene expression system for protein synthesis	SDS-PAGE of purified protein
Mono	T7(pT7-7): NH_2 -(hFTN-H)-(EA) ₂ -COOH (Single expression vector)	 ← (hFTN-H)-(EA) ₂
Mono	T7(pT7-7): NH_2 -(hFTN-H)-EB-COOH (Single expression vector)	 ← (hFTN-H)-EB
Mono	T7(pT7-7): NH_2 -(hFTN-H)-(EC) ₂ -COOH (Single expression vector)	 ← (hFTN-H)-(EC) ₂
Multi	T7(pT7-7): NH_2 -(hFTN-H)-EB-COOH T7(pET28a): NH_2 -(hFTN-H)-EC-EA-COOH (Two expression vectors for co-expression)	 ← (hFTN-H)-EB ← (hFTN-H)-EC-EA
Multi	T7(pET28a): NH_2 -(hFTN-H)-EB-COOH ibpfxs(pS32): NH_2 -(hFTN-H)-EC-EA-COOH (Two expression vectors for co-expression)	 ← (hFTN-H)-EB ← (hFTN-H)-EC-EA
Multi	T7(pET28a): NH_2 -(hFTN-H)-EC-EA-COOH ibpfxs(pS32): NH_2 -(hFTN-H)-EB-COOH (Two expression vectors for co-expression)	 ← (hFTN-H)-EB ← (hFTN-H)-EC-EA

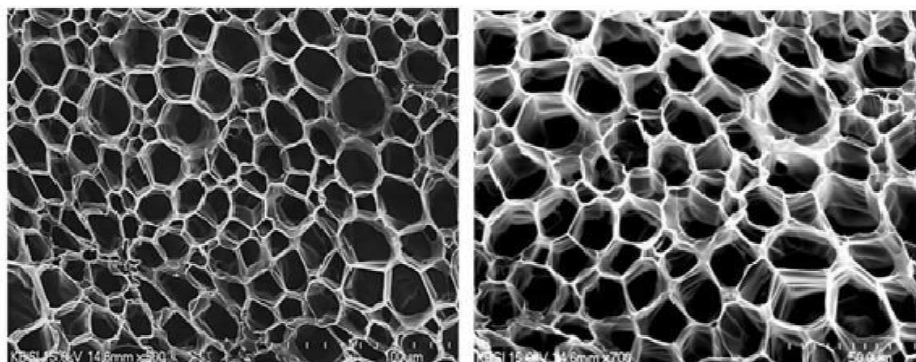
도면5



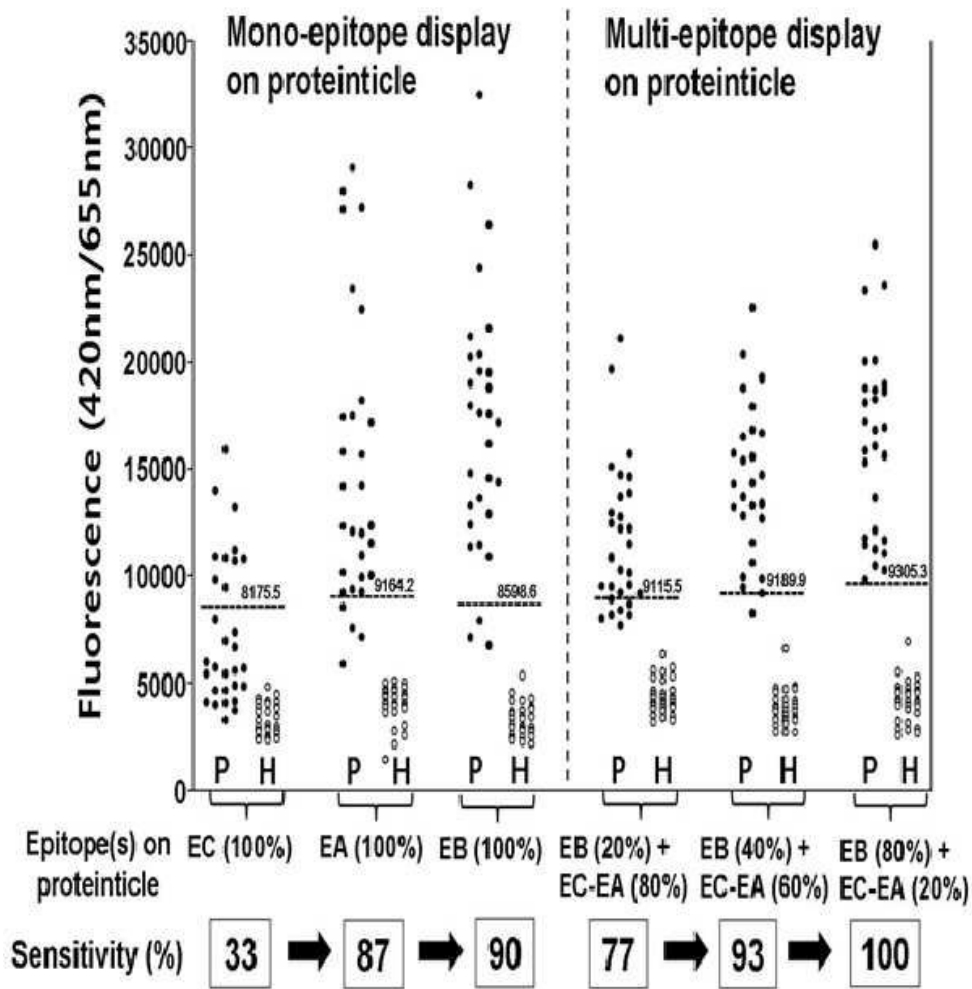
도면6



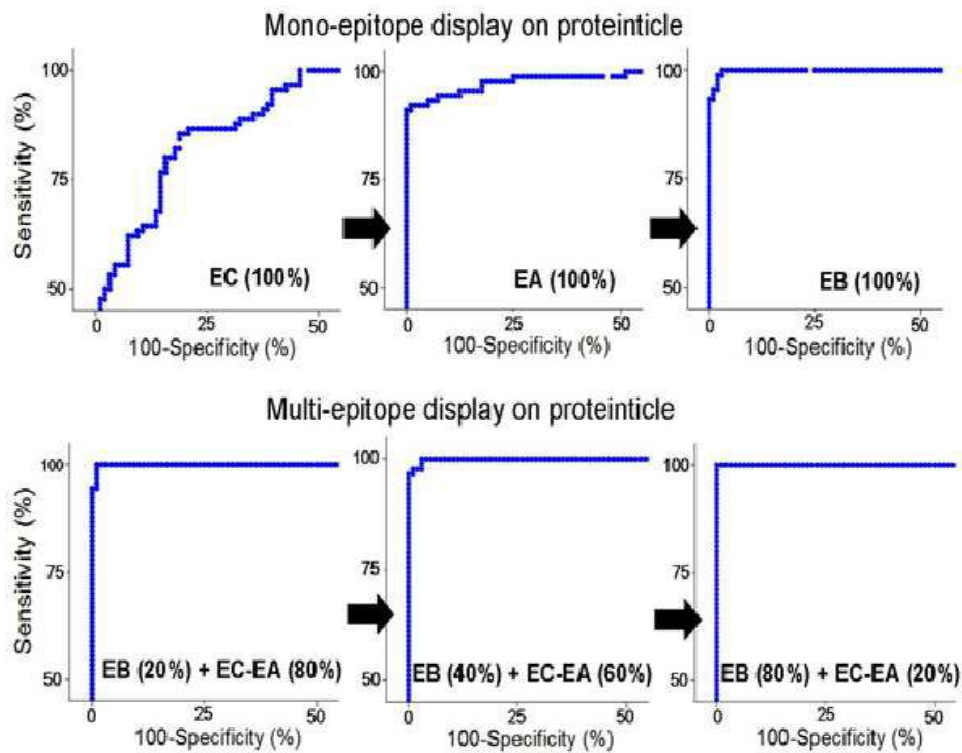
도면7



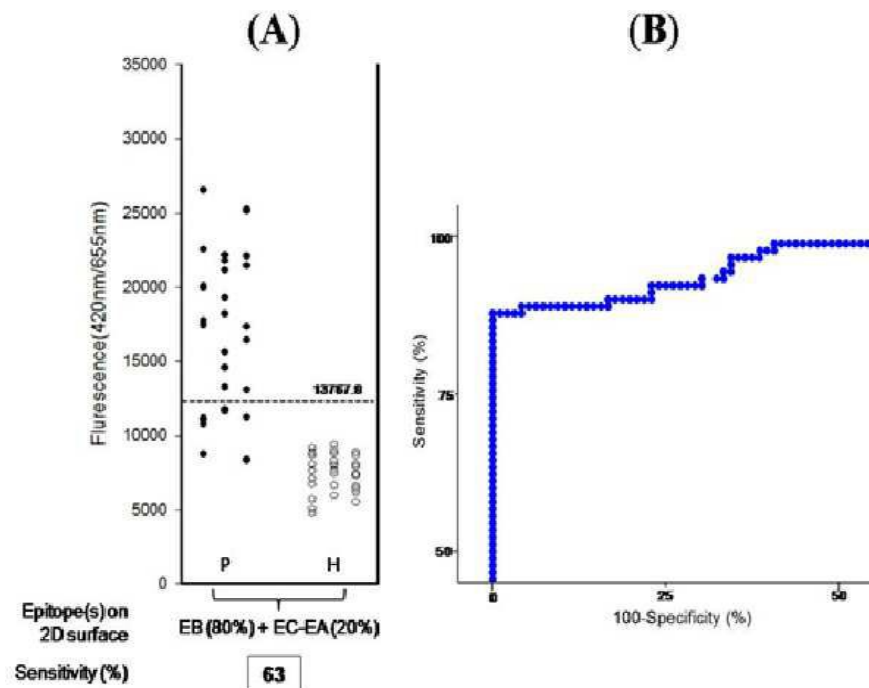
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Protein nanoparticle linked with multiple disease specific marker epitope and ultra-sensitive method for detecting disease specific

marker using it

<130> P14-B228

<160> 48

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 307

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ibpfxs promoter

<400> 1

ttcgaagacc ataaactgca aaaaaaagtc cgctgataag gcttgaaaag ttcatttcca 60

gaccatTTTT tacatcgtag ccgatgagga cgcgcctgat ggggtgttctg gctacctgac 120

ctgtccattg tggaaggctc tacattctcg ctgatttgtc gacaaattct ggggattact 180

accaaaaata gttgcgcaaa catcttgaaa ttttgctaata gaccacaata taagctaaac 240

gcgattcgca acccattcag gtagccgggg ttaaccggct gctattaata aaggagatat 300

acatatg 307

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 1

<400> 2

catatgacga ccgcgtccac ctcg 24

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 2

<400> 3

ctcgagagtg cctccccac ttccgccacc gctttcatta tc 42

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 3

<400> 4

ctcgagccca ccgccgctgc cacctccagt gcctcccca ct 42

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 4

<400> 5

aaaaacaaac gtaacaccaa ccgccgcca caggatatta agtt 44

<210> 6

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 5

<400> 6

taaactccac caacgatctg accaccgcc gggaacttaa taccctgtgg gcggc 55

<210> 7

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 6

<400> 7

gtcagatcgt tgggtggagtt tacttgttg gcgcagggg cccaggttg g 51

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 8

<400> 8

ggaagtcttc ctagtcgcgc gcacaccaa cctggggccc 40

<210> 9

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 8
 <400> 9
 aaaaacaaac gtaacaccaa ccg 23
 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 9
 <400> 10
 ggaagtccttc ctatgcgcg 19
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 10
 <400> 11
 ctcgagaaaa acaaacgtaa c 21

 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 11
 <400> 12
 gaattcggaa gtcttcctag t 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 12
 <400> 13
 gaattcaaaa acaaacgtaa c 21

<210> 14
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 13
 <400> 14
 aagcttttag tgatggatgat ggtgatggga agtcttccta gtcgcgcg 48

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 14
 <400> 15
 gaattcaaaa acaaacgtaa c 21

<210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 15
 <400> 16
 aagcttttag gaagtcttcc tagt 24

<210> 17
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 16
 <400> 17
 gcggtggact ttatccctgt ggagaaccta gagacaacca tgaggteccc ggtgttca 58

<210> 18
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 17

<400> 18
 tgagccacct ggaagctctg gggcactact ggtggagagg agttatccgt gaacaccggg 60
 gacctca 67
 <210> 19
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 18
 <400> 19
 gagcttcag gtggctcacc tccatgctcc cacaggcagc ggcaaaagca ccaaggtccc 60
 ggctgc 66
 <210> 20
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 19
 <400> 20
 gcagcaacag aggggttgag tactagcacc ttatagccct gagctgcata tgcagccggg 60
 accttg 66
 <210> 21
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 20
 <400> 21
 tcaaccctc tgttgctgca aactgggct ttggtgctta catgtccaag gctcatggga 60
 tcgaccta 70
 <210> 22
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 21
 <400> 22

gtgatggggc tgccagtggg aattgttctc accccgggtcc tgatgttagg atcgatccca	60
tgagccttg	69
<210> 23	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Seq ID 22	
<400> 23	
ctggcagccc catcacgtac tccacctacg gcaagttcct tgccgacggc ggggtgctcg	60
gggg	64
<210> 24	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Seq ID 23	
<400> 24	
gatgtggcat ccgtggagtg gcactcgtca caaattatta tgtcataagc gcccccgag	60
cacc	64
<210> 25	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Seq ID 24	
<400> 25	
ctccacggat gccacatcca tcttgggcat cggcactgtc cttgaccaag cagagactgc	60
gggggc	66
<210> 26	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Seq ID 25	
<400> 26	
cacagtgcgc gagcccgag ggggtggcggg ggcgagcaca accagtctcg cccccgcagt	60

ctct	64
<210> 27	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Seq ID 26	
<400> 27	
gggtccgtc actgtgcccc atccaacat cgaggaggtt gctctgtcca ccaccggaga	60
gatccc	66
<210> 28	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Seq ID 27	
<400> 28	
gagatgtctc ccccccttga ttacttcgag ggggatagcc ttgccgtaaa aagggatctc	60
tccggtggt	69
<210> 29	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Seq ID 28	
<400> 29	
taatcaaggg ggggagacat ctcatcttct gtcattcaaa gaagaagtgc gacgaactcg	60
ccgcaaagc	69
<210> 30	
<211> 65	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Seq ID 29	
<400> 30	
cgtaagacc gcggtagtag gccacggcat tgatgcccaa tgcgaccagc ttgcggcga	60
gttcg	65

<210> 31
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 30
 <400> 31
 accgcggtct tgacgtgtcc gtcatcccga ccagcggcga tgttgtcgtc gtggcaaccg 60
 atgc 64

 <210> 32
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 31
 <400> 32
 acacgtattg cagtctatca ccgagtcgaa gtcgccggta tagccggta tgaggcatc 60
 ggttgccacg 70

 <210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 33
 <400> 33
 gcggtggact ttatccctg 19

 <210> 34
 <211> 22
 <212> DNA
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 34
 <400> 34
 acacgtattg cagtctatca cc 22

 <210> 35
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 35

<400> 35

ctcgaggcgg tggactttat ccct 24

<210> 36

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 36

<400> 36

aagcttttag tgatggtgat ggtgatgaca cgtattgcag tctatcacgc agtc 54

<210> 37

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 37

<400> 37

atcatccccg atagggaagt tctctaccag gagttcgacg agatgg 46

<210> 38

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 38

<400> 38

cctgttcgat gtaaggagg tgttggaac actcctccat ctgctgaac tctctg 56

<210> 39

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Seq ID 39

<400> 39

cctcccttac atcgaacagg gaatgatgct cgccgagcaa ttcaaacaga aggcgc 56

<210> 40

<211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 40
 <400> 40
 ccagtgcctc ccccaacttc gccacccaac cggagcgct tctgtttgaa ttgc 54
 <210> 41
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 41
 <400> 41
 tgggggaggc actggagggtg gcagcggcgg tgggatagcg ttcgcctcgc g 51
 <210> 42
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 42
 <400> 42
 cacatagtgc gtgggggaga cgtggttacc ccgcgaggcg aacgct 46

 <210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 43
 <400> 43
 atcatccccg atagggaagt t 21
 <210> 44
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 44
 <400> 44
 cacatagtgc gtggggg 17

<210> 45
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 45
 <400> 45
 ctcgagatca tccccgat 18

<210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 46
 <400> 46
 gaattccaca tagtgcgtgg g 21

<210> 47
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 47
 <400> 47
 gaattcatca tccccgat 18

<210> 48
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq ID 48
 <400> 48
 aagcttttag tgatggtgat ggtgatgcac atagtgcgtg gg 42