



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년01월23일
 (11) 등록번호 10-0673674
 (24) 등록일자 2007년01월17일

(21) 출원번호	10-2000-7012700	(65) 공개번호	10-2001-0043571
(22) 출원일자	2000년11월13일	(43) 공개일자	2001년05월25일
심사청구일자	2004년04월12일		
번역문 제출일자	2000년11월13일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP1999/003255	(87) 국제공개번호	WO 1999/58683
국제출원일자	1999년05월07일	국제공개일자	1999년11월18일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 남아프리카, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장

9810276.7 1998년05월13일 영국(GB)

(73) 특허권자

글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
 벨기에왕국 럭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89

(72) 발명자

루엘레, 진-루이스
 벨기에리센사르트(비-1330)루드린스티튜트89스미스클라인비이참바이
 오로지칼즈에스.에이.

(74) 대리인

남상선

심사관 : 정의준

전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 나이세리아 메닌지티디스로부터의 B A S B 029폴리누클레오티드 및 폴리펩티드

(57) 요약

본 발명은 BASB029 폴리펩티드 및 BASB029 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드 및 재조합 기술에 의해 이러한 폴리펩티드를 생성시키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 진단, 예방 및 치료적 용도를 제공한다.

내용도

도 3

특허청구의 범위

청구항 1.

서열 번호: 2 또는 서열 번호: 4의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드.

청구항 2.

서열 번호: 2 또는 서열 번호: 4의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드.

청구항 3.

C-말단 앵커 도메인이 결여된, 제 1 항의 폴리펩티드의 면역원성 단편.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 상기 면역원성 단편이 N-말단 도메인이 추가로 결여되었음을 특징으로 하는 면역원성 단편.

청구항 5.

서열 번호: 2 또는 서열 번호: 4의 폴리펩티드의 불변 영역인 제 1 항의 폴리펩티드의 면역원성 단편.

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

서열 번호: 1 또는 서열 번호: 3인 누클레오티드 서열 또는 상기 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 3에 완전히 상보적인 누클레오티드 서열을 가지는 단리된 폴리누클레오티드.

청구항 10.

서열 번호: 1 또는 서열 번호: 3인 누클레오티드 서열로 구성되는 단리된 폴리누클레오티드.

청구항 11.

적합한 라이브러리를 염격한 하이브리드화 조건하에서 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 3의 서열 또는 이의 단편을 갖는 표지된 프로브로 스크리닝하므로써 얻을 수 있는 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 4의 폴리펩티드를 코드화하는 누클레오티드 서열을 가지는 단리된 폴리누클레오티드.

청구항 12.

C-말단 앵커 도메인이 결여되었거나, C-말단 앵커 도메인 및 N-말단 도메인 둘 모두가 결여되었거나, 서열번호: 2 또는 서열번호: 4의 폴리펩티드의 불변영역인, 서열번호: 2 또는 서열번호: 4의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드의 면역원성 단편을 엔코딩하는 단리된 폴리누클레오티드.

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 폴리누클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 17.

제 16항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 18.

제 16항에 따른 발현 벡터를 포함하는 살아있는 미생물.

청구항 19.

제 11 항 또는 제 12 항의 누클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 나이세리아 메닌지티디스 숙주 세포.

청구항 20.

제 1 항 또는 제 2 항의 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 면역원성 단편을 발현하는 숙주 세포 막.

청구항 21.

제 20 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 각각 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 3을 가지는 누클레오티드 서열로부터 발현됨을 특징으로 하는 막.

청구항 22.

제 1 항 또는 제 2 항의 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 면역원성 단편을 발현하는 숙주 세포의 세포내 분획물.

청구항 23.

제 22 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 각각 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 3을 가지는 누클레오티드 서열로부터 발현됨을 특징으로 하는 세포내 분획물.

청구항 24.

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 정의된 면역원성 단편을 생성하는 방법으로서, 제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 폴리누클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 상기 폴리펩티드 또는 면역원성 단편을 생성하기에 충분한 조건하에서 배양시키고 배양 배지로부터 폴리펩티드 또는 면역원성 단편을 회수하는 것을 포함하는 방법.

청구항 25.

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 정의된 면역원성 단편을 생성하는 방법으로서, 상기 폴리펩티드 또는 면역원성 단편을 생성하기에 충분한 조건하에서 제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 폴리누클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양시키고 배양 배지로부터 폴리펩티드 또는 면역원성 단편을 회수하는 것을 포함하는 방법.

청구항 26.

제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 폴리누클레오티드의 발현을 위해 충분한 조건하에서 제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 폴리누클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하여 제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 폴리누클레오티드를 발현시키는 방법.

청구항 27.

서열번호: 1 또는 서열번호: 3을 가지는 폴리누클레오티드의 발현을 위해 충분한 조건하에서 제 11 항 또는 제 12 항의 누클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 나이세리아 메닌지티디스 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하여 서열번호: 1 또는 서열번호: 3을 가지는 폴리누클레오티드를 발현시키는 방법.

청구항 28.

제 1 항 또는 제 2 항의 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 면역원성 단편의 생성을 위해 충분한 조건하에서 제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 폴리누클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하고 배양 배지로부터 막을 회수하는 것을 포함하여, 제 1 항 또는 제 2 항의 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 면역원성 단편을 발현하는 숙주 세포 막을 생성하는 방법.

청구항 29.

유효량의 제 1 항 또는 제 2 항의 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 나이세리아 메닌지티디스 감염에 대한 백신 조성물.

청구항 30.

유효량의 제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 폴리누클레오티드 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 나이세리아 메닌지티디스 감염에 대한 백신 조성물.

청구항 31.

유효량의 제 1 항 또는 제 2 항의 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 면역원성 단편을 발현하는 숙주 세포 막 또는 제 1 항 또는 제 2 항의 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 면역원성 단편을 발현하는 숙주 세포의 세포내 분획물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 나이세리아 메닌지티디스 감염에 대한 백신 조성물.

청구항 32.

(i) 유효량의 제 1 항 또는 제 2 항의 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 면역원성 단편;

(ii) 약제학적으로 허용되는 담체; 및

(iii) 3 데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A, QS21, QS21 및 콜레스테롤, 면역자극성 올리고누클레오티드 및 이들의 조합물을 포함하는 군으로부터 선택된 애쥬번트

를 포함하는 나이세리아 메닌지티디스 감염에 대한 백신 조성물.

청구항 33.

(i) 유효량의 서열번호: 1 또는 서열번호: 3의 폴리누클레오티드;

(ii) 약제학적으로 허용되는 담체; 및

(iii) 3 데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A, QS21, QS21 및 콜레스테롤, 면역자극성 올리고누클레오티드 및 이들의 조합물을 포함하는 군으로부터 선택된 애쥬번트

를 포함하는 나이세리아 매닌지티디스 감염에 대한 백신 조성물.

청구항 34.

제 32 항에 있어서, 상기 면역자극성 올리고누클레오티드가 메틸화되지 않은 CpG임을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 35.

제 33 항에 있어서, 상기 면역자극성 올리고누클레오티드가 메틸화되지 않은 CpG임을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 36.

제 32 항에 있어서, 담체가 대사가능한 오일을 포함하는 수중유 에멀전을 포함함을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 37.

제 36 항에 있어서, 대사가능한 오일이 스쿠알렌, 알파 토코페롤, 및 트원 80을 포함함을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 38.

제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 정의된 면역원성 단편에 대해 생성되는 모노클로날 항체.

청구항 39.

제 1 항 또는 제 2 항의 폴리펩티드, 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 면역원성 단편, 제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 폴리누클레오티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 정의된 면역원성 단편에 대해 생성되는 모노클로날 항체를 포함하는 진단 키트.

청구항 40.

제 1 항 또는 제 2 항의 재조합 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 면역원성 단편의 정제 방법으로서,

이온 금속 친화성 크로마토그래피, 황산 암모늄 침전법, 에탄올 침전법, 산 추출법, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 및 렉틴 크로마토그래피로 구성된 군으로부터 선택된 정제 방법.

청구항 41.

삭제

청구항 42.

삭제

청구항 43.

작제

청구항 44.

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 폴리펩티드 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 정의된 면역원성 단편을 생성하는 방법으로서, 상기 폴리펩티드 또는 면역원성 단편을 생성하기에 충분한 조건하에서 제 11 항 또는 제 12 항의 누클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 *나이세리아 메닌지티디스* 숙주 세포를 배양시키고 배양 배지로부터 폴리펩티드 또는 면역원성 단편을 회수하는 것을 포함하는 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 폴리누클레오티드(본원에서는 "BASB029 폴리누클레오티드(들)", 이들에 의해 코드화된 폴리펩티드(본원에서는 "BASB029" 또는 "BASB029 폴리펩티드(들)", 재조합 물질 및 이들의 제조 방법에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 박테리아 감염에 대한 백신을 포함하여, 이러한 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드를 사용하는 방법에 관한 것이다. 추가의 양태에서, 본 발명은 특정 병원균의 감염을 검출하기 위한 진단 분석 방법에 관한 것이다.

배경기술

나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*)(메닌조코커스 (*meningococcus*))는 주로 사람 상기도로부터 단리되는 그람-네거티브 박테리아이다. 이는 때때로 균혈증 및 수막염과 같은 침입성 박테리아 질환을 유발시킨다. 메닌조코커스 질환의 발병률은 지리학적 계절 및 연간에 따라 차이가 있다(Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2(Supplement), S18-S24, 1989). 온난 국가의 대부분의 질환은 세로그룹 B 균주로부터 초래되며, 1-10/100,000/연간 총 인구의 발병률을 나타내며, 이는 때때로 이보다 더 높은 값에 이른다(Kaczmarski, E.B.(1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7:R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T. et al. Clin. Infect. Dis. 16:237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., et al. Epidemiol. Infect. 105:119-126, 1990).

중앙 아프리카에서 세로그룹 A 메닌조코커스가 대부분을 차지하는 전염병은 때때로 1000/100,000/1년의 수준까지 도달 한다(Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V. Clin. Microbiol. Rev. 2(Supplement), S18-S24, 1989). 대부분의 메닌조코커스 질환과 같이 거의 모든 경우는 세로그룹 A, B, C, W-135 및 Y 메닌조코커스에 의해 초래되며, 4가 A, C, W-135, Y 폴리사카라이드 백신은 구입 가능하다(Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10:335-339, 1982).

상기 폴리사카라이드 백신은 최근에 이들을 담체 단백질에 화학적 컨주케이션하는 방식으로 개발되었다(Lieberman, J.M., Chiu, S.S., Wong, V.K., et al. JAMA 275:1499-1503, 1996).

B 캡슐 폴리사카라이드가 비면역원성인 것으로 밝혀졌고, 무엇보다도 숙주 성분과 구조적 유사성을 공유하기 때문에, 세로그룹 B 백신은 사용 불가능하다(Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L. et al. J. Infect. Dis. 126:514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Maekelae, P.M. Lancet ii: 355-357, 1983).

수년 동안, 메닌조코커스 외막 기재 백신의 개발이 착수되었으며, 수행되어 왔다(de Moraes, J.C., Perkins, B., Camargo, M.C. et al. Lancet 340:1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E.A. Gronnesby, J.K. et al. 338:1093-1096, 1991). 이러한 백신은 어린이(>4세) 및 청소년에게서 57% 내지 85%의 효능이 입증되었다.

PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB와 같은 많은 박테리아 외막 성분이 이러한 백신에 존재하며, 관찰된 방어에 대한 이들 성분의 효과는 추가의 정의가 요구되고 있다. TbpB 및 NspA와 같은 다른 박테리아 외막 성분은, 동물 또는 사람 항체를 사용하여 방어적 면역성의 유도에 잠재적으로 관련된 것으로써 정의되었다(Martin, D., Cadieux, N., Harmel, J., Brodeux, B.R., J. Exp. Med. 185:1173-1183, 1997; Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, C., Dumas, P. et al., Inf. Immun. 63:884-890, 1995). 방어 면역성의 메카니즘은 항체 매개된 멸균 활성 및 옵소노파고사이토시스 (opsonophagocytosis)를 포함할 것이다.

균혈증 동물 모델은 모든 항체 매개된 메카니즘을 조합시키는데 사용될 수 있다(Saukkonen, K., Leinonen, M., Abdillahi, H. Poolman, J.T. Vaccine 7:325-328, 1989). 최신의 상보적 성분 매개된 멸균 메카니즘은 메닌조코커스 질환에 대한 면역성에 중요한 것으로 받아들여졌다(Ross.S.C., Rosenthal P.J., Berberic, H.M., Densen, P.J. Infect. Dis. 155:1266-1275, 1987).

나이세리아 메닌지티디스 감염의 발생률은 지난 몇십년 동안 극적으로 증가되어 왔다. 이는 항체 저항성 균주 번식의 출현 및 약화된 면역 시스템을 갖는 인구의 증가로 인한 것이다. 표준 항생제 일부 또는 모두에 저항성인 나이세리아 메닌지티디스 균주를 단리하는 것은 보기 드문 것이 아니다. 이러한 현상은 새로운 항균제, 백신, 약물 스크리닝 방법 및 이러한 유기체에 대한 진단 시험에 대한 의학적 필요성과 요구가 창출되었다.

발명의 요약

본 발명은 BASB029, 특히 BASB029 폴리펩티드 및 BASB029 폴리누클레오티드, 재조합 물질 및 이들의 제조 방법에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물 질환의 예방 및 치료를 포함하여, 이러한 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드를 사용하는 방법에 관한 것이다. 추가의 양태에서, 본 발명은 BASB029 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드의 발현 또는 활성을 검출하기 위한 분석법과 같은, 미생물 감염과 관련된 질환 및 이러한 감염과 관련된 질병을 검출하기 위한 진단 검정 방법에 관한 것이다.

하기 상세한 설명 및 본 발명의 내용을 숙지한 당업자라면 본 발명의 사상 및 범위내에 다양한 변화 및 변경이 일어날 수 있음을 인지할 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 하기 상세히 설명될 바와 같이 BASB029 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 나이세리아 메닌지티디스의 BASB029의 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드에 관한 것이며, 아미노산 서열 상동성에 있어서, 해모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 표면 섬유(HSF) 단백질과 관련되어 있다. 본 발명은 특히, 각각 서열 번호: 1,3 및 서열 번호: 2,4에 기재된 핵산 및 아미노산 서열을 갖는 BASB029에 관한 것이다. 서열 목록 아래에 "DNA"로서 언급된 서열은 본 발명의 한 구체예를 나타내는 것으로 이해되는데, 그 이유는 당업자는 이러한 서열이 리보폴리누클레오티드를 포함하여 일반적인 폴리누클레오티드에 유용하게 사용될 수 있다는 것을 인지할 것이기 때문이다.

폴리펩티드

본 발명의 한 양태는, "BASB029" 및 "BASB029 폴리펩티드"로서 언급된 나이세리아 메닌지티디스의 폴리펩티드, 및 생물학적으로, 진단학적으로, 예방학적으로, 임상학적으로 또는 치료학적으로 유용한 이들의 변이체 및 이를 포함하는 조성물을 제공한다.

본 발명은 추가로,

(a) 서열 번호: 2,4에 기재된 아미노산 서열과 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 97-99% 이상의 동일성을 지니거나 완전히 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드;

(b) 서열 번호: 1,3의 전체 길이에 걸쳐 각각 서열 번호: 1,3의 서열과 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 97-99% 이상의 동일성을 지니거나 완전히 동일한 폴리누클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리누클레오티드에 의해 코드화된 폴리펩티드; 또는

(c) 서열 번호: 2,4의 아미노산 서열과 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 97-99% 이상의 동일성을 지니거나 완전히 동일한 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리누클레오티드에 의해 코드화된 폴리펩티드를 제공한다.

서열 번호: 2,4에 제공된 BASB029 폴리펩티드는 나이세리아 메닌지티디스 균주 ATCC13090 및 H44/76으로부터의 BASB029 폴리펩티드이다.

본 발명은 또한, BASB029 폴리펩티드의 면역원성 단편, 즉 서열 번호: 2,4의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드와 동일하거나 사실상 동일한 면역원성 활성을 갖는 BASB029 폴리펩티드의 인접 부분을 제공한다. 말하자면, 단편(필요에 따라, 담체에 커플링될 경우)은 BASB029 폴리펩티드를 인지하는 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 이러한 면역원성 단편은 예를 들어, N-말단 리더 서열, 및/또는 트랜스멤브레인 도메인 및/또는 C-말단 앵커 도메인이 결여된 BASB029 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 BASB029의 면역원성 단편은, 서열 번호: 2의 전체 길이에 걸쳐서열 번호: 2,4의 서열과 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 97-99% 이상의 동일성을 지니거나 완전히 동일한 폴리펩티드의 사실상 모든 세포외 도메인을 포함한다.

단편은, 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 서열 전부는 아니지만 전체적으로 부분적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다. BASB029 폴리펩티드와 관련하여 설명하자면, 단편은 "단독으로 존재(free-standing)"할 수 있거나, 일부 또는 영역을 형성하는 더 큰 폴리펩티드 내에서 가장 바람직하게는, 단일의 더 큰 폴리펩티드내의 단일의 연속성 영역으로서 포함될 수 있다.

바람직한 단편은 예를 들어, 서열 번호: 2,4의 아미노산 서열 또는 이들 변이체의 일부를 갖는 절단 폴리펩티드, 예컨대, 아미노- 및/또는 카르복실-말단 아미노산 서열을 포함하는 일련의 연속성 잔기를 포함한다. 숙주 세포에 의해 또는 숙주 세포내에서 생성된, 분해된 형태의 본 발명의 폴리펩티드가 또한, 바람직하다. 추가로 바람직한 것은, 알파-헬릭스 및 알파-헬릭스 형성 영역, 베타-시이트 및 베타-시이트-형성 영역, 텐 및 텐-형성 영역, 코일 및 코일 형성 영역, 친수성 영역, 소수성 영역, 알파 양친매성 영역, 베타 양친매성 영역, 가요성 영역, 표면-형성 영역, 기질 결합 영역 및 높은 항원성 지수 영역을 포함하는 단편과 같은 구조적 또는 기능적 특성에 의해 특징지어진다.

추가의 바람직한 단편은, 서열 번호: 2,4의 아미노산 서열로부터의 15, 20, 30, 40, 50 또는 100개 이상의 연속 아미노산을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드, 또는 서열 번호: 2,4의 아미노산 서열로부터 절단되거나 결실된 15, 20, 30, 40, 50 또는 100개 이상의 연속 아미노산을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드의 단편은, 웨프티드 합성에 의해 상응하는 전장(full-length) 폴리펩티드를 생성하는데 사용될 수 있다: 따라서, 이러한 단편은 본 발명의 전장 폴리펩티드를 생성하기 위한 매개체로서 사용될 수 있다.

특히 바람직한 것은, 수 개, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 또는 1개의 아미노산이 치환되거나, 결실되거나 첨가된 변이체이다.

본 발명의 폴리펩티드 또는 면역원성 단편은 "성숙" 단백질의 형태일 수 있거나, 전구체 또는 융합 단백질과 같은 더 큰 단백질의 부분일 수 있다. 분비 또는 리더 서열, 프로-서열, 다중 히스티딘 잔기와 같은 정체에 도움이 되는 서열을 함유하는 추가적 아미노산 서열, 또는 재조합 생성 동안 안정성을 위한 추가적 서열을 포함하는 것이 종종 유리하다. 게다가, 최종 분자의 면역원성 잠재력을 증가시키기 위한 외인성 폴리펩티드 또는 지질 테일 또는 폴리누클레오티드 서열의 첨가가 고려된다.

한 양태에서, 본 발명은, 본 발명의 폴리펩티드 또는 이것의 단편, 및 다양한 서브클래스의 면역글로불린(IgG, IgM, IgA, IgE)의 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역의 다양한 일부를 포함하는 유전학적으로 조작된 가용성 융합 단백질에 관한 것이다. 면역글로불린으로서 바람직한 것은, 융합이 힌지 영역에서 발생하는 사람 IgG, 특히 IgG1의 중쇄의 불변 영역이다. 특정 구체예에서, Fc 부분은 혈액 응고 인자 Xa로 절단될 수 있는 절단 서열의 혼입에 의해 간단하게 제거될 수 있다.

게다가, 본 발명은 유전 공학에 의해 이러한 융합 단백질을 생성시키는 방법, 및 약물 스크리닝, 진단 및 치료에 이들을 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 추가의 양태는 또한, 이러한 융합 단백질을 코드화하는 폴리누클레오티드에 관한 것이다. 융합 단백질 기술의 예는 국제 특허 출원 WO94/29458 및 WO94/22914에서 찾아볼 수 있다.

상기 단백질은 화학적으로 켄주게이션되거나, 재조합 융합 단백질로서 발현되어, 비융합 단백질과 비교하여 발현 시스템에서 증가된 수준의 생성을 가능하게 한다. 융합 파트너는 T 헬퍼 에피토프, 바람직하게는 사람에 의해 인지된 T 헬퍼 에피토프의 제공을 보조할 수 있거나(면역학적 융합 파트너), 천연 재조합 단백질보다 높은 수율로의 단백질 발현을 보조한다(발현 인핸서). 바람직하게는, 융합 파트너는 면역학적 융합 파트너 및 발현 인핸싱 파트너이다.

융합 파트너는 헤모필루스 인플루엔자로부터의 단백질 D 및 인플루엔자 바이러스, NS1로부터의 비구조적 단백질(헤마글루틴)을 포함한다. 또 다른 융합 파트너는 LytA로서 공지된 단백질이다. 바람직하게는, 분자의 C 말단 부분이 사용된다. LytA는 N-아세틸-L-알라닌 아미다아제, 아미다아제 LytA(lytA 유전자에 의해 코드화됨(Gene, 43(1986) page 265-272)), 웨프티도글리칸 백본에 특정 결합을 특이적으로 분해하는 오토리신을 합성하는 스트렙토코커스 뉴모니아

(*Streptococcus pneumoniae*)로부터 유도된다. LytA 단백질의 C-말단 도메인으로 인해 DEAE와 같은 콜린 또는 일부의 콜린 유사체로의 친화성을 갖는다. 이러한 특성은 융합 단백질의 발현에 유용한 대장균 C-LytA 발현 플라스미드의 개발을 촉진시켰다. 아미노 말단에서 C-LytA 단편을 함유하는 하이브리드 단백질의 정제는 문헌[Biotechnology: 10, (1992) page 795-798]에 설명되어 있다. 잔기 178, 예를 들어, 188-305에서 시작하는 C 말단부에서 발견된 LytA 분자의 반복 부분을 사용하는 것이 가능하다.

본 발명은 또한, 상기 언급된 폴리펩티드의 변이체, 즉 잔기가 유사 특성의 또 다른 잔기에 의해 치환되는 보존적 아미노산 치환에 의해 기준물과 상이한, 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 전형적인 치환체로는 Ala, Val, Leu 및 Ile; Ser 및 Thr; 산성 잔기 Asp 및 Glu; Asn 및 Gln; 및 염기성 잔기 Lys 및 Arg; 또는 방향성 잔기 Phe 및 Tyr이 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 단리된, 자연적으로 발생한 폴리펩티드, 재조합적으로 생성된 폴리펩티드, 합성적으로 생성된 폴리펩티드, 또는 이러한 방법의 혼합에 의해 생성된 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 폴리펩티드를 제조하는 방법은 당해분야에 널리 공지되어 있다.

본 발명의 폴리펩티드가 나이세리아 메닌지티디스로부터 유도된 것이 가장 바람직하지만, 동일한 분류적 속의 기타 유기체로부터 수득된 것도 바람직하다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 예를 들어, 동일한 분류적 계 또는 목의 유기체로부터 수득될 수 있다.

폴리누클레오티드

본 발명의 목적은, BASB029 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드, 특히 본원에서 고안된 BASB029를 코드화하는 폴리누클레오티드를 제공하는 것이다.

본 발명의 특히 바람직한 구체예에서, 폴리누클레오티드는 전장 유전자 또는 이들의 변이체를 포함하는, 서열 번호: 1,3에 기재된 서열을 포함하는 BASB029 폴리펩티드를 코드화하는 영역을 포함한다.

서열 번호: 1,3에 제공된 BASB029 폴리누클레오티드는 나이세리아 메닌지티디스 균주 ATCC13090 및 H44/76으로부터의 BASB029 폴리누클레오티드이다.

본 발명의 추가적 양태로서, BASB029 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드, 특히 나이세리아 메닌지티디스 BASB029 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드를 코드화하고/거나 발현하는 단리된 핵산 분자, 예를 들어, 비프로세싱된 RNA, 리보자임 RNA, mRAN, cDNA, 지놈성 DNA, B- 및 Z-DNA를 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 본 발명의 추가적인 구체예는, 생물학적으로, 진단학적으로, 예방학적으로 또는 치료학적으로 유용한 폴리누클레오티드 및 폴리펩티드, 이들의 변이체 및 이를 포함하는 조성물을 포함한다.

본 발명의 또 다른 양태는, 서열 번호: 2,4의 추론된 아미노산 서열을 갖는 BASB029 폴리펩티드를 코드화하며, 하나 이상의 전장 유전자를 포함하는 단리된 폴리누클레오티드, 이들과 밀접하게 관련된 폴리누클레오티드 및 이들의 변이체에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 특히 바람직한 구체예에는, 서열 번호: 2,4의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 나이세리아 메닌지티디스로부터의 BASB029 폴리펩티드 및 이들의 변이체이다.

서열 번호: 1,3에 기재된 폴리누클레오티드와 같이 본원에 제공된 정보를 이용하므로써, BASB029 폴리펩티드를 코드화하는 본 발명의 폴리누클레오티드는, 출발 물질로서 나이세리아 메닌지티디스를 사용하여 박테리아로부터 염색체 DNA 단편을 클로닝하고, 시퀀싱한 후, 전장 클론을 수득하는 것과 같은 표준 클로닝 및 스크리닝 방법을 사용하므로써 수득될 수 있다. 예를 들어, 서열 번호: 1,3에 제공된 폴리누클레오티드 서열과 같은 본 발명의 폴리누클레오티드 서열을 수득하기 위해, 대장균 또는 다른 적합한 숙주중의 나이세리아 메닌지티디스의 염색체 DNA 클론의 라이브리리는 전형적으로, 부분 서열로부터 유래된, 방사선 동위원소 표지된 올리고누클레오티드, 바람직하게는 17개 이상의 올리고누클레오티드로 프로빙된다. 그 후, 프로브의 DNA와 동일한 DNA를 갖는 클론은 염격한 하이브리드화 조건을 사용하여 구별된다. 이렇게 확인된 개별적인 클론을 원래의 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드 서열로부터 고안된 시퀀싱 프라이머와의 하이브리드화에 의해 시퀀싱하므로써, 양 방향으로 폴리누클레오티드 서열을 확장시켜 전장 유전자 서열을 측정하는 것이 가능하게 된다. 편리하게는, 이러한 시퀀싱은 예를 들어, 플라스미드 클론으로부터 제조된 변성된 이중 가닥 DNA를 사용하므로써 수행된다. 적합한 방법은 문헌[Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989)(특히, Screening

by Hybridization 1.90 and Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70]에 기재되어 있다. 직접적인 지놈성 DNA 시퀀싱 또한, 전장 유전자 서열을 수득하기 위해 수행될 수 있다. 본 발명의 실례로서, 서열 번호: 1,3에 기재된 각각의 폴리누클레오티드는 나이세리아 메닌지티디스로부터 유래된 DNA 라이브러리에서 발견되었다.

게다가, 서열 번호: 1,3에 기재된 각각의 DNA 서열은, 당해분야에 널리 공지된 아미노산 잔기 분자량 값을 사용하여 계산될 수 있는 추론된 분자량을 갖는, 약 서열 번호: 2,4에 기재된 아미노산 잔기의 수를 갖는 단백질을 코드화하는 오픈 리딩 프레임을 함유한다.

서열 번호: 1의 누클레오티드 1번에서의 개시 코돈과 누클레오티드 1783번에서 시작하는 정지 코돈 사이의 서열 번호: 1의 폴리누클레오티드는 서열 번호: 2의 폴리펩티드를 코드화한다.

서열 번호: 3의 누클레오티드 1번에서의 개시 코돈과 누클레오티드 1774번에서 시작하는 정지 코돈 사이의 서열 번호: 3의 폴리누클레오티드는 서열 번호: 4의 폴리펩티드를 코드화한다.

추가의 양태에 있어서, 본 발명은 하기 (a) 또는 (b)를 포함하거나 이들로 구성된 단리된 폴리누클레오티드를 제공한다:

(a) 각각 서열 번호: 1,3의 전체 길이에 걸쳐 서열 번호: 1,3의 서열과 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 97-99% 이상의 동일성을 지니거나 완전히 동일한 폴리누클레오티드 서열; 또는

(b) 각각 서열 번호: 2,4의 전체 길이에 걸쳐 서열 번호: 2,4의 아미노산 서열과 85%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 97-99% 이상의 동일성을 지니거나 100% 동일한 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드 서열.

나이세리아 메닌지티디스 이외의 종으로부터의 상동물 및 오톨로그(ortholog)를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드는, 적합한 라이브러리를 염격한 하이브리드화 조건(예를 들어, 45-65°C의 온도 및 0.1-1%의 SDS 농도)하에 서열 번호: 1,3의 서열 또는 이들의 단편을 포함하거나 이들로 구성된 표지되거나 검출가능한 프로브로 스크리닝하고; 상기 폴리누클레오티드 서열을 함유하는 전장 유전자 및/또는 지놈성 클론을 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득될 수 있다.

본 발명은 서열 번호: 1,3의 코딩 서열(오픈 리딩 프레임)과 전체 길이에 걸쳐 동일한 폴리누클레오티드 서열을 제공한다. 또한, 단독으로 성숙 폴리펩티드 또는 이들의 단편에 대한 코딩 서열뿐만 아니라, 또 다른 코딩 서열을 갖는 리딩 프레임내에서의 성숙 폴리펩티드 또는 단편에 대한 코딩 서열, 예컨대, 리더 또는 분비 서열, 프리-, 프로-, 또는 프리프로-단백질 서열을 코드화하는 서열이 제공된다. 본 발명의 폴리누클레오티드는 또한, 예를 들어, 하나 이상의 5' 내지 3' 비코딩 서열, 예컨대, 전사되었으나 비번역된 서열, 말단 시그널(rho-의존 및 rho-독립적 말단 시그널), 리보좀 결합 부위, 코작(Kozak) 서열, mRNA를 안정화시키는 서열, 인트론 및 폴리아데닐화 시그널을 포함하나, 여기에 제한되지는 않는 하나 이상의 비코딩 서열을 함유할 수 있다.

폴리누클레오티드 서열은 또한, 추가적 아미노산을 코드화하는 추가적 코딩 서열을 포함한다. 예를 들어, 융합된 폴리펩티드의 정제를 촉진하는 마커 서열은 코드화될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 마커 서열은 pQE 벡터(Qiagene, Inc.)에 제공되고, 문헌[Gentz et al., Proc.Natl.Acad.Sci., USA 86:821-824(1989)]에 설명된 바와 같은 헥사-히스티딘 웨프티드 또는 HA 웨프티드 tag(Wilson et al., Cell 37:767(1984))이며, 이 둘 모두는 이들에 융합된 폴리펩티드 서열을 정제하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 폴리누클레오티드는 또한, 유전자 발현을 제어하는 구조 유전자 및 이의 자연적으로 결합된 서열을 포함하는 폴리누클레오티드를 포함하나, 여기에 제한되지는 않는다.

서열 번호: 2,4의 BASB029 폴리펩티드를 코드화하는 누클레오티드 서열은 각각 서열 번호: 1의 누클레오티드 1 내지 1782에 함유된 서열을 코드화하는 폴리펩티드, 또는 서열 번호: 3의 누클레오티드 1 내지 1773에 함유된 서열을 코드화하는 폴리펩티드와 동일할 수 있다. 대안적으로, 유전자 코드의 중복성(축퇴성)에 의해, 서열 번호: 2,4의 폴리펩티드를 코드화하는 서열일 수 있다.

본원에 사용된 용어 "폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드"는 본 발명의 폴리펩티드, 특히 박테리아 폴리펩티드, 더욱 특히 서열 번호: 2,4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 나이세리아 메닌지티디스 BASB029의 폴리펩티드를 코드화하는 서열을 포함하는 폴리누클레오티드를 포함한다. 상기 용어는 또한, 폴리펩티드를 코드화하는 단일의 연속 영역 또는 비연

속 영역(예를 들어, 인테그레이션된 파아지(phage), 인테그레이션된 삽입 서열, 인테그레이션된 백터 서열, 인테그레이션된 트랜스포손 서열에 의해, 또는 RNA 편집 또는 지놈성 DNA 재구성화에 의해 차단된(interrupted) 폴리누클레오티드)과 또한 코딩 및/또는 비코딩 서열을 함유할 수 있는 추가적인 영역을 포함하는 폴리누클레오티드를 포함한다.

본 발명은 또한, 서열 번호: 2,4의 추론된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 변이체를 코드화하는, 본원에 설명된 폴리누클레오티드의 변이체에 관한 것이다.

본 발명의 폴리누클레오티드의 단편은 예를 들어, 본 발명의 전장 폴리누클레오티드를 합성하는데 사용될 수 있다.

추가의 특히 바람직한 구체예는, 여러개, 몇몇 개, 5 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 3개, 2개, 1개 또는 0개의 아미노산 잔기가 치환되거나, 변형되거나, 결실되고/거나 첨가된, 서열 번호: 2,4의 BASB029 폴리펩티드의 아미노산 서열을 갖는 BASB029 변이체를 코드화하는 폴리누클레오티드이다. 특히 바람직한 것은, BASB029 폴리펩티드의 특성 및 활성을 변형시키지 않는 침묵성 치환, 첨가 및 결실이다.

본 발명의 추가의 바람직한 구체예는, 서열 번호: 2,4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 BASB029 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드의 전체 길이에 걸쳐 85% 이상의 동일성을 지니는 폴리누클레오티드, 및 이러한 폴리누클레오티드에 상보적인 폴리누클레오티드이다. 이러한 경우, 전체 길이에 걸쳐 90% 이상의 동일성을 지니는 폴리누클레오티드가 더욱 바람직하며, 95% 이상의 동일성을 지니는 폴리누클레오티드가 특히 더 바람직하다. 게다가, 이러한 95% 이상의 동일성을 지니는 폴리누클레오티드 중 97% 이상의 동일성을 지니는 폴리누클레오티드가 더 바람직하며, 98% 이상 및 99% 이상의 동일성을 지니는 폴리누클레오티드가 더욱 더 바람직하며, 99% 이상의 동일성을 지니는 폴리누클레오티드가 이보다 더 바람직하다.

바람직한 구체예는, 서열 번호: 1,3의 DNA에 의해 코드화된 성숙 폴리펩티드와 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 사실상 보유하는 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드이다.

본 발명의 특정의 바람직한 구체예에 따라서, 서열 번호: 1,3의 폴리누클레오티드와 같은 BASB029 폴리누클레오티드 서열과 특히 염격한 조건하에 하이브리드화되는 폴리누클레오티드를 제공한다.

본 발명은 또한, 본원에 제공된 폴리누클레오티드 서열과 하이브리드화되는 폴리누클레오티드에 관한 것이다. 이러한 경우에 있어서, 본 발명은 특히, 본원에 기재된 폴리누클레오티드와 염격한 조건하에 하이브리드화되는 폴리누클레오티드에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "염격한 조건" 및 "염격한 하이브리드화 조건"은 서열간 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상의 동일성이 존재하는 경우에만 발생하는 하이브리드화을 의미한다. 염격한 하이브리드화 조건의 특정 실례는, 50% 포름아미드, 5x SSC(150mM NaCl, 15mM 트리나트륨 시트레이트), 50mM 나트륨 포스페이트(pH7.6), 5x 덴하르트(Denhardt) 용액, 10% 엑스트란 술페이트, 및 20 μ g/ml의 변성되고, 전단된 엔더 정액 DNA를 포함하는 용액에서 42°C에서 밤새 인큐베이션시킨 후, 약 65°C에서 0.1x SSC에서 하이브리드화 지지물을 세척하는 것을 말한다. 하이브리드화 및 세척 조건은 널리 공지되어 있으며, 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularly Chapter 11]에 예시되어 있다. 용액 하이브리드화는 또한, 본 발명에 의해 제공된 폴리누클레오티드 서열과 함께 이용될 수 있다.

본 발명은, 서열 번호: 1,3에 기재된 폴리누클레오티드 서열에 대한 완전한 유전자를 함유하는 적합한 라이브러리를, 염격한 하이브리드화 조건하에 서열 번호: 1,3에 기재된 상기 폴리누클레오티드 서열 또는 이것의 단편의 서열을 갖는 프로브로 스크리닝하고; 상기 폴리누클레오티드 서열을 분리하므로써 수득된 폴리누클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 구성된 폴리누클레오티드를 제공한다.

본원에 논의된 바와 같이, 본 발명의 폴리누클레오티드 분석에 있어서, 예를 들어, 본 발명의 폴리누클레오티드는, BASB029를 코드화하는 전장 cDNA 및 지놈성 클론을 분리하고, BASB029 유전자에 대한 높은 동일성, 특히 높은 서열 동일성을 지니는 다른 유전자의 cDNA 및 지놈성 클론을 분리하기 위해 RNA, cDNA 및 지놈성 DNA에 대한 하이브리드화 프로브로써 사용될 수 있다. 이러한 프로브는 일반적으로, 15개 이상의 누클레오티드 잔기 또는 염기쌍을 포함할 것이다. 바람직하게는, 이러한 프로브는 30개 이상의 누클레오티드 잔기 또는 염기쌍을 가질 것이며, 50개 이상의 누클레오티드 잔기 또는 염기쌍을 가질 수 있다. 특히, 바람직한 프로브는 20개 이상의 누클레오티드 잔기 또는 염기쌍을 가질 것이며, 30개 미만의 누클레오티드 잔기 또는 염기쌍을 가질 것이다.

BASB029 유전자의 코딩 영역은, 서열 번호: 1,3에 제공된 DNA 서열을 사용하여 스크리닝하므로써 분리되어 올리고누클레오티드 프로브를 합성할 수 있다. 그 후, 본 발명의 유전자의 서열과 상보적인 서열을 갖는 표지된 올리고누클레오티드는, cDNA, 지놈성 DNA 또는 mRNA의 라이브러리를 스크리닝하여, 프로브가 라이브러리의 어느 부분에 하이브리드화되는지를 측정하는데 사용된다.

전장 DNA를 수득하거나, 짧은 DNA를 연장시키기 위한 여러가지 방법, 예를 들어, cDNA 말단의 신속한 증폭(Rapid Amplification:RACE) 방법을 기초로 하는 방법들이 이용가능하며, 이러한 방법들은 당업자에게 널리 공지되어 있다 (Frohman, et al., *PNAS USA* 85:8998-9002, 1988). 예를 들어, 마라톤(Marathon: 등록상표명) 기법에 의해 예시화된 최근의 변형된 기법은, 더 긴 cDNA에 대한 조사를 현전하게 단순화시켰다. 마라톤 기법에서, cDNA는 선택된 조직으로부터 추출된 mRNA 및 각각의 말단에 연결된 '어댑터' 서열로부터 제조될 수 있다. 그 후, 유전자 특이적인 올리고누클레오티드 프라이머와 어댑터 특이적인 올리고누클레오티드 프라이머의 혼합을 이용하여 DNA의 "결손" 5'말단부를 증폭시키기 위해 핵산 증폭(PCR)이 수행된다. 그 후, PCR 반응은 "포개지는(nested)" 프라이머, 즉 증폭된 생성물내에서 어닐링되도록 고안된 프라이머(전형적으로, 어댑터 서열에서 추가의 3'을 어닐링시키는 어댑터 특이적 프라이머, 및 선택된 유전자 서열에서 추가의 5'을 어닐링시키는 유전자 특이적 프라이머)를 사용하여 반복된다. 그 후, 이러한 반응의 생성물은 이 생성물을 존재하는 DNA에 직접적으로 결합시켜 완전한 서열을 제공하거나, 5' 프라이머의 디자인에 대한 새로운 서열 정보를 이용하여 개별적인 전장의 PCR을 수행하므로써 구성된 전장의 DNA 및 DNA 시퀀싱에 의해 분석될 수 있다.

본 발명의 폴리누클레오티드 및 폴리펩티드는 폴리누클레오티드 분석에 관해 본원에 추가로 논의된 바와 같이, 예를 들어, 질환, 특히 사람 질환의 치료법 및 진단법을 발견하기 위한 조사 시약 및 물질로서 사용될 수 있다.

서열 번호: 1-4의 서열로부터 유래된 올리고누클레오티드인 본 발명의 폴리누클레오티드는 본원에 설명된 공정, 바람직하게는 PCR에 사용되어 본원에서 확인된 폴리누클레오티드가 전체적으로 또는 부분적으로 감염된 조직내의 박테리아에서 전사되었는지의 여부를 측정하는데 사용될 수 있다. 이러한 서열은 또한, 병원균이 유도한 감염의 유형 및 단계를 진단하는데 유용한 것으로 인지되었다.

본 발명은 또한, 성숙한 단백질과 추가적인 아미노산 또는 카르복실-말단 아미노산, 또는 성숙한 폴리펩티드 전의 아미노산(성숙한 형태가 예를 들어, 2개 이상의 폴리펩티드 사슬을 갖는 경우)인 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드를 제공한다. 이러한 서열은 전구체로부터 성숙한 형태로의 단백질 프로세싱에 작용할 수 있거나, 단백질을 수송할 수 있거나, 단백질 반감기를 길게하거나 짧게 할 수 있거나, 무엇보다도 분석 또는 생산을 위한 단백질의 조작을 촉진할 수 있다. 일반적으로 생체내의 경우와 같이, 추가적인 아미노산은 세포 효소에 의해 성숙 단백질로부터 프로세싱될 수 있다.

본 발명의 각각 및 모든 폴리누클레오티드에 있어서, 이것에 상보적인 폴리누클레오티드를 제공한다. 이러한 상보적 폴리누클레오티드는 상보적인 이들 각각의 폴리누클레오티드에 완전히 상보적이다.

하나 이상의 프로서열에 융합된 성숙한 형태의 폴리펩티드를 갖는 전구체 단백질은 불활성 형태의 폴리펩티드일 수 있다. 프로서열이 제거되는 경우, 이러한 불활성 전구체는 일반적으로 활성화된다. 프로서열 일부 또는 전체는 활성화전에 제거될 수 있다. 일반적으로, 이러한 전구체는 프로단백질로 불린다.

누클레오티드의 A, G, C, T/U 이외에, 용어 "N" 또한, 본 발명의 특정 폴리누클레오티드를 설명하는데 사용될 수 있다. "N"은 네 개의 DNA 또는 RNA 누클레오티드가 DNA 또는 RNA 서열에서 이러한 고안된 위치에서 나타날 수 있다는 것을 의미하며, 단 바람직하게는, N은, 근접한 누클레오티드 위치와 함께 취해지는 경우, 정확한 리딩 프레임에서 해독될 경우, 이러한 리딩 프레임에서 미성숙 말단 코돈의 생성 효과를 갖는 핵산은 아니다.

요약하자면, 본 발명의 폴리누클레오티드는 성숙 단백질, 성숙 단백질과 리더 서열(프리단백질로서 언급될 수 있음), 프리단백질 또는 프리프로단백질의 리더 서열이 아닌 하나 이상의 프로서열을 갖는 성숙 단백질의 전구체를 코드화할 수 있으며, 상기 프리프로단백질은 리더 서열 및 하나 이상의 프로서열을 갖는 프로단백질에 대한 전구체이며, 이들 리더 서열과 프로서열은 일반적으로 활성적이고 성숙한 형태의 폴리펩티드를 생성하는 프로세싱 단계 동안 제거된다.

본 발명에 양태에 있어서, 본 발명은 치료학적 또는 예방학적 목적, 특히 유전적 면역화를 위한 본 발명의 폴리누클레오티드의 용도를 제공한다.

유전적 면역화에서 본 발명의 폴리누클레오티드의 사용 방법은 바람직하게는, 적합한 수송 방법, 예컨대, 플라스미드 DNA의 근육으로의 직접 주입(Wolff et al., *Hum Mol Genet*(1992) 1:363, Manthorpe et al., *Hum. Gene Ther.*(1983)

4:419), 특이적 단백질 담체와 복합된 DNA의 수송(Wu et al., *J Biol Chem.* (1989)(264:16985), 칼슘 포스페이트와 DNA의 공동침전(Benvenisty & Reshef. *PNAS USA*, (1986)83:9551), 다양한 형태의 리포좀에서의 DNA 캡슐화(Kaneda et al., *Science*(1989)243:375), 입자 충격(Tang et al., *Nature*(1992) 356:152, Eisenbraun et al., *DNA Cell Biol*(1993) 12:791) 및 클로닝된 레트로바이러스 벡터를 사용한 생체내 감염(Seeger et al., *PNAS USA*(1984)81:5849)을 이용할 것이다.

벡터, 숙주 세포, 발현 시스템

본 발명은 또한, 본 발명의 폴리누클레오티드 또는 폴리누클레오티드들을 포함하는 벡터, 본 발명의 벡터로 유전공학적으로 조작된 숙주 세포, 및 재조합 기법에 의한 본 발명의 폴리펩티드의 생성물에 관한 것이다. 세포 비함유 번역 시스템 또한, 본 발명의 DNA 구성물로부터 유래된 RNA를 사용하여 이러한 단백질을 제조하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 재조합 폴리펩티드는 발현 시스템을 포함하는 유전공학적으로 조작된 숙주 세포로부터 당업자에 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리누클레오티드 또는 폴리누클레오티드들을 포함하는 발현 시스템, 이러한 발현 시스템을 갖는 유전공학적으로 조작된 숙주 세포, 및 재조합 기법에 의한 본 발명의 폴리펩티드의 생성물에 관한 것이다.

본 발명의 폴리펩티드의 재조합 생성물에 있어서, 숙주 세포는 일반적으로, 본 발명의 발현 시스템 또는 이의 부분, 또는 폴리펩티드가 혼입되도록 유전공학적으로 조작될 수 있다. 숙주 세포로의 폴리누클레오티드의 도입은 많은 표준 실험 설명서, 예컨대, 문헌 [Davis, et al., *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, (1986) and Sambrook, et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)]에 기재된 바와 같은 방법, 예를 들어, 칼슘 포스페이트 트랜스펙션, DEAE-덱스트란 매개된 트랜스펙션, 트랜스백션(transvection), 미세주입, 양이온성 지질-매개된 트랜스펙션, 일렉트로포레이션, 형질도입, 스크랩 로딩(scrap loading), 발사체 도입(ballistic introduciton) 및 감염에 의해 달성될 수 있다.

적합한 숙주의 대표적인 예로는, 박테리아 세포, 예컨대, 스트렙토코커스(streptococci), 스타필로코커스(staphylococci), 엔테로코커스(enterococci), 대장균, 스트렙토마이세스(streptomyces), 시아노박테리아(cyanobacteria), 바실루스 수브틸리스(*Bacillus subtilis*), 모락셀라 카타르할리스(*Moraxella catarrhalis*), 해모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 및 나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 세포; 진균 세포, 예컨대, 효모, 클루베로마이세스(*Kluveromyces*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 바시디오마이세테(basidiomycete), 칸디다 알비칸(*Candida albicans*) 및 아스페르길루스(*Aspergillus*); 곤충 세포, 예컨대, 드로소필라(*Drosophila*) S2 및 스포돕테라(*Spodoptera*) Sf9의 세포; 동물 세포, 예컨대, CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 및 보웨스 멜라노마(Bowes melanoma) 세포; 및 식물 세포 예컨대, 곁씨식물 또는 속씨식물의 세포를 포함한다.

매우 다양한 발현 시스템이 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는데 사용될 수 있다. 이러한 벡터는, 염색체-, 에피소말- 및 바이러스-유래된 벡터, 예를 들어, 박테리아 플라스미드, 박테리오파아지, 트랜스포손(transposon), 효모 에피좀, 삽입 요소, 효모 염색체 요소, 바쿨로바이러스(baculoviruses), 파포바 바이러스(papova viruses), 예컨대, SV40, 백시니아 바이러스(vaccinia viruses), 계두 바이러스, 슈도라비스 바이러스(pseudorabies viruses), 피코르나바이러스(picornaviruses), 레트로바이러스 및 알파바이러스와 같은 바이러스로부터 유래된 벡터, 및 이들의 혼합물로부터 유래된 벡터, 예컨대, 플라스미드 및 박테리오파아지 유전자 요소, 예컨대, 코스미드 및 파지미드로부터 유래된 벡터를 포함한다. 상기 발현 시스템 구성물은 발현을 발생시키고 조절하는 조정 영역을 함유할 수 있다. 이점에 있어서 일반적으로, 숙주 세포의 폴리누클레오티드를 유지시키거나, 증식시키거나 발현시키고/거나 폴리펩티드를 발현시키는데 적합한 시스템 또는 벡터가 발현에 사용될 수 있다. 적합한 DNA 서열은 다양하게 널리 공지되어 있으며, 일정한 기법, 예컨대, 문헌 [Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*(상기 언급됨)]에 설명된 바와 같은 기법에 의해 발현 시스템에 유입될 수 있다.

진핵세포의 재조합 발현 시스템에서, 번역된 단백질을 소포체의 루멘, 원형질막 주위공간 또는 세포외 환경으로 분비시키기 위해, 적합한 분비 시그널이 발현된 폴리펩티드로 혼입될 수 있다. 이러한 시그널은 폴리펩티드에 대해 내인성일 수 있거나, 외인성 시그널일 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 암모늄 술페이트 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 수산기인회석 크로마토그래피 및 렉

틴 크로마토그래피를 포함한 널리 공지된 방법에 의해 재조합 세포 배양으로부터 회수되고 정제될 수 있다. 가장 바람직하게는, 이온 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)가 정제에 사용된다. 단백질 재풀딩에 널리 공지된 기법은, 세포간 합성, 분리 및/또는 정제 동안 폴리펩티드가 변성되는 경우, 활성 형태를 재생성시키는데 사용될 수 있다.

상기 발현 시스템은 또한, 바이러스 또는 박테리아와 같은 재조합된 살아있는 미생물일 수 있다. 관심있는 유전자를 살아있는 재조합 바이러스 또는 박테리아의 지놈으로 삽입시킬 수 있다. 이러한 살아있는 벡터로의 접종 및 생체내 감염은 항원의 생체내 발현 및 면역 반응을 유도할 것이다. 이러한 목적에 사용되는 바이러스 및 박테리아로는 예를 들어, 폭스바이러스(poxviruses)(예를 들어, 백시니아, 계두, 카나리폭스), 알파바이러스(신드비스 바이러스(Sindbis virus), 셈리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest virus), 베네주엘리안 에콰인 엔세팔리티스 바이러스(Venezuelian Equine Encephalitis Virus), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 피코르나바이러스(picornaviruses)(폴리오바이러스(poliovirus), 리노바이러스(rhinovirus)), 헤르페스바이러스(바리셀라 조스터 바이러스(varicella zoster virus) 등), 리스테리아(Listeria), 살모넬라, 시겔라(Shigella), 나이세리아, BCG가 있다. 이러한 바이러스 및 박테리아는 유독성이거나, 살아있는 백신을 수득하기 위해 다양한 방법으로 독소가 약화될 수 있다. 이러한 살아있는 백신 또한 본 발명의 일부이다.

진단, 예후, 혈청형 및 변이체 분석

본 발명은 또한, 진단 시약으로서 사용하기 위한 본 발명의 BASB029 폴리누클레오티드 및 폴리펩티드의 사용 방법에 관한 것이다. 진핵세포, 특히 포유동물, 특히 사람의 BASB029 폴리누클레오티드 및/또는 포릴펩티드의 검출은 질환의 진단, 질환의 단계, 또는 약물에 대한 감염성 유기체의 반응에 대한 진단 방법을 제공할 것이다. BASB029 유전자 또는 단백질을 포함하는 유기체로 감염되거나 감염된 것으로 여겨진 진핵세포, 특히 포유동물, 특히 사람 세포는 본원에 제공된 방법 뿐만 아니라 널리 공지된 다양한 방법에 의해 핵산 또는 아미노산 수준이 검출될 수 있다.

예후, 진단 또는 기타 분석을 위한 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드는 감염된 것으로 추정되고/거나 감염된 개별적 몸체 물질로부터 수득될 수 있다. 이러한 발생원, 폴리누클레오티드, 특히 DNA 또는 RNA는 직접적으로 검출에 사용되거나, 분석 전에 PCR 또는 기타 증폭 방법에 의해 효소적으로 증폭될 수 있다. RNA, 특히 mRNA, cDNA 및 지놈성 DNA 또한, 동일한 방법으로 사용될 수 있다. 증폭을 사용하므로써, 개개인에 존재하는 감염성 또는 내재성 유기체의 종 및 균주의 특징은 유기체의 선택된 폴리누클레오티드의 유전자형의 분석에 의해 형성될 수 있다. 결실 및 삽입은 관련된 유기체, 바람직하게는, 동일한 속의 상이한 종 또는 동일한 종의 상이한 계로부터 선택된 기준 서열의 유전자형과 비교하여 증폭된 생성물의 크기의 변화에 의해 검출될 수 있다. 점 변이는 증폭된 DNA를 표지된 BASB029 폴리누클레오티드 서열과 하이브리드화하므로써 확인될 수 있다. 완전하게 또는 현저하게 매칭된 서열은, 각각 DNA 또는 RNA에 대한 DNase 또는 RNase에 의해, 또는 융점 또는 탈변성 역학(renaturation kinetics)에서의 차이를 검출하므로써 불완전하게 또는 더욱 현저하게 미스매치된 이중물로부터 구별된다. 폴리누클레오티드 서열 차이는 또한, 기준 서열과 비교하여 젤에서 폴리누클레오티드 단편의 일렉트로포레스트 이동에 있어서의 변화에 의해 검출될 수 있다. 이는 변성 제제 유무에 상관 없이 수행될 수 있다. 폴리누클레오티드 차이는 또한, DNA 또는 RNA 시퀀싱을 유도하므로써 검출될 수 있다[참조: Myers et al., science, 230:1242(1985)]. 특정 위치에서의 서열 변화는 또한, 누클라아제 방어 분석, 예컨대, RNase, V1 및 S1 방어 분석, 또는 화학 절단 방법에 의해 드러나게 될 수 있다[참조: Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 85:4397-4401(1985)].

또 다른 구체예에서, BASB029 누클레오티드 서열 또는 이것의 단편을 포함하는 올리고누클레오티드 프로브의 배열은 예를 들어, 유전적 변이, 혈청형, 분류학적 분류 또는 확인을 위해 구성될 수 있다. 배열 기술 방법은 널리 공지되어 있으며, 일반적인 적용성을 가지며, 유전자 발현, 유전자 결합 및 유전자 변이성을 포함한 문자 유전자에서 다양한 의문을 제기하는데 사용될 수 있다[참조: Chee et al., Science. 274:610(1996)].

또 다른 양태에서, 본 발명은 하기 (a) 내지 (d)를 포함하는 진단 키트에 관한 것이다:

- (a) 본 발명의 폴리누클레오티드, 바람직하게는 서열 번호: 1,3의 누클레오티드 서열 또는 이것의 단편;
- (b) (a)의 누클레오티드 서열에 상보적인 누클레오티드 서열;
- (c) 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게는 서열 번호: 2,4의 폴리펩티드 또는 이것의 단편; 또는
- (d) 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게는 서열 번호: 2,4의 폴리펩티드에 대한 항체.

이러한 키트에 있어서, (a), (b), (c) 또는 (d)는 중요한 성분을 포함할 수 있다는 것이 인식될 것이다. 이러한 키트는 질환 또는 질환에 대한 민감성을 진단하는데 사용될 것이다.

이러한 발명은 또한, 진단 시약으로서 본 발명의 폴리누클레오티드를 사용하는 방법에 관한 것이다. 질환 또는 병원성과 관련된 본 발명의 폴리누클레오티드, 바람직하게는 서열 번호: 1,3의 변이된 형태의 검출은 첨가될 수 있는 진단 도구를 제공하거나, 질환의 진단, 질환 경과의 예후, 질환 단계의 측정 또는 질환에 대한 민감성을 규정할 것이며, 이는 폴리누클레오티드의 과소-발현, 과다-발현 또는 변형된 발현으로부터 유도된다. 유기체, 특히 이러한 폴리누클레오티드에서 변이를 갖는 감염성 유기체는 본원에 설명된 바와 같이 다양한 기법에 의해 폴리누클레오티드 수준으로 검출될 수 있다.

본 발명의 폴리누클레오티드 및/또는 폴리펩티드에서 변이체 또는 다형성(대립유전자 변이체)을 갖는 유기체로부터의 세포는 또한, 다양한 기법에 의해 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드 수준으로 검출되어 예를 들어, 항혈청형을 결정할 수 있다. 진스캔(GeneScan)과 같은 자동화된 검출 시스템과 관련하여 RT-PCR을 사용하는 것이 특히 바람직하다. RNA, cDNA 또는 지놈성 DNA는 또한, 동일한 목적으로 PCR에 사용될 수 있다. 예로서, BASB029 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드에 상보적인 PCR 프라이머는 변이를 확인하고 분석하는데 사용될 수 있다.

본 발명은 추가로, 5' 및/또는 3' 말단으로부터 제거되는 1, 2, 3 또는 4개의 누클레오티드를 갖는 프라이머를 제공한다. 이러한 프라이머는 무엇보다도, 몸체 물질과 같은 개체로부터 유래된 샘플로부터 단리된 BASB029 DNA 및/또는 RNA를 증폭시키는데 사용될 수 있다. 상기 프라이머는 감염된 개체로부터 단리된 폴리누클레오티드를 증폭시키고, 증폭된 폴리누클레오티드는 폴리누클레오티드 서열을 설명하기 위해 다양한 기법으로 처리될 수 있다. 이러한 방법으로, 폴리누클레오티드 서열의 변이체가 검출될 수 있으며, 감염 또는 이의 단계 또는 경과를 진단하고/거나 예지하거나, 항혈청을 결정하고/거나 감염체를 분류하는데 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 개체 예컨대, 몸체 물질로부터 유래된 샘플로부터 서열 번호: 1,3의 서열을 갖는 폴리누클레오티드의 증가된 수준의 발현을 측정하는 것을 포함하여, 질환, 바람직하게는 박테리아 감염, 더욱 바람직하게는, 나이세리아 메닌지티디스에 의해 초래된 감염을 진단하는 방법을 제공한다. BASB029 폴리누클레오티드의 증가되거나 감소된 발현은 예를 들어, 증폭, PCR, RT-PCR, RNase 방어, 노던 블로팅, 분광광도법 및 기타 하이브리드화 방법과 같은 폴리누클레오티드의 정량을 위해 당해 분야에서 널리 공지된 방법중 하나를 사용하므로써 측정될 수 있다.

또한, 보통의 제어 조작 샘플과 비교하여 BASB029 폴리펩티드의 과다발현을 검출하기 위한 본 발명에 따른 진단 분석이 예를 들어, 감염의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 숙주, 예컨대, 몸체 물질로부터 유래된 샘플중에서 BASB029 폴리펩티드의 수준을 측정하는데 사용될 수 있는 분석 기법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이러한 분석 방법은 방사선면역분석, 경쟁적-결합 분석법, 웨스턴 브로트 분석, 항체 샌드위치 분석, 항체 검출 및 ELISA 분석을 포함한다.

본 발명의 폴리누클레오티드는 폴리누클레오티드 배열, 바람직하게는 고밀도 배열 또는 그리드의 성분으로서 사용될 수 있다. 이러한 고밀도 배열은 특히, 진단 및 예후 목적에 유용하다. 예를 들어, 각각 상이한 유전자를 포함하고, 추가로 본 발명의 폴리누클레오티드 또는 폴리누클레오티드들을 포함하는 지점의 세트는, 몸체 샘플로부터 수득되거나 유래된 프로브를 사용하여 하이브리드화시키거나 핵산을 증폭시키는 것과 같은 프로토콜에 사용되어 개체에서 특정 폴리누클레오티드 서열 또는 이와 관련된 서열의 존재를 측정할 수 있다. 이러한 존재는 병원균, 특히 나이세리아 메닌지티디스의 존재를 나타낼 수 있으며, 질환 또는 질환의 경과를 진단하고/거나 예후하는데 유용할 수 있다. 서열 번호: 1,3의 폴리누클레오티드 서열의 다양한 변이체를 포함하는 그리드가 바람직하다. 또한, 서열 번호: 2,4의 폴리펩티드 서열을 코드화하는 폴리누클레오티드 서열의 많은 변이체를 포함하는 그리드가 바람직하다.

항체

본 발명의 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드 또는 이것의 변이체, 또는 이를 발현하는 세포는 각각 이러한 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드에 대해 면역특이적인 항체를 생성하는데 면역원으로서 사용될 수 있다.

본 발명의 특정의 바람직한 구체예에서, BASB029 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드에 대한 항체를 제공한다.

본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드에 대해 생성된 항체는, 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 폴리누클레오티드, 이 중 하나 또는 이 둘 모두의 에피토프-함유 단편, 이중 하나 또는 이 둘 모두의 유사체, 또는 이중 하나 또는 이 둘 모두를 발현하는 세포를, 일정한 프로토콜을 사용하여 동물, 바람직하게는 사람이외의 동물에 투여하므로써 수득될 수 있다. 모노클로날 항체의 제조에 있어서, 세포주 연속 배양에 의해 생성된 항체를 제공하는 당해분야에 공지된 기술이 사용될 수 있다. 실례로는 다양한 기법, 예컨대, 문헌[Kohler, G. and Milstein, C., *Nature* 256:495-497(1975); Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72(1983); Cole et al., pg, 77-96 in *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc.(1985)]에 기술된 기법을 포함한다.

단일 사슬 항체의 생성 방법(미국 특허 제 4,946,778)이 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드에 대한 단일 사슬 항체를 생성하는데 적용될 수 있다. 또한, 유전자이식된 마우스 또는 다른 유기체 또는 동물, 예컨대 기타 포유동물이 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드에 대해 면역특이적인 사람화된 항체를 발현시키는데 사용될 수 있다.

대안적으로, 파아지 표시 기법은 항-BASB029를 갖는 것에 대해 스크리닝된 사람으로부터의 림프구의 PCR 증폭된 v-유전자의 레퍼터리로부터 또는 순수한 라이브러리로부터 본 발명의 폴리펩티드에 대한 결합 활성을 갖는 항체 유전자를 선택하는데 사용될 수 있다(McCafferty, et al., (1990), *Nature* 348, 552-554; Marks, et al., (1992) *Biotechnology* 10, 779-783). 이러한 항체의 친화성은 예를 들어, 사슬 재편성에 의해 개선될 수 있다(Clackson et al., (1991) *Nature* 352:628).

상기 설명된 항체는 예를 들어, 친화성 크로마토그래피에 의해 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드를 정제하기 위해 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드를 발현시키는 클론을 분리하거나 확인하는데 사용될 수 있다.

BASB029-폴리펩티드 또는 BASB029-폴리누클레오티드에 대한 항체는 감염, 특히 박테리아 감염을 치료하는데 사용될 수 있다.

항원적으로, 에피토프적으로 또는 면역학적으로 동등한 변이체를 포함하는 폴리펩티드 변이체는 본 발명의 특정 양태를 형성한다.

바람직하게는, 항체 또는 이것의 변이체는 개체에서 면역원성을 더 적게 지니도록 변형된다. 예를 들어, 개체가 사람인 경우, 항체는 가장 바람직하게는, 하이브리도마-유래된 항체의 상보성 결정 영역 또는 영역이 예를 들어, 문헌 [Jones et al. (1986), *Nature* 321, 522-525 or Tempest et al., (1991) *Biotechnology* 9, 266-273]에 기재된 바와 같이 사람 모노클로날 항체에 이식되어 "사람화"될 수 있다.

길항체 및 작용제-분석 및 분자

본 발명의 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드는 또한, 예를 들어, 세포, 세포-비함유 제조물, 화학적 라이브러리, 및 천연 생성물의 혼합물에서 소분자 기질 및 리간드의 결합을 평가하는데 사용될 수 있다. 이러한 기질 및 리간드는 천연 기질 및 리간드이거나, 구조적 또는 작용적 의태물일 수 있다[참조: Coligan et al., *Current Protocols in Immunology* 1(2): Chapter 5(1991)].

스크리닝 방법으로, 후보 화합물의 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드, 또는 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드를 함유하는 세포 또는 막, 또는 폴리펩티드의 융합 단백질로의 결합을 후보 화합물에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된 표지에 의해 간단하게 측정할 수 있다. 대안적으로, 스크리닝 방법은 표지된 경쟁물질과 경쟁하는 것을 포함할 수 있다. 추가로, 이러한 스크리닝 방법으로, 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드를 포함하는 세포에 적합한 검출 시스템을 사용하므로써, 후보 화합물이 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드의 활성 또는 억제에 의해 생성된 시그널을 초래하는지의 여부를 측정할 수 있다. 활성 억제제는 일반적으로 공지된 작용제의 존재하에 분석되며, 후보 화합물의 존재하에 작용제의 활성에의 영향이 관찰된다. 구성적으로 활성적인 폴리펩티드 및/또는 구성적으로 발현된 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드는, 후보 화합물이 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드의 활성 억제를 초래하는지의 여부를 시험하므로써, 작용제 또는 억제제의 부재 하에 역 작용제 또는 억제제에 대한 스크리닝 방법에 사용될 수 있다. 추가로, 스크리닝 방법은 간단히, 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드를 함유하는 용액을 후보 화합물과 혼합시켜 혼합물을 형성시키고, 혼합물중의 BASB029 폴리펩티드 및/또는 폴리누클레오티드 활성을 측정하고, 혼합물의 BASB029 폴리펩티드 및/또는 폴리누클레오티드 활성을 기준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 융합 단백질, 예컨대, 본원에 설명된 바와 같이 Fc 부분과 BASB029 폴리펩티드로부터 제조된 융합 단백질은 또한, 대규모 스크리닝 분석에 사용되어, 본 발명의 폴리펩티드 및 계통발생적으로 및/또는 작용적으로 관련된 폴리펩티드의 길항제를 확인할 수 있다(참조: D.Bennett et al., *J Mol Recognition*, 8:52-58(1995); and K.Johanson et al., *J Biol Chem*, 270(16):9459-9471(1995)).

본 발명의 폴리펩티드에 결합하고/거나 상호반응하는 항체, 폴리누클레오티드 및 폴리펩티드는 또한, 세포에서 mRNA 및/또는 폴리펩티드의 생성시 첨가된 화합물의 영향을 검출하기 위한 스크리닝 방법을 형성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, ELISA 분석은 당해분야에 공지된 표준 방법에 의해 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 사용하므로써, 분비되거나 세포 결합된 수준의 폴리펩티드를 측정하기 위해 구성될 수 있다. 이는 적합하게 조작된 세포 또는 조직으로부터 폴리펩티드의 생성을 억제시키거나 증진시킬 수 있는 제제(또한, 각각 길항제 또는 작용제로 불림)를 발견하는데 사용될 수 있다.

본 발명은 또한, BASB029 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드의 활동을 증진(작용제)시키거나 차단(길항제)시키는 화합물, 특히 박테리아 발육 저지성 및/또는 멸균성인 화합물을 확인하기 위한 화합물 스크리닝 방법을 제공한다. 스크리닝 방법은 대규모 기법을 포함할 수 있다. 예를 들어, 작용제 또는 길항제를 스크리닝하기 위해, BASB029 폴리펩티드 및 표지된 기질 또는 이러한 폴리펩티드의 리간드를 포함하는, 합성 반응 혼합, 세포 구획물, 예컨대, 막, 세포 외피 또는 세포 벽, 또는 이들의 제조물은, BASB029 작용제 또는 길항제일 수 있는 후보 분자의 존재 또는 부재하에 인큐베이션된다.

BASB029 폴리펩티드를 작용제화시키거나 길항제화시키는 후보 분자의 능력은 표지된 리간드의 감소된 결합 또는 기질로부터의 생성물의 감소된 생성에 반영된다. 불필요하게 결합하는 분자, 즉 BASB029 폴리펩티드의 영향을 유도하지 않는 분자는 대부분 우수한 길항제로 여겨진다. 잘 결합하며, 경우에 따라 이러한 생성물의 생성율을 증가시키거나, 시그널 형질도입을 증가시키거나, 화학 채널 활성을 증가시키는 분자가 작용제이다. 기질로부터의 생성물의 생성, 시그널 형질도입 또는 화학 채널 활성의 비 또는 필요에 따라, 수준의 검출은 리포터 시스템을 사용하므로써 증진될 수 있다. 이러한 경우에 유용할 수 있는 리포터 시스템은, 생성물로 전환된 비색계의 표지된 기질, BASB029 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드 활성에서의 변화에 반응적인 리포터 유전자 및 당해분야에 공지된 결합 분석을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

BASB029 작용제에 대한 분석법의 또 다른 구체예는, 경쟁 억제 분석에 적합한 조건하에, BASB029 및 잠재적 작용제를 BASB029-결합 분자, 재조합 BASB029 결합 분자, 천연 기질 또는 리간드, 기질 또는 리간드 의태물과 혼합시키는 경쟁 분석법이다. BASB029를 예컨대, 방사능 또는 비색계 화합물에 의해 표지하여, 결합 분자에 결합되거나 생성물로 전환된 BASB029 분자의 수를 정확하게 측정하여 잠재적 길항제의 효과를 평가할 수 있다.

잠재적 길항제는 본 발명의 폴리누클레오티드 및/또는 폴리펩티드에 결합하여 이의 활성을 억제하거나 단절시키는 유기 소분자, 웨티드, 폴리펩티드 및 항체를 포함한다. 잠재적 길항제는 또한, 결합 분자 예컨대, BASB029-유도 활성을 유도하지 않는, 유기 소분자, 웨티드, 폴리펩티드, 예를 들어, 결합분자상의 동일한 부위에 결합하므로써, BASB029 폴리펩티드 및/또는 폴리누클레오티드가 결합하는 것을 차단하여 BASB029 폴리펩티드 및/또는 폴리누클레오티드의 활동 또는 발현을 억제하는, 밀접하게 관련된 단백질 또는 항체일 수 있다.

잠재적 길항제는 폴리펩티드의 결합부위에 결합하고 점령하여 세포 결합 분자로의 결합을 억제하여, 정상적인 생물학적 활성을 억제하는 소분자를 포함한다. 소분자의 실례는, 유기 소분자, 웨티드 또는 웨티드 유사 분자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 기타 잠재적 길항제는 안티센스 분자를 포함한다(이러한 분자는 하기 문헌 참조: Okano, J.Neurochem. 56:560(1991); OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION. CRC Press, Boca Raton, FL(1988)). 바람직한 잠재적 길항제는 BASB029에 관련된 화합물 및 BASB029의 변이체를 포함한다.

추가적인 양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 또는 이것의 단편, 및 다양한 서브클래스의 면역글로불린(IgG, IgM, IgA, IgE)의 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역의 다양한 부분을 포함하는 유전공학적으로 조작된 가용성 융합 단백질에 관한 것이다. 면역글로불린으로서 바람직한 것은, 헌지 영역에서 융합이 발생하는 사람 IgG 특히, IgG1의 중쇄의 불변 부분이다. 특정 구체예에서, Fc 부분은 혈액 응고 인자 Xa로 절단될 수 있는 절단 서열의 혼입에 의해 간단하게 제거될 수 있다. 게다가, 본 발명은 유전공학에 의한 이러한 융합 단백질의 제조 방법, 약물 스크리닝, 진단 및 치료에서의 이들의 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명의 추가적 양태는 또한, 이러한 융합 단백질을 코드화하는 폴리누클레오티드에 관한 것이다. 융합 단백질 기법의 예는, 국제 특허 출원 WO94/29458 및 WO94/22914에서 찾아볼 수 있다.

본원에 제공된 각각의 폴리누클레오티드 서열은 항바이러스 화합물의 발견 및 개발에 사용될 수 있다. 발현시 코드화된 단백질은, 항바이러스 약물의 스크리닝에 대한 표적물로서 사용될 수 있다. 추가적으로, 코드화된 단백질 또는 샤인-달가노의 아미노 말단 영역을 코드화하는 폴리누클레오티드 서열, 또는 각각의 mRNA의 다른 번역 촉진 서열은 관심있는 코딩 서열의 발현을 제어하기 위한 안티센스 서열을 구성하는데 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 병원균 또는 병원균들과 진핵세포, 바람직하게는 포유동물, 후속 감염을 초래하는 숙주사이의 초기 물리적 상호반응을 방해하는 본 발명의 폴리펩티드, 폴리누클레오티드, 작용제 또는 길항제의 용도를 제공한다. 특히, 본 발명의 분자는, 박테리아, 특히 그램 포지티브 및/또는 그램 네거티브 박테리아가 유치 기기(in-dwelling device)상의 진핵세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 세포외 매트릭스 단백질 또는 상처부위의 세포외 매트릭스 단백질로 부착하는 것을 방해하는데 사용될 수 있으며; 진핵세포, 바람직하게는, 포유동물 세포, 세포외 매트릭스 단백질과 조직 손상을 막개하는 박테리아 BASB029 단백질 사이의 박테리아 부착을 차단하는데 사용될 수 있고/거나; 유치 기기의 이식 또는 외과 기술 이외의 것에 의해 개시되는 감염에서의 정상적인 발병의 진행을 차단하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에는 BASB029 작용제 및 길항제, 바람직하게는 박테리아 발육 저지성 또는 멸균성인 작용제 및 길항제가 제공된다.

본 발명의 길항제 및 작용제는 예를 들어, 질환을 방지하고, 억제하고/거나 치료하는데 사용될 수 있다.

추가적 양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드의 미모토프(mimotope)에 관한 것이다. 미모토프는, 천연 웨პ티드를 인지하는 항체에 의해 인지될 수 있거나; 적합한 담체에 커플링되는 경우, 천연 웨პ티드를 인지하는 항체를 증가시킬 수 있는 천연 웨პ티드와 사실상 유사한(서열적으로 또는 구조적으로) 웨პ티드 서열이다.

웨პ티드 미모토프는 선택된 아미노산의 첨가, 결실 또는 치환에 의해 특정 목적을 위해 고안될 수 있다. 따라서, 웨პ티드는 단백질 담체로 용이하게 컨주케이션되기 위해 변형될 수 있다. 예를 들어, 일부 화학적 컨주케이션 방법에 있어서는 말단 시스테인을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 담백질 담체에 컨주케이션된 웨პ티드가, 웨პ티드의 컨주케이션된 말단으로부터의 소수성 말단부를 포함하여, 웨პ티드의 유리 비컨주케이션된 말단이 담체 단백질의 표면에 결합되도록 유지시키는 것이 바람직할 수 있다. 이렇게 하여, 전체 천연 분자에서도 발견된 바와 같은 웨პ티드 형태를 매우 유사하게 닮은 형태의 웨პ티드가 제시된다. 예를 들어, 상기 웨პ티드는 N-말단 시스테인 및 C-말단 소수성 아미드화된 테일을 갖도록 변형될 수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 아미노산의 D-입체이성질체의 첨가 또는 치환을 수행하여, 예를 들어, 웨პ티드의 안정성을 증진하기 위한 이로운 유도체를 생성시킬 수 있다.

대안적으로, 웨პ티드 미모토프는, 파아지 표출 기법(EP 0 552 267 B1)과 같은 기법에 의해 본 발명의 폴리웨პ티드에 결합할 수 있는 항체를 사용하므로써 확인될 수 있다. 이러한 기법으로, 천연 웨პ티드의 구조를 최소화시켜, 항-천연 웨პ티드 항체에는 결합할 수 있으나, 천연 폴리웨პ티드와의 현저한 서열 상동성을 공유할 필요는 없는 많은 수의 웨პ티드 서열이 생성된다.

백신

본 발명의 또 다른 양태는, 개체에 항체 및/또는 T 세포 면역 반응을 생성하는데 적합한 BASB029 폴리누클레오티드 및/또는 폴리웨პ티드, 또는 이것의 단편 또는 변이체를 접종하여 감염, 특히 박테리아 감염, 더욱 특히 나이세리아 메닌지티디스 감염으로부터 상기 개체를 방어하는 것을 포함하여, 개체, 특히 포유동물, 바람직하게는 사람에서의 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다. 또한, 이렇게 하여 이러한 면역 반응이 박테리아의 복제를 감소시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 개체에서 면역학적 반응을 유도하는 방법으로서, 면역학적 반응, 예컨대, 항체 면역 반응 및/또는 예를 들어, 시토카인-생성 T 세포 또는 세포독성 T 세포를 포함하는 T 세포 면역 반응을 유도하여 개체, 바람직하게는 사람을 질환(질환이 개체내에 이미 존재하는지의 여부에 상관없이)으로부터 방어하기 위해, 이러한 개체로 핵산 벡터, 서열 또는 리보자임을 수송하여, 생체내에서 BASB029 폴리누클레오티드 및/또는 폴리웨პ티드, 또는 이들의 단편 또는 변이체 발현을 위해 BASB029 폴리누클레오티드 및/또는 폴리웨პ티드, 또는 이들의 단편 또는 변이체의 발현을 유도하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 유전자 투여의 한 예는 입자상의 코팅 또는 다른 형태로서 목적하는 세포에 가속되어 투여되는 것이다. 이러한 핵산 벡터는 DNA, RNA, 리보자임, 변형된 핵산, DNA/RNA 하이브리드, DNA-단백질 복합물 또는 RNA-단백질 복합물을 포함할 수 있다.

본 발명의 추가적 양태는, 면역학적 조성물이 면역 반응을 유도할 수 있는 개체, 바람직하게는, 사람에 도입되는 경우, BASB029 폴리누클레오티드 및/또는 이들로부터 코드화된 폴리웨პ티드에 대한 개체의 면역학적 반응을 유도하는 면역학적 조성물로서, 재조합 BASB029 폴리누클레오티드 및/또는 이들로부터 코드화된 폴리웨პ티드를 포함하고/거나 상기 BASB029 폴리누클레오티드, 이들로부터 코드화된 폴리웨პ티드 또는 본 발명의 기타 폴리웨პ티드의 항원을 코드화하고 발현시키는 DNA 및/또는 RNA를 포함하는 면역학적 조성물에 관한 것이다. 면역학적 반응은 치료학적으로 또는 예방학적으로 사용될 수 있으며, 항체 면역성 및/또는 세포 면역성 예컨대, CTL 또는 CD4+ T 세포로부터 발생하는 세포 면역성의 형태를 취할 수 있다.

BASB029 폴리웨პ티드 또는 이것의 단편은, 스스로 항체를 생성할 수 있거나 없으며, 제 1 단백질을 안정화시킬 수 있으며, 항원성 및/또는 면역원성 및 바람직하게는 방어성을 갖는 융합된 또는 변형된 단백질을 생성시킬 수 있는, 보조단백질 또는 화학 부분과 융합될 수 있다. 이렇게 융합된 재조합 단백질은 바람직하게는, 항원성 보조단백질, 예컨대, 헤모필루스 인플루엔자, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(GST) 또는 베타갈락토시다아제로부터의 지질단백질 D, 또는 상기 단백질을 안정화시키고, 이들의 생성 및 정제를 촉진하는 기타 비교적 큰 보조단백질을 추가로 포함한다. 게다가, 보조단백질은 상기 단백질을 수용하는 유기체의 면역 시스템의 일반화된 자극을 제공한다는 점에 있어서 애쥬반트(adjuvant)로서 작용할 수 있다. 보조단백질은 제 1 단백질의 아미노- 또는 카르복시-말단에 부착될 수 있다.

문헌[Sato, Y. et al., Science 273:352(1996)]에 기재된 바와 같이, 본 발명의 폴리웨პ티드 및/또는 폴리누클레오티드 및 면역자극 DNA 서열을 포함하는 조성물, 특히 백신 조성물 및 방법이 제공된다.

또한, 상기 설명된 폴리누클레오티드 또는 이들의 특정 단편으로서, 나이세리아 메닌지티디스로의 동물 모델 감염에서 이러한 유전자 면역화 실험에 사용되는 폴리누클레오티드 구성물에서 박테리아 세포 표면 단백질의 비가변 영역을 코드화하는 것으로 입증된 단편을 사용하는 방법을 제공한다. 이러한 실험은 특히, 예방적 또는 치료적 면역 반응을 야기할 수 있는 단백질 에피토프를 확인하는데 유용할 것이다. 이러한 방법은, 포유동물, 특히 사람에서 박테리아 감염, 특히 나이세리아 메닌지티디스 감염의 치료학적 처리 또는 예방학적 제제의 개발을 위해, 감염에 성공적으로 저항하거나 이를 제거하는 동물의 필수 기관으로부터 유래된 특정 값의 모노클로날 항체의 후속 제조를 가능하게 하는 것으로 여겨진다.

또한, 본 발명은 적합한 담체, 예컨대, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 본 발명의 면역원성 재조합 폴리펩티드 및/또는 폴리누클레오티드를 포함하는 백신 제형을 포함한다. 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드는 위에서 분해될 수 있기 때문에, 예를 들어, 피하내, 근내, 정맥내, 피내 투여를 포함하여, 비경구적으로 투여하는 것이 바람직하다. 비경구 투여에 적합한 제형은, 개체의 체액, 바람직하게는 혈액과 등장성인 제형인 항-산화제, 완충제, 박테리아 밸육 저지성 화합물 및 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주입 용액; 및 혼탁제 또는 농후제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 혼탁액을 포함한다. 상기 제형은 단위-용량 또는 다중-용량 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 유리병에 존재할 수 있으며, 사용 직전에 멸균 액체 담체를 첨가해야 하는 냉동건조 조건하에 저장될 수 있다.

본 발명의 백신 제형은 또한, 제형의 면역원성을 증진시키기 위한 보조 시스템을 포함한다. 바람직하게는, 보조 시스템은 바람직하게는, TH1 유형의 반응을 증가시킨다.

면역 반응은 체액성 또는 세포 매개된 면역 반응인 두 개의 극단적인 카테고리로 넓게 구분될 수 있다(전형적으로, 각각 방어의 항체 및 세포 이펙터(effectector) 메카니즘을 특징으로 함). 반응의 이러한 카테고리는 TH1-유형 반응(세포 매개된 반응) 및 TH2-유형 면역 반응(체액성 반응)으로 불린다.

극단적인 TH1-유형 면역 반응은 항원 특이적인 일배체형(haplotype)으로 제한된 세포독성 T 림프구 및 천연 킬러 세포 반응의 발생에 의해 특징지어질 수 있다. 마우스에서 TH1-유형 반응은 종종, IgG2a 서브타입의 항체 생성에 의해 특징지어지는 반면, 사람에서는 IgG1 유형 항체에 상응한다. TH2-유형 면역 반응은 마우스 IgG1, IgA 및 IgM을 포함하는 광범위한 범위의 면역글로불린 이소타입의 생성에 의해 특징지어진다.

이러한 두 유형의 면역 반응의 발생 후의 추진력은 시토카인에 있는 것으로 여겨질 수 있다. 고수준의 TH1-유형 시토카인은 제공된 항원에 대한 세포 매개된 면역 반응을 유도하는 경향이 있는 반면, 고수준의 TH2-유형 시토카인은 항원에 대한 체액성 면역 반응을 유도하는 경향이 있다.

TH1 및 TH2-유형 면역 반응의 특징은 절대적이지 않다. 실제로는, 개체는 주로 TH1 또는 주로 TH2로서 언급된 면역 반응을 지지할 것이다. 그러나, 모스만(Mosmann)과 코프만(Coffman)(*Mosmann, T.R. and Coffman, R.L.*(1989) TH1 and TH2 cells: 상이한 패턴의 림포카인 분비가 상이한 작용 특성을 유도함, *Annual Review of Immunology*, 7, p145-173)에 의한 바와 같이, 쥐과동물 CD4+ ve T 세포 클론에 있어서, 시토카인의 계통을 고려하는 것이 편리하다. 전형적으로, TH1-유형 반응은 T-림프구에 의해 INF- γ 및 IL-2 시토카인의 생성과 관련된다. TH1-유형 면역 반응의 유도와 종종 직접 관련된 기타 시토카인은 T-세포, 예컨대, IL-12에 의해 생성되지 않는다. 반대로, TH2-유형 반응은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-13과 관련된다.

특정 백신 애쥬번트는 특히, TH1 또는 TH2-유형 시토카인 반응의 자극에 적합한 것으로 공지되어 있다. 전형적으로, 백신화 또는 감염 후, 면역 반응의 TH1:TH2 균형의 가장 우수한 지시제는, 항원으로의 재자극 후 시험관내에서 T 림프구에 의해 생성된 TH1 또는 TH2 시토카인의 직접적인 측정치 및/또는 항원 특이적 항체 반응의 IgG1:IgG2a 비의 측정을 포함한다.

이렇게, TH1-유형 애쥬번트는, 시험관내에서 항원으로 재자극되는 경우, 단리된 T-세포 개체군을 선택적으로 자극하여, 고수준의 TH1-유형 시토카인을 생성하고, TH1-유형 이소타입과 관련된 항원 특이적 면역글로불린 반응 및 CD8+ 세포 독성 T 림프구 둘 모두의 전개를 촉진한다.

TH1 세포 반응을 선택적으로 자극할 수 있는 애쥬번트는 국제 특허 출원 WO94/00153 및 WO95/17209에 기재되어 있다.

3 데-*O*-아실화된 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)은 이러한 애쥬번트중 하나다. 이는 GB 2220211(Ribi)에 공지되어 있다. 화학적으로, 이는 3 데-*O*-아실화된 모노포스포릴 지질 A와 4, 5 또는 6 아실화된 사슬의 혼합물이며, 리비 이뮤노켐(Ribi Immunochem)(Montana)에 의해 제조되었다. 바람직한 형태의 3 데-*O*-아실화된 모노포스포릴 지질 A는 유럽 특허 0 689 454 B1(SmithKline Beecham Biologicals SA)에 기재되어 있다.

바람직하게는, 3D-MPL의 입자는 0.22마이크론 막을 통해 멸균 여과되기에 충분히 작다(유럽 특허 제 0 689 454).

3D-MPL은 1회용량당 10 μ g-100 μ g, 바람직하게는 25-50 μ g의 범위로 존재하며, 항원은 전형적으로 1회용량당 2-50 μ g의 범위로 존재할 것이다.

또 다른 바람직한 애쥬번트는 QS21 즉, 퀼리아자 사포나리아 몰리나(Quillaja Saponaria Molina)의 껍질로부터 유래된 Hplc 정제된 비독성 분획물을 포함한다. 선택적으로, 이는 3 데-*O*-아실화된 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)과 선택적으로 담체와 함께 혼합될 수 있다.

QS21의 제조 방법은 미국 특허 제 5,057,540호에 기재되어 있다.

QS21을 함유하는 비반응원성(non-reactogenic) 애쥬번트 제형은 이미 공지되어 있다(WO 96/33739). QS21 및 콜레스테롤을 포함하는 이러한 제형은, 항원과 함께 제형되는 경우, 성공적인 TH1 자극 애쥬번트인 것으로 입증되었다.

또한, TH1 세포 반응의 선택적인 자극제인 애쥬번트는 WO96/02555에 기재된 바와 같은 면역조절 올리고누클레오티드, 예를 들어, 비메틸화된 CpG 서열을 포함한다.

상기 언급된 바와 같이, 상이한 TH1 자극 애쥬번트의 혼합은 또한, TH1 세포 반응의 선택적인 자극제인 애쥬번트를 제공하는 것으로써 여겨진다. 예를 들어, QS21은 3D-MPL과 함께 제형화될 수 있다. QS21:3D-MPL의 비는 전형적으로, 1:10 내지 10:1, 바람직하게는 1:5 내지 5:1이며, 사실상 종종 1:1이다. 최적의 공동상승 효과를 위한 바람직한 비는 2.5:1 내지 1:1의 3D-MPL:QS21이다.

바람직하게는, 담체는 또한, 본 발명에 따른 백신 조성물중에 존재한다. 담체는 수중유 에멀션 예컨대, 알루미늄 포스페이트 또는 수산화알루미늄 또는 알루미늄 염일 수 있다.

바람직한 수중유 에멀션은 스쿠알렌, 알파 토코페롤 및 트윈 80과 같은 대사가능 오일을 포함한다. 특히 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 백신 조성물중의 항원은 이러한 에멀션에서 QS21 및 3D-MPL와 혼합된다. 따라서, 수중유 에멀션은 스펜(span) 85 및/또는 레시틴 및/또는 트리카프릴린을 함유할 수 있다.

전형적으로, 사람 투여에 있어서, QS21 및 3D-MPL은 1회용량 당 1 μ g-200 μ g, 예컨대, 10-100 μ g, 바람직하게는 10 μ g-50 μ g의 양으로 백신중에 존재할 것이다. 전형적으로, 수중유는 2 내지 10% 스쿠알렌, 2 내지 10% 알파 토코페롤 및 0.3 내지 3% 트윈 80을 포함할 것이다. 바람직하게는, 스쿠알렌:알파 토코페롤의 비는 동일하거나 1보다 적으며, 이는 더욱 안정적인 에멀션을 제공한다. 스펜 85는 또한, 1% 수준으로 존재할 수 있다. 일부 경우에는, 본 발명의 백신이 안정화제를 추가로 함유하는 것이 유리할 수 있다.

비독성 수중유 에멀션은 바람직하게는, 비독성 오일, 예를 들어, 스쿠알렌 또는 유화제, 예를 들어, 수성 담체중의 트윈 80을 함유한다. 수성 담체는 예를 들어, 인산염 완충된 염수일 수 있다.

수중유 에멀션중의 QS21, 3D-MPL 및 토코페롤을 포함하는 특히 유효한 애쥬번트 제형은 WO95/17210에 기재되어 있다.

본 발명은 또한, 본 발명의 백신 제형과 기타 항원, 특히 암, 자가면역 질환 및 이와 관련된 질환에 유용한 항원을 포함하는 다가 백신 조성물을 제공한다. 이러한 다가 백신 조성물은 본원에 언급된 바와 같은 TH-1 유도 애쥬번트를 포함할 수 있다.

본 발명은 특정 BASB029 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드를 참조로 설명되어 있지만, 이는 자연적으로 발생하는 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드의 단편, 및 재조합 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드의 면역원성 특성에 사실상 영향을 끼치지 않는 첨가, 결실 또는 치환된 유사한 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드의 단편을 포함하는 것으로 이해해야 한다.

상기 항원은 전체 박테리아(죽은 또는 살아있는) 또는 세포내 분획 형태로 전달될 수 있으며, 나이세리아 메닌지티디스 자체를 포함할 수 있다.

조성물, 키트 및 투여

본 발명의 추가적 양태에 있어서, 세포 또는 다중세포 유기체로의 투여를 위해 BASB029 폴리누클레오티드 및/또는 BASB029 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 제공된다.

본 발명은 또한, 본원에서 논의된 폴리누클레오티드 및/또는 폴리펩티드 또는 이들의 작용제 또는 길항제를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리누클레오티드는 세포, 조직 또는 유기체에 사용하기 위한 비멸균 또는 멸균 담체(들), 예컨대, 개체 투여에 적합한 약제학적 담체와 혼합된 형태로 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 예를 들어, 매질 첨가제 또는 치료학적 유효량의 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 폴리누클레오티드, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 담체는 염수, 완충된 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 제형은 투여 방식에 적합하여야 한다. 본 발명은 추가로, 본 발명의 상기 언급된 조성물의 하나 이상이 성분으로 충전된 하나 이상의 컨테이너를 포함하는 진단학적 및 약제학적 팩 및 키트에 관한 것이다.

본 발명의 폴리펩티드, 폴리누클레오티드 및 기타 화합물은 단독으로 또는 치료학적 화합물과 같은 다른 화합물과 함께 사용될 수 있다.

약제학적 조성물은 예를 들어, 국부적, 경구적, 항문, 생식 기관, 정맥내, 복강내, 근내, 피하내, 비내 또는 피내 경로에 의한 투여를 포함한 효과적이고 간편한 방식으로 투여될 수 있다.

치료 또는 예방에 있어서, 활성제는 주입가능한 조성물, 예를 들어, 멸균수 분산액, 바람직하게는 등장액으로서 개체에 투여될 수 있다.

추가의 양태에서, 본 발명은, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합된 치료학적 유효량의 폴리펩티드 및/또는 폴리누클레오티드, 예컨대, 가요성 형태의 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 폴리누클레오티드, 작용제 또는 길항제 웨პ티드 또는 소분자 화합물을 포함하는 약제 조성물을 제공한다. 이러한 담체는 염수, 완충된 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명은 추가로, 본 발명의 상기 언급된 조성물의 하나 이상이 성분으로 충전된 하나 이상의 컨테이너를 포함하는 진단학적 및 약제학적 팩 및 키트에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드, 폴리누클레오티드 및 기타 화합물은 단독으로 또는 치료학적 화합물과 같은 다른 혼합물과 함께 사용될 수 있다.

상기 조성물은 예를 들어, 전신 또는 경구 투여에 적합하게 될 것이다. 전신 투여에 바람직한 형태는 주입, 전형적으로, 정맥내 주입을 포함한다. 다른 주입 경로, 예컨대, 피하내, 근내 또는 복강내 경로가 이용될 수 있다. 전신 투여에 대한 대안적인 방법은, 담즙 염 또는 푸시드산(fusidic acid) 또는 다른 디터전트(detergent)와 같은 침투제를 이용하여, 점막통과 및 피부통과 투여를 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 기타 화합물이 장(enteric) 제형 또는 캡슐화 제형으로 제형화될 수 있다면, 경구 투여가 또한 가능하다. 이러한 화합물의 투여는 또한, 연고, 페이스트(paste), 젤, 용액, 분말 등의 형태로 국소적 및/또는 국부적으로 수행될 수 있다.

포유동물, 특히 사람으로의 투여에 있어서, 활성제의 1일 투여수준은 0.01mg/kg 내지 10mg/kg, 전형적으로 약 1mg/kg인 것으로 예상된다. 의사가 개인에 가장 적합한 실제 용량을 결정할 것이며, 이는 특정 개체의 나이, 체중 및 반응성에 따라 변한다. 상기 용량은 평균 용량의 예이다. 물론, 개인에 따라 더 높거나 낮은 양이 적합할 수 있으며, 이를 또한 본 발명의 범위에 포함된다.

요구되는 용량 범위는 선택된 웨პ티드, 투여 경로, 제형의 특성, 시험체의 질환 특성 및 주치의의 판단에 따른다. 그러나, 적합한 용량은 시험체의 1kg 당 0.1 내지 100 μ g이다.

백신 조성물은 편리하게는 주입가능한 형태를 띤다. 통상적인 애쥬번트는 면역 반응을 증진시키기 위해 사용될 수 있다. 백신화에 적합한 단위 용량은 항원 1kg 당 0.5 내지 5 μ g이며, 이러한 용량은 바람직하게는 1 내지 3주의 간격을 두고 1 내지 3회 투여된다. 지적된 용량 범위에서, 적합한 개체로의 투여를 불가능하게 하는 불리한 독성 효과는 본 발명의 화합물에 대해 관찰되지 않았다.

그러나, 요구된 용량에서의 광범위한 변화는 다양한 화합물의 사용 가능성 및 투여의 다양한 경로에 따른 상이한 효능이 예상된다. 예를 들어, 경구 투여는 정맥내 주입에 의한 투여보다 많은 용량을 필요하는 것으로 예상된다. 이러한 용량 수준 내에서의 변화는 당해분야에 널리 공지된 바와 같이, 최적화를 위한 표준 실험 절차를 이용하여 조절될 수 있다.

서열 데이터베이스, 유형성 배지(Tangible Medium)에서의 서열 및 연산

폴리누클레오티드 및 폴리펩티드 서열은 귀중한 정보원을 형성하여 이들의 2차원 및 3차원 구조를 결정할 뿐만 아니라 유사한 상동성의 또 다른 서열을 확인한다. 이러한 접근 방법은 컴퓨터 판독 매체로 서열을 저장한 후 공지된 거대분자 구조 프로그램에서 저장된 데이터를 사용하므로써 매우 용이하게 이행되거나 GCG 프로그램 패키지와 같은 널리 공지된 서치 도구를 이용하여 서열 데이터베이스를 서치하는 것이다.

또한, 본 발명은 특징 서열 또는 가닥, 특히 유전자 서열 또는 코드화된 단백질 서열을 분석하는 방법을 제공한다. 바람직한 서열 분석 방법에는 예를 들어, 동일성과 유사성 분석과 같은 서열 상동성 분석, DNA, RNA 및 단백질 구조 분석, 서열 어셈블리, 분기학분석, 서열 모티브 분석, 오픈 리딩 프레임 결정, 핵산 염기 콜링, 코돈 사용 분석, 핵산 염기 트리밍 및 시퀀싱 크로마토그램 피크 분석 방법이 포함된다.

컴퓨터 방식 방법이 상동성 확인을 위해 제공된다. 이 방법은 컴퓨터 판독가능한 매질 중에 폴리누클레오티드의 서열을 포함하는 제 1 폴리누클레오티드 서열을 제공하는 단계 및 제 1 폴리누클레오티드 서열을 하나 이상의 제 2 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 비교하여 상동성을 확인하는 단계를 포함한다.

컴퓨터 방식 방법이 또한 상동성 확인을 위해 제공되며, 이 방법은 컴퓨터 판독가능한 매질 중에 폴리펩티드의 서열을 포함하는 제 1 폴리펩티드 서열을 제공하는 단계 및 제 1 폴리펩티드 서열을 하나 이상의 제 2 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 비교하여 상동성을 확인하는 단계를 포함한다.

특히 및 특히 출원을 포함하나 이로 제한되는 것은 아닌, 본원에 인용되는 모든 문헌 및 참조문헌은 각각의 문헌 또는 참조문헌이 구체적으로 및 개별적으로 완전히 언급되는 참고문헌으로 인용되는 것으로 지시되는 바와 같이 참고문헌으로 인용된다. 본 출원전의 특허출원은 문헌 및 참조를 위해 상기 언급된 방식으로 본원에 참고문헌으로 인용된다.

정의

당해 공지된 바와 같이, "동일성"은 해당 경우가 서열을 비교하므로써 결정되는 경우일 수 있으므로 두개 이상의 폴리펩티드 서열 또는 두개 이상의 폴리누클레오티드 서열 간의 관계이다. 당 분야에서, "동일성"은 또한 경우에 따라, 서열의 가닥 사이의 매치에 의해 결정되므로, 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드 서열 사이의 서열 관련 정도를 의미한다. "동일성"은 문헌(*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heine, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stokton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073(1988))에 기술된 방법을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아닌 공지된 방법에 의해 용이하게 계산될 수 있다. 동일성을 측정하는 방법은 시험되는 서열간에 최대 매치를 제공하도록 고안된다. 또한, 동일성을 측정하는 방법은 대중적으로 이용할 수 있는 컴퓨터 프로그램으로 복사된다. 두 서열간의 동일성을 측정하기 위한 컴퓨터 프로그램 방법에는 GCG 프로그램 패키지에서의 GAP 프로그램(Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387(1984)), BLASTP, BLASTN(Altschul, S.F. et al., *J. Molec. Biol.* 215:403-410(1990), 및 FASTA(Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448(1988))이 포함되나 이로 제한되는 것은 아니다. BLAST 류의 프로그램은 공개적으로 NCBI 및 그 밖의 출처(*BLAST Manual*, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410(1990))로부터 공개적으로 입수할 수 있다. 널리 공지된 스미스 워터맨(Smith Waterman) 알고리즘 또한 동일성을 측정하는데 사용될 수 있다.

폴리펩티드 서열 비교를 위한 파라미터는 하기를 포함한다:

알고리즘: 니들맨 앤 운쉬(Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453(1970))

비교 매트릭스: 헨리코프 앤 헨리코프(Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919(1992))로부터의 BLOSSUM62

캡 폐널티(Gap Penalty): 8

캡 길이 폐널티(Gap Length Penalty): 2

이러한 파라미터를 갖는 유용한 프로그램은 지네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group, Madison WI)으로부터의 "캡" 프로그램으로서 공개적으로 입수할 수 있다. 상기 언급된 파라미터는 웹티드 비교에 대한 결합 파라미터(말단 캡에 대해 부재 폐널티와 함께)이다.

폴리누클레오티드 비교를 위한 파라미터는 하기를 포함한다:

알고리즘: 니들맨 앤 운쉬(Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453(1970))

비교 매트릭스: 매치 = + 10, 미스매치 = 0

캡 폐널티: 50

캡 길이 폐널티: 3

지네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group, Madison WI)으로부터의 "캡" 프로그램으로서 입수 가능. 이들 파라미터는 핵산 비교를 위한 결합 파라미터이다.

경우에 따라서, 폴리누클레오티드 및 폴리웹티드에 대한 "동일성"의 바람직한 의미가 하기 (1) 및 (2)에 제시된다:

(1) 폴리누클레오티드 구체에는 추가로 서열 번호: 1의 기준 서열에 대해, 적어도 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 또는 100% 동일성을 갖는 폴리누클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 폴리누클레오티드를 포함하며, 이러한 폴리누클레오티드 서열은 서열 번호: 1의 기준 서열과 동일하거나, 기준 서열과 비교하여 특정 정수 이하의 변형된 누클레오티드를 포함할 수 있으며, 이러한 변형은 하나 이상의 누클레오티드 삭제, 치환(전이 및 트랜스버전(transversion) 포함), 또는 삽입으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 이러한 변형은 기준 누클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치, 또는 개별적으로 기준 서열의 누클레오티드 사이 또는 기준 서열내 하나 이상의 연속된 그룹내의 누클레오티드 사이로 산재된 상기 말단 위치 사이 어느 곳에서나 발생할 수 있으며, 변형된 누클레오티드의 개수는 서열 번호: 1의 누클레오티드의 총수와 100으로 나눈 동일율을 나타내는 정수를 곱하고, 이것을 서열 번호: 1의 누클레오티드 총수로부터 공제하므로써 결정되거나, 하기 식으로 계산될 수 있다:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y)$$

상기 식에서,

n_n 은 변형된 누클레오티드 수이고,

x_n 은 서열 번호: 1의 누클레오티드의 총수이고,

y 는 50% 대해 0.50, 60% 대해 0.60, 70% 대해 0.70, 80% 대해 0.80, 85% 대해 0.85, 90% 대해 0.90, 95% 대해 0.95, 97% 대해 0.97 또는 100% 대해 1.0이고,

·는 곱셈 연산기호이고,

x_n 과 y의 모든 소수는 x_n 으로부터 이를 공제하기 전에 반올림된 정수로 어림된다. 서열 번호: 2의 폴리펩티드를 코드화하는 폴리누클레오티드 서열의 변형은 이러한 코딩 서열에서 뉴센스(nonsense), 미스센스(missense) 또는 프레임시프트(frameshift) 변이를 일으켜, 이러한 변형 후에 폴리누클레오티드에 의해 코드화된 폴리펩티드를 변형시킬 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 폴리누클레오티드 서열은 서열 번호: 1의 기준 서열과 동일할 수 있다. 즉, 기준 서열과 비교하여 100% 동일하거나, 특정 정수 이하의 변형된 핵산을 포함하여, 동일율이 100% 미만일 수 있다. 이러한 변형은 하나 이상의 핵산의 삭제, 치환(전이 및 트랜스버전 포함), 또는 삽입으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 이러한 변형은 기준 폴리누클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치, 또는 개별적으로 기준 서열의 핵산 사이 또는 기준 서열내 하나 이상의 연속된 그룹 내의 핵산 사이로 산재된 상기 말단 위치 사이 어느 곳에서나 발생할 수 있다. 변형된 핵산 수는, 서열 번호: 1의 핵산의 총 수와 100으로 나눈 동일율을 나타내는 정수를 곱하고, 이것을 서열 번호: 1의 핵산의 총 수로부터 공제하므로써 결정되거나, 하기 식으로 계산될 수 있다:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y)$$

상기 식에서,

n_n 은 변형된 핵산의 수이고,

x_n 은 서열 번호: 1의 핵산의 총 수이고,

y는 70% 대해 0.70, 80% 대해 0.80, 85% 대해 0.85 등이고,

·는 곱셈 연산기호이고,

x_n 과 y의 모든 소수는 x_n 으로부터 이를 공제하기 전에 반올림된 정수로 어림된다.

(2) 폴리펩티드 구체예는 추가로 서열 번호: 2의 기준 서열에 대해, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 또는 100% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함하며, 이러한 폴리펩티드 서열은 서열 번호: 2의 기준 서열과 동일하거나, 기준 서열과 비교하여 특정 정수 이하의 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 이러한 변형은 하나 이상의 아미노산 삭제, 치환(보전적 및 비보전적 치환 포함), 또는 삽입으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 이러한 변형은 기준 폴리펩티드 서열의 아미노- 또는 카르복시 말단 위치, 또는 개별적으로 기준 서열의 아미노산 사이 또는 기준 서열내 하나 이상의 연속된 그룹내의 아미노산 사이로 산재된 상기 말단 위치 사이 어느 곳에서나 발생할 수 있으며, 변형된 아미노산 수는, 서열 번호: 2의 아미노산의 총 수와 100으로 나눈 동일율을 나타내는 정수를 곱하고, 이것을 서열 번호: 2의 아미노산 총 수로부터 공제하므로써 결정되거나, 하기 식으로 계산될 수 있다:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y)$$

상기 식에서,

n_a 는 변형된 아미노산의 수이고,

x_a 은 서열 번호: 2의 아미노산의 총 수이고,

y는 50% 대해 0.50, 60% 대해 0.60, 70% 대해 0.70, 80% 대해 0.80, 85% 대해 0.85, 90% 대해 0.90, 95% 대해 0.95, 97% 대해 0.97 또는 100% 대해 1.0이고,

·는 곱셈 연산기호이고,

x_a 과 y의 모든 소수는 x_a 로부터 이를 공제하기 전에 반올림된 정수로 어림된다.

예를 들어, 본 발명의 폴리누클레오티드 서열은 서열 번호: 2의 기준 서열과 동일할 수 있다. 즉, 기준 서열과 비교하여 100% 동일하거나 특정 정수 이하의 변형된 아미노산을 포함하여, 동일율이 100% 미만일 수 있다. 이러한 변형은 하나 이상의 아미노산의 삭제, 치환(보전적 및 비보전적 치환 포함), 또는 삽입으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 이러한 변형은 기준 폴리펩티드 서열의 아미노산- 또는 카르복시 말단 위치, 또는 개별적으로 기준 서열의 아미노산 사이 또는 기준 서열 내 하나 이상의 연속된 그룹내의 아미노산 사이로 산재된 상기 말단 위치 사이 어느 곳에서나 발생할 수 있다. 변형된 아미노산의 수는 서열 번호: 2의 아미노산의 총수와 100으로 나눈 동일율을 나타내는 정수를 곱하고, 이것을 서열 번호: 2의 아미노산 총수로부터 공제하므로써 결정되거나, 하기 식으로 계산될 수 있다:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y)$$

상기 식에서,

n_a 은 변형된 아미노산의 수이고,

x_a 은 서열 번호: 2의 아미노산의 총수이고,

y 는 70% 대해 0.70, 80% 대해 0.80, 85% 대해 0.85 등이고,

·는 곱셈 연산기호이고,

x_a 과 y 의 모든 소수는 x_a 로부터 이를 공제하기 전에 반올림된 정수로 어림된다.

유기체와 관련하여 본원에서 사용된 "개체"는 후생 동물, 포유 동물, 양과, 소과, 원숭이과, 영장류 및 사람을 포함하나 이로 제한되는 것은 아닌 다세포 진핵세포를 의미한다.

"단리된"은 원래 상태로부터 "사람의 손에 의해" 변형된 것을 의미한다. 즉, 천연 발생인 경우에, 원래 환경으로부터 변화되거나 제거되거나, 또는 이들 모두를 의미한다. 예를 들어, 살아있는 유기체에 원래 존재하는 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 원래 상태의 공존 물질로부터 분리된 동일한 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드는 이러한 용어가 본원에 사용되는 경우에는 "단리된" 것이다. 또한, 변형, 유전자 조작 또는 그 밖의 재조합 방법에 의해 유기체에 도입된 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드는 유기체가 살아있거나 죽었거나 유기체에 여전히 존재하는 경우에는 "단리된" 것이다.

"폴리누클레오티드"는 일반적으로 단일 및 이중 가닥 영역을 포함하는 변형되지 않은 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 폴리리보누클레오티드 또는 폴리데옥시리보누클레오티드를 의미한다.

"변이체"는 기준 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드와는 상이하나 본질적 특성을 보유한 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 폴리누클레오티드의 대표적인 변이체는 또 다른 기준 폴리누클레오티드와 누클레오티드 서열에서 상이하다. 변이체의 누클레오티드 서열에서의 변화는 기준 폴리누클레오티드에 의해 코드화된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변형시키거나 변형시키지 않을 수 있다. 누클레오티드 변화는 하기 논의되는 바와 같이, 기준 서열에 의해 코드화된 폴리펩티드에서의 아미노산 치환, 침가, 삭제, 융합 및 양말단 잘림을 초래할 수 있다. 대표적인 폴리펩티드의 변이체는 또 다른 기준 폴리펩티드와 아미노산 서열에서 상이하다. 일반적으로, 차이점은, 기준 폴리펩티드와 변이체의 서열이 전반적으로 매우 유사하고, 많은 영역에서 동일하도록 제한된다. 변이체 및 기준 폴리펩티드는 하나 이상의 치환, 침가, 삭제의 조합에 의해 아미노산 서열이 상이할 수 있다. 치환되거나 삽입된 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해 코드화되거나 될 수 없다. 폴리누클레오티드 또는 폴리펩티드의 변이체는 대립형질 변이체와 같은 천연 발생적일 수 있으며, 또는 천연 발생인 것으로 공지되지 않은 변이체일 수도 있다. 천연 발생이 아닌 폴리누클레오티드 및 폴리펩티드 변이체는 변이생성 기법 또는 직접 합성법에 의해 이루어질 수 있다.

"질병"은 예를 들어, 상기도 감염, 침입성 세균성 질병(균혈증 및 뇌막염과 같은)을 포함하는 세균에 의한 질병 또는 이러한 세균에 의한 감염과 관련된 질병을 의미한다.

실시예

하기 실시예는 다르게 상세히 명시한 경우를 제외하고는 당해 기술자들에게 널리 공지되어 있고, 통상적인 표준 기술을 사용하여 수행하였다. 실시예는 예시적인 것이지, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

실시예 1: 두개의 N. 메닌지티디스 균주로부터 BASB029 유전자의 발견 및 확인을 위한 DNA 시퀀싱

A: N. 메닌지티디스 세로그룹 B 균주 ATCC13090의 BASB029

서열 번호: 1의 BASB029 유전자를 먼저 N. 메닌지티디스 균주 ATCC 13090의 미완성 지놈성 DNA 서열을 함유하는 인사이트 파토세크(Incite PathoSeq) 데이터베이스에서 발견하였다. 서열 번호: 2에 나타난 BASB029 폴리누클레오티드 서열의 번역은 헤모필루스 인플루엔자 표면 피브릴(HSF) 단백질과 상당한 유사하였다(582개의 아미노산이 중첩되는 52% 동일성). BASB029 유전자의 서열은 추가의 실험으로 확인되었다. 이를 위해, 지놈성 DNA를 QIAGEN 지놈성 DNA 추출 키트(Qiagen GmbH)를 사용하여 N. 메닌지티디스 세포(균주 ATCC 13090)의 10^{10} 세포로부터 추출하고, 1 μ g의 상기 물질을 내부 *NdeI* 부위(밀줄친 부분)을 함유하는 프라이머 *Hsf1*(5'-GGG GCA TAT GAA CAA AAT ATA CCG CAT CAT TTG GAA-3')[서열 번호: 5] 및 내부 *Xhol* 부위(밀줄친 부분)를 함유하는 *Hsf2*(5'-GGG GCT CGA GCC ACT GAT AAC CGA CAG ATG CGG A-3')[서열 번호: 6]를 사용하는 PCR(Polymerase Chain Reaction) DNA 증폭 처리하였다. 상기 PCR 생성물을 겔 정제시키고, 빅 다이 사이클 시퀀싱 키트(Big Dye Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer)) 및 ABI 373A/PRISM DNA 시퀀서를 사용하여 DNA 시퀀싱하였다. DNA 시퀀싱을 두번 더 두 가닥 모두에 대해 수행하고, 전체 길이의 서열을 DNASTAR 레이저진 소프트웨어 패키지(Lasergene software package)로부터의 시크맨(SeqMan) 프로그램을 사용하여 어셈블링하였다. 결과의 DNA 서열은 서열 번호: 1과 100% 동일한 것으로 밝혀졌다.

B: N. 메닌지티디스 세로그룹 B 균주 H44/76의 BASB029

BASB029 유전자 서열을 또한 또 다른 N. 메닌지티디스 세로그룹 B 균주인, 균주 H44/76에서 측정하였다. 이를 위해, 지놈성 DNA를 실시예 1에 제시된 실험 조건을 사용하여 N. 메닌지티디스 균주 H44/76으로부터 추출하였다. 이후, 상기 물질(1 μ g)을 BASB029 유전자에 특이적인 프라이머 *Hsf1* 및 *Hsf2*를 사용하여 PCR DNA 증폭 처리하였다. 4389bp DNA 단편을 얻어 *NdeI*/*Xhol* 제한 엔도누클레아제에 의해 분해시키고, 표준 분자량 생물학 기법(Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989)을 사용하여 pET-24b 클로닝/발현 벡터(Novagen)의 상응하는 부위에 삽입시켰다. 이후, 재조합 pET-24b/BASB029를 빅 다이 키트(Applied biosystems)를 사용하여 DNA 시퀀싱 처리하고, 공급자들에 의해 기술된 조건하에서 ABI 373/A DNA 시퀀서로 분석하였다. 결과로서, 서열 번호: 3 및 4에 해당하는 폴리누클레오티드 및 유래된 폴리펩티드 서열을 각각 얻었다. GCG 패키지로부터의 PILEUP 프로그램을 사용하여 서열 번호: 1 및 3의 폴리누클레오티드 서열을 배열을 수행하고, 도 1에 나타냈으며, GAP 프로그램에 의해 측정한 이들의 동일성 수준은 96.8%에 이르렀다. 동일한 PILEUP 프로그램을 사용하여 서열 번호: 2 및 4의 폴리펩티드 서열의 배열을 수행하였으며, 이는 도 2에 나타냈으며, GAP 프로그램에 의해 측정한 이들의 동일성 수준은 94.2%에 이르렀다. 결론적으로, 이들 데이터는 두개의 N. 메닌지티디스 세로그룹 B 균주 사이에 BASB029 유전자의 강한 서열 보존을 시사한다.

실시예 2: 대장균에서의 재조합 BASB029 단백질의 발현 및 정제

pET-24b/BASB029 클로닝/발현 벡터의 구성은 실시예 1B에 기술되었다. 이 벡터는 강력한 박테리오파아지 T7 유전자 10 프로모터의 조절하에 배치된 6개의 히스티딘 잔기의 스트레치와 융합되는 균주 H44/76으로부터 단리된 BASB029 유전자에 잠복되어 있다. 발현 연구를 위해, 상기 벡터를 대장균 균주 노바블루(Novablue)(DE3)(Novagen)에 유입하고, T7 폴리머라제에 대한 유전자를 이소프로필-베타-D 티오칼락토시드(IPTG)-조절가능한 *lac* 프로모터의 조절하에 두었다. 노바블루(DE3)[pET-24b/BASB029] 대장균 재조합 균주의 배양액(100ml)을 600nm(OD600)에서의 광학 밀도가 0.6에 도달할 때까지 37°C에서 교반하면서 성장시켰다. 동시에, 1mM의 최종 농도가 되도록 IPTG를 첨가하고, 이 배양액을 추가로 4시간 동안 성장시켰다. 이후, 배양액을 10,000rpm에서 원심분리시키고, 펠릿을 10시간 이상 동안 -20°C에서 동결시켰다. 해동시킨 후, 펠릿을 완충액 A(6M의 구아디닌 히드로클로라이드, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M 트리스, pH 8.0)중에서 25°C에서 30분 동안 재현탁시키고, 니들을 통해 3회 통과시키고, 원심분리(20000rpm, 15분)에 의해 분류하였다. 이후, 이 샘플을 Ni²⁺-적재된 히트랩 칼럼(Hitrap column(Pharmacia Biotech)) 상에서 1ml/분의 유량으로 적재시켰다. 완전히 흐른 다음에, 칼럼을 40ml의 완충액 B(8M 우레아, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M 트리스, pH 8.0)와 40ml의 완충액 C(8M 우레아, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M 트리스, pH 6.3)로 연속해서 세척하였다. 이후, 재조합 단백질 BASB029/His6을 500mM의 이미다졸을 함유하는 30ml의 완충액 D(8M 우레아, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M 트리스, pH 6.3)로 칼럼으로부터

용리시켜, 3ml 크기의 분획을 수거하였다. 도 3(레인 1)에 도시된 바와 같이, 66kDa(추정된 상대 분자량)에서 이동하는 매우 농축된(쿠마시에 염색(coomassie staining)에서 90% 넘게 순수한 것으로 순도 추정) BASB029/His6 단백질을 칼럼으로부터 용리시켰다. 이 폴리펩티드는 5-히스티딘 모티브(도 3, 레인 2)에 대해 제기된 마우스 모노클로날 항체에 반응성을 띤다. 결론적으로, 이들 데이터는 BASB029 유전자가 대장균에서 재조합 형태(BASB029/His6)로 발현되고 정제될 수 있음을 시사한다.

실시예 3: 재조합 BASB029로 마우스의 면역화

대장균에 발현된 부분 정제된 재조합 BASB029 단백질을 0, 14 및 29일째에 발브(Balb)/C 마우스에 3회 주사하였다(8마리/그룹). 동물에게 약 5 μ g의 항원을 100 μ g의 AlPO₄ 상에서 흡착되거나, SBAS2 에멀션(투여당 5 μ g의 MPL 및 5 μ g의 QS21을 함유하는 SB62 에멀션)으로 제형된 두가지 상이한 제형으로 피하 경로에 의해 주사하였다. 단지 SBAS2 에멀션 만으로 면역된 마우스로 이루어진 네가티브 대조군을 또한 실험에 참여시켰다. 마우스를 29일(포스트II 15일째) 및 35일(포스트III 6일째)에 채혈하여 특이적 안티-BASB029 항체를 검출하였다. 특이적 안티-BASB029 항체를 6개의 상이한 NmB 균주 상의 웨스턴-블로팅(western-blotting)(도 4 및 5)에 의해 푸울링된 혈청(10마리 마우스/그룹)에 대해 측정하였다.

웨스턴-블로팅에 의해 상이한 NmB 균주에 대한 BASB029 에피토프의 인지

이 시험에서, 면역된 마우스 혈청(푸울링된)을 6개의 상이한 나이세리아 메닌지티디스 B 균주, 즉, H44/76(B:15:P1.7, 16, 계통 ET-5), M97 250987(B:4:P1.15), BZ10(B:2b:P1.2, 계통 A4), BZ198(B:NT*:-, 계통 3), EG328(B:NT*, 계통 ST-18) 및 ATCC 13090 멘(Men) B 균주 뿐만 아니라 부분 정제된 재조합 BASB029 단백질에 대한 BASB029 에피토프의 인식에 대해 웨스턴-블로팅으로 시험하였다(*:NT; 유형화되지 않음).

간단히, 샘플 완충액으로 처리된(95°C에서 10분) 각각의 샘플의 10 μ l(>10⁸ 세포/레인)을 SDS-PAGE 구배 젤(트리스-글리신 4-20%, Novex, code n°EC60252)에 넣었다. 90분 동안 125 볼트에서 일렉트로포레스트 이동시켰다. 이후, 단백질을 바이오-라드 트랜스-블로트 시스템(code n°170-3930)을 사용하여 1시간 동안 100볼트에서 니트로셀룰로오스 시트(0.45 μ m, 바이오-라드 코드 n°162-0114)에 옮겼다. 필터를 실온에서 밤새 PBS-0.05% 트윈 20으로 블록킹시킨 후, AlPO₄ 및 SBAS2 제형 둘 모두로부터 유래된 안티-BASB029 항체를 함유하는 마우스 혈청과 인큐베이션시켰다. 이들 혈청을 PBS-0.05% 트윈 20으로 100배 희석하고, 미니-블로터 시스템(mini-blotter system)(Miniprotean, Bio-rad code n°170-4017)을 사용하여 완만하게 흔들면서 실온에서 2시간 동안 니트로셀룰로오스 시트 상에서 인큐베이션시켰다. 5분 동안 PBS-0.05% 트윈 20으로 3회 반복하여 세척한 후에, 니트로셀룰로오스 시트를 동일한 세척 완충액으로 1/500으로 희석된 적합한 컨주케이트(양으로부터의 바이오티닐화된 안티-마우스 Ig 항체, Amersham code n°RPN1001)과 함께 완만하게 흔들면서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 상기 막을 이전과 같이 3회 세척하고, 상기 세척 완충액으로 1/1000으로 희석된 스트렙타비딘-페옥시다아제 착물(Amersham code n°1051)을 사용하여 교반하면서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 마지막으로 3회 반복하여 세척한 후에, 30mg의 4-클로로-1-나프톨(Sigma), 10mg의 메탄올, 40ml의 PBS 및 30 μ l의 H₂O₂를 함유하는 50ml 용액중에 20분 동안 인큐베이션시켜 발색시켰다. 희석된 물로 여러번 막을 세척하는 동안에 착색이 멈추었다.

도 4 및 5에 예시된 결과는 시험된 모든 균주가 약 65-70kDa에서 예상된 밴드를 나타내며, 약 55 및 90kD에서의 두개의 다른 주밴드를 나타내며, 이는 명백히 본 BASB029 단백질(중합체, 변성 생성물)과 관련되어 있다. 이는 BASB029 단백질이 모두 그런것은 아닐지라도, 대부분 NmB 균주에서 발현됨을 의미한다. 도 4에서, 재조합 BASB029 단백질은 4개의 상이한 단백질로서 나타났으며, 두개는 예상된 분자량인 65-70kDa에서, 그리고, 나머지 두개는 재조합 BASB029 단백질의 응집물인 것으로 여겨지는 매우 높은 분자량(>200kDa)에서 나타났다.

실시예 4: 회복기 화자로부터의 혈청에서 안티-BASB029 항체의 존재

본 시험에서는, 정제된 재조합 BASB029 단백질의 인지를 위한 웨스턴-블로팅에 의해 회복기 혈청을 시험하였다.

간단히, 5 μ g의 부분 정제된 BASB029 NmB 단백질을 일렉트로포레스트 이동을 위해 SDS-PAGE 구배 젤(4-20%, Novex, code n°EC60252)에 넣었다. 단백질을 바이오-라드 트랜스-블로트 시스템(code n°170-3930)을 사용하여 1시간 동안 100볼트에서 니트로셀룰로오스 시트(0.45 μ m, 바이오-라드 n°162-0114)에 옮겼다. 이후, 필터를 실온에서 밤새 PBS-0.05% 트윈 20으로 블록킹시킨 후, 사람 혈청과 인큐베이션시켰다. 이들 혈청을 PBS-0.05% 트윈 20으로 100배 희

석하고, 미니-블로터 시스템(mini-blotter system)(Miniprotein, Bio-rad code n°170-4017)을 사용하여 완만하게 흔들면서 실온에서 2시간 동안 니트로셀룰로오스 시트 상에서 인큐베이션시켰다. 5분 동안 PBS-0.05% 트윈 20으로 3회 반복하여 세척한 후에, 니트로셀룰로오스 시트를 동일한 세척 완충액으로 1/500으로 희석한 적합한 컨주게이트(양으로부터의 바이오티닐화된 안티-사람 Ig 항체, Amersham code n°RPN1003)과 함께 완만하게 흔들면서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 상기 막을 이전과 같이 3회 세척하고, 상기 세척 완충액으로 1/1000으로 희석된 스트렙타비딘-페옥시다제 착물(Amersham code n°1051)을 사용하여 교반하면서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 마지막 3회 반복하여 세척한 후에, 30mg의 4-클로로-1-나프톨(Sigma), 10mg의 메탄올, 40ml의 초순수 물 및 30μl의 H₂O₂를 함유하는 50ml 용액중에서의 20분 동안 인큐베이션시켜 발색시켰다. 희석된 물로 여러번 막을 세척하는 동안에 착색이 멈추었다.

도 6 및 7에 예시된 결과는 시험된 모든 7개의 회복기 혈청은 약 65-70kDa에서 재조합 BASB029 단백질에 대해 반응한 반면, 두개의 상위 밴드(>200kDa)가 이들 대부분에 인식되었고, 이들중 소수에 대해서는 약한 반응이 있었다. 고분자량 단백질에 대한 반응도는 두개의 밴드가 명백히 BASB029 단백질과 관련된 것이며, 이는 응집된 형태로 존재할 것임을 확인시켜 준다. 도 6 및 7의 파트 A에서, 이들 4개의 밴드에 대한 동일 반응은 면역된 마우스 혈청으로도 확인된다. 이는 이들 4개의 밴드 모두가 재조합 BASB029 단백질과 관련되어 있음을 분명히 확인시켜 준다. 네가티브 마우스 혈청은 도 7에 도시된 바와 같이 재조합 단백질과 반응하지 않는다.

기탁 물질

나이세리아 메닌지티디스 세로그룹 B 균주를 함유하는 기탁물질을 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection, 이하 "ATCC")에 1997년 6월 22일자로 기탁하고, 기탁 번호 13090을 부여받았다. 기탁물질은 나이세리아 메닌지티디스(Albrecht and Ghon)으로서 기재되었으며, N. 메닌지티디스 단리물로부터 구성된 냉동건조된 1.5-2.9kb 인서트 라이브러리이다. 기탁물질은 문헌(Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 8:1-15(1958))에 기재되어 있다.

나이세리아 메닌지티디스 균주 기탁물질을 본원에서는 "기탁 균주" 또는 "기탁 균주의 DNA"로 언급하였다.

기탁된 균주는 전체 길이의 BASB029 유전자를 함유한다. 본원의 서열 기재와 대립되는 경우에는 기탁된 균주에 함유된 폴리누클레오티드의 서열 뿐만 아니라 이로써 코드화된 폴리펩티드의 아미노산 서열이 우선적이다.

기탁된 균주의 기탁은 특히 절차상의 취지에 부합하여 미생물 기탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 규약에 의하여 이루어졌다. 상기 균주는 변경불가능하며, 특히 공고시에 제한 또는 조건없이 대중에게 공개될 것이다. 기탁된 균주는 단지 당해 기술자들에게 편의상 제공되는 것이며, 35 U.S.C. §112하에 요구되는 바와 같이 기탁이 권리부여에 요구됨을 인정하는 것은 아니다.

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SmithKline Beecham Biologicals S.A.

<120> Novel Compounds

<130> BM45321

<160> 6

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1785

<212> DNA

<213> Bacteria

<400> 1

atgaacaaaa tataccgcac	catttggaat	agtgcctca	atgcctgggt	cgccgtatcc	60
gagctcacac	gcaaccacac	caaacgcgcc	tccgcaaccg	tggcgaccgc	120
acactgttgt	ttgcaacgggt	tcagggaggt	actaccgtg	acgacgattt	180
cccgatacaac	gcactgctgt	cgtgttgagc	tccgttccg	ataaagaagg	240
aaagaaggta	cagaagattc	aaattgggga	gtatatttcg	acaagaagg	300
ggcgaaacaa	tcaccctcaa	agccggcgac	aacctgaaaa	tcaaacaaaa	360
acaccaatg	ccagtagctt	cacctactcg	ctgaaaaaaag	acccacaga	420
gttggaaactg	aaaaattatc	gtttagcgca	aacagcaata	atgtcaacat	480
accaaaggct	tgaatttcgc	aaaaaaaacg	gtcgagacca	acggcgacac	540
ctgaacggta	tcggttcgac	tttgaccgt	acgctgtgta	ataccggagc	600
gttaaccaacg	acaacgttac	cgatgacgag	aaaaaacgtg	cgccaaagcgt	660
ttaaaggcg	gttggacat	taaaggcggt	aaaccccgta	caacagcttc	720
gatttcgtcc	gcacttacga	cacagtgcag	tctttgagcg	cagatcggaa	780
gttaatgtgg	aaagcggaaa	caacggcaag	agaaccgaaag	ttaaattcg	840
tctgttatca	aaagaaaaaga	cggttaatgtt	gttactggta	aagacaaaagg	900
tcttctacag	acaaaggcgca	aggctttagtg	acgcacaaag	aagtgttttg	960
aggctgggtt	ggagaatgaa	accaacaacd	gtcaatggtc	aaadaggta	1020
tttgaaaaccg	ttacatcagg	cacaaatgtt	acctttgtt	gtggtaaagg	1080
actgttaagta	aaagatgatca	aggcaacatc	actgttatgt	atgtatgtaaa	1140

gcccctaaacg tcaatcagct gcaaaaacage ggttggaaatt tggatccaa agcggttgc	1200
ggttcttcgg gcaaagtcat cagggcaat gtttgcggca gcaaggaaaa gatggatgaa	1260
acccgtcaaca ttaatgcgg caacaacatc gagattaccc gcaacggcaaa aaataatcgac	1320
atcgccactt cgtgaccccc gcaattttcc aegtttgcg tggcgccggg ggcggatgog	1380
cccaacttaa gctgtggatga cggggcccg tggatgtcg gcaagcaagg gccaacaaa	1440
cccggtccgca ttcccaatgt cgcccgccgc gtaaagagg gggatgttac aaacgtcgca	1500
caacttaaag gctgtggcgca aaacttgaac aaccacatcg acaatgtgga cggcaacgcg	1560
cgtgcgggca tcgcccaga gattgcaacc gcagggtctgg ttcaaggcgta tctgcccggc	1620
agagatgtga tggcgatcg cggccgact ttcgcggcg aagccggtaa tgccatcgcc	1680
tactcaagca ttccgacgg cggaaattgg attatcaaag gcacggcttc cggcaattcg	1740
cgcggccatt tcgggtgttcc cgcacatcgcc ggttatcagt ggtaa	1785

<210> 2
 <211> 594
 <212> PRT
 <213> Bacteria

<400> 2		
Met Asn Lys Ile Tyr Arg Ile Ile Trp Asn Ser Ala Leu Asn Ala Trp		
1	5	10
Val Ala Val Ser Glu Leu Thr Arg Asn His Thr Lys Arg Ala Ser Ala		15
20	25	30
Thr Val Ala Thr Ala Val Leu Ala Thr Leu Leu Phe Ala Thr Val Gln		
35	40	45
Ala Ser Thr Thr Asp Asp Asp Asp Leu Tyr Leu Glu Pro Val Gln Arg		
50	55	60
Thr Ala Val Val Leu Ser Phe Arg Ser Asp Lys Glu Gly Thr Gly Glu		
65	70	75
65	70	75
Lys Glu Val Thr Glu Asp Ser Asn Trp Gly Val Tyr Phe Asp Lys Lys		80
85	90	95
Gly Val Leu Thr Ala Gly Thr Ile Thr Leu Lys Ala Gly Asp Asn Leu		
100	105	110
Lys Ile Lys Gln Asn Thr Asn Glu Asn Thr Asn Ala Ser Ser Phe Thr		
115	120	125
Tyr Ser Leu Lys Lys Asp Leu Thr Asp Leu Thr Ser Val Gly Thr Glu		
130	135	140
Lys Leu Ser Phe Ser Ala Asn Ser Asn Lys Val Asn Ile Thr Ser Asp		
145	150	155
Thr Lys Gly Leu Asn Phe Ala Lys Lys Thr Ala Glu Thr Asn Gly Asp		160

165	170	175
Thr Thr Val His Leu Asn Gly Ile Gly Ser Thr Leu Thr Asp Thr Leu		
180	185	190
Leu Asn Thr Gly Ala Thr Thr Asn Val Thr Asn Asp Asn Val Thr Asp		
195	200	205
Asp Glu Lys Lys Arg Ala Ala Ser Val Lys Asp Val Leu Asn Ala Gly		
210	215	220
Trp Asn Ile Lys Gly Val Lys Pro Gly Thr Thr Ala Ser Asp Asn Val		
225	230	235
Asp Phe Val Arg Thr Tyr Asp Thr Val Glu Phe Leu Ser Ala Asp Thr		
245	250	255
Lys Thr Thr Thr Val Asn Val Glu Ser Lys Asp Asn Gly Lys Arg Thr		
260	265	270
Glu Val Lys Ile Gly Ala Lys Thr Ser Val Ile Lys Glu Lys Asp Gly		
275	280	285
Lys Leu Val Thr Gly Lys Asp Lys Gly Glu Asn Asp Ser Ser Thr Asp		
290	295	300
Lys Gly Glu Gly Leu Val Thr Ala Lys Glu Val Ile Asp Ala Val Asn		
305	310	315
Lys Ala Gly Trp Arg Met Lys Thr Thr Thr Ala Asn Gly Gln Thr Gly		
325	330	335
Gln Ala Asp Lys Phe Glu Thr Val Thr Ser Gly Thr Asn Val Thr Phe		
340	345	350
Ala Ser Gly Lys Gly Thr Thr Ala Thr Val Ser Lys Asp Asp Gln Gly		
355	360	365
Asn Ile Thr Val Met Tyr Asp Val Asn Val Gly Asp Ala Leu Asn Val		
370	375	380
Asn Gln Leu Gln Asn Ser Gly Trp Asn Leu Asp Ser Lys Ala Val Ala		
385	390	395
Gly Ser Ser Gly Lys Val Ile Ser Gly Asn Val Ser Pro Ser Lys Gly		
405	410	415
Lys Met Asp Glu Thr Val Asn Ile Asn Ala Gly Asn Asn Ile Glu Ile		
420	425	430
Thr Arg Asn Gly Lys Asn Ile Asp Ile Ala Thr Ser Met Thr Pro Gln		
435	440	445
Phe Ser Ser Val Ser Leu Gly Ala Gly Ala Asp Ala Pro Thr Leu Ser		
450	455	460
Val Asp Asp Glu Gly Ala Leu Asn Val Gly Ser Lys Asp Ala Asn Lys		
465	470	475
		480

Pro Val Arg Ile Thr Asn Val Ala Pro Gly Val Lys Glu Gly Asp Val	485	490	495	
Thr Asn Val Ala Gln Leu Lys Gly Val Ala Gln Asn Leu Asn Asn His	500	505	510	
Ile Asp Asn Val Asp Gly Asn Ala Arg Ala Gly Ile Ala Gln Ala Ile	515	520	525	
Ala Thr Ala Gly Leu Val Gln Ala Tyr Leu Pro Gly Lys Ser Met Met	530	535	540	
Ala Ile Gly Gly Thr Tyr Arg Gly Glu Ala Gly Tyr Ala Ile Gly	545	550	555	560
Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Gly Gly Asn Trp Ile Ile Lys Gly Thr Ala	565	570	575	
Ser Gly Asn Ser Arg Gly His Phe Gly Ala Ser Ala Ser Val Gly Tyr	580	585	590	
Gln Trp				

<210> 3
<211> 1776
<212> DNA
<213> Bacter

```

<400> 3

atgaacaaaa tataccgcat catttggaaat agtgccctca atgcctgggt cggcgatattcc 60
gagctcacac gcaaccacac caaacgcgcc tccgcacccg tgaagacgcg cgtatggcg 120
acactgttgt ttgcacacggt tcaggcaagt gctaacaatg aagagacaaga aagaagattna 180
tattttagacc ccgtacaaacg cactgttgcc tggttgcata tcaattccga taaagaaggc 240
acggggggaaat aagaaaaaat tcagatggg cagttatattt caacggaaaa 300
ggagttactaa cagccagaga aatccacccctc aaaaaggccggc acaaccctgaa aatccaaacaa 360
aacggccacaa acttcaccta ctcgcgtaaa aaaaacccca aagatctgac cagttgtgg 420
actgaaaaat tatecggttag cgcacccggc aataaaagtca acatcacaag cgacacaaaa 480
ggcttgaatt ttgcgaaaaga aacggctggg acgaaacggcg acacccacggt tcaactgtggac 540
ggttatgggtt cgactttgac cgatcgcgtg ctgaaatccg gaggcgaccac aaaaacgtaaacc 600
aacggccacaa acttcaccta ctcgcgtaaa aaaaacccca aagatctgac cagttgtgg 660
gcaggctggaa acattaaagg cgttaaaccc ggtacacacag ttcccgatata cgttgcattt 720
gtccgcaccc acgacacacgt cgagttcttg agcgcgcata cggaaaaacac gactgttataat 780
gtggaaagca aagacaaacgg caagaaaaacc gaatgttaaaa tcggcgcga aactctgtt 840
ataaaaagaa aagacggtaa gtgtgttact ggttaaagaca aaggcgagaa tggttcttct 900
acagacacaa ggcggccgtt agtgactgcgaa aaaaaggatca ttgcgttgcgtt aaaaacggct 960

```

ggttggagaa	tgaaaacaac	aaccgcta	aat ggtcaaacag	gtcaagctga	caagttgaa	1020
accgttacat	caggcacaaa	tgtacac	ttt gctagtggta	aaggcacaa	tcgcactgt	1060
agtaaagatg	atcaaggcaa	catca	ctgtt atgtatgt	gtatgtcg	cgatgccta	1140
acgtcaatc	agctgcaaaa	cagcggttgg	aat tggatt	ccaaagcggt	tgcaagg	1200
tcgggcaag	tcatcagcg	caatgtt	cg	cgagcaagg	gaaagatgga	1260
aacattaatg	ccggcaaca	catcgagatt	acc	cgcaadg	gtaaaaat	1320
acttgcgtga	c	cccg	cagttt	ttcc	cggtt	1380
ttggcgttgg	atggggacgc	attgaatgtc	ggc	agcaaga	aggacaa	1440
attaccaatg	tcgccccggg	cgtaa	agag	ggggatgtt	caaacgtcg	1500
ggcggtggcgc	aaaacttggaa	caac	cgatgtgg	acggcaacgc	gctgcggc	1560
atcgccaa	cgatgtcaac	cg	cgagg	gttgcgg	atttgc	1620
atcgatcg	gcggcggcac	ttat	cgccgg	gaagccgg	acgc	1680
atttgcacg	ggggaaat	tttgc	gg	tttgcgg	ccggcaat	1740
ttcggtgtt	ccgc	atctgt	cg	ttatcag	tgtaa	1776

<210> 4

<211> 591

<212> PRT

<213> Bacteria

<400> 4

Met	Asn	Lys	Ile	Tyr	Arg	Ile	Ile	Trp	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn	Ala	Trp
1						5			10				15		
Val	Ala	Val	Ser	Glu	Leu	Thr	Arg	Aan	His	Thr	Lys	Arg	Ala	Ser	Ala
						20			25				30		
Thr	Val	Lys	Thr	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu	Phe	Ala	Thr	Val	Gln
						35			40				45		
Ala	Ser	Ala	Asn	Aan	Glu	Glu	Gln	Glu	Glu	Asp	Leu	Tyr	Leu	Asp	Pro
						50			55				60		
Val	Gln	Arg	Thr	Val	Ala	Val	Ile	Leu	Asn	Ser	Asp	Lys	Glu	Gly	
						65			70				75		80
Thr	Gly	Glu	Lys	Glu	Lys	Val	Glu	Glu	Asn	Ser	Asp	Trp	Ala	Val	Tyr
						85			90				95		
Phe	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Arg	Glu	Ile	Thr	Leu	Lys	Ala
						100			105				110		
Gly	Asp	Asn	Leu	Lys	Ile	Lys	Gln	Asn	Gly	Thr	Aan	Phe	Thr	Tyr	Ser
						115			120				125		
Leu	Lys	Asp	Leu	Thr	Asp	Leu	Thr	Ser	Val	Gly	Thr	Glu	Lys	Leu	
						130			135				140		

Ser Phe Ser Ala Asn Gly Asn Lys Val Asn Ile Thr Ser Asp Thr Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Asn Phe Ala Lys Glu Thr Ala Gly Thr Asn Gly Asp Thr Thr
 165 170 175
 Val His Leu Asn Gly Ile Gly Ser Thr Leu Thr Asp Thr Leu Leu Asn
 180 185 190
 Thr Gly Ala Thr Thr Asn Val Thr Asn Asp Asn Val Thr Asp Asp Glu
 195 200 205
 Lys Lys Arg Ala Ala Ser Val Lys Asp Val Leu Asn Ala Gly Trp Asn
 210 215 220
 Ile Lys Gly Val Lys Pro Gly Thr Thr Ala Ser Asp Asn Val Asp Phe
 225 230 235 240
 Val Arg Thr Tyr Asp Thr Val Glu Phe Leu Ser Ala Asp Thr Lys Thr
 245 250 255
 Thr Thr Val Asn Val Glu Ser Lys Asp Asn Gly Lys Lys Thr Glu Val
 260 265 270
 Lys Ile Gly Ala Lys Thr Ser Val Ile Lys Glu Lys Asp Gly Lys Leu
 275 280 285
 Val Thr Gly Lys Asp Lys Gly Glu Asn Gly Ser Ser Thr Asp Glu Gly
 290 295 300
 Glu Gly Leu Val Thr Ala Lys Glu Val Ile Asp Ala Val Asn Lys Ala
 305 310 315 320
 Gly Trp Arg Met Lys Thr Thr Ala Asn Gly Gln Thr Gly Gln Ala
 325 330 335
 Asp Lys Phe Glu Thr Val Thr Ser Gly Thr Asn Val Thr Phe Ala Ser
 340 345 350
 Gly Lys Gly Thr Thr Ala Thr Val Ser Lys Asp Asp Gln Gly Asn Ile
 355 360 365
 Thr Val Met Tyr Asp Val Asn Val Gly Asp Ala Leu Asn Val Asn Gln
 370 375 380
 Leu Gln Asn Ser Gly Trp Asn Leu Asp Ser Lys Ala Val Ala Gly Ser
 385 390 395 400
 Ser Gly Lys Val Ile Ser Gly Asn Val Ser Pro Ser Lys Gly Lys Met
 405 410 415
 Asp Glu Thr Val Asn Ile Asn Ala Gly Asn Asn Ile Glu Ile Thr Arg
 420 425 430
 Asn Gly Lys Asn Ile Asp Ile Ala Thr Ser Met Thr Pro Gln Phe Ser
 435 440 445
 Ser Val Ser Leu Gly Ala Gly Ala Asp Ala Pro Thr Leu Ser Val Asp

```

450          455          460
Gly Asp Ala Leu Asn Val Gly Ser Lys Lys Asp Asn Lys Pro Val Arg
465          470          475          480
Ile Thr Asn Val Ala Pro Gly Val Lys Glu Gly Asp Val Thr Asn Val
485          490          495
Ala Gln Leu Lys Gly Val Ala Gln Asn Leu Asn Asn Arg Ile Asp Asn
500          505          510
Val Asp Gly Asn Ala Arg Ala Gly Ile Ala Gln Ala Ile Ala Thr Ala
515          520          525
Gly Leu Val Gln Ala Tyr Leu Pro Gly Lys Ser Met Met Ala Ile Gly
530          535          540
Gly Gly Thr Tyr Arg Gly Glu Ala Gly Tyr Ala Ile Gly Tyr Ser Ser
545          550          555          560
Ile Ser Asp Gly Gly Asn Trp Ile Ile Lys Gly Thr Ala Ser Gly Asn
565          570          575
Ser Arg Gly His Phe Gly Ala Ser Ala Ser Val Gly Tyr Gln Trp
580          585          590

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 5
ggggcatatg aacaaaatat accgcatcat ttggaa          36

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 6
ggggctcgag ccactgataa ccgacagatg cgga          34

```

도면

도면 1a

BASB029 폴리누클레오티드 서열의 배열

서열 1에 대해 동일함은 · 으로 나타내며, ("−")는 결손 누클레오티드를 나타낸다.

서열 1: ATGAACAAAATATACCGCATCTTTGGAATAGTGCCTCAATGCTGGGT:50
서열 3::50

60 . 80 . 100
서열 1: CGCGTATCCGAGCTCACACGCAACCAACACCAAAACGCGCTCCGCAACCG: 100
서열 3:: 100

서열 1: TGGCGACCGCCGTATTGGCGACACTGTTGTTGCAACGGTTCAGGGCAGT:150
서열 2: AA.....A.....150

160 . 180 . 200
서열 1: ACTACCGAT-----GACGACGATTATATTAGAACCCGTACAACG:191
.....5' A A GAGACCAA A A 5' 200

도면1b

360 * 380 * 400

서열 1: AATCAAACAAAACACCAATGAAAACACCAATGCCAGTAGCTTACCTACT:388
서열 3:G..CA.A.....:382

* 420 * 440 *

서열 1: CGCTGAAAAAAGACCTCACAGATCTGACCACTGTTGGAACTGAAAAATTA:438
서열 3::432

460 * 480 * 500

서열 1: TCGTTAGCGAAACAGCAATAAAGTCAACATCACAGCAGACACCAAAGG:488
서열 3:G.....:482

* 520 * 540 *

서열 1: CTTGAATTTCGCGAAAAAAACGGCTGAGACCAACGGCGACACCGGTC:538
서열 3:T.....G.....G.....:532

560 * 580 * 600

서열 1: ATCTGAACGGTATCGGTTGACTTGTGACCGATACGCTGCTGAATACCGGA:588
서열 3: ..C.....T.....:582

* 620 * 640 *

서열 1: GCGACCACAAACGTAACCAACGACAACGTTACCGATGACGAGAAAAACG:638
서열 3::632

660 * 680 *

서열 1: TCGGGCAAGCGTTAAAGACGTATTAACGCGAGGCTGGAACATTAAAGGCG:688
서열 3::682

도면1c

720 * 740 *

서열 1: TAAACCCGGTACAACAGCTTCGATAACGTTGATTCGTCCGCACTTAC:738
서열 3::732

760 * 780 * 800 *

서열 1: GACACAGTCGAGTTCTGAGCGCAGATAACGAAACACGACTGTTAATGT:788
서열 3::782

820 * 840 *

서열 1: GGAAGCAAAGACAACGGCAAGAGAACCGAAGTTAAATCGGTGCGAAGA:838
서열 3:A:832

860 * 880 * 900 *

서열 1: CTTCTGTTATCAAAGAAAAGACGGTAAGTGGTTACTGGTAAAGACAAA:888
서열 3:T:882

920 * 940 *

서열 1: GCGAGAATGATTCTTCTACAGACAAAGGCGAAGGCTTAGTGACTGCAAA:938
서열 3:G:932

960 * 980 * 1000 *

서열 1: AGAAAGTGATTGATGAGTAAACAAGGCTGGTGGAGAATGAAAACACAA:988
서열 3::982

1020 * 1040 *

서열 1: CCGCTAATGGTCAAACAGGTCAAGCTGACAAGTTGAAACCGTTACATCA:1038
서열 3::1032

1060 * 1080 * 1100 *

서열 1: GGCACAAATGTAACCTTGCTAGTGGTAAAGGTACAACGTGCGACTGTAAG:1088
서열 3::1082

도면1d

1120 * 1140 *

서열 1: TAAAGATGATCAAGGCAACATCACTGTTATGTATGATGTAATGTGGCG:1138
 서열 2::1132

1160 * 1180 * 1200 *

서열 1: ATGCCCTAACGTCAATCAGCTGAAACAGCCGTTGGAATTGGATTCC:1188
 서열 2::1182

1220 * 1240 *

서열 1: AAAGCGGTTGCAGGGTTCTCGGGCAAAGTCATCAGCGGCAATGTTCGCC:1238
 서열 2::1232

1260 * 1280 * 1300 *

서열 1: GAGCAAGGGAAAGATGGATGAAACCGTCAACATTAATGCCGGCAACAACA:1288
 서열 2::1282

1320 * 1340 *

서열 1: TCGAGATTACCCGCAACGGAAAAATATCGACATGCCACTTCGATGACC:1338
 서열 2:T:1332

1360 * 1380 * 1400 *

서열 1: CCGCAATTTCCAGCGTTCGCTGGCGCGGGGGCGGATGCGCCACTT:1388
 서열 2:G:1382

1420 * 1440 *

서열 1: AAGCGTGGATGACGAGGGCGCGTTGAATGCGGCAGCAAGGATGCCAACA:1438
 서열 2: G.....G..A...A.....A.G.A....:1429

도면1e

1460 . 1480 . 1500
 서열 1: AACCCGTCCGATTACCAATGTCGCCCCGGCGTAAAGAGGGGATGTT:1488
 서열 3::1479

1520 . 1540 .
 서열 1: ACAAACGTGCGACAACCTAAAGGCCTGGCGAAAACCTGAAACAACCACAT:1538
 서열 3::1529

1560 . 1580 . 1600
 서열 1: CGACAAATGTGGACGGCAACGCGCGTGGGGCATGCCAAGCGATTGCAA:1588
 서열 3::1579

1620 . 1640 .
 서열 1: CGCAGGTCTGGTTAGGCGTATCTGCCGGCAAGAGTATGATGGCGATC:1638
 서열 3::1629

1660 . 1680 . 1700
 서열 1: GGCAGGGCGGACTTATCGGGCGAAGCCGTTATGCCATGGCTACTAAG:1688
 서열 3::1679

1720 . 1740 .
 서열 1: CATTTCGACGGCGGAAATTGGATTATCAAAGGACGGCTTGGCAATT:1738
 서열 3: T.....:1729

1760 . 1780 .
 서열 1: CGCGCGGCCATTGGTGCTTCCGATCTGTCGGTTATCAGTGGTAA:1785
 서열 3::1776

도면2a

BASB029 폴리펩티드 서열의 배열

서열 2에 대해 동일함은 ·으로 나타내며, ("—")는
결손 누클레오티드를 나타낸다.

20 * 40 *

서열 2: MNKIYRIJWNSALNAWVAVSELTRNHTKRASATVATAVATLLFATVQAS:50
서열 4:K.....:50

60 * 80 * 100 *

서열 2: T---TDDDDLYLEPVQRTAVVLSFRSDKEGTGEKE-VTEDSNWGVYFDKK:96
서열 4: ANNEEQEED....VA..IVN.....K.E....A....E.:100

120 * 140 *

서열 2: GVLTAGTITLKGDNLKIKQNTNENTNASSFTYSLKKDLTDLTSGTEKL:146
서열 4:RE.....----G.N.....:144

160 * 180 * 200 *

서열 2: SFSANSNKVNITSDTKGLENFAKKTAETNGDTTVHLNGIGSTLTDLLNTG:196
서열 4:G.....E.G.....:194

220 * 240 *

서열 2: ATTNVTNNDNVTDDDEKKRAASVKDVNLNAGWNKGVPGTTASDNVDFVRTY:246
서열 4::244

260 * 280 * 300 *

서열 2: DTVEFLSADTKTTTVNVESKDNGKRTEVKIGAKTSVIKEKDGLVTGDK:296
서열 4::294

320 * 340 *

서열 2: GENDSSTDKGEGLVTAKEVIDAVNKAGWRMKTTANGQTGQADKFETVTS:346
서열 4: ...G....E.....:344

도면2b

360 * 380 * 400
 서열 2: GTNVTFA5GKGTTATVKDDQGNITVMDVNVDALNVNQLQNSGWNLDS:396
 서열 4::394

* 420 * 440 *
 서열 2: KAVAGSSGKVISGNVSPSKGKMDETVNINAGNNIEITRNGKNIDIATSMT:446
 서열 4::444

460 * 480 * 500
 서열 2: PQFSSVSLGAGADAPTLSVDEGALNVGSKDANKPVRITNVAPGVKEGDV:496
 서열 4:GD-.....KD.....:493

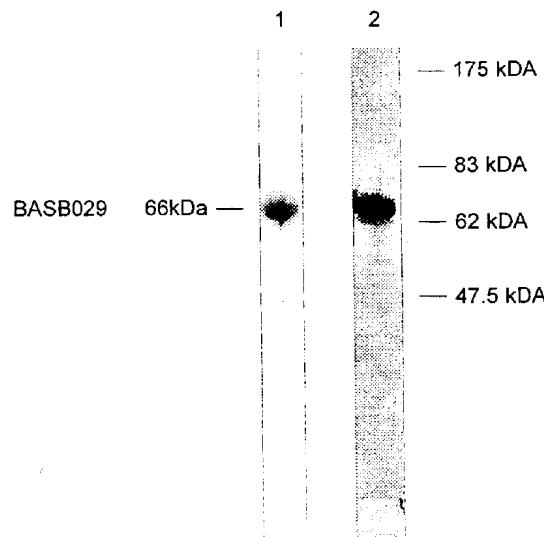
* 520 * 540 *
 서열 2: TNVAQLKGVAQNLNNHIDNVDGNARAGIAQAIATAGLVQAYLPGKSMMAI:546
 서열 4:R.....:543

560 * 580 *
 서열 2: GGGTYRGEAGYAIKYSSISDGGNWIIKGTASGNRGRHFGASASVGYQW:594
 서열 4::591

도면3

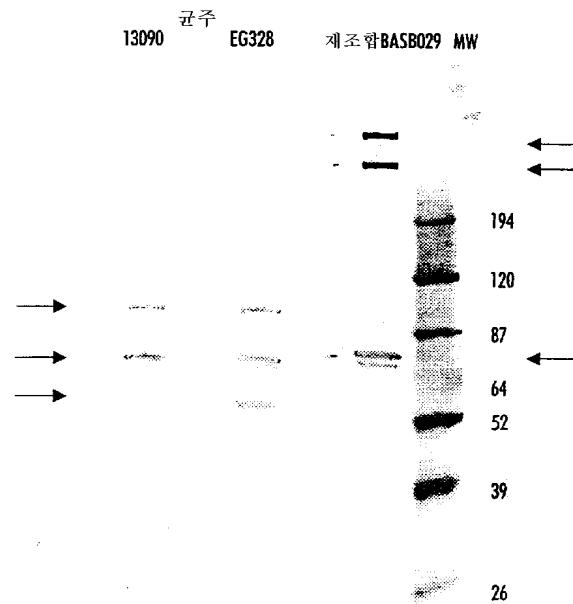
E.coli에서의 재조합 BASB029의 발현 및 정제

실질적으로 정제된 BASB029 단백질 분획(80%초과)을 단백질 분자량 마아카와 병행하여 PAGE-SDS 조건하에서 4-20% 구배 폴리아크릴아미드 겔 (NOVEX) 상에서 분리시켰다. 겔을 쿠마시에 블루 R250(레인1)로 착색시키거나 안티-(His5) 단일클론성 항체를 사용하는 웨스턴 블로트에 의해 분석하였다(레인2).



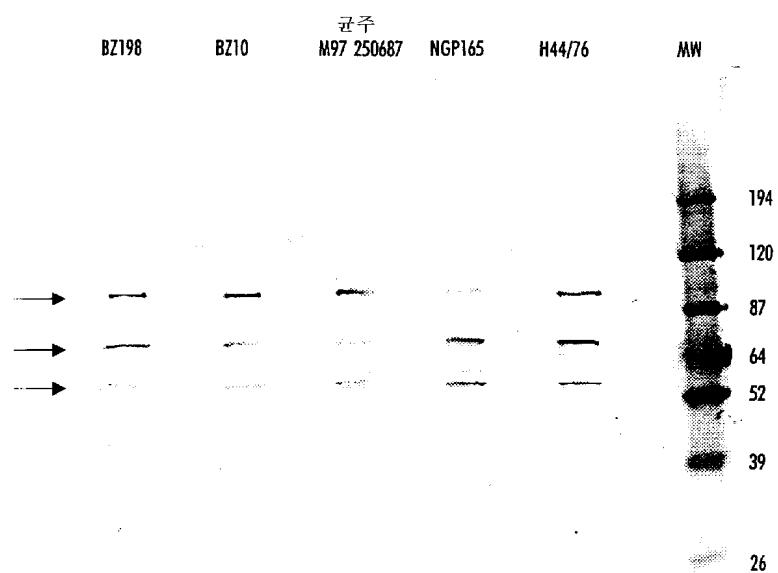
도면4

BASB029 면역된 마우스 혈청으로 수개의 NmB 균주상의
BASB029 단백질 인식



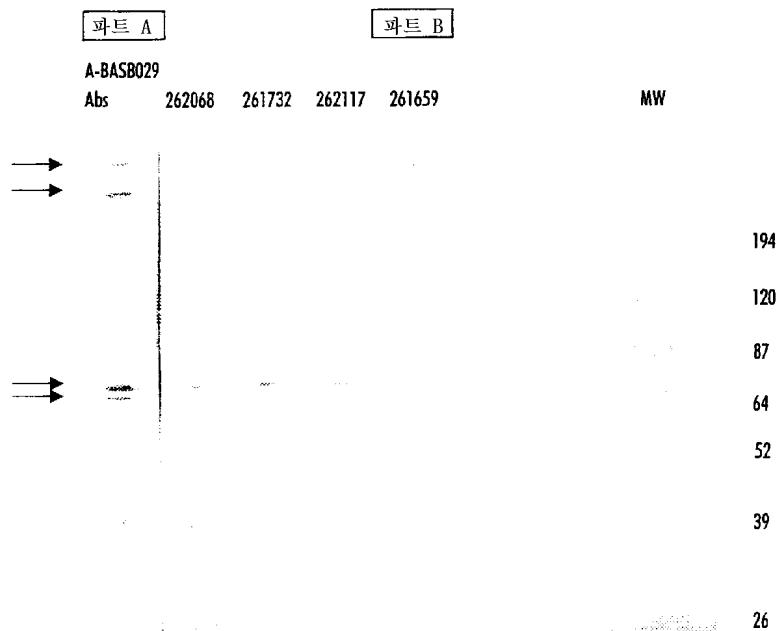
도면5

BASB029 면역된 마우스 혈청으로 수개의 NmB 균주상의
BASB029 단백질 인식



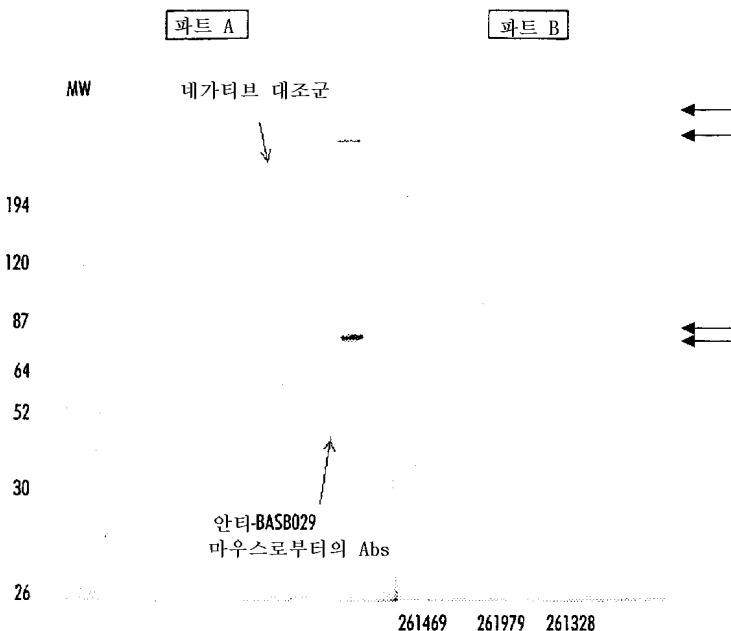
도면6

회복기 혈청(파트 B) 및 면역된 마우스(파트 A)의
안티-BASB029 항체



도면7

회복기 혈청(파트 B) 및 면역된 마우스(파트 A)의
안티-BASB029 항체



서열목록 전자파일 첨부