(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0133212
(43) 공개일자 2013년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/21 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01) *A61K 39/104* (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7015420
(22) 출원일자(국제) 2011년03월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년06월14일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/054127
(87) 국제공개번호 WO 2012/084272
국제공개일자 2012년06월28일
(30) 우선권주장
61/426,760 2010년12월23일 미국(US)

(71) 출원인
인터셀 오스트리아 아게
오스트리아, 비엔나 에이-1030, 캠퍼스 비엔나 바이오센터 3
(72) 발명자
클라데, 크리스토프
오스트리아, 비너 노이슈타트, 아-2700, 그뢰어뮐 가세 1비/17
슐레글, 로베르트
오스트리아, 지겐펠트, 아-2500, 로젠탈 63
베스트리슈니히, 케르스틴
오스트리아, 비엔나, 아-1190, 베가가세 16
(74) 대리인
강명구

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **입원 및 다른 환자에서 OprF/I 물질 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I (OprI 또는 OMPI)의 아미노 말단 단부가 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F (OprF 또는 OMPF)의 카르복시-말단 부분의 카르복시-말단 단부에 융합된 것을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 백신의 신규한 용도, 뿐만 아니라 이러한 융합 단백질 또는 이들의 약제학적 조성물에 대항하는 단일클론 또는 다클론 항체의 신규한 용도에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

인간의 사망률 감소에 사용하기 위한 OprF/I 물질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인간은 입원 환자, ICU 환자, 낭포성 섬유증 환자, 인공호흡기를 장착한 ICU 환자, 또는 화상 피해자로 이루어진 군에서 선택되는 물질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인간은 입원 환자, ICU 환자 또는 인공호흡기를 장착한 ICU 환자인 물질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 물질은 SEQ ID NO: 1의 세 가지 OprF/I 융합 단백질 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 가지는 이들의 면역성 변이체를 포함하는 단백질 복합체인 물질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 물질은 SEQ ID NO: 1의 세 가지 OprF/I 융합 단백질 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 가지는 이들의 면역성 변이체로 적어도 80% 이루어진 단백질 복합체인 물질.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, OprF/I 융합 단백질은 다음으로 이루어진 군에서 선택되는 물질

(a) Cys18-Cys27-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 11), 및

(b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 12), 및

(c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 13),

또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 가지고, (a), (b) 또는 (c)에 특정된 동일한 이황화 결합 패턴을 가지는 이들의 면역성 변이체.

청구항 7

제6항에 있어서, a) Cys18-Cys27-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 11), b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 12), 및 c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 13)의 합은 75% 이상인 물질.

청구항 8

제4항 또는 제5항에 있어서, OprF/I 융합 단백질은 다음으로 이루어진 군에서 선택되는 물질

(a) Cys18-Cys27-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 11), 또는

(b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 12), 또는

(c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 13),

또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 가지고, (a), (b) 또는 (c)에 특정된 동일한 이황화 결합 패턴을 가지는 이들의 면역성 변이체.

청구항 9

SEQ ID NO: 1의 세 가지 OprF/I 융합 단백질 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 가지는 이들의 면역성 변이체로 적어도 80% 이루어진 단백질 복합체인 물질을 포함하는 인간의 사망률 감소에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, OprF/I 융합 단백질은 다음으로 이루어진 군에서 선택되는 조성물

(a) Cys18-Cys27-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 11), 및/또는

(b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 12), 및/또는

(c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 13),

또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 가지고, (a), (b) 또는 (c)에 특정된 동일한 이황화 결합 패턴을 가지는 이들의 면역성 변이체.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 인간은 입원 환자, ICU 환자, 낭포성 섬유증 환자, 인공호흡기를 장착한 ICU 환자, 또는 화상 피해자로 이루어진 군에서 선택되는 조성물.

청구항 12

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 인간은 입원 환자, ICU 환자 또는 인공호흡기를 장착한 ICU 환자인 조성물.

청구항 13

제9항, 제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 조성물은 백신인 조성물.

청구항 14

인간에서 가령 예컨대 입원 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 약제학적 유효량의 OprF/I 물질을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 15

인간에서 사망률 감소에 사용하기 위한 OprF/I 물질을 표적으로 하는 항체 또는 그의 기능적 변이체.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I (본 명세서에서 또한"OprI" 또는 "OMPI"로 지칭됨)의 아미노 말단 단부가 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F (본 명세서에서 또한 "OprF" 또는 "OMPF"로 지칭됨)의 카르복시-말단 부분의 카르복시-말단 단부에 융합된 것을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 백신의 신규한 용도, 뿐만 아니라 이러한 융합 단백질 또는 이들의 약제학적 조성물에 대항하는 단일클론 또는 다클론 항체의 신규한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 발명의 배경

[0004] 원내 감염(nosocomial infection)은 병원 또는 보건의료 서비스 유닛에서 처리의 결과인 감염이다. 감염은 병원 입원 48시간 후 또는 퇴원 후 30일 이내에 일차 발생할 경우 원내 감염으로 간주된다. 이러한 유형의 감염은 병원-획득 감염 (또는, 일반적인 용어로, 보건의료-연관된 감염)으로서 공지되어 있다. 미국에서는, 미국 질병통제예방센터(Center for Disease Control and Prevention)는 박테리아를 비롯한 모든 유형의 미생물에 걸쳐 대략 1천7백만 병원-연관된 감염이, 매년 99,000건의 사망과 연계되거나, 원인이 되거나 이에 기여하는 것으로 추정하고 있다. 병원 설문조사가 실시된 바 있는 유럽에서, 그람-음성(Gram-negative) 감염의 범주는 매년 25,000건의 사망의 3분의 2에 대한 원인이 된다고 추정된다. 원내 감염은 중증 폐렴 및 요도, 혈류 및 신체의 다른 부분의 감염을 야기할 수 있다. 많은 유형은 항생제로 공격하기 어려우며, 항생제 내성이 병원 외부의 사람들에게

감염될 수 있는 그람-음성 박테리아에게 전파된다.

[0005] 그람-음성 박테리아에서, 지질다당류 (LPS) 및 외부-막 단백질이 박테리아 외피의 주요한 항원성 부분이다. LPS 기반 백신은 1970년대에 심도있게 연구되었다 (Priebe G, Pier G. Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa* 2003. New Bacterial vaccines, 편집 Ellis RW, Brodeur B. 260-82). Parke Davis는 7개 상이한 혈청군의 LPS로부터 백신 위유전자(Pseudogen)를 개발하였다. 위유전자를 이용한 비-무작위 연구에서 암 및 화상 환자에서는 일부 활성이 관찰되었지만 낭포성 섬유증 (CF) 및 백혈병 환자에서는 관찰되지 않았다. LPS 기반 위유전자는 매우 독성이었고 따라서 허가받지 못했다 (Priebe, 상기와 동일). Opr의 F 및 I의 두 가지 상이한 버전의 재조합 융합 단백질을 이용하여, von Specht 및 그의 동료들은, 둘다 LD50의 1000-배 초과의 과량 투여에 대해, 능동 면역화가 호중구 감소증 마우스를 보호할 수 있고 수동 면역화가 SCID 마우스를 보호할 수 있음을 확인하였다 (von Specht BU, Knapp B, Muth G et al. Protection of immunocompromised mice against lethal Infection with *Pseudomonas aeruginosa* by active or passive immunization with recombinant *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F and Outer membrane protein I fusion proteins. Infect Immun 1995; 63(5):1855-1862; Knapp B, Hundt E, Lenz U et al. A recombinant fusion outer membrane protein for vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine 1999; 17(13-14):1663-1666). 상기 융합 단백질은 이후 건강한 지원자에서 높은 수준의 특정 혈청 항체에 도달하는 안전성 및 면역원성에 대해 시험되었다. 낭포성 섬유증에서 증강된 점막의 면역원성을 얻기 위해 상기 융합 단백질의 에멀겔(emulgel) 제형이 개발되고 건강한 지원자 및 폐 손상 환자에서 안전성 및 면역원성에 대해 시험되었다. 그렇지만, 혈청 항체 반응은 비교적 낮았다. 전신성 면역 촉진제는 점막의 백신접종 스케쥴 단독에 비해 혈청 항체 반응을 증강시켰다.

[0006] 10-100 kDa 범위의 분자량을 갖는 4 가지 상이한 균주의 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)*으로 이루어진 외막 단백질 제제가 한국에서 백신으로 개발되었다. 상기 백신은 최소량의 다당류를 함유하고 화상 환자에서 이중-맹검, 위약-대조 실험으로 시험되었다 (Jang II, Kim IS, Park WJ, et al. Human immune response to a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine. Vaccine 1999; 17(2): 158-68). 백신 항원에 대한 항체 수준은 위약 군에서 2.3-배 (19명의 환자) 및 백신 군에서 4.9 배 (76명의 환자)까지 증가하였다 (Kim DK, Kim JJ, Kim JH et al. Comparison of two immunization schedules for a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins vaccine in burn patients. Vaccine 2001; 19(9-10):1274-83). Priebe 및 Pier는 상기 연구를 비판했는데, 연구에서 환자의 팔로우-업이 불완전했고, 분석은 치료의도적(intention-to-treat)이지 않았고, 임상적 결과와 관련한 데이터가 없었기 때문이다 (9). 유사한 Opr 백신을 러시아에서 10년 전에 시험하였다 (Stanislavsky ES, Balayan SS, Sergienko AI, et al. Clinico-immunological trials of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. Vaccine 1991;9(7):491-4). 세포-벽 단백질 보호 항원을 주로 함유하는 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 백신 (PV)을 119명 지원자의 면역화에 의해 안전성 및 면역원성에 대해 시험하였다. 상기 PV 백신은 잘 용인되었다. 높은 수준의 특정 항체가 5-달 기간의 관찰 동안 지속되었다. 항체 역가는 94-97%의 지원자에서 증가하였고 더욱이 45.6%에서 항체 역가 (ELISA 단위체의 수)는 2.5-3-배 이상 증가하였다. 항-*녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 혈장이 중증 유형의 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 감염된 46명의 환자 (40명의 성인 및 6명의 최대 2년생 영유아)의 치료를 위해 사용되었고 87%의 환자가 회복되었다. 1991년 이후에는 PV 백신을 이용한 어떠한 팔로우-업 연구도 존재하지 않는다.

[0007] 병원-획득 감염은 세계적으로 사망 및 심각한 질병의 주요 원인 중 하나이며, 선진국에서 2백억 초과의 미국 달러의 연간 비용 부담을 야기한다. 미국 및 유럽에서 매년 약 6백만 명의 환자가 감염되며 연간 140,000건의 사망을 야기한다. 원내 감염의 발생은 증가하는 의료 개입 및 항생제 내성으로 인해 꾸준히 증가하고 있다. 따라서, 예컨대 화상 피해자 및 섬유증 환자, ICU 환자 및 인공호흡기를 장착한 ICU 환자의 백신접종에 의한 병원 획득 감염을 통한 사망률 위험을 최소화하는 것은 상기 환자의 중요한 미충족된 의료적 수요이며, 더욱 더 그러하게 될 것으로 예상된다.

[0008] 본 발명에 따르면, 놀랍게도 아미노 말단 단부를 이용하여 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F (OprF 또는 OMPF)의 카르복시-말단 부분의 카르복시-말단 단부에 융합된 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I (OprI 또는 OMPI) 또는 이의 단편을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 백신, 및 특히 SEQ ID NO: 1의 융합 단백질을 포함하는 비-항원보강된 백신이 장치로 인공호흡기를 장착한 집중치료 환자에서 위약 대조에 비해 알룸(alum) 상에서 사망률을 상당하게 낮추었음이 발견되었다.

[0009] 장치로 인공호흡기를 장착한 집중치료 환자는 중증이고 흔히 생명을 위협하는 유형의 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 또는 다른 감염, 가령 인공호흡기(Ventilator)-연관된 폐렴 (VAP), 패혈증 또는 연조직 감염을 획득할 특수한 위험에 처해있다. 그러한 감염은 또한 화상 피해자, 중증 화상 피해자, 암 및 면역이 억제된 이식

환자, 및 낭포성 섬유증 환자, 집중치료 유닛 (ICU) 환자 또는 일반적으로는 모든 내원 환자에서 발병할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 발명의 요약

[0011] 놀랍게도, 본 발명자들은 OprI의 N-말단 단부가 OprF의 C-말단 부분 (예컨대 하기 정의된 바와 같음)에 연결된, 융합 단백질을 포함하는 비-항원보강된 백신(본 명세서에서 또한 "OprF/I 물질" 또는 "OprF/I 융합 단백질"로 지칭됨)이 장치로 인공호흡기를 장착한 집중치료 환자에서 위약 대조로서의 알룸 단독 치료보다 사망률을 상당하게 감소시킴을 발견하였다. 게다가, 상기 융합 단백질을 포함하는 알룸-항원보강된 백신은 또한 위약에 비해 감소된 사망률을 나타내었다.

과제의 해결 수단

[0012] 따라서, 본 발명의 특정한 발견에 따르면, 하기 내용이 제공된다:

[0013] 1.1 인공호흡기를 장착한 집중치료 유닛 환자 가령 장치로 인공호흡기를 장착한 집중치료 유닛 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0014] 1.2 낭포성 섬유증 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0015] 1.3 화상 피해자에서 가령 1도, 2도 또는 3도 화상 피해자, 바람직하게는 3도 화상 피해자에서 사망률을 감소시키는 방법이되, 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0016] 1.4 암 또는 면역억제된 이식 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0017] 1.5 집중치료 유닛 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0018] 1.6 입원 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0019] 1.7 48시간을 초과하는 장치적인 인공호흡을 필요로 하여 집중치료 유닛에 입원한 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0020] 1.8 수술받거나 수술받기로 예정된 인간 또는 비-인간 동물에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 인간 또는 비-인간 동물에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을, 바람직하게는 예정된 수술보다 적어도 2주 전에 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0021] 1.9 집중치료 유닛에 입원해야 하는 위험에 처한 인간 가령 위험한 스포츠(가령 베이스점핑, 번지점핑, 글라이딩, 행글라이딩, 고공줄타기, 스키점핑, 스카이다이빙, 스카이 서핑, 스카이 플라잉, 실내 암벽등반, 모험경주, 어그레시브 인라인 스케이팅, BMX, 동굴탐험, 익스트림 모토크로스, 익스트림 스키, 프리스타일 스키, 랜드 및 아이스 요트, 산악자전거, 산악보드, 암벽등반, 샌드보딩, 스테이트보딩, 스노우보딩, 스노우모빌, 스피드 바이크, 스피드 스키, 스쿠터, 맨발 워터스키, 암벽 다이빙, 자유-다이빙, 제트스키, 바다수영, 파워보트 레이싱, 라운드 더 월드 요트 레이싱, 스쿠버 다이빙, 스노클링, 스피드세일링, 서핑, 웨이크보드, 급류 카약,

윈드서핑)를 하는 인간에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 인간에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을, 바람직하게는 예정된 위험한 스포츠 시점보다 적어도 2주 전에 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0022] 1.10 인간에서, 특히 임의의 연령대, 예컨대 2세 이상의 인간에서 사망률을 감소시키는 방법이되, 상기 인간에 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법, 바람직하게는 여기서 상기 방법은 추가적으로 정기적인 촉진제 백신접종을 포함함;

[0023] 1.11 임의 종류의 감염을 갖는 인간에서 사망률을 감소시키는 방법이되, 상기 인간에 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법, 바람직하게는 여기서 상기 방법은 추가적으로 정기적인 촉진제 백신접종을 포함함;

[0024] 1.12 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, OprF/I 물질은 i) SEQ ID NO: 2, 3, 7 내지 10, 및 ii) SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 11 내지 13로 이루어진 폴리펩티드; 및 상기 폴리펩티드 또는 SEQ ID NO: 1을 표적으로 하는 항체 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되는 방법;

[0025] 1.13 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 약제학적 조성물은 백신인 방법;

[0026] 1.14 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 약제학적 조성물은 비-항원보강된 백신인 방법.

[0027] 1.15 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 1차 약물 물질 및 2차 약물 물질의 공동-투여를 포함하는 방법, 여기서 상기 1차 약물 물질은 유효량(가령 약제학적 유효량)의 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1을 포함하는 백신이고, 여기서 상기 2차 약물 물질은 유효량(가령 약제학적 유효량)의 항생제 가령 정맥 항생제 및 특히 사망 위험을 감소시키는 측면에서 환자, 인간, 또는 비-인간 동물의 상태를 향상시키는 다른 약물 물질로 이루어진 군에서 선택된 물질임;

[0028] 1.16 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 사망률은 100 미만인 방법.

[0029] 1.17 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 예컨대 ICU 환자에서, 바람직하게는 인공호흡기를 장착한 ICU 환자에서, 사망률은 95, 바람직하게는 90, 더 바람직하게는 85, 더 바람직하게는 80, 더 바람직하게는 75, 더 바람직하게는 70, 더 바람직하게는 65 미만, 더욱 더 바람직하게는 60 미만, 가장 바람직하게는 55 미만인 방법.

[0030] 1.18 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, OprF/I 물질은 SEQ ID NO: 1을 가지는 세 가지 OprF/I 물질, 또는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 특히 95% 동일성을 가지는 이들의 면역성 변이체를 포함하는 (또는 이들로 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 더 바람직하게는 90% 구성되는) 단백질 복합체인 방법;

[0031] 1.19 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, OprF/I 물질은

[0032] (a) Cys18-Cys27-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 11), 및

[0033] (b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 12), 및

[0034] (c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 13)로 이루어진 군에서 선택되거나,

[0035] 또는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 특히 95% 동일성을 가지고 (a), (b) 또는 (c)에 명시된 것과 동일한 이황화 결합을 가지는 이들의 면역성 변이체이고;

[0036] 바람직하게는 OprF/I 물질은 SEQ ID NO: 1을 가지는 세 가지 OprF/I 물질, 또는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 특히 95% 동일성을 가지는 이들의 면역성 변이체를 포함하는 단백질 복합체이고, a) Cys18-Cys27-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 11), b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 12), 및 c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 13)의 합은 75% 이상이다.

[0037] 적합한 2차 약물 물질은 예컨대 항생제 가령 i) 항균 화합물, 예컨대 페니실린, 세팔로스포린, 폴리믹신, 퀴놀론, 설폰아미드, 아미노글리코시드, 마크롤리드, 테트라사이클린, 답토마이신, 티제시클린, 리네졸리드; ii) 항진균 화합물, 예컨대 폴리엔 안티미코틱스, 나타마이신, 리모시딘, 필리핀, 니아스타틴, 암포테리신 B, 칸디신,

하마이신을 포함할 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용된 용어 "공동-투여" 또는 "병용 투여" 등은 선택된 요법 또는 예방 물질의 한 환자에 대한 투여를 포괄하는 것을 의미하며, 상기 물질이 반드시 동일한 투여의 경로에 의해 또는 동시에 투여되는 것이 아닌 치료 또는 예방 계획을 포함하는 것으로 의도된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도면의 간략한 설명

도 1: 충족된 면역원성에 대한 일차 종료점 - 연구 결과의 면역원성의 요약 (GMT: 기하 평균 역가)

도 2: 모든 백신 군에서 사망률 감소 vs. 위약. 알룸없는 100mcg로 면역화시킨 군에 대한 사망률의 통계적으로 유의한 감소 (제28일에 p = 0.0196)

도 3: 생존에 대한 OprF/I 역가의 유의한 예후 값. 항-OprF/I (SEQ ID NO: 1) IgG 역가는 제14일에 측정하였다. Cox 회귀 분석은 생존에 대한 OprF/I IgG 역가의 유의한 예후 값을 나타내었다 (p= 0.0336)

도 4: 감염된 환자에서 사망률 감소 vs 위약. 하위군 C (파선): 임의의 조사자를 갖는 환자는 전반적인 감염을 확인하였다. 하위군 D (실선): 임의의 조사자가 없는 환자는 전반적인 감염을 확인하였다

도 5는 본 발명에 따른 환원 및 제어된 재산화 공정을 개략적으로 도시한다.

도 6은 IMAC 상에서 발현 및 포획 후, 환원 후, 및 재산화/정제 후의 OprF/I 융합 단백질의 RP-HPLC 프로파일을 합성한 것을 나타낸다.

도 7은 IMAC 상에서 발현 및 포획 후, 및 재산화/정제 후의 OprF/I 융합 단백질의 SEC 프로파일을 합성한 것을 나타낸다.

도 8은 재산화된 IMAC/G50 풀(pool)의 RP-HPLC 분석을 나타낸다. 샘플은 300 분 및 21 시간 후에 분석하였다.

도 9는 pH 8.0 및 pH 2에서 OprF/I 융합 단백질 샘플의 SEC 분석 동안 체류 시간의 변화를 나타낸다.

도 10은 OprF/I 융합 단백질의 예시적인 제조 및 정제 공정의 흐름도를 나타낸다.

도 11은 선발된 QSHP 분획의 분취용 및 분석용 RP-HPLC 용리 프로파일을 나타낸다.

도 12는 OprF/I 융합 단백질의 피크 P1, P2 및 P3의 이황화 결합 패턴을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 발명의 상세한 설명

[0041] *정의:*

[0042] 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 숙련된 기술자에 의해 공통적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0043] 본 명세서에서 사용된 용어 "항체"는 전(whole) 항체 및 어느 한 항원 결합 단편 (즉, "항원-결합 부분") 또는 그의 단일 사슬을 포함한다. 자연 발생적 "항체"는 이황화 결합에 의해 서로-연결된 적어도 두 개의 중 (H) 사슬 및 두 개의 경 (L) 사슬을 포함하는 당단백질이다. 각각의 중사슬은 중사슬 가변 영역 (본 명세서에서 VH로 약기됨) 및 중사슬 불변 영역으로 이루어진다. 중사슬 불변 영역은 세 개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각각의 경사슬은 경사슬 가변 영역 (본 명세서에서 VL로 약기됨) 및 경사슬 불변 영역으로 이루어진다. 경사슬 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 이루어진다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)이라고 명명된, 더욱 보존된 영역과 교차된, 상보성 결정 영역 (CDR)이라고 명명된 초가변성 영역으로 더욱 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 다음의 순서로 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 배열된 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2. FR3. CDR3, FR4. 중 및 경사슬의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역 시스템의 다양한 세포 (예컨대, 효과기 세포) 및 전통적인 보체 시스템의 일차 성분 (C1q)을 비롯한 숙주 숙주 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 용어 항체의 "항원 결합 부분"은 주어진 항원 (예컨대, OprF/I 물질 또는 SEQ ID NO: 1)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 온전한 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 기능

은 온전한 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다. 용어 항체의 "항원 결합 부분" 내에 포괄되는 결합 단편의 예는 카멜화된 VH 또는 dAb 도메인으로 이루어진 일가 단편인 Fab 단편, 경첩 영역에서 이황화 결합에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편인 $F(ab)_2$ 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; VH 도메인 또는 VL 도메인으로 구성된 단일 도메인 항체 (dAb) 단편 (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546); 및 고립된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다.

[0045] 게다가, 비록 Fv 단편의 두 도메인인, VL 및 VH가 떨어져있는 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 재조합 방법을 이용하여, 단일 단백질 사슬로 만들어질 수 있게 하는 인공적 펩티드 링커에 의해 연결될 수 있고 여기서 VL 및 VH 영역은 쌍을 이뤄 일가 분자를 형성한다 (단일 사슬 Fv (scFv)로도 공지됨; 예컨대, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; 및 Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 65:5879-5883을 참조). 그러한 단일 사슬 항체는 하나 이상의 항체의 "항원 결합 부분"을 포함한다. 이들 항체 단편은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 수득되고, 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다. 항원 결합 부분은 또한 단일 도메인 항체, 맥시바디(maxibodies), 미니바디(minibodies), 인터바디(interbodies), 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies), 테트라바디(tetrabodies). v-NAR 및 비스-scFv 내로 포함될 수 있다 (예컨대, Hollinger 및 Hudson. 2005. Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136을 참조). 항체의 항원 결합 부분은 폴리펩티드 가령 피브로넥틴(Fibronectin) 타입 III (Fn3)를 기초로 하는 골격 내에 접합될 수 있다 (피브로넥틴 폴리펩티드 모노바디를 기술하는 미국 특허 제6.703.199호를 참조). 항원 결합 부분은 상보적인 경사슬 폴리펩티드와 함께, 항원 결합 영역의 쌍을 형성하는 탠덤(tandem) Fv 세그먼트 (VH-CHI-VH-CMI)의 쌍을 포함하는 단일 사슬 분자 내에 포함될 수 있다 (Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8(10): 1057- 1062; 및 미국 특허 제5,641,870호).

[0046] 본 명세서에서 사용된, 용어 "친화성"은 단일 항원성 위치에서 항체와 항원 사이의 상호작용의 강도를 지칭한다. 각각의 항원성 위치 내에서, 항체 "팔"의 가변 영역이 많은 위치에서 약한 비-공유적 힘을 통해 항원과 상호작용하며; 상호작용이 많을 수록, 친화성은 강해진다.

[0047] 본 명세서에서 사용된, 용어 "결합력"은 항체-항원 복합체의 전반적인 안정성 및 강도의 정보를 제공하는 정도를 지칭한다. 이것은 세 가지 주요 요인에 의해 제어된다: 항체 에피토프 친화성; 항원 및 항체 둘다의 원자가; 및 상호작용 부분의 구조적 배열. 궁극적으로 이들 요인들은 특정 항체가 정확한 항원 에피토프에 결합할 가능성인 항체의 특이성을 나타낸다.

[0048] 용어 "아미노산"은 자연 발생적 및 합성적 아미노산, 뿐만 아니라 자연 발생적 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 자연 발생적 아미노산은 유전적 코드에 의해 인코딩되는 것들, 뿐만 아니라 이후에 변형된 아미노산, 예컨대, 히드록시프롤린, y-카르복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연 발생적 아미노산과 동일한 기초 화학 구조를 가지는 화합물, 즉, 수소, 카르복실 기, 아미노 기, 및 R 기, 예컨대, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭사이드, 메티오닌 메틸 설포늄에 결합된 알파 탄소를 지칭한다. 그러한 유사체는 변형된 R 기 (예컨대 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 가지나, 자연 발생적 아미노산과 동일한 기초 화학 구조를 유지한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반적 화학 구조와 상이한 구조를 가지나, 자연 발생적 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물을 지칭한다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 용어 "결합 특이성"은 단 하나의 항원성 결정부위와만 반응하는 개별적인 항체 조합 위치의 능력을 지칭한다. 항체의 조합 위치는 분자의 Fab 부분에 위치하며 중 및 경 사슬의 초가변 영역으로 이루어진다. 항체의 결합 친화성은 항체에서 단일 항원성 결정부위와 단일 조합 위치 사이의 반응의 강도이다. 이것은 항원성 결정부위 및 항체의 조합 위치 사이에 작용하는 끌어당기고 밀어내는 힘의 합이다. 두 독립체 사이의 특이적 결합은 적어도 $1 \times 10^{7}\ M^{-1}$, $10^{8}\ M^{-1}$, $10^{9}\ M^{-1}$, $10^{10}\ M^{-1}$, $10^{11}\ M^{-1}$, $10^{12}\ M^{-1}$, $10^{13}\ M^{1}$의 평형상수 (KA)를 갖는 결합을 의미한다. 문구 항체 (예컨대, OprF/I 물질-결합 항체)에 "특이적으로 (또는 선별적으로) 결합하는"은 예컨대 단백질 및 다른 화합물의 여러 다양한 집단 내에서 항원 (예컨대, OprF/I 물질)의 존재를 확인해주는 결합 반응을 가리킨다. 상기 언급된 평형상수 (KA) 이외에, 본 발명의 OprF/I 물질-결합 항체는 전형적으로 또한 약 $1 \times 10^{-2}\ s^{-1}$, $1 \times 10^{'3}\ s^{-1}$, $1 \times 10^{4}\ s^{-1}$, $1 \times 10^{'4}\ s^{-1}$, 또는 그 이하의 해리 속도 상수 (Kd)를 가지며, 비-특이적 항원에 대한 결합을 위한 친화성보다 적어도 10-배, 바람직하게는 100-배, 또는 최대 1000-배 또는 그 이상인 친화성을 가지고 OprF/I 물질(들)에 결합한다. 문구 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 대해 특이적인 항체"는 본 명세서에서 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 상호교환적으로 사용된다.

[0050] 본 명세서에서 사용된, 용어 "개체"는 인간 또는 비-인간 동물 중 어느 하나를 포함한다.

[0051] 용어 "비-인간 동물"은 모든 비인간 척추동물, 예컨대 포유류 및 비-포유류, 가령 비인간 영장류, 설치류, 토끼, 양, 개, 고양이, 말, 소, 새, 양서류, 파충류, 등을 포함한다.

[0052] 용어 "키메라 항체"는 (a) 불변 영역, 또는 그의 부분이, 변화, 교체 또는 교환되어서 항원 결합 위치 (가변 영역)가 상이하거나 변화된 부류, 효과기 기능 및/또는 종, 또는 완전히 상이한 분자의 불변 영역과 연결되어 키메라 항체에 신규한 특성, 예컨대 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물, 등이 부여되거나; 또는 (b) 가변 영역, 또는 그의 부분이 상이한 또는 변화된 항원 특이성 가변 영역으로 변화, 교체 또는 교환된 항체분자이다. 예를 들면, 마우스 항체는 그의 불변 영역을 인간 면역글로불린으로부터의 불변 영역으로 대체함으로써 변형될 수 있다. 인간 불변 영역을 이용하여 대체됨으로 인해, 상기 키메라 항체는 원래의 마우스 항체에 비해 인간에서 감소된 항원성을 가지는 반면 항원을 인식하는 그의 특이성은 보유할 수 있다.

[0053] 용어 "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘다에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산, 또는 핵산이 아미노산 서열을 인코딩하지 않는 경우에는, 본질적으로 동일한 서열을 지칭한다. 유전적 코드의 퇴화로 인해, 많은 수의 기능적으로 동일한 핵산이 임의의 주어진 단백질을 인코딩한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 인코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 구체화되는 모든 위치에서, 상기 코돈은 인코딩된 폴리펩티드를 변화시키지 않고 기술된 상응하는 코돈 중 어느 하나로 변화될 수 있다. 그러한 핵산 변이는 보존적으로 변형된 변이의 한 종류인 "잠재성 변이(silent variation)"이다. 본 명세서에서 폴리펩티드를 인코딩하는 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 잠재성 변이를 기술한다. 당업자는 핵산 내 각각의 코돈 (본래 메티오닌을 위한 유일한 코돈인 AUG, 및 본래 트립토판을 위한 유일한 코돈인 TGG는 제외)이 변형되어 기능적으로 동일한 분자를 얻을 수 있음을 알 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 각각의 잠재성 변이는 각각의 기술된 서열 내에 내포된다.

[0054] 폴리펩티드 서열에 있어서, "보존적으로 변형된 변이체"는 폴리펩티드 서열에 대한 개별적인 치환, 결실 또는 삽입을 포함하고 이는 한 아미노산의 화학적으로 유사한 아미노산으로의 치환을 야기한다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 그러한 보존적으로 변형된 변이체는 본 발명의 다형성 변이체, 종간 상동체, 및 대립유전자에 더하여 존재하며 이들을 배제하지 않는다. 다음의 여덟 개 군은 다른 하나에 대해 보존적 치환인 아미노산을 내포한다: 1) 알라닌 (A), 글리신 (G); 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); 4) 아르기닌 (R), 리신 (K); 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M) (예컨대 Creighton. Proteins (1984)를 참조). 일부 구체예에서, 용어 "보존적 서열 변형"은 그 아미노산 서열을 내포하는 항체의 결합 특징에 중요한 영향을 끼치거나 이를 변형시키지 않는 아미노산 변형을 지칭하기 위해 사용된다.

[0055] 용어 "교차-차단", "교차-차단된" 및 "교차-차단하는"은 본 명세서에서 표준 경쟁 결합 어세이에서 임의의 OprF/I 물질에 대한 다른 항체 또는 결합 물질의 결합을 방해하는 항체 또는 다른 결합 물질의 능력을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0056] 항체 또는 다른 결합 물질이 OprF/I 물질에 대한 또다른 항체 또는 결합 분자의 결합을 방해할 수 있고, 그러므로 본 발명에 따라 교차-차단한다고 지칭될 수 있는 능력 또는 정도는 표준 경쟁 결합 어세이를 이용하여 측정할 수 있다. 한 적합한 어세이는 Biacore 기술 (예컨대 BIAcore 3000 장비 (Biacore, Uppsala, Sweden)를 이용함)의 사용을 포함하며, 이는 표면 플라스몬 공명 기술을 이용하여 상호작용의 정도를 측정할 수 있다. 교차-차단을 측정하기 위한 또다른 어세이는 ELISA-기반 접근법을 사용한다.

[0057] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정부위를 의미한다. 에피토프는 보통 분자 가령 아미노산 또는 당 곁사슬의 화학적으로 활성인 표면 그룹으로 이루어지며 보통 특정한 삼차원적 구조적 특징, 뿐만 아니라 특정한 하전 특징을 갖는다. 입체구조적 및 비입체구조적 에피토프는 변성 용매의 존재에서 전자에 대한 결합은 손실되지만 후자에 대해서는 손실되지 않는 점에서 구별된다.

[0058] 본 명세서에서 사용된, 용어 IgG 항체 또는 이의 단편 (예컨대, Fab 단편)에 대한 "고 친화성"은 표적 항원에 대해 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 또는 10^{-10} M, 또는 10^{-11} M 이하, 또는 10^{-12} M 이하, 또는 10^{-13} M 이하의 KD를 갖는 항체를 가리킨다. 그렇지만, "고 친화성" 결합은 다른 항체 이소타입에 잇어서 달라질 수 있다. 예를 들면, IgM 이소타입에 대한 "고 친화성" 결합은 10^{-7} M 이하, 또는 10^{-8} M 이하의 KD를 갖는 항체를 가리킨다. 한 양태에서, 본 명세서에 기술된 항-OprF/I 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 1nM 이하, 바람직하게는 200 pM

이하, 더 바람직하게는 100 pM 이하, 및 더욱 더 바람직하게는 10 pM 이하의 KD를 갖는다.

[0059] 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역이 둘다 인간 유래의 서열에서 유래된 가변 영역을 가지는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 게다가, 항체가 불변 영역을 함유할 경우, 불변 영역은 또한 인간 서열 가령, 예컨대, 인간 생식세포 서열, 또는 인간 생식세포 서열의 돌연변이 버전으로부터 유래된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 서열에 의해 인코딩되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다 (예컨대, 시험관 내 무작위 또는 위치-특정 돌연변이생성 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이).

[0060] 용어 "인간 단일클론 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역이 둘다 인간 서열로부터 유래된 가변 영역을 가지고 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 가리킨다. 한 구체예에서, 인간 단일클론 항체는 불멸화 세포에 융합된 인간 중사슬 전이유전자 및 경사슬 전이유전자를 포함하는 유전체를 가지는 형질전환 비인간 동물, 예컨대, 형질전환 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 제조된다.

[0061] "인간화된" 항체는 비-인간 항체의 반응성을 보유하는 반면 인간에서 덜 면역성인 항체이다. 이것은 예를 들면, 비-인간 CDR 영역을 유지하고 항체의 나머지 부분을 이의 인간 상대부분 (즉, 불변 영역뿐만 아니라 가변 영역의 프레임워크 부분)으로 교체함으로써 달성될 수 있다. 예컨대 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6851-6855, 1984; Morrison 및 Oi. Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536. 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498. 1991; 및 Padlan. Molec. Immun., 31:169-217, 1994를 참조하라. 인간 생명공학 기술의 다른 예는 US 5,766,886에 개시된 Xoma 기술을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 문맥에서, 용어 "동일한" 또는 백분율 "동일성"은 둘 이상의 서열 또는 하위서열이 동일한 것을 가리킨다. 하기의 서열 비교 알고리즘 중 하나를 이용하여 또는 수동 나열 및 시각적 관찰에 의해 관찰하여 비교 창 또는 지정된 영역에 걸쳐 최대 상응도에 대해 비교하고 나열한 경우, 두 서열이 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 특정된 백분율을 가지는 경우 (즉, 특정한 영역에 걸쳐, 또는, 특정되지 않은 경우, 전체 서열에 걸쳐 60% 동일성, 임의로 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%. 또는 99% 동일성), 두 서열은 "실질적으로 동일하다". 임의로, 동일성은 적어도 약 50 뉴클레오티드 (또는 10 아미노산) 길이인 영역에 걸쳐, 또는 더 바람직하게는 100 내지 500 또는 1000 이상의 뉴클레오티드 (또는 20, 50, 200 이상의 아미노산) 길이인 영역에 걸쳐 존재한다.

[0063] 서열 비교를 위해, 전형적으로 한 서열은 검사 서열이 비교되는 기준 서열로서 기능한다. 서열 비교 알고리즘을 이용하는 경우, 검사 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요한 경우, 하위서열 좌표를 지정하고, 그리고 서열 알고리즘 프로그램 변수를 지정한다. 디폴트 프로그램 변수를 사용할 수 있거나, 대안적 변수를 지정할 수 있다. 서열 비교 알고리즘은 이후 상기 프로그램 변수를 기초로 하여, 기준 서열에 비교한 검사 서열에 대해 백분율 서열 동일성을 계산한다. 본 명세서에서 사용된 "비교 창"은 20 내지 600. 보통 약 50 내지 약 200, 더욱 보통 약 100 내지 약 150로 이루어진 군에서 선택된 임의의 한 갯수의 인접한 위치의 세그먼트에 대한 기준을 포함하며 여기서 서열은 두 서열이 최적으로 나열된 후 동일한 갯수의 인접한 위치의 기준 서열에 대해 비교될 수 있다. 비교를 위한 서열의 나열 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 나열은, 예컨대, Smith 및 Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c의 위치 상동성 알고리즘에 의해, Needleman 및 Wunsch, J. MoI. Biol. 48:443, 1970의 상동성 나열 알고리즘에 의해, Pearson 및 Lipman. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988의 유사성 연구 방법에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터 응용법 (Wisconsin Genetics Software Package 내의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, Genetics Computer Group. 575 Science Or., Madison. WI)에 의해, 또는 수동 나열 및 시각적 관찰에 의해 (예컨대 Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)을 참조) 수행될 수 있다. 백분율 서열 동일성 및 서열 유사성을 측정하기 위해 적합한 알고리즘의 두 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이며, 이들은 각각 Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; 및 Altschul et al., J. MoI. Biol. 215:403-410, 1990에 기술되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개되어 있어 입수가 가능하다. 상기 알고리즘은 테이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어를 이용하여 나열된 경우 일부 양의-값의 임계 점수 T에 들어맞거나 이를 충족하는, 쿼리 (query) 서열에서 길이 W의 짧은 단어를 인식함으로써 고득점 서열쌍 (HSP)을 일차 인식하는 단계를 포함한다. T는 이웃 단어 점수 임계값으로 지칭된다 (Altschul et al., 상기와 동일). 이들 초기 이웃 단어 히트(hit)는 이들을 내포하는 더 긴 HSP를 찾기 위한 최초 서칭을 위한 실마리로서 기능한다. 상기 단어 히트는 누적 나열 점수가 증가될 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양쪽 방향으로 연장된다. 누적 점수는 뉴클레오티드 서열에 있어서, 변수 M (부합하는 잔기의 쌍에 대한 득점; 항상 > 0) 및 N (부합하지 않는 잔기에 대한 실점; 항상 < 0)을

이용하여 계산된다. 아미노산 서열에 있어서, 채점표가 누적 점수를 계산하기 위해 사용된다. 각 방향으로의 단어 히트의 연장은 다음의 경우에 중지된다: 누적 나열 점수가 그의 최대 득점 값으로부터 X 수량 만큼 떨어질 경우; 하나 이상의 음의-득점 잔기 나열의 누적으로 인해 누적 점수가 제로 또는 그 이하로 떨어지는 경우; 또는 어느 한 서열의 끝에 도달한 경우. BLAST 알고리즘 변수 W, T, 및 X는 나열의 감응성 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램은 (뉴클레오티드 서열에 있어서) 디폴트로서 11의 단어 길이 (W), 10의 예상치 (E), M=5, N=-4 및 양쪽 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열에 있어서, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 단어길이, 및 10의 예상치 (E), 및 50의 BLOSUM62 채점표 (Henikoff 및 Henikoff, Proc. Natl. Acad Sci. USA 89:10915, 1989를 참조) 나열 (B), 10의 예상치 (E), M=5, N=-4, 및 양쪽 가닥의 비교를 사용한다. BLAST 알고리즘은 또한 두 서열 사이의 유사성의 통계적인 분석을 수행한다 (예컨대 Karlin 및 Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993를 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 한 척도는 최소 합계 가능성 (P(N))이며, 이는 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 매칭이 우연에 의해 일어날 가능성의 지표를 제공한다. 예를 들면, 핵산은 기준 핵산에 대한 검사 핵산의 비교에서 최소 합계 가능성이 약 0.2 미만, 더 바람직하게는 약 0.01 미만, 및 가장 바람직하게는 약 0.001인 경우 기준 서열과 유사한 것으로 간주된다. 두 아미노산 서열 사이의 백분율 동일성은 또한 PAM120 가중 잔기 표, 12의 간극 길이 실점 및 4의 간극 실점을 이용하여 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)으로 통합된, E. Meyers 및 W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, 1988)의 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또한, 두 아미노산 서열 사이의 백분율 동일성은 Blosum62 채점표 또는 PAM250 채점표, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 간극 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 가중치를 이용하는 GCG 소프트웨어 패키지 (www.gcg.com에서 입수가능) 내의 GAP 프로그램으로 통합된 Needleman 및 Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 상기 언급된 서열 동일성의 백분율 이외에, 두 핵산 서열 또는 폴리펩티드가 실질적으로 동일하다는 또다른 지표는 하기 기술되는 바와 같이 첫 번째 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩티드가 두 번째 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩티드에 대해 생성된 항체와 면역적으로 교차반응성인 것이다 따라서, 예를 들면, 두 펩티드가 단지 보존적 치환에 의해서만 상이한 경우 폴리펩티드는 전형적으로 두 번째 폴리펩티드와 실질적으로 동일하다. 두 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또다른 지표는 하기 기술되는 바와 같이, 두 분자 또는 이들의 상보체가 엄격한 조건 하에서 서로 혼성화되는 것이다. 실질적으로 동일하다는 또다른 지표는 동일한 프라이머가 서열을 증폭하기 위해 사용될 수 있는 것이다.

[0064] 용어 "고립된 항체"는 상이한 항원성 특이성을 가지는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 가리킨다 (예컨대, OprF/I 물질에 특이적으로 결합하는 고립된 항체는 임의의 OprF/I 물질 외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). OprF/I 물질에 특이적으로 결합하는 고립된 항체는 그렇지만, 다른 항원에 대해 교차-반응성을 가질 수 있다. 게다가, 고립된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

[0065] 용어 "이소타입"은 중사슬 불변 영역 유전자에 의해 제공된 항체 클래스 (예컨대, IgM, IgE, IgG 가령 IgG1 또는 lgG4)를 지칭한다. 이소타입은 또한 이들 클래스 중 하나의 변형된 버전을 포함하며, 여기서 상기 변형은 Fc 기능을 변화시키기 위해, 예를 들면, 효과기 기능 또는 Fc 수용체에 대한 결합을 향상시키거나 감소시키기 위해 실시된 것이다.

[0066] 본 명세서에서 사용된, 용어 "Kassoc" 또는 "Ka"는 특정 항체-항원 상호작용의 결합속도를 지칭하는 것으로 의도되는 반면에, 본 명세서에서 사용된 용어 "Kdis" 또는 "Kd"는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도를 지칭하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "K_0"는 Kd 대 Ka (즉 Kd/Ka)의 비로부터 얻어진 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도되며 몰 농도 (M)로서 표현된다. 항체에 대한 K_0 값은 당해 분야에 널리 확립된 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 항체의 K_0를 측정하기 위한 한 방법은 표면 플라스몬 공명, 또는 바이오센서 시스템 가령 Biacore® 시스템을 이용하는 것이다.

[0067] 본 명세서에서 사용된 용어 "단일클론 항체" 또는 "단일클론 항체 조성물"은 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 지칭한다. 단일클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타낸다.

[0068] 용어 "핵산"은 본 명세서에서 용어 "폴리뉴클레오티드'와 상호교환적으로 사용되며 단일- 또는 이중-가닥 형태인 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이들의 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며, 기준 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사된 합성적, 자연 발생적, 및 비-자연 발생적인 공지의 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 백본 잔기 또는 결합을 내포하는 핵산을 포괄한다. 그러한 유사체의 예는 비제한적으로, 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산 (PNA)를 포함한다. 달리 명시되지 않은 한, 특정 핵산 서열은 또한 암묵적으로 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예컨대, 변성 코돈 치환) 및 상보적인 서열, 뿐만 아니라 명시적으로

지시된 서열을 포괄한다. 구체적으로, 하기 설명되는 바와 같이, 변성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다 (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19.5081. 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem 260:2605-2608, 1985; 및 Rossolini el. al., MoI. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

[0069] 용어 "작동가능하게 연결된"은 둘 이상의 폴리뉴클레오티드 (예컨대, ONA) 세그먼트 사이의 기능적 관계를 지칭한다. 전형적으로, 이는 전사 조절 서열의 전사된 서열에 대한 기능적 관계를 지칭한다. 예를 들면, 프로모터 또는 인핸서 서열은 이것이 적절한 숙주 세포 또는 다른 발현 시스템에서 코딩 서열의 전사를 촉진하거나 조절하는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 전사된 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 전사 조절 서열은 전사된 서열에 물리적으로 인접해 있으며, 즉, 이들은 시스-작용성(cis-acting)이다. 그러나, 일부 전사 조절 서열, 가령 인핸서는 이들이 전사를 촉진하는 코딩 서열에 물리적으로 인접하거나 가까이 위치할 필요가 없다.

[0070] 본 명세서에서 사용된, 용어, "최적화된"은 뉴클레오티드 서열이 생산 세포 또는 생물, 일반적으로 진핵 세포, 예를 들면, 피치아(Pichia), 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary) 세포 (CHO) 또는 인간 세포의 세포에서 선호되는 코돈을 이용하는 아미노산 서열을 인코딩하도록 변형된 것을 의미한다. 최적화된 뉴클레오티드 서열은 또한 "부모" 서열이라고 공지되는 출발하는 뉴클레오티드 서열에 의해 원래 인코딩되던 아미노산 서열을 완전히 또는 가능한한 많이 보유하도록 조작된다. 본 명세서의 최적화된 서열은 포유류 세포에서 선호되는 코돈을 가지도록 조작되었다. 그렇지만, 다른 진핵 세포 또는 원핵 세포에서 이들 서열의 최적화 발현이 또한 본 명세서에서 고려된다. 최적화된 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 아미노산 서열 또한 최적화된 것으로 지칭된다.

[0071] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생적 아미노산의 인공적 화학적 모방체인 것, 뿐만 아니라 자연 발생적 아미노산 중합체 및 비-자연 발생적 아미노산 중합체인 아미노산 중합체에 적용된다. 달리 명시되지 않은 한, 특정 폴리펩티드 서열은 또한 암묵적으로 이들의 보존적으로 변형된 변이체를 포괄한다.

[0072] 본 명세서에서 사용된 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체, 가령 인간 면역글로불린 유전자 또는 이로부터 제조되는 하이브리도마를 위해 형질전환 또는 염색체전환(transchromosomal)된 동물 (예컨대, 마우스)로부터 단리된 항체, 인간 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예컨대, 형질주입종으로부터 단리된 항체, 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 인간 면역글로불린 유전자, 서열 내지 다른 DNA 서열 중 전부 또는 한 부분의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체는 프레임워크 및 CDR 영역이 인간 생식세포 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는다. 특정 구체예에서, 그러나, 그러한 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이생성 (또는, 인간 Ig 서열을 위한 동물 형질전환이 사용된 경우, 생체 내 체세포 돌연변이생성)을 겪을 수 있고 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식세포 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 연관되지만, 생체 내 인간 항체 생식세포 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다

[0073] 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 단순히 "숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭한다. 상기 용어가 특정 개체 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손까지 지칭하는 것으로 의도됨이 이해되어야 할 것이다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 이어지는 세대에 특정한 변형이 일어날 수 있기 때문에, 그러한 자손은 실제로는 부모 세포와 동일할 수 없지만, 여전히 본 명세서에서 사용된 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 포함된다.

[0074] 용어 "개체"는 인간 및 비-인간 동물을 포함한다. 비-인간 동물은 모든 척추동물, 예컨대, 포유류 및 비-포유류, 가령 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 및 파충류를 포함한다. 언급된 경우를 제외하고, 용어 "환자" 또는 "개체"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0075] 용어 "치료하는"은 질환 (예컨대, 낭포성 섬유증) 또는 감염의 증상, 합병증, 또는 생물화학적 지표의 발병을 예방 또는 지연하기 위해 (가령 예컨대 ICU 환자 또는 입원 환자에서 감염을 예방 또는 지연 또는 달리 본 명세서에서 기술된 바와 같이) 조성물 가령 백신 또는 항체를 포함하는 조성물을 투여하여, 증상을 완화하거나 질환, 용태, 또는 장애의 추가적인 발달을 중지 또는 저해하는 것을 포함한다. 치료는 예방적 (질환의 발병을 예방 또는 지연하는 것, 또는 그의 임상적 또는 준임상적 증상의 나타남을 예방하는 것) 또는 치료적 억제 또는 질환이 나타난 후에 증상의 경감일 수 있다.

[0076] 용어 "벡터"는 이것에 연결된 또다른 폴리뉴클레오티드를 전달할 수 있는 폴리뉴클레오티드 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"이고, 이것은 추가적인 DNA 세그먼트가 연결될 수 있는 환형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 벡터의 또다른 유형은 바이러스 벡터, 가령 아데노-연관된 바이러스 벡터 (AAV, 또는 AAV2)이고, 여기서 추가적인 DNA 세그먼트 바이러스 유전체에 연결될 수 있다. 특정한 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자가 복제가 가능하다 (예컨대, 박테리아 복제 시작점을 가지는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 다른 벡터 (예컨대, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포로의 도입 시 숙주 세포의 유전체 내에 끼어들어갈 수 있고, 이를 통해 숙주 유전체와 함께 복제된다. 게다가, 특정한 벡터는 이들이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 그러한 벡터는 본 명세서에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히, "발현 벡터")라고 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 흔히 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, 플라스미드가 벡터의 가장 흔하게 사용되는 형태이기 때문에 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그렇지만, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는 그러한 발현 벡터의 다른 형태, 가령 바이러스 벡터 (예컨대, 복제결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관된 바이러스)를 포함하는 것으로 의도된다.

[0077] 용어 "백신"은 특정한 집단의 사람에서 특정 감염 및/또는 질환에 대한 면역성을 향상시키는 생물학적 제제를 의미한다. 백신은 전형적으로 질환-유발성 미생물과 유사한 물질을 함유하며, 약화되거나 사균된 형태의 미생물 또는 그의 독소로부터 제조되거나 여러가지 그러한 성분의 단편 또는 융합물이다. 상기 물질은 신체의 면역 시스템이 그 물질을 외부물질로 인식, 파괴하고, 이것을 "기억"하도록 촉진하여, 따라서 면역 시스템은 이후에 상대하게 되는 임의의 이들 미생물을 더 쉽게 식별하고 파괴할 수 있다. 백신은 예방적 (예컨대 임의의 자연적 또는 "야생" 병원체에 의한 미래의 감염의 효과를 예방 또는 개선하는 것), 또는 치료적일 수 있다 (예컨대 암, 낭포성 섬유증을 갖는 사람들, 또는 면역억제된 이식받은 사람들에 대한 백신이 치료적으로 처리될 수 있다).

[0078] 용어 본 발명의 OprF/I 물질의 "약제학적 유효량" 또는 "약제학적으로 허용되는 양"은 본 명세서에서 기술된 바와 같이 환자에서 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위해, 예컨대 본 명세서에서 기술된 바와 같이 환자 또는 인간에서 사망률을 감소시키기 위해 요구되거나 충분한 양이다. 유효량은 개체의 크기 및 체중, 질병의 유형, 또는 본발명의 특정 OprF/I 물질과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 OprF/I 물질의 선택은 "약제학적 유효량"을 구성하는데 영향을 줄 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 본 명세서에 포함된 요인들을 연구할 수 있고 다수의 실험 없이도 본 발명의 화합물의 유효량에 대한 결정을 내릴 수 있을 것이다.

[0079] 용어 "mcg"는 마이크로그램과 동의어이다.

[0080] 용어 "사망률"은 본 발명의 문맥에서 어떤 집단에서 (일반적으로, 또는 특정한 요인으로 인한) 단위 시간당 상기 집단의 크기에 대비한 사망의 수의 척도를 의미한다. 본 발명의 실험 단락은 예컨대 ICU (0 제0일)에 도착부터 ICU에서의 제28일까지 (본 명세서에서 또한 제28일 사망률로 지칭됨) 기간 동안 인공호흡기를 장착한 ICU 환자의 집단에서의 사망률, 즉 사망의 수를 기술한다.

[0081] 용어 "사망 위험" 또는 단순히 "사망률"은 본 발명의 문맥에서 상이한 연구 또는 환자 그룹에서 사망률의 비교 척도를 얻기 위해 측정을 표준화하기 위한 비율 계산을 의미한다. 요약하면, 사망 위험 또는 사망률은 위약 대조 환자에서의 사망률 대비 약물치료 환자(예컨대 OprF/I 치료 환자군)에서의 사망률의 비 곱하기 백, 즉 사망 위험 (사망률) = 약물치료군의 사망률/위약군의 사망률 (X100)이다. 사망률이 100과 거의 동일할 경우 = 약물치료 및 위약군 사이에 차이 없음; 사망률이 100 초과인 경우 = 사망률이 위약군보다 약물치료군에서 더 높음; 사망률이 100 미만인 경우 = 사망률이 위약군보다 약물치료군에서 더 낮음.

[0082] *본 발명의 OprF/I 물질:*

[0083] 본 발명은 본 명세서에서 추가로 기술되는 바와 같이 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I (전장 외막 단백질 I, 또한 Opr I = SEQ ID NO: 5로 지칭됨)을 포함하는 융합 단백질의 용도에 관한 것이며 상기 단백질은 그의 아미노-말단 단부가 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F ((전장 외막 단백질 F, 또한 Opr F = SEQ ID NO: 6로 지칭됨) 가령 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 그의 변이체의 카르복시-말단 부분의 카르복시-말단 단부에 융합된 것이다(SEQ ID NO: 1 및 그의 변이체는 또한 본 명세서에서 "OprF/I 물질" 또는 "OprF/I 물질들"로 지칭된다).

[0084] 바람직한 양태에서, 상기 융합 단백질은 자연적인 OprF 단백질 (SEQ ID NO: 3)의 아미노산 190 내지 아미노산 342 서열을 갖는 외막 단백질 F의 카르복시 말단 부분 또는 자연적인 OprI 단백질 (SEQ ID NO: 4)의 아미노산 21 내지 아미노산 83 서열을 갖는 외막 단백질 I의 아미노-말단 단부에 융합된 자연적인 OprF 단백질 (SEQ ID

NO: 2)의 아미노산 190 내지 아미노산 350 서열을 갖는 외막 단백질 F의 카르복시 말단 부분을 포함한다. 본 발명의 추가적인 바람직한 양태에서, 상기 융합 단백질은 가령 예컨대 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 내에 Ala-$(His)_6$ 태그를 포함한다.

[0085] 추가적인 양태에서 OprF/I 물질은 본 명세서에서 특정된 임의의 서열, 가령 SEQ ID NO: 1-13, 특히 SEQ ID NO: 1의 변이체로 이루어지거나 이들을 포함할 수 있다. 한 구체예에서 이것은 기능적 활성 변이체이고 및/또는 상기 특정된 서열에 대해 적어도 50% 서열 동일성, 특히 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 더 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 99% 서열 동일성을 갖는다. 변이체는 이것이 원래 유래된 서열의 생물학적 활성을 나타내는 경우, 특히 상기 변이체의 활성이 서열 변화없는 서열의 활성의 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 25%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 80%, 특히 적어도 90%, 특히 적어도 95%, 가장 바람직하게는 적어도 99%에 달하는 경우에, 기능적 활성 변이체로 간주된다. 활성은 "실험 단락" 또는 상응하는 동물 연구에서 기술되는 바와 같이 시험될 수 있다.

[0086] 따라서, OprF/I 물질은 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I을 포함하거나 이것으로 이루어지고 그의 아미노-말단 단부가 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F의 카르복시-말단 부분의 카르복시-말단 단부에 융합된 융합 단백질인 것을 특징으로 할 수 있고, 특히

[0087] (i) 여기서 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I은 전장 외막 단백질 I; 특히 SEQ ID NO: 5이고;

[0088] (ii) 여기서 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F는 전장 외막 단백질 F, 특히 SEQ ID NO: 6이고;

[0089] (iii) 여기서 OprF/I 물질은 i) SEQ ID NO: 2, 3, 7 내지 10, 및/또는 ii) SEQ ID NO: 4를 포함하거나 이들로 이루어지고;

[0090] (iv) 여기서 OprF/I 물질은 SEQ ID NO: 1로 이루어지거나 이들을 포함하고;

[0091] (v) 여기서 OprF/I 물질은 상기 폴리펩티드 또는 SEQ ID NO: 1을 표적으로 하는 항체 또는 이의 단편으로 이루어지거나 이들을 포함하고;

[0092] (vi) 여기서 OprF/I 물질은 기능적 활성 변이체이고 및/또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 50% 서열 동일성, 특히 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 더 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 90%, 심지어 더 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 99% 서열 동일성을 가지고;

[0093] (vii) 여기서 OprF/I 물질은 자연적인 OprF 단백질 (SEQ ID NO: 3)의 아미노산 190 내지 아미노산 342 서열을 갖는 외막 단백질 F의 카르복시 말단 부분 또는 자연적인 OprF 단백질 (SEQ ID NO: 2)의 아미노산 190 내지 아미노산 350서열을 갖는 외막 단백질 F의 카르복시 말단 부분을 포함하고;

[0094] (viii) 여기서 OprF/I 물질은 자연적인 OprI 단백질 (SEQ ID NO: 4)의 아미노산 21 내지 아미노산 83 서열을 갖는 외막 단백질 I의 아미노-말단 단부를 포함하고;

[0095] (ix) 여기서 OprF/I 물질은 자연적인 OprF 단백질 (SEQ ID NO: 3)의 아미노산 190 내지 아미노산 342 서열을 갖는 외막 단백질 F의 카르복시 말단 부분 또는 자연적인 OprI 단백질 (SEQ ID NO: 4)의 아미노산 21 내지 아미노산 83 서열을 갖는 외막 단백질 I의 아미노-말단 단부에 융합된 자연적인 OprF 단백질 (SEQ ID NO: 2)의 아미노산 190 내지 아미노산 350 서열을 갖는 외막 단백질 F의 카르복시 말단 부분을 포함하거나 이들로 이루어지고; 및/또는

[0096] (x) 여기서 상기 융합 단백질은 가령 예컨대 SEQ ID NO: 1, 11 내지 13의 OprF/I 물질 내에 Ala-$(His)_6$ 태그를 포함한다.

[0097] 본 발명은 추가로 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I을 포함하고 그의 아미노-말단 단부가 녹농균 (Pseudomonas aeruginosa) 외막 단백질 OprF의 카르복시-말단 부분의 카르복시-말단 단부에 융합된 융합 단백질의 용도에 관한 것이며, 여기서 상기 카르복시-말단 부분은 하나 이상의 표면-노출된 B-세포 에피토프 SEE 1, SEE 2, SEE 3 및 SEE 4를 포함한다. 이들 B-세포 에피토프는 OprF의 다음의 아미노산 (aa) 자리에 위치한다: SEE 1=aa 212-240 (SEQ ID NO: 7), SEE 2=aa 243-256 (SEQ ID NO: 8), SEE 3=aa 285-298 (SEQ ID NO: 9) 및 SEE 4=aa 332-350 (SEQ ID NO: 10) (Hughes et al. (1992), Infect. Immun. 60, pp. 3497-3503를 참조).

[0098] 본 발명의 또다른 양태는 본 명세서에서 추가로 기술되는 바와 같이 적어도 하나의 상기-언급된 융합 단백질을

포함하는 약제학적 조성물의 용도이다.

[0099] 본 발명의 또다른 양태는 본 명세서에서 추가로 기술되는 바와 같이 적어도 하나의 상기-언급된 융합 단백질을 포함하는 백신의 용도이다.

[0100] 더욱이, 본 발명은 본 명세서에서 추가로 기술되는 바와 같이 하나 이상의 상기 융합 단백질을 표적으로 하는 단일클론 또는 다클론 항체의 용도에 관한 것이다. 이들 항체는 또한 예컨대 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)*에 의한 감염에 대하여 개체에 수동적 보호를 제공하기 위해 약제학적 조성물에서 사용될 수 있고 따라서 본 명세서에서 추가로 기술되는 바와 같이 급성 세팅(setting)에서 사용하기에 유용하며 처방될 수 있다.

[0101] 상기 OprF/I 물질 및 이들을 제조하는 방법은 또한 예컨대 항원에 대해 EP717106, Von Specht et al. Infection and Immunity, May 1995, p. 1855-1862)에서 및 본 명세서의 실험 단락에서 기술되어 있다. 요약하면, 상기 OprF/I 물질은, 원핵- 또는 진핵 세포에서 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산의 발현을 유도하는 단계를 포함하는 공정에 따라 제조될 수 있다. OprF/I 물질 가령 예컨대 SEQ ID NO: 1은 예컨대 주사가능한 (가령 근육내 또는 정맥내, 바람직하게는 근육내 투여를 위해) 수산화 알루미늄 (400 mcg)이 있거나 없는 생리적 식염수용액 (0,81% 부피당 중량) 내에 100 mcg의 용량으로 제형화될 수 있다. 일단 구체적인 항원이 공지되면 항체의 제조는 당해 분야에 널리 공지되어 있고 예컨대 완전히 인간인 항체의 제조와 생산의 경우에 WO2008055795 및 WO04102198에 기술된 바와 같은 방법에 따라 실시될 수 있다.

[0102] 상기 설명을 참조하여, 본 발명의 특히 바람직한 구체예는 OprF/I 융합 단백질의 혼합물, 특히 복합체이고 상기 각각의 OprF/I 융합 단백질은 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F의 부분을 그의 카르복시 말단 단부가 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I의 아미노 말단 단부의 부분에 융합된 것을 포함하고, 여기서 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F의 상기 부분은 자연적인 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F의 아미노산 190-342를 포함하고 여기서 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I의 상기 부분은 자연적인 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I의 아미노산 21-83을 포함하고, 각각의 OprF/I 융합 단백질은 Ala-$(His)_6$-N-말단을 내포하며, 상기 혼합물은 다음을, 특히 삼량체의 형태로 포함한다,

[0103] (a) Cys18-Cys27-결합만을 가지는 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 11),

[0104] (b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합을 가지는 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 12), 및/또는

[0105] (c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합을 가지는 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 13).

[0106] 상기 아미노산 번호는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열에 따른 것이다. 상기 혼합물의 순도는 바람직하게는 RP-HPLC로 측정하여 혼합물의 전체 단백질 함량에 비하여 적어도 약 75%, 바람직하게는 적어도 약 80% 내지 약 90%, 특히 적어도 약 85%, 예컨대 75% 내지 90% 또는 85% 내지 90%이다.

[0107] 상기 설명된 바와 같이, 본 발명의 특정한 장점은 OprF/I 융합 단백질이 바람직하지 않은 응집물, 특히 고 분자량 응집물을 형성하지 않고, 바람직하게는 삼량체를 형성하는 점이다. 흥미롭게도, OprF/I 융합 단백질 삼량체는 동그란 모양이 아니라 길다란 모양을 가지며, 특히 5.6 nm의 스톡스-반경(Stokes-radius)으로 계산되는 높은 유체역학적 반경을 갖는다. 삼량체는 예컨대 생리적 조건 하에서 가령 예컨대 약 7인 pH 및 실온에서 용액 내에서 안정하였고, 즉 어떠한 해리도 관찰되지 않았다.

[0108] 그러므로, 본 발명의 또다른 양태는 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F의 부분을 그의 카르복시 말단 단부가 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I의 아미노 말단 단부의 부분에 융합된 것을 포함하는 삼량체 OprF/I 융합 단백질, 여기서 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F의 상기 부분은 자연적인 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F의 아미노산 190-342를 포함하고 여기서 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I의 상기 부분은 자연적인 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I의 아미노산 21-83을 포함함, 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 특히 95% 동일성을 가지는 이들의 면역성 변이체이다.

[0109] 바람직하게는 삼량체 OprF/I 융합 단백질은 상기 설명된 것과 동일한 이황화 결합을 보유한다. 또한, 삼량체 OprF/I 융합 단백질(들)은 상기 설명된 것과 같이 혼합물 내에 존재할 수 있다.

[0110] *본 발명의 OprF/I 물질에 관한 신규하고 독창적인 용도:*

[0111] 본 발명의 특정한 발견에 따르면, 다음의 신규하고 독창적인 방법 및/또는 용도가 제공된다:

[0112] 1.1 인공호흡기를 장착한 집중치료 유닛 환자 가령 장치로 인공호흡기를 장착한 집중치료 유닛 환자에서 사망률

을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0113] 1.2 낭포성 섬유증 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0114] 1.3 화상 피해자에서 가령 1도, 2도 또는 3도 화상 피해자, 바람직하게는 3도 화상 피해자에서 사망률을 감소시키는 방법이되, 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0115] 1.4 암 또는 면역억제된 이식 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0116] 1.5 집중치료 유닛 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0117] 1.6 입원 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0118] 1.7 48시간을 초과하는 장치적인 인공호흡을 필요로 하여 집중치료 유닛에 입원한 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0119] 1.8 수술받거나 수술받기로 예정된 인간 또는 비-인간 동물에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 인간 또는 비-인간 동물에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을, 바람직하게는 예정된 수술보다 적어도 2주 전에 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0120] 1.9 집중치료 유닛에 입원해야 하는 위험에 처한 인간 가령 위험한 스포츠 (가령 베이스점핑, 번지점핑, 글라이딩, 행글라이딩, 고공줄타기, 스키점핑, 스카이다이빙, 스카이 서핑, 스카이 플라잉, 실내 암벽등반, 모험경주, 어그레시브 인라인 스케이팅, BMX, 동굴탐험, 익스트림 모토크로스, 익스트림 스키, 프리스타일 스키, 랜드 및 아이스 요트, 산악자전거, 산악보드, 암벽등반, 샌드보딩, 스테이트보딩, 스노우보딩, 스노우모빌, 스피드 바이크, 스피드 스키, 스쿠터, 맨발 워터스키, 암벽 다이빙, 자유-다이빙, 제트스키, 바다수영, 파워보트 레이싱, 라운드 더 월드 요트 레이싱, 스쿠버 다이빙, 스노클링, 스피드세일링, 서핑, 웨이크보드, 급류 카약, 윈드서핑)를 하는 인간에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 인간에게 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을, 바람직하게는 예정된 위험한 스포츠 시점보다 적어도 2주 전에 투여하는 단계를 포함하는 방법;

[0121] 1.10 인간에서, 특히 임의의 연령대, 예컨대 2세 이상의 인간에서 사망률을 감소시키는 방법이되, 상기 인간에 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법, 바람직하게는 여기서 상기 방법은 추가적으로 정기적인 촉진제 백신접종을 포함함;

[0122] 1.11 임의 종류의 감염을 갖는 인간에서 사망률을 감소시키는 방법이되, 상기 인간에 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량(가령 약제학적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법, 바람직하게는 여기서 상기 방법은 추가적으로 정기적인 촉진제 백신접종을 포함함;

[0123] 1.12 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, OprF/I 물질은 i) SEQ ID NO: 2, 3, 7 내지 10, 및 ii) SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 11 내지 13로 이루어진 폴리펩티드; 및 상기 폴리펩티드 또는 SEQ ID NO: 1을 표적으로 하는 항체 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되는 방법;

[0124] 1.13 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 약제학적 조성물은 백신인 방법;

[0125] 1.14 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 약제학적 조성물은 비-항원보강된 백신인 방법.

[0126] 1.15 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 1차 약물 물질 및 2차 약물 물질의 공동-투여를 포함하는 방법, 여기서 상기 1차 약물 물질은 유효량(가령 약제학적 유효량)의 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1을 포함하는 백신이고, 여기서 상기 2차 약물 물질은 유효량(가령 약제학적 유효량)의 항생제 가령 정맥 항생제 및 특히 사망 위험을 감소시키는 측면에서 환자, 인간, 또는 비-인간 동물의 상태를 향상시키는 다른 약물 물질로 이루어진 군에서 선택된 물질임;

[0127] 1.16 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 사망률은 100 미만인 방법.

[0128] 1.17 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 예컨대 ICU 환자에서, 바람직하게는 인공호흡기를 장착한 ICU 환자에서, 사망률은 95, 바람직하게는 90, 더 바람직하게는 85, 더 바람직하게는 80, 더 바람직하게는 75, 더 바람직하게는 70, 더 바람직하게는 65 미만, 더욱 더 바람직하게는 60 미만, 가장 바람직하게는 55 미만인 방법.

[0129] 1.18 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, OprF/I 물질은 SEQ ID NO: 1을 가지는 세 가지 OprF/I 물질, 또는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 특히 95% 동일성을 가지는 이들의 면역성 변이체를 포함하는 (또는 이들로 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 더 바람직하게는 90% 구성되는) 단백질 복합체인 방법;

[0130] 1.19 상기 정의된 바와 같은 방법에 있어서, 상기 단백질 복합체는

[0131] (a) Cys18-Cys27-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 11), 및

[0132] (b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 12), 및

[0133] (c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 13)로 이루어진 군에서 선택된 OprF/I 물질,

[0134] 또는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 특히 95% 동일성을 가지고 (a), (b) 또는 (c)에 명시된 것과 동일한 이황화 결합을 가지는 이들의 면역성 변이체를 포함하고;

[0135] 바람직하게는 a) Cys18-Cys27-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 11), b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 12), 및 c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합을 갖는 SEQ ID NO: 1의 OprF/I 물질 (SEQ ID NO: 13)의 합은 75% 이상임.

[0136] 적합한 2차 약물 물질은 예컨대 항생제 가령 i) 항균 화합물, 예컨대 페니실린, 세팔로스포린, 폴리믹신, 퀴놀론, 설폰아미드, 아미노글리코시드, 마크롤리드, 테트라시클린, 답토마이신, 티제시클린, 리네졸리드; ii) 항진균 화합물, 예컨대 폴리엔 안티미코틱스, 나타마이신, 리모시딘, 필리핀, 니아스타틴, 암포테리신 B, 칸디신, 하마이신; iii) 1차 물질의 OprF/I 물질이 항원인 경우에는 본 명세서에 정의된 바와 같은 OprF/I를 표적으로 하는 항체를 포함할 수 있다.

[0137] 본 명세서에서 사용된 용어 "공동-투여" 또는 "병용 투여" 등은 선택된 요법 또는 예방 물질의 한 환자에 대한 투여를 포괄하는 것을 의미하며, 상기 물질이 반드시 동일한 투여의 경로에 의해 또는 동시에 투여되는 것이 아닌 치료 또는 예방 계획을 포함하는 것으로 의도된다.

[0138] 상기의 대안으로서 본 발명은 또한 다음을 제공한다:

[0139] 2. 상기 1.1 내지 1.19 하에 정의된 바와 같은 임의의 방법에서 사용하기 위한 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1; 또는

[0140] 3. 상기 1.1 내지 1.19 하에 정의된 바와 같은 임의의 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물의 제조에서 사용하기 위한 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1; 또는

[0141] 4. 상기 1.1 내지 1.19 하에 정의된 바와 같은 임의의 방법에서 사용하기 위해 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1을 포함하는 약제학적 조성물.

[0142] 5. 1 다음을 포함하는 약제학적 조합:

[0143] a) OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1을 포함하는 백신인 1차 물질, 여기서 상기 백신은 임의로 비-항원보강됨,

및

[0144] b) 항균 또는 항진균 화합물인, 예컨대 상기 개시된 바와 같은 보조-물질.

[0145] 5.2 다음을 포함하는 약제학적 조합:

[0146] a) OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1을 표적으로 하는 항체 또는 이의 단편인 1차 물질, 및

[0147] b) 항균 또는 항진균 화합물인, 예컨대 상기 개시된 바와 같은 보조-물질.

[0148] 본 명세서에서 사용된 용어 "약제학적 조합"은 하나 초과의 활성 성분의 혼합 또는 조합으로 산출된 생성물을 의미하며 활성 성분의 고정된 및 비-고정된 조합을 모두 포함한다. 용어 "고정된 조합"은 활성 성분, 예컨대 OprF/I 물질 및 보조-물질이 둘다 단일 독립체 또는 투여물의 형태로 동시에 환자에게 투여되는 것을 의미한다. 용어 "비-고정된 조합"은 활성 성분, 예컨대 OprF/I 물질 및 보조-물질이 둘다 동시에, 함께 또는 특정한 시간 제한 없이 순서대로 분리된 독립체로서 환자에게 투여되는 것을 의미하며, 여기서 그러한 투여는 환자의 체내에 2 화합물의 치료적으로 유효한 수준을 제공한다.

[0149] OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1의 효용성은, 단독 또는 본 명세서에 또는 다른 곳에 기술되는 다른 약물 물질과 조합되어, 적합한 군 가령 입원 환자, 낭포성 섬유증 환자, ICU 환자, 장치로 인공호흡기를 장착한 ICU 환자, 화상 피해자 가령 중증 화상 환자, 암 및/또는 면역억제되었거나 면역억제될 이식 환자, 수술받거나 받게 될 인간 또는 비-인간 동물, 예컨대 본 명세서에서 상기 명시된 바와 같은 동물에서 사망률의 감소에 있어서, 동물 시험 방법뿐만 아니라 추가적인 임상적 실험에서, 예를 들면 이하에서 실험 단락에 기술된 방법에 따라 더욱 증명될 수 있다.

[0150] 백신을 포함하는 본 발명의 약제학적 조성물은 널리 공지된 및 당해 분야에서 일상적으로 실시되는 방법에 따라 제조될 수 있다 (예컨대 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co. 20th ed. 2000; 및 Ingredients of Vaccines - Fact Sheet from the Centers for Disease Control and Prevention을 참조, 예컨대 백신의 능력이 향상되도록 돕는 어쥬번트 및 인핸서 가령 알룸, 백신이 변하지 않게 돕는 보존제 및 안정화제 (예컨대 알부민, 페놀, 글리신)). 약제학적 조성물은 바람직하게는 GMP 조건 하에서 제조된다. 전형적으로 약제학적으로 효과적인 용량의 OprF/I 물질이 본 발명의 약제학적 조성물에 사용된다. OprF/I 물질은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 통상적인 방법에 의해 약제학적으로 허용되는 투여 형태로 제형화된다. 투여 계획은 최적의 바람직한 반응 (예컨대 치료적 또는 예방적 반응)을 제공하기 위해 조정된다. 예를 들면, 두 단위 투여 형태가 예컨대 백신의 경우 투여될 수 있거나 (가령 실험 단락의 백신, 즉 SEQ ID NO: 1을 포함하는 백신), 여러 나뉘어진 용량 (예컨대 항체 조성물의 경우)이 시간에 걸쳐 투여될 수 있거나 또는 투여량이 치료 상황의 긴급성에 의해 지시되는 대로 부분적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 투여량의 획일성을 위해 투여 단위 형태의 비경구 조성물로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본 명세서에서 사용된 투여 단위 형태 (예컨대 SEQ ID NO: 1의 100 mcg 단위 형태)는 치료받을 개체를 위한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 요망되는 약제학적 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 OprF/I 물질을 필요한 약제학적 담체 또는 부형제와 함께 함유한다.

[0151] 본 발명의 약제학적 조성물 내 활성 성분의 실제 투여 수준은 환자에게 독성이지 않고 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 요망되는 약제학적 반응을 얻기에 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위하여 달라질 수 있다. 선택된 투여 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여의 경로, 투여의 시간, 사용되는 특정 화합물의 방출 속도, 치료의 기간, 사용된 특정 조성물과 조합되어 사용된 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 용태, 일반 건강 및 이전 병력, 및 유사 요인을 비롯한 다양한 약동학적 요인에 의존적이다.

[0152] 의사 또는 수의사는 약제학적 조성물 내에 사용된 본 발명의 OprF/I 물질의 용량을 요망되는 치료적 효과를 얻기 위해 요구되는 것보다 더 적은 수준에서 출발하여 요망되는 효과가 성취될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 효과적인 용량은, 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 사람들의 그룹의 예방적 및 치료적 처리를 위해, 투여 수단, 표적 위치, 환자의 생리적인 상태, 환자가 인간인지 동물인지, 투여받는 다른 의약, 및 처리가 예방적인지 치료적인지 여부를 비롯한 많은 상이한 요인에 따라 달라진다. 치료제 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 적정되어야 한다. OprF/I 물질 가령 본 발명의 백신 또는 항체를 전신에 투여하기 위해, 투여량은 숙주 체중의 약 0.01 내지 100 mcg/kg, 및 더 일반적으로는 1 내지 15 mcg/kg 범위이다. 예시적인 투여 계획은 예컨대 백신에 있어서 두 번 또는 한 번 또는 항체 처리에 있어서 매 두 주에 한 번 또는 한 달에 한 번 또는 매 3 내지 6 달에 한번의 전신 투여를 수반한다. 예시적인 투여 계획은

100 mcg SEQ ID NO: 1 및 물 내 0,81% 부피당 중량 NaCl으로 이루어진 백신에 있어서 제0일 및 제7일에 두 번인 전신 투여를 수반한다.

[0153] 본 발명의 추가적인 양태에서, 본 발명은 다음의 약제학적 조성물을 제공한다:

[0154] 1.1. 인공호흡기를 장착한 집중치료 유닛 환자 가령 장치로 인공호흡기를 장착한 집중치료 유닛 환자에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0155] 1.2 낭포성 섬유증 환자에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0156] 1.3 화상 피해자에서 가령 1도, 2도 또는 3도 화상 피해자, 바람직하게는 3도 화상 피해자에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0157] 1.4 암 또는 면역억제된 이식 환자에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0158] 1.5 집중치료 유닛 환자에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0159] 1.6 입원 환자에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0160] 1.7 48시간을 초과하는 장치적인 인공호흡을 필요로 하여 집중치료 유닛에 입원한 환자에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0161] 1.8 수술받거나 수술받기로 예정된 인간 또는 비-인간 동물에서 사망률을 감소시키는데 바람직하게는 예정된 수술보다 적어도 2주 전에 사용하기 위한, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0162] 1.9 집중치료 유닛에 입원해야 하는 위험에 처한 인간 가령 위험한 스포츠 (가령 베이스점핑, 번지점핑, 글라이딩, 행글라이딩, 고공줄타기, 스키점핑, 스카이다이빙, 스카이 서핑, 스카이 플라잉, 실내 암벽등반, 모험경주, 어그레시브 인라인 스케이팅, BMX, 동굴탐험, 익스트림 모토크로스, 익스트림 스키, 프리스타일 스키, 랜드 및 아이스 요트, 산악자전거, 산악보드, 암벽등반, 샌드보딩, 스테이트보딩, 스노우보딩, 스노우모빌, 스피드 바이크, 스피드 스키, 스쿠터, 맨발 워터스키, 암벽 다이빙, 자유-다이빙, 제트스키, 바다수영, 파워보트 레이싱, 라운드 더 월드 요트 레이싱, 스쿠버 다이빙, 스노클링, 스피드세일링, 서핑, 웨이크보드, 급류 카약, 윈드서핑)를 하는 인간에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, 바람직하게는 예정된 위험한 스포츠 시점보다 적어도 2주 전에 투여되는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0163] 1.10 인간에서, 특히 임의의 연령대, 예컨대 2세 이상의 인간에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0164] 1.11 임의 종류의 감염을 갖는 인간에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1 및 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물;

[0165] 1.12 상기 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 있어서, OprF/I 물질은 i) SEQ ID NO: 2, 3, 7 내지 10, 및 ii) SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 11 내지 13로 이루어진 폴리펩티드; 및 상기 폴리펩티드 또는 SEQ ID NO: 1을 표적으로 하는 항체 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되는 약제학적 조성물;

[0166] 1.13 상기 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 있어서, 약제학적 조성물은 백신인 약제학적 조성물;

[0167] 1.14 상기 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 있어서, 약제학적 조성물은 비-항원보강되거나 적어로 알룸으로 항원보강되지 않은 백신인 약제학적 조성물.

[0168] 1.15 상기 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 있어서, 1차 약물 물질 및 2차 약물 물질의 공동-투여를 포

함하는 약제학적 조성물, 여기서 상기 1차 약물 물질은 유효량(가령 약제학적 유효량)의 본 명세서에서 기술된 바와 같은 OprF/I 물질, 예컨대 SEQ ID NO: 1을 포함하는 백신이고, 여기서 상기 2차 약물 물질은 유효량(가령 약제학적 유효량)의 항생제 가령 정맥 항생제 및 특히 사망 위험을 감소시키는 측면에서 환자, 인간, 또는 비-인간 동물의 상태를 향상시키는 다른 약물 물질로 이루어진 군에서 선택된 물질임;

[0169] 1.16 상기 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 있어서, 사망률은 100 미만인 약제학적 조성물.

[0170] 1.17 상기 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 있어서, 예컨대 ICU 환자에서, 바람직하게는 인공호흡기를 장착한 ICU 환자에서, 사망률은 95, 바람직하게는 90, 더 바람직하게는 85, 더 바람직하게는 80, 더 바람직하게는 75, 더 바람직하게는 70, 더 바람직하게는 65 미만, 더욱 더 바람직하게는 60 미만, 가장 바람직하게는 55 미만인 약제학적 조성물.

[0171] 항체 조성물은 보통 여러 번에 걸쳐 투여된다. 단일 투여 사이의 간격은 매주, 매달 또는 매년일 수 있다. 간격은 또한 환자에서 항체의 혈중 수준에 의해 나타나는 대로 비정기적일 수 있다. 전신성 투여의 일부 방법에서, 투여량은 1-1000 μg/ml 및 일부 방법에서는 25-500 μg/ml의 혈장 항체 농도를 얻기 위해 조정된다. 대안적으로, 항체는 덜 빈번한 투여가 요구되는 경우에 서방출 제형으로서 투여될 수 있다. 투여량 및 빈도는 환자에서 항체의 반-감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 키메라 항체 및 비인간 항체보다 더 긴 반감기를 나타낸다. 투여량 및 투여의 빈도는 치료가 예방적인지 치료적인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적 적용에 있어서, 비교적 적은 용량이 긴 기간에 걸쳐 비교적 덜 빈번한 간격으로 투여된다. 일부 환자는 그들의 일생 내내 치료를 계속 받는다. 치료적 적용에 있어서는, 질환의 진행이 감소되거나 중단될 때까지, 바람직하게는 환자가 질환의 증상의 부분적 또는 완전한 완화를 나타낼 때까지 비교적 짧은 간격으로 비교적 높은 투여량이 일부 경우에 요구된다.

[0172] 표 1: 서열

SEQ ID NO:	대안적 명칭(들)	아미노산 서열
1	Ala-(His)6-OprF190-342 - OprI21-83	AHHHHHHAPAPEPVADVCSDSDNDGVCDNVDKCPDTPANVTVD ANGCPAVAEVVRVQLDVKFDFDKSKVKENSYADIKNLADFMKQ YPSTSTTVEGHTDSVGTDAYNQKLSERRANAVRDVLVNEYGVEG GRVNAVGYGESRPVADNATAEGRAINRRVESSHSKETEARLTATE DAAARAQARADEAYRKADEALGAAQKAQQTADEANERALRML EKASRK
2	OprF190-350	APAPEPVADVCSDSDNDGVCDNVDKCPDTPANVTVDANGCPAV AEVVRVQLDVKFDFDKSKVKENSYADIKNLADFMKQYPSTSTTV EGHTDSVGTDAYNQKLSERRANAVRDVLVNEYGVEGGRVNAVG YGESRPVADNATAEGRAINRRVEAEVEAEAK
3	OprF190-342	APAPEPVADVCSDSDNDGVCDNVDKCPDTPANVTVDANGCPAV AEVVRVQLDVKFDFDKSKVKENSYADIKNLADFMKQYPSTSTTV EGHTDSVGTDAYNQKLSERRANAVRDVLVNEYGVEGGRVNAVG YGESRPVADNATAEGRAINRRVE
4	OprI21-83	SSHSKETEARLTATEDAAARAQARADEAYRKADEALGAAQKAQ QTADEANERALRMLEKASRK
5	OprI, NP_251543	MNNVLKFSALALAAVLATGCSSHSKETEARLTATEDAAARAQAR ADEAYRKADEALGAAQKAQQTADEANERALRMLEKASRK
6	OprF, NP_250468	MKLKNTLGVVIGSLVAASAMNAFAQGQNSVEIEAFGKRYFTDSV RNMKNADLYGGSIGYFLTDDVELALSYGEYHDVRGTYETGNKK VHGNLTSLDAIYHFGTPGVGLRPYVSAGLAHQNITNINSDSQGRQ QMTMANIGAGLKYYFTENFFAKASLDGQYGLEKRDNGHQGEWM AGLGVGFNFGGSKAAPAPEPVADVCSDSDNDGVCDNVDKCPDTP ANVTVDANGCPAVAEVVRVQLDVKFDFDKSKVKENSYADIKNL ADFMKQYPSTSTTVEGHTDSVGTDAYNQKLSERRANAVRDVLVN EYGVEGGRVNAVGYGESRPVADNATAEGRAINRRVEAEVEAEAK
7	OprF212-240	NVDKCPDTPANVTVDANGCPAVAEVVRVQL
8	OprF243-256	KFDFDKSKVKENSY
9	OprF285-298	TDAYNQKLSERRAN
10	OprF332-350	EGRAINRRVEAEVEAEAK
11	Ala-(His)6-OprF190-342 - OprI21-83, 잔기 18-27 사이의 이황화 결합 (둘다 볼드)	AHHHHHHAPAPEPVADV**C**SDSDNDGV**C**DNVDKCPDTPANVTVD ANGCPAVAEVVRVQLDVKFDFDKSKVKENSYADIKNLADFMKQ YPSTSTTVEGHTDSVGTDAYNQKLSERRANAVRDVLVNEYGVEG GRVNAVGYGESRPVADNATAEGRAINRRVESSHSKETEARLTATE DAAARAQARADEAYRKADEALGAAQKAQQTADEANERALRML EKASRK
12	Ala-(His)6-OprF190-342 - OprI21-83, 잔기 18-27 (둘다	AHHHHHHAPAPEPVADV**C**SDSDNDGV**C**DNVDK*C*PDTPANVTVD ANG*C*PAVAEVVRVQLDVKFDFDKSKVKENSYADIKNLADFMKQ YPSTSTTVEGHTDSVGTDAYNQKLSERRANAVRDVLVNEYGVEG GRVNAVGYGESRPVADNATAEGRAINRRVESSHSKETEARLTATE DAAARAQARADEAYRKADEALGAAQKAQQTADEANERALRML EKASRK

[0173]

	볼드) 및 33-47 (둘다 이탤릭) 사이의 이황화 결합	
13	Ala-(His)6-OprF190-342 - OprI21-83, 잔기 18-47 (둘다 볼드) 및 27-33 (둘다 이탤릭) 사이의 이황화 결합	AHHHHHHAPAPEPVADVCSDSDNDGVCDNVDKCPDTPANVTVD ANGCPAVAEVVRVQLDVKFDFDKSKVKENSYADIKNLADFMKQ YPSTSTTVEGHTDSVGTDAYNQKLSERRANAVRDVLVNEYGVEG GRVNAVGYGESRPVADNATAEGRAINRRVESSHSKETEARLTATE DAAARAQARADEAYRKADEALGAAQKAQQTADEANERALRML EKASRK

[0174]

[0175] 본 발명의 실험 파트

[0176] 약어

약어	설명
AUC	분석용 초원심분리
CV	컬럼 부피
DTT	디티오트레이톨
DV	정용여과 부피
DS	약물 물질
ED50	50% 혈청전환 비율을 도출하는 샘플의 희석의 역수
EGT	유로젠텍(Eurogentec)
gDNA	유전체 DNA
GMT	기하 평균 역가
GSH	환원된 글루타티온
GSSG	산화된 글루타티온
HCP	숙주 세포 단백질
HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
ICLL	인터셀(Intercell)
IMAC	고정화 금속 친화성 킬레이트 크로마토그래피

[0177]

MALDI-ToF	매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 질량 분석기-비행 시간
MALS	다각도 광산란
ß-ME	베타-메르캅토에탄올
PAGE	폴리아크릴아미드겔 전기영동
QSHP	Q-세파로스 HP
RP	역상
RT	실온 (약 20℃)
SCD	침강 계수 분산
SEC	크기 배제 크로마토그래피
UF/DF	한외여과/정용여과

[0178]

[0179] A. 재료

[0180] 일반 재료

[0181] NaOH (Riedel-de Haen), NaCl (Riedel-de Haen), 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (Merck KGaA, Darmstadt), L-시스틴 (Aldrich), DTT (Sigma), HCl (Merck KGaA), Q-세파로스® HP (GE 보건의료), DEAE-세파로스® FF (GE 보건의료). 모든 다른 재료는 달리 언급되지 않는 한 분석용 등급이었다.

[0182] 배합 완충액: 둘베코(Dulbecco's) 1x PBS pH 7.4 (H15-002), 1x 농축액 (g/L)

[0183] KCl 0.2 g/L

[0184] KH_2PO_4 0.2 g/L

[0185] NaCl 8.0 g/L

[0186] Na_2HPO_4 무수 1.15 g/L

[0187] 약물 물질

[0188] 임상 연구를 위해 사용된 약물 물질은 OprF/I 물질 Ala-(His)6 -OprF 190-342 - OprI 21-83 단백질 (= SEQ ID NO: 1)이다: 융합 단백질 구조체는 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)*의 두 외막 단백질, N-말단 His 6 태그를 갖는 OprF 및 OprI의 에피토프: Met-Ala-(His)6 -OprF 190-342 - OprI 21-83 단백질로 이루어진다. 이것은 *E. coli*에서 224 AA 융합 단백질로서 재조합 발현된다. N-말단 Met은 발현 후 절단된다. 아미노산 A-1 (A) 내지 아미노산 160-E 범위의 His 6 태그를 포함하는 N-말단 OprF 단편이, OprI 단편 뒤의 위치 161 내지 223에 이어진다. 출발 물질 (즉 연관 DNA 구조체)의 구성, Ala-(His)6 -OprF 190-342 - OprI 21-83 단백질의 발현 및 정제 그리고 3개의 이황화 결합 패턴 변이체를 포함하는 그의 삼량체 형태이성질체가 아래에서 더욱 기술된다.

[0189] 일반 방법

[0190] 단백질 샘플의 환원

[0191] OprF/I 융합 단백질 샘플을 달리 언급되지 않는 한 β-메르캅토에탄올 (2.5% v/v 최종 부피, 대략 360 mM 최종 농도)을 이용하여 환원시켰다. 이황화 결합의 완전한 환원을 확실하게 하기 위해 샘플을 실온에서 20 내지 30분간 항온처리하였다.

[0192] RP-HPLC

[0193] 하위 개발 작업에 있어서 IMAC/G50 내 특정 OprF/I 함량의 추정치가 단계 수율을 계산하기 위해 필요하였다. OprF/I 함량은 RP-HPLC에 의해 측정하였다. HPLC 시스템을 정제된, 자연의 (환원안된) OprF/I 상용 표준으로 보정하였다. 상용 표준의 단백질 함량은 $\varepsilon_{0.1\%}$=0.373의 1 mg/mL 용액에 대한 계산된 이론적 흡광 계수를 기초로 하여 UV 280 nm 측정에 의해 측정하였다. RP-HPLC에 의한 IMAC/G50 풀의 분석 전에, 한 분취액에 DTT 또는 β-메르캅토에탄올 (100 mM 최종 농도)을 첨가함으로써 완전히 환원시켜 다양한 응집되고 잘못 접힌 (가장 가능하게는 이황화로 뒤섞인) OprF/I 변이체를 분리하였다. 샘플을 실온에 30 분간 항온처리하고 RP-HPLC로 분석하였다. 환원 후에, 단일 피크로서 용리된 OprF/I를 처리안된 IMAC/G50 풀에 비교하였다. IMAC/G50 후에 환원된 OprF/I의 함량을 피크 면적의 적분에 의해 계산하였다.

[0194] 모든 다른 샘플 (예컨대 재산화된 OprF/I, QS-HP 등으로부터의 분획)을 추가적인 처리 없이 직접 주입하고 OprF/I 농도를 계산하였다.

[0195] 재산화된 샘플은 RP-HPLC에 의해 즉시 분석할 수 있거나 이황화 결합의 형성을 pH 2-3까지 산성화함으로써 (1 ml 재산화 용액당 ~20 ㎕ 6%HCl) 퀀칭하고 이후의 분석을 위해 2-8℃에서 저장할 수 있다.

[0196] 분석용 RP-HPLC

[0197] 샘플의 분석용 RP-HPLC 분석을 Dionex Ultimate 3000 HPLC 시스템에 연결된 Jupiter C4 컬럼 (4.6 mm x 150 mm, 300A, 5 ㎛, Phenomenex)에서 수행하였다. 용매 A는 0.1% TFA를 함유하는 물이었고, 용매 B는 0.1% TFA를 함유하는 아세토니트릴이었다. 피크의 분리는 1 mL/분의 유속으로 13분 내 27% B 내지 37% B인 선형 구배 용리에 의해 수행하였다. 컬럼 온도는 40℃로 설정하였다. 피크 검출을 214 nm 및 280 nm에서 수행하였다.

[0198] 분취용 RP-HPLC

[0199] 분취용 RP-HPLC를 분석용 RP-HPLC에 의해 검출된 개별적인 피크의 단리를 위해 사용하였다. 정제를 Aekta Purifier 크로마토그래피 시스템에 연결된 Jupiter C4 컬럼 (10mm x 250mm, 300A, 5 ㎛, Phenomenex) 상에서 수행하였다. 분취 규모의 고정 상은 분석 규모에서 사용된 것과 동일하였다. 용매 A는 0.1% TFA를 함유하는 물였고, 용매 B는 0.1% TFA를 함유하는 물 내 80% 아세토니트릴이었다. 샘플 부피는 2 내지 4 mL (총 단백질 로딩 < 2 mg)였다. 피크의 분리를 2.5 mL/분의 유속으로 8 컬럼 부피에 걸쳐 35%B 내지 40%B인 선형 구배 용리에 의해 수행하였다. 컬럼 온도를 40℃로 설정하였다. 피크 검출을 280 및 214 nm에서 실시하였다. 0.8 mL의 분획을 수집하고 pH를 0.25 mL 0.1 M 인산나트륨 완충액, pH 7.0을 첨가하여 pH~7까지 조정하였다. 더 많은 양 (~0.5 내지 2 mg)의 P1 내지 4를 여러 분취용 정제 런에 의해 제조하였다. 개별적인 피크를 함유하는 요방되는 분획의 풀을 형성한 후에, 샘플을 5 kDa 초원심분리 장비 (Millipore)를 이용하여 대략 5차례 농축하였다. 농축된 풀을 PD10 컬럼 (GE Healthcare)에 의해 탈염시키고 완충액을 최종 약물 생성물 배합 완충액 (0.9% NaCl로 희석된 1/10 PBS, pH ~7)에 대해 교환하였다. 단리된 OprF/I 변이체를 함유하는 최종 샘플을 RP-HPLC 및 SEC-HPLC에 의해 순도 및 함량에 대해 분석하였다. RP-HPLC에 의해 결정된 상대 순도는 적어도 90%였다. 샘플을 -20℃에서 이후의 분석까지 저장하였다.

[0200] SDS-PAGE

[0201] SDS-PAGE를 4-12% NuPAGE 겔 (Invitrogen)상에서 MES 러닝 완충액을 이용하여 실시하였다. 샘플을 환원 또는 비-환원 조건 하에서 LDS 샘플링 완충액과 혼합하고 달리 언급되지 않는 한 70℃에서 5분간 항온처리하였다. 염색은 콜로이드성 쿠마씨(Coomassie) 또는 은 염색 (Heukeshoven)으로 실시하였다.

[0202] 웨스턴 블롯 분석

[0203] 웨스턴 블로팅을 항체 항 OprF/I 944/5 D5 에피토프 (1:20000 희석된 것) 및 966/363 E3 에피토프 (1:10000 희석된 것)를 이용하여 실시하였다.

[0204] pH 및 전도율 측정

[0205] 샘플 및 완충액의 pH 및 전도율을 측정하기 위해 WTW 720 시스템을 사용하였다. 전도율을 25℃에서 선형 온도 보상 모드를 이용하여 측정하였다.

[0206] 내독소 측정

[0207] 내독소 측정을 발색성 LAL-어세이 (Cambrex)를 이용하여 실시하였다. 선택된 샘플을 또한 외부의 공인된 연구실에서 통상적인 겔 클롯 어세이 (리물루스 변형세포 용해물(Limulus Amoebocyte Lysate) 검사)를 이용하여 측정하였다.

[0208] 숙주 세포 단백질 측정 (HCP)

[0209] HCP의 정량화를 위해, 제네릭 *E.coli* HCP ELISA 키트 (Cygnus Technologies, Inc.)를 사용하였다.

[0210] 펩티드-질량 핑거프린트 및 이황화 맵핑법

[0211] 분취용 RPC로부터 수득된 정제된 분획을 LC-MS/MS에 의해 분석하였다. 샘플을 환원 없이 또는 환원 및 알킬화 후에 AspN 또는 트립신으로 분해하였다.

[0212] MALDI-ToF 질량 분석법

[0213] MALDI-ToF 분석을 Voyager STR 4069 시스템 (Applied Biosystems)에서 수행하였다. 0.1%TFA/30%AcN에 용해된 시나핀산을 샘플 매트릭스로서 사용하였다. DS 샘플을 샘플 매트릭스로 5-배 희석하고 2 ㎕을 표적 상에 배치하였다. 지연된 추출 모드 및 양의 극성을 사용하였다. 시스템을 BSA (질량 보정 키트, Applied Biosystems)로 외부적으로 보정하였다. 내부적 보정을 위해 미오글로빈(Myoglobin) (Sigma M-0630, 평균 Mr 16951.5)을 DS 샘플에 대략 100 ㎍/mL의 농도로 혼합하였다. 내부 보정에 대한 질량 정확도는 대략 ± 0.3% (예컨대 24100 ± 72 Da)로, 외부 보정에 대해서는 ± 0.6% (예컨대 24100 ± 145 Da)로 추정할 수 있다.

[0214] 자연 PAGE

[0215] NativePAGE™ Novex® 비스-트리스 겔 시스템은 준중성 pH이고, 자연 (비-변성) 전기영동을 수행하기 위해 미리-성형된 폴리아크릴아미드 미니 겔 시스템이다. OprF/I 융합 단백질 샘플의 자연 PAGE를 NativePAGE 4-16% 비스-트리스 겔 (Invitrogen) 상에서 제조사의 지침에 따라 실시하였다. 샘플 완충액은 50 mM 비스트리스, 50 mM NaCl, 16 mM HCl, 10% w/v 글리세롤, 0.001% 폰소 S, pH 7.2였다. 러닝 완충액은 50 mM 비스트리스, 50 mM 트

리신, pH 6.8였다. 음극 완충액은 0.02% 쿠마씨 G-250를 포함하는 러닝 완충액이었다.

[0216] N-말단 서열분석

[0217] N-말단 서열분석을 Applied Biosystems 494HT 머신 및 N-말단 에드만(Edman) 서열분석의 방법을 이용하여 수행하였고, 여기서 단백질의 N-말단 아미노산을 연속하여 화학적으로 제거하고 HPLC로 확인하였다. 단백질을 먼저 PVDF 막 상에 이를 블로팅하거나 바이오브렌 처리된 유리 섬유 필터 상에 이를 흡착시킴으로써 서열분석 장치 내부에 고정하였다. 그 후에 부착된 단백질을 에드만(Edman) 시약, (페닐이소티오시아네이트, PITC)와 높은 pH에서 반응시켰다. 상기 반응 후에, 생성된 화합물은 무수 산을 이용하여 단백질을 절단하였다. 상기 커플링 및 절단 공정을 필요한 대로 수차례 반복하였다. 보통 15 내지 20 AA를 분석할 수 있었다. 절단된 생성물을 수성산을 이용하여 이들의 안정한 페닐티오히단토인, PTH으로 전환시키고, 이후 온-보드(on-board) HPLC를 이용하여 분석하였다. 아미노산의 식별은 표준 혼합물에 비해 용리 시간을 비교함으로써 성취하였다. HPLC로부터의 데이터는 서열의 가시적 회부를 위해 컴퓨처 상에서 수집하였다.

[0218] 티올기의 알킬화

[0219] 단백질 내 유리 티올 기를 시스테인의 유리 티올 기와 선택적으로 반응하여 카르복스아미도메틸 시스테인을 생성하는 아이오도아세트아미드를 이용한 알킬화에 의해 검출될 수 있다. 유리 티올 기가 존재하는 경우, 이들은 공유적으로 차단되어 부착된 아이오드아세트아미드 분자당 57 Da의 질량 증가를 도출할 수 있다.

[0220] 47 mg 아이오도아세트아미드를 1 mL 1 M 트리스-HCl, pH 8.0 (0.2 M 아이오도아세트아미드 용액)에 용해하였다. 200 ㎕ 각각의 정제된 피크 1, 2 및 3 (단백질 농도 대략 200 ㎍/mL)을 20 ㎕의 아이오도아세트아미드 스톡 용액 (최종 아이오도아세트아미드 농도 ~0.02M)과 혼합하였다. OprF/I 융합 단백질 샘플 (단백질 농도 대략 1 mg/mL)을 PBS로 3배 희석하여 대략 330 ㎍/mL의 최종 농도를 만들었다. 30 ㎕ 아이오드아세트아미드 스톡 용액을 300 ㎕ 희석된 DS에 첨가하였다. 또다른 실험에서 샘플을 희석 및 알킬화 전에 5 mM DTT (20 분)로 환원시켰다. 모든 샘플을 실온에서 암소에서 30분간 항온처리한 후 LC-MS 분석하였다.

[0221] 고정된 광 산란 분석

[0222] 크로마토그래피 시스템은 Ultimate 3000 펌프 및 탈기기, Ultimate 3000 자동샘플러 및 Ultimate 3000 컬럼 부분을 포함하는 Dionex사의 HPLC 시스템으로 구성되었다. 컬럼 및 크로마토그래피 조건은 SEC-HPLC에 대해 기술된 바와 동일하였다. 모든 용매를 0.1 ㎛ Supor 막 필터 (Pall VacuCap 60)를 통해 여과하였다. 달리 언급되는 않는 한 100 ㎕의 주입 부피를 모든 샘플에 대해 사용하였다.

[0223] 크로마토그래피 검출기는 214 nm 및 280 nm에 설정된 Dionex Ultimate 3000 광다이오드 어레이 검출기, Shodex RI-101 굴절률 검출기 및 DAWN TREOS MALS (다각도 광산란) 검출기 (Wyatt Technology Corporation)를 포함하고, 이것을 온-라인 모드로 사용하였다. 크로마토그래피 데이터 수집 및 분석을 Chromeleon 소프트웨어 패키지 (버전 6.80, Dionex)를 이용하여 수행하였다. MALS-신호의 실험 수집 및 데이터 분석을 ASTRA 소프트웨어 패키지 (버전 5.3.2.13, Wyatt Technology)를 이용하여 수행하였다. 상기 소프트웨어를 사용함으로써 광 산란 신호 (3 MALS 각도)를 UV-, 및 RI-신호와 함께 수집하고 이후 분석할 수 있었다.

[0224] 분석용 초원심분리 (AUC)

[0225] 모든 실험을 BeckmanCoulter XL-I 분석용 초원심분리기를 이용하여 50.000 rpm 및 25℃로 수행하였다. 샘플을 12 mm 광학 경로 길이의 사파이어-뚜껑의 두-부분 티타늄 센터피스에 배치하였다. 390 ㎕의 용액 및 용매를 샘플 및 기준 부분에 각각 배치하였다. 침강 흔적을 굴절률(간섭 광학)에서 국부 차이를 기록함으로써 검출하였다. 샘플을 10-배 희석하거나 추가로 희석하지 않고 분석하였다. 확산-보정 침강 계수 분산 (SCD)을 P. Schuck, NIH에 의해 제안된 유한 요소 접근법을 이용하여 산출하였다 (Peter Schuck et al., Biopolymers, Vol 54, Issue 5, 페이지 328-341, Oct 2000). 마찰비 f/f0를 피팅 변수로서 처리하였다. 완충액 (인산염 완충된 식염수, PBS)의 밀도 및 점도뿐만 아니라 단백질의 부분 비부피 (v)를 Sednterp을 이용하여 조성물로부터 계산하였다. 각각의 SCD를 계산할 때에 이들 값을 사용하였다.

[0226] RP-HPLC에 의한 수산화 알루미늄을 포함하는 OprF/I 융합 단백질 샘플의 분석

[0227] 배합된 OprF/I 융합 단백질의 분취액 (0.25 ml)을 16000 x g로 10 분간 20℃에서 원심분리하여 수산화 알루미늄 침전물을 상청액으로부터 분리하였다. 투명한 상청액을 제거하고 결합안된 융합 단백질을 RP-HPLC에 의해 분석하기 위해 사용하였다. 잔여 펠렛을 0.25 ml의 물 내 0.1% TFA (pH ~2)에 재현탁하였다. 샘플을 실온에서 2시간 동안 항온처리하고, 이후 10 분간 16.000g로 실온에서 원심분리하여 알루미늄 입자를 침강시켰다. 투명한 상청

액을 RP-HPLC (TFA 탈착)에 의해 분석하기 위해 사용하였다.

[0228] **구체적인 방법 및 결과**

[0229] OprF/I 융합 단백질의 발현 및 회수

[0230] OprF/I은 녹농균 외막 포린 단백질 OprF 및 OprI의 융합 단백질이다. 상기 단백질은 그의 N-말단에 His_6-태그를 함유하는 224 aa 융합 단백질로서 발현된다. N-말단 Met은 *E.coli*에서 발현 후 절단된다. 발현된 단백질 (N-말단 메티오닌 포함)의 일차 구조는 SEQ ID NO: 3에 나타난다.

[0231] 자연적인 단백질의 분자량은 24118.2 Da으로 계산되었다 (완전히 환원된 단백질, N-말단 메티오닌 없음). pI는 5.3로서 계산되었다.

[0232] 본 실시예의 단백질은 N-말단 히스티딘 태그 (His 태그)를 함유하는 외막 단백질 F 및 I의 융합 단백질이다. 단백질은 *E.coli* XL1-Blue/pTrc-Kan-OprF/I_His 균주에서 발현시켰다. OprF/I-His 단백질을 30℃에서 용해성 형태로 세포내 발현하였다.

[0233] 세포 용해

[0234] OprF/I는 특히 고농도의 NaCl이 없는 용해 완충액 및 이미다졸이 사용될 때, 박테리아 프로테아제에 의해 분해될 수 있다. 그러므로, 세포를 0.1 M 트리스, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.06 M 이미다졸로 이루어진 차가운 용해 완충액 (완충액 내 세포 페이스트의 1:5 희석)에 재현탁시켰다. 0.5 M NaCl의 첨가는 특히 용해물에서 분자의 단백질 가수분해를 저해하였다. 재현탁 및 이후의 균질화 (800 bar에서 2 주기)를 차가운 실내 온도에서 실시하고 용해물을 즉시 얼음 상에 배치하였다. 더 높은 온도는 생성물 분해 또는 더 높은 프로테아제 활성을 야기할 수 있다.

[0235] IMAC-구리 포획 단계

[0236] 킬레이트화 세파로스 FF (구리 이온 로딩된 것)를 His-태그달린 OprF/I를 포획하기 위해 사용하였다. 용해물을 로딩한 후에, 상이한 농도의 이미다졸을 이용하여 용리를 수행하였다: 0.07 M, 0.325 M 및 0.5 M 이미다졸. OprF/I 함유 분획을 0.325 M 이미다졸에서 두 분리된 피크로 용리하였다. 분석 데이터는 RP-HPLC 용리 프로파일이 수 개의 피크를 함유함을 나타내었다. 동일한 샘플이 환원된 조건 하에서 (DTT 또는 β-ME의 첨가) 분석된 경우에 단 하나의 주요 피크만 관찰되었다. 처리안된 샘플에서 다양한 피크는 가장 가능하게는 자연적인 분자의 이황화 뒤섞인 변이체 및 응집물이었다.

[0237] 예시적인 정제 런을 8.59L의 발효 브로스에 등가인 992g 세포 페이스트를 이용하여 실시하였다. IMAC 정제 및 Sephadex® G50 상에서의 탈염 (하기 참조) 후에 OprF/I의 총 량은 1600 mg 이었고 이는 발효 브로스의 리터당 186 mg OprF/I에 등가였다.

[0238] Sephadex G50 상에서 탈염

[0239] 이 단계는 저분자량 불순물 (예컨대 이미다졸, 구리, 등.)의 함량을 감소시키고 완충액 교환을 수행하였다. 로딩 부피는 컬럼 부피 대략 20%였다. 용리 완충액으로서 0.1M 트리스-HCl, 0.15M NaCl, pH 8.0를 사용하였다. 이것은 환원 및 재산화를 위해 사용된 것과 동일한 완충액이었다. 대안적으로, 상기 단계는 또한 100K 차단 막을 이용하는 UF/DF에 의해 대체되었다.

[0240] 환원

[0241] IMAC/G50 단계 후에, OprF/I는 도 5에 도식적으로 도시되는 바와 같이 이황화 뒤섞임으로 야기된 잘못접힌 형태 (고 및 저분자량 응집물)의 불균일 혼합물로서 존재한다. 이황화 결합의 환원을 모든 분자간- 및 분자내 이황화 결합을 쪼개기 위해 5 mM DTT를 이용하여 실시하였다. 완전히 환원된 단백질은 RP-HPLC 데이터에 따라 단일 피크로서 용리된다. DTT는 β-ME에 의해 대체될 수 있다. DTT가 수용액에서 시간의 경과에 걸쳐 안정하지 않기 때문에, 갓 제조된 DTT 용액 (물 내 1 M, 1시간 내 사용)의 분취액을 천천히 교반하면서 IMAC/G50 풀에 부가한다 (IMAC/G50 풀의 리터당 5 mL의 1 M DTT 스톡 용액). 상기 풀을 실온에서 30 분간 교반 없이 항온처리한다. 환원의 진행을 관찰하기 위해 샘플을 RP-HPLC로 분석할 수 있다.

[0242] 재산화

[0243] 재산화 조건의 최적화를 위해, 상이한 산화환원 시스템 (GSSG/GSH, 시스타민/시스테아민, 시스틴/시스테인)을

저 농도의 DTT (1mM)의 존재에서 시험하여 이황화 결합의 올바른 재조립을 가능하게 하였다. 재산화의 과정 (이황화 결합의 형성)은 접힘 변이체가 상이한 체류 시간을 가지기 때문에 다양한 시간 간격 후에 RP-HPLC로 관찰될 수 있다. 다양한 산화환원 시스템의 일차적인 연구 후에, 시스틴을 산화제로서 사용할 것을 결정하였다. 시스타민/시스테아민을 이용한 재산화는 처리된 조건하에서 성공적이지 않았다. IMAC/G50 풀의 환원/재산화 전과 후의 대표적인 RP-HPLC 및 SEC 용리 프로파일이 도 6 및 도 7에 나타난다. 0.5 mM 시스틴의 존재에서 재산화 후에, RP-HPLC 및 SEC로 관찰된 용리 프로파일은 "처리안된" IMAC/G50 풀에 비해 훨씬 더 균질하였다. 환원 전의 IMAC 풀에 존재하는 다양한 피크는 환원 조건하에서 하나의 주요 피크로 이동하였다. 재산화 후에, 환원된 단백질에 비해 하나의 주요 피크 (도 8에 피크 2로서 명명됨)가 상이한 체류 시간으로 관찰된다. 피크 2는 정확하게 접힌 OprF/I를 나타낼 것이다. 피크 2는 접힘 변이체이어야 할 세 가지 더 작은 피크 (도 8의 피크 1, 피크 3 및 피크 4)로 둘러싸인다. 대략 13.17 및 13.81 분에서 용리하는, 도 8에서 피크 5 및 피크 6로 명명되는 피크는 다른 접힘 변이체이다 (MS 데이터에 따른 이황화 가교-연결된 응집물).

[0244] LC-MS에 의한 피크 1의 추가적인 특징분석은 피크 2에 비해 240 Da의 분자량 증가를 나타내었다. 이러한 질량 이동은 가장 가능하게는 두 분자 시스테인의 공유적 부착에 의해 야기되었다. 유리 시스테인이 DTT와 시스틴의 반응에 의해 형성되었고, 이는 2 분자 시스테인을 도출하였다. 피크 2가 증가하는 농도의 산화제에서 (GSSG 또는 시스틴) 감소하는 반면 피크 1은 증가하는 것이 추가로 발견되었다.

[0245] SEC에 의한 재산화 후에 메인 피크의 평가는 단백질이 단량체로서 존재하지 않음을 보여준다. SEC 컬럼을 1.35 내지 670 kDa 범위의 기준 단백질 (BioRad의 크기 배제 표준)을 이용하여 보정하였다. 메인 피크의 체류 시간(~25 분)은 구형 형상 및 고정상과 어떠한 비특이적 상호작용도 없다는 가정 하에서 ~180 kDa의 계산된 이론 질량에 상응한다. 상기 규명된 다량체 상태가 적용된 과정 및 배합 조건 하에서 우선적으로 형성됨 및 NaCl의 존재에서 중성 pH의 수용액에서 안정해 보이는 것이 관찰되었다. OprF/I 융합 단백질은 pH 7 내지 8에서 180 kDa에 상응하는 다량체로 용리되는 반면, 산성화 샘플 (pH ~2)에서 피크는 대략 55 kDa에 상응하는 더 높은 체류 시간 (~28 분)으로 이동한다(도 9를 참조). 이러한 체류 시간의 변화는 낮은 pH에서 다량체의 해리에 의해 야기될 수 있다.

[0246] 실험의 첫 번째 세트에서, GSSG 및 GSH를 재산화제로서 시험하였다. 5 mM DTT 내 환원된 IMAC/G50 풀을 부드럽게 교반하면서 GSSG (0-4 mM)를 함유하는 0.1 M 트리스-HCl, 0.15 M NaCl pH 8.0로 5-배 희석하였다. DTT는 GSSG와 반응하여 GSH, GSSG 및 환원된/산화된 DTT를 형성한다. 시험된 최종 재산화 조건은 넓은 범위의 상이한 비의 GSH, GSSG 및 DTT를 포괄하였다. 샘플의 분취액을 또한 다양한 시간 간격 후에 HCl로 퀀칭하였고 RP-HPLC로 분석하였다. 증가하는 GSSG 농도에서 피크 1은 증가하고 피크 2는 감소하였다. 피크 1의 형성은 재산화 과정에서 매우 일찍 발생하며 시간이 지나도 불변하게 유지된다. 피크 1+2에 대한 총 회수율은 완전히 환원된 단백질 (100%)로부터 출발하여 ~60%인 것으로 추정되었고, 모든 검출된 피크의 회수율은 출발 물질에 비해 대략 90%였다.

[0247] 실험의 두 번째 세트에서, 시스틴 및 시스테인을 재산화제로서 시험하였다. 환원된 IMAC/G50 풀 (5 mM DTT)을 다양한 농도의 시스틴 (0-3 mM) 및 시스테인 (0-3 mM)을 함유하는 0.1 M 트리스-HCl, 0.15 M NaCl pH 8.0 내에 5-배 희석하였다. 최종 DTT 농도는 1 mM였다. 시스틴의 0.2 M 스톡 용액을 0.5 M NaOH로 제조하였음에 유의하라. 300분 후 및 실온에서 밤새 항온처리한 후에 샘플을 분석하였다. 1 mM DTT 및 무 시스틴을 함유하는 샘플 외에는 두 시점 간의 각각의 개별적인 실험에 대한 RP-HPLC 피크 패턴에서 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. 단백질은 5시간 후에도 여전히 환원되어 있었고, 밤새 항온처리한 후에 피크 2가 나타났다. 최종 시스틴 및 시스테인 농도에 따라, 상이한 비율의 피크 1 및 피크 2가 검출되었다. RP-HPLC 프로파일은 피크 1 농도가 0.5 mM 시스틴의 존재에서 가장 낮았음을 나타내었다.

[0248] <u>DEAE 세파로스 FF에 의한 정제</u>

[0249] 잔여 내독소 및 gDNA의 함량을 낮추기 위해 재산화 후 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 OprF/I 함유 공정 스트림의 추가적인 정제를 시험하였다. 이들 잔여 불순물은 중성 내지 약간 염기성인 pH에서 심지어 더 높은 전도율에서도 음이온 교환 매체에 결합하는 반면, 생성물은 그냥 유동해야 할 것이었다. DEAE 세파로스를 시험하였고 수지 상에의 OprF/I의 결합에 의해 어떠한 주요 생성물 손실 없이 내독소를 제거하기 위한 우수한 특성을 가짐을 발견하였다.

[0250] <u>Q-세파로스 HP (QSHP)에 의한 정제</u>

[0251] 재산화 및 크로마토그래피를 통한 DEAE 유동 후에, 단백질 용액을 Q-세파로스 HP에 의해 추가로 정제하였다.

QSHP에 의한 정제는 메인 풀 내에 ~2EU/mg의 내독소 농도를 야기하였고, 이는 허용되는 낮은 수준 이내였다.

[0252] 한외여과/정용여과

[0253] 최종적으로, QS-HP 풀을 제형 완충액 (1xPBS 완충액 pH 7.4, Dulbecco, Ca, Mg없음)에 대해 정용여과하였다. 10 kDa 또는 30 kDa의 재생성된 셀룰로스 막 (Amicon Ultra 15 원심 필터 장치, Millipore)을 사용하였다. OprF/I를 30 kDa 막의 침투물에서 검출하였다. 그러므로, 10 kDa 막을 최종 UF/DF에 대해 배합 완충액 내로 사용하여 >95%의 단계 수율을 얻었다. 상기 풀을 UV 측정을 기초로 하여 1 mg/ml의 최종 단백질 농도로 조정하였다.

[0254] 전체 제조 및 정제 과정의 개요도가 도 10에 나타난다. 정제된 OprF/I 융합 단백질의 약 34% 내지 약 40%의 전반적인 수율을 성취하였다.

[0255] **정제된 OprF/I 융합 단백질의 특징분석**

[0256] OprF/I 융합 단백질 변이체의 분취용 단리

[0257] QSHP 크로마토그래피 단계로부터의 선택 부분 분획을 분취용 단리를 위해 사용하였다. 전형적인 분취용 용리 프로파일 및 검출된 피크의 명칭이 도 11에 나타난다. 개별적인 피크를 함유하는 모든 조합된 분획을 환원 및 비-환원 조건 하에서 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 환원 조건 하에서 모든 밴드는 OprF/I 표준에 비해 유사한 이동 특성을 가졌다. 비-환원 조건 하에서, 대략 60 kDa (분자량 마커에 대해 보정된 것)에서 검출된 다량체 OprF/I 변이체의 함량은 피크 C, D, 5 및 6에 대해 증가하였다. 모든 밴드는 또한 단일클론 항 OprF/I 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다. 이들 결과는 RP-HPLC에 의해 검출된 모든 피크가 관련 생성물임을 나타내었다. 상기 발견을 또한 개별적인 분획의 펩티드-질량 핑거프린트 분석에 의해 확인하였다. 최종 DS에서 오로지 P1, 2, 3, 4 및 5만 RPC로 검출될 수 있다. 다른 피크, A, B, C, D 및 6은 메인 분획으로부터의 Q-세파로스 HP 상에서 분취용 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있었다. Q-세파로스 HP 크로마토그래피 도중에 작은 피크가 메인 피크 전에 용리되었다. 상기 분획은 분석용 RP-HPLC 및 MALDI-ToF에 의해 검출시 더 높은 농도의 OprF/I 분해 생성물 (7kDa 피크로 표시된 것)을 함유하였다. 상기 피크는 또한 15.5 kDa 및 7.2 kDa OprF/I 단편으로 이루어진 생성물 관련 단편인 것으로 밝혀졌다.

[0258] OprF/I 융합 단백질 변이체의 분석용 특징분석

[0259] 정제된 OprF/I 융합 단백질은 RP-HPLC (도 8 참조)에 의해 나타난 상이한 형태의 분자로 구성된다. 다섯 개의 피크가 RP-HPLC에 의해 검출될 수 있었다. 피크 2 (P2)가 피크 1 (P1), 피크 3 (P3) 및 피크 4 (P4)로 둘러싸이고, 50 내지 55%의 상대 함량을 갖는 가장 우세한 피크였다. 피크 5 (P5)는 약간 더 높은 체류 시간으로 용리되어 다른 피크로부터 잘 분리되었다. 상대 피크 함량이 표 2에 요약된다. β-ME 또는 DTT를 갖는 샘플의 환원 후, 용리 프로파일은 변화한다. 한 주요 피크 용출물 및 개별적인 변이체는 동일한 크로마토그래피 체류 시간을 나타낸다. 이들 결과를 기초로 하여 P1 내지 P4는 이황화 결합의 차이로 야기된 접힘 변이체로서 간주된다.

[0260] **표 2**

[0261]

피크	샘플 1	샘플 2	샘플 3	샘플 4
1	19%	14%	13%	11%
2	50%	55%	54%	60%
3	18%	17%	19%	14%
4	9%	9%	9%	9%
피크 1,2 및 3 의 합	87%	86%	86%	85%

[0262] 유의점: 샘플 1의 재산화는 0.5mM 시스틴의 존재에서 수행되었고; 샘플 2, 3 및 4는 0.375mM 시스틴의 존재에서 재산화되었다. 약간 더 높은 시스틴 농도는 샘플 1에 있어서 피크 1 함량의 미미한 증가를 도출하였다.

[0263] MALDI-ToF 분석

[0264] MALDI-ToF 분석을 위해 시스템을 BSA에 대해 외부적으로 보정하였다. 내부 보정을 위해 미오글로빈(Myoglobin)을 사용하였다. 모든 네 개의 샘플이 유사한 질량 스펙트럼을 나타냈다. 메인 신호는 자연적인 OprF/I 단량체로부터 이후 OprF/I 이량체 및 삼량체 피크로부터였다. 표 3은 내부 보정 후 얻어진 분자 질량을 요약한다. 예측된 분자 질량으로부터의 편차는 실험적 오차 이내 (± 0.3%)였다. 24 kDa, 48 kDa 및 72 kDa에서의 질량 피크가

검출되어, 단량체, 이량체 및 삼량체 OprF/I 융합 단백질의 존재를 나타내었다.

[0265] 표 3

피크	분석 질량 (Da)	이론적 질량으로부터의 편차 (Da)* (이론적 MW로부터 상대 % 편차)
단량체		
샘플 1	24096	-20 (-0.08)
샘플 2	24053	-63 (-0.26)
샘플 3	24097	-19 (-0.08)
샘플 4	24045	-71 (-0.30)
이량체		
샘플 1	48408	+176 (+0.36)
샘플 2	48104	-128 (-0.27)
샘플 3	48239	-7 (-0.01)
샘플 4	48031	-201 (-0.42)
삼량체		
샘플 1	72379	+31 (+0.04)
샘플 2	72105	-243 (-0.34)
샘플 3	72135	-213 (-0.30)
샘플 4	72250	-98 (-0.14)

[0266]

[0267] * 이론적 질량: 두 이황화 결합의 가정하에 단량체 24116 Da, 이량체 48232, 삼량체 72348

[0268] 자연 PAGE

[0269] 비-환원 및 환원 조건하에서 OprF/I 융합 단백질 샘플의 자연 PAGE를 상기 설명한 바와 같이 수행하였다. 쿠마씨 블루 염색 후의 밴드 강도를 농도계에 의해 평가하였다. 자연 조건 하에서 하나의 OprF/I 메인 밴드를 대략 94 내지 97%의 상대 강도를 가지고 대략 180 kDa의 범위에서 검출하였다. 환원 조건 하에서 겉보기 분자 크기를 206 kDa로서 측정하였다. 겉보기 분자량은 SEC-HPLC 데이터와 잘 일치하나, OprF/I 질량이 80 kDa (삼량체)의 범위였던 SEC-MALS 및 AUC 결과와는 상이하다. 자연 PAGE를 위한 분리 메커니즘은 자연 SEC와 동일하며, 분리 특성은 겔을 통과하는 단백질 복합체의 형상에 매우 의존적이다. 상기 결과는 OprF/I가 오히려 높은 유체역학 반경을 갖는 연장된 형상을 가짐을 입증한다.

[0270] N-말단 서열분석

[0271] 두 상이한 샘플의 첫 번째 13 또는 15 aa를 분석하였다. 이론적 및 검출된 아미노산 서열 사이에 어떠한 차이도 발견되지 않았다. 서열분석 결과는 N-말단 Met이 발현 도중 완전히 절단되었음을 확인하였다.

[0272] 티올기의 알킬화

[0273] OprF/I 융합 단백질 샘플의 티오기의 알킬화의 결과는 알킬화 후에 아이오드아세트아미드의 4 부착된 분자에 상응하는 +226 Da의 질량 증가를 나타내었다 (이론적 질량 증가 +228 Da; 부착된 아이오드아세트아미드 분자당 +57 Da의 질량 증가). 상기 결과는 환원된 단백질이 4개의 유리 시스테인 잔기를 가지기 때문에 예상되었던 것이다. 모든 다른 샘플은 질량의 증가를 나타내지 않았다. 이들 결과를 기초로 하여 RP-HPLC의 피크 P1 (도 8)는 하나의 추가적인 이황화 결합을 함유하는 이중 시스테이닐화된 변이체로서 간주될 수 있었다. 피크 P2 및 P3은 두 이황화 결합을 함유하는 변이체로서 생각되었다.

[0274] 정적 광 산란법 (SEC/MALS)

[0275] 280 nm에서 굴절률/UV 검출을 이용한 SEC를 단백질 특징분석 및 분자량 검출을 위해 광 산란법과 조합하였다. 몰 질량은 23 내지 26 분 사이에 용리되는 메인 피크의 횡단면적에 걸쳐 불변하였기 때문에, 계산된 단분산 분자종이 용리되었다. 메인 피크를 위해 대략 80 내지 86 kDa 범위의 분자 질량이 검출되었다. 누적 질량 분획은

94 내지 98% 범위였다(종 1).

[0276] 20 내지 22 분 사이에 용리되는 고분자량 분획(종 2)은 140 내지 190 kDa 범위의 분자 질량을 나타내었다. 고분자량 분획에 대한 저 레일리(Rayleigh) 신호 강도로 인해 측정된 분자 질량은 높은 정도의 변이를 나타내었다. 종 2의 누적 질량 분획은 120 내지 200 kDa 범위에서 0.5 내지 1% 범위였다.

[0277] 이들 결과는 OprF/I가 삼량체 (종 1)로서 존재하며 단지 작은 부분의 단백질만 더높은 분자 질량의 응집물 (종 2)을 형성함을 나타낸다.

[0278] SEC-MALS로 수득된 결과는 또한 AUC 결과와 잘 일치한다 (하기 참조). SEC/UV 검출 및 자연 PAGE로 수득된 결과는 180 kDa의 범위로 OprF/I 융합 단백질에 대한 더 높은 분자 질량을 나타내었다. SEC 및 자연 PAGE로 수득된 결과는 구형 단백질 형상의 가정을 기초로 하는 반면, 단백질 형상은 정적 광 산란법 또는 AUC 데이터에 영향을 주지 않는다. 적용된 상이한 방법으로부터의 결과를 기초로 하여, OprF/I 삼량체가 구형 형상으로 존재하지 않으나 큰 유체역학적 반경을 나타낸다고 결론지었다.

[0279] 분석용 초원심분리 (AUC)

[0280] 침강속도 프로파일을 기록하고 SedFit 소프트웨어를 이용하여 데콘볼루션하여 샘플 성분의 침강 계수값을 얻었다. 개별적인 종 1 (OprF/I 융합 단백질 메인 피크) 및 종 2 (응집물)에 대한 생성된 계산된 침강 계수 및 분자 질량을 측정하였다. 우세한 성분 종 1에 대한 침강 계수 값은 오히려 연구된 모든 샘플에 대해 잘 일치하였다. 이는 상이한 시험된 샘플 사이에 어떠한 유의한 차이점도 존재하지 않음을 표시한다. 메인 성분 종 1의 몰 질량은 상기 변수에 대한 실험적 변동폭 내에서 상이하다. 이는 일반적으로 OprF/I 융합 단백질의 삼량체를 표시한다. 서열로부터 계산된 단량체 및 삼량체의 몰 질량은 각각 24.1 kg/몰 및 72.3 kg/몰이다.

[0281] 상기 삼량체의 어떠한 해리도 시험된 상기 농도 범위 위에서 발생하지 않았다. 삼량체에 대한 스톡스-반경(Stokes-radius)을 5.6 nm인 것으로 계산하였다. 예상되는 삼량체 물질의 구형 단백질에 대한 스톡스-반경(Stokes-radius)은 2.8 nm이다. 이는 고도로 비대칭인 및/또는 수화된 분자를 표시한다. 종 2는 다양한 침강 계수에서 구별된 피크로서 나타났다. 이는 종 2가 비특이적 응집과 다르게, 구별된 화학양론을 갖는 성분과 일치함 (6량체, 9량체, 등.)을 표시한다. 이들 데이터는 자연적인 OprF/I 융합 단백질이 삼량체로서 존재하나, SEC 및 자연 PAGE로 수득된 계산된 분자 질량과 상당히 상이하다는 SEC-MALS 결과와 매우 잘 일치한다 (비-구형 형상으로 인한 질량의 과대 평가). 침강속도 실험에서 일차적이고 가장 믿을 만한 변수는 침강 계수 그 자체이다. SCD의 계산을 위해, 계산된 모든 침강 계수에 적용하기 위한 단일 마찰 계수를 가정하였다. 이는 피팅 단계에서 최적화되었다. 마찰 계수는 SCD를 몰 질량 분포 (MMD)로 전환하기 위해 필요하다. 본 연구에서 < 2 S 인 침강 계수에 대한 신호는 10-배 희석에서만 나타났다. 종 1이 변하지 않았기 때문에 이러한 피크가 OprF/I의 추정상의 단량체와 일치할 가능성을 배제될 수 있다. 결론적으로, OprF/I는 삼량체 분자로서 용액 내에 존재한다. 어떠한 해리도 시험된 상기 농도 범위 위에서 발생하지 않았다.

[0282] 이황화 맵핑법

[0283] *MALDI-MS/MS 분석을 이용한 이황화 결합 맵핑법*

[0284] 샘플 피크 1 (P1)의 가능한 시스테이닐화는 트립신 소화의 선형 모드 스펙트럼에서 볼 수 있었다. 시스테인 잔기를 함유하는 펩티드는 약 240 Da의 차이를 나타내며 시스테이닐화 효과 (2 시스테인)를 표시하였다.

[0285] 2100.0 Da의 MH+를 나타내는 가능하게는 기준 샘플의 시스테인 33 및 시스테인 47 사이에 이황화-가교연결된 펩티드를 MALDI-MS/MS로 단편화하였다. 두 개의 표지된 시스테인은 이황화 다리에 의해 가교연결된다. 이러한 펩티드는 또한 샘플 피크 1 (P1) 및 피크 2 (P2)에서 발견되나 샘플 피크 3 (P3)에서는 발견되지 않았다.

[0286] *나노-MS/MS 분석을 이용한 이황화 결합 맵핑법*

[0287] 이 연구의 목적은 피크 1, 2 및 3 사이에 이황화 다리 패턴의 차이를 확인하는 것이었다. 피크를 단리하고 농축하였다. 주요 서열은 4개의 시스테인 잔기를 위치 18 (C1), 27 (C2), 33 (C3) 및 47 (C4)에 함유하였다 (SEQ ID NO: 1 참조). 온-라인 LC/ES-MS에 의한 온전한 분자량 측정의 데이터로부터 피크 1이 하나의 이황화 다리 및 두 개의 시스테이닐을 가지고, 피크 2 및 3은 두 개의 이황화 다리를 가진다고 결론내렸다. 모든 세 가지 피크의 트립신 소화 펩티드 단편 1 내지 55를 생성하였고, 이는 단백질의 모든 4개 시스테인을 함유한다. 세 개의 피크에서 상기 단편에 대해 관찰된 질량은 온전한 MW 분석으로부터의 배치를 확정하였다. 모든 세 피크로부터의 펩티드 단편 1 내지 55를 수집하고 AspN으로 추가분해시키고 LC-MS로 분석하였다. 미가공 데이터의 해석을 기초

로 하여 도 12에 다른 구조를 세 상이한 피크에서 우세한 성분에 대하여 도출하였다.

[0288] 이들 발견을 환원 및 AspN 추가분해로부터 선택된 신호의 MS/MS 실험으로 확인하였다. 이황화 다리 패턴외에도 탈아미드화를 세 개의 상이한 피크에서 관찰하였다. 트립신 펩티드 120 내지 132에서, Asn 124는 가능하게는 부분적으로 탈아미드화된다. 상이한 펩티드에서, Asn 45의 탈아미드화를 역시 관찰하였다.

[0289] 안정성에 대한 온도의 영향

[0290] SDS-PAGE 겔 (환원 및 비-환원 조건)을 상이한 온도에서 10 일에 걸쳐 항온처리한 OprF/I 융합 단백질 샘플에 대해 진행하였다. 환원된 겔에서 OprF/I 융합 단백질 메인 밴드의 상대 함량은 2-8℃ 샘플 (기준)에 대한 밴드 강도의 정상화에 의한 겔의 농도 평가에 의해 계산하였다. 밴드 패턴에서 어떠한 분해 또는 변화도 -80℃, -20℃, 2-8℃ 및 RT (20℃)에서 10일의 저장기간에 걸쳐 저장된 샘플에 대해 관찰되지 않았다.

[0291] 안정성에 대한 pH의 영향

[0292] OprF/I 융합 단백질 샘플을 pH 1.98 내지 pH 11.1의 상이한 pH 값에서 항온처리하고 RP-HPLC 및 SEC-HPLC로 분석하였다. 비-공유적 삼량체에 상응하는 OprF/I 융합 단백질의 메인 피크는 pH 5.9 내지 11.1에서 2-8 ℃에서 23일의 기간에 걸쳐 대략 90%로 불변하였다. 삼량체는 가역적으로 낮은 pH (pH 2)에서 해리되었다.

[0293] 첨가제/어쥬번트로서 수산화 알루미늄

[0294] RP-HPLC 결과는 OprF/I 융합 단백질이 pH 4.88에서 수산화 알루미늄 상에의 결합에 의해 더욱 안정화될 수 있었고 높은 회수율로 탈착될 수 있었음을 나타내었다.

[0295] 상이한 OprF/I 융합 단백질 분획의 면역원성

[0296] 그룹당 다섯 마리 BALB/c 마우스에 1 ml의 상이한 OprF/I 융합 단백질 분획 (RP-HPLC 분획의 피크 1, 2 및 3) 및 비분획형 OprF/I 융합 단백질 (DS)을 복강으로(i.p.) 제0일과 제14일에 투여하였다. 제21일에 마우스의 혈액을 특정 항체에 대해 시험하였고 수치 (GMT [㎍/ml] + SD)를 특정 용량 (㎍ 단백질)에서 측정하였다. 결과는 표 4에 요약된다.

[0297] 표 4

[0298]

용량	피크 1	피크 2	피크 3	DS
31,6	29,36	40,75	49,53	83,54
10	15,58	4,59	24,63	31,04
3,16	0,09	0,03	0,24	0,70
1	0,01	0,01	0,01	0,05
0,316	0,01	0,01	0,01	0,01

[0299] 모든 분획뿐만 아니라 비분획형 OprF/I 융합 단백질이 특정 항체를 유도한 것을 확인하였다. 피크 2 분획에 대한 ED50 값은 추가적으로 5.6 ㎍ (비분획형 OprF/I 융합 단백질: 1.8 ㎍)로서 측정하였다.

[0300] 결론

[0301] 1. OprF/I 융합 단백질 및 그의 삼량체 복합체는 제조되어 IMAC-Cu 포획 단계로 출발하여 전반적으로 최대 40%의 수율로 가교-연결된 이황화 응집물 없이 정제될 수 있다 (즉 삼량체의 형태인 SEQ ID NO: 1 여기서 SEC에 따르면 삼량체 함량은 약 90% 초과이고 응집물 함량은 1% 미만임).

[0302] 2. 상이한 생산 로트에서 제조된 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 1)은 매우 일관적이다.

[0303] 3. OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 1)은 생리적 조건 하에서 대략 80 kDa의 평균 분자 질량 및 94 내지 98%의 상대 함량을 갖는 자연적인 외막 단백질 OprF로서 삼량체로서 존재한다.

[0304] 4. 본 발명에 따라 제조된 OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 1)은 RP-HPLC에 의해 여러 변이체로 분리될 수 있다 (도 8 및 12 참조). 피크 1 (P1)은 위치 18 (C1) 및 27 (C2) 사이에 이황화 결합을 함유하는 위치 33 (C3) 및 47 (C4)에서 이중 시스테이닐화된 부가체이다 (또한 SEQ ID NO: 11 참조). 피크 2 (P2)는 위치 18 (C1) - 27 (C2) 및 33 (C3) - 47 (C4)에 두 개의 이황화 다리를 함유하는 변이체이다 (또한 SEQ ID NO: 12 참조). 피크 3 (P3)은 위치 18 (C1) - 47 (C4) 및 27 (C2) - 33 (C3)에 2 이황화 다리를 함유하는 추가적인 변이체이다 (또한 SEQ ID NO: 13을 참조).

[0305] 5. OprF/I 융합 단백질 (SEQ ID NO: 1)은 10일의 기간에 걸쳐 -80℃ 내지 +20℃에서, 그리고 2-8 ℃에서 23일의 기간에 걸쳐 pH 5.9 내지 11.1에서 안정하다. pH 4.88에서 OprF/I 융합 단백질은 수산화 알루미늄 상에의 결합에 의해 더욱 안정화될 수 있다.

[0306] 6. 모든 세 변이체 (피크 1, 2 및 3)뿐만 아니라 비분획형 OprF/I 융합 단백질이 BALB/c 마우스의 백신접종 후에 특정 항체를 유도하였다.

[0307] 임상 연구에서 사용된 약물 생성물은 a) Ala-(His)6 -OprF 190-342 - OprI 21-83 단백질 (SEQ ID NO: 1), b) 염화나트륨, c) 주사용 물 및 d) 수산화 알루미늄 유/무로 이루어진 (표 5 참조) 근육내로 주사되는 녹농균 *(Pseudomonas aeruginosa)* 백신 (또한 본 실험 단락에서 "OprF/I 백신"로서 지칭됨)이다.

[0308] 표 5: 약물 생성물의 최종 농도:

[0309]

	최종 제형에서의 농도 (명목 값)	
	$Al(OH)_3$을 갖는 OprF/I 백신, 또한 본 명세서에서 알룸-항원보강된 백신으로 지칭됨	$Al(OH)_3$없는 OprF/I 백신
약물 물질: Ala-(His)6 -OprF 190-342 - OprI 21-83 단백질 (SEQ ID NO: 1) - PBS 완충액 내 단백질	100 mcg/ml	100 mcg/ml
염화나트륨 0.9% (NaCl)	0.81%[1]	0.81%[1]
수산화 알루미늄 $Al(OH)_3$	400 mcg/ml	-

[0310] [1]계산된 이론적 값: 약물 물질 내에 이미 존재하는 임의의 염 성분을 고려하지 않음

[0311] 약물 생성물의 제조: 동결된 약물 물질 (Ala-(His)6 -OprF 190-342 - OprI 21-83 단백질 (SEQ ID NO: 1) - PBS 완충액 내 단백질)을 밤새 2-8℃에서 해동시키고 0.9% 염화나트륨 용액과 배합하여 상기 나트륨 최종 농도에 도달하게 하였다. 최종 제형을 주입 직전에 무균 여과하였다. 알룸 항원보강된 약물 생성물에 있어서 무균 $Al(OH)_3$을 무균 여과 단계 후에 부가한다. 1.2 ml의 1 ml 용량 분취액 (추출가능 부피 1 ml)을 무균 무-발열물질 유리 바이알에 무균으로 주입하였다.

[0312] 위약은 시판되고 등록된 생리적 NaCl 제품으로 이루어진다 (NaCl 0.9%, 동중성자 염화나트륨 0.9% Braun; 5mL Mini-Plasco® 연결). 위약은 5ml 용기에 제공되며 정맥 및 피하 적용을 위해 등록되어 있다. 이는 실온에 저장된다. 백신을 완전하게 모방하기 위해 위약은 0.9% 식염수로 10배 희석된 PBS로 이루어지고, 400 mcg/ml $Al(OH)_3$을 부가한다. 위약의 명목 부피는 1 ml이고, 2 ml 유리 바이알에 주입된다. 이것은 2-8℃에서 저장하여야 한다. 2상 임상 연구를 위한 위약은 수산화 알루미늄을 갖는 약물 생성물과 같이, 유사한 공정을 이용하여, 동일한 제조사에서 배합되고 주입되었다.

[0313] B. 임상 연구

[0314] *무작위, 위약-대조, 부분적으로 맹검 2상 예비 연구 설계:*

[0315] 48시간을 초과하는 장비에 의한 인공호흡이 필요하여 ICU에 입원한 18세 내지 80세 연령의 400명의 남성 또는 여성 환자를, 100 또는 200 mcg 알룸-항원보강된 OprF/I 백신 (SEQ ID NO: 1), 100 mcg 비-항원보강된 OprF/I 백신 (SEQ ID NO: 1) 또는 위약 대조로서 알룸을 투여받는 네 개의 치료 그룹에서 제0일 및 제7일에 백신을 투여하였다 (시험된 약물 생성물의 더욱 상세한 설명을 위해 상기 재료 단락을 참조하라). 환자당 연구 기간은 90일로 추정하였고 전반적인 연구 기간은 12 내지 18개월로 추정하였다.

[0316] 다음의 종료점을 측정하였다:

[0317] 일차:

[0318] · OprF/I 백신 (SEQ ID NO: 1) 또는 위약을 투여받은 환자에서 ELISA에 의해 측정한 OprF/I 특이적 IgG 항체

역가에 의해 측정된 제14일의 면역원성

[0319] 이차:

[0320] · OprF/I 백신 또는 위약을 투여받은 환자에서 ELISA에 의해 측정한 OprF/I 특이적 IgG 항체 역가에 의해 측정된 제7일 및 제14일 이후 병원 퇴원까지 2주 간격으로, ICU 퇴원일 및 제90일의 면역원성

[0321] · 중증 부작용 보고 및 최초 백신접종 후 최대 90일까지 백신접종 기간 동안 부작용 보고의 비율

[0322] · 최초 백신접종 후 최대 90일까지 안전 실험실 척도 (혈액학, 혈청 화학, 뇨검사)

[0323] · 전신 내약성 (생명 징후: 혈압, 맥박, 체온)

[0324] · 국부 내약성 (국부 주사위치 반응)

[0325] · 최대 90일까지 OprF/I 백신 또는 위약을 투여받는 환자에서 *녹농균(P. aeruginosa)*으로의 침습성 감염, 가령 균혈증 (양성 혈액 배양으로 결정) 또는 *녹농균(P. aeruginosa)* 폐렴 (NNIS VAP 기준에 따라 결정)을 가진 환자의 수

[0326] · OprF/I 백신 또는 위약을 투여받는 환자에서 *녹농균(P. aeruginosa)* 기관기관지염, *녹농균(P. aeruginosa)* 양성 상처, 뇨 및 호흡 분비 배양을 갖는 환자의 수

[0327] · OprF/I 백신 또는 위약을 투여받는 환자의 전반적인 생존

[0328] · ICU 및 병원에서의 체류 기간

[0329] · OprF/I 백신 또는 위약을 투여받는 환자에서 VAP의 발병 시기

[0330] · OprF/I 백신 또는 위약을 투여받는 환자에서 무-항생제 기간

[0331] · OprF/I 백신 또는 위약을 투여받는 환자에서 *녹농균(P. aeruginosa)*이 아닌 병원체로 인한 감염의 유병률

[0332] · 장기 기능 (순차 기관 기능상실 평가(Sequential Organ Failure Assessment [SOFA]) 점수)

[0333] · 제7, 14, 90일 및 ICU 퇴원일의 OprF/I 백신 또는 위약을 투여받는 환자에서 항-히스티딘 항체의 존재

[0334] · 제7, 14일, 병원 퇴원까지 2주 간격으로, ICU 퇴원일, 제90일의 OPA에 의한 기능적 IgG 항체의 측정

[0335] · 제7, 14일, ICU 퇴원일 및 제90일의 OprF/I 특이적 IgG 항체의 결합력의 측정

[0336] *연구의 결과:*

[0337] 상기 연구의 일차 종료점은 모든 백신 군이 양호한 혈청전환 (즉, 최초 백신접종 후 제14일까지 OprF/I IgG의 적어도 4-배 증가) 비율을 나타냈음으로 충족되었고 (OprF/I 백신 (SEQ ID NO: 1) 치료군에서 65 내지 81%) 여기서 IgG 항체 기하 평균 역가 (GMT)는 제14일에 모든 OprF/I 백신 (SEQ ID NO: 1) 처리군에서 위약군 (OprF/I 백신 (SEQ ID NO: 1) 군에서 GMT: 995-2117 ELISA 유닛/ml)에 비해 유의하게 더 높았다(도 1). 이는 제0일 내지 제14일에서 OprF/I IgG의 대략 4배 증가이다. 치료군 사이에 어떠한 처리 유발성 부작용 보고의 유의한 차이도 없었고 국부 및 전신성 내약성은 본 연구 집단에 적용할 수 있는 한, 양호한 것으로 나타났다. 보고된 약물 관련 부작용 보고의 수 및 성질은 어떠한 안전성 우려도 일으키지 않으며 잠정 데이터를 기초로 하는 데이터 안전 관찰 보드(Data Safety Monitoring Board, DSMB)에 의해 확인되었다.

[0338] 이차 면역원성 종료점 또한 상기 연구에서 충족되었고 90일의 기간에 걸쳐 7회 측정된 IgG 반응을 포함하였고, 옵소닌식세포작용 어세이에 의한 기능적 항체 활성의 측정, 및 항체 결합력의 측정을 포함하였다. 이차 백신접종 후에 전반적인 강한 면역원성은 모든 백신군에서 관찰되었다. 용량 반응을 관찰할 수 있었던 반면, 비-알룸 항원보강된 백신은 적어도 알룸-항원보강된 백신만큼의 면역성을 가졌다. 항체 결합력은 모든 백신군에서 유사하였다. 기능적 옵소닌화 흡수를 볼 수있었고 백신-유도된 IgG 역가와 매우 관련되었다. 집중치료 환자에서 면역 반응은 건강한 지원자에서의 전술된 1상 연구의 결과에 비해 더 약하게 나타났다. 이는 참여한 환자의 감소된 일반적 건강 조건으로 인해 예기치 못한 것이었다.

[0339] 비록 상기 연구가 효능에 있어서는 뒷받침되지 못했으나 임상 종료점 위원회(Clinical Endpoint Committee, CEC)는 감염률 및 사망률이 이차 종료점 분석 내에서 기록되었음을 확인하였다. 더 낮은 사망률이 대조군에 비하여 모든 백신군에서 관찰되었다(도 2). 사망률의 감소는 비-항원보강된 백신에 있어서 통계적으로 유의하였다 ($p = 0.0196$) (위약군에서 40.0%인 제28일 사망률에 비하여 비-항원보강된 OprF/I 백신 군에서 21.7%인 제28일

사망률). 연구 종점까지 생존했던 환자는 최초 백신접종 후 제14일 후에 사망한 환자에 비해 제14일에 더 높은 OprF/I IgG 역가를 가졌다 (도 3). Cox 회귀 분석은 생존에 대한 OprF/I IgG 역가의 유의한 예후 값을 나타내었다 ($p = 0.0336$).

[0340] 임의의 군 사이에 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 감염률에 어떠한 유의한 차이도 없었음이 분명하였다. 그러나, 이는 본 II상 연구의 비교적 적은 샘플 크기 및 믿을만한 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 진단의 방법론적 한계로 인한 것일 수 있다. 게다가, OprF/I 백신 (SEQ ID NO: 1)을 이용한 백신접종은 다른 감염의 과정을 비롯한 *녹농균(P. aeruginosa)* 감염의 제거보다는 병독성에 영향을 줄 수 있다. 상기 후자의 가정은 임의 종류의 감염 (병원체와 관계없이)을 경험했던 OprF/I 백신 (SEQ ID NO: 1) 접종된 환자가 연구 과정 동안 임의 종류의 감염 (임의 병원체로 인한 것)을 가지나 위약으로 백신접종된 환자에 비해 대략 15 % 더 낮은 사망률을 나타내었다는 관찰에 의해 뒷받침된다 (도 4).

[0341] 알룸 항원보강된 위약에 대비하여 비 알룸 항원보강된 OprF/I 백신 (SEQ ID NO: 1)으로 치료받은 임의 종류의 감염을 갖는 환자에서 관찰된 대략 15%의 사망률 감소를 참조하면, 숨은 메커니즘에 대해 추측할 수 밖에 없다. 상기 백신은 멸균 면역성을 제공하기 보다는 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)*의 병독성을 감소시킬 수 있다. OprF (백신 항원의 일부)는 인간 인터페론(Interferon)-감마에 결합할 수 있고 이를 통해 *녹농균(P. aeruginosa)*의 병독성 인자의 발현을 변화시킨다 (Wu L. et al. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. Science, 2005; 309: 774-7). OprF/I 백신에 의해 유도된 OprF에 대한 항체는 이러한 상호작용을 차단한다 (Bin Ding et al. Vaccine 2010; 28:4119-22).

[0342] *녹농균(P. aeruginosa)*의 병독성을 감소시키는 것은 간접적으로는 다른 병원체로 인한 차후의 감염 빈도를 줄일 수 있다. 이러한 관점에서 *녹농균(P. aeruginosa)* 감염과 사망률 사이의 인과 관계를 형성하는 것을 제한하는, *녹농균(P. aeruginosa)*의 진단에서 악명높은 어려움을 강조하는 것이 중요하다. 마지막으로, 면역화는 일반적으로 감염의 과정에 긍적적인 영향을 끼칠 수 있는 면역조절 효과를 갖는다.

[0343] 더 크고, 충분히 뒷받침된 임상 연구가 사망률과 감염률에 대한 임의의 백신 효과를 입증하고 확인하기 위해 요구될 수 있다.

[0344] 또다른 핵심 목적으로서, 본 II상 연구는 이러한 어려운 표적 집단에서 중심축 효능 연구를 수행하는 것의 실행 가능성을 연구하였고: 최종 데이터는 예상한 수의 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 감염을 확인시켜준다. 관찰된 6 내지 14%의 침습률은 본 연구를 위해 연구 위치만 10 내지 25%의 추정된 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 침습성 감염률로 선택하였을 때 예상치 내에 충분히 포함된다.

[0345] **바람직한 양태**

[0346] 1. 인간에서 가령 예컨대 입원 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 약제학적 유효량의 OprF/I 물질을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0347] 2. ICU 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 약제학적 유효량의 OprF/I 물질을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0348] 3. 인공호흡기를 장착한 ICU 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 약제학적 유효량의 OprF/I 물질을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0349] 4. 화상 피해자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 피해자에게 약제학적 유효량의 OprF/I 물질을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0350] 5. 낭포성 섬유증 환자에서 사망률을 감소시키는 방법이되 상기 환자에게 약제학적 유효량의 OprF/I 물질을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0351] 6. 양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 치료적 유효량의 OprF/I 물질 및 2차 약물 물질의 공동-투여를 포함하는 방법이되, 상기 2차 약물 물질은 항균 또는 항진균 약물인 방법.

[0352] 7. 양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 치료적 유효량의 OprF/I 물질의 투여는 100 mcg의 양으로 두 번 제공되는 방법.

[0353] 8. 양태 2 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 치료적 유효량의 OprF/I 물질의 투여는 ICU에 입원하기 적어도 2주

전에 제공되는 방법.

[0354] 9. 전술된 양태 중 어느 하나에 있어서, OprF/I 물질은 SEQ ID NOs: 1 내지 13를 갖는 폴리펩티드, 이들의 삼량체 형태, 및 상기 폴리펩티드 중 어느 하나를 표적으로 하는 항체로 이루어진 군에서 선택된 화합물인 방법.

[0355] 10. 전술된 양태 중 어느 하나에 있어서, OprF/I 물질은 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13, 그리고 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 및 SEQ ID NO: 13의 혼합물을 갖는 삼량체 형태를 비롯한 이들의 삼량체 형태, 및 상기 폴리펩티드 또는 삼량체 형태 중 어느 하나를 표적으로 하는 항체로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

[0356] 11. 전술된 양태 중 어느 하나에 따른 어느 한 방법에서 사용하기 위한 OprF/I 물질.

[0357] 12. 입원 환자, ICU 환자, 낭포성 섬유증 환자, 인공호흡기를 장착한 ICU 환자, 또는 화상 피해자의 사망률 감소에 사용하기 위한 OprF/I 물질.

[0358] 13. 양태 12에 있어서, OprF/I 물질은 SEQ ID NO: 1를 갖는 폴리펩티드인 사망률 감소에 사용하기 위한 OprF/I 물질.

[0359] 14. 양태 1 내지 10 중 어느 하나에 따른 어느 한 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물이되, OprF/I 물질과 함께 이를 위한 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

[0360] 15. 다음을 포함하는 약제학적 조합:

[0361] a) OprF/I 물질인 1차 물질, 및

[0362] b) 항균제 또는 항진균제인 보조-물질.

[0363] 16. 양태 1 내지 10 중 어느 하나의 방법, 양태 11 내지 13 중 어느 하나의 OprF/I 물질 또는 양태 14 또는 15의 약제학적 조성물, 여기서 OprF/I 물질은 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I의 아미노 말단 단부가 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F의 카르복시-말단 부분의 카르복시-말단 단부에 융합된 것을 포함하거나 이것으로 이루어진 융합 단백질이고, 특히

[0364] (i) 여기서 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 I은 전장 외막 단백질 I이고;

[0365] (ii) 여기서 *녹농균(Pseudomonas aeruginosa)* 외막 단백질 F는 전장 외막 단백질 F이고;

[0366] (iii) 여기서 OprF/I 융합 단백질은_SEQ ID NO: 1로 이루어지거나 이를 포함하고;

[0367] (iv) 여기서 OprF/I 융합 단백질은_상기 폴리펩티드 또는 SEQ ID NO: 1을 표적으로 하는 항체 또는 이의 단편으로 이루어지거나 이를 포함하고;

[0368] (v) 여기서 OprF/I 융합 단백질은_기능적 활성 변이체이고 및/또는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 50% 서열 동일성, 특히 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 더 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 90%, 심지어 더 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 99% 서열 동일성을 가지고;

[0369] (vi) 여기서 융합 단백질은 SEQ ID NO: 1을 갖는 폴리펩티드 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일성을 갖는 이들의 면역성 변이체를 포함하는 (또는 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%가 이들로 이루어진) 삼량체를 형성하고;

[0370] (vii) 여기서 융합 단백질은 SEQ ID NO: 1을 갖는 폴리펩티드 또는 SEQ ID NO: 1에 대해 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일성을 갖는 이들의 면역성 변이체를 포함하는 (또는 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%가 이들로 이루어진) 삼량체를 형성하고 여기서 상기 폴리펩티드 또는 이들의 변이체는 a) Cys18-Cys27-결합 (예컨대 SEQ ID NO: 11 참조), b) Cys18-Cys27-결합 및 Cys33-Cys47-결합 (예컨대 SEQ ID NO: 12 참조), 또는 c) Cys18-Cys47-결합 및 Cys27-Cys33-결합 (예컨대 SEQ ID NO: 13 참조)를 가짐을 특징으로 하는 방법.

[0371] 17. 임의의 상기 양태에 따른 OprF/I 융합 단백질을 제조하기 위한 방법이되, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 방법

[0372] (a) 환원제를 이용하여 상기 OprF/I 융합 단백질을 환원시키는 단계, 및

[0373] (b) 환원제의 존재에서, 산화환원제를 이용하여 환원된 OprF/I 융합 단백질을 산화시키는 단계.

[0374] 18. 양태 17에 있어서, 단계 (a)에서 환원제의 농도는 약 3 mM 내지 약 10 mM이고 환원제는 디티오트레이톨

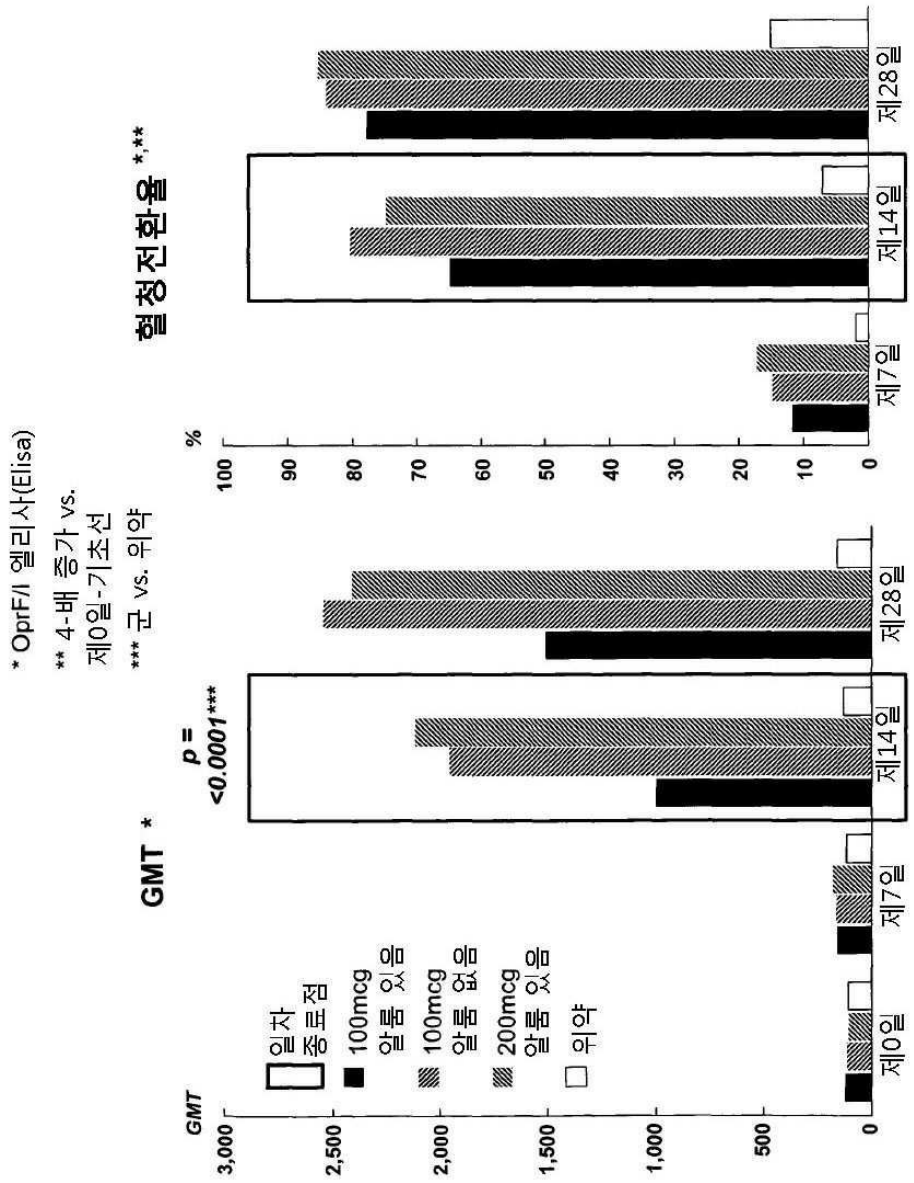
(DTT), 디티오에리트리톨 (DTE) 또는 β-메르캅토에탄올인 방법.

[0375] 19. 양태 17 또는 18에 있어서, 단계에서 (b) 산화환원제의 농도는 약 0.2 mM 내지 약 4 mM이고 산화환원제는 이황화 글루타티온/글루타티온 또는 산화환원제 시스틴/시스테인이고, 환원제의 농도는 약 0.375 mM 내지 약 1.5 mM이고 환원제는 디티오트레이톨 (DTT), 디티오에리트리톨 (DTE) 또는 β-메르캅토에탄올인 방법.

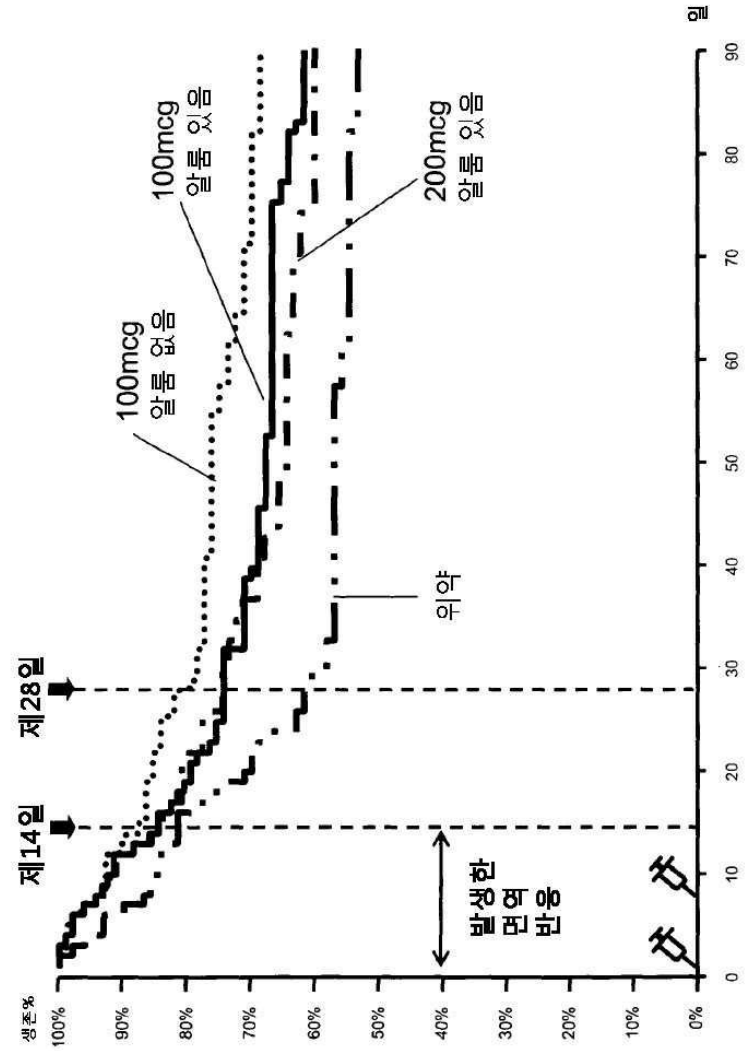
[0376] 20. 양태 17 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 반응 온도는 약 18 ℃ 내지 약 25 ℃인 방법.

도면

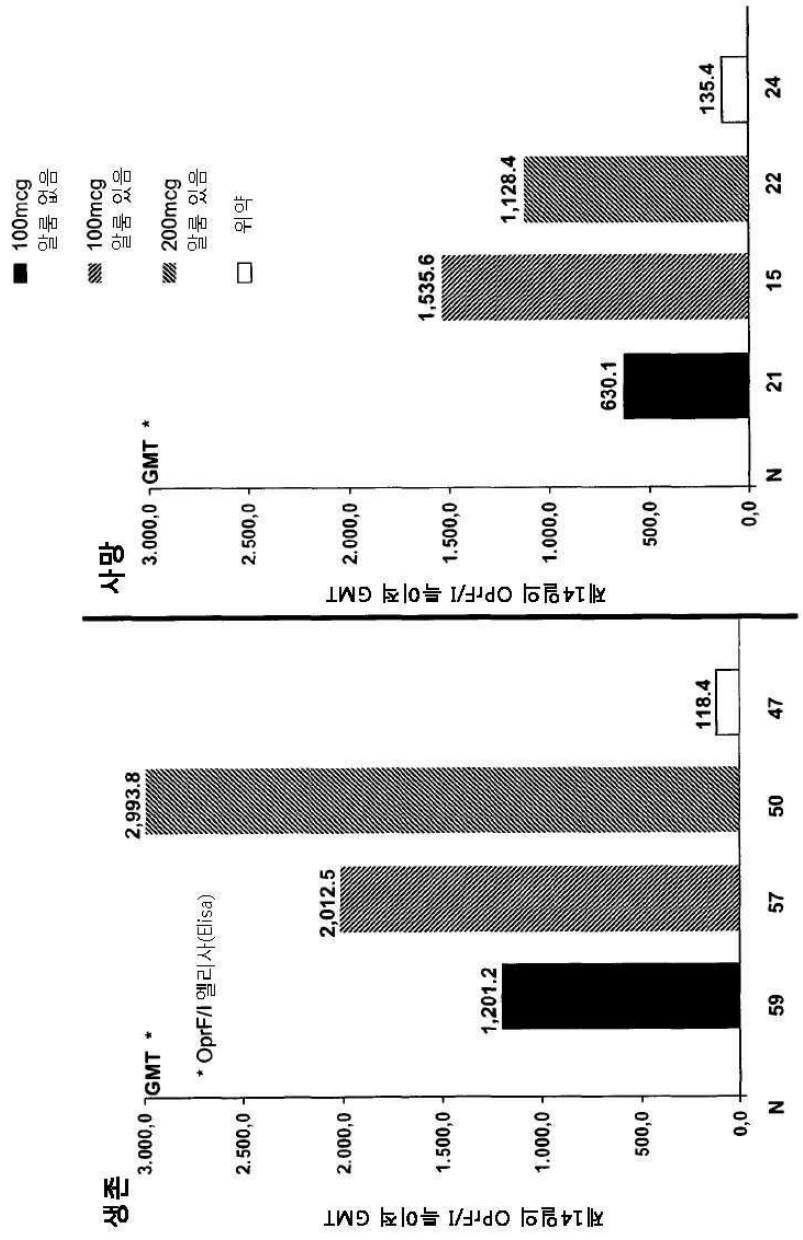
도면1



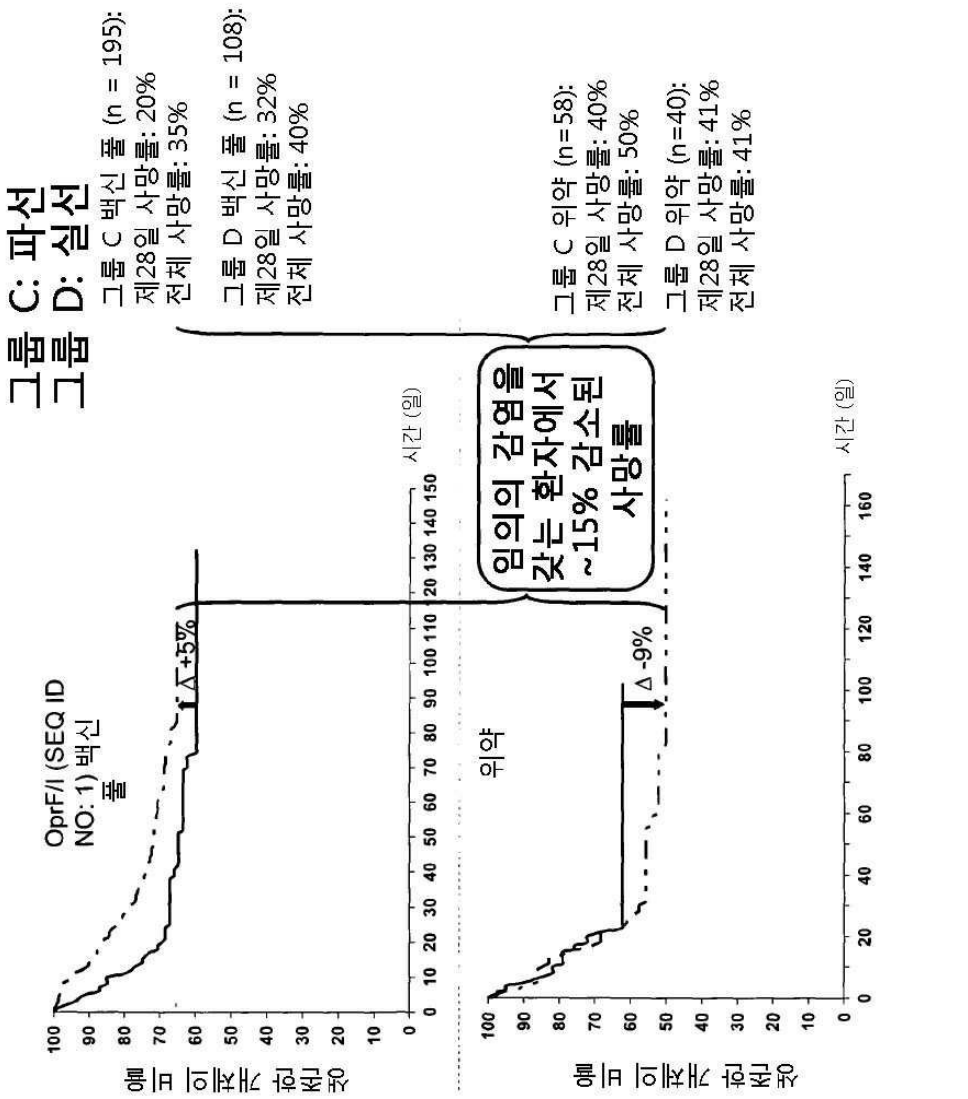
도면2


일
100mcg
알룸 있음
200mcg
알룸 있음
100mcg
알룸 없음
위약
제28일
제14일
통계학적 유의한 차이
생존%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90

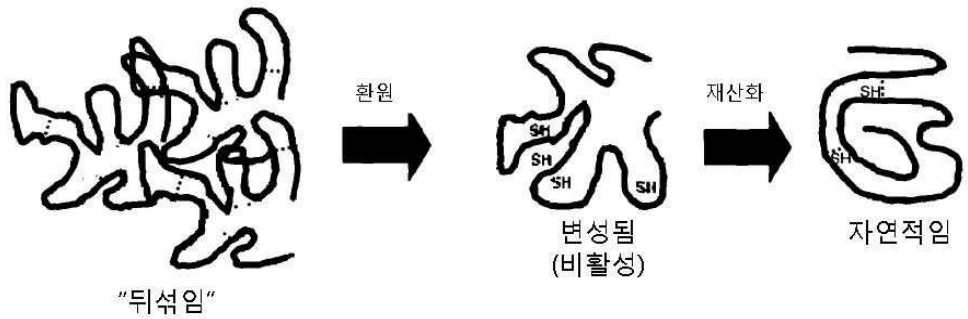
도면3


100mcg 알룸 없음
100mcg 알룸 있음
200mcg 알룸 있음
위약
생존
사망
GMT *
* OprF/I 엘리사(Elisa)
제14일의 OprF/I 특이적 GMT
3,000,0
2,500,0
2,000,0
1,500,0
1,000,0
500,0
0,0
N
59
57
50
47
21
15
22
24
1,201.2
2,012.5
2,993.8
118.4
630.1
1,535.6
1,128.4
135.4

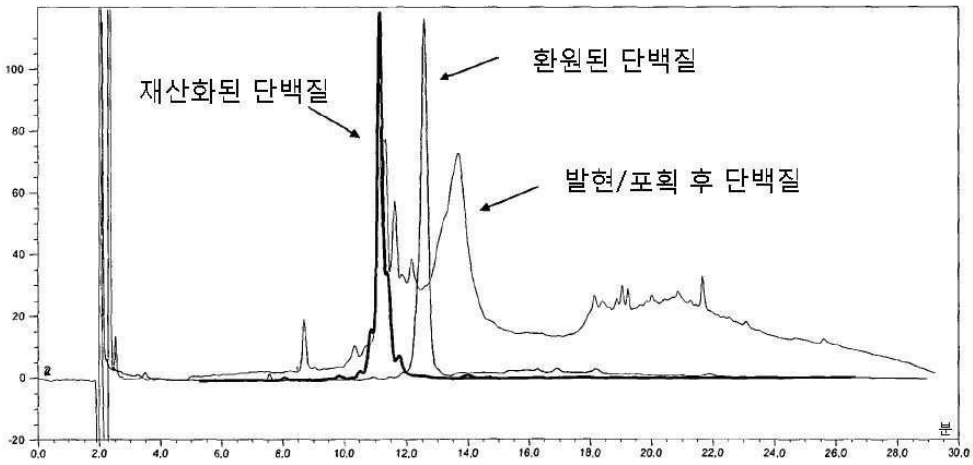
도면4


그룹 C: 파선
그룹 D: 실선
그룹 C 백신 풀 (n = 195):
제28일 사망률: 20%
전체 사망률: 35%
그룹 D 백신 풀 (n = 108):
제28일 사망률: 32%
전체 사망률: 40%
그룹 C 위약 (n=58):
제28일 사망률: 40%
전체 사망률: 50%
그룹 D 위약 (n=40):
제28일 사망률: 41%
전체 사망률: 41%
OprF/I (SEQ ID NO: 1) 백신 풀
위약
Δ +5%
Δ -9%
임의의 감염을 갖는 환자에서 ~15% 감소된 사망률
생존한 개체의 비율
시간 (일)

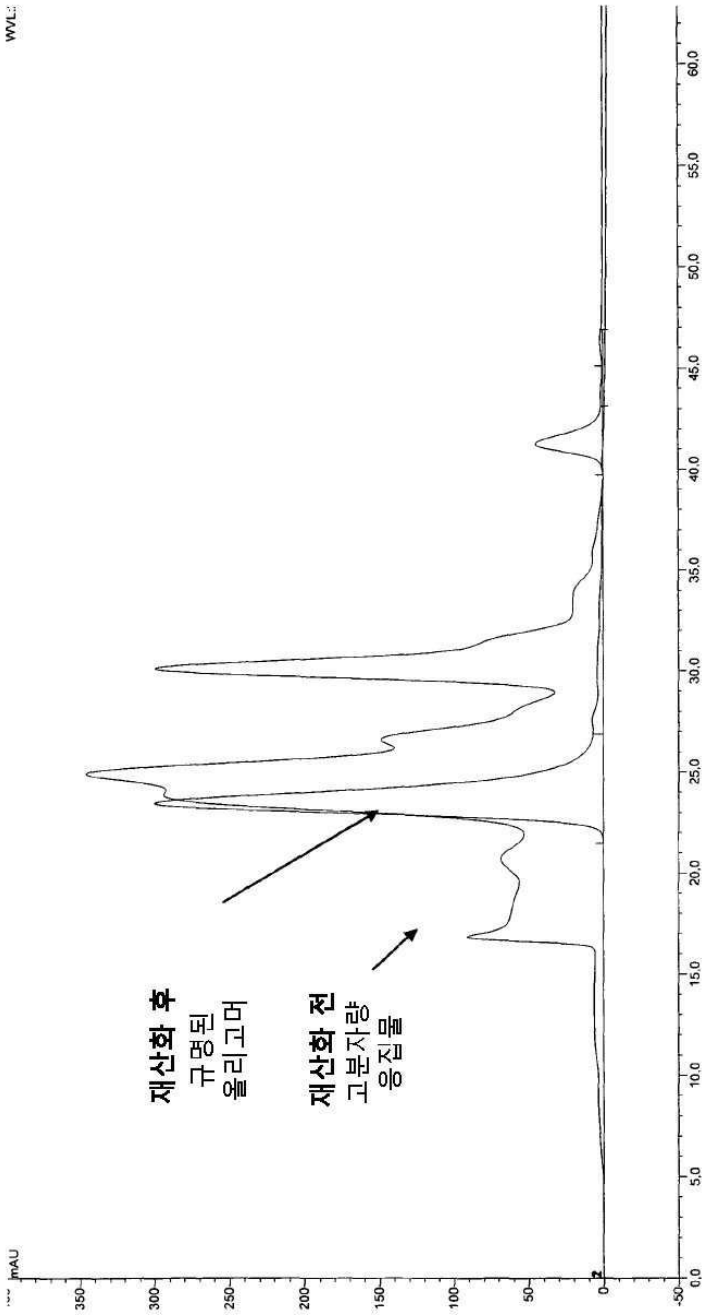
도면5


환원
재산화
"뒤섞임"
변성됨
(비활성)
자연적임

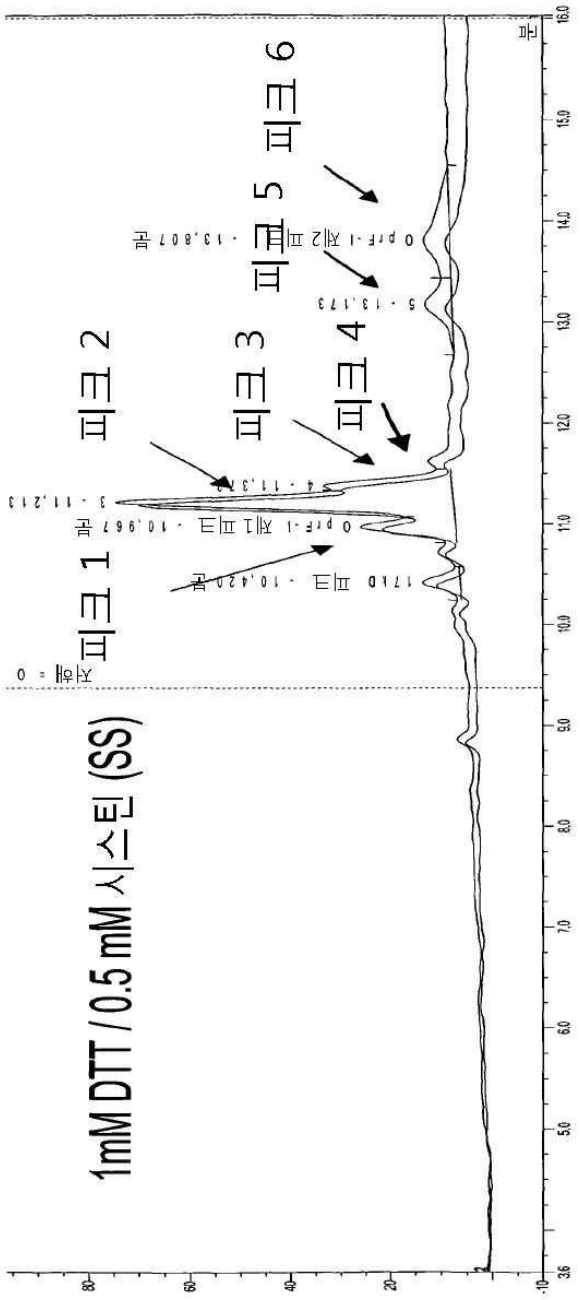
도면6



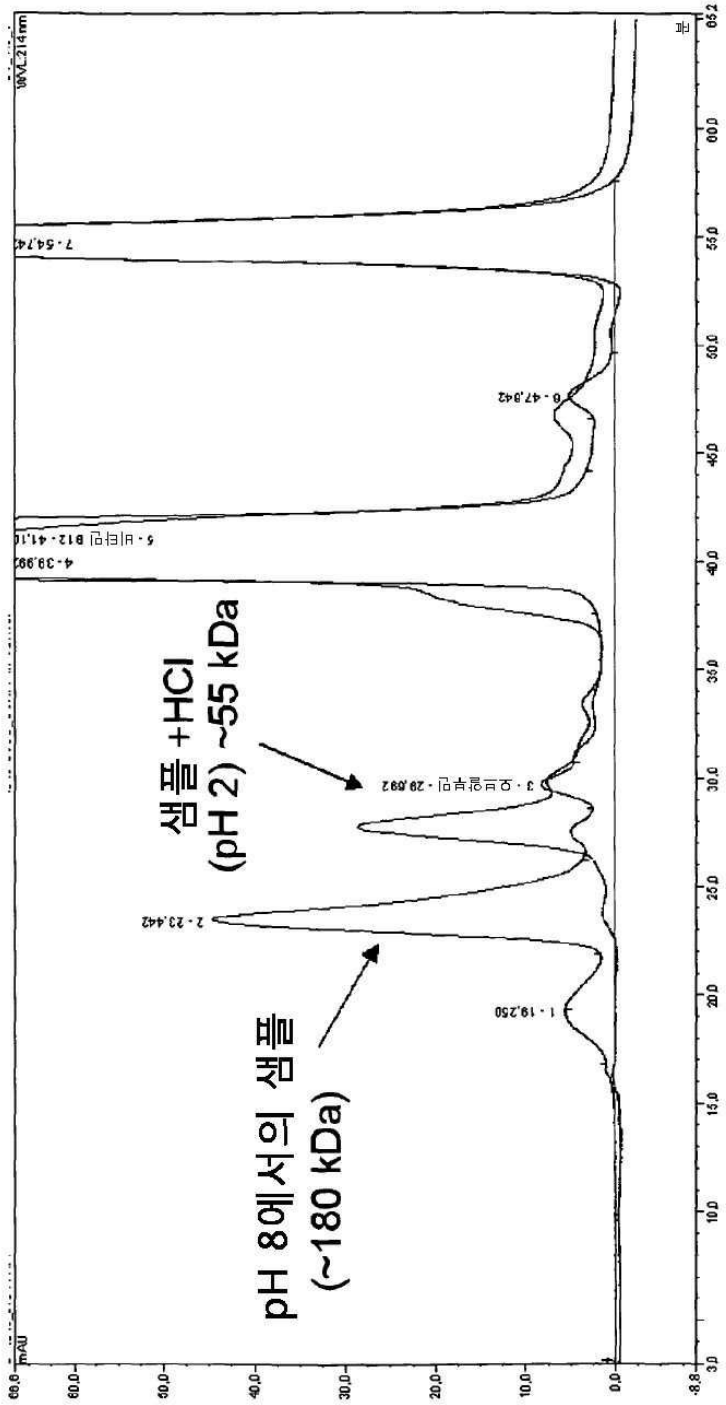
도면7


재산화 후
규명된
올리고머
재산화 전
고분자량
응집물
mAU
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
55.0
60.0

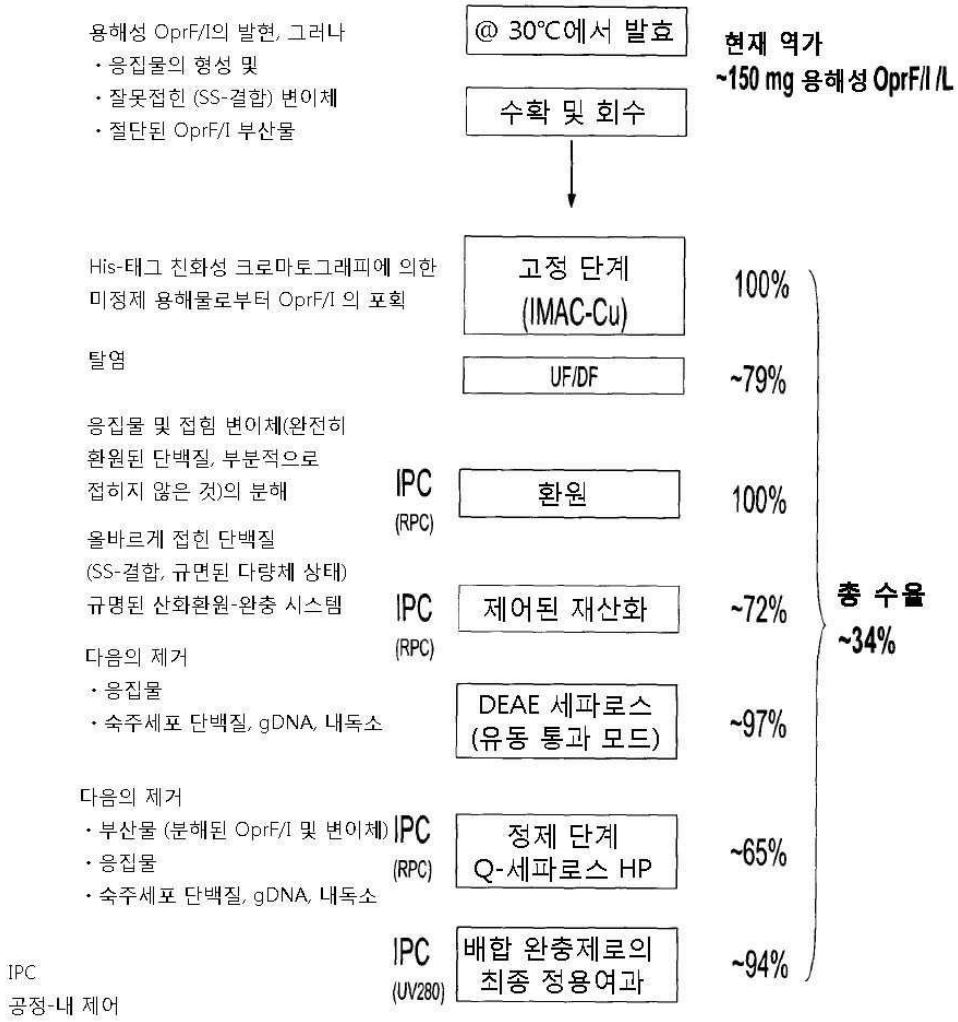
도면8



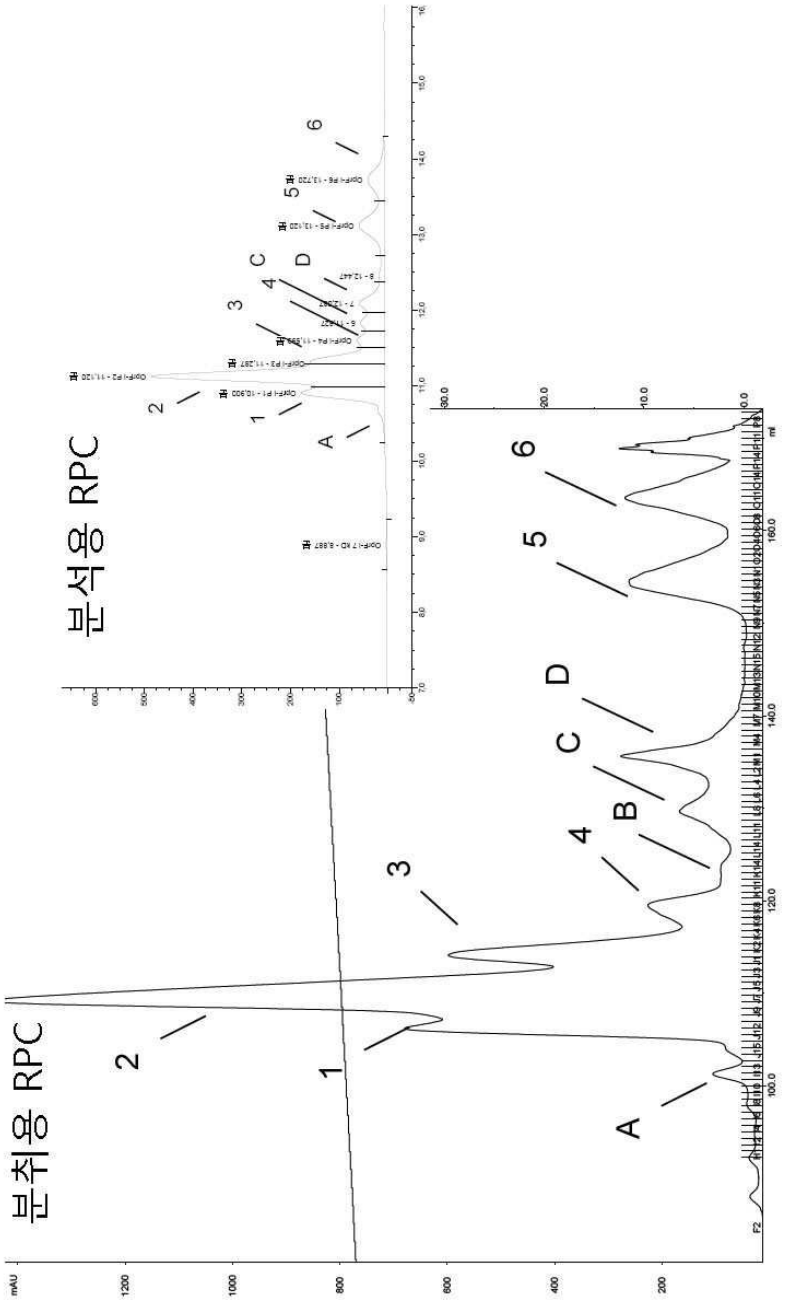
도면9



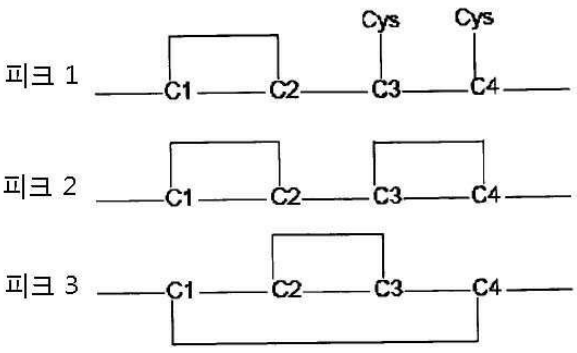
도면10


용해성 OprF/I의 발현, 그러나
• 응집물의 형성 및
• 잘못접힌 (SS-결합) 변이체
• 절단된 OprF/I 부산물
@ 30°C에서 발효
현재 역가
~150 mg 용해성 OprF/I /L
수확 및 회수
His-태그 친화성 크로마토그래피에 의한
미정제 용해물로부터 OprF/I 의 포획
고정 단계
(IMAC-Cu)
100%
탈염
UF/DF
~79%
응집물 및 접힘 변이체(완전히
환원된 단백질, 부분적으로
접히지 않은 것)의 분해
IPC
(RPC)
환원
100%
올바르게 접힌 단백질
(SS-결합, 규면된 다량체 상태)
규명된 산화환원-완충 시스템
IPC
(RPC)
제어된 재산화
~72%
총 수율
~34%
다음의 제거
• 응집물
• 숙주세포 단백질, gDNA, 내독소
DEAE 세파로스
(유동 통과 모드)
~97%
다음의 제거
• 부산물 (분해된 OprF/I 및 변이체)
• 응집물
• 숙주세포 단백질, gDNA, 내독소
IPC
(RPC)
정제 단계
Q-세파로스 HP
~65%
IPC
(UV280)
배합 완충제로의
최종 정용여과
~94%
IPC
공정-내 제어

도면11



도면12



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Intercell AG

<120> OprF/I agents and its use in hospitalized and other patients

<130> ICP096/PCT

<150> US 61/426,760

<151> 2010-12-23

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ala-(His)6-OprF190-342-OprI21-83

<400> 1

Ala His His His His His His Ala Pro Ala Pro Glu Pro Val Ala Asp
1 5 10 15

Val Cys Ser Asp Ser Asp Asn Asp Gly Val Cys Asp Asn Val Asp Lys

20 25 30

Cys Pro Asp Thr Pro Ala Asn Val Thr Val Asp Ala Asn Gly Cys Pro
35 40 45

Ala Val Ala Glu Val Val Arg Val Gln Leu Asp Val Lys Phe Asp Phe
50 55 60

Asp Lys Ser Lys Val Lys Glu Asn Ser Tyr Ala Asp Ile Lys Asn Leu
65 70 75 80

Ala Asp Phe Met Lys Gln Tyr Pro Ser Thr Ser Thr Thr Val Glu Gly

85 90 95

His Thr Asp Ser Val Gly Thr Asp Ala Tyr Asn Gln Lys Leu Ser Glu
100 105 110

Arg Arg Ala Asn Ala Val Arg Asp Val Leu Val Asn Glu Tyr Gly Val
115 120 125

Glu Gly Gly Arg Val Asn Ala Val Gly Tyr Gly Glu Ser Arg Pro Val

130 135 140

Ala Asp Asn Ala Thr Ala Glu Gly Arg Ala Ile Asn Arg Arg Val Glu

145 150 155 160

Ser Ser His Ser Lys Glu Thr Glu Ala Arg Leu Thr Ala Thr Glu Asp

165 170 175

Ala Ala Ala Arg Ala Gln Ala Arg Ala Asp Glu Ala Tyr Arg Lys Ala

180 185 190

Asp Glu Ala Leu Gly Ala Ala Gln Lys Ala Gln Gln Thr Ala Asp Glu

195 200 205

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

210 215 220

<210> 2

<211> 161

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OprF190-350

<400> 2

Ala Pro Ala Pro Glu Pro Val Ala Asp Val Cys Ser Asp Ser Asp Asn

1 5 10 15

Asp Gly Val Cys Asp Asn Val Asp Lys Cys Pro Asp Thr Pro Ala Asn

20 25 30

Val Thr Val Asp Ala Asn Gly Cys Pro Ala Val Ala Glu Val Val Arg

35 40 45

Val Gln Leu Asp Val Lys Phe Asp Phe Asp Lys Ser Lys Val Lys Glu

50 55 60

Asn Ser Tyr Ala Asp Ile Lys Asn Leu Ala Asp Phe Met Lys Gln Tyr

65 70 75 80

Pro Ser Thr Ser Thr Thr Val Glu Gly His Thr Asp Ser Val Gly Thr

85 90 95

Asp Ala Tyr Asn Gln Lys Leu Ser Glu Arg Arg Ala Asn Ala Val Arg

100 105 110

Asp Val Leu Val Asn Glu Tyr Gly Val Glu Gly Gly Arg Val Asn Ala
115 120 125
Val Gly Tyr Gly Glu Ser Arg Pro Val Ala Asp Asn Ala Thr Ala Glu
130 135 140
Gly Arg Ala Ile Asn Arg Arg Val Glu Ala Glu Val Glu Ala Glu Ala
145 150 155 160
Lys

<210> 3
<211> 153
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> OprF190-342
<400> 3

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

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

Val Gly Tyr Gly Glu Ser Arg Pro Val Ala Asp Asn Ala Thr Ala Glu
130 135 140

Gly Arg Ala Ile Asn Arg Arg Val Glu

145 150

<210> 4

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OprI21-83

<400> 4

Ser Ser His Ser Lys Glu Thr Glu Ala Arg Leu Thr Ala Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ala Ala Ala Arg Ala Gln Ala Arg Ala Asp Glu Ala Tyr Arg Lys Ala

20 25 30

Asp Glu Ala Leu Gly Ala Ala Gln Lys Ala Gln Gln Thr Ala Asp Glu

35 40 45

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

50 55 60

<210> 5

<211> 83

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 5

Met Asn Asn Val Leu Lys Phe Ser Ala Leu Ala Leu Ala Ala Val Leu

1 5 10 15

Ala Thr Gly Cys Ser Ser His Ser Lys Glu Thr Glu Ala Arg Leu Thr

20 25 30

Ala Thr Glu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Gln Ala Arg Ala Asp Glu Ala

35 40 45

Tyr Arg Lys Ala Asp Glu Ala Leu Gly Ala Ala Gln Lys Ala Gln Gln

50 55 60

Thr Ala Asp Glu Ala Asn Glu Arg Ala Leu Arg Met Leu Glu Lys Ala

65 70 75 80

Ser Arg Lys

<210> 6

<211> 350

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 6

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

Ala Ser Ala Met Asn Ala Phe Ala Gln Gly Gln Asn Ser Val Glu Ile
20 25 30

Glu Ala Phe Gly Lys Arg Tyr Phe Thr Asp Ser Val Arg Asn Met Lys
35 40 45

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

50 55 60

Val Glu Leu Ala Leu Ser Tyr Gly Glu Tyr His Asp Val Arg Gly Thr
65 70 75 80

Tyr Glu Thr Gly Asn Lys Lys Val His Gly Asn Leu Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Ala Ile Tyr His Phe Gly Thr Pro Gly Val Gly Leu Arg Pro Tyr Val
100 105 110

Ser Ala Gly Leu Ala His Gln Asn Ile Thr Asn Ile Asn Ser Asp Ser

115 120 125

Gln Gly Arg Gln Gln Met Thr Met Ala Asn Ile Gly Ala Gly Leu Lys
130 135 140

Tyr Tyr Phe Thr Glu Asn Phe Phe Ala Lys Ala Ser Leu Asp Gly Gln
145 150 155 160

Tyr Gly Leu Glu Lys Arg Asp Asn Gly His Gln Gly Glu Trp Met Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Val Gly Phe Asn Phe Gly Gly Ser Lys Ala Ala Pro Ala

180 185 190

Pro Glu Pro Val Ala Asp Val Cys Ser Asp Ser Asp Asn Asp Gly Val
195 200 205

Cys Asp Asn Val Asp Lys Cys Pro Asp Thr Pro Ala Asn Val Thr Val
210 215 220
Asp Ala Asn Gly Cys Pro Ala Val Ala Glu Val Val Arg Val Gln Leu
225 230 235 240
Asp Val Lys Phe Asp Phe Asp Lys Ser Lys Val Lys Glu Asn Ser Tyr

245 250 255
Ala Asp Ile Lys Asn Leu Ala Asp Phe Met Lys Gln Tyr Pro Ser Thr
260 265 270
Ser Thr Thr Val Glu Gly His Thr Asp Ser Val Gly Thr Asp Ala Tyr
275 280 285
Asn Gln Lys Leu Ser Glu Arg Arg Ala Asn Ala Val Arg Asp Val Leu
290 295 300
Val Asn Glu Tyr Gly Val Glu Gly Gly Arg Val Asn Ala Val Gly Tyr

305 310 315 320
Gly Glu Ser Arg Pro Val Ala Asp Asn Ala Thr Ala Glu Gly Arg Ala
325 330 335
Ile Asn Arg Arg Val Glu Ala Glu Val Glu Ala Glu Ala Lys
340 345 350

<210> 7
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> OprF212-240
<400> 7
Asn Val Asp Lys Cys Pro Asp Thr Pro Ala Asn Val Thr Val Asp Ala
1 5 10 15

Asn Gly Cys Pro Ala Val Ala Glu Val Val Arg Val Gln Leu
20 25 30

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> OprF243-256

<400> 8

Lys Phe Asp Phe Asp Lys Ser Lys Val Lys Glu Asn Ser Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OprF285-298

<400> 9

Thr Asp Ala Tyr Asn Gln Lys Leu Ser Glu Arg Arg Ala Asn

1 5 10

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OprF332-350

<400> 10

Glu Gly Arg Ala Ile Asn Arg Arg Val Glu Ala Glu Val Glu Ala Glu

1 5 10 15

Ala Lys

<210> 11

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ala-(His)6-OprF190-342-OprI21-83, disulfide bond on residues

18-27

<220><221> DISULFID

<222> (18)..(27)

<400> 11

Ala His His His His His His Ala Pro Ala Pro Glu Pro Val Ala Asp

1 5 10 15

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

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

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

195 200 205
Ala Asn Glu Arg Ala Leu Arg Met Leu Glu Lys Ala Ser Arg Lys
210 215 220

<210> 12

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ala-(His)6-OprF190-342-OprI21-83, disulfide bonds on residues 18-27 and 33-47

<220><221> DISULFID

<222> (18)..(27)

<220><221> DISULFID

<222> (33)..(47)

<400> 12

Ala His His His His His His Ala Pro Ala Pro Glu Pro Val Ala Asp

1 5 10 15

Val Cys Ser Asp Ser Asp Asn Asp Gly Val Cys Asp Asn Val Asp Lys

20 25 30

Cys Pro Asp Thr Pro Ala Asn Val Thr Val Asp Ala Asn Gly Cys Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Asp Phe Met Lys Gln Tyr Pro Ser Thr Ser Thr Thr Val Glu Gly

85 90 95

His Thr Asp Ser Val Gly Thr Asp Ala Tyr Asn Gln Lys Leu Ser Glu

100 105 110

Arg Arg Ala Asn Ala Val Arg Asp Val Leu Val Asn Glu Tyr Gly Val

115 120 125

Glu Gly Gly Arg Val Asn Ala Val Gly Tyr Gly Glu Ser Arg Pro Val

130 135 140

Ala Asp Asn Ala Thr Ala Glu Gly Arg Ala Ile Asn Arg Arg Val Glu

145 150 155 160

Ser Ser His Ser Lys Glu Thr Glu Ala Arg Leu Thr Ala Thr Glu Asp

165 170 175

Ala Ala Ala Arg Ala Gln Ala Arg Ala Asp Glu Ala Tyr Arg Lys Ala

180 185 190

Asp Glu Ala Leu Gly Ala Ala Gln Lys Ala Gln Gln Thr Ala Asp Glu

195 200 205

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

210 215 220

<210> 13

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ala-(His)6-OprF190-342-OprI21-83, disulfide bonds on residues 18-47 and 27-33

<220><221> DISULFID

<222> (18)..(47)

<220><221> DISULFID

<222> (27)..(33)

<400> 13

Ala His His His His His His Ala Pro Ala Pro Glu Pro Val Ala Asp

1 5 10 15

Val Cys Ser Asp Ser Asp Asn Asp Gly Val Cys Asp Asn Val Asp Lys

20 25 30

Cys Pro Asp Thr Pro Ala Asn Val Thr Val Asp Ala Asn Gly Cys Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Asp Phe Met Lys Gln Tyr Pro Ser Thr Ser Thr Thr Val Glu Gly

85 90 95

His Thr Asp Ser Val Gly Thr Asp Ala Tyr Asn Gln Lys Leu Ser Glu

100 105 110

Arg Arg Ala Asn Ala Val Arg Asp Val Leu Val Asn Glu Tyr Gly Val

115 120 125

Glu Gly Gly Arg Val Asn Ala Val Gly Tyr Gly Glu Ser Arg Pro Val

130 135 140

Ala Asp Asn Ala Thr Ala Glu Gly Arg Ala Ile Asn Arg Arg Val Glu

145 150 155 160

Ser Ser His Ser Lys Glu Thr Glu Ala Arg Leu Thr Ala Thr Glu Asp

165 170 175

Ala Ala Ala Arg Ala Gln Ala Arg Ala Asp Glu Ala Tyr Arg Lys Ala

180 185 190

Asp Glu Ala Leu Gly Ala Ala Gln Lys Ala Gln Gln Thr Ala Asp Glu

195 200 205

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

210 215 220