



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월25일

(11) 등록번호 10-2677201

(24) 등록일자 2024년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) **C07K 14/005** (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
(21) 출원번호 **10-2023-0066237**
(22) 출원일자 **2023년05월23일**
심사청구일자 **2023년05월23일**
(30) 우선권주장
1020220062790 2022년05월23일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
US20180244756 A1
US20210363194 A1
KR102076917 B1

(73) 특허권자
주식회사 백스다임
서울특별시 성동구 성수이로22길 37, 3층 306C호
(성수동2가)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
손명현
서울 강남구 삼성로 150 206동 1201호
박성현
인천광역시 계양구 안남로573번길 16, 5동 208호
(효성동, 뉴서울1차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 11 항

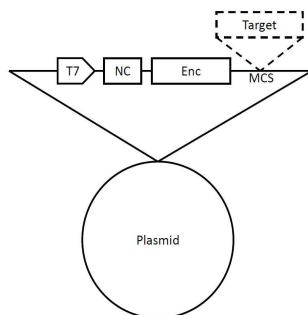
심사관 : 정이든

(54) 발명의 명칭 **바이러스 뉴클레오펙시드를 이용한 결정성 단백질 기반 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 플랫폼**

(57) 요약

본 발명의 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터는 목적 단백질의 융합 파트너로서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오펙시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 또한, 본 발명의 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 방법은 목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오펙시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터를 제작하는 단계; 상기 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/35 (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)

김승후

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

(72) 발명자

한재원

인천광역시 연수구 송도국제대로 261, 211동 3702
 호(송도동, 송도 더샵 센트럴시티)

김성재

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465039739
과제번호	HV23C0013000023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	신속범용백신기술개발
연구과제명	미래 West Nile Virus 팬더믹 대응을 위한 백신 개발 비임상 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	주식회사 백스다임
연구기간	2023.04.01 ~ 2024.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465037059
과제번호	HV22C0259
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병 예방·치료 기술개발(사업단)
연구과제명	백신자급화기술개발 공용활용기술개발 및 지원
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2022.07.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

목적 단백질의 융합 파트너로서 캡슐린 또는 페리틴인 결정성 단백질 및 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오택시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것인, 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오택시드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 벡터는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자를 대장균에서 생산하기 위한 것인, 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드는 결정성 단백질 및 상기 결정성 단백질의 N-말단에 결합된 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오택시드를 암호화하고 상기 결정성 단백질의 C-말단에 목적 단백질 암호화 부위 또는 목적 단백질을 결합하기 위한 클로닝 부위를 포함하는, 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터.

청구항 8

제1항, 제2항, 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 9

목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 캡슐린 또는 페리틴인 결정성 단백질 및 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오택시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터를 제작하는 단계;

상기 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것인, 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오키프시드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 숙주 세포는 대장균인, 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 방법.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 결정성 단백질, 상기 결정성 단백질의 N-말단에 결합된 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오키프시드 및 상기 결정성 단백질의 C-말단에 결합된 목적 단백질을 암호화하는, 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이러스 뉴클레오키프시드를 이용한 결정성 단백질 기반 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 플랫폼에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오키프시드를 융합 파트너로 이용하여 목적 단백질, 특히 대장균에서 불용성으로 발현되는 난발현 단백질이 융합되어, 예를 들어 면역적으로 의미있는 구조로 표면에 제시된, 자가 조립 나노 입자를 숙주 세포, 특히 대장균에서 효율적으로 제조할 수 있는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포 및 이를 이용한 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 감염성 질환에 대응하기 위한 백신 기술 중, 최근 개발된 기술로서 중합체 구조를 잘 형성하는 바이러스 유사입자(Virus-like Particle: VLP) 구조체에 외부 병원균 항원을 도입한 융합 바이러스 유사입자(chimeric VLP) 기술이 개발되었으며, 다양한 병원균을 대상으로 하는 백신 개발에 활용되어 왔다. 이는 다른 특정 바이러스의 구조 단백질 또는 자가 조립(self-assembling) 단백질로 구성된 VLP 기반 구조의 표면에 외부 병원균 항원을 표출시킨 형태를 띄고 있다.

[0004] VLP 기반 구조에 외부 항원을 도입하기 위해서는 화학적 결합(chemical conjugation) 또는 유전적 융합(genetic

fusion) 방식이 사용된다. 화학적 결합 방식은 이미 제조된 VLP 기반 구조에 별도로 제조된 외부 항원을 공유 결합을 통해 화학적 융합을 시키는 것으로서 일정한 방향으로의 항원 정배열에 어려움이 있으며 표출되는 항원의 밀집도가 상대적으로 낮다는 단점이 지적되고 있다. 반면, 유전적 융합 방식의 경우는 VLP 구조 형성 단백질의 유전자와 목적 항원 단백질의 유전자를 DNA 레벨에서 융합 발현시킴으로써 보다 단순한 공정으로 융합 바이러스 유사입자 제조가 가능하다는 장점이 있으나, 도입 가능한 외부 항원에 제약이 있다는 문제가 있으며, 특히 고효율 신속 생산을 위해 대장균 발현 시스템을 이용할 경우 전사 후 샤페론(post-translational chaperons)이나 전사 후 과정(posttranslational processing)의 부재로 인한 비정상적 단백질 발현 문제, 예를 들어 단백질이 불가용성 응집체로 형성되는 문제가 있어, 이를 해소하기 위한 기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2076917호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 주된 목적은 목적 단백질, 특히 대장균에서 불용성으로 발현되는 난발현 단백질이 융합되어, 예를 들어 면역적으로 의미있는 구조로 표면에 제시된, 자가 조립 나노 입자를 숙주 세포, 특히 대장균에서 효율적으로 제조할 수 있는 발현 벡터를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현 벡터로 형질전환되어 상기 자가 조립 나노 입자의 효율적인 제조를 실현할 수 있는 숙주 세포를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 벡터 및/또는 상기 숙주 세포를 이용하여 상기 자가 조립 나노 입자를 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 목적 단백질의 융합 파트너로서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오펙시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 상기 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오펙시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터를 제작하는 단계; 상기 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면 목적 단백질, 특히 대장균에서 불용성으로 발현되는 난발현 단백질이 융합되어, 특히 면역적으로 의미있는 구조로 표면에 제시된, 자가 조립 나노 입자를 숙주 세포, 특히 대장균에서 효율적으로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 결정성 단백질인 캡슐린 단백질의 예시로서 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 유래의 캡슐린의 구조를 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시형태에 따른 발현 벡터를 나타낸다. T7, T7 프로모터; NC, 바이러스 뉴클레오펙시드 암호화 부위; Enc, 캡슐린 암호화 부위; Target, 목적 단백질 암호화 부위; MCS, 다중 클로닝 부위.
- 도 3은 본 발명의 개략적인 개념을 나타낸다.
- 도 4는 자가 조립 나노 입자의 제조를 위한 융합 파트너로서 결정성 단백질과 바이러스 뉴클레오펙시드(NC) 조합의 활용 가능성을 조사하기 위한 융합 단백질 컨스트럭트를 나타낸다.
- 도 5 및 도 6은 본 발명의 일 실시형태에 따른 발현 벡터에서 융합 단백질 컨스트럭트 부위를 나타낸다.
- 도 7은 도 4의 융합 단백질 컨스트럭트를 대장균에서 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 8은 도 4의 융합 단백질 컨스트럭트 발현 생성물(자가 조립 나노 입자)을 투과전자현미경(transmission electron microscopy: TEM)으로 관찰한 결과를 나타낸다.
- 도 9는 도 4의 융합 단백질 컨스트럭트 발현 생성물(자가 조립 나노 입자)에 대한 크기배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography, SEC) 분석 결과를 나타낸다.
- 도 10은 도 4의 융합 단백질 컨스트럭트 발현 생성물(자가 조립 나노 입자)을 초저온 전자현미경(Cryo-EM)으로 관찰한 결과를 나타낸다.
- 도 11은 도 4의 융합 단백질 컨스트럭트 발현 생성물(자가 조립 나노 입자) 상에서 융합 단백질의 N-말단 및 C-말단 부위의 위치를 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 12는 도 5의 융합 단백질 컨스트럭트를 대장균에서 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 13은 도 5의 융합 단백질 컨스트럭트 발현 생성물(자가 조립 나노 입자)을 투과전자현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.
- 도 14는 도 5의 융합 단백질 컨스트럭트 발현 생성물(자가 조립 나노 입자)의 항원으로서의 기능을 조사한 결과를 나타낸다.
- 도 15는 도 6의 융합 단백질 컨스트럭트를 대장균에서 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 16은 도 6의 융합 단백질 컨스트럭트 발현 생성물(자가 조립 나노 입자)을 투과전자현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 목적 단백질의 융합 파트너로서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오펙시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터가 제공된다.
- [0019] 본 명세서에서 사용된 용어 "목적 단백질"(target protein)은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 제조용 벡터에 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 삽입하여 숙주 세포에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.
- [0020] 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.
- [0021] 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.
- [0022] 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.
- [0023] 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것이거나, 추후 목적 단백질을

을 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.

[0024] 본 발명은 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오펙시드를 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 나노 입자를 효율적으로 제조할 수 있다는 새로운 연구 결과를 바탕으로 한다.

[0025] 특히, 본 발명에서 융합 파트너로 사용하는 바이러스 뉴클레오펙시드는 그 크기가 매우 작기 때문에(짧은 길이의 펩타이드), 목적 단백질에 대한 간섭을 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 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 가능하면 작은 크기임에도 불구하고 목적 단백질의 수용성과 활성을 높이는 융합 파트너를 발굴하는 것이 매우 중요하다. 특히, 본 발명에서 융합 파트너로 사용하는 바이러스 뉴클레오펙시드는 그 크기가 매우 작기 때문에(짧은 길이의 펩타이드), 목적 단백질뿐만 아니라 목적 단백질 단량체의 자가조립(본 발명의 경우 나노 입자로의 자가조립)에 대한 구조적 간섭을 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 일반적으로 이러한 구조적 간섭을 피하기 위해 기존 기술의 경우 융합 단백질을 생산 후 이를 특이 절단 효소로 처리하여 융합 파트너의 제거가 필수적이며 따라서 고가의 효소 사용 및 추가적인 절단, 정제 공정 등에 따른 생산비용 증가가 애로사항으로 남아 있다. 본 발명에서는 기술적으로 이러한 문제를 획기적으로 개선할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명에 따르면 바이러스 뉴클레오펙시드 고유의 아연 결합 도메인(zinc binding domain)을 이용할 수 있다는 장점이 있다. 예를 들어, 바이러스 뉴클레오펙시드의 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.

[0027] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오펙시드는 기존에 알려진 바이러스 뉴클레오펙시드일 수 있으며, 본 발명의 활성, 즉 결정성 단백질과 함께 목적 단백질의 융합 파트너로서 작용하여 목적 단백질이, 특히 대장균에서, 수용성으로 발현되도록 하면서, 특히 면역적으로 의미있는 구조로 표면에 제시된, 자가 조립 나노 입자를 형성할 수 있도록 하는 활성이 유지되는 한 상기 바이러스 뉴클레오펙시드의 단편 또는 변이체일 수도 있다.

[0028] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오펙시드는 레트로바이러스, 예를 들어 HIV-1, SIV, MuLV 등과 같은 레트로바이러스의 뉴클레오펙시드일 수 있다.

[0029] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오펙시드는 바람직하게는 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus: HIV)의 뉴클레오펙시드이다.

[0030] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오펙시드는 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.

[0031] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오펙시드를 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 서

열 동일성을 만족하는 염기 서열을 포함한다.

- [0032] 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.
- [0033] 본 발명에서 결정성 단백질은 각각이 단위체로써 조립체, 예를 들어 케이지(cage) 형태의 복합 단백질을 형성할 수 있는 활성이 있는 단백질이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 예를 들어, 엔캡슐린(Encapsulin) 또는 페리틴(ferritin)을 사용할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서는 기존에 알려진 엔캡슐린 또는 페리틴은 물론 조립체, 예를 들어 케이지 형태의 복합 단백질을 형성할 수 있는 활성이 유지되는 한 상기 엔캡슐린 또는 페리틴의 단편을 사용할 수도 있다.
- [0035] 마이코박테리움 튜버클로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 썬모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*), 파이로코커스 푸리오서스(*Pyrococcus furiosus*), 믹소코커스 잔투스(*Myxococcus xanthus*) 등과 같은 생물 유래의 엔캡슐린을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 마이코박테리움 튜버클로시스 유래의 엔캡슐린을 사용한다.
- [0036] 본 발명에서 결정성 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.
- [0037] 본 발명에서 결정성 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.
- [0038] 본 발명의 발현 벡터는 원핵 및 진핵을 포함한 모든 생물 중에서 선택된 세포에서 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자를 생산하기 위한 것일 수 있으나, 바람직하게는 대장균속(*Escherichia*) 미생물에서 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자를 생산하기 위한 것이며, 보다 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)에서 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자를 생산하기 위한 것이다.
- [0039] 본 발명의 발현 벡터에서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오타이드를 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(결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오타이드 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.
- [0040] 일 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질의 융합 파트너로서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 상기 폴리뉴클레오타이드는 결정성 단백질 및 상기 결정성 단백질의 N-말단에 결합된 바이러스 뉴클레오타이드를 암호화하고 상기 결정성 단백질의 C-말단에 목적 단백질을 암호화 부위 또는 목적 단백질을 결합하기 위한 클로닝 부위를 포함한다. 이러한 구성에 따르면 목적 단백질은 나노 입자의 외부로 노출되고 바이러스 뉴클레오타이드는 나노 입자의 내부에 위치한 형태의 자가 조립 나노 입자를 제조할 수 있어, 특히 면역 반응을 위한 항원 제시 나노 입자를 제조하는데 효과적이다. 이러한 실시형태의 구체적인 예로서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 순서대로 프로모터, 바이러스 뉴클레오타이드 암호화 부위, 결정성 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.
- [0041] 다른 일 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질의 융합 파트너로서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클

레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 상기 폴리뉴클레오타이드는 결정성 단백질 및 상기 결정성 단백질의 N-말단에 결합된 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하고 상기 결정성 단백질과 상기 바이러스 뉴클레오캡시드의 사이에 목적 단백질 암호화 부위 또는 목적 단백질을 결합하기 위한 클로닝 부위를 포함한다. 이러한 실시형태의 구체적인 예시로서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 순서대로 프로모터, 바이러스 뉴클레오캡시드 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)), 결정성 단백질 암호화 부위 및 터미네이터가 작동 가능하게 연결된 컨스트럭트를 포함한다.

[0042] 또 다른 일 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질의 융합 파트너로서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 상기 폴리뉴클레오타이드는 결정성 단백질 및 상기 결정성 단백질의 N-말단에 결합된 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하고 상기 결정성 단백질의 C-말단 및 상기 결정성 단백질과 상기 바이러스 뉴클레오캡시드의 사이에 목적 단백질을 결합하기 위한 클로닝 부위를 포함한다. 이 경우 사용자가 목적 단백질을 결정성 단백질 C-말단에 위치시킬 것인지, 결정성 단백질의 N-말단에 위치시킬 것인지를 선택할 수 있다. 이러한 실시형태의 구체적인 예시로서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 순서대로 프로모터, 바이러스 뉴클레오캡시드 암호화 부위, 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 제1클로닝 부위(예를 들어 제한효소 인식 부위, 예를 들어 다중 클로닝 부위(MCS)), 결정성 단백질 암호화 부위, 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 제2클로닝 부위(예를 들어 제한효소 인식 부위, 예를 들어 다중 클로닝 부위(MCS)) 및 터미네이터가 작동 가능하게 연결된 컨스트럭트를 포함한다.

[0043] 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.

[0044] 상기과 같은 본 발명의 발현 벡터는 예를 들어 기존의 발현 벡터를 기반으로 통상적인 재조합 방식을 사용하여 제작할 수 있다.

[0045] 본 발명의 다른 일 실시형태에 따르면, 본 발명의 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 제공된다.

[0046] 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.

[0047] 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(electrophoration), 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.

[0048] 본 발명의 또 다른 일 실시형태에 따르면, 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자를 이중 또는 동종의 숙주 세포에서 효율적으로 제조할 수 있는 방법으로서, 목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 결정성 단백질 및 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터를 제작하는 단계; 상기 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조용 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조 방법이 제공된다.

[0049] 이때 발현 벡터에 관한 사항 및 발현 벡터의 도입에 관한 사항 등의 구체적인 사항은 앞서 기술된 사항을 참조할 수 있다.

[0050] 형질전환체의 배양을 위해 숙주 세포에 적합한 것으로 알려진 배양 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포가 대장균인 경우, LB(Luria-Bertani) 배지에서 16 내지 37°C의 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.

- [0052] 이하의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위해 제시한 것으로 하기 내용이 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0054] [실시예]
- [0055] 제조예 1
- [0056] 자가 조립 나노 입자의 제조를 위한 융합 파트너로서 결정성 단백질과 바이러스 뉴클레오캡시드(NC) 조합의 활용 가능성을 조사하기 위해, 결정성 단백질인 엔캡슐린의 N-말단에 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus: HIV)의 NC가 연결되고 이들 사이에 6개의 히스티딘 및 TEV(Tobacco Etch Virus) 프로테아제 절단 부위가 존재하는 형태로 발현시키기 위한 벡터를 제작하였다(도 4).
- [0057] 목적 단백질의 발현이 T7 프로모터에 의해 조절되도록 설계된 pGEMEX-1(Promega) 벡터를 기반으로 제작하였으며, 엔캡슐린을 암호화하는 서열로서 서열번호 5의 서열을 사용하였고, NC를 암호화하는 서열로서 서열번호 2(또는 서열번호 3)의 서열을 사용하였다.
- [0058] 제작된 벡터에서 상기 컨스트럭트 부위의 서열은 서열번호 8과 같고, 예상되는 발현 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 9와 같다.
- [0060] 실시예 1
- [0061] 결정성 단백질인 엔캡슐린의 N-말단에 NC가 연결되고 이들 사이에 6개의 히스티딘 및 TEV 프로테아제 절단 부위가 존재하고 엔캡슐린의 C-말단에 목적 단백질인 COVID19 RBD(receptor binding domain)가 연결된 형태의 융합 단백질의 자가 조립 나노 입자를 제조하기 위한 벡터를 제작하였다(도 5).
- [0062] 상기 제조예 1과 같은 방식을 사용하되, pGEMEX-1(Promega) 벡터의 MCS에 NC - 6X His tag - TEV 프로테아제 절단 부위 - 엔캡슐린 - 목적 단백질 컨스트럭트를 암호화하는 서열을 삽입하였다.
- [0063] 제작된 벡터에서 상기 컨스트럭트 부위의 서열은 서열번호 10과 같고, 예상되는 발현 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 11과 같다.
- [0065] 실시예 2
- [0066] 결정성 단백질인 페리틴의 N-말단에 목적 단백질인 독감 항원(H5N1 HA: H5gd)이 연결되고 독감 항원의 N-말단에 NC가 연결되고 NC와 독감 항원 사이에 6개의 히스티딘 및 TEV 프로테아제 절단 부위가 존재하는 형태의 융합 단백질의 자가 조립 나노 입자를 제조하기 위한 벡터를 제작하였다(도 6).
- [0067] 상기 제조예 1과 같은 방식을 사용하되, pGEMEX-1(Promega) 벡터의 MCS에 NC - 6X His tag - TEV 프로테아제 절단 부위 - 목적 단백질 - 페리틴 컨스트럭트를 암호화하는 서열을 삽입하였다.
- [0068] 제작된 벡터에서 상기 컨스트럭트 부위의 서열은 서열번호 12와 같고, 예상되는 발현 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 13과 같다.
- [0070] 실험예
- [0071] 상기 제조예 및 실시예의 벡터를 대장균 SHuffle/T7(NEB) 또는 SHuffle/T7/pLsS(NEB)에 형질전환시켜 배양하였다. SHuffle/T7/pLsS는 BL21 star (DE3) pLysS One Shot™vitrogen™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 50 μ g/ml의 암피실린(ampicillin) 단독 또는 50 μ g/ml 암피실린과 34 μ g/ml 클로람페니콜(chloramphenicol) 이 포함된 LB 배지에서 배양하였다. 배양 온도는 16 내지 37℃로 설정하였다. 대장균의 OD600값이 0.5 이상이 되면, T7 프로모터를 활성화시키기 위해 IPTG를 0 μ M 내지 1mM 수준으로 첨가하고, 단백질이 충분히 생산될 수 있도록,

IPTG를 넣어준 이후부터 37℃에서는 3시간 또는 25℃에서는 5시간 정도를 배양하였다. 충분히 배양된 대장균은 원심분리하여 상등액을 제거한 후에 보관하였다. 그 다음, LB 배지의 5ml에 해당되는 대장균 수확물에 PBS 0.3 ml을 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.

[0072] 먼저 제조예 1의 벡터를 대장균에 도입하여 융합 단백질의 발현을 유도한 결과, 도 7과 같이, 정상적으로, 즉 예상되는 크기 및 수용성으로, 대량으로 발현되는 것으로 나타났다. 이는 엔캡슐된 단백질과 NC 조합이 목적 단백질 융합 자가 조립 나노 입자 제조를 위한 융합 파트너 용도로서 활용될 가능성이 있음을 보여준다.

[0073] 또한, 상기 발현 유도를 통한 생성물을 투과전자현미경(transmission electron microscopy: TEM)으로 관찰한 결과, 도 8과 같이, 나노 입자 형태를 취하는 것으로 나타났다.

[0074] 또한, 상기 발현 유도를 통한 생성물에 대한 크기배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography, SEC)를 수행한 결과, 도 9와 같이, 일정한 크기 분포를 갖는 것으로 나타났다.

[0075] 또한, 상기 발현 유도를 통한 생성물을 초저온 전자현미경(Cryo-EM)으로 관찰한 결과, 도 10과 같이, 구 형태의 나노 입자 형태를 취하는 것으로 나타났으며, 추가로 초저온 전자현미경 촬영 후 융합 단백질의 N-말단 및 C-말단 부위의 위치를 분석한 결과, 도 11과 같이, 융합 단백질의 N-말단은 나노 입자의 내부에 C-말단은 나노 입자의 외부에 위치하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 NC를 엔캡슐된 N-말단에 연결시키고 목적 단백질로서 항원 단백질을 C-말단에 연결시킬 경우, 항원 단백질이 나노 입자의 외부에 노출되어 항원으로서 작용할 수 있으면서 NC는 나노 입자의 내부에 위치하도록 하여 불필요한 면역 반응 간섭을 방지할 수 있는 매우 효율적인 항원 나노 입자를 제조할 수 있음을 보여준다.

[0076] 실시예 1의 벡터를 대장균에 도입하여 융합 단백질의 발현을 유도한 결과, 도 12와 같이, 정상적으로, 즉 예상되는 크기 및 수용성으로, 대량으로 발현되는 것으로 나타났다.

[0077] 또한, 상기 실시예 1의 벡터의 발현 유도를 통한 생성물을 투과전자현미경(transmission electron microscopy: TEM)으로 관찰한 결과, 도 13과 같이, 나노 입자 형태를 취하는 것으로 나타났다.

[0078] 또한, 상기 실시예 1의 벡터의 발현 유도를 통한 생성물, 즉 자가 조립 나노 입자를 생쥐의 복강내(IP) 또는 근육(IM)으로 적정량을 접종하고 2주 뒤에 안와채혈을 통해 혈청을 얻은 후, ELISA를 수행하였다. 접종하는 횟수는 3회, 2주 간격으로 진행하였다. 이의 결과, 도 14와 같이, IgG 역가가 나타났다. 이는 본 발명의 방식에 따르면 목적 단백질이 본래의 구조를 잘 유지한 상태로 융합된 자가 조립 나노 입자를 제조할 수 있음을 보여준다.

[0079] 실시예 2의 벡터를 대장균에 도입하여 융합 단백질의 발현을 유도한 결과, 도 15와 같이, 정상적으로, 즉 예상되는 크기 및 수용성으로, 대량으로 발현되는 것으로 나타났다.

[0080] 또한, 상기 실시예 2의 벡터의 발현 유도를 통한 생성물을 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 도 16과 같이, 나노 입자 형태를 취하는 것으로 나타났다.

[0082] 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.

[0084] <서열목록>

[0085] 서열번호 1

[0086] 서열명칭 : Amino acid sequence of HIV nucleocapsid

[0087] 서열타입 : AA

- [0088] 생물명 : human immunodeficiency virus
- [0089] 서열 :
- [0090] QRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWRCGREGHQMKDCTERQAN
- [0092] 서열번호 2
- [0093] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding HIV nucleocapsid
- [0094] 서열타입 : DNA
- [0095] 생물명 : human immunodeficiency virus
- [0096] 서열 :
- [0097] CAGCGGGGAAACTTCAGGAACCAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAAGGC
TGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAAAC
- [0099] 서열번호 3
- [0100] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding HIV nucleocapsid
- [0101] 서열타입 : DNA
- [0102] 생물명 : synthetic construct
- [0103] 서열 :
- [0104] CAGCGTGGTAACTTCCGTAACCAGCGTAAACCGTTAAATGCTTCAACTGCGGCAAAGAAGGCCACATCGCGAAAACTGCCGTGCGCCGCGTAAAAAAGGC
TGCTGGCGTTGCGGCCGTGAAGGCCACCAGATGAAAGATTGCACCGAACGTCAGGCCAAC
- [0106] 서열번호 4
- [0107] 서열명칭 : Amino acid sequence of encapsulin from Mycobacterium tuberculosis
- [0108] 서열타입 : AA
- [0109] 생물명 : Mycobacterium tuberculosis
- [0110] 서열 :
- [0111] NNLYRDLAPVTEAAWAE IELEAARTFKRHIAGRVRVDVSDPGGPVTAAVSTGRL IDVKAPTNGVIAHLRASKPLVRLRVPFTLSRNEIDDVERGSKDSWEP
VKEAAKKLAFVEDRTIFEGYSAASIEGIRSASSNPALTLPEDPREIPDVISQALSELRLAGVDGPYSVLLSADVTKVSETSDHGYPIREHLNRLVDGDI IW
APAIDGAFVLTTTRGGDFDLQLGTDVAIGYASHD TDTVRLYLQETLTFLCYTAEASVALSH
- [0113] 서열번호 5
- [0114] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding encapsulin from Mycobacterium tuberculosis
- [0115] 서열타입 : DNA
- [0116] 생물명 : Mycobacterium tuberculosis
- [0117] 서열 :
- [0118] AATAACCTGTACCGGGACCTTGCAACAGTCACTGAGGCTGCGTGGGCCGAGATCGAGCTTGAGGCCGCACGTACGTTTAAGCGTCATATTGCGGGCCGTCGG
GTTGTGGATGTATCAGATCCTGGAGGTCCTGTAACCGCTGCGGTATCGACAGGCGTTTGATTGACGTAAAGGCTCCAACCAACGGTGTCATTGCCCACTTA
CGCGCCAGCAAGCCTTTAGTTTCGTTTAAGAGTGCCTTTACGTTAAGCCGGAACGAAATTGATGATGTGGAACGTGGGTCAAAGGACAGTGATTGGGAACCA
GTGAAAGAGGCGCGGAAGAAGTTGGCCTTCGTCGAAGATCGTACCATATTTGAAGGCTACTCCGTGCTTCCATAGAAGGGATTCCGTCCGCCTCCTCAAAT

CCAGCATTAACGCTGCCTGAAGACCCGCGGAGATTCTGATGTAATCTCACAGGCACCTTTCGGAATTACGTTTGGCAGGGGTCGATGGACCATACAGTGTT
CTTTTGTAGTCAGATGTATACCAAGGTGAGCGAGACCAGTGATCACGGCTATCCAATACGGGAACACCTGAACAGACTTGTGATGGCGACATAATCTGG
GCGCCCGCAATTGACGGCGCATTCGTGTTGACCACCCGTGGTGGTGATTTTGATTACAATTAGGCACCGATGTTGCGATTGGGTATGCGAGTCATGATACG
GACACTGTACGTTTGTATCTTCAAGAGACGCTGACGTTCTTATGTTACACCGCTGAGGCGTCCGTGGCGCTTTCGCAT

[0120] 서열번호 6

[0121] 서열명칭 : Amino acid sequence of ferritin from Escherichia coli

[0122] 서열타입 : AA

[0123] 생물명 : Escherichia coli

[0124] 서열 :

[0125] KGDTKVINYLNKLGLNELVAINQYFLHARMFKNWGLKRLNDVEYHESIDEMKHADRYIERILFLEGLPNLQDLGKLNIGEDVEEMLRSDLALELDGAKNLR
AIGYADSVHDYVSRDMMIEILRDEEGHIDWLETELDLIQKMGLQNYLQAQIREEG

[0127] 서열번호 7

[0128] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding ferritin from Escherichia coli

[0129] 서열타입 : DNA

[0130] 생물명 : Escherichia coli

[0131] 서열 :

[0132] AAAGGTGATACTAAAGTTATAAATTATCTCAACAACTGTTGGGAAATGAGCTTGTGCAATCAATCAGTACTTTCTCCATGCCGAATGTTTAAAACTGG
GGTCTCAAACGTCTCAATGATGTGGAGTATCATGAATCCATTGATGAGATGAAACACGCCGATCGTTATATTGAGCGCATTCTTTTCTGGAAGGTCTTCCA
AACTTACAGGACCTGGGCAAACTGAACATTGGTGAAGATGTTGAGGAAATGCTGCGTTCTGATCTGGCACTTGAGCTGGATGGCGCAAGAATTTGCGTGAG
GCAATTGGTTATGCCGATAGCGTTCATGATTACGTCAGCCGCGATATGATGATAGAAATTTTGCGTGATGAAGAAGGCCATATCGACTGGCTGGAACGGAA
CTTGATCTGATTAGAAGATGGGCTGCAAAATTATCTGCAAGCACAGATCCGCGAAGAAGGT

[0134] 서열번호 8

[0135] 서열명칭 : Nucleotide sequence of fusion protein construct

[0136] 서열타입 : DNA

[0137] 생물명 : synthetic construct

[0138] 서열 :

[0139] ATGCAGCGGGGAACTTCAGGAACCAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAA
GGCTGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAAAACCATCACCATCACCATCACGAAAACCTGTATTTTCAGGGT
GGATCCAATAACCTGTACCGGGACCTTGACCAGTCACTGAGGCTGCGTGGGCCGAGATCGAGCTTGAGGCCGCACGTACGTTTAAGCGTCATATTGCGGGC
CGTCGGGTTGTGGATGTATCAGATCTGGAGGTCTGTAAACCGTGCGGTATCGACAGGGCGTTTGATTGACGTAAAGGCTCAACCAACGGTGTCAATTGCC
CACTTACGCGCCAGCAAGCCTTAGTTCGTTTAAGAGTGCCCTTTACGTTAAGCCGGAACGAAATTGATGATGTGGAACGTGGGTCAAAGGACAGTGATTGG
GAACCAAGTGAAGAGGCGCGCAAGAAGTTGGCCTTCGTGAAGATCGTACCATATTTGAAGGCTACTCCGCTGCTTCCATAGAAGGGATTCCGTCCGCTCC
TCAAATCCAGCATTAACGCTGCCTGAAGACCCGCGGAGATTCTGATGTAATCTCACAGGCACCTTTCGGAATTACGTTTGGCAGGGGTCGATGGACCATAC
AGTGTTCTTTTGTAGTGCAGATGTATACCAAGGTGAGCGAGACCAGTGATCACGGCTATCCAATACGGGAACACCTGAACAGACTTGTGATGGCGACATA
ATCTGGGCGCCGCAATTGACGGCGCATTCGTGTTGACCACCCGTGGTGGTGATTTTGATTACAATTAGGCACCGATGTTGCGATTGGGTATGCGAGTCAT
GATACGGACACTGTACGTTTGTATCTTCAAGAGACGCTGACGTTCTTATGTTACACCGCTGAGGCGTCCGTGGCGCTTTCGCATGATATCGTCACAAGCTT
TGA

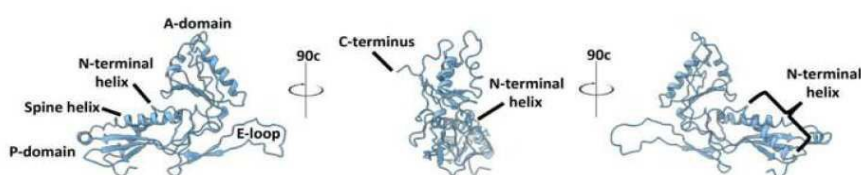
- [0141] 서열번호 9
- [0142] 서열명칭 : Amino acid sequence of expected fusion protein
- [0143] 서열타입 : AA
- [0144] 생물명 : synthetic construct
- [0145] 서열 :
- [0146] MQRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWRCGREGHQMKDCTERQANHHHHHHENLYFQGGSNLYRDLAPVTEAAWAEIELEAARTFKRHIAG
RRVVDVSDPGGPVTA AVSTGRL IDVKAPTNGVIAHLRASKPLVRLRPVFTLSRNEIDDERGSKSDWEVPVKEAAKKLAFVEDRTIFEGYSAASIEGIRSAS
SNPALTLPEDPREIPDVISQALSELRLAGVDGPYSVLLSADVYTKVSETSDHGYP IREHLNRLVDGDI IWAPAIDGAFVLTTRGGDFDLQLGTDVAIGYASH
DTDTVRLYLQETLTFLCYTAEASVALSHDIVDKL
- [0148] 서열번호 10
- [0149] 서열명칭 : Nucleotide sequence of fusion protein construct
- [0150] 서열타입 : DNA
- [0151] 생물명 : synthetic construct
- [0152] 서열 :
- [0153] CAGCGGGAAACTTCAGGAACCAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAAGGC
TGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAAAACGAAACCTGTATTTTCAGGGCCATCACCATCACCATCAGAT
GATGATGATGGTACCGATCCAATAACCTGTACCGGACCTTGACACAGTCACTGAGGCTGCGTGGGCCGAGATCGAGCTTGAGGCCGCACGTACGTTTAAG
CGTCATATTGCGGGCCGTCGGGTGTGGATGTATCAGATCCTGGAGGTCTGTAACCGCTGCGGTATCGACAGGGCGTTTGATTGACGTAAAGGCTCCAACC
AACGGTGTCAATGCCCATTACGCGCCAGCAAGCCTTTAGTTCGTTTAAAGAGTGCCCTTTACGTTAAGCCGGAACGAAATTGATGATGTGGAACGTGGGTCA
AAGGACAGTGATTGGGAACCAAGTGAAAGAGGCGGCGAAGAAGTTGGCCTTCGTCGAAGATCGTACCATATTTGAAGGCTACTCCGCTGCTTCCATAGAAGGG
ATTCGGTCCGCTCTCTAAATCCAGCATTAAACGCTGCCTGAAGACCCGCGAGATTCTGATGTAATCTCACAGGCACTTTCGGAATTACGTTTGGCAGGG
GTCGATGGACCATAACAGTGTCTTTTGAGTGCAGATGTATACCAAGGTGAGCGAGACCAGTGATCACGGCTATCCAATACGGGAACACCTGAACAGACTT
GTCGATGGCGACATAATCTGGGCGCCGCAATTGACGGCGCATTCGTGTTGACCACCCGTGGTGGTGATTTTGATTTACAATTAGGCACCGATGTTGCGATT
GGGTATGCGAGTCATGATACGGACACTGTACGTTTGTATCTTCAAGAGACGCTGACGTTCTTATGTTACACCGCTGAGGCGTCCGTGGCGCTTTCGCATGAT
ATCGTCGACAACATAACAAATCTATGTCCCTTTGGAGAAGTGTTTAAACGCGACCCGTTTGGCAGCGTTTACGCATGGAATCGCAAGCGCATTTCTAACTGC
GTGGCGGACTACAGCGTGCTGTATAATTCGCGTCGTTCTCTACGTTTAAATGCTACGGCGTGAGCCCGACTAAGTTGAATGATCTGTGTTTACCAATGTT
TACGTGACAGCTTTGTTATTCGTGGTGATGAGGTTTCGTGAGATTGCGCCAGGTCAGACCGGTAAATTCGCGGACTATAACTACAACTTCCGGATGATTTT
ACCGGCTGCGTCATCGCTGGAACCTCAACAACCTGGACTCGAAGGTGGGTGTAATTACAACCTACCTCAGACGTCTGTTCCGCAAGTCTAACCTGAAACCG
TTTGAACGTGACATCAGACCGAGATCTACCAAGCGGGTAGCACCCCGTGTAATGGCGTTGAAGGTTTCAACTGCTATTTCCGCTGCAGAGCTATGGCTTC
CAACCGACGAACGCGTGGGCTATCAACCGTATCGTGTGTCGTAAGCTTCGAGAACAAAGTCCGCTCCGGCAACCGTTTGGCGTCCG
- [0155] 서열번호 11
- [0156] 서열명칭 : Amino acid sequence of expected fusion protein
- [0157] 서열타입 : AA
- [0158] 생물명 : synthetic construct
- [0159] 서열 :
- [0160] QRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWRCGREGHQMKDCTERQANENLYFQGHHHHHHDDDDGTGSNNLYRDLAPVTEAAWAEIELEAARTFK
RHIAGRRVVDVSDPGGPVTA AVSTGRL IDVKAPTNGVIAHLRASKPLVRLRPVFTLSRNEIDDERGSKSDWEVPVKEAAKKLAFVEDRTIFEGYSAASIEG
IRSASSNPALTLPEDPREIPDVISQALSELRLAGVDGPYSVLLSADVYTKVSETSDHGYP IREHLNRLVDGDI IWAPAIDGAFVLTTRGGDFDLQLGTDVAI
GYASHDTDTVRLYLQETLTFLCYTAEASVALSHDIVDNI TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLNYSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNV
YADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKL PDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLRRLFRKSNLKPFERDISTE IYQAGSTPCNGVEGFNCFPLQSYGF

QPTNGVGYQPYRVVLSFENKSAPATVCGP

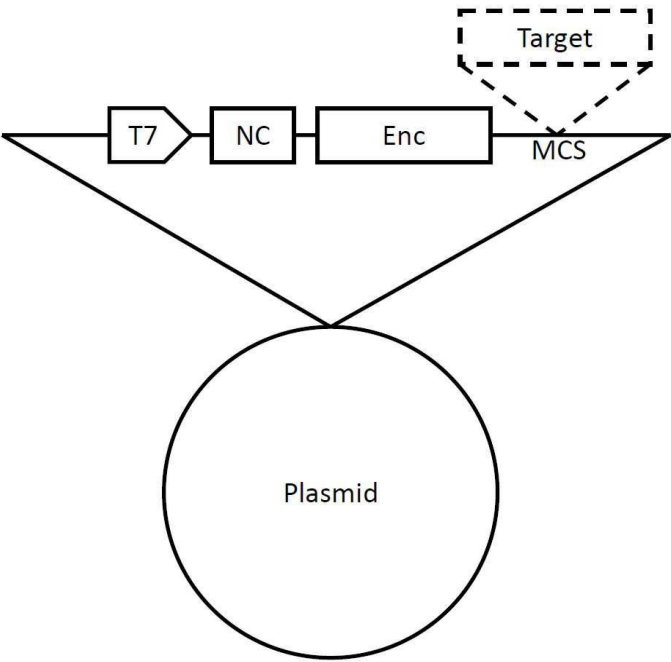
- [0162] 서열번호 12
- [0163] 서열명칭 : Nucleotide sequence of fusion protein construct
- [0164] 서열타입 : DNA
- [0165] 생물명 : synthetic construct
- [0166] 서열 :
- [0167] CAGCGGGGAAACTTCAGGAACCAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAAGGC
TGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAAACCATCATCATCATCATGAAAACTGTATTTTCAGGGTGGT
ACCGGATCCGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGG
TCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCAT
TTTGAGAAAAATCAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTGAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTT
AGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGAATT
CACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCAACCATATATTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAA
ATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAT
TTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGATATCGTCGACATGAAAGGTGATACTAAAGTT
ATAAATTATCTCAACAACTGTTGGGAATGAGCTTGTGCAATCAATCAGTACTTTCTCCATGCCCGAATGTTTAAAACTGGGGTCTCAAACGTCTCAAT
GATGTGGAGTATCATGAATCCATTGATGAGATGAAACACGCCGATCGTTATATTGAGCGCATCTTTTCTGGAAGGTCTTCCAACTTACAGGACCTGGGC
AAACTGAACATTGGTGAAGATGTTGAGGAAATGCTGCGTTCTGATCTGGCATTGAGCTGGATGGCGCGAAGAATTTGCGTGAGGCAATTGGTTATGCCGAT
AGCGTTCATGATTACGTCAGCCGCGATATGATGATAGAAATTTTGCCTGATGAAGAAGGCCATATCGACTGGCTGGAACGGAACCTGATCTGATTAGAAG
ATGGGCTGCAAAATTATCTGCAAGCACAGATCCGCGAAGAAGGT
- [0169] 서열번호 13
- [0170] 서열명칭 : Amino acid sequence of expected fusion protein
- [0171] 서열타입 : AA
- [0172] 생물명 : synthetic construct
- [0173] 서열 :
- [0174] QRGNFRNQRKTVKFCNCGKEGHI AKNCRAPRKGCWRCGREGHQMKDCTERQANHHHHHHENLYFQGGTSGVKPL ILRDCSVAGWLLGNPMCDEF INVPEW
SYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRINHFEDIQI IPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFVRNVWL IKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGI
HHPNDAAEQTRLVQNPITYISIGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFI APEYAYKI VKKGDSAIMKSELDIVDMKGDTKV
INYNKLLGNELVAINQYFLHARMFKNWGLKRLNDVEYHESIDEMKHADRYIERILFLEGLPNLQDLGKLNIGEDVEEMLRSDLALELDGAKNLREAI GYAD
SVHDYVSRDMMIE ILRDEEGHIDWLETELDIQKMGLQNYLQAQIREEG

도면

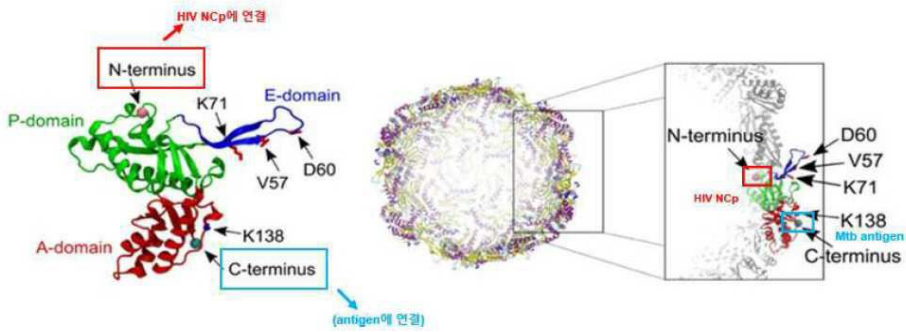
도면1



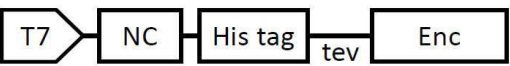
도면2



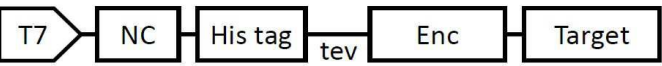
도면3



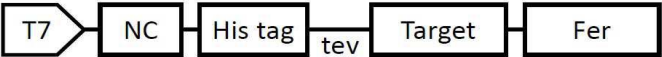
도면4



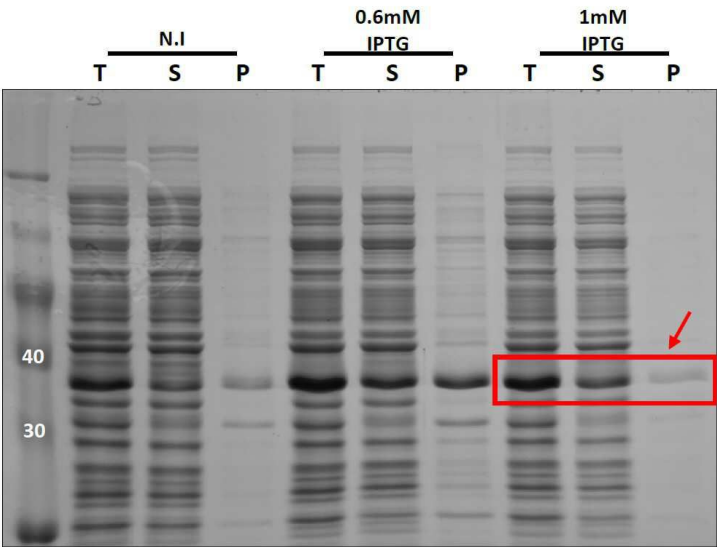
도면5



도면6

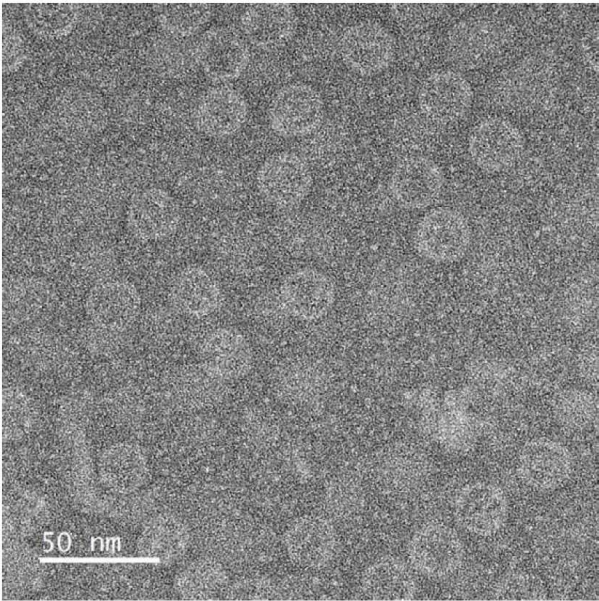


도면7

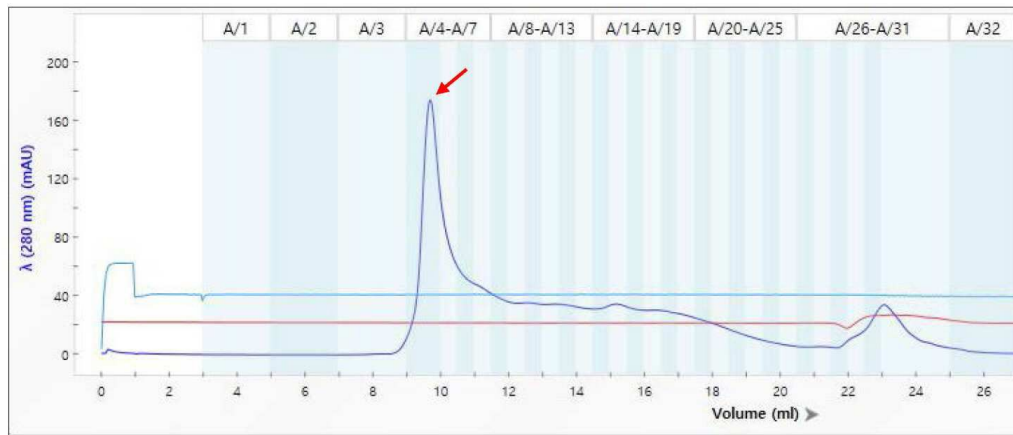


35~37 kDa predicted

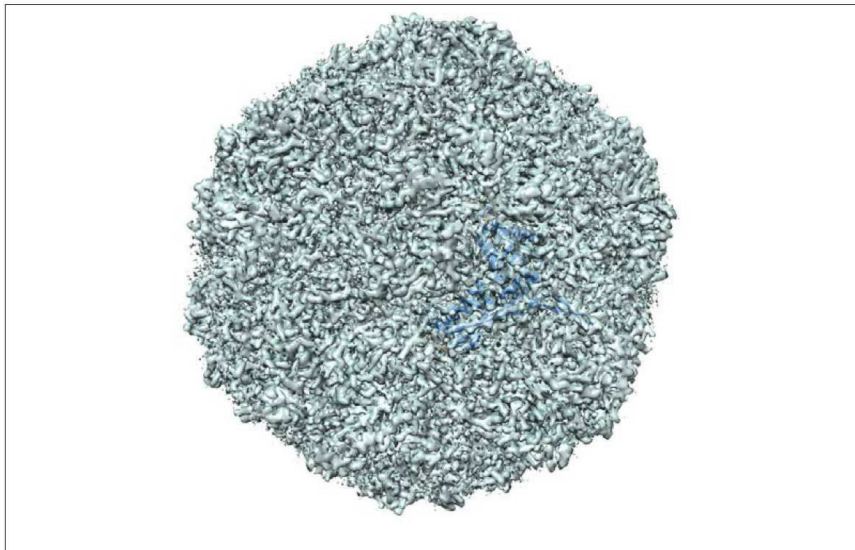
도면8



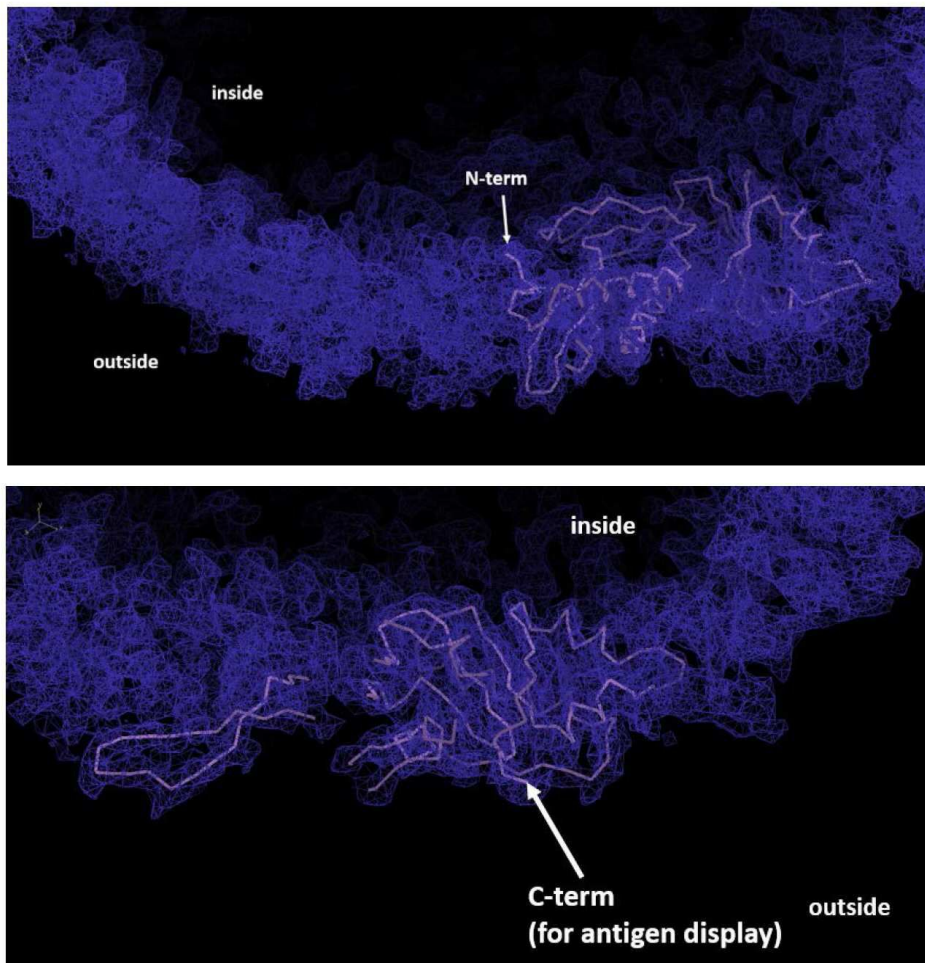
도면9



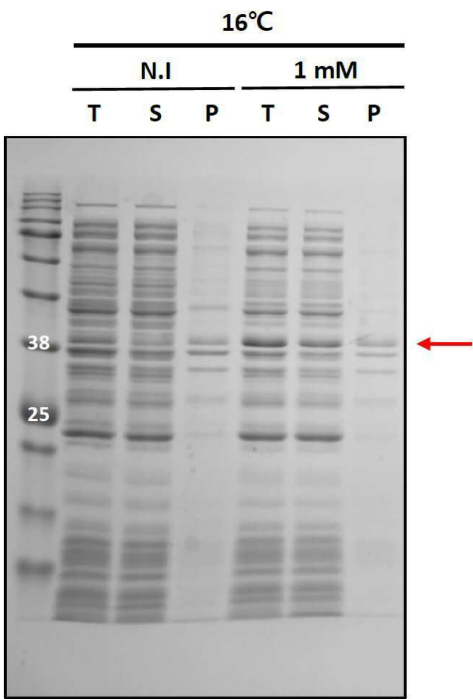
도면10



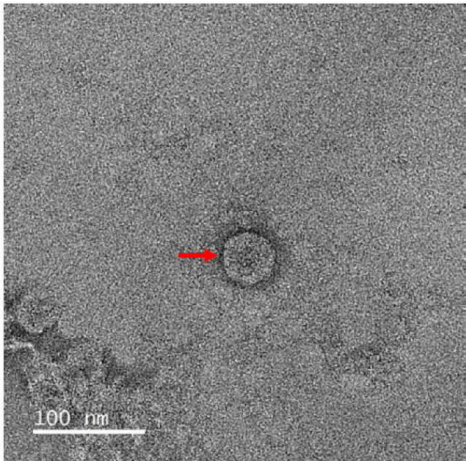
도면11



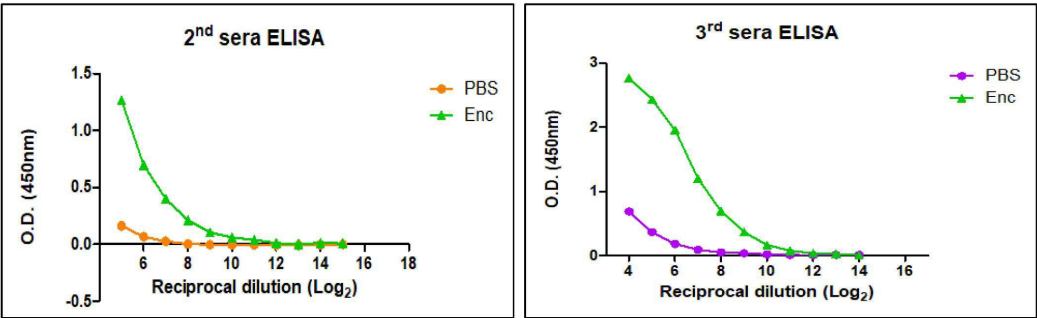
도면12



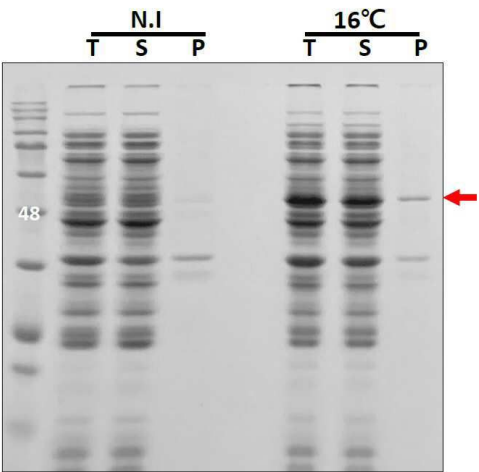
도면13



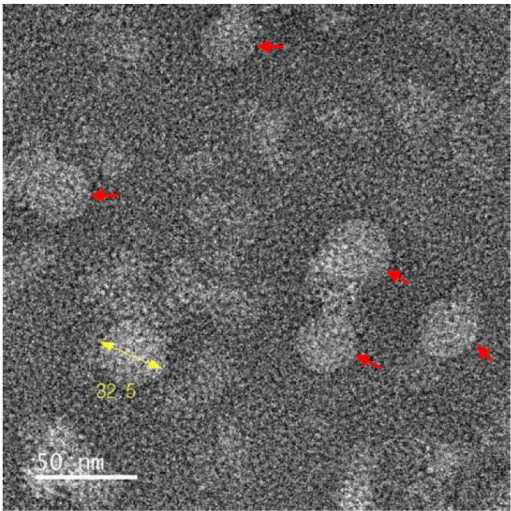
도면14



도면15



도면16



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.