



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월26일

(11) 등록번호 10-1588736

(24) 등록일자 2016년01월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 14/29* (2006.01) *A61K 39/40* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01) *C07K 16/12* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2010-7017635
- (22) 출원일자(국제) 2009년01월09일  
 심사청구일자 2013년11월14일
- (85) 번역문제출일자 2010년08월09일
- (65) 공개번호 10-2010-0122902
- (43) 공개일자 2010년11월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/030527
- (87) 국제공개번호 WO 2009/102509  
 국제공개일자 2009년08월20일
- (30) 우선권주장  
 61/020,379 2008년01월10일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 John W. Sumner 등. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 37, No. 5, 페이지 1447-1453 (1999.)  
 Michael J. Yabsley 등. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 41, No. 11, 페이지 5202-5206 (2003.)
- (73) 특허권자  
 리서치 디벨롭먼트 파운데이션  
 미국 네바다주 89703 카슨 씨티 노쓰 디비전 스트리트 402
- (72) 발명자  
 맥브라이드, 예레, 더블유.  
 미합중국 텍사스 77573, 리그 시티, 미스트크릭 코트 5303  
 루오, 티안  
 미합중국 텍사스, 갤버스턴, 미스트크릭 코트 5303
- (74) 대리인  
 김영관

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 **얼리키아 샤피엔시스에 대한 백신 및 진단제**

**(57) 요약**

본 발명은 백신, 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드, 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 얼리키아 샤피엔시스 (*E. chaffeensis*)에 대한 VLPT 면역반응성 조성물 및 이에 관련된 조성물에 관한 것이다. 상세하게는, 얼리키아 샤피엔시스 VLPT 에 대한 에피토프가 기재된다.

**대표도** - 도1a

**N (17)** MSQFSEDNMGNIQMPFD  
**R4 (30)** SDSHEPSHLELPSLSEEVIQLES DLQSSN  
**R3 (30)** SDLHGFSVELFDPFKEAVQLGNDLQSSD  
**R2 (30)** SDLHGFSVELFDPSKEEVQLES DLQSSN  
**R1 (30)** SDLHESSFVELPGPSKEEVQFEDDAKNVVY  
**C (61)** GQDHVSLSELGLLLGGVFSTMNYLSGYTPY  
 YYHHYCCYNPYYYYFDYVTPDYCHHCSESSLE

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 갖고 길이가 50개 이하의 아미노산인 것인 분리된 폴리펩타이드를 포함하는, 얼리키아 감염 진단용 폴리펩타이드 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 분리된 폴리펩타이드는 약제학적으로 허용가능한 희석제에 분산된 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 분리된 폴리펩타이드 중 하나 이상과 면역학적으로 반응하는 분리된 항체.

#### 청구항 13

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

(a) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 갖고 길이가 50개 이하의 아미노산인 것인 분리된 폴리펩타이드; 또는

(b) 상기 (a)의 폴리펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩타이드와 면역학적으로 반응하는 항체의 존재를 개체의 얼리키아 샤페렌시스 감염의 지표로 이용하는 방법으로서, 상기 개체로부터 얻은 시료가 상기 (a)의 폴리펩타이드 또는 상기 (b)의 항체에 대해 분석되는 것인 방법.

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

제24항에 있어서, 상기 분석은 상기 (b)의 항체에 대한 엘라이자 (ELISA)에 의하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

제1항의 폴리펩타이드 조성물을 포함하는, 적합한 용기에 보관된 키트.

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 본 출원은 본 명세서에서 전체적으로 원용에 의해 통합된, 2008년 1월 10일자로 제출된 미국 가출원 일련번호 제61/020,379호에 대한 우선권을 주장한다.
- [0002] 본 발명은 미국 국립보건원 연구보조금 R01 AI 071145-01로부터 나온 자금에 의해 적어도 일부가 작성되었다. 미국 정부는 본 발명에 일정 권리를 갖는다.
- [0003] 본 발명은 적어도 분자생물학, 세포생물학, 병리학 및 수의학에 포함하는 의학의 분야에 관한 것이다. 상세한 관점에서, 본 발명은 얼리키아 샤페엔시스 (*E. chaffeensis*)에서 면역반응하는 VLPT 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0004] 얼리키아 샤페엔시스 (*Ehrlichia chaffeensis*)는 새로이 출현한 인간에서 생명을 위협하는 질병인 인간 단핵구 영양성 에르리히증 (human monocytotropic ehrlichiosis, HME)을 유발하고, 또한 야생 및 가축용 개과 동물에서 가벼운 것에서부터 심각한 질병도 야기하는 진드기로 전염되는 절대적인 세포 내 (obligately intracellular) 박테리아이다 (Paddock and Childs, 2003). 얼리키아 캐니스 (*E. canis*) 그리고 얼리키아 샤페엔시스 (*E. chaffeensis*)와 얼리키아 루미난티움 (*E. ruminantium*)을 포함하는 이 속의 다른 생물의 게놈은 높은 수준의 게놈 신테니 (synteny), 유사 단백질 패밀리를 (paralogous protein families), 막통과 헬릭스 (transmembrane helices) 및/또는 시그널 서열을 가진 단백질의 높은 비율, 및 O-글리코실화와 인산화에 대한 잠재력과 관련된 독특한 세린-트레오닌 편중화를 나타내고, 숙주-병원균 상호작용과 관련된 단백질에서 일렬 반복서열 (tandem repeats)과 안키린 도메인 (ankyrin domains)을 가진다 (Collins *et al.*, 2005; Dunning Hotopp *et al.*, 2006; Frutos *et al.*, 2006; Mavromatis *et al.*, 2006). 이들 게놈 각각에 의해 인코딩되는 900개 이상의 단백질 중 작은 소집합 (subset)이 항체에 의해 인지된다 (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000). 확인되고 분자적으로 특성이 규명된 주요 면역반응하는 단백질의 몇 가지는 분비되는 세린-풍부한 당단백질이다. 이들 당단백질의 많은 수가 일렬 반복서열을 가진다: 그러나 하나는 진핵세포-유사한 여러 가지 안키린 도메인을 가진다 (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000; Nethery *et al.*, 2005; Singu *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2000).
- [0005] 얼리키아 캐니스 (*E. canis*)에서의 두 가지 해당 단백질 (각각 gp140 및 gp36)뿐만 아니라 일렬 반복서열을 가지는 세 가지 면역반응하는 단백질 (gp120, gp47, 및 VLPT)이 얼리키아 샤페엔시스 (*E. chaffeensis*)에서도 확인되고 분자적으로 특성이 규명되었다. 얼리키아 샤페엔시스 gp120 및 gp47은 진한 코아를 가진 얼리키아균 표면 상에서 차별적으로 발현되고 분비되는 주요 면역반응하는 단백질이다 (Doyle *et al.*, 2006; Popov, *et al.*, 2000). 얼리키아 캐니스의 gp36 뿐만 아니라 얼리키아 샤페엔시스의 면역반응하는 단백질 (gp120, gp47 및 VLPT)에서 일렬 반복서열의 숫자 및/또는 서열 상의 광범위한 다양성은 잘 문서로 기재되어 있다 (Chen *et al.*, 1997; Doyle *et al.*, 2006; Sumner *et al.*, 1999). 상기 gp120은 둘 내지 다섯 개의 거의 일치하는 세린-풍부한 TRs를 각각 80개-아미노산과 함께 포함하고, 또한 gp47 은 각 종의 서로 다른 분리물에서 아미노산 숫자 및 서열이 다양해지는 카르복시-말단 세린-풍부한 TRs를 가진다. gp120 및 gp47 둘 다의 주요 항체 에피토프는 이들 세린-풍부한 산성의 TRs로 맵핑되었다 (Doyle *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997). 유사하게, 상기 VLPT 는 셋 내지 여섯 개의 일치하지 않는 세린-풍부한 TRs (30개 아미노산)을 가진다; 그러나 얼리키아 캐니스의 해당 단백질 (gp19)은 다중 TRs가 없다. 게놈의 코딩 및 비코딩 부위 모두에서 일렬 반복서열의 존재는 얼리키아 게놈의 활발한 확장 및 감소 과정과 연결되어 왔고 (Frutos *et al.*, 2006) 또한 게놈의 변화와 불안정성의 주요한 원인으로 생각된다 (Bzymek and Lovett, 2001). 상기 얼리키아 샤페엔시스 vlpt 유전자도 역시 90-bp 일렬 반복서열의 숫자 (2 내지 6)에서 다양성을 나타내고 분자적 진단 표적으로서 분리물의 구별 (differentiation)을 위해 사용되어 왔다 (Sumner *et al.*, 1999; Yabsley *et al.*, 2003).
- [0006] 최근에 강력한 산성을 띠는 얼리키아 캐니스의 19-kDa 주요 면역반응하는 단백질 (gp19)이 확인되었고, 이는 얼리키아 샤페엔시스에서의 VLPT 단백질에 관하여 이전에 보고된 바와 동일한 상대적인 염색체 위치와 C-말단의 시스테인-타이로신-풍부한 도메인에서 실질적인 상동성 (homology)을 가진다. 그러나, 얼리키아 샤페엔시스 VLPT 가 면역반응성을 가지는 하지만, 그의 세포 내 위치, 기능 및 보호적 면역의 발생에서의 역할에 관해서 거의 알려져 있지 않다. 또한, 자연 상태 (native) VLPT의 분자량 (molecular mass)에 대해서도 알지 못한다.

엘리키아 샤피엔시스 아르칸사스 균주 (*E. chaffeensis* Arkansas strain)가 44-kDa이라고 제시되기는 하였지만, 이 분자량에 해당하는 면역반응하는 단백질은 보고된 바가 없었다 (Sumner *et al.* 1999). 엘리키아 샤피엔시스 아르칸사스의 VLPT는 네 개의 반복서열 (30개 아미노산)을 가지는 198개 아미노산 단백질이지만, 그의 아미노산 서열에 의해 예측되는 것과는 대략 두 배가 되는 분자량을 가진다 (Sumner *et al.*, 1999). 엘리키아 샤피엔시스 VLPT 단백질은 다른 기재된 엘리키아 당단백질과 일치하는 번역 후 수식 (posttranslational modification)을 하는 것으로 보이지만, VLPT 상에서 탄수화물의 존재가 밝혀지지는 않았다.

[0007]

감염 시 체액성 면역을 나타내는 데 관여하는 엘리키아 면역 결정기 (immunodeterminants)의 분자적 특성을 정의하는 것은 엘리키아 종에 대한 면역의 기초를 이해하기 위해 중요하다. 본 발명은 포유동물에서 엘리키아 감염에 관하여 새로운 방법 및 조성물을 제공하여 당해 기술분야에서 필요를 채우고, 상세하게는 엘리키아 샤피엔시스 (*E. chaffeensis*) VLPT를 사용하는 방법 및 조성물을 제공한다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008]

인간 단핵구영양성 에르리히증 (human monocytotropic ehrlichiosis, HME)은 절대적인 세포 내 세균인 엘리키아 샤피엔시스 (*Ehrlichia chaffeensis*)에 의해 유발되는 진드기-유래 질병이다. 일반적으로, 본 발명은 엘리키아 조성물 및 그들을 제조하고 이용하는 방법에 관한 것이다. 특정한 구체예에서, 본 발명은 예를 들어 서브유닛 백신과 같은 엘리키아 질병에 대한 백신으로서, 면역보호적 (immunoprotective) 항원을 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 본 면역원성 조성물은 예를 들어 인간, 개, 고양이, 말, 돼지, 염소 또는 양을 포함하는 어떠한 포유동물에라도 사용될 수 있다.

[0009]

엘리키아 샤피엔시스 (*Ehrlichia chaffeensis*) 및 엘리키아 캐니스 (*E. canis*)는 강한 숙주 면역 반응을 나타내고 숙주-병원균 상호작용과 연관을 가지는 일렬-반복서열 (tandem-repeat, TR)을 포함하는 단백질의 작은 소집합을 가진다. 이전에, 엘리키아 캐니스의 매우 보존되어 있는 (highly conserved) 19-kDa 주요 면역반응하는 단백질(gp19)이 특성 분석되었고 이에 해당하는 TR-포함하는 해당 단백질의 가변-길이 PCR 표적 (variable-length PCR target, VLPT) 단백질이 엘리키아 샤피엔시스에서 확인된 바 있었다. 본 발명의 한 가지 구체예에서, 자연 상태의 32-kDa VLPT 단백질이 확인되며 더 나아가 엘리키아 샤피엔시스의 숙주 면역반응의 분자적 기초를 밝히기 위해 면역결정기가 규명된다. VLPT의 다양한 부위에 해당하는 합성 및/또는 재조합 폴리펩타이드가 TR-포함하는 부위에 주요 항체 에피토프를 정착시키기 위해 사용되었다. 주요 항체 에피토프는 세 가지 일치하지 않는 반복서열 (R2, R3 및 R4)에서 확인되었는데, 이는 엘리키아 샤피엔시스-감염된 개 및 HME 환자로부터 얻은 혈청에 존재하는 항체와 강하게 반응하였다. VLPT-R3 및 VLPT-R2 가 항체와 가장 강하게 반응하였고, 더 나아가 에피토프는 중-특이적인 이들 반복서열 사이에 공통적인 거의 일치하는 연결부 (proximal) 17-아미노산 부위에 정착하고 있었다. R4에서의 에피토프는 R2 및 R3의 에피토프와는 구별되었고 구조적인 의존성 (conformational dependence)을 가지는 것이 발견되었다. VLPT는 감염된 세포로부터 얻은 상청액에서 검출되어 상기 단백질이 분비되는 것을 보여주었다. VLPT는 망상 (reticulate) 및 진한-코어를 가진 (dense-cored) 세포 둘 다에 정착하고 있었으며, 이는 세포외적으로 상실배 원섬유 기질 (morula fibrillar matrix)에서 발견되었고 상실배 막과 연관되어 있었다.

[0010]

본 발명의 일정 관점에서는, 엘리키아 샤피엔시스에서 주요 면역반응 하는 당단백질인 VLPT, 즉 엘리키아 캐니스 gp19의 해당 단백질의 확인 및 특성 분석이 존재한다. 상기 엘리키아 캐니스 gp19는 엘리키아 샤피엔시스 VLPT 에 존재하는 일렬 반복서열이 결여되어 있지만, 이들 두 단백질은 시스테인/타이로신-풍부한 카르복실-말단 부위에서 실질적인 아미노산 유사성 (59%)을 나타내고 상기 두 유전자는 동일한 상대적인 염색체 위치 (location)를 가진다. 재조합 엘리키아 TR-포함하는 단백질 상에 탄수화물은 그의 자연 상태의 것과 유사한 예상된 분자량 (predicted mass)보다 더 큰 것으로 밝혀졌다. VLPT는 젤 전기영동에 의해 예상되는 분자량보다 더 큰 것을 보여주고, 이는 자연 상태 및 재조합 VLPT 단백질 모두에서 관찰되는 발견이다. 세린과 트레오닌 잔기는 0-글리칸의 연결 부위이고, 이들 아미노산의 일부는 VLPT 상의 글리칸 부착 부위가 될 것으로 예측되었다. 그러나, 다른 엘리키아 단백질과는 달리, 탄수화물이 VLPT 상에서 발견되지 않았으며, 단편 (VLPT-R32; 반복서열 R3 및 R2의 조합)을 포함하는 두 가지 재조합 반복서열의 분자량 (MALDI-TOF에 의해 결정됨)은 그의 예상된 분자량과 일치하여 비정상적인 이동이 VLPT 일렬 반복서열의 번역 후 수식으로 인한 것이 아닌 점을 입증해 주었다. 대안의 구체예에서, 그러나 VLPT 는 번역 후 수식적으로 변형된다. VLPT은 높은 산성을 띠는 단백질이고, 이는 일정 구체예에서 전기영동적 이동의 증가와 관련이 있다. 특정한 구체예에서, VLPT의 높은 산성 아미노산의 함량 및 낮은 전체적인 pI (3.8)는 그의 전기영동적 행동과 관련이 있고, 특정한 경우에 다른 높은

산성을 띠는 TR-포함하는 얼리키아 단백질의 변칙적인 행동에 기여하기도 한다.

- [0011] 본 발명의 특정한 관점에서, 하기 특성의 하나 이상을 가지는 얼리키아 VLPT 폴리펩타이드 조성물 (또는 그들의 전부 또는 일부를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 조성물)이 존재한다: 1) 특정한 구체예에서 에피토프 결정기의 일부를 포함하는 하나 이상의 부분 (moiety)을 포함하고; 2) 에피토프와 같이 면역원성으로 중-특이적인 하나 이상의 부분을 포함하며; 3) 분비에 의해서와 같이 세포외로 방출되고; 4) 주요 B 세포 에피토프를 포함하며; 5) 표면에 노출되고; 6) 예를 들어 표면 상에서와 같이 얼리키아균의 감염성 진한-코아 형태와 연관이 있으며; 7) 상실배 원섬유 (morula fibrils)와도 연관이 있다 (얼리키아균은 많은 개별 얼리키아균을 함유하는 세포 내 배큐올 [상실배 (morulae)] 내부에 마이크로콜로니를 형성한다.). 더 나아가 관점에서, 본 발명의 재조합 폴리펩타이드 조성물은 예를 들어 백신을 포함하는 면역원성 조성물로서 사용될 수 있다.
- [0012] 본 발명의 상세한 구체예에서는, 면역원성인 아미노산 서열을 포함하는 얼리키아 샤페렌시스 VLPT 면역원성 조성물이 존재하고, 더 나아가 상세한 구체예에서는, 면역원성은 에피토프의 적어도 일부에 의해 특성 분석된다. 더 나아가 구체예에서, 아미노산 서열은 얼리키아 샤페렌시스와 같은 얼리키아 생물체에 대항하는 백신 조성물의 적어도 일부를 포함한다. 특정한 구체예에서, 상기 아미노산 서열은 세린, 트레오닌, 및/또는 선택사항으로, 알라닌, 프롤린, 발린, 및/또는 글루탐산을 포함한다.
- [0013] 더 나아가 특정한 구체예에서, 본 발명의 아미노산 서열, 예를 들어 면역원성 아미노산 서열은 하기 대표적인 서열의 일부 또는 전부를 포함한다: SDSHEPShLELPSLSEEVlQLESdLQSSN (서열번호 3); 대표적인 서열: SDLHGFSVSLFDPFKEAVQLGNDLQSSD (서열번호 4); 대표적인 서열: SDLHGFSVSLFDPKSKEEVQLESdLQSSN (서열번호 5); 대표적인 서열: SDLHGFSVSLFDPFKE (서열번호 8); 대표적인 서열: HGSFSVSLFDPFKE (서열번호 9); 대표적인 서열: HGSFSVSLFDPFKEAVQ (서열번호 10); 대표적인 서열: HGSFSVSLFDPFKEAVQLGN (서열번호 11). 추가적인 구체예에서, 상기 아미노산 서열은 본 발명의 일정 관점에서 아주반트 (adjuvant)를 포함하는, 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함한다. 본 발명의 일정 관점에서 서열번호 1 (MSQFSEDNMGNIQMPFDSHLEPShLELPSLSEEVlQLESdLQSSNSDLHGFSVSLFDPFKEAVQLGNDLQSSDSDLHGFSVSLFDPKSKEEVQLESdLQSSNSDLHESSVSLFPGPSKEEVQFEDDAKNVYVYGDHVSLSLGLLGGVFTMNYLSGYTPYHHYCCYNPYYPDYVTPDYCHHCSESSLE)의 폴리펩타이드 서열을 인코딩하는 서열번호 16 (tttatatttatatatgatataataatgataatggtatgtggtataactgcttatagttgatcatgtactctgtgttatgttaaatagggtataaaatgtcacaaatctctgaagataatagggtataacaaatgccttttgattctgattcacatgagccttctcatcttgagctacctagctcttctgaagaagtgtcaattagagagtgatctacaacaatcttcaatctgatttacacgggtcttttctgttgagtatttgatcctttaaagaagcagttcaattggggaatgatctacaacaatcttctgattctgatttacacgggtcttttctgttgagtatttgatccttctaaagaagaagttcaattggagagtgatctacaacaatcttcaatctgatttacacgagctcttctttgttgagttacctggctctccaagaagaagttcaattcgaagatgatgctaaaaatgtagtatatggacaagaccatgttagtttatctgaattaggcttatgttaggtggtgttttagtacaatgaatatttgctggttatacaccgtattattatcattattgtttgattataatccttattatttttgattatgttactccagattatgtcatcactgtagtgaagtagtttagagtaggatattagaataataatggtgttgacttcacaaagggtgtagttttatgttttatgctgttttatagtggtataaggatagagttgttttactatttt)을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 존재한다.
- [0014] 본 발명의 일정 구체예에서, 면역원성 VLPT 얼리키아 샤페렌시스 조성물이 존재하고, 상기 VLPT 조성물의 특정한 서열은 그의 면역원성을 부여할 수 있다; 예를 들어, 상기 VLPT 조성물의 부위는 에피토프를 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일정 관점에서, 다중의 (multiple) 서로 다른 얼리키아 샤페렌시스 균주는 면역원성 VLPT 조성물을 포함하고, 균주들 중에서 중요한 서열 일치도가 에피토프를 포함하는 상기 VLPT 조성물의 부위에서 존재한다 (예를 들어, 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 보다 더 큰 것과 같이).
- [0016] 그러나 일정 구체예에서, 균주들 중에서 중요한 서열 동일성이 에피토프를 포함하지 않는 VLPT 조성물의 부위에서 존재할 수 있다. 본 발명의 상세한 관점에서, 하나 이상의 얼리키아 샤페렌시스 균주에 대해 면역원성을 가지는 VLPT 조성물이 존재하고, 또한 상세한 관점에서 이 균주의 하나의 에피토프가 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11이거나 이를 포함하거나 이로써 구성되거나 필수적으로 구성된다. 대안의 VLPT 얼리키아 샤페렌시스 에피토프가 확인된 구체예에서, 예를 들어 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11를 포함하는 혼합물과 같은 VLPT 얼리키아 샤페렌시스 에피토프의 혼합물을 포함하는 면역원성 조성물이 제공될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 면역원성 VLPT 얼리키아 샤페렌시스 당단백질이 존재한다. 본 발명의 추가적인 구체예에서는, 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11

를 포함하는 얼리키아 샤페렌시스 조성물이 존재한다. 본 발명의 특정한 관점에서, 조성물은 더 나아가 억제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다. 본 조성물은 더 나아가 하나 이상의 탄수화물 부분을 포함하는 것, 에피토프의 일부 또는 전부를 포함하는 것, 및/또는 서브유닛 백신과 같은 백신으로서 정의된다.

[0018] 본 발명의 다른 구체예에서, 서열번호 16의 폴리뉴클레오타이드의 적어도 일부분에 의해 인코딩되는 폴리펩타이드를 포함하는 얼리키아 샤페렌시스 조성물 및/또는 서열번호 1의 폴리펩타이드를 포함하는 얼리키아 샤페렌시스 조성물이 존재한다. 본 발명의 한 가지 구체예에서는, (a) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11:로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열; 또는 (b) 상기 (a)에서의 하나 이상의 서열과 적어도 약 70%가 일치하는 서열:을 포함하는 얼리키아 VLPT 당단백질을 포함하는 분리된 조성물이 존재한다. 본 조성물은 더 나아가 (a)에서의 하나 이상의 서열과 적어도 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 85%, 약 90%, 또는 약 95%가 일치하는 서열로서 정의될 수 있다. 본 조성물도 역시 억제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것, 하나 이상의 탄수화물 부분을 포함하는 것, 및/또는 백신으로서 적합한 억제학적 조성물을 포함하는 것으로서 정의될 수 있다.

[0019] 특정한 구체예에서, 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11 또는 그들의 혼합물을 인코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드가 존재한다.

[0020] 상세한 구체예에서, a) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드; 또는 b) 면역반응하는 얼리키아 샤페렌시스 VLPT 폴리펩타이드를 인코딩하는 a) 뉴클레오타이드와 적어도 대략 90%가 일치하는 폴리뉴클레오타이드가 존재한다.

[0021] 본 발명의 추가적인 구체예에서는, a) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11: 또는 b) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11 과 적어도 약 70%가 일치하는 VLPT 폴리펩타이드를 포함하고, 면역원성 활성을 포함하는 분리된 폴리펩타이드가 존재한다. 특정한 구체예에서, 폴리펩타이드는 억제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하고 및/또는 이것은 더 나아가 백신으로 적합한 억제학적 조성물을 포함하는 것으로서 정의될 수 있다.

[0022] 본 발명의 일정 관점에서, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 또는 서열번호 22의 대표적인 프라이머 하나 이상에 의해 증폭될 수 있는 폴리뉴클레오타이드가 존재한다 (표 4).

[0023] 본 발명의 다른 관점에서는, 본 발명의 폴리펩타이드 하나 이상과 결합하는 분리된 항체가 존재한다. 항체는 예를 들어 모노클론, 폴리클론, 항체 단편일 수 있다. 상세한 구체예에서, 항체는 VLPT의 에피토프에, 예를 들어 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11을 포함하는 것에 선택적으로 결합한다. 특정 구체예로서, 항체는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 폴리펩타이드에 면역학적으로 반응하는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 추가적인 구체예에서는, VLPT 항체, 폴리펩타이드, 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 같은 본 발명의 조성물의 치료학적 유효량을 개인에게 전달하는 단계를 포함하는 얼리키아 샤페렌시스 감염에 대한 저항성을 제공하는 방법이 존재한다.

[0025] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 VLPT 폴리펩타이드의 치료학적 유효량을 개인에게 전달하는 단계를 포함하는 개인에서 면역 반응을 유도하는 방법이 존재한다. 본 발명의 추가적인 구체예에서는, 노출 전 또는 노출된 것으로 의심되는 또는 얼리키아 샤페렌시스가 감염된 개체를 확인하고; 얼리키아 샤페렌시스 감염을 억제하기 위해 본 발명의 폴리펩타이드, 항체 및/또는 폴리뉴클레오타이드를 억제학적 유효량으로 투여하는: 단계를 포함하는 개체에서 얼리키아 샤페렌시스 감염을 억제하거나 예방하는 방법이 존재한다.

[0026] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터와 같은 벡터 내에 포함될 수 있고, 여기서 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터 (adenoviral vector), 레트로바이러스 벡터 (retroviral vector), 렌티바이러스 벡터 (lentiviral vector), 아데노-관련 벡터, 허피스 바이러스 벡터, 또는 백시니아 바이러스 벡터일 수 있고 또한 비-바이러스 벡터는 플라스미드일 수 있다. 본 발명의 더 나아가 관점에서, 벡터는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 (operably linked) 프로모터를 포함할 수 있고, 여기서 프로모터는 원핵생물, 진핵생물 또는 둘 다에서 작동할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 리포솜 (liposome)을 포함할 수 있고 및/또는 억제학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일정 관점에서, 본 발명의 폴리펩타이드와 면역학적으로 반응하는 분리된 항체가 존재하고, 이 항체는 예를 들어 모노클론 항체일 수 있고, 폴리클론 항체형에 포함될 수 있으며, 또는 항체 단편일 수 있다.

- [0028] 본 발명의 다른 구체예에서, 폴리펩타이드, 항체 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 같은 본 발명의 조성물의 약제학적 유효량을 개인에게 전달하는 단계를 포함하는 개인에서 면역 반응을 유도하는 방법이 존재한다.
- [0029] 본 발명의 추가적인 구체예에서는, 노출 전 또는 노출된 것으로 의심되는 또는 얼리키아 샤피엔시스가 감염된 개체를 확인하고; 얼리키아 샤피엔시스 감염을 억제하기 위해 본 발명의 폴리펩타이드를 약제학적 유효량으로 투여하는: 단계를 포함하는 개체에서 얼리키아 샤피엔시스 감염을 억제하는 방법이 존재한다. 본 발명의 더 나아가 구체예에서는, 본 발명의 항체, 폴리펩타이드, 및/또는 폴리뉴클레오타이드에 대하여 개인으로부터 얻은 시료를 분석하는 단계를 포함하는 개인에서 얼리키아 샤피엔시스 감염을 확인하는 방법이 존재한다.
- [0030] 본 발명의 특정한 관점에서, 폴리펩타이드는 더 나아가 예를 들어 길이가 10부터 11개 아미노산까지 되는, 길이가 10부터 12개 아미노산까지 되는, 길이가 10부터 13개 아미노산까지 되는, 길이가 10부터 14개 아미노산까지 되는, 길이가 10부터 15개 아미노산까지 되는, 길이가 10부터 17개 아미노산까지 되는, 길이가 10부터 20개 아미노산까지 되는, 길이가 10부터 25개 아미노산까지 되는, 길이가 14부터 20개 아미노산까지 되는, 길이가 14부터 25개 아미노산까지 되는, 길이가 14부터 27개 아미노산까지 되는, 길이가 14부터 30개 아미노산까지 되는, 길이가 15부터 30개 아미노산까지 되는, 길이가 16부터 20개 아미노산까지 되는, 길이가 16부터 25개 아미노산까지 되는, 길이가 16부터 30개 아미노산까지 되는, 길이가 17부터 20개 아미노산까지 되는, 길이가 17부터 25개 아미노산까지 되는, 길이가 17부터 30개 아미노산까지 되는, 길이가 20부터 25개 아미노산까지 되는, 길이가 20부터 30개 아미노산까지 되는, 길이가 24부터 30개 아미노산까지, 길이가 24부터 35개 아미노산, 길이가 24부터 40개 아미노산, 길이가 24부터 45개 아미노산까지, 길이가 24부터 50개 아미노산까지, 길이가 24부터 55개 아미노산까지, 길이가 24부터 60개 아미노산까지, 길이가 24부터 65개 아미노산까지, 길이가 24부터 70개 아미노산까지, 길이가 24부터 75개 아미노산까지, 길이가 24부터 80개 아미노산까지, 길이가 24부터 85개 아미노산까지, 길이가 24부터 90개 아미노산까지, 길이가 24부터 95개 아미노산까지, 길이가 24부터 100개 아미노산까지, 길이가 30부터 50개 아미노산까지 되는, 길이가 30부터 45개 아미노산까지 되는, 또는 길이가 30부터 55개 아미노산까지 되는 것으로서 정의된다.
- [0031] 상세한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 길이가 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 또는 75개 또는 그 이상 아미노산이 된다. 본 발명의 일정 관점에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 길이가 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 또는 75 개 아미노산을 넘지 않는다.
- [0032] 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11을 포함하는 폴리펩타이드의 변형체는 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11과 적어도 80%가 일치하는 것으로서; 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11과 적어도 85%가 일치하는 것으로서; 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11과 적어도 90% (또는 91%, 또는 92%, 또는 93%, 또는 94%)가 일치하는 것으로서; 또는 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11과 적어도 95% (또는 96%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%)가 일치하는 것으로서 정의될 수 있다.
- [0033] 추가적인 구체예에서는, 개인에서 면역 반응을 나타낼 수 있는, (a) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11을 가지는 펩타이드; 또는 (b) 변형체가 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11와 적어도 75%가 일치하는 (a) 펩타이드의 변형체를 포함하는 조성물이 존재한다. 특정한 구체예에서는, 길이가 14 부터 30개 아미노산까지 되는 펩타이드가 존재한다. 특정한 구체예에서, 본 변형체는 더 나아가 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 일치하는 것으로서 정의된다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 개인을 위해 얼리키아 샤피엔시스에 대항하는 면역을 제공하는 활성을 가지는 것으로서 정의될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개인을 위해 얼리키아 샤피엔시스에 대항하는 면역 반응을 유도하는 활성을 가지는 것으로서 정의될 수 있다. 본 발명의 조성물은 본 명세서에서 제공되는 폴리펩타이드, 펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 및/또는 항체 모두를 포함한다.
- [0035] 핵산 분자는 더 나아가 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터와 같은 벡터에 포함되는 것으로서 정의될 수 있고, 여기서 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 레트로바이러스 벡터, 또는 아데노-관련 바이러스 벡터를 포함

할 수 있다. 핵산 분자는 리포솜을 포함할 수 있다.

- [0036] 특정한 구체예에서, 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열과 면역학적으로 반응하는 분리된 항체가 존재한다. 더 나아가 특정한 구체예에서, 항체는 모노클론 항체이고, 폴리클론 항혈청에 포함되며, 또는 항체 단편이다.
- [0037] 추가적인 구체예에서는, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포를 제공하고, 및 인코딩된 폴리펩타이드를 생산하기 위하여 숙주 세포가 폴리뉴클레오타이드를 발현하기에 적합한 조건 하에서 세포를 배양하는 것을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하는 방법이 존재한다. 본 방법은 더 나아가 폴리펩타이드를 분리하는 것을 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 추가적인 구체예에서, 본 발명의 조성물의 약제학적 유효량을 개인에게 전달하는 단계를 포함하는 개인에서 면역 반응을 유도하는 방법이 존재한다.
- [0039] 본 발명의 더 나아가 구체예에는, 본 발명의 조성물의 유효량을 노출 전 또는 노출된 것으로 의심되는 또는 얼리키아 사피엔시스가 감염된 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 얼리키아 사피엔시스 감염을 억제하는 방법이 존재한다.
- [0040] 본 발명의 추가적인 구체예에서, 하기 나열된 (a) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11, 또는 그의 혼합물; 또는 (b) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열과 면역학적으로 반응하는 항체:의 하나 또는 둘 다에 대하여 개인으로부터 얻은 시료를 분석하는 단계를 포함하는, 개인에서 얼리키아 사피엔시스 감염을 확인하는 방법이 존재한다. 특정한 구체예에서, (b)의 항체는 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11의 아미노산 서열과 면역학적으로 반응한다. 특정한 관점에서, 항체를 대하여 시료를 분석하는 것은 더 나아가 (b)의 항체보다는 하나 이상의 얼리키아 사피엔시스 항체에 대하여 분석 가능하게 하는 것에 의해서와 같이 엘라이자에 의해 항체에 대하여 분석하는 것으로서 정의된다.
- [0041] 본 발명의 구체예에서는, 하기 나열된 (a) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11을 포함하는 분리된 폴리펩타이드; (b) (a)의 폴리펩타이드와 적어도 70%가 일치하는 분리된 폴리펩타이드; (c) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11을 포함하는 분리된 폴리펩타이드; (d) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11과 적어도 70%가 일치하는 분리된 폴리펩타이드; (e) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열과 면역학적으로 반응하는 분리된 항체:의 조성물 하나 이상을 포함하는 키트가 존재한다. 특정한 구체예에서, 키트는 더 나아가 둘 이상의 조성물을 포함하는 것으로서 정의된다.
- [0042] 본 발명의 한 가지 구체예에서, 하기 (a) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드; 또는 (b) (a)의 폴리펩타이드와 적어도 95%가 일치하는 분리된 폴리펩타이드: 하나 이상을 포함하는 폴리펩타이드 조성물이 존재한다. 특정한 구체예에서, 분리된 폴리펩타이드는 약제학적으로 허용가능한 희석제에 분산된다. 다른 특정한 구체예에서, (a)의 폴리펩타이드는 서열번호 2, 서열번호 4 및 서열번호 5를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 추가적인 특정한 구체예에서, (a)의 폴리펩타이드는 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10 또는 서열번호 11를 포함하는 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0043] 본 발명의 추가적인 구체예에서, 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 및 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열과 면역학적으로 반응하는 분리된 항체가 존재한다. 특정한 구체예에서, 항체는 모노클론 항체 또는 폴리클론 항체이다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물의 약제학적 유효량을 개인에게 전달하는 단계를 포함하는 개인에서 면역 반응을 유도하는 방법이 존재한다. 본 발명의 한 가지 구체예에서는, 본 발명의 조성물의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 얼리키아 사피엔시스 감염을 억제하는 방법이 존재한다.
- [0045] 본 발명의 일정 관점에서, 하기 나열된 (a) 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 또는 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드; 또는 (b) (a)의 폴리펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산과 면역학적으로 반응하

는 항체:의 하나에 대하여 개인으로부터 얻은 시료를 분석하는 단계를 포함하는, 개인에서 얼리키아 사피엔시스 감염을 확인하는 방법이 존재한다. 한 가지 구체예에서, 시료는 서열번호 17 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드에 대하여 분석된다. 특정한 구체예에서, 본 분석법은 (b)의 항체에 대한 엘라이자에 의한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 방법은 더 나아가 개인으로부터 얻은 시료를 획득하는 것을 포함한다.

[0046] 본 발명의 추가적인 구체예에서, 본 발명의 폴리펩타이드 조성물을 포함하는 적합한 용기에 보관된 키트가 존재한다. 일정 구체예에서, 본 키트는 둘 이상의 본 발명의 폴리펩타이드를 포함한다. 특정한 구체예에서, 폴리펩타이드는 서열번호 3; 서열번호 4; 서열번호 5; 서열번호 8; 서열번호 9; 서열번호 10; 및/또는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함한다.

[0047] 상기 내용은 하기 기술되는 발명의 상세한 설명을 더 잘 이해할 수 있도록 본 발명의 특징 및 기술적 장점을 광범위하게 윤곽을 그리려고 하였다. 본 발명의 추가적인 특징 및 장점은 본 발명의 청구범위의 주제를 형성하는 하기 내용에 기술될 것이다. 당업자라면 당연히 기재된 개념 및 특정한 구현예가 본 발명의 동일한 목적을 달성하기 위하여 다른 구조를 변형하거나 설계하는 기초로서 바로 사용될 수 있는 점을 이해하고 있다. 당업자라면 또한 당연히 이러한 동등한 구조물이 첨부된 청구범위에 기술된 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않는 것을 깨닫고 있다. 본 발명의 특징이라고 믿어지는 새로운 요점, 즉 더 나아가 목적 및 장점과 함께 그의 구성 및 작동 방법 둘 다에 관한 것은 첨부되는 도면과 연결하여 생각할 때 하기 기술로부터 더 잘 이해될 것이다. 그러나, 각 도면은 묘사와 기술만의 목적을 위해 제공된 것이고 본 발명의 제한의 정의로서 의도된 것이 아니라 는 점을 분명하게 이해해야 한다.

**과제의 해결 수단**

[0048] 본 출원은 2007년 8월 7일 제출된 국제특허출원 PCT/US2007/75343, 및 2006년 8월 31일에 제출된 미국 가출원 일련번호 제60/841,465호 전부를 원용에 의해 통합한다.

**I. 정의**

[0050] 오래 유지된 특허법의 전통을 유지하면서, 단어 "하나(a)" 및 "하나(an)"는 본 청구범위를 포함하여 단어 포함하는 (comprising)과 조화시켜 본 명세서에서 사용될 때, "하나 이상 (one or more)"을 의미한다. 본 명세서에서 기술된 어떠한 방법 또는 조성물이라도 본 명세서에 기술된 다른 방법 또는 조성물에 관하여 사용될 수 있는 점을 주시해야 한다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "탄수화물 (carbohydrate)"은 탄소, 수소 및 산소를 포함하는 조성물, 상세하게는 2 H : 1 C : 1 O 비율인 것을 말한다. 본 용어는 예를 들어 당, 전분, 및 셀룰로오스를 포함한다.

[0052] 본원에 사용된 용어 "에피토프 (epitope)"는 특이 항체가 결합하는 조성물의 부위를 말한다.

[0053] 본원에 사용된 용어 "글리칸 (glycan)"은 "다당류 (polysaccharide)"라고도 언급될 수 있으며, 가수분해에 의해 둘 이상의 모노사카라이드로 분해되는 탄수화물을 말한다. 다른 말로 하면, 이것은 단순한 당류의 사슬이라고 언급될 수 있다 (폴리하이드트릭 알코올의 알데하이드 또는 케톤 유도체).

[0054] 당업계에 공지된 용어 "동일성 (identity)"은 서열들을 비교하여 결정된 둘 이상의 폴리펩타이드 분자 또는 둘 이상의 핵산 분자의 서열들 간 연관성을 말한다. 당해 기술에서 "동일성"은 또한 해당 사례일 경우 둘 이상의 핵산 잔기 또는 둘 이상의 아미노산 잔기의 사슬들 간 맞아떨어지는 숫자에 의해 결정되는 핵산 분자들 간 또는 폴리펩타이드들 간 서열 관련성의 정도를 의미한다. "동일성"은 특정한 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램 (예로, "알고리즘")에 의해 표시되는 간격 배열 (있는 경우)을 가지는 더 작은 둘 이상 서열들 간 일치하는 매치 퍼센트를 측정한다.

[0055] 본원에 사용된 용어 "면역원성 (immunogenic)"은 이에 대하여 면역 반응을 유발할 수 있는 조성물을 말한다.

[0056] 본원에 사용된 용어 "면역 반응 (immune response)"는 항원에 대한 항체를 만드는 것에 의한 항원 존재에 대한 면역 시스템의 반응을 말한다. 더 나아가 구체예에서, 항원에 대한 면역은 세포 수준에서 전체적인 몸에 의해 발생할 수 있고, 항원에 대한 과다 민감성 (hypersensitivity)도 발달될 수 있으며, 및/또는 연속적인 도전으로부터인 것과 같이 내성이 생길 수 있다. 특정한 구체예에서, 면역 반응은 항원성 분자를 외래 물질로 확인하여 항체의 형성을 유도하는 림프구 및 이와 반응하고 이를 덜 유해하게 만드는 림프구를 포함한다.

- [0057] 본원에 사용된 용어 "면역반응성 (immunoreactive)"는 개인의 혈청으로부터 얻은 항체와 반응하는 조성물을 말한다. 특정한 구체예에서, 조성물은 항체가 이를 인지하는 경우 이에 결합하는 것 및/또는 이와 면역학적으로 반응하는 것에 의해서와 같이 면역반응한다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "뮤신 (mucin)"은 하나 이상의 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc.)으로 높게 글리코실화된 당단백질을 말한다.
- [0059] 본원에 사용된 용어 "오쏘로그 (ortholog)"는 하나의 종에서 폴리뉴클레오타이드에 해당하는 다른 종으로부터 얻은 폴리뉴클레오타이드를 말하고; 상기 두 폴리뉴클레오타이드는 공통 조상의 종을 통해 연관된다 (상동한 폴리뉴클레오타이드). 그러나, 하나의 종으로부터 얻은 폴리뉴클레오타이드는 진화하여 나머지 종의 폴리뉴클레오타이드와는 달라진다.
- [0060] 용어 "유사도(similarity)"는 관련된 개념이지만, "동일성"과는 대조적으로 일치하는 매치와 보존되는 치환 매치 둘 다를 포함하는 서열 연관성을 말한다. 두 가지 폴리펩타이드가 예를 들어 {분획 (10/20)} 일치하는 아미노산을 가지고, 나머지는 모두 비-보존적인 치환인 경우라면 퍼센트 동일성 및 유사도는 둘 다 50%일 수 있다. 만일, 동일한 예에서 보존되는 치환이 존재하는 5 이상의 위치가 존재하는 경우라면, 퍼센트 동일성은 동일성은 있지만 퍼센트 유사도는 75%가 될 수 있다 ({분획 (15/20)}). 따라서, 보존되는 치환이 존재하는 경우에서, 두 폴리펩타이드 간 유사도의 정도는 이들 두 폴리펩타이드 간 퍼센트 동일성보다 더 높을 것이다.
- [0061] 본원에 사용된 용어 "유닛 백신 (unit vaccine)"은 전체 생물에 대항하는 폴리펩타이드 또는 그의 단편이 사용되는 백신을 말한다.
- [0062] 본원에 사용된 용어 "백신 (vaccine)"은 도전에 대해 개인에게 면역을 제공하는 조성물을 말한다.
- [0063] 본원에 사용된 용어 "감염인자 (virulence factor)"는 미생물이 특정한 숙주 종 상에서 또는 내에서 자신을 확립하고 그의 병원성 (pathogenicity)을 증진시킬 수 있는 하나 이상의 유전자 산물을 말한다. 대표적인 감염인자는 예를 들어 박테리아 부착을 매개하는 세포 표면 단백질, 박테리아를 보호하는 세포 표면 탄수화물 및 단백질, 박테리아 독소 (toxins), 및 박테리아의 병원성에 기여할 수 있는 가수분해 효소를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 실행에서는 달리 표시되지 않는 경우라면, 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 및 당해 분야의 기술 내의 기타의 통상적인 기법 (techniques)을 사용할 것이다. 이러한 기법은 문헌에 완벽히 설명되어 있다. 예로, 샘브룩 등의 분자클로닝: 실험실 매뉴얼 {Sambrook, Fritsch, and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition (1989)}, 올리고뉴클레오타이드 합성 (OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS, M. J. Gait Ed., 1984), 동물 세포 배양 (ANIMAL CELL CULTURE, R. I. Freshney, Ed., 1987), 효소학의 방법 시리즈 (the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, Inc.); 포유동물 세포를 위한 유전자 전달 벡터 (GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS, J. M. Miller and M. P. Calos eds. 1987), 실험 면역학의 핸드북 (HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, D. M. Weir and C. C. Blackwell, Eds.), 분자생물학의 최신 프로토콜 (CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, and K. Struhl, eds., 1987), 면역학의 최신 프로토콜 (CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); 면역학의 연간 리뷰 (ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY); 뿐만 아니라 면역학의 발전 (ADVANCES IN IMMUNOLOGY)과 같은 저널에서의 모노그래프를 참조한다. 상기 및 하기 양쪽의 본 명세서에서 언급된 모든 특허, 특허 출원서 및 특허 공개서는 참고문헌에 의해 본 명세서에 통합된다.
- [0065] **II. 본 발명의 구체예**
- [0066] 본 발명은 얼리키아 종 (*Ehrlichia* spp.) 단백질, 이들을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 이에 대한 단편과 관련된 분자에 관한 것이다. 본 발명의 상세한 관점에서, 글리코실화된 일련 반복서열 상의 에피토프에 조기 항체 반응을 나타내는 차별적으로-발현되고 분비되는 주요 면역반응하는 단백질의 얼리키아 캐니스 및 얼리키아 샤피엔시스 오쏘로그 (ortholog)이 존재한다. 상세하게는, 본 발명은 특정한 구체예에서, 본 발명은 얼리키아 종으로부터 나온 하나 이상의 당단백질에 관한 것이다. 더 나아가 구체예에서, 본 발명은 얼리키아 종으로부터 얻은 VLPT 단백질이기도 한 당단백질에 관한 것이다. 추가적인 구체예에서, VLPT 단백질은 얼리키아 샤피엔시스로부터 나온 것이다.
- [0067] 얼리키아 샤피엔시스는 감염된 개에서 조기 얼리키아 특이 항체 반응을 나타내는 19-kDa 단백질을 포함하는 주

요 면역반응하는 단백질의 작은 소집합을 가진다. 본 발명은 얼리키아 사피엔시스 가변-길이 PCR 표적 (VLPT) 단백질의 확인 및 분자적 특성 분석에 관한 것이다.

[0068] 본 발명의 일정 구체에는 노출 전 또는 노출된 것으로 의심되는 또는 얼리키아 사피엔시스가 감염된 개체를 확인하고, 얼리키아 사피엔시스 감염을 억제하기 위해 얼리키아 사피엔시스 항원을 약제학적 유효량으로 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 얼리키아 사피엔시스 감염을 억제하는 방법을 추구한다. 본 억제제는 예로 개체의 체액성 또는 세포성 면역 반응의 자극과 같은 수단 모두를 통해 또는 항원의 정상적인 기능을 억제하는 것, 또는 심지어 개체의 몸에서 어떤 제제와 반응하기 위해 항원과 경쟁하는 것과 같은 다른 수단에 의해, 또는 그들의 조합에 의해 일어날 수 있다.

[0069] 본 발명은 또한 개인에게 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 개인에게 표적된 치료 방법을 추구한다. 여기서 상기 화합물은 표적하는 부분 (targeting moiety) 및 치료적 부분 (therapeutic moiety)을 가지고, 또한 상기 표적하는 부분은 VLPT 단백질에 대해 특이적이다. 일정 관점에서, 상기 표적하는 부분은 VLPT에 대해 특이적인 항체, 또는 리간드 또는 VLPT 를 결합시키는 리간드 결합 도메인이다. 마찬가지로, 상기 치료적 부분은 예를 들어 방사성 동위원소, 독소, 화학요법적 제제, 면역 자극제, 세포독성 제제, 또는 항생제이다.

[0070] 본 발명의 다른 구체에는 (얼리키아 사피엔시스를 위한) VLPT 조성물에 대한 항체로 사용되는 예를 들어 혈액 또는 혈청과 같은 포유동물로부터 나온 시료를 분석하는 것에 의하여 포유동물에서 얼리키아 감염을 진단하는 것에 관한 것이다.

[0071] **III. 얼리키아 사피엔시스 VLPT 아미노산 조성물**

[0072] 본 발명은 얼리키아 사피엔시스 VLPT를 포함하는 폴리펩타이드 또는 펩타이드에 관한 것이다. 간략히, 하기 섹션은 폴리펩타이드 및 펩타이드를 포함하는, 본 발명의 얼리키아 사피엔시스 VLPT 아미노산 조성물 모두를 언급할 것이다.

[0073] 상세한 구체예에서, 폴리펩타이드는 예를 들어 재조합 폴리펩타이드일 수 있고 또는 자연으로부터 분리되고 및/또는 정제될 수 있다. 상세한 관점에서, 아미노산 서열은 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 본 폴리펩타이드는 특정한 구체예에서, 항원으로서 유용하다. 다른 상세한 구체예에서, 본 펩타이드는 예를 들어 합성적으로 생성될 수 있고 또는 올리고 뉴클레오타이드에 의해 인코딩될 수 있다. 본 펩타이드는 특정한 구체예에서, 항원으로서 유용하다.

[0074] 본 발명은 또한 프로모터에 작동가능하게 연결된 아미노산 서열을 인코딩하는 서열을 포함하는 발현 구조물 (expression construct)로 이루어진 벡터를 획득하고; 상기 벡터를 세포 내로 형질전환 시키며; 및 상기 발현 구조의 발현에 효과적인 조건 하에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 재조합 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 추구한다. 본 아미노산 서열은 대안의 구체예에서 합성적으로 생성될 수 있다.

[0075] "실질적으로 순수한 단백질 (substantially pure protein)"은 자연적으로 이를 동반하는 적어도 몇 가지 이질 성분으로부터 분리되었던 단백질을 의미한다. 예를 들어, 실질적으로 순수한 면역반응하는 조성물이 자연적 출처로부터 추출에 의해; 면역반응하는 조성물을 인코딩하는 재조합 핵산의 발현에 의해; 또는 예를 들어 단백질을 화학적으로 합성하는 것에 의해, 획득될 수 있다. 따라서, 실질적으로 순수한 단백질은 대장균 (*E. coli*), 다른 원핵생물 또는 이들이 자연적으로 생겨나지 않는 그 외 다른 생물에서 합성된 단백질을 포함한다.

[0076] 따라서, 일정 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 단백질성 분자를 포함하는 새로운 조성물에 관한 것이다. 본원에 사용된, "단백질성 분자 (proteinaceous molecule)", "단백질성 조성물 (proteinaceous composition)", "단백질성 화합물 (proteinaceous compound)", "단백질성 사슬 (proteinaceous chain)" 또는 "단백질성 물질 (proteinaceous material)"은 일반적으로, 이에 제한되지는 않지만 약 130개보다 많은 아미노산 또는 하나의 유전자로부터 번역된 전장의 내인성 서열의 단백질; 약 100개보다 많은 아미노산을 가진 폴리펩타이드; 및/또는 약 3 부터 약 100개까지 아미노산의 펩타이드를 말한다. 상기에서 기술된 모든 "단백질성"이라는 용어는 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0077] 일정 구체예에서, 적어도 하나의 단백질성 분자의 크기는 이에 제한되지는 않지만, 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39, 약 40, 약 41, 약 42, 약 43, 약 44, 약 45, 약 46, 약 47, 약 48, 약 49,

약 50, 약 51, 약 52, 약 53, 약 54, 약 55, 약 56, 약 57, 약 58, 약 59, 약 60, 약 61, 약 62, 약 63, 약 64, 약 65, 약 66, 약 67, 약 68, 약 69, 약 70, 약 71, 약 72, 약 73, 약 74, 약 75, 약 76, 약 77, 약 78, 약 79, 약 80, 약 81, 약 82, 약 83, 약 84, 약 85, 약 96, 약 87, 약 88, 약 89, 약 90, 약 91, 약 92, 약 93, 약 94, 약 95, 약 96, 약 97, 약 98, 약 99, 약 100, 약 110, 약 120, 약 130개, 또는 더 많은 아미노산 잔기, 및 여기서 유래할 수 있는 모든 범위를 포함할 수 있다.

[0078] 본원에 사용된, "아미노산 분자"는 모든 폴리펩타이드, 폴리펩타이드 유도체, 또는 당업자가 숙지할 수 있는 폴리펩타이드 유사체 (polypeptide mimetic) 모두를 말한다. 일정 구체예에서, 단백질성 분자의 잔기는 아미노산 분자 잔기의 서열을 방해하는 비-아미노산 분자가 전혀 없이 연속적이다. 다른 구체예에서, 본 서열은 하나 이상의 비-아미노산 부분을 포함할 수 있다. 상세한 구체예에서, 단백질성 분자의 잔기의 서열은 하나 이상의 비-아미노산 분자 부분에 의해 방해될 수 있다.

[0079] 따라서, 용어 "단백질성 조성물"은 하기 표 1에 나타난 것에 제한되지는 않지만 이를 포함하여 자연적으로 합성된 단백질에서 20개 공통 아미노산의 적어도 하나, 또는 적어도 하나의 변형된 또는 특별한 아미노산을 포함하는 아미노산 분자 서열을 포괄한다.

표 1

[0080]

| 변형된 및 특별한 아미노산 |                                  |       |              |
|----------------|----------------------------------|-------|--------------|
| Abbr.          | 아미노산                             | Abbr. | 아미노산         |
| Aad            | 2-아미노아디펙산                        | EtAsn | N-에틸아스파라진    |
| Baad           | 3-아미노아디펙산                        | Hyl   | 하이드록시라이신     |
| Bala           | $\beta$ -알라닌, $\beta$ -아미노-프로피온산 | AHyl  | 알로-하이드록시라이신  |
| Abu            | 2-아미노부티릭산                        | 3Hyp  | 3-하이드록시프롤린   |
| 4Abu           | 4-아미노부티릭산, 피페리딘산                 | 4Hyp  | 4-하이드록시프롤린   |
| Acp            | 6-아미노카프로익산                       | Ide   | 이소테스모신       |
| Ahe            | 2-아미노헵타노익산                       | Alle  | 알로-이소루이신     |
| Aib            | 2-아미노이소부티릭산                      | MeGly | N-메틸글리신, 사코신 |
| Baib           | 3-아미노이소부티릭산                      | MeIle | N-메틸이소루이신    |
| Apm            | 2-아미노피렐릭산                        | MeLys | 6-N-메틸라이신    |
| Dbu            | 2,4-디아미노부티릭산                     | MeVal | N-메틸발린       |
| Des            | 데스모신                             | Nva   | 노르발린         |
| Dpm            | 2,2'-디아미노피렐릭산                    | Nle   | 노르루이신        |
| Dpr            | 2,3-디아미노프로피온산                    | Orn   | 오르니틴         |
| EtGly          | N-에틸글리신                          |       |              |

[0081] 일정 구체예에서 상기 단백질성 조성물은 적어도 하나의 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 포함한다. 더 나아가 구체예에서, 단백질성 조성물은 생물적합한 (biocompatible) 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 포함한다. 본원에 사용된, 용어 "생물적합한"은 본 명세서에서 기술된 방법 및 정량에 따라 주어진 생물에 적용하거나 투여할 때 기대하지 않은 효과를 유의하게 발생시키지 않는 물질을 말한다. 이러한 기대하지 않거나 원하지 않은 효과는 유의한 독성 또는 면역학적인 반응의 부작용과 같은 것이다.

[0082] 단백질성 조성물은 예를 들어 표준 분자생물학 기법을 통한 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 발현, 자연적 출처로부터 단백질성 화합물의 분리, 또는 단백질성 물질의 화학적 합성을 포함하여 당업자가 숙지하고 있는 기술 모두에 의해 제조될 수 있다. 뉴클레오타이드 및 다양한 유전자에 대한 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드 서열이 이전에 기재된 바 있었고, 당업자가 숙지하고 있고 컴퓨터화된 데이터베이스에서 발견될 수 있다. 예를 들어, 이러한 데이터 베이스 두 가지는 바이오테크놀로지 정보에 관한 국립 센터 (National Center for Biotechnology Information)의 진뱅크 (GenBank)와 진펩트 (GenPept) 데이터베이스이다. 이들 기지의 유전자에 대한 코딩 부위는 본 명세서에서 기술된 기법을 사용하거나 당업자가 숙지하고 있는 바와 같이 증폭될 수 있고 및/또는 발현될 수 있다. 대안적으로, 단백질, 폴리펩타이드, 및 펩타이드의 다양한 상업적인 제조는 당업자라면 잘 숙지하고 있다.

[0083] 일정 구체예에서 단백질성 화합물은 정제될 수 있다. 일반적으로, "정제된 (purified)"은 다양한 기타 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드를 제거하기 위해 분획 과정이 실시되었고, 그의 조성이 예를 들어 특정한 또는 원하는 단백질에 대해 당업자라면 누구나 알 수 있는 단백질 분석법에 의해 측정될 수 있는 그의 활성을 실질적인

로 보유하고 있는 특정한 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드 조성물을 말할 것이다. 정제된 단백질성 조성물에서 보유를 측정할 수 있는 대표적인 활성은 이온-결합하는 활성 및 면역반응성이다.

[0084] 본 발명의 특정한 구체예에서, 폴리펩타이드는 표지되고, 검출될 수 있는 어떠한 표지라도 모두 본 발명에 적합하다. 상기 표지는 예를 들어 N-말단에서, C-말단에서, 또는 아미노산 잔기의 측쇄에서 폴리펩타이드에 부착될 수 있다. 하나 이상의 표지가 사용될 수 있다. 대표적인 표지로는 방사성 표지, 형광 표지, 비색 표지 (colorimetric label) 등을 들 수 있다. 특정한 구체예에서, 표지는 상기 폴리펩타이드에 공유적으로 부착된다.

[0085] **IV. 얼리키아 샤페렌시스 VLPT 핵산 조성물**

[0086] 본 발명의 일정 구체예는 얼리키아 케니스 gp19 핵산에 관한 것이다. 간략히, 하기 섹션은 본 발명의 E.케니스 gp19 핵산 조성물 모두를 언급할 것이다.

[0087] 일정 관점에서, 핵산은 야생형 또는 돌연변이 핵산을 포함한다. 상세한 관점에서, 핵산은 전사된 핵산을 인코딩하거나 이를 포함한다. 다른 관점에서, 핵산은 핵산 분절, 또는 그의 생물학적으로 기능을 가진 동등물 (functional equivalent)을 포함한다. 특정한 관점에서, 핵산은 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드를 인코딩한다.

[0088] 용어 "핵산 (nucleic acid)"은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 본 명세서에서 용어 "폴리뉴클레오타이드"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. "핵산"은 본 명세서에서 사용되는 바 일반적으로 뉴클레오베이스 (nucleobase)를 포함하는, DNA, RNA 또는 그의 유도체 또는 유사체 (analog)의 분자 (예로, 가닥)를 말할 것이다. 뉴클레오베이스는 예를 들어 DNA (예로, 아데닌 "A", 구아닌 "G", 티민 "T" 또는 사이토신 "C" 또는 RNA (예로, A, G, 우라실 "U", 또는 C)에서 발견되는 자연적으로 발생하는 퓨린 또는 피리미딘 염기를 포함한다. 용어 "핵산"은 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"를 각각 "핵산"이라는 용어의 소단위 (subgenus)로서 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 길이가 약 3 내지 약 100개 뉴클레오베이스 사이인 분자를 말한다. 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 길이가 약 100개 뉴클레오베이스 보다 많은 적어도 하나의 분자를 말한다.

[0089] 이들 정의는 일반적으로 단일-가닥의 분자를 말하지만, 특정한 구체예에서는 역시 단일-가닥 분자에 부분적으로, 실질적으로 또는 완전히 상보적인 추가적인 가닥을 포함할 것이다. 따라서, 핵산은 하나 이상의 상보적인 가닥(들) 또는 분자를 포함하는 특정한 서열의 "보체(들) (complement)"을 포함하는 이중-가닥 분자 또는 삼중-가닥 분자를 포함할 수 있다. 본원에 사용된, 단일가닥 핵산은 접두사 "ss"에 의해, 이중가닥 핵산은 접두사 "ds"에 의해, 및 삼중가닥 핵산은 접두사 "ts"에 의해 표시될 수 있다.

[0090] **A. 뉴클레오베이스**

[0091] 본원에 사용된, "뉴클레오베이스"는 예를 들어 자연적으로 발생하는 적어도 하나의 핵산 (예로, DNA, 및 RNA), 및 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 이러한 뉴클레오베이스의 유도체(들) 그리고 상기 유사체에서 발견되는 자연적으로 발생하는 뉴클레오베이스 (예로, A, T, G, C 또는 U)와 같은 헤테로사이클릭 염기를 말한다. 뉴클레오베이스는 일반적으로 자연적으로 발생하는 뉴클레오베이스 결합쌍 (pairing)을 치환할 수 있는 방식으로 자연적으로 발생하는 적어도 하나의 뉴클레오베이스와 하나 이상의 수소 결합 ("어닐링하다 (anneal)" 또는 "하이브리화하다 (hybridize)")을 형성할 수 있다 (예로, A 및 T, G 및 C, 그리고 A 및 U 간의 수소 결합).

[0092] "퓨린" 및/또는 "피리미딘" 뉴클레오베이스 (들)은 자연적으로 발생하는 퓨린 및/또는 피리미딘 뉴클레오베이스 또한 그의 유도체(들) 및 유사체(들)를 포괄하고, 이에 제한되는 것은 아니지만 알킬, 카복시아킬, 아미노, 하이드록실, 할로겐 (예로, 플루오로, 클로로, 브로모, 또는 이오도), 티올 또는 알킬티올 부분의 하나 이상에 의해 치환되는 그들 퓨린 또는 피리미딘을 포함한다. 바람직한 알킬 (예로, 알킬, 카복시알킬, 등) 부분은 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개 부터 약 6개까지의 탄소 원자를 포함한다. 퓨린 또는 피리미딘의 다른 비-제한적인 예는 디아자퓨린 (deazapurine), 2,6-디아미노퓨린 (2,6-diaminopurine), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 크산틴 (xanthine), 하이포산틴 (hypoxanthine), 8-브로모구아닌 (8-bromoguanine), 8-클로로구아닌 (8-chloroguanine), 브로모티민 (bromothymine), 8-아미노구아닌 (8-aminoguanine), 8-하이드록시구아닌 (8-hydroxyguanine), 8-메틸구아닌 (8-methylguanine), 8-티오구아닌 (8-thioguanine), 아자구아닌 (azaguanine), 2-아미노퓨린 (2-aminopurine), 5-에틸사이토신 (5-ethylcytosine), 5-메틸사이토신 (5-

methylycyosine), 5-브로모우라실 (5-bromouracil), 5-에틸우라실 (5-ethyluracil), 5-이오도우라실 (5-iodouracil), 5-클로로우라실 (5-chlorouracil), 5-프로필우라실 (5-propyluracil), 티오우라실 (thiouracil), 2-메틸아데닌 (2-methyladenine), 메틸티오아데닌 (methylthioadenine), N,N-디메틸아데닌 (N,N-dimethyladenine), 아자아데닌 (azaadenine), 8-브로모아데닌 (8-bromoadenine), 8-하이드록시아데닌 (8-hydroxyadenine), 6-하이드록시아미노퓨린 (6-hydroxyaminopurine), 6-티오퓨린 (6-thiopurine), 4-(6-아미노헥실/사이토신) [4-(6-aminohexyl/cytosine)] 등을 포함한다.

[0093] 뉴클레오베이스는 본 명세서에서 기술되는 화학적 또는 자연적 합성 방법 모두를 사용하고 당업자에게 알려져 있는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 포함될 수 있다.

[0094] **B. 뉴클레오사이드**

[0095] 본원에 사용된, "뉴클레오사이드"는 뉴클레오베이스 링커 부분 (nucleobase linker moiety)에 공유적으로 부착하는 뉴클레오베이스를 포함하는 개별 화학적 유닛을 말한다. "뉴클레오베이스 링커 부분"의 비-제한적인 예는 5-탄소 원자 (예로, "5-탄소 당")을 포함하는 당이고, 이에 제한되지는 않지만 데옥시리보스, 리보스, 아라미노스, 또는 5-탄소 당의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 5-탄소 당의 유도체 또는 유사체의 비-제한적인 예는 2'-플루오로-2'-데옥시리보스 또는 슈가 환에서 탄소가 산소 원자로 치환되는 탄소환 당을 포함한다.

[0096] 뉴클레오베이스 링커 부분에 대한 뉴클레오베이스의 공유적 부착(들)의 다양한 타입은 당해 기술 분야에 알려져 있다. 비-제한적인 예에 의해, 퓨린 (예로, A 또는 G) 또는 7-데아자퓨린 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오사이드는 일반적으로 퓨린 또는 7-데아자퓨린의 9 위치를 5-탄소 당의 1'-위치에 공유적으로 부착시킨다. 또 다른 비-제한적인 예에서, 피리미딘 뉴클레오베이스를 포함하는 뉴클레오사이드는 일반적으로 피리미딘의 1 위치를 5-탄소 당의 1 위치에 공유적으로 부착시킨다 (Kornberg and Baker, 1992).

[0097] **C. 뉴클레오타이드**

[0098] 본원에 사용된, "뉴클레오타이드"는 더 나아가 "골격 부분 (backbone moiety)"를 포함하는 뉴클레오사이드를 말한다. 골격 부분은 일반적으로 핵산을 만들기 위해 뉴클레오타이드를 뉴클레오타이드를 포함하는 다른 분자에, 또는 다른 뉴클레오타이드에 공유적으로 부착시킨다. 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드에서 "골격 부분"은 일반적으로 인 부분 (phosphorus moiety)을 포함하고, 이는 5-탄소 당에 공유적으로 결합된다. 골격 부분의 부착은 일반적으로 5-탄소 당의 3'- 또는 5'-위치 둘 중 하나에서 일어난다. 그러나, 다른 타입의 부착이 당해 분야에 알려져 있고, 상세하게는 뉴클레오타이드가 자연적으로 발생하는 5-탄소 당 또는 인 부분의 유도체 또는 유사체를 포함할 때이다.

[0099] **D. 핵산 유사체**

[0100] 핵산은 자연적으로 발생하는 핵산에 존재할 수 있는 뉴클레오베이스, 뉴클레오베이스 링커 부분 및/또는 골격 부분의 유도체 또는 유사체를 포함할 수 있고, 또는 전체적으로 포함할 수 있다. 본원에 사용된, "유도체 (derivative)"는 자연적으로 발생하는 분자의 화학적으로 변형된 또는 변화된 형태를 말하는 한편, 용어 "의사체 (mimic)" 또는 "유사체 (analog)"는 자연적으로 발생하는 분자 또는 부분을 구조적으로 닮거나 닮지 않을 수 있지만, 유사한 기능을 소유하는 분자를 말한다. 본원에 사용된, "부분 (moety)"는 일반적으로 더 큰 화학적 또는 분자적 구조의 더 작은 화학적 또는 분자적 구성요소를 말한다. 뉴클레오베이스, 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체는 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 기술되어 있다 (예를 들어, 본 명세서에 참고문헌에 의해 통합되는 Scheit, 1980, 참조).

[0101] 5-탄소 당 및/또는 골격 부분 유도체 또는 유사체를 포함하는 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드 또는 핵산의 추가적인 비-제한적인 예는 삼중 헬릭스 (triple helix)를 형성하고 및/또는 dsDNA의 발현을 방해하는 퓨린 유도체를 포함하는 올리고 뉴클레오타이드를 기술하는 미국특허 제5,681,947호; DNA 또는 RNA에서 발견되는 뉴클레오사이드의 형광 유사체를 삽입한 핵산을, 상세하게는 형광 핵산 프로브로서의 용도에 대해 기술하는 미국특허 제5,652,099호 및 제5,763,167호; 증진된 뉴클레아제 안정성을 보유한 피리미딘 고리 상의 치환을 가진 올리고 뉴클레오타이드 유사체를 기술한 미국특허 제5,614,617호; 핵산 검출에 사용되는 변형된 5-탄소 당 (예로, 변형된 2'-데옥시플라노실 부분)을 가지는 올리고 뉴클레오타이드 유사체를 기술하는 미국특허 제5,670,663호, 제

5,872,232호 및 제5,859,221호; 혼성화 분석법에 사용될 수 있는 수소가 아닌 치환기를 가지는 4' 위치에서 치환된 적어도 하나의 5-탄소 당 부분을 포함하는 올리고 뉴클레오타이드를 기술하는 미국특허 제5,446,137호; 3'-5' 뉴클레오타이드 간 연결 (internucleotide linkage)과 2'-5' 뉴클레오타이드 간 연결 둘 다를 가진 테옥시리보뉴클레오타이드를 가지는 올리고 뉴클레오타이드를 기술하는 미국특허 제5,886,165호; 뉴클레오타이드 간 연결의 3' 위치 산소가 탄소로 치환되어 핵산의 뉴클레아제 저항성을 증진시키는 변형된 뉴클레오타이드 간 연결을 기술하는 미국특허 제5,714,606호; 뉴클레아제 저항성을 증진시키는 하나 이상의 5' 메틸렌 포스포네이드 뉴클레오타이드 간 연결을 포함하는 올리고 뉴클레오타이드를 기술하는 미국특허 제5,672,697호; 약제 또는 검출 부분을 전달하는 증진된 뉴클레아제 안정성 및 능력을 제공하기 위해 약제 또는 올리고 뉴클레오타이드의 2' 탄소에 대한 표지를 포함할 수 있는 치환 부분의 연결을 기술하는 미국특허 제5,466,786호 및 제5,792,847호; 증진된 세포 도입 (cellular uptake), 뉴클레아제에 대한 저항성 및 표적 RNA에 대한 혼성화를 제공하기 위해 인접한 5-탄소 당 부분의 4' 위치 및 3' 위치를 부착시키는 2 또는 3 탄소 골격 연결을 가진 올리고 뉴클레오타이드 유사체를 기술하고 있는 미국특허 제5,223,618호; 핵산 혼성화 프로브로서 유용한 적어도 하나의 설파메이트 또는 설파아마이드 뉴클레오타이드 간 연결을 포함하는 올리고 뉴클레오타이드를 기술하고 있는 미국특허 제5,470,967호; 향상된 뉴클레아제 저항성, 세포 도입 및 RNA 발현을 조절하는 데 사용되는 포스포다이에스터 골격 부분을 대체하는 세 개 또는 네 개 원자 링커 부분을 가지는 올리고 뉴클레오타이드를 기술하고 있는 미국특허 제5,378,825호, 제5,777,092호, 제5,623,070호, 제5,610,289호 및 제5,602,240호; 증진된 막 투과성 및 안정성을 위해 올리고 뉴클레오타이드의 2'-O 위치에 부착된 소수성 운반체 제제 (hydrophobic carrier agent)를 기술하고 있는 미국특허 제5,858,988호; DNA 또는 RNA에 대한 증진된 혼성화를 보유한 5' 말단에서 안트라퀴논 (anthraquinone)과 결합된 올리고 뉴클레오타이드를 기술하고 있는 미국특허 제5,214,136호; 증진된 뉴클레아제 저항성, 결합 친화도, 및 RNase H를 활성화시키는 능력을 위해 2'-데옥시-에리트르=펜토포라노실 (2'-deoxy-erythro-pentofuranosyl) 뉴클레오타이드를 포함하는 PNA-DNA-PNA 키메라 (chimeras)를 기술하고 있는 미국특허 제5,700,922호; 및 DNA-RNA 하이브리드를 형성하기 위해 DNA에 연결된 RNA를 기술하고 있는 미국특허 제5,708,154호를 포함한다.

**E. 폴리에테르 및 펩타이드 핵산**

일정 구체예에서, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 유도체 또는 유사체를 포함하는 핵산이 본 발명의 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 점을 주시한다. 비-제한적인 예는 미국특허 일련번호 제5,908,845호에 기술되고 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 "폴리에테르 핵산 (polyether nucleic acid)"이다. 폴리에테르 핵산에서 하나 이상의 뉴클레오베이스는 폴리에테르 골격에서 키랄 탄소 원자와 연결된다.

또 다른 비-제한적인 예는 "PNA", "펩타이드-기초한 핵산 유사체" 또는 "PENAM"이라고 알려져 있고 미국특허 일련번호 제5,786,461호, 제5,891,625호, 제5,773,571호, 제5,766,855호, 제5,736,336호, 제5,719,262호, 제5,714,331호, 제5,539,082호, 및 국제특허출원 제WO 92/20702호에 기술되며 이들 각각은 본 명세서에서 참고문헌으로 통합되어 있는 "펩타이드 핵산"이다. 펩타이드 핵산은 DNA 및 RNA와 같은 분자와 비교하여 일반적으로 증진된 서열 특이성, 결합 특성, 및 효소 분해에 대한 저항성을 가진다 (Egholm *et al.*, 1993; PCT/EP/01219). 펩타이드 핵산은 일반적으로 뉴클레오베이스 부분, 5-탄소 당이 아닌 뉴클레오베이스 링커 부분, 및/또는 포스페이트 골격 부분이 아닌 골격 부분을 포함하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드를 포함한다. PNAs에 대해 기술된 뉴클레오베이스 링커 부분의 예로는 아자 질소 원자, 아미도 (amido) 및/또는 우레이도 테더 (ureido tethers) (예를 들어, 미국특허 제5,539,082호 참조)를 포함한다. PNAs에 대해 기술된 골격 부분의 예로는 아미노에틸글리신, 폴리아마이드, 폴리에틸, 폴리티오아마이드, 폴리설펜아마이드 또는 폴리설펜아마이드 골격 부분을 포함한다.

일정 구체예에서, 펩타이드 핵산과 같은 핵산 유사체는 미국특허 일련번호 제 5,891,625호에 기술된 바와 같이, PCR에서와 같은 핵산 증폭을 억제하고, 위 양성 (false positive)을 감소시키고 단일 염기 돌연변이들 간을 구별하는 데 사용될 수 있다. 핵산 유사체의 다른 변형 및 용도는 당해 기술분야에 알려져 있고, gp36 폴리뉴클레오타이드에 의해 포괄된다. 비-제한적인 예로는, 미국특허 제5,786,461호가 분자의 수용성을 증진시키기 위해 PNA 골격에 부착된 아미노산 측쇄를 가진 PNAs를 기술하고 있다. 또 다른 예에서는, PNAs의 세포 도입 특성이 친지질성 그룹의 부착에 의해 증가된다. 미국출원 일련번호 제117,363호에는 PNA의 세포 도입을 증진시키는 데 사용되는 몇 가지 알킬아미노 부분을 기술하고 있다. 또 다른 예는 미국특허 제5,766,855호, 제5,719,262호, 제5,714,331호 및 제5,736,336호에 기술되고 있고, 이는 자연적으로 및 비-자연적으로 발생하는 뉴클레오베이스 및 자연적으로 발생하는 핵산에 비해 서열 특이성, 수용성 및/또는 결합 친화도를 향상시키는

알킬아민 측쇄를 포함하는 PNAs를 기술하고 있다.

[0106] **F. 핵산의 제조**

[0107] 핵산은 예를 들어, 화학적 합성, 효소적 생산 또는 생물학적 생산과 같이 당업자가 알고 있는 모든 기법에 의해 만들어질 수 있다. 합성 핵산 (예로, 합성 올리고 뉴클레오타이드)의 비-제한적인 예는 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되는 유럽특허 번호 제EP 266,032호에 기술된 바와 같은 포스포트리에스터, 포스포이트 또는 포스포라미다이트 (phosphoramidite) 화학 및 고체상 기술을 사용하는 생체 내 화학적 합성에 의해, 또는 본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되는 Froehler *et al.*, 1986 및 미국특허 일련번호 제5,705,629호에 기술된 바와 같이, 만들어진 핵산을 포함한다. 본 발명의 방법에서는, 하나 이상의 올리고 뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. 올리고 뉴클레오타이드 합성의 다양한 다른 기작이 예를 들어, 미국특허 제4,659,774호, 제4,816,571호, 제5,141,813호, 제5,264,566호, 제4,959,463호, 제5,428,148호, 제5,554,744호, 제5,574,146호, 제5,602,244호에 기재되었고, 이들 각각은 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있다.

[0108] 효소적으로 생산된 핵산의 비-제한적인 예는 PCR<sup>TM</sup> (예를 들어, 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되는 미국특허 제4,683,202호 및 미국특허 번호 제4,682,195호 참조), 또는 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되는 미국특허 제5,645,897호에 기술된 올리고 뉴클레오타이드의 합성과 같은 증폭 반응에서 효소에 의해 생산되는 것을 포함한다. 생물학적으로 생산되는 핵산의 비-제한적인 예는 박테리아에서 복제되는 재조합 DNA 벡터 (예를 들어, 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되는 Sambrook *et al.* 1989, 참조)와 같이 살아있는 세포에서 생산되는 (예로, 복제되는) 재조합 핵산을 포함한다.

[0109] **G. 핵산의 정제**

[0110] 핵산은 폴리아크릴아마이드 젤, 세슘 크로라이드 원심분리 구배 상에서, 또는 당업자가 알고 있는 다른 수단에 의해 정제될 수 있다 (예를 들어, 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되는 Sambrook *et al.* 1989, 참조).

[0111] 일정 관점에서, 본 발명은 분리된 핵산인 핵산에 관한 것이다. 본원에 사용된, 용어 "분리된 핵산 (isolated nucleic acid)"은 하나 이상의 세포의 전체 게놈 및 전사된 대량의 핵산이 없이 분리되었던, 또는 그렇지 않으면 전혀 없는 핵산 분자 (예로, RNA 또는 DNA 분자)를 말한다. 일정 구체예에서, "분리된 핵산"은 예를 들어 지질 또는 단백질, 작은 생물학적 분자 등과 같은 마크로분자 (macromolecules)와 같이 대량의 세포 구성요소 또는 시험관 내 반응 구성요소가 없이 분리되었던, 또는 그렇지 않으면 전혀 없는 핵산 분자를 말한다.

[0112] **H. 핵산 분절**

[0113] 일정 구체예에서, 핵산은 핵산 분절이다. 본원에 사용된, 용어 "핵산 분절 (nucleic acid segment)"는 비-제한적인 예를 들어, 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서열의 일부만을 인코딩하는 것과 같은 핵산의 작은 단편이다. 따라서, "핵산 분절"은 유전자 서열의 일부, 약 2개 뉴클레오타이드로부터 전장의 펩타이드까지 또는 폴리펩타이드 인코딩 부위를 포함할 수 있다.

[0114] 다양한 핵산 분절은 상세한 핵산 서열에 기초하여 설계될 수 있고, 어떠한 길이도 가질 수 있다. 서열에 숫자 값을 배정하여, 예를 들어 첫 번째 잔기는 1, 두 번째 잔기는 2 등등, 모든 핵산 분절을 정의하는 알고리즘이 생성될 수 있다:

[0115]  $n$  내지  $n + y$

[0116] 여기서  $n$ 은 1부터 서열의 마지막 숫자까지의 정수이고,  $y$  는 핵산 분절 마이너스 1의 길이이며, 여기서  $n + y$  은 서열의 마지막 숫자를 넘지 않는다. 따라서, 10 머 (mer)의 경우 핵산 분절은 1 내지 10개, 2 내지 11개, 3 내지 12개 등에 해당한다. 15 머 의 경우는 핵산 분절이 1 내지 15개, 2 내지 16개, 3 내지 17개 등에 해당한다. 20-머의 경우, 핵산 분절은 1 내지 20개, 2 내지 21개, 3 내지 22개 등에 해당한다. 일정 구체예에서, 핵산 분절은 프로브 또는 프라이머일 수 있다. 본원에 사용된, "프로브"는 일반적으로 검출 방법 또는 조성물에 사용되는 핵산을 말한다. 본원에 사용된, "프라이머"는 일반적으로 연장 또는 증폭 방법 또는 조성물에 사용되는 핵산을 말한다.

[0117]

**I. 핵산 보체 (Nucleic Acid Complements)**

[0118]

본 발명은 또한 하나 이상의 다른 핵산에 상보적인 핵산을 포괄한다. 특정한 구체예에서, 예를 들어 핵산은 폴리뉴클레오타이드의 발현을 적어도 부분적으로 억제하기 위해서와 같이 안티센스 또는 siRNA 목적으로 사용될 수 있다.

[0119]

상세한 구체예에서, 본 발명은 예를 들어 본 명세서에서 나열한 서열에 상보적인 핵산 또는 핵산 분절을 포괄한다. 핵산은 표준 왓슨-크릭, 후구스틴 (Hoogsteen) 또는 역 후구스틴 결합 상보성 규칙에 따라 다른 핵산과 염기쌍을 이룰 수 있을 때 "보체 (들)"이고 또는 다른 핵산에 대해 "상보적"이다. 본원에 사용된, "또 다른 핵산 (another nucleic acid)"은 동일한 분자의 독립된 분자 또는 공간적으로 독립된 서열을 말할 수 있다.

[0120]

본원에 사용된, 용어 "상보적인" 또는 보체(들)"도 역시 다소간의 뉴클레오베이스가 상대방 뉴클레오베이스와 염기쌍을 이루지 않을지라도 다른 핵산 가닥 또는 이중체와 혼성화할 수 있는 연속적인 뉴클레오베이스 또는 반연속적인 (semiconsecutive) 뉴클레오베이스 (예로, 하나 이상의 뉴클레오베이스 부분이 분자에 존재하지 않는다.)의 서열을 포함하는 핵산을 말한다. 일정 구체예에서, "상보적인" 핵산은 뉴클레오베이스 서열의 약 70%, 약 71%, 약 72%, 약 73%, 약 74%, 약 75%, 약 76%, 약 77%, 약 78%, 약 79%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 100%까지 및 여기서 모든 가능한 범위가 단일 또는 이중 표준 핵산 분자와 혼성화하는 동안 염기쌍을 이룰 수 있다.

[0121]

일정 구체예에서, "부분적으로 상보적인 (partly complementary)" 핵산은 단일 또는 이중의 표준 핵산과 낮은 엄격도 조건에서 혼성화할 수 있는 서열을 포함하거나, 뉴클레오베이스 서열의 약 70% 이하가 단일 또는 이중 가닥의 핵산 분자와 염기쌍을 이룰 수 있는 서열을 포함한다.

[0122]

[0123]

**J. 혼성화**

[0124]

본원에 사용된, "혼성화 (hybridization)", "혼성화하다 (hybridize)" 또는 "혼성화할 수 있는 (capable of hybridizing)"은 이중 또는 삼중 가닥의 분자 또는 일부 이중 또는 삼중 가닥의 본성을 가진 분자를 형성하는 것을 의미하는 것으로 이해된다.

[0125]

본원에 사용된, "엄격한 조건(들) [stringent condition(s)]" 또는 "높은 엄격도 (high stringency)"는 상보적인 서열(들)을 포함하는 하나 이상의 핵산 가닥(들) 사이 또는 이내에서 혼성화를 허용하지만, 무작위 서열의 혼성화를 배제시키는 이들 조건이다. 엄격한 조건을 핵산 및 표적 가닥 간의 적은 미스매치 (mismatch)가 있는 경우라도 참아낸다. 이러한 조건은 당업자라면 잘 알고 있고, 높은 선택성을 요구하는 응용에서 바람직하다. 비-제한적인 응용은 유전자 또는 그의 핵산 분절과 같은 핵산을 분리하는 것 또는 적어도 하나의 특이 mRNA 전사체 또는 그의 핵산 분절을 검출하는 것 등을 포함한다.

[0126]

엄격한 조건은 예를 들어, 약 0.02 M 내지 약 0.15 M NaCl 에 의해 예를 들어 약 50°C 내지 약 70°C의 온도에서 제공되는 것과 같은 낮은 염 및/또는 높은 온도 조건을 포함할 수 있고, 여기서 상기 엄격한 조건은 50-65°C, 5X SSPC, 50% 포름아마이드에서 하이브리화이고; 50-65°C, 5X SSPC에서 세척; 또는 60°C, 0.5X SSC, 0.1% SDS에서 세척이다. 원하는 엄격도의 온도 및 이온 강도는 부분적으로 특정한 핵산의 길이, 표적 서열(들)의 길이 및 뉴클레오베이스 함량, 핵산(들)의 전하 조성, 및 포름아마이드 (formamide), 테트라메틸암모늄 클로라이드 (tetramethylammonium chloride) 또는 혼성화 혼합물에서의 다른 용매(들)의 존재 또는 농도에 의해 결정된다.

[0127]

또한 혼성화를 위한 이들 범위, 조성 및 조건은 비-제한적인 예에 의해서만 언급되고, 특정한 혼성화 반응을 위해 기대되는 엄격도는 종종 하나 이상의 양성 또는 음성 대조군과 비교하여 경험적으로 결정되는 것으로 이해된다. 예상되는 응용에 의존하여, 표적 서열에 대한 핵산의 다양한 선택도를 달성하기 위해 혼성화의 다양한 조건을 적용하는 것이 바람직하다. 비-제한적인 예에서, 엄격한 조건 하에서 핵산에 혼성화 하지 않는 관련된 표적 핵산의 확인 또는 분리가 낮은 온도 및/또는 높은 이온 강도에서 혼성화에 의해 달성될 수 있다. 이러한 조건을 "낮은 엄격도" 또는 "낮은 엄격도 조건"이라고 말하고, 낮은 엄격도의 비-제한적인 예는 약 0.15 M 내지 약 0.9 M NaCl에서 약 20°C 내지 약 50°C의 온도 범위에서 수행되는 혼성화를 포함한다.

- [0128] **V. 핵산-기초한 발현 시스템**
- [0129] 상세한 구체예에서, 본 발명은 번역반응하는 얼리키아 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이고, 또한 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그의 인코딩된 산물을 얼리키아균으로 감염된 개인 및/또는 얼리키아균에 감염되기 쉬운 개인과 같이 이를 필요로 하는 개인에게 전달하는 것을 포함한다. 간략히, 하기 섹션은 본 발명의 얼리키아 샤페렌시스 VLPT 핵산 조성물 및/또는 핵산-기초한 발현 시스템을 언급할 것이다.
- [0130] 본 발명은 번역반응하는 얼리키아 조성물을 인코딩하는 실질적으로 순수한 및/또는 분리된 DNA를 추구한다. 일반적으로, 인코딩된 단백질은 성숙한 단백질의 생산을 가져오는 번역 후 수식 후에 절단되는 N-말단 서열을 포함한다.
- [0131] 유전자 코드의 반복성 (degeneracy) (예로, 대부분의 아미노산의 경우 하나 이상의 뉴클레오타이드 삼중체 (코돈)가 단일 아미노산을 암호화한다.) 때문에, 서로 다른 뉴클레오타이드 서열은 특정한 아미노산, 또는 폴리펩타이드를 같이 암호화할 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열은 예를 들어 제공된 대표적인 서열 또는 이러한 서열의 반복되는 변형체 (degenerate variant) 모두를 포함한다. 본 발명의 상세한 관점에서, 반복되는 변형체는 본 발명의 서열과 일치하지 않지만 여전히 본 발명의 서열의 하나 이상의 성질을 보유하는 서열을 포함한다.
- [0132] 본원에 사용된, "실질적으로 순수한 DNA (substantially pure DNA)"는 환경의 분자의 일부 또는 전부를 분리하여, 또는 청구된 DNA를 측면 우회하는 (flank) 서열을 변형하여 DNA가 자연적으로 발생하는 환경의 부분이 아닌 DNA를 의미한다. 따라서 이 용어는 예를 들어 벡터 내에, 자발적으로 복제하는 플라스미드 또는 바이러스 내에, 또는 원핵세포 또는 진핵세포의 게놈 DNA 내에 삽입되는; 또는 다른 서열과 독립적으로 독립된 분자로서 존재하는 [예로, 폴리머라제 연쇄반응 (PCR) 또는 제한효소 소화에 의해 생산되는 cDNA 또는 게놈 또는 cDNA 단편] 재조합 DNA를 포함한다. 또한 이것은 추가적인 폴리펩타이드 서열, 예로 융합 단백질을 인코딩하는 하이브리드 유전자의 일부인 재조합 DNA를 포함한다.
- [0133] 본 발명은 더 나아가 번역반응 하는 얼리키아 조성물을 인코딩하고 벡터가 세포 내로 도입될 때 폴리뉴클레오타이드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 추구한다. 특정한 구체예에서, 본 벡터는 작동가능하게 연결된 하기: a) 복제 원점; b) 프로모터; 및 c) 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 포함한다.
- [0134] 본원에 사용된, "벡터 (vector)"는 복제가능한 핵산 구조물 예로 플라스미드 또는 바이러스 핵산으로서 정의될 수 있다. 벡터는 번역반응하는 얼리키아 조성물을 인코딩하는 핵산을 증폭시키고 및/또는 발현하는 데 사용될 수 있다. 발현 벡터는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열이 세포 내에서 폴리펩타이드의 발현에 영향을 줄 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 복제 가능한 구조물이다. 이러한 조절 서열의 필요성은 선별된 세포 및 선택된 형질전환 방법에 의존하여 다양해진다. 일반적으로, 조절 서열은 예를 들어 mRNA 리보솜 결합 부위, 및 전사와 해독의 종결을 통제하는 서열에 적합한 전사 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 당업자에게 잘 알려진 방법은 적절한 전사 및 해독 조절 신호를 포함하는 발현 벡터를 제작하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 샘브룩 등의 분자 클로닝: 실험실 매뉴얼 {Sambrook, Fritsch, and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition (1989)}에 기술된 기법을 참조한다. 발현되는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 그의 전사 조절 서열은 전사 조절 서열이 폴리뉴클레오타이드 서열의 전사를 효과적으로 통제할 수 있는 경우 "작동가능하게 연결된 (operably linked)" 것으로서 정의된다. 본 발명의 벡터는 이에 제한되는 것은 아니지만, 플라스미드 및 바이러스 벡터를 포함한다. 본 발명의 바람직한 바이러스 벡터는 예를 들어, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, SV40 바이러스, 또는 허피스 바이러스로부터 유래한 것이다.
- [0135] 일반적으로, 발현 벡터는 발현되는 폴리뉴클레오타이드의 효과적인 전사를 용이하게 하는 프로모터 서열을 포함하고, 숙주세포와의 연결에 사용된다. 본원에 사용된, 용어 "숙주"는 효모, 식물 및 동물세포와 같은 원생생물 뿐만 아니라 진핵생물을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 얼리키아의 번역반응하는 조성물을 인코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드는 당업자가 보편적으로 잘 알고 있는 기법 모두를 사용하여 숙주를 형질전환하는 데 사용될 수 있다. 원핵생물 숙주는 대장균, 살모넬라 티피뮤리움 (*S. typhimurium*), 세라티아 마르세센스 (*Serratia marcescens*) 및 바실러스 서틸리스 (*Bacillus subtilis*)를 포함할 수 있다. 진핵생물 숙주는 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 포유동물 세포 및 곤충세포와 같은 효모를 포함한다.
- [0136] 하기 기술 내용은 대표적인 구성요소, 반응액, 얼리키아 폴리뉴클레오타이드의 폴리뉴클레오타이드 및 핵산을 전달하는 방법에 관한 것이다.

[0137]

**A. 벡터**

[0138]

용어 "벡터"는 핵산 서열이 복제될 수 있는 세포 내로 도입되기 위해 삽입될 수 있는 운반체 핵산 분자를 언급하는 데 사용된다. 핵산 서열은 "내인성 (exogenous)"일 수 있고, 이는 벡터가 도입되고 있는 세포에서 외래의 것이거나, 서열이 세포 내에서의 서열과 상동하지만 숙주세포 핵산 내에서 보통 발견되지 않는 위치에 있는 것을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스 (박테리오파지, 동물 바이러스, 및 식물 바이러스), 및 인공적인 염색체 (예로, YACs)를 포함한다. 당업자라면 표준 재조합 기법을 통해 벡터를 제작하도록 잘 훈련되어 있을 것이다 (예를 들어, 둘 다 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 Maniatis *et al.*, 1988 및 Ausubel *et al.*, 1994, 참조)

[0139]

용어 "발현 벡터"는 전사될 수 있는 RNA를 암호화하는 핵산을 포함하는 유전적 구조의 모든 형태를 말한다. 어떤 경우에서, RNA 분자는 다시 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩타이드로 해독된다. 다른 경우에서, 이들 서열은 예를 들어 안티센스 분자 또는 리보자임의 생산에서는 해독되지 않는다. 발현 벡터는 특정한 숙주세포에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 전사 및 가능하게는 해독에 필요한 핵산 서열을 약칭하는 다양한 "조절 서열"을 포함할 수 있다. 전사 및 해독을 관리하는 조절 서열에 추가하여, 벡터 및 발현 벡터는 다른 기능도 수행하는 핵산 서열을 포함할 수 있고, 하기에 기술된다.

[0140]

**1. 프로모터 및 인핸서**

[0141]

"프로모터"는 개시 및 전사 속도가 통제되는 핵산 서열의 한 부위이다. 이것은 RNA 폴리머라제 및 다른 전사인과 같은 조절 단백질 및 분자가 결합하여 핵산 서열의 특이한 전사를 개시하는 유전적 요소를 포함할 수 있다. 구절 "작동가능하게 위치하는 (operatively positioned)", "작동가능하게 연결된 (operatively linked)", "조절 하 (under control)" 및 "전사적 조절 하 (under transcriptional control)"는 프로모터가 전사 개시 및/또는 이 서열의 발현을 통제하기 위해 핵산 서열에 관하여 올바른 기능적 정착 및/또는 방향에 있는 것을 의미한다.

[0142]

프로모터는 일반적으로 RNA 합성을 위한 시작 부위를 위치시키는 기능을 하는 서열을 포함한다. 이것의 가장 좋은 기지의 예는 TATA 박스이지만, 예를 들어 포유동물의 말단 데옥시뉴클레오타이드 전이효소 (terminal deoxynucleotidyl transferase)를 위한 프로모터 및 SV40 후기 유전자에 대한 프로모터와 같이 TATA 박스가 결합된 몇몇 프로모터에서 시작 부위와 겹치는 명확한 요소가 개시 장소를 고정하도록 도와준다. 추가적인 프로모터 요소가 전사 개시의 빈도를 조절한다. 일반적으로, 많은 프로모터가 시작 부위의 하류에 기능적인 요소를 포함하는 것으로 관찰되고는 있지만, 이들은 시작 부위의 30 내지 100개 염기 상류 부위에 위치한다. 암호화하는 서열을 프로모터의 "조절 하"에 가져오기 위해서는, 하나를 선택된 프로모터의 "하류 (downstream)"에 (예로, 3') 전사 리딩 프레임의 전사 개시 부위의 5'-말단을 위치시킨다. "상류 (upstream)" 프로모터는 DNA의 전사를 자극하고, 인코딩된 RNA의 발현을 상승시킨다.

[0143]

프로모터 요소들 간의 공간 배치는 빈번히 유연적이어서 프로모터의 기능은 요소가 역전되거나 서로 간 위치가 이동될 때 보존된다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소들 간 공간 배치는 활성이 떨어지기 시작하기 전 50bp까지 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 이것은 개별 요소가 전사를 활성화시키기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 기능할 수 있는 점을 보여준다. 프로모터는 "인핸서 (enhancer)"와 연결하여 사용될 수 있거나 사용될 수 없고, 이를 핵산 서열의 전사 활성화에 관여하는 시스-작동하는 조절 서열 (cis-acting regulatory sequence)이라고 부른다.

[0144]

프로모터는 암호화 분절 및/또는 엑손의 상류에 위치하는 5' 비-암호화 서열을 분리하여 획득될 수 있는 핵산 서열과 자연적으로 연관된 것이다. 이러한 프로모터는 "내인성"이라고 약칭된다. 유사하게, 인핸서는 상기 서열의 하류 또는 상류 둘 중 하나에 위치하는 핵산 서열과 자연적으로 연결된 것이다. 대안적으로, 암호화하는 핵산 분절을 재조합 또는 동종유래 (heterologous) 프로모터의 조절 하에 위치시키어 일정한 유익을 얻을 수 있을 것이고, 이것을 자연 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 연관되지 않은 프로모터라고 말한다. 재조합 또는 동종유래 인핸서도 역시 자연 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 연관되지 않은 인핸서라고 말한다. 이러한 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 및 다른 바이러스 또는 원핵 또는 진핵세포로부터 분리된 프로모터 또는 인핸서, 및 "자연적으로 발생하지 않는" 예로, 서로 다른 전사 조절 부위의 서로 다른 요소, 및/또는 발현을 변화시키는 돌연변이를 포함하는 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 재

조합 DNA 제작에 가장 보편적으로 사용되는 프로모터는 베타 락타마제 (페니실리나제), 락토스 및 트립토판 (trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 합성적으로 생산하는 것에 추가하여, 서열이 본 명세서에서 기술된 조성물과 연결하여 PCR™을 포함하는 (본 명세서에서 참고문헌으로 각각 통합되어 있는 미국특허 제4,683,202호 및 제5,928,906호 참조) 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 또한, 서열의 전사 및/또는 발현을 미토콘드리아, 염록체 등과 같은 비-핵 소기관 내에서 유도하는 조절 서열이 마찬가지로 사용될 수 있는 점이 주목된다.

[0145] 당연히, 세포, 소기관, 세포 타입, 조직, 기관, 또는 발현을 위해 선택된 생물에서 DNA 분질의 발현을 효과적으로 유도하는 프로모터 및/또는 인핸서를 적용하는 것이 중요할 것이다. 분자생물학의 당업자라면 일반적으로 단백질의 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포 타입 조합의 사용을 잘 알고 있다 (본 명세서에서 참고문헌으로 통합되어 있는 Sambrook *et al.*, 1989, 참조). 적용된 프로모터는 재조합 단백질 및/또는 펩타이드의 대량 생산에 유리한 것과 같이 도입된 DNA 분질의 높은 수준의 발현을 유도하기 위해 항상 발현하는 (constitutive), 조직-특이적, 유도되는, 및/또는 적절한 조건 하에서 유용한 것일 수 있다.

[0146] 프로모터는 원핵 세포, 진핵 세포 또는 둘 다에서 사용하는 데 적합한 것일 수 있다. 추가적으로 프로모터/인핸서 조합은 또한 발현을 촉진시키는 데 사용될 수 있다 [예를 들어, 진핵 프로모터 데이터베이스 (Eukaryotic Promoter Data Base, EPDB)]. T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 사용은 가능한 구체예의 하나이다.

[0147] **2. 개시 신호 및 내부 리보솜 결합 부위**

[0148] 특이한 개시 신호도 역시 암호화하는 서열의 효과적인 해독을 위해 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접한 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함하여 외인성 해독 조절 신호가 제공되는 것이 필요할 수 있다. 당업자라면 이를 결정하고 필요한 신호를 즉시 제공할 수 있을 것이다. 개시 코돈이 전체삽입자 (insert)의 해독을 보장하기 위해서는 원하는 암호화 서열의 리딩 프레임과 "끼워맞추어 (in-frame)"져야 하는 것은 잘 알려져 있다. 외인성 해독 조절 신호 및 개시 코돈은 자연적 또는 합성적일 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 요소의 삽입에 의해 증진될 수 있다.

[0149] 본 발명의 일정 구체예에서, 내부 리보솜 도입 부위 (internal ribosome entry sites, IRES) 요소는 다중 유전자 (multigene), 또는 폴리시스트론 정보를 만드는 데 사용된다. IRES 요소는 5' 메틸화된 캡 (CAP) 의존성 해독의 리보솜 스캐닝 모델을 통과하여 내부 부위에서 해독을 시작할 수 있다 (Pelletier and Sonenberg, 1988). 포유동물 정보로부터 나온 IRES (Macejak and Sarnow, 1991)뿐만 아니라 피코나바이러스 패밀리의 두 구성원 [폴리오 및 뇌심근염 (encephalomyocarditis)]으로부터 나온 IRES 요소가 기술되었다 (Pelletier and Sonenberg, 1988). IRES 요소는 동종유래의 오픈 리딩 프레임에 연결될 수 있다. 다수의 오픈 리딩 프레임이 함께 전사될 수 있고, 각각은 IRES 에 의해 분리되고 폴리시스트론 정보를 만든다. IRES 요소에 의해, 각 오픈 리딩 프레임은 효과적인 해독을 위해 리보솜에 접근하기 쉽다. 다수의 유전자가 단일 정보를 전사하기 위해 단일 프로모터/인핸서를 사용하여 효율적으로 발현될 수 있다 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제5,925,565호 및 제 5,935,819호 참조).

[0150] **3. 다중 클로닝 부위**

[0151] 벡터는 다중 제한효소 부위를 포함하는 핵산 부위인 다중 클로닝 부위 (multiple cloning site, MCS)를 포함할 수 있고, 이 모두는 표준 재조합 기술과 연결하여 벡터를 절단하는 데 사용될 수 있다 (예를 들어, 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, 및 Cocea, 1997). "제한효소 절단 (restriction enzyme digestion)"은 핵산 분자의 특정한 위치에서만 기능하는 효소를 사용한 핵산 분자의 촉매적 절단을 말한다. 이러한 효소의 사용은 당업자에게 널리 이해되고 있다. 빈번히 벡터는 외인성 서열을 벡터에 결합시키기 위해 MCS 내에서 절단되는 제한효소를 사용하여 선형화되거나 단편화된다. "결착 (ligation)"은 두 개 핵산 단편 간 포스포디에스터 결합 (phosphodiester bonds)을 형성하는 과정을 말하고, 이는 서로 연속되거나 연속되지 않을 수 있다. 제한효소와 결합 반응이 관여하는 기술은 재조합 기술의 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0152] **4. 스플라이싱 부위**

[0153] 대부분의 전사된 진핵성 RNA 분자는 일차 전사체로부터 인트론을 제거하기 위해 RNA 스플라이싱 (splicing)을 거칠 것이다. 게놈 진핵성 서열을 포함하는 벡터는 단백질 발현을 위한 전사체의 적절한 프로세싱을 보장하기 위해 공여자 및/또는 수여자 스플라이싱 부위를 필요로 할 수 있다(예컨대, 참조문헌으로 통합되는 Chandler et al., 1997).

[0154]

[0155] **5. 종결 신호**

[0156] 본 발명의 벡터 또는 구조체는 일반적으로 적어도 하나의 종결 신호를 포함할 것이다. "종결 신호 (termination signal)" 또는 "종결 인자 (terminator)"는 RNA 폴리머라제에 의한 RNA 전사체의 특이 종결과 관련 있는 DNA 서열을 포함한다. 따라서, 일정 구체예에서는 RNA 전사체의 생산을 마치는 종결 신호가 주목된다. 종결인자는 원하는 정보 수준을 달성하기 위해 *생체 내에서* 필요할 수 있다.

[0157] 진핵성 시스템에서, 종결인자 부위는 또한 새로운 전사체의 부위-특이적 절단을 허용하여 폴리아데닐화 부위를 노출시키는 특이 DNA 서열을 포함할 수 있다. 이것은 특수화된 내인성 폴리머라제가 약 200개의 A 잔기 (polyA) 연결을 전사체의 3' 말단에 첨가하도록 신호를 보낸다. 이러한 polyA 꼬리로 변형된 RNA 분자는 더 안정하게 보이고 더 효율적으로 해독된다. 따라서, 진핵생물에 관한 다른 구체예에서, 종결인자는 RNA 절단을 위한 신호를 포함하는 것이 바람직하고, 종결 신호는 정보의 폴리아데닐화를 상승시키는 것이 더욱 바람직하다. 종결인자 및/또는 폴리아데닐화 부위 요소는 정보 수준을 증진시키고 카세트로부터 다른 서열까지의 연속적 정보 리딩 (read through)을 최소화하는 데 작용할 수 있다.

[0158] 본 발명에서의 사용이 주목되는 종결인자는 예를 들어 이에 제한되지는 않지만, 예로 소의 성장 호르몬 종결인자 또는 예로, SV40 종결인자와 같은 바이러스 종결 서열과 같은 유전자의 종결 서열을 포함하는 본 명세서에서 기술되거나 당업자가 알고 있는 기지의 전사 종결인자 모두를 포함한다. 일정 구체예에서, 종결 신호는 서열 절단 (sequence truncation)으로 의해서와 같이, 전사할 수 있는 또는 해독할 수 있는 서열이 절여될 수 있다.

[0159] **6. 폴리아데닐화 신호**

[0160] 발현, 상세하게는 진핵성 발현에서, 일반적으로 전사체의 적절한 폴리아데닐화에 영향을 미치기 위하여 폴리아데닐화 신호가 포함될 것이다. 폴리아데닐화 신호의 본성이 본 발명의 성공적인 실행에 결정적인 역할을 하는 것으로 믿어지지는 않지만, 이러한 서열 모두가 사용될 수 있다. 바람직한 구체예는 SV40 폴리아데닐화 신호 또는 소의 성장호르몬 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 이는 편리하고 다양한 표적 세포에서 잘 기능하는 것으로 알려져 있다. 폴리아데닐화는 전사체의 안정성을 증가시킬 수 있거나 세포질 운반을 용이하게 할 수 있다.

[0161] **7. 복제 원점**

[0162] 벡터를 숙주세포에서 전파시키기 위해서, 복제가 개시되는 특이 핵산 서열이기도 한 하나 이상의 복제 원점 (종종 "ori"라고 명명됨)이 포함될 수 있다. 대안적으로 숙주세포가 효모인 경우라면 자발적으로 복제하는 서열 (autonomously replicating sequence, ARS)이 적용될 수 있다.

[0163] **8. 선택 가능하고 검색 가능한 마커**

[0164] 본 발명의 일정 구체예에서, 본 발명의 핵산 구조를 포함하는 세포는 발현 벡터에 마커를 포함하여 시험관 내 또는 생체 내에서 확인될 수 있다. 이러한 마커는 세포에 확인할 수 있는 변화를 부여할 수 있고, 본 발현 벡터를 포함하는 세포의 용이한 확인을 가능하게 할 수 있다. 일반적으로, 선택 가능한 마커는 선별이 허용되는 성질을 부여하는 것이다. 양성의 선별 가능한 마커는 마커의 존재가 그의 선택을 허락하는 것인 한편, 음성의 선별 가능한 마커는 그의 존재가 그의 선택을 방해하는 것이다. 양성의 선별 가능한 마커는 약제 저항성 마커이다.

[0165] 보통 약제 선별 가능한 마커의 내입 (inclusion)은 형질전환체의 클로닝 및 확인에 도움을 주고, 예를 들어 네오마이신 (neomycin), 푸로마이신 (puromycin), 하이그로마이신 (hygromycin), DHFR, GPT, 제오신 (zeocin) 및 히스티딘올 (histidinol)에 대한 저항성을 부여하는 유전자가 유용한 선별 가능한 마커가 된다. 조건의 시행에

기초하여 형질전환체의 구별을 허락하는 표현형을 부여하는 마커에 추가하여, 비색 분석에 기초하는 GFP와 같은 검색가능한 마커를 포함하는 또 다른 타입의 마커도 역시 주목된다. 대안적으로, 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (tk) 또는 클로로암페니콜 아세틸전이효소 (CAT)와 같은 검색가능한 효소가 사용될 수 있다. 당업자라면 또한 면역학적 마커, 가능하게는 FACS 분석법과 연결하여 사용하는 방법을 알고 있을 것이다. 사용되는 마커는 유전자 산물을 인코딩하는 핵산으로 동시에 발현될 수 있는 한, 중요한 것으로 여겨지지는 않는다. 선별 가능하고 검색 가능한 마커의 더 나아간 예는 당업자에게 잘 알려져 있다.

**9. 플라스미드 벡터**

일정 구체예에서, 플라스미드 벡터는 숙주세포를 형질전환 하는 용도가 주목된다. 일반적으로, 숙주세포와 양립할 수 있는 종으로부터 유래한 복제점 (replicon) 및 조절 서열을 포함하는 플라스미드 벡터가 이들의 숙주와 연결하여 사용된다. 벡터는 보통 복제 부위뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형의 선별을 제공할 수 있는 마커 서열을 보유한다. 비-제한적인 예에서, 대장균은 종종 *E. coli* 종으로부터 유래한 플라스미드인 pBR322의 유도체를 사용하여 형질전환된다. pBR322 는 앰피실린 및 테트라사이클린 저항성에 대한 유전자를 포함하고 따라서 형질전환된 세포를 확인하는 용이한 수단을 제공한다. pBR 플라스미드 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 파지도 역시 예를 들어 미생물 자신 단백질의 발현을 위해 미생물에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 포함하거나 포함하도록 변형되어야 한다.

또한, 숙주 미생물과 양립할 수 있는 복제점 및 조절 서열을 포함하는 파지 벡터는 이들 숙주와 연결하여 형질 전환하는 벡터로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 파지 람다 GEMT11는 예를 들어, *E. coli* LE392 와 같은 숙주 세포를 형질전환하는 데 사용될 수 있는 재조합 파지 벡터를 제조하는 데 사용될 수 있다.

더 나아간 유용한 플라스미드 벡터로는 글루타치온 S 전이효소 (GST)의 수용성 융합 단백질을 생성하고 이후에 정제 및 분리 또는 절단하는 용도를 위해 pIN 벡터 (Inouye *et al.*, 1985); 및 pGEX 벡터를 포함한다. 다른 적합한 융합 단백질은 베타 갈락토시다제, 유비퀴틴 등을 가진 것들이다.

박테리아 숙주세포는 예를 들어, 발현 벡터를 포함하는 대장균(*E. coli*)이 예를 들어, 많은 적합한 배지 LB 에서 배양된다. 일정 벡터에서 재조합 단백질의 발현은 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 숙주세포를 일정 프로모터 하에 특이적인 약제를 접촉시켜, 예로 IPTG를 배지에 첨가하여 또는 더 높은 온도로 바꾸어 배양하여 유도할 수 있다. 박테리아를 더 긴 기간 동안 배양한 후, 일반적으로 2 및 24시간 사이에서 세포는 원심분리에 의해 수확되고 잔여 배지를 제거하기 위해 세척된다.

**10. 바이러스 벡터**

일정 바이러스가 세포를 감염시키거나 수용체가 매개하는 세포내이입 (endocytosis)을 통해 세포로 들어가고, 또한 숙주세포 계놈 내로 삽입되어 바이러스 유전자를 안정적으로 및 효율적으로 발현하는 능력은 그들이 외래의 핵산을 세포 (예로, 포유동물 세포) 내로 전달하는 데 매력적인 후보가 되도록 하였다. 본 발명의 구성요소는 하나 이상의 조성물을 인코딩하는 바이러스 벡터 또는 예를 들어 면역조절인자 (immunomodulator) 또는 아휴반트와 같은 기타 구성요소를 포함할 수 있다. 본 발명의 핵산을 운반하는 데 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 비-제한적인 예는 하기에 기술된다.

**a. 아데노바이러스 벡터**

핵산을 운반하는 상세한 방법은 아데노바이러스 발현 벡터의 사용을 포함한다. 아데노바이러스 벡터가 계놈 DNA 내로의 삽입에 대한 낮은 능력을 가지는 것으로 알려져 있기는 하지만, 이러한 특징이 이들 벡터에 의해 기대되는 유전자 전달의 높은 효율과 상반되지는 않는다. "아데노바이러스 발현 벡터 (adenovirus expression vector)"는 (a) 벡터 구조물의 포장을 지지하고 (b) 궁극적으로 여기에 클론되었던 조직 또는 세포 특이적인 구조물을 발현하기에 충분한 아데노바이러스 서열을 포함하는 이들 구조물을 포함하는 것을 의미한다. 아데노바이러스, 즉 36 kb 크기의 선형 이중 가닥 DNA 바이러스의 유전적 구성에 대한 정보는 7 kb까지 외래 유전자를 가진 큰 조각의 아데노바이러스 DNA의 치환이 가능하도록 한다 (Grunhaus and Horwitz, 1992).

[0176] **b. AAV 벡터**

[0177] 핵산은 아데노바이러스가 돕는 형질감염 (adenovirus assisted transfection)을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 증가된 형질감염 효율을 아데노바이러스 결합된 시스템을 사용하는 세포 시스템에서 보고되어 왔다 (Kelleher and Vos, 1994; Cotten *et al.*, 1992; Curiel, 1994). 아데노 관련 바이러스 (Adeno associated virus, AAV)는 높은 삽입 빈도를 가지고 분열하지 않는 세포를 감염시킬 수 있어, 이것이 포유동물 세포 예를 들어 조직 배양 (Muzyczka, 1992) 또는 생체 내에서 유전자의 운반을 위해 유용하기 때문에, 본 발명의 조성물에서의 사용에는 매력적인 벡터 시스템이다. AAV 는 감염을 위한 광범위한 숙주 범위를 가진다 (Tratschin *et al.*, 1984; Laughlin *et al.*, 1986; Lebkowski *et al.*, 1988; McLaughlin *et al.*, 1988). rAAV 벡터의 생성 및 용도에 관한 상세한 사항은 본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는 미국특허 제5,139,941호 및 제4,797,368호에 기술되어 있다.

[0178] **c. 레트로바이러스 벡터**

[0179] 레트로바이러스는 그의 유전자를 숙주 게놈 내로 삽입하여 많은 양의 외래 유전적 물질을 전달하고 넓은 범위의 종을 감염시키며 또한 특별한 세포주에서 포장될 수 있는 능력으로 인해 운반 벡터로서 유용하였다 (Miller, 1992).

[0180] 레트로바이러스 벡터를 제작하기 위하여, 핵산 (예로, 관심 조성물을 인코딩하는 것)이 일정 바이러스 서열을 대신하여 바이러스 게놈 내로 삽입되어 복제 결합을 가진 바이러스를 생산한다. 비리온 (virions)을 생산하기 위하여, gag, pol, 및 env 유전자를 포함하지만 LTR 및 포장 구성요소가 없는 포장을 세포주가 제작된다 (Mann *et al.*, 1983). 레트로바이러스 LTR 및 포장 서열을 함께 가진 cDNA를 포함하는 재조합 플라스미드가 특별한 세포주 내로 (예를 들어, 칼슘 포스페이트 침전법에 의해)로 도입될 때, 포장 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자 내로 포장되도록 허락하고, 이것은 다시 배양 배지 내로 분비된다 (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). 재조합 레트로바이러스를 포함하는 배지는 다시 수확되고, 선택사항으로 농축되며, 또한 유전자 전달을 위해 사용된다. 레트로바이러스 벡터는 광범위하게 다양한 세포 타입을 감염시킨다. 그러나, 삽입 및 안정적 발현은 숙주세포의 분열을 요구한다 (Paskind *et al.*, 1975).

[0181] 렌티바이러스 (Lentiviruses)는 공통의 레트로바이러스 유전자인 gag, pol, 및 env에 추가하여 조절하는 또는 구조적인 기능을 가지는 다른 유전자를 포함하는 복잡한 레트로바이러스이다. 렌티바이러스 벡터는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다 (예를 들어, Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Blomer *et al.*, 1997; 미국특허 제6,013,516호 및 제5,994,136호 참조). 렌티바이러스의 일부 예로는 인간 면역결핍 바이러스: HIV-1, HIV-2 및 원숭이 면역결핍 바이러스 (Simian Immunodeficiency Virus, SIV)를 포함한다. 렌티바이러스 벡터는 예를 들어 벡터를 생물학적으로 안전하게 만들기 위하여 env, vif, vpr, vpu 및 nef 가 삭제된 지연시키는 (attenuating) HIV 감염 유전자를 증식시키어 생산되어 왔다.

[0182] 재조합 렌티바이러스 벡터는 분열하지 않는 세포를 감염시킬 수 있고, 생체 내 및 생체 외 (*ex vivo*) 유전자 전달 및 핵산 서열의 발현에 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 숙주세포가 포장 기능을 가지는 즉 rev 및 tat 뿐만 아니라 gag, pol 및 env 을 포함하는 둘 이상의 벡터로 형질전환된 분열하지 않는 세포를 감염할 수 있는 재조합 렌티바이러스가 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제5,994,136호에 기술되어 있다. 외피 (envelop) 단백질을 항체 또는 특정한 세포-타입의 수용체에 표적하는 특정한 리간드와 연결하여 재조합 바이러스를 표적할 수 있다. 예를 들어, 특이 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드를 인코딩하는 다른 유전자와 함께 관심 서열 (조절 부위를 포함)을 바이러스 벡터 내로 삽입하여, 벡터는 표적-특이적이 된다.

[0183]

[0184] **d. 기타 바이러스 벡터**

[0185] 다른 바이러스 벡터가 본 발명의 백신 구조물로서 적용될 수 있다. 백시니아 바이러스 (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), 신드비스 바이러스 (sindbis virus), 사이토메갈로바이러스 및 허피스 심플렉스 바이러스와 같은 바이러스로부터 유래한 벡터가 사용될 수 있다. 그들은 다양한 포유동물 세포에 대해 몇 가지 매력적인 특징을 제시한다 (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

[0186]

**e. 변형된 바이러스를 사용한 운반**

[0187]

운반되는 핵산은 특이 결합 리간드를 발현하도록 조작되어진 감염성 바이러스 내에 보관될 수 있다. 바이러스 입자는 따라서 표적 세포의 동족 수용체 (cognate receptors)에 특이적으로 결합하고 세포로 내용물을 운반할 것이다. 바이러스 외피로 락토스 잔기를 화학적으로 첨가하는 레트로바이러스의 화학적 변형에 근거하여, 레트로바이러스 벡터의 특이 표적을 허락하도록 설계된 새로운 접근법이 개발되었다. 이러한 변형은 시알로 당단백질 (sialoglycoprotein) 수용체를 통한 간세포 (hepatocytes)의 특이 감염을 허용할 수 있다.

[0188]

레트로바이러스 외피 단백질에 대항하고 특이 세포 수용체에 대항하는 바이오틴화된 항체가 사용되는 또 다른 재조합 레트로바이러스의 표적 접근법이 설계되었다. 항체는 스트렙트아비딘 (Roux *et al.*, 1989)을 사용하는 바이오틴 구성요소를 통해 결합된다. 주요 조직적합성 복합체 클래스 I 및 클래스 II 항원을 사용하여, 그들은 실험관 내 이코트로픽 바이러스 (ecotropic virus)와 함께 이들의 표면 항원을 보유하는 다양한 인간 세포의 감염을 보여주었다 (Roux *et al.*, 1989).

[0189]

**11. 벡터 운반 및 세포 형질전환**

[0190]

본 발명의 용도에서 소기관, 세포, 조직 또는 생물체의 형질전환을 위한 얼리키아 핵산 운반에 적합한 방법은 가상적으로 핵산이 (예를 DNA)가 소기관, 세포, 조직 또는 생물체 내로 도입될 수 있거나 당업자가 알고 있는 모든 방법을 포함하는 것으로 여겨진다. 이러한 방법은 이에 제한되지는 않지만, 생체 외 형질감염 (Wilson *et al.*, 1989, Nabel *et al.*, 1989)에 의해서, 마이크로인젝션 (Harlan and Weintraub, 1985; 본 명세서에서 참고 문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제5,789,215호)을 포함하는 주입에 의해서 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는 미국특허 제5,994,624호, 제5,981,274호, 제5,945,100호, 제5,780,448호, 제5,736,524호, 제5,702,932호, 제5,656,610호, 제5,589,466호 및 제5,580,859호); 전기천공법에 의해 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 번호 제5,384,253호; Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984); 칼슘 포스페이트 침전에 의해 (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); DEAE 텍스트란에 이어서 폴리에틸렌 글리콜에 의해 (Gopal, 1985); 직접적인 음과 부하에 의해 (Fechheimer *et al.*, 1987); 리포솜 매개된 형질감염 (Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) 및 수용체-매개된 형질감염 (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988)에 의해; 마이크로투사체 충돌 (microprojectile bombardment)에 의해 (PCT 국제출원 번호 제 WO 94/09699호 및 제 95/06128호; 본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는 미국특허 제 5,610,042호; 제5,322,783호, 제5,563,055호, 제5,550,318호, 제5,538,877호 및 제5,538,880호); 실리콘 카바이드 섬유에 의한 요동에 의해 (Kaeppler *et al.*, 1990; 본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는 미국특허 제5,302,523호 및 제5,464,765호); 아그로박테리움 매개된 형질전환에 의해 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는 미국특허 제5,591,616호 및 제5,563,055호); PEG 매개된 원형질의 형질전환에 의해 (Omirulleh *et al.*, 1993; 본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는 미국특허 제4,684,611호 및 제 4,952,500호); 탈수/억제 매개된 DNA 도입에 의해 (Potrykus *et al.*, 1985), 그리고 이러한 방법의 조합 모두와 같은 직접적인 DNA 운반을 포함한다. 이들과 같은 기법을 적용하여, 소기관(들), 세포(들), 조직(들) 또는 생물(들)은 안정적으로 또는 일시적으로 형질전환된다.

[0191]

**a. 생체 외 형질전환**

[0192]

생체 외 셋팅에서 생물로부터 제거된 혈관 세포 및 조직을 형질감염하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 개의 내피세포는 일반적으로 시험관 내 레트로바이러스 유전자 전달에 의해 유전적으로 변형되고 개 내로 이식되어 왔다 (Wilson *et al.*, 1989). 또 다른 예에서, 유카탄 미니돼지의 내피세포는 시험관 내 레트로바이러스에 의해 형질감염되고 이중-공 카테타 (double-ballon catheter)를 사용하여 동맥 내로 이식되었다 (Nabel *et al.*, 1989). 따라서, 세포 또는 조직이 제거되어 본 발명의 핵산을 사용하여 생체 외 형질감염될 수 있는 것이 주목된다. 상세한 관점에서, 이식된 세포 또는 조직은 생물체 내에 놓여질 수 있다. 바람직한 측면에서 핵산은 이식된 세포 또는 조직에서 발현된다.

[0193]

**b. 주입**

[0194] 일정 구체예에서, 핵산은 소기관, 세포, 조직 또는 생물체로 예를 들어 피하로, 피내로, 근육내로, 정맥간으로, 복강내로 등과 같이 하나 이상의 주입 (예로, 바늘 주입)을 통해 운반될 수 있다. 백신의 주입 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다 (예로, 식염수를 포함하는 조성물의 주입). 본 발명의 더 나아간 구체예는 직접적인 마이크로인젝션에 의한 핵산의 주입을 포함한다. 직접적인 마이크로인젝션은 제노푸스 (Xenopus) 난자 내로 핵산 구조물을 도입하는 데 사용되어 왔다 (Harland and Weintraub, 1985). 사용되는 조성물의 양은 사용되는 소기관, 세포, 조직 또는 생물체뿐만 아니라 항원의 본성에 따라 달라질 수 있다.

[0195] **c. 전기천공법**

[0196] 본 발명의 일정 구체예에서, 핵산은 전기천공법을 통해 소기관, 세포, 조직 또는 생물체 내로 도입될 수 있다. 전기천공법은 세포 및 DNA 현탁액을 높은 볼트의 전기 방전에 노출시키는 것이다. 본 방법의 일정 변형체에서, 펙틴 분해하는 효소와 같은 일정 세포벽을 분해하는 효소가 표적 수여 세포를 전기천공에 의한 형질전환에 처리되지 않은 세포보다 취약하게 만들기 위해 사용된다 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제5,384,253호). 대안적으로, 수여 세포는 기계적인 상처내기에 의한 형질전환에 더 취약하게 만들어질 수 있다.

[0197] 전기천공법을 사용하는 진핵세포의 형질감염은 매우 성공적이었다. 이러한 방식으로, 마우스 B 전립프구는 인간 카파 면역글로불린 유전자로 형질전환 되었고 (Potter *et al.*, 1984), 래트 간세포는 클로로암페니콜 아세틸 전이효소 유전자로 형질전환된 바 있었다 (Tur Kaspas *et al.*, 1986)

[0198] 예를 들어, 식물세포와 같은 세포에서 전기천공법에 의한 형질전환에 영향을 주기 위하여, 세포의 현탁 배양 또는 배아적 캘러스와 같은 무른 조직을 적용할 수 있거나 대안적으로 미성숙한 배아 또는 다른 조직화된 조직을 직접 형질전환할 수 있다. 이러한 기법에서, 선택된 세포의 세포벽을 통제하는 방식으로 펙틴 분해효소 (펙토라이아제)에 노출시키거나 기계적으로 상처를 입히어 부분적으로 분해할 수 있다. 그대로의 세포를 전기천공하여 형질전환시킨 몇몇 종의 예로는 옥수수 (미국특허 제5,384,253호; Rhodes *et al.*, 1995; D'Halluin *et al.*, 1992), 밀 (Zhou *et al.*, 1993), 토마토 (Hou and Lin, 1996), soybean (Christou *et al.*, 1987) 및 담배 (Lee *et al.*, 1989)를 들 수 있다.

[0199] 또한 식물 세포의 전기천공법 형질전환을 위해 원형질체 (protoplast)를 사용할 수 있다 (Bates, 1994; Lazzeri, 1995). 예를 들어, 떡잎 유래의 원형질의 전기천공법에 의한 형질전환 콩 식물의 생산이 디르 및 위드홈에 의해 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 국제특허출원 번호 제WO 9217598호에서 기술되어 있다. 원형질 형질전환이 기술되었던 다른 종의 예로는 보리 (Lazzeri, 1995), 수수 곡류 (Batraw *et al.*, 1991), 옥수수 (Bhattacharjee *et al.*, 1997), 밀 (He *et al.*, 1994) 및 토마토 (Tsukada, 1989)를 들 수 있다.

[0200] **d. 칼슘 포스페이트**

[0201] 본 발명의 다른 구체예에서, 핵산은 칼슘 포스페이트 침전을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 인간 KB 세포는 이러한 기법을 사용하여 아데노바이러스 5 DNA (Graham and Van Der Eb, 1973)로 형질감염된 바 있었다. 또한 이러한 방식에서, 마우스 L(A9), 마우스 C127, CHO, CV 1, BHK, NIH3T3 및 HeLa 세포는 네오마이신 마커 유전자로 형질감염되었고 (Chen and Okayama, 1987), 래트 간세포는 다양한 마커 유전자로 형질감염되었다 (Rippe *et al.*, 1990).

[0202] **e. DEAE 텍스트란**

[0203] 또 다른 구체예에서, 핵산은 DEAE 텍스트란에 이어지는 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 세포 내로 전달된다. 이 방식에서 리포터 플라스미드는 마우스 마이엘로마 및 적백혈병 (erythroleukemia cells) 세포 내로 도입되었다 (Gopal, 1985).

[0204] **f. 음파 부하**

[0205] 본 발명의 추가적인 구체예에는 직접적인 음파 부하 (sonic loading)에 의한 핵산 도입을 포함한다. LTK 섬유아 세포 (fibroblast)가 과쇄 부하에 의해 티미딘 키나제 유전자로 형질전환된 바 있었다 (Fechheimer *et al.*, 1987).

[0206] **g. 리포솜-매개 형질감염**

[0207] 본 발명의 더 나아가 구체예에서, 얼리키아 핵산은 예를 들어 리포솜을 포함하는 것과 같이 지질 복합체를 포함할 수 있다. 리포솜은 인지질 이중막 및 내부 수성 배지로 특성 분석되는 소포 구조 (vesicular structure)이다. 다중층 리포솜 (multilamellar liposomes)은 수성 배지에 의해 구분되는 다중 지질층을 가진다. 그들은 인지질이 과다한 수용액에 현탁될 때 자발적으로 형성된다. 지질 구성요소는 폐쇄 구조의 형성 이전에 자가 재배열 (self reaarangement)을 거치고 지질 이중막 안에서 물과 녹은 용질을 포획한다 (Ghosh and Bachhawat, 1991). 또한 리포펙타민 (Lipofectamine, Gibco BRL) 또는 슈퍼펙트 (Superfect, Qiagen) 와 복합된 핵산이 주목된다.

[0208] 시험관 내 리포솜-매개된 핵산 운반 및 외래 DNA 발현이 매우 성공적이었다 (Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987). 배양된 닭 배아, HeLa 및 간암 세포에서 리포솜 매개된 운반 및 외래 DNA 발현의 가능성이 또한 기술된 바 있었다 (Wong *et al.*, 1980).

[0209] 본 발명의 일정 구체예에서, 리포솜은 혈구응집 바이러스 (hemagglutinating virus, HVJ)와 복합될 수 있다. 이것은 세포막과의 융합을 용이하게 하고 리포솜 둘러싸인 DNA의 세포 도입을 상승시키는 것으로 관찰되었다 (Kaneda *et al.*, 1989). 다른 구체예에서, 리포솜은 복합될 수 있거나 핵의 비히스톤 염색체 단백질 (HMG 1)과 연결하여 사용될 수 있다 (Kato *et al.*, 1991). 더 나아가 구체예에서, 운반체는 리간드 및 리포솜을 포함할 수 있다.

[0210] **h. 수용체-매개된 형질감염**

[0211] 더 나아가, 핵산은 수용체 매개된 운반체를 통해 표적 세포로 전달될 수 있다. 이들은 표적 세포에서 일어날 수용체-매개된 세포내입에 의한 마크로분자의 선택적인 도입을 이용한다. 다양한 수용체의 세포 타입 특이 배치의 관점에서, 이러한 운반 방법은 본 발명에 또 다른 정도의 특이도를 부가한다.

[0212] 일정 수용체 매개된 유전자 표적 운반체는 세포 수용체 특이 리간드 및 핵산 결합 제제를 포함한다. 다른 것은 운반되는 핵산이 작동적으로 부착된 세포 수용체 특이 리간드를 포함한다. 몇 가지 리간드가 수용체 매개된 유전자 전달을 위해 사용되었고 (Wu and Wu, 1987; Wagner *et al.*, 1990; Perales *et al.*, 1994; Myers, EPO 0273085), 이는 이 기법의 작동성을 확립한다. 또 다른 포유동물 세포 타입의 내용에서 특이 운반이 기술된 바 있었다 (Wu and Wu, 1993; incorporated herein by reference). 본 발명의 일정 관점에서, 리간드가 표적 세포 집단 상에 특이적으로 발현되는 수용체에 해당하도록 선택될 것이다.

[0213] 또 다른 구체예에서, 세포 특이 핵산 표적하는 운반체의 핵산 운반체 구성요소는 리포솜과 조합되어 특이 결합 리간드를 포함할 수 있다. 운반되는 핵산(들)은 리포솜 내에 보관되고 특이 결합 리간드는 리포솜 막 내에 기능적으로 삽입된다. 리포솜은 따라서 표적 세포의 수용체에 특이적으로 결합하고 내용물을 세포로 운반할 것이다. 이러한 시스템은 예를 들어 표피 성장인자 (EGF)가 EGF 수용체의 상승조절 (upregulation)을 나타내는 세포로 핵산의 수용체 매개된 운반에 사용되는 시스템을 사용하여 실제로 기능하는 것을 보여주었다.

[0214] 보다 더 나아가 구체예에서, 표적된 운반체의 핵산 운반체 구성요소는 리포솜 자신일 수 있고, 이는 바람직하게 세포 특이 결합을 유도하는 하나 이상의 지질 또는 당단백질을 포함할 것이다. 예를 들어, 락토실 세라미드, 갈락토스 말단 어시알갱글리오사이드 (galactose terminal asialganglioside)은 리포솜 내로 삽입되었고 간세포에 의한 인슐린 유전자의 도입이 증가하는 것이 관찰되었다 (Nicolau *et al.*, 1987). 본 발명의 조직 특이 형질전환 구조물이 유사한 방식으로 표적 세포 내로 특이적으로 운반될 수 있다.

[0215] **i. 마이크로투사체 충돌 (Microprojectile Bombardment)**

[0216] 마이크로투사체 충돌 기법은 핵산을 적어도 하나의 소기관, 세포, 조직 또는 생물체 내로 도입하는 데 사용될 수 있다 (본 명세서에서 각각 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는 미국특허 번호 제5,550,318호; 미국특허 제

5,538,880호; 미국특허 제5,610,042호; 및 PCT 국제출원 제WO 94/09699호). 이 방법은 DNA 코팅된 마이크로투사체를 세포를 죽이지 않고 세포막이 뚫리어 세포 내로 도입 가능하게 하는 높은 속도로 가속화하는 능력에 의존한다 (Klein *et al.*, 1987). 당해 기술분야에서 잘 알려진 광범위하고 다양한 마이크로투사체 충돌 기법이 존재하고 이들 중 많은 것이 본 발명에서 적용 가능하다.

[0217] 마이크로투사체 충돌은 예를 들어 모든 식물 종과 같은 다양한 세포(들), 조직(들) 또는 생물체 (들)을 형질전환하는 데 사용될 수 있다. 마이크로투사체 충돌에 의해 형질전환되었던 종의 예로는 담배 (Tomes *et al.*, 1990; Busing and Benbow, 1994), 콩 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제5,322,783호), 해바라기 (Knittel *et al.* 1994), 땅콩 (Singsit *et al.*, 1997), 면화 (McCabe and Martinell, 1993), 토마토 (VanEck *et al.* 1995), 및 일반적으로 콩류 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제5,563,055호)를 포함하는 많은 쌍떡잎 식물뿐만 아니라; 옥수수 (PCT 국제출원 번호 제 WO 95/06128호), 보리 (Ritala *et al.*, 1994; Hensgens *et al.*, 1993), 밀 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제563,055호), 쌀 (Hensgens *et al.*, 1993), 귀리 (Torbet *et al.*, 1995; Torbet *et al.*, 1998), 호밀 (Hensgens *et al.*, 1993), 사탕수수 (Bower *et al.*, 1992), 및 수수 (Casas *et al.*, 1993; Hagio *et al.*, 1991)와 같은 외떡잎 식물을 들 수 있다.

[0218] 이러한 마이크로투사체 충돌에서, 하나 이상의 입자가 적어도 하나의 핵산으로 코팅되어 추진력에 의해 세포 내로 운반될 수 있다. 작은 입자를 가속화하는 몇 가지 장치가 개발되었다. 이러한 장치의 하나는 높은 볼트의 방전에 의존하여 전류를 생성하고, 이는 다시 운동력을 제공한다 (Yang *et al.*, 1990). 사용되는 마이크로투사체는 텅스텐 또는 금 입자 또는 비드와 같은 생물학적으로 불활성인 물질로 이루어졌다. 대표적인 입자로는 텅스텐, 백금 및 바람직하게는 금을 포함하는 것을 들 수 있다. 일정 경우에 금속입자 상에 DNA 침전은 마이크로투사체 충돌을 사용하는 수여 세포로의 DNA 운반을 위해 필요하지 않을 수 있는 점이 주목된다. 그러나, 입자가 DNA로 코팅되기 보다는 DNA를 포함할 수 있는 점이 주목된다. DNA 코팅된 입자는 입자 충돌을 통해 DNA 운반의 수준을 증가시키지만 그들 자체가 필요한 것은 아니다.

[0219] 상기 충돌을 위해, 현탁된 세포는 필터 또는 고체 배양 배지 상에서 농축된다. 대안적으로, 미성숙 배아 또는 다른 표적 세포는 고체 배양 배지 상에 배열될 수 있다. 충돌될 세포는 마이크로투사체 정지 (macroprojectile stopping) 플레이트 아래에 적절한 거리를 두고 위치한다.

[0220] 가속화에 의한 세포 (예로, 식물 세포) 내로 DNA 를 운반하는 방법의 묘사적인 구체예는 바이오리스트 입자 운반 시스템 (Biolistics Particle Delivery System)이고, 이는 스테인레스 스틸 또는 나이텍스 스크린 (Nytex screen)과 같은 스크린을 통해 예를 들어 현탁 배양된 외떡잎 식물세포와 같은 세포로 덮힌 필터 표면 상에 DNA로 코팅된 입자 또는 세포를 추진시키는 데 사용될 수 있다. 입자는 큰 덩어리로 수여 세포로 운반되지 않기 때문에 스크린은 입자를 분산시킨다. 투사 장치와 충돌되는 세포 사이에 개입하는 스크린은 투사되는 덩어리의 크기를 감소시키고 지나치게 큰 투사체에 의해 수여 세포 상에 미치는 손상을 감소시키고 형질전환의 더 높은 빈도에 기여할 수 있는 것으로 여겨진다.

[0221] **12. 숙주 세포**

[0222] 본원에 사용된, 용어 "세포 (cell)", "세포주 (cell line)", 및 "세포 배양 (cell culture)"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 이들 용어 모두는 또한 일부 및 전부가 연속되는 세대인 그들의 자손을 포함한다. 모든 자손은 세밀하거나 부적절한 돌연변이로 인해 일치하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 동종유래 핵산 서열을 발현하는 내용에서, "숙주세포"는 원핵세포 또는 진핵세포를 말하고 이것은 벡터를 복제하고 및/또는 벡터에 의해 인코딩되는 동종 유래 유전자를 발현할 수 있는 형질전환 가능한 생물체를 모두 포함할 수 있다. 숙주세포는 벡터의 수여자로서 사용될 수 있고 사용되어 왔다. 숙주세포는 "형질감염된 (transfected)" 또는 "형질전환된 (transformed)" 것이 될 수 있고 이는 외인성 핵산이 숙주세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 말한다. 형질전환된 세포는 일차적 세포 및 그의 자손을 포함한다. 본원에 사용된, 용어 "조작된 (engineered)" 및 "재조합" 세포 또는 숙주세포는 예를 들어 벡터와 같은 외인성 핵산 서열이 내부로 도입되었던 세포를 말하려는 것이다. 따라서, 재조합 세포는 재조합적으로 도입된 핵산을 포함하지 않는 자연적으로 발생하는 세포와 구별된다.

[0223] 일정 구체예에서, RNAs 또는 단백질성 서열이 다른 선택된 RNAs 또는 단백질성 서열과 동일한 숙주세포에서 공-발현될 수 있는 것을 주목한다. 공-발현 (co-expression)은 숙주세포를 둘 이상의 구별되는 재조합 벡터로 공-

형질감염시키는 것에 의해 달성될 수 있다. 대안적으로, 단일 재조합 벡터는 RNAs에 대한 다수의 구별되는 암호화 부위를 포함하도록 제작될 수 있고, 이것은 다시 단일 벡터로 형질감염된 숙주세포에서 발현될 수 있다.

[0224] 조직은 본 발명의 조성물로 형질전환된 숙주세포 또는 세포를 포함할 수 있다. 이 조직은 일부이거나 생물체로부터 분리되었다. 일정 구체예에서, 조직은 이에 제한되지는 않지만, 지방세포 (adipocyte), 치조 법랑질세포 (alveolar, ameloblast), 축삭 (axon), 기저세포 (basal cell), 혈액 (예로, 림프구), 혈관, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 연골, 경부, 결장, 각막, 배아, 자궁내막, 내피, 표피, 식도, 근막, 섬유아세포, 여포, 신경질, 신경교, 술잔 세포, 신장, 간, 폐, 림프절, 근육, 뉴런, 난소, 이자, 말초혈액, 전립선, 피부, 소장, 비장, 줄기세포, 위, 정소, 정포, 콧 (cobs), 귀, 꽃, 허스크 (husk), 속씨 (kernel), 잎, 중간분화 세포 (meristematic cell), 화분, 뿌리 말단, 뿌리, 실크, 줄기 및 그의 모든 암을 포함할 수 있다.

[0225] 일정 구체예에서, 숙주세포 또는 조직은 적어도 하나의 생물체에 포함될 수 있다. 일정 구체예에서, 상기 생물체는 이에 제한되지는 않지만 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 원핵생물 (예로, 진정박테리아, 태고생물) 또는 진핵생물일 수 있다 (예를 들어, 웹 페이지 <http://phylogenv.arizona.edu/tree/phylogenv.html> 참조).

[0226] 다수의 세포주 및 배양액은 숙주세포로서의 용도를 위해 입수 가능하고, 그들은 살아있는 배양액 및 유전적 물질을 위한 보관분을 제공하는 기관인 ATCC (American Type Culture Collection)를 통해 획득할 수 있다. ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). 적절한 숙주는 벡터 골격 및 원하는 결과에 근거하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 또는 코스미드는 많은 벡터의 복제를 위해 원핵 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 벡터 복제 및/또는 발현을 위해 입수 가능한 세포 타입은 이에 제한되는 것은 아니지만, 대장균 [예로, *E. coli* 균주 RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC 기탁번호 제31537호)] 뿐만 아니라 대장균 W3110 (F, 람다, 원영양적, ATCC 기탁번호 제273325호), DH5a, JM109, 및 KC8, 바실러스 서틸리스와 같은 바실러스균; 그리고 살모넬라 티피뮤리움, 세라티아 마세란스, 다양한 슈도모나스 종과 같은 기타 엔테로박테리아, 뿐만 아니라 SURE<sup>®</sup> Competent Cells 및 SOLOPACK 골드 세포 (STRATAGENE<sup>®</sup> La Jolla)와 같은 많은 상업적으로 입수가능한 박테리아 숙주를 포함한다. 일정 구체예에서, 대장균 LE392 와 같은 박테리아 세포는 상세하게는 파지 바이러스를 위한 숙주세포로서 주목된다.

[0227] 벡터의 복제 및/또는 발현을 위한 진핵성 숙주세포의 예로는 이에 제한되는 것은 아니지만, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos, 및 PC12 을 들 수 있다. 다양한 세포 타입 및 생물체로부터 나온 많은 숙주세포가 입수 가능하고 당업자가 이를 잘 알고 있다. 유사하게는, 바이러스 벡터는 원핵성 또는 진핵성 숙주세포 둘 중 하나, 상세하게는 벡터의 복제와 발현을 허용하는 것을 연결하여 사용될 수 있다.

[0228] 어떠한 벡터는 원핵세포 및 진핵세포 모두에서 복제되고 및/또는 발현되도록 허락하는 조절 서열을 적용할 수 있다. 당업자라면 더 나아가 상기 기술된 숙주세포를 배양하고 유지하며 벡터의 복제를 가능하게 하는 조건을 잘 이해할 것이다. 또한 벡터 및 그의 동족 폴리펩타이드, 단백질, 또는 펩타이드에 의해 인코딩되는 핵산의 생산 뿐만 아니라 벡터의 대량 생산도 가능하게 하는 기법 및 조건도 이해하고 숙지하고 있을 것이다.

[0229] **13. 발현 시스템**

[0230] 상기에서 논의된 조성물의 적어도 일부 또는 전부를 포함하는 다수의 발현 시스템이 존재한다. 진핵세포 및/또는 진핵세포-기초한 시스템이 본 발명의 용도를 위해 핵산 서열 또는 그의 동족 폴리펩타이드, 단백질 및 펩타이드를 생산하기 위해 적용될 수 있다. 많은 이러한 시스템이 상업적으로 또한 널리 입수가능하다.

[0231] 곤충세포/배클로바이러스 시스템이 본 명세서에서 둘 다 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제5,871,986호, 제4,879,236호에 기술되는 바와 같이 동종유래 핵산 분절의 높은 수준의 단백질 발현을 생산할 수 있고, 이는 예를 들어 인비트로젠사 (INVITROGEN<sup>®</sup>)으로부터 나온 상표명 MAXBAC<sup>®</sup> 2.0 그리고 클론테크사 (CLONTECH<sup>®</sup>)로부터 나온 상표명 BACPACK<sup>™</sup> 배클로바이러스 발현 시스템 (BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM)으로 구입할 수 있다.

[0232] 발현 시스템의 다른 예로는 합성 엑디손-유도가능한 수용체 또는 그의 pET 발현 시스템, 즉 대장균 발현 시스템을 포함하는 스트라타젠사 (STRATAGENE<sup>®</sup>)의 컴플리트 컨트롤 (COMPLETE CONTROL) 유도성 포유동물 발현 시스템 (Inducible Mammalian Expression System)을 들 수 있다. 유도성 발현 시스템의 또 다른 예는 인비트로젠

사로부터 입수 가능하고, 이는 전장의 CMV 프로모터를 사용하는 유도성 포유동물 발현 시스템인 T-REX™ (테트라 사이클린-조절되는 발현) 시스템을 보유한다. 또한, 인비트로겐사는 피키아 메타놀리카 발현 시스템 (Pichia methanolica Expression System)이라고 불리는 효모 발현 시스템을 제공하고, 이는 메틸로영양성 효모 피키아 메타놀리카 (Pichia methanolica)에서 재조합 단백질 높은 수준으로 생산하기 위해 설계된다.

[0233] 본 발명의 방법에 의해 생산되는 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 "과다 발현되고 (overexpressed)" 예로, 세포에서 자연적인 발현과 비교하여 증가된 수준으로 발현될 수 있다. 이러한 과다발현 (overexpression)은 방사성 표지 및/또는 단백질 정제를 포함하는 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다. 그러나, 단순하고 직접적인 방법, 예를 들어 SDS/PAGE 및 단백질 염색 또는 웨스턴 블롯팅과 이어지는 이로부터 얻은 젤 또는 블롯의 밀도측정 스캐닝과 같은 정량적인 분석법을 포함하는 것이 바람직하다. 자연적 세포에서의 수준과 비교하여 재조합 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드 수준에서의 특이적 증가가 과다발현의 표시이고, 이는 숙주에 의해 생산되는 다른 단백질에 비해 특이적 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드가 상대적으로 풍부하여, 젤 상에서 관찰 가능하다.

[0234] 일정 구체예에서, 발현되는 단백질성 서열은 숙주세포에서 봉입체 (inclusion body)를 형성하고 숙주세포는 진한 봉입체와 세포막을 수용성 세포 성분으로부터 분리시키기 위해 예를 들어, 세포 균질기 (cell homogenizer)에서 파쇄되어 용해되고, 세척되며 및/또는 원심분리된다. 이러한 원심분리는 진한 봉입체가 슈크로스과 같은 당의 흡수에 의해 완충용액 내로 또한 선택적인 속도에서 원심분리에 의해 농축되는 조건 하에서 수행될 수 있다. 봉입체는 베타 머캅토에탄올 또는 DTT (디티오트레이톨)과 같은 환원제 존재 하에 높은 농도의 우레아 (예로, 8M) 또는 구아니딘 하이드로클로라이드와 같은 무질서 유발제를 포함하는 용액에서 수용성화되고 당업자가 알고 있는 바와 같이 더욱 바람직한 구조로 재폴딩될 수 있다.

[0235] **VI. 생물학적 기능적인 동등물**

[0236] 본 발명에 따라 폴리뉴클레오타이드 및/또는 단백질의 구조에서 변형 및/또는 변화가 만들어질 수 있기 때문에, 유사하거나 향상된 특징을 가지는 분자를 획득할 때 이러한 생물학적으로 기능적인 동등물도 역시 본 발명의 범위에 포함된다.

[0237] **A. 변형된 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드**

[0238] 생물학적 기능적인 동등물은 “야생형” 또는 표준 단백질을 인코딩하는 능력을 보유하면서, 동시에 서로 다른 서열을 포함하도록 조작되어진 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이것은 유전자 암호의 반복성 (degeneracy), 예로 동일한 아미노산을 인코딩하는 다수 코돈의 존재에 의해 달성될 수 있다. 한 가지 예에서, 당업자라면 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 능력을 방해하지 않으면서 제한효소 인지서열을 이 폴리뉴클레오타이드 내로 도입하고자 할 수 있다.

[0239] 또 다른 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 더 유의한 변화를 가진 생물학적 기능적인 동등물을 만들고 (또한 인코딩)할 수 있다. 어떠한 아미노산은 단백질 구조에서 예를 들어 항체의 항원-결합 부위, 기질 분자 상의 결합 부위, 수용체 등과 같은 구조와 상호작용하는 결합 능력의 다소간 상실도 없이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 소위 말하는 “보존적인 (conservative)” 변화는 구조적인 변화가 단백질의 설계된 기능을 수행하는 그의 능력에 영향을 미치는 것이 아니기 때문에 단백질의 생물학적인 활성을 방해하지 않는다. 따라서 본 발명자는 다양한 변화가 여전히 본 발명의 목적을 만족시키면서 본 명세서에서 기재된 유전자 및 단백질의 서열에서 만들어질 수 있다고 생각한다.

[0240] 기능적인 동등물이란 관점에서, 당업자는 “생물학적으로 기능적인 동등한” 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드의 정의에서 허용가능한 수준의 동등한 생물학적 활성을 가진 분자를 보유하면서 분자의 정의된 부분 안에서 만들어질 수 있는 변화의 숫자에 제한이 있는 개념이 본질적이라는 점을 잘 이해하고 있다. 따라서 생물학적으로 기능적인 동등물은 본 명세서에서 이들 단백질 (및 폴리뉴클레오타이드)이 선택된 아미노산 (또는 코돈)에서 치환될 수 있기 때문에 정의되는 것이다. 기능적 활성.

[0241] 일반적으로, 분자의 길이가 짧아질수록, 기능을 유지하면서 분자 내에 만들어질 수 있는 변화가 적어진다. 더 긴 도메인은 중간 정도의 변화를 가질 수 있다. 전장의 단백질은 더 많은 수의 변화에 대해 가장 큰 내성을 가질 것이다. 그러나, 분자 또는 도메인의 구조에 매우 의존하는 어떠한 분자 또는 도메인은 변형을 거의 또는

전혀 건디지 못할 수도 있는 점을 인정해야 한다.

[0242] 아미노산 치환은 일반적으로 예를 들어 그들의 소수성, 친수성, 전하, 크기 및/또는 기타 등등과 같은 아미노산 측쇄 치환기의 상대적인 유사성에 근거한다. 크기, 모양 및/또는 아미노산 측쇄 치환기의 타입 분석은 아르기닌, 라이신 및/또는 히스티딘이 모두 양성 전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글리신 및/또는 세린은 모두 동일한 크기이며; 및/또는 페닐알라닌, 트립토판 및/또는 타이로신은 모두 일반적으로 유사한 모양을 가지는 점을 보여준다. 따라서, 이들 고려사항을 근거로 하여, 아르기닌, 라이신 및/또는 히스티딘; 알라닌, 글리신 및/또는 세린; 및/또는 페닐알라닌, 트립토판 및/또는 타이로신;은 본 명세서에서 생물학적으로 기능적인 동등물로서 정의된다.

[0243] 보다 정량적인 변화에 영향을 주기 위하여, 아미노산의 수치료법 지수 (hydropathic index)가 고려될 수 있다. 각 아미노산은 그들의 소수성 및/또는 전하 특징을 기초로 하여 수치료법 지수가 배당되었으며, 이들은: 이소루이신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루이신 (+3.8); 페닐알라닌 (+2.8); 시스테인/시스틴 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 ( 0.4); 트레오닌 ( 0.7); 세린 ( 0.8); 트립토판 ( 0.9); 타이로신 ( 1.3); 프롤린 ( 1.6); 히스티딘 ( 3.2); 글루타메이트 ( 3.5); 글루타민 ( 3.5); 아스파테이트 ( 3.5); 아스파라진 ( 3.5); 라이신 ( 3.9); 및/또는 아르기닌 ( 4.5)이다.

[0244] 단백질에 상호작용하는 생물학적 기능을 부여하는 데 수치료법 아미노산 지수의 중요성은 일반적으로 당해 기술 분야에서 잘 이해된다 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 Kyte & Doolittle, 1982). 어떤 아미노산은 유사한 수치료법 지수 및/또는 점수를 가지는 다른 아미노산으로 치환되고 및/또는 여전히 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있는 점이 보고되어 있다. 수치료법 지수에 기초하는 변화를 만드는데 있어, 수치료법 지수가 ±2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, 상세하게는 ±1 이내인 것이 바람직하며, 및/또는 상세하게는 ±0.5 이내 인 것이 훨씬 더 바람직하다.

[0245] 또한 당해 기술 분야에서 유사한 아미노산의 치환은 소수성을 기초로 하여, 상세하게는 이에 의해 만들어진 생물학적 동등한 단백질 및/또는 펩타이드가 본 발명의 일정 구체예에서와 같은 면역학적 구체예에서 사용되려는 곳에서 효과적으로 만들어질 수 있는 것으로 이해된다. 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제4,554,101호는 단백질의 가장 큰 국소적 평균 소수성은 그의 인접한 아미노산의 소수성에 의해 관리되는 바 그의 면역원성 및 항원성과, 예로 단백질의 생물학적 성질과 상호 관련되어 있다.

[0246] 미국특허 제4,554,101호에 상세히 기술된 바와 같이, 하기 소수성 값이 아미노산 잔기에 배당되었다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스파테이트 (+3.0 ± 1); 글루타메이트 (+3.0 ± 1); 세린 (+0.3); 아스파라진 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글리신 (0); 트레오닌 ( 0.4); 프롤린 (-0.5 ± 1); 알라닌 ( 0.5); 히스티딘 ( 0.5); 시스테인 ( 1.0); 메티오닌 ( 1.3); 발린 ( 1.5); 루이신 ( 1.8); 이소루이신 ( 1.8); 타이로신 ( 2.3); 페닐알라닌 ( 2.5); 트립토판 ( 3.4). 유사한 소수성 값에 근거한 변화를 만드는데 있어, 소수성 값이 ±2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, 상세하게는 ±1 이내인 것이 바람직하며, 및/또는 상세하게는 ±0.5 이내인 것이 훨씬 더 바람직하다.

[0247] **B. 변화된 아미노산**

[0248] 본 발명은 많은 관점에서 적절한 폴리뉴클레오타이드의 전사 및 해독을 통한 세포 내 펩타이드 및 폴리펩타이드의 합성에 의존한다. 이들 펩타이드 및 폴리펩타이드는 스무 개 “자연적인” 아미노산 및 그의 번역 후 수식을 포함할 것이다. 그러나, 시험관 내 펩타이드 합성은 변형된 및/또는 특별한 아미노산의 사용을 허용한다. 표 1은 대표적이지만 이에 제한되지 않는 변형된 및/또는 특별한 아미노산을 제공한다.

[0249] **C. 의사체**

[0250] 상기에서 논의된 생물학적 기능적인 동등물에 추가하여, 본 발명자는 또한 구조적으로 유사한 화합물이 본 발명의 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 중요한 부분을 모방하도록 제조될 수 있는 점을 주목한다. 펩타이드 의사체 (peptidomimetics)라고 부를 수 있는 이러한 화합물은 본 발명의 펩타이드와 같이 동일한 방식으로 사용될 수 있고 또한 따라서 기능적 동등물이다.

[0251] 단백질의 이차 및 삼차 구조의 요소를 모방하는 일정 의사체는 Johnson *et al.* (1993)에 기술되어 있다. 펩타이드 의사체의 용도 이면에 잠재된 이론적 근거는 단백질의 펩타이드 골격이 주로 항체 및/또는 항원체와 같

은 분자적 상호작용을 용이하게 하는 방식으로 아미노산 측쇄를 배치하기 위해 존재하는 점이다. 펩타이드 의사체는 따라서 자연적 분자와 유사한 분자적 상호작용을 허용하도록 설계된다.

[0252] 펩타이드 의사체 개념의 성공적인 응용 일부는 단백질 내 β-회전 의사체에 초점을 맞추어 왔고 이는 매우 항원성이 높은 것으로 알려져 있다. 마찬가지로 폴리펩타이드 내 β 회전 구조는 본 명세서에서 논의된 바와 같이 컴퓨터-기초한 알고리즘에 의해 예측될 수 있다. 일단 상기 회전의 성분 아미노산이 결정되면, 아미노산 측쇄의 필수적인 요소의 유사한 공간적 배치를 달성하도록 의사체가 제작될 수 있다.

[0253] 다른 접근법은 큰 단백질의 결합 부위를 모방하는 생물학적으로 활성을 가진 구조를 생산하기 위한 매력적인 구조적 주형으로서 작은, 다중설파이드-포함하는 단백질의 사용에 초점을 맞추어 왔다. Vita *et al.* (1998). 어떤 독소에서 진화적으로 보존되는 것으로 보이는 구조적인 모티프는 작고 (30-40개 아미노산), 안정하며 돌연변이에 대해 매우 관대하다. 이러한 모티프는 세 개 디설파이드에 의해 내부 코어가 연결된 베타 시트 및 알파 헬릭스로 구성된다.

[0254] 베타 II 회전은 환상의 L-펩타이드 및 D-아미노산을 가진 이것을 사용하여 성공적으로 모방된 바 있었다. Weisshoff *et al.* (1999). 또한, Johannesson *et al.* (1999)은 역회전 유도하는 성질을 가진 이중환 트리펩타이드에 관해 보고하고 있다.

[0255] 특이 구조를 생성하는 방법은 당해 기술 분야에 기재되어 왔다. 예를 들어, 알파-헬릭스 의사체는 미국특허 제 5,446,128호; 제5,710,245호; 제5,840,833호; 및 제5,859,184호에 기술되어 있다. 이들 구조는 펩타이드 또는 단백질을 더 열적으로 안정하게 만들고 또한 단백질 분해에 대한 저항성을 증가시킨다. 여섯, 일곱, 열 하나, 열 둘, 열 셋 및 열 넷 구성원을 가진 환 구조가 기재되어 있다.

[0256] 구조적으로 제한된 베타 회전 및 베타 만곡을 생성하는 방법이 예를 들어 미국특허 제5,440,013호; 제5,618,914호; 및 제5,670,155호에 기술되어 있다. 베타-회전은 변화된 측면 치환을 이에 해당하는 골격 구조의 변화가 없이 허용하고, 표준 합성 과정에 의해 펩타이드 내로 삽입되기 위한 적절한 말단을 가진다. 의사체 회전의 다른 타입은 역전 및 감마 회전을 포함한다. 역회전 의사체가 미국특허 제5,475,085호 및 제5,929,237호에 기재되어 있고 감마 회전 의사체가 미국특허 제5,672,681호 및 제5,674,976호에 기재되어 있다.

[0257] **VII. 면역학적 조성물**

[0258] 본 발명의 상세한 구체예에서, 면역학적 조성물이 적용된다. 간략히, 하기 섹션은 본 명세서의 다른 곳에 단지 대표적인 구체예로서 기술되어 있는 바와 같이 본 발명의 얼리키아 샤피엔시스 VLPT 면역학적 조성물 모두를 언급할 것이다. 예를 들어, 본 조성물은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15의 일부 또는 전부를 포함하는 것과 같은 얼리키아 샤피엔시스 VLPT 폴리펩타이드의 전부 또는 일부, 서열번호 16의 일부 또는 전부를 포함하는 것과 같은 VLPT 폴리뉴클레오타이드, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 펩타이드에 대한 항체, 또는 그의 혼합물을 포함할 수 있다. 항체는 항원을 결합시키는 데, 예를 들어 분자를 그의 활성에 대해 적어도 부분적으로 비효율적으로 만드는 데 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 항원에 대한 항체는 시료로부터 항원의 존재를 검출하는 것과 같이 본 발명의 진단적 관점에서 사용될 수 있다. 대표적인 시료는 얼리키아 캐니스 또는 얼리키아 샤피엔시스 감염을 가진 것으로 의심되는 동물로부터, 얼리키아 캐니스 또는 얼리키아 샤피엔시스 감염에 취약한 동물로부터, 또는 얼리키아 캐니스 또는 얼리키아 샤피엔시스 감염을 가진 동물로부터 나올 수 있다. 대표적인 시료는 혈액, 혈청, 뇌척수액, 소변, 대변, 얼굴 긁음, 유두 흡입 등으로 획득될 수 있다.

[0259] 정제된 면역반응하는 조성물 또는 면역반응하는 조성물의 항원성 단편은 당업자가 숙지하고 있는 표준 프로토콜을 적용하여 새로운 항체를 생성하거나 이미 존재하는 항체를 (예로, 진단적 분석법에서 양성 대조군으로서) 테스트하는 데 사용될 수 있다.

[0260] 본 기술에서 잘 알려진 바와 같이, 특정한 면역원에 대한 면역원성 (immunogenicity)은 아쥘반트라고 알려진 면역 반응의 비-특이적 자극제의 사용에 의해 증진될 수 있다. 대표적이고 바람직한 아쥘반트는 완전한 BCG, Detox, (RIBI, Immunochem Research Inc.), ISCOMS 및 알루미늄 하이드록사이드 아쥘반트 (Superphos, Biosector)를 포함한다.

[0261] 면역반응하는 조성물 또는 면역반응 하는 조성물의 단편을 예로 래트에서 면역원으로서 사용하여 생성되는 폴리

클론 항혈청이 본 발명에 포함된다. 당업자가 잘 알고 있는 모노클론 및 폴리클론 항체 생산을 위한 표준 프로토콜이 적용될 수 있다. 이러한 과정에 의해 생성되는 모노클론 항체는 예를 들어 재조합 *얼리키아* cDNA 클론을 확인하고 기지의 cDNA 클론으로부터 그들을 구별하는 능력에 대해 검색될 수 있다.

[0262] 본 발명은 그대로인 모노클론 항체뿐만 아니라 면역학적으로-활성을 가진 항체 단편, 예로 Fab 또는 (Fab)<sub>2</sub> 단편; 조각된 단일 사슬 scFv 분자; 또는 키메라 분자, 예로 한 가지 항체, 예로 마우스 유래의 항체의 의 결합 특이성을 또한 다른 항체, 예로 인간 유래의 항체의 나머지 부분을 포함하는 항체를 포괄한다.

[0263] 한 가지 구체예에서, 항체 또는 그의 단편은 독소에 또는 검출가능한 표지, 예로 방사성 표지, 비-방사성 동위원소 표지, 형광성 표지, 화학발광성 표지, 자성 표지 (paramagnetic label), 효소 표지 또는 비색 표지에 연결될 수 있다. 적합한 독소의 예는 디프테리아 독소, 슈도모나스 엔도톡신 A, 라이신 (ricin), 및 콜레라 독소를 포함한다. 적합한 효소 표지의 예는 말레이트 하이드로게나제, 스테필로코코스 뉴클레아제, 델타-5-스테로이드 이소머라제, 알코올 디하이드로게나제, 알파 글리세롤 포스페이트 디하이드로게나제, 트리오스 포스페이트 이소머라제, 피옥시다제, 알칼라인 포스파타제, 아스파라진 분해효소, 글루코스 옥시다제, 베타-갈락토시다제, 리보뉴클레아제, 우레아제, 카탈라제, 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나제 글루코아밀라제, 아세틸콜린에스터라제 등을 포함한다. 적합한 방사성 표지의 예는 <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, 등을 포함한다.

[0264] 시험관 내 진단의 목적을 위한 상작성 동위원소는 또한 본 발명의 방법에 따라 사용될 수 있다. 자기 공명 이미지 (magnetic resonance imaging)에 유용한 요소의 많은 예가 존재한다. 생체 내 핵자기 공명 이미지분석에 관한 논의를 위해서, 예를 들어 Schaefer *et al.*, (1989) JACC 14, 472-480; Shreve *et al.*, (1986) Magn. Reson. Med. 3, 336-340; Wolf, G.L., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 93-95; Wesby *et al.*, (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 145-155; Runge *et al.*, (1984) Invest. Radiol. 19, 408-415을 참조한다. 적합한 형광 표지의 예는 플로레신 표지 (fluorescein label), 이소티오시알레이트 표지 (isothiocyalate label), 로다민 표지 (rhodamine label), 피코에리트린 표지 (phycoerythrin label), 피코시아닌 표지 (phycocyanin label), 알로피코시아닌 표지 (allophycocyanin label), 오프알데하이드 표지 (opthaldehyde label), 플로레스카민 표지 (fluorescamine label) 등을 포함한다. 화학발광성 표지의 예는 루미날 표지 (luminal label), 이소루미날 표지 (isoluminal label), 방향성 아크리디늄 에스테르 표지 (aromatic acridinium ester label), 루시페린 표지 (luciferin label), 루시페라제 표지, 에쿠오린 표지 (aequorin label)을 포함한다.

[0265] 당업자라면 이들 및 다른 적합한 표지를 잘 알고 있을 것이고, 이는 본 발명에 따라 적용될 수 있다. 이들 표지가 항체 또는 그의 단편에 결합하는 것은 당업자가 보편적으로 알고 있는 표준 기법을 사용하여 달성될 수 있다. 일반적인 기법은 Kennedy *et al.*, (1976) Clin. Chim. Acta 70, 1-31; 및 Schurs *et al.*, (1977) Clin. Chim. Acta 81, 1-40 에 의해 기술되어 있다. 이후 언급되는 결합 기법은 글루탈알데하이드 방법, 피리오데이트 방법, 디말레이미드 방법, 말레이미도벤질-N-하이드록시-숙시니미드 에스테르 방법이다. 이들 방법 모두는 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있다.

[0266] **D. 항체**

[0267] 본 발명의 일정 관점에서, 발현된 VLPT에 대해 하나 이상의 항체가 생산될 수 있다. 이들 항체는 본 명세서에서 기술된 다양한 진단적 및/또는 치료적 응용에 사용될 수 있다.

[0268] 본원에 사용된, 용어 "항체"는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE와 같은 면역적 결합제 모두를 널리 말하려는 것이다. 일반적으로, IgG 및/또는 IgM가 바람직하고, 이는 그들이 생리학적 상황에서 가장 보편적인 항체이기 때문이고 또한 그들이 실험실 세팅에서 가장 쉽게 만들어지기 때문이다.

[0269] 용어 "항체"는 항원 결합 부위를 가지는 항체-유사 분자 모두를 말하는 데 사용되고, 또한 Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>, 단일 도메인 항체 (DABs), Fv, scFv (단일 사슬 Fv), 등등과 같은 항체 단편을 포함한다. 다양한 항체-기초한 구조물 및 단편을 제조하고 사용하는 기법이 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 항체를 제조하고 특성 분석하는 수단은 또한 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다 [예로, 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 항체: 실험실 매뉴얼 (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 참조].

[0270] 또한 "미니 항체 (mini-antibodies)" 또는 "미니체 (minibodies)"는 본 발명에서의 사용이 주목된다. 미니체는 힌지 부위에 의해 sFv로부터 분리된 그의 C-말단에 올리고머화 도메인을 포함하는 sFv 폴리펩타이드 사슬이

다. Pack *et al.* (1992) *Biochem* 31:1579-1584. 올리고머화 도메인은 더 나아가 추가적인 디설파이드 결합에 의해 안정화될 수 있는 자가-연결된  $\alpha$ -헬릭스, 예로 루이신 지퍼를 포함한다. 올리고머화 도메인은 막을 통과하여 벡터성 폴딩과 양립할 수 있도록 설계된다. 이 과정은 기능적인 결합 단백질 내로 폴리펩타이드의 생체 내 폴딩을 용이하게 하는 것으로 사료된다. 일반적으로, 미니체는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있는 재조합 방법을 사용하여 생산된다. 예로, Pack *et al.* (1992) *Biochem* 31:1579-1584; Cumber *et al.* (1992) *J Immunology* 149B:120-126를 참조한다.

[0271] 항체-유사 결합 펩티도사체도 역시 본 발명에서 주목된다. Liu *et al.* *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003 Mar;49(2):209-16 에서는 줄어든 항체로서 작용하고 덜 번거로운 합성 방법뿐만 아니라 더 긴 혈청 반감기라는 장점을 가지는 "항체 유사 결합 펩티도사체" (ABIPs)를 기술하고 있다.

[0272] 모노클론 항체 (MAbs)는 예로 재생산 및 대량 생산이라는 장점을 가지면서 인식되어 그들의 사용이 일반적으로 선호된다. 따라서 본 발명은 인간, 마우스, 원숭이, 래트, 햄스터, 토끼 및 심지어 닭 기원의 모노클론 항체를 제공한다. 용이한 제조 및 반응액의 즉각적인 입수가능성으로 인해, 마우스의 모노클론 항체는 자주 선호될 것이다.

[0273] 그러나, "인간화된 (humanized)" 항체도 역시 인간 불변 및/또는 가변 부위 도메인을 가지는 마우스, 래트 또는 기타 종으로부터 나온 키메라 항체, 이중특이 항체, 재조합 및 조작된 항체 및 그의 단편과 같이 주목된다. 본원에 사용된, 용어 "인간화된" 면역글로불린은 인간 틀 부위 및 비-인간 (보통 마우스 또는 래트) 면역글로불린으로부터 나온 하나 이상의 CDR's 를 포함하는 면역글로불린을 말한다. CDR's를 제공하는 비-인간 면역글로불린은 "공여자"라고 불리고 틀을 제공하는 인간 면역글로불린은 "수여자"라고 불린다. "인간화된 항체"는 인간화된 경쇄 및 인간화된 중쇄 면역글로불린을 포함하는 항체이다.

[0274] **E. 모노클론 항체를 생성하는 대표적인 방법**

[0275] 모노클론 항체 (MAbs)를 생성하는 대표적인 방법은 일반적으로 폴리클론 항체를 제조하는 것과 동일한 과정으로 시작된다. 간단히, 폴리클론 항체는 본 발명에 따라 동물을 LEE 또는 CEE를 사용하여 면역화하고 면역화된 동물로부터 항혈청을 수확하는 것에 의해 제조된다.

[0276] 넓은 범위의 동물 종이 항혈청을 생산하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로 항혈청의 생산에 사용되는 동물은 토끼, 마우스, 래트, 햄스터, 기니아 피그 또는 염소이다. 동물의 선택은 당업자가 숙지하고 있는 바와 같이 조작의 용이성, 비용 또는 원하는 혈청의 양에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 관심이 되는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열에 대해 형질전환된 (transgenic) 포유동물 또는 식물의 생산 및 그로부터 나온 회수할 수 있는 형태의 항체 생산을 거쳐 형질전환적으로 생산될 수 있다. 포유동물에서 형질전환된 생산과 연결하여, 항체는 염소, 소 또는 기타 포유동물의 우유로부터 생산되고 회수될 수 있다. 미국특허 제5,827,690호, 제5,756,687호, 제5,750,172호, 및 제5,741,957호를 참조한다.

[0277] 당해 기술 분야에서 역시 잘 알려지나, 특정 면역원 조성물의 면역원성은 아췌반트로 알려진 면역 반응의 비-특이 자극제의 사용에 의해 증진될 수 있다. 적합한 아췌반트로 는 사이토카인, 케모카인 (chemokine), 공인자 (cofactors), 독소, 플라즈모디아 (plasmodia), 합성적 조성물 또는 이러한 아췌반트를 인코딩하는 LEEs 또는 CEEs를 들 수 있다.

[0278] 사용될 수 있는 아췌반트는 IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, g-인터페론, GMCSF, BCG, 알루미늄 하이드록사이드, thur-MDP 및 nor-MDP와 같은 MDP 화합물, CGP (MTP-PE), 지질 A, 및 모노포스포릴 지질 A (MPL)을 포함한다. 박테리아로부터 추출된 세 가지 구성요소를 포함하는RIBI, MPL, 트레할로스 디마이코레이트 (TDM) 및 2% 스쿠알렌/트윈 80 에멀전에 녹인 세포벽 골격이 또한 주목된다. 심지어 MHC 항원이 사용될 수도 있다. 대표적이고 종종 선호되는 아췌반트는 완전 프런드 아췌반트 (죽은 마이코박테리움 튜버쿨로시스를 포함하는 면역반응의 비-특이 자극제), 불완전 프런드 아췌반트 및 알루미늄 하이드록사이드 아췌반트를 포함한다.

[0279] 아췌반트에 추가하여, T 세포 면역을 상승조절 (upregulate) 하거나 억제자 (suppressor) 세포 활성을 하강조절 (downregulate)하는 것으로 보이는 생물적 반응 조절자 (biologic response modifiers, BRM)를 공투여하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 BRMs 은 이에 제한되는 것은 아니지만, 시메티딘 (Cimetidine, CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); 낮은 용량의 사이클로포스포아미드 (cyclophosphamide, CYP; 300 mg/m2) (Johnson/ Mead, NJ), g-인터페론, IL-2, 또는 IL-12와 같은 사이토카인 또는 B-7과 같은 면역 도움 기능에 관

여하는 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함한다.

- [0280] 폴리클론 항체를 생산하는 데 사용되는 면역원 조성물의 양은 면역화에 사용되는 동물뿐만 아니라 면역원의 본성에 따라 다양해진다. 다양한 경로가 이에 제한되는 것은 아니지만 피하, 근육내, 피내, 표피내, 정맥내 및 복강내를 포함하는 경로가 면역원을 투여하는 데 사용될 수 있다. 폴리클론 항체의 생산은 면역화를 따라 다양한 시점에 면역화된 동물의 혈액을 시료화하는 것에 의해 감시될 수 있다.
- [0281] 두 번째, 부스터 용량 (예로, 주입에서 제공되는)도 역시 주어질 수 있다. 부스팅 및 적정의 과정은 적합한 적정이 달성될 때까지 반복된다. 면역원성이 원하는 수준으로 획득될 때, 면역화된 동물이 채혈되고 혈청이 분리되어 보관되며, 및/또는 동물이 MAbs를 생성하는 데 사용될 수 있다.
- [0282] 토끼 폴리클론 항체의 생산을 위해, 동물은 귀 정맥을 통해 또는 대안적으로 심장 천공에 의해 채혈될 수 있다. 제거된 혈액은 응고된 다음 전체 세포 및 혈액 응고물로부터 혈청 성분을 분리하기 위해 원심분리된다. 혈청이 다양한 응용을 위해 사용될 수 있거나 그 외 원하는 항체 분획이 또 다른 항체, 고체 기질에 결합한 펩타이드를 사용한 친화 크로마토그래피와 같은 잘 알려진 방법에 의해 또는 예로 단백질 A 또는 단백질 G 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있다.
- [0283] MAbs 는 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 번호 제, 4,196,265호에서 예시된 것과 같은 잘-알려진 기법의 사용을 통해 즉시 제조될 수 있다. 일반적으로 이러한 기법은 선택된 면역원 조성물을, 예로 이것이 야생형 또는 돌연변이 조성물인 경우 정제된 또는 부분적으로 정제된 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 도메인을 사용하여 적합한 동물을 면역화하는 것을 포함한다. 면역화하는 조성물은 항체를 생산하는 세포를 자극하는 데 효과적인 방식으로 투여된다.
- [0284] 모노클론 항체 (MAbs)를 생성하는 방법은 일반적으로 폴리클론 항체를 제조하는 것과 동일한 과정으로 시작된다. 마우스 및 래트와 같은 설치류가 바람직한 동물이고, 그러나 토끼, 양 또는 개구리 세포의 사용도 역시 가능하다. 래트의 사용은 일정한 장점을 제공할 수 있지만 (Goding, 1986, pp. 60-61), 마우스가 바람직하고 BALB/c 마우스는 가장 일상적으로 사용되고 일반적으로 더 높은 퍼센트의 안정적인 융합을 주기 때문에 가장 바람직하다.
- [0285] 일반적으로 상기에서 기술된 바와 같이, 동물에는 항원이 주입된다. 항원은 프런드 완전 및 불완전 아쥘반트와 같은 아쥘반트와 함께 혼합될 수 있다. 동일한 항원 또는 상기 항원을 인코딩하는 DNA를 사용하는 부스터 투여가 대략 두 주 간격으로 시행될 것이다.
- [0286] 면역화에 이어서, 항체, 상세하게는 B 림프구 (B 세포)를 생산하는 잠재력을 가진 체세포가 MAbs 생성하는 프로토콜에 사용되기 위해 선별된다. 이들 세포는 생검된 비장, 편도선 또는 림프절로부터 또는 말초혈액 시료로부터 획득될 수 있다. 비장 세포 및 말초혈액 세포가 바람직하고, 전자는 분열하는 혈장세포 단계에서 존재하는 항체-생산하는 세포의 풍부한 출처이기 때문이고, 후자는 말초 혈액이 쉽게 얻을 수 있기 때문이다.
- [0287] 종종, 동물 폐원이 면역화되었을 것이고 가장 높은 항체 역가를 가진 동물의 비장이 분리될 것이고 비장 림프구가 비장을 주사기로 균질화하여 획득된다. 전형적으로, 면역화된 마우스로부터 얻은 비장은 대략  $5 \times 10^7$  to  $2 \times 10^8$  림프구를 포함한다.
- [0288] 면역화된 동물로부터 얻은 항체-생산하는 B 림프구는 다시 불멸화된 마이엘로마 세포, 일반적으로 면역화된 동물과 동일한 종의 세포와 세포 융합된다. 하이브리도마 생산하는 융합 과정에 사용하기 적합한 마이엘로마 세포주는 바람직하게 항체 생산하지 않고, 높은 융합 효율을 가지며, 원하는 융합된 세포 (하이브리도마)의 성장만을 지원하는 선별 배지에서 성장하지 못하는 효소 결함이 있다.
- [0289] 당업자가 알고 있는 바와 같이, 많은 수의 마이엘로마 세포라면 어느 것이라도 사용될 수 있다 (Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984). 인용). 예를 들어, 면역화된 동물이 마우스인 경우, P3 X63/Ag8, X63 Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210 Ag14, FO, NSO/U, MPC 11, MPC11 X45 GTG 1.7 및 S194/5XX0 Bu1을 사용할 수 있고; 래트인 경우 R210.RCY3, Y3 Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210을 사용할 수 있으며; 그리고 U 266, GM1500 GRG2, LICR LON HMy2 및 UC729 6 은 모두 인간 세포 융합과 연결하여 유용하다. 마이엘로마 발현 시스템의 논의를 위해서는 Yoo *et al.*, J. Immunol Methods. 2002 Mar 1;261(1-2):1-20를 참조한다.
- [0290] 바람직한 마우스 마이엘로마 세포 하나는 NS-1 마이엘로마 세포주 (P3-NS-1-Ag4-1이라고도 명명됨)이고, 이는 NIGMS 인간 유전적 돌연변이 세포 기탁기관 (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repositor)에 세포주 기탁번호

제 GM3573호를 요청하여 즉시 입수 가능하다. 사용될 수 있는 또 다른 마우스 마이엘로마 세포주는 8 아자구아닌 저항하는 마우스의 마우스 마이엘로마 SP2/0 비-생산자 세포주이다.

[0291] 항체 생산하는 비장 또는 림프절 세포와 마이엘로마 세포의 하이브리드를 생성하는 방법은 보통 체세포를 마이엘로마 세포와 2 : 1 비율로 혼합하는 것을 포함한다. 이 비율은 세포막의 융합을 상승시키는 제제 또는 제제들 (화학적 또는 전기적)의 존재 하에 약 20 : 1로부터 약 1 : 1까지 각각 변화시킬 수 있다. 센다이 바이러스 (Sendai virus)를 사용한 융합 방법이 Kohler and Milstein (1975; 1976)에 의해 기술된 바 있었고, 37% (v/v) PEG 와 같은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 사용한 방법이 Gefter *et al.*, (1977)에 의해 기술되었다. 전기적으로 유도된 융합 방법의 사용도 역시 적절하다 (Goding pp. 71 74, 1986).

[0292] 융합 과정은 보통 낮은 빈도, 약  $1 \times 10^{-6}$  내지  $1 \times 10^{-8}$ 로 살아있는 하이브리드를 생산한다. 그러나 이것은 문제가 되지 않고, 이는 살아있는 융합된 하이브리드가 선별 배지에 배양하는 것에 의해 부모의 융합되지 않은 세포 (상세하게는 정상적으로는 무한히 분열하는 융합되지 않은 마이엘로마 세포)로부터 분화되기 때문이다. 선별 배지는 일반적으로 조직 배양 배지에서 뉴클레오타이드의 새로운 합성 (*de novo* synthesis)을 방해하는 제제를 포함하는 것이다. 대표적인 바람직한 제제는 아미노프테린 (aminopterin), 메토틱세이트 (methotrexate) 및 아자세린 (azaserine)이다. 아미노프테린과 메토틱세이트는 퓨린 및 피리미딘 둘 다의 새로운 합성을 방해하는 한편, 아자세린은 퓨린 합성만을 방해한다. 아미노프테린 또는 메토틱세이트가 사용될 때에는, 배지에 뉴클레오타이드의 출처로서 하이폭산틴 및 티미딘이 보충된다 (HAT 배지). 아자세린이 사용될 때에는, 배지에 하이폭산틴이 보충된다.

[0293] 바람직한 선별 배지는 HAT이다. 뉴클레오타이드 회수 경로 (salvage pathways)를 작동시킬 수 있는 세포만이 HAT 배지에서 살아남을 수 있다. 마이엘로마 세포는 회수 경로의 중요한 효소, 예로 하이폭산틴 포스포리보실전이효소 (hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT)에 결함이 있어 그들이 살아남을 수 없다. B 세포는 이러한 경로를 작동시킬 수 있지만, 배양 시에 제한된 수명을 가지고 일반적으로 약 두 주 이내에 죽는다. 따라서, 선별 배지에서 살아남을 수 있는 세포만이 마이엘로마 및 B 세포로부터 형성되는 이들의 하이브리드이다.

[0294] 이러한 배양은 특히 하이브리도마가 선택되는 하이브리도마의 집단을 제공한다. 전형적으로, 하이브리도마의 선별은 마이크로타이터 플레이트에서 단일-클론 회식에 의해 세포를 배양하고 이어서 원하는 반응성에 대해 개별 클론의 상층액을 테스트하는 것에 의해 (약 둘 내지 삼 주 이후에) 수행된다. 분석법은 방사성면역분석법, 요소면역분석법, 세포독성 분석법, 플라크 분석법, 도트 면역결합 분석법 등과 같이 민감하고, 단순하고 신속해야 한다.

[0295] 선별된 하이브리도마는 다시 연속하여 회식되고 개별 항체를 생산하는 세포주로 클론될 것이며, 이 클론은 다시 MAbs를 제공하기 위해 무한히 증식될 수 있다. 본 세포주는 두 가지 기본 방식으로 MAb 생산에 사용될 수 있다. 첫째, 하이브리도마 시료는 원래 융합을 위한 체세포 및 마이엘로마 세포를 제공하던 데 사용되었던 타입의 조직적합한 동물 (예로, 유전적 동계의 마우스) 내로 주입될 수 있다 (종종 복강 내로). 선택사항으로, 이 동물은 주입 전 하이드로카본, 특히 프리스탄 (pristine) (테트라메틸펜타데칸)과 같은 오일로 자극이 주어진다. 주입된 동물은 융합된 세포 하이브리드에 의해 생산되는 특히 모노클론 항체를 분비하는 종양을 발달시킨다. 혈청 또는 복수액과 같은 동물의 체액은 다시 자극되어 높은 농도로 MAbs를 제공한다. 둘째, 개별 세포주는 시험관 내에서 배양될 수 있고, 여기서 MAbs는 당연히 그들이 높은 농도로 바로 회수될 수 있는 배양 배지로 분비된다.

[0296] 더 나아가, 생산 세포주로부터 본 발명의 항체의 발현 (또는 이로부터 나온 다른 부분)은 많은 기지의 기법을 사용하여 증진될 수 있다. 예를 들어, 글루타민 합성효소 및 DHFR 유전자 발현 시스템은 일정 조건 하에서 발현을 증진시키기 위한 보편적인 접근법이다. 높게 발현하는 세포 클론은 제한된 회식 클로닝 및 마이크로드롭 (microdrop) 기술과 같은 통상적인 기법을 사용하여 확립될 수 있다. GS 시스템이 유럽특허 번호 제0 216 846호, 제 0 256 055호, 및 제 0 323 997호 그리고 유럽특허출원 번호 제 89303964.4호와 연결하여 전체 또는 일부에서 논의된다.

[0297] 일정 수단에 의해 생산되는 MAbs 가 원하는 경우, 여과, 원심분리 및 HPLC 또는 친화 크로마토그래피와 같은 다양한 크로마토그래피 방법을 사용하여 정제될 수 있다. 본 발명의 모노클론 항체의 단편이 모노클론 항체로부터 획득될 수 있고, 펩신 또는 파파인과 같은 효소를 사용한 절단을 포함하는 방법에 의해, 및/또는 화학적 환원에 의한 디설파이드 결합의 절단에 의해 생산된다. 대안적으로, 본 발명에 의해서 포괄되는 모노클론 항체

단편은 자동화된 펩타이드 합성기를 사용하여 합성될 수 있다.

[0298] 또한 분자적 클로닝 접근법은 모노클론날을 생성하는 데 사용될 수 있다. 한 가지 구체예에서, 조합 면역글로불린 파지미드 라이브러리 (combinatorial immunoglobulin phagemid libraries)가 면역화된 동물의 비장으로부터 분리된 RNA 로부터 제조될 수 있고, 적절한 항체를 발현하는 파지미드가 항원을 발현하는 세포 및 대조군 세포를 사용하는 페닝에 의해 선별된다. 통상적인 하이브리도마 기법을 넘어서는 이러한 접근법의 장점은 대략  $10^4$  배 많은 항체가 생산되고 단화에 검색될 수 있고, 새로운 특이성이 적절한 항체를 발견하는 기회가 보다 증가하는 H 및 L 사슬 조합에 의해 생성되는 것이다. 또 다른 예에서, LEEs 또는 CEEs 는 무세포 시스템 (cell free system)으로 시험관 내에서 항원을 생산하는 데 사용될 수 있다. 이들은 단일 사슬 항체 라이브러리를 스키프하기 위한 표적으로서 사용될 수 있다. 이것은 많은 서로 다른 항체가 동물을 사용하지 않고도 매우 신속히 확인되도록 할 것이다.

[0299] 본 발명에 따라 항체를 생산하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예는 미국특허 제6,091,001호에서 발견되고, 이는 Cre-매개된 부위-특이 재조합을 사용하는 변형된 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 세포의 게놈 서열로부터 항체를 발현하는 세포를 생산하는 방법을 기술하고 있다. 본 방법은 처음 항체-생산하는 세포를 lox 부위 및 게놈 서열의 면역글로불린 유전자좌 부위와 인접한 첫 번째 DNA 서열과 상동한 표적하는 서열을 포함하는 상동성-표적 벡터로 형질전환하는 것을 포함한다. 이는 변형된 부위로 전환되어 첫 번째 lox 부위는 부위-특이 상동성 재조합을 통해 게놈 서열 내로 삽입된다. 그 다음 세포는 Cre-매개된 재조합에 적합한 두 번째 lox 부위를 삽입된 lox 부위 및 변형하는 서열과 함께 포함하는 lox-표적하는 벡터로 형질전환되어 면역글로불린 유전자좌의 부위를 변형된 부위로 전환시킨다. 이러한 전환은 lox 부위를 Cre와 생체 내에서 상호작용하는 것에 의해 수행되어, 변형하는 서열은 lox 부위의 Cre-매개된 부위-특이 재조합을 통해 게놈 서열 내로 삽입된다.

[0300] 대안적으로, 본 발명에 의해 포괄되는 모노클론 항체 단편은 자동화된 펩타이드 합성기를 사용하여 또는 대장균에서 전장의 유전자 또는 유전자 단편의 발현에 의해 합성될 수 있다.

[0301] **F. 항체 접합체**

[0302] 본 발명은 더 나아가 적어도 하나의 약제에 연결되어 항체 접합체를 형성하는 VLPT 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드에 대항하는, 일반적으로 모노클론 타입의 항체를 제공한다. 진단적 또는 치료적 제제로서의 항체 분자의 효능을 증가시키기 위하여, 적어도 하나의 원하는 분자 또는 부위에 연결되거나 공유적으로 결합하거나 복합되는 것이 편리하다. 이러한 분자 또는 부분은 이에 제한되는 것은 아니지만, 적어도 하나의 효과기 (effector) 또는 리포터 분자 (reporter molecule)일 수 있다. 효과기 분자는 원하는 활성, 예로 세포독성 활성을 가지는 분자를 포함한다. 항체에 부착되어 왔던 효과기 분자의 비-제한적인 예는 독소, 항-종양 제제, 치료적 효소, 방사성-표지된 뉴클레오타이드, 항바이러스 제제, 킬레이팅제, 사이토카인, 성장인자 및 올리고-또는 폴리-뉴클레오타이드를 포함한다. 대조적으로, 항체에 접합되어 왔던 리포터 분자의 비-제한적인 예는 효소, 방사성 표지, 햅텐 (hapten), 형광성 표지, 인형광 분자 (phosphorescent molecules), 화학발광 분자 (chemiluminescent molecule), 발색단 (chromophores), 발광 분자 (luminescent molecule), 광친화 분자 (photoaffinity molecule), 바이오틴과 같은 색상 입자 또는 리간드를 포함한다.

[0303] 충분한 선택도, 특이도 또는 친화도를 가진 항체라면 모두 항체 접합체에 위한 기본으로 적용될 수 있다. 이러한 성질은 당해 기술 분야에서 알려진 통상적인 면역학적 검색 방법학 (immunological screening methodology)를 사용하여 평가될 수 있다. 항체 분자에서 생물학적 활성 분자에 결합하는 부위는 표준 항원 결합 부위에 추가하여, 병원균, B-세포 슈퍼항원, T 세포 공-수용체 CD4 및 HIV-1 외피와 결합할 수 있는 가변 도메인에 있는 부위를 포함한다 (Sasso *et al.*, 1989; Shorki *et al.*, 1991; Silvermann *et al.*, 1995; Cleary *et al.*, 1994; Lenert *et al.*, 1990; Berberian *et al.*, 1993; Kreier *et al.*, 1991). 또한, 가변 도메인은 항체 자가-결합에 관여하고 (Kang *et al.*, 1988), 그리고 항-항체에 의해 인식되는 에피토프 (이디오프)를 포함한다 (Kohler *et al.*, 1989).

[0304] 항체 접합체의 어떤 예는 항체가 검출가능한 표지에 연결된 이들 접합체이다. "검출가능한 표지 (detectable label)"은 화합물 및/또는 그들의 특이 기능적 성질 및/또는 화학적 특성으로 인해 검출될 수 있는 효소이고, 이의 사용은 그들이 부착하는 항체가 검출되고 및/또는 더 나아가 원하는 경우 정량되도록 허락한다. 또 다른 이러한 예는 세포 독성 또는 항 세포 제제와 연결된 항체를 포함하는 접합체의 형성이고 "면역독소 (immunotoxins)"라고 말할 수 있다.

- [0305] 항체 접합체는 일반적으로 진단적 제제로서의 사용이 바람직하다. 항체 진단제는 일반적으로 다양한 면역분석법과 같은 시험관 내 진단학에서의 용도를 위한 것, 및/또는 "항체 유도되는 영상법 (antibody directed imaging)"으로서 일반적으로 알려진 생체 내 진단적 프로토콜 용도를 위한 것이라는 두 가지 클래스 내에 속한다.
- [0306] 많은 적절한 영상촬영 제제가 항체에 그들을 부착하는 방법과 같이 당해 기술 분야에 알려져 있다 (예로, 본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는, 미국특허 번호 제5,021,236호; 제4,938,948호; 및 제4,472,509호 참조). 사용되는 영상촬영 부분은 상자성 이온; 방사성 동위원소; 형광발색; NMR-검출가능한 물질; X-선 영상일 수 있다.
- [0307] 상자성 이온의 경우에서, 크롬 (III), 망간 (II), 철 (III), 철 (II), 코발트 (II), 니켈 (II), 구리 (II), 네오디뮴 (III), 사마리움 (III), 이터븀 (III), 가도리늄 (III), 바나듐 (II), 터븀 (III), 디스프로슘 (III), 홀뮴 (III) 및/또는 에르븀 (III)과 같은 대표적인 이온에 의해 언급될 수 있고, 가도리늄이 특히 바람직하다. X-선 영상과 같은 다른 내용에서 유용한 이온은 이에 제한되는 것은 아니지만 란타넘 (III), 금 (III), 납 (II), 및 특히 비스무스 (III)이다.
- [0308] 치료적 및/또는 진단적 응용을 위한 방사성 동위원소의 경우에서, 아스타틴<sup>211</sup>, <sup>14</sup>탄소, <sup>51</sup>크롬, <sup>36</sup>염소, <sup>57</sup>코발트, <sup>58</sup>코발트, 구리<sup>67</sup>, <sup>152</sup>Eu, 갈륨<sup>67</sup>, <sup>3</sup>수소, 요오드<sup>123</sup>, 요오드<sup>125</sup>, 요오드<sup>131</sup>, 인듐<sup>111</sup>, <sup>59</sup>철, <sup>32</sup>인, 레니움186, 레니움188, <sup>75</sup>셀레늄, <sup>35</sup>황, 테크니슘99m 및/또는 이트륨<sup>90</sup>이 언급될 수 있다. <sup>125</sup>I 은 종종 일정 구체예에서 사용이 바람직하고, 테크니슘<sup>99m</sup> 및/또는 인듐<sup>111</sup>도 역시 종종 그들의 낮은 에너지와 장기간 검출에 대한 적합성으로 인해 바람직하다. 본 발명의 방사성 표지된 모노클론 항체는 당해 기술 분야에 잘-알려진 방법에 따라 생산될 수 있다. 예를 들어, 모노클론 항체는 소듐 및 포타슘 요오드 및 소듐 하이포클로라이드와 같은 화학적 산화제 또는 락토퍼옥시다제와 같은 효소적 산화제와 접촉시켜 요오드화될 수 있다. 본 발명에 따른 모노클론 항체는 리간드 교환 방법에 의해, 예를 들어 퍼테크네이트를 주석을 함유하는 용액으로 환원시키고, 환원된 테크네튬을 세파텍스 컬럼 상에 킬레이팅하며 항체를 상기 컬럼에 적용하는 것에 의해 테크네튬으로 표지될 수 있다. 대안적으로, 직접적인 표지 기법은 예로 퍼테크네이트,  $\text{SNCl}_2$  와 같은 환원제, 소듐-포타슘 프탈레이트 용액과 같은 완충용액, 및 항체를 반응시키는 것에 의해 사용될 수 있다. 금속 이온으로서 존재하는 방사성 동위원소를 항체에 결합시키기 위해 종종 사용되는 중간 기능적 그룹은 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA) 또는 에틸렌 디아민테트라아세트산 (EDTA)이다.
- [0309] 접합체로서의 용도가 주목되는 형광성 표지 중에는 Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 케스테이드 블루, Cy3, Cy5,6-FAM, 플루오레신 이소티오시아네이트, HEX, 6-JOE, 오레곤 그린 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린 514, 퍼시픽 블루, REG, 로다민 그린, 로다민 레드, 레노그래핀, ROX, TAMRA, TET, 테트라메틸로다민, 및/또는 텍사스 레드가 포함된다.
- [0310] 본 발명에서 주목되는 항체 접합체의 또 다른 타입은 일차적으로 시험관 내 용도가 의도된 것이고, 여기서 항체는 이차적인 결합 리간드에 및/또는 발색 기질과 접촉하여 색상을 띤 산물을 생성할 효소 (효소 태그)에 연결된다. 적합한 효소의 예는 우레아제, 알칼라인 포스파타제, (호스레디쉬) 하이드로젠 퍼옥시다제 또는 글루코스 옥시다제를 포함한다. 바람직한 이차적인 결합 리간드는 바이오틴 및/또는 아비딘 및 스트렙타비딘 화합물이다. 이러한 표지의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는 미국특허 제3,817,837호; 제3,850,752호; 제3,939,350호; 제3,996,345호; 제4,277,437호; 제4,275,149호 및 제4,366,241호에 기술되어 있다.
- [0311] 그러나 항체에 분자를 부위-특이적 부착하는 또 다른 기지의 방법은 항체와 헵텐-기초한 친화 표지의 반응을 포함한다. 필수적으로, 헵텐-기초한 친화 표지는 항원 결합 부위에서 아미노산과 반응하고, 이에 의해 상기 부위를 파괴하고 특이 항원 반응을 방해한다. 그러나, 이것은 항체 결합체에 의해 항원 결합이 상실되는 결과를 초래하기 때문에 유리하지 않을 수 있다.
- [0312] 아지도 (azido) 그룹을 포함하는 분자도 역시 낮은 강도의 자외선에 의해 생성되는 반응성 니트렌 중간체를 통하여 단백질에 대한 공유 결합을 형성하는 데 사용될 수 있다 (Potter & Haley, 1983). 상세하게는, 퓨린 뉴클레오타이드의 2- 및 8-아지도 유사체가 세포 추출물에서 뉴클레오타이드 결합 단백질을 확인하기 위한 부위-유도된 광프로브로서 사용되어 왔다 (Owens & Haley, 1987; Atherton *et al.*, 1985). 2- 및 8-아지도 뉴클레오타이드도 역시 정제된 단백질의 뉴클레오타이드 결합 도메인을 맵핑하기 위하여 사용되어 왔고 (Khatoun *et*

*al.*, 1989; King *et al.*, 1989; and Dholakia *et al.*, 1989) 또한 항체 결합체로서 사용될 수 있다.

[0313] 접합체 부분에 항체를 부착하거나 접합시키는 몇 가지 방법이 당해 기술 분야에 알려져 있다. 어떠한 부착 방법은 예를 들어 디에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물 (DTPA); 에틸렌트리아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔설포나마이드; 및/또는 항체에 부착한 테트라클로로-3a-6 a-디페닐글리코우릴-3과 같은 유기 킬레이팅제를 적용하는 금속 킬레이트 복합체의 사용을 포함한다 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 각각 통합되어 있는 미국특허 제4,472,509호 및 제4,938,948호). 모노클론 항체도 역시 글루탈알데하이드 또는 피리오데이트와 같은 결합체의 존재 하에서 효소와 반응할 수 있다. 플루오레신 마커를 가지는 접합체는 이들 결합체의 존재 하에서 또는 이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조된다. 미국특허 제4,938,948에서는, 유방암의 영상촬영이 모노클론 항체를 사용하여 달성되고, 검출가능한 영상 부분은 메틸-p-하이드록시벤즈이미데이트 또는 N-숙시니미딜-3-(4-하이드록시페닐)프로피오네이트와 같은 링커를 사용하여 항체에 부착된다.

[0314] 다른 구체예에서, 항체 조합하는 부위를 변화시키지 않는 반응 조건을 사용하여 면역글로불린의 Fc 부위에서 설프하이드릴 그룹을 선택적으로 도입하는 것에 의한 면역글로불린의 유도체화가 주목된다. 본 방법학에 따라 생산된 항체 접합체는 향상된 수명, 특이도 및 민감도를 나타내는 것으로 기재되어 있다 (본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 미국특허 제5,196,066호). 리포터 또는 효과기 분자가 Fc 부위에서 탄수화물 잔기에 접합되어 있는 효과기 또는 리포터 분자의 부위-특이 부착도 역시 문헌에 기재되었다 (O'Shannessy *et al.*, 1987). 이러한 접근법은 현재 임상 평가를 받고 있는 진단적 및 치료적으로 유망한 항체를 생산하기 위해 보고된 바 있었다.

[0315] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 항-gp36 항체가 미국특허 제6,048,616호; 제5,990,479호; 제5,690,807호; 제5,505,928호; 제5,262,357호 (모두가 본 명세서에서 참고문헌에 의해 전체적으로 통합됨)에 기술되어 있는 것과 같은 반도체 나노크리스탈 (semiconductor nanocrystal)에 연결된다. 상세하게는, 본 발명의 생물학적 및 화학적 분석법에서 반도체 나노크리스탈로서의 용도를 가진 대표적인 물질은 이에 제한되는 것은 아니지만, 하기 기술된 것을 포함한다. ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, GaN, GaP, GaAs, GaSb, InP, InAs, InSb, AlS, AlP, AlSb, PbS, PbSe, Ge 및 Si 그리고 그의 삼차 및 사차 혼합물과 같은 그룹 II-VI, III-V 및 그룹 IV를 포함한다. 반도체 나노크리스탈을 항체에 연결하는 방법은 미국특허 제6,630,307호 및 제6,274,323호에 기술되어 있다.

[0316] **G. 면역검출 방법**

[0317] 보다 더 나아간 구체예에서, 본 발명은 면역반응하는 폴리펩타이드와 같은 생물학적 구성요소를 결합시키고, 정제하며, 제거하고, 정량하는 및/또는 그렇지 않으면 일반적으로 검출하는 면역검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제조된 항체는 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 검출하는 데 적용될 수 있다. 야생형 및/또는 돌연변이 항체의 사용이 주목된다. 어떤 면역검출 방법은 일부 언급하자면 효소 연결된 면역흡착 분석법 (ELISA), 방사성면역분석법 (RIA), 면역방사성측정 분석법 (immunoradiometric assay), 형광면역분석법 (fluoroimmunoassay), 화학발광 분석법 (chemiluminescent assay), 생물발광 분석법 (bioluminescent assay) 및 웨스턴 블롯을 포함한다. 다양한 유용한 면역검출 방법의 단계가 예로 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 Doolittle MH and Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B and Galand P, 1993; De Jager R *et al.*, 1993; 및 Nakamura *et al.*, 1987와 같은 과학적 문헌에 기술되어 왔다.

[0318] 일반적으로, 면역결합 방법 (immunobinding method)은 본 발명에 따라 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 포함하는 것으로 의심되는 시료를 획득하고, 첫 번째 항-gp19 항체와 이 경우에서와 같이 시료를 면역복합체를 형성하는 데 효과적인 조건 하에서 접촉시키는 것을 포함한다.

[0319] 이들 방법은 환자의 시료로부터 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 정제하는 데 적용될 수 있는 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 정제하는 방법 및/또는 제조합적으로 발현된 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 정제하는 방법을 포함한다. 이들 경우에서, 항체는 시료로부터의 항원성 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드 성분을 제거한다. 항체는 바람직하게 컬럼 매트릭스 형태에서의 고체 기질에 연결될 것이고, 야생형 또는 돌연변이 단백질 항원성 성분을 포함하는 것으로 의심되는 시료가 고정된 항체에 적용될 것이다. 원하지 않는 성분은 컬럼으로부터 고정된 항체에 면역 복합된 항원을 남기고 세척될 것이며, 야생형 또는 돌연변이 단백질 항원은 다시 컬럼으로부터 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드를 제거하여 수

확된다.

- [0320] 면역결합 방법은 또한 시료에서 야생형 또는 돌연변이 단백질 반응성 성분의 양을 검출하고 정량하는 방법 그리고 상기 결합 과정 동안 형성된 면역 복합체의 검출 및 정량을 포함한다. 여기서는, 야생형 또는 돌연변이 단백질 및/또는 펩타이드를 포함하는 것으로 의심되는 또는 얼리키아 케니스 생물체를 포함하는 것으로 의심되는 시료를 획득하고 시료를 야생형 또는 돌연변이와 대항하는 항체와 접촉시킨 다음 특이 조건 하에서 형성되는 면역 복합체의 양을 검출하고 정량할 것이다.
- [0321] 항원 검출의 관점에서, 분석되는 생물학적 시료는 견본품, 균질화된 조직 추출물, 세포, 분리된 및/또는 정제된 형태의 상기 야생형 또는 돌연변이 단백질-포함하는 조성물 모두, 또는 심지어 감염으로 얼리키아 케니스 생물과 접촉하게 되어 생기는 생물학적인 액체 모두와 같은, 야생형 또는 돌연변이 단백질-특이 항원을 포함하는 것으로 의심되는 시료라면 모두 될 수 있다.
- [0322] 선택된 생물학적 시료를 효과적인 조건 하에서 또한 면역 복합체 (일차 면역복합체)를 형성할 수 있는 충분한 기간 동안 항체와 접촉시키는 것은 일반적으로 단순히 항체 조성물을 시료에 첨가하고 상기 항체가 예로 여기에 결합하는 존재하는 어떤 단백질 항원과 면역복합체를 형성하기에 충분한 기간 동안 상기 혼합물을 배양하는 문제이다. 이러한 시간 이후에, 조직 섹션, 엘라이자, 도트 블롯 또는 웨스턴 블롯과 같은 시료-항체 조성물은 일반적으로 비-특이적으로 결합된 항체 종을 제거하기 위해 세척될 것이고, 일차적인 면역복합체 내에 특이적으로 결합한 이들 항체만이 검출 가능하게 된다.
- [0323] 일반적으로, 면역복합체 형성에 대한 검출은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있고 다수 접근법의 응용을 통해 달성될 수 있다. 이들 방법은 일반적으로 방사성, 형광성, 생물학적 및 효소적 태그와 같은 표지 또는 마커의 검출을 근거로 한다. 이러한 표지의 사용에 관한 미국특허는 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 번호 제3,817,837호; 제3,850,752호; 제3,939,350호; 제3,996,345호; 제4,277,437호; 제4,275,149호 및 제4,366,241호를 포함한다. 당연히, 당해 기술 분야에 알려진 바와 같이 이차 항체 및/또는 바이오틴/아비딘 리간드 결합 배열과 같은 이차적인 결합 리간드의 사용을 통해 부가적인 유익을 발견할 수 있다.
- [0324] 검출에 적용되는 항체는 검출가능한 표지에 자가 연결될 수 있고, 다시 이러한 표지는 단순하게 검출될 것이며 이에 의해 조성물에서 일차적인 면역 복합체의 양이 결정될 수 있다. 대안적으로, 일차적인 면역 복합체 내에 결합되는 첫 번째 항체는 항체 대한 결합 친화도를 가지는 두 번째 리간드에 의해 검출될 수 있다. 이들 경우에, 두 번째 결합 리간드는 검출가능한 표지에 연결될 수 있다. 두 번째 결합 리간드는 종종 자체가 항체가 되고 이는 따라서 "이차적인" 항체라고 불릴 수 있다. 일차적인 면역 복합체는 표지된 이차적인 결합 리간드 또는 항체와 효과적인 조건 하에서 이차적인 면역 복합체를 형성할 정도로 충분한 기간 동안 접촉되어 진다. 이차적인 면역 복합체는 다시 일반적으로 비-특이적으로 결합된 표지된 이차 항체 또는 리간드를 모두 제거하기 위해 세척되고, 이차적인 면역 복합체에 남아있는 표지는 다시 검출된다.
- [0325] 더 나아가 방법은 두 단계 접근법에 의한 일차적인 면역 복합체의 검출을 포함한다. 항체와 같은 항체에 대한 결합 친화도를 가지는 두 번째 결합 리간드는 상기에서 기술한 바와 같이 이차적인 면역 복합체를 형성하는 데 사용될 수 있다. 세척 후에, 이차적인 면역 복합체는 두 번째 항체에 대한 결합 친화도를 가지는 세 번째 리간드 또는 항체와 다시 효과적인 조건 하에서 면역 복합체 (삼차적인 면역 복합체)를 형성할 정도로 충분한 기간 동안 접촉되어 진다. 세 번째 리간드 또는 항체는 검출가능한 표지에 연결되고, 따라서 형성된 삼차적인 면역 복합체의 검출이 허용된다. 이러한 시스템은 원하는 경우 신호 증폭을 허용한다.
- [0326] 면역검출의 한 가지 방법은 두 개의 서로 다른 항체를 사용한다. 첫 번째 단계 바이오틴화, 모노클론 또는 폴리클론 항체는 표적 항원을 검출하는 데 사용되고 두 번째 단계 항체는 그 다음 복합된 바이오틴에 부착되는 바이오틴을 검출하는 데 사용된다. 이 방법에서, 테스트될 시료는 먼저 첫 번째 단계 항체를 포함하는 용액에서 배양된다. 표적 항원이 존재하는 경우, 일부 항체가 항원에 결합하여 바이오틴화된 항체/항원 복합체를 형성한다. 항체/항원 복합체는 다시 추가적인 바이오틴 부위를 항체/항원 복합체에 첨가하는 각 단계로 스트렙타미딘 (또는 아비딘), 바이오틴화 DNA, 및/또는 상보적인 바이오틴화된 DNA의 연속되는 용액에서 반응시키는 것에 의해 증폭된다. 증폭 단계는 시료가 바이오틴에 대항하는 두 번째 단계 항체를 포함하는 용액에서 배양되는 시점인 적합한 증폭 수준에 이를 때까지 반복된다. 이러한 두 번째 단계 항체는 예를 들어 발색원 기질을 사용한 조직효소학에 의해 항체/항원 복합체의 존재를 검출하는 데 사용될 수 있는 효소를 사용하여 표지된다. 적합한 증폭으로, 육안으로 볼 수 있는 접합체가 생산될 수 있다.
- [0327] 또 다른 알려진 면역검출 방법은 면역-PCR (중합효소 연쇄반응) 방법학을 유리하게 이용한다. PCR 방법은 바

이오틴화된 DNA와 배양하는 것까지는 캔터 방법 (Cantor method)과 유사하지만, 스트렙트아비딘 및 바이오틴화 DNA 반응을 수 차례 사용하는 대신 DNA/바이오틴/스트렙트아비딘 /항체 복합체가 낮은 pH 또는 항체를 배출하는 높은 염 농도의 완충용액을 사용하여 세척된다. 그 결과 세척 용액은 다시 적절한 대조군과 함께 적합한 프라이머를 사용한 PCR 반응을 수행하는 데 사용된다. 적어도 이론으로는, 엄청난 PCR의 증폭 능력 및 특이성이 단일 항원 분자를 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0328] 본 발명의 면역검출 방법은 예를 들어, 백혈병을 포함하는 암과 같은 다양한 형태의 과다 증식하는 질병과 같은 조건의 진단 및 예후에 명확한 유용성을 가진다. 여기서는, 야생형 또는 돌연변이 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드 및/또는 돌연변이를 포함하는 것이 의심되는 생물학적 및/또는 임상적 시료가 사용된다. 그러나, 이들 구체에도 역시 항원 또는 항체 시료를 적정하는 데, 예를 들어 하이브리도마의 선별에서와 같이 비-임상적 시료에 적용성을 가진다.

[0329] **H. 엘라이자**

[0330] 상기에서 상술한 바와 같이, 가장 단순하고 및/또는 직접적인 의미에서, 면역분석법은 결합 분석법이다. 일정 바람직한 면역분석법은 당해 기술 분야에 알려져 있는 다양한 타입의 효소 연결된 면역흡착 분석법 (ELISAs) 및/또는 방사성면역분석법 (RIA)이다. 그러나, 검출이 이러한 기법에 제한되지 않고 및/또는 웨스턴 블롯, 도트 블롯, FACS 분석, 및/또는 등도 역시 사용될 수 있는 점은 바로 이해될 것이다.

[0331] 하나의 대표적인 ELISA에서, 본 발명의 항체는 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트에서의 웰과 같은 단백질 친화성을 나타내는 선택된 표면 상에 고정된다. 그 다음, 임상 시료와 같은 야생형 및/또는 돌연변이 단백질 항원을 포함하는 것이 의심되는 테스트 조성물이 웰에 첨가된다. 결합시키고 및/또는 세척하여 비-특이적으로 결합한 면역 복합체를 제거한 후에, 결합된 야생형 및/또는 돌연변이 단백질 항원이 검출될 수 있다. 검출은 일반적으로 검출 가능한 표지에 연결된 또 다른 항체를 첨가하여 달성될 수 있다. 이러한 타입의 엘라이자는 단순한 "샌드위치 엘라이자 (sandwich ELISA)"이다. 검출은 또한 두 번째 항체의 첨가와 이어지는 두 번째 항체에 대한 친화도를 가지고 검출 가능한 표지에 연결된 세 번째 항체의 첨가에 의해 달성될 수 있다.

[0332] 또 다른 대표적인 엘라이자에서, 야생형 및/또는 돌연변이 단백질 항원을 포함하는 것으로 의심되는 시료는 웰 표면 상에 고정되고 및/또는 그 다음 본 발명의 항체와 접촉된다. 결합시키고 및/또는 세척하여 비-특이적으로 결합한 면역 복합체를 제거한 후에, 결합된 항체는 검출된다. 초기 항체가 검출가능한 표지에 연결될 때, 면역 복합체가 직접적으로 검출될 수 있다. 다시, 면역 복합체는 첫 번째 항체에 대한 결합 친화도를 가지고 검출 가능한 표지에 연결된 두 번째 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

[0333] 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드가 고정되는 또 다른 엘라이자는 검출 시 항체 경쟁을 사용한다. 이러한 엘라이자에서, 야생형 또는 돌연변이 단백질에 대항하는 표지된 항체가 웰에 첨가되고, 결합되도록 허용되며, 및/또는 그들의 표지에 의해 검출된다. 미지의 시료에서 야생형 및/또는 돌연변이 단백질의 양이 그 다음 코팅된 웰을 사용하여 배양하기 전 및/또는 배양하는 동안 야생형 및/또는 돌연변이에 대항하는 표지된 항체와 시료를 혼합하여 결정된다. 시료에서 야생형 및/또는 돌연변이 단백질의 존재는 웰에 결합하는 야생형 또는 돌연변이 단백질에 대항하는 항체의 양을 감소시키는 데 작용하고 따라서 결국 신호를 감소시킨다. 이것은 또한 표지되지 않은 항체가 항원-코팅된 웰에 결합하고 표지된 항체를 결합시키는 사용가능한 항원의 양을 감소시키는 경우 미지의 시료에서 야생형 또는 돌연변이 단백질에 대항하는 항체를 검출하는 데 적절하다.

[0334] 적용되는 포맷과 상관없이, 엘라이자는 코팅, 배양 및 결합하는 것, 세척하여 비-특이적으로 결합한 종을 제거하는 것 및 결합된 면역 복합체를 검출하는 것과 같은 공통적인 어떤 특징을 가진다. 이들은 하기에 기술된다.

[0335] 항원 또는 항체로 플레이트를 코팅하는 것에서, 일반적으로 플레이트의 웰을 항원 또는 항체의 용액으로 하룻밤 또는 특정한 기간 동안 배양할 것이다. 플레이트의 웰은 그 다음 세척되어 불완전하게 흡착된 물질을 제거할 것이다. 웰의 남아있는 사용가능한 표면 모두는 그 다음 테스트 항혈청에 관하여 항원적으로 중성인 비특이 단백질로 "코팅된다". 이들은 소의 혈청 알부민 (BSA), 카제인 또는 분유 용액을 포함한다. 이 코팅은 고정하는 표면 상에서 비특이 흡착 부위의 블록킹을 가능하게 하고 따라서 표면 상 항혈청의 비특이 결합에 의해 야기되는 백그라운드를 감소시킨다.

[0336] 엘라이자에서, 직접적인 과정보다는 오히려 이차적 또는 삼차적인 검을 사용하는 것이 아마도 더 관행적이다. 따라서, 단백질을 또는 항체를 웰에 결합시키고, 비-반응성 물질로 코팅하여 백그라운드를 감소시키며, 세척하여

결합하지 않은 물질을 제거한 후에 고정하는 표면이 면역 복합체 (항원/항체)를 형성하게 하는 데 효과적인 조건 하에서 테스트될 생물학적 시료와 접촉시킨다. 그 다음 면역 복합체의 검출은 표지된 이차적인 결합 리간드 또는 항체 그리고 표지된 삼차 항체 또는 세 번째 결합 리간드와 연결한 이차적인 결합 리간드 또는 항체를 필요로 한다.

[0337] "면역복합체 (항원/항체)의 형성을 허용하는 효과적인 조건 하에서"는 조건이 바람직하게 항원 및/또는 항체를 BSA, 소의 감마 글로블린 (BGG) 또는 인산 완충용액 (PBS)/트윈과 같은 용액으로 희석하는 것을 포함한다. 이들 첨가된 제제는 또한 비특이적 백그라운드의 감소를 도와주는 경향이 있다.

[0338] "적합한" 조건도 역시 효과적인 결합을 하기에 충분한 온도에서 또는 기간 동안 배양이다. 배양 단계는 전형적으로 약 1 내지 2시간부터 4시간까지, 바람직하게는 25°C 내지 27°C 순서의 온도에서 또는 4°C에서 하루밤 동안 일 수 있다.

[0339] 엘라이자에서 모든 배양 단계를 지나고 나서, 접촉된 표면은 세척되어 복합화되지 않은 물질을 제거한다. 바람직한 세척 PBS/트윈 또는 보레이트 완충용액과 같은 용액으로 세척하는 것을 포함한다. 테스트 시료와 원래 결합된 물질 간 특이 면역 복합체의 형성과 이어지는 세척을 거치고 나서, 심지어 극소량의 면역 복합체의 생성도 측정될 수 있다.

[0340] 검출하는 수단을 제공하기 위하여, 두 번째 또는 세 번째 항체가 검출을 허용하는 관련된 표지를 가질 것이다. 바람직하게, 이것은 적절한 발색 기질과 배양하여 색상을 생성시키는 효소일 것이다. 따라서, 예를 들어 첫 번째 및 두 번째 면역 복합체를 우레아제, 글루코스 옥시다제, 알칼라인 포스파타제 또는 하이드로겐 퍼옥시다제-접합된 항체와 일정 기간 동안 보다 더 면역 복합체를 발생시키는 조건 하에서 접촉시키거나 배양하려고 할 것이다 (예로, 상온에서 2시간 동안 PBS-트윈과 같은 PBS-포함하는 용액에서 배양).

[0341] 표지된 항체와의 배양 및 이어지는 결합하지 않은 물질을 제거하기 위한 세척 이후에, 표지량이 효소 표지로서 퍼옥시다제를 사용하는 경우 예로 우레아와 같은 발색 기질 또는 브로모크레졸 퍼플, 또는 2,2'-아지노-디-(2-에틸-벤즈티아졸린-6-설폰산 (ABTS), 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 와 함께 배양하여 정량될 수 있다. 정량은 그 다음 생성되는 색상의 정도를 측정하여 예로 가시적 스펙트럼 분광측정기를 사용하여 시행된다.

[0342] **I. 면역조직화학**

[0343] 본 발명의 항체는 또한 새로이-동결된 및/또는 포르말린-고정된, 면역조직화학 (IHC) 연구를 위해 제작된 파라핀-담긴 조직 블록과 연결되어 사용될 수 있다. 이들 개별 시료로부터 조직 블록을 제작하는 방법은 이전에 다양한 예후인자의 IHC 연구에서 성공적으로 사용되어 왔고 및/또는 당업자에게 잘 알려져 있다 (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990; Allred *et al.*, 1990).

[0344] 간략히, 동결된-편 (frozen-section)은 50 ng 의 동결된 "분쇄된" 조직을 상온에서 인산 식염 완충액 (PBS)으로 작은 플라스틱 캡슐 내에서 재수화시키고; 입자를 원심분리에 의해 펠렛으로 만들며; 그들을 접착성 임베딩 배지 (OCT)에서 재현탁시키고; 캡슐을 역전시키고 및/또는 원심분리에 의해 다시 펠렛으로 만들며; 70°C 이소펜탄에서 얼리고; 플라스틱 캡슐을 자르고 및/또는 동결된 조직 실린더를 제거하며; 조직 실린더를 냉동 미세절단기 상에 안전하게 두고; 및/또는 25-50개 연속적 편을 자르는 과정에 의해 제조될 수 있다.

[0345] 영구적-편 (permanent-section)은 50 mg 시료를 플라스틱 마이크로원심분리 튜브에서 재수화시키고; 펠렛을 만들며; 10% 포르말린에서 4 시간 동안 고정하여 재현탁시키고; 세척하고/펠렛을 만들고; 따뜻한 2.5% 아가에서 재현탁시키고; 펠렛을 만들고; 아가를 균히기 위해 얼음물에서 식히고; 튜브로부터 조직/아가 블록을 제거하고; 블록을 파라핀에 침습 및/또는 담그고; 및/또는 50개까지 연속 영구편을 자르는 과정을 포함하는 유사한 방법에 의해 제작될 수 있다.

[0346] **J. 면역전자 현미경**

[0347] 본 발명의 항체는 또한 세포 내 조직 성분을 확인하기 위해 전자현미경과 연결하여 사용될 수 있다. 간략히, 전자-표지는 직접적으로 또는 간접적으로 항체에 접합된다. 본 발명에 따른 전자-표지의 예는 페리틴과 금이다. 전자-표지는 전자를 흡수하여 전자현미경에 의해 볼 수 있다.

[0348] **K. 면역검출 키트**

[0349] 보다 더 나아간 구체예에서, 본 발명은 상기 기술된 면역검출 방법으로서의 사용을 위한 면역검출 키트에 관한 것이다. 항체는 일반적으로 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리클로날 및/또는 모노클로날 항체를 검출하는 데 사용되기 때문에, 바람직하게 항체가 키트에 포함될 것이다. 그러나 이러한 구성요소 둘 다를 포함하는 키트가 제공될 수 있다. 면역검출 키트는 따라서 적합한 용기 수단에서 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리클로날 및/또는 모노클로날 항체에 결합하는 첫 번째 항체 및/또는 선택사항으로 면역검출 반응액 및/또는 더 나아가 선택사항으로 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리클로날 및/또는 모노클로날 항체를 포함할 것이다.

[0350] 바람직한 구체예에서, 모노클로날 항체가 사용될 것이다. 일정 구체예에서, 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리클로날 및/또는 모노클로날 항체에 결합하는 첫 번째 항체는 컬럼 매트릭스 및/또는 마이크로타이터 플레이트의 웰과 같은 고체 지지체에 미리 결합될 수 있다.

[0351] 상기 키트의 면역 검출 반응액은 주어진 항체와 관련되고 및/또는 이에 연결되는 검출가능한 표지를 포함하여 다양한 형태의 어떤 것이거나도 취할 수 있다. 이차적인 결합 리간드와 관련되고 및/또는 이에 부착되는 검출 가능한 표지도 역시 주목된다. 대표적인 이차적인 리간드는 첫 번째 항체에 대한 결합 친화도를 가지는 이들의 이차적인 항체이다.

[0352] 본 키트에서의 사용을 위한 더 나아간 적합한 면역검출 반응액은 두 번째 항체에 대한 결합 친화도를 가지는 검출가능한 표지가 연결된 세 번째 항체와 함께 첫 번째 항체에 대한 결합 친화도를 가지는 이차적인 항체를 포함하는 두 개 성분 반응액을 포함한다. 상기에서 주목된 바와 같이, 많은 대표적인 표지들이 당해 기술 분야에 알려져 있고 및/또는 이러한 모든 표지는 본 발명과 연결하여 적용될 수 있다.

[0353] 본 키트는 더 나아가 표지되고 및/또는 표지되지 않고 상관없이 검출 분석법을 위한 표준 곡선을 만드는 데 사용될 수 있는 야생형 및/또는 돌연변이 단백질, 폴리클로날 및/또는 모노클로날 항체의 적합하게 분량된 (aliquoted) 조성물을 포함한다. 본 키트는 완전히 접합된 형태에서, 중간체 형태에서, 및/또는 본 키트의 사용자에게 의해 접합되는 분리된 부분으로서 항체-표지 접합체를 포함할 수 있다. 본 키트의 구성요소는 수성 배지에서 및/또는 동결건조된 형태에서 포장될 수 있다.

[0354] 본 키트의 용기 수단은 적합하게 보관될 것이고, 일반적으로 항체가 담기고 및/또는 바람직하게는 적합하게 분량될 수 있는 적어도 하나의 바이알, 테스트 튜브, 병, 주사기 및/또는 용기 수단을 포함할 것이다. 야생형 및/또는 돌연변이 gp19 단백질, 폴리클로날 및/또는 모노클로날 항체 및/또는 두 번째 및/또는 세 번째 결합 리간드 및/또는 추가적인 구성요소가 제공될 때, 본 키트는 또한 일반적으로 이러한 리간드 및/또는 구성요소가 담기는 두 번째, 세 번째 및/또는 기타 추가적인 용기를 포함할 것이다. 본 발명의 키트는 또한 일반적으로 상업적인 판매를 위해 밀폐되어 있는 항체, 항원 및/또는 기타 반응액 용기를 포함하는 수단을 포함할 것이다. 이러한 용기는 원하는 바이알이 보관되는 주입 및/또는 바람이 들어간 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

[0355] **VIII. 약제학적 제조물**

[0356] 또한 약제학적 조성물은 본 발명의 새로운 조성물을 사용하여 제조될 수 있는 점이 주목된다. 이러한 경우에, 약제학적 조성물은 본 발명의 새로운 활성이 있는 조성물과 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 당업자라면 불필요한 실험 없이 본 발명의 활성 성분의 적절한 용량 및 투여 경로를 즉시 결정할 수 있을 것이다.

[0357] 어구 "약제학적으로 허용가능한 (pharmaceutically acceptable)"은 개체에게 투여될 때 알레르기 또는 유사한 의도하지 않은 반응을 생성하지 않는 분자적 실체 및 조성물을 말한다. 활성 성분으로서 단백질을 포함하는 수성 조성물의 제조는 당해 기술 분야에 잘 이해되고 있다. 일반적으로, 이러한 조성물은 주사제로서, 액체 용액 또는 현탁액으로서 제조되고; 용액 또는 현탁액으로 사용되기 적합한 고체 형태가 주입 전 액체 제조될 수 있다. 제조물은 또한 에멀전화될 수도 있다.

[0358] 일반적으로, 본 발명의 약제학적 조성물은 얼리키아 샤피엔시스 VLPT 폴리클로날, 폴리뉴클레오타이드 또는 항체 및/또는 그의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0359] 단백질은 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염은 산 부가 염 (단백질의 자유 아미노 그룹으로 형성되는)을 포함하고 이는 예를 들어 염산 또는 인산과 같은 무기산으로 형성되거나

아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산으로 형성된다. 자유 카복실 그룹으로 형성된 염도 역시 예를 들어, 소듐, 포타슘, 알루미늄, 칼슘, 또는 산화철과 같은 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로케인 등과 같은 유기 염으로부터 유래할 수 있다.

[0360] 제형화 시, 용액은 용량 제형과 양립할 수 있는 방식으로 치료적으로 효과적인 양이 투여될 것이다. 제형은 주입할 수 있는 용액과 같은 다양한 용량 형태로 용이하게 투여된다.

[0361] 예를 들어 수성 용액에서 비경구 투여하기 위해, 용액이 필요한 경우 적합하게 완충되고 액체 희석제가 먼저 충분한 식염수 또는 포도당으로 등장액이 되어야 한다. 이들 특정한 수성 용액은 특히 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다. 이러한 연결에서, 적용될 수 있는 무균 수성 배지는 본 기재의 측면에서 당업자에서 알려져 있을 것이다. 예를 들어, 한 번 용량은 1 mL의 등장 NaCl 용액에 녹일 수 있고 1000 mL의 피하주입 용액에 첨가되거나 주입의 제안된 부위에 주사될 수 있다 (예를 들어, "레밍톤의 약제학적 과학 (Remington's Pharmaceutical Sciences)" 15판, 페이지 1035-1038 및 1570-1580 참조). 용량에서 몇 가지 변화가 치료되는 개체의 조건에 따라서 반드시 시도되어야 한다. 투여에 책임이 있는 사람이 어떠한 경우에도 개별 개체에 대한 적절한 용량을 결정할 것이다.

[0362] 본 발명의 약제학적 조성물은 폴리펩타이드 또는 그의 분비를 표적하는 하나 이상 제제의 또는 약제학적으로 허용가능한 담체에 녹이거나 분산된 추가적인 제제를 유효량 포함한다. 어구 "약제학적", "약제학적으로 허용가능한", "약학적으로 허용가능한"은 예를 들어 인간과 같은 동물에 투여될 때 역효과, 알레르기 또는 기타 원하지 않는 반응을 생성하지 않는 분자적 실체 및 조성물을 말한다. 폴리펩타이드 또는 그의 분비를 표적하는 적어도 하나의 제제 및/또는 추가적인 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 제조는 본 기재의 측면에서 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 레밍톤의 약제학적 과학에 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990)에 예시된 바와 같이 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다. 더욱이, 동물 (예로 인간) 투여를 위하여, 제조물은 FDA 생물학적 기준에 의해 요구되는 무균성, 발열원성, 일반적인 안전성 및 순수도 표준을 만족시켜야 하는 것으로 이해될 것이다.

[0363] 본원에 사용된, "약학적으로 허용가능한 담체"는 일부 및 모든 용매, 분산 배지, 코팅제, 표면활성제, 항산화제, 방부제 (예로, 항세균 제제, 항곰팡이 제제), 등장 제제, 흡수 지연제, 염, 방부제, 약제, 약제 안정제, 젤, 결합제, 부형제, 분해제, 운활제, 감미제, 향미제, 염색제, 이와 유사한 물질 및 그들의 조합을 당업자가 알고 있는 바와 같이 포함한다 (예를 들어, 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 레밍톤의 약제학적 과학, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990 pp. 1289-1329, 참조). 어떠한 통상적인 담체가 활성 성분과 맞지 않는 경우를 제외하고 치료적 또는 약제학적 조성물에서의 그의 사용이 고려된다.

[0364] 본 발명은 고체, 액체 또는 에어졸 형태로 투여되는지 여부, 및 주사와 같은 투여 경로를 위해 무균화될 필요가 있는지 여부에 의존적으로 서로 다른 타입의 담체를 포함할 수 있다. 본 발명은 정맥 내로, 피내로, 동맥 내로, 상처 내로, 뇌신경 내로, 관절 내로, 전립선 내로, 흉막 내로, 기관 내로, 비강 내로, 유리체 내로, 질 내로, 직장 내로, 국소적으로, 중앙 내로, 근육 내로, 복강 내로, 피하로, 결막 하로, 포낭 내로, 점막 내로, 심장막 내로, 탯줄 내로, 안구 내로, 경구로, 국소적으로, 국소적으로 (locally), 흡입 (예로, 에어로졸 흡입), 주사, 주입, 연속적인 주입, 카테타를 통해, 세척을 통해, 크림에서, 지질 조성물에서 표적세포를 직접적으로 담근 국한된 관류로, 또는 기타 방법 또는 상기 내용의 조합 모두에 의해 투여될 수 있다 (예를 들어, 본 명세서에서 참고문헌에 의해 통합되어 있는 레밍톤의 약제학적 과학, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, 참조).

[0365] 동물 환자에게 투여되는 본 발명의 조성물의 실제 용량은 체중, 질병의 증정도, 치료되는 질병의 타입, 이전 또는 동시 치료적 개입, 환자의 특발증 및 투여 경로와 같은 신체적 및 생리학적 인자에 의해 결정될 수 있다. 투여에 책임을 가진 시술자라면 어떠한 경우라도 개별 개체를 위해 조성물 및 적절한 용량 (들)에서 활성 성분 (들)의 농도를 측정할 것이다.

[0366] 일정 구체예에서, 약제학적 조성물은 예를 들어 적어도 0.1%의 활성 화합물을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 활성 화합물은 뉴트 무게의 약 2% 내지 약 75% 사이, 또는 예를 들어 약 25% 내지 약 60% 사이 그리고 여기서 유래될 수 있는 모든 범위를 포함할 수 있다. 다른 비-제한적인 예에서, 용량은 또한 투여 시마다 약 1 마이크로그램/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중, 약 10 마이크로그램/kg/체중, 약 50 마이크로그램/kg/체중, 약 100 마이크로그램/kg/체중, 약 200 마이크로그램/kg/체중, 약 350 마이크로그램/kg/체중, 약 500 마이크로그램/kg/체중, 약 1 밀리그램/kg/체중, 약 5 밀리그램/kg/체중, 약 10 밀리그램/kg/체중, 약 50 밀리그램/kg/체중, 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 200 밀리그램/kg/체중, 약 350 밀리그램/kg/체중, 약 500 밀리

그램/kg/체중부터 약 1000 밀리그램/kg/체중까지 또는 그 이상 그리고 여기서 유래될 수 있는 모든 범위를 포함한다. 본 명세서에서 나열된 숫자로부터 유래될 수 있는 범위의 비-제한적인 예에서, 약 5 mg/kg/체중 내지 약 100 mg/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중 내지 약 500 밀리그램/kg/체중 등의 범위가 상기 기술한 숫자에 근거하여 투여될 수 있다.

[0367] 어떠한 경우라도, 본 조성물은 하나 이상 성분의 산화를 지연하기 위하여 다양한 항산화제를 포함할 수 있다. 추가적으로, 미생물 작용의 예방이 이에 제한되는 것은 아니지만 파라벤 (예로, 메틸파라벤, 프로필파라벤), 클로로부탄올, 페놀, 솔비산, 티머로잘 또는 그의 조합을 포함하는 다양한 항세균 및 항곰팡이 제제와 같은 방부제에 의해 달성될 수 있다.

[0368] 본 발명은 자유 염기, 중성 또는 염 형태에서 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염은 산 부가염, 예로 단백질성 조성물의 자유 아미노 그룹으로 형성되는 것, 또는 예를 들어, 염산 또는 인산과 같은 무기산 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 말릴산과 같은 유기산으로 형성되는 것을 포함한다. 자유 카르복실 그룹으로 형성되는 염도 역시 예를 들어, 소듐, 포타슘, 암모니움, 칼슘 또는 산화철과 같은 무기 염기; 또는 이소프로필아민, 테트라메틸아민, 히스티딘 또는 프로케인과 같은 유기 염기로부터 유래될 수 있다.

[0369] 조성물이 액체 형태인 구체예에서는, 담체는 이에 제한되는 것은 아니지만 물, 에탄, 폴리올 (예로, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 지질 (예로, 트리글리세라이드, 채소 오일, 리포솜) 및 그의 조합을 포함하는 용매 또는 분산 배지이다. 적절한 유동성 (fluidity)은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해; 예를 들어 액체 폴리올 또는 지질과 같은 담체에 분산하여 필요한 특정 크기를 유지함에 의해; 예를 들어 하이드로프로필셀룰로스와 같은 표면활성제의 사용에 의해; 또는 이러한 방법의 조합에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에서, 예를 들어 당, 소듐 클로라이드 또는 그의 조합과 같은 등장 제제를 포함하는 것이 바람직할 것이다.

[0370] 다른 구체예에서, 본 발명의 안약 (eye drop), 비강 용액 또는 스프레이, 에어로졸 또는 흡입제를 사용할 수 있다. 이러한 조성물은 일반적으로 표적 조직 타입에 잘 맞도록 설계된다. 비-제한적인 예에서, 비강 용액은 보통 방울 또는 스프레이로 비강 통로에 투여되도록 설계된 수성 용액이다. 비강 용액은 비강 분비물과 많은 측면에서 유사하도록, 또한 정상적인 점막 작용이 유지되도록 제조된다. 따라서, 바람직한 구체예에서 상기 수성 용액은 보통 등장성이거나 약간 완충용액화 되어 pH 약 5.5 내지 약 6.5를 유지한다. 또한, 항미생물 보존제는 안과 제제, 약제 또는 적절한 약제 안정제에 사용되는 것과 유사하게, 필요한 경우 제형에 포함될 수 있다. 예를 들어, 다양한 상업적으로 판매되는 비강 제제물이 알려져 있고 항생제 또는 항히스타민과 같은 약제를 포함한다.

[0371] 일정 구체예에서, 상기 조성물은 경구 섭취와 같은 경로에 의한 투여를 위해 제조된다. 이들 구체예에서, 고체 조성물은 예를 들어, 용액, 현탁액, 에멀전, 정제 (tablet), 정제 (pill), 캡슐 (예로, 딱딱한 또는 부드러운 막의 젤라틴 캡슐), 서방성 제형, 볼 조성물 (buccal composition), 트로키, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 경구 조성물은 식사 음식으로 직접 투입될 수 있다. 경구 투여를 위한 바람직한 담체는 불활성 희석제, 동화할 수 있는 먹을 수 있는 담체 또는 그의 조합을 포함한다. 본 발명의 다른 측면에서, 경구 조성물은 시럽 또는 엘릭시르로서 제조될 수 있다. 시럽 또는 엘릭시르는 예를 들어 적어도 하나의 활성제, 감미제, 방부제, 향미제, 염색제, 보존제 또는 그의 조합을 포함할 수 있다.

[0372] 일정 바람직한 구체예에서, 경구 조성물은 하나 이상의 결합제, 부형제, 분해제, 운활제, 향미제 및 그의 조합을 포함할 수 있다. 일정 구체예에서, 조성물은 하기 나열한 하나 이상을 포함할 수 있다: 예를 들어 검 트라가칸스 (gum tragacanth), 아카시아, 옥수수 전분, 젤라틴 또는 그의 조합과 같은 결합제; 예를 들어 디칼슘 포스페이트, 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 셀룰로스, 마그네슘 카보네이트 또는 그의 조합과 같은 부형제; 예를 들어 옥수수 전분, 토마토 전분, 알긴산 또는 그의 조합과 같은 분해제; 예를 들어 마그네슘 스테아레이트와 같은 운활제; 예를 들어 슈크로스, 락토스, 사카린 또는 그의 조합과 같은 감미제; 예를 들어 페퍼민트, 등록유 (oil of wintergreen), 체리 향료, 오렌지 향료 등과 같은 향미제; 또는 상기 언급한 것의 조합. 용량 유닛 형태가 캡슐일 때 이것은 상기 타입의 물질에 추가하여 액체 담체와 같은 담체를 포함할 수 있다. 다양한 기타 물질이 코팅제로서 또는 그렇지 않으면 용량 유닛의 물리적 형태를 변형시키기 위해 존재한다. 예를 들어, 태블릿 정제, 필 정제 또는 캡슐이 셸락 (shellac), 당 또는 둘 다로 코팅될 수 있다.

[0373] 다른 유형의 투여에 적합한 추가적인 제형은 서포지토리 (suppositories)를 포함한다. 서포지토리는 보통 직장, 질 또는 노관 내로의 삽입을 위해 투여되는 다양한 무게와 모양을 가지는 고체 용량 형태이다. 삽입 후

에, 서포지토리는 내강 액체에서 부드러워지고, 녹고 또는 물에 녹는다. 일반적으로, 서포지토리로 사용되는 전통적인 담체는 예를 들어 폴리알킬렌 글리콜, 트리글리세라이드 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 일정 구체예에서, 서포지토리는 예를 들어 약 0.5% 내지 약 10%, 바람직하게는 약 1% 내지 약 2% 범위에서 활성 성분을 포함하는 혼합물로부터 형성될 수 있다.

[0374] 무균 주사가 가능한 용액은 활성이 있는 화합물을 적절한 용매에 필요한 양으로 상기 열거한 다양한 다른 성분과 함께 투입하고, 필요한 경우 이어지는 여과로 무균화시키어 제조된다. 일반적으로, 분산제는 다양한 무균화된 활성 성분을 기본 분산 배지 및/또는 다른 성분을 포함하는 무균 운반체 내로 투입하여 제조된다. 무균 주사가 가능한 용액, 현탁액 또는 에멀전의 제조를 위한 무균 파우더의 경우, 바람직한 제조방법은 활성 성분과 미리 무균-여과된 그의 액체 배지로부터 나온 추가적인 모든 원하는 성분을 합한 파우더를 생산하는 진공-건조 또는 동결-건조 기법이다. 액체 배지는 필요한 경우 적절하게 완충용액화 되어야 하고, 액체 분산제는 주입되기 전 충분한 식염수 또는 포도당으로 먼저 등장액이 되어야 한다. 직접적인 주사를 위한 매우 농축된 제조물도 역시 주목되고, 여기서는 용매로서의 DMSO 사용이 극도로 신속한 침투를 야기하여 작은 면적에 높은 농도의 활성 제제를 운반하는 것으로 본다.

[0375] 상기 조성물은 제조 및 보관의 조건 하에서 안정해야 하고 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 방부보존되어야 한다. 엔도톡신 오염이 안전한 수준, 예를 들어 0.5 ng/mg 단백질 이하에서 최소적으로 유지되어야 하는 것이 이해될 것이다.

[0376] 상세한 구체예에서, 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수가 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴 또는 그의 조합과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 본 조성물에 사용하여 달성될 수 있다.

[0377] **IX. 본 발명의 대표적인 키트**

[0378] 본 발명의 상세한 구체예에서는, 적합한 용기에 보관된 키트가 존재한다. 본 키트는 개인을 얼리키아 사피엔시스와 같은 *얼리키아* 균으로부터 진단, 치료 및/또는 보호하는데 적합할 수 있다. 상세한 구체예에서, 본 키트는 얼리키아 사피엔시스 VLPT 항원을 표적하는 제제를 적합한 용기에 포함한다. 상기 제제는 항체, 작은 분자, 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 그의 혼합물일 수 있다. 상기 제제는 예를 들어 무균, 동결건조 또는 둘 다와 같은 적합한 형태에서 키트로 제공될 수 있다. 상세한 구체예에서, 본 키트는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 14, 또는 서열번호 15의 하나 이상에 대항하는 항체; 및/또는 그의 관련된 단백질을 포함한다. 본 명세서에서 상세하게 기술하지 않은 다른 얼리키아 사피엔시스 VLPT-관련 면역원성-관련 조성물 (폴리펩타이드, 펩타이드 또는 항체를 포함하는)도 역시 포함될 수 있다.

[0379] 본 키트는 더 나아가 필요한 개인에게 운반하기 위한 하나 이상의 장치를 포함할 수 있다. 본 장치는 예를 들어 주사기, 눈 드롭퍼, 바늘, 생검 도구, 스킵플라 (scoopula), 카테타 (catheter) 등을 포함할 수 있다.

[0380] 본 키트를 진단적 목적으로 사용하는 구체예에서, 본 키트는 더 나아가 하나 이상의 검출 조성물 및/또는 얼리키아 캐니스 gp19 항원을 확인하는 장치를 제공할 수 있다. 이러한 구체예는 예를 들어 항체를 위한 것과 같은 검출가능한 표지를 사용할 수 있고, 본 표지는 예를 들어 형광성, 방사성, 화학발광성 또는 비색성일 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0381] 본 발명을 보다 완벽하게 이해하기 위하여, 첨부되는 도면에 의거하여 본 발명을 상세히 설명할 것이다.

도 1a는 네 개 TRs (괄호 안의 아미노산 수; R = 반복서열)의 모든 도메인과 위치를 보여주는 VLPT 단백질의 아미노산 서열을 제공한 것이다.

도 1b는 네 개 얼리키아 사피엔시스 VLPT 반복서열의 연관성을 보여주는 계통발생도 (phylogenetic tree)를 제공한 것이다. 척도는 아미노산 퍼센트 동일성을 나타낸다.

도 2a는 항-VLPT-R3 펩타이드 항체와 반응시킨 얼리키아 사피엔시스 전체 세포 용출액 (레인 1), 얼리키아 사피엔시스 감염된 세포로부터 유래한 상청액 (레인 2), 및 얼리키아 캐니스 전체 세포 용출액 (레인 3)에서 자연 상태의 VLPT 를 확인하여 나타낸 것이다.

도 2b는 동일하지만 항-얼리키아 사피엔시스 개 혈청과 반응시킨 것을 나타낸다. 면역화전 토끼 혈청 또는 개

혈청 대조군은 얼리키아 샤피엔시스 전체 세포 용출액 또는 상청액을 인식하지 않았다 (결과 미도시).

도 3은 VLPT 에피토프를 맵핑하는 데 사용되는 합성 및 재조합 펩타이드의 모식도를 제공하는 것이다.

도 4a는 합성 및 재조합 얼리키아 샤피엔시스 VLPT 펩타이드의 항-얼리키아 샤피엔시스 개 (번호 2251) 혈청과의 면역반응성을 나타낸 것이다. SDS-PAGE 및 정제된 재조합 펩타이드 (위)의 전체 단백질 염색 그리고 이에 해당하는 항-얼리키아 샤피엔시스 개 혈청 (아래)을 사용한 웨스턴 면역블롯. 프리시전 표준 단백질 (M, Precision Protein Standard, Bio-Rad); 대조군, 정제된 재조합 티오레독신.

FIG 4b는 작은 재조합 VLPT 폴리펩타이드 및 이에 해당하는 합성 VLPT 폴리펩타이드 (N [합성만], R1, R2, R3, 및 R4) 그리고 VLPT 단백질의 큰 단편 (재조합만; C, R4321-C, 및 R32)의 면역반응성을 엘라이자에 의해 나타낸 것이다. OD 측정값은 완충용액만 있는 웰의 OD 값을 차감한 세 개 웰에 대한 평균값 (± 표준 편차)을 나타낸 것이다.

도 5a는 VLPT-R3를 대표하는 겹치는 펩타이드 (7개 펩타이드)의 서열 및 방향을 제공한 것이다.

도 5b는 VLPT-R3 겹치는 펩타이드의 면역반응성을 항-얼리키아 샤피엔시스 개 혈청을 사용한 엘라이자에 의해 나타낸 것이다.

도 6은 합성 및 재조합 얼리키아 샤피엔시스 VLPT 반복서열 (R2, R3 및 R4)의 면역반응성을 세 명의 HME 환자 혈청을 사용한 엘라이자에 의해 나타낸 것이다 (도 6a, 6b, 6c; 대조군, 정제된 재조합 테오레독신). 엘라이자에 의해 14명 HME 환자 혈청 (레인 1-14), 항-얼리키아 샤피엔시스 개 혈청 (레인 15) 및 정상 인간 혈청 (레인 16)과 반응한 합성 얼리키아 샤피엔시스 VLPT-R3 (도 6d). 정상 인간 혈청은 다른 펩타이드 및 단백질도 마찬가지로 인식하지 못하였다 (결과 미도시).

도 7은 항-VLPT-R3 펩타이드 항체로 표지된 얼리키아 샤피엔시스의 DH82 세포 배양 상청액과의 웨스턴 면역블롯 (각각 감염 후 0 내지 6 일, 레인 1 내지 7)을 나타낸 것이다. 프리시전 표준 단백질 (M. Precision Protein Standard, Bio-Rad).

도 8a는 얼리키아 샤피엔시스 VLPT가 망상 및 진한-코아 얼리키아균에 정착한 것을 보여주는 얼리키아 샤피엔시스-감염된 DH82 세포의 초박편 전자 광현미경 사진을 제공한 것이다.

도 8b는 감염되지 않은 DH82 세포를 포함하는 초박편 (음성 대조군)의 해당 사진을 제공한 것이다. 양쪽 패널의 세포는 토기 항-VLPT-R3 펩타이드 항체 (1:10,000)와 반응시켰다. 막대 = 1µm

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0382] 하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 구체예들을 기술하기 위하여 포함된다. 당업자라면 당연히 하기 기술되는 실시예에 기재된 기법이 본 발명의 실행에 있어서 잘 기능하는 본 발명자들이 발견한 기법을 표현하고 있는 것을 잘 이해할 것이고, 따라서 그의 실행을 위한 바람직한 형식을 구성하는 것으로 생각할 수 있다. 그러나, 당업자라면 본 발명의 기재의 관점에서, 많은 변화가 기재된 특정한 구체예에서 창조될 수 있고, 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 여전히 같거나 유사한 결과를 획득할 수 있는 점을 당연히 인정할 것이다.

[0383] **실시예 1**

[0384] **대표적인 재료 및 방법**

[0385] **얼리키아 균의 배양 및 정제.** 얼리키아 캐니스 (제이크 균주, Jake strain) 및 얼리키아 샤피엔시스 (아르칸사스 균주)가 이전에 기술된 바와 같이 증식되었다 (McBride *et al.*, 2001). 얼리키아균 (Ehrlichiae)은 크기 배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography)에 의해 세파크릴 S-100 (에머삼 바이오사이언스, 피스 카타웨이, N.J.) 상에서 이전에 기술된 바와 같이 정제되었다 (Rikihisa *et al.*, 1992). 박테리아를 포함하는 분획은 냉동되어 항원 및 DNA 출처로서 사용되었다.

[0386] **얼리키아 샤피엔시스 게놈 DNA 및 항원의 제조.** 게놈 DNA 및 항원은 얼리키아 샤피엔시스 (아르칸사스 균주)로부터 이전에 기술된 바와 같이 정제되었다 (McBride *et al.*, 1996).

[0387] **엘리키아 샤페옌시스 VLPT 유전자 단편의 PCR 증폭.** 엘리키아 샤페옌시스 VLPT 유전자 단편의 증폭을 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 수동으로 또는 프라이머 셀렉트 (Primer Select; Lasergene v5.08, DNASTar, 매디슨, WI) 제품에 의해 진뱅크 (GenBank; 기탁번호 AF121232)의 서열에 따라 설계되고 합성되었다 (시그마-제노시스, 우드랜드, TX) (표2). 네 가지 단일 TRs (VLPT-R4, VLPT-R3, VLPT-R2 및 VLPT-R1), C-말단 (VLPT-C), 반복서열 R3 및 R2의 조합 (VLPT-R32), 그리고 다중 반복서열 (R4, R3, R2, and R1) 및 엘리키아 샤페옌시스 VLPT 유전자의 C-말단을 포함하는 거의 전장 (full-length) 길이의 VLPT (VLPT-R4321-C)에 해당하는 일곱 개의 유전자 단편을 PCR 핫마스터 믹스 (PCR HotMaster Mix; 에펜도르프, 웨스트베리, NY) 및 엘리키아 샤페옌시스 (아르칸사스 군주) 계놈 DNA의 주형을 사용하여 증폭하였다 (표 2 및 3). 열적 순환 프로파일 (thermal cycling profile)은 95°C에서 4분, 94°C에서 30초 35회, 어닐링 온도 (가장 낮은 프라이머 T<sub>m</sub> 보다 3°C 낮음)에서 30초, 및 72°C에서 적절한 연장 시간 이후에 72°C에서 7분 동안 연장 그리고 4°C에서 보관:이었다.

[0388] **제조합 엘리키아 샤페옌시스 VLPT 단백질의 발현과 정제.** 증폭된 PCR 산물은 pBAD/Thio-TOPO (인비트로젠, Carlsbad, CA) 또는 pTriEx-6 3C/LIC 발현 벡터 (노바젠, 매디슨, WI) 내로 직접 클로닝되었다. 대장균 (*Escherichia coli*) 세포 (TOP10; 인비트로젠)가 엘리키아 샤페옌시스 VLPT 유전자 단편을 포함하는 플라스미드로 형질전환 되었으며, 또한 양성 형질전환체는 삽입 벡터의 존재와 적절한 방향 (orientation) 여부를 PCR에 의해 검색하였고 텍사스 대학교 메디칼 브랜치 단백질 코아 연구실 (University of Texas Medical Branch Protein Chemistry Core Laboratory)에서 ABI 프리즘377XL DNA 서열결정기 (어플라이드 바이오시스템사, 포스터시, CA)를 사용하여 서열 분석하였다. 제조합 단백질 발현은 4시간 동안 0.2% 아라비노스 (pBAD/Thio-TOPO) 또는 0.5 mM 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드 (IPTG; pTriEx-6 3C/LIC)로 유도한 후에 수행되었다. 제조합 단백질은 HisSelect<sup>®</sup> 컬럼 (pBAD/Thio-TOPO의 경우; 시그마, 세인트루이스, MO) 또는 Strep-Tactin<sup>®</sup> 슈퍼플로우 컬럼 (pTriEx-6 3C/LIC의 경우; 노바젠)을 사용하는 자연적 T건 하에서 정제되었고 BCA 단백질 분석법 (피어스, Rockford, IL)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 정량되었다.

[0389] **엘리키아 샤페옌시스 VLPT 합성 펩타이드.** 엘리키아 샤페옌시스 VLPT 단백질의 N-말단 단편 (VLPT-N; 17 아미노산) 및 네 가지의 개별 TR 유닛 (R4, R3, R2, 및 R1; 각각 30 아미노산)에 해당하는 다섯 개 합성 펩타이드뿐만 아니라 R3 (R3-1 내지 R3-7)의 서로 다른 부위 및 R4 (R4-N)의 20-아미노산 N-말단 펩타이드에 해당하는 일곱 개 겹치는 (overlapping) 펩타이드가 합성되었다 (바이오신세스, 루이스빌, TX) (표 3). 동결건조된 파우더는 분자생물학 등급의 물 (1 mg/ml)로 재현탁되었다.

**표 2**

[0390] 엘리키아 샤페옌시스 (아르칸사스) 계놈 코딩 서열 및 단백질 서열; 본 명세서에서 원용에 의해 통합된 진뱅크 기탁번호 (GeneBank Accession) AF121232 하에서 둘 다 입수가 가능함

| 서열  | 서열번호: |
|---|-------|
| MSQFSEDNMGNIQMPFSDSHEPSHLELPSLSEEV I QLES DLQQSSNSDLHGFSFVELFDPFKEAVQLGNDLQQSSDSLHGFSFVELFDPSPKEEVQLES DLQQSSNSDLHESSFVELPGPSKKEEVQFEDDAKNVVYVGDHVSLSSELGLLLGGVFTMNYLSGYTPYYHHYCCYNPYYFVDYVTPDYCHHCSESSLE   | 1     |
| tttatatttatatatgattaatatataatgataatggatggttataactgcttattagttgatcatgtacctgtgtttatgtaaatagggtataaatatgtcacaattctctgaagataaatgggtaatatacaaatgccttttgattctgattcacatgagccttctcatcttgagctacctagtcttctgaagaagtgat tcaattagagagtgatctacaacaatcttcaattctgatttacacgggtcttttctgttgagttatttgatccttttaagaagcagttcaattggggaatgatctacaacaatcttctgattctgatttacacgggtcttttctgttgagttatttgatccttcaagaagaagttcaattggagagtgatctacaacaatcttcaattctgatttacacgagttcttctgttgagttacctggtccttccaagaagaagttcaattcgaagatgatgctaaaaatgt agtatatggacaagacatgttagtttatctgaattaggcttattgttagtggtgtttttagtagcaatgaattattgtctggttatacaccgtattattatcatcatattgttggtataaatccttattattttgattatgttactccagatatttgtcatcactgt agtgaagtagtttagagtaggatatttagaaatataaatggttgttgacttcacaaaagggtgatttttatgttttatgctgttttatagtggttataaggatagagttggttttactattttt | 16    |

[0391] **항혈청.** 회복기에 있는 항-엘리키아 샤페옌시스 개 혈청은 실험적으로 감염된 개 (no. 2251)로부터 획득하였다. HME 환자로부터 얻은 혈청은 포커스 테크놀로지 (Focus Technologies, 사이프레스, CA)로부터 기증받았다. 토끼 항-VLPT-R3 항혈청은 상업적 공급자가 합성 엘리키아 샤페옌시스 VLPT-R3 KLH-결합된 펩타이드

에 대항하도록 생산하여 공급하였다 (바이오-신세시스).

- [0392] **젤 전기영동 및 웨스턴 면역블롯팅.** 정제된 얼리키아 샤피엔시스 또는 얼리키아 캐니스의 전체 세포 용출액 (whole-cell lysates) 또는 재조합 단백질은 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 분리되고 니트로셀룰로스 (nitrocellulose)로 전이시켰으며, 또한 웨스턴 면역블롯팅 (Western immunoblotting)이 일차 개 및 인간 혈청이 1:100으로 희석되고 토끼 항-VLPT-R3 항혈청이 1:2,000으로 희석되는 것을 제외하고는 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다 (McBride *et al.*, 2003).
- [0393] **탄수화물 검출.** 재조합 단백질 VLPT 상의 글리칸 검출은 디옥시제닌 글리칸 검출 키트 (digoxigenin glycan detection kit; 로슈, 인디애나폴리스, IN)를 사용하여 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다 (McBride *et al.*, 2000).
- [0394] **ELISA.** 효소-연결 면역흡착 분석법 (ELISA) 플레이트 (MaxiSorp; NUNC, Roskilde, 덴마크)는 인산-식염 완충 용액 (pH 7.4)에 녹인 재조합 단백질 또는 합성 펩타이드로 코팅시켰다 (0.5 µg/웰; 50 µl). 단백질과 펩타이드는 ELISA 플레이트에 하룻밤 동안 4°C에서 가만히 흔들면서 흡착시킨 다음 이어서 0.2% 트윈 20 (TBST)을 포함하는 200 µl의 트리스-식염 완충용액으로 세 번 세척하고 TBST 에 녹인 100 µl의 3% 소혈청 알부민 (BSA)으로 상온에서 1 시간 동안 흔들면서 블록킹시킨 다음 다시 세척하였다. 회복기에 있는 항- 얼리키아 샤피엔시스 개 또는 인간 혈청을 3% BSA-TBST에서 1 : 100으로 희석하고 각 웰 (50 µl)에 첨가하였으며 상온에서 1시간 동안 가만히 흔들면서 반응시켰다. 이 플레이트를 네 번 세척하고 3% BSA-TBST 에서 1 : 5,000으로 희석시킨 50 µl의 알칼라인 포스파타제-표지된 염소 항-개 또는 인간 IgG (H + L) 이차 항체 (Kirkegaard & Perry Laboratorie, Gaithersburg, MD)을 첨가하였으며 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 플레이트를 네 번 세척하고, 기질 (100 µl, BluePhos; Kirkegaard & Perry Laboratories)을 각 웰에 첨가하였다. 이 플레이트는 암소에서 30분 동안 흔들면서 반응시켰고 발색 정도를 마이크로플레이트 리더기 (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 A<sub>650</sub>에서 측정하였으며, 데이터는 소프트맥스 프로 버전 4.0 (SoftmaxPro v4.0; Molecular Devices)에 의해 분석되었다. 흡광도 (optical density; OD) 측정값은 차감되는 완충용액만의 웰의 OD를 감안한 세 개 웰에 대한 평균 (± 표준 편차)을 나타낸다.
- [0395] **면역전자 현미경법.** 면역골드 전자 현미경법 (immunogold electron microscopy)는 얼리키아 샤피엔시스-감염된 DH82 세포 상에서 일차 토끼 항-VLPT-R3 펩타이드 혈청을 1 : 10,000으로 희석한 것을 제외하고는 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다 (McBride *et al.* 2005). 감염되지 않은 DH82 세포가 음성 대조군으로서 사용되었다.
- [0396] **질량 분광분석법.** 질량 분광분석법 (mass spectrometry)은 텍사스 대학교 메디칼 브랜치 단백질 코어 연구실 (University of Texas Medical Branch Protein Chemistry Core Laboratory)에서 매트릭스-도움 레이저 탈착/이온화 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) 비행 시간 (time-of-flight; TOF) 질량 분광분석기 (MS) (Voyager-DE STR; 어플라이드 바이오시스템사)를 사용하여 수행되었다.
- [0397] **분비된 VLPT 단백질의 분석.** 얼리키아 샤피엔시스-감염된 DH82 세포 배양 상청액 (1 ml)이 세포 단일층을 흐뜨리지 않으면서 매일 수확되었고 세포와 박테리아를 펠렛으로 만들기 위해 높은 속도에서 원심분리되었다 (5분 동안 10,000 x g). 이어서 상청액은 젤 전기영동과 항-VLPT-R3 특이 폴리클론 항체를 사용한 웨스턴 면역블롯팅을 위해 10배 농축되었다 (센트리콘 초원심분리 필터, 10-kDa 컷오프; 밀리포아, Billerica, MA).
- [0398] **서열 분석.** 얼리키아 샤피엔시스 VLPT 는 줄레니우스 등이 개발한 YinOYang 버전1.2 프로그램 (Julenius *et al.*, 2005), 및 블롬 등이 개발한 NetPhos 버전2.0 프로그램 (Blom *et al.*, 1999)의 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 가능성 있는 O-연결 글리코실화 (glycosylation) 및 인산화 (phosphorylation)에 대해 평가되었다. 가능성 있는 시그널 서열 또는 비-고전적인 분비는 벤드센 등이 개발하고 그램-음성 박테리아에서 잘 훈련된 SignalP

3.0 및 SecretomeP 2.0 프로그램 (Bendtsen *et al.*, 2004)의 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 확인되었다. 핵산 및 아미노산 배열 (alignments)은 MegAlign (Lasergene 버전5.08, DNASTar)을 사용하여 수행되었다. 얼리키아 샤페렌시스 VLPT 에피토프는 단백질-단백질 기초 국소배열 탐색도구 (Basic Local Alignment Search Tool; BLAST)을 사용하여 다른 얼리키아 종의 단백질 (VLPT 해당 단백질 포함)과의 상동성 (homology)에 대해서도 조사되었다.

표 3

[0399]

대표적인 얼리키아 샤페렌시스 VLPT 합성 폴리펩타이드

| 펩타이드 | 서열  | 아미노산 | 서열번호: |
|------|---|------|-------|
| N    | MSQFSEDNMGNIQMPFD   | 17   | 2     |
| R4   | SDSHEPSHLELPSLSEEVIQLES DLQSSN                                  | 30   | 3     |
| R3   | SDLHGSPSVELFDPFKEAVQLGNDLQSSD                                   | 30   | 4     |
| R2   | SDLHGSPSVELFDPKSKEEVQLES DLQSSN                                 | 30   | 5     |
| R1   | SDLHESSFVELPGPSKEEVQFEDDAKNVY                                   | 30   | 6     |
| R3-1 | SDLHGSPSVELFDP  | 14   | 7     |
| R3-2 | SDLHGSPSVELFDPFKE   | 17   | 8     |
| R3-3 | HGSFSVELFDPFKE  | 14   | 9     |
| R3-4 | HGSFSVELFDPFKEAVQ   | 17   | 10    |
| R3-5 | HGSFSVELFDPFKEAVQLGN  | 20   | 11    |
| R3-6 | VELFDPFKEAVQLGND  | 16   | 12    |
| R3-7 | FKEAVQLGNDLQSSD   | 16   | 13    |
| R4-N | HEPSHLELPSLSEEVIQLES  | 20   | 14    |
| C    | GQDHSVLSLGLLLGGVFSTMNYLSGYTPY<br>YHHYCCYNPYYYFDYVTPDYCHHCSESSLE | 61   | 15    |

표 4

[0400]

얼리키아 샤페렌시스 VLPT 유전자 단편의 증폭을 위한 올리고 뉴클레오타이드 프라이머

| 단편      | 정방향 프<br>라이머 | 서열   | 역방향 프<br>라이머 | 서열   | 증폭 단편<br>크기 |
|---------|--------------|--|--------------|--|-------------|
| R4      | 4F           | TCTGATTCACATGAGCCTC (서열번호 17)                | 4(2)R        | ATTAGAAGATTGTTGTAGATCACTC (서열번호 18)                  | 90          |
| R3      | 3(2)F        | TCTGATTACACGGGTCTT (서열번호 19)                 | 3R           | ATCAGAAGATTGTTGTAGATCAT (서열번호 20)                    | 90          |
| R2      | 3(2)F        | TCTGATTACACGGGTCTT (서열번호 21)                 | 4(2)R        | ATTAGAAGATTGTTGTAGATCACTC (서열번호 22)                  | 90          |
| R1      | 1F           | TCTGATTACACGAGTCTTCT (서열번호 23)               | 1R           | ATATACTACATTTTAGCATCATCTC (서열번호 24)                  | 90          |
| C       | CF           | GGACAAGACCATGTTAGTTT (서열번호 25)               | CR           | CTCTAAACTACTTTCCTACTACAGTG (서열번호 26)                 | 183         |
| R4321-C | 4F           | TCTGATTCACATGAGCCTC (서열번호 27)                | CR           | CTCTAAACTACTTTCCTACTACAGTG (서열번호 28)                 | 543         |
| R32     | 3(2)F        | TCTGATTACACGGGTCTT (서열번호 29)                 | 4(2)R        | ATTAGAAGATTGTTGTAGATCACTC (서열번호 30)                  | 180         |
| R32a    | 3F-lic       | CAGGGACCCGGTCTTCTAATTCTGATTTACACGG (서열번호 31) | 2R-lic       | GGCACCAGAGCGTTTAAATTAGAAGATTGTTGTAGATCACTC (서열번호 32) | 213         |

[0401]

실시예 2

[0402]

얼리키아 샤페렌시스 VLPT 단백질의 특성 분석

[0403]

얼리키아 샤페렌시스 VLPT 단백질의 조성 및 특성. 세린 (33 잔기; 16.7%), 루이신 (22; 11.1%), 글루탐레이트 (20; 10.1%), 및 아스파테이트 (17; 8.6%)는 얼리키아 샤페렌시스 VLPT 단백질에서 전체 아미노산 함량의 46.5%가 되는 가장 빈번히 나타나는 아미노산이었다 (도 1A). 더욱이 VLPT 단백질의 반복서열에서는, 이 네 가지 잔

기의 출현은 각각 20%, 12.5%, 13.3% 및 10% 조성으로 더욱 빈번해졌고, 전체 반복 부위 아미노산의 55.8% 가 되었다. 디설파이드 결합과 연관된 네 개 시스템인 잔기는 단백질의 카르복실-말단 도메인에 존재하였지만, 이 도메인은 타이로신 잔기 (19.7%)가 우세하게 존재하였다. 강한 산성 잔기인 글루탐산 및 아스파테이트의 높은 비율로 인해, VLPT 단백질은 높은 산성을 띠었다 (pI 3.8). N-말단 부위 (17 아미노산) 및 가장 큰 도메인인 TR 부위 (120 아미노산)는 높은 산성이었고 (각각 pI 3.2 및 3.8), 또한 카르복실-말단 도메인 (61 아미노산)은 가장 낮은 산성이었다 (pI 4.7).

[0404] VLPT의 TRs는 서로 일치하지는 않았지만, R3 및 R2는 가장 높은 아미노산 동일성 (identity; 83%)을 가졌으며 R4 및 R1는 R3와 각각 53% 및 49% 동일성을 가졌다 (도 1B). VLPT-R3 및 VLPT-R4로부터 얻은 아미노산 서열을 이용한 BLAST 탐색으로 VLPT 반복서열과 얼리키아 단백질 또는 밀접한 연관성이 있는 속의 생물체로부터 얻은 단백질 간에 상동성이 전혀 없는 것을 발견하였다.

[0405] **자연 상태 VLPT 단백질의 확인.** 웨스턴 블롯팅은 합성 VLPT-R3 단백질에 대한 단일특이 토끼 항혈청과 반응한 얼리키아 샵피엔시스 전체-세포 용출액 및 얼리키아 샵피엔시스-감염된 세포로부터 얻은 상청액에서 분자량 ~32 kDa (예상되는 질량 25.8 kDa 보다 ~6.2 kDa 더 큼)을 가지는 자연 상태의 단백질 및 다섯 개의 보다 작은 단백질 (22~30 kDa)을 확인하였다 (도 2A). 또한, 항-VLPT-R3 항체는 *E. 콜리*의 전체 세포 용출액과는 반응하지 않았다 (도 2A). 얼리키아 샵피엔시스 전체-세포 용출액 및 감염된 배양액으로부터 얻은 상청액에서 유사한 크기의 단백질 (~32 kDa)도 역시 항-얼리키아 샵피엔시스 개 혈청과 반응하였다 (도 2B). 면역전 (pre-immunization) 토끼 혈청 또는 개 혈청 대조군은 얼리키아 샵피엔시스 전체 세포 용출액 또는 상청액을 인지하지 못했다 (결과는 미도시).

[0406] **VLPT 부위를 포함하는 에피토프.** VLPT 부위를 포함하는 주요 에피토프를 결정하기 위하여, 서로 다른 VLPT 도메인 (R4321-C, R32, R1, R2, R3 R4, 및 C; 도 3)에 해당하는 재조합 단백질이 발현되었다. pBAD/Thio-TOPO 벡터 내에서 발현되는 모든 재조합 VLPT 단백질은 VLPT-R3 및 VLPT-C를 제외하고는 아미노산 서열에 의해 예측되는 분자량 보다 SDS-PAGE에 의한 분자량이 실질적으로 더 큰 점을 보여주었다. 실질적으로 더 작은 N-말단 융합 단백질 (pBAD/Thio 벡터인 경우, 13.1 kDa과 비교해 2.4 kDa)을 가지는 대안의 pTriEx6 3C/LIC 벡터 내에서 발현되는 VLPT-R32도 역시 증가된 분자량을 나타내지만 (예상된 것보다 3.7 kDa 더 큼), pBAD/Thio 벡터에서 발현된 VLPT-R32의 분자량보다는 더 작다 (예상된 것보다 5.2 kDa 더 큼). 재조합 VLPT 단백질에 의해 나타나는 증가된 분자량은 단백질이 번역 후 수식으로 변형된 것을 보여주었다; 더욱이 몇 가지 예측되는 글리코실화 부위가 컴퓨터 알고리즘에 의해 VLPT 상에서 확인되었다. 그러나, 탄수화물이 재조합 얼리키아 샵피엔시스 VLPT 폴리펩타이드 상에서는 전혀 검출되지 않았다 (결과 미도시). 더 나아가 재조합 VLPT 단백질 하나의 실제 분자량을 검증하기 위하여, pTriEx6 3C/LIC 벡터 내에서 발현되는 VLPT-R32를 포함하는 물질이 MALDI-TOF에 의해 결정되었다. VLPT-R32의 분자량은 아미노산 서열에 의해 예측되는 량 (9,325 Da) 보다 약간 더 작은 9,206 Da이었고 (2.4 kDa 발현 태그는 제외함), 이는 번역 후 수식이 존재하지 않는 것을 보여주었다.

[0407] 웨스턴 블롯팅에 의해, TR-포함하는 큰 단백질 R4321-C 및 R32 그리고 개별 반복서열 유닛 R2 및 R3이 항-얼리키아 샵피엔시스 개 혈청과 강하게 반응하였지만, 카르복시 말단 도메인 (C) 및 반복서열 유닛 R1 및 R4는 항-얼리키아 샵피엔시스 개 혈청과 반응하지 않았다 (도 4A). 항-얼리키아 샵피엔시스 개 혈청과 VLPT (합성 폴리펩타이드 및 이에 해당하는 재조합 단백질)의 반응성도 역시 가능성 있는 구조적 에피토프 (conformational epitope)를 확인하기 위하여 엘라이자에 의해 조사되었다 (도 4B). VLPT-N (합성), VLPT-C (재조합), 또는 VLPT-R1 (합성 및 재조합) 폴리펩타이드는 항-얼리키아 샵피엔시스 개 혈청과 반응하지 않았다. 웨스턴 블롯팅에 의한 결과와 유사하게, VLPT-R3 또는 R2 펩타이드 (합성 및 재조합)은 항-얼리키아 샵피엔시스 개 혈청과 강하게 반응하였으나; VLPT-R3 (합성)은 VLPT-R2 (합성)보다 면역반응성이 더 컸다. 반대로, 웨스턴 블롯팅에 의해 면역반응성이 없었던 재조합 VLPT-R4는 엘라이자에 의해 항-얼리키아 샵피엔시스 개 혈청과 강하게 반응하였으며 (합성 및 재조합), 이는 구조적 에피토프가 VLPT-R4에 존재하는 것을 보여주었다 (도 4A 및 B).

[0408] **주요 VLPT 면역결정기의 확인.** 얼리키아 샵피엔시스 VLPT 단백질의 주요 에피토프를 정찰시키기 위하여, VLPT-R3 내에 서로 다른 위치에 해당하는 일곱 개의 겹치는 펩타이드 (R3-1 내지 R3-7로 나타냄)를 항-얼리키아 샵피

엔시스 개 혈청과 반응시켰다 (도 3 and 5A). 펩타이드 R3-6 및 R3-7 (C-말단 부위)는 면역반응하지 않았으나, N-말단 부위에 해당하는 R3-2, R3-3, R3-4 및 R3-5는 엘라이자에 의해 항-엘리키아 샤피엔시스 개 혈청과 유사하게 또한 강하게 반응하는 것이 관찰되었고 (도 4B), 이는 VLPT-R3의 N-말단 부위 (23 아미노산; SDLHGFSVELFDPFKEAVQLGN)가 주요 항체 에피토프를 포함하는 것을 보여주었다. 펩타이드 R3-3 (14 아미노산; HGSFSVELFDPFKE)은 항-엘리키아 샤피엔시스 개 혈청과 반응하는 가장 작은 펩타이드였다 (도 5A 및 B). 각각 세 개 (C-말단) 및 네 개 (N-말단) 아미노산이 서로 달라지는 펩타이드 R3-1 및 R3-6는 이와 반응하지 않았다 (도 5A 및 B).

[0409] VLPT-R4에서 면역결정기를 조사하고 비교한 결과, VLPT-R3 (도 4A)에서의 R3-5에 해당하는 20-아미노산 펩타이드 (HEPSHLELPSSLSEEVIQLS)는 개 혈청 또는 환자 혈청 둘 다와 면역반응하지 않았으며 (결과 미도시), 이는 R4에서 VLPT의 세 번째 에피토프가 분자적으로 서로 다르고, R3 및 R2와 비교하여 R4의 아미노산 서열에 나타난 차이점과 일맥상통하는 것을 보여주었다 (도 1B).

[0410]

[0411] **VLPT-R3 펩타이드의 HME 환자 혈청과의 반응성.** 면역형광 분석법 (immunofluorescence assay; IFA)에 의해 검출될 수 있는 엘리키아 샤피엔시스 항체를 가지는 세 가지 HME 환자 혈청 (번호 1, 4 및 12)이 엘라이자에 의해 (각각 도 6A-C) VLPT-R4, R3, 및 R2 (합성 및 재조합)의 면역반응성을 조사하기 위해 사용되었다. 항-엘리키아 샤피엔시스 개 혈청으로 나타나는 면역반응성과 모순되지 않게, VLPT-R3 및 R2도 역시 HME 환자 혈청과 가장 강한 면역반응성을 나타내었고, 두 명의 환자 (번호 1 및 12)는 VLPT-R4에 대해 강한 항체 반응을 나타내었다 (도 6A-C).

[0412] VLPT-R3로부터 얻은 일곱 개의 겹치는 합성 펩타이드 (R3-1 내지 R3-7)를 가지는 세 명의 HME 환자 혈청의 면역반응성이 엘라이자에 의해 결정되었다 (도 6A-C). 유사한 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 R3-4 (17 아미노산) 및 R3-5 (20 아미노산) (도 5A 참조)는 테스트된 모든 HME 환자 혈청과 강하게 또한 일정하게 반응하였다 (도 6A-C). 상기 겹치는 펩타이드와 비교하면서, 이러한 면역반응기 (immunodeterminant)에 중요한 최소의 펩타이드 서열은 17 아미노산 (펩타이드 R3-5)이었다. HME 환자 및 엘리키아 샤피엔시스로 실험적으로 감염된 개로부터 얻은 항체는 VLPT-R3와 유사하게 반응하였다 (도 4B 및 6A-C). 그러나, 인간 혈청에서의 항체는 일차적으로 VLPT-R3 내의 R3-4 및 R3-5 펩타이드에 대하여 반응하였다 (도 6A-C). 정상 인간 혈청은 이들 펩타이드와 단백질을 인식하지 못하였다 (결과 미도시).

[0413] 검출될 수 있는 엘리키아 샤피엔시스 항체를 가지는 더 많은 HME 환자 (14명의 환자) 혈청과의 VLPT-R3의 반응성이 조사되었다. 모든 환자 혈청은 VLPT-R3 (합성)과 반응하였으며 (도 6D), 이는 이 에피토프가 인간에 의해 일관되게 인식되고 환자 혈청에서 이 에피토프와 항체의 반응성은 IFA와 완벽하게 상호연관이 있는 것을 보여주었다. 정상 인간 VLPT-R3를 인식하지 못하였다 (도 6D, 레인 16)

[0414] **엘리키아 샤피엔시스 VLPT의 일시적 분비.** VLPT는 감염된 세포로부터 얻은 상청액에서 감염후 1시간부터 검출되었고 감염후 6일까지 그 양이 증가하였다 (도 7). 이 VLPT 단백질은 감염되지 않은 DH82 세포 배양 상청액에서는 관찰되지 않았다.

[0415] **VLPT의 세포 및 세포외적 정착.** 몇 가지 특성 분석된 엘리키아 단백질은 진한-코아를 가진 엘리키아균 상에서 차별적으로 발현된다 (gp120, gp36, 및 gp47). 그러나, 엘리키아 캐니스의 gp19 해당 단백질과 같이, 엘리키아 샤피엔시스 VLPT 단백질은 상실배 막 그리고 망상 및 진한-코아 엘리키아균의 표면 상에서 관찰되지만, 상실배 원섬유 기질 (morula fibrillar matrix) 상에서 면역전자 현미경법에 의해서도 관찰되었다 (도 8A). 항-VLPT-R3 항체는 감염되지 않은 DH82 세포와는 반응하지 않았다 (도 8B).

[0416] **실시예 3**

[0417] **본 발명의 중요성**

[0418] 엘리키아 샤피엔시스 VLPT 유전자에 관한 초기 기제는 분자적 진단학 및 역학을 위한 유전자 적용에 초점을 맞추었다. 따라서, VLPT 유전자가 TRs 유닛의 숫자에서의 차이점 및 유전자에 존재하는 서열 다양성에 근거하여

분리물을 구별하는 데 빈번히 사용되어 왔다 (Sumner *et al.*, 1999; Yabsley *et al.*, 2003). 이전에 연구가 재조합 VLPT가 HME 환자 혈청에서 항체와 반응하였던 점을 보여주었다라도, VLPT 단백질의 면역학적 성질이 전부 밝혀지지는 않았다 (Popov *et al.*, 2000). 분명하게, VLPT 단백질이 자연 상태의 얼리키아 사피엔시스 전체 세포 용출액에서 결정적으로 확인되지 않았고 그의 보고된 분자량 44-kDa (예상된 크기의 두 배)에 해당하는 주요 면역반응하는 단백질도 전혀 확인되지 않았다. 따라서, VLPT의 정체성 및 이에 대항하는 숙주 반응 정도는 여전히 밝혀지지 않았다. 최근에, 얼리키아 캐니스에서 조기 항체 반응을 나타내는 보존되고 (conserved) 강한 산성을 띠고 주요 면역반응하는 19-kDa 단백질 (gp19)의 확인 및 특성 분석이 보고되었다 (McBride *et al.*, 2003). 또한 게놈 및 단백질 분석에 기초하여, 얼리키아 사피엔시스 VLPT 단백질은 gp19단백질에 해당하는 것으로 결론 맺었다. 또한 얼리키아 병리생물학에서 얼리키아 사피엔시스 VLPT 단백질은 알려져 있지 않고 다른 기지의 박테리아 단백질과 연관성의 결여도 그의 잠재적 기능에 관한 단서를 제공하게 하지 못한다. VLPT 및 얼리키아 캐니스 gp19의 탁월한 특징은 타이로신이 우세한 상동한 카르복시-말단 도메인이고, 이는 기능적으로 중요한 보존된 도메인인 것을 보여준다.

[0419] 본 발명에서 관찰되는 얼리키아 사피엔시스 VLPT 단백질 (아르칸사스 균주)의 외관상 분자량 (~32 kDa) 및 이전에 보고된 재조합 VLPT의 분자량 (~44 kDa)에서의 차이가 관찰되었고, 이는 자연 상태의 VLPT 가 이전 연구에서는 확인되지 않은 점을 주지해야 한다. 그럼에도 불구하고, 항-VLPT-R3 항체에 의해 얼리키아균 용출액으로부터 확인되는 자연 상태의 VLPT 단백질 (~32 kDa)과 재조합 VLPT 단백질 (융합 태그 없는)는 일치하였다. 따라서, 본 발명에 의해 나온 증거는 VLPT (재조합 및 자연 상태) 물질은 ~32-kDa인 것을 보여주고, 이는 예상된 분자량 (25.7-kDa)보다 더 크지만 이전에 보고된 것보다는 실질적으로 더 작다 (Sumner *et al.*, 1999).

[0420] 얼리키아 사피엔시스 및 얼리키아 캐니스에서 주요 면역반응하는 단백질의 네 개 쌍 (gp200s, gp120/gp140, gp47/gp36, 및 VLPT/gp19)이 확인되었다. 두 가지 해당 단백질 쌍은 TR-포함하는 단백질이고, VLPT/gp19 도역시 유사하게 나타난다. 얼리키아 캐니스 gp19 은 얼리키아 사피엔시스 VLPT에서 발견되는 다중 반복서열이 결합되어 있긴 하지만, 크기와 조성이 VLPT의 단일 세린-풍부 반복서열 유닛과 유사한 Ser/Thr/Glu-풍부한 패치를 가지고, gp19의 주요 면역결정기는 STE-풍부한 패치에 위치하였다. 유사하게, 항체 에피토프는 gp36/47 및 gp120/140를 포함하는 다른 세린-풍부한 TR-포함하는 얼리키아 단백질에서 확인되었다 (Doyle *et al.*, 2006; Yu *et al.* 1996).

[0421] p28/p30를 제외하고, 특성 분석된 얼리키아 사피엔시스 및 얼리키아 캐니스의 모든 주요 면역반응하는 단백질은 우세한 글루타메이트 및 아스파테이트로 인해 높은 산성을 띠지만, 또한 이들 단백질에서 발견되는 TRs 내에 높은 빈도로 존재하는 세린과 같은 극성 아미노산을 높은 비율로 가진다. 더욱이, 이들 단백질의 주요 항체 에피토프는 이들 세린-풍부한 산성 TRs 또는 산성 도메인에 위치하였다 (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2000; Nethery *et al.*, 2007). 얼리키아 캐니스 gp19 의 아미노산 조성은 세 가지 아미노산, 세린, 글루타메이트 및 아스파테이트로 이루어졌다. gp19를 포함하는 다른 주요 면역반응하는 단백질과 마찬가지로, VLPT은 TRs 부위에서 더 두드러지는 세린, 글루타메이트 및 아스파테이트가 유사한 우세를 보인다. 이 극성 및 산성 아미노산의 높은 빈도는 숙주 면역 반응 및 산성의 세린-풍부한 반복적 서열 및 도메인 간의 직접적인 연관성을 보여준다.

[0422] 이전에, 예상되는 물질보다 더 큰 재조합 얼리키아 TR-포함하는 단백질 상에 탄수화물 검출은 그들의 자연 상태 단백질과 유사한 것으로 보고되었다. 또한, VLPT는 젤 전기영동에 의해 예상되는 것보다 더 큰 분자량을 나타내는 것으로 보고되었고, 이는 자연 상태 및 재조합 VLPT 단백질 모두를 사용하여 본 발명에서 관찰되었던 발견이다 (Sumner *et al.*, 1999). 따라서, 글리코실화가 이러한 차이에 원인에 될 가능성이 고려되었다. 세린과 트레오닌 잔기는 O-글리칸에 대한 연결 부위이고 이들 아미노산의 일부는 VLPT 상에 글리칸 부착 부위일 것으로 예측되었다. 그러나, 다른 얼리키아 단백질과는 달리, VLPT 상의 탄수화물이 검출되지 않았고, 재조합 두 반복서열 포함하는 단편 (VLPT-R32)의 분자량 (MALDI-TOF에 의해 결정된)은 그의 예상된 분자량과 일치하였으며, 비정상적인 이동이 VLPT 일련 반복서열의 번역 후 수식으로 인한 것이 아니라는 점을 입증하였다. 한 구체예에서, 전기영동적 이동이 증가하는 것은 VLPT이 높은 산성 단백질이기 때문이다. 다른 이들은 리보뉴클레아제 U2 (ribonuclease U2) 및 칼데스몬 (caldesmon)과 같은 높은 산성 단백질은 중성화 후에 정상화될 수 있는 변칙적인 전기영동적 행동을 나타내는 것을 보고하였다 (Garcia-Ortega *et al.*, 2005; Graceffa *et al.*, 1992; Moussa *et al.*, 2004). 본 발명의 특정 구체예에서, VLPT의 높은 산성 아미노산 함량 및 전체적으로 낮은 pI (3.8) 는 그의 전기영동적 행동을 설명하고 다른 높은 산성 TR-포함하는 얼리키아 단백질의 변칙적인 행동에 원인이 된다.

[0423] 얼리키아 사피엔시스 VLPT 단백질에서 세 가지 에피토프-포함하는 부위가 동일하지 않은 세린-풍부한 반복서열

유닛 R2, R3 및 R4 에서 확인되었고, 이는 다른 얼리키아 TR-포함하는 단백질에서 에피토프의 위치와 일치한다 (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000). 인간 혈청 둘 다와 가장 강한 항체 반응성을 나타내었던 R3에서의 항체 에피토프는 R2 와 높은 상동성을 가지는 (두 개 아미노산 변화) 17 아미노산 N-말단 부위에 정착하였다. 따라서, R3에 대항하는 항체는 R2와 교차 반응하는 것 같다. 따라서, R3 에피토프는 인간과 개 항-VLPT 항체에 대한 일차 면역결정기가 되는 것으로 보인다. 흥미롭게도, R3 면역결정기는 인간 항체에 의해 검출될 때 R3-4 펩타이드에서 세 개 말단 아미노산 (AVQ)에 매우 의존적인 것으로 나타난 한편, 개 혈청에 반응하는 항체는 바로 위쪽 (directly upstream)의 세 개 아미노산 (FKE) 에 더 의존적인 것으로 나타났다. 따라서 R3-3는 개 항체에 의해 인식되는 최소의 에피토프 서열 (14 아미노산)이었고, 세 개 추가된 C-말단 아미노산을 포함하는 R3-4 (17 아미노산)은 인간 혈청과의 항체 반응성에 있어 필수적이다. 흥미롭게도 R4는 가장 다른 (divergent) 반복서열이었고, 웨스턴 블롯팅에 의해 반응하지는 않았지만 엘라이자에 의해 항체와 반응하였다. 이것은 구별되는 구조적 에피토프가 R4에 존재하는 것을 보여준다. 구조적 에피토프는 얼리키아 (*Ehrlichia*) 및 아나플라스마 (*Anaplasma*) 종에서 기술된 바 있었다 (Chen *et al.*, 1996; Munodzana *et al.*, 1998). 따라서, R4는 R3와 독립적인 VLPT의 면역반응성에 기여한다. VLPT-R3 에서의 R3-5 에 해당하는 더 작은 R4 펩타이드 (20 아미노산)은 면역 반응하지 않았지만; 전체 반복서열 (30 아미노산)은 면역반응하였으며, 이는 이 에피토프가 연속되지 않고 에피토프를 만들어내기 위해 전체 반복서열을 필요로 한다는 결론을 지지한다.

[0424]

VLPT 반복서열 유닛에서 확인되는 에피토프는 항- VLPT-R3 항체가 밀접한 유연 관계를 가진 얼리키아 캐니스와 교차-반응하지 않았고, VLPT-R2, R3 및 R4, 그리고 다른 얼리키아 종 또는 밀접하게 연관된 병원균 간에 아미노산 동일성이 관찰되지 않았기 때문에, 종-특이적인 것을 보여준다. 이것은 이전에 보고된 바 있고 역시 종-특이적이었던 얼리키아 캐니스 gp19 (VLPT 해당 단백질)에서 확인된 항체 에피토프와 모순되지 않는다. 또한, gp120/gp140, gp47/gp36, gp200s 를 포함하는 얼리키아 샤피엔시스 및 얼리키아 캐니스의 해당 단백질에서 유사한 종-특이적인 에피토프가 확인되었다 (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2000). 더 나아가 현재의 발견은 얼리키아 샤피엔시스에 대항하여 생성된 항체가 일차적으로 종-특이적인 에피토프로 이동하는 사실을 지지한다. 따라서 한 가지 얼리키아 종에 대항하여 생성된 항체는 이 경우에 얼리키아 캐니스와 같이 밀접하게 연관된 병원균에 대항하여 조금도 보호 작용을 하지 못할 수 있다. 그러나, VLPT와 같은 종-특이적인 항원은 민감한 종-특이적 면역진단학의 개발하는데 탁월한 후보가 되며 역학적 연구에도 유용하다.

[0425]

얼리키아 샤피엔시스 gp120 및 gp47와 같은 얼리키아 TR-포함하는 단백질은 분비된다 (Doyle *et al.*, 2006; Popov *et al.*, 2000). 본 발명에서는, VLPT 단백질 또한 분비되는 것을 기술한다. 분비의 기작은 VLPT가 아미노-말단 시그널 서열을 가지지 않기 때문에 *sec*-의존적인 것으로 나타난다. VLPT는 SecretomeP 2.0에 의해 비고전적인 리더 서열이 없는 분비 시스템에 의해 분비되는 것으로 예측되었다; 따라서, VLPT 및 다른 TR-포함하는 단백질의 분비는 얼리키아 샤피엔시스 gp120 및 gp47를 포함하여 유사한 기작에 의해 일어날 수 있고, 이것도 역시 N-말단 시그널 서열이 결여되어 있지만 상실배에서 또한 감염된 세포 배양 상정액에서 박테리아 외부에서 발견된다. 타입 IV 분비 시스템 구성요소를 인코딩하는 유전자가 얼리키아 및 아나플라스마 둘 다에서 보고되었으며 (Dunning Hotopp *et al.*, 2006; Ohashi *et al.*, 2002), *A. 파고사이토파일럼* (*A. phagocytophilum*)의 AnkA 은 이러한 시스템에 의해 분비되는 것으로 보인다 (Lin *et al.*, 2007). 그러나, VLPT는 타입 IV 효과기 단백질 일치 서열 (R-X<sub>7</sub>-R-X-R-X-R-X-X<sub>n</sub>)을 포함하지 않는 것으로 나타나지 않고, 얼리키아 종에서 확인되었던 다른 분비 시스템 (*sec*-의존성 및 *sec*-비의존성)의 기질이 될 수 있다 (Dunning Hotopp *et al.*, 2006).

[0426]

얼리키아 샤피엔시스 gp120 및 gp47의 차별적인 발현 (진한-코아 얼리키아균 상에)과는 다르지만 얼리키아 캐니스 gp19 (Doyle *et al.*, 2006; Popov *et al.*, 2000)의 정착과는 일치하여, 얼리키아 샤피엔시스 VLPT 단백질은 망상 및 진한-코아 얼리키아균 둘 다의 모양적인 형태 상에서 검출되었지만, 주로 상실배 원섬유 및 상실배 막와 연관되어 세포외적으로 발견되었다. 따라서, 상기 VLPT 단백질은 주요 표면 단백질 인 것으로 보이지 않고 얼리키아균의 감염성 형태 (진한 코아를 가지는)와도 특이적으로 연관되어 있지 않다. VLPT의 상실배 공간 및 막 내로 분비는 상실배 유지에서 또는 감염인자로서의 잠재적으로 중요한 역할을 나타낸다.

[0427]

얼리키아 종의 대다수 특성분석된 주요 면역반응하는 단백질은 공통적인 아미노산 사용성 (usage)을 가지고 TRs로 유도되는 강한 체액성 면역반응을 나타내는 산성의 TR-포함하는 단백질이다. 숙주 면역반응은 주로 TRs 내의 에피토프로 유도되는 것으로 보이고, 이는 이들 단백질 모두가 숙주 면역 반응과 유사하게 상호작용하는 것을 보여준다. 본 발명의 특정한 구체예에서, TR-단백질에 있는 특이 에피토프에 유도되는 항체는 보호적이다.

[0428]

**실시예 4**

[0429]

**본 발명의 백신**

[0430]

본 발명의 상세한 관점에서, 본 발명의 면역반응하는 조성물은 서브유닛 백신과 같은 백신으로서 적합하다. 본 발명의 다른 관점에서, 면역원성 조성물은 면역보호적이라고 언급된다.

[0431]

상세하게는, 예를 들어 얼리키아 사피엔시스 VLPT 에피토프와 같은 본 발명의 하나 이상의 조성물은 예를 들어 인간, 개, 소, 또는 말과 같은 포유동물에 투여된다. 포유동물로부터 나온 혈청은 혈청에서 항체를 검출하는 것에 의해서와 같은 면역 반응을 위해 분석될 수 있다. 포유동물은 다시 얼리키아 케니스 생물체와 같은 병원성 생물 또는 다른 적절한 조성물과의 연속적인 도전을 받기 쉽고 또한 면역보호가 측정된다. 대조군은 돌연변이된 에피토프 또는 탄수화물 부분을 포함하지 않는 에피토프의 면역화 예와 같이 적용될 수 있다. 상기 연속적인 도전에 대항하는 완전한 또는 부분적인 보호는 조성물의 면역보호적 본성을 나타내는 것이고 본 조성물이 백신이 된다. 부분적인 보호는 적어도 하나의 감염 증상이 발생하는 것으로부터 보호하는 것 또는 발생하는 것을 지연시키는 것 또는 적어도 하나의 증상이 악화되는 것으로부터 보호하는 것으로서 정의될 수 있다.

[0432]

**[참고문헌]**

[0433]

**[특허문헌]**

[0434]

본 명세서에서 언급된 특허 및 간행물 모두는 본 발명이 속한 기술 분야에서의 당업자의 수준을 나타낸 것이다. 모든 특허 및 간행물은 마치 각 개별 간행물이 특이적으로 또한 개별적으로 참고문헌에 의해 통합된 것을 나타내는 것과 동일한 정도로 본 명세서에서 원용에 의해 통합되어 있다.

[0435]

미국특허 제5,440,013호

[0436]

미국특허 제5,618,914호

[0437]

미국특허 제5,670,155호

[0438]

미국특허 제5,446,128호

[0439]

미국특허 제5,710,245호

[0440]

미국특허 제5,840,833호

[0441]

미국특허 제5,859,184호

[0442]

미국특허 제5,929,237호

[0443]

미국특허 제5,475,085호

[0444]

미국특허 제5,672,681호

[0445]

미국특허 제5,674,976호

[0446]

미국특허 제4,554,101호

[0447]

국제출원 제PCT/US07/75343호

[0448]

**[비특허문헌]**

[0449]

Bendtsen, J. D., H. Nielsen, H. G. von, and S. Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:783-795.

[0450]

Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294:1351-1362.

[0451]

Bzymek, M. and S. T. Lovett. 2001. Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in

multiple mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98:8319-8325.

- [0452] Chen, S. M., X. J. Yu, V. L. Popov, E. L. Westerman, F. G. Hamilton, and D. H. Walker. 1997. Genetic and antigenic diversity of *Ehrlichia chaffeensis*: comparative analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains. J. Infect. Dis. 175:856-863.
- [0453] Chen, S. M., V. L. Popov, H. M. Feng, and D. H. Walker. 1996. Analysis and ultrastructural localization of *Ehrlichia chaffeensis* proteins with monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54:405-412.
- [0454] Collins, N. E., J. Liebenberg, E. P. de Villiers, K. A. Brayton, E. Louw, A. Pretorius, F. E. Faber, H. H. van, A. Josemans, K. M. van, H. C. Steyn, M. F. van Strijp, E. Zweggarth, F. Jongejan, J. C. Maillard, D. Berthier, M. Botha, F. Joubert, C. H. Corton, N. R. Thomson, M. T. Allsopp, and B. A. Allsopp. 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 102:838-843.
- [0455] Doyle, C. K., A. M. Cardenas, D. M. Aguiar, M. B. Labruna, L. M. Ndip, X. J. Yu, and McBride J.W. 2006. Molecular characterization of *E. canis* gp36 and *E. chaffeensis* gp47 tandem repeats among different geographic locations. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1063.
- [0456] Doyle, C. K., K. A. Nethery, V. L. Popov, and J. W. McBride. 2006. Differentially expressed and secreted major immunoreactive protein orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* elicit early antibody responses to epitopes on glycosylated tandem repeats. Infect. Immun. 74:711-720.
- [0457] Dunning Hotopp, J. C., M. Lin, R. Madupu, J. Crabtree, S. V. Angiuoli, J. Eisen, R. Seshadri, Q. Ren, M. Wu, T. R. Utterback, S. Smith, M. Lewis, H. Khouri, C. Zhang, H. Niu, Q. Lin, N. Ohashi, N. Zhi, W. Nelson, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, J. Sundaram, S. C. Daugherty, T. Davidsen, A. S. Durkin, M. Gwinn, D. H. Haft, J. D. Selengut, S. A. Sullivan, N. Zafar, L. Zhou, F. Benahmed, H. Forberger, R. Halpin, S. Mulligan, J. Robinson, O. White, Y. Rikihisa, and H. Tettelin. 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. PLoS Genet. 2:e21.
- [0458] Frutos, R., A. Viari, C. Ferraz, A. Morgat, S. Eychenie, Y. Kandassamy, I. Chantal, A. Bensaid, E. Coissac, N. Vachery, J. Demaille, and D. Martinez. 2006. Comparative genomic analysis of three strains of *Ehrlichia ruminantium* reveals an active process of genome size plasticity. J Bacteriol 188:2533-2542.
- [0459] Garcia-Ortega, L., I. R. De, V, A. Martinez-Ruiz, M. Onaderra, J. Lacadena, P. A. Martinez del, and J. G. Gavilanes. 2005. Anomalous electrophoretic behavior of a very acidic protein: ribonuclease U2. Electrophoresis 26:3407-3413.
- [0460] Graceffa, P., A. Jancso, and K. Mabuchi. 1992. Modification of acidic residues normalizes sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of caldesmon and other proteins that migrate anomalously. Arch. Biochem. Biophys. 297:46-51.
- [0461] Johannesson *et al.*, 1999, "Bicyclic tripeptide mimetics with reverse turn inducing properties." J. Med. Chem. 42:601-608.
- [0462] Julenius, K., A. Molgaard, R. Gupta, and S. Brunak. 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. Glycobiology 15:153-164.
- [0463] Lin, M., A. den Dulk-Ras, P. J. Hooykaas, and Y. Rikihisa. 2007. Anaplasma phagocytophilum AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. Cell Microbiol. 9:2644-2657.
- [0464] Mavromatis, K., C. K. Doyle, A. Lykidis, N. Ivanova, M. P. Francino, P. Chain, M. Shin, S. Malfatti, F. Larimer, A. Copeland, J. C. Detter, M. Land, P. M. Richardson, X. J. Yu, D. H. Walker, J. W. McBride, and N. C. Kyrpides. 2006. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. J Bacteriol

188:4015-4023.

- [0465] McBride J.W., C. K. Doyle, X. F. Zhang, A. M. Cardenas, V. L. Popov, K. A. Nethery, and M. E. Woods. 2006. *Ehrlichia canis* 19-kDa glycoprotein ortholog of *E. chaffeensis* variable length PCR target contains a single serine-rich epitope defined by a carbohydrate immunodeterminant. *Infect.Immun.*
- [0466] McBride JW, R. E. Corstvet, S. D. Gaunt, C. Boudreaux, T. Guedry, and D. H. Walker. 2003. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect.Immun.* 71:2516-2524.
- [0467] McBride, J. W., J. E. Comer, and D. H. Walker. 2003. Novel immunoreactive glycoprotein orthologs of *Ehrlichia* spp. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990:678-684.
- [0468] McBride, J. W., L. M. Ndip, V. L. Popov, and D. H. Walker. 2002. Identification and functional analysis of an immunoreactive DsbA-like thio-disulfide oxidoreductase of *Ehrlichia* spp. *Infect. Immun.* 70:2700-2703.
- [0469] McBride, J. W., R. E. Corstvet, E. B. Breitschwerdt, and D. H. Walker. 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. *J. Clin. Microbiol.* 39:315-322.
- [0470] McBride, J. W., X. J. Yu, and D. H. Walker. 1999. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnostic antigen. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 6:392-399.
- [0471] McBride, J. W., X. J. Yu, and D. H. Walker. 2000. Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *E. canis*. *Infect. Immun.* 68:13-18.
- [0472] McBride, J. W., X. Yu, and D. H. Walker. 2000. A conserved, transcriptionally active p28 multigene locus of *Ehrlichia canis*. *Gene* 254:245-252.
- [0473] Munodzana, D., T. F. McElwain, D. P. Knowles, and G. H. Palmer. 1998. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infection & Immunity* 66:2619-2624.
- [0474] Nethery, K. A., C. K. Doyle, B. L. Elsom, N. K. Herzog, V. L. Popov, and J. W. McBride. 2005. Ankyrin repeat containing immunoreactive 200 kD glycoprotein (gp200) orthologs of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis* are translocated to the nuclei of infected monocytes, p. 0-60. In 4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Longrono, Spain.
- [0475] Nethery, K. A., C. K. Doyle, X. Zhang, and J. W. McBride. 2007. *Ehrlichia canis* gp200 contains dominant species-specific antibody epitopes in terminal acidic domains. *Infect. Immun.* 75:4900-4908.
- [0476] Ohashi, N., N. Zhi, Q. Lin, and Y. Rikihisa. 2002. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infect. Immun.* 70:2128-2138.
- [0477] Paddock, C. D. and J. E. Childs. 2003. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:37-64..
- [0478] Popov, V. L., X. J. Yu, and D. H. Walker. 2000. The 120-kDa outer membrane protein of *Ehrlichia chaffeensis*: preferential expression on dense-core cells and gene expression in *Escherichia coli* associated with attachment and entry. *Microb. Path.* 28:71-80..
- [0479] Rikihisa, Y., S. A. Ewing, J. C. Fox, A. G. Siregar, F. H. Pasaribu, and M. B. Malole. 1992. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *J. Clin. Microbiol.* 30:143-148.
- [0480] Singu, V., H. Liu, C. Cheng, and R. R. Ganta. 2005. *Ehrlichia chaffeensis* expresses macrophage- and tick cell-specific 28-kilodalton outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 73:79-87.
- [0481] Sumner, J. W., J. E. Childs, and C. D. Paddock. 1999. Molecular cloning and characterization of the *Ehrlichia chaffeensis* variable-length PCR target: an antigen-expressing gene that exhibits interstrain

variation. J. Clin. Microbiol. 37:1447-1453.

- [0482] Vita *et al.*, 1998, "Novel miniproteins engineered by the transfer of active sites to small natural scaffolds." Biopolymers 47:93-100.
- [0483] Weisshoff *et al.*, 1999, "Mimicry of beta II'turns of proteins in cyclic pentapeptides with one and without D-amino acids." Eur. J. Biochem. 259:776-788.
- [0484] Yabsley, M. J., S. E. Little, E. J. Sims, V. G. Dugan, D. E. Stallknecht, and W. R. Davidson. 2003. Molecular variation in the variable-length PCR target and 120-kilodalton antigen genes of *Ehrlichia chaffeensis* from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). J. Clin. Microbiol. 41:5202-5206.
- [0485] Yu, X. J., J. W. McBride, C. M. Diaz, and D. H. Walker. 2000. Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. J.Clin.Microbiol. 38:369-374.
- [0486] Yu, X. J., J. W. McBride, X. F. Zhang, and D. H. Walker. 2000. Characterization of the complete transcriptionally active *Ehrlichia chaffeensis* 28 kDa outer membrane protein multigene family. Gene 248:59-68.
- [0487] Yu, X. J., P. A. Crocquet-Valdes, L. C. Cullman, V. L. Popov, and D. H. Walker. 1999. Comparison of *Ehrlichia chaffeensis* recombinant proteins for serologic diagnosis of human monocytotropic ehrlichiosis. J.Clin.Microbiol. 37:2568-2575.
- [0488] Yu, X. J., P. Crocquet-Valdes, and D. H. Walker. 1997. Cloning and sequencing of the gene for a 120-kDa immunodominant protein of *Ehrlichia chaffeensis*. Gene 184:149-154.
- [0489] Yu, X. J., P. Crocquet-Valdes, L. C. Cullman, and D. H. Walker. 1996. The recombinant 120-kilodalton protein of *Ehrlichia chaffeensis*, a potential diagnostic tool. J.Clin.Microbiol. 34:2853-2855.
- [0490] Yu, X., J. F. Piesman, J. G. Olson, and D. H. Walker. 1997. Short report: geographic distribution of different genetic types of *Ehrlichia chaffeensis*. Am.J Trop.Med Hyg. 56:679-680.

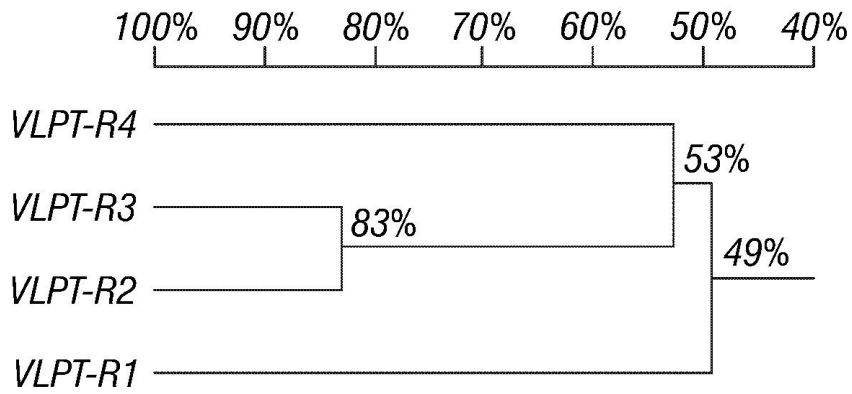
[0491] 본 발명과 그의 장점이 상세히 기술되기는 하였지만, 본 명세서에서 다양한 변화, 치환 및 변형이 첨부된 청구 범위에 의해 정의된 바와 같이 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 만들어질 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 더욱이, 본 출원의 범위를 본 명세서에서 기술된 과정, 기기, 제조, 물질의 조성물, 수단, 방법 및 단계의 특정한 구체예에 제한하려고 의도한 것은 아니다. 당업자의 한 사람이라면 본 발명의 기재로부터 바로 이해할 수 있는 바와 같이, 현재 존재하거나 이후에 개발되어 본 명세서에 기술된 해당하는 구체예와 실질적으로 동일한 기능을 수행하거나 실질적으로 동일한 결과를 달성하는 과정, 기기, 제조, 물질의 조성물, 수단, 방법 또는 단계는 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 따라서, 첨부된 청구범위는 그들의 범위 내에 이러한 과정, 기기, 제조, 물질의 조성물, 수단, 방법 또는 단계를 포함하려고 의도한다.

**도면**

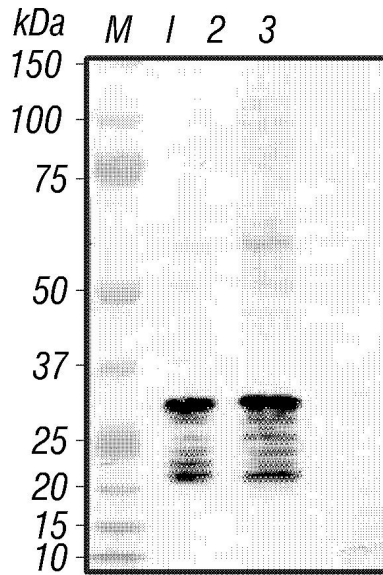
**도면1a**

|                |   |
|----------------|---|
| <b>N (17)</b>  | MSQFSEDNMGNIQMPFD   |
| <b>R4 (30)</b> | SDSHEPSHLELPSLSEEVIQLES DLQSSN                                      |
| <b>R3 (30)</b> | SDLHGFSVELFDPFKEAVQLGNDLQSSD  |
| <b>R2 (30)</b> | SDLHGFSVELFDPSKEEVQLES DLQSSN                                       |
| <b>R1 (30)</b> | SDLHESSFVELPGPSKEEVQFEDDAKNVVY                                      |
| <b>C (61)</b>  | GQDHVSLSELG LLLGGVFSTMN YLSGYTPY<br>YHHYCCYNPYY YFDYVTPDYCHHCSESSLE |

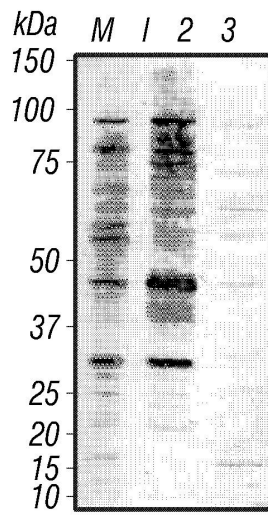
도면1b



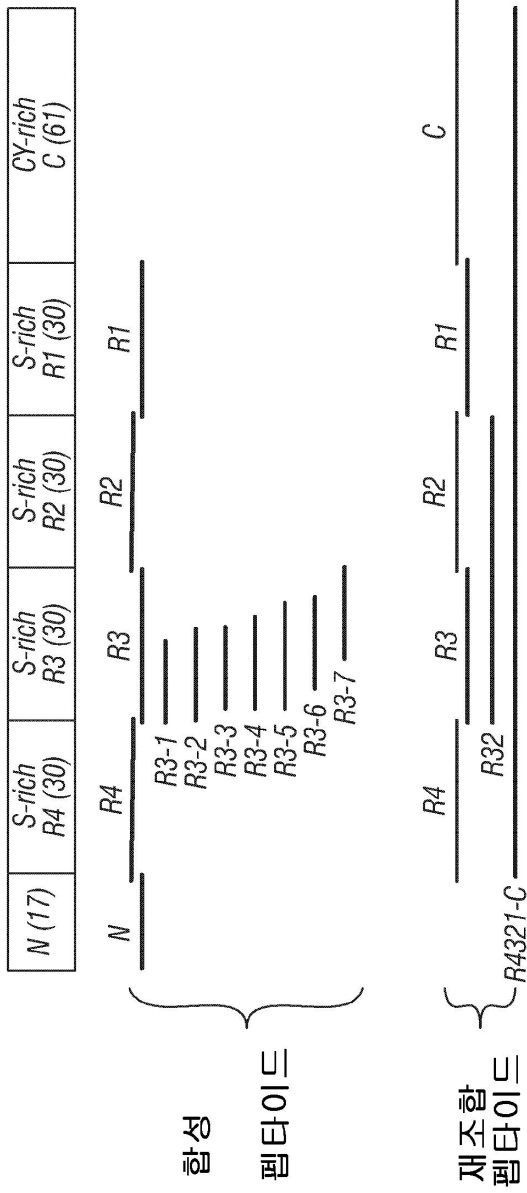
도면2a



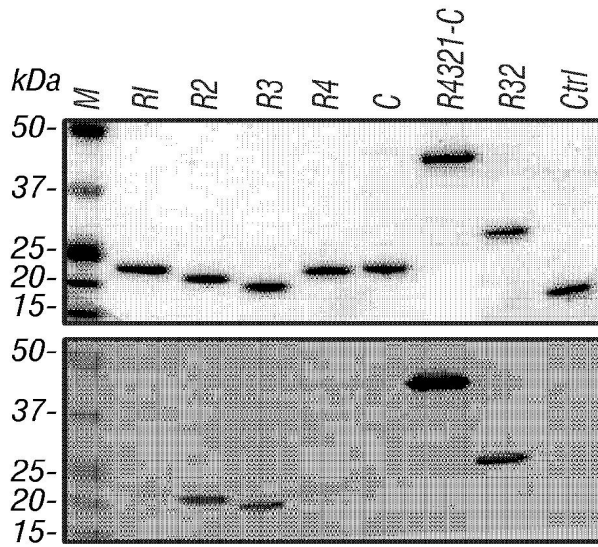
도면2b



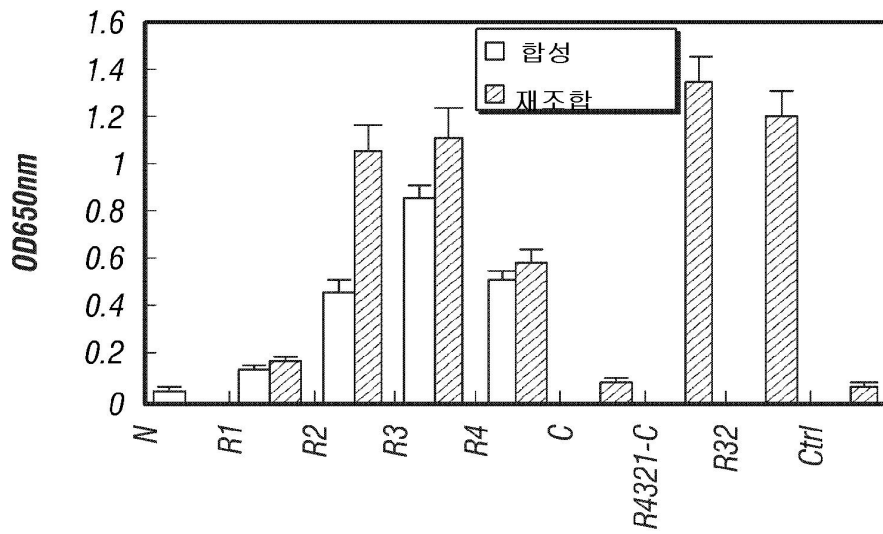
도면3



도면4a



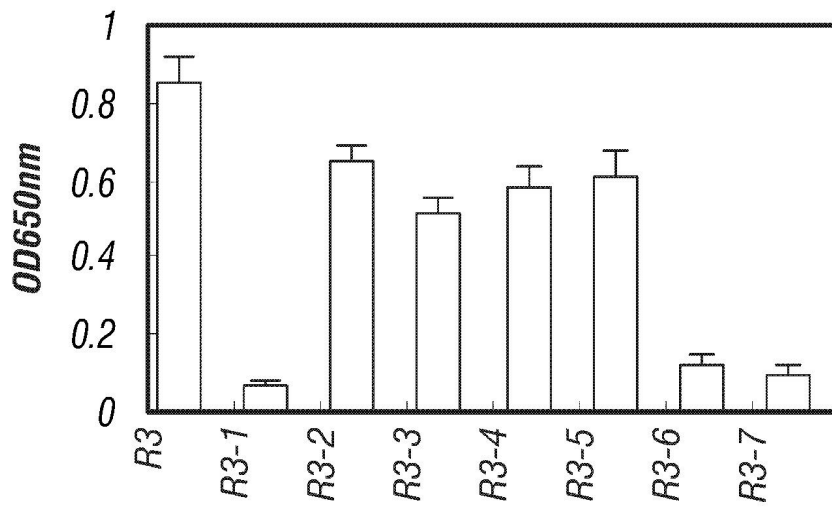
도면4b



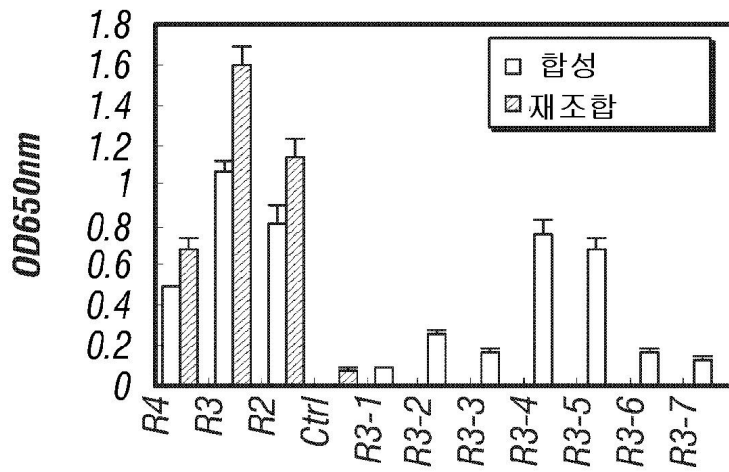
도면5a

**R3 (30)      SDLHGFSVVELFDPFKEAVQLGNDLQQSSD**  
**R3-1 (14)    SDLHGFSVVELFDP**  
**R3-2 (17)    SDLHGFSVVELFDPFKE**  
**R3-3 (14)      HGSFSVVELFDPFKE**  
**R3-4 (17)      HGSFSVVELFDPFKEAVQ**  
**R3-5 (20)      HGSFSVVELFDPFKEAVQLGN**  
**R3-6 (16)            VELFDPFKEAVQLGND**  
**R3-7 (16)                FKEAVQLGNDLQQS**

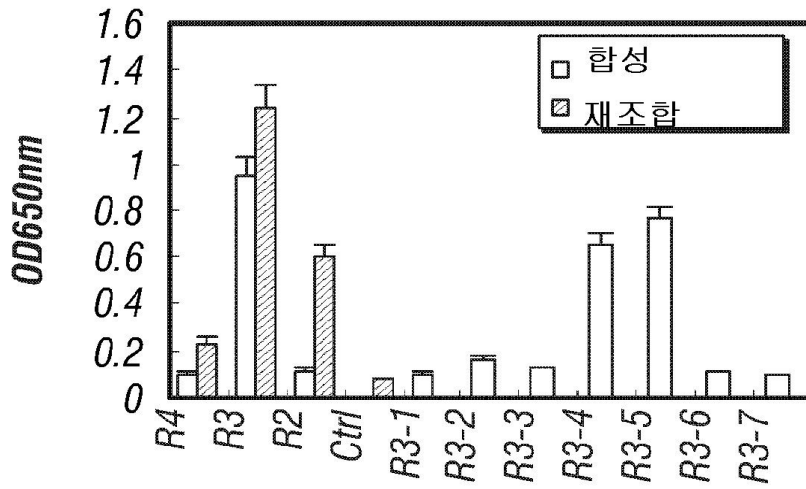
도면5b



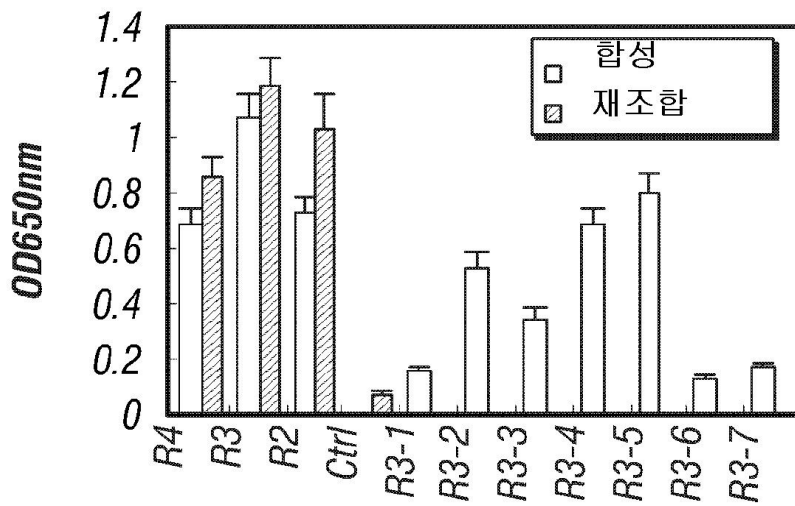
도면6a



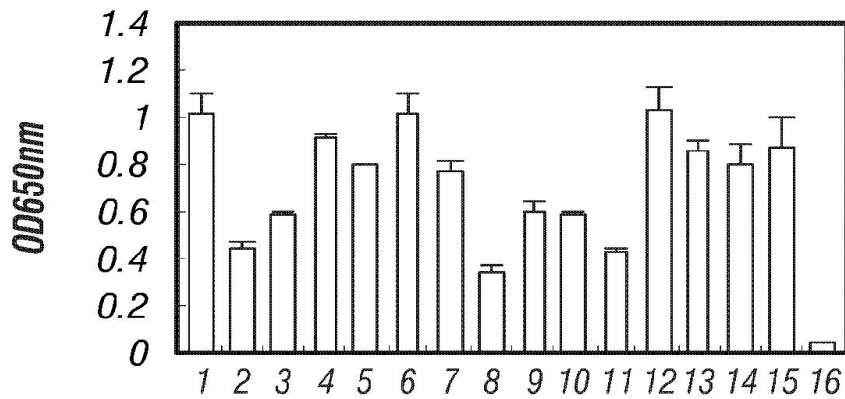
도면6b



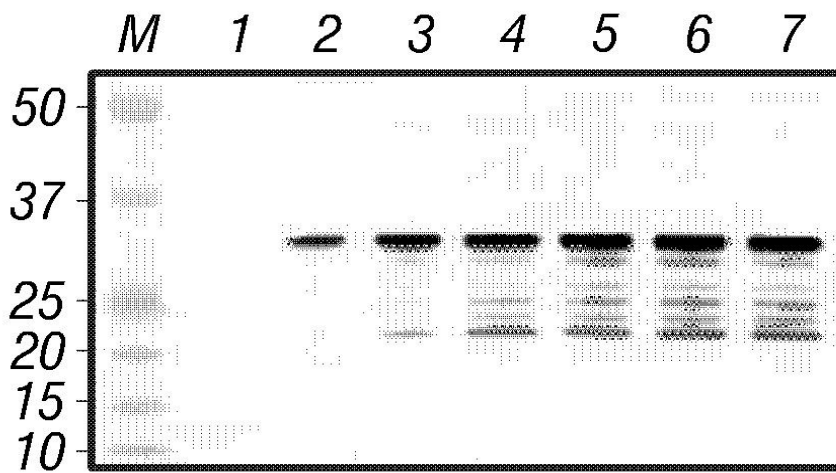
도면6c



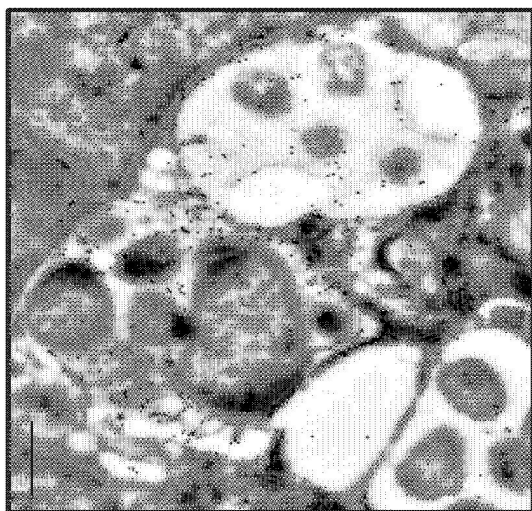
도면6d



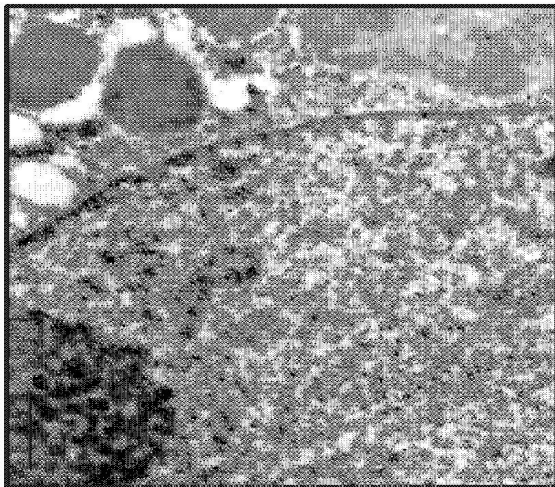
도면7



도면8a



도면8b



서열목록

<110> Research Development Foundation

McBride, Jere W.

Luo, Tian

<120> VACCINES AND DIAGNOSTICS FOR THE EHRLICHIOSES

<130> AO-CLFR:303WO

<140> PCT/US2009/030527

<141> 2009-01-09

<150> 61/020,379

<151> 2008-01-10

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 198

<212> PRT

<213> Ehrlichia chaffeensis

<400> 1

Met Ser Gln Phe Ser Glu Asp Asn Met Gly Asn Ile Gln Met Pro Phe

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Ser His Glu Pro Ser His Leu Glu Leu Pro Ser Leu Ser

20                    25                    30

Glu Glu Val Ile Gln Leu Glu Ser Asp Leu Gln Gln Ser Ser Asn Ser  
 35 40 45

Asp Leu His Gly Ser Phe Ser Val Glu Leu Phe Asp Pro Phe Lys Glu  
 50 55 60

Ala Val Gln Leu Gly Asn Asp Leu Gln Gln Ser Ser Asp Ser Asp Leu  
 65 70 75 80

His Gly Ser Phe Ser Val Glu Leu Phe Asp Pro Ser Lys Glu Glu Val  
 85 90 95

Gln Leu Glu Ser Asp Leu Gln Gln Ser Ser Asn Ser Asp Leu His Glu  
 100 105 110

Ser Ser Phe Val Glu Leu Pro Gly Pro Ser Lys Glu Glu Val Gln Phe  
 115 120 125

Glu Asp Asp Ala Lys Asn Val Val Tyr Gly Gln Asp His Val Ser Leu  
 130 135 140

Ser Glu Leu Gly Leu Leu Leu Gly Gly Val Phe Ser Thr Met Asn Tyr  
 145 150 155 160

Leu Ser Gly Tyr Thr Pro Tyr Tyr Tyr His His Tyr Cys Cys Tyr Asn  
 165 170 175

Pro Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Val Thr Pro Asp Tyr Cys His His Cys  
 180 185 190

Ser Glu Ser Ser Leu Glu  
 195

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 2

Met Ser Gln Phe Ser Glu Asp Asn Met Gly Asn Ile Gln Met Pro Phe  
 1 5 10 15

Asp

<210> 3  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 3  
 Ser Asp Ser His Glu Pro Ser His Leu Glu Leu Pro Ser Leu Ser Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Val Ile Gln Leu Glu Ser Asp Leu Gln Gln Ser Ser Asn  
                   20                   25                   30

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 4  
 Ser Asp Leu His Gly Ser Phe Ser Val Glu Leu Phe Asp Pro Phe Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Ala Val Gln Leu Gly Asn Asp Leu Gln Gln Ser Ser Asp  
                   20                   25                   30

<210> 5  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic peptide  
 <400> 5  
 Ser Asp Leu His Gly Ser Phe Ser Val Glu Leu Phe Asp Pro Ser Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Glu Val Gln Leu Glu Ser Asp Leu Gln Gln Ser Ser Asn  
                   20                   25                   30

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 6

Ser Asp Leu His Glu Ser Ser Phe Val Glu Leu Pro Gly Pro Ser Lys

1                    5                    10                    15

Glu Glu Val Gln Phe Glu Asp Asp Ala Lys Asn Val Val Tyr

                  20                    25                    30

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 7

Ser Asp Leu His Gly Ser Phe Ser Val Glu Leu Phe Asp Pro

1                    5                    10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 8

Ser Asp Leu His Gly Ser Phe Ser Val Glu Leu Phe Asp Pro Phe Lys

1                    5                    10                    15

Glu

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 9

His Gly Ser Phe Ser Val Glu Leu Phe Asp Pro Phe Lys Glu

1                    5                    10

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 10

His Gly Ser Phe Ser Val Glu Leu Phe Asp Pro Phe Lys Glu Ala Val

1                    5                    10                    15

Gln

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> synthetic peptide

<400> 11

His Gly Ser Phe Ser Val Glu Leu Phe Asp Pro Phe Lys Glu Ala Val

1                    5                    10                    15

Gln Leu Gly Asn

20

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 12

Val Glu Leu Phe Asp Pro Phe Lys Glu Ala Val Gln Leu Gly Asn Asp

1                    5                    10                    15

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 13

Phe Lys Glu Ala Val Gln Leu Gly Asn Asp Leu Gln Gln Ser Ser Asp

1                    5                    10                    15

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 14

His Glu Pro Ser His Leu Glu Leu Pro Ser Leu Ser Glu Glu Val Ile

1                    5                    10                    15

Gln Leu Glu Ser

20

<210> 15

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 15

Gly Gln Asp His Val Ser Leu Ser Glu Leu Gly Leu Leu Leu Gly Gly

1                    5                    10                    15

Val Phe Ser Thr Met Asn Tyr Leu Ser Gly Tyr Thr Pro Tyr Tyr Tyr

20                    25                    30

His His Tyr Cys Cys Tyr Asn Pro Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Val Thr

35                    40                    45

Pro Asp Tyr Cys His His Cys Ser Glu Ser Ser Leu Glu

50                    55                    60

<210> 16

<211> 805

<212> DNA

<213> Ehrlichia chaffeensis

<400> 16

tttatattta tatatgatta atatataatg ataatggtat gtggttataa ctgcttatta 60

gttgatcatg tacctgtgtg ttatgttaaa tagggtataa atatgtcaca attctctgaa 120  
gataatatgg gtaatataca aatgcctttt gattctgatt cacatgagcc ttctcatctt 180  
gagctaccta gtctttctga agaagtgatt caattagaga gtgatctaca acaatcttct 240  
aattctgatt tacacgggtc tttttctggt gaggattttg atccttttaa agaagcagtt 300  
caattgggga atgatctaca acaatcttct gattctgatt tacacgggtc tttttctggt 360

gaggattttg atccttctaa agaagaagtt caattggaga gtgatctaca acaatcttct 420  
aattctgatt tacacgagtc ttcttttgtt gaggttacctg gtccttcaa agaagaagtt 480  
caattcgaag atgatgctaa aatgtagta tatggacaag accatgtagg tttatctgaa 540  
ttaggccttat tggtaggtgg tgtttttagt acaatgaatt atttgtctgg ttatacaccg 600  
tattattatc atcattattg ttgttataat ctttattatt attttgatta tgttactcca 660  
gattattgtc atcactgtag tgaaagtagt ttagagtagg atatttagaa atataaatgg 720  
ttgttgactt cacaaaaggt gtagttttat atgttttatg ctgttttata gtgttataag 780

gatatgagtt gtttttacta ttttt 805

<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic primer  
<400> 17

tctgattcac atgagccttc 20

<210> 18  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic primer  
<400> 18

attagaagat tgtttagat cactc 25

<210> 19  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 19  
 tctgatttac acgggtctt 19  
 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 20  
 atcagaagat tgtttagat cat 23  
 <210> 21  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 21  
 tctgatttac acgggtctt 19  
 <210> 22  
 <211> 25  
  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 22  
 attagaagat tgtttagat cactc 25  
 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 23  
 tctgatttac acgagtcttc t 21  
 <210> 24  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer  
 <400> 24  
 atatactaca ttttagcat catcttc 27

<210> 25  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 25  
 ggacaagacc atgttagttt 20

<210> 26  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 26  
 ctctaaacta ctttcactac agtg 24

<210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 27  
 tctgattcac atgagccttc 20

<210> 28  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 28  
 ctctaaacta ctttcactac agtg 24

<210> 29  
 <211> 19

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 29  
 tctgatttac acgggtctt 19  
 <210> 30  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 30  
 attagaagat tgtttagat cactc 25  
  
 <210> 31  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 31  
 cagggaccgc gttcttctaa ttctgattta cacgg 35  
 <210> 32  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic primer  
 <400> 32  
 ggcaccagag cgtttaatt agaagattgt ttagatcac tc 42