

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
A61K 39/385  
A61K 47/48  
A61K 39/12

(11) 공개번호 10-2005-0027168  
(43) 공개일자 2005년03월17일

(21) 출원번호 10-2004-7018442  
(22) 출원일자 2004년11월15일  
번역문 제출일자 2004년11월15일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/007849 (87) 국제공개번호 WO 2004/009124  
국제출원출원일자 2003년07월18일 국제공개일자 2004년01월29일

(30) 우선권주장 60/396,638 2002년07월19일 미국(US)

(71) 출원인 사이토스 바이오테크놀로지 아게  
스위스 체하-8952 솔리렌 바기스트라쎄 25

(72) 발명자 바크만마틴에프.  
스위스 체하-8472 수자크 골드에케르버그 8  
  
푸루리자알마  
스위스 체하-8952 스클리에렌 스클스트라쎄 69

(74) 대리인 최규팔  
이은선

심사청구 : 없음

(54) 그렐린-캐리어 컨쥬게이트

명세서

기술분야

본 발명은 분자 생물학, 바이러스학, 면역학 및 의학 분야에 관한 것이다. 본 발명은 정돈되고 반복적인 항원 또는 항원 결정기 어레이, 및 특히 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드-어레이를 포함하는 조성물을 제공한다. 더욱 특히, 본 발명은 바이러스양(virus-like) 입자 및 그에 결합하는 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 컨쥬게이트 및 정돈되고 반복적인 어레이 각각을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 비만 및 음식물 섭취량 증가 또는 체중 증가와 관련된 다른 질환을 치료하기 위한 백신 및 면역 반응 특히 항체 반응을 효과적으로 유도하기 위한 백신의 제조에서 유용하다. 추가로, 본 발명의 추가로, 본 발명의 조성물은 특히 지정된 범위내에서 자기-특이성 면역 반응을 효과적으로 유도시키는데 유용하다.

배경기술

비만은 전세계 수백만의 인구를 위협하는 질환이다. 비만에 내재되어 있는 원인은 많지만, 거의 모든 형태의 비만의 공통된 원인은 음식물 섭취량의 증가이다. 렙틴, 성장 호르몬(GH), 뉴로펩티드 Y (NPY), agouti-관련 단백질 (AGRP) 및 다른 것을 포함하는 여러 인자가 배고픔 및 섭취 행위를 조절한다. 최근 확인된 섭취 행위의 중요한 조절자는 그렐린으로서, 위 및 또는 뇌의 일부분(시상하부)에서 생성된 아실화된 펩티드이다(Kojima et al. Nature 402: 656-660 (1999)). 그렐린은 프레프로 형태로부터의 효소적 절단에 의해 유도된 3번 세린에서 n-옥타노일화를 갖는 28개 아미노산 길이의 펩티드이다. 생물학적으로 활성인 그렐린은 이 위치에서 n-옥타노일화되어야 한다. 14번 위치에 글루타민(Q)이 결합되어 있는 그렐린의 두번째 27 aa 이소폼(그렐린-desQ14)을 확인하였지만, 이 이소폼은 순환 그렐린중 단지 최소 성분을 나타낸다. 전장의 그렐린과 같이, 그렐린-des-Q14의 생물학적 활성은 3번 세린상의 n-옥타노일 그룹에 의존한다. 그럼에도 불구하고, 대부분의 작용 활성은 28aa 그렐린 이소폼으로부터 유도된다(Hosoda et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 279 (3): 909-913 (2000)). 인간 및 래트 그렐린은 단지 2

개의 아미노산에서만 상이하므로 (GSSFLSPEHQRVQQRKESKPKPAKLQPR (서열번호: 31) 대 GSSFLSPEHQKAQQ-RKESKPKPAKLQPR (서열번호: 32)) 그렐린은 고도로 보존성이다(Kojima et al. Nature 402: 656-660 (1999)).

그렐린 수용체는(GHS-R)는 뇌의 다양한 부위, 예로서 시상하부의 궁상핵(Arc) 및 복내측핵 및 뇌하수체에서 발견되고(Howard et al. Science 273: 974-977 (1996)); McKee et al. Mol Endokrin. 11: 415-423 (1997); Guan et al., Mol brain research 48: 23-29 (1997)), 이는 그렐린이 주로 뇌에서 작용한다는 것을 암시한다. 뇌하수체로부터 GH의 방출을 자극하는 것외에도(Kojima et al. Nature 402: 656-660 (1999)), 그렐린은 섭취의 중요한 중추 조절자인 것으로 더욱 최근 밝혀졌다(Nakazato et al., Nature 409: 194-198 (2001)). 특히, 뇌내뇌실 적용시, 그렐린은 섭취를 자극하는 것으로 나타났다. 또한, 항-그렐린 항체의 뇌내뇌실 적용은 섭취를 저해하였다. 그렐린 주사는 AGRP 길항제와 함께 NPY 및 항-NPY 항체의 방출을 상향 조절하였고, AGRP 길항제와 함께 항-NPY는 그렐린 유도 섭취를 차단하였고, 이는 그렐린이 NPY 및 AGRP의 발현을 증진시켜 섭취를 조절한다고 제안되었다(Nakazato et al., Nature 409: 194-198 (2001)). 또한, 마우스 및 래트에서 그렐린의 1일 말초 투여는 체중을 증가시켰고, 혈청 그렐린 농도는 금식시킨 래트에서 증가하고 섭취에서 감소하였으며, 이는 섭취를 조절함에 그렐린이 중요한 작용을 한다고 제안되었다(Tschop et al, Nature 407: 908-912). Arc에서 항-센스 GHS-R RNA를 발현시키는 형질전환된 래트는 체중이 더 작고, 지방 조직도 더 적은 것으로 나타났고, 이는 그렐린이 체중을 조절하는 것을 입증하는 것이다(Shuto et al., JCI 109: 14291436 (2002)). 인간 섭취 행위에서 그렐린 중요한 작용을 하는 증거 또한 존재한다. 인간에서 그렐린을 말초 투여하였을 때 식욕이 증가되어 인간의 음식물 섭취는 증가하였다(Wren et al., J Clin Endocrinol Metab 86: 5992-5998 (2001)). 인간의 증후군적 비만중 가장 보편화된 형태인 프라더-윌리증후군을 갖는 환자는 고도로 증가된 그렐린 수준을 나타낸다(Cummings et al. Nat Med 8: 643-644 (2002)). 추가로, 인간에서 혈장내 그렐린 수준은 다이어트에 의한 체중 감량 후 현저히 증가하고, 이는 다이어트를 중단하였을 때 체중이 급격히 증가하는 것과 관련이 있다. 대조적으로, 위 우회로조성술을 받은 환자에서 그렐린 수준은 다이어트 하는 동안 및 구 후에 낮게 유지되고, 이러한 조건하에서 그들의 체중은 통상 증가하지 않는다((Cummings et al., N Engl J Med 21: 1623-1630 (2002)). 따라서, 그렐린인 인간의 체중 및 음식물 섭취의 중요한 조절자인 것으로 나타났다.

그렐린의 말초 투여는 음식물 섭취를 증가시켜 체중을 증가시킬 수 있기 때문에(Tschop et al, Nature 407: 908-912), 위에서 생산된 그렐린은 혈류를 통해 뇌에 도달하여 섭취를 유발할 수 있다. 따라서, 동물 및 인간에서 그렐린이 혈액으로부터 뇌로 이동하는 것을 차단하여 음식물 섭취를 중단시킬 수 있다. 특히 항체가 뇌에서 그렐린의 작용을 차단할 수 있는 것으로 나타났기 때문에(Nakazato et al., Nature 409: 194-198 (2001)), 말초 항체 또한 말초 그렐린의 작용을 차단할 수 있을 것이다. 또한, 항체는 혈액뇌장벽을 효과적으로 투과하지 못하기 때문에, 아마도 그렐린-특이 항체는 그렐린을 뇌로부터 차단할 수 있지만 뇌에서 그렐린에는 작용하지 못할 것이다. 그렐린은 또한 음식물 섭취와 상이한 작용을 하는 뇌에서 생산되기 때문에 이것이 특히 관심의 대상이 되는 가능성을 제시할 것이다(Nakazato et al., Nature 409: 194-198 (2001)). 따라서, 비만에 대한 효능이 있는 치료법은 숙주에서 그렐린-특이 항체를 유도하여 장기간동안 그렐린을 차단 폐쇄시킴으로써 위 우회로 환자에서 관찰되는 바와 유사하게 음식물 섭취를 감소시키는 것이다.

W098/42840에는 그렐린 및 그렐린-유도 단편의 위장관에 대한 효능 및 특히 위운동 위 배출에 대한 효능에 대하여 기술되어 있다. 또한, US 6'420'521에는 위 배출, 위 수축 및 글루코스 흡수를 포함하는 위 작용에 효능을 위해 짧은 그렐린 펩티드의 용도가 기술되어 있다.

그러나, 통상 펩티드, 특히 자기-펩티드에 대한 항체 반응을 유도하기는 어렵다.

백신화 효능을 개선시키는 방법은 적용되는 항원의 반복 정도를 증가시키는것이다. 분리된 단백질과는 달리, 바이러스는 T-세포 헬프 여부에 상관없이 모두에서 어느 어쥬번트의 부재하에 즉각적이고 유효한 면역반응을 유도한다(Bachmann and Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15 : 235-270 (1991)). 바이러스는 주로 몇개 안되는(few) 단백질로 구성되지만, 그의 분리된 성분보다 더욱 강력한 면역 반응을 유발할 수 있다. B-세포 반응에 대하여, 바이러스의 면역원성에 대한 하나의 중요한 인자는 바이러스 에피토프의 반복성 및 배열이다. 다수의 바이러스는 B 세포 상의 에피토프-특이성 이뮤노글로블린과 유효하게 가교결합하는 규칙적인 배열의 에피토프를 나타내는 유사(quasi)-결정질 표면을 나타낸다(Bachmann and Zinkernagel, Immunol. Today 17 : 553-558 (1996)). B세포 상의 표면 이뮤노글로블린의 가교결합은 세포 주기 진행 및 IgM 항체 생산을 직접적으로 유도하는 강력한 활성화 시그널이다. 추가로, 그렇게 유발된 B 세포는 T 보조 세포를 활성화시켜, 결과적으로 B 세포에서 IgM으로부터 IgG 항체 생산 변환을 유도하고, 어느 백신화의 목적이 되는 장기간의 B 세포 메모리를 형성하게 된다(Bachmann and Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15 : 235-270 (1997)). 바이러스 구조는 자기면역 질환 및 병원에 대해 자발생적 반응의 일부로서의 항-항체 생성과도 관련이 있다(참조 Fehr, T., et al., J Exp. Med. 185 : 1785-1792 (1997)). 따라서, 고도로 조직화된 바이러스 표면에 의해 제시된 항체는 강력한 항-항체 반응을 유도할 수 있다.

그러나, 언급한 바와 같이, 면역계는 일반적으로 자기-유도성 구조에 대한 항체는 생산하지 못한다. 저농도로 존재하는 가용성 항원은 Th 세포 수준의 내성에 기인한다. 이러한 조건하에, 자기-항원을 T 헬프를 전달할 수 있는 캐리어와 커플링시키는 것은 내성을 깰 수 있다. 고농도로 존재하는 가용성 단백질 및 저농도의 막 단백질에 대하여 B 및 Th 세포는 내성일 수 있다. 그러나, B 세포 내성은 가역성(무반응)이고 고도로 조직화된 방식으로 외부 캐리어에 커플링된 항원을 투여하므로써 깨질 수 있다(Bachmann and Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15 : 235-270 (1997)).

**발명의 요약**

본 발명자는 고유한 반복적 체계의 구조를 갖는 코어 입자, 특히 바이러스양 입자 (VLPs) 및 VLPs의 서브유닛에 각각 결합하여 고도로 정돈되고 반복적인 컨쥬게이트를 형성하는 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드가 특히 항체 유도에 대하여 유력한 이뮤노겐이라는 것을 발견하게 되었다.

본 발명은 정돈되고 반복적인 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드-코어 입자 어레이, 및 특히 VLP-그렐린/그렐린 펩티드-컨쥬게이트 및 -어레이 각각에 기초하는 비만 및 관련 질환 관리를 위한 예방 및 치료 방법을 제공한다. 이 예방 및 치료용 조성물은 백신화된 동물에서 고역가의 항-그렐린 항체를 유도할 수 있다. 따라서, 본 발명은 그렐린 및 그의 뇌-관련 성질에 초점을 두고 있다. 또한, 본 발명은 뇌에서 그렐린의 주요 효능, 더욱 중요하게는 식욕, 성장 호르몬 분비 및 에너지 항상성 조절에 초점을 두고 있다. 그러므로, 본 발명자의 백신화 전략법에 의해 유도된 항체가 그렐린의 n-옥타노일화된 형태(들)와 결합할 수 있는 것이 바람직하다. 언급한 바와 같이, 그렐린 또는 짧은의 그렐린 펩티드 단편은 코어 입자와 커플링되었을 때, 및 다르게 또는 바람직하게 애주번트중에서 투여될 경우 인간 및 동물에서 그렐린-특이 항체를 유도하기 위하여 사용될 수 있다.

그러므로, 짧은의 그렐린 펩티드 단편, 특히 각각 코어 입자 또는 바이러스양 입자에 C- 또는 N-말단으로 커플링된 잔기 24-33, 42-51, 31-41 및 28-37의 짧은 펩티드는 그렐린이 CNS에 들어가 성장 호르몬 및 즉 음식물 섭취에 작용하기 전에 말초 순화 그렐린을 중화시킬 수 있는 고도로 특이적인 항-그렐린 항체를 유도할 수 있다.

따라서, 본 발명의 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 서열번호: 144 내지 146에 기술된 서열중 어느 것의 잔기 24-33, 42-51, 31-41 및 28-37에 상응하는 그렐린 펩티드 그룹으로부터 선택되고 바람직한 그렐린 펩티드 단편은 인간 그렐린; (b) 소 그렐린; (c) 양 그렐린; (d) 개 그렐린; (e) 고양이 그렐린; (f) 마우스 그렐린; (g) 돼지 그렐린; 및 (h) 말 그렐린로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

더욱 특히, 본 발명에서 본 발명자는 본 명세서, 특히 실시예 17에 기술하는 바와 같이 놀랍게도 그렐린의 n-옥타노일화된 형태를 인식하는 고수준의 항체를 유도할 수 있었다. 추가로, 생성된 항체는 또한 다른 이소폼인 그렐린-desQ14를 인식하였다. 결과적으로 각각 코어 입자 또는 바람직하게 VLP에 C- 또는 N-말단으로 연결된(linked) 그렐린 및 그렐린 펩티드로 백신화하여 생성된 항체는 마우스에서 n-옥타노일화된 그렐린이 뇌안으로 들어가는 것을 차단하고 음식물 섭취를 조절할 수 있었다. 따라서, 본 발명은 비만 및 다른 관련 질환용 치료로서 활성 그렐린에 대한 백신화 전략법에 초점을 두고 있다.

본 명세서, 특히 실시예 18에 나타낸 바, 각각 코어 입자 또는 바람직하게 VLP에 C- 또는 N-말단으로 연결된(linked) 그렐린 및 그렐린 펩티드에 의한 백신화는 마우스에서 음식물 섭취를 감소시킴으로써, 그렐린 및 그렐린 펩티드는 각각 음식물 섭취의 중요한 조절자이고, 그렐린 및 그렐린 펩티드 각각을 표적하는 항체가 비만 및 다른 관련 질환에 대한 강력한 요법인 것으로 추정되었다.

따라서, 본 발명은(a) 적어도 하나의 제 1 결합부위를 갖는 코어 입자; 및 (b) 적어도 하나의 제 2 결합부위를 갖는 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는 조성물을 제공한다(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드이고, 제 2 결합부위는 (i) 항원 또는 항원 결정기와 함께 비자연적으로 발생된 결합부위; 및 (ii) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연적으로 발생된 결합부위로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 제 1 결합부위와 결합할 수 있으며; 항원 또는 항원 결정기 및 코어 입자는 상기 결합을 통해 상호작용하여 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성한다). 본 발명에서 사용하기에 적절한 코어 입자의 바람직한 일례는 바이러스, 바이러스양 입자, 박테리오파지, 박테리아 섬모 또는 편모 또는 본 발명에 따라 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성할 수 있는 고유한 반복적 구조를 갖는 다른 코어 입자이다.

더욱 특히, 본 발명은 정돈되고 반복적인 항원 또는 항원 결정기 어레이, 및 특히 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드 VLP 컨쥬게이트를 포함하는 조성물을 제공한다. 더욱 특히, 본 발명은 바이러스양 입자 및 그에 결합된 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 각각 컨쥬게이트 및 정돈되고 반복적인 어레이를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 비만 및 관련 질환 치료용 백신 생산에 유용하고, 비만 및 관련 질환의 치료 및 치유 및 면역 반응, 특히 항체 반응의 효과적인 유도를 위한 약제로서 유용하다. 추가로, 본 발명의 조성물은 특히 지정된 범위내에서 자기-특이성 면역을 효과적으로 유도시키는데 유용하다.

본 발명에서 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드는 전형적으로 지향적(oriented) 방식으로 각각 코어 입자 및 VLP에 결합하여 정돈되고 반복적인 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드 항원 어레이를 형성한다. 추가로, 고도로 반복적이고 정돈된 구조의 코어 입자 및 VLPs는 고도로 정돈되고 반복적 방식으로 각각 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드 디스플레이를 매개하여 고도로 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성한다. 추가로, 코어 입자 및 VLP는 각각 코어 입자-그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드 어레이 및 VLP-그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드 어레이로 면역화된 숙주와 이질성이므로 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드와 코어 입자 및 VLP의 결합은 각각 T 헬퍼세포 에피토프를 제공한다. 이 어레이는 고도로 정돈된 구조, 크기, 및 어레이 표면상의 항원 반복성에 있어서 선행 컨쥬게이트와 상이하다.

본 발명의 일면으로 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드는 적절한 발현 숙주에서 발현되거나 합성되는 반면, 코어 입자 및 VLP는 각각 코어 입자 및 VLP의 폴딩(folding) 및 어셈블리에 적절한 발현 숙주로부터 발현되고 교체된다. 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드는 또한 화학적으로 합성될 수 있다. 생물학적으로 합성인 그렐린은 3번 위치에 n-옥타노일화된 세린을 포함하기 때문에, 화학적 합성이 생물학적으로 합성인 형태의 그렐린을 포함하는 백신 체제를 위한 그렐린을 제조하는 바람직한 방법이 될 것이다. 이어서 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드 어레이는 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드가 각각 코어 입자 및 VLP에 결합하므로써 어레이된다.

또다른 일면으로 본 발명은 (a) 바이러스양 입자, 및 (b) 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는 조성물을 제공한다(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드이고, 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기는 바이러스양 입자에 결합한다).

추가 일면으로, 본 발명은 (a) 본 발명의 조성물, 및 (b) 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

또다른 추가 일면으로, 본 발명은

(a) 적어도 하나의 제 1 결합부위를 갖는 코어 입자; 및 (b) 적어도 하나의 제 2 결합부위를 갖는 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는 백신 조성물을 제공한다(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드이고, 제 2 결합부위는 (i) 항원 또는 항원 결정기와 함께 비자연적으로 발생된 결합부위; 및 (ii) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연적으로 발생된 결합부위로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 제 1 결합부위와 결합할 수 있으며; 항원 또는 항원 결정기 및 코어 입자는 상기 결합을 통해 상호작용하여 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성한다).

추가로, 본 발명은 (a) 바이러스양 입자, 및 (b) 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는 백신 조성물을 제공한다(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드이고, 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기는 바이러스양 입자에 결합한다).

추가로, 본 발명은 (a) 바이러스양 입자를 제공하고; (b) 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 제공하고 ((여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드이다); (c) 바이러스양 입자 및 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 결합(combine)시켜 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기가 바이러스양 입자에 결합하도록 하는 것을 포함하는 제 1항의 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

유사하게, 본 발명은 (a) 적어도 하나의 제 1 결합부위를 갖는 코어 입자를 제공하고; (b) 적어도 하나의 제 2 결합부위를 갖는 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 제공하고(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드이고, 제 2 결합부위는 (i) 항원 또는 항원 결정기와 함께 비자연적으로 발생된 결합부위; 및 (ii) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연적으로 발생된 결합부위로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 제 1 결합부위와 결합할 수 있다); (c) 항원 또는 항원 결정기와 코어 입자를 결합시키는 것을 포함하는(여기에서, 항원 또는 항원 결정기와 코어 입자는 상기 결합을 통해 상호작용하여 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성한다) 본 발명의 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

또다른 일면으로, 본 발명은 동물 또는 인간에게 제 1항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 면역화 방법을 제공한다.

추가로, 본 발명은 비만 및 관련 질환 치료용 약제를 제조하기 위한 제 1항의 조성물의 용도를 제공한다.

추가로, 본 발명은 비만 또는 관련 질환의 치료 또는 예방 요법용 약제를 제조하기 위한 제 1항의 조성물의 용도를 제공한다. 또한, 추가로, 본 발명은 비만 및 관련 질환을 치료 또는 예방하기 위하고/하거나, 포유동물의 면역계를 자극하기 위한 조성물, 백신, 약물, 또는 약제를 제조하기 위한 분리 또는 다른 약제와 배합된 형태의 제 1항의 조성물의 용도를 제공한다.

따라서, 본 발명은 비만 및 관련 질환 또는 그와 관련된 이상을 예방하고/거나 감소시키거나 치유하기에 적절한 백신 조성물을 제공한다. 본 발명은 추가로 동물, 특히 고양이 또는 개와 같은 애완동물 및 인간에서 비만 및 관련 질환 또는 그와 관련된 이상을 예방하고/거나 감소시키거나 치유하기 위한 면역화 및 백신화 방법을 각각 제공한다. 본 발명의 조성물은 예방학적으로 또는 치료학적으로 사용될 수 있다.

특정 일례로, 본 발명은 "자기" 유전자 산물, 즉, 본 명세서에서 사용되는 바 "자기 항원에 의해 유발되거나 악화되는 비만 및 관련 질환 또는 그와 관련된 이상을 예방하고/거나 감소시키거나 치유하는 방법을 제공한다. 관련된 일면으로, 본 발명은 동물 및 개체에서 "자기" 유전자 산물에 의해 유발되거나 악화되는 비만 및 관련 질환 또는 그와 관련된 이상을 예방, 치유 및 또는 약화시키는 항체를 생산시키도록 하는 면역학적 반응을 유도하는 방법을 각각 제공한다.

본 분야의 기술자에게 잘 이해되고 있는 바, 본 발명의 조성물은 동물 또는 인간에 투여하는 경우, 염, 완충액, 애주버트, 또는 조성물의 효능을 개선시키기 위해 바람직한 다른 물질을 포함하는 조성물일 수 있다. 약제학적 조성물 제조에 사용하기 적절한 재료의 예는 Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A, ed., Mack Publishing Co. (1990))를 포함하는 다수의 출처에서 제공하고 있다.

본 발명의 조성물은 수령자가 투여에 대하여 내성인 경우 "약물학적으로 허용가능"이라고 언급된다. 또한, 본 발명의 조성물은 "치료학적 유효량"(즉, 바람직한 생리학적 효능을 일으키는 양)으로 투여될 것이다.

본 발명의 조성물은 본 분야에 공지된 다양한 방법으로 투여될 수 있지만, 일반적으로 주입, 흡입, 경구 투여, 또는 다른 적절한 물리적 방법에 의해 투여될 것이다. 다르게 조성물은 근육내, 정맥내 또는 피하에 투여될 수 있다. 투여용 조성물의 성분은 멸균수(예: 생리학적 염수) 또는 비수용성 용액 및 현탁액을 포함한다. 비수용성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물유 에로서, 올리브 오일, 및 주사용 유기 에스테르 에로서, 에틸올레이트이다. 캐리어 또는 밀봉드레싱용 캐리어를 사용하여 피부 투과성을 증진시키고 항원 흡착을 증가시킬 수 있다.

본 분야에 공지되어 있는 것과 관련하여 당업자는 본 발명의 다른 일면은 하기 도면 및 본 발명의 설명, 및 청구범위를 이해할 것이다.

**도면의 간단한 설명**

도 1은 Q $\beta$  캡시드 단백질과 뮤린 C-그렐린 (서열번호 77) 또는 뮤린 그렐린-GC (서열번호 105)으로부터의 커플링 산물을 나타낸다. 라인 M은 마커이고, 라인 1은 유도된 Q $\beta$  VLP, 라인 2는 가용성 분획중 Q $\beta$ -C-그렐린, 라인 3은 가용성 분획중 Q $\beta$  -C-그렐린, 라인 4는 가용성 분획중 그렐린-GC-Q $\beta$ , 및 라인 5는 불용성 분획중 그렐린-GC-Q $\beta$ 을 나타낸다. 불용성 분획중에는 거의 산물이 존재하지 않았다.

도 2는 0, 14, 21 및 42일째 무린 Q $\beta$ -C-그렐린 (Q $\beta$ -cGhr), 무린 그렐린-GC-Q $\beta$  (Q $\beta$ -GhrC) 또는 PBS로 면역화된 마우스로부터의 폴딩된 혈청에서 검출된 그렐린-특이 IgG 항체의 평균 역가를 나타낸다. ELISA 역가는 ELISA 분석에서 1/2의 최대 OD를 유발하는 혈청 희석율로서 나타낸다. ELISA 플레이트를 20 $\mu$ g/ml 농도의 세린-옥타닐화된 무린 그렐린 (Bachem, Product No. H-4862)으로 코팅하였다. 플레이트를 차단한 후 14, 21 및 42일째 일련의 희석된 마우스 혈청과 함께 인큐베이션시켰다. 결합된 항체를 효소적으로 표지된 항-마우스 IgG 항체로 검출하였다. 대조군으로서, 동일한 마우스의 프리-이뮤노 혈청을 시험하였다.

도 3은 무린 Q $\beta$ -C-그렐린 (Q $\beta$ -cGhr), 무린 그렐린-GC-Q $\beta$  (Q $\beta$ -GhrC) 또는 PBS로 면역화된 마우스의 누적 음식 소비량을 나타낸다. 대조군으로서 마우스를 PBS로 면역화시켰다. 모든 마우스를 0일 및 14일째 정상 다이어트 상에 놓았다. 연속하여 모든 마우스에 고지방(45%) 섭취물을 제공하여 음식물-유도 비만을 유도하였다. 음식물 및 물을 임의로 투여하였다. 각 마우스의 체중 변화를 관찰하고 케이지당(즉, 그룹) 음식물 및 물의 소비량 또한 면역후 일정한 간격으로 (면역 후 5, 11, 14, 21, 28, 35, 40, 49, 및 55일째) 관찰하였다.

**발명의 상세한 설명**

달리 언급하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 분야의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것과 동일하거나 일치하는 어느 방법 및 재료를 본 발명의 실시 또는 교시에 사용할 수 있지만, 이하 바람직한 방법 및 재료를 기술한다.

1. 정의:

애주버트: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "애주버트"는 면역 반응의 비특이성 자극제 또는 본 발명의 백신과 함께 배합되었을 때 더욱 증강된 면역 반응을 제공하는 숙주내 데포 생산을 가능하게 하는 물질을 언급한다. 다양한 애주버트가 사용될 수 있는 있다. 예를 들면, 프로인트 완전 및 불완전 애주버트, 수산화알루미늄 및 변형된 무라아미데 펩티드를 포함한다. 추가의 애주버트는 무기 겔 예로서 수산화알루미늄, 계면활성제 예로서 리소랙시틴, 플루론 폴리올, 폴리염이온, 펩티드, 오일 유제, 키홀 림페테모시아닌, 디니트로페놀을 포함하고, BCG (바실 칼메트(*bacille Calmette*) 및 코리네박테리움 파르부름(*Corynebacterium parvum*)과 같은 인간 애주버트이다. 그러한 애주버트는 본 분야에 잘 공지되어 있다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 추가로 애주버트는, 제한하는 것은 아니지만 모노포스포릴 리피드 면역조절제, AdjuVax100a, QS-21, QS-18, CRL1005, 알루미늄 염 (Alum), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294, 및 비로솜(Virosomal) 애주버트 기술을 포함한다. 애주버트는 또한 이들 물질의 혼합물을 포함할 수 있다.

남미 나무 키리야 사포닌 모리나의 껍질로부터 유래된 애주버트 활성을 갖는 면역학적으로 활성인 사포닌 분획이 본 분야에 공지되어 있다. 예를 들면 QA21로도 공지되어 있는 QS21는 키리야 사포닌 모리나 나무로부터 유래된 Hplc 정제 분획이고, 그의 생산 방법은 U. S. Pat. No. 5, 057, 540에 기술되어 있다(QA21로 기술되어 있음). 키리야 사포닌은 Scott et al, Int. Archs. Allergy App1.Immun., 1985, 77, 409에 의해 애주버트로도 기술되어 있다. 모노스포릴 리피드 A 및 그의 유도체가 본 분야에 공지되어 있다. 바람직한 유도체는 3 데-*o*-아실화 모노스포릴 리피드 A이고, British Patent No. 2220211로부터 알려졌다. 추가로 바람직한 애주버트는 WO00/00462에 기술되어 있고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로서 전체적으로 인용된다.

그러나, 본 발명의 이로운 특성은 본 발명의 조성물의 면역원성이 높다는 점이다. 본 명세서에서 이미 약속했거나, 본 명세서에서 계속 언급함에 따라 자명해질 것인 바, 추가의 대체 또는 바람직한 일례로 애주버트는 부작용을 유발할 수 있기 때문에 애주버트가 결여되어 있는, 우수한 안전성 프로파일을 갖는 AD 치료용 백신 및 억제학적 조성물로서의 애주버트가 결여된 백신 및 억제학적 조성물이 제공된다. AD 치료용 백신 및 억제학적 조성물과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "결여"는 애주버트가 사용되지 않는 백신 및 억제학적 조성물을 언급한다.

아미노산 링커: 본 명세서에서 사용되는 "아미노산 링커" 또는 그냥 "링커"는 항원 또는 항원 결정기를 제 2 결합부위와 결합시키거나, 더욱 바람직하게는 반드시 그런 것은 아니지만, 전형적으로는 하나의 아미노산 잔기와 같은 제 2 결합부위를 사전에 포함하거나 함유한다. 그러나, 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "아미노산 링커"는 아미노산 잔기들로 구성된 아미노산 링커가 본 발명의 바람직한 일례이지만, 상기 아미노산 링커는 아미노산 잔기들로만 구성되는 것을 의미하는 것은 아니다. 아미노산 링커의 아미노산 잔기는 바람직하게, 본 분야에 공지되어 있는 자연발생 아미노산 또는 비자연발생 아미노산, all-L 또는 all-D 또는 그의 혼합물로 구성된다. 그러나, 한 분자와 설프하이드릴 그룹 또는 시스테인 잔기를 포함하는 아미노산 링커도 본 발명에 포함된다. 상기 분자는 바람직하게 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬-, 사이클로알킬(C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>), 아릴 또는 헤테로아릴 부위를 포함한다. 그러나, 바람직하게 아미노산 링커외에도, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬-, 사이클로알킬(C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>), 아릴 또는 헤테로아릴 부위를 포함하고 아미노산(들)이 결여된 링커가 본 발명의 범위내 포함되어야 한다. 항원 또는 항원 결정기 또는 임의로 제 2 결합부위와 아미노산 링커의 결합은 바람직하게 적어도 하나의 공유 결합, 더욱 바람직하게 적어도 하나의 펩티드 결합에 의한다.

동물: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "동물"은 예를 들면, 인간, 양, 고라니, 사슴, 검은 사슴(mule deer), 멧돼지, 포유동물, 원숭이, 말, 소, 돼지, 염소, 개, 래트, 마우스, 새, 닭, 파충류, 어류 및 거미류를 포함한다.

항체: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항체"는 에피토프 또는 항원 결정기에 결합할 수 있는 분자를 언급한다. 이 용어는 전체 항원 및 그의 항원-결합 단편을 포함하며, 짧은 항체를 포함하는 것을 의미한다. 항체는 인간 항원 결합 항체 단편을 포함하고 제한하는 것은 아니지만 Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>, Fd, 짧은 Fvs(scFv), 짧은 항체, 디설파이드-결합 Fvs(sdFv) 및 VL 또는 VH 영역을 포함하는 단편을 포함한다. 항체는 가끔 및 포유동물을 포함하는 동물로부터 기원하는 것일 수 있다. 바람직하게, 항체는 포유동물 예로서, 인간, 쥐, 래빗, 염소, 기니 피그, 낙타, 말 등, 또는 다른 적절한 동물, 예로서 닭이다. 본 명세서에서 사용되는 바, "인간" 항체는 인간 이뮤노글로블린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하고, 인간 이뮤노글로블린 라이브러리 또는 하나 이상의 인간 이뮤노글로블린이 도입되었지만, 내인성 이뮤노글로블린은 발현시키지 않는 동물로부터 분리된 항체를 포함한다[U. S. Patent No. 5,939, 598에 기재되어 있고, 이는 전체적으로 참고문헌으로서 인용된다].

**항원:** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항원"은 항체 또는 MHC 분자에 의해 제시(present)되는 경우 T 세포 수용체(TCR)에 의해 결합할 수 있는 분자를 언급한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항원"은 또한 T-세포 에피토프를 포함한다. T-세포 에피토프는 적혈구를 제외한 신체 모든상에 존재하는 MHC I 부류, 또는 면역세포 및 특히 항원제시세포상에 존재하는 II 부류와 관련하여 T-세포 수용체에 의해 인식된다. 인식 이벤트에 의해 T-세포는 활성화되고 연속하여 T-세포 증식, 시토카인 분비, 퍼포린 분비 등과 같은 효과기(effector) 메카니즘을 일으킨다. 항원은 또한 면역계에 의해 인식될 수 있고/거나 B- 및/또는 T-림프구를 활성화시키는 체액면역반응 및/또는 세포면역반응을 유도할 수 있다. 그러나, 적어도 특별한 경우에는 항원은 T<sub>H</sub> 세포 에피토프를 포함하거나 이에 결합되어 있고 어뷰먼트중에 제공된다. 항원은 하나 이상의 에피토프(B- 및 T-에피토프)를 포함할 수 있다. 상기 언급한 특이적 반응은 항원은 바람직하게는 전형적으로 고도로 특이적인 방식으로 그에 상응하는 항체 또는 TCR과 반응하지만 다른 항원에 의해 유발될 수 있는 다수의 다른 항체 또는 TCR과 반응하지 않는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 항원은 또한 여러 개체 항원의 혼합물일 수 있다.

**항원 결정기:** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "항원 결정기"는 B- 또는 T-림프구에 의해 특이적으로 인식되는 항원의 일부분을 언급한다. 항원 결정기에 반응하는 B-림프구는 항체를 생산하는 반면, T-림프구는 세포 및/또는 체액면역 매개에 중요한 효과적 작용을 증식시키거나 구축하여 항원 결정기에 반응한다

**결합(Association):** 본 명세서에서 사용되는 바, 제 1 및 제 2 결합부위에 적용되는 바 용어 "결합"은 바람직하게 적어도 하나의 비펩티드성 결합인 제 1 및 제 2 결합부위의 결합을 언급한다. 결합성은 공유, 이온, 소수성, 극성 결합 또는 그의 조합일 수 있고, 바람직한 결합은 공유 결합이다.

**제 1 결합부위:** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "제 1 결합부위"는 항원 또는 항원 결정기상에 위치하는 제 2 결합부위가 결합할 수 있는, 비자연발생 또는 자연발생된 코어 입자의 인자를 언급한다. 제 1 결합부위는 단백질, 폴리펩티드, 아미노산, 펩티드, 당, 폴리뉴클레오티드, 천연 또는 합성 폴리머, 2차 대사물질 또는 화합물(바이오틴, 형광물질, 레티놀, 디곡시게닌, 금속 이온, 페닐메틸설포닐플루오라이드), 또는 그의 배합물, 또는 그의 화학적 반응 그룹일 수 있다. 제 1 결합부위는 전형적이며 바람직하게 코어 입자, 예를 들면, 바람직하게 바이러스양 입자와 같은 코어 입자의 표면에 위치한다. 다중 제 1 결합부위는 전형적으로 반복적 배열로 코어 및 바이러스양 입자 각각의 표면에 존재한다.

**제 2 결합부위:** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "제 2 결합부위"는 코어 입자 및 바이러스양 입자, 각각의 표면에 위치하는 제 1 결합부위가 결합할 수 있는 항원 또는 항원 결정기와 결합되어 있는 요소를 언급한다. 항원 또는 항원 결정기의 제 2 결합부위는 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 당, 폴리뉴클레오티드, 천연 또는 합성 폴리머, 2차 대사물질 또는 화합물(바이오틴, 형광물질, 레티놀, 디곡시게닌, 금속 이온, 페닐메틸설포닐플루오라이드), 또는 그의 배합물, 또는 그의 화학적 반응 그룹일 수 있다. 적어도 하나의 제 2 결합부위는 항원 또는 항원 결정기상에 존재한다. 따라서, 용어 "적어도 하나의 제 2 결합부위를 갖는 항원 또는 항원 결정기"는 적어도 항원 또는 항원 결정기 및 제 2 결합부위를 갖는 항원 또는 항원 구성체를 언급한다. 그러나, 특히 비자연발생 기원, 즉 항원 또는 항원 결정기내에서 자연적으로 발생된 것이 아닌 제 2 결합부위의 경우 이들 항원 또는 항원 구성체는 "아미노산 링커"를 포함한다.

**결합(Bound):** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "결합"은 예를 들면 화학적 커플링에 의한 공유결합 또는 부착, 또는 예를 들면, 이온간 상호작용, 소수성 상호작용, 수소 결합 등의 비공유결합 부착을 언급한다. 공유결합은 예를 들면, 에스테르, 에테르, 포스포에스테르, 아마이드, 펩티드, 이미드, 탄소-황 결합, 탄소-인 결합 등일 수 있다. 용어 "결합"은 예로서 용어 "커플링", "융합(fused)" 및 "부착(attached)"보다 광범위하다.

**코트 단백질(들):** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "코트 단백질(들)"은 박테리오파지 또는 RNA-파지의 캡시드 어셈블리내 혼입될 수 있는 박테리오파지 또는 RNA-파지의 단백질을 언급한다. 그러나, RNA-파지의 코트 단백질 유전자중 특정 유전자 산물을 언급하는 경우 용어 "CP"를 사용한다. 예를 들면, RNA-파지 Q $\beta$ 의 코트 단백질 유전자중 특정 유전자 산물은 "Q $\beta$  CP"로 언급되고, 박테리오파지 Q $\beta$ 의 "코트 단백질"은 "Q $\beta$  CP" 및 A1 단백질을 포함한다. 박테리오파지 Q $\beta$ 의 캡시드는 주로 Q $\beta$  CP와 소수의 A1 단백질로 구성된다. 유사하게, VLP Q $\beta$  코트 단백질은 주로 Q $\beta$  CP와 소수의 A1 단백질을 포함한다.

**코어 입자:** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "코어 입자"는 고유의 반복적 구조를 갖는 단단한 구조를 언급한다. 본 명세서에서 사용되는 바 코어 입자는 합성 과정의 산물 또는 생물학적 산물일 수 있다.

**커플링:** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "커플링"은 공유 결합 또는 강한 비공유 결합 상호작용에 의한 결합, 전형적이며 바람직하게는 공유 결합에 의한 결합을 언급한다. 본 분야의 기술자에 의해 생물학적 활성인 재료를 커플링하기 위해 통상 사용되는 방법을 본 방법에 사용할 수 있다.

**유효량:** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "유효량"은 원하는 생물학적 효능을 얻기 위해 필요하거나 충분한 양을 언급한다. 조성물의 유효량은 이러한 선택된 결과를 초래하는 양일 것이며, 이는 본 분야의 기술자에 의해 일반적으로 측정될 수 있다. 예를 들면, 면역결핍 치료를 위한 유효량은 면역계를 활성화시켜 항원에 노출되었을 때 항원 특이성 면역 반응을 발생시키기 위해 필요한 양일 수 있다. 이 용어는 "충분량"과 유사한 의미를 갖는다.

**특정 적용에 대한 유효량:** 치료하고자 하는 질환 또는 이상, 투여되는 특정 조성물, 대상의 크기, 및/또는 질환 또는 이상의 경중도와 같은 인자에 의해 달라질 수 있다. 본 분야의 기술자는 부적절한 실험을 요하지 않으면서 본 발명의 특정 조성물의 유효량을 실험적으로 측정할 수 있다.

**에피토프:** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "에피토프"는 동물, 바람직하게 포유동물, 및 가장 바람직하게 인간에서 항원 또는 면역원성 활성을 갖는 폴리펩티드의 연속 또는 불연속 부위를 언급한다. 에피토프는 MHC 분자와 관련하여 T 세포 수용체를 통해 T 세포 또는 항체에 의해 인식된다. 본 명세서에서 사용되는 바 "면역원성 에피토프"는 본 분야의 공지된 방법에 의해 결정된 바와 같은, 동물에서 T-세포 반응을 유도하거나 항체 반응을 유도하는 폴리펩티드 부위로서 정의된다(참조, 예: Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 3998-4002 (1983)). 본 명세서

에서 사용되는 바, 용어 "항원 에피토프"는 본 분야의 공지된 방법에 의해 결정된 바와 같은 항체가 면역특이적으로 그의 항원을 결합시킬 수 있는 단백질 부위로서 정의된다. 면역특이성 결합은 비특이적 결합을 제외하고 있지만, 필수적으로 다른 항원과의 가교-반응을 제외시키는 것은 아니다. 항원 에피토프가 필수적으로 면역원성일 필요는 없다. MHC 분자와 관련하여 T-세포 수용체에 의해 면역특이적으로 결합할 수 있는 경우 항원 에피토프는 또한 T-세포 에피토프일 수 있다.

에피토프는 에피토프에 특이적인 공간 구조내 3개의 아미노산을 포함할 수 있다. 일반적으로 에피토프는 적어도 약 5개의 상기 아미노산으로 구성되고, 더욱 통상적으로 적어도 약 8-10개의 상기 아미노산으로 구성된다. 에피토프가 유기분자인 경우 이는 니트로페닐과 같이 작용할 수 있다.

융합: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "융합"은 코딩 뉴클레오타이드 서열의 인프레임(in-frame) 조합에 의한 하나의 폴리펩티드중 상이한 기원의 아미노산 서열의 조합을 언급한다. 용어 "융합"은 명확하게 하나의 말단에 대한 융합외에도 내부 융합, 즉 폴리펩티드 쇄내의 상이한 기원의 서열의 삽입을 포함한다.

그렐린: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "그렐린"은 그렐린 유전자에 의해 코딩되는 단백질로부터 유도된 펩티드를 언급한다. 본 명세서에서 사용되는 바 그렐린은 인간, 고양이, 개 및 모든 기틀여진 동물 및 다른 동물에서 알려진 모든 형태의 그렐린을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바 그렐린은 n-옥타노일-변형을 포함하거나 포함하지 않는 그렐린을 포함한다. 또한, 그렐린은 또한 그렐린에 존재하는 모든 슬라이스 변이체를 포함한다.

추가로, 상이한 종 사이 그렐린의 서열은 고도로 상동성이기 때문에(랫 및 인간 그렐린에서 단지 2개의 aa만이 교체됨(Kojima et al. Nature 402: 656- 660 (1999)), 80% 이상의 아이덴티티, 바람직하게 90% 이상, 더욱 바람직하게 95% 이상의 모든 자연발생된 변이체도 본 명세서에서 "그렐린"으로서 언급된다.

본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "그렐린-유도 펩티드" 또는 "그렐린-펩티드"는 근원 그렐린 펩티드중 적어도 2개, 바람직하게 적어도 3개, 더욱 바람직하게 적어도 4개, 더욱 바람직하게 적어도 5개 더욱 바람직하게 적어도 6개, 및 더욱더 바람직하게 적어도 8개 또는 9개 또는 더욱더 바람직하게 적어도 10개의 연속 아미노산을 포함하는 그렐린 분획을 나타내는 펩티드로서 광범위하게 정의된다. 통상, "그렐린 펩티드" 및 "그렐린 단편"은 호환적으로 사용된다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "그렐린 펩티드 및 그의 단편"은 그렐린 펩티드외에 바람직하게 N 및/또는 C 말단에서 하나 이상의 아미노산이 결실됨으로써 유도될 수 있는 그렐린 펩티드의 분획을 포함하여야 한다. 그렐린 펩티드는 그렐린 펩티드 단독으로, 또는 그렐린 펩티드의 폴딩, 발현 또는 용해를 촉진시키거나 그렐린 펩티드의 정제를 촉진시키기 위한 다른 아미노산 또는 단백질과의 융합체로서 진행 또는 유행 발현시스템에서 재조합 발현에 의해 수득될 수 있다. 그렐린 펩티드와 VLPs 또는 캡시드의 서브유닛 단백질 사이의 융합체 단백질의 정확한 폴딩을 촉진하거나 이를 가능하도록 하기 위하여 그렐린 펩티드 N- 또는 C-말단에 하나 이상의 아미노산을 가할 수 있다. 그렐린 펩티드와 VLPs 또는 캡시드 또는 코어 입자의 서브유닛 단백질이 커플링할 수 있도록, 적어도 하나의 제 2 결합부위를 그렐린 펩티드에 가할 수 있다. 다르게는 그렐린 펩티드는 본 분야에 공지된 방법에 의해 합성될 수 있다. 상기 펩티드는 상응하는 그렐린 펩티드 단백질에 존재하지 않는 아미노산도 포함할 수 있다. 펩티드는 n-옥타노일화에 의해 변형될 수 있다.

잔기: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "잔기"는 폴리펩티드 백본 또는 측쇄중 특정 아미노산을 의미한다.

면역반응: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "면역반응"은 항원과 같은 분자 또는 화합물에 대하여 지시되는 개체의 면역계에 의한 어느 작용을 언급한다. 포유동물에서 면역반응은 세포의 활성화 및 시토카인 및 항체와 같은 가용성 분자의 생산을 포함한다. 따라서, 이 용어는 B-및/또는 T-림프구의 활성화 및/또는 증식을 일으키는 체액 면역반응 및/또는 세포 면역반응을 포함한다. 그러나, 일부에서는 면역반응의 강도가 낮아 본 발명에 따른 적어도 하나의 물질을 사용하는 경우에만 면역반응을 검출할 수 있다. "이뮤노젠"은 생체 유기체의 면역계를 자극하여 하나 이상의 면역적 기능을 증가시키고 면역원성 인자(agent)로 향하게 하기 위하여 사용되는 인자를 언급한다. "면역원성 폴리펩티드"는 어췌든 존재 여하에 상관없이 단독으로 또는 캐리어에 결합하여 세포 및/또는 체액 면역반응을 유도하는 폴리펩티드이다. 바람직하게, 항원 전달 세포는 활성화될 수 있다.

면역 반응을 "증강"시키는 물질은 상기 물질을 첨가하지 않고 측정된 동일한 면역 반응과 비교하여 물질을 첨가로 어느 방식으로든 현저하거나 강화되거나 벗어나는 면역 반응이 관찰되는 경우 이 물질을 언급한다. 예를 들면, 세포 독성 T 세포의 용해 활성화는 면역화시 상기 물질을 사용하거나 사용하지 않고 관찰된 샘플에서 예를 들면, <sup>51</sup>Cr 방출 분석을 사용하여 측정할 수 있다. 물질을 사용하지 않은 CTL 용해 활성화와 비교하여 CTL 용해 활성화가 증강된 물질의 양은 항원에 대한 동물의 면역 반응을 증강시키기에 충분한 양이다. 바람직한 일면으로, 면역 반응은 적어도 약 2개, 더욱 바람직하게 3개 이상의 인자에 의해 증강된다. 분비되는 사이토카인의 양 및 유형은 변경될 수 있다. 다르게는, 유도된 항체의 양 또는 그의 서브클래스는 변경될 수 있다.

면역화: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "면역시키다" 또는 "면역화" 또는 관련 용어는 표적 항원 또는 에피토프에 대한 실질적인 면역 반응(항체 및/또는 효과기 CTL과 같은 세포 면역 포함)을 일으키는 능력을 제공하는 것을 언급한다. 이 용어는 형성되는 면역이 완전한 것일 필요는 없지만, 형성되는 면역 반응은 실질적으로 기준보다는 월등하여야 한다. 예를 들면, 본 발명의 방법을 적용시킨 후 표적 항원에 대한 세포 및/또는 체액 면역 반응이 발생하는 경우 포유 동물이 표적 항원에 대하여 면역화되었다고 볼 수 있다.

자연발생 기원: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "자연발생 기원"은 전체 또는 그의 일부가 합성된 것이 아니고 자연적으로 존재하거나 생산된 것을 의미한다. 바람직하게, 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "자연발생 기원"은 전체가 합성된 것이 아니고 자연적으로 존재하거나 생산된 것을 의미한다.

비자연발생: 본 명세서에서 사용되는 바, 이 용어는 통상 자연으로부터의 것이 아닌 것, 더욱 특히, 인공을 의미한다.

비자연발생 기원: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "비자연발생 기원"은 통상 합성 또는 자연으로부터의 것이 아닌 것, 더욱 특히, 인공을 의미한다.

정돈된 반복 항원 또는 항원 결정기 어레이: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "정돈된 반복 항원 또는 항원 결정기 어레이"는 전형적이고, 바람직하게는 각각 코어 입자 및 바이러스양 입자에 관하여 항원 또는 항원 결정기의 균일한 공간 배열을 특징으로 하는 통상의 항원 또는 항원 결정기의 반복적 패턴을 언급한다. 본 발명의 일면으로, 반복적 패턴은 기하학적 패턴일 수 있다. 적절하게 정돈된 반복 항원 또는 항원 결정기 어레이의 전형적이고 바람직한 예는 0.5 내지 30 나노미터, 바람직하게 5 내지 15 나노미터 간격으로 항원 또는 항원 결정기가 엄격하게 반복적이고 거의 결정과 같은(paracrystalline) 구조를 갖는 것이다.

섬모(pili): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "섬모"(단수 "필러스(pilus)")는 정돈되고 반복적 패턴으로 조직화된 단백질 모노머(예: 필린 모노머)로 구성된 박테리아 세포의 세포의 구조를 언급한다. 또한, 섬모는 박테리아 세포의 숙주 세포 표면 수용체와의 결합, 세포내 유전자 교환, 및 세포-세포 인식과 같은 과정에 관여하는 구조이다. 섬모의 예는 1형 섬모, P-섬모, F1C 섬모, S-섬모, 및 987P-섬모를 포함한다. 추가로 섬모의 예를 본 명세서에 기술한다.

섬모성 구조(pilus-like structure): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "섬모성 구조"는 섬모와 유사한 성질을 갖고 단백질 모노머로 구성된 구조를 언급한다. "섬모성 구조"의 한 예는 자연발생된 섬모와 본질적으로 동일한 정돈되고 반복적 어레이를 형성하지 않는 변형된 필린 단백질을 발현시키는 박테리아 세포에 의해 형성된 구조이다.

폴리펩티드: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "폴리펩티드"는 아마이드 결합(또는 펩티드 결합으로 공지됨)에 의해 선형으로 연결된 모노머(아미노산)으로 구성된 분자를 언급한다. 이는 아미노산 분자쇄를 지시하고 산물의 특정 길이를 언급하는 것은 아니다. 따라서, 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 올리고펩티드 및 단백질이 폴리펩티드 정의에 포함된다. 이 용어는 또한 폴리펩티드의 발현 후 변형, 예를 들면, 당화, 아세틸화, 인산화 등은 언급하고자 한다. 필수적으로 재조합 또는 유래된 폴리펩티드가 지정된 핵산 서열로부터 해독되는 것은 아니다. 화학적 합성방법을 포함하는 어느 방식으로 형성될 수 있다.

자기 항원: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "자기 항원"은 숙주 DNA에 의해 코딩된 단백질을 언급하고, 숙주 DNA에 의해 코딩된 RNA 또는 단백질에 의해 형성된 산물은 자가의 것으로 정의된다. 또한, 두개 또는 수개의 자기 분자의 조합으로부터 생성되거나 자기 분자의 분해를 나타내는 단백질 및 상기 정의된 바와 같이 고도로 상동성인(> 95%, 바람직하게 > 97%, 더욱 바람직하게 > 99%)이 두개의 자기 분자를 갖는 단백질이 자가의 것으로 인지된다.

치료: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "치료", "치료하다", "치료받은" 또는 "치료하는"은 예방법 및/또는 치료법을 언급한다. 감염성 질환과 관련하여 사용되는 경우, 예를 들면, 상기 용어는 병원균 감염에 대하여 대상자의 내성을 증가시키거나, 다시말해, 대상자가 병원균에 의해 감염되거나 감염에 의한 병의 징후를 나타낼 가능성을 감소시키는 예방적 치료법 및 대상자가 감염된 후 감염과 싸우기 위한, 예를 들면, 감염을 감소시키거나 제거하거나 악화되지 못하도록 하는 치료법을 언급한다. 비만 및 관련 질환에 사용되는 경우, 용어 "치료"는 비만에 대하여 대상의 내성을 증가시키고/거나 비만을 복귀시키는 예방 또는 치료적 요법을 언급한다.

백신: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "백신"은 본 발명의 조성물을 포함하는 동물에 투여될 수 있는 형태의 제제를 언급한다. 전형적으로, 백신은 본 발명의 조성물이 현탁되거나 용해되는 완충 수용액 또는 통상의 염수를 포함한다. 본 발명의 조성물은 이상을 통상적으로는 예방하고, 호전시키기 위해, 다르게는 치료하기 위하여 사용된다. 숙주에 도입될 때, 백신은 제한하는 것은 아니지만 항체 및/또는 사이토카인의 생산, 세포독성 T 세포, 항원 전달 세포, 헬퍼 T 세포, 수상 세포 및/또는 다른 세포 반응의 활성화를 포함하는 면역 반응을 일으킬 수 있다.

임의로, 본 발명의 백신은 본 발명의 화합물에 비례하여 최소 또는 최대로 존재할 수 있는 어쥬번트를 포함한다.

바이러스양 입자 (VLP): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "바이러스양 입자"는 바이러스 입자와 유사한 구조를 언급한다. 또한, 본 발명에 따른 바이러스양 입자는 바이러스 게놈 전체 또는 일부, 특히 바이러스 게놈의 복제성이고 감염성인 성분이 결여되어 있기 때문에 비복제성이고 비감염성이다. 본 발명에 따른 바이러스양 입자는 그의 게놈과 상이한 핵산을 포함할 수 있다. 전형적이고 바람직한 본 발명에 따른 바이러스양 입자는 바이러스 캡시드, 예로서 바이러스, 박테리오파지, 또는 RNA-파지의 바이러스 캡시드이다. 본 명세서에서 호환적으로 사용되는 바, 용어 "바이러스 캡시드" 또는 "캡시드"는 바이러스 단백질 서브유닛으로 구성되는 고분자 어셈블리를 언급한다. 전형적이고 바람직하게, 바이러스 단백질 서브유닛은 각각 고유의 반복적 구조를 갖는 바이러스 캡시드 및 캡시드내로 어셈블링된다(여기에서, 구조는 전형적으로 구형 또는 튜브형이다). 예를 들면, RNA-파지 또는 HBcAg의 캡시드는 대칭된 정이십면체 구형을 갖는다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "캡시드성 구조"는 충분히 정돈 및 반복 정도를 유지하면서 정의된 의미의 캡시드 형태와 유사하지만, 전형적인 대칭적 어셈블리로부터 이탈된 바이러스 단백질 서브유닛으로 구성된 고분자 어셈블리를 언급한다.

박테리오파지의 바이러스양 입자: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "박테리오파지의 바이러스양 입자"는 비복제성이고 비감염성이고, 박테리오파지의 복제수단(machinery)을 코딩하는 적어도 하나의 유전자 및 유전자들이 결여되어 있고, 전형적으로는 바이러스가 숙주와 결합하거나 그 내로 들어가는 것과 관련된 단백질 또는 단백질들을 코딩하는 유전자 또는 유전자들이 결여되어 있는, 박테리오파지의 바이러스양 입자를 언급한다. 그러나, 상기 유전자 또는 유전자들이 존재하지만 불활성화이기 때문에 박테리오파지의 바이러스양 입자를 비복제성이고 비감염성이 되도록 하는 박테리오파지의 바이러스양 입자를 포함하여야 한다.

RNA 파지 코트 단백질의 VLP: 임의로 숙주 RNA를 포함하고 RNA 파지 코트 단백질의 180개의 서브유닛의 자가-어셈블리로부터 형성된 캡시드 구조를 "RNA 파지 코트 단백질의 VLP"로 언급한다. 특정 일례는 Q $\beta$  코트 단백질의 VLP이다. 특히, Q $\beta$  코트 단백질의 VLP는 Q $\beta$  CP 서브유닛으로부터만 어셈블리하거나(억제를 통해 장쇄의 A1 단백질의 어느 발현을 저지하는 TAA 종결 코돈을 포함하는 Q $\beta$  CP의 발현을 통해 형성, 참조 Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9- 15(1996)), 추가로 캡시드 어셈블리에 A1 단백질 서브유닛을 포함할 수 있다.

바이러스 입자: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "바이러스 입자"는 바이러스의 형태학적 형태를 언급한다. 일부 바이러스 타입에서 이는 단백질 캡시드로 둘러싸인 게놈을 포함하고; 다른 것은 추가 구조(예: 인벨럽, 테일(tail) 등)을 갖는다.

하나(One), 한개(a), 또는 한개(an): 본 명세서에서 하나(One), 한개(a), 또는 한개(an)가 사용되는 경우, 이는 달리 언급하지 않는 한 "적어도 하나의" 또는 "하나 이상"을 의미한다.

본 분야의 기술자는 이해하고 있는 바와 같이, 본 발명의 특정 일면은 클로닝, 중합효소연쇄반응, DNA 및 RNA 정제, 원핵 및 진핵 세포등에서 재조합 단백질의 발현과 같은 재조합 핵산 기술의 사용을 포함한다. 상기 방법론은 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있는 공개된 실험용 방법 매뉴얼에서 통상 발견할 수 있다(예: Sambrook, J. et al., eds., Molecular cloning, A Laboratory Manual, 2nd. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubel, F. et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)). 조직 배양 세포주를 사용하는 실험에 대한 기초 실험 기술(Celis, J., ed., Cell Biology, Academic Press, 2<sup>nd</sup> edition, (1998)) 및 항체-기초 기술(Harlow, E. and lane, D., Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988); Deutscher, M. P., "Guide to Protein Purification," Meth. Enzymol. 128, Academic Press San Diego (1990); Scopes, R. K., Protein Purification Principles and Practice, 3rd ed., Springer-Verlag, New York (1994)) 또한 상기 문헌(이들 모두는 전체적으로 참고문헌으로서 본 명세서에서 인용된다)에 적절하게 기술된다.

2. 면역 반응 증강용 조성물 및 증강 방법

기술하는 방법은 동물에서 그렐린 또는 그렐린 펩티드에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 조성물 및 증강 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 (a) 적어도 하나의 제 1 결합부위를 갖는 코어 입자; 및 (b) 적어도 하나의 제 2 결합부위를 갖는 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하거나, 다르게는 구성된다(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린 펩티드이고, 제 2 결합부위는 (i) 항원 또는 항원 결정기와 함께 비자연적으로 발생된 결합부위로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 제 1 결합부위와 결합할 수 있으며; 항원 또는 항원 결정기 및 코어 입자는 상기 결합을 통해 상호작용하여 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성한다). 더욱 특히, 본 발명의 조성물은 바이러스양 입자 및 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하거나, 다르게는 상기로 구성된다(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린 펩티드이고, 적어도 하나의 하나의 항원 또는 항원 결정기는 바이러스양 입자에 결합하여 정돈되고 반복적인 항원-VLP-어레이를 형성한다). 추가로, 본 발명을 통해 당업자는 비만을 치료 및/또는 예방하기 위한 상기와 같은 조성물을 용이하게 구성할 수 있다.

특정 일례로, 코어 입자는 바이러스, 박테리아 섬모, 박테리아 섬모, 박테리오파지, 바이러스양 입자, 바이러스 캡시드 입자로부터 형성된 구조 또는 그의 재조합형을 포함한다. 정돈되고 반복적 코트 및/또는 코어 단백질 구조를 갖는 본 분야에 공지된 바이러스는 본 발명의 방법의 코어 입자로서 사용하기 위하여 선택될 수 있다. 적절한 바이러스의 예는 제한하는 것은 아니지만 신드비스 및 다른 알파바이러스, 람다바이러스(예: 베시쿨라 스토타티스 바이러스, 피코나바이러스(예: 인간 리노 바이러스, 아키 바이러스), 토가바이러스(예: 루벨라 바이러스), 오르토믹소바이러스(예: 토고토 바이러스, 마트켄 바이러스, 가금독감 바이러스), 폴리오마바이러스(예: 폴리오마바이러스 BK, 폴리오마바이러스 JC, 가금 폴리오마바이러스 BFDV), 파보바이러스, 로타바이러스, 노르윙크 바이러스, 구저 질환 바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 담배 모자이크병 바이러스, 플라크 하우스(Flock House) 바이러스, 및 인간 유두종바이러스, 및 바람직하게, RNA 파지, 박테리오파지 Q $\beta$ , 박테리오파지 R17, 박테리오파지 M11, 박테리오파지 MX1, 박테리오파지 NL95, 박테리오파지 fr, 박테리오파지 GA, 박테리오파지 SP, 박테리오파지 MS2, 박테리오파지 f2, 박테리오파지 PP7(예: Bachman, M. F. and Zinkernagel, R. M., Immunol. Today 17 : 553-558(1996)이 표 1 참조)를 포함한다.

추가 일면에서, 본 발명은 이중의 단백질, 펩티드, 항원 결정기 또는 특성의 반응성 아미노산 잔기를 포함하는 제 1 결합부위와 정돈되고 반복적 바이러스 인벨럽 단백질 사이의 융합을 형성하기 위하여 바이러스를 유전공학적으로 이용한다. 본 분야의 기술자에게 공지된 다른 유전자 조작법은 발명의 조성물의 작제에 포함될 수 있고; 예를 들면, 유전자를 돌연변이를 통해 재조합 바이러스의 복제 능력을 제한하는 것이 바람직할 수 있다. 추가로, 본 발명에 사용되는 바이러스는 화학 또는 물리적 불활성화에 의해, 또는 지시한 바와 같이 복제 능력이 있는 게놈의 결핍에 기인하여 복제 능력이 없다. 제 1 결합부위 단백질을 포함하는 단백질로 융합시키기 위하여 선택된 바이러스 단백질은 조직적이고 반복적 구조를 가져야 한다. 조직적이고 반복적 구조는 바이러스 표면상에 0.5-30nm, 바람직하게 5-15nm의 간격으로 거의 결정과 같은(paracrystalline) 구조를 포함한다. 이러한 타입의 융합 단백질 형성은 바이러스 표면상에 다중의 정돈되고 반복적 제 1 결합부위를 형성할 것이다. 따라서, 그로부터 형성된 제 1 결합부위의 정돈되고 반복적 구조는 자연발생된 바이러스 단백질의 일반 구조를 반영한다. 본 분야의 기술자에게 이해되는 바와 같이, 제 1 결합부위는 특성의 항원 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하여 정돈되고 반복적 구조의 항원 어레이를 제공하는 적절한 단백질, 폴리펩티드, 당, 폴리뉴클레오티드, 펩티드(아미노산), 자연발생 또는 합성 폴리머, 2 차 대사물질 또는 그의 배합물이거나 그의 일부일 수 있다.

본 발명의 또다른 일면으로, 코어 입자는 재조합 알파바이러스, 및 더욱 특히, 재조합 신드비스 바이러스이다. 알파 바이러스는 DNA 중간체 없이 전체적으로 감염된 세포의 세포질내에서 그의 게놈 RNA를 복제하는 (+) 스트랜드 RNA 바이러스이다(Strauss, J. and Strauss, E., Microbiol. Rev. 58 : 491-562 (1994)). 알파바이러스과의 여러 구성원, 신드비스(Xiong, C. et al., Science 243 : 1188-1191(1989); Schlesinger, S., Trends Biotechnol. 11 : 18-22(1993)), 셈리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스(SFV)(Liljestrom, P. & Garoff, H., Biol기술 9: 1356-1361(1991)) 및 다른 것(Davis, N. L. et al., Virology 171 : 189-204(1989))은 상이한 단백질에 대한 바이러스-기초 발현 벡터로서(Lundstrom, K., Curr. Opin. Biotechnol. 8 : 578-582(1997); Liljestrom, P., Curr. Opin. Biotechnol. 5 : 495-500(1994)) 및 백신 개발을 위한 후보물질로서 주목을 받아왔다. 이중 단백질 발현 및 백신 개발을 위한 알파바이러스가 기재되어 있다(참조 U. S. Patent Nos. 5,766, 602; 5,792, 462; 5,739, 026; 5,789, 245; 및 5,814, 482; 본 명세서에서 전체적으로 참고문헌으로 인용된다). 본 발명의 일면에 따른 알파 바이러스 코어 입자의 작제는 본 명세서에서 전체적으로 참고문헌으로 인용되는 상기 논문에 기술된 바와 같이 재조합 DNA 기술 분야에서 일반적으로 공지되어 있는 방법에 의해 수행될 수 있다.

다양하고 상이한 재조합 숙주 세포를 사용하여 항원 또는 항원 결정기 결합을 위한 바이러스-기초 코어 입자를 생산할 수 있다. 예를 들면, 다양한 범위의 알파바이러스가 공지되어 있다; 신드비스 바이러스를 배양된 포유동물, 파충류, 및 양서류 세포, 및 곤충 세포를 감염시킨다(Clark, H., J. Natl. Cancer Inst. 51 : 645 (1973); Leake, C., J. Gen. Virol. 35 : 335 (1977); Stollar, V. in THE TOGAVIRUS, R. W. Schlesinger, Ed., Academic Press, (1980), pp. 583-621). 따라서, 다수의 재조합 숙주 세포를 본 발명의 실시예에 사용할 수 있다. BHK, COS, Vero, HeLa 및 CHO 세포는 인간 세포와 유사한 방식으로 이질성 단백질을 당화시킬 수 있고(Watson, E. et al., Glycobiology 4 : 227, (1994)) 선택되거나(Watson, E. et al., Glycobiology 4 : 227, (1994)) 유전자적으로 조작되어(Renner W. et al., Biotech. Bioeng. 4 : 476 (1995); Lee K. et al. Biotech. Bioeng 50 : 336 (1996)) 무혈청 배지, 및 현탁액에서 성장할 수 있는 가능성이 있기 때문에 이질성 단백질 생산에 특히 적절하다.

숙주 세포내로 폴리뉴클레오티드 벡터를 도입하는 것은 표준 실험 매뉴얼(참조, 예: Sambrook, J. et al., eds., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), Chapter 9; Ausubel, F. et al., eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997), Chapter 16)에 기술된 방법, 예를 들면, 일렉트로포레이션, DEAE-덱스트란 배개 형질감염, 형질감염, microinjection, 양이온성 지질-배개 형질감염, 형질유도, 스크레이프 로딩, 탄도 도입(ballistic introduction), 및 감염에 의해 수행할 수 있다. 외인성 DNA 서열을 숙주 세포내로 도입하는 방법은 Felgner, P. et al., U. S. Patent No. 5, 580,859에 기술되어 있다. 또한 패키징된 RNA 서열을 사용하여 숙주 세포를 감염시킬 수 있다. 이 패키징된 RNA 서열을 배양 배지에 가하여 숙주 세포내로 도입할 수 있다. 비감염성 알파바이러스 알파바이러스 입자의 제조는 여러 출처, 예를 들면, "Sindbis Expression System", Version C(Invitrogen Corporation, Carlsbad CA; Catalog No. K750-1)에 기술되어 있다.

포유동물 세포를 재조합 숙주세포로 사용하여 바이러스-기초 코어 입자를 생산하는 경우, 이 세포는 일반적으로 조직 배양액에서 배양된다. 배양액내에서 세포를 배양하는 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있다(참조; 예: Celis, J., ed., CELL BIOLOGY, Academic Press, 2nd edition.(1998); Sambrook, J. et al., eds., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.(1989); Ausubel, F. et al., eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John H. Wiley & Sons, Inc.(1997); Freshney, R., CULTURE OF ANIMAL CELLS, Alan R. Liss, Inc.(1983)).

추가로, 본 발명에서 코어 입자로서 사용하기 적절한 RNA 바이러스의 예는 제한하는 것은 아니지만 하기와 같다: 레오비리다에과(Reoviridae), 오르토투레오바이러스속(Orthoreovirus)(다중 혈청형의 포유동물 및 가금 레트로바이러스), 오르비바이러스속(Orbivirus) (블루팅바이러스, 유진아기 바이러스, 케메로보 바이러스, 아프리카마역바이러스, 및 콜로라도 톱 피버 바이러스, 로타바이러스 속(인간 로타바이러스, 네브라스카 소 설사 바이러스, 뮤린 로타바이러스, 유인원 로타바이러스, 소 또는 양 로타바이러스, 가금 로타바이러스); 피코마비리다에과, 엔테로바이러스속(폴리오바이러스), 콕사키 바이러스 A 및 B, 에코 바이러스(ECHO) 바이러스, A, C, D, E 및 G형 간염 바이러스, 유인원 엔테로바이러스, 뮤린 뇌척수염 (ME) 바이러스, 폴리오바이러스 뮤리스, 소 엔테로바이러스바이러스, 돼지 엔테로바이러스, 카디오바이러스속(Cardiovirus)(뇌척수신근염 바이러스(Encephalomyocarditis virus (EMC)), 멩고바이러스(Mengovirus)), 리노바이러스속(Rhinovirus)(적어도 113의 서브타입을 포함하는 인간 리노바이러스; 다른 리노바이러스), 아토포바이러스속(Aphovirus)(구제 질환(FMDV); 칼시비리다에과(Calciviridae), 돈 수포진 바이러스(Vesicular exanthema of swine virus), 선 미겔 아시카우일스, 펠린 피코나바이러스(고양이 피코나바이러스) 및 노르위크 바이러스 포함; 토가비리다에과(Togaviridae), 알파바이러스속(동부마 뇌염 바이러스, 켈리키 포레스트 바이러스, 신드비스 바이러스, 치쿤구니 바이러스, 오농-농 바이러스, 로스리버바이러스, 베네주엘라 말 뇌염 바이러스, 서부마 뇌염 바이러스, 플라바이러스속(모기매개의 바이러스 뇌염 바이러스, 뎅그 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스, Murray Valley 뇌염 바이러스, West 나일 바이러스, 쿤진 바이러스, 중부유럽 린드기매개 뇌염바이러스, Far Eastern 린드기 매개 바이러스, Kyasanur 포레스트 바이러스, 도약병 III(Louping III) 바이러스, Powassan 바이러스, Omsk 출혈열 바이러스, 루비바이러스속(루벨라바이러스), 페스티 바이러스속(점막병 질환 바이러스, 돼지 콜레라 바이러스, 보더 질환 바이러스( Border disease virus)); 부니아비리다에과, 부니아바이러스속(부니아웨라 및 관련 바이러스, 캘리포니아 뇌염 그룹 바이러스), 플레보바이러스(Phlebovirus)(Sandfly fever Sicilian 바이러스, Rift Valley 열 바이러스), 나이로바이러스속(Nairovirus)(Crimean-Congo 출혈열 바이러스, Nairobi 양 질환 바이러스), 및 우우쿠바이러스속(Uukuvirus)(우우쿠니에미(Uukuniemi) 및 관련 바이러스); 오르토투레오비리다에과(Orthomyxoviridae), 인플루엔자 바이러스(A형 인플루엔자 바이러스, 다수의 인간형 서브타입); 돼지 인플루엔자 바이러스, 및 가금 및 말 인플루엔자 바이러스; B형 인플루엔자 (다수의 인간형 서브타입), 및 C형 인플루엔자(가능한 다른 속); 파라믹소비리다에과(paramyxoviridae), 파라믹소바이러스속(Paramyxovirus)(1형 파라인플루엔자바이러스, Sendai 바이러스, 혈구흡착성(Hemadsorption) 바이러스, 2형 내지 5형 파라인플루엔자 바이러스, 뉴 카슬 병 바이러스, 이하선염 바이러스), 모르빌리바이러스속(Morbillivirus) (홍역 바이러스, 경화성전뇌염 바이러스, 홍역 바이러스, 우역 바이러스(Rinderpest virus)), 뉴모바이러스속(Pneumovirus)(호흡기합포체 바이러스(RSV), 소 호흡기합포체 바이러스 및 마우스의 뉴모니아바이러스); 포레스트 바이러스, 신드비스 바이러스, 치쿤구니 바이러스, 오농-농 바이러스, 로스리버바이러스, 베네주엘라 말 뇌염 바이러스, 서부마 뇌염 바이러스, 플라바이러스속(모기매개의 바이러스 뇌염 바이러스, 뎅그 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스, Murray Valley 뇌염 바이러스, 서 나일 바이러스, 쿤진 바이러스, 중부유럽 린드기매개 뇌염바이러스, Far Eastern 린드기 매개 바이러스, Kyasanur 포레스트 바이러스, 도약병 III 바이러스, Powassan 바이러스, Omsk 출혈열 바이러스, 루비바이러스속(루벨라바이러스), 페스티 바이러스속(점막병 질환 바이러스, 돼지 콜레라 바이러스, 보더 질환 바이러스); 부니아비리다에과, 부니아바이러스속 (부니아웨라 및 관련 바이러스, 캘리포니아 뇌염 그룹 바이러스), 플레보바이러스(Sandfly fever Sicilian 바이러스, Rift Valley 열 바이러스), 나이로바이러스속(Crimean-Congo 출혈열 바이러스, Nairobi 양 질환 바이러스), 및 우우쿠바이러스속(우우쿠니에미 및 관련 바이러스); 오르토투레오비리다에과, 인플루엔자바이러스(A형 인플루엔자 바이러스, 다수의 인간형 서브타입); 돼지 인플루엔자 바이러스, 및 가금 및 말 인플루엔자 바이러스; B형 인플루엔자 (다수의 인간형 서브타입), 및 C형 인플루엔자(가능한 다른 속); 파라믹소비리다에과, 파라믹소바이러스속(1형 파라인플루엔자바이러스, Sendai 바이러스, 혈구흡착성 바이러스, 2형 내지 5형 파라인플루엔자 바이러스, 뉴 카슬 병 바이러스, 이하선염 바이러스), 모르빌리바이러스속(홍역 바이러스, 경화성전뇌염 바이러스, 홍역 바이러스, 우역 바이러스, 뉴모바이러스속(호흡기합포체 바이러스)(RSV), 소 호흡기합포체 바이러스 및 마우스의 뉴모니아바이러스); 랩도비리다에과(Rhabdoviridae), 베시쿨로바이러스속(Vesiculovirus)(VSV), 찬디푸르바이러스(Chandipur Virus), Flanders-Hart Park 바이러스), 리스바이러스속(Lyssavirus)(라비스 바이러스), 어류 랩도바이러스 및, 필로바이러스(Marburg 바이러스 및 엘보바이러스); 아르나비리다에과(Arenaviridae), 임파구 맥락수막염 바이러스(LCM),

Tacaribe 바이러스 콤플렉스, 및 라스바이러스; 코로나비리다에과(Coronoaviridae), 전염성 기관지염 바이러스(IBV), 마우스 간염 바이러스, 인간 장 코로나바이러스, 및 고양이 감염성 복막염(고양이 코로나바이러스)를 포함한다.

코어 입자로서 사용할 수 있는 DNA 바이러스의 예는 제한하는 것은 아니지만, 포스리비다에과(Poxviridae), 오르토폭스바이러스속(대두창, 소두창, 원숭이 포스 백신, 우두, 버팔로포스, 래빗포스, 서두(Ectromelia)), 레포리포스 바이러스속(Leporipoxvirus)(점액종, 섬유종), 아비포스바이러스속(Avipoxvirus)(파울포스, 다른 가금 포스바이러스), 카프리포스바이러스속(Capripoxvirus)(젓포스(sheepox), 코트포스(goatpox)), 수이포스바이러스속(Suipoxvirus)(스윈포스(Swinepox)), 파라포스바이러스속(Parapoxvirus)(감염성농포성 피부염 바이러스, 가성 우두, 소 구진 구내염 바이러스); 이리도비리다에과(Iridoviridae)(아프리카 돼지 열 바이러스, 2 및 3형 프로그 바이러스, 어류의 림포시스티스 바이러스); 헤르페스비리다에과(Herpesviridae), 알파-헤르페스바이러스(1 및 2형 단순포진, 베리셀라-조스터, 말 유산 바이러스, 2 및 3형 말 헤르페스 바이러스, 슈도라비스바이러스, 감염성 소 각결막염 바이러스, 감염성 소 비기관염 바이러스, 고양이 비기관염 바이러스, 감염성 후두기관염 바이러스) 베타-헤르페스바이러스(인간 거대세포바이러스 및 돼지, 원숭이 및 로렌츠 거대세포바이러스); 감마-헤르페스바이러스(엡스타인바 바이러스(EBV), 마렉병 바이러스, 헤르페스 사이미리(Herpes saimiri), 헤르페스바이러스 아펠레스, 헤르페스바이러스실비라구스, 기니아 피그 헤르페스 바이러스, 루크중양 바이러스; 아데노비리다에과(Adenoviridae), 매스트아데노바이러스속(A, B, C, D 및 E형 인간형 서브타입 및 그룹화되지 않은 것; 유인원 아데노바이러스(적어도 23 혈청형), 감염성 캐나인 헤파티스, 및 소, 돼지, 양, 프로그 및 여러 다른 종의 아데노바이러스, 아비아데노바이러스속(가금 아데노바이러스); 및 비가축성 아데노바이러스; 파르보비리다에과, 유두종 바이러스속(인간 유두종 바이러스, 소 유두종 바이러스, Shope 래빗 유두종 바이러스, 및 다른 종의 다양한 병원성 유두종 바이러스), 폴리오마 바이러스속(폴리오마바이러스, 유인원 공포화제(SV-40), 래빗 공포화제(RKV), K 바이러스, BK 바이러스, JC 바이러스, 및 다른 영장류 폴리오마 바이러스 예로서 림프구 친화성 유두종 바이러스); 파르보비리다에과 아데노-관련 바이러스속, 파르보바이러스속(고양이 범백혈구감소증, 소 파르보바이러스, 캐나인 파르보바이러스, 알류트산 멧크 질화 바이러스 등)을 포함한다. 마지막으로, DNA 바이러스는 만성 감염성 신경성 체제(CHIN 바이러스)와 같은 바이러스를 포함할 수 있다.

다른 일면에서, 박테리아 필린, 박테리아 필린의 하위부분, 또는 박테리아 필린 또는 그의 하위부분을 포함하는 용합 단백질의 박테리아 필린, 박테리아 필린의 하위부분을 사용하여 본 발명의 조성물 및 백신 조성물을 제조할 수 있다. 필린 단백질의 예는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 헤모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 네이세리아 고노르호에아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 카울로박터 크레스텐투스(*Caulobacter crescentus*), 슈도모나스 스투제리(*Pseudomonas stutzeri*), 및 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)에 의해 제조된 필린을 포함한다. 본 발명에 사용하기 적절한 필린 단백질의 아미노산 서열은 GenBank 리포트 AJ000636, AJ132364, AF229646, AF051814, AF051815, 및 X00981에 기술된 것을 포함하고, 이는 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 인용된다.

박테리아 필린 단백질은 일반적으로 단백질이 박테리아의 원형질막공간에 노출되기 전에 N-말단 리더 서열을 제거하도록 프로세싱된다. 추가로, 본 분야의 기술자가 인지하고 있는 바와 같이 본 발명의 조성물 및 백신 조성물 제조에 사용되는 박테리아 필린 단백질은 일반적으로 자연발생적으로 존재하는 리더 서열을 갖지 않는다.

본 발명에 사용하기 적절한 필린 단백질의 한 특정 일례는 *E. coli*의 P-필린(GenBank 리포트 AF237482(서열번호 1)이다. 본 발명에 사용하기 적절한 1형 *E. coli* 필린의 한 예는 GenBank 리포트 M27603(서열번호 3)에 기술된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산에 의해 코딩된, GenBank 리포트 P04128(서열번호 2)에 기재된 아미노산 서열을 갖는 필린이다. 이 GenBank 리포트 전체는 본 명세서에서 참조문헌으로 인용된다. 다시, 상기 참조된 단백질의 성숙한 형태는 본 발명의 조성물 및 백신 조성물 제조에 일반적으로 사용될 것이다.

본 발명의 실시예에 적절한 박테리아 필린 또는 필린 하위부분은 일반적으로 결합하여 정돈되고 반복적 항원 어레이를 형성할 수 있다.

시험관내에서 섬모 및 섬모성 구조를 제조하는 방법은 본 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, [Bullitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 12890-12895(1996)]에는 *E. coli* P-섬모 서브유닛의 시험관내 재구성이 기술되어 있다. 추가로, [Eshdat et al(R Bacteriol. 148 : 308-314(1981))]에는 *E. coli*의 1형 섬모를 분해하고 섬모를 재구성하는 적절한 방법이 기술되어 있다. 간단하게, 이 방법은 하기와 같다: 섬모를 포화된 구아닌인 하이드로클로라이드에서 37°C 하에 인큐베이션시켜 분해한다. 이어서 필린 단백질을 크로마토그래피에 의해 정제한 후, 5 mM tris(하이드록시메틸) 아미노메탄 클로라이드(pH 8.0)에 대하여 투석시켜 필린 다이머를 형성한다. Eshdat 등은 또한 필린 다이머는 5 mM MgCl<sub>2</sub>를 포함하는 5 mM tris(하이드록시메틸) 아미노메탄(pH 8.0)에 대하여 투석시킬 때 다시 어셈블리하여 섬모를 형성한다는 것을 밝혀냈다.

추가로, 예를 들면, 통상의 유전 공학 방법 및 단백질 변형 방법을 사용하여 항원 또는 항원 결정기가 제 2 결합부위를 통해 결합하는 제 1 결합부위가 필린 단백질을 포함하도록 변형시킬 수 있다. 다르게는 항원 또는 항원 결정기를 제 2 결합부위를 통해 이들 단백질중 자연발생적으로 남아있는 아미노산 잔기에 직접 결합시킬 수 있다. 이 변형된 필린 단백질을 본 발명의 백신 조성물을 면역화시키는데 사용할 수 있다.

본 발명의 조성물 및 백신 조성물 제조에 사용되는 박테리아 필린 단백질은 HBcAg에 대하여 기술된 것과 유사한 방식으로 변형될 수 있다. 예를 들면, 시스테인 및 리신 잔기를 결실시키거나 다른 아미노산 잔기로 치환시킬 수 있고 제 1 결합부위를 이 단백질에 첨가할 수 있다. 추가로, 필린 단백질은 변형 형태로 발현되거나 발현 후 화학적으로 변형될 수 있다. 유사하게, 본래의 섬모를 박테리아로부터 수거한 후 화학적으로 변형시킬 수 있다.

또다른 일례로, 섬모 또는 섬모성 구조를 박테리아(예: *E. coli*)로부터 수거하고 본 발명의 조성물 및 백신 조성물 형성에 사용한다. 조성물 및 백신 조성물 제조에 적절한 섬모의 예는 *E. coli*의 1형 섬모로 이는 서열번호:2에 기술한 아미노산 서열을 갖는 필립 모노머로부터 형성된다.

박테리아 섬모를 수거하는 다수의 방법이 본 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, [Bullitt and Makowski(Biophys. J. 74 : 623-632(1998))]에는 *E. coli*로부터 P-섬모를 수거하는 섬모 정제 방법이 기술되어 있다. 이 방법에 따라, P-섬모 플라스미드를 포함하는 과다하게 섬모가 형성된 *E. coli*로부터 섬모를 전단하고 가용화 및  $MgCl_2$ (1.0 M) 침전 사이클에 의해 정제하였다.

일단 수거되면, 섬모 또는 섬모성 구조는 여러 방식으로 변형될 수 있다. 예를 들면, 제 1 결합부위를 하나 이상의 항원 또는 항원 결정기가 제 2 결합부위를 통해 결합할 수 있는 섬모에 첨가할 수 있다. 다시 말하면, 박테리아 섬모 또는 섬모성 구조는 수거되고 변형되어 정돈되고 반복적 항원 어레이를 형성할 수 있다.

항원 또는 항원 결정기는 섬모 또는 섬모성 구조내 존재하는 자연발생적으로 발생된 시스테인 잔기 또는 리신 잔기에 결합할 수 있다. 일부 경우에서, 자연발생된 아미노산 잔기의 고도한 정렬과 반복성을 통해 항원 또는 항원 결정기가 섬모 또는 섬모성 구조에 커플링할 수 있다. 예를 들면, 섬모 또는 섬모성 구조는 헤테로이작용기성 가교제를 사용하여 항원 또는 항원 결정기의 제 2 결합부위에 결합할 수 있다.

유기체에 의해 자연적으로 합성된 구조(예: 섬모)를 사용하여 본 발명의 조성물 및 백신 조성물을 제조하는 경우, 이 유기체가 바람직한 성질을 갖는 구조를 생성하도록 유전 공학적으로 조작한다는 잇점을 갖는다. 예를 들면, *E. coli*의 1형 섬모를 사용하는 경우, 이들 섬모가 수거된 *E. coli*는 특정 성질을 갖는 구조를 생성하도록 변형될 수 있다. 필린 단백질의 가능한 변형 예는 하나 이상의 리신 잔기의 삽입, 하나 이상의 자연발생적으로 남아있는 리신 잔기의 결실 또는 치환, 및 하나 이상의 자연발생적으로 남아있는 시스테인 잔기(예: 서열번호 2;에서 44번 및 84번 위치의 시스테인 잔기)의 결실 또는 치환을 포함한다.

추가로, 추가의 변형을 통해 리신 잔기이외의 제 1 결합부위(예: FOS 또는 JUN 영역)를 포함하는 발현 산물을 수득시키는 필린 유전자를 제조할 수 있다. 물론, 적절한 제 1 결합부위는 필린 단백질이 본 발명의 백신 조성물에 사용하기 적절한 섬모 또는 섬모성 구조를 형성하지 못하도록 것으로 제한될 것이다.

박테리아 세포에 자연적으로 존재하는 필린 유전자는 생체내에서 변형될 수 있거나(예: 상동성 재조합에 의해) 또는 특성의 성질을 갖는 필린 유전자는 이들 세포내로 삽입될 수 있다. 예를 들면, 필린 유전자는 복제가 가능한 클로닝 벡터 또는 박테리아 염색체내로 삽입되는 벡터 성분으로서 박테리아 세포내로 삽입될 수 있다. 삽입된 필린 유전자는 또한 발현 조절 서열(예: *lac* 오퍼레이터)과 연결될 수 있다.

대체로, 본 발명의 조성물 및 백신 조성물 각각에서 사용되는 섬모 또는 섬모성 구조는 필린 서브유니트의 단일 타입으로 구성될 것이다. 그러나, 본 발명의 조성물은 또한 이질성 필린 서브유니트로부터 형성된 섬모 또는 섬모성 구조를 포함하는 백신을 포함한다. 동일한 서브유니트로 구성된 섬모 또는 섬모성 구조는 일반적으로 고도로 정돈되고 반복적 항원 어레이를 제시하는 구조를 형성할 수 있다고 기대되기 때문에 사용될 것이다.

그러나, 본 발명의 조성물은 또한 이질성 필린 서브유니트로부터 형성된 섬모 또는 섬모성 구조를 포함하는 조성물 및 백신 조성물을 포함한다. 이들 섬모 또는 섬모성 구조를 형성하는 필린 서브유니트는 자연적으로 박테리아 세포내 존재하는 유전자로부터 발현될 수 있거나 세포내로 도입될 수 있다. 자연발생적으로 존재하는 필린 유전자 및 도입된 유전자 둘 모두 섬모 또는 섬모성 구조를 형성하는 세포에서 발현될 때, 결과는 통상 이들 필린 단백질 혼합물로부터 형성된 구조일 것이다. 추가로, 두개 이상의 필린 유전자가 박테리아에서 발현될 때 각 필린 유전자의 상대적인 발생율은 전형적으로 섬모 또는 섬모성 구조내에서 상이한 필린 서브유니트의 비를 결정하는 요소가 될 것이다.

혼합 필린 서브유니트의 특정한 구성을 갖는 섬모 또는 섬모성 구조가 바람직한 경우, 적어도 하나의 필린 유전자의 발현은 이질적이고 유도성인 프로모터에 의해 조절될 수 있다. 프로모터, 및 유전 요소를 사용하여 상이한 필린 서브유니트의 상대량을 조절할 수 있고, 이로써 섬모 또는 섬모성 구조의 구성을 조절할 수 있다.

또한, 항원 또는 항원 결정기는 펩티드 결합이 아닌 박테리아 섬모 또는 섬모성 구조에 연결될 수 있다. 본 발명의 조성물에 사용되는 섬모 또는 섬모성 구조를 생산하는 박테리아 세포는 항원 또는 항원 결정기에 융합되는 필린 단백질을 생성하기 위하여 유전적으로 조작될 수 있다. 섬모 또는 섬모성 구조를 형성하는 이러한 융합 단백질이 본 발명의 백신 조성물에 사용하기 적절하다.

본 출원과 관련하여 바이러스양 입자는 병원성이 아니라는 점을 제외하고 바이러스 입자와 유사한 구조를 언급한다. 일반적으로 바이러스양 입자는 바이러스 게놈이 결여되어 있기 때문에 비감염성이다. 또한, 바이러스양 입자는 이질성 발현에 의해 대량으로 생산될 수 있고, 용이하게 정제될 수 있다.

바람직한 일면으로, 바이러스양 입자는 재조합 바이러스양 입자이다. 본 분야의 기술자는 대중이 용이하게 이용할 수 있는 바이러스 코딩 서열 및 재조합 DNA 기술을 사용하여 VLPs를 제조할 수 있다. 예를 들면, 조절 서열에 코딩 서열을 작용 결합(functional linkage)시키는 서열의 적절한 변형을 통해 상업적으로 이용가능한 바콜로바이러스 벡터를 사용하여, 바이러스 프로모터의 조절 제어하에 바콜로바이러스 발현 벡터에서 바이러스 인벨럽 또는 코어 단백질의 코딩 서열을 발현시키기 위하여 조작할 수 있다.

VLPs의 예는 제한하는 것은 아니지만, B형 간염 바이러스(Ulrich, et al., Virus Res. 50 : 141-182 (1998)), 홍역 바이러스(Warnes, et al., 유전자 160 : 173-178 (1995)), 신드비스 바이러스, 로타바이러스(US 5,071, 651 및 US 5,374, 426), 구저질할 바이러스(twomey, et al., Yaccine 13 : 1603-1610, (1995)), 노르윅 바이러스(Jiang, X., et al., Science 250 : 1580-1583 (1990); Matsui, S. M., et al., J. Clin. Invest. 87 : 1456-1461 (1991))의 캡시드 단백질, 레트로바이러스 GAG 단백질(WO 96/30523), 레트로트랜스포손 Ty 단백질 pl, B형 간염 바이러스(WO 92/11291), 인간 유두종 바이러스(WO 98/15631), RNA 파지, Ty, fr-파지, GA-파지 및 Q $\beta$ -파지의 표면 단백질을 포함한다.

본 분야의 기술자에게 용이하게 이해되는 바, 본 발명의 VLP는 어느 특정의 형태로 제한하지 않는다. 입자는 화학적 또는 생물학적 과정을 통해 합성될 수 있고, 이는 자연발생이거나 비자연발생될 수 있다. 예로서 이러한 유형의 일례로 바이러스양 입자 또는 그의 재조합 형태를 포함한다.

더욱 구체적인 일례로, VLP는 로타바이러스의 재조합 폴리펩티드, 노르윅 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 알파 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 구제 질환 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 홍역 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 신드비스 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 폴리오마 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 레트로바이러스의 재조합 폴리펩티드, B형 간염 바이러스의 재조합 폴리펩티드(예: HBcAg), 담배 모자이크병 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 플라크 하우스(Flock House) 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 인간 유두종 바이러스의 재조합 폴리펩티드, 박테리오파지의 재조합 폴리펩티드, RNA 파지의 재조합 폴리펩티드, Ty의 재조합 폴리펩티드, fr-파지의 재조합 폴리펩티드, GA-파지의 재조합 폴리펩티드 및 QB-파지의 재조합 폴리펩티드로부터 선택되는 재조합 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 구성되거나, 다르게는 구성될 수 있다. 바이러스양 입자는 추가로 하나 이상의 상기 폴리펩티드, 및 상기 폴리펩티드 변이체로부터 선택되는 재조합 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 필수적으로 구성되거나, 다르게는 구성될 수 있다. 폴리펩티드 변이체는 예를 들면, 그의 야생형 카운터파트와 아미노산 수준으로 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 일치성을 공유할 수 있다.

바람직한 일례로, 바이러스양 입자는 RNA-파지의 재조합 폴리펩티드 또는 그의 단편을 포함하거나, 본질적으로는 상기로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 바람직하게, RNA-파지는 a) 박테리오파지 QB ; b) 박테리오파지 R17; c) 박테리오파지 fr; d) 박테리오파지 GA; e) 박테리오파지 SP; f) 박테리오파지 MS2; g) 박테리오파지 M11; h) 박테리오파지 MX1 ; i) 박테리오파지 NL95; k) 박테리오파지 f2 ; l) 박테리오파지 PP7 ; m) 박테리오파지 AP25로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

본 발명의 또다른 바람직한 일례로, 바이러스양 입자는 RNA-박테리오파지 QB, 또는 RNA-박테리오파지 fr, RNA-박테리오파지 AP25의 재조합 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 재조합 단백질은 RNA 파지의 코트 단백질을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

캡시드 또는 VLPs를 형성하는 RNA-파지 코트 단백질, 또는 캡시드 또는 VLP내로의 자기-어셈블리에 적합한 박테리오파지 코트 단백질의 단편이 본 발명의 주장의 바람직한 일면이다. 예를 들면, 박테리오파지 QB 코트 단백질은 *E. coli*에서 재조합적으로 발현될 수 있다. 추가로, 발현시 이 단백질은 캡시드를 자발적으로 형성한다. 또한, 이 캡시드는 고유한 반복적 체계의 구조를 형성한다.

본 발명의 조성물 제조에 사용할 수 있는 박테리오파지 코트 단백질의 특정 일례는 박테리오파지 QB(서열번호: 4; PIR 데이터베이스, 수탁번호 VCBPQR, QB CP로 언급됨 및 서열번호: 5; 수탁번호 AAA16663, QB A1 단백질로 언급됨) 박테리오파지 R17(서열번호: 6; PIR 수탁번호 VCBPR7), 박테리오파지 fr(서열번호: 7; PIR 수탁번호 VCBPFR), 박테리오파지 GA(서열번호: 8; GenBank 수탁번호 NP-040754), 박테리오파지 SP(서열번호: 9; GenBank 수탁번호 CAA30374, SP CP로 언급됨 및 서열번호: 10; 수탁번호, SP A1 단백질로 언급됨), 박테리오파지 MS2(서열번호: 11; PIR 수탁번호 VCBPM2), 박테리오파지 M11(서열번호: 12 GenBank 수탁번호 AAC06250), 박테리오파지 MX1(서열번호: 19; GenBank 수탁번호 AAC14699), 박테리오파지 NL95(서열번호: 14; GenBank 수탁번호 AAC14704), 박테리오파지 f2(서열번호: 15; GenBank 수탁번호 P03611), 박테리오파지 PP7(서열번호: 16)

및 RNA-박테리오파지 AP25(서열번호 28)과 같은 RNA 박테리오파지의 코트 단백질을 포함한다. 추가로, 박테리오파지 QB(서열번호 5)의 A1 단백질 또는 그의 C-말단으로부터 약 100, 약 150 또는 약 180 아미노산 정도가 누락된 C-말단 절단형을 QB 코트 단백질의 캡시드 어셈블리내로 혼입시킬 수 있다. 일반적으로, 캡시드 어셈블리중 QB CP에 상대적인 A1 단백질의 퍼센트는 캡시드 형성을 안정하게 하기 위하여 제한될 것이다.

QB 코트 단백질은 또한 *E. coli*에서 발현될 때 캡시드내로 자기-어셈블리하는 것으로 밝혀졌다(Kozlovska TM. et al., 유전자 137 : 133-137(1993)). 수득된 캡시드 또는 바이러스양 입자는 직경 25 nm이고 중대칭성 T=3인 20면체의 파지성 캡시드 구조를 나타내었다. 추가로, 파지 QB의 결정형 구조가 해석되었다. 캡시드는 QB 코트 단백질의 캡시드에 주목할만한 안정성을 제공하는 디설파이드 브릿지에 의해 공유 펜타머 및 헥사머로 결합된 180개 카피수의 코트 단백질을 포함한다(Golmohammadi, R. et al., 구조 4 : 543-5554(1996)). 그러나, 재조합 QB 코트 단백질로부터 제조된 VLPs 또는 캡시드는 캡시드내 다른 서브유닛과 디설파이드 결합에 의해 결합되지 않은 서브유닛, 또는 불완전하게 결합된 서브유닛을 포함할 수 있다. 따라서, 환원성 SDS-PAGE상에 재조합 QB 캡시드를 로딩할 때, 모노머 QB 코트 단백질에 상응하는 밴드 및 QB 코트 단백질의 헥사머 또는 펜타머에 상응하는 밴드를 볼 수 있다. 비환원성 SDS-PAGE에서 불완전하게 디설파이드 결합된 서브유닛 다이머, 트리머, 또는 테트라머 밴드로 나타날 수 있다. QB 캡시드 단백질은 또한 유기 용매 및 변성화제에 대한 특이한 내성을 나타낸다. 놀랍게도, 본 발명자는 30%만큼 높은 농도의 DMSO 및 아세트니트릴, 및 1M만큼 높은 농도의 구아니디늄은 캡시드의 안정성에 작용하지 못한다는 것을 발견하였다. QB 코트 단백질의 캡시드의 고도의 안정성은 특히 본 발명에 따른 포유동물의 면역화 및 백신화에 사용하기에 유리한 성질이다.

*E. coli*에서 발현될 때, [Stoll, E. et al. J. Biol. Chem. 252: 990-993(1977)]에 기술된 바와 같이 N-말단 Edman 시퀀싱에 의해 본 발명자가 관찰한 바 QB 코트 단백질의 N-말단 메티오닌은 통상 제거된다. N-말단 메티오닌이 제거되지 않은 QB 코트 단백질로부터 구성된 VLP, 또는 N-말단 메티오닌이 절단되거나 존재하는 QB 코트 단백질의 혼합물을 포함하는 VLP 모두 본 발명의 범위내 포함한다.

본 발명에 따른 RNA-파지, 특히 QB의 바람직한 바이러스양 입자는 WO 02/056905(이는 본 명세서에서 참고문헌으로서 전체적으로 인용된다)에 기술되어 있다.

추가 RNA 파지 코트 단백질 또한 박테리아 숙주에서 발현될 때 자가-어셈블리하는 것으로 나타났다(Kastelein, RA. et al., 유전자 23: 245-254(1983), Kozlovskaya, TM. et al., Dokl. Akad. Nauk SSSR 287 : 452-455(1986), Adhin, MR. et al., Virology 170 : 238-242(1989), Ni, CZ., et al., protein Sci. 5 : 2485-2493(1996), Priano, C. et al., J. Mol. Biol. 249: 283-297(1995)). Q $\beta$  파지 캡시드는 코트 단백질외에도, 이른 바 리드-트루(read-through) 단백질 A1 및 돌연변이 단백질 A2를 포함한다. A1은 UGA 종결 코돈에서의 억제에 의해 형성되고 길이는 329 aa이다. 본 발명에서 사용되는 파지 Q $\beta$  재조합 코트 단백질의 캡시드에는 A2 용해(lysis) 단백질이 결합되어 있고, 숙주로부터의 RNA를 포함한다. RNA 파지의 코트 단백질은 RNA 결합 단백질이고 바이러스의 라이프 사이클 동안 해독 억제물질로부터 작용하는 리플리카제 유전자의 리보솜 결합 위치의 스템 루프와 상호작용한다. 상호작용의 구조 요소 및 서열은 공지되어 있다(Witherell, GW. & Uhlenbeck, OC. Biochemistry 28 : 71-76(1989); Lim F. et al., J. Biol. Chem. 271 : 31839-31845(1996)). 일반적으로 스템 루프 및 RNA가 바이러스 어셈블리에 관여한다고 공지되어 있다(Golmohammadi, R. et al., Structure 4 : 543-5554(1996)).

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 바이러스양 입자는 RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질, 바람직하게 상기 언급된 RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된, RNA-파지의 재조합 단백질 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 또다른 바람직한 일면에서, RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질은 치환에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 제거, 또는 치환에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형되었거나; 다르게 RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질은 적어도 하나의 리신 잔기의 결실, 또는 삽입에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형된 것이다. 백신 요건에 적합하고 부합되도록 적어도 하나의 리신 잔기의 결실, 치환 또는 첨가에 의해 커플링 정도, 즉, RNA-파지의 VLP 서브유닛당 A $\beta$ 1-6 펩티드의 양을 달리할 수 있다.

또다른 바람직한 일면으로, 바이러스양 입자는 서열번호 : 4의 아미노산 서열을 갖는 코트 단백질, 또는 서열번호 : 4 및 서열번호 : 5 또는 바람직하게 N-말단 메티오닌이 절단된 서열번호 : 5의 뮤턴트의 아미노산 서열을 갖는 코트 단백질 혼합물을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 RNA-박테리오파지 Q $\beta$ 의 재조합 단백질 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

바람직한 추가의 일면에서 본 발명은, 바이러스양 입자는 뮤턴트 Q $\beta$  코트 단백질을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 Q $\beta$ 의 재조합 단백질을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된. 또다른 바람직한 일면으로, 이들 뮤턴트 코트 단백질은 적어도 하나의 리신 잔기의 제거, 또는 치환에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형되었거나; 다르게 RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질은 적어도 하나의 리신 잔기의 결실, 또는 삽입에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형된 것이다.

4개의 리신 잔기가 Q $\beta$  코트 단백질 캡시드 표면에 노출된다. 노출된 리신 잔기가 아르기닌에 의해 대체된 Q $\beta$  뮤턴트를 본 발명에 사용할 수 있다. 따라서, 하기 Q $\beta$  코트 단백질 뮤턴트 및 뮤턴트 Q $\beta$  VLPs를 본 발명의 실시예에 사용할 수 있다: "Q $\beta$ -240" (Lys13-Arg; 서열번호 : 17), "Q $\beta$ -243" (Asn 10-Lys; 서열번호 : 18), "Q $\beta$ -250" (Lys 2-Arg, Lys13-Arg; 서열번호 : 19), "Q $\beta$ - 251" (서열번호 : 20) 및 "Q $\beta$ -259" (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; 서열번호 : 21). 따라서, 본 발명의 추가의 일면으로, 바이러스양 입자는 a) 서열번호 : 17의 아미노산 서열; b) 서열번호 : 18의 아미노산 서열; c) 서열번호 : 19의 아미노산 서열; d) 서열번호 : 20의 아미노산 서열; 및 e) 서열번호 : 21의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함하는 뮤턴트 Q $\beta$  코트 단백질의 재조합 단백질을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다. 상기 언급한 Q $\beta$  코트 단백질, 뮤턴트 Q $\beta$  코트 단백질 VLPs 및 캡시드 각각의 작제, 발현 및 정제는 WO 02/56905에 기술되어 있다(본 명세서에서 참고문헌으로 인용된다). 특히, 상기 언급한 출원의 실시예 18을 참고한다.

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 바이러스양 입자는 상기 Q $\beta$  뮤턴트 및 상응하는 A1 단백질중 하나의 혼합물을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 Q $\beta$ 의 재조합 단백질 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 바이러스양 입자는 RNA-파지 AP205의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

AP205 계통은 돌연변이 단백질, 코트 단백질, 리플리카제 및 관련된 파지에는 존재하지 않는 두개의 오픈 리딩 프레임: 돌연변이 유전자의 해독에서 중요한 역할을 하는 오픈 리딩 프레임 및 분해 유전자로 구성된다(Klovins, J., et al., J Gen. ViroL 83 : 1523-33(2002)). AP205 코트 단백질은 pQb10의 유도체(Kozlovskaya, T. M. et al., 유전자 137 : 133-37(1993))이고, AP205 리보솜 결합 부위를 갖는 플라스미드 pAP283-58(서열번호: 27)로부터 발현될 수 있다. 다르게는, AP205 코트 단백질은 벡터에 존재하는 리보솜 결합 부위 하류의 pQb185내로 클로닝될 수 있다. 상기 양 방법에 의해 단백질이 발현되고 캡시드가 형성된다. 벡터 pQb10 및 pQb185는 pGEM 벡터로부터 유도된 벡터이고 이들 벡터내 클로닝된 유전자의 발현은 *trp* 프로모터에 의해 조정된다(Kozlovskaya, T. M. et al., 유전자 137 : 133-37(1993)). 플라스미드 pAP283-58(서열번호: 27)는 하기 서열에서 XbaI 위치의 하류, 및 AP205 코트 단백질의 ATG 개시 코돈 상류 바로 가까이에 추정된 AP205 리보솜 결합 위치를 포함한다: tctagaATTTTCTGCGCACCCAT CCCGGGTGGCGCCCAAAGTGAGGAAAATCACATg(서열번호: 57). 벡터 pQb185는 XbaI 위치로부터 하류 및 개시 코돈의 상류에 Shine Delagarno 서열을 포함한다 (tctagaTTAACCCAACCGTAGGAG TCAGGCCATg(서열번호: 58), Shine Delagarno 서열은 밑줄로 표시).

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 바이러스양 입자는 RNA-파지 AP205의 재조합 코트 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

따라서, 본 발명의 바람직한 일면은 캡시드를 형성하는 AP205 코트 단백질을 포함한다. 상기 단백질은 재조합적으로 발현되거나 자연발생된 공급원으로부터 제조된다. 박테리아에서 생산된 AP205 코트 단백질은 전자현미경(EM) 및 면역확산법에 의해 입증된 바 자발적으로 캡시드를 형성한다. AP205 코트 단백질(서열번호: 28)에 의해 형성된 캡시드의 구조적 성질 및 AP205 RNA 파지의 코트 단백질에 의해 형성된 캡시드의 것은 EM에 의해 관찰할 경우 거

의 식별불가능하다. AP205 VLP는 고도로 면역원성이고, 항원 및/또는 항원 결정기와 결합하여 반복적 방식으로 방향성을 띤 항원 및/또는 항원 결정기를 디스플레이하는 백신 구조물을 형성할 수 있다. 결합한 항원 및/또는 항원 결정기는 항체 분자와 상호작용하기 쉽고 면역원성이라는 것을 나타내는 디스플레이된 항원에 대하여 고역가를 유도한다.

본 발명의 추가로 바람직한 일례로, 바이러스양 입자는 RNA-과지 AP205의 재조합 뮤턴트 코트 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

5번 아미노산인 프롤린이 트레오닌으로 치환된 AP205 코트 단백질(서열번호: 29)을 포함하는 어셈블링 수행능력이 있는 돌연변이 형태의 AP205 VLP 또한 본 발명의 실시예에 사용할 수 있고, 본 발명의 추가로 바람직한 일례이다. 이들 VLP, 자연발생 공급원으로부터 유래된 AP205 VLP, 또는 AP205 바이러스 입자는 항원과 결합하여 본 발명의 항원의 정돈된 반복 어레이를 형성할 수 있다.

AP205 P5-T 뮤턴트 코트 단백질은 pQb185로부터 직접적으로 유도되고 QB 코트 단백질 유전자 대신 돌연변이 AP205 코트 단백질을 포함하는 플라스미드 pAP281-32(서열번호: 30)로부터 발현될 수 있다. AP205 코트 단백질을 발현시키기 위한 벡터를 *E. coli*내로 형질감염시켜 AP205 코트 단백질을 발현시킨다.

각각 VLP내로 자가-어셈블리하는 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질을 발현시키는 방법은 실시예 20 및 21에 기술되어 있다. 적절한 *E. coli* 균주는 제한하는 것은 아니지만 *E. coli* K802, JM 109, RR1이다. 적절한 벡터 및 균주 그의 배합은 SDS-PAGE에 의해 각각 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질의 발현을 테스트하여 확인하고 캡시드 형성 및 어셈블리는 임의로 우선 겔 여과에 의해 캡시드를 정제한 후 연속하여 면역확산 분석(Ouchterlony test) 또는 전자현미경법에 의해 테스트하여 확인한다(Kozlovskaya, T. M., et al., 유전자 137 : 133-37(1993)).

벡터 pAP283-58 및 pAP281-32로부터 발현된 AP205 코트 단백질은 *E. coli*의 세포질에서 프로세싱되기 때문에 초기 메티오닌 아미노산이 결핍되어 있을 수 있다. 절단, 절단되지 않은 형태의 AP205 VLP, 또는 그의 혼합물이 본 발명의 추가로 바람직한 일례이다.

본 발명의 추가로 바람직한 일례로, 바이러스양 입자는 RNA-과지 AP205의 재조합 코트 단백질, 또는 그의 단편의 혼합물 및, RNA-과지 AP205의 재조합 뮤턴트 코트 단백질, 또는 그의 단편의 혼합물을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 상기로 구성되거나, 다르게는 상기로 구성된다.

본 발명의 추가로 바람직한 일례로, 바이러스양 입자는 RNA-과지 AP205의 재조합 코트 단백질 또는 재조합 뮤턴트 코트 단백질의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 상기로 구성되거나, 다르게는 상기로 구성된다.

각각 VLP 및 캡시드내로 어셈블링할 수 있는 재조합 AP205 코트 단백질 단편은 또한 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 이 단편은 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질의 내부 또는 말단에서 결실되므로써 형성될 수 있다. VLP내로의 어셈블리에 적합한 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질 서열내 삽입 또는 항원 서열과 코트 단백질 및 뮤턴트 코트 단백질 서열의 융합이 본 발명에 포함되고, 이는 각각 키메라성 AP205 코트 단백질, 및 입자를 가져온다. 삽입, 결실 및 코트 단백질 서열에 대한 융합 결과 및 VLP내로의 어셈블리 적합성 여부는 전자현미경으로 측정할 수 있다.

AP205 코트 단백질, 코트 단백질 단편 및 키메라성 코트 단백질에 의해 형성된 입자는 침전에 의한 분류 단계 및 예를 들면, 세파로스 CL-4B, 세파로스 CL-2B, 세파로스 CL-6B 칼럼 및 그의 조합을 사용하여 겔 여과에 의한 정제 단계를 병용하여 순수한 형태로 분리할 수 있다. 바이러스양 입자 분리를 분리하는 다른 방법은 공지되어 있고, 이를 사용하여 박테리오파지 AP205의 바이러스양 입자(VLP)를 분리할 수 있다. 예를 들면, 효모 레트로트랜스포존(retrotransposon) Ty의 VLP를 분리하기 위하여 초원심분리법을 사용하는 것이 U. S. Patent No. 4,918, 166(본 명세서에서 참고문헌으로 인용된다)에 기술되어 있다.

여러 RNA 박테리오파지의 결정형 구조가 측정되었다(Golmohammadi, R. et al., 구조 4 : 543-554(1996)). 상기 정보를 사용하여, 표면 노출 잔기를 확인하고 하나 이상의 반응성 아미노산 잔기가 삽입 또는 치환에 의해 삽입될 수 있도록 RNA-과지 코트 단백질을 변형시킬 수 있다. 따라서, 변형된 형태의 박테리오파지 코트 단백질을 본 발명에 사용할 수 있다. 따라서, 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 단백질의 변이체(예: 박테리오파지 QB, 박테리오파지 R17, 박테리오파지 fr, 박테리오파지 GA, 박테리오파지 SP, 및 박테리오파지 MS2의 코트 단백질) 또한 본 발명의 백신 조성물 제조에 사용할 수 있다.

상기 논의된 변이체 단백질의 서열은 야생형 카운터파트와 상이하지만, 이 변이체 단백질은 일반적으로 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 능력을 보유하고 있다. 따라서, 본 발명은 추가로 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 단백질 변이체를 포함하는 조성물 및 백신 조성물, 및 조성물 및 백신 조성물을 제조하기 위하여 사용되는 개체 단백질 서브유니트를 포함한다. 따라서, 정돈되고 반복적 어레이를 형성하고 캡시드 또는 캡시드-성 구조와 결합하고 형성하는 능력을 보유하는 야생형 단백질의 변이체 형태(예: 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 단백질 변이체)도 본 발명의 범주내 포함된다.

결과적으로, 본 발명은 추가로 각각 정돈된 어레이를 형성하고 고유한 반복적 구조를 형성하는 야생형 단백질과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 일치하는 아미노산을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 단백질을 포함하는, 각각의 조성물 및 백신 조성물을 포함한다.

본 발명의 조성물을 제조하기 위하여 사용되는 단백질을 코딩하는 핵산 분자가 본 발명의 범주내 추가로 포함된다.

다른 일면에서, 본 발명은 추가로 서열번호 : 4-21에 나타난 아미노산 서열중 어느 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 일치하는 아미노산 서열을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 단백질을 포함하는 조성물을 포함한다.

본 발명에 사용하기 적절한 단백질은 또한 캡시드 또는 캡시드-성 구조, 또는 VLPs를 형성하는 단백질의 C-말단 절단(truncation) 뮤턴트 또한 포함한다. 절단 뮤턴트의 특정 일례로 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 또는 17번 아미노산이 C-말단으로부터 제거된 서열번호: 4-21중 어느 것에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 전형적으로, 이 C-말단 절단 뮤턴트는 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 능력은 보유할 것이다.

본 발명에 사용하기 적절한 단백질은 또한 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 단백질의 N-말단 절단 뮤턴트 또한 포함한다. 절단 뮤턴트의 특정 일례로 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 또는 17번 아미노산이 N-말단으로부터 제거된 서열번호: 4-21중 어느 것에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 전형적으로, 이 N-말단 절단 뮤턴트는 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 능력은 보유할 것이다.

본 발명에 사용하기 적절한 추가의 단백질은 또한 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 단백질의 N- 및 C-말단 절단 뮤턴트 또한 포함한다. 절단 뮤턴트의 특정 일례로 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 또는 17번 아미노산이 N-말단으로부터 제거되고 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 또는 17번 아미노산이 C-말단으로부터 제거된 서열번호: 4-21 중 어느 것에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 전형적으로, 이 N- 및 C-말단 절단 뮤턴트는 캡시드 또는 캡시드-성 구조를 형성하는 능력은 보유할 것이다.

본 발명은 추가로, 상기 기술한 절단 뮤턴트와 적어도 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 일치하는 아미노산 서열을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 단백질을 포함하는 조성물을 포함한다.

따라서, 본 발명은 캡시드 또는 VLPs를 형성하는 단백질로부터 제조된 조성물 및 백신 조성물, VLPs 또는 캡시드의 각 단백질 서브유닛으로부터 이들 조성물을 제조하는 방법, 각 단백질 서브유닛, 이들 서브유닛을 코딩하는 핵산 분자,을 제조하는 방법, 및 본 발명의 조성물을 사용하여 개체에서 면역 반응을 유도하거나 백신화시키는 방법을 포함한다.

일면으로, 본 발명은 추가로 에우번트를 포함하는 본 발명의 백신 조성물을 제공한다. 또다른 일면으로, 백신 조성물에는 에우번트가 결합되어 있다. 본 발명의 추가의 일면으로, 백신 조성물은 바이러스양 입자(여기에서, 바람직하게, 바이러스양 입자는 재조합 바이러스양 입자이다)를 포함하고, 바람직하게 바이러스양 입자인 본 발명의 코어 입자를 포함한다. 바람직하게, 바이러스양 입자는 RNA-과지, 바람직하게 RNA 과지의 코트 단백질의 재조합 단백질을 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 본질적으로는 구성되거나, 다르게는 구성된다. 바람직한 일면으로, RNA 과지의 코트 단백질은 (a) 서열번호 : 4; (b) 서열번호: 4 및 서열번호 : 5의 혼합물 ; (c) 서열번호 : 6; (d) 서열번호: 7; (e) 서열번호: 8; (f) 서열번호: 9; (g) 서열번호: 9 및 서열번호 : 10의 혼합물; (h) 서열번호: 11 ; (i) 서열번호: 12; (k) 서열번호 : 13; (l) 서열번호 : 14; (m) 서열번호 : 15; (n) 서열번호 : 16 ; 및 (o) 서열번호 : 28로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산을 갖는다. 다르게는, 본 발명의 백신 조성물의 바이러스양 입자의 재조합 단백질은 a) 박테리오파지 Qβ; b) 박테리오파지 R17; c) 박테리오파지 fr; d) 박테리오파지 GA; e) 박테리오파지 SP; f) 박테리오파지 MS2; g) 박테리오파지 M11; h) 박테리오파지 MX1 ; i) 박테리오파지 NL95; k) 박테리오파지 f2 ; l) 박테리오파지 PP7 ; m) 박테리오파지 AP25로 구성된 그룹으로부터 선택되는 RNA-판지의 뮤턴트 코트 단백질을 포함하거나, 다르게는 본질적으로는 구성되거나, 다르게는 구성된다.

바람직한 일면에서, RNA 과지의 뮤턴트 코트 단백질은 적어도 하나의 리신 잔기의 제거, 또는 치환에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형되었다. 또다른 바람직한 일면에서, RNA 과지의 뮤턴트 코트 단백질은 적어도 하나의 리신 잔기의 결실, 또는 삽입에 의한 적어도 하나의 리신 잔기의 첨가에 의해 변형된 것이다. 바람직한 일면으로, 바이러스양 입자는 RNA-과지 Qβ, 또는 다르게는 RNA-과지 fr, 또는 RNA-과지 AP205의 재조합 단백질 또는 그의 단편을 포함한다.

앞서 기술한 바와 같이, 본 발명은 바이러스양 입자 또는 그의 재조합 형태를 포함한다. 추가의 바람직한 일면에서, 본 발명의 조성물에서 사용되는 입자는 B형 간염 캡시드(코어) 단백질(HBcAg), HBcAg 단편으로 구성된다. 추가의 일례로, 본 발명의 조성물에서 사용되는 입자는 B형 간염 캡시드(코어) 단백질(HBcAg), HBcAg 단백질 단편으로 유리 시스테인 잔기를 제거하거나 그 갯수를 감소시키기 위하여 변형된다. Zhou 등(J. Virol. 66 : 5393-5398(1992)은 자연적으로 남아있는 시스테인 잔기가 제거되어 변형된 HBcAg는 캡시드와 결합하고 형성하는 능력을 보유하고 있다고 증명하였다. 따라서, 본 발명의 조성물에 사용하기에 VLPs는 자연적으로 남아있는 하나 이상의 시스테인 잔기가 결실되거나 또다른 아미노산 잔기(예: 세린 잔기)로 치환된 변형된 HBcAg, 또는 그의 단편을 포함하는 것을 포함한다.

HBcAg은 B형 간염 코어 항원 전구체 단백질을 프로세싱하여 형성된 단백질이다. 다수의 HBcAg 이소타입이 확인되었고 그의 아미노산 서열을 본 분야의 기술자는 이용하게 이용할 수 있다. 대부분의 경우, 본 발명의 조성물 및 백신 조성물 각각은 HBcAg의 프로세싱된 형태(즉, B형 간염 코어 항원 전구체 단백질의 N-말단 리더 서열이 제거된 HBcAg)를 사용하여 제조할 수 있다.

본 발명에 사용할 수 있는 바람직한 B형 간염 바이러스양 입자는 예를 들면, WO 00/32227, 특히 실시예 17 내지 19 및 21 내지 24, 및 WO 01/85208, 특히 실시예 17 내지 19, 21 내지 24, 31 및 41, 및 WO 02/56905에 기술되어 있다. 후자 출원의 경우에는 특히, 실시예 23, 24, 31 및 51에 기술되어 있다. 3개의 문서 모두 전체적으로 참고문헌으로서 인용된다.

본 발명은 또한 하나 이상의 추가의 시스테인 잔기를 결실시키거나 치환하여 변형된 HBcAg 변이체를 포함한다. 본 분야에서는 유리 시스테인 잔기가 다수의 화학적 부작용에 관여할 수 있다고 공지되어 있다. 이 부작용은 디설파이

드 교환, 예를 들면, 다른 물질과의 병용 요법에서 주사되거나 형성된 화학 물질 또는 대사물질과의 반응, 또는 직접적인 산화 및 UV 노출시 뉴클레오티드와의 반응을 포함한다. 특히, HBcAgs는 핵산에 결합하는 경향이 있다는 사실을 고려할 때 독소 첨가 물질이 형성될 수 있다. 따라서 개별적으로 낮은 농도로 존재할 수 있지만 함께인 경우에는 독성 수준에 도달할 수 있는 독소 첨가 물질은 다수의 종 사이에 분포할 수 있다.

상기와 관련하여, 변형시켜 자연발생적으로 남아있는 시스템인 잔기를 제거된 백신 조성물중 HBcAgs의 용도에 대한 잇점은 항원 또는 항원 결정기가 결합한 경우 독소 종류가 결합하는 부위가 양적으로 감소하거나 모두 제거된다는 점이다.

다수의 실시예 사용하기에 적절한 다수의 자연발생된 HBcAg 변이체가 확인되었다. Yuan 등(J. Virol. 73 : 10122-10128(1999))은 예를 들면, 서열번호: 22의 97번 위치에 상응하는 위치의 이소류신 잔기가 류신 잔기 또는 페닐알라닌 잔기로 대체된 변이체를 기술하였다. 다수의 HBcAg 변이체, 및 수개의 B형 간염 코어 항원 전구체 변이체의 아미노산 서열은 GenBank 리포트 AAF121240, AF121239, X85297, X02496, X85305, X85303, AF151735, X85259, X85286, X85260, X85317, X85298, AF043593, M20706, X85295, X80925, X85284, X85275, X72702, X85291, X65258, X85302, M32138, X85293, X85315, U95551, X85256, X85316, X85296, AB033559, X59795, X85299, X85307, X65257, X85311, X85301 (서열번호: 23), X85314, X85287, X85272, X85319, AB010289, X85285, AB010289, AF121242, M90520 (서열번호: 24), P03153, AF110999, 및 M95589 에 기술되어 있고 이들 각각은 전체적으로 참고문헌으로서 본 명세서에서 인용된다. 추가로 상기 언급된 B형 간염 코어 항원의 전구체 변이체의 서열은 WO 01/85208에서 서열번호: 89-138로 기술되어 있다. 이들 HBcAg 변이체는 서열번호: 77에서 위치 12,13, 21,22, 24,29, 32, 33,35, 38,40, 42,44, 45,49, 51,57, 58,59, 64,66, 67,69, 74,77, 80,81, 87,92, 93, 97,98, 100,103, 105, 106, 109,113, 116,121, 126,130, 133,135, 141,147, 149,157, 176,178, 182 및 183번에 위치하는 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는, 여러 위치의 아미노산 서열에서 상이하다. 추가로, 본 발명의 조성물에 사용하기 적절하고 본 명세서에 따라 추가로 변형될 수 있는 HBcAg 변이체는 WO 00/198333, WO 00/177158 및 WO 00/214478에 기술되어 있고, 이는 전체적으로 참고문헌으로서 본 명세서에서 인용된다.

상기 언급한 바와 같이, 프로세싱된 HBcAgs(즉, 리더 서열이 결합된 서열)를 본 발명의 조성물 및 백신 조성물에 사용할 것이다. 본 발명은 조성물, 및 이 조성물을 사용하는 방법을 포함하고, 이는 상기 기술한 변이체 HBcAg를 사용한다.

폴리펩티드의 아미노산 서열이 상기 야생형 아미노산 서열들중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 약 99% 일치하는 아미노산 서열, 또는 그의 하위부분을 갖는지는 Bestfit 프로그램과 같이 공지된 컴퓨터 프로그램을 통상적으로 사용하여 결정할 수 있다. 특정 서열이 본 발명에 따른 참고 아미노산 서열과 예를 들면, 약 95% 일치하는지 결정하기 위하여 Bestfit 또는 어느 다른 서열 배열(alignment) 프로그램을 사용하는 경우 파라미터를 세팅하여 일치도(%)를 전장의 참고 아미노산 서열에 대하여 계산하고 참고 아미노산 서열중 전체 아미노산 잔기의 5% 이하의 상동성의 차는 인정한다.

상기 언급한 HBcAg 변이체 및 전구체의 아미노산 서열은 서로서로 상대적으로 유사하다. 따라서, 서열번호 25중 특정 위치에 상응하는 위치에 존재하는 HBcAg 변이체의 아미노산 잔기에 대한 언급은 서열번호:25에 나타난 아미노산 서열중 그 위치에 존재하는 아미노산 잔기를 참고한다. 이들 HBcAg 변이체 사이의 상동성은 포유동물을 감염시키는 B형 간염 바이러스중에서 대체로 매우 높기 때문에 본 분야의 기술자는 서열번호:25에 나타난 아미노산 서열과 특정 HBcAg의 변이체의 것을 리뷰하고 "상응하는" 아미노산 잔기를 확인하는 것이 어렵지 않을 것이다. 추가로, 우드척을 감염시키는 바이러스로부터 유래된 HBcAg의 아미노산을 나타내는 서열번호: 24에 나타난 HBcAg 아미노산 서열은 서열번호 :25중 155번 아미노산 잔기 및 156번 아미노산 잔기 사이에 서열번호 : 23에 3개의 아미노산 잔기 인서트가 존재한다는 것이 자명한 서열번호 : 25에 나타난 아미노산 서열을 갖는 HBcAg과 충분히 상동성이다.

본 발명은 또한 가금류를 감염시키는 B형 간염 바이러스의 HBcAg 변이체를 포함하는 백신 조성물, 및 HBcAg 변이체의 단편을 포함하는 백신 조성물을 포함한다. 이들 HBcAg 변이체에 대하여 이 폴리펩티드에 자연발생적으로 존재하는 1개, 2개, 3개 이상의 시스템인 잔기는 본 발명의 백신 조성물에 포함되기 앞서 또다른 아미노산 잔기로 치환되거나 결실될 수 있다.

상기 기술한 바와 같이, 유리 시스템인 잔기를 제거하여 독소 성분이 HBcAg에 결합하는 부위, 동일하거나 이웃하는 HBcAg의 리신 및 시스템인 잔기의 가교-결합 부위의 수를 감소시킨다. 따라서, 본 발명의 또다른 일면에서, B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 하나 이상의 시스템인 잔기는 또다른 아미노산 잔기로 치환되거나 결실될 수 있다.

다른 일면에서, 본 발명의 조성물 및 백신 조성물은 각각 C-말단 부위 (예: 서열번호 : 25중 145-185번 또는 150-185번 아미노산 잔기)가 제거된 것으로부터의 HBcAgs를 포함할 것이다. 따라서, 본 발명의 실시예 사용하기 적절한 추가로 변형된 HBcAgs는 C-말단 절단 뮤턴트를 포함한다. 적절한 절단 뮤턴트는 C-말단으로부터 1, 5,10, 15,20, 25,30, 34, 35번 아미노산이 제거된 HBcAgs를 포함한다.

본 발명의 실시예 사용하기 적절한 추가로 변형된 HBcAgs는 N-말단 절단 뮤턴트를 포함한다. 적절한 절단 뮤턴트는 N-말단으로부터 1, 2,5, 7,9, 10,12, 14,15, 또는 17번 아미노산이 제거된 변형된 HBcAgs를 포함한다.

추가로 본 발명의 실시예 사용하기 적절한 추가로 변형된 HBcAgs는 N- 및 C- 말단 절단 뮤턴트를 포함한다. 적절한 절단 뮤턴트는 N-말단으로부터 1, 2,5, 7,9, 10,12, 14,15, 또는 17번 아미노산이 제거되고, C-말단으로부터 1, 5,10, 15,20, 25,30, 34, 35번 아미노산이 제거된 HBcAgs를 포함한다.

본 발명은 추가로 상기 기술한 절단 뮤턴트와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 일치하는 아미노산을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 단백질을 포함하는, 각각의 조성물 및 백신 조성물을 포함한다.

본 발명의 특정 일면에서 그렐린 또는 그렐린 펩티드가 HBcAg의 VLP에 결합하는 것을 매개하기 위하여 리신 잔기를 HBcAg 폴리펩티드내로 도입한다. 바람직한 일면에서, 본 발명의 조성물을 79번 및 80번에 상응하는 아미노산이 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly의 아미노산 서열을 갖는 펩티드(서열번호 33)로 대체하여 서열번호 26의 서열을 갖는 HBcAg 폴리펩티드로 형성하도록 변형된 서열번호: 25중 1-144번, 또는 1-149번, 1-185번 아미노산을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 HBcAg를 사용하여 제조한다. 추가의 바람직한 일면에서, 서열번호: 25중 48번 및 107번의 시스테인 잔기는 세린으로 돌연변이화된다. 본 발명은 추가로 상기 언급한 바와 같은 아미노산 변이(alteration)를 갖는 서열번호: 29-74중 어느 것에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 상응하는 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 포함한다. 캡시드 또는 VLP를 형성하기 위하여 결합할 수 있고 상기 언급한 바와 같은 아미노산 변이를 갖는 추가의 HBcAg 변이체가 본 발명의 범위내 추가로 포함된다. 따라서, 본 발명은 추가로 각각 야생형 아미노산 서열의 어느 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 일치하는 아미노산을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 폴리펩티드, 및 적절하게 N-말단 리더 서열이 제거되고 상기 언급한 변이로 변형된 이들 단백질 형태를 포함하는 조성물 및 백신 조성물을 포함한다.

본 발명의 조성물 및 백신 조성물은 상이한 HBcAg의 혼합물을 포함할 수 있다. 따라서, 백신 조성물은 아미노산 서열이 상이한 HBcAg로 구성될 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형된(예: 결실, 삽입 또는 치환) 변형된 HBcAg 및 "야생형" HBcAg를 포함하여 조성물 및 백신 조성물을 제조할 수 있다. 추가로, 본 발명의 바람직한 백신 조성물은 항원이 그렐린 또는 그렐린 펩티드인 고도로 정돈되고 반복적 항원 어레이를 제시하는 것이다.

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 적어도 하나의 공유 결합에 의해 코어 입자 및 바이러스양 입자에 각각 결합한다. 바람직하게, 비펩티드성 결합인 공유 결합에 의해 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 코어 입자 및 바이러스양 입자에 각각 결합하여 각각 코어 입자-그렐린 정돈되고 반복적 어레이 및 그렐린-VLP- 어레이 또는 -컨주게이트를 제공한다. 이 그렐린-VLP 어레이 및 컨주게이트 각각은 적어도 하나, 그러나 일반적으로 하나 이상의 그렐린 또는 그렐린 펩티드가 지향적(oriented) 방식으로 VLP에 결합하기 때문에 전형적으로 바람직하게는 반복적이고 정돈된 구조를 갖는다. 바람직하게, 120개 이상, 180개 이상, 바람직하게 270개 이상, 및 더욱 바람직하게 360개 이상의 그렐린 또는 그렐린 펩티드가 VLP에 결합한다. 각각의 반복적이고 정돈된 그렐린-VLP 어레이 및 컨주게이트 형성은 하기에서 명확시되는 바와 같이 지향적이고 규제되고(directed) 지정된 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린 펩티드와 VLP의 결합에 의해 확인한다. 추가로, VLPs의 전형적으로 고유한 반복적 체계의 구조는 유리하게 고도로 정돈되고 반복적 방식으로 각각 그렐린 또는 그렐린 펩티드 디스플레이에 의해 고도로 정돈되고 반복적인 그렐린-VLP 어레이 및 컨주게이트를 각각 형성한다.

따라서, 바람직한 본 발명의 컨주게이트 및 어레이는 각각 고도로 정돈된 구조, 크기, 및 어레이 표면상의 항원 반복성에 있어서 선행 컨주게이트와 상이하다. 추가로, 본 발명의 바람직한 일면에서 항원의 적절한 폴딩을 보장하는 발현 숙주에서 항원 및 입자 모두, 즉, 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린 펩티드, 및 VLP의 적절한 폴딩 및 어셈블리를 발현시킬 수 있다.

본 발명은 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 각각 코어 입자 및 VLPs에 결합시키는 방법을 개시한다. 언급한 바와 같이 본 발명의 일면에서 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 화학적 가교 결합에 의해, 전형적이고 바람직하게는 헤테로이작용기성 가교제를 사용하여 각각 코어 입자 및 VLP에 결합한다. 수개의 헤테로-이작용기성 가교제는 본 분야에 공지되어 있다. 일례로, 헤테로-이작용기성 가교제는 바람직하게 제 1결합부위, 즉, 코어 입자 및 VLP 또는 적어도 하나의 VLP 서브유닛 각각의 리신 잔기의 측쇄 아미노 그룹과 반응할 수 있는 작용 그룹, 및 추가로, 제 2 결합부위, 즉, 존재하거나, 환원 반응에 이용할 수 있도록 제조되거나, 그렐린 또는 그렐린 펩티드상에서 조작되고 임의로 환원 반응에 이용할 수 있도록 제조된 시스테인 잔기와 반응할 수 있는 작용 그룹을 포함한다. 소위 유도화로 불리는 공경의 첫번째 단계는 코어 입자 또는 VLP와 가교제의 반응이다. 이 반응 산물은 활성화된 캐리어라 불리는 활성화된 코어 입자 또는 활성화된 VLPs이다. 두번째 단계에서 반응하지 않은 가교제는 겔 효과 또는 투석과 같은 일반적인 방법을 사용하여 제거된다. 세번째 단계에서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 활성화된 캐리어와 반응하고, 이 단계는 전형적으로 커플링 단계로 명명된다. 반응하지 않은 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 임의로 네번째 단계에서 예를 들면 투석에 의해 제거될 수 있다. 수개의 헤테로-이작용기성 가교제가 본 분야에 공지되어 있다. 이는 가교제 SMPH(Pierce), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA 및 Pierce Chemical Company(Rockford, IL, USA)로부터 입수되고 아미노 그룹에 대하여 반응성인 하나의 작용 그룹 및 시스테인 잔기에 대하여 반응성인 하나의 작용 그룹을 갖는, 이용가능한 다른 가교제를 포함한다. 상기 언급한 가교제 모두 티오에테르 결합을 형성한다. 본 발명의 실시예에 적절한 다른 부류의 가교제는 커플링시 그렐린 또는 그렐린 펩티드 및 코어 입자 또는 VLP 사이에 디설파이드 결합을 도입하는 것을 특징으로 한다. 이 부류에 속하는 가교제는 예를 들면 SPDP 및 Sulfo-LC-SPDP(Pierce)를 포함한다. 가교제에 의한 코어 입자의 유도화 범위는 실험 조건, 예를 들면, 반응 파트너의 농도, 한 시약의 다른 것에 대한 초과량, pH, 온도 및 등장성을 달리하여 영향을 받을 수 있다. 커플링도, 즉 코어 입자 및 VLP 서브유닛당 그렐린 또는 그렐린 펩티드의 양 각각은 상기 기술한 실험 조건을 달리하여 백신의 필요조건에 일치하도록 조절할 수 있다. 그렐린 또는 그렐린 펩티드의 용해도가 각 서브유닛상에 커플링할 수 있는 그렐린 또는 그렐린 펩티드의 양을 제한할 수 있고, 수득한 백신이 불용성인 경우에는 서브유닛당 그렐린 또는 그렐린 펩티드의 양을 줄이는 것이 바람직하다.

그렐린 또는 그렐린 펩티드를 각각 코어 입자 및 VLP에 결합시키는 특히 바람직한 방법은 그렐린 또는 그렐린 펩티드상의 시스테인 잔기와 각각 코어 입자 및 VLP 표면상의 리신 잔기의 결합이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 일면, 제 1결합부위는 리신 잔기이고 제 2결합부위는 시스테인 잔기이다. 일례로, 제 2 결합부위 또는 그의 일부로서 시스테인 잔기를 포함하는 아미노산 링커를 각각의 코어 입자 및 VLP에 커플링하기 위한 그렐린 또는 그렐린 펩티드로 조작할 필요가 있다. 다르게는, 시스테인은 그렐린 또는 그렐린 펩티드내로 삽입 또는 돌연변이화에 의해 도입될 수 있다. 다르게는 시스테인 잔기 또는 티올 그룹은 화학적 커플링에 의해 도입될 수 있다.

항원 및 자기-항원 각각의 성질, 즉, 그렐린 또는 그렐린 펩티드의 성질, 그의 생화학적 특성, 예로서 pI, 전하 분포 및 당화에 따라 아미노산 링커를 선택할 것이다. 일반적으로, 가용성 아미노산 링커가 바람직하다. 아미노산 링커의 바람직한 예는 (a) CGG; (b) N-말단 감마 1-링커; (c) N-말단 감마 3-링커; (d) Ig 힌지(hinge) 부위; (e) N-말단 클리신 링커; (f)  $(G)_kC(G)_n$  ( $n=0-12$  및  $k=0-5$ ); (g) N-말단 클리신-세린 링커; (h)  $(G)_kC(G)_m(S)_l(GGGGS)_n$  ( $n=0-3$ ,  $k=0-5$ ,  $m=0-10$ ,  $l=0-2$ )(서열번호 35); (i) GGC; (k) GGC-NH<sub>2</sub>; (1) C-말단 감마 1-링커; (m) C-말단 감마 3-링커; (n) C-말단 클리신 링커; (o)  $(G)_nC(G)_k$  ( $n=0-12$  및  $k=0-5$ )(서열번호 36); (p) C-말단 클리신-세린 링커; (q)  $(G)_m(S)_l(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k$  ( $n=0-3$ ,  $k=0-5$ ,  $m=0-10$ ,  $l=0-2$ , 및  $o=0-8$ )(서열번호 37)으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

아미노산 링커의 바람직한 추가의 예는 모두 추가로 제 2 결합부위로서 시스테인 잔기 및 임의로 추가의 클리신 잔기를 포함하는 이류노글로불린의 힌지 부위, 클리신 세린 링커  $(GGGGS)_n$  (서열번호 38), 및 클리신 링커  $(G)_n$  이다. 아미노산 링커의 전형적으로 바람직한 예는 N-말단 감마 1: CGDKTHTSPP(서열번호 39); C-말단 감마 1: DKTHTSPPCG(서열번호 40); N-말단 감마 3: CGGPKSTPPGSSGGAP(서열번호 41); C-말단 감마 3: PKPSTPPGSSGGAPGGCG(서열번호 42); N-말단 클리신 링커: GCGGGG(서열번호 43); C-말단 클리신 링커: GGGGCG(서열번호 44); C-말단 클리신-리신 링커: GGKKG(서열번호 45); N-말단 클리신-리신 링커: CGKKG(서열번호 46)이다.

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 특히 항원이 그렐린인 경우, 펩티드의 C-말단의 GGCG(서열번호 47), GGC 또는 GGC-NH<sub>2</sub> ("NH<sub>2</sub>"는 아민화를 나타낸다) 링커 및 그의 N-말단의 CGG가 아미노산 링커로서 바람직하다. 일반적으로, 클리신 잔기는 거대한(bulky) 아미노산 및 시스테인 사이에 삽입되어 제 2 결합부위로 사용되어 커플링 반응에서 더욱 거대한 아미노산의 입체 방해의 가능성을 피할 수 있도록 한다.

그렐린 또는 그렐린 펩티드상에 존재하는 시스테인 잔기는 활성화된 VLP상의 헤테로이작용기성 가교제와 반응하기 위하여 환원상태로 존재하여야 하는, 즉 유리 시스테인 잔기이거나, 유리 설피하이드릴 그룹을 포함하는 시스테인 잔기가 이용가능하여야 한다. 결합부위로서 작용하는 시스테인 잔기가 산화된 형태인 경우 예를 들면, 디설피이드 브릿지를 형성한다면, 예로서, DTT, TCEP 또는 β-머캅토테탄올에 의한 디설피이드 브릿지의 환원이 요구된다.

상기 기술한 바람직한 방법에 따른 헤테로이작용기성 가교제를 사용한 그렐린 또는 그렐린 펩티드와 코어 입자 및 VLP 각각의 결합은 그렐린 또는 그렐린 펩티드가 코어 입자 및 VLP와 각각 지향적 방식으로 커플링할 수 있도록 한다. 그렐린 또는 그렐린 펩티드와 코어 입자 및 VLP 각각의 결합의 다른 방법은 그렐린 또는 그렐린 펩티드가 카보디이미드 EDC, 및 NHS를 사용하여 코어 입자 및 VLP 각각에 결합하는 방법을 포함한다. 또한, 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 우선 예를 들면, SATA, SATP 또는 이미노티올레인과 반응을 통해 티올화될 수 있다. 이어서 필요한 경우 탈보호화시킨 후 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 하기와 같이 코어 입자 및 VLP 각각에 커플링시킬 수 있다. 과량의 티올화제를 분리한 후 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 앞서 시스테인 반응 부위를 갖는 헤테로이작용기성 가교제로 활성화되어 상기 기술한 바와 같이 티올화된 그렐린 또는 그렐린 펩티드가 반응할 수 있는 시스테인 잔기에 대하여 반응성인 적어도 하나 또는 수개의 작용 그룹을 디스플레이하는 각각의 코어 입자 및 VLP와 반응시킨다. 임의로, 소량의 환원제가 반응 혼합물에 포함된다. 추가의 방법에서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 글루타탈데히드, DSG, BM[PEO]<sub>4</sub>, BS<sup>3</sup>, (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA)과 같은 호모-이작용성 가교제 또는 각각의 코어 입자 및 VLP의 아민 그룹 또는 카복실 그룹에 대하여 반응성인 작용 그룹을 갖는 다른 공지된 호모-이작용성 가교제를 사용하여 각각의 코어 입자 및 VLP에 결합한다.

VLP를 그렐린 또는 그렐린 펩티드에 결합시키는 또다른 방법은 각각 코어 입자 및 VLP를 바이오티닐화시키고, 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 스트렙타비딘-융합 단백질로서 나타내는 방법, 또는 예를 들면, WO 00/23955에 기술된 바와 같이 그렐린 또는 그렐린 펩티드 및 코어 입자 및 VLP 각각을 바이오티닐화시키는 방법을 포함한다. 이러한 경우, 유리 결합 부위는 다음 단계에서 첨가되는 각각의 코어 입자 및 VLP가 결합할 수 있도록 그렐린 또는 그렐린 펩티드 대 스트렙타비딘의 비를 조절하여 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 먼저 스트렙타비딘 또는 아비딘에 결합시킬 수 있다. 다르게는, 모든 성분을 '원 팻' 반응에서 혼합할 수 있다. 가용성 형태의 수용체 및 리간드가 이용가능하고, 각각 코어 입자 및 VLP, 또는 그렐린 또는 그렐린 펩티드에 가교-결합할 수 있는 다른 리간드-수용체 쌍을 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 각각 코어 입자 및 VLP에 결합시키기 위한 결합제로서 사용할 수 있다. 다르게는 리간드 또는 수용체 중 하나를 그렐린 또는 그렐린 펩티드에 융합시키고, 각각 수용체, 또는 리간드에 화학적으로 결합하거나 융합된 각각의 코어 입자 및 VLP에 결합하는 것을 매개할 수 있다. 융합은 또한 삽입 또는 치환에 의해 수행될 수 있다.

앞서 언급한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 일면에서, VLP는 RNA 패키지의 VLP이고, 더욱 바람직한 일면에서 VLP는 RNA 패키지 Qβ 코트 단백질의 VLP이다.

하나 또는 수개의 항원 분자, 즉, 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 바람직하게 입체적으로 허용되는 경우 RNA 패키지의 VLP의 노출된 리신 잔기를 통해 RNA 패키지 코트 단백질의 VLP 또는 캡시드의 하나의 서브유닛에 결합할 수 있다. RNA 패키지의 코트 단백질의 VLP 및 특히 Qβ 코트 단백질 VLP의 특이적인 성질은 서브유닛당 수개의 항원과 커플링할 수 있다는 것이다. 이로서 조밀한 항원 어레이를 형성할 수 있다.

본 발명의 바람직한 일면으로, 적어도 그렐린 또는 그렐린 펩티드와 각각의 코어 입자 및 바이러스양 입자의 결합 및 결합(attachment)은 각각 바이러스양 입자의 적어도 하나의 제 1 결합부위 및 항원 또는 항원 결정기의 적어도 하나의 제 2 결합부위 사이의 작용 및 결합 각각에 의한다..

Qβ 코트 단백질의 VLPs 또는 캡시드는 캡시드 내부로 향하고 RNA와 상호작용하는 3개의 리신 잔기, 및 캡시드 외부로 노출된 다른 4개의 리신 잔기를 갖는 제한된 토폴로지로서 그의 표면에 제한된 갯수의 리신 잔기를 디스플레이한다. 이러한 제한된 성질은 리신 잔기가 RNA와 상호작용하는 내부보다는 입자 외부가 항원과의 결합에 바람직

하다. 다른 RNA 파지의 VLPs는 또한 그의 표면상에 제한된 갯수의 리신 잔기를 갖고, 이들 잔기의 제한된 토폴로지를 갖는다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면에서, 제 1결합부위는 리신 잔기이고/거나 제 2결합부위는 설프하이드릴 그룹 또는 시스테인 잔기를 포함한다. 본 발명의 매우 바람직한 일면에서, 제 1결합부위는 리신 잔기이고 제 2결합부위는 시스테인 잔기이다.

본 발명의 매우 바람직한 일면에서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 그렐린 또는 그렐린 펩티드상에 자연발생적으로 존재하거나 조작된 시스테인 잔기를 통해 RNA 파지 코트 단백질의 VLP, 및 특히 Q $\beta$  코트 단백질의 VLP의 리신 잔기에 결합한다.

RNA 파지로부터 유래된 VLPs의 또다른 잇점은 적절한 비용으로 대량의 물질을 생산케하는 박테리아에서의 고발현율이다.

언급한 바와 같이, 본 발명의 컨쥬게이트 및 어레이는 각각 고도로 정돈된 구조, 크기, 및 어레이 표면상의 항원 반복성에 있어서 선행 컨쥬게이트와 상이하다. 또한, 캐리어로서 VLP를 사용하므로써 항원 밀도가 다양한 강력한 항원 어레이 및 컨쥬게이트 각각을 형성할 수 있다. 특히, RNA 파지의 VLP의 사용, 및 특히 RNA 파지 Q $\beta$  코트 단백질의 VLP의 사용으로 고밀도의 에피토프를 수득할 수 있다. 고밀도의 에피토프를 포함하는 RNA 파지 코트 단백질의 VLPs 조성물의 제조는 본 출원의 교시를 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일면으로 그렐린 펩티드가 바람직하게 RNA 파지 Q $\beta$  코트 단백질의 VLP에 커플링될 때 서브유닛당 그렐린 펩티드의 평균 갯수는 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 이상 이 바람직하다.

본 명세서에 정의된 바 제 2결합하는 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연발생적 또는 비자연발생적으로 존재할 수 있다. 항원 또는 항원 결정기상에 적절한 자연발생된 제 2결합부위가 존재하지 않는 경우, 비자연발생된 제 2결합부위가 항원에 설계된다.

상기 기술한 바와 같이, 4개의 리신 잔기는 Q $\beta$  코트 단백질의 VLP 표면상에 노출되어 있다. 전형적으로 이들 잔기는 가교제 분자와의 반응시 유도체화된다. 일례로 모든 노출된 리신 잔기가 항원과 커플링할 수 없는 경우, 가교제와 반응한 리신 잔기는 유도체화 단계후  $\epsilon$ -아미노 그룹에 결합된 가교제 분자와 함께 남아있다. 이는 하나 또는 수개의 양전하를 소멸시키고, 이는 VLP의 가용성 및 안정성에 유해할 수 있다. 하기 기술하는 Q $\beta$  코트 단백질 뮤턴트에서와 같이 일부의 리신 잔기를 아르기닌으로 대체하여 아르기닌 잔기는 가교제와 반응하지 않기 때문에 양전하가 소멸되는 것을 막았다. 또한, 리신 잔기를 아르기닌으로 대체하여 항체 반응에 대하여 보다 소수의 부위가 이용가능하기 때문에 더욱 한정된 항원 어레이를 제공할 수 있다.

따라서, 본 출원에서 기술하는 하기 Q $\beta$  코트 단백질 뮤턴트 및 뮤턴트 Q $\beta$  VLPs에서 노출된 리신 잔기를 아르기닌으로 대체하였다: Q $\beta$ -240 (Lys13-Arg; 서열번호 : 17), Q $\beta$ -250 (Lys 2-Arg, Lys13-Arg ; 서열번호 : 19) 및 Q $\beta$ -259 (Lys 2-Arg, Lys16-Arg ; 서열번호 : 21). 작제물을 클로닝하고 단백질을 발현시키고 VLPs를 정제하고 펩티드 및 단백질 항원과 커플링에 사용하였다. Q $\beta$ -251 ; (서열번호: 20) 또한 작제하고 Q $\beta$ -251 코트 단백질의 VLP를 발현시키고, 정제하고 커플링하는 방법에 대한 가이드는 본 출원을 통해 알 수 있다.

추가 일면으로, 본 발명자는 더욱 고밀도의 항원 어레이 수득에 적절한 추가로 하나의 리신 잔기를 포함하는 Q $\beta$  뮤턴트 코트 단백질을 기술한다. 이 뮤턴트 Q $\beta$  코트 단백질, Q $\beta$ -243 (Asn 10-Lys; 서열번호: 18)를 클로닝하고, 단백질을 발현시키고 캡시드 또는 VLP를 분리하고 정제하여 추가의 리신 잔기 도입이 캡시드 또는 VLP와 서브유닛의 자기-어셈블리에 적합하다는 것을 나타내었다. 따라서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드 어레이 및 컨쥬게이트 각각을 Q $\beta$  코트 단백질 뮤턴트의 VLP를 사용하여 제조할 수 있다. 특히 항원과 VLPs, 특히 RNA 파지 코트 단백질의 VLP를 결합시키는 바람직한 방법은 항원, 즉 그렐린 또는 그렐린 펩티드상에 자연발생적으로 존재하거나 조작된 시스테인 잔기와 RNA 파지 코트 단백질의 VLP 표면상에 존재하는 리신 잔기에 결합이다. 시스테인 잔기에 대하여 제 2결합부위로서 유효하게 하기 위하여, 설프하이드릴 그룹을 커플링에 이용할 수 있어야 한다. 따라서, 시스테인 잔기는 환원 상태로, 즉, 유리 시스테인 또는 유리 설프하이드릴 그룹과의 시스테인 잔기가 이용가능하여야 한다. 제 2결합부위로서 작용하는 시스테인 잔기가 산화된 형태인 경우, 예를 들면, 디설파이드 브릿지를 형성한다면, 예로서, DTT, TCEP 또는  $\beta$ -머캅노에탄올을 사용하여 디설파이드 브릿지의 환원이 필요하다. 환원제 농도, 및 항원에 대한 환원제의 과량의 몰수는 각 항원에 대하여 조절하여야 한다. 10 $\mu$ M 이하의 저농도로부터 시작하여 10 내지 20 mM 이상의 환원제의 적정 범위를 필요하다면 시험하고, 항원과 캐리어의 커플링을 분석하였다. WO 02/056905에 기술된 바와 같이 저농도의 환원제가 커플링 반응에 적절하지만, 본 분야의 기술자는 알고 있는 바, 이러한 경우 환원제를 투석 또는 겔 여과에 의해 제거하여야 한다. 이롭게는, 투석 또는 평형 완충액의 pH는 7 미만, 바람직하게 6이다. 낮은 pH 완충액과 항원 활성 또는 안정성과의 적합성은 시험되어야 한다.

RNA 파지 코트 단백질의 VLP상의 에피토프 밀도는 가교제 및 다른 반응 조건의 선택에 따라 조절될 수 있다. 예를 들면, 가교제 Sulfo-GMBS 및 SMPH를 통해 전형적으로 고밀도의 에피토프를 얻을 수 있다. 유도체화는 고농도의 환원제에 의해 바람직하게 영향을 받고, 환원 조건의 조작을 통해 RNA 파지 코트 단백질의 VLP, 및 특히 Q $\beta$  코트 단백질의 VLP에 커플링하는 항원의 수를 조절할 수 있다.

비자연발생적인 제 2결합부위를 디자인하기 앞서, 융합, 삽입, 또는 유전적으로 조작되어야 하는 위치를 선택하여야 한다. 따라서, 제 2결합부위의 위치는 제 2결합부위 또는 동일한 것을 포함하는 어느 아미노산 링커로부터 입체방해를 피할 수 있도록 선택되어야 한다. 추가 일면으로, 자기-항원과 그의 자연발생된 리간드의 상호작용 부위와 상이한 부위에 지정된 항체 반응이 바람직하다. 이 일례에서, 제 2결합부위는 자기-항원과 그의 자연발생된 리간드의 상호작용에 대한 항체 생산을 막도록 선정될 수 있다.

가장 바람직한 일면에서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 각각의 코어 입자 및 VLPs 또는 VLP 서브유닛상의 제 1 결합부위와 결합할 수 있는 단일 제 2 결합부위 또는 단일 반응 결합부위를 포함한다. 이는 적어도 하나의, 전형적으로는 하나 이상, 바람직하게 10, 20, 40, 80, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 400, 450개 이상의 항원과 각각의 코어 입자 및 VLP의 한정되고 균일한 결합 및 결합(association) 각각을 확실히 한다. 항원상에 단일 제 2 결합부위 또는 단일 반응 결합부위를 제공하여 단일의 균일한 형태의 결합 및 결합(association) 각각을 확실히 하여 매우 고도로 정돈되고 반복적 어레이. 예를 들면, 리신-(제 1 결합부위) 및 시스테인-(제 2 결합부위) 상호작용에 의해 결합 및 결합(association) 각각이 수행된 경우, 본 발명의 바람직한 일면에 따라 항원상에 존재하는 시스테인 잔기가 자연발생 또는 비자연발생인 것과 상관없이 항원 하나당 단지 하나의 시스테인 잔기가 VLP 및 코어 입자의 제 1 결합부위 각각을 결합 및 결합(association) 시킬 수 있다는 것이 확인된다.

일례로, 항원상의 제 2 결합부위의 조작용이 본 발명의 개시에 따른 제 2 결합부위로서 적절한 아미노산을 포함하는 아미노산 링커의 용합을 요구한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 일면으로, 아미노산 링커는 적어도 하나의 공유 결합을 통해 항원 또는 항원 결정기에 결합한다. 바람직하게, 아미노산 링커는 제 2 결합부위를 포함하거나, 다르게는 구성된다 추가의 바람직한 일면에서 아미노산 링커는 설포하이드릴 그룹 또는 시스테인 잔기이다. 또다른 바람직한 일면으로, 아미노산 링커는 시스테인이다. 아미노산 링커 선정의 기준 및 본 발명에 따른 추가의 바람직한 아미노산 링커 일례는 이미 상기 언급한 바 있다.

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기, 즉, 그렐린 또는 그렐린 펩티드 어레이는 각각의 코어 입자 및 바이러스양 입자에 용합된다, 상기 요약한 바와 같이 VLP는 전형적으로 VLP내로 어셈블리하는 적어도 하나의 서브유닛으로 구성된다. 따라서, 다시 본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 항원 또는 항원 결정기, 바람직하게 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 바이러스양 입자 또는 키메라성 VLP-서브유닛-그렐린 또는 그렐린 펩티드 용합을 형성하는 VLP내로 혼입될 수 있는 단백질의 적어도 하나의 서브유닛으로 용합된다.

그렐린 또는 그렐린 펩티드 용합은 VLP 서브유닛 서열내로 삽입, 또는 VLP-서브유닛 또는 VLP내로 혼입될 수 있는 단백질의 N- 또는 C- 말단에 용합에 의해 수행될 수 있다. 이하, VLP 서브유닛으로의 펩티드의 용합 단백질을 언급할 때 서브유닛 서열의 말단 또는 서브유닛 서열내 펩티드의 내부 삽입에 대한 용합을 포함한다.

용합은 또한 그렐린 또는 그렐린 펩티드 서열을 절단 뮤턴트로도 불리우는 서브 유닛 서열 일부가 결실된 VLP 변이체내로 삽입시켜 수행될 수 있다. 절단 뮤턴트는 VLP 서브유닛 서열중 일부가 N- 또는 C-말단, 또는 내부 결실된 것일 수 있다. 예를 들면, 79 내지 81번의 아미노산 잔기가 결실된 특정 VLP HBCAg는 내부 결실된 절단 뮤턴트이다. 그렐린 또는 그렐린 펩티드와 N- 또는 C- 말단의 절단 뮤턴트 VLP-서브유닛 용합은 본 발명의 일면을 제공한다. 또한, 에피토프와 VLP 서브유닛의 서열의 용합은 또한 예를 들면, 아미노산 79-81이 외래 에피토프로 대체된 특정 VLP HBCAg의 경우 치환체 의해 수행될 수 있다. 따라서, 이하 언급되는 바 용합은 VLP 서브유닛 서열내 그렐린 또는 그렐린 펩티드 서열 삽입, 그렐린 또는 그렐린 펩티드 서열로 VLP 서브유닛 서열 일부 치환, 또는 결실, 치환 또는 삽입의 조합에 의해 수행될 수 있다.

일반적으로 키메라성 그렐린 또는 그렐린 펩티드-VLP 서브유닛은 VLP내로 자가-어셈블리할 수 있다. 그의 서브유닛에 용합된 에피토프를 디스플레이하는 VLP를 본 명세서에서 키메라성 VLPs로서 언급한다. 언급한 바와 같이, 바이러스양 입자는 적어도 하나의 VLP 서브유닛을 포함하거나, 다르게는 상기로 구성된다. 본 발명의 추가의 일면으로, 바이러스양 입자는 키메라성 VLP 서브유닛 및 비키메라성 VLP 서브유닛, 즉, 그에 용합된 항원을 갖지 않는 VLP 서브유닛의 혼합물을 포함하거나, 다르게는 상기로 구성되어, 소위 모자이크 입자를 제공한다. 이는 VLP와의 어셈블리 형성을 확실히 하는 잇점이 될 수 있다. 일면에서, 키메라성 VLP-서브유닛의 비율은 1,2, 5,10, 20,30, 40,50, 60,70, 80,90, 95% 이상일 수 있다.

측면에 위치하는 아미노산 잔기를 VLP 서브유닛의 서열 말단중 어느 쪽에 용합되는 펩티드 또는 에피토프 서열 중 어느 쪽에 가할 수 있거나, VLP 서브유닛 서열내로 상기 펩티드 서열을 내부 삽입시킬 수 있다. 글리신 및 세린 잔기는 용합되는 그렐린 또는 그렐린 펩티드에 가해지는 측면에 위치하는 서열내에서 사용되는 특히 바람직한 아미노산이다. 글리신 잔기는 추가로 가요성을 제공하여 VLP 서브유닛 서열내로 외래 서열을 용합시키는 잠재적인 탈안정화 효과를 감소시킬 수 있다.

본 발명의 특정 일면에서, VLP는 B형 간염 코어 항원 VLP이다. HBCAg의 N-말단으로의 용합 단백질(Neyrinck, S. et al., Nature Med. 5 : 1157-1163 (1999)) 또는 주 면역우성 부위(major immunodominant region)(MIR)내 삽입이 기술되어 있고(Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44 : 98-114 (2001), WO 01/98333), 이는 본 발명의 바람직한 일례이다. MIR내 결실을 갖는 자연발생된 HBCAg의 변이체 또한 기술되어 있고(Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44 : 98-114 (2001) 전체적으로 참고문헌으로서 인용된다), N- 또는 C-말단으로의 용합, 및 wt HBCAg와 비교하여 결실 부위에 상응하는 위치에서의 삽입 또한 본 발명의 추가의 일례이다. C-말단으로의 용합 또한 기술되어 있다(Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44 : 98-114 (2001)). 본 분야의 기술자는 고전적인 분자 생물학적 기술을 사용하여 용합 단백질을 작제하는 방법에 관한 가이드스를 용이하게 찾을 수 있을 것이다(Sambrook, J. et al., eds., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), Ho et al., 유전자 77 : 51 (1989)). HBCAg 및 HBCAg 용합 단백질을 코딩하고 HBCAg 및 HBCAg 용합 단백질 발현에 유용한 벡터 및 플라스미드가 기술되어 있고(Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44: 98-114 (2001), Neyrinck, S. et al., Nature Med. 5 : 1157-1163 (1999)) 본 발명에 실시예에 사용될 수 있다. 본 발명자는 또한 한 예로서 (실시예 6), 에피토프를 HBCAg의 MIR에 삽입하여 HBCAg를 키메라성 자기-어셈블리하는 것을 기술한다. 자기-어셈블리 및 HBCAg의 MIR내 삽입된 에피토프를 디스플레이하는 효능을 최적화하는 중요한 인자는 삽입 위치 및 삽입시 MIR내 HBCAg 서열로부터 결실된 아미노산의 수(Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44 : 98-114 (2001); EP 421'635; US 6'231'864), 또는 다시 말하면, 새 에피토프로 치환되는 HBCAg로부터의 아미노산의 수의 선택이다. 예를 들면, 외래 에피토프에 의한 76-80,79-81, 79-80, 75-85 또는 80-81번 HBCAg 아미노산 치환이 기술되어 있다(Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44 : 98-114 (2001); EP0421635; US 6'231'864). HBCAg는 캡시드 어셈블리에 필수적인 것은 아니며 핵산을 결합시킬 수 있는(Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44 : 98-114 (2001)) 장쇄의 아르기닌

테일을 포함한다(Pumpens, P. and Grens, E., Intervirology 44 : 98-114 (2001)). 이 아르기닌을 포함하거나 결여되어 있는 HBcAg 모두 본 발명의 일면이다.

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, VLP는 RNA 파지의 VLP이다. 박테리아, 특히, E. coli에서 발현될 때 RNA 파지의 주요 코트 단백질은 자발적으로 VLPs로 어셈블리한다. 본 발명의 조성물을 제조하기 위하여 사용될 수 있는 박테리오파지 코트 단백질의 특정 일례는 박테리오파지 Q $\beta$  (서열번호 : 4; PIR 데이터베이스, 수탁번호, VCBPQ $\beta$  Q $\beta$  CP로도 언급, 및 서열번호: 11; 수탁번호 AAA16663, Q $\beta$  A1 단백질로도 언급함) 및 박테리오파지 fr (서열번호 : 4; PIR 수탁번호 VCBPFR)과 같은 RNA 박테리오파지의 박테리오파지 코트 단백질을 포함한다.

더욱 바람직한 일면에서, 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린 펩티드가 Q $\beta$  코트 단백질에 융합된다. 에피토프가 절단된 형태의 Q $\beta$ 의 A1 단백질의 C-말단에 융합되었거나, A1 단백질내 삽입된 융합 단백질이 기술되어 있다 (Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology, 39 : 9-15 (1996)). A1은 UGA 종결 코돈에서의 억제에 의해 형성되고 길이는 329 aa, 또는 N-말단 메티오닌의 절단을 고려하면 328aa이다. 알라닌(Q $\beta$  CP 유전자에 의해 코딩되는 두번째 아미노산) 앞의 N-말단 메티오닌은 통상 E. coli에서 절단되고, 이는 Q $\beta$  코트 단백질 CP의 N-말단의 경우이다. A1 유전자의 일부인, UGA 오프 코돈의 3'은 CP 신장부(extension)를 코딩하고, 길이는 195 아미노산이다. CP 신장부중 위치 72번 및 73번 사이에 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 삽입하여 본 발명의 추가의 일면을 제공한다(Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9-15 (1996)). C-말단 절단된 Q $\beta$  A1 단백질의 C-말단에 그렐린 또는 그렐린 펩티드의 융합은 본 발명의 추가의 일면을 제공한다. 예를 들면, Kozlovskaya 등은 (Intervirology, 39 : 9-15 (1996)) 19번 위치가 절단된 Q $\beta$  CP 신장부의 C-말단에 에피토프가 융합된 Q $\beta$  A1 단백질 융합을 기술하였다.

Kozlovskaya 등(Intervirology, 39 : 9-15 (1996))에 의해 기술된 바와 같이, 융합된 에피토프를 디스플레이하는 입자의 어셈블리는 모자이크 입자를 형성하기 위하여 전형적으로 A1 단백질-그렐린 또는 그렐린 펩티드 융합 및 wt CP 존재를 필요로 한다. 그러나, embodiments comprising 바이러스양 입자, 및 특히 그에 융합된 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 갖는 VLP 서브유닛으로만 구성된 RNA 파지 Q $\beta$  코트 단백질의 VLPs를 포함하는 일면이 본 발명의 범주내 포함된다.

모자이크 입자의 생산은 다수의 방법으로 수행될 수 있다. Kozlovskaya 등[Intervirology, 39 : 9-15 (1996)]은 2개의 방법을 기술하였고, 이 모두 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 첫번째 접근법에서, 융합된 에피토프를 VLPs상에 효율적으로 디스플레이하는 것은 UGA 코돈을 Trp로 해독하는 클로닝된 UGA 억제자 tRNA를 코딩하는 플라스미드(pISM3001 플라스미드 (SM11ey B. K., et al., 유전자 134 : 33-40 (1993)))를 수반하는 E. coli 균주내 CP 및 CP 신장부 사이의 UGA 종결 코돈을 갖는 Q $\beta$  A1 단백질 융합을 코딩하는 플라스미드 발현에 의해 매개된다. 다른 접근법에서, CP 유전자 종결 코돈을 UAA로 변형시키고 A1 단백질-그렐린 또는 그렐린 펩티드 융합을 발현시키는 두번째 플라스미드를 함께 형질전환시킨다. 두번째 플라스미드는 상이한 항생제 내성을 코딩하고, 복제 기점은 첫번째 플라스미드와 호환성(compatible)이다(Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39 : 9-15 (1996)). 세번째 접근법에서, CP 및 A1 단백질-그렐린 또는 그렐린 펩티드 융합은 Kozlovskaya 등[Intervirology, 39 : 9-15 (1996)]에 의한 도 1에 기술된 바와 같이 프로모터, 예로서 Trp 프로모터 작동가능하게 연결되어 바이시스트론 방식으로 코딩된다.

추가의 일면으로, 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 fr CP의 2번 및 3번 아미노산(절단된 CP 번호, 즉, N-말단 메티오닌이 절단됨) 사이에 삽입되어 그렐린 또는 그렐린 펩티드-fr CP 융합 단백질을 제공한다. 본 발명의 실시예에 유용하고 VLP로 자기 어셈블리하는 fr CP 융합 단백질의 작제 및 발현을 위한 벡터 및 발현 시스템이 기술되어 있다 (Pushko P. et al., Prot. Eng. 6 : 883-891 (1993)). 특정 일면에서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드 서열은 2번 아미노산 다음(여기에서, fr CP의 3번 및 4번 잔기가 결실됨)의 fr CP의 결실 변이체내로 삽입된다(Pushko P. et al., Prot. Eng. 6 : 883-891 (1993)).

RNA 파지 MS-2의 코트 단백질의 N-말단의 돌출된  $\beta$ -헤어핀내 에피토프 융합 및 연속하여 RNA 파지 MS-2의 자기-어셈블리된 VLP상의 융합된 에피토프 제시 또한 기술되어 있고(WO 92/13081), RNA 파지 MS-2의 코트 단백질내 삽입 또는 치환에 의한 그렐린 또는 그렐린 펩티드의 융합도 본 발명의 범위내 포함된다.

본 발명의 또다른 일면으로, 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 유두종 바이러스의 캡시드 단백질에 융합된다. 더욱 특정 일면으로, 그렐린 또는 그렐린 펩티드는 1형 소 유두종 바이러스(BPV-1)의 주요 캡시드 단백질 L1에 융합된다. 바쿨로바이러스/곤충에서 BPV-1 융합 단백질을 작제 및 발현시키기 위한 벡터 및 발현 시스템이 기술되어 있다 (Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 2373-2378 (1999), WO 00/23955). BPV-1 L1중 130-136번 아미노산을 그렐린 또는 그렐린 펩티드로 치환하여 BPV-1 L1-그렐린 또는 그렐린 펩티드 융합 단백질을 제공하고, 이는 본 발명의 바람직한 일면이다. 바쿨로바이러스 벡터에서의 클로닝 및 바쿨로바이러스 감염 Sf9 세포에서의 발현이 기술되어 있고, 이는 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다(Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 2373-2378 (1999), WO 00/23955). 융합된 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 디스플레이하는 어셈블리된 입자의 정제는 다양한 방법, 예를 들면, 겔 여과 또는 수크로오스 구배 초원심분리에 의해 수행될 수 있다 (Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 2373-2378 (1999), WO 00/23955).

본 발명의 추가의 일면으로, 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 Ty VLP내로 혼입될 수 있는 Ty 단백질에 융합시킨다. 특정 구체적인 일면에서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 are fused to the p1 또는 TYA 유전자에 의해 코딩되는 캡시드 단백질에 융합시킨다(Roth, J. F., Yeast 16 : 785-795 (2000)). 효모 레트로트랜스포존 Ty1, 2,3 및 4는 사카로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 분리된 반면, 레트로트랜스포존 Tf1은 스킴조사카로미세스 폼바에(*Schizosaccharomyces Pombe*)로부터 분리된다(Boeke, J. D. and Sandmeyer, S. B., "Yeast Transposable elements," in The molecular and cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces* : Genome dynamics, Protein Synthesis, and Energetics., p. 193, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1991)). 레트로트랜스포존 Ty1 및 2는 식물 및 동물 구성 요소중 *copia* 클래스와 관련되는 반면, Ty3은 식물 및 동물 레트로바이러스와 관련된 레트로트랜스포존의 *gypsy* 패밀리에 속한다. Ty1 레트로트랜스포존에서, Gag 또는 캡시드 단백질

로 언급되는 p1 단백질의 길이는 440 아미노산이다. P1은 VLP의 성숙동안 408번 위치에서 절단되어 VLP의 필수 성분인 p2 단백질을 가져온다.

효모에서 p1로의 융합 단백질 및 상기 융합 단백질의 발현을 위한 벡터가 기술되어 있다(Adams, S. E., et al., Nature 329 : 68-70(1987)). 예를 들면, pMA5620 플라스미드의 BamH1 위치내로 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 코딩하는 서열을 삽입하여 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 p1에 융합시킬 수 있다(Adams, S. E., et al., Nature 329 : 68-70(1987)). 외부 에피토프를 코딩하는 서열을 pMA5620 벡터내로 클로닝하여 외부 에피토프의 N-말단에 대하여 C-말단으로(terminally) 융합된 Ty1-15의 p1중 아미노산 1-381을 포함하는 융합 단백질이 발현된다. 유사하게 그렐린 또는 그렐린 펩티드 부위의 N-말단 융합, 또는 p1 서열로의 내부 삽입, 또는 p1 서열 일부 치환 또한 본 발명의 범위내 포함된다. 특히, Ty 단백질 p1중 30-31번, 67- 68번, 113-114번 및 132-133번 아미노산 사이의 Ty 서열내로 그렐린 또는 그렐린 펩티드 부위를 삽입하는 것이(EP0677111) 본 발명의 바람직한 일례이다.

그렐린 또는 그렐린 펩티드 부위의 융합에 적절한 추가의 VLP는 예를 들면 레트로바이러스양-입자(W09630523), HIV2 Gag(Kang, Y. C., et al, Biol. Chem. 380 : 353-364(1999)), Cowpea Mosaic 바이러스(Taylor, K. M. et al., Biol. Chem. 380 : 387-392(1999)), 파르보바이러스(parvovirus) VP2 VLP(Rueda, P. et al., Virology 263 : 89-99(1999)), HBsAg(US 4,722, 840, EP0020416B1)이다.

본 발명의 실시예에 적절한 키메라성 VLP의 예는 Intervirology 39 : 1(1996)에 기술되어 있다. 본 발명에서 사용되는 것으로 주시되는 추가의 VLP는 예로서: HPV-1, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-45, CRPV, COPV, HIV GAG, Tobacco Mosaic Virus이다. SV- 40, 폴리오마바이러스, 아데노바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 로타바이러스 및 노르윙크 바이러스의 바이러스양 입자이 제조되고, 이들 VLP의 키메라성 VLP도 본 발명의 범위내 포함된다.

본 발명의 바람직한 추가의 일면에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린 펩티드이다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로 항원 또는 항원 결정기는 a) 인간 그렐린; b) 고양이 그렐린 ; c) 개 그렐린 ; d) 소 그렐린; e) 양 그렐린 ; f) 말 그렐린 g) 돼지 그렐린 ; h) a)-g)의 어느 그렐린의 펩티드 또는 그의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로 항원 또는 항원 결정기는

- (a) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:48)
- (b) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:31)
- (c) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:49)
- (d) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:50)
- (e) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:32)

GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:51)

KKPPAKLQPR (서열번호:52)

PPAKLQPR (서열번호:53)

AKLQPR (서열번호:54)

GSSFLSPEHQ (서열번호:55)

EHQRVQQRKE (서열번호:56)

EHQRVQQRKES (서열번호:111)

EHQKAQQRKE (서열번호:112)

EHQKAQQRKES (서열번호:113)

EHQKLQQRKE (서열번호:114)

EHQKLQQRKES (서열번호:115)

LSPEHQRVQQ (서열번호:116)

LSPEHQKAQQ (서열번호:117)

(s) LSPEHQKLQQ (서열번호:118)

로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로 항원 또는 항원 결정기는 각각 인간, 고양이, 돼지, 말, 양, 소, 기니아 피그, 개 또는 마우스 그렐린 및 그렐린 펩티드이다. 각각의 그렐린 및 그렐린 펩티드는 강력한 프로모터의 조절하에 그렐린 및 그렐린 펩티드를 코딩하는 DNA의 발현을 통해 제조될 수 있다. 바람직하게, DNA는 프래프로그렐린 및 활성 n-옥타노일-변형된 펩티드의 펩티드 백본을 코딩한다. 그의 다양한 예가 문헌에 기술되어 있고, 가능하게는 바람직한 종의 그렐린을 발현시키기 위하여 변형시킨 후 사용될 수 있다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린-유도 펩티드 또는 그의 단편이다. 바람직하게, 그렐린 펩티드는 a) 인간 그렐린 펩티드 ; b) 소 그렐린 펩티드; c) 고양이 그렐린 펩티드 ; d) 개 그렐린 펩티드 e) 돼지 그렐린 펩티드; f) 닭 그렐린 펩티드 ; g) 마우스 그렐린 펩티드; h) 말 그렐린 펩티드 ; 및 i) 양 그렐린 및 j) a)-i)의 어느 그렐린 펩티드의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

그렐린 펩티드 또는 그의 단편은 관심의 대상이 되는 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 PCR에 의해 증폭시키고 융합체로서 폴리펩티드 태그, 예로서 히스티딘 태그, Flag 태그, myc 태그 또는 항체의 불변 부위(Fc 부위)에 클로닝하는 표준 분자생물학 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 그렐린 단편 및 태그 사이에 엔테로키나제 절단 부위를 도입하여 엔테로키나제로 분해하여 정제시킨 후 그렐린 단편을 태그로부터 분리할 수 있다. 다른 접근법으로 본 분야의 기술자에게 공지되어 있는 표준 펩티드 합성 반응을 사용하여 n-옥타노일-변형을 포함하거나 포함하지 않고 시험관내에서 그렐린 단편을 합성할 수 있다. 추가의 접근법에서, 모두 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있는 전장 그렐린의 단백질분해효소 분해 또는 화학적 절단에 의해 그렐린 단편을 제조할 수 있다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로 그렐린 펩티드는 그렐린중 적어도 하나의 항원 부위를 포함한다. 모두 본 분야의 기술자는 각각 상응하는 펩티드 및 아미노산 서열을 확인하는 방법을 알고 있다. 바람직한 단편은 그렐린의 N 또는 C 말단을 포함한다. 변형되지 않은 형태에 특이적이 항체의 결합을 방해할 수 있는 n-옥타노일-변형은 N-말단에 근접하여 위치하고 있기 때문에 C-말단이 특히 유용할 수 있다.

바람직한 인간 그렐린 펩티드는 하기를 포함한다:

**KKPPAKLQPR** (서열번호:52)

**PPAKLQPR** (서열번호:53)

**AKLQPR** (서열번호:54)

**KLQPR** (서열번호:59)

**GSSFLSPEHQ** (서열번호:55)

**EHQRVQQRKES** (서열번호:111)

**LSPEHQRVVQ** (서열번호:116)

**GSSFLSP** (서열번호:119)

그러나, 그렐린 내부 영역으로부터의 펩티드 또한 백신을 위한 관심의 대상이 되는 후보물질일 수 있다. 다양한 종의 그렐린은 고도로 상동성이기 때문에, 교차-반응성 항체 반응을 유도할 수 있을 것이다. 따라서, 개 또는 마우스 그렐린에 대한 항체 반응은 또한 인간 그렐린을 인식할 수 있고, 그 반대로 성립할 수 있다. 인간 그렐린에 대하여 80% 이상, 바람직하게 85% 이상, 더욱 바람직하게 90% 이상, 또는 더더욱 바람직하게 95%, 97% 또는 더욱더 99% 이상의 아미노산 일치도를 갖는 모든 그렐린 분자 및 그의 유도된 펩티드가 백신용으로서 사용될 수 있음이 본 발명의 범주내 포함된다.

특히, 바이러스양 입자에 결합시키기 위한 인간 그렐린 또는 그렐린 펩티드의 변형 방법에 대한 가이드는 본 명세서를 통해 제공한다. 바람직하게 각각 코어 입자 및 VLP에 결합되어 있는 인간 그렐린 또는 그렐린 펩티드를 포함하는 본 발명의 조성물을 사용하는 그렐린에 대한 백신화가 비만을 치료하는 방법을 제공할 수 있다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로— 항원 또는 항원 결정기는

- (c) **GSSFLSPEHQRVQ** (인간)(서열번호:60)
- (d) **QRKESKKPPAKLQPR** (인간)(서열번호:61)
- (e) **PPAKLQPR** (인간)(서열번호:53)
- (f) **GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR** (개)(서열번호:49)
- (g) **GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR** (개)(서열번호:50)
- (h) **GSSFLSPEHQKLQ** (개)(서열번호:62)
- (i) **QRKESKKPPAKLQPR** (개)(서열번호:63)
- (k) **EHQRVQQRKE** (인간)(서열번호:56)
- (l) **GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR** (쥐)(서열번호:32)

(n) (a)-(l)의 어느 단편의 아미노산 서열로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된 그렐린, 또는 그렐린 펩티드이다.

본 발명의 추가의 바람직한 일면으로, 항원 또는 항원 결정기는 (i) 항원 또는 항원 결정기와 함께 비자연적으로 발생된 결합부위; 및 (ii) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연적으로 발생된 결합부위로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 제 2 결합부위를 추가로 포함한다. 결합부위는 본 발명의 아미노산 링커, 바람직하게 C, CG, 또는 CGG의 링커 서열을 포함한다. 바람직하게, 적어도 하나의 제 결합부위를 갖는 항원 또는 항원 결정기는

- CGSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (인간)(서열번호:64)
- CGSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR (인간)(서열번호:65)
- GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRC (인간)(서열번호:66)
- GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRGC (인간)(서열번호:120)
- GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRC (인간)(서열번호:67)
- GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRGC (인간)(서열번호:121)
- GSSFLSPEHQRVQC (인간)(서열번호:68)
- GSSFLSPEHQRVQGC (인간)(서열번호:122)
- CQRKESKKPPAKLQPR (인간)(서열번호:69)
- CPPAKLQPR (인간)(서열번호:70)
- CGSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR (개)(서열번호:71)
- CGSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR (개)(서열번호:72)
- GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRC (개)(서열번호:73)
- GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRGC (개)(서열번호:123)
- GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRC (개)(서열번호:74)
- GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRGC (개)(서열번호:124)
- GSSFLSPEHQKLC (서열번호:75)
- GSSFLSPEHQKLCGC (서열번호:125)
- CEHQRVQQRKE (서열번호:76)
- CGSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (쥐)(서열번호:77)
- GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC (쥐)(서열번호:126)
- GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC (쥐)(서열번호:127)
- GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC (쥐)(서열번호:128)
- GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC (쥐)(서열번호:129)
- GSSFLSPEHQKAQC (쥐)(서열번호:130)
- GSSFLSPEHQKAQGC (쥐)(서열번호:131)
- GSSFLSPEHQGC (서열번호:132)
- CKKPPAKLQPR (서열번호:133)
- CEHQKAQQRKE (서열번호:134)
- CEHQKAQQRKES (서열번호:135)
- CLSPEHQKAQQ (서열번호:136)
- CEHQRVQQRKES (서열번호:137)
- CLSPEHQRVQQ (서열번호:138)

(a)-(ee)중 어느 단편의 아미노산 서열로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 다르게는 본질적으로 구성되거나, 다르게는 구성된다.

매우 바람직한 그렐린 펩티드중 일부는 실시예 13(여기에서, 상응하는 무린 펩티드를 제공한다)에 기술되어 있다. 이들 펩티드는 VLPs 및 섬모에 커플링시키기 위하여 첨가된 제 2 결합부위로서 N- 또는 C-말단 시스테인 잔기를 포함한다. 이들 바람직한 짧은 그렐린 펩티드 단편은 각각 VLP 및 코어 입자에 커플링되었을 때 더욱 증강된 면역원성을 가질 수 있다. 바람직한 그렐린 단편은 추가로 더욱 짧은 단편으로서 표적 자가-단백질이 T 세포 에피토프를 포함할 가능성이 더욱 없는 경우 발생할 수 있는 안정성 문제를 극복할 수 있다. 통상, 펩티드가 짧을수록, T 세포 활성화와 관련하여 더욱 안전성을 띤다. 그러나, 펩티드가 너무 짧은 경우에는 용액내 그렐린에 강하게 결합할 수 있는 고친화성 항체를 유도할 수 없을 것이다.

모든 공지된 종 사이의 그렐린의 N-말단 세그먼트가 일치하기 때문에 잔기 1-10 (GSSFLSPEHQ) (서열번호: 55)의 무린 그렐린 단편에 상응하는 매우 바람직한 그렐린 펩티드 단편을 우선 선택하였다. 추가로, 그렐린이 확인되어야 할 중에 있어서도 일치할 것이다. 추가로, 글루타민이 C-말단 잔기는 각각 VLP 및 코어 입자에 커플링되었을 때 가용성 백신의 제조를 촉진시키면서 가용성을 증진시킬 것이다. 실제로, 펩티드의 가용성이 주로 커플링의 효율성 및 백신의 안정성에 대한 제한 요소이다. 추가로 논리는 효능이 있는 T 세포 에피토프를 피하는 것을 포함한다. 더욱 짧은 펩티드 단편을 선택하므로써 T 세포가 존재할 수 있는 가능성을 줄일 수 있다. 무린 그렐린 잔기를 C-말단에 의해 VLP에 커플링시킴으로써 마우스내로 면역화되었을 때 활성 그렐린에 결합하여 혈액뇌장벽을 통과하지 못하도록 하고, 이로써 음식물 섭취를 감소시킬 수 있는 N-말단 특이 항체를 유도할 수 있을 것이다.

잔기 42-51(KKPPAKLQPR) (서열번호: 52)의 무린 그렐린 펩티드 단편에 상응하는 추가의 바람직한 그렐린 펩티드 단편을 상기와 유사한 이유에서 선택하였다. 유일한 차이점은 N-말단에 의해 커플링된 이 펩티드 단편은 마우스내로 면역화되었을 때 그렐린의 C-말단에 특이적인 항체를 유도할 수 있다는 점이다. 또한, 3번 세린상의 n-옥타노일 그룹 회피됨에 따라 항체 인식은 증가될 수 있고, 따라서 그의 방해 효능은 감소된다. 무린 그렐린 잔기 42-51를 N-말단에 의해 VLP에 커플링시킴으로써 마우스내로 면역화되었을 때 활성 그렐린에 결합하여 혈액뇌장벽을 통과하지 못하도록 하고, 이로써 음식물 섭취를 감소시킬 수 있을 것이다.

추가로, 잔기 31-41 (EHQKAQQRKES) (서열번호: 113) 및 잔기 28-37 (LSPEHQKAQQ) (서열번호: 117)의 뮤린 그렐린 펩티드 단편에 상응하는 추가의 바람직한 그렐린 펩티드 단편을 선택하고 이는 그렐린의 중심 세그먼트를 포함한다. 유사하게, 이들 그렐린 단편은 잠재된 T 세포 에피토프를 회피하고 또한 3번 세린상의 n-옥타노일 그룹을 회피할 것이다. 이들 펩티드를 N- 또는 C- 말단에 의해 VLP에 커플링시킴으로써 활성 그렐린을 중화시킬 수 있는 항체를 유도할 수 있고, 따라서 혈액뇌장벽을 통과하지 못하도록 하고, 이로써 음식물 섭취를 감소시킬 수 있을 것이다.

본 발명에 사용하기 적절한 바람직한 그렐린 펩티드는 현존 또는 이후의 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 사용하여 동정될 수 있다.

추가로 바람직한 그렐린 분자 및 상기 분자로부터 유도된 펩티드는 차후에 서열 정보를 아직 이용할 수 있는 종에서도 발견될 수 있다.

관련 분야의 기술자는 본 명세서에 기술한 방법 및 적용에 대한 적절한 변형 및 조절에 대하여 용이하게 이해할 수 있고 본 발명의 또는 그의 어느 일례로부터 벗어나지 않도록 수행할 수 있다. 본 발명을 상세히 설명하고, 하기 실시예를 참고로 하여 더욱 명확하게 이해될 것이며, 실시예는 단지 설명을 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

## 실시예

### 실시예 1

Q $\beta$  코트 단백질의 작제 및 발현, 뮤턴트 Q $\beta$  코트 단백질 VLPs 또는 캡시드의 정제.

플라스미드 작제 뮤턴트 코트 단백질의 클로닝

pQ $\beta$ -240 작제 :

pQ $\beta$ -240 작제를 위해 플라스미드 pQ $\beta$ 10(Kozlovskaya, TM, et al., 유전자 137 : 133-137)를 초기 플라스미드로서 사용하였다. 역 PCR(inverse PCR)에 의해 돌연변이 Lys13→Arg를 형성하였다. 역 프라이머를 역전된 테일-투-테일 방향(inverted tail-to-tail directions)으로 디자인하였다:

5'-GGTAACATCGGT**CG**AGATGGAAAACAAACTCTGGTCC-3' (서열번호: 78)

5'-GGACCAGAGTTTGTTTTCCATCTCGAC**CG**ATGTTACC-3' (서열번호: 79)

1차 PCR 산물을 2차 PCR 반응을 위한 주형으로서 사용하고, 여기에서, 상류 프라이머

5'-AGCTCGCCCGGGATCCTCTAG-3' (서열번호: 80)

하류 프라이머

5'-CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3'(서열번호: 81)를 사용하였다. 2차 PCR 산물을 XbaI 및 *Mph1103*로 분해하고, 동일한 제한 효소에 의해 절단된 pQ $\beta$ 10 발현 벡터내에서 클로닝하였다. PCR 반응은 PCR 키트 시약을 사용하고 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

디렉트 라벨 혼입 방법(direct label incorporation method)을 사용한 서열화를 통해 바람직한 돌연변이화를 확인하였다. pQ $\beta$ -240를 수반하는 E. coli 세포를 통해 SDS-PAGE상에서 Q $\beta$  과지 입자로부터 분리된 대조군 Q $\beta$  코트 단백질과 함께 이동하는 14-kD 단백질이 효율적으로 합성된다는 것을 입증하였다.

생성된 아미노산 서열: (서열번호: 17)

AKLETVTLGNIGRDGKQTLVLPNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

ALEKRVTVSVSQPSNRNKYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

KYADVTFSTQYSTDEERAFVRETELAALLASPLLDIAIDQLNPAY

pQ $\beta$ -243 작제

플라스미드 pQ $\beta$ 10을 pQ $\beta$ -243의 작제를 위해 초기 플라스미드로서 사용하였다. 역 PCR에 의해 돌연변이 Asn10→Lys를 형성하였다. 역 프라이머를 역전된 테일-투-테일 방향으로 디자인하였다:

5'-GGCAAATAGAGACTGTTACTTTAGGTA**AG**ATCGG-3' (서열번호: 82) 및

5'-CCGATCTTACCTAAAGTAACAGTCTCTAATTTTGCC-3' (서열번호: 83)

1차 PCR 산물을 2차 PCR 반응을 위한 주형으로서 사용하고,

여기에서, 상류 프라이머

5'-AGCTCGCCCGGGATCCTCTAG-3' (서열번호: 80) 및

하류 프라이머

5'-CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3'(서열번호: 81)를 사용하였다.

2차 PCR 산물을 XbaI 및 *Mph1103*로 분해하고, 동일한 제한 효소에 의해 절단된 pQβ10 발현 벡터내에서 클로닝 하였다. PCR 반응은 PCR 키트 시약을 사용하고 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

디렉트 라벨 혼입 방법을 사용한 서열화를 통해 바람직한 돌연변이화를 확인하였다. pQβ-243를 수반하는 E. coli 세포를 통해 SDS-PAGE상에서 Qβ 파지 입자로부터 분리된 대조군 Qβ 코트 단백질과 함께 이동하는 14-kD 단백질이 효율적으로 합성된다는 것을 입증하였다

생성된 아미노산 서열: (서열번호: 18)

AKLETVTLG**K**IGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

ALEKRVTVSQPSRNRKQVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

KYADVTFSTQYSTDEERAFVRELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

pQβ-250의 작제 :

플라스미드 pQβ240을 pQβ-250의 작제를 위해 초기 플라스미드로서 사용하였다. 부위특이 돌연변이 기술 (site-directed mutagenesis)에 의해 돌연변이 Lys2→Arg를 형성하였다.

상류 프라이머

5'-GGCCATGGCAGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3'(서열번호: 84) 및

하류 프라이머

5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'(서열번호: 85) 를 뮤턴트 PCR-단편 합성을 위해 사용하고 유일한 제한 부위 **NcoI** 및 **HindIII**에 pQβ-185 발현 벡터내로 도입하였다. PCR 반응은 PCR 키트 시약을 사용하고 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

디렉트 라벨 혼입 방법을 사용한 서열화를 통해 바람직한 돌연변이화를 확인하였다. pQβ-250을 수반하는 E. coli 세포를 통해 SDS-PAGE상에서 Qβ 파지 입자로부터 분리된 대조군 Qβ 코트 단백질과 함께 이동하는 14-kD 단백질이 효율적으로 합성된다는 것을 입증하였다.

생성된 아미노산 서열: (서열번호: 19)

ARLETVTLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

ALEKRVTVSQPSRNRKQVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

KYADVTFSTQYSTDEERAFVRELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

pQβ-251의 작제 :

pQβ-251 작제를 위해 플라스미드 pQβ10을 초기 플라스미드로서 사용하였다. 역 PCR에 의해 돌연변이 Lys16→Arg를 형성하였다. 역 프라이머를 역전된 테일-투-테일 방향으로 디자인하였다:

5'-GATGGAC**CGT**CAAACCTCTGGTCCTCAATCCGCGTGGGG-3'(서열번호: 86) 및

5'-CCCCACGCGGATTGAGGACCAGAGTTTG**ACGT**CCATC-3' (서열번호: 87)

1차 PCR 산물을 2차 PCR 반응을 위한 주형으로서 사용하고, 여기에서, 상류 프라이머

5'-AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3' (서열번호: 80) 및

하류 프라이머

5'-CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3'(서열번호: 81) 를 사용하였다. 2차 PCR 산물을 *XbaI* 및 *Mph1103*로 분해하고, 동일한 제한 효소에 의해 절단된 pQ $\beta$ 10 발현 벡터내에서 클로닝하였다. PCR 반응은 PCR 키트 시약을 사용하고 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

디렉트 라벨 혼입 방법을 사용한 서열화를 통해 바람직한 돌연변이화를 확인하였다. pQ $\beta$ -251를 수반하는 *E. coli* 세포를 통해 SDS-PAGE상에서 Q $\beta$  과지 입자로부터 분리된 대조군 Q $\beta$  코트 단백질과 함께 이동하는 14-kD 단백질이 효율적으로 합성된다는 것을 입증하였다. 이 작제물에 의해 코딩된 생성된 아미노산 서열 을 서열번호 :20에 나타낸다.

pQ $\beta$ -259의 작제 :

pQ $\beta$ -259 작제를 위해 플라스미드 pQ $\beta$ 251을 초기 플라스미드로서 사용하였다. 부위특이 돌연변이 기술 (site-directed mutagenesis)에 의해 돌연변이 Lys2→Arg를 형성하였다.

상류 프라이머

5'-GGCCATGGCAGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3' (서열번호: 84) 및

하류 프라이머 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'(서열번호: 85) 를 뮤턴트 PCR-단편 합성을 위해 사용하고 유일한 제한 부위 *NcoI* 및 *HindIII*에 pQ $\beta$ -185 발현 벡터내로 도입하였다. PCR 반응은 PCR 키트 시약을 사용하고 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)

디렉트 라벨 혼입 방법을 사용한 서열화를 통해 바람직한 돌연변이화를 확인하였다. pQ $\beta$ -259를 수반하는 *E. coli* 세포를 통해 SDS-PAGE상에서 Q $\beta$  과지 입자로부터 분리된 대조군 Q $\beta$  코트 단백질과 함께 이동하는 14-kD 단백질이 효율적으로 합성된다는 것을 입증하였다.

생성된 아미노산 서열: (서열번호: 21)

AKLETVTLGNIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

ALEKRVTVSVSQPSRNRKQVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

Q $\beta$  및 Q $\beta$  뮤턴트를 발현하고 정제하는 일반적인 방법

발현

*E. coli* JM109를 Q $\beta$  코트 단백질 발현 플라스미드로 형질 전환시켰다. 20 $\mu$ g/ml 암피실린을 포함하는 5 ml의 LB 액체 배지를 Q $\beta$  코트 단백질 발현 플라스미드로 형질 전환된 클론으로 접종하였다. 접종된 배양액을 37°C에서 16-24 시간동안 진탕하지 않고 인큐베이션시켰다. 연속하여 제조된 접종물을 20  $\mu$ g/ml 암피실린을 포함하는 100-300 ml의 신선한 LB 배지를 사용하여 1: 100으로 희석하고 37°C에서 밤새도록 진탕하지 않고 인큐베이션시켰다. 플라스크내에서 생성된 2차 접종물을 1 % Casaminoacid 및 0.2 % 글루코오스를 포함하는 M9 배지를 사용하여 1: 50으로 희석하고, 진탕시키면서 37°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다.

정제

정제용 용액 및 완충액:

1. 용해 완충액

5mM EDTA을 포함하는 50mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% tritonX100 및 5 $\mu$ g/ml의 새로 제조된 PMSF. 라이조자임 및 DNAase 결여

2. SAS

물중 포화된 황산암모늄

### 3. 완충액 NET.

5mM EDTA을 포함하는 20 mM Tris-HCl, pH 7.8 및

150 mM NaCl.

### 4. PEG

NET중 40% (w/v) 폴리에틸렌글리콜 6000

파괴 및 용해

냉동된 세포를 2 ml/g 세포로 LB에 재현탁시켰다. 혼합물을 얼음상에서 용액을 냉동시키기 위한 1분간의 간격으로 22 kHz로 15초동안 5회 초음파처리하였다. 용해물을 1시간동안 14,000 rpm에서 Janeki K 60 회전날개 (rotor)(Ependorf)를 사용하여 원심분리하였다. 하기 기술하는 원심분리 단계 모두 달리 언급하지 않는 한 동일한 회전날개를 사용하여 수행하였다. 상등액을 4°C에 저장하고, 세포 조각을 LB로 2회 세척하였다. 원심분리 후, 용해물의 상등액 및 세척 분획을 폴링하였다.

분획화

황산암모늄 포화용액을 교반하면서 상기 폴링된 용해물에 적가하였다. SAS의 용량은 총 용량의 1/5로 조절하여 포화도가 20%가 되도록하였다. 용액을 밤새도록 방치하고 다음날 14 000 rpm에서 20분동안 원심분리하였다. 펠릿을 소량의 20% 황산암모늄으로 세척하고 다시 원심분리하였다. 수득한 상등액을 폴링하고 SAS를 적가하여 포화도가 40%가 되도록하였다. 용액을 밤새도록 방치하고 다음날 14, 000 rpm에서 20분동안 원심분리하였다. 수득한 펠릿을 NET 완충액에 용해시켰다.

크로마토그래피:

NET 완충액에 재용해된 캡시드 또는 VLP 단백질을 세파로스 4B 칼럼에 로딩하였다. 크로마토그래피하는 동안 3개의 피크가 용출되었다. 첫번째 것은 주로 막 및 막 단편을 포함하였지만, 회수하지 않았다. 캡시드는 두번째에 포함되어 있고, 다른 E. coli 단백질은 세번째 것에 포함되어 있었다.

피크 분획을 폴링하고 NaCl의 최종 농도를 0.65 M로 조절하였다. 교반하면서 다량의 1/2의 폴링된 피크 분획에 상응하는 PEG 용액을 적가하였다. 진탕하지 않고 용액을 밤새도록 방치하였다. 14, 000 rpm에서 20분동안 원심분리하여 캡시드 단백질을 침전시켰다. 이어서 최소량의 NET에 용해시킨 후 세파로스 CL-4B 칼럼에 로딩하였다. 피크 분획을 폴링하고 60%(w/v) 포화도로 황산암모늄을 사용하여 침전시켰다. 원심분리 및 NET 완충액에서 재용해시킨 후, 다시 크로마토그래피하기 위하여 캡시드 단백질을 세파로스 CL- 6B 칼럼에 로딩하였다.

투석 및 건조

상기에서 수득한 피크 분획을 폴링하고 멸균수에 대하여 광범위하게 투석하고 저장하기 위하여 동결시켰다.

### Qβ-240 발현 및 정제

세포(플라스미드 pQβ-240으로 형질전환된 E. coli JM 109)을 LB에 재현탁시키고 15초동안 5회 초음파처리하고 (빙수 자켓) 13,000 rpm에서 1시간동안 원심분리하였다. 추가의 단계시까지 상등액을 4°C에서 저장하고, 조각을 9 ml의 LB로 2회, 마지막으로 LB중 9 ml의 0.7 M 우레아로 세척하였다. 모든 상등액을 폴링하고, 세파로스 CL-4B 칼럼상에 로딩하였다. 폴링된 피크 분획을 황산암모늄으로 침전시키고 원심분리하였다. 재용해된 단백질을 추가로 세파로스 2B 칼럼상에서 정제하고 마지막으로 세파로스 6B 칼럼상에서 정제하였다. 캡시드 피크를 마지막으로 물에 대하여 광범위하게 투석하고 상기 기술한 바와 같이 동결시켰다. 전자 현미경을 통해 코트 단백질과 캡시드의 어셈블리를 확인하였다.

### Qβ-243 발현 및 정제

세포(E. coli RR1)을 LB에 재현탁시키고 통상의 방법에 따라 처리하였다. 세파로스 CL-4B 칼럼 및 마지막으로 세파로스 CL-2B 칼럼상에 2회 연속하여 겔 여과하여 단백질을 정제하였다. 피크 분획을 폴링하고 상기 기술한 바와 같이 동결시켰다. 전자 현미경을 통해 코트 단백질과 캡시드의 어셈블리를 확인하였다.

### Qβ-250 발현 및 정제

세포(플라스미드 pQβ-250으로 형질전환된 E. coli JM 109)을 LB에 재현탁시키고 통상의 방법에 따라 처리하였다. 세파로스 CL-4B 칼럼 및 마지막으로 세파로스 CL-2B 칼럼상에서 겔 여과하여 단백질을 정제하고, 상기 기술한 바와 같이 동결시켰다. 전자 현미경을 통해 코트 단백질과 캡시드의 어셈블리를 확인하였다.

### Qβ-259 발현 및 정제

세포(플라스미드 pQ $\beta$ -259로 형질전환된 *E. coli* JM 109)을 LB에 재현탁시키고 초음파처리하였다. 조각을 1회시 10 ml의 LB로 2회시 LB중 10ml의 0,7 M 우레아로 세척하였다. 단백질을 세파로스 CL-4B 칼럼상에서 2개의 겔 여과 크로마토그래피 단계에 의해 정제하였다. 단백질을 투석하고 상기 기술한 바와 같이 동결시켰다. 전자 현미경을 통해 코트 단백질과 캡시드의 어셈블리를 확인하였다.

## 실시예 2

HBcAg (1-149)의 c/e1 에피토프내로의 리신 잔기를 포함하는 펩티드 삽입

HBcAg의 c/e1 에피토프 (잔기 72 내지 88)는 B형 간염 바이러스 캡시드 (HBcAg) 표면상의 끝(tip) 부위에 위치한다. 이 부위중 일부(프롤린 79 및 알라닌 80)를 펩티드 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly(서열번호: 33)로 유전적으로 대체하였다(HBcAg-Lys 작제물). 도입된 리신 잔기는 유리 시스테인 그룹을 포함하는 어느 항원과 분자내 화학적 가교결합을 하기 위해 사용될 수 있는 그의 측쇄에 반응성 아미노 그룹을 포함한다.

서열번호 18에 나타난 HBcAg-Lys DNA를 PCRs을 사용하여 제조하였다: HBcAg 단편을 코딩하는 두개의 단편 (아미노산 잔기 1 내지 78 및 81 내지 149)를 PCR에 의해 따로따로 증폭시켰다. PCR용 프라이머를 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly 펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 도입하였다. HBcAg (1 내지 78) 단편은 프라이머 EcoRIHBcAg (s) 및 Lys-HBcAg (as)를 사용하여 pEco63으로부터 증폭시켰다. HBcAg (81 내지 149) 단편은 프라이머 Lys-HBcAg (s) 및 HBcAg (1-149) Hind (as)를 사용하여 pEco63으로부터 증폭시켰다. 프라이머 Lys-HBcAg (as) 및 Lys-HBcAg (s)를 2개의 PCR 산물의 양 말단에 위치하는 상보적인 DNA 서열에 도입하여 연속된 어셈블리 PCR에서 2개 PCR 산물을 융합시켰다. 어셈블리된 단편을 프라이머 EcoRIHBcAg (s) 및 HbcAg (1-149) Hind (as)를 사용하여 증폭시켰다.

PCR을 위해 100 pmol의 각 올리고 및 50 ng의 주형 DNAs를 2 유니트의 Pwo 폴리머라제, 0.1 mM dNTPs 및 2 mM MgSO<sub>4</sub>를 포함하는 50 ml의 반응 혼합물에서 사용하였다. 양 반응을 위해 하기와 같이 온도를 사이클링하였다: 94°C에서 2 분; 94°C(1분), 50°C(1분), 72°C(2 분) 30 사이클.

프라이머 서열:

EcoRIHBcAg (s):

(5'-CCGGAATTCATGGACATTTGACCCCTTATAAAG-3')(서열번호: 88);

Lys-HBcAg (as):

(5'- CCTAGAGCCACCTTTGCCACCATCTTCTAAATTAGTACCCACCCAG  
GTAGC-3')(서열번호: 89);

Lys-HBcAg (s):

(5'-

GAAGATGGTGGCAAAGGTGGCTCTAGGGACCTAGTAGTCAGTTAT

GTC-3')(서열번호: 90);

HBcAg (1-149) Hind (as):

(5'-CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG-3')(서열번호: 91)

PCR에 의해 두개의 PCR 단편을 융합시키기 위하여 100 pmol의 프라이머 EcoRIHBcAg(s) 및 HBcAg(1-149)Hind(as)를 2 유니트의 Pwo 폴리머라제, 0.1 mM dNTPs 및 2 mM MgSO<sub>4</sub>를 포함하는 50ml의 반응 혼합중 100 ng의 두개의 정제된 PCR 단편과 함께 사용하였다. PCR 사이클링 조건은 94°C에서 2 분; 94°C(1분), 50°C(1 분), 72 °C(2 분)에서 30 사이클. 어셈블리된 PCR 산물을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분해하고, 정제하고 적절한 완충액중에서 EcoRI 및 HindIII 제한효소로 19시간동안 분해하였다. 분해된 DNA 단편을 EcoRI/HindIII-분해된 pKK 벡터내로 결합시켜 pKK-HBcAg-Lys 발현 벡터를 생산하였다. PCR 산물을 벡터내로의 삽입은 EcoRI/HindIII 제한 분석 및 인서트의 DNA 서열화에 의해 분석하였다.

## 실시예 3

HBcAg-Lys의 발현 및 정제.

*E. coli* 균주 K802 또는 JM109를 pKK-HBcAg-Lys로 형질전환시켰다. 밤새 배양된 1 ml의 박테리아 배양물을 사용하여 100 $\mu$ g/ml의 앵피실린을 포함하는 100 ml LB 배지에 접종하였다. 600 nm에서의 OD가 대략 0.8이 될 때까지 이 배양물을 4시간동안 37°C에서 배양하였다. IPTG를 최종 농도 1mM으로 가하여 HBcAg-Lys 합성 유도를 수

행하였다. 유도후, 박테리아를 추가로 37°C에서 4시간동안 진탕시켰다. 박테리아를 5000 x g에서 15 분동안 원심 분리하여 회수하였다. 펠릿을 -80°C에서 냉동시켰다. 펠릿을 해동시키고 200µg/ml 라이소자임 및 10µl의 Benzonye (Merck)으로 보충된 박테리아 용해 완충액(10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 30 mM NaCl, 0.25% Tween-20, 10 mM EDTA)에 재현탁시켰다. 세포를 30분동안 실온에서 인큐베이션시키고 초음파처리하여 파쇄하였다. pKK-HBcAg-Lys 발현 플라스미드 또는 대조군 플라스미드를 수반하는 *E. coli* 세포를 사용하여 IPTG를 사용하여 HBcAg-Lys 발현을 유도하였다. IPTG를 첨가하기 앞서, pKK-HBcAg-Lys 플라스미드를 수반하는 박테리아 배양액 및 대조군 플라스미드를 수반하는 박테리아 배양액으로부터 샘플을 제거하였다. IPTG를 가하고 4시간 후, pKK-HBcAg-Lys을 포함하는 배양액 및 대조군 배양액으로부터 샘플을 다시 제거하였다. SDS-PAGE에 이어서 Coomassie 염색에 의해 단백질 발현을 관찰하였다.

불용성 세포 조각(debris)를 제거하기 위하여 용해물을 30 분동안 12,000 x g에서 원심분리하였다. 상등액 및 펠릿을 HBcAg에 대한 모노클로날 항체(YVS1841, Accurate Chemical and Scientific Corp.로부터 구입, Westbury, NY, USA)를 사용하는 웨스턴 블랏에 의해 분석하고 상당량의 HBcAg-Lys 단백질이 가용성임을 제시하였다. 간단하게, HBcAg-Lys를 발현시키는 *E. coli* 세포 및 대조군 세포로부터의 용해물은 30분동안 14,000 x g에서 원심분리하였다. 상등액 (= 가용성 분획) 및 펠릿 (= 불용성 분획)을 분리하고 SDS 샘플 완충액을 사용하여 동일한 용량으로 희석하였다. 샘플을 SDS-PAGE 이어서, 항-HBcAg 모노클로날 항체 YVS 1841를 사용하는 웨스턴 블랏팅에 의해 분석하였다.

정제된(cleared) 세포 용해물 이어서 4 ml의 박테리아 용해물을 3 ml 15% 수크로스 용액으로 오버레이된 4 ml 65% 수크로스 용액으로 구성된 수크로스 단계 구배를 사용하는 단계-구배 원심분리를 위해 사용하였다. 샘플을 3 hrs동안 100, 000 x g으로 4°C에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 구배 상층으로부터 1 ml의 분획을 회수하고 SDS-PAGE에 이어 Coomassie 염색에 의해 분석하였다. HBcAg-Lys 단백질을 Coomassie 염색에 의해 검출하였다.

HBcAg-Lys 단백질은 15 및 65% 수크로스 경계면 사이에 풍부하였고, 이는 캡시드 입자를 형성하였음을 나타내었다. 대부분의 박테리아 단백질은 구배의 수크로스가 없는 상층에 남아 있고, 따라서, HBcAg-Lys 입자의 단계-구배 원심분리에 의해 입자를 풍부하게 하고, 부분적으로 정제하였다.

대량의 HBcAg-Lys의 발현 및 정제를 하기와 같이 수행하였다. 100 ml LB, 100µg/ml 엠펜실린중 단일 콜로니를 접종하고, 37°C에서 밤새도록 배양액을 배양하여 오버나이트 배양액을 제조하였다. 다음날 25 ml의 사전 배양액을 800 ml LB 엠펜실린 배지에 희석하고 배양액을 최적 밀도 OD<sup>600</sup>이 0.6-0.8때까지 배양하였다. 이어서 배양액을 1 mM IPTG로 유도하고 추가의 4시간동안 방치하여 성장하도록 하였다. 이 세포를 회수하고 상기 기술한 바와 같이 본질적으로 용해시켰다(Lysed).

이어서 우선 황산암모늄 (30% 포화)으로 단백질을 정제된 세포 용해물로부터 침전시키고, 겔 여과 칼럼(Sephacryl S-400, Pharmacia)상에 재용해된 펠릿을 로딩하여 HBcAg-Lys를 정제하였다. 풀링된(pooled) 분획을 황산암모늄을 사용하여 다시 침전시키고, 펠릿을 재용해시키고 동일한 겔 여과 칼럼상에 2차로 로딩하였다. 분획을 마지막으로 풀링하고 농축시키고 Bradford 시험(BioRad)을 사용하여 농축물을 평가하였다.

#### 실시예 4

유리 시스템인 잔기가 결여되어 있고 삽입된 리신 잔기를 포함하는 HBcAg의 작제

서열번호 : 25중 48번 및 107번에 상응하는 위치에 시스템인 잔기가 결여되어 있고, 삽입된 리신 잔기를 포함하는 HBcAg-lys-2cys-Mut로 언급되는 간염 코어 항원 (HBcAg)을 하기 방법을 사용하여 작제하였다.

상기 실시예 2에 기술된 바와 같이 제조된 3개의 HBcAg-Lys 유전자 단편을 하기 PCR 프라이머 조합을 사용하여 두개의 돌연변이를 도입하였다. PCR 방법 및 통상의 클로닝 기술을 사용하여 HBcAg-lys-2cys-Mut 유전자를 제조하였다.

간단하게, 하기 프라이머를 사용하여 단편 1을 제조하였다:

프라이머 1 : EcoRIHBcAg (s)

CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG (서열번호: 88)

프라이머 2: 48as

GTGCAGTATGGTGAGGTGAGGAATGCTCAGGAGACTC (서열번호: 92)

하기 프라이머를 사용하여 단편 2를 제조하였다:

프라이머 3: 48s

GSGTCTCCTGAGCATTTCCTCACCTCACCATACTGCAC (서열번호: 93)

프라이머 4 : 107as

CTTCCAAAAGTGAGGGAAGAAATGTGAAACCAC (서열번호: 94)

하기 프라이머를 사용하여 단편 3을 제조하였다:

프라이머 5: HBcAg149hind-as

CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAGCGTTGATAG(서열번호: 95)

프라이머 6: 107s

GTGGTTTCACATTTCTTCCCTCACTTTTGGGAAG (서열번호: 96)

이어서, 단편 1 및 2를 PCR 프라이머 EcoRIHBcAg (s) 및 107as와 결합시켜 단편 4를 수득하였다. 이어서 단편 4 및 단편 3를 프라이머 EcoRIHBcAg (s) 및 HBcAg149hind-as와 결합하여 전장의 유전자를 제조하였다. 전장의 유전자를 EcoRI (GAATTC) 및 HindIII (AAGCTT) 효소로 분해하고 동일한 제한 부위에서 절단된 pKK 벡터 (Pharmacia)로 클로닝하였다. 실시예 3에 기술한 바와 같이 HBcAg-lys-2cys-Mut의 발현 및 정제를 수행하였다.

### 실시예 5

HBcAg1-185-Lys의 작제.

간염 코어 항원 (HBcAg) 1-185를 실시예 2에 기술된 바와 같이 변형시켰다. c/e1 에피토프 (잔기 72 내지 88) 부위(프롤린 79 및 알라닌 80)중 일부를 펩티드 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly(서열번호: 33)에 의해 유전적으로 대체하여, HBcAg1-185-Lys 작제물을 수득하였다(서열번호: 26). 도입된 리신 잔기는 HBcAg 입자가 유리 시스테인 그룹을 포함하는 어느 항원과 분자내 화학적 가교결합을 하기 위해 사용될 수 있는 그의 측쇄에 반응성 아미노 그룹을 포함한다. PCR 방법 및 통상의 클로닝 기술을 사용하여 HBcAg1-185-Lys 유전자를 제조하였다.

실시예 2에 기술된 바와 같이 별개의 HBcAg 유전자 단편 두개를 pEco63로부터 증폭시킨 후 PCR에 의해 전장의 유전자를 어셈블리하기 위하여 두개의 단편을 융합시켜 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (서열번호: 33)서열을 삽입하였다. 하기 PCR 프라이머 조합을 사용하였다:

단편 1:

프라이머 1: EcoRIHBcAg (s) ((서열번호: 88), 참조 실시예 2)

프라이머 2: Lys-HBcAg (as) ((서열번호: 89), 참조 실시예 2)

단편 2:

프라이머 3: Lys-HBcAg (s) ((서열번호: 90), 참조 실시예 2)

프라이머 4: HBcAgwtHindIII

CGCGTCCCAAGCTTCTAACATTGAGATTCCTCCGAGATTG (서열번호: 97)

어셈블리:

프라이머 1: EcoRIHBcAg (s) ((서열번호: 88), 참조 실시예 2)

프라이머 2: HBcAgwtHindIII (서열번호: 97)

이어서 어셈블리된 전자의 유전자를 EcoRI (GAATTC) 및 HindIII (AAGCTT) 효소로 분해하고 동일한 제한 부위로 절단된 pKK 벡터 (Pharmacia)로 클로닝하였다.

### 실시예 6

HbcAg의 MIR 부위내 펩티드 에피토프의 융합

HBcAg1-185의 79번 및 80번 잔기를 에피토프 CεH3의 서열 VNLTWSRASG(서열번호: 98)으로 치환하였다. CεH3 서열은 인간 IgE의 중쇄중 세번째 불변 영역의 서열로부터 유래한다. 어셈블리 PCR 방법을 사용하여 에피토프를 HBcAg1-185에 삽입하였다. 1차 PCR 단계에서, ATCC 클론 pEco63으로부터 기원하고 프라이머 HBcAg-wt EcoRI fwd 및 HBcAg-wt Hind III rev로 증폭된 HBcAg1-185 유전자를 주형으로서 두개의 별개의 반응에서 사용하여 CεH3 서열을 코딩하기 위한 서열 요소를 포함하는 두개의 단편을 증폭시켰다. 이 두개의 단편을 제 3 PCR 단계, 어셈블리 PCR 반응에서 어셈블리시켰다.

제 1 PCR 단계에서 프라이머 조합: CεH3fwd와 HBcAg-wt Hind III rev, 및 HBcAg-wt EcoRI fwd와 CεH3rev. 어셈블리 PCR 반응에서, 1차 PCR 단계에서 분리된 두개의 단편을 우선 외부(Outer) 프라이머는 사용하지 않고 3 PCR 사이클동안 어셈블리시키고 이후 외부 프라이머를 다음 25 사이클동안 반응 혼합물에 가하였다. 외부 프라이머: HBcAg-wt EcoRI fwd 및 HBcAg-wt Hind III rev.

E. coli를 발현시키기 위해 EcoRI 및 HindIII 부위를 사용하여 PCR 산물을 pKK223.3에서 클로닝하였다. 키메라성 VLP를 E. coli에 발현시키고 실시예 2에 기술된 바와 같이 정제하였다. 겔 여과로부터 용출된 HBcAg1-185-CεH3의 용출 용량이 용합 단백질과 키메라성 VLP의 어셈블리를 나타내었다.

프라이머 서열:

**CεH3fwd:**

5' GTT AAC TTG ACC TGG TCT CGT GCT TCT GGT GCA TCC AGG GAT CTA GTA GTC

3' (서열번호:99)

V N L T W S R A S G A80 S R D L V V86

(서열번호:100)

**CεH3rev:**

5' ACC AGA AGC ACG AGA CCA GGT CAA GTT AAC ATC TTC CAA ATT ATT ACC CAC 3'

(서열번호:101)

D78 E L N N G V72

(서열번호:102)

**HBcAg-wt EcoRI fwd:**

5' CCGgaattcATGGACATTGACCCCTTATAAAG (서열번호:103)

**HBcAg-wt Hind III rev:**

5' CGCGTCCCcaagcttCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (서열번호:104)

**실시예 7**

HbcAg MIR 부위내 렐린 펩티드 에피토프 용합

HBcAg1-185중 79번 및 80번 잔기를 그렐린 펩티드 에피토프의 서열 EHQRVQQRKE (서열번호: 56)로 치환시켰다. 2개의 중첩(overlapping) 프라이머는 실시예 6에 기술된 동일한 방법, 및 어셈블리 PCR에 의해 작제된 용합 단백질을 사용하여 디자인하였다. PCR 산물을 pKK223.3 벡터에서 클로닝하고 E. coli K802에서 발현시켰다. 키메라성 VLPs 를 발현시키고 실시예 3에 기술한 바와 같이 정제하였다.

**실시예 8**

CP 신장부의 19번 위치가 절단된 Qβ A1 단백질의 C-말단과 그렐린 펩티드 에피토프의 용합

Qβ A1 유전자의 5' 말단에 어닐링하는 프라이머 및 A1 유전자의 3' 말단에 어닐링하고 추가로 서열 KKPPAKLQPR (서열번호: 52)의 그렐린 단편을 코딩하는 서열 요소를 포함하는 프라이머를 주형으로서의 pQβ 10 과 함께 PCR 반응에 사용하였다. PCR 산물을 pQβ 10에서 클로닝하고(Kozlovskaya T. M. et al., 유전자 137 : 133-37 (1993)), 및 키메라성 VLP를 발현시키고 실시예 1에 기술한 바와 같이 정제하였다.

**실시예 9**

fr 코트 단백질 2번 및 3번 위치사이에 그렐린 펩티드 에피토프 삽입

서열 EHQRVQQRKE (서열번호: 56)의 그렐린 펩티드의 서열을 코딩하고, *Bsp119I* 적합(compatible) 말단 및 프레임 삽입을 가능케하는 추가의 뉴클레오티드를 포함하는 상보적인 프라이머를 표준 분자 생물학적 기술에 의해 pFrd8 벡터의 *Bsp119I* 부위에 삽입하였다(Pushko, P. et al., Prot. Eng. 6 : 883-91 (1993)). 다르게는, *Bsp119I* 로 분해한 후 pFrd8 벡터의 돌출 부분을 Klenow로 채우고 그렐린 펩티드 무린 그렐린 펩티드의 서열을 코딩하는 올리고뉴클레오티드 및 프레임 클로닝을 위한 추가의 뉴클레오티드를 Klenow 처리 후 pFrd8에 결합시켰다. 우 배향(Right orientation)의 인서트를 포함하는 클론을 서열화에 의해 분석하였다. E. coli JM109 또는 E. coli K802에서 키메라성용합 단백질의 발현 및 정제를 Pushko, P. et al, Prot. Eng. 6 : 883-91 (1993)에 기술된 바와 같이 수행하였고, 단, 예외적으로 크로마토그래피 단계는 세파로스 CL-4B 또는 Sephacryl S-400 (Pharmacia)를 사용하였다. 세포 용해물을 황산암모늄으로 침전시키고, 실시예 1에 Qβ에 기술된 방법과 유사하게 2개의 연속된 겔 여과 정제 단계에 의해 정제하였다.

**실시예 10**

벡터 pOGS8111에서 Ty1 단백질 p1의 67번 및 68번 위치 사이에 그렐린 펩티드 에피토프 삽입

인간 그렐린 펩티드 서열 EHQRVQQRKE (서열번호: 56)를 코딩하는 2개 상보적인 올리고뉴클레오티드를 pOGS8111의 NheI 부위에 적합한 말단을 사용하여 합성하였다. EP06777111에 기술된 바와 같이 따라 추가의 뉴클레오티드를 가하여 뮤린 그렐린 에피토프를 코딩하는 서열의 프레임 삽입을 가능케하였다. 삽입된 에피토프의 측면에 위치하는 아미노산 AS 및 SS를 pOGS8111의 TyA (d) 유전자내 올리고뉴클레오티드의 삽입에 의해 형성된 변경된 NheI 부위에 의해 코딩하였다.

참고문헌으로서의 EP06777111에 기술된 바와 같이 키메라성 Ty VLP의 발현을 위해 POGS8111를 *S. 세르비시아* (*S. cerevisiae*) 균주 MC2로 형질전환시켰다. 키메라성 Ty VLP를 EP06777111에 기술된 바와 같이 수크로스 구배 초원심분리하여 정제하였다.

### 실시예 11

1형 유두종 바이러스(BPV-1)의 주요 캡시드 단백질 L1내로 그렐린 펩티드 에피토프 삽입

서열 EHQRVQQRKE (서열번호: 56)을 갖는 그렐린 에피토프를 코딩하는 서열을 (Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. USA 96 : 2373-2378 (1999))에 기술된 바와 같이 pFastBacl (GIBCO/BRL) 벡터에서 클로닝된 BPV-1 L1 유전자중 130-136 아미노산을 코딩하는 서열로 치환하였다. 작제물의 서열을 뉴클레오티드 서열 분석에 의해 확인하였다. 제조사의 설명에 따라 GIBCO/BRL 바쿨로바이러스(*baculovirus*) 시스템을 사용하여 재조합 바쿨로바이러스(*baculovirus*)를 생산하였다. [Kirnbauer, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89 : 12180-84 (1992) and Greenstone, H. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95 : 1800-05 (1998)]에 기술된 바와 같이 키메라성 VLPs를 바쿨로바이러스(*baculovirus*) 감염 Sf9 세포로부터 정제하였다.

### 실시예 12

VLPs에 융합된 그렐린-펩티드를 사용한 마우스의 면역화

실시예 7, 9, 10 및 11에서 제조된 서열 EHQRVQQRKE (서열번호: 56)의 뮤린 그렐린 에피토프를 나타내는 키메라성 VLPs를 사용하여 실시예 15에 기술하는 바와 같이 마우스를 면역화시켰다. 면역화된 마우스로부터 수득한 혈청을 실시예 14에 기술하는 바와 같이 그렐린-특이 ELISA에서 분석하였다.

백신의 효능을 마우스의 체중 증가를 주시하고, 음식물 섭취를 측정하여 조사하였다.

### 실시예 13

뮤린 그렐린 및 뮤린 그렐린 펩티드와 Q $\beta$  캡시드 단백질의 커플링:

그렐린 펩티드 백신

하기 그렐린 펩티드를 화학적으로 합성하였다:

- cGhrel: CGSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:77)
- GhrelC: GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:105)
- cGhrQ14: CGSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:106)
- GhrQ14C: GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:107)
- Ghrel24-33C GGSSFLSPEHQGC (서열번호:132)
- cGhrel42-51 CKKPPAKLQPR (서열번호:133)
- cGhrel31-40 CEHQKAQQRKE (서열번호:134)
- cGhrel31-41 CEHQKAQQRKES (서열번호:135)
- cGhrel28-37 CLSPEHQKAQQ (서열번호:136)

(이들은 VLPs 및 섬모와 커플링하기 위하여 첨가된 N- 또는 C-말단 시스테인 잔기를 포함하고, 하기 기술하는 바와 같이 Q $\beta$ 와 화학적으로 커플링하기 위하여 사용되었다).

20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.4중 5ml의 140 $\mu$ M Q $\beta$  캡시드 단백질 용액을 요동식 진탕기에서 30분동안 H<sub>2</sub>O중 108 $\mu$ l의 65mM SMPH 용액(Pierce)과 25 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 연속하여 반응 용액을 2시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 5l의 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2에 대하여 2회 투석시켰다. 이어서 100 $\mu$ l의 투석시킨 반응 혼합물을 28.6 $\mu$ l의 그렐린 펩티드의 10mM 저장액(DMSO중)(1: 10 펩티드/캡시드 단백질 비)와 반응시켰다. 커플링 반응은 수조에서 2시간동안 15 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 반응 혼합물을 연속하여 20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.2에 대하여 24시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 투석하였다.

커플링된 산물을 원심분리하고 상등액 및 펠릿을 환원 조건하에서 16% SDS-PAGE 겔상에서 분석하였다. 겔을 Coomassie Brilliant Blue로 염색하였다.

그렐린 펩티드와 fr 캡시드 단백질의 커플링

20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.2중 120 $\mu$ M fr 캡시드 단백질 용액을 DMSO중 저장액으로부터 희석된 10배 물 과량의 SMPH(Pierce)와 요동식 진탕기에서 30분동안 25 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 연속하여 반응 용액을 2시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 1 $\ell$ 의 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2에 대하여 2회 투석시켰다. 이어서 투석시킨 fr 반응 혼합물을 요동식 진탕기에서 밤새도록 16 $^{\circ}$ C에서 동일한 물농도의 그렐린 펩티드 또는 1:2비의 그렐린 펩티드/fr을 반응시켰다. 커플링 산물을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.

그렐린 펩티드와 HBcAg-Lys-2cys-Mut의 커플링

20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.2중 120 $\mu$ M HBcAg-Lys-2cys-Mut 용액을 DMSO중 저장액으로부터 희석된 10배 물 과량의 SMPH(Pierce)와 요동식 진탕기에서 30분동안 25 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 연속하여 반응 용액을 2시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 1 $\ell$ 의 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2에 대하여 2회 투석시켰다. 이어서 투석시킨 HBcAg-Lys-2cys-Mut 반응 혼합물을 요동식 진탕기에서 밤새도록 16 $^{\circ}$ C에서 동일한 물농도의 그렐린 펩티드 또는 1:2비의 그렐린 펩티드/HBcAg-Lys-2cys-Mut를 반응시켰다. 커플링 산물을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.

그렐린 펩티드와 섬모의 커플링

20 mM Hepes, pH 7.2중 125 $\mu$ M E. coli의 1형 섬모 용액을 DMSO중 저장액으로부터 희석된 50배 물 과량의 가교제 SMPH(Pierce)와 요동식 진탕기에서 60분동안 RT에서 반응시켰다. 반응 혼합물을 PD-10 칼럼(Amersham-Pharmacia Biotech)상에서 탈염화시켰다. 칼럼으로부터 용출된 단백질 포함 분획을 폴링하고, 탈염화된 유도된 섬모 단백질을 동일한 물농도의 그렐린 펩티드 또는 1:2비의 그렐린 펩티드와 요동식 진탕기에서 밤새도록 16 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 커플링 산물을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.

실시예 14

VLP-그렐린 펩티드 컨쥬게이트에 의한 마우스의 면역화

Q $\beta$ 에 커플링된 그렐린 펩티드에 의한 마우스의 면역화

암컷 C57BL/6 마우스를 alum과 혼합되고, IFA에서 유화되거나 애주번트를 포함하지 않은 Q $\beta$ 에 커플링된, 실시예 13에 열거된 그렐린 펩티드로 면역화시켰다. 50 $\mu$ g을 0일 및 14일 및 28일째 피하 주사하였다. 면역화시킨 후 14, 21, 28, 42일째, 이후 매달 1개월 간격으로 안와후방으로 출혈시켰다. 그렐린 단백질-특이 ELISA를 사용하여 혈청을 분석하였다.

명확한 이해를 위해 설명 및 실시예를 통해 더욱 상세히 본 발명을 전체적으로 기술하였고, 본 분야의 기술자는 본 발명의 범위 또는 그의 특정 일례에 영향을 주지 않으면서 광범위하고 동등한 범위의 조건, 제조 및 다른 파라미터 내에서 본 발명을 변형하거나 수정하여 동일하게 수행할 수 있고, 그러한 수정 및 변형이 본 발명의 범위내 포함된다는 것을 이해할 것이다.

본 명세서에서 기술된 모든 출원, 특허 및 특허 출원은 본 발명이 포함된 분야의 기술자의 수준으로 암시되고, 각 개의 출원, 특허 및 특허 출원은 참고문헌으로서 인용된다고 구체적이고 개별적으로 지정된 바와 같이 참고문헌으로서 인용된다.

실시예 15

C-그렐린 및 그렐린-GC와 Q $\beta$  캡시드 단백질의 커플링

20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.2중 2ml의 2.0mg/ml의 Q $\beta$  캡시드 단백질 용액을 30분동안 114.4 $\mu$ l의 SMPH 용액(Pierce)(DMSO에 용해된 50mM 저장액으로부터)과 25 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 연속하여 반응 용액을 2시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 2 $\ell$ 의 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2에 대하여 2회 투석시켰다.

투석시킨, 유도된 Q $\beta$  VLP를 20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.2에서 2시간동안 15 $^{\circ}$ C에서 뮤린 C-그렐린 (서열번호 77) 또는 뮤린 그렐린-GC 펩티드 (서열번호 105)와 반응시켰다. 커플링 반응을 다중 분취량으로 수행하고, 이 반응에서 1ml의 유도된 Q $\beta$  VLP(농도 2.0mg/ml)를 286 $\mu$ l의 10mM 펩티드 용액과 반응시켰다. 10% 아세토니트릴을 커플링 반응에 가하였다. 반응 용액을 2시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 2 $\ell$ 의 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2에 대하여 1회 투석시킨 후, 이어서 밤새도록 투석시켰다.

커플링된 산물을 원심분리하고 상등액 및 펠릿을 환원 조건하에서 16% SDS-PAGE 겔상에서 분석하였다. 겔을 Coomassie Brilliant Blue로 염색하였다. 결과를 도 1에 나타낸다. 커플링된 산물을 Coomassie-염색된 겔에서 검출할 수 있고 C-그렐린 또는 그렐린-GC와 Q $\beta$  캡시드 단백질의 공유 결합(coupling)을 확인할 수 있었다. 서브유닛당 1, 2, 3, 또는 4개의 펩티드에 상응하는 커플링 밴드를 화살표로 나타낸다.

도 1은 C-그렐린 또는 그렐린-GC와 Q $\beta$  캡시드 단백질의 반응으로부터의 커플링 산물을 나타낸다. 레인 2 및 4는 각각 Q $\beta$ -C-그렐린 및 그렐린-GC-Q $\beta$ 의 가용성 분획중 커플링 산물을 나타낸다. 불용성 분획중 산물은 거의 존재하지 않았다.

실시예 16

Q $\beta$  캡시드 단백질에 커플링된 C-그렐린 또는 그렐린-GC에 의한 마우스의 면역화

암컷 C57BL/6 마우스(그룹당 5마리)를 Q $\beta$  캡시드 단백질에 커플링된 뮤린 C- 그렐린 (서열번호 77) 또는 뮤린 그렐린-GC (서열번호 105)로 백신화시켰다. 각 샘플로부터 50 $\mu$ g의 투석된 백신을 PBS에서 200 $\mu$ l 용량으로 희석하고 1, 14, 및 42일째 피하 주사하였다(배쪽 양 사이드로 100 $\mu$ l씩). 추가의 애주번트없이 백신을 투여하였다. 대조군의 마우스는 PBS로 면역화시켰다. 면역화시킨 후 14, 21, 28, 42일째, 이후 매달 1개월 간격으로 안와후방으로 출혈시켰다. 그렐린 단백질-특이 ELISA를 사용하여 혈청을 분석하였다(실시예 17). 추가로, 마우스의 체중 및 음식물 소비량을 실험 시간에 따라 일정한 간격으로 조사하였다(실시예 18).

실시예 17

ELISA에서의 그렐린-특이 항체 검출

ELISA 플레이트를 세린-옥타닐화된 뮤린 그렐린(Bachem, Product No. H-4862)으로 20 $\mu$ g/ml의 농도로 코팅하였다. 플레이트를 차단하고 14, 21, 및 42일째부터 일련의 희석된 마우스 혈청과 함께 인큐베이션시켰다. 결합된 항체는 효소적으로 표지된 항-마우스 IgG 항체로 검출하였다. 대조군으로서, 동일한 마우스의 면역전 혈청을 시험하였다(도 2).

Q $\beta$ -C-그렐린 또는 그렐린-GC-Q $\beta$ 로 면역화된 마우스에서, 21일째 평균 역가는 각각 13000 및 8000에 도달하였다(도 2). 면역전 혈청 또는 PBS로 면역화된 마우스로부터의 혈청은 그렐린 펩타이드과의 어느 반응도 나타내지 않았다. 그렐린-VLP 컨쥬게이트는 그렐린이 자기단백질인 경우에도 그렐린에 대하여 고도의 항체를 유도할 수 있음이 명확하게 입증되었다.

실시예 18

Q $\beta$  캡시드 단백질에 커플링된 C-그렐린 또는 그렐린-GC에 의한 효능 시험

암컷 C57BL/6 마우스(그룹당 5마리)를 실시예 16에 기술된 바와 같이 Q $\beta$  캡시드 단백질에 커플링된 뮤린 C- 그렐린 또는 뮤린 그렐린-GC로 백신화시켰다. 0일 및 14일 사이에 모든 마우스를 정상 식이요법 처리하였다. 연속하여 모든 마우스에 고지방(45%)을 제공하여 식이요법에 의해 유도된 비만 발생을 촉진시켰다. 음식물 및 음료는 임의로 투여하였다. 각 마우스의 체중 변화를 조사하고, 케이지당(즉, 그룹당) 음식물 및 음료 소비량을 면역후 일정한 간격으로 조사하였다(면역 후 5, 11, 14, 21, 28, 35, 40, 49, 및 55일째) (참조 도 3).

Q $\beta$ -C-그렐린 또는 그렐린-GC-Q $\beta$ 로 면역화된 마우스에서, 음식물 섭취량은 PBS로 면역화된 대조군 마우스와 비교하여 대량 평균적으로 30-40% 감소되었다(도 3). 그렐린-VLP 컨쥬게이트가 식욕을 억제하고 음식물 소비량을 감소시킬 수 있다고 입증되었다.

실시예 19

비만인 동물 모델에서의 Q $\beta$  캡시드 단백질에 커플링된 C-그렐린 또는 그렐린-GC에 의한 효능 시험

암컷 C57BL/6 *ob/ob* 마우스(그룹당 5마리)를 Q $\beta$  캡시드 단백질에 커플링된 뮤린 C- 그렐린 또는 뮤린 그렐린-GC로 백신화시켰다. 대조군은 PBS 또는 Q $\beta$  VLP만으로 면역화시켰다. 50 $\mu$ g의 투석된 백신 또는 대조군 단백질을 200 $\mu$ l 용량의 PBS으로 희석하고 alum을 포함하거나 포함하지 않고, 0일째 피하 주사하였다(배쪽 양 사이드로 100 $\mu$ l씩). 14, 28 및 42일째 상응하는 제제를 마우스에 추가접종하였다. 마우스를 0, 14, 21, 42, 56, 70일 및 이후 매달 1개월 간격으로 안와후방으로 출혈시켰다. 실시예 17에 기술된 바와 같이 그렐린-특이 ELISA에서 그렐린-특이 항체에 대하여 혈청을 분석하였다. 실험 기간동안 그렐린-특이 항체 역가가 현저히 감소하는 경우에 따라 마우스에 추가 접종하였다. 백신의 효능은 임의 조건하에서 음식물 소비량을 측정하고, 실시예 18에 기술된 바와 같이 마우스의 체중 증가를 하여 관찰하여 조사하였다.

실시예 20:

AP205 코트 단백질 유전자

AP205 코트 단백질 (CP)의 cDNA(서열번호: 28)를 역전사-PCR 기술을 사용하여 서열화용의 시판용 플라스미드 pCR 4-TOPO에서 클로닝하여 파지 AP205 RNA로부터 생성된 2개의 cDNA 단편으로부터 어셈블리하였다. 역전사 기술은 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있다. 플라스미드 p205-246에 포함된 첫번째 단편은 CP 서열의 상류 269개의 뉴클레오티드 및 CP의 처음 24개의 N-말단의 아미노산을 코딩하는 74개의 뉴클레오티드를 포함하였다. 플라스미드 p205-262에 포함된 두번째 단편은 CP의 아미노산 12-131을 코딩하는 363개의 뉴클레오티드 및 CP 서열의 하류 162개의 뉴클레오티드를 포함하였다. p205-246 및 p205-262 둘 모두 J. Klovins로부터 입수하였다.

플라스미드 283, -58을 2단계 PCR에 의해 디자인하여 하나의 전장 CP 서열에서 플라스미드 p205-246 및 p205-262로부터 CP 단편 두개 모두를 융합시켰다.

플라스미드 pQb185내로 클로닝하기 위한 *NcoI* 부위를 갖는 상류 프라이머 p1.44 또는 플라스미드 pQb10 내로 클로닝하기 위한 *XbaI* 부위를 갖는 p1.45, 및 *HindIII* 제한 부위를 갖는 하류 프라이머 p1.46을 사용하였다(제한 효소의 인식 부위는 밑줄로 표시):

p1.44 5'-AACC ATG GCA AAT AAG CCA ATG CAA CCG-3' (서열번호: 139)

p1.45 5'-AATCTAGAATTTTTCTGCGCACCCATCCCGG-3' (서열번호: 140)

p1.46 5'-AAAAGC TTA AGC AGT AGT ATC AGA CGA TAC G-3' (서열번호: 141)

추가로 2개의 프라이머, p205-262에 포함된 단편의 5' 말단에 어닐링하는 p1.47, 및 플라스미드 p205-246에 포함된 단편의 3' 말단에 어닐링하는 p1.48를 사용하여 1차 PCR에서 단편을 증폭시켰다. 프라이머 p1.47 및 p1.48은 서로 상보적이다.

p1.47: 5'-GAGTGATCCAACCTCGTTTATCAACTACATTTTCAGCAAGTCTG-3' (서열번호: 142)

p1.48: 5'-CAGACTTGCTGAAAATGTAGTTGATAAACGAGTTGGATCACTC-3' (서열번호: 143)

처음 2개의 PCR 반응에서, 두개의 단편이 생성되었다. 첫번째 단편은 프라이머 p1.45 및 p1.48 및 주형 p205-246에 의해 생성되었다. 두번째 단편은 프라이머 p1.47 및 p1.46, 및 주형 p205-262에 의해 생성되었다. 두개의 단편을 프라이머 조합물 p1.45 및 p1.46 또는 p1.44 및 p1.46과 함께 두번째 PCR 반응, 스플라이스-중복 신장을 위한 주형으로서 사용하였다. 두개의 2차 단계 PCR 반응 산물을 각각 *XbaI* 또는 *NcoI*, 및 *HindIII*로 분해하고, 동일한 제한 부위를 사용하여 *E.coli* 트립토판 오페론 프로모터 조절하에 두개의 pGEM-유도 발현 벡터인 pQb10 또는 pQb185내로 클로닝하였다.

2개의 플라스미드, pQb10내 wt AP205 CP를 코딩하는 유전자(서열번호: 28)를 포함하는 pAP283-58 (서열번호: 27), 및 pQb185내 돌연변이 Pro5→Thr (서열번호: 29)를 포함하는 pAP281-32 (서열번호: 30)을 수득하였다. DNA 서열화에 의해 코트 단백질 서열을 확인하였다. PAP283-58은 *XbaI* 부위 하류의 CP의 ATG 코돈 상류에 49개의 뉴클레오티드를 포함하고, 추정의 코트 단백질 mRNA의 오리지널 리보솜 결합 부위를 포함한다.

실시예 21:

재조합 AP205 VLP의 발현 및 정제

#### A. 재조합 AP205 VLP의 발현

*E. coli* JM109를 플라스미드 pAP283-58로 형질전환시켰다. 20µg/ml 앰피실린을 포함하는 5 ml의 LB 액체 배지에 단일 콜로니를 접종하고 37°C에서 16-24시간동안 진탕시키지 않고 인큐베이션시켰다.

제조된 접종물을 20µg/ml 앰피실린을 포함하는 100-300 ml의 LB 배지에 1: 100으로 희석하고, 37°C에서 밤새도록 진탕시키지 않고 인큐베이션시켰다. 생성된 2차 접종물을 0.2 % 글루코오스 및 완충용 포스페이트를 포함하는 2TY 배지에서 1: 50으로 희석하고 진탕기상에서 37°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 원심분리하여 세포를 수거하고 -80°C에서 냉동시켰다.

#### B. 재조합 AP205 VLP의 정제

용액 및 완충액:

용해 완충액

5mM EDTA을 포함하는 50mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% tritonX100 및 5µg/ml의 PMSF.

#### SAS

물중 포화된 황산암모늄

완충액 NET.

5mM EDTA을 포함하는 20 mM Tris-HCl, pH 7.8 및

150 mM NaCl.

PEG

NET중 40% (w/v) 폴리에틸렌글리콜 6000

용해:

냉동된 세포를 2 ml/g 세포로 용해 완충액에 재현탁시켰다. 혼합물을 얼음상에서 용액을 냉동시키기 위한 1분간의 간격으로 22 kHz로 15초동안 5회 초음파처리하였다. 용해물을 20 분동안 12,000 rpm에서 F34-6-38 회전날개(rotor)(Eppendorf)를 사용하여 원심분리하였다. 하기 기술하는 원심분리 단계 모두 달리 언급하지 않는 한 동일한 회전날개를 사용하여 수행하였다. 상등액을 4°C에 저장하고, 세포 조각을 용해 완충액으로 2회 세척하였다. 원심분리 후, 용해물의 상등액 및 세척 분획을 풀링하였다.

황산암모늄 침전을 추가로 사용하여 AP205 VLP를 정제할 수 있다. 첫번째 단계에서, AP205 VLP이 침전하지 않는 황산암모늄의 농도를 선택하였다. 생성된 펠릿을 버렸다. 다음 단계에서, AP205 VLP이 정량적으로 침전된 황산암모늄의 농도를 선택하고, AP205 VLP를 원심분리(14 000 rpm, 20분)에 의해 침전 단계의 펠릿으로부터 분리하였다. 수득한 펠릿을 NET 완충액에 용해시켰다.

크로마토그래피:

풀링된 상등액으로부터의 캡시드 단백질을 세파로스 4B 칼럼 (2.8 X 70 cm)에 로딩하고, NET 완충액을 사용하여 4 ml/h/분획으로 용출시켰다. 분획 28-40 을 회수하고 60% 포화도로 황산암모늄을 사용하여 침전시켰다. 분획을 SDS-PAGE 및 침전시키기 앞서 AP205에 특이적인 항혈청을 사용하는 웨스턴 블랏에 의해 분석하였다. 원심분리에 의해 분리된 펠릿을 NET 완충액에 재현탁시키고 세파로스 2B 칼럼 (2.3 X 65 cm)에 로딩하고 3 ml/h/분획으로 용출시켰다. 분획을 SDS-PAGE에 의해 분석하고 분획 44-50을 수거하고 풀링하고 60% 포화도로 황산암모늄을 사용하여 침전시켰다. 원심분리에 의해 분리된 펠릿을 NET 완충액에 재현탁시키고 세파로스 6B 칼럼 (2.5 X 47 cm)에 로딩하고 3 ml/h/분획으로 용출시켰다. 분획을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 분획 23-27을 수거하고 염 농도를 0.5 M로 조정하고 PEG 6000으로 침전시키고 물중 40% 저장액 내지 최종 농도 13.3%에 가하였다. 원심분리에 의해 분리된 펠릿을 NET 완충액에 재현탁시키고 상기와 같은 동일한 세파로스 2B 칼럼에 로딩하고 동일한 방식으로 용출시켰다. SDS-PAGE에 의한 분획 분석을 도 6C에 나타내었다. 분획 43-53을 수거하고 60% 포화도로 황산암모늄을 사용하여 침전시켰다. 원심분리에 의해 분리된 펠릿을 물에 다시 용해시키고 수득한 단백질을 용액에 대하여 광범위하게 투석시켰다. 세포 1mg당 약 10 mg의 정제된 단백질을 분리할 수 있었다.

전자 현미경으로 바이러스양 입자를 관찰하므로써 이들이 파지 입자와 동일한 것임을 나타내었다.

명확한 이해를 위해 설명 및 실시예를 통해 더욱 상세히 본 발명을 전체적으로 기술하였고, 본 분야의 기술자는 본 발명의 범위 또는 그의 특정 일례에 영향을 주지 않으면서 광범위하고 동등한 범위의 조건, 제조 및 다른 파라미터 내에서 본 발명을 변형하거나 수정하여 동일하게 수행할 수 있고, 그러한 수정 및 변형이 본 발명의 범위내 포함된다는 것을 이해할 것이다.

본 명세서에서 기술된 모든 출원, 특허 및 특허 출원은 본 발명이 포함된 분야의 기술자의 수준으로 암시되고, 각 개의 출원, 특허 및 특허 출원은 참고문헌으로서 인용된다고 구체적이고 개별적으로 지정된 바와 같이 참고문헌으로서 인용된다.

**(57) 청구의 범위**

**청구항 1.**

- (a) 적어도 하나의 제 1 결합부위를 갖는 코어 입자; 및
- (b) 적어도 하나의 제 2 결합부위를 갖는 적어도 하나의 항원 또는 항원 결정기를 포함하는

(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드이고, 제 2 결합부위는 (i) 항원 또는 항원 결정기와 함께 비자연적으로 발생된 결합부위; 및

(ii) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연적으로 발생된 결합부위로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 제 1 결합부위와 결합할 수 있으며; 항원 또는 항원 결정기 및 코어 입자는 상기 결합을 통해 상호작용하여 정돈되고 반복적인 항원 에피타입을 형성한다) 조성물.

**청구항 2.**

제 1항에 있어서, 코어 입자가 (i) 바이러스; (ii) 바이러스양 입자; (iii) 박테리오파지; (iv) RNA-파지의 바이러스양 입자; (v) 박테리아 섬모; (vi) 바이러스 캡시드 입자; 및 (vii) (i), (ii), (iii), (iv), (v) 또는 (vi)의 재조합 형태로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 3.**

제 1항에 있어서, 코어 입자가 바람직하게 바이러스양 입자이고, 바람직하게 바이러스양 입자가 재조합 바이러스양 입자인 조성물.

**청구항 4.**

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 바이러스양 입자는

(a) B형 간염 바이러스의 재조합 단백질; (b) 홍역 바이러스의 재조합 단백질; (c) 신드비스 바이러스의 재조합 단백질; (d) 로타바이러스의 재조합 단백질; (e) 구제 질환 바이러스의 재조합 단백질; (f) 레트로바이러스의 재조합 단백질; (g) 노르윙크 바이러스의 재조합 단백질; (h) 알파바이러스의 재조합 단백질; (i) 인간 파필로마바이러스의 재조합 단백질; (j) 폴리오마바이러스의 재조합 단백질; (k) 박테리오파지의 재조합 단백질; (l) RNA-파지의 재조합 단백질; (m) Ty의 재조합 단백질; (n) Q $\beta$ -파지의 재조합 단백질; (o) GA-파지의 재조합 단백질; (p) fr-파지의 재조합 단백질; (q) AP205 파지의 재조합 단백질; 및 (r) (a) 내지 (q)로부터의 재조합 단백질중 어느 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택된 재조합 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 조성물.

**청구항 5.**

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 바이러스양 입자가 B형 간염 바이러스 코어 항원인 조성물.

**청구항 6.**

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 바이러스양 입자가 RNA-파지의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 그로 구성된 조성물.

**청구항 7.**

제 6항에 있어서, RNA-파지가

- a) 박테리오파지 Q $\beta$  ;
- b) 박테리오파지 R17 ;
- c) 박테리오파지 fr;
- d) 박테리오파지 GA;
- e) 박테리오파지 SP;
- f) 박테리오파지 MS2;
- g) 박테리오파지 M11 ;
- h) 박테리오파지 MX1 ;
- i) 박테리오파지 NL95;
- k) 박테리오파지 f2 ;
- l) 박테리오파지 PP7; 및
- m) 박테리오파지 AP205로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 8.**

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 바이러스양 입자가 RNA-파지 Q $\beta$ 의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나 다르게는 그로 구성된 조성물.

**청구항 9.**

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 바이러스양 입자가 RNA-파지 fr의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나 다르게는 그로 구성된 조성물.

**청구항 10.**

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 바이러스양 입자가 RNA-파지 AP205의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나 다르게는 그로 구성된 조성물.

**청구항 11.**

제 3항 내지 제 10항중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질이 RNA 파지의 코트 단백질을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성하거나, 구성된 조성물.

**청구항 12.**

제 11항에 있어서, 아미노산을 갖는 RNA 파지의 코트 단백질이 (a) 서열번호: 4; (b) 서열번호: 4 및 서열번호:5의 혼합물; (c) 서열번호: 6; (d) 서열번호: 7; (e) 서열번호:8 ;(f) 서열번호: 9; (g) 서열번호: 9 및 서열번호: 10의 혼합물; (h) 서열번호: 11; (i) 서열번호: 12; (k) 서열번호: 13; (l) 서열번호: 14; (m) 서열번호: 15; (n) 서열번호: 16; 및 (o) 서열번호: 28로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 13.**

제 3항 내지 제 10항중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질이 RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질을 포함하거나, 다르게는 본질적으로 그로 구성하거나, 구성된 조성물.

**청구항 14.**

제 13항에 있어서, RNA-파지가

a) 박테리오파지 QB ; b) 박테리오파지 R17 ; c) 박테리오파지 fr; d) 박테리오파지 GA; e) 박테리오파지 SP; f) 박테리오파지 MS2; g) 박테리오파지 M11 ; h) 박테리오파지 MX1 ; i) 박테리오파지 NL95; k) 박테리오파지 f2 ; l) 박테리오파지 PP7; 및 m) 박테리오파지 AP205로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 15.**

제 13항 또는 제 14항에 있어서, RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질이 치환에 의해 적어도 하나의 리신 잔기가 제거되므로써 변형된 조성물.

**청구항 16.**

제 13항 또는 제 14항에 있어서, RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질이 치환에 의해 적어도 하나의 리신 잔기가 첨가되므로써 변형된 조성물.

**청구항 17.**

제 13항 또는 제 14항에 있어서, RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질이 적어도 하나의 리신 잔기의 결실에 의해 변형된 조성물.

**청구항 18.**

제 13항 또는 제 14항에 있어서, RNA 파지의 뮤턴트 코트 단백질이 삽입에 의해 적어도 하나의 리신 잔기가 첨가되므로써 변형된 조성물.

**청구항 19.**

제 1항 내지 제 18항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부위가 적어도 하나의 공유 결합을 통해 제 1 결합부위에 결합할 수 있는 조성물.

**청구항 20.**

제 1항 내지 제 19항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부위가 적어도 하나의 비펩티드 결합을 통해 제 1 결합부위에 결합할 수 있는 조성물.

**청구항 21.**

제 1항 내지 제 20항중 어느 한 항에 있어서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드가 코어 입자에 융합된 조성물.

**청구항 22.**

제 1항 내지 제 21항중 어느 한 항에 있어서, 항원 또는 항원 결정기가 a) 인간 그렐린; b) 소 그렐린 ; c) 양 그렐린 ; d) 개 그렐린; e) 고양이 그렐린 ; f) 마우스 그렐린; g) 돼지 그렐린 ; h) 말 그레린; k) a)-h)의 어느 그렐린의 펩티드 또는 그의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 그렐린인 조성물.

**청구항 23.**

제 1항 내지 제 22항중 어느 한 항에 있어서, 항원 또는 항원 결정기가 a) 인간 그렐린 펩티드; b) 소 그렐린 펩티드; c) 양 그렐린 펩티드; d) 개 그렐린 펩티드; e) 고양이 그렐린 펩티드; f) 마우스 그렐린 펩티드; g) 돼지 그렐린 펩티드

드; h) 말 그렐린 펩티드; k) a)-h)의 어느 그렐린의 펩티드 또는 그의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 그렐린 펩티드인 조성물.

**청구항 24.**

제 1항 내지 제 23항중 어느 한 항에 있어서, 항원 또는 항원 결정기가 그렐린 펩티드, 바람직하게, 인간 그렐린 펩티드 또는 개 그렐린 펩티드인 조성물.

**청구항 25.**

제 1항 내지 제 24항중 어느 한 항에 있어서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드가

- (a) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:48)
- (b) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:31)
- (c) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:49)
- (d) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:50)
- (e) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:32)
- (f) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:51)
- (g) KKPPAKLQPR (서열번호:52)
- (h) PPAKLQPR (서열번호:53)
- (i) AKLQPR (서열번호:54)
- (j) GSSFLSPEHQ (서열번호:55)
- (k) EHQRVQRKE (서열번호:56)
- (l) KLQPR (서열번호:59)
- (m) GSSFLSPEHQRVQ (서열번호:60)
- (n) QRKESKKPPAKLQPR (서열번호:61)
- (o) GSSFLSPEHQKLQ (서열번호:62)
- (p) QRKESKKPPAKLQPR (서열번호:63)
- (q) EHQRVQRKES (서열번호:111)
- (r) EHQAQQRKE (서열번호:112)
- (s) EHQAQQRKES (서열번호:113)
- (t) EHQKLQRKE (서열번호:114)
- (u) EHQKLQRKES (서열번호:115)
- (v) LSPEHQRVQQ (서열번호:116)
- (w) LSPEHQKAQQ (서열번호:117)
- (x) LSPEHQKLQQ (서열번호:118), 및
- (y) GSSFLSP (서열번호:119).

으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 바람직하게 갖는 조성물.

**청구항 26.**

제 1항 내지 제 25항중 어느 한 항에 있어서, 항원 또는 항원 결정기가 그렐린의 적어도 하나의 항원 부위를 갖는 그렐린 펩티드인 조성물.

**청구항 27.**

제 1항 내지 제 26항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부위를 포함하거나, 다르게는 그로 구성된 아미노산 링커를 추가로 포함하는 조성물.

**청구항 28.**

제 1항 내지 제 27항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부위 또는 제 2 결합부위를 갖는 아미노산 링커가 그의 C-말단, 또는 다르게는 그의 N-말단에서 그렐린 또는 그렐린 펩티드에 결합하는 조성물.

**청구항 29.**

제 1항 내지 제 28항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부위 또는 제 2 결합부위를 갖는 아미노산 링커가 (a) GGC ; (b)GGC-CONH<sub>2</sub> ;(c) GC ; (d)GC-CONH<sub>2</sub> ; (e)C ; 및 (f) C-CONH<sub>2</sub>로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 30.**

제 1항 내지 제 29항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부위를 갖는 그렐린 또는 그렐린 펩티드가

- (a) CGSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:64)
- (b) CGSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:65)
- (c) CGSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:71)
- (d) CGSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:72)
- (e) CGSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:77)
- (f) CGSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:106)
- (g) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:66)
- (h) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:120)
- (i) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:67)
- (j) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:121)
- (k) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:73)
- (l) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:123)
- (m) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:74)
- (n) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:124)
- (o) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:105)
- (p) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:107)
- (q) CKKPPAKLQPR (서열번호:108)
- (r) CPPAKLQPR (서열번호:70)
- (s) CAKLQPR (서열번호:109)
- (t) GSSFLSPEHQC (서열번호:110)
- (u) CEHQRVQQRKE (서열번호:76)
- (v) GSSFLSPEHQRVQC (서열번호:68)
- (w) GSSFLSPEHQRVQGC (서열번호:122)
- (x) CQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:69)
- (y) GSSFLSPEHQKLQC (서열번호:75)
- (z) GSSFLSPEHQKLQGC (서열번호:125)
- (aa) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:126)
- (bb) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:127)
- (cc) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:128)
- (dd) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:129)
- (ee) GSSFLSPEHQKAQC (서열번호:130)
- (ff) GSSFLSPEHQKAQGC (서열번호:131)
  
- (gg) GGSSFLSPEHQGC (서열번호:132)
- (hh) CKKPPAKLQPR (서열번호:133)
- (ii) CEHQKAQQRKE (서열번호:134)
- (jj) CEHQKAQQRKES (서열번호:135)
- (kk) CLSPEHQKAQQ (서열번호:136)
- (ll) CEHQRVQQRKES (서열번호:137) 및
- (mm) CLSPEHQRVQQ (서열번호:138)

로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 바람직하게 그는 구성된 조성물.

**청구항 31.**

제 1항 내지 제 30항중 어느 한 항에 있어서, 항원 또는 항원 결정기는 n-옥타노일-변형을 포함하지 않는 그렐린, 또는 바람직하게 그렐린 펩티드의 생물학적으로 불활성 형태인 조성물.

**청구항 32.**

- (a) 제 1항의 조성물; 및
- (b) 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 33.**

제 32항에 있어서, 추가로 애주번트를 포함하는 억제학적 조성물.

**청구항 34.**

제 32항 또는 제 33항에 있어서, 백신 조성물에 애주번트가 결합된 억제학적 조성물.

**청구항 35.**

제 1항 또는 제 31항의 조성물을 포함하는 백신 조성물.

**청구항 36.**

제 35항에 있어서, 추가로 애주번트를 포함하는 백신 조성물.

**청구항 37.**

제 35항 또는 제 36항에 있어서, 백신 조성물에 애주번트가 결합된 백신 조성물.

**청구항 38.**

제 35항 또는 제 37항에 있어서, 바이러스양 입자가 RNA-과지의 재조합 단백질, 또는 그의 단편을 포함하거나, 다르게는 그로 구성된 백신 조성물.

**청구항 39.**

제 35항 내지 제 38항중 어느 한 항에 있어서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드가 a) 인간 그렐린; b) 소 그렐린; c) 양 그렐린; d) 개 그렐린; e) 고양이 그렐린; f) 마우스 그렐린; g) 돼지 그렐린; h) 말 그렐린; k) a)-h)의 어느 그렐린의 펩티드 또는 그의 단편으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 백신 조성물.

**청구항 40.**

제 35항 내지 제 40항중 어느 한 항에 있어서, 그렐린 또는 그렐린 펩티드가

- (a) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:48)
- (b) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:31)
- (c) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:49)
- (d) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:50)
- (e) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:32)
- (f) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:51)
- (g) KKPPAKLQPR (서열번호:52)
- (h) PPAKLQPR (서열번호:53)
- (i) AKLQPR (서열번호:54)
- (j) GSSFLSPEHQ (서열번호:55)
- (k) EHQRVQRKE (서열번호:56)
- (l) KLQPR (서열번호:59)
- (m) GSSFLSPEHQRVQ (서열번호:60)
- (n) QRKESKKPPAKLQPR (서열번호:61)
- (o) GSSFLSPEHQKLQ (서열번호:62)
- (p) QRKESKKPPAKLQPR (서열번호:63)
- (q) EHQRVQRKES (서열번호:111)
- (r) EHQAQRKE (서열번호:112)
- (s) EHQAQRKES (서열번호:113)
- (t) EHKLQRKE (서열번호:114)
- (u) EHKLQRKES (서열번호:115)
- (v) LSPEHQRVQQ (서열번호:116)
- (w) LSPEHQKAQQ (서열번호:117)
- (x) LSPEHQKLQQ (서열번호:118), 및
- (y) GSSFLSP (서열번호:119).

으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 바람직하게 갖는 백신 조성물.

**청구항 41.**

제 35항 내지 제 39항중 어느 한 항에 있어서, 항원 또는 항원 결정기가

- (a) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:48)
- (b) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:31)
- (c) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:49)
- (d) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:50)
- (e) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:32)
- (f) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:51)
- (g) KKPPAKLQPR (서열번호:52)
- (h) PPAKLQPR (서열번호:53)
- (i) AKLQPR (서열번호:54)
- (j) GSSFLSPEHQ (서열번호:55)
- (k) EHQRVQQRKE (서열번호:56)
- (l) KLQPR (서열번호:59)
- (m) GSSFLSPEHQRVQ (서열번호:60)
- (n) QRKESKKPPAKLQPR (서열번호:61)
- (o) GSSFLSPEHQKLQ (서열번호:62)
- (p) QRKESKKPPAKLQPR (서열번호:63)
- (q) EHQRVQQRKES (서열번호:111)
- (r) EHQAQQRKE (서열번호:112)
- (s) EHQAQQRKES (서열번호:113)
- (t) EHKLQQRKE (서열번호:114)
- (u) EHKLQQRKES (서열번호:115)
- (v) LSPEHQRVQQ (서열번호:116)
- (w) LSPEHQKAQQ (서열번호:117)
- (x) LSPEHQKLQQ (서열번호:118), 및
- (y) GSSFLSP (서열번호:119).

으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 바람직하게 갖는 그렐린 펩티드인 백신 조성물.

**청구항 42.**

제 35항 내지 제 41항중 어느 한 항에 있어서, 제 2 결합부위를 갖는 항원 또는 항원 결정기가

- (a) CGSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:64)
- (b) CGSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:65)
- (c) CGSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:71)
- (d) CGSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:72)
- (e) CGSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:77)
- (f) CGSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:106)
- (g) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:66)
- (h) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:120)
- (i) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:67)
- (j) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:121)
- (k) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:73)
- (l) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:123)
- (m) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:74)
- (n) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:124)
- (o) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:105)
- (p) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:107)
- (q) CKKPPAKLQPR (서열번호:108)
- (r) CPPAKLQPR (서열번호:70)
- (s) CAKLQPR (서열번호:109)
- (t) GSSFLSPEHQC (서열번호:110)
- (u) CEHQRVQQRKE (서열번호:76)
- (v) GSSFLSPEHQRVQC (서열번호:68)
- (w) GSSFLSPEHQRVQGC (서열번호:122)
- (x) CQRKESKKPPAKLQPR (서열번호:69)
- (y) GSSFLSPEHQKLQC (서열번호:75)
- (z) GSSFLSPEHQKLQGC (서열번호:125)
- (aa) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:126)
- (bb) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:127)
- (cc) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC (서열번호:128)
- (dd) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC (서열번호:129)
- (ee) GSSFLSPEHQKAQC (서열번호:130)
- (ff) GSSFLSPEHQKAQGC (서열번호:131)
  
- (gg) GGSSFLSPEHQGC (서열번호:132)
- (hh) CKKPPAKLQPR (서열번호:133)
- (ii) CEHQKAQQRKE (서열번호:134)
- (jj) CEHQKAQQRKES (서열번호:135)
- (kk) CLSPEHQKAQQ (서열번호:136)
- (ll) CEHQRVQQRKES (서열번호:137) 및
- (mm) CLSPEHQRVQQ (서열번호:138)

으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 백신 조성물.

### 청구항 43.

- (a) 바이러스양 입자를 제공하고;
- (b) 적어도 하나의 제 2 결합부위를 갖는 항원 또는 항원 결정기를 제공하고(여기에서, 항원 또는 항원 결정기는 그 델린 또는 그델린-유도 펩티드이고, 제 2 결합부위는 (i) 항원 또는 항원 결정기와 함께 비자연적으로 발생된 결합부위; 및 (ii) 항원 또는 항원 결정기와 함께 자연적으로 발생된 결합부위로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 제 1 결합부위와 결합할 수 있다);
- (c) 항원 또는 항원 결정기와 코어 입자를 결합시키는 것을 포함하는(여기에서, 항원 또는 항원 결정기와 코어 입자는 상기 결합을 통해 상호작용하여 정돈되고 반복적인 항원 어레이를 형성한다) 제 1항 내지 제 42항중 어느 한 항의 조성물을 제조하는 방법.

### 청구항 44.

제 1항 내지 제 43항중 어느 한 항의 조성물을 동물 또는 인간에게 투여하는 것을 포함하는 면역화 방법.

**청구항 45.**

제 44항에 있어서, 항원 또는 항원 결정기가 자가-항원인 면역화 방법.

**청구항 46.**

제 44항 또는 제 45항에 있어서, 동물이 인간이고, 항원 또는 항원 결정기가 인간 그렐린 또는 인간 그렐린 펩티드인 면역화 방법.

**청구항 47.**

제 44항 내지 제 46항중 어느 한 항에 있어서, 동물이 고양이 기원이고, 항원 또는 항원 결정기가 인간 그렐린 또는 인간 그렐린 펩티드인 면역화 방법.

**청구항 48.**

제 44항 내지 제 46항중 어느 한 항에 있어서, 동물이 개 기원이고, 항원 또는 항원 결정기가 인간 그렐린 또는 인간 그렐린 펩티드인 면역화 방법.

**청구항 49.**

약제로서 사용하기 위한 제 1항 내지 제 42항중 어느 한 항의 조성물.

**청구항 50.**

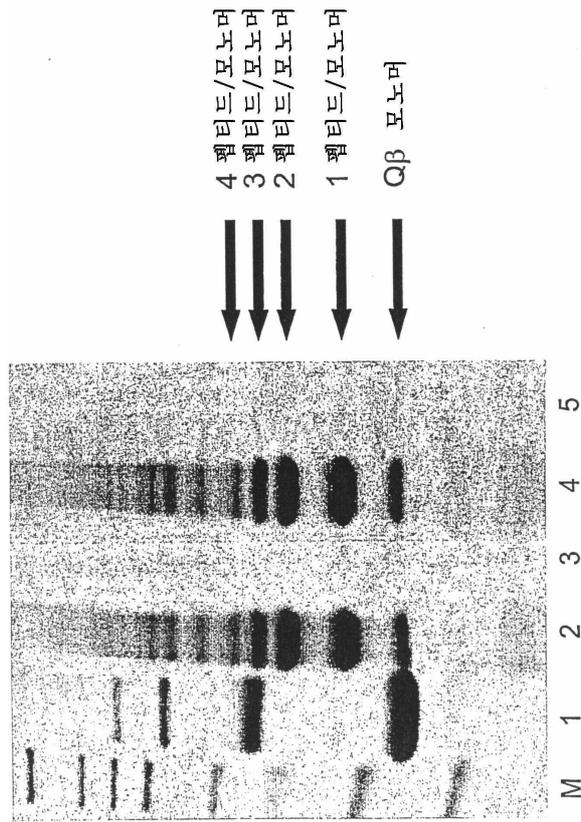
비만 치료용 약제를 제조하기 위한 제 1항 내지 제 42항중 어느 한 항의 조성물의 용도.

**요약**

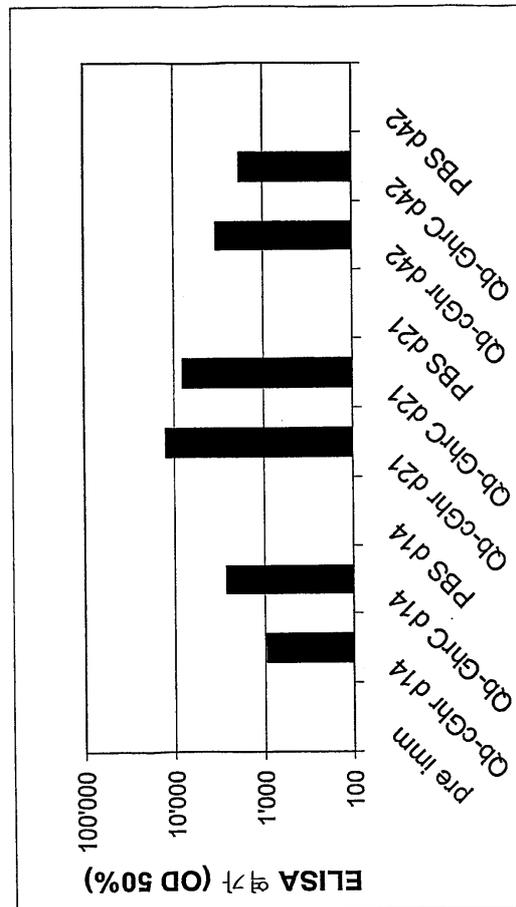
본 발명은 분자 생물학, 바이러스학, 면역학 및 의학 분야에 관한 것이다. 본 발명은 정돈되고 반복적인 항원 또는 항원 결정기 어레이, 및 특히 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드-어레이를 포함하는 조성물을 제공한다. 더욱 특히, 본 발명은 바이러스양(virus-like) 입자 및 그에 결합하는 적어도 하나의 그렐린 또는 그렐린-유도 펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 컨쥬게이트 및 정돈되고 반복적인 어레이 각각을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 비만 및 음식물 섭취량 증가 또는 체중 증가와 관련된 다른 질환을 치료하기 위한 백신 및 면역 반응 특히 항체 반응을 효과적으로 유도하기 위한 백신의 제조에서 유용하다. 추가로, 본 발명의 추가로, 본 발명의 조성물은 특히 지정된 범위내에서 자기-특이성 면역 반응을 효과적으로 유도시키는데 유용하다.

**도면**

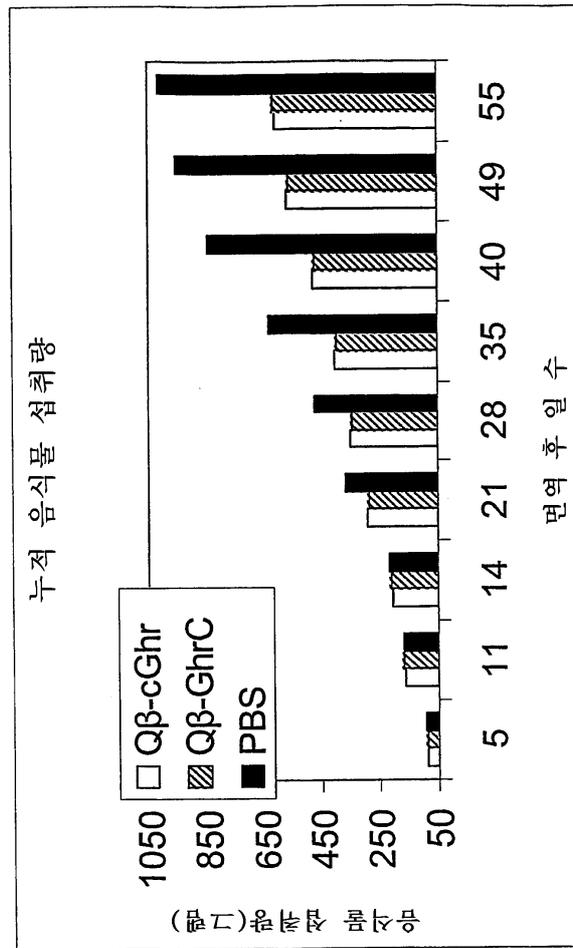
도면1



도면2



도면3



SEQUENCE LISTING

<110> Cytos Biotechnology AG  
 Bachmann, Martin F  
 Fulurija, Alma

<120> Grehlin-Carrier Conjugates

<130> C62354PC

<150> US 60/396,638

<151> 2002-07-19

<160> 146

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Ala Val Val Ser Phe Gly Val Asn Ala Ala Pro Thr Thr Pro Gln  
 1 5 10 15



50

55

60

Leu Ala Gln Glu Gly Ala Thr Ser Ser Ala Val Gly Phe Asn Ile Gln  
65 70 75 80

Leu Asn Asp Cys Asp Thr Asn Val Ala Ser Lys Ala Ala Val Ala Phe  
85 90 95

Leu Gly Thr Ala Ile Asp Ala Gly His Thr Asn Val Leu Ala Leu Gln  
100 105 110

Ser Ser Ala Ala Gly Ser Ala Thr Asn Val Gly Val Gln Ile Leu Asp  
115 120 125

Arg Thr Gly Ala Ala Leu Thr Leu Asp Gly Ala Thr Phe Ser Ser Glu  
130 135 140

Thr Thr Leu Asn Asn Gly Thr Asn Thr Ile Pro Phe Gln Ala Arg Tyr  
145 150 155 160

Phe Ala Thr Gly Ala Ala Thr Pro Gly Ala Ala Asn Ala Asp Ala Thr  
165 170 175

Phe Lys Val Gln Tyr Gln  
180

<210> 3

<211> 853

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

acgtttctgt ggctcgacgc atcttctca ttcttctctc caaaaaccac ctcatgcaat 60

ataaacatct ataaataaag ataacaata gaatattaag ccaacaaata aactgaaaaa 120

gtttgtccgc gatgctttac ctctatgagt caaaatggcc ccaatgtttc atcttttggg 180

ggaaactgtg cagtgttggc agtcaaactc gttgacaaac aaagtgtaca gaacgactgc 240

ccatgtcgat ttagaaatag ttttttgaag ggaaagcagc atgaaaatta aaactctggc 300

aatcgttggt ctgtcggctc tgcctcag ttctacgacg gctctggccg ctgccacgac 360

ggttaatggt gggaccgttc actttaaagg ggaagttggt aacgccgctt gcgcagttga 420

tgcaggctct gttgatcaaa cgttcagtt aggacaggtt cgtaccgcat cgctggcaca 480

ggaaggagca accagttctg ctgtcggttt taacattcag ctgaatgatt gcgataccaa 540

tgttgcacat aaagccgctg ttgccttttt aggtacggcg attgatgcgg gtcataccaa 600

cgttctggct ctgcagagtt cagctgcggg tagcgcaaca aacggtggtg tgcagatcct 660  
 ggacagaacg ggtgctgctg tgacgctgga tggtagcgaca tttagttcag aaacaaccct 720  
 gaataacgga accaatacca ttccggtcca ggcgcggttat tttgcaaccg gggccgcaac 780  
 cccgggtgct gctaatacgg atgcgacctt caaggttcag tatcaataac ctacctaggt 840  
 tcagggacgt tca 853

<210> 4  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriophage Q-beta

<400> 4

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

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

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 5  
 <211> 329  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriophage Q-beta

<400> 5

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly  
1 5 10 15

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser  
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser  
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu  
100 105 110

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln  
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro  
145 150 155 160

Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu  
165 170 175

Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala  
180 185 190

Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu  
195 200 205

Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr  
210 215 220

Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr



100 105 110  
 Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile  
 115 120 125

Tyr

<210> 7  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriophage fr

<400> 7

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr  
 1 5 10 15

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu  
 20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser  
 35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu  
 50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val  
 65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe  
 85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr  
 100 105 110

Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly  
 115 120 125

Ile Tyr  
 130

<210> 8  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriophage GA

<400> 8

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly  
 1 5 10 15

Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
 20 25 30

Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr  
 35 40 45

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val  
 50 55 60

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

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
 85 90 95

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe  
 100 105 110

Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe  
 115 120 125

Tyr Ala  
 130

- <210> 9
- <211> 132
- <212> PRT
- <213> Bacteriophage SP

<400> 9

Met Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly  
 1 5 10 15

Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys  
 50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys



130

135

140

Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro  
145 150 155 160

Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly  
165 170 175

Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg  
180 185 190

Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu  
195 200 205

Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp  
210 215 220

Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp  
225 230 235 240

Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly  
245 250 255

Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu  
260 265 270

Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala  
275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser  
290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro  
305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser  
325

<210> 11

<211> 130

<212> PRT

<213> Bacteriophage MS2

<400> 11

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr





130

<210> 14  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriophage NL95

<400> 14

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

Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
 50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Lys Asp Ala Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Gly Ser Arg Asp Val Thr Leu Ser Phe  
 85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Glu Arg Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly  
 130 135 140

Asn Asn Pro Tyr Pro Gly Val Pro Asp Ser Pro Asn Val Lys Pro Pro  
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly  
 165 170 175

Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys  
 180 185 190

Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu

195

200

205

Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp  
210 215 220

Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp  
225 230 235 240

Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp  
245 250 255

Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr  
260 265 270

Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala  
275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser  
290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro  
305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu  
325 330

<210> 15  
<211> 129  
<212> PRT  
<213> Bacteriophage f2

<400> 15

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val  
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val  
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala



<211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Bacteriophage Qbeta 240 mutant

<400> 17

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

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

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 18  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Bacteriophage Q-beta 243 mutant

<400> 18

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Lys Ile Gly Lys Asp Gly Lys  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val

20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

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

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 19  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Bacteriophage Q-beta 250 mutant

<400> 19

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

85

90

95

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

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 20

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Bacteriophage Q-beta 251 mutant

<400> 20

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

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

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Bacteriophage Q-beta 259 mutant

<400> 21

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

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

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 22  
 <211> 185  
 <212> PRT  
 <213> Hepatitis B virus

<400> 22

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu  
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp  
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35

40

45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu  
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala  
65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys  
85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg  
100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr  
115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro  
130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg  
145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg  
165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
180 185

<210> 23

<211> 212

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 23

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile  
20 25 30

Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu  
35 40 45

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser

50

55

60

Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His  
65 70 75 80

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Asn  
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Val Ser Arg Asp  
100 105 110

Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Thr Thr Val Gly Leu Lys Phe Arg Gln  
115 120 125

Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val  
130 135 140

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr  
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro  
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg  
195 200 205

Glu Ser Gln Cys  
210

<210> 24

<211> 188

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 24

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys

35

40

45

Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Glu Gln  
65 70 75 80

Val Arg Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys  
85 90 95

Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln  
100 105 110

His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr  
115 120 125

Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro  
130 135 140

Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser  
145 150 155 160

Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro  
165 170 175

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Thr Asn Cys  
180 185

<210> 25

<211> 185

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 25

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu  
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp  
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys  
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu





ggcctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga 900  
 ggccttgttt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggogcca 960  
 tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cggtgcttca acggcctcaa cctactactg 1020  
 ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gatatggtgc actctcagta 1080  
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat 1140  
 ggctgcgccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 1200  
 ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 1260  
 accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta 1320  
 tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcagggtgg cacttttcgg 1380  
 ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 1440  
 ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 1500  
 attcaacatt tccgtgtcgc cttattccc tttttgcggt cattttgcct tctgtttttt 1560  
 gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcaogagtg 1620  
 ggttacatcg aactggatct caacagcggc aagatccttg agagttttcg cccogaagaa 1680  
 cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atccogtatt 1740  
 gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag 1800  
 tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 1860  
 gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga 1920  
 ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt 1980  
 tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgocctgta 2040  
 gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg 2100  
 caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc 2160  
 cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg 2220  
 atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg 2280  
 gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 2340  
 attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 2400  
 cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacccaa 2460  
 atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 2520  
 tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 2580  
 ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctacca ctctttttcc gaaggtaact 2640

ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 2700  
 cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg 2760  
 gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 2820  
 gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 2880  
 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgcgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 2940  
 gaagggagaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3000  
 agggagcttc cagggggaaa cgctgggtat ctttatagtc ctgtcggggtt tcgccacctc 3060  
 tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3120  
 agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt 3180  
 cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc 3240  
 gctcgccgca gccgaacgac gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc 3300  
 caatacgsaa accgcctctc cccgcgcggt gcccgattca ttaatgcagc tgtggtgtca 3360  
 tggtcggtga tcgccagggg gccgacgcg atctcgactg catggtgcac caatgcttct 3420  
 ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta tggccgtgca ggtcgtaaata cactgcataa 3480  
 ttcgtgtcgc tcaaggcgca ctcccgttct ggataatggt ttttgcgccg acatcataac 3540  
 ggttctggca aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agttaactag 3600  
 tacgcaagtt cacgtaaaaa gggtatcgcg gaatt 3635

<210> 28  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriophage AP205

<400> 28

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile  
 1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu  
 20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser  
 35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly  
 50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg



130

<210> 30  
 <211> 3607  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> plasmid pAP281-32

<400> 30  
 cgagctcgcc cctggccttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60  
 gctcgcccgg ggatcctcta gattaacca acgcgtagga gtcaggccat ggcaaataag 120  
 acaatgcaac cgatcacatc tacagcaaataaaaattgtgt ggtcggatcc aactcgttta 180  
 tcaactacat tttcagcaag tctgttacgc caacgtgtta aagttggtat agccgaactg 240  
 aataatgttt cagggtcaata tgtatctgtt tataagcgtc ctgcacctaa accgaaggtc 300  
 agatgcctgt gtcattatgc cgaatgaaaa ccaatccatt cgcacagtga tttcagggtc 360  
 agccgaaaac ttggctacct taaaagcaga atgggaaact cacaaacgta acgttgacac 420  
 actcttcgcg agcggcaacg ccggtttggg tttccttgac cctactgcgg ctatcgtatc 480  
 gtctgatact actgcttaag cttgtattct atagtgtcac ctaaactgta tgtgtatgat 540  
 acataagggt atgtattaat ggtagccgcg ttctaacgac aatatgtaca agcctaattg 600  
 tgtagcatct ggcttactga agcagaccct atcatctctc tcgtaaactg ccgtcagagt 660  
 cggttggggt ggacagacct ctgagtttct ggtaacgccg ttccgcaccc cggaaatggt 720  
 caccgaacca ttcagcaggg tcatcgctag ccagatcctc tacgccggac gcatcgtggc 780  
 ccgcatcacc ggcgccacag gtgcggtgct ggcgcctata tcgccgacat caccgatggg 840  
 gaagatcggg ctcgccactt cgggctcatg atcgtctggt tccgcctggg tatggtggca 900  
 ggccccgtgg cccgggggac tgttggggcg catctccttg catgcaccat tccttgcggc 960  
 ggcggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcttc ctaatgcagg agtcgcataa 1020  
 gggagagcgt cgatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc 1080  
 caactccgct atcgtctagt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg 1140  
 ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgcttc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg 1200  
 tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc 1260  
 ttgaagacga aagggcctcg tgatagcct atttttatag gttaatgtca tgataataat 1320  
 ggtttcttag acgtcagggt gcacttttcg gggaaatgtg cgccggacccc ctattggttt 1380  
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 1440

tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 1500  
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaagtaaa 1560  
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 1620  
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgtttttca atgatgagca cttttaaagt 1680  
tctgctatgt gtcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccc 1740  
catacactat tctcagaatg acttggtggt acctaccagt cacagaaaag catcttacgg 1800  
atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacctgccc 1860  
ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca 1920  
tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt ggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa 1980  
acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtac gaacggcaac aacgttgccg aactattaa 2040  
ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata 2100  
aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggtgg ctggtttatt gctgataaat 2160  
ctggagcccg tgagcgtggg tctcgcggtt tcattgcagc actggggcca gatggtaagc 2220  
cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata 2280  
gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt 2340  
actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcatTTTTA atttaaaagg atctaggtga 2400  
agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttocactgag 2460  
cggtcagacc ccgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tcctTTTTTT ctgcgcgtaa 2520  
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag 2580  
agctaccaac tctTTTTCCG aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg 2640  
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat 2700  
acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 2760  
ccgggttggg ctcaagacga taggtaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg 2820  
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc 2880  
gcgagcattg agaaagcgc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa 2940  
gcggcagggg cggaacaaga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc 3000  
tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 3060  
cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttctggcct 3120  
ttggctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttata ccctgattct gtggataacc 3180  
gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgccag ccgaacgacc gacggcgcag 3240

cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 3300  
 ttggccgatt cattaatgca gctgtggtgt catggtcggt gatcgccagg gtgccgacgc 3360  
 gcatctcgac tgcattggtgc accaatgctt ctggcgctcag gcagccatcg gaagctgtgg 3420  
 tatggccgtg caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt 3480  
 ctggataatg ttttttgcgg cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct 3540  
 ggtgacaatt aatcatcgaa ctagttaact agtacgcaag ttcacgtaaa aagggtatcg 3600  
 cggaatt 3607

<210> 31  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 32  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 32

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 33  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Linker

<400> 33

Gly Gly Lys Gly Gly  
 1 5

<210> 34

<211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> N-terminal glycine linker

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Glycine can be repeated from zero to five times

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Glycine can be repeated from zero to twelve times

<400> 34

Gly Cys Gly  
 1

<210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> N terminal glycine serine linkers

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Glycine can be repeated from zero to five times

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Glycine can be repeated from zero to ten times

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Serine can be repeated from zero to two times

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (5)..(9)  
 <223> These residues can be repeated from zero to three times as a group

<400> 35

Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 36

<211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> C-terminal glycine linker

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Glycine can be repeated from zero to twelve times

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Glycine can be repeated from zero to five times

<400> 36

Gly Cys Gly  
 1

<210> 37  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> C terminal glycine serine linkers

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Glycine can be repeated from zero to ten times

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Serine can be repeated from zero to two times

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (3)..(7)  
 <223> These residues can be repeated from zero to three times as a group

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Glycine can be repeated from zero to eight times

<220>  
 <221> REPEAT  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Glycine can be repeated from zero to five times

<400> 37



<400> 41

Cys Gly Gly Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala  
1 5 10 15

Pro

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C-terminal gamma 3

<400> 42

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Cys Gly

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-terminal glycine linker

<400> 43

Gly Cys Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C-terminal glycine linker

<400> 44

Gly Gly Gly Gly Cys Gly  
1 5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> C-terminal glycine-lysine linker

<400> 45

Gly Gly Lys Lys Gly Cys  
 1 5

<210> 46  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> N-terminal glycine-lysine linker

<400> 46

Cys Gly Lys Lys Gly Gly  
 1 5

<210> 47  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> C-terminal linker

<400> 47

Gly Gly Cys Gly  
 1

<210> 48  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Grehlin precursor mutant

<400> 48

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 49

<211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

<400> 49

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 50  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Canis familiaris ghrelin mutant

<400> 50

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 51  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Mus musculus ghrelin mutant

<400> 51

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 52  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 52

Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 1 5 10

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 1 5

<210> 54  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 1 5

<210> 55  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln  
 1 5 10

<210> 56  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 56

Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10

<210> 57  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> AP205 ribosomal binding site

<400> 57  
 tctagaattt tctgcgacc catcccgggt ggcgcccaaa gtgaggaaaa tcacatg 57

<210> 58  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Shine-Dalgarno sequence of vector pQb185

<400> 58  
 tctagattaa cccaacgcgt aggagtcagg ccatg 35

<210> 59  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 59  
  
 Lys Leu Gln Pro Arg  
 1 5

<210> 60  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 60  
  
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln  
 1 5 10

<210> 61  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 61  
  
 Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 1 5 10 15

<210> 62  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

<400> 62  
  
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln  
 1 5 10

<210> 63  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

<400> 63  
  
 Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg



<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> human ghrelin peptide 24-51 mutant

<400> 67

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys  
 20 25

<210> 68  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> human ghrelin peptide 24-36 mutant

<400> 68

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Cys  
 1 5 10

<210> 69  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> human ghrelin peptide 37-51 mutant

<400> 69

Cys Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 1 5 10 15

<210> 70  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> human ghrelin peptide 44-51 mutant

<400> 70

Cys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 1 5

<210> 71

<211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> dog ghrelin peptide 24-51 mutant

<400> 71

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg  
 1 5 10 15

Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 72  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> dog ghrelin peptide mutant

<400> 72

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 73  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> dog ghrelin peptide24-51 mutant

<400> 73

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys  
 20 25

<210> 74  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> dog ghrelin mutant

<400> 74

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys  
 20 25

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> dog ghrelin peptide 24-36 mutant

<400> 75

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Cys  
 1 5 10

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ghrelin peptide 31-40 mutant

<400> 76

Cys Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10

<210> 77

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse ghrelin peptide 24-51 mutant

<400> 77

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg  
 1 5 10 15

Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 78

<211> 37

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 78  
 ggtaacatcg gtcgagatgg aaaacaaact ctggtcc 37

<210> 79  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 79  
 ggaccagagt ttgttttcca tctcgaccga tgttacc 37

<210> 80  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 80  
 agctcgcccg gggatcctct ag 22

<210> 81  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 81  
 cgatgcattt catccttagt tatcaatagc ctgggttcag 40

<210> 82  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 82  
 ggcaaaatta gagactgtta ctttaggtaa gatcgg 36

<210> 83

<211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 83  
 ccgatcttac ctaaagtaac agtctctaattttgccc 36

<210> 84  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 84  
 ggccatggca cgactcgaga ctgttacttt agg 33

<210> 85  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 85  
 gatttaggtg aactatag 19

<210> 86  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 86  
 gatggacgtc aaactctggt cctcaatccg cgtgggg 37

<210> 87  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer  
  
 <400> 87  
 ccccacgcyg attgaggacc agagtttgac gtccatc 37

<210> 88

<211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> EcoRIHBcAg(s) primer  
  
 <400> 88  
 ccggaattca tggacattga ccctataaa g 31  
  
 <210> 89  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Lys-HBcAg(as) primer  
  
 <400> 89  
 cctagagcca cctttgccac catcttctaa attagtaccc acccaggtag c 51  
  
 <210> 90  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Lys-HBcAg(s) primer  
  
 <400> 90  
 gaagatggtg gcaaaggtgg ctctagggac ctagtagtca gttatgtc 48  
  
 <210> 91  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> HBcAg(1-149)Hind(as) primer  
  
 <400> 91  
 cgcgtcccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaag 38  
  
 <210> 92  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> 48as primer  
  
 <400> 92  
 gtgcagtatg gtgaggtgag gaatgctcag gagactc 37  
  
 <210> 93

<211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> 48s primer  
  
 <400> 93  
 gagtctcctg agcattcctc acctcacat actgcac 37  
  
 <210> 94  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> 107as primer  
  
 <400> 94  
 cttccaaaag tgaggaaga aatgtgaaac cac 33  
  
 <210> 95  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> HBcAg149hind-as  
  
 <400> 95  
 cgcgtcccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaagcg ttgatag 47  
  
 <210> 96  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> 107s primer  
  
 <400> 96  
 gtggtttcac atttcttccc tcacttttgg aag 33  
  
 <210> 97  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> HBcAgwtHindIIII primer  
  
 <400> 97  
 cgcgtcccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg 38  
  
 <210> 98



<223> CeH3rev primer

<400> 101

accagaagca cgagaccagg tcaagttaac atcttccaaa ttattacca c

51

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CeH3rev primer peptide

<400> 102

Asp Glu Leu Asn Asn Gly Val

1 5

<210> 103

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HBcAg-wt EcoRI fwd primer

<400> 103

ccggaattca tggacattga ccctataaa g

31

<210> 104

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HBcAg-wt Hind III rev primer

<400> 104

cgcgtcccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg

38

<210> 105

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GhrelC mutant

<400> 105

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys

20 25 30

<210> 106  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> cGhrQ14 mutant

<400> 106

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 107  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> GhrQ14C mutant

<400> 107

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys  
 20 25

<210> 108  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Ghrelin peptide mutant

<400> 108

Cys Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 1 5 10

<210> 109  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Ghrelin peptide mutant

<400> 109

Cys Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
1 5

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ghrelin peptide mutant

<400> 110

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Cys  
1 5 10

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser  
1 5 10

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 112

Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu  
1 5 10

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 113

Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser  
1 5 10

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 114

Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10

<210> 115  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

<400> 115

Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys Glu Ser  
 1 5 10

<210> 116  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 116

Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln  
 1 5 10

<210> 117  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 117

Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln  
 1 5 10

<210> 118  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

<400> 118

Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln  
 1 5 10

<210> 119  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 119

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro  
 1 5

<210> 120

<211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ghrelin peptide mutant

<400> 120

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys  
 20 25

<210> 121  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ghrelin peptide mutant

<400> 121

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys  
 20 25 30

<210> 122  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ghrelin peptide mutant

<400> 122

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gly Cys  
 1 5 10 15

<210> 123  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ghrelin peptide mutant

<400> 123

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys



<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> mouse ghrelin peptide mutant

<400> 127

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys  
 20 25

<210> 128  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> mouse ghrelin peptide mutant

<400> 128

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys  
 20 25

<210> 129  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> mouse ghrelin peptide mutant

<400> 129

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys  
 20 25 30

<210> 130  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> mouse ghrelin peptide mutant

<400> 130

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Cys  
 1 5 10

<210> 131

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mouse ghrelin peptide mutant

<400> 131

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gly Cys  
 1 5 10 15

<210> 132

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ghrel24-33C

<400> 132

Gly Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Gly Cys  
 1 5 10

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cGhrel42-51

<400> 133

Cys Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 1 5 10

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cGhrel31-40

<400> 134

Cys Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu



<211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer p1.44  
  
 <400> 139  
 aaccatggca aataagccaa tgcaa 25  
  
 <210> 140  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer p1.45  
  
 <400> 140  
 aatctagaat tttctgcgca cccatcccgg 30  
  
 <210> 141  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer p1.46  
  
 <400> 141  
 aaaagcttaa gcagtagtat cagacgatac g 31  
  
 <210> 142  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer p1.47  
  
 <400> 142  
 gagtgatcca actcgtttat caactacatt ttcagcaagt ctg 43  
  
 <210> 143  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer p1.48  
  
 <400> 143  
 cagacttgct gaaaatgtag ttgataaacg agttggatca ctc 43  
  
 <210> 144

<211> 117  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 144

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu  
 1 5 10 15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His  
 20 25 30

Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu  
 35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln  
 50 55 60

Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe  
 65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln  
 85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu  
 100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys  
 115

<210> 145  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

<400> 145

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu  
 1 5 10 15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His  
 20 25 30

Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu  
 35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln  
 50 55 60

