



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0085234
(43) 공개일자 2012년07월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/40 (2006.01) *A61P 31/10* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7002540
 (22) 출원일자(국제) 2010년07월02일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2012년01월30일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/040949
 (87) 국제공개번호 WO 2011/003085
 국제공개일자 2011년01월06일
 (30) 우선권주장
 61/223,005 2009년07월03일 미국(US)

- (71) 출원인
 로스 엔젤레스 바이오메디칼 리서치 인스티튜트
 옛 하버-유씨엘에이 메디칼 센터
 미국, 캘리포니아 90250-2064, 토렌스, 웨스트 카
 슌 스트리트 1124
 (72) 발명자
 푸, 유에
 미합중국, 캘리포니아 90202, 토렌스, 사우스 버
 먼트 애비뉴 21501
 뤼, 관평성
 미합중국, 캘리포니아 90501, 토렌스, 240, 더블
 유 카슨 스트리트 아파트 1520
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 이문섭

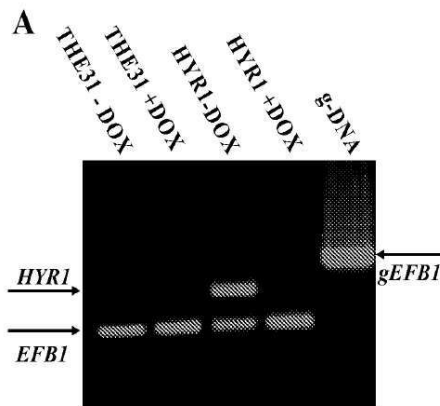
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **칸디다에 대한 능동 및 수동 면역의 표적으로서 HYR 1**

(57) 요약

본 발명은 백신 표적 및 과중성 칸디다증(candidiasis)에 대한 예방 전략으로서 *HYR1* 를 제공한다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

아브라함, 아시라프

미합중국, 캘리포니아 92620, 얼바인, 다이어맨터
29

스펠베르그, 바드, 제이.

미합중국, 캘리포니아 90275, 란초 팔로스 베르데
스, 아베니다 셀레스티 30140

에드워드, 존, 이., 주니어

미합중국, 캘리포니아 90274, 팔로스 베르데스 이
스테이트, 비아 라 셀바 3708

특허청구의 범위

청구항 1

HYR1 폴리펩타이드의 단편과 실질적으로 동일한 폴리펩타이드를 함유하는 백신.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HYR1 폴리펩타이드는 하기 서열번호 1의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 백신:

```

1      MKVVSNI FTILLTLNLSAALEVVTSRI DRGGIQGFHGDVKVHSGATWAI LGTTLCSEFFG
61     GLEVEKGASLFIKSDNGPVLALNVALSTLVRPVI NNGVILNSKSSTSFSNFDI GGSSFT
121    NNGE IYLDSSGLVKSTAYLYAREWTNNGLI VAYQNQKAAGNI AFGTAYQTI TNNGQICLR
181    HQDFVPATKIKGTGCVTADEDTWIKLGNTILSVEPTHNFYLKDSKSSLIVHAVSSNQFTF
241    VHGFNGNKLGLTLPLTGNRDHFRFEYYPDTGILQLRADALPQYFKIGKGYDSKLFRI VN
301    SRGLKNAVTYDGPVPNNEIPAVCLIPCTNGPSAPESEDLNTPPTSSI ETSSYSSAATES
361    SVVSESSAVDSL TSSSLSSKSESSDVVSSTNI ESSSTA IETTMNESST DAGSSSI SQ
421    SESSSTAI TSSSETSSSESMSASSTTASNTSI ETDSGIVSQSESSSNALSSTEQSI TSSP
481    GGSTIYVNSTVTSTITSCDENKCTEDVVTIFTTVPCSTDCVPTTGDIPMSTSYTQRTVTS
541    TITNCDEVSCSQDDVVTYTTNPHTTVDATTTTTSTGGDNSTGGNESGSHGPGNGSTEG
601    SGNGSGAGSNEGSQSGPNNGSGSGSEGGSNNGSGSDSGSNNGSGSGSNNGSGSGSTEGSE
661    GSGSNEGSQSGSGSQPGPNEGSEGGSGSNEGSNHGSNEGSQSGSGSNNGSGSGSQSG
721    SGSGSQSGSESGSNSGSNEGSNPGAGNGSNEGSQSGGNGSEAGSQGSGPNNGSGSGHN
781    DGSGSGSNQGSNPGAGSGSGSESGSKAGSHSGSNEGAKTDSIEGFHTESKPGFNTGAHTD
841    ATVTGNSVANPVTTSTESDTTISVTVSI TSYMTGFDGKPKPFTTVDVI PVPHSMPNNTD
901    SSSSVPTIDTNEGSSIVTGGKSILFGLIVSMVLFM (SEQ ID NO. :1).
    
```

청구항 3

제1항에 있어서, 보강제(adjuvant)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 HYR1 폴리펩타이드의 단편은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 크루세이(*Candida krusei*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 및 캔디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*)로 구성된 군에서 선택된 캔디다(*Candida*) 균주에서 발현되는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단편은 HYR1 폴리펩타이드의 N-말단 영역 단편으로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 단편은 하기 서열번호 2의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 백신:

```

1          TSRIDRGGIQ GFHGDVKVHS
21         GATWAILGTT LCSFFGGLEV
41         EKGASLFIKS DNGPVLALNV
61         ALSTLVRPVI NNGVISLNSK
81         SSTSFSNFDI GGSSFTNNGE
101        IYLASSGLVK STAYLYAREW
121        TNNGLIVAYQ NQKAAGNIAF
141        GTAYQTITNN GQICLRHQDF
161        VPATKIKGTG CVTADEDTWI
181        KLGNTILSVE PTHNFYKDS
201        KSSLIVHAVS SNQFTVHGF
221        GNGNKLGLTL PLTGNRDHRF
241        FEYYPDTGIL QLRAAALPQY
261        FKIGKGYDSK LFRIVNSRGL
281        KNAVTYDGPV PNNEIPAVCL
301        IPCTNGPSAP ESESDLNTPT
321        TSSIET (SEQ ID NO.:2) .
    
```

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단편은 융합 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 단편은 이종(heterologous) 리더 서열에 융합된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 단편은 태그(tag) 또는 링커 서열에 융합된 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 태그는 히스티딘(histidine) 태그인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 단편은 형질전환된 세포로부터 얻는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 형질전환된 세포는 형질전환된 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 세포인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 백신의 면역량을 투여하는 것을 포함하는, 칸디다증(candidiasis) 감염의 치료 또는 예방 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 칸디다증 감염은 파종성(disseminated) 칸디다증인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 투여는 능동 면역화, 수동 면역화, 또는 그 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

HYR1 폴리펩타이드의 단편과 실질적으로 동일한 단리된 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 칸디다증(candidiasis) 감염의 치료 또는 예방 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 HYR1 폴리펩타이드의 단편은 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 및 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*)로 구성된 군에서 선택된 칸디다(*Candida*) 균주에서 발견되는 것을 특징으로 하는 방법..

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 단편은 HYR1 폴리펩타이드의 N-말단 영역 단편으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 단편은 서열번호 2의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 단편은 융합 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 단편은 이종(heterologous) 리더 서열에 융합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 단편은 태그(tag) 또는 링커 서열에 융합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 태그는 히스티딘(histidine) 태그인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제16항에 있어서, 상기 단편은 형질전환된 세포로부터 얻는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 형질전환된 세포는 형질전환된 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 퍼블릭 헬스 서비스 그랜트 R21 AI066010, R01 AI067703, R01 AI063503, 및 R03 AI083251하의 정부 지원으로 만들어 졌다. 미합중국 정부는 본 발명에 일정 권리를 가진다.
- [0002] 본 발명은 캔디다(*Candida*) 균사(hyphal) 세포벽 단백질에 관한 것이며, 캔디다 균사 세포벽 단백질로 백신화(vaccination)에 대한 면역 응답으로부터 초래되는 항체에 관한 것이며, 캔디다증(candidiasis) 및 캔디다 균사 세포벽 단백질을 갖는 다른 세균 감염의 치료 및/또는 예방 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0003] 여기에 언급된 모든 문헌과 인용 부분들은 2009. 7. 3자 출원된 미국 가출원 번호 61/223,005를 포함하여 본 명세서에 참조로서 포함된다. 그러나, 어떤 문헌들도 청구된 발명의 선행기술로서 받아들여지지 않는다.
- [0004] 약 60,000 건의 과중성 캔디다증(disseminated candidiasis)이 매년 미국에서 발생되어 [1], 수십억 달러의 보건의료 비용을 초래한다. 그러한 감염은 40% 의 사망율을 가지므로, 새로운 예방 또는 치료적 표적을 발굴할 필요가 있다.
- [0005] 과중성 캔디다증에 대한 1차 숙주 방어 메커니즘은 유기체(organism)의 탐식적(phagocytic) 사멸이다 [2, 3]. 오직 탐식 세포들만이 시험관내에서 캔디다(*Candida*)를 직접 사멸시킬 수 있다 [4]. 또한, 마우스, 래빗, 개 또는 인간에 캔디다(*Candida*)를 정맥 접종한지 30분이내에 망상내피계(reticuloendothelial system), 특히 간(liver)에 머무르게 된다. 쿠퍼(Kupffer) 대식세포가 풍부한 간은 단일 패스동안 문맥계(portal system)에서 99.9%의 효모(yeast)를 제거시킬 수 있어서 [5], 진균류(fungus)에 대한 탐식적 방어 메커니즘의 유효성을 보여 준다. 따라서, 캔디다 알비칸스(*C. albicans*)의 탐식적 사멸에 대한 내성은 유기체의 중요한 병독성(virulence) 기능이다.
- [0006] 세포 표면 글리코실 포스파티딜이노시톨(Cell surface glycosyl phosphatidylinositol (GPI))-앵커된(anchored) 단백질들은 병원체(pathogen)와 숙주(host)사이의 중요한 인터페이스에 있으며, 이들 단백질이 숙주-병원체 상호작용에 참여할 가능성을 높여준다 [6].
- [0007] 상기 병독성에 기여하는 유기체의 조절 경로(regulatory pathway)에서의 효과인자들(effectors)을 동정하는 것은 기존 항진균제들(antifungal agents)보다 우수한 치료방법 또는 치료제 개발의 기회를 제공한다. 상기 병독성에 관여하는 조절 경로에 영향을 주는 세포표면 단백질들 또는 균사(hyphal) 단백질을 동정하는 것은 특히 유망한데, 이들 단백질의 특성화(characterization)가 캔디다 감염과 싸울 때 기존 항진균제들보다 우수하거나 그들과 상승적 효과를 나타낼 가능성이 있는 면역치료적(immunotherapeutic) 기술을 가능케하기 때문이다.
- [0008] 캔디다 알비칸스(*C. albicans*)의 병독성은 숙주 구성성분에 부착하고 효모에서 균사(hyphae)로 변형하는 능력이 병원성(pathogenicity)을 결정하는데 가장 중요한 여러 개의 추정상 병독성 인자들에 의해 조절된다. 캔디다를 살균할 수 있는 강력한 항진균제들이 존재하지만, 암포테리신(amphotericin) B와 같은 강력한 항진균제로 처리

하더라도 칸디다증의 기여 사망률은 약 38%에 이른다. 또한, 암포테리신 B와 같은 기존 약제들은 원치않는 독성(toxicity)을 나타내는 경향이 있다. 비록 암포테리신 B보다 독성이 약한 항진균제들이 추가적으로 개발될 수 있지만, 더 강력한 약제들이 개발될 가능성은 적다. 따라서, 과중성 칸디다증을 치료 또는 예방할 수 있는 수동(passive) 또는 능동(active) 면역치료법은 표준 항진균 요법의 대체로서 유망하다.

[0009] 따라서, 칸디다 및 기타 면역원적 관련 병원체들에 대해 숙주 면역방어 및 수동 면역방어를 제공할 수 있는 효과적인 면역원(immunogens)에 대한 필요성이 존재한다. 본 발명은 이러한 필요성을 만족시켜줄 뿐만 아니라 관련된 이점들을 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 칸디다(*Candida*) HYR1 폴리펩타이드 항원들과 그러한 항원들의 치료적 용도를 특징으로 한다. 본 발명의 HYR1 폴리펩타이드 항원들은 개체(subject)에서 칸디다 감염을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

[0011] 칸디다 알비칸스(*C. albicans*)에서 GPI-앵커된 단백질들에 초점을 맞추어 새로운 조건(conditional) 과발현/억제 시스템을 스크린함으로써, 본 발명자들은 병독성 인자로서 *HYR1* 를 동정하였다. *HYR1* 은 균사(hyphae) 공동-발현 유전자로서, 그것의 널(null) 돌연변이 균주는 시험관내에서 어떤 형태학적 이상도 나타내지 않는다 [7]. 아래에서 우리는 *HYR1* 가 시험관내에서 탐식적 사멸에 대한 내성을 매개하고, 생체내에서 조직의 진균 부하(burden)를 조절하고, 따라서 과중성 칸디다증의 중증도를 경감시킬 수 있는 백신 표적이 될 수 있다는 것을 보여주는 결과들을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 정의

[0013] “HYR1” 폴리펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩타이드를 의미한다. 바람직하게는, HYR1 폴리펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 70, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100% 동일성을 가진다.

[0014] “HYR1 폴리펩타이드의 단편” 또는 “HYR1 단편” 은 937, 936, 또는 935 아미노산 미만을 함유하는 HYR1 폴리펩타이드의 단편을 의미한다. 바람직한 HYR1 단편은 길이가 300 내지 350, 또는 250 내지 500 아미노산이다. 바람직하게는, 상기 단편은 937, 936, 935, 934, 933, 932, 931, 또는 930, 920, 910, 900, 890, 880, 870, 860, 850, 840, 830, 820, 810, 800, 790, 780, 770, 760, 750, 740, 730, 720, 710, 700, 690, 680, 670, 660, 650, 640, 630, 620, 610, 600, 590, 580, 570, 560, 550, 540, 530, 520, 510, 500, 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 400, 390, 380, 370, 360, 350, 340, 330, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 또는 10 아미노산 미만이며, 바람직하게는 면역원성(immunogenic)이다. 예컨대, HYR1 단편은 서열번호 2의 서열에서 하나 이상의 보존적(conservative) 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 더 바람직한 HYR1 단편은 서열번호 2의 서열에서 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 함유하고, 및/또는 서열번호 2의 서열의 N- 및/또는 C-말단에 적어도 한 개의 측점(flanking) 아미노산 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 측점 아미노산) 을 함유할 수 있다. 다른 바람직한 HYR1 단편은 서열번호 2의 서열의 7개 이상의 연속적 아미노산을 함유할 수 있다.

[0015] 제한되지 않는 HYR1 단편의 예들은 서열번호 2의 서열의 1-40, 10-50, 20-60, 30-70, 40-80, 50-90, 60-100, 70-110, 80-120, 90-130, 100-140, 110-150, 120-160, 130-170, 140-180, 150-190, 160-200, 170-210, 180-220, 190-230, 200-240, 210-250, 220-260, 230-270, 240-280, 250-290, 및 260-300, 270-310, 280-320, 및 290-331 아미노산을 포함하며, 이들 단편은 하나 이상의 다음 특징들을 가진다: 서열번호 2의 서열에서 하나 이상의 보존적 아미노산 치환 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 보존적 아미노산 치환); 서열번호 2의 서열의 N- 및/또는 C-말단으로부터 절단된(truncated) 하나 이상의 아미노산 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 아미노산); 및, 서열번호 2의 서열의 N- 및/또

는 C-말단에 적어도 한 개의 측접 아미노산 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 측접 아미노산).

- [0016] “실질적으로 동일한” 은 비교 아미노산 서열과 적어도 50%, 바람직하게는 60%, 70%, 75%, 또는 80%, 더 바람직하게는 85%, 90%, 또는 95%, 가장 바람직하게는 99% 아미노산 서열 동일성을 나타내는 폴리펩타이드를 의미한다. 비교 서열의 길이는 일반적으로 적어도 10 아미노산, 바람직하게는 적어도 15 인접(contiguous) 아미노산, 더 바람직하게는 적어도 20, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 275, 300, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 또는 350 인접 아미노산, 및 가장 바람직하게는 전장 아미노산 서열일 수 있다.
- [0017] 서열 동일성(identity)은 디폴트 세팅에서 서열분석 소프트웨어 (예컨대, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705 소재 Genetics Computer Group 의 Sequence Analysis Software Package)를 이용하여 측정할 수 있다. 그러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실 및 기타 변형에 대해 상동성(homology)의 정도를 부여함으로써 유사한 서열들을 매치시킬 수 있다.
- [0018] 다중(Multiple) 서열들은 Clustal W(1.4) 프로그램 (Germany and Desmond Higgins of European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK 소재 European Molecular Biology Laboratory의 Julie D. Thompson 및 Toby Gibson에 의해 만들어진)을 이용하여 정렬(aligned)될 수 있으며, 쌍별(pairwise) 정렬 모드를 “슬로우” 로 세팅하고, 쌍별 정렬 파라미터를 10.0의 오픈 갭 페널티 및 0.1의 확장 갭 페널티를 포함하도록 하고, 유사성(similarity) 매트릭스를 “블로섬(blosum)” 으로 세팅한다. 또한, 다중 정렬 파라미터는 10.0의 오픈 갭 페널티, 0.1의 확장 갭 페널티를 포함하고, 유사성 페널티를 “블로섬”으로, 딜레이 다이버전트를 40%로, 갭 거리를 8로 세팅할 수 있다.
- [0019] “보존적 아미노산 치환” 은 측쇄의 화학적 성질이 관련된 한 패밀리에 속하는 아미노산들내에서 한 아미노산에서 다른 아미노산으로의 치환을 의미한다.
- [0020] 유전적으로 코딩되는 아미노산들은 4개의 패밀리로 나눌 수 있다: 산성 (아스파테이트, 글루타메이트); 염기성 (라이신, 아르기닌, 히스티딘); 비극성 (알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판); 및 비하전 극성 (글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 타이로신). 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신은 종종 방향족 아미노산으로 그룹핑된다. 유사한 방식으로, 아미노산들은 다음 그룹들로 구분될 수 있다: 산성 (아스파테이트, 글루타메이트); 염기성 (라이신, 아르기닌, 히스티딘); 지방족 (글라이신, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 세린, 트레오닌) (임의로 지방족-히드록실로 그룹핑되는 세린 및 트레오닌; 방향족 (페닐알라닌, 타이로신, 트립토판); 아미드 (아스파라긴, 글루타민); 및 황-함유 (시스테인, 메티오닌).
- [0021] 아미노산 서열의 변화가 기능성 상동성을 초래하는지는 본 명세서에 기재된 어세이와 같은 표준 방법들 사용하여 변이체 펩타이드가 야생형 단백질과 유사한 방식으로 기능하는 능력을 평가함으로써 결정될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구현에는 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열에 적어도 하나의 보존적 아미노산 치환을 함유하고, 더 바람직하게는 서열번호 1 또는 2의 서열에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 보존적 아미노산 치환을 함유할 수 있다.
- [0023] “측접(flanking) 아미노산” 은 특정 서열의 N- 또는 C-말단에 직접 인접한 폴리펩타이드 서열에서의 아미노산을 의미한다. 바람직하게는, 측접 아미노산은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열 또는 그 단편의 N- 및/또는 C-말단에 존재하고, 더 바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 측접 아미노산이 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열 또는 그 단편의 N- 및/또는 C-말단에 존재할 수 있다.
- [0024] “융합 단백질” 은 (1) HYR1 폴리펩타이드, HYR1 단편; 및 (2) 융합 파트너 로 구성된 폴리펩타이드를 의미한다.
- [0025] “융합 파트너” 는 HYR1 폴리펩타이드 또는 HYR1 단편에 융합될 수 있는 이종(heterologous) 서열을 의미한다. 융합 파트너의 예들은 여기 기술되며 검출 마커, 안정화(stabilizing) 도메인, 또는 단백질의 생산 또는 정제를 도와주는 서열을 포함한다.
- [0026] “면역 응답(immune response)” 은 항원 또는 감염체에 응답하는 유기체의 면역계의 활성화를 의미한다. 척추동물에서, 이것은 하나이상의 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 비접촉(naive) B 세포의 기억 B 세포로의 성숙; 혈장 세포 (이펙터 B 세포)에 의한 항체 생성; 세포-매개 면역의 유도; CD4⁺ T 세포의 활성화 및 사이토카인 방출; CD8⁺ T 세포의 활성화 및 사이토카인 방출; 탐식 세포들 (예컨대, 대식세포, 호중구, 호산구)의

사이토카인 동원 및 활성화 및; 및/또는 보체(complement) 활성화.

- [0027] “면역원성(immunogenic)”은 개체에서 면역 응답을 유도할 수 있는 어떤 물질도 의미한다.
- [0028] “약학적으로 허용가능한 염”은 약학 분야에서 사용되는 어떤 비독성 산부가염 또는 금속착염(metal complex)도 의미한다. 상기 산부가염의 예들은 아세트산, 젖산, 파모산, 말레산, 시트르산, 말산, 아스코르브산, 숙신산, 벤조산, 팔리트산, 수베르산, 살리실산, 타르타르산, 메탄술폰산, 툴루엔술폰산, 또는 트리플루오로아세트산 등과 같은 유기산들; 타닉산, 카르보메틸 셀룰로스 등과 같은 중합산; 염산, 브롬산, 황산, 인산 등 과 같은 무기산을 포함한다. 금속착염은 아연, 철 등을 포함한다.
- [0029] “약학적으로 허용가능한 담체”는 개체에 약제를 용해시키고 전달하는데 사용되는 어떤 용액도 의미한다. 바람직한 약학적으로 허용가능한 담체는 염수(saline)이다. 바람직한 구현예에서, 약학적으로 허용가능한 담체는 보강제(adjuvant)를 포함한다. 보강제의 예들은 여기에 기술된다. 다른 생리학적으로 허용가능한 담체 및 그들의 제제는 당업계에 알려져 있으며, 예컨대 Remington’s Pharmaceutical Sciences, (20th edition), ed. A. Gennaro, 2003, Lippincott Williams & Wilkins에 기술되어 있다.
- [0030] “단리된(isolated)”은 자연적으로 부수되는 성분들과 분리된 단백질 (또는 그 단편)을 의미한다. 전형적으로, 폴리펩타이드는 자연적으로 연합되는 단백질들 및 자연 발생 유기분자들이 없이 중량기준 적어도 60%일 때 실질적으로 단리된 것으로 본다. 상기 정의는 또한 그것의 측접 아미노산들로부터 구분된 폴리펩타이드까지 확장된다(예컨대, 아미노산 서열의 경우 폴리펩타이드에서 서열이 자연적으로 연합된 측접 아미노산들이 없는 서열도 단리된을 의미함). 바람직하게는, 폴리펩타이드는 중량기준 적어도 75%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 99% 단리된다. 단리된 폴리펩타이드 표준 기술들, 예컨대 자연 소스로 부터의 추출(예컨대 캔디다로 감염된 세포로부터 정제)하거나, HYP1 단편 또는 그 융합 단백질을 코딩하는 재조합 핵산을 발현시키거나, 폴리펩타이드를 화학적으로 합성함으로써 얻어질 수 있다. 순도(Purity)는 어떤 적당한 방법, 예컨대, 칼럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 또는 HPLC 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0031] “치료학적 유효량”은 개체에 하나이상의 다음 효과를 생성하는데 필요한 면역원성 화합물 (예컨대, 폴리펩타이드, 단편, 융합 단백질, 또는 백신)의 양을 의미한다: 면역 응답, 캔디다 감염 수준의 감소 (예컨대, 적어도 5%, 10%, 20%, 또는 30%; 더 바람직하게는 40%, 50%, 60%, 또는 70%; 및 가장 바람직하게는 80% 또는 90% 감소); 환자에서 캔디다 감염의 하나이상의 증상의 감소 (예컨대, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 감소); 또는 새로운 캔디다 감염에 대한 내성의 증가 (예컨대, 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50%; 더 바람직하게는 60%, 70%, 80%, 또는 90%; 또는 가장 바람직하게는 100%, 200%, 또는 300% 증가).
- [0032] 본 발명의 다른 특징들과 이점들은 후술하는 상세한 설명, 도면 및 청구항들로부터 명백할 것이다.
- [0033] 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)는 인간의 일반적인 병원체이다. 예컨대, *C. albicans*는 정상적으로는 무해한 공생균이지만, 질(vaginal) 및/또는 구인두(oropharyngeal) 캔디다증과 같은 표면 점막피부 감염으로부터 깊은 기관이 관여하는 파종성(disseminated) 캔디다증에 이르기까지 다양한 질환을 유발할 수 있다. 질병을 유발하기 전에, 진균류는 위장관, 몇몇 경우에는 피부 및 점막을 콜론화(colonize)한다. 숙주 점막 표면에 부착하는 것이 이러한 초기 단계의 중요한 필수과정이다. 콜론화 이후, *C. albicans*는 감염된 혈관내 기구를 통해 또는 화학요법이나 스트레스성 케양에 타협하여 위장 점막을 통해 이주(transmigration)함으로써 혈류내로 진입한다. 유기체는 다음 혈류를 통해 파종하고, 혈관내피에 결합하고 침투하여 혈관 트리로부터 퇴거하고, 간, 비장, 및 신장과 같은 깊은 기관에 침입한다.
- [0034] 여기 기술된 HYR1 단편의 동정 및 기능 특성화는 이 폴리펩타이드를 캔디다증의 치료에 효과적으로 이용될 수 있게 해준다.
- [0035] 내피 세포에의 부착에 의한 *C. albicans*의 발병기전의 성질은 여기에 전체로서 참조로 포함된 U.S. Pat. No. 5,578,309에서 토론된다. HYR1 유전자의 설명 및 그 유전자 산물들의 특성화를 포함하는 특성들은 Bailey et al. (*Journal of Bacteriology* 178:5353-5360, 1996)를 참조하라.
- [0036] 본 발명은 단리된 HYR1 단편 및 임의로 약학적으로 허용가능한 매체에서의 보강제를 갖는 백신을 제공한다. 상기 백신은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 크루세이(*Candida krusei*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 또는 캔디다 파라프실로시스(*Candida*

parapsilosis)와 같은 캔디다(*Candida*) 종에서 유래된 HYR1 단편일 수 있다.

- [0037] 본 발명은 과증성 캔디다증을 치료, 예방 또는 완화하기 위한 백신으로서 *C. albicans* HYR1 서열의 유전자 산물을 이용한다 상기 백신은 *C. albicans* 의 서로다른 균주(strains)뿐만 아니라 다른 캔디다(*Candida*) 종(species)에 대해서도 유효하다.
- [0038] 따라서, 한 양태에 따르면, 본 발명은 약학적 조성물로 제제화되고 보강제가 있거나 없이 백신으로서 투여시 유용한 HYR1 단편을 제공한다. HYR1 단편은 캔디다 오리진일수도 있고 예컨대 캔디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 캔디다 크루세이(*Candida krusei*), 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 및 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*)와 같은 캔디다 속에 속하는 종들로부터 얻어질 수도 있다. HYR1 단편은 단리된 또는 정제된 형태로 얻어질 수 있으며, 따라서 본 발명의 한 구현예에 따르면 HYR1 단편은 캔디다에 대한 면역 응답을 유도하기 위해 환자들의 면역 응답을 유발하는 백신으로서 제제화될 수 있다.
- [0039] 본 발명은 또한 과증성 캔디다증을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 그 방법은 면역량(immunogenic amount)의 HYR1 단편 백신을 투여하는 것을 포함한다. 상기 백신은 보강제(adjuvant)가 있거나 없이 투여될 수 있다. HYR1 단편은 서로다른 캔디다 균주들뿐만 아니라 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 크루세이(*Candida krusei*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 및 캔디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*)와 같은 다른 캔디다 종들로부터 유래될 수도 있다.
- [0040] 본 발명의 백신의 서로다른 캔디다 균주들, 서로다른 캔디다 종들, 기타 세균 및 감염체 및 그들의 광범위한 면역 활성화는 후술되는 것과 같은 표준 방법에 따라 평가되었다.
- [0041] 여기에 제공된 교시와 안내에 따르면, 당업계의 기술자는 보강제가 있거나 없이 백신으로서 투여되는 약학적으로 허용가능한 조성물내의 하나이상의 HYR1 단편에 당업계에 잘 알려진 면역치료 방법들이 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 발명의 목적을 위해서, 용어 “약학적” 또는 “약학적으로 허용가능한” 은 비독성이고 바람직하게는 인간에 안전하게 투여될 수 있는 담체 또는 첨가제와 함께 사용되는 당업계 알려진 기술로 제제화된 조성물을 의미한다. 투여는 당업계에 잘 알려진 루트들, 예컨대 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하 주사를 통해 수행될 수 있다. 본 발명의 백신은 또한 용액내 백신의 활성을 보존시켜준다고 당업계에 알려진 버퍼, 염 또는 기타 용매를 포함할 수 있다. 유사하게, 당업계에 잘 알려진 광범위한 보강제중 어떤 것도 감수성 숙주 세포에 캔디다의 결합, 침입 및/또는 감염을 감소시키거나 차단시킬 수 있는 치료학적 유효 면역 응답을 발휘하거나 촉진하거나 향상시키는 본 발명의 백신과 함께 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 다양한 구현예들의 활성화에 실질적으로 영향을 주지 않는 변형들이 여기 제공된 본 발명의 정의에 포함될 수 있다는 것은 이해된다. 따라서, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하기 위한 것이지만 이를 제한하기 위한 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 *HYR1* 의 조건 발현이 캔디다 알비칸스(*C. albicans*)의 호중구 및 대식세포 매개된 사멸을 향상시킨다는 것을 보여준다. (A) *HYR1* 조건 과발현/억제 균주 CAAH-31의 확인. *HYR1* 의 RT-PCR 결과는 -DOX 배지에서 유전자의 과발현을 +DOX 배지에서 발현의 결여를 보여준다. *EFB1* 단편을 공동-증폭시켜 대조군으로 이용했다. cDNA 제조시 게놈 DNA 오염의 결여는 *EFB1*의 인트론을 함유하는 919 bp 밴드의 부재에 의해 증명된다. THE31은 야생형 대조군 균주이다. (B) *C. albicans* 균주를 DOX 가 있고(*HYR1*의 억제) DOX가 없는(*HYR1* 의 과발현) YPD 에서 30oC에서 하룻밤 성장시킨 다음, 인간 호중구와 함께 공배양하였고; (C) *C. albicans*를 HL-60 유래된 호중구와 공배양하였고; (D) HL-60 유래된 대식세포와 공배양하였다.

도 2는 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) *HYR1*의 발현이 *bcr1* 널(null) 돌연변이 또는 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 균주에서 인간 호중구 사멸 내성을 증가시킨다는 것을 보여준다 (A 및 B). *C. albicans* 의 *bcr1* 결핍 균주에서 *HYR1*의 자율(Autonomous) 발현은 모 균주의 호중구 사멸 내성에 대한 과민성(hypersusceptibility)을 완전히 상보(complement)시켰다.. *C. albicans* 균주 DAY185 (야생형), CJN702 (*bcr1* 널 돌연변이) 및 CJN698 (*BCR1* 상보된), CJN114, CJN1153, CJN1222, CJN1259, CJN1276, CJN1281, 및 CJN1288 (*bcr1* 널 돌연변이) 백그라운드에서 각각 *ALS1*, *ALS3*, *HWP1*, *HYR1*, *RBT5*, *CHT2* 및 *ECE1* 자율 발현)을 YPD에서 하룻밤동안 30oC에서 성장시켰다. 데이터는 중앙값(median) + 사분위(interquartile)로 나타내었다. * P <0.04 대(vs.) 야생형 및 *BCR1*-상보된. (C) *C. albicans* *HYR1* 유전자의 이중 발현은 *C. glabrata* 의 HL-60 유

래된 호중구 매개된 사멸에 대한 내성을 증가시켰다. * P<0.0001.

도 3은 비록 그 발현이 시험관내에서 호중구에 의해 초기 저해되지만 파종성 캔디다증동안 *HYR1* 발현의 검출을 보여준다. (A) 신장, 간, 폐, 비장 및 뇌를 *C. albicans*로 정맥내 감염한지 6 또는 24 h후 수거하였다. 네스티드(Nested) RT-PCR을 사용하여 *HYR1*의 발현을 검출하였다. *C. albicans* EFB1 및 마우스 하우스-키퍼 유전자 G3PDH를 대조군으로 사용하였다. +는 감염된 마우스, -는 비감염된 마우스를 나타낸다. (B) HL-60 유래된 호중구는 *C. albicans* *HYR1* 발현을 저해하였다. 야생형 *C. albicans* 를 10% 풀다운(pooled) 인간 혈청이 더해진 RPMI 1640에서 배양하였다. 호중구가 없을 때에는, *HYR1* 발현이 반시간 유도후에 검출되었다. 호중구가 있을 때에는, *HYR1* 발현이 2시간동안 저해되었다.

도 4는 *HYR1* 생체내(*in vivo*) 발현과 진균 부하(burden)에 대한 그 효과를 보여준다. 파종성 캔디다증 동안 *HYR1* 발현을 검출하기 위해, 신장, 간, 폐, 비장 및 뇌를 *C. albicans* 로 정맥내 감염한지 6 또는 24 h 후 수거하였다. 네스티드 RT-PCR을 사용하여 *HYR1*의 발현을 검출하였다. *C. albicans* EFB1 및 마우스 하우스-키퍼 유전자 G3PDH를 대조군으로 사용하였다. + 는 감염된 마우스, - 는 비감염된 마우스를 나타낸다 (A). 조건 발현 *HYR1* 는 확장적 조직 포식세포를 갖는 기관들에서 진균 부하를 증가시켰다. 조건 발현 (-DOX) 또는 억제 (+DOX) 조건에서 성장된 *C. albicans* *HYR1* 또는 대조군 균주로 감염된 면역적격(immunocompetent) 마우스 (그룹당 n=8)의 간 및 비장에서 *C. albicans* 의 부하 (A) 및 생체내 *HYR1* 발현 (B). 간 및 비장을 감염후 하루째 수거하였다. y-축은 어세이의 검출의 낮은 한계를 반영한다. 데이터는 중간값 ± 사분위로 표시하였다. * P <0.0001 대(vs.) *HYR1* 균주 (*HYR1*-DOX) 또는 대조군 균주의 비발현.

도 5는 항-Hyr1p 혈청으로 간접 면역형광한 결과 *C. albicans* 균사(hyphae)상에 Hyr1p의 표면 발현을 보여준다. RPMI 1640에서 90분간 *C. albicans* 를 인큐베이션함으로써 균사(Hyphal) 형성이 유도되었다. 세포를 *hyr1* 널 돌연변이 프리-흡수된 항 -Hyr1p 혈청 (1:100) 또는 빈 플라스미드 클론 혈청 (음성 대조군)으로 부터의 항-단백질 제조물로 염색한 후, Alexa 표지된 항 -마우스 Ab로 염색하였다.

도 6은 Hyr1p의 재조합 N-말단 (rHyr1p-N)은 쥐의 혈행 파종성 캔디다증에 대하여 현저히 방어하였다. (A) 완전 또는 불완전 Freund 보강제와 혼합된 rHyr1p-N로 백신화하고 캔디다 알비칸스 SC5314의 2.2×10^5 블라스토스포어로 꼬리 정맥내로 감염시킨 마우스 (그룹당 8마우스)의 생존율 (B) 0.1% 알히드로겔과 혼합된 rHyr1p-N 또는 약독화 rHyr1p-N로 백신화하고 캔디다 알비칸스 15563의 7×10^5 블라스토스포어로 감염시킨 마우스 (17마우스를 갖는 대조군을 제외한 그룹당 8 마우스)의 생존율. *P = .001 로그(log) 랭크 테스트. (C) Hyr1이 조건 발현 또는 억제된 *C. albicans* 의 마우스 호중구 사멸 차단에 대한 백신화된 또는 대조군 F(ab)' 2 의 효과. 대조군은 F(ab)' 2 의 부재하에 수행된 어세이를 나타낸다. 데이터는 중간값 ± 사분위 편차로 나타내었다. *P = .001 만-화이트니(Mann-Whitney) 테스트.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044]

실시예 I

[0045]

캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) Hyr1p는 호중구 사멸(neutrophil killing)에 대한 내성을 부여하고 백신타겟이다.

[0046]

상술한 바와 같이, 캔디다 알비칸스는 인간에서 침습성 진균 감염의 가장 일반적인 원인이다. 치명적인 전신 감염 시 캔디다 알비칸스가 어떻게 탐식적 공격(phagocytic attack)으로부터 벗어나 적대적 혈액 환경에서 생존하는지는 알려져 있지 않다. 조건적 과발현/억제 유전적 방법을 이용하여, 본 발명자들은 상기 *HYR1* 유전자가 시험관내에서 캔디다 알비칸스의 탐식적 사멸을 감소시키고 생체내에서 조직 진균 부하(tissue fungal burden)를 증가시킨다는 것을 발견하였다. 전사인자 Bcr1p에 의한 그것의 양성조절(positive regulation)에 맞추어, *HYR1* 은 시험관내에서 캔디다 알비칸스의 *bcr1* 제거 돌연변이체(null mutant)의 탐식세포-매개된 사멸에 대한 과민-감수성(hyper-susceptibility)을 보완하였다. 더욱이, 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*)에서 *HYR1*의 이중 발현은 유기체가 호중구 사멸에 대한 내성을 더 갖게 하였다. 결국, 재조합 Hyr1p를 이용한 백신화는 이중성 파종성 캔디다증에 대하여 마우스를 효과적으로 보호하였다. 따라서, Hyr1은 캔디다 알비칸스에 대한 중요한 병독성 인자이며, 탐식적 사멸에 대한 내성을 매개한다. 그러므로, Hyr1p는 백신 또는 다른 면역학적 또는 소분자 개입(small molecule intervention)에 대한 타겟이며 파종성 캔디다증의 결과를 개선시킨다.

- [0047] **결과**
- [0048] **출아포자(blastospores)에서 HYR1의 조건적 발현은 시험관내에서 탐식세포-매개된 사멸에 대한 캔디다 알비칸스의 내성을 현저히 강화시킨다.**
- [0049] CAAH-31. *HYR1*의 기능을 연구하기 위하여, 본 발명자들은 조건적 과발현/억제 캔디다 알비칸스 균주, CAAH-31을 제작하였다. CAAH-31에서, *HYR1*의 하나의 형질(allele)은 테트라사이클린 조절된(tetracycline regulated, TR)-프로모터에 의해 조절(control)되고 다른 형질은 방해(disrupt)되었다. 반정량적 RT-PCR을 이용하여, 본 발명자들은 CAAH-31의 출아포자가 DOX 없는 배지에서 성장할 때 *HYR1*이 다량으로 발현되고, DOX가 있는 경우에는 검출되지 않음을 확인하였다 (도 1A). 예상대로, *HYR1*은 군사 공동-발현된 유전자이기 때문에 유전자 야생형 (THE31) 출아포자에서는 검출되지 않았다 (도 1A).
- [0050] 상기 *HYR1* 조건적 과발현 균주, CAAH-31, 및 THE31 야생형 대조군은 DOX의 존재와 관계없이 동일한 성장률을 나타내었다 (DOX 없는 야생형 대조군 균주에 대한 배가시간(doubling time) = 1.51 ± 0.29 hr, DOX 있는 경우 = 1.51 ± 0.38 hr; DOX 없는 CAAH-31 균주에 대한 배가시간 = 1.39 ± 0.30 hr, DOX 있는 경우 = 1.35 ± 0.19 hr). 또한 본 발명자들은 세포 표면에서 다른 GPI-앵커된 단백질들의 정상 축적에 대한 *HYR1* 과발현의 영향(impact)을 평가하였다. 직접 면역형광(direct immunofluorescence)을 이용하여, 본 발명자들은 *HYR1* 과발현이 GPI-앵커된 단백질 Als1p의 축적에 어떠한 영향도 주지 않음을 확인하였다 (데이터 미도시) [8].
- [0051] 병독성-관련 표현형에 대한 일상적 스크리닝 시, 본 발명자들은 인간 탐식세포에 의한 캔디다성 사멸(candidal killing)에서 *HYR1*의 조건적 과발현의 영향을 측정하였다. *HYR1*-발현하는 캔디다 알비칸스(CAAH-31-DOX)는 야생형 캔디다 알비칸스 (출아포자 단계에서 *HYR1*을 발현하지 않는 것) 및 *HYR1*-억제된 캔디다 알비칸스(CAAH-31+DOX) 보다 인간 호중구-매개된 사멸에 대하여 현저히 더 높은 내성을 나타내었다 (도 1B). 사멸(killing)은 야생형 대조군과 *HYR1*-억제된 캔디다 알비칸스(+DOX) 사이에서 별다른 차이가 없으므로 이러한 표현형은 DOX 때문이 아니었다.
- [0052] 또한 본 발명자들은 HL-60 세포주를 이용하여 캔디다성 사멸 분석을 수행하였는데, 이는 호중구-유사 또는 대식세포-유사 세포 중 하나로 분화될 수 있다 [9, 10]. 신선하게 획득된 인간 호중구와 유사하게, *HYR1*의 조건적 과발현은 시험관내에서 HL-60 호중구 유사 (도 1C) 및 대식세포-유사 (도 1D) 세포 둘 다에 의한 캔디다 알비칸스 출아포자의 사멸을 감소시켰다.
- [0053] ***bcr1* 제거 돌연변이체(null mutant)의 호중구 사멸에 대한 과민-감수성은 시험관내에서 *HYR1* 발현에 의해 보완되었다.**
- [0054] *HYR1*은 양성 전사인자 조절자 Bcr1p의 하류 유전자(downstream gene)이기 때문에 [17], 본 발명자들은 *bcr1*의 방해(disruption)가 야생형 캔디다 알비칸스를 촉진시켜 *HYR1*을 발현하는 (즉, 군사 형성 시) 조건하에서 호중구 사멸에 대한 감수성을 가속시킬 것으로 가정하였다. 따라서 본 발명자들은 37°C에서 40분간 10% FBS가 첨가된 RPMI에서 세포를 배양함으로써 캔디다 알비칸스의 발아관(germ tubes) 형성을 유도하였다. 이러한 조건이 *HYR1*의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있고 [18], 그 결과 광범위한(extensive) 군사가 형성되지는 않을 만큼 짧은 발아관을 형성시킴으로써 사멸 분석(kill assay)에서 CFUs(colony forming units)의 정량을 가능하게 한다. 본 발명자들은 *bcr1* 제거 돌연변이(null mutant) 균주(CJN702), *bcr1* 제거 돌연변이 백그라운드(null mutant background)에서 *BCR1* 보완된 균주(CJN698), 및 야생형 캔디다 알비칸스 균주(DAY185)의 호중구 사멸을 비교하였다. 상기 *bcr1* 제거 돌연변이체는 *BCR1*-보완된 균주와 야생형 대조군 균주에 비해 과민-감수성이었다 (도 2A). 게다가, *bcr1*-결핍된 캔디다 알비칸스의 사멸에 대한 과민-감수성은 *bcr1* 돌연변이 백그라운드에서 *HYR1*의 자발적인 발현에 의해 완전하게 보완되었으나, Bcr1p에 의해 조절된 유전자를 코딩하는 다른 세포 표면에 의해서는 그렇지 않았다 [17] (도 2A 및 2B).
- [0055] **탐식세포 사멸에 대하여 *HYR1*을 과발현하는 캔디다 알비칸스의 내성은 캔디다 글라브라타에서 *HYR1*의 이중 발현에 의해 재현될 수 있다.**
- [0056] *HYR1*에 의해 매개된 병독성 표현형을 확인하기 위해, 본 발명자들은 구조성(constitutive) *PGK1* 프로모터를 수반하는 플라스미드 pGRB2.2을 이용하여 [11] 캔디다 글라브라타 BG14에서 이중성으로 상기 유전자를 발현시켰다

[19]. 또한 본 발명자들은 음성대조군으로서 빈 플라스미드로 형질전환된 캔디다 글라브라타 BG14를 제작하였다. 캔디다 글라브라타에서 *HYR1*의 발현은 빈 플라스미드로 형질전환된 캔디다 글라브라타에 비해, 시험관내에서 HL-60-유래된 호중구에 의한 사멸을 75% 감소시켰다 (도 2C).

[0057] **호중구는 캔디다성 *HYR1* 발현을 저해한다.**

[0058] *HYR1*의 조건적 과발현이 호중구-매개된 사멸에 대한 캔디다의 내성을 부여하기 때문에, 본 발명자들은 RT-PCR을 이용하여 시험관내에서 HL-60-유래된 호중구에 반응하는 야생형 캔디다 알비칸스(SC5314) *HYR1*의 발현을 연구하였다. *HYR1*은 혈청을 포함하는 배지에 노출 후 빠르면 30분에 발현되어, 배양 시 2.5시간 동안 높은 발현을 유지하였다 (도 3A). 그러나, 캔디다 알비칸스가 배양에서 HL-60-유래된 호중구에 노출되면, 혈청이 존재하는 경우에서조차, *HYR1* 발현은 공동-배양에서 2시간까지 저해되었다 (도 3A).

[0059] **야생형 캔디다 알비칸스는 이종의 파종성 캔디다증 시 *HYR1*을 발현하여, 탐식세포가 풍부한 기관(organs)에서 조직 진균 부하를 증가시킨다.**

[0060] *HYR1*이 이종의 파종성 캔디다증 시 발현되는지를 확인하기 위하여, 5가지 주요 기관 - 뇌, 간, 폐, 비장 및 신장 - 을 캔디다 알비칸스 야생형 균주로 감염된 마우스로부터 감염 6시간 및 24시간 후에 획득하였다. 개선된 nested-RT-PCR 분석 [20]은 생체내 *HYR1* 발현을 분석하는데 사용되었다. *HYR1* 발현은 모든 5가지 기관에서 검출되었다 (도 3B).

[0061] *HYR1*의 과발현은 간 및 비장에서 진균 부하를 증가하였고 *HYR1*의 억제제는 간 및 비장에서 진균 부하를 감소시켰다 (도 4A). 또한, 본 발명자들은 상기 과발현하는 균주가 간에서 야생형 균주 보다 현저히 높은 수준의 *HYR1*을 나타내는지 확인하였다; 상기 억제된 균주는 감소된 수준으로의 경향을 설명하였다 (도 4B). 대조적으로, *HYR1* 발현은 상주하는(resident) 탐식세포가 결핍된 기관인 신장에서 진균 부하를 크게 변경시키지는 않았다 (데이터 미도시).

[0062] **백신 후보로서 *rHyr1p-N***

[0063] 서열 분석에 기초하면, Hyr1p는 세포 표면 단백질일 것으로 예상된다 [7]. 이를 확인하기 위해, 본 발명자들은 아미노산 25-350의 코딩서열(*rHyr1p-N*)을 포함하는 발현 클론으로 형질전환된 *E. coli*에서 재조합 N-말단 Hyr1p를 제조하였다. *rHyr1p-N*으로 면역화된 마우스로부터 얻은 혈청을 캔디다 알비칸스의 *hyr1* 제거 돌연변이체에 사전-흡수(pre-absorb)시킨 다음 [7], 야생형 균사에 대하여 간접 면역-염색하였다. 본 발명자들은 야생형 캔디다 알비칸스 균사의 세포벽이 질게 염색(heavily stained)되고 (도 5), 그것이 세포-표면 발현됨을 확인함으로써, 면역계(immune system)에 노출되었음을 확인하였다.

[0064] Hyr1p는 세포 표면 단백질이기 때문에, 탐식세포에 의한 캔디다성 사멸에 대한 내성을 부여하는데, 본 발명자들은 백신 후보로서 그것의 가능성을 확인하려 노력하였다. 보강제(adjuvant)가 첨가된 *rHyr1p-N* 또는 보강제 단독으로 마우스를 백신화하였다. 부스트(boost) 2주후, 마우스를 높은 병독성 캔디다 알비칸스 SC5314로 꼬리 정맥을 통해 감염시켰다. *rHyr1p-N*로 백신화는 보강제 단독으로 백신화된 것에 비해 마우스의 생존율을 현저하게 개선시켰다 (35일째 생존율 각각 62.5 및 0%) (도 6A).

[0065] 완전한 또는 불완전한 프로이드 보강제(Freund's adjuvant) 또는 명반(alum)과 혼합된 *rHyr1p-N*로 백신화는 어느 한쪽의 보강제 단독으로 백신화된 것에 비해 마우스의 생존율을 현저하게 개선시켰다 (도 6A 및 6B).

[0066] **항-*rHyr1p* 혈청은 *Hyr1p* 호중구 내성 기능을 직접적으로 저해함으로써 마우스에서 호중구 사멸을 강화시켰다.**

[0067] *rHyr1p-N*의 보호 효과는 항-*rHyr1p* 혈청이 캔디다 알비칸스에서 Hyr1p의 보호 기능을 중화시킬 수 있음을 시사하였다. 항-*rHyr1p* 항체가 Hyr1p 기능을 직접적으로 저해할 수 있는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 *rHyr1p-N* 또는 대조군 (빈 플라스미드로 형질전환된 *E. coli* 세포에서 제조된 것) 중 하나로 면역화된 마우스의 총 IgG로부터 F(ab)'₂ 단편을 분리, 제조하였다. 본 발명자들은 대조군 혈청이 아닌 면역성 혈청에서 얻은 F(ab)'₂가 *HYR1* 조건적 발현 균주의 호중구 사멸을 억제된 균주(suppressing strain)와 동등한 수준까지 복구

시킬 수 있음을 확인하였다 (도 6C).

요약

본 발명에서는, *HYRI*, 군사 공동-발현 유전자 [7, 21]가 캔디다성 탐식세포 내성 인자(resistance factor)를 코딩함을 밝혀내었다. 캔디다 출아포자에서 *HYRI*의 조건적 발현은 진균(fungus)이 야생형 캔디다 알비칸스 출아포자에 비해 탐식세포에 의한 사멸에 대하여 더 내성을 나타내게 하였다. 추가적으로, 캔디다 알비칸스에서 *HYRI*의 기능은 시험관내에서 캔디다 글라브라타의 상기 유전자를 이중성으로 발현함으로써 재현되었다. 또한 본 발명자들은, *HYRI* 발현을 양성적으로 조절하는 전사인자인 [17], Bcr1p가 결핍된 균주가 강화된 탐식세포-매개된 사멸에 대한 감수성을 나타냄을 확인하였다. *bcr1* 제거 돌연변이체의 탐식세포 사멸에 대한 과민-감수성은 자발적으로 발현된 *HYRI*에 의해 완전히 보완되었으나, Bcr1p에 의해 양성적으로 조절된 GPI-단백질들을 코딩하는 다른 유전자들은 그렇지 않았다. 따라서, *HYRI*은 탐식세포 사멸 내성 경로에서 *BCRI*의 하류(downstream) 유전자이다.

HL-60 유래된 호중구가 탐식세포와 캔디다 사이의 최초 접촉(initial contact) 시 야생형 캔디다 알비칸스에서 *HYRI*의 발현을 저해하였다는 것이 흥미롭다. 따라서, 동적상호작용(dynamic interaction)은 숙주 탐식세포와 캔디다 알비칸스 사이에서 일어나는데, 이때 탐식세포가 야생형 진균에서 탐식세포-내성 유전자 발현의 지연을 매개하였다. 이는 인간 호중구가 캔디다 알비칸스 군사의 형성 및 군사 공동-발현된 유전자들의 발현을 지연시켰다는 이전 연구와 일치한다 [18].

탐식세포에 대한 내성은 다중 인자에 기인하는 것과 같은 복잡한 표현형이다. 탐식세포는 세포외적으로 (extracellularly) 또는 세포내적으로(intracellularly) 캔디다를 사멸시킬 수 있다. 최근, 캔디다 알비칸스 세포 표면 슈퍼옥사이드 디스뮤티아제(superoxide dismutases)는 숙주-유래된 높은 활성산소종(reactive oxygen species)을 분해함으로써 진균이 사멸로부터 벗어나도록 돕는 병독성 인자들로 특성화되었다 [22]. 호중구는 전형적으로 진균의 군사형(hyphal forms)의 표면에 부착하여 퍼지는데, 확장된 군사가 너무 커져서 탐식세포가 완전하게 섭취(ingest)하는 것과 같다. 캔디다 알비칸스는 군사형에서 *HYRI*을 발현하기 때문에, Hyr1p가 탐식세포에 접촉하는 표면을 보호함으로써 탐식세포 사멸에 대한 내성을 제공하는 것이 가능하다. 다른 방법으로, Hyr1p는 탐식세포의 산화적 또는 비산화적 사멸 메커니즘을 방해할 수 있다.

HYRI 과발현의 시험관내 표현형은 생체내에서 재현되었다. 쥐(murine)의 과중성 감염동안, 상주하는(resident) 탐식세포를 갖는 기관에서 야생형 균주에 비해 조직 진균 부하에 있어서, *HYRI*의 과발현은 현저한 증가를 초래하고, *HYRI*의 억제제는 현저한 감소를 초래하였다. 신장에서 표현형의 결핍은 신장이 상주하는 탐식세포를 갖지 않으며, 치명적인 과중성 캔디다증 시 감염 24시간 이상까지는 신장에 호중구 유입(influx)이 시작되지 않는다는 사실을 반영할 것이다 [15]. 그럼에도 불구하고, rHyr1p-N으로 백신화는 이중성 과중성 캔디다증에 대한 상당한 보호를 나타내었다. rHyr1p-N 백신에서 보이는 효능은 이전에 보였던 rAls1p-N 및 rAls3p-N 백신으로 백신화된 마우스에서 보다 더 컸다. 따라서, rHyr1p-N은 과중성 캔디다증에 대한 유망한 백신 후보이다.

또한 본 발명의 데이터는 해당 유전자의 잠재적인 병독성 기능을 탐색하기 위한 조건적 과발현/억제 접근법을 이용하는 이점을 설명한다. 시험관내에서 병독성 유전자들을 탐색하기 위한 대규모 유전적 접근법은 기능적 스크리닝 분석법을 필요로 하고, 상기 분석법을 수행하는 동안 발현되는 유전자에 대한 스크리닝에 제한된다. 시험관내 스크리닝 분석법에 사용된 조건에서 유전자가 야생형 균주에서 현저하게 발현되지 않을 때, 캔디다 출아포자 성장 시 *HYRI*의 경우와 같이, 상기 유전자의 과발현이 분석법에서 기능-획득 현상(gain-of-function phenomenon)의 검출을 여전히 가능하게 한다. 유전자가 강하게 발현될 때, 유전자의 조건적 발현은 동일한 분석법에서 기능-상실 표현형(loss-of-function phenotype)을 나타낸다. 더욱이, 과발현 및 억제가 동시에 사용될 때, 생체내에서 간 및 비장 진균 부하에 대한 *HYRI*의 효과의 경우와 같이, 표현형이 증폭될 수 있다. 유전자 과발현 및 억제를 비교함으로써 표현형을 검출하는 능력은 조건적 유전자 발현이 기능적 중복(functional redundancy)의 제한을 극복하게 하는데, 이 제한은 한 유전자 패밀리의 일원들을 연구할 때 특히 유전적 접근법을 어렵게(plague) 한다.

요약하면, 본 발명자들은 표면 발현된 캔디다 알비칸스에 대한 병독성 인자로서 Hyr1p를 동정하기 위해 조건적 유전자 발현 접근법을 사용하였다. *HYRI* 발현은 시험관내에서 호중구 사멸에 대한 내성을 매개하고 생체내에서 조직 진균 부하를 증가시켰다. 결국, *HYRI*이 과중성 캔디다증에 대한 예방법(prophylactic strategy)으로서 더 발전된 장점을 갖는 유망한 백신 타겟임을 증명하였다.

- [0075] **재료 및 방법**
- [0076] 상기 결과는 다음의 재료 및 방법을 이용하여 얻었다.
- [0077] **균주 및 배양 조건**
- [0078] 사용된 모든 균주는 표 1에 개시되어 있으며 이전에 보고된 바에 따라 배양하였다 [8].
- [0079] **조건적 *HYR1* 과발현/억제 돌연변이체 구성물**
- [0080] 조건적 *HYR1* 발현 균주를 제조하기 위해, *HIS1-TR* 프로모터 카세트(promoter cassette) [8]를 생산성 균주 (yielding strain) CAAH인, 균주 THE4의 *HYR1* 유전자의 한 형질(one allele)의 앞에 삽입하였다. 균주 CAAH의 *HIS1* 자리(locus)에 있는 *URA3*은 루프아웃(looped out)되어, CAAH-1을 생산하였다. CAAH-1에 있는 *HYR1*의 두 번째 형질(second allele)을 재활용(recyclable) *URA3* 카세트로 방해하여, 균주 CAAH-2를 제조한 다음, *URA3*을 루프아웃시켜 생산성 균주 CAAH-3을 제조하였다. *URA3-IROI*을 포함하는 3.9-kb *Nhe I-Pst I* 단편을 CAAH-3 게놈 상 그것의 원자리(original locus)에 삽입하여, CAAH-31을 제조하였다. 사용된 프라이머는 표 1에 개시되어 있다.
- [0081] **반정량적 RT-PCR**
- [0082] 시험관내에서 유전자 발현을 검출하기 위한 반정량적 RT-PCR은 이전에 설명되어 있다. *EFB1* 발현을 검출하는데 사용된 프라이머는 EFB1a 및 EFB1b이다; *HYR1*을 증폭하는데 사용된 프라이머는 *HYR1* specific 1 및 *HYR1* specific 2이다 (표 1). 캔디다 알비칸스 *HYR1* 발현에 대한 호중구의 영향을 연구하기 위해, YPD에서 1×10^6 세포로 밤새(overnight) 배양한 SC5314를 1×10^7 의 HL-60 유래된 호중구와 공동-배양 또는 혼합 인간혈청(pooled human serum)이 10% 첨가된 RPMI 1640에서 단독 배양 중 하나로 배양하였다. RNA가 추출될 때까지 샘플을 3시간 동안 30분 간격으로 취하여, 반정량적 RT-PCR을 수행하였다.
- [0083] **탐식세포 사멸 분석**
- [0084] 인간 호중구를 분리하고, HL-60 세포를 호중구 또는 대식세포로 분화시켜, 탐식세포 사멸 분석을 이전에 설명된 바와 같이 수행하였다 [8-10]. 간략히 설명하면, 탐식세포를 1시간 동안 진균과 배양한 후, 초음파 처리하고 정량적으로 배양하였다. 사멸률은 대식세포로 공동-배양한 후 진균 콜로니 수를 대식세포가 없는 배지로 배양한 진균 콜로니 수로 나누어서 계산되었다. 인간 호중구 및 HL-60 유래된 호중구 또는 대식세포를 각각 2:1 및 20:1 탐식세포:진균 비율로 시험하였다. *bcr1* 및 관련 돌연변이체를 위해, 분석을 수행하기 전에 출아포자를 37 °C에서 10% FBS가 첨가된 RPMI에서 40분간 사전-발아시켰다.
- [0085] **캔디다 글라브라타 BG14에서 *HYR1*의 이중 발현**
- [0086] 캔디다 글라브라타 BG14를 *HYR1* 발현 벡터 pGRB2.2-*HYR1* 또는 빈 대조군 플라스미드 pGRB2.2 중 하나로 형질전환시켰다 [11]. *HYR1* 코딩 서열을 CG-Hyr1-a 및 CG-Hyr1-b (표 1)로 증폭시키고 제조사의 설명서(Clontech Laboratories, Mountain View, CA)에 따라 In-Fusion™ 2.0 Dry-Down PCR 클로닝 키트를 이용하여 pGRB2.2의 *Xba I*, *Xho I* 부위로 클로닝시켰다.
- [0087] **이중 감염 시 캔디다 알비칸스 *HYR1* 발현**
- [0088] 야생형 캔디다 알비칸스 SC5314에 의한 *HYR1* 발현은 설명된 바와 같이 이중성 과중성 캔디다증 시 시험되었다. BALB/C 마우스의 뇌, 간, 폐, 신장 및 비장을 감염 후 6시간 및 24시간에 수집하였다. 사용된 프라이머는 표 1에 개시되어 있다. 역전사는 RETROscript (Ambion, Texas)로 수행하였다. 마우스 *G3PDH* 하우스키퍼링 유전자 (housekeeping gene)의 증폭을 위해, 프라이머 *G3PDHF* 및 *G3PDHR*를 사용하였다. 캔디다 알비칸스의 *HYR1* 및

*EFBI*의 검출을 위해, 2 라운드(round)의 PCR을 수행하였다. 라운드 1은 외부 프라이머 세트(outer primer set)(*EFBI*을 위한 *EFB1F* 및 *EFB1R*, 또는 *HYR1*을 위한 P2 및 P5)을 사용하였고; 라운드 2는 주형으로 라운드 1 PCR 산물의 앨리퀀트(aliquot)(1 μ l)를 사용하였다. 내부 프라이머 세트(inner primer sets)는 다음과 같다: *EFB1nF* 및 *EFB1nR* (*EFBI*을 위한), 또는 P2 및 P4 (*HYR1*을 위한). 모든 PCR 조건은 다음과 같다: 95°C에서 2분 변성(denaturing) 및 94°C 30초(denaturing), 55°C 30초(annealing), 및 72°C 90초(extension)의 35 사이클 동안 증폭(amplification). qRT-PCR을 위해, cDNA를 상기와 같이 제조하였다. 증폭 효율의 최적화 및 실시간 RT-PCR SYBR green assays를 개시된 바와 같이 수행하였다 [12]. 구조적으로 발현되는 *ACT1*은 모든 반응에 대한 대조군으로 사용되었다. 계산 및 통계학적 분석은 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System User Bulletin 2 (Applied Biosystems, USA)에 개시된 바와 같이 수행하였다.

[0089] **조직 진균 부하(Tissue fungal burden)**

[0090] 마우스에 감염 관련 -3일에 시작하여 실험기간 내내 5% 수크로오스 용액에 녹인 DOX(2 mg/ml)가 있거나 없는 물을 제공하고 [13], 음식 및 물을 제한 없이 제공하였다. 조직 진균 부하는 기관들이 감염 후 1일째에 제거되는 것을 제외하고는 이전에 개시된 바와 같이 수행하였다 [8]. 마우스와 관련된 모든 절차는 NIH 가이드라인에 따른, 동물실험윤리위원회에 의해 승인받았다.

[0091] **rHyr1p-N 제조**

[0092] (Hyr1p의 아미노산 25-350에서 얻은) rHyr1p-N은 대장균(*Escherichia coli*) pQE-32 발현 시스템(Qiagen)에서 제조하였으며, 6XHis 태그(tag)된 단백질은 HisPur Cobalt resin (Thermo Scientific) 친화성 칼럼(affinity column)을 이용하는 것을 제외하고는, 어떤 경우에서 개시된 바[14]와 같이 정제하였다. 엔도톡신(endotoxin)은 Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (Thermo Scientific)를 이용하여 rHyr1p-N로부터 제거되었으며, 상기 엔도톡신 수준은 제조사의 설명서에 따라 *Limulus Amebocyte Lysate endochrome* (Charles River)로 결정하였다. 이러한 절차를 이용하여, 엔도톡신은 백신화를 위해 사용되는 회당(dose) <0.28 EU까지 감소시켰다.

[0093] **Hyr1p 세포내 위치의 면역형광 검출**

[0094] (아미노산 25-350에서 얻은) rHyr1p-N로 마우스를 면역화시켜 제조된 폴리클로날 항-Hyr1p 항혈청을 이용하여 간접 면역형광(indirect immunofluorescence)을 수행하였다. *hyr1* 제거 균주(null strain)의 1×10^7 출아포자의 접종원(inoculum)을 37°C에서 90분간 RPMI 1640에서 배양하고 두 번 펠렛(pellet)하여 항혈청을 흡수시켰다.

[0095] 캔디다 알비칸스 출아포자(1×10^5)를 37°C에서 90분간 RPMI 1640에서 사전-발아시키고 4웰 챔버 슬라이드(Nalge Nunc International Corp, IL, USA)에 옮겼다. 4°C에서 30분간 배양 후, 상기 세포를 300 μ l의 1.5% 염소혈청(goat serum)으로 블록시키고, 1:100 희석에서 폴리클로날 항혈청으로 또는 음성대조군으로서 PBS으로 염색한 다음, 형광 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate)-라벨된 염소 항-마우스 IgG 1:200에서 염색하였다. 상기 세포는 공초점 스캐닝 레이저 현미경으로 이미지화되었다 [15].

[0096] **면역화 프로토콜**

[0097] 모든 백신화는 목밑(base of the neck)에서 피하(subcutaneous) 주사하였다. 8마리의 어린(juvenile)(10-12주령) C57BL/6 마우스를 완전한 프로이드 보강제(complete Freund's adjuvant)에서 친화성-정제된 20 μ g의 rHyr1p-N로 백신화하고, 3주째에 불완전한 프로이드 보강제(IFA)로 부스트(boost)하였다. 8마리 추가 어린 마우스는 빈 플라즈미드로 형질전환된 *E. coli* 세포에서 제조된 조제물(preparation)과 혼합된 보강제 단독을 투여 받았다. 부스트 14일 후, 5×10^5 세포의 야생형 캔디다 알비칸스 SC5314로 마우스를 꼬리 정맥을 통해 감염시켰다 [16].

[0098] 또한 이종성 과종성 캔디다증에 대한 보호에 있어서 rHyr1p-N의 효능은 인간에 사용하도록 FDA(Food and Drug Administration)에서 승인된 보강제인, 명반(alum)(2% Alhydrogel; Brenntag Biosector)을 이용하여 평가하였

다. 추가적으로, rHyr1p-N이 캔디다 알비칸스의 다른 균주에 대하여 보호하는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 다른 임상 분리주인, 균주 15563을 사용하였다. 이러한 실험을 위해, 친화성-정제된 rHyr1p-N 33 µg을 0.1% alhydrogel과 혼합하여 상기 0일째에 BALB/c 마우스에 투여하고, 21일째에 부스트한 후, 35일째에 꼬리 정맥 감염을 통해 캔디다 알비칸스로 감염시켰다. 모든 백신화 실험에 대하여, 감염 후 35일간 마우스의 생존율을 엔드 포인트(end point)로 사용하였다.

[0099] **F(ab)'₂ 블로킹 분석**

[0100] 혼합(pooled) 항-Hyr1p 또는 대조군 혈청은 rHyr1p-N 또는 빈 플라스미드로 형질전환된 *E. coli*에서 제조된 조제물(preparation) 중 하나로 백신화된 5마리 마우스에서 수집되었다. 둘 모두의 혈청에서 얻은 총 IgG는 Nab Spin Kit (Thermo Scientific)를 이용하여 분리하였다. F(ab)'₂ 단편은 제조사의 설명서에 따라 Pierce F(ab)'₂ Preparation Kit로 정제하였다. 캔디다 세포를 마우스 호중구와 혼합하기 전에 얼음 상에서 45분간 5% 정상 마우스 혈청(Santa Cruz Biotechnology) 또는 rHyr1p-N 백신화되거나 또는 대조군 마우스 IgG 중 하나로부터 제조된 5% F(ab)'₂가 첨가된 5% 정상 마우스 혈청으로 옵소닌화(opsonize)하였다. 마우스 호중구 사멸 분석은 상기에 기술하였다.

[0101] **통계분석**

[0102] 서로 다른 그룹 사이의 탐식세포 매개된 사멸 및 조직 진균 부하는 적절하게, 언페어드 비교(unpaired comparison)를 위한 Mann-Whitney U test로 비교하였다. non-parametric Log Rank test를 사용하여 생존 시간의 차이를 결정하였다. <0.05의 P 값은 유의하게 고려되었다.

표 1

[0103]

본 발명에 사용된 균주 및 올리고뉴클레오티드 균주		
캔디다 알비칸스 균주	유전형(Genotype)	출처(source)
THE31	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i> <i>HIS1/his1::dp1200</i> <i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434::URA3-IRO1</i> <i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i>	[8]
CAAH	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i> <i>his1::URA3-dp1200/his1::dp1200</i> <i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i> <i>HYR1/HIS1-pTR-HYR1</i>	[8]
CAAH-1	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i> <i>his1::dp1200/his1::dp1200</i> <i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i> <i>HYR1/HIS1-pTR-HYR1</i>	본 발명
CAAH-2	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i> <i>his1::dp1200/his1::dp1200</i> <i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i> <i>hyr1::URA3-dp1200/HIS1-pTR-HYR1</i>	본 발명

CAAH-3	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i> <i>his1::dp1200/his1::dp1200</i> <i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i> <i>hyr1::dp1200/HIS1-pTR-HYR1</i>	본 발명
CAAH-31	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i> <i>his1::dp1200/his1::dp1200</i> <i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434::URA3-IRO1</i> <i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i> <i>hyr1::dp1200/HIS1-pTR-HYR1</i>	본 발명
DAY185	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG::ARG4-URA3/arg4::hisG</i>	[17]
CJN702	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	[17]
CJN698	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1-BCR1/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	[17]
CJN1144	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-ALS1-t_{TEF1}/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	[17]
CJN1153	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-ALS3-t_{TEF1}/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	[17]
CJN1222	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-HWP1-t_{TEF1}/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	[17]
CJN1259	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-HYR1-t_{TEF1}/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	[17]
CJN1276	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-RBT51-t_{TEF1}/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	[17]
CJN1281	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-CHT2-t_{TEF1}/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	[17]
CJN1288	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i> <i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-ECE1-t_{TEF1}/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	[17]
<i>Candida glabrata strain BG14</i>	<i>ura3Δ (-85 + 932)::Tn903NeoR</i>	[17]

표 2

[0104]

올리고뉴클레오티드	
<i>HYR1</i> 조건적 과발현/억제 균주를 표시 및 확인하는데 사용된 올리고뉴클레오티드	
P1	5'-ACTTGGCACCAGGAACAAC
P2	5'-ACAGCTTTATCTCAGAAAACTAGTAATAACAACATGAAAGTGGTATCA
P3	5'-CGACAAACACAACGGCACATTCTGGTTTCAACAACTGGAATACTTTG
P4	5'-AGCAGTAACACAACCAGTACCT
PH1	5'-GTCGTCGCTGTGTTTGTC
PH2	5'-CGTTGGAGAAGGTAATTGTGA
P5	5'-CAGCATGAACAATCAAAGACGA
P6	5'-CAAAGTATTCCAGTTTGTGAAACC
시험관내 발현을 검출하는데 사용된 올리고뉴클레오티드	
HYR1 specific1	5'-CGTCAACCTGACTGTTACATC
HYR1 specific2	5'-TCTACGGTGGTATGTGGAAC
EFB1a	5'-ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC
EFB1b	5'-CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG
생체내 발현을 검출하는데 사용된 올리고뉴클레오티드	
EFB1F	5'-CACAAACCAATACATAATG
EFB1R	5'-GTAGACAGTGACATCAGC
EFB1nF	5'-TCAGATTCTCTAAAGTCG
EFB1nR	5'-TGACATCAGCTTGAGTGG
G3PDHF	5'-GTCTTCACCACCATGGAGAAGG
G3PDHR	5'-TCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA
원자리(original locus)에서 <i>URA3-IRO1</i> 를 확인하는데 사용된 올리고뉴클레오티드	
<i>URA3</i> Conf1	5'-TGCTGGTTGGAATGCTTATTTG
<i>URA3</i> Conf2	5'-TGCAAATTCTGCTACTGGAGTT
캔디다 글라브라타에서 <i>HYR1</i> 발현 구성물(expression construct)에 사용된 올리고뉴클레오티드	
CG-Hyr1-a	5'-ATATAAAACATCTAGATGAAAGTGGTATCAAACCTTTATATTC
CG-Hyr1-b	5'-GGGTTGTGTTCTCGATCACATGAATAAAACAACCATG

[0105] 실시예 II

[0106] rHyr1p-N은 과중성 캔디다증에 대한 백신이다.

[0107] 배경기술:

[0108] 본 발명자들은 캔디다 알비칸스에 의한 *HYR1*의 과발현이 시험관내에서 호중구 사멸에 대한 내성을 매개하는 것으로 확인하였다. 본 발명자들은 감염 시 생체내에서 조직 진균 부하에 대한 *HYR1* 과발현의 효과를 측정하고, 마우스에서 과중성 캔디다증에 대하여 보호하기 위한 rHyr1p-N으로 백신화에 있어서 가능성을 확인하려고 노력하였다.

[0109] 방법:

[0110] 마우스를 *HYR1* 과발현/억제 또는 야생형 캔디다 알비칸스로 꼬리-정맥을 통해 감염시켰다. 간과 비장을 감염 후 1일째에 획득하여 *HYR1*의 발현 수준 및 조직 진균 부하를 qRT-PCR 및 정량적 배양으로 각각 측정하였다. 백신화를 위해, rHyr1p-N를 *E. coli* pQE-32 발현 시스템에서 제조하고 제조사의 설명서(Qiagen)에 따라 정제하였다. 마우스를 완전한 프로이드 보강제(CFA)에 있는 20 µg의 rHyr1p-N으로 백신화하고, 3주째에 불완전한 프로이드 보강제(IFA)로 부스트(boost)한 후, 부스트 후 2주째에 캔디다 알비칸스 균주 SC5314로 감염시켰다. 대조군 마우스는 빈 플라스미드로 형질전환된 *E. coli*에서 얻은 세포 추출물을 첨가한 보강제를 투여하였다.

[0111] **결과:**

[0112] *HYR1*의 과발현은 대조군 균주에 비해 간과 비장 둘 다에서 진균 부하(fungal burden)를 현저히 증가시켰다. *HYR1*의 억제체는 대조군 균주에 비해 간과 비장 둘 다에서 진균 부하를 현저히 감소시켰다. *HYR1* 발현의 상대적인 수준은 대조군 균주 대비 과발현 또는 억제 균주로 감염된 간에서 각각 2.5 및 0.8이었다. rHyr1p-N 백신은 대조군 마우스에서 0% 생존율을 나타낸 데 비해, 감염된 마우스의 장기 생존율(long-term survival)을 62.5%로 나타내었다.

[0113] **결론:**

[0114] *HYR1* 발현은 생체내에서 조직을 감염시키는 캔디다 알비칸스의 능력에 영향을 준다. 더욱이, rHyr1p-N로 백신화는 과중성 캔디다증으로부터 마우스를 현저하게 보호하였다. 상기 rHyr1p-N 백신은 과중성 캔디다증을 예방하는데 유용하다.

[0115] [참조문헌 (References)]

[0116] 1. Spellberg BJ, Filler SG, and Edwards JE, Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. Clin Infect Dis. 2006;42:244-251

[0117] 2. Del Poeta M. Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell 2004;3:1067-1075

[0118] 3. Koh AY, Kohler JR, Coggshall KT, Van Rooijen N and Pier GB. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. PLoS Pathog. 2008;4:DOI:10.1371/journal.ppat.0040035.

[0119] 4. Gulay Z, Imir T. Anti-candidial activity of natural killer (NK) and lymphokine activated killer (LAK) lymphocytes *in vitro*. Immunobiology 1996;195:220-230

[0120] 5. Stone HH. Studies in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of *Candida* sepsis in children. J Pediatr Surg. 1974;9:127-133

[0121] 6. Richard M, Ibata-Ombetta S, Dromer F, Bordon-Pallier F, Jouault T and Gaillardin C. Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. Mol. Microbiol. 2002;44

[0122] 7. Bailey DA, Feldmann PJ, Bovey M, Gow NA and Brown AJ. The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. J Bacteriol. 1996;178:5353-5360

[0123] 8. Fu Y, Luo G., Spellberg BJ, Edwards JE, Jr, and Ibrahim AS. Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2008;7:483-492

[0124] 9. Nusing R, Goerig M, Habenicht AJ and Ullrich V. Selective eicosanoid formation during HL-60 macrophage differentiation. Regulation of thromboxane synthase. Eur J Biochem 1993;212:371-376

[0125] 10. Spellberg BJ, Collins M, French SW, Edwards JE, Jr., Fu Y and Ibrahim AS. A phagocytic cell line markedly improves survival of infected neutropenic mice. J Leukoc Biol 2005;78:338-344

[0126] 11. Eiden-Plach A, Zagorc T, Heintel T, Carius Y, Breinig F. Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. Appl.Environ.Microbiol 2004;70:961-966

[0127] 12. Avrova AO, Venter E, Birch PR and Whisson SC. Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. Fungal Genetics & Biology 2003;40:4-14

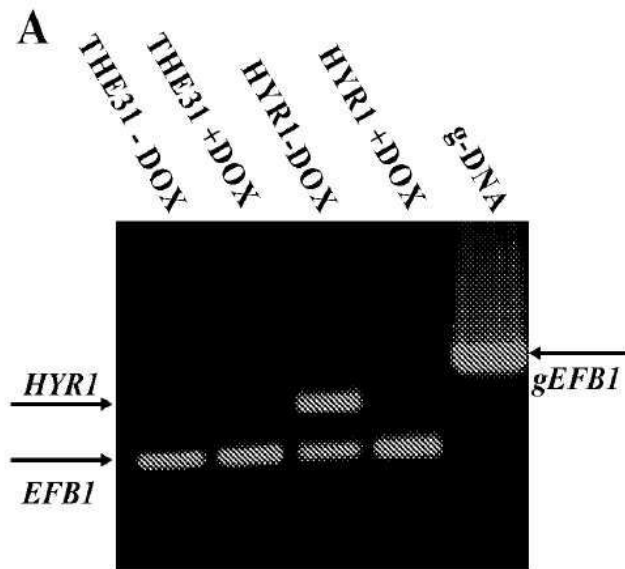
[0128] 13. Saviile SP, Lazzell AL, Monteagudo C and Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during

infection. *Eukaryot Cell* 2003;2:1053-1060.

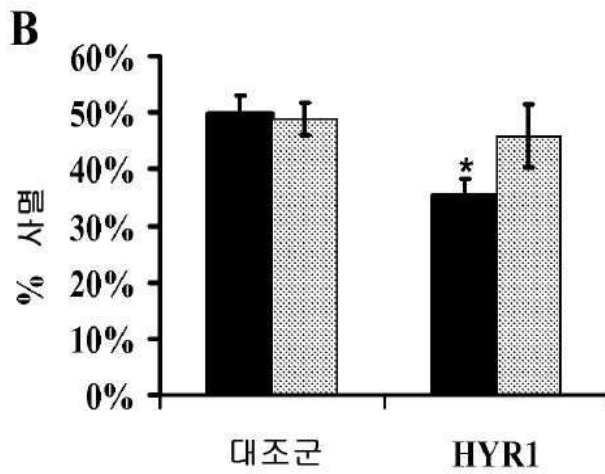
- [0129] 14. Spellberg B, Ibrahim AS, Yeaman MR, et al. The antifungal vaccine derived from the recombinant N terminus of Als3p protects mice against the bacterium *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2008;76:4574-4580
- [0130] 15. Fu Y, Ibrahim AS, Sheppard DC, Chen YC, French SW and Cutler JE. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* 2002;44:61-72
- [0131] 16. Ibrahim AS, Spellberg BJ, Avenissian V, Fu Y, Filler SG and Edwards JE. Vaccination with rAls1p-N improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. *Infect Immun* 2005;73:999-1005
- [0132] 17. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS Pathog*. 2006;2:e63
- [0133] 18. Fradin C, De Groot P, MacCallum D, et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Microbiology* 2005;56:397-415
- [0134] 19. Castano I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B and Cormack BP. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 2005;55:1246-1258
- [0135] 20. Schofield DA, Westwater C, Warner T, Nicholas PJ, Paulling EE and Balish E. Hydrolytic gene expression during oroesophageal and gastric candidiasis in immunocompetent and immunodeficient gnotobiotic mice. *J Infect Dis* 2003;188:591-599
- [0136] 21. Kumamoto CA, Vences MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol*. 2005;7:1546-1554
- [0137] 22. Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O and Kuchler K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* 2009;71:240-252

도면

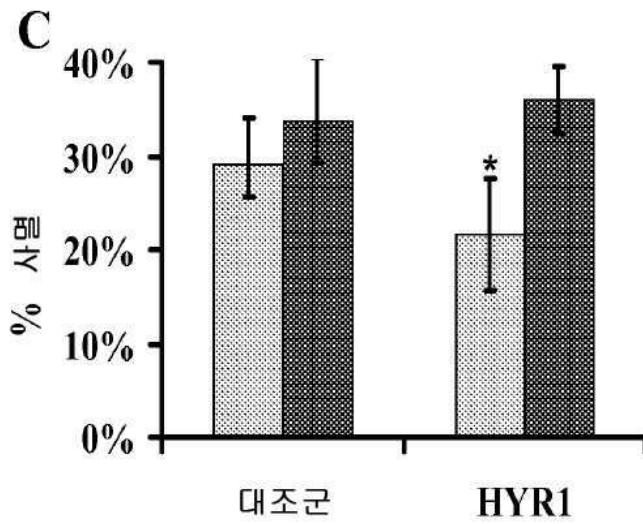
도면1a



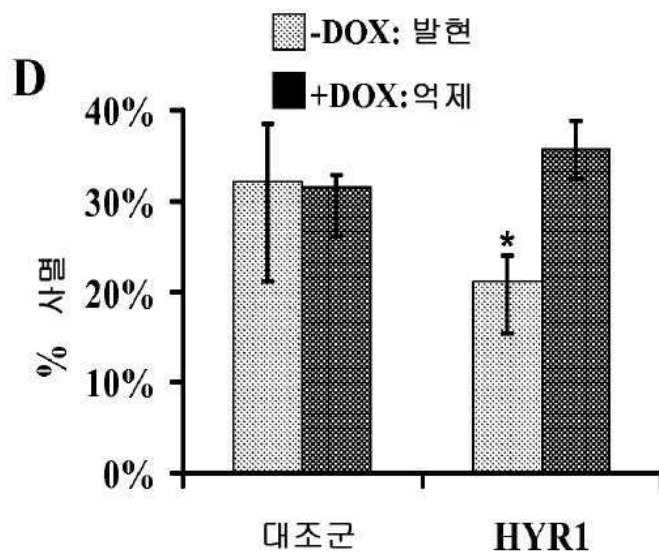
도면1b



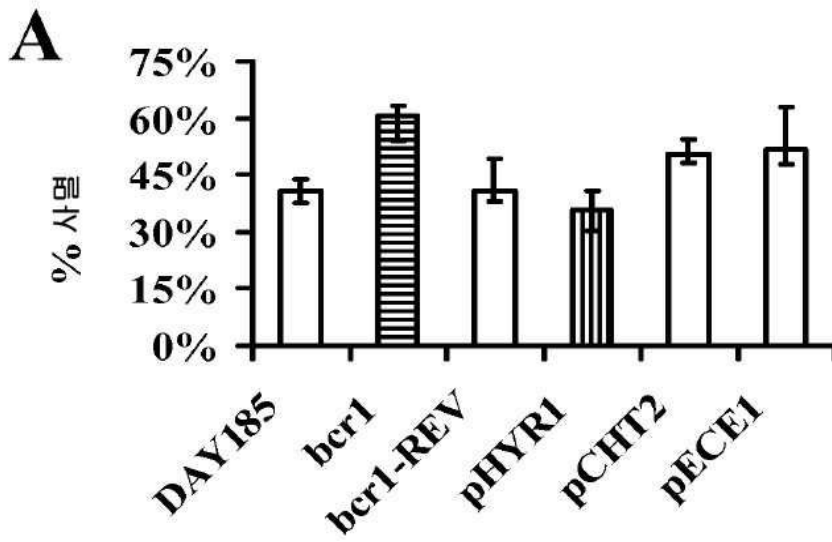
도면1c



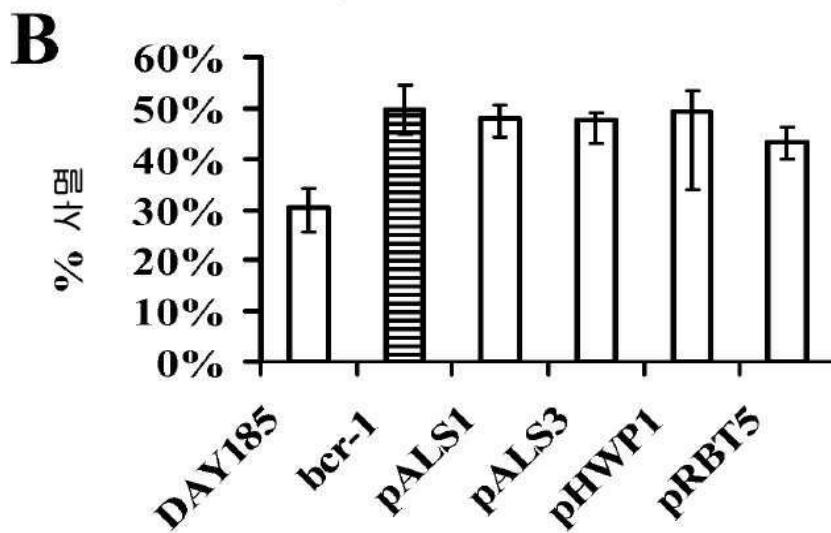
도면1d



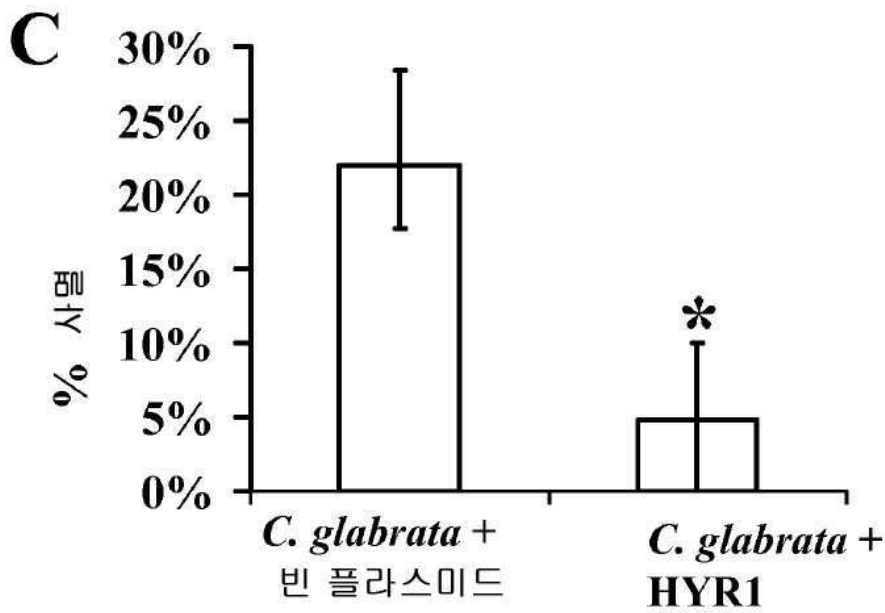
도면2a



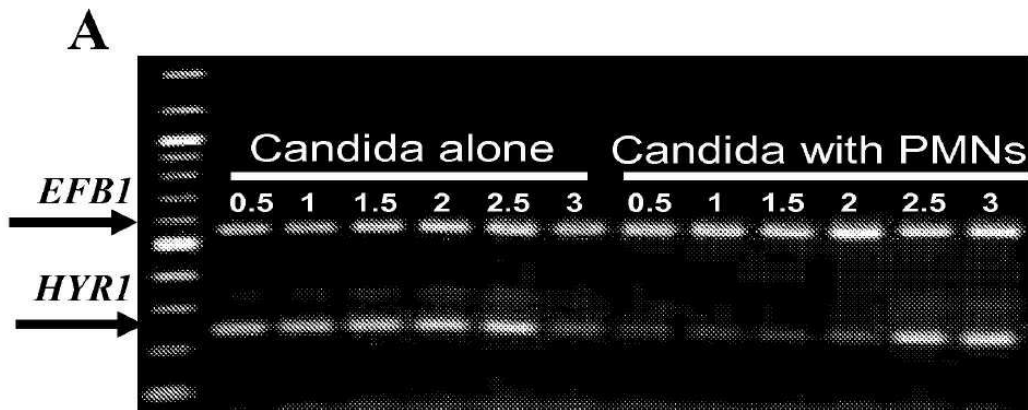
도면2b



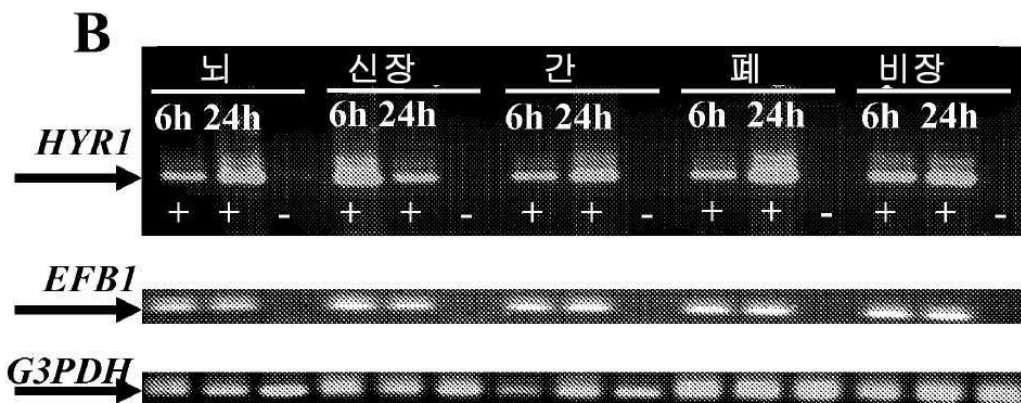
도면2c



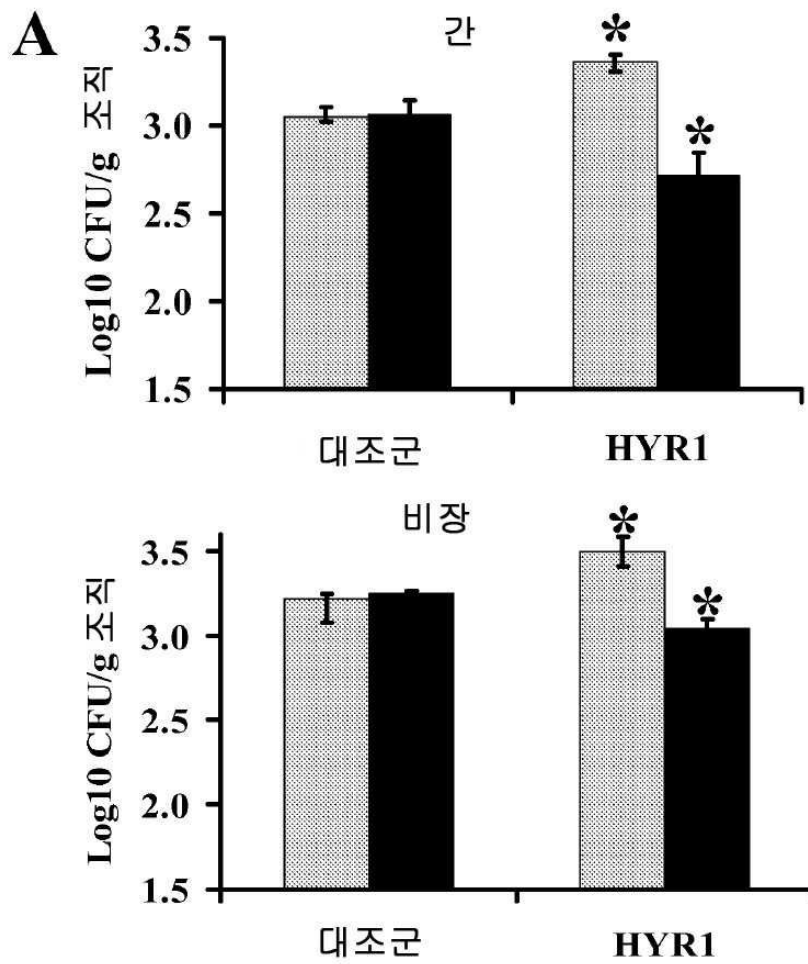
도면3a



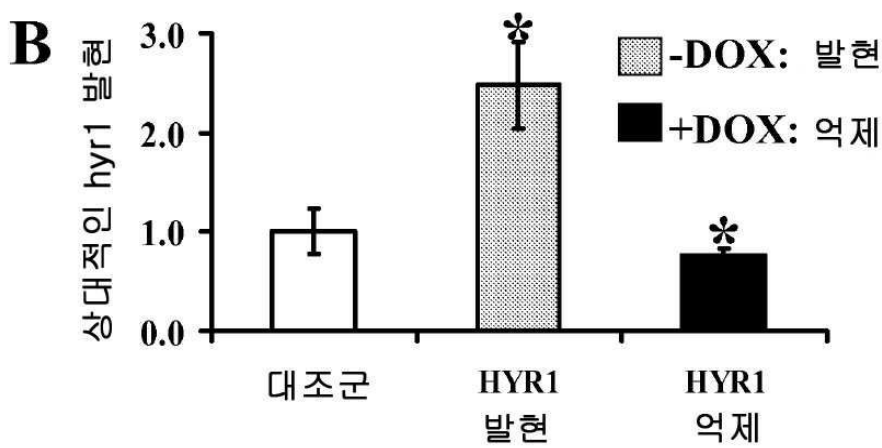
도면3b



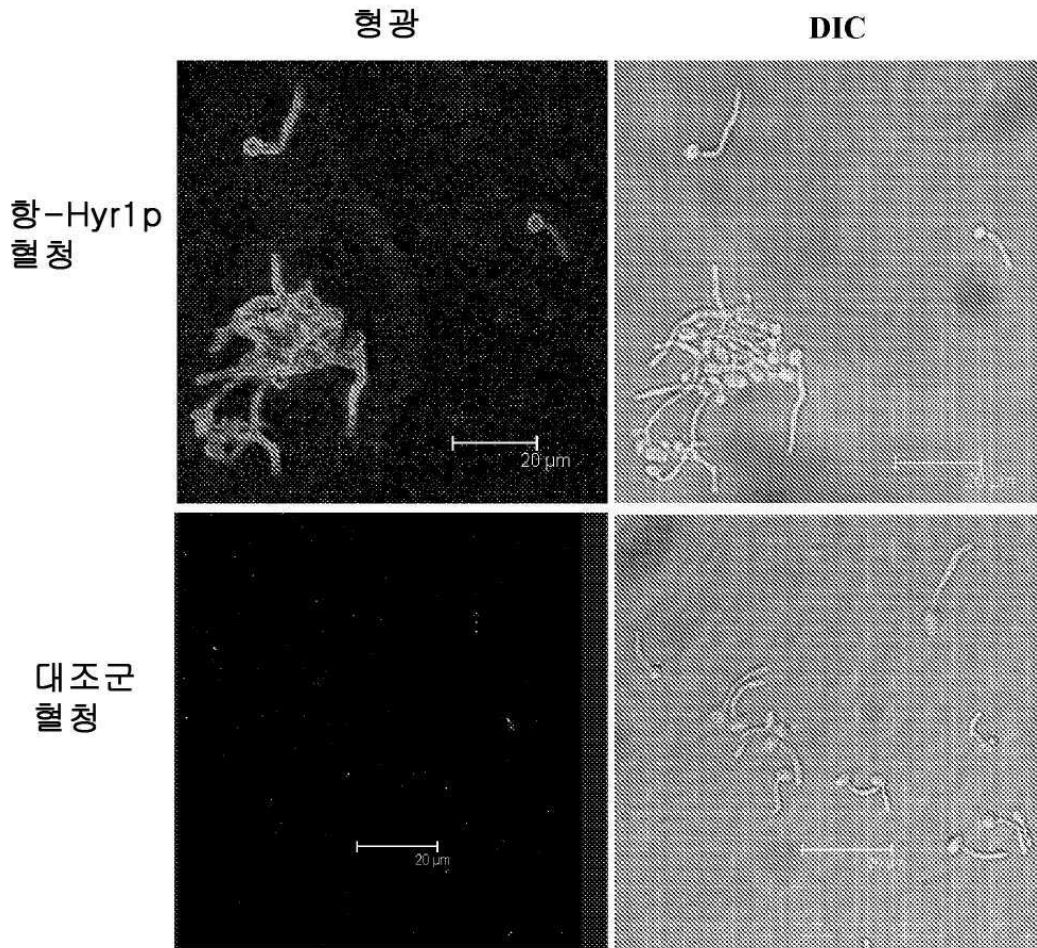
도면4a



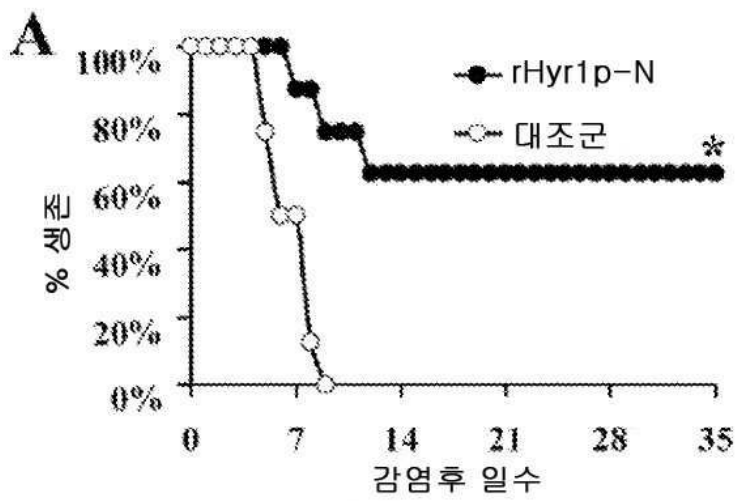
도면4b



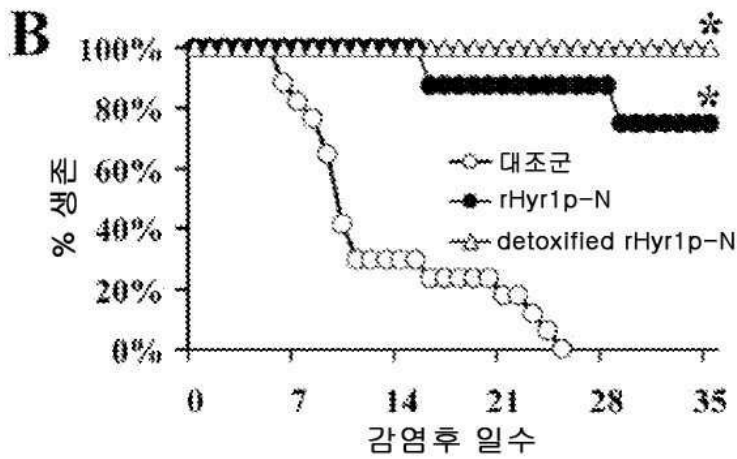
도면5



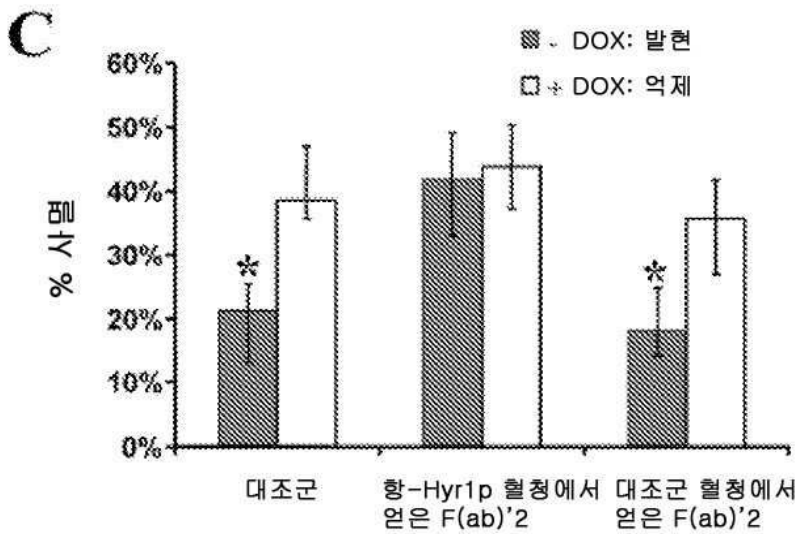
도면6a



도면6b



도면6c



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> LOS ANGELES BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE AT HARBOR-UCLA
MEDICAL CENTER

FU, Yue

LUO, Guanpingsheng

IBRAHIM, Ashraf

SPELLBERG, Brad J.

EDWARDS, Jr., John E.

<120> HYR1 AS A TARGET FOR ACTIVE AND PASSIVE IMMUNIZATION AGAINST

CANDIDA

<130> 50665/003WO2

<140> Not Yet Assigned

<141> 2010-07-02

<150> US 61/223,005

<151> 2009-07-03

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210

> 1

<211> 937

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 1

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

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

 115 120 125
 Ser Ser Gly Leu Val Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Tyr Ala Arg Glu Trp
 130 135 140
 Thr Asn Asn Gly Leu Ile Val Ala Tyr Gln Asn Gln Lys Ala Ala Gly

145 150 155 160
 Asn Ile Ala Phe Gly Thr Ala Tyr Gln Thr Ile Thr Asn Asn Gly Gln
 165 170 175
 Ile Cys Leu Arg His Gln Asp Phe Val Pro Ala Thr Lys Ile Lys Gly
 180 185 190
 Thr Gly Cys Val Thr Ala Asp Glu Asp Thr Trp Ile Lys Leu Gly Asn
 195 200 205
 Thr Ile Leu Ser Val Glu Pro Thr His Asn Phe Tyr Leu Lys Asp Ser
 210 215 220
 Lys Ser Ser Leu Ile Val His Ala Val Ser Ser Asn Gln Thr Phe Thr
 225 230 235 240
 Val His Gly Phe Gly Asn Gly Asn Lys Leu Gly Leu Thr Leu Pro Leu
 245 250 255
 Thr Gly Asn Arg Asp His Phe Arg Phe Glu Tyr Tyr Pro Asp Thr Gly
 260 265 270
 Ile Leu Gln Leu Arg Ala Asp Ala Leu Pro Gln Tyr Phe Lys Ile Gly
 275 280 285
 Lys Gly Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Arg Ile Val Asn Ser Arg Gly Leu
 290 295 300
 Lys Asn Ala Val Thr Tyr Asp Gly Pro Val Pro Asn Asn Glu Ile Pro

 305 310 315 320
 Ala Val Cys Leu Ile Pro Cys Thr Asn Gly Pro Ser Ala Pro Glu Ser
 325 330 335
 Glu Ser Asp Leu Asn Thr Pro Thr Thr Ser Ser Ile Glu Thr Ser Ser
 340 345 350
 Tyr Ser Ser Ala Ala Thr Glu Ser Ser Val Val Ser Glu Ser Ser Ser
 355 360 365
 Ala Val Asp Ser Leu Thr Ser Ser Ser Leu Ser Ser Lys Ser Glu Ser

 370 375 380
 Ser Asp Val Val Ser Ser Thr Thr Asn Ile Glu Ser Ser Ser Thr Ala
 385 390 395 400

Ile Glu Thr Thr Met Asn Ser Glu Ser Ser Thr Asp Ala Gly Ser Ser
 405 410 415
 Ser Ile Ser Gln Ser Glu Ser Ser Ser Thr Ala Ile Thr Ser Ser Ser
 420 425 430
 Glu Thr Ser Ser Ser Glu Ser Met Ser Ala Ser Ser Thr Thr Ala Ser
 435 440 445
 Asn Thr Ser Ile Glu Thr Asp Ser Gly Ile Val Ser Gln Ser Glu Ser
 450 455 460
 Ser Ser Asn Ala Leu Ser Ser Thr Glu Gln Ser Ile Thr Ser Ser Pro
 465 470 475 480
 Gly Gln Ser Thr Ile Tyr Val Asn Ser Thr Val Thr Ser Thr Ile Thr
 485 490 495
 Ser Cys Asp Glu Asn Lys Cys Thr Glu Asp Val Val Thr Ile Phe Thr
 500 505 510
 Thr Val Pro Cys Ser Thr Asp Cys Val Pro Thr Thr Gly Asp Ile Pro
 515 520 525
 Met Ser Thr Ser Tyr Thr Gln Arg Thr Val Thr Ser Thr Ile Thr Asn
 530 535 540
 Cys Asp Glu Val Ser Cys Ser Gln Asp Val Val Thr Tyr Thr Thr Asn
 545 550 555 560
 Val Pro His Thr Thr Val Asp Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr
 565 570 575
 Gly Gly Asp Asn Ser Thr Gly Gly Asn Glu Ser Gly Ser Asn His Gly
 580 585 590
 Pro Gly Asn Gly Ser Thr Glu Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Ala Gly
 595 600 605
 Ser Asn Glu Gly Ser Gln Ser Gly Pro Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly
 610 615 620
 Ser Glu Gly Gly Ser Asn Asn Gly Ser Gly Ser Asp Ser Gly Ser Asn
 625 630 635 640
 Asn Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Ser Thr

Asn Thr Thr Asp Ser Ser Ser Ser Val Pro Thr Ile Asp Thr Asn Glu
 900 905 910
 Asn Gly Ser Ser Ile Val Thr Gly Gly Lys Ser Ile Leu Phe Gly Leu
 915 920 925
 Ile Val Ser Met Val Val Leu Phe Met
 930 935
 <210> 2
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Candida albicans
 <400> 2
 Thr Ser Arg Ile Asp Arg Gly Gly Ile Gln Gly Phe His Gly Asp Val

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

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

 130 135 140
 Gln Thr Ile Thr Asn Asn Gly Gln Ile Cys Leu Arg His Gln Asp Phe
 145 150 155 160
 Val Pro Ala Thr Lys Ile Lys Gly Thr Gly Cys Val Thr Ala Asp Glu

