(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149404
(43) 공개일자 2024년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/52 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) *C07K 16/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/52 (2021.08)
A61K 39/0216 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7027669
(22) 출원일자(국제) 2023년01월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년08월19일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2023/050028
(87) 국제공개번호 WO 2023/137519
국제공개일자 2023년07월27일
(30) 우선권주장
2022900101 2022년01월20일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인
덴테릭 피티와이 엘티디
오스트레일리아, 빅토리아 3000, 멜버른, 31 퀸 스트리트, 레벨 9
(72) 발명자
레이놀즈 에릭 찰스
오스트레일리아, 빅토리아 3000, 멜버른, 31 퀸 스트리트, 씨/- 레벨 9
슬라케스키 나다
오스트레일리아, 빅토리아 3000, 멜버른, 31 퀸 스트리트, 씨/- 레벨 9
오브라이언-심슨 네일
오스트레일리아, 빅토리아 3000, 멜버른, 31 퀸 스트리트, 씨/- 레벨 9
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 75 항

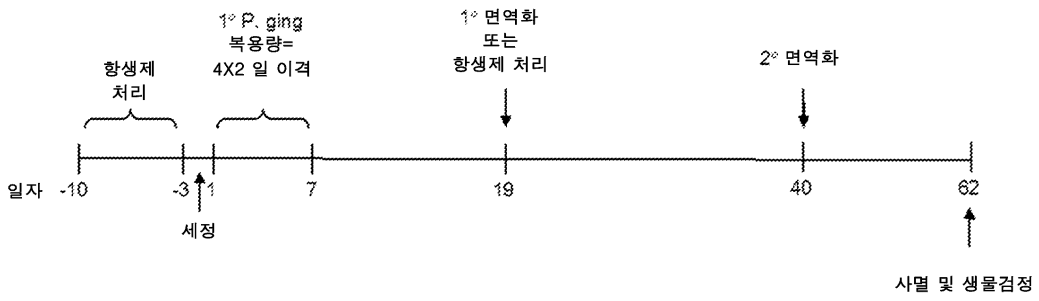
(54) 발명의 명칭 **키메라 폴리펩티드**

(57) 요 약

*P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질로서, 상기 단백질은 제2 폴리펩티드에 연결된 제1 폴리펩티드를 포함하며, 여기서: A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고 B) 제2 폴

(뒷면에 계속)

대 표 도



리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며; 여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하고, 그리고 여기서 제2 폴리펩티드는: a) 절단된 어드헤신 도메인(CAD)의 서열 또는 이의 일부를 포함하지 않고, b) Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 전체 길이에 실질적으로 상응하는 아미노산 서열을 포함하고, c) 상응하는 영역에서의 자연적으로 발생하는 Arg- 또는 Lys-긴기페인 서열과 비교하여, 어드헤신 도메인에 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환을 포함하고; 및/또는 d) 본원에 정의된 바와 같은 하나 이상의 추가의 아미노산 모티프 치환을 포함한다.

(52) CPC특허분류
A61P 31/04 (2018.01)
C07K 14/195 (2013.01)
C07K 16/1203 (2013.01)
C12Y 304/22037 (2013.01)
C12Y 304/22047 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/55505 (2013.01)
A61K 2039/55522 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

*P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질로서, 상기 단백질은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하고,

여기서 제2 폴리펩티드는:

a) 절단된 어드헤신 도메인(CAD)의 서열을 포함하지 않고; 그리고

b) Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 전체 길이에 실질적으로 상응하는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질:

c) 상응하는 영역에서의 자연적으로 발생하는 Arg- 또는 Lys-긴기페인 서열과 비교하여, ABM에서의 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환; 및/또는

d) 다음으로부터 선택된 아미노산 모티프 치환:

i) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나, 이와 등가인 위치에서 서열 PVQN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환;

ii) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 2 내지 5에 상응하거나, 이와 등가인 위치에서 서열에서의 모티프 NEFA의 SEYQ로의 치환;

iii) 서열번호: 15 또는 20(ABM2)의 위치 5에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 제2 티로신 잔기와, 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 위치 23에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서의 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환.

청구항 2

제1항에 있어서, 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20, 서열번호: 14 또는 19 및/또는 서열번호: 17 또는 21에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18 또는 22 중 임의의 하나에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 12 또는 13에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 CAD의 서열 또는 이의 일부를 포함하지 않는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 전체 길이에 실질적으로 상응하는 아미노산 서열은 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 길이의 적어도 80%, 85%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 서열인, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 아미노산 서열은 서열번호: 23에 제시된 서열이거나 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열인, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 34에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 14 또는 19의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나, 이와 등가인 위치에서, *P. 긴기발리스* 어드헤신 도메인의 ABM1의 서열 PVQN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 14 또는 19의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나, 이와 등가인 위치에서, ABM1에서의 서열 AVQP를 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 14 또는 19의 잔기 2 내지 5에 상응하거나, 이와 등가인 위치에서, *P. 긴기발리스* 어드헤신 도메인의 ABM1에서 모티프 NEFA의 SEYQ로의 치환을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 15 또는 20의 위치 5에서의 잔기에 상응하거나 이에 등가인 위치에서 ABM2의 제2 티로신 잔기와, 서열번호: 14 또는 19의 위치 23에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 ABM1의 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 DUF2436 도메인에서의 시스테인 잔기의 치환을 포함하지 않는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 13

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 DUF2436 도메인에서의 시스테인 잔기의 치환을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 14

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 ABM 도메인에서의 시스테인 잔기 중 하나 이상의 치환을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 하나 이상의 시스테인 잔기의 치환은 세린 잔기 또는 발린 잔기로의 치환인, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 16

제14항에 있어서, 하나 이상의 시스테인 잔기의 치환은 세린 잔기로의 치환인, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 ABM 도메인의 서열은 서열번호: 18에 제시되어 있고, 하나 이상의 시스테인 잔기는 서열번호: 18 또는 22의 위치 36 및 50, 또는 이에 등가인 위치에서 잔기에 상응하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 35 내지 49 중 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 19

제8항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 42, 또는 44 내지 49에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩티드는 제2 폴리펩티드에 연결되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩티드는 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 위치되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩티드는 제2 폴리펩티드에 직접적으로 조인되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩티드는 링커를 통해 제2 폴리펩티드에 연결되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 24

제23항에 있어서, 링커는 펩티드 링커인, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 25

제24항에 있어서, 펩티드 링커는 적어도 2개 아미노산, 적어도 5개 아미노산, 적어도 10개 아미노산, 적어도 15개 아미노산, 적어도 20개 아미노산을 포함하고, 바람직하게는 링커는 50개 이하의 아미노산을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 펩티드 링커는 25개 이하의 아미노산, 20개 이하의 아미노산, 15개 이하의 아미노산 또는 10개 이하의 아미노산인, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 내지 11 중 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 28

제27항에 있어서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 또는 2에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 30

제29항에 있어서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 또는 제2 폴리펩티드에 C-말단으로 위치되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 31

제30항에 있어서, 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 키메라 또는 융합 단백질의 제1 또는 제2 폴리펩티드에 직접적으로 연결되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 32

제31항에 있어서, 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 펩티드 링커에 의해 제1 또는 제2 폴리펩티드에 연결되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 33

제32항에 있어서, 펩티드 링커는 적어도 2개 아미노산, 적어도 5개 아미노산, 적어도 10개 아미노산, 적어도 15개 아미노산, 적어도 20개 아미노산을 포함하고, 바람직하게는 링커는 50개 이하의 아미노산을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 펩티드 링커는 25개 이하의 아미노산, 20개 이하의 아미노산, 15개 이하의 아미노산 또는 10개 이하의 아미노산인, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 35

제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 36

제34항에 있어서, 제1 폴리펩티드 및 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 서로 동일하거나 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 37

제35항에 있어서, 제1 폴리펩티드 및 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 이종 긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 38

제35항에 있어서, 제1 폴리펩티드 및 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 39

제35항에 있어서, 제1 폴리펩티드는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하고, 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 Arg-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 58, 59, 60, 61, 69, 70, 71, 72, 73, 74 또는 75 중 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 41

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 58 또는 59에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 42

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 60 또는 61에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 43

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 69에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 44

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 72 또는 74에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 45

*P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질로서, 상기 단백질은 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하고

여기서 제2 폴리펩티드는:

a) 절단된 어드헤신 도메인(CAD)의 서열을 포함하지 않고; 그리고

다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질:

b) 상응하는 영역에서 자연적으로 발생하는 Arg- 또는 Lys-긴기페인 서열과 비교하여 ABM에서의 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환; 및/또는

c) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나, 이와 등가인 위치에서 서열 PVQN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환.

청구항 46

제45항에 있어서, 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20, 서열번호: 14 또는 19 및/또는 서열번호: 17 또는 21에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18 또는 22에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 48

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 12 또는 13에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 CAD의 서열 또는 이의 일부를 포함하지 않는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 49

제47항 또는 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 14 또는 19의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나, 이에 등가인 위치에서 ABM1에서의 서열 AVQP를 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 50

제50항에 있어서, 제2 폴리펩티드는 ABM 도메인에서의 시스테인 잔기 중 하나 이상의 아미노산 서열 치환을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 51

제45항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 52

제51항에 있어서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 또는 제2 폴리펩티드에 C-말단으로 위치되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 53

제45항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 서열번호: 80 또는 81에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 재조합 발현 시스템에서의 발현을 촉진하고/하거나 단백질의 정제를 촉진하기 위해 추가의 아미노산 잔기를 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 55

제54항에 있어서, 추가의 아미노산은, 임의적으로 N-말단 메티오닌 및/또는 알라닌 잔기를 포함하는, N-말단 영역에 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 56

제54항 또는 제55항에 있어서, 추가의 아미노산은, 바람직하게는 정제를 용이하게 하기 위해, C-말단 영역에 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산을 포함하는, 키메라 또는 융합 단백질.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산.

청구항 58

제57항에 따른 핵산을 포함하는 벡터 또는 작제물.

청구항 59

제57항에 따른 핵산, 또는 제58항에 따른 벡터 또는 작제물을 포함하는 숙주 세포.

청구항 60

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 조성물은 백신 조성물이고, 키메라 또는 융합 단백질에 대한 면역 반응을 강화시키기 위한 하나 이상의 보조제를 포함하는, 조성물.

청구항 62

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 및 임의적으로 키메라 또는 융합 단백질에 대한 면역 반응을 강화시키기 위한 보조제를 포함하는 백신 또는 면역 자극 조성물.

청구항 63

*P. 긴기발리스*에 대한 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 제60항 또는 제61항에 따른 조성물, 또는 제62항에 따른 백신 또는 면역 자극 조성물을 면역 반응 유도를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 64

대상체에서 *P. 긴기발리스*에 대한 체액성 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 제60항 또는 제61항에 따른 조성물, 또는 제62항에 따른 백신 또는 면역 자극 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 유도된 면역 반응은 Th1 면역 반응에서 Th2 면역 반응으로의 전환을 포함하는, 방법.

청구항 66

P. 긴기발리스 감염에 대해 대상체를 면역화하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 제60항 또는 제61항에 따른 조성물, 또는 제62항에 따른 백신 또는 면역 자극 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 67

대상체에서 *P. 긴기발리스* 감염을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 제60항 또는 제61항에 따른 조성물, 또는 제62항에 따른 백신 또는 면역 자극 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에게 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 68

P. 긴기발리스 감염과 연관된 증상의 중증도를 감소 또는 최소화하는 방법으로서, 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 제60항 또는 제61항에 따른 조성물, 또는 제62항에 따른 백신 또는 면역 자극 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하며,

여기서 증상은 붓거나 부어오른 잇몸, 쉽게 출혈하는 잇몸, 후퇴하는 잇몸, 치아 주변의 치주 주머니, 치아 지지 조직(치주 인대, 백악질 및/또는 치조골) 플러스 잇몸과 치아 사이의 손실, 및 치은염으로 구성된 군에서 선택되는, 방법.

청구항 69

제67항 또는 제68항에 있어서, 방법은 항균 화합물, 항-염증제 중 하나 이상의 투여를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 70

다음을 위한 약제의 제조에서, 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질의 용도:

- *P. 긴기발리스*에 대한 대상체에서 면역 반응 유도;
- *P. 긴기발리스* 감염에 대한 대상체 면역화;
- 대상체에서 *P. 긴기발리스* 감염 치료; 또는
- 대상체에서 *P. 긴기발리스* 감염의 하나 이상의 증상의 중증도 최소화 또는 감소.

청구항 71

다음에 사용하기 위한, 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 제60항 또는 제61항에 따른 조성물, 또는 제62항에 따른 백신 또는 면역 자극 조성물:

- *P. 긴기발리스*에 대한 대상체에서 면역 반응 유도;
- *P. 긴기발리스* 감염에 대한 대상체 면역화;
- 대상체에서 *P. 긴기발리스* 감염 치료; 또는
- 대상체에서 *P. 긴기발리스* 감염의 하나 이상의 증상의 중증도 최소화 또는 감소.

청구항 72

*P. 긴기발리스*에 대한 항체를 얻는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 제60항 또는 제61항에 따른 조성물, 또는 제62항에 따른 백신 또는 면역 자극 조성물을 비-인간 동물에게 투여하고, 이에 의해 동물에서 *P. 긴기발리스*에 대한 항체를 생성시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 방법은 동물 또는 동물의 난으로부터 항체를 단리하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 74

*P. 긴기발리스*에 대한 항체를 포함하는 항체 제제로서, 항체 제제는 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 제60항 또는 제61항에 따른 조성물, 또는 제62항에 따른 백신 또는 면역 자극 조성물을 비-인간 동물에 투여하고, 이에 의해 동물에서 *P. 긴기발리스*에 대한 항체를 생성시키고, 동물 또는 그의 난으로부터 항체를 단리함에 의해 획득되는, 항체 제제.

청구항 75

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 키메라 또는 융합 단백질, 제60항 또는 제61항에 따른 조성물, 또는 제62항에 따른 백신 또는 면역 자극 조성물을 포함하는 키트로서, 임의적으로 키트는 밀봉된 용기에 하나 이상의 사이토카인 및/또는 보조제를 포함하고, 바람직하게는 여기서 키트는 조성물이 개체를 면역화하는데 사용된다는 것을 나타내는 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함하고, 임의적으로 여기서 라벨 또는 패키지 삽입물은 사용 지침을 포함하는, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **발명의 분야**

[0002] 발명은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하는데 유용한 키메라 폴리펩티드, 이를 포함하는 조성물 및 *P. 긴기발리스*-관련된 병태 및 질환의 예방 및 치료를 위한 그의 용도에 관한 것이다.

[0003] **관련 출원**

[0004] 본 출원은 호주 가출원 AU 2022900101로부터 우선권을 주장하며, 그 내용은 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0005] 치태가 치아 주변의 치은(잇몸) 가장자리에 쌓이게 방치되면 치은 염증(치은염)을 야기한다. 만성 치은염은 치주낭의 기저부에서 치주 병원균인 *프로피로모나스 긴기발리스*(*P. 긴기발리스*)의 출현을 허용하여 만성 감염과 심각한 질환의 발병을 초래할 수 있다. 이 심각한 형태의 치주 질환을 치주염이라고 하며 감염을 제거하기 위한 면역 체계에 의한 접근방식에서 치아 손실을 야기할 수 있다.

[0006] 만성 치주염은 치조골의 용식작용과 결국 치아 손실을 야기하는 치아의 지지 조직의 염증성 질환이다. 질환은 모든 사회에서 주요 공중 보건 문제이고, 심각한 형태는 성인 인구의 12-15%에 영향을 미치는 것으로 성인 인구의 최대 30%에 영향을 미치는 것으로 추정된다.

[0007] 성인 3명 중 1명은 중등도에서 중증의 치주염을 앓고 있다. 전염병학의 조사로부터, 치주염은 심혈관 질환, 특정 암, 조산, 류마티스 관절염 및 치매를 포함한 염증성 질환의 증가된 위험과 연관되어 있다. 보다 최근의 연구에서는 *P. 긴기발리스*에 의한 만성 감염을 치매 및 류마티스 관절염과 연관시키고 있다. 예를 들어, 한 연구에서는 알츠하이머병(AD) 뇌 샘플의 96%에서 *P. 긴기발리스*가 존재하는 것으로 나타났다. 또 다른 연구에서는 *P. 긴기발리스*를 갖는 마우스의 만성 경구 감염이 인간에서의 AD와 연관된 뇌 플라크를 초래했고 *P. 긴기발리스* 프로테아제가 아밀로이드 전구체와 타우 단백질을 절단하여 AD와 연관된 플라크와 엉킴을 형성할 수 있음을 보여준다.

[0008] 다수의 독성 요인이, 달리는 "*P. 긴기발리스* 긴기페인"으로도 알려져 있는, LPS, 핌브리애, 헤마글루티닌, 용혈소 및 세포외 가수분해 효소(특히 Arg-X 및 Lys-X 특이적 단백질분해효소)를 포함한 *P. 긴기발리스*의 병원성에 기여하는 것으로 보고되었다.

[0009] 공중 보건 문제의 정도는 *P. 긴기발리스* 감염에 대한 강력한 보호 반응을 제공하는 백신과 이를 제공하는 수단에 대한 필요성이 있게 된다.

[0010] 한 가지 문제는 선택할 독성 요소가 너무 많은 *P. 긴기발리스* 감염에 대한 강력한 보호 반응을 얻는 방법이 명확하지 않다는 것이다.

[0011] *P. 긴기발리스* 감염의 발생률 및/또는 중증도를 예방 또는 감소시키거나 대상체에서의 *P. 긴기발리스* 감염 및 질환을 치료하기 위해 사용하기 위한 상업적으로 승인된 백신은 현재로는 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서 *P. 긴기발리스* 백신의 설계 및 제조를 위한 대안적인 및/또는 개선된 접근방법, 및 *P. 긴기발리스*로부터 생산된 대안적인 및/또는 개선된 백신에 대한 필요성이 있다.

[0013] 명세서에서 임의의 선행 기술에 대한 언급은 이 선행 기술이 임의의 관할권에서 공통적인 일반 지식의 일부를 형성하거나 이 선행 기술이 합리적으로 이해되고, 관련성이 있는 것으로 간주되고, 및/또는 당업자에 의한 다른 선행 기술의 일부와 조합되는 것이 기대될 수 있다는 것을 인정하거나 암시하는 것이 아니다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질을 제공하며, 단백질은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

[0015] A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

[0016] B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0017] 여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하고, 바람직하게는 여기서 ABM은 *P. 긴기발리스* 긴기페인의 DUF2436 도메인과 절단된 어드헤신 도메인(CAD) 사이의 ABM의 일부 또는 전부에 상응하고;

[0018] 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제

시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0019] 더욱 바람직하게는 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2) 서열번호: 14 또는 19(ABM1) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0020] 가장 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18, 22 또는 27 중 임의의 것에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

[0021] 그리고 여기서 제2 폴리펩티드는:

[0022] a) 절단된 어드헤신 도메인(CAD)의 서열 또는 이의 일부, 바람직하게는 서열번호: 12 또는 13에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 CAD의 서열을 포함하지 않고; 및/또는Ereic

[0023] b) Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 전체 길이에 실질적으로 상응하는 아미노산 서열, 바람직하게는 서열번호: 23에 제시된 바와 같은 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

[0024] 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다:

[0025] c) 상응하는 영역에서의 자연적으로 발생하는 Arg- 또는 Lys-긴기페인 서열과 비교하여, 어드헤신 도메인에서의 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환; 및/또는

[0026] d) 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 모티프 치환:

[0027] i) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나, 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환;

[0028] ii) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 2 내지 5에 상응하거나, 이와 등가인 위치에서 서열에서의 모티프 NxFA의 SxYQ로의 치환;

[0029] iii) 서열번호: 15 또는 20(ABM2)의 위치 5에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 제2 티로신 잔기와, 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 위치 23에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서의 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환.

[0030] 바람직하게는, 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함한다. *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 또는 제2 폴리펩티드에 C-말단으로 위치될 수 있다. 특정 구체예에서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 적어도 2개의 추가 폴리펩티드가 존재할 수 있다. 이러한 구체예에서, 2개의 추가 폴리펩티드는 제2 폴리펩티드에 N-말단으로, 제2 폴리펩티드에 C-말단으로, 또는 제2 폴리펩티드에 N 및 C 말단으로 위치될 수 있다.

[0031] 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 50개 이하의 아미노산의 링커를 통해 키메라 또는 융합 단백질의 제1 또는 제2 폴리펩티드에 연결되거나, 제1 또는 제2 폴리펩티드에 직접적으로 연결될 수 있다.

[0032] 임의의 구체예에서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0033] 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0034] 임의의 구체예에서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 폴리펩티드 및 추가의 폴리펩티드는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하거나, 또는 여기서 아미노산 서열이 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 이종 긴기페인의 활성 부위(예를 들어, *P. 긴기발리스*의 다양한 균주의 긴기페인)로부터 유래될 수 있다. 제1 폴리펩티드와 추가 폴리펩티드는 서로 다른 긴기페인으로부터 유래된 아미노산 서열을 가질 수 있다(예를 들어, 여기서 폴리펩티드의 하나는 Kgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 Rgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다;

또는 대안적으로 여기서 폴리펩티드의 하나는 RgpA로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 RgpB로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다).

[0035] 제1 양태에서, 본 발명은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질을 제공하며, 단백질은 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

[0036] A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

[0037] B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0038] 여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하고, 바람직하게는 여기서 ABM은 *P. 긴기발리스* 긴기페인의 DUF2436 도메인과 절단된 어드헤신 도메인(CAD) 사이의 ABM의 일부 또는 전부에 상응하고;

[0039] 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2), 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0040] 더욱 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2), 서열번호: 14 또는 19(ABM1) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0041] 가장 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18, 22 또는 27 중 임의의 하나에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

[0042] 여기서 제2 폴리펩티드는:

[0043] a) 절단된 어드헤신 도메인(CAD)의 서열을 포함하지 않으며, CAD는 바람직하게는 서열번호: 12 또는 13에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 가지며;

[0044] 바람직하게는 여기서 융합 단백질의 키메라는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함한다.

[0045] *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로, 제2 폴리펩티드에 C-말단으로 위치될 수 있다. 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 50개 이하의 아미노산의 링커를 통해 키메라 또는 융합 단백질의 제1 또는 제2 폴리펩티드에 연결되거나, 제1 또는 제2 폴리펩티드에 직접적으로 연결될 수 있다.

[0046] 임의의 구체예에서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0047] 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0048] 발명의 제1 양태의 임의의 구체예에서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하거나, 아미노산 서열이 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 이종 긴기페인의 활성 부위(예를 들어, *P. 긴기발리스*의 다양한 균주의 긴기페인)로부터 유래될 수 있다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 서로 다른 긴기페인으로부터 유래된 아미노산 서열을 가질 수 있다(예를 들어, 여기서 폴리펩티드의 하나는 Kgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 Rgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다; 또는 대안적으로 여기서 폴리펩티드의 하나는 RgpA로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 RgpB로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다).

[0049] 제2 양태에서, 본 발명은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질을 제공하며, 단백질은 제2 폴리펩티드에 연결된 제1 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

[0050] A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

[0051] B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0052] 여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하고, 바람직하게는 ABM은 *P. 긴기발리스* 긴기페인의 DUF2436 도메인과 절단된 어드헤신 도메인(CAD) 사이의 ABM의 일부 또는 전부에 상응하고;

[0053] 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0054] 더욱 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2), 서열번호: 14 또는 19(ABM1) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM2)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0055] 가장 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18 또는 22 중 임의의 하나에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

[0056] 여기서 제2 폴리펩티드는:

[0057] a) 절단된 어드헤신 도메인(CAD)의 서열 또는 이의 일부를 포함하지 않으며, CAD는 바람직하게는 서열번호: 12 또는 13에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 갖고; 그리고

[0058] b) 바람직하게는 서열번호: 23에 제시된 바와 같은, Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 전체 길이에 실질적으로 상응하는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같이, DUF2436 도메인의 전체 길이에 실질적으로 상응하는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열은 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 길이인 서열을 지칭한다.

[0060] 바람직한 구체예에서, Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 아미노산 서열은 서열번호: 23에 제시된 서열이거나 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열이다.

[0061] 가장 바람직하게는, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 34에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 대안적인 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 76에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0062] 바람직하게는, 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함한다. *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 또는 제2 폴리펩티드에 C-말단으로 위치될 수 있다. 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 50개 이하의 아미노산의 링커를 통해 키메라 또는 융합 단백질의 제1 또는 제2 폴리펩티드에 연결되거나, 제1 폴리펩티드에 직접적으로 연결될 수 있다.

[0063] 임의의 구체예에서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0064] 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0065] 임의의 구체예에서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 폴리펩티드 및 추가의 폴리펩티드는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 아미노산 서열이 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 이종 긴기페인의 활성 부위(예를 들어, *P. 긴기발리스*의 다양한 균주의 긴기페인)로부터 유래될 수 있다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 서로 다른 긴기페인으로부터 유래된 아미노산 서열을 가질 수 있다(예를 들어, 여기서 폴리펩티드의 하나는 Kgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 Rgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다; 또는 대안적으로 여기서 폴리펩티드의 하나는 RgpA로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 RgpB로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다).

[0066] 발명의 제2 양태의 특히 바람직한 구체예에서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 28, 50, 51, 52, 53 또는 54 중 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0067] 발명의 제3 양태에서, 본 발명은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질을 제공하며, 단백질은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

[0068] A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

[0069] B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0070] 여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하고, 바람직하게는 ABM은 *P. 긴기발리스* 긴기페인의 DUF2436 도메인과 절단된 어드헤신 도메인(CAD) 사이의 ABM의 일부 또는 전부에 상응하고,

[0071] 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0072] 더욱 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2), 서열번호: 14 또는 19(ABM1) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0073] 가장 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18 또는 22 또는 서열번호: 27 중 임의의 하나에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

[0074] 여기서 제2 폴리펩티드는 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다:

[0075] a) 상응하는 영역에서의 자연적으로 발생하는 Arg- 또는 Lys-긴기페인 서열과 비교하여 어드헤신 도메인에서의 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환; 및/또는

[0076] b) 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 모티프 치환:

[0077] i) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환;

[0078] ii) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 2 내지 5에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열에서의 모티프 NxFA의 SxYQ로의 치환;

[0079] iii) 서열번호: 15 또는 20(ABM2)의 위치 5에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 제2 티로신 잔기와, 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 위치 23에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환.

[0080] 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환은 세린 잔기 또는 발린 잔기로 치환일 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 시스테인 치환은 세린 잔기로 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다.

[0081] 특정 구체예에서, 단 하나의 시스테인 잔기가 치환될 수 있다. 다른 구체예에서, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기가 치환될 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 시스테인 잔기는 발린과 세린 잔기의 조합으로 치환된다. 다른 구체예에서, 모든 치환된 시스테인 잔기는 세린으로 치환되거나 모든 치환된 시스테인 잔기는 발린으로 치환된다.

[0082] 특히 바람직한 구체예에서, 어드헤신 도메인은 DUF2436 도메인 또는 이의 일부를 포함하고, DUF2436 도메인의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린, 바람직하게는 세린으로 치환된다. 다른 구체예에서, 어드헤신 도메인은

DUF2436 도메인을 포함하고, DUF2436 도메인에서의 시스테인 잔기는 치환되지 않고, 바람직하게는 어드헤신 도메인의 나머지에서의 하나 이상의 시스테인 잔기가 치환된다.

[0083] 임의적으로, 어드헤신 도메인은 서열번호: 23에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 위치 115에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환된다.

[0084] 임의적으로, 어드헤신 도메인은 서열번호: 25에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 위치 77에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환된다.

[0085] 바람직하게는, 어드헤신 도메인은 서열번호: 34 또는 서열번호: 76에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 하나 이상의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환된다.

[0086] 발명의 제3 양태의 특히 바람직한 구체예에서, *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질이 제공되며, 단백질은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

[0087] A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

[0088] B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0089] 여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하며, 바람직하게는 ABM은 P. 긴기발리스 긴기페인의 DUF2436 도메인과 절단된 어드헤신 도메인(CAD) 사이의 ABM의 일부 또는 전부에 상응하고,

[0090] 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2), 서열번호: 14 또는 19(ABM1) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0091] 더욱 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18 또는 22 또는 서열번호: 27 중 임의의 하나에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

[0092] 그리고 여기서 제2 폴리펩티드는

[0093] c) 자연적으로 발생하는 어드헤신 도메인 서열과 비교하여 하나 이상의 시스테인에서 세린으로 아미노산 치환을 포함하고; 그리고

[0094] d) 서열번호: 14 또는 19의 서열의 위치 6 내지 9에서 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 치환 및/또는 아스파라긴 치환을 포함한다.

[0095] 바람직하게는, 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함한다. *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 또는 제2 폴리펩티드에 C-말단으로 위치될 수 있다.

[0096] 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 어드헤신 도메인은 서열번호: 18 또는 22에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고; 여기서 서열번호: 18 또는 22에서의 하나 또는 둘 모두의 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고 서열번호: 18 또는 서열번호: 22의 위치 63 내지 66(서열번호: 14 또는 19의 위치 6 내지 9에 해당)에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기, 또는 이와 등가인 위치가 치환된다. 임의적으로, 프롤린 잔기는 알라닌 잔기로 치환되고/되거나 아스파라긴 잔기는 프롤린 또는 알라닌 잔기로 치환되며, 바람직하게는 여기서 프롤린은 알라닌으로 치환되고, 아스파라긴은 프롤린으로 치환되어 서열번호: 18 또는 서열번호: 22의 위치 63 내지 66에서 서열이 AxxP(예를 들어 AVQP)이다.

[0097] 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 34에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하며, 여기서 1개, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기가 세린 잔기로 치환된다. 바람직하게는 서열번호: 34의 잔기 115에서 또는 이에 등가인 위치에서의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는다. 바람직하게는, 서열번호: 34의 위치 115에서 또는 이와 등가인 위치에서의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는 반면, 서열번호: 34의 위치 208 및 222에서 또는 이에 등가인 위치에서의 시스테인 잔기는

세린 잔기로 치환된다.

[0098] 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 34에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하며, 여기서 1개, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고, 여기서 위치 235 내지 238에서 또는 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및 아스파라긴 잔기가 치환된다. 바람직하게는 서열번호: 34의 잔기 115 또는 이에 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는다. 바람직하게는, 서열번호: 34의 위치 115 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는 반면, 서열번호: 34의 위치 208 및 222에서 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고, 여기서 위치 235에서 또는 이와 등가인 위치에서 프롤린 잔기는 알라닌 잔기로 치환되고, 위치 238에서 또는 이와 등가인 위치에서 아스파라긴 잔기는 프롤린으로 치환된다.

[0099] 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 35 내지 49 중 임의의 하나에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0100] 임의의 구체예에서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0101] 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0102] 임의의 구체예에서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 폴리펩티드 및 추가의 폴리펩티드는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 아미노산 서열이 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 이종 긴기페인의 활성 부위(예를 들어, *P. 긴기발리스*의 다양한 균주의 긴기페인)로부터 유래될 수 있다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 서로 다른 긴기페인으로부터 유래된 아미노산 서열을 가질 수 있다(예를 들어, 여기서 폴리펩티드의 하나는 Kgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 Rgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다; 또는 대안적으로 여기서 폴리펩티드의 하나는 RgpA로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 RgpB로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다).

[0103] 발명의 제3 양태의 바람직한 구체예에서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 55, 56 또는 57 중 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0104] 발명의 제4 양태에서, 본 발명은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질을 제공하며, 단백질은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

[0105] A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

[0106] B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0107] 여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하며, 바람직하게는 여기서 ABM은 *P. 긴기발리스* 긴기페인의 DUF2436 도메인과 절단된 어드헤신 도메인(CAD) 사이의 ABM의 일부 또는 전부에 상응하고;

[0108] 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2), 서열번호: 14 또는 19(ABM1) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0109] 더욱 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18 또는 22 중 임의의 하나에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

[0110] 그리고 여기서 제2 폴리펩티드는:

[0111] a) 바람직하게는 서열번호: 23에 제시된 바와 같은 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 전체 길이에 실

질적으로 상응하는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고; 그리고

[0112] 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다:

[0113] b) 상응하는 영역에서의 자연적으로 발생하는 Arg- 또는 Lys-긴기페인 서열과 비교하여 어드헤신 도메인에서의 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환; 및/또는

[0114] d) 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 모티프 치환:

[0115] i) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환;

[0116] ii) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 2 내지 5에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열에서의 모티프 NxFA의 SxYQ로의 치환;

[0117] iii) 서열번호: 15 또는 20(ABM2)의 위치 5에서 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 제2 티로신 잔기와, 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 위치 23에서 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환.

[0118] 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환은 세린 잔기 또는 발린 잔기로 치환일 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 시스테인 치환은 세린 잔기로 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다.

[0119] 특정 구체예에서, 단 하나의 시스테인 잔기가 치환된다. 다른 구체예에서, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기가 치환된다. 특히 바람직한 구체예에서, 시스테인 잔기는 발린과 세린 잔기의 조합으로 치환된다. 다른 구체예에서, 모든 치환된 시스테인 잔기는 세린으로 치환되거나 모든 치환된 시스테인 잔기는 발린으로 치환된다.

[0120] 특히 바람직한 구체예에서, 어드헤신 도메인은 DUF2436 도메인을 포함하고, DUF2436 도메인에서의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린, 바람직하게는 세린으로 치환된다. 다른 구체예에서, 어드헤신 도메인은 DUF2436 도메인을 포함하고, DUF2436 도메인에서의 시스테인 잔기는 치환되지 않고, 바람직하게는 어드헤신 도메인의 나머지에서의 하나 이상의 시스테인 잔기는 치환된다.

[0121] 바람직하게는, 어드헤신 도메인은 서열번호: 34 또는 서열번호: 76에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 하나 이상의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환된다.

[0122] 발명의 이 양태에 따르면, 서열번호: 34의 잔기 235 내지 238에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN은 프롤린 및 아스파라긴 잔기의 치환을 포함한다. 바람직하게는, 치환은 PxxN에서 AxxP로이다.

[0123] 발명의 이 양태의 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 34에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하며, 여기서 1개, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환된다. 바람직하게는 서열번호: 34의 잔기 115 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는다. 바람직하게는, 서열번호: 34의 위치 115 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는 반면, 서열번호: 34의 위치 208 및 222, 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환된다.

[0124] 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 34에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하며, 여기서 1개, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고, 여기서 위치 235 내지 238 또는 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및 아스파라긴 잔기는 치환된다. 바람직하게는 서열번호: 34의 잔기 115 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는다. 바람직하게는, 서열번호: 34의 위치 115 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는 반면, 서열번호: 34의 위치 208 및 222에서 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고, 여기서 위치 235에서 또는 이와 등가인 위치에서 프롤린 잔기는 알라닌 잔기로 치환되고, 위치 238에서 또는 이와 등가인 위치에서 아스파라긴 잔기는 프롤린으로 치환된다.

[0125] 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 35 내지 49 중 임의의 하나에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0126] 특히 바람직한 구체예에서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 62 내지 63 중 임의의 하나에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0127] 바람직하게는, 융합 단백질의 키메라는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함한다. *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 또는 제2 폴리펩티드에 C-말단으로 위치될 수 있다.

[0128] 임의의 구체예에서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0129] 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0130] 임의의 구체예에서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 폴리펩티드 및 추가의 폴리펩티드는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하거나, 아미노산 서열이 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 이종 긴기페인의 활성 부위(예를 들어, *P. 긴기발리스*의 다양한 균주의 긴기페인)로부터 유래될 수 있다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 서로 다른 긴기페인으로부터 유래된 아미노산 서열을 가질 수 있다(예를 들어, 여기서 폴리펩티드의 하나는 Kgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 Rgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다; 또는 대안적으로 여기서 폴리펩티드의 하나는 RgpA로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 RgpB로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다).

[0131] 발명의 제5 양태에서, 본 발명은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질을 제공하며, 단백질은 제2 폴리펩티드에 연결된 제1 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

[0132] A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

[0133] B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0134] 여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하며, 바람직하게는 여기서 ABM은 *P. 긴기발리스* 긴기페인의 DUF2436 도메인과 절단된 어드헤신 도메인(CAD) 사이의 ABM의 일부 또는 전부에 상응하고;

[0135] 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0136] 더욱 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2), 서열번호: 14 또는 19(ABM1) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0137] 가장 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18 또는 22 중 임의의 하나에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

[0138] 그리고 여기서 제2 폴리펩티드는:

[0139] a) 절단된 어드헤신 도메인(CAD)의 서열, 또는 이의 일부, 바람직하게는 서열번호: 12 또는 13에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 CAD의 서열을 포함하지 않고; 그리고

[0140] b) 바람직하게는 서열번호: 23에 제시된, Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 전체 길이에 실질적으로 상응하는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고; 그리고

[0141] 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다:

[0142] c) 상응하는 영역에서 자연적으로 발생하는 Arg- 또는 Lys-긴기페인 서열과 비교하여 DUF 2436 도메인 및 ABM의 아미노산 서열에서 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환; 및/또는(바람직하게는 및)

[0143] d) 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 모티프 치환:

[0144] i) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환;

[0145] ii) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 2 내지 5에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열에서의 모티프 NxFA의 SxYQ로의 치환;

[0146] iii) 서열번호: 15 또는 20(ABM2)의 위치 5에서 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 제2 티로신 잔기와, 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 위치 23에서 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환.

[0147] 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환은 세린 잔기 또는 발린 잔기로 치환일 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 시스테인 치환은 세린 잔기로 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다.

[0148] 특정 구체예에서, 단 하나의 시스테인 잔기가 치환된다. 다른 구체예에서, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기가 치환된다. 특히 바람직한 구체예에서, 시스테인 잔기는 발린과 세린 잔기의 조합으로 치환된다. 다른 구체예에서, 모든 치환된 시스테인 잔기는 세린으로 치환되거나 모든 치환된 시스테인 잔기는 발린으로 치환된다.

[0149] 특히 바람직한 구체예에서, 어드헤신 도메인은 DUF2436 도메인을 포함하고, DUF2436 도메인에서의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린, 바람직하게는 세린으로 치환된다. 다른 구체예에서, 어드헤신 도메인은 DUF2436 도메인을 포함하고, DUF2436 도메인에서의 시스테인 잔기는 치환되지 않고, 바람직하게는 어드헤신 도메인의 나머지에서의 하나 이상의 시스테인 잔기는 치환된다.

[0150] 바람직하게는, 어드헤신 도메인은 서열번호: 34에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 하나 이상의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환된다.

[0151] 발명의 이 양태에 따르면, 서열번호: 34의 잔기 235 내지 238에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN은 프롤린 및 아스파라긴 잔기의 치환을 포함한다. 바람직하게는, 치환은 PxxN에서 AxxP로이다.

[0152] 발명의 이 양태의 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 34에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하며, 여기서 1개, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환된다. 바람직하게는 서열번호: 34의 잔기 115 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는다. 바람직하게는, 서열번호: 34의 위치 115 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는 반면, 서열번호: 34의 위치 208 및 222, 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환된다.

[0153] 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 34에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하며, 여기서 1개, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고, 여기서 위치 235 내지 238, 또는 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및 아스파라긴 잔기는 치환된다. 바람직하게는 서열번호: 34의 잔기 115 또는 이에 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는다. 바람직하게는, 서열번호: 34의 위치 115 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는 반면, 서열번호: 34의 위치 208 및 222에서 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고, 여기서 위치 235에서 또는 이와 등가인 위치에서 프롤린 잔기는 알라닌 잔기로 치환되고, 위치 238에서 또는 이와 등가인 위치에서 아스파라긴 잔기는 프롤린으로 치환된다.

[0154] 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 35 내지 49 중 임의의 하나에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0155] 특히 바람직한 구체예에서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 58 내지 61 중 임의의 하나에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0156] 바람직하게는, 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함한다. *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 또는 제2 폴리펩티

드에 C-말단으로 위치될 수 있다.

[0157] 임의의 구체예에서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0158] 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0159] 임의의 구체예에서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 폴리펩티드 및 추가의 폴리펩티드는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 아미노산 서열이 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 이종 긴기페인의 활성 부위(예를 들어, *P. 긴기발리스*의 다양한 균주의 긴기페인)로부터 유래될 수 있다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 서로 다른 긴기페인으로부터 유래된 아미노산 서열을 가질 수 있다(예를 들어, 여기서 폴리펩티드의 하나는 Kgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 Rgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다; 또는 대안적으로 여기서 폴리펩티드의 하나는 RgpA로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 RgpB로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다).

[0160] 발명의 제6 양태에서, 본 발명은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질을 제공하며, 단백질은 제2 폴리펩티드에 연결된 제1 폴리펩티드를 포함하며, 여기서:

[0161] A) 제1 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 그리고

[0162] B) 제2 폴리펩티드는 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며;

[0163] 여기서 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 어드헤신 결합 모티프(ABM)의 서열을 포함하고, 바람직하게는 여기서 ABM은 *P. 긴기발리스* 긴기페인의 DUF2436 도메인과 절단된 어드헤신 도메인(CAD) 사이의 ABM의 일부 또는 전부에 상응하고;

[0164] 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0165] 더욱 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 15 또는 20(ABM2), 서열번호: 14 또는 19(ABM1) 및/또는 서열번호: 17 또는 21(ABM3)에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고,

[0166] 가장 바람직하게는 여기서 하나 이상의 ABM은 서열번호: 16 또는 서열번호: 18 또는 22 중 임의의 하나에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하고;

[0167] 그리고 여기서 제2 폴리펩티드는:

[0168] a) 절단된 어드헤신 도메인(CAD)의 서열, 또는 이의 일부, 바람직하게는 서열번호: 12 또는 13에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 CAD의 서열을 포함하지 않고; 그리고

[0169] 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다:

[0170] b) 상응하는 영역에서 자연적으로 발생하는 Arg- 또는 Lys-긴기페인 서열과 비교하여 ABM의 아미노산 서열에서 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환; 및/또는

[0171] c) 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 모티프 치환:

[0172] i) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN(예를 들어 PVQN)에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환;

[0173] ii) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 2 내지 5에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열에서의 모티프 NxFA의 SxYQ로(예를 들어 NEFA의 SEYQ로)의 치환;

[0174] iii) 서열번호: 15 또는 20(ABM2)의 위치 5에서 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 제2 티로신 잔기와,

서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 위치 23에서 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환.

[0175] 발명의 이 양태에서, 바람직하게는 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 23에 제시된 바와 같은, Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인에 상응하거나 또는 이로부터 유래된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하지 않는다는 것이 인식될 것이다.

[0176] 발명의 제6 양태에 따르면, 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환은 세린 잔기 또는 발린 잔기로 치환일 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 시스테인 치환은 세린 잔기로 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다.

[0177] 임의적으로, 단 하나의 시스테인 잔기가 치환된다. 다른 구체예에서, 2개의 시스테인 잔기가 치환된다. 특히 바람직한 구체예에서, 시스테인 잔기는 발린과 세린 잔기의 조합으로 치환된다. 다른 구체예에서, 모든 치환된 시스테인 잔기는 세린으로 치환되거나 모든 치환된 시스테인 잔기는 발린으로 치환된다.

[0178] 바람직하게는, 어드헤신 도메인은 서열번호: 18 또는 22에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 하나 이상의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환된다.

[0179] 발명의 이 양태에 따르면, 서열번호: 18의 잔기 63 내지 66에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN(예를 들어 PVQN)은 프롤린 및 아스파라긴 잔기의 치환을 포함한다. 바람직하게는, 치환은 PxxN에서 AxxP(예를 들어 AVQP)로이다.

[0180] 발명의 이 제6 양태의 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 18에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하며, 여기서 1개 또는 2개의 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환된다.

[0181] 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 18에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하며, 여기서 1개 또는 2개의 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고, 여기서 위치 63 내지 66 또는 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및 아스파라긴 잔기는 치환된다.

[0182] 발명의 제6 양태의 임의의 구체예에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 직접적으로 조인되거나 링커로 조인될 수 있다. 바람직하게는 링커는 바람직하게는 약 1개 아미노산 잔기 내지 약 20개 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 5개 이하의 아미노산 또는 약 10개 이하의 아미노산 길이 또는 약 15개 이하의 아미노산 길이의 일련의 아미노산 서열을 포함한다.

[0183] 바람직한 구체예에서, 제1 및 제2 폴리펩티드(각각 서열번호: 1 및 18의 대표적인 아미노산 서열(즉, 본원에 기술된 아미노산 치환이 없는 아미노산 서열)을 가짐)는 아미노산 서열 DMEVEDDSP를 갖는 펩티드 서열을 통해 연결될 수 있다.

[0184] 특히 바람직한 구체예에서, 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 80 또는 81 중 임의의 하나에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0185] 바람직하게는, 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함한다. *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 또는 제2 폴리펩티드에 C-말단으로 위치될 수 있다.

[0186] 임의의 구체예에서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0187] 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0188] 임의의 구체예에서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 폴리펩티드 및 추가의 폴리펩티드는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 아미노산 서열이 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 이종 긴기페인의 활성 부위(예를 들어, *P. 긴기발*

*리스*의 다양한 균주의 긴기페인)로부터 유래될 수 있다. 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 서로 다른 긴기페인으로부터 유래된 아미노산 서열을 가질 수 있다(예를 들어, 여기서 폴리펩티드의 하나는 Kgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 Rgp로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다; 또는 대안적으로 여기서 폴리펩티드의 하나는 RgpA로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖고 다른 폴리펩티드는 RgpB로부터 활성 부위의 아미노산 서열을 갖는다).

[0189] 발명의 임의의 양태의 임의의 구체예에서, 키메라 또는 융합 단백질은 본원에 정의된 바와 같은 제1 및 제2 폴리펩티드의 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다. 따라서 키메라 또는 융합 단백질은 자연적으로 발생하는 긴기페인 다중단백질 서열에서의 이들 도메인의 배치와 다른 도메인의 배열 또는 배치를 포함한다는 것이 인식될 것이다. 환언하면, 제1 및 제2 폴리펩티드와 그 안의 도메인은 자연적으로 발생하는 긴기페인 다중단백질에 대해 차별적인 공간 배치를 갖다.

[0190] 발명의 임의의 양태의 임의의 구체예에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 연결된다. 제1 및 제2 폴리펩티드는 직접적으로, 링커를 통해, 또는 100개 이하, 바람직하게는 50개 이하의 아미노산의 폴리펩티드 서열을 통해 연결될 수 있다. 바람직하게는, 제1 및 제2 폴리펩티드는 직접적으로 연결되거나, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 이하의 아미노산에 의해 연결된다. 가장 바람직하게는, 제1 및 제2 폴리펩티드는 직접적으로 연결된다.

[0191] 발명의 임의의 양태의 임의의 구체예에서, 제1 폴리펩티드의 C-말단 잔기는 직접적으로, 링커를 통해, 또는 50개 이하의 아미노산의 폴리펩티드 서열을 통해 제2 폴리펩티드의 N-말단 잔기에 연결될 수 있다. 대안적으로, 제1 폴리펩티드의 N-말단 잔기는 직접적으로, 링커를 통해, 또는 50개 이하의 아미노산의 폴리펩티드 서열을 통해 제2 폴리펩티드의 C-말단 잔기에 연결될 수 있다.

[0192] 발명의 제2 내지 제5 양태 중 임의의 하나에서, Arg- 또는 Lys-긴기페인으로부터 유래된 DUF2436 도메인 및 ABM 도메인은 직접적으로 연결되거나 링커 또는 폴리펩티드 서열을 통해 조인될 수 있다. 바람직하게는, DUF2436 및 ABM 도메인은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산을 포함하는 짧은 링커 서열을 통해 연결된다. 특히 바람직한 구체예에서, DUF 및 ABM 도메인은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 이하의 아미노산의 짧은 링커 서열을 통해 연결된다.

[0193] 바람직한 구체예에서, DUF2436 및 ABM 도메인(각각 서열번호: 23 및 18의 대표적인 아미노산 서열(즉, 본원에 기술된 아미노산 치환이 없는 아미노산 서열)을 가짐)은 아미노산 서열 EVEDDSP를 갖는 펩티드 서열을 통해 연결될 수 있다.

[0194] 임의의 구체예에서, 추가 폴리펩티드는 제1 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 키메라 또는 융합 단백질에 직접적으로 또는 링커를 통해 조인될 수 있다. 추가 폴리펩티드가 제2 폴리펩티드를 통해 융합 단백질의 C 말단 영역에 조인되는 구체예에서, 바람직하게는 제2 폴리펩티드의 C 말단은 추가 폴리펩티드의 N 말단에 직접적으로 조인된다. (예를 들어, 어드헤신 도메인의 C 말단은 바람직하게는 활성 부위 아미노산 서열의 N 말단에 직접적으로 조인된다).

[0195] (예를 들어 서열번호: 54에 예시된 바와 같이 하나 초과의 추가 폴리펩티드가 포함되는 경우, 추가 폴리펩티드의 사본은 서로 직접적으로 조인되거나 링커 서열을 통해 조인될 수 있다.

[0196] 발명의 임의의 양태의 임의의 구체예에서, 링커 영역은 15개 이하의 아미노산, 바람직하게는 2개 초과 아미노산의 아미노산 서열이다. 가용성에 최소한의 영향을 미치는 것을 포함하여 단백질 작제물에 사용하기에 적합한 링커는 당업계에 공지되어 있다. 유용한 링커에는 글리신-세린(GlySer) 링커가 포함되며, 이는 당업계에 잘 알려져 있고 다양한 순서로 조합된 글리신 및 세린 단위를 포함한다. 예는 (GS), (GSGGS)n, (GGGS)n 및 (GGGGS)n을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 여기서 n은 적어도 1의 정수, 전형적으로 1과 약 10 사이, 예를 들어 1과 약 8 사이, 1과 약 6 사이, 또는 1과 약 5 사이의 정수이다. 다른 유용한 링커로는 DSSG, DSSGAS, KLDSSG 또는 본원에 기술된 다른 것들이 포함된다. 특정 구체예에서, 링커 영역은 천연 기니기페인 다중단백질 서열로부터 유래될 수 있다.

[0197] 본 발명은 또한 본원에 정의된 임의의 키메라 또는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산을 제공한다.

[0198] 바람직하게는, 핵산은 본원의 표 1에 정의된 아미노산 서열 중 임의의 하나 이상을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0199] 임의의 구체예에서, 이러한 핵산은 핵산이 프로모터에 작동가능하게 연결된 발현 작제물에 포함된다. 이러한 발

현 작제물은 벡터, 예를 들어 플라스미드 또는 바이러스 벡터에 있을 수 있다.

[0200] 본 발명은 또한 본원에 기술된 바와 같은 핵산, 또는 핵산 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 본 발명의 세포의 예에는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포가 포함된다. 바람직하게는, 세포는 단리되거나, 실질적으로 정제되거나 재조합된다.

[0201] 본 발명은 또한 임의적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 조합하여, 본원에 기술된 키메라 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0202] 조성물은 또한 키메라 또는 융합 단백질에 대한 면역 반응을 강화하기 위한 보조제를 포함할 수 있다.

[0203] 따라서 본 발명은 대상체에서 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 백신 또는 면역 자극 조성물을 추가로 제공하며, 조성물은 다음을 포함한다:

[0204] i) 본원에 기술된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질의 형태에서 면역원, 및

[0205] ii) 대상체에서 면역원에 대한 면역 반응을 강화하기 위한 보조제.

[0206] 바람직하게는, 발명의 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물에 제공된 유일한 면역원은 본원에 기술된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질이다.

[0207] 본 발명은 또한 *P. 긴기발리스*에 대해 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 방법은 본원에 기술된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질, 백신 또는 면역 자극 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0208] 본 발명은 또한 대상체에서 *P. 긴기발리스*에 대한 체액성 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 방법은 본원에 정의된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0209] 바람직하게는 유도되는 면역 반응은 Th1 면역 반응에서 Th2 면역 반응으로의 전환을 포함한다.

[0210] 임의의 구체예에서, 본원에 기술된 키메라 또는 융합 단백질, 또는 이를 포함하는 백신 또는 다른 조성물의 투여에 의해 유발된 면역 반응은 바람직하게는 항원-특이적이라는 것이 인식될 것이다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 본원에 기술된 방법, 조성물 및 키메라 단백질은 *P. 긴기발리스* 긴기페인 항원에 대한 면역 반응, 바람직하게는 보호적 면역 반응을 유도하기 위한 것이다.

[0211] 임의의 구체예에서, 발명의 조성물, 키메라 단백질 및 방법은 *P. 긴기발리스*에 대한 대상체의 면역 반응(예컨대 보호적 면역 반응)을 강화하기 위한 것일 수 있다.

[0212] 본 발명은 또한 *P. 긴기발리스* 감염에 대해 대상체를 면역화하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 본원에 정의된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0213] 임의의 구체예에서, 발명의 키메라 또는 융합 단백질, 또는 이를 포함하는 조성물 또는 백신을 수용하거나 투여받은 대상체는 단백질, 조성물 또는 백신을 수용하지 않은 대상체와 비교하여, *P. 긴기발리스*로의 감염 또는 *P. 긴기발리스* 감염의 하나 이상의 증상의 중증도에 대해 증가된 수준의 보호를 갖는다.

[0214] 더욱이, 발명은 대상체에서 *P. 긴기발리스* 감염을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 본원에 정의된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하여, 이에 의해 대상체에서 *P. 긴기발리스* 감염을 치료하는 것을 포함한다.

[0215] 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에게 본원에 정의된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 투여하는 것을 포함하는, *P. 긴기발리스*로의 감염과 연관된 증상의 중증도를 감소 또는 최소화하는 방법을 제공하며, 여기서 증상은 붓거나 부어오른 잇몸, 쉽게 출혈하는 잇몸, 후퇴하는 잇몸, 치아 주변의 치주 주머니, 치아 지지 조직(치주 인대, 백악질 및/또는 치조골) 플러스 잇몸과 치아 사이의 손실, 및 치은염으로 구성된 군에서 선택된다.

[0216] 본 발명은 또한 대상체에서 *P. 긴기발리스*-관련된 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 본원에 정의된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직하게는 *P. 긴기발리스*-관련된 질환은 치주 질환을 포함한다.

[0217] 본 발명은 항균 화합물, 항염증제 중 하나 이상의 투여를 포함할 수도 있는 발명의 키메라 또는 융합 단백질,

조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물의 투여를 포함하는 치료의 방법을 제공한다.

[0218] 발명은 또한 다음을 위한 약제의 제조에 있어서, 본원에 정의된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질의 용도를 제공한다:

[0219] · *P. 긴기발리스*에 대한 대상체에서 면역 반응(바람직하게는 보호적 면역 반응) 유도;

[0220] · *P. 긴기발리스* 감염에 대한 대상체 면역화;

[0221] · 대상체에서 *P. 긴기발리스* 감염 치료;

[0222] · *P. 긴기발리스* 감염의 하나 이상의 증상의 중증도 최소화 또는 감소; 또는

[0223] · 대상체에서 *P. 긴기발리스*-관련된 질환 치료.

[0224] 발명은 또한 다음에서의 용도를 위한 본원에 정의된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 제공한다:

[0225] · *P. 긴기발리스*에 대한 대상체에서 면역 반응(바람직하게는 보호적 면역 반응) 유도;

[0226] · *P. 긴기발리스* 감염에 대한 대상체 면역화;

[0227] · 대상체에서 *P. 긴기발리스* 감염 치료;

[0228] · *P. 긴기발리스* 감염의 하나 이상의 증상의 중증도 최소화 또는 감소; 또는

[0229] · 대상체에서 *P. 긴기발리스*-관련된 질환 치료.

[0230] 발명에 따라 사용하기 위한 임의의 방법, 용도 또는 단백질, 조성물 또는 백신에서, 대상체는 *P. 긴기발리스*에 감염되었거나 감염될 위험이 있는 임의의 대상일 수 있다. 대상체는 인간일 수 있다. 대상체는 *P. 긴기발리스*에 감염되었거나 감염될 위험이 있는 반려 동물과 같은 수의학적 대상체일 수 있다.

[0231] 본 발명은 또한 *P. 긴기발리스*에 대한 항체를 얻는 방법을 제공하며, 방법은 발명의 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 비-인간 동물에게 투여하고, 이에 의해 동물에서 *P. 긴기발리스*에 대한 항체를 생성하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 방법은 동물(예를 들어, 동물의 혈액으로부터 추출) 또는 그의 알(동물이 조류 종이인 경우, 바람직하게는 닭)로부터 항체를 단리하는 것을 추가로 포함한다.

[0232] 본 발명은 또한 *P. 긴기발리스*에 대한 항체를 포함하는 항체 제제를 제공하며, 여기서 항체 제제는 발명의 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 비-인간 동물에게 투여하고, 이에 의해 동물에서 *P. 긴기발리스*에 대한 항체를 생성하고, 동물 또는 그의 알로부터 항체를 단리함에 의해 얻어진다.

[0233] *P. 긴기발리스*에 대한 항체는 *P. 긴기발리스* 감염을 제거하거나 감소시키기 위해 치료적으로 사용될 수 있거나, *P. 긴기발리스* 감염의 중증도를 예방하거나 감소시키기 위해 예방적으로 사용될 수 있다.

[0234] 본 발명은 또한 본원에 정의된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물을 포함하는 키트를 제공하며, 여기서 임의적으로 키트는 밀봉된 용기에 하나 이상의 사이토카인 및/또는 보조제를 포함한다.

[0235] 바람직하게는, 키트는 조성물이 개체를 면역화하는데 사용된다는 것을 나타내는 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함하고, 임의적으로 여기서 라벨 또는 패키지 삽입물은 사용 지침을 포함한다.

[0236] 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥상 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다", "포함한다" 및 "포함하는"은 언급된 단계나 요소 또는 단계나 요소들의 그룹을 포함하는 것을 의미하지만 다른 단계나 요소 또는 단계나 요소들의 그룹을 배제하는 것은 아닌 것으로 이해될 것이다. 따라서, 용어 "포함하는" 등의 사용은 나열된 구성요소가 요구되거나 필수이지만, 다른 요소는 선택적이고 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있음을 나타낸다. "구성된"은 "구성된"이라는 문구 뒤에 오는 모든 것을 포함하고 제한하는 것을 의미한다. 따라서 "구성된"이라는 문구는 나열된 요소가 요구되거나 필수이고 다른 요소가 존재할 수 없음을 나타낸다. "본질적으로 구성된"은 문구 뒤에 나열된 임의의 요소를 포함하는 것을 의미하고, 나열된 요소에 대한 개시내용에 명시된 활동이나 행위를 방해하거나 기여하지 않는 다른 요소로 제한된다. 따라서 문구 "본질적으로 구성된"은 나열된 요소가 요구되거나 필수이지만 다른 요소(예를 들어, 폴리펩티드 서열의 N-말단 또는 C-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 20개 초과의 추가 아미노산 잔기)는 선택적이고 나열된 요소의 활동이나 행위에 영향을 미치는지 미치지 않는지 여부에 따라 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있다는 것을 나타낸다.

[0237] 본 발명의 추가 양태와 이전 단락에 기술된 양태의 추가 구체예는 첨부 도면을 참조하여 예로서 주어진 다음의 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0238] **도 1. A.** 마우스 치주염 모델 - 치료적 백신 접종. **B.** 발명의 키메라 또는 융합 단백질을 생성하기 위한 Kgp 긴 기페인 다중단백질 및 그로부터 유래된 성분의 도메인 구조를 보여주는 도식.

도 2. A. K1 도메인이 있거나 없는 재조합 변이체를 발현하고 전체 길이 또는 절삭된 DUF 도메인을 함유하는 *대장균* 분획의 SDS-PAGE. 저온 및 낮은 IPTG 조건이 사용된다. 전체 길이 DUF는 가용성에 필수적이다. 전체 길이 K1은 가용성에 해롭다. **B.** DTT의 부재의 존재에서 키메라 구조 KDA 및 KDAK1의 천연 PAGE. KDA에 K1 도메인의 첨가는 가용성을 감소하지만 단백질은 다량체화된다.

도 3. 다량체화의 제거 A. ABM1 및 ABM2 도메인의 위치를 보여주는 Kgp 다중단백질의 도식적 표현. **B-D.** DTT의 존재 또는 부재에서 전기영동을 실시한 정제된 재조합 단백질 변이체의 NATIVE_PAGE 분석. **B:** "PVQN" 돌연변이체 변이체의 연구. **C:** 추가의 Cys>Ser 돌연변이를 갖는 "PVQN" 돌연변이체 변이체의 연구. **D:** "PVQN" 모티프(레인 2-4) 앞에 있는 루프에서의 돌연변이와 각각 ABM2 및 ABM1(레인 5-7)에서 고도로 보존된 소수성 Tyr 및 Trp 잔기의 연구. **E.** 정제된 키메라 KDcAK1n 및 시스테인과 PVQP 돌연변이가 있는 재조합 ABM21의 NATIVE PAGE 분석. KDcAK1n은 봉입체로부터 정제되었고, 재조합 ABM21은 *대장균* 발현 균주로부터 가용성 단백질로 정제되었다. **F.** 소규모 정제된 재조합 변이체의 NATIVE PAGE 분석. G. (i) 4-12% SDS 겔 및 (ii) 다양한 백신 후보의 3-12% 천연 겔. 레인 1 & 2: KDAK-3S-AVQP(1: 비환원; 2: 환원); 레인 3 & 4: KDAK-1V-2S-AVQP(3: 비환원; 4: 환원); 레인 5 & 6: KDAK-1V-AVQP(5: 비환원; 6: 환원); 레인 7 & 8: KDAK-AVQP(7: 비환원; 8: 환원); 레인 9 & 10: KDcAK1n(9: 비환원, 10: 환원). 겔은 쿠마시 블루로 염색되었다.

도 4. 뼈 손실 연구. 통계 분석 - 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3. # 대조군 챌린지 그룹과 유의하게 상이함.

도 5. 열-사멸된 *P. 긴기발리스* 전체 세포에 대한 항원의 항체 이소형 반응(개별 혈청). 나이브 = 대조군 비 챌린지. 긴기발리스 = *P. 긴기발리스*로 대조군 챌린지. 키메라 = KDcAK1n 항원. 아목스 = 아목시실린.

도 6. 뼈 손실 연구. 통계 분석 - 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3. # 대조군 챌린지 그룹과 유의하게 상이함.

도 7. 뼈 손실 연구 통계 분석 - 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3. #p<0.01; ##p<0.05(T 테스트) 대조군 챌린지 그룹과 유의하게 상이함.

도 8. 뼈 손실 연구. S = 가용성 분획; 우레아 = 정제에 사용되는 우레아; AC = 친화성 컬럼 정제; IB = 봉입체; 배치 = 배치 정제 방법. 통계 분석: 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3. #p<0.01 대조군 챌린지 그룹과 유의하게 상이함.

도 9 다양한 융합 단백질 작제물로 동물의 면역화에 이은 뼈 손실 연구. 통계 분석: 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3 대조군 챌린지 그룹과 유의하게 상이함 # p<0.05 ## p<0.01 ### p<0.001 #### p<0.0001.

도 10 다양한 융합 단백질 작제물로 동물의 면역화에 이은 뼈 손실 연구. 통계 분석: 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3. ###(p<0.05); ####(p<0.01); 대조군 챌린지 그룹과 유의하게 상이함.

도 11 다양한 융합 단백질 작제물로 동물의 면역화에 이은 뼈 손실 연구. 통계 분석: 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3. #(p<0.05) 대조군 챌린지 그룹과 유의하게 상이함.

도 12 다양한 융합 단백질 작제물로 동물의 면역화에 이은 뼈 손실 연구. KDcAK1n 외에 테스트된 모든 항원은 "AVQP" 치환도 포함한다; 즉, KDAK-3S = KDAK-3S-AVQP; KDAK-1V2S = KDAK-1V2S-AVQP; KDAK-3S-태그 = KDAK-3S-AVQP-태그; 통계 분석: 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3. *(p<0.05) 나이브(즉, 대조군 비-챌린지된 그룹)와 유의하게 상이함.

도 13 실시예 4에서 테스트된 *P. 긴기발리스* 항원의 최종 생성물의 순도. His-태그된 항원(A 및 B) 및 태그가 없는 KDAK-3S-AVQP(C)의 PAGE 분석. (A) SDS-PAGE; (B) 천연 PAGE 또는 천연 겔. (C) 가열되거나(95℃) 비가열된 장입된 샘플을 갖는 SDS- 및 천연 PAGE 또는 천연 겔 상. R: 겔 장입된 샘플이 환원됨; NR: 겔 강입된 샘플이 환원되지 않음; M: 단백질 표준. His-태그된 KDAK-3S-AVQP는 다른 His-태그된 단백질과 병행하여

정제되었다.

도 14 다양한 융합 단백질 작제물로 동물의 면역화에 이은 뼈 손실 연구. 통계 분석 - 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3. #($p<0.05$, 나이브 대조군(즉, 대조군 비-챌린지)과 비교됨); ##($p<0.05$, 감염된 대조군(즉, 대조군 챌린지)과 비교됨).

도 15 열-사멸된 *P. 긴기발리스* 전체 세포에 대한 마우스 혈청(개체)에서의 항체 역가. (A) 총 IgG 역가; (B) IgG1 하위유형 역가; (C) IgG2a 하위유형 역가.

도 16 Kgpcat 교차반응성 Ab 역가로 치주골 손실 보호와 함께, 발명의 예시적인 융합 단백질의 용량 반응 추세.

서열 정보

표 1: 서열 정보

서술자	서열번호	서열
KAS (활성 부위 도메인)	1	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK
Kgp 활성 부위 [432-468]	2	LNTGV[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L][L/V]T[A/T][T/S]Q[V/L]KALTNK[D/N]K
RgpA 활성 부위 [426-462]	3	FNGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQ
KAS1	4	LNTGV[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L]
KAS2	5	NTGV[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L][L/V]T[A/T][T/S]Q[V/L]KALTNK[D/N]K
KAS3	6	V[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L][L/V]
PAS1K	7	LNTGVSFANYTAHGSETAWADP
RAS1	8	FNGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSH
RAS2	9	NGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQ
RAS3	10	ISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHF
PAS1R	11	FNGGISLANYTGHGSETAWGT
K1 (CAD 도메인)	12	TLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASSTGNDASNFTNALLEETITAKGVRSPKAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGTKYVAFRHFQSTDMFYIDLDEVEIKANGKR
K1n (절삭된 CAD 도메인 K1)	13	TLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITPALDLPNGG
ABM1 Kgp [942-970]	14	SNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNGT

ABM2 Kgp [885-941] 밑줄친 알라닌으로 치환을 위한 티로신 부위	15	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYT AGVSPKVCKDVTVEG
ABM2+1 펩티드 [885-970] 굵은 글씨의 NEFA 서열 모티프	16	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYT AGVSPKVCKDVTVEGS**NEFA**PVQNLTGSSVGQKVTLKWDAP NGT
ABM3 Kgp [971-983]	17	PNPNPNPNPNPGT
ABM2+1+3 펩티드 (밑줄친 Cys 잔기) [885-983] 굵은 글씨의 NxFA 서열 모티프; 이태릭체의 PxxN 서열 모티프	18	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYT AGVSPKVCKDVTVEGS**NEFA***PVQ*NLTGSSVGQKVTLKWDAP NGTPNPNPNPNPNPGT
ABM1 RgpA [921-949]	19	SNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPNGT
ABM2 RgpA [864-920]	20	SDYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVA(A/T)GNHEYCVEVK YTAGVSPKVCKDVTVEG

ABM3 Rgp [950-964]	21	PNPNPNPNPNPNPGT
ABM 2+1+3 Rgp [864+964]	22	SDYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVA(A/T)GNHEYCVEVK YTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLKWD APNGTPNPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 (밑줄친 Cys)	23	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDM
DUF2436 Cys 에서 Ser/Val 로 치환	24	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYI**S/V**ITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDM
Dc (절삭된 DUF2436) (밑줄친 Cys)	25	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASG KMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD M
Dc Cys 에서 Ser 로 치환	26	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY**S**ITNPEPASG KMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD M
절삭된 DUF2436+AMB 2+1+3 밑줄친 Dc	27	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASG KMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD MEVEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHE YCVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQK VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
KDAK (즉 K 도메인, 전체 DUF 도메인,	28	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNG

ABM2+1+3, K 도메인)		TPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQL KALTNKDK
AVQP ABM1	29	SNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPNGT
AVQP ABM213	30	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYT AGVSPKVCKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAP NGTPNPNPNPNPNPGT
ABM213 Cys #1 에서 Ser	31	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEVKYTA GVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPN GTPNPNPNPNPNPGT
ABM213 Cys #2 에서 Ser	32	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYT AGVSPKVSKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAP NGTPNPNPNPNPNPGT
ABM213 Cys #1+ #2 에서 Ser	33	ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEVKYTA GVSPKVSKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPN GTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436+ABM 213	34	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 Cys 에서 Ser/Val (믿줄침) + ABM213	35	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY[S/V]ITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDME VEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTL KWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 + ABM213 Cys#1 에서 Ser (믿줄침)	36	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEV

		KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 Cys to Ser/Val + ABM213 Cys #1 에서 Ser (밑줄침)	37	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY[S/V]ITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDME VEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYS VEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTL KWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 + ABM213 Cys#2 에서 Ser (밑줄침)	38	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 Cys 에서 Ser/Val + ABM213 Cys #2 에서 Ser (밑줄침)	39	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY[S/V]ITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDME VEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTL KWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 +ABM213 Cys #1 + #2 에서 Ser (밑줄침)	40	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEV KYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 + ABM213 모두 3 Cys 잔기에서	41	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY[S/V]ITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDME

Ser 또는 Val (없을 경우)		VEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYS VEVKYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTL KWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 + ABM213 AVQP (없을 경우)	42	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGDGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 Cys 예서 Ser/Val + ABM213 AVQP	43	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGDGEVVIPGGVYDY[S/V]ITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDME VEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTL KWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 +ABM213 Cys#1 예서 Ser + AVQP	44	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGDGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 Cys 예서 Ser/Val + ABM213 Cys#2 예서 Ser +AVQP (없을 경우)	45	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGDGEVVIPGGVYDY[S/V]ITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDME VEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTL KWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 + ABM213	46	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA

Cys#2 에서 Ser+ AVQP (밑줄침)		NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 Cys 에서 Ser/Val + ABM213 Cys#2 에서 Ser + AVQP (밑줄침)	47	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY[S/V]ITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDME VEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTL KWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 +ABM213 Cys#1 + 2 에서 Ser + AVQP (밑줄침)	48	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEV KYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGT
DUF2436 +ABM213 모두 3 Cys 에서 Ser + AVQP (밑줄침)	49	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY[S/V]ITNPEPASGKM WIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDME VEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYS VEVKYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTL KWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
KDA	50	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG

		VSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGT
KDAKK	51	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQL KALTNKDKNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNK DK
KDAR	52	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHFGT THVKQLTNSNQ
KKDA	53	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKKLNTGV SFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSREVKRI GDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFLLDAD HNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPVVTTQ NIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGNQPA RYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPASYTYT VYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAGVSPK VCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNGTPNP NPNPNPNPGT
KKDAKK (밑줄친 링커)	54	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK<u>DSSGAS</u> NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN

		QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQL KALTNKDKKLDSSGNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQL KALTNKDK
KDcAK1nK-4S-AVQP	55	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDNT GYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYSITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEV KYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDG HGWKPGNAPGIAGYNSNGSVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITP ALDLPNGGNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNK DK
KDcAK1n-4S	56	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDNT GYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYSITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEV KYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDG HGWKPGNAPGIAGYNSNGSVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITP ALDLPNGG
KDcAK1n-4S-AVQP	57	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDNT GYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYSITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEV KYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDG HGWKPGNAPGIAGYNSNGSVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITP ALDLPNGG

KDA-1S/V-2S-AVQP (D 도메인에 Cys 에서 S/V 옵션)	58	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY[S/V]ITNPEPASGKMWIAGDG GNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSP ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEVKYTA GVSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPN GTPNPNPNPNPNPGT
KDAK-1S/V-2S-AVQP (굵은 밑줄 D 도메인에 Cys 에서 S/V 옵션; 밑줄친 ABM 도메인에 시스테인에서 세린 치환; 이태릭체의 AVQP)	59	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY**[S/V]**ITNPEPASGKMWIAGDG GNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSP ASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEVKYTA GVSPKVSKDVTVEGSNEFA*AVQ*PLTGSSVGQKVTLKWDAPN GTPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTS QLKALTNKDK
KDA-2S-AVQP (Ser 으로 치환된 ABM 도메인에서 Cys # 2 및 3)	60	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEVKYTAG VSPKVSKDVTVEGSNEFA*AVQ*PLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGT
KDAK-2S-AVQP (미치환된 DUF	61	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV

도메인에서 Cys -- 위은 밑줄: Ser 으로 치환된 ABM 도메인에서 Cys #2 및 3 (밑줄침) 이태학적의 AVQP		VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYSITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTEEDGVAAGNHEYSVEVKYTAG VSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQL KALTNKDK
KDAK1n-4S-AVQP	S2	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYSITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTEEDGVAAGNHEYSVEVKYTAG VSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWK PGNAPGIAGYNSNGSVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITPALDLP NGG
KDAK1nK-4S-AVQP	S3	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYSITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTEEDGVAAGNHEYSVEVKYTAG VSPKVSKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWK PGNAPGIAGYNSNGSVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITPALDLP NGGNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK
KDcAK1n	S4	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDNT GYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA

		GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDG HGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITP ALDLPNGG
KDAK1n	65	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWK PGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITPALDLP NGG
KDAK1	66	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDNT GYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDG HGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITP ALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASSTGNDASNFT NALLEETITAKGVRSPKAIRGRIQGTWRQKTVDLPAGTKYVAF RHFQSTDMFYIDLDEVEIKANGKR
KDcAK1nK 밑줄친 활성 부위	67	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKWGDNT GYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDG HGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITP

		ALDLPNGGNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK
KDAK1nK 밑줄친 활성 부위	68	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWK PGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITPALDLP NGGNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK
KDAK-3S-AVQP [밑줄친 활성 부위] 굵고 밑줄친 3 시스테인에서 S 치환; 이태릭체의 AVQP	69	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY**S**ITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEY**S**VEVKYTAG VSPKV*S*KDVTVEGSNEFA*AVQ*PLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQL KALTNKDK
KDAK-1V-AVQP	70	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY**V**ITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQL KALTNKDK

KDAK-AVQP	71	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQL KALTNKDK
KDAR-1V-2S-AVQP 밑줄친 활성 부위	72	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY**V**ITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEY**S**VEVKYTAG VSPKV**S**KDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNGGISLANYTGHGSETAWGTSHFGTTH VKQLTNSNQ
KDAR-1V-AVQP	73	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDY**V**ITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNGGISLANYTGHGSETAWGTSHFGTTH VKQLTNSNQ
KDAR-3S-AVQP (밑줄친 시스테인에서 세린 치환; AVQP)	74	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYSITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEVKYTAG VSPKVSKDVTVEGSNEFA*AVQP*LTGSSVGQKVTLKWDAPNG

		TPNPNPNPNPNPGTNGGISLANYTGHGSETAWGTSHFGTTH VKQLTNSNQ
KDAR-AVQP	75	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAAVQPLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNGGISLANYTGHGSETAWGTSHFGTTH VKQLTNSNQ
DUF2436 + ABM2+1	76	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGT
KDAK-3S 밑줄친 K 도메인	77	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYSITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEVKYTAG VSPKVSKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNG TPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQL KALTNKDK
KKDAK1nKK 밑줄친 K 도메인 굵은체의 링커	78	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK**DSSGAS** NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKAEGSRE VKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFL LDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPV VTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGN QPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVEDDSPAS YTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAG VSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNG

		TPNPNPNPNPNPGTTLSESFENGIPASWKTIDADGDGHGWK PGNAPGIAGYNSNGCVYSESFGLGGIGVLTPDNYLITPALDLP NGGNTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK**KLD SSG**NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDK
DUF2436 + ABM2+3	79	AEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKVVLAADNVWGDN TGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPA NADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIA GDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGPNPNPNPNPNPGT
KAK	80	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEV KYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPL LTTSQLKALTNKDK
KAK-2S-AVQP (세린으로 치환된 ABM 도메인에서 2 시스테인; 밑줄침; 이태릭체의 AVQP)	81	NTGVSFANYTAHGSETAWADPLLTTSQLKALTNKDKDMEVED DSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYSVEV KYTAGVSPKVSKDVTVEGSNEFA*AVQP*LTGSSVGQKVTLKW DAPNGTPNPNPNPNPNPGTNTGVSFANYTAHGSETAWADPL LTTSQLKALTNKDK
Dc+2+1+3	82	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASG KMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD MEVEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHE YCVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQK VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPGT
Dc+2+3	83	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASG KMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD MEVEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHE YCVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGPNPNPNPNPNPGT
Dc+2+1	84	WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANF EYLIPANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASG KMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTD MEVEDDSPASYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHE YCVEVKYTAGVSPKVCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQK VTLKWDAPNGT

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0239] 본 명세서에 개시되고 정의된 발명은 본문 또는 도면으로부터 언급되거나 명백한 개별 특징 중 2개 이상의 모든 대안적인 조합으로 확장된다는 것이 이해될 것이다. 이들 상이한 조합은 모두 발명의 다양한 대안적 양태를 구성한다.

[0240] 이제 발명의 특정 구체예를 상세히 참조할 것이다. 발명은 구체예와 조합하여 기술되지만, 발명을 이들 구체예로 제한하려는 의도는 없다는 것이 이해될 것이다. 반대로, 발명은 청구범위에 의해 정의된 발명의 범주 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 등가물을 포괄하도록 의도된다.

[0241] 당업자는 본 발명의 실시에 사용될 수 있는 본원에 기술된 것과 유사하거나 등가인 많은 방법 및 재료를 인식할 것이다. 본 발명은 기술된 방법 및 재료에 결코 제한되지 않는다. 본 명세서에 개시되고 정의된 발명은 언급되거나 본문 또는 도면으로부터 명백한 개별 특징 중 2개 이상의 모든 대안적인 조합으로 확장된다는 것이 이해될

것이다. 이들 다양한 조합은 모두 발명의 다양한 대안적 양태를 구성한다.

[0242] 본원에 언급된 모든 특허 및 간행물은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0243] 본원을 해석할 목적으로, 단수로 사용된 용어는 복수도 포함할 것이며 그 반대의 경우도 마찬가지이다.

[0244] 본 발명에 이르게 된 연구에서, 발명자들은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하는 데 사용하기 위한 다양한 키메라 또는 융합 단백질과 백신 후보로 사용하기 위한 이러한 키메라의 대규모 생산에 대한 방법을 조사하였다.

[0245] 발명자들은 P. 긴기발리스 긴기페인의 성분으로부터 유래된 키메라 또는 융합 단백질의 대규모 제조 및 생산과 연관된 다양한 문제를 식별하였다. 첫째, 선행 기술에 기술된 키메라 또는 융합 단백질은 가용성 단백질로서 충분히 많은 양으로 생산하기가 어렵다. 보다 구체적으로, 선행 기술의 키메라 단백질은 전형적으로 *대장균*에서 봉입체에서 생산되어 하류 임상 제품 개발을 위한 대량의 가용성 단백질을 생산하는 것이 어렵다.

[0246] *대장균*에서 생산될 때 감소된 가용성은 또한 제조 시간과 규모에 실질적으로 기여할 뿐만 아니라 일단 봉입체로부터 용해되고 다시 접혀져 단백질의 빈약한 안정성에 기여한다.

[0247] 보다 더욱이, 선행 기술에 기술된 긴기페인-유래된 키메라 단백질도 다량체화를 겪고 있다. 키메라 단백질에서의 도메인 사이에 베타-시트의 형성은 규제 관점에서 최종 백신 제품의 평가를 어렵게 할 뿐만 아니라 투여된 다음 면역 반응을 잠재적으로 감소시킬 수도 있다.

[0248] 따라서 본 발명은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하는 데 사용하기 위한 키메라 또는 융합 단백질의 개선된 설계, 및 이를 포함하는 방법 및 용도에 관한 것이다.

[0249] 임의의 구체예에서, 본 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 선행 기술에 기술된 키메라 또는 융합 단백질에 비해 개선된 가용성 및/또는 안정성을 갖는다. 개선된 가용성 및/또는 안정성은 임상 환경에서 사용하기 위한 융합 단백질의 대규모 생산을 시행할 상당한 이점을 제공한다.

[0250] 대안적인 구체예에서, 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 선행 기술의 키메라 또는 융합 단백질에 비해 응집하고 다량체화하는 감소된 경향을 갖는다. 응집 및 다량체화는 치료/예방 단백질의 대규모 제조 및 생산을 방해할 수 있다. 결과적으로, 발명의 키메라 단백질의 응집 및/또는 다량체화에 대한 경향을 감소시키는 것은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하는 데 사용하기 위한 선행 기술의 키메라 단백질에 비해 상당한 개선을 제공한다.

[0251] 추가로, 임의의 구체예에서, 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 선행 기술의 키메라 또는 융합 단백질에 비해 증가된 면역원성을 갖는다.

[0252] 따라서, 발명자들은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질을 얻기 위한 다양한 새로운 접근법을 식별하였고, 이는 선행 기술에 비해 하나 이상의 이점을 갖는 키메라 또는 융합 단백질을 초래한다.

[0253] 발명자들은 본원에 기술된 바와 같이 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 키메라 또는 융합 단백질을 생성하기 위한 하나 이상의 새로운 접근법이 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하는 데 적합한 면역원성 조성물의 제조 용이성 증가; 향상된 저장-수명 및/또는 향상된 면역원성을 포함하는 이점을 초래할 수 있다고 믿는다.

[0254] 긴기페인

[0255] *P. 긴기발리스*의 병원성은 무엇보다도 시스테인 단백질분해효소(긴기페인), 핌브리에, 햄-결합 단백질, 및 외막 수송 단백질을 포함하는 다수의 표면-연관된 병독성 요인에 기인된다. 특히, *P. 긴기발리스*의 세포외 Arg- 및 Lys-특이적 단백질분해효소인 '긴기페인'(RgpA/B 및 Kgp)은 집락화, 숙주 조직 안으로의 침투, 면역 반응의 조절 장애, 디스바이오시스 및 질환에 주요한 병독성 요인으로 연루되어 있다.

[0256] 긴기페인, 특히 Lys-특이적 단백질분해효소 Kgp는 *P. 긴기발리스*가 마우스 치주염 모델에서 치조골 용식작용을 유도하는 데 필수적이다. 긴기페인은 또한 심각한 치주염의 부위에서 치은 조직에서 치은연하 플라크에 가까운 높은 농도로 발견되었으며, 치은 조직 안으로 더 깊은 원위 부위에서는 낮은 농도로 발견되었다. Lys-특이적 및 Arg-특이적 단백질분해효소는 시험관내에서 다양한 숙주 단백질, 예를 들어, 피브리노겐, 피브로넥틴 및 라미닌을 분해하는 것으로 나타났다. 혈장 숙주 방어 및 조절 단백질분해효소 억제제 α-트립신, α2-마크로글로불린,

항키모트립신, 항트롬빈 III 및 항플라스민 또한 *P. 긴기발리스*로부터의 Lys- 및 Arg- 단백질분해효소에 의해 분해된다. 이는 만성 치주염의 전개에서 *P. 긴기발리스*에 의한 핵심 역할을 설명하는 설득력 있는 메커니즘의 개발로 이어졌다.

[0257] RgpA, RgpB 및 Kgp 유전자 모두는 길이가 ~22개 아미노산의 N-말단 신호 펩티드, 길이가 ~200개 아미노산의 비정상적으로 긴 프로펩티드, ~480개 아미노산의 촉매 도메인을 인코딩한다. 촉매 도메인에 대한 C-말단은 어드헤신 결합 도메인(ABM 또는 5개의 별개의 서열이 기술됨)으로 구성되는 큰 헤마글루티닌-어드헤신(HA) 도메인, "알려지지 않은 기능의 도메인"(알려지지 않은 기능의 보존된 Pfam 도메인으로 정의된 일명 DUF2436; IPR018832) 및 C-말단 어드헤신 도메인 또는 절단된 어드헤신 도메인(또는 CAD)이다. ABM, DUF 및 CAD의 특정 배열은 Kgp와 RgpA/B 간에 다르다.

[0258] Kgp 다중단백질의 도메인 구조는 도 1b에 예시되어 있었다. 예를 들어, Kgp는 다음을 포함한다(N 말단에서 C 말단): 촉매 도메인, 제1 ABM(ABM1), DUF2436, ABM2, ABM1, ABM3을 포함하는 도메인, 2개의 CAD 도메인(K1 및 K2로 명명), ABM2 및 ABM1을 포함하는 추가 도메인, 추가 CAD 도메인(K3으로 명명), ABM2 및 C-말단 도메인.

[0259] 본원에 사용된 바와 같이, ABM 1, 2 및 3에 대한 언급은 일반적으로 도 1b에 묘사된 바와 같이 Kgp의 바로 C 말단에서 DUF2436으로 서열에서 ABM2, ABM1 및 ABM3 순서로 발견되는 ABM을 지칭하는 것으로 이해될 것이다.

[0260] RgpB와 RgpA의 촉매 도메인은 높은-정도의 서열 상동성을 공유한다. 그러나, RgpB는 HA 도메인을 결하고 외막 상에 단량체 형태로 위치된다. HA 도메인 중 일부는 C-말단 어드헤신 도메인 또는 절단된 어드헤신 도메인(CAD)으로 대안적으로 기술되었고 일부는 DUF("알려지지 않은 기능의 도메인") 2436 도메인(알려지지 않은 기능의 보존된 Pfam 도메인; IPR018832)이다.

[0261] RgpA 및 Kgp 전구체 단백질은 비-공유적으로 회합되어 남아 있어 큰 외막 단백질 복합체를 형성하는 다중 도메인으로 절단된다. 따라서 생체내에서 Arg- 및 Lys-특이적 단백질분해효소는 비공유적으로 회합된 단백질분해효소와 어드헤신의 세포-회합된 복합체에서 발견된다. 하나의 이러한 복합체가 RgpA-Kgp 단백질분해효소-어드헤신 복합체(이전에는 PrtR-PrtK 단백질분해효소-어드헤신 복합체로 지칭됨)로 지정되었다. 복합체는 45kDa Arg-특이적 칼슘-안정화된 시스테인 단백질분해효소와 7개의 서열-관련된 어드헤신 도메인으로 구성되어 있다.

[0262] 본원에 사용된 Lys-긴기페인 촉매 도메인은 KAS 도메인 또는 PAS 도메인으로도 지칭될 수 있다. 본원에 사용된 Arg-긴기페인 촉매 도메인은 RAS 도메인 또는 PAS 도메인으로도 지칭될 수 있다. 전형적으로 Lys-긴기페인 또는 Arg-긴기페인의 촉매 도메인은 단백질의 N 말단 ~480 아미노산 영역에 위치된다. 촉매 도메인 내의 활성 부위는 전형적으로 아미노산 잔기 426-446(RgpA의 경우) 및 432-453(Kgp의 경우)에 위치된다. 촉매 도메인 내에서 발견되는 예시적인 활성 부위 펩티드는 표 1에 서열번호: 1-11로 제시되어 있다.

[0263] 본원에 사용된 바와 같이 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 어드헤신 도메인은 전형적으로 촉매 또는 활성 부위 도메인의 C-말단에 있는 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 영역을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 어드헤신 도메인(HA 도메인으로도 지칭됨)은 전형적으로 알려지지 않은 기능의 도메인(DUF) 도메인(특히 알려지지 않은 기능의 DUF 2436 보존된 Pfam 도메인; IPR018832) 및 여러 어드헤신 결합 모티프(ABM) 도메인과 절단된 어드헤신 도메인(CAD)을 포함한다.

[0264] 제1 폴리펩티드

[0265] 본 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg-X 또는 Lys-X 단백질분해효소(본원에서는 각각 Arg- 또는 Lys-긴기페인으로도 지칭됨)의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 폴리펩티드를 포함한다.

[0266] 임의의 구체예에서, 제1 폴리펩티드는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0267] *개선된 면역원성*

[0268] 바람직하게는, 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드를 포함한다. *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위를 포함하거나 이로 구성된 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 제1 폴리펩티드에 N-말단으로, 제1 폴리펩티드에 C-말단으로, 제2 폴리펩티드에 N-말단으로 또는 제2 폴리펩티드에 C-말단으로 위치될 수 있다. 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 50개 이하의 아미노산의 링커를

통해 키메라 또는 융합 단백질의 제1 또는 제2 폴리펩티드에 연결되거나 제1 폴리펩티드에 직접적으로 연결될 수 있다.

[0269] 하나 이상의 추가 폴리펩티드는 바람직하게는 서열번호: 1 내지 11의 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0270] 임의의 구체예에서, *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 제1 폴리펩티드 및 추가 폴리펩티드는 동일한 아미노산 서열, 또는 서로 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0271] 바람직한 구체예에서, 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 2개 이하 또는 3개 이하 또는 4개 이하의 폴리펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스*의 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 활성 부위의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 5개 미만, 보다 바람직하게는 4개 미만, 가장 바람직하게는 3개 미만의 폴리펩티드를 갖는다.

[0272] 제2 폴리펩티드

[0273] 본 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 P. 긴기발리스의 ArgX 또는 Lys-X 단백질분해효소의 어드헤신 도메인의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 제2 폴리펩티드를 포함한다.

[0274] 제2 폴리펩티드는 전형적으로 (Kgp 및 RgpA와 같은) *P. 긴기발리스*의 ArgX 또는 Lys-X 단백질분해효소의 어드헤신 도메인에서 인식된 도메인/모티프인 어드헤신-결합 모티프(ABM) 중 하나 이상에 상응하는 서열을 적어도 포함한다는 것이 이해될 것이다.

[0275] Kgp 및 RgpA에 대해 정의된 5개의 ABM(ABM1-5)이 있다. 이들 ABM에 대한 예시적인 서열은 표 1에 제시되어 있다.

[0276] 전형적으로, 제2 폴리펩티드는 하나 이상의 ABM을 포함하고, 바람직하게는 제2 폴리펩티드는 적어도 ABM1 및 ABM2, 또는 각각의 ABM1 또는 ABM2와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 제2 폴리펩티드는 또한 ABM3의 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함할 수 있다.

[0277] 또한 제2 폴리펩티드에서의 ABM 펩티드의 배열은 자연적으로 발생하는 어드헤신 도메인에서 발견되는 ABM 펩티드의 배열에 상응할 필요가 없다는 것도 이해될 것이다. 예를 들어, ABM 펩티드는 ABM1, ABM2, ABM3 등의 서열(N-말단에서 C-말단까지)에서의 제2 폴리펩티드에 배열될 수 있다. 대안적으로, ABM 펩티드는 Kgp의 어드헤신 도메인 1에서 발생하는 것과 같이, ABM2, ABM1 및 ABM3과 같은 자연적으로 발생하는 어드헤신 도메인에서의 배열을 반영하도록 배열될 수 있다.

[0278] 보다 더욱이, 제2 폴리펩티드에서의 ABM은 연속적으로 배열될 수 있거나 50개 이하의 아미노산의 아미노산 서열에 의해 서로 분리될 수 있다. 당업자는 ABM 사이의 이격이 발명의 키메라 또는 융합 단백질의 디자인에 결정적이지 않다는 것을 인식할 것이다.

[0279] 임의의 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 16에 제시된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0280] 임의의 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 18 또는 서열번호: 27에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0281] 임의의 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 22 또는 서열번호: 27에 제시된 아미노산 서열, 또는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0282] *개선된 가용성*

[0283] 발명자들은 키메라 또는 융합 단백질에 사용하기 위해 자연적으로 발생하는 긴기페인에서 발견되는 다양한 도메

인을 단순히 선택하는 것을 포함하는 선행 기술의 방법이 전형적으로 재조합 시스템에서 불충분하게 발현되고 (예를 들어 *대장균*에서의 봉입체에서) 불용성 단백질로 발현되는 경향을 갖는 단백질의 생성을 초래한다는 사실을 확립하였다.

[0284] 본 명세서의 실시예를 참조하여, 발명자들은 서열번호: 13에 제시된 서열(즉, CAD 도메인의 절삭된 형태)이 어떻게 Kgp 다중단백질이 세포 표면 상에서 단백질용리적으로 처리되고 조립되는지를 나타낸다는 것을 인식하였다. 따라서 그러한 서열의 함입은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응의 유도에 결정적인 것으로 생각되었다. 그러나, 발명자들은 놀랍게도 이 서열이 존재하는 경우 대장균에서 발현될 때 재조합 단백질의 빈약한 가용성 및 봉입체의 형성에 기여한다는 것을 발견하였다.

[0285] 발명자들은 융합 단백질에서 CAD의 전체 서열을 포함시킴에 의해 이 문제를 바로잡으려고 노력하였다. 놀랍게도 이는 가용성을 개선시키지 못했고 실제로 가용성을 낮추는 데 기여하였다.

[0286] 따라서, 본 발명자들은 하나 이상의 절단된 어드헤신 도메인(CAD) 또는 이의 일부(들)에 상응하는 서열의 함입이 긴기페인 서열로부터 유래된 제안된 키메라 단백질 및 백신 조성물의 감소된 가용성에 기여한다는 것을 발견하였다.

[0287] 이와 같이 본 발명의 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 13에 제시된 서열 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하지 않는다.

[0288] 대안적으로, 제2 폴리펩티드는 서열번호: 12에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열 또는 이의 일부를 포함하지 않는다.

[0289] 발명자들은 또한 발명의 키메라 또는 융합 단백질이 DUF2436 도메인(즉, N-말단으로 절삭된 DUF2436 도메인)의 일부만을 포함하는 경우 발명의 키메라 또는 융합 단백질의 가용성이 감소된다는 것을 발견하였다.

[0290] 본 명세서의 실시예를 참조하여, 발명자들은 *P. 긴기발리스* 백신 디자인에 대한 선행 기술 접근법이 DUF2436 도메인의 N-말단으로 절삭된 형태를 포함하였다는 것을 인식하였다. 절삭된 DUF2436 도메인은 Kgp 다중단백질이 세포 표면 상에서 단백질용리적으로 처리되고 조립되는 방식을 나타내지만, 발명자들은 DUF2436 도메인의 전체 길이의 서열(즉 DUF2436 도메인의 N-말단 부분 포함)을 제공하는 것이 가용성 재조합 단백질의 생산을 실질적으로 개선시켰다는 것을 발견하였다.

[0291] 이와 같이, 바람직한 구체예에서, 발명의 키메라 또는 융합 단백질에서의 제2 폴리펩티드는 DUF2436 도메인의 잔기 1 내지 37을 포함하고, 바람직하게는 여기서 키메라 단백질은 실질적으로 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 전체 길이에 실질적으로 상응하는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다.

[0292] 본 명세서에 사용된 바와 같이, DUF2436 도메인의 전체 길이에 실질적으로 상응하는 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열은 Arg- 또는 Lys-긴기페인의 DUF2436 도메인의 길이의 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 서열을 지칭한다.

[0293] 바람직하게는 DUF2436 도메인은 서열번호: 23에 제시된 서열, 또는 이와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0294] *감소된 다량체화*

[0295] 발명자들은 또한 긴그페인에서의 다양한 도메인이 다량체화 경향을 가지며, 이는 다량체화 또는 응집될 때 키메라 또는 융합 단백질의 감소된 가용성 및 감소된 면역원성에 기여한다는 것을 확립하였다. 따라서, 다량체의 형성은 기니기페인 서열로부터 유래된 키메라 단백질의 대규모 생산의 용이성과 백신으로의 사용에 대한 영향을 가지지만, 보호적 반응의 생성에도 영향을 미칠 수 있다.

[0296] 특히, 발명자들은 다량체 형성을 위한 2가지 메커니즘인: 시스테인 잔기 사이의 이황화물 가교의 형성 및 ABM 도메인 사이의 베타-가닥 교환을 식별하였다. 도 1b에서 Kgp의 다양한 도메인을 묘사하는 개략도를 교차-참조하여, 발명자들은 ABM1이 생체내에서 Kgp 다중단백질의 접힘 동안 그의 다음 이용가능한 이웃인 ABM2와 상호작용할 수 있다는 가설을 세웠다. 별도로, 발명자들은 별도의 단백질로서 재조합 ABM1 및 ABM2의 공동-발현이 안정한 베타 시트 복합화된 구조를 형성할 수 있음을 보여준다.

[0297] 따라서, 본 발명에 따라 사용하기 위해 제안된 키메라 단백질의 다량체화를 감소시키기 위해, 발명자들은 베타 시트 형성의 원인이 될 수 있는 ABM 2 및 1 내의 특이적 모티프에 부가하여 DUF 및 ABM 도메인의 시스테인 잔기

를 표적화하였다.

[0298] 발명자들은 다음 변형 중 하나 이상이 Kgp 및 Rgp 다중단백질로부터 유래된 키메라 융합 단백질의 다량체화를 감소시키는 데 기여한다는 것을 식별하였다:

[0299] c) 상응하는 영역에서 자연적으로 발생하는 Arg- 또는 Lys-긴기페인 서열과 비교하여 DUF 2436 도메인 및 ABM의 아미노산 서열에 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환을 포함하고; 및/또는

[0300] d) 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 모티프 치환을 포함한다:

[0301] i) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환;

[0302] ii) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 2 내지 5에 상응하거나, 이와 등가인 위치에서 서열에서의 모티프 NxFA의 SxYQ로의 치환;

[0303] iii) 서열번호: 15 또는 20(ABM2)의 위치 5에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 제2 티로신 잔기와, 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 위치 23에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서의 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환.

[0304] 따라서, 발명의 특히 바람직한 구체예에서, 제2 폴리펩티드는 자연적으로 발생하는 어드헤신 도메인 서열과 비교하여 하나 이상의 시스테인 아미노산 치환을 포함한다.

[0305] 시스테인 잔기는 (적어도) *P. 긴기발리스* Kgp 서열에서의 DUF2436 도메인, ABM 2 및 K1 CAD 서열에서 발견된다. 이와 같이, 본 발명은 이황화물 가교의 형성을 감소, 최소화 또는 폐지하기 위해 1개 이상, 2개 이상 또는 3개 이상의 시스테인 잔기가 치환된 키메라 또는 융합 단백질을 고려한다는 것이 인식될 것이다.

[0306] 시스테인 아미노산 치환은 세린 잔기 또는 발린 잔기로 치환일 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 시스테인 치환은 세린 잔기로의 하나 이상의 치환을 포함한다.

[0307] 특히 바람직한 구체예에서, DUF2436 도메인에서의 시스테인 잔기는 치환되지 않는 반면, DUF2436 도메인의 C-말단과 K1 CAD 도메인에 대한 N-말단 사이의 어드헤신 도메인 영역의 하나 이상의 시스테인 잔기는 치환될 수 있다. DUF 도메인과 CAD 도메인 사이 영역의 예시적인 서열은 서열번호: 18에 제시되어 있다. 발명의 바람직한 구체예에서, 위치 36 및 50, 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기 중 하나 또는 둘 모두가 임의적으로 세린 또는 발린 잔기, 바람직하게는 세린 잔기로 치환된다. DUF2436 도메인 플러스 ABM2+1+3 영역의 예시적인 서열은 서열번호: 34에 제시되어 있다. 발명의 바람직한 구체예에서, 위치 208 및 222, 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기 중 하나 또는 둘 모두는 임의적으로 세린 또는 발린 잔기로, 바람직하게는 세린 잔기로 치환된다.

[0308] 대안적인 구체예에서, DUF2436 도메인에서의 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기, 바람직하게는 세린 잔기로 치환되고, DUF2436 도메인의 C-말단과 K1 CAD 도메인에 대해 N-말단 사이의 어드헤신 도메인의 영역에서의 시스테인 잔기 하나 또는 둘 모두가 치환될 수 있다. DUF 도메인과 CAD 도메인 사이 영역의 예시적인 서열은 서열번호: 18에 제시되어 있다. 발명의 바람직한 구체예에서, 위치 36 및 50, 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기 중 하나 또는 둘 모두는 임의적으로 세린 또는 발린 잔기로, 바람직하게는 세린 잔기로 치환된다. DUF2436 도메인 플러스 ABM2+1+3 영역의 예시적인 서열은 서열번호: 34에 제시되어 있다. 발명의 바람직한 구체예에서, 위치 115에서 시스테인 잔기, 및 위치 208 및 222 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기 중 하나 또는 둘 모두는 임의적으로 세린 또는 발린 잔기, 바람직하게는 세린 잔기로 치환된다.

[0309] 따라서, 특히 바람직한 구체예에서, 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 서열번호: 35 내지 49 중 임의의 하나에 제시된 서열에 상응하는 아미노산 서열, 또는 (그러나 그 안의 시스테인 치환에 대해) 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다.

[0310] 발명자들은 ABM 도메인 2, 1 및 3에 존재하는 보존된 모티프의 돌연변이에 의해 다량체화도 감소된다는 것을 추가로 확립하였다.

[0311] 한 예에서, 발명자들은 어드헤신 도메인의 ABM1의 N 말단에서 도메인의 변형을 고려하였다. 보다 구체적으로, 모티프 PxxN의 치환(예를 들어 서열번호: 14에 제시된 *P. 긴기발리스* Kgp의 ABM1에서의 PVQN)은 감소된 다량체화 및 ABM 도메인 간의 베타-가닥 교환에서의 감소에 실질적으로 기여하는 것으로 밝혀졌다.

[0312] 바람직한 구체예에서, 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 따라서 *P. 긴기발리스* 긴기페인의 어드헤신 도메인에

상응하는 키메라 또는 융합 단백질의 영역에서 ABM1 PxxN 모티프의 변형을 포함한다. 따라서, 제2 폴리펩티드는 바람직하게는 ABM1을 정의하는 서열번호: 14 또는 19의 서열의 위치 6 내지 9에 등가인 위치 또는 상응하는 서열 PxxN에서 프롤린 치환 및 아스파라긴 치환을 포함한다.

[0313] 프롤린 아미노산 치환은 바람직하게는 알라닌 잔기로의 치환이다.

[0314] 아스파라긴 아미노산 치환은 프롤린 잔기 또는 알라닌 잔기로의 치환일 수 있다. 바람직하게는 아스파라긴 잔기는 프롤린 잔기로 치환된다. 다른 구체예에서, 아스파라긴 잔기는 치환되지 않는다.

[0315] 추가 예에서, 발명자들은 Kgp/Rgp 다중단백질에서의 ABM1에서 서열에서 모티프 NEFA를 고려하였다. 이 서열은 본원에서 서열번호: 14 및 19의 잔기 2 내지 5에서 정의된다. 실시예에서 추가로 입증된 바와 같이, 아스파라긴, 페닐알라닌 및 알라닌 잔기의 각각 세린, 글루타민 및 티로신으로의 치환을 통한 모티프 NEFA의 SEQY로의 변형은 다량체화를 유의하게 감소시킨다.

[0316] 또 다른 예에서, 발명자들은 서열번호: 15 또는 20의 위치 5에서 잔기에 상응하거나 이에 등가인 위치에서 ABM2의 티로신 잔기와, 서열번호: 14 또는 19의 위치 23에 상응하거나 이에 등가인 위치에서 ABM1의 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환도 다량체화를 유의하게 감소시켰다는 것을 결정하였다.

[0317] 마지막으로, 발명자들은 시스테인 변형 및 하나 이상의 치환의 조합을 통해 다량체화가 실질적으로 제거되었다는 것을 발견하였다:

[0318] i) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 6 내지 9에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열 PxxN에서의 프롤린 및/또는 아스파라긴 잔기의 치환;

[0319] ii) 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 서열의 잔기 2 내지 5에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 서열에서의 모티프 NxFA의 SxYQ로의 치환;

[0320] iii) 서열번호: 15 또는 20(ABM2)의 위치 5에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서 제2 티로신 잔기와, 서열번호: 14 또는 19(ABM1)의 위치 23에서의 잔기에 상응하거나 이와 등가인 위치에서의 트립토판 잔기의 알라닌 잔기로의 치환.

[0321] 특히 바람직한 구체예에서, 발명자들은 하나 이상의 시스테인 변형, 바람직하게는 세린으로의 적어도 2개의 시스테인 치환, 및 AXXP로 ABM1의 PXXN 모티프의 변형의 조합이 생성된 재조합 키메라 단백질의 다량체화를 제거하였다는 것을 발견하였다.

[0322] ABM1 도메인의 시스테인 변형 및 PXXN 모티프의 변형을 종합하면, 본 발명은 따라서 본원에 기술된 바와 같은 키메라 또는 융합 단백질을 제공하며, 여기서 *P. 긴기발리스* Arg 또는 Lys 긴기페인의 어드헤신 도메인의 영역에 상응하는 키메라 단백질의 제2 폴리펩티드는 서열번호: 34에 제시된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 여기서 1개, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고/되거나 여기서 위치 235 내지 238, 또는 이와 등가인 위치에서 서열 PXXN에서의 프롤린 및 아스파라긴 잔기는 치환된다.

[0323] 바람직하게는 서열번호: 34의 잔기 115 또는 이에 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는다.

[0324] 바람직하게는, 서열번호: 34의 위치 115 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 또는 발린 잔기로 치환되지 않는 반면, 서열번호: 34의 위치 208 및 222에서 또는 이와 등가인 위치에서 시스테인 잔기는 세린 잔기로 치환되고, 여기서 위치 235 또는 이와 등가인 위치에서 프롤린 잔기는 알라닌 잔기로 치환되고, 위치 238 또는 이와 등가인 위치에서 아스파라긴 잔기는 프롤린으로 치환된다.

[0325] 제1 및 제2 폴리펩티드의 연결

[0326] 본 발명의 키메라 또는 융합 단백질에서, 제1 폴리펩티드의 C-말단 잔기는 (어드헤신 도메인 폴리펩티드에 상응하는) 제2 폴리펩티드의 N-말단 잔기에 공유적으로 연결될 수 있거나 또는 제1 펩티드의 N-말단 잔기는 (어드헤신 도메인 폴리펩티드에 상응하는) 제2 폴리펩티드의 C-말단 잔기에 공유적으로 연결될 수 있다. 이 배열에서, 제1 펩티드와 어드헤신 도메인 폴리펩티드는 "직접적으로 연결"되거나 "인접"된다고 언급된다.

[0327] 다른 구체예에서, 키메라 또는 융합 단백질은 제1 펩티드를 어드헤신 도메인 폴리펩티드에 연결하기 위한 링커를 포함한다. 링커는 아미노산 및 비-아미노산 링커 둘 모두를 포함하여, 펩티드를 폴리펩티드에 조인할 수 있

는 임의의 링커일 수 있다.

[0328] 바람직하게, 링커는 비-면역원성이다. 전형적으로, 링커는 아미노산으로 구성되고, 따라서 펩티드 링커로 명명될 수 있다.

[0329] 링커는 일반적으로 최대 20개의 아미노산 길이를 갖는 펩티드이지만 더 길 수도 있다. 용어 "연결된" 또는 "융합된"은 두 모이어티 사이에 형성된 공유 결합, 예를 들어 펩티드 결합을 지칭한다. 따라서, 본 발명의 맥락에서 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개 이상의 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 키메라 또는 융합 단백질은 *P. 긴기발리스* 긴기페인 활성 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 폴리펩티드와 *P. 긴기발리스* 긴기페인의 어드헤신 도메인에 상응하는 제2 폴리펩티드 사이, 예컨대 제2 폴리펩티드의 N-말단과 제1 폴리펩티드의 C-말단 사이에 링커를 포함할 수 있다. 이러한 링커는 융합 단백질의 다양한 폴리펩티드가 독립적으로 접히고 예상대로 거동할 가능성을 더 높일 수 있다는 이점이 있다. 적합한 링커는 길이가 최대 50개 아미노산일 수 있지만, 20개 미만, 15개 미만 또는 5개 미만의 아미노산이 바람직하다. 링커는 제1 펩티드 및 어드헤신 도메인 폴리펩티드를 *P. 긴기발리스* 트립신-유사 효소에서 일반적으로 관찰되는 것보다 더 가까운 공간적 배열로 하는 기능을 할 수 있다. 대안적으로, 이는 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드(어드헤신 도메인 폴리펩티드에 상응함)를 이격시킬 수 있다.

[0330] 가용성에 최소한의 영향을 미치는 것을 포함하여 단백질 작제물에 사용하기에 적합한 링커는 당업계에 공지되어 있다. 링커는 당업자에게 공지된 임의의 링커일 수 있고 유연한 링커(예컨대 글리신 및 세린 잔기의 반복을 포함하는 링커), 단단한 링커(예컨대 알라닌 반복에 측접하는, 글루탐산 및 리신 잔기를 포함하는 링커) 및/또는 절단가능한 링커(예컨대 프로테아제 절단에 민감한 서열)일 수 있다. 이러한 링커의 예는 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어 Chen et al., (2013) Advanced Drug Delivery Reviews, 65: 1357-1369에 기재되어 있다.

[0331] 유용한 링커에는 글리신-세린(GlySer) 링커가 포함되며, 이는 당업계에 잘 알려져 있고 다양한 순서로 조합된 글리신 및 세린 단위를 포함한다. 예는 (GS), (GSGGS)n, (GGGS)n 및 (GGGGS)n을 포함하지만 이에 제한되지는 않으며, 여기서 n은 적어도 1의 정수, 전형적으로 1 내지 약 10 사이, 예를 들어 1 내지 약 8, 1 내지 약 6, 또는 1 내지 약 5 사이의 정수이다.

[0332] 일부 구체예에서, 펩티드 링커는 아미노산 글리신 및 세린을 다양한 길이 및 조합으로 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 펩티드 링커는 서열 Gly-Gly-Ser(GGS), Gly-Gly-Gly-Ser(GGGS) 또는 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(GGGGS) 및 이의 변이 또는 반복을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS(6개 아미노산 길이의 링커) 또는 그보다 더 긴 것을 포함할 수 있다. 링커는 길이가 다른 일련의 반복되는 글리신 및 세린 잔기(GS), 즉 (GS)n일 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 15 이상의 임의의 수이다. 예를 들어, 링커는 (GS)3(즉, GSGSGS) 또는 더 긴 (GS)11 또는 더 길 수 있다. n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 이상을 포함하는 임의의 수일 수 있다는 것이 인식될 것이다. 이러한 길이의 링커를 갖는 융합 단백질은 본 발명의 범주 내에 포함된다. 유사하게, 링커는 세린 잔기에 의해 분리된 일련의 반복되는 글리신 잔기일 수 있다. 예를 들어, (GGGGS)3(즉, 링커는 아미노산 서열 GGGGSGGGGSGGGGS(G4S)3을 포함할 수 있음.) 및 이의 변이형.

[0333] 한 구체예에서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS(6개 아미노산 길이의 링커) 또는 그보다 더 긴 것을 포함할 수 있다. 링커는 상이한 길이의 일련의 반복되는 글리신 및 세린 잔기(GS), 즉 (GS)n일 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 15 이상의 임의의 수이다. 예를 들어, 링커는 (GS)3(즉, GSGSGS) 또는 더 긴 (GS)11 또는 더 길 수 있다. n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 이상을 포함하는 임의의 수일 수 있다는 것이 인식될 것이다.

[0334] 다른 유용한 링커에는 DSSG, DSSGAS, KLDSSG 및 이의 변이형이 포함된다. 다른 적합한 링커의 예는 Chen et al., (2013) Advanced Drug Delivery Reviews, 65: 1357-1369에 기재되어 있다.

[0335] 키메라 또는 융합 단백질 및 재조합 단백질

[0336] 전형적으로 폴리펩티드는 재조합 기술을 사용하여 제작되지만, 발명의 키메라 또는 융합단백질은 임의의 다수의 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0337] 재조합 폴리펩티드의 경우, 원하는 펩티드를 인코딩하는 DNA 단편은 잘 알려진 분자 유전 기술을 사용하여 적절한 벡터 안에 서브클로닝될 수 있다(예를 들어, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982); Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) 참조. 단편은 전사될 수 있고 폴리펩티드는 후속적으로 시험관내에서 번역될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 키트도 이용될 수 있다(예를 들어, 예컨대 Clontech, Palo

Alto, Calif.; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, N.J.; InVitrogen, Carlsbad, Calif., 등에 의해 제작됨). 중합효소 연쇄 반응은 임의적으로 핵산의 조작에 이용될 수 있다.

[0338] "단편"은 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 기능적 활성 또는 실질적으로 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 유지하는 본 발명의 폴리펩티드의 일부이며, 이는 본원에 기술된 검정을 사용하여 결정될 수 있다.

[0339] 폴리펩티드 서열, 즉 본원에 정의된 발명의 폴리펩티드에 관한 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성" 또는 "퍼센트(%) 동일한"은 서열을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하고, 서열 동일성의 일부로 임의의 보존적 치환을 고려하지 않은 후 발명의 특정한 폴리펩티드에서의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 인용된 서열에 대해 "적어도 x% 서열 동일성"을 갖는 변이체에 대한 본원에서의 언급은 변이체가 인용된 서열과 적어도 x% 동일하다는 것을 의미한다.

[0340] 발명의 다양한 양태 및 구체예에서, 정의된 폴리펩티드는 참조 서열과 적어도 80% 상동성 이상을 갖는 변이체를 참조하여 기술된다. 백분율(%) 상동성은 일반적으로 서열을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하고, 서열 동일성의 일부로 임의의 보존적 치환을 고려하지 않은 후 발명의 특정한 폴리펩티드에서의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로 정의되는 본원에 정의된 발명의 폴리펩티드를 지칭한다.

[0341] 아미노산인 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신은 종종 서로 (지방족 측쇄를 갖는 아미노산) 치환될 수 있다. 이들 가능한 치환 중에서 글리신과 알라닌이 서로 (그들은 상대적으로 짧은 측쇄를 갖기 때문에) 치환하는 데 사용되는 것 및 발린, 류신 및 이소류신이 서로 (그들은 소수성인 더 큰 지방족 측쇄를 갖기 때문에) 치환하는 데 사용되는 것이 바람직하다. 종종 서로 치환될 수 있는 기타 아미노산은: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판(방향족 측쇄를 갖는 아미노산); 리신, 아르기닌 및 히스티딘(염기성 측쇄를 갖는 아미노산); 아스파르테이트 및 글루타메이트(산성 측쇄를 갖는 아미노산); 아스파라긴 및 글루타민(아미드 측쇄를 갖는 아미노산); 및 시스테인 및 메티오닌(황 함유 측쇄를 갖는 아미노산)을 포함한다.

[0342] 이 성질의 치환은 종종 "보존적" 또는 "반-보존적" 아미노산 치환으로 지칭된다.

[0343] 아미노산 결실 또는 삽입은 또한 *P. 긴기발리스* 단백질의 천연 서열과 관련하여 이루어질 수 있다. 따라서, 예를 들어 폴리펩티드의 활성에 실질적인 영향을 미치지 않거나 적어도 그러한 활성을 제거하지 않는 아미노산이 결실될 수 있다. 이러한 결실은 활성을 여전히 유지하면서 폴리펩티드의 전반적인 길이와 분자량이 감소될 수 있기 때문에 특히 더 긴 폴리펩티드에서 유리할 수 있다. 이는 특정 목적에 필요한 폴리펩티드의 양이 감소되도록 할 수 있으며 - 예를 들어, 복용량 수준이 감소될 수 있다.

[0344] 천연 폴리펩티드의 서열에 대한 아미노산 삽입이 또한 이루어질 수 있다. 이는 본 발명에 사용하기 위한 폴리펩티드의 특성을 변경하기 위해(예를 들어 항원성을 강화하기 위해) 수행될 수 있다.

[0345] 아미노산 변화는 임의의 적합한 기술을 사용하여 예를 들어 부위-지향된 돌연변이유발 또는 고체-상태 합성을 사용함에 의해 이루어질 수 있다.

[0346] 본 발명의 범주 내의 아미노산 치환 또는 삽입은 자연적으로 발생하는 또는 비-자연적으로 발생하는 아미노산을 사용하여 이루어질 수 있음이 인식되어야 한다. 천연 또는 합성 아미노산이 사용되는지 여부에 관계없이 L-아미노산만 존재하는 것이 바람직하다.

[0347] 당업자는 비교되는 서열의 전체-길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘(하기 기술되는 비-제한적 예)을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 아미노산 서열이 정렬될 때, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, B와, 또는 B에 대비한 주어진 아미노산 서열 A의 퍼센트 아미노산 서열 동일성(이는 대안적으로 주어진 아미노산 서열 B에 대한, B와, 또는 B에 대비한 특정한 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)은: 퍼센트 아미노산 서열 동일성 = X/Y100으로 계산될 수 있으며, 여기서 X는 A와 B의 서열 정렬 프로그램 또는 알고리즘의 정렬에 의해 동일한 일치로 점수가 매겨진 아미노산 잔기의 수이고 Y는 B에서의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않은 경우, B에 대한 A의 퍼센트 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 퍼센트 아미노산 서열 동일성과 같지 않을 것이다.

[0348] 퍼센트 동일성을 계산함에 있어 전형적으로 정확히 일치하는 항목이 계산된다. 두 서열 사이의 퍼센트 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 성취될 수 있다. 두 서열의 비교에 활용되는 수학적 알고리즘의 비-제한적 예는 Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877에서와 같이 변형된 Karlin and

Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 Altschul et al. (1990) J. MoI. Biol. 215:403의 BLASTN 및 BLASTX 프로그램에 통합되어 있다. 비교 목적을 위한 갭이 있는 정렬을 얻기 위해, 갭이 있는 BLAST(BLAST 2.0 내)가 Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389에 기술된 바와 같이 활용될 수 있다. 대안적으로, PSI-Blast가 분자 간의 원격의 관계를 검출하는 반복된 검색을 수행하기 위해 사용될 수 있다. Altschul et al. (1997) 상기 참조. BLAST를 활용할 때, 갭이 있는 BLAST 및 PSI-Blast 프로그램을 활용하는 경우, 각각의 프로그램의 기본 매개변수(예를 들어, BLASTX 및 BLASTN)가 사용될 수 있다. 정렬은 검사에 의해 수동으로 수행될 수도 있다. 서열의 비교를 위해 활용되는 수학적 알고리즘의 또 다른 비-제한적 예는 ClustalW 알고리즘이다(Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). ClustalW는 서열을 비교하여 완전한 아미노산 또는 DNA 서열을 정렬하고, 따라서 전체 아미노산 서열의 서열 보존에 대한 데이터를 제공할 수 있다. ClustalW 알고리즘은 Vector NTI Program Suite(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)의 ALIGNX 모듈과 같은 여러 상업적으로 이용가능한 DNA/아미노산 분석 소프트웨어 패키지에서 사용된다. ClustalW로 아미노산 서열의 정렬 후, 퍼센트 아미노산 동일성이 평가될 수 있다. ClustalW 정렬의 분석에 유용한 소프트웨어 프로그램의 비-제한적인 예는 GENEDOC™ 또는 JalView(http://www.jalview.org/)이다. GENEDOC™은 다중 단백질 간의 아미노산(또는 DNA) 유사성과 동일성의 평가를 허용한다. 서열의 비교에 활용되는 수학적 알고리즘의 또 다른 비-제한적 예는 Myers and Miller(1988) CABIOS 4:11-17의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 GCG Wisconsin Genetics Software Package, 버전 10(Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USA에서 이용가능)의 일부인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합되어 있다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 활용하는 경우, PAM 120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티, 및 4의 갭 페널티가 사용될 수 있다.

[0349] 폴리펩티드는 바람직하게는 아미노 말단 및 카르복실 말단을 포함한다. 폴리펩티드는 D-아미노산, L-아미노산 또는 D- 및 L-아미노산의 혼합물을 포함할 수 있다. 그러나, D-아미노산으로 구성된 폴리펩티드가 생체내에서 그 생물학적 활성을 더 많이 유지할 것으로 예상되기 때문에 D-형태의 아미노산이 특히 바람직하다.

[0350] 본원에 사용된 용어 "보존적 치환"은 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 아미노산 또는 유사한 입체 특성을 갖는 펩티드 모방체로, 펩티드에서 천연 서열에 존재하는 아미노산의 대체를 지칭한다. 대체될 천연 아미노산의 측쇄가 극성 또는 소수성인 경우, 보존적 치환은 자연적으로 발생하는 아미노산, 비-자연적으로 발생하는 아미노산으로 또는 또한 극성 또는 소수성(부가하여 대체된 아미노산의 측쇄와 동일한 입체 특성을 갖는 것)인 펩티드 모방 모이어티로 되어야 한다.

[0351] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 아미노산 치환 표는 당업자에게 잘 알려져 있다. 다음 6개 그룹은 서로 보존적 치환으로 간주될 수 있는 아미노산의 예이다:

[0352] 1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T);

[0353] 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);

[0354] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0355] 4) 아르기닌(R), 리신(K);

[0356] 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 및

[0357] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W).

[0358] 자연적으로 발생하는 아미노산은 전형적으로 그 특성에 따라 그룹화되므로, 하전된 아미노산의 입체적으로 유사한 비-하전된 아미노산으로의 대체는 보존적 치환으로 간주된다는 사실을 염두에 두고 자연적으로 발생하는 아미노산에 의한 보존적 치환이 결정된 수 있다. 비-자연적으로 발생하는 아미노산에 의한 보존적 치환을 생성하기 위해, 당업계에 잘 알려진 아미노산 유사체(합성 아미노산)를 사용하는 것도 가능하다. 자연적으로 발생하는 아미노산의 펩티드모방체는 당업자에게 공지된 문헌에 잘 기록되어 있으며, 비-자연 또는 자연적이 아닌 아미노산은 아래에 추가로 기술되어 있다. 보존적 치환에 영향을 미칠 때 치환 아미노산은 원래 아미노산과 측쇄에서 동일하거나 유사한 작용기를 가져야 한다.

[0359] 본원에 사용된 어구 "비-보존적 치환" 또는 "비-보존적 잔기"는 모 서열에 존재하는 아미노산의 다른 전기화학적 및/또는 입체적 속성을 갖는 또 다른 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 아미노산에 의한 대체를 지칭한다. 따라서, 치환 아미노산의 측쇄는 치환되는 천연 아미노산의 측쇄보다 유의하게 더 클(또는 더 작을) 수 있고/있거나 치환되는 아미노산과 유의하게 다른 전자 속성을 갖는 작용기를 가질 수 있다. 이 유형의 비-보존

적 치환의 예는 알라닌에 대한 페닐알라닌 또는 시클로헥실메틸 글리신, 글리신에 대한 이소류신, 또는 아스파르트산에 대한 -NH-CH[(-CH2)5-COOH]-CO-의 치환을 포함한다. 비-보존적 치환은 보존적이라고 간주되지 않는 임의의 돌연변이를 포함한다.

[0360] 비-보존적 아미노산 치환은 (a) 치환의 영역에서 아미노산 백본의 구조; (b) 아미노산의 전하 또는 소수성; 또는 (c) 대부분의 아미노산 측쇄에서의 변화를 초래할 수 있다. 일반적으로 단백질 속성에 가장 큰 변화를 일으킬 것으로 예상되는 치환은 (a) 친수성 잔기가 소수성 잔기에 대해 (또는 이에 의해) 치환되거나; (b) 프롤린이 다른 잔기에 대해 (또는 이에 의해) 치환되거나, (c) 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 페닐알라닌이 측쇄를 갖지 않는 잔기, 예를 들어 글리신에 대해 (또는 이에 의해) 치환되거나; 또는 (d) 전기양성 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 리실, 아르기닐 또는 히스타딜이 전기음성 잔기, 예를 들어 글루타밀 또는 아스파르틸에 대해 (또는 이에 의해) 치환되는 것들이다.

[0361] 삽입, 결실 및/또는 치환과 같은 돌연변이체 폴리펩티드를 생성하기 위한 천연 아미노산 서열의 변경은 당업자에게 공지된 다양한 수단에 의해 수행될 수 있다. 예로서, 부위-특이적 돌연변이는 변형된 부위를 포함하는 합성된 올리고뉴클레오티드를 발현 벡터 안으로 결찰함에 의해 도입될 수 있다. 대안적으로, Walder et al., Gene 42: 133 (1986); Bauer et al., Gene 37: 73 (1985); Craik, Biotechniques, 12-19 (January 1995); 및 미국 특허 번호 4,518,584 및 4,737,462에 개시된 바와 같은 올리고뉴클레오티드-지향된 부위-특이적 돌연변이유발 절차가 사용될 수 있다. 돌연변이를 도입하기 위한 바람직한 수단은 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene, LaJolla, CA)이다.

[0362] 임의의 적절한 발현 벡터(예를 들어, Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual(Elsevier, N.Y.: 1985)에 기술된 바와 같음) 및 상응하는 적절한 숙주가 재조합 폴리펩티드의 생산에 이용될 수 있다. 발현 숙주에는 *에스케리키아, 바실러스, 슈도모나스, 살모넬라* 속 내의 박테리아 종, 바쿨로바이러스 시스템을 포함하는 포유동물 또는 곤충 숙주 세포 시스템(예를 들어, Luckow et al., Bio/Technology 6:47(1988)에 기술된 바와 같음) 및 COS-7, C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주 등과 같은 확립된 세포주가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 당업자는 발현 숙주의 선택이 생산된 폴리펩티드의 유형에 영향을 미친다는 것을 알고 있다. 예로서, 효모 또는 포유동물 세포(예를 들어, COS-7 세포)에서 생산된 폴리펩티드의 글리코실화는 *대장균*과 같은 박테리아 세포에서 생산된 폴리펩티드의 것과 다를 것이다.

[0363] 대안적으로, 발명의 폴리펩티드는 당업자에게 잘 알려진 표준 펩티드 합성 기술을 사용하여 합성될 수 있다(예를 들어, Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Heidelberg: 1984)에 요약된 바와 같음). 특히, 폴리펩티드는 고체-상 합성의 절차를 사용하여 합성될 수 있다(예를 들어, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-54 (1963); Barany et al., Int. J. Peptide Protein Res. 30: 705-739 (1987); 및 미국 특허 번호 5,424,398 참조). 원하는 경우 이는 자동화된 펩티드 합성기를 사용하여 수행될 수 있다. t-부틸옥시카르보닐(t-BOC) 또는 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc) 아미노산 차단기의 제거 및 수지로부터 폴리펩티드의 분리는 예를 들어 감소된 온도에서의 산 처리에 의해 달성될 수 있다. 폴리펩티드-함유 혼합물은 그런 다음 예로서 디메틸 에테르로 추출되어 비-펩티드 유기 화합물이 제거될 수 있고, 합성된 폴리펩티드는 수지 분말로부터 (예를 들어, 약 25% w/v 아세트산으로) 추출될 수 있다. 폴리펩티드의 합성에 이어서, 임의의 불완전한 폴리펩티드 또는 유리 아미노산을 제거하기 위해 추가 정제(예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여)가 임의적으로 수행될 수 있다. 합성된 폴리펩티드에 대해 그 정체성을 검증하기 위해 아미노산 및/또는 HPLC 분석이 수행될 수 있다. 발명에 따른 다른 적용의 경우, 본원에 기술된 방법이나 기타 유전적 수단에 의해 더 큰 융합 단백질의 일부로, 또는 당업자에게 공지되어 있고 본원에 기술된 바와 같은 물리적 또는 화학적 접합을 통해 더 큰 접합체의 일부로 폴리펩티드를 생산하는 것이 바람직할 수 있다.

[0364] 발명의 임의의 구체예에서, 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 재조합 발현 시스템에서의 발현을 용이하게 하고/하거나 단백질의 정제를 용이하게 하기 위해 추가적인 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에 정의된 단백질은 N-말단 영역에 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산과 같은 추가 아미노산을 포함할 수 있다. 전형적으로 추가 아미노산은 재조합 발현 시스템에서 발현을 촉진하기 위한 N-말단 메티오닌을 포함할 것이지만 전형적으로 이러한 N-말단 잔기는 단백질 번역에 이어서 절단된다는 것이 인식될 것이다. 특정 구체예에서, N-말단 아미노산은 적어도 메티오닌 및 알라닌 잔기를 포함한다.

[0365] 더욱이, 발명에 따른 키메라 또는 융합 단백질은 바람직하게는 정제를 용이하게 하기 위해 N 또는 C-말단 영역에 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산과 같은 추가 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 아미노산 잔기는 단백질에서 정제 태그(예컨대 히스티딘 태그 등)의 함입을 촉진할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 태깅되지 않은 버전의

단백질이 생산되는 경우 이러한 잔기는 포함되지 않을 수 있다.

[0366] 발명의 폴리펩티드는 또한 정제를 촉진하거나, 폴리펩티드의 생체내 반감기를 증가시키기 위해 또는 당업계에 공지된 방법을 사용하는 면역검정에 사용하기 위해 다른 모이어티에 의해 변형되거나, 이에 접합되거나 융합될 수 있다. 예를 들어, 발명의 폴리펩티드는 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단 그룹에 의한 유도체화, 단백질용리적 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 연결 등에 의해 변형될 수 있다.

[0367] 핵산

[0368] 발명의 임의의 키메라 또는 융합 단백질 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자가 또한 발명의 범주 내에 속한다. 핵산은 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드를 제조함에 있어 그리고 치료제로서 유용하다. 이는 배양물에서 또는 생체내에서 세포에 투여될 수 있고, 세포로부터 발명의 폴리펩티드의 분비를 지시하거나 촉진하는 분비 신호를 포함할 수 있다. 또한 발명의 범주 내에는 발명의 핵산(아래에 추가로 기술됨)을 함유하거나 포함하는 발현 벡터 및 숙주 세포가 있다. 발명의 핵산은 정의상 "단리된" 것으로 지칭될 수 있지만, 발명의 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드가 아니므로 자연적으로 발생하는 핵산에 의해 인코딩되지 않는다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 및 핵산은 "정제된", "실질적으로 정제된", "단리된", "재조합" 또는 "합성"일 수 있지만 이는 자연적으로 발생하는 물질과 구별되기 위해 반드시 그렇게 될 필요는 없다.

[0369] "단리된" 핵산 분자는 핵산의 자연 공급원에서 통상적으로 회합되어 있는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 식별되고 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태나 환경과 다르다. 따라서 단리된 핵산 분자는 자연 세포에 존재하는 것과 같은 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자에는 일반적으로 Kgp를 발현하는 세포에 함유된 핵산 분자가 포함되며 여기서, 예를 들어, 핵산 분자는 자연 세포의 것과 다른 염색체 위치에 있다.

[0370] 용어 "핵산 분자" 및 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 이의 유사체 중 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드의 비-제한적인 예에는 유전자, 유전자 단편, 메신저 RNA(mRNA), cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머가 포함된다. 발명의 폴리뉴클레오티드는 단리된 형태 또는 정제된 형태로 제공될 수 있다. 선택된 폴리펩티드를 "인코딩하는" 핵산 서열은 적절한 조절 서열의 제어 하에 위치될 때 생체내에서 폴리펩티드 안으로 전사되고(DNA의 경우) 번역되는(mRNA의 경우) 핵산 분자이다. 코딩 서열의 경계는 5'(아미노) 말단에서 시작 코돈과 3'(카르복시) 말단에서 번역 정지 코돈에 의해 결정된다. 발명의 목적을 위해, 이러한 핵산 서열에는 바이러스, 원핵 또는 진핵 mRNA로부터 cDNA, 바이러스 또는 원핵 DNA 또는 RNA로부터 게놈 서열, 심지어 합성 DNA 서열이 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 전사 종결 서열은 코딩 서열에 대해 3'에 위치될 수 있다.

[0371] 발명의 폴리뉴클레오티드는 Sambrook et al(1989, Molecular Cloning - a Laboratory manual; Cold Spring Harbor Press)에 예로서 기술된 바와 같이 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 합성될 수 있다.

[0372] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자는 삽입된 서열에 작동가능하게 연결된 제어 서열을 포함하는 발현 카세트의 형태로 제공될 수 있으며, 따라서 표적화된 대상체에서 생체내에서 발명의 폴리펩티드의 발현을 가능하게 한다. 이들 발현 카세트는 차례로 전형적으로 핵산 면역화를 위한 시약으로 사용하기에 적합한 벡터(예를 들어, 플라스미드 또는 재조합 바이러스 벡터) 내에 제공된다. 이러한 발현 카세트는 숙주 대상체에게 직접적으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 숙주 대상체에게 투여될 수 있다. 바람직하게는 폴리뉴클레오티드는 유전적 벡터를 사용하여 제조 및/또는 투여된다. 적합한 벡터는 충분한 양의 유전 정보를 담지할 수 있고 발명의 폴리펩티드의 발현을 허용할 수 있는 임의의 벡터일 수 있다.

[0373] 따라서 본 발명은 이러한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 따라서, 본 발명은 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 임의적으로 본원에 정의된 바와 같은 다양한 폴리펩티드를 인코딩하는 하나 이상의 추가 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 염증성 질환 또는 병태를 예방하거나 치료하는 데 사용하기 위한 벡터를 제공한다.

[0374] 더욱이, 발명의 조성물 및 생성물은 폴리펩티드와 폴리뉴클레오티드의 혼합물을 포함할 수 있음이 인식될 것이다. 따라서, 발명은 폴리펩티드 중 임의의 하나 대신에 상기 폴리펩티드를 발현할 수 있는 폴리뉴클레오티드가 있는, 본원에 정의된 조성물 또는 생성물을 제공한다.

[0375] 발현 벡터는 분자 생물학 분야에서 일상적으로 구축되고, 예를 들어 플라스미드 DNA 및 적절한 개시자, 프로모터, 인핸서 및 기타 요소, 예컨대 예를 들어 필요할 수 있고, 발명의 펩티드의 발현을 허용하기 위해 올바른 배

향으로 위치되는 폴리아데닐화 신호의 사용을 포함할 수 있다. 다른 적합한 벡터는 당업자에게 명백할 것이다. 이와 관련하여 추가의 예로서는 Sambrook et al을 언급한다.

[0376] 따라서, 발명의 폴리펩티드는 이러한 벡터를 세포에 전달하고 벡터로부터의 전사가 일어나도록 허용함에 의해 제공될 수 있다. 바람직하게는, 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터에서 발명에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에 의한 코딩 서열의 발현을 제공할 수 있는 제어 서열에 작동가능하게 연결되며, 즉 벡터는 발현 벡터이다.

[0377] "작동 가능하게 연결된"은 그런 기술된 구성요소가 그의 일반적인 기능을 수행하도록 구성되는 요소의 배열을 지칭한다. 따라서, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터와 같은 주어진 조절 서열은 적절한 효소가 존재할 때 그 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 프로모터는 그 발현을 지시하는 기능을 하는 한 서열과 인접할 필요는 없다. 따라서, 예를 들어, 개재하는 번역되지 않았지만 전사된 서열이 프로모터 서열과 핵산 서열 사이에 존재할 수 있고, 프로모터 서열은 여전히 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 것으로 간주될 수 있다.

[0378] 다수의 발현 시스템이 당업계에 기재되어 있으며, 그 각각은 전형적으로 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 관심 유전자 또는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 벡터로 구성된다. 이들 제어 서열에는 전사 프로모터 서열과 전사 개시 및 종결 서열이 포함된다. 발명의 벡터는 예를 들어 복제의 기점, 임의적으로 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터 및 임의적으로 프로모터의 조절자가 제공된 플라스미드, 바이러스 또는 파지 벡터일 수 있다. "플라스미드"는 염색체외 유전 요소의 형태에서의 벡터이다. 벡터는 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자, 예를 들어 박테리아 플라스미드의 경우 암피실린 저항성 유전자 또는 진균 벡터의 경우 저항성 유전자를 함유할 수 있다. 벡터는 예를 들어 DNA 또는 RNA의 생산을 위해 시험관내에서 사용될 수 있거나, 숙주 세포, 예를 들어 포유동물 숙주 세포를 형질감염 또는 형질전환시키는 데 사용될 수 있다. 벡터는 또한 예를 들어 폴리펩티드의 생체내 발현을 허용하기 위해 생체내에서 사용되도록 개조될 수 있다.

[0379] "프로모터"는 폴리펩티드-인코딩 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시하고 조절하는 뉴클레오티드 서열이다. 프로모터에는 유도성 프로모터(프로모터에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현이 분석물, 보조인자, 조절 단백질 등에 의해 유도되는 경우), 억제성 프로모터(프로모터에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현이 분석물, 보조인자, 조절 단백질 등에 의해 억제되는 경우) 및 구성적 프로모터가 포함될 수 있다. 용어 "프로모터" 또는 "제어 요소"는 전체 길이 프로모터 영역 및 이들 영역의 기능적(예를 들어, 전사 또는 번역 조절) 세그먼트를 포함하는 것으로 의도된다.

[0380] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 발현 카세트 또는 벡터는 신호 펩티드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 신호 펩티드 서열은 일반적으로 신호 펩티드가 발현되고 또한 프로모터와의 작동가능하게 연결된 코딩 서열에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 분비를 촉진하도록 프로모터와 작동가능한 연결에서 삽입된다.

[0381] 전형적으로 신호 펩티드 서열은 10 내지 30개 아미노산, 예를 들어 15 내지 20개 아미노산의 펩티드를 인코딩한다. 종종 아미노산은 주로 소수성이다. 전형적인 상황에서, 신호 펩티드는 발현 세포의 소포체에 대한 신호 펩티드를 보유하는 성장하는 폴리펩티드 사슬을 표적화한다. 신호 펩티드는 소포체에서 절단되어 골지체를 통해 폴리펩티드의 분비를 허용한다.

[0382] 면역원성 및 백신 조성물

[0383] 발명은 추가로 본원에 정의된 키메라 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물, 및 *P. 긴기발리스* 감염의 치료 또는 예방에서 면역원성 또는 백신 조성물에서의 이러한 키메라 또는 융합 단백질의 용도를 제공한다.

[0384] 본원에서 사용되는 용어 "백신 조성물"은 유기체를 질환에 대해 보호하거나 치료하기 위해 조성물 내의 항원(면역원)에 대한 면역 반응을 도출하는데 사용되는 조성물로 정의된다.

[0385] 본원에 사용된 용어 "면역자극 조성물", "백신 조성물" 및 "면역원성 조성물"은 일반적으로 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0386] 발명의 면역자극 조성물 또는 백신은 치료적 또는 예방적 활성 성분으로서 발명의 하나 이상의 펩티드에 부가하여 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제, 보조제, 비히클, 완충제 또는 안정화제를 적절하게 포함할 수 있다. 이러한 담체에는 식염수, 완충 식염수, 덱스트로스, 리포솜, 물, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올 및 이의 조합이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0387] 면역자극 조성물 또는 백신 조성물은 임의의 적절한 경로, 예를 들어 비경구(피하, 근육내, 정맥내 또는 피내 포함 또는 뇌척수액으로의 주사 포함), 경구(협측 또는 설하 포함), 비강, 국소(협측, 설하 또는 경피 포함),

질 또는 직장 경로에 의해 투여에 적합할 수 있다. 이러한 조성물은 약학 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 멸균 조건 하에서 펩티드를 담체(들) 또는 부형제(들)와 혼합함에 의해 제조될 수 있다. 전형적으로, 백신 조성물은 피하, 근육내, 정맥내 또는 피내 경로, 전형적으로 주사에 의한 투여에 적합하다. 대안적으로, 백신 조성물은 경구 또는 비강 투여에 적합할 수 있다.

[0388] 비경구 투여에 적합한 면역자극 조성물 또는 백신 조성물은 항산화제, 완충제, 정균제 및 제형을 의도된 수용체의 혈액과 실질적으로 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용액; 및 현탁화제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액일 수 있다. 주사 용액에 사용될 수 있는 부형제는 예를 들어 물, 알코올, 폴리올, 글리세린 및 식물성 오일을 포함한다. 조성물은 단위-용량 또는 다중-용량 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플 및 바이알로 제공될 수 있고, 사용 직전에 담지된 멸균 액체, 예를 들어 주사용수만 첨가하면 되는 냉동-건조(동결건조)된 상태로 보관될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0389] 경구 투여에 적합한 면역자극 또는 백신 조성물은 캡슐, 정제 또는 로젠지와 같은 개별 단위로; 분말 또는 과립으로; 용액, 시럽 또는 현탁액으로(수성 또는 비-수성 액체에; 또는 식용 거품 또는 휘프로; 또는 유제로) 제공될 수 있다.

[0390] 정제 또는 경질 젤라틴 캡슐에 적합한 부형제에는 락토스, 옥수수 전분 또는 이의 유도체, 스테아르산 또는 이의 염이 포함된다. 연질 젤라틴 캡슐과 함께 사용하기에 적합한 부형제에는 예를 들어 식물성 오일, 왁스, 지방, 반고체 또는 액체 폴리올 등이 포함된다.

[0391] 용액과 시럽의 제조를 위해 사용될 수 있는 부형제에는 예를 들어 물, 폴리올, 및 설탕이 포함된다. 현탁액의 제조를 위해, 오일(예를 들어 식물성 오일)을 사용하여 수중유 또는 유중수 현탁액을 제공할 수 있다.

[0392] 담체가 고체인 비강 투여에 적합한 면역자극 또는 백신 조성물은 예를 들어 20 내지 500 마이크론 범위의 입자 크기를 갖는 거친 분말을 포함하며 이는 코담배를 취하는 방식으로, 즉 코에 가까이 유지한 분말의 용기로부터 비강을 통한 빠른 흡입에 의해 투여된다. 비강 스프레이 또는 비강 점제로서 투여하기 위한 담체가 액체인 적합한 조성물은 활성 성분의 수성 또는 오일 용액을 포함할 수 있다.

[0393] 흡입에 의한 투여에 적합한 조성물에는 다양한 유형의 계측된 용량 가압 에어로졸, 분무기 또는 취입기의 수단에 의해 생성될 수 있는 미세 입자 먼지 또는 미스트가 포함된다.

[0394] 경피 투여에 적합한 면역자극 또는 백신 조성물은 장기간 동안 수용체의 표피와 긴밀한 접촉을 유지하도록 의도된 별도의 패치로 제공될 수 있다. 예를 들어, 활성 성분은 Pharmaceutical Research. 3(6):318(1986)에 일반적으로 기술된 바와 같이 이온삼투법에 의해 패치로부터 전달될 수 있다.

[0395] 국소 투여에 적합한 조성물은 연고, 크림, 현탁액, 로션, 분말, 용액(예를 들어 구강 세척) 페이스트, 젤, 스프레이, 에어로졸 또는 오일로 제형화될 수 있다. 눈 또는 기타 외부 조직, 예를 들어 입 및 피부의 감염의 경우, 조성물을 국소 연고 또는 크림으로 적용될 수 있다. 연고로 제형화될 경우, 활성 성분은 파라핀계 또는 수-혼화성 연고 베이스와 함께 이용될 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 수중유 크림 베이스 또는 유중수 베이스와 함께 크림으로 제형화될 수 있다. 눈에 대한 국소 투여에 적합한 약학적 조성물은 활성 성분이 적합한 담체, 특히 수성 용매에 용해되거나 현탁된 점안액을 포함할 수 있다. 입안의 국소 투여에 적합한 약학적 조성물은 로젠지, 향정 또는 구강 세척제를 포함할 수 있다.

[0396] 면역자극 또는 백신 조성물은 보존제, 가용화제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 감미제, 착색제, 취기제, 염(본 발명의 물질 자체가 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 제공될 수 있음), 완충제, 코팅제 또는 항산화제를 함유할 수 있다.

[0397] 발명의 백신 조성물은 또한 본원에 정의된 키메라 또는 융합 단백질에 부가하여 하나 이상의 다른 예방적 또는 치료적 활성제를 함유할 수 있다.

[0398] 발명의 백신 조성물에 사용하기 위한 키메라 또는 융합 단백질은 동결건조되거나 동결건조되지 않을 수 있다.

[0399] 발명의 백신 조성물은 또한 본원에 정의된 펩티드(들)에 부가하여 약학적으로 허용가능한 보조제를 포함할 수 있다. 백신 조성물의 면역원성을 강화하기 위해 보조제가 첨가된다.

[0400] 백신 조성물에 함입시키기에 적합한 보조제는 당업계에 공지되어 있고, 불완전 프로인트 보조제, 완전 프로인트 보조제, MDP(무라밀디펩티드), 명반(수산화알루미늄), 명반 플러스 보르다텔라 백일해 및 면역 자극 복합체

(ISCOM, 전형적으로 바이러스 단백질을 함유한 Quil A의 매트릭스), QS- 21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjumer, PG-026, GSK-I, GcMAF, B-alethine, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, 베타펙틴, 및 MF59를 갖는 프로인트 보조제를 포함한다.

[0401] 발명의 백신 조성물은 또한 하나 이상의 공동-자극 분자를 포함하거나 이와 공동-투여될 수 있다.

[0402] 본 발명의 백신 조성물의 복용량은 치료할 개체의 연령 및 상태 등에 의존하여 광범위한 한계 사이에서 달라질 수 있고 의사는 궁극적으로 사용될 적절한 복용량을 결정할 것이다.

[0403] 이 복용량은 적절한 만큼 자주 반복될 수 있다. 예를 들어, 백신의 초기 용량이 투여된 다음 나중에 추가 접종이 투여될 수 있다.

[0404] 포유동물, 특히 인간에게 투여하는 경우, 활성제의 1일 복용량은 1μg/kg 내지 10mg/kg 체중, 전형적으로 약 10μg/kg 내지 1mg/kg 체중일 것으로 예상된다. 어떠한 경우에도 의사는 개체의 연령, 체중, 성별 및 반응을 포함한 요인에 의존하여 개체에 대해 가장 적합한 실제 복용량을 결정할 것이다. 위의 복용량은 평균적인 경우의 예시이다. 물론, 더 높거나 더 낮은 복용량이 가치있는 경우가 있을 수 있고, 이러한 것은 본 발명의 범주 내에 있다.

[0405] 발명의 백신 조성물은 근육내, 정맥내, 흡입, 복강내 또는 경구 경로를 통해 또는 뇌척수액으로의 주사에 의한 것과 같은 본원에 기술된 임의의 편리한 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0406] 발명의 백신 조성물은 단위 복용량 형태로 제공될 수 있고, 일반적으로 밀봉된 용기에 제공되고, 키트의 일부로 제공될 수 있다. 이러한 키트에는 일반적으로(반드시 그런 것은 아니지만) 사용 지침이 포함된다. 이는 복수의 상기 단위 복용량 형태를 포함할 수 있다.

[0407] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 밀봉된 용기에 발명의 백신 조성물과 하나 이상의 사이토카인 및/또는 보조제를 포함하는 부품의 키트를 제공한다.

[0408] 대상체 키메라 또는 융합 단백질을 사용하여 대상체를 면역화하는 방법

[0409] 본 발명은 이를 필요로 하는 개체에서 *P. 긴기발리스*로의 감염을 치료 또는 예방하거나 감염의 가능성을 최소화하기 위한 방법 및 조성물을 제공하며, 상기 방법은 발명의 융합 또는 키메라 단백질을 투여하는 것을 포함한다.

[0410] 본 발명은 또한 *P. 긴기발리스*에 대한 대상체에서 체액성 면역 반응을 유도하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 체액 반응은 보호/치료가 필요한 개체에서 직접적으로 보호적/치료적 항-*P. 긴기발리스* 항체를 얻는 목적을 위한 것일 수 있다. 대안적으로, 체액 반응은 그 다음 대상체(또는 그의 난)로부터 단리된 항체를 생성하는 목적을 위한 것일 수 있으며, 이로써 항체는 그 다음 항체로의 치료/보호가 필요한 개체에게 직접적으로 투여될 수 있다.

[0411] 이와 같이, 본 발명은 대상체에서 *P. 긴기발리스*로의 감염을 예방하고/하거나, 감염 가능성을 최소화하고/하거나 *P. 긴기발리스* 감염의 중증도 및 기간을 감소시키기 위한 방법 및 조성물을 포함한다.

[0412] 본 발명은 또한 *P. 긴기발리스*에 대한 항체를 얻는 방법을 제공하며, 상기 방법은 발명의 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 비-인간 동물에게 투여하고, 이에 의해 동물에서 *P. 긴기발리스*에 대한 항체를 생성하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 방법은 동물(예를 들어 동물의 혈액)로부터 또는 동물의 난(예를 들어 닭으로부터 IgY 항체를 생성하는 경우)으로부터 항체를 단리하는 것을 추가로 포함한다.

[0413] 본 발명은 또한 *P. 긴기발리스*에 지향한 항체를 포함하는 항체 제제를 제공하며, 여기서 항체 제제는 발명의 키메라 또는 융합 단백질, 조성물, 백신 또는 면역 자극 조성물을 비-인간 동물에게 투여하고, 이에 의해 동물에서 *P. 긴기발리스*에 지향된 항체를 생성하고, 동물 또는 그 난으로부터 항체를 단리함에 의해 얻어진다.

[0414] *P. 긴기발리스*에 지향된 항체는 *P. 긴기발리스* 감염을 제거하거나 감소시키기 위해 치료적으로 사용될 수 있거나, *P. 긴기발리스* 감염의 중증도를 예방하거나 감소시키기 위해 예방적으로 사용될 수 있다.

[0415] 본원에 사용된 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 질환이나 상태, 질환이나 상태의 증상, 또는 질환이나 상태의 위험(또는 이에 대한 감수성)을 지연, 늦추기, 안정화, 치유, 치료, 경감, 완화, 변경, 구제, 악화 감소, 호전, 개선 또는 영향을 미치는 목적으로 대상체에 대한 발명의 조성물의 적용 또는 투여(또는 대상체로부터의 세포 또는 조직에 대한 발명의 화합물의 적용 또는 투여)를 포함한다. 용어 "치료"는 임의의 객관적 또는 주관적 매

개변수 예컨대 완화; 진정; 악화 속도의 감소; 질환의 중증도 감소; 안정화, 증상의 감소 또는 대상체가 부상, 병리 또는 병태를 더 견딜 수 있게 만드는 것; 퇴화 또는 쇠퇴 속도의 둔화; 퇴화의 최종 지점을 덜 쇠약하게 만드는 것; 또는 대상체의 신체적 또는 정신적 안녕을 개선하는 것을 포함하여 부상, 병리 또는 병태의 치료 또는 호전에 있어서 성공의 임의의 징후를 지칭한다.

[0416] 본원에 사용된 "예방하는" 또는 "예방"은 질환 또는 장애를 획득할 위험(또는 이에 대한 감수성)의 가능성(즉, 질환에 노출되거나 질환에 걸리기 쉬운 대상체에서 전개하지 않지만 질환의 증상을 아직 경험하지 않거나 나타내지 않는 질환의 임상 증상 중 적어도 하나를 야기함)의 적어도 감소를 지칭하는 것으로 의도된다. 그러한 대상체를 식별하기 위한 생물학적 및 생리학적 매개변수가 본원에 제공되어 있고 의사에게도 잘 알려져 있다.

[0417] 발명의 백신 조성물은 이를 가장 필요로 한다고 느끼는 대상체, 예를 들어 인간 환자의 맥락에서 어린이 또는 노인 또는 *P. 긴기발리스*에 노출될 위험이 있는 개체에게 투여될 수 있다. 발명의 백신 조성물은 또한 *P. 긴기발리스*로 감염된 것으로 의심되거나 진단된 대상체에게 투여될 수 있다.

[0418] 본 발명의 조성물 및 방법은 인간 및/또는 수의학 둘 모두에서의 용도, 진단제의 생성 또는 기타 치료 시약의 생성에 동일하게 확장된다.

[0419] 본원에서 사용되는 용어 "대상체"는 인간을 포함한 임의의 동물, 예를 들어 포유동물을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 예시적인 대상체에는 인간 및 비-인간 영장류가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 대상체는 인간일 수 있다. 추가 예에서, 대상체는 반려 동물(고양이, 개, 기니피그 등)과 같은 수의학 대상체일 수 있다.

[0420] 본원에 사용된 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0421] 당업자는 본원에 기술된 키메라 또는 융합 단백질 또는 조성물로 성공적인 백신화/면역화를 결정하는 방법에 익숙할 것이다. 예를 들어, 당업자는 면역화에 이어서 생성된 항체를 정량화하는 방법 및/또는 면역화에 이어서 유도된 체액성(Th2) 반응의 정도를 정량화하는 방법에 익숙할 것이다.

[0422] 키트

[0423] 또 다른 구체예에서는 발명의 하나 이상의 단백질, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 및/또는 상기 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하는 키트 또는 제작 물품이 제공된다.

[0424] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에 대한 개별, 후속 또는 동시 투여를 위한 발명의 백신 조성물 및 하나 이상의 보조제를 포함하는 부품의 키트를 제공한다.

[0425] 다른 구체예에서, 위에서 언급된 치료적 또는 예방적 적용에 사용하기 위한 키트가 제공되며, 상기 키트는 다음을 포함한다:

[0426] - 발명의 단백질, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 면역원성 조성물을 담는 용기;

[0427] - 사용 지침이 있는 라벨 또는 패키지 삽입물.

[0428] 임의의 구체예에서, 키트는 대상체에서 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 도출하기 위한 하나 이상의 추가 활성 본질 또는 구성성분을 함유할 수 있다.

[0429] 키트 또는 "제작 물품"은 용기 및 용기 상에 있거나 용기와 연관된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기에는 예를 들어 병, 바이알, 주사기, 블리스터 팩 등이 포함된다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 용기는 병태를 치료하는 데 효과적인 치료적 조성물을 보유하고 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어 용기는 정맥주사의 용액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있음). 라벨 또는 패키지 삽입물은 치료적 조성물이 선택한 병태를 치료하는 데 사용된다는 것을 나타낸다. 한 구체예에서, 라벨 또는 패키지 삽입물은 사용 지침을 포함하고 치료적 또는 예방적 조성물이 본원에 기술된 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 데 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0430] 키트는 (a) 치료적 또는 예방적 조성물; 및 (b) 제2 활성 본질 또는 구성성분이 그 안에 함유된 제2 용기를 포함할 수 있다. 발명의 이 구체예의 키트는 본원에 기술된 염증성 질환 또는 병태로부터 유래하는 합병증을 예방하거나 장애를 치료하는 데 사용될 수 있는 조성물 및 다른 활성 성분을 나타내는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 키트는 약학적으로-허용가능한 완충액, 예컨대 정균 주사용수(BWFI), 인산염-완충 식염수, 링거 용액 및 덱스트로스 용액을 포함하는 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다.

이는 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다.

[0431] 임의의 구체예에서 치료적 조성물은 치료적, 예방적 또는 면역원성 조성물을 보유하기 위한 저장소를 포함하여 일회용 또는 재사용이 가능한 디바이스의 형태로 제공될 수 있다. 한 구체예에서 디바이스는 주사기, 자동주사기 또는 나노패치이다. 디바이스는 0.1 내지 2mL의 치료적 또는 면역원성 조성물을 보유할 수 있다. 치료적 또는 예방적 조성물은 사용 준비가 된 상태로, 또는 혼합, 용해 또는 재현탁 또는 추가 성분의 첨가를 필요로 하는 상태로 디바이스에 제공될 수 있다.

[0432] 본 명세서에 개시되고 정의된 발명은 언급되거나 본문 또는 도면으로부터 명백한 개별 특징 중 2개 이상의 모든 대안적인 조합으로 확장된다는 것이 이해될 것이다. 이들 다양한 조합은 모두 발명의 다양한 대안적 양태를 구성한다.

[0433] 다음 실시예는 발명의 일부 구체예를 더 완전하게 예시하기 위해 제시된다. 그러나 이는 결코 발명의 넓은 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 당업자는 발명의 범주를 벗어나지 않고 본원에 개시된 원리의 다양한 변경 및 변형을 쉽게 고안할 수 있다.

[0434] **실시예**

[0435] 다음 실시예는 발명의 키메라 또는 융합 단백질에 관한 일련의 시험관내 및 생체내 연구를 기술한다. 실시예 1은 실시예 2 및 3에 기술된 연구에 사용된 재료 및 방법을 기술한다. 실시예 2는 시험관내 연구의 결과를 기술하고, 실시예 3은 생체내 연구의 결과를 기술한다.

[0436] **실시예 1: 재료 및 방법**

[0437] **1.1 시험관내 연구를 위한 재료 및 방법**

[0438] 재조합 단백질의 발현

[0439] 재조합 단백질(즉, 본원에 기술된 바와 같은 상이한 키메라 또는 융합 단백질)은 본질적으로 다음과 같이 이소프로필 β-D-티오갈락토시다제(IPTG)로의 유도에 의해 pET28 벡터(또는 하나의 벡터로부터의 rABM1 + rABM2 공동-발현의 경우 pDUET-1)로부터 발현되었다.

[0440] 상이한 키메라 및 키메라의 구성요소와 융합 단백질(활성 부위 및 어드헤신 도메인 포함)을 인코딩하는 핵산은 *P. 긴기발리스* W50 게놈 DNA 주형 및 특별히 설계된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하는 중첩 확장("SOEing") PCR을 통한 표준 PCR 또는 DNA 스플라이싱에 의해 생산되었다. PCR 단편 또는 SOEn PCR 단편을 정제하고 클로닝 벡터 pGEMTeasy 또는 pBHA 안으로 결찰하고 화학적으로 적격인 *대장균* α-Gold 세포(Bioline, New South Wales, Australia)로 형질전환시켰다.

[0441] "DSSG" 아미노산 링커 영역을 함유하거나 링커를 함유하지 않는 단일 추가 KAS(즉, 활성 부위) 잔기를 인코딩하는 DNA 서열은 본질적으로 다음과 같이 한 번에 하나씩 재조합 키메라 및 Kgp 어드헤신 도메인에 순차적으로 첨가되었다: 제한 효소 부위는 제한 효소에 특이적인 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드 프라이머로 PCR에 의해 키메라 및 어드헤신 변이체 마더클론에서의 DNA 삽입 단편의 말단 상에 도입되었다. 상응하는 제한 서열을 갖는 개별 KAS 서열을 인코딩하는 합성 DNA 단편은 마더클론으로부터의 DNA 작제물의 삽입 말단 상에 결찰되었고 재조합 클론이 정제되었다. 후속적으로 제2 또는 제3 추가 KAS가 추가되면 추가 제한 서열이 이들 클로닝된 삽입물의 말단 상에 도입되었고 다른 제한 부위를 갖는 KAS 서열을 인코딩하는 추가 DNA 단편이 한 번에 하나씩 결찰되었다. 단일, 이중 또는 사중 선형 KAS 인코딩 서열을 갖는 마더클론 작제물은 특정 제한 소화를 거치고 하위-단편은 그 다음 결찰을 통해 상호교환되어 수많은 변이체(표 1에 예시된 것 포함)가 생성될 수 있다.

[0442] ABM1 및 ABM2 내의 잔기와 시스테인 잔기는 제조업체의 지침에 따라 QuickChange II Site Directed Mutagenesis 키트(Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 돌연변이되었다.

[0443] 클로닝 벡터 pGEMTeasy 및 pBH1에서의 모든 삽입물의 완전성은 DNA 서열분석(Applied Genetics and Diagnostics Facility, The University of Melbourne)에 의해 확인되었다. 돌연변이는 전체 삽입물의 DNA 서열분석에 의해 추가로 검증되었다. 그런 다음 검증된 작제물은 선택 효소로의 제한 소화를 거치고 삽입물은 *대장균* α-선택 화학적으로 적격인 세포에서 관련 pET 발현 벡터 안으로 클로닝되고 후속적으로 *대장균* 발현 숙주인 BL21-CodonPlus(DE3) RIPL(Stratagene, Australia) 안으로 클로닝되었다.

[0444] 재조합 단백질의 가용성에 영향을 미치는 키메라의 특성에 대한 조사; 소규모

[0445] 단일 콜로니 형질전환체를 사용하여 30㎍/ml 카나마이신을 함유한 2mL의 Luria Bertani(LB) 브로쓰를 37℃에서 쉐도 진탕기에서 밤새 접종하였다. 그런 다음 이 접종원을 사용하여 30㎍/ml 카나마이신을 함유한 LB 2ml를 접종(1:100)하였다. OD600에서 세포 배양물 = 0.6-1.0을 1mM IPTG로 37℃에서 2시간 동안 유도하였다. 세포 배양물을 원심분리하고 펠렛을 250㎕ PBS에 재현탁하고 CPX750 초음파 프로세서(Cole Parmer Instrument Company, USA)를 사용하여 간단히 초음파 처리하고 원심분리하였다.

[0446] 총 용리물, 가용성(상등액) 및 불용성(펠렛) 분획을 SDS-PAGE로 분석하여 재조합 단백질의 가용성을 평가하였다. 이들 초기 파일럿 발현 조건 하에서 불용성으로 남아 있거나 낮은 가용성을 나타낸 재조합 단백질은 증강된 가용성을 위한 최적의 조건을 확인하기 위해 더 낮은 온도(16℃ 내지 30℃) 및 더 낮은 IPTG(0.01 - 0.5mM)로의 다양한 조건 하에서 발현되었다. 모든 재조합 단백질 유도는 중간-크기 규모에서 가용성을 테스트하기 위해 최적의 조건 하에서 규모를 확대하였다(20 - 200mls). 배양물(200mL)을 다양한 온도(예를 들어, 30℃에서 5시간 또는 16℃에서 16시간)에서 IPTG 유도를 받도록 하였다.

[0447] 세포를 수확하고 용리 완충액(20mM 인산나트륨, 500mM NaCl, 0.5% v/v Triton X-100, 5mg/ml DNAseI, 1X 단백질분해효소 억제제 칵테일, 1mg/ml 리소자임, 10mM 이미다졸, pH 8)에 재현탁하였다. 세포 재현탁액을 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음 깨끗한 용리물을 원심분리(8,000g, 30분, 4℃)하여 상등액(가용성) 및 펠릿(불용성) 분획을 수집하고 SDS- 및 NATIVE-PAGE로 분석하였다.

[0448] 재조합 단백질의 겔-내 HIS 염색

[0449] SDS PAGE를 받은 재조합 단백질을 제조업체의 지침에 따라 Invision In Gel His Stain 키트(Invitrogen)를 사용하여 염색하였다. 이 염색은 His-태깅된 단백질에 고도로 특이적이다. 모든 후보 물질이 C-말단 His 태그를 함유하고 있으므로 이 절차를 사용하여 재조합 단백질의 N-말단 분해를 식별하였다.

[0450] 동물 모델에서의 연구를 위한 키메라의 대규모 정제

[0451] 각 재조합 단백질의 정제 조건은 다음 섹션에 자세히 설명되어 있다.

[0452] *단백질 발현 및 세포 용리*

[0453] 동물 모델을 위한 백신 후보로 사용하기 위해 식별된 모든 재조합 단백질은 이전에 기술된 대로 *대장균* BL21(DE3)에서 재조합 C-말단으로 His-태깅된 융합 단백질로 또는 "태그없는" 단백질로 발현되었다. 세포는 LB 배지, TB 배지 또는 50㎍/mL 카나마이신이 보충된 변형된 M9 최소 배지에서 37℃에서 성장되었다. OD600에서 배양물 = 0.8-1.0은 37℃ 또는 34℃에서 2-4시간, 25℃에서 12시간, 또는 16℃에서 16-20시간 동안 0.4mM IPTG로 유도되었다. 4℃에서 원심분리에 의해 8000g에서 수확한 후, 세포를 달리 지시되지 않는 한 용리 완충액[0.35mg/mL 리소자임, TBS150에서 40㎍/mL DNAse I(50mM Tris·Cl, 150mM NaCl, pH 7.5], 플러스 1% Triton X-100 및 EDTA-유리 프로테아제 억제제(Complete ULTRA Tablets, Sigma-Aldrich)에서 얼음 위에서 1.5시간 동안 용리시켰다. 세포 용리물을 4℃에서 23,500g에서 40분 동안 원심분리에 의해 정화하였다.

[0454] 번역된 서열 MA로 시작하는, 표 1에 표시된 모든 재조합 단백질 상의 개시자 Met 잔기(aa 1)는 두 번째의 잔기가 작은 잔기일 때 메티오닌을 절단하는 *대장균* N 말단 메티오닌 처리 효소에 의해 생체내에서 제거된다. 이는 KDAK 및 KDAK-변이체 재조합 단백질의 질량 분광 분석에 의해 확인되었다.

[0455] *비-변성 조건 하에서 가용성 분획으로부터 His-태깅된 단백질 정제*

[0456] 1. Ni-친화성 크로마토그래피

[0457] 세포 용리물을 4℃에서 20,000g에서 원심분리에 의해 정화하여 세포 잔해물을 제거하였다. 0.22㎛ 필터를 통해 여과한 후, 용리물을 장입 완충액 TBS300(50mM Tris·Cl, 300mM NaCl, pH 7.5), 플러스 10mM 이미다졸 및 1% Triton X-100에서의 HisTrap Ni-친화성 컬럼(GE Healthcare)에 장입하였다. 컬럼을 장입 완충액으로 광범위하게 세척한 다음 TBS300에서의 20mM 이미다졸로 세척하였다. 결합된 단백질은 TBS300에서 20-350mM 이미다졸 구배를 사용하여 용리되었으며 흡광도는 280nm에서 모니터링되었다. 피크 분획은 SDS 및/또는 천연 PAGE로 분석되었다. 용리된 표적 단백질은 단백질 크기에 의존하여 3kDa 또는 10kDa의 분자량 컷오프를 갖는 Amicon 필터 장치를 사용하여 농축되었다. 생성된 단백질 용액을 추가 정제를 위해 -70℃에 보관하였다.

[0458] 2. 음이온 교환 크로마토그래피

[0459] 모든 후보 단백질의 등전점(pI)은 온라인 분석 ProtParam 도구 - ExPASy(https://web.expasy.org/protparam/)를 사용하여 산성 범위에 있을 것으로, 음이온 교환 크로마토그래피를 필요한 경우 추가 정제를 위해 적용하였다. 간단히 말하면, Ni-친화성 정제로부터 농축된 단백질을 완충액 A(50mM Tris.Cl, 20mM NaCl, pH 7.5) 안에 희석하여 이온 강도를 감소시킨 다음 완충액 A에서 음이온 교환 HiTrap Q 컬럼(GE Healthcare)에 장입하였다. 단백질은 280nm에서 흡광도를 모니터링하면서 Tris 완충액에서 20부터 400mM의 NaCl 구배로 용리되었다. 피크 분획에서의 표적 단백질은 SDS- 및/또는 천연 PAGE로 검증되었고 적절한 분자량 컷-오프의 Amicon 필터 장치를 사용하여 농축되었다. 단백질 용액은 크기 배제 크로마토그래피 또는 투석을 사용한 추가 정제 또는 완충액 교환을 위해 -70℃에서 보관되었다.

[0460] 3. 크기 배제 크로마토그래피

[0461] 크기 배제 크로마토그래피는 HiLoad Superdex 200 또는 HiLoad Superdex 75 컬럼(GE Healthcare) 상에서 4℃에서 수행되었다. Ni 친화성 정제 또는 음이온 교환 크로마토그래피의 추가 단계로부터의 단백질을 적절한 컬럼에 장입하고 280nm에서의 흡광도를 모니터링하면서 TBS150 또는 TBS100(50mM Tris.Cl 내 100mM NaCl, pH 7.5)의 완충액에서 용리시켰다. 피크 분획에서 표적 단백질은 SDS- 및/또는 천연 PAGE로 검증되었다. 이량체와 같은 단일 올리고머 종의 단리를 위해 제2 또는 추가 라운드의 크기 배제 정제를 수행하였다. 최고의 단백질 순도를 함유한 분획을 모아서 농축하였다. 단백질 동종다량체의 혼합물의 제조를 위해, 표적 단백질 분획을 간단히 모아서 농축하였다. 단백질 동일성은 액체 크로마토그래피-전기분무 이온화 분광법(LC-MS, Agilent)을 사용한 온전한 단백질 몰 질량의 결정에 의하거나 필요한 경우 액체 크로마토그래피 오비트랩 탠덤 질량 분석법(LC-MS/MS, Agilent)을 사용한 서열 분석에 의해 확인하였다. 단백질 농도는 동물 모델 실험을 위한 제출 전에 계산된 흡광계수를 사용하여 280nm에서의 흡광도의 결정에 의해 정량하였다.

[0462] *봉입체로부터 His-태깅된 단백질의 정제*

[0463] 1. 산화 조건 하

[0464] (가용성 분획으로부터의 정제에 대해 기술된 바와 같이) 세포의 용리에 이어서, 불용성 펠릿을 TBS150으로 2회 세척하였다. 봉입체로서 발현된 단백질을 TBS300 또는 20mM NaPi, 500mM NaCl, pH 7.4(PBS500)에서 1시간 동안 롤링 플랫폼에서 실온에서 8M 우레아로 용해시켰다. 단백질 추출물을 20,000g에서 원심분리하고 0.22μm 필터 장치를 통해 여과한 다음 우레아 함유 완충액 TBSU(TBS300 내 8M 우레아 + 20mM 이미다졸) 또는 PBSU(8M 우레아, 20mM NaPi pH 7.8, 500mM NaCl, 플러스 20mM 이미다졸)에서의 HisTrap 친화성 컬럼에 장입하였다. 컬럼을 동일한 8M 우레아 완충액으로 광범위하게 세척하였다. PBSU에 단백질이 장입된 컬럼에 대해 pH 6.5에서 PBSU를 사용한 추가 세척을 적용하였다. 우레아의 제거를 위해 PBSU에서 20-500mM 이미다졸의 구배를 사용하여 표적 단백질을 용리하였다. 느슨한 Ni-NTA 수지(Thermofisher)를 사용하는 경우 우레아 추출물을 PBSU에서 부드럽게 교반하면서 2시간 동안 수지와 혼합하였다. PBSU(pH 7.8, 그 다음 pH 6.5)로 광범위하게 세척한 후, 결합된 단백질을 동일한 완충액 내 500mM 이미다졸로 수지에서 용리시켰다. 용리된 단백질을 3.5kDa의 분자량 컷-오프를 갖는 투석 튜브(Fisher Biotec, Australia)에서 6M, 4M 및 2M 우레아 인산염 완충액으로 단계적으로 투석하였다. 2M 우레아 완충액에서의 단백질을 식염수로만 추가로 투석하고 동물 모델 실험에 제출하기 전에 4℃에서 유지하거나 달리는 추가 투석 없이 2M 우레아 완충액에서 제출하였다.

[0465] 2. 환원 조건 하

[0466] 단백질을 5mM TCEP의 존재에서 6M 우레아 완충액으로 봉입체로부터 추출하고 동일한 완충액에서의 HisTrap 컬럼에 장입하였다. 컬럼을 2M TCEP를 함유하는 4M 우레아 완충액으로 세척한 후, 표적 단백질을 2M TCEP의 존재에서 우레아의 농도 구배를 4M에서 0M로 감소시키면서 컬럼 상에 다시 접었다. 단백질을 그 다음 TBS300 플러스 2mM TCEP에서 20-350mM의 이미다졸의 농도 구배를 증가시켜 용리시켰다. 용리된 단백질은 그 다음 비변성 조건하에서 가용성 분획으로부터 단백질 이량체 또는 다량체의 정제에 대한 섹션에 기술된 것과 동일한 방식으로 환원 완충액(TBS150에서의 2mM TCEP)에서 크기 배제 크로마토그래피를 위해 농축되었다. SDS- 및 천연 PAGE, 질량 분석법 및 정량화로 분석 후 샘플을 환원 완충액에 -70℃에 보관하거나 동물 모델 실험에 제출하였다.

[0467] *산화 및 변성 조건 하에서 가용성 분획으로부터 His-태깅된 단백질의 정제*

[0468] 잔해물과 불용성 물질을 제거하기 위해 20,000g에서 원심분리하여 세포 용리물을 정화한 다음, 실온에서 1시간 동안 교반하면서 PBS500에서 우레아 용액을 최종 농도 8M로 첨가하여 용리물을 즉시 변성시켰다. 생성된 용리물을 실온에서 40분 동안 20,000g에서 원심분리하였다. 표적 단백질을 위의 봉입체로부터 정제 - 산화 조건 하의 섹션에 기술된 대로 HisTrap Ni-친화성 컬럼 또는 느슨한 Ni-NTA 수지를 사용한 동일한 접근법으로 정제하였다.

식염수에서 정제된 항원은 동물 모델 실험에 제출하기 전에 4℃에 보관되었다.

[0469] *가용성 분획으로부터 태그가 없는 후보군의 정제*

[0470] 음이온 교환 크로마토그래피 이는 태그가 없는 단백질의 정제를 위한 제1 크로마토그래피 단계이다. 그의 His-태깅된 대응물과 마찬가지로 태그가 없는 후보군의 pI 또한 온라인 분석 ProtParam 도구 - ExPASy(https://web.expasy.org/protparam/)를 사용하여 산성 범위에 있을 것으로 예측되었다. 따라서, 음이온 교환 크로마토그래피를 적용하여 2 라운드 수행하였다. 제1 라운드에서는 정화된 세포 용리물을 0.22μm 필터 디스크를 통해 여과하고 완충액 AA(20mM NaPi, pH 6.5, 0.05x 프로테아제 억제제 칵테일이 보충됨)에서의 음이온 교환 HiTrap Q 컬럼(GE Healthcare)에 장입하였다. 10 컬럼 부피의 완충액 AA로 세척한 후, 결합된 단백질을 0-100% 완충액 BA(20mM NaPi에서의 1M NaCl pH 6.5)의 NaCl 구배로 용리시키고 280nm에서의 흡광도를 모니터링하였다. 피크 분획에서의 표적 단백질은 SDS- 및/또는 천연 PAGE로 검정되었다. 제2 라운드에서는 제1 라운드의 음이온 교환 단계로부터 최상의 분획을 모아서 완충액 AA로 6배로 희석한 다음 동일한 완충액에서 음이온 교환 HiTrap Q 컬럼(GE Healthcare)에 재-장입하였다. 결합된 단백질을 280nm에서의 흡광도를 모니터링하면서 0-50% 완충액 BA의 NaCl 구배를 사용하여 용리하였다. 피크 분획에서의 표적 단백질은 SDS- 및/또는 천연 PAGE로 검정되었으며 최상의 분획은 10kDa 분자량 컷-오프의 Amicon 필터 장치를 사용하여 농축되었다. 단백질 용액은 크기 배제 크로마토그래피로 추가 정제를 위해 -20℃에 보관되었다.

[0471] 제1-라운드 크기 배제 크로마토그래피 크기 배제 크로마토그래피는 HiLoad Superdex 200 컬럼(GE Healthcare) 상에서 실온에서 수행되었다. 음이온 교환 크로마토그래피를 통한 정제로부터의 단백질을 크기 배제 컬럼에 장입하고 280nm에서 흡광도를 모니터링하면서 AS의 완충액(1M $(NH_4)_2SO_4$, 50mM NaPi pH 7.0, 0.05x 프로테아제 억제제 칵테일이 보충됨)에서 용리시켰다. 피크 분획에서의 표적 단백질은 SDS- 및/또는 천연 PAGE로 검정되었다. 최상의 단백질 순도의 분획을 소수성 상호작용 크로마토그래피로 추가 정제를 위해 모았다.

[0472] 소수성 상호작용 크로마토그래피 제1-라운드 크기 배제 크로마토그래피로부터 완충액 AS에서 표적 단백질의 모아진 분획을 0.22μm 막을 통해 여과하고 완충액 AH(1M (NH4)2SO4, 50mM NaPi pH 7)에서 4℃에서 사전-평형화된 HiTrap 페닐 HP 컬럼에 장입하였다. 결합된 단백질은 280nm에서 흡광도를 모니터링하면서 완충액 BH(50mM NaPi, pH 7)에서 800mM에서 200mM (NH4)2SO4로 이온 강도가 감소하는 구배로 용리되었다. 피크 분획에서의 표적 단백질은 SDS- 및/또는 천연 PAGE로 검정되었으며 최상의 분획은 제2-라운드 크기 배제 크로마토그래피의 다음 정제 또는 완충액 교환 단계를 위해 Amicon 필터 장치를 사용하여 모아지고 농축되었다.

[0473] 제2-라운드 크기 배제 크로마토그래피 소수성 상호작용이 있는 정제 단계에서 농축된 샘플을 제1-라운드 크기 배제 크로마토그래피에서 사용된 크기 배제 컬럼에 장입하고 BTS의 완충액(20mM Bis-Tris, 150mM NaCl, pH 6.5)에서 용리시켰다. 피크 분획은 SDS- 및/또는 천연 PAGE로 분석되었다. 최상의 순도의 분획을 모아서 농축하였다. 액체 크로마토그래피-전기분무 이온화 질량 분석법(LC-MS, Agilent)으로 식별하고 정량화 후, 항원을 분취하고 향후 사용을 위해 -80℃에 보관하였다.

[0474] *태그가 없는 후보군의 단백질 식별 및 정량화*

[0475] SDS- 또는 천연 PAGE 검증에 부가하여, 단백질 동일성은 LC-MS를 사용하여 온전한 단백질 몰 질량의 결정에 의하거나 필요한 경우 액체 크로마토그래피 오비트랩 탠덤 질량 분석법(LC-MS/MS, Agilent)을 사용한 서열 분석에 의해 확인하였다. 단백질 농도는 계산된 흡광 계수를 사용하여 280nm에서의 흡광도의 결정에 의해 정량하였다(표 3). 동물 모델 실험을 제출하기 전에 완충액 교환이 필요한 경우 Superdex 200 크기 배제 컬럼(GE Healthcare) 또는 Zeba™ 스핀 탈염 컬럼(ThermoFisher Scientific)을 사용하였다.

[0476] **1.2 생체내 연구를 위한 재료 및 방법**

[0477] 치주염의 마우스 모델을 위한 박테리아의 배양

[0478] *P. 긴기발리스* 균주; W50(혈청형 C); 호주 멜버른 대학의 멜버른 치과 학교 구강 건강 협동 연구 센터의 배양물 컬렉션으로부터 수득되었다. *P. 긴기발리스* W50은 MK3 혐기성 워크스테이션(Don Whitley Scientific Ltd., Adelaide, Australia)에서 5% CO_2를 함유하는 혐기성 N_2 대기에서 10% v/v 용리된 말 혈액(37℃)이 보충된 Horse Blood Agar(HBA)(20g/L HBA; Oxoid Ltd., Hampshire, UK)에서 성장되었다. 5mg/L 헤민 및 0.5mg/L 시스테인이 보충된 20mL 멸균된 뇌 심장 주입(37g/L BHI; Oxoid Ltd., Hamsphire, UK) 배지로 구성된 개시자 배양물 안에 콜로니를 접종하고[McKee et al. (1986) *Infect Immun* 52: 349-355] 혐기성으로 인큐베이션하였다(24시간, 37℃). 배치 배양물의 흡광도는 분광광도계(모델 295E, Perkin-Elmer, Germany)를 사용하여 OD650nm에서

모니터링하였다. 원심분리(7,000g, 20분, 4℃)에 의해 후기 지수 성장 동안 박테리아 세포를 수확하였다. 박테리아 순도는 그람 염색에 의해 일상적으로 확인되었다[Slots (1982). In: Host-Parasite Interaction in Periodontal Disease, Genco, R.J. and Merganhagan, S.E. (eds). Washington D.C.: American Society for Microbiology. pp. 27-45.].

[0479] 열-사멸된 박테리아의 제조

[0480] *P. 긴기발리스* W50 배양물을 수확하고(6,500g, 4℃), 인산염 완충 식염수(PBS)(0.01M Na2HPO4, 1.5mM KH_2PO_4 및 0.15M NaCl, pH 7.4)로 1회 세척한 다음 원심분리(7,000g, 20분 4℃)로 펠렛화하였다. 박테리아 세포를 PBS에 재현탁시키고 65℃에서 15분 동안 가열하였다. 현탁액을 원심분리(7,000g, 20분 4℃)하고 멸균 PBS에 재현탁하고 이를 1회 반복하였다. 제2 세척 후, 상등액을 버리고 세포 펠렛을 멸균 PBS에 재현탁하여 2 x 10^{10} 세포/mL의 세포 밀도를 얻었고, Biorad 단백질 검정 염색 시약 농축물(Life Science, NSW, Australia)을 사용하여 단백질 농도를 결정하였다.

[0481] 마우스 치주염 모델

[0482] 마우스 치주염 실험은 Baker et al.'s mode (1994). *Arch Oral Biol* 39: 1035-1040)로부터 변형되고 O'Brien-Simpson et al. (2005 *J Immunol* 175: 3980-3989)에 의해 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다. 0일차에 마우스(암컷 BALB/c; 6-8주령, 10마리 마우스/그룹)에 2일 간격으로 제공된 *P. 긴기발리스* W50[2% w/v 카르복시메틸셀룰로오스(CMC, Sigma, New South Wales, Australia)를 함유한 20μL PG 완충액(50mM Tris-HCL, 150mM NaCl, 10mM $MgSO_4$ 및 14.3mM 머캅토에탄올, pH 7.4)에 현탁된 1 x 10^{10} 생존 *P. 긴기발리스* W50 세포]의 4회 용량으로 구성된 *P. 긴기발리스*를 경구 내로 접종하였다. 접종원을 무산소적으로 제조한 다음 즉시 상악 대구치의 치은 가장자리에 적용하였다. 각 접종원에서 생존 박테리아의 수는 유세포분석법과 혈액 한천 상의 CFU 계수에 의해 검정되었다. 동물 그룹은; *P. 긴기발리스* W50 경구로 접종된 군(감염된 대조군), 비-박테리아 접종된 대조군, 및 면역화된 군으로 구성된다. 치료적 백신접종 치주염 모델(도 1)의 경우 마우스는 제1 경구 접종 후 19일차에 식염수/명반(알하이드로겔; 2% 수산화알루미늄 습윤 겔 현탁액; Invivogen)에서의 백신 후보군 50μg로 복강내 경로를 통해 면역화되었다. 마우스는 40일차에 피하 경로를 통해 제2 면역화(식염수/명반 내 50μg)를 받았다. 62일차에, 마우스를 심장 천자로 채혈하고 치사시켰다. 상악골을 제거하여 정중선을 통해 절반으로 나누고, 10 절반을 사용하여 치조골 손실을 결정하였다. ELISA를 사용하여 항체 프로파일을 결정하기 위해 혈청을 사용하였다.

[0483] 마우스 상악골에서 치조골 손실의 측정

[0484] 뼈 손실에 대해 검사할 상악골을 탈이온수에서 끓이고(1분) 기계적으로 탈육하고 2% w/v 수산화칼륨에 침지하였다(16시간, 25℃). 상악골을 탈이온수(25℃)로 2회 세척하고 건조하고(1시간, 37℃) 0.5% w/v 수성 메틸렌 블루로 염색하였다. 수평 뼈 손실을 평가하기 위해 OLYSIA BioReport 소프트웨어 버전 3.2(Olympus Australia Pty Ltd, New South Wales, Australia)를 사용하여 해부 현미경 상에 장착된 Olympus DP12 디지털 카메라로 상악의 협측의 디지털 이미지를 캡처하였다. 상악골은 협측 및 설측 어금니 교두가 겹쳐지도록 방향이 지정되었다. 이미지는 프레임에서 마이크로미터로 캡처되어 각 이미지에 대한 측정이 표준화될 수 있다. 수평 뼈 손실은 능선 높이의 감소를 초래하는 치조골 능선에 수직인 수평면에서 발생하는 손실로 정의된다. OLYSIA BioReport 소프트웨어 버전 3.2 이미징 소프트웨어를 사용하여 각 어금니의 백악법랑 접합부(CEJ)에서 치조골 능선(ABC)까지의 가시 영역을 측정하여 전체 가시 CEJ-ABC 영역을 ㎟로 제공하였다. ㎟로 *P. 긴기발리스*-유발된 치조골 손실은 각 실험 그룹의 총 가시 CEJ-ABC 영역으로부터 접종되지 않은(N-C) 그룹의 총 가시 CEJ-ABC 영역을 차감함에 의해 계산되었다. 치조골 손실 측정은 무작위 및 맹검 프로토콜로 두 번 결정되었다. 데이터는 ㎟로 평균 +/- 표준 편차로 표시되고 일원 ANOVA 및 Dunnetts T3 사후검정 테스트를 사용하여 분석되었다.

[0485] 효소면역측정법(ELISA)에 의한 백신 후보군의 사전-스크리닝

[0486] *P. 긴기발리스*에 대한 여러 단클론 항체를 사용하여 백신 후보군을 사전-스크리닝하여 백신 작제물에 존재하는 주요 도메인과 에피토프가 항체에 접근할 수 있는지 여부를 결정하며, 따라서 생체내에서 항체 반응의 생성을 허용하였다. 스크리닝되어 지는 항원을 0.1M PBS(pH 7.4)에서 평평-바닥 폴리비닐 미세역가 플레이트(Microtiter; Dynatech Laboratories, McLean, VA, US) 상에 16시간 동안, 4℃에서 코팅하였다. 이들 실험에서 다음의 항체 희석이 사용되었다; 염소 항-마우스의 1/4000 희석의 희석; IgG(M8642) 항체(Sigma, New South Wales, Australia). ELISA 실험을 전개하기 위해 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 돼지 항-염소 IgG 항체(M5420,

Sigma, New South Wales, Australia)의 1/4000 희석을 사용하였다.

[0487] ELISA를 사용하여 혈청에서 서브클래스 항체의 결정

[0488] ELISA를 수행하여 평평-바닥 폴리비닐 미세역가 플레이트(Microtiter; Dynatech Laboratories, McLean, VA, US)의 웰(16시간, 4℃)을 코팅하기 위해 0.1M PBS(pH 7.4)에서의 HK W50 세포, 도메인 서브유닛 또는 에피토프의 용액(1μg/mL)을 사용하여 Pathirana et al. (2007). *Infect Immun* 75: 1436-1442)에 기술된 대로 혈청에서의 서브클래스 항체를 평가하였다. 이 실험에서 다음과 같은 항체 희석액이 사용되었다; 염소 항-마우스의 1/4000 희석의 희석; IgG(M8642), IgG1(M8770), IgG2a(M4434) 항체(Sigma, New South Wales, Australia). ELISA 실험을 전개하기 위해 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 돼지 항-염소 IgG 항체(M5420, Sigma, New South Wales, Australia)의 1/4000 희석을 사용하였다. 에피토프 ELISA의 경우 비오틴화된 펩티드를 사전-차단된 스트렙타비딘 코팅된 평평 바닥 플레이트(Pierce; Thermo-Fisher)에 10μg/mL로 결합시켰다. 혈청과 함께 인큐베이션 후 ELISA는 1/4000 염소 항-마우스 IgG 및 1/4000 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 돼지 항-염소 IgG 항체로 전개되었다. 모든 광학 밀도 측정은 Wallac VICTOR3 1420 멀티라벨 카운터(Perkin Elmer) 상에서 405nm에서 수행되었다.

[0489] **실시예 2: 시험관내 연구의 결과**

[0490] 연구 1: 재조합 단백질의 가용성에 영향을 미치는 키메라 성분

[0491] 이전에 보고된(WO 2010/022463) 한 키메라는 N 말단으로 절삭된 DUF2436 도메인(Dc), ABMs213(A)을 포함하는 어드헤신 도메인 및 C 말단으로 절삭된 CAD 도메인(절삭된 K1 도메인, K1n으로 명명됨)이 접합된 KAS(K) 펩티드로 구성된다. 이 키메라는 "KDcAK1n"(서열번호: 64이고, 또한 본 발명의 키메라 및 융합 단백질과 비교하여 본원에서 "원래 키메라" 또는 "키메라"로 지칭될 수 있음)으로 명명된다. KDcAK1n 단백질은 *대장균*에서 봉입체로 생성되고 가용성이 낮고 안정성도 낮다.

[0492] A1 어드헤신 단편의 절삭된 DUF 및 K1 도메인은 Kgp 다중단백질이 감염 중에 *P. 긴기발리스* 세포 표면에서 자연적으로 단백질분해적으로 처리되고 조립되는 방식을 나타난다. 절삭된 DUF 및 K1 도메인은 긴기페인에 대한 면역 반응을 생성하기 위한 백신에의 함입을 위한 확실한 후보군으로 만든다는 것이 이어진다.

[0493] 가용성 KDcAK1n을 생산하려는 광범위한 시도가 이루어졌다. 성장 배지, 성장 조건, IPTG 농도, *대장균* 발현 균주, 유도 온도, 유도 시 세포 성장 단계, 성장 안정제의 추가, 용리 완충액 및 단백질 저장 완충액에 대한 광범위한 시험에서의 변화를 체계적으로 조사하였다. 저온 및 IPTG 유도 하에서 소규모 발현에서 가용성 재조합 단백질 발현의 증강이 관찰되었다. 소규모에서 KDcAK1n은 전체 재조합 단백질 발현의 대략적으로 30-50%를 가용성 단백질로 생산하였다. 그럼에도 불구하고, 가용성 재조합체는 10ml 배양물 이상으로 규모를 조정할 수 없었으며 규모를 확대하려는 임의의 시도로 봉입체 형성을 초래하였다.

[0494] *가용성에 대한 K1 도메인의 영향*

[0495] Kgp 다중단백질의 모든 전체 DUF, ABM213, ABM21 및 DUF-ABM213 도메인은 고도로 가용성 및 안정성 재조합 단백질로 발현되었다. 그러나 전체 K1 도메인 단독으로는 불용성이었고 봉입체(IB)로만 발현되었다.

[0496] ABM213 도메인에 접합된 KAS 모티프(즉, "KA") 또는 DUF 및 ABM213 도메인 둘 모두에 접합된 KAS 모티프(즉, "KDA")의 발현은 고도로 가용성, 안정성 재조합 단백질을 생성하였다.

[0497] 그러나, 도 2에 도시된 것처럼 재조합 KA 또는 KDA(KAK1 또는 KDAK1)에 대한 C-말단으로 절삭된 K1 도메인(즉, K1n 단편) 또는 전체 K1 도메인의 첨가는 손상된 가용성을 초래하였다.

[0498] KDAK1n(서열번호: 65) 및 KDAK1(서열번호: 66) 단백질(즉, K 도메인, DUF2436 및 ABM을 포함하는 어드헤신 도메인 및 절삭된 또는 전체 길이 CAD 도메인을 포함함) 둘 모두는, KDA(즉, 절삭된 또는 전체 길이 CAD를 제외한 동일한 단백질)보다 유의하게 낮은 수준에서 가용성 발현을 위해 보다 까다로운 성장 조건을 필요로 한다.

[0499] K1 도메인 발현에 대한 결과와 함께 K1(CAD) 도메인이 키메라-기반된 재조합체의 빈약한 가용성에 대한 기여자이다는 것이 분명하다.

[0500] *단백질 가용성에 대한 DUF 도메인의 영향*

[0501] 키메라 단백질 작제물에서 DUF 도메인의 절삭은 가용성 단백질 발현의 제거를 초래하였다. 이 결과는 여분의 38개 N-말단 잔기를 함유하는 전체 DUF 도메인이 재조합 단백질의 가용성 발현 및 효율적인 안정화를 최적화하는

데 바람직하다는 것을 나타낸다.

[0502] 따라서, 확장된 Dc 도메인을 갖는 키메라 변이체(38개 N 말단 잔기에 의해 확장된 Dc를 갖는 키메라)를 발현하는 작제물이 창출되었다. 이 재조합체는 KDAK1n으로 지정되었고 결과는 키메라 가용성이 전체 DUF 도메인으로 유의하게 증강된다는 것을 보여준다. 0.2-0.5mM IPTG로 30℃에서 대규모로 KDAK1n의 발현은 우수한 수율의 가용성 재조합 단백질의 발현을 초래하였다.

[0503] *가용성에 대한 K1 및 전체 길이 DUF 도메인의 영향*

[0504] 이 규모에서 이 가용성 단백질 발현에도 불구하고, KDAK1n/KDAK1에 K1n/K1의 함입은 K1n/K1을 결하는 KDA 변이체에 대한 것보다 더 문제가 있는 제조를 만드는 것으로 나타나, K1과 관련된 이들 변이체는 규모 확대 및 상업적인 개발에 덜 바람직할 수 있다.

[0505] 요약하면:

[0506] · 재조합 변이체의 가용성를 위해서는 전체 길이 DUF 도메인이 바람직하다(도 2a).

[0507] · K1 도메인(전체 길이이든 절삭되든)은 변이체의 응집 및 불용성에 대해 주로 원인이 되었다.

[0508] · 전체 길이의 DUF 도메인(즉, DUFc)의 부재에서 K1 및 K1n 함유 변이체는 완전히 불용성이었다(도 2a).

[0509] · 전체 길이 DUF 도메인의 존재에서, K1 및 K1n - 함유 변이체의 매우 낮은-수준 가용성은 매우 온화한 유도 조건 하에서 명백하였다. 그럼에도 불구하고, 이 가용성은 전체 재조합 단백질의 대략적으로 80 - 90%가 봉입체로 발현될 정도로 매우 낮았다.

[0510] · 가용성 KDAK1 재조합체의 중간-규모 정제의 NATIVE PAGE 겔 분석은 재조합체의 무질서한 응집을 나타냈다(즉, KDA 변이체에 대해서는 깔끔하고 균일한 래더가 아님). 미니-니켈 스핀 컬럼을 사용한 이들 변이체(낮은 단백질 농도)의 소규모 정제에서는 유사한 응집이 발생하지 않았지만 절삭된 DUF 변이체의 소규모 정제에서는 또한 NATIVE PAGE 상의 단백질의 특징적인 래더가 고르지 않아 무질서한 응집을 암시하는 것으로 나타났다.

[0511] · 변이체를 함유하는 K1 및 K1n 도메인은 더 높은 농도에서 그리고 정제된 샘플의 동결-해동 후 응집에 대한 경향이 증가하였다. K1 도메인이 이 불안정성에 대한 원인이 되었다. 그러나, K1 또는 K1n을 결하는 모든 변이체는 동결-해동 시 및 더 높은 농도(예를 들어 30mg/ml 이상의 농도)에서 매우 안정적이었다.

[0512] 전체 길이 또는 절삭된 K1 도메인을 함유하는 변이체는 매우 불용성이었고 생성된 가용성 재조합 단백질의 작은 수준은 정제 후 불안정성과 응집에 대한 경향이 있었다. 변이체를 함유한 가용성 K1의 효율적인 확장은 가능하지 않았다.

[0513] 따라서 DUF의 전체 길이로의 확장 및/또는 K1(또는 K1n) 도메인의 제거는, 바람직하게는 둘 모두는, 재조합 단백질의 가용성과 안정성에 중요하다.

[0514] 연구 2: 다량체화에 영향을 미치는 요인

[0515] 정제된 가용성 DUF-ABM213과 ABM213 및 ABM21 재조합 단백질의 천연 PAGE 분석은 다량체화를 나타내는 광범위하고 균일한 래더링을 초래한다. 다량체화는 또한 변성된 도메인 사이의 분자간 이황화 결합 형성을 통해 선행 기술의 KDcAK1n 키메라에서 명백하다. 이 이황화 연결된 다량체화는 봉입체로부터 정제된 KDcAK1n 키메라에서 가장 분명하였다.

[0516] 재조합 키메라 및 Kgp 어드헤신에 대한 연구 과정에서 재조합 단백질의 다량체화는 ABM1과 ABM2 모티프 사이의 상호작용을 통해 발생한다는 것이 분명해졌다. ABM2(1), ABM2(2) 및 ABM3 도메인을 포함하는 재조합 단백질(도 3a의 도식 참조)은 쉽게 다량체를 형성할 수 있었다. ABM2(1), ABM1(2) 및 ABM3(rABM213으로 지정됨)을 인코딩하는 더 작은 재조합 단백질과 ABM2(1) 및 ABM1(2)(rABM21로 지정됨)을 인코딩하는 재조합 단백질의 후속 발현은 두 재조합 모두가 쉽게 다량체화할 수 있음을 보여주었다. 이 다량체화는 천연 PAGE에 깔끔한 밴드의 래더가 존재함으로써 분명해졌다.

[0517] Kgp 다중도메인 다중단백질이 접히는 동안 ABM1 도메인은 ABM2 도메인과 상호작용하여 FnIII 유사 안정한 베타 시트 복합체화된 구조를 형성하는 것으로 제안되었다. 발명자들은 ABM1(1)이 그의 다음 이용가능한 이웃인, ABM2(1)과 상호작용할 것이고, ABM1(2)는 Kgp 다중단백질이 접히는 동안 ABM2(2)와 상호작용할 것이라는 등등의 가설을 세웠다(도 3a에 도식적으로 묘사됨).

[0518] 별도의 연구에서 발명자들은 별도의 단백질로서 rABM1 및 rABM2의 공동-발현이 상호작용하여 안정한 베타 시트 복합체화된 구조를 형성할 수 있음을 보여주었다. rABM2(1)은 rABM1(1) 또는 rABM1(2)와 안정적인 구조를 형성할 수 있었다. 보다 구체적으로, 접힌 ABM 도메인의 NMR 분광학 분석은 도메인이 ABM1 및 ABM2 모티프를 포함하는 베타-가닥 교환을 통해 다량체화됨을 나타낸다. 함께 이들 결과는 ABM 도메인을 함유하는 키메라와 변이체가 적절하게 접힌 ABM 도메인의 ABM1과 ABM2 모티프 간의 상호작용을 통해 다량체화될 것이라는 증거를 제공한다.

[0519] 이어서, 발명자들은 Kgp W50 다중단백질 상의 잔기 878-968을 포함하는 재조합 ABM21(rABM21) 단백질 내에서 ABM1 또는 ABM2의 특정 잔기를 돌연변이시키는 것을 목표로 하였다.

[0520] 이용가능한 모든 박테리아 게놈에서 Kgp ABM1 및 ABM2 서열의 BLAST 분석은 ABM1 및 ABM2 모티프 내의 하위 모티프가 모든 문에 걸쳐 매우 고도로 보존되어 있음이 밝혀냈다. 이어서 W83 게놈 내의 모든 ORF에 대한 ABM1 및 ABM2 서열의 정렬은 이들 잔기가 *P. 긴기발리스* 유전자에서 유사하게 고도로 보존된다는 것을 밝혀냈다. 보존된 프롤린 잔기를 갖는 "PVQN" 모티프는 *P. 긴기발리스*를 포함하여 문 전반에 걸쳐 고도로 보존되었다.

[0521] 온라인 프로그램을 사용한 제안된 3차 접힘의 분자 모델링은 이 "PVQN" 서열이 베타 시트 구조의 시작에 위치되었다는 것과 이 모티프("NEFA")의 바로 N 말단에 있는 서열은 구조화되지 않은 "루프"일 가능성이 가장 높은 것으로 밝혀졌다는 것을 밝혀냈다.

[0522] 발명자들은 rABM21의 PVQN 모티프 내의 잔기를 돌연변이시켰을 뿐만 아니라 PVQN 직전 루프 내의 잔기를 돌연변이시켰다. 베타 시트 구조에 선행하는 루프의 크기와 형상이 인접한 베타 시트 접힘의 강도에 영향을 미칠 수 있다고 믿었기 때문에 루프 내의 잔기를 표적화하였다. 이러한 "루프" 구조 내의 프롤린 잔기의 수와 위치는 인접한 베타 시트 상호작용과 관련이 있는 것으로 보고되었다.

[0523] 부가하여 발명자들은 각각 ABM2 및 ABM1에 존재하는 고도로 보존된 소수성 잔기 Y(878) 및 W(968)를 돌연변이시켰다. 발명자들은 또한 ABM1에서 모티프 NxFA의 서열 안에 SxYQ에 대한 치환을 도입하였다(아래 표 2에 언급된 SSEYQ 변이체 참조).

[0524] 돌연변이된 rABM21 변이체를 정제하고 다량체화하는 그 능력을 평가하였다. 발명자들은 안정한 단량체로서 정제될 수 있는 안정한 가용성 재조합 분자를 초래할 돌연변이를 식별하고자 노력하였다.

[0525] **표 2: DTT의 존재 또는 부재에서 NATIVE-PAGE 상에서 다량체를 형성하는 능력과 재조합 단백질 가용성의 요약.** (N/T = 테스트되지 않음)

재조합 단백질	37 °C에서 4h 동안 1M IPTG로 LB 에서 유도된 발현 균주에서 재조합체의 가용성.	다량체를 형성하는 능력(-DTT)	DTT 의 존재에서 다량체를 형성하는 능력
rABM213	매우 높음	+++++	+++++
rABM21	매우 높음	+++++	+++++
rABM21-Cys>Ser	매우 높음	+++++	+++++
rABM21-2XCys>Ser	매우 높음	+++++	+++++
rABM21-AVQN	매우 높음	+++++	+++++
rABM21-AVQA	매우 높음	+++++	+++++
rABM21-AVQP	매우 높음	++++	++
rABM21-AVQA-Cys>Ser	매우 높음	++++	++++
rABM21-AVQA-2X Cys>Ser	매우 높음	++++	++++
rABM21-AVQP-Cys>Ser	매우 높음	+	-
rABM21-AVQP-2X Cys>Ser	매우 높음	-	-
rABM21-PNPFA	매우 높음	+++++	N/T
rABM21-PSPYQ	매우 높음	+++++	N/T
rABM21-SSEYQ	매우 높음	++	N/T
rABM21--Y>A	매우 높음	+++++	N/T
rABM21-Y>A/W>A	매우 높음	-	N/T

[0526]

[0527] 모든 재조합 단백질(WT rABM213, rABM21 및 rABM21-돌연변이체 변이체)은 가혹한 유도 조건 하에서 고도로 가용성 재조합 단백질의 매우 높은 수준 발현을 생성하였다(표 2에 요약됨).

[0528] 천연 Page 분석(도 3b-e)을 받은 정제된 재조합 단백질은 rABM21이 2가지 메커니즘을 통해 다량체를 형성할 수 있음을 보여주었다: (1) ABM1 모티프 "PVQN"을 통한 다량체화 및 (2) 이황화 결합을 통한 다량체화.

[0529] rABM21에서의 AVQN 또는 AVQA에 대한 고도로 보존된 "PVQN" 모티프의 돌연변이는 다량체화를 제거하지 않았다.

[0530] "PVQN"의 AVQP로의 돌연변이는 DTT의 존재에서 다량체화에서 상당한 감소 및 DTT의 부재에서 다량체화에서 약간의 감소를 가져왔으며, 이는 PVQN에서 AVQP로의 변화만으로도 다량체화 감소에 어느 정도 영향을 미친다는 것을 시사한다.

[0531] ABM 도메인에서 시스테인 잔기 중 하나 또는 둘 모두의 세린으로의 치환과 조합한 AVQA 돌연변이는 다량체화에서 약간 감소를 초래하였다. ABM 도메인에서 시스테인 잔기 중 ***하나 또는 둘 모두***의 세린으로의 돌연변이와 함께 "PVQN"의 AVQP로의 돌연변이는 rABM21의 다량체화의 거의 또는 완전한 제거를 초래하였다.

[0532] 모델링된 "베타 시트 영역"의 ABM1 "PVQN" 모티프에 바로 선행하는 모델링된 "루프" 영역에서 잔기의 조작 및 돌연변이도 다량체화를 감소시킬 수 있었지만 완전히 제거하지는 못하였다. 보다 구체적으로, ABM1에서의 "SSEYQ" 치환(예를 들어 고도로 보존된 PVQN 모티프에 대해 바로 N 말단 SSEYQ로 서열 SNEFA의 변형)은 다량체화에서 유의한 감소를 초래하였다.

[0533] Tyr-889 및 Trp-964 잔기(각각 ABM2 및 1 내)의 돌연변이는 함께 또한 rABM21의 다량체화의 제거를 초래하였다.

[0534] ABM 도메인 내의 시스테인 잔기의 치환과 함께 "PVQN" 모티프의 AVQP로의 조작은 *대장균* pET 발현 시스템을 사용하여 가용성이 매우 높은 단량체 단백질의 발현 및 정제를 가능하게 하였다.

[0535] ABM21 도메인 내의 2개의 Cys 잔기가 온전한 원래 서열로 구성된 모든 키메라 후보군은 광범위한 래더링 다량체화를 입증하였다(도 3b 및 c). 그러나, AVQP 치환과 조합된 하나의 Cys 잔기의 치환이 다량체화에서 유의한 감소를 제공했음에도 불구하고 이들 두 Cys 잔기의 치환은 래더링 다량체화의 완전한 제거를 초래하지 않았다(도 3c 레인 15 및 16). 래더링 다량체화의 완전한 제거는 2개의 ABM 시스테인 잔기의 치환 플러스 모티프 PVQN의 AVQP로의 변경에 의해서만 달성되었다.

[0536] 흥미롭게도, 2개의 ABM 시스테인 잔기가 남아 있고 유일한 DUF 도메인 시스테인 잔기의 변경이 있거나 없는 KDAK-1V-AVQP(서열번호: 70) 및 KDAK-AVQP(서열번호: 71)는 환원 조건 하에서 다량체화를 유의하게 감소시켰다. 두 단백질은 감소되거나 감소되지 않은 천연 겔 상에서 본질적으로 동일한 프로파일을 공유하였다(도 3g). 분명하게, DUF 시스테인 잔기는 래더링 다량체화에 기여하지 않았지만 두 ABM 시스테인 잔기의 존재는 이들 두 변이체에서 래더링 다량체의 형성에 중요하였다. 이는 DUF 도메인 시스테인 잔기가 다량체화에 중요한 기여자가 아님을 시사한다.

[0537] 래더링 다량체화는 시스테인 잔기 및 PVQN 모티프의 변경에 의해 가능하지 않았지만 특정 조건 하에서 단량체 상태와 올리고머 상태 사이의 평형이 여전히 존재하였다. 이 종류의 평형은 크기 배제 크로마토그래피를 사용한 분석으로부터 온도, pH 및 농도 의존성인 것으로 밝혀졌다. 온도 증가, pH 감소 및 농도 감소는 단량체 상태에 유리한 것으로 밝혀졌다. His-태그의 존재는 단백질 상태의 평형에 대한 원인이 아니었다. SEC-MALS 분석은 선두 후보군에 대해 높은 안정성과 함께 2mg/mL 이하의 농도에서 용액에서의 단량체의 압도적인 존재를 보여주었다.

[0538] 연구 3: 활성 부위(KAS) 모티프

[0539] 추가 KAS 모티프를 재조합 키메라 변이체 상에 조작하여 이것이 면역원성에 영향을 미치는지 결정하였다. 단일 KAS 또는 2개의 연속 KAS가 그의 N 말단 또는 양 말단에서 변이체에 추가되었다. 더욱이, 각 KAS 모티프 사이에 DSSG 링커 서열을 함유하는 4개 KAS 잔기의 선형 서열도 선택된 변이체의 N 말단에 추가되었다.

[0540] 재조합체의 정제 프로파일 및 His 겔 염색 분석은 추가 KAS 잔기가 재조합 단백질의 일부 불안정성과 분해를 야기하였다는 것을 밝혀냈다. 분해 및 불안정성은 4x 선형 KAS 변이체에서 가장 높았으며, 이는 단백질용리 처리가 추가 KAS 서열 내에서 발생하고 있음을 시사한다. 인접한 KAS 서열 사이의 DSSG 링커의 후속적인 제거는 안정성을 개선하지 않았다.

[0541] 따라서, 연속적인 다중 KAS 서열이 선형 서열로 발현될 때 이들 변이체는 단백질용리 처리되기 쉽다는 결론이 내려졌다. 일 또는 양 말단에서 단일 KAS가 있는 가용성 변이체는 상대적으로 안정적이고 분해에 대한 경향이 덜 하고 정제 수율이 저하되는 경향이 덜 하다.

[0542] 연구 4: 대규모 단백질 수율 및 안정성

[0543] 가용성 단백질로 발현되고 비-변성 조건 하에서 정제된 대부분의 재조합 단백질은 상대적으로 높은 그 최종 생성물 수율을 가졌다(> 10mg/L 배양물). 그들 중 일부는 심지어 20mg/L 배양물 이상의 수율에 도달하였다. 특히, His-태깅된 KDAK-1V2S-AVQP 단백질(서열번호: 59, His 태그 제외)은 2 YT 풍부 배지에서 발현되었을 때 45mg/L 배양물의 수율을 가졌다. 가장 주목할 만한 수율은 Terrific Broth(TB)에서 발현된 태그가 없는 KDAK-1V2S-AVQP(서열번호: 59)와 KDAK-3S-AVQP(서열번호: 69)의 정제된 최종 생성물에 대해 나타났고 LB 또는 2YT 배지에서 성장한 세포의 경우보다 다수 배인, 각각 80 및 60mg/L 배양물 이상의 생산을 가졌다. 표적 단백질 생산에서의 이 유의한 개선은 세포가 TB에서 성장할 때 세포의 높은 성장률과 높은 세포 밀도에 기인하였다.

[0544] 의도적으로 이를 변성시키는 조건(예를 들어 요소) 하에서 봉입체 또는 가용성 분획으로부터 정제할 때 이들 동일한 재조합 단백질의 수율은 훨씬 낮았다(2.1-3.6mg/L 배양물). 변성된 단백질은 변성 조건 하에서 Ni-친화성 수지에 대한 낮은 결합 친화성을 가지고 비-변성 완충액에서 최종적으로 평형화될 때 낮은 가용성을 가진다는 것이 주목되었다. 부가하여, 그의 변성된 형태로부터 정제된 변이체는 단백질이 처음에 수용성 단백질로 발현되었는지, 불용성 형태로 발현되었는지와, 사전팩킹된 컬럼을 사용하거나 느슨한 Ni-NTA 수지를 사용하여 정제되었는지와 관계없이 완충되지 않은 식염수에서 불안정하였다. 이들 결과는 변성제가 필요하지 않은 경우에는 그의 사용을 줄이거나 피하는 것이 바람직할 수 있음을 시사한다.

[0545] 16℃에서 낮은 발현 온도는 KDAK1(서열번호: 66)과 같은 빈약하게 가용성 단백질의 가용성 발현을 개선하는 데 효과적인 것으로 입증되었다. 그럼에도 불구하고, 음이온 교환 정제 동안 낮은 이온 강도의 완충액에서 컬럼 상에 농축은 4℃의 낮은 온도에서도 컬럼 상에 응집이나 침전에 기인하여 수율을 현저히 손상시켰다. 이들 단백질의 경우, 음이온 교환 단계를 우회하는 정제는 더 높은 수율을 초래하였으며, 예를 들어 이 방식으로 생산하면 KDAK1의 수율이 두 배가 되었다. 또한 KDAK1n(서열번호: 65)이 가용성 단백질로 발현되었으나, 단지 2.3mg/L 배양물의 수율로 이후 정제 과정에서 용액에서 안정한 것으로 보이지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0546] K1이 불용성이고 KDA 또는 DA에 K1 또는 K1n의 첨가는 대규모 정제에서 재조합 변이체의 가용성을 감소시킨다는 점을 고려하면, 위에서 언급한 바와 같이 K1 영역이 K1-함유 키메라 변이체의 불안정성에 원인이 될 수 있어 도메인이 보호에 필요하지 않은 경우 K1의 배제가 바람직한 것으로 보인다.

[0547] 겔의 His 염색은 다중 KAS(K) 잔기를 함유하는 영역 내에서 분해가 있었음을 확인했지만, Ni-친화성 크로마토그래피에 의한 수율에 대한 부정적인 영향은 관찰되지 않았다. 예를 들어, 3가지 보호 항원인, KKDAK1nKK(서열번호: 78), KKDAKK(서열번호: 54) 및 KDAK1nK-4S-AVQP(서열번호: 63)는 그의 최종 생성물에서 예상되는 전체-길이 단백질 종의 90% 이상으로 12-21mg/L 배양물의 범위인 수율을 가졌다.

[0548] 환원 조건은 우레아를 사용하여 봉입체로부터 불용성 KDcAK1n의 추출에 유리한 것으로 밝혀졌다. 환원 조건 하에서의 것보다 비-환원 조건 하에서 더 높은 농도의 우레아가 필요하였다. 분명하게, 변성 조건 하에서 이황화 결합의 형성은 단백질 가용성에 부정적인 영향을 미쳤다. 흥미롭게도, KDcAK1n 키메라 대 세린으로 돌연변이된 4개의 시스테인 잔기 모두를 갖는 키메라(서열번호: 56)의 천연 PAGE 겔 분석은 돌연변이된 KDcAK1n 키메라에서 이황화 결합의 제거가 단지 베타-가닥 교환 다량체화가 발생하는 것과 일치하는 천연 PAGE에서 보다 명확한 래더 형성을 초래했음을 보여주었다. 더욱이, 키메라 돌연변이체 KDcAK1n PVQN>AVQP/4 Cys> Ser 변이체(서열번호: 57)는 우레아에서 동일한 비-환원 변성 조건 하에서 KDcAK1n보다 더 높은 가용성를 나타내었다.

[0549] His-태깅된 KDAK-1V2S-AVQP와 같은 일부 가용성 단백질의 농도는 적어도 40mg/mL에 도달할 수 있었다. 2개의 리드 태그가 없는 후보군 서열번호: 59 및 서열번호: 69(KDAK-1V2S-AVQP 및 KDAK-3S-AVQP)는 각각 pH 6.5에서 용액을 완충하는 웰에서 최대 30mg/mL 및 16mg/mL 이상 농축되었고, 이들 농도는 여전히 최대값이 아니다.

[0550] 대조적으로, 봉입체로부터 정제된 C-말단 His-태깅된 원래 키메라(KDcAK1n) 및 그의 변이체 KDcAK1n-4S는 완충되지 않은 식염수에서 가장 적은 안정성이었다. 식염수에서 KDcAK1n 및 KDcAK1n-4S의 도달가능한 최고 농도는 각각 1.35mg/mL 및 2.3mg/mL였다. 분명하게, 비-특이적 이황화 결합 형성은 키메라의 유의한 단백질 응집과 낮은 가용성에 대한 요인 중 하나였다. KDcAK1n-4S에서 Cys 잔기의 제거는 분자간 이황화 결합의 형성을 가능하지 않게 했고 단백질 가용성을 개선하였다.

[0551] C-말단 His-태그는 동일한 조건 하에서 단백질을 발현시켰을 때 단백질 생성 및 가용성에 상당한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0552] 태그가 없는 후보군의 정제에서 음이온 교환 크로마토그래피가 표적 단백질을 농축했지만, 이 단계는 대부분의

대장균 단백질이 표적 단백질에 가까운 pI를 가지는 이들 중 다수가 갖는 4-7의 pI 범위에서 산성이기 때문에 수지에 대한 밀접한 결합 친화성에 기인해 *대장균* 숙주의 것으로부터 표적 단백질을 효율적으로 분리할 수 없었다. 그러나, 흥미롭게도 1M $(NH_4)_2SO_4$의 완충액을 사용한 실온에서의 크기 배제 크로마토그래피는 중요한 단계인 것으로 나타났고 *대장균*의 것으로부터 표적 단백질의 고도로 효율적인 분리를 제공하였다. 소수성 상호작용과 제2 라운드의 크기 배제 크로마토그래피로의 추가 정제 후, 두 리드 태그가 없는 후보군 모두는 높은 균질성으로 99%의 순도로 정제되었으며, 이는 SDS-/천연 PAGE 및 SEC-MALS 분석에 의해 입증되었다.

[0553] **표 3: *대장균*에서 발현된 재조합 Kgp 키메라 및 단편의 요약**

명칭	코멘트	다량체[예/아니오]	(20ml 내지 200ml 에서 가용성)		His 염색 분해
			37°C, 0.2 내지 0.5 mM IPTG	16°C-30°C, 0.2 - 0.5 mM IPTG	
K1	CAD 도메인 SEQ ID 12	NA	(-)	(-)	테스트되지 않음
DUF	DUF2436 도메인 (서열번호: 23)	아니오	(+++)		테스트되지 않음
DUF-ABM213	DUF2436 도메인 플러스 ABM (서열번호): 34)	예	(+++)		테스트되지 않음
ABM213	ABM2+1+3 (서열번호: 18)	예	(+++)		테스트되지 않음
ABM21	서열번호: 16	예	(+++)		테스트되지 않음
ABM21-2S-AVQP	서열번호: 16 시스테인에서 세린 변형 플러스 AVPQ 가짐	아니오	(+++)		테스트되지 않음
KDcAK1n	서열번호: 64 (절삭된 DUF, 절삭된 CAD 도메인, 시스테인 또는 AVPQ 치환 없음)	예	(-)	(-)	(-)
KDcAK1n-4S	절삭된 DUF, 절삭된 CAD 도메인 (4C>4S)	예	(-)	(-)	테스트되지 않음
KDcAK1n-4S-AVQP	절삭된 DUF, 절삭된 CAD 도메인 (4C>4S) +PVQN>AVQP	아니오	(-)	(-)	(-)

[0554]

[0555]

KA	KAS 도메인 플러스 ABM 2+1+3, DUF 도메인 없음	테스트되지 않음	(+++)	(+++)	(+/-)
KDA	KAS 도메인, 전체 길이 DUF, ABM 2+1+3, CAD 도메인 없음	예	(+++)	(+++)	(+/-)
KDAK1n	전체 DUF 도메인 및 절삭된 CAD 도메인 포함	예	(+/-)	(+++) {30°C}	(-/+)
KDAK1	전체 DUF 도메인 및 전체 길이 CAD 도메인	예	(-)	(++) {16°C}	(+/-)
KDA-3S-AVQP	KDA 돌연변이체	아니오	(+++)		(+/-)
KDAK1n-4S-AVQP	KDAK1n 돌연변이체	아니오	(++)	(+++) {30°C}	(-/+)
KKA	링커 없는 N-말단에 이중 KAS	테스트되지 않음	(+++)		(+++)
KKDA	"	(+)	(+++)		(++)
KKDAK1n	"	(+)	(+/-)	(+++) {30°C}	(+)
KDAK	링커 없는 양 말단에 KAS	예	(+++)		(+)
KDcAK1nK	"	예	(-)	(-)	(+)
KDAK1nK	"	예	(+/-)	(+++) {30°C}	(+)
KDAK-3S-AVQP	"	아니오	(+++)		(+)
KDAK-3S	N/A	예	(+++)	N/A	N/A
KDAK-2S-AVQP	N/A	아니오	(+++)	N/A	N/A

KDAK-1V2S-AVQP	N/A	아니오	(+++)	N/A	N/A
KDAK-1V-AVQP	N/A	아니오	(+++)	N/A	N/A
KDAK-AVQP	N/A	최소	(+++)	N/A	(N/A)
KDcAK1nK-4S-AVQP	"	아니오	(-)	(-)	(+)
KDAK1nK-4S-AVQP	"	아니오	(++)	(+++) (30°C)	(+)
KKAKK	DSSG 링커 있는 N & C에 이중 KAS	예	(+++)		(+++)
KKDAKK	"	예	(+++)		(++)
KKDcAK1nKK	"	예	(-)	(-)	(+)
KKDAK1nKK	"	예	(+/-)	(+++) (30°C)	(+)
KKDAK1KK	"	예	(-)	(++) (16°C)	(+)
KKKKA	DSSG 링커 있는 N-말단에 4XKAS	예	(+++)		(++++)
KKKKDA	"	예	(+++)		(+++)
KKKKDcAK1n	"	예	(-)	(-)	(+++)
KKKKDAK1n	"	예	(+/-)	(+++) (30°C)	(+++)
KKKKDAK1	"	예	(-)	(++) (16°C)	(++)

[0556]

[0557] 연구 5: DUF 도메인 및 KAS 도메인의 중요성 평가

[0558] 본 연구에서, 발명자들은 키메라 융합 단백질에서 DUF 도메인의 중요성을 결정하고 이를 아르기닌-의존성 긴기 페인에서 유래된 활성 부위 서열을 포함하는 작제물의 가용성/안정성과 비교하기 위해 다양한 작제물(항원)을 테스트하였다. 생산된 작제물은: KDAK-3S-AVQP; KDAK-2S-AVQP(His 태그), KAK-2S-AVQP(His 태그) 및 KDAR-3S-AVQP(His 태그)였다.

[0559] *단백질 생산 및 수율*

[0560] 모든 항원이 잘 발현되었다. KDAK-2S-AVQP 작제물에서 DUF 도메인 내의 나머지 하나의 시스테인 잔기는 단백질 가용성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0561] 후보군 KDAR-3S-AVQP를 함유하는 RAS는 다른 항원보다 가용성이 낮았으며 이는 RAS 서열과 단백질 구조의 간섭을 나타냈지만 여전히 후속 마우스 모델 실험에 사용될 수 있었고 가용성 분획으로부터 비-환원 조건 하에서 정제될 수 있었다.

[0562] 모든 항원은 가용성 분획으로부터 비-환원 조건 하에 정제되었다. 3개의 His-태깅된 단백질은 Ni 친화성, 음이온 교환 및 크기 배제 크로마토그래피를 통해 정제되었다. KDAK-3S-AVQP(비태깅됨)는 음이온 교환, 소수성 상호작용 및 크기 배제 크로마토그래피를 통해 정제되었다. 정제된 항원의 수율은 높았다. His-태깅된 3가지 단백질 중에서 KDAK-2S-AVQP-His6이 가장 높은 수율을 가졌다(>160mg/L 배양물, 20mg/g 습윤 세포).

[0563] C-말단 His-태그는 단백질이 동일한 조건 하에서 발현되었을 때 단백질 생성 및 가용성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 이는 His-태그의 존재가 단백질 핵심 구조를 방해하지 않음을 시사한다.

[0564] 대조적으로, KDAR-3S-AVQP-His6 항원은 그의 낮은 가용성로 인해 더 낮은 수율(55mg/L 배양물, 7.2mg/g 습윤 세포)을 가졌다. 가장 작은 분자량을 갖는 항원 KAK-2S-AVQP-His6은 106mg/L 배양물(14mg/g 습윤 세포)의 수율을 가졌다. 모든 항원의 식별은 온전한 단백질 MS 분광법에 의해 확인되었으며, 제1 Met 잔기는 누락되었다.

[0565] His-태깅된 단백질의 경우, RAS 함유 항원에 비해 KAS 단독 항원의 더 높은 가용성은 Ni-친화성 정제 단계에서 His-태깅된 단백질의 용리 프로파일에서의 피크 강도로부터 반영되었다. 그럼에도 불구하고, RAS 항원이 순수할 때 그것은 또한 고도로 가용성이어서 적어도 15mg/mL까지 농축될 수 있었다.

[0566] 이들 단백질은 지금까지 15-33mg/mL 범위로 농축되었지만 그의 높은 가용성로 인해 더 높은 농도로 훨씬 더 농축될 수 있다.

[0567] *올리고머화*

[0568] 일부 약간의 밴드가 KAK-2S-AVQP-His6 및 KDAR-3S-AVQP-His6의 음이온 교환 분획의 SDS 겔 상에서 각 주요 전체-길이 표적 단백질 아래에서 관찰될 수 있었는데, 이는 이들 두 단백질에서 약간의 분해가 발생했음을 시사한다. 대부분의 분해물은 본질적으로 크기 배제 크로마토그래피에 의해 제거되었으며 각 단백질에 대한 고품질의 최종 생성물이 얻어졌다(도 13). 그럼에도 불구하고, DUF 도메인을 함유하지 않은 작제물(KAK-2S-AVQP-His6)은 그 최종 생성물에 지속되는 더 심각한 분해를 가졌으며(도 13), 이는 DUF 도메인이 분해로부터 일정 수준의 보호를 제공할 수 있음을 시사한다.

[0569] KAK-2S-AVQP-His6에서의 두 종과 KDAR-3S-AVQP-His6에서의 단량체 형태 아래의 래더링 분자량의 종은 이전 Ni-친화성 크로마토그래피에서도 볼 수 있듯이 AIEX에서의 하나의 주요 피크에서 공동-용리되었다.

[0570] 그 크기 배제 테일링 프로파일에서 KAK-2S-AVQP-His6 및 KDAR-3S-AVQP-His6 둘 모두의 약간 비대칭인 주요 피크는 분해물의 존재의 징후일 수도 있다.

[0571] 이러한 분해는 KDAK-2S-AVQP-His6의 경우 명확하게 나타나지 않았다(예를 들어 도 13). RAS의 존재는 단백질을 불안정화하고 DUF 도메인은 단백질을 더욱 안정하게 만드는 것으로 나타났다.

[0572] 약간의 분해가 발생할 수 있지만, KAK-2S-AVQP-His6을 제외한 모든 최종 생성물은 높은 순도와 높은 균질성을 가졌으며, 이는 SEC-MALS 분석에 의해서도 뒷받침되었다. SEC-MALS는 이들 모든 단백질에 대해 2mg/mL의 용액에서 단량체의 우세한 존재를 나타냈다(데이터는 표시되지 않음). KDAK-3S-AVQP 및 KDAK-2S-AVQP-His6은 4개의 항원 중에서 더 높은 품질을 갖는 것으로 나타났으며, KAK-2S-AVQP-His6은 SDS-PAGE 분석에 따르면 최소 균질성이 있는 것으로 보였지만 소수 종은 SEC-MALS 분석에서 분석되지 않았다(예를 들어 도 13).

[0573] **실시예 3: 동물 연구**

[0574] **치주염의 마우스 모델에서 *P. 긴기발리스* 뼈 손실의 예방**

[0575] 1. 실험 1

[0576] 테스트된 항원: KDcAK1n 50㎍; KDcAK1n 0.5㎍; KDA 50㎍; KDA 0.5㎍; KDAK1 50㎍; KDAK1 0.5㎍. 모든 항원은 PBS(pH 7.4)에서 명반 상에 흡수되었다.

[0577] KDcAK1n: 봉입체로부터, Ni-NTA 수지로 배치 정제하고 이어서 비-환원 조건 하에서 2M 우레아-PBS로 투석한다.

[0578] KDA 및 KDAK1: 가용성 분획으로부터, Ni-친화성(사전팩킹된 컬럼) 및 구배 용리를 갖는 음이온 교환 크로마토그래피에 이어서 비-환원 조건 하에서 PBS로 투석한다.

[0579] *마우스 상악골에서 P. 긴기발리스-유도된 치조골 손실*

[0580] KDcAK1n과 KDA는 동물 모델에서 뼈 손실을 방지하였다. KDcAK1n은 테스트된 두 농도 모두에서 뼈 손실을 방지한 반면 KDA는 50㎍에서만 보호하였다(도 4). KDAK1에 대한 데이터는 표시되지 않는다.

[0581] *항체 반응*

[0582] 치주염 모델에서 면역화된 마우스의 혈청 항체 서브클래스 반응을 ELISA에 의해 검사하였다. 항혈청을 사용하여 열 사멸된 *P. 긴기발리스* 균주 W50을 흡수된 항원으로 조사하였다. 항체 반응은 획득된 ELISA 역가 마이너스 배경 수준의 3배로 표현되며, 각 역가는 10마리 개별 마우스의 평균 ± s.d.를 나타낸다(도 5). KDcAK1n(도 5에서 "키메라"로 지칭됨)과 KDA는 *P. 긴기발리스* 전체 세포에 대해 가장 강력한 총 IgG 및 IgG1 반응을 유도했고 그 다음에 KDAK1이 이어졌다. 50㎍에서 테스트한 항원 간에 IgG 및 IgG1 항체 반응에서 유의미한 차이는 없었다.

[0583] 2. 실험 2

[0584] 테스트된 항원: KDcAK1n 50㎍; KDcAK1n 0.5㎍; KDA 50㎍; KDA 0.5㎍; KDAK1 50㎍; KDAK1 0.5㎍. 모든 항원은 식염수(pH 7.4)의서 명반 상에 흡수되었다.

[0585] 항원은 실험 1에 대해서와 동일한 방법으로 정제되었다.

[0586] *마우스 상악골에서* P. 긴기발리스-*유도된 치조골 손실*

[0587] 이 실험에서는 실험 1과 동일한 항원을 조사하였다; 그러나, 그것은 PBS 대신 식염수를 사용하여 명반 상에 흡수되었다. 뼈 손실 결과는 실험 1과 KDcAK1n 및 KDA만이 보호를 보인 도 4(데이터는 표시되지 않음)를 반영했으

며, 이는 명반 제조를 위해 PBS 또는 식염수를 사용하는 것이 실험 결과에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

[0588] *항체 반응*

[0589] 테스트된 모든 항원은 전체 세포 *P. 긴기발리스*에 대해 유사한 총 IgG 및 IgG1 반응을 유도하였다. KDA와 KDAK1은 KDcAK1n에 비해 더 강한 IgG2a 반응을 유도하였다(표시되지 않음).

[0590] 3. 실험 3

[0591] 테스트된 항원: KDcAK1n을 제외한 모든 항원은 기술된 대로 분획화되었다: KDcAK1n(이량체); KDcAK1n(다량체); KDcAK1n(키메라, 원본); KDcAK1n-4S-AVQP; KDA(이량체); KDA(다량체).

[0592] KDcAK1n-4S-AVQP, KDcAK1n 이량체 및 다량체: 봉입체로부터 추출된 우레아, 환원 조건 하에서 2개의 KDcAK1n 샘플로 Ni-친화성 컬럼 정제에 이어서 겔 여과 정제하였다.

[0593] KDA 이량체 및 다량체: 가용성 분획으로부터, 비-환원 조건 하에서 Ni-친화성 컬럼 정제에 이어서 음이온 교환 및 겔 여과 정제하였다.

[0594] KDcAK1n: 실험 1에서와 같이 정제하였다.

[0595] P. 긴기발리스 *에피토프에 대한 mAb로의 백신 후보군의 사전-스크리닝*

[0596] 동물 모델에 대한 항원 적합성을 결정하기 위한 사전-스크리닝 검정을 개발하기 위해, 항원을 KAS2, ABM2, ABM3 및 EP1에 대한 mAb를 사용하여 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 음성 대조군 muBM4 mAb와 비교하여 큰 적정 곡선에서 알 수 있듯이, 모든 백신 후보군은 KAS2, ABM3 및 EP1 mAb에 결합할 수 있었다. KDcAK1n 및 KDcAK1n-4S-AVQP는 ABM2 mAb에 결합했지만 KDcAK1n 이량체, KDcAK1n 다량체, KDA 이량체 및 KDA 다량체는 결합하지 않았으며 - 이는 이 mAb가 인식하는 에피토프가 이들 구조에서 접근할 수 없음을 나타낸다(표시되지 않음).

[0597] *마우스 상악골에서* P. 긴기발리스*-유도된 치조골 손실*

[0598] 2x His 태그가 있는 KDcAK1n과 별도로, 단일 His 태그가 있는 KDcAK1n을 포함한 분획화된 항원 중 어느 것도 *P. 긴기발리스*-유도된 뼈 손실로부터 보호되지 않았지만(도 6), 단일 His 태그 키메라(KDcAK1n)의 정제된 이량체종에 의한 보호에 대한 경향은 있었다(유의하지 않음).

[0599] *항체 반응*

[0600] 치주염 모델에서 면역화된 마우스의 혈청 항체 서브클래스 반응을 ELISA에 의해 검사하였다. 항혈청을 사용하여 열 사멸된 *P. 긴기발리스* 균주 W50을 흡수된 항원으로 조사하였다. 테스트된 모든 항원은 다양한 정도로 IgG 반응을 생성하였다. KDcAK1n 다량체와 KDA 다량체는 강력한 IgG1 아이소타입 반응을 생성하였다.

[0601] 모아진 혈청 샘플을 사용하여 ELISA 플레이트 상에 흡수된 *P. 긴기발리스* 도메인을 조사하였다(표시되지 않음). ABM21(다량체 및 이량체) 및 ABM213(다량체 및 이량체)에 대한 총 IgG 반응은 KDcAK1n-4S-AVQP 및 KDA 이량체를 제외한 모든 항원에 의해 생성되었다.

[0602] DUF2436에 대한 IgG 반응은 KDA(이량체 및 다량체)인 - 전체 DUF 도메인이 있는 모델에서 테스트된 유일한 항원에서만 분명하였다. 모아진 혈청 샘플을 또한 사용하여 *P. 긴기발리스* 에피토프 펩티드를 조사하였다(표시되지 않음). 보호 혈청과 비-보호 혈청 사이에는 명확한 패턴이 관찰되지 않았다.

[0603] *비보호 정제된 이량체 및 다량체 항원의 분석*

[0604] 환원 및 비-환원 천연 및 SDS PAGE를 사용하여 실험 3에서 보호를 제공하지 않은 음이온 교환 및 겔 여과 정제된 단일 KDA 이량체 및 다량체 종의 분석은 두 경우 모두에서 정제된 단일 종이 안정한 종으로 이황화 고정된 이황화 가교 변성된 도메인이었다는 것을 밝혀냈다. 이 분석은 이들 분자량 종이 안정적이고 음이온 교환 및 겔 여과 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있는 이유를 설명한다.

[0605] 4. 실험 4

[0606] 테스트된 항원: KKDA1nKK; KDAK1n; KDAK1nK-4S-AVQP; KKDAKK.

[0607] 모든 항원은 음이온 교환 크로마토그래피를 사용함이 없는 KDAK1nK-4S-AVQP를 제외하고 Ni-친화성 컬럼, 음이온 교환 및 겔 여과 크로마토그래피로 비-환원 조건 하에서 가용성 분획으로부터 정제되었다.

[0608] *명반 흡수*

[0609] 항원을 흡수하는 알히드로겔 2%의 능력은 항원을 명반과 60분 동안 4℃에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션함에 의해 테스트하였다. 명반을 펠렛화하고 명반 흡수 전 및 후 항원에 대해 브래드포드 단백질 검정을 그 다음 수행하였다. 모든 항원은 91.7% 내지 99.3%의 백분율로 명반에 결합하였다. SDS-PAGE 겔은 명반 흡수 전 및 후 샘플에 대해서도 적용되었고 브래드포드 검정 단백질 결정과 일치하였다.

[0610] *P. 긴기발리스 에피토프에 대해 mAb로 백신 후보군의 사전-스크리닝*

[0611] 음성 대조군 muBM4 mAb와 비교하여 큰 적정 곡선에서 알 수 있듯이, 모든 백신 후보군은 KAS2, ABM3 및 EP1 mAb에 결합할 수 있었다. KDAK1nK-4S-AVQP는 ABM2 mAb에 결합했지만 KKDA1nKK, KDAK1n 및 KKDAKK는 결합하지 않았으며 - 이는 이 mAb가 인식하는 에피토프가 이들 구조에서 접근할 수 없음을 나타낸다(표시되지 않음).

[0612] *마우스 상악골에서* P. 긴기발리스 *유도된 치조골 손실*

[0613] KKDAK1nKK, KDAK1nK-4S-AVQP 및 KKDAKK는 *P. 긴기발리스*-유도된 뼈 손실을 보호하였다(도 7).

[0614] *항체 반응*

[0615] 치주염 모델에서 면역화된 마우스의 혈청 항체 서브클래스 반응을 ELISA에 의해 검사하였다. 항혈청을 사용하여 열 사멸된 *P. 긴기발리스* 균주 W50을 흡수된 항원으로 조사하였다. 테스트된 모든 항원은 다양한 정도의 IgG 반응을 생성하였다. 보호적 KKDAK1nKK와 KKDAKK는 열-사멸된 *P. 긴기발리스*에 대해 강력한 총 IgG 및 IgG1 반응을 유도하였다. 흥미롭게도, 뼈 손실을 보호하는 KDAK1nK-4S-AVQP는 일부의 덜 보호적인 항원(KDAK1n)보다 전체 세포 *P. 긴기발리스*에 대한 항체 반응이 더 낮았다.

[0616] 모아진 혈청 샘플을 사용하여 ELISA 플레이트 상에 흡수된 *P. 긴기발리스* 도메인을 조사하였다. ABM21(다량체 및 이량체) 및 ABM213(다량체 및 이량체)에 대한 총 IgG 반응은 모든 항원에 의해 다양한 정도로 생성되었다. DUF2436에 대한 IgG 반응은 전체 DUF 도메인(KKDAK1nKK, KDAK1n, KDAK1nK-4S-AVQP 및 KKDAKK)을 함유하는 항원에서만 명백하였다. 모아진 혈청 샘플은 또한 *P. 긴기발리스* 에피토프 펩티드를 조사하는 데 사용되었고 보호적 항혈청에서 높은 KAS 역가에 대한 명백한 경향이 있었지만 보호와 비-보호 사이의 명확한 패턴은 관찰할 수 없었다.

[0617] 5. 실험 5

[0618] *테스트된 항원*

[0619] 모든 항원은 Ni-친화성 크로마토그래피를 사용한 비-환원 조건 하에서 정제하고 이어서 식염수로 투석하였다.

[0620] KDcAK1n - 봉입체로부터, 우레아 및 친화성 컬럼을 사용하여 정제됨(IB, 우레아, AC); KDA - 가용성 분획으로부터 친화성 컬럼 정제됨(S, AC); KDA - 가용성 분획으로부터, 우레아 및 친화성 컬럼을 사용하여 정제됨(S, 우레아, AC); KDA - 가용성 분획으로부터, 우레아 및 배치 정제 방법 사용(S, 우레아, 배치); KDAK1 - 가용성 분획으로부터, 우레아 및 친화성 컬럼을 사용하여 정제됨(S, 우레아, AC); KDAK1 - 봉입체로부터, 우레아 및 친화성 컬럼을 사용하여 정제됨(IB, 우레아, AC); KDAK1 - 봉입체로부터, 우레아 및 배치 정제 방법 사용(IB, 우레아, 배치).

[0621] P. 긴기발리스 *에피토프에 대해 mAb로 백신 후보군의 사전-스크리닝*

[0622] 음성 대조군 muBM4 mAb와 비교하여 큰 적정 곡선에서 볼 수 있듯이, 모든 후보군은 KAS2, ABM3 및 EP1 mAb에 결합할 수 있었다. 항원 중 어느 것도 ABM2 mAb에 결합하지 않았는데, 이는 이 mAb가 인식하는 에피토프가 이들 작제물에서 접근가능하지 않음을 나타낸다(표시되지 않음).

[0623] *마우스 상악골에서* P. 긴기발리스 *유도된 치조골 손실*

[0624] KDcAK1n(IB, 우레아, AC), KDA(S, AC), KDAK1(S, 우레아, AC), KDAK1(IB, 우레아, AC) KDAK1(IB, 우레아, 배치) 및 KDA(S, 우레아, 배치)는 최고의 보호를 제공하는 KDcAK1n(IB, 우레아, AC), KDA(S, AC) 및 KDAK1(IB, 우레아, 배치)로 뼈 손실에 대한 유의한 보호를 나타냈다. KDA(S, AC)에서 관찰된 유의한 보호는 우레아로 변성, 예를 들어 KDA(S, 우레아, AC)에서 손실되었다는 것을 주지해야 한다(도 8).

[0625] 분획화되지 않은 친화성-정제된 항원이 뼈 손실의 보호를 제공하였다는 점, 특히 친화성 정제된 가용성 KDA로 우수한 보호가 관찰되었지만 이 보호는 변성된 D와 A 도메인의 이황화 교차 연결을 촉진하는 산화 조건 하에서 우레아로의 처리 시 부분적으로 손실되었다 점은 주목할 만하다. 다시 이들 결과는 변성된 도메인의 이황화 가교가 항원-유도된 보호를 파괴할 수 있어, 우레아를 피해야 하고 가용성 접힌 도메인의 제조가 선호되어야 함을

시사한다.

[0626] 6. 실험 6

[0627] *테스트된 항원*

[0628] 모든 항원은 Ni-친화성 크로마토그래피를 사용하여 비-환원 조건 하에서 정제하고 이어서 식염수 안으로 투석하였다. 테스트된 항원은: KDcAK1n - 봉입체로부터, 우레아 및 친화성 컬럼을 사용하여 정제됨(IB, 우레아, AC); KDAK-3S-AVQP, KDAK1nK, KDAK1n-4S-AVQP, KDAK, KKDAKK, KKDAK1nKK이었다.

[0629] *마우스 상악골에서* P. 긴기발리스 *유도된 치조골 손실*

[0630] 테스트된 모든 항원은 *P. 긴기발리스*-유도된 뼈 손실을 보호하였다(도 9).

[0631] 7. 실험 7

[0632] *테스트된 항원*

[0633] 이 실험에서, 발명자들은 4S, 3S, 4S-AVQP 및 3S-AVQP 돌연변이에 기반한 몇 가지 새로운 작제물을 테스트하였다: KDcAK1n(종래 기술 키메라), KDcAK1n-4S, KDAK, KDAK-3S, KDAK-3S-AVQP, KDAK1nK-4S-AVQP.

[0634] 모든 항원은 His-태그를 갖고 있으며 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제되었다. 중량-대-중량 비율로 동등한 부피의 명반을 단백질에 첨가함에 의해 항원을 명반 상에 흡수시켰다. 명반:단백질 화합물을 일정한 혼합으로 4℃에서 인큐베이션 이전에 IP 또는 SC 주입에 적합한 농도(0.5mg/mL)로 조정하였다. 마우스에 그 다음 IP(백신접종 1) 또는 SC(백신접종 2)를 주사하였다. 모든 항원은 Ni-친화성 크로마토그래피를 사용하여 비-환원 조건 하에서 정제하고 이어서 식염수 안으로 투석하였다.

[0635] *마우스 상악골에서* P. 긴기발리스 *유도된 치조골 손실*

[0636] 나이브(비-챌린지) 대조군과 비교하여, KDcAK1n, KDAK-3S-AVQP 및 KDAK를 주사한 동물은 유의한 뼈 손실을 전개하지 않았다(도 10). KDAK1nK-4S-AVQP는 부분적인 보호를 제공하였다. 감염된 대조 마우스는 유의한 수준의 치조골 손실을 전개하였다(도 10).

[0637] 결과는 대조군 챌린지(### p<0.05, #### p<0.01, ###), 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3)와 통계적으로 달랐다(도 10).

[0638] 8. 실험 8

[0639] *테스트된 항원*

[0640] 이 실험에서, 발명자들은 1V, 1V-2S, 3S 및 AVQP 돌연변이의 상이한 순열에 기반한 몇 가지 새로운 작제물을 테스트하였다: KDcAK1n(종래 기술 키메라), KDAK-3S-AVQP, KDAK-1V-2S-AVQP, KDAK-1V-AVQP 및 KDAK-AVQP.

[0641] 모든 항원은 His-태그를 갖고 있으며 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제되었다. 중량-대-중량 비율로 동등한 부피의 명반을 단백질에 첨가함에 의해 항원을 명반에 흡수시켰다. 명반:단백질 화합물을 일정한 혼합으로 4℃에서 인큐베이션 이전에 IP 또는 SC 주입에 적합한 농도(0.5mg/mL)로 조정하였다. 마우스에 그 다음 IP(백신접종 1) 또는 SC(백신접종 2)를 주사하였다.

[0642] *마우스 상악골에서* P. 긴기발리스 *유도된 치조골 손실*

[0643] 키메라(KDcAK1n), KDAK-3S-AVQP, KDAK-1V-2S-AVQP, KDAK-1V-AVQP 또는 KDAK-AVQP로 면역화된 마우스는 감염된 대조군에서의 마우스보다 유의하게 낮은 뼈 손실을 전개하였다(도 11). 감염된 대조 마우스는 나이브 마우스에 비해 유의한 수준의 치조골 손실을 전개하였다. (통계 분석은 일원 ANOVA 및 사후검정 Dunnet의 T3에 의하였다. * = p<0.05; 대조군 챌린지 그룹에 비교함).

[0644] 9. 실험 9

[0645] *테스트된 항원*

[0646] 이 실험에서, 발명자들은 His-태그의 사용 없이 정제된 항원을 도입하는 것뿐만 아니라 다양한 농도에서 1V-2S, 3S 및 AVQP 돌연변이의 상이한 순열을 갖는 여러 작제물을 테스트하였다.

[0647] 그룹은 또한 단백질의 항원성에 대한 명반의 영향을 결정하기 위해 포함되었다. His-태그가 있는 항원은 모두 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제하였고, His-태그를 갖지 않는 항원은 방법 섹션에 기술된 바와 같이 음

이온 교환-, 크기 배제-, 소수성 상호작용-크로마토그래피의 조합을 사용하여 정제하였다(도 12). 적절한 경우, 단백질의 농도(100㎍, 50㎍ 및 25㎍)에 관계없이 일정한 농도의 명반(100㎍/용량)을 사용하여 항원을 명반 상에 흡수시켰다. 명반:단백질 화합물을 일정하게 혼합하면서 4℃에서 인큐베이션 이전에 IP 및 SC 주사에 적합한 항원 농도(1.0mg/mL, 0.5mg/mL 또는 0.25mg/mL)로 조정하였다. 마우스에 그 다음 IP(백신접종 1) 및 SC(백신접종 2)를 주사하였다.

[0648] 테스트된 항원은 다음과 같다: KDcAK1n - 봉입체로부터 His-태깅됨, 우레아 및 친화성 컬럼을 사용하여 정제됨(IB, 우레아, AC); KDAK-3S-AVQP 비태깅됨(100㎍, 50㎍ 및 25㎍ 용량) KDAK-1V-2S-AVQP 비태깅됨(100㎍, 50㎍ 및 25㎍ 용량), KDAK-3S-AVQP His-태깅됨(100㎍ 용량), KDAK-3S-AVQP 비태깅되고 명반 없음.

[0649] *마우스 상악골에서* P. 긴기발리스 *유도된 치조골 손실*

[0650] 도 12에 도시된 바와 같이, 나이브 대조군과 비교하여, 100㎍에서 선행 기술 키메라(KDcAK1n)로 처리된 마우스는 유의한 뼈 손실을 전개하지 않았다. 더욱이, 모든 농도의 KDAK-3S-AVQP(100㎍, 50㎍ 및 25㎍)로 처리된 마우스도 나이브 대조군 마우스에 비해 유의한 수준의 치조골 손실이 전개하지 않았다.

[0651] KDAK-1V-2S-AVQP 백신을 받은 마우스는 100㎍의 최고 용량에서 치조골 손실로부터 보호되었지만 50㎍ 및 25㎍ 또는 단백질을 백신접종한 경우 유의한 골 손실을 전개하였다.

[0652] KDAK-3S-AVQP로부터 His-태그의 제거는 보호의 효능에는 유의하게 영향을 미치지 않았다. 그러나, 백신접종으로부터 명반의 제거는 두 백신 모두에서 더 높은 수준의 뼈 손실을 초래하였다.

[0653] *항체 반응*

[0654] 치주염 모델에서 면역화된 마우스의 혈청 항체 서브클래스 반응을 ELISA에 의해 검사하였다. 항혈청을 사용하여 열 사멸된 *P. 긴기발리스* 균주 W50을 흡착된 항원으로 조사하였다. 테스트된 모든 항원은 *P. 긴기발리스*에 대해 총 IgG 반응을 생성했으며, KDA(S, 우레아, AC), 이어서 KDAK1(IB, 우레아, 배치) 및 KDcAK1n(IB, 우레아, AC)이 *P. 긴기발리스* 전체 세포에 대해 강한 IgG1 반응을 가졌다. KDAK1(IB, 우레아, AC)만이 *P. 긴기발리스* 전체 세포에 대해 강력한 IgG2a 반응을 유도하였다.

[0655] 모아진 혈청 샘플을 사용하여 ELISA 플레이트 상에 흡착된 *P. 긴기발리스* 도메인을 조사하였다. ABM21(다량체 및 이량체) 및 ABM213(다량체 및 이량체)에 대한 총 IgG 반응은 다양한 수준으로 모든 항원에 의해 생성되었으며, KDA(S, 우레아, AC), KDcAK1n-1His(IB, 우레아, AC) 및 KDAK1(IB, 우레아, 배치)는 지속적으로 가장 강한 반응을 유도하는 반면, KDA(S, AC)는 ABM21 또는 ABM213(다량체 및 이량체)에 대해 가장 약한 반응을 유도하였다. 흥미롭게도, KDA(S, 우레아, AC), KDA(S, AC) 및 KDAK1(IB, 우레아, AC)은 DUF2436 도메인에 대해 가장 강력한 반응을 유도하였다.

[0656] 모아진 혈청 샘플을 또한 사용하여 *P. 긴기발리스* 에피토프 펩티드를 조사하였다. KDA(S, 우레아, AC), KDAK1(IB, 우레아, 배치) 및 KDAK1(IB, 우레아, AC)은 KAS 및 ABM3 에피토프에 대해 강한 IgG 반응을 유도하였다. KDA(S, 우레아, AC)는 또한 EP1 및 ABM2a 에피토프에 대한 IgG 항체를 유도하였다. KDAK1(S, 우레아, AC)을 제외한 모든 항원 그룹은 EP1 에피토프에 대한 반응을 유도하였다. 보호적 항원 중 어느 것도 K1 에피토프 ABM5에 결합하는 항혈청을 생성하지 않았다.

[0657] 10. 실험 10

[0658] *테스트된 항원*

[0659] 이 실험에서, 발명자들은 실시예 6, 7, 8 및 9에서 이전에 테스트된 작제물의 생체내 활성을 추가로 테스트하고, DUF 도메인을 포함하지 않는 작제물 및 아르기닌-의존성 긴기페인으로부터 유래된 활성 부위 서열을 포함하는 작제물과 활성을 비교하였다.

[0660] 테스트된 작제물은 다음과 같다: KDAK-3S-AVQP(이전에 실험 6, 7, 8 및 9에서 테스트됨); KDAK-2S-AVQP(His 태그), KAK-2S-AVQP(His 태그) 및 KDAR-3S-AVQP(His 태그).

[0661] *마우스 상악골에서* P. 긴기발리스 *유도된 치조골 손실*

[0662] 이 실험에서는 항원 KDAK-3S-AVQP를 2가지 농도에서 사용하였다: 이전에 테스트된 100㎍/마우스 및 2배 증가한 200㎍/마우스. 치조골 손실에 대한 보호에서 용량 의존적 증가가 있었으며, 200㎍ 용량을 받은 마우스는 100㎍ 그룹보다 더 적은 뼈 손실을 전개하였다(도 14).

[0663] KDAK-3S-AVQP와 KDAK-2S-AVQP 사이의 차이인 하나의 시스테인의 복원은 이들 두 변이체 사이의 치조골 손실에서 유의한 차이를 초래하지 않았다(도 14).

[0664] 유사하게, KDAK-2S-AVQP와 KAK-2S-AVQP의 차이인 D 도메인의 제거는 관찰된 치조골 손실에 유의하게 영향을 미치지 않았지만(도 14), KAK-2S-AVQP 변이체에 대한 평균값은 더 높았고 연구에서 더 큰 검정력(예를 들어 더 많은 동물)으로 유의성에 도달했을 수 있다.

[0665] KDAK-3S-AVQP와 KDAR-3S-AVQP 사이의 차이인 C 말단 KAS를 RAS 그룹으로 변경은 동등한 백신 용량에서 다른 변이체와 비교했을 때 평균 치조골 손실을 훨씬 더 유의하게 증가시켰다(도 14). 이는 이 모델에서 뼈 손실에 대한 보호를 제공하기 위한 KAS 서열의 중요성을 강조한다. 그럼에도 불구하고, KDAR-3S-AVQP 항원은 감염된 대조군 동물보다 여전히 더 낮은 평균 뼈 손실을 생성하므로 RAS 도메인이 본원에 기술된 키메라 융합 단백질 항원의 맥락에서 활용될 수 있다는 증거를 여전히 제공한다.

[0666] *항체 반응*

[0667] 치주염 모델에서 면역화된 마우스의 혈청 항체 서브클래스 반응은 전체 *P. 긴기발리스*, 정제된 RgpA/Kgp 복합체, 정제된 촉매 도메인 Kgpcat뿐만 아니라 KAS, 및 ABM 도메인, ABM3 및 ABM2의 보호적 에피토프를 포함한 여러 상이한 보호적 에피토프를 포함한 여러 상이한 항원에 대해 ELISA에 의해 조사되었다. (RgpA/Kgp 복합체 및 정제된 촉매적 도메인 Kgpcat는 *P. 긴기발리스*로부터 정제되었고 검정 시 접혀 있고 효소적으로 활성인 것으로 확인되었다).

[0668] 처음에 항혈청을 사용하여 열 사멸된 *P. 긴기발리스*를 흡수된 항원으로 조사하였다. 항체 반응은 획득된 ELISA 역가 마이너스 배경 수준의 두 배 값으로 표현되며, 각 역가는 10마리 개별 마우스의 평균 ± s.d.를 나타낸다. 테스트된 모든 항원은 *P. 긴기발리스*에 대해 IgG 반응을 생성했으며, KDAR-3S-AVQP 및 KDAK-3S-AVQP 200㎍ 백신접종으로 백신접종 후 가장 강한 반응이 관찰되었다. 유도된 면역 반응은 주로 IgG1 면역 반응이었으며 이는 보호적 면역 반응과 연관되어 있다(도 15).

[0669] *P. 긴기발리스* 정제된 RgpA/Kgp 프로테아제 복합체(데이터는 표시되지 않음) 및 *P. 긴기발리스*로부터 재조합 Kgpcat(데이터는 표시되지 않음)에 대한 항체 역가도 측정되었다. 두 경우 모두에서 KDAK-3S-AVQP 백신은 강력하고 용량 의존적으로 다시 주로 IgG1 면역 반응을 제공하였다. KDAK-2S-AVQP 백신은 테스트된 다른 두 백신인, KAK-2S-AVQP 및 KDAR-3S-AVQP에 비해 RgpA/Kgp 프로테아제 복합체 및 재조합 Kgpcat에 대해 더 높은 IgG1 항체를 유도하였다.

[0670] 보호적 에피토프에 대한 반응성을 추가로 정의하기 위해, 혈청 샘플을 모아서 스트렙다비딘 플레이트에 결합된 *P. 긴기발리스* 특이적 비오틴화된 펩티드를 조사하는 데 사용하였다. 테스트된 모든 항원에 대해 KAS2 펩티드에 대해 매우 높은 역가가 관찰되었다. 그러나, KDAK-3S-AVQP는 용량 의존적, IgG1 우세 방식으로 가장 높은 항-KAS2 항체를 유도하였다. Kgpcat 및 RgpA/Kgp 복합 반응과 유사한 이전에 테스트되지 않은 3가지 백신 중에서, KDAK-2S-AVQP로의 백신접종이 가장 높은 양의 항-KAS2 항체를 유도하였다.

[0671] 항-KAS2 항체에 비해 모든 단백질로 백신접종 후 더 낮은 수준의 항-ABM2 항체가 유도되었지만, 면역 반응은 여전히 강력했고 주로 IgG1이었다. KDAK-3S-AVQP로 백신접종은 용량 의존적 IgG1 우성 면역 반응을 유도했지만, KAK-2S-AVQP는 ABM2에 대해 관찰된 가장 강력한 면역 반응을 유도하였다.

[0672] 마지막으로, *P 긴기발리스*-유도된 뼈 손실의 KDAK-3S-AVQP 보호에 대한 실험 9 및 10으로부터 용량 반응 데이터는 정제된 천연 Kgpcat 프로테아제와 교차-반응성인 항체 역가와 밀접하게 연관되어 있었다(도 16).

[0673] **실시예 2 및 3에 제시된 결과의 요약 및 논의**

[0674] 이 보고서에 기술된 작업은 *P. 긴기발리스*에 대한 면역 반응을 유도하고 *P. 긴기발리스*-유도된 치조골 손실을 감소시키는 데 가장 효과적이고 생산의 용이성을 촉진하는 키메라 백신의 구성성분(예컨대 향상된 가용성, 안정성 및 다량체화에 대한 감소된 경향에 기여하는 구성성분)을 식별하기 위해 다양한 백신 후보군의 생산과 효능을 비교한다.

[0675] 동물 치주염 모델에서 치주골 손실을 예방하는 데 효과적이면서, 선행 기술 백신인 KDcAK1n은 봉입체로서 *대장균*에 의해 발현되고 다양한 가용성 및 안정성을 나타낸다.

[0676] KDcAK1n은 Lys-특이적 긴기페인 Kgp의 활성 부위 서열(KAS 또는 K)과 Kgp 다중단백질의 처리된 어드헤신 단편(A1) 사이의 융합에 기반되었다. Kgp 다중단백질 도메인의 구조 분석으로부터 세포 표면에서 발견된 A1 어드헤

신 단편이 3개의 별도의 구조 도메인인, DUF 도메인(D), ABM 도메인(A) 및 K1 도메인(K1)을 포함한다는 것이 이제 분명해졌다. 단백질분해효소 촉매 도메인과 어드헤신을 방출하기 위한 *P. 긴기발리스*의 표면 상에 Kgp 다중단백질을 처리하는 것은 38개 아미노산 잔기에 의한 DUF 도메인의 N-말단 절삭이 포함된다. 절삭된 도메인(Dc) 대신 전체 DUF 도메인을 생성하기 위해 이들 추가 N-말단 38개 잔기를 작제물에 대해 추가하는 것은 고도로 가용성 재조합 단백질(예를 들어 DUF2436, KDA 및 KKDAKK)을 생성하였다.

[0677] KDcAK1n은 또한 A1 어드헤신 단편을 생성하기 위한 Kgp 다중단백질의 세포 표면 처리에 다시 기반하여 C-말단으로 절삭된 K1 도메인(K1n)을 포함하였다. K1n에 누락된 C-말단 서열의 추가를 갖는 전체 K1 도메인은 단백질이 여전히 *대장균*에 의해 봉입체로 주로 발현되었기 때문에 가용성의 관점에서 개선되지 않았다. 부분적 또는 완전한 K1 도메인을 갖는 대부분의 작제물은 일부 가용성 문제를 나타내기 때문에, 전체 DUF 도메인은 *대장균*에 의한 가용성 단백질로서의 작제물의 발현을 위한 중요한 도메인이고 키메라 변이체에 K1 도메인의 함입은 가능하다면 피해야 한다는 결론이 내려졌다. 더욱이, 동물 실험으로부터의 치주골 손실 및 에피토프 분석 데이터로부터, 특히 보호적 항원 중 어느 것도 K1 에피토프 ABM5에 결합하는 항혈청을 생성하지 않는 경우 K1 도메인이 보호에 유의미하게 추가되지 않을 수 있는 것으로 나타났다.

[0678] KDcAK1n은 DUF에 1개, ABM에 2개, 및 K1에 1개로 4개 시스테인 잔기를 함유한다. 이들 시스테인 잔기는 봉입체의 형성을 갖는 문제에 기여하는 것으로 생각된다. *P. 긴기발리스*는 절대혐기성균이고 병원성이 있으려면 고도로 환원된 환경이 필요하다. Kgp 도메인의 알려졌거나 모델링된 구조는 시스테인 잔기가 세포 표면에서 환원되고 이황화 가교에 관여하지 않음을 나타낸다. 보다 산화 조건 하에서 *대장균*에서 발현은 변성된 도메인과 봉입체 형성 사이에 이황화 가교를 초래한다. 키메라의 변성된 도메인 사이의 이황화 가교는 환원 시 변화하는 비-환원 천연-PAGE에서 관찰될 수 있다.

[0679] 본원에 제시된 결과는 Kgp의 접힌 ABM 도메인이 베타-가닥 교환에 의해 다량체화되어 환원제와 무관한 균일한 래더를 형성한다는 것을 보여준다(도 3, 레인 9 및 10). 이 새로운 베타-가닥 교환 다량체화는 *P. 긴기발리스*가 세포뿐만 아니라 질환 진행 동안 숙주 안으로 방출되는 외막 소포에서도 긴기페인의 표면층을 형성하는 데 사용하는 중요한 메커니즘이다. 선행 기술 키메라 KDcAK1n 및 도메인을 특징으로 하는 이 작업은 원래의 키메라에 존재하는 다량체의 2가지 형태인; 이황화 가교 변성된 도메인-기반된 다량체 및 베타-가닥 교환 천연 ABM 도메인-기반된 다량체가 있음을 분명히 보여준다. 이들 상이한 형태를 특정 이량체와 더 큰 분자량의 다량체로 분리하고 정제하려는 시도는 성공하지 못하였다. 더욱이, 이들 상이한 정제된 단일 종의 사용은 단일 종이 이황화-잠금 변성된 구조임에 기인하여 동물 모델에서 치주골 손실에 대한 보호를 초래하지 않았다(도 6). 이 작업은 이황화 가교 없이 접힌 D 및 A 도메인을 갖는 가용성, 정의된 균질 재조합체가 낮은 수율로 8M 우레아에서 봉입체로부터 키메라의 가용화에 의하여 생성된 변성된 및 천연 형태의 혼합물보다 우수할 것임을 시사한다(도 6, 8, 9).

[0680] 이들 결과는 항원에서 시스테인 잔기의 존재가 상업적 개발을 위한 가용성 및 정의된 후보군의 발현 및 정제에 문제가 될 수 있음을 시사한다. 따라서 이들 시스테인 잔기를 세린으로 돌연변이시킬 가능성이 탐구되었다. 4개 시스테인 잔기의 4개 세린 잔기로의 돌연변이는 ABM(A) 천연 도메인 베타-가닥 교환 다량체화를 중단하지 않았으며 이는 ABM 도메인이 "4C"에서 "4S" 돌연변이체에서 여전히 적절하게 접혀 있음을 나타낸다(도 3).

[0681] 더욱이, 이들 결과는 베타-가닥 플리핑을 허용하는 Pro 힌지 엘보우인 것으로 예측되는 ABM 도메인의 중요한 서열의 돌연변이(PVQN > AVQP)가 베타-가닥 교환 다량체화를 제거했음을 보여준다(도 3). 따라서 4개 Cys 잔기에서 Ser로 돌연변이시키고 힌지 영역 PVQN에서 AVQP로 돌연변이시키는 조합은 산화 및 환원 조건 둘 모두 하에서 다량체화를 제거한다(도 3). 이와 관련하여 돌연변이체 KDAK1nK-4S-AVQP는 치주골 손실을 보호하고 동물 치주염 모델에서 예측된 보호적 에피토프(KAS, DUF, ABM)에 대해 우수한 항체 역가를 생성하였다(도 7).

[0682] 보호적 및 비-보호적 혈청을 사용하여 키메라의 상이한 세그먼트(K, D, A 및 K1)와 의심되는 중요한 에피토프(KAS, ABM2, ABM3, EP1)에 대한 항체 반응의 조사는 임의의 명백한 패턴을 제공하지 않은 반면, 보호된 키메라 변이체는 전체 *P. 긴기발리스* 세포뿐만 아니라 알려진 보호적 에피토프(KAS, DUF, ABM)에 대해서도 강한(IgG/IgG1) 반응을 나타내는 경향이 있어 보호는 치주골 손실의 완전한 보호를 보장하는데 필요한 임의의 하나의 에피토프에 관련되지 않지만 에피토프의 조합에 더 관련될 수 있다는 것을 나타냈다는 것이 명백하였다. 그러나, 보호를 제공하는 키메라 변이체에 대한 활성 부위 서열 KAS와 관련된 하나의 에피토프가 눈에 띄는 경향이 있었다.

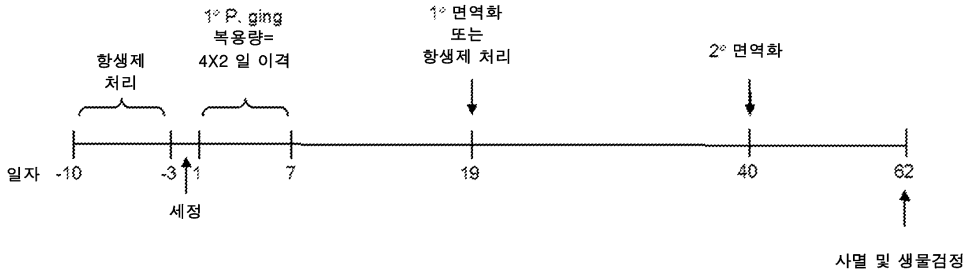
[0683] 그 에피토프에 대한 반응이 백신에 의해 유도된 보호의 대리 또는 바이오마커로 사용될 수 있을 정도로 임의의 하나의 에피토프가 더 중요하다는 명확한 징후는 없었지만, 보호적 키메라 변이체가 프로테아제 활성 부위 서열

(KAS 또는 K)에 대해 우수한 항체 반응을 생성하는 경향이 있다는 것은 분명하였다. 활성 부위 서열에 대해 생성된 항체는 *P. 긴기발리스*의 주요 독성 인자인 긴기페인(Kgp & RgpA/B)의 단백질용리 활성을 중화시키는 것으로 이전에 나타났다. 따라서 활성 부위에 대한 항체 역가를 강화하고 따라서 보호를 강화하는 접근방식에서 발명자들은 활성 부위 서열(K)의 추가 카피를 KDA 및 KDAK1n에 추가했으며 두 작제물 모두는 동물 치주염 모델에서 개선된 보호를 나타냈다(도 8). KAS(K) 모티프의 2개 카피를 갖는 가용성 비-다량체화 돌연변이체 KDAK1nK-4S-AVQP는 *P. 긴기발리스*에 의해 유도된 치주골 손실에 대해 우수한 보호를 제공하였다(도 9).

[0684] KDAK-3S-AVQP, KDAK-1V-2S-AVQP 및 KDAK-2S-AVQP를 포함한 다른 가용성, 비-다량체화 돌연변이체도 *P. 긴기발리스*에 의해 유도된 치주골 손실에 대해 우수한 보호를 제공하였다(도 9 내지 13).

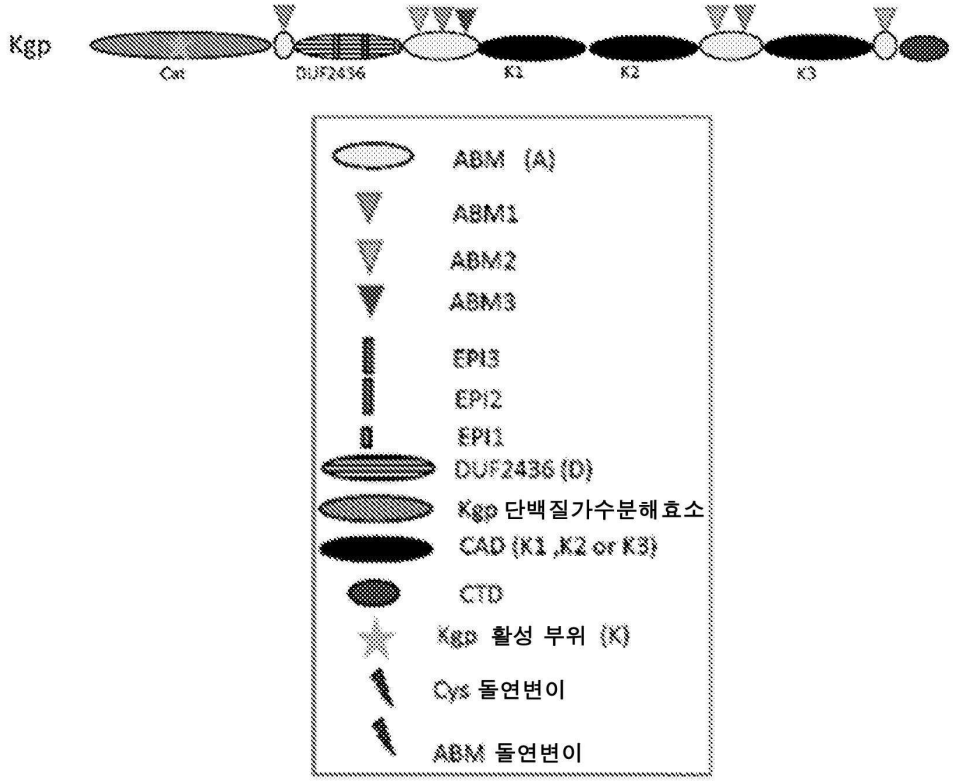
도면

도면1a



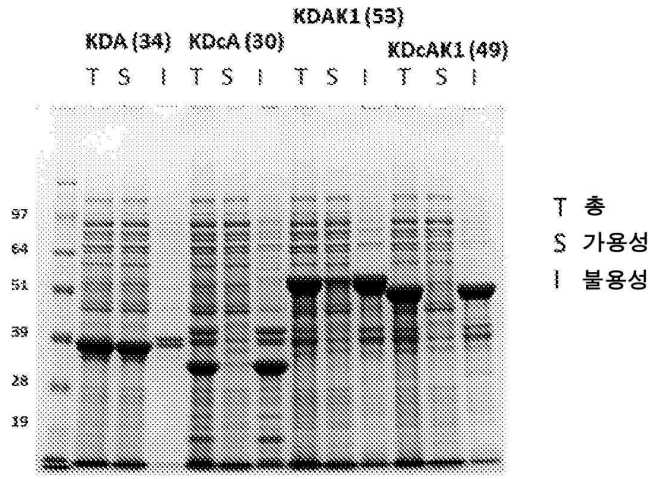
도면1b

B

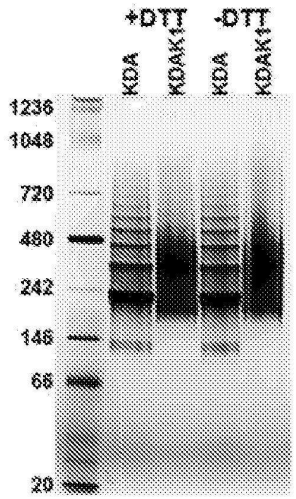

Kgp
Cat
DUF2436
K1
K2
K3
ABM (A)
ABM1
ABM2
ABM3
EPI3
EPI2
EPI1
DUF2436 (D)
Kgp 단백질가수분해효소
CAD (K1 ,K2 or K3)
CTD
Kgp 활성 부위 (K)
Cys 돌연변이
ABM 돌연변이

도면2

A.

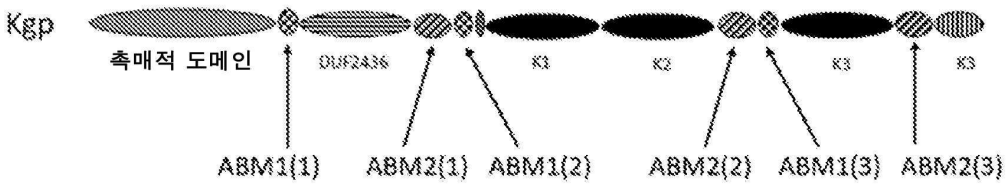

KDA (34)
KDcA (30)
KDAK1 (53)
KDcAK1 (49)
T S I T S I T S I T S I
97
64
51
39
28
19
T 총
S 가용성
I 불용성

B,


+DTT
-DTT
KDA
KDAK1
KDA
KDAK1
1236
1048
720
480
242
146
66
20

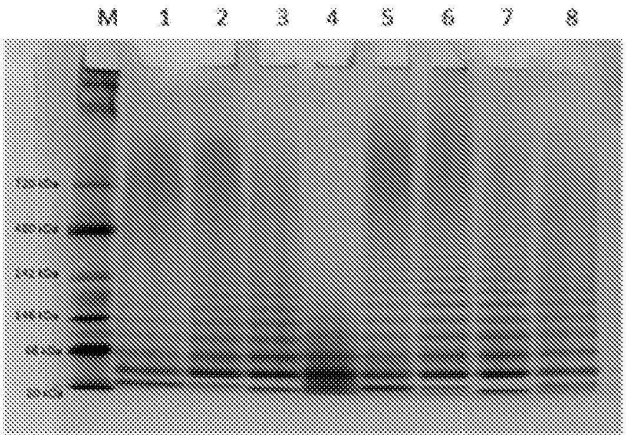
도면3a

A


Kgp
촉매적 도메인
DUF2436
K3
K2
K3
K3
ABM1(1)
ABM2(1)
ABM1(2)
ABM2(2)
ABM1(3)
ABM2(3)

도면3b

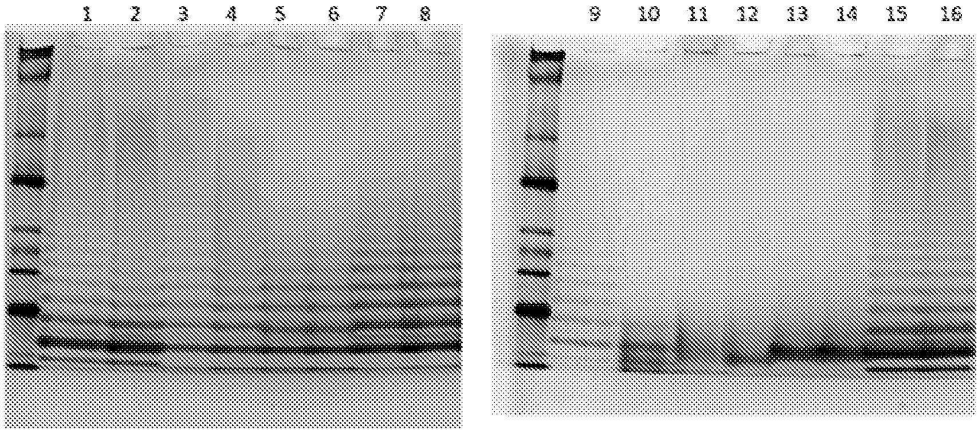
B



M 천연 마커
1 rABM21 (+ DTT)
2 rABM21-AVQN (+ DTT)
3 rABM21-AVQA (+ DTT)
4 rABM21-AVQP (+ DTT)
5 rABM21 (- DTT)
6 rABM21-AVQN (- DTT)
7 rABM21-AVQA (- DTT)
8 rABM21-AVQP (- DTT)

도면3c

C

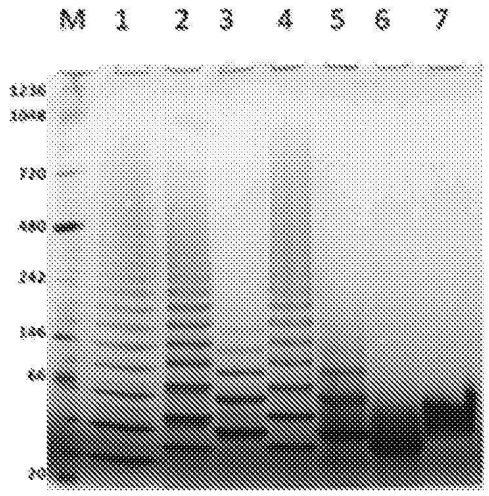


1: rABM12 (- DTT)
2: rABM12 (+ DTT)
3: rABM21-AVQA (- DTT)
4: rABM21-AVQA (+ DTT)
5: rABM21-AVQA-Cys>Ser (- DTT)
6: rABM21-AVQA-Cys>Ser (+ DTT)
7: rABM21-AVQA-2X Cys>Ser (- DTT)
8: rABM21-AVQA-2X Cys>Ser (+ DTT)

9: rABM21-AVQP (- DTT)
10: rABM21-AVQP (+ DTT)
11: rABM21-AVQP-Cys>Ser (- DTT)
12: rABM21-AVQP-Cys>Ser (+ DTT)
13: rABM21-AVQP-2X Cys>Ser (- DTT)
14: rABM21-AVQP-2X Cys>Ser (+ DTT)
15: rABM21-2X Cys>Ser (- DTT)
16: rABM21-2X Cys>Ser (+ DTT)

도면3d

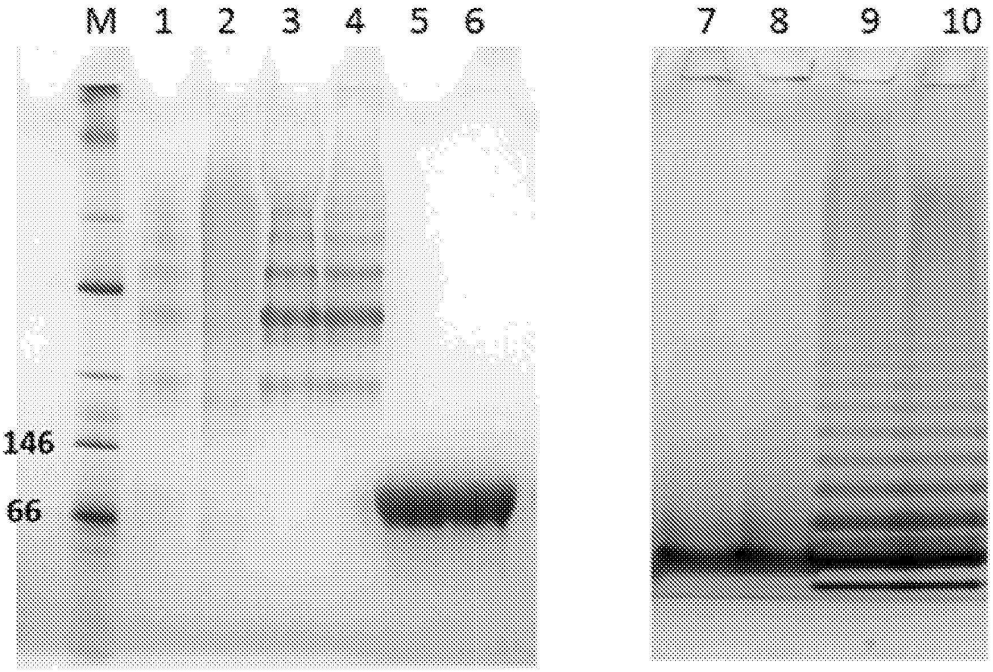
D



1. rABM21
2. rABM21-PNPFA
3. rABM21-SSEYQ
4. rABM21-PSPY
5. rABM21-Y>A
6. rABM21-Y>A/W>A
7. rABM21-AVQP-2X Cys>Ser

도면3e

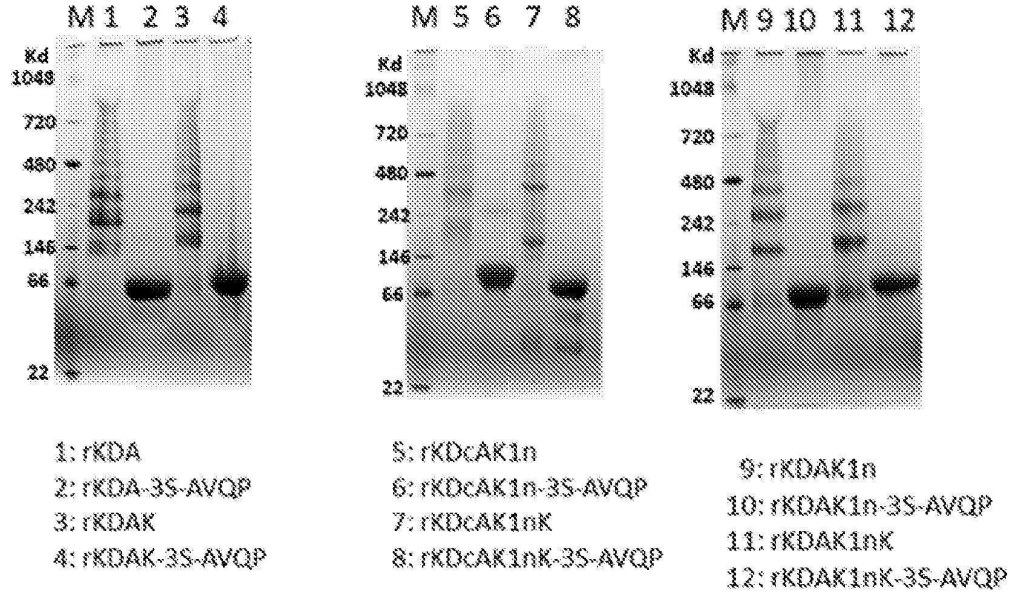
E



1- KDcAK1n + DTT
2- KDcAK1n - DTT
3- KDcAK1n 4XCys>Ser + DTT
4- KDcAK1n 4XCys>Ser - DTT
5- KDcAK1n 4XCys>Ser/PVQN>AVQP + DTT
6- KDcAK1n 4XCys>Ser/PVQN>AVQP - DTT
7- ABM21 2XCys>Ser/PVQN>AVQP - DTT
8- ABM21- 2XCys>Ser/PVQN>AVQP + DTT
9- ABM21 2X Cys>Ser - DTT
10-ABM21 2XCys>Ser + DTT

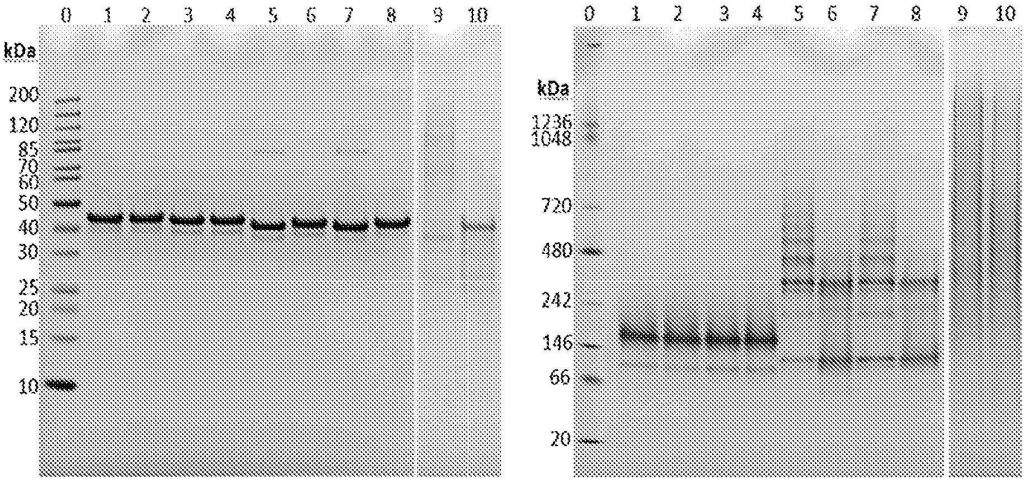
도면3f

F

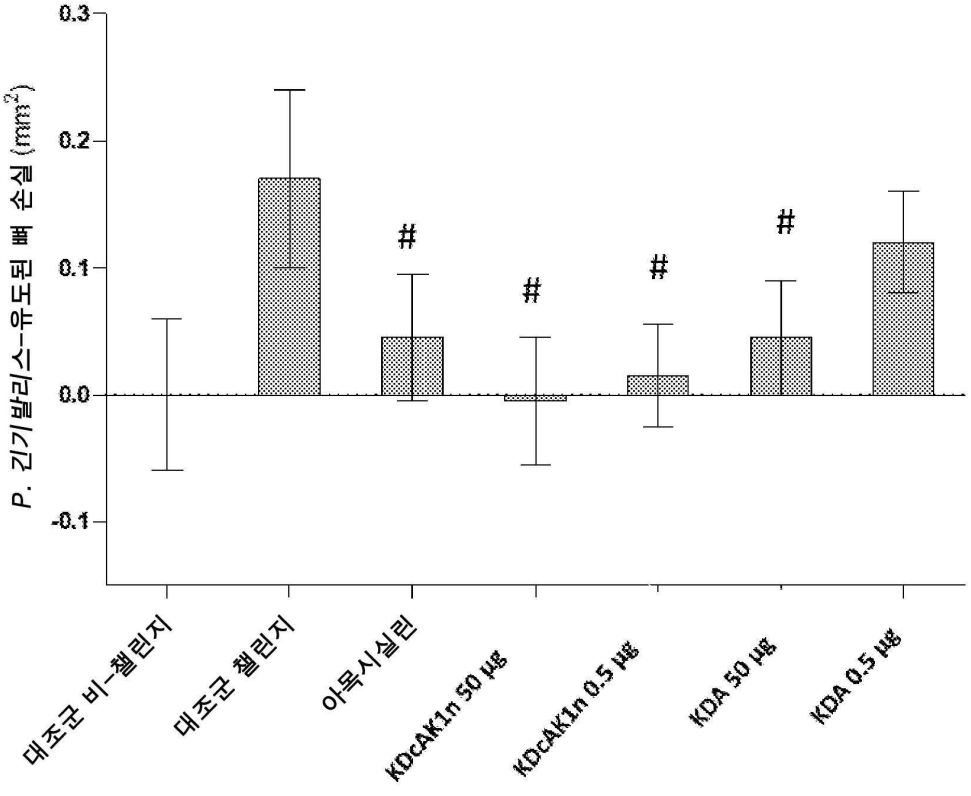

M 1 2 3 4
Kd
1048
720
480
242
146
66
22
M 5 6 7 8
Kd
1048
720
480
242
146
66
22
M 9 10 11 12
Kd
1048
720
480
242
146
66
22
1: rKDA
2: rKDA-3S-AVQP
3: rKDAK
4: rKDAK-3S-AVQP
5: rKDcAK1n
6: rKDcAK1n-3S-AVQP
7: rKDcAK1nK
8: rKDcAK1nK-3S-AVQP
9: rKDAK1n
10: rKDAK1n-3S-AVQP
11: rKDAK1nK
12: rKDAK1nK-3S-AVQP

도면3g

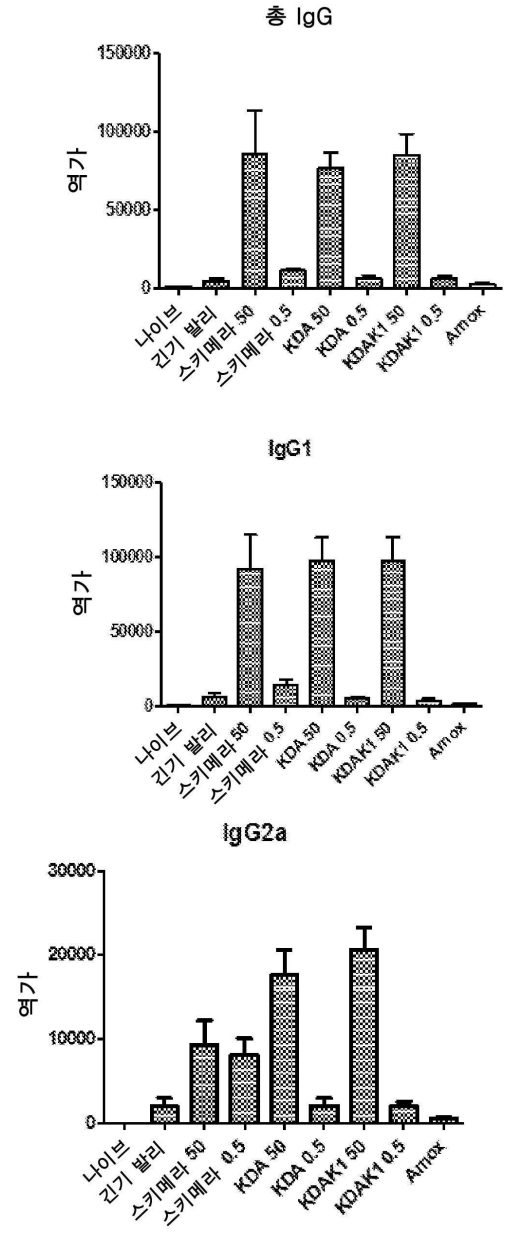
G


0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
kDa
200
120
85
70
60
50
40
30
25
20
15
10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
kDa
1236
1048
720
480
242
146
66
20

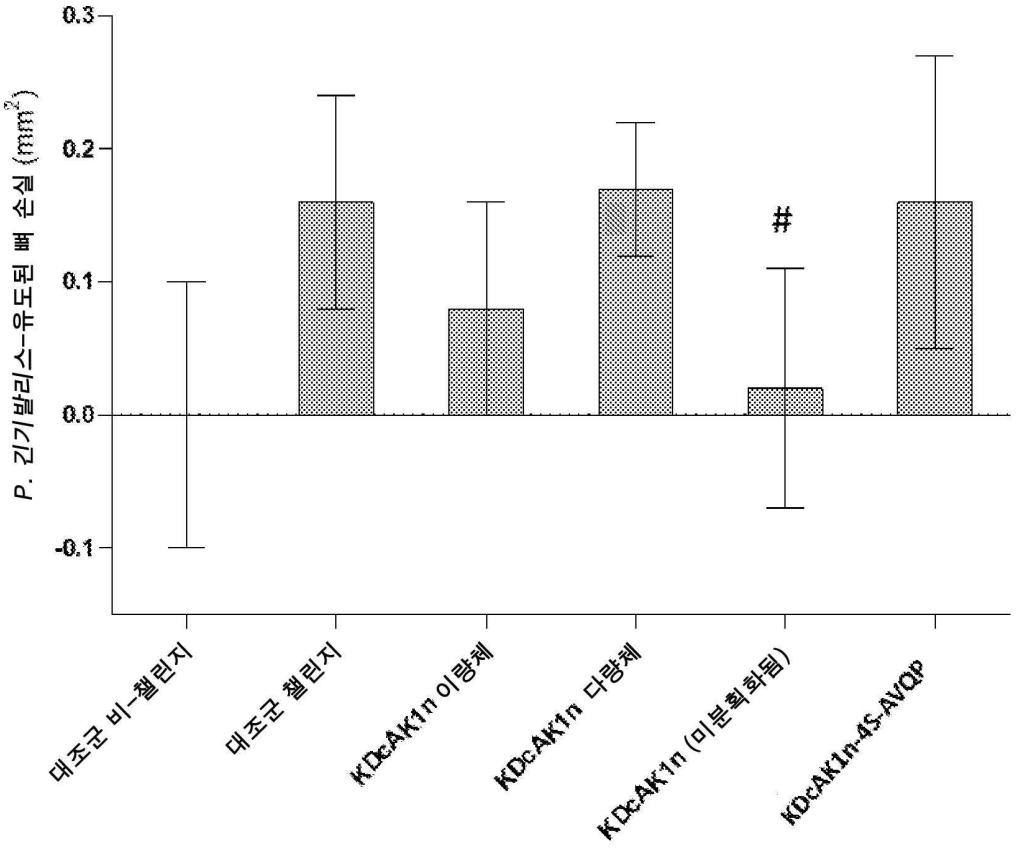
도면4


P. 긴기발리스-유도된 뼈 손실 (mm²)
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
#
#
#
#
대조군 비-챌린지
대조군 챌린지
아목시실린
KDcAK1n 50 μg
KDcAK1n 0.5 μg
KDA 50 μg
KDA 0.5 μg

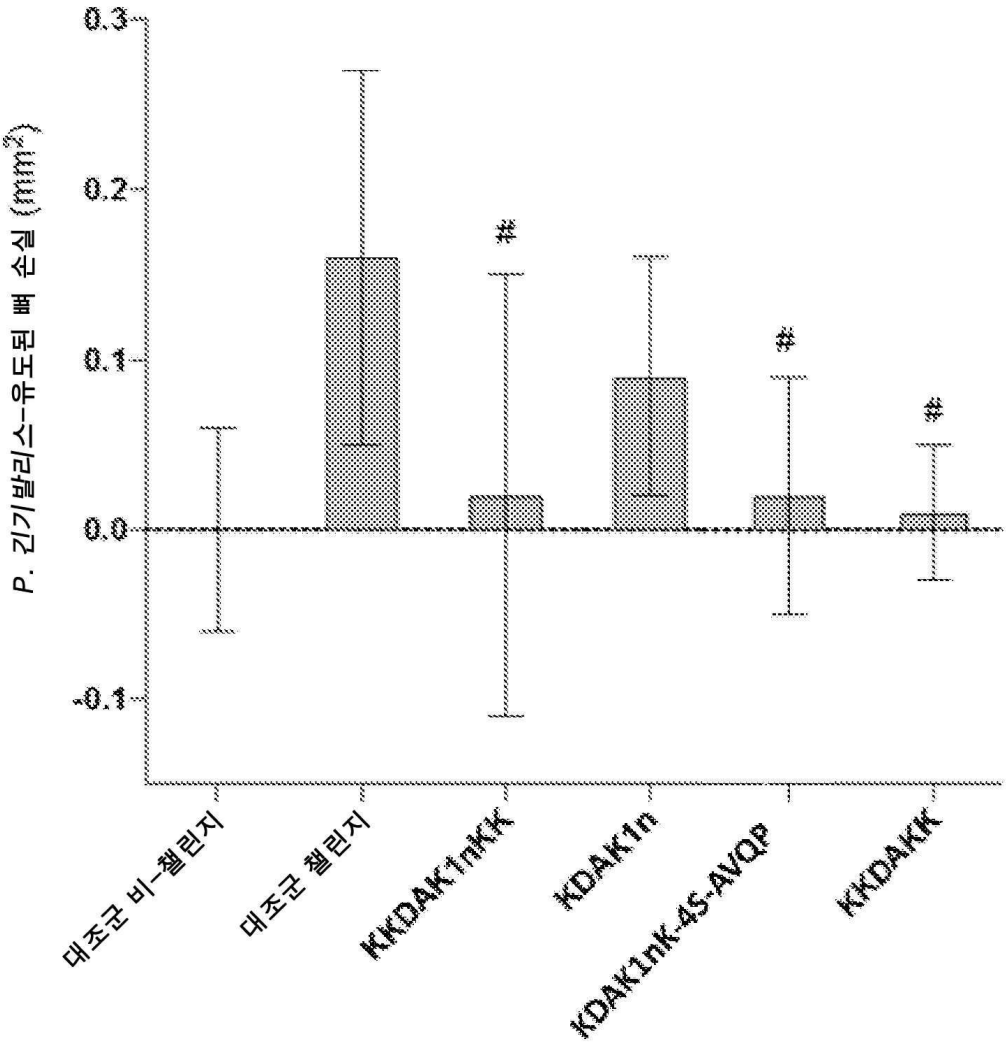
도면5


총 IgG
역가
150000
100000
50000
0
나이브
긴기 발리
스키메라 50
스키메라 0.5
KDA 50
KDA 0.5
KDAK1 50
KDAK1 0.5
Amox
IgG1
역가
150000
100000
50000
0
나이브
긴기 발리
스키메라 50
스키메라 0.5
KDA 50
KDA 0.5
KDAK1 50
KDAK1 0.5
Amox
IgG2a
역가
30000
20000
10000
0
나이브
긴기 발리
스키메라 50
스키메라 0.5
KDA 50
KDA 0.5
KDAK1 50
KDAK1 0.5
Amox

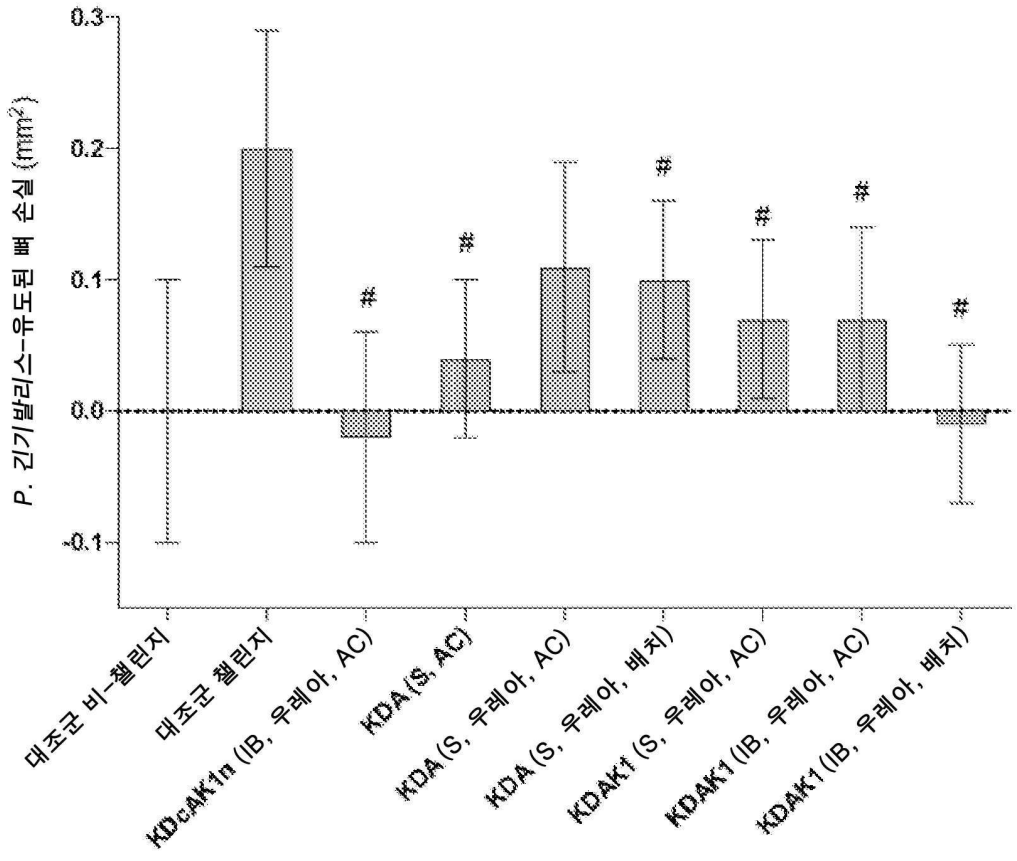
도면6


0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
P. 긴기발리스-유도된 뼈 손실 (mm²)
#
대조군 비-챌린지
대조군 챌린지
KDcAK1n 이량체
KDcAK1n 다량체
KDcAK1n (미분획화됨)
KDcAK1n-4S-AVQP

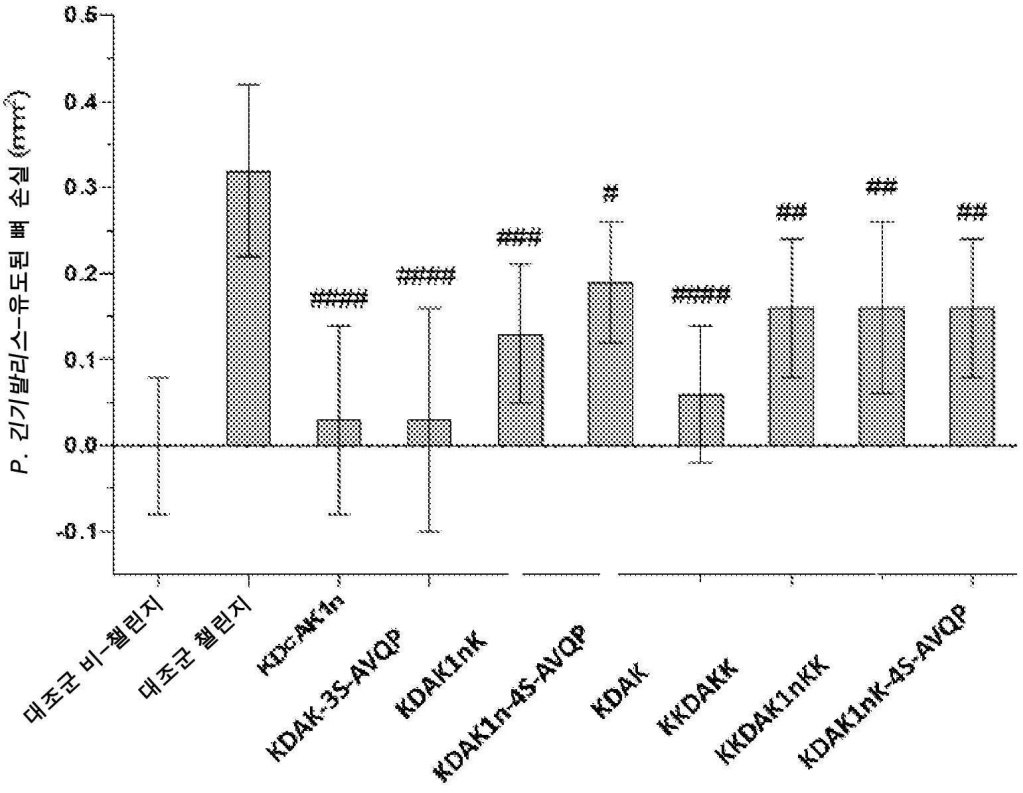
도면7


0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
P. 긴기발리스-유도된 뼈 손실 (㎟)
#
#
#
대조군 비-챌린지
대조군 챌린지
KKDAK1nKK
KDAK1n
KDAK1nK-4S-AVQP
KKDAKK

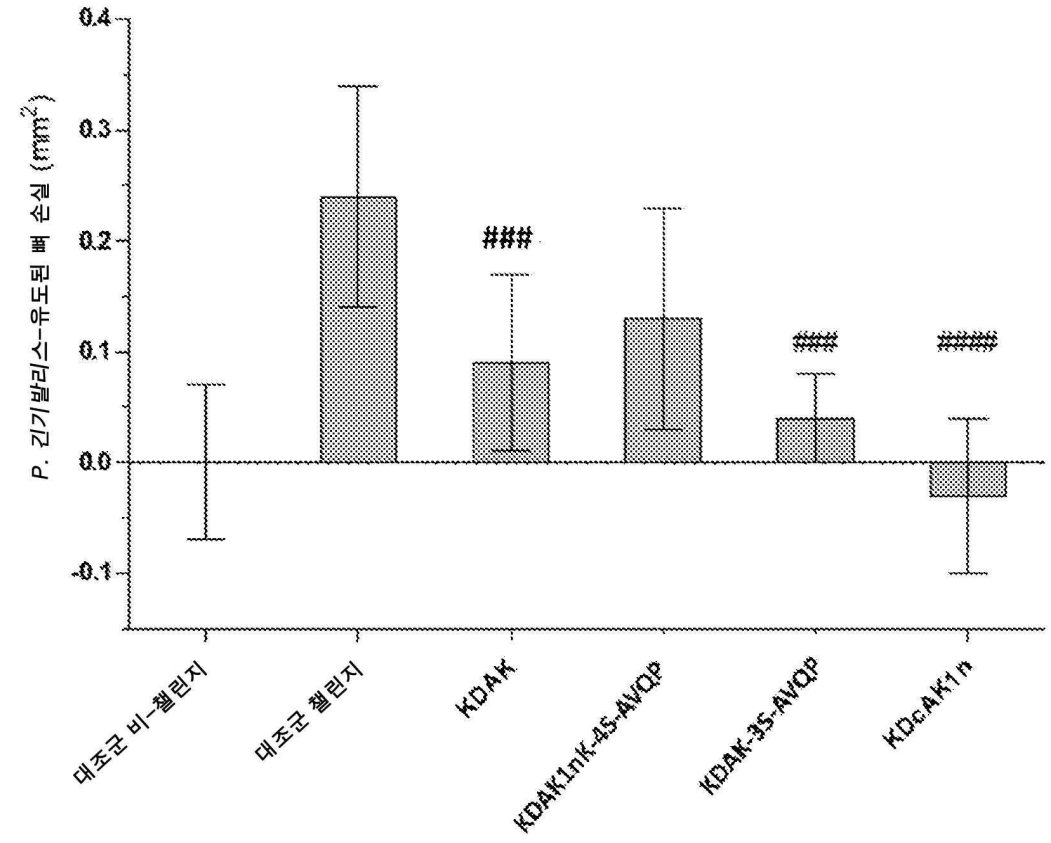
도면8


P. 긴기발리스-유도된 뼈 손실 (mm²)
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
#
대조군 비-챌린지
대조군 챌린지
KDcAK1n (IB, 우레아, AC)
KDA (S, AC)
KDA (S, 우레아, AC)
KDA (S, 우레아, 베치)
KDAK1 (S, 우레아, AC)
KDAK1 (IB, 우레아, AC)
KDAK1 (IB, 우레아, 베치)

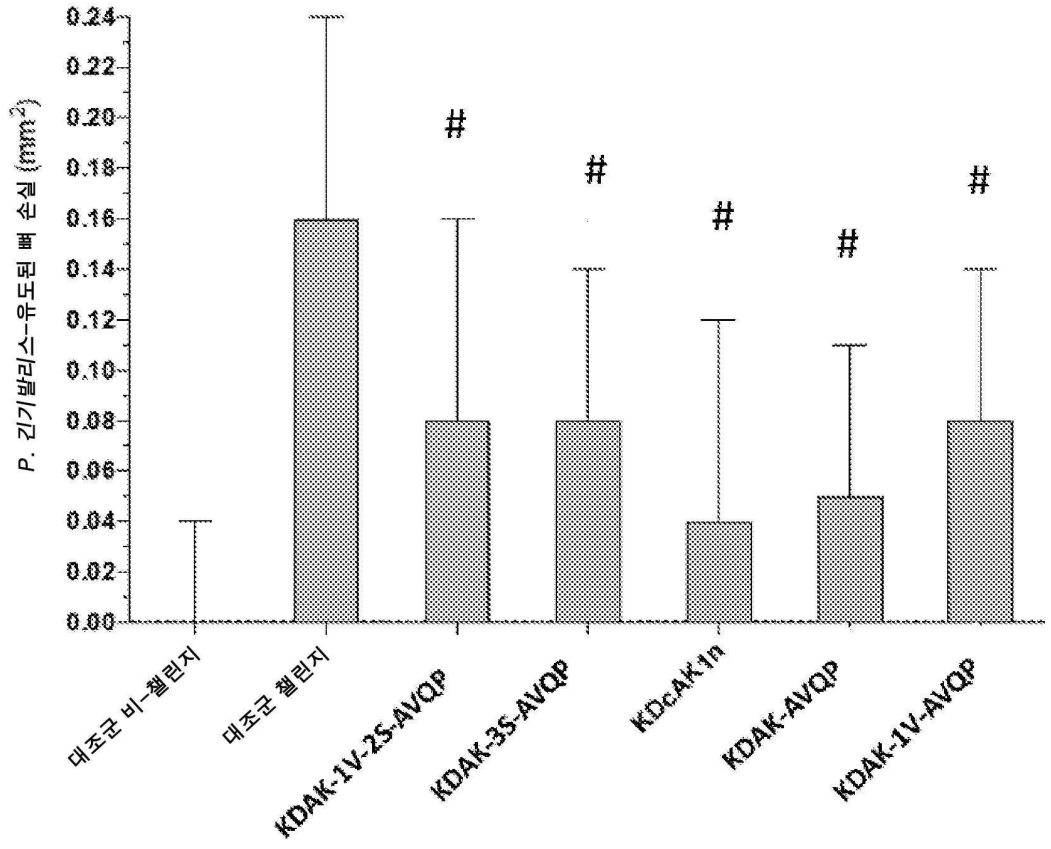
도면9


P. 긴기발리스-유도된 뼈 손실 (mm²)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
#
##
###
####
대조군 비-챌린지
대조군 챌린지
KDcAK1n
KDAK-3S-AVQP
KDAK1nK
KDAK1n-4S-AVQP
KDAK
KKDAKK
KKDAK1nKK
KDAK1nK-4S-AVQP

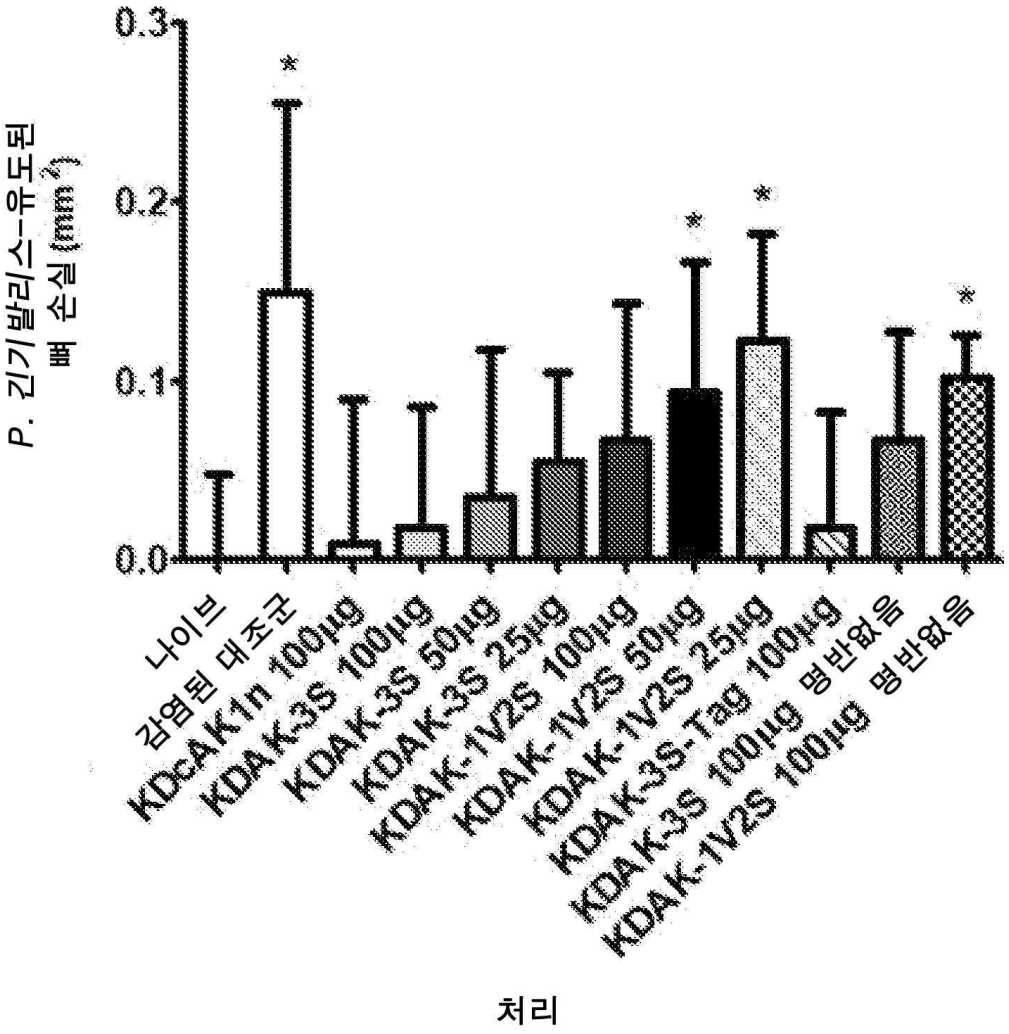
도면10


0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
P. 긴기발리스-유도된 뼈 손실 (mm^2)
###
###
#####
대조군 비-챌린지
대조군 챌린지
KDAK
KDAK1nK-4S-AVQP
KDAK-3S-AVQP
KDcAK1n

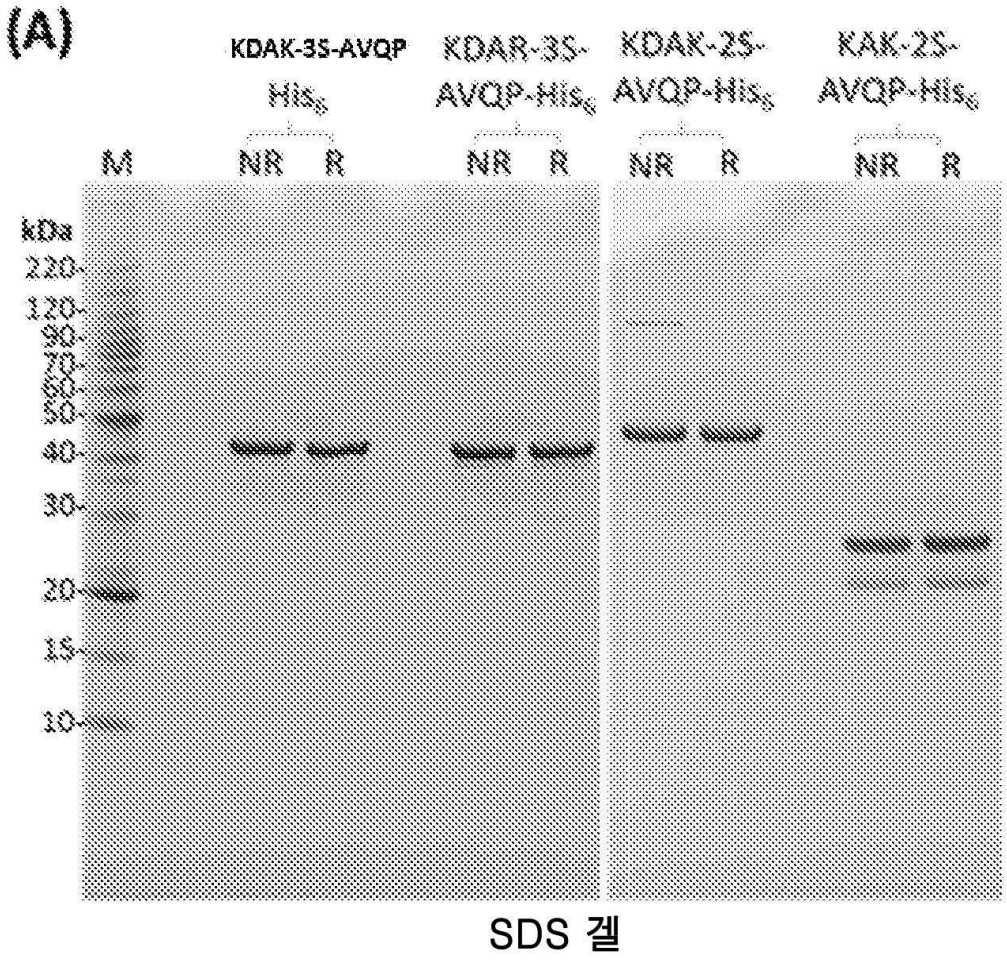
도면11


P. 긴기발리스-유도된 뼈 손실 (mm^2)
0.24
0.22
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
#
#
#
#
#
대조군 비-췔린지
대조군 췔린지
KDAK-1V-2S-AVQP
KDAK-3S-AVQP
KDcAK1n
KDAK-AVQP
KDAK-1V-AVQP

도면12

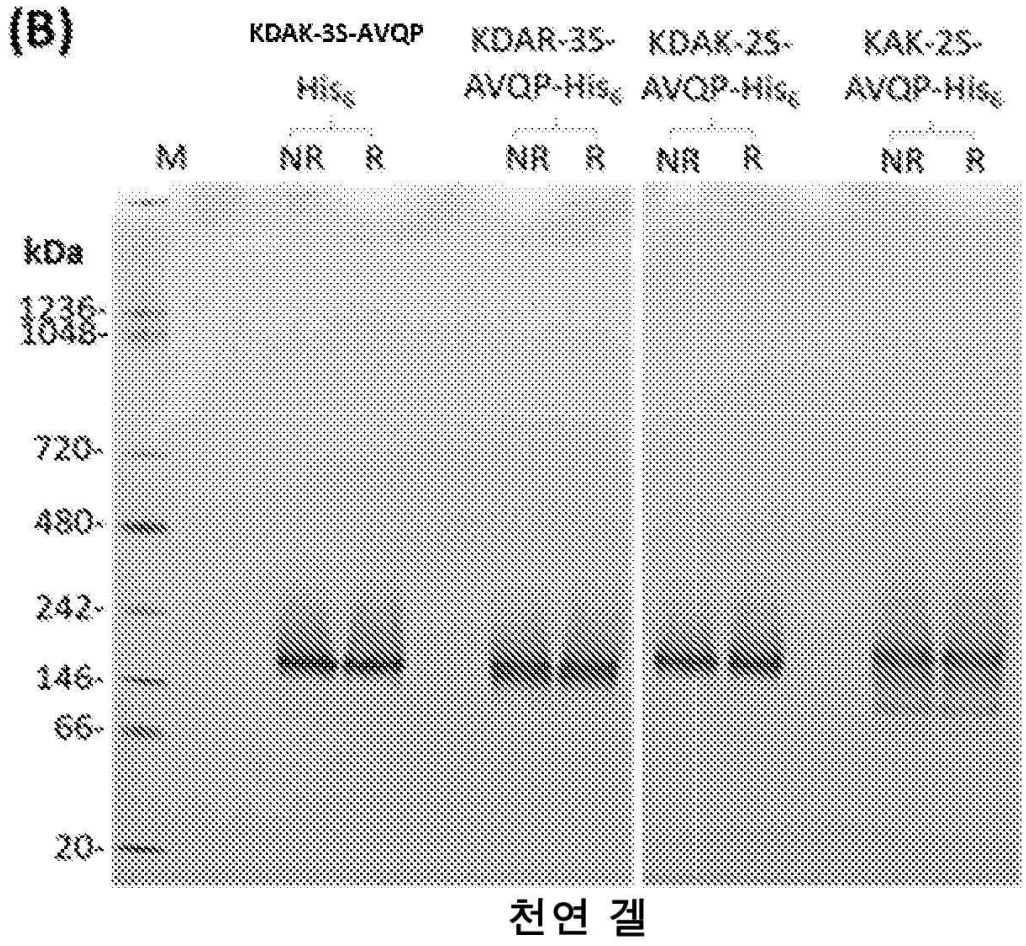

P. 긴기발리스-유도된 뼈 손실 (mm²)
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
*
*
나이브
감염된 대조군
KDcAK1n 100μg
KDAK-3S 100μg
KDAK-3S 50μg
KDAK-3S 25μg
KDAK-1V2S 100μg
KDAK-1V2S 50μg
KDAK-1V2S 25μg
KDAK-3S-Tag 100μg
KDAK-3S 100μg 명반없음
KDAK-1V2S 100μg 명반없음
처리

도면13a

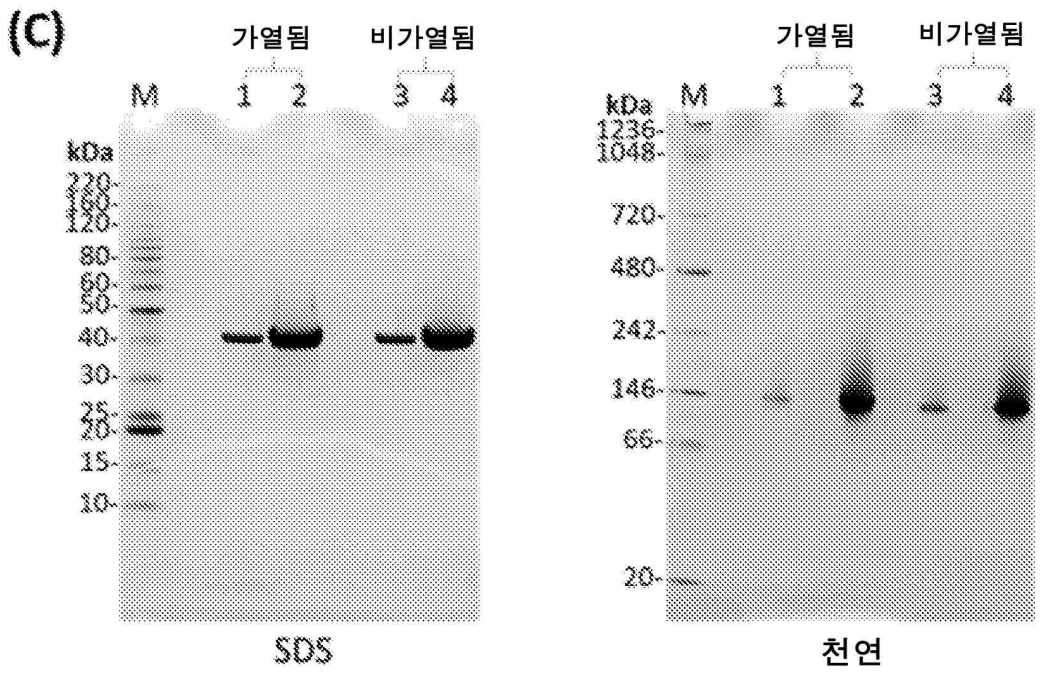

(A)
KDAK-3S-AVQP-His6
KDAR-3S-AVQP-His6
KDAK-2S-AVQP-His6
KAK-2S-AVQP-His6
M
NR
R
NR
R
NR
R
NR
R
kDa
220
120
90
70
60
50
40
30
20
15
10

SDS 겔

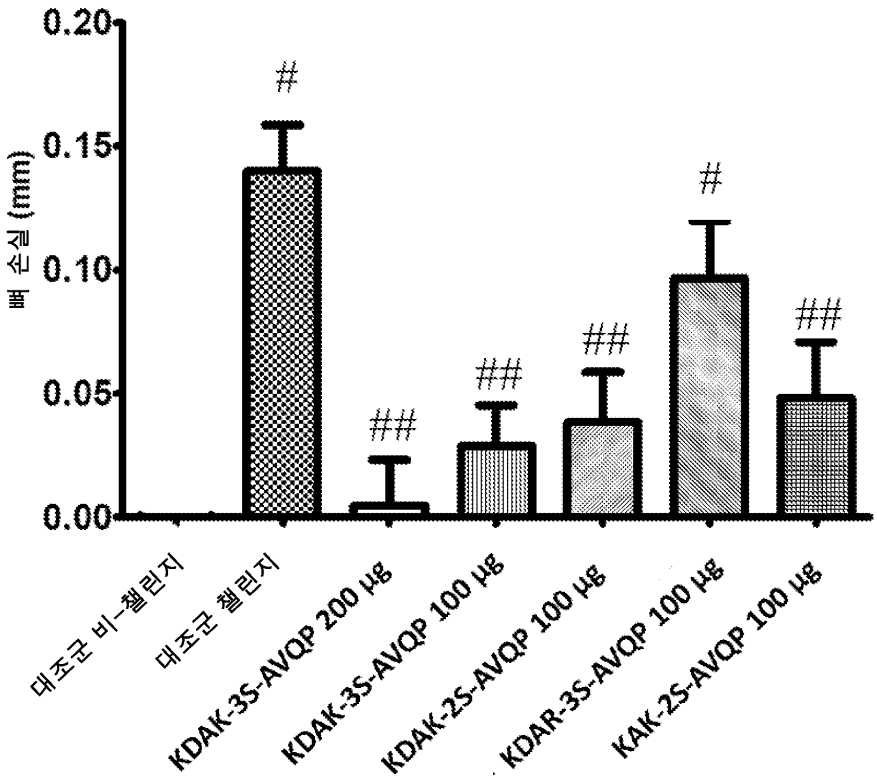
도면13b


(B)
KDAK-3S-AVQP-His6
KDAR-3S-AVQP-His6
KDAK-2S-AVQP-His6
KAK-2S-AVQP-His6
M
NR
R
NR
R
NR
R
NR
R
kDa
1236
1048
720
480
242
146
66
20
천연 겔

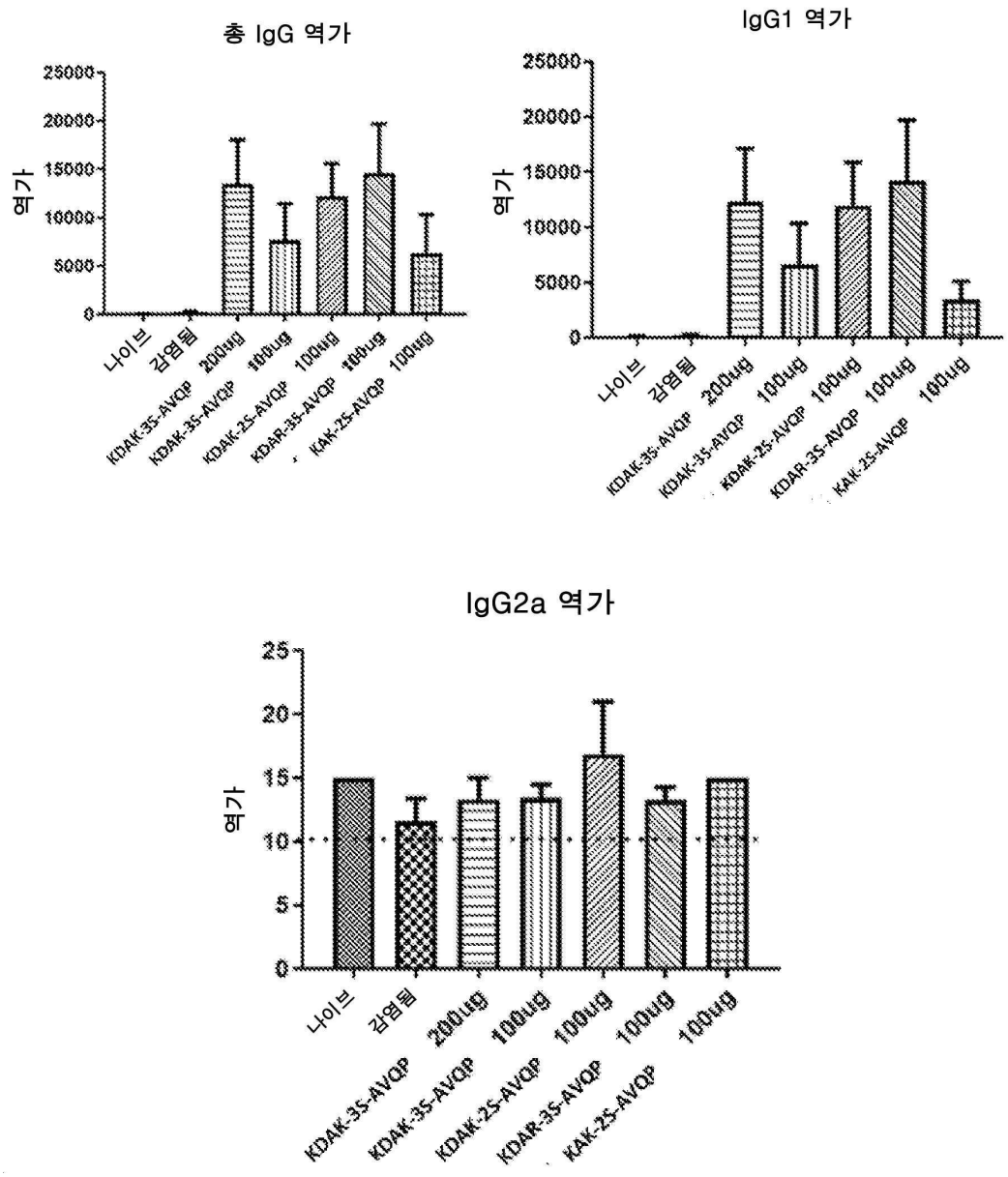
도면13c


(C)
가열됨
비가열됨
M
1
2
3
4
kDa
220
160
120
80
60
50
40
30
25
20
15
10
SDS
가열됨
비가열됨
M
1
2
3
4
kDa
1236
1048
720
480
242
146
66
20
천연

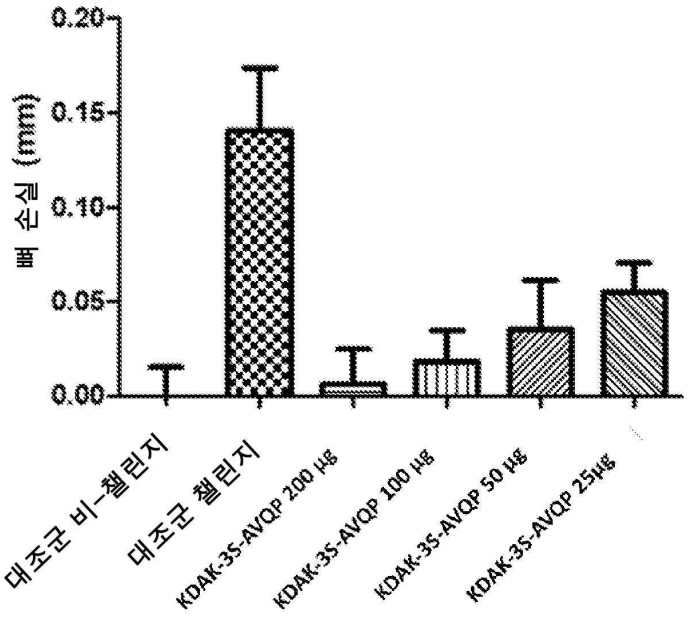
도면14

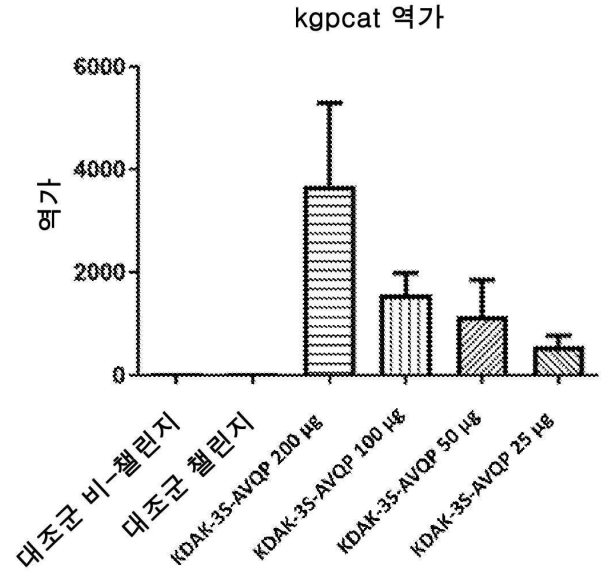

0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
뼈 손실 (mm)
#
##
##
##
#
##
대조군 비-챌린지
대조군 챌린지
KDAK-3S-AVQP 200 μg
KDAK-3S-AVQP 100 μg
KDAK-2S-AVQP 100 μg
KDAR-3S-AVQP 100 μg
KAK-2S-AVQP 100 μg

도면15


총 IgG 역가
역가
25000
20000
15000
10000
5000
0
나이브
감염됨
200㎍
100㎍
100㎍
100㎍
100㎍
KDAK-35-AVQP
KDAR-35-AVQP
KDAK-25-AVQP
KDAR-35-AVQP
KAK-25-AVQP
IgG1 역가
역가
25000
20000
15000
10000
5000
0
나이브
감염됨
200㎍
100㎍
100㎍
100㎍
100㎍
KDAK-35-AVQP
KDAK-35-AVQP
KDAK-25-AVQP
KDAR-35-AVQP
KAK-25-AVQP
IgG2a 역가
역가
25
20
15
10
5
0
나이브
감염됨
200㎍
100㎍
100㎍
100㎍
100㎍
KDAK-35-AVQP
KDAK-35-AVQP
KDAK-25-AVQP
KDAR-35-AVQP
KAK-25-AVQP

도면16


0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
뼈 손실 (mm)
대조군 비-챌린지
대조군 챌린지
KDAK-35-AVQP 200 μg
KDAK-35-AVQP 100 μg
KDAK-35-AVQP 50 μg
KDAK-35-AVQP 25μg


kgpcat 역가
6000
4000
2000
0
역가
대조군 비-챌린지
대조군 챌린지
KDAK-35-AVQP 200 μg
KDAK-35-AVQP 100 μg
KDAK-35-AVQP 50 μg
KDAK-35-AVQP 25 μg

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.