



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2017년04월03일  
 (11) 등록번호 10-1722802  
 (24) 등록일자 2017년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/108* (2006.01) *A61K 39/106* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-7009647  
 (22) 출원일자(국제) 2010년09월16일  
 심사청구일자 2015년03월26일  
 (85) 번역문제출일자 2012년04월13일  
 (65) 공개번호 10-2012-0081600  
 (43) 공개일자 2012년07월19일  
 (86) 국제출원번호 PCT/SE2010/050996  
 (87) 국제공개번호 WO 2011/034495  
 국제공개일자 2011년03월24일  
 (30) 우선권주장  
 61/272,351 2009년09월16일 미국(US)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 Infect. Immun. 68(11): 6391-6397 (2000. 11.)  
 KR1020050109978 A  
 W02009049013 A2  
 US20060171966 A1

(73) 특허권자  
**엠에스디 웰컴 트러스트 힐레멘 랩스 피브이티,  
 리미티드**  
 인도 뉴델리-110062, 햅다드 나가르, 자미야 햅다  
 드 유니버시티, 나노테크놀로지 빌딩, 2폴로어  
 (72) 발명자  
**흠그렌, 잔**  
 스웨덴 에스-426 74 바스트라 프롤룬다, 코르베트  
 가탄 1디  
**레벤스, 마이클**  
 스웨덴 에스-523 99 호케룸, 다날프 103  
 (74) 대리인  
**손민**

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **콜레라 및 장독소생성 이. 콜라이(E T E C) 설사에 대한 백신**

**(57) 요약**

오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함함을 특징으로 하는 비브리오 콜레라에 O1 세포를 포함하는, 콜레라 및/또는 ETEC에 대한 백신이 제공된다. 이러한 백신에 사용하기 위한 유전적으로 변형된 비브리오 콜레라에 O1 세포, 변형을 위한 DNA-작제물, 백신의 용도 및 백신의 제조방법이 또한 제공된다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함함을 특징으로 하는, 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*) O1 세포를 포함하는 백신으로서,

상기 백신은 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함하는 다수의 비브리오 콜레라에 O1 세포를 포함하며, 세포의 O1 항원 중의 10 내지 90%가 오가와-혈청형인 것인 백신.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포가 CFA/I, CS2 및 CS5으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 ETEC 콜로니화 인자(CF) 단백질(들)을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CF 단백질(들)이 단일, 이중 또는 하이브리드 펄브리아(fimbriae)로 발현되는 백신.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 백신은 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함하는 비브리오 콜레라에 O1 세포 외에 어떠한 추가의 면역학적으로 활성인 전체 세포(whole cells)도 함유하지 않는 백신.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 백신은 경구 투여용인 백신.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 세포가 포르말린-불활성화된 백신.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 방어적 면역화에 사용하기 위한 백신.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 콜레라 및/또는 장독소생성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)-감염(ETEC)에 대한 방어적 면역화에 사용하기 위한 백신.

#### 청구항 8

- a. 숙주 세포의 내인성 *wbeT*-유전자 또는 이의 암호화된 단백질이 불활성이고;
- b. 세포가 *wbeT* 효소 활성의 발현을 유도하는 재조합 DNA-작제물을 포함하며; 여기서
- c. 트랜스제닉 *wbeT* 효소 활성의 수준이, 세포가 이나바 및 오가와 항원을 동시 발현하도록 하는 수준임을 특징으로 하는, 이나바 및 오가와 항원 둘다를 동시 발현하는 제1항에 따른 비브리오 콜레라에 O1 세포.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 세포에 의해 발현된 O1 항원의 10 내지 90%가 오가와-혈청형의 것인 비브리오 콜레라에 O1 세포.

#### 청구항 10

- a. 세포가 내인성 *wbeT*-유전자를 포함하고;
- b. 세포가 내인성 *wbeT* 유전자의 발현 수준 또는 이의 생성물의 효소 활성을 조절할 수 있는 재조합 DNA-작제물을 포함하며; 여기서
- c. *wbeT* 효소 활성의 조절된 수준이, 세포가 이나바 및 오가와 항원을 동시 발현하도록 하는 수준임을 특징으로

하는, 이나바 및 오가와 항원 둘다를 동시 발현하는 제8항에 따른 비브리오 콜레라에 01 세포.

**청구항 11**

제8항에 있어서, 상기 세포가 CFA/I, CS2 및 CS5로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 ETEC 콜로니화 인자 (CF) 단백질(들)을 추가로 발현하고, 여기서 상기 CF 단백질(들)이 단일, 이중 또는 하이브리드 펩티다스로 발현되는 비브리오 콜레라에 01 세포.

**청구항 12**

비브리오 콜레라에 01 숙주 세포 내에서 단백질 발현을 유도하기에 적합한 프로모터에 작동적으로 커플링된 서열 번호 6에 대해 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 *WbeT*-단백질을 암호화하는 DNA를 포함하고, 여기서, 암호화된 *WbeT*-단백질이 서열 번호 6과 동일한 서열을 갖는 단백질의 효소 활성과 비교하여 상기 암호화된 단백질의 효소 활성을 감소시키는 서열 번호 6 내에서의 서열 변형을 포함함을 특징으로 하는, 제8항의 유전적으로 변형된 비브리오 콜레라에 01 세포로부터 획득된 DNA-작제물.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 서열 변형이 서열 번호 6의 158번 위치에서 세린 잔기의 치환을 포함하는 DNA-작제물.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 서열 변형이 서열 번호 6의 158번 위치에서 세린 잔기의 글리신, 프롤린, 트레오닌, 페닐알라닌 또는 트립토판으로의 치환을 포함하는 DNA-작제물.

**청구항 15**

비브리오 콜레라에 01 숙주 세포내에서 단백질 발현을 유도하는데 적합한 프로모터에 작동적으로 커플링된 서열 번호 6에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 *WbeT*-단백질을 암호화하는 DNA를 포함하고, 여기서, 프로모터가 초기에 이나바 표현형의 비브리오 콜레라에 01 숙주 세포내에서 암호화된 *WbeT*-단백질의 발현을, 숙주 세포에 의해 이나바 및 오가와 항원 둘다의 동시 발현을 허용하도록 하는 트랜스제닉(transgenic) *WbeT* 단백질 발현의 수준으로 유도하기에 적합함을 특징으로 하는, 제12항에 따른 DNA-작제물.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 프로모터가 *cat*, *tac* 및 *lac*로 구성된 균으로부터 선택된 유도성 프로모터인 DNA-작제물.

**청구항 17**

제12항에 있어서, 상기 DNA 작제물이 숙주 세포내에서 복제할 수 있는 플라스미드 벡터 또는 숙주 세포내에서 염색체 통합할 수 있는 벡터인 DNA-작제물.

**청구항 18**

제12항에 있어서, 선택가능한 마커를 추가로 포함하는 DNA-작제물.

**청구항 19**

작제물이 동종 재조합에 의해 비브리오 콜레라에 01 숙주 세포의 내인성 *wbeT* 유전자의 변형에 적응됨을 특징으로 하는, 상기 제1항의 비브리오 콜레라에 01 숙주 세포로부터 획득된 DNA-작제물.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 선택가능한 마커를 추가로 포함하는 DNA-작제물.

**청구항 21**

- a. 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 01 항원을 포함하는 비브리오 콜레라에 01 세포를 제공하는 단계; 및
- b. 포르말린-처리에 의해 상기 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는,

제1항의 백신의 제조 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 세포는 제8항에 따른 세포인 것인 제조 방법.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 상기 세포는 제8항에 따른 세포인 것인 백신.

**청구항 24**

제8항에 있어서, 상기 재조합 DNA-작제물은 제12항 또는 제15항에 따른 DNA 작제물인 것인 비브리오 콜레라에 O1 세포.

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 발명의 기술 분야

[0002] 본 발명은 백신 분야, 특히 콜레라 및 장독소생성 이. 콜라이(*E. coli*)(ETEC) 설사에 대한 백신에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 발명의 배경

[0004] 콜레라는 전세계의 대부분의 지역에서 주요한 건강 문제로 남아있다. 이는 또한 ETEC의 경우 사실이며, 이는 개발도상국 뿐만 아니라 이들 나라로의 여행자에 있어서도 설사병의 주요 원인이다. 많은 개발도상국들에서 콜레라와 다른 장 감염의 제어를 위한 효과적인 물 및 위생 조치(measure)가 현재는 불가능하며, 이와 관련하여, 백신이 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나, 이렇게 하기 위해서는, 이들이 효과적이고 용이하게 접근가능하며 무엇보다도 저렴할 필요가 있다. 여행자들에 있어 콜레라 및 특히 ETEC 백신의 사용을 위한 의학적 요구 및 매우 실질적인 상업적 시장이 또한 존재한다.

[0005] 하나의 시도는 경구의 전세포 사백신의 개발이었다. Dukoral™은 콜레라에 대해 90% 까지의 효능 및 또한 장독소생성 에스케리키아 콜라이(ETEC)-유도된 설사에 대해 유의적인 효능이 입증된 경구 세포 백신(OCV)이다. 이는

4개의 상이한 제형(2개의 열-사멸되고 2개의 포르말린-사멸된) 중 3개의 상이한 브이. 콜레라에(*V. cholerae*) 균주 및 또한 재조합적으로 생산된 콜레라 독소 B 소단위(rCTB)를 포함한다. rCTB 성분은 콜레라에 대한 효능에 대해 유의적으로 기여하며 콜레라 독소(CT)-유사 이. 콜라이 열-불안정성 독소(LT)에 대해 교차-중화 항체를 유도하는 이의 능력으로 인해 ETEC 설사에 대해 관측된 보호에 유일하게 관여되어 있다. 그러나, rCTB는 산-불안정성이므로 백신(이는 2회 투여량으로 제공될 필요가 있다)은 중탄산염 완충액과 함께 투여되어야 한다.

[0006] Dukoral™이 유일하게 국제적으로 승인된 OCV임에도 불구하고, CTB 성분이 있거나 없는 당해 백신의 카피가 현재 개발도상국-베트남, 인도 및 중국에서 시판되고 있다. 베트남 및 인도에서 제조된 OCV(이는 CTB 성분을 결여하고 있다)는 Dukoral에서와 동일한 4개의 세균 성분들과 혈청 그룹 0139의 5번째의 포르말린-사멸된 브이. 콜레라에 균주를 함유한다.

[0007] OCV에 의해 유발된 콜레라에 대한 방어적 면역성은, 세포벽 지다당류 01(O1 LPS)에 대한 항체 및 CTB-함유 Dukoral 백신의 경우 또한 장내 항독소 항체의 점막 생산을 주로 기초로 하지 않는 경우가 대부분이다. 이러한 사실로부터, 콜레라/ETEC 백신을 생산하기 위한 당해 분야의 현재의 상태는 단순함과 거리가 있으며, 비록 이미 효과적이라고 해도, 콜레라 백신을 좀더 접근가능하도록 하기 위한 실제 기여는 몇몇 수준에서 제형의 조성을 합리화할 수 있다.

[0008] Dukoral™과 같은 전세포 사백신에서 몇가지 상이한 비브리오 콜레라에 균주를 포함할 필요성은 백신내 비브리오 콜레라에의 몇가지 상이한 항원성 변이체를 나타낼 필요성으로부터 발생한다. 현재 사용된 백신내 모든 방어성 균주는 1993년까지 유행성 콜레라를 유발하는 것으로 알려진 200개 이상의 확인된 혈청그룹 중 유일하며 여전히 우세한 혈청그룹이다. 그러나, O1 혈청 그룹은 표면 지다당류(LPS)의 O-항원의 말단 당의 메틸화에 있어서 상이한 오가와(Ogawa) 및 이나바(Inaba) 혈청형으로 불리는 2개의 변이체를 갖는다. 혈청형 스위칭(Serotype switching)은 오가와 혈청형 유기체가 이나바 유기체를 발생시킬 수 있는 경우 발생하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 역 스위치는 드물다.

[0009] 비록 특히 이나바 뿐만 아니라 오가와 혈청형을 사용한 면역화도 다른 혈청형과 교차-반응하는 항체를 발생시킬 수 있다고 해도, 이는 또한 방어에 유의적으로 기여하는 혈청형 특이적인 항체를 생성한다. 따라서, 효과적인 백신은 이나바 및 오가와 혈청형 변이체 둘다에 대해 교차반응성일 뿐 아니라 또한 혈청형-특이적이기도 한 항체를 유도할 수 있다.

[0010] 혈청형 스위칭은 단일 유전자(*wbeT*)에서 돌연변이와 관련된 것으로 알려져 있다. 당해 유전자를 불활성화시키는 어떠한 돌연변이도 오가와로부터 이나바 혈청형으로의 스위칭을 초래한다. 이러한 현상을 역전시킬 수 있는 돌연변이는, 비록 이나바로부터 오가와 혈청형으로의 스위칭과 관련된 유전자의 인 트랜스(in trans)로의 제공에 의해 용이하게 달성될 수 있다고 해도, 예측가능하게 보다 더 드물다. 포함된 유전자(*wbeT*, 또한 *rfbT*로 나타냄)는 O-항원 다당류 반복 단위내 말단 페로사민 잔기를 메틸화하는 메틸 트랜스퍼라제를 암호화한다. 이나바 혈청형을 생성하는 당해 유전자내 돌연변이는 넌센스(nonsense) 코돈을 유도하는 거의 비가역적인 삽입, 결실 또는 염기 변화이다.

[0011] 히코지마(Hikojima)로서 공지된 제3의 O1 변이체는 또한 야생에서 발생한 것으로 문서화되어 왔다. 히코지마는, 이의 표면에 오가와 및 이나바 결정인자 둘다를 발현하며 둘다의 유형에 대해 특이적인 항혈청을 교차시키는 것을 특징으로 한다. 히코지마 표현형은 매우 드물며 불안정한 전이 형태인 것으로 문헌에서 고려되어 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0012] 이로 인해, 본 발명자들은 3개의 현재 사용된 균주를 효과적으로 대체하는 브이. 콜레라에의 단일 백신 균주를 고안하기 위해 착수하였다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 단순화된 제형 및 보다 적은 생산 비용을 사용하며 또한 단일 투여 후 방어적 면역성을 이상적으로 생산하는, 콜레라 및/또는 ETEC 설사에 대해 효과적인 백신을 제공하기 위한 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0014] 본 발명은 신규한 콜레라 및/또는 ETEC 백신의 작제(construction), 제조 방법, 제형 및 의학적-예방 용도를 기술한다.
- [0015] 명세서 전반을 통하여, 확립된 과학적 실시와 동일 선상에서, 명칭 "*wbeT*"(이텔릭체)는 유전자를 나타내는 반면, 명칭 "*WbeT*"(이텔릭체)는 *wbeT* 유전자에 의해 암호화된 단백질을 나타낸다.
- [0016] 제1 국면에서, 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*) O1 세포가 오가와 및 이나바 혈청형 둘 다의 O1 항원을 포함함을 특징으로 하는, 비브리오 콜레라에 O1 세포를 포함하는 백신이 제공된다.
- [0017] 당해 백신은 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함하는 다수의 비브리오 콜레라에 O1 세포를 포함할 수 있으며, 여기서, 평균적으로, 상기 세포의 O1 항원의 10 내지 90%는 오가와-혈청형의 것이다.
- [0018] 바람직하게는, 세포에 의해 발현된 O1 항원의 10 내지 90%는 오가와-혈청형의 것이다. 보다 바람직하게는, 세포에 의해 발현된 O1 항원의 10 내지 70%는 오가와-혈청형의 것이다. 여전히 보다 바람직하게는, 세포에 의해 발현된 O1 항원의 10 내지 50%는 오가와-혈청형의 것이다. 여전히 보다 바람직하게는, 세포에 의해 발현된 O1 항원의 10 내지 40%는 오가와-혈청형의 것이다. 가장 바람직하게는, 세포에 의해 발현된 O1 항원의 10 내지 30%는 오가와-혈청형의 것이다.
- [0019] 백신의 세포는 CFA/I, CS2 또는 CS5와 같은 하나 이상의 ETEC 콜로니화 인자(CF) 단백질(들)을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 상기 CF 단백질(들)은 단일, 이중 또는 하이브리드 펄브리아(*fimbriae*)로 발현된다.
- [0020] 바람직하게는, 상기 백신은 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함하는 비브리오 콜레라에 O1 세포 외에 어떠한 추가의 면역학적으로 활성인 전체 세포도 함유하지 않는다.
- [0021] 바람직하게는, 백신은 경구 투여용이다. 바람직하게는, 백신내 세포는 포르말린-불활성화된다.
- [0022] 바람직하게는, 세포는 유전적으로 변형된 세포, 바람직하게는 본 발명의 제7 또는 제8 국면에 따른 유전적으로 변형된 세포이다(하기 참조).
- [0023] 제2 국면에서, 제1 국면에 따른 백신이 방어적 면역화에서 사용하기 위해, 바람직하게는 콜레라 및/또는 장독소 생성 에스케리키아 콜라이-감염(ETEC)에 대한 예방적 면역화에서 사용하기 위해 제공된다.
- [0024] 제3 국면에서, 제1 국면에 따른 백신을 면역화시킬 대상체에게 투여함을 포함하여, 방어적 면역성을 유도하기 위한 방법이 제공된다. 바람직하게는, 방어적 면역성은 콜레라 및/또는 장독소생성 에스케리키아 콜라이-감염(ETEC)에 대한 것이다. 또한 바람직하게는, 투여는 경구적으로 수행된다.
- [0025] 제4 국면에서, 비브리오 콜레라에 O1 숙주 세포내에서 단백질 발현을 유도하는데 적합한 프로모터에 작동적으로 커플링된 서열 번호 6에 대해 적어도 70% 서열 동일성(보다 바람직하게는 적어도 80% 동일성, 심지어 보다 바람직하게는 적어도 90% 동일성, 여전히 보다 바람직하게는 적어도 95% 동일성 및 가장 바람직하게는 적어도 99% 동일성)을 갖는 *WbeT*-단백질을 암호화하는 DNA를 포함하고, 암호화된 *WbeT*-단백질이, 서열 번호 6과 동일한 서열을 지닌 단백질의 효소 활성에 대해 암호화된 단백질의 효소적 활성을 감소시키는 서열 번호 6과 관련하여 서열 변형을 포함함을 특징으로 하는, DNA-작제물이 제공된다.
- [0026] 바람직하게는, 서열 변형은 서열 번호 6의 158번 위치에서 세린 잔기, 보다 바람직하게는 서열 번호 6의 158번 위치에서 세린 잔기의 글리신, 프롤린, 트레오닌, 페닐알라닌 또는 트립토판으로의 치환을 포함한다.
- [0027] 제5 국면에서, 비브리오 콜레라에 O1 숙주 세포내에서 단백질 발현을 유도하는데 적합한 프로모터에 작동적으로 커플링된 서열 번호 6에 대해 적어도 70% 서열 동일성(보다 바람직하게는 적어도 80% 동일성, 여전히 보다 바람직하게는 적어도 90% 동일성, 한층 더 바람직하게는 적어도 95% 동일성 및 가장 바람직하게는 적어도 99% 동일성)을 갖는 *WbeT*-단백질을 암호화하는 DNA를 포함하고, 프로모터가 초기에 이나바 표현형의 비브리오 콜레라에 O1 숙주 세포(즉, DNA 작제물에 의한 형질전환 전에 이바나인 숙주 세포)내에서 암호화된 *WbeT*-단백질의 발현을, 숙주 세포에 의한 이나바 및 오가와 항원 둘다의 동시 발현을 허용하도록 하는 트랜스제닉(*transgenic*) *WbeT* 단백질 발현의 수준으로 유도하기에 적합함을 특징으로 하는 DNA-작제물이 제공된다.
- [0028] 바람직하게는, 상기 국면의 프로모터는 *tac* 또는 *lac* 프로모터와 같은 유도성 프로모터이다.
- [0029] 바람직하게는, 상기 국면의 DNA 작제물은 숙주 세포내에서 복제할 수 있는 플라스미드 벡터 또는 숙주 세포내에

서 염색체 통합할 수 있는 벡터이다.

- [0030] 바람직하게는, 상기 국면에 따른 DNA-작제물은 선택가능한 마커, 보다 바람직하게는 항생제 내성 유전자 또는 대사적으로 선택가능한 마커와 같은 양성적으로 선택가능한 마커를 추가로 포함한다.
- [0031] **제6 국면**에서, 작제물이 적용되어 동종 재조합에 의해 숙주의 내인성 *wbeT* 유전자를 변형시킴을 특징으로 하는, 비브리오 콜레라에 01 숙주내 동종 재조합을 위한 DNA 작제물이 제공된다. 바람직하게는, 제6 국면에 따른 DNA-작제물은 선택가능한 마커, 보다 바람직하게는 항생제 내성 유전자 또는 대사적으로 선택가능한 마커와 같은 양성적으로 선택가능한 마커를 추가로 포함한다.
- [0032] **제7 국면**에서,
- [0033] a. 숙주 세포의 내인성 *wbeT*-유전자 또는 이의 암호화된 단백질이 불활성이고;
- [0034] b. 세포가 *WbeT* 효소 활성의 발현을 유도하는 재조합 DNA-작제물을 포함하며; 여기서,
- [0035] c. 트랜스제닉 *WbeT* 효소 활성의 수준이, 세포가 이나바 및 오가와 항원을 동시에 발현하도록 함을 특징으로 하는, 이나바 및 오가와 항원 둘다를 동시에 발현하는 비브리오 콜레라에 01 세포가 제공된다.
- [0036] 바람직하게는, 상기 국면의 재조합 DNA-작제물은 제4 내지 제5 국면에 따른 DNA 작제물이다.
- [0037] **제8 국면**에서,
- [0038] a. 세포가 내인성 *wbeT*-유전자를 포함하고;
- [0039] b. 세포가 내인성 *wbeT* 유전자의 발현 수준 또는 이의 생성물의 효소 활성을 조절할 수 있는 재조합 DNA-작제물을 포함하며; 여기서,
- [0040] c. *WbeT* 효소 활성의 조절된 수준이, 세포가 이나바 및 오가와 항원을 동시 발현하도록 함을 특징으로 하는, 이나바 및 오가와 항원 둘다를 동시 발현하는 비브리오 콜레라에 01 세포가 제공된다.
- [0041] 바람직하게는, 상기 국면의 재조합 DNA-작제물은 제6 국면에 따른 DNA 작제물이다.
- [0042] 바람직하게는, 상기 국면의 세포에 의해 발현된 01 항원의 10 내지 90%는 오가와-혈청형의 것이다. 보다 바람직하게는, 상기 국면의 세포에 의해 발현된 01 항원의 10 내지 70%가 오가와-혈청형의 것이다. 여전히 보다 바람직하게는, 상기 국면의 세포에 의해 발현된 01 항원의 10 내지 50%가 오가와-혈청형의 것이다. 여전히 보다 바람직하게는, 상기 국면의 세포에 의해 발현된 01 항원의 10 내지 40%가 오가와-혈청형의 것이다. 가장 바람직하게는, 상기 국면의 세포에 의해 발현된 01 항원의 10 내지 30%가 오가와-혈청형의 것이다.
- [0043] 바람직하게는, 상기 국면의 세포는 CFA/I, CS2 또는 CS5와 같은 하나 이상의 ETEC 콜로니화 인자(CF) 단백질(들)을 추가로 발현하며, 여기서 상기 CF 단백질(들)은 단일, 이중 또는 하이브리드 펩브리아로 발현된다.
- [0044] **제9 국면**에서,
- [0045] 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 01 항원을 포함하는 비브리오 콜레라에 01 세포를 제공하는 단계; 및
- [0046] 상기 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, 백신을 제조하는 방법이 제공된다.
- [0047] 바람직하게는, 사멸은 포르말린-처리 또는 열-처리에 의해 수행된다.
- [0048] 바람직하게는, 세포는 제7 또는 제8 국면에 따른 세포이다.
- [0049] **제10 국면**에서, 본 발명은 또한 1개-단위 조성물로서 제형화된 백신집중에 사용하기 위한 키트(kit)에 관한 것이며, 이에 의해 조성물은 키트의 하나의 부분에 존재하며, 그리고 또 다른 부분에 사용하기 위한 지시사항에 관한 것이다.
- [0050] 발명의 상세한 설명
- [0051] **오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 01 항원을 지닌 세포를 포함하는 백신**
- [0052] 비록 혈청 그룹 0139의 브이. 콜레라에가 또한 콜레라를 유발할 수 있다고 해도, 전세계의 모든 콜레라의 > 98%는 브이. 콜레라에 01에 의해 유발된다. 01 혈청그룹은 2개의 아형(subtype)/혈청형인, 오가와 및 이나바를 갖는다. 오가와로부터 이나바 아형으로의 혈청형 스위칭(Serotype switching)는 비교적 높은 빈도로 발생하는 반

면 상호간의 전환은 드물다. 혈청형 스위치의 기준은 O1 항원의 구조내 변화를 초래하는 LPS 합성 경로에 있어서 돌연변이이다. 이들의 LPS는 방어에 기여하는 공유된 및 차별된 에피토프 둘다와 혈청학적으로 차별화되므로 효과적인 백신은 이의 조성물내에 오가와 및 이나바 균주 둘다를 포함하는 것이 필요하다.

[0053] 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 발현하는 비브리오 콜레라에 O1 세포를 포함하는 백신이 기재되어 있으며, 이는 백신의 제조시 표현형 각각에 대해 차별된 세포를 사용할 필요성을 제거하므로 생산을 단순화하는 장점을 갖는다. 단일 유형의 세포를 사용하는 것이 가능하도록 함으로써, 단지 1개 유형의 불활성화 처리가 요구되므로, 백신의 제조는 또한 단순화된다.

[0054] 본 발명의 백신을 사용한 면역화는 오가와 및 이나바 항원 둘다에 대해 교차-반응성 및 또한 유형-특이적인 항체를 생성하는 상이한 양의 오가와 및 이나바 혈청형 둘다를 발현하는 단일의 브이. 콜레라에 균주를 기본으로 한다(참조: 실시예 1).

[0055] 평균적으로, 세포의 O1 항원의 10 내지 90%는 오가와-혈청형의 것이다. 이나바-항원은 오가와에 대해 특정 수준의 교차-혈청형 보호를 유발할 수 있는 반면, 오가와-항원은 단지 자체에 대해 방어를 유발할 수 있으므로, 이나바-항원은 바람직하게는 오가와-항원보다 보다 더 많은 양(50% 이상의 의미)으로 존재한다.

[0056] ETEC에 대한 백신의 효능은, 세포가 CFA/I, CS2 또는 CS5와 같은 하나 이상의 ETEC 콜로니화 인자(CF) 단백질(들)을 추가로 발현하는 특징의 혼입에 의해 추가로 개선될 수 있으며, 여기서, 상기 CF 단백질(들)은 단일, 이중 또는 하이브리드 펩브리아로서 발현된다(세부사항에 대해서는 하기 참조).

[0057] 상기 백신이 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함하는 비브리오 콜레라에 O1 세포 외에 어떠한 추가의 면역학적으로 활성인 전체 세포를 함유하지 않는 것이 바람직하다. 그러나, 상기 백신은 또한 Dukoral™과 유사한 방식으로 재조합체 CTB를 추가로 포함할 수 있다.

[0058] 백신은 바람직하게는 경구 투여용이지만, 또한 주사에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는, 백신은 포르말린-불활성화된 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함하는 비브리오 콜레라에 O1 세포를 포함한다.

[0059] 바람직하게는, 백신은 유전적으로 변형된 비브리오 콜레라에 O1 세포, 바람직하게는 하기 기술된 바와 같이 유전적으로 변형된 비브리오 콜레라에 O1 세포를 포함한다.

[0060] 본 발명의 백신은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체, 희석제 및 보조제를 포함하는 백신 조성물일 수 있다.

[0061] 본 발명에 따른 백신 조성물의 제형은 당해 분야의 숙련가에게 잘 공지되어 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제는 임의의 및 모든 통상의 용매, 분산 매질, 충전제, 고체 담체, 수용액, 피복제, 항세균제, 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제, 등을 포함한다. 약제학적으로 활성인 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당해 분야에 잘 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌(참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA)에 기술되어 있다. 임의의 통상의 매질 또는 제제가 활성 성분과 비혼용성이 아닌 한, 본 발명의 약제학적 조성물에서 이의 사용이 고려된다. 보충적인 활성 성분을 또한 조성물내로 포함할 수 있다.

[0062] 경구용 백신 조성물은 바람직하게는  $10^8$  내지  $10^{14}$  세포/ml, 보다 바람직하게는  $10^{10}$  내지  $10^{12}$  세포/ml, 및 가장 바람직하게는 약  $10^{11}$  세포/ml를 포함할 수 있다.

[0063] 경구용 백신 조성물은 식료품, 음료 또는 식품 보충물(동물을 면역화하는데 사용하는 경우)로 제형화될 수 있다.

[0064] 백신 조성물은 당해 분야에 공지된 보조제를 포함할 수 있거나 어떠한 보조제도 결여할 수 있다.

### 발명의 효과

#### [0065] 백신의 용도

[0066] 본 발명은 바람직하게는 콜레라 및/또는 장독성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)-감염(ETEC)에 대해 예방적 면역화시 상기 백신의 용도를 기증하고 있다. 바람직하게는, 백신은 경구 또는 설하로 투여된다.

[0067] 본 발명은 또한 상기에 따른 백신을 면역화시킬 대상체에게 투여함을 포함하여, 방어적 면역성을 유도시키는 방법을 기재하고 있다. 바람직하게는, 방어적 면역성은 콜레라 및/또는 장독성 에스케리키아 콜라이-감염(ETEC)

에 대한 것이다. 바람직하게는, 투여는 경구 또는 설하로 수행된다. 투여는 또한 주사에 의해 수행될 수 있다.

- [0068] 백신은 바람직하게는 사람 및 애완동물(고양이, 개 등)과 같은 기타 포유동물 또는 농장 동물(예: 소, 말, 양, 염소, 돼지 등)을 면역화하는데 사용된다.
- [0069] 바람직하게는, 백신은  $10^8$  내지  $10^{14}$ 개 세포/투여량, 보다 바람직하게는  $10^{10}$  내지  $10^{12}$ 개 세포/투여량, 및 가장 바람직하게는 약  $10^{11}$ 개 세포/투여량으로 경구 투여된다.
- [0070] 면역화 프로토콜은 단일 투여로 이루어질 수 있거나 2회 이상의 투여를 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, 방어적 면역성을 유도하기 위한 초기 면역화 프로토콜은 적어도 7일까지 그러나 약 2개월을 넘지 않는 기간에 맞춰 분리된, 제1 투여 및 제2 투여를 포함한다. 초기 면역화 프로토콜 후에, 3년 미만의 간격, 바람직하게는 2년 미만의 간격으로 일어나는 추가(booster) 투여가 바람직한 한, 방어적 면역성을 유지할 수 있다. 추가 투여는 제1의 투여로부터 적어도 1년이 경과하기 전에 수행하지 않는 것이 바람직할 수 있다.
- [0071] **백신의 제조 방법**
- [0072] a. 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함하는 비브리오 콜레라에 O1 세포를 제공하는 단계; 및
- [0073] b. 포르말린 처리 또는 열 처리에 의해서와 같이, 상기 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는, 백신의 제조 방법이 기재되어 있다.
- [0074] 바람직하게는, 사멸은 포르말린 처리에 의해 수행된다. 바람직하게는 세포는, 바람직하게는 하기 기술된 바와 같은, 유전적으로 변형된 세포이다.
- [0075] 단일의 불활성화(사멸) 방법의 사용을 가능하도록 하는 장점 외에, 상기 백신은 예를 들면, Dukoral™의 제조로부터 공지된 표준 프로토콜을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0076] **백신 제조용으로 유용한 유전적으로 변형된 세포 및 이러한 세포를 획득하기 위한 DNA 작제물**
- [0077] 백신에 포함된 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함하는 비브리오 콜레라에 세포는 원칙적으로 히코지마 표현형(Hikojima phenotype)을 갖는 천연적으로 발생한 균주로부터 획득될 수 있다. 그러나, 본 발명자들의 우수한 지식으로도, 이러한 균주는 매우 드물며 현재 일반에게 이용가능한 이러한 균주는 존재하지 않는다. 문헌에서, 이러한 천연 균주는 또한 불안정한 것으로 기술되어 왔는데, 이들은 백신의 산업적 생산에 대해 덜 유망하다.
- [0078] 따라서, 본 발명자들은 유전적 가공에 의해 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 발현하는 브이. 콜레라에 세포를 유래시켰으며 안정한 히코지마 표현형을 가진 신규 균주를 획득하였다. 이러한 방식으로 유래된 세포는 또한, 임의의 바람직한 균주(예: 공지되어 있고 잘-특징화된 백신 균주)가 생산을 실질적으로 단순화시키고 GMP 생산 및 규제 승인에 요구되는 실험을 간소화하는 출발 점으로 사용될 수 있다는 장점을 갖는다.
- [0079] 본 발명자들은 본 출원에서, 바람직한 히코지마 표현형을 획득하기 위한 주요 매개변수가 *WbeT* 효소 활성의 적합한 수준을 획득하기 위한 것임을 입증한다. 이와 관련하여 적합하게는 세포의 *WbeT* 효소 활성이, 세포가 필수적으로 순수한 이노바 표현형을 가지도록 너무 낮지 않으며 세포가 필수적으로 순수한 오가와 표현형을 가지도록 너무 높지 않음을 의미한다.
- [0080] 본 발명과 관련하여, 세포에서 O1 항원의 10 내지 90%가 오가와 유형(나머지는 결과적으로 이나바 유형)인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 세포에서 O1 항원의 10 내지 80%가 오가와 유형의 것이며, 여전히 보다 바람직하게는 10 내지 50%, 여전히 보다 바람직하게는 10 내지 40% 및 가장 바람직하게는 20 내지 30%가 오가와 유형의 것이다.
- [0081] 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 위에서 요약한 적합한 히코지마 표현형은
- [0082] a) 낮은 효소 활성을 가진 돌연변이체 *WbeT* 단백질이 이나바 표현형을 가진 숙주내에서 높은 수준으로 발현될 수 있거나;
- [0083] b) 높은 효소 활성을 갖는 *WbeT* 단백질이 이나바 숙주내에서 낮은 수준으로 발현될 수 있거나;
- [0084] c) 오가와 숙주의 내인성 *WbeT* 유전자가, 예를 들면, 동종 재조합에 의해 돌연변이되어 획득되는 단백질이 적합

하게 감소된 활성을 갖도록 할 수 있거나;

- [0085] d) 이나바 숙주의 내인성 *WbeT* 유전자가, 예를 들면, 유전자에 의해 생산된 단백질이 적합하게 증가된 활성을 가지도록 하기 위한 동종 재조합에 의해 대체되거나 변형될 수 있는 재조합 DNA 기술을 이용한 몇가지 분명한 전략들에 의해 수득가능하다.
- [0086] 본 발명은 상기 전략들 각각에 의해 수득된 세포, 및 상기 전략들 각각에 의해 세포를 수득하기에 적합한 DNA-작제물을 기재한다.
- [0087] 본 출원의 교시내용으로부터, 당해 분야의 숙련가에게는 위에 요약한 전략들에 의해 *WbeT* 발현의 바람직한 수준을 달성하는 것이 많은 상이한 방식으로 실현될 수 있음이 명백하다. 예를 들어, *WbeT* 삽입유전자의 발현 수준은 유도성 프로모터(예: *cat*, *lac* 또는 *tac*)를 사용함으로써 조절할 수 있으며, 이에 의해 발현의 수준은 숙주 세포가 노출되는 유도인자의 수준을 조절함으로써 숙주 세포의 배양 동안 조절될 수 있다.
- [0088] 대안적으로, 몇가지 약하고 강한 구성적 프로모터가 또한 공지되어 있으며 적합하게 변형된 *WbeT* 단백질과 함께 사용될 수 있다. 약한 프로모터는 고도로 활성인(예: 야생형; 서열 번호 6) *WbeT* 단백질의 매우 낮은 발현을 구성적으로 유도하기 위해 사용될 수 있다. 역으로, 강력한 구성적 프로모터를 사용하여 활성이 낮은 *WbeT* 단백질(예: 바람직하게는 하기 기술된 바와 같은, 돌연변이된 *WbeT* 단백질)의 고 수준의 발현을 유도할 수 있다.
- [0089] 플라스미드 및 염색체적으로 통합된 *WbeT* 삽입유전자 둘다는 본 발명의 세포내에서 사용되어 바람직한 표현형을 달성할 수 있다.
- [0090] *WbeT*-단백질의 많은 상이한 돌연변이는 잠재적으로 적합한 활성 단백질을 생성할 수 있으며, 이러한 돌연변이된 돌연변이체는 본 출원의 교시내용을 바탕으로 하여, 더 단순한 통상의 실험에 의해 당해 분야에 잘 공지된 방법을 사용하여 숙련가에 의해 용이하게 수득될 수 있다. 바람직한 표현형의 세포가 돌연변이된 *WbeT* 단백질을 발현함으로써 수득되는지의 여부는 숙련가에 의해 예를 들면 실시예 5에 기재된 방법을 사용하여 용이하게 분석될 수 있다. 본 발명자들은 활성을 조절하기에 적합한 잔기로서 *WbeT* 단백질(서열 번호 6)에서 세린 158번을 확인하였다. 따라서, 돌연변이는 바람직하게는 158번 세린의 치환, 보다 바람직하게는 158번 세린의 글리신, 프롤린, 발린, 루이신, 알라닌, 트레오닌, 메티오닌, 트립토판, 아르기닌 또는 페닐알라닌으로의 치환을 포함한다. 가장 바람직하게는, 158번 세린은 글리신, 프롤린, 트레오닌, 페닐알라닌 또는 트립토판으로 치환된다.
- [0091] **ETEC 콜로니화 인자(CF) 단백질(들)**
- [0092] 상기한 사항으로부터 명백한 바와 같이, 본 발명의 백신(또는 오히려 백신이 기초로 하는 세포)은 또한 이나바 및 오가와 혈청형 둘다의 O1 항원의 결합된 발현 외에 다른 향상된 특징을 포함할 수 있다. 특히, 세포는 CFA/I, CS2 또는 CS5와 같은, 하나 이상의 ETEC 콜로니화 인자(CF) 단백질을 발현할 수 있으며, 여기서 상기 CF 단백질(들)은 실시예 7에서 입증된 바와 같이 단일, 이중 또는 하이브리드 펩브리아로 발현된다. 백신의 세포내 이러한 CF 단백질의 포함은 ETEC에 대한 방어 면역성을 유도하는데 특히 유용하다.
- [0093] 본 출원에 인용된 모든 참조문헌들은, 이의 전문이 참조로 인용되어 있다.
- [0094] 본 출원에 사용된 것으로서, 표현 "포함하는"은 기술된 항목들을 포함하나, 이에 한정되지 않는 것으로 이해하여야 한다.
- [0095] 본 발명은 또한 다음 실시예로 추가로 설명하며, 이로써 발명이 제한되는 것이 아니다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0096] **실시예 1. 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 포함하는 비브리오 콜레라에 세포를 포함하는 백신의 제조 및 시험**
- [0097] 유전적으로 변형되어 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 발현한 균주 JS1569(이나바)의 브이. 콜레라에 세균을 포함하는 백신이 모 JS1569 이나바 균주를 사용한 면역화 후 항체 반응과 비교하여 ELISA에서 오가와 및 이나바 LPS와 반응하는 항체의 상이한 비율로 항체 반응을 유발할 수 있는지를 시험하였다.
- [0098] 실시예 2(하기 참조)로부터의 세균은 포르말린-사멸시키고 면역화에 사용하였다. 세균의 포르말린-사멸 및 경구 면역화 및 검정 방법은 이전 기술된 바와 같이 수행하였다[참조: Nygren E, Li BL, Holmgren J, Attridge

SR. Infect Immun. 2009 Aug;77(8):3475-84]. 요약하면, Balb/c 마우스를 2주 간격으로 3x10<sup>8</sup> 포르말린-사멸된 세포(WbeT 균주용 보조제와 함께)의 2일 투여량을 사용하여 3 라운드(round)로 면역화시키고, 마지막 면역화 후 1주째에 마우스를 희생시키고 혈청을 수집하여 이나바 또는 오가와 LPS로 피복시킨 ELISA 플레이트내 합해진 IgG/IgM 항체 역가(titer)에 대해 시험하였다.

[0099] 결과를 하기 표에 나타내며, 항-오가와 역가보다 약간 더 높은 항-이나바와 항체 반응을 유발하는 모 JS1569 이나바 균주와는 대조적으로, JS1569/야생형 Wbe S158S 백신은 비록 여전히 또한 특이적인 항-이나바 항체의 보통의 형성을 유발한다고 해도, 항-이나바 역가보다 훨씬 더 높은 항-오가와와의 항체 반응을 유발하였다:

면역 혈청	이나바/오가와 역가(비)
JS1569에 대해	10290/5060 (2:1)
오가와와 동일하게 흡수됨	2940/160 (18:1)
JS1569/야생형 Wbe S158S에 대해	36000/365000 (1:10)
이나바와 동일하게 흡수됨	1600/49000 (1:30)
오가와와 동일하게 흡수됨	1700/2500 (1:1.5)

[0100] 이들 발견은, 면역화가 보조제없이 피하 제공되는 경우 확인되었다. 모 JS1569 이나바 균주를 사용한 면역화에 대한 현저한 차이로 및 오가와 A457 참조 균주를 사용한 면역화와 보다 유사하게, JS1569 WbeT를 사용한 면역화는 하기 표에 나타낸 바와 같이, 강한 비율의 오가와 특이적인 항체를 사용하여 면역 혈청을 유발하였다.

면역 혈청	이나바 역가	오가와 역가	이나바/오가와 비
JS1569 이나바	480	260	1.8:1
오가와 A457을 지닌 JS1569 abs	180	60	3:1
1569 WbeT를 지닌 JS1569 abs	240	60	4:1
A457 오가와	660	1940	1:1.9
이나바 1569를 지닌 A457 abs	240	1020	1:4.3
JS1569 WbeT를 지닌 A457 abs	180	40	1.8:1
JS1569 WbeT	420	1580	1:3.8
오가와 A457을 지닌 WbeT abs	150	60	2.5:1
이나바 JS1569를 지닌 WbeT abs	180	920	1:5.1
JS1569 WbeT를 지닌 WbeT abs	120	100	1.2:1

[0102] 실시예 2: 돌연변이된 *WbeT*-단백질의 발현에 의한 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 발현하는 유전적으로 변형된 비브리오 콜레라에 세포: 돌연변이된 *WbeT*-단백질의 발현 플라스미드-기반의 발현

[0104] 히코지마 균주로부터의 *wbeT* 유전자의 GenBank에서의 단일 도입시, 비록 동일한 돌연변이가 이나바 혈청형인 것으로 확인된 균주에서 기술되어 있다고 해도(각각 GenBank 수탁 번호 FJ619106 및 DQ401028), 단백질의 158번 위치에서 세린을 프롤린으로 전환시키는 돌연변이(S158P)가 존재한다. 프라이머 *wbeT1* EcoRI(서열 번호: 1 5'-CCCGTCTCGAATTC CTGCATCTGCAAGTTGATTCTGTATG-3') 및 *wbeT2* HindIII(서열 번호: 2 5'-CCCGTCTCAAGCTTATAGTGAAGTCTTCGAAATGTCTG-3')를 사용한 O1 EI Tor 오가와 균주 VX44945로부터의 야생형 *wbeT* 유전자가 증폭된 경우, 이를 Eco31I로 분해하여 pAF1()로부터 유도된 발현 벡터로내로 클로닝되며, 여기서 클로닝된 유전자는 EcoRI 및 HindIII로 분해된 강력한 합성 tac 프로모터의 조절하에 위치하였다. 유전자의 서열은 플라스미드를 프라이머 *wbe1*(서열 번호: 3 5'-CTGCATCTGCAAGTTGATTCTGTATG-3') 및 *wbe2*(서열 번호: 4 5'-ATAGTGAAGTCTTCGAAATGTCTG-3')로 DNA 서열분석함으로써 확인하였다.

[0105] 야생형 *wbeT* 유전자의 DNA 서열은 서열 번호 5에 나타낸 반면 야생형 단백질은 서열 번호 6에 나타낸다.

[0106] 야생형 *wbeT*를 발현하는 플라스미드(pML-*wbeTtac*)의 완전한 서열은 서열 번호 7에 나타낸다.

[0107] 유전자 생성물의 158번 아미노산 위치에서 돌연변이를 수반하는 *wbeT*의 돌연변이체 라이브러리를 작제하기 위하여, 올리고뉴클레오타이드 *wbeT* m3(서열 번호: 8 5'-GCGCGCCAGAAGTTCGCTATTTTAAACC-3' 및 *wbeT* m1(서열 번호:

GGGGGTTCAAGTTTATGAGTTTGATAATAGGGTGNBTCATTATATTTTCAAAAAATACAGACATAGCAGATAAGGTTAAAAATAGCCAAGTCTGGCGC GC-3')을 합성하였다. 2개의 올리고뉴클레오타이드를 등몰량으로 혼합하고 실온에서 밤새 어닐링(annealing)되도록 하였다. 완전한 길이의 이중가닥 DNA를 과량의 테옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 T4 DNA 폴리머라제를 사용하여 짧은 *wbeT* m3 프라이머를 연장시켜 제조하였다. 수득된 단편을 Bsp119I 및 Van91I으로 분해하고 동일한 효소로 분해한 pML-*wbeTtac*(서열 번호: 7)내로 연결하였다. 연결된 DNA를 사용하여 상업적으로 입수한 전자-적격성(electro-competent) 이. 콜라이 균주 DH12S(제조원: Invitrogen)을 형질전환시켰다. 항생제 선택없이 항온처리한 후, 세포의 소 분취량을 암피실린(100 µg/ml)이 보충된 선택적인 LB 아가 플레이트(agar plate)에 펼쳤다(spread). 세포의 나머지를 신선한 LB 액체배지(broth)를 사용하여 25 ml로 희석시켰다. 암피실린을 100µg/ml의 최종 농도로 가하고 배양물을 37°C에서 밤새 성장시켜 클론 라이브러리를 수득하였다. 수득되는 배양물의 분취량을 글리세롤을 사용하여 17%의 최종 농도로 보충하고 -70°C에서 저장하였다. 다른 분취량을 사용하여 플라스미드 DNA를 제조하였다.

[0108] LB 아가 플레이트에서 수득한 콜로니를 신선한 플레이트에 떼어내어 콜로니를 배양함으로써 플라스미드 DNA를 제조하였다. 플라스미드를 서열분석하여 *wbeT* 유전자가 돌연변이를 수반하는지를 측정하였다. 라이브러리로 부터 수득한 *wbeT*의 돌연변이체는 다음과 같다: S158G, S158P, S158V, S158I, S158L, S158A, S158T, S158M, S158W, S158R, S158C 및 S158F. 추가로, 야생형 유전자 및 158번 위치에 정지 시그널 TGA를 갖는 유전자를 분리하였다.

[0109] 상이한 플라스미드를 분리하여 O1 분류적 이나바 균주 JS1569를 형질전환시켰다. 당해 균주는 정지 코돈(TGA)으로 변화되어 절단되고(truncated) 불활성인 생성물(서열 번호: 10 및 서열 번호: 11)을 생성하는, 단백질의 219번 위치에서 글리신(GGA)을 갖는 돌연변이체 *wbeT* 유전자를 갖는다.

[0110] 임의의 유의성을 가진 것으로 나타나지 않는 다른 다형성(polymorphism)이 존재한다.

[0111] 유도 조건하에서(1mM IPTG의 존재하에서) 성장하는 경우 상이한 재조합 플라스미드의 도입으로 생성된 상이한 균주들은 상이한 수준의 오가와 항원을 발현하였다. 표현형은 응집 검정 및 일부 경우에 억제 ELISA(참조: 재료 및 방법의 기술에 관한 실시예 5 참조)를 사용하여 평가하였다. 야생형 유전자는 거의 전체의 혈청형 스위칭을 생성한 반면, 다른 것(예: S158P 및 S158G)은 오가와-특이적인 항혈청과의 약간이지만 검출가능한 응집 및 또한 이나바-특이적인 항혈청과의 응집을 제공하였다(이에 따라서 히코지마 혈청형으로 부여되었다). 일부 돌연변이체는 오가와-특이적인 항혈청(S158I 및 S158C)과 검출가능한 활성을 가지지 않으며 여전히 다른 것들은 중간의 응집(S158T, S158F 및 S158W)을 제공하였다.

[0112] 당해 결과는, 돌연변이 및 구체적으로 *wbeT* 유전자 생성물의 158번 위치에서 돌연변이가, 효소 활성이 변경된 단백질을 생성함을 분명하게 입증한다. 현재, 야생형과 비교하여 이들 돌연변이체의 효소 활성의 수준을 직접적으로 정량 측정하기 위한 신뢰가능한 검정은 존재하지 않으나, 관련된 최종 결과는 실시예 5에서와 같이 용이하게 평가될 수 있다. 요약하면, 모든 예외적인 S158C 및 S158I는 숙주 균주의 이나바 표현형을 어느 정도 보충할 수 있었다.

[0113] **실시예 3: 돌연변이된 *WbeT*-단백질의 발현에 의해 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 발현하는 유전적으로 변형된 비브리오 콜레라에 세포 : 돌연변이체 *wbeT*의 염색체 삽입**

[0114] 균주 JS1569에서 절단된 염색체 *wbeT* 유전자를 실시예 2에서 생성한 돌연변이체 유전자로 치환하였다. 관련된 돌연변이된 유전자를 프라이머 *wbeT1* B1gII(서열 번호: 1) 및 *wbeT2* BgIII(서열 번호: 2)로 증폭시켰다. 증폭된 단편을 BgIII로 분해하고 BamHI으로 분해한 자살 벡터 pMT-SUICIDE(서열 번호: 12)내로 연결하였다. 이는 헬퍼 플라스미드[pNJ5000; 참조: Grinter NJ, Gene. 1983 Jan-Feb;21(1-2):133-43]의 도움으로 플라스미드가 브이. 콜레라에 균주에 접합적으로 이전되도록 하는 광범위한 숙주-범위 플라스미드 RP4로부터의 클로람페니콜 내성 유전자 및 전달(*oriT*) 오리진을 수반하는 엠. 레벤스(M. Lebens)에 의해 당해 실험실에서 작제된 작은 R6K-기반의 자살 벡터이다.

[0115] 생성된 클론에서, *wbeT* 유전자(S158G 및 야생형)를 *cat* 유전자에 대해 반대 배향으로 클론된 유전자와 함께 둘다 삽입하였다. 이러한 벡터의 서열을 서열 번호 13(야생형 *wbeT* 유전자 수반; S158G에 대한 작제물은 *WbeT* 잔기 158을 암호화하는 뉴클레오타이드를 제외하고는 동일하다)으로 예시된다.

[0116] 수득된 플라스미드를 균주 JS1569내로 짝을 지어 클로람페니콜 및 리팜피친 내성을 기준으로 하여 선택하였다. 플라스미드는 플라스미드의 손실에 대해 역-선택이 없으므로, 동종 재조합에 의한 염색체내로 이의 삽입은 플라

스미드에 의해 분리된 *wbeT* 유전자의 직열 카피들(tandem copies)을 생성한다. 재조합이 발생한 위치에 따라, 클론은 상이한 표현형을 가졌다(참조: 실시예 5).

- [0117] 야생형 유전자(1342)를 제공받은 균주는 명확한 히코지마 표현형을 가졌다. 역제 ELISA는, 이것이 S158G 돌연변이체를 제공받은 균주의 표면에 존재하는 오가와 LPS의 단지 15%를 발현하였음을 나타내었다. 후자의 균주(1356)는 사실상 오가와-특이적인 항혈청과 강력하게 응집하지만, 결코 이나바-특이적인 항혈청과 강력하게 응집하지 않는 오가와 균주이었다.
- [0118] 그러나, 당해 균주는 매우 안정하였으며; 이들은 이들의 LPS 혈청형을 유지하였으며 선택의 부재하에서도 클로람페니콜 내성을 유지하였는데, 이는, 플라스미드가 용이하게 손실되지 않았음을 나타낸다.
- [0119] *wbe1* 및 2 프라이머를 사용하는 PCR 및 서열분석(각각 서열 번호: 3 및 4)은, 숙주내에 존재하는 유전자와 도입된 것 사이에 변위 부위에서 변화하는 균주내 2개의 유전자가 존재하였음을 나타내었다. *wbeT* 유전자의 직열 카피가 존재하는 경우 단지 증폭을 허용하는 증폭 및 프라이머 *wbeTfor* 87> (서열 번호 14: 5'-CGGTGCAAACGTTGGAACCTTCTG-3') 및 *wbeT rev* 51< (서열 번호 15: 5'-GGAAAACAATGCCATCCAAATTCGC-3')를 사용한 서열 분석은, 근접한 유전자(87번 아미노산으로부터)의 3' 말단과 51번 아미노산까지의 근접 유전자의 5' 말단 및 이들 사이의 플라스미드를 성공적으로 증폭시켰다. *wbeTfor* 87> 프라이머를 사용한 서열분석은, 균주 1342 내에서 천연의 프로모터에 인접한 *wbeT* 유전자가 절단된 숙주 유전자이었음을 나타내었다. 원위(distal) 유전자는 야생형 서열을 가졌지만 프로모터를 가지지 않았다. 당해 배열은, 야생형 유전자가 잠재 프로모터로부터 극도로 낮은 수준으로 발현되므로 히코지마 표현형을 생성하였다.
- [0120] 오가와 균주 1356에서 배열은 상이하였다. 재조합은 천연의 프로모터로부터 발현되는 천연의 *wbeT* 유전자 및 원위로 위치하는 돌연변이체 S158G 유전자를 생성하므로 결국 인식가능한 프로모터를 전혀 가지지 않았다. 유전자 카피들 둘다는 219번 위치에서 정지 코돈을 상실한 것으로 나타나지만, 이러한 돌연변이는 표현형에 있어 명백한 영향을 가지지 않았다.
- [0121] **실시예 4: 천연의 *WbeT*-단백질을 낮은 수준으로 발현함으로써 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 발현하는 유전적으로 변형된 비브리오 콜레라에 세포**
- [0122] 실시예 2에 기술된 돌연변이체 *wbeT* 에 대한 실험과 관련하여 야생형 *wbeT* 를 수반하는 대조군 플라스미드가 이것이 유도되지 않은 경우에도 균주 JS1569에서 돌연변이체 유전자를 부분적으로 보완할 수 있는 것으로 주지되었다. 이것은 심지어 야생형 유전자의 존재하에서도 히코지마 혈청형을 유도하였으며, 이는 표현형이 또한 발현 수준을 제한함에 의해 달성될 수 있으며, 이러한 경우에 리프레스된 *tac* 프로모터를 유지하고 유도인자의 부재하에서 발생하는 돌발 발현(breakthrough expression) 만을 허용함으로써 달성될 수 있음을 입증한다.
- [0123] 실시예 3에서, 클론 1342는 잠재 프로모터(cryptic promoter)로부터 발현된 염색체적으로 통합된 야생형 유전자를 가졌으며, 히코지마 혈청형을 유도하였다. 이들 결과는, 야생형 유전자의 매우 낮은 수준에서의 발현이 히코지마 혈청형을 유도할 수 있음을 입증한다.
- [0124] **실시예 5: 유전적으로 변형된 비브리오 콜레라에 세포의 표현형의 특성화**
- [0125] 야생형 *WbeT* 메틸라제 단백질(균주 JS1569/S158S) 또는 158번 위치에서 S로부터 G(JS1569/S158G)로 또는 S로부터 A(JS1569/S158A)로의 돌연변이를 지닌 *WbeT* 단백질을 암호화하는 돌연변이된 *wbeT* 유전자를 암호화하는 플라스미드를 함유하도록 변형된 균주 JS1569(이나바)의 브이. 콜레라에 세균을 LB 아가 플레이트에서 성장시키고, 단일 콜로니를 이나바 또는 오가와 O 항원 각각에 대해 특이적인 항체에 의한 응집에 대해 시험하였다.
- [0126] 이들 항체는 토끼를 정제된 오가와 및 이나바 LPS 각각으로 우선 면역화한 후 혈청을 이중 혈청형의 포르말린 사멸된 세균으로 집중적으로 흡수시켜 교차-반응성 항체를 제거한 후 수득되었다. 흡수 후, 오가와-특이적인 항혈청은 오가와 혈청형의 참조 브이. 콜레라에 세포의 강력한 응집을 제공하였으나 이나바 세포를 응집시킬 수 없었으며 이나바 특이적인 혈청은 이와 반대였다.
- [0127] 응집 시험은 표준 방법에 의해 수행되었다. 요약하면, 시험한 균주의 신선한 플레이트로부터의 단일 콜로니를 50 내지 100  $\mu$ l의 생리식염수 완충액 속에 현탁시키고, 10  $\mu$ l의 현탁액을 현미경 슬라이드에 위치시켰다. 이후에, 10  $\mu$ l의 적절히 희석된 특이적인 항혈청을 가하고 응집이 명확히 가시화될 때까지 슬라이드를 5분까지 후방 및 전방으로 경사지게함으로써(tilting) 세포와 혼합시켰다. 각각의 검정을 참조 이나바 및 오가와 균주로부터의 세포들로 이루어진 음성 및 양성 대조군과 비교하였다.
- [0128] 추가로, 혈청이 완충액으로 대체된 자발적인 응집에 대한 조절을 시험한 각각의 균주에 대해 수행하였다. 결과

들은, 하기 표에 나타내며, 야생형 *WbeT* 단백질을 암호화하는 플라스미드를 함유하는 JS1569/S158S 균주가 이나 바로부터 오가와로의 혈청형에 있어 완전히 스위치(switch)되었고, *WbeT* 158S에서 G로의 돌연변이를 가진 JS1569/S158G는 강력한 오가와를 발현하였지만 또한 검출가능한 이나바 반응성을 발현하였으며, *WbeT* 158S에서 A로의 돌연변이를 가진 JS1569/S158A는 단지 미미한 오가와 반응성을 가졌음을 나타낸다.

균주	<i>WbeT</i> 암호화 플라스미드	항-오가와 항체와의 응집	항-이나바 항체와의 응집
JS1569 이나바	없음	-	+++
Cairo 50 오가와	없음	+++	-
A457 오가와	없음	+++	-
JS1569/S158S	<i>WbeT</i> S158S 야생형	+++	(+)
JS1569/S158G	<i>WbeT</i> S158G	++	++
JS1569/S158A	<i>WbeT</i> S158A	(+)	+++

[0129]

[0130]

이들 결과는, 동일한 균주의 포르말린-사멸시킨 세균을 동일한 혈청과의 응집에 대해 시험한 경우 확인되었다. 이들은 또한, 포르말린-사멸시킨 세균을 ELISA-억제 방법을 사용하여 세균 표면에서 이나바 및 오가와 항원의 이들의 정량적 발현에 대해 시험한 경우 확인되고 확장되었다. 당해 방법은 다음과 같이 수행하였다: 고 결합 그레이너 바이오-원 플레이트(Greiner Bio-one plate)를, PBS 중의 5µg/ml의 정제된 오가와 LPS의 용액의 웰(well)당 100 µl와 밤새 항온처리함으로써 오가와 LPS로 피복하였다. 200 마이크로리터의 OD<sub>600</sub> 1.00 포르말린 사멸시킨 세균으로 출발하여; 7개의 일련 5배 희석물을 세포를 함유하지 않는 8번째 블랭크 튜브(eighth blank tube)를 사용하여 PBS 속에서 제조하였다(1:15625로 강하시킴). 150 µl의 각각의 희석물은 동량의 적절하게 희석된 항-오가와 혈청과 PBS, 0.2% BSA 속에서 함께 혼합하였다. 시료를 실온에서 1시간 동안 교반없이 항온처리하였다. 피복된 플레이트를 PBS로 2회 세척하고 200 µl/웰의 PBS, 0.1% BSA로 30분 동안 37°C에서 차단하였다. 세포를 현탁액으로부터 5분 동안 20,000 xg에서 원심분리하여 제거하고 100 µl의 상층액을 플레이트(들)를 차단하기 위해 첨가하였다. 세포 또는 항-오가와 혈청을 함유하지 않는 PBS, 0.1% BSA를 함유하는 블랭크를 모든 플레이트에 포함시키고 모든 시료를 2회 수행하였다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 항온처리한 후 PBS, 0.05% 트윈 20으로 3회 세척하였다. PBS, 0.1% BSA, 0.05% 트윈 20 중의 적절히 희석된 염소 항-토끼 IgG 100 µl를 각각의 웰에 가하고 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 플레이트를 PBS, 0.1% BSA, 0.05% 트윈 20으로 3회 세척한 후 0.1M 시트레이트 pH 4.5 중 0.1% 오르토펜렌디아민(OPD) 및 0.012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 기질 용액을 첨가하였다. 흡광도를 10분 후에 490nm에서 판독하였다.

[0131]

50% 억제시키는 세균 희석물을 추론하고 또한 하기의 표에 나타낸 결과를 사용하여 1:25의 세균 희석에서 흡광도의 억제 %를 추론하였다. 결과는, 야생형 *WbeT*를 암호화하는 *wbeT* 유전자를 함유하는 JS1569/S158S 균주가 특이적인 항-오가와 혈청을 효율적으로 억제할 수 있는 반면, 단일 돌연변이를 가진 *wbeT* 유전자를 함유하는 균주는 또한 항-오가와 혈청을 중간 활성(JS1569/S158G)으로 또는 단지 검출가능하게(JS1569/S158A) 억제할 수 있었다:

균주	50% 억제를 위한 희석	1:25의 희석에서 억제 %
JS1569 이나바	<< 1:1	0
A457 오가와	1:60	65
JS1569/S158G	1:70	70
JS1569/S158S	1:1	20

[0132]

[0133]

각각 *WbeT* 및 S158G를 암호화하는 플라스미드를 기초로 하여, JS1569, 1356(야생형 *WbeT*) 및 1342(S158G *WbeT*)의 2개의 재조합 유도체 균주를 수득하였으며, 여기서 돌연변이된 *wbeT* 유전자는 염색체내로 안정하게 삽입되어 예측하지 않았으나 안정한 표현형을 제공하였다. 이들 균주의 설명 및 기술에 대해서는 상기 실시예를 참조한다. 이들 균주 및 적절한 참조 균주를 오가와 발현의 검정을 위해 콜로니 블롯(colony blot)에 적용시켰다. 돌연변이된 *wbeT* 유전자를 함유하는 균주를 이나바 및 오가와 대조균 균주와 함께 LB 아가 플레이트에 덮고 37°C에서 밤새 성장시켰다. PBS로 습윤화시킨 니트로셀룰로즈 막을 성장된 콜로니가 들어있는 플레이트에 적용시키고 15분 동안 실온에서 정치시켰다. 막을 종이 조각 위에 5분 동안 건조되도록 둔 후 이를 20분 동안 PBS 중 10ml의 1% 소 혈청 알부민(BSA) 속에서 실온으로 차단하였다. 차단 액을 버리고 0.1% BSA 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS 속에서 10ml 중의 항-오가와 혈청의 적절한 희석물로 교체하였다. 막을 흔들리는 탁자에서 2시간

동안 실온으로 항온처리하였다. 이후에, 막을 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS로 3회 세척한 후 PBS 중의 0.1% BSA 중 서양고추냉이 퍼옥시다제(제조원: Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.)에 접합된 염소 항-토끼 IgG를 가하고 실온에서 2시간 동안 온화하게 교반하면서 항온처리하였다.

[0134] PBS, 0.05% 트윈 20 속에서 추가로 3회 세척 및 PBS 만으로 단일 세척에 이어서 막을 0.05% 4-클로로-1-나프톨 및, 500 mM NaCl 및 16.7% 메탄올을 함유하는 20 mM 트리스-HCl pH 7.5 중 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 15분 동안 전개하였다. 이후에, 이를 수돗물로 철저히 세척하고 종이 조각 위에 건조되도록 두었다. 전개된 막으로부터 디지털 사진을 촬영하고 염색 농도를 컴퓨터 시스템으로 측정하였다.

[0135] 표의 결과는, 균주 1356이 오가와 참조 균주와 거의 유사하게 많은 양의 오가와 항원을 발현한 반면 균주 1342는 실질적으로 보다 적은 양의 오가와 항원을 발현하였음을 나타낸다. 이러한 발견은 균주의 포르말린-사멸된 제제를 표에 또한 나타낸 바와 같이 상기 기술된 바와 같이 수행된 억제-ELISA에 의해 오가와 항원의 정량적 발현에 대해 시험한 경우를 추가로 확인하였다:

균주	도트 블롯(dot blot) 밀도 단위/mm <sup>2</sup>	50% 억제를 위한 희석
A 457 오가와	12700	1:60
JS1569 이나바	0	<<1:1
1356	10000	1:80
1342	4500	1:7

[0136]

[0137] **실시예 6: 히코지마 혈청형을 수득하기 위한 내인성 *wbeT* 유전자의 유전적 변형**

[0138] 비록 상기 실시예에 제공된 균주들이 안정하고 명확하게 바람직한 표현형을 가진다고 해도, 히코지마 표현형을 수득하는 다른 방식은 내인성 유전자에서 진정한 유전자 치환을 수행하는 것이다. 내인성의 활성 *wbeT* 유전자 생성물의 158번 위치에서 적합한 돌연변이(위에서 기술한 바와 같음)는 활성을 약화시키므로 히코지마 혈청형을 생성한다. 이는 실시예 5 및 최적의 면역원성 특성을 위한 면역화 실험에서와 같이 히코지마 발현에 대해 시험될 수 있는 상이한 수준의 오가와 발현을 가진 광범위한 돌연변이체를 생성할 것이다.

[0139] 언급한 바와 같이, pMT-SUICIDE 벡터는 적합한 역-선택 유전자를 결여하고 있으며, 이는 플라스미드를 결여하고 바람직한 유전자 및 표현형을 보유하는 유도체를 분리하기가 어려운 것으로 입증되었다. 이러한 이유로 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로부터의 *sacB* 유전자를 수반하는 새로운 자살 벡터를 작제하여, 그람-음성 세균에서 *sacB* 유전자 생성물의 발현이 치명적이고 *wbeT* 유전자의 2개 카피들 사이의 동종 재조합으로 인하여 플라스미드를 상실한 세포로부터 기원한 콜로니들만이 생존할 것이므로 플라스미드를 손실한 균주만이 슈크로스를 함유하는 플레이트에서의 선택에 의해 분리되도록 한다. 플라스미드, pMT 자살/*sacB*(서열 번호: 16)는 동일한 기능을 가진 비교가능한 플라스미드보다 훨씬 더 작으며 사용하기에 훨씬 더 용이하다.

[0140] 야생형 및 다수의 돌연변이체 *wbeT* 유전자를 새로운 벡터내로 클로닝하고 앞서와 같이 균주 JS1569, 및 적합한 오가와 균주와 같은 다른 균주내로 교배할 것이다.

[0141] 정확한 클론을 수득하는 기회를 최적화하기 위하여, 접합(transconjugation) 실험으로부터 생성되는 부분 이배체의 유전자 배열을 분석한 후 후보물 균주를, 재조합되어 플라스미드가 제거된 균주의 선택을 추가로 고려하기 위해 선택한다.

[0142] **실시예 7: 하이브리드 CFA/I+CS2의 발현**

[0143] 이. 콜라이 TOP10 및 브이. 콜레라에 JS1569 균주는 ETEC의 주요 콜로니화 인자들 중의 하나, 즉, CFA/I 펩브리아를 이들의 표면에 발현할 수 있다[참조: Tobias J, Lebens M, Bolin I, Wiklund G, Svennerholm AM. Vaccine. 2008 Feb 6;26(6):743-52]. CFA/I-함유 발현 벡터를 상기 균주내로 전기천공한 후, 표면 발현을 도트 블롯 검정(dot blot assay)으로 검출하였다.

[0144] 최근에, 이. 콜라이 TOP10이 CFA/I 및 CS2 둘다의 주요 소단위, 즉, ETEC의 추가의 주요 콜로니화 인자를 함유하는 하이브리드 펩브리아를 발현할 수 있음이 밝혀졌다[참조: Tobias J, Svennerholm AM, Holmgren J, Lebens M. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Jul;87(4)].

[0145] 따라서, 본 발명자들은 브이. 콜레라에 JS1569에서 동일한 하이브리드 펩브리아의 발현의 용이성을 시험하였다.

균주를 기술한 바와 같이(참조: Tobias et al. 2008, *supra*; Tobias J, Holmgren J, Hellman M, Nygren E, Lebens M, Svennerholm AM. Vaccine. 2010 Aug 20. [Epub ahead of print]) 발현 벡터 pJT-CFA/I-CotA로 전기 천공시켰다.

[0146] 이후에, 50개 콜로니(클론)를 클로람페니콜(12.5 µg/ml) 및 IPTG(1 mM)가 보충된 2개의 LB 플레이트에 스트리킹(streaking)한 후 37°C에서 밤새 항온처리하였다. 이후에 CFA/I에 대한 특이적인 모노클로날 항체(MAb) 1:6 및 CS2에 대한 MAb 10:3을 콜로니 블롯 검정(참조: Tobias et al, 2010, *supra*)에서 적용시켜 브이. 콜레라에 JS1569에서 하이브리드 CFA/I-CotA 펩브리아의 표면 발현을 시험하였다. 이후에, 블롯을 전개하여 브이. 콜레라에 JS1569의 모든 시험한 50개 클론에서 하이브리드 CFA/I-CS2 펩브리아의 표면 발현의 양성 시그널을 나타내었다.

[0147] 따라서, 오가와 및 이나바 혈청형 둘다의 O1 항원을 발현하도록 가공된 동일한 세포에서 항원성 하이브리드 펩브리아의 발현을 결합시키는 것이 가능하다.

### 서열 목록

<110> Gotovax AB

<120> Vaccine against cholera and enterotoxigenic E. coli (ETEC)  
diarrhea

<130> IPA120205

<150> US 61/272,351

<151> 2009-09-16

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Vibrio cholerae

<400> 1

cccggctctg aattcctgca tctgcaagtt gattctgtat g 41

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Vibrio cholerae

<400> 2

cccggctctca agcttatagt gaactcttcg gaaatgtctg 40

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Vibrio cholerae  
 <400> 3  
 ctgcatctgc aagttgattc tgtatg 26  
 <210> 4  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Vibrio cholerae  
 <400> 4  
 atagtgaact cttcggaat gtctg 25  
 <210> 5  
 <211> 953  
 <212> DNA  
 <213> Vibrio cholerae  
 <220><221> CDS  
 <222> (67)..(927)  
 <400> 5  
 cctgcatctg caagttgatt ctgtatgta ttttttacgc taatattatt taaaattgag 60  
 gtagta atg aaa cat cta ata aaa aac tat gta caa aaa tta att aaa 108

Met Lys His Leu Ile Lys Asn Tyr Val Gln Lys Leu Ile Lys  
 1 5 10  
 aca gag ctt gat gct att cag tca aag tct gtt cat gat aat cga aac 156  
 Thr Glu Leu Asp Ala Ile Gln Ser Lys Ser Val His Asp Asn Arg Asn  
 15 20 25 30  
 ttc att tac aat gga gag ttt tta att ctt gaa agc gaa ttt gga tgg 204  
 Phe Ile Tyr Asn Gly Glu Phe Leu Ile Leu Glu Ser Glu Phe Gly Trp

35 40 45  
 cat tgt ttt ccc aga gtg cag ttg aac cat gct tta agc tac aaa aac 252  
 His Cys Phe Pro Arg Val Gln Leu Asn His Ala Leu Ser Tyr Lys Asn  
 50 55 60  
 cca aac ttt gat tta ggt atg cgt cac tgg att gtt aat cat tgt aag 300  
 Pro Asn Phe Asp Leu Gly Met Arg His Trp Ile Val Asn His Cys Lys  
 65 70 75

cat gac acc act tat att gat atc ggt gca aac gtt gga act ttc tgt	348
His Asp Thr Thr Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Asn Val Gly Thr Phe Cys	
80 85 90	
gga atc gct gct cgt cat att aca caa gga aaa att ata gcg ata gaa	396
Gly Ile Ala Ala Arg His Ile Thr Gln Gly Lys Ile Ile Ala Ile Glu	
95 100 105 110	
cca ctc aca gaa atg gaa aat agt att agg atg aat gtt caa tta aat	444
Pro Leu Thr Glu Met Glu Asn Ser Ile Arg Met Asn Val Gln Leu Asn	
115 120 125	
aat cca ctg gtt gag ttt cat cat ttt ggc tgt gca ata ggt gag aat	492
Asn Pro Leu Val Glu Phe His His Phe Gly Cys Ala Ile Gly Glu Asn	
130 135 140	
gaa ggg gaa aat att ttc gaa gtt tat gag ttt gat aat agg gtg tca	540
Glu Gly Glu Asn Ile Phe Glu Val Tyr Glu Phe Asp Asn Arg Val Ser	
145 150 155	
tca tta tat ttt caa aaa aat aca gac ata gca gat aag gtt aaa aat	588
Ser Leu Tyr Phe Gln Lys Asn Thr Asp Ile Ala Asp Lys Val Lys Asn	
160 165 170	
agc caa gtt ctg gtt aga aag tta agt agt tta gat ata tcg cct act	636
Ser Gln Val Leu Val Arg Lys Leu Ser Ser Leu Asp Ile Ser Pro Thr	
175 180 185 190	
aac tct gta gtt ata aaa att gat gct gaa ggc gca gaa ata gag ata	684
Asn Ser Val Val Ile Lys Ile Asp Ala Glu Gly Ala Glu Ile Glu Ile	
195 200 205	
tta aac cag att tac gaa ttc aca gaa aag cat aat gga att gaa tat	732
Leu Asn Gln Ile Tyr Glu Phe Thr Glu Lys His Asn Gly Ile Glu Tyr	
210 215 220	
tat att tgc ttt gaa ttt gca atg ggt cat ata cag agg tct aat aga	780
Tyr Ile Cys Phe Glu Phe Ala Met Gly His Ile Gln Arg Ser Asn Arg	
225 230 235	
act ttt gat gag att ttt aac ata ata aac tca aaa ttc gga agt aag	828

Thr Phe Asp Glu Ile Phe Asn Ile Ile Asn Ser Lys Phe Gly Ser Lys  
 240 245 250  
 gca tat ttt att cat cca tta tca tcc gct gaa cat cct gag ttt aat 876  
 Ala Tyr Phe Ile His Pro Leu Ser Ser Ala Glu His Pro Glu Phe Asn  
 255 260 265 270  
 aaa gca acg cag gat att aat ggg aat atc tgt ttt aaa tat gta tca 924  
 Lys Ala Thr Gln Asp Ile Asn Gly Asn Ile Cys Phe Lys Tyr Val Ser  
 275 280 285  
 taa aataatttaa tatattccgt atgtca 953  
 <210> 6  
 <211> 286  
 <212> PRT  
 <213> Vibrio cholerae  
 <400> 6  
 Met Lys His Leu Ile Lys Asn Tyr Val Gln Lys Leu Ile Lys Thr Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Asp Ala Ile Gln Ser Lys Ser Val His Asp Asn Arg Asn Phe Ile  
 20 25 30  
 Tyr Asn Gly Glu Phe Leu Ile Leu Glu Ser Glu Phe Gly Trp His Cys  
 35 40 45  
 Phe Pro Arg Val Gln Leu Asn His Ala Leu Ser Tyr Lys Asn Pro Asn  
 50 55 60  
 Phe Asp Leu Gly Met Arg His Trp Ile Val Asn His Cys Lys His Asp  
 65 70 75 80  
 Thr Thr Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Asn Val Gly Thr Phe Cys Gly Ile  
 85 90 95  
 Ala Ala Arg His Ile Thr Gln Gly Lys Ile Ile Ala Ile Glu Pro Leu  
 100 105 110  
 Thr Glu Met Glu Asn Ser Ile Arg Met Asn Val Gln Leu Asn Asn Pro  
 115 120 125  
 Leu Val Glu Phe His His Phe Gly Cys Ala Ile Gly Glu Asn Glu Gly

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

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

260 265 270  
 Thr Gln Asp Ile Asn Gly Asn Ile Cys Phe Lys Tyr Val Ser  
 275 280 285

<210> 7

<211> 4858

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic plasmid

<400> 7

aggtggcact tticggggaa atgtgcgagg aaccctatt tgtttatfff tctaaataca 60  
 ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata acctgataa atgcttcaat aatccggatt 120  
 gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg 180  
  
 cattttgcct tcctgttttt gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag 240  
 atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg 300  
 agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg 360  
 gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt 420

ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tctcagaaaa gcatcttacg gatggcatga 480  
cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccacttac 540  
ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc 600

atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc 660  
gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac 720  
tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag 780  
gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg 840  
gtgagcgtgg gtctcgggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta 900  
tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg 960  
ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaaactgtc agaccaagtt tactcatata 1020

tactttagat tgatttaaaa cttcatTTTT aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt 1080  
ttgataatct catgacaaa atccctaac gtgagttttc gttccactca gcgtcagacc 1140  
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctTTTT tctgcgcgta atctgctgct 1200  
tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa 1260  
ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtcttcttag 1320  
tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc 1380  
tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 1440

actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 1500  
cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt 1560  
gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg 1620  
tcggaacagg acagcgcacg agggagcttc caggggaaa cgcttggtat ctttatagtc 1680  
ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 1740  
ggagcctatg gaaaatcttt cctgcgttat ccctgattc tgtggataac cgtattaccg 1800  
cctttgagtg agctgacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttctggc 1860

cttttgctca caigtcttt cctgcgttat ccctgattc tgtggataac cgtattaccg 1920  
cctttgagtg agctgatacc gctcggca gccgaacgac cgagcgcagc gactcagtga 1980  
gagaggaagc ggaagagcgc ctgatgcggt attttctct tacgcatctg tgcggtattt 2040  
cacaccgcat atggtgcaact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagt 2100  
atacactccg ctatcgctac gtgactgggt catggctgcg ccccgacacc cgccaacacc 2160  
cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac 2220

cgtctccggg agctgcatgt gtcagagggt ttaccgtca tcaccgaaac gcgagaggca 2280  
  
 ggatcccgaa cgccagcaag acgtagccca gcgctcggc cagcttgcaa ttcgcgctaa 2340  
 ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 2400  
 ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgccagggt 2460  
 ggtttttctt ttaccagtg agacgggcaa cagctgattg cccttcaccg cctggccctg 2520  
 agagagtgc agcaagcggc ccacgtggt ttgccccagc aggcgaaaat cctgtttgat 2580  
 ggtggttaac ggcgggatat aacatgagct gtcttcggta tcgtcgtatc cactaccga 2640  
 gatatacgca ccaacgcgca gcccgactc ggtaatggcg cgcattgcgc ccagcgcct 2700  
  
 ctgatcgttg gcaaccagca tcgcagtggg aacgatgccc tcattcagca tttgcatggt 2760  
 ttgttgaaaa ccggacatgg cactccagtc gccttcccgt tccgctatcg gctgaatttg 2820  
 attgcgagt agatattat gccaccagc cagacgcaga cgcgccgaga cagaacttaa 2880  
 tgggcccgt aacagcgca tttgctggtg accaatgcg accagatgct ccacgccag 2940  
 tcgctaccg tcttcatggg agaaaataat actgttgatg ggtgtctggt cagagacatc 3000  
 aagaaataac gccggaacat tagtgcaggc agcttcaca gcaatggcat cctggtcatc 3060  
 cagcggatag ttaatgatca gccactgac gcgttcgcg agaagattgt gcaccgccg 3120  
  
 tttacaggct tcgacccgc ttcgttctac catcgacacc accacgtgg caccagttg 3180  
 atcggcgca gatttaatcg ccgcaaat ttgcgacggc gcgtgcaggc ccagactgga 3240  
 ggtggcaac ccaatcagca acgactgtt gccgccagt tgttgcca cgcggttggg 3300  
 aatgtaatc agctccgca tcgcccctc cacttttcc cgcgttttcg cagaaactg 3360  
 gctggcctgg ttaccacgc gggaaacggt ctgataagag acaccggcat actctgcgac 3420  
 atcgtataac gttactggtt tcacattcac cacctgaat tgactctctt ccggcgcta 3480  
 tcatgcata ccgcaagg ttttgcacca ttgatggtg tcaacgtaa tgccgttcg 3540  
  
 ccttcgcg cgaattgcaa gctgatccgg gcttatcgac tgcacggtgc accaatgctt 3600  
 ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggtcgtaa atcactgcat 3660  
 aattcgtgc gctcaaggc cactcccgtt ctggataatg tttttgccc cgacatcata 3720  
 acggttctgg cagatctgaa atgagctgtt gacaattaat catcggtcgc tataatgtgt 3780  
 ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaacagaa ttctgcatc tgcaagtga 3840  
 ttctgtatgt ttttttac gctaattaa tttaaaattg aggtagtatg aaacatctaa 3900  
 taaaaacta tgtacaaaa ttaattaa cagagcttga tgctattcag tcaaagtctg 3960

ttcatgataa tcgaaacttc atttacaatg gagagttttt aattcttgaa agcgaatttg 4020  
 gatggcattg ttttccaga gtgcagttga accatgcttt aagctacaaa aacccaaact 4080  
 ttgatttagg tatgcgtcac tggattgtta atcattgtaa gcatgacacc acttatattg 4140  
 atatcgggtgc aaacgttggga actttctgtg gaatcgtctgc tcgtcatatt acacaaggaa 4200  
 aaattatagc gatagaacca ctcacagaaa tggaaaatag tattaggatg aatgttcaat 4260  
 taataatcc actagttgag tttcatcatt ttggctgtgc aataggtgag aatgaagggg 4320  
 aaaatatttt cgaagtttat gagtttgata atagggtgtc atcattatat tttcaaaaaa 4380

atacagacat agcagataag gttaaaaata gccaaagtct ggtagaaag ttaagtagtt 4440  
 tagatataatc gcctactaac tctgtagtta taaaaattga tgctgaaggc gcagaaatag 4500  
 agatattaaa ccagatttac gaattcacag aaaagcataa tggaattgaa tattatattt 4560  
 gctttgaatt tgcaatgggt catatacaga ggtctaatag aacttttgat gagattttta 4620  
 acataataaa ctcaaaattc ggaagtaagg catattttat tcatccatta tcatccgctg 4680  
 aacatcctga gtttaataaa gcaacgcagg atattaatgg gaatatctgt tttaaatag 4740  
 tatcataaaa taatttaata tattctcgta tgcattgca agttcaacag acatttcgga 4800

agagttcact ataagcttag cccgcctaata gagcgggctt tttttctcg aggacgtc 4858

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Vibrio cholerae

<400> 8

gcgcgccaga acttgctat ttttaacc 28

<210> 9

<211> 104

<212> DNA

<213> Vibrio cholerae

<220><221> misc\_feature

<222> (36)..(37)

<223> n denotes a, t, c or g

<220><221> misc\_feature

<222> (38)..(38)

<223> b denotes c or g or t

<400> 9

gggggttcga agtttatgag ttgataata gggtgnbnc attatatttt caaaaaata 60

cagacatagc agataaggtt aaaaatagcc aagttctggc gcgc 104

<210> 10

<211> 934

<212> DNA

<213> Vibrio cholerae

<220><221> CDS

<222> (22)..(678)

<400> 10

attatttaaa ttgaggtagt a atg aaa cat cta ata aaa aac tat gta caa 51

Met Lys His Leu Ile Lys Asn Tyr Val Gln

1 5 10

aaa tta att aaa aca gag ctt gat gct att cag tca aag tct gtt cat 99

Lys Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Ala Ile Gln Ser Lys Ser Val His

15 20 25

gat aat cga aac ttc att tac aat gga gag ttt tta att ctt gaa agc 147

Asp Asn Arg Asn Phe Ile Tyr Asn Gly Glu Phe Leu Ile Leu Glu Ser

30 35 40

gaa ttt gga ttg cat tgt ttt ccc aga gtg cag ttg aac cat gct tta 195

Glu Phe Gly Leu His Cys Phe Pro Arg Val Gln Leu Asn His Ala Leu

45 50 55

agc tac aaa aac cca aac ttt gat tta ggt atg cgt cac tgg att gtt 243

Ser Tyr Lys Asn Pro Asn Phe Asp Leu Gly Met Arg His Trp Ile Val

60 65 70

aat cat tgt aag cat gac acc act tat att gat atc ggt gca aac gtt 291

Asn His Cys Lys His Asp Thr Thr Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Asn Val

75 80 85 90

gga act ttc tgt gga atc gct gct cgt cat ata cac caa gga aaa att 339

Gly Thr Phe Cys Gly Ile Ala Ala Arg His Ile His Gln Gly Lys Ile

95 100 105

ata gcg ata gaa cca ctc aca gaa atg gaa aat agt att agg atg aat 387

Ile Ala Ile Glu Pro Leu Thr Glu Met Glu Asn Ser Ile Arg Met Asn  
 110 115 120  
 gtt caa tta aat aat cca cta gtt gag ttt cat cat ttt ggc tgt gca 435  
 Val Gln Leu Asn Asn Pro Leu Val Glu Phe His His Phe Gly Cys Ala  
 125 130 135  
 ata ggt gag aat gaa ggg gaa aat att ttc gaa gtt tat gag ttt gat 483  
 Ile Gly Glu Asn Glu Gly Glu Asn Ile Phe Glu Val Tyr Glu Phe Asp  
 140 145 150  
 aat agg gtg tca tca tta tat ttt aaa aaa aat aca gac ata gca gat 531  
 Asn Arg Val Ser Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Asn Thr Asp Ile Ala Asp  
 155 160 165 170  
 aag gtt aaa aat agc caa gtt ctg gtt aga aag tta agt agt tta gat 579  
 Lys Val Lys Asn Ser Gln Val Leu Val Arg Lys Leu Ser Ser Leu Asp  
 175 180 185  
 ata tcg cct act aac tct gta gtt ata aaa att gat gct gaa ggc gca 627  
 Ile Ser Pro Thr Asn Ser Val Val Ile Lys Ile Asp Ala Glu Gly Ala  
 190 195 200  
 gaa ata gag ata tta aac cag att tac gaa ttc aca gaa aag cat aat 675

Glu Ile Glu Ile Leu Asn Gln Ile Tyr Glu Phe Thr Glu Lys His Asn  
 205 210 215  
 tga atgaaatatt atatttgctt tgaatttgca atgggtcata tacagaggtc 728  
 taatagaact tttgatgaga tttttaacat aataaactca aaattcggaa gtaaggcata 788  
 ttttattcat ccattatcat ccgctgaaca tcttgagttt aataaagcaa cgcaggatat 848  
 taatgggaat atctgtttta aatatgtatc ataaaataat ttaatatatt ccgtatgtca 908  
 ttgcaagtte aacagacatt tcgaga 934

<210> 11

<211> 218

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae

<400> 11

Met Lys His Leu Ile Lys Asn Tyr Val Gln Lys Leu Ile Lys Thr Glu

1                    5                    10                    15  
 Leu Asp Ala Ile Gln Ser Lys Ser Val His Asp Asn Arg Asn Phe Ile  
                           20                    25                    30  
 Tyr Asn Gly Glu Phe Leu Ile Leu Glu Ser Glu Phe Gly Leu His Cys  
                           35                    40                    45  
 Phe Pro Arg Val Gln Leu Asn His Ala Leu Ser Tyr Lys Asn Pro Asn  
  
                           50                    55                    60  
 Phe Asp Leu Gly Met Arg His Trp Ile Val Asn His Cys Lys His Asp  
 65                                    70                    75                    80  
 Thr Thr Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Asn Val Gly Thr Phe Cys Gly Ile  
                           85                    90                    95  
 Ala Ala Arg His Ile His Gln Gly Lys Ile Ile Ala Ile Glu Pro Leu  
                           100                    105                    110  
 Thr Glu Met Glu Asn Ser Ile Arg Met Asn Val Gln Leu Asn Asn Pro  
  
                           115                    120                    125  
 Leu Val Glu Phe His His Phe Gly Cys Ala Ile Gly Glu Asn Glu Gly  
                           130                    135                    140  
 Glu Asn Ile Phe Glu Val Tyr Glu Phe Asp Asn Arg Val Ser Ser Leu  
 145                                    150                    155                    160  
 Tyr Phe Lys Lys Asn Thr Asp Ile Ala Asp Lys Val Lys Asn Ser Gln  
                           165                    170                    175  
 Val Leu Val Arg Lys Leu Ser Ser Leu Asp Ile Ser Pro Thr Asn Ser  
  
                           180                    185                    190  
 Val Val Ile Lys Ile Asp Ala Glu Gly Ala Glu Ile Glu Ile Leu Asn  
                           195                    200                    205  
 Gln Ile Tyr Glu Phe Thr Glu Lys His Asn  
                           210                    215  
 <210> 12  
 <211> 1954  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Synthetic plasmid

<400> 12

agtaatacga ctactagtg ggcagatctt cgaatgcac gcgcgcaccg tacgtctcga 60  
 ggaattcctg caggatatct ggatccacga agcttcccat ggtgacgtca cggttctag 120  
  
 atacctaggt gagctctggt accctctagt caaggcctgt cagccgtaa gtgttctgt 180  
 gtcactgaaa attgctttga gaggtctctaa gggcttctca gtgcgttaca tccttggtt 240  
 gttgtccaca accgttaaac cttaaaagct ttaaaagcct tataatattct ttttttctt 300  
 ataaaactta aaaccttaga ggctatntaa gttgctgatt tatattaatt ttattgttca 360  
 aacatgagag cttagtagct gaaacatgag agcttagtac gttagccatg agagcttagt 420  
 acgttagcca tgagggttta gttcgttaaa catgagagct tagtacgtta aacatgagag 480  
 cttagtagct gaaacatgag agcttagtac gtactatcaa caggttgaac tgctgatctt 540  
  
 cagatctccg cttgcccetca tctgttacgc cggcggtagc cggccagcct cgcagagcag 600  
 gattcccgtt gagcaccgcc aggtgcgaat aaggacagct gaagaaggaa caccgcctcg 660  
 cgggtgggcc tacttcacct atcctgcccg gctgacgccg ttggatacac caagaaagt 720  
 ctacacgaac cttttgcaa aatcctgtat atcgtgcgaa aaaggatgga tataccgaaa 780  
 aaatcgtat aatgacccc aagcaggggt atgcagcgga aaagcgtgc tccctgctg 840  
 ttttgtgaa tatctaccga ctggaacag gcaaatgcag gaaattactg aactgagggg 900  
 acaggcgaga gatctggcct aggccgaccg aataaatacc tgtgacggaa gatcacttcg 960  
  
 cagaataaat aaatcctggt gtcctgttg ataccgggaa gccctgggcc aacttttggc 1020  
 gaaaatgaga cgttgatcgg cacgtaagag gttccaactt tcaccataat gaaataagat 1080  
 cactaccggg cgtatTTTT gagttgtcga gattttcagg agctaaggaa gctaaaatgg 1140  
 agaaaaaat cactggatat accaccgttg atatatcca atggcatcgt aaagaacatt 1200  
 ttgaggcatt tcagtcagtt gctcaatgta cctataacca gaccgttcag ctggatatta 1260  
 cggccttttt aaagaccgta aagaaaaata agcacaagtt ttatccggcc tttattcaca 1320  
 ttcttgccc cctgatgaat gctcatccgg aattacgtat ggcaatgaaa gacggtgagc 1380  
  
 tggatgatg ggatagtgtt caccctgtt acaccgttt ccatgagcaa actgaaacgt 1440  
 tttcatcgt ctggagtga taccacgacg atttccggca gtttctacac atatattgc 1500  
 aagatgtggc gtgttacgtt gaaaacctgg cctatttccc taaagggttt attgagaata 1560  
 tgttttctgt ctacccaat ccctgggtga gtttaccag ttttgattta aacgtggcca 1620  
 atatggaaa cttcttcgcc cccgtttca ccatgggcaa atattatag caaggcgaca 1680  
 aggtgctgat gccgctggcg attcaggtt atcatgccgt ttgtgatggc ttccatgtcg 1740

gcagaatgct taatgaatta caacagtact gcgatgagtg gcagggcggg gcgtaatfff 1800

ttaagcag ttattggcgc ccataaacgc ctggttgcta cgcctgaata agtgataata 1860

agcggatgaa tggcagaaat tcgaaagcaa attcgaccgc gtcgtcggtt cagggcaggg 1920

tcgttaaata gccgcttatg tctattgctg gttt 1954

<210> 13

<211> 2948

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic vector construct with wild-type wbeF insert

<220><221> misc\_feature

<222> (151)..(1011)

<223> wbeF wild-type CDS insert in reverse orientation

<400> 13

agtaatacga ctactagtgc ggcagatctt cgaatgcacg gcgcgcaccg tacgtctcga 60

ggaattcctg caggatatct ggatctatag tgaactcttc ggaaatgtct gttgaacttg 120

caatgacata cgagaatata ttaaattatt ttatgatata tatttaaac agatattccc 180

attaatatcc tgcgttgctt tattaaacctc aggatgttca gcggatgata atggatgaat 240

aaaatatgcc ttacttccga attttgagtt tattatgtta aaaatctcat caaaagtctt 300

attagacctc tgtatatgac ccattgcaaa ttcaaagcaa atataatatt caattccatt 360

atgcttttct gtgaattcgt aaatctgggt taatatctct atttctgcgc cttcagcatc 420

aatftttata actacagagt tagtaggcga tatatctaaa ctacttaact ttctaaccag 480

aacttggcta tttttaacct tatctgctat gtctgtatft ttttgaaat ataatgatga 540

caccctatta tcaaactcat aaacttcgaa aatattttcc cttcattct cacctattgc 600

acagccaaaa tgatgaaact caactagtgg attatttaat tgaacattca tcctaatact 660

atftttccatt tctgtgagtg gttctategc tataatfttt ccttgtgtaa tatgacgagc 720

agcgattcca cagaaagttc caacgtttgc accgatatca atataagtgg tgtcatgctt 780

acaatgatta acaatccagt gacgcatacc taaatcaaag tttgggtttt ttagcttaa 840

agcatggttc aactgcactc tgggaaaaca atgccatcca aattcgcttt caagaattaa 900

aaactctcca ttgtaaatga agtttcgatt atcatgaaca gactttgact gaatagcatc 960

aagctctggt ttaattaatt tttgtacata gttttttatt agatgtttca tactacctca 1020

atfttaata atattagcgt aaaaaataac atacagaatc aacttcgaga tgcagagatc 1080

cacgaagctt cccatgggga cgtcaccggt tctagatacc taggtgagct ctggtaccct 1140  
ctagtcaagg cctgtcagcc gtttaagtgt cctgtgtcac tgaaaattgc tttgagagcc 1200  
tctaagggct tctcagtgcg ttacatccct ggcttgttgt ccacaaccgt taaaccttaa 1260  
aagctttaa agccttatat attctttttt ttcttataaa acttaaaacc ttagaggcta 1320  
  
tttaagtgc tgatttatat taattttatt gttcaaacad gagagcttag tacgtgaaac 1380  
atgagagctt agtacgttag ccatgagagc ttagtacgtt agccatgagg gtttagttcg 1440  
ttaaacatga gagcttagta cgttaaacad gagagcttag tacgtgaaac atgagagctt 1500  
agtacgtact atcaacaggt tgaactgctg atcttcagat ctccgcttgc cctcatctgt 1560  
tacgccggcg gtagccggcc agcctcgagc agcaggattc ccgttgagca ccgccaggtg 1620  
cgaataaggg acagtgaaga aggaacacc gctcggggg gggcctactt cacctatcct 1680  
gcccggctga cgccgttggg tacaccaagg aaagtctaca cgaacccttt ggcaaaatcc 1740  
  
tgtatatcgt gcgaaaaagg atggatatac cgaaaaatc gctataatga ccccgaagca 1800  
gggttatgca gcgaaaaagc gctgcttccc tgctgttttg tggaatatct accgactgga 1860  
aacaggcaaa tgcaggaat tactgaactg aggggacagg cgagagatct ggcctagccc 1920  
gaccgaataa atacctgga cggaagatca cttcgagaa taaataaatc ctggtgtccc 1980  
tgttgatacc gggaaagcct gggccaactt ttggcgaaaa tgagacgttg atcggcacgt 2040  
aagaggttcc aactttcacc ataatgaaat aagatcacta ccgggcgtat tttttgagtt 2100  
gtcagatatt tcaggagcta aggaagctaa aatggagaaa aaaatcactg gatataccac 2160  
  
cgttgatata tcccaatggc atcgtaaaga acattttgag gcatttcagt cagttgctca 2220  
atgtacctat aaccagaccg ttcagctgga tattacggcc ttttaaga cgtaagaa 2280  
aaataagcac aagttttatc cggcctttat tcacattctt gcccgcctga tgaatgctca 2340  
tccggaatta cgtatggcaa tgaagacgg tgagctggg atatgggata gtgttcacc 2400  
ttgttacacc gttttcatg agcaactga aacgtttca tcgctctgga gtgaatacca 2460  
cgacgatttc cggcagtttc tacacatata ttcgaagat gtggcgtgtt acggtgaaaa 2520  
cctggcctat ttcctaag ggtttattga gaatatgtt ttcgtctcag ccaatccctg 2580  
  
ggtgagtttc accagttttg atttaaacgt ggccaatatg gacaacttct tcgcccgtt 2640  
ttccatagc gcaaatatta tacgcaagc gacaaggtgc tgatccgct ggcgattcag 2700  
gttcatcatg ccgtttgga tggcttccat gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag 2760  
tactcgatg agtggcaggg cggggcgtaa ttttttaag gcagttattg gtgccataa 2820  
acgcctggtt gctacgctg aataagtgat aataagcggg tgaatggcag aaattcga 2880  
gcaaatcga cccggtcgtc ggttcagggc agggctggtt aatagccgct tatgtctatt 2940

gctggttt 2948

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Vibrio cholerae  
 <400> 14  
 cggtgcaaac gttggaactt tctg 24  
 <210> 15  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Vibrio cholerae  
 <400> 15  
 ggaaaacaat gccatccaaa ttcgc 25  
 <210> 16  
 <211> 3694  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Synthetic construct  
 <400> 16  
 ttcgatattt tttagttctt taggcccgta gtctgcaaat ccttttatga ttttctatca 60  
 aacaaaagag gaaaatagac cagttgcaat ccaaacgaga gtctaataga atgaggtcga 120  
  
 aaagtaaadc gcgcggttt gttactgata aagcaggcaa gacctaaaat gtgtaaaggg 180  
 caaagtgtat actttggcgt cacccttac atattttagg tcttttttta ttgtgcgtaa 240  
 ctaacttgcc atcttcaaac aggaggctg gaagaagcag accgctaaca cagtacataa 300  
 aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct 360  
 ttactaccgc actgctggca ggaggcgcaa ctcaagcgtt tgcgaaagaa acgaacccaa 420  
 agccatataa gaaacatcac ggcatttccc atattacag ccatgatafg ctgcaaatcc 480  
 ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag ttctgaatt cgattcgtcc acaattaaaa 540  
  
 atatctcttc tgcaaaaggc ctggacgttt gggacagctg gccattacaa aacgctgacg 600  
 gcactgtcgc aaactatcac ggctaccaca tcgtctttgc attagccgga gatcctaaaa 660  
 atgcggatga cacatcgatt tacatgttct atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca 720  
 gctggaaaaa cgctggccgc gtccttaaag acagcgacaa attcgatgca aatgattcta 780

tcctaaaaga ccaaacacaa gaatggtcag gttcagccac atttacetct gacggaaaaa 840  
 tccgtttatt ctacactgat ttctccgta aacattacgg caaacaaaca ctgacaactg 900  
 cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct ctttgaacat caacggtgta gaggattata 960  
  
 aatcaatctt tgacggtgac ggaaaaacgt atcaaaatgt acagcagttc atcgatgaag 1020  
 gcaactacag ctcaggcgac aaccatacgc tgagagatcc tctactacgta gaagataaag 1080  
 gccacaaata cttagtattt gaagcaaaca ctggaactga agatggctac caaggcgaag 1140  
 aatctttatt taacaaagca tactatggca aaagcacatc attcttccgt caagaaagtc 1200  
 aaaaacttct gcaaagcgat aaaaaacgca cggctgagtt agcaaacggc gctctcggt 1260  
 tgattgagct aaacgatgat tacacactga aaaaagtgat gaaaccgctg attgcatcta 1320  
 acacagtaac agatgaaatt gaacgcgcga acgtctttaa aatgaacggc aatggtacc 1380  
  
 tgttcactga ctcccgcgga tcaaaaatga cgattgacgg cattacgtct aacgatattt 1440  
 acatgcttgg ttatgtttct aattctttaa ctggccata caagccgctg aacaaaactg 1500  
 gccttgtgtt aaaaatggat cttgatccta acgatgtaac ctttacttac tcacacttcg 1560  
 ctgtacctca agcgaaagga aacaatgtcg tgattacaag ctatatgaca aacagaggat 1620  
 tctacgcaga caacaatca acgtttgcgc caagcttctt gctgaacatc aaaggcaaga 1680  
 aaacatctgt tgtcaaagac agcatccttg aacaaggaca attaacagtt aacaaataaa 1740  
 aacgcaaaag aaaaatgccga ttgaggccag tttgctcagg ctctccccgt ggaggaata 1800  
  
 attgacgata tgatcagtaa tacgactcac tagtgggcag atcttcaat gcatcgcgcg 1860  
 cacgctacgt ctcgaggaat tctgcagga tatctggatc cacgaagctt cccatggtga 1920  
 cgtcaccggt tctagatacc taggtgagct ctggtaccct ctagtcaagg cctgtcagcc 1980  
 gttaagtgtt cctgtgtcac tgaaaattgc tttgagaggc tctaagggct tctcagtgcg 2040  
 ttacatccct ggettggtgt ccacaaccgt taaaccttaa aagctttaa agccttatat 2100  
 attctttttt ttcttataaa acttaaaacc ttagaggcta ttaagttgc tgatttatat 2160  
 taattttatt gttcaaacat gagagcttag tacgtgaaac atgagagctt agtacgttag 2220  
  
 ccatgagagc ttagtacgtt agccatgagg gtttagttcg ttaaacatga gagcttagta 2280  
 cgttaaacat gagagcttag tacgtgaaac atgagagctt agtacgtact atcaacaggt 2340  
 tgaactgctg atcttcagat ctccgcttgc cctcatctgt tacgccggcg gtagccggcc 2400  
 agcctcgag agcaggattc ccgttgagca ccgccaggtg cgaataaggg acagtgaaga 2460  
 aggaacacce gctcgcgggt gggcctactt cacctatcct gcccggtga gcctgtgga 2520  
 tacaccaagg aaagtctaca cgaacccttt ggcaaaatcc tgtatctcgt gcgaaaaagg 2580

atggatatac cgaaaaaatc gctataatga ccccgaagca gggttatgca gcgaaaaagc 2640

gctgcttccc tgctgttttg tggaatatct accgactgga aacaggcaaa tgcagaaat 2700

tactgaactg aggggacagg cgagagatct ggcctaggcc gaccgaataa atacctgtga 2760

cggaagatca cttcgcagaa taaataaatc ctggtgtccc tgttgatacc gggaagccct 2820

gggccaactt ttggcgaaaa tgagacgttg atcggcacgt aagagttcc aactttcacc 2880

ataatgaaat aagatcacta ccgggcgtat tttttgagtt gtcgagattt tcaggagcta 2940

aggaagctaa aatggagaaa aaaatcactg gatataccac cgttgatata tccaatggc 3000

atcgtaaaga acatthttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg 3060

ttcagctgga tattacggcc tttttaaaga ccgtaaagaa aaataagcac aagttttatc 3120

cggcctttat tcacattctt gcccgctga tgaatgctca tccggaatta cgtatggcaa 3180

tgaaagacgg tgagctggtg atatgggata gtgttcaccc ttgttacacc gttttccatg 3240

agcaaaactga aacgttttca tcgctctgga gtgaatacca cgacgatttc cggcagtttc 3300

tacacatata ttgcaagat gtggcgtgtt acggtgaaaa cctggcctat ttcctaaag 3360

ggttttattga gaatatgttt ttctctcag ccaatcctg ggtgagtttc accagttttg 3420

atttaaacgt ggccaatatg gacaacttct tcgccccgt tttcacatg ggcaaatatt 3480

atacgcaagg cgacaagtg ctgatgccgc tggcgattca ggttcatcat gccgtttgtg 3540

atggcttcca tgcggcaga atgcttaatg aattacaaca gtactgcgat gagtggcagg 3600

gcggggcgta atttttttaa ggcagttatt ggtgcccata aacgcctggt tgctacgcct 3660

gaataagtga taataagcgg atgaatggca gaaa 3694