



(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) 선행기술조사문현

EP0510907 A2

US20020127220 A1

전체 청구항 수 : 총 23 항

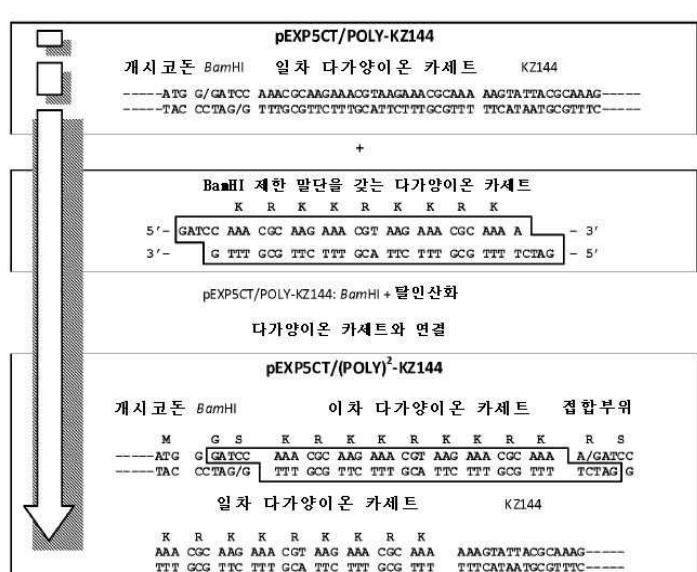
심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 항균제

(57) 요 약

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)

대 표 도 - 도1

변이체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 약제, 특히 진단 수단, 살균제 또는 화장용 물질로서 그람음 성균 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 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.

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, 보르데렐라, 레지오넬라, 바르토넬라, 콕시엘라, 해모필루스, 파스퇴렐라, 만헤이미아, 악티노바실루스, 가르드네렐라, 스피로채타세아, 웨토스피라세아, 캄필로박터, 헬리코박터, 스피렐롬, 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, 프로비텐시아, 세라티아 및 예르시니아 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 엔도리신 변이체.

청구항 7

제5항에 있어서,

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

청구항 8

제5항에 있어서,

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

청구항 9

제5항에 있어서,

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

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 웹티드 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

기술 분야

[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 뉴클레오티드 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.

배경 기술

[0003]

엔도리신은 박테리오파지(또는 세균 바이러스)에 의해 인코딩되는 펩티도글리칸 가수분해효소이다. 이는 과지 중식의 용균 사이클에서 후기 유전자 발현 동안 합성되며, 박테리아 펩티도글리칸의 분해를 통해 감염된 세포로부터 파생(progeny) 비리온의 방출을 막개한다. 이는 β (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 군의 항균제를 개발하고자 하는 강렬한 요구가 나타났으며, '효소'와 '항생물질'의 혼성 용어인 '엔지비오틱스(enzybiotics)'로서 사용되는 엔도리신은 이러한 요구를 완전히 충족시켰다. 2001년에 Fischetti와 그의 동료들은 처음으로 그룹 A 스트렙토코시에 대한 박테리오파지 C1 엔도리신의 치료적 효능을 입증하였다(Nelson et al., 2001). 그 이후로 다수의 문헌에서 특히 그람양성균에 의한, 세균 감염을 제어하는 매력적이고 상호보완적인 대안으로서 엔도리신이 인정되었다. 그 후, 스트렙토코쿠스 뉴모니아(Loeffler et al., 2001), 바실루스 안트라시스(Schuch et al., 2002), S. 아갈락티아

(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 웨티도글리칸으로부터 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)' 메카니즘을 수행한다(Hancock and Wong, 1984). 이의 별크성(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 패킹은 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 점점 더 많아지는 감염을 치료하는데 있어서 어려움이 발생하고 있다. 특히 슈도모나스 애루지노사 및 엔테로박테리아세아와 같은 그람음성균에 의해 야기되는 감염에 대해 어려움이 발생한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 그람음성균에 대한 신규한 항균제가 요구된다.

[0007] 이러한 목적은 특히 청구범위에 기재된 발명에 의해 해결된다.

과제의 해결 수단

[0008] 본원에서 "단백질"은 "폴리펩티드"와 동일한 의미로 나타낸다. 본원에서 "단백질"은 특이적 서열의 웨티드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 선형 폴리머를 나타낸다. 단백질의 아미노산 잔기는 예컨대 탄수화물과 인산과 같은 다양한 기들의 공유 결합에 의해 개질될 수 있다. 헴 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 웨티도글리칸 가수분해효소와 이차 또는 추가의 아미노산 서열의 융합을 나타낸다. 상기 이차 또는 추가의 아미노산 서열은 바람직하게는 웨티드 스트레치, 특히 양이온성 및/또는 다가양이온성 웨티드이다. 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 웨티드 스트레치, 특히 양이온성 및/또는 다가양이온성 웨티드를 포함하는 융합 단백질을 나타낸다.

[0011] 본원에서 "웨티드 스트레치(peptide stretch)"는 엔도리신, 오토리신 및/또는 웨티도글리칸 가수분해효소와 같은 단백질에 연결된 임의 종류의 웨티드를 나타낸다. 특히 본원에서 "웨티드 스트레치"는 양이온성 웨티드 및/또는 다가양이온성 웨티드를 나타낸다. 그러나, 본 발명의 의미 내에서 웨티드 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 "웨티드 스트레치"와 대조적으로 "tag"라는

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

[0012] 본원에서 "웨티드"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 폴리웨티드를 나타내며, 여기에서 하나의 아미노산 잔기의 아미노기는 웨티드 결합에 의해 다른 아미노산 잔기의 카르복실기에 결합된다. 웨티드는 특이적 기능을 가질 수 있다. 웨티드는 자연적으로 발생한 웨티드이거나, 또는 합성에 의해 설계되고 제조된 웨티드일 수 있다. 웨티드는 예를 들어 효소적 또는 화학적 분할에 의해 천연 단백질로부터 유래되거나 제거될 수 있으며, 또는 통상의 웨티드 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 웨티드는 예컨대 양이온성 또는 다가양이온성 웨티드가 바람직하다.

[0013] 본원에서 "양이온성 웨티드"는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 갖는 웨티드를 나타낸다. 바람직하게는, 양이온성 웨티드는 pK_a 값이 9.0 또는 그 이상이다. 통상적으로, 양이온성 웨티드의 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 웨티드"는 또한 다가양이온성 웨티드를 나타낸다.

[0014] 본원에서 "다가양이온성 웨티드"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 웨티드를 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, 웨티드는 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: 엔도웨티다제, N-아세틸-뮤라모일-L-알라닌-아미다제(아미다제), N-아세틸-뮤라미다제, N-아세틸-글루코사미나제(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 웨티드 글리칸 결합 도메인이며, 세균의 웨티드 글리칸에 결합한다.

[0016] 본원에서 "세포벽"은 그람음성균의 외부 세포 인클로저(enclosure)를 형성함에 따라 세포의 완전한 상태를 보장하는 모든 성분들을 나타낸다. 특히, 본원에서 "세포벽"은 웨티드 글리칸, 지질다당류를 갖는 그람음성균의 외막, 세균의 세포막을 나타내며, 또한 예컨대 캡슐, 외부 단백질 층 또는 점액으로서 웨티드 글리칸에 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 웨티드 글리칸을 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 웨티드에 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 웨티드로서 LPS 분열 활성을 갖는 웨티드 스트레치에 의해 분열될 수 있다. 또한, 상기 웨티드 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 웨티드 스트레치가 그람음성균의 외막을 통해 상기 웨티드 스트레치에 융합된 엔도리신의 통과를 촉진한다는 것을 발견하였다. 그람음성균의 외막을 통한 엔도리신의 촉진된 통과 후에, 웨티드글리칸 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 웨티드 스트레치로 구성된 융합 단백질에 관한 것이며, 상기 웨티드 스트레치는 N-말단 및/또는 C-말단에서 효소에 융합된다. 본 발명에 따른 상기 융합 단백질은 개질된 엔도리신 변이체 또는 단순하게 엔도리신 변이체 또는 개질된 엔도리신이라고도 지칭된다.

[0024] 개질된 엔도리신 변이체의 엔도리신 부분은, 엔테로박테리아세아(에스케리키아, 특히 대장균, 살모넬라, 쉬겔라, 시트로박터, 에드워드시엘라, 엔테로박터, 하프니아, 클레브시엘라, 특히 K. 뉴모니아, 모르가넬라, 프로테우스, 프로비덴시아, 세라티아, 예르시니아), 슈도모나다세아(슈도모나스, 특히 P. 에루지노사, 버크홀데리아, 스테노트로포모나스, 슈와넬라, 스판고모나스, 코마모나스), 네이세리아, 모락셀라, 비브리오, 에어로모나스, 브루셀라, 프란시셀라, 보르데텔라, 레지오넬라, 바르토넬라, 콕시엘라, 해모필루스, 파스퇴렐라, 만헤이미아, 악티노바실루스, 가르드네렐라, 스피로채타세아(트레포네마 및 보렐리아), 렙토스피라세아, 캄필로박터, 헬리코박터, 스피릴룸, 스트렙토바실러스, 박테로이다세아(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 엔테로박테리아세아(에스케리키아, 특히 대장균, 살모넬라, 쉬겔라, 시트로박터, 에드워드시엘라, 엔테로박터, 하프니아, 클레브시엘라, 특히 K. 뉴모니아, 모르가넬라, 프로테우스, 프로비덴시아, 세라티아, 예르시니아), 슈도모나다세아(슈도모나스, 특히 P. 에루지노사, 버크홀데리아, 스테노트로포모나스, 슈와넬라, 스판고모나스, 코마모나스), 네이세리아, 모락셀라, 비브리오, 에어로모나스, 브루셀라, 레지오넬라, 바르토넬라, 콕시엘라, 해모필루스, 파스퇴렐라, 만헤이미아, 악티노바실루스, 가르드네렐라, 스피로채타세아(트레포네마 및 보렐리아), 렙토스피라세아, 캄필로박터, 헬리코박터, 스피릴룸, 스트렙토바실러스, 박테로이다세아(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 VI0	Perry, L.L. and Applegate, B.M.	PhiVI0p30	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 트랜스글리코질라제(C) / 1개의 막관통 도메인(N)
B3	Braid, M.D. and Kitts, C.L.	ORF23	용해성 트랜스글리코질라제(C) / 2개의 막관통 도메인(N)
BCEP μ	Summer, E.J. and Young, R.	BcepMu22	용해성 트랜스글리코질라제(M) / 1개의 막관통 도메인(N)
F116	Byrne, M. and Kropinski, A.M.	F116p62	무라미니다제(T4-유자)
FELS-2	McClelland, M. and Wilson, R.K.	STM2715.S.Fels2	무라미니다제(T4-유자)
ES18	Casjens, S.R. and Hendrix, R.W.	gp76	무라미니다제(T4-유자)
SETP3	De Lappe, N and Cormican, M.	SPSV3_gp23	무라미니다제(T4-유자)
Φ EC032	Savalia, D and Severinov, K	phi32_17	무라미니다제(T4-유자)
HK022	Juhala, R and Hendrix, R.W.	HK022p54	무라미니다제(람다 유자)
HK97	Juhala, R and Hendrix, R.W.	HK97p58	무라미니다제(람다 유자)
HK620	Clark, A.J. and Dhillon, T.S.	HK620p36	무라미니다제(람다 유자)
E1	Pickard, D. and Dougan, G	VIP0007	무라미니다제(람다 유자)
SF6	Casjens, S and Clark, A.J.	Sf6p62	무라미니다제(람다 유자)
SFW	Allison, G.E. and Verma, N.K.	R (SfVp40)	무라미니다제(람다 유자)
BCEPC6B	Summer, EJ and Young, R.	gp22	무라미니다제(람다 유자)
BCEPMNAZGUL	Summer, EJ and Young, R.	Nazgul38	무라미니다제(람다 유자)
P2	Christie, G.E. and Calender, R.	K (P2p09)	무라미니다제(람다 유자)
WΦ	Christie, G.E. and Esposito, D.	K (Wphi09)	무라미니다제(람다 유자)
RV5	Kropinski, A.M. and Johnson	rv5_gp085	무라미니다제(람다 유자)
JS98	Zuber, S and Denou, E.	EpJS98_gp116	무라미니다제(T4-유자)
I3A	Savalia, D and Molineux, I.	gp3.5	뮤라모일-L-알라닌 아미다제
BA14	Savalia, D and Molineux, I.	gp3.5	뮤라모일-L-알라닌 아미다제
ECODS1	Savalia, D and Molineux, I.	gp3.5	뮤라모일-L-알라닌 아미다제
K1F	Scholl, D and Merril, C	CKV1F_gp16	뮤라모일-L-알라닌 아미다제

[0027]

T3	Pajunen, M.I. and Mollineux, I.J.	T3p18	류라모일-L-알라닌 아미다제
GH-1	Kropinski, A.M. and Kovalyova, I.V.	gh-1p12	류라모일-L-알라닌 아미다제
K11	Molineux, I. and Savalia, D.	gp3.5	류라모일-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) / 류라미다제(C)
BCEP43	Summer, EJ and Young, R.	Bcep43-27	PG-결합 도메인(N) / 류라미다제(C)
BCEP781	Summer, EJ and Young, R.	Bcep781-27	PG-결합 도메인(N) / 류라미다제(C)
BCEP1	Summer, EJ and Young, R.	Bcep1-28	PG-결합 도메인(N) / 류라미다제(C)
BCEPNY3	Summer, EJ and Young, R.	BcepNY3gene26	PG-결합 도메인(N) / 류라미다제(C)
Φ E12-2	DeShazer, D and Nierman, W.C.	gp45	PG-결합 도메인(N) / 류라미다제(C)
Φ 52237	DeShazer, D and Nierman, W.C.	gp28	PG-결합 도메인(N) / 류라미다제(C)
Φ P27	Recktenwald, J and Schmidt, H.	P27p30	엔도펩티다제
RB49	Monod, C and Krisch, H.M.	RB49p102	엔도펩티다제
Φ 1	Arbiol, C. and Comeau, A.M.	phi1-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.	Aeh1p339	무라미나디제(T4-유사)
YYZ-2008	Kropinski, A.M.	YYZgp45	무라미나디제(람다-유사)

[0028]

[0029] 슈도모나스 에루지노사 파지 ΦKZ 및 EL, 슈도모나스 푸티다 파지 OBP, 파지 LUZ24의 엔도리신으로부터, 또는 T4 리소자임, gp61 류라미다제 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, 폐길화(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 웨პ티드는 양으로 하전된 아미노산으로서 리신, 아르기닌 및/또는 히스티дин을 하나 이상 포함하는 양으로 하전된 웨პ티드를 포함한다. 바람직하게는, 상기 웨პ티드에서 아미노산의 80% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 바람직하게는 100%가 양으로 하전된 아미노산이다. 유리하게는, 양이온성 웨პ티드는 엔도리신 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단 끝에 융합되며, 이에 따라 이후의 단백질의 양이온성을 증대시킨다. 본 발명의 또다른 구현예에서, 엔도리신에 융합된 양이온성 웨პ티드는 5개 이상, 더 바람직하게는 9개 이상의 아미노산 길이를 갖는다.

[0033] 바람직한 구현예에서, 엔도리신 변이체는 엔도리신 및 엔도리신에 융합된 웨프티드를 포함하며, 상기 웨프티드는 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 웨프티드를 포함하며, 상기 웨프티드는 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 웨프티드 스트레치는 엔도리신의 N-말단 및/또는 C-말단에 융합된다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 웨프티드 스트레치는 엔도리신의 N-말단에만 융합된다. 그러나, N-말단과 C-말단 모두에서 웨프티드 스트레치를 갖는 개질된 엔도리신 변이체가 또한 바람직하다. N-말단 및 C-말단 상의 상기 웨프티드 스트레치는 동일하거나 구별되는 웨프티드 스트레치일 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체의 웨프티드 스트레치는 바람직하게는 효소에 공유결합된다. 바람직하게는, 상기 웨프티드 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 웨프티드 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 웨프티드 스트레치가 더 바람직하다.

[0036] 본 발명의 일측면에서, 상기 융합된 웨프티드 스트레치는 리신, 아르기닌 및/또는 히스티딘, 특히 리신 및/또는 아르기닌의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 하나 이상 포함하는 양이온성 및/또는 다가양이온성 웨프티드이다. 바람직하게는, 상기 웨프티드 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 웨프티드 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 웨프티드 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 웨프티드 스트레치가 또한 바람직하다.

[0037] 서열번호:10(KRKKRK)에 따른 하나 이상의 모티브(motive)를 포함하는 양이온성 및/또는 다가양이온성 웨프티드 스트레치가 특히 바람직하다. 특히, 서열번호:10(KRKKRK)에 따른 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개의 모티브를 포함하는 양이온성 웨프티드 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 웨프티드 스트레치가 더 바람직하다.

[0038] 또다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 양이온성 웨프티드 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 웨프티드 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 폴리웨프티드 스트레치가 바람직하다. 특히, 서열번호:32(KRXKR)에 따른 하나 이상의 모티브를 포함하는 폴리웨프티드 스트레치가 바람직하며, 여기에서 X는 리신, 아르기닌 및 히스티딘과 다른 임의의 아미노산이다. 특히, 서열번호:33(KRSKR)에 따른 하나 이상의 모티브를 포함하는 폴리웨프티드 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] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 양이온성 웨პ티드 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 웨პ티드 스트레치가 바람직하다.

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

펩티드 스트레치	길이	서열번호
KKKKKK	6	서열번호:10
KKKKKKKK	9	서열번호:11
RRRRRRRRR	9	서열번호:12
EEEEEEEEE	8	서열번호:13
KKKKKKKKKK	10	서열번호:14
KKKKKKKKKKKK	12	서열번호:15
KKKKKKKKKKKKR	14	서열번호:16
EEEEEEEEEKKKKKKKK	16	서열번호:17
KKKKKKKKKKKKKKKK	19	서열번호:18
RRRRRRRRRRRRRRRRR	19	서열번호:19
EEEEEEEEEKKKKKKKK	19	서열번호:20
KKKKKKKKRSKKKKKKKK	20	서열번호:21
KKKKKKKKRSKKKKKKKK	21	서열번호:22
KKKKKKKKRSKKKKKKKK	21	서열번호:23
KKKKKKKKRGSGKRRKKKK	22	서열번호:24
KKKKKKKKRGSGSGKRRKKKK	24	서열번호:25
KKKKKKKKRKKKRKKKRKKK	25	서열번호:26
KKKKKKKKRSKKKKRKRSKKKKRK	31	서열번호:27
KKKKKKKKRGSGSGKRRKKRKGSRKRRKKRK	38	서열번호:28
KKKKKKKKRKKKRKKKRKKKRKKERKKRK	39	서열번호:29
KKKKKKKKRSKKKKRKRSKKKKRKRSKKKKRK	42	서열번호:30

[0042]

[0043] 바람직하게는, 웨პ티드 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 웨პ티드 스트레치 및/또는 개질된 엔도리신 변이체는 상기 tag 또는 tag들을 포함할 수도 있다.

[0044] 바람직하게는, 웨პ티드 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 웨პ티드 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) ² -gp144	서열번호:36	서열번호:1	서열번호:21
(POLY) ³ -gp144	서열번호:37	서열번호:1	서열번호:27
(POLY) ⁴ -gp144	서열번호:38	서열번호:1	서열번호:30
POLY-gp188	서열번호:39	서열번호:2	서열번호:11
(POLY) ² -gp188	서열번호:40	서열번호:2	서열번호:21
(POLY) ³ -gp188	서열번호:41	서열번호:2	서열번호:27
(POLY) ⁴ -gp188	서열번호:42	서열번호:2	서열번호:30
pKK2144pET32b	서열번호:43	서열번호:1	서열번호:14
KRK_6_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
K9_pET32b	서열번호:47	서열번호:1	서열번호:12
K8_pET32b	서열번호:48	서열번호:1	서열번호:13
pK2KZ144_pET32b_mod3	서열번호:49	서열번호:1	서열번호:28
PKFSP3gp10	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 C-말단: 서열번호:21
pK2KZ144_pET32b_mod1	서열번호:73	서열번호:1	서열번호:24
pK2KZ144_pET32b_mod2	서열번호:74	서열번호:1	서열번호:25
smi01_KRK9	서열번호:75	서열번호:1	서열번호:11
smi02_KRK9	서열번호:76	서열번호:1	서열번호:11
smi03_KRK9	서열번호:77	서열번호:1	서열번호:11
smi04_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 His₆-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 His₆-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 His₆-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 His₆-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 수득될 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 티오로독신이며, 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 알라닌 잔기는 도입된 엔테로키나제 분해 분위로부터 생성된 것이었다.

[0052] 또 다른 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 일구현예에서, 효모 세포는 페치아 파스토리스 세포이다. 숙주는 예컨대 수율, 가용성, 비용 등의 단순한 생명공학적 이유에 기인하여 선택될 수 있지만, 또한 의료적 관점, 예컨대 비-병리학적 세균 또는 효모, 인간 세포로부터 선택될 수도 있다.

[0055] 본 발명의 또 다른 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 또 다른 측면은, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체 및/또는 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체를 인코딩하는 뉴클레오티드 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 키퍼레이터와 같이 그람음성균의 외막을 투과할 수 있는 제제를 부가적으로 포함할 수 있다. 상기 언급된 투과성 제제의 조합을 포함하는 조성물이 또한 바람직하다. 특히, 약 10 μ M 내지 약 100 mM EDTA, 더 바람직하게는 약 50 μ 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 μ 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 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 숙주에 관한 것이다.

[0059] 본 발명의 또 다른 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 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주의 용도에 관한 것이다. 특히, 상기 장애, 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방은 엔테로박테리아세아(에스케리키아, 특히 대장균, 살모넬라, 쇠겔라, 시트로박터, 에드워드시엘라, 엔테로박터, 하프니아, 클레브시엘라, 특히 K. 뉴모니아, 모르가넬라, 프로테우스, 프로비デン시아, 세라티아, 예르시니아), 슈도모나다세아(슈도모나스, 특히 P. 에루지노사, 베크홀데리아, 스테노트로포모나스, 슈와넬라, 스피고모나스, 코마모나스), 네이세리아, 모락셀라, 비브리

오, 에어로모나스, 브루셀라, 프란시셀라, 보르데렐라, 레지오넬라, 바르토넬라, 콕시엘라, 해모필루스, 파스퇴렐라, 만헤이미아, 악티노바실루스, 가르드네렐라, 스피로채타세아(트레포네마 및 보렐리아), 렘토스피라세아, 캄필로박터, 헬리코박터, 스피렐룸, 스트렙토바실러스, 박테로이디세아(박테로이데스, 푸소박테리움, 프레보텔라, 포르피로모나스), 아시네토박터, 특히 A. 바우마니 등의 인간 또는 동물에 병원성인 균주를 포함하는 세균군, 과, 속 또는 종의 그람음성균에 의해 야기될 수 있다. 바람직하게는, 상기 장애, 질환 또는 상태는 슈도모나스, 특히 슈도모나스 에루지노사 및/또는 슈도모나스 푸티다, 베크홀데리아, 특히 베크홀데리아 슈도말레이 및/또는 베크홀데리아 솔라나세아룸, 살모넬라, 특히 살모넬라 티피무리움 및/또는 살모넬라 엔테리티디스, 아시네토박터, 특히 아시네토박터 바우마니, 대장균 및/또는 클레브시엘라, 특히 클레브시엘라 뉴모니애에 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, 당제, 정제, 분말, 죽약, 유제, 혼탁액, 젤, 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, 젤, 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 위장관의 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 백터로 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 폐혈증, 심내막염으로 고통받으며, 특히 환자는 정맥 약물 사용자이거나 또는 개심수술로부터의 합병증, 특히 오염된 안과 용액의 사용 후의 고도의 과민적인 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 베크홀데리아 슈도말레이에 의해 야기되며, 특히 휘트모어병, 만성 폐렴, 폐혈증이며, 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 또 다른 특정 구현예에서, 상기 장애, 질환 또는 상태는 아시네토박터 바우마니에 의해 야기되며, 특히 기관지염, 폐렴, 특히 정맥내 카테터삽입의 결과로서 상처 감염 및 폐혈증이다.

[0069] 본 발명의 또 다른 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, 폐혈증, 장성독혈증, 유선염 및 이질이다.

[0070] 본 발명의 또 다른 특정 구현예에서, 상기 장애, 질환 또는 상태는 클레브시엘라 뉴모니에 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, 세포탁심, 세팔로스포린, 세프타지덤 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, 박테리오신 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 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 하나 이상의 숙주, 또는 본 발명에 따른 조성물을 포함한다.

[0072] 본 발명의 또 다른 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 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 하나 이상의 숙주를 약학적으로 허용가능한 회석제, 부형제 또는 담체와 혼합하는 단계를 포함한다.

[0073] 또 다른 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 또 다른 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 β -갈락토시다제, 또는 응고효소 양성 균주에 대해 응고효소)를 사용하여 이후에 세균을 특이적으로 검출하기 위한 초기 단계로서 필요하다.

[0075] 본 발명의 또 다른 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 처치될 수 있다. 상기 처치는 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 엔테로박테리아세아, 예컨대 대장균, 살모넬라, 쇠겔라, 시트로박터, 에드워드시엘라, 엔테로박터, 하프니아, 클레브시엘라, 모르가넬라, 프로테우스, 프로비덴시아, 세라티아 및 예르시니아 종에 의한 병원 감염은 본 발명의 개질된 엔도리신 변이체에 의해 예방적으로 처치될 수도 있고 급성 단계 동안 처치될 수도 있다. 따라서, 본 발명에 따른 개질된 엔도리신 변이체는 또한 살균액, 예컨대 세제(detergent), 텐시드, 용매, 항생물질, 란티바이오틱 또는 박테리오신에서 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, 젤 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 융합 단백질의 항균 활성을 증대시키는 제제를 각각 부가적으로 포함할 수 있다. 융합 단백질은 또한 통상의 살균제, 예컨대 알코올, 알데히드, 산화제, 폐놀수지, 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. 융합 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 $(\text{POLY})^n\text{-gp144}((\text{POLY})^n\text{-KZ144})$ 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 올리고뉴클레오티드의 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/(\text{POLY})ⁿ-gp144(pEXP5CT/(\text{POLY})ⁿ-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 $30 \mu\text{l}$ 의 상청액이 $270 \mu\text{l}$ 의 클로로포름-투과 P. 예루지노사 PA01p 세포에 첨가된다. 완충 조건은 POLY-gp144($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) $\text{I} = 120 \text{ mM}$ pH 6.2의 최적의 효소적 조건이었다. 그 후, 광밀도가 분광광도법에 의해 기록되었다. 광밀도의 하락은 P. 파스토리스에 의한 뮤라리티(muralytic) 효소의 분비를 나타낸다. 음성대조군으로서, P. 파스토리스 X33 미발현 플라스미드가 포함된다(다이아몬드형).

도 3은 슈도모나스 예루지노사 PA01p 세포에 대해, 비개질된 phiKZgp144 및 ELgp188 엔도리신의 항균 활성, 9개의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하는 웨티드 스트레치를 포함하는 개질된 변이체 POLY-gp144 및 POLY-gp188의 항균 활성, 및 18개의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하는 웨티드 스트레치를 포함하는 개질된 변이체 $(\text{POLY})^2\text{-gp144}$ 및 $(\text{POLY})^2\text{-gp188}$ 의 항균 활성을 그래프 도식으로 나타낸다. 여러 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^{2+} 친화성 크로마토그래피 후에 용리 완충액($20 \text{ mM} \text{ NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ pH 7.4; $0.5 \text{ M} \text{ NaCl}$; 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 mM 의 EDTA를 포함하지만 엔도리신을 포함하지 않는 조성물로, $1.315 \mu\text{M}$ 의 비개질된 PSP3gp10을 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, $1.315 \mu\text{M}$ 의 개질된 PKPSP3gp10을 포함하지만

EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315 μM 의 비개질된 PSP3gp10 및 0.5 mM의 EDTA를 포함하는 조성물로, 1.315 μM 의 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. "△"는 각각의 PSP3gp10 및 PKPSP3gp10 샘플 사이의 활성의 차이를 나타낸다. 여러 바는 평균의 표준 편차를 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 μM 의 비개질된 P2gp09를 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315 μM 의 개질된 PKP2gp09를 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315 μM 의 비개질된 P2gp09 및 0.5 mM의 EDTA를 포함하는 조성물로, 1.315 μM 의 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 베크홀데리아 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. "△"는 각각의 P2gp09 및 PKP2gp09 샘플 사이의 활성의 차이를 나타낸다. 여러 바는 평균의 표준 편차를 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 μM 의 비개질된 OBPgpLYS를 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315 μM 의 개질된 PKOBPgpLYS를 포함하지만 EDTA를 포함하지 않는 조성물로, 1.315 μM 의 비개질된 OBPgpLYS 및 0.5 mM의 EDTA를 포함하는 조성물로, 1.315 μM 의 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 베크홀데리아 슈도말레이 세포에 대한 항균 활성이 나타난다. "△"는 각각의 OBPgpLYS 및 PKOBPgpLYS 샘플 사이의 활성의 차이를 나타낸다. 여러 바는 평균의 표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080] 하기의 실시예는 본 발명을 설명하는 것이지만, 이에 한정되는 것으로 고려되어서는 안 된다. 달리 나타내지 않는다면, 예컨대 [Sambrook 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 ELgp188 엔도리신 변이체의 클로닝, 발현 및 정제

[0082] 서열번호:1로 표시되는 phiKZgp144 및 서열번호:2로 표시되는 ELgp188은 N-말단 펩티도글리칸 결합 도메인 및 C-말단 촉매 도메인을 갖는 슈도모나스 에루지노사 파지 ϕ 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 TTTCTATGTGCTGCAAC(서열번호:81); ELgp188에 대해 ATACGAAAT AACGTGACGA(서열번호:82))가 적용되었으며 PCR이 사용되었다. 9개의 양으로 하전된 잔기(Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-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' ATGGGATCCAACGCAAGAACGTAAGAAA CGCAAAAAAGTATTACGCAAAG 3'(서열번호:79); ELgp188에 대해 5' ATGGGATCCAACGCAAGAACGTAAGAAA CGCAAAAAACTCCGGACGAAG 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)ⁿ-gp144 또는 (POLY)ⁿ-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) ² -gp144	서열번호:36	19
(POLY) ³ -gp144	서열번호:37	29
(POLY) ⁴ -gp144	서열번호:38	39
POLY-gp188	서열번호:39	9
(POLY) ² -gp188	서열번호:40	19
(POLY) ³ -gp188	서열번호:41	29
(POLY) ⁴ -gp188	서열번호:42	39

[0084]

[0085] 개질된 엔도리신 변이체 POLY-gp144(서열번호:35), (POLY)²-gp144(서열번호:36), POLY-gp188(서열번호:39) 및 (POLY)²-gp188(서열번호:40)는 추가 연구를 위해 사용되었다. 상기 단백질은 C-말단 6xHis-tag를 사용하여 Ni²⁺ 친화성 크로마토그래피(1ml His-trap Ni-NTA 컬럼을 사용한 악타 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

대장균 발현 배양물 리터 당 엔도리신 유도체의 재조합 정제 수율

융합	엔도리신	
	phiKZgp144	ELgp188
POLY	2 mg	48 mg
(POLY) ²	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 이형화 결합이 멀티머화를 야기하는 것을 나타낸다.

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

[0089] 지수적(약 10^6 /m1) P. 예루지노사 PA01p 세포(Pirnay JP et al. (2003), J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202)는 100배 희석되었으며(최종 밀도는 약 10^6 /m1였음), 완충액(20 mM NaH₂PO₄-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 100 μ g/m1의 최종 농도에서, 각각의 10 μ g의 투석되지 않은 단백질(비개질된 엔도리신 phiKZgp144(서열번호:1) 및 ELgp188(서열번호:2) 및 개질된 엔도리신 변이체 POLY-gp144(서열번호:35), (POLY)²-gp144(서열번호:36), POLY-gp188(서열번호:39) 및 (POLY)²-gp188(서열번호:40))로 실온에서 배양되었다. 1시간 후에, 세포 혼탁액은 PBS 완충액(10e-5, 10e-4 및 10e-3)에서 희석되었으며, 플레이팅되었다(표준 LB-배지, 37°C에서 밤새 배양됨). 또한, PBS 완충액에서 세포를 포함하는 음성대조군이 플레이팅되었다. 잔여 콜로니가 밤새 배양 이후에 카운팅되었다. 카운팅된 세포수에 기초하여, 상대적 불활성(%)($=100 - (N_i/N_0) * 100$, 여기서 N_0 = 비처리된 세포의 수, N_i = 처리된 세포의 수)으로서 로그 단위($=\log_{10}N_0/N_i$)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)²-gp144, POLY-gp188 및 (POLY)²-gp188에 의한 배양은 세균 세포수(POLY-gp144에 대해 99.85±0.09 %, POLY-gp188에 대해 98.0±0.2 %)의 유의적인 감소($\alpha = 0.05$)를 야기한다. 다가양이온성 웨티드 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)²-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) ²	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 웨티드 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 웨티드 스트레치 및 엔도리신의 공동 작용은 세포를 사멸시킨다.

[0093] 추가 실험에서, 개질된 엔도리신 POLY-gp144는 50 mM KH₂PO₄/K₂HP0₄ 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

POLY-gp144(서열번호:35)를 인코딩하는 오픈 리딩 프레임은 pPICZaA 셔틀 벡터(Invitrogen)에서 클로닝되었으며, 그 후 상동 재조합에 의해 *P.* 파스토리스 계놈에 통합되었다(제조사의 지시에 따름; *P.* 파스토리스 X33 세포, Invitrogen). 유전자 발현은 BMGY-배지에서 메탄올(1%)에 의해 유도되었으며, 상청액은 1일, 3일 및 4일 후에 효소 활성의 존재를 위해 분석되었다. 따라서, *P.* 파스토리스 발현 배양의 30 μ l의 상청액이 1일, 3일 및 4일 후에 270 μ l의 클로로포름-투파 *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 뮤라리티(muralitytic) 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 α -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 웨티드 스트레치를 인코딩하는 더 많은 카세트의 부가를 가능하게 한다.

[0097] 실시예 4: 다른 다가양이온성 웨티드 스트레치들을 갖는 더 개질된 엔도리신 phiKZgp144 변이체

phiKZgp144의 다가양이온성 웨티드 변이체와 다른 엔도리신의 능력을 시험하고 비교하기 위하여, 단백질의 N-말단 끝에서 다른 다가양이온성 웨티드를 갖는 인코딩 유전자들이 합성되었다. 웨티드 스트레치 변이는 길이, 조성물 및 링커(linker) 서열의 삽입과 관련된다. 한편으로는, KRK 모티브의 N-말단 복합체(multiple)를 갖는 추가 다가양이온성 웨티드 스트레치가 제조되었다. 다른 한편으로는, 아르기닌(R) 또는 리신(K)으로만 이루어진 다가양이온성 웨티드 스트레치가 제조되었다. 또한, 긴 다가양이온성 웨티드 스트레치들의 번역을 증가시키기 위하여, 링커 서열을 포함하는 다가양이온성 웨티드 스트레치가 제조되었다.

[0099] 다른 산물들이 pET32b 발현 벡터(Novagen, Darmstadt, Germany)에서 클로닝되었다. pET32b는 대장균 숙주에 대한 다가양이온성 웨티드의 잠재적 독성을 감소시키기 위해 사용되었다. 벡터-인코딩된 융합 단백질(티오레독신)은 다가양이온성 웨티드를 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 4시간 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 (서열번호:1)	0	-
pKKZ144pET32b (서열번호:43)	10	KRKRRKKRK (서열번호:14)
RK_6_pET32b (서열번호:44)	6	RKRRRK (서열번호:10)
RK_12_pET32b (서열번호:45)	12	RKRRRKRRRK (서열번호:15)
RK_14_pET32b (서열번호:46)	14	RKRRRKRRRKRRK (서열번호:16)
R9_pET32b (서열번호:47)	9	RRRRRRRRR (서열번호:12)
R8_pET32b (서열번호:48)	8	KKKKKKKK (서열번호:13)
pK2KZ144_pET32b_mod3 (서열번호:49)	38	RKRRRKRRRKRGSGSGKRKRRRKKGSGSGKRKRRK KRK (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. 예루지노사 PAO1p 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 NaH₂PO₄-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 100 μ g/ml의 최종 농도에서 상기 기재된 각각의 10 μ g의 투석되지 않은 단백질과 실온에서 배양되었다. 1시간 후에, 세포 혼탁액은 1:100으로 희석되었으며, LB에 플레이팅되었다. 또한, 완충액(20 mM NaH₂PO₄-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 항균 활성이 산출되었다(표 3). 모든 샘플은 적어도 4배로 복제되었다.

표 3

엔도리신 비개질 및 개질된 phiKZgp144 및 ELgp188의 항균 효과

개질된 엔도리신 변이체	펩티드 스트레치의 서열	감소[%]
phiKZgp144 (서열번호:1)		0
KKZ144pET32b (서열번호:43)	KRKRRKKRK (서열번호:14)	99 - 99.9
RK_6_pET32b (서열번호:44)	RKRRRK (서열번호:10)	99.9
RK_12_pET32b (서열번호:45)	RKRRRKRRRK (서열번호:15)	99 - 99.9
RK_14_pET32b (서열번호:46)	RKRRRKRRRKRRK (서열번호:16)	99.9
R9_pET32b (서열번호:47)	RRRRRRRR (서열번호:12)	99
R8_pET32b (서열번호:48)	KKKKKKKK (서열번호:13)	99
pK2KZ144_pET32b_mod3 (서열번호:49)	RKRRRKRRRKRGSGSGKRKRRRKKGSGSGKRKRRK KRK (서열번호:28)	99.9

[0105] 비개질된 phiKZgp144는 음성대조군에 비해 세포수를 유의적으로 감소시키지 않는다. 또한, KRK 모티브의 N-말단

복합체(multiple)의 다가양이온성 웨티드를 갖는 개질된 phiKZgp144 변이체는 항균 효과를 현저하게 증가시킨다. 그러나, 리신 또는 아르기닌의 호모머(homomer) 웨티드 스트레치를 갖는 변이체는 또한 측정된 비 개질된 phiKZgp144에 비해 세포의 유의적인 감소를 나타낸다. 또한, 38 아미노산 잔기의 다가양이온성 웨티드 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 람다-유사 뮤라미다제 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' TGCCATCACCCCGGCCAGCGTG 3'(서열번호:51))가 사용되었다. 다가양이온성 9-머 웨티드 Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys(서열번호:11)를 인코딩하는 유전자 단편으로 PSP3gp10을 인코딩하는 ORF의 5' 말단을 연장하기 위하여, 연장된 5' 프라이머(5' ATGGGATCCAAACGCAAGAACGTAA GAAACGCAAACCGGTCATTAATACTCACCAG 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 Ni²⁺ 친화성 크로마토그래피(Akta FPLC, GE Healthcare)에 의해 정제되었다. Ni²⁺ 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 NaH₂PO₄-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 NaH₂PO₄-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 NaH₂PO₄-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 500 mM 이미다졸)에서 각각 PSP3gp10 및 PKPSP3gp10으로 이루어진 정제된 모액은 SDS-PAGE 젤에서 시작적으로 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 μ M의 PKPSP3gp10 엔도리신 및 0.5 mM의 EDTA의 조합이 임상의 *P. 예루지노사* 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 10⁶/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 NaH₂PO₄-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 사용되었으며, 배양은 엔도리신의 최종 농도 1.315 μ 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 예루지노사 PA01p	화상 분리주(isolate), Queen Astrid 병원, Brussels	Pirnay et al., 2003*
슈도모나스 예루지노사 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 혼탁액은 3배(각각 10⁵-10⁴-10³ 세포/ml) 희석되었으며, 100 μ 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 6).

표 6

[0122]

다른 지수성장 그람음성 종들에 대해, EDTA-Na₂의 존재 및 부재하에 비개질된 엔도리신(PSP3gp10) 및 그의 개질된 엔도리신 변이체(PKPSP3gp10)의 항균 활성

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

[0123] 모든 샘플은 3배로 복제되었다. 평균+/-표준편차가 나타난다. 관찰되는 최대 감소는 10 세포/ml의 검출 수준 및 초기 세포 밀도에 의존한다. PAO1p에 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 람다-유사 뮤라미다제 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' ATGGGATCCCCGGTAATTACACGCATC 3'(서열번호:54)) 및 기준 (standard) 3' 프라이머(5' AGCCGGTACGCCAGCGGTACGC 3'(서열번호:55))가 사용되었다. 다가양이온성 9-머 펩티드 Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys(서열번호:11)를 인코딩하는 유전자 단편으로 P2gp09를 인코딩하는 ORF의 5' 말단을 연장하기 위하여, 연장된 5' 프라이머(5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGC AAACCGGTAATTACACGCATC 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 모두 제조사의 TA-클로닝 프로토콜에 따라 pEXP5CT/TOPO® 발현 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 연결되었다.

[0129] 서열번호:9에 따른 P2gp09 및 서열번호:57에 따른 PKP2gp09의 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 Ni²⁺ 친화성 크로마토그래피(Akta FPLC, GE Healthcare)에 의해 정제되었다. Ni²⁺ 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 NaH₂PO₄-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 NaH₂PO₄-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 nm에서 정제된 모액(stock solution)의 총부피 및 단백질 농도의 분광광도 측정에 의해 결정되었다. 용리 완충액 (20 mM NaH₂PO₄-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-그람음성 스펙트럼을 측정하기 위하여, 1.315 μM 의 PK2gp09 엔도리신 및 0.5 mM의 EDTA의 조합이 임상의 *P. 예루지노사* 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 10⁶/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 NaH₂PO₄-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 사용되었으며, 배양은 엔도리신의 최종 농도 1.315 μM 에서 발생되었다. 대조군으로서 각각의 균주는 엔도리신 없이 0.5 mM의 EDTA(상기 기재된 것과 동일한 완충액)와 30분 동안 배양되었다. 배양 후에, 세포 혼탁액은 3배(각각 10⁵-10⁴-10³ 세포/ml) 희석되었으며, 100 μl 의 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-Na₂의 존재 및 부재하에 비개질된 엔도리신(P2gp09) 및 그의 개질된 엔도리신 변이체(P2gp09)의 항균 활성

	0.5 mM EDTA	1.315 μM P2gp09	1.315 μM PKP2gp09	△	1.315 μM P2gp09 + 0.5 mM EDTA	1.315 μM PKP2gp09 + 0.5 mM EDTA	△
P. 예루지노사 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. 예루지노사 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

그람음성 균주	소스(source)	참조
슈도모나스 예루지노사 PA01p	화상 분리주(isolate), Queen Astrid 병원, Brussels	Pirnay et al., 2003*
슈도모나스 예루지노사 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) 벨현 균주	Prof C. Michiels

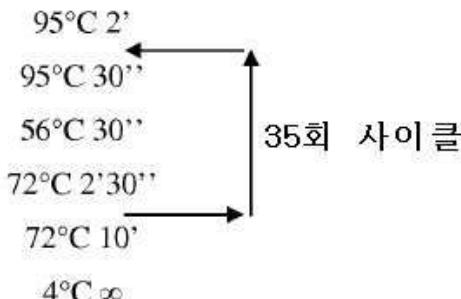
슈도모나스 푸티다 G1	토양 분리주, Moscow	Prof V.Krylov
--------------	----------------	---------------

[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 과자 OBP의 개질된 엔도리신 변이체

[0143] 서열번호:7에 따른 OBPgpLYS는 추정상의 N-말단 웨티도글리칸 결합 도메인 및 C-말단 촉매 키티나제 도메인을 갖는 슈도모나스 푸티다 과자 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 웨티도글리칸 결합 도메인을 포함한다.

[0144] 과자 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' AACTATTCCGAGTGCTTCCTTG 3'(서열번호:59))가 사용되었다. 다가양이온성 9-머 웨티드 Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys(서열번호:11)를 인코딩하는 유전자 단편으로 OBPgpLYS를 인코딩하는 ORF의 5' 말단을 연장하기 위하여, 연장된 5' 프라이머(5' ATGGGATCCAAACGCAAGAACGTAAGAACGCAAAAAATAGCGAG 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 Ni²⁺ 친화성 크로마토그래피(Akta FPLC, GE Healthcare)에 의해 정제되었다. Ni²⁺ 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 NaH₂PO₄-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 NaH₂PO₄-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 NaH₂PO₄-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 500 mM 이미다졸)에서 각각 OBPgpLYS 및 PKOBPgpLYS로 이루어진 정

제된 모액은 SDS-PAGE 젤에서 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 μM 의 PKOBPgpLYS 엔도리신 및 0.5 mM의 EDTA의 조합이 임상의 다중 내성 *P. 예루지노사* 균주 Br667, 슈도모나스 푸티다 G1(과지 OBP의 숙주) 및 다른 범위의 그람음성 병원균(대장균 WK6, 살모넬라 티피무리움 LT2 및 베크홀데리아 슈도말레이아)에 대해 테스트되었다(표 12 참조). 지수성장 세균 세포(OD_{600nm}: 0.6)는 각 균주의 최종 밀도 약 10⁶/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 혼들지 않고 배양되었다. 배양을 위해, 엔도리신은 각각 완충액(20 mM NaH₂PO₄-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 사용되었으며, 배양은 엔도리신의 최종 농도 1.313 μM 에서 발생되었다. 대조군으로서 각각의 균주는 엔도리신 없이 0.5 mM의 EDTA(상기 기재된 것과 동일한 완충액)와 30분 동안 배양되었다. 배양 후에, 세포 혼탁액은 3배(각각 10⁵-10⁴-10³ 세포/ml) 희석되었으며, 100 μl 의 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+/-표준편차가 나타난다. 관찰되는 최대 감소는 10 세포/ml의 검출 수준 및 초기 세포 밀도에 의존한다.

표 11

[0155] 다른 지수성장 그람음성 종들에 대해, EDTA-Na₂의 존재 및 부재하에 비개질된 엔도리신(OBPgpLYS) 및 그의 개질된 엔도리신 변이체(PKOBPgpLYS)의 항균 활성

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

표 12

사용된 그람음성 균주의 리스트

그람음성 균주	소스(source)	참조
슈도모나스 예루지노사 PA01p	화상 분리주(isolate), Queen Astrid 병원, Brussels	Pirnay et al., 2003*
슈도모나스 예루지노사 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 티피무리음 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 처치의 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 활성에 대해 관찰된다.

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

[0160] 비개질 및 개질된 엔도리신의 항균 활성에 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 PAO1p 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 10⁶/m1로 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 μM, 0.131 μM 및 1.315 μM에서 각각 완충액(20 mM NaH₂PO₄-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 NaH₂PO₄-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)이 부가되었다. 배양 후에, 세포 혼탁액은 3배(각각 10⁵-10⁴-10³ 세포/m1) 희석되었으며, 100 μl의 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 N₀=비처리된 세포의 수, N_i= 처리된 세포의 수)의 상대적 불활성으로서 항균 활성이 산출되었다(표 13). 모든 샘플은 3배로 복제되었다. 평균+/-표준편차가 나타난다. 관찰되는 최대 감소(5.69 로그 단위)는 10 세포/m1의 검출 수준 및 초기 세포 밀도에 의존한다. PAO1p에 대해, EDTA는 비개질된 PSP3gp10 엔도리신 및 그의 개질된 변이체 PKPSP3gp10 모두와 상승적으로 작용한다. "△"는 각각의 OBPgpLYS 및 PKOBPgpLYS 샘플 사이의 활성의 차이를 나타낸다.

표 13

[0161] 지수성장 슈도모나스 에루지노사 PAO1p 세포에 대한, 다른 EDTA 농도와 조합된 비개질된 엔도리신(OBPgpLYS) 및 그의 개질된 엔도리신 변이체(PKOBPgpLYS)의 항균 활성

EDTA-Na ₂ 의 농도(mM)				
	0	0.05	0.5	10
엔도리신 부재	/	0.028 +/- 0.008	0.130 +/- 0.023	1.827 +/- 0.052
0.013 μM OBPgpLYS	0.956 +/- 0.110	/	4.626 +/- 0.287	/
0.013 μM PKOBPgpLYS	0.992 +/- 0.181	/	5.204 +/- 0.000	/
△	0.036		0.578	
0.131 μM OBPgpLYS	2.158 +/- 0.027	/	4.599 +/- 0.275	/

0.131 μ M PKOBPgpLYS	2.529 +/- 0.184	/	5.671 +/- 0.000	/
△	0.371		1.072	
1.315 μ M OBPgpLYS	2.531 +/- 0.173	2.762 +/- 0.091	4.357 +/- 1.857	4.888 +/- 0.275
1.315 μ M PKOBPgpLYS	3.079 +/- 0.015	4.145 +/- 0.015	> 5.687	> 5.687
△	0.548	1.383	> 1.330	> 0.799

[0162] 표 13에서 보여진 바와 같이, 비개질된 엔도리신 OBPgpLYS는 음성대조군에 비해 세포수를 1.315 μ M에 대해서는 2.5 로그 단위 이상, 0.013 μ 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-Na₂와 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 μ M 엔도리신).

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

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

[0165] 다른 산물들이 pET32b 발현 벡터(Novagen, Darmstadt, Germany)에서 클로닝되었다. pET32b는 대장균 숙주에 대한 다가양이온성 웨프티드의 잠재적 독성을 감소시키기 위해 사용되었다. 벡터-인코딩된 융합 단백질(티오레독신)은 다가양이온성 웨프티드를 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 10⁶/m1) 성장 세포(화상 분리주(Burn wound isolate), Queen Astrid 병원, Brussels; Pirnay JP et al. (2003), J Clin Microbiol., 41(3):1192-1202), 아시네토박ter 바우마니(DSMZ 30007) 또는 베크홀데리아 솔라나세움(Prof. C. Michiels에서 제공된 분리주)는 100배 희석되었으며(최종 밀도는 약 10⁶/m1였음), 완충액(20 mM NaH₂PO₄-NaOH pH 7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M 이미다졸)에서 100 μ g/m1의 최종 농도에서 상기 기재된 각각의 10 μ g의 투석되지 않은 단백질과 실온에서 배양되었다. 1시간 후에, 세포 혼탁액은 1:100으로 희석되었으며, LB에 플레이팅되었다. 또한, 완충액(20 mM NaH₂PO₄-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/N₀)*100, 여기서 N₀= 비처리된 세포의 수, N_i= 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 솔라나세아롭	0
POLYKZ144	버크홀데리아 솔라나세아롭	99 - 99.9

[0171]

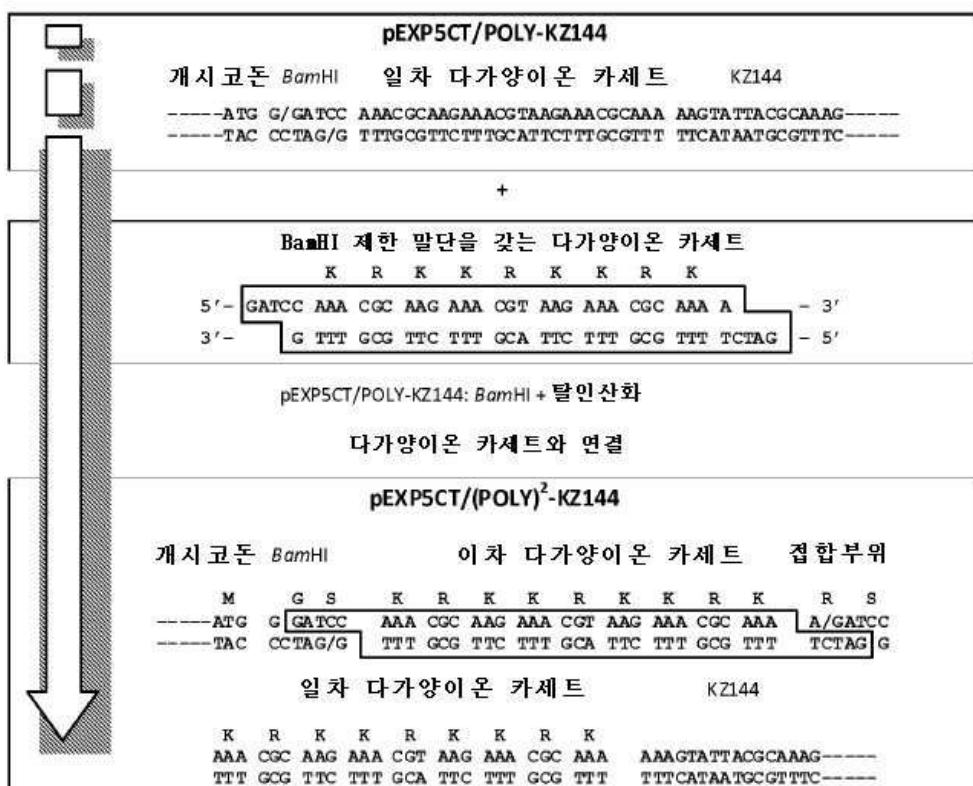
비개질된 엔도리신 phiKZgp144 및 smi01(YP_001712536)은 음성대조군에 비해 세포수를 유의적으로 감소시키지 않는다. 이러한 관찰은 또한 엔도리신이 그람음성균의 세포벽을 분해하는 장벽으로서 외막의 효능을 설명한다. 표 14에서 보여지는 것처럼 대조적으로, 개질된 엔도리신 KRK9_smi01, pKKZ144pET32b 및 POLY-gp144에 의한 배양은 아시네토박터 바우마니(KRK9_smi01에 대해 50%; pKKZ144pET32b에 대해 99.9%), 슈도모나스 에루지노사(pKKZ144pET32b에 대해 90-99.9%) 및 버크홀데리아 솔라나세아롭(POLYKZ144에 대해 90-99.9%)에 대해 세균 세포수의 유의적인 감소를 야기한다.

[0172]

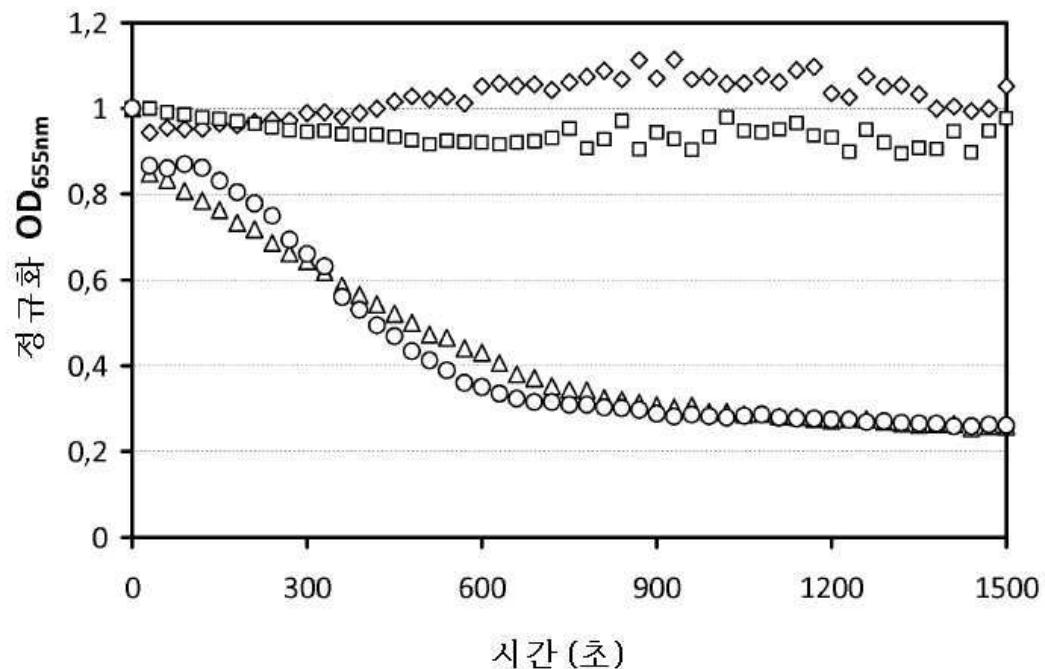
본 실험들은 다른 엔도리신에 대한 양이온성/다가양이온성 융합의 접근 적용가능성을 입증한다. 또한, 본 실험들은 개질된 엔도리신이 다양한 세균들에 대해 작용함을 입증하였다.

도면

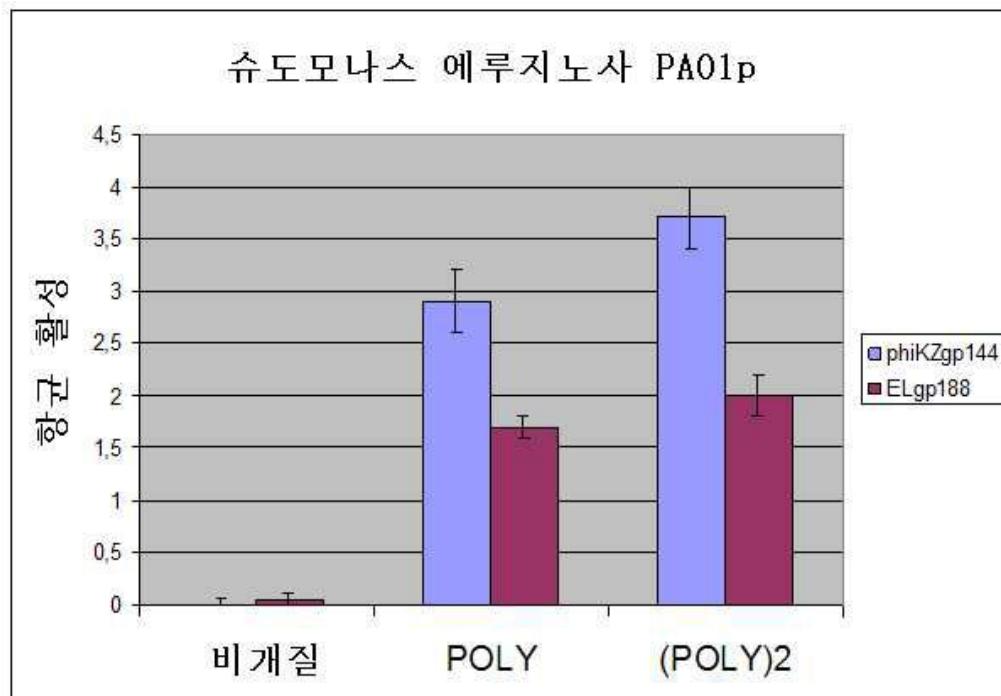
도면1



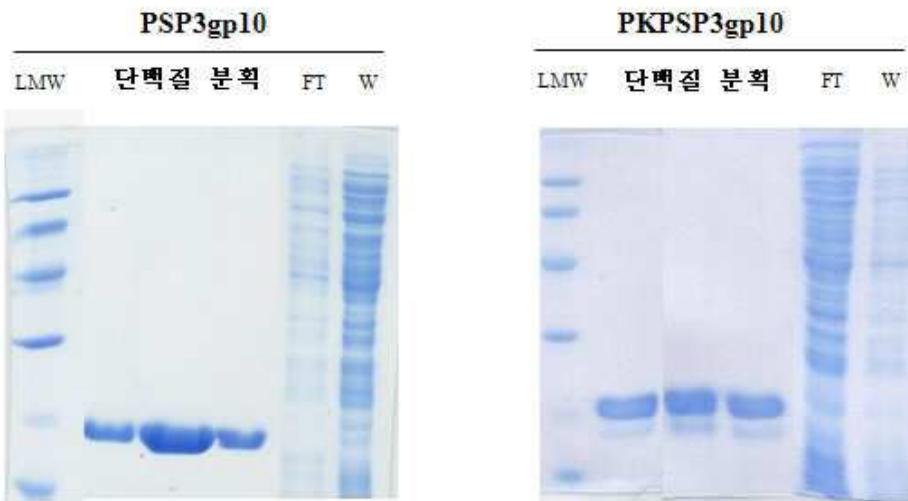
도면2



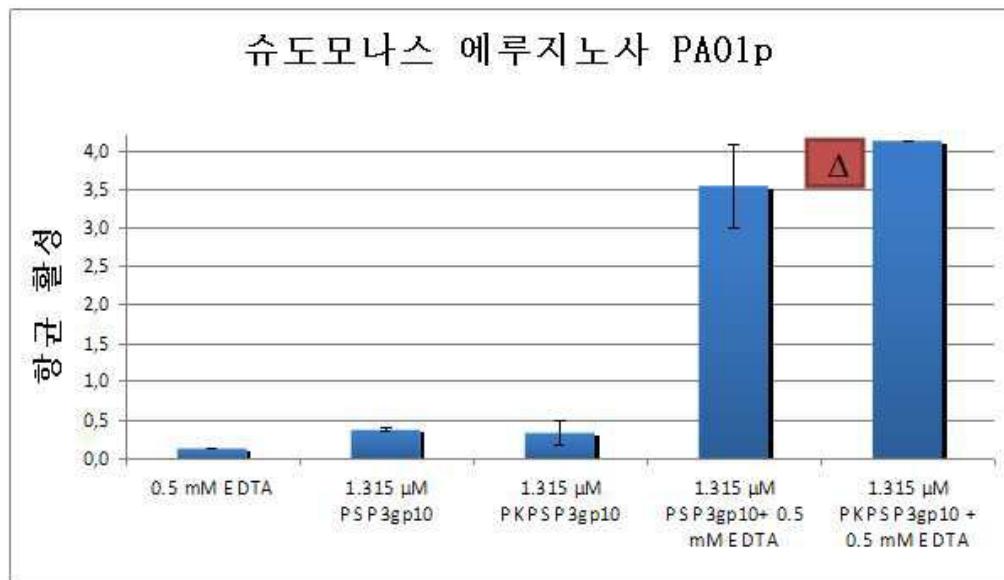
도면3



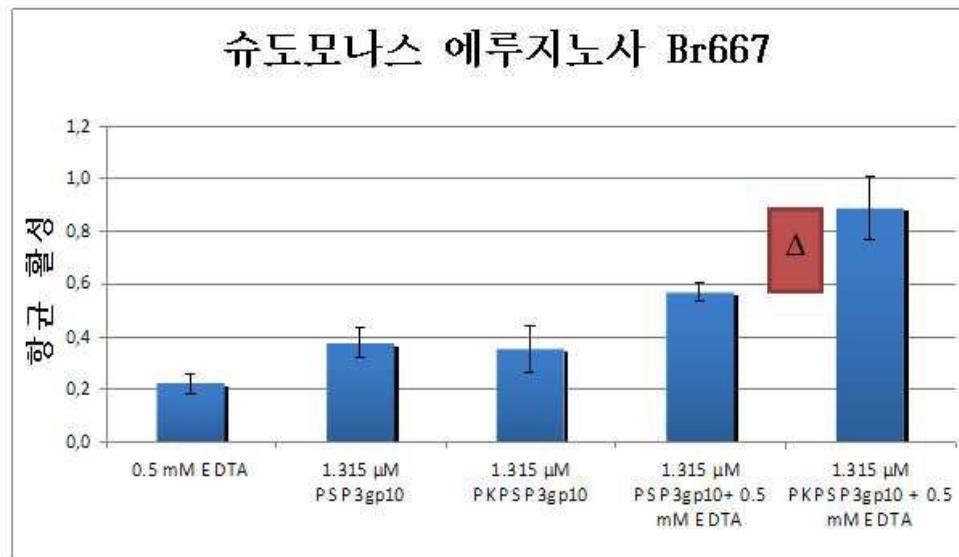
도면4



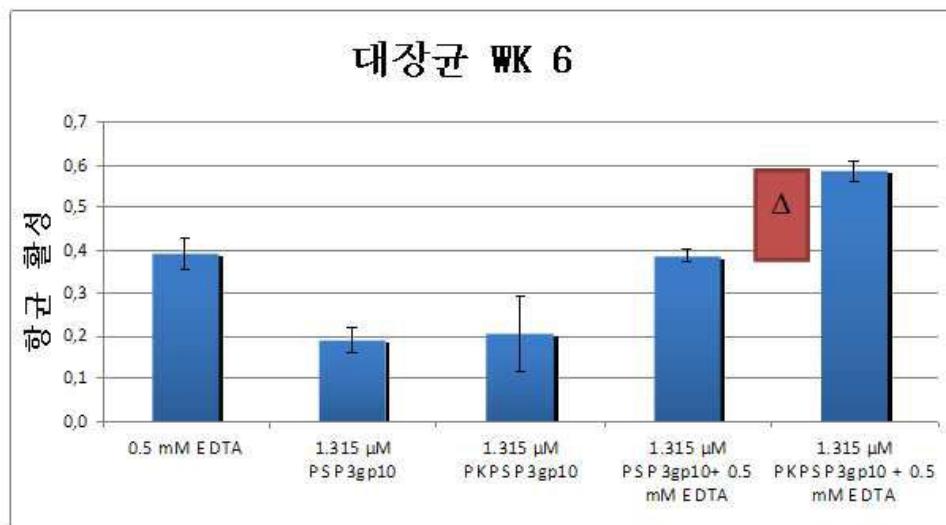
도면5a



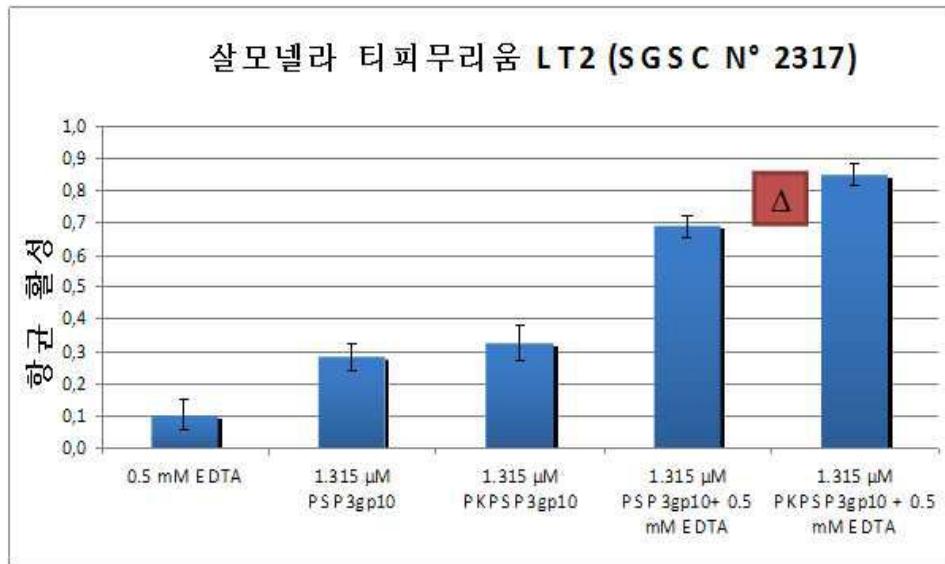
도면5b



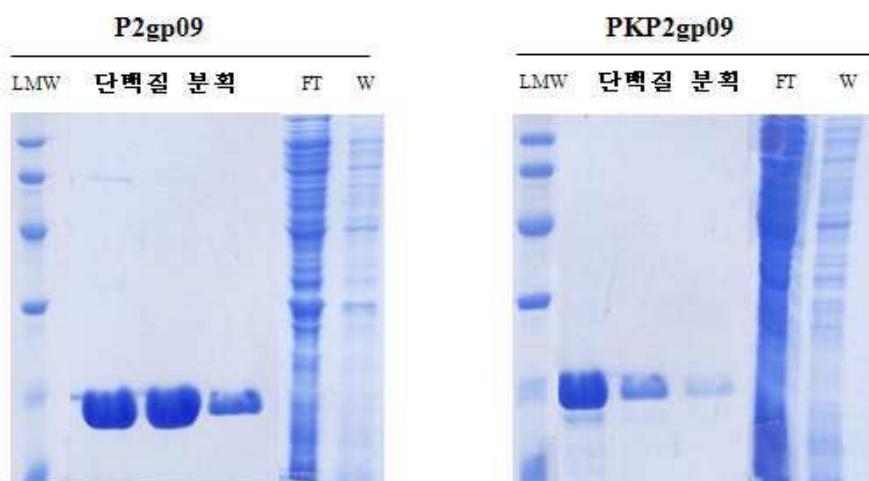
도면5c



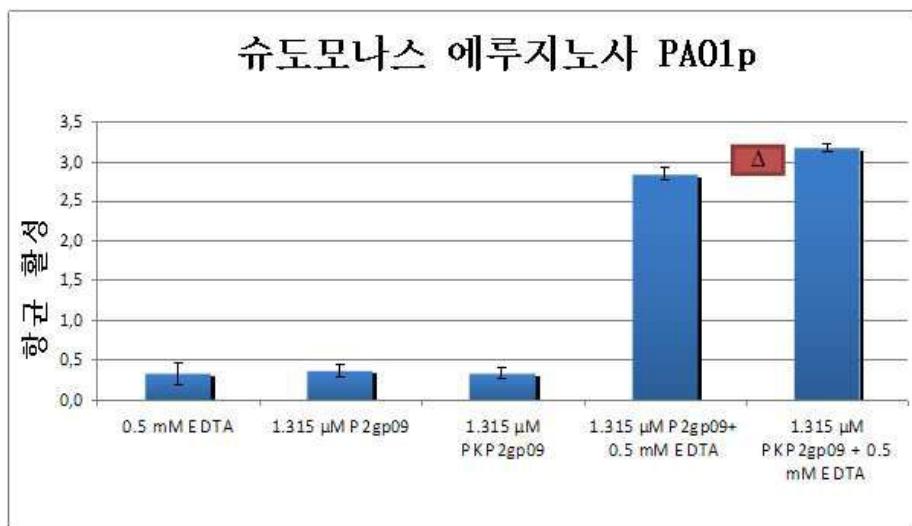
도면5d



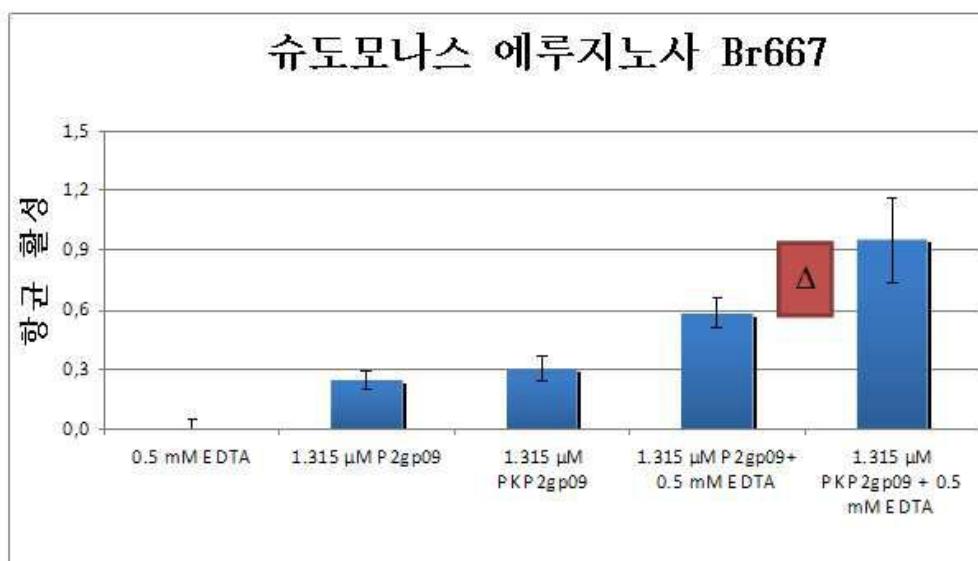
도면6



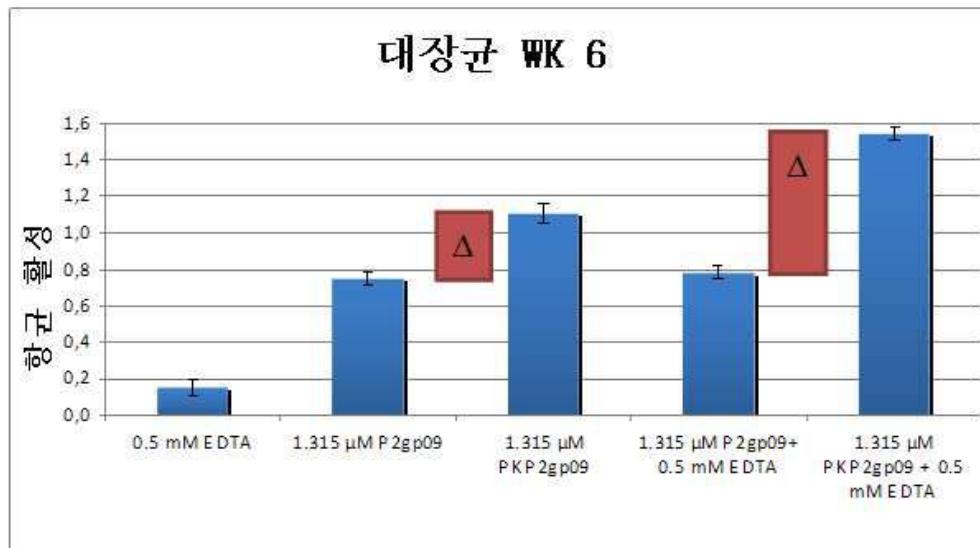
도면7a



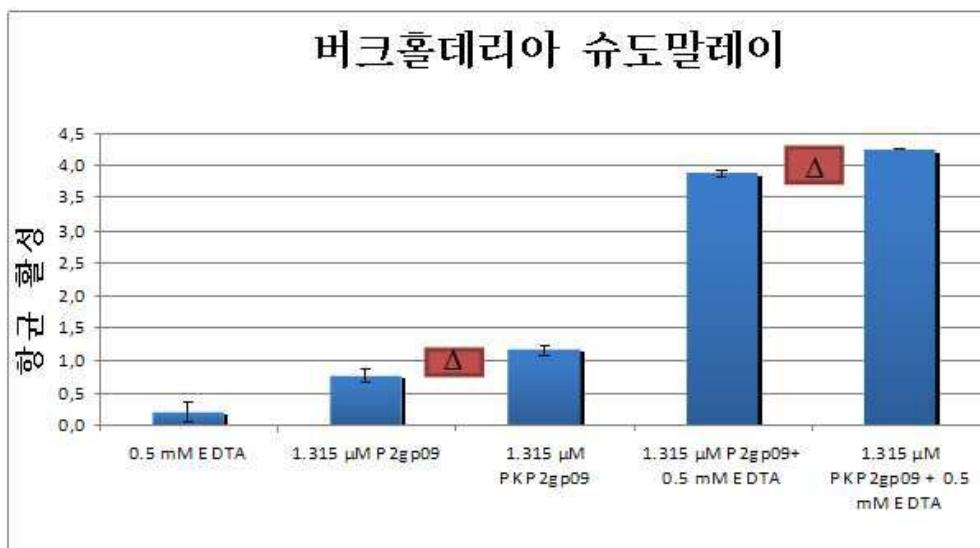
도면7b



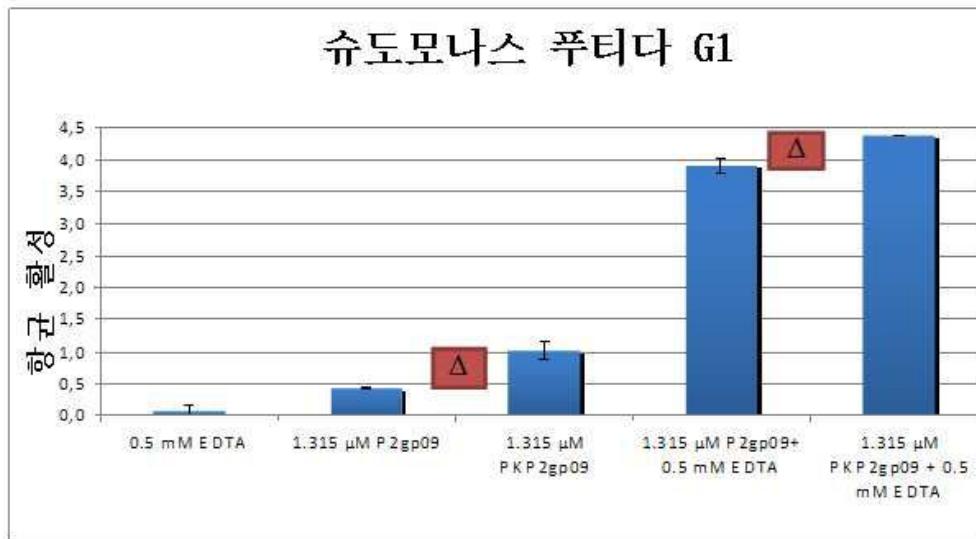
도면7c



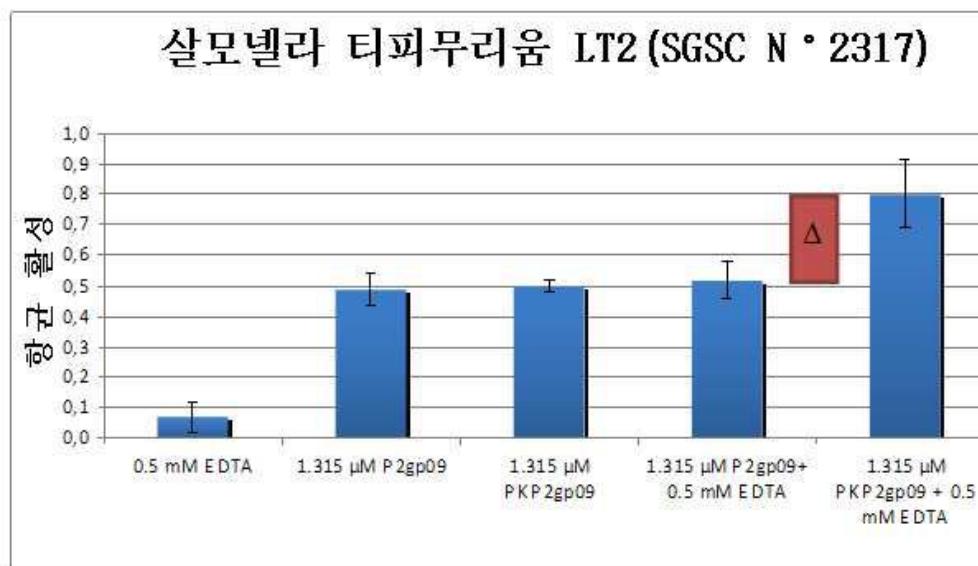
도면7d



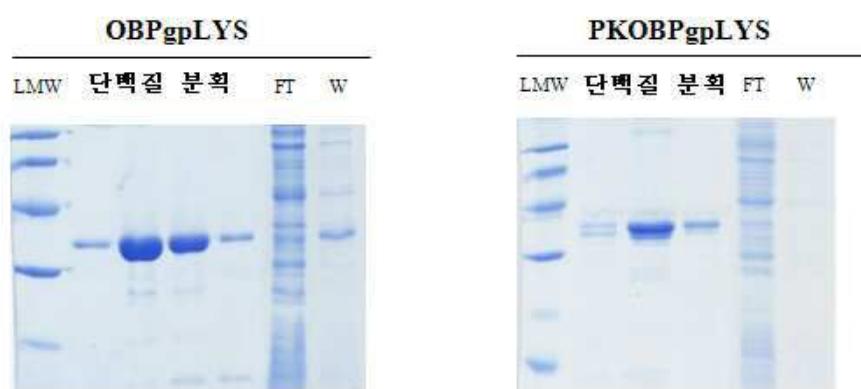
도면7e



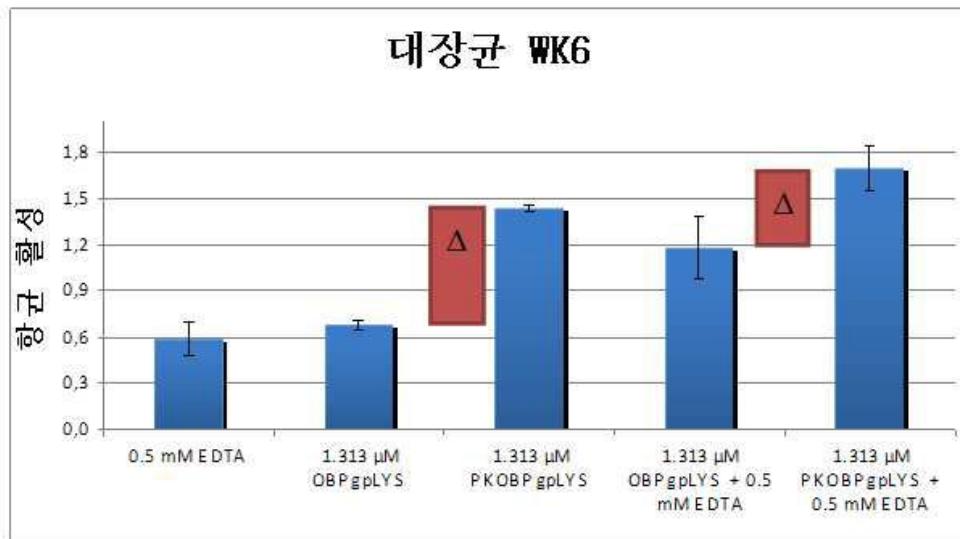
도면7f



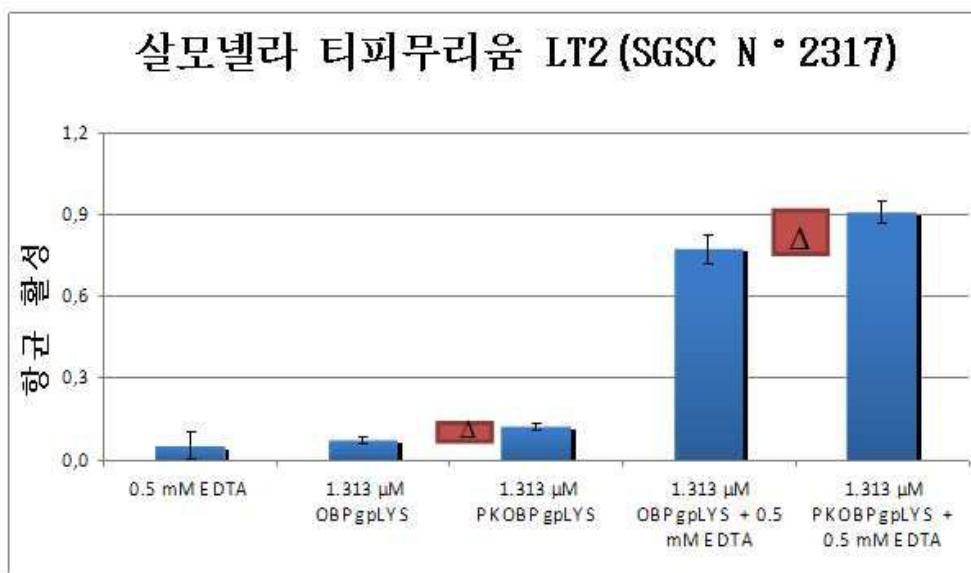
도면8



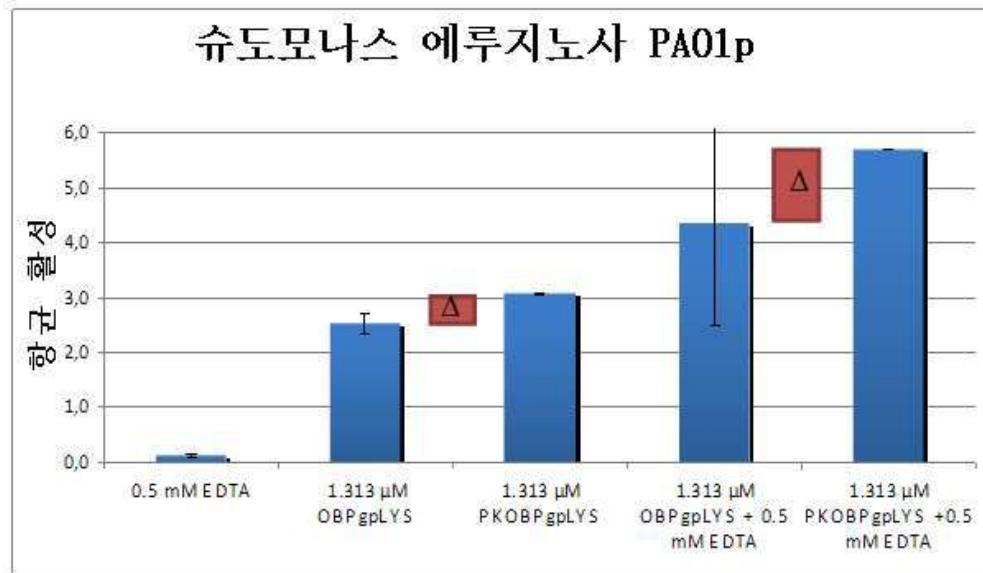
도면9a



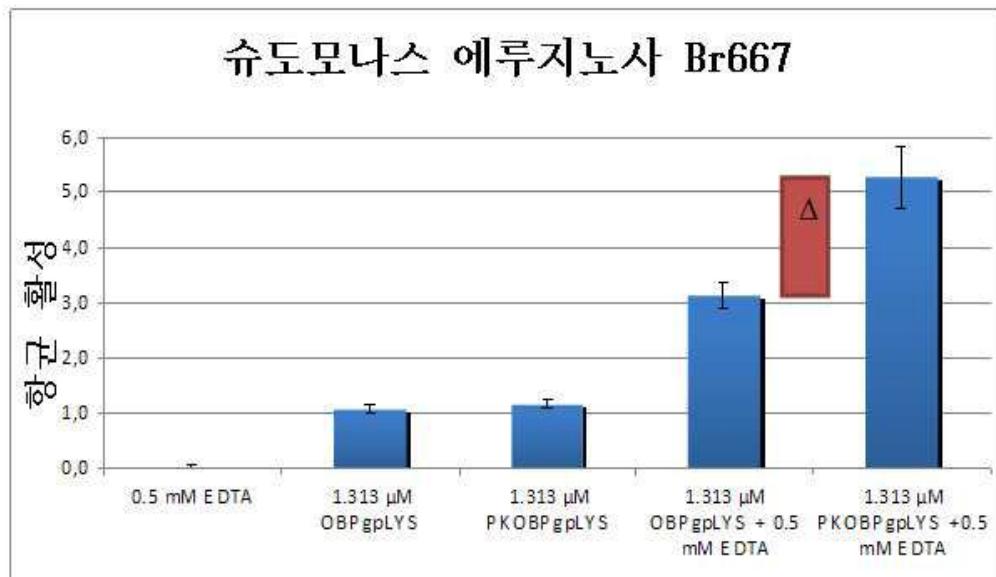
도면9b



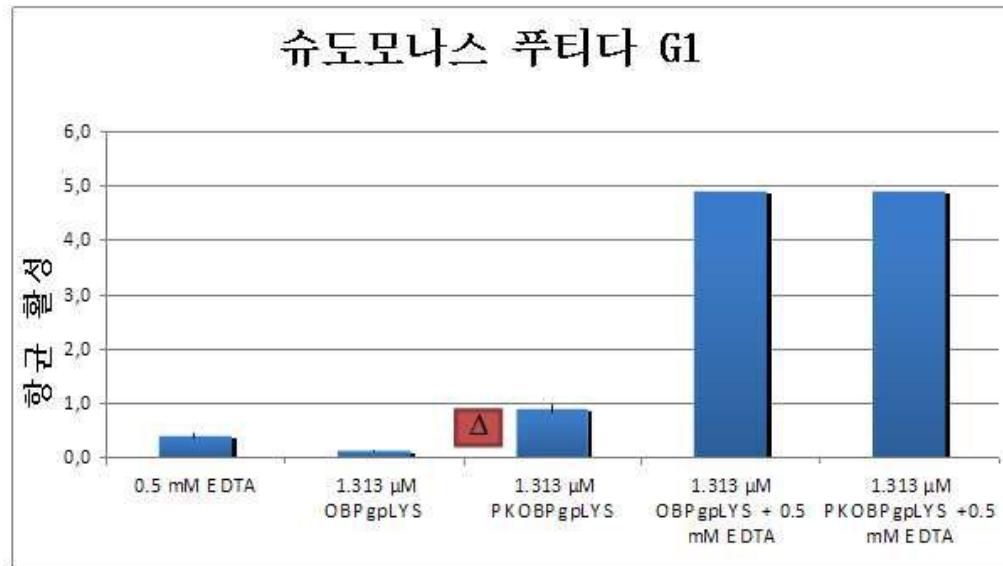
도면9c



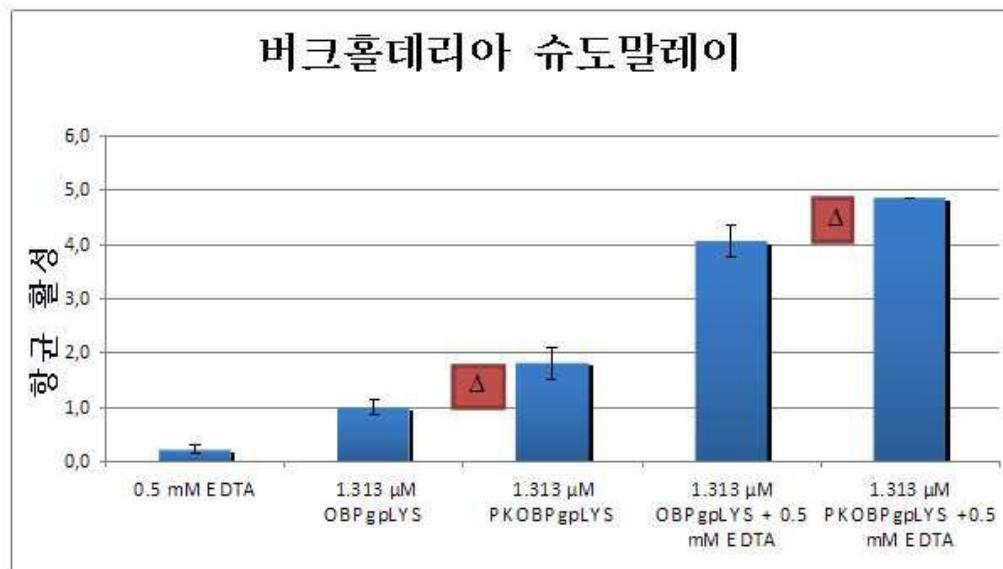
도면9d



도면9e



도면9f



서 열 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> Kopatent In 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 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 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
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 Ala Asp		
225	230	235
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
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 Glu20 25 30
Thr Ile Arg Met Trp His Lys Gln Gln Ala Trp Leu Asp Val Gly Tyr35 40 45
His Phe Ile Ile Lys Arg Asp Gly Thr Val Glu Glu Gly Arg Pro Val50 55 60
Asn Val Val Gly Ser His Val Lys Asp Trp Asn Ser Arg Ser Val Gly65 70 75 80
Val Cys Leu Val Gly Gly Ile Asn Ala Lys Gly Gln Phe Glu Ala Asn85 90 95
Phe Thr Pro Ala Gln Met Asn Ser Leu Arg Asn Lys Leu Asp Asp Leu
100 105 110Lys 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 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 Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 17

Lys Lys

1 5 10 15

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 18

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

1 5 10 15

Arg Arg Arg

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> synthetic peptide

<400> 20

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 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 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

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 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 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

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg 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 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 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

1 5 10 15

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 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
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 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 Arg Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Lys Lys Arg 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 Arg Ser Lys Arg

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys 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

275

280

285

Ala Ala His Arg Lys

290

<210> 38

<211> 304

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> (POLY)4-gp144

<400> 38

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

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys 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 Val Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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 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 Ser Lys Arg

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg 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 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 Ser Lys Arg
 1 5 10 15

 Lys Lys Arg Lys 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 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
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
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
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 Ser Lys Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg 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 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

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 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 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 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														
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 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 ccggcagccg tg 22

<210> 52

<211> 57

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer PKPSP3gp10 forw

<400> 52

atggatcca aacgcaagaa acgttaagaaa 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 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 cgtaattaa cacgcac			28
<210> 55			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> artificial sequence			
<220><223> primer P2gp09 rev			
<400> 55			
agccggtagc ccgcagcg tacgc			25
<210> 56			
<211> 54			
<212> DNA			
<213> artificial sequence			
<220><223> primer PKP2gp09 forw			
<400> 56			
atgggatcca aacgcaagaa acgttaagaaa 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 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 OBPgpLYS 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

atggatcca aacgcaagaa acgttaagaaa 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 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
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
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
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 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 Arg Ser Lys

1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser Lys Arg 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 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 Arg Lys Arg Ser Lys			
1	5	10	15

Arg Lys Lys Arg Lys 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 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
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
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
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 Arg Lys

1 5 10 15

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
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 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

1 5 10 15

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

1 5 10 15
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> 71		
<211> 279		
<212> PRT		
<213> unknown		
<220><223> K16_pET32b		
<400> 71		
Ala Met Gly Ser Lys		
1	5	10
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
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 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 Arg 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 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 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
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
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

atggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaaag tattacgcaa ag 52

<210> 80

<211> 51

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer PKgp188 for

<400> 80

atggatcca aacgcaagaa acgttaagaaa 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