



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0090509
(43) 공개일자 2017년08월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) **C07K 7/06** (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/1037 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7020523
- (22) 출원일자(국제) 2015년12월21일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년07월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/080738
- (87) 국제공개번호 WO 2016/102434
 국제공개일자 2016년06월30일
- (30) 우선권주장
 14199588.6 2014년12월22일
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
모르포시스 아게
 독일 프라네그 디-82152, 제멜바이스스트라쎄 7
- (72) 발명자
어반, 요하네스 허버트
 독일 뮌헨 81373 크렐러스트라쎄 3
무스마이어, 마커스 안드레아스
 독일 란다우 에이.디. 이자르 94405 이잘란데 4에
 이
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
허용록

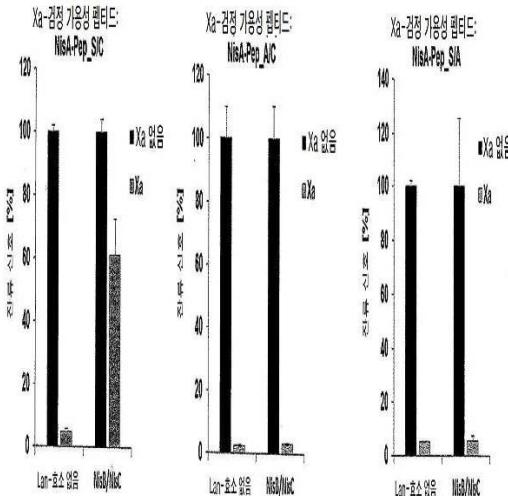
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **박테리오파지 입자 상에서의 고리형 웹티드의 신규한 디스플레이 방법**

(57) 요 약

본 발명은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웹티드 및 그의 무리의 디스플레이 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

C07K 7/08 (2013.01)

(72) 발명자

보스마, 티베

네덜란드 에이치피 리펜휴이젠 8408 드 뷔오렌 100

프라슬러, 요세프

독일 거머링 82110 크라이거스트라쎄 8에이

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 전구체 고리형 웨티드를 인코드하는 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포를 제공하는 단계;
- (b) 상기 전구체 고리형 웨티드의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 단계;
- (c) 전구체 고리형 웨티드 내 하나 이상의 아미노산 잔기의 효소성 탈수 단계;
- (d) 상기 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의한 하나 이상의 분자내 결합 형성으로 고리형 웨티드를 형성하는 단계; 및
- (e) 상기 숙주 세포에서의 박테리오파지 입자 생산 단계로서, 여기서 상기 박테리오파지 입자는 표면 상에 상기 고리형 웨티드를 디스플레이하며, 상기 고리형 웨티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 단계

를 포함하는 박테리오파지 입자 표면 상의 고리형 웨티드 디스플레이 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 서열은 박테리오파지 입자의 코트 단백질 및 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열을 추가로 인코드하는 것인 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 번역 후-개질(PTM) 효소를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 추가로 보유하는 것인 방법.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 번역 후-개질(PTM) 효소는 란티웨티드 합성효소인 방법.

청구항 5

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 번역 후-개질(PTM) 효소는 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제 및/또는 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소인 방법.

청구항 6

제 2 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리더 서열은 LanA 전구체 웨티드 유래의 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 웨티드로부터 유도된 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 웨티드 유래의 컨센서스 모티프를 보유하는 리더 서열인 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 리더 서열은 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제, 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소에 의해 인식되는 것인 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 탈수된 아미노산 잔기는 디히드로알라닌(Dha) 또는 디히드로부티린(Dhb)인 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자내 결합은 티오에테르- 또는 라이시노알라닌-가교인 방법.

청구항 10

박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 펩티드를 디스플레이할 수 있는 핵산 서열로서, 상기 핵산은

- (a) 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질;
- (b) 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열, 및
- (c) 전구체 고리형 펩티드

를 인코드하며,

여기서, 전구체 고리형 펩티드를 인코드하는 핵산은 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 위치되어 있고,

상기 전구체 고리형 펩티드는 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 분자내 결합을 형성할 수 있는 것인 핵산 서열.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 리더 서열은 LanA 전구체 펩티드 유래의 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 펩티드로부터 유도된 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 펩티드 유래의 컨센서스 모티프를 보유하는 리더 서열인 핵산 서열.

청구항 12

제 10 항 또는 제 11 항의 핵산을 함유하는 벡터.

청구항 13

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 방법으로 수득가능한 고리형 펩티드를 그의 표면 상에서 디스플레이하는 박테리오파지 입자.

청구항 14

제 21 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 상기 박테리오파지 입자는 고리형 펩티드의 다양한 무리들로부터 한 고리형 펩티드를 디스플레이하고, 여기서 상기 고리형 펩티드들이 하나 이상의 탈수 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함하는 것인, 박테리오파지 입자의 다양한 무리.

청구항 15

(a) 제 25 항의 박테리오파지 입자의 다양한 무리를 제공하는 단계; 및

(b) 상기 다양한 무리의 스크리닝 및/또는 상기 다양한 무리로부터의 선별로, 상기 원하는 특성을 가진 고리형 펩티드를 디스플레이하는 적어도 하나의 박테리오파지 입자를 수득하는 단계

를 포함하는, 원하는 특성을 가진 고리형 펩티드의 수득 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 파지 코트 단백질의 C-말단에서의 박테리오파지 입자 표면 상의 고리형 펩티드 디스플레이 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고리형 펩티드는 등근 고리 구조를 취한 폴리펩티드 사슬로, 다중적 생물학적 활성, 예를 들어 항박테리아 활성, 면역억제 활성 또는 항종양 활성을 갖는 것으로 공지되어 있다. 자연에서 발견되는 여러 고리형 펩티드는 항-박테리아 그라미시딘 에스(anti-bacterials gramicidin S), 타이로시딘(tyrocidine), 및 반코마이신(vancomycin), 또는 면역억제 활성을 가진 시클로스포린 에이(cyclosporine A)와 같은 임상에서 이용된다. 생물

학적 활성을 가진 천연 고리형 웨티드에 힘입어, 유전자적 및 합성 방법의 두 가지 모두로 인공 고리형 웨티드를 개발해 보려 노력해 왔다.

- [0003] 부상하고 있는 고리형 구조를 가진 생체 분자 계열은 리보솜 합성 웨티드인데, 이는 생물학적 활성 웨티드 형성을 위해 광범위한 번역 후-개질을 필요로 한다. 대부분의 리보솜 합성 천연 웨티드는 리더- 및 코어-웨티드로 구성된 전구체로서 번역된다. 리더는 인식 서열로서 제공되며, 코어 웨티드의 특정 잔기에 번역 후-개질(PTMs)을 설치할 효소 기구를 유인한다.
- [0004] 이로써, 번역 후-개질, 예를 들어 이종성- 또는 거대고리화, 탈수, 아세틸화, 글리코실화, 할로겐화, 프레닐화 및 에피머화가 그러한 웨티드의 생물학적 활성을 야기할 뿐 아니라, 그러한 웨티드 계열의 수 많은 대표적 부재에서 발견되는 탁월한 안정성에 직접 기여하여, 그들이 약물 개발에 매력적인 후보자가 되도록 한다.
- [0005] 란티웨티드 및 란티바이오틱은 그람-양성 박테리아에 의해 생산되며, 본래 그에 작용하는 독특한 리보솜 합성 및 번역 후-개질 항생제 웨티드의 한 무리를 형성한다(리뷰에 대해서는, 하기 문헌 참조: Knerr and van der Donk, Annu. Rev. Biochem. 2012. 81:479-505). 천연 란티바이오틱, 예를 들어 니신(nisin) 또는 서브릴리신이 연구가 잘 되어 있으며, 치즈와 같은 낙농 제품 제조 및 보존을 위한 식품 산업에 상용용으로 이용된다.
- [0006] 항미생물 활성을 가진 웨티드의 하위계열로서의 란티웨티드 및 란티바이오틱은 해당 웨티드를 단백질가수분해성 분해로부터 보호하고, 중대된 열안정성을 부여하는 티오에테르 아미노산 란티오닌(Lan) 및 3-메틸란티오닌(MeLan)에 의해 형성되는 분자간 티오에테르-가교 또는 고리를 포함한다. 티오에테르-가교 설치는 각각 세린 또는 트레오닌의 불포화 디히드로알라닌(Dha) 및 디히드로부티린(Dhb)으로의 효소성 탈수에 이은 시스테인 티올의 분자간 마이클-유형 첨가(Michael-type addition)와 함께 개시되며, 란티웨티드 합성효소에 의해 매개된다(클래스 I에 대해서는 LanB 및 LanC, 클래스 II에 대해서는 LanM, 클래스 III에 대해서는 LanKC, 클래스 IV에 대해서는 LanL). 클래스 I 란티웨티드에서, 세린/트레오닌 탈수 및 후속하는 고리화는 각각 LanB 유형 디히드라타아제 및 LanC 유형 시클라라아제에 의해 실행되는 반면, 클래스 II 란티웨티드에서는 단일 이중관능성 LanM 유형 효소가 두 반응을 실행한다. 흥미롭게도, 불포화 Dha는 높은 화학 반응성을 갖고 있으며, 약한 염기성 조건 하에서는 시스테인 또는 라이신의 측쇄와 쉽게 반응하여 각각 비-입체선택성 티오에테르-가교 및 라이시노알라닌-가교를 제공한다. 클래스 III 및 클래스 IV 란티웨티드의 생합성은 각각 다중관능성 LanKC 및 LanL 유형 효소에 의해 뒷받침되는데, 이는 아미노-말단 포스포-Ser/포스포-Thr 라이아제 도메인, 중앙 키나아제형 도메인 및 카르복시-말단 LanC-형 도메인(시클라라아제)을 특징으로 한다(van der Donk 등, 2014 Current Opinion in Structural Biology 2014, 29:58-66).
- [0007] 지난 몇 년에 걸쳐 란티웨티드 생합성의 원리는 고리형 구조를 가진 인공 생물활성 웨티드의 발견 및 생성을 위해 더욱더 적합화되었다.
- [0008] 2004년에 최초로 란티웨티드-합성 효소들이, 유리하게는 PTM, 예를 들어 티오에테르-가교를, 웨티드의 안정성 개선 및/또는 그의 활성 변경을 위해 정상적으로는 개질되지 않는 웨티드들에 도입하기 위해 이용될 수 있음이 제안되었다(Kuipers 등, 2004. J. Biol. Chem. 279, 22176-22182). WO2006/062398에서는, 관심대상의 웨티드가 통상적 란티바이오틱 효소 복합체의 부분이 아닌 단리된 란티바이오틱 디히드라타아제, 예를 들어 LanB에 의해 숙주 세포에서 탈수될 수 있음을 나타내었다. 개질된 티오에테르-가교 포함 웨티드가 그의 천연 숙주에서 추정되는 란티바이오틱 수송자 이외의 단백질 배출 시스템에 의해 분비될 수 있음이 추가로 증명되었다.
- [0009] 이후, WO2012/005578에서는 티오에테르-가교 포함 웨티드가 란티바이오틱을 위한 생합성 및 배출 기구를 발현하는 숙주 세포(예를 들어, 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*))의 표면에 의해 쉽게 생산되고 그 위에서 디스플레이될 수 있음이 증명되었다.
- [0010] 더 구체적으로, WO2012/005578은 N-말단 란티바이오틱 리더 서열, 탈수잔기- 또는 티오에테르-포함 폴리웨티드 및 C-말단 하전 막 고정 도메인으로 번역 후-개질되는 관심대상의 아미노산 서열을 포함하는 융합 웨티드를 인코드하는 발현 벡터를 제공한다. 원하는 활성을 가진 고리화된 웨티드를 스크리닝하기 위한 디스플레이 라이브러리가 제안되었다. 그러나, 본래 란티바이오틱을 생산할 수 있는 그람-양성 숙주 세포, 특별하게는 락트산 박테리아 상에서의 디스플레이만이 가능하게 되었다.
- [0011] 당업계에 공지된 여타 디스플레이 시스템, 예를 들어 상이한 단백질 배출 기구를 가진 그람-음성 박테리아를 필요로 하는 과지 디스플레이를 대안으로 간주되지 않으며, 따라서 선행기술에서 가능한 것이 아니다.
- [0012] 필라멘트형 과지가 그의 유전자 III 단백질(pIII)에 삽입되는 외래 단백질 단편을 용인하며, 또한 과지 표면 상에 단백질 단편들을 제시한다는 증명을 기반으로 1985년에 과지 디스플레이 역사가 시작되었다(Smith, 1985).

Ladner는 그러한 개념을 파지 표면 상에서 디스플레이된 (폴리)펩티드 및/또는 단백질의 레퍼토리의 스크리닝까지 확장했으며(WO1988/06630; WO1990/02809), 그 아래로 파지 디스플레이의 극적인 진전을 겪고, 그 결과 실질적 성과를 제공했다. (폴리)펩티드/단백질 파지-디스플레이 라이브러리를 구축 및 스크리닝하기 위한 다양한 포맷이 개발되었으며, 수 많은 검토 논평 및 논문이 그러한 개발을 다루며 요약했다(예를 들어, Kay 등, 1996; Dunn, 1996; McGregor, 1996). 웹티드 또는 단백질을 필라멘트성 박테리오파지 표면에 고정하기 위해, 대부분 파지 코트 단백질에 대한 유전자 융합이 채용되었다. 유전자 III 단백질에 대한 융합(Parmley & Smith, 1988) 또는 그의 단편에 대한 융합(Bass 등, 1990), 및 유전자 VIII 단백질에 대한 융합(Greenwood 등, 1991)이 바람직하다. 어떤 경우에는, 유전자 VI이 이용되었으며(Jespers 등, 1995), 최근에는 유전자 VII 및 유전자 IX의 조합이 Fv 단편들의 디스플레이에 이용되었다(Gao 등, 1999).

[0013] 이제까지 오직 디설파이드 결합을 통해 안정화된 선형 (폴리)펩티드 및 고리형 웹티드가 파지 상에서 성공적으로 디스플레이되지 않았다(참고문헌은, WO2000/077194, WO2009/098450). 더욱 최근에는, WO2012/019928에서 pIII의 N-말단에 융합된 마이크로비비리딘 K의 선형 전구체가 파지 상에서 디스플레이되었다. 디스플레이된 선형 전구체의 번역 후-개질은 세포의 동일계통 개질 효소들을 포함하는 세포 분해물과의 후속 인큐베이션에 의해 달성되었다. 그러나, WO2012/019928은 란티펩티드의 디스플레이를 위한 이용가능한 개시 내용을 제공하지 않으며, 파지 조립에 앞서 번역 후-개질을 겪은 웹티드의 디스플레이를 교시하지 않는다.

[0014] 따라서, 박테리아 유래 고리형 번역 후-개질 웹티드의 디스플레이를 클래식 파지 디스플레이로 번역할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 선행기술에서 박테리아 상에서의 티오에테르-가교 포함 웹티드의 디스플레이는 성공적으로 증명되었다. 그러나, 디스플레이용 박테리아 이용으로 심각한 단점이 동반된다. 예를 들어, 그램-양성 박테리아, 예를 들어 락토바실러스 락티스(*L. lactis*)는 전기천공시 형질전환 효율이 감소되며, 그의 취급을 어렵고 불안정하게 만드는 군집 형성의 경향이 있다. 따라서, 락토바실러스 락티스를 통해 디스플레이된 라이브러리는 다양성이 약 10^6 을 초과하지 못하며, 이에 반해 통상적 파지 디스플레이의 10^{12} 가지를 초과하는 상이한 클론을 갖는 것으로 공지되어 있다.

[0016] 따라서, 본 개시 내용에서 다룰 기술적인 문제는 파지 입자 상에 고리형 웹티드의 디스플레이를 가능케 할 단순하며 신뢰감 있는 시스템을 개발하는 것이다. 그러한 기술적 문제에 대한 해법은 본원에서 특징을 기술한 구현 예를 제공함으로써 달성된다. 본 개시 내용은 고리형 웹티드를 파지 코트 단백질의 C-말단에 부착시키고, 상기 고리형 웹티드의 파지 표면 상에서의 디스플레이를 가능케 한다. 그와 같은 C-말단 파지 디스플레이의 pVIII 상에서의 선형 웹티드에 대해 제시되었으며(Heid 등, 2004 & Weiss 등, 2000), 또한 pIII 코트 단백질 상에서도 제시되었으나(Fuh 등, 2000), 파지 코트 단백질의 C-말단을 통한 고리형 웹티드 또는 번역 후-개질 웹티드의 디스플레이의 언급되지도 제안되지도 않았다. 일반적으로, 통상적인 파지 디스플레이의 디스플레이용 파지 코트 단백질의 N-말단을 이용하고, 파지 코트 단백질의 C-말단만을 통해서는 고리형 웹티드가 유효하게 디스플레이될 것으로 예상되지 않는다.

[0017] 더 구체적으로, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는, 박테리오파지 입자 상에서의 고리형 웹티드의 디스플레이 방법을 포함한다:

[0018] (a) 전구체 고리형 웹티드를 인코드하는 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포를 제공하는 단계;

[0019] (b) 상기 전구체 고리형 웹티드의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 단계;

[0020] (c) 전구체 고리형 웹티드 내 하나 이상의 아미노산 잔기의 효소성 탈수 단계;

[0021] (d) 상기 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의한 하나 이상의 문자내 결합 형성으로 고리형 웹티드를 형성하는 단계; 및

[0022] (e) 상기 숙주 세포에서의 박테리오파지 입자 생산 단계로서, 여기서 상기 박테리오파지 입자는 표면 상에 상기 고리형 웹티드를 디스플레이하며, 상기 고리형 웹티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 단계.

- [0023] 한 양태에서, 고리형 웨티드는 하나 이상의 탈수된 잔기들의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함한다. 또 다른 양태에서, 고리형 웨티드는 하나 이상의 탈수된 잔기들의 시스테인 잔기 또는 라이신 잔기에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함한다. 또 다른 양태에서, 고리형 웨티드는 하나 이상의 탈수된 아미노산 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함한다.
- [0024] 따라서, 본 개시 내용은 파지 상에 고리형 웨티드를 디스플레이하도록 한다. 본 개시 내용의 기술적 접근법, 즉 고리형 웨티드를 파지 코트 단백질의 C-말단에 부착시키는 것은 선행기술에서 제공되지도 제안되지도 않았다.
- [0025] 따라서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자의 표면 상에 고리형 웨티드를 디스플레이하는 방법에 관한 것으로, 여기서 상기 고리형 웨티드가 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착된다. 추가적으로, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자의 표면 상에 디스플레이된 고리형 웨티드의 대형 라이브러리의 창출 및 스크리닝을 가능케 한다.
- [0026] 수 많은 경우, 상기 방법을 이용해 고리형 웨티드를 제시하는 것이 유리하다. 고리형 웨티드를 포함하는 라이브러리를 디스플레이하는 것은 청구된 방법에서 효용이 있다.
- [0027] 나아가, 청구된 방법의 이용에 의해 디스플레이된 고리형 웨티드를 포함하는 라이브러리도 효용이 있다. 그러한 라이브러리는 관심대상의 표적에 대해 스크리닝될 수 있는 광범위한 고리형 웨티드를 포함한다.
- [0028] 개시된 방법의 이용으로 본질적으로 웨티드 내 임의의 원하는 위치에 분자내 결합을 도입할 수 있게 된다. 특별히 관심대상이 되는 것은 생물학적 활성을 가진 웨티드, 예를 들어 치료용 웨티드인데, 이는 하나 이상의 분자내 결합의 도입이 일반적으로 웨티드의 생물안정성을 증가시키기 때문이다. 나아가, 고리형 구조는 생물학적 활성, 예를 들어 항원 특이성, 수용체 결합 친화성, 항미생물 활성, 또는 웨티드의 효소 특이성을 변경시키기 위해 이용될 수 있기 때문이다. 관심대상의 웨티드는, 예를 들어 아고니스트 웨티드, 안타고니스트 웨티드, 아미드화 웨티드, 호르몬, 효소 저해제, 효소 활성화제, 수용체 리간드, 저해 웨티드, 란티바이오틱 단백질, 바이러스 단백질, 진핵세포 단백질, 이들의 돌연변이(예를 들어, 특정 위치에서의 개질을 허용하도록 특이적으로 고안된 것), 그들의 모방체, 유사체 또는 기능성 분절 등가물이다. 그러한 방법은 고리형 웨티드 기재의 치료 연관성이 있고 치료 활성인 분자들을 식별하기 위해 이용될 수 있거나, 또는 그러한 분자들을 특정지우기 위해 이용될 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0029] 정의
- [0030] 용어 "박테리오파지"는 파지 복제에 필요한 핵산을 포함하는 단백질 코트로 이루어진 포장 형성 박테리아성 바이러스를 지칭한다. 핵산은 이중 또는 단일 가닥인, 선형 또는 원형의 DNA 또는 RNA이다. 파지 람다 또는 필라멘트형 파지 같은 박테리오파지(예를 들어, M13, fd, 또는 f1)는 당업자에게 널리 공지되어 있다. 용어 "박테리오파지 입자"는 본 개시 내용에 따른 입자, 즉 고리형 웨티드를 디스플레이하는 입자를 지칭한다. 박테리오파지의 조립 동안에, 그들이 포장 신호를 포함한다면, 코트 단백질은 상이한 핵산 서열을 포장할 수도 있다.
- [0031] 용어 "웨티드"는 50 개 이하의 아미노산을 가진 분자를 의미한다.
- [0032] 용어 "(폴리)웨티드"는 웨티드 결합을 통하여 연결된 다수의 즉, 2 개 이상의 아미노산의 하나 이상의 사슬로 이루어진 50 개 초과의 아미노산을 갖는 분자를 의미한다.
- [0033] 용어 "단백질"은 해당 (폴리)웨티드의 적어도 일부분이 그것의 (폴리)웨티드 사슬(들) 사이 및/또는 내부에서 2차, 3차, 4차 구조들을 형성함으로써, 규정된 3차원 배열을 가지거나 획득할 수 있는 (폴리)웨티드를 지칭한다. 그러한 단편 또는 도메인들이 상기 기재된 바와 같이 규정된 3차원 배열을 획득할 수 있는 한, 이러한 정의는 전체 단백질의 단편 또는 도메인 뿐만 아니라, 자연적으로 발생하거나 또는 적어도 부분적으로 인공적인 단백질과 같은 단백질도 포함한다.
- [0034] 용어 "티오에테르" 또는 "티오에테르-가교"는 각 분자에서 2 개의 상이한 탄소 또는 헤테로 원자들과 결합된 황원자를 지칭한다. 한 구현예에서 티오에테르-가교는 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 번역 후 탈수 후에 및 상기 탈수 잔기의 시스테인으로의 커플링 후에 형성된다. 한 구현예에서 티오에테르-가교는 란티오닌- 또는 메틸란티오닌-가교이다. 란티오닌은 화학식 ($\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$)를 가지는, 티오에테르-가교에 의해 그들의 베타 탄소 원자에서 가교된 2 개의 알라닌 잔기로 구성된, 비 단백질유전자 아미노산이다. 메틸

란티오닌은 화학식 (HOOC-CH(NH₂)-CH(CH₃)-S-CH₂-CH(NH₂)-COOH)를 가지는 비-단백질유전자 아미노산이다.

[0035] 용어 "라이시노알라닌-가교"는 디히드로알라닌의 라이신 잔기와의 상호 작용을 지칭한다. 본원에서 라이시노알라닌-가교는 효소적으로 또는 비-효소적으로, 예를 들어 pH에 조절에 의해 유발된다. "라이시노알라닌"은 개질된 아미노산 N6-(DL-2-아미노-2-카르복시에틸)-L-라이신을 지칭한다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "분자내 결합"은 추가 분자(외인성의) 구조 혼입 없이 및 디설파이드 가교 형성(예를 들어, 환원반응을 통해), 부가 환화 또는 스타우딩어 반응 같은 화학적 과정의 배제 없이, 웨티드 서열 내 아미노산의 측쇄 사이에서의 공유결합을 지칭한다. 본원에서, 분자내 결합은 하나 이상의 탈수 잔기들을 시스테인 또는 라이신에 커플링시킴으로써 형성될 수 있다. 한 구현예에서 상기 하나 이상의 탈수 잔기들은 디히드로알라닌(Dha) 또는 디히드로부티린(Dhb)이다. 본원에서 분자내 결합은 라이시노알라닌-가교 또는 티오에테르-가교에 의해 형성될 수 있다. 본 개시 내용의 한 구현예에서 분자내 결합은 란티오닌-가교에 의해 형성된다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 분자내 결합은 메틸란티오닌-가교에 의해 형성된다. 본 개시 내용의 한 구현예에서 하나 이상의 분자내 결합은 한 웨티드 서열 내에서 형성된다. 본 개시 내용의 한 구현예에서 웨티드 서열 내 분자내 결합은 안정화 고리 구조를 형성한다. 한 구현예에서 상기 하나 이상의 분자내 결합들은 효소로 형성된다. 한 구현예에서 상기 하나 이상의 분자내 결합은 란티웨티드 합성효소에 의해 형성된다. 한 구현예에서 상기 하나 이상의 분자내 결합은 시클라아제에 의해 형성된다. 한 구현예에서 상기 시클라아제는 LanC 유형 시클라아제 또는 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소이다. 또 다른 구현예에서 상기 LanC 유형 시클라아제는 NisC(Uniprot 접근 번호: Q03202), SpaC, MibC, PepC, EpiC 또는 그것의 기능적 등가물이다. 또 다른 구현예에서 상기 이중관능성 LanM 유형 효소는 ProcM(접근 번호 NP_894083), LctM, MutM, BovM, LanM 1/2, CinM, HalM1/2, CyanM1-4, 또는 그의 기능적 등가물이다. 또 다른 구현예에서 상기 하나 이상의 분자내 결합은 비-효소적으로 형성된다. 추가 구현예에서 상기 하나 이상의 분자내 결합은 염기성 조건 하에서 형성된다. 또 다른 구현예에서 상기 하나 이상의 분자내 결합은 약한 염기성 조건 하에서 형성된다. 또 다른 구현예에서 상기 염기성 조건은 pH7.5, pH8, pH8.5, pH9, pH9.5, pH10, pH10.5, pH11, pH11.5, pH12, pH12.5, pH13, pH13.5 또는 pH14이다. 추가 구현예에서 상기 하나 이상의 분자내 결합은 효소로, 예를 들면 란티웨티드 합성 효소에 의해 그리고 염기성 조건 하에 형성된다.

[0037] 본원에서 용어 "고리형 웨티드"는 하나 이상의 분자내 결합에 의해 형성된 2차 구조를 가진 아미노산, 웨티드 또는 폴리웨티드의 구간을 지칭한다. 아미노산 또는 웨티드 또는 폴리웨티드의 전체 구간이 원형일 필요는 없다. 본 개시 내용의 한 구현예에서 고리형 웨티드는 단일고리형 또는 다중고리형 웨티드이다. 또 다른 구현예에서 고리형 웨티드는 전체 단백질의 단편 또는 도메인 웨티드 뿐만 아니라, 자연 발생 또는 인공 웨티드 같은 웨티드를 포함한다. 추가 구현예에서 고리형 웨티드는 아미드화된 고리형 웨티드이다.

[0038] 용어 "다중고리" 또는 "다중고리 구조"는 적어도 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 분자내 결합을 갖는 구조를 지칭한다. 개시 내용에 따라 사용되는 웨티드의 길이에 따라, 더 복잡한 2차 웨티드 구조가 성립될 수 있다.

[0039] 용어 "전구체 고리형 웨티드"는 본원 개시 내용에 따라 고리형 웨티드를 형성할 수 있는 아미노산, 웨티드 또는 폴리웨티드의 구간을 지칭한다. 더 구체적으로 본 개시 내용에 따른 전구체 고리형 웨티드는 분자내 결합을 형성하기 위해 적어도 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 및 하나 이상의 시스테인 또는 라이신을 포함한다.

[0040] 용어 "탈수 잔기"는 반응 분자로부터 물 분자의 손실을 포함하는 화학 반응을 겪는 개질된 아미노산 잔기를 지칭한다. 한 구현예에서 "탈수 잔기"는 탈수 세린 또는 탈수 트레오닌이다. 또 다른 구현예에서 "탈수 잔기"는 디히드로알라닌(Dha) 또는 디히드로부티린(Dhb)이다. 한 구현예에서 하나 이상의 세린 또는 트레오닌의 탈수는 란티웨티드 합성효소에 의해 행해진다. 한 구현예에서 하나 이상의 세린 또는 트레오닌의 탈수는 디히드라타아제에 의해 행해진다. 한 구현예에서 상기 효소 탈수는 LanB 유형 디히드라타아제 또는 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소에 의해 행해진다. 한 구현예에서 상기 LanB 유형 디히드라타아제는 NisB(Uniprot 접근 번호: P20103), EpiB, SpaB, MibB, PepB 또는 이들의 기능적 등가물이다. 또 다른 구현예에서 상기 이중관능성 LanM 유형 효소는 ProcM(접근 번호 NP_894083), LctM, MutM, BovM, LanM1/2, CinM, HalM1/2, CyanM1-4, 또는 이들의 기능적 등가물이다.

[0041] 본원에 사용된 용어 "리더" 또는 "리더 서열"은 번역 후-개질(PTM) 효소를 위한 인식 모티프를 지칭한다. 본 개시 내용의 한 구현예에서 리더 서열은 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되어진다. 본 개시 내용의 한 구현예에서 리더 서열은 란티웨티드 합성효소에 의해 인식되는 서열이다. 또 다른 구현예에서 리더 서열은 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열로부터 유래될 수 있는 컨센서스 모티프를 보유한다. 본 개시 내용의

또 다른 구현예에서 리더 서열은 LanA 전구체 웹티드로부터 유래될 수 있는 서열이다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서 리더 서열은 LanA 전구체 웹티드로부터 유래된 컨센서스 모티프를 보유한다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서 리더 서열은 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제 및/또는 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL유형 효소에 의해 인식되는 서열이다.

[0042] 본원에 사용된 용어 "번역 후-개질 효소" 또는 "PTM 효소"는 번역된 웹티드의 구조적 변화, 예를 들어 가공 기구의 부분으로서 생물학적 활성 웹티드의 생합성에서의 자연 리보솜 웹티드의 특이적 개질을 유발하는 효소를 지칭한다. 이러한 부류는 카르복실화 아민 리가아제, 시클라아제, 디히드로게나아제, 시클로디히드라타아제, 디카르복실라아제, 에피머라아제, 헤드록실라아제, 웹티다아제, 디히드라타아제, 라이아제, 키나아제, 트랜스퍼라아제, 에스테라아제, 옥시제나아제 및 이소머라아제, 특히 란티오닌 결합 형성 효소, 세포 용해소 형성 효소, 시아노백틴 형성 효소, 티오웹티드 형성 효소, 코노웹티드 형성 효소, 마이크로비리딘 형성 효소, 사이클로타이드 형성 효소, 박테리오신 형성 효소 및 서브틸로신 형성 효소를 포함하는 여러 유형의 효소를 포함한다. 바람직하게는, 본원에 사용된 PTM 효소들은 란티웹티드 합성효소들이다. 바람직하게는, 본원에 사용된 PTM 효소들은 디히드라타아제, 시클라아제 또는, 디히드라타아제 또는 라이아제/키나아제 및 시클라아제 활성을 포함하는 이중 또는 다중관능성 효소들이다. 본원에 사용된 바람직한 PTM 효소는 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제, 이중관능성 LanM 유형 효소들 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소들 또는 그의 기능적 등가물이다.

[0043] 용어 웹티드 또는 단백질의 "기능적 등가물"은 해당 웹티드 또는 단백질의 한 가지 이상, 바람직하게는 실질적으로 전부의 기능들을 공유하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 그러한 기능들은 생물학적 기능들이며, 바람직하게는 디히드라타아제 및/또는 시클라아제 활성 같은 바람직한 효소 기능들이다.

[0044] 용어 "박테리오파지 입자의 표면"은 입자가 포함된 매질과 접촉하며 접근가능한 박테리오파지 입자의 부분을 지칭한다. 표면은 적절한 숙주 세포에서 파지 생산 동안 조립되는 파지 코트의 일부인 단백질(입자의 단백질 코트의 부재)에 의해 결정되어진다.

[0045] 파지 디스플레이는, 각각의 변이체 잔기를 인코드하는 유전자 물질이 내부에 존재하면서 웹티드 또는 단백질 변이체 라이브러리가 파지 비리온의 외부에서 발현되는 선별 기법을 기술한다. 이것은 각각의 변이체 단백질 서열과 그것을 인코드하는 DNA 사이에 물리적 연결을 창출하며, 패닝(panning)으로 지칭되는 시험관내 선별 공정에 의해 주어진 표적 문자(항체, 효소, 세포-표면 수용체 등)에 대한 결합 친화성을 기반으로 신속한 분할을 가능하게 한다. 그의 가장 단순한 형태에서, 표적으로 도포된 플레이트(또는 비드) 상의 파지-디스플레이된 웹티드의 라이브러리를 배양해 패닝을 실시하고, 미결합 파지를 세척해 내고, 특이적으로 결합된 파지를 용출한다. 이어서, 용출된 파지들은 증폭하고, 추가적인 연결/증폭 순환을 통해 취해져 서열 결합에 우호적인 집단이 풍부화된다. 수회 후, 개별 클론들은 DNA 서열분석 및 ELISA에 의해 특징분석된다.

[0046] 용어 "파지미드"는 박테리아 복제 기원, 예를 들어 CoIE1, 및 박테리아 파지의 유전자간 영역 복제본을 갖는 플라스미드 벡터를 지칭한다. 파지미드는 필라멘트형 박테리아파지를 포함하는 임의의 공지된 박테리아 파지 기재의 것일 수 있다. 상기 플라스미드는 또한 일반적으로 항생제 내성에 대한 선별가능 마커를 포함한다. 이러한 벡터로 클로닝된 DNA 단편들은 플라스미드로 증식될 수 있다. 이러한 벡터를 보유하는 세포들이 파지 입자 생산에 필요한 모든 유전자를 공급받을 때, 플라스미드 복제 방식은 플라스미드 DNA 한 가닥의 복제본을 발생시키고 파지 입자를 포장시키기 위해서 회전 원형 복제로 변화한다. 이러한 파지미드는 감염성 또는 비감염성의 파지 입자를 형성할 수 있다. 이러한 용어는 이중성 폴리웹티드가 파지 입자 표면에 디스플레이되도록 유전자 융합으로 이중성 폴리웹티드에 연결된 파지 코트 단백질 유전자, 또는 그것의 단편을 포함하는 파지미드를 포함한다 (Sambrook 등, 417).

[0047] 용어 "파지 벡터"는 이중성 유전자를 포함하고 복제가능한 박테리오파지의 이중가닥 복제체를 지칭한다. 파지 벡터는 파지복제 및 파지 입자 형성을 가능하게 하는 파지 복제 기원을 갖는다. 파지는 바람직하게는 필라멘트형 박테리오파지, 예를 들어 M13, f1, fd, Pf3 파지, 또는 이들의 유도체, 람다형 파지, 예를 들어 람다, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 등, 또는 이들의 유도체, 배콜로바이러스 또는 그의 유도체, T4 파지 또는 그의 유도체, T7 파지 바이러스 또는 그의 유도체이다. 세포로부터 DNA의 제조는 플라스미드 DNA를 숙주세포의 배양균으로부터 단리하는 것을 의미한다. DNA 제조에 일반적으로 사용되는 방법은 Sambrook 등의 문헌의 125-133 부분에서 설명된 크고 작은 규모의 플라스미드 제법들이다. DNA의 제조 이후에, 그것은 Sambrook 등의 문헌의 140 부분에서 설명된 것과 같은 당업계에 널리 공지된 방법으로 정제될 수 있다.

[0048] 용어 "코트 단백질"은 박테리오파지 입자의 표면에 존재하는 단백질 또는 그의 적어도 일부분이다. 기능적인 견

해로 보면, 숙주 세포에서 파지 조립 과정 동안에 코트 단백질은 박테리오파지 입자와 회합되어 있으며, 그것이 다른 숙주 세포를 감염시킬 때까지 조립된 파지와 회합된 상태로 유지되는 임의의 단백질이다. 필라멘트형 박테리오파지의 경우에 상기 야생형 단백질은 유전자 III 단백질(pIII), 유전자 VI 단백질(pVI), 유전자 VII 단백질(pVII), 유전자 VIII 단백질(pVIII), 및 유전자 IX 단백질(pIX)이다. 코트 단백질은 주된 코트 단백질 또는 미량의 코트 단백질일 수 있다. "주된" 코트 단백질은 파지 코트에 10 개 이상의 단백질 복제본으로 존재하는 코트 단백질, 예를 들어 주된 코트 단백질 pVIII이다. 주된 코트 단백질은 파지 당 수십, 수백, 수천 개의 복제본으로 존재할 수 있다. 미량의 코트 단백질은 파지 당 10 개 미만의 복제본으로 파지 코트에 존재하는데, 예를 들어 미량의 코트 단백질 pIII이다.

[0049] 용어 "야생형 코트 단백질"은 자연 발생 박테리오파지의 파지 코트를 형성하는 코트 단백질을 지칭한다. 필라멘트형 박테리오파지들, 예를 들어 f1, fd, 및 M13의, 유연관계가 가까운 부재들 사이의 차이를 포함하는 서열들은 당업자에게 널리 공지되어 있다(참고문헌은, 예를 들어 Kay 등, 1996). 필라멘트형 박테리오파지의 경우에, 상기 야생형 단백질은, 예를 들어 유전자 III 단백질(pIII), 유전자 VI 단백질(pVI), 유전자 VII 단백질(pVII), 유전자 VIII 단백질(pVIII), 및 유전자 IX 단백질(pIX)이다. 한 구현에서, 본 개시 내용은 상기 막 단백질이 박테리오파지의 야생형 코트 단백질인 방법에 관한 것이다.

[0050] 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 코트 단백질은 박테리오파지의 야생형 코트 단백질의 절단된 변이체이며, 여기서 상기 절단된 변이체는 상기 코트 단백질의 박테리오파지 입자의 단백질 코트로의 혼입을 유발하는 상기 야생형 코트 단백질의 적어도 일부를 포함한다.

[0051] 용어 "절단된 변이체"는 야생형 서열의 적어도 일부의 결실로 개변되는 상기 언급된 야생형 단백질로부터 유도된 단백질을 지칭한다. 이는 변이체, 예를 들어 박테리오파지 돌연변이체에서 발견되거나(Crissman & Smith, 1984) 또는 표준 파지 디스플레이 방법들의 과정에서 생성되는(예를 들면 Bass 등, 1990; Krebber, 1996) 절단된 유전자 III(pIII) 또는 유전자 VIII(pVIII) 단백질 변이체들을 포함한다. 예를 들어, 상기 절단된 변이체는 유전자 III 단백질(pIII) 또는 유전자 VIII 단백질(pVIII)의 CT 도메인으로 구성되거나 또는 그것을 포함할 수 있다. 본 개시 내용에 따라 절단된 변이체들을 식별하기 위해서, 검출 태그가 변이체에 융합될 수 있으며, 변이체가 변이체 존재 하에 형성되는 박테리오파지 입자의 파지 코트로 혼입되는지 여부를 결정하는 검정이 설정될 수 있다.

[0052] 더욱더 바람직한 구현예에서, 상기 코트 단백질은 박테리오파지의 야생형 코트 단백질의 개질된 변이체인데, 여기서 상기 개질된 변이체는 박테리오파지 입자의 단백질 코트로 혼입될 수 있다.

[0053] 본 개시 내용에 따라 야생형 단백질의 개질을 성취하기 위한 방법들은 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 표준 클로닝 및/또는 돌연변이 유발 기법을 포함한다. 본 개시 내용에 따른 방법에 사용되는 야생형 단백질의 개질 변이체를 인코드하는 핵산 분자의 구축 방법, 파지 및/또는 파지미드 벡터의 구축을 포함하는 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터의 구축 방법, 상기 벡터를 적절히 선택된 숙주 세포에 도입하는 방법 및 상기 개질된 단백질의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다(참고문헌은, 예를 들어 Sambrook 등, 1989; Ausubel 등, 1999; Kay 등, 1996). 본 개시 내용에 따라 개질된 변이체를 식별하기 위해서, 검출 태그가 변이체에 융합될 수 있으며, 변이체가 변이체 존재 하에 형성된 박테리오파지 입자의 파지 코트로 혼입될 수 있거나 또는 혼입되었는지 여부를 결정하기 위한 검정법이 설정될 수 있다.

[0054] 상기 박테리오파지가 필라멘트형 박테리오파지인 방법이 또한 바람직하다. 필라멘트형 박테리오파지, 예를 들어 M13, fd, 또는 f1은 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0055] 필라멘트형 박테리오파지의 경우, 박테리오파지 입자의 상기 코트 단백질이 야생형 코트 단백질 pIII이거나 또는 그로부터 유도된 것인 방법이 특히 바람직하다.

[0056] 박테리오파지 입자의 상기 코트 단백질이 야생형 코트 단백질 pIII이거나 또는 그로부터 유도된 것인 방법이 더욱 바람직하다. 바람직하게는, 야생형 서열에 대응하는 개질 단백질의 부분이 해당 야생형 서열과 비교하여 약 40% 초과, 바람직하게는 약 50% 초과, 바람직하게는 약 60% 초과, 바람직하게는 약 70% 초과, 바람직하게는 약 80% 초과, 가장 바람직하게는 약 90% 초과의 아미노산 일치를 나타낸다.

[0057] 용어, 주어진 폴리펩티드 서열의 "N-말단"은 주어진 폴리펩티드 서열의 N-말단 잔기에서 시작하거나 또는 그 근처에서 시작하는 근접 길이의 주어진 폴리펩티드 서열이다. 주어진 폴리펩티드의 N-말단은 길이로 한정될 수 있다. 유사하게, 용어 주어진 폴리펩티드 서열의 "C-말단"은 주어진 폴리펩티드 서열의 C-잔기에서 종료하거나 또는 그 근처에서 종료하는 근접 길이의 주어진 폴리펩티드 서열이다. 주어진 폴리펩티드의 C-말단은 길이로 한정

될 수 있다. 본 개시 내용의 한 구현예는, 코트 단백질의 C-말단을 지칭한다. 바람직한 구현예에서 코트 단백질의 C-말단은 상기 코트 단백질의 막통과 도메인에 대해 C-말단에 위치된 아미노산 또는 아미노산 서열이다. 또 다른 구현예에서, 코트 단백질의 C-말단은 상기 코트 단백질의 막통과 도메인의 C-말단에 위치된 아미노산 또는 아미노산 서열로, 상기 코트 단백질이 유전자 III 단백질(pIII, 서열번호 2; Uniprot: P69168) 또는 유전자 VIII 단백질(pVIII; 서열번호 3; Uniprot: P69541)인 것이다. 한 구현예에서 유전자 III 단백질(pIII)의 C-말단은 아미노산 서열 LRNkes(서열번호 4) 또는 그의 유도체 또는 개질된 변이체이다. 또 다른 구현예에서, 유전자 III 단백질(pIII)의 C-말단은 막통과 도메인에 대해 C-말단에 위치되어 있고, 아미노산 서열 LRNkes(서열번호 4)의 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 또 다른 구현예에서 유전자 VIII 단백질(pVIII)의 C-말단은 아미노산 서열 TSKAS(서열번호 5) 또는 그의 유도체 또는 그것의 개질 변이체를 포함한다. 또 다른 구현예에서 유전자 VIII 단백질(pVIII)의 C-말단은 막통과 도메인에 위치되어 있고, 아미노산 서열 TSKAS(서열번호 5)의 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 유전자 III 단백질(pIII) 및 유전자 VIII 단백질(pVIII)의 개요 도식은 도 4에 제시되어 있다.

[0058] 본 개시 내용의 한 구현예에서 단백질 코트 부재의 C-말단은 고리형 웨티드에 부착되어 있고, 박테리오파지 입자의 표면에 상기 고리형 웨티드를 디스플레이한다.

[0059] 바람직한 구현예에서, (폴리)웨티드/단백질을 디스플레이하는 박테리오파지 입자는 (폴리)웨티드/단백질을 인코드하는 핵산 서열을 포함한다.

[0060] 본 개시 내용의 맥락에서, 용어 "발현을 유발하거나 또는 허용하는"은 핵산 서열이 발현되는 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 것을 기술한다. 본 개시 내용에 따른 (폴리)웨티드/단백질을 인코드하는 핵산 분자의 구축 방법, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터의 구축 방법, 상기 벡터를 적절히 선택된 숙주 세포로 도입하는 방법 및 (폴리)웨티드/단백질의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다(참고문헌은, 예를 들어 Sambrook 등., 1989; Ausubel 등., 1999). 적절한 숙주세포에서 자손 박테리오파지 또는 박테리오파지 입자의 생성 및 상기 자손 박테리오파지 또는 박테리오파지 입자의 생성을 유발하거나 또는 허용하기 위해 필요한 유전자 물질의 도입 방법도 역시 널리 공지되어 있다(참고문헌은, 예를 들어 Kay 등., 1996). 박테리오파지 입자들의 생산을 유발하거나 또는 허용하는 단계는, 예를 들어 과자미드를 이용하는 작업의 경우 적절한 조력자 파지의 이용이 필요할 수 있다.

[0061] 또 다른 구현예에서, 본 개시 내용은 본 개시 내용에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0062] 추가 구현예에서, 본 개시 내용은 본 개시 내용에 따른 핵산 서열 또는 본 개시 내용에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0063] 본 개시 내용의 맥락에서 용어 "숙주 세포"는 이에 제한되지 않으나, 박테리아, 예를 들어 대장균(*Escherichia coli*)(Ge 등., 1995), 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)(Wu 등., 1993), 균류, 예를 들어 효모(Horwitz 등., 1988; Ridder 등., 1995) 또는 사상균(Nyyssonen 등., 1993), 식물세포(Hiatt & Ma, 1993; Whitelam 등., 1994), 곤충세포(Potter 등., 1993; Ward 등., 1995), 또는 포유류세포(Trill 등., 1995)를 포함하는 이종성 단백질 생산에 통상적으로 사용되는 임의의 것일 수 있다.

[0064] 더욱 바람직한 구현예에서, 본 개시 내용은 본 개시 내용에 따른 핵산 서열로 인코드되는 야생형 박테리오파지 코트 단백질의 개질 변이체, 본 개시 내용에 따른, 또는 본 개시 내용에 따른 숙주세포에 의해 생산되는 벡터에 관한 것이다. 개질된 변이체는 클로닝, 발현, 또는 단백질 수송에 필요한 아미노산 잔기를 추가로 포함할 수 있다. 클로닝에 필요한 아미노산 잔기는 핵산 서열을 적당한 벡터로 클로닝할 수 있게 해 주기 위해 혼입되는 제한효소에 대한 인식 서열을 포함하는 핵산 서열로 인코드되는 잔기를 포함할 수 있다. 발현에 필요한 아미노산 잔기는 (폴리)웨티드/단백질의 용해도 또는 안정성 증가를 유도하는 잔기를 포함할 수 있다. 단백질 수송에 필요한 아미노산 잔기는 대장균의 주변세포질에 대한 개질된 변이체 수송을 담당하는 신호전달 서열 및/또는 상기 신호전달 서열의 효율적 절단을 촉진하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 상기 언급된 클로닝, 발현, 단백질 수송, 정제 및/또는 검출 목적에 요구되는 추가 아미노산 잔기들은 당업자에게 널리 공지된 수 많은 모이어티들이다.

[0065] "박테리오파지 입자의 다양한 무리"는 "라이브러리" 또는 "복수"로 지칭될 수 있다. 본 개시 내용의 맥락에서, 그러한 라이브러리의 각 부재는 그 라이브러리의 구분되는 부재를 나타낸다. 본 개시 내용의 맥락에서, 용어 "다양한 무리"는 그들의 조성, 특성 및/또는 배열의 적어도 일부분에서 상이한 적어도 2 개의 입자 또는 분자의 무리를 지칭한다. 예를 들어, 고리형 웨티드의 다양한 무리는 그들의 배열의 적어도 하나의 아미노산 자리에서

상이한 일련의 고리형 웨티드이다. 그러한 다양한 무리는 다양한 방식, 예를 들어 출발 (폴리)웨티드/단백질을 인코드하는 핵산 서열의 적어도 하나의 코돈의 무작위 돌연변이유발에 의해, 출발 (폴리)웨티드/단백질을 인코드하는 핵산 서열 증폭을 위한 오류 발생이 쉬운 PCR 이용으로, 또는 본 개시 내용에 따른 방법에서 숙주 세포로서 돌연변이 유발 균주 이용으로 수득될 수 있다. 웨티드의 다양한 무리의 생성을 위한 이들 및 추가적 또는 대안적 방법들이 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0066] 본 개시 내용의 맥락에서, 용어 "원하는 특성"은 다양한 무리 중 한 부재가 가져야 하며, 다양한 무리를 스크리닝 및/또는 선별하기 위한 근거를 형성하는 예정된 특성을 지칭한다. 그러한 특성은, 표적에 대한 결합, 표적의 차단, 표적-매개 반응의 활성화, 효소 활성 및 당업자에게 공지된 추가 특성들과 같은 특성들을 포함한다. 원하는 특성의 유형에 따라, 당업자는 스크리닝 및/또는 선별 수행을 위해 필요한 형식 및 단계를 식별할 수 있을 것이다.

[0067] 원하는 특성이 관심대상의 표적에 대한 결합인 방법이 가장 바람직하다.

[0068] 관심대상의 상기 표적은 당업자에게 널리 공지된 다양한 방식으로 박테리오파지 입자 상에 디스플레이된 상기 고리형 웨티드의 다양한 무리에 제시될 수 있는데, 예를 들어 고상 바이오패닝(biopanning) 표면 상의 코팅, 용액에서의 바이오패닝을 위한 자석 비드와 같은 입자들에 대한 연결, 또는 전체 세포 바이오패닝 또는 조직편 상의 바이오패닝을 위한 세포 표면 상의 디스플레이가 예시된다. 상기 표적에 결합되어 있는 박테리오파지 입자들은 당업자에게 널리 공지된 다양한 방법, 예를 들어 적절한 완충액을 이용한 pH-또는 염 구배를 이용하는 용출, 또는 가용성 표적을 이용하는 특이적 용출에 의해 회수될 수 있다.

[0069] 용어 "의 인접"은 상기 (폴리)웨티드/단백질의 N- 또는 C-말단으로부터 양쪽 경우 모두에서 계수되는 15 개 이하, 또는 더 바람직하게는 10 개 이하 아미노산의 구간을 지칭한다.

구현예의 상세한 설명

[0071] 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨티드를 디스플레이하는 방법에 관한 것으로, 여기서 상기 고리형 웨티드가 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되며, 상기 고리형 웨티드는 하나 이상의 탈수된 잔기들의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함한다.

[0072] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는 박테리오파지 입자 표면 상의 고리형 웨티드 디스플레이 방법에 관한 것이다:

[0073] (a) 전구체 고리형 웨티드를 인코드하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포를 제공하는 단계;

[0074] (b) 상기 전구체 고리형 웨티드의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 단계;

[0075] (c) 전구체 고리형 웨티드 내 하나 이상의 아미노산 잔기의 효소성 탈수 단계;

[0076] (d) 상기 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의한 하나 이상의 분자내 결합 형성으로 고리형 웨티드를 형성하는 단계; 및

[0077] (e) 상기 숙주 세포에서의 박테리오파지 입자 생산 단계로서, 여기서 상기 박테리오파지 입자는 표면 상에 상기 고리형 웨티드를 디스플레이하며, 상기 고리형 웨티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 단계.

[0078] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는 박테리오파지 입자의 표면 상에 고리형 웨티드를 디스플레이하는 방법에 관한 것이다:

[0079] (a) 전구체 고리형 웨티드를 인코드하는 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포를 제공하는 단계;

[0080] (b) 상기 전구체 고리형 웨티드의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 단계;

[0081] (c) 전구체 고리형 웨티드 내 하나 이상의 아미노산 잔기의 효소성 탈수를 유발하거나 또는 허용하는 단계;

[0082] (d) 상기 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의한 하나 이상의 분자내 결합 형성을 유발하거나 또는 허용하여, 고리형 웨티드를 형성하는 단계; 및

[0083] (e) 상기 숙주 세포에서의 박테리오파지 입자 생산 단계로서, 여기서 상기 박테리오파지 입자는 표면 상에 상기 고리형 웨티드를 디스플레이하며, 상기 고리형 웨티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부

착되어 있는 단계.

- [0084] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 핵산 서열은 박테리오파지 입자의 코트 단백질 및 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열을 추가로 인코드한다.
- [0085] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 숙주 세포는 번역 후-개질(PTM) 효소를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 추가로 보유한다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서는 번역 후-개질(PTM) 효소를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 추가로 보유하는데, 여기서 상기 하나 이상의 핵산 서열은 세포에 인공적으로 도입된다.
- [0086] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는 박테리오파지 입자 표면 상의 고리형 웨티드 디스플레이 방법에 관한 것이다:
- [0087] (a) 전구체 고리형 웨티드를 인코드하는 핵산 서열을 보유하고, 번역 후-개질(PTM) 효소를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포를 제공하는 단계;
- [0088] (b) 상기 전구체 고리형 웨티드 및 상기 하나 이상의 번역 후-개질(PTM) 효소의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 단계;
- [0089] (c) 전구체 고리형 웨티드 내 하나 이상의 아미노산 잔기의 효소성 탈수 단계;
- [0090] (d) 상기 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의한 하나 이상의 분자내 결합을 형성해, 고리형 웨티드를 형성하는 단계; 및
- [0091] (e) 상기 숙주 세포에서의 박테리오파지 입자 생산 단계로서, 여기서 상기 박테리오파지 입자는 표면 상에 상기 고리형 웨티드를 디스플레이하며, 상기 고리형 웨티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 단계.
- [0092] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는 박테리오파지 입자 표면 상의 고리형 웨티드 디스플레이 방법에 관한 것이다:
- [0093] (a) 전구체 고리형 웨티드를 인코드하는 핵산 서열을 보유하고, 번역 후-개질(PTM) 효소를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포를 제공하는 단계;
- [0094] (b) 상기 전구체 고리형 웨티드 및 상기 하나 이상의 번역 후-개질(PTM) 효소의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 단계;
- [0095] (c) 전구체 고리형 웨티드 내 하나 이상의 아미노산 잔기의 효소성 탈수를 유발하거나 또는 허용하는 단계;
- [0096] (d) 상기 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의한 하나 이상의 분자내 결합 형성을 유발하거나 또는 허용하여, 고리형 웨티드를 형성하는 단계; 및
- [0097] (e) 상기 숙주 세포에서의 박테리오파지 입자 생산 단계로서, 여기서 상기 박테리오파지 입자는 표면 상에 상기 고리형 웨티드를 디스플레이하며, 상기 고리형 웨티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 단계.
- [0098] 한 구현예에서, 단계 c)에서의 효소성 탈수는 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 유발된다. 한 구현예에서, 단계 d)에서의 하나 이상의 분자내 결합 형성은 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 유발된다. 한 구현예에서, 단계 c)에서의 효소성 탈수 및 단계 d)에서의 하나 이상의 분자내 결합의 형성은 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 유발된다. 한 구현예에서, 단계 c)에서의 효소성 탈수 및 단계 d)에서의 하나 이상의 분자내 결합의 형성은 하나의 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 유발된다. 또 다른 구현예에서, 단계 c)에서의 효소성 탈수 및 단계 d)에서의 하나 이상의 분자내 결합의 형성은 상이한 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 유발된다. 또 다른 구현예에서, 단계 c)에서의 효소성 탈수가 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 유발되며, 단계 d)에서의 하나 이상의 분자내 결합은 염기성 조건 하에 형성된다. 또 다른 구현예에서, 단계 c)에서의 효소성 탈수가 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 유발되며, 하나 이상의 분자내 결합이 숙주 세포에서의 박테리오파지 입자 생산 후 염기성 조건 하에 형성된다.
- [0099] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 번역 후-개질(PTM) 효소가 란티펩티드 합성효소이다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 상기 번역 후-개질(PTM) 효소가 디히드라타아제, 시클라아제 또는, 디히드라타아제 또는 라이아제/키나아제 및 시클라아제 활성을 포함하는 이중- 또는 다중관능성 효소이다. 바람직한 구현예에서, 본원에서 사용된 PTM 효소는 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제, 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소 또는 이들의 기능적 등가물이다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 상기

번역 후-개질(PTM) 효소는 디히드라타아제 또는 라이아제/키나아제 및/또는 시클라아제이다.

[0100] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 하나 이상의 탈수된 잔기가 디히드로알라닌(Dha) 또는 디히드로부티린(Dhb)이다.

[0101] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 란티펩티드 합성효소에 의해 또는 약한 염기성 조건 하에 형성된다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 LanC 유형 시클라아제, 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소에 의해 또는 약한 염기성 조건 하에 형성된다. 본 개시 내용의 한 구현예에서, 아미노산 잔기의 탈수 및 분자내 결합의 형성이 란티오닌- 또는 메틸란티오닌-가교 형성 효소에 의해 매개된다.

[0102] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 웨პ티드 또는 폴리펩티드 서열 내에서 형성된다. 본 개시 내용의 한 구현예에서, 웨პ티드 또는 폴리펩티드 서열 내 분자내 결합이 안정화 고리 구조를 형성한다. 본 개시 내용의 한 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 번역 후-개질 웨პ티드 또는 폴리펩티드 내에 형성된다. 본 개시 내용의 한 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 하나 이상의 탈수된 잔기를 포함하는 웨პ티드 또는 폴리펩티드 내에서 형성된다. 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 디히드라타아제, 시클라아제 또는 디히드라타아제 또는 라이아제/키나아제 및 시클라아제 활성을 포함하는 이중- 또는 다중관능성 효소에 의해 개질된 웨პ티드 또는 폴리펩티드 내에 형성된다. 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제, 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소에 의해 개질된 웨პ티드 또는 폴리펩티드 내에 형성된다. 또 다른 구현예에서, LanB 유형 디히드라타아제는 NisB(Uniprot 접근 번호: P20103), EpiB, SpaB, MibB, PepB 또는 이들의 기능적 등가물이다. 추가 구현예에서, 상기 이중관능성 LanM 유형 효소가 프로클로코커스(*Prochlorococcus*) MIT 9313 유래의 ProcM(접근 번호 NP_894083) 또는 그의 유연관계가 가까운 유사한 프로클로코커스 MIT 9303 유래의 ProcM(접근 번호 YP_001018107), CyanM1-4(접근 번호 YP_002485891, YP_002483601, YP_002484655, YP_002483742; 시아노테세 종(*Cyanothece sp.*) 유래 PCC 7425), LctM, MutM, BovM, LanM1/2, CinM, HalM1/2, 또는 이들의 기능적 등가물이다.

[0103] 한 구현예에서, 상기 하나 이상의 분자내 결합이 란티오닌- 또는 메틸란티오닌-가교 형성 효소에 의해 형성된다. 한 구현예에서, 상기 하나 이상의 분자내 결합이 시클라아제에 의해 형성된다. 한 구현예에서, 상기 시클라아제가 LanC 유형 시클라아제, 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소이다.

[0104] 또 다른 구현예에서, LanC 유형 시클라아제가 NisC(Uniprot 접근 번호: Q03202), SpaC, MibC, PepC, EpiC 또는 이들의 기능적 등가물이다. 추가 구현예에서, 상기 이중관능성 LanM 유형 효소가 프로클로코커스 MIT 9313 유래의 ProcM(접근 번호 NP_894083) 또는 그의 유연관계가 가까운 유사한 프로클로코커스 MIT 9303 유래의 ProcM(접근 번호 YP_001018107), CyanM1-4(접근 번호 YP_002485891, YP_002483601, YP_002484655, YP_002483742; 시아노테세 종 유래 PCC 7425), LctM, MutM, BovM, LanM1/2, CinM, HalM1/2, 또는 이들의 기능적 등가물이다.

[0105] 또 다른 구현예에서, 상기 하나 이상의 분자내 결합이 약한 염기성 조건 하에 형성된다. 또 다른 구현예에서, 상기 약한 염기성 조건이 7.5 내지 11, 8 내지 11, 9 내지 11, 10 내지 11, 7.5 내지 9, 8 내지 9 또는 9 내지 10의 pH이다. 또 다른 구현예에서, 상기 약한 염기성 조건이 pH7.5, pH8, pH8.5, pH9, pH9.5, pH10, pH10.5 또는 pH11 또는 이들 각각 사이의 범위이다.

[0106] 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 티오에테르-가교이다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 란티오닌-가교 또는 메틸란티오닌-가교이다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 분자내 결합이 라이시노알라닌-가교이다.

[0107] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 고리형 웨პ티드가 번역 후-개질 웨პ티드 또는 폴리펩티드이다. 또 다른 구현예에서, 고리형 웨პ티드가 티오에테르-가교 포함 웨პ티드 또는 폴리펩티드이다. 또 다른 구현예에서, 고리형 웨პ티드가 란티오닌-가교 포함 웨პ티드 또는 폴리펩티드, 메틸란티오닌-가교 포함 웨პ티드 또는 폴리펩티드 또는 라이시노알라닌-가교 포함 웨პ티드 또는 폴리펩티드이다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 고리형 웨პ티드가 단일고리형 또는 다중고리형이다.

[0108] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상의 고리형 웨პ티드의 디스플레이 방법에 관한 것으로, 상기 고리형 웨პ티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있으며, 상기 고리형 웨პ티드

가 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성된 분자내 결합을 포함하고, 상기 방법이 하기 단계를 포함한다:

[0109] (a) 전구체 고리형 웨티드를 인코드하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포를 제공하는 단계;

[0110] (b) 상기 전구체 고리형 웨티드의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 단계;

[0111] (c) 하나 이상의 분자내 결합의 형성 단계; 및

[0112] (d) 상기 숙주 세포에서의 박테리오파지 입자 생성 단계.

[0113] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 코트 단백질이 박테리오파지의 야생형 코트 단백질이다. 또 다른 구현예에서, 박테리오파지 입자의 상기 코트 단백질이 야생형 코트 단백질 pIII 또는 야생형 코트 단백질 pVIII이거나 또는 그로부터 유도된 것이다.

[0114] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 고리형 웨티드가 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 고리형 웨티드 및 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단이 물리적으로 연합되어 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 고리형 웨티드는 유전자 융합을 통해 또는 하나 이상의 인공적으로 도입된 시스테인에 의해 형성된 디설파이드 결합을 통해 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있다.

[0115] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 고리형 웨티드는 유전자 융합을 통해 또는 하나 이상의 인공적으로 도입된 시스테인에 의해 형성된 디설파이드 결합을 통해 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 고리형 웨티드는 유전자 융합을 통해 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 결합되어 있다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 상기 고리형 웨티드는 하나 이상의 인공적으로 도입된 시스테인에 의해 형성된 디설파이드 결합을 통해 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있다.

[0116] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 박테리오파지는 필라멘트성 박테리오파지이다.

[0117] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 고리형 웨티드는 500 개 이하, 400 개 이하, 300 개 이하, 200 개 이하, 100 개 이하, 90 개 이하, 80 개 이하, 70 개 이하, 60 개 이하, 50 개 이하, 40 개 이하, 30 개 이하, 20 개 이하, 또는 10 개 이하의 아미노산을 포함한다.

[0118] 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 상기 고리형 웨티드는 아미드화 고리형 웨티드이다. 추가 구현예에서, 상기 아미드화 고리형 웨티드는 상기 고리형 웨티드의 C-말단에 아미드 부분을 포함한다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 상기 고리형 웨티드는 C-말단 아미드화에 의해 번역 후-개질되어 있다. 또 다른 구현예에서, 아미드화를 위해 개질되는 아미노산이 아미드기를 제공하는 글리신에 후속한다. 아미드화는 예를 들어 글리신이 산화되어 알파-히드록시-글리신을 형성하는 제 1 반응 단계를 포함한다. 산화된 글리신은 C-말단 아미드화 웨티드 및 N-글리옥실화 웨티드로 절단한다. C-말단 아미드화는 다수 웨티드, 예를 들어 뉴로웨티드 및 호르몬의 생물학적 활성에 필수적일 수 있다.

[0119] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨티드를 디스플레이 할 수 있는 핵산 서열에 관한 것으로, 핵산은

[0120] (a) 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질,

[0121] (b) 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열, 및

[0122] (c) 전구체 고리형 웨티드

를 인코드하며,

[0124] 여기서, 전구체 고리형 웨티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 위치되어 있고,

[0125] 상기 전구체 고리형 웨티드는 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의한 분자내 결합을 형성할 수 있다.

[0126] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 박테리오파지 입자의 표면 상에 고리형 웨티드를 디스플레이 할 수 있는 상기 핵산 서열은 추가로 신호 서열을 인코드한다.

- [0127] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨პ티드를 디스플레이할 수 있는 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것으로, 여기서 상기 핵산은
- [0128] (a) 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질;
- [0129] (b) 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열, 및
- [0130] (c) 전구체 고리형 웨პ티드
- [0131] 를 인코드하며,
- [0132] 여기서, 전구체 고리형 웨პ티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 위치되어 있고,
- [0133] 상기 전구체 고리형 웨პ티드가 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 분자내 결합을 형성할 수 있다.
- [0134] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨პ티드를 디스플레이할 수 있는 핵산 서열에 관한 것으로, 여기서 상기 핵산은 N-말단으로부터 C-말단까지 하기의 배열을 갖는다:
- [0135] N-(파지 코트 단백질)-(번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열)-(전구체 고리형 웨პ티드)-C.
- [0136] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨პ티드를 디스플레이할 수 있는 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것으로, 여기서 상기 핵산은 N-말단으로부터 C-말단까지 하기의 배열을 갖는다:
- [0137] N-(파지 코트 단백질)-(번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열)-(전구체 고리형 웨პ티드)-C(여기서, N은 N-말단이고, C는 C-말단임).
- [0138] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨პ티드를 디스플레이할 수 있는 핵산 서열에 관한 것으로, 여기서 상기 핵산은 N-말단으로부터 C-말단까지 하기의 배열을 갖는다:
- [0139] N-(신호 서열)-(파지 코트 단백질)-(번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열)-(전구체 고리형 웨პ티드)-C.
- [0140] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨პ티드를 디스플레이할 수 있는 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것으로, 여기서 상기 핵산은 N-말단으로부터 C-말단까지 하기의 배열을 갖는다:
- [0141] N-(신호 서열)-(파지 코트 단백질)-(번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열)-(전구체 고리형 웨პ티드)-C(여기서, N은 N-말단이고, C는 C-말단임).
- [0142] 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서, 벡터는 배출 신호를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 추가로 포함한다. 본 개시 내용의 또 다른 구현예에서 벡터는 유도가능한 프로모터를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 추가로 포함한다. 한 구현예에서, 본 개시 내용은 본원에 개시된 핵산 서열 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0143] 또 다른 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨პ티드를 디스플레이할 수 있는 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것으로, 상기 핵산은 파지 코트 단백질을 인코드하고, 상기 파지 코트 단백질은 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열의 부근에서 인코드된다.
- [0144] 또 다른 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨პ티드를 디스플레이할 수 있는 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것으로, 여기서 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열은 전구체 고리형 웨პ티드의 부근에서 인코드된다.
- [0145] 추가 구현예에서, 본 개시 내용은 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것으로, 여기서 상기 핵산 서열 상에서 파지 코트 단백질이 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열의 부근에서 인코드되고, 상기 리더 서열은 전구체 고리형 웨პ티드의 부근에서 인코드된다. 본 개시 내용의 한 구현예에서, 부근이란 핵산의 해당 삼중향에 의해 인코드되는 15 개, 14 개, 13 개, 12 개, 11 개, 10 개, 9 개, 8 개, 7 개, 6 개, 5 개, 4 개, 3 개, 2 개 또는 1 개의 아미노산을 지칭한다.
- [0146] 또 다른 구현예에서, 상기 전구체 고리형 웨პ티드는 하나 이상의 분자내 결합을 형성하는 적어도 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 및 하나 이상의 시스테인 또는 라이신을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 핵산에 의해 인코드되는 박테리오파지 입자의 상기 코트 단백질은 야생형 코트 단백질 pIII 또는 야생형 코트 단백질 pVIII이거나

또는 그로부터 유도된 것이다.

[0147] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 본원에 개시된 방법으로 수득가능한 그의 표면 상에 고리형 웨티드를 디스플레이하는 박테리오파지 입자를 지칭한다. 한 구현예에서, 본 개시 내용은 그의 표면 상에 고리형 웨티드를 디스플레이하는 박테리오파지 입자에 관한 것으로, 여기서 상기 고리형 웨티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있으며, 상기 고리형 웨티드는 분자내 결합을 포함한다. 한 구현예에서, 본 개시 내용은 그의 표면 상에 고리형 웨티드를 디스플레이하는 박테리오파지 입자에 관한 것으로, 여기서 상기 고리형 웨티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있으며, 상기 고리형 웨티드가 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함한다.

[0148] 또 다른 구현예에서, 상기 박테리오파지 입자는 상기 고리형 웨티드를 형성할 수 있는 전구체 고리형 웨티드를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 벡터를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 박테리오파지 입자는 본원에 개시된 벡터를 포함한다.

[0149] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 본원에 개시된 박테리오파지 입자의 다양한 무리에 관한 것이다. 한 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자의 다양한 무리로서, 상기 박테리오파지 입자가 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 고리형 웨티드를 디스플레이하고, 상기 고리형 웨티드가 분자내 결합을 포함하는 박테리오파지 입자의 다양한 무리에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 각각의 상기 박테리오파지 입자가 고리형 웨티드의 다양한 무리를 중에서 고리형 웨티드를 디스플레이하며, 여기서 상기 고리형 웨티드가 분자내 결합을 포함한다. 한 구현예에서, 본 개시 내용은 박테리오파지 입자의 다양한 무리에 관한 것으로, 여기서 상기 박테리오파지 입자가 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 고리형 웨티드를 디스플레이하고, 상기 고리형 웨티드가 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 각각의 상기 박테리오파지 입자는 고리형 웨티드의 다양한 무리 중 한 고리형 웨티드를 디스플레이하고, 여기서 상기 고리형 웨티드들은 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함한다.

[0150] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드의 수득 방법에 관한 것이다:

[0151] (a) 본원에 개시된 박테리오파지 입자의 다양한 무리를 제공하는 단계; 및

[0152] (b) 상기 다양한 무리를 스크리닝 및/또는 상기 다양한 무리를 선별하여, 상기 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드를 디스플레이하는 하나 이상의 박테리오파지 입자를 수득하는 단계.

[0153] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는, 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드의 수득 방법에 관한 것이다:

[0154] (a) 박테리오파지 입자의 다양한 무리를 제공하는 단계로서, 상기 박테리오파지 입자가 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 고리형 웨티드를 디스플레이하고, 상기 고리형 웨티드가 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함하는 단계; 및

[0155] (b) 상기 다양한 무리를 스크리닝 및/또는 상기 다양한 무리를 선별하여, 상기 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드를 디스플레이하는 적어도 하나의 박테리오파지 입자를 수득하는 단계.

[0156] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 원하는 특성은 관심대상의 표적에 대한 결합이다.

[0157] 또 다른 구현예에서, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드의 수득 방법에 관한 것이다:

[0158] (a) 박테리오파지 입자의 다양한 무리를 제공하는 단계로서, 상기 박테리오파지 입자가 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 고리형 웨티드를 디스플레이하고, 상기 고리형 웨티드가 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함하는 단계; 및

[0159] (b) 상기 다양한 무리의 스크리닝 및/또는 상기 다양한 무리의 선별로 상기 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드를 디스플레이하는 적어도 하나의 박테리오파지 입자를 수득하는 단계, 여기서 단계 (b)는 추가로 하기 단계를 포함함:

[0160] (ba) 상기 박테리오파지 입자의 다양한 무리를 관심대상의 표적과 접촉시키는 단계;

- [0161] (bb) 관심대상의 표적에 결합하지 않는 박테리오파지 입자를 용출시키는 단계; 및
- [0162] (bc) 관심대상의 표적에 결합하는 박테리오파지 입자를 용출시키는 단계.
- [0163] 한 구현예에서, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드의 수득 방법에 관한 것이다:
- [0164] (a) 박테리오파지 입자의 다양한 무리를 제공하는 단계로서, 상기 박테리오파지 입자가 고리형 웨티드들의 다양한 무리 중 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 고리형 웨티드를 디스플레이하고, 상기 고리형 웨티드가 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함하는 단계; 및
- [0165] (b) 상기 다양한 무리의 스크리닝 및/또는 상기 다양한 무리의 선별로 상기 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드를 디스플레이하는 적어도 하나의 박테리오파지 입자를 수득하는 단계.
- [0166] 본 개시 내용의 한 구현예에서, 상기 원하는 특성을 관심대상의 표적에 대한 결합이다.
- [0167] 또 다른 구현예에서, 본 개시 내용은 하기 단계를 포함하는 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드의 수득 방법에 관한 것이다:
- [0168] (a) 박테리오파지 입자의 다양한 무리를 제공하는 단계로서, 상기 박테리오파지 입자가 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 고리형 웨티드들의 다양한 무리 중 한 고리형 웨티드를 디스플레이하고, 상기 고리형 웨티드가 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함하는 단계; 및
- [0169] (b) 상기 다양한 무리의 스크리닝 및/또는 상기 다양한 무리의 선별로 상기 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드를 디스플레이하는 적어도 하나의 박테리오파지 입자를 수득하는 단계, 여기서 단계 (b) 가 추가로 하기 단계를 포함함:
- [0170] (ba) 상기 박테리오파지 입자의 다양한 무리를 관심대상의 표적과 접촉시키는 단계;
- [0171] (bb) 관심대상의 표적에 결합하지 않는 박테리오파지 입자를 용출시키는 단계; 및
- [0172] (bc) 관심대상의 표적에 결합하는 박테리오파지 입자를 용출시키는 단계.
- [0173] **Lan-효소**
- [0174] 현재 여러 란티오닌- 또는 메틸란티오닌-가교 형성 효소 및 그의 유전자가 공지되어 있다:
- [0175] 1. LanB 유형 디히드라타아제는 세린 및 트레오닌의 탈수 단계를 촉매하는 것으로 제안된 효소의 C-말단을 구성하는 것으로 나타났다.
- [0176] 2. LanC 유형 시클라아제는 시스테인 티올의 부가를 촉매한다. LanC는, 시클라아제 부재로, 아연 금속단백질이며, 그의 결합된 금속은 친핵성 부가를 위한 티올 기질을 활성화하는 것으로 제안된 바 있다.
- [0177] 3. LanM 유형 효소는 이중관능성의 디히드라타아제 및 시클라아제이다. 란티바이오틱 합성 동안 전구체-웨티드의 탈수 및 고리화를 모두 담당한다.
- [0178] 4. LanD 산화성 디카르복실라아제 유형 효소들은 에피더민의 C-말단 메소-란티오닌의 시스테인 잔기로부터 2 개의 환원 등가물을 촉매하여, ~C=C~~ 이중 결합을 형성한다.
- [0179] 5. 라이아제, 키나아제 및 시클라아제 도메인을 포함하나, 시클라아제 도메인에 통상적인 아연-리간드가 없는 LanKC 유형 다중관능성 효소.
- [0180] 6. 라이아제, 키아나제 및 금속 리간드 포함 시클라아제 도메인을 포함하는 LanL 유형 다중관능성 효소.
- [0181] 7. LanP 유형 웨티다아제는 리더 웨티드를 란티바이오틱스로부터 절단한다.
- [0182] 8. ABC 트랜스포터에 융합되어 있는 LanT 유형 웨티다아제; 전구체 웨티드의 절단은 분비 과정의 일부로서 수송자에 의해 매개된다.
- [0183] 9. LtnM 및 LtnJ 유형의 디히드라타아제 및 디히드로제나아제는 D-알라닌의 형성에 관여되어 있다.
- [0184] 10. CinX는 신나마이신 생합성 동안 아스파라긴을 히드록실화한다.

- [0185] 예를 들어, 란티바이오틱스(란티오닌-가교 또는 메틸란티오닌-가교를 포함하는 항미생물성 펩티드)의 형성에서, 란티바이오틱-합성 효소들은 막-결합 복합체에서 조작되어 있는 것으로 기재되어 있다(Siegers 등, 1996. *J. Biol. Chem.* 271, 12294-12301; Kiesau 등, 1997. *J. Bacteriol.* 179, 1475-1481; Sahl 등, 1998. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:41-7). 그러한 복합체는 란티바이오틱 수송자(LanT), 탈수 효소(LanB; 디히드라타아제로도 지칭됨) 및 시클라아제(LanC)로 이루어진다. 일부 란티바이오틱의 경우, 이중관능성 효소(LanM)가 탈수 및 고리화 단계를 모두 수행한다. 리보솜 합성 전구체 펩티드에서의 N-말단 란티바이오틱 리더 펩티드는 란티바이오틱 효소에 대한 인식 신호인데, 탈수 효소 또는 탈수 및 고리 형성을 전부 수행하는 효소로 출발한다. 리더 펩티드는 란티바이오틱 복합체에 결합하여 전구체 펩티드를 란티바이오틱 효소들의 근접한 곳에 두는 것으로 여겨진다. 선행기술(참고문헌은, 예를 들어 WO2006/062398)은 예를 들어 융합 단백질에서 디히드라타아제에 의해 번역 후 탈수되는 관심대상의 펩티드를 생산하도록 여러 란티바이오틱 리더 펩티드 및 그의 용도를 개시한다. WO2006/062398에 따르면, 리더 펩티드 및 개질될 펩티드가 비-란티바이오틱 배출 신호, 예를 들어 SEC 배출 신호에 선행한다. 배출 신호 및 리더 펩티드가 세포 고정 서열, 예를 들어 LPTX-소르타아제 인식 모티프에 의해 분리될 수 있다.
- [0186] 최근 문헌에 상세하게 기재된 바와 같이(Qi Zhang, Xiao Yang, Huan Wang, Wilfred A. van der Donk (2014) *ACS Chem. Biol.*, 2014, 9, 2686-2694), 유전체 채굴 전략(genome mining strategies)이 당업자에 의해 채용되어 신규 리더 펩티드 및 그의 동일계통 개질 Lan-효소(들)을 식별해 낼 수 있다. Lan-효소는 서열 유사성, 유사한 도메인 구조 및 고도로 보존되는 모티프를 특징으로 한다. 예를 들어, 현재까지 공지된 여러 Lan-효소들은 활성 부위 아연 이온의 결합을 지지하는 시클라아제 도메인 중에 "CHG" 모티프를 포함한다. 여타의 것이 Zn^{2+} 배좌를 지지하는 "CCG" 모티프를 포함하는 것으로 식별되었다. 검색어로서 Lan-효소 서열 및 보존성 모티프를 이용하면, 신규 Lan-효소가 BlastP 검색에 의해 타 유기체에서 식별될 수 있다. 일단 신규 Lan-효소가 식별되면, 그들의 동일계통 기질 LanA 전구체 펩티드들은 용이하게 검출되는데, 이는 그들이 일반적으로 동일 유전체 클러스터에서 가까이 인코드되고, 짧은 오픈 리딩 프레임 및 타 LanA들에 대한 서열 유사성을 특징으로 하기 때문이다.
- [0187] 리더 서열
- [0188] 임의의 유형의 리더 서열은 본 개시 내용의 실행에 이용될 수 있는데, 단 이는 디히드라타아제에 의해 인식될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 그러한 리더 서열은 또한 란티오닌- 또는 메틸란티오닌-가교를 형성할 수 있는 시클라아제에 의해 인식된다. 리더 서열의 아미노산 서열은 공공의 데이터베이스 및 출판물에서 이용가능하며, 여기에는 문헌[Plat A. 등, 2013 *Curr Protein Pept Sci.* 2013 Mar; 14(2):85-96 및 Plat A. 등; *Appl Environ Microbiol.* 2011 Jan;77(2):604-11]에 기재된 리더 서열 및 리더 컨센서스 서열이 포함된다.
- [0189] 한 구현예에서, 상기 리더 서열은 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제, 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소에 의해 인식되는 리더 서열이거나 또는 그의 컨센서스 모티프를 포함한다.
- [0190] 또 다른 구현예에서, 본 개시 내용의 리더 서열은 LanA 전구체 펩티드로부터 유도된 리더 서열 또는 LanA 전구체 펩티드로부터 유도된 공지된 리더 서열의 아미노산 서열 배열로부터 유도될 수 있는 컨센서스 모티프를 보유한다. 추가 구현예에서, 상기 리더 서열은 LanA 전구체 펩티드로부터 유래된 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 펩티드로부터 유도된 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 펩티드 유래의 컨센서스 모티프를 보유하는 리더 서열이며, 여기서 상기 리더 서열은 란티펩티드 합성효소에 의해 인식된다. 추가 구현예에서, 상기 리더 서열은 LanA 전구체 펩티드로부터 유래된 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 펩티드로부터 유도된 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 펩티드 유래의 컨센서스 모티프를 보유하는 리더 서열이며, 여기서 상기 리더 서열은 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제, 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소에 의해 인식된다.
- [0191] LanA 전구체 펩티드의 아미노산 서열은 공공의 데이터베이스로부터 입수가능하며, 하기의 LanA 전구체 펩티드를 포함한다:
- [0192] NisA(니신, 락토코커스 락티스)
- [0193] ProCA(프로클로로신, 프로클로로코커스 마리너스(*Prochlorococcus marinus*) MIT9313; 프로클로로코커스 마리너스 MIT9303)

- [0194] SpaS(서브틸리신; 바실러스 서브틸리스 ATCC 6633)
- [0195] LctA(락티신 481; 락토코커스 락티스 아종 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*))
- [0196] MutA(뮤타신 II, 스트렙토코커스 뮤坦스(*Streptococcus mutans*))
- [0197] MibA(마이크로비스포리신, 미크로비스포라 코랄리나(*Microbispora corallina*))
- [0198] BovA(보비신 HJ50; 스트렙토코커스 보비스(*Streptococcus bovis*) HJ50)
- [0199] LanA 1/2(리체니시딘, 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*))
- [0200] CinA(신나마이신, 스트렙토마이세스 신나모네우스 신나모네우스 (*Streptomyces cinnamoneus* *cinnamoneus*) DSM 40005)
- [0201] HalA1/2(할로두라신, 바실러스 할로두란스(*Bacillus halodurans*))
- [0202] CyanA(명청 없음, 시아노테세 종 PCC 7425)
- [0203] Pep5(스타필로코커스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*))
- [0204] EpiA(에피데르민, 스타필로코커스 에피데르미디스)
- [0205] WO2006/062398의 표 1A 및 1B는 그러한 리더 웨이트드의 예시 배열이다. 당업자는 예를 들어 Vector NTI의 AlignX와 같은 공공의 또는 시판하는 이용가능한 정렬 소프트웨어를 이용해 정렬된 서열로부터 컨센서스 모티프를 유도할 수 있다. 리더 서열 컨센서스 모티프는 적어도 5 개, 더욱 바람직하게는 적어도 10 개, 가장 바람직하게는 적어도 15 개의 공지된 리더 웨이트드 서열의 배열로부터 유도된다. 그렇게 수득된 컨센서스 모티프는 후속하여 당업계에 공지된 방법을 이용하여 리더 웨이트드 활성, 즉 디히드라타아제에 의한 인식 및 세린 또는 트레오닌 탈수에 대해 확인한다. 주어진 표적 서열의 탈수는 Maldi-TOF MS를 이용해 모니터링될 수 있다.
- [0206] 리더 웨이트드 컨센서스 서열은 다양한 컨센서스 서열, 예를 들어 컨센서스 모티프 X1-D/E-E-V/L-S/T-D/E-X2-E-L-D/E를 포함할 수 있는데, 여기서 X1는 임의의 소수성 아미노산이고, X2는 임의의 아미노산이다. 예를 들어, 서열 LEEVSEQELD (서열번호 7)을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 리더 서열은 컨센서스 모티프 F-D/E/N-L-D/E/N-X3를 포함하며, 여기서 X3는 L, I 또는 V이다. 예를 들어, 서열 LFDLDL(서열번호 8) 또는 FNLDV(서열번호 9)를 포함한다. 리더는 예를 들어 ILELQNL(서열번호 10)를 포함하는 컨센서스 I/L-L/F-D/E/N-L-Q-D/N/A/S/T-L/M-D/E를 포함할 수 있다. 리더 웨이트드는 컨센서스 서열, 예를 들어 FNLDV(서열번호 9)에 이어, 컨센서스 서열과 개질될 전구체 웨이트드 사이의 스페이서 서열로 이루어질 수 있다. 상기 스페이서 서열은 각 효소의 촉매 중심이 닿는 범위 내에서 개질되는 부위를 포함한다(Annechien Plat, Leon D. Kluskens, Anneke Kuipers, Rick Rink, Gert N. Moll (2010). N-말단 도메인 및 스페이서는 니신 리더 웨이트드의 기능에 충분하다(*Appl. Environ. Microbiol.* 77, 604-611).
- [0207] 수 많은 클래스 II LanA 리더 웨이트드들이 서열 유사성을 근거로 N11P, TIGR03898 및 N11P 패밀리로 지정된 반면, 타 부재들은 패밀리 배정이 되어 있지 않다. 또 다른 구현예에서, 리더 서열은 리더 웨이트드의 N11P 패밀리로 지정되어 있으며, 동일계통 균주에서 인코드되는 단일 개질 ProcM 효소의 기질인 프로클로로코커스 MIT 9313에서 인코드되는 29개의 고도로 보존성인 부재들, 및 프로클로로코커스 MIT 9303에서 인코드되는 또 다른 15 개의 부재를 현재 포함하고 있는 ProcA 리더로부터 유도된다. 대부분의 ProcA 리더 서열은 현저히 길고(60 개 아미노산 초과), 전반적으로 높은 보존성으로 인해 명백한 최소 컨센서스 서열은 없다. 그러나, ProcA2.8의 부모의 63 개 잔기 리더 서열의 23 개 잔기 버전으로의 N-말단 절단은 ProcM-매개 효소 전구체 웨이트드 개질을 완전히 뒷받침하여, 대부분의 리더 서열이 불필요하며, 기능성의 최소 서열이 쉽게 유도될 수 있음을 나타낸다.
- [0208] 또 다른 구현예에서, 리더 서열은 NisA(Nisin, 락토코커스 락티스) 또는 ProcA(프로클로로신, 프로클로로코커스 마리너스 MIT9313 또는 프로클로로코커스 마리너스 MIT9303) 리더 서열이거나, 또는 NisA 또는 ProcA 리더 서열로부터 유도될 수 있는 컨센서스 모티프를 보유한다.
- [0209] 본원에 개시된 추가 구현예:
- [0210] 1. (a) 전구체 고리형 웨이트드를 인코드하는 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포를 제공하는 단계;
- [0211] (b) 상기 전구체 고리형 웨이트드의 발현을 유발하거나 또는 허용하는 단계;
- [0212] (c) 전구체 고리형 웨이트드 내 하나 이상의 아미노산 잔기의 효소성 탈수 단계;

- [0213] (d) 상기 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의한 하나 이상의 분자내 결합 형성으로 고리형 웨პ티드를 형성하는 단계; 및
- [0214] (e) 상기 숙주 세포에서의 박테리오파지 입자 생산 단계로서, 여기서 상기 박테리오파지 입자는 표면 상에 상기 고리형 웨პ티드를 디스플레이하며, 상기 고리형 웨პ티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 단계
- [0215] 를 포함하는 박테리오파지 입자 표면 상의 고리형 웨პ티드 디스플레이 방법.
- [0216] 2. 제 1 구현예에 있어서, 상기 핵산 서열은 박테리오파지 입자의 코트 단백질 및 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열을 추가로 인코드하는 것인 방법.
- [0217] 3. 제 1 구현예 또는 제 2 구현예에 있어서, 상기 숙주 세포는 번역 후-개질(PTM) 효소를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 추가로 보유하는 것인 방법.
- [0218] 4. 제 2 구현예 또는 제 3 구현예에 있어서, 상기 번역 후-개질(PTM) 효소는 란티웨პ티드 합성효소인 방법.
- [0219] 5. 제 2 구현예 내지 제 4 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 번역 후-개질(PTM) 효소는 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제 및/또는 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소인 방법.
- [0220] 6. 제 2 구현예 내지 제 5 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 리더 서열은 LanA 전구체 웨პ티드 유래의 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 웨პ티드로부터 유도된 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 웨პ티드 유래의 컨센서스 모티프를 보유하는 리더 서열인 방법.
- [0221] 7. 제 6 구현예에 있어서, 상기 리더 서열은 LanB 유형 디히드라타아제, LanC 유형 시클라아제, 이중관능성 LanM 유형 효소 또는 다중관능성 LanKC 또는 LanL 유형 효소에 의해 인식되는 방법.
- [0222] 8. 제 2 구현예 내지 제 7 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 리더 서열은 NisA 또는 ProcA 리더 서열이거나, 또는 그의 컨센서스 모티프를 보유하는 방법.
- [0223] 9. 제 1 구현예 내지 제 8 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 분자내 결합은 시클라아제에 의해 또는 약한 염기성 조건 하에 형성되는 것인 방법.
- [0224] 10. 제 1 구현예 내지 제 9 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 탈수된 잔기는 디히드로알라닌(Dha) 또는 디히드로부티린(Dhb)인 방법.
- [0225] 11. 제 1 구현예 내지 제 10 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 분자내 결합이 티오에테르- 또는 라이시노알라닌-가교인 방법.
- [0226] 12. 제 1 구현예 내지 제 11 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 코트 단백질은 박테리오파지의 야생형 코트 단백질인 방법.
- [0227] 13. 제 12 구현예에 있어서, 상기 박테리오파지 입자의 상기 코트 단백질은 야생형 코트 단백질 pIII 또는 야생형 코트 단백질 pVIII이거나 또는 그로부터 유도된 것인 방법.
- [0228] 14. 제 1 구현예 내지 제 13 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 고리형 웨პ티드는 유전자 융합을 통해 또는 하나 이상의 인공적으로 도입된 시스테인에 의해 형성되는 디설파이드 결합을 통해 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있는 것인 방법.
- [0229] 15. 박테리오파지 입자 표면 상에 고리형 웨პ티드를 디스플레이할 수 있는 핵산 서열로서, 상기 핵산이
- [0230] (a) 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질;
- [0231] (b) 번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열, 및
- [0232] (c) 전구체 고리형 웨პ티드
- [0233] 를 인코드하며,
- [0234] 여기서, 전구체 고리형 웨პ티드를 인코드하는 핵산은 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 위치되어 있고,

- [0235] 상기 전구체 고리형 웨티드는 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 분자내 결합을 형성할 수 있는 것인 핵산 서열.
- [0236] 16. 제 15 구현예에 있어서, N-말단부터 C-말단까지 하기의 배열을 갖는 핵산 서열:
- [0237] N-(파지 코트 단백질)-(번역 후-개질(PTM) 효소에 의해 인식되는 리더 서열)-(전구체 고리형 웨티드)-C.
- [0238] 17. 제 15 구현예 내지 제 17 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 리더 서열은 LanA 전구체 웨티드 유래의 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 웨티드로부터 유도된 리더 서열이거나, 또는 LanA 전구체 웨티드 유래의 컨센서스 모티프를 보유하는 리더 서열인 핵산 서열.
- [0239] 18. 제 15 구현예 내지 제 17 구현예 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 전구체 고리형 웨티드는 적어도 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 및 하나 이상의 시스테인 또는 라이신을 함유하는 것인 핵산 서열.
- [0240] 19. 제 15 구현예 내지 제 18 구현예 중 어느 한 구현예의 핵산을 함유하는 벡터.
- [0241] 20. 제 15 구현예 내지 제 18 구현예 중 어느 한 구현예의 핵산 서열 또는 제 19 구현예의 벡터를 함유하는 숙주 세포.
- [0242] 21. 제 1 구현예 내지 제 14 구현예 중 어느 한 구현예의 방법으로 수득가능한 고리형 웨티드를 그의 표면 상에서 디스플레이하는 박테리오파지 입자.
- [0243] 22. 그의 표면 상에 고리형 웨티드를 디스플레이하는 박테리오파지 입자로서, 상기 고리형 웨티드는 상기 박테리오파지 입자의 코트 단백질의 C-말단에 부착되어 있고, 상기 고리형 웨티드가 하나 이상의 탈수된 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함하는 박테리오파지 입자.
- [0244] 23. 제 21 구현예 또는 제 22 구현예에 있어서, 상기 고리형 웨티드를 형성할 수 있는 전구체 고리형 웨티드를 인코드하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 벡터를 추가로 함유하는 박테리오파지 입자.
- [0245] 24. 제 23 구현예에 있어서, 상기 벡터는 제 19 구현예의 벡터인 박테리오파지 입자.
- [0246] 25. 각각의 해당 박테리오파지 입자가 고리형 웨티드의 다양한 무리로부터 한 고리형 웨티드를 디스플레이하고, 여기서 상기 고리형 웨티드가 하나 이상의 탈수 잔기의 시스테인 또는 라이신에 대한 커플링에 의해 형성되는 분자내 결합을 포함하는, 제 21 구현예 내지 제 24 구현예 중 어느 한 구현예의 박테리오파지 입자의 다양한 무리.
- [0247] 26. (a) 제 25 구현예의 박테리오파지 입자의 다양한 무리를 제공하는 단계; 및
- [0248] (b) 상기 다양한 무리를 스크리닝 및/또는 상기 다양한 무리를 선별하여, 상기 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드를 디스플레이하는 적어도 하나의 박테리오파지 입자를 수득하는 단계
- [0249] 를 포함하는, 원하는 특성을 가진 고리형 웨티드의 수득 방법.
- [0250] 27. 제 26 구현예에 있어서, 상기 원하는 특성이 관심대상의 표적에 대한 결합인 방법.

도면의 간단한 설명

- [0251] 도 1: 인자 Xa-절단 리포터 검정은 대장균에서 발현된 고리형 웨티드의 개질 상태를 확인한다.

NisA-리더 서열을 보유하는 발현된 가용성 웨티드의 개질 상태는 ELISA 기반의 인자 Xa-절단 리포터 검정을 이용함으로써 개질 NisB/NisC 효소의 공동 발현의 존재 또는 부재 하의 대장균 세포 용해물에서 평가했다. NisB/NisC 공동 발현의 부재 하에 생산된(Lan-효소 없음), ASWIEGRWCN-모티프 (서열번호 1; 인자 Xa 인자 서열에 밀줄)를 포함하는 웨티드가 인자 Xa에 의해서 거의 완벽하게 절단되는 반면, NisB/NisC의 공동 발현은 디히드로알라닌(탈수 세린)으로부터 시스테인으로 티오에테르 가교의 효소 도입 및 인자 Xa-절단 저항성을 유도한다 (좌측 패널). 세린(중앙 패널) 또는 시스테인(우측 패널) 잔기의 알라닌으로의 돌연변이는 NisB/NisC 공동 발현의 존재 하에도 효소 티오에테르 가교 형성을 막고, 웨티드를 인자 Xa-민감성으로 만든다. 인자 Xa 저항성(잔류 신호[%])은 3 개의 독립적으로 생산되어진 세포 용해물 유래의 미처리 시료(Xa 없음)에 비례하여 산출되었다.

도 2: 전구체 웨티드를 포함하는 NisA-리더의 pIII의 C-말단으로의 융합은 효소 고리화(티오에테르 가교 형성)를 위한 기질이며, 후속하여 파지 입자 상에 디스플레이된다.

(A) 파지 입자들은 ASWIEGRWCN-모티프(서열번호 1)가 있는 웨티드를 포함하는 동일 NisA-리더를 pIII의 C-말단

또는 N-말단에 융합시키는 파지미드를 사용하여 생산되었고, 인자 Xa-절단 리포터 검정에 적용했다. NisB/NisC 공동 발현의 존재 하에 생산되고 파지 상에 디스플레이되는 C-말단 융합체는 대체로 인자 Xa-절단에 저항적이어서, 생산자 세포에서 효소 개질 및 파지 입자로의 후속 혼입을 나타낸다(좌측 패널). 대조적으로 파지 상에 디스플레이된 동일 웨პ티드의 N-말단 융합은 심지어 NisB/NisC의 공동 발현 하의 생산시 인자 Xa-민감성이다(우측 패널). (B) C-말단 pIII 융합체의 코어 웨პ티드에서 세린(좌측 패널) 또는 시스테인(우측 패널) 잔기의 알라닌으로의 돌연변이는 NisB/NisC 공동 발현 존재 하에 효소 티오에테르 가교 형성을 막고 디스플레이된 웨პ티드를 인자 Xa-민감성으로 만든다. 인자 Xa 저항성(잔류 신호[%])은 3 개의 독립적으로 생산되어진 파지 시료 유래 미처리 시료(Xa 없음)에 비례해서 산출되었다. (C) 말토스 결합 단백질(MBP)의 C-말단 또는 N-말단에 융합된 (A)에서 디스플레이된 전구체 웨პ티드를 포함하는 동일 NisA-리더를 발현하는 대장균 균주의 세포 용해물을 생산해, 인자 Xa-절단 리포터 검정에 적용했다. 전구체 웨პ티드의 MBP의 C-말단으로의 융합은, 효소 개질을 확인하는 NisB/NisC 공동 발현의 존재 하에 생산시 대체로 인자 Xa-절단 저항성이다. NisB/NisC 공동 발현의 부재 하에 동일 웨პ티드 융합은 탐지될 수 없었으며(n.d.), 이것은 빠른 턴 오버를 나타낼 수 있다(좌측 패널). 전구체 웨პ티드의 N-말단의 MBP으로의 융합은 NisB/NisC 공동 발현과 상관없이 고수준으로 축적되었지만, 인자 Xa-절단 검정(우측 패널)에 의해 판단되어진 것처럼 효소로 개질되지 않는다. 그 결과는 전구체 웨პ티드의 담지체 단백질의 C-말단에 대한 융합은 폭넓게 적용가능하며, N-말단에 대한 융합과는 대조적으로, 효소 기구에 의한 효율적인 개질을 뒷받침한다는 점을 시사한다.

도 3: 전구체 웨პ티드를 포함하는 ProcA-리더의 pIII의 C-말단에 대한 융합은 효소 고리화(티오에테르 가교 형성)를 위한 기질이며, 후속하여 파지 입자 상에 디스플레이된다.

파지 입자는 ASWIEGRWCN-모티프(서열번호 1; S/C; 또는 동일계통의 T/C 및 S/A 파생물)가 있는 웨პ티드를 포함하는 ProcA-리더를 pIII의 C-말단에 융합시키는 파지미드를 사용함으로써 생산하고 인자 Xa-절단 리포터 검정에 적용했다. ProcM 효소 공동 발현의 존재 하에 생산된 S/C (좌측 패널) 또는 T/C (중앙 패널) 잔기를 포함하는 C-말단 웨პ티드 융합체는, 각각 디히드로알라닌(S/C) 및 디히드로부티린(T/C)으로부터 효소성 티오에테르 가교 형성을 나타내는 인자 Xa-절단에 대한 저항성 및 후속하는 파지 입자에 대한 혼입을 나타낸다. 대조적으로, ProcM의 존재 하에 생산되는 경우에, S/A 잔기와의 융합체는 티오에테르 형성을 위한 기질이 아니며, Xa-민감성을 유지한다(우측 패널). 인자 Xa 저항성(신호 잔류[%])은 3 개의 독립적으로 생산된 파지 시료 유래의 미처리 시료(Xa 없음)에 비례해 산출되었다.

도 4: 장내세균의 파지 M13 g3p(pIII) 및 g8p(pVIII) 단백질의 야생형 아미노산 서열

pIII의 서열(서열번호 2; UniProt-ID: P69168) 및 pVIII의 서열(서열번호 3; UniProt-ID: P69541) 단백질에서 강조 표시된 신호 웨პ티드(볼드체)와 막관통 도메인 서열(볼드체, 밑줄)을 제공했다.

도 5: NisA- 및 ProcA-리더 서열 및 pIII의 C-말단 상의 크기가 다양한 고리를 포함하는 웨პ티드 융합체의 효소 고리화(티오에테르 가교 형성) 및 파지 디스플레이.

(A) 파지 입자는 AASWIEGRECN-(서열번호 11), ASWAAIEGRAECN-(서열번호 12), ASWAAAIEGRAAAECN-(서열번호 13), 또는 ASWAAGAAIEGRAAGAAECN-모티프(서열번호 14)(각각, 구축물 i, i+7, i, i+10, i, i+13, 및 i, i+17; 인자 Xa 절단 부위에 밑줄)를 갖는 웨პ티드를 포함하는 NisA-리더를 pIII의 C-말단에 융합시킨 파지미드를 사용해 생산하고, 인자 Xa-절단 리포터 검정에 적용했다. NisB/C 효소 공동 발현의 존재 하에 생산된 C-말단 웨პ티드 융합체는 세린/시스테인 간격에 의해서 좌우되는 고리 크기와는 독립적으로 Xa-절단 저항성을 나타낸다. 인자 Xa 저항성(잔류 신호[%])은 3 개의 독립적으로 생산된 파지 시료 유래의 미처리 시료(Xa 없음)에 비례해서 산출되었다. (B) ProcA-리더 서열을 포함하는 pIII-웨პ티드 융합체이며, ProcM 효소 공동 발현의 존재 또는 부재 하에 생산된 점을 제외하고, (A)와 동일하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0252] **작업 실시예**

[0253] **실시예 1: 대장균에서의 가용성 티오에테르-가교 웨პ티드의 이종성 발현 및 인자 Xa-절단 리포터 검정을 이용한 개질 상태의 확인**

[0254] 하기 실시예에서, 모든 분자생물학 실험은 표준 프로토콜(Ausube1 등, 1999)에 따라 수행한다.

[0255] **벡터의 구축 및 모델 웨პ티드(인자 Xa-절단 부위를 포함하는 웨პ티드)의 가용성 발현:**

- [0256] 대장균에서의 티오에테르-가교 란티바이오틱의 이종성 발현이 최근 기재된 바 있으며, 동일계통 개질 효소들과 함께 전구체 웨프티드의 공동 발현에 의해 달성되었다(Shi 등, *J Am Chem Soc.* 2011 Mar 2;133(8):2338-41). 복합 생물학적 시료에서 그들의 개질 상태의 신속한 평가를 가능케 하며, 미량의 재료만 필요로 하는 리포터 웨프티드를 개발했다. 그러한 웨프티드는 인공 코어 웨프티드에 융합되어 있는 리더 웨프티드(예를 들어, NisA, ProcA, 및 기타로부터 유도된 것)로 이루어지는데, 이는 효소성 티오에테르-가교 설치를 위한 기질 잔기가 측면에 있는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위 및 검출을 위한 2 개의 친화성 태그(예를 들어, His₆- 및 FLAG-태그)를 포함한다.
- [0257] 그러한 웨프티드를 인코드하는 DNA 서열을 IPTG-유도성 Lac-프로모터의 제어 하에 앰피실린 내성 유전자 및 ColE1 복제 기원을 보유하는 대장균 발현 플라스미드에 클로닝했다. 결과로서 수득한 플라스미드를 IPTG-유도성 P_{LlacO1} -프로모터의 제어 하의 번역 후-개질을 위해 동일계통 효소(란티웨프티드 합성효소)(예를 들어, NisB/NisC, ProcM, 및 기타)를 인코드하는 상용성 제 2 플라스미드(클로람페니콜 내성, RSF1030 복제 기원)와 조합하여, 대장균 균주의 동일 세포 내에서 함께 유지했다. 대장균 균주에서의 IPTG 공동-유도시, 선형 전구체 웨프티드가 생산되며, 후속하여 인자 Xa-절단 부위 측면의 기질 잔기의 공유결합성 연결 및 안정한 티오에테르-가교 형성을 유도하는 효소-매개 PTM 개질에 적용했다.
- [0258] 발현 후, 인자 Xa 프로테아제를 이용한 웨프티드의 처리는 인식 부위의 아르기닌과 인접 잔기 사이의 웨프티드 결합의 가수분해를 유도한다. 그러나, 각각 절단 부위 측면의 친화성 태그들 중 하나를 포함하는 두 가지 분리된 폴리웨프티드 대신, 안정한 티오에테르-가교가 두 친화성 태그를 포함하는 두 폴리웨프티드가 연결되어 유지되도록 해준다.
- [0259] 따라서, 샌드위치 효소-연계 면역흡착 검정(ELISAs)에서 인자 Xa 절단 후 두 친화성 태그의 공동-검출은 모델 웨프티드의 원하는 개질(고리화) 확인에 이용되며, 비개질 웨프티드(선형)에 대해서는 두 태그 중 오직 하나만 검출 가능하다.
- [0260] 모델 웨프티드의 개질 상태 모니터링에서 그러한 인자 Xa-절단 리포터 검정의 신뢰성은 하기에 도시했다(도 1). NisA-리더 웨프티드에 융합되어 있는 ompA 신호 서열 및 ASWIEGRWCN(서열번호 1) 서열 측면에 접한 His₆- 및 FLAG-태그를 포함하여 이루어진 코어 웨프티드(S 및 C는 효소-매개 티오에테르-가교 설치에 대한 기질임, 인자 Xa 인식 모티프)를 포함하는 모델 웨프티드가 대장균 MC1061F'에서의 개질 효소 NisB 및 NisC의 공동-발현의 부재 또는 존재 하에 발현된다.
- [0261] 대조군 개질로서, 그렇지 않으면 상동일 서열들이 있는 불용 돌연변이 웨프티드(S를 A로, 또는 C를 A로 한 돌연변이)를 NisB 및 NisC의 부재 또는 존재 하에 발현시켰다.
- [0262] 초기 대수성장기까지 모든 균주들을 37°C, 220 rpm에서 생장시키고, 효소 발현은 0.25 mM IPTG의 첨가로 유도했으며, 배양물의 생장은 22°C에서 밤새 계속했다. 세포 분해물을 확립하고, 각 균주의 가용성 단백질 분획을 항-His IgG 코팅된 384-웰 플레이트에 4 개씩 옮겨 His₆-태그를 통해 발현된 모델 웨프티드를 포획했다. 세척(4×TBS, 1× 인자 Xa 반응 완충액) 후, 2 개씩의 각 시료 중 하나를 500 nM 인자 Xa 프로테아제로 밤새 소화시키고, 나머지 2 개씩은 미처리로 두었다. 플레이트를 TBST로 세척 후, 바이오틴화 항-FLAG IgG를 첨가하고, 온전한 웨프티드를 스트렙타비딘:SULFO-TAG 컨쥬게이트를 이용해 검출했다(전자화학발광을 Meso Scale Discovery SECTOR Imager 6000을 이용해 측정함). 인자 Xa 처리 없이 수득된 신호를 100%로 설정하고(입력), 인자 Xa 처리 후 동일 시료에 대한 신호 비율을 산출했다(Xa-처리 후 잔류 신호[%]). 따라서, 수득된 값은 인자 Xa-절단 내성 웨프티드의 백분율을 반영하며, 티오에테르-가교 형성 효능의 직접적인 측정이다.
- [0263] 도 1에 제시된 바와 같이, 약 60% 절단 내성 웨프티드가 NisB 및 NisC 효소의 공동 발현시 수득되며, 개질 효소의 부재 하에 제공되는 웨프티드는 거의 완전히 절단된다(좌측 패널). 대조적으로, S를 A로(중앙 패널) 또는 C를 A로(우측 패널) 한 돌연변이를 포함하는 웨프티드 변이체는, 효소성 티오에테르-가교 형성에 대한 기질이 아닌데, 심지어 NisB 및 NisC 공동 발현의 존재 하에 생성될 때에도 인자 Xa에 의해 완전히 절단된다.
- [0264] 실시예 2: 전구체 웨프티드를 포함하는 NisA-리더의 pIII에 대한 C-말단 융합체는 생산자 세포에서의 효소성 티오에테르-가교 형성 및 파지 상의 디스플레이를 뒷받침한다
- [0265] 대부분의 파지 디스플레이 적용에서, 관심대상의 단백질 또는 웨프티드는 g3p(미량의 코트 단백질 pIII) 또는 g8p(주된 코트 단백질 pVIII)의 N-말단에 유전자적으로 융합되어, 각각 단일가 및 다가 디스플레이를 제공한다. pIII 및 pVIII의 N-말단은 관심대상의 추정되는 리간드에 대한 결합을 위한 디스플레이된 단백질 또는 웨프티드의 접근성을 뒷받침하는 것으로 여겨지는 파지 입자 본체로부터 멀어지게 된다.

- [0266] 그러나, N-말단 상의 관심대상의 단백질의 널리 적용되는 디스플레이에 추가하여, pIII 및 pVIII의 상응하는 C-말단 상의 파지 디스플레이의 드문 예시가 기재된 바 있다(Fuh 등, FEBS Lett. 2000 Sep 1;480(2-3):231-4; Held 등, J Mol Biol. 2004 Jul 9;340(3):587-97.).
- [0267] 파지 상의 고리화된 모델 웨프티드의 디스플레이를 위해, 도 1에 제시된 모델 전구체 웨프티드 서열 포함 동일 NisA-리더가 파지 g3p의 N- 및 C-말단의 양쪽에 대한 유전자 융합체로서 파지미드 벡터로 클로닝되어(N-말단 절단 변이체 pIII-CT) 효소성 웨프티드 개질 및 파지 입자 상의 디스플레이와의 상용성에 대해 시험한다.
- [0268] 동일계통 개질 효소들의 공동 발현의 존재 또는 부재 하에 그러한 융합체를 인코드하는 파지 입자를 제조하고, 그들을 인자 Xa-절단 리포터 검정에 적용했다.
- [0269] 간략하게, pIII에 대한 N- 또는 C-말단 모델 전구체 웨프티드(NisA-리더 포함) 융합을 위한 발현 플라스미드를 보유하는 대장균 MC1061F' 세포들은 개질 NisB 및 NisC 효소들을 인코드하는 제 2 발현 플라스미드의 존재 또는 부재 하에 3 개씩 생장시켰다. 배양을 24웰 플레이트에서 37°C, 220 rpm으로 초기 대수증식기까지 생장시키고, 약 10의 다수 감염 배수로 VCSM13 헬퍼 파지로 감염시켰다. 감염 후, 세포를 원심분리로 수합한 후, IPTG 함유 배지에 의해 유도된 pIII-융합 및 개질 효소들의 발현 및 파지 생산이 22°C에서 16 시간 동안 계속되도록 했다. 원심분리에 의한 생산자 세포의 제거 후, 파지 포함 상청액을 항-M13(Santa Cruz) IgG-코팅된 384 웰 플레이트에 4 개씩 이동시켜, 주된 코트 단백질 pVIII을 통해 파지 입자를 포획했다.
- [0270] 세척(4×TBS, 1×인자 Xa 반응 완충액) 후, 2 개씩의 시료를 500 nM 인자 Xa 프로테아제로 밤새 소화시키고, 나머지 2 개씩은 미처리로 두었다.
- [0271] 플레이트를 TBST로 세척 후, 바이오틴화 항-FLAG IgG(Sigma; N-말단 pIII-융합체 용) 또는 바이오틴화 항-His IgG(R&D Systems; C-말단 pIII-융합체 용)를 첨가하고, 온전한 웨프티드를 스트렙타비딘:SULFO-TAG 컨쥬게이트를 이용해 검출했다(전기화학발광을 Meso Scale Discovery SECTOR Imager 6000을 이용해 측정함). 인자 Xa 처리 없이 수득된 신호를 100%로 설정하고(입력), 인자 Xa 처리 후 동일 시료에 대한 신호 비율을 산출했다(Xa-처리 후 잔류 신호[%]). 이후 수득된 값은 인자 Xa-절단 저항성 웨프티드의 백분율을 반영하며, 티오에테르-가교 형성 효능의 직접적 측정이다.
- [0272] 도 2의 A에 제시된 바와 같이, 파지 생산 동안 NisB 및 NisC 효소의 공동 발현은 pIII의 C-말단에 융합된 전구체 웨프티드의 효소성 티오에테르-가교 개질 및 파지 표면 상의 고리형 웨프티드의 후속적 디스플레이를 제공했다(좌측 패널). 대조적으로, 동일 전구체 웨프티드의 pIII의 N-말단에 대한 융합은 NisB/NisC-매개 개질을 제공하지 않았으며, 파지 상에서 고리형 웨프티드가 검출되지 않았다(우측 패널). 그러한 발견사실은 전구체 웨프티드 융합 담지체로서 가용성의 발현된 말토오스-결합 단백질(MBP)을 이용해 수득되는 결과에 의해 추가로 뒷받침되는데, 여기서 C-말단에 대한 웨프티드 융합체는 효소로 개질되며(도 2의 C, 좌측 패널), NisB/NisC은 N-말단 융합체를 개질하지 않는다(도 2의 C, 우측 패널; 시료 제조 및 검정 설정은 실시예 1에 기재된 것과 본질적으로 동일)는 결과에 의해 추가로 뒷받침된다. C-말단 전구체의 맥락에서, 티오에테르-가교 형성에 관여되는 잔기들인 pIII 돌연변이, 예를 들어 세린을 알라닌으로(pIII-NisA-Pep_A/C; 도 2B, 좌측 패널) 또는 시스테인을 알라닌으로(pIII-NisA-Pep_S/A; 도 2의 B, 우측 패널)한 웨프티드 융합체는 고리형 웨프티드의 형성 및 디스플레이를 무효화하는데, 이는 맞춤형 웨프티드 개질로 달성된 정확성을 추가로 강조한다.
- [0273] 실시예 3: 번역 후-개질 웨프티드의 C-말단 pIII 파지 디스플레이가 널리 적용가능하며, 타 효소 시스템으로 이동 가능함
- [0274] 파지 구조 단백질의 C-말단 상의 번역 후-개질 웨프티드 디스플레이의 기재된 접근법이 하기 개요하는 타 효소 또는 반-효소 개질 시스템에도 용이하게 적합화될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 모델 전구체 웨프티드는 Prochlorosin3.3(ProcA3.3) 리더 웨프티드 및 코어 웨프티드 서열 GDAGIOAVLASWIEGRECNAAGP(서열번호 6; 인자 Xa 절단 부위 및 번역 후-개질을 위한 측면 S 및 C 잔기들에 밑줄)에 이어 His₆-태그를 포함하는 pIII의 C-말단(플라스미드: pL3C_P3.3_mut10-His)에 융합되었다. 추가적인 대조군 구축물에서, 부모 코어 웨프티드의 세린이 트레오닌으로 돌연변이화되거나(디히드로부티린을 통한 메틸란티오닌 형성을 시험하기 위함) 또는 시스테인이 알라닌으로 돌연변이화된다(효소성 티오에테르-가교 형성을 방지하기 위함).
- [0275] 여러 자연 발생 프로클로로신(ProcA3.3 포함) 전구체를 개질하는 것으로 공지된 이중관능성 디히드라타아제/시클라아제를 인코드하는 프로클로로코카스 MIT9313 유래의 *procM* 유전자는 염색체 DNA로부터 증폭되며, 대장균 발현 플라스미드로 클로닝된다. 모델 전구체 웨프티드를 디스플레이하는 파지가 ProcM 효소 공동 발현의 존재 또는 부재 하에 제공되어, 상기 기재된 바와 같은 인자 Xa-절단 리포터 검정에 적용된다. Xa-절단 내성 웨프티드 융

합체들은 이중특이적 개질 ProcM 효소의 존재 하에 생산시 코어 서열을 포함하는 세린/시스테인- (ProcA-Pep_S/C-pIII; 도 3, 좌측 패널) 및 트레오닌/시스테인- (ProcA-Pep_T/C-pIII; 도 3, 중앙 패널)이 있는 변이체에 대해 검출되었는데, 이는 각각 란티오닌 및 메틸란티오닌을 포함하는 고리형 웨티드의 형성 및 디스플레이를 나타낸다. 다시금, 티오에테르-가교 형성에 관여된 시스테인이 알라닌으로 돌연변이화되었을 때(ProcA-Pep_S/A-pIII; 도 3, 우측 패널), 고리형 웨티드 형성/디스플레이가 없어진다.

[0276] 실시예 4: 유연한 고리 크기를 가진 번역 후-개질 웨티드의 C-말단 pIII 과지 디스플레이

맞춤형 고리 크기를 가진 C-말단 pIII-웨티드 융합체가 효소성 개질에 필요한 시스테인에 대한 세린 및 트레오닌 잔기의 거리 조정에 의해 과지 상에 디스플레이될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 세린 대 시스테인 거리가 증대된 모델 전구체 웨티드를 인코드하는 서열들이 확립되어, pIII의 C-말단에 융합되었다. 본원에서, NisA-리더 웨티드에 이어 FLAG-태그 및 ASW~~I~~EGRECN-(서열번호 11), ASWAA~~I~~EGRAECN-(서열번호 12), ASWAAA~~I~~EGRAAAECN-(서열번호 13), 또는 ASWAAGAA~~I~~EGRAAGAAECN-모티프(서열번호 14; 고리 크기를 각각 i, i+7, i, i+10, i, i+13, 및 i, i+17로 함; 인자 Xa 절단 부위에 밀줄), 및 그에 이어 His₆-태그가 배치된 것이 pIII의 C-말단에 융합되었다.

유사하게, ProcA3.3-리더 웨티드에 이어 HA-태그 및 ASW~~I~~EGRECN-(서열번호 11), ASWAA~~I~~EGRAECN-(서열번호 12), ASWAAA~~I~~EGRAAAECN-(서열번호 13), 또는 ASWAAGAA~~I~~EGRAAGAAECN-모티프(서열번호 14), 및 그에 이어 His₆-태그가 pIII의 C-말단에 융합된다. NisA- 또는 ProcA-리더 서열이 있는 모델 전구체 웨티드를 디스플레이하는 과자는 동일계통 개질 NisB/NisC 또는 ProcM 효소 각각의 존재 또는 부재 하에 생산되어, 상기 기재된 바와 같은 인자 Xa-절단 리포터 검정에 적용되었다. 과지 상에서 디스플레이되는 인자 Xa-절단 내성(티오에테르-가교됨) 웨티드 융합체를 NisB/NisC(도 5의 A) 및 ProcM (도 5의 B) 효소 시스템의 두 가지 모두를 이용해 관찰했다. 절단 내성 웨티드 융합체의 백분율로 판단하여, 시험한 웨티드의 개질 효능이 고리 크기와 대체로 독립적이다.

[0278] 작용 실시예는 대장균에서 과지 pIII의 C-말단에 융합된 리더 서열-포함 웨티드의 효소성 번역 후-개질 및 후속하는 과지 입자 상의 디스플레이를 증명한다. 유사한 결과가 과지의 주된 코트 단백질, pVIII에 대한 C-말단 전구체 웨티드 융합체에 대해 예상된다.

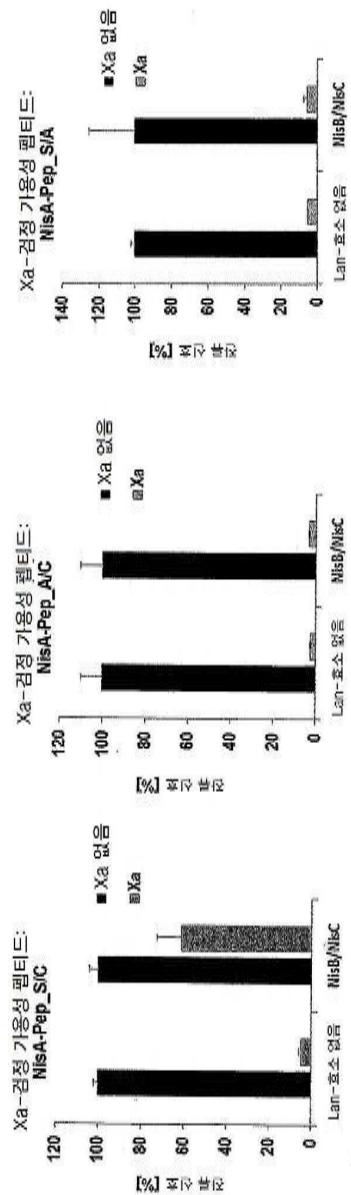
[0279] 본원에 기재된 접근법의 광범위한 적용성을 쉽게 확인할 수 있는데, 이는 심지어 유연관계가 면 종류들, 예를 들어 락트산- 및 시아노박테리아로부터 기원하는 상이한 효소 기구/리더-웨티드 쌍도 번역 후-개질 적용에 유호하게 이용될 수 있기 때문이다. 유사하게, 그러한 개념은 기능적으로 동등한 타 전구체 웨티드/효소 시스템까지 확장될 수 있다.

[0280] 요약하면, 세린 및 트레오닌 잔기의, 디히드라타아제, 예를 들어 NisB 또는 이중관능성 효소, 예를 들어 ProcM에 의한 각각 매우 화학 반응성인 디히드로알라닌 및 디히드로부티린으로의 번역 후 탈수 및, 시클라아제, 예를 들어 NisC 또는 이중관능성 효소, 예를 들어 ProcM에 의한 고리형 웨티드의 형성이 과지 디스플레이와 상용성인 것으로 입증되었다.

[0281] 대안으로서, 약한 알칼리성 조건 하에 디히드로알라닌을 포함하는 과지 디스플레이된 웨티드가 이웃하는 시스테인 또는 라이신 잔기와 쉽게 반응하여, 각각 티오에테르- 및 리소알라닌-가교를 형성하고, 과지 입자 상에 디스플레이되는 다양한 속박 폴리웨티드 구조를 형성한다.

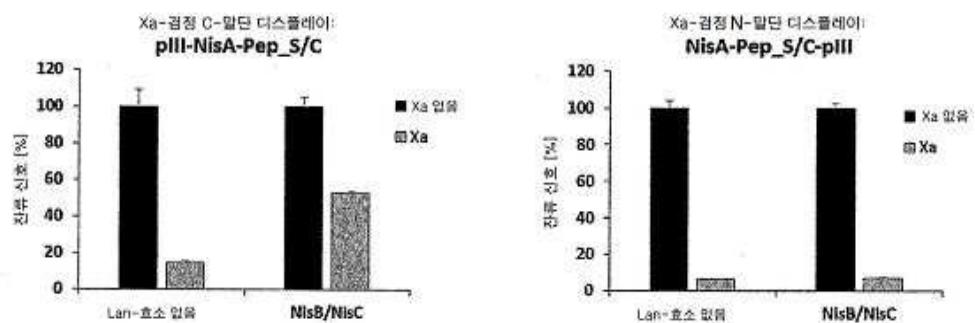
도면

도면1

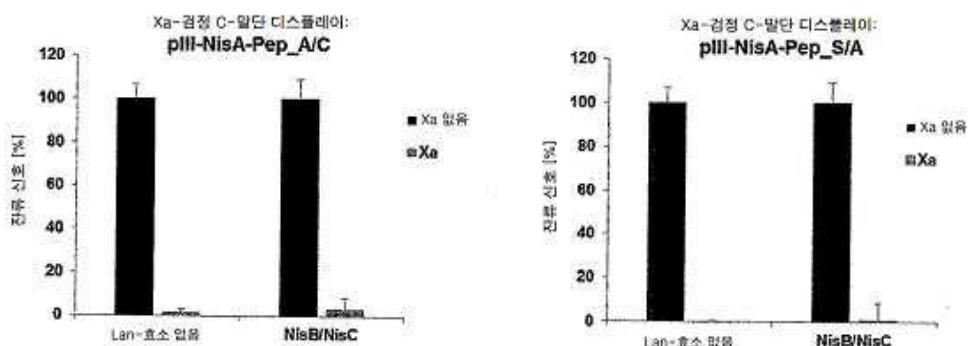


도면2

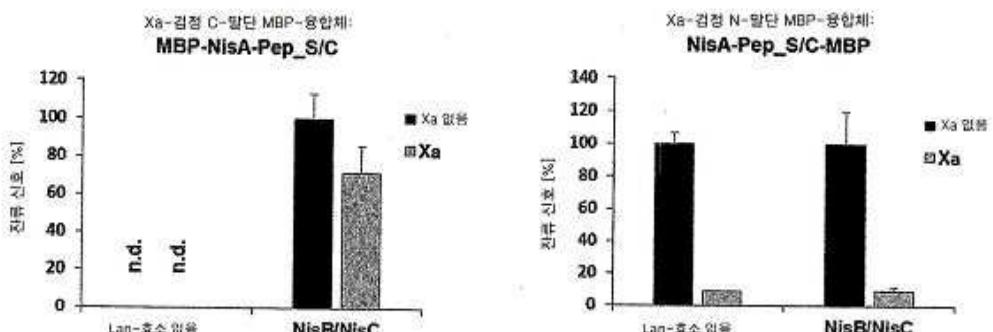
A



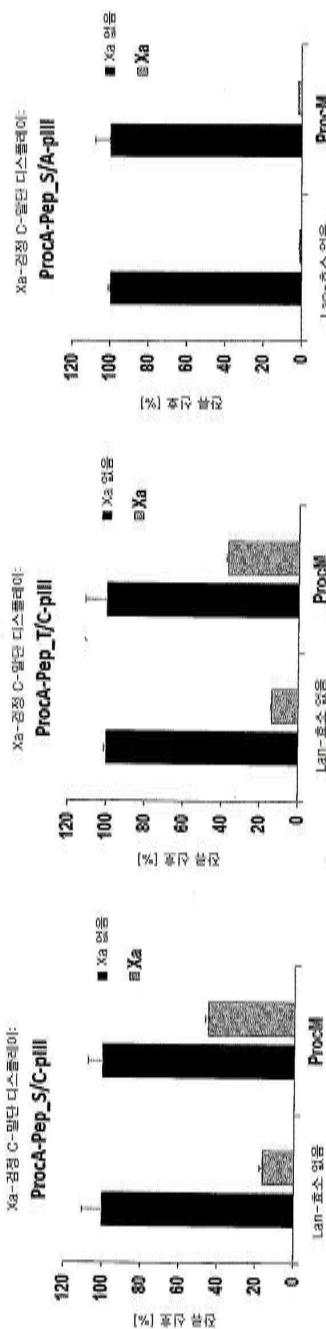
B



C



도면3



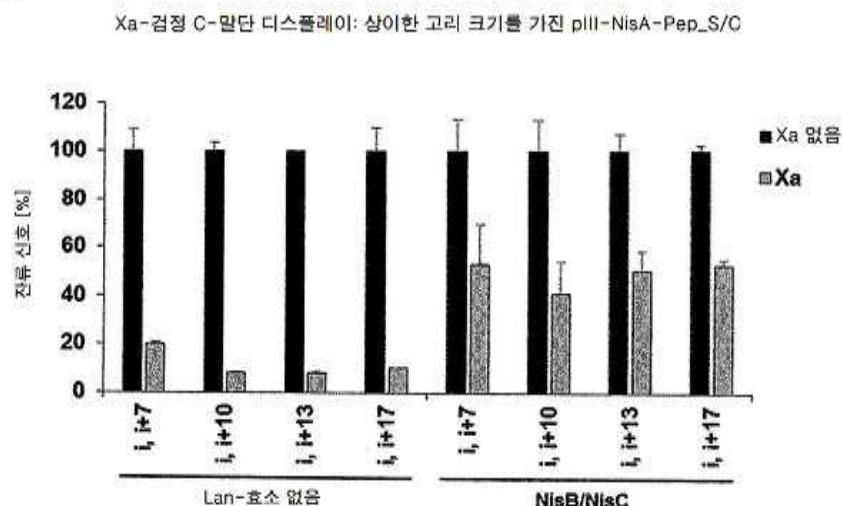
도면4

pIII MKLLFAIPLVVPFYSHSAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNA
TGVVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGSSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIP
GYTYINPLDGTYPGPTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTIVYTGTVT
QGTDPVKTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSQFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPP
VNAGGGSGGGGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGSGDFDYEKMANANKGAMT
ENADENALQSDAKGKLDSVATDYGAAIDGFIGDVSGLANGNGATGDFAGNSSQMAQVG
DGDNSPLMNNFRQYLPQLPQSVECRPFVFSAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVA
TEMYVFSTFANILRNKES

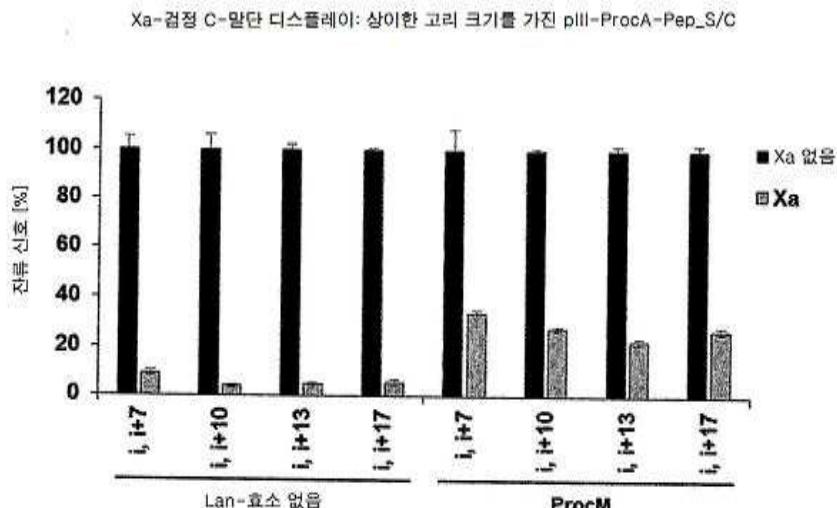
pVIII MKKSLVLKASAVAVATLVPMLSFAAEGDDPAKAAFNSLQASATEYIGYAWAMVVVIVGA
TIGIKLFKKFTSKAS

도면5

A



B



서 열 목 록

- <110> MorphoSys AG
- <120> NOVEL METHODS FOR DISPLAYING CYCLIC PEPTIDES ON BACTERIOPHAGE PARTICLES
- <130> MS225/PCT
- <150> EP14199588.6
- <151> 2014-12-22
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 1

Ala Ser Trp Ile Glu Gly Arg Trp Cys Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 424

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Artificial sequence

<400> 2

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser

1 5 10 15

His Ser Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu

20 25 30

Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr

35 40 45

Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys

50 55 60

Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu

65 70 75 80

Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu

85 90 95

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp

100 105 110

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

115 120 125

Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu

130 135 140

Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg

145 150 155 160

Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly
 165 170 175
 Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys
 180 185 190
 Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe
 195 200 205

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

275 280 285
 Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly
 290 295 300
 Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe
 305 310 315 320
 Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
 325 330 335
 Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn
 340 345 350

Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln
 355 360 365
 Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Ser Ala Gly Lys Pro Tyr Glu
 370 375 380
 Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala
 385 390 395 400
 Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala
 405 410 415

Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser

420

<210> 3

<211> 73

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 3

Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Phe Asn Ser Leu Gln Ala Ser Ala Thr Glu Tyr Ile Gly Tyr Ala

35 40 45

Trp Ala Met Val Val Val Ile Val Gly Ala Thr Ile Gly Ile Lys Leu

50 55 60

Phe Lys Lys Phe Thr Ser Lys Ala Ser

65 70

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 4

Leu Arg Asn Lys Glu Ser

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 5

Thr Ser Lys Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 6

Gly Asp Ala Gly Ile Gln Ala Val Leu Ala Ser Trp Ile Glu Gly Arg

1 5 10 15

Glu Cys Asn Ala Ala Ala Gly Pro

20

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 7

Leu Glu Glu Val Ser Glu Gln Glu Leu Asp

1 5 10

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 8

Leu Phe Asp Leu Asp Leu

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 9

Phe Asn Leu Asp Val

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 10

Ile Leu Glu Leu Gln Asn Leu Asp

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 11

Ala Ser Trp Ile Glu Gly Arg Glu Cys Asn

1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 12

Ala Ser Trp Ala Ala Ile Glu Gly Arg Ala Glu Cys Asn

1 5 10

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 13

Ala Ser Trp Ala Ala Ala Ile Glu Gly Arg Ala Ala Glu Cys Asn

1 5 10 15

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 14

Ala Ser Trp Ala Ala Gly Ala Ala Ile Glu Gly Arg Ala Ala Gly Ala

1 5 10 15

Ala Glu Cys Asn

20