(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [6]
C07K 7/08

(45) 공고일자 2002년10월18일
(11) 등록번호 10-0356040
(24) 등록일자 2002년09월26일

(21) 출원번호 10-1999-7010041
(22) 출원일자 1999년10월29일
번역문 제출일자 1999년10월29일
(86) 국제출원번호 PCT/AU1998/00311
(86) 국제출원출원일자 1998년04월30일

(65) 공개번호 특2001-0020417
(43) 공개일자 2001년03월15일

(87) 국제공개번호 WO 1998/49192
(87) 국제공개일자 1998년11월05일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 PO6528 1997년04월30일 오스트레일리아(AU)

(73) 특허권자
더 유니버시티 오브 멜버른
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 그라탠 스트리트
빅토리안 데어리 인더스트리 오소리티
오스트레일리아 브이아이시 3067 압보츠포드 빅토리아 스트리트651-653
씨에스엘 리미티드
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플라 로드 45

(72) 발명자
레이놀즈에릭찰스
오스트레일리아브이아이씨3104노스발윈힐로드104
오브라이언-심프슨닐마틴
오스트레일리아브이아이씨3052브룬스위크사우스오들리스트리트7/10
슬레이키스키나다
오스트레일리아브이아이씨3101큐핀돈스트리트4

(74) 대리인 유미특허법인
송만호

심사관 : 이처영

(54) 포피로모나스 긴기발리스 관련 치주염의 진단 및 치료용 합성 펩타이드 구조체

요약

본 발명은 치주 질환과 관련된 구강 내 박테리아인 포피로모나스 긴기발리스의 병원 효과를 억제하는 경구용 조성물 및 면역 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 포피로모나스 긴기발리스 감염 확률을 감소시키고 치료하는 방법에 대한 것이다.

대표도

도 1

색인어

포피로모나스 긴기발리스, 면역 반응, 항원, 항체, 백신

명세서

기술분야

본 발명은 치주 질환과 관련된 구강 내 박테리아인 포피로모나스 긴기발리스 (Porphyromonas gingivalis)의 병원(病原) 효과를 억제하기 위한 경구용 조성물 및 면역원성 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 치은하 플라크(subgingival plaque) 샘플 내의 포피로모나스 긴기발리스 및 혈청 내의 포피로모나스 긴기발리스 항원의 존재 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다. 상기 조성물은 포피로모나스 긴기발리스의 PrtR-PrtK 단백질분해효소-아드헤진 복합체의 구조적 기능적 유의 영역에 해당하는 합성 펩타이드 구조체를 포함한다. 또한, 본 명세서에는 합성 펩타이드 구조체의 제조 방법이 기재된다. 합성 펩타이드 구조체는 포피로모나스 긴기발리스에 대한 면역 반응을 증가시키는 면역원(免疫原)으로 유용하며 수동면역법(passive immunization)에 유용한 단백질-특이성 및 펩타이드-특이성 항혈청을 배양하거나 진단 분석용 시료로도 사용될 수 있다.

배경기술

치주 질환은 박테리아와 연관된 치은 조직의 염증성 질환으로서, 치은 조직의 비특이적이며 가역적인 염증 생성과 같이 비교적 유순한 형태의 치은염 (gingivitis)에서 치은구조를 파괴하는 보다 격렬한 형태의 치주염(periodontitis)이 있다. 치주염은 치주조직을 파괴하는 특이적 그램-음성(Gram-negative) 박테리아 집합체의 치은하 감염과 연관 있으며, 이는 주요 공중보건 문제중 하나 이다. 성인의 치주염 병소(病巢)에서 상기 미생물의 회수율은 치은하의 혐기성 증식 세균 군중 50%에 이르는 반면, 건강한 부위에서는 포피로모나스 긴기발리스가 거의 회수되지 않는다. 이러한 이유로 포피로모나스 긴기발리스는 상당한 관심을 끌어온 박테리아 중 하나였다. 치은하 플라크 내에서 포피로모나스 긴기발리스 수준이 증가하면 치주염의 피해도 비례적으로 증가하며 치은하에서 증식하는 미생물 군에서 상기 미생물이 박멸되면 상기 질환도 함께 사라진다. 사람이 아닌 영장류에서 치주염 병소의 진행은 포피로모나스 긴기발리스를 치은하에 접종(implantation) 함으로서 연구되었다. 동물 및 사람에서의 이러한 발견은 포피로모나스 긴기발리스가 성인의 치주염 발생에 있어서 중요한 역할을 담당함을 암시한다.

포피로모나스 긴기발리스는 특정한 아미노산을 대사하여 에너지를 얻는 검정 색소의 혐기성, 단백질 분해성, 그램-음성 간균(桿菌)이다. 이 미생물의 생장에는 철, 바람직하게는 헴(heme) 또는 Fe(III) 산화반응 생성물인 헤민(hemin) 형태의 철이 절대적으로 요구되며 과량의 헤민이 존재하는 조건에서 생장한 실험 동물에서 매우 강한 병독성이 나타난다. 캡슐, 아드헤진(adhesin), 세포독소(cytotoxin), 및 세포외 가수분해 효소를 포함하는 포피로모나스 긴기발리스의 병원성에는 많은 병독성 인자가 관련된다. 포피로모나스 긴기발리스의 콜로니 형성(colonisation)을 예방하기에 효과적이며 안전한 백신(vaccine)을 개발하기 위해서는 중화용 항체를 생성하는 면역원으로 작용할 수 있는 병독성과 연관된 효과적인 항원을 동정할 필요가 있다.

본 발명자들은 포피로모나스 긴기발리스의 주요 병독성 인자인 시스테인 단백질 분해효소 및 아드헤진의 300 kDa 다중단백질(multiprotein) 복합체를 정제하고 판독하였다. 본 명세서에 참조 인용된 국제특허 PCT/AU96/00673에는 생화학적으로 판독된 상기 복합체가 개시되어 있다. 상기 복합체는 C-말단 아드헤진 도메인(PrtK)을 가지는 163 kDa의 Lys-특이성 단백질 분해효소와 결합된 C-말단 아드헤진 도메인(PrtR)을 가지는 160 kDa의 Arg-특이성 단백질 분해효소로 이루어진다. PrtR 및 PrtK의 C-말단 아드헤진 도메인은 포피로모나스 긴기발리스의 혈구응집소(HagA)와 공통점을 가진다. 본 명세서에 참조 인용된 국제특허 WO96/17936에는 HagA를 코딩하는 유전자가 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명자는 포피로모나스 긴기발리스의 주요 병독성 인자인 시스테인 단백질 분해효소 및 아드헤진의 300 kDa 다중단백질 복합체에서 구조적 기능적으로 중요한 많은 서열을 동정하였다. 이들 서열은 하기의 표 1에 기재하였다.

<표1> 기능적으로 중요한 PrtR-PrtK단백질분해효소-아드헤진 복합체의 아미노산 서열

단백질분해효소 활성자리	서열(단일문자 코드)	지정
PrtR45 (426-446)	FNGGISLANYTGHGSETAWGT	PAS1(R45)
PrtK48 (432-453)	LNTGVSFANYTAHGSETAWADP	PAS1(K48)
PrtR45 (467-490)	FDVACVNGDFLFSMPCFAEALMRA	PAS2(R45)
PrtK48 (473-496)	IGNCCITAQFDYVQPCFGEVITRV	PAS2(K48)

아드헤진 결합모티브	서열(단일문자 코드)	지정
PrtR45 (660-689)	GEPNPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK	ABM1(R45)
PrtR44 (919-949)	EGSNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT	ABM1(R44)
PrtR17 (1375-1405)	VNSTQFNPVKNLKAQPDGGDVVLKWEAPSAK	ABM1(R17)
PrtK48 (681-711)	GEPSPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWEAPSAK	ABM1(K48)
PrtK39 (940-970)	EGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNGT	ABM1(K39)
PrtK44 (1393-1425)	VNSTQFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK	ABM1(K44)
HagA (1837-1863)	QFNPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT	ABM1(HagA1)
HagA (1381-1407)	QFNPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT	ABM1(HagA2)
HagA (925-951)	QFNPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT	ABM1(HagA3)
HagA (474-499)	FAHVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT	ABM1(HagA4)
HagA (202-227)	FAPVQNLQWSVSGQTVTLTWQAPASD	ABM1(HagA5)
HagA (2293-2321)	QFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK	ABM1(HagA6)
PrtR44 (865-893)	DYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAT	ABM2(R44)
PrtR17 (1322-1350)	DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT	ABM2(R17)
PrtR27 (1580-1608)	SYTYTVYRDGTKIKEGLTETTYRDAGMSA	ABM2(R27)
PrtK39 (886-914)	SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA	ABM2(K39)
PrtK44 (1340-1368)	DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT	ABM2(K44A)
PrtK44 (1606-1634)	SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT	ABM2(K44B)
HagA (2236-2264)	DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT	ABM2(HagA1)
HagA (1780-1808)	DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT	ABM2(HagA2)
HagA (1324-1352)	DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT	ABM2(HagA3)
HagA (868-896)	DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT	ABM2(HagA4)
HagA (415-443)	DYTYTVYRDNVVIAQNLAATTFNQENVAP	ABM2(HagA5)
HagA (2502-2530)	SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT	ABM2(HagA6)
PrtR44 (946-971)	PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF	ABM3(R44)
PrtK39 (967-989)	PNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESF	ABM3(K39)
HagA (1860-1881)	PNGTPNPNPNPNPGTTTLSESF	ABM3(HagA1)
HagA (1404-1425)	PNGTPNPNPNPNPGTTTLSESF	ABM3(HagA2)
HagA (948-969)	PNGTPNPNPNPNPGTTTLSESF	ABM3(HagA3)
HagA (496-513)	PNGTPNPNPGTTTLSESF	ABM3(HagA4)
PrtR17 (1278-1297)	WIERTVDLPAGTKYVAFRHY	ABM4(R17)
PrtR44 (1028-1043)	WRQKTVDLPAGTKYVAFRHF	ABM4(R44)
PrtK44 (1296-1315)	WIERTVDLPAGTKYVAFRHY	ABM4(K44A)
PrtK44 (1565-1584)	WRQKTVDLPAGTKYVAFRHF	ABM4(K44B)
PrtK39 (1116-1135)	WYQKTVQLPAGTKYVAFRHF	ABM4(K39)
HagA (2191-2211)	WIERTVDLPAGTKYVAFRHY	ABM4(HagA1)
HagA (1736-1755)	WIERTVDLPAGTKYVAFRHY	ABM4(HagA2)
HagA (1280-1299)	WIERTVDLPAGTKYVAFRHY	ABM4(HagA3)
HagA (824-843)	WIERTVDLPAGTKYVAFRHY	ABM4(HagA4)
HagA (2012-2031)	WYQKTVQLPAGTKYVAFRHF	ABM4(HagA5)
HagA (1556-1575)	WYQKTVQLPAGTKYVAFRHF	ABM4(HagA6)

<표1. 계속>

아드헤진 결합모티브 펩타이드	서열(단일문자 코드)	지정
HagA (2461-2480)	WYQKTVQLPAGTKYVAFRHF	ABM4(HagA7)
HagA (1100-1119)	WYQKTVQLPAGTKYVAFRHF	ABM4(HagA8)
HagA (644-663)	WYQKTVQLPAGTKYVAFRHF	ABM4(HagA9)
HagA (372-392)	ERTIDLSAYAGQQVYLAFRHF	ABM4(HagA10)
PrtR15 (1154-1169)	PAEWTTIDADGDGQGW	ABM5(R15)
PrtR44 (976-991)	PASWKTIDADGDGHGW	ABM5(R44)
PrtK15 (1172-1187)	PAEWTTIDADGDGQGW	ABM5(K15)
PrtK39 (994-1009)	PASWKTIDADGDGHGW	ABM5(K39)
PrtK44 (1439-1454)	PASWKTIDADGDGNNW	ABM5(K44)
HagA (2068-2083)	PAEWTTIDADGDGQGW	ABM5(HagA1)
HagA (1612-1627)	PAEWTTIDADGDGQGW	ABM5(HagA2)
HagA (1156-1171)	PAEWTTIDADGDGQGW	ABM5(HagA3)
HagA (700-715)	PAEWTTIDADGDGQGW	ABM5(HagA4)
HagA (1430-1445)	PASWKTIDADGDGNNW	ABM5(HagA5)
HagA (974-989)	PASWKTIDADGDGNNW	ABM5(HagA6)
HagA (1886-1901)	PASWKTIDADGDGNNW	ABM5(HagA7)
HagA (518-533)	PASWKTIDADGDGNNW	ABM5(HagA8)
HagA (2335-2350)	PSSWKTIDADGDGNNW	ABM5(HagA9)
HagA (243-258)	PNGWTMIDADGDGHNW	ABM5(HagA10)
PrtR44 (919-938)	EGSNEFAPVQNLTGSAVGQK	ABM6(R44)
PrtR45 (659-678)	GEPNPYQPVSNLTATTQGQK	ABM6(R45)
PrtK39 (940-959)	EGSNEFAPVQNLTGSSVGQK	ABM6(K39)
PrtK48 (681-700)	GEPSPYQPVSNLTATTQGQK	ABM6(K48)
PrtK44 (1394-1412)	NSTQFNPVQNLTAEQAPNS	ABM6(K44)
HagA (469-488)	EGSNEFAHVQNLTGSAVGQK	ABM6(HagA1)
HagA (1834-1852)	DPVQFNPVQNLTGSAVGQK	ABM6(HagA2)
HagA (1378-1396)	DPVQFNPVQNLTGSAVGQK	ABM6(HagA3)
HagA (922-940)	DPVQFNPVQNLTGSAVGQK	ABM6(HagA4)
HagA (197-216)	EGGNEFAPVQNLQWSVSGQT	ABM6(HagA5)
HagA (2290-2308)	NPTQFNPVQNLTAEQAPNS	ABM6(HagA6)
PrtR44 (894-918)	GNHEYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTV	ABM7 (R44)
PrtR17 (1351-1375)	GNHEYCVEVKYTAGVSPKKCVNVTV	ABM7 (R17)
PrtR27 (1610-1630)	SHEYCVEVKYTAGVSPKVCVD	ABM7 (R27)
PrtK39 (915-939)	GNHEYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTV	ABM7 (K39)
PrtK44 (1369-1393)	GNHEYCVEVKYTAGVSPKKCVNVTV	ABM7 (K44)
HagA (2265-2289)	GNHEYCVEVKYTAGVSPKVCVNVTI	ABM7 (Hag1)
HagA (444-468)	GQYNYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTV	ABM7 (Hag2)
HagA (1809-1833)	GNHEYCVEVKYTAGVSPEVCVNVTV	ABM7 (Hag3)
HagA (1353-1377)	GNHEYCVEVKYTAGVSPEVCVNVTV	ABM7 (Hag4)
HagA (897-921)	GNHEYCVEVKYTAGVSPEVCVNVTV	ABM7 (Hag5)

따라서 본 발명의 제1 특징은 포피로모나스 긴기발리스에 대한 면역반응을 증가시키는 용도의 조성물에 있으며, 상기 조성물은 적당한 보조제 및/또는 수용가능한(acceptable) 담체 또는 부형제(賦形劑) 및 하기의 펩타이드로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 펩타이드를 포함한다.

FNGGISLANYTGHGSETAWGT;

LNTGVSFANYTAHGSETAWADP;

FDVACVNGDFLFSMPCFAEALMRA;

IGNCCITAQFDYVQPCFGEVITRV;

GEPNPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK;

EGSNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;

VNSTQFNPVKNLKAQPDGGDVVLKWEAPSAK;

GEPSPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWEAPSAK;

EGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNGT;

VNSTQFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK;

QFNPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;

FAHVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;

FAPVQNLQWSVSGQTVTLTWQAPASD;

QFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK;

DYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAT;

DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT;

SYTYTVYRDGTKIKEGLTETTYRDAGMSA;

SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA;

DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT;

SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT;

DYTYTVYRDNVVIAQNLAATTFNQENVAP;

SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT;

PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF;

PNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESF;

PNGTPNPNPNPNPGTTTLSESF;

PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK; 및VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF.본 발명의 제1 특징의 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 하기의 펩타이드로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 펩타이드를 포함한다.

FNGGISLANYTGHGSETAWGT;

LNTGVSFANYTAHGSETAWADP;

PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK;

SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA;

VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF;

WIERTVDLPAGTKYVAFRHY;

PAEWTTIDADGDGQGW; 및

EGSNEFAPVQNLTGSAVGQK.

상기 조성물이 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 경우, 상기 펩타이드는 개별적인 펩타이드 또는 멀티머 형태로 상기 조성물에 존재할 수 있다. 멀티머 형태가 사용되는 경우, 멀티머는 동일한 펩타이드의 다중(multiple) 복사체를 포함할 수 있다. 그러나 상이한 펩타이드를 포함하는 멀티머가 바람직하다.

표 1의 펩타이드(PAS1 및 PAS2)는 Cys-His 촉매성 이분체(dyad)를 함유하는 활성 자리를 형성하는 Arg-특이성(PrtR45) 및 Lys-특이성(PrtK48) 시스테인 단백질 분해효소의 서열을 나타낸 것이다.

나머지 펩타이드(ABM 펩타이드)는 PrtR-PrtK 단백질-아드헤진 복합체와 HagA의 아드헤진 결합 모티프(motif) 및 단백질 분해효소 활성자리 서열을 나타낸 것이며, 이들은 합성 펩타이드 백신으로서 효과적임이 입증되었다.

본 발명의 제2 특징은 하기의 펩타이드로 이루어지는 군에서 선택되는 펩타이드에 있다.

FNGGISLANYTGHGSETAWGT;

LNTGVSFANYTAHGSETAWADP;

FDVACVNGDFLFSMPCFAEALMRA;

IGNCCITAQFDYVQPCFGEVITRV;

GEPNPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK;

EGSNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;

VNSTQFNPVKNLKAQPDGGDVVLKWEAPSAK;

GEPSPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWEAPSAK;

EGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNGT;

VNSTQFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK;

QFNPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;

FAHVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;

FAPVQNLQWSVSGQTVTLTWQAPASD;

QFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK;

DYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAT;

DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT;

SYTYTVYRDGTKIKEGLTETTYRDAGMSA;

SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA;

DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT;

SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT;

DYTYTVYRDNVVIAQNLAATTFNQENVAP;

SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT;

PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF;

PNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESF;

PNGTPNPNPNPNPGTTTLSESF;

PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK; 및VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF.본 발명의 제2 특징의 바람직한 구현예에서, 상기 펩타이드는 하기의 펩타이드로 이루어지는 군에서 선택된다.

FNGGISLANYTGHGSETAWGT;

LNTGVSFANYTAHGSETAWADP;

PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK;

SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA;

VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF;

WIERTVDLPAGTKYVAFRHY;

PAEWTTIDADGDGQGW; 및

EGSNEFAPVQNLTGSAVGQK.

당업자는 상기의 펩타이드들이 진단 테스트용 항원 또는 제제 (formulations)용 면역원으로 사용될 수 있음을 쉽게 이해할 수 있을 것이다.

본 발명의 제3 특징은 본 발명 제1 특징의 조성물 또는 본 발명 제2 특징의 펩타이드에 대하여 특이적으로 유도되는 항체를 포함하는 항체 제제(preparation)에 있다. 항체는 폴리클론 또는 모노클론 항체일 수 있다.

본 발명의 제4 특징은 포피로모나스 긴기발리스 감염으로 병을 앓고 있는 대상의 치료 방법에 있으며, 이 방법은 상기 대상에 유효량의 본 발명 제3 특징의 항체 제제을 투여하는 것을 포함한다.

바람직한 구현예에서, 상기 항체 조성물은 구강 세정제(mouth wash) 또는 치약(dentifrice)으로 투여된다. 본 발명의 제5 특징은 포피로모나스 긴기발리스 감염으로 병을 앓고 있는 대상을 치료하는 방법에 있으며, 이 방법은 상기 대상에 본 발명의 조성물 또는 본 발명의 펩타이드를 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 조성물 또는 펩타이드는 구강 세정제(mouth wash) 또는 치약(dentifrice)으로 투여된다. 본 발명의 제6 특징은 개체의 포피로모나스 긴기발리스 감염 확률 및/또는 질병의 피해도를 감소시키는 방법에 있으며, 이 방법은 개체 내에서 포피로모나스 긴기발리스에 대한 면역반응을 유도하는 본 발명의 조성물을 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함한다.

본 명세서 전반에서, 달리 지정하지 않는한, '포함한다' 라는 것은 구성요소나 그 갯수 또는 구성요소나 그 갯수의 군을 포함하는 것을 의미하지만, 다른구성요소나 그 갯수 또는 구성요소나 그 갯수의 군을 제외시키는 것은 아니다. 펩타이드는 표준 고상 펩타이드 합성법, 예를 들면 t-부틸옥시카르보닐 아미노산을 사용하는 방법(Mitchell et al., 1978, J. Org. Chem. 43:2845-2852), 폴리아마이드 담체 상의 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc) 아미노산을 사용하는 방법(Druland et al., 1986, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 125-137), 펩스칸(pepscan) 합성법(Geysen et al., 1987, J. Immunol Methods 03;259;1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998) 또는 표준 액상 합성법을 포함하는 당 기술 분야에 공지된 펩타이드 합성법 중 하나를 이용하여 합성될 수 있다.

상기 펩타이드 항원은 다가/멀티펩타이드 고분자량 펩타이드 분자를 합성하는 다양한 방법을 사용하여 합성될 수 있다. 이는 당 기술 분야에 공지된 신규한 연결(ligation) 방법을 사용하여 이루어질 것이다.

합성 펩타이드 제조

표 1의 펩타이드는 동일하거나 상이할 수 있는, 상보적인 리간드이거나 그렇지 않을 수도 있는 두 개의 리간드를 함유하도록 합성될 수 있다. 이러한 이형(bi-modal) 펩타이드는 어떠한 리간드와도 결합할 수 있으므로, 티오에테르, 티오

에스테르, 히드라존, 옥심(oxim), 티아졸리딘과 같은 결합이 멀티펩타이드 구조체 합성에 사용될 수 있다(Shao and Tam., 1995, J. Am. Chem. Soc. 117, 3893-3899, Rose, et al 1996, Bioconjugate Chem. 7(5):552-556, Rose. K., 1994, J. Am. Chem. Soc. 116:30-33, Canne., et al. 1995, J. Am. Chem. Soc. 177:2998-3007, Lu., et al. 1991, Mol. Immunol 28(6):623-630, Liu and Tam., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91.:6584-6588). 신규한 연결 방법은 티오아니솔(thioanisole) 및 아크릴로일 펩타이드 간에 공지된 반응(O'Brien-Simpson et al., 1997, J. Am. Chem. Soc. 119 (6))을 사용하여 산성 조건에서 이중 결합에 의한 티오아니솔의 파라 치환을 일으키는 방법이다. 아크릴로일-펩타이드 및 페닐티오 아세틸 펩타이드를 합성하고 혼합하여 산성 조건에 이들을 노출시킴으로써 프리델-크래프트(Friedal-Craft) 알킬화 반응이 진행되어 연결이 이루어진다. 연결은 펩타이드 간에 이루어질 수도 있으며 상기 리간드 중 하나로 유도된 올리고리신 담체 상에서 이루어 수도 있다. 연결 조건은 당 기술 분야에 공지된 프리델-크래프트 반응 조건 및 펩타이드 절단(cleavage) 조건일 수 있다.

이형 펩타이드를 형성하는 리간드 그룹은 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단 또는 펩타이드 서열내의 유리 아미노기와 리간드를 결합시킴으로써 도입될 수 있다.이는 표준 펩타이드 커플링(coupling) 방법을 사용하여, 예를 들면 Fmoc(Fmoc) 2,3-디아미노 프로피온산 또는 Fmoc Lys (Fmoc)-OH 또는 Fmoc Lys (Mtt)-OH와 같이 수직으로 보호된 리신 잔기를 N-말단 또는 C-말단 또는 펩타이드 서열 사이 내로도입된다. 보호기를 제거한(deprotection) 후에 리간드 그룹을 아미노기에 결합시킬 수도 있고 Fmoc Lys (Mtt)와 같은 보호기를 선택적으로 제거하고 상이한 리간드를 단일 펩타이드에 결합시킬 수도 있다. 합성의 어떠한 단계에서도 사용될 수 있는 스페이서 부분(spacer moieties)이 펩타이드와 리간드 사이 및/또는 리간드들 사이에 도입되어 연결 반응에서 입체적 장해를 감소시킬 수 있다. 도 1은 합성 과정을 도시한 것이다.

펩타이드 연결은 용액 내 또는 고상(solid phase)에서 이루어질 수 있다. 상이한 리간드를 결합시키고 하나의 리간드를 선택적으로 보호함으로써 다가, 멀티펩타이드 구조체를 합성하고 펩타이드를 연속하여 연결할 수 있다. 이 방법은 연결된 펩타이드의 방향 및 순서를 알 수 있으며 조절할 수 있다는 이점이 있다. 리간드 보호기의 예로는 표준 절단 조건에 대하여 안정하며 염기성 조건 또는 촉매성 알릴 트랜스퍼(transfer)로 쉽게 제거될 수 있는 Fmoc, 알릴옥시카르보닐(Aloc), 또는 니트로신나밀옥시카르보닐(Noc)이 있다. 도 2는 이형 펩타이드를 사용하여 다가 펩타이드 구조체를 합성하는 연결 체계(ligation scheme)를 도시한 것이다. 이 방법은 이형 펩타이드를 형성하기 위하여 펩타이드와 결합하는 리간드를 간단히 변화시켜 다양한 연결 화학법에 적용될 수 있다.

각각의 펩타이드는 단계적으로 고상에 첨가될 수 있다. 이는 4-히드록시메틸 벤조산과 같은 염기 불안정성 물질을 처리하여 고체 담체에서 펩타이드를 합성함으로서 달성될 수 있다. 이것은 펩타이드의 곁사슬 보호기가 완전히 제거되고 펩타이드는 고체 담체상에 부착된 상태로 남아있도록 한다. 결과적으로, 고체 담체를 간단히 세척하여 반응하지 않은 이형 펩타이드에서 리간드 생성물을 분리시키는 것을 제외하고는 용액상 연결에 사용되는 것과 동일한 수 용매 중에서 연결이 수행될 수 있게된다. 이 반응은 닌히드린 또는 트리니트로벤젠 술폰산 테스트를 사용하여 관찰할 수 있으며, 이형 펩타이드 내의 리신 잔기는, 예를 들면 산성 절단에 안정하며 히드라진으로 제거될 수 있는 (4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥-1-실리덴) 에틸(Dde)로 보호될 필요가 있다. 도 3은 고상 연결 방법을 도시한 것이다.

리간드가 N-말단 및 C-말단에 존재하도록 이형 펩타이드가 합성될 수 있다. 이는 펩타이드가 N-말단이 N-말단에, C-말단이 C-말단에, 또는 N-말단이 C-말단과 각각 쌍을 이루어 서로 평행 또는 역평행으로 진행되어 고리형 펩타이드 제조 및 이형 펩타이드 구조체 형성을 가능하게 한다(도 4).

다가 펩타이드 구조체 합성에 관한 다른 방법은 펩타이드를 올리고리신 담체에 연결하는 것이다(Rose, et al 1996, Bioconjugate Chem. 7(5):552-556, Canne., et al 1995, J. Am. Chem. Soc. 117:2998-3007 and Lu., et al, 1

991. Mol. Immunol 28(6):623-630). 많은 상이한 리간드 및/또는 보호 리간드를 리신 담체에 결합시킴으로서 펩타이드를 담체 상의 특정한 위치에 연결시킬 수 있다. 할로알킬화(haloalkylation) 및 프리델-크래프트 알킬화 반응에 의한 옥심 또는 히드라존과 같은 연결 화학제가 리간드를 보호할 필요 없이 연속적으로 사용될 수 있다. 리간드 보호는 리신 담체에 결합된 상이한 펩타이드의 수를 증가시키기 위하여 사용될 수 있다. 도 5는 상기 합성 과정을 도시한 것이다.

당 기술분야에 공지된 다른 방법은 아크릴로일 펩타이드를 합성하여 이를 아크릴로일 아미노산 또는 아크릴아마이드와 중합하는 것이다(O'Brien-Simpson et al., 1997, J. Am. Chem. Soc. 119(6)). 표 1에 기재된 PrtR-PrtK 단백질 복합체의 펩타이드는 단독으로 또는 혼합되어 아크릴로일화된 후 중합 될 수 있다. 이 방법으로는 많은 펩타이드가 중합 가능하지만, 결합되는 펩타이드의 순서를 조절할 수 없다.

최종 펩타이드 구조체는 표 1에 기재된 펩타이드 전체 또는 일부를 함유할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 또한 상기 구조체는 당 기술 분야에 공지된 무차별적인 T-세포 에피토프(epitopes) (Kaumaya et al., 1994, in Solid Phase Synthesis, Ed Epton, R) 또는 MHC 클래스 II 결합 펩타이드의 구조적/결합 모티프에서 유래된 서열을 함유할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다(O'Sullivan et al., 1991, J. Immunol, 147:2663-2669, Hammer et al., 1993, Cell, 74:197-203 and Alexander et al., 1994, Immunity, 1:751-761). 또한, 팔미트산 또는 콜레스테롤과 같은 지질 부분이 포함되어 펩타이드 구조체의 면역원적 특성을 강화시킬 수도 있다. 효소적 절단이 가능한 공지된 서열(Duncan et al., ref) 또는 절단 모티프에서 유래된 서열(Van Noort and van der Drift., ref)도 또한 펩타이드 구조체에 결합 될 수 있다.

동정된 표 1의 합성 펩타이드 항원이 중화 항체를 함유하는 경구용 조성물을 통한 수동면역 및 백신 개발에 의한 중화 및 진단용으로 특히 효과적이다. 상기에서 언급된 포피로모나스 긴기발리스 항원에 비하여 이들 합성 펩타이드 항원의 우수한 점은 이들 서열이 포피로모나스 긴기발리스의 주요 병독성 인자인 PrtR-PrtK 단백질 분해효소-아드헤진 복합체의 구조적 기능적으로 중요한 영역과 상당히 일치한다는 것이다. 상기 펩타이드는 단백질 분해효소의 활성 자리 및 아드헤진의 결합 도메인과 관련된 서열을 나타내므로 진단 및 면역적예방 제품 개발용으로 이상이다.

항원에 대한 항체는 치약 및 구강 세정제와 같은 경구용 조성물에 사용되어 항원을 중화시켜 질병을 예방하는데 사용될 수 있다. 또한, 항원-특이성 항체는 진단 분석하여 치은하 플라크 샘플 내에서 포피로모나스 긴기발리스를 조기 검출하는데 사용될 수 있다. 이러한 항원 및 적당한 보조제로 이루어지는 백신을 코 또는 입으로 흡입하거나 주사하면 이들 항원에 대한 특이적 면역반응이 유도되어 포피로모나스 긴기발리스의 클론 및 병독성이 감소되어 질병을 예방할 수 있다. 본 발명의 펩타이드 항원은 예방 및/또는 치료 백신 조성물의 면역원으로 사용될 수 있으며; 혈청에서 포피로모나스 긴기발리스-특이성 항체의 혈청 역가(serum titre)의 증가를 측정하여 포피로모나스 긴기발리스의 감염을 검출하는 진단 면역분석용 항원으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 합성 펩타이드는 수동면역 및 치은하 플라크 샘플과 같은 임상용 표본에서 포피로모나스 긴기발리스 존재 여부를 검출하는 진단 분석용 시료로 사용될 수 있는 항원-특이성 항체를 생성하는데 사용될 수도 있다.

포피로모나스 긴기발리스 전체세포 또는 다른 기존에 제조된 항원과는 달리, 본 발명의 합성 펩타이드 항원은 포피로모나스 긴기발리스-관련 치주 질환과 관련된 백신 제조용으로 안전하고 효과적인 항원이다.

본 발명은 치주 질환과 연관된 구강 내 박테리아인 포피로모나스 긴기발리스의 병원 효과를 억제하는 경구용 조성물 및 면역원 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 치은하 플라크 샘플에서 포피로모나스 긴기발리스의 존재를 검출하는 진단 테스트 및 혈청 내의 특이적 항-포피로모나스 긴기발리스 항체에 관한 것이다. 표 1의 펩타이드 항원은 단독으로 또는 멀티머 또는 멀티펩타이드 구조체로 합성될 수 있다.

상기 합성 펩타이드 항원은 표준 방법을 사용하여 폴리클론 또는 모노클론 항체를 배양하는데 사용된다. 항체 배양에 사용되는 동물로는 생쥐, 토끼, 염소, 닭, 양, 말, 소 등이 있다. 항원에 대한 항체 역가를 면역학적 분석으로 검출하는 경우는 동물의 피를 뽑거나 알(egg) 또는 젖을 수집하여 표준 방법을 사용하여 혈청을 준비한 후 항체를 정제하거나, 표준 방법을 사용하여 비장 세포와 골수종 세포를 융합하여 모노클론 항체를 제조한다. 항체(면역글로불린 분획물)는 염석, 겔 여과, 이온교환 및/또는 친화성 크로마토그래피 등을 사용하여 배지 또는 복수(腹水) 유체, 혈청, 젖, 또는 알에서 분리될 수 있으며, 염석법을 사용하는 것이 바람직하다. 염석법에서는 항혈청 또는 젖을 황산암모늄으로 포화시켜 침전시킨 후, 이 침전물을 생리 식염수로 투석하여 특이 항체를 가지는 정제된 면역글로불린 분획물을 얻는다. 바람직한 항체는 말의 항혈청 및 소의 항혈청 및 우유에서 얻어지는 것이다. 본 발명에서는 동물에 항원을 접종하여 얻어지는 항혈청 및 젖에 함유된 항체를 경구용 조성물에 혼합한다. 이 경우에는 항혈청 및 젖뿐만 아니라 항혈청 및 젖에서 분리 정제된 항체가 사용될 수도 있다. 이런 물질은 각각 단독으로 또는 둘 이상을 혼합되여 사용될 수 있다. 항체는 치약 및 구강 세정제와 같은 경구용 조성물에 사용되어 포피로모나스 긴기발리스를 중화시켜 질환을 예방하는데 사용될 수 있다. 또한, 항체는 체어사이드(chairside) Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 사용하여 의한 치은하 플라크 샘플 내에서 포피로모나스 긴기발리스를 조기 진단하는데 사용될 수도 있다.

경구용 조성물에 투여되는 상기 항체의 용량은 0.0001 내지 50 g/kg/day이 바람직하며, 상기 항체의 함량은 조성물의 0.0002 내지 10 중량%, 특히 0.002 내지 5 중량%가 바람직하다. 상기 혈청 또는 젖 항체를 함유하는 본 발명의 경구용 조성물은 크림치약, 분말치약 및 액체치약, 구강 세정제, 정제, 츄잉 껌, 치과용 치약, 치은 맛사지 크림, 양치용 정제, 낙농제품, 및 그 밖의 식료품을 포함하는 치약과 같이 경구에 적용 가능한 다양한 형태로 제조되어 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 경구용 조성물은 특정 유형 및 형태에 따라 공지된 첨가성분을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 몇몇 매우 바람직한 형태에서 경구용 조성물은 실제로 구강 세정제 또는 헹굼제와 같은 액체일 수 있다. 이러한 제품에서 통상적인 전색제(vehicle)는 하기에 기재된 보습제(humectant)를 포함하는 물-알콜 혼합물이다. 일반적으로, 알콜에 대한 물의 중량비는 약 1:1 내지 20:1 이다. 이러한 유형의 제품 내에서 물-알콜 혼합물의 전체 함량은 통상적으로는 제품중량의 약 70 내지 99.9 중량%이다. 알콜은 에탄올 또는 이소프로판올이 보편적이며, 이중 에탄올이 바람직하다.

본 발명의 이러한 액체 및 다른 제품의 pH는 일반적으로 약 4.5 내지 9이며, 약 5.5 내지 8이 보편적이다. pH는 약 6 내지 8.0, 특히 7.4가 바람직하다. pH는 산(예, 시트르산 또는 벤조산) 또는 염기(예, 수산화나트륨) 또는 완충제(소듐 시트레이트, 베조에이트, 카보네이트, 또는 바이카르보네이트, 디소듐 하이드로겐 포스페이트, 소듐 디하이드로겐 포스페이트 등)로 조절될 수 있다.

본 발명의 다른 바람직한 형태의 경구용 조성물은 실제로 분말 치약, 치약 정제 또는 치약과 같은 특성의 고체 또는 크림(pasty) 형태, 즉 크림 치약 또는 젤 치약일 수 있다. 일반적으로 이러한 고체 또는 크림 형태의 경구용 조성물의 전색제는 치아에 적당한 폴리싱(polishing) 물질을 함유한다. 세정 물질의 예로는 수불용성 소듐 메타포스페이트, 칼륨 메타포스페이트, 트리칼슘 포스페이트. 디하이드레이티드 칼슘 포스페이트, 무수 디칼슘 포스페이트, 칼슘 피로포스페이트, 마그네슘 오르토포스페이트, 트리마그네슘 포스페이트, 칼슘 카보네이트, 수화된 알루미나, 하소된 알루미나, 알루미늄 실리케이트, 지르코늄 실리케이트, 실리카, 벤토나이트, 및 이들의 혼합물이 있다. 다른 적당한 폴리싱 물질에는 멜라민-, 페놀릭-, 및 우레아-포름알데하이드, 및 교차결합된 폴리에폭사이드 및 폴리에스테르와 같은 미립자 열경화성 수지가 포함된다. 바람직한 폴리싱 물질에는 약 5 미크론 이하의 입자 크기를 가지며 평균 입자 크기가 약 1.1 미크론 이하이고 표면적이 약 50,000 cm^2/gm인 결정형 실리카, 실리카겔 또는 콜로이드성 실리카, 및 비결정질의 알칼리 금속 알루미노실리케이트 복합체가 포함된다.

외관상 투명한 겔을 사용하는 경우에는 상품명 SYLOID인 Syloid 72 및 Syloid 74 또는 상품명 SANTOCEL인 Santocel 100과 같은 코로이드질 실리카의 광택제를 사용하며, 특히 치약에 보편적으로 사용되는 겔화제 액체(물 및/또는 보습제 포함) 시스템의 굴절률에 가까운 굴절률을 가지는 알칼리 금속 알루미노-실리케이트 복합체가 특히 유용하다.

많은 '수 불용성(water insoluble)' 폴리싱 물질은 음이온성이며 소량의 가용성 물질을 포함한다. 따라서, 적당한 방법을 사용하여 불용성 소듐 메타포스페이트를 제조할 수 있다(Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, Volume 9, 4th Edition, pp. 510-511). 보다 적당한 물질의 예로는 마드레염(Madrell's salt) 및 쿠론염(Kurrol' salt)으로 공지된 불용성 소듐 메타포스페이트 형태가 있다. 이들 메타포스페이트 염은 단지 순간적으로 수용성을 나타내므로, 보통은 불용성 메타포스페이트(IMP)라 불린다. 여기에는 불순물로서 소량의 가용성 포스페이트 물질이 존재하며, 이는 일반적으로 4 중량% 이하로 존재한다. 불용성 메타포스페이트의 경우에는 가용성 소듐 트리메타포스페이트를 포함하는 물로 세척하여 가용성 포스페이트 물질의 함량을 감소시키거나 제거할 수 있다. 불용성 알칼리 금속 메타포스페이트는 통상적으로는 물질의 1%를 넘지 않는 37 미크론 이상의 입자 크기를 가지는 분말 형태로 사용된다.

일반적으로 폴리싱 물질은 약 10 내지 99 중량%의 농도로 고체 또는 크림 조성물에 존재한다. 크림 치약에는 약 10 내지 75 % 함량으로 존재하는 것이 바람직하며, 분말 치약에는 약 70 내지 99% 함량으로 존재하는 것이 바람직하다. 크림 치약에서, 폴리싱 물질이 규산질인 경우에는 일반적으로 약 10 내지 30 중량% 함량으로 존재한다. 다른 폴리싱 물질은 통상 약 30 내지 75 중량% 함량으로 존재한다.

크림 치약에서, 액체 전색제는 통상 제품의 중량을 기준으로 약 10 내지 80 중량% 함량의 물 및 보습제를 포함할 수 있다. 글리세린, 프로필렌 글리콜, 소르비톨, 및 폴리프로필렌 글리콜은 적당한 보습제/담체의 예이다. 또한 물, 글리세린, 및 소르비톨의 액체 혼합물이 유용하다. 굴절률이 중요한 투명 겔에는 약 2.5 내지 30% w/w의 물, 약 0 내지 70% w/w의 글리세린, 및 20 내지 80% w/w의 소르비톨이 사용되는 것이 바람직하다.

크림 치약, 크림 및 겔은 통상 천연 또는 합성 증점제(thickner) 또는 겔화제를 약 0.1 내지 10, 바람직하게는 0.5 내지 5% w/w 비율로 함유한다. 적당한 증점제는 합성 헥토라이트, 합성 콜로이드 마그네슘 알칼리 금속 실리케이트 복합체 점토이며, 제품의 예로는 Laporte Industries Limited 제품의 Laponite(예, CP, SP 2002, D)가 있다. Laponite D는 대략 58.00%의 SiO_2, 25.40%의 MgO, 3.05%의 Na_2O, 0.98%의 LiO_2, 및 약간의 물과 소량의 금속으로 이루어진다. 이것의 비중은 2.53이며, 습도 8%에서 1.0 g/㎖의 겉보기 부피밀도(bulk density)를 가진다.

다른 적당한 증점제는 아이리시 이끼, 이오타 카라게닌(iota carrageenan), 트레거컨트 고무(gum tragacanth), 녹말, 폴리비닐피롤리돈, 히드록시에틸프로필셀룰로스, 히드록시부틸 메틸 셀루로스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀루로스(예, 시판 제품인 Natrosol), 소듐 카르복시메틸 셀루로스, 및 미세하게 분쇄된 Syloid(예, 244)와 같은 콜로이드 실리카를 포함한다. 또한, 가용화제(solubilizing agent)가 포함될 수 있는 프로필렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜, 및 헥실렌 글리콜과 같은 보습 폴리올, 메틸 셀로솔브(cellosolve) 및 에틸 셀로솔브와 같은 셀로솔브, 올리브유, 피마자유, 및 바셀린과 같이 직쇄(straigth chain)에 적어도 12개의 탄소원자를 함유하는 식물성 기름과 왁스, 및 아밀 아세테이트, 에틸 아세테이트, 및 벤질 베조에이트와 같은 에스테르가 있다.

경구용 조성물은 기존의제품과 마찬가지로 적당한 이름을 가진 포장제품으로 시판될 것이다. 따라서 구강 헹굼제의 용기는 구강 헹굼제 또는 구강 세정제와 같이 이것을 설명하고 이들의 용도를 나타내는 이름을 가질 것이다; 크림 타입의 치약, 크림 또는 겔은 일반적으로 크림치약, 겔 또는 덴탈 크림과 같이 이들을 설명하는 이름이 표기된 압출 튜브, 통상 알루미늄, 라인드 리드(lined lead) 또는 플라스틱, 또는 다른 스퀴즈(squeeze), 펌프 또는 압축 분산기(dispenser)에 내장된다.

예방 효과를 증가시키고 활성제를 구강 전체에 완전하고 완벽하게 분산되도록 조력하며 상업적으로 보다 잘 수용될 수 있는 인스턴트 조성물을 얻기 위하여 본 발명의 조성물에 유기질의 표면-활성제가 사용된다. 유기질 표면-활성 물질은 실제로 본 발명의 항체를 변성시키기 않는 음이온성, 비이온성 또는 양쪽성이 바람직하며, 표면-활성제는 항체를 변성시키지 않으면서 조성물에 세제 특성 및 발포 특성을 부여하는 세제 물질을 사용하는 것이 바람직하다. 적당한 음이

온성 계면활성제의 예로는 수소화 코코넛유 지방산의 모노설페이트화 모노글리세라이드의 소듐염과 같은 고분자 지방산 모노글리세라이드 모노설페이트, 소듐 라우릴 설페이트와 같은 고분자 알킬 설페이트, 소듐 도데실 벤젠 술포네이트와 같은 알킬 아릴 술포네이트, 고분자 알킬술포-아세테이트, 1,2-디히드록시 프로판 술포네이트의 고분자 지방산 에스테르, 및 지방산, 알킬 또는 아실 라디칼에 12 내지 16개의 탄소원자를 가지는 저분자 지방족 아미노 카르복시산 화합물의 대체로 포화된 고분자 지방족 아실 아마이드 등의 수용성 염이 있다. 마지막으로 언급된 아마이드의 예로는 비누 또는 유사한 고분자 지방산 물질이 실제적으로 제거된 N-라우로일 사코신(sarcosine), 및 N-라우로일, N-미리스토일, 또는 N-팔미토일 사코신의 소듐, 칼륨, 및 에탄올아민 염이 있다. 이들 사코나이트(sarconite) 화합물을 본 발명의 경구용 조성물에 사용하면 산성 용액 내에서 치아 에나멜(enamel)의 용해도가 다소 감소될 뿐 아니라 탄화수소 분해에 따른 구강 내의 산성의 형성을 억제하는 뛰어난 효과를 나타낸다. 항체와 함께 사용하기에 적당한 수용성의 비이온성 계면활성제의 예로는 폴리(에틸렌 옥사이드)와 지방산, 지방질 알콜, 지방질 아마이드 폴리하이드릭 알콜(예, 소르비탄 모노스테아레이트), 및 폴리프로필렌옥사이드(예, 플루론계(Pluronic) 물질)의 축합(condensation) 생성물과 같은 소수성의 긴 사슬(예, 약 12 내지 20개의 탄소원자를 가지는 지방족 사슬)을 가지는 다양한 반응성 수소 함유 화합물과 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물이 있으며, 이들 축합 생성물('에톡사머: ethoxamer')은 친수성 폴리에틸렌 부분을 함유한다.

표면 활성제는 통상 약 0.1 내지 5 중량%의 함량으로 존재한다. 주목할 만한 사실은, 표면 활성제가 본 발명의 항체가 용해되는 것을 도와주므로 가용화 보습제의 요구량을 감소시킬 수 있다는 것이다.

본 발명의 경구용 조성물에는 미백제, 보존제, 실리콘, 클로로필 화합물, 및/또는 우레아, 디암모늄 포스페이트와 같은 암모니아성 물질, 및 이들의 혼합물과 같은 다른 다양한 물질이 첨가될 수 있다. 이러한 보조제가 사용되는 경우에는 바람직한 특성 및 특징에 대하여 실제로 역효과를 나타내지 않는 함량으로 조성물에 첨가된다.

또한, 적당한 향료 또는 감미제가 사용될 수도 있다. 적당한 향료 성분의 예로는 스피아민트, 페파민트, 윈터그린, 사사프라스(sassafras), 클로브(clove), 세이지, 유칼리나무, 마요라나(marjoram), 계피(cinnamon), 레몬, 및 오렌지와 같은 향료 기름 및 메틸 살리실레이트가 있다. 적당한 감미제는 수크로스, 락토스, 말토스, 소르비톨, 크실리톨, 소듐 사이클라메이트, 페릴라틴(perillartine), AMP(아스파틸 페닐 알라닌, 메틸 에스테르), 사카린, 등을 포함한다. 바람직하게는, 향료 및 감미제는 각각 또는 함께 조성물에 약 0.1 내지 5% 이상 포함될 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시예에서 본 발명의 조성물을 함유하는 구강 세정제 또는 치약과 같은 본 발명의 경구용 조성물은 매일매일 또는 이틀 또는 사흘 또는 바람직하게는 매일 1 내지 3회씩, pH 약 4.5 내지 9, 일반적으로는 약 5.5 내지 8, 바람직하게는 약 6 내지 8로, 적어도 2주 내지 8주 동안 또는 평생 동안 규칙적으로 치아에 적용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 조성물은 로젠즈(lozenges) 또는 츄잉껌 또는 그 밖의 제품, 예를 들면 종래의 가소제 또는 연화제, 설탕 또는 글루코스, 소르비톨 등과 같은 다른 감미료와 함께 젤루통(jelutong), 고무 라텍스, 비닐라이트 수지 등일 수 있는 따뜻한 껌의 기본재료에 교반 첨가하거나 껌 기본재료의 외피에 코팅하거나 하여 첨가될 수 있다.

본 발명의 다른 중요한 형태는 코 흡입, 경구 투여 또는 주사로 투여되어 항원에 대하여 특이적으로 면역반응을 일으켜 포피로모나스 긴기발리스 콜로니 및 병독성을 감소시켜 질병을 예방하는 항원 및 적당한 보조제로 이루어지는 면역 조성물이다. 포피로모나스 긴기발리스 전체세포 또는 기존에 제조된 항원과는 달리, 본 발명의 펩타이드 항원은 포피로모나스 긴기발리스 관련 치주 질환을 예방하는 백신의 제조용으로 안전하고 효과적인 항원이다. 또한, 본 발명의 항원 펩타이드는 치주 질환 및 포피로모나스 긴기발리스 매개성 감염에 대한 수동면역법에 유용한 포피로모나스 긴기발리스 항혈청 생성에 사용될 수 있다.

하기 실시예는 본 발명의 특성을 보다 자세히 설명하기 위한 것이며, 이들 실시예로 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다. 본 명세서 및 첨부된 청구항에 기재된 모든 함량 및 비율은 달리 지정하지 않는 한 중량을 기준으로 한 것이다.

도면의 간단한 설명

< 도 1 이형 펩타이드 합성.

뒤에는 특정한 실시예가 도시되어 있지만 리간드는 리신의 a 또는 e 아미노기에 도입될 수도 있다.

(a) 아크릴화: 예) 아미노산:HOBt:HBTU:DIPEA이 1:1:1:1.5인 디메틸 포름아마이드(DMF) 용액.

(b) Fmoc 보호기 제거: 예) 20% 피페리딘 DMF 용액.

(c) 레불린산(Levulinic acid):디이소프로필 카보디이미드(DIC)이 2:1인 디클로로메탄(DCM) 용액, 1시간.

(d) Mtt 제거: 3×1% TFA DCM 용액, 3분.

(e) Fmoc-히드라지노(Hydrazino) 벤조산:DIC가 2:1인 DCM 용액, 1시간.

(f) 산성 절단: 예) TFA:물 95:5.

< 도 2 이형 펩타이드를 사용하는 다가 펩타이드 합성.

(a) 연결(ligation): 8 M 우레아 및 0.1 M NaH_2PO_4 (pH: 3 내지 4.7), 연결은 역상(reverse phase) 분석용 HPLC 및 질량 분석기(mass spectrometry)를 사용하여 관찰될 수 있다.

(b) 보호기 제거(deprotection): 예를 들면, Aloc는 염기성 리셉터 (receptor)에 대한 팔라듐(0)-촉매 아릴기 트랜스퍼(transfer)에 의하여 제거된다. 연결 생성물은 예비 HPLC을 사용하여 정제하여 수분을 제거할 수 있다(lyphoised).

(c) 연결: 상기 (a)와 동일한 조건. 상이한 리간드를 가지는 펩타이드를 합성하고 동일한 펩타이드 상에는 비-상보적인 리간드를 합성하여 연결하므로 리간드를 보호할 필요가 없다. 사각형 = 보호된 것, L = 리간드, P = 펩타이드.

< 도 3 고상에 의한 이형 펩타이드를 사용하는 다가 펩타이드 구조체 (multivalent peptide constructs) 합성.

(a) 보호기 제거 및 연결: S-아세틸 보호기는 pH 7.3, 0.05 M 수계 히드록시아민으로 제거된다. 세척한 후, 제1 펩타이드를 SH기에 연결될 수 있고, 질소 존재하에서 6 M 수계 구아니딘 염화수소 및 0.05 M EDTA는 1 M 트리스-HCl을 사용하여 pH를 6.4 내지 6.5로 조절된다. 연결 버퍼는 아세토니트릴과 같은 유기 용매를 함유할 수 있다.

(b) 보호기 제거: S-아세틸 보호기는 pH 7.3, 0.05 M 수계 히드록시아민으로 제거된다.

(c) 연결: (a)에 기재된 방법과 같으며, 상이한 리간드를 가지는 펩타이드를 합성하고 동일한 펩타이드와 비-상보적인 리간드를 합성하여 사용하므로 리간드를 보호할 필요가 없다. 사각형 = 보호된 것, L = 리간드, P = 펩타이드.

< 도 4 이형 펩타이드를 사용하는 고리화(Cvclization).

(a) 보호기 제거 및 고리화: N-말단과 C-말단의 리간드와 상보적인 이형 펩타이드를 합성하여 수계 버퍼 내에서 이들 펩타이드를 고리화한다. (i) 연결, (ii) 보호기 제거 및 연결, (iii) 염기 불안정성 핸들에서 고리형 펩타이드 절단.

예를 들어도시된 펩타이드는 prtR 45에 활성 자리 펩타이드가 존재하는 표1의 펩타이드이다.

(a) 연결: 95% 수계 TFA, 역상 분석용 HIPLC 및 질량 분석기를 사용하여 연결을 관찰할 수 있다. 연결 조건에는 펩타이드 합성에 보편적으로 사용되는 스캐빈져(scavengers)가 포함될 수 있으며 프리델-크래프트 알킬화를 촉진하는 상이한 산성 조건이 포함될 수도 있다.

(b) 보호기 제거 및 연결: S-아세틸 보호기는 pH 7.3, 0.05 M 수계 히드록시아민으로 제거된다. 세척한 후, 제1 펩타이드를 SH기에 연결될 수 있고, 질소 존재하에서 6 M 수계 구아니딘 염화수소 및 0.05 M EDTA는 1 M 트리스-HCl을 사용하여 pH를 6.4 내지 6.5로 조절된다. 연결은 고상에서 수행된다. N-말단 및 C-말단에 도입되는 리간드를 선택하면 평행 및 역평행의 고리형 펩타이드를 합성할 수 있다.

< 도 5 다른 연결 화학을 사용하는 다가 멀티 항원 펩타이드(MAPs) 합성.

상이한 연결 방법을 사용하면 다양한 펩타이드를 단일 멀티 항원 펩타이드에 연결할 수 있다. 예를 들어 도시된 펩타이드는 표 1에 기재된 펩타이드이다.

(a) 연결: 95% 수계 TFA, 반대 상 분석용 HIPLC 및 질량 분석기를 사용하여 연결을 관찰할 수 있다.

(b) 보호기 제거(deprotection): 예를 들면, Aloc는 염기성 리셉터 (receptor)에 대한 팔라듐(0)-촉매 아릴기 트랜스퍼(transfer)에 의하여 제거된다. 정제 후, 제2 펩타이드를 MAP에 연결할 수 있다.

(c) 8 M 우레아 및 0.1 M NaH_2PO_4 (pH 3 내지 4.7).

< 도 6 포화 및 농축 분획물을 Q 세파로스 음이온 교환 FPLC에서 용리하는 겔 여과 FPLC.

160-246 mM NaCl에서 용리되고 단백질 분해활성/아미노산 분해활성의 주요 피크의 리딩 에지(leading edge)를 나타내는 이온교환 분획물을 모아, pH 7.4, 50 mM의 NaCl을 함유하는 TC 버퍼로 평형화하고 농축하여, 동일한 버퍼를 사용하여 0.3 ㎖/min의 유속으로 Superose HR 10/30 겔여과 칼럼에 걸었다. 아조카제인, BZ-L-Arg-pNA, 및 z-L-Lys-pNA를 사용하여 분획물(0.5 ㎖)의 단백질 분해활성/아미노산 분해활성을 분석하였다. BZ-L-pNA를 가지는 각각의 분획물 0.5 ㎖의 아미노산 분해활성을 히스토그램으로 도시하였다.

< 도 7 Arg-특이적 활성을 함유하며 200 mM NaCl에서 용리되는 이온 교환 (Mono Q) 피크의 SDS-PAGE (boiled/reduced conditions).

레인 1 = Pharmacia 저분자 표준; 레인 2 = 정제된 5o kDa Arg-특이성 단백질 분해효소, PrtRII50.

< 도 8 최적의 유사성을 가지는 PrtRⅡ50, PrtR45 Arg-특이성 단백질 분해효소, 및 PrtK48 Lys-특이성 단백질 분해효소에서 유래된 아미노산 서열의 배열.완성된 단백질의 N-말단 잔기에서부터 rtRII50의 아미노 아실 잔기에 번호를 매겼다. *는 PrtRⅡ50과 동일한 잔기를 나타낸다. 밑줄 그은 잔기는 추정되는 아드헤진-결합 모티프를 나타낸다. 추정되는 촉매활성 His 및 Cys 잔기는 박스로 묶었다. < 도 9 prtRⅡ,prtR, 및 prtK 유전자의 모식도. 최적의 유사성을 가지는 PrtRⅡ50, PrtR45 Arg-특이성 단백질 분해효소, 및 PrtK48 Lys-특이성 단백질 분해효소에서 유래된 아미노산 서열의 배열.

PrtR 초기 폴리프로테인은 리더 서열 및 전구분절로 이루어지고 그 뒤에 PrtR45 Arg-특이성 단백질 분해효소 및 뒤에 PrtR44, PrtR15, PrtR17, 및 PrtR27 아드헤진 도메인이 이어지는 구조로 되어있다. PrtK 초기 폴리단백질도 이와 유사하게 리더 서열, 전구분절, PrtK48 Lys-단백질 분해효소, 및 PrtK39, PrtK44 아드헤진 도메인으로 이루어진다. PrtRⅡ 초기 폴리단백질은 아드헤진과 관련없이 리더 서열, 전구분절, 및 PrtRⅡ50 Arg-특이성 단백질 분해효소만으로 이루어진다. B는 추정되는 아드헤진-결합 모티프와 연관되는 위치를 나타낸 것이며, C는 단백질 분해효소의 추정되는 촉매활성 His, Cys 이분체의 위치를 나타낸 것이다. < 도 10 추정되는 아드헤진 결합 모티프(ABM)에 해당하는 합성 펩타이드와 TLCK-불활성화 PrtR-PrtK 단백질 분해효소-아드헤진 복합체의 결합을 입증하는 경쟁적 결합 분석.

TLCK-불활성화 PrtR-PrtK 단백질 분해효소-아드헤진 복합체의 결합을 입증하는 경쟁적 결합 분석.

-◖ -◖ -ABM 합성 펩타이드 PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK, PrtR45의 428-448 잔기에 해당하는
-▌ -▌ -조절 펩타이드 FNGGISLANYTGHGSETAWGT, - ◢ -◢ -카제인. 물질 및 방법을 자세히 살핀다.

< 도 11 생쥐의 abcsess 모델에서 포피로모나스 긴기발리스로 자극받은 생쥐의 평균 병소 크기.

BALB/c 생쥐(6/group)에 CFA 및 IFA에서 유화된 500 μg의 항원을 1차 및 2차 접종한 후(s.c.), 8 ×10 ^{9}의 포피로모나스 긴기발리스 균주 33277로 자극하였다.

ABMl(R45)-DT, (□); ABM2(K39)-KT,(◖): ABM3(R44)-DT, (*); ABM4(Rl7)-DT, (◖); ABM5(Rl5)-DT, (◆); ABM6(K39)-DT, (◇); PAS1(R45)-DT, (◢); PAS1(K48)-DT, (▌); 대조 펩타이드-DT, (-◇-); 포르말린으로 죽인 포피로모나스 긴기발리스 균주 33277, (+); DT,(- - ∠ - -); 보조제, (×). 명백한 오류에 대한 바(bars)는 도시되시 않았다.

실시예

실시예 1

포피로모나스 긴기발리스 W50의 Arg-특이성 단백질 분해효소를 코딩하는 두 번째 유전자를 클로닝하고 판독하여 단백질 분해효소 활성 자리 및 아드헤진 결합 모티프의 동정을 용이하게 한다.

시 약

O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HBTU), 1히드록시벤조트리아졸(HOBt), 디이소프로필에틸아민(DIPEA), N,N-디메틸포름아마이드(DMF), 피페리딘, 트리플루오로아세트산(TEA), 및 9-플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc)-보호된 아미노산을 Auspep Pty Ltd (Melbourne, Australia)에서 구입하였다. 트리이소프로필실란(TIPS) 및 에탄디티올(EDT)을 Aldrich(New South Wales, Australia)에서 구입하였다. 1,8-디아자바이시클로[5.4.0]운데-7-켄(DBU)을 Sigma Chemical Company(New South Wales, Australia)에서 구입하였다. 페놀 및 디에틸 에테르를 BDH(Poole, UK)에서 구입하였다. 달리 언급하지 않는다면, 화학물질은 펩타이드 합성 물질(grade) 또는 이것의 등가물이다.

박테리아 균주 및 생장 조건

포피로모나스 긴기발리스 W50의 동결건조 배양물은 P. Marsh 교수로부터 제공받았다(PHLS, Centre for Applied Microbiology and Reaserch, Wiltshire, UK). 포피로모나스 긴기발리스 W50은 혐기성 조건에서 배양하였으며(Bhogal et al., 1997) Escherichia coli JM109 및 LE392 균주는 상기에 개시된 방법에 따라 배양하였다(Slakeski et al., 1996).

50 kDa Arg-특이성 단백질 분해효소 정제

포피로모나스 긴기발리스 W50을 배치(batch) 배양액(5 ℓ) 내에서 배양하여 후기의 로그증식기에서 원심분리하여(5,000 ×g, 20 min, 4 ℃) 회수하였다. 세포를 50 mM NaCl을 함유하는 TC 버퍼(20 mM 트리스-HCL, pH 7.4, 및 5 mM $CaCl_2$) 150 ㎖로 1회 세척하고 상기에 개시된 방법에 따라 분쇄(sonicate) 하였다(Bhogal et al., 1997). 상기 분쇄물을 원심분리하여(100,000 ×g, 30min, 4℃) 음이온-교환 FPLC전에 상층액을 여과하였다(0.22 ㎛). 여과물을 50 ㎖의 슈퍼루프(superloop, Pharmacia-LKB))를 사용하여 여러번 주입하여 4℃로 냉각된 음이온-교환 칼럼(Hiload XK 16/10 Q Sepharose, Pharmacia-LKB)에 가하였다. 분쇄물을 90 분에 걸쳐 2.0 ㎖/min의 유속으로 직선 구배를 사용하여 0 내지 100% 버퍼 B에서 용리하였다. 280 nm에서 흡광도를 측정하고, Frac 100 분획물 수집기(Pharmacia-LKB)를 사용하여 4℃에서 6 ㎖의 분획물에서 용리물을 수집하였다. 버퍼 A는 50 mM의 NaCl을 함유하는 TC 버퍼이며 버터 B는 500 mM의 NaCl을 함유하는 TC 버퍼이다. 기질이 첨가되기 전에 분획물이 10 mM의 시스테인으로 25℃에서 10분 동안 예비-배양되는 것을 제외하고는 상기에 기재된 바와 같이 아조카제인(A-2765, Sigma Chemical Co. St Luis, MO), 벤조일-L-Arg-p-니트로아닐라이드(Bz-L-Arg-pNA, Sigma), 및 벤조일옥시카르보닐-L-Lys-P-니트로아닐라이드(z-L-Lys-pNA, Calbiochem, Melbourne, Australia)를 사용하여 분획물의 단백질 분해활성 및 아미노산 분해활성을 분석하였다. 아미노산 분해도를 분석하기 위하여 상기에 기재된 바와 같이(Bhogal et al., 1997) 410 nm에서 흡광도를 관찰하여 아미노산 분해 활성을 U로 나타내었다 (U = 25℃에서 분당 전환되는 기질(㎛㏖)). Lys-특이적 활성에 대한 Arg-특이성을 최고의 비율로 함유하는 160 내지 246 mM NaCl에서 용리한 음이온-교환 분획물을 150 mM NaCl을 함유하는 TC 버퍼 내에서 centripep 및 centricon 10 농축기(Amicon)를 사용하여 세척하고 농축하여 150 mM NaCl을 함유하는 TC 버퍼를 사용하여 0.3 ㎖/min의 유속으로 겔 여과 칼럼(Superose 12, HR 10/30, Pharacia-LKB)에 가하였다. 280 nm에서 흡광도를 측정하고 Frac 100 분획물 수집기를 사용하여 4℃에서 분획물을 수집하였다. 겔 여과 분자량 측정법(Pharmacia-LKB)을 사용하여 용리 피크의 M_r 값을 측정하였다. 단지 Arg-특이성 아미노산 분해활성을 함유하는 50 kDa에서 피크 용리물을 50 mM NaCl을 함유하는 TC 버퍼 내에서 centricon-10 농축기(Amicon)를 사용하여 세척하고 5 ㎖ 루프를 사용하여 Mono Q(HR 5/5) 음이온-교환 칼럼에 가한 후 1.0 ㎖/min의 유속으로 0 내지 100% 버퍼의 직선 구배를 사용하여 용리하였다. 버퍼 A는 150 mM의 NaCl을 함유하는 TC 버퍼이며 버터 B는 500 mM의 NaCl을 함유하는 TC 버퍼이다. 280 nm에서 흡광도를 측정하고 Frac 100 분획물 수집기를 사용하여 4℃에서 분획물을 수집하였다.

SDS-PAGE, 단백질 트랜스블롯(transblot) 및 N-말단 서열 분석

12%(w/v), 1 mm 분리젤 5% 적층 젤(Laemmli, 1970)을 가지는 Mini proptean II 전기영동 시스템(Biorad)을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하고, 단백질을 트랜스블롯하고 상기에 기재된 방법에 따라(Bhogal et al., 1997) N-말단의 서열을 분석하였다.

클로닝 및 뉴클레오타이드 서열 분석

PrtR45의 N-말단 서열에 해당하는 prtR의 뉴클레오타이드 서열(Slakeski et al., 1996)에서 유래된 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 포피로모나스 긴기발리스 W50 LambdaGEM™-12 게놈 은행(Slakeski et al., 1996)을 스크린 하였다. 올리고뉴클레오타이드 프로브(probe)의 5'-말단을 γ^{32} P ATP 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제(kinase)를 사용하여 표지하였다. 대략 1.5 ×10^4 파지(phage)를 나일론 막 필터 상에 걸고 49℃에서 혼성화(hybridisation) 버퍼(6 ×SSC(SSC = 15 mM 소듐 시트레이트, 150 mM NaCl, pH 8.0), 0.25% SDS, 5 ×Denhardt's 용액(Sambrook et al., 1989), 및 100㎍/㎖ 연어 정자 DNA) 내에서 하룻밤 동안 방사능 표지된 올리고뉴클레오타이드와 혼성시켜 스크린하였다. 필터를 49℃에서 0.1% SDS(w/v)를 함유하는 2 ×SSC 용액으로 광범위하게 세척하였다. 표준법(Sambrook et al., 1989)을 사용하여 양성-혼성화 플라크에서 파지를 정제하였다. 파지 DNA를 Eco72 I로 분해하고 얻어진 분절(fragment)을 열적층법(heat shoock procedure, Sambrook et al., 1989)을 사용하여 E. coli JM 109를 형질 전환시키는데 사용된 Sma I-BAP pUC18(Pharmacia, Sydney, Australia)에 연결하였다. 상기에 기재된 방법에 따라(Slakeski et al., 1996) 이중가닥 DNA 주형의 서열을 분석하였다.

prtRⅡ로 코딩된 내부 Eco 72I 자리를 함유하는 991 bp의 분절을 두 개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 5'-CGGCTTCCGTAAAGTC-3'(전위 프라이머는 PrtRⅡ 서열의 657-672 염기와 동일함) 및 5'-TGGCTACGATGACGATCATACGAC-3'(PrtRⅡ의 1624-1647 염기와 96% 동일성을 가지는 역위 프라이머)을 사용하여 PCR 증폭하였다. 100 ㎕의 최종 부피 및 100 ng의 포피로모나스 긴기발리스 W50 게놈 DNA, 0.2 mM의 dNTP, 1.5 mM 의 $MgCl_2$, 100 ㎜ol의 각각의 프라이머, 20 mM의 트리스-HCl, pH 8.4, 50 mM의 KCl, 및 2.5 U의 Taq DNA 폴리머라제(Gibco BRL)를 함유하는 반응 혼합물 내에서 PCR을 수행하였다. 반응 혼합물을 95에서 3분 동안 가열한 후, 95℃에서 30초 동안 25 사이클의 DNA 변성(denaturation)을 실시하고, 40℃에서 1분 동안 프라이머를 어닐링(annealing)하고 72℃에서 2 분 간 방치하였다. 사이클링에 이어서, 마지막으로 반응 혼합물을 72℃에서 5분 간 가열하였다. 증폭된 DNA를 PCR Spinclean Kit(Progen)을 사용하여 정제하고 Eco 72I 자리에서 양방향으로 서열을 분석 하였다.

Arg-특이성과 Lys-특이성 단백질 분해효소 및 아드헤진의 고분자 복합체(PrtR-PrtK 복합체) 정제

고분자, 포피로모나스 긴기발리스 W50의 세포-관련 단백질 분해효소-아드헤진 복합체(PrtR-PrtK 복합체)를 음이온-교환, 젤 여과, 및 Arg-세파로스 친화성 크로마토그래피를 사용하여 세포 분쇄물에서 정제하였다(Bhogal et al., 1997). SDS-PAGE, 트랜스블로팅, 및 서열분석을 사용하여 상기 복합체를 판독하고 Bz-L-Arg-pNA 및 Z-L-Lys-pNA 기질을 사용하여 효소 활성을 분석 하였다(Bhogal et al., 1997).

고상 펩타이드 합성

표준 Fmoc 고상 펩타이드 합성 방법을 사용하여 수동으로 펩타이드를 합성하였다. 상기 펩타이드를 Fmoc-Pal-Peg-PS 수지(PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA)를 사용하여 카르복시아마이드 형태로 응집시켰다. 4가의 Fmoc-아미노산 및 6가의 DIPEA를 사용하여 HBTU/HOBt 활성화로 커플링을 수행하였다. 2% v/v 피페리딘을 함유하는 DMF 내의 2% v/v DBU로 Fmoc기를 제거하였다. TFA:페놀:TIPS:EDT:물(92:2:2:2:2) 절단 칵테일(cocktail)을 사용하여 2.5시간 동안 수지 담체에서 펩타이드를 절단하였다. 절단 후, 여과하여 수지를 제거한 후, 이 여과물을 질소 하에서 대략 1 ㎖로 농축하였다. 펩타이드 생성물을 차가운 에테르로 침전시킨 후, 원심분리하여 3차례에 걸쳐 세척하였다. 그런 후에, 펩타이드 침전물을 0.1% v/v TFA를 함유하는 10 ㎖의 물에 녹이고 원심분리하여 불용성 수지를 제거하였다.

합성된 펩타이드를 Water HPLC 시스템에 장착된 Brownlee C18 Aquapore ODS 칼럼(250 ×100 mm)을 사용하여 정제하였다. 크로마토그램을 0.1% v/v TFA 수용액(용매 A) 및 0.1% v/v TFA 90% 아세토니트릴 수용액(용매 B)을 사용하여 5.0 ㎖ min^{-1} 의 유속으로 전개시켰다. 펩타이드를 10 내지 30%의 용매 B의 구배로 40분에 걸쳐 용리하였다. Applied Biosytems HPLC 시스템에 장착된 Brownlee C8 Aquapore RP-300 칼럼(220 ×4.6 mm)을 사용하여 분석용 HPLC를 수행하였다. 크로마토그램을 1.0 ㎖ min^{-1} 의 유속으로 용매 A 및 용매 B 및 0 내지 100% 직선 구배 용매 B를 사용하여 30분에 걸쳐 전개시켰다. 214 nm의 흡광도를 사용하여 칼럼에서 용리된 물질을 관측하였다. PerSeptive Biosystems Voyager DE MALDI-TOF를 사용하여 펩타이드의 질량을 분석하였다.

경쟁적 결합 분석

평평한 바닥의 폴리비닐 미세적정 플레이트(Microtitre, Dynatech Laboratories, VA)의 웰을 0.1% v/v Tween 20 (PBST) 및 0.1% w/v 소듐 아자이드를 함유하는 pH 7.4, 0.1M 포스페이트 버퍼 염용액 내에서 아드헤진 결합 모티프(ABM) 펩타이드 용액을 사용하여 4℃에서 하룻밤 동안 코팅하였다. 코팅 용액을 제거한 후, 2% w/v 스킨 밀크 파우더 함유 PBST 용액을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 코팅되지 않은 가소성 잔여물을 차단한 후, 세척하였다(4 ×PBST). PrtR-PrtK 단백질 분해효소-아드헤진 복합체(1 mM TLCK로 비활성화됨) 용액(1 mg/㎖)을 ABM 펩타이드, 대조 펩타이드, 및 카제인의 공지된 농축액으로 1시간 동안 배양하한 후, ABM 펩타이드로 코팅된 미세적정 플레이트로 옮겼다. 37℃에서 2시간 동안 배양한 후, 플레이트를 세척하였다(5 ×PBST). 1% w/v 스킨 밀크 파우더를 함유하는 PBST로 1/10,000 희석된 토끼 항-PrtR-PrtK 항혈청을 세척된 웰에 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 결합된 항체를 토끼 면역글로불린(BioRad, Richmond, CA)에 대한 양고추냉이 퍼옥사이드-접합 염소 면역글로불린(Ig)으로 37℃에서 1.5시간 동안 배양하여 검출하였다. 세척한 후(5×PBST), 기질(0.004% v/v 과산화수소를 함유하는 0.4 mM 3,3',5,5'-테트라메틸벤자이딘을 함유하는 0.1 M 소듐 아세테이트/시트르산 버퍼)을 첨가하고 2 M의 H_2SO_4를 첨가하여 발색 현상을 정지시켰다. BioRad 마이크로플레이트 판독기 모델 450을 사용하여 450 nm에서 광학 밀도(O.D.)를 측정하였다.

결 과

PrtRⅡ50 Arg-특이성 단백질 분해효소 정제 및 판독

포피로모나스 긴기발리스 W50 세포 분쇄물은 25℃에서 각각의 기질로서 1.0 mM Bz-L-Arg-pNA 및 z-L-Lys-pNA를 가지는 0.36 mg $㎖^{-1}$ 단백질 및 2.4와 1.1 $μ㏖\ min^{-1}$ mg 단백질$^{-1}$ 활성을 함유한다. 분쇄물을 Q-세파로스 음이온 교환 FPLC에 주입하고 160 내지 246 mM의 NaCl 중에서 단백질 분해활성/아미노산 분해활성 용리물을 수집하여 centripep 및 centricon-10 농축기(Amicon, Sydney, Australia)를 사용하여 농축하였다. 이 분획물을 단백질 분해활성/아미노산 분해활성의 주요 피크의 리딩 에지(leading edge)를 나타냈으며 Lys-특이적 활성에 대하여 높은 비율의 Arg-특이적 활성을 함유하고 있었다. 농축한 후, 분획물을 Superose 12 젤 여과 칼럼에 걸었다(도 6). Arg-특이적 활성 및 Lys-특이적 활성은 0.6 - 2.0 $×10^6$ Da 의 M_r값 및 300 kDa의 피크에 해당하는 고분자 용리 물질과 관련이 있었다(Bhogal et al., 1997). 그러나, Arg-특이적 활성만이 나타나는 50 kDa의 저분자량 피크도 관찰되었으며, 이 피크는 추가 정제를 위하여 수집되었다. 50 kDa 젤 여과 피크를 Mono Q 음이온 교환 칼럼에 가하고, Arg-특이적 활성을 함유하는 피크를 50 kDa의 단일 단백질 밴드를 나타내는 SDS-PAGE에 주입하였다(도 7). 50 kDa 밴드를 트랜스블롯하고 아미노 아실 서열 YTPVEEKENGRMIVIVPKKYEEDIED을 제공하는 N-말단의 서열을 분석하였다. 아르기닌 잔기에 대한 50 kDa 단백질 분해효소의 특이성은 z-L-Lys-pNA를 제외한 Bz-L-Arg-pNA 만을 절단하는 효소에 의하여 확인되었다. 50 kDa의 Arg-특이성 효소는 티올(특히, 시스테인)에 의하여 활성화되며, 세린 단백질 분해효소 저해제, 페닐메틸 술포닐 플루오라이드 또는 4-(2-아미노에틸)-벤젠술포닐 플루오라이드에 의해서는 억제되지 않으나, PrtR45가 억제되었던 동일한 농도에서 설파이드릴-유도 시료, 루펩틴 및 EDTA에 의하여 억제되었다(Bhogal et al., 1997). EDTA에 의한 억제는 과량의 Ca^{2+} 를 첨가하면 제거될 수 있으며 효소에 대한 최적의 pH는 8.0이고 pH 6.0 이하에서는 최소 활성을 나타낸다.

prtRⅡ 유전자의 분자 클로닝 및 서열 분석

몇 명 양성(positive) 클론이 동정된 PrtR45의 N-말단에 대하여 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 포피로모나스 긴기발리스 게놈 은행을 스크린 하였다. 이들 클론에서 DNA을 발췌하여 써던(Southern) 분석하여 제2 Arg-특이성 단백질 분해효소를 코딩하는 유전자(Slakeski et al., 1996)에 해당하는 12 kb BamH I 분절을 함유하는 서열을 동정하였다. 추가 분석을 위하여 12 kb BamH I 분절을 함유하는 람다(Lambda) 클론 18을 선택하여 DNA를 분리하고 Eco 72 I로 분해하여 플라스미드 Sma I-BAP pUC18 내에 무작위적으로 클로닝하였다. 인접한 3.3 및 1.2 kb Eco 72 I의 게놈 분절의 서열을 양방향으로 분석하여 prtRⅡ 뉴클레오타이드 서열(Genebank Accession No. AF007124)을 배양하였다. A 991 bp PCR 분절을 배양하고 서열 분석하여 내부 Eco 72 I 자리를 포함하는 서열을 확인하였다.

prtRII ORF는 2208 bp(736 a.a. 잔기)를 포함하며 정제된 50 kDa의 효소(PrtRII50)에 대한 정확한 N-말단 아미노 아실 서열을 함유하는 성숙된 Arg-특이성 단백질 분해효소(507 a.a. 잔기)가 뒤에 연결되는 예비분절과 추정적 리더 서열로 구성되는 전구 단백질을 코딩한다. PrtR45와 같이 성숙된 단백질의 N-말단 서열은 전구분절의 Arg 잔기의 바로 뒤에 이어진다.

prtRII 유전자는 PrtR45를 코딩하며 아드헤진과 연관된 5'의 다섯 번째 두 개의 prtR 유전자와 매우 유사성이 높다(도 8 및 도 9). 번역된(translated) 두 개의 서열은 번역된 예비전구분절 및 단백질 분해효소 도메인에 대하여 각각 전체 76% 및 80%의 유사성을 나타내었다. 그러나, prtRII는 아드헤진과 연관되지 않은 정제된 PrtRII50 단백질 분해효소에 결합된 것과 동일한 prtR 및 prtK 유전자에 의하여 코딩되는 C-말단 혈구응집소/아드헤진 도메인은 코딩하지 않는다. 번역된 prtRII유전자 서열에서 유래된 PrtRII50 완성된 단백질 분해효소의 M_r은 SDS-PAGE에 의하여 얻어진 50 kDa과 일치하며 PrtR45에서 유래된 53.9 kDa의 M_r(Bhogal et al., 1997) 보다 약간 큰 55.6 kDa 이다.

PrtR45 Arg-특이성 단백질 분해효소 및 PrtK48 Lys-특이성 단백질 분해효소(Slakeski et al., 1996; Bhogal et al., 1997)를 가지는 아미노 아실 서열의 배열은 C-말단 80 아미노 아실 잔기를 제외한 아드헤진-관련 PrtR45에 높은 서열 유사성(97.5% 동일성)을 보이는 PrtRII50이라는 것을 보여준다(도 8). 사실, 상기 PrtRII50의 C-말단 80 잔기는 PrtR27 아드헤진 도메인, 적어도 PrtR의 도메인(도 9) C-말단 80 잔기에 유사하다(47% 동일성). PrtRII50 및 PrtR45 단백질 분해효소의 높은 서열 동일성에 대조적으로, PrtRII50에는 존재하지 않는 모티프-GEPNPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK(도 8의 밑줄 그은 부분)이 두 단백질 분해효소에서와 거의 동일한 C-말단 영역 주변을 제외하고는 두 아드헤진-관련 PrtR45 및 PrtK48 단백질 분해효소 간에는 전체적으로 낮은 유사성(25% 동일성)을 보인다. 또한, 유사한 모티프는 PrtR 및 PrtK의 PrtR44, PrtR17, PrtK39 및 PrtK44 아드헤진 도메인에서 나타난다(표 1 ABM1 펩타이드). 이는 이들 모티프가 PrtR 및 PrtK 단백질 분해효소 및 아드헤진의 큰 복합체 형성과 관련된 아드헤진-결합 모티프임을 암시한다.

추정되는 아드헤진 결합 모티프에 해당하는 합성 펩타이드와 PrtR-PrtK 복합체의 결합

제안된 아드헤진 결합 모티프 PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTTK에 해당하는 펩타이드(ABM1[R45])를 합성하여 PrtR-PrtK 복합체의 결합을 측정하기 위하여 사용하였다. ABM 펩타이드와 TLCK-불성화 PrtR-PrtK 복합체의 특이적 결합은 미세적정 플레이트 상에 흡착되는 ABM 펩타이드와 상기 복합체의 결합을 방해하기 위해서는 용액내에 5-100 배(mol)의 과량의 ABM 펩타이드가 요구되는 경쟁적 결합 분석에서 입증되었다(도 10). 카제인뿐만 아니라 PrtR45의 428-448 잔기에 해당하는 대조 펩타이드, FNGGISLANYTGHGSETAWGT는 흡착된 ABM 펩타이드와 TLCK-불성화 PrtR-PrtK 복합체의 결합을 방해하지 않았다. 항-PrtR-PrtK 항혈청은 PrtR-PrtK 복합체가 없는 조건에서는 ABM 펩타이드와 결합하지 않았다. TLCK에 의한 불성화는 상기 복합체가 단백질 분해효소의 활성자리를 통해서 펩타이드와 결합하지 않는다는 것을 입증한다. 이는 또한 카제인 및 유사한 크기의 비-특이성 펩타이드와 PrtR-PrtK 복합체의 결합의 결여 및 관련성이 없는 ABM 펩타이드에 대한 리신 함량에 의해 확증되었다. 따라서, ABM 펩타이드와 TLCK-불활성화 PrtR-PrtK 복합체의 특이적 결합을 입증하는 결과는 큰 복합체를 형성하는 PrtR 및 PrtK 단백질 분해효소 및 아드헤진과 관련된 보호된 모티프의 제안된 역할과 일치한다.

결과 분석

포피로모나스 긴기발리스 W50 세포 분쇄물을 사용하여 상기에서 판독된 Arg-특이성 시스테인 단백질 분해효소 PrtR45(Bhogal et al., 1997)와 거의 동일한 제2 세포-관련, Arg-특이성, 칼슘-안정화 시스테인 단백질 분해효소를 정제하고 판독하였다. 그러나, PrtR45와 효소적 특성 및 저해제/활성화제가 거의 동일함에도 불구하고 제2 효소는 중요한 차이점이 많이 나타났다. 첫째, PrtRII50으로 지정된 제2 효소는 아드헤진과 관련없는 분리된 효소이다. Arg-특이성 카제인 단백질 분해효소, PrtR45는 Arg-특이성 및 리신-특이성 단백질 분해효소 및 아드헤진의 거대 멀티-단백질 복합체의 45 kDa 구성물이다(Bhogal et al., 1997). 둘째는 PrtRII50은 SDS-PAGE상의 PrtR45보다 약간 크다는 것이고(M_r50 kDa), 세째는 PrtRII50의 제1 25 N-말단 잔기 내에서 4개의 아미노산 치환이 있다는 것이다. PrtRII50은 8 위치에 PrtR45의 Gln 대신에 Glu를, 17번 위치에 PrtR45의 Ala 대신에 Pro를, 22번 위치에 PrtR45의 Gly 대신에 Glu를, 25번 위치에 PrtR45의 Lys 대신에 Glu를 가지고 있다(도 8). 크기 및 N-말단 아미노 아실 서열상에서의 이러한 차이점은 제2 Arg-특이성 단백질 분해효소를 코딩하는 유전자 prtRII를 클로닝하고 서열 분석하여 확인하였다.

prtRII 유전자에서 유래된 아미노산 서열은 최근에 보고된 포피로모나스 긴기발리스 ATCC 33277의 rgpB 유전자(Nakayama, 1997)의 아미노산 서열과 98%의 동일성을 나타내며, 이는 두 유전자가 두 개의 다른 균주의 같은 위치에 존재함을 의미한다. 반면, rgpB 유전자의 완성된 단백질 분해효소에 대한 서열은 prtRII 유전자 생산물에서 발견된 3개의 N-말단 아미노 아실 치환은 함유하지 않았고 단지 8번 위치에 Gln이 Glu으로 치환되어 있다. 유전자 생성물이 N-말단 서열 분석에 의하여 prtR(rgpA)의 완성된 PrtR45 단백질 분해효소와 명백히 차별화 되는 RrtRII50에서 발견되는 17, 22, 및 25 위치에서의 치환은 rgpB에서는 발견되지 않았다. 본 발명에서는 완성된 단백질 분해효소의 N-말단 서열 및 크기에서의 차이는 아드헤진과 관련된 45 kDa Arg-특이성 단백질 분해효소(PrtR45)와 50 kDa Arg-특이성 단백질 분해효소(PrtRII50)를 구별할 수 있게 하였다. 두 개의 유전자(각각 prtR 및 PrtRII)에 대한 두 개의 단백질 분해효소(PrtR45 및 PrtK48)의 지정은 분리된 PrtRII50에서는 발견되지 않는 두 개의 아드헤진-관련 단백질 분해효소 내에 보존된 모티프를 동정할 수 있게 하였다. 또한, 보존된 모티프는 prtR 및 prtK의 몇몇 아드헤진에서 발견되었으므로 본 발명자들은 거대한 복합체로 회합되는 prtR 및 prtK 단백질 분해효소와 관련된 아드헤진 결합 모티프라는 것을 제안한다. 이러한 제안은 보존된 모티프에 해당하는 합성 펩타이드가 TLCK-불활성화 PrtR-PrtK 복합체에 특이적으로 결합한다는 점에 근거한다.

아드헤진 결합 모티프 1에 보존된 모티프 PVXNLT.....LKWXAP를 동정함으로서 상보적 모티프가 소수성이며 음전하를 띠고 있을 수 있음을 추측하게 되었다. 따라서, 소수성이며 음전하성 잔기를 함유하는 반복 모티프가 예를 들면 TATTFEEDGVA(ABM 2, 표 1) 및 WKTIDADGDG(ABM 5. 표 1)의 합성을 위하여 선택되었다. 연구를 목적으로 선택된 다른 모티프는 소수성 및/또는 전하 및/또는 중성 극성 잔기를 가지는 다른 반복 모티프이며, 예로는 VYRDGTKIKE(ABM 2, 표 1), WEIRTVDLPAGTKYV(ABM 4, 표 1), 및 EFAPVQNLTGSA(ABM 6, 표 1)이 있다.

PrtR45 Arg-특이성 단백질 분해효소 및 PrtK48 Lys-특이성 단백질 분해효소의 촉매 영역을 가지는 PrtRII50의 아미노 아실 서열의 배열을 추가 조사하여 보다 흥미로운 유사성을 가지는 영역을 발견하였다(도 8). 비록 포피로모나스 긴기발리스의 세 개의 시스테인 단백질 분해효소는 공지된 다른 시스테인 단백질 분해효소 군과는 전혀 유사성을 가지고 있지는 않더라도, 단지 하나의 His 잔기 및 두 개의 Cys 잔기가 세 개의 서열-관련 효소에 보존되어 있기 때문에 촉매 잔기의 동일성을 추측할 수 있다. 따라서, 이들 효소의 촉매 Cys, His 이분체는 세 개의 단백질 분해효소에 유일하게 보존된 His인 PrtRII50의 H^{440} 으로 이루어져 있을 것이다. 또한, 촉매 Cys는 세 개의 서열-관련 단백질 분해효소에 보존된 두 개의 시스테인 잔기 C^{473} 및 C^{484} 중 하나일 것이다.

실시예 2

단백질 분해효소 활성자리 및 아드헤진 결합 모티프 펩타이드의 합성 및 Murine Lesion Model 테스트.

표 1에 기재된 단백질 분해효소 활성자리 및 아드헤진 결합 모티프를 의미하는 하기의 펩타이드를 합성하고 접합하여 생쥐의 병소 모델에서 테스트하였다(표 2).

<표 3> 합성 펩타이드의 오리진 및 아미노산 서열

오리진	아미노산 서열	약어
단백질 분해효소 활성자리 펩타이드		
PrtR45 (426-446)	FNGGISLANYTGHGSETAWGT	PAS1(R45)
PrtK48 (432-453)	LNTGVSFANYTAHGSETAWADP	PAS1(K48)
아드헤진 결합모티브 펩타이드		
PrtR45 (664-689)	PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK	ABM1(R45)
PrtK39 (1580-1608)	SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA	ABM2(K39)
PrtR44 (939-971)	VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF	ABM3(R44)
PrtK44 (1296-1315)	WIERTVDLPAGTKYVAFRHY	ABM4(K44)
PrtR15 (1154-1169)	PAEWTTIDADGDGQGW	ABM5(R15)
PrtR44 (919-938)	EGSNEFAPVQNLTGSAVGQK	ABM6(R44)
Control Peptide		
PrtR27 (1432-1463)	ANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFLLDADHNTFG	Control peptide

시 약

달리 언급하지 않는다면, 화학물질은 펩타이드 합성 물질(grade) 또는 이것의 등가물이다. O-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HBTU), 1히드록시벤조트리아졸(HOBt), 디이소프로필에틸아민(DIPEA), N,N-디메틸포름아마이드(DMF), 피페리딘, 트리플루오로아세트산(TEA), 및 9-플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc)-보호된 아미노산을 Auspep Pty Ltd(Melbourne, Australia)에서 구입하였다. 트리이소프로필실란(TIPS) 및 에탄디티올(EDT)을 Aldrich(New South Wales, Australia)에서 구입하였다. 1,8-디아자바이시클로[5.4.0]운데-7-켄(DBU)을 Sigma Chemical Company(New South Wales, Australia)에서 구입하였다. 페놀 및 디에틸 에테르를 BDH(Poole, UK)에서 구입하였다.

고상 펩타이드 합성

표준 Fmoc 고상 펩타이드 합성기를 사용하여 수동으로 펩타이드를 합성하였다. 전반에 걸쳐 표준 고상 펩타이드 합성 방법을 사용하였다. 상기 펩타이드를 Fmoc-Pal-Peg-PS 수지(PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA)를 사용하여 카르복시아마이드 형태로 응집시켰다. 4 당량의 Fmoc-아미노산 및 6 당량의 DIPEA를 사용하여 HBTU/HOBt 활성화로 커플링을 수행하였다. 2% v/v 피페리딘을 함유하는 DMF 내의 2% v/v DBU로 Fmoc기를 제거하였다. TFA:페놀:TIPS:EDT:물(92:2:2:2:2) 절단 칵테일(cocktail)을 사용하여 펩타이드의 아르기닌 함량에 따라 2.5시간 내지 4시간 동안 수지 담체에서 펩타이드의 절단을 수행하였다. 절단 후, 여과하여 수지를 제거한 후, 이 여과물을 질소 하에서 대략 1 ㎖로 농축하였다. 펩타이드 생성물을 차가운 에테르로 침전시킨 후, 원심분리하여 3차례에 걸쳐 세척하였다. 그런 후에, 펩타이드 침전물을 0.1% v/v TFA를 함유하는 10 ㎖의 물에 녹이고 원심분리하여 불용성 수지를 제거하였다.

S-아세틸메르캅토아세트산 펩타이드 합성

펩타이드를 함유하는 수지는 DMF 내에서 팽창시켜 N-말단 Fmoc 그룹은 2% v/v 피페리딘을 함유하는 DMF 2% v/v DBU 용액을 사용하여 제거하였다. S-아세틸메르캅토아세트산(SAMA) 그룹을 5 당량의 SAMA-OPfp 및 5 당량의 OBt를 사용하여 N-말단 아미노산기에 도입하였다. 트리니트로벤젠 술폰산(TNBSA) 테스트하여 이 반응을 관찰하였다. TNBSA 테스트가 음성으로 전환될 때, 수지를 세척하였다(5 ×DMF, 3 ×DCM, 및 3 ×디에틸 에테르). 수지를 진공에서 건조시켜 상기 수지 담체에서 SAMA-펩타이드를 절단하였다.

펩타이드 정제

합성된 펩타이드를 Water HPLC 시스템에 장착된 Brownlee C18 Aquapore ODS 칼럼(250 ×100 mm)을 사용하여 정제하였다. 크로마토그램을 0.1% v/v TFA 수용액(용매 A) 및 0.1% v/v TFA 90% 아세토니트릴 수용액(용매 B)을 사용하여 5.0 ㎖ min^{-1} 의 유속으로 전개시켰다. 펩타이드를 10 내지 30%의 용매 B의 구배로 40분에 걸쳐 용리하였다. Applied Biosytems HPLC 시스템에 장착된 Brownlee C8 Aquapore RP-300 칼럼(220 ×4.6 mm)을 사용하여 분석용 HPLC를 수행하였다. 크로마토그램을 1.0 ㎖ min^{-1} 의 유속으로 용매 A 및 용매 B 및 0 내지 100% 직선 구배 용매 B를 사용하여 30분에 걸쳐 전개시켰다. 214 nm의 흡광도를 사용하여 칼럼에서 용리된 물질을 관측하였다. PerSeptive Biosystems Voyager DE MALDI-TOF를 사용하여 펩타이드의 질량을 분석하였다.

디프테리아(Diphtheria) 독소와 SAMA-펩타이드의 접합

62 kDa 분자당 9 당량 아미노기를 함유하는 디프테리아 독소(DT)는 Dr I. Barr(CSL Pty. Ltd. Melbourne, Australia)로부터 얻었다. 포스페이트-버퍼 염 용액(0.1M 소듐 포스페이트, 0.9% NaCl; pH 7.4)내의 10mg/mL의 DT를 함유하는 용액을 얻기 위하여 1% W/v 용액 m-말레이미도 벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르(MBS)를 DMF에 첨가한다. 30 분 후, 반응하지 않은 MBS를 제거하고 DT로 변형된 MBS는 접합(conjugation)dyd 버퍼(0.1 M 소듐 포스페이트, 5 mM EDTA; pH 6.0)로 평형화된 PD10 칼럼(Pharmacia, NSW, Australia)을 사용하여 겔 여과법으로 수집하였다.

정제된 SAMA-펩타이드(1.3 μmole)를 0.5M 트리스(Tris); 2mM EDTA; pH 6.0을 함유하는 200μℓ 6M 구아니딘 HCl에 녹여 800μℓ MilliQ 물로 희석하고 MilliQ 물에 용해된 2M NH_2OH(40 당량) 25μℓ를 첨가하여 보호기를 제거한다. 수집된 MBS-DT를 즉시 비보호된 SAMA-펩타이드와 반응시키고 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 펩티드-DT 접합체를 PBS로 pH 7.4의 평형화된 PD10 칼럼을 사용하여 겔 여과하여 반응하지 않은 펩타이드와 분리하고 수분을 제거하였다(lysophilised). Ellmans 테스트를 사용하여 반응을 관찰하였다. MBS-DT에 대한 SAMA-펩타이드의 접합 수득률은 34% 내지 45%이며 이는 DT 분자당 3내지 4 펩타이드가 쌍을 이룬다는 것을 의미한다.

면역화 반응 및 생쥐의 병소 모델 방법

6내지 8주 된 BALB/c 생쥐는 50 μg의 펩타이드-DT 접합체 50 μg의 DT 또는 2×109 포르말린으로 죽인 완전한 Freund's 보조제(CFA)로 유화된 포피로모나스 긴기발리스 균주 33277의 세포를 피하에 면역접종하였다. 30일 후, 생쥐의 피하에 불완전한 Freund's 보조제(IFA)로 유화된 항원(50 μg의 펩타이드-DT 접합체, 50 μg의 DT 또는 2×109 포르말린으로 죽인 포피로모나스 긴기발리스 균주 33277의 세포)을 주사하고 12일 후 역구근 망상조직(retrobulbar plexus)에서 피를 뽑았다. 모든 생쥐는 복부에 피하 주사하여 8×109 세포 포피로모나스 긴기발리스로 자극하고 10일 후에 무게와 병소 크기를 측정하였다. 병소크기는 mm^2 로 표시하고 Kruskal-Wallis one-way ANOVA 및 Mann-Wilcoxon rank sum W 테스트를 사용하여 통계적으로 분석하였다.

펩타이드-DT 접합체는 생쥐의 병소 모델에서 포피로모나스 긴기발리스 자극을 방어하는데 그들의 효능을 측정하기 위하여 BALB/c 생쥐에 면역접종 하는데 사용하였다. 도 6은 담체 단백질인 디프테리아 독소만을 면역 접종된 생쥐가 보조제만으로 면역 접종된 생쥐(대조부)와 유사한 평균 병소크기를 가짐을 도시한 것이다. 이는 DT 단독으로는 포피로모나스 긴기발리스를 방어할 수 없으며, 펩타이드-DT 접합체는 펩타이드에 의하여 유도되는 면역반응에 기여할 수 있음을 의미한다. 대조 펩타이드-DT 접합체는 평균 병소크기가 DT 또는 보조제로 면역 접종된 생쥐의 병소 크기와 상당히 차이가 있으므로 포피로모나스 긴기발리스를 방어할 수 없다. DT와 접합된 두 개의 단백질 분해효소 활성자리 펩타이드(PAS-1(R45) 및 PAS1(K48))의 접종은 DT 조절제와 관련된 포피로모나스 긴기발리스 자극으로 유발된 병소의 크기를 상당히 감소시킨다(표 3). 면역원으로 사용될 경우의 모든 아드헤진 결합 모티프 펩타이드는 병소의 크기를 감소시키지만, ABM1(R45), ABM(K39) 및 ABM3(R44)는 사용되는 동물의 수에 대하여 유의성을 나타낸다.

상기의 결과는 생쥐의 병소모델에서 포피로모나스 긴기발리스의 자극을 방어하는 면역원으로 사용되는 경우의 PrtR-PrtK 단백질 분해효소 활성자리 펩타이드 및 아드헤진 결합 모티프 펩타이드의 효능을 입증한다. 따라서, 이러한 결과는 이들 펩타이드가 사람에 대한 포피로모나스 긴기발리스-관련질환(예, 치주염)을 예방하는 백신으로 사용될 수 있음을 암시한다.

PAS1 펩타이드에 대항하는 항혈청은 Arg-특이성 및 Lys-특이성 단백질 분해활성을 억제하므로 이러한 펩타이드의 면역접종은 뛰어난 예방법이 될 수 있다. 항-PAS1 항혈청에 의한 단백질 분해활성의 억제는 이들 항체가 포피로모나스 긴기발리스 단백질 분해효소 및 이들의 파손을 중화하는 구강 세정제, 치약, 및 다른 구강내 전달 전색제(delivery vehicle)에 사용될 수 있음을 암시한다. 마찬가지로, 아드헤진 결합 모티프에 대항하는 항혈청, 특히 ABM1, ABM2, 및 ABM3은 포피로모나스 긴기발리스의 집단 부착(block adherence) 및 콜로니 형성을 방지하는 구강 보호제품 및 약품에 사용될 수 있다.

<표 3> 펩타이드-디프테리아 접합체의 최대 병소 크기 및 유의성

	DT[d]	ABM1(R4 5)-DT	ABM2(K3 9)-DT	ABM3(R4 4)-DT	ABM4(K4 4)-DT	ABM5(R1 5)-DT	ABM6(R4 4)-DT	PAS1(R4 5)-DT	PAS1(K4 8)-DT	Control peptide -DT	FK 33277[e]
최대 병소 크기 (mm^2)	33.59 ±18.77[a]	10.42 ±11.7	12.63 ±10.89	12.27 ±4.68	18.83 ±18.87	14.79 ±10.04	15.22 ±11.55	10.46 ±4.08	9.28 ±10.36	36.61 ±34.92	13.78 ±12.55
유의성	-	p <0.05	p <0.05	p <0.05	N/S[c]	N/S[c]	N/S[c]	p <0.05	p <0.05	N/S[c]	p <0.05

상기 표에서,

a = 표준 편차 = 5,6

b = Mann-Whitney U 테스트

c = 중요한 차가 없음

d = 디프테리아 독소

e = 포르말린으로 죽인 Pophyromonas gingivalis 균주 33277.

실시예 3

(1) 펩타이드 항원 및 멀티 구조체의 합성

Fmoc 또는 tBoc 합성법을 사용하여 표 1의 펩타이드를 합성하고 도 1-5에 개략적으로 도시된 방법을 사용하여 멀티 펩타이드 구조체를 합성하였다.

(2) 항체 제조

말, 토끼, 양 또는 젖소를 면역 접종하여 혈청 항체를 얻었다.

표준 방법을 사용하여 예방접종을 수행하였다. 초기 면역접종은 항원 및 Freund's 불완전 보조제의 혼합물로 행하였다. 항체는 표준 방법을 사용하여 동물 혈청 또는 젖에서 회수될 수 있다.

실시예 4

항원 펩타이드를 사용하는 진단 면역분석 방법

본 명세서에 기재된 포피로모나스 긴기발리스 펩타이드 항원은 백신 제품의 면역원; 및 진단 분석 또는 치료 및/또는 진단용 포피로모나스 긴기발리스-특이성 항혈청 증식을 위한 항원용도로 합성될 수 있다.

표 1에 기재된 펩타이드는 당 기술 분야에 공지된 다양한 방법을 사용하여 개별적으로 또는 화학적으로 결합시켜 합성될 수 있다. 사용될 수 있는 몇 가지 방법을 도 1-5에 도시하였다. 상기 펩타이드는 테트라부틸옥시카르보닐 아미노산을 사용하거나(Mitchell et al., 1978, J. Org. Chem. 43:2845-2852), 폴리아마이드 담체 상의 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐 아미노산을 사용하는(Dryland et al., 1986, J. Chem. So. Perkin Trans. I, 125-137)표준 고상 펩타이드 합성법; 펩스칸(pepscan) 합성법(Geysen et al., 1987, J. Immunol. Methods 03:259; 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998); 또는 표준 액상 펩타이드 합성법을 포함하는 당 분야에 공지된 몇몇 펩타이드 합성 방법 중 하나를 사용하여 합성할 수 있다. 펩타이드 또는 올리고펩타이드의 면역학적 특성을 실제적으로 손상시키지 않기 위하여 아미노산의 결실 및 치환(및 아미노산의 연장 및 첨가를 포함하는) 및 다른 방법을 사용하여 펩타이드 또는 올리고펩타이드의 변형체를 만들 수 있다. 특히, 본 명세서에 기재된 항원의 아미노산 서열은 하나 또는 그 이상의 아미노산을 펩타이드, 또는 올리고펩타이드 또는 키메라(chimera)의 물리화학적 반응에서 관찰되는 상이점이 잠재하는 변형을 초래하는 기능적으로 등가인 아미노산으로 대체하여 변형될 수 있다. 기능적으로 등가인 아미노산이 유사한 극성 또는 전하를 가지는 아미노산으로서 당 기술분야에 공지되어 있다. 따라서, 본 명세서의 서열 목록에 기재된 아미노산 서열은 펩타이드, 올리고펩타이드 또는 키메라의 주요한 생물학적 기능의 변화 없이 기능적으로 등가인 아미노산의 치환체를 함유하는 아미노산 서열에 속한다.

정제된 합성 펩타이드는 포피로모나스 긴기발리스에 감염되었으리라 여겨지는 개체의 혈액 중에 존재하는 포피로모나스 긴기발리스-특이성 항혈청을 검출하기 위한 면역분석에서 항원으로 사용될 수 있다. 면역분석에 있어 항원 또는 관련 펩타이드의 검출법은 당 기술 분야에 공지된 면역분석법인 방사능면역분석, 효소-결합 면역흡착제 분석(ELISA), '샌드위치' 분석, 침강소 반응, 응집 분석, 형광성 면역분석, 및 화학발광계 면역분석을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

실시예 5

합성 펩타이드 항원 및 멀티펩타이드 구조체와 관련된 백신 조성물의 제조 방법 및 화합물.

본 발명은 포피로모나스 긴기발리스 감염을 예방하거나 치료하는 능동면역용 예방약 및/또는 치료 백신 내에서 면역원으로 작용하는 표 1의 펩타이드 항원을 제공한다. 백신 용도의 합성 펩타이드 구조체를 포함하는 포피로모나스 긴기발리스의 항원은 면역원이며 손상되지 않은 박테리아상의 표면에 노출된 하나 또는 그 이상의 에피토프(epitopes)를 인식하는 기능성 항체를 포함한다. 에피토프는 포피로모나스 긴기발리스 균주 중에 보존된다.

디펩타이드 PAS1-PAS2 구조체(도 4)는 백신 항원의 바람직한 특성을 가진다. 상기 디펩타이드 구조체는 본 명세서의 실시예 3에 기재된 방법을 사용하여 합성될 수 있다.

합성 펩타이드는 상관된 면역원 물질로서 면역 반응을 유도하는 치료 유효량으로 백신 제제에 포함된다. 예방 접종하기 위하여 인간 또는 동물에 백신 조성물을 주입하는 다양한 방법이 공지되어 있다. 여기에는 피내 투여, 근육내 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 안구 투여, 비강내 투여, 및 경구 투여가 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 백신은 용액, 폴리머 또는 리포좀과 같은 생리학적 담체; 및 보조제, 또는 이들의 혼합물을 추가로 포함할 수 있다.

다양한 보조제가 백신 제제에 접합되어 사용된다. 보조제는 면역 반응을 조절하고 소량의 백신항원 또는 극소량의 투여량을 사용하여 백신 항원만이 투여되는경우보다 지속적이며 높은 면역성을 발휘하도록 조절하여 조력한다. 보조제의 예로는 불완전 Freund's 보조제(ISA), Adjuvant 65(땅콩 기름, 마니드(mannide) 모노올레이트, 및 알루미늄 모노스테아레이트 함유), 기름 에멀젼, Ribi 보조제, 플루론계 폴리올, 폴리아민, Avridine, Quil A, 사포닌, MPL, QS-21, 및 수산화알루미늄, 인산알루미늄 등과 같은 미네랄 겔이 있다.

본 발명은 또한 항원-특이성 아미노산 서열을 헵텐(hapten), 즉 스스로 면역 반응을 유도할 수 없는 분자로 제조하는 것과 관련 있다. 이런 경우, 헵텐은 면역시스템에 노출되었을 때에 결합된 헵텐에 면역성을 부여하는 담체 또는 면역원 분자에 공유결합될 수 있다. 따라서, 담체 분자에 결합된 항원-특이성 헵텐은 백신 제제 내의 면역원이 될 수 있다.

능동 면역법의 변형으로서 합성 펩타이드에 대항하는 항체를 함유하는 정제 면역글로불린을 투여하는 면역법과 같은 수동면역법이 있다.

실시예 6

다음은 항-펩타이드 항체를 함유하는 제안된 치약(toothpaste) 조성물의 실시예이다.

[표 1]

성분	중량%
디칼슘 포스페이트 디하이드레이트	50.0
글리세롤	20.0
소듐 카르복시메틸 셀루로스	1.0
소듐 라우릴 설페이트	1.5
소듐 라우로일 사코니세이트(sarconisate)	0.5
향료(flavour)	1.0
소듐 사카린	0.1
클로르헥시딘(Chlorhexindine) 글루코네이트	0.01
덱스트라나제(Destranase)	0.01
항-펩타이드 항체 함유 염소 혈청	0.2
물	나머지

실시예 7

다음은 제안된 치약 조성물의 실시예이다.

[표 2]

성분	중량%
디칼슘 포스페이트 디하이드레이트	50.0
소르비톨	10.0
글리세롤	10.0
소듐 카르복시메틸 셀루로스	1.0
소듐 라우릴 설페이트	1.5
소듐 라우로일 사코니세이트	0.5
향료	1.0
소듐 사카린	0.1
소듐 모노플루오로포스페이트	0.3
클로르헥시딘 글루코네이트	0.01
덱스트라나제	0.01
항-펩타이드 항체 함유 소과 동물 혈청	0.2
물	나머지

실시예8

다음은 제안된 치약 조성물의 실시예이다.

[표 3]

성분	중량%
디칼슘 포스페이트 디하이드레이트	50.0
소르비톨	10.0
글리세롤	10.0
소듐 카르복시메틸 셀루로스	1.0
라우로일 디에탄올아마이드	1.0
수크로스 모노라우레이트	2.0
향료	1.0
소듐 사카린	0.1
소듐 모노플루오로포스페이트	0.3
클로르헥시딘 글루코네이트	0.01
덱스트라나제	0.01
항-펩타이드 항체 함유 소과 동물 우유	0.1
물	나머지

실시예 9

다음은 제안된 치약 조성물의 실시예이다.

[표 4]

성분	중량%
소르비톨	22.0
아이리시 이끼	1.0
소듐 하이드록사이드	1.0
Gantrez	19.0
물 (탈이온수)	2.69
소듐 모노플루오로포스페이트	0.76
소듐 사카린	0.3
피로포스페이트	2.0
수화된 알루미나(hydrated alumina)	48.0
향료 기름	0.95
항-펩타이드 생쥐 모노클론	0.3
소듐 라우릴 설페이트	2.00

실시예 10

다음은 제안된 액체 치약 조성물의 실시예이다.

[표 5]

성분	중량%
소듐 폴리아크릴레이트	50.0
소르비톨	10.0
글리세롤	20.0
향료	1.0
소듐 사카린	0.1
소듐 모노플루오로포스페이트	0.3
클로르헥시딘 글루코네이트	0.01
에탄올	3.0
항-펩타이드 항체 함유 말 면역글로불린	0.2
리놀산	0.05
물	나머지

실시예 11

다음은 제안된 구강 세정제 조성물의 실시예이다.

[표 6]

성분	중량%
에탄올	20.0
향료	1.0
소듐 사카린	0.1
나트륨 모노플루오로포스페이트	0.3
클로르헥시딘 글루코네이트	0.01
라우로일 디에탄올아마이드	0.3
항-펩타이드 항체 함유 말 면역글로불린	0.2
물	나머지

실시예 12

다음은 제안된 구강 세정제 조성물의 실시예이다.

[표 7]

성분	중량%
Gantrez S-97	2.5
글리세린	10.0
향료 기름	0.4
소듐 모노플루오로포스페이트	0.05
클로르헥시딘 글루코네이트	0.01
라우로일 디에탄올아마이드	0.2
생쥐 항-펩타이드 모노클론	0.3
물	나머지

실시예 13

다음은 제안된 로젠지(lozenge) 조성물의 실시예이다.

[표 8]

성분	중량%
설탕	75 - 80
옥수수 시럽	1 - 20
향료 기름	1 - 2
NaF	0.01 - 0.05
생쥐 항 - 펩타이드 모노클론	0.3
Mg 스테아레이트	1 - 5
물	나머지

실시예 14

다음은 제안된 치은 맛사지 크림 조성물의 실시예이다.

[표 9]

성분	중량%
백색 바셀린(petrolatum)	8.0
프로필렌 글리콜	4.0
스테아릴 알콜	8.0
폴리에틸렌 글리콜 4000	25.0
폴리에틸렌 글리콜 400	37.0
수크로스 모노스테아레이트	0.5
클로로헥시딘 글루코네이트	0.1
생쥐 항 - 펩타이드 모노클론	0.3
물	나머지

실시예 15

다음은 제안된 츄잉 껌(chewing gum) 조성물의 실시예이다.

[표 10]

성분	중량%
껌 기제	30.0
칼슘 카르보네이트	2.0
결정형 소르비톨	53.0
글리세린	0.5
향료 기름	0.1
생쥐 항 - 펩타이드 모노클론	0.3
물	나머지

당업자는 본 발명의 범위 및 내용을 벗어나지 않고 상기 특정 구현예에 도시된 바와 같이 본 발명이 다양하게 변화 및/또는 변형될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 따라서 본 발명의 구현예는 본 발명을 설명하기 위한 것이며 이들로 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

참고 자료

Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., et al(1994), 'Development of high potentcy universal DR - restri cted helper epitopes by modification of high affinity DR - blocking peptides.' Immunity 1: 751 - 761.

Bhogal, P. S., Slakeski, N. & Reynolds, E. C. (1997). Characterization of a cell-associated, protein complex of Porphyromonas gingivalis W50 containing Arg- and Lys-specific cysteine proteinases and adhesins. Microbiology 143, 2485-2495.

Canne, L. E., Ferre-D'Amare, A. R., Burley, S.K., and Kent, S.B.H.(1995). 'Total chemical synthesis of a unique transcription factor-related protein: cMYc-Max.' J. A. Chem. Soc. 117: 2998-3001.

Druland, et. al. (1986). J. Chem. Soc. Perkn Trans. 1: 125-137.

Duncan, R., and Kopececk, J. (1980). 'Degradation of side chains of N-(2-hvdroxypropyl)methacrylamide copolymers by lysosomal enzymes.' Biochem. Biophys. Res. Commun. 94: 284-290.

Geysen, H. M., Meleon. R.H., and Barteling, S.J. (1984). 'Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid.' Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 3998.

Geysen, H. M., Rodda, S.J., Mason,T.J., et al. (1987). 'Strategies for epitope mapping using peptide synthesis.'J. Immunol. Methods. 102: 259.

Hammer, J., Valsasnini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B., and Sihigaglia, F. (1993). 'Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides.' Cell 74: 197-203.

Kaumaya. P. T. P., Kobs-Conrad. S., and DiGeorge. A. M. (1994). Synthetic peptide vaccines: Misconceptions and problems, strategies and prospects Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis. R. Epton. Kingswinford, Mayflower: 279-292.

Liu, C. F. a. T., J.P. (1994). 'Peptide ligation strategy without use of protectecing groups.' Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 6584-6588.

Lu, Y. A., Clavijo, P., Galantino, M., Shen, Z.Y., and Tam, J.P. (1991). 'Chemically unambiguous peptide immunogen: Preparation, orientation and antigenicity of purified peptide cinjugated to the multiple antigen peptide system.' Mol. Immunol. 28(6): 623-630.

Mitchell., e. a. (1978). J. Org. Chem. 43: 2845-2852.

Nakayama, K. (1997). Domain-specific rearrangement between the two Arg-gingipain-encoding genes in Porphyromonas gingivalis: possible involvement of nonreciprocal recombination. Microbiol Immunol 48, 185-196.

O'Brien-Simpson.. N.M., Ede, N.J., Brown, L.E., Swan, J., and Jackson, D.C. (1997). 'Polymerisation of unprotected synthetic peptides: a view towards a synthetic peptide vaccines.' J. Am. Chem. Soc. 117(6).

O'Sullivan, D., Arrhenius.. T., Sidney, J., et al (1991). 'On the interaction of Promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Indentification of common structural motifs.' J. Immunol 147(8): 2663-2669.

Rose, K. (1994). 'Facile synthesis of homogeneous artificial proteins.' J. Am. Chem. Soc, 116: 30-33.

Rose, J., Zeng, W., Regamey, P. O., Chernusheivich, I.V., Standing, K. G., and Gaertner, H.F. (1996). 'Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkages.' Bioconjugate Chem. 7(5): 552-556.

Shao, J., and Tam, J.P. (1995). J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899.

Slakeski. N., Cleal, S. M. & Reynolds, E. C. (1996). Characterization of a Porphyromoiias gingivalis gene prtR that encodes an arginine-specific thiol proteinase and multiple adhesins. Biochem Biophys Res Comm 224,605-610.

Spetzler, J. C. a. T., J.P. (1994). A general approach for the synthesis of branched peptides for synthetic vaccines: Synthesis of multiple antigen peptides using unprotected segments. Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis. R. Epton. Kingswinford, Mayflower: 293-300.

van Noort, J. M., and van der Drift, A.C.M. (1989). 'The selectivity of cathepsin D suggeste an involveme nt of the enzyme in the generation of T-cell epitopes.' J. Biol. Chem. 264(24): 14159-14164.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기의 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 펩타이드 및 적합한 보조제(adjuvant) 및/또는 수용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 포피로모나스 긴기발리스에 대한 면역 반응을 일으키는조성물:

FNGGISLANYTGHGSETAWGT;
LNTGVSFANYTAHGSETAWADP;
FDVACVNGDFLFSMPCFAEALMRA;
IGNCCITAQFDYVQPCFGEVITRV;
GEPNPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK;
EGSNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;
VNSTQFNPVKNLKAQPDGGDVVLKWEAPSAK;
GEPSPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWEAPSAK;
EGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNGT;
VNSTQFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK;
QFNPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;
FAHVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;
FAPVQNLQWSVSGQTVTLTWQAPASD;
QFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK;
DYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAT;
DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT;
SYTYTVYRDGTKIKEGLTETTYRDAGMSA;
SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA;
DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT;
SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT;
DYTYTVYRDNVVIAQNLAATTFNQENVAP;
SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT;
PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF;
PNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESF;
PNGTPNPNPNPNPGTTTLSESF;

PNGTPNPNPGTTTLSESF;

WIERTVDLPAGTKYVAFRHY;

WRQKTVDLPAGTKYVAFRHF;

WYQKTVQLPAGTKYVAFRHF;

ERTIDLSAYAGQQVYLAFRHF;

PAEWTTIDADGDGQGW;

PASWKTIDADGDGHGW;

PASWKTIDADGDGNNW;

PSSWKTIDADGDGNNW;

PNGWTMIDADGDGHNW;

EGSNEFAPVQNLTGSAVGQK;

GEPNPYQPVSNLTATTQGQK;

EGSNEFAPVQNLTGSSVGQK;

GEPSPYQPVSNLTATTQGQK;

NSTQFNPVQNLTAEQAPNS;

EGSNEFAHVQNLTGSAVGQK;

DPVQFNPVQNLTGSAVGQK;

EGGNEFAPVQNLQWSVSGQT;

NPTQFNPVQNLTAEQAPNS;

GNHEYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTV;

GNHEYCVEVKYTAGVSPKKCVNVTV;

SHEYCVEVKYTAGVSPKVCVD;

GNHEYCVEVKYTAGVSPKKCVNVTV;

GNHEYCVEVKYTAGVSPKVCVNVTI;

GQYNYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTV;

GNHEYCVEVKYTAGVSPEVCVNVTV;

PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK; 및

VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPGTTTLSESF.

청구항 2.

제1항에 있어서, 하기의 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 펩타이드를 포함하는 조성물:

FNGGISLANYTGHGSETAWGT;

LNTGVSFANYTAHGSETAWADP;

PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK;

SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA;

VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPGTTTLSESF;

WIERTVDLPAGTKYVAFRHY;

PAEWTTIDADGDGQGW; 및

EGSNEFAPVQNLTGSAVGQK.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물이 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 조성물.

청구항 4.

제3항에 있어서,

상기 조성물이 상이한 펩타이드의 하나 또는 그 이상의 멀티머를 포함하는 조성물.

청구항 5.

하기의 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 펩타이드:

FNGGISLANYTGHGSETAWGT;

LNTGVSFANYTAHGSETAWADP;

FDVACVNGDFLFSMPCFAEALMRA;

IGNCCITAQFDYVQPCFGEVITRV;

GEPNPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK;

EGSNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;

VNSTQFNPVKNLKAQPDGGDVVLKWEAPSAK;

GEPSPYQPVSNLTATTQGQKVTLKWEAPSAK;

EGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNGT;

VNSTQFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK;

QFNPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;

FAHVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT;

FAPVQNLQWSVSGQTVTLTWQAPASD;

QFNPVQNLTAEQAPNSMDAILKWNAPASK;

DYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAT;

DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT;

SYTYTVYRDGTKIKEGLTETTYRDAGMSA;

SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA;

DYTYTVYRDGTKIKEGLTETTFEEDGVAT;

SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT;

DYTYTVYRDNVVIAQNLAATTFNQENVAP;

SYTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLAT;

PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF;

PNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESF;

PNGTPNPNPNPNPGTTTLSESF;

PNGTPNPNPGTTTLSESF;
WIERTVDLPAGTKYVAFRHY;
WRQKTVDLPAGTKYVAFRHF;
WYQKTVQLPAGTKYVAFRHF;
ERTIDLSAYAGQQVYLAFRHF;
PAEWTTIDADGDGQGW;
PASWKTIDADGDGHGW;
PASWKTIDADGDGNNW;
PSSWKTIDADGDGNNW;
PNGWTMIDADGDGHNW;
EGSNEFAPVQNLTGSAVGQK;
GEPNPYQPVSNLTATTQGQK;
EGSNEFAPVQNLTGSSVGQK;
GEPSPYQPVSNLTATTQGQK;
NSTQFNPVQNLTAEQAPNS;
EGSNEFAHVQNLTGSAVGQK;
DPVQFNPVQNLTGSAVGQK;
EGGNEFAPVQNLQWSVSGQT;
NPTQFNPVQNLTAEQAPNS;
GNHEYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTV;
GNHEYCVEVKYTAGVSPKKCVNVTV;
SHEYCVEVKYTAGVSPKVCVD;
GNHEYCVEVKYTAGVSPKKCVNVTV;
GNHEYCVEVKYTAGVSPKVCVNVTI;
GQYNYCVEVKYTAGVSPKVCKDVTV;
GNHEYCVEVKYTAGVSPEVCVNVTV;

PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK; 및

VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF.

청구항 6.

제5항에 있어서, 하기 군에서 선택되는 펩타이드:

FNGGISLANYTGHGSETAWGT;
LNTGVSFANYTAHGSETAWADP;
PYQPVSNLTATTQGQKVTLKWDAPSTK;
SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA;
VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLSESF;
WIERTVDLPAGTKYVAFRHY;
PAEWTTIDADGDGQGW; 및
EGSNEFAPVQNLTGSAVGQK.

청구항 7.

제5항 또는 제6항의 펩타이드에 대하여 특이적으로 유도되는 항체를 포함하는 항체 제제(preparation).

청구항 8.

제7항에 있어서,

상기 항체가 폴리클론 항체인 항체 제제.

청구항 9.

제7항에 있어서,

상기 항체가 모노클론 항체인 항체 제제.

청구항 10.

유효량의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제5항 또는 제6항 의 펩타이드를 포함하는 포피로모나스 긴기발리스 감염에 의한 치주질환 치료용 제약학적 조성물.

청구항 11.

제10항에 있어서,

구강 세정제 또는 치약의 형태인 치주질환 치료용 제약학적 조성물.

청구항 12.

유효량의 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 조성물을 포함하는 포피로모나스 긴기발리스 감염에 의한 치주질환 치료용 제약학적 조성물.

청구항 13.

제12항에 있어서,

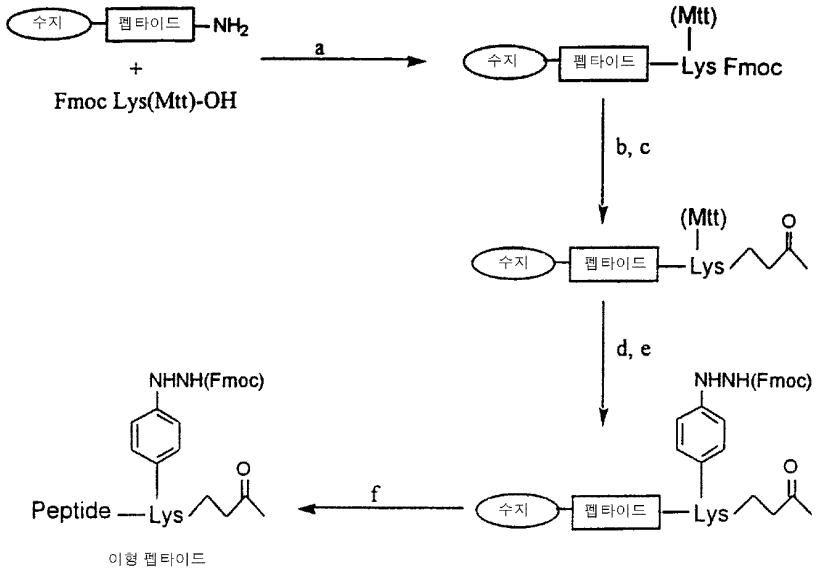
구강 세정제 또는 치약의 형태인 치주질환 치료용 제약학적 조성물.

청구항 14.

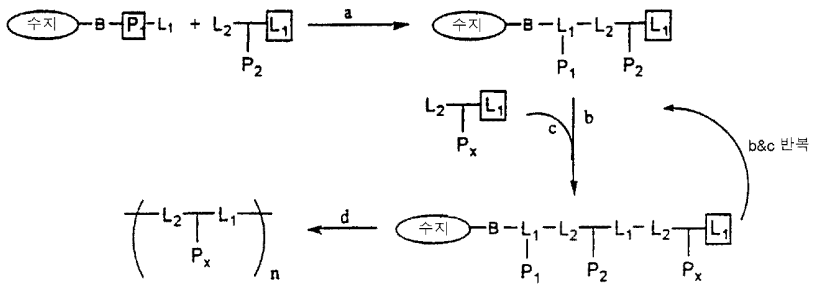
포피로모나스 긴기발리스 감염율 및 질병의 피해도 감소시키기 위해 포피로모나스 긴기발리스에 대하여 개체 내 면역반응을 유도하는 유효량의 제1항 또는 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 치주염 예방용 제약학적 조성물.

도면

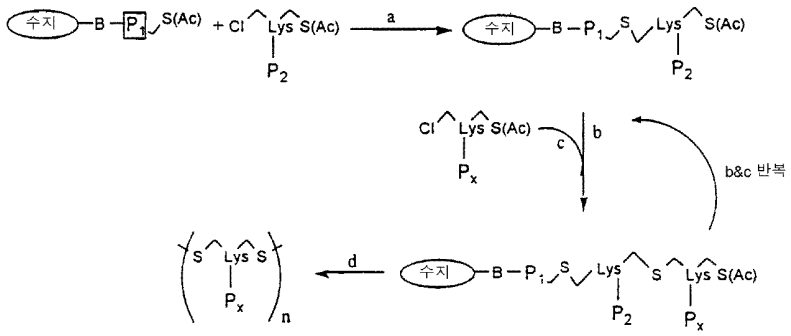
도면 1


수지
펩타이드
NH2
+
Fmoc Lys(Mtt)-OH
a
(Mtt)
Lys Fmoc
b, c
Lys
d, e
NHNH(Fmoc)
f
Peptide
이형 펩타이드

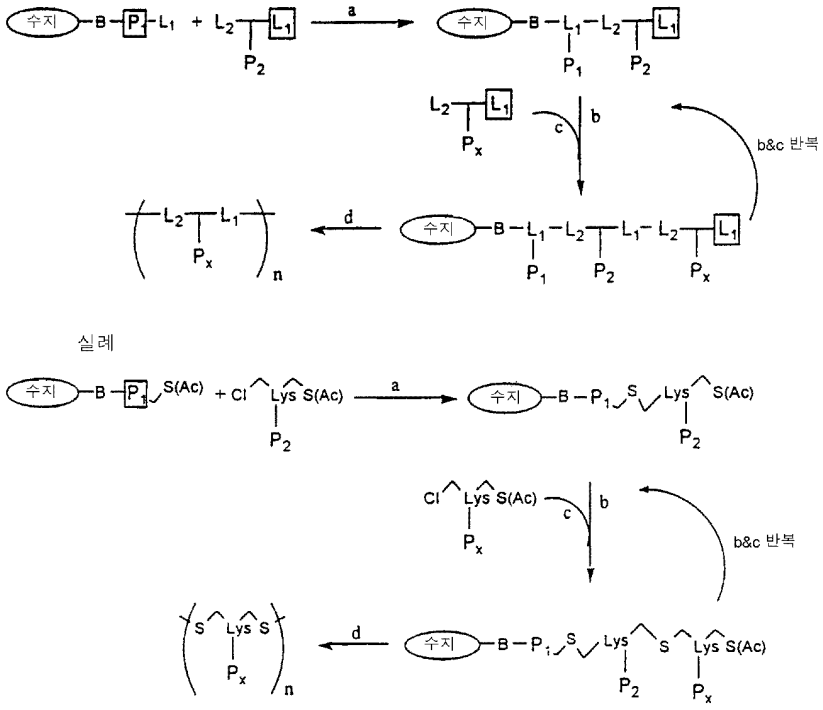
도면 2



실례

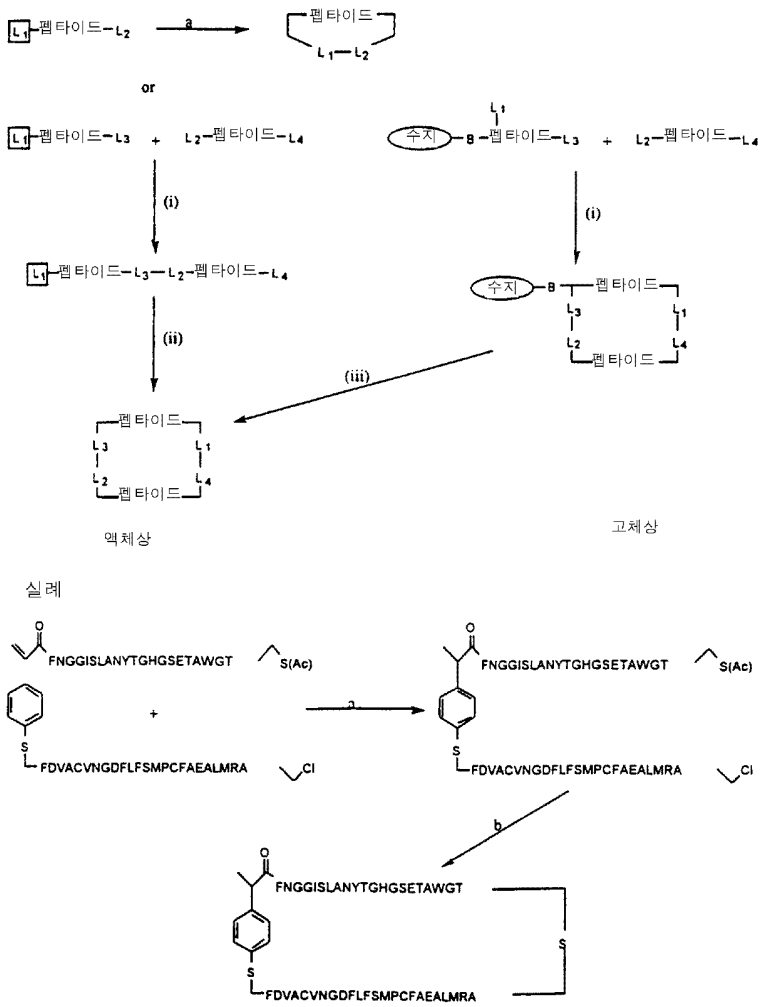


도면 3

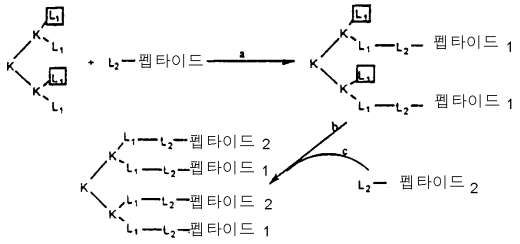


실례

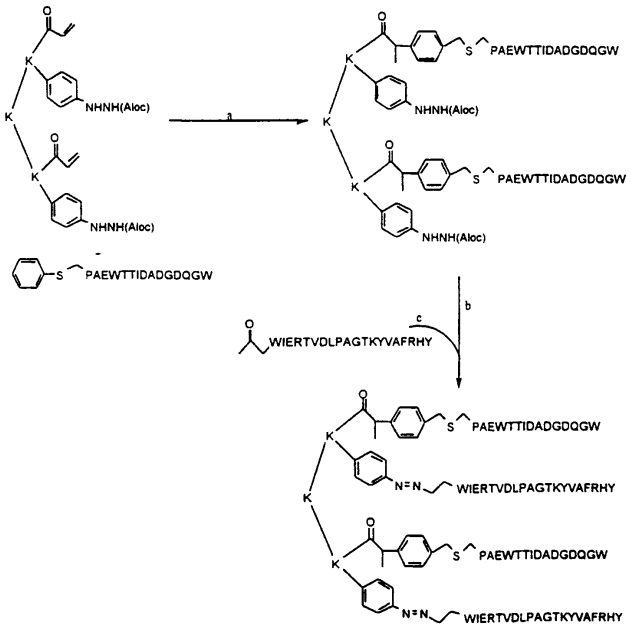
도면 4


펩타이드-L2
a
펩타이드
L1—L2
or
펩타이드-L3 + L2-펩타이드-L4
수지-B-펩타이드-L3 + L2-펩타이드-L4
(i)
(i)
펩타이드-L3-L2-펩타이드-L4
수지-B-펩타이드
(ii)
(iii)
펩타이드
펩타이드
액체상
고체상
실례
FNGGISLANYTGHGSETAWGT
S(Ac)
FDVACVNGDFLFSMPCFAEALMRA
Cl
a
b

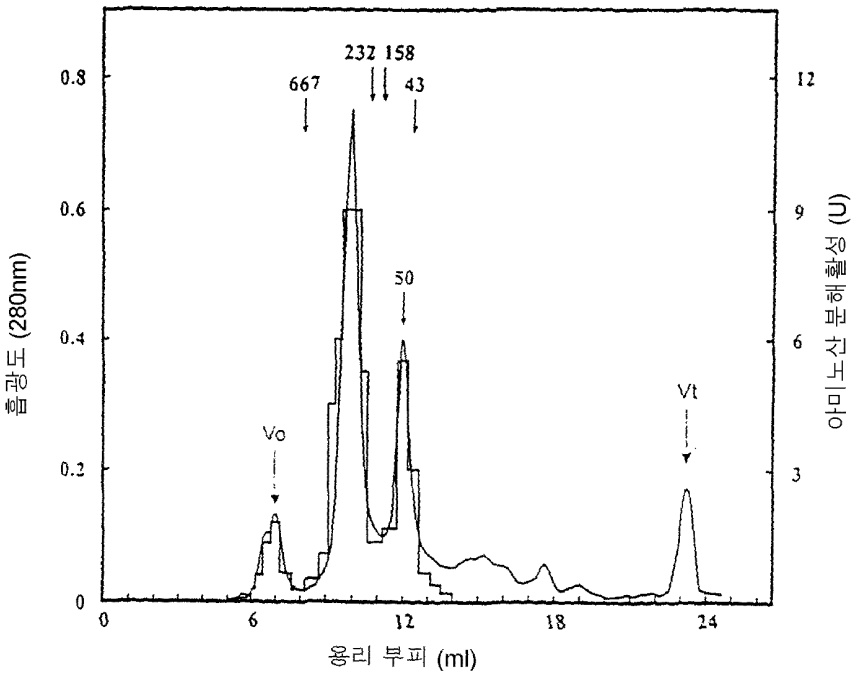
도면 5


펩타이드 1
펩타이드 1
펩타이드 2
펩타이드 1
펩타이드 2
펩타이드 1
펩타이드 2

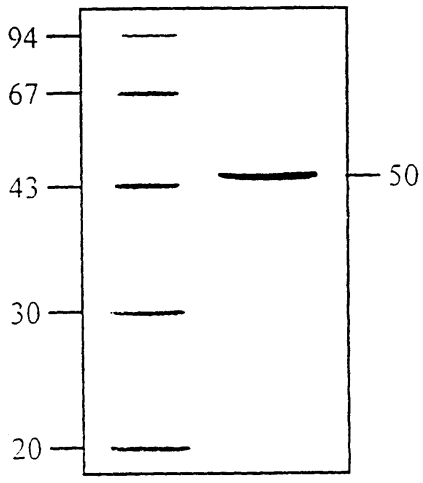
실례


NHNH(Aloc)
NHNH(Aloc)
PAEWTTIDADGDQGW
PAEWTTIDADGDQGW
NHNH(Aloc)
NHNH(Aloc)
PAEWTTIDADGDQGW
WIERTVDLPAGTKYVAFRHY
PAEWTTIDADGDQGW
WIERTVDLPAGTKYVAFRHY
PAEWTTIDADGDQGW
WIERTVDLPAGTKYVAFRHY

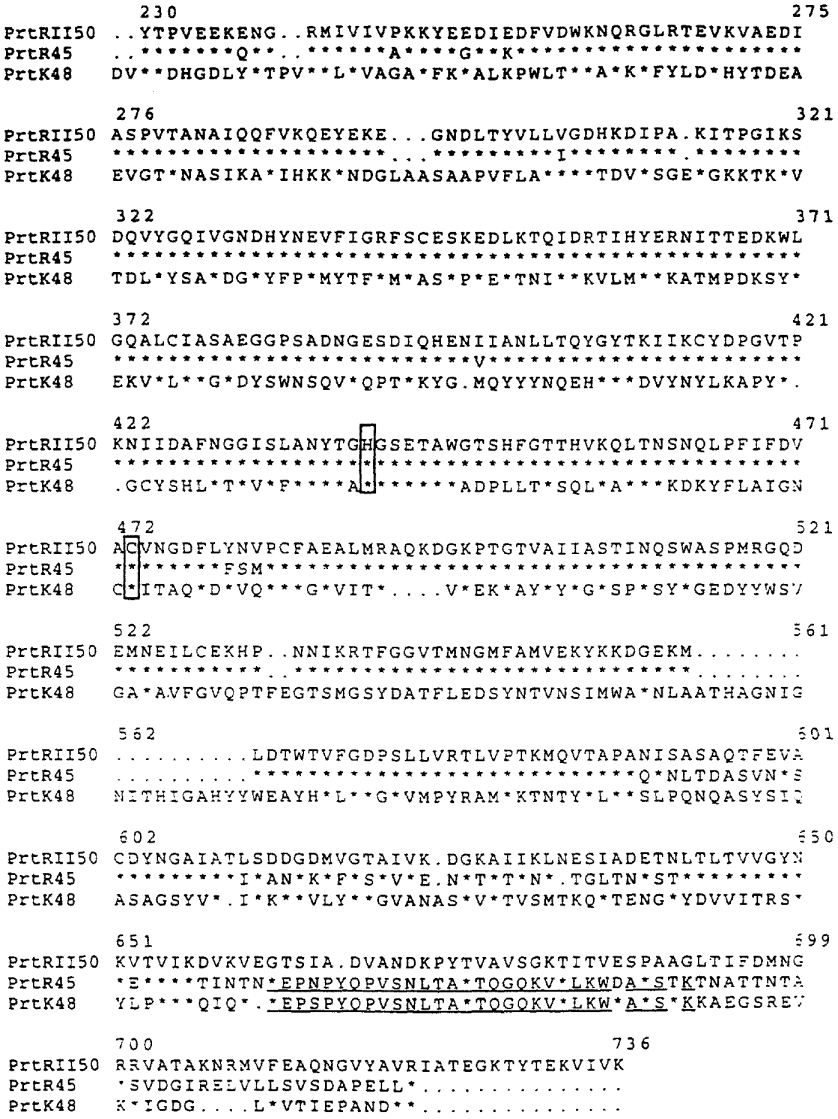
도면 6


232 158
667
43
50
Vo
Vt
0.8
0.6
0.4
0.2
0
12
9
6
3
0
6
12
18
24
흡광도 (280nm)
유출량 (ml)
용리 부피 (ml)

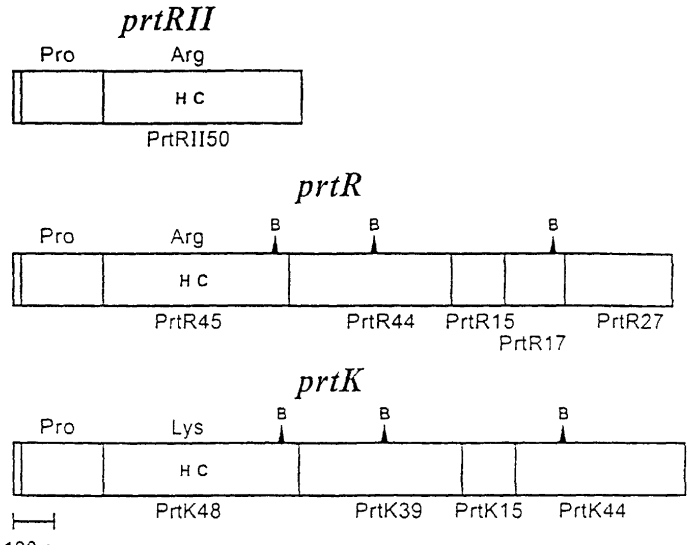
도면 7


94
67
43
30
20
50

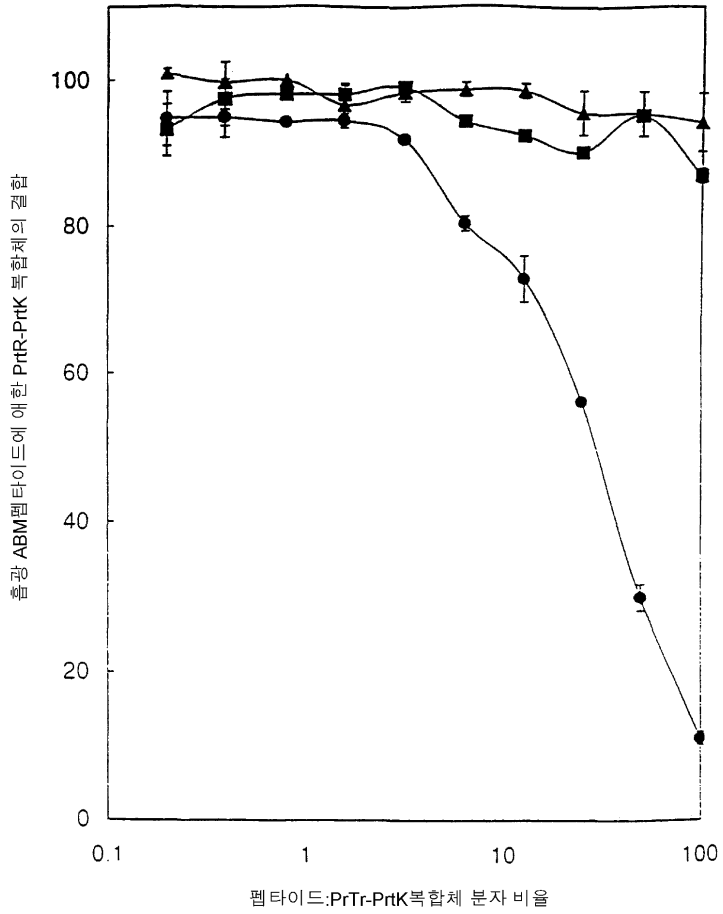
도면 8


230 275
PrtRII50 ..YTPVEEKENG..RMIVIVPKKYEEDIEDFVDWKNQRGLRTEVKVAEDI
PrtR45 ..*******Q**..******A****G**K**********
PrtK48 DV**DHGDLY*TPV**L*VAGA*FK*ALKPWLT**A*K*FYLD*HYTDEA
276 321
PrtRII50 ASPVTANAIQQFVKQEYEKE...GNDLTYVLLVGDHKDIPA.KITPGIKS
PrtR45 **********...********I********.********
PrtK48 EVGT*NASIKA*IHKK*NDGLAASAAPVFLA****TDV*SGE*GKKTK*V
322 371
PrtRII50 DQVYGQIVGNDHYNEVFIGRFSCESKEDLKTQIDRTIHYERNITTEDKWL
PrtR45 **********
PrtK48 TDL*YSA*DG*YFP*MYTF*M*AS*P*E*TNI**KVLM**KATMPDKSY*
372 421
PrtRII50 GQALCIASAEGGPSADNGESDIQHENIIANLLTQYGYTKIIKCYDPGVTP
PrtR45 **********V**********
PrtK48 EKV*L**G*DYSWNSQV*QPT*KYG.MQYYYNQEH***DVYNYLKAPY*.
422 471
PrtRII50 KNIIDAFNGGISLANYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIFDV
PrtR45 **********
PrtK48 .GCYSHL*T*V*F****A********ADPLLT*SQL*A***KDKYFLAIGN
472 521
PrtRII50 ACVNGDFLYNVPCFAEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTINQSWASPMRGQD
PrtR45 ********FSM**********
PrtK48 C*ITAQ*D*VQ***G*VIT*....V*EK*AY*Y*G*SP*SY*GEDYYWSV
522 561
PrtRII50 EMNEILCEKHP..NNIKRTFGGVTMNGMFAMVEKYKKDGEKM.....
PrtR45 **********..**********.....
PrtK48 GA*AVFGVQPTFEGTSMGSYDATFLEDSYNTVNSIMWA*NLAATHAGNIG
562 601
PrtRII50 .....LDTWTVFGDPSLLVRTLVPTKMQVTAPANISASAQTFEVA
PrtR45 .....**********Q*NLTDASVN*S
PrtK48 NITHIGAHYYWEAYH*L**G*VMPYRAM*KTNTY*L**SLPQNQASYSIQ
602 650
PrtRII50 CDYNGAIATLSDDGDMVGTAIVK.DGKAIIKLNESIADETNLTLTVVGYN
PrtR45 *********I*AN*K*F*S*V*E.N*T*T*N*.TGLTN*ST********
PrtK48 ASAGSYV*.I*K**VLY**GVANAS*V*TVSMTKQ*TENG*YDVVITRS*
651 699
PrtRII50 KVTVIKDVKVEGTSIA.DVANDKPYTVAVSGKTITVESPAAGLTIFDMNG
PrtR45 *E****TINTN*EPNPYQPVSNLTA*TQGQKV*LKWDA*STKTNATTNTA
PrtK48 YLP***QIQ*.*EPSPYQPVSNLTA*TQGQKV*LKW*A*S*KKAEGSREV
700 736
PrtRII50 RRVATAKNRMVFEAQNGVYAVRIATEGKTYTEKVIVK
PrtR45 *SVDGIRELVLLSVSDAPELL*.....
PrtK48 K*IGDG....L*VTIEPAND**.....

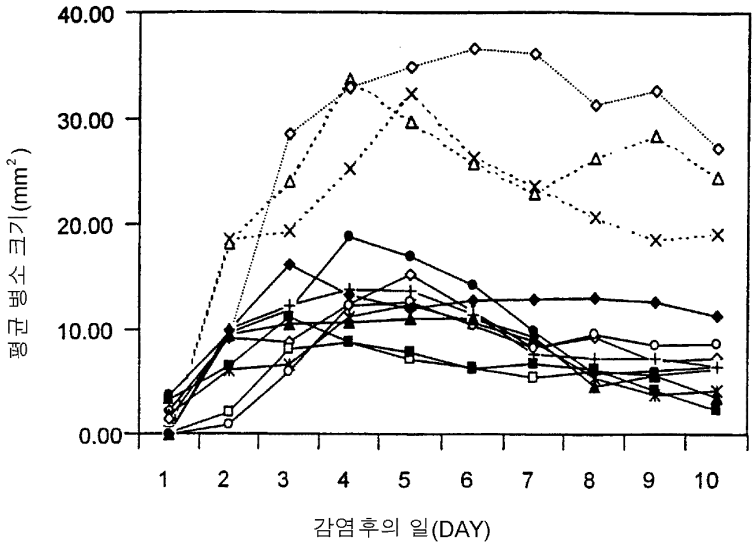
도면 9


prtRII
Pro
Arg
H C
PrtRII50
prtR
Pro
Arg
B
B
B
H C
PrtR45
PrtR44
PrtR15
PrtR17
PrtR27
prtK
Pro
Lys
B
B
B
H C
PrtK48
PrtK39
PrtK15
PrtK44

도면 10


흡광 ABM펩타이드에 의한 PrtR-PrtK 복합체의 결합
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
펩타이드:PrTr-PrtK복합체 분자 비율

도면 11



<110> THE UNIVERSITY OF MELBOURNE VICTORIAN DAIRY INDUSTRY AUTHORITY
CSL LIMITED <120> SYNTHETIC PEPTIDE CONSTRUCTS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATME
NT OF P ERIODONTITIS ASSOCIATED WITH PORPHYROMONAS GINGIVALIS <130> IPP9
90282AU <150> PCT/AU PO6528 <151> 1997-04-30 <160> 51 <170> K
OPATIN 1.5 <210> 1 <211> 21 <212> PRT <213> Porphyromonas gingiv
alis <400> 1 Phe Asn Gly Gly Ile Ser Leu Ala Asn Tyr Thr Gly His Gly Ser Glu 1
5
10 15 Thr Ala Trp Gly Thr 20 <210> 2 <211>
22 <212&g
t; PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 2 Leu Asn Thr Gly Val Ser Phe Ala
Asn
Tyr Thr Ala His Gly Ser Glu 1 5 10 15
Thr Ala Trp Ala Asp Pro
20 <210> 3 <211> 24 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis
<400> 3 Phe Asp Ala Val Cys Val Asn Gly Asp Phe Leu Phe Ser Met Pro Cys 1
5
10 15 Phe Ala Glu Ala Leu Met Arg Ala 20
<210> 4 <21
1> 24 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 4 Ile Gly Asn Cys
Cys Ile Thr Ala Gln Phe Asp Tyr Val Gln Pro Cys 1 5 10
15 Phe
Gly Glu Val Ile Thr Arg Val 20 <210> 5 <211> 31 <212>
P
RT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 5 Gly Glu Pro Asn Pro Tyr Gln Pro Val Ser A
sn Leu Thr Ala Thr Thr 1 5 10 15
Gln Gly Gln Lys Val Thr Leu

Lys Trp Asp Ala Pro Ser Thr Lys 20 25 30 <210> 6 <211> 31 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 6 Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala 1 5 10 15 Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr 20 25 30 <210> 7 <211> 31 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 7 Val Asn Ser Thr Gln Phe Asn Pro Val Lys Asn Leu Lys Ala Gln Pro 1 5 10 15 Asp Gly Gly Asp Val Val Leu Lys Trp Glu Ala Pro Ser Ala Lys 20 25 30 <210> 8 <211> 31 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 8 Gly Glu Pro Ser Pro Tyr Gln Pro Val Ser Asn Leu Thr Ala Thr Thr 1 5 10 15 Gln Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys Trp Glu Ala Pro Ser Ala Lys 20 25 30 <210> 9 <211> 31 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 9 Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ser 1 5 10 15 Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr 20 25 30 <210> 10 <211> 33 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 10 Val Asn Thr Ser Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Ala Glu Gln 1 5 10 15 Ala Pro Asn Ser Met Asp Ala Ile Leu Lys Trp Asn Ala Pro Ala Ser 20 25 30 Lys <210> 11 <211> 27 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 11 Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys 1 5 10 15 Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr 20 25 <210> 12 <211> 26 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 12 Phe Ala His Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys Val 1 5 10 15 Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr 20 25 <210> 13 <211> 26 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 13 Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Gln Trp Ser Val Ser Gly Gln Thr Val 1 5 10 15 Thr Leu Thr Trp Gln Ala Pro Ala Ser Asp 20 25 <210> 14 <211> 29 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 14 Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Ala Glu Gln Ala Pro Asn Ser 1 5 10 15 Met Asp Ala Ile Leu Lys Trp Asn Ala Pro Ala Ser Lys 20 25 <210&gt

; 15 <211> 29 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 15
Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly 1 5
10
15 Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr 20
25 &l
t;210> 16 <211> 29 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400&
gt; 16 Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly 1
5
10 15 Leu Thr Glu Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr
20 25
<210> 17 <211> 29 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400
> 17 Ser Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly 1
5
10 15 Leu Thr Glu Thr Thr Tyr Arg Asp Ala Gly Met Ser Ala
20 2
5 <210> 18 <211> 29 <212> PRT <213> Porphyromonas ging
ivalis <400> 18 Ser Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly 1

5 10 15 Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly
Val Ala Ala 20
25 <210> 19 <211> 29 <212> PRT <213> Porphyromonas gi
ngivalis <400> 19 Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly 1

5 10 15 Leu Thr Glu Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly
Val Ala Thr 20
25 <210> 20 <211> 29 <212> PRT <213> Porphyromonas gi
ngivalis <400> 20 Ser Tyr Thr Tyr Thr Ile Tyr Arg Asn Asn Thr Gln Ile Ala Ser Gly 1

5 10 15 Val Thr Glu Thr Thr Tyr Arg Asp Pro Asp
Leu Ala Thr 20
25 <210> 21 <211> 29 <212> PRT <213> Porphyromonas gi
ngivalis <400> 21 Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Asn Val Val Ile Ala Gln Asn 1

5 10 15 Leu Ala Ala Thr Thr Phe Asn Gln Glu Asn
Val Ala Pro 20
25 <210> 22 <211> 29 <212> PRT <213> Porphyromonas gi
ngivalis <400> 22 Ser Tyr Thr Tyr Thr Ile Tyr Arg Asn Asn Thr Gln Ile Ala Ser Gly 1

5 10 15 Val Thr Glu Thr Thr Tyr Arg Asp Pro Asp
Leu Ala Thr 20
25 <210> 23 <211> 26 <212> PRT <213> Porphyromonas gi
ngivalis <400> 23 Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn 1

5 10 15 Pro Gly Thr Thr Thr Leu Ser Glu Ser Phe
20
25 <210> 24 <211> 23 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis &
lt;400> 24 Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Gly 1
5
10 15 Thr Thr Leu Ser Glu Ser Phe 20 <210>
25 <211>

22 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 25 Pro Asn Gly Thr Pro A
sn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Gly Thr Thr 1 5 10
15 Thr Leu
Ser Glu Ser Phe 20 <210> 26 <211> 18 <212> PRT <213>
Porphyromonas gingivalis <400> 26 Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Gly Thr Thr Thr Leu S
er Glu 1 5 10 15 Ser Phe <210>
27 <211> 20 &
lt;212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 27 Trp Ile Glu Arg Thr Val As
p Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala 1 5 10
15 Phe Arg His T
yr 20 <210> 28 <211> 20 <212> PRT <213> Porphyromonas gi
ngivalis <400> 28 Trp Arg Gln Lys Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala 1

5 10 15 Phe Arg His Phe 20 <210>
29 <211> 20 &
lt;212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 29 Trp Tyr Gln Lys Thr Val Gl
n Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala 1 5 10
15 Phe Arg His P
he 20 <210> 30 <211> 21 <212> PRT <213> Porphyromonas g
ingivalis <400> 30 Glu Arg Thr Ile Asp Leu Ser Ala Tyr Ala Gly Gln Gln Val Tyr Leu
1
5 10 15 Ala Phe Arg His Phe 20
<210> 31 <211>
16 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 31 Pro Ala Glu Trp Thr T
hr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Gln Gly Trp 1 5 10
15 <210&
gt; 32 <211> 16 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 3
2 Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Gly Trp 1 5
10
15 <210> 33 <211> 16 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis &
lt;400> 33 Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Asn Asn Trp 1
5
10 15 <210> 34 <211> 16 <212> PRT <213> Porphyrom
onas gingivalis <400> 34 Pro Ser Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Asn Asn
Trp 1
5 10 15 <210> 35 <211> 16 <212> PRT
<213&gt
; Porphyromonas gingivalis <400> 35 Pro Asn Gly Trp Thr Met Ile Asp Ala Asp Gly
Asp Gly H
is Asn Trp 1 5 10 15 <210> 36
<211> 20 <21
2> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 36 Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro
Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala 1 5 10
15 Val Gly Gln Lys
20 <210> 37 <211> 20 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <
400> 37 Gly Glu Pro Asn Pro Tyr Gln Pro Val Ser Asn Leu Thr Ala Thr Thr 1
5
10 15 Gln Gly Gln Lys 20 <210> 38 <211> 20 <212>
P

RT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 38 Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro Val Gln
sn Leu Thr Gly Ser Ser 1 5 10 15
Val Gly Gln Lys 20
<210> 39 <211> 20 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400
> 39 Gly Glu Pro Ser Pro Tyr Gln Pro Val Ser Asn Leu Thr Ala Thr Thr 1
 5
10 15 Gln Gly Gln Lys 20 <210> 40 <211> 19 <212>
 P
RT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 40 Asn Ser Thr Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn
Leu Thr Ala Glu Gln Ala 1 5 10 15
Pro Asn Ser <210> 4
1 <211> 20 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 41 Glu G
ly Ser Asn Glu Phe Ala His Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala 1 5
 10
15 Val Gly Gln Lys 20 <210> 42 <211> 19 <212> PRT <213>
Porphyromonas gingivalis <400> 42 Asp Pro Val Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly
Ser A
la Val 1 5 10 15 Gly Gln Lys <210>
 43 <211> 2
0 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 43 Glu Gly Gly Asn Glu Phe
Ala Pro Val Gln Asn Leu Gln Trp Ser Val 1 5 10
 15 Ser Gly Gln
Thr 20 <210> 44 <211> 19 <212> PRT <213> Porphyromonas
gingivalis <400> 44 Asn Pro Thr Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Ala Glu Gln Ala
1
5 10 15 Pro Asn Ser <210> 45 <211> 25 <212>
 PRT
<213> Porphyromonas gingivalis <400> 45 Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys
Tyr
Thr Ala Gly Val Ser 1 5 10 15 Pro
Lys Val Cys Thr Asp Val Thr
Val 20 25 <210> 46 <211> 25 <212> PRT <213>
Porphyromonas gingivalis <400> 46 Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala
Gly Va
l Ser 1 5 10 15 Pro Lys Lys Cys
Val Asn Val Thr Val
20 25 <210> 47 <211> 21 <212> PRT <213> Porphyromona
s gingivalis <400> 47 Ser His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser Pro
 1
5 10 15 Lys Val Cys Val Asp 20
<210> 48 <211>
25 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 48 Gly Asn His Glu Tyr C
ys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser 1 5 10
 15 Pro Lys L
ys Cys Val Asn Val Thr Val 20 25 <210> 49 <211> 25
<212&gt
; PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 49 Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu
Val
Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser 1 5 10 15
 Pro Lys Val Cys Val Asn

Val Thr Ile 20 25 <210> 50 <211> 25 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 50 Gly Gln Tyr Asn Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser 1 5 10 15 Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val 20 25 <210> 51 <211> 25 <212> PRT <213> Porphyromonas gingivalis <400> 51 Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser 1 5 10 15 Thr Glu Val Cys Val Asn Val Thr Val 20 25