



등록특허 10-2617592



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월29일
(11) 등록번호 10-2617592
(24) 등록일자 2023년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01) C07K 14/25 (2006.01)
C07K 14/28 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0066238
(22) 출원일자 2023년05월23일
심사청구일자 2023년05월23일
(30) 우선권주장
1020220062791 2022년05월23일 대한민국(KR)
(65) 공개번호 10-2023-0163941
(43) 공개일자 2023년12월01일
(56) 선행기술조사문헌
KR102332725 B1
KR1020170093731 A

(73) 특허권자
주식회사 백스다임
서울특별시 강남구 봉은사로63길 11, 3층 335호(삼성동, 명화빌딩)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
손명현
서울 강남구 삼성로 150 206동 1201호
김태훈
인천광역시 연수구 송도과학로27번길 55, 202동 1533호(송도동, 롯데캐슬 캠퍼스타운)
(74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 11 항

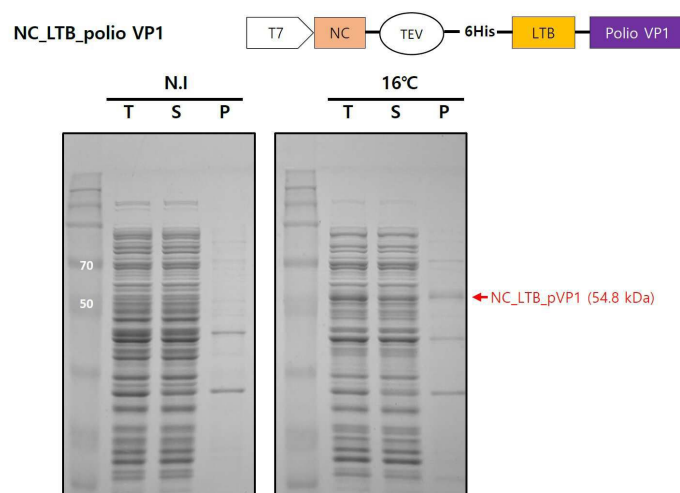
심사관 : 정이든

(54) 발명의 명칭 바이러스 뉴클레오캡시드를 이용한 오랑체형 독소 단백질 기반 목적 단백질 융합 오랑체 제조 플랫폼

(57) 요약

본 발명의 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터는 목적 단백질의 융합 파트너로서 오랑체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 또한, 본 발명의 목적 단백질 융합 오랑체 제조 방법은 목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 오랑체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터를 제작하는 단계; 상기 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C07K 14/245 (2013.01)

C07K 14/25 (2013.01)

C07K 14/28 (2013.01)

C12N 15/62 (2013.01)

C07K 2319/21 (2013.01)

C07K 2319/735 (2013.01)

C07K 2319/81 (2013.01)

C12N 2740/16022 (2013.01)

(72) 발명자

박성현

인천광역시 계양구 안남로573번길 16, 5동 208호(
효성동, 뉴서울1차아파트)

김성재

서울특별시 강남구 개포로110길 15, 110동 1003호
(일원동, 일원동우성7차아파트)

김승후

서울특별시 중랑구 겸재로29길 27, 103동 603호(면
목동, 아남리치카운티아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

목적 단백질의 융합 파트너로서 오랑체형 독소 단백질 및 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오패시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 오랑체형 독소 단백질은 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit, CTB), 대장균 이열성 장독소 B 서브유닛(heat-labile enterotoxin B subunit, LTB) 및 시가 독소 B 서브유닛(Shiga-toxin B subunit)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 목적 단백질은 자가 조립 과정에서 소단위체로 오랑체를 형성하는 정이십면체형 바이러스의 캡시드 단백질인, 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오패시드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 벡터는 목적 단백질 융합 오랑체를 대장균에서 생산하기 위한 것인, 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제3항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 8

목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 오랑체형 독소 단백질 및 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오패시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터를 제작하는 단계;

상기 목적 단백질 융합 오랑체 제조용 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 목적 단백질 융합 오랑체 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 오랑체형 독소 단백질은 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit, CTB), 대장균 이열성 장독소 B 서브유닛(heat-labile enterotoxin B subunit, LTB) 및 시가 독소 B 서브유닛(Shiga-toxin B subunit)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 목적 단백질 융합 오랑체 제조 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 목적 단백질은 자가 조립 과정에서 소단위체로 오랑체를 형성하는 정이십면체형 바이러스의 캡시드 단백질인, 목적 단백질 융합 오랑체 제조 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오캡시드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 목적 단백질 융합 오랑체 제조 방법.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 숙주 세포는 대장균인, 목적 단백질 융합 오랑체 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이러스 뉴클레오캡시드를 이용한 오랑체형 독소 단백질 기반 목적 단백질 융합 오랑체 제조 플랫폼에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 오랑체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오캡시드를 융합 파트너로 이용하여 목적 단백질을 오랑체의 형태로 숙주 세포에서 효율적으로 제조할 수 있는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포 및 이를 이용한 목적 단백질 융합 오랑체 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 단백질을 생산하기 위한 여러 가지 시스템이 있지만, 대량의 빠르고 저렴한 생산의 측면에서 가능하다면 대장균(*Escherichia coli*)과 같은 원핵 세포 시스템을 이용하는 것이 바람직할 것이다. 그러나, 이러한 시스템의 경우 많은 단백질, 특히 진핵 세포 유래 단백질이나 이에 감염을 일으키는 바이러스 단백질들이 수용성을 잃어버리고 불용성 침전으로 생성되는 문제가 있다.

[0004] 한편, 백신 효능을 증가시키는 등의 이점을 위해 항원 단백질을 다량체의 형태로 생산하기 위한 기술들이 연구되고 있으며, 이러한 기술 중 하나로 오랑체 구조를 형성하는 독소 단백질을 활용하는 방법이 시도되고 있다. 이열성 독소(heat-labile enterotoxin, LT) 패밀리에 속하는 독소 단백질들이 이러한 오랑체 구조를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 여기에 속하는 것으로서 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit; CTB)의 경우 화학적으로 또는 유전적으로 결합된 외래 항원의 접막을 통한 흡수를 촉진시키는 운반체(carrier) 기능으로 유용하게 사용되고 있다.

[0005] 이러한 오랑체형 독소 단백질 기반 융합 단백질 또한 대량의 빠르고 저렴한 생산을 위해 대장균과 같은 원핵 세포 시스템에서 생산하려는 시도가 있지만, 단백질 접힘 관련 문제 등으로 인해 불용성 침전으로 생산되고 또한 이를 재접힘 등의 과정을 거치더라도 원하는 오랑체로 제조하기 어렵다는 문제가 있다. 따라서, 이를 해소하기 위한 기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Arakawa, T., et al. (2001). Synthesis of a cholera toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein in potato. Plant cell reports, 20(4), 343-348.
- (비특허문헌 0002) Nozoye, T., et al. (2009). Production of Ascaris suum As14 protein and its fusion protein with cholera toxin B subunit in rice seeds. Journal of Veterinary Medical Science, 71(7), 995-1000.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 주된 목적은 목적 단백질, 특히 대장균에서 불용성으로 발현되는 난발현 단백질을 오량체의 형태로 숙주 세포, 특히 대장균에서 효율적으로 제조할 수 있는 발현 벡터를 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현 벡터로 형질전환되어 상기 오량체의 효율적인 제조를 실현할 수 있는 숙주 세포를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 벡터 및/또는 상기 숙주 세포를 이용하여 상기 오량체를 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 목적 단백질의 융합 파트너로서 오량체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 오량체 제조용 발현 벡터를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 상기 목적 단백질 융합 오량체 제조용 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 오량체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 오량체 제조용 발현 벡터를 제작하는 단계; 상기 목적 단백질 융합 오량체 제조용 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 목적 단백질 융합 오량체 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따르면 목적 단백질, 특히 대장균에서 불용성으로 발현되는 난발현 단백질을 오량체의 형태로 숙주 세포, 특히 대장균에서 효율적으로 제조할 수 있다. 특히, 본 발명에 따르면 정교한 오량체 형성으로 인해 면역 원성이 크게 향상된 백신용 항원을 효율적으로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명의 일 실시형태에 따른 발현 벡터를 포함하여 실험에 사용된 발현 벡터들의 융합 단백질 컨스트럭트를 나타낸다.
- 도 2는 도 1의 1번 융합 단백질 컨스트럭트를 대장균에서 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 도 1의 2번 융합 단백질 컨스트럭트를 대장균에서 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 도 1의 3번 융합 단백질 컨스트럭트를 대장균에서 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 5는 도 1의 5번 융합 단백질 컨스트럭트를 대장균에서 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 6은 도 1의 6번 융합 단백질 컨스트럭트를 대장균에서 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 7 및 8은 도 1의 각 융합 단백질 컨스트럭트 발현 생성물(오량체)의 GM1 결합력 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 목적 단백질의 융합 파트너로서 오량체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 오량체 제조용 발현 벡터가 제공된다.

- [0020] 본 명세서에서 사용된 용어 "목적 단백질"(target protein)은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 벡터에 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 삽입하여 숙주 세포에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에서 목적 단백질은 면역반응을 유도하는 바이러스 항원 단백질일 수 있다. 예를 들어, 구형의 정이십면체(icosahedral) 캡시드 구조를 가지는 바이러스로서 상기 정이십면체는 소단위체인 정삼각형 20개가 모여서 만 들어지는 구조이고 12개의 꼭지점은 크게 2배축(two-fold axis), 3배축(three-fold axis), 5배축(five-fold axis)이 존재하고, 축에 따라 소단위체가 오각형 또는 육각형의 조합으로 이루어지는 바이러스의 항원 단백질일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 목적 단백질은 자가 조립 과정에서 소단위체로 오량체(또는 육량체)를 형성하는 정이십면체형 바이러스의 캡시드 단백질일 수 있다. 이러한 단백질을 목적 단백질로 사용하는 경우, 특히 대장균에서, 본래의 바이러스 캡시드 단백질의 오량체와 같은 수준의 항원성을 갖는 재조합 오량체를 제조할 수 있다.
- [0024] 이에는 일반적으로 정이십면체를 구성하는 모든 외피형 또는 비외피형 바이러스의 오량체 구성 항원이 적용될 수 있다.
- [0025] 지질막을 가지는 외피형 바이러스(enveloped virus)의 예로는 DNA 유전자형을 가지는 헤르페스바이러스속(Herpesviridae), 헤파드나바이러스속(Hepadnaviridae) 바이러스가 포함될 수 있고, RNA 유전자형을 가지는 플라비바이러스속(Flaviviridae) 바이러스가 포함될 수 있다.
- [0026] 지질막이 없이 바이러스 외피 단백질로 구성된 비외피형 바이러스(non-enveloped 또는 naked virus)로는, DNA 유전자형을 가지는 아데노바이러스속(Adenoviridae), 파보바이러스속(Pavoviridae) 바이러스가 포함될 수 있고, RNA 유전자형을 가지는 레오바이러스속(Reoviridae), 피코르나바이러스속(Picornaviridae), 칼리시바이러스속(Caliciviridae) 바이러스가 포함될 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된 용어 "발현 벡터"는 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 이중 또는 동종의 숙주 세포에 도입하여 발현시키기 위한 벡터로서, 원형 또는 선형의 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 DNA 또는 RNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 프로모터 및/또는 터미네이터 서열을 포함할 수 있으며, 복제 개시점, 선택 마커, 폴리아데닐화 신호 등과 같은 벡터로 사용하기 위해 필요한 구성 요소 또한 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스 벡터, 파지 입자 또는 게놈 삽입물일 수 있으며, 숙주 세포 내로 도입된 후, 숙주 세포의 게놈과 무관하게 복제되거나 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것이거나, 추후 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함시켜 사용하기 위한 것일 수 있다. 특히 후자의 경우 바람직하게는 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 용이하게 포함시킬 수 있는 구성 요소로서 통상 다중 클로닝 부위(Multi Cloning Site: MCS)라고 부르는 제한효소 인식 부위를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명은 오량체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오캡시드를 목적 단백질의 융합 파트너로서 적용할 경우 목적 단백질을 효율적으로, 예를 들어 융합 파트너를 사용하지 않거나 다른 기존의 융합 파트너를 사용하는 경우에 불용성으로 발현되는 단백질을 수용성으로, 발현시킬 수 있으며, 이러한 수용성으로 발현된 목적 단백질이 자가 조립된 오량체를 효율적으로 제조할 수 있다는 새로운 연구 결과를 바탕으로 한다.
- [0031] 이러한 융합 파트너를 사용 시 목적 단백질을 수용성을 증강하여 생산할 수 있다는 장점이 있으며 일반적으로 융합 파트너의 크기가 클수록 목적 단백질의 수용성 증강에 도움이 된다. 그러나 융합 파트너 크기에 따라 바로 인접한 목적 단백질의 구조적 간섭이 심화되어 생리학적 활성구조로의 생산을 방해할 수도 있다. 따라서 가능한 작은 크기임에도 불구하고 목적 단백질의 수용성과 활성을 높이는 융합 파트너를 발굴하는 것이 매우 중요하다.
- [0032] 특히, 본 발명에서 융합 파트너로 사용하는 바이러스 뉴클레오캡시드는 그 크기가 매우 작기 때문에(짧은 길이의 펩타이드), 목적 단백질뿐만 아니라 목적 단백질 단량체의 자가조립(본 발명의 경우 오량체로의 자가조립)에 대한 구조적 간섭을 최소화할 수 있다는 장점이 있다.
- [0033] 또한, 본 발명에 따르면 바이러스 뉴클레오캡시드 고유의 아연 결합 도메인(zinc binding domain)을 이용할 수

있다는 장점이 있다. 예를 들어, 바이러스 뉴클레오패시드의 아연 결합 도메인을 이용하면, 예를 들어 아연 친화성 정제 방법을 사용하면, 히스티딘 태그와 같은 정제를 위한 별도의 구성 요소 없이도 융합 단백질을 쉽게 정제할 수 있다. 본 발명에서 바이러스 뉴클레오패시드는 기존에 알려진 바이러스 뉴클레오패시드일 수 있으며, 본 발명의 활성, 즉 오랑체형 독소 단백질과 함께 목적 단백질의 융합 파트너로서 작용하여 목적 단백질이, 특히 대장균에서, 수용성으로 발현되도록 하면서 오랑체를 형성할 수 있도록 하는 활성이 유지되는 한 상기 바이러스 뉴클레오패시드의 단편 또는 변이체일 수도 있다.

[0034] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오패시드는 레트로바이러스, 예를 들어 HIV-1, SIV, MuLV 등과 같은 레트로바이러스의 뉴클레오패시드일 수 있다.

[0035] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오패시드는 바람직하게는 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus: HIV)의 뉴클레오패시드이다.

[0036] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오패시드는 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열과 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는 서열번호 1에서 14번, 17번, 22번 및 27번의 서열을 유지하면서, 보다 바람직하게는 14번, 17번, 22번, 27번, 35번, 38번, 43번 및 48번의 서열을 유지하면서, 보다 바람직하게는 6번, 9번, 10번, 13번, 14번, 17번, 19번, 22번, 25번, 27번, 28번, 31번, 32번, 33번, 35번, 37번, 38번, 40번, 43번, 46번, 48번 및 51번의 서열을 유지하면서, 상기 서열 동일성을 만족하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0037] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오패시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기 서열과 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기 서열 또는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기 서열을 포함한다. 바람직하게는 서열번호 1에서 14번, 17번, 22번 및 27번의 서열을 유지하는, 보다 바람직하게는 14번, 17번, 22번, 27번, 35번, 38번, 43번 및 48번의 서열을 유지하는, 보다 바람직하게는 6번, 9번, 10번, 13번, 14번, 17번, 19번, 22번, 25번, 27번, 28번, 31번, 32번, 33번, 35번, 37번, 38번, 40번, 43번, 46번, 48번 및 51번의 서열을 유지하는 아미노산 서열을 암호화하면서, 상기 서열 동일성을 만족하는 염기 서열을 포함한다.

[0038] 본 명세서에서 서열 동일성은 아미노산 서열과 참조 아미노산 서열 사이 또는 뉴클레오타이드 서열과 참조 뉴클레오타이드 서열 사이의 서열 동일성을 의미한다. 서열 동일성은 비교 목적으로 정렬될 수 있는 각 서열의 위치를 비교하여 결정할 수 있다. 비교 서열의 위치를 같은 아미노산 또는 염기가 차지하는 경우, 이때 분자들은 그 위치에서 동일하다. 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열들 사이의 동일성 정도는 각각 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열에 의해 공유되는 위치에서 동일한 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 수의 함수이다. 예를 들어, FASTA 또는 BLAST를 포함하는 다양한 정렬 알고리즘 및/또는 프로그램을 사용하여 두 서열 사이의 동일성을 계산할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 오랑체형 독소 단백질은 각각이 단위체로써 오랑체(pentamer) 형태의 복합 단백질을 형성할 수 있는 활성이 있는 독소 단백질로서, 기존에 알려진 오랑체형 독소 단백질은 물론 오랑체 형태의 복합 단백질을 형성할 수 있는 활성이 유지되는 한 상기 오랑체형 독소 단백질의 단편일 수도 있다. 예를 들어, 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit, CTB), 대장균 이열성 장독소 B 서브유닛(heat-labile enterotoxin B subunit, LTB) 및 시가 독소 B 서브유닛(Shiga-toxin B subunit)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0040] 본 발명에서 오랑체형 독소 단백질은 바람직하게는 서열번호 4 또는 서열번호 6의 아미노산 서열과 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 또는 서열번호 4 또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 본 발명에서 오랑체형 독소 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 5 또는 서열번호 7의 염기 서열과 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상,

보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기 서열 또는 서열번호 5 또는 서열번호 7의 염기 서열을 포함한다.

- [0042] 본 발명의 발현 벡터는 원핵 및 진핵을 포함한 모든 생물 중에서 선택된 세포에서 목적 단백질 융합 오량체를 생산하기 위한 것일 수 있으나, 바람직하게는 대장균속(*Escherichia*) 미생물에서 목적 단백질 융합 오량체를 생산하기 위한 것이며, 보다 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)에서 목적 단백질 융합 오량체를 생산하기 위한 것이다.
- [0043] 본 발명의 발현 벡터에서 오량체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 다른 구성 요소, 예를 들어 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 클로닝 부위, 예를 들어 제한효소 인식 부위, 예를 들어 다중 클로닝 부위(MCS); 목적 단백질과 융합 파트너 사이 및/또는 융합 파트너들의 사이(오량체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오키프시드 사이)의 간격을 부여하기 위한 링커 서열; 태그 서열, 예를 들어 히스티딘 태깅 서열; 및/또는 발현된 융합 단백질의 일부를 잘라내기 위한 프로테아제 인식 부위 암호화 서열을 더 포함할 수 있다. 이들 각각은 필요에 따라 다양하게 배치될 수 있으며, 또한 다양한 수로 포함될 수 있다.
- [0044] 일 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질의 융합 파트너로서 오량체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 상기 폴리뉴클레오타이드는 오량체형 독소 단백질 및 상기 오량체형 독소 단백질의 N-말단에 결합된 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하고 상기 오량체형 독소 단백질의 C-말단에 목적 단백질 또는 목적 단백질을 결합하기 위한 클로닝 부위를 포함한다. 이러한 실시형태의 구체적인 예시로서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 순서대로 프로모터, 바이러스 뉴클레오키프시드 암호화 부위, 오량체형 독소 단백질 암호화 부위, 목적 단백질 암호화 부위 또는 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 클로닝 부위(예를 들어 제한효소 인식 부위, 예를 들어 다중 클로닝 부위(MCS)) 및 터미네이터가 작동 가능하게 연결된 컨스트럭트를 포함한다.
- [0045] 다른 일 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질의 융합 파트너로서 오량체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 상기 폴리뉴클레오타이드는 오량체형 독소 단백질 및 상기 오량체형 독소 단백질의 C-말단에 결합된 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하고 상기 오량체형 독소 단백질과 상기 바이러스 뉴클레오키프시드의 사이에 목적 단백질 또는 목적 단백질을 결합하기 위한 클로닝 부위를 포함한다. 이러한 실시형태의 구체적인 예시로서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 순서대로 프로모터, 오량체형 독소 단백질 암호화 부위, 목적 단백질 암호화 부위 또는 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 클로닝 부위(예를 들어 제한효소 인식 부위, 예를 들어 다중 클로닝 부위(MCS)), 바이러스 뉴클레오키프시드 암호화 부위 및 터미네이터가 작동 가능하게 연결된 컨스트럭트를 포함한다.
- [0046] 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질 및 융합 파트너 암호화 DNA의 전사(transcription)가 박테리오파지 T7 시스템에 의해 조절되도록 T7 프로모터 및 T7 터미네이터를 포함할 수 있다. 이에 따르면 대장균에서 목적 단백질의 보다 효과적인 생산이 가능하다.
- [0047] 상기와 같은 본 발명의 발현 벡터는 예를 들어 기존의 발현 벡터를 기반으로 통상적인 재조합 방식을 사용하여 제작할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 다른 일 실시형태에 따르면, 본 발명의 목적 단백질 융합 오량체 제조용 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 제공된다.
- [0049] 본 발명에서 숙주 세포는 원핵 및 진핵을 포함한 모든 생물의 세포에서 선택된 것일 수 있으나, 바람직하게는 대장균속(*Escherichia*) 미생물의 세포이며, 보다 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)이다.
- [0050] 본 명세서에서 사용된 용어 "형질전환" 또는 "도입"은 폴리뉴클레오타이드를 숙주로 도입하여 폴리뉴클레오타이드가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질전환시키는 방법은 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO₄)법, 염화칼슘(CaCl₂)법, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법 또는 초산 리튬-DMSO법을 포함할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 일 실시형태에 따르면, 목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 오량체형 독소 단백질 및 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 오량체 제조용 발현 벡터를 제작하는 단계; 상기 목적 단백질 융합 오량체 제조용 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형

질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 목적 단백질 융합 오량체 제조 방법이 제공된다.

[0052] 이때 발현 벡터에 관한 사항 및 발현 벡터의 도입에 관한 사항 등의 구체적인 사항은 앞서 기술된 사항을 참조할 수 있다.

[0053] 형질전환체의 배양을 위해 숙주 세포에 적합한 것으로 알려진 배양 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포가 대장균인 경우, LB(Luria-Bertani) 배지에서 15 내지 39℃의 온도로 배양하는 방법을 사용할 수 있다. 발현 벡터에 항생제 선별 마커(예를 들어, 항생제인 암피실린(ampicillin) 저항성 유전자)의 구성 요소가 있다면, 이때 배지에 해당 항생제(예를 들어, 암피실린)를 첨가하여 배양함으로써 발현 벡터가 포함된 대장균의 증식을 우선적으로 유도할 수 있다. 또한 발현 벡터에 목적 단백질 암호화 DNA의 전사 및/또는 번역을 조절하는 구성 요소, 예를 들어 lac 오페론 관련 구성 요소가 있다면, 관련 물질, 예를 들어 IPTG를 첨가하여 목적 단백질의 발현을 유도할 수 있다.

[0055] 이하의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위해 제시한 것으로 하기 내용이 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0057] [실시예]

[0058] 제조예 1

[0059] 오량체의 제조를 위한 융합 파트너로서 오량체형 독소 단백질과 바이러스 뉴클레오펙시드(NC) 조합의 활용 가능성을 조사하기 위해, 오량체형 독소 단백질인 대장균 이열성 장독소 B 서브유닛(heat-labile enterotoxin B subunit: LTB)의 N-말단에 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus: HIV)의 NC가 연결되고 LTB의 C-말단에 6개의 히스티딘이 연결된 형태로 발현시키기 위한 벡터를 제작하였다(도 1의 1번 컨스트럭트).

[0060] 이때 목적 단백질의 발현이 T7 프로모터에 의해 조절되도록 설계된 pGEMEX-1(Promega) 벡터를 기반으로 제작하였으며, LTB를 암호화하는 서열로서 서열번호 5의 서열을 사용하였고, NC를 암호화하는 서열로서 서열번호 2(또는 서열번호 3)의 서열을 사용하였다.

[0061] 제작된 벡터에서 상기 컨스트럭트 부위의 서열은 서열번호 8과 같고, 예상되는 발현 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 9와 같다.

[0063] 실시예 1

[0064] 오량체형 독소 단백질인 LTB의 N-말단에 NC가 연결되고 이들 사이에 TEV(Tobacco Etch Virus) 프로테아제 절단 부위 및 6개의 히스티딘이 존재하고 LTB의 C-말단에 목적 단백질인 소아마비바이러스(Poliovirus)의 VP1이 연결된 형태의 융합 단백질의 오량체를 제조하기 위한 벡터를 제작하였다(도 1의 2번 컨스트럭트).

[0065] 상기 제조예 1과 같이 pGEMEX-1(promega) 벡터를 기반으로 제작하였다.

[0066] 제작된 벡터에서 상기 컨스트럭트 부위의 서열은 서열번호 10과 같고, 예상되는 발현 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 11과 같다.

[0068] 실시예 2

[0069] 오량체형 독소 단백질인 콜레라균의 콜레라 독소 B 서브유닛(CTB)의 N-말단에 NC가 연결되고 이들 사이에 TEV 프로테아제 절단 부위 및 6개의 히스티딘이 존재하고 CTB의 C-말단에 목적 단백질인 소아마비바이러스의 VP1이 연결된 형태의 융합 단백질의 오량체를 제조하기 위한 벡터를 제작하였다(도 1의 3번 컨스트럭트).

[0070] 상기 제조예 1과 같이 pGEMEX-1(Promega) 벡터를 기반으로 제작하였다.

[0071] 제작된 벡터에서 상기 컨스트럭트 부위의 서열은 서열번호 12와 같고, 예상되는 발현 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 13과 같다.

[0073] 비교예 1

[0074] 오량체형 독소 단백질인 LTB의 N-말단에 NC 대신 EPRS가 연결되고 이들 사이에 TEV 프로테아제 절단 부위 및 6개의 히스티딘이 존재하고 LTB의 C-말단에 목적 단백질인 소아마비바이러스의 VP1이 연결된 형태의 융합 단백질의 오량체를 제조하기 위한 벡터를 제작하였다(도 1의 4번 컨스트럭트).

[0075] 여기서, EPRS는 인간 유래 Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase의 WHEP 도메인(EPRS의 중간 부분에 위치한 WHEP

도메인으로 TRS-1, TRS-2, TRS-3과 세 도메인을 연결하는 링커를 포함함)이다.

[0076] 상기 제조예 1과 같이 pGEMEX-1(Promega) 벡터를 기반으로 제작하였다.

[0078] 실시예 3

[0079] 오랑체형 독소 단백질인 LTB의 N-말단에 NC가 연결되고 이들 사이에 6개의 히스티딘 및 TEV 프로테아제 절단 부위가 존재하고 LTB의 C-말단에 목적 단백질인 구제역바이러스(Foot-and-Mouth Disease Virus: FMDV)의 VP1이 연결된 형태의 융합 단백질의 오랑체를 제조하기 위한 벡터를 제작하였다(도 1의 5번 컨스트럭트).

[0080] 상기 제조예 1과 같이 pGEMEX-1(Promega) 벡터를 기반으로 제작하였다.

[0081] 제작된 벡터에서 상기 컨스트럭트 부위의 서열은 서열번호 14와 같고, 예상되는 발현 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 15와 같다.

[0083] 실시예 4

[0084] 오랑체형 독소 단백질인 LTB의 C-말단에 목적 단백질인 구제역바이러스(FMDV)의 VP1이 연결되고 FMDV VP1의 C-말단에 NC가 연결되고 NC의 C-말단에 6개의 히스티딘이 연결된 형태의 융합 단백질의 오랑체를 제조하기 위한 벡터를 제작하였다(도 1의 6번 컨스트럭트).

[0085] 상기 제조예 1과 같이 pGEMEX-1(promega) 벡터를 기반으로 제작하였다.

[0086] 제작된 벡터에서 상기 컨스트럭트 부위의 서열은 서열번호 16과 같고, 예상되는 발현 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 17과 같다.

[0088] 비교예 2

[0089] 오랑체형 독소 단백질인 LTB의 N-말단에 NC 대신 EPRS가 연결되고 이들 사이에 6개의 히스티딘 및 TEV 프로테아제 절단 부위가 존재하고 LTB의 C-말단에 목적 단백질인 구제역바이러스의 VP1이 연결된 형태의 융합 단백질의 오랑체를 제조하기 위한 벡터를 제작하였다(도 1의 7번 컨스트럭트).

[0090] 상기 제조예 1과 같이 pGEMEX-1(promega) 벡터를 기반으로 제작하였다.

[0092] 실험예

[0093] 상기 제조예, 실시예 및 비교예의 벡터를 대장균 Shuffle/T7/pLysS에 형질전환시켜 배양하였다. Shuffle/T7/pLysS는 BL21 star (DE3) pLysS One Shot™(Invitrogen™) competent 대장균에서 pLysS 플라스미드를 Mini-prep을 통해 추출하고 pLysS를 SHuffle®T7(NEB) competent 대장균에 도입한 후 pLysS에 포함되어 있는 항생제 마커인 클로람페니콜(chloramphenicol: CM)로 선별해서 만든 것이다. 모든 형질전환된 대장균은 50µg/ml의 암피실린(ampicillin) 및 34µg/ml의 클로람페니콜이 포함된 LB 배지에서 배양하였다. 배양 온도는 16 내지 37℃로 설정하였다. 대장균의 OD600값이 0.5 이상이 되면, T7 프로모터를 활성화시키기 위해 IPTG를 0µM 내지 1mM 수준으로 첨가하고, 단백질이 충분히 생산될 수 있도록, IPTG를 넣어준 이후부터 30℃에서는 3시간 또는 16 ~ 20℃에서는 16시간 정도를 배양하였다. 충분히 배양된 대장균은 원심분리하여 상등액을 제거한 후에 보관하였다. 그 다음, LB 배지의 5ml에 해당되는 대장균 수확물에 PBS 0.3ml을 넣고 초음파 분쇄를 하여, 용해물(lysate)을 만들었다. 그리고 용해물을 원심분리하여 용해 분획(soluble fraction)과 펠렛 분획(pellet fraction)으로 나누었고, 총 용해물(total lysate), 용해 분획(soluble fraction), 펠렛 분획(pellet fraction)을 구분하여 SDS-PAGE로 분석하였다.

[0094] 먼저 제조예 1의 벡터를 대장균에 도입하여 융합 단백질의 발현을 유도한 결과, 도 2와 같이, 정상적으로, 즉 예상되는 크기 및 수용성으로, 대량으로 발현되는 것으로 나타났다. 이는 오랑체형 독소 단백질과 NC 조합이 목적 단백질 융합 오랑체 제조를 위한 융합 파트너 용도로서 활용될 가능성이 있음을 보여준다.

[0095] 실시예 1의 벡터를 대장균에 도입하여 융합 단백질의 발현을 유도한 결과, 도 3과 같이, 정상적으로 발현되는 것으로 나타났다. 특히, LTB는 대장균에서 불용성으로 발현되어 정상적인 발현이 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 결과는 본 발명의 방식이 기존에 대장균에서 불용성으로 발현되는 단백질을 수용성으로 발현시킬 수 있음을 보여준다.

[0096] 실시예 2의 벡터를 대장균에 도입하여 융합 단백질의 발현을 유도한 결과, 도 4와 같이, 이 또한 정상적으로 발현되는 것으로 나타났다.

- [0097] 실시예 3의 박터를 대장균에 도입하여 융합 단백질의 발현을 유도한 결과, 도 5와 같이, 이 또한 정상적으로 발현되는 것으로 나타났다.
- [0098] 실시예 4의 박터를 대장균에 도입하여 융합 단백질의 발현을 유도한 결과, 도 6과 같이, 이 또한 정상적으로 발현되는 것으로 나타났다. 이 경우, 오량체형 독소 단백질, 목적 단백질 및 NC의 배치를 변경한 것이므로, 이러한 결과는 각 구성 요소의 배치를 변경하더라도 정상적인 발현이 가능함을 보여준다.
- [0099] 또한, 상기 제조예, 실시예 및 비교예의 각 박터의 발현 유도를 통한 생성물, 즉 오량체의 GM1 결합력을 조사하였다. 장독소(enterotoxin) 패밀리에 속하는 독소 단백질들은 장점막 표면에서 오량체를 형성하여 GM1 강글리오사이드 수용체에 결합할 수 있는 능력을 나타낸다. 그렇기 때문에 발현 생성물이 GM1 강글리오사이드와 결합할 수 있다는 것은 오량체가 잘 형성되었을 의미하며, 단백질이 단순히 수용성으로 발현되기만 한 것이 아닌, 제대로 구조가 형성된 것을 의미한다. 따라서 GM1 결합력 조사를 통해 이를 확인하고자 하였다.
- [0100] 구체적으로, GM1을 bicarbonate buffer(pH 9.6)에 희석하여 immuno plate(Maxisorp, Thermo Scientific)에 분주하고 4℃에서 16시간 정도 코팅하였다. 그 다음 PBS-T(Tween-20 0.1%)로 3번 세척하고, 발현 생성물 시료를 2배씩 희석(초기 희석 농도를 100nM로 맞추고 연속 희석)해서 준비한 후 각 웰에 넣고 GM1과 충분히 결합할 수 있도록 4시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 1차 항체로 anti-6His tag를 serum dilution buffer(PBS-T with 0.25% BSA)에 1:2,000으로 희석해서 플레이트의 각 웰에 넣고, 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 2차 항체로 anti-mouse(HRP conjugated)를 serum dilution buffer에 1:10,000으로 희석해서 플레이트의 각 웰에 넣고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 각 1, 2차 항체를 반응시킨 후 PBS-T로 세척하고, 2차 항체 반응 후 TMB(BD OptEIA TMB Substrate Reagent Set)을 각 웰에 넣어서 HRP의 발색을 유도하였다. 30분 후 2N Sulfuric acid를 넣어서 반응을 종료시킨 후 ELISA 리더기로 분석하였다.
- [0101] 제조예 1, 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1의 GM1 결합력을 조사한 결과, 도 7과 같이, 제조예 1 및 비교예 1에 비해 실시예들의 GM1 결합력이 우수한 것으로 나타났다.
- [0102] 제조예 1, 실시예 3, 실시예 4 및 비교예 2의 GM1 결합력을 조사한 결과, 도 8과 같이, 제조예 1 및 비교예 2에 비해 실시예들의 GM1 결합력이 우수한 것으로 나타났다.
- [0104] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.
- [0106] <서열목록>
- [0107] 서열번호 1
- [0108] 서열명칭 : Amino acid sequence of HIV nucleocapsid
- [0109] 서열타입 : AA
- [0110] 생물명 : human immunodeficiency virus
- [0111] 서열 :
- [0112] QRGNFRNQRKTVKFCNCGKEGHI AKNCRAPRKKGWCRCGREGHQMKDCTERQAN
- [0114] 서열번호 2
- [0115] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding HIV nucleocapsid
- [0116] 서열타입 : DNA
- [0117] 생물명 : human immunodeficiency virus
- [0118] 서열 :
- [0119] CAGCGGGGAACTTCAGGAACCAAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAAGGC TGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCCAAAC

- [0121] 서열번호 3
- [0122] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding HIV nucleocapsid
- [0123] 서열타입 : DNA
- [0124] 생물명 : synthetic construct
- [0125] 서열 :
- [0126] CAGCGTGGTAACTTCCGTAACCAGCGTAAAACCGTTAAATGCTTCAACTGCGGCAAAGAAGGCCACATCGCGAAAACTGCCGTGCGCCGCGTAAAAAAGGC
TGCTGGCGTTGCGGCCGTGAAGGCCACCAGATGAAAGATTGCACCGAACGTCAGGCGAAC
- [0128] 서열번호 4
- [0129] 서열명칭 : Amino acid sequence of heat-labile enterotoxin B subunit from Escherichia coli
- [0130] 서열타입 : AA
- [0131] 생물명 : Escherichia coli
- [0132] 서열 :
- [0133] APQTITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMVIIITFKSGETFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRITYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAISMK
N
- [0135] 서열번호 5
- [0136] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding heat-labile enterotoxin B subunit from Escherichia coli
- [0137] 서열타입 : DNA
- [0138] 생물명 : Escherichia coli
- [0139] 서열 :
- [0140] GCTCCCCAGACTATTACAGAACTATGTTTCGGAATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATACGGAATCGATGGCAGGCAAA
AGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGAAACATTTTCAGGTGGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAGAAAAAGCCATTGAAAGGATG
AAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAAATTGATAAATTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATCAATTGCGGCAATCAGTATGAAA
AAC
- [0142] 서열번호 6
- [0143] 서열명칭 : Amino acid sequence of cholera toxin B subunit from Vibrio cholerae
- [0144] 서열타입 : AA
- [0145] 생물명 : Vibrio cholerae
- [0146] 서열 :
- [0147] TPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMA
N
- [0149] 서열번호 7
- [0150] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding cholera toxin B subunit from Vibrio cholerae
- [0151] 서열타입 : DNA
- [0152] 생물명 : Vibrio cholerae
- [0153] 서열 :
- [0154] ACTCCGCAGAACATTACGGACCTGTGTGCGGAGTATCATAATACGCAGATTCACACTTTGAATGACAAGATTTTTTCATATACGGAGTCATTAGCTGGTAAA
CGTGAAATGGCAATTATCACTTTTAAAAATGGTGCGACGTTCCAGGTGGAAGTCCGGGCAGTCAGCATATTGATAGTCAGAAAAAGCCATCGAACGTATG
AAGGATACCTTGCGTATTGCGTACTTAACCGAGGCTAAAGTCGAGAAATTATGTGTCTGGAATAATAAGACCCACATGCCATTGCTGCGATTTCGATGGCC

AAT

[0156] 서열번호 8

[0157] 서열명칭 : Nucleotide sequence of fusion protein construct

[0158] 서열타입 : DNA

[0159] 생물명 : synthetic construct

[0160] 서열 :

[0161] ATGCAGCGGGGAACTTCAGGAACCAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAA
GGCTGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAACCGGATCCGCTCCCAGACTATTACAGAACTATGTTCCGAA
TATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATACGGAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGC
GAAACATTTAGGTCGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAGAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAG
ACCAAAATTGATAAATTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATGAAAAAC

[0163] 서열번호 9

[0164] 서열명칭 : Amino acid sequence of expected fusion protein

[0165] 서열타입 : AA

[0166] 생물명 : synthetic construct

[0167] 서열 :

[0168] MQRGNFRNQKTKVFCNKGEGHIAKNCRAPRKKGCWRCGREGHQMKDCTERQANGSAPQTI TELCSEYRNTQIYITINDKILSYTESMAGKREMIITFKSG
ETFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLITYLTETKIDKLCVWNKTPNSIAAISMKN

[0170] 서열번호 10

[0171] 서열명칭 : Nucleotide sequence of fusion protein construct

[0172] 서열타입 : DNA

[0173] 생물명 : synthetic construct

[0174] 서열 :

[0175] CAGCGGGGAACTTCAGGAACCAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAAGGC
TGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAACGAAAACCTGTATTTTCAGGGCCATCACCATCACCATCAGGAT
GATGATGATGGTACCGGATCCGCTCCCAGACTATTACAGAACTATGTTCCGGAATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATAT
ACGGAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGAAACATTTTCAGGTGGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAG
AAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAAATTGATAAATTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCA
ATTGCGGCAATCAGTATGAAAAACGATATCGGCTTAGGTCAGATGCTTGAATCCATGATTGATAACACAGTGCCTGAAACCGTAGGCGCAGCCACAAGCCGT
GACGCGCTGCCTAACACTGAAGCGTCTGGTCCGACGCACTCTAAAGAAATCCCGGCGCTGACCGCGGTTGAAACCGGTGCGACCAACCCGTTAGTTCCGTCT
GATACCGTTCAGACCCGTCACGTTGTTTCAGCACCGTTCTCGTAGCGAATCTAGCATTGAATCTTTCTTCGCGCGTGGTGCCTGCGTAACGATCATGACCGTT
GATAACCCAGCGAGCACCACAAACAAAGATAAATTATTCGCTGTTTGAAAAATCACCTACAAAGATACCGTTCAGCTGCGTCGTAACTGGAATCTTTCACC
TACTCTCGCTTCGACATGGAATTGACCTTCGTTGTTACCGCAACTTCACCGAAACCAACACCGTCACGCACTGAACCAGGTTTACCAGATCATGTACGTT
CCGCCGGGCGCGCGGTTCCGGAATAATGGGATGATTATACCTGGCAGACCAGCAGAACCCGAGCATCTTCTACACCTACCGTACCGCGCCGGCGCGTATC
AGCGTTCCGTACGTGGGCATCAGCAACGCGTATAGCCACTTCTATGACGGGTTTCAGCAAAGTTCCGCTGAAAGATCAGAGCGCGCGCTGGGCGATAGCCTG
TACGTTGCGGCGTCCCTGAACGATTTCCGTTATCCTGGCGGTGCGTGTGTGAACGATCACAACCCGACCAAGTGACCTCTAAATCCGTTTACCTGAAA
CCGAAACACATCCGTGTTTGGTGTCCGCGTCCGCCGCGTGCCTGCGTACTACGGTCCGGGCGTTGATTACAAAGATGGTACCCTGACCCCGCTGAGCACC
AAAGATCTGACCACCTAC

[0177] 서열번호 11

[0178] 서열명칭 : Amino acid sequence of expected fusion protein

[0179] 서열타입 : AA

- [0180] 생물명 : synthetic construct
- [0181] 서열 :
- [0182] QRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWRCGREGHQMKDCTERQANENLYFQGHHHHHHDDDDGTGSAPQTI TELCSEYRNTQIYTI NDKILSY
TESMAGKREMI I TFKSGETFQVEVPGSQHIDSQKKA IERMKDLRI TYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAISMKNDIGLQMLESIMIDNTVRETVGAATSR
DALPNTASGPTHSKEIPALTAVETGATNPLVPSDTVQTRHVQHRSRSESSIESFFARGACVTIMTVDNPASTTNKDKLFAVWKI TYKDTVQLRRKLEFFT
YSRFDMEITFVVTANFTETNNGHALNQVYQIMYVPPGAPVPEKWDDYTWTSSNPSIFYTYGTAPARISVPYVGISNAYSHFYDGF SKVPLKDQSAALGDSL
YGAASLNDFGILAVRVVNDHNPTKVTSKIRVYLKPKHIRVWCPRPPRAVAYYGPVDYKDGTLTPLSTKDLTTY
- [0184] 서열번호 12
- [0185] 서열명칭 : Nucleotide sequence of fusion protein construct
- [0186] 서열타입 : DNA
- [0187] 생물명 : synthetic construct
- [0188] 서열 :
- [0189] CAGCGGGGAAACTTCAGGAACAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAAGGC
TGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAAACGAAACCTGTATTTTCAGGGCCATCACCATCACCATCACGAT
GATGATGATGGTACCGGATCCACTCCGAGAACATTACGGACCTGTGTGCGGAGTATCATAATACGCAGATTCACACTTTGAATGACAAGATTTTTTCATAT
ACGGAGTCATTAGCTGGTAAACGTGAAATGGCAATTATCACTTTTAAAAATGGTGCAGCTTCCAGGTGGAAGTCCGGGCAGTCAGCATATTGATAGTCAG
AAAAAGCCATCGAACGTATGAAGGATACCTTGGCTATTGCGTACTTAACCGAGGCTAAAGTCGAGAAATATGTGTCTGGAATAATAAGACCCACATGCC
ATTGTGTCGATTTTCGATGGCCAATGATATCGGCTTAGGTCAGATGCTTGAATCCATGATTGATAACACAGTGGTGAACCGTAGGCGCAGCCACAAGCCGT
GACGCGCTGCCTAACACTGAAGCGTCTGGTCCGACGCACTCTAAAGAAATCCCGGCGCTGACCGCGGTTGAAACCGGTGCGACCAACCCGTTAGTTCCGTCT
GATACCGTTCAGACCCGTCACGTTGTTTCAGACCGTTCTCGTAGCGAATCTAGCATTGAATCTTTCTTCGCGCGTGGTGCCTGCGTAACGATCATGACCGTT
GATAACCCAGCGAGCACCACAAACAAAGATAAATTATTCGCTGTTTGGAAATCACCTACAAAGATACCGTTCAGCTGCGTCGTAAACTGGAATTTCTTACC
TACTCTCGCTTCGACATGGAATTGACCTTCGTTGTTACCGGAACTTCACCGAAACCAACACGGTCACGCACTGAACAGGTTTACCAGATCATGTACGTT
CCGCCGGCGCGCGGTTCCGGAATAATGGGATGATTATACCTGGCAGACCAGCAGAACCCGAGCATCTTCTACACCTACGGTACCGCGCCGCGCGTATC
AGCGTTCCGTACGTGGGCATCAGCAACGCGTATAGCCACTTCTATGACGGGTTTCAGCAAAGTTCCGCTGAAAGATCAGAGCGCGGCGCTGGGCGATAGCCTG
TACGGTGGCGGCTCCCTGAACGATTTCCGTATCCTGGCGGTGCGTGTGTAACGATCACAACCCGACCAAAGTGACCTCTAAATCCGTGTTTACCTGAAA
CCGAAACACATCCGTGTTTGGTGTCCGCGTCCGCCGCTGCGGTTGCGTACTACGGTCCGGGCGTTGATTACAAAGATGGTACCCTGACCCCGCTGAGCACC
AAAGATCTGACCACCTAC
- [0191] 서열번호 13
- [0192] 서열명칭 : Amino acid sequence of expected fusion protein
- [0193] 서열타입 : AA
- [0194] 생물명 : synthetic construct
- [0195] 서열 :
- [0196] QRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWRCGREGHQMKDCTERQANENLYFQGHHHHHHDDDDGTGSTPQNI TDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSY
TESLAGKREMAI I TFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA IERMKDLRI IAYL TEAKVEKLCVWNNKTPHIAAISMANDIGLQMLESIMIDNTVRETVGAATSR
DALPNTASGPTHSKEIPALTAVETGATNPLVPSDTVQTRHVQHRSRSESSIESFFARGACVTIMTVDNPASTTNKDKLFAVWKI TYKDTVQLRRKLEFFT
YSRFDMEITFVVTANFTETNNGHALNQVYQIMYVPPGAPVPEKWDDYTWTSSNPSIFYTYGTAPARISVPYVGISNAYSHFYDGF SKVPLKDQSAALGDSL
YGAASLNDFGILAVRVVNDHNPTKVTSKIRVYLKPKHIRVWCPRPPRAVAYYGPVDYKDGTLTPLSTKDLTTY
- [0198] 서열번호 14
- [0199] 서열명칭 : Nucleotide sequence of fusion protein construct
- [0200] 서열타입 : DNA
- [0201] 생물명 : synthetic construct
- [0202] 서열 :

[0203] CAGCGGGGAAACTTCAGGAACCAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAAGGC
TGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAAACGAAAACCTGTATTTTCAGGGCCATCACCATCACCATCACGAT
GATGATGATGGTACCGGATCCGCTCCCAGACTATTACAGAACTATGTTTCGGAATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATAT
ACGGAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGAAACATTTTCAGGTCGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAG
AAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAAATTGATAAATATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCA
ATTGCGGCAATCAGTATGAAAAACGATATCACCCTACCACCGGTGAAAGCGCAGACCCGGTAACTACTACCGTTGAAAACTACGGGGGCGAAACCCAAACG
GCGCGTCGTCTGCATACTGACGTAGCGTTTCGTGCTGGACCGCTTCGTAAACTGACCAACCGAAATCAACTCAGACACTTGATTTAATGCAGATCCCTTCC
CACACCTGGTGGGTGCTCTATTGCGATCTGCCACCTACTACTTCAGCGATCTGGAAGTTGCCCTGGTGCATACCGGGCCGGTTACCTGGGTTCCGAACGGC
GCTCCGAAACCGCACTCAACAACACCAATCCAACAGCATATCAGAAACAGCCGATCACCCTGCTGGCGCTGCCTTATACTGCCCCGATCGTGTCTG
AGCACGGTGTAACCGGTAAAACGACCTATGGCGAAGAATCGTCTCGTCTGGTGACCTGGCGCGGTGGCACGTCGCGTGAATAACCGCTGCCGACCTCT
TTCAACTACGGTGGGTAAAAGCCGATACCATCACCGAATGCTGATCCGTATGAAACGTGCGGAAACCTACTGCCGCGCCCGTTGCTGGCACTGGATACC
ACGCAGGATCGCCGTAAACAAAAATCATCGCACCGGAAAAACAGATGATC

[0205] 서열번호 15

[0206] 서열명칭 : Amino acid sequence of expected fusion protein

[0207] 서열타입 : AA

[0208] 생물명 : synthetic construct

[0209] 서열 :

[0210] QRGNFRNRKTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGWCRCGREGHQMKDCTERQANENLYFQGHHHHHHDDDDGTGSAPQTI TELCSEYRNTQIYTI NDKILSY
TESMAGKREMI I TFKSGETFQVEVPGSQHIDSQKKA I ERMKDLRI TYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAI SMKNDITTTGESADPVTITVENYGGTQT
ARRLHTDVAFLDRFVKLTQPKSTQTLDMQIPSHTLVGALLRSATYFSDLEVAL VHTGPVTWVPNGAPKTLNHNHTNPTAYKQPI ITRLALPYTAPHRVL
STVYNGKTTYGESSRRGLAALARRVNNRLPTSFNYGAVKADTI TELLI RMKRAETCYCPRLALDITTDQRRKQKI I APEKQMI

[0212] 서열번호 16

[0213] 서열명칭 : Nucleotide sequence of fusion protein construct

[0214] 서열타입 : DNA

[0215] 생물명 : synthetic construct

[0216] 서열 :

[0217] GCTCCCCAGACTATTACAGAACTATGTTTCGGAATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATACGGAATCGATGGCAGGCAAA
AGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGAAACATTTTCAGGTCGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAGAAAAAGCCATTGAAAGGATG
AAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAAATTGATAAATATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATGAAA
AACGGATCCACCACTACCACCGGTGAAAGCGCAGACCCGGTAACTACTACCGTTGAAAACTACGGGGGCGAAACCCAAACGGCGCGTCTGCTGCATACTGAC
GTAGCGTTTCGTGCTGGACCGCTTCGTAAACTGACCAACCGAAATCAACTCAGACACTTGATTTAATGCAGATCCCTTCCCACCCCTGGTGGGTGCTCTA
TTGCGATCTGCCACCTACTACTTCAGCGATCTGGAAGTTGCCCTGGTGCATACCGGGCCGGTTACCTGGGTTCCGAACGGCGCTCCGAAACCGCACTCAAC
AACCACACCAATCCAACAGCATATCAGAAACAGCCGATCACCCTGCTGGCGCTGCCTTATACTGCCCCGATCGTGTCTGAGCACGGTGTACAACGGTAAA
ACGACCTATGGCGAAGAATCGTCTCGTCTGGTGACCTGGCGCGCTTGGCACGTCGCGTGAATAACCGCTGCCGACCTCTTTCAACTACGGTGCGGTAAAA
GCCGATACCATACCGAACTGCTGATCCGTATGAAACGTGCGGAAACCTACTGCCGCGCGCCGTTGCTGGCACTGGATACCACGCAGGATCGCCGTAAACAA
AAAATCATCGCACCGGAAAAACAGATGATCGATATCCAGCGGGGAACTTCAGGAACCAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGGCCAC
ATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAAGGTGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAACAAGCTT
CATCACCATCACCATCAC

[0219] 서열번호 17

[0220] 서열명칭 : Amino acid sequence of expected fusion protein

[0221] 서열타입 : AA

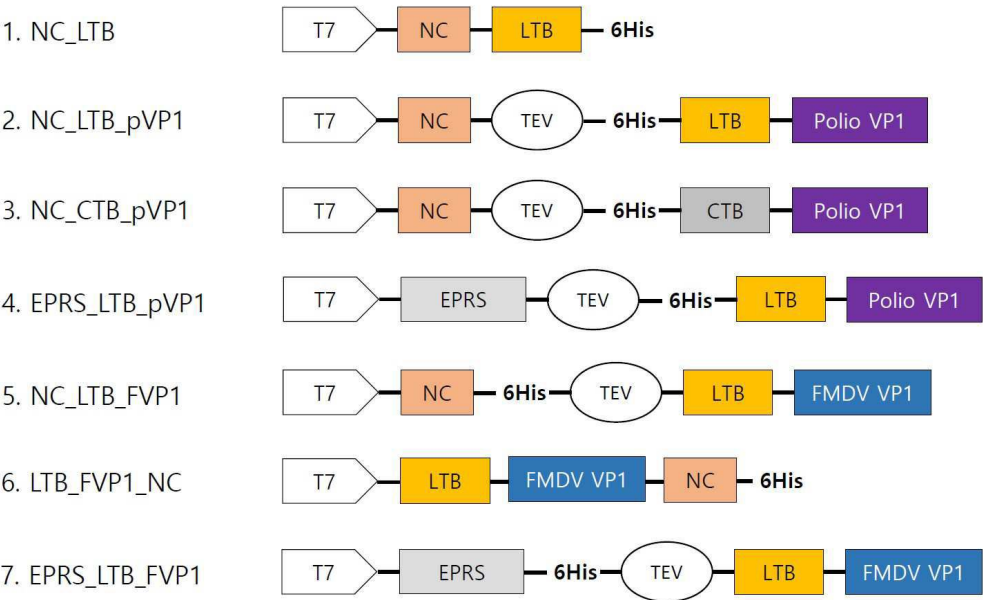
[0222] 생물명 : synthetic construct

[0223] 서열 :

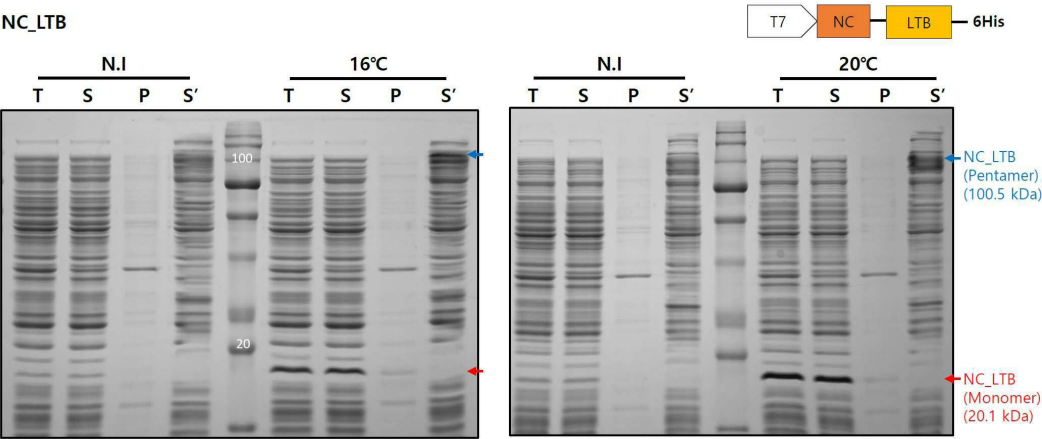
[0224] APQTITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMV I I TFKSGETFQVEVPGSQHIDSQKKA IERMKDTLRIT YLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAISMK
NGSTTTTGESADPVTTTVENYGGETQTARRLHTDVAFLDRFVKLTQPKSTQTLDLMQIPSHTLVGALLRSATYYFSDLEVALVHTGPVTWVPNGAPKTALN
NHTNPTAYQKQPITRLALPYTAPHRVLSTVYNGKTTYGEESSRRGDLAALARRVNNRLPTSFNYGAVKADTI TELLIRMKRAETYCPRPLLALDTTQDRRKQ
KIIAPEKQMIDIQRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGWCRCGREGHQMKDCTERQANKLHHHHHH

도면

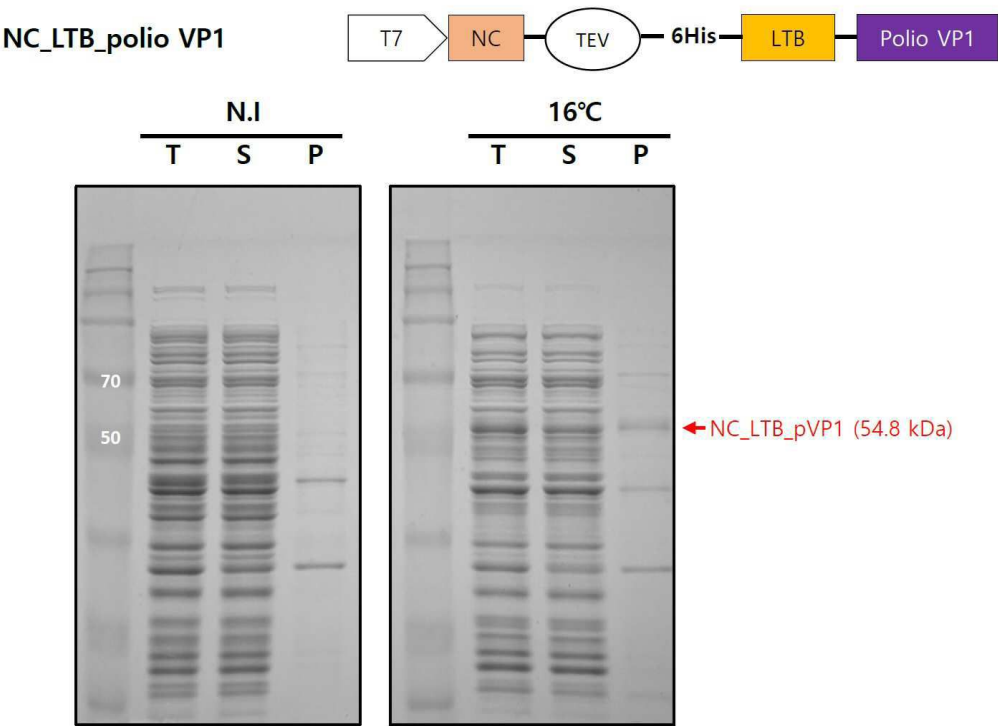
도면1



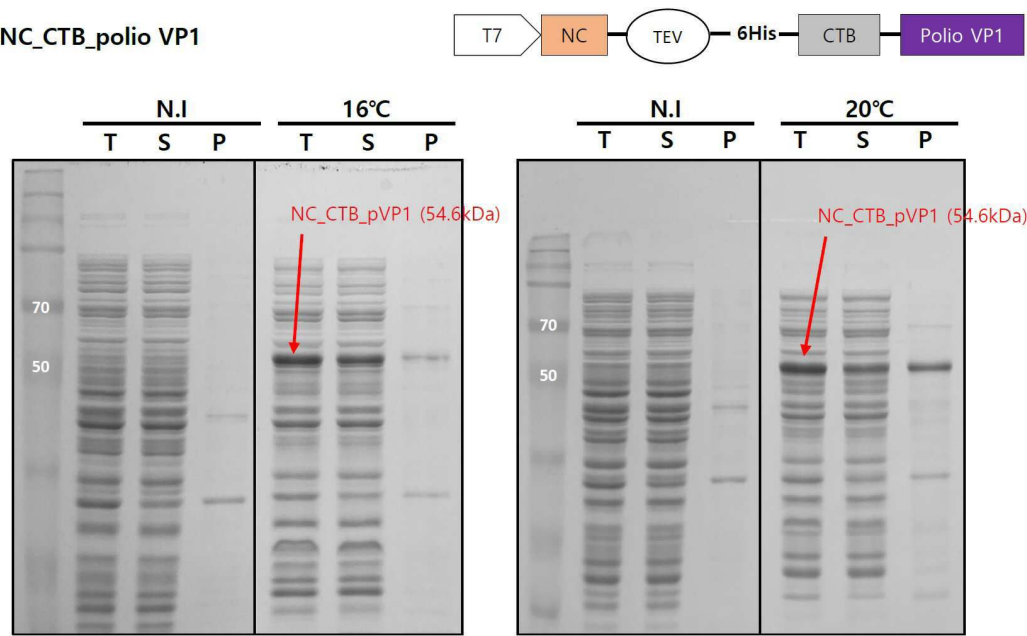
도면2



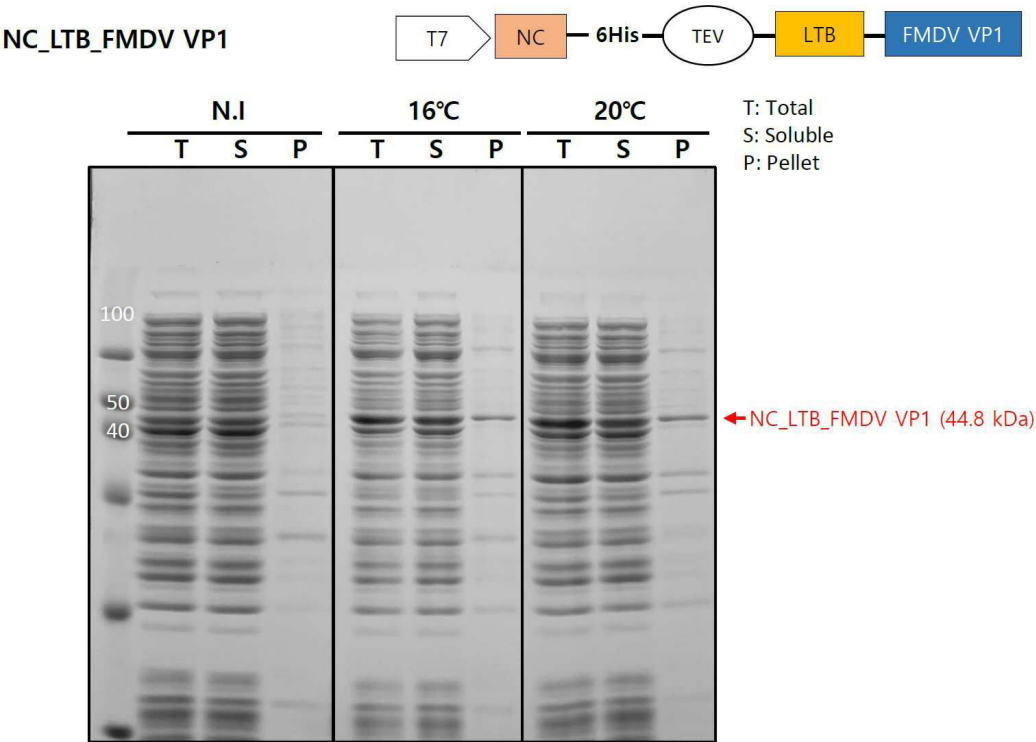
도면3



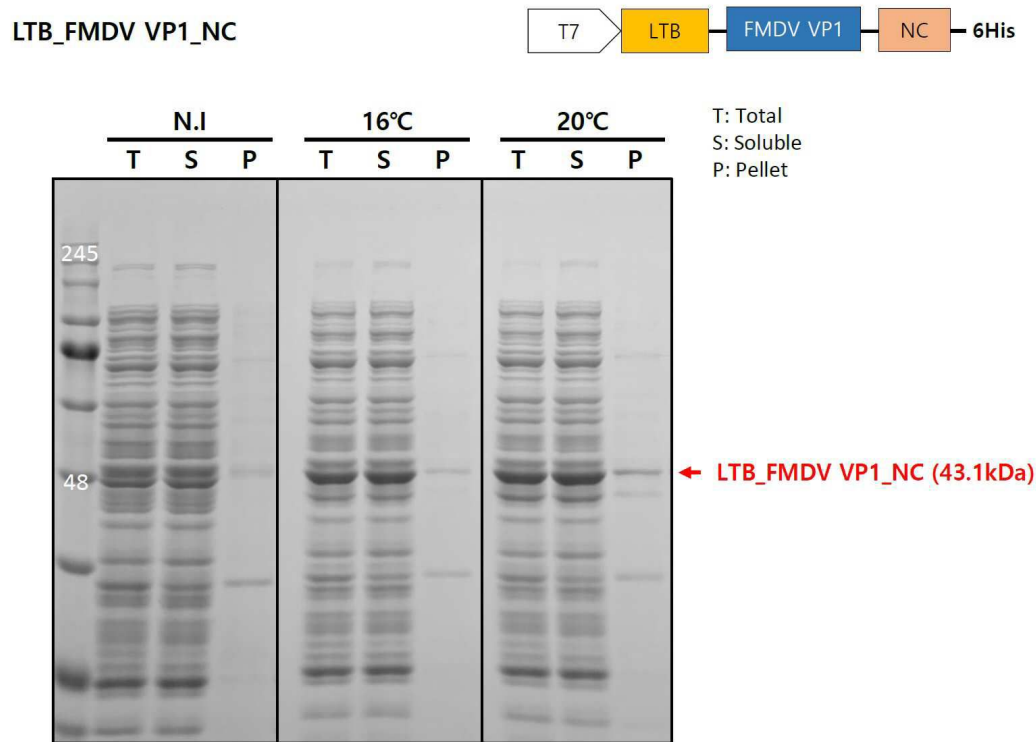
도면4



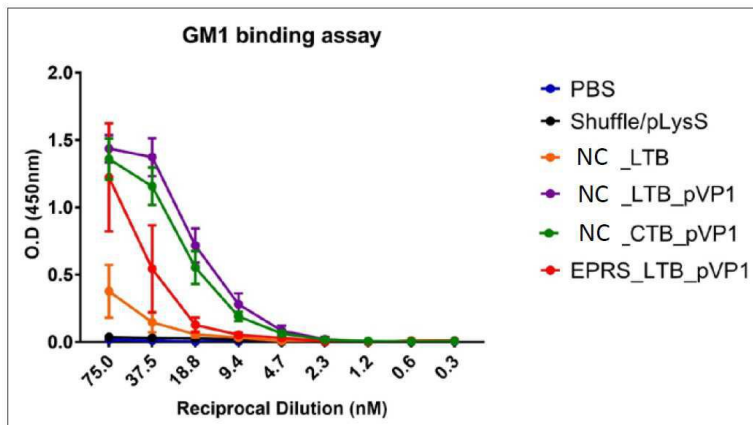
도면5



도면6

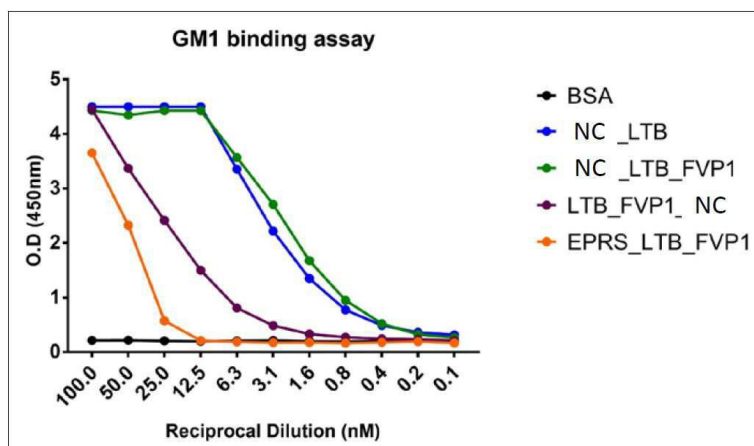


도면7



Coating	GM1
Protein.	300nM or 75nM, ½ serial dilution.
1 st Antibody	α-His (1:2,000)
2 nd Antibody	α-Mouse IgG (1:10,000)

도면8



Sample	Ni-NTA 정제 & 농축
Coating	GM1
Protein	100nM, ½ serial dilution.
1 st Ab	α-His (1:2,000)
2 nd Ab	α-Mouse (1:10,000)

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.