



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월03일
 (11) 등록번호 10-1722742
 (24) 등록일자 2017년03월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) *C08J 3/075* (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01) *C08L 101/12* (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01) *C08L 63/08* (2006.01)
C08L 67/04 (2006.01) *C08L 71/02* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/43595 (2013.01)
C08J 3/075 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0079563(분할)
- (22) 출원일자 2016년06월24일
 심사청구일자 2016년06월24일
- (65) 공개번호 10-2016-0083826
- (43) 공개일자 2016년07월12일
- (62) 원출원 특허 10-2014-0102544
 원출원일자 2014년08월08일
 심사청구일자 2014년08월08일
- (56) 선행기술조사문헌
 Yun Jung Yang 등. NPG Asia Materials. Vol.5,
 e50, 페이지 1-7 (2013)

- (73) 특허권자
포항공과대학교 산학협력단
 경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
- (72) 발명자
차형준
 경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 1001호 (지곡동, 교수아파트)
- 양윤정**
 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 포항공과대학교
 환경공학동 303호 (지곡동)
- (74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **말미잘유래 재조합단백질을 포함하는 하이드로겔 제조용 조성물 및 이를 포함하는 하이드로겔의 생산방법**

(57) 요약

본 발명은 콜라겐 또는 실크와 유사한 서열적, 구조적 특성을 가지는 말미잘유래 재조합단백질의 생산방법, 이를 포함하는 단백질 기반 하이드로겔 제조용 조성물, 상기 말미잘유래 재조합단백질의 가공물을 포함하는 겔 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 말미잘유래 재조합단백질은 유전공학적 방법으로 대량생산 및 분리가 가능하고, 우수한 기계적 물성을 가지며, 물을 함유할 수 있을 뿐 아니라 3차원적 구조를 유지할 수 있다는 점에서 각막, 고막과 같은 인공 생체막을 비롯한 의료용 소재분야에 적용될 수 있고, 새로운 단백질 기반 소재로 이용 가능성이 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

- C08J 3/24* (2013.01)
- C08L 101/12* (2013.01)
- C08L 5/08* (2013.01)
- C08L 63/08* (2013.01)
- C08L 67/04* (2013.01)
- C08L 71/02* (2013.01)
- C07K 2319/20* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	D11013213H320000110
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	(재)한국해양과학기술진흥원
연구사업명	해양생명공학기술개발사업
연구과제명	TECHNOLOGY DEVELOPMENT OF MARINE INDUSTRIAL BIOMATERIALS
기 여 율	1/1
주관기관	포항공과대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 포함하는 겔(gel) 제조용 조성물의 가교화물을 포함하는 겔로서, 상기 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 반복단위가 1 내지 200회 반복하여 연결된 폴리펩티드를 포함하며, 상기 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 말미잘유래 재조합단백질인 것인 겔 제조용 조성물의 가교화물을 포함하는 겔.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 반복단위는 서열번호 2, 8, 10, 18, 및 19의 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군에서 1종 이상 선택된 것인, 겔 제조용 조성물의 가교화물을 포함하는 겔.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 폴리펩티드는 서열번호 34의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 것인, 겔 제조용 조성물의 가교화물을 포함하는 겔.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 말미잘유래 재조합단백질은 단백질의 C말단, N말단, 또는 양 말단에 His 태그(his tag), GST 태그(glutathione stransferase tag), 및 MBP 태그(maltose binding protein tag)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 추가로 연결된 것인, 겔 제조용 조성물의 가교화물을 포함하는 겔.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 인산, 아세트산, 포름산, 염산, 황산, 질산, 시트르산, 헥사플루오로아이소프로판올(hexafluoroisopropanol, HFIP), 헥사플루오로프로판올(hexafluoropropanol, HFP), HFA(hexafluoroacetone), 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA), 디아이소프로필 에틸아민(diisopropylethylamine), 및 메틸이미다졸리움 클로라이드(methylimidazolium chloride) 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매를 추가로 포함하는 것인, 겔 제조용 조성물의 가교화물을 포함하는 겔.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은,

PEO(poly-ethylene oxide), PEG (polyethylene glycol), PCL(polycaprolactone), PLA(poly-lactic acid), PLGA(poly-lactic-co-glycolic acid), PLLA(poly-L-lactide acid) 및 키토산으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 고분자 화합물;

알부미노이드(albuminoid); 또는

이들의 혼합물;

을 추가로 포함하는 것인, 겔 제조용 조성물의 가교화물을 포함하는 겔.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 알부미노이드는 케라틴, 글루텐, 락트알부민, 콜라겐, 및 이들의 재조합단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 겔 제조용 조성물의 가교화물을 포함하는 겔.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 겔은 경도가 0.01 내지 3.0 MPa이고, 강도가 10 내지 1000 kPa이며, 탄성력은 10 내지 150 %인 것인, 겔 제조용 조성물의 가교화물을 포함하는 겔.

청구항 9

말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 포함하는 겔(gel) 제조용 조성물을 가교화하는 단계를 포함하는 겔 생산 방법으로써,

상기 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 반복단위가 1 내지 200회 반복하여 연결된 폴리펩티드를 포함하며, 상기 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 말미잘유래 재조합단백질인 것인, 겔 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 가교화는 글루타알데하이드, 포름알데하이드, 카르보다이미드, 및 비스(설포숙신이미딜)수베레이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 가교제를 첨가하여 수행하는 것인, 겔 생산방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 가교화는 전자수용체 및 광반응성 금속 리간드를 첨가하여 재조합단백질에 포함된 타이로신 잔기가 광반응을 통해 다이-타이로신(di-tyrosine) 잔기를 형성하여 수행되는 것인, 겔 생산방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 전자수용체는 과황산염(persulfate), 과아이오딘산염(periodate), 과브롬산염(perbromate), 과염소산염(perchlorate), 비타민, 펜타아민클로로코발트, 암모늄 세륨 질산염, 옥살산(oxalic acid), 및 이디티에이(EDTA)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 겔 생산방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 광반응성 금속 리간드는 루테튬, 팔라듐, 구리, 니켈, 망간, 및 철로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 겔 생산방법.

청구항 14

서열번호 34 또는 서열번호 35의 아미노산 서열로 이루어진 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 조성물은 말미잘유래 실크유사 재조합단백질을 추가로 포함하고,

상기 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은 서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어진 반복단위가 1 내지 200회 반복하여 연결된 폴리펩티드를 포함하며, 상기 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 말미잘유래 재조합단백질인 것인, 겔.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 반복단위는 서열번호 37, 38, 45 및 47의 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군에서 1종 이상 선택된 것인, 겔.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 폴리펩티드는 서열번호 69의 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 것인, 겔.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 말미잘유래 재조합단백질을 포함하는 하이드로겔 제조용 조성물, 이를 이용한 하이드로겔의 생산방법 및 이를 포함하는 하이드로겔에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 하이드로겔이란 친수성의 팽창 가능한 고분자 망상구조를 뜻하며, 보통 30% 이상의 함유율을 보이는 것을 기본으로 하며 90% 이상의 함유율을 보이는 경우에는 고흡수성 하이드로겔이라 말할 수 있다. 하이드로겔은 물을 포집할 수 있으며, 안정한 삼차원 구조를 가지고 있어 세포 배양의 기본 지지체로서 높은 장점을 갖기 때문에 이를 이용한 생체공학적 응용연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0003] 1960년대 폴리-2-하이드록시에틸메타아크릴레이트(PHEMA)가 알려짐에 따라 화학합성폴리머를 기반으로 한 하이드로겔화에 대한 연구가 시작되었으며, 1980년 이후에는 칼슘알지네이트를 이용한 하이드로겔이 개발되면서 천연 유래의 고분자 물질에 대한 관심이 증대되었다. 이렇듯 하이드로겔은 생산에 이용되는 기본 물질에 따라 천연 하이드로겔(natural hydrogel)과 합성 하이드로겔(synthetic hydrogel)로 나뉠 수 있으며, 천연 하이드로겔의 경우, 콜라겐, 엘라스틴, 피브로인, 실크를 비롯한 단백질 기반의 하이드로겔과, HA, 알지네이트, 키토산, 텍스트란을 비롯한 다당류기반의 하이드로겔, 그리고 플라스미드를 이용한 DNA기반의 하이드로겔을 포함한다.

[0004] 합성 하이드로겔의 경우, 생분해가 가능한 PEG, PPF-PEG, PHEMA-PCL가 대표적인 예이며, 생분해가 불가능한 PHEMA, PHPMA, PNIPAm, PEGDA, PVA도 많이 쓰이고 있다. 또는 이들 간의 블렌딩을 통한 다양한 하이브리드 하이드로겔을 제조하여 보다 나은 특성을 지니는 하이드로겔을 생산하고자 하는 연구가 주를 이루고 있는 실정이다.

[0005] 또는 생반응의 성질을 추가적으로 도입함으로써 세포, 효소, 생육인자 등과 같은 특정 바이오 분자에 반응이 가능한 하이드로겔의 제조가 가능하다. 물리적 자극 (온도, 빛, 압력, 전기력)이나 화학적 자극 (이온, pH, 분자 인식)에 특이적으로 반응하는 반응성 하이드로겔은 센서, 진단, 마이크로채널, 약물전달의 기본 물질로도 이용될 수 있다. 특히, 생체공학적 연구에 응용 가능한 하이드로겔의 제조에 있어서는 세포와의 반응성, 세포의 부착 및 증식이 중요한 요인이 된다. 따라서 세포 부착능의 기능성 펩타이드를 도입함으로써 세포와의 반응을 증진시킬 수 있다. 일례로 fibronectin 유래(RGD, EILDV, LIGRKK, SPPRRARV, WQPPRARI, KQAGDV 등), vitronectin 유래 (GKKQRFRHRNRKG), bone sialoprotein 유래 (FHRRIKA), laminin 유래 (IKVAV, YIGSR, PDGSR, LRGDN, LRE, IKLLI 등), collagen 유래 (DGEA, GFOGER, GDR, GRD)등을 들 수 있으며, 위와 같은 기능성 잔기를 화학합성기반의 폴리머에 도입하는 선행연구는 이미 많이 알려져 있다.

[0006] 단백질기반 폴리머의 경우, 화학적 폴리머에 비해 생분해성이 높고, 세포와의 반응성이 보다 뛰어나다는 장점이 있어 재조합단백질 또는 자연추출 단백질 기반의 하이드로겔의 중요성이 높아지고 있으나, 폴리머 기반의 하이드로겔에 비해 기계적 물성이 약하다는 단점이 있다.

[0007] 3차원적 공간을 생체조직이 재생되는 동안 하이드로겔이 형태를 유지하기 위해서는 기계적 특성은 중요한 요소이다. 하이드로겔의 기계적 특성은 단백질의 농도, 가교방법, 가교제의 종류, 가교제의 농도, 후처리 방법 등 다양한 요소에 의해 좌우될 수 있다. 뿐만 아니라 하이드로겔을 위한 단백질 재료의 선택에 따라 유도되는 기계

적 물성 역시 다르다. 일례로, 구조단백질인 실크 또는 콜라겐 기반의 하이드로겔의 기계적 물성은 상대적으로 높은 수치이다. 그럼에도 불구하고, 기계적 물성을 증가시키기 위한 겔 소재의 다양한 탐색은 상대적으로 부족하였다.

[0008] 구조단백질의 대표적인 예인 콜라겐은 우리 몸을 구성하는 결합조직의 주성분으로써 세포외기질의 기본 뼈대이다. 콜라겐은 자연상에서 추출을 통하여 얻을 수 있으나, 타 동물에서 유래한 이중면역의 문제 및 단백질 추출 및 분리의 어려움으로 인해 높은 가격을 감수해야 하는 문제가 있다. 대안으로 재조합콜라겐을 생산하려는 시도가 있었으나, 콜라겐이 가지고 있는 특이한 삼중나선구조와 변형된 하이드록시프롤린(hydroxyproline)을 인위적으로 모사 하기가 쉽지 않다.

[0009] 또 다른 구조단백질인 실크단백질의 경우, 누에에서 대량 얻을 수 있으나, 거미실크에 비해 물성적 강도가 낮다. 거미실크의 경우, 거미의 서로 잡아먹는 본성으로 인해 대량사육이 불가하여 자연적으로 많은 양을 얻는 데에는 한계가 있다. 누에와 거미의 반복서열은 크기가 커서 대장균 시스템 하에서는 재조합단백질로 생산하기도 어렵다. 따라서 많은 연구들이 물성에 영향을 주는 반복서열의 일부를 발현시키려고 하거나, 이들의 발현 후 가교방법을 통해 물성을 증진시키려는 연구가 있었다.

[0010] 2000년대에 들어서는 실크단백질이 종과 종류에 따라 물성적 차이가 있음이 알려지게 되면서 보다 다양한 종(種)의 누에와 거미에서 유래한 실크에 대한 연구가 보고되기 시작하였다. 거미의 경우, dragline 실크에 국한된 실크연구가 flagelliform, cylindriform까지 넓어지게 되었다. 이와 더불어 실크 또는 실크유사 단백질이 누에와 거미뿐 아니라 거미, 벌, 개미, 잠자리, 및 메뚜기 등의 곤충들과, 홍합, 진주조개, 키조개 및 새우 등의 해양생물에 존재하고 있음이 밝혀졌다. 새로운 구조와 서열의 다양한 단백질이 알려졌음에도 불구하고, 상기 곤충 및 해양생물은 사육이 불가능하고, 얻어지는 실크단백질 양이 미미하여 자연유래 추출로는 실직한 이용이 불가능하다. 대안으로 제시되는 재조합단백질 생산기술은 자연상에 존재하지만 발현에 어려운 새로운 단백질의 발견 및 응용을 가능하게 할 대안 중 하나이다. 이미 의료용, 산업용을 목적으로 하는 효소 및 항체, 유용 단백질 생산이 성공적으로 마무리된 사례가 있다. 상기 기술을 이용하면 100 kDa 이상 크기를 갖는 고분자량 단백질의 사슬길이를 대장균, 효모 또는 동물세포와 같은 생명체내에서 자유롭게 조절할 수 있다. 재조합단백질 생산기술을 기반으로 한 반복서열 구조단백질의 발현 및 생산은 자연 유래의 유용한 유전서열을 실용화시킬 수 있을 뿐 아니라, 알려지지 않았던 단백질의 다양한 구조와 특성을 발휘할 수 있다. 무엇보다도 물성에 한계를 보였던 단백질기반의 하이드로겔 제조에 있어, 보다 향상된 기계적 물성을 이끌어내는 방법이 될 수 있다.

[0011] 단백질 기반 소재 연구는 미국, 호주, 일본 등 선진국에서는 이미 많은 연구가 이루어졌다. 개미실크, 레질린과 같은 새로운 단백질의 탐색뿐 아니라 실크-엘라스틴 융합단백질의 생산을 통해 기존의 있었던 단백질 재료의 발전을 도모하고 있다. 새로운 유전서열의 발견과 응용은 기본에 알려지지 않았던 구조적, 기계적, 물리화학적 특성을 기반으로 적용분야를 넓힐 수 있을 뿐 아니라, 원천소재를 확보함으로써 선두그룹으로서의 연구적 우위를 점할 수 있다는 데에 의의가 있다. 무엇보다 해양에 존재하는 생물체에 관한 적은 정보와 응용사례는 해양 유래 생물체에서 유래한 신소재 발굴의 중요성과 높은 잠재성을 알려준다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명에서는 말미잘유래 실크유사단백질과 콜라겐유사단백질을 토대로 새로운 서열을 탐색한 결과, 반복서열 재조합단백질을 발현 및 정제하며, 상기 단백질의 겔화를 통해 소재의 제제화를 달성하고, 이들의 기계적 물성의 우수함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 말미잘유래 실크유사단백질 및 콜라겐유사단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 단백질을 포함하는 겔 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 가교화하는 단계를 포함하는 겔 생산방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질의 가교물을 포함하는 겔을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일구현에는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 및/또는 콜라겐유사 재조합단백질을 포함하는 겔 제조용 조성물, 상기 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 및/또는 콜라겐유사 재조합단백질을 이용한 겔 제조방법 및

겔에 관한 것이다.

- [0017] 본 발명에서는 말미잘의 촉수와 피부에 주로 존재하는 유래한 실크와 콜라겐유사 단백질을 바탕으로 하이드로겔을 제조하고, 생체조직공학용 소재로서의 가능성을 확인하였다. 말미잘유래 실크유사단백질은 거미실크단백질의 일종인 flagelliform 과, 말미잘유래 콜라겐유사단백질은 콜라겐과 서열적, 구조적 상동성을 가짐을 확인한 바 있다. 말미잘유래 실크유사단백질은 약 5%의 타이로신을 함유하고 있으며, 말미잘유래 콜라겐유사단백질은 약 10%의 높은 타이로신 함유량을 가지고 있다. 따라서 타이로신을 기반으로 한 단백질의 광가교를 통하여 다이타이로신(di-tyrosine)잔기를 유도해 낼 수 있으며, 이와 같은 공유결합의 유도는 단백질기반 하이드로겔의 겔화를 가능하게 하며 보다 높은 기계적 물성을 유도하는 방안이 될 수 있다.
- [0018] 구체적으로, 본 발명은 말미잘유래 재조합단백질, 예컨대 말미잘유래 실크유사 재조합단백질과 콜라겐유사 재조합단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 단백질을 포함하는 겔 제조용 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 콜라겐유사 재조합단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 반복단위로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상, 예를 들면 5종의 반복단위가 총 1 내지 200회, 바람직하게는 5 내지 120회 반복하여 연결된 폴리펩티드를 포함하며, 상기 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 단백질을 포함하는 겔 제조용 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 상기 실크유사 재조합단백질은 서열번호 36의 아미노산 서열을 갖는 반복단위로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상, 예를 들면 4종의 반복단위가 총 1 내지 200회, 바람직하게는 5 내지 120회 반복하여 연결된 폴리펩티드를 포함하며, 상기 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 단백질을 포함하는 겔 제조용 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 상기 콜라겐유사 재조합단백질의 반복단위는 서열번호 2 내지 33의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2, 8, 10, 18, 및 19의 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군에서 선택된 반복단위일 수 있다.
- [0022] 상기 실크유사 재조합단백질의 반복단위는 서열번호 37 내지 68의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 37, 38, 45 및 47의 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군에서 선택된 반복단위일 수 있다.
- [0023] [서열번호 1]
- [0024] G-L-Xaa₁-V-Xaa₂-Y-Xaa₃-P-Xaa₄-Xaa₅
- [0025] 상기 서열에서, Xaa₁=P or Q, Xaa₂=L or F, Xaa₃=P or T, Xaa₄=S or T, 또는 Xaa₅=N or I일 수 있다.
- [0026] [서열번호 36]
- [0027] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-N-T-G-Xaa₄-P-Xaa₅-Q
- [0028] 상기 서열에서, Xaa₁=G or D, Xaa₂=P or S, Xaa₃=G or S, Xaa₄=Y or C, 또는 Xaa₅=G or W일 수 있다.
- [0029] 상기 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열이 1회 이상 연결된 폴리펩티드, 바람직하게는 1 내지 200회 사이에서 연결된 폴리펩티드, 더욱 바람직하게는 1 내지 120회 사이에서 연결된 폴리펩티드일 수 있다. 또한 상기 1 내지 200회 또는 1 내지 120회 사이에 다른 아미노산 서열이 포함되어 연결된 폴리펩티드일 수 있다.
- [0030] 예를 들면 상기 콜라겐유사 재조합단백질은 서열번호 34 또는 35의 아미노산 서열을 포함하며, 서열번호 34 또는 35로 기재된 아미노산과 80% 이상의 서열 상동성을 가지는 것을 특징으로 하는 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 제공한다. 바람직하게는 상기 서열번호 서열번호 34 또는 35로 기재된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 것을 특징으로 하는 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 제공한다.
- [0031] 상기 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은 서열번호 36의 아미노산 서열이 1회 이상 연결된 폴리펩티드, 바람직하게는 1 내지 200회 사이에서 연결된 폴리펩티드, 더욱 바람직하게는 1 내지 120회 사이에서 연결된 폴리펩티드일 수 있다. 또한 상기 1 내지 200회 또는 1 내지 120회 사이에 다른 아미노산 서열이 포함되어 연결된 폴리펩티드일 수 있다.
- [0032] 예를 들면 상기 실크유사 재조합단백질은 서열번호 69 또는 70의 아미노산 서열을 포함하며, 서열번호 69 또는

70으로 기재된 아미노산 서열과 80% 이상의 서열상동성을 가지는 것을 특징으로 하는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질을 제공한다. 바람직하게는 상기 서열번호 69 또는 70으로 기재된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열상동성을 가지는 것을 특징으로 하는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질을 제공한다.

- [0033] 본 발명의 일구현에는, 상기 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 및/또는 콜라겐유사 재조합단백질을 가교화하는 단계를 포함하는 겔 생산방법을 제공하는 것이다.
- [0034] 본 발명의 추가 구현에는 상기 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 및/또는 콜라겐유사 재조합단백질의 가교물을 포함하는 겔을 제공하는 것이다.
- [0035] 이러한 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 및/또는 콜라겐유사 재조합단백질의 겔화를 통해 단백질 제제화를 달성하고, 이들의 기계적 물성을 기반으로 세포 지지용 고정체, 미세 필터, 효소, 약물 캐리어 등과 같은 생체분해 가능한 단백질 기반 기능성 의료소재로 활용될 수 있다.
- [0036] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0037] 본 발명은 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 및/또는 콜라겐유사 재조합단백질을 포함하는 겔 제조용 조성물, 상기 재조합단백질을 가교화하는 단계를 포함하는 겔의 제조방법, 및 상기 재조합단백질의 가교물을 포함하는 겔에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명은 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 및 콜라겐유사 재조합단백질로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 단백질을 포함하는 겔 제조용 조성물을 제공한다. 구체적으로, 본 발명에 따른 겔 제조용 조성물은 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 또는 콜라겐유사 재조합단백질 각각의 단독성분을 포함하거나 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 서열번호 1의 일반식을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군으로부터 선택되는 1종 이상 포함하며, 반복단위의 총 반복수는 1 내지 200회, 바람직하게는 5 내지 150회, 예를 들면 10회 내지 120회인 폴리펩티드를 포함하며, 상기 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 단백질이다.
- [0040] 상기 서열번호 1의 일반식을 갖는 반복단위는 서열번호 2 내지 33의 아미노산 서열을 갖는 반복단위로 이루어지는 군에서 1종 이상 선택될 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2, 8, 10, 18, 및 19의 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군에서 선택된 반복단위일 수 있다.
- [0041] 자연 유래의 콜라겐 섬유의 분자량은 약 2 내지 300 kDa 수준임을 감안할 때, 재조합단백질의 반복서열의 반복 횟수 증가는 자연 유래의 콜라겐을 모사하는 방법이 될 수 있다. 무엇보다 높은 분자량을 갖는 물질일수록 기계적 물성, 점도, 인성, 내구성, 방사성, 고무탄성 등의 증가를 도모할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 가설의 단백질(hypothetical protein)로, NCBI (NCBI accession number XP_001623116.1)의 정보를 이용하였으며, 자연에 존재하는 말미잘유래 콜라겐단백질의 경우, 반복서열 단백질은 198개 아미노산을 가진다.
- [0043] 본 발명의 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 *Nematostella vectensis* 유래의 아미노산 서열을 코딩하는 말미잘유래 콜라겐단백질의 mRNA 서열 중 일부의 코돈 서열을 재배치하고 분자량을 최적화한 후, 최적화된 190개의 아미노산 반복서열 단백질의 유전자를 포함하는 발현백터를 제조하고, 상기 발현백터를 숙주세포에 삽입하여 형질전환체를 제조한 다음, 형질전환체로부터 생산된다.
- [0044] 본 발명의 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 균(*Syntrophobotulus glycolicus*)에 존재하는 콜라겐의 삼중나선구조, 홍합(*Mytilus californianus*)의 족사단백질과는 각각 48%, 32%의 동일성을 갖는다.
- [0045] 본 발명에 따른 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은, 상기 단백질의 C말단, N말단, 또는 양 말단에 His 태그 (His tag), GST 태그(glutathione transferase tag), 및 MBP 태그(maltose binding protein tag)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 추가로 연결된 것일 수 있으며, 재조합단백질의 제조과정에서 C말단, N말단, 또는 양 말단에 제한효소 인식부위 또는 이의 일부를 포함할 수 있다. 본 발명의 일예에 따른 재조합 단백질의 구체적인 예는 상기 발현백터로 재조합단백질을 생산하는 경우에는 단백질의 C-말단에 6개의 히스티딘이 연결(6 x His 정제 tag 서열; HHHHHH)되어 있으며, 이를 서열번호 35로 표시하였다.
- [0046] 본 발명의 일구현에는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군에서 선택된 1종 이상의 반복단위가 총 반복 횟수 1 내지 200회 반복되어 연결되어 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상기 반복단위의 총 반복 횟수

는 바람직하게는 총 1 내지 120회 반복 연결되어 10 내지 1200개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드를 포함할 수 있으며, 상기 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 단백질이다. 또한, 상기 반복단위가 서로 연결되는 부분에 다른 아미노산 서열이 추가로 포함되어 연결된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 서열번호 1의 아미노산 서열은 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 아미노산 서열이고, 하기 일반식을 가진다.

[0047] [일반식 I]

[0048] G-L-Xaa₁-V-Xaa₂-Y-Xaa₃-P-Xaa₄-Xaa₅ (서열번호 1)

[0049] 상기 일반식 I에서, Xaa₁는 P 또는 Q이고, Xaa₂는 L 또는 F이고, Xaa₃는 P 또는 T이고, Xaa₄는 S 또는 T이고, Xaa₅는 N 또는 I이다.

[0050] 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 반복단위의 구체적인 예는 서열번호 2 내지 서열번호 33에 표시하였으며, 이를 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

[0051]

서열번호	아미노산 서열 (N말단 -> C말단)
서열번호 2	GLPVLYPPSN
서열번호 3	GLPVLYPPSI
서열번호 4	GLPVLYPPTN
서열번호 5	GLPVLYPPTI
서열번호 6	GLPVLYTPSN
서열번호 7	GLPVLYTPSI
서열번호 8	GLPVLYTPTN
서열번호 9	GLPVLYTPTI
서열번호 10	GLPVFYPPSN
서열번호 11	GLPVFYPPSI
서열번호 12	GLPVFYPPTN
서열번호 13	GLPVFYPPTI
서열번호 14	GLPVFYTPSN
서열번호 15	GLPVFYTPSI
서열번호 16	GLPVFYTPTN
서열번호 17	GLPVFYTPTI
서열번호 18	GLQVLYPPSN
서열번호 19	GLQVLYPPSI
서열번호 20	GLQVLYPPTN
서열번호 21	GLQVLYPPTI
서열번호 22	GLQVLYTPSN
서열번호 23	GLQVLYTPSI
서열번호 24	GLQVLYTPTN
서열번호 25	GLQVLYTPTI
서열번호 26	GLQVFYPPSN
서열번호 27	GLQVFYPPSI
서열번호 28	GLQVFYPPTN
서열번호 29	GLQVFYPPTI
서열번호 30	GLQVFYTPSN
서열번호 31	GLQVFYTPSI
서열번호 32	GLQVFYTPTN
서열번호 33	GLQVFYTPTI

[0052] 본 발명의 말미잘유래 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 구성하는 반복단위는 바람직하게는 서열번호 2, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 18 및 서열번호 19이며, 상기 재조합단백질은 상기 5개 반복단위가 각각 독립적으로 반복되어 총 반복회수가 5 내지 200회, 바람직하게는 10 내지 120회 반복되어 이루어지는 단백질일 수 있다.

[0053] 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질에 히스티딘 태그가 포함된 경우 약간의 분자량 변화가 생긴다. 단백질을

전기영동(SDS-PAGE) 하에서 크기를 확인해 본 결과, 목적 단백질 본래의 크기보다 조금 작은 분자량에서 단백질의 존재가 확인되었다. 이는 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 아미노산 서열 특성으로 인해 전기영동 시 단백질의 이동의 양상이 달라 보여지는 현상으로 생각된다. 정확한 크기의 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 확인하기 위하여 MALDI-MS 분석을 통해 이론적인 값에 해당하는 분자량의 확인을 시도하였으나, 물이나 버퍼에서 단백질의 용해도가 좋지 못하였고, 강한 산성 용액에만 완벽히 녹는 성질로 인하여 matrix의 crystal 형성을 방해하였기 때문에 레이저에 의한 이온 탈착을 방해하여 분석이 용이하지 못하였다.

- [0054] 본 발명의 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은 서열번호 36의 일반식을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하며, 반복단위의 총 반복수는 1 내지 200회, 바람직하게는 5 내지 150회, 예를 들면 10회 내지 120회인 폴리펩티드를 포함하며, 상기 1 내지 200회 또는 1 내지 120회 사이에 다른 아미노산 서열이 포함되어 연결된 폴리펩티드일 수 있다.
- [0055] 자연유래의 실크섬유의 분자량은 약 2 내지 500 kDa 수준임을 감안할 때, 재조합단백질의 반복서열의 반복횟수 증가는 자연유래의 실크를 모사하는 방법이 될 수 있다. 무엇보다 높은 분자량을 갖는 물질일수록 고분자의 특성을 나타내기 때문에 보다 높은 기계적 물성, 점도, 인성, 내구성, 방사성, 고무탄성 등의 증가를 도모할 수 있다.
- [0056] 상기 서열번호 36의 일반식을 갖는 반복단위는 서열번호 37 내지 68의 아미노산 서열을 갖는 반복단위로 이루어지는 군에서 1종 이상 선택될 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 45 및 서열번호 47의 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군에서 선택된 반복단위일 수 있다.
- [0057] 자연에 존재하는 말미잘 실크 단백질(aneroin)은 기존의 거미 유래 실크 단백질(flagelliform)로 알려진 5개의 아미노산의 반복구조[GPGXX (X=A,V,S,Y)]를 가지고 이와 비슷한 아미노산 서열을 가지는 단백질(서열번호 69의 아미노산 서열)로, NCBI Reference Sequence (XP_001621085.1)의 정보를 이용하였다.
- [0058] 본 발명의 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은 *Nematostella vectensis* 유래의 아미노산 서열에서 반복구조가 나타나는 190개의 아미노산 반복서열을 최적화하여 발현백터를 제조하고, 상기 발현백터를 숙주세포에 삽입하여 형질전환체를 제조한 다음, 형질전환체로부터 생산된다.
- [0059] NCBI 검색을 통해 얻은 말미잘 실크 단백질은 누에(*Bombyx mori*) 유래 실크 단백질과 49.5%의 동일성 및 60.2%의 상동성을 가지며, 거미(*Nephila clavipes*) 유래 실크 단백질과는 43.2%의 동일성 및 64%의 상동성을 갖는다.
- [0060] 본 발명에 따른 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은 말미잘(*Nematostella vectensis*) 유래의 가상의 반복서열 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 mRNA 서열 중 일부의 코돈 서열을 재배치하여 최적화하여 제조되었으며, 최적화된 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 유전자를 포함하는 발현백터를 제조하고, 상기 발현백터를 숙주세포에 삽입하여 형질전환체를 제조한 다음, 형질전환체로부터 생산된다.
- [0061] 본 발명에 따른 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은, 상기 단백질의 C말단, N말단, 또는 양 말단에 His 태그 (His tag), GST 태그(glutathione stransferase tag), 및 MBP 태그(maltose binding protein tag)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 추가로 연결된 것일 수 있으며, 재조합단백질의 제조과정에서 C말단, N말단, 또는 양 말단에 제한효소 인식부위 또는 이의 일부를 포함할 수 있다. 본 발명의 일예에 따른 재조합 단백질의 구체적인 예는 상기 발현백터로 재조합단백질을 생산하는 경우에는 단백질의 C-말단에 6개의 히스티딘이 연결(6 x His 정제 tag 서열; HHHHHH)되어 있으며, N-말단에 발현향상 모티프 서열 (MKAI FVLKDDDDK)이 연결되어 있다. 이를 서열번호 70으로 표시하였다.
- [0062] 본 발명의 일구현에는 서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어지는 반복단위 군에서 선택된 1종 이상의 반복단위가 총 반복수 1 내지 200회 반복되어 연결되어 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상기 반복단위의 총 반복 횟수는 바람직하게는 총 1 내지 120회 반복 연결되어 10 내지 1200개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드를 포함할 수 있으며, 상기 폴리펩티드가 1회 내지 20회 반복하여 연결된 단백질이다. 또한 상기 반복단위가 서로 연결되는 부분에 다른 아미노산 서열이 추가로 포함되어 연결된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 서열번호 36의 아미노산 서열은 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 아미노산 서열이고, 하기 일반식을 가진다.
- [0063] [일반식 2]
- [0064] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-N-T-G-Xaa₄-P-Xaa₅-Q (서열번호 36)
- [0065] 상기 서열에서, Xaa₁=G or D, Xaa₂=P or S, Xaa₃=G or S, Xaa₄=Y or C, 또는 Xaa₅=G or W일 수 있다.

[0066] 서열번호 36의 아미노산 서열을 갖는 반복단위의 구체적인 예는 서열번호 37 내지 68에 표시하였으며, 이를 하기 표 2에 표시하였다.

표 2

서열번호	아미노산 서열 (N말단 -> C말단)
서열번호 37	GPGNTGYPGQ
서열번호 38	DPGNTGYPGQ
서열번호 39	GSGNTGYPGQ
서열번호 40	DSGNTGYPGQ
서열번호 41	GPSNTGYPGQ
서열번호 42	DPSNTGYPGQ
서열번호 43	GSSNTGYPGQ
서열번호 44	DSSNTGYPGQ
서열번호 45	GPGNTGCPCGQ
서열번호 46	DPGNTGCPCGQ
서열번호 47	GSGNTGCPCGQ
서열번호 48	DSGNTGCPCGQ
서열번호 49	GPSNTGCPCGQ
서열번호 50	DPSNTGCPCGQ
서열번호 51	GSSNTGCPCGQ
서열번호 52	DSSNTGCPCGQ
서열번호 53	GPGNTGYPWQ
서열번호 54	DPGNTGYPWQ
서열번호 55	GSGNTGYPWQ
서열번호 56	DSGNTGYPWQ
서열번호 57	GPSNTGYPWQ
서열번호 58	DPSNTGYPWQ
서열번호 59	GSSNTGYPWQ
서열번호 60	DSSNTGYPWQ
서열번호 61	GPGNTGCPWQ
서열번호 62	DPGNTGCPWQ
서열번호 63	GSGNTGCPWQ
서열번호 64	DSGNTGCPWQ
서열번호 65	GPSNTGCPWQ
서열번호 66	DPSNTGCPWQ
서열번호 67	GSSNTGCPWQ
서열번호 68	DSSNTGCPWQ

[0068] 본 발명의 말미잘유래 실크유사 재조합단백질을 구성하는 반복단위는 바람직하게는 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 45 및 서열번호 47이며, 상기 재조합단백질은 상기 4개 반복단위가 각각 독립적으로 반복되어 총 반복 회수가 5 내지 200회, 바람직하게는 10 내지 120회 반복되어 이루어지는 단백질일 수 있다.

[0069] 말미잘유래 실크유사 재조합단백질에 히스티딘 태그가 포함된 경우 단백질을 전기영동(SDS-PAGE) 하에서 본래 크기와는 다른 거동을 보인다. 이는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 아미노산 서열 특성으로 인해 전기영동 시 단백질의 이동의 양상이 다르거나, 단백질이 다이머(dimer)의 형태로 나타나기 때문이다. 이는 HPLC 분석을 통해 얻은 단백질의 전기영동에서도 확인할 수 있었다.

[0070] 본 발명의 일구현예에 따른 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질 및 실크유사 재조합단백질은, 상업적으로 제조된 벡터에 외부 유전자를 삽입하여 형질전환체내에서 유전공학적인 방법으로 대량생산이 가능하다.

[0071] 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입하고, 발현벡터를 숙주세포에 삽입하여 재조합단백질을 생산하는 형질전환체를 만드는 방법은 기존의 확립된 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0072] 본 발명에서 사용된 숙주세포로는 대장균, 효모, 동물세포, 식물세포 또는 곤충세포 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 대장균으로서 예를 들면 BL21(DE3)균을 이용할 수 있으나, BLR(DE3) 또는 BLR(DE3)pLysS도 선택 균주로 포함될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

- [0073] 하기에 숙주세포로 대장균을 사용하여 형질전환체의 제조 및 이로부터 말미잘유래 반복서열 재조합단백질의 생산방법에 대해 상세히 설명하도록 한다.
- [0074] 먼저 NCBI에서 얻어진 말미잘유래 단백질의 mRNA 서열 중 주요 코돈의 반복을 피하기 위한 코돈 서열 재배치를 실행한다. 말미잘유래 재조합단백질의 DNA 서열은 발현을 위한 숙주 내에서 가장 최적화된 코돈으로 치환될 수 있으며, 코돈의 중복을 피하기 위하여 최적화될 수 있다.
- [0075] 최적화된 말미잘유래 재조합단백질의 DNA서열은 화학적으로 합성되며, 발현용 벡터에 삽입시키기 위해 양 말단에 Nde1, Xho1의 제한효소 사이트에 첨가하였다. 디자인된 말미잘유래 반복서열 재조합단백질은 발현용 프로모터 T7(pT7)을 포함하는 발현벡터 pET23b(+)에 클로닝하여 제조한다.
- [0076] 말미잘유래 재조합단백질이 삽입된 발현벡터는 단백질의 C말단에는 히스티딘 태그[6 x his 정제 tag 서열; HHHHHH]가 포함되었고, 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 경우, N말단에 발현향상 펩타이드가 첨가되었다. 상기 발현벡터는 단백질 생산을 위한 숙주세포의 종류 및 배양 특성에 따라 선택되며, 새롭게 제조할 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 말미잘유래 반복서열 재조합단백질은 바람직하게는 서열번호 35 또는 70의 아미노산 서열을 가진다.
- [0077] 상기 용어 "발현향상 펩타이드"는 번역 개시 효율을 향상시켜 재조합단백질의 발현을 수준을 높이는 역할을 하는 아미노산 서열을 뜻하며, 대장균의 트립토판 오페론(trp operon)으로부터 유래한 8개의 아미노산으로 이루어진 번역 개시 펩타이드일 수 있다.
- [0078] 상기 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, CoIE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHCF79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0080] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL ^{λ} 프로모터, CMV 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0081] 상기 단백질을 생산하는 방법은 더욱 자세하게는, 말미잘유래 재조합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계; 상기 발현벡터를 숙주세포에 삽입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 상기 형질전환체로부터 말미잘유래 재조합단백질을 생산하는 단계; 및 상기 생산된 재조합단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 일 예에서, 목적 단백질이 삽입된 발현벡터를 숙주세포에 삽입함으로써 재조합단백질을 생산하는 형질전환체를 만들 수 있으며, 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 숙주세포는 상기 발현벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있다.
- [0083] 본 발명에서 사용된 숙주세포로는 대장균, 효모, 동물세포, 식물세포, 또는 곤충세포 등을 포함할 수 있으며, 원핵세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776,

E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(*Chinese hamster ovary*) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에서 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜매개 형질 감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0084] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

[0085] 본 발명의 일예에서, 숙주세포로서 대장균을 사용하여 형질전환체의 제조 및 이로부터 말미잘유래 재조합단백질의 생산방법에 대해 상세히 설명하도록 한다. 상기 대장균으로서 BLR(DE3), BL21(DE3)균, 또는 BLR(DE3)pLysS를 이용할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 상기 제조된 발현벡터를 열충격 방법으로 숙주세포에 삽입하여 말미잘유래 재조합단백질을 생산하는 형질전환체를 제조한다. 상기 형질전환체를 앰피실린이 첨가된 LB 배지에 접종하여 진탕배양한다.

[0086] 말미잘유래 재조합단백질의 발현을 유도하기 위하여, 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)가 600nm에서 0.4 내지 1.0, 바람직하게는 0.8 내지 1.0이 되었을 때 단백질 발현 유도물질인 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 0.1 내지 10 mM로 첨가하고, 추가로 배양한다. 배양액으로부터 세포를 회수한다.

[0087] 상기 회수된 세포를 용해 용액에 부유시키고 초음파 분쇄기 또는 고압분질기를 이용하여 파쇄한다. 파쇄된 세포의 일부를 전세포 파쇄액(whole cell lysate), 수용성 분액(soluble fraction) 및 불용성 분액(insoluble fraction)으로 나누고, 나머지 전세포 파쇄액은 원심분리한다. 불용성 분액만을 회수하며, 회수된 분액은 히스태그 컬럼(Histag column)을 이용하여 발현되는 말미잘유래 재조합단백질을 분리 및 정제한다. 구체적으로, 숙주세포에서 생산된 말미잘유래 재조합 친화도 크로마토그래피를 실시하여, 컬럼에 결합한 단백질을 용출하여 얻을 수 있다. 바람직하게는, 말미잘유래 반복서열 재조합단백질을 세포파쇄용액으로 파쇄하고, 파쇄된 세포의 수용성 분액을 니켈 NTA(nitrilotriacetic acid) 컬럼에 주입하고 세척용액으로 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 세척한다. 용출완충액으로 단백질을 컬럼에서 분리하고 정제한다.

[0088] 또한, 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 산추출을 통하여 보다 쉽게 정제할 수 있다. 바람직하게는, 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질이 포함된 파쇄된 세포의 불용성 분액을 원심분리를 통해 분리해내고, 분리된 불용성 분액을 산 용액(예를 들어, 인산 또는 포름산 등)에 녹여 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 추출할 수 있다.

[0089] 또한, 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은 열충격과 산추출을 통하여 정제할 수 있다. 바람직하게는, 말미잘유래 실크유사 재조합단백질이 포함된 파쇄된 세포의 수용성 분액을 40 내지 100℃에서 열충격을 가하고, 이때 생성된 수용성 분액을 원심분리를 통해 분리해내고, 분리된 수용성 분액을 산 용액(예를 들어, 인산 또는 포름산 등)과 섞은 후, 생기는 불용성 분액을 제거하여 얻을 수 있다.

[0090] 상기의 친화도 크로마토그래피법이나, 열충격과 산추출을 통하여 정제된 말미잘유래 반복서열 재조합단백질은 물을 이용한 투석을 통해 단백질 수용액에 남아있는 물과 단백질 이외의 성분을 제거하고 최종적으로 동결건조를 통해 분말 형태로 정제된 재조합단백질을 얻는다.

[0091] 본 발명에 따른 말미잘유래 재조합단백질은 가교화하여 겔을 형성하거나 멤브레인을 제조할 수 있어, 겔 형성용 단백질로 기능 할 수 있다. 말미잘유래 재조합단백질은 겔 형태의 3차원 소재로 제조될 수 있으며, 이를 위해서는 단백질의 가교가 필수적이다.

[0092] 상기 단백질 겔은 가교법을 이용하여 제조가 가능하며, 구체적으로 상기 분말 형태로 정제된 말미잘유래 재조합단백질을 산성용매 및 유기용매로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 용매에 용해시키고, 상기 용매에 용해된 말미잘유래 재조합단백질 또는 그 혼합물을 pH를 이용한 가교법, 글루타알데하이드를 이용한 단백질의 가교법, 또는 광반응 가교법 등을 이용하여 단백질의 겔 화를 유도할 수 있다.

- [0093] 말미잘유래 재조합단백질은 고분자 화합물과 혼합하여 겔화시킬 수 있다. 상기 고분자 화합물로는 PEO(polyethylene oxide), PDO(polydioxanone), PCL(polycaprolactone), PLGA(poly-lactic-co-glycolic acid), PLLA(poly-L-lactide acid), 키토산(chitosan) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0094] 또한, 말미잘유래 재조합단백질은 알부미노이드와 혼합하여 겔 화시킬 수 있다. 상기 알부미노이드는 케라틴, 글루텐, 락트알부민, 콜라겐, 및 이들의 재조합단백질 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0095] 상기 산성용매는 인산, 아세트산, 포름산, 염산, 황산, 질산, 시트르산 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 유기용매는 HFIP(hexafluoroisopropanol), HFP (hexafluoropropanol), HFA(hexafluoroacetone), TFA(trifluoroacetic acid), 디아이소프로필 에틸아민(diisopropylethylamine), 메틸이미다졸리움 클로라이드(methylimidazolium chloride) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서는 포름산이 바람직하다. 이때, 상기 용매에 용해된 말미잘유래 재조합단백질의 농도는 5 내지 30 %(w/v), 바람직하게는 5 내지 20 %(w/v) 이다.
- [0096] pH를 이용한 가교법은 겔을 염기상태로 처리함으로써 가능하며, 10 내지 100 mM의 수산화나트륨을 첨가하여 pH 7 내지 pH 12에 해당하는 완충용액을 이용할 수 있다. 이 경우 단백질의 가교는 물리적으로 일어나며 쉽게 부서지는 형태의 겔이 만들어진다.
- [0097] 글루타알데하이드를 이용한 단백질의 가교의 경우, 글루타알데하이드는 아민기의 단백질 가교에 역할을 한다고 알려져 있지만, 기존 문헌들에 따르면 라이신, 타이로신, 트립토판, 페닐알라닌을 비롯하여 히스티딘, 시스테인 프롤린, 글라이신 등 다양한 아미노산 잔기들의 가교에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0098] 광반응 가교법을 이용한 단백질의 겔 화의 경우, 전자수용체 및 광반응성 금속 리간드를 첨가하여 수행할 수 있다. 상기 전자수용체는 과황산염(persulfate), 과아이오딘산염(periodate), 과브롬산염(perbromate), 과염소산염(perchlorate), 비타민(B12), 펜타아민클로로코발트(Pentaaminechlorocobalt(III)), 암모늄 세륨 질산염(ammonium cerium(IV) nitrate), 옥살산(oxalic acid), 또는 이디티에이(EDTA)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 광반응성 금속 리간드는 루테튬(Ru(II)), 팔라듐(Pd(II)), 구리(Cu(II)), 니켈(Ni(II)), 망간(Mn(II)), 및 철(Fe(III))로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0099] 상기 단백질 겔을 생산하는 방법은 구체적으로,
- [0100] 말미잘유래 재조합단백질의 유전자를 포함하는 발현백터를 제조하는 단계, 상기 발현백터를 숙주세포에 삽입하여 형질전환체를 제조하는 단계,
- [0101] 상기 형질전환체로부터 말미잘유래 재조합단백질을 생산하는 단계,
- [0102] 상기 생산된 말미잘유래 재조합단백질을 분리 및 정제하는 단계, 및
- [0103] 상기 정제된 말미잘유래 재조합단백질을 가교화하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0104] 본 발명의 일구현예는, 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질 및/또는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 가교물을 포함하는 겔을 제공 할 수 있다.
- [0105] 상기 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질 및/또는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 가교물을 포함하는 겔의 경도는 0.01 내지 3.0 MPa, 0.1 내지 3.0 MPa, 또는 0.05 내지 2.5 MPa 일 수 있다. 강도의 경우, 10 내지 1000 kPa 또는 50 내지 900 kPa 일 수 있다. 탄성력은 10 내지 150 % 또는 30 내지 100 % 일 수 있다.

발명의 효과

- [0106] 본 발명에 따른 말미잘유래 재조합단백질은 높은 반복성을 갖는 특이 단백질로서, 형질전환체로부터 다량의 재조합단백질을 생산할 수 있고, 강도와 탄성력, 인력과 같은 기계적 물성이 우수하여, 다양한 화학적 제조가 용이하여 넓은 산업분야에 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 말미잘유래 재조합단백질의 겔화를 통해 제제화를 달성하고, 이들의 기계적 물성을 가지고 있어, 세포 지지용 고정체, 미세 필터, 효소, 약물 캐리어 등과 같은 생체분해 가능한 단백질 기반 기능성 의료소재로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0107] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 유전자를 포함하는 발현백터의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 산추출 정제 후, 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 실버 염색법으로 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 산추출 정제 후, 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 산추출 정제후, 아미노산 조성 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 *Nematostella vectensis*의 IgG 항체를 이용한 면역조직화화법을 통한 항원항체 반응을 확인한 실험 결과이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 *Nematostella vectensis*의 말미잘유래 콜라겐재조합단백질의 항체를 이용한 면역조직화화법을 통한 항원항체 반응을 확인한 실험 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 35의 아미노산 서열로 이루어지는 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 몰드에서 광반응으로 경화시킨 후 몰드를 제거한 겔형태의 단백질이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 35의 아미노산 서열로 이루어지는 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질 겔의 인장강도실험 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 유전자를 포함하는 발현벡터의 모식도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 산추출 정제 후, 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현 정도를 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 산추출 정제 후, 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.

도 11은 발현향상 모티프가 첨가된 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 아미노산 조성 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 70의 아미노산 서열로 이루어지는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질을 몰드에서 광반응으로 경화시킨 후 몰드를 제거한 겔형태의 단백질이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 70의 아미노산 서열로 이루어지는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 하이드로겔의 인장강도실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0108] 다음의 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하겠으나, 이는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명이 다음의 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0110] **실시예 1. 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질 발현벡터의 제조**

[0111] **1-1. 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 DNA 서열의 최적화**

[0112] 본 실험에 사용된 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 가설의 단백질(hypothetical protein)로, NCBI Reference Sequence의 정보를 이용하였다. 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 NCBI(XP_001623116.1)의 정보를 이용하였으며, 자연에 존재하는 말미잘 콜라겐유사 단백질의 아미노산 서열을 2배로 늘린 형태가 서열번호 34로 나타내었다.

[0113] 아미노산 서열의 반복이 주가 되는 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 아미노산 서열의 반복이 주로 일어나므로 편향적으로 쓰이는 아미노산이 존재하고, 몇 가지 아미노산이 주로 쓰는 DNA 코돈으로 인해, DNA 서열의 중복이 일어나게 된다. 이러한 DNA 반복서열은 대장균 내에서 쉽게 삭제되거나, 전사가 미완성으로 일어나는 경우가 있으므로 DNA 수준에서 서열의 반복을 막는 것은 단백질 발현을 용이하게 하는데 있어서 중요하다. 따라서, 반복서열 재조합단백질의 mRNA 서열 중 일부의 코돈 서열의 반복을 피할 수 있도록 하여 서열을 최적화하였다.

[0114] 상기 최적화된 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 프롤린(24.6%), 루신(17.4%), 및 글라이신(10%)이 주로

존재하는 총 190개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서, 10개의 아미노산으로 이루어진 재조합단백질의 기본 모듈이 19번 반복되는 특이한 구조의 서열을 지니고 있다.

[0116] **1-2. 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 발현백터의 제조**

[0117] 상기 실시예에서 최적화한 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 DNA에 양 끝에 NdeI 및 XhoI의 제한효소를 이용하여, T7(pT7)과 C말단에 히스티딘 태그(histidine tag, 6 x his 정제 tag 서열; HHHHHH)를 포함하는 발현백터 pET23b(+)에 삽입하였다. 상기 제조된 재조합단백질의 유전자를 포함하는 발현백터의 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0119] **1-3. 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 생산하는 형질전환된 대장균의 제조**

[0120] 통상적으로 클로닝에 많이 사용되는 대장균 TOP10(Invitrogen)과 단백질 발현용으로 사용되는 대장균 BL21(DE3)을 CaCl₂ 완충액을 사용하여 반응성 있는 세포를 만들었다. 그 다음, 상기 실시예 1에서 제조한 발현백터를 42 °C에서 2분간 방치하는 열충격 방법으로 대장균에 형질전환도입하였다.

[0121] 상기 대장균을 50 mg/ml의 앰피실린(ampicillin)이 첨가된 LB 배지에 접종하여 5l 용량의 배양기에서 12시간 동안 37°C에서 진탕 배양하여 형질전환된 대장균을 선별하였다.

[0123] **실시예 2. 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 발현 확인 및 정제**

[0124] **2-1. 재조합단백질의 발현**

[0125] 형질전환 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 발현을 유도하기 위하여, 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)가 600 nm에서 0.6 내지 1.0 정도가 되었을 때 유도물질인 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, 1mM)를 첨가하였다.

[0126] 상기 배양된 세포를 4000 rpm에서 10분간 원심 분리한 다음 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 용해 용액 (lysis buffer, pH 8.0, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl)에 부유시킨 다음 초음파 분쇄기(sonicator) 또는 고압분질기(homogenizer)를 이용하여 파쇄하였다. 히스티딘 태그를 이용한 분리의 경우는 요소가 포함된 용액(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris · Cl, 8 M Urea, pH 8.0)이 세포파쇄용액으로 이용되었다.

[0127] 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 발현 여부를 SDS-PAGE 상에서 확인하기 위하여, 파쇄된 세포의 일부를 전세포 파쇄액(whole cell lysate), 수용성 분액(soluble fraction) 및 불용성 분액(insoluble fraction)으로 나누었다. 나머지 전세포 파쇄액은 9000 rpm에서 20분간 원심분리하여 불용성 분액을 회수하였다.

[0129] **2-2. 히스태그 컬럼(His-tag column)을 이용한 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 정제**

[0130] 상기 실시예 2-1에서 회수된 상등액은 히스태그 컬럼을 이용하여 수용성 분액에서 발현되는 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 분리 및 정제하였다.

[0131] 수용성 분액의 단백질을 니켈NTA(nitrilotriacetic acid) 컬럼에 주입하고, 단백질이 컬럼과 결합할 시간을 충분히 주었다. 그 다음, 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 세척용액(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris · Cl, 8 M Urea, pH 6.3)으로 세척하고, 용출 완충액(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris · Cl, 8 M Urea, pH 4.5)으로 단백질을 컬럼에서 분리하고 정제하였다. 히스태그 컬럼을 이용하여 분리된 단백질의 생산량은 리터당 10 mg이하이다.

[0133] **2-3. 열충격을 이용한 콜라겐유사 재조합단백질의 정제**

[0134] 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 또 다른 분리 및 정제 방법으로, 열충격과 산추출에 의한 방법을 이용하였다.

[0135] 구체적으로는, 상기 실시예 3-1에서 파쇄된 세포에서 불용성 분액만을 회수하고 세척용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0)을 이용하여 씻어낸 후, 여기에 다시 약 60 °C의 열충격을 가하였다. 이 과정에서 다시 불용성 분액을 취하여 포름산에 녹인 후, 물로 투석하고 동결 건조하여 생산하였다. 산추출로 얻어진 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 생산량은 리터당 50 mg내외이다.

[0136] 상기 생산된 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함한다. 상기 형질전환된 대장균으로부터 생산된 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질 중 히스티딘 태그를 포함하는 서열번호 35로 표기된 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 이론 등전점은 6.69이며, 이론 분자량은 41.65 kDa이다.

[0138] 실시예 3. 정제된 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 확인

[0139] 3-1. 실버 염색법과 웨스턴 블롯

[0140] 실시예 3에서 얻은 각 분액들과 정제된 샘플은 SDS-PAGE용 완충액 (1M TrisHCl (pH 6.8), 10 % 글리세롤, 2 % SDS, 5 % β-머캅토 에탄올, 0.25 % 브로모페놀블루)에 희석하고, 100 °C에서 5분 동안 반응시켜 변성시켰다. 그리고 실험 샘플을 12 % SDS폴리 아크릴아미드 겔에 전기영동하여 분자량 별로 크기를 분리하였다.

[0142] *분리된 단백질은 실버 염색법 또는 웨스턴 블롯을 통하여 발현 확인이 이루어졌다. 실버 염색법은 전기영동한 단백질 기능기에 결합하는 은이온의 환원자를 이용하여 염색하는 것으로, 쿠마시 염색법보다 민감도가 우수하다는 장점이 있다. 실버 염색법으로 확인해본 결과, 발현된 말미잘유래 단백질만이 검출되었으며, 이론 값보다 약간 낮은 분자량 영역에서 관찰됨을 확인하였다.

[0143] 웨스턴 블롯의 경우, 재조합단백질 C-말단의 히스티딘 태그를 인지하는 항원을 이용하여 전기영동한 단백질의 존재를 확인하였고, 결과 역시 실버 염색법과 동일하였기에 목적 단백질이 높은 수율로 추출될 수 있음을 확인하였다.

[0144] 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 발현 정도를 실버 염색법과 웨스턴 블롯으로 확인한 결과는 도 2와 도 3에 각각 나타내었다.

[0145] 도 2에 나타낸 바와 같이, 약 38 kDa 부근에서 밴드가 확인되었으며, 히스태그가 붙은 단백질의 이론 분자량은 41.65 kDa인바, 단백질의 분자량은 정확하게 일치하지는 않으나, 항원항체반응을 이용한 도 3의 웨스턴 블롯의 경우 실버 염색법과 같은 위치에서 단백질이 확인되는 것으로 보아, 원하는 목적단백질이 전기영동상의 이동상의 문제일 뿐, 발현에는 문제가 없는 것으로 보인다. 또한, 웨스턴 블롯의 경우 C-말단의 히스티딘 태그를 이용하기 때문에 단백질 끝 부분까지 정상적인 크기로 발현이 완료되었다고 할 수 있다.

[0147] 3-2. 콜라겐유사 재조합단백질의 아미노산 조성 분석

[0148] 발현하여 분리된 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질이 본래 목적으로 하는 단백질인지를 정확하게 확인하기 위하여, 정제된 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 아미노산 조성 분석을 수행하였다.

[0149] 구체적으로는, 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 6N 염산과 페놀에 녹이고 아미노산 정량 분석 키트 (standard solution amino acids for Hydrolysate Program (H), Sykam)를 이용하여 아미노산의 조성을 분석하였다.

[0150] 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 아미노산 조성 분석 결과는 도 4에 나타내었으며, 아미노산 조성 분석 결과의 측정값을 이론값과 비교한 값은 표 3에 나타내었다.

표 3

[0151]

아미노산 종류	측정된 값	이상적인 값
Asx	10.2	9.5
Thr	1.3	1.1
Ser	5	10
Glx	5.8	4.2
Pro	20.3	24.7
Gly	10.3	10
Ala	3.3	0
Cys	0	0
Val	10	10
Met	0.4	0
Ile	1.5	0.5
Leu	16.3	17.4
Tyr	9.2	10
Phe	3.4	2.6
His	0.8	0
Lys	1	0
Arg	1.3	0

[0152] 아미노산 분석방법은 실제 실험에 이용된 단백질의 아미노산 성분비를 알 수 있는 방법이다. 따라서 단백질서열을 알고 있는 단백질의 이론상 아미노산 성분비와 실험에 사용된 아미노산 성분비를 비교하면, 실험에 사용된 단백질의 대략적인 순도측정도 가능하다. 만약 두 성분비가 판이하게 다를 경우, 실험에 쓰이는 단백질은 목적 단백질이 주가 되지 않는다는 의미이며, 이는 분리나 정제과정에 있어 잡다한 단백질이 상대적으로 많이 존재함을 의미할 수 있다.

[0153] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 얻어진 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 아미노산 조성과 NCBI에서 확인된 본 연구의 말미잘에서 유래하는 반복서열의 아미노산 조성을 비교하면, 특히 프롤린, 글라이신, 타이로신, 루신과 같은 주요 아미노산 몇 가지의 조성비가 대장균에서 생산된 재조합단백질의 값과 이론상의 값에 큰 차이가 없이 일치하는 것으로 확인되었다.

[0155] **3-3. 면역조직화학법을 통한 항원항체 반응 확인 실험**

[0156] 본 발명에 따른 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 경우, 재조합단백질 반복 서열에 대한 항체를 제작하고, 말미잘(*Nematostella vectensis*) 조직 간의 면역조직화학법을 이용하여 단백질의 존재와 위치를 확인하였다.

[0157] 구체적으로, 파라핀에 고정된 말미잘 샘플은 4um 두께의 절편으로 자른 후, 파라핀과 물기를 제거한다. 면역조직화학법을 위하여 재조합 말미잘유래 반복서열단백질에 대한 1차 항체를 처리하고, 2차 항체로 HRP avidin이 표지 된 것을 이용한다. 이후, DAB을 첨가하고, 상온에서 발색이 될 때까지 기다린다. 효소에 의해 분해된 DAB substrate가 침착된 부위를 관찰함으로써 목적 단백질의 위치를 확인한다.

[0158] 상기 생산된 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 단백질을 *Nematostella vectensis*의 IgG 항체와 말미잘유래 실크단백질 항체를 이용한 면역조직화학법을 통한 항원항체 반응을 확인한 실험 결과를 각각 도 5a와 도 5b에 나타내었다.

[0160] **실시예 4. 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 겔화 시험**

[0161] **4-1. 광화학반응을 이용한 겔 제조**

[0162] 상기 실시예에서 얻어진 단백질의 가교는 광화학반응으로도 유도될 수 있다. 특히, 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질의 타이로신 잔기의 비율은 10 %로 높은 수치이며, 광반응을 통한 다이-타이로신(di-tyrosine)잔기 형성을 유도할 수 있다. 약 5 내지 40 %(w/v)의 높은 농도로 단백질을 용해시킨 후, 1 내지 10 mM의 Ru(BPY)₃ (Ruthenium-tris(2,2'-bipyridyl) dichloride)와, 10 mM 내지 200 mM의 APS(ammonium persulfate) 또는 SPS(sodium persulfate)를 첨가하고, 450 nm의 파장을 가지는 LED를 조사한다. 조사시간은 넣어준 전자수여체의 농도와 광반응성 금속 리간드, 광량에 따라 조절이 가능하다.

[0163] 도 6은 본 발명의 실시예 2에서 제조한 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질을 몰드에서 광반응으로 경화시킨 모습을 나타낸 사진이다.

[0165] **4-2. 겔의 인장강도실험**

[0166] 상기 실시예 4-1에서 얻은 0.5 cm X 2 cm 형태의 얇은 막 시트형태의 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질은 INSTRON(모델명: 3544)를 이용한 인장강도실험(tensile test)를 실행하여 얻어진 응력 변형도 곡선(stress-strain curve)을 얻을 수 있으며, 이로써 소재의 기본적 물성인 압축강도(strength), 탄력성(extensibility), 경도(stiffness), 인성(toughness) 등의 물성을 확인하였다.

[0167] 인장강도실험을 통해 얻어지는 응력 변형도 곡선(stress-strain curve)은 얇은 막 시트형태의 단백질 시험편을 파괴할 때까지 잡아당겨서 그 강도를 조사하는 실험으로, 이때의 strain이 탄력성을 의미하며, 이때의 stress가 강도를 의미한다. 경도는 그래프의 초기 기울기로 나타내어질 수 있으며, 인성은 겔의 파단이 일어나기 위해 필요한 에너지로서, 그래프 하단의 면적으로 구할 수 있다.

[0168] 겔화 후 얻어진 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질 하이드로겔의 인장강도실험 결과는 도 7에 나타내었으며, 측정값의 결과는 표 4에 나타내었다.

표 4

[0169]

강도 (MPa)	탄력성 (%)	경도 (MPa)	인성 (MJ/m ³)
0.86 (±0.28)	68.31 (±23.89)	2.11 (±0.86)	0.42 (±0.22)

[0170] 상기 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질로 만들어진 수화된 겔의 탄력성은 약 ~68%로 엘라스틴(~150%)에 비해 낮은 수준이지만, 나일론(~30%) 또는 누에실크(~35%) 보다 좋은 수준으로 나타났다. 하이드로겔에서 중요한 기계적 물성인 경도의 경우, 약 2.11 Mpa로서, 같은 단위면적의 엘라스틴, 합성고무보다 강하고 거미의 점착성 실크(Araneus 계열, viscid silk, ~3 MPa) 보다는 약한 수준으로 나타났다. 보통 화학합성된 폴리머로 제작된 하이드로겔의 경우, 경도와 강도는 1 내지 100 kPa 수준이고, 단백질 기반의 하이드로겔은 그 이하의 수준이다. 이를 감안하면 얻어진 강도와 경도는 보다 보다 향상된 수준임을 알 수 있다. 무엇보다 acellular collagen gel의 경도가 2 내지 60 kPa 수준임을 감안하여 보면, 상기 말미잘유래 콜라겐유사 재조합단백질 겔은 보다 더 단단한 겔이므로 3차원적 구조를 유지하는 데 있어 도움이 될 것으로 사료된다.

[0172] **실시예 5: 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현벡터의 제조**

[0173] **5-1. 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 DNA 서열의 최적화**

[0174] 본 실험에 사용된 말미잘 실크 단백질은 가설의 단백질(hypothetical protein)로, NCBI Reference Sequence (XP_001621085.1)의 정보를 이용하였다.

[0175] 상기 말미잘 실크 단백질은 글리신(35%)과 프롤린(18%)이 주로 존재하는 총 319개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서, 10개의 아미노산(GPGNTGYPGQ)(서열번호 37), 이 30번 이상 반복되는 특이한 구조의 서열을 지니고 있으며, 서열의 중간 또는 앞의 한두 개의 아미노산이 조금 다른 형태로 존재하기도 한다 [말미잘 실크 단백질의 반복서열(변형된 것 포함) - 서열번호 36에 기재된 일반식을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 반복서열 [(G/D)(P/S)(G/S)NTG(Y/C)P(G/W)Q(서열번호 36)], 예를 들면 서열번호 37 내지 68로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어지는 반복서열, 바람직하게는 GPGNTGYPGQ (서열번호 37), DPGNTGYPGQ (서열번호 38), GPGNTGCPGQ (서열번호 45) 또는 GSGNTGCPGQ (서열번호 47) 등].

[0176] 아미노산 서열의 반복이 주가 되는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은 아미노산 서열의 반복이 주로 일어나므로 편향적으로 쓰이는 아미노산이 존재하고, 몇 가지 아미노산이 주로 쓰는 DNA 코돈으로 인해, DNA 서열의 중복이 일어나게 된다. 이러한 DNA 반복서열은 대장균 내에서 쉽게 삭제되는 경우가 있으므로 DNA 수준에서 서열의 반복을 막고 단백질의 발현을 용이하게 하기 위하여, 말미잘 실크 단백질의 mRNA 서열 중 일부의 코돈 서열을 재배치하여 최적화하였다.

[0178] *또한, 전사를 조절하는 서열의 경우 전사물의 2차 구조의 형성에 크게 관여하며, 이것은 전사의 정지와 지속을 좌우하므로 2차 구조의 형성이 덜 되는 반복 서열의 일부를 말미잘 실크 단백질의 앞 부분에 배치하여 이로 인한 문제점을 최소화하고자 하였다.

[0179] 자연에 존재하는 말미잘 실크 단백질의 아미노산 서열(이론 pI: 3.98, 이론 분자량: 29.35 kDa)은 서열번호 69로 나타내었다.

[0181] **5-2. 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현벡터의 제조**

[0182] 상기 5-1에서 최적화한 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 DNA를 양 끝에 NdeI, XhoI의 제한효소 사이트에 첨가하여 발현벡터인 pET23b(+)에 클로닝하였다. pET23b(+) 벡터 내 C-말단에 히스티딘 태그(histidine tag)가 포함되도록 하였다[6 x his 정제 tag 서열; HHHHHH]. 또한, 별도로 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현량을 증가시키기 위하여 TrpL 모티프(motif)를 말미잘 실크 단백질의 N-말단에 엔테로키나제 절단 (enterokinase cleavage) 서열을 이용하여 연결하였다[발현향상 모티프 서열; MKAIFVLKDDDDK]. 상기 제조된 발현벡터는 대장균 발현용 프로모터 T7(pT7)을 포함한다.

[0183] 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 유전자를 포함하는 발현벡터의 모식도는 도 8에 나타내었다.

[0185] **5-3. 말미잘유래 실크유사 재조합단백질을 생산하는 형질전환된 대장균의 제조**

[0186] 통상적으로 클로닝에 많이 사용되는 대장균 TOP10(Invitrogen)과 단백질 발현용으로 사용되는 대장균 BL21(DE3)을 CaCl₂ 완충액을 사용하여 반응성 있는 세포를 만들었다. 그 다음, 상기 실시예 5-2에서 제조한 발현벡터를 42℃에서 2분간 방치하는 열충격 방법으로 대장균에 삽입하여 형질전환된 대장균을 제조하였다.

[0188] **실시예 6: 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현 확인 및 정제**

[0189] **6-1. 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현**

[0190] 상기 실시예 5-3에서 형질전환된 대장균을 50mg/ml의 앰피실린이 첨가된 LB 배지에 접종하여 5 l 용량의 배양기에서 10시간 동안 37℃에서 진탕배양하였다. 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현을 유도하기 위하여, 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)가 600nm에서 0.8 내지 0.9 정도가 되었을 때 유도물질인 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, 1mM)를 첨가하였다. 배양된 세포를 4000 rpm에서 10분간 원심 분리한 다음 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 용해 용액 (lysis buffer, pH 8.0, 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazole)에 부유시킨 다음 초음파 분쇄기(sonicator) 또는 고압분질기(homogenizer)를 이용하여 파쇄하였다. 말미잘유래 재조합 실크 단백질의 발현 여부를 SDS-PAGE 상에서 확인하기 위하여, 파쇄된 세포의 일부를 전세포 파쇄액(whole cell lysate), 수용성 분액(soluble fraction) 및 불용성 분액(insoluble fraction)으로 나누었다. 나머지 전세포 파쇄액은 9000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액만을 회수하였다.

[0192] **6-2. 히스-태그 컬럼(His-tag column)을 이용한 정제 방법**

[0193] 회수된 상등액은 히스-태그 컬럼을 이용하여 수용성 분액에서 발현되는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질을 분리 및 정제하였다. 수용성 분액의 단백질을 니켈-NTA(nitrilotriacetic acid) 컬럼에 주입하고, 단백질이 컬럼과 결합할 시간을 충분히 주었다. 그 다음, 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 세척용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM 이미다졸, pH 8.0)으로 세척하고, 용출 완충액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 300 mM 이미다졸, pH 8.0)으로 단백질을 컬럼에서 분리하고 정제하였다.

[0195] **6-3. 열충격과 산추출에 의한 정제 방법**

[0196] 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 또 다른 분리 및 정제 방법으로, 열충격과 산추출에 의한 방법을 이용하여 정제하였다. 구체적으로는, 파쇄된 세포에서 수용성 분액만을 회수하여 여기에 다시 약 80℃에서 열충격을 가하였다. 이 과정에서 형성된 수용성 분액을 원심분리를 통해 분리해내고, 분리된 수용성 분액만을 포름산 또는 인산과 섞어주었다. 이 용액을 다시 원심분리 과정을 거쳐 상등액만을 취함으로써 산과 반응한 불용성의 단백질을 제거하였다. 얻어진 상등액은 물을 이용한 투석을 하루 동안 수행하여 단백질 수용액에 남아있는 물과 단백질 이외의 성분을 제거하였다. 투석이 끝난 단백질을 동결건조하여 분말 형태의 말미잘유래 실크유사 재조합단백질을 얻었다.

[0197] 형질전환된 대장균으로부터 생산된 발현향상 모티프가 첨가된 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 아미노산 서열(이론 pI: 5.11, 이론 분자량: 31.88 kDa)은 각각 서열번호 70으로 나타내었다.

[0199] **실시예 7: 정제된 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 확인**

[0200] **7-1. SDS-PAGE와 웨스턴블롯을 이용한 정제된 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 확인**

[0201] 상기 실시예 6에서 얻은 각 분액들과 정제된 샘플을 SDS-PAGE 용 완충액 (0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% 글리세롤, 5% SDS, 5% β-머캅토에탄올, 0.25% 브로모페놀블루)에 희석한 후 100℃에서 5분 동안 끓여 변성시켰다. 이 시료를 12% SDS-폴리 아크릴아미드 겔에 전기영동하여 분자량별로 분리하였다. 또한, 웨스턴 블롯을 통해 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현을 확인하였다.

[0202] 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 발현 정도를 SDS-PAGE와 웨스턴 블롯으로 확인한 결과는 각각 도 9와 도 10에 나타내었다.

[0203] 도 9와 도 10에 나타난 바와 같이, 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은 약 30 kDa의 크기이나, 전기영동(SDS-PAGE) 시에 다량의 단백질이 30 kDa이 아닌 60 kDa 이상의 위치에서 발견된다. 이는 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 아미노산 서열 특성상 전기영동 하에서 이동이 제대로 이루어지지 못하거나 다이머(dimer)형태로 전기영동이 되어 발생하는 현상으로 생각된다.

[0205] **7-2. 정제된 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 아미노산 조성 분석**

[0206] 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 정제를 더욱 명확히 하기 위하여, 정제된 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 아미노산 조성 분석을 수행하였다.

[0207] 구체적으로는, 정제된 말미잘유래 실크유사 재조합단백질을 증류수에 녹이고 아미노산 정량 분석 키트(amino acid standard H, Pierce Chem. Co.)를 이용하여 아미노산 조성 분석을 수행하였다.

[0208] 발현향상 모티프가 첨가된 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 아미노산 조성 분석 결과는 도 11에 나타내었으며, 말미잘유래 재조합 실크 단백질의 아미노산 조성 분석 결과의 측정값을 이론값과 비교한 값은 표 5에 나타

내었다.

표 5

[0209]

아미노산 종류	측정된 값	이상적인 값
Asx	17.2	12.6
Thr	12.3	9.4
Ser	1.8	1.8
Glx	8.4	9.7
Pro	17.6	17.6
Gly	31.7	34.7
Ala	1.8	0.3
Cys	0.25	2.9
Val	0.19	0.3
Met	0.14	0.3
Ile	0.26	0.3
Leu	0.36	0.6
Tyr	5	5
Phe	0	0.3
His	2.1	2.9
Lys	0.84	0.9
Arg	0	0

[0210]

실시예 8. 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 겔화 시험

[0211]

8-1. 광화학반응을 이용한 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 하이드로겔제조

[0212]

상기 실시예에서 얻어진 말미잘유래 실크유사 재조합단백질의 가교는 광화학반응으로도 유도될 수 있다. 말미잘 유래 실크유사 재조합단백질의 타이로신 잔기의 비율은 5 %이며, 쉽고 빠르게 광반응을 통한 다이-타이로신(di-tyrosine)잔기를 형성을 유도할 수 있다. 약 10 내지 40 % (w/v)의 높은 농도로 단백질을 용해시킨 후, 1 내지 10 mM의 Ru(BPY)₃ (Ruthenium-tris(2,2'-bipyridyl) dichloride)와, 10 mM 내지 200 mM의 APS(ammonium persulfate) 또는 SPS(Sodium persulfate)를 첨가하고, 450 nm의 파장을 가지는 LED를 조사한다. 조사시간은 넣어준 전자수여체의 농도와 광반응성 금속 리간드, 광량에 따라 조절이 가능하다. 본 실시예 따라 재조합단백질을 물드에서 광반응으로 경화시킨 형태를 도 12에 나타냈다.

[0214]

8-2. 겔의 인장강도실험

[0215]

상기 실시예 8-1에서 얻은 0.5 cm X 2 cm 형태의 얇은 막 시트형태의 말미잘유래 실크유사 재조합단백질은 INSTRON(모델명: 3544)를 이용한 인장강도실험(tensile test)를 실행하여 얻어진 응력 변형도 곡선(stress-strain curve)을 얻을 수 있으며, 이로써 소재의 기본적 물성인 압축강도(strength), 탄력성(extensibility), 경도(stiffness), 인성(toughness) 등의 물성을 확인하였다.

[0216]

인장강도실험을 통해 얻어지는 응력 변형도 곡선(stress-strain curve)은 얇은 막 시트형태의 단백질 시험편을 파괴할 때까지 잡아당겨서 그 강도를 조사하는 실험으로, 이때의 strain이 탄력성을 의미하며, 이때의 stress가 강도를 의미한다. 경도는 그래프의 초기 기울기로 나타내어질 수 있으며, 인성은 겔의 파단이 일어나기 위해 필요한 에너지로서, 그래프 하단의 면적으로 구할 수 있다.

[0217]

겔화 후 얻어진 말미잘유래 실크유사 재조합단백질 하이드로겔의 인장강도실험 결과는 도 13에 나타내었으며, 측정값의 결과는 표 6에 나타내었다.

표 6

[0218]

강도 (MPa)	탄력성 (%)	경도 (MPa)	인성 (J/m ³)
0.08 (±0.02)	41.96(±9.09)	0.19 (±0.02)	19.5(±3.6)

[0219]

상기 말미잘유래 실크유사 재조합단백질로 만들어진 수화된 겔의 경도는 약 0.08 MPa로서, 탄력성은 ~42% 수준

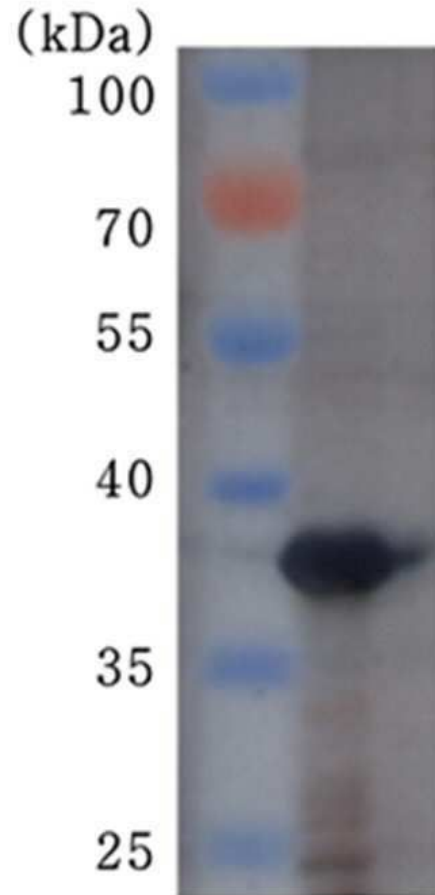
이다. 보통 화학합성된 폴리머로 제작된 하이드로겔의 경우, 경도와 강도는 1 내지 100 kPa 수준이고, 단백질 기반의 하이드로겔은 그 이하의 수준임을 감안하면 얻어진 강도는 기존 단백질 기반 하이드로겔과 비슷한 수준이며, 경도는 2배정도 향상된 기계적 물성을 보여줌을 알 수 있다. 조직으로는 피부의 경도가 10 내지 100 kPa 수준이므로 제일 비슷하다고 볼 수 있다.

도면

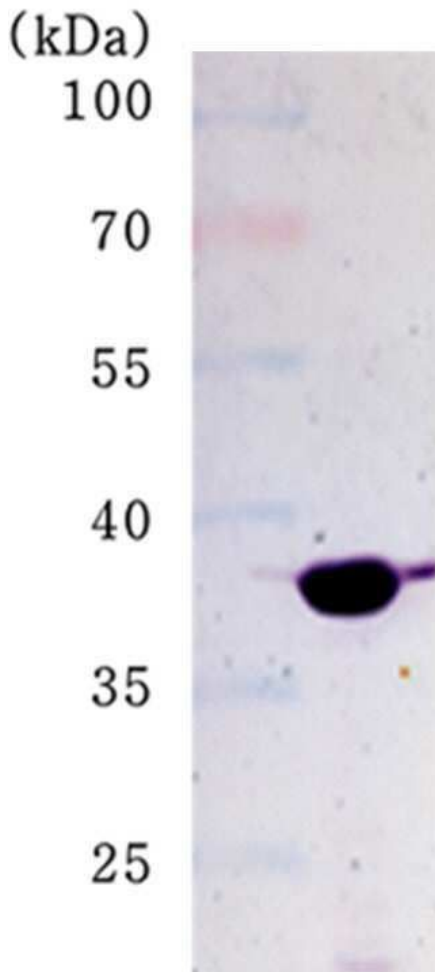
도면1



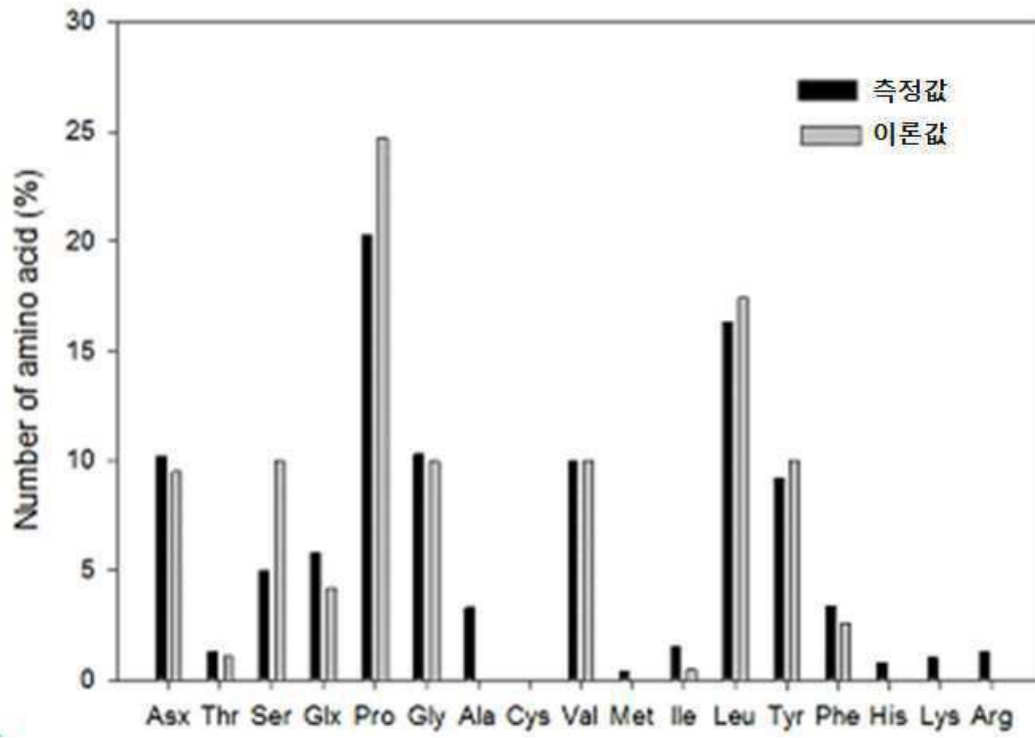
도면2



도면3



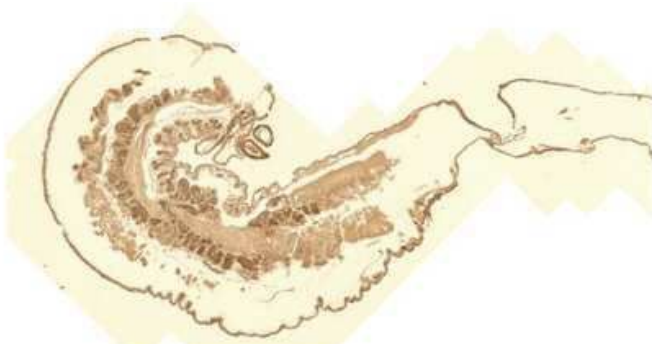
도면4



도면5a



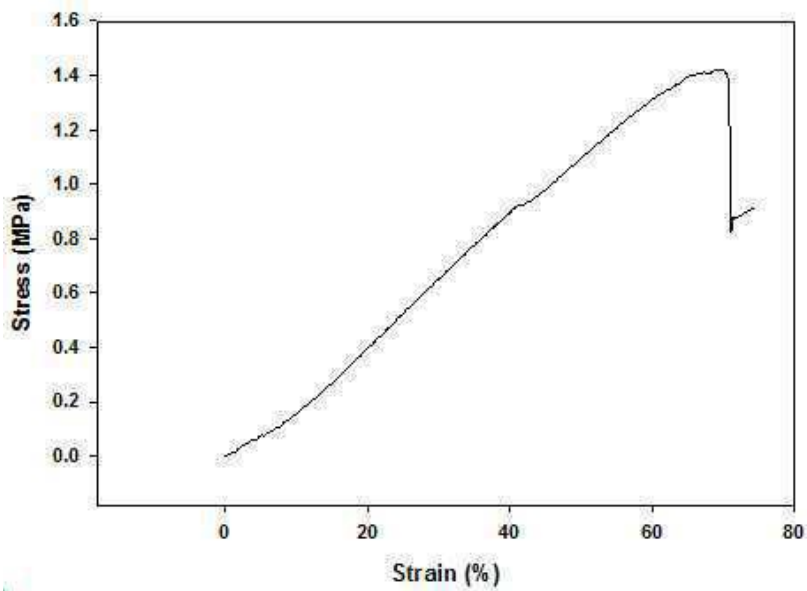
도면5b



도면6



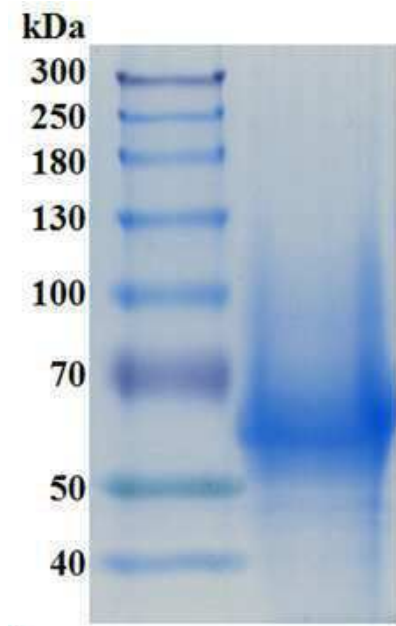
도면7



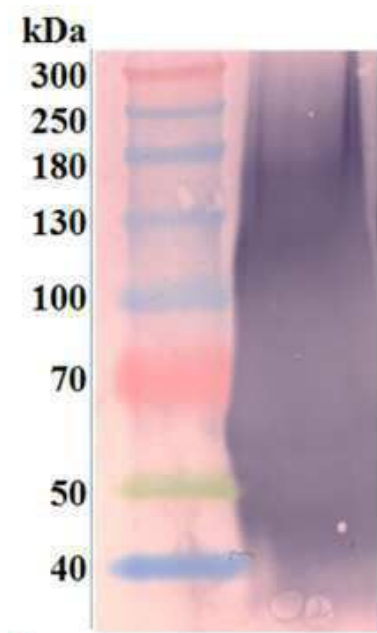
도면8



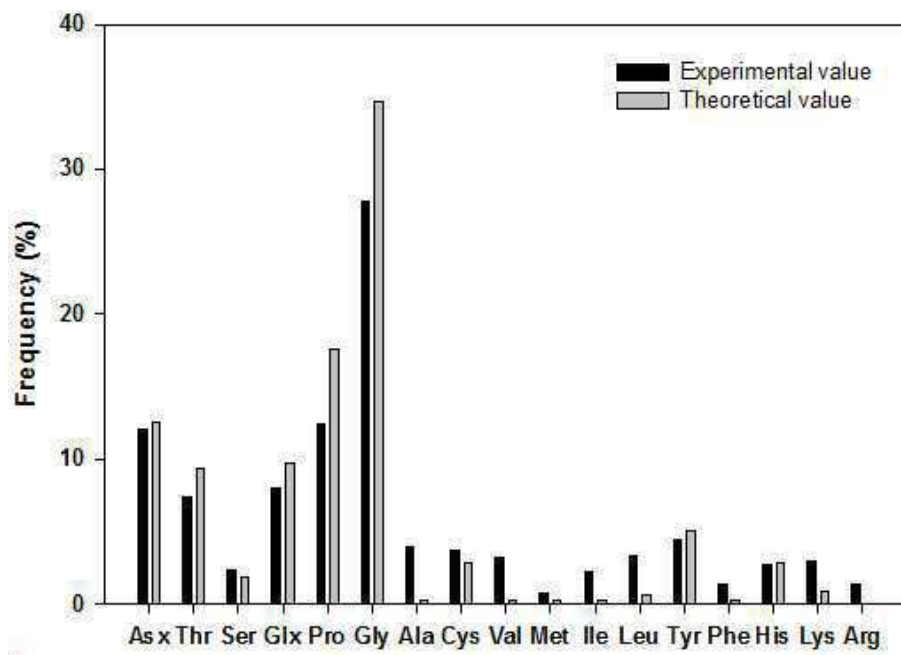
도면9



도면10



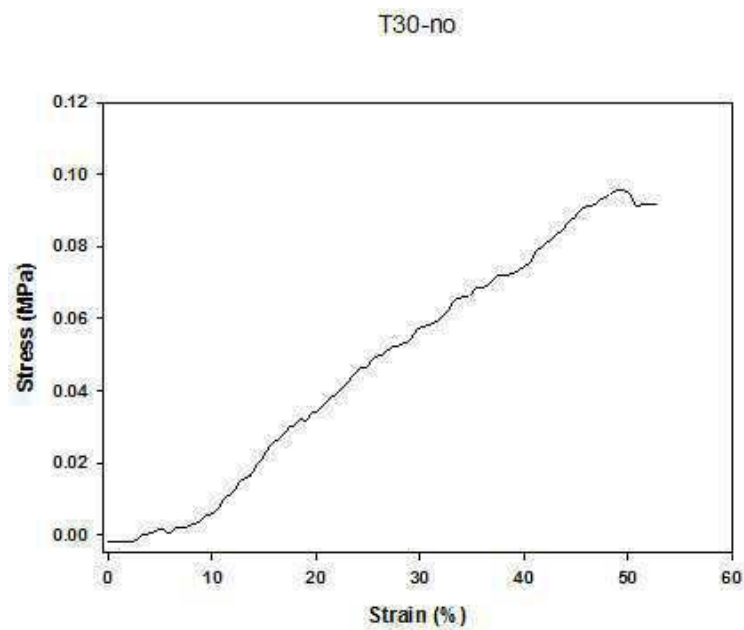
도면11



도면12



도면13



서열목록

<110> POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION

<120> Composition comprising recombinant protein derived from sea anemone for preparing hydrogel and method for preparing hydrogel using the same

<130> DPP20162272KR

<160> 70

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> X is Pro or Gln.

<220><221> VARIANT

<222> (5)

<223> X is Leu or Phe.

<220><221> VARIANT

<222> (7)

<223> X is Pro or Thr.

<220><221> VARIANT

<222> (9)

<223> X is Ser or Thr.

<220><221> VARIANT

<222> (10)

<223> X is Asn or Ile.

<400> 1

Gly Leu Xaa Val Xaa Tyr Xaa Pro Xaa Xaa

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 2
 Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn
 1 5 10

<210> 3

<211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 3
 Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Ile
 1 5 10

<210> 4

<211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 4
 Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Thr Asn
 1 5 10

<210> 5

<211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400>
 5
 Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Thr Ile

1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence
 <400> 6
 Gly Leu Pro Val Leu Tyr Thr Pro Ser Ile
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 7
 Gly Leu Pro Val Leu Tyr Thr Pro Ser Ile
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 8
 Gly Leu Pro Val Leu Tyr Thr Pro Thr Asn
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 9
 Gly Leu Pro Val Leu Tyr Thr Pro Thr Ile
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400>

> 10

Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 11

Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 12

Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Thr Asn

1 5 10

<210>

> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 13

Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Thr Ile

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 14

Gly Leu Pro Val Phe Tyr Thr Pro Ser Asn

1 5 10
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 15
 Gly Leu Pro Val Phe Tyr Thr Pro Ser Ile

1 5 10
 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 16
 Gly Leu Pro Val Phe Tyr Thr Pro Thr Asn

1 5 10
 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 17
 Gly Leu Pro Val Phe Tyr Thr Pro Thr Ile

1 5 10
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 18
 Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn

1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 19
 Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Ile
 1 5 10

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 20
 Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Thr Asn
 1 5 10

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 21
 Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Thr Ile
 1 5 10

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 22
 Gly Leu Gln Val Leu Tyr Thr Pro Ser Asn
 1 5 10

<210> 23

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 23
 Gly Leu Gln Val Leu Tyr Thr Pro Ser Ile
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 24
 Gly Leu Gln Val Leu Tyr Thr Pro Thr Asn
 1 5 10
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

 <400> 25
 Gly Leu Gln Val Leu Tyr Thr Pro Thr Ile
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 26
 Gly Leu Gln Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn
 1 5 10
 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 27
 Gly Leu Gln Val Phe Tyr Pro Pro Ser Ile
 1 5 10

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 28
 Gly Leu Gln Val Phe Tyr Pro Pro Thr Asn
 1 5 10

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 29
 Gly Leu Gln Val Phe Tyr Pro Pro Thr Ile
 1 5 10

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 30
 Gly Leu Gln Val Phe Tyr Thr Pro Ser Asn
 1 5 10

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 31

Gly Leu Gln Val Phe Tyr Thr Pro Ser Ile

1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 32

Gly Leu Gln Val Phe Tyr Thr Pro Thr Asn

1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 33

Gly Leu Gln Val Phe Tyr Thr Pro Thr Ile

1 5 10

<210> 34

<211> 380

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 34

Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr

1 5 10 15

Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu

20 25 30

Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Ser

35 40 45

Ser Asn Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val

Leu Tyr Thr Pro Thr Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn

305 310 315 320

Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Leu Tyr

325 330 335

Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu

340 345 350

Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro

355 360 365

Ser Asn Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn

370 375 380

<210> 35

<211> 390

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 35

His Met Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val

1 5 10 15

Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn

20 25 30

Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Phe Tyr

35 40 45

Pro Ser Ser Asn Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu

50 55 60

Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro

65 70 75 80

Ser Ile Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val

85 90 95

Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn

100 105 110

Gly Leu Pro Val Leu Tyr Thr Pro Thr Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr

115 120 125
 Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu
 130 135 140
 Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val
 165 170 175
 Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn
 180 185 190
 Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr
 195 200 205
 Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu
 210 215 220
 Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Ser
 225 230 235 240
 Ser Asn Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val
 245 250 255
 Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Ile
 260 265 270
 Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr
 275 280 285
 Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu
 290 295 300
 Pro Val Leu Tyr Thr Pro Thr Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro
 305 310 315 320
 Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val
 325 330 335
 Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Gln Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn
 340 345 350
 Gly Leu Pro Val Phe Tyr Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Leu Tyr
 355 360 365

Pro Pro Ser Asn Gly Leu Pro Val Leu Tyr Pro Pro Ser Asn Leu Glu

370 375 380

His His His His His His

385 390

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> X is Gly or Asp.

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> X is Pro or Ser.

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> X is Gly or Ser.

<220><221> VARIANT

<222> (7)

<223> X is Tyr or Cys.

<220><221> VARIANT

<222> (9)

<223> X is Gly or Trp.

<400> 36

Xaa Xaa Xaa Asn Thr Gly Xaa Pro Xaa Gln

1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 37

Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln

1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 38

Asp Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln

1 5 10
 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 39

Gly Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln

1 5 10
 <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 40

Asp Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln

1 5 10
 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 41

Gly Pro Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln

1 5 10
 <210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 42

Asp Pro Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln

1 5 10
 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 43

Gly Ser Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln

1 5 10
 <210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 44

Asp Ser Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln

1 5 10
 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 45

Gly Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln

1 5 10

<210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 46
 Asp Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 47
 Gly Ser Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln
 1 5 10
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 48
 Asp Ser Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 49
 Gly Pro Ser Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 50

Asp Pro Ser Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln

1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 51

Gly Ser Ser Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln

1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 52

Asp Ser Ser Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 53

Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 54
 Asp Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 55
 Gly Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 56
 Asp Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 57
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 57
 Gly Pro Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence
 <400> 58
 Asp Pro Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 59
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence
 <400> 59
 Gly Ser Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 60
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence
 <400> 60
 Asp Ser Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence
 <400> 61
 Gly Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence
 <400> 62

Asp Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 63

Gly Ser Gly Asn Thr Gly Cys Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 64

Asp Ser Gly Asn Thr Gly Cys Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 65

Gly Pro Ser Asn Thr Gly Cys Pro Trp Gln
 1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 66

Asp Pro Ser Asn Thr Gly Cys Pro Trp Gln

1 5 10
 <210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 67

Gly Ser Ser Asn Thr Gly Cys Pro Trp Gln

1 5 10
 <210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 68

Asp Ser Ser Asn Thr Gly Cys Pro Trp Gln

1 5 10
 <210> 69
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 69

Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly

1 5 10 15
 His Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Asp Pro

20 25 30
 Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Asp Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro
 35 40 45
 Gly Gln Asp Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn
 50 55 60
 Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln
 65 70 75 80

Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly
 85 90 95

Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln Gly Pro
 100 105 110

Gly Asn Thr Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly
 115 120 125

Asn Thr Gly His Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly
 130 135 140

Gln Asp Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Asp Pro Gly Asn Thr
 145 150 155 160

Gly Cys Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly
 165 170 175

Ser Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Ser Gly Asn Thr Gly Cys
 180 185 190

Pro Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly
 195 200 205

Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly His Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr
 210 215 220

Gly Tyr Pro Gly Gln Asp Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Asp
 225 230 235 240

Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Cys
 245 250 255

Pro Gly Gln Gly Ser Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Ser Gly
 260 265 270

Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr
 275 280 285

Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly
 290 295 300

Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr
 305 310 315

<210> 70

<211> 339

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 70

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro Gly

1 5 10 15

Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly His Pro Gly

20 25 30

Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Asp Pro Gly Asn Thr

35 40 45

Gly Tyr Pro Gly Gln Asp Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Asp

50 55 60

Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Cys

65 70 75 80

Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Pro Gly

85 90 95

Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly

100 105 110

Gln Gly Pro Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Trp Gln Gly Pro Gly Asn Thr

115 120 125

Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly

130 135 140

His Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Asp Pro

145 150 155 160

Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Asp Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro

165 170 175

Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Ser Gly Asn

180 185 190

Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Ser Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln

195 200 205

Gly Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro

210 215 220
 Gly Asn Thr Gly His Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro
 225 230 235 240
 Gly Gln Asp Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Asp Pro Gly Asn
 245 250 255
 Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln

 260 265 270
 Gly Ser Gly Asn Thr Gly Cys Pro Gly Gln Gly Ser Gly Asn Thr Gly
 275 280 285
 Cys Pro Gly Gln Gly Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Gly Tyr Pro
 290 295 300
 Gly Gln Gly Pro Ser Asn Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn
 305 310 315 320
 Thr Gly Tyr Pro Gly Gln Gly Pro Gly Asn Thr Leu Glu His His His
 325 330 335

 His His His