



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0123730
 (43) 공개일자 2010년11월24일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A61K 39/02</i> (2006.01) <i>A61K 39/385</i> (2006.01)
 <i>A61K 39/39</i> (2006.01) <i>A61P 31/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-7020946</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년02월19일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2010년09월17일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2009/000287</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/104074
 국제공개일자 2009년08월27일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/064,163 2008년02월20일 미국(US)
 (뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
 글리코박신 아게
 스위스 쉴리어렌 그라벤슈트라쎄 3 (우:8952)</p> <p>(72) 발명자
 페르난데즈, 파비아나
 스위스 체하-8103 운터랑스트링엔 다리엔슈트라쎄 17
 웨터, 미하엘
 스위스 체하-8003 취리히 쉐트랄슈트라쎄 118
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 남상선</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 원핵생물 세포로부터의 N-당화된 재조합 단백질로부터 제조된 바이오컨쥬게이트

(57) 요약

본 발명은 X 및 Z가 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있는 하나 이상의 컨센서스 서열 D/E - X - N - Z - S/T를 함유하는 단백질 담체를 포함하는 단백질 담체; 상기 단백질 담체에 연결된, 하나 이상의 병원성 박테리아로부터의 하나 이상의 항원성 다당류; 및 임의로 애쥬번트를 포함하는, 01-바이오컨쥬게이트 백신과 같은 바이오컨쥬게이트 백신에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 다수의 단계를 포함하여 생물반응기에서 01-바이오컨쥬게이트를 생성시키는 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

코와릭, 미하엘

스위스 체하-8055 취리히 골드브룬넨슈트라쎈 57

악커, 미하엘

스위스 체하-8103 운터렝스트링엔 다리엔슈트라쎈
17

(30) 우선권주장

61/071,545 2008년05월05일 미국(US)

61/129,480 2008년06월30일 미국(US)

61/129,852 2008년07월24일 미국(US)

61/136,687 2008년09월25일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

X 및 Z가 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있는 삼입 컨센서스(consensus) 서열 D/E - X - N - Z - S/T를 포함하는 단백질 담체;

상기 단백질 담체에 연결된 하나 이상의 박테리아로부터의 하나 이상의 항원성 다당류로서, 상기 하나 이상의 항원성 다당류가 시겔라(*Shigella*), E. 콜리(*E. coli*) 또는 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 중 하나 이상의 균주로부터의 하나 이상의 박테리아 O-항원인, 하나 이상의 항원성 다당류; 및

임의로, 애주번트를 포함하는, 바이오컨쥬게이트(bioconjugate) 백신.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단백질 담체가 하나 이상의 컨센서스 서열을 함유하는 변형된 슈도모나스 아에루기노사의 외독소(Exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*, EPA)인 바이오컨쥬게이트 백신.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 EPA가 2개의 컨센서스 서열을 함유하는 바이오컨쥬게이트 백신.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 하나 이상의 박테리아 O-항원이 시겔라 디센테리에(*Shigella dysenteriae*) O1으로부터의 박테리아 O-항원인 바이오컨쥬게이트 백신.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 하나 이상의 박테리아 O-항원이 장외 병원성 E. 콜리(extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC)로부터의 박테리아 O-항원인 바이오컨쥬게이트 백신.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 변형된 EPA가 서열 목록 번호:7에 제공된 서열을 갖는 바이오컨쥬게이트 백신.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 하나 이상의 박테리아 O-항원이 시겔라 디센테리에 O1, S. 플렉스네리(*S. flexneri*) 2a, S. 플렉스네리 3a, S. 플렉스네리 3b, S. 플렉스네리 6 및 S. 손네이(*S. sonnei*) 중 하나 이상으로부터의 박테리아 O-항원인 바이오컨쥬게이트 백신.

청구항 8

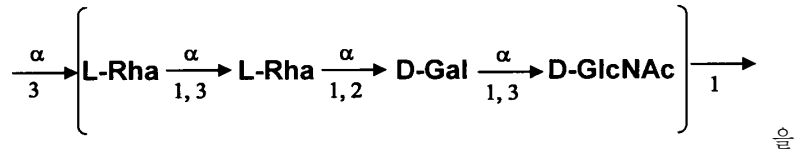
제 1항에 있어서, 상기 하나 이상의 박테리아 O-항원이 E. 콜리 O4:K52(ExPEC), E. 콜리 O4:K6(ExPEC), E. 콜리 O6:K2(ExPEC), E. 콜리 O6:K54(ExPEC), E. 콜리 O22(ExPEC), E. 콜리 O75(ExPEC), E. 콜리 O83(ExPEC), E. 콜리 O7, E. 콜리 O9, E. 콜리 O16, E. 콜리 O121 및 E. 콜리 O157(EHEC) 중 하나 이상으로부터의 박테리아 O-항원인 바이오컨쥬게이트 백신.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 하나 이상의 박테리아 O-항원이 슈도모나스 아에루기노사 O11로부터의 박테리아 O-항원인 바이오컨쥬게이션 백신.

청구항 10

X 및 Z가 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있는 하나 이상의 컨센서스 서열 D/E - X - N - Z - S/T를 함유하도록 변형된 슈도모나스 아에루기노사의 외독소(EPA)를 포함하는 단백질 담체;



상기 단백질 담체에 연결되고, 구조식
갖는 하나 이상의 다당류 사슬; 및

임의로, 에슈번트를 포함하는, 시겔라 바이오컨쥬게이트 백신.

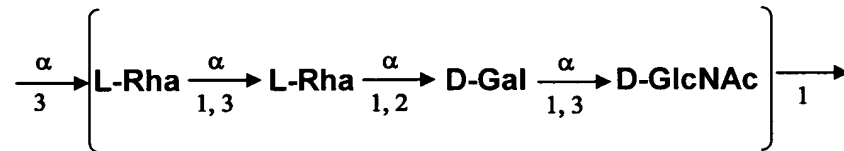
청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 단백질 담체가 2개의 컨센서스 서열을 함유하는 변형된 EPA인 시겔라 바이오컨쥬게이트 백신.

청구항 12

서열 목록 번호:7에 제공된 서열을 갖는 단백질 담체;

상기 단백질 담체에 연결되고, 구조식



및

을 갖는 하나 이상의 다당류 사슬;

에슈번트를 포함하는, 시겔라 디센테리에 01 바이오컨쥬게이트 백신.

청구항 13

서열 목록 번호:5의 서열을 포함하는 플라스미드.

청구항 14

서열 목록 번호:5의 서열을 포함하는 유전 서열.

청구항 15

서열 목록 번호:6의 서열을 포함하는 아미노산 서열.

청구항 16

서열 목록 번호:7의 서열을 포함하는 아미노산 서열.

청구항 17

벡터 pGVXN64.

청구항 18

올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OST/OTase)를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열;

단백질 담체를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및

하나 이상의 박테리아로부터의 하나 이상의 항원성 다당류 합성 유전자 클러스터(cluster)로서, 상기 항원성 다당류가 박테리아 0-항원인 항원성 다당류 합성 유전자 클러스터를 포함하는, 하나 이상의 박테리아에 대한 바이오컨쥬게이트 백신을 생성하기 위한 발현 시스템.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 OST/OTase가 서열 목록 번호:2에 제공된 아미노산 서열을 갖는 발현 시스템.

청구항 20

제 18항에 있어서, 상기 단백질 담체가 X 및 Z가 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있는 하나 이상의 컨센서스 서열 D/E - X - N - Z - S/T를 함유하도록 변형된 단백질인 발현 시스템.

청구항 21

제 18항에 있어서, 상기 단백질 담체가 X 및 Z가 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있는 하나 이상의 컨센서스 서열 D/E - X - N - Z - S/T를 함유하도록 변형된 AcrA 및 EPA로 구성된 균으로부터 선택되는 발현 시스템.

청구항 22

제 18항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열 목록 번호:6의 서열을 포함하는 단백질 담체를 엔코딩하는 발현 시스템.

청구항 23

제 18항에 있어서, 상기 박테리아가 시겔라, E. 콜리, 슈도모나스 아에루기노사 011 또는 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*)의 병원성 균주로 구성된 균으로부터 선택되는 발현 시스템.

청구항 24

서열 목록 번호:2의 서열을 갖는 PglB를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열;

서열 목록 번호:6의 서열을 갖는 변형된 EPA를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및

서열 목록 번호:5의 서열을 포함하는 다당류 합성 유전자 클러스터를 포함하는, 시겔라 디센테리에 01에 대한 바이오컨쥬게이트 백신을 생성하는 발현 시스템.

청구항 25

PglB를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 변형된 EPA를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열이 E. 콜리 유전체로 안정적으로 통합되고, 다당류 합성 유전자 클러스터가 플라스미드로서 도입되는, 제 24항의 발현 시스템을 포함하는 설계된 박테리아.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 박테리아가 E. 콜리인 박테리아.

청구항 27

X 및 Z가 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있는 하나 이상의 컨센서스 서열 D/E - X - N - Z - S/T를 함유하는 변형된 EPA, 또는 AcrA; PglB; 및 하나 이상의 01-다당류를 박테리아에서 발현시키는 단계;

상기 하나 이상의 01-다당류에 연결된 AcrA 또는 변형된 EPA를 포함하는 01-바이오컨쥬게이트의 일정량을 생성시키는 기간 동안 박테리아를 성장시키는 단계;

원형질막 주위공간 단백질을 추출하는 단계; 및

추출된 원형질막 주위공간 단백질로부터 01-바이오컨쥬게이트를 분리시키는 단계를 포함하여, 생물반응기에서 01-바이오컨쥬게이트를 생성시키는 방법.

청구항 28

글리코실트랜스퍼라아제의 사용을 통해 재조합 유기체에서 S. 디센테리에의 다당류를 어셈블리(assembly)시키는 단계;

상기 재조합 유기체에서 하나 이상의 표적 단백질의 아스파라긴 잔기에 상기 다당류를 연결시키는 단계로서, 상기 하나 이상의 표적 단백질이 하나 이상의 T-세포 에피토프를 함유하는 단계를 포함하여, S. 디센테리에 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키는 방법.

청구항 29

표적 단백질의 N-당화를 수행하는 대사 기구를 엔코딩하는 유전 정보를 원핵생물 유기체에 도입시켜 변형된 원핵생물 유기체를 생성시키는 단계로서, 하나 이상의 재조합 표적 단백질의 발현에 필요한 상기 유전 정보가 상기 원핵생물 유기체에 도입되고, 상기 대사 기구가 지질 담체 상의 S. 디센테리애의 다당류의 어셈블리에 대한 특정 글리코실트랜스퍼라아제, 및 표적 단백질의 아스파라긴 잔기에 상기 다당류를 공유적으로 연결시키는 올리고사카릴트랜스퍼라아제, 및 하나 이상의 T-세포 에피토프를 함유하는 표적 단백질을 포함하는 단계;

상기 변형된 원핵생물 유기체의 배양물을 생성시키는 단계; 및

상기 배양 배지로부터 당화된 단백질을 수득하는 단계를 포함하여, S. 디센테리애 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 재조합 당단백질, 즉 N-당화된 단백질로부터 제조된, 바이오컨쥬게이트(bioconjugate), 특히 바이오컨쥬게이트 백신에 관한 것이다. 본 발명은 최적화된 아미노산 컨센서스 서열(들)을 갖는 하나 이상의 도입된 N-당화된 단백질, 이러한 단백질을 엔코딩하는 핵산 뿐만 아니라 해당 벡터 및 숙주 세포를 포함한다. 또한, 본 발명은 바이오컨쥬게이트 백신을 제조하기 위한 상기 단백질, 핵산, 벡터 및 숙주 세포의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키는 방법을 제공한다.

배경기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 당단백질은 하나 이상의 공유적으로 부착된 당 중합체를 갖는 단백질이다. N-결합 단백질 당화는 진핵생물 유기체의 소포체에서 발생하는 본질적이고 보존된 과정이다. 이는 단백질 폴딩, 올리고머화, 안정성, 품질 제어, 분비 단백질 및 막 단백질의 분류 및 수송에 중요하다(Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu. Rev. Biochem. 73, 1019-1049).

[0005] 단백질 당화는 단백질의 항원성, 안정성 및 반감기에 현저한 영향을 미친다. 또한, 당화는 크로마토그래피, 예를 들어, 단백질의 당화된 부분과 상호작용하는 고체상에 결합된 렉틴 리간드를 이용하는 친화성 크로마토그래피에 의한 단백질의 정제를 도울 수 있다. 따라서, 이는 생물학적 및 약학적으로 유용한 당화 패턴을 제공하기 위해 진핵생물 세포에서 많은 당화된 단백질을 재조합적으로 생성시키는 확립된 수단이다.

[0006] 박테리아인 식품 매개 병원체 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*)가 또한 이의 단백질을 N-당화시킬 수 있음이 입증되어 있다(Szymanski, et al. (1999). Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. Mol. Microbiol. 32, 1022-1030). 당화에 필요한 기구는 소위 *pgl* 유전자좌에서 군집을 이루는 12개의 유전자에 의해 엔코딩된다. N-당화의 붕괴는 C. 제주니의 침범 및 발병기전에 영향을 미치나, 대부분의 진핵생물 유기체에서만끔 치명적이진 않다(Burda P. and M. Aebi, (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochim Biophys Acta 1426(2):239-57). E. 콜리(*E. coli*)에서 *pgl* 유전자좌 및 수용체 당단백질을 동시에 재조합적으로 발현시킴으로써 C. 제주니 단백질의 N-당화를 재구성시키는 것이 가능하다(Wacker et al. (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. Science 298, 1790-1793).

[0007] 설사성 질환은 빈도 및 경제적 영향에 있어서 국제 여행과 관련된 주요 건강 문제이다. 여행자의 설사는 사람이 선진국에서 개발도상국으로 여행하는 경우에 얻어지는 장 질환을 의미한다. 오늘날, 5천만명 이상의 사람이 매년 선진국에서 개발도상국으로 여행하고, 이러한 여행자의 50% 이하가 이들의 체류의 처음 2주 동안 설사를 겪는 것으로 보고한다. 지역 기반을 개선시키기 위해 여행 산업에 의해 이루어진 노력에도 불구하고, 1970년대 이래로 여행자의 설사의 발생율은 현저하게 감소하지 않았다.

[0008] 여행자의 설사는 배설과 관련하여 오염된 음식 및 덜 일반적으로는 물의 섭취를 통해 초래된다. 감염의 80% 이하의 원인이 되는 박테리아가 여행자 설사의 주요 원인이다. 장독소생성 E. 콜리(*E. coli*)(ETEC)가 여행자 설

사와 관련하여 세계의 모든 지역에서 가장 빈번하게 분리되는 박테리아이고, 시겔라(*Shigella*) 종 및 *C. 제주니* (*C. jejuni*)가 뒤를 따른다.

- [0009] 시겔라증은 심각하고 흔한 질병으로 남아있다. 수성 설사를 일으키는 것 외에, 시겔라는 이질(열, 복통, 및 대변에서의 혈액 및/또는 점액)의 주요 원인이다. 인간은 이러한 박테리아에 대해 유일한 천연 숙주이다. 시겔라 감염의 추정 수는 매년 2억명을 넘는다. 이중 약 500만명이 입원하고, 100만명이 사망한다. 3개의 혈청군이 세균성 이질로 기술되는 상기 질병의 가장 원인이 된다: *S. 디센테리에*(*S. dysenteriae*), *S. 플렉스네리* (*S. flexneri*) 및 *S. 손네이*(*S. sonnei*).
- [0010] *S. 디센테리에* 및 *S. 플렉스네리*가 열대지방에서 대부분의 감염의 원인이 되고, 이의 치사율은 20% 이하이다. 시겔라증은 풍토병 및 유행병 둘 모두로 발생한다. 많은 열대성 국가에서, 풍토 감염은 주로 *S. 플렉스네리*로 인한 것인 반면, *S. 디센테리에*의 주요 유행병은 중부 아메리카, 중부 아프리카 및 남동 아시아에서 발생한다. 이러한 유행병은 주요한 공중위생 위협이다. 주로 *S. 손네이* 및 덜 빈번하게는 *S. 플렉스네리*로 인한 감염은 선진국에서도 지속적으로 발생한다.
- [0011] 킨주게이트 백신은 시겔라 감염에 대한 유망한 결과를 나타낸다. *S. 디센테리에* 타입 1의 O-특이적 다당류가 마우스에서 면역 반응을 유발시키는 킨주게이트 백신을 합성하기 위해 사용되었다. 이러한 백신은 화학적으로 합성되고, 인간 혈청 알부민에 킨주게이션되거나, O-다당류가 시겔라로부터 정제되도록 개발되었다. *S. 손네이* 및 *S. 플렉스네리*의 O-특이적 다당류는 또한 *P. 아에루기노사*(*P. aeruginosa*) 외독소에 화학적으로 킨주게이션되었고, 마우스에서 유의한 면역 반응을 유발하였다. 추가로, 이들은 면역원성이며, 인간에서 안전한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 화학적 킨주게이션은 고비용이며, 항상 신뢰성 있고 재현가능한 백신을 발생시키지 않는 시간 소모적인 과정이다. 이는 상업적 규모로 상기 바이오킨주게이트 백신을 개발하려고 하는 경우에 우수제조 관리기준(good manufacturing practices, GMP) 문제를 발생시킨다.

발명의 내용

- [0012] **발명의 개요**
- [0013] 한 양태에서, 본 발명은 삽입된 킨센서스 서열, D/E - X - N - Z - S/T(여기서, X 및 Z는 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있음)를 포함하는 단백질 담체; 단백질 담체에 연결된, 하나 이상의 박테리아로부터의 하나 이상의 항원성 다당류(여기서, 상기 하나 이상의 항원성 다당류는 시겔라, *E. 콜리* 또는 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 중 하나 이상의 균주로부터의 하나 이상의 박테리아 O-항원임); 및 임의로 애쥬번트를 포함하는 바이오킨주게이트 백신에 관한 것이다.
- [0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 킨센서스 서열 D/E - X - N - Z - S/T(여기서, X 및 Z는 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있음)를 함유하도록 변형된 슈도모나스 아에루기노사의 외독소(EPA)를 포함하는 단백질 담체; 단백질 담체에 연결되고,

$$\frac{\alpha}{3} \rightarrow \left[\text{L-Rha} \xrightarrow[1,3]{\alpha} \text{L-Rha} \xrightarrow[1,2]{\alpha} \text{D-Gal} \xrightarrow[1,3]{\alpha} \text{D-GlcNAc} \right] \xrightarrow[1]{\alpha}$$

 의 구조를 갖는 하나 이상의 다당류 사슬; 및 임의로 애쥬번트를 포함하는 시겔라 바이오킨주게이트 백신에 관한 것이다.
- [0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열 목록 번호:7에 제공된 서열을 갖는 단백질 담체; 단백질 담체에 연결되고,

$$\frac{\alpha}{3} \rightarrow \left[\text{L-Rha} \xrightarrow[1,3]{\alpha} \text{L-Rha} \xrightarrow[1,2]{\alpha} \text{D-Gal} \xrightarrow[1,3]{\alpha} \text{D-GlcNAc} \right] \xrightarrow[1]{\alpha}$$

 의 구조를 갖는 하나 이상의 다당류 사슬; 및 애쥬번트를 포함하는 시겔라 디센테리에 01 바이오킨주게이트 백신에 관한 것이다.
- [0016] 추가 양태에서, 본 발명은 서열 목록 번호:5의 서열을 포함하는 플라스미드; 서열 목록 번호:5의 서열을 포함하는 유전 서열; 서열 목록 번호:6의 서열을 포함하는 아미노산 서열; 서열 목록 번호:7의 서열을 포함하는 아미노산 서열; 또는 벡터 pGVXN64에 관한 것이다.
- [0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OST/OSTase)를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열; 단백

질 담체를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 하나 이상의 박테리아로부터의 하나 이상의 항원성 다당류 합성 유전자 클러스터를 포함하는 하나 이상의 박테리아에 대한 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키기 위한 발현 시스템에 관한 것으로, 상기 항원성 다당류는 박테리아 O-항원이다.

[0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열 목록 번호:2의 서열을 갖는 PglB를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열; 서열 목록 번호:6의 서열을 갖는 변형된 EPA를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 서열 목록 번호:5의 서열을 포함하는 다당류 합성 유전자 클러스터를 포함하는 시겔라 디센테리에 O1에 대한 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키기 위한 발현 시스템에 관한 것이다.

[0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 박테리아에서 하나 이상의 컨센서스 서열, D/E - X - N - Z - S/T(여기서, X 및 Z는 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있음)을 함유하는 변형된 EPA, 또는 AcrA; PglB; 및 하나 이상의 O1-다당류를 발현시키는 단계; 하나 이상의 O1-다당류에 연결된 AcrA 또는 변형된 EPA를 포함하는 일정량의 O1-바이오컨쥬게이트를 생성시키기 위해 일정 기간 동안 박테리아를 성장시키는 단계; 원형질막 주위공간 단백질을 추출하는 단계; 및 추출된 원형질막 주위공간 단백질로부터 O1-바이오컨쥬게이트를 분리시키는 단계를 포함하여, 생물반응기(bioreactor)에서 O1-바이오컨쥬게이트를 생성시키는 방법을 고려한다.

[0020] 한 추가 양태에서, 본 발명은 글리코실트랜스퍼라아제의 사용을 통해 재조합 유기체에서 S. 디센테리에의 다당류를 어셈블리시키는 단계; 상기 재조합 유기체에서 하나 이상의 표적 단백질의 아스파라긴 잔기에 상기 다당류를 연결시키는 단계를 포함하여, S. 디센테리에 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키는 방법을 고려하며, 상기 하나 이상의 표적 단백질은 하나 이상의 T-세포 에피토프를 함유한다.

[0021] 한 추가 양태에서, 본 발명은 표적 단백질의 N-당화를 수행하는 대사 기구를 엔코딩하는 유전 정보를 원핵생물 유기체로 도입시켜 변형된 원핵생물 유기체를 생성시키는 단계로서, 하나 이상의 재조합 표적 단백질의 발현에 필요한 상기 유전 정보가 상기 원핵생물 유기체로 도입되고, 상기 대사 기구가 지질 담체 상의 S. 디센테리에 다당류의 어셈블리를 위한 특정 글리코실트랜스퍼라아제 및 표적 단백질의 아스파라긴 잔기에 다당류를 공유적으로 연결시키는 올리고사카릴트랜스퍼라아제, 및 하나 이상의 T-세포 에피토프를 함유하는 표적 단백질을 포함하는 단계; 변형된 원핵생물 유기체의 배양물을 발생시키는 단계; 및 상기 배양 배지로부터 당화된 단백질을 수득하는 단계를 포함하여, S. 디센테리에 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키는 방법을 고려한다.

[0022] **도면의 설명**

[0023] **도 1**은 작제물 A 내지 C로부터 유래된 Lip 단백질의 N-당화를 예시한다(실시에 1 참조). C. 제주니로부터의 기능성 *pgl* 오페론(Wacker et al., 2002, 상기) 및 작제물 A(라인 2), B(라인 1), 및 C(라인 3) 또는 돌연변이 D121A를 갖는 작제물 C의 돌연변이(라인 4)를 코딩하는 플라스미드를 갖는 E. 콜리 Top 10 세포. 단백질은 원형질막 주위공간 추출물로부터 발현되고, 정제되었다. 정제된 단백질 분석의 SDS-PAGE 및 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue) 염색이 제시된다.

[0024] **도 2**는 플라스미드로부터 다양한 단백질을 발현하는 CLM24 세포(Feldman et al., (2005). Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 3016-3021) 또는 Top 10 세포(패널 E 라인 1-6) 또는 SCM7 세포(Alaimo, C, Catrein, I., Morf, L., Marolda, C. L., Callewaert, N., Valvano, M. A., Feldman, M. F., Aebi, M. (2006). Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. EMBO Journal 25, 967-976)(패널 E, 라인 7, 8)에서의 C. 제주니 *pgl* 오페론(Wacker et al., 2002, 상기)에 의한 서열 특이적 N-당화에 대해 분석된 상기 다양한 단백질의 N-당화 분석을 도시한다. 니트로셀룰로오스 막으로 옮겨지고, 특정 항혈청으로 시각화된 SDS-PAGE 분리된 원형질막 주위공간 추출물이 제시된다. 패널 A-D에서, 상부 패널은 항 AcrA 항혈청(Wacker et al. 2002, 상기; Nita-Lazar, M., Wacker, M., Schegg, B., Amber, S., and Aebi, M. (2005). The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. Glycobiology 15, 361-367)으로 프로빙(probing)된 면역블롯(immunoblot)을 도시하는 반면, 하부 패널은 R12 항혈청(Wacker et al., 2002, 상기)으로 프로빙된 면역블롯을 도시한다. + 및 -는 세포에서의 기능성 또는 돌연변이 *pgl* 오페론의 존재를 나타낸다. 패널 A는 *pe1B* 신호 서열 및 핵사 히스태그(histag)를 갖는 가용성 야생형 AcrA(라인 1, 2), AcrA-N273Q(라인 3, 4), 및 AcrA-D121A(라인 5)의 샘플을 함유한다. 패널 B: AcrA(라인 1, 2), AcrA-T145D(라인 3), AcrA-N123Q-N273Q-T145D(라인 4, 5). 패널 C: AcrA-F115D-T145D(라인 1, 2), AcrA-N123Q-N273Q-N272D(라인 3, 4). 패널 D: AcrA-N273Q(라인 1, 2), AcrA-N273Q-F122P(라인 3, 4). 패널 E: CtxB(라인 1, 2), CtxB-W88D(라인 3, 4), CtxB-Q56/DSNIT(라인 5, 6), 및 CtxB-W88D-Q56/DSNIT.

- [0025] 도 3은 OmpH1 내의 다수의 당화 부위의 설계를 도시한다. ΔwaaL 균주 SCM6은 플라스미드 pACYCpgl(전체 pgI 유전자좌를 엔코딩함), 및 야생형 OmpH1(라인 1), OmpH1^{N139S}-myc(라인 2), OmpH1^{KGN→NIT, HFGDD→DSNIT}-myc(라인 3), OmpH1^{RGD→NIT, HFGDD→DSNIT}-myc(라인 4), OmpH1^{KGN→NIT, RGD→NIT}-myc(라인 5), OmpH1^{KGN→NIT, RGD→N.T, HFGDD→DSNIT}-myc(라인 6) 또는 OmpH1^{RGD→NIT, V83T}-myc(라인 7)를 발현하는 플라스미드로 공동 형질전환되었다. 세포는 호기적으로 성장되었고, 분석 3시간 전에 0.5% 아라비노오스로 유도되었다. 전체 세포 용해질은 재료 및 방법 섹션에 기재된 바와 같이 배양물의 광학 밀도가 균일화된 후에 TCA 침전되었다. 단백질은 15% SDS-PAGE에 의해 분리되었고, PVDF 막에 옮겨졌다. 첫번째 패널에서, 전체 세포 용해질의 면역블롯은 항-myc 태그 항체로 프로빙되었다. 하루 패널에서, 전체 세포 용해질의 면역블롯은 글리칸-특이적 항혈청으로 프로빙되었다. 당화되지 않거나 당화된 OmpH1의 위치가 우측에 표시된다.
- [0026] 도 4는 다양한 OmpH1 변이체를 발현하는 세포의 형광 현미경검사를 도시한다. 형광 현미경 검사는 액시오플랜 2(Axioplan2) 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 수행되었다. 어도비 포토샵(Adobe Photoshop) 버전 CS2를 이용하여 이미지를 조합시켰다. OmpH1(패널 A), OmpH1^{N139S}(패널 B), OmpH1^{C20S}(패널 C), OmpH1^{KGN→NIT, HFGDD→DSNIT}(패널 D), OmpH1^{RGD→NIT, HFGDD→DSNIT}(패널 E), OmpH1^{KGN→NIT RGD→NIT}(패널 F), OmpH1^{V83T, KGN→NIT}(패널 G), 및 OmpH1^{KGN→NIT, RGD→NIT, HFGDD→DSNIT}(패널 H)를 발현하는 SCM6 세포. 첫번째 컬럼은 흑색 배경 상의 그레이톤(greystone)으로 제시된 컬럼 2, 3 및 4 내의 그림의 병합이다. 컬럼 2: DAPI 균주로부터의 그레이톤 중의 청색 형광, 컬럼 3: 글리칸 특이적 형광으로부터의 녹색 형광, 컬럼 4: 항-myc 염색으로부터의 적색 형광.
- [0027] 도 5A는 그람-양성 및 그람-음성 박테리아에서의 캡슐 다당류 및 지질다당류의 개략도를 도시한다.
- [0028] 도 5B는 통합된 PglB 및 EPA를 갖는 유전체 DNA, 및 다당류 합성 유전자 클러스터를 엔코딩하는, 상호교환가능한(즉, 교환가능한) 플라스미드 DNA를 도시한다.
- [0029] 도 6A는 본 발명의 기술을 이용한 킨주게이트 백신의 생성 과정을 도시한다.
- [0030] 도 6B는 시겔라 디센테리에 01 항원 발현 플라스미드 pGVXN64의 작제물을 도시한다.
- [0031] 도 7A 및 7B는 본 발명에서 사용되는 단백질 당화 경로의 개략도를 도시한다.
- [0032] 도 8A 및 8B는 본 발명의 바이오킨주게이트 생성을 위한 발현 플랫폼을 도시하는 개략도이다.
- [0033] 도 9는 시겔라 바이오킨주게이트의 생성을 도시한다.
- [0034] 도 10A는 운테카프레놀피로포스페이트(UPP)에서의 S. 디센테리에 혈청형 01의 0-항원의 다당류 생합성을 도시한다.
- [0035] 도 10B는 N-당화 부위가 설계될 수 있는 담체 단백질, 예를 들어, EPA의 개략도를 도시한다.
- [0036] 도 11은 마우스에서의 시겔라 01 다당류에 대한 면역 반응을 유발하는 바이오킨주게이트를 도시한다.
- [0037] 도 12는 생물반응기에서의 시겔라 01-EPA 바이오킨주게이트(예를 들어, 01-EPA)의 생성으로부터의 결과를 도시한다.
- [0038] 도 13은 01-EPA의 정제를 도시한다.
- [0039] 도 14A는 다양한 조건하에서 수득된 LB 진탕 플라스크에서 생성된 시겔라 01-AcrA 바이오킨주게이트의 일련의 표본의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다.
- [0040] 도 14B는 시겔라의 다양한 혈청형 및 이의 항원성을 규정하는 다당류 구조(즉, 시겔라 0-항원)를 제공한다.
- [0041] 도 15는 본 발명의 S. 디센테리에 혈청형 01 바이오킨주게이트의 한 예의 1H NMR 스펙트럼의 아노머 영역의 확장을 도시한다.
- [0042] 도 16A는 바이오매스(biomass) 농도(0.1 OD_{600nm})의 세포/라인)로 표준화된 시겔라 01 바이오킨주게이트(예를 들어, EPA-01)의 단백질 샘플을 도시한다.
- [0043] 도 16B는 EPA 및 EPA-01를 확인하기 위해 7.5% SDS-PAGE 상에 로딩되고, 쿠마시로 염색되는, 시겔라 01 바이오킨주게이트 생성 과정으로부터의 원형질막 주위공간 추출물을 도시한다.

- [0044] **도 17A**는 시겔라 01 바이오컨쥬게이트를 확인하기 위해 SDS-PAGE에 의해 분석되고, 쿠마시에 의해 염색된, 1. 소스 Q(Source Q)로부터의 단백질 분획을 도시한다.
- [0045] **도 17B**는 시겔라 01 바이오컨쥬게이트를 확인하기 위해 SDS-PAGE에서 분석되고, 쿠마시에 의해 염색된, 2. 소스 Q로부터의 단백질 분획을 도시한다.
- [0046] **도 18A**는 시겔라 01 바이오컨쥬게이트를 확인하기 위해 SDS-PAGE에 의해 분석되고, 쿠마시에 의해 염색된, 슈퍼덱스 200(Superdex 200) 컬럼으로부터의 단백질 분획을 도시한다.
- [0047] **도 18B**는 SDS-PAGE에 의해 분석되고, 쿠마시에 의해 염색된, 다양한 정제 단계로부터의 시겔라 바이오컨쥬게이트를 도시한다.
- [0048] **본 발명의 상세한 설명**
- [0049] **발명에 대한 서언**
- [0050] 본 발명은 다능한(versatile) 생체내 당화 플랫폼을 제공한다.
- [0051] 유럽 특허 출원 번호 03 702 276.1호(European Patent 1 481 057)는, (i) 지질 담체 상의 올리고당류의 어셈블리를 위한 특정 글리코실트랜스퍼라아제, (ii) 컨센서스 서열 "N - X - S/T" (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산일 수 있음)를 포함하는 재조합 표적 단백질, 및 (iii) 표적 단백질의 컨센서스 서열에 상기 올리고당류를 공유적으로 연결시키는 C. 제주니의 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OTase)를 엔코딩하는 핵산이 도입되는 원핵생물 유기체를 교시한다. 상기 원핵생물 유기체는 특정 글리코실트랜스퍼라아제의 타입에 의해 규정되는 특정 구조를 갖는 N-글리칸을 생성한다.
- [0052] 단백질 내의 공지된 N-당화 컨센서스 서열은 C. 제주니의 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OTase)를 포함하는 원핵생물 유기체 내에서 재조합 표적 단백질의 N-당화를 가능케 한다.
- [0053] 본 발명의 목적은 원핵생물 유기체 생체내에서 생성될 수 있는 N-당화에 대한 최적화된 효능을 갖는 단백질 뿐만 아니라 이러한 단백질을 생성시키는 수단 및 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질의 항원성, 안정성, 생물학적, 예방적 및/또는 치료적 활성을 변형시키기 위한, 재조합 단백질로의 N-글리칸의 보다 효과적인 도입을 목표로 한다. 한 추가 목적은 표면 상에서 본 발명의 재조합 N-당화 단백질을 효과적으로 제시하는 숙주 세포의 제공이다.
- [0054] 첫번째 양태에서, 본 발명은 최적화된 N-당화 아미노산 서열(들)인 D/E - X - N - Z - S/T(최적화된 컨센서스 서열) 중 하나 이상을 포함하는 재조합 N-당화 단백질(여기서, X 및 Z는 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있고, 부분적인 상기 N-당화 아미노산 서열(들) 중 하나 이상이 도입됨)을 제공한다.
- [0055] 놀랍게도, 단백질로의 부분적인 특정 아미노산 서열(들)(최적화된 컨센서스 서열(들))의 도입이 상기 도입된 위치에서 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OST, OTase)에 의해 효과적으로 N-당화되는 단백질을 발생시키는 것으로 밝혀졌다.
- [0056] 본 발명의 상황에서 사용되는 용어 "부분적 아미노산 서열(들)"은 또한 "최적화된 컨센서스 서열(들)" 또는 "컨센서스 서열(들)"로 언급될 것이다. 최적화된 컨센서스 서열은 종래에 공지된 일반적인 컨센서스 서열 "N - X - S/T"보다 훨씬 더 효과적으로, 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OST, OTase)에 의해 N-당화된다.
- [0057] 일반적으로, 용어 "재조합 N-당화 단백질"은 상기 단백질을 엔코딩하는 핵산을 천연적으로 포함하지 않는 숙주 세포에서 생성된 임의의 이종성 폴리펩티드 또는 올리고펩티드를 의미한다. 본 발명의 상황에서, 이러한 용어는 임의의 숙주 세포, 예를 들어, 진핵생물 또는 원핵생물 숙주 세포, 바람직하게는 원핵생물 숙주 세포, 예를 들어, 에스케리키아 종, 캄필로박터 종, 살모넬라 종, 시겔라 종, 헬리코박터 종, 슈도모나스 종, 바실러스 종, 더욱 바람직하게는 에스케리키아 콜리, 캄필로박터 제주니, 살모넬라 티피무리움 등에서 재조합적으로 생성된 단백질을 의미하고, 상기 단백질을 엔코딩하는 핵산은 상기 숙주 세포에 도입되고, 엔코딩된 단백질은 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 OTase에 의해 N-당화되고, 상기 트랜스퍼라아제 효소는 상기 숙주 세포에서 천연 발생하거나 상기 숙주 세포로 재조합적으로 도입된다.
- [0058] 국제적으로 인정된 아미노산에 대한 1 글자의 코드에 따르면, 약어 D, E, N, S 및 T는 각각 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 세린 및 트레오닌을 나타낸다. 본 발명에 따른 단백질은 최적화된 컨센서스 서열(들)인 D/E - X - N - Z - S/T 중 하나 이상이 도입되고, N-당화된다는 점에서 천연 단백질 또는 종래 단백질과 상이하다.

그러므로, 본 발명의 단백질은 최적화된 컨센서스 서열을 또한 포함하나, 임의의 추가(도입된) 최적화된 컨센서스 서열을 포함하지 않는 천연 발생 C. 제주니 단백질과 상이하다.

- [0059] 최적화된 컨센서스 서열의 도입은 하나 이상의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환에 의해 달성될 수 있다. 최적화된 컨센서스 서열을 도입시키기 위한 하나 이상의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환은 고상-보조 화학적 펩티드 합성과 같은 당업자에게 널리 공지된 화학적 합성 방법에 의해 달성될 수 있다. 대안적으로, 폴리펩티드는 클수록 바람직하고, 본 발명의 단백질은 표준 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 단백질은 이들이 높은 효율로 생성될 수 있고, 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 기능성 *pgl* 오페론을 포함하는 임의의 원핵생물 숙주에서 생성될 수 있는 장점을 가진다. 본 발명의 양태 및 구체예를 실시하기 위한 캄필로박터 종으로부터의 바람직한 대안적 OTase는 캄필로박터 콜리(*Campylobacter coli*) 및 캄필로박터 라리(*Campylobacter lari*)이다(Szymanski, C.M. and Wren, B.W. (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. Nat. Rev. Microbiol. 3:225-237 참조). 기능성 *pgl* 오페론은 상기 원핵생물 숙주가 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니인 경우에 천연적으로 존재할 수 있다. 그러나, 당 분야에서 기존에 입증되고, 상기 언급된 바와 같이, *pgl* 오페론은 세포로 전달될 수 있고, 상기 새로운 세포 환경에서 기능적인 채로 유지될 수 있다.
- [0061] 용어 "캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 기능성 *pgl* 오페론"은 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니의 기능성 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OTase), 및 지질 담체 상의 올리고당류를 어셈블리할 수 있는 하나 이상의 특정 글리코실트랜스퍼라아제를 인코딩하는 핵산의 클러스터를 의미하며, 상기 올리고당류는 OTase에 의해 지질 담체로부터 하나 이상의 최적화된 아미노산 서열(들)인 D/E - X N - Z - S/T를 갖는 표적 단백질로 전달될 수 있다. 본 발명의 상황에서 용어 "캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 기능성 *pgl* 오페론"은 단일한 전사 단위로서의 오페론을 반드시 의미하지는 않는 것이 이해되어야 한다. 상기 용어는 단지 하나의 숙주 세포에서의 재조합 단백질의 N-당화를 위한 기능성 성분의 존재를 필요로 한다. 이러한 성분은 하나 이상의 별개의 mRNA로 전사될 수 있고, 함께 또는 별개로 조절될 수 있다. 예를 들어, 상기 용어는 또한 하나의 숙주 세포 내의 유전체 DNA 및 플라스미드(들)에 위치한 기능성 성분을 포함한다. 효능을 위해, 기능성 *pgl* 오페론의 모든 성분이 동시에 조절되고 발현되는 것이 바람직하다.
- [0062] 단지 기능성 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OTase)가 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터 유래되어야 하고, 지질 담체 상의 올리고당류를 어셈블리할 수 있는 하나 이상의 특정 글리코실트랜스퍼라아제가 숙주 세포로부터 유래될 수 있거나 숙주 세포로 재조합적으로 도입될 수 있고, 상기 글리코실트랜스퍼라아제에 의해 어셈블리된 올리고당류가 OTase에 의해 지질 담체로부터 하나 이상의 최적화된 컨센서스 서열을 갖는 표적 단백질로 전달될 수 있는 것이 유일한 기능적 제한이 되는 것을 인식하는 것이 중요하다. 그러므로, 특정 글리코실트랜스퍼라아제를 천연적으로 포함하는 숙주 세포의 선택 및/또는 상기 숙주 내에 천연적으로 존재하는 특정 글리코실트랜스퍼라아제의 불활성화 뿐만 아니라 이중성 특정 글리코실트랜스퍼라아제의 도입은 당업자가 본 발명의 단백질 내의 최적화된 N-당화 컨센서스 부위에 결합된 N-글리칸을 변경시키는 것을 가능케 할 것이다.
- [0063] 상기의 결과로서, 본 발명은 본 발명의 단백질 상의 N-글리칸-패턴의 개별적 계획을 제공한다. 따라서, 단백질은 생물학적, 약학적 및 정제 요구를 충족시키기 위해 N-글리칸 패턴에서 개별화될 수 있다.
- [0064] 한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 단백질은 하나, 또한 하나 이상, 바람직하게는 2개 이상, 바람직하게는 3개 이상, 더욱 바람직하게는 5개 이상의 상기 N-당화된 최적화 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 단백질 내의 하나 이상의 N-당화된 최적화 아미노산 서열(들)의 존재는 단백질의 항원성을 증가시키고/시키거나, 안정성을 증가시키고/시키거나, 생물학적 활성에 영향을 주고/주거나, 생물학적 반감기를 연장시키고/시키거나, 정제를 간소화시키는데 유리할 수 있다.
- [0066] 최적화된 컨센서스 서열은 위치(들) X 및 Z 내에 프롤린을 제외한 임의의 아미노산을 포함할 수 있다. 용어 "임의의 아미노산"은 흔한 천연 아미노산 및 드문 천연 아미노산 뿐만 아니라 여전히 최적화된 컨센서스 서열이 OTase에 의해 N-당화되는 합성 아미노산 유도체 및 유사체를 포함하는 것을 의미한다. 천연 발생의 흔한 아미노산 및 드문 아미노산이 X 및 Z에 바람직하다. X 및 Z는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0067] X 및 Z가 본 발명에 따른 단백질 내의 각각의 최적화된 컨센서스 서열에 대해 상이할 수 있음이 인지된다.
- [0068] 최적화된 컨센서스 서열에 결합된 N-글리칸은 특정 글리코실트랜스퍼라아제, 및 OTase에 의한 이동을 위해 지질 담체 상의 올리고당류가 어셈블리되는 경우의 상기 글리코실트랜스퍼라아제의 상호작용에 의해 결정될 것이다. 당업자는 요망되는 숙주 세포에 존재하는 특정 글리코실트랜스퍼라아제의 유형(들) 및 양을 변화시킴으로써 N-

글리칸을 설계할 수 있다.

- [0069] N-글리칸은 본원에서 N-글리코시드 결합을 통해 단백질 내의 아스파라긴 잔기의 ε-아미드 질소에 연결되는 다양한 조성의 당당류, 올리고당류 또는 다당류로 규정된다. 바람직하게는, OTase에 의해 전달된 N-글리칸은 그람-음성 또는 양성 박테리아의 세포질막에 존재하는 운데카프레놀-피로포스페이트 지질-앵커(anchor) 상에서 어셈블리된다. 이들은 O 항원, O 다당류 및 펩티도글리칸의 합성과 관련된다(Bugg, T.D., and Brandish, P. E. (1994). From peptidoglycan to glycoproteins: common features of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 119, 255-262; Valvano, M.A. (2003). Export of O-specific lipopolysaccharide. *Front Biosci* 8, S452-471).
- [0070] 한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 단백질은 그람-음성 박테리아 내의 O 다당류 또는 그람-양성 박테리아, 바람직하게는 P. 아에루기노사(P. aeruginosa) O9, O11; E. 콜리 O7, O9, O16, O157 및 시겔라 디센테리아 O1로부터의 캡슐 다당류 또는 다당류 구조에 영향을 주는 글리코실트랜스퍼라아제 및 에피머라아제(epimerase)를 삽입하거나 결실시킴으로써 수득되는 상기 O 다당류 또는 캡슐 다당류의 설계된 변이체를 형성하는 O 항원으로 전달된 올리고당류 및 다당류로부터 유래된 N-글리칸인 캄필로박터 중, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 N-글리칸의 군으로부터 선택된 하나 이상의 N-글리칸을 포함한다.
- [0071] 한 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 단백질은 두개 이상의 다양한 N-글리칸을 포함한다.
- [0072] 예를 들어, 동일한 단백질 상의 다양한 N-글리칸은 초기 또는 후기 프로모터를 이용하여 특정 글리코실트랜스퍼라아제의 발현 시기를 조절하거나, 개별적 특정 글리코실트랜스퍼라아제의 프로모터 활성을 개시시키고/시키거나, 사일런싱시키고/시키거나, 향상시키고/시키거나, 감소시키는 인자를 도입시킴으로써 제조될 수 있다. 활성을 제어하기에 적합한 프로모터 및 인자는 당업자에게 통상적으로 이용된다.
- [0073] 본 발명의 재조합 단백질의 기원에 대해서는 제한이 없다. 바람직하게는, 상기 단백질은 포유동물, 박테리아, 바이러스, 진균 또는 식물 단백질로부터 유래된다. 더욱 바람직하게는, 단백질은 포유동물, 가장 바람직하게는 인간 단백질로부터 유래된다. 본 발명에 따른 항원성 재조합 단백질을 제조하기 위해, 바람직하게는 백신에서 활성 성분으로 사용하기 위해, 재조합 단백질이 박테리아, 바이러스 또는 진균 단백질로부터 유래되는 것이 바람직하다.
- [0074] 한 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명은 단백질 및/또는 N-글리칸(들)이 치료적 및/또는 예방적으로 활성인 재조합 단백질을 제공한다. 하나 이상의 최적화된 N-당화 컨센서스 서열의 도입은 단백질에 치료적 및/또는 예방적 활성을 변형시키거나 도입할 수도 있다. 더욱 바람직한 구체예에서, 이는 면역학적으로 활성인 단백질 및/또는 N-글리칸(들)이다. 이러한 경우, 도입된 N-당화(들)은 단백질의 생물학적 활성에 대한 효과를 변형시킬 수 있고/있거나, 신규한 항원성 부위를 도입할 수 있고/있거나, 붕괴 단계를 회피하기 위해 단백질을 차폐할 수 있고/있거나, 반감기를 증가시킬 수 있다.
- [0075] 본 발명의 재조합 단백질은 숙주 세포, 바람직하게는 박테리아, 더욱 바람직하게는 그람-음성 박테리아의 외막 및/또는 표면으로 효과적으로 표적화될 수 있다. 표면 제시 및/또는 외막 국소화를 돕기 위해, 본 발명의 재조합 단백질이 박테리아, 바람직하게는 그람-음성 박테리아의 외막 및/또는 세포 표면으로 상기 재조합 단백질을 표적화할 수 있는 하나 이상의 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 것이 바람직하다.
- [0076] 한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 단백질은, 상기 표적화 폴리펩티드 서열이 타입 II 신호 펩티드 (Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C., and Dalbey, R. E. 2002. Signal peptidases. *Chem Rev* 102: 4549-4580.) 또는 외막 단백질(Wemerus, H., and Stahl, S. 2004. Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem* 40: 209-228.에 개관되어 있음)로 구성된 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 OmpH1, C. 제주니로부터의 JIpA의 전장 단백질 또는 신호 펩티드, E. 콜리로부터의 외막 단백질, 바람직하게는 OmpS, OmpC, OmpA, OprF, PhoE, LamB, Lpp'OmpA (표면 제시 기술을 위한 융합 단백질, Francisco, JA₁ Earhart, C. F., and Georgiou, G. 1992. Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2713-2717. 참조), 및 슈도모나스 아에루기노사로부터의 Inp 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 재조합 단백질이다.
- [0077] 한 상이한 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 단백질을 엔코딩하는 핵산에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 핵산은 mRNA, DNA 또는 PNA, 더욱 바람직하게는 mRNA 또는 DNA, 가장 바람직하게는 DNA이다. 핵산은 상기 단백질을 코딩하는 서열, 및 추가로 조절 서열과 같은 기타 서열, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 정지 코돈, 개시 코돈 및 언급된 조절 서열을 통해 재조합 단백질의 발현을 조절하는데 필요한 유전자 등을 포함할 수

있다. 용어 "본 발명에 따른 재조합 단백질을 엔코딩하는 핵산"은 상기 코딩 서열, 및 임의로 캄필로박터 중, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 기능성 *pgl* 오페론을 함유하는 숙주 세포에서 본 발명의 재조합 단백질을 생성할 수 있는 한 서열 정보에 관계 없는 임의의 추가의 핵산 서열을 포함하는 핵산에 관한 것이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된, 바람직하게는 공지된 유도성(inducible) 및 항시발현(constitutive) 원핵생물 프로모터, 더욱 바람직하게는 테트라사이클린 프로모터, 아라비노스 프로모터, 살리실레이트 프로모터, *lac*-프로모터, *trc*-프로모터 및 *tac* 프로모터로 구성된 군으로부터 선택된 프로모터에 연결된 분리되고 정제된 핵산을 제공한다(Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 411-421; Billman-Jacobe, H. (1996). Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 7, 500-504.). 상기 작동가능하게 연결된 핵산은, 예를 들어, 백신 접종에 사용될 수 있다.

[0078] 더욱이, 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 핵산 및/또는 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포의 유형은 이러한 숙주 세포가 C. 제주니로부터의 기능성 *pgl* 오페론 및 본 발명의 재조합 표적 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산을 수용하는 한 제한되지 않는다. 바람직한 숙주 세포는 원핵생물 숙주 세포, 더욱 바람직하게는 박테리아, 가장 바람직하게는 에스케리키아 중, 캄필로박터 중, 살모넬라 중, 시겔라 중, 헬리코박터 중, 슈도모나스 중, 바실러스 중, 바람직하게는 에스테리키아 콜리, 더욱 바람직하게는 E. 콜리 균주 Top10, W3110, CLM24, BL21, SCM6 및 SCM7(Feldman et al., (2005). Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 3016-3021; Alaimo, C, Catrein, I., Morf, L., Marolda, C. L., Callewaert, N., Valvano, M. A., Feldman, M.F., Aebi, M. (2006). Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *EMBO Journal* 25, 967-976) 및 S. 엔테리카(*S. enterica*) 균주 SL3261(*Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* LT2 (delta) *aroA*, see Hoiseth, S. K., and Stocker, B.A. 1981, Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291:238-239), SL3749(*Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* LT2 *waaL*, see Kaniuk et al., *J. Biol. Chem.* 279: 36470-36480) 및 SL3261 Δ *waaL*로 구성된 군으로부터 선택된 것이다.

[0079] 더욱 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 숙주 세포는 외막으로의 표적화 및/또는 본 발명에 따른 재조합 단백질의 표면 제시에 유용한 숙주 세포, 바람직하게는, i) a) 지질 담체 상의 올리고당류의 어셈블리를 위한 하나 이상의 천연 또는 재조합 특정 글리코실트랜스퍼라아제, b) 캄필로박터 중, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 하나 이상의 천연 또는 재조합 원핵생물 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OTase) 및 c) 본 발명에 따른 하나 이상의 재조합 단백질, 바람직하게는 표적화 폴리펩티드를 추가로 포함하는 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전형, 및 ii) 그람-음성 박테리아의 외막 내 및/또는 상에 위치되는 본 발명에 따른 재조합 N-당화 단백질을 포함하는 표현형을 갖는, 재조합 그람-음성 박테리아인 숙주 세포이다.

[0080] 상기 구체예에 대한 숙주 세포는 바람직하게는 에스케리키아 중, 캄필로박터 중, 시겔라 중, 헬리코박터 중 및 슈도모나스 중, 살모넬라 중, 바람직하게는 E. 콜리, 더욱 바람직하게는 E. 콜리 균주 Top 10, W3110, CLM24, BL21, SCM6 및 SCM7, 및 S. 엔테리카 균주 SL3261, SL3749 및 SL326i δ *waaL*(Hoiseth, S. K., and Stocker, B.A. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239 참조), SL3749(Kaniuk, N.A., Vinogradov, E., and Whitfield, C. 2004. Investigation of the structural requirements in the lipopolysaccharide core acceptor for ligation of O antigens in the genus *Salmonella*: WaaL "ligase" is not the sole determinant of acceptor specificity. *J Biol Chem* 279: 36470-36480)로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0081] 본 발명의 바람직한 단백질은 단독으로 및/또는 도입된 N-당화 부위로 인해 치료적 또는 예방적 활성을 가질 수 있으므로, 이들은 약제의 제조에 사용될 수 있다. 본 발명을 실시하기 위한 단백질의 유형은 제한되지 않고, 따라서 본 발명의 단백질, 몇 가지 예를 들어, EPO, IFN-알파, TNF알파, IgG, IgM, IgA, 인터루킨, 사이토카인, C. 제주니 단백질, 예를 들어, HisJ(Cj0734c), AcrA(Cj0367c), OmpH1(Cj0982c)와 같은 백신접종을 위한 바이러스 및 박테리아 단백질, 디프테리아 독소(CRM 197), 콜레라 독소, P. 아에루기노사 외독소, 및 이에 도입된 최적화된 N-당화 컨센서스 서열은 약제를 제조하는데 유용하다(Wyszynska, A., Raczko, A., Lis, M., and Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2004). Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine* 22, 1379-1389).

[0082] 또한, 본 발명에 따른 핵산 및/또는 벡터는 약제의 제조, 바람직하게는 유전자 요법에 사용하기에 또한 유용하

다.

- [0083] 더욱이, 본 발명에 따른 숙주 세포, 바람직하게는 박테리아, 바람직하게는 그람-음성 박테리아, 더욱 바람직하게는 상기 나열된 그람-음성 박테리아 중 하나의 외막 내 및/또는 상에 위치되는 본 발명의 N-당화 재조합 단백질을 포함하는 표현형을 갖는 숙주 세포가 특히 약제의 제조에 유용하다.
- [0084] 더욱 바람직하게는, 본 발명의 단백질은 치료적 및/또는 예방적 백신접종을 필요로 하는 피검체의 치료적 및/또는 예방적 백신접종을 위한 약제의 제조에 사용된다.
- [0085] 한 더욱 바람직한 구체예에서, 본 발명은 바람직하게는 유전자 요법에 의한 치료적 및/또는 예방적 백신접종을 필요로 하는 피검체의 치료적 및/또는 예방적 백신접종을 위한 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 핵산 및/또는 벡터의 용도에 관한 것이다.
- [0086] 상기 N-당화 재조합 단백질을 제시하는 본 발명의 숙주 세포는 백신 제조에 특히 유용한데, 이는 제시된 N-당화 단백질이 숙주 세포 표면에 풍부하게 존재하고 면역 세포, 특히 면역 세포의 친수성 N-글리칸에 의해 용이하게 접근되며, 숙주 세포가 살아있는 경우 다소 복제될 수 있으며 백신접종 효과를 증폭시킬 수 있는 애쥬번트의 추가 효과를 갖기 때문이다.
- [0087] 바람직하게는, 본 발명의 의학적 양상을 실시하기 위한 숙주 세포는 감염된 또는 사멸된 숙주 세포이다.
- [0088] 약제, 바람직하게는 백신을 제조하기 위한 본 발명의 숙주 세포의 사용의 또 다른 이점은 이들이 세포 성분으로 인해 IgA 항체를 유도한다는 점이다.
- [0089] 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 동물, 바람직하게는 포유동물, 설치류, 양과, 말과, 개과, 소과 또는 인간에서 IgA 항체를 유도하기 위해 본 발명에 따라 사용된다. 백신접종을 필요로 하는 상기 피검체가 조류, 포유동물 또는 어류, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 소, 양, 말, 개, 고양이 및 인간으로 구성된 군으로부터 선택된 포유동물, 가장 바람직하게는 인간인 것이 바람직하다. 가금류가 또한 바람직하다.
- [0090] 본 발명의 한 추가 양태는 본 발명에 따른 하나 이상의 단백질, 하나 이상의 핵산, 하나 이상의 벡터 및/또는 하나 이상의 숙주 세포를 포함하는 약제 조성물에 관한 것이다. 단백질 또는 숙주 세포, 바람직하게는 감염되거나 사멸된 숙주 세포를 포함하는 약제의 제조, 및 유전자 요법을 위한 핵산 및/또는 벡터를 포함하는 약제의 제조는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 최종 약제 조성물을 위한 제조 계획 및 약제 조성물의 투여를 위한 방법 및 세부사항은 사용되는 단백질, 숙주 세포, 핵산 및/또는 벡터에 좌우될 것이다.
- [0091] 한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 약제 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 희석제 및/또는 애쥬번트를 포함한다.
- [0092] 본 발명은 (i) 본 발명에 따른 재조합 단백질, 숙주 세포, 핵산, 및/또는 재조합 단백질이거나/이를 엔코딩하거나/이를 발현하는 재조합 벡터 중 하나 이상, 및 (ii) 약학적으로 허용되는 부형제, 희석제 및/또는 애쥬번트를 포함하는 약제 조성물을 제공한다.
- [0093] 적합한 부형제, 희석제 및/또는 애쥬번트는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 부형제 또는 희석제는 활성 성분에 대해 비히클 또는 매질로 작용할 수 있는 고체, 반고체 또는 액체 물질일 수 있다. 조성물 제조 분야의 당업자는 선택되는 생성물의 특정한 특성, 치료되는 질병 또는 질환, 질병 또는 질환의 단계, 및 다른 관련 상황에 따라 적절한 투여 형태 및 방식을 용이하게 선택할 수 있다(*Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (1990)). 약학적으로 허용되는 희석제 또는 부형제의 비율 및 특성은 선택되는 약학적 활성 화합물의 가용성 및 화학적 특성, 선택된 투여 경로, 및 표준 약학적 실시예에 의해 결정된다. 약학적 제조물은 경구, 비경구 또는 국소적 용도로 적합화될 수 있고, 정제, 캡슐, 좌약, 용액, 현탁액 등의 형태로 환자에 투여될 수 있다. 단독으로 효과적인 본 발명의 약학적 활성 화합물은 안정성, 결정화 편의성, 증가된 가용성 등을 위해 상기 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 예를 들어, 산 부가염 또는 염기 부가염의 형태로 제형화되고 투여될 수 있다.
- [0094] 본 발명의 한 추가 양태는, a) i) 캄필로박터 중, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 기능성 *pgl* 오페론, 및 ii) N-당화된 최적화 아미노산 컨센서스 서열(들)인 D/E - X - N - Z - S/T 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 재조합 표적 단백질(여기서, X 및 Z는 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있고, 상기 N-당화된 최적화 아미노산 컨센서스 서열(들) 중 하나 이상이 도입됨)을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 유도체, 바람직하게는 원핵생물 유도체를 제공하는 단계, 및 b) 표적 단백질(들)의 생성 및 N-당화에 적합한 방식으로 재조합 유도체

를 배양하는 단계를 포함하는, N-결합 당화 단백질을 생성시키기 위한 방법에 관한 것이다.

- [0095] 바람직하게는, 표적 단백질은 본 발명에 따른 상기 기재된 재조합 단백질 중 하나이다.
- [0096] 본 발명의 한 바람직한 방법에서, 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 기능성 *pgl* 오페론은, OTase에 의해 표적 단백질로 전달되는 지질 담체 상의 올리고당류의 어셈블리를 위한, i) 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 재조합 OTase, 및 ii) 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 재조합 및/또는 천연 특정 글리코실트랜스퍼라아제, 및/또는 iii) 캄필로박터 종이 아닌 종으로부터의 재조합 및/또는 천연 특정 글리코실트랜스퍼라아제를 코딩하는 핵산을 포함한다.
- [0097] 더욱이, 한 바람직한 구체예에서, 본 발명은, i) 그람-음성 박테리아를 제공하는 단계, ii) a) 지질 담체 상의 올리고당류의 어셈블리를 위한 하나 이상의 재조합 특정 글리코실트랜스퍼라아제, 및/또는 b) 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 하나 이상의 재조합 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OTase), 및/또는 c) N-당화된 최적화 아미노산 컨센서스 서열(들)인 D/E - X - N - Z - S/T 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 재조합 단백질(여기서, X 및 Z는 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있고, 상기 N-당화된 최적화 아미노산 컨센서스 서열(들) 중 하나 이상이 도입됨)을 엔코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 상기 박테리아에 도입시키는 단계, 및 iii) 상기 c)의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 하나 이상의 재조합 N-당화 단백질이 그람-음성 박테리아의 외막 내 및/또는 상에 위치될 때까지 상기 박테리아를 배양하는 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 숙주 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0098] 상기 바람직한 방법을 실시하기 위해, 재조합 원핵생물 유기체 또는 숙주 세포는 바람직하게는 에스케리키아 종, 캄필로박터 종, 살모넬라 종, 시겔라 종, 헬리코박터 종, 슈도모나스 종, 바실러스 종, 바람직하게는 에스케리키아 콜리, 바람직하게는, E. 콜리 균주 Top10, W3110, W3110ΔwaaL, BL21, SCM6 및 SCM7, 및 S. 엔테리카 균주 SL3261, SL3749 및 SL3261ΔwaaL로 구성된 박테리아의 그룹으로부터 선택된다.
- [0099] 본 발명에 따른 재조합 단백질을 생성하고/하거나, 분리시키고/시키거나, 정제하기 위한 또 다른 바람직한 방법은, a) 숙주 세포를 배양하는 단계, b) 상기 재조합 그람-음성 박테리아의 외막을 제거하는 단계, 및 c) 상기 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0100] 세포, 바람직하게는 원핵생물 세포, 더욱 바람직하게는 그람-음성 박테리아 세포의 외막을 제거하기 위한 예시적 방법은 적절한 효소 처리 방법, 삼투압 충격 세제 용해화 및 프렌치 프레스(French press) 방법이다.
- [0101] 가장 바람직하게는, 본 발명은 캄필로박터 종, 바람직하게는 C. 제주니가 아닌 종으로부터의 재조합 또는 천연 특정 글리코실트랜스퍼라아제가 상기 숙주 세포에서 기능적으로 발현될 수 있는 박테리아, 고세균(archaea) 및/또는 진핵생물(eukaryota)로부터 유래되는 글리코실트랜스퍼라아제 및 에피머라아제의 군으로부터 선택되는 방법에 관한 것이다.
- [0102] **바이오컨쥬게이트 백신**
- [0103] 본 발명의 구체예는 신규한 바이오컨쥬게이트 백신을 포함한다. 본 발명의 한 추가 구체예는 면역원성 또는 항원성 바이오컨쥬게이트를 직접적으로 생성시키는 재조합 박테리아 세포를 이용하는 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키는 신규한 방법을 포함한다. 한 구체예에서, 바이오컨쥬게이트 백신은 설사, 원내 감염 및 수막염과 같은 박테리아 질병을 치료하거나 예방하는데 사용될 수 있다. 추가 구체예에서, 바이오컨쥬게이트 백신은 암 또는 다른 질병에 대해 치료적 및/또는 예방적 잠재력을 가질 수 있다.
- [0104] 컨쥬게이트 백신은 아동을 박테리아 감염에 대해 보호하기 위해 투여될 수 있고, 이는 성인에게 오래 지속되는 면역 반응을 제공할 수 있다. 본 발명의 작제물은 동물에서 IgG 반응을 발생시키는 것으로 밝혀졌다. 인간에서의 시겔라 O-특이적 다당류-단백질 컨쥬게이트 백신에 대한 IgG 반응이 인간에서의 면역 보호와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(Passwell, J.H. et al., "Safety and Immunogenicity of Improved *Shigella* O-Specific Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines in Adults in Israel" Infection and Immunity, 69(3):1351-1357 (Mar. 2001)). 다당류(즉, 당 잔기)가 당 특이적인 단기 면역 반응을 촉발시키는 것으로 생각된다. 또한, 인간 면역계는 박테리아의 특정 다당류 표면 구조, 예를 들어, O-항원 및 캡슐 다당류에 대해 강한 반응을 발생시킨다. 그러나, 다당류에 대한 면역 반응은 IgM 의존성이므로, 면역계는 기억 면역 반응으로 발달하지 않는다. 다당류를 지니는 단백질 담체는 T 세포 의존성이고, 면역계가 기억 면역 반응으로 발달하므로 장기간 지속되는 보호를 제공하는 IgG 반응을 촉발시킨다.
- [0105] 인간에 대한 통상적인 백신접종 투여량은 약 1 내지 25 μg, 바람직하게는 약 1 μg 내지 약 10 μg, 가장 바람

직하게는 약 10 μg이다. 임의로, 백신, 예를 들어, 본 발명의 바이오컨쥬게이트 백신은 애주번트를 포함한다.

- [0106] 다당류(즉, 당 잔기) 및 단백질(즉, 단백질 담체)의 합성된 복합체는 다수의 박테리아 감염에 대해 보호하기 위한 컨쥬게이트 백신으로 사용될 수 있다. 한 양태에서, 본 발명은 고전적인 화학적 컨쥬게이션 방법보다 나은 장점을 제공하는 면역원성 컨쥬게이트 백신을 생성시키는 신규한 생체공학적 방법에 관한 것이다. 한 구체예에서, 상기 방법은 박테리아 세포, 예를 들어, 그람-음성 세포, 예를 들어, E. 콜리에서의 당단백질의 생체내 생성을 포함한다.
- [0107] 다양한 다당류의 생합성은 박테리아 세포에서 보존되어 있다. 다당류는 규정된 특이성을 갖는 다양한 글리코실트랜스퍼라아제에 의해 세포질막에서 통상적인 전구체(활성화된 당 뉴클레오티드)로부터 담체 지질 상에서 어셈블리된다. 지질다당류(LPS)는 그람-음성 박테리아, 예를 들어, 시겔라 종, 슈도모나스 종, 및 E. 콜리(ExPEC, EHEC)에서만 제공된다.
- [0108] 지질다당류(LPS)의 합성은 막의 세포질 측면에서 담체 지질 운테카프레닐 포스페이트로의 다당류의 첨가와 함께 시작한다. 항원은 다양한 글리코실트랜스퍼라아제에 의해 활성화된 당 뉴클레오티드로부터의 다당류의 연속적인 첨가에 의해 제조되고, 지질-결합된 다당류는 플립파아제(flippase)에 의해 막을 통해 플립핑(flipping)된다. 항원-반복 단위는 효소 반응에 의해 중합된다. 이후, 다당류는 리가아제 WaaL에 의해 지질 A로 전달되어 표면으로 외수송되는 LPS를 형성하는 반면, 캡슐 다당류는 중합 후에 담체 지질로부터 방출되고 표면으로 외수송된다. 상기 다당류의 생합성 경로는 생체내에서 LPS 바이오컨쥬게이트의 생성을 가능케 하여, 원형질막 주위공간 내의 다당류가 단백질 담체에 포획되도록 한다. 바이오컨쥬게이트, 예를 들어, LPS 바이오컨쥬게이트가 본 발명에서 바람직하다.
- [0109] 도 5A에 도시된 바와 같이, 그람-양성 및 그람-음성 박테리아 둘 모두는 캡슐 다당류에 의해 둘러싸인 세포막을 갖는다. 그람-음성 박테리아는 두개의 막을 분리시키는 원형질막 주위공간을 갖는, 세포막 위에 외막을 추가로 갖는다. 또한, 이들은 표면에 지질다당류를 함유한다. 그람-음성 박테리아, 예를 들어, E. 콜리가 본 발명의 컨쥬게이트 백신을 생성시키기 위해 사용되는 경우, 컨쥬게이트 백신에 사용되는 당단백질은 원형질막 주위공간에서 어셈블리된다.
- [0110] 박테리아 감염에 대해 보호하기 위해 컨쥬게이트 백신이 성공적으로 사용되었다. 단백질 담체로의 항원성 다당류의 컨쥬게이션이 보호적 기억 반응에 필요한데, 이는 다당류가 T 세포 의존성 항원이기 때문이다. 다당류는 다당류 내의 활성화 반응기 뿐만 아니라 단백질 담체를 이용하여 다양한 화학적 방법에 의해 단백질 담체로 컨쥬게이션된다.
- [0111] 도 6A는 현재 사용되는 방법에 비한 본 발명의 기술을 이용한 컨쥬게이션 백신의 생성 방법을 도시한다. 현재, 컨쥬게이트 백신은 상부 패넬에 개략적으로 도시된 바와 같이, 2회의 발효 작업을 이용하여 여러 정제 및 화학적 분해 단계 후에 생성된다. 이러한 현재의 방법은 많은 문제점을 갖는다. 첫째로, 병원성 유기체의 대규모의 배양이 요구된다. 둘째로, 컨쥬게이션 방법이 다당류에 의존적이다. 셋째로, 상기 방법은 낮은 재현성을 갖는다. 넷째로, 상기 방법은 특이적이지 않은 컨쥬게이션으로 인해 낮은 동질성을 갖는다. 다섯째로, 상기 방법은 또한 컨쥬게이션에서의 과량의 다당류로 인해 낮은 순도를 갖는다. 마지막으로, 현재의 방법은 20% 미만의 수율을 제공한다.
- [0112] 도 6A의 하부 패넬에 도시된 바와 같이, 한 구체예에서, 본 발명의 혁신적인 기술이 화학적 반응을 회피하고, 소수의 정제 단계 후에 고순도를 제공하면서, 비-병원성 세포를 이용하여 생체내에서 완전한 컨쥬게이트 백신(예를 들어, 바이오컨쥬게이트 백신)을 개발하는데 사용될 수 있다. 이러한 신규한 방법은 또한 현재의 방법을 이용하여 실행가능하지 않은 바이오컨쥬게이트 백신의 생성을 가능케 한다. 더욱이, 컨쥬게이션 및 정제 방법은 사용되는 다당류 항원에 의존적이다. 결과적으로, 바이오컨쥬게이트 백신은 신규한 글리칸 구조를 이용하여 보다 신속하게 설계될 수 있다. 생성된 컨쥬게이트의 증가된 동질성 및 상기 컨쥬게이트의 개선된 재현성(즉, 배치 투 배치(batch to batch) 변이성이 없음)은 상기 컨쥬게이트를 품질 관리(quality control) 및 조절 시각(perspective)으로부터 매우 매력적인 방법으로 만든다. 또한, 신규한 방법은 우수한 수율(30-60 mg/L 및 200 mg/L 이하)을 제공한다.
- [0113] 본 발명은 최종 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키기 위해 박테리아 세포를 설계하는 것을 포함하는 신규한 컨쥬게이션 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 구체예는 화학적 컨쥬게이션을 회피함에 따라 생성 방법을 간단하게 하면서, 생체내에서 바이오컨쥬게이트 백신의 생성을 가능케 한다. 상기 기술은 단백질 결합된 당류로 구성된 신규한 바이오컨쥬게이트의 생체내 합성을 위한 신규한 유전적/효소적 메커니즘을 포함한다.

- [0114] 본 발명의 한 양태의 기초는 캄필로박터 제주니가 원핵생물 유기체에 대해선 통상적이지 않은 특징인 일반적인 N-결합 단백질 당화 시스템을 함유한다는 발현을 포함한다. C. 제주니의 다양한 단백질은 7탄당에 의해 변형되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 7탄당은 특정 글리코실트랜스퍼라아제에 의해 촉매되는 누클레오티드 활성화 당당류의 단계적인 첨가에 의해 내막의 세포질 면에서 담체 지질인 운데카프레닐 피로포스페이트 상에서 어셈블리된다. 이후, 지질-결합된 올리고당류는 플립파아제, 예를 들어, PglK에 의해 원형질막 주위공간으로 플립-플롭(flip-flop)(회전하여 확산)된다. N-결합 단백질 당화의 최종 단계에서, 올리고사카릴트랜스퍼라아제(예를 들어, PglB)는 담체 지질로부터 컨센서스 서열 Asp/Glu-Xaa-Asn-Zaa-Ser/Thr(즉, D/E - X - N - Z - S/T)(여기서, Xaa 및 Zaa는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산일 수 있음) 내의 Asn 잔기로의 올리고당류의 전달을 촉매한다(도 7A). 본 발명자는 7탄당에 대한 당화 클러스터를 E. 콜리로 성공적으로 전달하였으며, 캄필로박터의 N-결합 당단백질을 생성시킬 수 있었다.
- [0115] 본 발명자는 PglB가 지질-결합된 당 기질에 대해 엄격한 특이성을 가지지 않는 것을 입증할 수 있었다. 운데카프레닐 피로포스페이트에서 어셈블리된 항원성 다당류는 원형질막 주위공간에서 PglB에 의해 포획되고, 단백질 담체로 전달된다(Feldman, 2005; Wacker, M., *et al.*, Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(18): p. 7088-93). 효소는 또한 이들이 환원 말단에서 N-아세틸화된 핵소사민을 함유하는 경우 운데카프레닐 피로포스페이트(UPP) 결합된 올리고당류의 다양한 어레이를 전달할 것이다. *pglB*에 대한 누클레오티드 서열은 서열 목록 번호:1에 제공되는 반면, PglB에 대한 아미노산 서열은 서열 목록 번호:2에 제공된다.
- [0116] 도 7A 및 7B는 본 발명의 단백질 당화 경로(즉, N-당화 시스템)의 개략도를 도시한다. 한 구체예에서, C. 제주니의 단백질 당화 경로(예를 들어, *pgl* 오페론을 포함함)는 E. 콜리로 도입될 수 있다. 도 7A에서, 올리고당류, 구체적으로 5개의 N-아세틸-D-갈락토사민 단위, 1개의 글루코오스 단위 및 1개의 2,4-디아세틸아미도-2,4,6-트리데옥시-D-글루코오스 단위로 구성된 7탄당이 내막의 세포질 면에서 글리코실트랜스퍼라아제(예를 들어, *pglA*, *pglC*, *pglH*, J; I)를 이용하여 지질 담체인 운데카프레닐피로포스페이트(UDP)로 어셈블리되고, PglK로 언급되는 플립파아제에 의해 원형질막 주위공간으로 전달된다. 별개로, 나선으로 묘사되고, 컨센서스 서열 D/E - X - N - Z - S/T(즉, Asp/Glu-Xaa-Asn-Zaa-Ser/Thr)를 함유하는 담체 단백질은 세포질에서 번역되고, 원형질막 주위공간으로 분비된다. 최종 단계에서, 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OST 또는 OTase)(예를 들어, PglB)는 담체 단백질의 컨센서스 서열 내의 Asn 잔기로 7탄당을 전달하여 당단백질을 생성시킨다.
- [0117] 도 7B는 또한 글리코실트랜스퍼라아제의 단계적 작용에 의한 다당류(즉, 항원성 다당류 또는 항원)의 생합성, 및 플립파아제에 의한 원형질막 주위공간으로의 O-항원의 전달 후, 중합효소(예를 들어, *wzy*)를 이용한 다당류로의 중합반응을 도시한다. 별개로, 담체 단백질, 예를 들어, EPA가 생성되고 원형질막 주위공간으로 분비된다. 올리고사카릴 트랜스퍼라아제(OST 또는 OTase), 예를 들어, PglB는 완화된 기질 특이성을 갖고, 지질 담체로부터 다당류를 EPA 내의 컨센서스 서열 내의 Asn으로 전달한다.
- [0118] 도 8A는 본 발명의 바이오컨쥬게이트 생성을 위한 발현 플랫폼의 구체예를 묘사하는 개략도를 도시한다. 본 발명의 기술은 이전에 논의된 바와 같이 담체 단백질이 컨센서스 서열을 함유하거나 이를 함유하도록 변형되는 한 다양한 현존하는 담체 단백질이 사용될 수 있다는 점에서 용도가 넓다. 특히, 도 8A는 발현 숙주, 예를 들어, 본 발명의 구체예에서 설계된 E. 콜리 박테리아의 작제물을 예시한다. 이러한 E. 콜리는 당화 시스템의 일반적인 성분(즉, OST/OTase, 예를 들어, PglB, 및 단백질 담체, 예를 들어, EPA)을 함유한다. 이러한 성분은 E. 콜리 균주의 유전체로 통합될 수 있다. 또한, 리가아제 WaaL 뿐만 아니라 WecG가 결실된다. 추가로, 다당류 항원 발현을 위한 특정 성분(즉, 예를 들어, 글리코실트랜스퍼라아제, 중합효소, 플립파아제, 및 당 생합성 효소를 함유하는 다당류 합성 유전자 클러스터)이 교환가능한 플라스미드의 첨가에 의해 제공될 수 있다. 이러한 작제물은 생체내에서 선택 다당류를 이용하여 단백질 담체의 특정 당화를 가능케 한다.
- [0119] 우수제조관리기준(Good Manufacturing Practices, GMP)와 양립되는 박테리아 바이오컨쥬게이트에 대한 발현 시스템의 한 구체예에서, 유도성 올리고사카릴트랜스퍼라아제 및 담체 단백질을 엔코딩하는 DNA는 박테리아(예를 들어, E. 콜리) 유전체로 안정적으로 통합될 수 있어, 항생제 선택을 위한 유전자가 생략될 수 있다. 예를 들어, 도 5B에 도시된 바와 같이, PglB 및 EPA는 유전체 DNA로 통합되는 반면, 상호교환가능한(즉, 교환가능한) 플라스미드 DNA는 다당류 합성 유전자 클러스터를 엔코딩한다.
- [0120] 또 다른 구체예에서, 도 8B는 3개의 플라스미드를 포함하는 박테리아 바이오컨쥬게이트에 대한 발현 시스템을 도시한다. 첫번째 플라스미드는 담체 단백질, 예를 들어, 2개의 N-당화 부위를 갖고, PelB 신호 펩티드에 의해

원형질막 주위공간으로 향하게 되는, 캄필로박터 제주니로부터의 AcrA를 코딩한다. 두번째 플라스미드는 OST/OTase, 예를 들어, 막 결합되는 C. 제주니로부터의 PgIB를 코딩한다. 세번째 플라스미드는, 예를 들어, 다당류(O 항원) 합성 클러스터, 예를 들어, 시겔라 디센테리에 01에 대한 다당류 합성 클러스터를 코딩하는 천연 플라스미드이다.

[0121] 한 구체예에서, 박테리아 O 항원, 예를 들어, 시겔라 디센테리에 01 항원에 대한 발현 플라스미드는 도 6B에 도시된 pGVXN64에서 삭제될 수 있다. 이러한 플라스미드는 01 혈청형으로 구성된 시겔라 디센테리에 균주 내의 다당류를 합성하는데 필요한 모든 효소를 엔코딩한다. 이러한 효소는 도 6B의 좌측 컬럼에 나열되어 있다. 시겔라 디센테리에 01 항원을 발현하는 벡터 pGVXN64는 EcoR I을 이용한 pLARFR1(Vanbleu, E. *et al.*, "Genetic and physical map of the pLARFR1 vector" DNA Seq. 15(3):225-227 (2004))의 분해 후, 올리고뉴클레오티드 카세트 5'-AATTCTGCAGGATCCTCTAGAAGCTTGG(서열 목록 번호:3) 및 5'-AATTCCAAGCTTCTAGAGGATCCTGCAG(서열 목록 번호:4)의 삽입에 의해 삭제되었다. 이후, 시겔라 디센테리에 01의 rfb 및 rfp 클러스터를 함유하는 pSDM7(Falt, I. *et al.*, "Construction of recombinant aroA salmonellae stably producing the Shigella Dysenteriae serotype 1 O-antigen and structural characterization of the Salmonella/Shigella hybrid LPS" Microb. Pathog. 20(1): 11-30 (1996))의 BamH I 단편이 BamH I 부위를 통해 pLARFR1을 함유하는 올리고뉴클레오티드 카세트로 클로닝되었다. pGVXN64 플라스미드 내의 시겔라 디센테리에 01 항원을 엔코딩하는 완전한 뉴클레오티드 서열은 하기에 제공되는 서열목록에서 서열 목록 번호:5에 기술되어 있다.

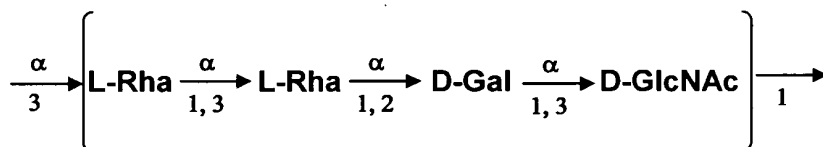
[0122] 본 발명의 발현 시스템을 위한 숙주 유기체는, 예를 들어, 에스케리키아 콜리 균주, 예를 들어, 에스케리키아 콜리 W31110 ΔwaaL일 수 있다. WaaL의 결실은 지질 A 코어로의 임의의 다당류의 전달을 방지한다. WaaL의 염색체 카피는 또한 PgIB에 의해 대체될 수 있다. 상기 균주는 또한 wbbL에 돌연변이를 함유하고, 이에 따라 어떠한 E. 콜리 016 다당류를 생성하지 않는다. 담체 지질 결합된 다당류의 생성을 추가로 증가시키기 위해, wegG가 결실되어 ECA(통상적인 장 항원(Enteroto Common Antigen))의 형성이 방지되었다.

[0123] 한 양태에서, 본 발명은 추가로 침습성의 그람-음성 박테리아인 하나 이상의 시겔라 종에 대한 바이오컨쥬게이트 백신, 바람직하게는 LPS 바이오컨쥬게이트 백신의 개발에 관한 것이다. 시겔라 종은 결장의 중증 염증인 시겔라증을 야기시킨다. 매년 전세계적으로 1억 6천 5백만명의 환자가 존재하며, 이러한 환자 중 70%는 5세 미만의 아동이다. 개발도상국에서, 시겔라증은 해마다 110만명의 사망자를 발생시킨다. 이는 배설물-경구 경로를 통해 전파되며, 고도로 전염성인 심각한 질병이다. 시겔라 종에 대한 면역화로부터 이로올 수 있는 잠재적인 그룹은, 예를 들어, 아동, 여행자, 및 난민 캠프의 사람들을 포함한다.

[0124] 4개의 상이한 시겔라의 혈청군, 즉, S. 디센테리에, S. 플렉스네리, S. 손네이 및 S. 보이디이(*S. boydii*)가 있다. 본 발명의 구체예에서, 면역원성 바이오컨쥬게이트는 시겔라의 상기 상이한 혈청군 각각에 대해 제조될 수 있다. 예를 들어, 도 14B는 시겔라의 상이한 혈청군, 및 이의 항원성을 규정하는 다당류 구조(즉, 시겔라 O-항원)를 제공한다.

[0125] 본 발명의 추가 구체예에서, 면역원성 LPS 바이오컨쥬게이트는, (1) 슈도모나스 아에루기노사와 같이 원내 감염을 야기시키는 박테리아; (2) 장외 E. 콜리(*ExPEC*)와 같이 요로 감염을 야기시키는 박테리아를 포함하여, 본 명세서의 교시내용을 이용하여 다른 박테리아에 대해 제조될 수 있다.

[0126] 한 구체예에서, 본 발명자는 간단한 발효 및 정제 방법과 함께 유전학적으로 설계된 E. 콜리를 이용하여 시겔라 디센테리에 01 LPS 바이오컨쥬게이트 백신(S. 디센테리에 바이오컨쥬게이트로도 언급됨)을 개발하였다. 도 9는 시겔라 바이오컨쥬게이트의 생성을 도시한다. 상부 패널은 E. 콜리에서의 바이오컨쥬게이트의 합성을 도시한다. 한 구체예에서, S. 디센테리에 01의 O-항원 반복 단위는 담체 지질 운데카프레닐 피로포스페이트(UPP) 상에서 어셈블리되고, 원형질막 주위공간으로 플립핑되고, 중합화된다. S. 디센테리에 01의 구조는 하기와 같고, 이는 또한 도 9의 중앙 우측에 제공된다:



[0127]

[0128] PgIB는 활성화된 다당류를 단백질 담체의 Asn 잔기로 전달하여, 시겔라 바이오컨쥬게이트를 형성시킨다. 예를 들어, 단백질 담체는 AcrA, 또는 단백질 당화에 대한 컨센서스 서열, 즉 D/E - X - N - Z - S/T(여기서, X 및 Z는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산일 수 있음(예를 들어, 변형된 외독소 슈도모나스 아에루기노사(EPA))를

함유하도록 변형된 단백질 담체일 수 있다. EPA는 컨주게이트 백신에서 성공적으로 사용되었다.

- [0129] 도 9에 예시된 한 구체예에서, PglB 및 O1 다당류 클러스터의 존재하에서 변형된 EPA를 발현하는 E. 콜리 세포의 원형질막 주위공간 단백질이 SDS-PAGE에 의해 분리되었고, 이후 니트로셀룰로오스로 전달되었고, EPA에 대해 발생된 항혈청을 이용하여 EPA가 면역검출되었다(레인 2). 레인 1에서, PglB 및 O1 다당류 클러스터의 존재하에서 캄필로박터 단백질 AcrA를 발현하는 E. 콜리 세포의 원형질막 주위공간 단백질이 분리되었고, AcrA에 대해 발생된 항혈청을 이용하여 면역검출되었다. 둘 모두의 단백질은 O1-다당류 클러스터로 당화되었다. 도 9의 가장 낮은 패널에서, E. 콜리로부터의 LPS가 SDS-PAGE에 의해 분리되었고, 은염색법(Silver Staining)에 의해 시각화되었다. 좌측 레인은 WaaL을 발현하지 않는 균주로부터 추출된 LPS를 나타내는 반면, 우측 레인은 통상적인 O1 LPS 패턴을 나타낸다. 둘 모두의 균주는 S. 디센테리에 O1의 다당류 생합성 클러스터를 발현한다.
- [0130] 박테리아 바이오컨주게이트, 예를 들어, 시겔라 바이오컨주게이트의 생성은 도 10A 및 10B를 참조로 하여 추가로 상세하게 구체예에 기재되어 있다. 박테리아 시스템, 예를 들어, E. 콜리를 이용한 박테리아 바이오컨주게이트의 어셈블리 전, 도 8A 및 8B를 참조로 하여 이전에 논의된 바와 같이 박테리아 시스템으로 도입시키기 위해 다양한 효소 및 단백질을 코딩하는 특정 유전 서열을 이용하는 것이 필요하다. 예를 들어, 이는 OST/Otase, 바람직하게는 C. 제주니로부터의 OST/Otase(예를 들어, PglB), 단백질 담체(예를 들어, EPA) 및 항원성 다당류 합성을 유도하는 유전자 클러스터(예를 들어, S. 디센테리에 O1 다당류 합성을 위한 유전자 클러스터)를 포함한다.
- [0131] 도 10A는 박테리아 바이오컨주게이트의 개발, 즉, 다당류, 예를 들어, S. 디센테리에 혈청형 O1의 O-항원의 생합성을 도시한다. 이러한 단계에서, 항원은 담체 지질 운데카프레닐 피로포스페이트(UPP) 상에서 합성된 후, 플립퍼아제를 이용하여 원형질막 주위공간으로 전달된다. 항원은 중합효소 Wzy에 의해 중합되고, 리가아제 WaaL에 의해 지질 A 코어로 전달된다. 단백질 담체로 다당류를 전달하기 위해, 리가아제는 올리고사카릴트랜스퍼라아제; PglB에 의해 대체된다.
- [0132] 박테리아 바이오컨주게이트의 생성에서의 단계 2는 적합한 단백질 담체의 설계를 포함한다. 유용한 단백질 담체는 바람직하게는 특정한 면역학적 및 약리학적 특징을 가져야 한다. 면역학적 시각으로부터, 바람직하게는, 단백질 담체는 (1) T 세포 에피토프를 지녀야 하고; (2) 면역계에서 항원 제시 세포(APC)에 항원을 전달할 수 있어야 하고; (3) 효능이 있고, 지속성이 있어야 하고; (4) 항원 특이적 전신 IgG 반응을 발생시킬 수 있어야 한다. 약리학적 시각으로부터, 바람직하게는, 단백질 담체는 (1) 비독성이어야 하고; (2) 온전한 상피 장막(epithelial barrier)을 효과적으로 가로질러 항원을 전달할 수 있어야 한다. 더욱 바람직하게는, 이러한 면역학적 및 약리학적 특징 외에, 박테리아 바이오컨주게이트의 생성에 적합한 단백질 담체는 (1) 원형질막 주위공간으로 용이하게 분비되어야 하고; (2) 루프 또는 선형 서열로서 단백질 담체에 용이하게 도입되는 항원 에피토프를 가질 수 있어야 한다.
- [0133] 본 발명자는 유전적으로 무독화된 슈도모나스 아에루기노사 외독소(EPA) 및 캄필로박터 단백질 AcrA가 적합한 단백질 담체이며, 가장 바람직하게는 EPA가 적합한 단백질 담체임을 발견하였다. AcrA는 천연 당화 부위를 함유하는 반면, EPA는 당화 부위를 엔코딩하기 위해 변형되는 것이 필요하다. 바람직하게는, EPA는 시겔라 O1 항원과 관련된 2개의 당화 부위를 도입시키기 위해 변형된다. 더욱 바람직하게는, 2개의 컨센서스 서열이 실시예 10에 논의되는 바와 같이 도입된다.
- [0134] 2개의 당화 부위를 함유하도록 본 발명의 한 구체예에서 변형된 바와 같이 EPA의 아미노산 서열은 하기에 제공되는 서열목록에서 서열 목록 번호:6(신호 서열을 가짐) 및 서열 목록 번호:7(신호 서열을 갖지 않음)로 제공된다. 서열 목록 번호:6 및 서열 목록 번호:7 각각의 당화 부위는 밑줄로 표시된다.
- [0135] 도 10B는 담체 단백질, 예를 들어, N-당화 부위가 박테리아 바이오컨주게이트의 생성에서 단계 3으로 계획될 수 있는 EPA의 개략도를 도시한다. N-당화 부위는 이전에 논의된 컨센서스 서열의 도입, 즉, D/E - X - N - Z - S/T 서열(여기서, X 및 Z는 프롤린을 제외한 임의의 천연 아미노산일 수 있음)의 삽입을 필요로 한다. 본 발명자는 돌연변이가 아닌 삽입 및 N-당화 부위의 작업을 최적화시키기 위해 플랭킹(flanking) 잔기를 이용하는 것을 고려하여, 표면 루프를 통해 상기 컨센서스 서열이 바람직하게 도입되는 것을 발견하였다.
- [0136] 도 11은 마우스에서의 시겔라 O1 다당류에 대해 면역 반응을 유발하는 바이오컨주게이트를 도시한다. O1-AcrA 및 O1-EPA가 친화성 컬럼 및 음이온 교환에 의해 정제되었다. 순수한 바이오컨주게이트가 마우스(n=10)에 주사되었다. O1-AcrA(상부) 또는 O1-EPA(하부)로 3회(1일, 21일, 60일) 면역화된 마우스의 혈청을 풀링(pooling)시키고, 70일에서 ELISA에 의해 당 특이적 IgG 반응에 대해 분석하였다. 플레이트(Nunc, polysorb)는 S. 디센

테리에 O1으로부터 분리된 LPS로 코팅되었고, 혈청 및 항 마우스 다가-HRP와 함께 인큐베이션되었다. 컨쥬게이트가 투여된 마우스는 다당류에 대해 IgG 반응이 발달되었고, 이는 두개의 단백질 담체 상의 T 세포 에피토프의 존재를 입증한다.

[0137] 결과로서, 본 발명의 박테리아 바이오컨쥬게이트는 생체내 면역원성을 나타낸다. 한 구체예에서, 박테리아 바이오컨쥬게이트는 (1) 탄수화물 특이적 반응; 및 (2) 담체 특이적 반응 또는 담체 단백질과 상관 없는 유사한 반응을 나타낼 수 있다. 또한, IgG 특이적 반응은 면역 반응의 T 세포 의존을 나타내어, 반응의 기억이 예상된다.

[0138] 도 12는 생물반응기에서의 시겔라 O1 바이오컨쥬게이트, 예를 들어, O1-EPA의 생성을 반영한다. EPA, PgIB 및 O1-다당류를 발현하는 E. 콜리 세포는 생물반응기에서 2개의 영양소 적용량(pulse)에 의해 OD₆₀₀ = 40까지 성장되었다. PgIB 및 EPA의 발현이 유도되었고, 세포는 영양소의 선형 공급(linear feed)에 의해 배양 성장되었다. 성장 곡선은 상부 패널에 도시된다. 전체 세포 추출물은 SDS-PAGE에 의해 분리되었고, EPA의 발현 및 당화는 EPA에 대해 발생된 폴리클로날 항혈청을 이용한 면역검출에 의해 분석되었다(하부). 세포는 높은 세포 밀도에서 EPA를 효율적으로 당화시킨다. 상기 과정은 재현가능하고, 90의 전체 광학 밀도(OD)를 발생시키며, 이는 진탕 플라스크 배양에 비해 45배 증가된 것이다. 결과적으로, 유가배양(fed-batch) 방법을 이용한 규모 증가가 가능하다.

[0139] 도 13은 O1-EPA의 정제의 예를 도시한다. 더욱 특히, 도 13은 S. 디센테리에 O1 바이오컨쥬게이트의 분획화 및 크로마토그래피 정제를 도시한다. O1-EPA를 발현하는 E. 콜리 세포가 생물반응기에서 높은 세포 밀도로 성장되었다(도 12 참조). 세포는 원심분리에 의해 펠렛화되었고, 원형질막 주위공간 단백질이 삼투압 충격에 의해 추출되었다. 원형질막 주위공간 단백질이 음이온 교환(Source Q)에 의해 분리되었다. O1-EPA에 대해 농화된 분획은 두번째 컬럼(Fluoroapatite)에 의해 추가로 정제되었다. 다양한 분획이 SDS-PAGE에 의해 분리되었고, 단백질이 쿠마시 블루에 의해 시각화되었다. 라인 1은 전체 세포 추출물을 도시하고, 라인 2는 삼투압 충격 후의 원형질막 주위공간 단백질을 도시하고, 라인 3은 음이온 교환 상에 로딩된 원형질막 주위공간 단백질을 도시하고, 라인 4 및 5는 음이온 교환으로부터의 용출액을 도시하고, 라인 6은 두번째 정제 컬럼 후의 O1-EPA 용출액을 도시한다. 이러한 방법은 대규모의 O1-EPA의 정제를 가능케 한다. 이러한 구체예에서, 정제 방법은 (1) 효과적(> 10 mg/L 배양물)이고; (2) 대규모화가 가능하고; (3) 우수제조 관리기준(GMP)과 양립된다. 이러한 정제 후, 글리세롤-LB 유가배양에 대한 EPA-O1 수율은 200 mg/L 이하였고, 이는 0.6 mg/L였던 LB 진탕 플라스크에 대한 수율보다 충분히 높다.

[0140] 도 14A는 산소 제한 환경하에서의 유도진, 유도 4시간 후, 및 유도 4시간 및 19시간 후를 포함하는 다양한 조건 하에서 수득된 LB 진탕 플라스크에서 생성된 AcrA-시겔라 O1 바이오컨쥬게이트의 일련의 표본의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. 추출 및 정제 후, 원형질막 주위공간 단백질은 SDS-PAGE에 의해 분리되었다. AcrA 및 AcrA-시겔라 O1 바이오컨쥬게이트는 항-AcrA 항체 및 제2의 항체를 통한 화학발광 검출을 이용하여 검출되었다. 로딩된 샘플은 샘플링 시점에서 배양 OD₆₀₀으로 표준화되었다.

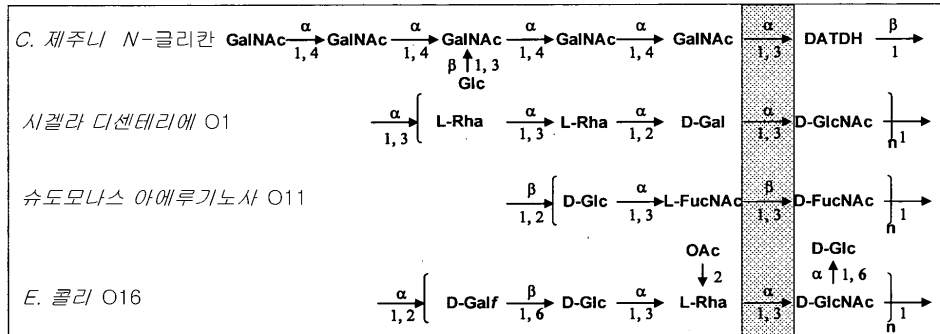
[0141] 요약하면, 한 양태에서, 본 발명의 기술은 S. 디센테리에 O1 감염에 대한 백신을 개발하는데 사용되었다. 예를 들어, S. 디센테리에 O1의 다당류는 E. 콜리 내의 EPA에 컨쥬게이션될 수 있다. 이는 EPA가 이전에 다양한 컨쥬게이션 백신과 함께 임상 시험에서 성공적으로 사용되었으므로 매우 이롭다. 본 발명에서, S. 디센테리에 O1 바이오컨쥬게이트가 31 스케일(scale)로 생물반응기에서 생성되었다. 세포는 높은 OD로 성장되었고, 바이오컨쥬게이트는 삼투압 충격에 의해 추출되었다. 바이오컨쥬게이트는 음이온 교환 및 크기 배제 크로마토그래피에 의해 98% 순도까지 정제되었다. 바이오컨쥬게이트는 다양한 마우스 균주에 주사되었다. 2 및 3회 주사 후, 다당류에 대한 당 특이적 IgG 반응이 분석을 위한 시겔라 디센테리에 O1로부터의 LPS를 이용하여 검출되었다(도 11). 예상된 바와 같이, LPS가 주사되는 경우 IgM 특이적 반응이 유도되었다. 바이오컨쥬게이트는 S. 디센테리에로부터 분리된 다당류에 대해 특이적 IgG 반응을 일으켰다. 담체 단백질과 화학적으로 커플링된, 상응하는 당 항원에 대한 IgG 반응은 인간에서의 보호와 관련된 것으로 밝혀졌다.

[0142] 이러한 결과는 본 발명의 E. 콜리 균주가 항원성 박테리아 백신, 예를 들어, 항원성 시겔라 백신의 잠재적인 생성에 적합하다는 것을 강하게 암시한다. 한 구체예에서, EPA-시겔라 바이오컨쥬게이트는 NMR, HPLC 및 MS와 같은 다양한 방법에 의해 철저히 특성규명되었다. 도 15는 본 발명의 S. 디센테리에 혈청형 O1 바이오컨쥬게이트의 예의 1H NMR 스펙트럼의 아노머 영역의 확장을 도시한다. 바이오컨쥬게이트는 0.15의 당/단백질 비와 함께, 단백질에 결합되는 항원의 13.2의 반복 단위, 및 당화되는 1-2개의 부위를 함유한다. 당화에 대한 2개의 컨센서스 서열이 EPA로 도입되었고, 단백질의 약 20%가 완전히 당화된다. 다당류는 환원 말단을 통해 단백질 담체

에 결합되고; 따라서, 다당류의 항원 에피토프는 변형되지 않는다. 또한, 생체내 컨쥬게이션 방법은 단지 O-항원 반복 부위를 단백질에 부착시키고, 지질 A 코어의 다당류는 부착되지 않는다.

[0143] 이러한 기술을 이용하여, 면역원성인 박테리아 바이오컨쥬게이트가 생성될 수 있다. 유전적 변형은 요망되는 단백질 및 요망되는 부위에서의 박테리아 다당류의 생체내 컨쥬게이션을 가능케 하도록 이루어질 수 있다. 예를 들어, 상기 논의된 바와 같이, 한 구체예에서, S. 디센테리에 O1의 항원성 다당류가 E. 콜리에서 발현될 수 있고, 생체내에서 2개의 상이한 단백질 담체(즉, EPA 및 AcrA)에 컨쥬게이션될 수 있다. 둘 모두의 바이오컨쥬게이트는 마우스에서 다당류에 대한 특이적 IgG 반응을 유발한다. 또 다른 예로서, 하기 표 1은 단백질 담체와 다당류를 컨쥬게이션시키기 위해 본 발명의 생체내 방법에서 사용될 수 있는 PglB와 같은 박테리아 OSTs/OTase에 대한 다양한 다당류 기질을 기재한다.

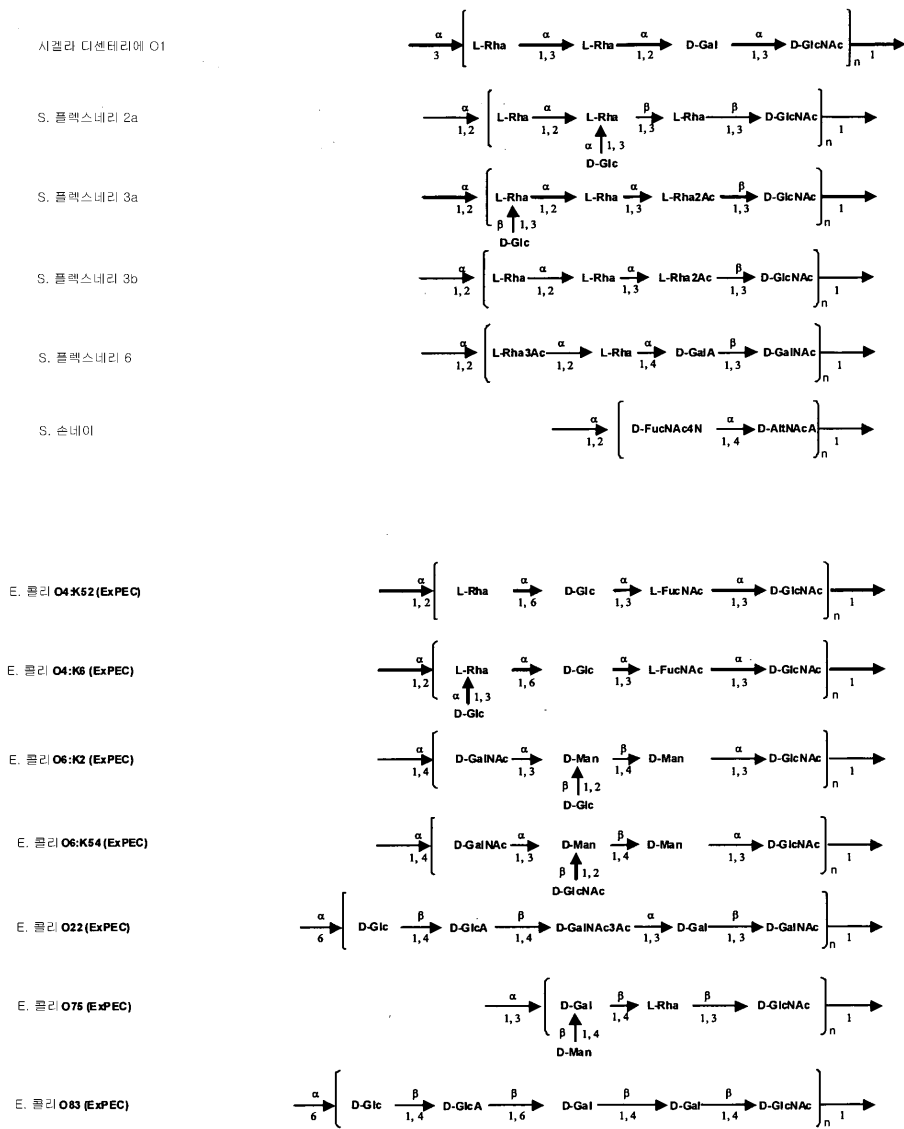
[0144] 표 1



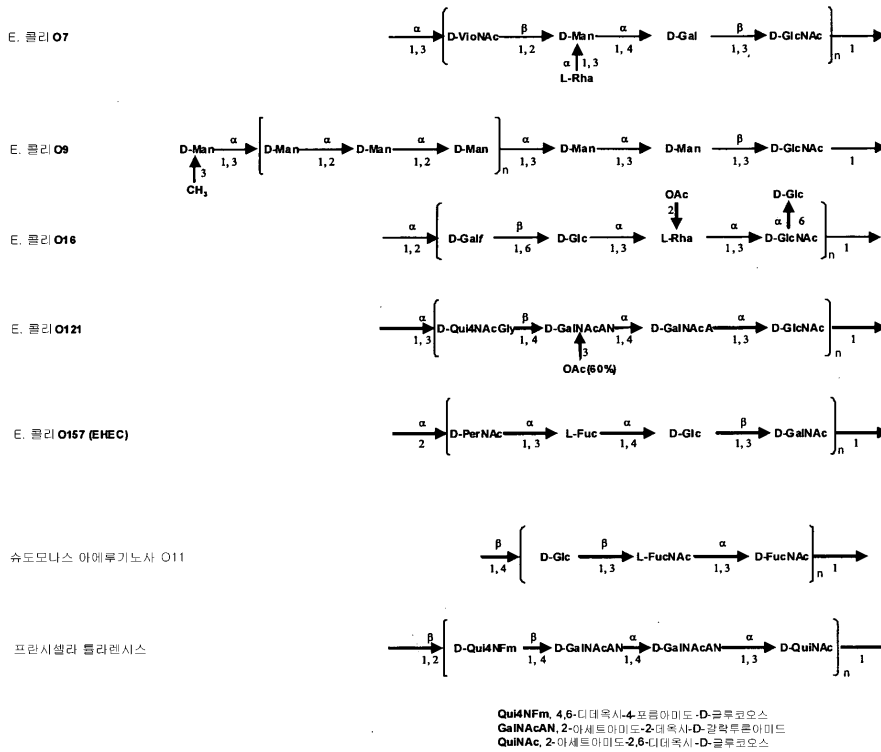
[0145]

[0146] 하기 표 2는 시겔라 및 E. 콜리 뿐만 아니라 슈도모나스 아에루기노사 O11 및 프란시셀라 툴라렌시스 (*Francisella tularensis*)의 다양한 균주와 함께 본 발명에서 이용될 수 있는 추가의 다양한 LPS 다당류 기질을 기재한다.

[0147] 표 2



[0148]



[0149]

[0150]

예를 들어, 본 발명의 한 추가 구체예에서, E. 콜리에 대한 바이오컨쥬게이트 백신이 또한 개발될 수 있다. E. 콜리는 널리 공지된 박테리아 종이다. 유전적 및 임상적 시각으로부터, 인간에 대해 생물학적으로 유의한 E. 콜리 균주는 공생 균주, 장 병원성 균주 및 장외 병원성 E. 콜리(ExPEC)로 광범위하게 분류될 수 있다. ExPEC 균주는 일반적인 장 균무리(flora)의 일부일 수 있고, 건강한 개체의 11%에서 분리된다. 이들은 인간에서 위장염을 야기시키지 않으나, 이들의 주요 특징은 장외 부위에 집락화되고, 다양한 기관 또는 해부학적 부위에서 감염을 유도하는 능력이다. 이들은 요로감염(UTI)의 주요 원인이고, 패혈증, 다양한 복부 감염 및 수막염과 관련이 있다. 세균혈증은 중증 패혈증을 야기시킬 수 있다. ExPEC로 인한 중증 패혈증은 2001년에 41,000명의 추정 사망과 관련이 있었다. ExPEC 균주는 항생제에 민감하나, 병원 및 공동체 둘 모두에서 더욱 항생제 내성인 균주로 진화되었다. 이러한 항균제 내성은 ExPEC 감염의 치료를 더욱 어렵게 만들고, 따라서 이러한 감염을 예방하기 위해서는 신규한 백신이 대안적 방법이 될 것이다.

[0151]

동물 모델에서, 캡슐, O-특이적 항원 및 다양한 외막 단백질에 대한 수동 및 능동 면역화는 전신 감염에 대한 보호를 제공하고, 상기 다양한 항원을 이용한 면역화는 상기 독성 인자를 발현하는 ExPEC 균주로부터의 요로감염에 대해 보호적이다. 혈청형 04, 06, 014, 022, 075 및 083은 UTI의 75%를 야기시킨다. 한 구체예에서, 본 발명의 신규한 기술은 하나의 항원(예를 들어, 혈청형 06, 주요 혈청형 중 하나)을 포함하는 1가 LPS 바이오컨쥬게이트 및 상기 6개의 항원을 포함하는 다가 LPS 바이오컨쥬게이트를 개발하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, ExPEC에 대한 O-항원을 합성하는 효소를 엔코딩하는 유전자 클러스터가 증폭된 후, 시퀀라 생성 균주에서 발현될 수 있다.

[0152]

본 발명은 비용 효과적인 방법으로 산업적 규모의 제조에 사용될 수 있는, 높은 잠재적인 수율을 갖는 고도로 효율적인 생성 방법을 포함한다. 이러한 바이오컨쥬게이트를 생성하는 신규한, 비용 효율적인 생물공학적인 방법은 다른 컨쥬게이트 및 다른 응용법에 적용될 수 있다. 본 발명의 추가적인 특징은 높은 재현성 및 로트(lot) 실패의 잠재적인 위험 감소를 갖는 박테리아 백신의 생성의 현저한 간소화를 포함한다.

[0153]

컨쥬게이트 백신의 제조 방법

[0154]

박테리아 발현 시스템을 설계하여 생물학적으로 활성인 특정 바이오컨쥬게이트를 생성시키는 것이 이제 가능하다. 예를 들어, S. 디센테리예의 O-특이적 다당류가 다양한 단백질 담체에 컨쥬게이션되었고, 생성된 바이오컨쥬게이트는 마우스에서 다당류에 대한 특정 IgG 반응을 유발하였다. 한 구체예에서, 본 발명의 기술은 제조할 담체 단백질을 동시에 발현시켜, 고도로 면역원성인 바이오컨쥬게이트 백신을 생성시키기 위해 생체내에서 박테리아 다당류(O 항원)를 커플링시키기 위해 올리고사카릴 트랜스퍼라아제, 예를 들어, 캄필로박터 제주니의 PglB

를 사용한다.

[0155] 산업적 규모로 이용할 수 있는 생성 방법이 확립되었다. 이는 다수의 다양한 컨주게이트 백신이 간단한 박테리아 발효를 이용하여 개발되고 제조될 수 있는 가능성을 개척하였다. 상기 방법은 도 6A의 상부 패널에 묘사된 시험관내 컨주게이션 방법에 비해 여러 이점을 갖는다. 이는 완전한 생체내 방법이므로, 비용 및 실패 위험이 현저히 감소되고, 상기 방법은 보다 재현성이 있다. 또한, 컨센서스 포획 서열은 특정한 빌트-인(built-in) 부위에서 규정된 단백질로의 다당류의 컨주게이션을 가능케 함으로써, 조절 수용 및 품질 제어를 촉진시킨다. 최종적으로, 상기 방법이 간소화되고, 생물공학적 도구만을 필요로 하므로 컨주게이션 백신의 개발이 훨씬 빨라진다. 또한, 생체내 컨주게이션 방법은 다당류 조성물이 화학적 가교를 방지하는 응용분야에 적합화된다.

[0156] 한 구체예에서, 본 발명은 박테리아 내의 제조합 당화 단백질 및 당화 효율을 결정하는 인자의 규모가 증가된 생성에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 제조합 당화 단백질은 진탕 플라스크(shake flask) 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 바이오컨주게이트는 이전에 주로 LB 진탕 플라스크 배양으로 생성되었다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 한 양태에서, 박테리아에서 제조합 당화 단백질의 생성을 위해 제1 유가배양 방법이 사용될 수 있다. 한 바람직한 제조 방법에서, 상기 목적은 당화 효율 및 세포당 제조합 단백질 수율을 유지하고, 상기 방법에서의 간소성 및 재현성을 유지하면서, 현저하게 증가된 최종 바이오매스(biomass) 농도를 달성하기 위한 것이다.

[0157] 한 구체예에서, 본 발명의 박테리아 바이오컨주게이트는 통상적인 E. 콜리 생성 방법을 이용하는 최적화된 제조 방법을 개발함으로써 상업적 규모로 제조될 수 있다. 첫번째로, 다양한 유형의 공급 방법, 예를 들어, 일괄 배양, 화학조절 배양 및 유가 배양이 이용될 수 있다. 두번째로, 산소 공급을 필요로 하는 방법 및 산소 공급을 필요로 하지 않는 방법을 이용할 수 있다. 세번째로, 생성물의 최대 수율을 가능케 하기 위해 시스템에서 유도가 발생하는 방식을 변화시킬 수 있다.

[0158] 담체 단백질의 발현과 대조적으로, N-결합 당화의 정도는 영양소 이용가능성, 탄소원 및 에너지원의 유형, 산소 공급 및 유도 시점의 변화에 강하게 반응하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 유가배양 방법에서, 일괄 배양물 및 유가배양 배양물로의 유도물질의 첨가는 특정 성장률을 즉시 3배 증가시키며, 이는 담체 단백질 및 막 결합된 올리고사카릴트랜스퍼라아제의 합성으로 인한 높은 대사적 부담 및/또는 스트레스를 나타낸다. 유도 후의 당화되지 않은 형태에 비해 당화된 담체 단백질의 출현의 반복 지연에 관한 본 발명자의 발견에 기초하여, 당화가 바이오컨주게이트 생합성에서 속도 제한적 단계인 결론내려졌다.

[0159] 이러한 결과에 기초하여, 본 발명의 구체예의 한 예에서, 배양을 위한 다음과 같은 방법의 계획이 개발되었다: 높은 세포 밀도를 달성하기 위한 유가 배양 방식; 최대 당화를 촉진하기 위한 유도 후의 연장된 배양; 생성 방법을 위한 기초적 성분(building block)의 충분한 공급을 제공하기 위한 유도까지의 바이오매스 형성 동안의 과잉 영양소 공급(예를 들어, LB 성분 효모 추출물 및 트립톤); 및 이화산물 억제 및 아세테이트 형성을 방지하기 위한 주요 탄소원 및 에너지원으로서의 글리세롤. 이러한 생물공정(bioprocess)은 LB 일괄 배양에 비해 수율에서의 50배 증가를 가능케 하고, 이는 상기 방법이 제조합 에스케리키아 콜리에서의 컨주게이트 백신의 비용 효과적 생성이 되도록 한다. 이러한 실시예에서, 생성 과정 전체에 걸쳐 산소 환경을 가질 수 있으며, 예를 들어, 이는 산소가 풍부한 통기를 통해 달성되나, 낮은 산소 함량이 또한 가능하다. 실시예 9는 보다 상세한 유가 배양 방법의 예를 기술한다. 그러나, 본 발명의 박테리아 LPS 바이오컨주게이트를 생성시키기 위해 다른 방법이 이용될 수 있음이 인지되어야 한다.

[0160] 결과적으로, 본 발명의 한 구체예에서, 당화된 단백질의 생체내 생성을 위해 E. 콜리가 이용될 수 있으며, 이는 당화된 단백질의 산업적 생성에 적합하다.

[0161] 하기 실시예는 본 발명을 추가로 예시하며, 이는 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0162] **실시예**

[0163] 실시예 1: N-당화를 최적화시키기 위한 모델 단백질로서의 AcrA의 선택

[0164] N-당화에 대한 수용체 단백질 필요조건을 최적화시키기 위해, C. 제주니 당단백질 AcrA(Cj0367c)에 대한 상세한 연구를 수행하였다. AcrA는 350개의 아미노산 잔기의 원형질막 주위공간 지질단백질이다. 원형질막 주위공간으로의 분비가 당화에 필수적이거나, 지질-앵커링(anchoring)은 필수적이지 않은 것으로 밝혀졌다(Nita-Lazar et

al., 2005, 상기). 외수송 신호는 E. 콜리에서 발견되는 경우 천연 AcrA 신호 서열이거나 이중성 PelB 신호일 수 있다. 5개의 잠재적인 N-결합 당화 세쿠온(sequon)(N117, N123, N147, N273, N274) 중, 동일한 2개의 세쿠온이 C. 제주니 및 E. 콜리에 사용된다(N123 및 N273 (Nita-Lazar et al., 2005, 상기)). AcrA를 모델로서 선택하였는데, 이는 상세한 구조적 정보가 이용가능한 C. 제주니의 유일한 원형질막 주위공간 N-당단백질이기 때문이다. 최근, AcrA 동족체인 그람-음성 박테리아 P. 아에루기노사로부터의 MexA 단백질의 결정 구조가 공개되었다(Higgins et al., (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 70f1 9994-9999). 둘 모두의 단백질은 소위 원형질막 주위공간 배출 펌프 단백질(PEP)의 일원이다(Johnson, J. M. and Church, G. M. (1999). Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. J. Mol. Biol. 287, 695-715)). 연장된 분자는 3개의 선형으로 배열된 서브도메인인 α -나선, 6개 가닥의 β -배럴(barrel) 도메인이 후속되는, 리포일 도메인에 의해 염기에서 함께 고정되는 역평행 코일드-코일(coiled-coil)을 함유한다. N-말단에서의 23-28 잔기 및 C-말단 내의 95-101 잔기가 결정에서 구조가 규명되지 않았다. MexA 및 AcrA 단백질 서열은 29.3% 동일하며, 50% 유사하다. 따라서, 2개의 단백질은 전체적으로 유사한 전체적인 접힘을 나타낼 것이다.

[0165] 실시예 2: 당화를 촉발시키는 일차 펩티드 서열의 설명

[0166] P. 아에루기노사의 MexA와 유사한 리포일 도메인 및 이에 따른 C. 제주니의 AcrA 내의 리포일 도메인이 E. 콜리에서 개별적으로 발견될 수 있는 치밀한 단백질을 형성하는 것이 공지되어 있다(Berg, A., and de Kok, A. (1997). 2-Oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. The central role of the lipoyl domain. Biol. Chem. 378, 617-634에 개관되어 있음). E. 콜리에서 *pgl* 기구에 의한 N-당화에 어떠한 수용체 펩티드 서열이 필요한지 확인하기 위해, AcrA의 리포일 도메인을 획득하였다. 이를 원형질막 주위공간으로 다양한 길이의 펩티드를 수송하고, 이를 생체내의 *pgl* 기구에 제시하기 위한 분자 스캐폴드(scaffold)로 사용하였다.

[0167] 따라서, 리포일 도메인(Lip)을 코딩하는 플라스미드를 작제하고, OmpA의 신호 서열에 N-말단으로 융합시키고(Choi, J. H., and Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol 64, 625-635), 헥사 히스테그(histag)에 C-말단으로 융합시켰다. 유전자 발현을 아라비노스 프로모터의 제어하에 두기 위해 클로닝을 수행하였다. Lip 도메인 경계를 위해, 동일한 위치에서 MexA 내의 리포일 도메인 부분의 도메인 경계로 보이는 아미노산 위치를 선택하였다. 수용 능력에 대해 다양한 펩티드를 시험하기 위해, 서열의 N-글리칸 스트레치(stretch)를 Lip 도메인의 2개의 망치머리형(hammerhead)-유사 부분 사이에 삽입하였다. 상기 스트레치는 C. 제주니 AcrA의 N-당화 부위 N123을 포함하는 서열로 구성되었다. 생성된 열린해독물은 OmpA 신호 서열을 코딩하는 서열, AcrA의 N-말단 망치머리형-유사 부분(D60-D95, 아미노산의 번호매김은 성숙 AcrA 폴리펩티드 서열 번호매김을 참조함), AcrA의 천연 N123 당화 부위를 함유하는 다양한 스트레치(하기 참조), AcrA-Lip의 C-말단 망치머리형-유사 부분(L167-D210) 및 C-말단 히스테그로 구성되었다.

[0168] 플라스미드의 작제를 표준 분자 생물학 기술에 의해 달성하였다. 상이한 길이의 AcrA의 천연 N123 당화 부위를 함유하는 3개의 스트레치를 Lip의 2개의 반쪽 사이에 삽입하여 3개의 상이한 ORF를 생성시켰다:

[0169] 작제물 A는 A118-S130을 함유하고, 하기와 같은 단백질 서열을 발생시킨다:

MKKTAIAIAVALAGFATVAQADVVIKPVSGVIVNKLKAGDKVKKGQTLFIIEQDQASK
DFNRSKALFSQLDHTEIKAPFDGTIGDALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADGSHHH
 HHH (서열 목록 번호: 8).

[0170]

[0171] 작제물 B는 F122-E138을 함유하고, 하기와 같은 단백질 서열을 발생시킨다:

MKKTAIAIAVALAGFATVAQADVVIKPVSGVIVNKLKAGDKVKKGQTLFIIEQDQFN
RSKALFSQSAISQKELDHTEIKAPFDGTIGDALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADGS
 HHHHHH (서열 목록 번호: 9).

[0172]

[0173] 작제물 C는 D121-A127을 함유하고, 하기와 같은 단백질 서열을 발생시킨다:

MKKTAIAlAVALAGFATVAQADVllKPQVSGVlVnKlFKAGDKVKKGQTLFllEQDQDF
NRSKALDHTElKAPFDGTlGDALVnIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADGSHllllllll

[0174] (서열 목록 번호:10).

[0175] 서열의 밑줄친 스트레치는 OmpA 신호 펩티드를 나타내며, 클로닝 이유 또는 단백질 내성이 붕괴되도록 하기 위해 단일하게 밑줄친 잔기가 도입되었다. 굵은 글씨: AcrA의 N123에 해당하는 당화 부위. 이탤릭체: 헥사-히스태그. 해당 유전자를 플라스미드 pEC415의 백본 내의 아라비노오스 프로모터의 조절하에서 발현시켰다(Schulz, H., Hennecke, H., and Thony-Meyer, L. (1998). Prototype of a heme chaperone essential for cytochrome c maturation. Science 281, 1197-1200).

[0176] 3개의 스트레치 중 어느 것이 Lip 단백질의 당화를 촉발시키는지 확인하기 위해, 단백질 발현 실험을 수행하였다. pACYCpgl 또는 pACYCpglmut(Wacker et al., 2002, 상기) 및 작제물 A, B 또는 C를 코딩하는 플라스미드를 지니는 E. 콜리 Top 10 세포(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 앰피실린 및 클로람페니콜을 함유하는 LB 배지에서 37°C에서 0.5의 OD까지 성장시켰다. 유도를 위해, 1/1000 부피의 20% 아라비노오스(w/v) 용액을 첨가하고, 또 다른 2시간 동안 세포를 성장시켰다. 이후, 원심분리에 의해 세포를 수거하고, 20 mM Tris/HCl, pH 8.5, 20% 수크로오스(w/v), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF 및 1 g/l(w/v) 리소자임에 재현탁시키고, 1시간 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 스페로블라스트(spheroblast)의 펠렛화 후에 원형질막 주위공간 추출물을 수득하고, 1/9 부피(v/v)의 10x 완충액 A(3M NaCl, 0.5 M Tris/HCl, pH 8.0 및 0.1M 이미다졸)로 희석시키고, MgSO₄를 2.5 mM로 첨가하였다. 완충액 A 중에서 아머삼 파르마시아 바이오테크사(Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden))로부터의 1 ml Ni-세파로오스 컬럼 상에서 Ni-친환성 정제를 수행하였다. 단백질을 0.25 M 이미다졸을 함유하는 완충액 A에서 용출시켰다.

[0177] 도 1은 Ni-정제된 원형질막 주위공간 추출물로부터의 피크 용출 분획의 쿠마시 브릴리언트 블루 염색된 SDS-PAGE 젤을 도시한다. 발현 분석은 작제물 B가 현저한 단일 단백질 종을 생성한 것을 나타내었다(도 1, 라인 1). 작제물 A 및 C 둘 모두는 현저한 단백질 외에, 보다 느린 전기영동 이동성을 갖는 제2의 단백질 밴드를 발생시켰다(도 1, 라인 2 및 3). 보다 무거운 단백질 종이 또한 당화된 것이 MALDI-TOF/TOF에 의해 입증되었다(도시되지 않음). 작제물 B에서는 실증되었으나, A 및 C에는 존재하는 유일한 아미노산은 D121이었으며, 이는 당화된 N123에 대해 N-말단쪽으로서의 2 위치의 아스파테이트 잔기이다. 이는 D121이 OTase에 의한 당화에 중요한 역할을 하는 하는 것을 입증한다. D121이 당화에 필수적인 것을 확인하기 위해, 이를 작제물 C에서 알라닌으로 돌연변이시켰다. 발현 분석은 단지 1개의 단백질 밴드를 발생시켰으며(도 1, 라인 4), 따라서 이는 D121이 당화에 중요함을 나타낸다. 더욱이, 인공 펩티드 전사 단백질이 당화될 수 있다는 사실은 D/E-X-N-Y-S/T 유형의 짧은 펩티드가 C. 제주니가 가진 N-당화가 발생하기 위한 모든 정보를 함유하는 것을 나타낸다.

[0178] 실시예 3: 실시예 2의 확인; AcrA-D121A는 N123에서 당화되지 않는다.

[0179] 펩티드 제시 방법으로부터의 발견을 확인하기 위해, 아스파테이트에서 알라닌으로의 돌연변이를 AcrA 단백질의 전장의 가용성 형태 내의 위치121(D121A, 즉, 당화되는 N123 2개 앞의 잔기)에 삽입시키고, 부위 N123이 여전히 E. 콜리에서 당화될 수 있는지 시험하였다. 이를 시험하기 위해, AcrA-D121A를 발현시키고, 이의 당화 상태를 분석하였다. 분석을 위해, 설계된 AcrA를 사용하였다. 이는 원형질막 주위공간으로서의 분비를 위해 PelB 신호 서열(Choi and Lee, 2004, 상기) 및 정제를 위해 C-말단 헥사 히스태그를 함유하는 점에서 본래의 C. 제주니 유전자와 상이하였다. 이러한 AcrA 변이체가 분비되었고, 신호 펩티드가 분해되었고, 지질 앵커링된 천연 단백질과 같이 당화된 것으로 밝혀졌다(Nita-Lazar et al., 2005, 상기). 하기는 가용성 AcrA 단백질의 아미노산 서열이다:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMHMSKEEAPKIQMPPQPVTTMSAKSEDLPLS/TYPA
KLVSDYDVIIKPVSGVIVNKLFKAGDKVKKGQTLFIEQDKFKASVDSAYGQALMAKA
TFENASKDFNRSKALFSKSAISQKEYDSSLATFNNSKASLASARAQLANARIDLHTEIK
APFDGTIGDALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADFFISDTDKLNLVRNTQSGKWLDL
SIHANLNLNGETVQGKLYFIDSVIDANS GTVKAKAVFDNNNSTLLPGAFATITSEGFQK
NGFKVPQIGVKQDQNDVYVLLVKNKGVEKSSVHSYQNNEYAIIDKGLQNGDKIILDNF
KKIQVGSEVKEIGAQLEHHHHHH (서열 목록 번호:11)

[0180]

[0181]

밀출친 잔기는 Pe1B 신호 펩티드이고, 이텔릭체는 헥사-히스태그이고, 굵은 글씨는 N123 및 N273에서의 두개의 친연 당화 부위이다. pEC415 플라스미드(Schulz et al., 1998) 내의 상기 단백질에 대한 ORF를 함유하는 플라스미드를 pAcrAper을 생성하기 위해 삭제하였다.

[0182]

AcrA 및 이의 돌연변이의 당화 상태를 시험하기 위한 검정(하기 참조)은 하기와 같다: 활성 또는 비활성 형태의 플라스미드-함유(borne) *pgl* 오페론(pACYCpg/ 또는 pACYCpg/mut, (Wacker et al., 2002, 상기) 참조) 및 AcrA를 코딩하는 플라스미드(pAcrAper)를 함유하는 지수적으로 성장하는 E. 콜리 CLM24(Feldman et al., 2005, 상기) 세포에서 0.02% 아라비노오스를 이용하여 AcrA의 발현을 유도하였다. 유도 4시간 후, 상기 기재된 바와 같이 원형질막 주위공간 추출물을 제조하고, SDS-PAGE, 전기이동(electrotransfer) 및 항-AcrA 항혈청 또는 R12 항혈청을 이용한 면역검출에 의해 분석하였다. R12 항혈청은 C. 제주니 N-글리칸 함유 단백질에 대해 특이적이다(Wacker et al., 2002, 상기).

[0183]

도 2A의 처음 2개의 레인은 기능성 *pgl* 오페론의 부재 및 존재하에서의 AcrA를 도시한다. 기능성 *pgl* 오페론의 부재하에서는 단지 1개의 밴드가 나타나지만, 이의 존재하에서는 3개의 밴드가 나타난다(도 2A, 상부 패널). 이는 당화되지 않은 AcrA(레인 1) 및 당화되지 않은 AcrA, 일당화된(monoglycosylated) AcrA 및 이당화된(diglycosylated) AcrA(레인 2)에 해당한다. 레인 2의 2개의 보다 무거운 단백질이 당화된 것이 R12 웨스턴 블롯에 의해 확인되었다(레인 2, 하부 패널). 돌연변이 AcrA-N273Q가 동일한 방식으로 발현되는 경우, 기능성 당화 *pgl* 오페론의 존재하에서 일당화된 AcrA만이 검출되었다(레인 3). 기능성 *pgl* 유전자좌의 부재하에서 당화되지 않은 AcrA가 검출되었다(레인 4). 돌연변이 AcrA-D121A의 분석은 2개의 밴드만을 생성시켰고, 이 중 하나가 레인 3에서 AcrA-N273Q를 이용하여 관찰된 바와 같이 당화되었다(레인 5). 이는 D121이 위치 123-125에서 효과적인 당화에 필수적인 것을 의미한다.

[0184]

실시예 4: AcrA로의 인공 당화 부위의 도입

[0185]

아스파테이트 잔기의 도입이 당화 부위를 발생시킬 수 있는지 시험하기 위해, 가용성 AcrA의 위치 N117 및 N147 내의 사용되지 않은 당화 부위의 -2 위치의 잔기가 아스파테이트로 교환(F115D, T145D)된 AcrA 돌연변이를 발생시켰다. 이후, 변형된 당화 부위가 실시예 2에 기재된 바와 동일한 검정에 의해 당화될 수 있는지 시험하였다. 둘 모두의 돌연변이를 개별적으로 AcrA의 가용성 형태의 야생형 서열, 또는 둘 모두의 사용되는 당화 부위가 결실(N123Q 및 N273Q)된 이중 돌연변이에 삽입하였다. 4시간 동안 유도된 배양물의 원형질막 주위공간 추출물을 제조하고, SDS-PAGE에 의해 분리시키고, 웨스턴 블로팅에 의해 분석하였다(도 2B). 대조군으로서, 야생형의 당화된 AcrA 및 당화되지 않은 AcrA의 샘플을 동일한 젤에서 영동시켰다(레인 1 및 2). T145D 돌연변이는 친연적으로 사용되지 않는 당화 세쿠온 N147-S149의 -2 위치에 영향을 미쳤다. AcrA-T145D의 발현 후, 항 AcrA 항혈청을 이용한 웨스턴 블로팅은 4개의 밴드를 발생시켰고, 이 중 가장 높은 밴드는 레인 2의 이중으로 당화된 단백질보다 느린 전기이동 이동성을 갖는다(도 2B의 레인 3). R12 블롯은 네번째 밴드가 삼중으로 당화된 AcrA였음을 입증하였다. 항 AcrA에 대한 낮은 강도에도 불구하고, 가장 무거운 밴드는 당화 특이적 R12 항혈청을 이용하여 가장 강한 신호를 발생시켰다. 동일한 돌연변이 AcrA-T145D가 친연 N-당화 서열(AcrA-N123Q-N273Q-T145D)의 부재하에서 발현되는 경우, 기능성 *pgl* 오페론의 존재하에서 일당화된 AcrA만이 검출되었고(도 2B, 레인 4), 이는 기능성 *pgl* 오페론의 부재하에서 실증되었다(레인 5). 이는 레인 4의 가장 무거운 밴드가 당화된 것을 입증한다. 그러므로, T145D 돌연변이의 간단한 도입에 의해, 최적화된 당화 부위가 생성되었다(DFNNS).

[0186]

-2 위치에 아스파테이트 잔기를 삽입함으로써 당화 부위를 도입시키는 것이 가능한지 추가로 확인하기 위해, 친연적으로 사용되지 않는 부위 N117-S119 및 N274-T276을 변경시켜, N-당화를 최적화시켰다. 이를 위해, 추가 돌연변이를 발생시켰다(도 2C). 상기 기재된 시스템에서의 AcrA-F115D-T145D의 발현은 항 AcrA 항혈청으로 검출된 5개의 단백질 종을 발생시켰다(레인 2). 이는 동일한 AcrA 분자에서 발생하는 4개의 당화물을 나타낸다. 검출이 C. 제주니 N-글리칸-특이적 R12 항혈청으로 수행되는 경우, 5개 밴드의 래터가 검출되었다. 가장 낮은

희미한 밴드는 당화의 부재하에서도 존재하므로 당화되지 않은 AcrA이며(레인 1), 가장 높은 밴드는 아마도 4중으로 당화된 AcrA 내의 5개의 항원성 결정기로 인해 강한 신호를 발생시켰다. 따라서, 2개의 도입된 부위(N117 및 N147) 및 2개의 천연적으로 사용되는 부위(N123 및 N273)이 사용되고, *pgl* 기구에 의해 당화된다. *pgl* 오페론을 갖거나 갖지 않는 AcrA-N123Q-N273Q-N272D의 발현은 제3의 인공적으로 도입된 당화 부위 N274(DNNST)가 또한 *pgl* 오페론에 의해 인지된 것을 입증하였다(도 2C, 레인 3 및 4).

[0187] 상기 실험은 C. 제주니의 OTase에 의해 인지되는 박테리아 N-당화 부위가 진핵생물의 컨센서스와 동일한 컨센서스(N - X - S/T, X≠P임)로 부분적으로 구성되나, 또한 -2 위치의 아스파테이트가 효율을 증가시키는데 필요하다는 발견을 입증한다. 더욱이, 본 발명자는 상기 최적화된 컨센서스 서열을 재조합적으로 도입시킴으로써 요구되는 부위에서 단백질을 당화시키는 것이 가능한 것을 입증한다.

[0188] 실시예 5: 최적화된 N-당화 서열 내의 위치 -1의 확인

[0189] 박테리아 당화 부위 내의 -1 위치가 진핵생물 내의 +1 위치와 동일한 제한을 나타내는지 시험하기 위해 추가 실험을 수행하였다(Imperiali, B., and Shannon, K.L. (1991). Differences between Asn-Xaa-Thr-containing peptides: a comparison of solution conformation and substrate behaviour with oligosaccharyl-transferase. *Biochemistry* 30, 4374-4380; Rudd, P.M., and Dwek, R.A. (1997). Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 1-100). +1의 프롤린 잔기는 당화가 억제되는 방식으로 펩티드를 제한하는 것으로 생각된다. -1 위치에서 유사한 효과가 또한 관찰될 수 있는지 시험하기 위해, 제 2의 천연 부위가 녹아웃(knock out)된 점 돌연변이 내의 제1의 천연적으로 사용되는 부위의 위치에 프롤린 잔기를 도입시켰다(AcrA-N273Q-F122P). AcrA-N273Q의 조절 발현은 기능성 *pgl* 오페론의 존재하에서 일당화된 단백질을 나타내었다(도 2D, 레인 1 및 2). 그러나, AcrA-N273Q-F122P는 당화되지 않았다(도 2D, 레인 3 및 4). 이는 프롤린이 아스파라긴과 -2 위치의 음성으로 하전된 잔기 사이의 잔기를 구성하는 경우에 상기 프롤린이 박테리아 N-당화를 억제하는 것을 나타낸다.

[0190] C. 제주니 *pgl* 기구에 의해 당화되는 것으로 공지된 모든 부위의 서열 정렬은 이들 모두가 -2 위치에 D 또는 E를 포함하는 것을 나타낸다(Nita-Lazar et al., 2005, 상기; Wacker et al., 2002, 상기; Young et al., (2002). Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* 277, 42530-42539). 따라서, 박테리아에 대한 당화 컨센서스 서열이 -2 위치에서 음성으로 하전된 아미노산에 의해 최적화되어, D/E - X - N - Z - S/T(여기서, X & Z ≠ P임)를 발생시킬 수 있음이 확립되었다.

[0191] 실시예 6: 비-C. 제주니 단백질의 N-당화

[0192] 박테리아에서의 N-당화에 대해 일차 서열 필요조건(최적화된 컨센서스 서열)이 충분한지 입증하기 위해, 비-C. 제주니 단백질이 상기 방법을 적용함으로써 당화될 수 있는지 시험하였다. 당화 표적으로 콜레라 독소 B 서브 유닛(CtxB)을 이용하였다. 실시예 1의 작제물 A 내지 C와 거의 동일하게, N-말단 상의 OmpA 신호 서열 및 C-말단의 헥사히스테그의 코딩 서열을 함유하도록 하는 방식으로 비브리오 콜레라로부터 해당 유전자를 증폭시켰다. 생성된 DNA를 실시예 1에서 사용된 플라스미드 내의 작제물 A를 대체하도록 클로닝시켰다. W88의 D로의 점 돌연변이 또는 W88 뒤의 D 삽입은 최적화된 당화 부위(DNNKT)를 발생시켰다. 야생형 및 신호 서열 및 히스-태그를 함유하는 W88D CtxB 단백질을 C. 제주니로부터의 기능성 *pgl* 유전자좌의 존재 및 부재하에서 E. 콜리 Top 10 및 다른 세포 유형에서 발현시켰다. Top 10 세포로부터의 원형질막 주위공간 추출물을 SDS-PAGE, 전기이동 및 CtxB 항혈청을 이용한 연속적인 면역블로팅으로 분석하는 경우, CtxB W88D 만이 *pgl* 유전자좌 백그라운드에서 보다 높은, 이에 따라 당화된 밴드를 발생시켰다(도 2E, 레인 3 및 4 비교). CtxB의 G54 또는 Q56, 즉, CtxB의 강글리오시드 GM 1 결합 활성에 기여하는 것으로 보고된 루프 중 하나를 대체함으로써 컨센서스 서열(DSNIT)을 또한 삽입시켰다(Q56 대체는 CtxB-Q56/DSNIT로 표시됨). 도 2E의 레인 5 및 6은 설계된 단백질(Top 10 세포에서 발현된 Q56 대신 펩티드 서열 DSNIT를 함유하는 작제물에 의해 예시됨)이 낮은 이동성을 발생시키고, 이에 따라 상기 기재된 것과 동일한 방식으로 분석되는 경우에 당화 적격인 세포에서 당화된 밴드를 발생시키나, 당화-결핍 세포에서는 당화된 밴드를 발생시키지 않는 것을 입증한다. 2개의 조작, 즉, W88 뒤의 D의 삽입 뿐만 아니라 Q56을 대체하는 DSNIT를 함유하는 CtxB가 SCM7 세포에서 이중 당화된 것이 또한 입증되었다(Alaimo et al., *EMBO Journal* 25: 967-976 (2006)) (패널 E, 레인 7 및 8). 레인 7에 도시된 이중 당화된 단백질 CtxB를 Ni²⁺ 친화성 정제시키고, 표준 프로토콜에 따른 젤내(in-gel) 트립신처리 후에 ESI-MS/MS로 분석하였다. 예상 당펩티드가 검출되었고, 이는 박테리아 N-당화에 대해 본 발명에 따른 최적화된 컨센서스 서열을 돌연변이시키거나 이를 삽입함으로써 박테리아 N-당화가 또한 비-C. 제주니 단백질과 관련될 수 있음을 입증한다(데이터는

나타내지 않음). 본 발명을 실시하기 위한 다른 적합한 예시적 E. 콜리 균주의 예는 W3110, CLM24, BL21(Stratagene, La Jolla, CA, USA), SCM6 및 SCM7이다.

[0193] 본원에서 사용되는 CtxB 단백질의 아미노산 서열이 하기 제시된다(재조합 OmpA 신호 서열에는 밑줄이 있고, 핵사-히스테그는 이탤릭체이고, W88은 굵은 글씨로 되어 있음):

**MKKTAI~~AI~~AV~~AL~~AGFATVAQATPQNITDLCAEYHNTQIH~~TL~~NDKIFSYTESLAGKREMAI
ITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKD~~TL~~RIAYL~~TE~~AKVEKLCVWNNKTPHAI~~AAI~~
SMANGSHHHHHH** (서열 목록 번호:12)

[0194] 실시예 7: C. 제주니 외막 단백질 OmpH1으로의 인공 N-당화 부위의 도입

[0196] 박테리아에서의 N-당화의 잠재적 적용은 표현형과 유전형을 연관시킴으로써 특정한 유전적 돌연변이를 선택하기 위한 박테리아 숙주 세포의 표면 상에서의 글리칸의 제시이다. N-글리칸이 외막 단백질에서 제시될 수 있는지 입증하기 위해, OmpH1 단백질을 본 발명에 따른 다수의 최적화된 컨센서스 부위를 함유하도록 하는 방식으로 설계하였다. 상기 부위를 공지된 결정 구조로부터 추론된 바와 같은 단백질의 루프 영역 내로 설계하였다 (Muller, A., Thomas, G. H., Horler, R., Brannigan, J.A., Blagova, E., Levnikov, V.M., Fogg, M.J., Wilson, K.S., and Wilkinson, A.J. 2005. An ATP-binding cassette-type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein. Mol. Microbiol. 57: 143-155). 이전의 실험은 최적의 당화 세쿠온이 돌연변이 V83T, K59N-G601-N61T, R190N-G191I-D192T 및 H263D-F264S-G265N-D266I-D267T에 의해 발생된 것을 나타내었다. 표면 제시를 위해, 대부분의 N-글리칸-특이적 샘플을 확립시키기 위해 도입된 부위의 다양한 조합을 평가하는 것이 요망되었다. 조합을 야생형 OmpH1 엔코딩 플라스미드 작제물에서 발생시켰고, AcrA에 대해 기술된 것과 유사한 방식으로 시험하였다. 도 3은 현존하는 야생형 세쿠온 외에 다수의 당화 세쿠온을 갖는 다양한 OmpH1 변이체의 분석을 도시한다. 3개 (라인 3, 4, 5 및 7) 및 4개의 당화 세쿠온(라인 6)을 이용하여 OmpH1 변이체를 발생시켰다. 단지 하나의 당화 세쿠온을 갖는 야생형 OmpH1 및 당화에 중요한 아스파라긴이 결핍된 돌연변이를 또한 실험에 포함시켰다. 여기서 시험된 모든 변이체는 높은 수준의 당화 효율을 입증할 뿐만 아니라, 모든 당화 세쿠온이 사용된 것을 입증하였다. 상기 결과는 캄필로박터 N-글리칸 특이적 면역혈청을 이용하여 확증되었다(도 3 하부 패널).

[0197] 하기 서열은 이탤릭체의 부착된 myc 태그를 갖는 캄필로박터 제주니(균주 81-176)의 OmpH1 단백질의 아미노산 서열이다:

**MKKILLSVLTTFVAVVLAACGGNSDKTLNSLDKIKQNGWRIGVFGDKPPFGYVDEKG
NNQGYDIALAKRIAKELFGDENKVQFVLVEAANRVEFLKSNKVDIILANFTQTPERAEQ
VDFCLPYMKVALGVAVPKDSNITSVEDLKDKTLLLNKGTTADAYFTQDYPNIKTLKYD
QNTETFAALMDKRGDALSHDNTLLFAWVKDHPDFKMGIKELGNKDVIAPAVKKGDKE
LKEFIDNLIKLGQEQFFHKAYDETLKAHFGDDVKADDWIEGGKILEQKL/SEEDL** (서열 목록 번호:13)

[0198] 단백질 내의 천연 당화 부위는 굵은 글씨이고, 신호 서열에는 밑줄이 있다.

[0200] 실시예 8: E. 콜리 세포의 외막 상의 OmpH1 상의 C. 제주니로부터의 N-글리칸의 표면 제시

[0201] 다수의 당화된 OmpH1 변이체가 박테리아 세포의 표면 상에 제시될 수 있는지의 의문에 답하기 위해, 다양한 OmpH1 변이체를 발현하는 박테리아 CLM24 또는 SCM6(이는 SCM7 ΔwaaL임) 세포에 대해 면역형광을 수행하였다. 야생형 OmpH1 및 당화에 중요한 아스파라긴이 결핍된 돌연변이를 실험에 포함시켰다. 또한, 원형질막 주위공간 내에 단백질을 보유시킴으로써, 실험에서 대조군으로 작용시키기 위해 C20S 돌연변이를 작제하였다. 파라포름 알데히드로 처리된 세포에서 면역염색을 수행하였다. 파라포름알데히드는 세포 구조를 파괴하거나 구획화 없이 세포를 고정시킨다. FITC 및 Cy3에 컨쥬레이션된 해당 이차 항체와 함께 c-Myc-특이적 및 N-글리칸-특이적 면역혈청을 박테리아 세포 표면 상의 단백질(적색 형광) 및 N-글리칸(녹색) 각각을 검출하기 위해 사용하였다. 추가로, 4,6-디아미노-2-페닐인돌(DAPI, 청색)을 박테리아 세포와 세포 부스리기 사이를 명백히 구별하기 위해 박테리아 DNA에 대한 염색에 사용하였다. 야생형 OmpH1을 발현하는 세포를 염색한 경우, 단백질 뿐만 아니라 N-글리칸에 특이적인 면역형광이 검출되었다(도 4A). 중요한 아스파라긴 N139S가 결핍된 돌연변이를 항-Myc-특이적 및 N-글리칸-특이적 면역혈청 둘 모두로 염색하는 경우, 단백질 특이적 신호만이 수득되고, 글리칸 특이적 신호는 수득되지 않았으며(패널 4B), 이는 N-글리칸-특이적 면역혈청의 특이성을 나타낸다. C20S 돌연변이에서

와 같이 원형질막 주위공간 내에 단백질이 보유되는 경우, 단백질 특이적인 적색 면역형광이 검출되지 않았고, 이는 항체가 세포 내에 확산될 수 없었고, 임의의 표면 현상을 검출하기에 충분히 적격임을 나타낸다(패널 4C). 다음으로, 다양하게 당화된 다수의 OmpH1 변이체를 발현하는 세포를 염색하였다: OmpH1^{KGN→NIT, HFGDD→DSNIT} (패널 4D), OmpH1^{RGD→NIT, HFGDD→DSNIT} (패널 4E), OmpH1^{KGN→NIT, RGD→NIT} (패널 4F), OmpH1^{V83T, KGN→NIT} (패널 4G) 및 OmpH1^{KGN→NIT, RGD→NIT, HFGDD→DSNIT} (패널 4H). 모든 OmpH1 변이체를 이중 염색하였고, 이는 박테리아 표면 상에 당화된 단백질의 존재를 나타낸다. 도 4는 그레이스케일(grayscale)로 제시되며, 첫번째 컬럼은 동일한 열의 다른 도면의 합병된 도면이다.

[0202] 도 4는 다양한 OmpH1 변이체를 발현하는 세포의 형광현미경 검사를 도시한다. 야생형 OmpH1 및 이의 변이체에 대한 발현 플라스미드를 포함하는 E. 콜리 균주 CLM24 또는 SCM6의 배양물을 0.25/ml의 OD₆₀₀으로 표준화시켰다. 세포를 인산염 완충 염수(PBS)(pH 7.4)로 2회 세척하고, 100 μl의 세포 현탁액을 젤라틴화된 유리 슬라이드로 적하시키고, 가습화된 챔버 내에서 30분 동안 실온(RT)에서 인큐베이션하였다. 전체 세포 면역형광 라벨링에서의 이후의 모든 단계를 가습화된 챔버 내에서 실온에서 수행하였다. 결합되지 않은 세포를 제거하고, 나머지를 실온에서 30분 동안 4% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS로 고정시켰다. 중요하게는, 파라포름알데히드는 세포를 투과화시키지 않고, 막에 의한 구획화를 온전하게 유지시키는 것으로 간주된다. 고정된 세포를 PBS로 2회 세척하고, PBS 중에 5% BSA를 함유하는 블로킹 완충액에 재현탁시켰다. 블로킹 후, 세포를 5% BSA를 함유하는 100 μl의 PBS 중에 1시간 동안 항-myc 모노클로날 마우스 IgG(1:50, Calbiochem) 및/또는 항-글리칸 항혈청(1:4000)과 함께 인큐베이션하였다. 세포를 각각 5분 동안 100 μl의 PBS로 3회 세척하고, 5% BSA를 함유하는 100 μl의 PBS 중에서 1시간 동안 FITC에 컨쥬게이션된 이차 항-라빗 항체(1:250, Jackson ImmunoResearch Laboratories) 및/또는 Cy3에 컨쥬게이션된 항-마우스 항체(1:250, Jackson ImmunoResearch Laboratories)와 함께 인큐베이션하였다. 요망시, 4,6-디아미노-2-페닐인돌(DAPI)(Sigma)(0.5 μg/ml)을 박테리아 DNA를 염색하기 위한 이차 항체 인큐베이션 시점에 첨가하였다. 이차 항체를 세포 PBS₁로부터 행구고, 배지를 마운팅하는 벡터실드(vectashield)(Vector Laboratories)를 이용하여 슬라이드 상에 덮개유리를 마운팅하고, 매니큐어로 밀봉하였다. 액시오플랜2(Axioplan2) 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 형광현미경 검사를 수행하였다. 어도비 포토샵(Adobe Photoshop) 버전 CS2를 이용하여 이미지를 조합시켰다. OmpH1(패널 A), OmpH1^{N139S}(패널 B), OmpH1^{C20S}(패널 C), OmpH1^{KGN→NIT, HFGDD→DSNIT}(패널 D), OmpH1^{RGD→NIT, HFGDD→DSNIT}(패널 E), OmpH1^{KGN→NIT, RGD→NIT}(패널 F), OmpH1^{V83T, KGN→NIT}(패널 G), 및 OmpH1^{KGN→NIT, RGD→NIT, HFGDD→DSNIT}(패널 H)를 발현하는 SCM6 세포. 첫번째 컬럼은 흑색 배경 상의 그레이톤으로 제시된 컬럼 2, 3 및 4의 도면의 병합이다. 컬럼 2: DAPI 염색으로부터의 그레이톤 중의 청색 형광, 컬럼 3: 글리칸 특이적 형광으로부터의 녹색 형광, 컬럼 4: 항-myc 염색으로부터의 적색 형광.

[0203] 실시예 9: 시겔라 01 LPS 바이오컨쥬게이트에 대한 생성 방법의 예

[0204] 이는 생성 방법의 예이나, 상이한 조건이 또한 유사한 생성물을 형성할 수 있다.

[0205] A. 생성 방법

[0206] PgIB, EPA 및 시겔라 01 다당류의 생합성을 위한 효소를 발현하는 3개의 플라스미드를 함유하는 E. 콜리 균주 W3110 ΔwaaL을 LPS 바이오컨쥬게이트의 생성을 위해 사용하였다. 단일 콜로니를 50 ml LB 배지에 접종시키고, 37°C에서 밤새 성장시켰다. 배양물을 21개의 생물반응기에서의 11개의 배양물을 접종시키기 위해 사용하였다. 생물반응기를 500 rpm으로 교반시키고, 2M KOH 또는 20% H₃PO₄의 자동 제어 첨가에 의해 pH를 7.0으로 유지시키고, 배양 온도를 37°C로 설정하였다. 용해된 산소(pO₂)의 수준을 0 내지 10% 산소로 유지시켰다. 세포를 카나마이신을 함유하는 반 규명된 글리세롤 배지에서 OD₆₀₀ = 15로 성장시켰다. 배지는 다음과 같은 성분을 함유하였다: 330 mM 글리세롤, 10 g 효모 추출물, 20 g 트립톤, 34 mM K₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 38 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄ · 7H₂O 및 5mM 시트르산. 최초 일괄 배양 상태 약 5시간 후, 첫번째 영양소 적용량(pulse)을 첨가하여 신속한 바이오매스 조성(글리세롤, 트립톤 및 효모 추출물)을 유지시켰다. 추가 1.5시간 후, 배양물은 OD₆₀₀ = 30에 도달하였다. 이러한 시점에서, 글리세롤 및 트립톤의 두번째 영양소 적용량을 요망되는 유도물질 1% L-아라비노오스 및 1 mM IPTG와 함께 첨가하였다. 유도를 최대 수준으로 유지시키고, 재조합 단백질 합성을 위한 추가의 아미노산을 공급하기 위해, 상기 적용량과 함께 선형 영양소/유도물질 공급(28.8ml/h)을 개시하였다. 상기 방법의 종료시까지 상기 공급을 유지시켰다. 생물반응기 배양물을 전체 ~ 24시간의 배양 후에 수거하였고,

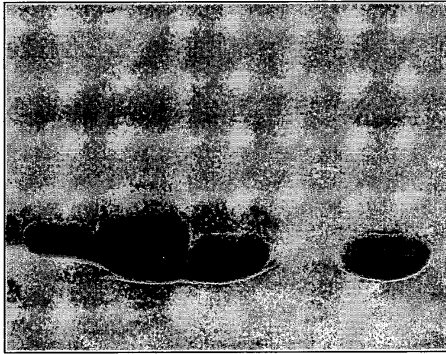
이때 배양물은 ± 80 의 OD₆₀₀에 도달하여야 한다.

- [0207] 생성 과정을 이전에 기재된 바와 같이 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다(Wacker, M., *et al.*, N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. Science, 2002. 298(5599): p. 1790-3.). 니트로셀룰로오스 막에 블로팅한 후, 샘플을 특정 항-EPA(Wacker, M., *et al.*, N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. Science, 2002. 298(5599): p. 1790-3.)로 면역염색하였다. 이차 항체로 항-래빗 IgG-HRP(Biorad)를 사용하였다. ECL™ 웨스턴 블로팅 검출 시약(Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire)으로 검출을 수행하였다.
- [0208] 도 16A는 바이오매스 농도(라인 당 0.1 OD₆₀₀의 세포)로 표준화된 유가 배양 방법으로부터의 시겔라 O1 LPS 바이오컨쥬게이트(즉, EPA-O1)의 추출된 단백질을 도시한다. 단백질을 SDS-PAGE로 분리시키고, 니트로셀룰로오스 막으로 이동시키고, 래빗 항 EPA 항체로 시각화시켰다. PglB 및 EPA 발현에 대한 유도 시간은 1시간 및 밤새(O/N)였다.
- [0209] B. 원형질막 주위공간 단백질 추출
- [0210] 10,000 g에서 20분 동안의 원심분리에 의해 세포를 수거하고, 1 부피의 0.9% NaCl에 재현탁시켰다. 세포를 7,000 g에서 25-30분 동안의 원심분리에 의해 펠렛화시켰다. 세포를 현탁 완충액(25% 수크로오스, 100 mM EDTA 200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 OD/ml)에 재현탁시키고, 현탁액을 30분 동안 4-8℃에서 교반하에서 인큐베이션하였다. 현탁액을 7,000-10,000 g에서 30분 동안 4-8℃에서 원심분리시켰다. 현탁액을 폐기하고, 세포를 동일 부피의 얼음 냉각된 20 mM Tris HCl(pH 8.5)에 재현탁시키고, 30분 동안 4-8℃에서 교반하에서 인큐베이션시켰다. 스페로블라스트(spheroblast)를 10,000 g에서 25-30분 동안 4-8℃에서 원심분리하고, 상층액을 수거하고, 0.2 μ 막을 통해 통과시켰다.
- [0211] 도 16B에 도시된 바와 같이, 원형질막 주위공간 추출물을 7.5% SDS-PAGE에 로딩하고, EPA 및 EPA-O1을 확인하기 위해 쿠마시로 염색하였다. EPA는 70kDa 마커 위에서 이동하는 두꺼운 밴드이다. O1-EPA(즉, EPA-O1)은 100 및 170kDa 사이에서 리더(leader)로서 이동한다.
- [0212] C. 바이오컨쥬게이트 정제
- [0213] 100,000 OD의 세포로부터 수득된 원형질막 주위공간 단백질을 함유하는 상층액을 완충액 A(20 mM Tris HCl pH 8.0)로 평형화된 소스 Q(Source Q) 음이온 교환 컬럼(XK 26/40 ~ 180 ml 베드(bed) 물질)에 로딩시켰다. 5 컬럼 부피(CV)의 완충액 A로 세척 후, 15CV 내지 50%의 완충액 B(20mM Tris HCl + 1M NaCl pH 8.0), 및 이후 2CV 내지 100%의 완충액 B의 선형 구배를 이용하여 단백질을 용출시켰다. 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 쿠마시로 염색하였다. O1-EPA를 함유하는 분획을 풀링하였다. 일반적으로, 바이오컨쥬게이트를 6 내지 17 mS의 전도도에서 용출시켰다. 샘플을 10배 농축시키고, 완충액을 20 mM Tris HCl pH 8.0로 교환하였다.
- [0214] 도 17A에 도시된 바와 같이, 1. 소스 Q로부터의 단백질 분획을 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 쿠마시로 염색하였다. 분획 C1 내지 G9는 O1 바이오컨쥬게이트를 함유하였고, 이를 풀링하였다.
- [0215] O1-바이오컨쥬게이트를 완충액 A: 20 mM Tris HCl(pH 8.0)로 평형화된 소스 Q 컬럼(XK 16/ 20 ~ 28 ml 베드 물질) 상에 2회 로딩하였다. 바이오컨쥬게이트를 용출하기 위해 상기에 사용된 것과 동일한 구배를 이용하였다. 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 쿠마시로 염색하였다. O1-EPA를 함유하는 분획을 풀링하였다. 일반적으로, 바이오컨쥬게이트를 6 내지 17 mS의 전도도에서 용출시켰다. 샘플을 10배 농축시키고, 완충액을 20 mM Tris HCl(pH 8.0)로 교환하였다.
- [0216] 도 17B에 도시된 바와 같이, 2. 소스 Q 컬럼으로부터의 단백질 분획을 SDS-PAGE에서 분석하고, 쿠마시로 염색하였다. O1 바이오컨쥬게이트를 함유하는 분획 A11 내지 B3을 풀링하였다.
- [0217] O1-바이오컨쥬게이트를 20 mM Tris HCl pH 8.0로 평형화된 슈퍼덱스 200(Superdex 200)(Hi Load 26/60, prep grade)에 로딩하였다.
- [0218] 도 18A에 도시된 바와 같이, 슈퍼덱스 200 컬럼으로부터의 단백질 분획을 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 쿠마시로 염색으로 염색하였다. 분획 F1 내지 F11을 풀링하였다.
- [0219] 도 18B에 도시된 바와 같이, 다양한 정제 단계로부터의 시겔라 바이오컨쥬게이트를 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 쿠마시로 염색하였다. O1-EPA를 상기 방법을 이용하여 98% 이상의 순도로 정제하였고, 이는 O1-EPA 바이오컨쥬게이트가 상기 기술을 이용하여 성공적으로 생성될 수 있는 것을 나타낸다.

도면

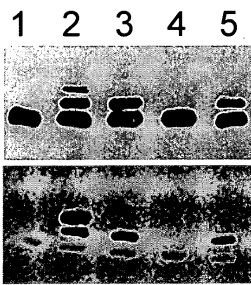
도면1

1 2 3 4



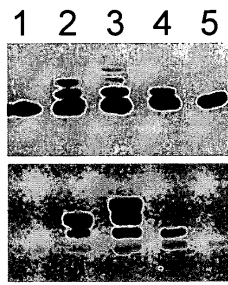
도면2

A



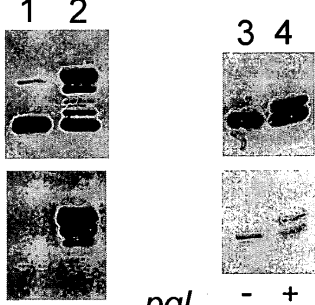
- + + - + *pgl*

B



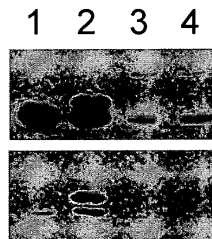
- + + + -

C



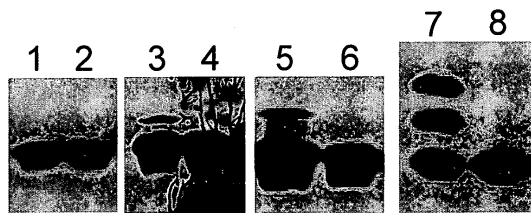
- + *pgl* - +

D



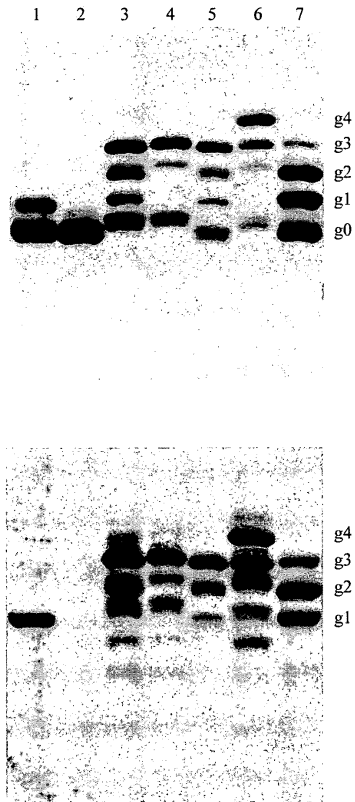
- + - + *pgl*

E

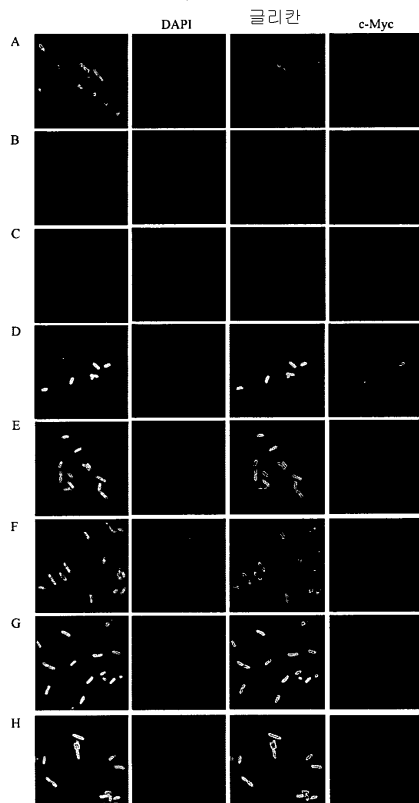


pgl + - + - + - + -

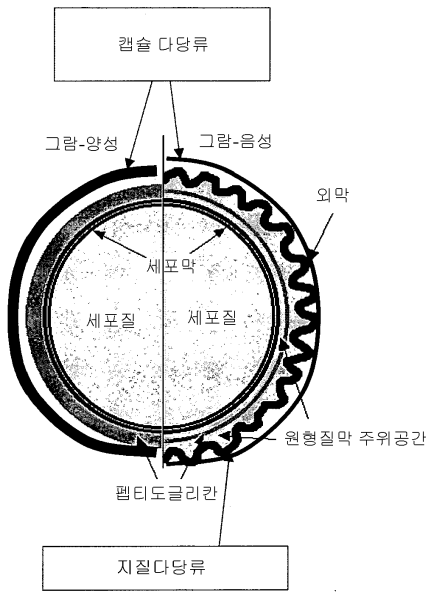
도면3



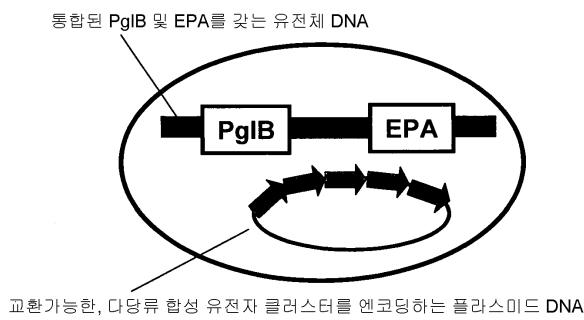
도면4



도면5a

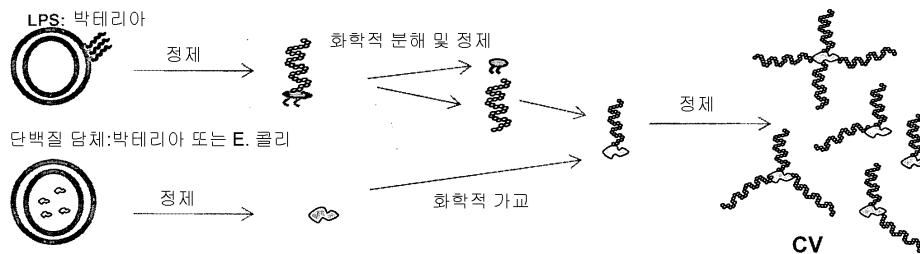


도면5b

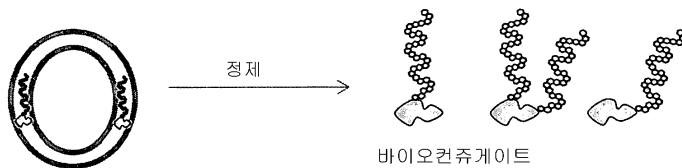


도면6a

2 발효 작업, 다수의 정제 단계

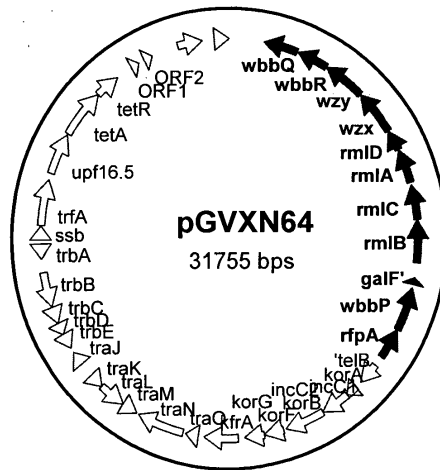


1 발효 작업, 보다 적은 정제 단계



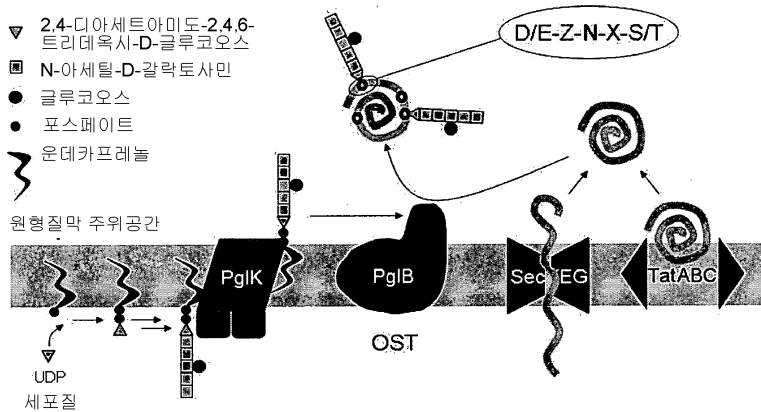
도면6b

- galF: 글루코오스-1-포스페이트
유리딜릴트랜스퍼라아제의 서브유닛
- rmlB: dTDP-글루코오스 4,6-탈수소효소
- rmlD: dTDP-4-데히드로람노오스 환원효소
- rmlA: dTDP-글루코오스
피로포스포릴라아제
- rmlC: dTDP-4-데히드로람노오스 3,5-
에피머라아제
- wzx: O-항원 플립파아제
- wzy: O-항원 중합효소
- wbbR: 람노실 트랜스퍼라아제 II
- wbbQ: 람노실 트랜스퍼라아제 I
- rfaA: 요구되지 않음.
- wbbP: 갈락토실 트랜스퍼라아제

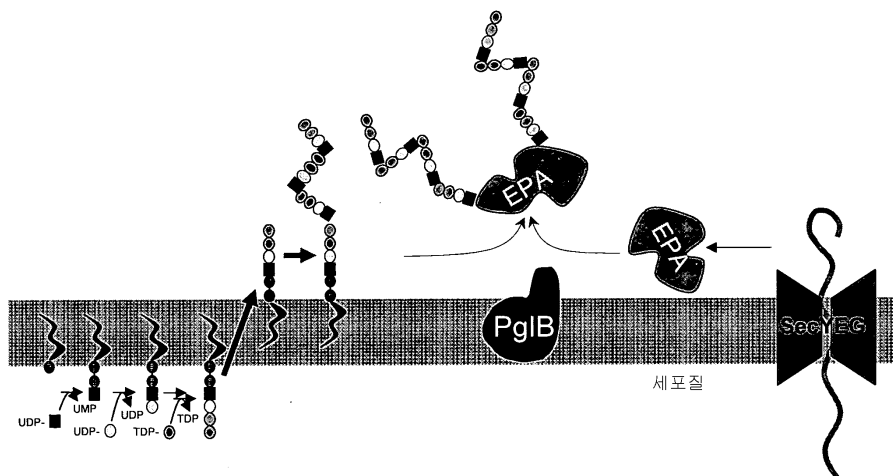


도면7a

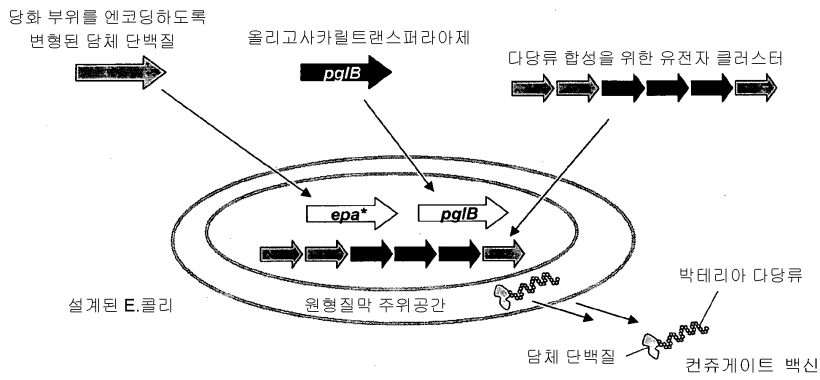
- ▼ 2,4-디아세트아미도-2,4,6-
트리데옥시-D-글루코오스
- ▣ N-아세틸-D-갈락토사민
- 글루코오스
- 포스페이트
- ~ 운데카프레놀



도면7b



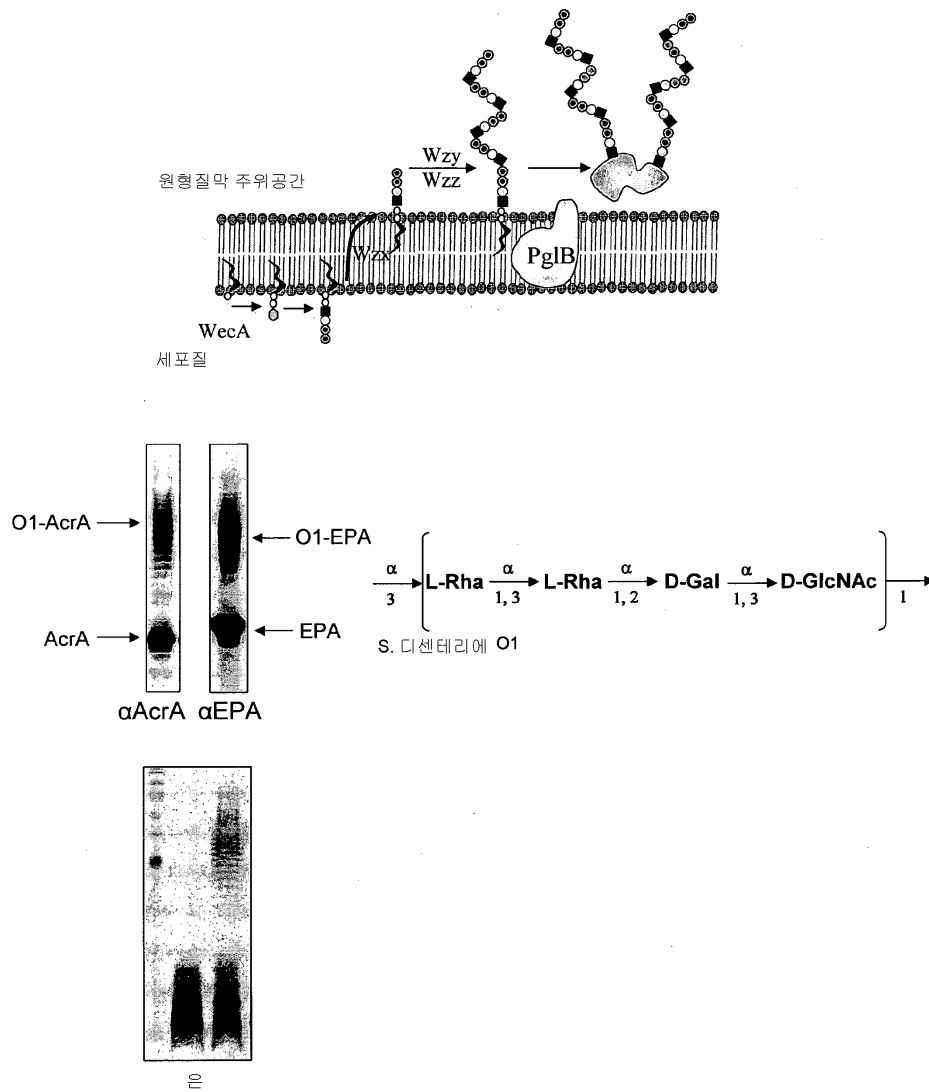
도면8a



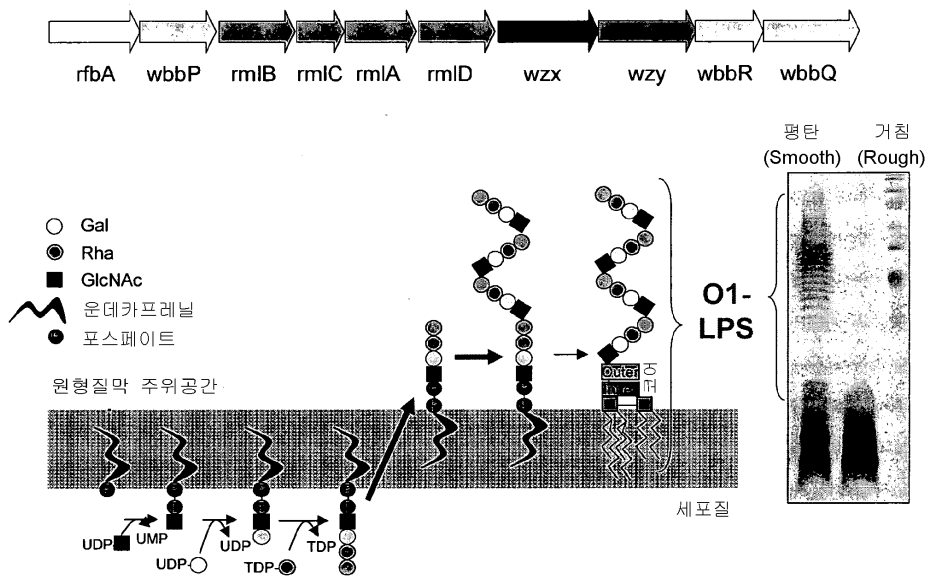
도면8b



도면9



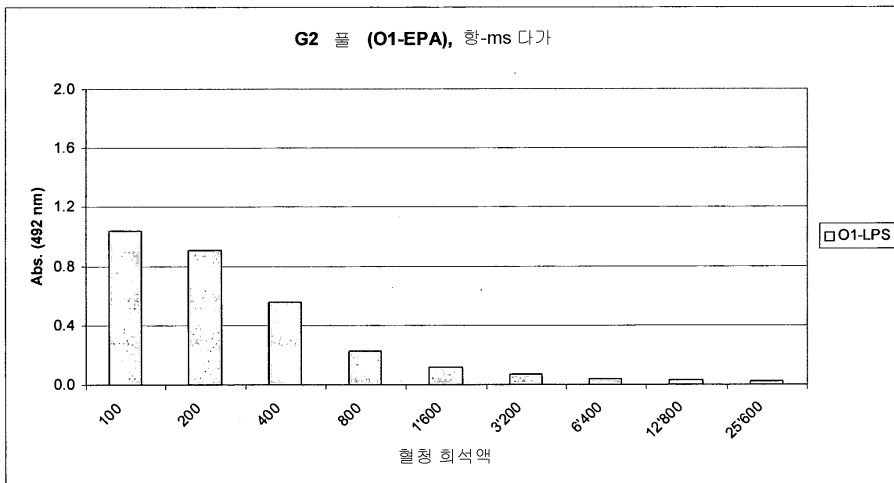
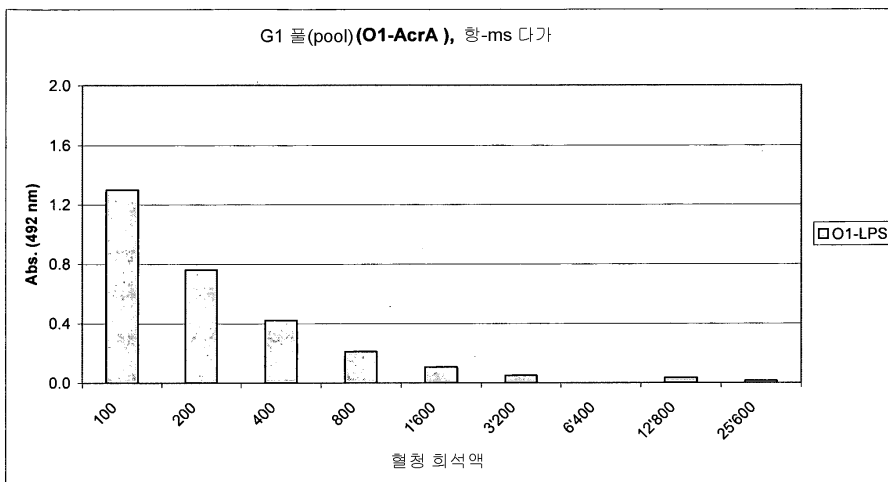
도면10a



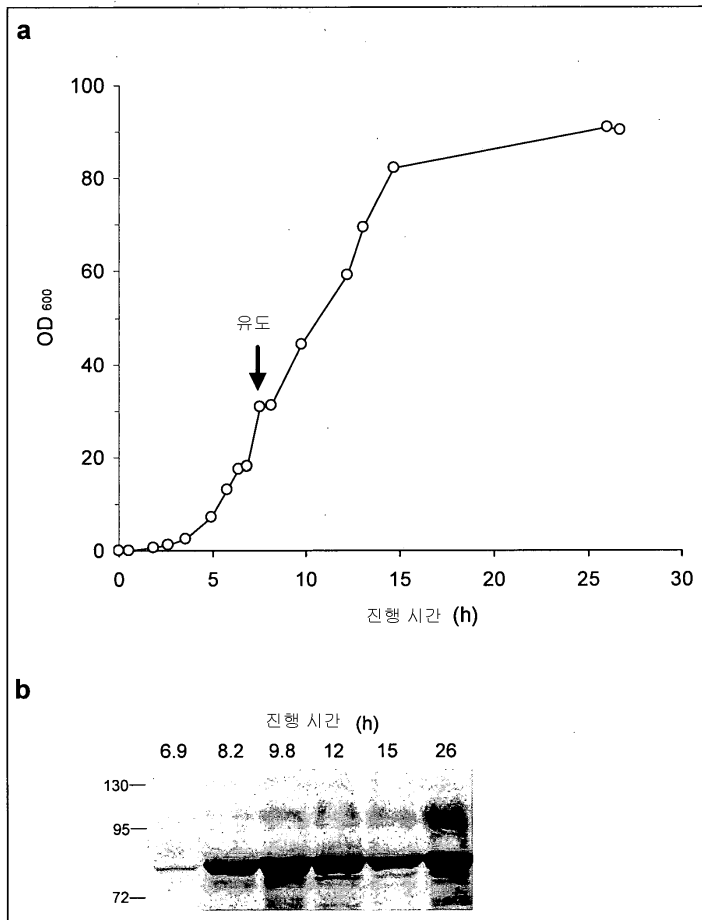
도면10b



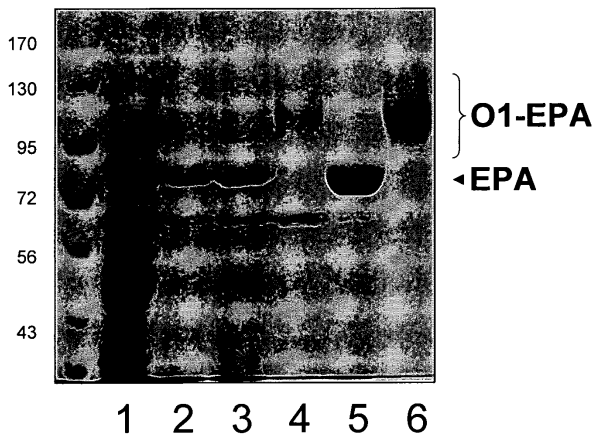
도면11



도면12

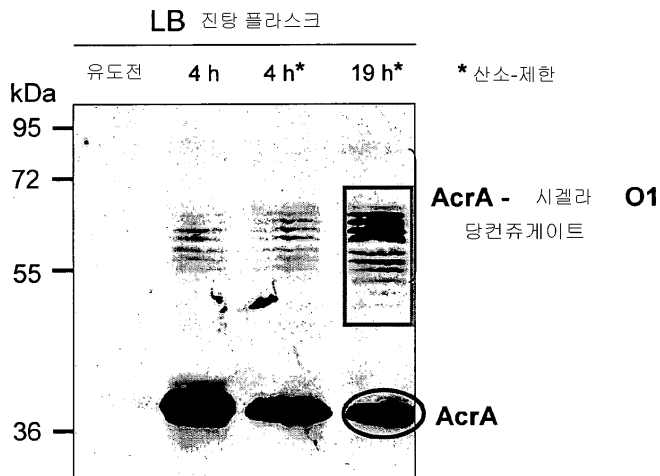


도면13

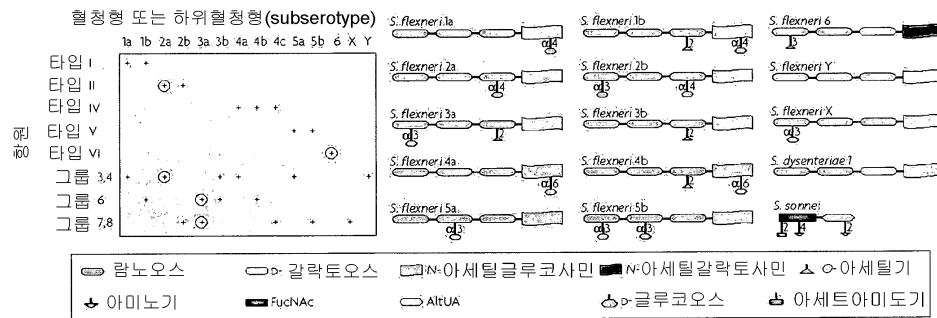


1. 전체 세포
2. 원형질막 주위공간 추출물
3. IEX 로드 (Load)(Source Q)
4. IEX 용출액 1
5. IEX 용출액 2
6. 용출액 1(플루오로아파타이트)

도면14a

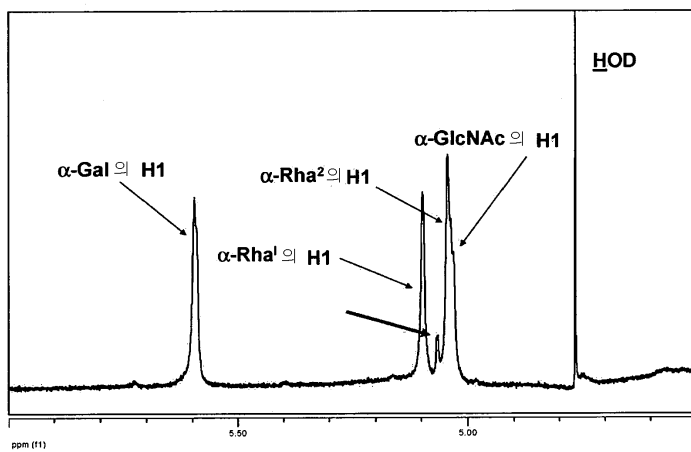


도면14b

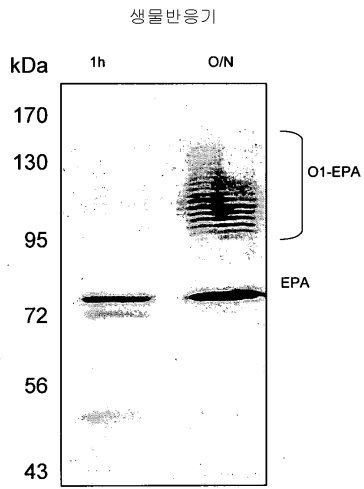


도면15

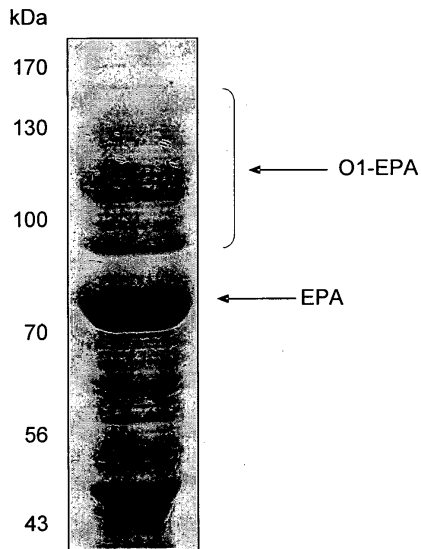
O1-EPA의 ¹H NMR 스펙트럼의 아노머 영역의 확장



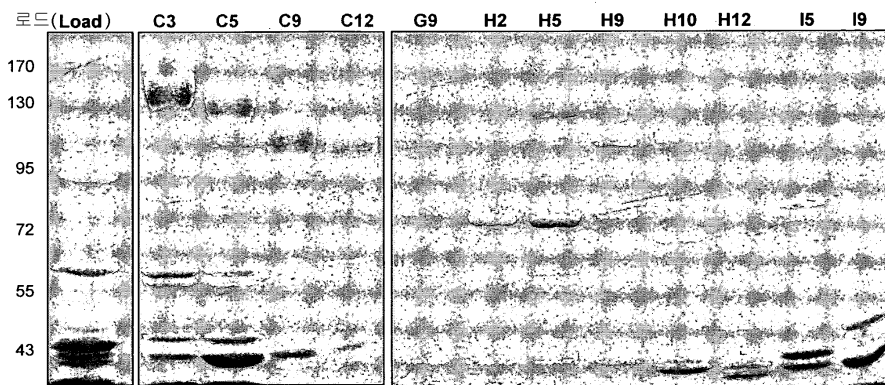
도면16a



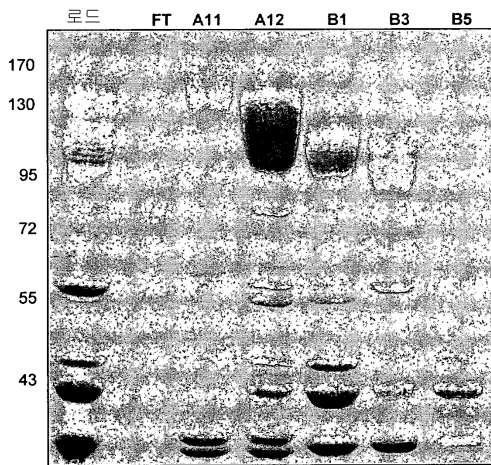
도면16b



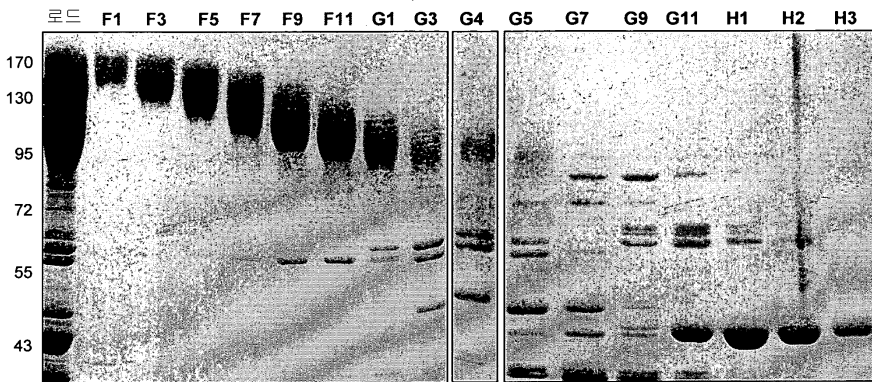
도면17a



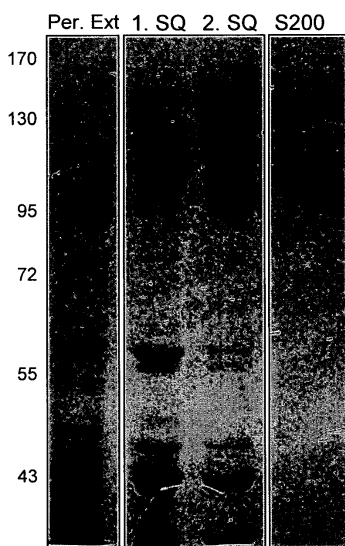
도면17b



도면18a



도면18b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GLYCOVAXYN AG

<120> BIOCONJUGATES MADE FROM RECOMBINANT N-GLYCOSYLATED
 PROTEINS FROM PROCARYOTIC CELLS

<130> 031229.00003-W005

<140> PCT/IB2009/000287

<141> 2009-02-19

<150> 61/136,687

<151> 2008-09-25

<150> 61/129,852

<151> 2008-07-24

<150> 61/129,480

<151> 2008-06-30

<150> 61/071,545

<151> 2008-05-05

<150> 61/064,163

<151> 2008-02-20

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2169

<212> DNA

<213> *Campylobacter jejuni*

<400> 1

```

atgttgaaaa aagagtattt aaaaaacct tatttagttt tgtttgcat gattatatta      60
gcttatgttt ttagtgattt ttgcaggttt tattgggttt ggtgggcaag tgagttaaat      120
gagtatTTTT tcaataatca gttaatgac attcaaatg atggctatgc ttttgctgag      180
ggcgcaagag atatgatagc aggttttcat cagcctaatg atttgagtta ttatggatct      240
tctttatccg cgcttactta ttgctttat aaaatcacac cttttcttt tgaagatc      300
atTTtatata tgagtacttt tttatcttct ttggtggtga ttcctactat tttgctagct      360
aacgaataca aacgtccttt aatgggcttt gtagctgctc ttttagcaag tatagcaaac      420

agttattata atcgcactat gagtgggtat tatgatacgg atatgctggt aattgTTTTg      480
cctatgttta tttatTTTT tatgtaaga atgattttaa aaaaagactt tttttcattg      540
attgccttgc cgttatttat aggaatttat ctttgggtgt atccttcaag ttatacttta      600
    
```

aatgtagctt taattggact tttttaatt tataactta ttttcatag aaaagaaaag 660
 atttttata tagctgtgat ttgtcttct cttactcttt caaatatagc atggttttat 720
 caaagtgcc tttatagtaat actttttgct ttattcgct tagagcaaaa acgcttaaat 780
 tttatgatta taggaatfff aggtagtgc actttgatat ttttgatfff aagtggggg 840

 gttgatccta tactttatca gcttaaatff tatatfff gaagtgatga aagtgcgaat 900
 ttaacgcagg gctttatgta ttttaatgfc aatcaaacca tacaagaagt tgaanaatgta 960
 gatcttagcg aatttatgcg aagaattagf gtagtgaaa ttgtttfff gttttctttg 1020
 tttggtfff taggctfff gagaaaacat aaaagtatga ttatggctff acctatattg 1080
 gtgcttgggt ttttagcctf aaaagggggg cttagattta ccatttattc tgtacctgta 1140
 atggccttag gatttggfff tttattgagc gagtttaagg ctataatggt taaaaaatat 1200
 agccaattaa cttcaaatgt ttgtattgff ttgcaacta ttttgactff agctccagta 1260

 tttatccata tttacaacta taaagcgcca acagttfff ctcaaatga agcatcatta 1320
 ttaaatcaat taaaaaatat agccaataga gaagattatg tggtaacttg ggcggcttat 1380
 ggttatcctg tgcgttatta tagcgatgtg aaaactfftag tagatggagg aaagcattta 1440
 ggtaaggata atttttccc ttctttgct ttaagcaaag atgaacaagc tgcagctaat 1500
 atggcaagac ttagttaga atatacagaa aaaagctfff atgctccgca aatgatatt 1560
 ttaaaaacag acattffgca agccatgatg aaagattata atcaaaagca tgtggatttg 1620
 tttctagctt cattatcaaa acctgattff aaaatcgata cgcaaaaac tcgtgatatt 1680

 tatctttata tgcccctag aatgctffg atttttctc cggaggctag tttttctfff 1740
 attaatttag atacaggagt ttggataaa cttttacct ttagcacagc ttatccactt 1800
 gatgttaaaa atggagaaat ttatcttagc aacggagtgg ttttaagcga tgattttaga 1860
 agttttaaaa taggtgataa tgtggtffct gtaaatagta tcgtagagat taattctatt 1920
 aaacaagggt aatacaaat cactccaatt gatgataagg ctgattffa tttttttat 1980
 ttaaaggata gtgctattcc ttacgcacaa tttatfftaa tggataaaac catgtttaat 2040
 agtgcttatg tgcaaatgff ttttttagga aattatgata agaattffat tgacttgggtg 2100

 attaattcta gagatgctaa ggtttffaa cttaaaatff acccatagca tgttccagat 2160
 tacgcttaa 2169
 <210> 2
 <211> 722
 <212> PRT
 <213> Campylobacter jejuni

<400> 2

Met Leu Lys Lys Glu Tyr Leu Lys Asn Pro Tyr Leu Val Leu Phe Ala
 1 5 10 15
 Met Ile Ile Leu Ala Tyr Val Phe Ser Val Phe Cys Arg Phe Tyr Trp
 20 25 30
 Val Trp Trp Ala Ser Glu Phe Asn Glu Tyr Phe Phe Asn Asn Gln Leu
 35 40 45
 Met Ile Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Ala Phe Ala Glu Gly Ala Arg Asp
 50 55 60
 Met Ile Ala Gly Phe His Gln Pro Asn Asp Leu Ser Tyr Tyr Gly Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Ser Ala Leu Thr Tyr Trp Leu Tyr Lys Ile Thr Pro Phe Ser
 85 90 95
 Phe Glu Ser Ile Ile Leu Tyr Met Ser Thr Phe Leu Ser Ser Leu Val
 100 105 110
 Val Ile Pro Thr Ile Leu Leu Ala Asn Glu Tyr Lys Arg Pro Leu Met
 115 120 125
 Gly Phe Val Ala Ala Leu Leu Ala Ser Ile Ala Asn Ser Tyr Tyr Asn
 130 135 140
 Arg Thr Met Ser Gly Tyr Tyr Asp Thr Asp Met Leu Val Ile Val Leu
 145 150 155 160
 Pro Met Phe Ile Leu Phe Phe Met Val Arg Met Ile Leu Lys Lys Asp
 165 170 175
 Phe Phe Ser Leu Ile Ala Leu Pro Leu Phe Ile Gly Ile Tyr Leu Trp
 180 185 190
 Trp Tyr Pro Ser Ser Tyr Thr Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Leu Phe
 195 200 205
 Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Phe His Arg Lys Glu Lys Ile Phe Tyr Ile
 210 215 220
 Ala Val Ile Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Asn Ile Ala Trp Phe Tyr
 225 230 235 240

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 3
 aattctgcag gatcctctag aagcttgg 28

<210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 4
 aattccaagc ttctagagga tctctgcag 28

<210> 5
 <211> 10174
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Unknown: Shigella dysenteriae O1
 Antigen in the PGVXN64 plasmid"

<400> 5
 atgaaaaacc ataaggtag tattatcatc cctgtttta ataacggaaa aactatagaa 60
 agatgcgttc tttccgcatt aaaacaaacc catagaaata tagagattat ttgtataaat 120
 gatggaccgt cagataatag ctggaatatt ttaaagaaat taagctcatt gtatggaaat 180
 gtttttgctt ttaataatga ggacaattca gggccgtcat tttccaggat taaaggggtt 240
 tcactatcta cggggcattt tttgtcattt ttggatgcag atgattactg gcatcAAAA 300
 aaactagaat tacaactatc atttattaat gatgaaaact tggatTTTT aggttcaacg 360
 tgttcattg gtgagaaaaa taaccaagaa attaaccaag gaattAAAA agaacattta 420

aaattaaaa taatttcatt taacatgatg ttgtttaaga attatttcca gactccagct 480
 gtcattatga aaagagatat ttttattcca tttaatgaga atcagcgttt ttcagaggac 540
 tacatgtcat ggcttgttat cgtttataat aaaaaaaca atgtggattt aatatatgga 600
 agggatttgg tttttctcga taaatttaac tttggagtgt cagggttgag tggtaattta 660
 tggttgatgg agaagtggga gttaaaaaat atatttact tcttgttgaa aggtaaaata 720
 atggcagtgct ctgcgatctt gttttctttg ataaaatag aaagaagatg cgctttaaca 780
 aagaaaaata aaggtaaggg taataaataa tgaagatctc aataataggg aacacagcaa 840

 atgctatgat tttgtttaga ttggatttaa taaaaacact aaccaacaaa gggatttcag 900
 tctatgcttt tgctactgac tataatgatt catccaagga aataataaaa aaagcaggcg 960
 ccattcctgt tgattataat ttaagtcgca gtggtattaa ccttgctggt gatttatgga 1020
 atacttactt attaagtaaa aaactaaaga agataaaacc agatgctatt ttatcttttt 1080
 tttcaaagcc ctctatcttt ggatcgttgg ctggtatfff ttcaggcgtt aaaaataata 1140
 acgctatgct tgaggggta ggttttttat ttacagagca gccacatgga actccgtaa 1200
 aaacaaagtt acttaaaaa atccaggttc tctgtataa aataatattt ccacatatca 1260

 actcattaat actcctaac aaggatgatt atcatgattt gatagataaa tacaaaataa 1320
 aattaaaatc ttgcatatt cttggtggca ttggtttaga tatgaataat tactgtaaaa 1380
 gcacgccacc aacaatgaa atatcattca tttttatagc tegtgtgcta gcagaaaaag 1440
 gagtcaatga gtttgttct gccgcaaaaa aataaaaaa aacacatccc aatgttgaat 1500
 ttattatact tggcctata gataaggaaa accccggagg gttatctgaa tctgacgtag 1560
 atactttaat taatcagga gttatttctt atccccgatt tgtttctaata gtggctgatt 1620
 ggattgaaaa atcaagcgtat tttgttctc cttcctatta tcgagagga gttcctcgtat 1680

 gtacacaaga agcgtaggct atggggaggc cgattttaac tactaattta ccaggctgca 1740
 aagaacaat tattgatggt gtgaatgat atgttgtaaa aaaatggtca catgaagatc 1800
 ttgcagaaaa aatgctgaag ttaattaata atcctgaaaa aataatcagt atgggagaag 1860
 aaagtataa gttagcaaga gaaagattcg atgcaaatgt aaataatgta aagttattaa 1920
 aaatactagg gattcctgat taataaacga aaagcggtc tgattcattc ggaactaaga 1980
 acctatctca ataggagcta aattcatgac cttaccagc catatcgacc tgcagcctga 2040
 ctgatccat tgcgaaactg gcgaaaaaac agtccgttga tgccatgctg atgactggag 2100

 acagctacga ctgcgaaaa aaaatgggct atatgcaggc gtttgtgaag tatgggctgc 2160
 gcaacctcaa agaagggcg aagttccgta aagggatgga gaagctgta agcgaataat 2220
 gaaaatctga ccgaatgtaa cggttgataa gaaaattata acggcagtgat agattcgtgg 2280

cgaaagtaat ttgttgcgaa tattctgcc gttgtttat ataacaatc agaataacaa 2340
 agagttagca ataggatitt cgtcaaagt tccaggatt ttccttgitt ccagagcggg 2400
 ttggtaaagac aattagtgtt tgaatttttc gggtttagcg cgagtgggta acgctcgtca 2460
 catcgtggac atgtatgcag tgctctggta gctgtaaagc caggggcggg agcgtgcatt 2520

 aatacctcta ttaatcaaac tgagagccgc ttatttcaca gcatgctctg aagtaatatg 2580
 gaataataaa gtgaagatac ttgttactgg tggcgcagga tttattggtt ctgctgtagt 2640
 tcgtcacatt ataaataata cgcaggatag tgttgtaaat gtcgataaat taacgtacgc 2700
 cggaaacctg gagtcaactg ctgatgtttc tgactctaaa cgctatgttt ttgaacatgc 2760
 ggataattgc gatgctgctg caatggcgcg gatTTTTgct cagcatcagc cggatgcagt 2820
 gatgcacctg gctgctgaaa gccatgtgga tcgttcaatt acaggccctg cggcatttat 2880
 tgaaaccaat attgttggta cttatgtcct ttTggaagcg gctcgcaatt actggctctgc 2940

 tcttgatggc gacaagaaaa atagcttccg tttcatcat atttctactg acgaagtcta 3000
 tggatattg cctcatcctg acgaagtaaa taataaagaa caattacccc tctttactga 3060
 gacgacagct tacgcgccta gtatgcctta tcccgcatca aaagcatcca gcgatcattt 3120
 agtccgtgcg tggaaacgta cctatggttt accgaccatt gtgactaact gttcgaataa 3180
 ctacggctct taccacttc cggaaaaatt gattccacta gtaattctta atgctctgga 3240
 aggtaaggca ttacctattt atggcaaagg ggatcaaatt cgtgactggc tgtatgttga 3300
 agatcatgcg cgtgcgttat atatcgtcgt aaccgaaggt aaagcgggtg aaacttataa 3360

 cattggtgga cacaacgaaa agaaaaacat cgatgtagtg ctcaactatt gtgatttgtt 3420
 ggatgagatt gtaccgaaag agaaatctta ccgcgagcaa attacttatg ttgccgatcg 3480
 cccgggacac gatgcgcgtt atgcgattga tgcagagaag attagccgcg aattgggctg 3540
 gaaaccgcag gaaacgtttg agagcgggat tcgtaaaacg gtgggatggt acctctccaa 3600
 taaaaatgg gttgataatg taaaagtgg tgctatcaa tcgtggattg aacagaacta 3660
 tgagggccgc cagtaatgaa taccctcctt ttcggcaaaa cagggcaggt aggttgggaa 3720
 ctacagcgtg ctctggcacc tctgggtaat ttgattgctc ttgatgttca ctccactgat 3780

 tactgigtg attttagtaa tcctgaaggt gtagctgaaa ccgtaagaag cattcgcct 3840
 gatattattg tcaacgcagc cgctcacacc gcagtagaca aagcagaatc agaaccggag 3900
 tttgcacaat tacttaacgc gacgagtgc gaagcgatcg cgaaagcagc caatgaagtc 3960
 ggccctggg ttattcacta ctctactgac tacgtattc cggggaccgg tgaaatacca 4020
 tggcaggagg cggatgcaac gcaccgcta aatgtttacg gtgaaaccaa gttagctgga 4080
 gaaaaagcat tacaagagca ttgtgcaag cacctaattt tccgtacaag ctgggtctat 4140

gcaggtaaag gaaataactt cgccaaaacg atgttgcgtc tgggaaaaga gcgtgaagaa 4200

ttagccgtta ttaatgatca gtttgggtgcg ccaacagggtg ctgaactgct ggctgattgt 4260

acggcacatg caattcgtgt ggcactgaat aaaccagaag tgcgaggctt gtaccatctg 4320

gtagccactg gtaccacaac ctggcacgat tatgctgcgc tggtttttga agaggcacga 4380

aaagcaggta ttcccttgc actcaacaag ctcaacgcag taccaacaac agcttatcct 4440

acaccagctc gtcgtccaca taactctcgc cttaatcacag aaaaatttca gcaaaatfff 4500

gcgcttgfff tgctgactg gcaggttggc gtgaaacgaa tgctcaacga attatttacg 4560

actacagcaa tttaatagtt tttgcatcft gttcgtgatg atggagcaag atgaattaaa 4620

aggaatgatg taatgaaaac gcgtaaaggt attatfffag cgggtggctc tggfacctgt 4680

ctttatcctg tgactatggc tgtcagtaaa cagctattac ctatfffatga taagccgatg 4740

atctattacc cgtctctac actgatgttg gcgggtattc gccatattct gattattagt 4800

acgccacagg atactcctcg ftttcaacaa ctctgggtg atggtagcca gtgggggtta 4860

aatcttcagt acaaagtca accgagtcca gatggfcttg cgcaggcatt tatcatcggt 4920

gaagagtfita tccgttggtga tgattgtgct ctggttctcg gtgataatat cttctacggt 4980

catgatctgc cgaagtfaat ggatgtcgt gtcaacaaag aaagtggfgc aacggfattt 5040

gcctatcacg ttaatgatcc tgaacgctac ggtgttgttg agtftgataa aaacggfacc 5100

gcaatcacgc tggaagaaaa accgctacaa ccaaaaagta attatgcggt aaccgggctt 5160

tatfffctatg ataacgacgt tgtcgaaatg gcgaaaaacc ttaagccttc tgcccgtggt 5220

gaactggaaa ttaccgatat taaccgtatt tatatggagc aggggcgttt atccgttgc 5280

atgatgggac gtggttatgc atggctggac acggggacac atcaaagtct tattgaagca 5340

agcaacttca ttgcaacaat tgaagagcgc caagggttaa aggtatcttg cctggaagag 5400

atfgcttate gtaaaggctt tattgacgca gacgaggtta atgtattagc cgaaccgcta 5460

aagaaaaatg cttatggfca gtatctgttg aaaatgatta aaggftatta aaaatgaatg 5520

taattaaaac tgaattcca gatgfattaa ttttcgagcc gaaagtffff ggtgatgaac 5580

gtggttffff tafgaaagc tttaccaga aagtfffcga agaggctgta gggcggaaagg 5640

ttgaatftgt tcaggataac cattctaaat caactaagggt tgtgttacgc ggactgcact 5700

atcagtfgga accttatgct caaggftaat tagttcgttg tgttgcggt gaagtffff 5760

atgtagcagt tgatattcgt aaatcgtcac ctacatftgg gaaatggatt ggggtgaatt 5820

tgtctgctga gaataagcgt cagtfgtgga tacctgaagg atftgcgat ggatftftgg 5880

tgctgagtga aacggctgag tttgtttata aaacaacaaa ctattacaat ccaagttttg 5940
 aaaaaagtat ttcatactca gatcctacca ttaaaattca gtggcccaat ttacaggata 6000
 tgcattttaa attatcaaat aaggatttga atgctaagaa cttttttaat aacaatagtt 6060
 taatgcaatg aagaaaaata tattgctctt gttcttagta catggggcaa attatttggt 6120
 cccgtttata gttcttccat atcaaaactcg aatattaagc atcgagacat tgcagatgt 6180
 agcaaaaatt caagccgctg tgatgctttt atctttaatc gtaaattatg gatataactt 6240
 atcaagtaca agagctatag ctagggccgt atctcaagca gaaataaata agatctatag 6300

 tgagactctt attgtaaat tattattggc aaccatttgt cttgcacttg gttgcgtaca 6360
 tttgatgtat gtcaaagagt actcattgat atatcctttt ataactcagtt cgatatatct 6420
 ttatggtagt gcattatttg ctacttgggt attccaagga cttgagaaaa tgaaagcgggt 6480
 cgttatagca acaacaatcg ctaaactgac tgggtgtgata cttactttta ttttagttaa 6540
 gtctccaaat gatatagttg cagctctttt tacacaaaac attgggatgt ttataagtgg 6600
 tataatatct attattttgg taaggaaaaa caaatatgca accgtaatat gttttcgact 6660
 taaaaatatt attgtaagct taaaagaagc gtggccgttt tttttatcat tagctgcaac 6720

 aagtgtatat acatatttta atgtgatttt attatctttt tatgctggcg actatgttgt 6780
 ggcaaatttt aatgctgctg ataaattaag aatggctgct caagggttac ttattccaat 6840
 aggacaggct gttttccac gattatctaa actagagggc tatgaatata gttctaaact 6900
 taaaatttat gcaataaggt atgctatttt tgggtgttgc attagtgcgg gacttgtatt 6960
 tttaggtccc atgttaacta ctatttattt aggcaaagaa tattcgttgt caggagaata 7020
 tcttcaaagt atgtttttac tacctgccac tatttcaata tgcactatac tgagtcaatg 7080
 gatgttgata cctcaaggca aagaaaaaat attaagcaga atctatattc taggcgccat 7140

 tgtccattta ttatatgcat ttcctttagt ttactattat ggggcttggg gcatggtaat 7200
 atcaatttta tttactgaag tcttaattgt attatttatg cttaggctg tgaaatgact 7260
 tactttactg gttttatttt aatattgttt gctattataa ttaaaagatt aactccaagt 7320
 caaagcaaga aaaatattgt cttaatagct aatgcgtttt ggggaatatt gttggtaggt 7380
 tatgctttca atgaacaata tttcgtacca ttaagtgcaa caaccttggt ttttatactt 7440
 gcattcttat tttcttttag tatgacttat attttaattg ctaggagtgg aagggttggt 7500
 tttcttttcg gtactggttt tatagaaagc aaatatattt actggtttgc tgggatgatt 7560

 aatattatta gtatctgctt tggcattatc cttttatata ataactattt ttctttaaaa 7620
 gtaatgagag aaggaatttt agatggttct attagtgggt ttggattggg gataagtttg 7680
 ccactttcct tctgctgtat gtatttagca agacatgaga ataaaaaaaa ttatttctat 7740

tgttttacac tactttcatt cttgcttgcg gtgttatcaa cttcaaagat cttcttaata 7800
 ttattccttg tatatattgt tggataaat agttatgtaa gcaaaaagaa attgcttatt 7860
 tatggagtgt ttgtatttgg actgttcgct ttatcaagta ttatcttggg taagtctct 7920
 tcagaccctg aaggcaagat tatttcagca atatttgata cgtaagggt ttatcttttc 7980

 tcgggattgg cagccttta tctttatgtt gaaaagaatg ccacgctccc cgaaaattta 8040
 cttttgtatc catttaagga ggtttggggg acgacaaaag atattcccaa aactgatatt 8100
 ttgccttggg tcaacattgg tgtatgggac acgaatgtat atacagcttt tgcacatgg 8160
 tatcagtcac tgggattata tgcagctata attattggta ttctcttagg gttttattac 8220
 gggatatggt ttagctttcg tcaaaaattta gctgtgggtt tttatcaaac atttttgtgt 8280
 tttcctcttt taatgttgtt tttccaggag cattatttgt tgtcatggaa aatgcatttt 8340
 atttatcttt tatgtgcaat tttattagcg atgagaaaag cattagagta tgaataaata 8400

 ttgtatctta gtactattta atccagatat aagtgttttt attgataatg tcaaaaagat 8460
 tttatctttg gatgtaagtt tatttgtata tgacaattca gcaataaac atgcattcct 8520
 tgctctatcc tcacaagagc aaacaaagat aaattacttt tcgatatgtg aaaatatcgg 8580
 attgtcgaag gcttataatg agacactaag gcataattctt gaatttaata agaattgaa 8640
 aaataaaagc attaatgata gtgtgctttt tctcgaccaa gactctgaag ttgatttaaa 8700
 ttccatcaat attttgtttg aaactatac agcagcagag tctaattgga tgatagtcgc 8760
 ggggaatccc ataaggagag atggactacc gtatatagat tacccccaca ctgtaacaa 8820

 tgtaaaattt gtaattagta gttatgctgt gtatcgctta gacgcattta gaaacatcgg 8880
 cttgtttcaa gaagattttt ttatagatca tatcgatagt gatttttgtt caaggctgat 8940
 aaaaagcaat taccaaatc tccttagaaa agatgccttt tttatcaac caataggaat 9000
 aaaaccatc aatctctgtg gtagatattt attccctatc ccatcacaac accgaacata 9060
 ttttcaaatt agaaatgctt ttttaagtta caggcgcaat ggtgttacat ttaattttt 9120
 atttaggaa attgtaaata gattgattat gagtatattc tcaggcctta acgagaaaga 9180
 ctatttgaaa cgattgcatt tatatttaaa aggaataaaa gatggtctta aatgtaatt 9240

 cttggctaga agtgggggcg ttgtgattaa aaaaaaagtg gcggcgataa ttataacata 9300
 taatccagat ctaacaatc tgcgagaaaag ttatacgagt ctatataagc aagtcgataa 9360
 aataattctt attgataaca actctacaaa ctatcaagaa cttagaagt tattcgaaaa 9420
 aaaagaaaa ataaaaatag tgcccttgag tgataatata ggactagcag cagctcaaaa 9480
 tttaggtttg aacttagcta ttaaaaataa ctatacttat gctatcttat tcgatcagga 9540
 tagcgtctta caagacaatg gaattaacag tttctttttt gaattgaga aattagttag 9600

tgaagaaaa ttaaataatag ttgccattgg gccaaagtttt tttgacgaaa agacaggaag 9660

acgctttcgg cctacaaaat ttatcgggtcc ctttttatat ccccttcgta aaataaccac 9720

aaaaaatcct ctaacagaag ttgacttctt gattgcttct ggttgtttca taaaattgga 9780

gtgtattaaa tcagccggaa tgatgactga atcgttattc atcgattata ttgatgttga 9840

atggtcatat cgtatgcgtt cgtatggcta taagctatat attcataatg atattccat 9900

gagtcattta gtgggagaat ctcgagttaa ttaggattg aaaactatct ctttacatgg 9960

gccgctaaga cgatattact tatttaggaa ttatatttca attttaaag tgagatata 10020

accgttagga tataaaatc gtgagggttt ttttaatac ggaagatttt tgtaagtat 10080

gattataact aaaaatagaa aaactttaat ttatacact ataaaagcaa ttaaggacgg 10140

aataaataat gaaatgggga aatataaagg ctaa 10174

<210> 6

<211> 643

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 6

Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys

 20 25 30

Ala Cys Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser

 35 40 45

Val Asp Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr

 50 55 60

Ser Met Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp

65 70 75 80

Asn Ala Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly

 85 90 95

Gly Val Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala

Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala
 355 360 365

Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu
 370 375 380

Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala
 385 390 395 400

Lys Asp Gln Asn Arg Thr Lys Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser
 405 410 415

Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu
 420 425 430

Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp
 435 440 445

Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly
 450 455 460

Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser
 465 470 475 480

Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile
 485 490 495

Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr
 500 505 510

Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala
 515 520 525

Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Trp Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg
 530 535 540

Thr Gly Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg
 545 550 555 560

Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro
 565 570 575

Glu Glu Glu Gly Gly Arg Val Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu
 580 585 590

Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val

130 135 140
 Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
 145 150 155 160
 Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
 165 170 175
 Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
 180 185 190

 Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
 195 200 205
 Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
 210 215 220
 Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
 225 230 235 240
 Asp Asn Asn Asn Ser Thr Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe
 245 250 255

 Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His
 260 265 270
 Leu Pro Leu Glu Ala Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
 275 280 285
 Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr
 290 295 300
 Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn
 305 310 315 320

 Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg
 325 330 335
 Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu
 340 345 350
 Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala
 355 360 365
 Ala Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Lys Asp Gln
 370 375 380

Asn Arg Thr Lys Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala
 385 390 395 400
 Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly
 405 410 415
 Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu
 420 425 430
 Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe
 435 440 445

Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe
 450 455 460
 Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly
 465 470 475 480
 Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp
 485 490 495
 Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg
 500 505 510

Val Tyr Val Pro Arg Trp Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu
 515 520 525
 Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly
 530 535 540
 His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu
 545 550 555 560
 Gly Gly Arg Val Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val
 565 570 575

Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp
 580 585 590
 Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu
 595 600 605
 Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 610 615 620

<210> 8

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 8

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Val Ile Ile Lys Pro Gln Val Ser Gly Val

 20 25 30

Ile Val Asn Lys Leu Phe Lys Ala Gly Asp Lys Val Lys Lys Gly Gln

 35 40 45

Thr Leu Phe Ile Ile Glu Gln Asp Gln Ala Ser Lys Asp Phe Asn Arg

50 55 60

Ser Lys Ala Leu Phe Ser Gln Leu Asp His Thr Glu Ile Lys Ala Pro

65 70 75 80

Phe Asp Gly Thr Ile Gly Asp Ala Leu Val Asn Ile Gly Asp Tyr Val

 85 90 95

Ser Ala Ser Thr Thr Glu Leu Val Arg Val Thr Asn Leu Asn Pro Ile

 100 105 110

Tyr Ala Asp Gly Ser His His His His His His

 115 120

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 9

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Val Ile Ile Lys Pro Gln Val Ser Gly Val
 20 25 30

Ile Val Asn Lys Leu Phe Lys Ala Gly Asp Lys Val Lys Lys Gly Gln
 35 40 45

Thr Leu Phe Ile Ile Glu Gln Asp Gln Phe Asn Arg Ser Lys Ala Leu
 50 55 60

Phe Ser Gln Ser Ala Ile Ser Gln Lys Glu Leu Asp His Thr Glu Ile
 65 70 75 80

Lys Ala Pro Phe Asp Gly Thr Ile Gly Asp Ala Leu Val Asn Ile Gly
 85 90 95

Asp Tyr Val Ser Ala Ser Thr Thr Glu Leu Val Arg Val Thr Asn Leu
 100 105 110

Asn Pro Ile Tyr Ala Asp Gly Ser His His His His His His
 115 120 125

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 10

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Val Ile Ile Lys Pro Gln Val Ser Gly Val
 20 25 30

Ile Val Asn Lys Leu Phe Lys Ala Gly Asp Lys Val Lys Lys Gly Gln
 35 40 45

Thr Leu Phe Ile Ile Glu Gln Asp Gln Asp Phe Asn Arg Ser Lys Ala
 50 55 60

Leu Asp His Thr Glu Ile Lys Ala Pro Phe Asp Gly Thr Ile Gly Asp
 65 70 75 80

Ala Leu Val Asn Ile Gly Asp Tyr Val Ser Ala Ser Thr Thr Glu Leu
 85 90 95

Val Arg Val Thr Asn Leu Asn Pro Ile Tyr Ala Asp Gly Ser His His
 100 105 110

His His His His
 115

<210> 11

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 11

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Met His Met Ser Lys Glu Glu Ala Pro Lys
 20 25 30

Ile Gln Met Pro Pro Gln Pro Val Thr Thr Met Ser Ala Lys Ser Glu
 35 40 45

Asp Leu Pro Leu Ser Phe Thr Tyr Pro Ala Lys Leu Val Ser Asp Tyr
 50 55 60

Asp Val Ile Ile Lys Pro Gln Val Ser Gly Val Ile Val Asn Lys Leu
 65 70 75 80

Phe Lys Ala Gly Asp Lys Val Lys Lys Gly Gln Thr Leu Phe Ile Ile
 85 90 95

Glu Gln Asp Lys Phe Lys Ala Ser Val Asp Ser Ala Tyr Gly Gln Ala
 100 105 110

Leu Met Ala Lys Ala Thr Phe Glu Asn Ala Ser Lys Asp Phe Asn Arg
 115 120 125

Ser Lys Ala Leu Phe Ser Lys Ser Ala Ile Ser Gln Lys Glu Tyr Asp
 130 135 140

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 12

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu

 20 25 30
 Tyr His Asn Thr Gln Ile His Thr Leu Asn Asp Lys Ile Phe Ser Tyr

 35 40 45
 Thr Glu Ser Leu Ala Gly Lys Arg Glu Met Ala Ile Ile Thr Phe Lys

 50 55 60
 Asn Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp

65 70 75 80
 Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala

 85 90 95
 Tyr Leu Thr Glu Ala Lys Val Glu Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys

 100 105 110
 Thr Pro His Ala Ile Ala Ala Ile Ser Met Ala Asn Gly Ser His His

 115 120 125
 His His His His

130

<210> 13

<211> 288

<212> PRT

<213> Campylobacter jejuni

<400> 13

Met Lys Lys Ile Leu Leu Ser Val Leu Thr Thr Phe Val Ala Val Val

1 5 10 15

Leu Ala Ala Cys Gly Gly Asn Ser Asp Ser Lys Thr Leu Asn Ser Leu
 20 25 30
 Asp Lys Ile Lys Gln Asn Gly Trp Arg Ile Gly Val Phe Gly Asp Lys
 35 40 45
 Pro Pro Phe Gly Tyr Val Asp Glu Lys Gly Asn Asn Gln Gly Tyr Asp
 50 55 60
 Ile Ala Leu Ala Lys Arg Ile Ala Lys Glu Leu Phe Gly Asp Glu Asn
 65 70 75 80
 Lys Val Gln Phe Val Leu Val Glu Ala Ala Asn Arg Val Glu Phe Leu
 85 90 95
 Lys Ser Asn Lys Val Asp Ile Ile Leu Ala Asn Phe Thr Gln Thr Pro
 100 105 110
 Glu Arg Ala Glu Gln Val Asp Phe Cys Leu Pro Tyr Met Lys Val Ala
 115 120 125
 Leu Gly Val Ala Val Pro Lys Asp Ser Asn Ile Thr Ser Val Glu Asp
 130 135 140
 Leu Lys Asp Lys Thr Leu Leu Leu Asn Lys Gly Thr Thr Ala Asp Ala
 145 150 155 160
 Tyr Phe Thr Gln Asp Tyr Pro Asn Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Asp Gln
 165 170 175
 Asn Thr Glu Thr Phe Ala Ala Leu Met Asp Lys Arg Gly Asp Ala Leu
 180 185 190
 Ser His Asp Asn Thr Leu Leu Phe Ala Trp Val Lys Asp His Pro Asp
 195 200 205
 Phe Lys Met Gly Ile Lys Glu Leu Gly Asn Lys Asp Val Ile Ala Pro
 210 215 220
 Ala Val Lys Lys Gly Asp Lys Glu Leu Lys Glu Phe Ile Asp Asn Leu
 225 230 235 240
 Ile Ile Lys Leu Gly Gln Glu Gln Phe Phe His Lys Ala Tyr Asp Glu
 245 250 255
 Thr Leu Lys Ala His Phe Gly Asp Asp Val Lys Ala Asp Asp Trp Ile

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 17
 gccgagaatg gtcacgcgcc cgccttc 27
 <210> 18
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 18
 cctgacctgc cccggggaat gcgcgg 26
 <210>
 > 19
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 19
 ccgcgattc cccgggag gtcagg 26
 <210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 20
 gtcgcaaag atcaaatag aactaaa 27
 <210>

21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 21

tttagttcta ttttgatctt tggcgac 27

<210> 22

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 22

catgacctgg acatcaagga taataataat tctactccca cggatcatcag tcatc 55

<210> 23

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 23

gatgactgat gaccgtggga gtagaattat tattatcctt gatgtccagg tcatg 55

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag"

<400> 24

His His His His His His

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 25

Asp Ser Asn Ile Thr

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

His Phe Gly Asp Asp

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 27

Asp Phe Asn Asn Ser

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 28

Asp Asn Asn Ser Thr

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 29

Asp Asn Asn Lys Thr

1 5