(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0053903
(43) 공개일자 2014년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/195 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7032751
(22) 출원일자(국제) 2012년05월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년12월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/037541
(87) 국제공개번호 WO 2012/155053
국제공개일자 2012년11월15일
(30) 우선권주장
61/484,934 2011년05월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
칠드런'즈 메디컬 센터 코포레이션
미국 매사추세츠 보스턴 새턱 스트리트 55 (우편번호:02115)
(72) 발명자
말리 리차드
미국 매사추세츠주 01915 비벌리 베이뷰 애비뉴 15
루 잉지에
미국 매사추세츠주 02467 체스트넛 힐 게리 로드 38
쟝 판
미국 매사추세츠주 02467 체스트넛 힐 게리 로드 38
(74) 대리인
문두현, 문기상

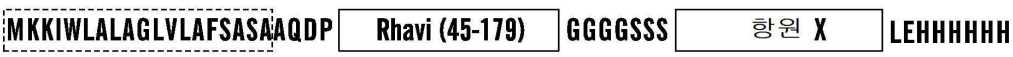
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 **변형 비오틴-결합 단백질, 그 융합 단백질 및 응용**

(57) 요 약

본원은 세균에서 고수율로 가용형으로 발현될 수 있는 변형 비오틴-결합 단백질을 제공한다. 또한 상기 변형 비오틴-결합 단백질 및 항원을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 본원은 또한 황색포도구균으로부터의 알파-용혈소의 비용혈성 변이형과, 알파-용혈소의 비용혈성 변이형 및 비오틴-결합 도메인들을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 또한 상기 단백질을 함유하는 면역성 조성물이 개시되며 대상체에서 면역 반응을 유도하거나 또는 대상체를 백신접종하기 위한 상기 면역성 조성물의 사용도 개시된다.

대 표 도 - 도3



(30) 우선권주장
61/608,168 2012년03월08일 미국(US)
61/609,974 2012년03월13일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 가용성 비오틴-결합 단백질 및 그것의 임의의 기능성 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비오틴-결합 단백질은 대장균에서 적어도 배지 1 L 당 10 ㎎의 수준으로 가용형으로 생산되는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 비오틴-결합 단백질은 2량체인, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비오틴-결합 단백질은 N-말단에 세균 시그널 서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 세균 시그널 서열은 서열번호 2인, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 시그널 서열은 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-단백질에 연결되어 있는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 펩티드 링커는 서열번호 8 또는 서열번호 9 VSDP의 아미노산 서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비오틴-결합 단백질은 C-말단에 정제 표지를 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 정제 표지는 히스티딘 표지, c-my 표지, Halo 표지, Flag 표지, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 히스티딘 표지는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제 표지는 펩티드 링커를 통해 상기 비오틴-결합 단백질에 연결되어 있는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 펩티드 링커는 서열번호 11 VDKLAAALE 또는 서열번호 12 GGGGSSSVDKLAAALE의 아미노산 서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비오틴-결합 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 비오틴-결합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 15

비오틴-결합 단백질과 단백질 또는 펩티드를 포함하는 융합 단백질.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 단백질 또는 펩티드는 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-결합 단백질에 융합되어 있는, 융합 단백질.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 펩티드 링커는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단백질 또는 펩티드는 폐렴구균 항원, 결핵 항원, 탄저병 항원, HIV 항원, 계절성 또는 유행성 플루 항원, 인플루엔자 항원, 백일해 항원, 황색포도구균 항원, 수막염균 항원, 헤모필루스 항원, HPV 항원, 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 항원인, 융합 단백질.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원은 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형인, 융합 단백질.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형은 야생형 황색포도구균 알파-용혈소의 아미노산 잔기 205, 213 또는 209-211에 돌연변이를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형은 상기 야생형 황색포도구균 알파-용혈소 내에 다음 돌연변

이들 중 하나를 포함하는 융합 단백질:

(i) 잔기 205 W에서 A로;

(ii) 잔기 213 W에서 A로; 또는

(iii) 잔기 209-211 DRD에서 AAA로.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형은 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 및 그 기능성 변이형, 부분, 및 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 23

제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 융합 단백질은 N-말단에 세균 시그널 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 세균 시그널 서열은 서열번호 2인, 융합 단백질.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서,

상기 시그널 서열은 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-단백질에 연결되어 있는, 융합 단백질.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 펩티드 링커는 서열번호 8 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 27

제15항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 융합 단백질은 C-말단에 정제 표지를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 정제 표지는 히스티딘 표지, c-my 표지, Halo 표지, Flag 표지, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 융합 단백질.

청구항 29

제27항에 있어서,

상기 히스티딘 표지는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제 표지는 펩티드 링커를 통해 상기 비오틴-결합 단백질에 연결되어 있는, 융합 단백질.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 펩티드 링커는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 32

제15항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비오틴-결합 단백질은 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 비오틴-결합 단백질인, 융합 단백질.

청구항 33

제15항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열번호 26, 서열번호 27, 및 서열번호 28로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 34

제15항 내지 제33항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 35

야생형 황색포도구균 알파-용혈소의 아미노산 잔기 205, 213 또는 209-211에 돌연변이를 포함하는 돌연변이 알파-용혈소(mHla) 단백질이며, 상기 돌연변이 알파-용혈소는 동역가의 야생형 알파-용혈소(Hla)보다 더 낮은 용혈 활성을 갖는 돌연변이 알파-용혈소(mHla) 단백질.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 돌연변이 알파-용혈소의 용혈 활성은 동역가의 야생형 Hla보다 적어도 25% 더 낮은, 돌연변이 알파-용혈소 단백질.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서,

상기 돌연변이 알파-용혈소는 상기 야생형 황색포도구균 알파-용혈소 내에 다음 돌연변이들 중 하나를 포함하는, 돌연변이 알파-용혈소 단백질:

(i) 잔기 205 W에서 A로;

(ii) 잔기 213 W에서 A로; 또는

(iii) 잔기 209-211 DRD에서 AAA로.

청구항 38

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이 알파-용혈소는 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 및 그 기능성 변이형, 부분, 및 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 돌연변이 알파-용혈소 단백질.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항의 돌연변이 알파-용혈소를 포함하는 조성물.

청구항 40

알파-용혈소 및 비오틴-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 상기 융합 단백질은 동역가의 야생형 알파-용혈소(Hla)보다 더 낮은 용혈 활성을 갖는 융합 단백질.

청구항 41

제18항에 있어서,

상기 알파-용혈소는 제35항 내지 제38항 중 어느 한 항의 돌연변이 용혈소이거나 또는 상기 알파-용혈소는 황색포도구균의 야생형 알파-용혈소의 아미노산 27-319의 아미노산 서열로 구성된, 융합 단백질.

청구항 42

제19항에 있어서,

상기 비오틴-결합 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된, 융합 단백질.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비오틴-결합 도메인과 상기 돌연변이 알파-용혈소는 펩티드 링커에 의해 연결되어 있는, 융합 단백질.

청구항 44

제43항에 있어서,

상기 펩티드 링커는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 45

제40항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 융합 단백질은 N-말단에 세균 시그널 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 46

제45항에 있어서,

상기 세균 시그널 서열은 서열번호 2인, 융합 단백질.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서,

상기 시그널 서열은 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-단백질에 연결되어 있는, 융합 단백질.

청구항 48

제47항에 있어서,

상기 펩티드 링커는 서열번호 8 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 49

제40항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 융합 단백질은 C-말단에 정제 표지를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 50

제49항에 있어서,

상기 정제 표지는 히스티딘 표지, c-my 표지, Halo 표지, Flag 표지, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 융합 단백질.

청구항 51

제50항에 있어서,

상기 히스티딘 표지는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정제 표지는 펩티드 링커를 통해 상기 비오틴-결합 단백질에 연결되어 있는, 융합 단백질.

청구항 53

제52항에 있어서,

상기 펩티드 링커는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 54

제40항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비오틴-결합 도메인은 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 비오틴-결합 단백질인, 융합 단백질.

청구항 55

제40항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열번호 26, 서열번호 27, 및 서열번호 28로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 56

제40항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 융합 단백질의 용혈 활성은 동역가의 야생형 Hla보다 적어도 25% 더 낮은, 융합 단백질.

청구항 57

제40항 내지 제56항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 58

제14항, 제34항, 제39항, 또는 제57항 기술의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체 내에 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 59

제14항, 제34항, 제39항, 또는 제57항 기술의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 항원을 지닌 병원체에 대하여 포유류를 백신접종하는 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서,

상기 대상체가 인간인, 방법.

청구항 61

제58항 또는 제59항에 있어서,

상기 대상체가 농가 동물 또는 비가축인, 방법.

청구항 62

제58항 또는 제59항에 있어서,

상기 대상체가 가축인, 방법.

청구항 63

제58항 또는 제59항에 있어서,

상기 투여가 피하, 비강내, 진피내 또는 근육내 주사인, 방법.

청구항 64

제58항에 있어서,

상기 면역 반응은 항체/B-세포 반응인, 방법.

청구항 65

제58항에 있어서,

상기 면역 반응은 Th1, Th2, 또는 Th17 반응을 포함하는 CD4+ T세포 반응인, 방법.

청구항 66

제58항에 있어서,

상기 면역 반응은 CD8+ T세포 반응인, 방법.

청구항 67

제14항, 제34항, 제39항, 또는 제57항에 있어서,

병원체 또는 면역 위협에의 노출에 대한 진단용의, 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2011년 5월 11일자로 출원된 미국 가출원 제61/484,934호; 2012년 3월 8일자로 출원된 미국 가출원 제61/608,168호; 및 2012년 3월 13일자로 출원된 미국 가출원 제61/609,974호의 35 U.S.C. § 119(e) 하에서의 이득을 주장하며, 이들 각각의 내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0003] 분야

[0004] 본 발명은 비오틴-결합 단백질 및 그 비오틴-결합 단백질을 포함하는 융합 단백질/조성물에 관한 것이다. 또한 본원에는 비오틴-결합 단백질 및/또는 그 융합 단백질을 세균에서 가용성으로 고수율로 발현하는 방법이 기술된다.

배 경 기 술

[0005] 비오틴-결합 단백질 및 그 유도체는 다양한 응용에 널리 사용될 수 있다. 그러나 재조합 비오틴-결합 단백질의 생산 또는 정제는 매우 어려울 수 있다. 대장균에서 발현될 때, 대부분의 비오틴-결합 단백질은 봉입체에 축적되는 경향이 있으며, 활성 단백질의 제조에는 변성(denaturing), 재접힘(refolding) 및 힘든 다운스트림 프로세싱(downstream processing)이 요구된다. 낮은 생산 비용과 추가의 조작의 가능성 때문에, 대장균에서의 발현이 바람직하며; 따라서, 대장균에서 효율적으로 생산될 수 있는 비오틴-결합 단백질이 매우 요망된다. 나아가, 대장균에서의 발현은 다양한 응용을 위한 비오틴-결합 단백질을 함유하는 재조합 융합 단백질을 생성할 가능성도 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 당 기술분야에서는 대장균에서 고수율로 가용형으로 발현 될 수 있는, 비오틴-결합 단백질 및 비오틴-결합 단백질을 함유하는 융합 단백질이 요구되고 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 요약

[0008] 본 개시의 일 목적은 대장균에서 고수율로 가용형으로 발현될 수 있는 재조합 비오틴-결합 단백질을 제공하는 것이다. 따라서, 본 개시는 비오틴-결합 단백질 및 이를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 재조합 비오틴-결합 단백질은 야생형 리즈아비딘(rhizavidin)(rhavi)의 아미노산 45 내지 179(FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD, 서열번호 1)를 포함하는 아미노산 서열의 N-말단에 융합된 대장균 시그널 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 대장균 시그널 서열은 MKKIWLALAGLVLAFSASA(서열번호 2)이다. 상기 시그널 서열은 유연(flexible) 펩티드 링커에 의해 야생형 rhavi의 아미노산 45-179를 포함하는 서열에 융합될 수 있다.

[0009] 본원에서는 대장균에서 고수율로 가용형으로 비오틴-결합 단백질을 발현하는 방법도 제공된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대장균에서 비오틴-결합 단백질을 발현하는 단계를 포함하며, 상기 비오틴-결합 단백질의 천연 시그널 서열이 대장균 시그널 서열에 의해 대체된 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 시그널 서열은 MKKIWLALAGLVLAFSASA(서열번호 2)이다.

[0010] 또다른 태양에서, 본 발명은 비오틴-결합 도메인과 단백질 또는 펩티드를 포함하는 비오틴-결합 융합 단백질을 제공한다.

[0011] 다른 태양에서 본원에는 지질화된(lipidated) 비오틴-결합 단백질이 제공된다. 본원에 있어서 용어 "지질화된 비오틴-결합 단백질"은 지질과 공유적으로 연결된(covalently linked) 비오틴-결합 단백질을 말한다. 지질화된 비오틴-결합 단백질은 톨 유사 수용체(Toll like receptor) 2의 리간드(ligand) 또는 작용제(agonist)이다. 따라서, 본원에는 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 지질화된 비오틴-결합 단백질을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0012] 본원에는 대장균에서 지질화된 비오틴-결합 단백질을 발현하는 방법도 제공된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대장균에서 지질화된 비오틴-결합 단백질을 발현하는 단계를 포함하며, 상기 비오틴-결합 단백질의 천연 시그널 서열이 지질화 모티프(lipidation motif)를 함유하는 대장균 시그널 서열에 의해 대체된 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 시그널 서열은 MKKVAAFVALSLLMAGC(서열번호 3)이다.

[0013] 또다른 태양에서 본원에는 황색포도구균(*Staphylococcal aureus*) 알파-용혈소(alpha-hemolysin)(Hla)의 비용혈성 유도체가 제공된다. 본원에 기술된 Hla 유도체는 융합 단백질의 형태일 수 있으며, 상기 융합 단백질은 Hla 유도체 도메인 및 비오틴-결합 도메인 둘다를 포함한다. 이 태양의 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 도메인은 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질이다.

[0014] 지질화된 비오틴-결합 단백질과 같이, 본원에 기재된 Hla 변이형(variant) 또는 그것의 비오틴-결합 단백질과의 융합 단백질도 톨 유사 수용체 또는 다른 패턴 인식 수용체(PRR)의 리간드 또는 작용제이다. 따라서, 본원에는 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 본원에 기술된 비용혈성 Hla 변이형 또는 그것의 비오틴-결합 단백질과의 융합 단백질을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이다.

[0015] 또다른 태양에서, 본원에는 비오틴-결합 단백질, 지질화된 비오틴-결합 단백질, 비오틴-결합 도메인과 항원성 단백질 또는 펩티드를 포함하는 비오틴-결합 융합 단백질을 포함하는 면역성 조성물 또는 백신 조성물이 제공된다. 이 태양의 일부 실시형태에서, 항원성 단백질은 본원에 기술된 Hla의 비용혈성 유도체이다.

[0016] 또다른 태양에서, 본원에는 또한 대상체, 예를 들어, 포유류, 인간을 본원에 개시된 면역성 조성물에 의해 백신 접종하는 방법으로서, 대상체에게 본원에 개시된 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본원에 개시된 실시형태에 따른 변형(modified) 비오틴-결합 단백질의 개요도.

도 2 는 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질의 SDS-PAGE.

도 3은 비오틴-결합 단백질 및 항원 X를 포함하는 융합 단백질의 개요도.

도 4는 정제된 리즈아비딘 융합 단백질들의 예시적 SDS-PAGE.

도 5는 본원에 개시된 실시형태에 따른 지질화된 비오틴-결합 단백질의 개요도.

도 6은 본원에 기술된 지질화된 비오틴-결합 단백질의 SDS-PAGE.

도 7은 지질화된 비오틴-결합 단백질의 용량-의존성 TLR2 활성을 보여 주는 막대 그래프.

도 8은 본원에 기술된 재조합 WT 또는 돌연변이 황색포도구균 알파-용혈소(Hla) 및 그것의 리즈아비딘 융합 단백질의 개요도. 비용혈성 Hla에서, 점 돌연변이는 다음과 같이 만들어졌다:(i) 잔기 205 W에서 A로; (ii) 잔기 213 W에서 A로; 또는 (iii) 잔기 209-211 DRD에서 AAA로.

도 9는 정제된 야생형 Hla 또는 그 비용혈성 변이형의 SDS-PAGE.

도 10은 야생형 Hla 또는 그 비용혈성 변이형의 정제된 비오틴-결합 융합 단백질의 SDS-PAGE.

도 11은 WT Hla 및 그 비용혈성 변이형의 용혈 활성을 보여 주는 선 그래프.

도 12는 야생형 Hla, 비용혈성 변이형 Hla, 및 야생형 Hla 및 그 비용혈성 변이형의 비오틴-결합 융합 단백질들의 용혈 활성을 보여 주는 선 그래프.

도 13은 비오틴-결합 융합 단백질(rhavi-Hla209)에 의한 마크로파아지의 자극이 다수의 친 염증성 시토킨을 유도함을 보여주는 막대 그래프.

도 14는 지질화된 리즈아비딘 또는 rhavi-Hla209를 함유하는 다항원 제시 시스템(MAPS) 복합체가 항원들에 대해 더 강한 T 세포 반응들을 유도함을 보여주는 막대 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 본원에 기술된 특정 조성물, 방법, 프로토콜(protocol), 및 시약, 등에 한정되지 않고 변화할 수 있음이 이해되어야 한다. 본원에 있어서 사용된 용어들은 특정 실시형태들을 기술하는 목적을 위한 것일 뿐이며, 오로지 특허청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 범주를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0019] 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 당 분야에서 비오틴-결합 단백질의 저발현은, 대장균의 세포질 내에서의, 형성되지 않거나 또는 매우 낮은 수준으로 형성되는 비오틴-결합 단백질의 각 모노머에서의 디설파이드 결합에 기인한 불량한 접힘 때문일 수 있다. 이제 본 발명자들은 단백질의 주변세포질 공간으로의 수송에 의해 정확한 접힘이 달성될 수 있음을 알아냈다. 따라서, 재조합 비오틴-결합 단백질의 정확한 접힘은 대장균 분비 시그널 서열에 의해 비오틴-결합 단백질의 완전한 천연 시그널 서열을 대체함으로써 개선될 수 있다. 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 이는 대장균 세포의 주변세포질 공간으로의 재조합 단백질의 이행(translocation)을 촉진한다. 대장균의 주변세포질 공간으로의 재조합 단백질의 이행은 그리고나서 비오틴-결합 단백질(예: 리즈아비딘)에 기능적으로 중요한 디설피드 결합을 제공할 수 있으며 상기 단백질은 고수율로 가용형으로 정확하게 접힐 수 있다.

[0020] 하나의 태양에서, 본원에는 대장균에서 고수율로 그리고 가용형으로 발현될 수 있는 비오틴-결합 단백질이 제공된다. 본원에 있어서 용어 "비오틴 결합 단백질"은 비오틴 또는 그 유사체 또는 유도체에 비공유적으로 결합하는 단백질을 말한다. 고수율은 단백질이 약 10 mg/L, 11 mg/L, 12 mg/L, 13 mg/L, 14 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L, 40 mg/L, 45 mg/L, 50 mg/L 또는 그 이상의 양으로 대장균에서 가용형으로 발현될 수 있음을 의미한다.

[0021] 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 단백질은 재조합 단백질일 수 있다. 비오틴-결합 단백질에 대한 코딩 서열은, 오리지날 유전자에 존재하는 희귀 코돈에 기인하여 대장균에서의 발현 동안 있을 수 있는 어려움을 피하기 위해, 대장균 발현 코돈들을 사용하여 최적화될 수 있다.

[0022] 일반적으로, 상기 비오틴-결합 단백질은 비오틴-결합 도메인을 포함한다. 본원에 있어서, "비오틴-결합 도메인" 은 비오틴에 결합하는 폴리펩티드 서열을 말한다. 완전한 비오틴-결합 단백질이 비오틴-결합 도메인으로서 사용될 수 있지만, 단백질의 비오틴-결합 부분만이 사용될 수도 있다. 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 도메인은 리즈아비딘에 유래한다.

[0023] 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 도메인은, 야생형 리즈아비딘의 아미노산 45-179에 상당하는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어진다. 야생형 리즈아비딘의 아미노산 서열은: MIITSLYATFGTIADGRRTSGGKTMIRTNAVAALVFAVATSALAFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(서열번호 4)이다.

[0024] 달리 말하면, 비오틴-결합 도메인은 야생형 리즈아비딘의 아미노산 1-

44(MIITSLYATFGTIADGRRTSGGKTMIRTNAVAALVFAVATSALA, 서열번호 5)를 포함하지 않는다(즉, 결여한다). 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 도메인은 아미노산 서열 FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSW NLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(서열번호 1)을 포함한다.

[0025] 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 도메인은 서열번호 1에 대해 적어도 50% 동일성, 적어도 55% 동일성, 적어도 60% 동일성, 적어도 65% 동일성, 적어도 70% 동일성, 적어도 75% 동일성, 적어도 80% 동일성, 바람직하게는 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성, 또는 적어도 99% 동일성, 및 더 바람직하게는 적어도 99.3% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] Helppolainen et al.(Biochem J., 2007, 405: 397-405)은 전장 리즈아비딘의 첫 24개 잔기들만의 제거를 기술하는 반면, 본 발명자들은 전장 리즈아비딘의 첫 44개 잔기들은 리즈아비딘의 기능과 중심 구조(core structure)에 불필요함을 알아냈다. 나아가, 예기치 않게, 전장 리즈아비딘의 첫 44개의 잔기들을 대장균 시그널 펩티드에 의해 대체하는 것이 본원에 기술된 비오틴 단백질의 대장균에서의 용해도와 분비의 증가로 이어졌으므로, 전장 리즈아비딘의 아미노산 25-44(MIRTNAVAALVFAVATSALA, 서열번호: 6)는 대장균에서 발현되는 리즈아비딘의 용해도와 분비를 감소시킨다.

[0027] 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질에 있어서, 비오틴-결합 도메인은 비오틴-결합 도메인의 N-말단이 야생형 리즈아비딘의 아미노산 서열 1-44에 상당하는 아미노산 서열을 포함하지 않는다는 전제 하에 N- 또는 C-말단이 1개 이상의 아미노산에 의해 연장될 수 있다. 본 발명자들은 야생형 리즈아비딘의 N-말단 상의 첫 44개의 아미노산들의 절단(truncation)이 대장균에서 가용형으로의 비오틴-결합 단백질의 발현을 극적으로 증가시킬 수 있음을 알아냈다. 따라서 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 서열 X^1-X^2-X^3을 포함할 수 있으며, 여기서 X^2는 야생형 리즈아비딘의 아미노산 45-179에 상당하는 아미노산 서열을 갖는 펩티드이고, X^1과 X^3은 독립적으로 부재하거나(absent) 또는 X^1의 N-말단이 야생형 리즈아비딘의 아미노산 1-44의 N-말단에 상당하는 아미노산 서열을 포함하지 않는다는 전제 하에서 1 내지 약 100개의 아미노산의 펩티드이다.

[0028] 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 단백질은 비오틴-결합 단백질의 N-말단에 접합된 시그널 펩티드를 포함할 수 있다. 즉, X^1은 시그널 펩티드를 포함할 수 있다. 상기 시그널 펩티드는 N-말단에서 리더 펩티드라고도 불리며, 이는 막을 통한 이행 후에 절단될 수도 절단되지 않을 수도 있다. 분비/시그널 펩티드에 대해서는 후에 상세히 기술한다. 일부 실시형태에서, 상기 시그널 서열은 MKKIWLALAGLVLAFSASA(서열번호 2), MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRA(서열번호 7), MKKVAAFVALSLLMAGC(서열번호 3), 또는 그 유도체 또는 기능성 부분이다.

[0029] 시그널 펩티드는 비오틴-결합 도메인의 N-말단에 직접적으로(예: 결합을 통해) 또는 간접적으로(예: 링커에 의해) 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 시그널 펩티드는 펩티드 링커에 의해 비오틴-결합 도메인의 N-말단에 연결될 수 있다. 펩티드 링커 서열은 임의의 길이일 수 있다. 예를 들면, 펩티드 링커 서열은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 그 이상의 아미노산들의 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 펩티드 링커는 4개의 아미노산들의 길이이다.

[0030] 펩티드 링커 서열은 임의의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 펩티드 링커는 시그널 펩티다제에 의해 절단될 수 있는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 펩티드 링커는 AQDP(서열번호 8) 또는 VSDP(서열번호 9)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0031] 비오틴-결합 단백질에서, 비오틴-결합 도메인은 그 C-말단에서 1-100개의 아미노산의 펩티드에 접합될 수 있다. 그러한 C-말단에서의 펩티드는 정제 표지(purification tag), 다른 도메인에의 링커 등으로 사용될 수 있다.

[0032] 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 단백질은 그 N- 또는 C-말단에 1개 또는 그 이상의(예: 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상의) 정제 표지(들)을 포함한다. 정제 표지의 예에는 히스티딘 표지, c-my 표지, Halo 표지, Flag 표지 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 단백질은 그 C-말단에 히스티딘 표지, 예를 들어, $(His)_6$(서열번호 10)을 포함한다.

[0033] 정제 표지는 그 표지가 외부에 노출될 가능성을 증진시키기 위해 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-결합 단백질에 접합될 수 있다. 상기 링커의 길이는 적어도 1개(예: 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 또는 15개)의 아미노산일 수 있다. 링커 펩티드는 임의의 아미노산 서열을 제한 없이

포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커 펩티드는 VDKLAAALE(서열번호 11) 또는 GGGGSSSVDKLAAALE(서열번호 12의)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0034] 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 단백질은 그 C-말단에 VDKLAAALEHHHHH(서열번호 13) 또는 GGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH(서열번호 14)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0035] 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 단백질은 아미노산 서열: MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENC NSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH(서열번호 15)을 포함한다.

[0036] 4량체(tetramer)를 형성하는 알려진 비오틴-결합 단백질에 비해, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 2량체(dimer)를 형성한다. 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 2량체 형성은 대장균에서 가용성 단백질로서의 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질의 발현을 더 향상시킬 수 있다.

[0037] 비오틴-결합 단백질들은 당 기술분야에 알려져 있지만, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 당 기술분야에 현재 알려져 있는 아비딘 및 아비딘-유사 단백질들과의 상당한 차이를 포함한다. 첫째, 현재 알려져 있는 아비딘들은 대장균에서 가용성 단백질로서 발현하기가 상당히 어렵다. 그러나 본 발명자들이 입증하였듯이 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 고수율로 대장균에서 가용성 단백질로서 발현될 수 있다.

[0038] 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 대장균에서의 발현에 의해, 고수율로, 예를 들어, 배양 1 L 당 30 mg 넘게, 가용형으로 얻어질 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 당 기술분야에 알려진 것들보다 더 가용성이며 근원적인(underlying) 차이점들을 반영한다. 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 용해도 차이는 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질과 당 기술분야의 알려진 다른 비오틴-결합 단백질 간의 근원적인 물리적 및/또는 화학적 및/또는 구조적 차이 때문일 수 있다.

[0039] 둘째, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 야생형 리즈아비딘의 아미노산 45-179로 구성된 비오틴-결합 도메인을 포함한다. 야생형 리즈아비딘과 그것의 부분적으로 절단된 부분(partially truncated portion)은 당 기술분야에 알려져 있지만, 야생형 리즈아비딘의 아미노산 45-179의 아미노산 서열을 포함하고 대장균 시그널 서열을 갖는 비오틴-결합 단백질이 대장균에서 고수율로 얻어질 수 있는 가용성 단백질로 이어질 것이다라는 것에 대한 교시 또는 시사는 없다. Helppolainen et al.(Biochem J., 2007, 405: 397-405)에 따르면 야생형 리즈아비딘의 아미노산 25-44는 추정(putative) 시그널 서열을 포함한다. 그러나, 본원에 논의된 바와 같이, 본 발명자들은 상기 추정 시그널 서열을 대장균 시그널 서열로 대체하는 것이 대장균에서의 비오틴-결합 단백질 발현의 가용형의 증가로 이어짐을 알아내고 입증하였다.

[0040] 셋째, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 아미노산 서열 GGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH(서열번호 14)의 펩티드를 포함한다. C-말단의 이 펩티드는 정제를 위한 히스티딘 표지와, 비오틴 단백질 내에 다른 도메인들, 예를 들어, 항원 도메인들을 삽입할 장소를 제공한다. 나아가, Helppolainen et al.(Biochem J., 2007, 405: 397-405)는 대장균에서 리즈아비딘의 발현을 기술하지만, Helppolainen et al.에는 리즈아비딘의 비오틴-결합 도메인의 C-말단에 추가의 펩티드를 접합하는 것에 대한 교시 또는 시사는 없다.

[0041] 네째, 리즈아비딘은 다른 아비딘-유사 단백질들에 비해 난 아비딘(egg avidin)에 대한 더 낮은 서열 상동성(22.4% 서열 동일성 및 35.0% 유사성)을 갖는다. 따라서, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 아비딘 및 다른 아비딘-유사 단백질과 상이하다.

[0042] 다섯째, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 아비딘 및 다른 아비딘-유사 분자에 비해 낮은 등전점(pI)을 갖는다. 야생형 리즈아비딘의 등전점은 4.0이다(Helppolainen et al., Biochem J., 2007, 405: 397-405). 다른 알려진 비오틴-결합 단백질들의 등전점은 일반적으로 6.1을 넘는다(참조, Helppolainen et al., Biochem J., 2007, 405: 397-405). 이에 비해, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질의 pI는 5.4이다. 본원에 기술된 결합-단백질의 산성 pI는 감소된 비특이적 결합으로 이어진다. 현재 알려져 있는 아비딘 및 아비딘-유사 펩티드의 사용에 있어서의 문제는 그것의 비특이적 결합이다. 현재 알려져 있는 아비딘 및 아비딘-유사 펩티드는 세포뿐만 아니라 DNA, 단백질, 및 생물학적 물질, 예컨대 막에도 비특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들면, 아비딘-비오틴 결합을 사용하는 물질의 검출에 있어서, 아비딘은 검출할 목적 물질 외의 물질들에 비특이적으로 결합하여 배경(background)을 증가시킨다. 아비딘의 높은 비특이적 결합에 대한 하나의 이유에는 그것의 고 등전점이 포함된다. 아비딘은 매우 강염기성의 단백질이며, 10 또는 그 이상의 상당히 높은 등전점을 가지고, 전체로서 양으로 하전되어 있다. 따라서, 아비딘은 많은 경우에 있어 음으로 하전된 생물학적 물질에 용이하게 결합한다고

여겨진다. 따라서, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질의 낮은 pI는 현재 알려져 있는 아비딘 및 아비딘-유사 펩티드들보다 유리하다.

[0043] 여섯째, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질의 크기는 현재 알려져 있는 아비딘 및 아비딘-유사 단백질들에 비해 비교적 작다. 상기 비오틴-결합 단백질은 28 kDa보다 작다(2량체 크기). 그러나 현재 알려져 있는 아비딘 및 아비딘-유사 단백질들의 대부분은 모두 60kDa보다 더 큰 크기를 갖는다(4량체 크기). 야생형 리즈아비딘은 크기가 약 29 kDa(2량체 크기)라고 한다. 상기 비오틴-결합 단백질의 작은 크기는 관심 대상의 분자들 사이의 결합 접합(binding conjugation)의 로딩(loading)을 증가시키는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 상기 비오틴-결합 단백질은 관심 대상의 제1의 분자를 관심 대상의 제2의 분자와 접합하는데 사용될 수 있다. 관심 대상의 분자들 중의 하나는 하나 이상의 비오틴 또는 비오틴-유사 분자들에 연결될 수 있으며 제2의 분자는 상기 비오틴-결합 단백질에 연결(linked), 접합(conjugated) 또는 융합(fused)될 수 있다. 본원에 기술된 비오틴-단백질의 작은 크기를 고려하면, 비오틴 또는 비오틴-유사 분자들은 서로 더 가깝게 배치될 수 있어, 제2의 분자가 더 큰 현재 알려져 있는 아비딘 또는 아비딘-유사 분자인 것에 비해 더 많은 결합을 허용한다.

[0044] 일곱째, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 2량체이다. 2량체의 형성은 대장균에서 가용성 단백질로서의 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질의 발현을 더 향상시킨다. 또한, 비오틴 결합 단백질이 모든 다른 알려진 아비딘-유사 단백질과 같은 4량체보다는 2량체를 형성하기 때문에, 1) 융합 항원들의 구조적 복잡성이 감소되고; 2) 재조합 비오틴-결합 단백질 융합 단백질들의 발현의 어려움도 마찬가지로 감소되며; 3) 비오틴-결합 단백질 융합의 조작의 입체 장애(steric hindrance)가 최소화되며, 이는 비오틴, 비오틴 모방제(biotin mimetic) 또는 비오틴 유도체를 예로 들 수 있으나 이에 한정되지 않는 것에 의한 추가의 조작에 유용하며, 또한 4) 비오틴-결합 단백질 융합의 용해도가 크게 증진된다. 따라서, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질과 당 기술분야에 알려진 것의 근원적인 차이를 입증한다.

[0045] 여덟째, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 이를 함유하는 면역성 조성물에 있어서 대상체에서 난-관련 알러지 반응을 유도할 위험을 감소시킨다. 게다가, 본원에 기술된 비오틴-결합 도메인에 대한 항체는 난 아비딘에 대해 명백한 교차 반응성을 갖지 않는다(그 역도 성립).

[0046] 나아가, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 야생형 리즈아비딘의 특성을 보유하면서, 향상된 특성들, 예컨대 비특이적 결합의 감소 또는 비오틴 결합의 추가적 향상을 가질 수 있다. 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질의, 예를 들면, 면역 검정 또는 핵산 혼성화 검정에서의 검출, 아비딘-비오틴 결합을 활용한 검체 측정에 있어서의 사용은, 배경을 감소시키고, 감도를 증가시키며, 가혹한 조건에 있어서 비오틴과의 결합 특성을 유지할 수 있다.

[0047] 본 연구는 아비딘 및 다른 아비딘-유사 단백질에 대한 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질의 이점 및 차이를 명백하게 입증한다. 따라서, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 아비딘-비오틴 기술을 활용하는 광범위한 응용에 있어서 강력하고 다용도의 도구로서 잠재력을 갖는다.

[0048] 제한 없이, 비오틴-결합 단백질은 아비딘-비오틴 시스템의 이용을 요구하는 임의의 방법, 조성물, 또는 시스템에 사용될 수 있다. 당업자가 잘 알고 있는 바와 같이, 아비딘-비오틴 시스템은 다양한 실험실 방법들, 예컨대 생접합(bioconjugation); 표적 분자 검출; 샘플로부터의 표적 분자 단리, 정제, 또는 풍부화(enrichment); 단백질 검출; 핵산 검출; 단백질 단리, 정제, 또는 풍부화; 핵산 단리, 정제, 또는 풍부화; ELISA; 흐름세포측정(flow cytometry); 등에 사용될 수 있다.

[0049] 따라서, 본원에 기술된 재조합 비오틴-결합 단백질의 예시적 용도에는 생접합; 표적 분자 검출; 샘플로부터의 표적 분자 단리, 정제, 또는 풍부화; 단백질 검출; 핵산 검출; 단백질 단리, 정제, 또는 풍부화; 핵산 단리, 정제, 또는 풍부화; ELISA; 흐름세포측정; 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다, .

[0050] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질은 미국 가출원 제61/48,934호, 2012년 5월 11일 출원; 제61/608,168호, 2012년 3월 8일 출원; 및 제61/609,974호, 2012년 3월 13일 출원, 및 PCT 출원 제PCT/US12/37412, 2012년 5월 11일 출원(이들 모두의 내용은 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 다항원 제시 시스템에서 친화성 쌍의 일부로 사용될 수 있다. MAPS에 대해서는 더 상세한 내용을 후술한다. 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질의 사용은 대상체에서 난-관련 알러지 반응을 유도할 MAPS의 위험을 감소시킨다. 게다가, 재조합 변형 리즈아비딘에 대한 항체는 난 아비딘에 대해 명백한 교차 반응성을 갖지 않는다(그 역도 성립).

[0051]

[0052] 지질화된 비오틴-결합 단백질

[0053] 다른 태양에서 본원에는 지질화된 비오틴-결합 단백질이 제공된다. 본원에 있어서 용어 "지질화된 비오틴-결합 단백질(lipidated biotin-binding protein)"은 지질과 공유적으로 접합된 비오틴-결합 단백질을 말한다. 그 지질 부분(moiety)은 디아실 또는 트리아실 지질일 수 있다.

[0054] 상기 지질화된 비오틴-결합 단백질은 지질화 서열을 사용하여 제조될 수 있다. 본원에 있어서 용어 "지질화 서열(lipidation sequence)"은 세균, 예를 들어, 대장균에서 그 지질화 서열을 지닌 폴리펩티드의 지질화를 촉진하는 아미노산 서열을 말한다. 상기 지질화 서열은 상기 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 존재할 수 있다. 상기 지질화 서열은 재조합 비오틴-결합 단백질에 연결되어 융합 단백질을 형성할 수 있으며, 이는 통상의 재조합 기술에 의해 대장균에서 발현될 때 지질화된 형태로 존재한다. 일부 실시형태에서, 지질화 서열은 비오틴-결합 단백질의 N-말단에 위치한다.

[0055] 당업자에게 알려져 있는 임의의 지질화 서열을 사용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 지질화 서열은 MKKVAAFVALSLLMAGC(서열번호 3) 또는 그 유도체 (derivative) 또는 기능성 부분(functional protein)이다. 다른 예시적 지질화 서열에는 MNSKKLCCICVLFSLLAGCAS(서열번호 16), MRYSKLTMLIPCALLLSAC(서열번호 17), MFVTSKKMTAAVLAITLAMSLSAC(서열번호 18), MIKRVLVVSMVGLSLVGC(서열번호 19), 및 그 유도체 또는 기능성 부분이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 일부 실시형태에서, 상기 지질화 서열은 펩티드 링커를 통해 상기 비오틴-결합 단백질에 융합될 수 있으며, 상기 펩티드 링커는 상기 비오틴-결합 단백질에 지질화 서열을 부착한다.

[0057] 일부 실시형태에서, 상기 펩티드 링커는 아미노산 서열 VSDP(서열번호 9)을 포함한다.

[0058] 일 실시형태에서, 상기 비오틴-결합 지질 단백질은 아미노산 서열 MKKVAAFVALSLLMAGCVSDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(서열번호 20)을 포함한다.

[0059] 지질화된 비오틴-결합 단백질은 톨 유사 수용체(TLR)에 대한 리간드이다. 그러므로, 본원에 기술된 지질화된 비오틴-결합 단백질은 TLR 리간드로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 지질화된 비오틴-결합 단백질은 조성물에 사용되어 TLR2 자극을 유도할 수 있다. 이는 상이한 항원들/병원체들에 대한 면역성을 유도하는데 유용할 수 있다. 따라서, 상기 비오틴-결합 지질 단백질은 항원에 대한 공자극인자(co-stimulation factor) 또는 보강제(adjuvant)로서 면역성 조성물에 사용될 수 있다.

[0060] 본원에 있어서 용어 "톨 유사 수용체(Toll Like Receptor)"는 임의의 종의 유기체의 임의의 톨-유사 수용체를 일반적으로 가리키고자 하는 것이다. TLR은 임의의 포유류 종에 유래하는 것일 수 있다. TLR은 예를 들면, 인간, 기니아 피그, 및 마우스들를 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 포유류 종에서 동정되었다. 특이적 TLR이 종의 기원(예: 인간, 마우스들 등), 특정 수용체(예: TLR2, TLR3, TLR9 등), 또는 이들 둘다를 더 참조하여 동정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 지질화된 비오틴-결합 단백질은 TLR2에 대한 리간드이다.

[0061] 톨-유사 수용체(TLR)들은 병원체 인식 및 선천적 면역시스템 활성화를 촉진시키는 생식세포계에 코딩된(germline encoded) 막관통 단백질들의 패밀리이다. 톨-유사 수용체(TLR)들은 패턴 인식 수용체(PRR)들이며, 마크로파아지, 수지상 세포 및 NK 세포를 포함하는 선천적 면역시스템의 세포에 의해 발현된다. TLR의 알려진 리간드의 예에는 그램 양성 세균(TLR-2), 세균 내독소(TLR-4), 플라겔린 단백질(TLR-5), 세균 DNA(TLR-9), 이중쇄 RNA 및 폴리 I:C(TLR-3), 및 효모(TLR-2)가 포함된다. 세포내 패턴 인식 수용체, 스캐빈저 수용체 또는 만노스-결합 수용체에 결합하는 다른 리간드들도 본 발명에 고려될 수 있다. TLR은 보존된 병원체-유도 리간드와 맞물리고 이어서 TLR/ IL-1R 시그널 전달 경로를 활성화하여 다양한 이펙터 유전자를 유도할 수 있다. 톨-유사 수용체(TLR)들은 병원체- 또는 미생물-관련 분자 패턴을 감지할 수 있는 PRR의 중요한 그룹을 나타낸다. 그것들은 여러 유형의 세포, 주목할 만하게는 수지상 세포(DC), 또한 마크로파아지, 상피 세포, 및 림프구에 의해 혈액, 비장, 폐, 근육 및 장에서 널리 발현된다.

[0062] 세포 표면에 위치하는 일부 TLR들은 미생물의 지질들 및 단백질들에 대하여 특이적인 반면, 세포 내부의 엔도좀 구획(endosomal compartment)과 결합된 다른 것들은 핵산에 대하여 특이적이다. 그것들의 특이적 리간드에 의한 TLR의 라이게이션(ligation)은 그 수용체의 형태적 변화를 초래하여, 주로 MyD88- 및 TRIF-의존성 경로를 수반하는 다운스트림 시그널 전달로 이어진다. TLR3을 제외한 모든 다른 TLR들은 MyD88 경로를 통해 시그널을 보내어 IB 키나제(IKK)-NF-B, 및 세포외 시그널 조절된 단백질 키나제(extracellular signal regulated protein

kinase)(ERK), c-Jun N-말단 키나제(JNK) 및 p38 분열촉진인자-활성화 단백질 키나제(p38 mitogen-activation protein kinases)(MAPK)를 포함하는 세포내의 단백질 키나제 캐스케이드(cascade)의 활성화를 수반하는 친 염증성 시토킨들을 유도할 수 있다. MyD88에 무관한 TRIF 경로는 TLR3과 TLR4 둘다에 의해 이용되며 I형 인터페론의 유도를 매개한다.

[0063] 본원에 기술된 재조합 비오틴-결합 지질 단백질은 증진된 면역성을 갖는다. 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 지질 단백질 또는 지질 펩티드의 N-말단의 지질 부분은 보강제 활성에 기여한다. 따라서, 추가의 실시형태는 단리된 비오틴-결합 지질 단백질, 또는 그것의 생체내 발현을 위한 적절한 벡터, 또는 이들 둘다, 및 적절한 담체를 포함하는, 면역 반응을 유도하기 위한 면역성 또는 백신 조성물을 제공하며, 뿐만 아니라, 숙주에, 단리된 재조합 비오틴-결합 지질 단백질, 상기 재조합 비오틴-결합 지질 단백질을 발현하는 벡터, 또는 상기 재조합 지질 단백질 또는 상기 벡터를 함유하는 조성물을, 반응을 유발하기에 충분한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 면역학적 또는 방어 반응을 끌어내는 방법을 제공한다.

[0064] 상기 비오틴-결합 지질 단백질을 함유하는 면역학적 또는 면역성 조성물은 국부적 또는 전신적 면역 반응을 끌어낸다. 상기 반응은 방어적일 수 있지만 반드시 그러해야만 하는 것은 아니다. 본원에 있어서 용어들 "면역학적 조성물" 및 "면역성 조성물"에는 "백신 조성물"(전자의 두 용어들이 방어적 조성물일 수 있으므로)이 포함됨을 주목해야 한다. 제한 없이, 본원에 기술된 지질화된 비오틴-결합 단백질은 면역학적, 면역성, 또는 백신 조성물에서 항원, 보강제, 또는 공자극자로서 사용될 수 있다. 나아가, 지질화된 비오틴-결합 단백질은 비오틴-결합 도메인을 포함하므로, 상기 지질화된 단백질은 MAPS의 폴리머 골격(polymer backbone)에 조립될 수 있다. 따라서, 본원에는 숙주인 포유류에서 면역학적 반응을 유도하는 방법도 제공된다. 상기 방법은 숙주에게 본원에 기술된 지질화된 비오틴-결합 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 함유하는 면역성, 면역학적 또는 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0065] 일부 실시형태에서, 상기 지질화된 비오틴-결합 단백질은 지질화된 비오틴-결합 단백질 및 단백질 또는 펩티드를 포함하는 융합 단백질이다.

[0066]

[0067] 비용혈성 Hla

[0068] 용혈소는 적혈구의 용해(lysis)를 일으키는 세균에 의해 생산되는 외독소(exotoxin)이다. 고면역성이지만 적혈구의 용혈을 일으키므로 백신에의 사용은 제한된다. 따라서, 다른 태양에서, 본원에는 황색포도구균 알파-용혈소(Hla)의 변이형(variant), 그것의 비오틴-결합 단백질과의 융합 구성체(fusion construct) 및 그 용도가 제공된다. 본원에 있어서 "mHla"로 지정된 이들 변이형은 실질적으로 비용혈성, 즉, 실질적으로 낮은 용혈 활성을 갖는다. 본원에 있어서, 구문 "실질적으로 비용혈성"은 야생형 Hla의 등역가에서 적혈구를 용해할 수 없음을 의미한다. 용어 "야생형 Hla"은 그러한 구문과 관련된 통상의 정의, 즉, 필요한 능력을 갖춘(capable) 세균 공급원에 의해 천연적으로 분비되는 Hla가 부여된다. "야생형 Hla"의 정의에는 예를 들어 재조합 DNA 기술을 통해 유도된 Hla 융합 산물은 포함되지 않는다. 일부 실시형태에서, mHla의 용혈 활성은 동역가의 야생형 Hla보다 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 더 낮다. 일부 실시형태에서, mHla는 검출가능한 용혈 활성을 갖지 않는다. 본 발명자들은 또한 mHla의 용혈 활성은 mHla를 비오틴-결합 단백질과 연결함으로써 더 감소시킬 수 있음도 알아내었다. 따라서, 본 개시는 mHla 단백질 및 비오틴-결합 단백질을 포함하는 융합 단백질도 기술한다.

[0069] 본원에서 제공되는 바와 같이, 비용혈성 Hla는 야생형 Hla에서 잔기 W205 또는 W213가 알라닌(A)으로 치환되거나 또는 트리펩티드 DRD 209-211이 트리-알라닌 펩티드(AAA)로 치환되어 생성될 수 있다. 상기 돌연변이된 Hla 단백질은 대장균 발현 시스템에서 발현 및 정제될 수 있다. 상기 돌연변이들은 퀵 체인지 돌연변이유발(quick change mutagenesis)을 이용하여 점 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 야생형 Hla를 코딩하는 핵산의 뉴클레오티드 서열은 야생형 Hla 내의 주어진 아미노산을 다른 아미노산으로 대체하도록 변경될 수 있다.

[0070] 일부 실시형태에서, mHla는 mHla 및 비오틴-결합 단백질을 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 mHla 융합 단백질은 아미노산 서열
MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENC
NSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVF
YSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVS

IGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQT NIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호 21)을 포함한다.

[0071] 본원에 기술된 Hla 변이형은 톨 유사 수용체(TLR)에 대한 리간드이다. 그러므로, 본원에 기술된 Hla 변이형은 TLR 리간드로 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 Hla 변이형은 조성물에 사용되어 TLR2 자극을 유도할 수 있다. 이는 상이한 항원들/병원체들에 대한 면역성을 유도하는데 유용할 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 Hla 변이형은 항원에 대한 공자극인자 또는 보강제로서 면역성 조성물에 사용될 수 있다. 나아가, mHla가 비오틴-결합 단백질과 융합될 때, 그 융합 단백질은 MAPS의 폴리머 골격에 접합될 수 있다.

[0072] 일부 실시형태에서, mHla는 면역성 또는 백신 조성물에서 공자극인자로 사용될 수 있다.

[0073] 나아가, 상기 mHla는 대상체에서 면역 반응을 유도하므로, 상기 mHla는 황색포도구균에 대하여 대상체를 백신접종하기 위한 면역성 또는 백신 조성물에 사용될 수 있다.

[0074] 본원에 기술된 mHla는 증진된 면역성을 갖는다. 따라서, 추가의 실시형태는 mHla, 또는 그것의 생체내 발현을 위한 적절한 벡터, 또는 이들 둘다, 및 적절한 담체를 포함하는, 면역 반응을 유도하기 위한 면역성 또는 백신 조성물을 제공하며, 뿐만 아니라, 숙주에, 단리된 mHla, 상기 mHla를 발현하는 벡터 또는 상기 mHla 또는 상기 벡터를 함유하는 조성물을, 상기 반응을 유발하기에 충분한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 면역학적 또는 방어 반응을 끌어내는 방법을 제공한다.

[0075] 상기 mHla를 포함하는 면역학적 또는 면역성 조성물은 국부적 또는 전신적 면역 반응을 끌어낼 수 있다. 상기 반응은 방어적일 수 있지만 반드시 그러해야 하는 것은 아니다. 따라서, 본원에 기술된 Hla의 비용혈성 돌연변이는 면역학적, 면역성, 또는 백신 조성물에서 항원, 보강제, 또는 공자극자일 수 있다.

[0076] 나아가, 숙주인 포유류에서 면역학적 반응을 유도하는 방법도 제공된다. 상기 방법은 상기 숙주에게 본원에 기술된 Hla의 비용혈성 돌연변이 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 면역성, 면역학적 또는 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0077] 다른 태양에서, 본원에는 항원성 단백질 또는 펩티드에 연결된 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질을 포함하는 융합 단백질이 제공된다. 이 융합 단백질은 또한 본원에서 비오틴-결합 융합 단백질 및 항원 융합 단백질이라 하기도 한다. 상기 비오틴-결합 단백질과 항원성 단백질 또는 펩티드는 임의의 배치로 연결될 수 있는데, 예를 들어, 융합 단백질의 N-말단에 비오틴-결합 단백질이, C-말단에 항원 펩티드가 있을 수 있고, 그 역도 가능하다.

[0078] 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 단백질과 항원성 단백질 또는 펩티드는 펩티드 링커에 의해 서로에게 연결된다. 제한 없이, 상기 펩티드 링커는 임의의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며 임의의 길이일 수 있다. 예를 들면, 상기 펩티드 링커 서열은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 그 이상의 아미노산의 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 비오틴-결합 도메인에 항원 도메인을 연결하는 펩티드 링커는 8개의 아미노산의 길이이다.

[0079] 일부 실시형태에서, 상기 비오틴-결합 도메인에 항원 도메인을 연결하는 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGSSS (서열번호 22)을 갖는다.

[0080] 일부 실시형태에서, 상기 항원성 단백질은 본원에 기술된 비용혈성 Hla이다.

[0081] 일부 실시형태에서, 상기 비용혈성 Hla 단백질은 본원에 기술된 비오틴-결합 단백질 및 비용혈성 Hla을 포함하는 융합 단백질이다.

[0082] 일부 실시형태에서, 상기 비용혈성 Hla 단백질은 본원에 기술된 지질화된 비오틴-결합 단백질 및 비용혈성 Hla을 포함하는 융합 단백질이다.

[0083]

[0084] 면역성 조성물

[0085] 다른 태양에서, 본원에는 본원에 기술된 항원 융합 단백질, 지질화된 비오틴-결합, 또는 Hla의 비용혈성 변이형을 포함하는 면역성 조성물이 제공된다. 추가로 본원에는, 폴리머 스캐폴드(polymer scaffold)에 부착된 적어도 하나의 항원 융합 단백질 또는 다수의 항원 융합 단백질들을 포함하는 면역성 복합체(immunogenic complex)를 포함하는, 대상체에게 투여되었을 때, 상기 폴리머에 부착된 항원들의 각각에 대한, 및 임의로 상기 폴리머

그 자체에 대한, 면역 반응을 끌어내기 위한 면역성 조성물 및 백신 조성물도 제공된다. 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 본원에 기술된 면역성 조성물은 체액성 및 세포 면역 반응을 자극한다: 그것은 단일의 MAPS 면역성 구성체(immunogenic construct)를 사용하여 다수의 단백질 항원들에 대한 항체 및 Th1/Th17 반응들을 생성할 수 있다. 유기체에 대한 B- 및 T-세포 면역의 조합은 침습적 감염 및 비인두 보균(nasopharyngeal carriage)과 관련된 폐렴구균 질환을 포함하는 많은 질환에 대한 최적의 백신 전략이다. 일부 실시형태에서, 상기 면역성 조성물은 백신이거나 또는 백신에 포함된다.

[0086] 따라서, 본원의 실시형태는 대상체에서 면역 반응을 일으키는데 유용한 면역성 조성물 및 방법들을 제공하며, 이들은 그 자체로 또는 본질적으로 임의의 존재하는 백신 접근방식과 결합 또는 혼합되어 사용될 수 있다.

[0087] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 적어도 2개의 항원, 또는 적어도 3개의 항원, 또는 적어도 5개의 항원, 또는 2~10개의 항원, 또는 10~15개의 항원, 또는 15~20개의 항원, 또는 20~50개의 항원, 또는 50~100개의 항원, 또는 100개 초과의 항원(일체를 포함)을 포함한다. 본원에 개시된 면역성 조성물이 적어도 2개의 항원들을 포함하는 일부 실시형태에서, 상기 항원들은 동일한 항원일 수도 있고 또는 적어도 2개의 상이한 항원들일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 항원들은 동일한 또는 상이한 병원체들로부터 유래할 수 있으며, 또는 동일한 항원성 단백질의 다른 에피토프들 또는 일부(part)들일 수 있으며, 또는 동일한 병원체의 상이한 혈청형들 또는 계절성 변이형들(예: 인플루엔자 바이러스 A, B, 및 C)에 특이적인 동일한 항원일 수도 있다

[0088] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 병원성 유기체 또는 이상 조직으로부터의 항원을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 항원은 종양 항원이다. 일부 실시형태에서, 상기 항원은 병원체 또는 기생생물의 항원들, 예컨대 폐렴연쇄구균(*Streptococcus pneumoniae*), 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 또는 M. 테타누스(M. tetanus), 탄저균(*Bacillus anthracis*), HIV의 항원들, 계절성 또는 유행성 인플루엔자 항원들(seasonal or epidemic influenza antigens)(예컨대 H1N1 또는 H5N1), 백일해균(*Bordetella pertussis*), 황색포도구균(*Staphylococcus aureus*), 수막염균(*Neisseria meningitides*) 또는 임균(*N. gonorrhoeae*), HPV, 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), HSV 또는 다른 헤르페스 바이러스들(herpes viruses), 또는 말라리아원충 종(*Plasmodia* sp.)의 항원에서 선택되는 적어도 하나의 항원일 수 있다. 이들 항원에는 펩티드, 단백질, 글리코단백질, 또는 폴리사카라이드가 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 항원은 톡소이드 또는 독소의 일부이다.

[0089] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 항원성 폴리사카라이드, 예를 들면, 예컨대 Vi 항원(장티푸스균 피막 폴리사카라이드)(*Salmonella typhi* capsular polysaccharide)), 폐렴구균 피막 폴리사카라이드(pneumococcal capsular polysaccharides), 폐렴구균 세포벽 폴리사카라이드(pneumococcal cell wall polysaccharide), Hib(헤모필루스 인플루엔자 B형(*Haemophilus influenzae* type B)) 피막 폴리사카라이드(capsular polysaccharide), 수막염균 피막 폴리사카라이드(meningococcal capsular polysaccharides), 및 다른 세균 피막 또는 세포벽 폴리사카라이드, 또는 그들의 임의의 조합, 을 포함한다. 상기 폴리사카라이드는 단백질 성분, 예를 들면 바이러스로부터의 글리코단백질을 포함할 수 있다.

[0090] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 상기 폴리머 또는 폴리사카라이드와 결합된(associated) 적어도 하나의 공자극인자를 더 포함하며, 상기 공자극인자는 직접적으로 또는 간접적으로 결합될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 공자극인자는 상기 폴리머에 공유적으로 부착될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 공자극인자는 상기 제1 친화성 분자에 공유적으로 부착되고, 그 제1 친화성 분자가 그리고나서 상기 폴리머에 가교될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 공자극인자는 상보적 친화성 분자에 부착되고, 그 상보적 친화성 분자가 제1 친화성 분자와 결합하여 상기 폴리머에 상기 공자극인자를 연결할 수 있다. 일부 실시형태에서, 공자극인자는 보강제이다. 대안적 실시형태에서, 공자극인자는 당업자에게 알려진 임의의 것일 수 있으며, 임의의 조합, 예를 들면, 제한 없이, 톨 유사 수용체 작용제들(TLR2, 3, 4, 5 7, 8, 9, 등에 대한 작용제들), NOD 작용제들, 또는 염증조절복합체(inflammasome)의 작용제들이 이에 포함될 수 있다.

[0091] 일부 실시형태에서, 상기 공자극인자는 본원에 기술된 지질화된 비오틴-결합 단백질이거나 또는 알파-용혈소의 비용혈성 변이형이거나 또는 mHla와 비오틴-결합 단백질의 융합 단백질일 수 있다 .

[0092] 본 발명의 다른 태양은 본원에 개시된 면역성 조성물의, 대상체에 투여되어 그 대상체에서 면역 반응을 끌어내는 용도에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 면역 반응은 항체/B 세포 반응, $CD4^+$ T-세포 반응(Th1, Th2 및 Th17 세포를 포함) 및/또는 $CD8^+$ T-세포 반응이다. 일부 실시형태에서, 상기 면역성 조성물과 함께 적어도 하나의 보강제가 투여된다.

[0093] 본 발명의 다른 태양은 본원에 개시된 면역성 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 항원에 대하여 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0094] 본 발명의 다른 태양은 본원에 개시된 면역성 조성물을 포함하는 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 항원에 대해, 동물, 예를 들어, 조류, 포유류 또는 인간을 백신접종하는 방법에 관한 것이다.

[0095] 본원에 개시된 모든 태양에서, 동물 또는 대상체는 인간일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 농가 동물 또는 비가축, 또는 가축일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물을 포함하는 백신 조성물은 피하, 비강내, 경구, 설하, 질, 직장, 진피내, 복강내, 또는 근육내 주사를 통해 투여될 수 있다.

[0096] 본원에 개시된 모든 태양에서, 면역 반응은 단백질/펩티드 항원(들)에 대한 항체/B-세포 반응, $CD4^+$ T-세포 반응(Th1, Th2 및 Th17 반응을 포함) 또는 $CD8^+$ T-세포 반응이다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 폴리머, 예를 들어, 폐렴구균 폴리사커라이드에 대한 항체/B-세포 반응이다. 일부 실시형태에서, 상기 면역성 조성물과 함께 적어도 하나의 보강제가 투여된다.

[0097] 본 발명의 다른 태양은 본원에 개시된 면역성 조성물의 병원체 또는 면역원에의 노출에 대한 진단에 사용하기 위한 용도에 관한 것이다.

[0098]

[0099] 다항원 제시 시스템(Multiple antigen presenting system)

[0100] 또한 본원에는 면역성 조성물의 생산에 유용한, 예컨대 백신에 유용한 면역성 다항원 제시 시스템(MAPS)이 제공된다. 특히, 본 발명은, 적어도 1종의 폴리머(예: 폴리사커라이드)로서 임의로 항원성인 것; 적어도 하나의 항원성 단백질 또는 펩티드; 및 (i) 상기 폴리머와 결합하는(associate) 제1 친화성 분자, 및 (ii) 상기 단백질 또는 펩티드와 결합하는 상보적 친화성 분자를 포함하여, 상기 제1 친화성 분자 및 상보적 친화성 분자가 상기 폴리머와 상기 항원성 단백질 또는 펩티드 간의 간접적 링크로서 기능하는, 적어도 하나의 상보적 친화성-분자쌍; 을 포함하는 면역성 복합체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 따라서, 상기 폴리머는 적어도 1개, 또는 적어도 2개, 또는 다수의 동일 또는 상이한 단백질 또는 펩티드 항원들을 부착할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 항원성이며, 예를 들면, 상기 폴리머는 폐렴구균 피막 폴리사커라이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 단백질 또는 펩티드 항원들은 재조합 단백질 또는 펩티드 항원들이다.

[0101] 본원에 개시된 면역성 조성물은 동시에 하나의 또는 다수의 항원에 대한 체액성 및 세포 반응 둘다를 끌어낼 수 있다. 상기 면역성 조성물은 장래의 감염으로부터 대상체를 잠재적으로 방어하는 장기 지속적 기억 반응을 제공한다. 이는, 고역가의 기능성 항-폴리사커라이드 항체를 일으키는 단일의 면역성 조성물을 허용하며, 통상의 접합체 백신에 의해 유도되는 항체 레벨과 유사하거나 또는 손색이 없다. 게다가, 특정 담체 단백질에 대한 제한이 없으며, 다양한 항원 단백질들이 MAPS 구성체에 사용되어 강력한 항-폴리사커라이드 항체 반응을 일으킬 수 있다.

[0102] 또한, 강한 항체 반응 및 Th17/Th1 반응들은 MAPS 조성물을 통해 제시되는 다수의 단백질 항원에 특이적이다. 이는 하나의 구성체에 의해 2가지 형태의 면역을 끌어내는 수단으로서의 주요한 이점을 제공한다. 단백질 담체에 접합된 항원성 폴리사커라이드에 대한 보다 통상적인 면역 반응에 더하여, 본 발명은 전신적으로 주사된 단백질에 대해 T-세포 반응과, 더 구체적으로, Th17 및 Th1 반응을 가능하게 한다. 게다가, 본 면역성 조성물은 폴리머 골격에 대해 리간드들을 도입할 수 있다. 이는 단백질/폴리머 비율, 복합체 크기를 변형함으로써, 또는 그 조성물에 특이적 공자극인자, 예컨대 TLR2/4 리간드들 등을 도입함으로써, 특이적 B-세포 또는 T-세포 반응을 증진하는 잠재력을 제공한다.

[0103] 단백질의 가혹한 처리를 수반하는 전형적인 접합 기술에 비해, 본 방법은 펩티드 항원의 다른 변형의 변성의 위험을 회피한다. 이는 포함된 단백질들의 항원성을 보존하는 실질적인 이점을 제공하며 그 단백질 자체가 항원으로서(단지 담체로서보다는) 기능할 가능성을 증가시킨다. 유사하게, 본 방법은 폴리사커라이드 골격의 불필요한 변형/손상을 회피하는데, 왜냐하면 화학적 가교가 많지 않기 때문이다; 폴리사커라이드의 특정 작용기들과 반응하도록 비오틴화를 정교하게 제어할 수 있으며, 비오틴화 수준은 용이하게 조정될 수 있다. 이는 면역성 및 방어의 감소를 일으킬 수 있는 결정적 측쇄들 또는 에피토프들에의 손상을 초래하는, 접합의 전형적인 프로세스를 회피함에 있어서 유용하다.

[0104] 본 발명의 친화성-기반 어셈블리는 면역성 조성물의 용이하고 매우 유연한 제제를 제공한다. 그것은 매우 특이

적이며 안정하다; 그것은 냉소에서 수개월간 유지되어 그 능력을 보유할 수 있다. 상기 어셈블리는 높은 재현성을 보장하기에 충분한 정도로 단순하며; 단지 몇 단계만 요구되어, 로트(lot)별 차이를 감소시켜, 현저한 산업적 이점을 갖는다. 상기 MAPS 어셈블리는 저농도의 단백질 및 폴리사커라이드(예컨대 0.1 mg/ml)에 있어서도 고효율적이며(95% 초과), 이는 주요한 이점인데, 왜냐하면 접합체 제조에 있어서의 비효율성(전형적으로 효율이 50% 미만의 범위에 있음)은 주요한 장애(hurdle)와 백신의 비용을 높이는 이유이기 때문이다. 제제에 관해, 조성물 및 최종 제품의 물성을 조정하는 것은 용이하다. 복합체에서의 단백질:폴리머 비율은 조정 가능하며; 폴리머의 중등 정도의(moderate) 비오틴화에 의해, 단백질:폴리머는 10:1 (w/w) 또는 그 이상일 수 있으며; 역으로, 그 비율은 면역적 목표에 기초해 이익이 된다면 1:10 또는 그 이하일 수도 있다. 또한, 면역성 MAPS 조성물의 크기는 폴리머의 크기의 선택에 의해 조정될 수 있다. MAPS의 제조 방법은 변형을 거의 가하지 않고 단백질과 폴리머를 용이하게 조합할 수 있게 한다. 단일의 면역성 구성체에 있어서, 동일 또는 상이한 병원체들(예: 폐렴구균 및 결핵)로부터의 다수의 단백질 항원들을 로딩함에 의한 최종 산물의 가능한 다가성(multivalency)에 의하면 1 이상의 질환에 대해 대상체를 면역화하는데 요구되는 백신들의 수를 감소시키는데 사용될 수 있는 조성물이 가능하다. 게다가, 상기 MAPS 조성물은 고안정성이며; 끓여야만 분해되고 심지어 4℃에서 수개월후에도 면역성을 유지한다. MAPS 복합체의 면역성은 항원성 단백질 또는 펩티드 성분의 안정성에 의해 제한될 수 있으며, 그 안정성은 MAPS 복합체 내로의 포함에 의해 신장될 수 있다. 본원에 사용되는 특이적 항원들은 실온과 적어도 1 사이클의 동결 해동에 있어서 안정성을 나타내었다. 이는 "저온 유통 체계(cold chain)"가 조심스럽게 유지되지 않으면 위태로워지는 현재의 백신보다 나은 유리한 점을 제공한다.

[0105] 따라서, 본 발명의 일 태양은 폴리머; 적어도 하나의 단백질 또는 펩티드 항원; 및 상기 폴리머와 결합하는 제1 친화성 분자, 및 상기 단백질 또는 펩티드 항원과 결합하는 상보적 친화성 분자를 포함하는 적어도 하나의 상보적 친화성-분자 쌍;을 포함하며, 상기 제1 친화성 분자가 상기 상보적 친화성 분자와 결합할 때, 간접적으로 상기 폴리머에 상기 항원을 연결하는, 면역성 조성물에 관한 것이다.

[0106] 일부 실시형태에서, 상기 제1 친화성 분자는 상기 폴리머에 가교제에 의해 가교되며, 가교제는 예를 들면 CDAP(1-시아노-4-디메틸아미노피리디늄 테트라플루오로보레이트), EDC(1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필] 카보디이미드 하이드로클로라이드), 소듐 시아노보로하이드라이드; 시아노겐 브로마이드; 또는 암모늄 바이카보네이트/아이오도아세트산에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 제1 친화성 분자는 상기 폴리머의 카복시, 히드록시, 아미노, 페녹시, 헤미아세탈, 및 머캅토 작용기에 가교된다. 일부 실시형태에서, 상기 제1 친화성 분자는 상기 폴리머에 공유적으로 결합된다.

[0107] 일부 실시형태에서, 상기 제1 친화성 분자는 비오틴 또는 그 유도체이고, 또는 비오틴과 유사한 구조 또는 물성을 갖는 분자로서, 예를 들면, 아민-PEG3-비오틴((+)-비오틴화-3,6,9-트리옥사운데칸디아민) 또는 그 유도체이다.

[0108] 일부 실시형태에서, 상기 면역성 조성물의 단백질 또는 펩티드 항원은 상기 상보적 친화성 결합 분자에 융합된 항원성 단백질 또는 펩티드를 포함하는 융합 단백질이다. 상기 융합은 유전적 구성체, 즉, 재조합 융합 펩티드 또는 단백질일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 상기 상보적 친화성 분자에 융합 단백질로서 공유적으로 부착될 수 있다. 대안적 실시형태에서, 항원은 상기 상보적 친화성 분자에 비공유적으로 부착될 수 있다.

[0109] 일부 실시형태에서, 상기 상보적 친화성 분자는 비오틴-결합 단백질 또는 그 유도체 또는 기능성 부분(functional portion)이다. 일부 실시형태에서, 상보적 친화성 분자는 아비딘-유사 단백질 또는 그 유도체 또는 기능성 부분이며, 예로서 리즈아비딘 또는 그 유도체를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 상보적 친화성 분자는 아비딘(avidin) 또는 스트렙트아비딘(streptavidin) 또는 그 유도체 또는 기능성 부분이다.

[0110] 일부 실시형태에서, 분비 시그널 펩티드는 아비딘-유사 단백질의 N-말단에 위치한다. 당업자에게 알려진 임의의 시그널 서열이 사용될 수 있으며; 일부 실시형태에서, 상기 시그널 서열은 MKKIWLALAGLVLAFSASA(서열번호 2) 또는 그 유도체 또는 기능성 부분이다. 일부 실시형태에서, 상기 항원은 유연 링커 펩티드를 통해 상보적 친화성 분자에 융합될 수 있으며, 상기 유연 링커 펩티드는 상기 상보적 친화성 분자에 상기 항원을 부착한다.

[0111] 일부 실시형태에서, 면역성 조성물의 폴리머 성분은 살아있는 유기체에서 유래한 폴리머(예: 폴리사커라이드)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리머는 천연 공급원으로부터 정제 및 단리되거나, 또는 천연 조성/구조를 갖도록 합성되거나, 또는 합성(예: 인공적 조성/구조로) 폴리머일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리머는 세균(bacteria), 고세균(archaea), 또는 진균 같은 진핵 세포, 곤충, 식물, 또는 그 키메라로 이루어지는 군에서 선택된 유기체에 유래하며: 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 병원성 세균에서 유래한 폴리사커라이드이다. 특

정 실시형태에서 상기 폴리사커라이드는 폐렴구균 피막 폴리사커라이드(pneumococcal capsular polysaccharide), 폐렴구균 세포-벽 폴리사커라이드(pneumococcal cell-wall polysaccharide), 또는 장티푸스균 Vi 폴리사커라이드(*Salmonella typhi* Vi polysaccharide)이다.

[0112] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물의 폴리머는 분지쇄 폴리머(예: 분지된 폴리사커라이드), 또는 대안적으로 직쇄 폴리머(예: 단쇄 폴리머(예: 폴리사커라이드))일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 폴리사커라이드, 예를 들면, 덱스트란(dextran) 또는 그 유도체이다. 일부 실시형태에서, 폴리머(예: 덱스트란 폴리사커라이드)는 평균 분자량 425kD~500kDa(일체를 포함)일 수 있고, 또는 일부 실시형태에서, 500kDa를 초과할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리머(예: 덱스트란 폴리사커라이드)는 평균 분자량 60kD~90kDa(일체를 포함)일 수 있고, 또는 일부 실시형태에서, 70 kDa 미만일 수 있다. 덱스트란 폴리머는 세균, 예컨대 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)로부터 유래한 것일 수 있다.

[0113] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 적어도 2개의 항원, 또는 적어도 3개의 항원, 또는 적어도 5개의 항원, 또는 2~10개의 항원, 또는 10~15개의 항원, 또는 15~20개의 항원, 또는 20~50개의 항원, 또는 50~100개의 항원, 또는 100개 초과의 항원(일체를 포함)을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 면역성 조성물이 적어도 2개의 항원을 포함하는 일부 실시형태에서, 항원은 동일한 항원일 수도 있고 또는 적어도 2개의 상이한 항원일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 동일 또는 상이한 병원체로부터 유래할 수 있으며, 또는 동일한 항원성 단백질의 다른 에피토프 또는 일부일 수 있으며, 또는 동일한 병원체의 상이한 혈청형 또는 계절성 변이형(예: 인플루엔자 바이러스 A, B, 및 C)에 특이적인 동일 항원일 수도 있다

[0114] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 병원성 유기체 또는 이상 조직으로부터의 항원을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 항원은 종양 항원이다. 일부 실시형태에서, 상기 항원은 병원체 또는 기생생물의 항원, 예컨대 폐렴연쇄구균(*Streptococcus pneumoniae*), 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 또는 M. 테타누스(*M. tetanus*), 탄저균(*Bacillus anthracis*), HIV의 항원, 계절성 또는 유행성 인플루엔자 항원(예컨대 H1N1 또는 H5N1), 백일해균(*Bordetella pertussis*), 황색포도구균(*Staphylococcus aureus*), 수막염균(*Neisseria meningitides*) 또는 임균(*N. gonorrhoeae*), HPV, 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), HSV 또는 다른 헤르페스 바이러스, 또는 말라리아원충 종(*Plasmodia* sp.)의 항원에서 선택되는 적어도 하나의 항원일 수 있다. 이들 항원에는 펩티드, 단백질, 글리코단백질, 또는 폴리사커라이드가 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 항원은 톡소이드(toxoid) 또는 독소의 일부이다.

[0115] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 항원성 폴리사커라이드, 예를 들면, 예컨대 Vi 항원(장티푸스균 피막 폴리사커라이드(*Salmonella typhi* capsular polysaccharide)), 폐렴구균 피막 폴리사커라이드(pneumococcal capsular polysaccharide), 폐렴구균 세포벽 폴리사커라이드(pneumococcal cell wall polysaccharide), Hib(헤모필루스 인플루엔자 B형(*Haemophilus influenzae* type B) 피막 폴리사커라이드, 수막염균 피막 폴리사커라이드(meningococcal capsular polysaccharides), 탄저균(*Bacillus anthracis*)(탄저병의 원인 병원체)의 폴리사커라이드 및 다른 세균 피막 또는 세포벽 폴리사커라이드, 또는 그들의 임의의 조합을 포함한다. 상기 폴리사커라이드는 단백질 성분, 예컨대 바이러스로부터의 글리코단백질을 포함할 수 있다.

[0116] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 폴리머 또는 폴리사커라이드와 결합된 적어도 하나의 공자극인자를 더 포함하며, 상기 공자극인자는 직접적으로 또는 간접적으로 결합될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 공자극인자는 상기 폴리머에 공유적으로 부착될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 공자극인자는 상기 제1 친화성 분자에 공유적으로 부착되고, 그 제1 친화성 분자가 그리고나서 상기 폴리머에 가교될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 공자극인자는 상보적 친화성 분자에 부착되고, 그 상보적 친화성 분자가 제1 친화성 분자와 결합하여 상기 폴리머에 상기 공자극인자를 연결할 수 있다. 일부 실시형태에서, 공자극인자는 보강제이다. 대안적 실시형태에서, 공자극인자는 당업자에게 알려진 임의의 것일 수 있으며, 임의의 조합, 예를 들면, 제한 없이, 톨 유사 수용체 작용제들(TLR2, 3, 4, 5 7, 8, 9, 등에 대한 작용제들), NOD 작용제들, 또는 염증조절복합체의 작용제들이 포함될 수 있다.

[0117] 본 발명의 다른 태양은 본원에 개시된 면역성 조성물의, 대상체에 투여되어 그 대상체에서 면역 반응을 끌어내는 용도에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 면역 반응은 항체/B 세포 반응, $CD4^+$ T-세포 반응(Th1, Th2 및 Th17 세포를 포함) 및/또는 $CD8^+$ T-세포 반응이다. 일부 실시형태에서, 상기 면역성 조성물과 함께 적어도 하나의 보강제가 투여된다.

[0118] 본 발명의 다른 태양은 본원에 개시된 면역성 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 적어도 하나의

항원에 대하여 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0119] 본 발명의 다른 태양은 본원에 개시된 면역성 조성물을 포함하는 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는. 적어도 하나의 항원에 대해, 동물, 예를 들어, 조류, 포유류 또는 인간을 백신접종하는 방법에 관한 것이다.

[0120] 본원에 개시된 모든 태양에서, 동물 또는 대상체는 인간일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 농가 동물 또는 비가축, 또는 가축일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물을 포함하는 백신 조성물은 피하, 비강내, 경구, 설하, 질, 직장, 진피내, 복강내, 또는 근육내 주사를 통해 또는 경피 면역 부여를 위한 피부 패치를 통해 투여될 수 있다.

[0121] 본원에 개시된 모든 태양에서, 면역 반응은 단백질/펩티드 항원(들)에 대한 항체/B-세포 반응, $CD4^+$ T-세포 반응(Th1, Th2 및 Th17 반응을 포함) 또는 $CD8^+$ T-세포 반응이다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 폴리머, 예를 들어, 폐렴구균 폴리사카라이드에 대한 항체/B-세포 반응이다. 일부 실시형태에서, 상기 면역성 조성물과 함께 적어도 하나의 보강제가 투여된다 .

[0122] 본 발명의 다른 태양은 본원에 개시된 면역성 조성물의 병원체 또는 면역원에의 노출에 대한 진단에 사용하기 위한 용도에 관한 것이다.

[0123] 본원에는 또한 대상체, 예를 들어, 포유류, 예를 들어, 인간을 본원에 개시된 면역성 조성물에 의해 백신접종하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게 본원에 개시된 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0124] 일반적으로, 면역성 조성물 및 면역 복합체를 포함하는 조성물은, 대상체에게 투여될 때, 폴리머에 부착한 항원들의 각각에 대한, 및 임의로 폴리머 그 자체에 대한, 면역 반응을 끌어내는 용도로, 폴리머 스캐폴드에 부착된, 적어도 하나의 항원, 또는 다수의 항원을 포함할 수 있다. 이 다항원 제시 시스템(MAPS)은 체액성 및 세포 면역 반응을 자극한다: 그것은 단일의 MAPS 면역성 구성체를 사용하여 다수의 단백질 항원에 대한 항-폴리사카라이드 항체 및 B-세포/ Th1/Th17 반응을 생성할 수 있다. 유기체에 대한 B- 및 T-세포 면역의 조합은 침습적 감염 및 비인두 보균과 관련된 폐렴구균 질환을 포함하는 많은 질환에 대한 최적의 백신 전략일 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 면역성 조성물은 백신이거나 또는 백신에 포함된다.

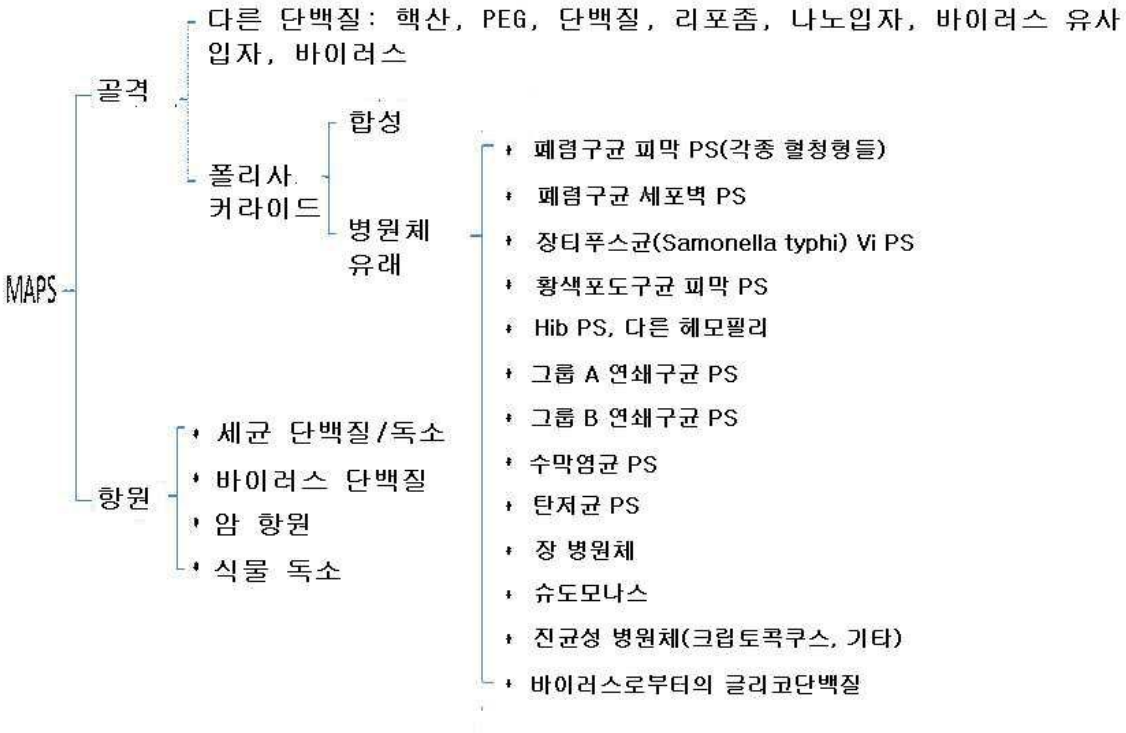
[0125] 따라서, 본 발명의 일 태양은, 적어도 하나의 폴리머(예: 하나의 폴리사카라이드); 적어도 하나의 단백질 또는 펩티드 항원; 및 (i) 상기 폴리머와 결합한 제1 친화성 분자, 및 (ii) 상기 항원과 결합한 상보적 친화성 분자를 포함하여, 상기 폴리머에 상기 항원을 간접적으로 부착하는데 기능하는(예: 상기 제1 친화성 분자가 상기 상보적 친화성 분자와 결합하여 상기 폴리머에 상기 항원을 연결함), 적어도 하나의 상보적 친화성-분자 쌍;을 포함하는 면역성 조성물(다항원 제시 시스템, 또는 MAPS)에 관한 것이다. 따라서, 상기 폴리머는 스캐폴드로서 사용되어 적어도 1개, 또는 적어도 2개, 또는 그 이상의(예: 복수의) 동일 또는 상이한 항원들을 부착하는데 사용될 수 있다. 본원에 개시된 면역성 조성물은 동시에 다수의 항원에 대한 체액성 및 세포 면역 둘다를 끌어내는데 사용될 수 있다.

[0126] 따라서, 본원의 실시형태는 대상체에서 면역 반응을 일으키는데 유용한 면역성 조성물 및 방법을 제공하며, 이는 그 자체로 또는 임의의 존재하는 백신 접근방식과 본질적으로 결합 또는 혼합되어 사용될 수 있다.

[0127] MAPS는 특정의, 넓은 스펙트럼, 또는 다양한 항원성 표적을 유발하도록 설계 및 제조될 수 있는 유연하고 다용도의(flexible and versatile) 조성물이다. 표 1은 MAPS 실시형태의 유연성을 가시화하기 위한 간단한 예시 가이드를 제공한다.

[0128] [표 1]

[0129] MAPS 플랫폼의 다용도성



[0130]

[0131] 폴리머

[0132] MAPS의 일 성분은 전형적으로 폴리머인 "골격(backbone)"으로 이루어진다. 상기 폴리머는 항원성 또는 비항원성일 수 있다. 그것은 폴리머가 면역적 방식으로 면역 시스템에 관련 항원(들)을 제시하는 수단으로서 작용한다는 것에 유의하여 본원에 기술된 광범위한 물질로부터 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 합성 폴리머이다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 천연 발생 폴리머, 예를 들면 세균 세포로부터 유래한 또는 정제된 폴리사카라이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리사카라이드는 진핵 세포, 예를 들어, 진균, 곤충 또는 식물 세포로부터 유래 또는 정제된다. 또다른 실시형태에서, 상기 폴리머는 포유류 세포, 예컨대 바이러스-감염 세포 또는 암 세포로부터 유래한다. 일반적으로, 그러한 폴리머는 당 기술분야에 잘 알려져 있으며 본원에 개시된 방법 및 조성물에의 사용에 포함된다.

[0133] 일부 실시형태에서, 폴리머는 덱스트란, 장티푸스균의 Vi 폴리사카라이드, 폐렴구균 피막 폴리사카라이드, 폐렴구균 세포벽 폴리사카라이드(CWPS), 수막염균 폴리사카라이드, 헤모필루스 인플루엔자 b형 폴리사카라이드, 또는 세균, 원핵생물 또는 진핵생물 기원의 임의의 다른 폴리사카라이드들로부터 선택된 폴리사카라이드이다.

[0134] 일부 실시형태에서, 상기 폴리사카라이드는 항원성 당 부분으로 구성되거나 또는 항원성 당 부분을 포함한다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 방법과 면역성 조성물에 사용되는 폴리사카라이드는 장티푸스균의 Vi 폴리사카라이드이다. Vi 피막 폴리사카라이드는 세균성 장 감염, 예컨대 장티푸스에 대해 개발되었다. Robbins et al., 150 J. Infect. Dis. 436(1984); Levine et al., 7 Baillieres Clin. Gastroenterol. 501(1993). Vi는 C-2 위치에 N 아세틸 및 C-3 위치에 가변의 O-아세틸화된, α1→4-갈락투론산의 폴리머이다. 장티푸스균의 독성(virulence)은 이 분자의 발현과 관련되어 있다. Sharma et al., 101 PNAS 17492(2004). 장티푸스균의 Vi 폴리사카라이드 백신은 몇가지 이점을 갖는다: 부작용이 드물고 마일드하며, 1회량으로 일관된 면역성 및 효능을 낳는다. Vi 폴리사카라이드는 다른 폴리사카라이드 백신에 대해 실증된 물리화학적 방법에 의해 신뢰성 있게 표준화될 수 있으며, Vi는 실온에서 안정하고, 면역성 및 인용성(tolerability)에 영향을 끼치지 않고 다른 백신들과 동시에 투여될 수 있다. Azze et al., 21 Vaccine 2758(2003).

[0135] 따라서, 장티푸스균의 Vi 폴리사커라이드는, 그 폴리사커라이드에 적어도 하나의 항원을 부착하기 위해, 본원에 개시된 제1 친화성 분자에 가교될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 얻어지는 면역성 조성물이 하나의 병원체, 또는 두개의 상이한 병원체들에 대해 적어도 일정 수준의 면역을 부여하도록 동일한 또는 상이한 유기체에서 유래하며; 항원이 폐렴구균에 대한 방어를 부여하면, 폴리머 스캐폴드가 Vi 폴리사커라이드인 면역성 조성물은 장티푸스균과 폐렴구균 둘다에 대한 면역 반응을 상승시킬 수 있다. 다른 예에는 2개의 다른 병원체들에 대한 면역 반응을 일으키는 면역성 조성물을 제공하기 위해, 피막화 세균(예컨대 수막구균, 황색포도구균, 폐렴구균, Hib, 등)으로부터의 당과 결핵 항원들을 조합하는 것이 포함된다.

[0136] 덱스트란, 세균 세포벽 폴리사커라이드(CWPS) 등의 대안으로서 본 발명에 사용될 수 있는 다른 폴리사커라이드(PS) 부분들에는, 암의 탄수화물 항원들이 포함된다.

[0137] 폐렴구균 폴리사커라이드에 관해 부연하면, 상기 폴리사커라이드는 현재까지 동정된 폐렴구균의 93개 이상의 혈청형 중 임의의 것, 예를 들면, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 및 33F이나 이에 한정되지 않는 것에 유래할 수 있다. 추가의 혈청형들이 동정되어 본원에 기술된 본 면역성 조성물에 포함될 수 있다. 1 이상의 폐렴구균 폴리사커라이드가 본 면역성 조성물 또는 본 MAPS 조성물을 포함하는 백신의 폴리머 골격에 포함될 수 있다.

[0138] 상기 폴리사커라이드는 상기 발명으로부터 유래할 수 있으며, 상기 면역성 조성물은 혈청그룹 A, C, W, W135, 또는 Y 중 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개로부터의 수막염균 피막 폴리사커라이드를 포함한다.

[0139] 추가의 실시형태는 황색포도구균의 폴리사커라이드 또는 올리고사커라이드의 5형, 8형, 또는 임의의 것을 포함한다.

[0140] 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 1종 이상의 폴리머를 포함하는 키메라 폴리머이다. 예를 들면 본원에 개시된 면역성 조성물의 폴리머는 일부분의 폴리머 A와 나머지 부분의 폴리머 B를 포함할 수 있다. 단일 MAPS 골격 독립체(entity)에 사용될 수 있는 상이한 종류들의 폴리머들의 양에는 제한이 없다. 폴리머가 분지된 폴리머인 일부 실시형태에서, 체인 폴리머는 폴리머 A일 수 있고, 분지는 적어도 1개 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개 또는 그 이상의 다른 폴리머일 수 있다.

[0141] 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 분지된 폴리머이다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 단쇄 폴리머이다.

[0142] 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 적어도 10개의 탄수화물 반복 단위, 또는 적어도 20개, 또는 적어도 50개, 또는 적어도 75개, 또는 적어도 100개, 또는 적어도 150개, 또는 적어도 200개, 또는 적어도 250개, 또는 적어도 300개, 또는 적어도 350개, 또는 적어도 400개, 또는 적어도 450개, 또는 적어도 500개, 또는 500개 초과의 (일체를 포함) 반복 단위를 포함하는 폴리사커라이드이다.

[0143] 본 발명의 하나의 태양에서, 상기 폴리사커라이드(PS)는 <500 kDa 또는 >500 kDa의 분자 질량을 가질 수 있다. 본 발명의 다른 태양에서, 상기 PS는 <70 kDa의 분자 질량을 가질 수 있다.

[0144] 일부 실시형태에서, 폴리머는 고분자량 폴리머이며, 예를 들어, 폴리머 는 평균 분자량이 약 425~500kDa(일체를 포함)일 수 있고, 예를 들면, 적어도 300kDa, 또는 적어도 350kDa, 또는 적어도 400kDa, 또는 적어도 425kDa, 또는 적어도 450kDa, 또는 적어도 500kDa 또는 500kDa 초과(일체를 포함)일 수 있으나 전형적으로는 500kDa 미만이다.

[0145] 일부 실시형태에서, 폴리머는 소분자량 폴리머일 수 있으며, 예를 들어, 폴리머는 평균 분자량이 약 60kDA~약 90kDa, 예를 들면, 적어도 50kDa, 또는 적어도 60kDa, 또는 적어도 70kDa, 또는 적어도 80kDa, 또는 적어도 90kDa, 또는 적어도 100kDa, 또는 100kDa 초과(일체를 포함)일 수 있으나, 일반적으로는 약 120kDa 미만이다.

[0146] 일부 실시형태에서, 상기 폴리머는 천연 공급원으로부터 취출되어 정제되고, 다른 실시형태에서, 상기 폴리머는 합성이다. 합성 폴리사커라이드를 포함, 합성 폴리머를 생산하는 방법은, 당업자에게 알려져 있으며 본원에 개시된 조성물과 방법에 포함된다.

[0147] 1개 이상의 항원 또는 항원 유형들에 대한 골격으로서 기능할 수 있는 폴리사커라이드 폴리머들 중 일부만을 표 2에 예시한다:

표 2

[0148] 예시적 폴리사커라이드 폴리머 MAPS 골격 및 관련 예시적 항원

폴리사커라이드		단백질 항원	
		항원의 수	항원 기원
덱스트란	D90(60-90KD)	2	페렴구균
	D150(150 KD)	3	페렴구균
	D270(270 KD)	3	페렴구균
	D500(425-575 KD)	2; 3; 6	페렴구균
페렴구균 피막 폴리사커라이드	혈청형 1	1, 2, 3, 5	페렴구균, 결핵, 포도구균
	혈청형 3	5	페렴구균, 결핵
	혈청형 5	1; 2; 3; 5	페렴구균, 결핵
	혈청형 6B	2	페렴구균
	혈청형 7	3	페렴구균
	혈청형 14	1; 2; 3; 5	페렴구균, 결핵
	혈청형 19	3	페렴구균
페렴구균 세포벽 폴리사커라이드		5	페렴구균
장티푸스균 Vi 폴리사커라이드		5	페렴구균

[0149]

[0150] 본원에 개시된 면역성 MAPS 조성물에 사용될 수 있는 추가의 폴리머에는 폴리에틸렌 글리콜계 폴리머, 폴리(오르쏘 에스테르) 폴리머, 폴리아크릴 담체, PLGA, 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아미도아민(PAMAM) 덴드리머, β-아미노 에스테르 폴리머, 폴리포스포에스테르(PPE), 리포좀, 폴리머로좀(polymerosome), 핵산, 포스포로티오에이트화 올리고뉴클레오티드, 키토산, 실크, 폴리머 미셀, 단백질 폴리머, 바이러스 입자, 바이러스-유사-입자(VLP) 또는 다른 마이크로-입자가 포함된다. 참조, 예를 들어, El-Sayed et al., *Smart Polymer Carriers for Enhanced Intracellular Delivery of Therapeutic Molecules*, 5 Exp. Op. Biol. Therapy, 23 (2005). 핵산 전달을 위해 개발된 생체적합성 폴리머는 본원에 기술된 골격으로서의 사용에 알맞을 수 있다. 참조, 예를 들어, BIOCOMPATIBLE POL. NUCL. ACID. DELIV. (Domb et al., eds., John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, 2011).

[0151] 예를 들면, VLP들은 바이러스에 닮았지만, 비전염성인데 왜냐하면 그것들은 바이러스성 유전물질을 전혀 함유하지 않기 때문이다. 바이러스 구조 단백질, 예컨대 외피 또는 캡시드 성분들의 재조합 발현을 포함하는 발현은 VLP들의 자기 집합(self-assembly)을 야기할 수 있다. VLP들은 파르보바이러스과(예: 아데노-관련 바이러스), 레트로바이러스과(예: HIV), 및 플라비바이러스과(예: B형 간염 또는 C 바이러스)를 포함하는 광범위한 바이러스 패밀리의 성분들로부터 생산되었다. VLP는 포유류 세포주, 곤충 세포주, 효모, 및 식물 세포를 포함하는 다양한 세포 배양 시스템에서 생산될 수 있다. 재조합 VLP들은 특히 유용한데 왜냐하면 바이러스 성분이 본원에 기술된 재조합 항원들에 융합될 수 있기 때문이다.

[0152]

[0153] 항원

[0154] 본원에 개시된 융합 단백질과 면역성 조성물은 대상체에서 면역 반응을 끌어내는 임의의 항원을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 1개 또는 그 이상의 항원은 조성물의 폴리머와 결합되어 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 2개, 또는 적어도 3개, 또는 적어도 5개, 또는 적어도 10개, 또는 적어도 15개, 또는 적어도 20개, 또는 적어도 50개, 또는 적어도 100개, 또는 100개 초과의 항원들이 본원에 개시된 폴리머에 결합될 수 있다. 면역성 조성물이 1개 이상의 항원을 포함하는 일부 실시형태에서, 항원들은 동일한 항원일 수 있고 또는 항원은 상기 폴리머와 결합된 다양한 상이한 항원들일 수 있다. 면역성 조성물이 1개 이상의 항원을 포함하는 일부 실시형태에서, 항원들은 동일한 병원체 또는 상이한 병원체들로부터의 항원일 수 있으며, 또는 대안적으로, 동일한 병원체로부터의 상이한 항원들, 또는 상이한 혈청형의 병원체들로부터의 유사한 항원들일 수 있다.

[0155] 본원에 기술된 융합 단백질과 면역성 조성물과 방법에 사용되는 항원은 병원성 펩티드, 독소, 톡소이드, 그 서브유닛, 또는 이들의 조합(예: 콜레라 독소, 파상풍 톡소이드)을 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 항원일 수 있다 .

[0156] 일부 실시형태에서, 상기 상보적 친화성 분자에 융합될 수 있는 항원은 전염성 질환, 또는 암 또는 면역질환과 관련된 임의의 항원일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 바이러스, 세균, 진균 또는 기생생물을 포함하는 임의의 다양한 감염원에 의해 발현되는 항원일 수 있다.

[0157] 일부 실시형태에서, 항원은 병원성 유기체로부터 유래한다(예: 얻어진다). 일부 실시형태에서, 상기 항원은 암 또는 종양 항원, 예를 들면, 종양 또는 암 세포에서 유래한 항원이다.

[0158] 일부 실시형태에서, 병원성 유기체에 유래하는 항원은 전염성 질환과 관련되며; 그것은 바이러스, 세균, 진균 또는 기생생물을 포함하는 다양한 감염원들 중의 어느 것으로부터 유래할 수 있다.

[0159] 일부 실시형태에서, 표적 항원은 병리학, 예를 들면 전염성 질환 또는 병원체, 또는 암 또는 면역질환, 예컨대 자가면역질환과 관련된 임의의 항원이다. 일부 실시형태에서, 항원은 바이러스, 세균, 진균 또는 기생생물을 포함하는 다양한 감염원들 중 어느 것에 의해 발현될 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 조성물에 사용되는 표적 항원에는 예를 들면, 병원성 펩티드, 독소, 톡소이드, 그 서브유닛, 또는 이들의 조합(예: 콜레라 독소, 파상풍 톡소이드)이 포함될 수 있다.

[0160] 전염 바이러스의 비제한적 예에는 다음이 포함된다: 레트로바이러스과(*Retroviridae*); 피코르나바이러스과(*Picornaviridae*)(예를 들면, 폴리오 바이러스(polio viruses), A형 간염 바이러스(hepatitis A virus); 장바이러스(enteroviruses), 인간 콕사키 바이러스(human coxsackie viruses), 리노바이러스(rhinoviruses), 에코바이러스(echoviruses)); 칼시바이러스과(*Calciviridae*)(위창자염(gastroenteritis)을 일으키는 종 등); 토가바이러스과(*Togaviridae*)(예를 들면, 말 뇌염 바이러스(equine encephalitis viruses), 풍진 바이러스(rubella viruses)); 플라바이러스과(*Flaviridae*)(예를 들면, 뎅기 바이러스(dengue viruses), 뇌염 바이러스(encephalitis viruses), 황열병 바이러스(yellow fever viruses)); 코로나바이러스과(*Coronaviridae*)(예를 들면, 코로나바이러스(coronaviruses)); 라브도바이러스과(*Rhabdoviridae*)(예를 들면, 소수포구내염 바이러스(vesicular stomatitis viruses), 광견병 바이러스(rabies viruses)); 필로바이러스과(*Filoviridae*)(예를 들면, 에볼라 바이러스(ebola viruses)); 파라믹소바이러스과(*Paramyxoviridae*)(예를 들면, 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza viruses), 볼거리 바이러스(mumps virus), 홍역 바이러스(measles virus), 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus)); 오르쏘믹소바이러스과(*Orthomyxoviridae*)(예를 들면, 인플루엔자 바이러스(influenza viruses)); 분가바이러스과(*Bungaviridae*)(예를 들면, 한탄 바이러스(Hantaan viruses), 분가 바이러스(bunga viruses), 플레보바이러스(phleboviruses) 및 나이로바이러스(Nairo viruses)); 아레나바이러스과(*Arena viridae*)(출혈열 바이러스(hemorrhagic fever viruses)); 레오바이러스과(*Reoviridae*)(예: 레오바이러스(reoviruses), 오르비바이러스(orbiviurses) 및 로타바이러스(rotaviruses)); 비르나바이러스과(*Birnaviridae*); B형 간염 바이러스과(*Hepadnaviridae*)(B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus)); 파르보바이러스과(*Parvoviridae*)(파르보바이러스(parvoviruses)); 파포바바이러스과(*Papovaviridae*)(파필로마바이러스(papilloma viruses), 폴리오마 바이러스(polyoma viruses)); 아데노바이러스과(*Adenoviridae*)(대부분의 아데노바이러스들(adenoviruses)); 헤르페스바이러스과(*Herpesviridae*)(단순 헤르페스 바이러스(herpes simplex virus)(HSV) 1 및 HSV-2, 수두 대상포진 바이러스(varicella zoster virus), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus(CMV)), 마레크병(Marek's disease) 바이러스, 헤르페스 바이러스(herpes viruses)); 마마바이러스과(*Poxviridae*)(두창 바이러스(variola viruses), 우두 바이러스(vaccinia viruses), 마마 바이러스(pox viruses)); 및 이리도바이러스과(*Iridoviridae*)(예컨대 아프리칸 돼지콜레라바이러스(African swine fever virus)); 및 미분류 바이러스들(예를 들면, 해면형 뇌증(Spongiform encephalopathies)의 병원 인자들, 델타 간염 인자들(B형 간염 바이러스의 결함있는 새털라이트(satellite)라고 생각됨), 비-A형, 비-B형 간염 인자들(클래스 1=내부로 전염된; 클래스 2=비경구적으로 전염된(즉, C형 간염)); 노르왁(Norwalk) 및 관련 바이러스, 및 아스트로바이러스(astroviruses)). 본원에 기술된 조성물과 방법은 이들 바이러스 인자들에 의한 감염의 치료에 사용하는 것이 고려된다.

[0161] 본 실시형태에서 항원의 포함에 의해 언급되는 진균 감염의 예에는 아스페르길루스증(aspergillosis); 아구창(thrush)(칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 의해 유발); 크립토콕쿠스증(cryptococcosis)(크립토콕쿠스(*Cryptococcus*)에 의해 유발); 및 히스토플라스마증(histoplasmosis)이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다 . 따라서, 전염성 진균의 예에는, 크립토콕쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캅슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 콕시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 블라스토마이세스 데르마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)가 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다. 이들 유기체 성분들은 본원에 기술된 MAPS 내에 항원들로서

포함될 수 있다.

[0162] 본 발명의 하나의 태양에서, 항원은 전염성 미생물 예컨대 백일해균(*Bordatella pertussis*), 브루셀라(*Brucella*), 장구균 종(*Enterococci* sp.), 수막염균(*Neisseria meningitidis*), 임균(*Neisseria gonorrheae*), 모락셀라(*Moraxella*), 분류가능한 또는 분류불가능한 헤모필루스(*Haemophilus*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 살모넬라(*Salmonella*), 시겔라(*Shigella*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 시트로박터(*Citrobacter*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 대장균(*E. coli*), 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 클로스트리디아(*Clostridia*), 박테로이데스(*Bacteroides*), 클라미디아 과(*Chlamydiaceae*), 콜레라균(*Vibrio cholera*), 마이코플라즈마(*Mycoplasma*), 트레포네마(*Treponemes*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borelia burgdorferi*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophilia*), 항산균 종(*Mycobacteria* sps)(예컨대 결핵균(*M. tuberculosis*), 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라(*M. intracellulare*), 마이코박테리움 간사이이(*M. kansaii*), 마이코박테리움 고르도내(*M. gordonae*), 나균(*M. leprae*)), 황색포도구균(*Staphylococcus aureus*), 단구성 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*), 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*)(그룹 A 연쇄구균), 스트렙토콕쿠스 아갈락티애(*Streptococcus agalactiae*)(그룹 B 연쇄구균), 연쇄구균(*Streptococcus*)(비리던스 그룹(viridans group)), 대변연쇄구균(*Streptococcus faecalis*), 스트렙토콕쿠스 보비스(*Streptococcus bovis*), 연쇄구균(혐기성 종), 폐렴연쇄구균(*Streptococcus pneumoniae*), 병원성 캄필로박터 종(pathogenic *Campylobacter* sp.), 장구균 종(*Enterococcus* sp.), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 탄저균(*Bacillus anthracis*), 디프테리아균(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 종(*Corynebacterium* sp.), 단독균(*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 클로스트리듐 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 파상풍균(*Clostridium tetani*), 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 폐렴막대균(*Klebsiella pneumoniae*), 렙토스피라 종(*Leptospira* sps.), 파스튤렐라 뮬토시다(*Pasturella multocida*), 박테로이데스 종(*Bacteroides* sp.), 푸소박테리움 누클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 모닐리포르미스사슬막대균(*Streptobacillus moniliformis*), 트레포네마 팔리디움(*Treponema pallidium*), 트레포네마 페르테뉴(*Treponema pertenue*), 및 방선균(*Actinomyces israelli*)으로부터 유래된다. 본원에 기술된 조성물과 방법은 이들 세균성 병원체에 대한 감염의 치료 또는 예방에의 사용이 고려된다.

[0163] 항원이 유래할 수 있는 추가의 기생생물 병원체에는 예를 들면, 이질아메바(*Entamoeba histolytica*), 열대열원충(*Plasmodium falciparum*), 리슈만편모충 종(*Leishmania sp.*), 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*), 리케챠(*Rickettsia*), 및 연충류(*Helminths*)가 포함된다.

[0164] 본 발명의 다른 태양에서, 항원은 절단된 폐렴구균 PsaA 단백질(truncated pneumococcal PsaA protein), 폐렴구균 용혈소 톡소이드 폐렴구균 세린/트레오닌 단백질 키나제(pneumolysin toxoid pneumococcal serine/threonine protein kinase)(StkP), 폐렴구균 세린/트레오닌 단백질 키나제 반복 단위(pneumococcal serine/threonine protein kinase repeating unit)(StkPR), 폐렴구균 PcsB 단백질(pneumococcal PcsB protein), 포도구균 알파 용혈소(staphylococcal alpha hemolysin), 결핵균 mtb 단백질(*Mycobacterium tuberculosis* mtb protein) ESAT-6, 결핵균 세포벽 중심 항원(*M. tuberculosis* cell wall core antigen), 클라미디아(*Chlamydia*) CT144, CT242또는 CT812 폴리펩티드 또는 이들의 단편들, 클라미디아 DNA 자이라제(gyrase) 서브유닛B, 클라미디아 설파이트 합성/중인산염 포스파타제(*Chlamydia* sulfite synthesis/biphosphate phosphatase), 클라미디아 세포 분할 단백질(*Chlamydia* cell division protein) FtsY, 클라미디아 메티오닐-tRNA 합성효소, 클라미디아 DNA 헬리카제(helicase)(uvrD), 클라미디아 ATP 합성효소 서브유닛I(atpI), 또는 클라미디아 금속 의존성 가수분해효소(*Chlamydia* metal dependent hydrolase)이다.

[0165] 본 발명의 실시형태는 병원체 결핵균(TB), 세포내의 세균성 기생생물을 표적으로 하는 면역성 조성물을 제공한다. TB 항원의 일 예는 TbH9(Mtb 39A로도 알려져 있음)이다. 다른 TB 항원에는 DPV(Mtb8.4로도 알려져 있음), 381, Mtb41, Mtb40, Mtb32A, Mtb64, Mtb83, Mtb9.9A, Mtb9.8, Mtb16, Mtb72f, Mtb59f, Mtb88f, Mtb71f, Mtb46f 및 Mtb31f(여기서 "f"는 융합 또는 2 이상의 단백질임을 나타냄)가 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0166] 상술한 바와 같이, 본 발명의 면역성 조성물에 사용되는 항원은 클라미디아 종으로부터 유래될 수 있다. 클라미디아 과(*Chlamydiaceae*)(클라미디아(*Chlamydiae*)와 클라미도필라(*Chlamydophila*)로 구성됨)는 절대 세포내 그램 음성 세균(obligate intracellular gram-negative bacteria)이다. 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*) 감염은 가장 만연한 세균성 성적 전염 감염에 속하며, 아마도 매년 8천 9백만의 신규 생식기 클라미디아 감염이 일어난다. 본 발명의 클라미디아에는 예를 들면, 클라미디아 트라코마티스(*C. trachomatis*), 클라미도필라 뉴모니애(*Chlamydophila pneumoniae*), 클라미디아 미리다룸(*C. muridarum*), 클라미디아 수이스(*C.*

suis), 클라미도필라 아보르투스(*Chlamydophila abortus*), 클라미도필라 프시타시(*Chlamydophila psittaci*), 클라미도필라 카비애(*Chlamydophila caviae*), 클라미도필라 펠리스(*Chlamydophila felis*), 클라미도필라 페코룸(*Chlamydophila pecorum*), 및 클라미디아 뉴모니애(*C. pneumoniae*)가 포함된다. 클라미디아 감염의 동물 모델은 T-세포가 초기 감염의 박멸과 민감성 숙주의 재감염으로부터의 방어 양쪽에 있어서 결정적인 역할을 함을 확고히 하였다. 따라서, 본원에 개시된 면역성 조성물이 사용되어 클라미디아 감염에 대한 세포 면역 반응을 끌어냄에 의해 특별한 가치를 제공할 수 있다.

[0167] 더 구체적으로, 본 발명에 유용한 클라미디아 항원에는 DNA 자이레이즈 서브유닛 B, 설파이트 합성/중인산염 포스파타제, 세포 분할 단백질 FtsY, 메티오닐-tRNA 합성효소, DNA 헬리카제(uvrD); ATP 합성효소 서브유닛 I(atpI) 또는 금속-의존성 가수분해효소(미국 특허출원 공개 제20090028891)가 포함된다. 추가의 클라미디아 트라코마티스 항원에는 CT144 폴리펩티드, CT144의 아미노산 잔기 67-86을 갖는 펩티드, CT144의 아미노산 잔기 77-96을 갖는 펩티드, CT242 단백질, CT242의 아미노산 109-117을 갖는 펩티드, CT242 폴리펩티드의 아미노산 112-120을 갖는 펩티드, CT812 단백질(pmpD 유전자로부터의), CT812 단백질의 아미노산 잔기 103-111를 갖는 펩티드; 및 클라미디아 트라코마티스로부터의 수개의 상이한 항원성 펩티드들: NVTQDLTSSTAKLECTQDLI(서열번호 29), AKLECTQDLIAQGKLIVTNP(서열번호 30), SNLKRMQKI(서열번호 31), AALYSTEDL(서열번호 32), FQEKDADTL(서열번호 33), QSVNELVYV(서열번호 34), LEFASCSSL(서열번호 35), SQAEGQYRL(서열번호 36), GQSVNELVY(서열번호 37), 및 QAVLLLDQI(서열번호 38)가 포함된다. 참조 WO 2009/020553. 또한, 전술한 폴리펩티드의 동족체를 포함하는 클라미디아 뉴모니애 항원(참조 미국 특허 제6,919,187호)도 본원에 개시된 면역성 조성물 및 방법에 사용될 수 있다. .

[0168] 진균 항원은 칸디다 종 및 다른 효모; 또는 다른 진균(아스페르길루스(aspergillus), 다른 환경 진균)로부터 유래될 수 있다. 다른 기생생물에 관해서는, 말라리아 뿐만 아니라 충(worm) 및 아메바도 본원에 개시된 면역성 조성물과 방법에 사용하기 위한 항원성 항원을 제공할 수 있다.

[0169] 항원이 항-인플루엔자 면역원을 생성하는 일부 실시형태에서, 표면 글리코단백질 헤마글루티닌(hemagglutinin)(HA) 및 노이라미다제(neuraminidase)(NA)는 일반적으로 선택되는 항원이다. 핵단백질(NP) 폴리펩티드 및 기질(M)은 내재적 바이러스 단백질이며 따라서 항체-기반 면역을 위한 백신 설계에 통상 고려되지 않는다. 인플루엔자 백신은 통상 인간에게 사용되며, 불활성화된 전 인플루엔자 바이러스, 약독생 인플루엔자 바이러스, 또는 바이러스 주로부터의 정제되고 불활성화된 물질로부터 유래된 백신을 포함한다. 예를 들면, 전통적 인플루엔자 백신은 3주(strain)의 강력하게 위협적인 플루 바이러스를 사용하여 제조될 수 있다. 이들 주(strain)는 통상 수정 계란에서 생육되며, 난(egg) 접종 및 인큐베이션, 난을 거두어들이고(harvest), 바이러스 정제 및 불활성화, 최종 백신 제제로 바이러스 또는 바이러스 성분을 프로세싱 및 저류(pooling), 및 적절한 용기 내에 무균 충전(aseptic filling)을 포함하는 광범위한 프로세싱이 요구된다. 전형적으로, 이 난-기반 생산 사이클은 70주 넘게 걸린다. 주요 유행성 인플루엔자 유행 이벤트에 있어서, 강력하고 안전한 백신의 이용가능성은 주요 관심사이다. 또한, 난 내의 불순물, 예컨대 백신 멸균성에 부정적인 영향을 미치는 항생제 및 오염물에 관련된 위험이 있다. 게다가, 난-유도 플루 백신들은 난 단백질에 대해 심각한 알러지를 가진 자들과 길리언 바르 증후군(Guillain-Barre syndrome)의 이력을 갖는 사람들에게 금기이다. 본 발명은 난-기반 인플루엔자 백신에 대한 대안을 제공하며, 난-관련 후유증들을 회피할 뿐 아니라 고도로 제어된 플랫폼에서 다수의 인플루엔자 항원들을 사용하기 위한 플랫폼을 제공한다.

[0170] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물에 사용되는 항원에는 세균전에서 사용되는 것들, 예컨대 CMI 반응을 일으킬 수 있는 리신(ricin)이 포함될 수 있다.

[0171] 또한, 본 발명은 암에 대한 면역 반응을 일으키는 항원들을 포함하는 면역성 조성물도 제공한다. 이들 접합체에 있어서, 항원은 암 또는 종양에 의해 발현되되거나 또는 종양으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 그러한 항원들은 본원에서 "암 항원"이라 하며 그 접합체가 이 단백질에 강력한 체액성 및 강력한 세포 면역 둘다를 끌어내도록 하는 전형적으로 주로 암 세포에 발현되는 단백질이다. 많은 암-관련 항원들이 동정되었으며, 그들 중 수개는 현재 실험적 암 치료 백신의 제조에 사용되고 있으며 따라서 본 실시형태에 사용하기에 적절하다. 1종 이상의 암과 연관된 항원들에는 암배아 항원(Carcinoembryonic antigen)(CEA); 암/고환 항원들, 예컨대 NY-ESO-1; 뮤신-1(MUC1) 예컨대 시알릴(Sialyl) Tn(STn); 강글리오시드(Gangliosides), 예컨대 GM3 및 GD2; p53 단백질; 및 HER2/neu 단백질(ERBB2로도 알려져 있음)이 포함된다. 특정 유형의 암에 고유한 항원에는, EGFRvIII로 불리는, 상피 성장 인자 수용체의 돌연변이형 ; 멜라닌세포(Melanocyte)/흑색종(melanoma) 분화 항원들, 예컨대 티로시나제(tyrosinase), MART1, gp100, 계통 관련 암-고환 그룹(lineage related cancer-testis group)(MAGE) 및 티로시나제-관련 항원; 전립선-특이적 항원; 백혈병-관련 항원(LAAs), 예컨대 융합 단

백질 BCR-ABL, 윌름즈 종양 단백질(Wilms' tumour protein) 및 단백질분해효소 3; 및 이디오타입(Idiotype)(Id) 항체들이 포함된다. 참조, 예를 들어, Mitchell, 3 Curr. Opin. Investig. Drugs 150(2002); Dao & Scheinberg, 21 Best Pract. Res. Clin. Haematol. 391(2008).

[0172] 암에 대한 면역 반응을 생성하는 다른 접근 방식은 암의 발병을 일으키거나 또는 기여하는 미생물로부터의 항원들을 채용한다. 이들 백신은 간세포 암종(B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 타이간흡충(*Opisthorchis viverrin*)), 림프종 및 비인두암종(엡스타인 바 바이러스(Epstei-Barr virus)), 결장직장암, 위암(헬리코박터 필로리), 방광암(방광주혈흡충(*Schisosoma hematobium*)), T-세포 백혈병(인간 T-세포 림프친화 바이러스(human T-cell lymphtropic virus)), 자궁경부암(인간 파필로마바이러스), 및 기타를 포함하는 암에 대해 사용되어 왔다. 지금까지, 방광암, 뇌종양, 유방암, 자궁경부암, 신장암, 흑색종, 다발골수종, 백혈병, 폐암, 췌장암, 전립선암, 및 고형 종양을 표적으로 하는 백신에 대한 임상 시험이 있었다. 참조 Pardoll et al., ABELOFF'S CLIN. ONCOL.(4th ed., Churchill Livingstone, Philadelphia 2008); Sioud, 360 Methods Mol. Bio. 277(2007); Pazdur et al., 30 J. Infusion Nursing 30(3):173(2007); Parmiani et al., 178 J. Immunol. 1975(2007); Lollini et al., 24 Trends Immunol. 62(2003); Schlom et al., 13 Clin. Cancer Res. 3776(2007); Banchereau et al., 392 Nature 245(1998); Finn, 358 New Engl. J. Med. 2704(2008); Curigliano et al., 7 Exp. Rev. Anticancer Ther. 1225(2007). 가금류에서 종양을 일으키는 마레크병(Marek's disease) 바이러스, 헤르페스 바이러스는, 백신에 의해 오랫동안 관리되어 왔다. 따라서, 본 실시형태는 예방적(preventive) 또는 예방적(prophylactic) 항암 면역성 조성물 및 처치/치료적 암 백신 둘다를 포함한다.

[0173] 고려되는 증식성의 질환 및 암에는 AIDS 관련 암, 청신경종(acoustic neuroma), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 샘낭 암종(adenocystic carcinoma), 부신피질암(adrenocortical cancer), 원인불명골수화생(agnogenic myeloid metaplasia), 탈모증(alopecia), 포상연부육종(alveolar soft-part sarcoma), 항문암, 혈관육종(angiosarcoma), 별아교세포종(astrocytoma), 실조-모세혈관확장증(ataxia-telangiectasia), 기저 세포 암종(basal cell carcinoma)(피부), 방광암, 골암, 장암, 뇌 및 CNS 종양, 유방암, 유암종 종양(carcinoid tumors), 자궁경부암, 소아기 뇌종양, 소아기암, 소아기 백혈병, 소아기 연조직 육종(childhood soft tissue sarcoma), 연골육종(chondrosarcoma), 융모막암종(choriocarcinoma), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia), 결장직장암(colorectal cancers), 피부 T-세포 림프종(cutaneous t-cell lymphoma), 피부 섬유육종(dermatofibrosarcoma-protuberans), 결합조직형성-소원형-세포-종양(desmoplastic-small-round-cell-tumour), 도관 암종(ductal carcinoma), 내분비 암(endocrine cancers), 자궁내막암(endometrial cancer), 뇌실막종(ependymoma), 식도암(esophageal cancer), 유잉 육종(Ewing's sarcoma), 간외 담관암(extra-hepatic bile duct cancer), 눈암(예를 들어, 눈 흑색종(eye melanoma) 및 망막모세포종(retinoblastoma)을 포함), 난관암(fallopian tube cancer), 판코니 빈혈(fanconi anemia), 섬유육종(fibrosarcoma), 담낭암(gall bladder cancer), 위암(gastric cancer), 위장암(gastrointestinal cancers), 위장-유암종종양(gastrointestinal-carcinoid-tumour), 비뇨생식암(genitourinary cancers), 생식세포 종양(germ cell tumors), 임신융모막 질환(gestational-trophoblastic disease), 신경아교종(glioma), 부인과 암(gynecological cancers), 혈액암(hematological malignancies), 털세포 백혈병(hairy cell leukemia), 두경부암, 간세포암(hepatocellular cancer), 유전 유방암(hereditary breast cancer), 호지킨병(Hodgkin's disease), 인간 파필로마바이러스-관련 자궁경부암, 포상기태(hydatidiform mole), 하인두암(hypopharynx cancer), 소도세포암(islet cell cancer), 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 신장암, 후두암, 평활근육종(leiomyosarcoma), 백혈병, 리-프라우메니 증후군(Li-Fraumeni syndrome), 입술암, 지방육종(liposarcoma), 폐암, 림프부종(lymphedema), 림프종(lymphoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 남성 유방암, 신장의 악성 간상 종양(malignant-rhabdoid-tumour-of-kidney), 수모세포종(medulloblastoma), 흑색종(melanoma), 메르켈세포암(Merkel cell cancer), 중피종(mesothelioma), 전이성 암(metastatic cancer), 구강암, 다발 내분비 신생물(multiple endocrine neoplasia), 균상식육종(mycosis fungoides), 골수 형성이상 증후군(myelodysplastic syndromes), 골수종(myeloma), 골수증식성 질환(myeloproliferative disorders), 비암, 비강인두암, 신장모세포종(nephroblastoma), 신경모세포종(neuroblastoma), 신경섬유종증(neurofibromatosis), 니스메겐 파손 증후군(Nijmegen breakage syndrome), 비흑색종 피부암(non-melanoma skin cancer), 비소세포폐암(NSCLC), 구강암, 구인두암(oropharynx cancer), 골육종(osteosarcoma), 오스토미 난소암(ostomy ovarian cancer), 췌장암(pancreas cancer), 파라비암(paranasal cancer), 부갑상선암, 이하선암, 음경암, 말초-신경외배엽-종양(peripheral-neuroectodermal-tumours), 뇌하수체암, 진성적혈구증가증(polycythemia vera), 전립선암(rhabdomyosarcoma), 콩팥 세포 암종, 망막모세포종

(retinoblastoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 로트문드 톰슨 증후군(Rothmund-Thomson syndrome), 침샘암(salivary gland cancer), 육종(sarcoma), 슈반세포종(Schwannoma), 세자리증후군(Sezary syndrome), 피부암, 소세포 폐암(SCLC), 소장암, 연조직 육종(soft tissue sarcoma), 척수 종양, 편평-세포-암종(squamous-cell-carcinoma)(피부), 위암, 윤활막 육종(synovial sarcoma), 고환암(testicular cancer), 가슴샘암(thymus cancer), 갑상선암, 이행세포암(transitional-cell-cancer)(방광), 이행세포암(콩팥-골반/요관), 융모암(trophoblastic cancer), 요도암(urethral cancer), 비뇨기계통암(urinary system cancer), 자궁육종(uterine sarcoma), 자궁암, 질암, 외음부암, 발덴스트롬마크로글로불린혈증(Waldenstrom's-macroglobulinemia), 및 윌름즈 종양(Wilms' tumor)이 포함된다.

[0174] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물에 사용되는 항원에는 자가면역질환(autoimmune diseases)의 항원이 포함될 수 있으며, 예를 들어, 그것은 "자가 항원(self-antigen)"일 수 있다. 본원에 기술된 검정에 따른 진단에 고려되는 자가면역질환에는 원형탈모증(alopecia areata), 강직척추염(ankylosing spondylitis), 항인지질 증후군(antiphospholipid syndrome), 애디슨병(Addison's disease), 재생불량빈혈(aplastic anemia), 다발경화증(multiple sclerosis), 부신의 자가면역질환, 자가면역 용혈빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 베체트병(Behcet's Disease), 물집유사천포창(bullous pemphigoid), 심근병증(cardiomyopathy), 비열대성 스프루우-피부염(celiac sprue-dermatitis), 만성 피로 증후군, 만성 염증성 말이집탈락 증후군(chronic inflammatory demyelinating syndrome)(CFIDS), 만성 염증성 다발신경증, 처르그 스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 반흔성유천포창(cicatricial pemphigoid), 크레스트 증후군(CREST Syndrome), 한냉 응집소 질환(cold agglutinin disease), 크론씨병(Crohn's disease), 포진피부염(dermatitis herpetiformis), 원반모양 루푸스(discoid lupus), 원발성 혼합 한냉-글로불린증(essential mixed cryoglobulinemia), 섬유근통(fibromyalgia), 사구체신염, 그레이브병(Grave's disease), 길랑-바레(Guillain-Barre), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 특발성폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 특발성 혈소판 감소증 자색반증(idiopathic thrombocytopenia purpura(ITP)), IgA 신장병(IgA nephropathy), 인슐린 의존성 당뇨병(I형), 편평태선(Lichen Planus), 루푸스, 메니에르병(Meniere's Disease), 혼합결합조직병(mixed connective tissue disease), 중증근육무력증(myasthenia gravis), 심근염(myocarditis), 보통천포창(pemphigus vulgaris), 악성 빈혈, 결절다발 동맥염(polyarteritis nodosa), 다발연골염(polychondritis), 다분비선 증후군(polyglandular syndromes), 류마티스 다발성 근육통(polymyalgia rheumatica), 다발성 근염-피부 근염(polymyositis and dermatomyositis), 원발 무감마글로불린혈증(primary agammaglobulinemia), 원발담관간경화(primary biliary cirrhosis), 건선(psoriasis), 레이노현상(Raynaud's phenomenon), 라이터 증후군(Reiter's syndrome), 류마티스 열(rheumatic fever), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 사르코이드증(sarcoidosis), 공피증(scleroderma), 쇠그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 강직증후군(stiff-man syndrome), 타카야수 동맥염(Takayasu arteritis), 관자동맥염/거세포 동맥염(temporal arteritis/giant cell arteritis), 궤양대장염(ulcerative colitis), 포도막염(uveitis), 베게너 증후군(Wegener's syndrome), 혈관염, 및 백반증(vitiligo)이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다. 자가면역질환을 갖거나 또는 갖는 것으로 의심되거나 또는 민감성인 대상체에서 잠재적인 또는 실제의 CMI 반응성을 평가하는 것이 일반적으로 중요하다.

[0175] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물에 사용되는 항원은 염증성 질환 또는 조건에 관련된 항원일 수 있다. 항원이 유용할 수 있는 염증성 질환과 조건의 예에는 그 중에서도 여드름(acne), 협심증(angina), 관절염(arthritis), 흡인 폐렴(aspiration pneumonia), 고름집(empyema), 위창자염(gastroenteritis), 괴사소장대장염(necrotizing enterocolitis), 골반염 질환(pelvic inflammatory disease), 인두염(pharyngitis), 늑막염(pleurisy), 만성 염증성 탈수초 다발신경증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), 만성 염증성 탈수초 다발신경근병증(chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy), 및 만성 염증성 탈수초 다발신경증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0176] 일부 실시형태에서, 항원은 온전한(즉, 전체) 항원, 또는 1 이상의 에피토프를 포함하는 항원의 기능성 부분일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 항원의 펩티드 기능성 부분이다. 본 맥락 내에서 "온전한(intact)"은 그 항원 폴리펩티드가 자연에서 발생하는 것 같이 그 항원이 전장 항원임을 의미한다. 이는 항원의 작은 부분이나 펩티드 만의 수송과 정 반대에 있다. 세포에 온전한 항원들을 수송하는 것은, 단지 하나의 또는 선택된 몇개의 펩티드 에피토프들이 아니라 온전한 항원들의 에피토프들의 전체 범위에 대한 면역 반응의 끌어냄을 가능하게 하거나 또는 촉진한다. 따라서, 본원에 기술된 방법 및 면역성 조성물은 단일 에피토프 펩티드-기반 항원의 사용에 비해 더 민감하고 더 높은 특이성의 면역 반응을 위해 폴리머와 결합된 온전한 항원을 포함한다.

[0177] 대안적으로, 일부 실시형태에서, 온전한 항원은 초기 항원의 크기에 따라 많은 부분들로 분할될 수 있다. 전형적으로, 전 항원이 다량체 폴리펩티드인 경우, 전 단백질은 항원의 각각의 개별적 서브유닛 또는 도메인이 본원에 개시된 방법에 따라 폴리머와 결합될 수 있는 서브유닛들 및/또는 도메인들로 분할될 수 있다. 대안적으로, 일부 실시형태에서, 온전한 항원은 전 항원의 기능성 단편들, 또는 부분들, 예를 들면, 적어도 2, 또는 적어도 3, 또는 적어도 4, 또는 적어도 5, 또는 적어도 6, 또는 적어도 7, 또는 적어도 8, 또는 적어도 9, 또는 적어도 10, 또는 적어도 11, 또는 적어도 12, 또는 적어도 13, 또는 적어도 15, 또는 적어도 20, 또는 적어도 25, 또는 25 부분들(예: 조각들 또는 단편들) 이상(일체를 포함)으로 분할될 수 있고, 그 경우 그 항원의 각각의 개별적 기능성 단편은 본원에 개시된 방법에 따라 상기 폴리머와 결합될 수 있다.

[0178] 전장 항원 폴리펩티드의 단편화 또는 분할은 전장 항원 폴리펩티드의 균등 분할일 수 있고, 또는 대안적으로, 일부 실시형태에서, 그 단편화는 비대칭적 또는 비균등적이다. 항원이 2개의 중첩하는(overlapping) 단편으로 분할되는 비제한적 예로서, 항원은 거의 동일한(대등한) 크기의 단편들로 분할될 수 있으며, 또는 대안적으로 하나의 단편은 전 항원의 약 45%이고 다른 단편은 약 65%일 수 있다. 추가의 비제한적 예로서, 전 항원은 다른 크기의 단편들의 조합으로 분할될 수 있고, 예를 들면, 항원이 2개의 단편으로 분할되는 경우, 단편들은 전 항원의 약 40% 및 약 70%, 또는 약 45% 및 약 65%; 또는 약 35% 및 약 75%; 또는 약 25% 및 약 85%(일체를 포함)로 분할될 수 있다. 전장 전 항원의 중첩하는 단편들의 임의의 조합이 항원의 중첩하는 폴리펩티드의 패널(panel)의 생성에의 사용에 포함된다. 단지 예시를 위한 예로서, 항원이 5 부분으로 분할되는 경우, 그 부분들은 균등하게(즉, 각 중첩하는 단편은 전체 전장의 약 21% 내지 25%이다) 또는 비균등하게(즉, 각 단편이 적어도 하나의 다른 단편과 중첩한다는 전제 하에, 항원은 다음의 5개의 중첩하는 단편으로 분할될 수 있다; 단편 1은 전장 항원의 크기의 약 25%, 단편 2는 약 5%, 단편 3은 약 35%, 단편 4는 약 10% 및 단편 5는 약 25%).

[0179] 전형적으로, 항원 부분(antigen portion)들의 패널(panel)은 전(또는 온전한) 항원 폴리펩티드의 전체 길이를 실질적으로 커버(cover)한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 면역성 조성물은, 동일한 온전한 항원의, 많은 상이한, 및/또는 중첩하는 단편들을 갖는 폴리머를 포함한다. 펩티드 항원의 단독 사용에 비해 항원의 중첩하는 단백질 단편들은 더 빠르고 저렴하게 그리고 증가된 안정성으로 제조될 수 있다. 추가의 일부 실시형태에서, 간단한 폴리펩티드들보다 큰 폴리펩티드들인 항원들이, 배치(conformation)가 에피토프 인식에 중요하기 때문에 바람직하며, 더 큰 항원 폴리펩티드들 또는 단편들은 펩티드 단편들보다 유리할 것이다.

[0180] 당업자는 전 항원을 항원의 중첩하는 단백질들로 분할하여 그 항원의 폴리펩티드들의 패널을 생성할 수 있다. 단지 설명을 위한 예에 지나지 않는, TB 특이적 항원 TB1(배양 여액-10 또는 CFP-10으로도 알려져 있는)은, 예를 들면 적어도 17개의 부분들로 분할되어, 각각 상이하지만 중첩하는 TB-특이적 항원 TB1(CFP) 단편을 포함하는 17개의 상이한 폴리펩티드들의 패널을 생성할 수 있다. 배양 여액 단백질(CFP-10)(Genbank AAC83445)은 결핵균(*M. tuberculosis*)로부터의 10 kDa, 100 아미노산 잔기 단백질 단편이다. 그것은 또한 L45 항원 상동 단백질(LHP)로도 알려져 있다.

[0181] 본원에 기술된 방법 및 조성물에 사용되는 표적 항원은 재조합 수단에 의해 발현될 수 있으며, 임의로, 그 방법이 당 기술분야에 잘 알려져 있는, 정제를 촉진하기 위한 친화성 또는 에피토프 표지를 포함할 수 있다. 유리(free) 또는 담체 단백질에 접합된 올리고펩티드의 화학적 합성이 본 발명의 항원을 얻는데 이용될 수 있다. 올리고펩티드들은 일종의 폴리펩티드로 간주된다. 항원은 리즈아비딘 또는 그 유도체 또는 기능성 단편을 예로 들 수 있으나 이에 한정되지 않는 상보적 친화성 분자와의 융합으로서 발현될 수 있다. 대안적으로, 표적 항원을 마련하고 그리고나서 그것을 리즈아비딘 또는 그 유도체 또는 기능성 단편을 예로 들 수 있으나 그에 한정되는 것은 아닌 상보적 친화성 분자에 접합하는 것도 가능하다.

[0182] 폴리펩티드들은 예컨대 미국 특허 제5,229,490호 및 제5,390,111호에 개시된 분지된 구조들로 합성될 수도 있다. 항원 폴리펩티드들에는 예를 들면, 합성 또는 재조합 B-세포 및 T-세포 에피토프들, 유니버설 T-세포 에피토프들, 및 하나의 유기체 또는 질환으로부터의 T-세포 에피토프들 및 다른 것으로부터의 B-세포 에피토프들의 혼합이 포함된다.

[0183] 재조합 수단을 통해 얻거나 또는 화학적 폴리펩티드 합성을 통해 얻어질 수 있는 항원, 뿐만 아니라 천연 소스 또는 추출물로부터 얻어진 항원은, 그 항원의 물리화학적 특성에 의해 예컨대 분별 또는 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 이들 기술은 당 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0184] 일부 실시형태에서, 항원은 물, 용매 예컨대 메탄올, 또는 완충액에 가용화될 수 있다. 적절한 완충액들에는 포스페이트 완충된 식염수 Ca^{2+}/Mg^{2+} 프리(PBS), 생리식염수(150 mM NaCl/물), 및 트리스 완충액이 포함되나 이에

한정되는 것은 아니다. 중성 완충액에 가용성이 아닌 항원은 10 mM 아세트산에 가용화하고나서 중성 완충액 예컨대 PBS에 의해 원하는 부피로 희석될 수 있다. 산성 pH에서만 가용성인 항원의 경우, 산성 pH의 아세테이트-PBS를 묽은 아세트산에 가용화 후에 희석제로서 사용할 수 있다. 글리세롤은 본원에 기술된 조성물, 방법 및 키트에 사용하기에 적절한 비수용매일 수 있다.

[0185] 전형적으로, 병원체에 대해 단백질 백신을 설계할 때, 세포외 단백질 또는 바이러스에 대한 환경에 노출된 것은 종종 백신의 항원 성분으로서 이상적인 후보이다. 그 세포외 단백질에 대해 생성된 항체들은 감염 동안 병원체에 대한 방어의 선봉이 된다. 항체는 병원체 상의 단백질에 결합하여 항체 옵소닌화를 촉진하여 식세포 예컨대 마크로파아지에 의한 소화와 파괴에 대해 병원체를 표지한다. 항체 옵소닌화는 또한 항체-의존성 세포 세포독성에 의해 병원체를 죽일 수 있다. 항체는 세포로부터의 용해 산물 예컨대 단핵구, 호중구, 호산구, 및 천연 킬러 세포의 방출을 촉발한다.

[0186] 본원에 기술된 발명의 일 실시형태에서, 본원에 개시된 조성물에 사용되는 항원은 아미노산 잔기들이 천연 발생 바이러스에서 발견되는 서열을 갖고 선택적 생장 조건 또는 분자생물학적 방법에 의해 변경되지 않은 모든 야생형 단백질들이다.

[0187] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 면역성 조성물은 글리코실화된 단백질인 항원을 포함할 수 있다. 환언하면, 관심 대상의 항원은 각각 글리코실화된 단백질일 수 있다. 본원에 기술된 면역성 조성물의 일 실시형태에서, 항원들, 또는 항원-융합 폴리펩티드들은 O-결합형 글리코실화된다. 본원에 기술된 면역성 조성물의 다른 실시형태에서 항원들, 또는 항원-융합 폴리펩티드들은 N-결합형 글리코실화된다. 본원에 기술된 면역성 조성물의 또다른 실시형태에서, 항원들, 또는 항원-융합 폴리펩티드들은 O-결합형 및 N-결합형 둘다로 글리코실화된다. 다른 실시형태에서, 다른 유형의 글리코실화도 가능하며, 예로서, C-만노실화가 있다. 단백질의 글리코실화는 주로 진핵 세포에서 일어난다. N-글리코실화는 일부 진핵생물 단백질의 접힘에 중요하며, 막과 분비된 단백질들의 구조 및 기능을 조절하는, 번역과 동시의(co-translational) 및 번역후의(post-translational) 변형(modification) 메커니즘을 제공한다. 글리코실화는 사커라이드들을 연결하여 글리칸을 생산하고 그들을 단백질들과 지질들에 부착하는 효소적 과정이다. N-글리코실화에서, 글리칸들은 단백질 번역 동안 아스파라긴 측쇄의 아미드 질소에 부착된다. 글리칸들을 형성하는 3개의 주요한 사커라이드는 글루코스, 만노스, 및 N-아세틸글루코사민 분자이다. N-글리코실화 공통서열(consensus)는 Asn-Xaa-Ser/Thr이고, 여기서 Xaa는 임의의 알려진 아미노산일 수 있다. O-결합형 글리코실화는 아마도 골지체에서, 단백질 프로세싱 동안의 후기에서 발생한다. O-결합형 글리코실화에서, N-아세틸-갈락토사민, O-퓨코스, O-글루코스, 및/또는 N-아세틸글루코사민이 세린 또는 트레오닌 잔기에 부가된다. 당업자는 생물정보학 소프트웨어 예컨대 NetNGlyc 1.0 및 NetOGlyc 예측 소프트웨어(Technical University of Denmark)를 사용하여 본 발명의 폴리펩티드 내에서 N- 및 O-글리코실화 자리를 찾아낼 수 있다. NetNglyc 서버는 Asn-Xaa-Ser/Thr 서열의 서열 전후관계를 검사하는 인공 신경망을 사용하여 단백질들에서 N-글리코실화 자리(site)들을 예측한다. NetNGlyc 1.0 및 NetOGlyc 3.1 예측 소프트웨어는 EXPASY 웹사이트에서 접근할 수 있다. 일 실시형태에서, N-글리코실화는 본원에 기술된 융합 폴리펩티드의 표적 항원 폴리펩티드에서 일어난다.

[0188]

[0189] 친화성 분자쌍

[0190] 본원에 개시된, 일부 실시형태에서, 항원은 상보적 친화성 쌍을 통해 폴리머에 접속된다(connected). 이러한 폴리머에의 항원의 접속은 제1 친화성 분자에 접속되는 폴리머에 의해 매개되며, 제 친화성 분자는 제2(예: 상보적) 친화성 분자와 결합하며(associate), 제2 친화성 분자는 항원에 부착된다. 상보적 친화성 쌍의 예는 비오틴/비오틴-결합 단백질이다.

[0191] 친화성 상보적 친화성 쌍의 전형적 예에는, 비오틴에 결합하는, 비오틴-결합 단백질 또는 아비딘-유사 단백질이 포함된다. 예를 들면, 제1 친화성 결합 분자가 비오틴(폴리머와 결합함)인 경우, 상보적 친화성 분자는 비오틴-결합 단백질 또는 아비딘-유사 단백질 또는 그 유도체, 비한정적 예로, 리즈아비딘, 또는 스트렙트아비딘 또는 변이형, 그 유도체 또는 기능성 부분일 수 있다.

[0192] 일부 실시형태에서, 제1 친화성 결합 분자는 비오틴, 비오틴 유도체, 또는 비오틴 모방제(mimic)이며, 예를 들면, 아민-PEG3-비오틴(((+)비오틴화-3,6,9-트리옥사운데칸디아민) 또는 그 유도체 또는 기능성 단편이나 이에 한정되는 것은 아니다. 특이적 비오틴 모방제는 $DX_aAX_bPX_c$(서열번호 39), 또는 $CDX_aAX_bPX_cCG$(서열번호 40)(여기서 X_a는 R 또는 L, X_b는 S 또는 T, 그리고 X_c는 Y 또는 W)의 서열을 함유하는 특이적 펩티드 모티프를 갖는다.

이들 모티프는 아비딘 및 뉴트라비딘을 결합할 수 있으나, 스트렙트아비딘은 그렇지 않다. 참조, 예를 들어, Gaj et al., 56 Prot. Express. Purif. 54(2006).

[0193] 폴리머에의 제1 친화성 분자의 연결, 및 항원에의 상보적 친화성 분자의 연결은 비공유적 연결, 또는 화학적 메커니즘, 예를 들면 공유 결합, 친화성 결합, 개재(intercalation), 배위 결합 및 복합체화(complexation)일 수 있다. 공유 결합은 매우 안정한 결합을 제공하며 본 실시형태에 특히 적합하다. 공유 결합은 존재하는 측쇄(side chain)들의 직접 축합 또는 외부 가교 분자들의 도입 중 어느 쪽에 의해 달성될 수 있다.

[0194] 예를 들면, 일부 실시형태에서, 항원은 상보적 고정 쌍 내의 쌍 중 하나에 비공유적으로 결합될 수 있다. 대안적 실시형태에서, 항원은 상보적 고정 쌍 내의 쌍 중 하나에 공유적으로 결합 또는 융합될 수 있다. 융합 단백질의 생성 방법은 당 기술분야에 잘 알려져 있으며, 본원에서 논의된다.

[0195] 다른 실시형태에서, 제1 친화성 결합 분자는 비공유 결합에 의해, 또는 공유 결합에 의해 폴리머에 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 가교제가 사용되어 본원에 개시된 고분자에 제1 친화성 결합 분자를 공유적으로 결합한다.

[0196] 일부 실시형태에서, 제1 친화성 결합 분자는 정전기적 상호 작용, 수소 결합, 소수성 상호 작용(즉, 반데르바알스힘), 친수성 상호 작용, 및 다른 비공유 상호 작용이나 이에 한정되지 않는 당 기술분야에 알려져 있는 비공유 결합 결합(non-covalent bond association)에 의해 상보적 친화성 분자와 결합한다. 중간체 부분들과의 다른 더 고차의 상호 작용도 고려된다.

[0197] 일부 실시형태에서, 상보적 친화성 분자는 아비딘-관련 폴리펩티드이다. 특이적 실시형태에서, 상보적 친화성 분자는 리즈아비딘이고, 예컨대 재조합 리즈아비딘이다. 특히, 재조합 리즈아비딘은 고수율로 대장균에서 발현될 수 있는 변형 리즈아비딘이다. 전형적인 수율은 대장균 배양 1 L 당 >30 mg이다. 리즈아비딘은 다른 아비딘-유사 단백질들에 비해 난 아비딘에 대해 더 낮은 서열 상동성을 갖는다(22.4% 서열 동일성 및 35.0% 유사성). 변형 리즈아비딘의 사용은 대상체에서 난-관련 알러지 반응을 유도할 MAPS의 위험을 감소시킨다. 게다가, 재조합 변형에 대한 항체는 난 아비딘에 대한 명백한 교차 반응성을 갖지 않는다(그 역도 성립).

[0198] 더 구체적으로, 일부 실시형태는 대장균에서의 재조합 발현을 위해 설계된 변형 리즈아비딘을 포함한다. 리즈아비딘 유전자에 대한 코딩 서열은 오리지날 유전자에 존재하는 희귀 코돈들에 기인한 대장균에서의 발현 동안의 임의의 어려움을 회피하기 위해 대장균 발현 코돈들을 사용하여 최적화되었다. 구성체를 단순화하기 위해, 생물정보학 및 구조-기반 분석 후, 전장 리즈아비딘의 첫 44개의 잔기들을 제거했는데, 그 이유는 이것들이 중심 구조 및 기능에 불필요함을 알아냈기 때문이다. 재조합 단백질의 정확한 접힘은, 리즈아비딘에서 기능적으로 중요한 디설파이드 결합이 정확하게 형성될 수 있는 대장균의 주변세포질 공간으로의 재조합 단백질의 이행을 촉진하기 위해, 상기 짧게 한 리즈아비딘(45-179)의 N-말단에 대장균 분비 시그널 서열이 부가됨으로써 향상되었다. 4량체를 형성하는 알려진 아비딘-유사 단백질들에 비해, 상기 변형 재조합 리즈아비딘은 2량체를 형성하여, 대장균에서 가용성 단백질로서의 재조합 리즈아비딘-항원 융합의 발현을 더 향상시킨다.

[0199] 게다가, 본 명세서의 다른 곳에서 더 상세히 기술하는 바와 같이, 대장균에서의 융합 항원들의 발현 및 용해도를 향상시키기 위해, 리즈아비딘과 항원 단백질 사이에 유연 링커 영역이 부가되었다. 또한, 생물정보학 및 구조적 분석에 기초하여, 상이한 항원 구성체들이 클로닝 및 발현되었다: 전장 항원, 또는 중요한 기능성 도메인, 또는 키메라 단백질 중 어느 것이 2개의 상이한 항원들에 포함되었다. 본원에 기술된 방법 및 조성물에 유용할 수 있는 추가의 친화성 쌍에는 항원-항체, 금속/이온-금속/이온-결합 단백질, 지질/지질 결합 단백질, 사커라이드/사커라이드 결합 단백질, 아미노산/펩티드/아미노산 또는 펩티드 결합 단백질, 효소-기질 또는 효소-저해제, 리간드-작용제/수용체, 또는 비오틴 모방제가 포함된다. 대안적 친화성 쌍을 사용할 때, 각각의 폴리머와 항원을 부착하는 대안적 수단, 예컨대 유전적 융합이 아니라 생체외 효소 반응들도 채용될 수 있다. 더 구체적으로, 항원-항체 친화성 쌍은 매우 강하고 특이적인 상호 작용을 가능하게 한다. 항원은 단백질, 펩티드, 핵산, 지질, 폴리/올리고사커라이드, 이온, 등을 포함하는 임의의 에피토프일 수 있다. 항체는 임의의 유형의 면역글로불린, 또는 면역글로불린의 Ag-결합 부분, 예컨대 Fab 단편일 수 있다. 금속/이온-금속/이온 결합 단백질에 관한 예에는 Ni NTA 대(vs.) 히스티딘-표지된 단백질, 또는 Zn 대 Zn 결합 단백질이 포함된다. 지질/지질 결합 단백질의 예에는 콜레스테롤 대 콜레스테롤 결합 단백질이 포함된다. 사커라이드/사커라이드 결합 단백질의 예에는 말토스 대 말토스 결합 단백질, 만노스/글루코스/올리고사커라이드 대 렉틴이 포함된다. 효소-기질/저해제에는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 당, 또는 이온을 포함하는 광범위의 물질들로부터의 기질이 포함된다. 저해제는, 일반적으로 효소들에 더 단단히(tightly) 심지어 비가역적으로 결합할 수 있는, 실제 기질의 유사체(analog)일 수 있다. 예를 들면, 트립신 대 대두 트립신 저해제이다. 저해제는 천연 또는 합

성 분자일 수 있다. 다른 리간드/작용제-수용체에 관하여, 리간드는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 당, 이온을 포함하는 광범위의 물질로부터의 것일 수 있고, 작용제는 진짜 리간드의 유사체일 수 있다. 그 예에는 LPS 대 TLR4 상호 작용이 포함된다.

[0200]

[0201] 가교제

[0202] 많은 2가 또는 다가 연결제들이 다른 분자에 대한 단백질 분자의 커플링에 유용하다. 예를 들면, 대표적인 커플링제에는 유기 화합물 예컨대 티오에스테르, 카보디이미드, 석신이미드 에스테르, 디이소시아네이트, 글루타르알데히드, 디아조벤젠 및 헥사메틸렌 디아민이 포함될 수 있다. 상기 목록은 당 기술분야에 알려진 다양한 클래스의 커플링제를 남김없이 기술하려는 것이 아니며 그보다는 보다 통상적인 커플링제의 예시이다. 참조, Killen & Lindstrom, 133J. Immunol. 1335(1984); Jansen et al., 62 Imm. Rev. 185(1982); Vitetta et al.

[0203] 일부 실시형태에서, 문헌에 기술된 가교제가 본원에 개시된 방법, 면역성 조성물 및 키트에서의 사용을 위해 포함된다. 참조, 예를 들어, Ramakrishnan, et al., 44 Cancer Res. 201(1984)(MBS(M-말레이미도벤조일-N-히드록시석신이미드 에스테르)의 사용을 기술하고 있음); Umemoto et al., 미국 특허 제5,030,719호(올리고펩티드 링커를 거쳐 항체에 커플링된 할로겐화 아세틸 하이드라지드 유도체의 사용을 기술하고 있음). 특정 링커들이 포함된다: (a) EDC(1-에틸-3-(3-디메틸아미노-프로필) 카보디이미드 하이드로클로라이드; (b) SMPT(4-석신이미딜옥시카보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)-톨루엔(Pierce Chem. Co., Cat.(21558G); (c) SPDP(석신이미딜-6 [3-(2-피리딜디티오) 프로피온아미도] 헥사노에이트(Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (d) 설포-LC-SPDP(설포석신이미딜 6 [3-(2-피리딜디티오)-프로피안아미드] 헥사노에이트(Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); 및 (f) EDC에 접합된 설포-NHS(N-히드록시설포-석신이미드: Pierce Chem. Co., Cat. #24510).

[0204] 상술한 연결 또는 가교제는 다른 속성들을 갖는 성분들을 함유하므로, 따라서 접합체(conjugate)가 상이한 생리화학적 특성들을 갖게 한다. 예를 들면, 알킬 카복실레이트의 설포-NHS 에스테르는 방향족 카복실레이트의 설포-NHS 에스테르보다 더 안정하다. 나아가, 상기 링커 SMPT는 입체 장애된 디설피드 결합을 함유하며, 증가된 안정성으로 접합체를 형성할 수 있다. 디설피드 결합들은 일반적으로 다른 연결보다 덜 안정한데 왜냐하면 디설피드 결합은 체외에서 절단되어 이용가능한 접합체가 적어지기 때문이다. 설포-NHS는 특히 카보디이미드 커플링의 안정성을 증진시킬 수 있다. 카보디이미드 커플링(예컨대 EDC)은 설포-NHS와 함께 이용될 때 카보디이미드 커플링 반응 단독에 비해 가수분해에 대하여 더 내성인 에스테르를 형성한다.

[0205] 본원에 개시된 방법과 면역성 조성물에 사용되는 전형적 가교 분자들에는 표 3과 표 4에 열거된 것들이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

표 3

[0206] 예시적 동종이작용성(homobifunctional) 가교자*

가교 표적	가교자 반응기, 특징	생성물 예
아민-to-아민	NHS 에스테르	DSG; DSS; BS3; TSAT(삼작용성); 생접합체 툴키트 시약 쌍(Bioconjugate Toolkit Reagent Pairs)
	NHS 에스테르, PEG 스페이서	BS(PEG)5; BS(PEG)9
	NHS 에스테르, 티올-절단 가능	DSP; DTSSP
	NHS 에스테르, misc-절단 가능	DST; BSOCOES; EGS; 설포-EGS
	이미도에스테르	DMA; DMP; DMS
	이미도에스테르, 티올-절단 가능	DTBP
	기타	DFDNB; THPP (삼작용성); 알데히드-활성화 덱스트란 키트

설프하이드릴-to-설프하이드릴	말레이미드	BMOE; BMB; BMH; TMEA(삼작용성)
	말레이미드, PEG 스페이서	BM(PEG)2; BM(PEG)3
	말레이미드, 절단 가능(cleavable)	BMDB; DTME
	피리딜디티올 (절단 가능)	DPDPB
	기타	HBVS (비닐설폰)
비선택적	아릴 아자이드	BASED (티올-절단 가능)
* 양 말단에 동일 유형의 반응기를 갖는 가교제. 시약들은 그것들이 어느 화학기를 가교하느냐(좌열) 및 그 화학적 조성(우열)에 의해 분류된다. 생성물은 각 칸 내에서 길이를 증가시키는 순서로 열거되어 있다.		

표 4

[0207] 예시적 이종이작용성(heterobifunctional) 가교자*

가교 표적	가교자 반응기, 특징	생성물 예
아민-to-설프하이드릴	NHS 에스테르/말레이미드	AMAS; BMPS; GMBS 및 설포-GMBS; MBS 및 설포-MBS; SMCC 및 설포-SMCC; EMCS 및 설포-EMCS; SMPB 및 설포-SMPB; SMPH; LCSMCC; 설포-KMUS
	NHS 에스테르/말레이미드, PEG 스페이서	SM(PEG)2; SM(PEG)4; SM(PEG)6; SM(PEG)8; SM(PEG)12; SM(PEG)24
	NHS 에스테르/피리딜디티올, 절단 가능	SPDP; LC-SPDP 및 설포-LC-SPDP; SMPT; 설포-LC-SMPT
	NHS 에스테르/할로아세틸	SIA; SBAP; SIAB; 설포-SIAB
아민-to-비선택적	NHS 에스테르/아릴 아자이드	NHS-ASA ANB-NOS 설포-HSAB 설포-NHS-LC-ASA SANPAH 및 설포-SANPAH
	NHS 에스테르/아릴 아자이드, 절단 가능	설포-SFAD; 설포-SAND; 설포-SAED
	NHS 에스테르/디아지린	SDA 및 설포-SDA; LC-SDA 및 설포-LC-SDA
	NHS 에스테르/디아지린, 절단 가능	SDAD 및 설포-SDAD
아민-to-카복시	카보디이미드	DCC; EDC
설프하이드릴-to-비선택적	피리딜디티올/아릴 아자이드	APDP
설프하이드릴-to-탄수화물	말레이미드/하이드라지드	BMPH; EMCH; MPBH; KMUH
	피리딜디티올/하이드라지드	BMPH; EMCH; MPBH; KMUH
탄수화물-to-비선택적	하이드라지드/아릴 아자이드	ABH
히드록시l-to-설프하이드릴	이소시아네이트/말레이미드	PMPI
아민-to-DNA	NHS 에스테르/소라렌(Psoralen)	SPB
*양 말단에 다른 반응기를 갖는 가교제. 시약들은 그것들이 어느 화학기를 가교하느냐(좌열) 및 그 화학적 조성(우열)에 의해 분류된다. 생성물은 각 칸 내에서 길이를 증가시키는 순서로 열거되어 있다.		

[0208]

[0209] 공자극인자

[0210] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 적어도 하나의 공자극분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 공자극인자는 상기 폴리머에 가교된다. 일부 실시형태에서, 항원이 폴리머와 결합되는 것과 유사하게 상보적 친화성 쌍에 의해 폴리머에 공자극인자가 결합된다. 일부 실시형태에서는, 폴리머에 공자극인자를 연결하는 상보적 친화성 쌍은, 폴리머에 항원을 연결하는 것과 동일한, 또는 상이한 상보적 친화성 쌍이다.

[0211] 일부 실시형태에서, 적어도 1개, 또는 적어도 2개, 또는 적어도 3개, 또는 적어도 5개, 또는 적어도 10개, 또는 적어도 15개, 또는 적어도 20개, 또는 적어도 50개, 또는 적어도 100개, 또는 약 100개 초과(일체를 포함)의 공자극인자들이 본원에 개시된 폴리머에 결합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 공자극인자들은 동일한 공자

극인자일 수 있고, 또는 그것들은 폴리머와 결합된 다양한 상이한 공자극인자들일 수 있다.

[0212] 일부 실시형태에서, 상기 공자극인자는 톨 유사 수용체의 리간드/작용제이며, 예로서 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 공자극인자는 NOD 리간드/작용제, 또는 염증조절복합체의 활성제/작용제이다. 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 상기 염증조절복합체는 카스파제 1, PYCARD, NALP 및 때때로 카스파제 5 또는 카스파제 11로 구성된 멀티단백질 올리고머이고 염증성 시토킨들인 인터루킨 1-β 및 인터루킨 18의 성숙을 촉진한다.

[0213] 일부 실시형태에서, 공자극인자는 시토킨이다. 일부 실시형태에서, 시토킨은 GM-CSF; IL-1a; IL-1b; IL-2; IL-3; IL4; IL5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-10; IL-12; IL-23; IFN-α; IFN-β; IFN-β; IFN-γ; MIP1α; MIP-1β; TGF-β; TNFα, 및 TNFβ로 이루어지는 군에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 공자극인자는 상기한 바와 같은, 폴리머에 결합될 수 있는 보강제일 수 있고, 또는 대상체에 대한 투여의 전에 또는 투여와 동시에 MAPS 조성물에 첨가될 수 있다. 보강제들에 대해서는 후에 더 상세히 기술한다.

[0214]

[0215] 재조합 단백질의 생산

[0216] 재조합 단백질은 당업자에 의해, 또는 상업적으로 입수가능한 키트, 예를 들면 PROBOND™ 정제 시스템(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)를 사용하여, 발현 및 정제될 수 있다. 일부 실시형태에서, 재조합 항원은 합성되고 당업자에게 알려진 세균 발현 시스템, 효모 발현 시스템, 바큘로바이러스/곤충 세포 발현 시스템, 포유류 세포 발현 시스템, 또는 형질전환 식물 또는 동물 시스템을 사용하는 단백질 정제 방법에 의해 정제될 수 있다.

[0217] 본원에 기술된 상기 단백질, 폴리펩티드 및 융합 폴리펩티드는 모두 당업자에게 잘 알려져 있는 단백질 및 분자적 방법들에 의해 합성되고 정제될 수 있다. 분자생물학적 방법 및 재조합 이종(heterologous) 단백질 발현 시스템들이 사용된다. 예를 들면, 재조합 단백질은 세균, 포유류, 곤충, 효모, 또는 식물 세포에서 또는 형질전환 식물 또는 동물 숙주에서 발현될 수 있다.

[0218] 일 실시형태에서, 본원에는 본원에 기술된 융합 폴리펩티드 또는 비융합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 통상의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 클로닝 기술을 사용하여 본원에 기술된 융합 폴리펩티드를 코딩하는 키메라 또는 융합 코딩 서열을 구성할 수 있다. 코딩 서열은 일반적 목적의 클로닝 벡터 예컨대 pUC19, pBR322, pBLUESCRIPT® (Stratagene, Inc.) 또는 pCR TOPO®(Invitrogen) 내에 클로닝할 수 있다. 얻어지는 본원에 기술된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 지닌 재조합 벡터는 그 후 추가의 분자생물학적 조작 예컨대 부위특이적 돌연변이유발(site-directed mutagenesis)에 사용되어 본원에 기술된 변이형 융합 폴리펩티드를 생성할 수 있고, 또는 포유류 세포주, 곤충 세포주, 효모, 세균 및 식물 세포로 구성되는 군에서 선택되는 숙주 세포를 사용하는 다양한 단백질 발현 시스템 내에서의 단백질 합성을 위한 단백질 발현 벡터나 바이러스 벡터 내로 서브클로닝 될 수 있다.

[0219] 각 PCR 프라이머는 증폭될 영역에서 그것의 상응하는 주형과 적어도 15 뉴클레오티드 중첩해야 한다. PCR 증폭에 사용되는 폴리머라제는 PCR 증폭 과정 동안의 서열 실수를 감소시키기 위한 예컨대 *Pfu*ULTRA® 폴리머라제(Stratagene)와 같이 높은 정확도를 가져야 한다. 수개의 개별적 PCR 단편들을 한데 연결하는 것을 용이하게 하기 위해, 예를 들면 융합 폴리펩티드의 구성 및 이어서 클로닝 벡터에의 삽입에 있어서, PCR 프라이머는 PCR 증폭동안 DNA 주형에 어닐링하지 않는 인접 말단들(flanking ends) 상에 뚜렷하고 독특한 제한 소화 부위들을 가져야 한다. 각 쌍의 특이적 프라이머에 대한 제한 소화 부위는, 융합 폴리펩티드 코딩 DNA 서열이 인 프레임(in-frame)이고 종결 코돈 없이 개시부터 종결까지 융합 폴리펩티드를 코딩하도록 선택해야 한다. 그와 동시에 그 선택된 제한 소화 부위들은 융합 폴리펩티드에 대한 코딩 DNA 서열 내에서는 발견되어서는 안 된다. 의도한 폴리펩티드에 대한 코딩 DNA 서열은, 증폭, 그 정확성(fidelity) 및 키메라 코딩 서열의 진성(authenticity)의 검증(verification), 폴리펩티드 내의 특정 아미노산 돌연변이 및 치환을 위한 치환/또는 부위특이적 돌연변이 유발을 위해 클로닝 벡터 pBR322 또는 그 일 유도체 내로 라이게이션될 수 있다.

[0220] 대안적으로 폴리펩티드에 대한 코딩 DNA 서열은 예를 들면, 토포아이소머라제-지원 TA 벡터, 예컨대 pCR® TOPO, pCR® BluntII-TOPO, pENTR/D-TOPO® 및 pENTR/SD/D-TOPO®(Invitrogen,Inc., Carlsbad, CA)를 포함하는 TOPO® 클로닝법을 사용하여 벡터 내로 PCR 클로닝될 수 있다. pENTR/D-TOPO®와 pENTR/SD/D-TOPO® 는 둘다, GATEWAY®

발현 벡터 내에 5'→3' 오리엔테이션으로 DNA 서열의 클로닝을 가능하게 하는, 방향성(directional) TOPO 엔트리 벡터이다. 5'→3' 오리엔테이션으로의 방향성 클로닝은, 프로모터 유도 단백질 발현을 가능하게 하는, 프로모터가 융합 폴리펩티드 코딩 DNA 서열의 5'ATG 개시 코돈의 업스트림인 단백질 발현 벡터내로의 DNA 서열의 일방향성 삽입을 용이하게 한다. 융합 폴리펩티드에 대한 코딩 DNA 서열을 지닌 재조합 벡터는 예컨대 XL1Blue, SURE®(STRATAGENE®) 및 TOP-10 세포(Invitrogen)와 같은 일반적 클로닝 대장균 내로 트랜스펙션되어 증식될 수 있다.

[0221] 당업자는, 당 기술분야에 잘 알려져 있는 특이적으로 설계된 올리고뉴클레오티드 프로브들과 중합효소 연쇄 반응(PCR) 방법들을 사용하여, 항원 또는 그 단편과 그 유도체의 상보적 친화성 분자를 포함하는 융합 폴리펩티드를 위한 키메라 코딩 서열을 구성하기 위해, 관심 대상의 항원의 코딩 영역을 상보적 친화성 분자의 코딩 영역과 함께 클로닝 및 라이게이션할 수 있을 것이다. 당업자는 또한 예를 들면 세균 발현 벡터, 곤충 발현 벡터 또는 바큘로바이러스(baculovirus) 발현 벡터 등의 선택된 벡터 내로 융합 단백질의 키메라 코딩 서열을 클로닝 및 라이게이션할 수 있을 것이다. 항원의 코딩 서열과 표적 항원 폴리펩티드 또는 그 단편은 인-프레임(in-frame)으로 라이게이션되어야 하고 키메라 코딩 서열은 프로모터의 다운스트림이면서 프로모터와 전사 터미네이터의 사이에 라이게이션되어야 한다. 그 다음에, 상기 재조합 벡터는 통상의 클로닝 대장균, 예컨대 XL1Blue 내로 트랜스펙션된다. 전달 벡터 DNA를 지닌 재조합 대장균은 그 후 비 재조합 플라스미드 DNA를 지닌 대장균을 제거하기 위해 항생제 저항성에 의해 선택된다. 선택된 형질전환체 대장균은 길러지고 재조합 벡터 DNA는 이어서 스포도프테라 프루기페르다(*S. frugiperda*) 세포 내로의 트랜스펙션을 위해 정제된다.

[0222] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 항원은 세균의 주변세포질 공간으로의 이행을 위해 시그널 펩티드를 포함할 수 있다. 시그널 펩티드는 또한 N-말단에서 리더 펩티드로도 불리며, 막을 통한 이행 후에 절단될 수도 절단되지 않을 수도 있다. 시그널 펩티드의 일 예는 본원에 개시된 MKKIWLALAGLVLAFSASA(서열번호 2)이다. 다른 시그널 서열은 MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRA(서열번호 7)이다. 시그널 펩티드의 다른 예는 시그널 펩티드 데이터베이스인 SPdb(월드 와이드 웹 사이트 "proline.bic.nus.edu.sg/spdb/")에서 찾을 수 있다.

[0223] 항원이 비오틴-결합 단백질에 융합되는 일부 실시형태에서, 상기 시그널 서열은 비오틴-결합 단백질의 N-말단에 위치할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 시그널 서열은 대장균의 주변세포질 공간으로의 이행 후 비오틴-결합 단백질로부터 절단된다.

[0224] 항원이 상보적 친화성 단백질에 융합되는 일부 실시형태에서, 상기 시그널 서열은 상보적 친화성 단백질의 N-말단에 위치할 수 있다. 예를 들면, 항원이 아비딘-유사 단백질에 융합되면, 시그널 서열은 상보적 친화성 단백질의 N-말단에 위치할 수 있다. 일부 실시형태에서, 시그널 서열은 상보적 친화성 단백질이 제1 친화성 분자와 결합하기 전에 상보적 친화성 단백질로부터 절단된다.

[0225] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 항원 및/또는 상보적 친화성 단백질은 시그널 서열이 결여되어 있다.

[0226] 본원에 기술된 폴리펩티드는 다양한 발현 숙주 세포 예를 들어, 세균, 효모, 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 조류(algal) 세포 예컨대 클라마도모나스(Chlamadomonas), 또는 무세포 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 일부 실시형태에서 핵산은 클로닝 벡터로부터 세균, 포유류, 곤충, 효모, 또는 식물 세포 또는 무세포 발현 시스템 예컨대 토끼 망상적혈구 발현 시스템에서의 융합 폴리펩티드의 발현을 위해 적절한 재조합 발현 벡터 내로 서브클로닝될 수 있다. 어떤 벡터들은 1회의 재조합 반응으로 포유류 세포, 곤충 세포 및 year에서의 발현을 위한 코딩 핵산 서열을 전달하도록 설계된다. 일부 GATEWAY® (Invitrogen) 데스티네이션 벡터(destination vector)는 바큘로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 레트로바이러스, 및 렌티바이러스의 구성을 위해 설계되며, 그들 각각의 숙주 세포를 감염시켜 적절한 숙주 세포에서의 융합 폴리펩티드의 이종 발현(heterologous expression)을 가능하게 한다. 데스티네이션 벡터 내로의 유전자 전달은 제조자 지시사항에 따라 단지 2단계로 실현될 수 있다. 곤충 세포, 포유류 세포, 및 효모에서의 단백질 발현을 위한 GATEWAY® 발현 벡터들이 있다. 대장균내 형질전환 및 선택 후에, 발현 벡터는 적절한 숙주 내에서의 발현을 위해 사용될 준비가 되어 있다.

[0227] 다른 발현 벡터 및 숙주 세포의 예는, 포유류 세포주, 예컨대 CHO, COS, HEK-293, Jurkat, 및 MCF-7에서의 발현을 위한, 강한 CMV 프로모터-기반 pcDNA3.1(Invitrogen) 및 pCINEO 벡터(Promega); 포유류 세포내의 아데노바이러스-매개 유전자 전달 및 발현을 위한, 복제능력이 없는 아데노바이러스 벡터 pADENOX™, pAd5F35, pLP-ADENO™-X-CMV(CLONETECH®, pAd/CMV/V5-DEST, pAd-DEST 벡터(Invitrogen); 포유류 세포내 레트로바이러스-매개

유전자 전달(transfer) 및 발현을 위한 RETRO-X™ 시스템(Clontech)과 함께 사용하기 위한 pLNCX2, pLXSN, 및 pLAPSN 레트로바이러스 벡터; 포유류 세포내 렌티바이러스-매개 유전자 전달 및 발현을 위한, pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™, 및 pLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen); 포유류 세포에서의 아데노 관련 바이러스-매개 유전자 전달 및 발현을 위한, 아데노바이러스-관련 바이러스 발현 벡터 예컨대 pAAV-MCS, pAAV-IRES-hrGFP, 및 pAAV-RC 벡터(Stratagene); 스포도프테라 프루기페르다9(Sf9), Sf11, Tn-368 및 BTI-TN-5B4-1 곤충 세포주에서의 발현을 위한, BACpak6 바큘로바이러스(Clontech) 및 pFASTBAC™ HT(Invitrogen); 드로소필라 슈나이더(*Drosophila schneider*) S2세포에서의 발현을 위한, pMT/BiP/V5-His(Invitrogen); 피키아 파스토리스(*P. pastoris*)에서의 발현을 위한 피키아(*Pichia*) 발현 벡터 pPICZα, pPICZ, pFLDα 및 pFLD(Invitrogen), 및 피키아 메타놀리카(*P. methanolica*)에서의 발현을 위한 벡터 pMETα 및 pMET; 효모 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*)에서의 발현을 위한 pYES2/GS 및 pYD1(Invitrogen) 벡터이다.

[0228] 녹조 클라미도모나스(*Chlamydomonas reinhardtii*)에서의 이종 단백질 대규모 발현에 있어서의 최근의 진전이 기술되어 있다. Griesbeck., 34 Mol. Biotechnol. 213(2006); Fuhrmann, 94 Methods Mol Med. 191(2006). 외래 이종(Foreign heterologous) 코딩 서열들은 상동 재조합에 의해 핵, 엽록체 및 미토콘드리아 게놈 내로 삽입된다. 가장 다용도의 엽록체 선택적 마커인, 스펙티노마이신 또는 스트렙토마이신에 내성을 부여하는, 아미노글리코시드 아데닐 전달라제(aadA)를 지니는 엽록체 발현 벡터 p64는, 엽록체에서 외래 단백질을 발현하는데 사용될 수 있다. 유전자 총 방법(biolistic gene gun method)은 조류(algae)에 벡터를 도입하는데 사용될 수 있다. 그것이 엽록체 내로 들어가면, 외래 DNA가 유전자 총 입자들로부터 방출되고 상동 재조합을 통해 엽록체 게놈 내로 통합된다.

[0229] 또한 본 발명에는 항원에 융합된 상보적 친화성 분자가 포함된다. 일부 실시형태에서, 융합 구성체는 또한 임의로 정제 표지, 및/또는 분비 시그널 펩티드를 포함할 수 있다. 이들 융합 단백질은 임의의 표준적 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들면, 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질을 발현하는 안정한 세포 주의 제조를 위해, PCR-증폭된 항원 핵산이 포유류 발현 벡터의 유도체의 제한효소 부위에 클로닝될 수 있다. 예를 들면, pcDNA3(Invitrogen)의 유도체인 KA는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 표지(HA)를 코딩하는 DNA 단편을 함유한다. 대안적으로, 다른 표지, 예컨대 c-myc 또는 폴리히스티딘 표지를 코딩하는 벡터 유도체를 사용할 수도 있다. 항원-상보적 친화성 분자 융합 발현 구성체는 예를 들면, 제조자 지시사항에 따라 LIPOFECTAMINE™ (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)을 사용하여, 또는 당 기술분야에 알려져 있는 임의의 다른 적절한 트랜스펙션 기술을 사용하여, 적절한 포유류 세포 주(예: COS, HEK293T, 또는 NIH 3T3 세포)내로 마커 플라스미드와 함께 트랜스펙션될 수 있다. 적절한 트랜스펙션 마커에는, 예를 들면, β-갈락토시다제 또는 녹색 형광 단백질(GFP) 발현 플라스미드 또는 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질과 동일한 검출가능 마커를 함유하지 않는 임의의 플라스미드가 포함된다. 융합 단백질 발현 세포는 선별하여 더 배양되거나, 또는 표지된 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질은 정제될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질은 시그널 펩티드에 의해 증폭된다. 대안적 실시형태에서, 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질을 코딩하는 cDNA는 시그널 펩티드 없이 증폭되고 강력한 분비 시그널 펩티드를 갖는 벡터(pSecTagHis)에 서브클로닝될 수 있다. 다른 예에서, 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질은 정제를 위한 알칼린 포스파타제(AP) 표지, 또는 히스타딘(His) 표지를 가질 수 있다. 항원 및/또는 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질의 단백질 정제에 대한 당업자에게 알려진 어떤 방법도 본 발명의 방법에의 사용에 포함된다.

[0230] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 임의의 폴리펩티드는 재조합 바큘로바이러스 벡터로부터의 발현에 의해 제조된다. 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 임의의 폴리펩티드는 곤충 세포에 의해 발현된다. 또다른 실시형태에서, 본원에 개시된 임의의 폴리펩티드는 곤충 세포로부터 단리된다. 곤충 세포에서 바큘로바이러스에 의한 단백질 발현에는, 높은 발현 수준, 스케일 업(scale-up)의 용이성, 번역 후 변형에 의한 단백질 생산, 및 단순화된 세포 성장을 포함하여 몇 가지 이점이 있다. 곤충 세포는 생장을 위해 CO_2를 요하지 않으며 대규모 발현을 위해 고밀도 현탁 배양에 용이하게 적응될 수 있다. 포유류 시스템 내에 존재하는 번역후 변형 경로(post-translational modification pathway) 중의 많은 것이 곤충 세포에 활용될 수 있으며, 이는 천연의 포유류 단백질에 항원적으로, 면역적으로, 및 기능적으로 유사한 재조합 단백질의 생산을 가능하게 한다.

[0231] 바큘로바이러스는 바큘로바이러스과의 DNA 바이러스이다. 이들 바이러스는 주로 인시류 종(Lepidopteran species)의 곤충(나비 및 나방)에 한정되는 좁은 숙주 범위를 갖는 것으로 알려져 있다. 바큘로바이러스 아우토그라파 칼리포니카 핵 폴리헤드로시스 바이러스(*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus)(AcNPV)는 원형(prototype) 바큘로바이러스로 되었으며, 민감성 배양 곤충 세포에서 효율적으로 복제된다. AcNPV는 약 130,000 염기쌍의 2중쇄 폐환 DNA 게놈을 가지며 숙주 범위, 분자생물학, 및 유전학에

대하여 잘 특성 규명되어 있다. 바큘로바이러스 발현 벡터 시스템(BEVS)은 곤충 세포 및 곤충에서의 재조합 단백질의 풍부한 생산을 위한 안전하고도 신속한 방법이다. 바큘로바이러스 발현 시스템은 곤충 세포에서의 고수준의 재조합 단백질 발현을 위한 강력하고 다용도인 시스템이다. 바큘로바이러스 발현 시스템을 사용한 500 mg/l까지의 발현 수준이 보고되었으며, 고수준 발현을 위한 이상적인 시스템임을 말한다. 외래 유전자를 발현하는 재조합 바큘로바이러스는 바큘로바이러스 DNA와 관심 대상의 유전자 서열을 함유하는 키메라 플라스미드 간의 상동 재조합을 거쳐 구성된다. 재조합 바이러스는 그 뚜렷한 플라크 형태(plaque morphology) 덕택으로 검출될 수 있으며 동종까지 플라크 분리된다(plaque-purified to homogeneity).

[0232] 본원에 기술된 재조합 융합 단백질은 인시류 종(*Lepidopteran* species) 스포도프테라 프루기페르다(*S. frugiperda*)로부터 유래된 세포가 포함되나 이에 한정되지 않는 곤충 세포에서 생산될 수 있다. 바큘로바이러스에 의해 감염될 수 있는 다른 곤충 세포, 예컨대 누에나방(*Bombyx mori*), 갈레리아 멜라노마(*Galleria mellanoma*), 트리크플루시아 니(*Trichplusia ni*), 또는 매미나방(*Lamanthria dispar*) 종으로부터의 곤충 세포도 본원에 기술된 재조합 단백질을 생산하기 위한 적절한 기질로서 사용될 수 있다. 재조합 단백질의 바큘로바이러스 발현은 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 참조 미국 특허 제4,745,051호; 제4,879,236호; 제5,179,007호; 제5,516,657호; 제5,571,709호; 제5,759,809호. 발현 시스템이 바큘로바이러스 발현 시스템에 한정되지 않는다는 것은 당업자가 잘 이해할 것이다. 중요한 것은 발현 시스템이 발현된 재조합 단백질의 N-글리코실화를 지시하는 것이다. 본원에 기술된 재조합 단백질은 다른 발현 시스템 예컨대 엔토모폭스(Entomopox) 바이러스(곤충의 마마바이러스), 세포질 폴리헤드로시스 바이러스(CPV)에서도 발현될 수 있으며, 재조합 유전자 또는 유전자들에 의한 곤충 세포의 형질전환은 발현을 구성한다. 상당히 많은 수의 바큘로바이러스 전달 벡터 및 그에 상응하는 적절히 변형된 숙주 세포들이 상업적으로 이용가능하며, 예를 들면, pAcGP67, pAcSECG2TA, pVL1392, pVL1393, pAcGHLT, 및 pAcAB4(BD Biosciences); pBAC-3, pBAC6, pBACgus-6, 및 pBACsurf-1(NOVAGEN®), 및 pPolh-FLAG 및 pPolh-MAT(SIGMA ALDRICH®)이다.

[0233] 프로모터와 전사 터미네이터 사이의 영역은 외래 코딩 서열(본 예에서는 항원 폴리펩티드, 및 상보적 친화성 분자에 대한 코딩 DNA 서열)의 클로닝을 촉진하기 위해 다수의 제한효소 소화부위를 가질 수 있다. 재조합 바이러스의 분비, 확인, 적절한 삽입, 양성 선택 및/또는 재조합 단백질의 정제를 용이하게 하기 위해, 추가의 서열, 예를 들어, 시그널 펩티드들 및/또는 표지 코딩 서열들(예컨대 His-표지, MAT-표지, FLAG 표지), 엔테로키나제 인식 서열, 꿀벌 멜리틴 분비 시그널, 베타-갈락토시다제, MCS의 글루타치온 S-전달라제(GST) 표지 업스트림이 포함될 수 있다.

[0234] 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 본원에 개시된 N-말단 시그널 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 시그널 서열은 본원에 개시된 상보적 친화성 분자의 N-말단에 부착된다.

[0235] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 융합 폴리펩티드는 스페이서 펩티드, 예를 들어, 상보적 친화성 분자로부터 항원을 분리하는 14-잔기 스페이서(GSPGISGGGGGILE)(서열번호 41)를 갖는다. 그러한 짧은 스페이서의 코딩 서열은 프라이머들의 상보적 쌍을 어닐링함으로써 구성될 수 있다. 당업자는 선택된 스페이서를 코딩할 올리고뉴클레오티드를 설계 및 합성할 수 있다. 스페이서 펩티드는 일반적으로 비극성 아미노산 잔기, 예컨대 글리신 및 프롤린을 가져야 한다.

[0236] 예를 들면, 부위특이적 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발 같은 당업자에 알려진 표준 기술을 사용하여, 본원에 기술된 융합 폴리펩티드의 항원 폴리펩티드 서열에, 예를 들면, 본원에 기술된 융합 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 내의 항원에, 아미노산 치환을 생성하기 위해 돌연변이를 도입할 수 있다. 바람직하게는, 변이형 융합 폴리펩티드는 본원에 기술된 융합 폴리펩티드에 대하여 50개 미만의 아미노산 치환, 40개 미만의 아미노산 치환, 30개 미만의 아미노산 치환, 25개 미만의 아미노산 치환, 20개 미만의 아미노산 치환, 15개 미만의 아미노산 치환, 10개 미만의 아미노산 치환, 5개 미만의 아미노산 치환, 4개 미만의 아미노산 치환, 3개 미만의 아미노산 치환, 또는 2개 미만의 아미노산 치환(일체를 포함)을 갖는다.

[0237] 또한 어떤 잠재성(silent) 또는 중성(neutral) 미스센스 돌연변이가 코딩된 아미노산 서열 또는 막관통 전달을 촉진하는 능력을 변화시키지 않는 DNA 코딩 서열 내에 만들어질 수도 있다. 이러한 유형의 돌연변이들은 코돈 사용법을 최적화하거나 재조합 단백질의 발현 및 생산에 유용하다.

[0238] 벡터 내의 융합 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 특정 부위특이적 돌연변이유발은 특정 아미노산 돌연변이와 치환의 생성에 사용될 수 있다. 부위특이적 돌연변이유 발은 예를 들면 제조자의 지시에 따라 QUICKCHANGE® 부위

특이적 돌연변이유발 키트(Stratagene)를 사용하여 행할 수 있다.

[0239] 일 실시형태에서, 세균, 포유류, 곤충, 효모, 또는 식물 세포에서 선택되는 숙주 세포를 사용한 단백질 발현 시스템으로부터 제조된 재조합 폴리펩티드의 발현과 정제를 위한, 본원에 기술된 폴리펩티드에 대한 코딩 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터가 본원에 기술된다. 상기 발현 벡터는 그것의 각 숙주 세포에서의 효율적인 유전자 전사 및 번역을 위해 예컨대 프로모터 서열들, 리보소옴 인식 및 TATA 박스, 및 3'UTR AAUAAA 전사 종결 서열 같은 필요한 5'업스트림 및 3'다운스트림 조절 요소들(regulatory elements)을 가져야 한다. 상기 발현 벡터는, 바람직하게는, CMV(사이토메갈로바이러스) 프로모터, RSV(루 사코마 바이러스) 프로모터, β-액틴 프로모터, SV40(시미안 바이러스 40) 프로모터 및 근육 크레아틴 키나제 프로모터로 이루어지는 군에서 선택되는 전사 프로모터와, SV40 폴리(A) 및 BGH 터미네이터로 이루어지는 군에서 선택되는 전사 터미네이터를 갖는 벡터; 더 바람직하게는, 사이토메갈로바이러스의 초기 프로모터/인핸서 서열과 아데노바이러스 삼부 리더(tripartite leader)/인트론 서열을 갖고 SV40의 복제원점 및 폴리(A) 서열을 함유하는 발현 벡터이다. 상기 발현 벡터는 발현된 융합 폴리펩티드에 도입될 수 있는 추가의 코딩 영역들, 예를 들면, 6X-히스티딘, V5, 티오레독신, 글루타치온-S-전달라제, c-Myc, VSVG, HSV, FLAG, 말토스 결합 펩티드, 금속-결합 펩티드, HA 및 "분비" 시그널(꿀벌 멜리틴, α-인자, PHO, Bip)을 코딩하는 영역을 가질 수 있다. 이에 더해, 그것들이 필요치 않다면 그것들의 효소적 제거를 촉진하기 위해 이들 코딩 영역 뒤에 도입된 효소 소화 부위들이 있을 수 있다. 이들 추가의 핵산들은 융합 폴리펩티드 발현의 검출, 친화성 크로마토그래피에 의한 단백질 정제, 숙주 세포질에서 재조합 단백질의 증가된 가용성, 및/또는 발현된 융합 폴리펩티드를 배지 또는 효모 세포의 스페로플라스트(spheroplast)로 분비해 내보내는 것에 유용하다. 융합 폴리펩티드의 발현은 숙주 세포에서 본질적이거나(constitutive) 또는 예를 들면 구리 설페이트, 당(예컨대 갈락토스), 메탄올, 메틸아민, 티아민, 테트라사이클린, 바큘로바이러스 감염, 및 (이소프로필-베타-D-티오갈락토피라노시드) IPTG, 락토스의 안정한 합성 유사체에 의해 유도될 수도 있다.

[0240] 다른 실시형태에서, 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 그 중에서도 바이러스 벡터, 예컨대 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 레트로바이러스, 및 렌티바이러스 벡터이다. 재조합 바이러스는 유전자 발현 연구 및 치료적 응용을 위한 다용도의 시스템을 제공한다.

[0241] 일부 실시형태에서, 본원에는 포유류 세포의 바이러스 감염으로부터 발현되는 융합 폴리펩티드가 개시된다. 그 바이러스 벡터는, 예를 들면, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 레트로바이러스, 및 렌티바이러스일 수 있다. 재조합 아데노바이러스를 생성하기 위한 단순화된 시스템은 He et al., 95 PNAS 2509(1998)에 제시되어 있다. 관심 대상의 유전자는 우선 셔틀 벡터(예: pAdTrack-CMV) 내로 클로닝된다. 얻어지는 플라스미드는 제한 효소 PmeI에 의해 소화함으로써 선형화되며, 이어서 아데노바이러스 골격 플라스미드(예: Stratagene의 ADEASY™ 아데노바이러스 벡터 시스템의 pADEASY-1)와 함께 대장균 BJ5183 세포내로 함께 형질전환된다. 재조합 아데노바이러스 벡터는 카나마이신 저항성에 대해 선택되고, 제한 효소 분석에 의해 재조합이 확인된다. 최종적으로, 선형화된 재조합 플라스미드는 아데노바이러스 패키징 세포주, 예를 들면 HEK 293 세포(E1-형질전환 인간 배아 신장세포) 또는 911(E1-형질전환 인간 배아 망막 세포) 내로 트랜스펙션된다. Fallaux, et al. 7 Human Gene Ther. 215 (1996). 재조합 아데노바이러스는 HEK 293 세포 내에서 생성된다.

[0242] 재조합 렌티바이러스는 분열 및 비분열 포유류 세포에서의 융합 폴리펩티드의 전달 및 발현의 이점을 갖는다. HIV-1계 렌티바이러스는 몰로니(Moloney) 백혈병 바이러스(MoMLV)-기반 레트로바이러스 시스템보다 더 넓은 숙주 범위를 효과적으로 형질도입한다. 재조합 렌티바이러스의 제조는 예를 들면, VIRAPOWER™ 렌티바이러스 발현 시스템(Invitrogen, Inc.)과 함께 pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ 또는 pLenti 벡터를 사용하여 달성될 수 있다.

[0243] 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터는 많은 상이한 인간 및 비인간 세포주 또는 조직들을 포함하는 광범위한 숙주 세포에 적용 가능하다. rAAV는 광범위한 세포 유형들을 형질 도입할 수 있으며 형질 도입은 활성 숙주 세포 분열에 비의존적이다. $>10^8$ 바이러스입자/ml의 고역가가 상청액에서 용이하게 얻어지며 추가 농축에 의해 10^{11}-10^{12}바이러스입자/ml가 얻어진다. 전이유전자가 숙주 게놈으로 통합되며 따라서 발현이 장기간이고 안정하다.

[0244] AAV 벡터의 대규모 제조는, 패키징 세포주에 3 플라스미드를(하위융합성의(subconfluent) 293 세포의 50 x 150 mm 플레이트에 코딩 핵산을 지니는 AAV 벡터, AAV rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV RC 벡터, 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드 pDF6를) 공 트랜스펙션(co-transfection)하여 행하여질 수 있다. 트랜스펙션 3일후 세포를

거두어들이고 3사이클의 동결 해동 또는 음파처리(sonication)에 의해 바이러스들이 방출된다.

[0245] AAV 벡터는 그 벡터의 혈청형에 따라 두가지 다른 방법으로 정제될 수 있다. AAV2 벡터는 그 헤파린 친화성에 기초하여 1단계 중력류 칼럼 정제 방법에 의해 정제된다. Auricchio et. al., 12 Human Gene Ther. 71 (2001); Summerford & Samulski, 72 J. Virol. 1438 (1998); Summerford & Samulski, 5 Nat. Med. 587 (1999). AAV2/1 및 AAV2/5 벡터는 현재 3회의 순차적 CsCl 구배에 의해 정제된다.

[0246] 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 단백질이 세균 세포를 포함하는 세포에 의해 발현될 때, 상기 단백질은 그 세포의 특정 부분을 표적으로 하거나 그 세포로부터 분비된다. 따라서, 단백질 조준(protein targeting) 또는 단백질 선별은 세포가 단백질들을 세포의 적합한 위치 또는 세포 외부로 수송하는 기구(mechanism)이다. 선별 표적은 세포소기관(organelle)의 내부 공간, 몇개의 내부 막들 중 어느 것, 셀의 외부 막, 또는 분비를 통한 그 외부일 수 있다. 이 전달 과정은 단백질 그 자체에 함유된 정보에 기해 행하여진다. 정확한 선별은 세포에 극히 중요하며 실수는 질환으로 이어질 수 있다.

[0247] 일부 예외는 있지만, 세균은 진핵생물에서 발견되는 막결합 세포소기관들이 없으나, 단백질들을 다양한 유형의 봉입체 예컨대 기체 소낭(gas vesicle) 및 저장 과립(storage granule)으로 조립할 수 있다. 또한, 세균의 종에 따라, 세균은 단일의 원형질막(그램 양성 세균), 또는 내부(플라스마) 막 및 외부 세포벽 막의 양쪽을, 주변 세포질이라고 불리우는 둘 사이의 수분함유공간과 함께 가질 수 있다(그램 음성 세균). 단백질은 외막이 있느냐에 따라 환경으로 분비될 수 있다. 원형질막에서의 기본 메커니즘은 진핵생물 단백질에 유사하다. 이에 더해, 세균은 단백질을 외막으로 또는 외막을 가로질러 조준할 수 있다. 세균 외막을 가로질러 단백질을 분비하는 시스템은 상당히 복잡할 수 있으며 발병에 핵심적인 역할을 한다. 이들 시스템은 I형 분비, II형 분비 등으로 기술될 수 있다.

[0248] 대부분의 그램 양성 세균에서, 어떤 단백질들은 원형질막을 가로지르는 외수송 및 이어지는 세균 세포벽에의 공유 부착을 표적으로 한다. 특수화한 효소인 소타아제(sortase)는 상기 단백질 C-말단 근처의 특징적 인식 부위, 예컨대 LPXTG 모티프(서열번호 42)(여기서 X는 임의의 아미노산일 수 있음)에서 표적 단백질을 절단하고, 상기 단백질을 세포벽으로 전달한다. 소타아제/LPXTG에 유사한, 모티프 PEP-CTERM(서열번호 43)를 갖는, 엑소소타아제/PEP-CTERM라고 명명된 시스템이 광범위한 그램 음성 세균 내에 존재한다고 제안되었다.

[0249] 적절한 N-말단 표적 시그널을 갖는 단백질들은 세포질에서 합성된 후 특이적 단백질 수송 경로를 향한다. 세포질막을 가로지른 이행의 동안, 또는 그 이행의 직후, 상기 단백질은 프로세싱되고 그 활성형으로 접힌다. 그리고나서 이행된 단백질은 그 세포의 주변세포질측에 보유되거나 또는 환경으로 방출된다. 단백질을 막으로 조준하는 시그널 펩티드는 수송 경로 특이성의 핵심 결정요소이므로, 이들 시그널 펩티드는 그것들이 단백질을 향하게 하는 수송 경로에 따라 분류된다. 시그널 펩티드 분류는 그 시그널 펩티드의 제거를 책임지는 시그널 펩티다제(SPase)의 유형에 기초한다. 외수송된 단백질의 대다수는 일반적 분비(Sec) 경로를 통해 세포질로부터 외수송된다. 그램 양성 병원체에 의해 분비되는 대부분의 잘 알려진 독성(virulence) 인자들(예: 황색포도구균의 외독소, 탄저균의 방어 항원, 단구성 리스테리아균의 리스테리오리신(lysteriolysin) O)은 그들을 상기 Sec-경로로 이끌 전형적인 N-말단 시그널 펩티드를 갖는다. 이 경로를 통해 분비되는 단백질들은 접히지 않은 상태로 세포질막을 가로질러 이행된다. 이들 단백질의 이어지는 후속의 프로세싱 및 접힘은 그 막의 트랜스 측의 세포벽 환경에서 일어난다. Sec 시스템에 더하여, 일부 그램 양성 세균은 막을 가로질러 접힌 단백질을 이행시킬 수 있는 Tat-시스템도 함유한다. 병원성 세균은 소수의 단백질들의 수송에만 특이적으로 관련되는 어떤 특이적 목적의 외수송 시스템들을 함유할 수 있다. 예를 들면 수개의 유전자 클러스터가 항산균에서 동정되었으며, 이들은 특이적 경로들(ESAT6)을 통해 환경으로 분비되며 항산균성 발병에 중요한 단백질들을 코딩한다. 특이적 ATP-결합 카세트(ATP-binding cassette)(ABC) 수송자는 박테리오신(bacteriocin)이라고 불리우는 작은 항세균 펩티드의 외수송 및 프로세싱을 지시한다. 세균 용해의 개시에 책임이 있는 엔돌리신에 대한 유전자는 종종 홀린-유사 단백질을 코딩하는 유전자의 근처에 위치하며 이들 홀린(holin)은 세포벽으로의 엔돌리신 외수송(endolysin export)에 책임이 있음을 시사한다. Wooldridge, BACT. SECRETED PROTS: SECRETORY MECHS. & ROLE IN PATHOGEN.(Caister Academic Press, 2009)

[0250] 일부 실시형태에서, 본 발명에 유용한 시그널 서열은 OmpA 시그널 서열이지만, 박테리오파아지로 감염된 세포의 외부로의 항미생물제의 수송 및 분비를 가능하게 하는 당업자에게 일반적으로 알려진 임의의 시그널 서열도 본 발명에의 사용에 포함된다.

[0251] 세균 세포로부터 단백질의 분비를 지시하는 시그널 서열은 예를 들면 국제 공개 제2005/071088호에 개시된 바와 같이 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 표 5에 나타낸 시그널 펩티드의 비제한적 예 중의 일부를 사

용할 수 있으며, 상기 시그널 펩티드는 항미생물제 조작된 박테리오파아지(예: AMP-조작된 박테리오파아지)에 의해 발현되는 항미생물 펩티드(Amp) 또는 항미생물 폴리펩티드의 아미노 말단 또는 카복시 말단에 부착될 수 있다. 부착은, 항미생물제 조작된 박테리오파아지(예: AMP-조작된 박테리오파아지)에 의해 감염된 세균으로부터의 분비를 초래하는, 선택된 항원 또는 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질의 융합 또는 키메라 조성물을 통한 것일 수 있다.

[0252] [표 5]

[0253] 세균 세포의 단백질 또는 펩티드 항원 또는 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질의 분비를 지시하는 시그널 펩티드의 예

분비 경로	시그널 펩티드 아미노산 서열 (NH_2-CO_2)	유전자	속/종
secA1	MKKIMLVITLILVSPIAQQTEAKD (서열번호 44)	Hly(LLO)	단구성 리스테리아균 (*Listeria monocytogenes*)
	MKKKIISAILMSTVILSAAAPLSG VYADT(서열번호 45)	Usp45	락토콕쿠스 락티스 (*Lactococcus lactis*)
	MKKRKVLIPLMALSTILVSSTGN LEVIQAEV(서열번호 46)	Pag(방어 항원)	탄저균 (*Bacillus anthracis*)
secA2	MNMKKATIAATAGIAVTAFAAP TIASAST(서열번호 47)	Iap(침습-관련 단백질 p60)	단구성 리스테리아균 (*Listeria monocytogenes*)
	MQKTRKERILEALQEEKKNKKSK KFKTGATIAGVTAIATSITVPGIEV IVSADE(서열번호 48)	NamA Imo2691(자가용해소)	단구성 리스테리아균 (*Listeria monocytogenes*)
	MKKLKMASCALVAGLMFSGLTP NAFAED(서열번호 49)	*BA_0281(NLP/P60 패밀리)	탄저균 (*Bacillus anthracis*)
	MAKKFNYKLPSMVALTLVGSAV TAHQVQAAE(서열번호 50)	* atl(자가용해소)	황색포도구균 (*Staphylococcus aureus*)
Tat	MTDKKSENQTEKTETKENKGM TRREMLKLSAVAGTGIAVGATGL GTILNVVDQVDKALT(서열번호 51)	Imo0367	단구성 리스테리아균 (*Listeria monocytogenes*)
	MAYDSRFDEWVQKLKEESFQN NTFDRRKFIQGAGKIAGLGLGLTI AQSVGAFG(서열번호 52)	PhoD(알칼린 포스파타제)	고초균 (*Bacillus subtillis*)

[0254]

[0255] 본원에 기술된 폴리펩티드, 예를 들어, 항원 또는 항원-상보적 친화성 분자 융합 단백질은 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의해 발현 및 정제될 수 있으며, 예를 들면, 본원에 기술된 융합 폴리펩티드는 임의의 적절한 발현 시스템으로부터 정제될 수 있다. 융합 폴리펩티드는, 당 기술분야에 잘 알려져 있는, 암모늄 설페이트 같은 물질에 의한 선택적 침전; 칼럼 크로마토그래피, 면역 정제법 및 기타를 포함하는 표준 기술에 의해 실질적으로 순수하게 정제될 수 있다. 참조, 예를 들어, Scopes, PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES & PRACTICE(1982); 미국 특허 제4,673,641호.

[0256] 재조합 단백질의 정제시에는 많은 과정들이 채용될 수 있다. 예를 들면 확립된 분자 부착 특성을 갖는 단백질이 선택된 단백질에 가역적으로 융합될 수 있다. 적절한 리간드에 의해, 상기 단백질은 정제 칼럼에 선택적으

로 흡착되고 그리고나서 상대적으로 순수한 형태로 상기 칼럼으로부터 유리될 수 있다. 그리고나서 상기 융합된 단백질은 효소 작용에 의해 제거된다. 최종적으로, 상기 선택된 단백질은 친화성 또는 면역친화 칼럼을 사용하여 정제될 수 있다.

[0257] 상기 단백질이 숙주 세포에서 발현된 후, 그 숙주 세포는 정제를 위해 발현된 단백질을 유리시키기 위해 용해될 수 있다. 다양한 숙주 세포의 용해 방법은 "Sample Preparation-Tools for Protein Research" EMD Bioscience와 Current Protocols in Protein Sciences(CPPS)에 소개되어 있다. 정제 방법의 예는 친화성 크로마토그래피 예컨대 히스티딘-표지된 융합 폴리펩티드에 대한 니켈, 코발트, 또는 아연 친화성 수지를 사용한 금속-이온 친화성 크로마토그래피이다. 히스티딘-표지된 재조합 단백질을 정제하는 방법은 Clontech에 의해 그들의 TALON® 코발트 수지를 사용하여 그리고 NOVAGEN®에 의해 그들의 pET 시스템 매뉴얼, 제10판에 기술되어 있다. 다른 바람직한 정제 전략은 면역-친화성 크로마토그래피이며, 예를 들면, 항-myc 항체 접합 수지가 myc-표지된 융합 폴리펩티드를 친화성 정제하는데 사용될 수 있다. 적절한 프로테아제 인식 서열들이 존재할 때, 융합 폴리펩티드는 상기 히스티딘 또는 myc 표지로부터 절단되어, 히스티딘-표지들과 myc-표지들이 친화성 부지에 부착해 있는 채로 그 친화성 수지로부터 그 융합 폴리펩티드를 방출할 수 있다.

[0258] 재조합 및 천연 발생 단백질을 정제하는 표준 단백질 분리 기술은 당 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면, 용해도 분별, 크기 배제 젤 여과, 및 다양한 칼럼 크로마토그래피이다.

[0259] 용해도 분별(Solubility fractionation): 종종 초기 단계로서, 특히 상기 단백질 혼합물이 복합체인 경우, 초기 염 분별에 의해 관심 대상의 단백질로부터 많은 원하지 않은 숙주 세포 단백질들을(또는 세포 배지로부터 유래하는 단백질들을) 분리할 수 있다. 바람직한 염은 암모늄 설페이트이다. 암모늄 설페이트는 상기 단백질 혼합물 중의 물의 양을 효과적으로 감소시킴으로써 단백질들을 침전시킨다. 그리고나서 상기 단백질들은 그 용해도에 기해 침전한다. 단백질이 더 소수성일수록 더 낮은 암모늄 설페이트 농도에서 침전한다. 전형적인 프로토콜(protocol)에는 얻어지는 암모늄 설페이트 농도가 20~30% 사이에 있도록 단백질 용액에 포화 암모늄 설페이트를 첨가하는 것이 포함된다. 이 농도는 대부분의 소수성 단백질을 침전시킬 것이다. 그리고 나서 그 침전물을 버리고(관심 대상의 단백질이 소수성이 아니라면) 그 상청액에 암모늄 설페이트를 관심 대상의 단백질을 침전시키는 것으로 알려진 농도까지 첨가한다. 그리고나서 그 침전물을 완충액에 용해하고 필요하다면 과잉의 염을 투석 또는 정용여과(diafiltration)에 의해 제거한다. 단백질의 용해도에 의존하는 다른 방법, 예컨대 냉 에탄올 침전(cold ethanol precipitation)은 당업자에게 잘 알려져 잇으며 복잡한 단백질 혼합물을 분별하는데 사용될 수 있다.

[0260] 크기 배제 여과(Size exclusion filtration): 선택된 단백질의 분자량을 이용하여, 그 단백질을 상이한 세공 크기의 막들(예를 들면, AMICON® 또는 MILLIPORE® 막들)을 통한 한외여과에 의해 크기가 더 크거나 더 작은 단백질로부터 분리할 수 있다. 제1 단계로서, 단백질 혼합물은 관심 대상의 단백질의 분자량보다 더 낮은 분자량 컷-오프(cut-off)를 갖는 세공 크기의 막을 통해 한외여과된다. 그리고나서 그 한외여과 농축물을 관심 대상의 단백질의 분자량보다 더 큰 분자량 커-오프를 갖는 막에 대해 한외여과한다. 재조합 단백질은 그 막을 통과해 여과액으로 갈 것이다. 그리고나서 상기 여과액에 대해서는 후술하는 바와 같이 크로마토그래피를 행할 수 있다.

[0261] 칼럼 크로마토그래피(Column chromatography): 선택된 단백질은 그 크기, 순 표면 전하, 소수성, 및 리간드에 대한 친화성에 기해 다른 단백질들로부터 분리될 수 있다. 이에 더하여, 재조합 또는 천연 발생 단백질들에 대하여 항체를 칼럼 매트리스에 접합하여 상기 단백질을 면역 정제할 수 있다. 이들 방법 모두는 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 크로마토그래피 기술이 많은 다른 제조자들(예: Pharmacia Biotech)로부터의 설비를 사용하여 임의의 규모로 수행될 수 있음은 당업자에게 명백하다. 예를 들면, 항원 폴리펩티드는 PA63 7량체 친화성 칼럼을 사용하여 정제될 수 있다. Singh et al., 269, J. Biol. Chem. 29039(1994).

[0262] 일부 실시형태에서, 정제 단계들의 조합, 예를 들면 (a) 이온 교환 크로마토그래피, (b) 히드록시아파타이트 크로마토그래피,(c) 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 및 (d) 크기 배제 크로마토그래피가 본원에 기술된 융합 폴리펩티드에 사용될 수 있다.

[0263] 무세포 발현 시스템도 고려할 수 있다. 무세포 발현 시스템은 전통적 세포-기반 발현 방법보다, 단백질 접힘을 돕기 위한 반응 조건의 용이한 변경, 생산물 독성에 대한 감소된 민감성, 및 감소된 반응 용적과 처리 시간에 기인한 빠른 발현 스크리닝 또는 대량의 단백질 생산과 같은 고처리용량 전략에 대한 적합성을 포함하는 몇가지 면에서 유리하다. 무세포 발현 시스템은 플라스미드 또는 선형 DNA를 사용할 수 있다. 게다가, 번역 효율의

향상은 반응 혼합물의 1밀리리터당 1밀리그램의 단백질을 초과하는 수율로 귀결된다. 시판의 무세포 발현 시스템에는 토끼 망상적혈구-기반 생체외 시스템을 사용하는 TNT 결합 망상적혈구 용해물 시스템(TNT coupled reticulocyte lysate Systems) (Promega)이 포함된다.

[0264]

[0265] 면역조성물의 제제와 사용 방법

[0266] 본 발명의 특정 실시형태는 동물에서 면역 반응을 끌어내는 본원에 개시된 면역성 조성물의 사용을 제공한다. 더 구체적으로, 상기 조성물은 체액성 및 세포 면역 둘다를, 그리고 많은 경우에 있어서 점막 면역을 끌어낸다. 본 발명의 실시형태는 특히 폐렴구균에 의한 감염에 대한 적어도 부분적 방어 또는 그 감염 후의 부분적 개선을 제공한다. 폐렴구균은 다수의 질환들, 예컨대 수막염, 폐렴, 균혈증, 및 중이염을 유발한다. 매년 세계적으로 거의 백만의 아동이 폐렴구균 질환으로 사망한다. 폐렴연쇄구균(*Streptococcus pneumoniae*)은 대대적으로 연구되었으며 그 게놈 서열의 적어도 일부는 서열 결정되었다. 참조, 예를 들어, 미국 특허 제7,141,418호. 피막 폴리사커라이드들에 대한 항체들은 알려진 혈청형들을 정의하고 혈청형 특이적 방어를 부여하지만, 면역의 다른 방어 메커니즘이 기술되었다. 참조 Malleyetal., 88 J. Mol. Med. 135(2010). 이들 다른 방어 메커니즘에는 비피막 항원에 대한 항체와 폐렴 구균 구성 성분들에 대한 T-세포 반응이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다. 단백질-폴리사커라이드 콘쥬게이트 백신의 응용인 PCV7는 질환을 상당히 감소시켰다. Black et al., 24(S2) Vaccine 79(2006); Hansen et al., 25 Pediatr. Infect. Dis. J. 779(2006)). 그러나, 최근의 연구는 PCV7에 다른 혈청형들이 결여되어 있는 결과, 대체의 폐렴구균 혈청형이 부상하였음을 밝혀냈다. Pichichero & Casey, 26(S10) Pediatr. Infect. Dis. J. S12(2007).

[0267] 종의 모든 혈청형들에 공통인 어떤 폐렴구균 항원들, 예를 들어, 표면 단백질 PspA, PspC, PsaA 및 세포독소 폐렴구균 용혈소 또는 뉴몰리소이드(pneumolysoid) 돌연변이들은 피막화에도 불구하고 면역방어 능력을 갖는 것으로 밝혀졌으며(Basset et al., 75 Infect. Immun. 5460(2007); Briles et al., 18 Vaccine 1707(2000)); 게놈 및 돌연변이 라이브러리의 사용에 의해 수십개의 추가의 종 공통 단백질이 동정되었다(Hava & Camilli, 45 Mol. Microbiol. 1389(2002); Wizemann et al., 60 Infect. Immun. 1593(2001)). 동물 모델들에서 개별 항원들에 의해 면역력이 유도되었으나(Alexander et al., 62 Infect. Immun. 5683(1994); Balachandran et al., 70 Infect. Immun. 2526(2002); Chung et al., 170 J. Immunol. 1958(2003); Glover et al., 76 Infect. Immun. 2767(2008); Wu et al., 175 J. Infect. Dis. 839(1997)), 그러나 지금까지 인간에 대한 사용에 대해 승인된 공통 항원에 기초한 백신은 없었다.

[0268] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여될 때 폴리머에 부착한 1개 이상의 항원들에 대한 면역 반응을 끌어내기 위한 용도의 적어도 1종의 폴리머 스캐폴드(예: 폴리사커라이드 또는 탄수화물 폴리머)에 부착된 적어도 하나의 또는 다항원들을 포함하는 면역성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 포유류의 백신접종 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 상기 면역 반응은 체액성 및/또는 세포 면역 반응이다.

[0269] 따라서, 본 발명의 일 태양은, 적어도 1종의 폴리머(예: 폴리사커라이드); 적어도 하나의 항원; 및 (i) 상기 폴리머(예: 폴리사커라이드)와 결합하는 제1 친화성 분자, 및 (ii) 상기 폴리머(예: 폴리사커라이드)에 상기 항원을 부착시키는, 상기 항원과 결합하는 상보적 친화성 분자(예: 상기 제1 친화성 분자는 상기 상보적 친화성 분자와 결합하여 상기 폴리머(예: 폴리사커라이드)에 상기 항원을 연결함), 를 포함하는 적어도 하나의 상보적 친화성-분자 쌍; 을 포함하는 면역성 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 끌어내는 방법에 관한 것이다.

[0270] 따라서, 본 발명의 일 태양은 동시에 다수의 항원들에 대한 체액성 및/또는 세포 면역을 끌어내는, 예로서 상기 대상체에게 투여되는 면역성 조성물은 적어도 1개, 또는 적어도 2개, 또는 그 이상의, 예를 들어, 다수의 동일 또는 상이한 항원들을 포함하는 중합체를 포함하는, 방법에 관한 것이다.

[0271] 본 발명의 일 태양은 1 이상의 병원체들에서 유래되는 적어도 하나의 항원을 포함하는 본원에 개시된 면역 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 병원체에 대해 대상체, 예를 들어 조류 또는 포유류, 예를 들어 인간을 면역부여 또는 백신접종하는 방법에 관한 것이다. 해당하는 상이한 항원들이 상기 면역성 조성물의 폴리머에 부착되는 일부 실시형태에서, 대상체는 동시에 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 2, 또는 적어도 3, 또는 적어도 5, 또는 적어도 10, 또는 적어도 15, 또는 적어도 약 20, 또는 적어도 50, 또는 적어도 약 100, 또는 100 초과의 상이한 병원체들에 대하여 면역 부여될 수 있다.

[0272] 일부 실시형태에서, 대상체에는 수개의 상이한 본원에 개시된 면역성 조성물들이 투여될 수 있으며, 예를 들면,

대상체에게는 하나의 항원, 또는 복수의 항원들(예: 항원 A, B, C, 및 D 등)과 함께 폴리머를 포함하는 조성물이 투여될 수 있으며 또한 상이한 항원, 또는 다른 세트의 항원들(예: 항원 W, X, Y, 및 Z 등)과 함께 폴리머를 포함하는 조성물도 투여될 수 있다. 대안적으로, 대상체에게는 하나의 항원, 또는 복수의 항원들(예: 항원 A, B, C, 및 D, 등)과 함께 폴리머 A를 포함하는 조성물이 투여될 수 있으며 또한 동일한(예: 항원 A, B, C, 및 D 등) 또는 상이한 세트의 항원들을 포함하는 폴리머 B를 포함하는 조성물이 투여될 수 있다. 본 발명은 요망되는 만큼의 많은 항원들에 의한, 예를 들어 100 개 이상의 많은 항원들에 의한 면역부여를 가능하게 하는, 본원에 개시된 다양한 상이한 면역성 복합체들에 의해, 대상체를 면역 부여하는 방법을 제공할 것으로 생각된다.

[0273] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 면역성 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 본원에 기술된 면역성 조성물은 조류, 포유류, 또는 인간에의 투여를 위해, 또는 백신으로 제제된다. 적절한 제제는 예를 들면, Remington'S Pharmaceutical Sciences(2006), 또는 Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms(4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1985)에서 찾을 수 있다.

[0274] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 면역성 조성물은 본질적으로 비독성이고 비치료적인 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 그러한 담체의 예에는 이온교환체, 알루미나, 스테아르산 알루미늄, 레시틴, 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 완충액 물질 예컨대 인산염, 글리신, 소르브산, 소르브산 포타슘, 포화 채소 지방산의 부분적 글리세라이드 혼합물, 물, 염, 또는 전해질 예컨대 프로타민 설페이트, 인산수소 이나트륨, 인산수소 포타슘, 소듐 클로라이드, 아연염, 콜로이달 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스계 물질, 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다. 모든 투여를 위해, 통상의 디포 제제(depot forms)가 적절히 사용된다. 그러한 제제에는 예를 들면, 마이크로캡슐, 나노-캡슐, 리포좀, 플래스터, 흡입제제, 코 스프레이, 설하정, 및 서방성 제제가 포함된다. 서방성 조성물의 예에 대해 미국 특허 제3,773,919호, 제3,887,699호, EP58,481A, EP158,277A, 캐나다 특허 제1176565호; Sidmanetal., 22 Biopolymers 547(1983); Langer et al., 12 Chem. Tech. 98(1982)를 참조할 수 있다. 상기 단백질은 통상환자마다 적용마다 약 0.1 mg/ml 내지 100 mg/ml의 농도로 제제될 것이다.

[0275] 일 실시형태에서, 항산화제(예: 아스코르브산); 저분자량(10개 미만의 잔기들) 폴리펩티드(예: 폴리아르기닌 또는 트리펩티드); 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루탐산, 아스파르트산, 또는 아르기닌; 모노사커라이드, 디사커라이드, 및 셀룰로스 또는 그 유도체, 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제 예컨대 EDTA; 및 당 알코올 예컨대 만니톨 또는 소르비톨를 포함하는 다른 성분이 백신 제제에 첨가될 수 있다.

[0276] 일부 실시형태에서, 본 MAPS 면역성 조성물은 적어도 하나의 보강제와 함께 투여된다. 보강제들은 동시에 투여되는 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 물질들의 불균질한 그룹(heterogeneous group)이다. 일부 경우에서, 보강제들은 면역 반응을 향상시켜 더 적은 백신이 필요하도록 한다. 보강제들은 항원 -특이적 방어 면역 반응을 자극하는 물질- 을 면역시스템과 접촉시키고 생산되는 면역의 유형, 뿐만 아니라 면역 반응의 질(크기 또는 지속시간)에 영향을 미친다. 보강제들은 어떤 항원들의 독성을 감소시키고 일부 백신 성분들에게 용해도를 제공한다. 오늘날 항원에 대한 면역 반응의 증진을 위해 사용되는 거의 모든 보강제들은 입자상이거나 또는 항원과 함께 입자를 형성한다. VACCINE DESIGN - SUBUNIT & ADJUVANT APPROACH (Powell & Newman, Eds., Plenum Press, 1995)라는 책에는 많은 알려진 보강제들이 그것들의 면역학적 활성 및 화학적 특성에 관하여 기술되어 있다. 입자를 형성하지 않는 유형의 보강제는 면역 시그널 물질로 작용하며 정상 조건 하에서 입자상 보강제 시스템의 투여 후에 면역 활성화의 결과로 면역 시스템에 의해 형성되는 물질로 구성되는 물질들의 그룹이다.

[0277] 면역성 조성물 및 백신을 위한 보강제는 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 예에는 모노글리세라이드 및 지방산(예: 모노-올레인, 올레산, 및 대두유의 혼합물); 미네랄 염들, 예를 들어, 수산화알루미늄 및 인산 알루미늄 또는 인산 칼슘 젤; 오일 에멀젼 및 계면활성제계 제제, 예를 들어, MF59(마이크로유동 디터전트 안정화 수중유 에멀젼), QS21(정제 사포닌), AS02 [SBAS2](수중유 에멀젼 + MPL + QS21), MPL-SE, Montanide ISA-51 및 ISA-720(안정화 유중수 에멀젼); 입자상 보강제들, 예를 들어, 비로좀(virosome)(인플루엔자 혈구응집소(haemagglutinin)를 도입하는 단층 리포좀 운반체), AS04([SBAS4] MPL과의 Al염), ISCOMS(사포닌 및 지질의 구조화 복합체), 폴리락티드 co-글리코라이드(PLG); 미생물 유도체(천연 및 합성), 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A(MPL), Detox(MPL + 마이코박테리움 플레이(M. Phlei) 세포벽 골격), AGP [RC-529](합성 아실화 모노사커라이드), DetoxPC, DC_Chol(리포좀으로 자기조직화할 수 있는 지질 면역부활제(lipoidal immunostimulator), OM-174(지질 A 유도체), CpG 모티프(면역자극 CpG 모티프를 함유하는 합성 올리고뉴클레오티드), 또는 다른 DNA 구조, 변형 LT 및 CT(비독성 보강제 효과를 제공하기 위해 유전적으로 변형된 세균 독소); 내생의 인간 면역조절자, 예를 들어, hGM-CSF 또는 hIL-12(단백질 또는 코딩된 플라스미드 중 어느 것으로서 투여될 수 있는 시토킨

들), 이뮤댑틴(Immudaptin)(C3d 종렬 정렬(tandem array)), MoGMCSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, 테라미드(TERamide), PSC97B, Adjumer, PG026, GSKI, GcMAF, B-알레틴(B-alethine), MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, 베타펙틴, Alum, 및 MF59 및 불활성 운반체, 예컨대 금 입자가 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다. 추가의 보강제들이 당 기술분야에 알려져 있다. 참조, 예를 들어, 미국 특허 제6,890,540호; 미국 특허공개 제2005; 0244420; PCT/SE97/01003.

[0278] 일부 실시형태에서 보강제는 입자성 물질이며 느리게 생분해하는 특징을 갖는다. 보강제가 독성 대사산물을 형성하지 않도록 주의하여야 한다. 바람직하게는 일부 실시형태에서 그러한 보강제들은 기질(matrice)일 수 있으며 주로 신체로부터 기원하는 물질들이 사용된다. 이들에는 젖산 폴리머, 폴리-아미노산(단백질), 탄수화물, 지질 및 저독성의 생체적합성 폴리머가 포함된다. 신체로부터 유래하는 이들 물질의 그룹의 조합 또는 신체로부터 유래하는 물질들과 생체적합성 폴리머들의 조합도 사용될 수 있다. 지질들은 그들을 생분해성으로 만드는 구조를 나타낼 뿐만 아니라 그들이 모든 생물 막에서 결정적인 요소라는 사실 때문에 선호되는 물질이다.

[0279] 일 실시형태에서, 투여를 위한 본원에 기술된 면역성 조성물은 대상체에 투여하기 위해 멸균되어야 한다. 멸균은 멸균 여과막(예: 0.2 마이크론 막)을 통한 여과, 또는 감마선 조사에 의해 용이하게 달성된다.

[0280] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 면역성 조성물은 생체적합성 오일, 생리식염수용액, 보존제, 탄수화물, 단백질, 아미노산, 삼투압 조절제, 담체 가스, pH-조절제, 유기 용매, 소수성 물질, 효소 저해제, 수분 흡수 폴리머, 계면활성제, 흡수촉진제 및 항-산화제를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는 의약품 부형제를 더 포함한다. 탄수화물의 대표예에는 가용성 당, 예컨대 하이드로프로필 셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 소듐 카복실 셀룰로스, 히알루론산, 키토산, 알기네이트, 글루코스, 자일로스, 갈락토스, 프룩토스, 말토스, 사커로스, 덱스트란, 콘드로이틴 설페이트, 등이 포함된다. 단백질의 대표예에는 알부민, 젤라틴, 등이 포함된다. 아미노산의 대표예에는 글리신, 알라닌, 글루탐산, 아르기닌, 리신, 및 그들의 염이 포함된다. 그러한 의약품 부형제는 당 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0281] 일부 실시형태에서, 면역성 MAPS 조성물은 예로서, 감마-인터페론, 시토킨, 화학요법제, 또는 항-염증제, 또는 항바이러스제를 포함하는 다른 치료 성분과 조합하여 투여된다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 면역성 조성물은 본원에 개시된 1 이상의 공 자극 분자들 및/또는 보강제들과 함께 투여될 수 있다.

[0282] 일부 실시형태에서, 면역성 조성물은 순수한 또는 실질적으로 순수한 형태로 투여되지만, 의약 조성물, 제제(formulation) 또는 프리페어레이션(preparation)으로 투여될 수도 있다. 그러한 제제는 1 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및 임의로 다른 치료 성분과 함께 본원에 기술된 MAPS를 포함한다. 다른 치료 성분에는 항원 제시를 증진하는 화합물, 예를 들어, 감마 인터페론, 시토킨, 화학요법제, 또는 항염증제가 포함된다. 제제는 단위 투여 제형으로 편리하게 제공될 수 있으며 약학 분야에 잘 알려져 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, Plotkin and Mortimer, VACCINES(2nd ed., W. B. Saunders Co., 1994)는 특정 병원체에 특이적인 면역 반응을 유도하기 위한 동물 또는 인간의 백신접종, 뿐만 아니라 항원의 제조 방법, 항원의 적절한 용량을 결정하는 방법, 및 면역 반응의 유도를 검정하는 방법을 기술한다.

[0283] 정맥내, 근육내, 비강내, 경구, 설하, 질, 직장, 피하, 또는 복강내 투여용으로 적절한 제제는 바람직하게는 수용자의 혈액과 등장인 용액과 함께 활성 성분의 멸균 수용액을 적합하게 포함한다. 그러한 제제는 생리적으로 적합한 물질들 예컨대 소듐 클로라이드(예: 0.1 M~2.0 M), 글리신, 등을 함유하는 물에 고형 활성 성분을 용해하고, 완충 pH를 생리적 조건에 적합화시켜 수용액을 제조하고, 그 용액을 멸균하여 편리하게 제조될 수 있다. 이것들은 1회분 또는 다회분의 용기에 예를 들면 봉입 앰플이나 바이얼로 존재할 수 있다.

[0284] 약학적으로 허용가능한 담체로서 리포좀 현탁액도 사용될 수 있다. 이들은 예를 들면 미국 특허 제4,522,811호에 기술된 바와 같은 당업자에게 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0285] 비강내 전달용의 제제는 미국 특허 제5,427,782호; 제5,843,451호; 제6,398,774호에 기술되어 있다.

[0286] 면역성 조성물의 제제에는 안정제가 도입될 수 있다. 예시적 안정제는 폴리에틸렌 글리콜, 단백질, 사커라이드, 아미노산, 무기산, 및 유기산이며 그들 단독으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 2 이상의 안정제는 적절한 농도 및/또는 pH에서 수용액으로 사용될 수 있다. 그러한 수용액 내의 특이적 삼투압은 일반적으로 0.1~3.0 osmoses의 범위에 있고, 바람직하게는 0.80~1.2 osmoses의 범위에 있다. 수용액의 pH는 pH 5.0~9.0의 범위 내, 바람직하게는 pH6~8의 범위내가 되도록 조정된다.

[0287] 경구 제제가 요망될 때, 면역성 조성물은 전형적인 담체, 그중에서도 예컨대 락토스, 수크로스, 녹말, 탈크 마그네슘 스테아레이트, 결정질 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 글리세린, 소듐 알기네이트 또는

아라비아 고무 와 조합될 수 있다.

[0288] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 면역원 조성물은 정맥내로, 비강내로, 근육내로, 피하로, 복강내로, 설하로, 질, 직장 또는 경구로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여 경로는 경구, 비강내, 피하, 또는 근육내이다. 일부 실시형태에서, 투여 경로는 비강내 투여이다.

[0289] 백신접종은 통상의 방법에 의해 행하여질 수 있다. 예를 들면, 면역성 조성물은 적절한 희석제 예컨대 식염수 또는 물, 또는 완전한 또는 불완전 보강제들 내에 사용할 수 있다. 면역성 조성물은 면역 반응을 끌어내는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 면역성 조성물은 면역 반응이 끌어내어지기까지 1회 또는 주기적 간격으로 투여될 수 있다. 면역 반응은 항체 생산, 세포독성 검정, 증식 검정 및 시토킨 방출 검정을 포함하나 이에 한정되지 않는 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들면, 혈액 샘플은 면역 부여된 포유류로부터 뽑을 수 있고 ELISA(참조 de Boer et. al., 115 Arch Virol. 147(1990))에 의해 면역성 조성물의 항원들에 대한 항체들의 존재에 대하여 분석될 수 있으며 이들 항체의 역가는 당 기술분야의 알려진 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0290] 제제에 채용될 정확한 용량은 투여 경로에 의존하며 개업의의 판단과 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 예를 들면 25 ㎍~900 ㎍의 총단백질 범위를 세달간 매달 투여할 수 있다.

[0291] 최종적으로는, 담당의가 특정 개체에 투여할 면역성 조성물 또는 백신 조성물의 양을 결정할 것이다. 모든 면역성 조성물 또는 백신에 대해, 면역원의 면역학적 유효량은 실험적으로 결정되어야 한다. 고려할 인자들에는 면역성, 면역원이 보강제 또는 담체 단백질 또는 다른 담체와 복합화되거나 또는 보강제 또는 담체 단백질 또는 다른 담체에 공유적으로 부착하는지 여부, 투여 경로 및 투여될 면역 용량의 수치가 포함된다. 그러한 인자들은 백신 분야에 알려져 있고 과도한 실험 없이 그러한 결정을 하는 것은 면역학자의 기술의 범주 내에 있다.

[0292] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 면역성 조성물 또는 백신 조성물은 마우스들에게 투여할 때, 질환 증상을 예방할 항원들을 포함하는 면역성 조성물 5 LD50에 의해 시험된 동물의 적어도 20%에서 질환 증상을 예방하는 면역반응을 끌어낼 수 있다. 면역 부여된 동물을 백신접종 및 시험하는 방법은 당업자에게 알려져 있다. 예를 들면, 본원에 기술된 면역성 조성물 또는 백신 조성물의 10 ㎍ 부분 표본(aliquot)을 100 ㎕ PBS 내에 마련하고 및/또는 프로인트 불완전 보강제(incomplete Freund's adjuvant)의 첨가와 함께 백신접종마다 마우스마다 근육내 주사한다. 대안적으로, 비경구적, 복강내 및 풋패드(footpad) 주사가 사용될 수 있다. 풋패드 주사의 부피는 50 ㎕로 감소된다. 마우스들는 본원에 기술된 면역성 조성물 또는 백신 조성물에 의해 수일(예: 14일) 간격을 갖는 3번의 분리된 때 면역 부여될 수 있다.

[0293] 백신접종의 효능은 병원체에 의한 시험에 의해 시험될 수 있다. 면역성 조성물의 최종 용량의 7일 후, 면역 부여된 마우스들는 항원이 유래한 병원성 유기체에 의해 비강내로 시험되었다. 에테르 마취된 마우스들(10 g ~ 12 g)는 5 LD_{50}의 병원성 유기체를 함유하는 50㎕의 PBS-희석 요막공간액(allantoic fluid)에 의해 비강내로 감염될 수 있다. 방어는 21일의 관찰 기간을 통해 평가되는 동물의 생존 및 체중량을 모니터링함으로써 측정될 수 있다. 심각하게 영향받은 마우스들는 안락사시킨다. A/Mallard/Pennsylvania/10218/84의 1 LD50은 100-1000 조직배양감염량$_{50}$(TCID50) 검정과 같다.

[0294] 다른 실시형태에서, 면역 부여된 마우스들는 다양한 상이한 병원성 유기체들, 예를 들어, 폴리머에 부착한 항원들의 각각이 유래한 상이한 병원성 유기체들에 의해 시험될 수 있다. 면역성 조성물이 폴리머(예: 폴리사커라이드)에 부착된 5개의 상이한 항원들을 포함하는, 각 항원이 5개의 상이한 병원성 유기체들로부터 유래된 예에서, 상기 면역 부여된 마우스들는 5개의 상이한 병원성 유기체의 각각에 의해 순차로(임의의 순서로), 또는 동시에 시험될 수 있다. 당업자는 면역 부여된 마우스들를 시험하는데 사용되는 각 병원성 유기체에 대하여 당 기술분야의 알려진 방법에 의해 LD_{50}를 측정할 수 있다. 참조, 예를 들어, LaBarre & Lowy, 96 J. Virol. Meths. 107(2001); Golub, 59J. Immunol. 7(1948).

[0295]

[0296] 키트

[0297] 본 발명은 또한 연구자가 바람직한 항원들을 갖는 면역성 조성물을 맞춤하는데 유용한, 예를 들어, 항원 또는 항원들의 조합의 면역 반응에 대한 효과를 평가하기 위한 연구 목적에 유용한, 본원에 개시된 면역성 조성물을 생산하기 위한 키트를 제공한다. 그러한 키트는 곧 이용할 수 있는 재료 및 시약으로 제조될 수 있다. 예를

들면, 그러한 키트는 다음의 재료들의 1 이상을 포함할 수 있다: 복수의 제1 친화성 분자에 의해 가교된 폴리머(예: 폴리사커라이드)를 포함하는 용기; 및 상기 제1 친화성 분자와 결합하는 상보적 친화성 분자를 포함하는 용기로서, 상기 상보적 친화성 분자는 항원과 결합한다.

[0298] 다른 실시형태에서, 상기 키트는 폴리머(예: 폴리사커라이드)를 포함하는 용기, 복수의 제1 친화성 분자를 포함하는 용기, 및 상기 폴리머에 상기 제1 친화성 분자를 가교하기 위한 가교제를 포함하는 용기를 포함할 수 있다.

[0299] 일부 실시형태에서, 상기 키트는 상기 항원에 상기 상보적 친화성 분자를 부착하기 위한 수단을 더 포함하며, 상기 수단은 가교제에 의하는 것 또는 어떤 중개자 융합 단백질에 의하는 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 키트는 폴리머에 첨가될 수 있는 적어도 하나의 공자극인자를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 키트는 상기 폴리머에 상기 공인자를 연결하기 위한 가교제, 예를 들면, CDAP(1-시아노-4-디메틸아미노피리디늄 테트라플루오로보레이트), EDC(1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보디이미드 하이드로클로라이드), 소듐 시아노보로하이드라이드; 시아노겐 브로마이드; 암모늄 바이카보네이트/요오드아세트산을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0300] 다양한 키트 및 성분들이 그 키트의 의도된 용도, 특별한 표적 항원 및 사용자의 필요에 따라 본원에 기술된 방법에 사용하기 위해 제조될 수 있다.

[0301] 본 발명은 다음 번호매긴 단락의 실시형태들 중 어느 것에 의해 더 기술될 수 있다.

[0302] 1.FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(서열번호 1)의 아미노산 서열을 포함하는 가용성 비오틴-결합 단백질 및 그것의 임의의 기능성 유도체.

[0303] 2. 단락 1에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 대장균에서 적어도 배지 1 L 당 10 mg의 수준으로 가용형으로 생산되는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0304] 3. 단락 1 또는 2에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 2량체인, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0305] 4. 단락 1-3 중 어느 하나에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 N-말단에 세균 시그널 서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0306] 5. 단락 4에 있어서, 상기 세균 시그널 서열은 MKKIWLALAGLVLAFSASA(서열번호 2)인, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0307] 6. 단락 4 또는 5에 있어서, 상기 시그널 서열은 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-단백질에 연결되어 있는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0308] 7. 단락 6에 있어서, 상기 펩티드 링커는 AQDP(서열번호 8) 또는 VSDP(서열번호 9)의 아미노산 서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0309] 8. 단락 1-7 중 어느 하나에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 C-말단에 정제 표지(purification tag)를 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0310] 9. 단락 8에 있어서, 상기 정제 표지는 히스티딘 표지, c-my 표지, Halo 표지, Flag 표지, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0311] 10. 단락 9에 있어서, 상기 히스티딘 표지는 HHHHHH(서열번호 10)의 아미노산 서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0312] 11. 단락 8-10 중 어느 하나에 있어서, 상기 정제 표지는 펩티드 링커를 통해 상기 비오틴-결합 단백질에 연결되어 있는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0313] 12. 단락 11에 있어서, 상기 펩티드 링커는 VDKLAAALE(서열번호 11) 또는 GGGGSSSVDKLAAALE(서열번호 12)의 아미노산 서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0314] 13. 단락 1-12 중 어느 하나에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH(서열번호 15)의 아미노산

서열을 포함하는, 가용성 비오틴-결합 단백질.

[0315] 14. 단락 1-13 중 어느 하나의 비오틴-결합 단백질을 포함하는 조성물.

[0316] 15. 비오틴-결합 단백질과 단백질 또는 펩티드를 포함하는 융합 단백질.

[0317] 16. 단락 15에 있어서, 상기 단백질 또는 펩티드는 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-결합 단백질에 융합되어 있는, 융합 단백질.

[0318] 17. 단락 15에 있어서, 상기 펩티드 링커는 GGGGSSS(서열번호 22)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0319] 18. 단락 15-17 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질 또는 펩티드는 폐렴구균 항원, 결핵 항원, 탄저병 항원, HIV 항원, 계절성 또는 유행성 플루 항원, 인플루엔자 항원, 백일해 항원, 황색포도구균 항원, 수막염균 항원, 헤모필루스 항원, HPV 항원, 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 항원인, 융합 단백질.

[0320] 19. 단락 15-18 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원은 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형인, 융합 단백질.

[0321] 20. 단락 19에 있어서, 상기 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형은 야생형 황색포도구균 알파-용혈소의 아미노산 잔기 205, 213 또는 209-211에 돌연변이를 포함하는, 융합 단백질.

[0322] 21. 단락 19에 있어서, 상기 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형은 상기 야생형 황색포도구균 알파-용혈소 내에 다음 돌연변이들 중 하나를 포함하는 융합 단백질:

[0323] (i) 잔기 205 W에서 A로;

[0324] (ii) 잔기 213 W에서 A로; 또는

[0325] (iii) 잔기 209-211 DRD에서 AAA로.

[0326] 22. 단락 19에 있어서, 상기 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형은

[0327] (i) W205A

[0328] ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYY
PRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSM
KAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호
23);

[0329] (ii) W213A

[0330] ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYY
PRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSM
KAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호
24);

[0331] (iii) DRD209-211AAA

[0332] ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYY
PRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSM
KAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호
25); 및 그 기능성 변이형, 부분, 및 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0333] 23. 단락 15-22 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질은 N-말단에 세균 시그널 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0334] 24. 단락 23에 있어서, 상기 세균 시그널 서열은 MKKIWLALAGLVLAFSASA(서열번호 2)인, 융합 단백질.

[0335] 25. 단락 23 또는 24에 있어서, 상기 시그널 서열은 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-단백질에 연결되어 있는, 융합 단백질.

[0336] 26. 단락 25에 있어서, 상기 펩티드 링커는 AQDP(서열번호 8) 또는 VSDP(서열번호 9)의 아미노산 서열을 포함

하는, 융합 단백질.

[0337] 27. 단락 15-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질은 C-말단에 정제 표지를 포함하는, 융합 단백질.

[0338] 28. 단락 27에 있어서, 상기 정제 표지는 히스티딘 표지, c-my 표지, Halo 표지, Flag 표지, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 융합 단백질.

[0339] 29. 단락 27에 있어서, 상기 히스티딘 표지는 HHHHHH(서열번호 10)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0340] 30. 단락 27-29 중 어느 하나에 있어서, 상기 정제 표지는 펩티드 링커를 통해 상기 비오틴-결합 단백질에 연결되어 있는, 융합 단백질.

[0341] 31. 단락 30에 있어서, 상기 펩티드 링커는 VDKLAAALE(서열번호 11)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0342] 32. 단락 15-31 중 어느 하나에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 단락 1-13 중 어느 하나의 비오틴-결합 단백질인, 융합 단백질.

[0343] 33. 단락 15-32 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질은

[0344] (i) W205A

[0345] MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENC
NSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVF
YSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVS
IGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQT
NIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHHHHHH(서열번호 26);

[0346] (ii) W213A

[0347] MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENC
NSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVF
YSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVS
IGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQT
NIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHHHHHH(서열번호 27);

[0348] (iii) DRD209-211AA

[0349] MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENC
NSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVF
YSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVS
IGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQT
NIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHHHHHH(서열번호 28)

[0350] 로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0351] 34. 단락 15-33 중 어느 하나의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

[0352] 35. 야생형 황색포도구균 알파-용혈소의 아미노산 잔기 205, 213 또는 209-211에 돌연변이를 포함하는 돌연변이 알파-용혈소(mHla) 단백질이며, 상기 돌연변이 알파-용혈소는 동역가의 야생형 알파-용혈소(Hla)보다 더 낮은 용혈 활성을 갖는 돌연변이 알파-용혈소(mHla) 단백질.

[0353] 36. 단락 35에 있어서, 상기 돌연변이 알파-용혈소의 용혈 활성은 동역가의 야생형 Hla보다 적어도 25% 더 낮은, 돌연변이 알파-용혈소 단백질.

[0354] 37. 단락 35 또는 36에 있어서, 상기 돌연변이 알파-용혈소는 상기 야생형 황색포도구균 알파-용혈소 내에 다음 돌연변이들 중 하나를 포함하는, 돌연변이 알파-용혈소 단백질:

[0355] (i) 잔기 205 W에서 A로;

[0356] (ii) 잔기 213 W에서 A로; 또는

[0357] (iii) 잔기 209-211 DRD에서 AAA로.

[0358] 38. 단락 13-15 중 어느 하나에 있어서, 상기 돌연변이 알파-용혈소는

[0359] (i) W205A

[0360] ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYY
PRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSM
KAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호
23);

[0361] (ii) W213A

[0362] ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYY
PRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSM
KAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호
24);

[0363] (iii) DRD209-211AAA

[0364] ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYY
PRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSM
KAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호
25); 및 그 기능성 변이형, 부분, 및 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 돌연변이 알파-용혈소.

[0365] 39. 단락 35 내지 38 중 어느 하나의 돌연변이 알파-용혈소를 포함하는 조성물.

[0366] 40. 알파-용혈소 및 비오틴-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 상기 융합 단백질은 동역가의 야생형 알파-용혈소(Hla)보다 더 낮은 용혈 활성을 갖는 융합 단백질.

[0367] 41. 단락 18에 있어서, 상기 알파-용혈소는 단락 35-38 중 어느 하나의 돌연변이 용혈소이거나 또는 상기 알파-용혈소는 황색포도구균의 야생형 알파-용혈소의 아미노산 27-319의 아미노산 서열로 구성된, 융합 단백질.

[0368] 42. 단락 19에 있어서, 상기 비오틴-결합 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된, 융합 단백질.

[0369] 43. 단락 40-42 중 어느 하나에 있어서, 상기 비오틴-결합 도메인과 상기 돌연변이 알파-용혈소는 펩티드 링커에 의해 연결되어 있는, 융합 단백질.

[0370] 44. 단락 43에 있어서, 상기 펩티드 링커는 GGGGSSS(서열번호 22)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0371] 45. 단락 40-44 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질은 N-말단에 세균 시그널 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0372] 46. 단락 45에 있어서, 상기 세균 시그널 서열은 MKKIWLALAGLVLAFSASA(서열번호 2)인, 융합 단백질.

[0373] 47. 단락 45 또는 46에 있어서, 상기 시그널 서열은 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-단백질에 연결되어 있는, 융합 단백질.

[0374] 48. 단락 47에 있어서, 상기 펩티드 링커는 AQDP(서열번호 8) 또는 VSDP(서열번호 9)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0375] 49. 단락 40-48 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질은 C-말단에 정제 표지를 포함하는, 융합 단백질.

[0376] 50. 단락 49에 있어서, 상기 정제 표지는 히스티딘 표지, c-my 표지, Halo 표지, Flag 표지, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 융합 단백질.

[0377] 51. 단락 51에 있어서, 상기 히스티딘 표지는 HHHHHH(서열번호 10)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0378] 52. 단락 49-51 중 어느 하나에 있어서, 상기 정제 표지는 펩티드 링커를 통해 상기 비오틴-결합 단백질에 연결되어 있는, 융합 단백질.

[0379] 53. 단락 52에 있어서, 상기 펩티드 링커는 VDKLAAALE(서열번호 11)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0380] 54. 단락 40-53 중 어느 하나에 있어서, 상기 비오틴-결합 도메인은 단락 1-13 중 어느 하나의 비오틴-결합 단

백질인, 융합 단백질.

[0381] 55. 단락 40-54 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 26, 서열번호 27, 및 서열번호 28로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0382] 56. 단락 40-55 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질의 용혈 활성은 동역가의 야생형 Hla보다 적어도 25% 더 낮은, 융합 단백질.

[0383] 57. 단락 40-56 중 어느 하나의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

[0384] 58. 단락 14, 34, 39, 또는 57 기술의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체 내에 면역 반응을 유도하는 방법.

[0385] 59. 단락 14, 34, 39, 또는 57 기술의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 항원을 지닌 병원체(antigen-bearing pathogen)에 대하여 포유류를 백신접종하는 방법.

[0386] 60. 단락 58 또는 59에 있어서, 상기 대상체가 인간인, 방법.

[0387] 61. 단락 58 또는 59에 있어서, 상기 대상체가 농가 동물 또는 비가축인, 방법.

[0388] 62. 단락 58 또는 59에 있어서, 상기 대상체가 가축인, 방법.

[0389] 63. 단락 58 또는 59에 있어서, 상기 투여가 피하, 비강내, 진피내 또는 근육내 주사인, 방법.

[0390] 64. 단락 58에 있어서, 상기 면역 반응은 항체/B-세포 반응인, 방법.

[0391] 65. 단락 58에 있어서, 상기 면역 반응은 Th1, Th2, 또는 Th17 반응을 포함하는 CD4+ T-세포 반응인, 방법.

[0392] 66. 단락 58에 있어서, 상기 면역 반응은 CD8+ T-세포 반응인, 방법.

[0393] 67. 단락 14, 34, 39, 또는 57에 있어서, 병원체 또는 면역 위협에의 노출에 대한 진단용의, 조성물.

[0394] 68.FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(서열번호 1)의 아미노산 서열을 포함하는 지질화된 비오틴-결합 단백질 및 그것의 임의의 기능성 유도체.

[0395] 69. 단락 68에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 대장균에서 적어도 배지 1 L 당 10 mg의 수준으로 가용형으로 생산되는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0396] 70. 단락 68 또는 69에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 2량체인, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0397] 71. 단락 68-70 중 어느 하나에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 N-말단에 지질화 서열을 포함하는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0398] 72. 단락 71에 있어서, 상기 지질화 서열이 MKKVAAFVALSLLMAGC(서열번호 3)인, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0399] 73. 단락 71 또는 72에 있어서, 상기 지질화 서열은 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-단백질에 연결되어 있는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0400] 74. 단락 73에 있어서, 상기 펩티드 링커는 AQDP(서열번호 8) 또는 VSDP(서열번호 9)의 아미노산 서열을 포함하는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0401] 75. 단락 68-74 중 어느 하나에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 C-말단에 정제 표지를 포함하는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0402] 76. 단락 75에 있어서, 상기 정제 표지는 히스티딘 표지, c-my 표지, Halo 표지, Flag 표지, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0403] 77. 단락 76에 있어서, 상기 히스티딘 표지는 HHHHHH(서열번호 10)의 아미노산 서열을 포함하는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0404] 78. 단락 75-77 중 어느 하나에 있어서, 상기 정제 표지는 펩티드 링커를 통해 상기 비오틴-결합 단백질에 연결되어 있는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0405] 79. 단락 78에 있어서, 상기 펩티드 링커는 서열번호 11의 VDKLAAALE 또는 서열번호 12의 GGGGSSSVDKLAAALE의

아미노산 서열을 포함하는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0406] 80. 단락 68-79 중 어느 하나에 있어서, 상기 비오틴-결합 단백질은 MKKVAAFVALSLLMAGCVSDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNS ATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(서열번호 20)의 아미노산 서열을 포함하는, 지질화된 비오틴-결합 단백질.

[0407] 81. 단락 68-80 중 어느 하나의 지질화된 비오틴-결합 단백질을 포함하는 조성물.

[0408] 82. 지질화된 비오틴-결합 단백질과 단백질 또는 펩티드를 포함하는 융합 단백질.

[0409] 83. 단락 82에 있어서, 상기 단백질 또는 펩티드는 펩티드 링커에 의해 상기 지질화된 비오틴-결합 단백질에 융합되어 있는, 융합 단백질.

[0410] 84. 단락 83에 있어서, 상기 펩티드 링커는 GGGGSSS(서열번호 22)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0411] 85. 단락 82-84 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질 또는 펩티드는 폐렴구균 항원, 결핵 항원, 탄저병 항원, HIV 항원, 계절성 또는 유행성 플루 항원, 인플루엔자 항원, 백일해 항원, 황색포도구균 항원, 수막염균 항원, 헤모필루스 항원, HPV 항원, 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 항원인, 융합 단백질.

[0412] 86. 단락 85에 있어서, 상기 항원은 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형인, 융합 단백질.

[0413] 87. 단락 86에 있어서, 상기 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형은 야생형 황색포도구균 알파-용혈소의 아미노산 잔기 205, 213 또는 209-211에 돌연변이를 포함하는, 융합 단백질.

[0414] 88. 단락 86에 있어서, 상기 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형은 상기 야생형 황색포도구균 알파-용혈소 내에 다음 돌연변이들 중 하나를 포함하는 융합 단백질:

[0415] (i) 잔기 205 W에서 A로;

[0416] (ii) 잔기 213 W에서 A로; 또는

[0417] (iii) 잔기 209-211 DRD에서 AAA로.

[0418] 89. 단락 86에 있어서, 상기 황색포도구균 알파-용혈소의 비용혈성 변이형은

[0419] (iv) W205A

[0420] ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYY PRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSM KAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호 23);

[0421] (v) W213A

[0422] ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYY PRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSM KAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호 24);

[0423] (vi) DRD209-211AAA

[0424] ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYY PRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSM KAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(서열번호 25); 및 그 기능성 변이형, 부분, 및 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0425] 90. 단락 82-89 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질은 N-말단에 지질화 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0426] 91. 단락 90에 있어서, 상기 지질화 서열은 MKKVAAFVALSLLMAGC(서열번호 3)인, 융합 단백질.

[0427] 92. 단락 90 또는 91에 있어서, 상기 시그널 서열은 펩티드 링커에 의해 상기 비오틴-단백질에 연결되어 있는,

융합 단백질.

[0428] 93. 단락 92에 있어서, 상기 펩티드 링커는 AQDP(서열번호 8) 또는 VSDP(서열번호 9)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0429] 94. 단락 82-93 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질은 C-말단에 정제 표지를 포함하는, 융합 단백질.

[0430] 95. 단락 94에 있어서, 상기 정제 표지는 히스티딘 표지, c-my 표지, Halo 표지, Flag 표지, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는, 융합 단백질.

[0431] 96. 단락 95에 있어서, 상기 히스티딘 표지는 HHHHHH(서열번호 10)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0432] 97. 단락 93-96 중 어느 하나에 있어서, 상기 정제 표지는 펩티드 링커를 통해 상기 비오틴-결합 단백질에 연결되어 있는, 융합 단백질.

[0433] 98. 단락 97에 있어서, 상기 펩티드 링커는 VDKLAAALE(서열번호 11)의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0434] 99. 단락 82-98 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질화된 비오틴-결합 단백질은 단락 68-80 중 어느 하나의 비오틴-결합 단백질인, 융합 단백질.

[0435] 100. 단락 82-99 중 어느 하나에 있어서, 상기 융합 단백질은

[0436] (i) 서열번호 53

[0437] MKKVAAFVALSLLMAGCVSPDFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNS
ATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYS
FIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIG
HTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI
DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHHHHHH;

[0438] (ii) 서열번호 54

[0439] MKKVAAFVALSLLMAGCVSPDFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNS
ATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYS
FIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIG
HTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI
DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHHHHHH; 및

[0440] (iii) 서열번호 55

[0441] MKKVAAFVALSLLMAGCVSPDFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNS
ATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYS
FIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIG
HTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI
DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHHHHHH(서열번호 55)로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

[0442] 101. 단락 82-100 중 어느 하나의 지질화된 비오틴-결합 단백질을 포함하는 조성물.

[0443] 102. 단락 81 또는 101 기술의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체 내에 면역 반응을 유도하는 방법.

[0444] 103. 단락 81 또는 101 기술의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 항원을 지닌 병원체에 대하여 포유류를 백신접종하는 방법.

[0445] 104. 단락 102 또는 103에 있어서, 상기 대상체가 인간인, 방법.

[0446] 105. 단락 102 또는 103에 있어서, 상기 대상체가 농가 동물 또는 비가축인, 방법.

[0447] 106. 단락 102 또는 103에 있어서, 상기 대상체가 가축인, 방법.

[0448] 107. 단락 102 또는 103에 있어서, 상기 투여가 피하, 비강내, 진피내 또는 근육내 주사인, 방법.

[0449] 108. 단락 102에 있어서, 상기 면역 반응은 항체/B-세포 반응인, 방법.

[0450] 109. 단락 102에 있어서, 상기 면역 반응은 Th1, Th2, 또는 Th17 반응을 포함하는 CD4+ T세포 반응인, 방법.

[0451] 110. 단락 102에 있어서, 상기 면역 반응은 CD8+ T세포 반응인, 방법.

[0452] 111. 단락 81 또는 101에 있어서, 병원체 또는 면역 위협에의 노출에 대한 진단용의, 조성물.

[0453] 몇몇의 선택된 정의들

[0454] 편의를 위해, 본원 전체(명세서, 실시예, 및 첨부의 청구범위를 포함)에 사용된 일부 용어들을 여기에 모아놓는다. 별도의 언급이 없는 한, 본원에 사용된 모든 기술용어와 과학용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게 보통으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

[0455] 본원 및 청구범위에서, 단수형은 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함하고 그 역도 성립한다. 용어 "또는(or)"은, 예를 들어 "어느 하나(either)"에 의해 수식되지 않는 한, 포괄적이다. 실시예 외에서는, 또는 달리 지시되지 않는 한, 본원에서 성분의 양이나 반응 조건을 표현하는 모든 숫자는 모든 경우에 있어서 용어 "약(about)"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다.

[0456] 본원에 있어서 용어 "면역성 조성물(immunogenic composition)"은 대상체에게 투여되었을 때 면역 반응, 예컨대 항체 또는 세포 면역 반응을 끌어낼 수 있는 조성물로 정의된다. 본 발명의 면역성 조성물은 면역방어성(immunoprotective) 또는 치료적일수도 아닐 수도 있다. 본 발명의 면역성 조성물이 대상체로부터 질환을 예방(prevent), 개선(ameliorate), 완화(palliate) 또는 제거(eliminate)할 때, 그 면역성 조성물은 임의로 백신으로 칭할 수도 있다. 그러나, 본원에 있어서 용어 면역성 조성물은 백신에 한정되는 것은 아니다.

[0457] 본원에 있어서 용어 "항원(antigen)"은 물질(substance)에 대해 면역 반응을 촉발하는 임의의 물질을 말한다. 일부 실시형태에서, 항원은 펩티드 또는 폴리펩티드이고, 다른 실시형태에서, 항원은 임의의 화학물질 또는 부분(moiety), 예를 들어, 그 물질에 대하여 면역 반응을 끌어내는, 탄수화물일 수 있다.

[0458] 본원에 있어서 용어 "결합하다(associate)"는 비공유 또는 공유 결합에 의한 2 이상의 분자들의 연결(linkage)을 말한다. 2 이상의 분자들의 연결이 공유 결합에 의해 일어나는 일부 실시형태에서, 상기 2 이상의 분자들은 함께 융합되거나 또는 가교될 수 있다. 2 이상의 분자들의 연결이 비공유 결합에 의해 일어나는 일부 실시형태에서, 상기 2 이상의 분자들은 복합체를 형성할 수 있다.

[0459] 본원에 있어서 용어 "복합체(complex)"는 공유적 상호 작용 외의 수단에 의해 공간적으로 연결된(spatially connected) 2 이상의 분자들의 무리(collection)를 말하며, 예를 들면 그것들은 정전기적 상호 작용, 수소결합, 또는 소수성 상호 작용(즉, 반데르바알스힘)에 의해 연결될 수 있다.

[0460] 본원에 있어서 용어 "융합(fused)"은 적어도 하나의 단백질 또는 펩티드가 제2의 단백질 또는 펩티드와 물리적으로 결합되어(associated) 있는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 융합은 전형적으로 공유 연결(covalent linkage)이지만, 다른 유형의 연결, 예를 들면, 정전기적 상호 작용, 또는 소수성 상호 작용 등을 통한 연결 등도 용어 "융합"에 포함된다. 공유 연결은, 융합 단백질로서의 연결, 또는 예를 들면 2개의 시스테인 잔기들 사이에 형성된 디설파이드 결합에 의하는 등의 화학적으로 커플링된 연결(chemically coupled linkage)을 포함할 수 있다.

[0461] 본원에 있어서 용어 "융합 폴리펩티드(fusion polypeptide)" 또는 "융합 단백질(fusion protein)"은 2 이상의 폴리펩티드 서열을 합쳐(join together) 생성되는 단백질을 의미한다. 본 발명에 포함되는 융합 폴리펩티드에는 1개 이상의 항원, 또는 그 단편 또는 돌연변이를 코딩하는 DNA 서열을 제2의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열과 합쳐 단일의 개방형 해독틀(single open-reading frame)을 형성하는 키메라 유전자 구성체(chimeric gene construct)의 번역 산물이 포함된다. 바꿔 말하면, "융합 폴리펩티드" 또는 "융합 단백질" 은 펩티드 결합에 의해 합쳐진 2 이상의 단백질들의 재조합 단백질이다. 일부 실시형태에서, 항원이 융합되는 상기 제2의 단백질은 상보적 친화성 쌍의 제1 친화성 분자와 상호 작용할 수 있는 상보적 친화성 분자이다.

[0462] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 호환적으로 사용될 수 있으며 펩티드 결합들에 의해 연결된 아미노산 잔기들의 폴리머를 말하며, 청구된 발명의 목적을 위해, 적어도 25개의 아미노산들의 전형적인 최소 길이를 갖는다. 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 다량체(multimer)적인 단백질, 예를 들어, 1 이상의 도메인(domain) 또는 서브유닛(subunit)을 포함하는 단백질일 수 있다. 본원에 있어서 용어 "펩티드"는 25개 미만의 아미노산들을 함

유하는 펩티드 결합-연결된 아미노산들의 서열, 예를 들어, 길이 약 4개 아미노산들에서 25개 아미노산들 사이를 말한다. 단백질 및 펩티드는 펩티드 결합들에 의해 연결된 선형적으로 배열된 아미노산들로 구성될 수 있으며, 생물학적으로, 재조합적으로, 또는 합성적으로 생성된 것도, 천연 발생 또는 비천연 발생 아미노들로 구성된 것도 본 정의에 포함된다. 전장(full length) 단백질과 그것의 25개의 아미노산보다 큰 단편이 상기 단백질의 정의 내에 포함된다. 상기 용어에는 또한 상기 폴리펩티드의 번역 과 함께의 변형(co-translational modification)(예: 시그널 펩티드 절단)과 번역 후의 변형(post-translational modification), 예컨대, 디설피드-결합 형성, 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 지질화, 단백질 분해 절단(proteolytic cleavage)(예: 메탈로프로테아제에 의한 절단) 등을 갖는 폴리펩티드가 포함된다. 나아가, 본원에 있어서, "폴리펩티드"는, 그 단백질이 소망의 활성을 유지하는 한도 내에서의, 천연 서열에 대한 변형(modification), 예컨대 결실, 부가, 및 치환(당업자에게 알려진 바와 같이 천연에서는 일반적으로 보존적인)을 포함하는 단백질을 말한다. 이들 변형은 부위특이적 돌연변이유발을 통해 계획된 것이거나 또는 우발적인 것, 예컨대 그 단백질을 생산하는 숙주의 돌연변이, 또는 PCR 증폭 또는 다른 재조합 DNA법에 기인한 에러를 통한 것일 수 있다.

[0463] "시그널 서열"은 핵산 분자에 작동적으로 연결될 때, 그 핵산 분자에 의해 코딩되는 산물(예: 단백질 또는 펩티드)의 분비를 촉진하는 핵산 서열을 의미한다. 일부 실시형태에서, 시그널 서열은 바람직하게는 그 핵산 분자의 5'에 위치한다.

[0464] 본원에 있어서 용어 "N-글리코실화된(N-glycosylated)" 또는 "N-글리코실화(N-glycosylation)"는, 폴리펩티드 내의 아스파라긴 잔기들에 당 부분(sugar moiety)이 공유 부착하는 것을 말한다. 당 부분들에는 글루코스, 만노스, 및 N-아세틸글루코사민이 포함될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 시알화 등의 글리칸의 변형도 포함된다.

[0465] "항원 제시 세포(antigen presenting cell)" 또는 "APC" 는, 주요조직적합성 복합체(MHC) 분자를 발현하며 그 표면에 MHC와 복합화된 외래 항원(foreign antigen)을 나타낼 수 있는 세포를 말한다. 항원 제시 세포의 예는 수지상 세포, 마크로파아지, B-세포, 섬유아세포(피부), 흉선 상피 세포, 갑상선 상피 세포, 교질 세포(뇌), 췌장베타 세포, 및 혈관 내피 세포이다.

[0466] "항원의 기능성 부분"의 맥락에서 사용되는 용어 "기능성 부분(functional portion)" 또는 "기능성 단편(functional fragment)" 은, 전체 항원 부분과 동일한 효과를 매개하는, 예를 들어, 대상체에서 면역 반응을 끌어내는, 또는 다른 분자와의 결합(association)(예: 적어도 에피토프에의 결합을 포함)을 매개하는, 항원 또는 항원 폴리펩티드의 부분을 말한다.

[0467] 본원에 있어서 표적 항원의 "부분(portion)"은 길이가 적어도 3개의 아미노산을 말하며, 예를 들면, 적어도 6개, 적어도 8개, 적어도 10개, 적어도 14개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개 또는 적어도 25개의 아미노산 또는 그 이상(일체를 포함)일 수 있다.

[0468] 용어 "세포독성 T 림프구(Cytotoxic T Lymphocyte)" 또는 "CTL"은 표적 세포에서 아폽토시스(apoptosis)를 유도하는 림프구를 말한다. CTL은 TCR과 표적 세포 표면 상의 프로세싱된 항원(Ag)의 상호 작용을 통해 표적 세포와 항원 특이적 접합체를 형성하며, 이는 그 표적 세포의 아폽토시스를 초래한다. 사멸체는 마크로파아지에 의해 제거된다. 용어 "CTL 반응" 은 CTL 세포에 의해 매개되는 원발 면역 반응을 말한다.

[0469] 본원에 있어서 용어 "세포 매개 면역(cell mediated immunity)" 또는 "CMI" 는 항체 또는 보체를 개입시키지 않고, 예를 들면, 마크로파아지, 천연 킬러 세포(NK), 항원-특이적 세포독성 T-림프구(T-세포)의 활성화, 및 표적 항원에 대응한 다양한 시토킨들의 방출을 개입시키는 면역 반응을 말한다. 다른 식으로 말하면, CMI는, 표적 항원을 나타내는 다른 세포(항원 제시 세포(APS) 같은)의 표면에 결합하여 반응을 촉발하는 면역 세포(예컨대 T-세포 및 다른 림프구)를 말한다. 상기 반응은 다른 림프구 및/또는 임의의 다른 백혈구와 시토킨의 방출을 수반할 수도 있다. 세포 면역은 신체를 :(1) 바이러스 감염 세포나 세포내 세균을 갖는 세포 같은, 표면에 외래 항원의 에피토프를 나타내는 체세포를 파괴할 수 있는 항원 특이적 세포독성 T-림프구(CTL)를 활성화함; (2) 마크로파아지와 NK 세포를 활성화하여, 그것들이 세포내 병원체를 파괴할 수 있게 함; 및 (3) 세포를 자극하여 획득 면역 반응과 선천 면역 반응에 관련된 다른 세포의 기능에 영향을 미치는 다양한 시토킨들을 분비하게 함에 의해 방어할 수 있다.

[0470] 본원에 있어서 용어 "면역 세포(immune cell)" 는 직접적 또는 간접적 항원 자극에 반응하여 시토킨을 방출할 수 있는 임의의 세포를 말한다. 용어 "면역 세포"에는 자연 살세포(NK 세포), T-세포(CD4+ 및/또는 CD8+ 세포), B-세포, 마크로파아지 및 단핵구, Th 세포; Th1 세포; Th2 세포; 백혈구; 수지상 세포; 마크로파아지;

비만 세포 및 단핵구 및 직접적 또는 간접적 항원 자극에 반응하여 시토킨 분자를 생산할 수 있는 임의의 다른 세포가 포함된다. 전형적으로, 면역 세포는 림프구, 예를 들면 T-세포 림프구이다.

[0471] 본원에 있어서 용어 "시토킨(cytokine)"은 항원에 의한 자극에 반응하여 면역 세포로부터 방출되는 분자를 말한다. 그러한 시토킨의 예에는 GMCSF; IL-1a; IL-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-10; IL-12; IL17A, IL-17F 또는 IL-17 패밀리의 다른 구성원들, IL-22, IL-23, IFN-α; IFN-β; IFN-ɣ; MIP-1α; MIP-1β; TGF-β; TNFα, 또는 TNFβ가 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다. 용어 "시토킨"에는 항체가 포함되지 않는다.

[0472] 본원에 있어서 용어 "대상체(subject)"는 면역 반응을 끌어내는데 유용한 임의의 동물을 말한다. 대상체는 야생 동물, 가축, 상업적 동물 또는 반려 동물, 예컨대 조류 또는 포유류일 수 있다. 대상체는 인간일 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서는 본원에 개시된 면역성 조성물이 인간의 치료 또는 예방적 처치에 적절할 수 있음이 고려되지만, 그것은 온혈 척추동물, 예를 들어, 포유류, 예컨대 비인간 영장류(특히 고등 영장류), 양, 개, 설치류(예: 마우스 또는 래트), 기니아 피그, 염소, 돼지, 고양이, 토끼, 소, 및 비포유류, 예컨대 닭, 오리, 또는 칠면조에도 적용 가능하다. 다른 실시형태에서, 대상체는 야생 동물, 예를 들면, 예컨대 조류 독감의 진단을 위한 조류이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 실험 동물 또는 질환 모델로서의 동물 치환체이다. 대상체는 수의과 처치를 요하는 대상체일 수 있으며, 여기서 항원에 대한 면역 반응을 끌어내는 것은 예를 들면 SIV, STL1, SFV, 또는 가축의 경우에 있어서, 발굽 및 구강 질환, 또는 조류 마레크병(Marek's disease) 또는 조류 인플루엔자의 경우에 있어서, 및 기타 다른 질환 등의 질환의 예방 및/또는 확산의 제어에 유용하다.

[0473] 본원에 있어서 용어 "병원체(pathogen)"는 대상체에 질환 또는 장애를 일으키는 유기체 또는 분자를 말한다. 예를 들면, 병원체에는 바이러스, 진균, 세균, 기생생물, 및 다른 전염성 유기체들 또는 그것들로부터의 분자, 뿐만 아니라 조류(algae), 진균, 효모, 원생돌물 등의 범주 내의 분류학상으로 관련된 거시적인 유기체들이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0474] "암 세포"는 생체 내(*in vivo*), 생체 밖(*ex vivo*), 또는 조직 배양 중 어느 하나에서의 암성의(cancerous), 암발병 전의(pre-cancerous), 또는 형질전환 세포를 말하며, 이는 새로운 유전물질의 흡수(uptake)를 필연적으로 수반하지 않는 자발적인 또는 유도된 형질 변화를 갖는다. 형질전환(transformation)은, 형질전환 바이러스에 의한 감염과 신규 게놈 핵산의 도입, 또는 외인성 핵산의 흡수로부터 일어날 수 있지만, 자발적으로 또는 내생 유전자를 돌연변이 시키는 발암물질에의 노출에 뒤이어 일어날 수도 있다. 형질전환/암은, 예를 들어, 세포의 형태적 변화, 불멸화, 비정상적 성장 조절, 병소 형성(foci formation), 부착 비의존성(anchorage independence), 악성종양(malignancy), 접촉 저지의 상실 및 성장의 밀도 제한, 성장 인자 또는 혈청 비의존성, 종양 특이적 마커, 침습성 또는 전이, 및 예컨대 누드 마우스들 등의 적절한 동물 숙주에서의 종양 성장과 관련될 수 있다. 참조, 예를 들어, Freshney, CULTURE ANIMAL CELLS: MANUAL BASIC TECH. (3rd ed., 1994).

[0475] 용어 "야생형(wild type)" 은, 생체내에 통상 존재하는 것과 같은, 천연 발생의, 통상의 단백질 코딩 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 그 부분, 또는 단백질 서열, 또는 그 부분을 각각 말한다.

[0476] 용어 "돌연변이(mutant)"는 유전 물질 내의 임의의 변화, 특히 야생형 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 변화(즉, 결실, 치환, 부가, 또는 변경) 또는 야생형 단백질 서열에 대한 임의의 변화를 갖는 유기체 또는 세포를 말한다. 용어 "변이형(variant)"은 "돌연변이(mutant)"와 호환적으로 사용될 수 있다. 유전 물질의 변화는 그 단백질의 기능의 변화를 초래한다고 종종 가정되지만, 용어 "돌연변이"와 "변이형"은 그 변화가 그 단백질의 기능을 변경(예: 증가, 감소, 새로운 기능 부여)하는지 또는 그 변화가 단백질의 기능에 영향을 끼치지 않는지(예: 그 돌연변이 또는 변이형이 잠재성(silent)임)에 무관하게 야생형 단백질의 서열의 변화를 말한다.

[0477] 용어 "약학적으로 허용가능한"은 과도한 독성 없이 포유류에 투여될 수 있는 화합물 및 조성물을 말한다. 용어 "약학적으로 허용가능한 담체는 조직 배지를 제외한다. 예시적인 약학적으로 허용가능한 염들에는, 무기산염들, 예컨대 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 인산염, 설페이트, 등, 및 유기산염들, 예컨대 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다. 약학적으로 허용가능한 담체들은 당 기술분야에서 잘 알려져 있다.

[0478] 단백질 또는 폴리펩티드는 종종 통상 20개의 천연 발생 아미노산이라 불리우는 20개의 아미노산 외의 다른 아미노산들을 함유할 수 있고, 많은 아미노산들이, 말단 아미노산들을 포함하여, 주어진 폴리펩티드에서 예컨대 글리코실화 및 다른 번역후 변형과 같은 자연적 프로세스에 의해, 또는 당 기술분야에 기술이 잘 알려져 있는 화

학적 변형에 의해 변형(modification) 될 수 있음이 이해될 것이다. 본 발명의 폴리펩티드에 존재할 수 있는 알려진 변형에는, 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헴부분의 공유 부착, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유 부착, 가교, 고리화, 디설피드 결합 형성, 탈메틸 반응, 공유 가교의 형성, 시스틴 형성, 피로글루탐산 형성, 제제화, 감마-카복시화, 당화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 수산화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질 분해 프로세싱, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 단백질에 대한 아미노산의 전달-RNA 매개 부가 예컨대 아르기닐화, 및 유비퀴틴화가 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다, .

[0479] 본원에 있어서 용어들 "상동의(homologous)" 또는 "상동체(homologues)"는 호환적으로 사용되며, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 기술하는데 사용될 때, 두 폴리뉴클레오티드들 또는 폴리펩티드들, 또는 그들의 지정된 서열들이, 예를 들면, 정렬에 대해 디폴트 파라미터로 하여 BLAST, version 2.2.14를 사용하여 적절히 정렬되어 비교될 때, 적절한 뉴클레오티드 삽입 또는 결실 또는 아미노산 삽입 또는 결실과 함께, 적어도 70%의 뉴클레오티드, 통상적으로 약 75%에서 99%, 예컨대 적어도 약 98%에서 99%의 뉴클레오티드가 동일한 것을 말한다. 폴리펩티드에 대해서는, 폴리펩티드에 적어도 50%의 아미노산 동일성이 있어야 한다. 본원에 있어서 용어 "상동체" 또는 "상동의" 는 또한 구조에 대한 상동성을 말한다. 유전자 또는 폴리펩티드의 상동체의 결정은 당업자가 용이하게 알아낼 수 있다. 정의된 퍼센트의 문맥 중에 있을 때, 정의된 퍼센트 상동성은 적어도 그 퍼센트의 아미노산 유사성을 의미한다. 예를 들면, 85% 상동성은 적어도 85%의 아미노산 유사성을 말한다.

[0480] 본원에서 핵산 서열, 단백질 또는 폴리펩티드에 대하여 사용되는 용어 " 이종(heterologous)"은, 이들 분자가 그 세포에서 천연 발생하는 것이 아님을 의미한다. 예를 들면, 예컨대 단백질 발현 벡터의 맥락에서, 세포에 삽입되는 본원에 기술된 융합 항원 폴리펩티드에 대한 코딩 핵산 서열은 이종 핵산 서열이다.

[0481] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열이 비교될 테스트 서열에 대해 참조 서열로 작용한다. 서열 비교 알고리듬을 사용시, 테스트 서열 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 부분열 좌표(subsequence coordinates)를 지정하며, 필요시, 서열 알고리듬 프로그램 파라미터들을 지정한다. 그리고나서 서열 비교 알고리듬은 지정된 프로그램 파라미터들에 기초하여 참조 서열에 대한 테스트 서열의 퍼센트 서열 동일성을 계산한다. 필요하거나 요망되면, 당 기술분야에 잘 알려져 있는 임의의 다양한 접근 방법에 의해 비교를 위한 적절한 서열의 정렬이 행하여 질 수 있다.

[0482] 본원에 있어서 용어 "변이형(variant)"은 천연 발생 폴리펩티드 또는 핵산과 1 이상의 아미노산 또는 핵산의 결실, 부가, 치환 또는 측쇄 수식에 의해 다르지만 그 천연 발생 분자의 1 이상의 특이적 기능이나 생물학적 활성을 여전히 유지하는 폴리펩티드 또는 핵산을 말한다. 아미노산 치환에는 상이한 천연 발생(naturally-occuring) 또는 비통상적 아미노산 잔기에 의해 아미노산이 대체되는 변경이 포함된다. 그러한 치환은 폴리펩티드에 함유된 아미노산 잔기가 극성, 측쇄 기능성(side chain functionality) 또는 크기와 관련하여 유사한 특성의 다른 천연 발생 아미노산으로 대체되는 경우에 "보존적(conservative)"으로 분류될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같은 변이형에 의해 포함되는 치환은 펩티드 내에 존재하는 아미노산 잔기가 다른 특성을 갖는 아미노산에 의해 치환되는 경우(예: 하전된 또는 소수성 아미노산을 알라닌에 의해 치환), 또는 대안적으로, 천연 발생의 아미노산이 비통상적 아미노산에 의해 치환되는 경우에는 "비보존적"일 수 있다. 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드에 대하여 사용될 때 용어 "변이형" 내에는 또한 기준 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 각각에 비교한(예: 야생형 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드에 비교한) 1차, 2차, 또는 3차 구조의 변이가 포함된다.

[0483] 용어 "실질적으로 유사한(substantially similar)"은, 오리지날 항원에 비교하여 항원의 변이형 또는 항원의 기능성 유도체에 대하여 사용될 때, 특정 대상체 서열이 항원 폴리펩티드 서열과, 1 이상의 치환, 결실, 또는 부가에 의해 다르지만, 대상체에게서 면역 반응을 끌어내는 그 항원 기능을 적어도 50%, 또는 더 높게, 예를 들어, 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상(일체를 포함) 보유하는 것을 의미한다. 폴리뉴클레오티드 서열을 결정함에 있어서, 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 모든 대상체 폴리뉴클레오티드 서열은, 코돈 서열의 차이에 상관없이, 기준 폴리뉴클레오티드에 실질적으로 유사한 것으로 간주된다. 뉴클레오티드 서열은 다음의 경우에 주어진 항원 핵산 서열에 "실질적으로 유사하다": (a) 뉴클레오티드 서열이 천연 항원 서열의 코딩 영역에 혼성화(hybridize)한다, 또는 (b) 뉴클레오티드 서열이 중등 정도의 엄격한 조건 하에서(under moderately stringent conditions) 천연 항원의 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있고 천연 항원 단백질에 유사한 생물학적 활성을 갖는다; 또는 (c) 뉴클레오티드 서열이 (a) 또는 (b)에 정의된 뉴클레오티드 서열에 관한 유전 암호의 결과 축퇴성(degenerate)이다. 실질적으로 유사한 단백질들은 전형적으로 천연 단백질의 상응하는 서열과 약 80% 넘게 유사할 것이다.

[0484] 변이형에는 아래 기술하는 바와 같은 보존적 또는 비보존적 아미노산 변화가 포함될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 변화는 기준 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드 내의 아미노산 치환, 부가, 결실, 융합 및 절단(truncation)을 초래할 수 있다. 변이형에는, 그 변이형의 기초인 펩티드 서열 내에 통상적으로는 일어나지 않는 아미노산들과 다른 분자들의 삽입 및 치환을 포함하여, 아미노산들의 삽입, 결실 또는 치환도 포함되며, 예로서 인간 단백질에서는 통상적으로 일어나지 않는 오르니틴(ornithine)의 삽입을 들 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. "보존적 아미노산 치환"은 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 다른 아미노산에 의해 대체함에 비롯된다. 기능적으로 유사한 아미노산들을 제공하는 보존적 치환표가 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 다음 여섯개의 그룹은 각각 상호 보존적인 치환인 아미노산들을 포함하고 있다: (1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T); (2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); (3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); (4) 아르기닌(R), 리신(K); (5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 및 (6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W). 참조, 예를 들어, Creighton, Proteins (W. H. Freeman & Co.,1984).

[0485] 보존적 아미노산의 선택은 예를 들면 아미노산이 펩티드의 외부에 있고 용매에 노출되는가, 또는 내부에 있고 용매에 노출되지 않는가와 같이, 펩티드 내 치환될 아미노산의 위치에 기초하여 선택될 수 있다. 그러한 보존적 아미노산 치환의 선택은 당업자의 기술의 범주 내이다. 따라서, 당업자는 단백질 또는 펩티드의 외부의 아미노산(즉, 용매에 노출되는 아미노산)에 적절한 보존적 아미노산 치환을 선택할 수 있다. Y의 F로의, T의 S 또는 K로의, P의 A로의, E의 D 또는 Q로의, N의 D 또는 G로의, R의 K로의, G의 N 또는 A로의, T의 S 또는 K로의, D의 N 또는 E로의, I의 L 또는 V로의, F의 Y로의, S의 T 또는 A로의, R의 K로의, G의 N 또는 A로의, K의 R로의, A의 S, K 또는 P로의 치환이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0486] 대안적으로, 당업자는 단백질 또는 펩티드의 내부의 아미노산(즉, 용매에 노출되지 않는 아미노산)에 적절한 보존적 아미노산 치환을 선택할 수도 있다. 예를 들면, Y의 F로의, T의 A 또는 S로의, I의 L 또는 V로의, W의 Y로의, M의 L로의, N의 D로의, G의 A로의, T의 A 또는 S로의, D의 N으로의, I의 L 또는 V로의, F의 Y 또는 L로의, S의 A 또는 T로의 및 A의 S, G, T 또는 V로의 치환인 보존적 치환을 이용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비보존적 아미노산 치환을 포함하는 LF 폴리펩티드도 용어 "변이형"에 포함될 수 있다. 본원에 있어서 용어 "비보존적" 치환은 어떤 아미노산 잔기를 상이한 화학적 성질을 갖는 상이한 아미노산 잔기로 치환하는 것을 말한다. 비보존적 치환의 비한정적 예에는 아스파르트산(D)의 글리신(G)으로의 치환; 아스파라긴(N)의 리신(K)으로의 치환; 및 알라닌(A)의 아르기닌(R)으로의 치환이 포함된다.

[0487] 본원에 있어서 용어 "유도체(derivative)"는 예를 들면 유비퀴틴화(ubiquitination), 표지화, 페길레이션(pegylation)(폴리에틸렌글리콜에 의한 유도체화) 또는 다른 분자의 부가에 의해 화학적으로 변형된 펩티드를 말한다. 한 분자는 통상적으로는 그 분자의 일부가 아닌 부가적인 화학적 부분들(chemical moieties)를 함유할 때 다른 분자의 "유도체"일 수 있다. 그러한 부분들은 분자의 용해도, 흡수도, 생물학적 반감기 등을 개선할 수 있다. 그 부분들은 대안적으로 그 분자의 독성을 감소시키거나, 또는 그 분자의 바람직하지 않은 부작용을 제거 또는 약화시킬 수 있다. 그러한 효과를 매개 가능한 부분들은 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(21st ed., Tory, ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)에 개시되어 있다.

[0488] 용어 "기능성"은 "유도체" 또는 "변이형"과 함께 사용될 때, 어떤 독립체(entity) 또는 분자의 유도체 또는 변이형으로서, 그 독립체 또는 분자의 생물학적 활성에 실질적으로 유사한 생물학적 활성을 보유하는 단백질 분자를 말한다. 본 문맥에서 "실질적으로 유사한"은 생물학적 활성, 예를 들어, 폴리펩티드의 항원성이, 기준, 예를 들어 상응하는 야생형 폴리펩티드의 적어도 50% 활성인 것, 예를 들어, 적어도 60% 활성, 70% 활성, 80% 활성, 90% 활성, 95% 활성, 100% 활성 또는 그보다 더 높은(즉, 변이형 또는 유도체가 야생형보다 더 큰 활성을 갖는), 예를 들어, 110% 활성, 120% 활성, 또는 그 이상(일체를 포함)인 것을 의미한다.

[0489] 용어 "재조합(recombinant)"은 핵산 분자를 기술하는데 사용될 때, 게놈, cDNA, 바이러스의, 반합성, 및/또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드를 의미하며, 그것은, 그것의 기원 또는 조작에 기인하여, 천연에서라면 결합할 폴리뉴클레오티드 서열들의 전부 또는 일부에 결합하지 않는다. 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 또는 재조합 융합 단백질에 대하여 사용되는 용어 재조합은 재조합 폴리뉴클레오티드로부터의 발현에 의해 생산되는 폴리펩티드를 의미한다. 숙주 세포에 대하여 사용되는 용어 재조합은, 재조합 폴리뉴클레오티드가 도입된 숙주 세포를 의미한다. 재조합은 또한 본원에서 물질(예: 세포, 핵산, 단백질, 또는 벡터)에 대하여 사용되어, 그 물질이 이종(heterologous) 물질(예: 세포, 핵산, 단백질, 또는 벡터)의 도입에 의해 변형되었다는 것을 가리킨다.

[0490] 용어 "벡터(vector)"는 그것에 연결된 이종 핵산을 숙주 세포에 수송 또는 발현 매개할 수 있는 핵산 분자를 말한다; 플라스미드는 용어 "벡터"에 포함되는 속(genus)의 종(species)이다. 용어 "벡터"는 전형적으로 복제 원

점과 숙주 세포 내에서의 복제 및/또는 유지에 필수적인 다른 요소들(entities)을 함유하는 핵산 서열을 말한다. 그것들이 작동적으로 연결된 유전자 및/또는 핵산 서열의 발현을 지시(direct)할 수 있는 벡터들을 본원에서는 "발현 벡터"라 한다. 일반적으로 유용한 발현 벡터는 종종 "플라스미드(plasmid)"의 형태로 존재하며, 플라스미드란, 그것의 벡터 형태에 있어서 염색체에 결합되어 있지 않고, 전형적으로 안정적 또는 일시적 발현을 위한 요소들 또는 코딩된 DNA를 포함하는 원형의 이중 나선 DNA 분자를 말한다. 본원에 개시된 방법에 사용 가능한 다른 발현 벡터에는 플라스미드, 에피좀(episome), 세균 인공 염색체, 효모 인공 염색체, 박테리오파아지 또는 바이러스 벡터가 포함되나 이에 한정되는 것은 아니며, 그러한 벡터는 특정 세포내에서 숙주 게놈에 통합되거나 자체적으로 복제할 수 있다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 동등한 기능을 제공할 수 있는 당 기술분야의 숙련자에게 알려진 다른 형태의 발현 벡터를 사용할 수도 있으며, 자기 복제 염색체외 벡터(self replicating extrachromosomal vector) 또는 숙주 게놈에 통합되는 벡터를 예로 들 수 있다. 바람직한 벡터는 자체적 복제 및/또는 그것이 연결되는 핵산의 발현이 가능한 것이다.

[0491] 본원에 있어서 용어 "감소된(reduced)" 또는 "감소시키다(reduce)" 또는 "감소하다(decrease)"는 일반적으로 기준에 대하여 통계적으로 유의한 양만큼의 감소를 말한다. 의심을 피하기 위해, "감소된"은, 본원의 정의에 의하면, 기준 수준에 비해 적어도 10%의 통계적으로 유의한 감소, 예를 들면 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 적어도 90% 또는 그 이상의, 100%의 감소(즉, 기준 샘플에 비해 부재 수준), 또는 기준 수준에 비해 10~100% 사이의 임의의 감소를 의미한다.

[0492] 본원에 있어서 용어 "낮은(low)"은 일반적으로 통계적 유의량만큼 더 낮은 것을 의미한다; 의심의 여지를 피하기 위해, "낮은"은 본원의 정의에 의하면, 기준 수준보다 적어도 10% 더 낮은, 예를 들면 기준 수준보다 적어도 20% 더 낮은, 기준 수준보다 적어도 30% 더 낮은, 기준 수준보다 적어도 40% 더 낮은, 기준 수준보다 적어도 50% 더 낮은, 기준 수준보다 적어도 60% 더 낮은, 기준 수준보다 적어도 70% 더 낮은, 기준 수준보다 적어도 80% 더 낮은, 기준 수준보다 적어도 90% 더 낮은, 기준 수준보다 100% 더 낮은(즉, 기준 샘플에 비해 부재 수준), 통계적 유의치를 말한다.

[0493] 본원에 있어서 용어 "증가한(increased)" 또는 "증가하다(increase)"는 본원의 정의에 의하면, 일반적으로 통계적 유의량의 증가; 예컨대 기준 수준에 비해 적어도 10%의 통계적으로 유의한 증가를, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100% 또는 그 이상의 증가(일체를 포함)를 포함하여, 예를 들면 기준 수준에 비해 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배 증가 또는 그 이상의 증가를 포함하여, 의미한다.

[0494] 본원에 있어서 용어 "높은(high)"은 일반적으로 기준에 대하여 통계적 유의량만큼 더 높은 것을 의미한다; 예컨대 기준 수준에 비해 적어도 10% 더 높은 통계적 유의치, 예를 들면 기준 수준에 비해 적어도 20% 더 높은, 적어도 30% 더 높은, 적어도 40% 더 높은, 적어도 50% 더 높은, 적어도 60% 더 높은, 적어도 70% 더 높은, 적어도 80% 더 높은, 적어도 90% 더 높은, 적어도 100% 더 높은(일체를 포함), 예컨대 적어도 2배 더 높은, 적어도 3배 더 높은, 적어도 4배 더 높은, 적어도 5배 더 높은, 적어도 10배 더 높은 또는 그 이상 더 높은 통계적 유의치를 의미한다.

[0495] 본원에 있어서 용어 "포함하는(comprising)"은 제시된 한정 요소들에 부가하여 다른 요소들도 존재할 수 있음을 나타낸다. "포함하는"의 사용은 한정보다는 내포를 가리킨다.

[0496] 용어 "로 구성된(consisting of)"은 본원에 기술된 조성물, 방법, 및 이들의 각각의 구성요소가 실시형태의 설명에서 언급되지 않은 임의의 요소를 배제하는 것을 말한다.

[0497] 본원에 있어서 용어 "로 본질적으로 이루어진(consisting essentially of)"은 주어진 실시형태에 필요한 요소들을 말한다. 이 용어는 본 발명의 그러한 실시형태의 기본적이고 신규하거나 기능적인 특성(들)에 실질적으로 영향을 주지 않는 추가 요소의 존재를 허용한다.

[0498] 나아가 핵산 또는 폴리펩티드에 대하여 주어진 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기, 및 모든 분자량 또는 분자질량 값들은 근사치이며, 기술하기 위해 제공된 것이라는 점이 이해되어야 한다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동일한 방법들과 재료들이 본 개시의 실행 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적절한 방법과 재료들이 본원에 기술된다.

[0499] 본원에 있어서 용어 "비오틴(biotin)" 은 화합물 비오틴 자체 및 그것의 유사체, 유도체 및 변이형을 말한다. 따라서, 용어 "비오틴"에는 비오틴 (cis-헥사하이드로-2-옥소-1H-티에노 [3,4]이미다졸-4-펜탄산)과, 비오틴-유사 화합물을 포함하여, 그 임의의 유도체 및 유사체가 포함된다. 그러한 화합물에는 예를 들면, 비오틴-e-N-리

신, 비오사이틴 하이드라지드(biocytin hydrazide), 2-이미노비오틴 및 비오티닐-E-아미노카프로산-N-히드록시석신이미드 에스테르의 아미노 또는 설프하이드릴 유도체, 설포석신이미드이미노비오틴, 비오틴브로모아세틸하이드라지드, p-디아조벤조일 비오사이틴, 3-(N-말레이미도프로피오닐)비오사이틴, 데스티오비오틴, 등이 포함된다. 용어 "비오틴"에는 또한 리즈아비딘, 아비딘, 스트렙트아비딘, 탐아비딘(tamavidin) 부분, 또는 다른 아비딘-유사 펩티드들 중의 하나 이상에 특이적으로 결합할(bind) 수 있는 비오틴 변이형이 포함된다.

[0500] 전술한 발명들은 명확한 이해를 목적으로 예시와 실시예를 이용하여 다소 상세하게 기술하였지만 당 기술분야의 통상의 기술자에게는 본 발명의 교시에 비추어 첨부된 특허청구범위의 사상 또는 범주를 벗어남 없이 소정의 변화와 변형이 행하여질 수 있음이 명백할 것이다. 하기는 본 발명의 설명에 도움을 주기 위한 것이지만 본 발명의 실행은 하기의 실시예에 의해 어떠한 식으로든 한정되거나 제한되지 않는다.

[0501]

[0502] 실시예

[0503] 실시예 1: 대장균에서 고수율로 발현하며 가용성인 재조합 비오틴-결합 단백질 및 그 융합 단백질

[0504] 본 연구에 사용된 재조합 리즈아비딘(rRhavi)은 그 야생형 단백질의 45-179 잔기들만을 함유하는 N-말단 변형된 형태이다. 대장균에서 rRhavi의 발현 수준을 최적화하기 위해, 리즈아비딘 폴리펩티드(45-179)을 코딩하는 유전자 서열을 대장균에 바람직한 발현 코돈들을 사용하여 재설계하고나서 합성하여 PET21b 벡터에 클로닝하였다. 정확한 접힘을 촉진하고 고수율의 가용성 재조합 단백질을 얻기 위해, 대장균 주변세포질 국지화 시그널 서열(periplasmic localization signal sequence)을 코딩하는 DNA 서열(19개의 아미노산, MKKIWLALAGLVLAFSASA, 서열번호 2)을 rRhavi의 합성 유전자의 5'말단에 도입하였다. 이 시그널 서열은 발현 과정 동안 대장균의 주변세포질로의 표적화 후에 재조합 단백질로부터 자동적으로 결실될 것으로 예측된다.

[0505] 유연 링커 영역 및 His-표지를 코딩하는 DNA 서열(GGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH, 서열번호 14)을 합성 rRhavi 유전자의 3' 말단에 직접 삽입하였다. 이는 재조합 비오틴-결합 단백질의 정제에 도움이 된다. 나아가, 양측에 유연 링커를 갖는 링커 내에 항원이 삽입될 수 있는데, 예를 들어, 항원은 상기 링커의 아미노산 S와 V의 사이에 삽입될 수 있다. 그러한 항원은 펩티드 링커(GGGGSSS, 서열번호 22)에 의해 비오틴-결합 단백질로부터 분리되어 있고 펩티드 링커(VDKLAAALE, 서열번호 11)에 의해 His-표지로부터 분리되어 있으며 이에 의해 융합 단백질을 안정화시킬 수 있다.

[0506] 리즈아비딘-항원 융합 단백질을 구성하기 위해, 7개의 아미노산으로 구성되는 유연 링커 영역을 코딩하는 DNA 서열(GGGGSSS, 서열번호 22)을 합성 rRhavi 유전자의 3' 말단에 직접 삽입하여 그 융합 단백질을 안정화시키는 것을 도울 수 있다. 후보 항원들을 코딩하는 유전자들(전장 또는 바람직한 단편)을 통상의 PCR 과정에 의해 관심 대상의 병원체의 게놈 DNA로부터 증폭하여 rRhavi 발현 벡터 내 링커 영역 바로 너머에 삽입하였다.

[0507] 단백질 발현을 위해, 표적 구성체를 함유하는 플라스미드들을 표준 열충격 과정을 이용하여 대장균 주 BL21(DE3)에 형질전환하였다. 플레이트로부터 단일 콜로니를 갓 찍어(또는 나중에는 글리세롤 스톡이 사용되었다) 37℃에서의 하룻밤 동안(overnight) 배양을 위해 암피실린 함유(Amp+) Luria-Bertani(LB) 배지 30 ml에 접종하였다. 제 2일에, 5 ml의 초기 배양을 1 L의 LB 배지/Amp+에 접종하여 OD_{600}=1이 될 때까지 37℃에서 생육하였다. 배지를 16℃로 냉각 후, 하룻밤 동안의 유도를 위해 배양에 0.2 mM 최종 농도의 IPTG를 첨가하였다.

[0508] 변형 삼투 충격 프로토콜을 사용하여 주변세포질 분획으로부터 단백질을 정제하였다. 즉, 6리터 배양으로부터 세균 세포를 수집하고 30 mM Tris(pH 8.0), 20% 수크로스 및 1mM EDTA를 함유하는 120 ml 완충액에 재현탁하였다. 실온에서 20분간 교반후, 세포를 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 재 펠렛화 하였다. 그 상청액을 분획 1로서 수집하고, 세포를 5 mM $MgCl_2$, 단백질분해효소 저해제 및 데옥시리보뉴클레아제를 함유하는 80 ml 빙냉 용액에 재현탁하였다. 4℃에서 20분간 교반 후, 혼합물을 13,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 그 상청액을 분획 2로서 수집하였다. 최종 농도 150 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ 및 10mM 이미다졸의 첨가 후, 분획 1과 분획 2를 합친 상청액을 Ni-NTA 칼럼에 가하였다. Ni-NTA 칼럼으로부터 용출된 단백질을 AKTA 정제기에서의 superdex 200 칼럼 전개를 이용한 젤 여과에 의해 더 정제하였다. 표적 단백질을 함유하는 피크 분획들을 모아 농축하였다. 그 단백질 농도를 BCA 단백질 검정 키트(Bio-Rad)를 사용하여 측정하였다. 정제된 단백질을 부분 표본하고(aliquoted), 장래의 사용을 위해 액체 질소에서 급속 냉동하여 -80℃에 보존하였다.

[0509] 비오틴-결합 단백질의 구성 개요를 도 1에 도시하며, 정제된 비오틴-결합 단백질의 SDS-PAGE를 도 2에 도시한다.

[0510] 비오틴-결합 단백질을 포함하는 융합 단백질의 구성 개요를 도 3에 도시하며, 정제된 융합 단백질의 예시적 SDS-PAGE를 도 4에 도시한다.

[0511]

[0512] 실시예 2: 비오틴-결합 단백질의 지질화된 유도체

[0513] 재조합 비오틴-결합 단백질의 지질화된 유도체를 실시에 1에 기술된 것과 같은 방법을 사용하여 제조하였다. 본 연구에 사용된 지질화된 유도체는, 야생형 단백질의 45-179 잔기들만을 함유하는, 야생형 리즈아비딘의 N-말단 변형된 형태이다. 대장균에서 rRhavi의 발현 수준을 최적화하기 위해, 리즈아비딘 폴리펩티드(45-179)을 코딩하는 유전자 서열을 대장균에 바람직한 발현 코돈들을 사용하여 재설계하고나서 합성하여 PET21b 벡터에 클로닝하였다. 정확한 접힘을 촉진하고 고수율의 가용성 재조합 단백질을 얻기 위해, 지질화 서열을 코딩하는 DNA 서열(19개의 아미노산, MKKVAAFVALSLLMAGC, 서열번호 3)을 rRhavi의 합성 유전자의 5'말단에 도입하였다. 지질화는 발현 과정 동안 세균(예: 대장균)에 의해 지질화 서열의 Cys 잔기에 부가될 것이다.

[0514] 단백질 발현을 위해, 표적 구성체를 함유하는 플라스미드들을 표준 열충격 과정을 이용하여 대장균 주 BL21(DE3)에 형질전환하였다. 플레이트로부터 단일 콜로니를 갓 찍어(또는 나중에는 글리세롤 스톡이 사용되었다) 37℃에서의 하룻밤 동안 배양을 위해 암피실린 함유(Amp+) Luria-Bertani(LB) 배지 30 ml에 접종하였다. 제 2일에, 5 ml의 초기 배양을 1 L의 LB 배지/Amp+에 접종하여 OD_{600}=1이 될 때까지 37℃에서 생육하였다. 배지를 16℃로 냉각 후, 하룻밤 동안의 유도를 위해 배양에 0.2 mM 최종 농도의 IPTG를 첨가하였다.

[0515] 지질화된 리즈아비딘을 대장균 막 분획으로부터 정제하였다. 대장균 세포를 수집하고, 프로테아제 저해제, 데옥시리보뉴클레아제, 10mM Mg^{2+} 및 리소자임을 함유하는, 용해 완충액(20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.0)에 재현탁하였다. 세포를 1회의 동결-해동 사이클에 의해 파괴하고 13,000 rpm에서 45분간의 원심분리 후에 그 상청액을 제거하였다. 그리고나서 세포 펠렛을 0.5% SDOC를 함유하는 용해 완충액에 재현탁하고 비즈 비터(beads beater)로 균질화하였다. 그리고나서 그 용해물을 13,000 rpm에서 45분간 원심분리하고 그 상청액을 친화성 정제를 위해 수집하였다. 지질화된 rhavi를 0.5% SDOC 및 300 mM Im를 함유하는 용해 완충액으로 용출하였다.

[0516] Ni-NTA 칼럼으로부터 용출된 단백질을 AKTA 정제기에서의 superdex 200 칼럼 전개를 이용한 젤 여과에 의해 더 정제하였다. 표적 단백질을 함유하는 피크 분획들을 모아 농축하였다. 그 단백질 농도를 BCA 단백질 검정 키트(Bio-Rad)를 사용하여 측정하였다. 정제된 단백질을 부분 표본하고(aliquoted), 장래의 사용을 위해 액체 질소에서 급속 냉동하여 -80℃에 보존하였다.

[0517] 제조된 지질화된 비오틴-결합 단백질의 개요를 도 5에, 정제된 지질화된 비오틴-결합 단백질의 SDS-PAGE를 도 6에 도시한다.

[0518]

[0519] 실시예 3: 지질화된 비오틴-결합 단백질의 TLR2 활성

[0520] 지질화된 비오틴-결합 단백질의 TLR2 활성을 HEK TLR2 세포에서 시험하였다. HEK TLR2 세포를 500 ㎕ 부피로 5×10^5 cells/per well로 24 웰 플레이트에 플레이팅하였다. 37 ℃에서 하룻밤 동안의 자극을 위해 상이한 농도로 지질화된 비오틴-결합 단백질을 첨가하였다. ELISA에 의한 IL-8 측정을 위해 제 2일에 그 상청액을 수집하였다. 대조로서, 동일 조건에서의 자극을 위해 HEK 293 세포를 사용하였다.

[0521] 지질화된 비오틴-결합 단백질의 TLR2 활성을 결정했다. 그 결과는 지질화된 비오틴-결합 단백질이 HEK TLR2로부터의 IL-8의 생산을 유도하였으나 HEK 293 세포로부터는 그러하지 않았음을 보여준다(도 7).

[0522]

[0523] 실시예 4: Hla의 비용혈성 돌연변이 및 융합 단백질

[0524] 야생형 Hla 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열(아미노산 27-319)을 황색포도구균 게놈으로부터 클로닝하였다. 모든 Hla의 비용혈성 돌연변이는 퀵체인지를 사용한 부위특이적 돌연변이유발에 의해 생성되었다. Hla-비오틴 결합 융합 단백질을 제조하기 위해, 야생형 Hla 또는 돌연변이 Hla를 코딩하는 DNA 서열을 비오틴-결합 단백질 유전자 뒤의 링커 영역 너머에 삽입하였다. 모든 구성체를 PET21b에 클로닝하고 상술한 바와

같이 발현을 위해 대장균에 형질전환하였다.

[0525] Hla의 비용혈성 돌연변이가 제조되었다. 예시적 Hla의 비용혈성 변이형의 개요를 도 8에 나타낸다. 정제된 Hla의 야생형 또는 비용혈성 변이형 및 융합 단백질의 SDS-PAGE를 도 9 및 도 10에 나타낸다.

[0526]

[0527] 실시예 5: 야생형 Hla의 용혈 활성, 돌연변이 Hla 및 융합 단백질

[0528] 야생형 Hla, 돌연변이 Hla 및 그 비오틴-결합 단백질과의 융합 단백질들의 용혈 활성을 토끼 혈세포를 사용하여 분석하였다. 250 ㎕의 토끼 혈액으로부터의 적혈구를 펠렛화하고, PBS로 2회 세정하고 그리고나서 10 ml의 PBS에 재현탁하였다. 야생형 Hla, 돌연변이 Hla 및 융합 단백질을 지시된 농도들로 PBS로 희석하고 그리고나서 96 웰 플레이트에 웰당 100 ㎕로 첨가하였다. Hla 또는 융합 단백질들을 함유하는 96 웰 플레이트에 혈세포를 웰당 25 ㎕로 첨가하고 나서 37 ℃에서 30분간 배양하였다. 상청액들을 2000 rpm에서 5분간 원심분리 후 수집하고 OD450에서 ELISA 판독기에 의해 분석하였다.

[0529] 야생형 Hla, 돌연변이 Hla 및 그 융합 단백질들의 용혈 활성을 검정하였다. 그 결과는 돌연변이 Hla가 야생형 Hla에 비해 더 낮은 용혈 활성을 가짐을 증명한다(도 11). 나아가. 비오틴-결합 단백질을 포함하는 Hla 융합 단백질은 비융합 돌연변이 Hla 단백질에 비해서도 더 낮은 용혈 활성을 가졌다(도 12).

[0530]

[0531] 실시예 6: 돌연변이 Hl 융합 단백질의 자극 활성

[0532] C57 WT 마크로파아지 세포를 비용혈성 Hla 돌연변이 융합 단백질로 자극하였다. 세포를 5×10^5 세포/웰로 24 웰 플레이트에 접종하였다. 돌연변이 Hla 융합 단백질을 생장 배지로 희석하고 37℃에서 하룻밤동안의 자극을 위해 지시된 농도로 웰에 첨가하였다. 제2일에 2000 rpm에서 5분간의 원심분리 후 그 상청액을 수집하고 ELISA에 의해 시토킨 분비에 대해 분석하였다.

[0533] 돌연변이 Hla 융합 단백질의 자극 활성을 분석하였다. 그 결과는 돌연변이 Hla 융합 단백질(rhavi-Hla209)이 TNF-α, IL-6, Il-23, IL-1β, 및 IL-17를 포함하는 다수의 친 염증성 시토킨들의 생산을 유도한 것을 보여준다(도 13).

[0534] 실시예 7. 지질화된 비오틴-결합 단백질 및 돌연변이 Hla 융합 단백질은 상이한 항원에 대한 면역 반응을 촉진함

[0535] MAPS 기반 백신 구성체를, 비오틴화 혈청형-1 폐렴구균 피막 폴리사커라이드, 리즈아비딘 융합 TB 항원들, 및 비지질화된 리즈아비딘, 지질화된 리즈아비딘 또는 rhavi-Hla209 중 어느 하나로부터 제조하였다. 마우스들을 상이한 MAPS 구성체들로 면역 부여하고 상이한 면역 부여 그룹들에서의 TB 항원들에 대한 T 세포 반응들을 분석하고 3 면역 부여 후 비교하였다. 즉, 상이한 마우스들 군들로부터의 전혈을, 37 ℃에서 6일간 생체외에서, 정제된 TB 단백질들로 자극하고, 그 상청액의 시토킨 농도를 ELISA에 의해 검출하였다.

[0536] 그 결과는 지질화된 리즈아비딘을 함유하거나 또는 rhavi-Hla209를 함유하는 MAPS 복합체를 받은 마우스들 군들은 TB 항원들에 대하여 더 나은 Th17(IL-17A) 및 Th1 세포(IFN-γ) 반응들을 생성함을 보여주었다(도 14). 이는 지질화된 리즈아비딘 및 rhavi-Hla209이 MAPS 백신 제제에서 공자극자/보강제로서 작용할 수 있음을 나타내었다.

[0537] 전술한 상세한 설명과 예들은 단지 예시적인 것으로서 본 발명의 범주에 대한 한정으로 받아들여져서는 안 되는 것으로 이해된다. 개시된 실시형태에 대하여 당업자에게 자명한 다양한 변화 및 변경이 본 발명의 사상 및 범주를 벗어남 없이 이루어질 수 있다. 확인된 모든 특허 및 다른 간행물은, 예를 들어 본 발명과 함께 사용될 수 있는 그러한 간행물에서 기술된 방법론을 설명하고 개시하려는 목적으로 본 명세서에 참고로 명시적으로 포함된다. 이들 간행물은 오로지 본 출원의 출원일 전의 그들의 개시 때문에 제공된다. 이에 관하여 어떤 것도, 본 발명자들이 종래 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유로 그러한 개시보다 선행되지 않음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이들 문헌의 내용에 관한 표현 및 날짜에 관한 모든 진술은 출원인이 이용가능한 정보에 기초하며, 이들 문헌의 내용 또는 날짜의 정확함에 대해 어떠한 것도 인정하는 것으로 여겨지지 않는다.

[0538] 본 명세서와 실시예에서 확인된 모든 특허 및 다른 간행물은, 모든 목적에 있어서 본 명세서에 참고로 명시적으

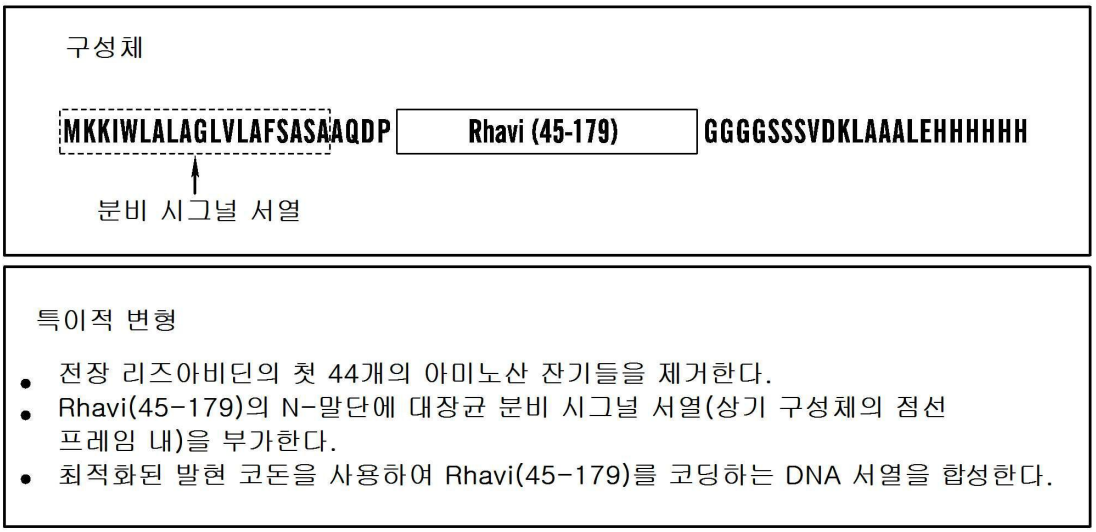
로 포함된다. 이들 간행물은 오로지 본 출원의 출원일 전의 그들의 개시 때문에 제공된다. 이에 관하여 어떤 것도, 본 발명자들이 종래 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유로 그러한 개시보다 선행되지 않음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이들 문헌의 내용에 관한 표현 및 날짜에 관한 모든 진술은 출원인이 이용가능한 정보에 기초하며, 이들 문헌의 내용 또는 날짜의 정확함에 대해 어떠한 것도 인정하는 것으로 여겨지지 않는다.

[0539] 본 명세서에 바람직한 실시형태를 도시하고 기술하였지만, 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않고서 다양한 변경, 부가, 치환 등이 이루어질 수 있으며, 이들은 따라서 하기의 특허청구범위에 정의된 본 발명의 범주 내에 포함된다는 것이 당업자에게 명백할 것이다.

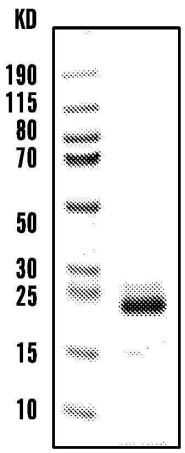
[0540] 나아가, 이미 지시되어 있지 않은 범위까지, 본원에 기술되고 예시된 다양한 실시형태 중 임의의 하나는 본 명세서에 개시된 다른 실시형태들 중 임의의 것에 나타낸 특징부를 포함시키도록 추가로 변경될 수 있다는 것이 당업자에게 이해될 것이다.

도면

도면1

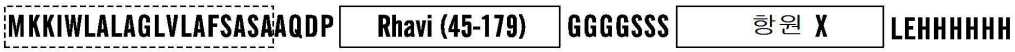


도면2

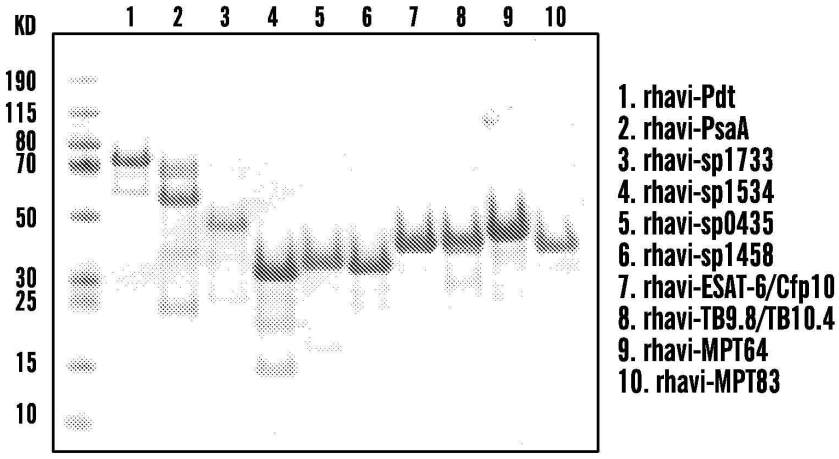


정제된 재조합 리즈아비딘(45-179)의 SDS-PAGE

도면3

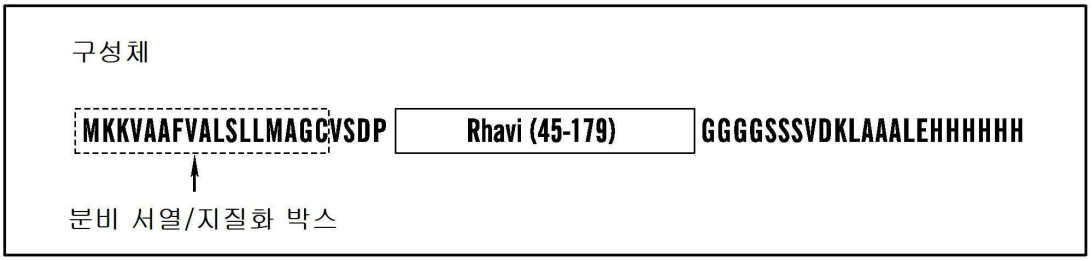


도면4



정제된 리즈아비딘 융합 단백질들의 SDS-PAGE

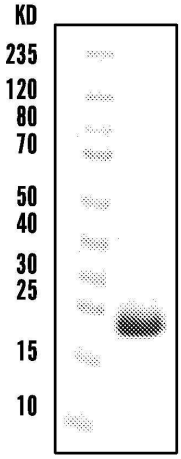
도면5



특이적 변형

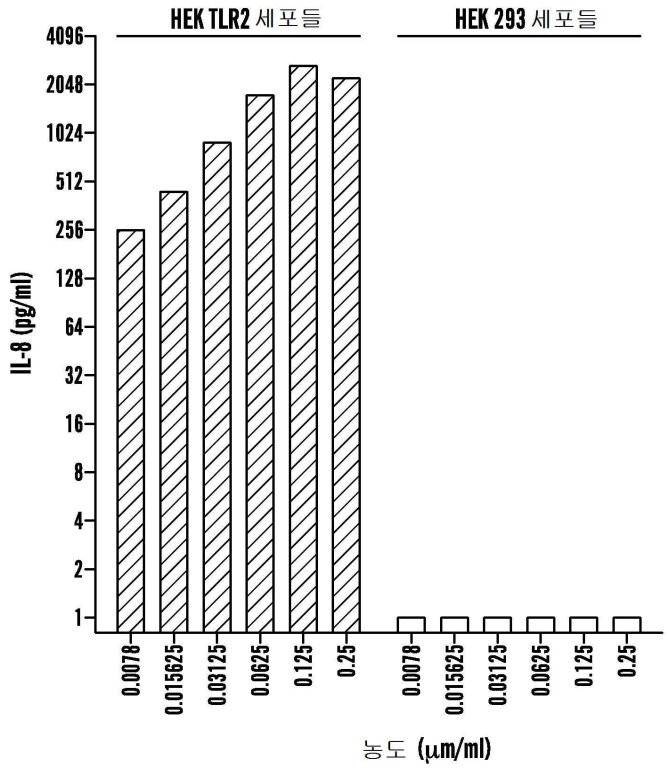
- 전장 리즈아비딘의 첫 44개의 아미노산 잔기들을 제거한다.
- Rhavi(45-179)의 N-말단에 대장균 시그널 서열/지질화 박스(상기 구성체의 점선 프레임 내)를 부가한다.
- 대장균 최적화된 발현 코돈을 사용하여 Rhavi(45-179)를 코딩하는 DNA 서열을 합성한다.

도면6



정제된 지질화 리즈아비딘의 SDS-PAGE

도면7



지질화된 리즈아비딘의 TLR2 활성

도면8

구성체

1) Hla (WT/돌연변이)

M | Hla (27-319) | LEHHHHHH

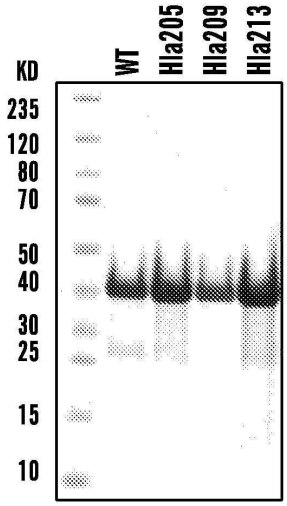
2) 리즈아비딘-Hla(WT/돌연변이) 융합 단백질

MKKIWLALAGLVLAFSASA | AQDP | 리즈아비딘(45-179) | GGGGSSS | Hla (27-319) | LEHHHHHH

Hla에 만들어진 점 돌연변이

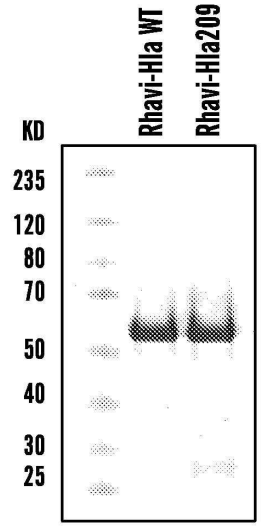
- 잔기 205 W에서 A로
- 잔기 209-211 DRD에서 AAA로
- 잔기 213 W에서 A로

도면9



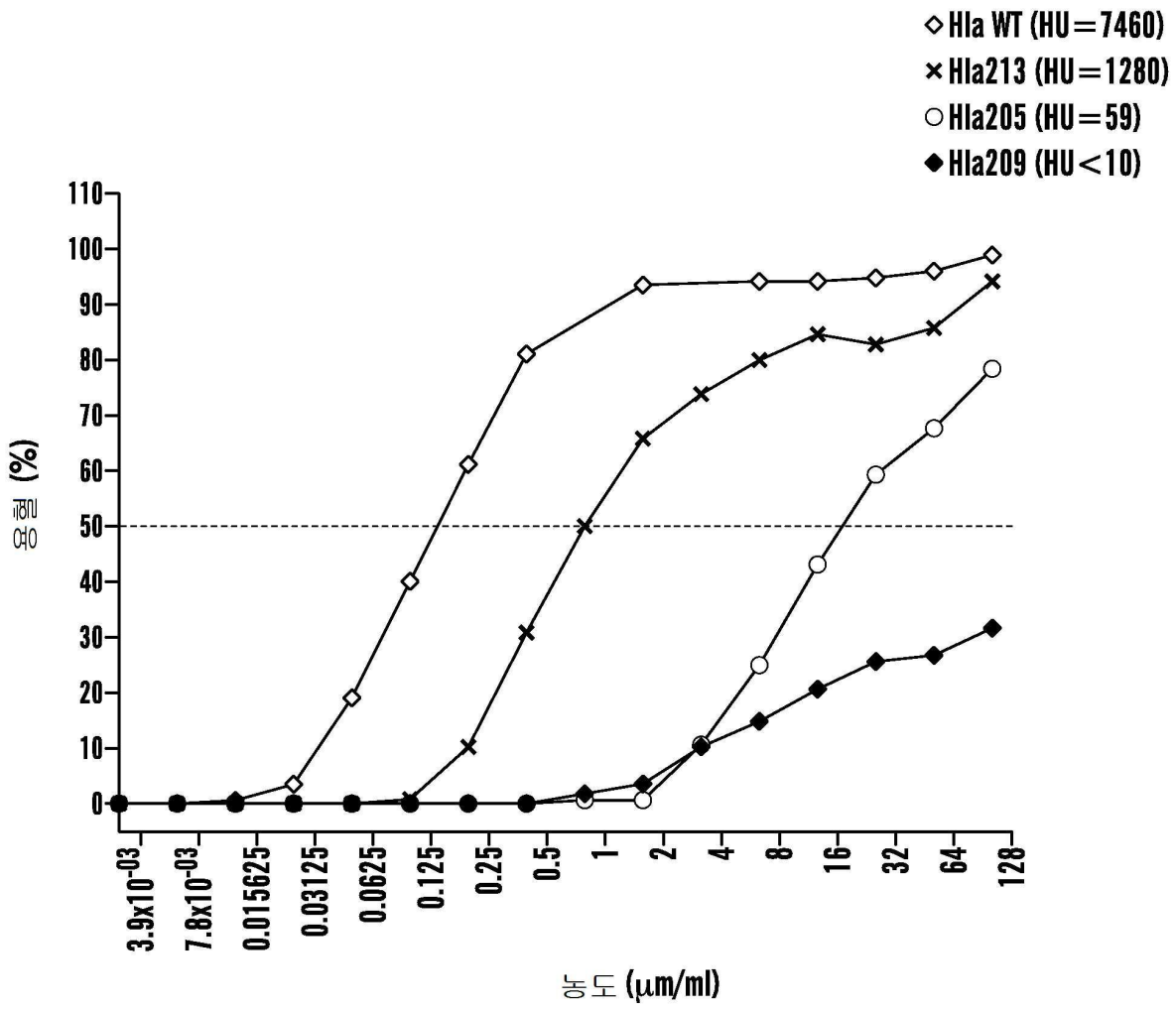
정제된 WT Hla 또는
돌연변이들의 SDS-PAGE

도면10



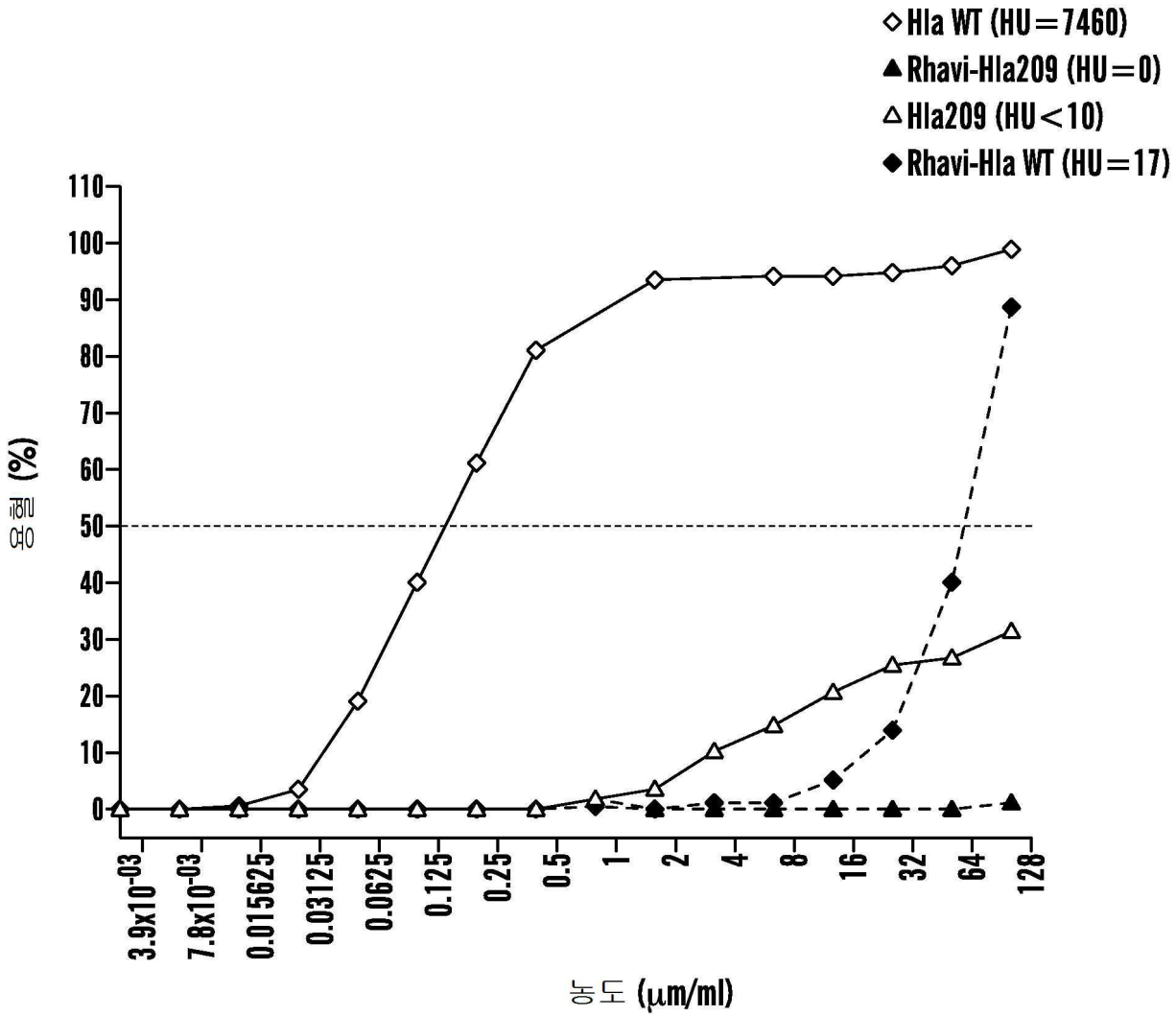
WT 또는 돌연변이 Hla의 정제된
리즈아비딘 융합 단백질들의 SDS-PAGE

도면11



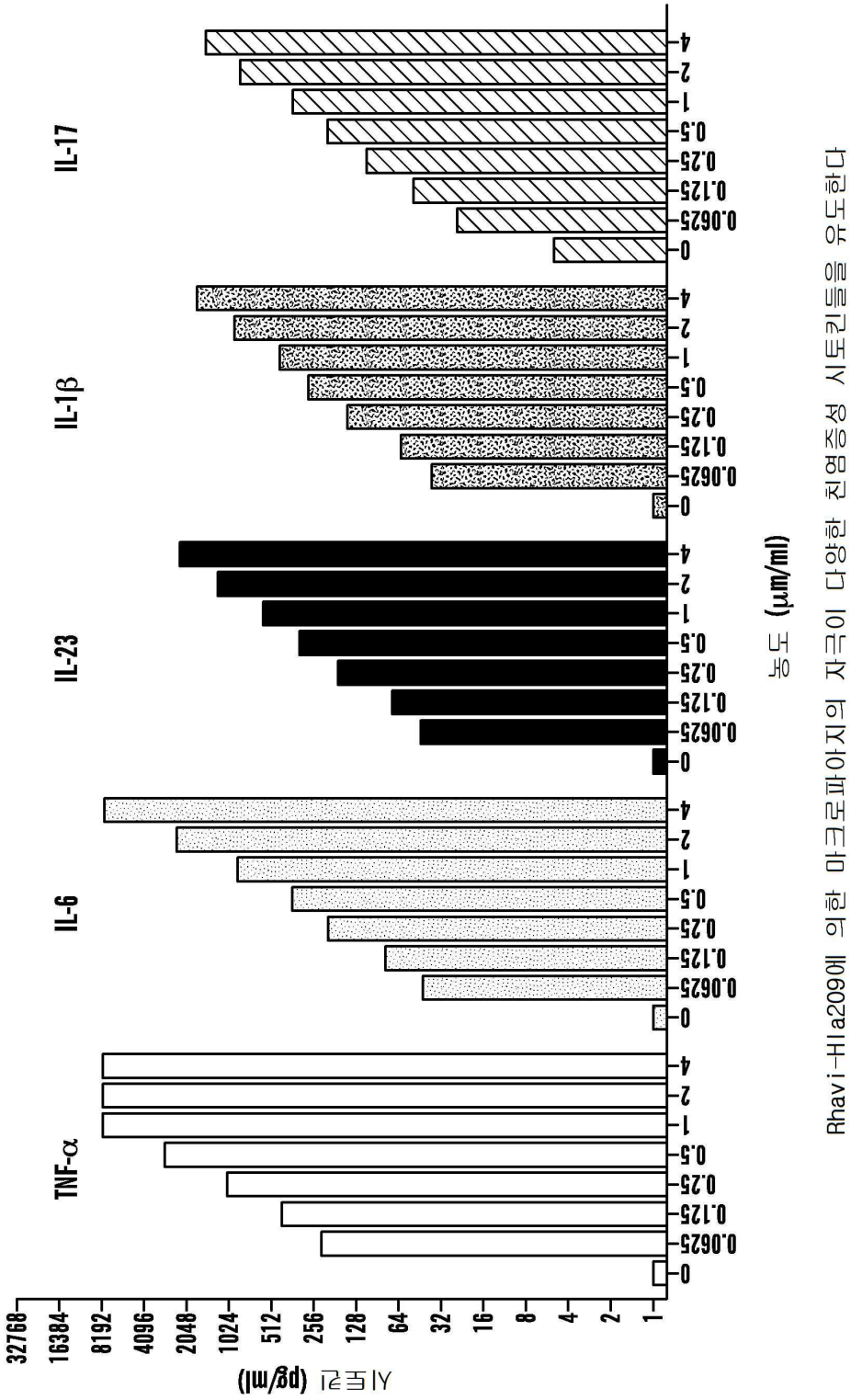
WT 또는 돌연변이 Hla의 용혈 활성

도면12

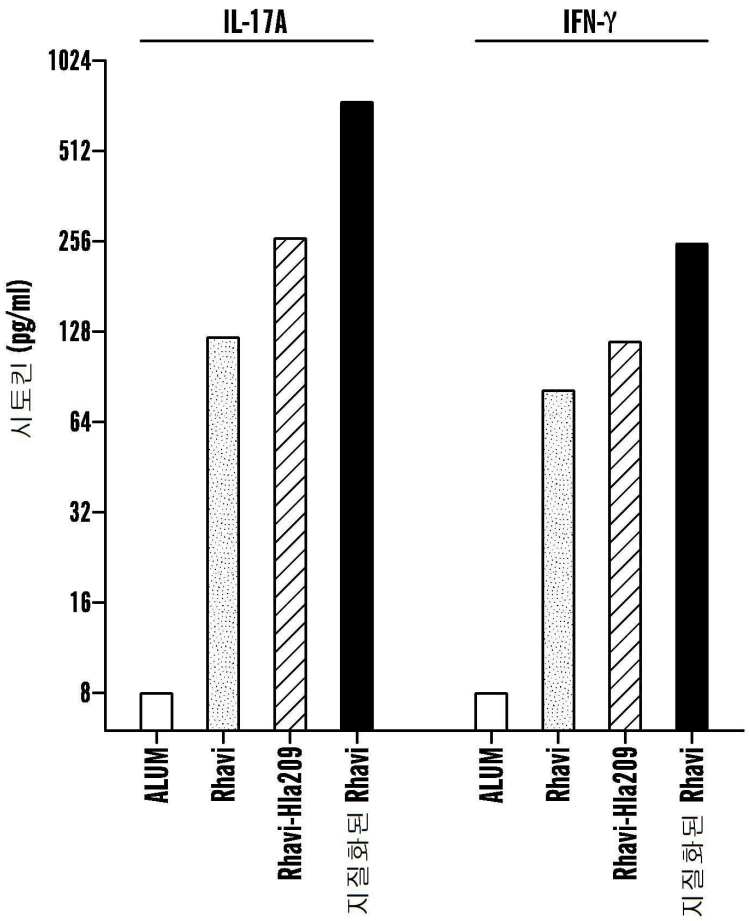


WT 또는 돌연변이 Hla 및 리즈아비딘 융합 단백질들의 용혈 활성

도면13


Rhavi-Hla2090에 의한 마크로파아지의 자극이 다양한 친염증성 시토킨들을 유도한다
사이토킨 (pg/ml)
32768
16384
8192
4096
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
1
TNF-α
IL-6
IL-23
IL-1β
IL-17
0
0.0625
0.125
0.25
0.5
1
2
4
농도 (μm/ml)

도면14



MAPS 복합체로의 지질화 리즈아비딘 또는 Rhavi-Hla209의 도입은 다른 항원들에 대한 T 세포 반응들을 증진한다

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION

<120> MODIFIED BIOTIN-BINDING PROTEIN, FUSION PROTEINS THEREOF AND APPLICATIONS

<130> 701039-074340-PCT

<140> PCT/US12/37541

<141> 2012-05-11

<150> 61/609,974

<151> 2012-03-13

<150> 61/608,168

<151> 2012-03-08

<150> 61/484,934

<151> 2011-05-11

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 135

<212> PRT

<213> Rhizobium sp.

<400> 1

Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ser

1 5 10 15

Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser Thr Met Ile Ile Gln Val Asp

20 25 30

Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr Val Asn Arg Ala Gln Gly Thr

35 40 45

Gly Cys Gln Asn Ser Pro Tyr Pro Leu Thr Gly Arg Val Asn Gly Thr

50 55 60

Phe Ile Ala Phe Ser Val Gly Trp Asn Asn Ser Thr Glu Asn Cys Asn

65 70 75 80

Ser Ala Thr Gly Trp Thr Gly Tyr Ala Gln Val Asn Gly Asn Asn Thr

85 90 95

Glu Ile Val Thr Ser Trp Asn Leu Ala Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro

100 105 110

Ala Ile Glu Gln Gly Gln Asp Thr Phe Gln Tyr Val Pro Thr Thr Glu

115 120 125

Asn Lys Ser Leu Leu Lys Asp

130 135

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser
1 5 10 15
Ala Ser Ala

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<400> 3
Met Lys Lys Val Ala Ala Phe Val Ala Leu Ser Leu Leu Met Ala Gly
1 5 10 15
Cys

<210> 4
<211> 179
<212> PRT
<213> Rhizobium sp.
<400> 4
Met Ile Ile Thr Ser Leu Tyr Ala Thr Phe Gly Thr Ile Ala Asp Gly

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

65 70 75 80
Val Ser Gly Gln Tyr Val Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln Asn
85 90 95
Ser Pro Tyr Pro Leu Thr Gly Arg Val Asn Gly Thr Phe Ile Ala Phe
100 105 110
Ser Val Gly Trp Asn Asn Ser Thr Glu Asn Cys Asn Ser Ala Thr Gly

115 120 125

Trp Thr Gly Tyr Ala Gln Val Asn Gly Asn Asn Thr Glu Ile Val Thr

130 135 140

Ser Trp Asn Leu Ala Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro Ala Ile Glu Gln

145 150 155 160

Gly Gln Asp Thr Phe Gln Tyr Val Pro Thr Thr Glu Asn Lys Ser Leu

165 170 175

Leu Lys Asp

<210> 5

<211> 44

<212> PRT

<213> Rhizobium sp.

<400> 5

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

1 5 10 15

Arg Arg Thr Ser Gly Gly Lys Thr Met Ile Arg Thr Asn Ala Val Ala

20 25 30

Ala Leu Val Phe Ala Val Ala Thr Ser Ala Leu Ala

35 40

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Rhizobium sp.

<400> 6

Met Ile Arg Thr Asn Ala Val Ala Ala Leu Val Phe Ala Val Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ala Leu Ala

20

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Signal
peptide

<400> 7

Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala
20

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 8

Ala Gln Asp Pro
1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223
> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 9

Val Ser Asp Pro
1

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag

<400> 10

His His His His His His

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 11

Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 13

Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His

1 5 10

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu
1 5 10 15

His His His His His His
20

<210> 15

<211> 180

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 15

Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser

1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Gln Asp Pro Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe
20 25 30

Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ser Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser
35 40 45

Thr Met Ile Ile Gln Val Asp Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr
50 55 60

Val Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln Asn Ser Pro Tyr Pro Leu

65 70 75 80

Thr Gly Arg Val Asn Gly Thr Phe Ile Ala Phe Ser Val Gly Trp Asn
85 90 95

Asn Ser Thr Glu Asn Cys Asn Ser Ala Thr Gly Trp Thr Gly Tyr Ala
100 105 110

Gln Val Asn Gly Asn Asn Thr Glu Ile Val Thr Ser Trp Asn Leu Ala
115 120 125

Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro Ala Ile Glu Gln Gly Gln Asp Thr Phe

130 135 140

Gln Tyr Val Pro Thr Thr Glu Asn Lys Ser Leu Leu Lys Asp Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Ser Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His
165 170 175
His His His His
180

<210> 16
<211> 21
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<400> 16
Met Asn Ser Lys Lys Leu Cys Cys Ile Cys Val Leu Phe Ser Leu Leu
1 5 10 15

Ala Gly Cys Ala Ser
20

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<400> 17
Met Arg Tyr Ser Lys Leu Thr Met Leu Ile Pro Cys Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Ala Cys

<210> 18
<211> 24
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<400> 18
Met Phe Val Thr Ser Lys Lys Met Thr Ala Ala Val Leu Ala Ile Thr
1 5 10 15
Leu Ala Met Ser Leu Ser Ala Cys

20

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 19

Met Ile Lys Arg Val Leu Val Val Ser Met Val Gly Leu Ser Leu Val
1 5 10 15

Gly Cys

<210> 20

<211> 156

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 20

Met Lys Lys Val Ala Ala Phe Val Ala Leu Ser Leu Leu Met Ala Gly
1 5 10 15

Cys Val Ser Asp Pro Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe Ser Ser
20 25 30

Ile Ala Ser Ala Ser Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser Thr Met
35 40 45

Ile Ile Gln Val Asp Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr Val Asn
50 55 60

Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln Asn Ser Pro Tyr Pro Leu Thr Gly
65 70 75 80

Arg Val Asn Gly Thr Phe Ile Ala Phe Ser Val Gly Trp Asn Asn Ser
85 90 95

Thr Glu Asn Cys Asn Ser Ala Thr Gly Trp Thr Gly Tyr Ala Gln Val
100 105 110

Asn Gly Asn Asn Thr Glu Ile Val Thr Ser Trp Asn Leu Ala Tyr Glu
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Pro Ala Ile Glu Gln Gly Gln Asp Thr Phe Gln Tyr

130 135 140

Val Pro Thr Thr Glu Asn Lys Ser Leu Leu Lys Asp
145 150 155

<210> 21

<211> 458

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 21

Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Gln Asp Pro Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe
20 25 30

Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ser Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser
35 40 45

Thr Met Ile Ile Gln Val Asp Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr
50 55 60

Val Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln Asn Ser Pro Tyr Pro Leu
65 70 75 80

Thr Gly Arg Val Asn Gly Thr Phe Ile Ala Phe Ser Val Gly Trp Asn
85 90 95

Asn Ser Thr Glu Asn Cys Asn Ser Ala Thr Gly Trp Thr Gly Tyr Ala
100 105 110

Gln Val Asn Gly Asn Asn Thr Glu Ile Val Thr Ser Trp Asn Leu Ala
115 120 125

Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro Ala Ile Glu Gln Gly Gln Asp Thr Phe
130 135 140

Gln Tyr Val Pro Thr Thr Glu Asn Lys Ser Leu Leu Lys Asp Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Ser Ser Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr

165 170 175

Thr Asp Ile Gly Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr

180 185 190

Tyr Asp Lys Glu Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile

195 200 205

Asp Asp Lys Asn His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly

210 215 220

Thr Ile Ala Gly Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys

225 230 235 240

Ser Gly Leu Ala Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro

245 250 255

Asp Asn Glu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile

260 265 270

Asp Thr Lys Glu Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn

275 280 285

Val Thr Gly Asp Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn

290 295 300

Val Ser Ile Gly His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr

305 310 315 320

Ile Leu Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe

325 330 335

Asn Asn Met Val Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Ala Ala Ala Ser Trp

340 345 350

Asn Pro Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser

355 360 365

Met Lys Ala Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu

370 375 380

Leu Ser Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp

385 390 395 400

Arg Lys Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg

405 410 415

Val Arg Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly
420 425 430

Thr Asn Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys
435 440 445

Ile Asp Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn
450 455

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 22

Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser

1 5

<210> 23

<211> 293

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 23

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
1 5 10 15

Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn
20 25 30

Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His
35 40 45

Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln
50 55 60

Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp
65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His

130 135 140

Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro

145 150 155 160

Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn

165 170 175

Gln Asn Ala Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly

180 185 190

Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp

195 200 205

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

210 215 220

Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys

225 230 235 240

Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr

245 250 255

Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp

260 265 270

Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys

275 280 285

Glu Glu Met Thr Asn

290

<210

> 24

<211> 293

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 24

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
1 5 10 15

Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn
20 25 30

Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His
35 40 45

Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln
50 55 60

Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp
65 70 75 80

Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala
85 90 95

Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr
100 105 110

Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp
115 120 125

Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His
130 135 140

Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro
145 150 155 160

Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn
165 170 175

Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Ala Asn Pro Val Tyr Gly
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp
195 200 205

Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe
210 215 220

Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys

225 230 235 240

Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr
245 250 255

Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp
260 265 270

Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys
275 280 285

Glu Glu Met Thr Asn
290

<210> 25

<211> 293

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 25

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
1 5 10 15

Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn
20 25 30

Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His
35 40 45

Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln
50 55 60

Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp
65 70 75 80

Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala
85 90 95

Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr
100 105 110

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

115 120 125

Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His

130 135 140

Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro

145 150 155 160

Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn

165 170 175

Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Ala Ala Ala Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly

180 185 190

Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp

195 200 205

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

210 215 220

Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys

225 230 235 240

Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr

245 250 255

Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp

260 265 270

Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys

275 280 285

Glu Glu Met Thr Asn

290

<210> 26

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 26

Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser

1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Gln Asp Pro Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe
20 25 30
Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ser Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser
35 40 45
Thr Met Ile Ile Gln Val Asp Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr
50 55 60

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

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

Tyr Asp Lys Glu Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile
195 200 205
Asp Asp Lys Asn His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly
210 215 220
Thr Ile Ala Gly Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys
225 230 235 240
Ser Gly Leu Ala Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro
245 250 255

Asp Asn Glu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile

260 265 270

Asp Thr Lys Glu Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn

275 280 285

Val Thr Gly Asp Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn

290 295 300

Val Ser Ile Gly His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr

305 310 315 320

Ile Leu Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe

325 330 335

Asn Asn Met Val Asn Gln Asn Ala Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp

340 345 350

Asn Pro Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser

355 360 365

Met Lys Ala Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu

370 375 380

Leu Ser Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp

385 390 395 400

Arg Lys Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg

405 410 415

Val Arg Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly

420 425 430

Thr Asn Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys

435 440 445

Ile Asp Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn Val Asp Lys Leu Ala Ala

450 455 460

Ala Leu Glu His His His His His His

465 470

<210> 27

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 27

Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Gln Asp Pro Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe
20 25 30

Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ser Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser
35 40 45

Thr Met Ile Ile Gln Val Asp Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr
50 55 60

Val Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln Asn Ser Pro Tyr Pro Leu
65 70 75 80

Thr Gly Arg Val Asn Gly Thr Phe Ile Ala Phe Ser Val Gly Trp Asn
85 90 95

Asn Ser Thr Glu Asn Cys Asn Ser Ala Thr Gly Trp Thr Gly Tyr Ala
100 105 110

Gln Val Asn Gly Asn Asn Thr Glu Ile Val Thr Ser Trp Asn Leu Ala
115 120 125

Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro Ala Ile Glu Gln Gly Gln Asp Thr Phe
130 135 140

Gln Tyr Val Pro Thr Thr Glu Asn Lys Ser Leu Leu Lys Asp Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Ser Ser Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr
165 170 175

Thr Asp Ile Gly Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr
180 185 190

Tyr Asp Lys Glu Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile
195 200 205

Asp Asp Lys Asn His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly
210 215 220

Thr Ile Ala Gly Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys

225 230 235 240

Ser Gly Leu Ala Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro

245 250 255

Asp Asn Glu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile

260 265 270

Asp Thr Lys Glu Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn

275 280 285

Val Thr Gly Asp Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn

290 295 300

Val Ser Ile Gly His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr

305 310 315 320

Ile Leu Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe

325 330 335

Asn Asn Met Val Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Ala

340 345 350

Asn Pro Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser

355 360 365

Met Lys Ala Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu

370 375 380

Leu Ser Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp

385 390 395 400

Arg Lys Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg

405 410 415

Val Arg Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly

420 425 430

Thr Asn Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys

435 440 445

Ile Asp Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn Val Asp Lys Leu Ala Ala

450 455 460

Ala Leu Glu His His His His His His

465 470

<210> 28

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 28

Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Gln Asp Pro Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe
20 25 30

Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ser Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser
35 40 45

Thr Met Ile Ile Gln Val Asp Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr
50 55 60

Val Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln Asn Ser Pro Tyr Pro Leu
65 70 75 80

Thr Gly Arg Val Asn Gly Thr Phe Ile Ala Phe Ser Val Gly Trp Asn
85 90 95

Asn Ser Thr Glu Asn Cys Asn Ser Ala Thr Gly Trp Thr Gly Tyr Ala
100 105 110

Gln Val Asn Gly Asn Asn Thr Glu Ile Val Thr Ser Trp Asn Leu Ala
115 120 125

Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro Ala Ile Glu Gln Gly Gln Asp Thr Phe
130 135 140

Gln Tyr Val Pro Thr Thr Glu Asn Lys Ser Leu Leu Lys Asp Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Ser Ser Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr
165 170 175

Thr Asp Ile Gly Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr
180 185 190

Tyr Asp Lys Glu Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile

195 200 205

Asp Asp Lys Asn His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly

210 215 220

Thr Ile Ala Gly Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys

225 230 235 240

Ser Gly Leu Ala Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro

245 250 255

Asp Asn Glu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile

260 265 270

Asp Thr Lys Glu Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn

275 280 285

Val Thr Gly Asp Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn

290 295 300

Val Ser Ile Gly His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr

305 310 315 320

Ile Leu Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe

325 330 335

Asn Asn Met Val Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Ala Ala Ala Ser Trp

340 345 350

Asn Pro Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser

355 360 365

Met Lys Ala Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu

370 375 380

Leu Ser Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp

385 390 395 400

Arg Lys Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg

405 410 415

Val Arg Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly

420 425 430

Thr Asn Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys

435 440 445

Ile Asp Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn Val Asp Lys Leu Ala Ala

450 455 460

Ala Leu Glu His His His His His His

465 470

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 29

Asn Val Thr Gln Asp Leu Thr Ser Ser Thr Ala Lys Leu Glu Cys Thr

1 5 10 15

Gln Asp Leu Ile

20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 30

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

1 5 10 15

Val Thr Asn Pro

20

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 31

Ser Asn Leu Lys Arg Met Gln Lys Ile

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 32

Ala Ala Leu Tyr Ser Thr Glu Asp Leu

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 33

Phe Gln Glu Lys Asp Ala Asp Thr Leu

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 34

Gln Ser Val Asn Glu Leu Val Tyr Val

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 35

Leu Glu Phe Ala Ser Cys Ser Ser Leu

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 36

Ser Gln Ala Glu Gly Gln Tyr Arg Leu

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 37

Gly Gln Ser Val Asn Glu Leu Val Tyr

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 38

Gln Ala Val Leu Leu Leu Asp Gln Ile

1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Arg or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Ser or Thr

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Tyr or Trp

<400> 39

Asp Xaa Ala Xaa Pro Xaa

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Arg or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ser or Thr

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Tyr or Trp

<400> 40

Cys Asp Xaa Ala Xaa Pro Xaa Cys Gly

1 5

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 41

Gly Ser Pro Gly Ile Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Leu Glu

1 5 10

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 42

Leu Pro Xaa Thr Gly

1 5

<210> 43

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 43

Pro Glu Pro

1

<210> 44

<211> 24

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 44

Met Lys Lys Ile Met Leu Val Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Pro Ile

1 5 10 15

Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp

20

<210> 45

<211> 29

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 45

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

1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Pro Leu Ser Gly Val Tyr Ala Asp Thr

20 25

<210> 46

<211> 31

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 46

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile

1 5 10 15

Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val
20 25 30

<210> 47

<211> 29

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 47

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

Thr Ala Phe Ala Ala Pro Thr Ile Ala Ser Ala Ser Thr
20 25

<210> 48

<211> 54

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400>

48

Met Gln Lys Thr Arg Lys Glu Arg Ile Leu Glu Ala Leu Gln Glu Glu
1 5 10 15

Lys Lys Asn Lys Lys Ser Lys Lys Phe Lys Thr Gly Ala Thr Ile Ala
20 25 30

Gly Val Thr Ala Ile Ala Thr Ser Ile Thr Val Pro Gly Ile Glu Val
35 40 45

Ile Val Ser Ala Asp Glu
50

<210> 49

<211> 28

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 49

Met Lys Lys Leu Lys Met Ala Ser Cys Ala Leu Val Ala Gly Leu Met
1 5 10 15

Phe Ser Gly Leu Thr Pro Asn Ala Phe Ala Glu Asp

20 25

<210> 50

<211> 31

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 50

Met Ala Lys Lys Phe Asn Tyr Lys Leu Pro Ser Met Val Ala Leu Thr

1 5 10 15

Leu Val Gly Ser Ala Val Thr Ala His Gln Val Gln Ala Ala Glu

20 25 30

<210> 51

<211> 59

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 51

Met Thr Asp Lys Lys Ser Glu Asn Gln Thr Glu Lys Thr Glu Thr Lys

1 5 10 15

Glu Asn Lys Gly Met Thr Arg Arg Glu Met Leu Lys Leu Ser Ala Val

20 25 30

Ala Gly Thr Gly Ile Ala Val Gly Ala Thr Gly Leu Gly Thr Ile Leu

35 40 45

Asn Val Val Asp Gln Val Asp Lys Ala Leu Thr

50 55

<210> 52

<211> 53

<212> PRT

<213> Bacillus subtillis

<400> 52

Met Ala Tyr Asp Ser Arg Phe Asp Glu Trp Val Gln Lys Leu Lys Glu

1 5 10 15

Glu Ser Phe Gln Asn Asn Thr Phe Asp Arg Arg Lys Phe Ile Gln Gly

20 25 30

Ala Gly Lys Ile Ala Gly Leu Gly Leu Gly Leu Thr Ile Ala Gln Ser
35 40 45

Val Gly Ala Phe Gly
50

<210> 53
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 53

Met Lys Lys Val Ala Ala Phe Val Ala Leu Ser Leu Leu Met Ala Gly
1 5 10 15
Cys Val Ser Pro Asp Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe Ser Ser
20 25 30
Ile Ala Ser Ala Ser Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser Thr Met

35 40 45
Ile Ile Gln Val Asp Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr Val Asn
50 55 60
Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln Asn Ser Pro Tyr Pro Leu Thr Gly
65 70 75 80
Arg Val Asn Gly Thr Phe Ile Ala Phe Ser Val Gly Trp Asn Asn Ser
85 90 95
Thr Glu Asn Cys Asn Ser Ala Thr Gly Trp Thr Gly Tyr Ala Gln Val

100 105 110
Asn Gly Asn Asn Thr Glu Ile Val Thr Ser Trp Asn Leu Ala Tyr Glu
115 120 125
Gly Gly Ser Gly Pro Ala Ile Glu Gln Gly Gln Asp Thr Phe Gln Tyr
130 135 140
Val Pro Thr Thr Glu Asn Lys Ser Leu Leu Lys Asp Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Ser Ser Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp

165 170 175

Ile Gly Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp

180 185 190

Lys Glu Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp

195 200 205

Lys Asn His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile

210 215 220

Ala Gly Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly

225 230 235 240

Leu Ala Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn

245 250 255

Glu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr

260 265 270

Lys Glu Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr

275 280 285

Gly Asp Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser

290 295 300

Ile Gly His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu

305 310 315 320

Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn

325 330 335

Met Val Asn Gln Asn Ala Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro

340 345 350

Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys

355 360 365

Ala Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser

370 375 380

Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys

385 390 395 400

Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg

405 410 415

Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn

420 425 430

Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp

435 440 445

Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu

450 455 460

Glu His His His His His His

465 470

<210> 54

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 54

Met Lys Lys Val Ala Ala Phe Val Ala Leu Ser Leu Leu Met Ala Gly

1 5 10 15

Cys Val Ser Pro Asp Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe Ser Ser

20 25 30

Ile Ala Ser Ala Ser Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser Thr Met

35 40 45

Ile Ile Gln Val Asp Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr Val Asn

50 55 60

Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln Asn Ser Pro Tyr Pro Leu Thr Gly

65 70 75 80

Arg Val Asn Gly Thr Phe Ile Ala Phe Ser Val Gly Trp Asn Asn Ser

85 90 95

Thr Glu Asn Cys Asn Ser Ala Thr Gly Trp Thr Gly Tyr Ala Gln Val

100 105 110

Asn Gly Asn Asn Thr Glu Ile Val Thr Ser Trp Asn Leu Ala Tyr Glu

115 120 125

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

Lys Glu Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp
195 200 205
Lys Asn His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile
210 215 220
Ala Gly Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly
225 230 235 240
Leu Ala Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn
245 250 255

Glu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr
260 265 270
Lys Glu Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr
275 280 285
Gly Asp Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser
290 295 300
Ile Gly His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu
305 310 315 320

Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn
325 330 335
Met Val Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Ala Asn Pro
340 345 350
Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys
355 360 365

Ala Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser
370 375 380

Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys
385 390 395 400
Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg
405 410 415
Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn
420 425 430
Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp
435 440 445

Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu
450 455 460
Glu His His His His His His
465 470

<210> 55
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 55
Met Lys Lys Val Ala Ala Phe Val Ala Leu Ser Leu Leu Met Ala Gly
1 5 10 15
Cys Val Ser Pro Asp Phe Asp Ala Ser Asn Phe Lys Asp Phe Ser Ser

20 25 30
Ile Ala Ser Ala Ser Ser Ser Trp Gln Asn Gln Ser Gly Ser Thr Met
35 40 45
Ile Ile Gln Val Asp Ser Phe Gly Asn Val Ser Gly Gln Tyr Val Asn
50 55 60
Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln Asn Ser Pro Tyr Pro Leu Thr Gly
65 70 75 80

Arg Val Asn Gly Thr Phe Ile Ala Phe Ser Val Gly Trp Asn Asn Ser

85 90 95

Thr Glu Asn Cys Asn Ser Ala Thr Gly Trp Thr Gly Tyr Ala Gln Val

100 105 110

Asn Gly Asn Asn Thr Glu Ile Val Thr Ser Trp Asn Leu Ala Tyr Glu

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Pro Ala Ile Glu Gln Gly Gln Asp Thr Phe Gln Tyr

130 135 140

Val Pro Thr Thr Glu Asn Lys Ser Leu Leu Lys Asp Gly Gly Gly Gly

145 150 155 160

Ser Ser Ser Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp

165 170 175

Ile Gly Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp

180 185 190

Lys Glu Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp

195 200 205

Lys Asn His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile

210 215 220

Ala Gly Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly

225 230 235 240

Leu Ala Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn

245 250 255

Glu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr

260 265 270

Lys Glu Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr

275 280 285

Gly Asp Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser

290 295 300

Ile Gly His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu

305 310 315 320

Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn

325 330 335

Met Val Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Ala Ala Ala Ser Trp Asn Pro

340 345 350

Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys

355 360 365

Ala Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser

370 375 380

Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys

385 390 395 400

Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg

405 410 415

Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn

420 425 430

Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp

435 440 445

Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu

450 455 460

Glu His His His His His His

465 470

<210> 56

<211> 23

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Signal

peptide

<400> 56

Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser

1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Gln Asp Pro

20

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 57

Leu Glu His His His His His His

1 5

<210> 58

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Signal

peptide

<400> 58

Met Lys Lys Val Ala Ala Phe Val Ala Leu Ser Leu Leu Met Ala Gly

1 5 10 15

Cys Val Ser Asp Pro

20