



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월16일  
(11) 등록번호 10-1473271  
(24) 등록일자 2014년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 9/14 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)  
C12N 15/74 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-7006983  
(22) 출원일자(국제) 2009년08월25일  
심사청구일자 2014년06월12일  
(85) 번역문제출일자 2011년03월25일  
(65) 공개번호 10-2011-0049883  
(43) 공개일자 2011년05월12일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/060947  
(87) 국제공개번호 WO 2010/023207  
국제공개일자 2010년03월04일  
(30) 우선권주장  
0815484.1 2008년08월26일 영국(GB)  
(56) 선행기술조사문헌  
EP0510907 A2  
US20020127220 A1

(73) 특허권자  
카톨릭대학교 유니버시티트 루벤  
벨기에, 3000 루벤, 와아이스트라아트 6-박스  
5105, 케이유 루벤 리서치 앤드 디벨롭먼트  
(72) 발명자  
브리어스, 이브  
스위스, 체하-5032 로 아게, 하우프트슈트라세 5  
0아  
라비네, 룬  
벨기에, 베-2170 메르크렘, 그라스블뤼슈트라트  
18  
폴카에르트, 쥐도  
벨기에, 베-3220 홀스백, 게스트몰렌슈트라트 24  
(74) 대리인  
특허법인오리진

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 김남경

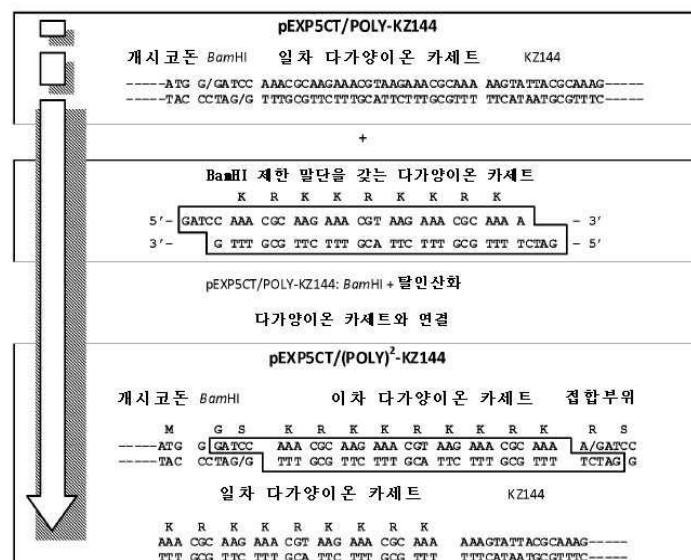
(54) 발명의 명칭 항균제

(57) 요약

본 발명은 막 또는 LPS 분열 활성을 갖는 펩티드 스트레치가 융합된 엔도리신을 포함하는 엔도리신 변이체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터, 및 상기 핵산 분자 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 엔도리신

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



변이체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 약제, 특히 진단 수단, 살균제 또는 화장용 물질로서 그람 음성균 감염을 치료 또는 예방하기 위한 약제로서 사용하기 위한 상기 개질된 엔도리신 변이체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 식품, 식품 가공 장비, 식품 가공 공장, 식품과 접촉하는 표면, 의료 장치, 병원 및 수술실의 표면의 그람 음성균 오염의 제거, 감소 또는 예방에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 의약, 식품 또는 사료의 진단 수단, 또는 환경 진단으로서 상기 엔도리신 변이체의 용도에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 상기 개질된 엔도리신 변이체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

지질다당류(LPS) 분열 활성을 갖는 양이온성 펩티드 스트레치(peptide stretch)가 융합된 엔도리신을 포함하는 엔도리신 변이체로서,

상기 양이온성 펩티드 스트레치가 5 내지 100개의 아미노산 잔기를 포함하며, 상기 펩티드 스트레치에 포함된 아미노산 잔기의 70% 이상이 아르기닌, 리신, 또는 아르기닌 및 리신이고, 아미노산 잔기의 0% 내지 30%가 세린, 글리신, 또는 세린 및 글리신인 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩티드 스트레치가 5 내지 50개의 아미노산 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 펩티드 스트레치가 엔도리신의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단 및 C-말단에 융합된 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 엔도리신은 그람음성균의 세포벽을 분해하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 그람음성균은 엔테로박테리아세아, 슈도모나다세아, 네이세리아, 모락셀라, 비브리오, 에어로모나스, 브루셀라, 프란시셀라, 보르데텔라, 레지오넬라, 바르토넬라, 콕시엘라, 해모필루스, 파스퇴렐라, 만헤이미아, 악티노바실루스, 가르드넬라, 스피로체타세아, 렙토스피라세아, 캄필로박터, 헬리코박터, 스피릴룸, 스트렙토바실러스, 박테로이다세아 및 아시네토박터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 엔테로박테리아세아는 에스케리키아, 살모넬라, 쉬겔라, 시트로박터, 에드워드시엘라, 엔테로박터, 하프니아, 클레브시엘라, 모르가넬라, 프로테우스, 프로비덴시아, 세라티아 및 예르시니아 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

### 청구항 7

제5항에 있어서,

상기 슈도모나다세아는 슈도모나스, 버크홀데리아, 스테노트로포모나스, 슈와넬라, 스펀고모나스 및 코마모나스 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

### 청구항 8

제5항에 있어서,

상기 스피로체타세아는 트레포네마 및 보렐리아 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

### 청구항 9

제5항에 있어서,

상기 박테로이다세에는 박테로이데스, 푸소박테리움, 프레보텔라 및 포르피로모나스 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

#### 청구항 10

제5항에 있어서,

상기 아시네토박터는 A. 바우마니인 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 엔도리신이 서열번호:1에 따른 phiKZgp144, 서열번호:2에 따른 ELgp188, 서열번호:3에 따른 살모넬라 엔도리신, 서열번호:4에 따른 엔테로박테리아 파지 T4 엔도리신, 서열번호:5에 따른 아시네토박터 바우마니 엔도리신, 서열번호:6에 따른 대장균 파지 K1F 엔도리신, 서열번호:8에 따른 PSP3 살모넬라 엔도리신 및 서열번호:9에 따른 대장균 파지 P2 엔도리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 펩티드 스트레치가 하나 이상의 KRK 모티브(motive)를 포함하는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

#### 청구항 13

제1항에 있어서,

상기 펩티드 스트레치가 서열번호:10 내지 30으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

#### 청구항 14

제1항에 있어서,

상기 엔도리신 변이체가 서열번호:35 내지 49, 53, 57, 62 내지 64 및 66 내지 78로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

#### 청구항 15

제1항에 따른 엔도리신 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 분리된 핵산 분자.

#### 청구항 16

제15항에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터.

#### 청구항 17

제15항에 따른 핵산 분자 또는 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 18

제17항에 따른 숙주 세포에서 엔도리신 변이체의 발현을 포함하는, 제1항에 따른 엔도리신 변이체의 제조방법.

#### 청구항 19

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

약제, 진단 수단, 살균제 또는 화장용 물질로 사용하기 위한 엔도리신 변이체.

#### 청구항 20

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,  
그람음성균 감염의 치료용 약제로 사용하기 위한 엔도리신 변이체.

#### 청구항 21

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

식품, 식품 가공 장비, 식품 가공 공장, 식품과 접촉하는 표면, 의료 장비, 병원 및 수술실의 표면의 그람음성균 오염의 제거, 감소 또는 예방을 위한 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

#### 청구항 22

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

의약, 식품 또는 사료의 진단 수단, 또는 환경 진단으로서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

#### 청구항 23

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 엔도리신 변이체를 포함하는 그람음성균 감염의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 그람음성균에 대한 항균 작용이 개선된 개질된 엔도리신(endolysin) 변이체에 관한 것이다. 상기 개질된 엔도리신 변이체는 엔도리신 및 상기 엔도리신에 융합된 양이온성 펩티드를 포함하며, 이에 따라 상기 엔도리신의 양이온성이 강화된다. 본 발명은 또한 양이온성이 강화된 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 미생물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 유기체를 제조할 때 본 발명에 따른 엔도리신 변이체를 인코딩하는 핵산으로 형질전환된 미생물을 사용하여 엔도리신 변이체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 특히, 본 발명은 막 또는 LPS 분열 활성을 갖는 펩티드 스트레치(peptide stretch)가 융합된 엔도리신을 포함하는 엔도리신 변이체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터, 및 상기 핵산 분자 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 엔도리신 변이체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 약제, 특히 진단 수단, 살균제 또는 화장용 물질로서 그람음성균 감염을 치료 또는 예방하기 위한 약제로서 사용하기 위한 상기 개질된 엔도리신 변이체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 식품, 식품 가공 장비, 식품 가공 공장, 식품과 접촉하게 되는 표면, 의료 장치, 병원 및 수술실의 표면의 그람음성균 오염의 제거, 감소 또는 예방에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 의약, 식품 또는 사료의 진단 수단, 또는 환경 진단으로서 상기 엔도리신 변이체의 용도에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 상기 개질된 엔도리신 변이체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0003] 엔도리신은 박테리오파지(또는 세균 바이러스)에 의해 인코딩되는 펩티도글리칸 가수분해효소이다. 이는 파지 증식의 용균 사이클에서 후기 유전자 발현 동안 합성되며, 박테리아 펩티도글리칸의 분해를 통해 감염된 세포로부터 파생(progeny) 비리온의 방출을 매개한다. 이는  $\beta$  (1,4)-글리코실라제(리소자임), 트랜스글리코실라제, 아미다제 또는 엔도펩티다제이다. 엔도리신의 항균 적용은 이미 Gasson에 의해 1991년에 제안되었다(GB2243611). 비록 엔도리신의 살균 능력이 오랫동안 알려져 왔으나, 이러한 효소의 항균제로서의 용도는 항생물질의 성공과 우월함 때문에 무시되었다. 다수의 항생물질에 내성인 세균의 출현 이후에 비로소 엔도리신으로 인간 병원균을 방지하는 이러한 단순 개념이 관심을 받았다. 완전히 신규한 균의 항균제를 개발하고자 하는 강렬한 요구가 나타났다으며, '효소'와 '항생물질'의 혼성 용어인 '엔지비오틱스(enzybiotics)'로서 사용되는 엔도리신은 이러한 요구를 완전히 충족시켰다. 2001년에 Fischetti와 그의 동료들은 처음으로 그룹 A 스트렙토코키에 대한 박테리오파지 C1 엔도리신의 치료적 효능을 입증하였다(Nelson et al., 2001). 그 이후로 다수의 문헌에서 특히 그람 양성균에 의한, 세균 감염을 제어하는 매력적이고 상호보완적인 대안으로서 엔도리신이 인정되었다. 그 후, 스트렙토코쿠스 뉴모니에(Loeffler et al., 2001), 바실루스 안트라시스(Schuch et al., 2002), S. 아갈락티에

(Cheng et al., 2005) 및 스타필로코쿠스 아우레우스(Rashel et al., 2007)와 같은 다른 그람양성 병원균에 대한 다양한 엔도리신이 엔지비오틱스로서 그의 효능을 입증하였다. 최근에 엔도리신 치료법의 가장 중요한 과제는 엔도리신의 외인성 작용에 대한 그람음성균의 무감각에 있는데, 그 이유는 외막이 펩티도글리칸으로부터 엔도리신의 접근을 보호하기 때문이다. 이는 현재 중요한 그람음성 병원균에 대해 효과적인 엔도리신의 범위의 확장을 방지한다.

[0004] 그람음성균은 홀마크로서 특징적인 비대칭 이중층을 갖는 외막을 갖는다. 외막 이중층은 인지질(주로 포스파티딜 에탄올아민)을 포함하는 내부 단층과 주로 단일 당지질, 지질다당류(LPS)로 구성된 외부 단층으로 이루어진다. 박테리아계에는 LPS 구조의 광범위한 다양성이 존재하며, LPS 구조는 우세한 환경 조건에 대응하여 개질될 수 있다. LPS 층의 안정성과 다른 LPS 분자 사이의 상호작용은 LPS 분자의 음이온 성분(지질 A 및 내부핵의 인산기와 KDO의 카르복실기)과 2가 이온( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ )의 정전기 상호작용에 의해 주로 달성된다. 따라서, 양이온-결합 부위는 외막의 완전성에 필수적이다(Vaara, 1992). 폴리-L-리신 폴리머(20개 이상의 잔기)와 같은 다가양이온성 제제는 이러한 안정화된 2가 양이온을 대체함으로써 외막 투과성을 증가시킨다. 또한, 이는 소위 '자가-촉진 흡수(self-promoted uptake)' 메커니즘을 수행한다(Hancock and Wong, 1984). 이의 벌크성(bulkiness) 때문에, 외막의 정상적인 차단 기능이 방해받으며, 그 자신의 흡수를 촉진하면서 일시적 크랙을 생성한다(Vaara and Vaara, 1983). 또한, 불포화 지방산의 부재에 의해 선호되는, 지질 A의 소수성 부분의 밀집되고 정렬된 패키징은 점도가 높은 강성(rigid) 구조를 형성한다. 이는 친유성 분자에 대해 덜 투과성이 되도록 하며, 외막(OM)에 대해 부가적인 안정성을 부여한다.

[0005] 그러나, 항생물질에 대해 증가되고 있는 미생물의 내성은 세균에 의해 야기되는 점점더 많아지는 감염을 치료하는데 있어서 어려움이 발생하고 있다. 특히 슈도모나스 에루지노사 및 엔테로박테리아세와 같은 그람음성균에 의해 야기되는 감염에 대해 어려움이 발생한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 따라서, 그람음성균에 대한 신규한 항균제가 요구된다.

[0007] 이러한 목적은 특허청구범위에 기재된 발명에 의해 해결된다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본원에서 "단백질"은 "폴리펩티드"와 동일한 의미로 나타낸다. 본원에서 "단백질"은 특이적 서열의 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 선형 폴리머를 나타낸다. 단백질의 아미노산 잔기는 예컨대 탄수화물과 인산과 같은 다양한 기들의 공유 결합에 의해 개질될 수 있다. 펩 또는 지질과 같은 다른 물질들이 폴리펩티드쇄와 더 느슨하게 결합될 수 있으며, 이는 본원에서 사용되는 "단백질"이라는 용어에 의해 구성되는 복합 단백질을 생성한다. 특히 알파 나선 및 베타-주름 시트의 존재와 관련하여 폴리펩티드쇄 폴드(fold)가 설명되는 다양한 방법들이 있다. 본원에서 "단백질"은 전부 알파, 전부 베타, 알파/베타, 및 알파 플러스 베타인 4개의 군의 단백질 모두를 나타낸다.

[0009] 본원에서 "융합 단백질"은 2개의 핵산 서열의 융합으로부터 생성된 발현 산물을 나타낸다. 상기 단백질은 예컨대 재조합 DNA 발현 시스템에서 제조될 수 있다. 또한, 본원에서 "융합 단백질"은 일차 아미노산 서열, 특히 엔도리신, 오토리신 및/또는 다른 펩티도글리칸 가수분해효소와 이차 또는 추가의 아미노산 서열의 융합을 나타낸다. 상기 이차 또는 추가의 아미노산 서열은 바람직하게는 펩티드 스트레치, 특히 양이온성 및/또는 다가양이온성 펩티드이다. 바람직하게는, 상기 이차 및/또는 추가의 아미노산 서열은 일차 아미노산 서열의 임의의 도메인에 대해 이질적이고, 실질적으로 상동적이지 않다.

[0010] 본원에서 "개질된 엔도리신 변이체"는 "엔도리신 변이체"와 동일한 의미로 사용된다. 상기 두 용어는 엔도리신 및 펩티드 스트레치, 특히 양이온성 및/또는 다가양이온성 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 나타낸다.

[0011] 본원에서 "펩티드 스트레치(peptide stretch)"는 엔도리신, 오토리신 및/또는 펩티도글리칸 가수분해효소와 같은 단백질에 연결된 임의 종류의 펩티드를 나타낸다. 특히 본원에서 "펩티드 스트레치"는 양이온성 펩티드 및/또는 다가양이온성 펩티드를 나타낸다. 그러나, 본 발명의 의미 내에서 펩티드 스트레치는 His-tag, Strep-tag, Avi-tag, Myc-tag, Gst-tag, JS-tag, 시스테인-tag, FLAG-tag 또는 당업계에 알려진 다른 tag들, 티오레독신 또는 말토스 결합 단백질(MBP)을 나타내지 않는다. 본원에서 "펩티드 스트레치"와 대조적으로 "tag"라는

용어는, tag가 하기 나열된 촉진 중 하나를 위해 유용하도록 하는 기능이 상기 펩티드의 양전하에 의해 야기되지 않는 한, 폴리펩티드의 발현 및/또는 친화성 정제를 촉진시키기 위해, 폴리펩티드를 표면에 고정화시키기 위해, 또는 예컨대 다른 ELISA 어세이 포맷에서 항체 결합에 의해 폴리펩티드를 탐지하기 위한 마커 또는 라벨 부분으로 제공하기 위해 이용할 수 있는 펩티드를 나타낸다. 그러나, His-tag는 각 pH에 따라 양으로 하전될 수도 있지만, 고정화된 2가 양이온에 결합될 때 친화성 정제 도구로서 사용되며 본 발명에 따른 펩티드 스트레치로서 사용되지 않는다.

[0012] 본원에서 "펩티드"는 약 2 내지 약 100개의 아미노산 잔기, 더 바람직하게는 약 4 내지 약 50개의 아미노산 잔기, 더 바람직하게는 약 5 내지 30개의 아미노산 잔기로 이루어진 짧은 폴리펩티드를 나타내며, 여기에서 하나의 아미노산 잔기의 아미노기는 펩티드 결합에 의해 다른 아미노산 잔기의 카르복실기에 결합된다. 펩티드는 특이적 기능을 가질 수 있다. 펩티드는 자연적으로 발생한 펩티드이거나, 또는 합성에 의해 설계되고 제조된 펩티드일 수 있다. 펩티드는 예를 들어 효소적 또는 화학적 분할에 의해 천연 단백질로부터 유래되거나 제거될 수 있으며, 또는 통상의 펩티드 합성법(예컨대, 고체상 합성) 또는 분자생물학 기법(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 합성에 의해 제조된 펩티드는 예컨대 양이온성 또는 다가양이온성 펩티드가 바람직하다.

[0013] 본원에서 "양이온성 펩티드"는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 갖는 펩티드를 나타낸다. 바람직하게는, 양이온성 펩티드는 pKa 값이 9.0 또는 그 이상이다. 통상적으로, 양이온성 펩티드의 아미노산 잔기의 4개 이상이 양으로 하전될 수 있으며 예를 들어 리신 또는 아르기닌이다. "양으로 하전된"은 대략 생리학적 조건에서 순(net) 양전하를 갖는 아미노산 잔기의 측쇄를 나타낸다. 본원에서 "양이온성 펩티드"는 또한 다가양이온성 펩티드를 나타낸다.

[0014] 본원에서 "다가양이온성 펩티드"는 양으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 리신, 아르기닌 및/또는 히스티딘 잔기, 더 바람직하게는 리신 및/또는 아르기닌 잔기로 주로 구성된, 합성에 의해 설계되고 제조된 펩티드를 나타낸다. 적어도 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 약 100 %의 아미노산 잔기가 양으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 리신 및/또는 아르기닌 잔기라면, 펩티드는 주로 양으로 하전된 아미노산 잔기로 구성된다. 양으로 하전된 아미노산 잔기가 아닌 아미노산 잔기는 중성으로 하전된 아미노산 잔기 및/또는 음으로 하전된 아미노산 잔기 및/또는 소수성 아미노산 잔기일 수 있다. 바람직하게는, 양으로 하전된 아미노산 잔기가 아닌 아미노산 잔기는 중성으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 세린 및/또는 글리신이다.

[0015] 본원에서 "엔도리신(endolysin)"은 세균의 세포벽을 가수분해하는데 적합한 효소를 나타낸다. "엔도리신"은 하나 이상의 하기 활성을 갖는 하나 이상의 "효소적 활성 도메인(EAD)"으로 이루어진다: 엔도펩티다제, N-아세틸-뮤라모일-L-알라닌-아미다제(아미다제), N-아세틸-뮤라미다제, N-아세틸-글루코사미니다제(리소자임) 또는 트랜스글리코실라제. 또한, 엔도리신은 효소적으로 불활성이고 숙주 세균의 세포벽에 결합하는 영역, 소위 CBD(세포벽 결합 도메인)를 포함할 수도 있다. 엔도리신은 한개, 두개 또는 그 이상의 CBD를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 "엔도리신"은 또한 하나 이상의 EAD를 갖지만 CBD는 갖지 않는 효소를 나타낸다. 일반적으로, 세포벽 결합 도메인은 세균의 표면상에서 다른 성분들을 결합할 수 있다. 바람직하게는, 세포벽 결합 도메인은 펩티도글리칸 결합 도메인이며, 세균의 펩티도글리칸에 결합한다.

[0016] 본원에서 "세포벽"은 그람음성균의 외부 세포 인클로저(enclosure)를 형성함에 따라 세포의 완전한 상태를 보장하는 모든 성분들을 나타낸다. 특히, 본원에서 "세포벽"은 펩티도글리칸, 지질다당류를 갖는 그람음성균의 외막, 세균의 세포막을 나타내며, 또한 예컨대 캡슐, 외부 단백질 층 또는 점액으로서 펩티도글리칸에 부착된 부가층을 나타낸다.

[0017] 본원에서 "오토리신(autolysin)"은 엔도리신과 연관된 효소이지만, 세균에 의해 인코딩되며 예컨대 세포 분할 및 세포벽 대사에 관여하는 효소이다. 오토리신에 대한 개요는 "Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. FEMS Microbiol Rev. 2008 Mar; 32(2): 259-86"에서 찾을 수 있다.

[0018] 본원에서 "EAD"는 엔도리신의 효소적 활성 도메인을 나타낸다. EAD는 세균의 펩티도글리칸을 가수분해하는 원인이 된다. 이는 엔도리신의 하나 이상의 효소적 활성을 나타낸다. EAD는 또한 한개보다 많은 효소적 활성 모듈(module)로 구성될 수도 있다. 본원에서 "EAD"는 "촉매 도메인"과 동일한 의미로 사용된다.

[0019] 본원에서 "삭제"는 각 출발 서열로부터 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 제거를 나타낸다.



- [0020] 본원에서 "삽입" 또는 "부가"는 각 출발 서열로부터 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 삽입 또는 부가를 나타낸다.
- [0021] 본원에서 "치환"은 특정 위치에 존재하는 아미노산 잔기를 다른 잔기로 교환하는 것을 나타낸다.
- [0022] 본 발명은 지질다당류(LPS) 분열 활성 또는 일반적으로 막 분열 활성을 갖는 펩티드에 융합된 엔도리신을 포함하는, 개질된 엔도리신 변이체의 경우, 그람음성균에 대한 개선된 항균제에 관한 것이다. LPS는 그람음성균의 외막의 주요 성분이다. 이는 세포막의 음전하를 증가시키고 특정 종류의 화학적 공격으로부터 막을 보호한다. 또한, 상기 LPS는 어느 정도까지는 그람음성균의 막을 세균의 외부로부터 부가된 엔도리신으로부터 보호한다. 그러나, LPS는 예컨대 양으로 하전된 펩티드로서 LPS 분열 활성을 갖는 펩티드 스트레치에 의해 분열될 수 있다. 또한, 상기 펩티드 스트레치는 외막 단백질 운반 메카니즘, 구조적 외막 단백질의 불안정화 및/또는 지질-의존 불안정화에 관여할 수 있다. 본 발명자들은 놀랍게도 LPS 분열 활성 또는 일반적으로 막 분열 활성을 갖는 펩티드 스트레치가 그람음성균의 외막을 통해 상기 펩티드 스트레치에 융합된 엔도리신의 통과를 촉진한다는 것을 발견하였다. 그람음성균의 외막을 통한 엔도리신의 촉진된 통과 후에, 펩티도글리칸 층의 분해에 이어서 세균의 내부 세포 압력이 더이상 견딜 수 없을 때 삼투적 용해에 기인하여 엔도리신에 의해 그람음성균의 세포벽은 더 용이하게 분열 또는 분해될 수 있다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 그람음성균의 세포벽을 분해하는 활성을 갖는 엔도리신과 막 분열 활성을 갖는 펩티드 스트레치로 구성된 융합 단백질에 관한 것이며, 상기 펩티드 스트레치는 N-말단 및/또는 C-말단에서 효소에 융합된다. 본 발명에 따른 상기 융합 단백질은 개질된 엔도리신 변이체 또는 단순히 엔도리신 변이체 또는 개질된 엔도리신이라고도 지칭된다.
- [0024] 개질된 엔도리신 변이체의 엔도리신 부분은, 엔테로박테리아세에(에스케리키아, 특히 대장균, 살모넬라, 쉬겔라, 시트로박터, 에드워드시엘라, 엔테로박터, 하프니아, 클레브시엘라, 특히 K. 뉴모니아, 모르가넬라, 프로테우스, 프로비덴시아, 세라티아, 예르시니아), 슈도모나다세에(슈도모나스, 특히 P. 에루지노사, 버크홀데리아, 스테노트로포모나스, 슈와넬라, 스펜고모나스, 코마모나스), 네이세리아, 모락셀라, 비브리오, 에어로모나스, 브루셀라, 프란시셀라, 보르데텔라, 레지오넬라, 바르토넬라, 콕시엘라, 해모필루스, 파스퇴렐라, 만헤이미아, 악티노바실루스, 가르드네렐라, 스피로채타세에(트레포네마 및 보렐리아), 램토스피라세에, 캄필로박터, 헬리코박터, 스피릴룸, 스트렙토바실러스, 박테로이다세에(박테로이데스, 푸소박테리움, 프레보텔라, 포르피로모나스), 아시네토박터, 특히 A. 바우마니 등의 인간 또는 동물에 병원성인 균주를 포함하는 세균 군, 과, 속 또는 종의 그람음성균과 같은 그람음성균에 대해 특이적인 박테리오파지에 의해 인코딩되는 것이 바람직하다.
- [0025] 또한, 엔도리신은 엔테로박테리아세에(에스케리키아, 특히 대장균, 살모넬라, 쉬겔라, 시트로박터, 에드워드시엘라, 엔테로박터, 하프니아, 클레브시엘라, 특히 K. 뉴모니아, 모르가넬라, 프로테우스, 프로비덴시아, 세라티아, 예르시니아), 슈도모나다세에(슈도모나스, 특히 P. 에루지노사, 버크홀데리아, 스테노트로포모나스, 슈와넬라, 스펜고모나스, 코마모나스), 네이세리아, 모락셀라, 비브리오, 에어로모나스, 브루셀라, 프란시셀라, 보르데텔라, 레지오넬라, 바르토넬라, 콕시엘라, 해모필루스, 파스퇴렐라, 만헤이미아, 악티노바실루스, 가르드네렐라, 스피로채타세에(트레포네마 및 보렐리아), 램토스피라세에, 캄필로박터, 헬리코박터, 스피릴룸, 스트렙토바실러스, 박테로이다세에(박테로이데스, 푸소박테리움, 프레보텔라, 포르피로모나스), 아시네토박터, 특히 A. 바우마니 등의 인간 또는 동물에 병원성인 균주를 포함하는 세균 군, 과, 속 또는 종의 그람음성균에 대해 세포벽 분해 활성을 갖는 것이 바람직하다.



[0026] 바람직하게는, 엔도리신 부분은 하기 표에 기재된 파지 또는 야생형(wild type) 엔도리신으로부터 유래된다.

| 파지(phage)         | 문헌  | 야생형 엔도리신        | 엔도리신의 예상되는 기능                     |
|-------------------|---|-----------------|-----------------------------------|
| φ V10             | Perry, L.L. and Applegate, B.M.               | PhiV10p30       | 키티나제                              |
| FELS-1            | McClelland, M. and Wilson, R.K.               | STM0907.Fels0   | 키티나제                              |
| ε 15              | Kropinski, A.M. and McConnel, M.R.            | epsilon15p25    | 키티나제                              |
| YUA               | Ceyssens, P. (Laboratory for Gene technology) | YuA20           | 용해성 트랜스글리코실라제(C) / 1개의 막관통 도메인(N) |
| B3                | Braid, M.D. and Kitts, C.L.                   | ORF23           | 용해성 트랜스글리코실라제(C) / 2개의 막관통 도메인(N) |
| BCEP <sub>μ</sub> | Summer, E.J. and Young, R.                    | BcepMu22        | 용해성 트랜스글리코실라제(H) / 1개의 막관통 도메인(N) |
| F116              | Byrne, M. and Kropinski, A.M.                 | F116p62         | 무라미니다제(T4-유사)                     |
| FELS-2            | McClelland, M. and Wilson, R.K.               | STM2715.S.Fels2 | 무라미니다제(T4-유사)                     |
| ES18              | Casjens, S.R. and Hendrix, R.W.               | gp76            | 무라미니다제(T4-유사)                     |
| SETP3             | De Lappe, N and Cornican, M.                  | SPSV3_gp23      | 무라미니다제(T4-유사)                     |
| φ EC032           | Savalia, D and Severinov, K                   | phi32_17        | 무라미니다제(T4-유사)                     |
| HK022             | Juhala, R and Hendrix, R.W.                   | HK022p54        | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| HK97              | Juhala, R and Hendrix, R.W.                   | HK97p58         | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| HK620             | Clark, A.J. and Dhillon, T.S.                 | HK620p36        | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| E1                | Pickard, D. and Dougan, G                     | VIP0007         | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| SF6               | Casjens, S and Clark, A.J.                    | Sf6p62          | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| SFV               | Allison, G.E. and Verma, N.K.                 | R (SfVp40)      | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| BCEPC6B           | Summer, EJ and Young, R.                      | gp22            | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| BCEPNAZGUL        | Summer, EJ and Young, R.                      | Nazgul38        | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| P2                | Christie, G.E. and Calender, R.               | K (P2p09)       | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| Wφ                | Christie, G.E. and Esposito, D.               | K (Wphi09)      | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| RV5               | Kropinski, A.M. and Johnson                   | rv5_gp085       | 무라미니다제(람다 유사)                     |
| JS98              | Zuber, S and Denou, E.                        | EpJS98_gp116    | 무라미니다제(T4-유사)                     |
| I3A               | Savalia, D and Molineux, I.                   | gp3.5           | 류라모일-L-알라닌 아미다제                   |
| BA14              | Savalia, D and Molineux, I.                   | gp3.5           | 류라모일-L-알라닌 아미다제                   |
| ECODS1            | Savalia, D and Molineux, I.                   | gp3.5           | 류라모일-L-알라닌 아미다제                   |
| K1F               | Scholl, D and Merrill, C                      | CKV1F_gp16      | 류라모일-L-알라닌 아미다제                   |

[0027]

|           |                                     |               |                                  |
|-----------|-------------------------------------|---------------|----------------------------------|
| T3        | Pajunen, M.I. and Mollineux, I.J.   | T3p18         | 뮤라모일-L-알라닌 아미다제                  |
| GH-1      | Kropinski, A.M. and Kovalyova, I.V. | gh-1p12       | 뮤라모일-L-알라닌 아미다제                  |
| K11       | Mollineux, I. and Savalia, D.       | gp3.5         | 뮤라모일-L-알라닌 아미다제                  |
| BIP-1     | Liu, M and Miller, J.F.             | bip-1p02      | 리소자임(N) / PG-결합 도메인(C)           |
| BMP-1     | Liu, M and Miller, J.F.             | bmp-1p02      | 리소자임(N) / PG-결합 도메인(C)           |
| BPP-1     | Liu, M and Miller, J.F.             | bpp2          | 리소자임(N) / PG-결합 도메인(C)           |
| Φ CTX     | Nakayama, K and Hayashi, T.         | ORF12         | PG-결합 도메인(N) / 뮤라미다제(C)          |
| BCEP43    | Summer, EJ and Young, R.            | Bcep43-27     | PG-결합 도메인(N) / 뮤라미다제(C)          |
| BCEP781   | Summer, EJ and Young, R.            | Bcep781-27    | PG-결합 도메인(N) / 뮤라미다제(C)          |
| BCEP1     | Summer, EJ and Young, R.            | Bcep1-28      | PG-결합 도메인(N) / 뮤라미다제(C)          |
| BCEPNY3   | Summer, EJ and Young, R.            | BcepNY3gene26 | PG-결합 도메인(N) / 뮤라미다제(C)          |
| Φ E12-2   | DeShazer, D and Nierman, W.C.       | gp45          | PG-결합 도메인(N) / 뮤라미다제(C)          |
| Φ 52237   | DeShazer, D and Nierman, W.C.       | gp28          | PG-결합 도메인(N) / 뮤라미다제(C)          |
| Φ P27     | Becktenwald, J and Schmidt, H.      | P27p30        | 엔도펩티다제                           |
| RB49      | Monod, C and Krisch, H.M.           | RB49p102      | 엔도펩티다제                           |
| Φ 1       | Arbiol, C. and Comeau, A.M.         | phil-p102     | 엔도펩티다제                           |
| T5        | Pankova, N.V. and Ksenzenko, V.N.   | lys (T5.040)  | 엔도펩티다제                           |
| 201phi2-1 | Thomas <i>et al.</i> , 2008         |               | PG-결합 도메인(N) / 알려지지 않은 촉매 도메인(C) |
| Aehl      | Monod, C and Krisch, H.M.           | Aehl p339     | 뮤라미다제(T4-유사)                     |
| YYZ-2008  | Kropinski, A.M.                     | YYZgp45       | 뮤라미다제(람다-유사)                     |

[0028]

[0029]

슈도모나스 에루지노사 파지 ΦKZ 및 EL, 슈도모나스 푸티다 파지 OBP, 파지 LUZ24의 엔도리신으로부터, 또는 T4 리소자임, gp61 뮤라미다제 및 PSP3 엔도리신으로부터 유래된 엔도리신 부분이 또한 바람직하다.

[0030]

더 바람직하게는, 엔도리신 부분은 서열번호:1에 따른 phiKZgp144, 서열번호:2에 따른 ELgp188, 서열번호:3에 따른 살모넬라 엔도리신, 서열번호:4에 따른 엔테로박테리아 파지 T4 엔도리신, 서열번호:5에 따른 아시네토박터 바우마니 엔도리신, 서열번호:6에 따른 대장균 파지 K1F 엔도리신, 서열번호:7에 따른 OBPgpLYS, 서열번호:8에 따른 PSP3 살모넬라 엔도리신(PSP3gp10) 및 서열번호:9에 따른 대장균 파지 P2 엔도리신(P2gp09)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0031]

또다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 엔도리신 또는 개질된 엔도리신 변이체는 아미노산 서열의 변형 및/또는 변이를 포함한다. 상기 변형 및/또는 변이는 삭제, 삽입 및 부가, 치환 또는 이의 조합과 같은 돌연변이, 및/또는 비오틴화, 아세틸화, 페길화(PEGylation)와 같은 아미노산 잔기의 화학적 변화, 아미노기, SH 기 또는 카르복실기의 화학적 변화를 포함할 수 있다. 상기 변형 및/또는 변이된 엔도리신은 각각의 야생형 엔도리신의 용균 활성을 나타낸다. 그러나, 상기 활성은 각각의 야생형 엔도리신의 활성보다 더 높거나 더 낮을 수 있다. 상기 활성은 각각의 야생형 엔도리신의 활성의 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 약 200 %, 또는 그 이상일 수 있다. 상기 활성은 예컨대 [Briers *et al.*, J. Biochem. Biophys Methods 70: 531-533, (2007)]에 기재된 액체 용균 어세이 또는 플레이트 용균 어세이와 같이 당업계에서 통상의 기술자에게 잘 알려진 어세이들에 의해 측정될 수 있다.

[0032]

본 발명의 일측면에서, 막 및/또는 LPS 분열 활성을 갖는 펩티드는 양으로 하전된 아미노산으로서 리신, 아르기닌 및/또는 히스티딘을 하나 이상 포함하는 양으로 하전된 펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 상기 펩티드에서 아미노산의 80% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 바람직하게는 100%가 양으로 하전된 아미노산이다. 유리하게는, 양이온성 펩티드는 엔도리신 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단 끝에 융합되며, 이에 따라 이후의 단백질의 양이온성을 증대시킨다. 본 발명의 또다른 구현예에서, 엔도리신에 융합된 양이온성 펩티드는 5개 이상, 더 바람직하게는 9개 이상의 아미노산 길이를 갖는다.

- [0033] 바람직한 구현예에서, 엔도리신 변이체는 엔도리신 및 엔도리신에 융합된 펩티드를 포함하며, 상기 펩티드는 약 3 내지 약 50개, 더 바람직하게는 약 5 내지 약 20개, 예를 들어 약 5 내지 약 15개의 아미노산 잔기를 포함하며, 상기 아미노산 잔기의 적어도 20, 30, 40, 50, 60 또는 70%, 더 바람직하게는 적어도 80%, 예를 들어 적어도 90%가 아르기닌 또는 리신 잔기이다. 또다른 바람직한 구현예에서, 엔도리신 변이체는 엔도리신 및 엔도리신에 융합된 펩티드를 포함하며, 상기 펩티드는 약 3 내지 약 50개, 더 바람직하게는 약 5 내지 약 20개, 예를 들어 약 5 내지 약 15개의 아미노산 잔기를 포함하며, 상기 아미노산 잔기는 아르기닌 또는 리신 잔기이다.
- [0034] 바람직하게는, 개질된 엔도리신 변이체의 펩티드 스트레치는 엔도리신의 N-말단 및/또는 C-말단에 융합된다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 펩티드 스트레치는 엔도리신의 N-말단에만 융합된다. 그러나, N-말단과 C-말단 모두에서 펩티드 스트레치를 갖는 개질된 엔도리신 변이체가 또한 바람직하다. N-말단 및 C-말단 상의 상기 펩티드 스트레치는 동일하거나 구별되는 펩티드 스트레치일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체의 펩티드 스트레치는 바람직하게는 효소에 공유결합된다. 바람직하게는, 상기 펩티드 스트레치는 적어도 5개, 더 바람직하게는 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99개 또는 적어도 100개의 아미노산 잔기로 이루어진다. 특히 약 5 내지 약 100개의 아미노산 잔기, 약 5 내지 약 50개 또는 약 5 내지 약 30개의 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드 스트레치가 바람직하다. 약 6 내지 약 42개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 39개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 38개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 31개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 25개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 24개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 22개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 21개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 20개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 19개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 16개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 14개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 12개의 아미노산 잔기, 약 6 내지 약 10개의 아미노산 잔기 또는 약 6 내지 약 9개의 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드 스트레치가 더 바람직하다.
- [0036] 본 발명의 일측면에서, 상기 융합된 펩티드 스트레치는 리신, 아르기닌 및/또는 히스티딘, 특히 리신 및/또는 아르기닌의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 하나 이상 포함하는 양이온성 및/또는 다가양이온성 펩티드이다. 바람직하게는, 상기 펩티드 스트레치에서 아미노산 잔기의 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99 % 이상이 양으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 리신 및/또는 아르기닌 잔기이다. 약 100 %의 양으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 아르기닌 및/또는 리신 잔기로 이루어진 펩티드 스트레치가 특히 바람직하며, 여기서 바람직하게는 약 60 % 내지 약 70 %의 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기가 리신 잔기이고 약 30 % 내지 약 40 %의 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기가 아르기닌 잔기이다. 약 100 %의 양으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 아르기닌 및/또는 리신 잔기로 이루어진 펩티드 스트레치가 더 바람직하며, 여기서 바람직하게는 약 64 % 내지 약 68 %의 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기가 리신이고 약 32 % 내지 약 36 %의 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기가 아르기닌이다. 아르기닌만으로 또는 리신만으로 이루어진 펩티드 스트레치가 또한 바람직하다.
- [0037] 서열번호:10(KRKRRK)에 따른 하나 이상의 모티브(motive)를 포함하는 양이온성 및/또는 다가양이온성 펩티드 스트레치가 특히 바람직하다. 특히, 서열번호:10(KRKRRK)에 따른 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개의 모티브를 포함하는 양이온성 펩티드 스트레치가 바람직하다. 하나 이상의 KRK 모티브(lys-arg-lys), 바람직하게는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 또는 33개의 KRK 모티브를 포함하는 양이온성 펩티드 스트레치가 더 바람직하다.
- [0038] 또다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 양이온성 펩티드 스트레치는 양으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 리신 및/또는 아르기닌 잔기 외에, 중성으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 글리신 및/또는 세린 잔기를 포함한다. 약 70 % 내지 약 100 %, 또는 약 80 % 내지 약 95 %, 또는 약 85 % 내지 약 90 %의 양으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 리신, 아르기닌 및/또는 히스티딘 잔기, 더 바람직하게는 리신 및/또는 아르기닌 잔기와 약 0 % 내지 약 30 %, 또는 약 5 % 내지 약 20 %, 또는 약 10 % 내지 약 20 %의 중성으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 글리신 및/또는 세린 잔기로 이루어진 양이온성 펩티드 스트레치가 바람직하다. 약 4 % 내지 약 8 %의 세린 잔기, 약 33 % 내지 약 36 %의 아르기닌 잔기, 및 약 56 % 내지 약 63%의 리신 잔기로 이루어진 폴리펩티드 스트레치가 바람직하다. 특히, 서열번호:32(KRXKR)에 따른 하나 이상의 모티브를 포함하는 폴리펩티드 스트레치가 바람직하며, 여기에서 X는 리신, 아르기닌 및 히스티딘과 다른 임의의 아미노산이다. 특히, 서열번호:33(KRSKR)에 따른 하나 이상의 모티브를 포함하는 폴리펩티드 스트레치가 바람직하다. 서열번호:32(KRXKR)



또는 서열번호:33(KRSKR)에 따른 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 약 20개의 모티브를 포함하는 양이온성 스트레치가 더 바람직하다.

[0039] 약 9 내지 약 16 %의 글리신 잔기, 약 4 내지 약 11 %의 세린 잔기, 약 26 내지 약 32 %의 아르기닌 잔기, 및 약 47 내지 약 55 %의 리신 잔기로 이루어진 폴리펩티드 스트레치가 또한 바람직하다. 특히, 서열번호:34(KRGSG)에 따른 하나 이상의 모티브를 포함하는 폴리펩티드 스트레치가 바람직하다. 서열번호:34(KRGSG)에 따른 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 약 20개의 모티브를 포함하는 양이온성 스트레치가 더 바람직하다.

[0040] 또다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 양이온성 펩티드 스트레치는 양으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 리신 및/또는 아르기닌 잔기 외에, 소수성 아미노산 잔기, 특히 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 시스테인, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 트레오닌, 세린, 프롤린 및 글리신 잔기, 더 바람직하게는 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌 및/또는 트립토판 잔기를 포함한다. 약 70 % 내지 약 100 %, 또는 약 80 % 내지 약 95 %, 또는 약 85 % 내지 약 90 %의 양으로 하전된 아미노산 잔기, 특히 리신 및/또는 아르기닌 잔기와 약 0 % 내지 약 30 %, 또는 약 5 % 내지 약 20 %, 또는 약 10 % 내지 약 20 %의 소수성 아미노산 잔기, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 시스테인, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 트레오닌, 세린, 프롤린 및 글리신 잔기, 더 바람직하게는 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌 및/또는 트립토판 잔기로 이루어진 양이온성 펩티드 스트레치가 바람직하다.

[0041] 특히, 하기의 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 펩티드 스트레치가 바람직하다.

| 펩티드 스트레치                         | 길이 | 서열번호    |
|----------------------------------|----|---------|
| KKKKK                            | 5  | 서열번호:10 |
| KKKKKKKK                         | 9  | 서열번호:11 |
| RRRRRRRR                         | 9  | 서열번호:12 |
| KKKKKKK                          | 8  | 서열번호:13 |
| KKKKKKKKK                        | 10 | 서열번호:14 |
| KKKKKKKKKKK                      | 12 | 서열번호:15 |
| KKKKKKKKKKKKK                    | 14 | 서열번호:16 |
| KKKKKKKKKKKKKKK                  | 16 | 서열번호:17 |
| KKKKKKKKKKKKKKKKK                | 19 | 서열번호:18 |
| RRRRRRRRRRRRRRRRRR               | 19 | 서열번호:19 |
| KKKKKKKKKKKKKKKKK                | 19 | 서열번호:20 |
| KKKKKKKKKSKKKKKKK                | 20 | 서열번호:21 |
| KKKKKKKKKSKKKKKKK                | 21 | 서열번호:22 |
| KKKKKKKKKKKKKKKKK                | 21 | 서열번호:23 |
| KKKKKKKKRGSGKKKKKK               | 22 | 서열번호:24 |
| KKKKKKKKRGSGGKKKKKK              | 24 | 서열번호:25 |
| KKKKKKKKKKKKKKKKKKK              | 25 | 서열번호:26 |
| KKKKKKKKKSKKKKKKKSKKKKKKK        | 31 | 서열번호:27 |
| KKKKKKKKRGSGGKKKKKKRGSGGKKKKKK   | 38 | 서열번호:28 |
| KKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKK    | 39 | 서열번호:29 |
| KKKKKKKKSKKKKKKKSKKKKKKKSKKKKKKK | 42 | 서열번호:30 |

[0042]

[0043] 바람직하게는, 펩티드 스트레치는 His-tag, Strep-tag, Avi-tag, Myc-tag, Gst-tag, JS-tag, 시스테인-tag, FLAG-tag 또는 당업계에 알려진 다른 tag들과 같은 tag가 없으며, 티오레독신 또는 말토스 결합 단백질(MBP)이 없다. 그러나, 본 발명에 따른 펩티드 스트레치 및/또는 개질된 엔도리신 변이체는 상기 tag 또는 tag들을 포함할 수도 있다.

[0044] 바람직하게는, 펩티드 스트레치는 그람음성균의 외막을 통해 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 유도하는 기능을 갖지만, 효소에 융합되지 않고 투여될 때 활성이 없거나 낮다. 그람음성균의 외막을 통해 개질된 엔도리신 변이체를 유도하는 기능은 상기 펩티드 스트레치의 외막 또는 LPS 분열 활성 능력에 의해 야기된다.

[0045] 특히, 하기의 개질된 엔도리신 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 개질된 엔도리신 변이체가 바람직하다.

| 개질된 엔도리신 변이체               | 서열번호: (개질된 엔도리신 변이체) | 엔도리신 부분 | 펩티드 스트레치 (다르게 나타내지 않는다면 N-말단)  |
|----------------------------|----------------------|---------|--------------------------------|
| POLY-gp144                 | 서열번호:35              | 서열번호:1  | 서열번호:11                        |
| (POLY) <sup>2</sup> -gp144 | 서열번호:36              | 서열번호:1  | 서열번호:21                        |
| (POLY) <sup>3</sup> -gp144 | 서열번호:37              | 서열번호:1  | 서열번호:27                        |
| (POLY) <sup>4</sup> -gp144 | 서열번호:38              | 서열번호:1  | 서열번호:30                        |
| POLY-gp188                 | 서열번호:39              | 서열번호:2  | 서열번호:11                        |
| (POLY) <sup>2</sup> -gp188 | 서열번호:40              | 서열번호:2  | 서열번호:21                        |
| (POLY) <sup>3</sup> -gp188 | 서열번호:41              | 서열번호:2  | 서열번호:27                        |
| (POLY) <sup>4</sup> -gp188 | 서열번호:42              | 서열번호:2  | 서열번호:30                        |
| pKKZ144pET32b              | 서열번호:43              | 서열번호:1  | 서열번호:14                        |
| KRK_5_pET32b               | 서열번호:44              | 서열번호:1  | 서열번호:10                        |
| KRK_12_pET32b              | 서열번호:45              | 서열번호:1  | 서열번호:15                        |
| KRK_14_pET32b              | 서열번호:46              | 서열번호:1  | 서열번호:16                        |
| R9_pET32b                  | 서열번호:47              | 서열번호:1  | 서열번호:12                        |
| K8_pET32b                  | 서열번호:48              | 서열번호:1  | 서열번호:13                        |
| pK2KZ144_pET32b_mod3       | 서열번호:49              | 서열번호:1  | 서열번호:28                        |
| PKPSP3gp10                 | 서열번호:53              | 서열번호:8  | 서열번호:11                        |
| PKP2gp09                   | 서열번호:57              | 서열번호:9  | 서열번호:11                        |
| PKOBPgpLYS                 | 서열번호:61              | 서열번호:7  | 서열번호:11                        |
| pK2KZ144pET32b             | 서열번호:62              | 서열번호:1  | 서열번호:22                        |
| pK3KZ144pET32b             | 서열번호:63              | 서열번호:1  | 서열번호:27                        |
| pK4KZ144pET32b             | 서열번호:64              | 서열번호:1  | 서열번호:30                        |
| KRK_19_pET32b              | 서열번호:66              | 서열번호:1  | 서열번호:18                        |
| KRK_21_pET32b              | 서열번호:67              | 서열번호:1  | 서열번호:23                        |
| KRK_25_pET32b              | 서열번호:68              | 서열번호:1  | 서열번호:26                        |
| KRK_39_pET32b              | 서열번호:69              | 서열번호:1  | 서열번호:29                        |
| K19_pET32b                 | 서열번호:70              | 서열번호:1  | 서열번호:20                        |
| K16_pET32b                 | 서열번호:71              | 서열번호:1  | 서열번호:17                        |
| pKKZ-144_K2_pET32b         | 서열번호:72              | 서열번호:1  | N-말단: 서열번호:11<br>C-말단: 서열번호:21 |
| pK2KZ144_pET32b_mod1       | 서열번호:73              | 서열번호:1  | 서열번호:24                        |
| pK2KZ144_pET32b_mod2       | 서열번호:74              | 서열번호:1  | 서열번호:25                        |
| sm101_KRK9                 | 서열번호:75              | 서열번호:1  | 서열번호:11                        |
| sm102_KRK9                 | 서열번호:76              | 서열번호:1  | 서열번호:11                        |
| sm103_KRK9                 | 서열번호:77              | 서열번호:1  | 서열번호:11                        |
| sm104_KRK9                 | 서열번호:78              | 서열번호:1  | 서열번호:11                        |

[0046]

[0047] 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체, 특히 서열번호:35 내지 49, 53, 57, 61 내지 64, 및 66 내지 78에 따른 바람직한 개질된 엔도리신 변이체는 예컨대 정제용 tag를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는 개질된 엔도리신 변이체의 C-말단에서 His<sub>6</sub>-tag가 바람직하다. 상기 tag는 예컨대 클로닝의 이유 때문에 부가적 아미노산 잔기에 의해 개질된 엔도리신 변이체에 연결될 수 있다. 바람직하게는, 상기 tag는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 부가적 아미노산 잔기에 의해 개질된 엔도리신 변이체에 연결될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 개질된 엔도리신 변이체는 부가적 아미노산 잔기인 리신 및 글리신(Lys-Gly) 또는 류신 및 글루탐산(Leu-Glu)에 의해 개질된 엔도리신 변이체에 연결된 C-말단에서 His<sub>6</sub>-tag를 포함한다.

[0048]

특히, 하기에 기재된 실시예에서 사용되는 개질된 엔도리신 변이체가 바람직하다. 실시예에서 사용되는 서열번호:35 내지 42, 53, 57 및 61에 따른 개질된 엔도리신 변이체는 부가적 아미노산 잔기인 리신 및 글리신(Lys-Gly)에 의해 각각의 개질된 엔도리신 변이체에 연결된 C-말단에서 His<sub>6</sub>-tag를 포함한다. 실시예에서 사용되는 서열번호:43 내지 49 및 75에 따른 개질된 엔도리신 변이체는 부가적 아미노산 잔기인 류신 및 글루탐산(Leu-Glu)에 의해 각각의 개질된 엔도리신 변이체에 연결된 C-말단에서 His<sub>6</sub>-tag를 포함한다.

[0049]

융합 단백질은 예컨대 [Sambrook et al. 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual]에 기재되어 있는 표준 클로닝 기법을 사용하여 둘 이상의 핵산 서열을 연결함으로써 구축된다. 상기 단백질은 예컨대 재조합 DNA 발현 시스템에서 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 융합 단백질은 엔도리신 및 각각의 펩티드 스트레치에 대한 핵산을 융합함으로써 획득될 수 있다.

[0050]

일부 융합 단백질은 세균에서 발현에 따라 독성일 수도 있고 단백질 분해에 기인하여 상동적이지 않을 수도 있

기 때문에, 전략은 다른 부가적 단백질에 결합되거나 융합된 이러한 융합 단백질을 발현하는 것일 수 있다. 이러한 다른 부가적 단백질에 대한 예는 티오레독신이며, 이는 대장균에서 독성 항균 펩티드의 발현을 중재하는 것으로 나타났다(TrxA mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from multiple joined genes in Escherichia coli. Zhou L, Zhao Z, Li B, Cai Y, Zhang S. Protein Expr Purif. 2009 Apr; 64(2): 225-230).

- [0051] 융합 단백질의 항균 기능을 위해, 부가적 융합 단백질을 단백질 분해에 의해 제거할 필요성이 있을 수 있다. 예컨대 사용되는 단백질분해 효소에 따라 융합 단백질의 N-말단을 예를 들어 MGS에서 AMGS(서열번호:31)로 개질하기 위해, pET32 발현 시스템(Novagen)과 같은 시판되는 키트가 필요할 수 있으며, 남아있는 알려진 잔기는 도입된 엔테로키나제 분해 분위로부터 생성된 것이었다.
- [0052] 또다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체의 펩티드 스트레치는 아미노산 서열의 변형 및/또는 변이를 포함한다. 상기 변형 및/또는 변이는 삭제, 삽입 및 부가, 치환 또는 이의 조합과 같은 돌연변이, 및/또는 비오틴화, 아세틸화, 페길화(PEGylation)와 같은 아미노산 잔기의 화학적 변화, 아미노기, SH 기 또는 카르복실기의 화학적 변화를 포함할 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 분리된(isolated) 핵산 분자에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 상기 벡터는 본 발명에 따른 상기 개질된 엔도리신 변이체의 구성적 또는 유도 발현을 가능하게 할 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명은 상기 개질된 엔도리신 변이체를 발현하는 유전적으로 개질된 적합한 숙주 세포와 같은 미생물로부터 상기 개질된 엔도리신 변이체를 수득하는 방법에 관한 것이다. 상기 숙주 세포는 미생물, 예컨대 세균 또는 효모 또는 균류, 또는 예컨대 포유류 세포, 특히 인간 세포와 같은 동물 세포일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 효모 세포는 피치아 파스토리스 세포이다. 숙주는 예컨대 수율, 가용성, 비용 등의 단순한 생명공학 적 이유에 기인하여 선택될 수 있지만, 또한 의학적 관점, 예컨대 비-병리학 적 세균 또는 효모, 인간 세포로부터 선택될 수도 있다.
- [0055] 본 발명의 또다른 측면은 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체의 발현을 얻기 위해 적합한 숙주 세포를 유전적으로 형질전환하는 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 유전적 물질을 숙주 세포로 도입함으로써 숙주 세포가 유전적으로 개질되며, 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 유전공학 방법에 의해 번역 및 발현을 수행한다.
- [0056] 본 발명의 또다른 측면은, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자 또는 벡터로 형질전환된 숙주를 포함하는 조성물, 바람직하게는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0057] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물은 예컨대 EDTA, TRIS, 락트산, 락토페린, 폴리믹신, 시트르산 및/또는 예컨대 [Vaara (Agents that increase the permeability of the outer membrane. Vaara M. Microbiol Rev. 1992 Sep; 56(3): 395-441)]에 기재된 다른 물질들과 같은 금속 킬레이터와 같이 그람음성균의 외막을 투과할 수 있는 제제를 부가적으로 포함할 수 있다. 상기 언급된 투과성 제제의 조합을 포함하는 조성물이 또한 바람직하다. 특히, 약 10  $\mu$ M 내지 약 100 mM EDTA, 더 바람직하게는 약 50  $\mu$ M 내지 약 10 mM EDTA, 더 바람직하게는 약 0.5 mM 내지 약 10 mM EDTA, 더 바람직하게는 약 0.5 mM 내지 약 2 mM EDTA, 더 바람직하게는 약 0.5 mM 내지 1 mM EDTA를 포함하는 조성물이 바람직하다. 그러나, 약 10  $\mu$ M 내지 약 0.5 mM EDTA를 포함하는 조성물이 또한 바람직하다. 약 0.5 mM 내지 약 2 mM EDTA, 더 바람직하게는 약 1 mM EDTA 및 부가적으로 약 10 내지 약 100 mM TRIS를 포함하는 조성물이 또한 바람직하다.
- [0058] 또한, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 숙주에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명의 또다른 측면은, 병원성 그람음성균과 관련된 장애, 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 약제의 제조에 있어서, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주의 용도에 관한 것이다. 특히, 상기 장애, 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방은 엔테로박테리아세(에스케리키아, 특히 대장균, 살모넬라, 쉬겔라, 시트로박터, 에드워드스텔라, 엔테로박터, 하프니아, 클레브시엘라, 특히 K. 뉴모니아, 모르가넬라, 프로테우스, 프로비덴시아, 세라티아, 예르시니아), 슈도모나다세(슈도모나스, 특히 P. 에루지노사, 버크홀데리아, 스테노트로포모나스, 슈와텔라, 스피고모나스, 코마모나스), 네이세리아, 모락셀라, 비브리



오, 에어로모나스, 브루셀라, 프란시셀라, 보르데텔라, 레지오넬라, 바르토넬라, 콕시엘라, 해모필루스, 파스퇴렐라, 만헤이미아, 악티노바실루스, 가르드네렐라, 스피로체타세에(트레포네마 및 보렐리아), 랩토스피라세에, 캄필로박터, 헬리코박터, 스피릴룸, 스트렙토바실러스, 박테로이다세에(박테로이데스, 푸소박테리움, 프레보텔라, 포르피로모나스), 아시네토박터, 특히 A. 바우마니 등의 인간 또는 동물에 병원성인 균주를 포함하는 세균 군, 과, 속 또는 종의 그람음성균에 의해 야기될 수 있다. 바람직하게는, 상기 장애, 질환 또는 상태는 슈도모나스, 특히 슈도모나스 에루지노사 및/또는 슈도모나스 푸티다, 버크홀데리아, 특히 버크홀데리아 슈도말레이 및/또는 버크홀데리아 솔라나세아룸, 살모넬라, 특히 살모넬라 티피무리움 및/또는 살모넬라 엔테리티디스, 아시네토박터, 특히 아시네토박터 바우마니, 대장균 및/또는 클레브시엘라, 특히 클레브시엘라 뉴모니아에 의해 야기될 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 숙주를 포함하는 약제에 관한 것이다.

[0061] 본 발명의 또다른 측면은 치료 및/또는 예방이 요구되는 대상체의 장애, 질환 또는 상태를 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 유효량의 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 유효량의 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 숙주, 또는 본 발명에 따른 조성물을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 대상체는 인간 또는 동물일 수 있다.

[0062] 바람직하게는, 상기 치료방법은 그람음성균, 특히 상기 기재된 그람음성균에 의해 야기된 감염의 치료 및/또는 예방을 위한 것일 수 있다. 특히, 상기 치료방법은 피부, 연조직, 호흡기 시스템, 폐, 소화관, 눈, 귀, 치아, 비인두, 입, 뼈, 질의 감염, 그람음성균, 특히 상기 기재된 그람음성균에 의해 야기된 균혈증 및/또는 심내막염의 상처의 감염의 치료 및/또는 예방을 위한 것일 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 치료(또는 예방) 방법에 사용되는 투여량 및 투여 경로는 치료하려는 특정 질환/감염 부위에 의존한다. 투여 경로는 예를 들어 경구, 국부, 비인두, 비경구, 흡입, 정맥내, 근육내, 척추강내, 척수내, 기관지내, 폐내, 골내, 심장내, 관절내, 직장, 질 또는 임의의 다른 투여 경로일 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 유효량의 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 숙주, 또는 본 발명에 따른 조성물을 감염 부위(또는 감염될 위험이 있는 부위)에 적용하기 위하여, 단백질분해 효소, 산화, 면역 반응 등과 같은 환경의 영향으로부터 보호하는 제형이 사용될 수 있다. 따라서, 상기 제형은 캡슐, 당체, 정제, 분말, 좌약, 유제, 현탁액, 겔, 로션, 크림, 연고, 주사액, 시럽, 스프레이, 흡입제, 또는 임의의 다른 의학적으로 적합한 추출 제형일 수 있다. 바람직하게는, 상기 추출 제형은 적합한 담체, 안정화제, 향료, 완충액 또는 다른 적합한 시약을 포함할 수 있다. 예를 들어, 국부 적용을 위한 제형은 로션, 크림, 겔, 연고 또는 반창고일 수 있으며, 비인두 적용을 위한 제형은 스프레이를 통해 코에 적용되는 염류 용액일 수 있다. 예컨대 장에서 특정 감염 부위의 치료 및/또는 예방의 경우에 경구 투여를 위해, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체가 감염 부위에 도달할 때까지 위 장관의 강력한 소화 환경으로부터 보호할 필요가 있을 수 있다. 따라서, 위에서 소화의 초기 단계에서 생존하고 나중에 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체가 장의 환경으로 분비하는, 담체로서의 세균이 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 특정 구현예에서, 슈도모나스, 특히 슈도모나스 에루지노사에 의해 야기된 장애, 질환 또는 상태, 특히 장 질환, 특히 유아에서, 뇌척수막의 감염, 예컨대 뇌막염 자반병, 중이의 감염, 피부(농창 농피증), 특히 화상, 요로, 비염, 균혈증 폐렴의 치료 및/또는 예방을 위한 약제의 제조에 있어서, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주의 용도에 관한 것이며, 특히 환자는 낭포성 섬유증 또는 혈액학적 악성종양, 예컨대 백혈병, 또는 면역억제요법으로부터의 호중구감소증, 특히 장기간 정맥내 또는 요로 카테터삽입, 침습성 수술 과정 및 중화상에 의한 패혈증, 심내막염으로 고통받으며, 특히 환자는 정맥 약물 사용자이거나 또는 개심수술로부터의 합병증, 특히 오염된 안과 용액의 사용 후의 고도의 파괴적인 안구 감염, 또는 안면 중화상, 특히 오염된 의상을 통한 심각한 외상 또는 자창의 결과로서 뼈연골염을 앓는 환자이다.

[0066] 본 발명의 또다른 특정 구현예에서, 상기 장애, 질환 또는 상태는 버크홀데리아 슈도말레이에 의해 야기되며, 특히 휘트모어병, 만성 폐렴, 패혈증이며, 특히 환자는 외상을 초래하는 피부 병변을 갖는다.

[0067] 본 발명의 또다른 특정 구현예에서, 상기 장애, 질환 또는 상태는 살모넬라 티피무리움 및 살모넬라 엔테리티디스에 의해 야기되며, 특히 급성 위장염 및 국소 화농성 과정, 특히 골수염, 심내막염, 담낭염이며, 특히 살모넬라 티피무리움에 의해 야기되는 뇌막염이며, 특히 환자는 두 살 미만이다.

- [0068] 본 발명의 또다른 특정 구현예에서, 상기 장애, 질환 또는 상태는 아시네토박터 바우마니에 의해 야기되며, 특히 기관지염, 폐렴, 특히 정맥내 카테터삽입의 결과로서 상처 감염 및 패혈증이다.
- [0069] 본 발명의 또다른 특정 구현예에서, 상기 장애, 질환 또는 상태는 대장균에 의해 야기되며, 특히 추가 장 감염, 특히 맹장염, 화농성 담낭염, 복막염, 화농성 뇌막염, 및 요로의 감염, 장내 대장균 감염, 특히 유행성 장염, 및 이질과 유사한 감염성 질환, 패혈증, 장성독혈증, 유선염 및 이질이다.
- [0070] 본 발명의 또다른 특정 구현예에서, 상기 장애, 질환 또는 상태는 클레브시엘라 뉴모니에에 의해 야기되며, 특히 폐렴, 균혈증, 뇌막염 및 요로의 감염이다. 바람직하게는, 만일 치료(또는 예방)하려는 감염이 다중 내성 세균 균주, 특히 스트렙토마이신, 테트라시클린, 세팔로틴, 젠타마이신, 세프트락심, 세팔로스포린, 세프트라지딤 또는 이미페넴의 항생물질의 하나 이상에 대해 내성인 균주에 의해 야기된다면, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체는 의료적 치료에 사용된다. 또한, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체는 통상의 항균 제제, 예컨대 항생물질, 란티바이오틱, 박테리옌 또는 엔도리신 등과 조합하여 투여함으로써 치료방법에 사용될 수 있다.
- [0071] 또한, 본 발명은 하나 이상의 구획을 포함하는 약학적 팩(pack)에 관한 것으로서, 상기 하나 이상의 구획은 본 발명에 따른 하나 이상의 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 하나 이상의 숙주, 또는 본 발명에 따른 조성물을 포함한다.
- [0072] 본 발명의 또다른 측면은 약학 조성물의 제조방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본 발명에 따른 하나 이상의 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 하나 이상의 숙주를 약학적으로 허용가능한 희석제, 부형제 또는 담체와 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0073] 또다른 측면에서, 본 발명에 따른 조성물은 화장용 조성물이다. 수개의 세균 종들은 피부와 같은 환자의 신체의 환경적으로 노출된 표면에 자극을 야기할 수 있다. 상기 자극을 예방하기 위하여, 또는 상기 세균성 병원균의 작은 발현을 제거하기 위하여, 충분한 양의 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 포함하는 특정 화장용 제제가 이미 존재하거나 새롭게 침전된 병원성 그람음성균을 분해하기 위해 이용될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 또다른 측면은 약물, 식품 또는 사료의 진단 수단 또는 환경의 진단으로서, 특히 그람음성균에 의해 야기되는 세균 감염의 진단을 위한 진단 수단으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체에 관한 것이다. 이와 관련하여, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체는 병원성 세균, 특히 그람음성 병원성 세균을 특이적으로 분해하는 도구로서 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체에 의한 세균 세포의 분해는 트리톤 X-100과 같은 세제 또는 폴리믹신 B와 같은 세균 세포 엔벨로프를 약화시키는 다른 첨가제를 부가함으로써 지지될 수 있다. 특이적 세포 분해는 핵산 기초 방법, 예컨대 PCR, 핵산 혼성화 또는 NASBA(핵산 서열 기초 증폭), 면역학적 방법, 예컨대 IMS, 면역형광법 또는 ELISA 기법, 또는 세균 세포의 세포 함량에 의존하는 다른 방법들, 예를 들어 구별되는 세균 군 또는 종에 대해 특이적인 단백질을 이용하는 효소 어세이(예컨대, 엔테로박테리아에 대해  $\beta$ -갈락토시다제, 또는 응고효소 양성 균주에 대해 응고효소)를 사용하여 이후에 세균을 특이적으로 검출하기 위한 초기 단계로서 필요하다.
- [0075] 본 발명의 또다른 측면은 식품, 식품 가공 장비, 식품 가공 공장, 선반 및 식품 보관소와 같은 식품과 접촉하게 되는 표면, 및 모든 다른 상황에서 그람음성균 오염의 제거, 감소 및/또는 예방을 위한, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체의 용도에 관한 것으로서, 병원성 세균, 조건적 병원성 세균 또는 원하지 않는 다른 세균은 식재료, 의료 장치 및 병원과 수술실의 모든 종류의 표면을 잠재적으로 감염시킬 수 있다.
- [0076] 특히, 본 발명의 개질된 엔도리신 변이체는 살균제로서 예방적으로 사용될 수 있다. 상기 살균제는 수술 전 또는 후에 사용될 수 있거나, 예를 들어 혈액투석하는 동안 사용될 수 있다. 또한, 조산아 및 면역약화된 환자, 또는 보철장치를 필요로 하는 대상체는 본 발명의 개질된 엔도리신 변이체로 처리될 수 있다. 상기 처리는 예방적으로 이루어질 수도 있고 급성 감염 동안 이루어질 수도 있다. 동일한 맥락에서, 병원 감염, 특히 항생물질 내성 균주, 예컨대 슈도모나스 에루지노사(FQRP), 아시네토박터 종 및 엔테로박테리아세에, 예컨대 대장균, 살모넬라, 쉬겔라, 시트로박터, 에드워드시엘라, 엔테로박터, 하프니아, 클레브시엘라, 모로가넬라, 프로테우스, 프로비덴시아, 세라티아 및 예르시니아 종에 의한 병원 감염은 본 발명의 개질된 엔도리신 변이체에 의해 예방적으로 처리될 수도 있고 급성 단계 동안 처리될 수도 있다. 따라서, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체는 또한 살균액, 예컨대 세제(detergent), 텐시드, 용매, 항생물질, 란티바이오틱 또는 박테리옌에서 유용한 다른 성분들과 조합하여 살균제로서 사용될 수도 있다.

[0077] 살균제로서 예컨대 병원, 치과, 동물병원, 주방 또는 욕실에서 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체의 사용을 위해, 개질된 엔도리신 변이체는 예컨대 유체, 분말, 겔 형태의 조성물, 또는 습윤 와이프(wet wipe) 또는 살균 시트 제품의 성분으로 제조될 수 있다. 상기 조성물은 그의 각 용도 및 형태를 위해 적합한 담체, 첨가제, 희석제 및/또는 부형제 뿐만 아니라 항균 활성을 지지하는 제제, 예컨대 EDTA 또는 용합 단백질의 항균 활성을 증대시키는 제제를 각각 부가적으로 포함할 수 있다. 용합 단백질은 또한 통상의 살균제, 예컨대 알코올, 알데히드, 산화제, 페놀수지, 사차 암모늄 화합물 또는 UV-광과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어 표면, 물체 및/또는 장치를 살균하기 위해, 개질된 엔도리신 변이체는 상기 표면, 물체 및/또는 장치에 적용될 수 있다. 예를 들어 살균 조성물을 의류 또는 천과 같은 임의의 수단에 스프레이 또는 주입하여 습윤시킴으로써 적용할 수 있다. 용합 단백질은 각각의 적용 및 완전한 항균 활성을 얻기 위한 "반응 시간"에 따라 농도를 변화시켜 사용될 수 있다.

[0078] 본 발명의 적용가능성의 추가 범위는 하기의 상세한 설명으로부터 명확해질 것이지만, 상세한 설명 및 특정 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내는 것이고 단지 예로서만 제공되며, 당업계의 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 상세한 설명으로부터 본 발명의 취지 및 범위 내에서 다양한 수정 및 변형을 명백하게 할 수 있다는 점이 이해되어야 한다. 전술한 상세한 설명과 후술하는 상세한 설명은 모두 예시적이고 설명적일 뿐이며, 이는 본 발명을 제한하려는 것이 아니다.

### 도면의 간단한 설명

[0079] 하기의 도는 본 발명을 설명한다.

도 1은 (POLY)<sup>n</sup>-gp144((POLY)<sup>n</sup>-KZ144)의 재조합 생성을 위한 플라스미드 구축을 보여주는 도식도이다. 사전에, pEXP5CT/POLY-gp144(pEXP5CT/POLY-KZ144)는 테일(tail) PCR에 의해 구축되었다(5' 테일(tail) 프라이머에서 BamHI 제한 부위 및 일차 다가양이온 카세트(cassette)를 가짐). 플라스미드는 BamHI에 의해 선형화되었으며, 탈인산화되었으며, 돌출된 BamHI 말단을 포함하는 카세트와 결합되었다. 이러한 카세트는 2개의 상보적 올리고 뉴클레오타이드의 혼성화로부터 유래하며 9개의 양으로 하전된 잔기들을 인코딩한다. 하나의 부가적 양성 아르기닌 잔기가 세린과 함께 일차 카세트와 이차 카세트 사이의 접합 부위에서 생성된다. 더 긴 pEXP5CT/(POLY)<sup>n</sup>-gp144(pEXP5CT/(POLY)<sup>n</sup>-KZ144) 변이체가 반복 사이클에 의해 유사하게 구축되었다.

도 2는 피치아 파스토리스에 의한 POLY-gp144의 발현 및 분비를 나타낸다. P. 파스토리스 X33 발현 배양[1일 후(사각형), 3일 후(삼각형) 및 4일 후(원형)]의 30  $\mu$ l의 상청액이 270  $\mu$ l의 클로로포름-투파 P. 에루지노사 PA01p 세포에 첨가된다. 완충 조건은 POLY-gp144(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) I = 120 mM pH 6.2의 최적의 효소적 조건이었다. 그 후, 광밀도가 분광광도법에 의해 기록되었다. 광밀도의 하락은 P. 파스토리스에 의한 뮤라리틱(muralytic) 효소의 분비를 나타낸다. 음성대조군으로서, P. 파스토리스 X33 미발현 플라스미드가 포함된다(다이어몬드형).

도 3은 슈도모나스 에루지노사 PA01p 세포에 대해, 비개질된 phiKZgp144 및 ELgp188 엔도리신의 항균 활성, 9개의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드 스트레치를 포함하는 개질된 변이체 POLY-gp144 및 POLY-gp188의 항균 활성, 및 18개의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드 스트레치를 포함하는 개질된 변이체 (POLY)<sup>2</sup>-gp144 및 (POLY)<sup>2</sup>-gp188의 항균 활성을 그래프 도식으로 나타낸다. 예러 바는 평균의 표준편차를 나타낸다.

도 4는 비개질된 엔도리신 PSP3gp10 및 그의 개질된 엔도리신 변이체 PKPSP3gp10의 발현 및 정제의 결과를 보여주는 쿠마시-염색 SDS-PAGE의 사진을 나타낸다. LMW 레인은 사이즈 마커와 관련된다(LMW 사다리). 옆의 3개의 레인은 Ni<sup>2+</sup> 친화성 크로마토그래피 후에 용리 완충액(20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 500 mM 이미다졸)에서 정제된 단백질의 단백질 분획과 관련된다. FT 레인은 플로우 스루(flow through)와 관련되며, W 레인은 폐기 분획(waste fraction)과 관련된다. 정제된 단백질 분획에서 단지 작은(minor) 이차 밴드가 보여지며, 이는 고순도의 재조합 단백질(>90%)을 나타낸다.

도 5a 내지 d는 실온에서 흔들지 않고 배양한 후에 여러 개의 지수성장(exponential growing) 그람음성균에 대해 다른 조성물에서 비개질된 PSP3gp10 및 개질된 PKPSP3gp10의 항균 활성을 그래프 도식으로 나타낸다. 그람음성균의 각 종들은 30분 동안 0.5 mM의 EDTA를 포함하지만 엔도리신을 포함하지 않는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 비개질된 PSP3gp10을 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 개질된 PKPSP3gp10을 포함하지만

EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 비개질된 PSP3gp10 및 0.5 mM의 EDTA를 포함하는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 개질된 PKPSP3gp10 및 0.5 mM의 EDTA를 포함하는 조성물로 배양되었다. 도 5a에 P. 에루지노사 PA01p 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 5b에 P. 에루지노사 Br667 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 5c에 대장균 WK 6 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 5d에 살모넬라 티피무리움 세포에 대한 항균 활성이 나타난다. " $\Delta$ "는 각각의 PSP3gp10 및 PKPSP3gp10 샘플 사이의 활성의 차이를 나타낸다. 여러 바는 평균의 표준편차를 나타낸다.

도 6은 비개질된 엔도리신 P2gp09 및 그의 개질된 엔도리신 변이체 PKP2gp09의 발현 및 정제의 결과를 보여주는 쿠마시-염색 SDS-PAGE의 사진을 나타낸다. LMW 레인은 사이즈 마커와 관련된다(LMW 사다리). 옆의 3개의 레인은  $Ni^{2+}$  친화성 크로마토그래피 후에 용리 완충액(20 mM  $NaH_2PO_4$ -NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 500 mM 이미다졸)에서 정제된 단백질의 단백질 분획과 관련된다. FT 레인은 플로우 스루(flow through)와 관련되며, W 레인은 폐기 분획(waste fraction)과 관련된다. 정제된 단백질 분획에서 단지 작은 이차 밴드가 보여지며, 이는 고순도의 재조합 단백질(>95%)을 나타낸다.

도 7a 내지 f는 실온에서 흔들지 않고 배양한 후에 여러 개의 지수성장(exponential growing) 그람음성균에 대해 다른 조성물에서 비개질된 P2gp09 및 개질된 PKP2gp09의 항균 활성을 그래프 도식으로 나타낸다. 그람음성균의 각 종들은 30분 동안 0.5 mM의 EDTA를 포함하지만 엔도리신을 포함하지 않는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 비개질된 P2gp09를 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 개질된 PKP2gp09를 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 비개질된 P2gp09 및 0.5 mM의 EDTA를 포함하는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 개질된 PKP2gp09 및 0.5 mM의 EDTA를 포함하는 조성물로 배양되었다. 도 7a에 P. 에루지노사 PA01p 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 7b에 P. 에루지노사 Br667 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 7c에 대장균 WK 6 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 7d에 버크홀데리아 슈도말레이 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 7e에 슈도모나스 푸티다 G1 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 7f에 살모넬라 티피무리움 LT2(SGSC N° 2317) 세포에 대한 항균 활성이 나타난다. " $\Delta$ "는 각각의 P2gp09 및 PKP2gp09 샘플 사이의 활성의 차이를 나타낸다. 여러 바는 평균의 표준편차를 나타낸다.

도 8은 비개질된 엔도리신 OBPgpLYS 및 그의 개질된 엔도리신 변이체 PKOBPgpLYS의 발현 및 정제의 결과를 보여주는 쿠마시-염색 SDS-PAGE의 사진을 나타낸다. LMW 레인은 사이즈 마커와 관련된다(LMW 사다리). 옆의 3개의 레인은  $Ni^{2+}$  친화성 크로마토그래피 후에 용리 완충액(20 mM  $NaH_2PO_4$ -NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 500 mM 이미다졸)에서 정제된 단백질의 단백질 분획과 관련된다. FT 레인은 플로우 스루(flow through)와 관련되며, W 레인은 폐기 분획(waste fraction)과 관련된다. 정제된 단백질 분획에서 단지 작은 이차 밴드가 보여지며, 이는 고순도의 재조합 단백질(>90%)을 나타낸다.

도 9a 내지 f는 실온에서 흔들지 않고 배양한 후에 여러 개의 지수성장(exponential growing) 그람음성균에 대해 비개질된 OBPgpLYS 및 개질된 PKOBPgpLYS의 다른 조성물의 항균 활성을 그래프 도식으로 나타낸다. 그람음성균의 각 종들은 30분 동안 0.5 mM의 EDTA를 포함하지만 엔도리신을 포함하지 않는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 비개질된 OBPgpLYS를 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 개질된 PKOBPgpLYS를 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 비개질된 OBPgpLYS 및 0.5 mM의 EDTA를 포함하는 조성물로, 1.315  $\mu$ M의 개질된 PKOBPgpLYS 및 0.5 mM의 EDTA를 포함하는 조성물로 배양되었다. 도 9a에 대장균 WK6 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 9b에 살모넬라 티피무리움 LT2(SGSC N° 2317) 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 9c에 슈도모나스 에루지노사 PA01p 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 9d에 슈도모나스 에루지노사 Br667 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 9e에 슈도모나스 푸티다 G1 세포에 대한 항균 활성이 나타나며, 도 9f에 버크홀데리아 슈도말레이 세포에 대한 항균 활성이 나타난다. " $\Delta$ "는 각각의 OBPgpLYS 및 PKOBPgpLYS 샘플 사이의 활성의 차이를 나타낸다. 여러 바는 평균의 표준편차를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080]

하기의 실시예는 본 발명을 설명하는 것이지만, 이에 한정되는 것으로 고려되어서는 안 된다. 달리 나타내지 않는다면, 예컨대 [Sambrock et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York]에 기재된 것과 같은 분자생물학적 표준 기법이 사용되었다.



[0081] 실시예 1: 개질된 phiKZgp144 및 ELgpgp188 엔도리신 변이체의 클로닝, 발현 및 정제

[0082] 서열번호:1로 표시되는 phiKZgp144 및 서열번호:2로 표시되는 ELgp188은 N-말단 캡티도글리칸 결합 도메인 및 C-말단 촉매 도메인을 갖는 슈도모나스 에루지노사 파지  $\phi$ KZ 및 EL로부터 유래된 모듈(modular) 엔도리신이다 (Briers et al., 2007).

[0083] phiKZgp144 및 ELgp188의 오픈 리딩 프레임(ORF)의 증폭을 위해, 기준(standard) 5' 프라이머(phiKZgp144에 대해 5' ATGAAAGTATTACGCAAA 3'(서열번호:83); ELgp188에 대해 5' ATGAACCTCCGGACGAAG 3'(서열번호:65))와 서열번호:81 및 82에 따른 기준(standard) 3' 프라이머(phiKZgp144에 대해 TTTTCTATGTGCTGCAAC(서열번호:81); ELgp188에 대해 ATACGAAAT AACGTGACGA(서열번호:82))가 적용되었으며 PCR이 사용되었다. 9개의 양으로 하전된 잔기(Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys - 서열번호:11)를 인코딩하는 유전자 단편으로 phiKZgp144 또는 ELgp188을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임의 5' 말단을 연장하기 위하여, 연장된 5' 프라이머(phiKZgp144에 대해 5' ATGGGATCCAAACGAAGAAACGTAAGAAA CGCAAAAAAGTATTACGCAAG 3'(서열번호:79); ELgp188에 대해 5' ATGGGATCCAAACGAAGAAACGTAAGAAA CGCAAAACTTCCGGACGAAG 3'(서열번호:80))와 서열번호:81 및 82에 따른 기준(standard) 3' 프라이머와 테일(tail) PCR이 적용되었다. PCR 산물은 제조사의 프로토콜에 따라 pEXP5CT/TOPO® 발현 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 클로닝되었다. tRNA 손실(depletion)을 피하고 프레임시프트의 위험을 감소시키기 위하여, 아르기닌 트리플렛(triplet)이 리신 트리플렛 외에 포함되었다(리신에 대해 유일한 2개의 이용가능한 트리플렛은 AAA 및 AAG이며, 이는 긴 A-스트레치를 유발함). 계획된 BamHI 제한 부위로 부가적인 다가양이온성 카세트의 삽입은 추가의 양이온성 잔기로 테일(tail)을 길어지게 한다. 이러한 삽입은 각각의 접합 부위에서 아르기닌 및 세린 트리플렛을 생성한다(도 1). 4개까지의 다가양이온성 펩티드 스트레치가 phiKZgp144 및 ELgp188에 융합되었으며, (POLY)<sup>n</sup>-gp144 또는 (POLY)<sup>n</sup>-gp188(n=1, 2, 3, 4)가 설계되었으며, N-말단에서 각각 9, 19, 29 및 39개의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함한다. 이에 따라, 하기의 구축물이 대장균 BL21 (DE3) pLysS 세포에서 발현되었다(37°C에서 세포의 지수성장(exponentially growing), 1mM IPTG를 사용한 유도, 37°C에서 4시간 동안 발현).

| 개질된 엔도리신 변이체               | 서열번호    | 양으로 하전된 아미노산 잔기의 수 |
|----------------------------|---------|--------------------|
| POLY-gp144                 | 서열번호:35 | 9                  |
| (POLY) <sup>2</sup> -gp144 | 서열번호:36 | 19                 |
| (POLY) <sup>3</sup> -gp144 | 서열번호:37 | 29                 |
| (POLY) <sup>4</sup> -gp144 | 서열번호:38 | 39                 |
| POLY-gp188                 | 서열번호:39 | 9                  |
| (POLY) <sup>2</sup> -gp188 | 서열번호:40 | 19                 |
| (POLY) <sup>3</sup> -gp188 | 서열번호:41 | 29                 |
| (POLY) <sup>4</sup> -gp188 | 서열번호:42 | 39                 |

[0084]

[0085] 개질된 엔도리신 변이체 POLY-gp144(서열번호:35), (POLY)<sup>2</sup>-gp144(서열번호:36), POLY-gp188(서열번호:39) 및 (POLY)<sup>2</sup>-gp188(서열번호:40)는 추가 연구를 위해 사용되었다. 상기 단백질은 C-말단 6xHis-tag를 사용하여 Ni<sup>2+</sup> 친화성 크로마토그래피(1ml His-trap Ni-NTA 컬럼을 사용한 액타 패스트 단백질 액체 크로마토그래피)에 의해 정제되었다. 대장균 발현 배양물 리터 당 총수율은 정제된 모액(stock solution)의 총부피 및 단백질 농도의 분광광도 측정에 의해 결정되었다. gp188 유도체의 정제는 gp144 유도체의 조건(50mM 이미다졸)보다 더 엄격한 조건(65 mM 이미다졸)에서 수행되어, 고순도가 보장되었다. 대장균 발현 배양물 리터 당 총수율은 표 1에 나타난다.

### 표 1

[0086] 대장균 발현 배양물 리터 당 엔도리신 유도체의 재조합 정제 수율

| 융합                  | 엔도리신       |         |
|---------------------|------------|---------|
|                     | phiKZgp144 | ELgp188 |
| POLY                | 2 mg       | 48 mg   |
| (POLY) <sup>2</sup> | 0.5 mg     | 0.06 mg |

[0087] 정제된 모액의 순도는 약 90%였다. POLY-유도체의 정제된 용액의 질량분석은 미량의 대장균 50S 리보솜 소단위 단백질 L2 및 16S rRNA 우리딘-516 유사(pseudo)-우리딜레이트 신타제를 나타내었다. 모든 phiKZgp144 유도체는 β-메르캅토에탄올의 첨가에 의해 모노머로 전환될 수 있는 멀티머 형성을 보여주었으며, 이는 이황화 결합이 멀티머화를 야기하는 것을 나타낸다.

[0088] 실시예 2: 개질된 phiKZgp144 및 ELgp188 변이체의 항균 활성

[0089] 지수적(약  $10^6$ /ml) P. 에루지노사 PA01p 세포(Pirnay JP et al. (2003), J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202)는 100배 희석되었으며(최종 밀도는 약  $10^6$ /ml였음), 완충액(20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 100 μg/ml의 최종 농도에서, 각각의 10 μg의 투석되지 않은 단백질(비개질된 엔도리신 phiKZgp144(서열번호:1) 및 ELgp188(서열번호:2) 및 개질된 엔도리신 변이체 POLY-gp144(서열번호:35), (POLY)<sup>2</sup>-gp144(서열번호:36), POLY-gp188(서열번호:39) 및 (POLY)<sup>2</sup>-gp188(서열번호:40))로 실온에서 배양되었다. 1시간 후에, 세포 현탁액은 PBS 완충액( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  및  $10^{-3}$ )에서 희석되었으며, 플레이트되었다(표준 LB-배지, 37°C에서 밤새 배양됨). 또한, PBS 완충액에서 세포를 포함하는 음성대조군이 플레이트되었다. 잔여 콜로니가 밤새 배양 이후에 카운팅되었다. 카운팅된 세포수에 기초하여, 상대적 불활성(%)=(100-(N<sub>i</sub>/N<sub>0</sub>)\*100, 여기서 N<sub>0</sub>= 비처리된 세포의 수, N<sub>i</sub>= 처리된 세포의 수)으로서 로그 단위(=log<sub>10</sub>N<sub>0</sub>/N<sub>i</sub>)의 항균 활성이 산출되었다(표 2). 모든 샘플은 6배로 복제되었다. 평균/표준편차가 나타난다. 통계학적 분석이 스튜던트 t-테스트를 이용하여 수행되었다.

[0090] 비개질된 엔도리신 phiKZgp144 및 ELgp188은 음성대조군에 비해 세포수를 유의적으로 감소시키지 않는다. 이러한 관찰은 엔도리신이 그람음성균의 세포벽을 분해하는 장벽으로서 외막의 효능을 설명한다. 표 2에서 보여지는 것처럼 대조적으로, 개질된 엔도리신 POLY-gp144, (POLY)<sup>2</sup>-gp144, POLY-gp188 및 (POLY)<sup>2</sup>-gp188에 의한 배양은 세균 세포수(POLY-gp144에 대해 99.85±0.09 %, POLY-gp188에 대해 98.0±0.2 %)의 유의적인 감소(α= 0.05)를 야기한다. 다가양이온성 펩티드 스트레치의 길이의 증가는 특히 phiKZgp144의 경우에 항균 활성을 증대시키는 경향이 또한 있다(99.98±0.02 % 또는 3.7±0.3 로그 단위까지의 감소가 (POLY)<sup>2</sup>-gp144에 대해 1시간 내에 달성된다). 또한, 본 실험들은 phiKZgp144의 개질된 엔도리신이 ELgp188의 개질된 엔도리신보다 더 높은 항균 활성을 갖는다는 점을 입증하였다.

## 표 2

[0091] 엔도리신 비개질 및 개질된 phiKZgp144 및 ELgp188 변이체의 항균 효과

| 지수 성장 세포            | 엔도리신       |           |          |           |
|---------------------|------------|-----------|----------|-----------|
|                     | phiKZgp144 |           | ELgp188  |           |
|                     | %          | log       | %        | log       |
| 비개질된 엔도리신           | 0±15       | 0.00±0.06 | 10±13    | 0.05±0.06 |
| POLY                | 99.85±0.09 | 2.9±0.3   | 98.0±0.2 | 1.7±0.1   |
| (POLY) <sup>2</sup> | 99.98±0.02 | 3.7±0.3   | 98.9±0.4 | 2.0±0.2   |

[0092] 따라서, 본 실시예는 phiKZgp144(서열번호:1)에 대해 N-말단으로 9개의 양이온성 잔기의 짧은 펩티드 스트레치의 부가는 1시간 내에 거의 99.9%의 세포를 사멸시키는데 이미 충분하다는 점을 입증하였다. 폴리-L-리신도 고유의 항균 활성을 갖지만, 이러한 성질은 지금까지 20개 이상의 잔기의 폴리머에만 해당하는 것으로 여겨진다(Vaara and Vaara, 1983a, 1983b). 그러나, 다가양이온성 펩티드 스트레치 및 엔도리신의 공동 작용은 세포를 사멸시킨다.

[0093] 추가 실험에서, 개질된 엔도리신 POLY-gp144는 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7로 투석되었으며, 상기 기재된 바와 같은 투석되지 않은 단백질 용액을 대신하여 사용되었다. 이에 의해, 불활성화 수준은 부가적으로 2.9±0.3 로그 단위에서 3.9±0.2 로그 단위로 증가되었다.



- [0094] 실시예 3: 비독성 재조합 생성을 위해 숙주로서 피치아 파스토리스에서 개질된 phiKZgp144 및 ELgp188 변이체의 발현
- [0095] POLY-gp144(서열번호:35)를 인코딩하는 오픈 리딩 프레임은 pPICZaA 서플 벡터(Invitrogen)에서 클로닝되었으며, 그 후 상동 재조합에 의해 P. 파스토리스 계능에 통합되었다(제조사의 지시에 따름; P. 파스토리스 X33 세포, Invitrogen). 유전자 발현은 BMMY-배지에서 메탄올(1%)에 의해 유도되었으며, 상청액은 1일, 3일 및 4일 후에 효소 활성의 존재를 위해 분석되었다. 따라서, P. 파스토리스 발현 배양의 30  $\mu$ l의 상청액이 1일, 3일 및 4일 후에 270  $\mu$ l의 클로로포름-투과 P. 에루지노사 PA01p 세포에 첨가되었다(완충 조건:  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  I = 120 mM pH 6.2)(Pirnay JP et al. (2003), J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202). 그 후, 광밀도가 분광광도법에 의해 기록되었다(도 2). 광밀도의 하락은 P. 파스토리스에 의한 뮤라리틱(muralytic) 효소의 분비를 나타낸다. 음성대조군으로서, P. 파스토리스 X33 미발현 플라스미드가 포함되었다. 따라서, 상청액 샘플의 부가에 따른 기질의 용해는 P. 파스토리스에 의한 POLY-gp144(서열번호:35)의 성공적인 재조합 생성 및 분비에 대한 측정이다. 1일 후에, 제한된 효소 활성이 검출될 수 있었다. 상청액에서 활성의 유의적인 증가가 4일째에 관찰되지 않았기 때문에, 최대 활성은 3일 후에 관찰되었다. P. 파스토리스의 세포 밀도에 대해 어떠한 독성 효과도 관찰되지 않았다.
- [0096] P. 파스토리스에 의한 발현 동안, 벡터의  $\alpha$ -분비 신호는 주위 배지로 재조합 단백질의 분비를 야기하며, 이는 다른 단백질의 한정된 수만 분비되기 때문에 단순화된 정제를 가능하게 한다. 오픈 리딩 프레임의 5' 말단에서 BamHI 제한 부위는 부가적 다가양이온성 펩티드 스트레치를 인코딩하는 더 많은 카세트의 부가를 가능하게 한다.
- [0097] 실시예 4: 다른 다가양이온성 펩티드 스트레치들을 갖는 더 개질된 엔도리신 phiKZgp144 변이체
- [0098] phiKZgp144의 다가양이온성 펩티드 변이체와 다른 엔도리신의 능력을 시험하고 비교하기 위하여, 단백질의 N-말단 끝에서 다른 다가양이온성 펩티드를 갖는 인코딩 유전자들이 합성되었다. 펩티드 스트레치 변이는 길이, 조성물 및 링커(linker) 서열의 삽입과 관련된다. 한편으로는, KRK 모티브의 N-말단 복합체(multiple)를 갖는 추가 다가양이온성 펩티드 스트레치가 제조되었다. 다른 한편으로는, 아르기닌(R) 또는 리신(K)으로만 이루어진 다가양이온성 펩티드 스트레치가 제조되었다. 또한, 긴 다가양이온성 펩티드 스트레치들의 번역을 증가시키기 위하여, 링커 서열을 포함하는 다가양이온성 펩티드 스트레치가 제조되었다.
- [0099] 다른 산물들이 pET32b 발현 벡터(Novagen, Darmstadt, Germany)에서 클로닝되었다. pET32b는 대장균 숙주에 대한 다가양이온성 펩티드의 잠재적 독성을 감소시키기 위해 사용되었다. 벡터-인코딩된 융합 단백질(티오레독신)은 다가양이온성 펩티드를 감추며(mask), 정제 과정 동안 제거될 수 있다.
- [0100] 이에 따라, OD600nm=0.6의 광밀도에 도달할 때까지 하기의 개질된 엔도리신 변이체들이 37°C에서 대장균 BL21(DE3) 세포에서 발현되었다. 그 후, 단백질 발현은 1 mM의 IPTG(최종 농도)에 의해 유도되었으며, 발현은 4 시간 동안 수행되었다. 이어서, 대장균 세포는 6000g에서 20분 동안 원심분리에 의해 수확되었으며, 세포 분열 및 단백질 정제는 S-tag 정제 키트(Novagen, Darmstadt, Germany)에 따라 수행되었다:

| 개질된 엔도리신 변이체                      | 펩티드 스트레치의 길이 | 펩티드 스트레치의 서열   |
|-----------------------------------|--------------|--|
| phiKZgp144<br>(서열번호:1)            | 0            | -  |
| pKKZ144pET32b<br>(서열번호:43)        | 10           | KKKKKKKKKK<br>(서열번호:14)                                |
| KKK_6_pET32b<br>(서열번호:44)         | 6            | KKKKKK<br>(서열번호:10)                                    |
| KKK_12_pET32b<br>(서열번호:45)        | 12           | KKKKKKKKKKKK<br>(서열번호:15)                              |
| KKK_14_pET32b<br>(서열번호:46)        | 14           | KKKKKKKKKKKKKK<br>(서열번호:16)                            |
| R9_pET32b<br>(서열번호:47)            | 9            | RRRRRRRRR<br>(서열번호:12)                                 |
| K8_pET32b<br>(서열번호:48)            | 8            | KKKKKKKK<br>(서열번호:13)                                  |
| pK2KZ144_pET32b_mod3<br>(서열번호:49) | 38           | KKKKKKKRKGSGSGKKKKKKRKGSGSGKKKKKKK<br>KKK<br>(서열번호:28) |

[0101]

[0102]

모든 단백질들은 S-Tag™ rEK 정제 키트(Novagen, Darmstadt, Germany)를 이용하여 정제되었다. pET32b 벡터를 이용할 때, 발현된 단백질은 숙주에 독성이 아니었으며 생성된 단백질의 고순도를 가져왔다. 정제된 모액들은 고순도를 나타내었다.

[0103]

지수적(약  $10^6$ /ml) P. 에루지노사 PA01p 세포(화상 분리주(Burn wound isolate), Queen Astrid 병원, Brussels; Pirnay JP et al. (2003), J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202)는 100배 희석되었으며(최종 밀도는 약  $10^6$ /ml였음), 완충액(20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도에서 상기 기재된 각각의 10  $\mu\text{g}$ 의 투석되지 않은 단백질과 실온에서 배양되었다. 1시간 후에, 세포 현탁액은 1:100으로 희석되었으며, LB에 플레이팅되었다. 또한, 완충액(20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)을 사용하여 음성대조군이 플레이팅되었다. 잔여 콜로니가 37°C에서 밤새 배양된 후에 카운팅되었다. 카운팅된 세포수에 기초하여, 상대적 불활성(%)=(100-( $N_i/N_0$ )\*100, 여기서  $N_0$ = 비처리된 세포의 수,  $N_i$ = 처리된 세포의 수)으로서 평균 활성이 산출되었다(표 3). 모든 샘플은 적어도 4배로 복제되었다.

### 표 3

[0104]

엔도리신 비개질 및 개질된 phiKZgp144 및 ELgp188의 평균 효과

| 개질된 엔도리신 변이체                     | 펩티드 스트레치의 서열                                    | 감소[%]     |
|----------------------------------|---|-----------|
| phiKZgp144<br>(서열번호:1)           |   | 0         |
| KKZ144pET32b<br>(서열번호:43)        | KKKKKKKKKK<br>(서열번호:14)                         | 99 - 99.9 |
| RK_6_pET32b<br>(서열번호:44)         | RKKRK<br>(서열번호:10)                              | 99.9      |
| RK_12_pET32b<br>(서열번호:45)        | RKKKKKKKKKKK<br>(서열번호:15)                       | 99 - 99.9 |
| RK_14_pET32b<br>(서열번호:46)        | RKKKKKKKKKKKKR<br>(서열번호:16)                     | 99.9      |
| 9_pET32b<br>(서열번호:47)            | RRRRRRRRR<br>(서열번호:12)                          | 99        |
| 8_pET32b<br>(서열번호:48)            | KKKKKKKK<br>(서열번호:13)                           | 99        |
| K2KZ144_pET32b_mod3<br>(서열번호:49) | RKKKKKKRKGSGSGKKKKKKRKGSGSGKKKKKKK<br>(서열번호:28) | 99.9      |

[0105]

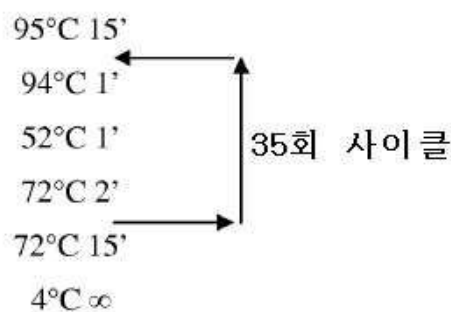
비개질된 phiKZgp144는 음성대조군에 비해 세포수를 유의적으로 감소시키지 않는다. 또한, KKK motifs의 N-말단

복합체(multiple)의 다가양이온성 펩티드를 갖는 개질된 phiKZgp144 변이체는 항균 효과를 현저하게 증가시킨다. 그러나, 리신 또는 아르기닌의 호모머(homomer) 펩티드 스트레치를 갖는 변이체는 또한 측정된 비개질된 phiKZgp144에 비해 세포의 유의적인 감소를 나타낸다. 또한, 38 아미노산 잔기의 다가양이온성 펩티드 스트레치를 가지며 링커 서열을 포함하는 변이체는 항균 효과를 현저하게 증가시킨다.

[0106] 실시예 5: 살모넬라 티피무리움 파지 PSP3의 개질된 엔도리신 변이체

[0107] 서열번호:8에 따른 PSP3gp10은 촉매 램다-유사 무라미다제 도메인을 갖는 살모넬라 티피무리움 파지 PSP3으로부터 유래된 165개의 아미노산 잔기를 갖는 구형 엔도리신이다. BLASTp 및 Pfam 분석에 의해 예측된 바와 같이, PSP3gp10 엔도리신은 대략 아미노산 잔기 34 내지 대략 아미노산 잔기 152의 범위에서 그의 촉매 도메인을 포함한다.

[0108] 파지 PSP3의 정제된 게놈성 DNA는 하기의 PCR 파라미터를 사용하여 핫 스타트(Hot Start) Taq 중합효소 PCR 반응(Qiagen, Germany)에서 PSP3gp10의 오픈 리딩 프레임(ORF)의 증폭을 위한 주형으로서 사용되었다:



[0109]

[0110] 상기 PCR을 위해, 기준(standard) 5' 프라이머(5' ATGGGATCCCCGGTCATTAATACTCACCAG 3'(서열번호:50)) 및 기준(standard) 3' 프라이머(5' TGCCATCACCCGCCAGCCGTG 3'(서열번호:51))가 사용되었다. 다가양이온성 9-머 펩티드 Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys(서열번호:11)를 인코딩하는 유전자 단편으로 PSP3gp10을 인코딩하는 ORF의 5' 말단을 연장하기 위하여, 연장된 5' 프라이머(5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAA GAAACGCAAAACCGGTCATTAATACTCACCAG 3'(서열번호:52))와 서열번호:51에 따른 기준(standard) 3' 프라이머와 테일(tail) PCR(동일한 파라미터에 의한 핫 스타트 Taq 중합효소 PCR)이 적용되었다. 원래의 비개질된 PSP3gp10 PCR 단편과 PK-연장된 단편은 모두 제조사의 TA-클로닝 프로토콜에 따라 pEXP5CT/TOPO® 발현 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 연결되었다.

[0111] 서열번호:8에 따른 PSP3gp10 및 서열번호:53에 따른 PKPSP3gp10의 재조합 발현은, 4시간의 주기 동안 37°C에서 1 mM의 IPTG(이소프로필티오갈락토시드)와의 배양 후에 지수성장 대장균 BL21(λDE3) pLysS 세포(Invitrogen)에서 수행된다. pEXP5CT/TOPO® 발현 벡터에 의해 인코딩된 상기 단백질 모두는 C-말단 6xHis-tag를 사용하여 Ni<sup>2+</sup> 친화성 크로마토그래피(Akta FPLC, GE Healthcare)에 의해 정제되었다. Ni<sup>2+</sup> 친화성 크로마토그래피는 4개의 일련의 단계로 수행되며, 이러한 단계 모두는 실온에서 이루어진다:

[0112] 1. 유속(flow rate) 0.5 ml/min에서 10 컬럼 부피의 세척 완충액(60 mM 이미다졸, 0.5 mM NaCl 및 pH 7.4의 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH)에 의한 Histrap HP 1 ml 컬럼(GE Healthcare)의 평형.

[0113] 2. 유속 0.5 ml/min에서 Histrap HP 1 ml 컬럼상에 전체 용해물(원하는 엔도리신이 포함됨)의 로딩.

[0114] 3. 유속 1 ml/min에서 15 컬럼 부피의 세척 완충액에 의한 컬럼의 세척.

[0115] 4. 유속 0.5 ml/min에서 10 컬럼 부피의 용리 완충액(500 mM 이미다졸, 5 mM NaCl 및 pH 7.4의 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH)에 의해 컬럼으로부터 결합된 엔도리신의 용리.

[0116] 대장균 발현 배양물 리터 당 두개의 정제된 재조합 단백질의 총수율은 표 4에 나타난다. 상기 값은 파장 280 nm에서 정제된 모액(stock solution)의 총부피 및 단백질 농도의 분광광도 측정에 의해 결정되었다. 용리 완충액(20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 500 mM 이미다졸)에서 각각 PSP3gp10 및 PKPSP3gp10으로 이루어진 정제된 모액은 SDS-PAGE 겔에서 시각적으로 측정될 때 90% 이상의 순도를 나타내었다.

표 4

[0117] 대장균 발현 배양물 리터 당 정제된 재조합 PSP3gp10 엔도리신 및 그의 개질된 변이체 PKPSP3gp10의 수율

| 엔도리신                | 발현율     |
|---------------------|---------|
| PSP3gp10(서열번호:8)    | 2.15 mg |
| PKPSP3gp10(서열번호:53) | 5.56 mg |

[0118] 서열번호:53에 따른 PKPSP3gp10 엔도리신의 항-그람음성 스펙트럼을 측정하기 위하여, 1.315  $\mu$ M의 PKPSP3gp10 엔도리신 및 0.5 mM의 EDTA의 조합이 임상의 P. 에루지노사 균주 PA01p 및 Br667, 대장균 WK6, 및 살모넬라 티피무리움에 대해 테스트되었다(표 5 참조). 지수성장 세균 세포( $OD_{600nm}$ : 0.6)는 각 균주의 최종 밀도 약  $10^6$ /ml로 100배 희석되었으며, 각각 0.5 mM의 EDTA와 조합하거나 조합하지 않은 비개질된 엔도리신 PSP2gp10(서열번호:8) 및 개질된 엔도리신 PKPSP3gp10(서열번호:53)와 실온에서 30분 동안 흔들지 않고 배양되었다. 배양을 위해, 엔도리신은 각각 완충액(20 mM  $NaH_2PO_4$ -NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 사용되었으며, 배양은 엔도리신의 최종 농도 1.315  $\mu$ M에서 발생되었다. 대조군으로서 각각의 균주는 엔도리신 없이 0.5 mM의 EDTA(상기 기재된 것과 동일한 완충액)와 30분 동안 배양되었다.

표 5

[0119] 사용된 그람음성 균주의 리스트

| 그람음성 균주           | 소스(source)                                 | 참조                   |
|-------------------|--|----------------------|
| 슈도모나스 에루지노사 PA01p | 화상 분리주(isolate), Queen Astrid 병원, Brussels | Pirnay et al., 2003* |
| 슈도모나스 에루지노사 Br667 | 화상 분리주(isolate), Queen Astrid 병원, Brussels | Pirnay et al., 2003* |
| 대장균 WK 6          | 표준 실험실(Standard laboratory) 발현 균주          | Prof. C. Michiels    |
| 살모넬라 티피무리움 LT2    | SGSC N° 2317                               | Prof. C. Michiels    |

[0120] \*Pirnay JP et al. (2003). Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202.

[0121] 배양 후에, 세포 현탁액은 3배(각각  $10^5$ - $10^4$ - $10^3$  세포/ml) 희석되었으며, 100  $\mu$ l의 각 희석액은 LB-배지에 플레이트되었다. 잔여 콜로니가 37°C에서 밤새 배양된 후에 카운팅되었다. 카운팅된 세포수에 기초하여, 로그 단위( $=\log_{10}N_0/N_i$ , 여기서  $N_0$ = 비처리된 세포의 수,  $N_i$ = 처리된 세포의 수)의 상대적 불활성으로서 평균 활성이 산출되었다(표 6).

표 6

[0122] 다른 지수성장 그람음성 종들에 대해, EDTA- $Na_2$ 의 존재 및 부재하에 비개질된 엔도리신(PSP3gp10) 및 그의 개질된 엔도리신 변이체(PKPSP3gp10)의 항균 활성

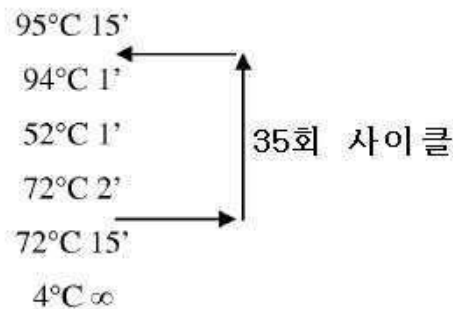
|                | 0.5 mM EDTA     | 1.315 $\mu$ M PSP3gp10 | 1.315 $\mu$ M PKPSP3gp10 | 1.315 $\mu$ M PSP3gp10 + 0.5 mM EDTA | 1.315 $\mu$ M PKPSP3gp10 + 0.5 mM EDTA |
|----------------|-----------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--|
| P. 에루지노사 PA01p | 0.146 +/- 0.002 | 0.383 +/- 0.015        | 0.344 +/- 0.163          | 3.552 +/- 0.536                      | > 4.146                                |
| P. 에루지노사 Br667 | 0.223 +/- 0.038 | 0.375 +/- 0.056        | 0.353 +/- 0.086          | 0.571 +/- 0.035                      | 0.891 +/- 0.118                        |
| 살모넬라 티피무리움     | 0.104 +/- 0.049 | 0.283 +/- 0.038        | 0.327 +/- 0.057          | 0.690 +/- 0.036                      | 0.850 +/- 0.032                        |
| 대장균 WK 6       | 0.393 +/- 0.035 | 0.190 +/- 0.029        | 0.205 +/- 0.088          | 0.387 +/- 0.014                      | 0.584 +/- 0.024                        |

[0123] 모든 샘플은 3배로 복제되었다. 평균 $\pm$ 표준편차가 나타난다. 관찰되는 최대 감소는 10 세포/ml의 검출 수준 및 초기 세포 밀도에 의존한다. PA01p에 대해, EDTA는 비개질된 PSP3gp10 엔도리신 및 그의 개질된 변이체 PKPSP3gp10 모두와 상승적으로 작용한다.

[0124] 실시예 6: 대장균 파지 P2의 개질된 엔도리신 변이체

[0125] 서열번호:9에 따른 P2gp09는 촉매 램다-유사 류라미다제 도메인을 갖는 대장균 파지 P2로부터 유래된 165개의 아미노산 잔기의 구형 엔도리신이다. BLASTp 및 Pfam 분석에 의해 예측된 바와 같이, P2gp09 엔도리신은 대략 아미노산 잔기 34 내지 대략 아미노산 잔기 152의 범위에서 그의 촉매 도메인을 포함한다.

[0126] 파지 P2의 정제된 게놈성 DNA는 하기의 PCR 파라미터를 사용하여 Pfu 중합효소에 의한 표준 PCR 반응 (Fermentas)에서 P2gp09의 오픈 리딩 프레임(ORF)의 증폭을 위한 주형으로서 사용되었다:



[0127]

[0128] 상기 PCR을 위해, 기준(standard) 5' 프라이머(5' ATGGGATCCCCGGTAATTAACACGCATC 3'(서열번호:54)) 및 기준 (standard) 3' 프라이머(5' AGCCGGTACGCCGCCAGCGGTACGC 3'(서열번호:55))가 사용되었다. 다가양이온성 9-머 펩 티드 Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys(서열번호:11)를 인코딩하는 유전자 단편으로 P2gp09를 인코딩하는 ORF의 5' 말단을 연장하기 위하여, 연장된 5' 프라이머(5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGC AAACCGGTAATTAACACGCATC 3'(서열번호:56))와 서열번호:55에 따른 기준(standard) 3' 프라이머와 테일(tail) PCR(상기 표준 PCR과 파라미터가 동일함)이 적용되었다. 원래의 비개질된 P2gp09 PCR 단편과 연장된 단편은 모 두 제조사의 TA-클로닝 프로토콜에 따라 pEXP5CT/TOPO® 발현 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 연결되 었다.

[0129] 서열번호:9에 따른 P2gp09 및 서열번호:57에 따른 PKP2gp09의 재조합 발현은, 4시간의 주기 동안 37°C에서 1 mM 의 IPTG(이소프로필티오갈락토시드)와의 배양 후에 지수성장 대장균 BL21(λDE3) pLysS 세포(Invitrogen)에서 수행된다. pEXP5CT/TOPO® 발현 벡터에 의해 인코딩된 상기 단백질 모두는 C-말단 6xHis-tag를 사용하여 Ni<sup>2+</sup> 친화성 크로마토그래피(Akta FPLC, GE Healthcare)에 의해 정제되었다. Ni<sup>2+</sup> 친화성 크로마토그래피는 4개의 일련의 단계로 수행되며, 이러한 단계 모두는 실온에서 이루어진다:

[0130] 1. 유속 0.5 ml/min에서 10 컬럼 부피의 세척 완충액(60 mM 이미다졸, 0.5 mM NaCl 및 pH 7.4의 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH)에 의한 Histrap HP 1 ml 컬럼(GE Healthcare)의 평형.

[0131] 2. 유속 0.5 ml/min에서 Histrap HP 1 ml 컬럼상에 전체 용해물(원하는 엔도리신이 포함됨)의 로딩.

[0132] 3. 유속 1 ml/min에서 15 컬럼 부피의 세척 완충액에 의한 컬럼의 세척.

[0133] 4. 유속 0.5 ml/min에서 10 컬럼 부피의 용리 완충액(500 mM 이미다졸, 5 mM NaCl 및 pH 7.4의 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH)에 의해 컬럼으로부터 결합된 엔도리신의 용리.

[0134] 대장균 발현 배양물 리터 당 두개의 정제된 재조합 단백질의 총수율은 표 7에 나타난다. 상기 값은 파장 280 nm 에서 정제된 모액(stock solution)의 총부피 및 단백질 농도의 분광광도 측정에 의해 결정되었다. 용리 완충액 (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 500 mM 이미다졸)에서 각각 P2gp09 및 PKP2gp09로 이루어진 정제된 모액은 SDS-PAGE 겔에서 시각적으로 측정될 때 95% 이상의 순도를 나타내었다.



표 7

[0135] 대장균 발현 배양물 리터 당 정제된 재조합 P2gp09 엔도리신 및 그의 PK-개질된 유도체 PKP2gp09의 수율

| 엔도리신              | 발현율     |
|-------------------|---------|
| P2gp09(서열번호:9)    | 5.52 mg |
| PKP2gp09(서열번호:57) | 3.40 mg |

[0136] 서열번호:57에 따른 PK2gp09 엔도리신의 항-그램음성 스펙트럼을 측정하기 위하여, 1.315  $\mu$ M의 PK2gp09 엔도리신 및 0.5 mM의 EDTA의 조합이 임상의 P. 에루지노사 균주 PA01p 및 Br667, 및 대장균 WK6에 대해 테스트되었다 (표 9 참조). 지수성장 세균 세포( $OD_{600nm}$ : 0.6)는 각 균주의 최종 밀도 약  $10^6$ /ml로 100배 희석되었으며, 각각 0.5 mM의 EDTA와 조합하거나 조합하지 않은 비개질된 엔도리신 P2gp09(서열번호:9) 및 개질된 엔도리신 PKP2gp09(서열번호:57)와 실온에서 30분 동안 흔들지 않고 배양되었다. 배양을 위해, 엔도리신은 각각 완충액 (20 mM  $NaH_2PO_4$ -NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 사용되었으며, 배양은 엔도리신의 최종 농도 1.315  $\mu$ M에서 발생되었다. 대조군으로서 각각의 균주는 엔도리신 없이 0.5 mM의 EDTA(상기 기재된 것과 동일한 완충액)와 30분 동안 배양되었다. 배양 후에, 세포 현탁액은 3배(각각  $10^5$ - $10^4$ - $10^3$  세포/ml) 희석되었으며, 100  $\mu$ l의 각 희석액은 LB-배지에 플레이팅되었다. 잔여 콜로니가 37°C에서 밤새 배양된 후에 카운팅되었다. 카운팅된 세포수에 기초하여, 로그 단위( $=\log_{10}N_0/N_i$ , 여기서  $N_0$ = 비처리된 세포의 수,  $N_i$ = 처리된 세포의 수, 상기 둘 다 배양 후에 카운팅됨)의 상대적 불활성으로서 항균 활성이 산출되었다(표 8).

표 8

[0137] 다른 지수성장 그람음성 종들에 대해, EDTA- $Na_2$ 의 존재 및 부재하에 비개질된 엔도리신(P2gp09) 및 그의 개질된 엔도리신 변이체(P2gp09)의 항균 활성

|                | 0.5 mM EDTA     | 1.315 $\mu$ M P2gp09 | 1.315 $\mu$ M PKP2gp09 | $\Delta$ | 1.315 $\mu$ M P2gp09 + 0.5 mM EDTA | 1.315 $\mu$ M PKP2gp09 + 0.5 mM EDTA | $\Delta$ |
|----------------|-----------------|----------------------|------------------------|----------|------------------------------------|--------------------------------------|----------|
| P. 에루지노사 PA01p | 0.330 +/- 0.146 | 0.374 +/- 0.084      | 0.326 +/- 0.069        | -0.038   | 2.840 +/- 0.079                    | 3.172 +/- 0.056                      | 0.332    |
| P. 에루지노사 Br667 | 0.003 +/- 0.051 | 0.246 +/- 0.042      | 0.300 +/- 0.062        | 0.054    | 0.582 +/- 0.074                    | 0.952 +/- 0.213                      | 0.370    |
| P. 푸티다 G1      | 0.072 +/- 0.084 | 0.419 +/- 0.024      | 1.014 +/- 0.139        | 0.595    | 3.919 +/- 0.118                    | > 4,386                              | > 0.467  |
| 버크홀데리아 슈도말레이   | 0.206 +/- 0.151 | 0.769 +/- 0.110      | 1.163 +/- 0.073        | 0.394    | 3.890 +/- 0.056                    | 4.255 +/- 0.001                      | 0.365    |
| 대장균 WK6        | 0.153 +/- 0.046 | 0.751 +/- 0.053      | 1.104 +/- 0.039        | 0.353    | 0.784 +/- 0.071                    | 1.545 +/- 0.102                      | 0.749    |

[0138] 모든 샘플은 3배로 복제되었다. 평균+/-표준편차가 나타난다.

[0139] 관찰되는 최대 감소는 10 세포/ml의 검출 수준 및 초기 세포 밀도에 의존한다.

표 9

[0140] 사용된 그람음성 균주의 리스트

| 그램음성 균주           | 소스(source)  | 참조                   |
|-------------------|---|----------------------|
| 슈도모나스 에루지노사 PA01p | 화상 분리주(isolate), Queen Astrid 병원, Brussels        | Pirnay et al., 2003* |
| 슈도모나스 에루지노사 Br667 | 화상 분리주(isolate), Queen Astrid 병원, Brussels        | Pirnay et al., 2003* |
| 버크홀데리아 슈도말레이      | 임상 분리주(clinical isolate), UZ Gasthuisberg, Leuven | Prof J. Verhaegen    |
| 대장균 WK 6          | 표준 실험실(Standard laboratory) 발현 균주                 | Prof C. Michiels     |



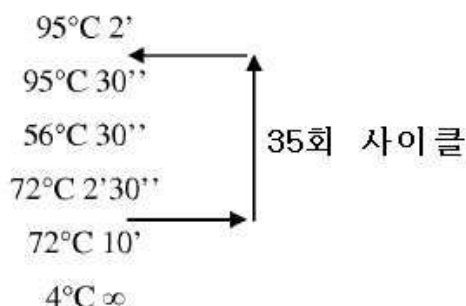
|              |                |               |
|--------------|----------------|---------------|
| 슈도모나스 푸티다 G1 | 토양 분리주, Moscow | Prof V.Krylov |
|--------------|----------------|---------------|

[0141] \*Pirnay JP et al. (2003). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202.

[0142] 실시예 7: 슈도모나스 푸티다 파지 OBP의 개질된 엔도리신 변이체

[0143] 서열번호:7에 따른 OBPgpLYS는 추정상의 N-말단 펩티도글리칸 결합 도메인 및 C-말단 촉매 키티나제 도메인을 갖는 슈도모나스 푸티다 파지 OBP로부터 유래된 328개 아미노산 잔기의 모듈(modular) 엔도리신이다. BLASTp 및 Pfam 분석에 의해 예측된 바와 같이, OBPgpLYS 엔도리신은 대략 아미노산 잔기 126 내지 대략 아미노산 잔기 292의 범위에서 그의 촉매 도메인을 포함하며, 대략 아미노산 잔기 7 내지 96의 범위에서 N-말단 펩티도글리칸 결합 도메인을 포함한다.

[0144] 파지 OBP의 정제된 게놈성 DNA는 하기의 PCR 파라미터를 사용하여 Pfu 중합효소에 의한 표준 PCR 반응(Fermentas, Ontario, Canada)에서 OBPgpLYS의 오픈 리딩 프레임(ORF)의 증폭을 위한 주형으로서 사용되었다:



[0145]

[0146] 따라서, 기준(standard) 5' 프라이머 (5' ATGAAAAATAGCGAGAAGAAT 3'(서열번호:58)) 및 기준(standard) 3' 프라이머(5' AACTATCCGAGTGCTTTCTTGT 3'(서열번호:59))가 사용되었다. 다가양이온성 9-머 펩티드 Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys(서열번호:11)를 인코딩하는 유전자 단편으로 OBPgpLYS를 인코딩하는 ORF의 5' 말단을 연장하기 위하여, 연장된 5' 프라이머(5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAAAAATAGCGAG AAGAAT 3'(서열번호:60))와 서열번호:59에 따른 기준(standard) 3' 프라이머와 테일(tail) PCR(상기 표준 PCR과 파라미터가 동일함)이 적용되었다. 원래의 비개질된 OBPgpLYS PCR 단편과 연장된 단편은 모두 제조사의 TA-클로닝 프로토콜에 따라 pEXP5CT/TOPO® 발현 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 연결되었다.

[0147] 서열번호:7에 따른 OBPgpLYS 및 서열번호:61에 따른 PKOBPgpLYS의 재조합 발현은, 4시간의 주기 동안 37°C에서 1 mM의 IPTG(이소프로필티오갈락토시드)와의 배양 후에 지수성장 대장균 BL21(λDE3) pLysS 세포(Invitrogen)에서 수행된다. pEXP5CT/TOPO® 발현 벡터에 의해 인코딩된 상기 단백질 모두는 C-말단 6xHis-tag를 사용하여 Ni<sup>2+</sup> 친화성 크로마토그래피(Akta FPLC, GE Healthcare)에 의해 정제되었다. Ni<sup>2+</sup> 친화성 크로마토그래피는 4개의 일련의 단계로 수행되며, 이러한 단계 모두는 실온에서 이루어진다:

[0148] 1. 유속 0.5 ml/min에서 10 컬럼 부피의 세척 완충액(60 mM 이미다졸, 0.5 mM NaCl 및 pH 7.4의 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH)에 의한 Histrap HP 1 ml 컬럼(GE Healthcare)의 평형.

[0149] 2. 유속 0.5 ml/min에서 Histrap HP 1 ml 컬럼상에 전체 용해물(원하는 엔도리신이 포함됨)의 로딩.

[0150] 3. 유속 1 ml/min에서 15 컬럼 부피의 세척 완충액에 의한 컬럼의 세척.

[0151] 4. 유속 0.5 ml/min에서 10 컬럼 부피의 용리 완충액(500 mM 이미다졸, 5 mM NaCl 및 pH 7.4의 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH)에 의해 컬럼으로부터 결합된 엔도리신의 용리.

[0152] 대장균 발현 배양물 리터 당 두개의 정제된 재조합 단백질의 총수율은 표 10에 나타난다. 상기 값은 파장 280 nm에서 정제된 모액(stock solution)의 총부피 및 단백질 농도의 분광광도 측정에 의해 결정되었다. 용리 완충액(20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 500 mM 이미다졸)에서 각각 OBPgpLYS 및 PKOBPgpLYS로 이루어진 정

제된 모액은 SDS-PAGE 겔에서 시각적으로 측정될 때 90% 이상의 순도를 나타내었다.

### 표 10

[0153] 대장균 발현 배양물 리터 당 정제된 재조합 OBPgpLYS 엔도리신 및 그의 PK-개질된 유도체 PKOBPgpLYS의 수율

| 엔도리신                | 발현율    |
|---------------------|--------|
| OBPgpLYS(서열번호:7)    | 3.3 mg |
| PKOBPgpLYS(서열번호:61) | 4.7 mg |

[0154] 서열번호:61에 따른 PKOBPgpLYS 엔도리신의 항-그람음성 스펙트럼을 측정하기 위하여, 1.313  $\mu$ M의 PKOBPgpLYS 엔도리신 및 0.5 mM의 EDTA의 조합이 임상의 다중 내성 P. 에루지노사 균주 Br667, 슈도모나스 푸티다 G1(파지 OBP의 숙주) 및 다른 범위의 그람음성 병원균(대장균 WK6, 살모넬라 티피무리움 LT2 및 버크홀데리아 슈도말레이)에 대해 테스트되었다(표 12 참조). 지수성장 세균 세포( $OD_{600nm}$ : 0.6)는 각 균주의 최종 밀도 약  $10^6$ /ml로 100배 희석되었으며, 각각 0.5 mM의 EDTA와 조합하거나 조합하지 않은 비개질된 엔도리신 OBPgpLYS(서열번호:7) 및 개질된 엔도리신 PKOBPgpLYS(서열번호:61)와 실온에서 30분 동안 흔들지 않고 배양되었다. 배양을 위해, 엔도리신은 각각 완충액(20 mM  $NaH_2PO_4$ -NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 사용되었으며, 배양은 엔도리신의 최종 농도 1.313  $\mu$ M에서 발생되었다. 대조군으로서 각각의 균주는 엔도리신 없이 0.5 mM의 EDTA(상기 기재된 것과 동일한 완충액)와 30분 동안 배양되었다. 배양 후에, 세포 현탁액은 3배(각각  $10^5$ - $10^4$ - $10^3$  세포/ml) 희석되었으며, 100  $\mu$ l의 각 희석액은 LB-배지에 플레이팅되었다. 잔여 콜로니가 37°C에서 밤새 배양된 후에 카운팅되었다. 카운팅된 세포수에 기초하여, 로그 단위( $=\log_{10}N_0/N_i$ , 여기서  $N_0$ = 비처리된 세포의 수,  $N_i$ = 처리된 세포의 수, 상기 둘다 배양 후에 카운팅됨)의 상대적 불활성으로서 항균 활성이 산출되었다(표 11). 모든 샘플은 3배로 복제되었다. 평균 $\pm$ 표준편차가 나타난다. 관찰되는 최대 감소는 10 세포/ml의 검출 수준 및 초기 세포 밀도에 의존한다.

### 표 11

[0155] 다른 지수성장 그람음성 종들에 대해, EDTA- $Na_2$ 의 존재 및 부재하에 비개질된 엔도리신(OBPgpLYS) 및 그의 개질된 엔도리신 변이체(PKOBPgpLYS)의 항균 활성

|                | 0.5 mM EDTA     | 1.313 $\mu$ M OBPgpLYS | 1.313 $\mu$ M PKOBPgpLYS | 1.313 $\mu$ M OBPgpLYS + 0.5 mM EDTA | 1.313 $\mu$ M PKOBPgpLYS + 0.5 mM EDTA |
|----------------|-----------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--|
| P. 에루지노사 PA01p | 0.130 +/- 0.023 | 2.531 +/- 0.173        | 3.079 +/- 0.015          | 4.357 +/- 1.857                      | > 5.687                                |
| P. 에루지노사 Br667 | 0.031 +/- 0.023 | 1.082 +/- 0.083        | 1.163 +/- 0.063          | 3.144 +/- 0.223                      | 5.272 +/- 0.573                        |
| P. 푸티다 G1      | 0.412 +/- 0.055 | 0.141 +/- 0.027        | 0.904 +/- 0.079          | 4.891 +/- 0.000                      | > 4.891                                |
| 버크홀데리아 슈도말레이   | 0.220 +/- 0.081 | 0.997 +/- 0.131        | 1.806 +/- 0.287          | 4.08 +/- 0.301                       | > 4.861                                |
| 대장균 WK6        | 0.592 +/- 0.113 | 0.681 +/- 0.032        | 1.434 +/- 0.018          | 1.179 +/- 0.200                      | 1.695 +/- 0.147                        |
| 살모넬라 티피무리움     | 0.054 +/- 0.048 | 0.076 +/- 0.011        | 0.127 +/- 0.013          | 0.774 +/- 0.052                      | 0.908 +/- 0.037                        |

### 표 12

[0156] 사용된 그람음성 균주의 리스트

| 그람음성 균주           | 소스(source)                                 | 참조                   |
|-------------------|--|----------------------|
| 슈도모나스 에루지노사 PA01p | 화상 분리주(isolate), Queen Astrid 병원, Brussels | Pirnay et al., 2003* |
| 슈도모나스 에루지노사 Br667 | 화상 분리주(isolate), Queen Astrid 병원, Brussels | Pirnay et al., 2003* |

|                |   |                   |
|----------------|---|-------------------|
| 슈도모나스 푸티다 G1   | 토양 분리주, Moskow                                    | Prof V.Krylov     |
| 버크홀데리아 슈도말레이   | 임상 분리주(clinical isolate), UZ Gasthuisberg, Leuven | Prof J. Verhaegen |
| 대장균 WK 6       | 표준 실험실(Standard laboratory) 발현 균주                 | Stratagene        |
| 살모넬라 티피무리움 LT2 | SGSC N° 2317                                      | Prof C. Michiels  |

[0157] \* Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Pirson J, Struelens M, Duinslaeger L, Cornelis P, Zizi M, Vanderkelen A. (2003). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol.*, 41(3):1192-1202.

[0158] OBPgpLYS 처리의 전반적인 효과가 종에 의존적인 반면, 표 11의 결과는 비개질된 OBPgpLYS에 비해 PKOBPgpLYS의 부가된 효과가 0.5 mM의 EDTA의 부재 및 존재 모두에서 테스트된 모든 세균 종들에 대해 나타남을 보여준다. 슈도모나스 및 버크홀데리아 종들에 대해, EDTA와의 명백한 상승 효과가 PKOBPgpLYS 활성화에 대해 관찰된다.

[0159] 실시예 8: OBPgpLYS 및 PKOBPgpLYS의 항균 활성화에 대한 다른 EDTA 농도의 효과

[0160] 비개질 및 개질된 엔도리신의 항균 활성화에 대한 EDTA의 영향을 확인하기 위하여, 다른 농도의 EDTA 및 엔도리신을 사용하여 비개질된 OBPgpLYS 엔도리신(서열번호:7) 및 PKOBPgpLYS 엔도리신(서열번호:61)의 항균 활성이 슈도모나스 에루지노사 PA01p 세포에 대해 테스트되었다(Pirnay JP et al. *J Clin Microbiol.*, 41(3):1192-1202 (2003)). 지수성장 세균 세포( $OD_{600nm}$ : 0.6)는 최종 밀도 약  $10^6$ /ml로 100배 희석되었으며, 비개질된 엔도리신 OBPgpLYS(서열번호:7) 및 개질된 엔도리신 PKOBPgpLYS(서열번호:61)와 실온에서 30분 동안 흔들지 않고 배양되었다. 배양을 위해, 엔도리신은 엔도리신의 최종 농도 0.013  $\mu$ M, 0.131  $\mu$ M 및 1.315  $\mu$ M에서 각각 완충액(20 mM  $NaH_2PO_4$ -NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 사용되었다. 이에 따라, 0 mM, 0.05 mM, 0.5 mM 및 10 mM의 다른 EDTA 농도가 사용되었다. 대조군으로서, 하나의 샘플이 엔도리신 없이 30분 동안 배양되었으며, 대신 완충액(20 mM  $NaH_2PO_4$ -NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)이 부가되었다. 배양 후에, 세포 현탁액은 3배(각각  $10^5$ - $10^4$ - $10^3$  세포/ml) 희석되었으며, 100  $\mu$ l의 각 희석액은 LB-배지에 플레이팅되었다. 잔여 콜로니가 37°C에서 밤새 배양된 후에 카운팅되었다. 카운팅된 세포수에 기초하여, 로그 단위( $=\log_{10}N_0/N_i$ , 여기서  $N_0$ = 비처리된 세포의 수,  $N_i$ = 처리된 세포의 수)의 상대적 불활성으로서 항균 활성이 산출되었다(표 13). 모든 샘플은 3배로 복제되었다. 평균 $\pm$ 표준편차가 나타난다. 관찰되는 최대 감소(5.69 로그 단위)는 10 세포/ml의 검출 수준 및 초기 세포 밀도에 의존한다. PA01p에 대해, EDTA는 비개질된 PSP3gp10 엔도리신 및 그의 개질된 변이체 PKPSP3gp10 모두와 상승적으로 작용한다. " $\Delta$ "는 각각의 OBPgpLYS 및 PKOBPgpLYS 샘플 사이의 활성의 차이를 나타낸다.

표 13

[0161] 지수성장 슈도모나스 에루지노사 PA01p 세포에 대한, 다른 EDTA 농도와 조합된 비개질된 엔도리신(OBPgpLYS) 및 그의 개질된 엔도리신 변이체(PKOBPgpLYS)의 항균 활성화

|                          | EDTA- $Na_2$ 의 농도(mM) |                   |                   |                   |
|--------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                          | 0                     | 0.05              | 0.5               | 10                |
| 엔도리신 부재                  | /                     | 0.028 $\pm$ 0.008 | 0.130 $\pm$ 0.023 | 1.827 $\pm$ 0.052 |
| 0.013 $\mu$ M OBPgpLYS   | 0.956 $\pm$ 0.110     | /                 | 4.626 $\pm$ 0.287 | /                 |
| 0.013 $\mu$ M PKOBPgpLYS | 0.992 $\pm$ 0.181     | /                 | 5.204 $\pm$ 0.000 | /                 |
| $\Delta$                 | 0.036                 |                   | 0.578             |                   |
| 0.131 $\mu$ M OBPgpLYS   | 2.158 $\pm$ 0.027     | /                 | 4.599 $\pm$ 0.275 | /                 |

|                             |                 |                 |                 |                 |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0.131 $\mu$ M<br>PKOBpgpLYS | 2.529 +/- 0.184 | /               | 5.671 +/- 0.000 | /               |
| $\Delta$                    | 0.371           |                 | 1.072           |                 |
| 1.315 $\mu$ M<br>OBpgpLYS   | 2.531 +/- 0.173 | 2.762 +/- 0.091 | 4.357 +/- 1.857 | 4.888 +/- 0.275 |
| 1.315 $\mu$ M<br>PKOBpgpLYS | 3.079 +/- 0.015 | 4.145 +/- 0.015 | > 5.687         | > 5.687         |
| $\Delta$                    | 0.548           | 1.383           | > 1.330         | > 0.799         |

[0162] 표 13에서 보여진 바와 같이, 비개질된 엔도리신 OBpgpLYS는 음성대조군에 비해 세포수를 1.315  $\mu$ M에 대해서는 2.5 로그 단위 이상, 0.013  $\mu$ M에 대해서는 +/- 1 로그 단위로 유의적으로 감소시킨다. 개질된 엔도리신 PKOBpgpLYS는 지수성장 PA01p 세포에 대해 추가적 0.5 로그 단위 감소를 유발한다. 관찰된 항균 효과는 0.5 및 10 mM EDTA의 농도에서 외막 투과제(permeabilizer) EDTA-Na<sub>2</sub>와 PKOBpgpLYS를 조합함으로써 5.69 로그 단위 감소(검출 수준보다 낮음)에 따라 더 증가될 수 있다. 비개질된 OBpgpLYS와 PK-개질된 OBpgpLYS 사이의 활성의 차이는 부가되는 엔도리신의 양을 증가시킴으로써 커진다(0.013 - 1.315  $\mu$ M 엔도리신).

[0163] 실시예 9: 다른 그람음성균에 대한 개질된 phiKZgp144 변이체의 항균 활성

[0164] phiKZgp144의 다가양이온성 펩티드 변이체와 다른 엔도리신의 능력을 시험하고 비교하기 위하여, 단백질의 N-말단 끝에서 다른 다가양이온성 펩티드를 갖는 인코딩 유전자들이 합성되었다.

[0165] 다른 산물들이 pET32b 발현 벡터(Novagen, Darmstadt, Germany)에서 클로닝되었다. pET32b는 대장균 숙주에 대한 다가양이온성 펩티드의 잠재적 독성을 감소시키기 위해 사용되었다. 벡터-인코딩된 융합 단백질(티오레독신)은 다가양이온성 펩티드를 감추며(mask), 정제 과정 동안 제거될 수 있다.

[0166] smi01(YP\_001712536) 및 KRK9\_smi01(서열번호:75)를 인코딩하는 유전자들이 완전히 합성되었으며(Entelechon, Regensburg, Germany), pET32b로 클로닝되었다.

[0167] 이에 따라, OD600nm=0.6의 광밀도에 도달할 때까지 하기의 개질된 엔도리신 변이체들이 37°C에서 대장균 BL21(DE3) 세포에서 발현되었다: smi01(YP\_001712536), KRK9\_smi01(서열번호:75), phiKZgp144(서열번호:1), pKKZ144pET32b(서열번호:43) 및 POLYKZ144(서열번호:35). 단백질 발현은 1 mM의 IPTG(최종 농도)에 의해 유도되었으며, 발현은 4시간 동안 수행되었다. 이어서, 대장균 세포는 6000g에서 20분 동안 원심분리에 의해 수확되었으며, 세포 분열 및 단백질 정제는 S-tag™ rEK 정제 키트(Novagen, Darmstadt, Germany)를 이용하여 수행되었다. pET32b 벡터를 이용할 때, 발현된 단백질은 숙주에 독성이 아니었으며 제조된 단백질의 고순도를 가져왔다. 정제된 모액들은 고순도를 나타내었다.

[0168] 비교를 위한 참조로서 시험하기 위하여, phiKZgp144 및 POLYgp144가 실시예 1에서 기재된 바에 따라 합성되고 정제되었다.

[0169] P. 에루지노사 PA01p의 지수적(약 10<sup>6</sup>/ml) 성장 세포(화상 분리주(Burn wound isolate), Queen Astrid 병원, Brussels; Pirnay JP et al. (2003), J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202), 아시네토박터 바우마니(DSMZ 30007) 또는 버크홀테리아 솔라나세움(Prof. C. Michiels에서 제공된 분리주)는 100배 희석되었으며(최종 밀도는 약 10<sup>6</sup>/ml였음), 완충액(20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 100  $\mu$ g/ml의 최종 농도에서 상기 기재된 각각의 10  $\mu$ g의 투석되지 않은 단백질과 실온에서 배양되었다. 1시간 후에, 세포 현탁액은 1:100으로 희석되었으며, LB에 플레이팅되었다. 또한, 완충액(20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)을 사용하여 음성대조군이 플레이팅되었다. 잔여 콜로니가 37°C에서 밤새 배양된 후에 카운팅되었다. 카운팅된 세포수에 기초하여, 상대적 불활성(%)=(100-(N<sub>i</sub>/N<sub>0</sub>)\*100, 여기서 N<sub>0</sub>= 비처리된 세포의 수, N<sub>i</sub>= 처리된 세포의 수)으로서 항균 활성이 산출되었다(표 3). 모든 샘플은 적어도 4배로 복제되었다.

[0170]

다른 세균 종들에 대한 다른 개질된 엔도리신 변이체(괄호 내 NCBI 번호)의 항균 효과

| 단백질                 | 세균 종                   | 감소[%]     |
|---------------------|------------------------|-----------|
| smi01(YP_001712536) | 아시네토박터 바우마니 DSMZ 30007 | 0         |
| KRK9_smi01          | 아시네토박터 바우마니 DSMZ 30007 | 50        |
|                     |                        |           |
| phiKZgp144          | 슈도모나스 에루지노사            | 0         |
| pKKZ144pET32b       | 슈도모나스 에루지노사            | 99 - 99.9 |
|                     |                        |           |
| phiKZgp144          | 아시네토박터 바우마니 DSMZ 30007 | 0         |
| pKKZ144pET32b       | 아시네토박터 바우마니 DSMZ 30007 | 99.9      |
|                     |                        |           |
| phiKZgp144          | 버크홀데리아 솔라나세아룸          | 0         |
| POLYKZ144           | 버크홀데리아 솔라나세아룸          | 99 - 99.9 |

[0171]

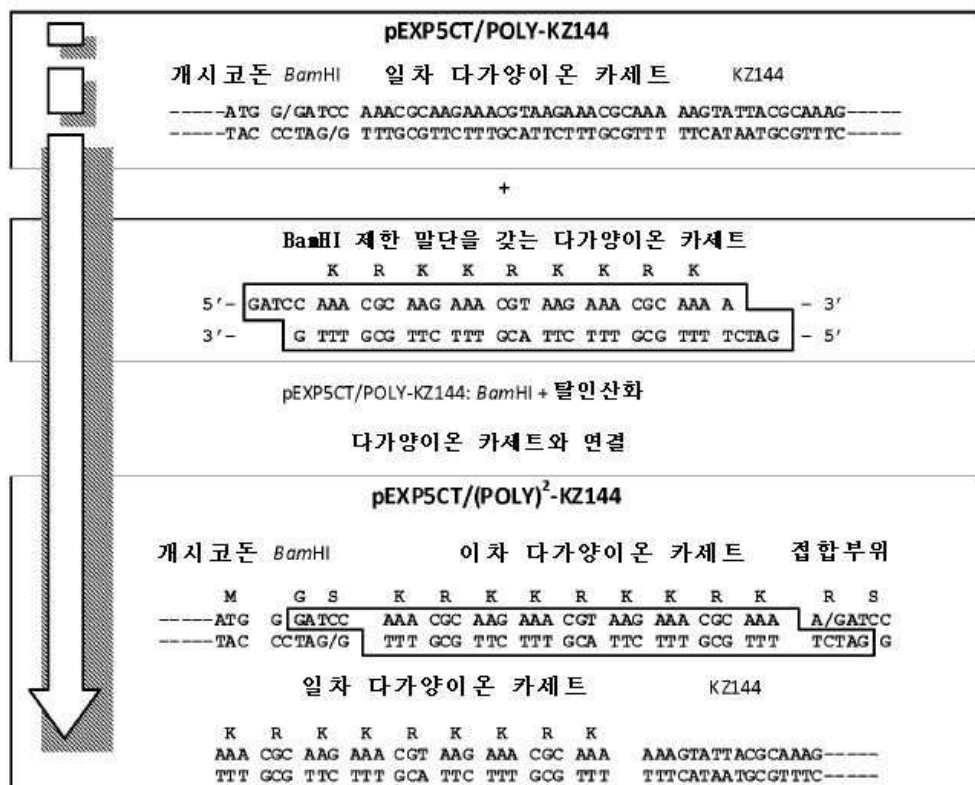
비개질된 엔도리신 phiKZgp144 및 smi01(YP\_001712536)은 음성대조군에 비해 세포수를 유의적으로 감소시키지 않는다. 이러한 관찰은 또한 엔도리신이 그람음성균의 세포벽을 분해하는 장벽으로서 외막의 효능을 설명한다. 표 14에서 보여지는 것처럼 대조적으로, 개질된 엔도리신 KRK9\_smi01, pKKZ144pET32b 및 POLY-gp144에 의한 배양은 아시네토박터 바우마니(KRK\_smi01에 대해 50%; pKKZ144pET32b에 대해 99.9%), 슈도모나스 에루지노사(pKKZ144pET32b에 대해 90-99.9%) 및 버크홀데리아 솔라나세움(POLYKZ144에 대해 90-99.9%)에 대해 세균 세포수의 유의적인 감소를 야기한다.

[0172]

본 실험들은 다른 엔도리신에 대한 양이온성/다가양이온성 융합의 접근 적용가능성을 입증한다. 또한, 본 실험들은 개질된 엔도리신이 다양한 세균들에 대해 작용함을 입증하였다.

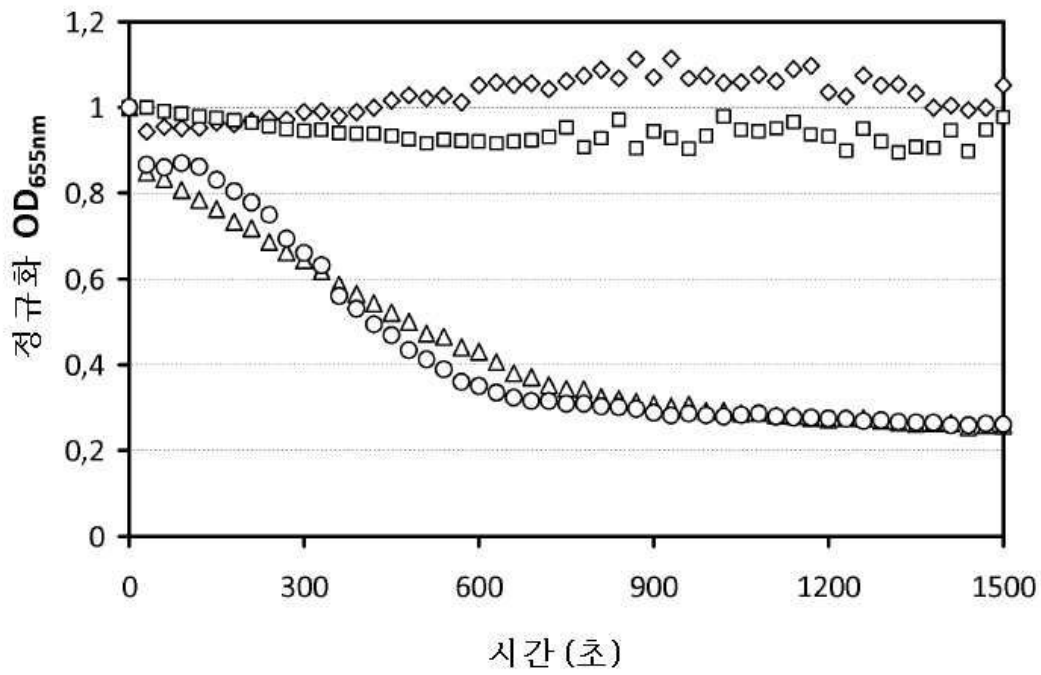
## 도면

### 도면1

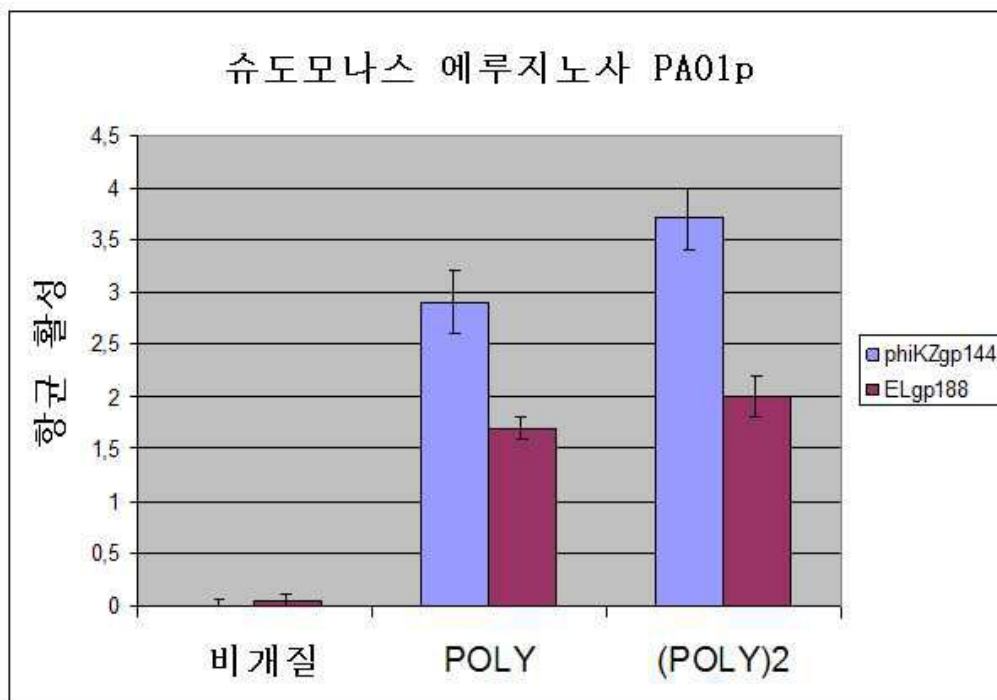




도면2

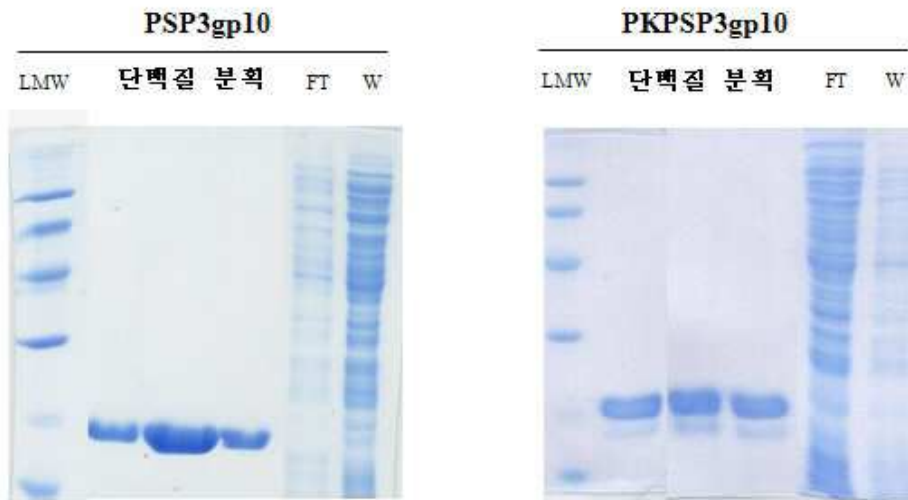


도면3

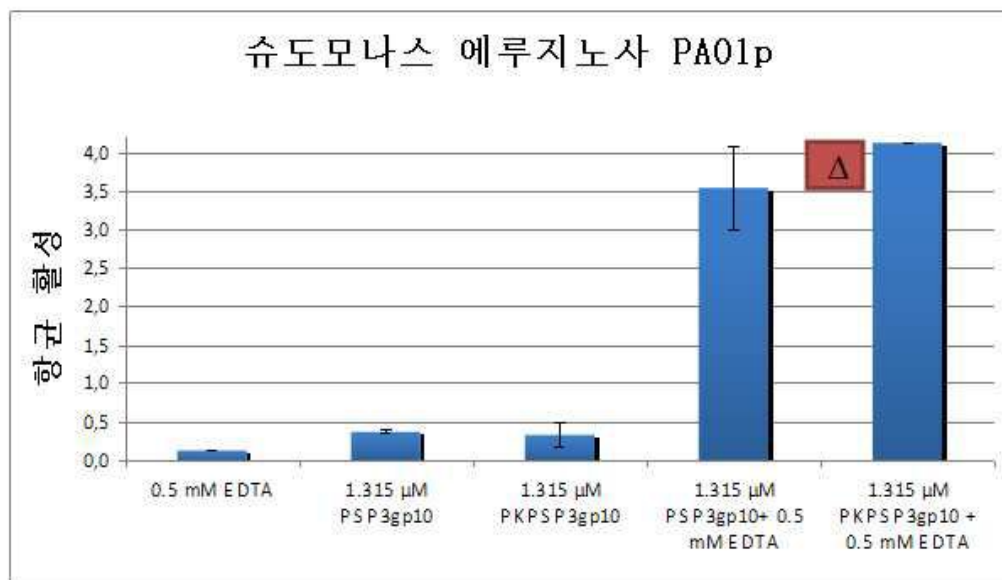




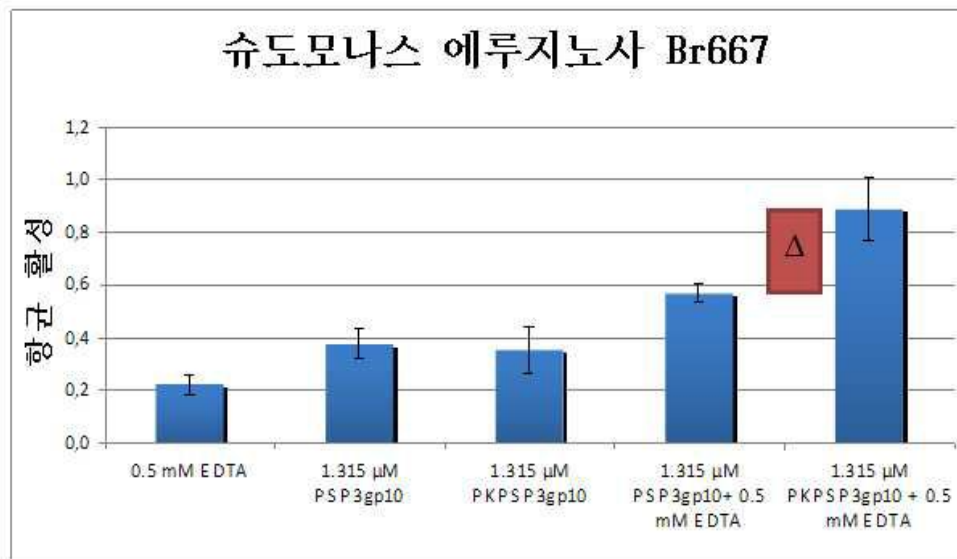
도면4



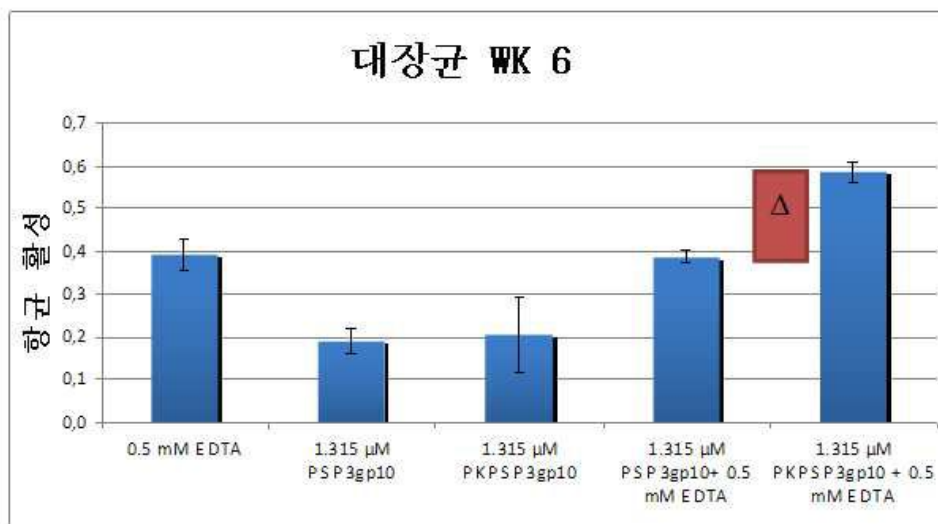
도면5a



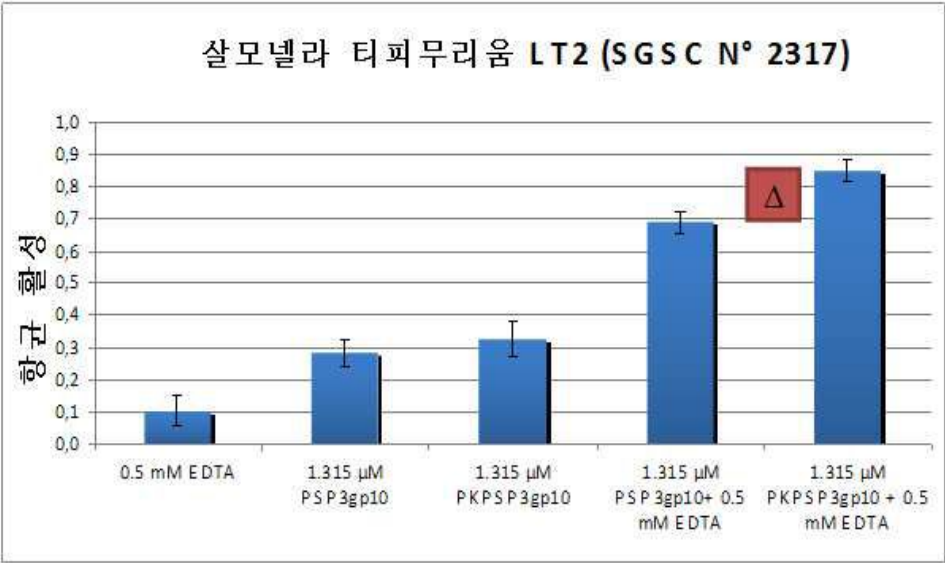
도면5b



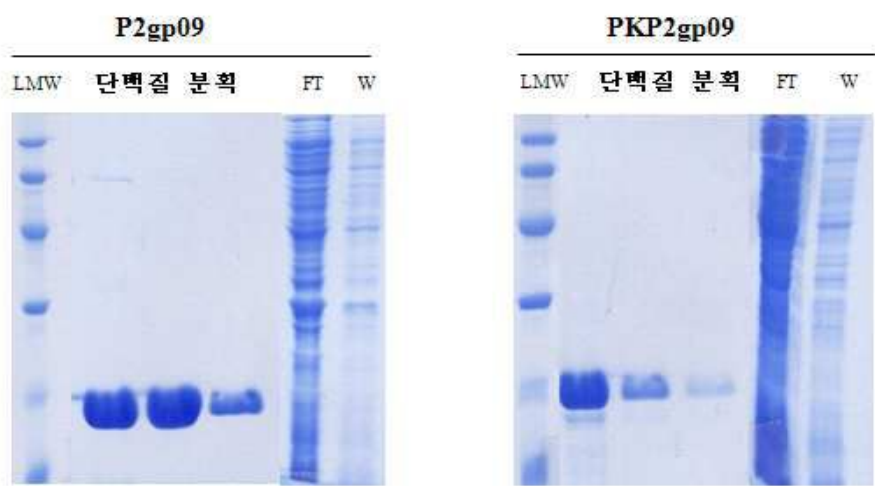
도면5c



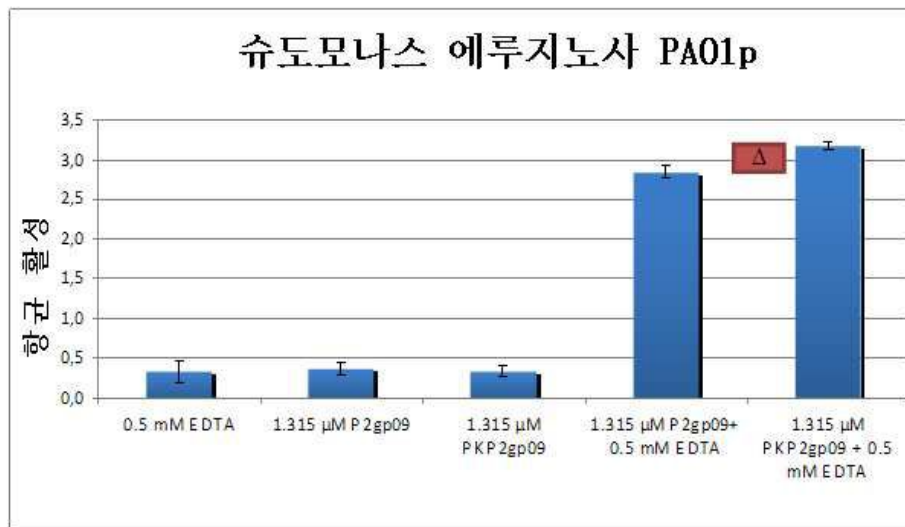
도면5d



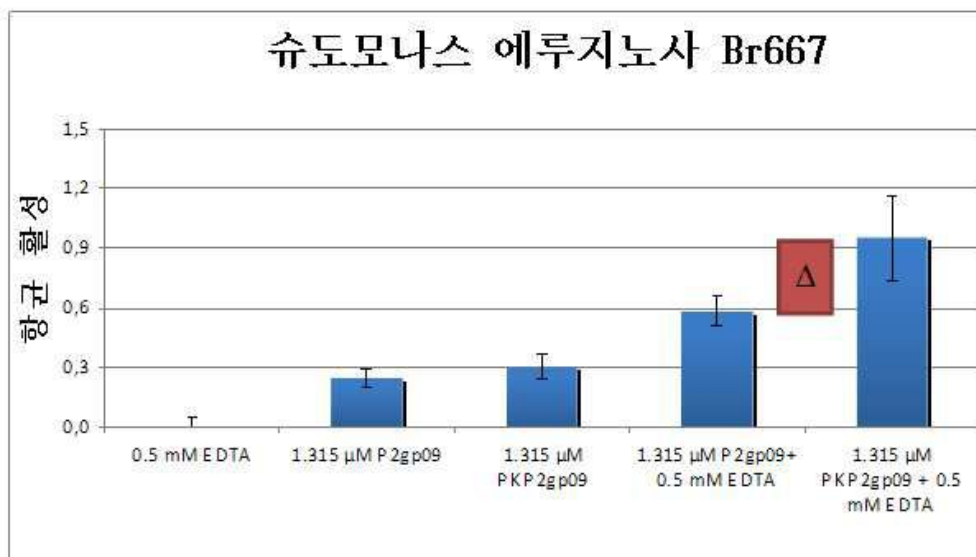
도면6



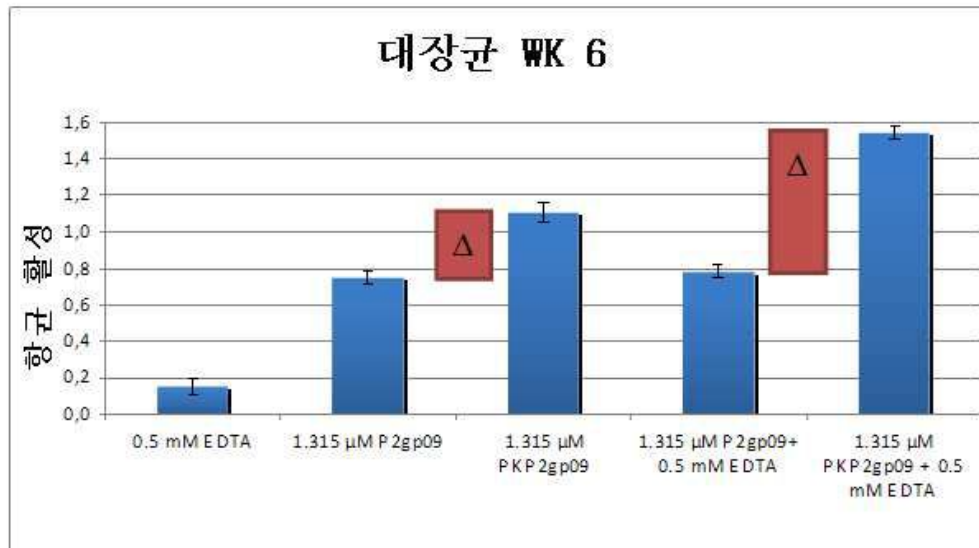
도면7a



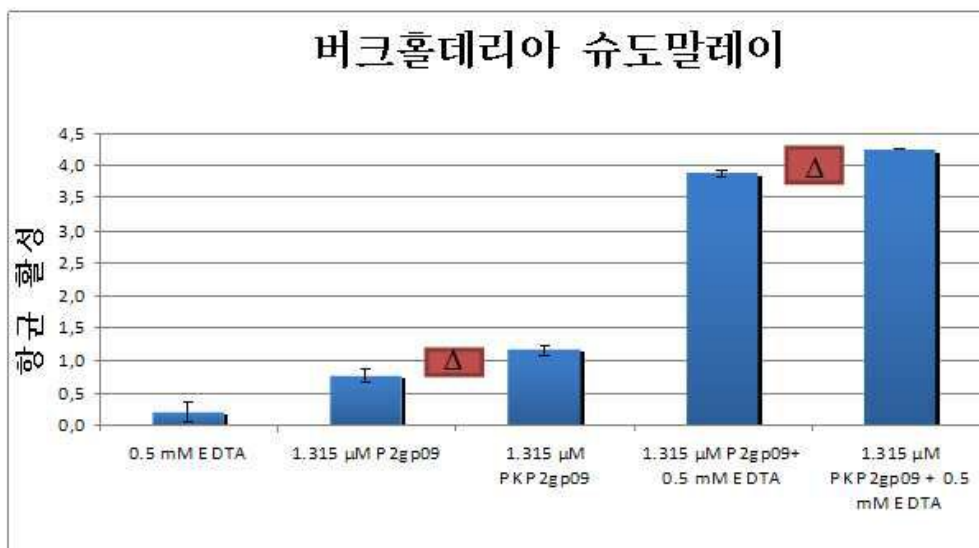
도면7b



도면7c

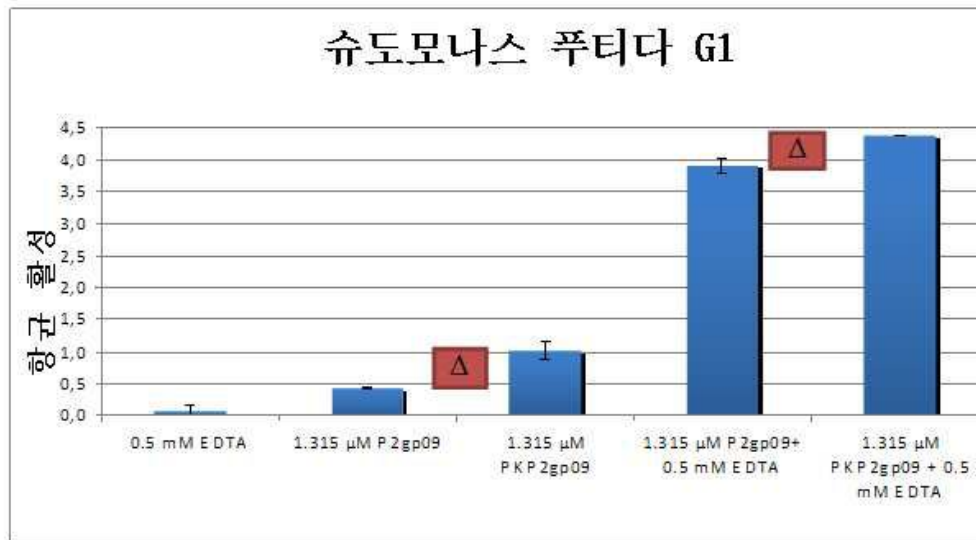


도면7d

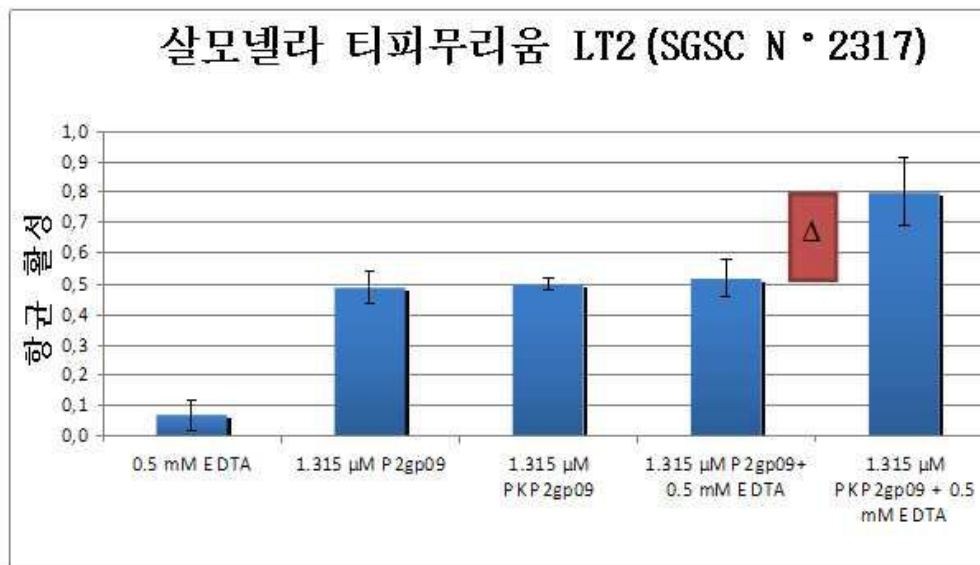




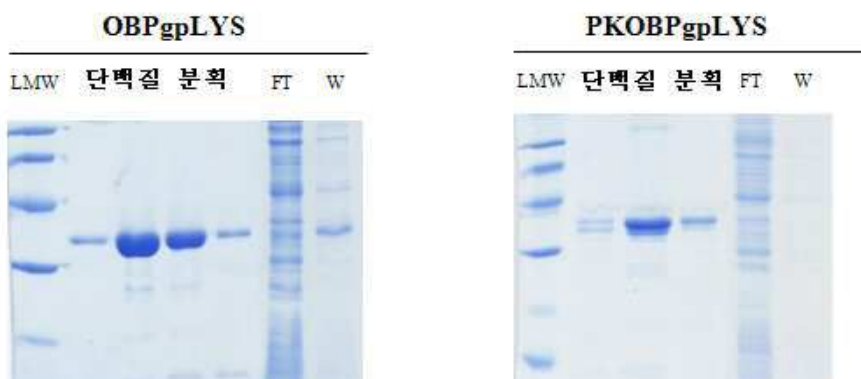
도면7e



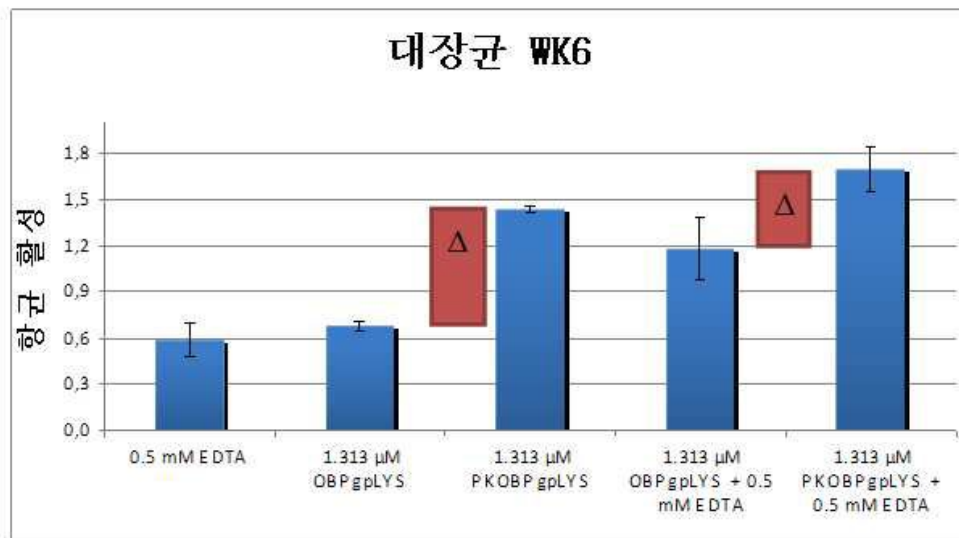
도면7f



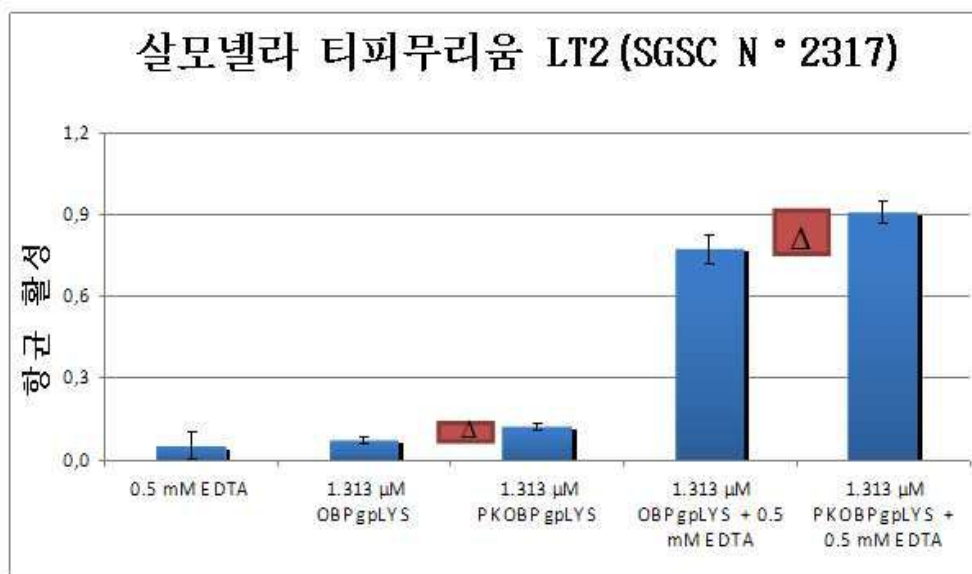
도면8



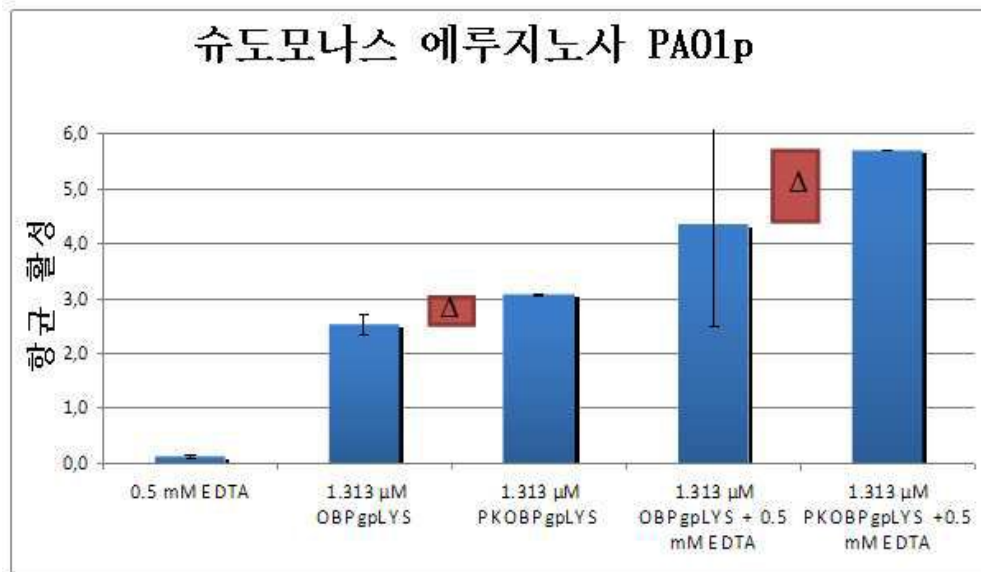
도면9a



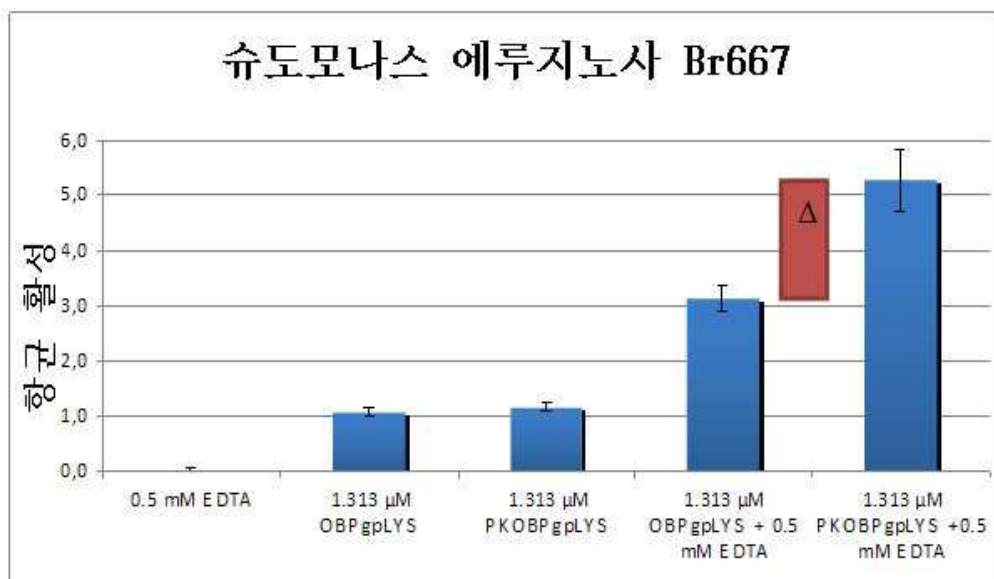
도면9b



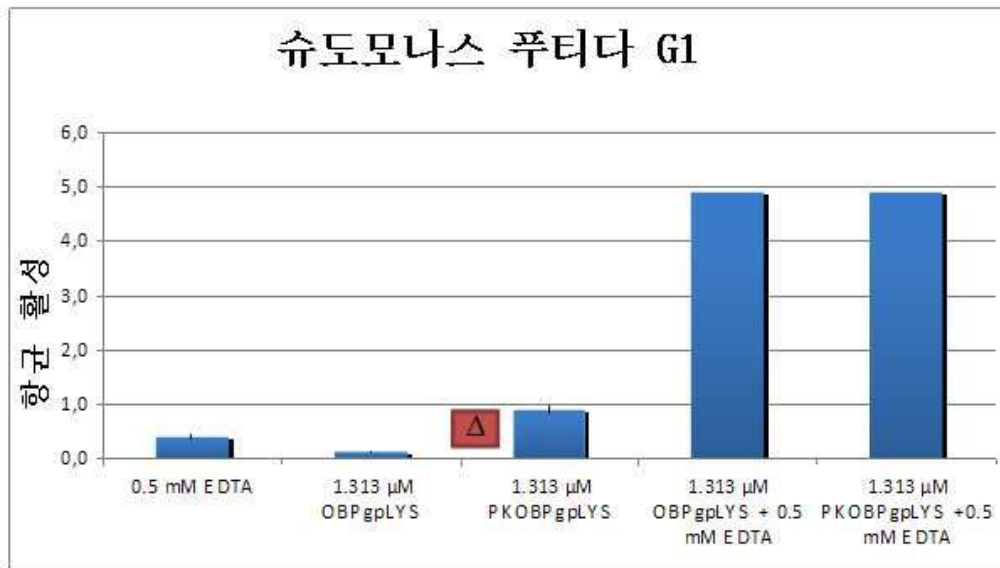
도면9c



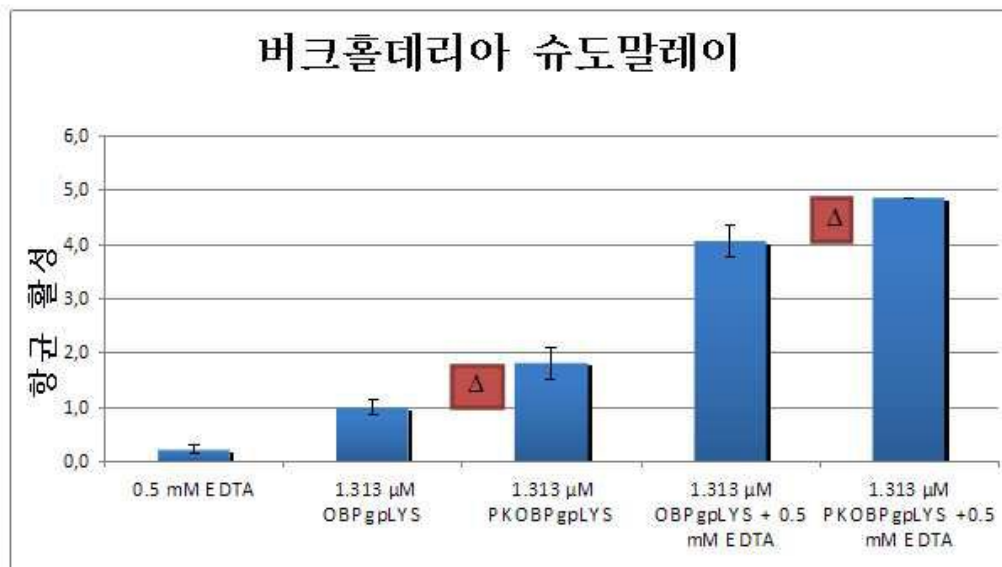
도면9d



도면9e



도면9f



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Katholieke Universiteit Leuven K.U. Leuven R & D

<120> Antimicrobial Agents

<130> IP20111685/DE

<150> GB 0815484.1

<151> 2008-08-26

<160> 83

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 260

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> phiKZgp144

<400> 1

Met Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu

1 5 10 15

Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly

20 25 30

Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp

35 40 45

Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu

50 55 60

Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met

65 70 75 80

Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala

85 90 95

Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala

100 105 110

Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser

115 120 125

Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile

130 135 140

Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala

145 150 155 160

Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile

165 170 175

Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr

180 185 190

Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg



195 200 205  
Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro

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

260

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> ELgp188

<400> 2

Met Asn Phe Arg Thr Lys Asn Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ala Leu Val

1 5 10 15  
Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Thr Gly Gln Ile Asp Gly Val Trp Gly Lys  
20 25 30  
Gly Thr Ser Ser Ser Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu Val  
35 40 45  
Val Gly Lys Asn Thr Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp Ala  
50 55 60  
Ser Gly Tyr Asn Val Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Leu

65 70 75 80  
Gly Leu Tyr Ser Leu Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr Leu  
85 90 95  
Ser Gly Leu Asp Lys Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg Thr  
100 105 110  
Pro Thr Tyr Asp Ile Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe Thr  
115 120 125

Ala Lys Val Lys Asp Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg Ala

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

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

260 265 270  
Thr Leu Tyr Thr Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg His  
275 280 285  
Val Ile Ser Tyr

290

<210> 3

<211> 181

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> Salmonella endolysin

<400> 3

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

20 25 30  
 Ile Thr Glu Lys Val Ala Arg Ala His Gly Tyr Arg Gly Asp Met Arg  
 35 40 45  
 Asn Leu Thr Arg Gly Gln Ala Leu Glu Ile Leu Glu Thr Asp Tyr Trp  
 50 55 60  
 Tyr Gly Pro Arg Phe Asp Arg Val Ala Lys Ala Ser Pro Asp Val Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Leu Cys Asp Thr Gly Val Asn Met Gly Pro Ser Val Ala Ala

85 90 95  
 Lys Met Leu Gln Arg Trp Leu Asn Val Phe Asn Gln Gly Gly Arg Leu  
 100 105 110  
 Tyr Pro Asp Met Asp Thr Asp Gly Arg Ile Gly Pro Arg Thr Leu Asn  
 115 120 125  
 Ala Leu Arg Val Tyr Leu Glu Lys Arg Gly Lys Asp Gly Glu Arg Val  
 130 135 140  
 Leu Leu Val Ala Leu Asn Cys Thr Gln Gly Glu Arg Tyr Leu Glu Leu

145 150 155 160  
 Ala Glu Lys Arg Glu Ala Asp Glu Ser Phe Val Tyr Gly Trp Met Lys  
 165 170 175  
 Glu Arg Val Leu Ile  
 180

<210> 4

<211> 163

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> Enterobacteria phage T4 endolysin

<400> 4

Met Asn Ile Phe Glu Met Leu Arg Ile Asp Glu Gly Leu Arg Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Ile Tyr Lys Asp Thr Glu Gly Tyr Tyr Thr Ile Gly Ile Gly His Leu

20 25 30  
 Leu Thr Lys Ser Pro Ser Leu Asn Ala Ala Lys Ser Glu Leu Asp Lys

35 40 45  
Ala Ile Gly Arg Asn Cys Asn Gly Val Ile Thr Lys Asp Glu Ala Glu  
50 55 60  
Lys Leu Phe Asn Gln Asp Val Asp Ala Ala Val Arg Gly Ile Leu Arg  
65 70 75 80  
Asn Ala Lys Leu Lys Pro Val Tyr Asp Ser Leu Asp Ala Val Arg Arg

85 90 95  
Cys Ala Leu Ile Asn Met Val Phe Gln Met Gly Glu Thr Gly Val Ala  
100 105 110  
Gly Phe Thr Asn Ser Leu Arg Met Leu Gln Gln Lys Arg Trp Asp Glu  
115 120 125  
Ala Ala Val Asn Leu Ala Lys Ser Arg Trp Tyr Asn Gln Thr Pro Asn  
130 135 140  
Arg Ala Lys Arg Val Ile Thr Thr Phe Arg Thr Gly Thr Trp Asp Ala

145 150 155 160  
Tyr Lys Asn

<210> 5

<211> 280

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> Acinetobacter baumannii endolysin

<400> 5

Met Glu Tyr Asp Met Ile Leu Lys Phe Gly Ser Lys Gly Asp Ala Val  
1 5 10 15  
Ala Thr Leu Gln Lys Gln Leu Ala Lys Met Gly Tyr Lys Gly Val Lys  
20 25 30  
Asp Lys Pro Leu Ser Val Asp Gly His Phe Gly Glu Ser Thr Glu Phe

35 40 45  
Ala Val Ile Gln Leu Gln Arg Lys Phe Gly Leu Val Ala Asp Gly Lys  
50 55 60  
Val Gly Asp Lys Thr Arg Gln Ala Leu Ala Gly Asp Ser Val Ser Lys

65                      70                      75                      80  
 Phe Leu Lys Asp Glu Asp Tyr Lys Lys Ala Ala Ile Arg Leu Lys Val  
                          85                      90                      95  
 Pro Glu Leu Val Ile Arg Val Phe Gly Ala Val Glu Gly Leu Gly Val  
  
                          100                      105                      110  
 Gly Phe Leu Pro Asn Gly Lys Ala Lys Ile Leu Phe Glu Arg His Arg  
                          115                      120                      125  
 Met Tyr Phe Tyr Leu Cys Gln Ala Leu Gly Lys Thr Phe Ala Asn Ser  
                          130                      135                      140  
 Gln Val Lys Ile Thr Pro Asn Ile Val Asn Thr Leu Thr Gly Gly Tyr  
 145                      150                      155                      160  
 Lys Gly Asp Ala Ala Glu Tyr Thr Arg Leu Ser Met Ala Ile Asn Ile  
  
                          165                      170                      175  
 His Lys Glu Ser Ala Leu Met Ser Thr Ser Trp Gly Gln Phe Gln Ile  
                          180                      185                      190  
 Met Gly Glu Asn Trp Lys Asp Leu Gly Tyr Ser Ser Val Gln Glu Phe  
                          195                      200                      205  
 Val Asp Gln Gln Gln Leu Asn Glu Gly Asn Gln Leu Glu Ala Phe Ile  
                          210                      215                      220  
 Arg Phe Ile Glu Trp Lys Pro Gly Leu Leu Glu Ala Leu Arg Lys Gln  
  
 225                      230                      235                      240  
 Asp Trp Asp Thr Val Phe Thr Leu Tyr Asn Gly Lys Asn Tyr Lys Lys  
                          245                      250                      255  
 Leu Gly Tyr Gln Ala Lys Phe Gln Lys Glu Trp Asp His Leu Glu Pro  
                          260                      265                      270  
 Ile Tyr Arg Glu Lys Thr Ala Ala  
                          275                      280  
 <210> 6  
 <211> 152  
 <212> PRT  
 <213> unknown  
 <220><223> E. coli K1F endolysin



<400> 6

Met Val Ser Lys Val Gln Phe Asn Pro Arg Ser Arg Thr Asp Ala Ile

1 5 10 15  
Phe Val His Cys Ser Ala Thr Lys Pro Glu Met Asp Ile Gly Val Glu  
20 25 30  
Thr Ile Arg Met Trp His Lys Gln Gln Ala Trp Leu Asp Val Gly Tyr  
35 40 45  
His Phe Ile Ile Lys Arg Asp Gly Thr Val Glu Glu Gly Arg Pro Val  
50 55 60  
Asn Val Val Gly Ser His Val Lys Asp Trp Asn Ser Arg Ser Val Gly

65 70 75 80  
Val Cys Leu Val Gly Gly Ile Asn Ala Lys Gly Gln Phe Glu Ala Asn  
85 90 95  
Phe Thr Pro Ala Gln Met Asn Ser Leu Arg Asn Lys Leu Asp Asp Leu  
100 105 110  
Lys Val Met Tyr Pro Gln Ala Glu Ile Arg Ala His His Asp Val Ala  
115 120 125  
Pro Lys Ala Cys Pro Ser Phe Asp Leu Gln Arg Trp Leu Ser Thr Asn

130 135 140  
Glu Leu Val Thr Ser Asp Arg Gly  
145 150

<210> 7

<211> 328

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> OBPgpLYS

<400> 7

Met Lys Asn Ser Glu Lys Asn Ala Ser Ile Ile Met Ser Ile Gln Arg  
1 5 10 15  
Thr Leu Ala Ser Leu Ser Leu Tyr Gly Gly Arg Ile Asp Gly Leu Phe  
20 25 30

Gly Glu Lys Cys Arg Gly Ala Ile Ile Leu Met Leu Asn Lys Val Tyr

35 40 45

Pro Asn Phe Ser Thr Asn Lys Leu Pro Ser Asn Thr Tyr Glu Ala Glu

50 55 60

Ser Val Phe Thr Phe Leu Gln Thr Ala Leu Ala Gly Val Gly Leu Tyr

65 70 75 80

Thr Ile Thr Ile Asp Gly Lys Trp Gly Gly Thr Ser Gln Gly Ala Ile

85 90 95

Asp Ala Leu Val Lys Ser Tyr Arg Gln Ile Thr Glu Ala Glu Arg Ala

100 105 110

Gly Ser Thr Leu Pro Leu Gly Leu Ala Thr Val Met Ser Lys His Met

115 120 125

Ser Ile Glu Gln Leu Arg Ala Met Leu Pro Thr Asp Arg Gln Gly Tyr

130 135 140

Ala Glu Val Tyr Ile Asp Pro Leu Asn Glu Thr Met Asp Ile Phe Glu

145 150 155 160

Ile Asn Thr Pro Leu Arg Ile Ala His Phe Met Ala Gln Ile Leu His

165 170 175

Glu Thr Ala Cys Phe Lys Tyr Thr Glu Glu Leu Ala Ser Gly Lys Ala

180 185 190

Tyr Glu Gly Arg Ala Asp Leu Gly Asn Thr Arg Pro Gly Asp Gly Pro

195 200 205

Leu Phe Lys Gly Arg Gly Leu Leu Gln Ile Thr Gly Arg Leu Asn Tyr

210 215 220

Val Lys Cys Gln Val Tyr Leu Arg Glu Lys Leu Lys Asp Pro Thr Phe

225 230 235 240

Asp Ile Thr Ser Ser Val Thr Cys Ala Gln Gln Leu Ser Glu Ser Pro

245 250 255

Leu Leu Ala Ala Leu Ala Ser Gly Tyr Phe Trp Arg Phe Ile Lys Pro

260 265 270

Lys Leu Asn Glu Thr Ala Asp Lys Asp Asp Ile Tyr Trp Val Ser Val

275 280 285  
Tyr Val Asn Gly Tyr Ala Lys Gln Ala Asn Pro Tyr Tyr Pro Asn Arg

290 295 300  
Asp Lys Glu Pro Asn His Met Lys Glu Arg Val Gln Met Leu Ala Val  
305 310 315 320  
Thr Lys Lys Ala Leu Gly Ile Val

325

<210> 8

<211> 165

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> PSP3gp10

<400> 8

Met Pro Val Ile Asn Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met

1 5 10 15

Leu Ala Tyr Ser Glu Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg

20 25 30  
Gly Tyr Asp Val Ile Val Thr Gly Phe Asp Gly Ser Pro Glu Ile Phe

35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Asp His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Pro Lys Val

50 55 60

Phe Asn Arg Arg Gly Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln

65 70 75 80

Leu Tyr Ile Phe Trp Pro His Tyr Lys Lys Gln Leu Ala Leu Pro Asp

85 90 95  
Phe Ser Pro Leu Ser Gln Asp Lys Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu

100 105 110

Arg Gly Ala Ile Asp Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Val

115 120 125

Ser Arg Cys Arg Asn Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly

130 135 140

Gln Arg Glu His Ser Leu Glu Lys Leu Val Thr Val Trp Arg Thr Ala

145 150 155 160

Gly Gly Val Met Ala

165

<210> 9

<211> 165

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> P2gp09

<400> 9

Met Pro Val Ile Asn Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met

1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Glu Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg

20 25 30

Gly Tyr Asp Val Ile Val Thr Gly Leu Asp Gly Lys Pro Glu Ile Phe

35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Asp His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Ala Lys Val

50 55 60

Phe Asn Arg Arg Gly Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Phe Trp Pro His Tyr Arg Lys Gln Leu Ala Leu Pro Asp

85 90 95

Phe Ser Pro Leu Ser Gln Asp Arg Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu

100 105 110

Arg Gly Ala Leu Asp Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Ile

115 120 125

Ser Arg Cys Arg Asn Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly

130 135 140

Gln Arg Glu His Ser Leu Glu Lys Leu Val Thr Val Trp Arg Thr Ala

145 150 155 160

Gly Gly Val Pro Ala

165

<210

> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 10

Lys Arg Lys Lys Arg Lys

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 11

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 12

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 13

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 14



<211> 10

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 14

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys

1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

1 5 10

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 16

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 17

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 18

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys

1 5 10 15

Arg Lys Lys

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 20

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

Lys Lys Lys

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 21

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys

20

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 22

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys

20

<210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 23

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys

20

<210> 24

<211> 22

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 24

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly Lys Arg Lys

1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys

20

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 25

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly Ser Gly Lys

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

20

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 26

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys

20

25

<210> 27

<211> 31

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 27

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

20

25

30

<210> 28

<211> 38

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 28

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly Ser Gly Lys

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Gly Ser Gly Ser Gly Lys Arg Lys

20 25 30

Lys Arg Lys Lys Arg Lys

35

<210> 29

<211> 39

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 29

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg

20 25 30

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

35

<210> 30

<211> 42

<212> PRT

<213> unknown

<220><223>

> synthetic peptide

<400> 30

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg

20 25 30

Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

|                          |  |    |
|--------------------------|--|----|
|                          | 35   | 40 |
| <210>                    | 31   |    |
| <211>                    | 4  |    |
| <212>                    | PRT  |    |
| <213>                    | unknown  |    |
| <220><223>               | synthetic peptide  |    |
| <400>                    | 31   |    |
| Ala Met Ser Gly          |  |    |
| 1                        |  |    |
|                          |  |    |
| <210>                    | 32   |    |
| <211>                    | 5  |    |
| <212>                    | PRT  |    |
| <213>                    | unknown  |    |
| <220><223>               | synthetic peptide  |    |
| <220><221>               | misc_feature   |    |
| <222>                    | (3)..(3)   |    |
| <223>                    | wherein Xaa is any other amino acid residue than lysine, arginine<br>and histidine |    |
| <400>                    | 32   |    |
| Lys Arg Xaa Lys Arg      |  |    |
| 1                      5 |  |    |
| <210>                    | 33   |    |
| <211>                    | 5  |    |
| <212>                    | PRT  |    |
| <213>                    | unknown  |    |
| <220><223>               | synthetic peptide  |    |
| <400>                    | 33   |    |
| Lys Arg Ser Lys Arg      |  |    |
| 1                      5 |  |    |
| <210>                    | 34   |    |
| <211>                    | 5  |    |
| <212>                    | PRT  |    |
| <213>                    | unknown  |    |
| <220><223>               | synthetic peptide  |    |



<

400> 34

Lys Arg Gly Ser Gly

1 5

<210> 35

<211> 271

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> POLY-gp144

<400> 35

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg

1 5 10 15

Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn

20 25 30

Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn

35 40 45

Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser

50 55 60

Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr

65 70 75 80

Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys

85 90 95

Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr

100 105 110

Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala

115 120 125

Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe

130 135 140

Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met

145 150 155 160

Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro

165 170 175

Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn  
180 185 190  
Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr  
195 200 205  
Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr  
210 215 220  
Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala  
225 230 235 240

Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln  
245 250 255  
Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
260 265 270

<210> 36

<211> 282

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> (POLY)2-gp144

<400> 36

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg  
1 5 10 15  
Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly

20 25 30  
Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp  
35 40 45  
Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val  
50 55 60  
Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly  
65 70 75 80  
Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro

85 90 95  
Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala  
100 105 110

Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln  
115 120 125  
Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile  
130 135 140  
Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly  
145 150 155 160  
Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu  
165 170 175  
Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu  
180 185 190  
Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val  
195 200 205  
Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe  
210 215 220  
Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu  
225 230 235 240  
Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe  
245 250 255  
Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu  
260 265 270  
Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
275 280

<210> 37

<211> 293

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> (POLY)3-gp144

<400> 37

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg  
1 5 10 15  
Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys  
20 25 30

Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln  
 35 40 45  
 Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp  
 50 55 60  
 Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys  
 65 70 75 80  
 Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala  
 85 90 95  
 Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro  
 100 105 110  
 Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn  
 115 120 125  
 Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe  
 130 135 140  
 Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met  
 165 170 175  
 Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly  
 180 185 190  
 Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu  
 195 200 205  
 Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro  
 210 215 220  
 Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala  
 225 230 235 240  
 Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe  
 245 250 255  
 Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly  
 260 265 270  
 Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val

[illegible]

180 185 190  
Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp

195 200 205  
Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met

210 215 220  
Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu

225 230 235 240  
Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr

245 250 255  
Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln

260 265 270  
Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile

275 280 285  
Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys

290 295 300  
<210> 39

<211> 303  
<212> PRT

<213> unknown  
<220><223> POLY-gp188

<400> 39  
Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asn Phe Arg Thr

1 5 10 15  
Lys Asn Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ala Leu Val Lys Glu Leu Gly Leu

20 25 30  
Tyr Thr Gly Gln Ile Asp Gly Val Trp Gly Lys Gly Thr Ser Ser Ser

35 40 45  
Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu Val Val Gly Lys Asn Thr

50 55 60  
Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp Ala Ser Gly Tyr Asn Val

65 70 75 80

Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Leu Tyr Ser Leu  
85 90 95

Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr Leu Ser Gly Leu Asp Lys  
100 105 110

Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg Thr Pro Thr Tyr Asp Ile  
115 120 125

Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe Thr Ala Lys Val Lys Asp  
130 135 140

Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg Ala Pro His Trp Leu Met  
145 150 155 160

Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr Phe Ser Pro Ser Ile Lys  
165 170 175

Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu Ile Gln Phe Met Ser Pro  
180 185 190

Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser Val Ile Arg Ser Met Asp  
195 200 205

Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys Tyr Phe Glu Met Trp Met  
210 215 220

Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Thr Ile  
225 230 235 240

Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala Asp Glu Val Leu Phe Leu  
245 250 255

Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Leu Gln Asn Lys Gly Phe Asp Val Asp Lys  
260 265 270

Asp Gly Lys Ile Thr Leu Gly Glu Ile Ser Ser Thr Leu Tyr Thr Thr  
275 280 285

Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg His Val Ile Ser Tyr  
290 295 300

<210> 40  
<211> 314  
<212> PRT  
<213> unknown



<220><223> (POLY)2-gp188

<400> 40

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asn Phe Arg Thr Lys Asn Gly Tyr Arg

20 25 30

Asp Leu Gln Ala Leu Val Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Thr Gly Gln Ile

35 40 45

Asp Gly Val Trp Gly Lys Gly Thr Ser Ser Ser Thr Glu Thr Leu Leu

50 55 60

Arg Gly Tyr Ala Glu Val Val Gly Lys Asn Thr Gly Gly Ile Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Asn Gly Thr Leu Ser Gly Leu Asp Lys Ala Phe Glu Val Tyr

115 120 125

Lys Glu Arg Tyr Arg Thr Pro Thr Tyr Asp Ile Ala Trp Ser Gly Lys

130 135 140

Val Ser Pro Ala Phe Thr Ala Lys Val Lys Asp Trp Cys Gly Val His

145 150 155 160

Val Pro Asn His Arg Ala Pro His Trp Leu Met Ala Cys Met Ala Phe

165 170 175

Glu Thr Gly Gln Thr Phe Ser Pro Ser Ile Lys Asn Ala Ala Gly Ser

180 185 190

Glu Ala Tyr Gly Leu Ile Gln Phe Met Ser Pro Ala Ala Asn Asp Leu

195 200 205

Asn Val Pro Leu Ser Val Ile Arg Ser Met Asp Gln Leu Thr Gln Leu

210 215 220

Asp Leu Val Phe Lys Tyr Phe Glu Met Trp Met Lys Arg Gly Lys Arg

225                      230                      235                      240  
 Tyr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Thr Ile Phe His Pro Ala Ser  
                          245                      250                      255  
 Val Gly Lys Lys Ala Asp Glu Val Leu Phe Leu Gln Gly Ser Lys Ala  
                          260                      265                      270  
 Tyr Leu Gln Asn Lys Gly Phe Asp Val Asp Lys Asp Gly Lys Ile Thr  
  
                          275                      280                      285  
 Leu Gly Glu Ile Ser Ser Thr Leu Tyr Thr Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu  
                          290                      295                      300  
 Leu Pro Glu Asn Arg His Val Ile Ser Tyr  
 305                      310  
 <210> 41  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> unknown  
 <220><223> (POLY)3-gp188  
 <400> 41  
 Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg  
 1                      5                      10                      15  
  
 Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys  
                          20                      25                      30  
 Arg Lys Asn Phe Arg Thr Lys Asn Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ala Leu  
                          35                      40                      45  
 Val Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Thr Gly Gln Ile Asp Gly Val Trp Gly  
                          50                      55                      60  
 Lys Gly Thr Ser Ser Ser Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu  
 65                      70                      75                      80  
  
 Val Val Gly Lys Asn Thr Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp  
                          85                      90                      95  
 Ala Ser Gly Tyr Asn Val Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe  
                          100                      105                      110  
 Leu Gly Leu Tyr Ser Leu Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr

115 120 125  
 Leu Ser Gly Leu Asp Lys Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg  
 130 135 140

Thr Pro Thr Tyr Asp Ile Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe  
 145 150 155 160

Thr Ala Lys Val Lys Asp Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg  
 165 170 175

Ala Pro His Trp Leu Met Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr  
 180 185 190

Phe Ser Pro Ser Ile Lys Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu  
 195 200 205

Ile Gln Phe Met Ser Pro Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser  
 210 215 220

Val Ile Arg Ser Met Asp Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys  
 225 230 235 240

Tyr Phe Glu Met Trp Met Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu  
 245 250 255

Asp Phe Tyr Leu Thr Ile Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala  
 260 265 270

Asp Glu Val Leu Phe Leu Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Leu Gln Asn Lys  
 275 280 285

Gly Phe Asp Val Asp Lys Asp Gly Lys Ile Thr Leu Gly Glu Ile Ser  
 290 295 300

Ser Thr Leu Tyr Thr Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg  
 305 310 315 320

His Val Ile Ser Tyr  
 325

<210> 42

<211> 336

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> (POLY)4-gp188

<400> 42

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys

20 25 30

Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asn Phe Arg

35 40 45

Thr Lys Asn Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ala Leu Val Lys Glu Leu Gly

50 55 60

Leu Tyr Thr Gly Gln Ile Asp Gly Val Trp Gly Lys Gly Thr Ser Ser

65 70 75 80

Ser Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu Val Val Gly Lys Asn

85 90 95

Thr Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp Ala Ser Gly Tyr Asn

100 105 110

Val Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Leu Tyr Ser

115 120 125

Leu Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr Leu Ser Gly Leu Asp

130 135 140

Lys Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg Thr Pro Thr Tyr Asp

145 150 155 160

Ile Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe Thr Ala Lys Val Lys

165 170 175

Asp Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg Ala Pro His Trp Leu

180 185 190

Met Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr Phe Ser Pro Ser Ile

195 200 205

Lys Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu Ile Gln Phe Met Ser

210 215 220

Pro Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser Val Ile Arg Ser Met

225                      230                      235                      240  
 Asp Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys Tyr Phe Glu Met Trp  
                          245                      250                      255  
  
 Met Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Thr  
                          260                      265                      270  
 Ile Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala Asp Glu Val Leu Phe  
                          275                      280                      285  
 Leu Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Leu Gln Asn Lys Gly Phe Asp Val Asp  
                          290                      295                      300  
 Lys Asp Gly Lys Ile Thr Leu Gly Glu Ile Ser Ser Thr Leu Tyr Thr  
 305                      310                      315                      320  
  
 Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg His Val Ile Ser Tyr  
                          325                      330                      335  
  
 <210> 43  
 <211> 272  
 <212> PRT  
 <213> unknown  
 <220><223> pKKZ144pET32b  
 <400> 43  
 Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu  
 1                      5                      10                      15  
 Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu  
                          20                      25                      30  
 Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn  
  
                          35                      40                      45  
 Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp  
                          50                      55                      60  
 Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys  
 65                      70                      75                      80  
 Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn  
                          85                      90                      95

Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala

100 105 110  
Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser  
115 120 125  
Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp  
130 135 140  
Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly  
145 150 155 160  
Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp

165 170 175  
Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met  
180 185 190  
Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu  
195 200 205  
Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr  
210 215 220  
Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln

225 230 235 240  
Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile  
245 250 255  
Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
260 265 270

<210> 44

<211> 269

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> KRK\_6\_pET32b

<400> 44

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys

20 25 30  
 Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe  
 35 40 45  
 Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly  
 50 55 60  
 Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro  
 65 70 75 80

Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg  
 85 90 95  
 Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val  
 100 105 110  
 Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp  
 115 120 125  
 Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe  
 130 135 140

Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile  
 165 170 175  
 Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu  
 180 185 190  
 Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala  
 195 200 205

His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln  
 210 215 220  
 Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val  
 245 250 255  
 Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 260 265



<210> 45

<211> 275

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> KRK\_12\_pET32b

<400> 45

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

1 5 10 15

Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln

20 25 30

Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile

35 40 45

Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn

50 55 60

Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu

65 70 75 80

Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro

85 90 95

Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val

100 105 110

Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser

115 120 125

Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala

130 135 140

Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu

145 150 155 160

Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu

165 170 175

Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys

180 185 190

Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp

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

245 250 255  
 Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala  
 260 265 270

His Arg Lys

275

<210> 46

<211> 277

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> KRK\_14\_pET32b

<400> 46

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln

20 25 30  
 Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp  
 35 40 45  
 Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys  
 50 55 60  
 Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro

85 90 95  
 Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn  
 100 105 110  
 Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe

115 120 125  
Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser  
130 135 140  
Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met  
145 150 155 160  
Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly  
165 170 175  
Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu  
180 185 190  
Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro  
195 200 205  
Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala

210 215 220  
Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe  
225 230 235 240  
Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly  
245 250 255  
Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val  
260 265 270  
Ala Ala His Arg Lys  
275

<210

> 47

<211> 272

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> R9\_pET32b

<400> 47

Ala Met Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Val Leu  
1 5 10 15  
Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu  
20 25 30  
Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn

35                      40                      45  
 Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp  
  
 50                      55                      60  
 Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys  
 65                      70                      75                      80  
 Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn  
 85                      90                      95  
 Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala  
 100                      105                      110  
 Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser  
  
 115                      120                      125  
 Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp  
 130                      135                      140  
 Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly  
 145                      150                      155                      160  
 Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp  
 165                      170                      175  
 Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met  
  
 180                      185                      190  
 Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu  
 195                      200                      205  
 Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr  
 210                      215                      220  
 Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln  
 225                      230                      235                      240  
 Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile  
  
 245                      250                      255  
 Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 260                      265                      270  
 <210> 48  
 <211> 271

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> K8\_pET32b

<400> 48

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

1 5 10 15

Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn

20 25 30

Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn

35 40 45

Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser

50 55 60

Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr

65 70 75 80

Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys

85 90 95

Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr

100 105 110

Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala

115 120 125

Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe

130 135 140

Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met

145 150 155 160

Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro

165 170 175

Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn

180 185 190

Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr

195 200 205

Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr

210 215 220

Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala

225 230 235 240

Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln

245 250 255

Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys

260 265 270

<210> 49

<211> 302

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> pK2KZ144\_pET32b\_mod3

<400> 49

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser

1 5 10 15

Gly Ser Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly

20 25 30

Ser Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys

35 40 45

Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu

50 55 60

Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr

65 70 75 80

Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp

85 90 95

Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser

100 105 110

Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser

115 120 125

Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly

130 135 140

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

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

260 265 270  
 Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu  
 275 280 285  
 Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 290 295 300

<210> 50

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer PSP3gp10 forw r

<400> 50

atgggatccc cggtcattaa tactcaccag

30

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer PSP3gp10 rev



<400> 51

tgccatcacc ccgccagccg tg

22

<210> 52

<211> 57

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer PKPSP3gp10 forw

<400> 52

atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaccgg tcattaatac tcaccag

57

<210> 53

<211> 176

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> PKPSP3gp10

<400> 53

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Pro Val Ile Asn

1 5 10 15  
Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met Leu Ala Tyr Ser Glu

20 25 30  
Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg Gly Tyr Asp Val Ile

35 40 45  
Val Thr Gly Phe Asp Gly Ser Pro Glu Ile Phe Thr Asp Tyr Ser Asp

50 55 60  
His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Pro Lys Val Phe Asn Arg Arg Gly

65 70 75 80  
Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln Leu Tyr Ile Phe Trp

85 90 95  
Pro His Tyr Lys Lys Gln Leu Ala Leu Pro Asp Phe Ser Pro Leu Ser

100 105 110  
Gln Asp Lys Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu Arg Gly Ala Ile Asp

115 120 125  
Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Val Ser Arg Cys Arg Asn

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 130   | 135 | 140 |     |
| Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly Gln Arg Glu His Ser |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Leu Glu Lys Leu Val Thr Val Trp Arg Thr Ala Gly Gly Val Met Ala |     |     |     |
|   | 165 | 170 | 175 |
| <210> 54  |     |     |     |
| <211> 28  |     |     |     |
| <212> DNA   |     |     |     |
| <213> artificial sequence                                       |     |     |     |
| <220><223> primer SP2gp09 forw                                  |     |     |     |
| <400> 54  |     |     |     |
| atgggatccc cggttaattaa cacgcatac                                |     |     | 28  |
| <210> 55  |     |     |     |
| <211> 25  |     |     |     |
| <212> DNA   |     |     |     |
| <213> artificial sequence                                       |     |     |     |
| <220><223> primer P2gp09 rev                                    |     |     |     |
| <400> 55  |     |     |     |
| agccggtacg ccgccagcgg tacgc                                     |     |     | 25  |
| <210> 56  |     |     |     |
| <211> 54  |     |     |     |
| <212> DNA   |     |     |     |
| <213> artificial sequence                                       |     |     |     |
| <220><223> primer PKP2gp09 forw                                 |     |     |     |
| <400> 56  |     |     |     |
| atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaccgg taattaacac gcat     |     |     | 54  |
| <210> 57  |     |     |     |
| <211> 176   |     |     |     |
| <212> PRT   |     |     |     |
| <213> unknown   |     |     |     |
| <220><223> PKP2gp09   |     |     |     |
| <400> 57  |     |     |     |
| Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Pro Val Ile Asn |     |     |     |

1                    5                    10                    15  
 Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met Leu Ala Val Ser Glu  
                   20                    25                    30  
 Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg Gly Tyr Asp Val Ile  
                   35                    40                    45  
 Val Thr Gly Leu Asp Gly Lys Pro Glu Ile Phe Thr Asp Tyr Ser Asp  
                   50                    55                    60  
 His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Ala Lys Val Phe Asn Arg Arg Gly

65                    70                    75                    80  
 Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln Leu Tyr Leu Phe Trp  
                   85                    90                    95  
 Pro His Tyr Arg Lys Gln Leu Ala Leu Pro Asp Phe Ser Pro Leu Ser  
                   100                    105                    110  
 Gln Asp Arg Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu Arg Gly Ala Leu Asp  
                   115                    120                    125  
 Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Ile Ser Arg Cys Arg Asn

130                    135                    140  
 Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly Gln Arg Glu His Ser  
 145                    150                    155                    160  
 Leu Glu Lys Leu Val Thr Val Trp Arg Thr Ala Gly Gly Val Pro Ala  
                   165                    170                    175

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer OBPgLYS forward

<400> 58

atgaaaaata gcgagaagaa t

21

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer OBPgpLYS reverse

<400> 59

aactattccg agtgctttct ttgt

24

<210> 60

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer PKOBPgpLYS forward

<400> 60

atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaaaa atagcgagaa gaat

54

<210> 61

<211> 339

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> PKOBPgpLYS

<400> 61

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Asn Ser Glu

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

20 25 30  
Ser Leu Tyr Gly Gly Arg Ile Asp Gly Leu Phe Gly Glu Lys Cys Arg

35 40 45  
Gly Ala Ile Ile Leu Met Leu Asn Lys Val Tyr Pro Asn Phe Ser Thr

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

65 70 75 80  
Leu Gln Thr Ala Leu Ala Gly Val Gly Leu Tyr Thr Ile Thr Ile Asp

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

100 105 110  
Ser Tyr Arg Gln Ile Thr Glu Ala Glu Arg Ala Gly Ser Thr Leu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Ala Thr Val Met Ser Lys His Met Ser Ile Glu Gln Leu

130 135 140

Arg Ala Met Leu Pro Thr Asp Arg Gln Gly Tyr Ala Glu Val Tyr Ile

145 150 155 160

Asp Pro Leu Asn Glu Thr Met Asp Ile Phe Glu Ile Asn Thr Pro Leu

165 170 175

Arg Ile Ala His Phe Met Ala Gln Ile Leu His Glu Thr Ala Cys Phe

180 185 190

Lys Tyr Thr Glu Glu Leu Ala Ser Gly Lys Ala Tyr Glu Gly Arg Ala

195 200 205

Asp Leu Gly Asn Thr Arg Pro Gly Asp Gly Pro Leu Phe Lys Gly Arg

210 215 220

Gly Leu Leu Gln Ile Thr Gly Arg Leu Asn Tyr Val Lys Cys Gln Val

225 230 235 240

Tyr Leu Arg Glu Lys Leu Lys Asp Pro Thr Phe Asp Ile Thr Ser Ser

245 250 255

Val Thr Cys Ala Gln Gln Leu Ser Glu Ser Pro Leu Leu Ala Ala Leu

260 265 270

Ala Ser Gly Tyr Phe Trp Arg Phe Ile Lys Pro Lys Leu Asn Glu Thr

275 280 285

Ala Asp Lys Asp Asp Ile Tyr Trp Val Ser Val Tyr Val Asn Gly Tyr

290 295 300

Ala Lys Gln Ala Asn Pro Tyr Tyr Pro Asn Arg Asp Lys Glu Pro Asn

305 310 315 320

His Met Lys Glu Arg Val Gln Met Leu Ala Val Thr Lys Lys Ala Leu

325 330 335

Gly Ile Val

<210> 62

<211> 283

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> pK2KZ144pET32b

<400> 62

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg

20 25 30

Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr

35 40 45

Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln

50 55 60

Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val

65 70 75 80

Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile

85 90 95

Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala

100 105 110

Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser

115 120 125

Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu

130 135 140

Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr

145 150 155 160

Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val

165 170 175

Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala

180 185 190

Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro

195 200 205

Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe

210 215 220

Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu

225 230 235 240

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

245 250 255

Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn

260 265 270

Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys

275 280

<210> 63

<211> 294

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> pK3KZ144pET32b

<400

> 63

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys

20 25 30

Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys

35 40 45

Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro

50 55 60

Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln

65 70 75 80

Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp

85 90 95

Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile

100 105 110

Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met

115 120 125

Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr

130                      135                      140  
 Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr  
 145                      150                      155                      160  
 Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr  
                          165                      170                      175  
 Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr  
                          180                      185                      190  
  
 Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu  
                          195                      200                      205  
 Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu  
                          210                      215                      220  
 Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala  
 225                      230                      235                      240  
 Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His  
                          245                      250                      255  
  
 Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp  
                          260                      265                      270  
 Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys  
                          275                      280                      285  
 Val Ala Ala His Arg Lys  
                          290  
 <210> 64  
 <211> 305  
 <212> PRT  
 <213> unknown  
 <220><223> pK4KZ144pET32b  
 <400> 64  
 Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys  
 1                      5                      10                      15  
  
 Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
                          20                      25                      30  
 Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val



|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 35  | 40  | 45  |
| Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu |     |     |
| 50  | 55  | 60  |
| Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly |     |     |
| 65  | 70  | 75  |
|   |     | 80  |
|   |     |     |
| Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu |     |     |
| 85  | 90  | 95  |
| Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser |     |     |
| 100   | 105 | 110 |
| Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala |     |     |
| 115   | 120 | 125 |
| Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn |     |     |
| 130   | 135 | 140 |
|   |     |     |
| Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu |     |     |
| 145   | 150 | 155 |
|   |     | 160 |
| Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly |     |     |
| 165   | 170 | 175 |
| Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr |     |     |
| 180   | 185 | 190 |
| Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys |     |     |
| 195   | 200 | 205 |
|   |     |     |
| Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
|   |     | 240 |
| Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
|   |     |     |
| Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr |     |     |
| 275   | 280 | 285 |

Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg

290 295 300

Lys

305

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> primer gp188 for

<400> 65

Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Cys Gly Ala

1 5 10 15

Ala Gly

<210> 66

<211> 282

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> KRK\_19\_pET32b

<400> 66

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly

20 25 30

Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp

35 40 45

Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val

50 55 60

Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly

65 70 75 80

Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro

85 90 95

Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala

100                      105                      110  
 Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln  
 115                      120                      125  
 Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile  
 130                      135                      140  
 Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly  
 145                      150                      155                      160  
 Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu  
 165                      170                      175  
  
 Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu  
 180                      185                      190  
 Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val  
 195                      200                      205  
 Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe  
 210                      215                      220  
 Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu  
 225                      230                      235                      240  
  
 Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe  
 245                      250                      255  
 Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu  
 260                      265                      270  
 Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 275                      280  
 <210> 67  
 <211> 284  
 <212> PRT  
 <213> unknown  
 <220><223> KRK\_21\_pET32b  
 <400> 67  
 Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 1                      5                      10                      15

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

260 265 270

Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys

275 280

<210> 68

<211> 288

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> KRK\_25\_pET32b

<400> 68

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Lys Val Leu

20 25 30

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu

35 40 45

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn

50 55 60

Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp

65 70 75 80

Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys

85 90 95

Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn

100 105 110

Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala

115 120 125

Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser

130 135 140

Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp

145 150 155 160

Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly

165 170 175

Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp  
180 185 190

Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met  
195 200 205

Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu  
210 215 220

Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr

225 230 235 240

Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln  
245 250 255

Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile  
260 265 270

Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
275 280 285

<210> 69

<211> 302

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> KRK\_39\_pET32b

<400> 69

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys  
20 25 30

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys  
35 40 45

Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu  
50 55 60

Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr  
65 70 75 80

Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp  
85 90 95

Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser  
100 105 110

Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser  
115 120 125

Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly  
130 135 140

Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe  
145 150 155 160

Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln  
165 170 175

Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys  
180 185 190

Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg  
195 200 205

Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile  
210 215 220

Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu  
225 230 235 240

Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly  
245 250 255

Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn  
260 265 270

Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu  
275 280 285

Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
290 295 300

<210> 70  
<211> 282  
<212> PRT  
<213> unknown  
<220><223> K19\_pET32b  
<400> 70

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys

1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly

20 25 30

Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp

35 40 45

Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val

50 55 60

Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly

65 70 75 80

Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro

85 90 95

Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala

100 105 110

Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln

115 120 125

Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile

130 135 140

Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly

145 150 155 160

Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu

165 170 175

Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu

180 185 190

Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val

195 200 205

Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe

210 215 220

Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu

225 230 235 240

Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe



245 250 255  
Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu

260 265 270  
Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys

275 280

<210> 71

<211> 279

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> K16\_pET32b

<400> 71

Ala Met Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val

20 25 30

Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys

35 40 45

Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe

50 55 60

Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr

65 70 75 80

Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr

85 90 95

Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val

100 105 110

Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu

115 120 125

Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys

130 135 140

Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys

145 150 155 160

Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro

165 170 175

Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala

180 185 190

Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg

195 200 205

Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly

210 215 220

Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr

225 230 235 240

His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys

245 250 255

Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly

260 265 270

Lys Val Ala Ala His Arg Lys

275

<210> 72

<211> 294

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> pKKZ-144\_K2\_pET32b

<400> 72

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

1 5 10 15

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu

20 25 30

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn

35 40 45

Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp

50 55 60

Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys

65                      70                      75                      80  
 Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn  
                                  85                      90                      95  
 Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala  
                                  100                      105                      110  
 Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser  
                                  115                      120                      125  
 Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp  
  
                                  130                      135                      140  
 Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly  
 145                      150                      155                      160  
 Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp  
                                  165                      170                      175  
 Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met  
                                  180                      185                      190  
 Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu  
  
                                  195                      200                      205  
 Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr  
                                  210                      215                      220  
 Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln  
 225                      230                      235                      240  
 Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile  
                                  245                      250                      255  
 Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
  
                                  260                      265                      270  
 Leu Glu Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys  
                                  275                      280                      285  
 Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
                                  290  
 <210> 73  
 <211> 285  
 <212> PRT

<213> unknown

<220><223> pK2KZ144\_pET32b\_mod1

<400> 73

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser

1 5 10 15

Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly

20 25 30

Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys

35 40 45

Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe

50 55 60

Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly

65 70 75 80

Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro

85 90 95

Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg

100 105 110

Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe

145 150 155 160

Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr

165 170 175

Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile

180 185 190

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

195 200 205

Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala

210 215 220

His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln  
 225 230 235 240  
 Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro  
 245 250 255  
 Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val  
 260 265 270  
 Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys

275 280 285

<210> 74

<211> 287

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> pK2KZ144\_pET32b\_mod2

<400> 74

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg  
 20 25 30  
 Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn  
 35 40 45

Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn  
 50 55 60  
 Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr  
 85 90 95  
 Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys  
 100 105 110

Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr  
 115 120 125  
 Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala  
 130 135 140

Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe  
 145                      150                      155                      160  
 Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met  
                          165                      170                      175

Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro  
                          180                      185                      190  
 Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn  
                          195                      200                      205  
 Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr  
                          210                      215                      220  
 Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr  
 225                      230                      235                      240

Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala  
                          245                      250                      255  
 Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln  
                          260                      265                      270  
 Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
                          275                      280                      285

<210> 75

<211> 292

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> smi01\_KRK9

<400> 75

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Glu Tyr Asp

1                      5                      10                      15  
 Met Ile Leu Lys Phe Gly Ser Lys Gly Asp Ala Val Ala Thr Leu Gln  
                          20                      25                      30  
 Lys Gln Leu Ala Lys Met Gly Tyr Lys Gly Val Lys Asp Lys Pro Leu  
                          35                      40                      45  
 Ser Val Asp Gly His Phe Gly Glu Ser Thr Glu Phe Ala Val Ile Gln  
                          50                      55                      60

Leu Gln Arg Lys Phe Gly Leu Val Ala Asp Gly Lys Val Gly Asp Lys

65                      70                      75                      80  
Thr Arg Gln Ala Leu Ala Gly Asp Ser Val Ser Lys Phe Leu Lys Asp

85                      90                      95  
Glu Asp Tyr Lys Lys Ala Ala Ile Arg Leu Lys Val Pro Glu Leu Val

100                      105                      110  
Ile Arg Val Phe Gly Ala Val Glu Gly Leu Gly Val Gly Phe Leu Pro

115                      120                      125  
Asn Gly Lys Ala Lys Ile Leu Phe Glu Arg His Arg Met Tyr Phe Tyr

130                      135                      140  
Leu Cys Gln Ala Leu Gly Lys Thr Phe Ala Asn Ser Gln Val Lys Ile

145                      150                      155                      160  
Thr Pro Asn Ile Val Asn Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Lys Gly Asp Ala

165                      170                      175  
Ala Glu Tyr Thr Arg Leu Ser Met Ala Ile Asn Ile His Lys Glu Ser

180                      185                      190  
Ala Leu Met Ser Thr Ser Trp Gly Gln Phe Gln Ile Met Gly Glu Asn

195                      200                      205  
Trp Lys Asp Leu Gly Tyr Ser Ser Val Gln Glu Phe Val Asp Gln Gln

210                      215                      220  
Gln Leu Asn Glu Gly Asn Gln Leu Glu Ala Phe Ile Arg Phe Ile Glu

225                      230                      235                      240  
Trp Lys Pro Gly Leu Leu Glu Ala Leu Arg Lys Gln Asp Trp Asp Thr

245                      250                      255  
Val Phe Thr Leu Tyr Asn Gly Lys Asn Tyr Lys Lys Leu Gly Tyr Gln

260                      265                      270  
Ala Lys Phe Gln Lys Glu Trp Asp His Leu Glu Pro Ile Tyr Arg Glu

275                      280                      285  
Lys Thr Ala Ala

290  
<210> 76

<211> 176

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> smi02\_KRK9

<400> 76

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Gly Asn Ile

1 5 10 15

Phe Glu Met Leu Arg Ile Asp Glu Gly Leu Arg Leu Lys Ile Tyr Lys

20 25 30

Asp Thr Glu Gly Tyr Tyr Thr Ile Gly Ile Gly His Leu Leu Thr Lys

35 40 45

Ser Pro Ser Leu Asn Ala Ala Lys Ser Glu Leu Asp Lys Ala Ile Gly

50 55 60

Arg Asn Cys Asn Gly Val Ile Thr Lys Asp Glu Ala Glu Lys Leu Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Lys Pro Val Tyr Asp Ser Leu Asp Ala Val Arg Arg Cys Ala Leu

100 105 110

Ile Asn Met Val Phe Gln Met Gly Glu Thr Gly Val Ala Gly Phe Thr

115 120 125

Asn Ser Leu Arg Met Leu Gln Gln Lys Arg Trp Asp Glu Ala Ala Val

130 135 140

Asn Leu Ala Lys Ser Arg Trp Tyr Asn Gln Thr Pro Asn Arg Ala Lys

145 150 155 160

Arg Val Ile Thr Thr Phe Arg Thr Gly Thr Trp Asp Ala Tyr Lys Asn

165 170 175

<210> 77

<211> 164

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> smi03\_KRK9



<400> 77

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Val Ser Lys

1 5 10 15

Val Gln Phe Asn Pro Arg Ser Arg Thr Asp Ala Ile Phe Val His Cys

20 25 30

Ser Ala Thr Lys Pro Glu Met Asp Ile Gly Val Glu Thr Ile Arg Met

35 40 45

Trp His Lys Gln Gln Ala Trp Leu Asp Val Gly Tyr His Phe Ile Ile

50 55 60

Lys Arg Asp Gly Thr Val Glu Glu Gly Arg Pro Val Asn Val Val Gly

65 70 75 80

Ser His Val Lys Asp Trp Asn Ser Arg Ser Val Gly Val Cys Leu Val

85 90 95

Gly Gly Ile Asn Ala Lys Gly Gln Phe Glu Ala Asn Phe Thr Pro Ala

100 105 110

Gln Met Asn Ser Leu Arg Asn Lys Leu Asp Asp Leu Lys Val Met Tyr

115 120 125

Pro Gln Ala Glu Ile Arg Ala His His Asp Val Ala Pro Lys Ala Cys

130 135 140

Pro Ser Phe Asp Leu Gln Arg Trp Leu Ser Thr Asn Glu Leu Val Thr

145 150 155 160

Ser Asp Arg Gly

<210> 78

<211> 194

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> smi04\_KRK9

<400> 78

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Gly Lys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Glu Ile Phe Asp Glu Ile Leu Gly Lys Glu Gly Gly Tyr Val

20 25 30  
 Asn His Pro Asp Asp Lys Gly Gly Pro Thr Lys Trp Gly Ile Thr Glu  
 35 40 45

Lys Val Ala Arg Ala His Gly Tyr Arg Gly Asp Met Arg Asn Leu Thr  
 50 55 60  
 Arg Gly Gln Ala Leu Glu Ile Leu Glu Thr Asp Tyr Trp Tyr Gly Pro  
 65 70 75 80  
 Arg Phe Asp Arg Val Ala Lys Ala Ser Pro Asp Val Ala Ala Glu Leu  
 85 90 95  
 Cys Asp Thr Gly Val Asn Met Gly Pro Ser Val Ala Ala Lys Met Leu  
 100 105 110

Gln Arg Trp Leu Asn Val Phe Asn Gln Gly Gly Arg Leu Tyr Pro Asp  
 115 120 125  
 Met Asp Thr Asp Gly Arg Ile Gly Pro Arg Thr Leu Asn Ala Leu Arg  
 130 135 140  
 Val Tyr Leu Glu Lys Arg Gly Lys Asp Gly Glu Arg Val Leu Leu Val  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Asn Cys Thr Gln Gly Glu Arg Tyr Leu Glu Leu Ala Glu Lys  
 165 170 175

Arg Glu Ala Asp Glu Ser Phe Val Tyr Gly Trp Met Lys Glu Arg Val  
 180 185 190

Leu Ile

<210> 79

<211> 52

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer PKgp144 for

<400> 79

atgggatcca aacgaagaa acgtaagaaa cgcaaaaaag tattacgcaa ag

52

<210> 80

<211> 51

<212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> primer PKgp188 for  
 <400> 80  
 atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaact tccggacgaa g 51

<210> 81  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> primer gp144 rev  
 <400> 81  
 ttttctatgt gctgcaac 18

<210> 82  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> primer gp144 rev  
 <400> 82  
 atacgaaata acgtgacga 19

<210> 83  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> primer gp144 for  
 <400> 83  
 atgaaagtat tacgcaaa 18