



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0041479
(43) 공개일자 2011년04월21일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.
C07K 14/255 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7001424</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년06월23일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년01월19일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/057836</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/156405
국제공개일자 2009년12월30일</p> <p>(30) 우선권주장
08305327.2 2008년06월25일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
인썸(인스티튜트 내셔널 드 라 쎄테 에 드 라 리 세르세메디칼르)
프랑스. 에프-75013 파리 튀 드 툴비아크 101
앵스티튀 파스티르 드 릴레
프랑스 릴레 에프-59000 튀 뒤 프로페세르-칼메트 1</p> <p>(72) 발명자
시라드, 장-클라우드
프랑스 에프-59021 릴레 사이트 칼메트 튀 뒤 프 로페세르 칼메트 1 인스티튜트 드 바이올로지 유801 인썸</p> <p>(74) 대리인
남상선</p> |
|--|--|

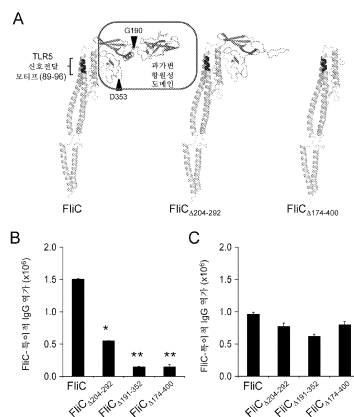
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 면역에주변트인 플라젤린 기반의 화합물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 생체내 면역 에주변트 활성을 나타내는 살모넬레 엔테리카(*Salmonelle enterica*) 기원의 플라젤린 (flagellin)으로부터 유래된 신규한 펩티드 화합물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

a) 서열 목록 번호:1의 위치 1에 위치된 아미노산 잔기로부터 시작하고, 서열 목록 번호:1의 위치 99 내지 173에 위치된 각각의 아미노산 잔기들로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 종료하는 아미노산 서열과 90% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 N-말단 펩티드; 및

b) 서열 목록 번호:1의 위치 401 내지 406에 위치된 각각의 아미노산 잔기들로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 시작하고, 서열 목록 번호:1의 위치 494에 위치된 아미노산 잔기에서 종료하는 아미노산 서열과 90% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 C-말단 펩티드를 포함하는 면역에슈버트 화합물로서,

상기 N-말단 펩티드가 상기 C-말단 펩티드에 직접 연결되거나, 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드가 스페이스(spacer) 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결된, 면역에슈버트 화합물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 N-말단 펩티드가 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-99, 1-137, 1-160 및 1-173으로 구성된 군으로부터 선택되는 면역에슈버트 화합물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 C-말단 펩티드가 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 401-494 및 406-494로 구성된 군으로부터 선택되는 면역에슈버트 화합물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드가 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-173 및 401-494로 각각 구성되는 면역에슈버트 화합물.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드가 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-160 및 406-494로 각각 구성되는 면역에슈버트 화합물.

청구항 6

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드가 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-137 및 406-494로 각각 구성되는 면역에슈버트 화합물.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드가 NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH 펩티드 서열로 구성된 중간 스페이스 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결되는 면역에슈버트 화합물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 목록 번호:1의 위치 488에 위치된 아스파라긴 아미노산 잔기가 세린으로 대체된 면역에슈버트 화합물.

청구항 9

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 N-말단에 추가 메티오닌 잔기를 포함하는 면역에슈버트 화합물.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 따른 면역에슈버트 화합물과 함께 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형

제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 따른 면역에슈버트 화합물과 함께 하나 이상의 항원을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 12

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 따른 면역에슈버트 화합물과 함께 하나 이상의 항원을 포함하는 백신 조성물.

청구항 13

상기 면역에슈버트 화합물이 상기 하나 이상의 항원에 공유적으로 연결되지 않은 제 11항에 따른 면역원성 조성물, 또는 제 12항에 따른 백신 조성물.

청구항 14

약제로서 사용하기 위한, 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 따른 면역에슈버트 화합물.

청구항 15

약학적 조성물의 제조에서의 제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 따른 면역에슈버트 화합물의 용도.

청구항 16

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 따른 면역에슈버트 화합물을 인코딩하는 핵산.

청구항 17

제 16항의 핵산을 포함하거나, 제 16항의 핵산이 삽입된 재조합 벡터.

청구항 18

제 16항의 핵산 또는 제 17항의 재조합 벡터로 트랜스펙션되거나 형질전환된 숙주 세포.

명세서

기술분야

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 개체 또는 동물에서의 면역 반응의 유도 및/또는 자극에 관한 것이다.

[0003] 이는 특히 면역원성 조성물 및 백신 조성물에 유용한 신규한 면역에슈버트(immunoadjuvant) 화합물에 관한 것이다.

배경기술

[0004] 발명의 배경

[0005] 안전하고 효능 있는 백신을 개발하는 것은 여전히 전세계 공중 보건의 주요 목표이다.

[0006] 특히, "점막"으로 언급되는 백신이 주사용 백신에 대한 매력적인 잠재적 대안으로 출현하였다.

[0007] 점막 투여는 잠재적으로 많은 바람직한 특성을 지닌다. 아마, 점막 백신 전달 기술을 개발하기 위한 대부분의 강력한 이유는 점막 진입 부위에서 많은 침입 병원체에 대한 국소 면역을 발생시킴으로써 면역 방어의 제 1선을 개발하려는 것이다.

[0008] 더욱이, 일부 연구자들은 통상적인 점막 면역계가 존재함으로써 한 부위에서 유도된 점막 면역이 원위의 점막 부위에서 면역을 초래할 수 있다는 것을 보고하였다(McGhee, J. R. et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. Vaccine 1992, 10:75-88).

- [0009] 또한, 점막 부위를 통한 항원의 전달은 전신 면역 반응을 발생시킬 잠재성을 갖는다.
- [0010] 이는 비침습성 방식, 예를 들어, 비내 또는 다른 점막 경로로 백신을 전달시켜 다양한 점막 부위에서 진입할 수 있는 매우 다양한 병원체에 대한 면역을 유발시킴으로써 유의한 이익이 달성될 수 있음을 암시한다.
- [0011] 대부분의 현재의 백신(점막 백신 또는 기타 백신)은, (i) 관심 치료 표적 항원, 및 (ii) 상기 항원을 자극하고/하거나 상기 항원에 대해 면역원성을 유도하는 면역에유버트 화합물(들)의 2개의 주요 성분으로 구성된다.
- [0012] 공지된 면역에유버트의 특성은 매우 다양하나, 이는 특히 광유, 박테리아 추출물, 생(生) 및 약독화된 유기체 및 수산화알루미늄 금속의 현탁액을 포함한다.
- [0013] 에유버트가 향상된 면역 반응을 제공하더라도, 이의 사용은 또한 특히 투여 경로에서 작용하는 부작용을 유발할 수 있다. 따라서, 인간에서 승인되고 효과적인 에유버트의 수는 비교적 제한되어 있다.
- [0014] 선천 면역 분야의 진보는 숙주 면역 반응의 조절을 통제하는 세포 및 분자 메커니즘 둘 모두의 보다 나은 이해를 제공하였다.
- [0015] 이러한 면역계의 보다 나은 지식은 신규한 잠재적으로 유용한 면역에유버트의 연구 및 개발을 가능케 하였다.
- [0016] 특히, 톨-유사 수용체(toll-like receptor, TLR)가 포유동물에서 선천 및 적응 면역의 협력된 유도에 유효하다. TLR은 매우 다양한 세포 유형에 의해 발현되므로, 이들은 신체 전체에 걸쳐 면역성을 촉발시킬 수 있다.
- [0017] 병원성 미생물에 의한 감염 후, TLR은 미생물 관련 분자 패턴(microbe-associated molecular pattern, MAMP)으로 언급되는 보존된 모티프를 인지한다. TLR 진입기전은 병원성 미생물에 대한 선천적 청소 및 후천적 면역 둘 모두에 제공되는 유전자 발현 프로그램을 유도한다. 예를 들어, TLR은 이후에 선천적 미생물 청소와 직접적으로 관련된 다형핵 호중구(PMN)을 특이적으로 유인하는 케모카인의 생성을 유도한다. 또한, TLR은 다면발현성 면역 매개체(예를 들어, TNF α)의 분비, 및 림프구로의 항원 제시를 특수화하는 수지상 세포(DC)의 기능적 성숙을 촉진한다.
- [0018] 결과적으로, TLR 효능제는 "광범위하게 특이적인" 전염증성 면역 반응을 자극할 뿐만 아니라, 규정된 항원에 대한 적응 면역 반응을 향상시키고, 이에 따라 면역에유버트로 간주된다.
- [0019] 이의 잠재적으로 유리한 효과에도 불구하고, MAMP의 전신 독성은 에유번시(adjuvancy)를 향해 MAMP 활성을 편향시키는 유도체를 개발하려는 노력을 유발시킨다. 게다가, 독특한 특성을 갖는 조작된 분자가 면역 반응의 조작의 주요 목표이다.
- [0020] 박테리아의 플라젤린(flagellin)(많은 박테리아 병원체에서 주요 플라젤라 성분)은 TLR5 활성화를 위한 특이적인 독특한 효능제이다.
- [0021] 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*)인 세로바 티피뮤리움(Serovar Typhimurium)(*S. Typhimurium*)으로부터의 FliC 플라젤린은 플라젤룸(flagellum) 구조-기능, 면역성 및 TLR5 신호전달에 대한 연구를 위한 모범이다.
- [0022] 이는 2개의 별개의 도메인을 갖는 494개의 아미노산 단백질이다. 아미노 말단 및 카르복시 말단의 "보존된" 영역은 TLR5 활성화에 필수적인 도메인을 형성한다.
- [0023] 플라젤린 FliC의 중간 도메인은 TLR5 신호전달에 필수적이지 않은 아미노산을 포함한다. 이는 "과가변" 영역으로 명명되는데, 이는 한 박테리아 종과 다른 박테리아 종에서 조성 및 크기에 있어서 주요 서열이 크게 상이하기 때문이다. 대조적으로, 과가변 영역은 플라젤린 항원성에 대해서는 필수적으로 공지되어 있다.
- [0024] 플라젤린의 정맥내(i.v.) 주사는 전염증성 매개체(예를 들어, TNF α 또는 IL-6)의 생성 및 DC 활성화를 특징으로 하는 전신 반응을 촉진하는 것을 나타내었다.
- [0025] 더욱이, 플라젤린은 점막 특이적인 선천 및 적응 방어 메커니즘을 촉발시킨다. 예를 들어, 상피세포주 및 폐 점막은 이후에 점막 PMN 및 DC를 각각 보충시키는 CXCL8(IL-8) 및 CCL20과 같은 케모카인의 생성을 상향조절한다.
- [0026] 다양한 저자는 또한 플라젤린이, (i) 혈청 및/또는 분비 항체 반응, 및 (ii) 플라젤린 자체 및 공동투여된 항원 둘 모두에 대한 Th1 및 Th2 세포 반응을 유발하는 효능 있는 전신 및 점막 면역에유버트인 것을 보고하였다.
- [0027] 이의 효능있는 전신 및 점막 면역에유버트 활성으로 인해, 플라젤린은 백신, 특히 점막 백신 유형의 개발에 특히 흥미로울 수 있다.

- [0028] 그러나, 상기 플라젤린 유형 애주번트의 대부분은 상기 백신 응용분야, 특히 상기 점막 백신 방법에 대해 완전히 적합하지는 않다.
- [0029] 확실히, 공지된 플라젤린 애주번트는 생체내 투여시 주요 부작용, 특히 내생 항원 활성화 및 전신 전염증성 특성을 나타낸다.
- [0030] 더욱이, 공지된 플라젤린 유형 면역애주번트 대부분은 생체내 투여시 효능 있는 면역 반응을 유발시키기 위해 표적 항원에 물리적으로 연결될 필요가 있다. 이러한 필요조건은 적합한 플라젤린-항원 연결, 및 최종적으로 유용한 면역원성 물질을 수득하기 위해 보충적인 복잡한 조작을 하도록 한다.
- [0031] 따라서, 특히 임의의 유의한 전신 염증 부작용을 현저히 촉발시키지 않고, 항원에 대한 점막 면역 반응을 유도하고/하거나 향상시키는, 면역학적 애주번트로 사용될 수 있는 신규한 화합물이 필요하다.
- [0032] 이러한 신규한 화합물은 또한 유리하게는 표적 항원과의 간단한 혼합에 의해 면역 반응을 촉발시킬 수 있어야 한다.
- [0033] 본 발명은 이제 상기 필요를 만족시키고, 면역원성 조성물 및 백신(특히, 점막 유형)의 생성에 특히 유용할 수 있는 신규한 면역애주번트 화합물을 제시한다.

발명의 내용

- [0034] **발명의 개요**
- [0035] 본 발명에 따르면, 본원의 실시예에 예시된 바와 같이 생체내 면역 애주번트 활성을 나타내는 서열 목록 번호:1 유형의 *살모넬라 엔테리카* 세로바 티피유리움 기원의 플라젤린으로부터 유도된 신규한 펩티드 화합물이 밝혀졌다.
- [0036] 또한, 본 발명에 따르면, 이러한 신규한 애주번트 화합물은 유의한 전신 전염증성 효과를 나타냄이 없이 특히 점막 애주번트 특성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.
- [0037] 따라서, 본 발명의 상기 신규한 플라젤린 유래 화합물은 유리하게는 점막 면역 반응을 유도하고/하거나 향상시키는, 면역애주번트 물질로서 특히 유용하다.
- [0038] 따라서, 본 발명은,
- [0039] a) 서열 목록 번호:1의 위치 1에 위치한 아미노산 잔기로부터 시작하고, 서열 목록 번호:1의 위치 99 내지 173에 위치한 각각의 아미노산 잔기들로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 종료하는 아미노산 서열과 90% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 N-말단 펩티드; 및
- [0040] b) 서열 목록 번호:1의 위치 401 내지 406에 위치한 각각의 아미노산 잔기들로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 시작하고, 서열 목록 번호:1의 위치 494에 위치한 아미노산 잔기에서 종료하는 아미노산 서열과 90% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 C-말단 펩티드를 포함하는 면역애주번트 화합물에 관한 것으로,
- [0041] 상기 N-말단 펩티드 및 C-말단 펩티드는 서로 직접 연결되거나, 상기 N-말단 펩티드 및 C-말단 펩티드는 스페이서(spacer) 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결된다.
- [0042] 본 발명의 면역애주번트 화합물의 바람직한 구체예는 이후에 상세한 설명에서 규정된다.
- [0043] 본 발명은 또한 상기(또는 하기 기재에서) 정의되는 면역애주번트 화합물과 함께 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상기 정의된 면역애주번트 화합물과 함께 하나 이상의 항원을 포함한다.
- [0045] 따라서, 상기 약학적 조성물은 유리하게는 면역원성 조성물(즉, 예를 들어, 항체를 생성시키기 위해 항원에 대한 면역 반응을 유도하려는 조성물) 또는 백신 조성물(즉, 질병을 치료하거나 예방하기 위해 피검체 또는 동물에서 면역 반응을 유도하려는 조성물)이다.
- [0046] 바람직한 구체예에 따르면, 상기 면역원성 조성물 또는 상기 백신은 유리하게는 상기 하나 이상의 항원에 공유적으로 연결되지 않은 상기 본 발명의 면역애주번트 화합물을 포함한다.
- [0047] 본 발명은 또한 약제(특히, 점막 애주번트 활성을 유도하고/하거나 향상시키기 위한 약제)로서 사용하기 위한 상기 정의된 면역애주번트 화합물에 관한 것이다.

- [0048] 본 발명은 또한 플라젤린 단백질이 아닌 하나 이상의 항원에 대한 면역 반응(특히, 점막 경로에 의한 투여 후의 점막 구획에서의 면역 반응)을 특히 유도하고/향상시키기 위한 약학적 조성물의 제조에서의 본 발명에 따른 면역에유버트 화합물의 용도에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명은, (i) 상기 기재된 면역에유버트 펩티드 화합물을 엔코딩하는 핵산, (ii) 상기 핵산을 포함하는, 상기 핵산이 삽입된 재조합 벡터, 및 (iii) 상기 핵산 또는 상기 재조합 벡터로 트랜스펙션되거나 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0050] **도면의 간단한 설명**
- [0051] **도 1. 과가변 영역이 결실된 플라젤린의 특성 및 교차반응성.**
- [0052] (A) 재조합 플라젤린의 개략적 3D 도면.
- [0053] 야생형 플라젤린 FliC의 구조가 Pymol (<http://www.pymol.org>)을 이용하여 좌측 패널에 제시된다. 단량체에서, 말단 영역(1-170 및 400-494)은 α -헬릭스로 밀접하게 폴딩되고, 플라젤린 기능과 관련된 구조 도메인을 형성한다. 모티프 89-96(흑색)이 TLR5 신호전달에 필수적이다. FliC "과가변" 도메인은 주로 β 구조 및 β 턴으로 구성된다.
- [0054] 스위스-모델(Swiss-Model)(<http://www.expasy.org/spdbv/>)을 이용하여, 과가변 영역의 부분 및 전체 결실을 각각 나타내는 FliC $_{\Delta 204-292}$ 및 FliC $_{\Delta 174-400}$ 에 대해 전체 구조가 예측되었다.
- [0055] FliC $_{\Delta 191-352}$ 에 대해, 결실을 나타내는 아미노산의 위치가 좌측 패널 상에 제시된다. FliC $_{\Delta 174-400}$ 및 FliC $_{\Delta 191-352}$ 는 결실 접합부에서 GAAG 및 LELE 링커를 각각 함유한다.
- [0056] (B, C) FliC 특이적 혈청의 교차반응성.
- [0057] 과면역 혈청이 프라이밍을 위한 CFA와 함께 제형화된 플라젤린의 피하 투여 후, IFA 부스트(boost) 후에 수득되었다. 혈청이 FliC, FliC $_{\Delta 204-292}$, FliC $_{\Delta 191-352}$ 및 FliC $_{\Delta 174-400}$ 에 대해 ELISA에서 적정되었다. 결과는 2개 실험으로 대표된다. (B) 항-FliC 혈청의 교차반응성. (C) 항-FliC $_{\Delta 174-400}$ 혈청의 교차반응성.
- [0058] 통계적 유의성(만-휘트니 검정(Mann-Whitney test)에서 $p>0.05$)은 별표로 표시된다.
- [0059] **도 2. 과가변 영역이 결실된 플라젤린의 상피 및 점막 전염증성 활성화.**
- [0060] (A, B) 재조합 플라젤린에 의한 상피 세포의 활성화.
- [0061] 인간 상피 세포가 지정된 농도의 플라젤린 FliC, FliC $_{\Delta 204-292}$, FliC $_{\Delta 191-352}$, FliC $_{\Delta 174-400}$ 또는 FliC $_{\Delta 174-400/89-96}$ 으로 활성화되었다. 리포터 융합체 *CCL20-luc*를 지닌 Caco-Rumbo 세포가 6시간 동안 활성화되고, 루시페라아제 활성이 포화 FliC 수준으로 측정된 최대 활성화에 대해 표준화되었다(A). BEAS-2B 기관지 상피 세포가 16시간 동안 자극되고, 상층액 중의 IL-8 수준이 측정되었다. 결과는 2개의 독립된 실험 중 대표 하나이다(B).
- [0062] (C-D) 결실된 플라젤린에 의한 점막 선천 반응의 자극.
- [0063] 재조합 플라젤린 또는 트립신 처리된 제조물(1 μ g 당량)이 마취된 마우스(n=3-5)에 비내 투여되었다. 전체 폐에서의 *CCL20*-특이적 mRNA 수준이 실시간 qRT-PCR을 이용하여 2시간 후에 결정되었다(C). 점적주입 6시간 후, *CCL20* 농도를 측정하기 위해 BAL(흑색 막대) 및 폐(빈 막대)가 샘플링되었다(D).
- [0064] 만-휘트니 검정으로 통계적 유의성($p>0.05$)이 결정되었다.
- [0065] **도 3. 과가변 영역 결실을 가진 플라젤린의 에유버트 효과.**
- [0066] 마우스(n=8)가 1일 및 21일에 난알부민(ovalbumin)(OVA) \pm 플라젤린 또는 콜레라 독소(CT)로 비내 면역화되었다.
- [0067] 35일에, OVA 특이적 IgG 역가가 혈청(A) 및 BAL(B)에서 측정되었다.
- [0068] BAL에서의 OVA 특이적 IgA의 농도가 결정되었다(C).
- [0069] 결과는 2개의 독립된 실험 중 대표 하나이다. 만-휘트니 검정으로 통계적 유의성($p>0.05$)이 결정되었다.
- [0070] **도 4. 과가변 영역이 결핍된 플라젤린의 내재 항원성 특성.**

- [0071] 마우스(n=8)가 1일 및 21일에 난알부민(OVA) ± 플라젤린 또는 콜레라 독소(CT) 또는 LPS로 비내 면역화되었다.
- [0072] 35일에, FliC 특이적 IgG 역가가 혈청(A) 및 BAL(B)에서 측정되었다. 결과는 2개의 독립된 실험 중 대표 하나이다.
- [0073] 만-휘트니 검정으로 통계적 유의성($p > 0.05$)이 결정되었다.
- [0074] **도 5. 플라젤린 특이적 항체에 의한 TLR5 신호전달의 증화.**
- [0075] NMRI 마우스가 1주에 $1\mu\text{g}$ 의 플라젤린 FliC 및 CFA로 면역화된 후, 3, 5 및 7주에 FliC 및 IFA로 부스팅되었다. 모의(mock) 조건에서, 동물은 난알부민 및 애쥬번트 또는 애쥬번트 단독으로 유사하게 처리되었다. 실험은 9주에 수행되었다.
- [0076] (A) 플라젤린 특이적 면역 혈청의 시험관내 TLR5 증화 활성화.
- [0077] 리포터 작제물 CCL20-luc를 지닌 Caco-Rumbo 상피 세포가 50% v/v FliC 과면역(빈 원) 또는 모의(흑색 원) 혈청과 함께 인큐베이션된 플라젤린 FliC를 이용하여 6시간 동안 활성화되었다. 루시퍼라아제 활성이 결정되고, 100 ng/ml FliC로 수득된 활성화에 대해 표준화되었다. 결과는 3개의 독립된 실험 중 대표 하나이다.
- [0078] (B, C) 플라젤린 특이적 면역 혈청의 생체내 TLR5 증화 활성화.
- [0079] 면역화된 동물(n=3)에 PBS(흑색 막대) 또는 $0.1\mu\text{g}$ (회색 막대) 또는 $1\mu\text{g}$ 의 플라젤린 FliC(빈 막대)가 정맥내 주사되었다. 혈청이 2시간 후에 수거되고, CCL20(B) 및 CXCL2(C)의 농도가 ELISA에 의해 결정되었다.
- [0080] (D) 면역 혈청의 증화 활성화.
- [0081] 동물(용량당 n=3)에 다양한 양의 플라젤린 특이적 혈청 또는 모의 혈청이 정맥내로 수동 전달되었고, 나타낸 바와 같이 재조합 플라젤린으로 1시간 후에 정맥내 처리되었다. 공격 2시간 후의 혈청에서의 케모카인 생성이 ELISA에 의해 측정되었다.
- [0082] 만-휘트니 검정을 이용하여 통계적 유의성($p > 0.05$)이 결정되었다.
- [0083] **도 6. 플라젤린 FliC 및 FliC $_{\Delta 174-400}$ 의 비내 용량-반응 활성화.**
- [0084] 마우스(n=3-5)에 다양한 양의 플라젤린 FliC(흑색 사각형) 또는 FliC $_{\Delta 174-400}$ (빈 사각형)가 비내 주입되었다. CCL20(A) 및 CXCL2(B)의 농도가 ELISA를 이용하여 BAL에서 6시간 후에 결정되었다.
- [0085] 만-휘트니 U 검정으로 통계적 유의성($p > 0.05$)이 결정되었다.
- [0086] **도 7. 과가변 영역이 결실된 플라젤린 FliC $_{\Delta 174-400}$ 의 전신 활성화 능력의 변경.**
- [0087] 다양한 양의 플라젤린 FliC(흑색 사각형) 또는 FliC $_{\Delta 174-400}$ (빈 사각형)이 정맥내 투여되었다. CCL20(A) 및 CXCL2(B)의 농도가 ELISA를 이용하여 혈청에서 2시간 후에 결정되었다.
- [0088] 만-휘트니 검정으로 통계적 유의성($p > 0.05$)이 결정되었다.
- [0089] **도 8 : 다양한 재조합의 과가변 영역이 결실된 플라젤린의 SDS PAGE 분석.**
- [0090] 도 8은 쿠마시 블루(Coomassie blue)를 이용한 염색 후의 재조합적으로 생성된 FliC $_{\Delta 174-400}$, FliC $_{\Delta 161-405}$, FliC $_{\Delta 138-405}$ 및 FliC $_{\Delta 100-405}$ 의 SDS PAGE 전기영동의 사진으로 구성된다.
- [0091] **도 9 : 다양한 재조합의 과가변 영역이 결실된 플라젤린의 면역블롯 분석.**
- [0092] 도 9는 항-FliC 항체를 이용한 염색 후의 재조합적으로 생성된 FliC $_{\Delta 174-400}$, FliC $_{\Delta 161-405}$, 및 FliC $_{\Delta 138-405}$ 및 FliC $_{\Delta 100-405}$ 의 웨스턴 블롯 전기영동의 사진으로 구성된다.
- [0093] **도 10: 다양한 재조합의 과가변 영역이 결실된 플라젤린에 의한 CCL20 케모카인 생성의 유도.**
- [0094] 결실된 플라젤린에 의한 전신 선천 반응의 자극.
- [0095] 재조합 플라젤린 또는 트립신 처리된 제조물($10\mu\text{g}$ 당량)이 마우스(n=2)에 복막내 투여되었다. 투여 2시간 후, CCL20 농도를 측정하기 위해 혈청이 샘플링되었다.

- [0096] **도 11 : 다양한 재조합의 과가변 영역이 결실된 플라젤린에 의한 CXCL2 케모카인 생성 유도의 유도.**
- [0097] 결실된 플라젤린에 의한 전신 선천 반응의 자극.
- [0098] 재조합 플라젤린 또는 트립신 처리된 제조물(10 μ g 당량)이 마우스(n=2)에 복막내 투여되었다. 투여 2시간 후, CXCL2 농도를 측정하기 위해 혈청이 샘플링되었다.
- [0099] **도 12 : HIV 바이러스로부터의 gp140 항원에 대한 면역화를 위한 재조합 FliC $_{\Delta 174-400}$ 의 애주번트 효과.**
- [0100] 1일 및 21일에 마우스(n=6)가 gp140(5 μ g) \pm 플라젤린(1 μ g)으로 비내 면역화되었다.
- [0101] 35일에, 혈청(채워진 기호) 및 BAL(빈 기호)에서 gpP140 특이적 IgG 역가가 측정되었다. 결과는 2개의 독립된 실험 중 대표 하나이다.
- [0102] **도 13 : 항-FliC $_{\Delta 174-400}$ 마우스 모노클로날 항체가 고정된 면역친화성 기질 상에서의 FliC의 정제 주기의 280nm에서의 크로마토그래피 프로파일.**
- [0103] **도 14 : 항-FliC $_{\Delta 174-400}$ 마우스 모노클로날 항체가 고정된 면역친화성 기질 상에서의 FliC의 정제 주기 동안 수거된 다양한 크로마토그래피 분획의 전기영동 분석.**
- [0104] 도 14는 쿠마시 블루를 이용한 염색 후의 도 13에 도시된 바와 같이 수거된 분획의 SDS PAGE 전기영동의 사진으로 구성된다.
- [0105] **발명의 상세한 설명**
- [0106] 본 발명에 따르면, 신규한 화합물이 적합한 해당 항원(들)과 함께 투여되는 경우, 상기 신규한 화합물이 생체내 점막 면역애주번트 활성을 유도하여 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 것으로 밝혀졌다.
- [0107] 특히, 본 발명의 신규한 애주번트 화합물은 마우스로의 비내 투여 후에 면역애주번트 특성을 나타내는 것이 본원에서 밝혀졌다. 본 발명의 상기 면역애주번트 화합물은 따라서 전신 및 점막 면역 반응에 효력을 더할 수 있다.
- [0108] 본 발명의 상기 플라젤린 유래 면역애주번트 화합물이 생체내 점막 전염증성 효과와 함께 TLR5-매개 점막 애주번트 특성을 가지나, 전신 주사 후에 어떠한 유의한 전신 전염증성 부작용을 나타내지 않는 것이 입증되었다.
- [0109] 더욱이, 본원의 실시예에 포함된 결과는 상기 플라젤린 유래 면역애주번트 화합물이 유의한 내생 항원성 효과를 나타내지 않고, 즉, 관심 분자가 비내 경로에 의해 투여되는 경우에 특히 혈청 또는 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage, BAL)으로 플라젤린 특이적 항체를 촉발시키는 효능을 방지하거나 약화시키는 것을 나타낸다.
- [0110] 상기 결과는 본 발명의 상기 플라젤린 유래 면역애주번트 화합물이 특히 점막 면역 반응을 유도하기 위한 면역 반응의 효과적인 애주번트로 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [0111] 상기 펩티드 화합물은 따라서 (i) 피검 유기체 체내에서 점막 면역 반응을 유도함으로써 질병을 예방하거나 치료하는 점막 백신 조성물, 또는 (ii) 요망되는 항원에 대한 면역 반응을 향상시키거나 촉발시키기 위한 면역원성 조성물에 포함되는 경우에 특히 유용할 수 있다.
- [0112] 특히, 본원의 실시예에 제시된 바와 같이, 본 발명자는 예기치 않게 TLR5 신호전달이 구획화되는 것을 발견하였는데, 이는 신규한 특정 FliC $_{\Delta 174-400}$ 플라젤린(즉, 살모넬라 엔테리카 세로바 티피뮤리움 ATCC14028 플라젤린 FliC로부터의 서열 목록 번호:1의 펩티드 서열이 위치 174로부터 위치 400이 결실된 플라젤린 유래 펩티드)이 점막에서 면역성을 자극하나, 임의의 유의한 전신 전염증 효과는 없기 때문이다.
- [0113] 본 발명자는 또한 FliC $_{\Delta 174-400}$ 플라젤린이 이의 fliC 특이적 항체를 중화시키는 것에 대한 불량한 능력으로 인해 현저히 이로운 특성을 갖는 것을 확립하였다.
- [0114] 또한, FliC $_{\Delta 174-400}$ 플라젤린이 야생형 플라젤린에 비해 전신 신호전달에 대해 크게 약화되는 반면, 점막 활성은 영향을 받지 않는 것이 본원에서 밝혀졌다.
- [0115] 또한, FliC $_{\Delta 161-405}$ 및 FliC $_{\Delta 138-405}$ 를 포함하는 다른 과가변 영역이 결실된 플라젤린에 면역애주번트 특성이 부여된

것이 본원에서 밝혀졌다.

[0116] **본 발명의 면역에슈번트 펩티드**

[0117] 상기 발견은 본 발명자가 FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, 및 FliC_{Δ138-405} 플라젤린과 동일한 특성 및 장점을 갖는 펩티드 패밀리를 디자인하는 것을 가능케 한다.

[0118] 상기 펩티드 패밀리는 잔존 TLR5 자극 활성을 가질 수 있는 트렁케이션(truncation)된 형태를 예측하기 위해, 본원의 실시예에서 연구되고, 서열 목록 번호:1의 플라젤린 펩티드 서열 및 펩티드의 결정학적 구조를 기초로 한 FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, 및 FliC_{Δ138-405} 플라젤린으로부터 시작하여 규정된다.

[0119] 따라서, 본 발명은 유리하게는,

[0120] a) 서열 목록 번호:1의 위치 1에 위치한 아미노산 잔기로부터 시작하고, 서열 목록 번호:1의 위치 99 내지 173에 위치한 각각의 아미노산 잔기들로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 종료하는 아미노산 서열을 갖는 N-말단 펩티드; 및

[0121] b) 서열 목록 번호:1의 위치 401 내지 406에 위치한 각각의 아미노산 잔기들로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 시작하고, 서열 목록 번호:1의 위치 494에 위치한 아미노산 잔기에서 종료하는 아미노산 서열을 갖는 C-말단 펩티드를 포함하는 면역에슈번트 화합물에 관한 것으로,

[0122] 상기 C-말단 펩티드는 상기 N-말단 펩티드에 직접 연결되거나, 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드는 중간 스페이서 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결된다.

[0123] 본 명세서에서 사용되는 경우, "포함하다/포함하는" 및 이의 문법상 변형은 언급된 특징, 정수, 단계 또는 성분 또는 이의 군의 존재를 상술하는 것으로 해석되어야 하나, 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계, 성분 또는 이의 군의 존재 또는 추가를 배제하지는 않는다.

[0124] 본 발명의 화합물은 "면역에슈번트 화합물" 또는 "플라젤린 유래 펩티드"로 본원에서 상호교환적으로 언급될 수 있다.

[0125] "면역에슈번트 화합물"에 대해서는, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드가 피검체 또는 동물에 투여되는 경우에 항원에 대한 면역 반응을 유도하고/하거나 향상시킬 수 있는 것으로 이해된다.

[0126] 또한, 이는 일반적으로 특정 항원에 대한 특정 면역 반응의 성질을 촉진하거나, 연장시키거나, 향상시키는 작용을 하는 물질을 의미한다.

[0127] 본원에 기재된 바와 같이, 상기 면역에슈번트 화합물은 하나 이상의 항원 및 약학적으로 허용되는 부형제와 함께 백신 또는 면역원성 조성물에서 사용될 수 있다.

[0128] 상기 언급된 서열 목록 번호:1의 펩티드 서열은 *살모넬라 엔테리카* 세로바 티피뮤리움 ATCC14028 플라젤린 FliC(등록 번호 AAL20871)로부터 유래된다.

[0129] 폴리펩티드 넘버링은 하기 언급되는 바와 같이 박테리아 숙주 세포에서 메티오닌 아미노펩티다아제에 의해 통상적으로 절단되는, 중국적인 N-말단 메티오닌 뒤의 첫번째 아미노산(서열 목록 번호:1에 도시되지 않음)에서 시작한다.

[0130] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 N-말단 및 C-말단 펩티드는 유리하게는 서열 목록 번호:1의 상응하는 아미노산 서열 부분과 90% 이상의 아미노산 동일성을 갖는다.

[0131] 동일성의 기재 및 이를 결정할 수 있는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0132] 본원에서 의도하는 바와 같이, 제공된 관심 아미노산 서열은, 상기 관심 아미노산 서열이 참조 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 경우 상기 참조 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는다.

[0133] 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성 퍼센트를 결정하기 위해, 서열은 최적 비교 목적을 위해 정렬된다. 예를 들어, 갭(gap)이 최적 정렬을 위해 제 1 및 제 2 아미노산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 도입될 수 있고, 비상동 서열이 비교 목적을 위해 무시될 수 있다.

[0134] 최적 비교 목적을 위해, 2개 아미노산 서열의 동일성 퍼센트는 다음과 같은 파라미터를 이용하여 CLUSTAL W(버

전 1.82)로 달성될 수 있다: (1) CPU MODE = ClustalW mp; (2) ALIGNMENT = <<full>>; (3) OUTPUT FORMAT = <<aln w/numbers>>; (4) OUTPUT ORDER = <<aligned>>; (5) COLOR ALIGNMENT = <<no>>; (6) KTUP(워드 크기) = <<default>>; (7) WINDOW LENGTH = <<default>>; (8) SCORE TYPE = <<percent>>; (9) TOPDIAG = <<default>>; (10) PAIRGAP = <<default>>; (11) PHYLOGENETIC TREE/TREE TYPE = <<none>>; (12) MATRIX = <<default>>; (13) GAP OPEN = <<default>>; (14) END GAPS = <<default>>; (15) GAP EXTENSION = <<default>>; (16) GAP DISTANCES = <<default>>; (17) TREE TYPE = <<cladogram>> et (18) TREE GRAP DISTANCES = <<hide>>.

- [0135] 특히, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 장점 및 활성을 파괴하지 않고 작은 변형이 이루어질 수 있음이 이해된다.
- [0136] 이러한 변형은 임의의 유의한 전신 전염증성 부작용이 없이 특정 면역 활성화, 특히 TLR5 매개 점막 애주버트 특성이 보존되는 한 본 발명의 용어 "면역애주버트 화합물" 또는 "플라젤린 유래 펩티드"의 의미에 포함된다.
- [0137] 추가로, 예를 들어, 다른 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산 또는 지질을 포함하는 다양한 분자가 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드에 공유적 또는 비공유적으로 부착될 수 있다.
- [0138] 이러한 부착된 분자는 중국적으로 면역 반응이 조사되는 항원을 구성한다. 이러한 변형은 본 발명의 정의에 포함된다.
- [0139] 작은 변형은 또한, 예를 들어, 천연 발생 아미노산의 보존성 치환 뿐만 아니라 비천연 발생 아미노산, 아미노산 유사체 및 기능성 모방체(mimetic)를 포함하는 구조적 변화에 관한 것일 수 있다. 예를 들어, 리신 아미노산 잔기가 아르기닌 아미노산 잔기에 대한 보존성 치환으로 간주된다.
- [0140] 따라서, 본원에서 의도되는 바와 같이, 제 2의 참조 폴리펩티드와 90% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 제 1 폴리펩티드는 제 2의 참조 폴리펩티드에 비해 하나 이상의 아미노산 차이를 포함하는 제 1 폴리펩티드를 포함하고, 상기 아미노산 차이는, (i) 하나 이상의 아미노산 치환, (ii) 하나 이상의 아미노산 결실 및 (iii) 하나 이상의 아미노산 첨가, 또는 상기 (i), (ii) 및 (iii)의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0141] 일반적으로, 본 발명은 이에 따라 참조 폴리펩티드에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가, 바람직하게는 참조 폴리펩티드에 비해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환, 및/또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 결실, 및/또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 첨가를 갖는 변이체 폴리펩티드를 포함한다.
- [0142] 당업자는 어떠한 구조가 기능적으로 동등한 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 구성하는지 알거나 결정할 수 있다.
- [0143] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 C-말단 및 N-말단 펩티드는 유리하게는 펩티드 결합에 의해 공유적으로 직접 연결될 수 있다.
- [0144] 한 대안적 구체예에서, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 스페이스 사슬을 통해 서로 간접적으로 연결된다.
- [0145] 스페이스 사슬은 최종 화합물의 생물학적 활성을 간섭하지 않고, 또한 최종 화합물의 면역원성이 현저히 증가되지 않도록 선택되어야 한다.
- [0146] 스페이스 사슬은 바람직하게는 펩티드 결합에 의해 함께 연결되고, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 N-말단 및 C-말단 서열 사이에서 공유적으로 연결된 아미노산으로 구성된다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 스페이스 사슬은 펩티드 결합에 의해 연결된 1 내지 20개의 아미노산을 포함하고, 상기 아미노산은 20개의 천연 발생 아미노산으로부터 선택된다. 더욱 바람직한 구체예에서, 1 내지 20개의 아미노산은 Gly, Ala, Pro, Asn, Gln, Cys, Lys으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, 스페이스 사슬은 NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH 서열로 구성된다.
- [0147] 비-펩티드 링커, 예를 들어, 알킬 링커가 또한 가능하다. 이러한 알킬 링커는 임의의 비-입체 장애기, 저급 아실, 할로젠, CN, NH₂, 페닐 등에 의해 추가로 치환될 수 있다. 비-펩티드 링커의 또 다른 유형은 폴리에틸렌 글리콜기이다.
- [0148] 당업자는 상기 스페이스 사슬을 잘 알 것이고, 특히 서로 연결시키기 위한 N-말단 펩티드 및 C-말단 펩티드 서열에 따라 적합한 스페이스 서열을 선택할 수 있다.
- [0149] 더욱이, 서열 목록 번호:1의 아미노산 위치 488에 위치한 C-말단 서열의 아스파라긴 아미노산 잔기는 유리하게

는 세린 잔기로 대체된다.

- [0150] 이러한 치환은 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드를 특별히 표시하기 위해 도입되었다. 이러한 치환은 TLR5 자극 활성을 변경시키지 않고 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*)와 같은 다른 박테리아 종의 플라젤린에서 천연 발생한다. 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드를 추가로 표시하기 위해 애쥬번트 TLR5 자극 활성을 변경시키지 않는 위치에 다른 치환이 도입될 수 있다.
- [0151] *본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 바람직한 구체예*
- [0152] 바람직한 구체예에 따르면, 서열 목록 번호:1의 플라젤린 펩티드 서열 및 결정학적 구조에 비추어, 본 발명의 면역애쥬번트 화합물의 N-말단 펩티드는 유리하게는 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-99, 1-137, 1-160 및 1-173으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0153] 특히, 플라젤린 FliC의 3D 구조는 N-말단 도메인이 베타-턴, 및 이후 베타-시트 및 베타 턴에 의해 분리된 3개의 알파-헬릭스로 구성되는 것을 나타낸다. N-말단에서의 상기 이차 구조의 잔존 부분(들)은 TLR5 자극 활성(특히, 점막 TLR5 자극 활성)을 보유하기에 충분할 수 있고, 즉, 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-99는 처음 2개의 알파-헬릭스를 함유하고, 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-137은 처음 3개의 알파-헬릭스를 함유하고, 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-173은 FliC_{Δ174-400} 플라젤린에서 발견된 N-말단 구조를 함유한다.
- [0154] 추가의 바람직한 구체예에서, 면역애쥬번트 화합물의 상기 C-말단 펩티드는 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 401-494 및 406-494로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0155] 특히, 플라젤린 FliC의 3D 구조는 C-말단 도메인이 베타-턴에 의해 분리된 2개의 알파-헬릭스로 구성되는 것을 나타낸다. N-말단에서의 상기 이차 구조의 잔존 부분(들)은 TLR5 자극 활성(특히, 점막 TLR 자극 활성)을 유지하기에 충분할 수 있고; 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 401-494는 FliC_{Δ174-400} 플라젤린에서 발견되는 서열인 반면, 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 406-494는 단지 2개의 C-말단 알파-헬릭스 종속물(secondary)을 함유한다.
- [0156] 특정한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 면역애쥬번트 화합물의 N-말단 펩티드는 서열 목록 번호:1의 위치 1에 위치한 알라닌 잔기에서 시작하고, 위치 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172 및 173에 위치한 아미노산 잔기로 구성된 군으로부터 선택된 서열 목록 번호:1의 위치에 위치한 아미노산 잔기에서 종료하는 아미노산 서열로 구성된다.
- [0157] 특정한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 면역애쥬번트 화합물의 C-말단 펩티드는 위치 401, 402, 403, 404, 405 및 406에 위치한 아미노산 잔기로 구성된 군으로부터 선택된 서열 목록 번호:1의 위치에 위치한 아미노산 잔기에서 시작하고, 서열 목록 번호:1의 위치 494에 위치한 아르기닌 잔기에서 종료하는 아미노산 서열로 구성된다.
- [0158] 상기 바람직한 구체예의 특정 양태에서, 본 발명의 면역애쥬번트 화합물의 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드는 유리하게는 상기 언급된 스페이스 사슬인 NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH를 통해 서로 연결(즉, 결실된 서열 174-400의 치환 중에서도)되고; 서열 목록 번호:1의 위치 488에 위치한 아스파라긴 아미노산 잔기가 또한 유리하게는 세린 잔기에 의해 치환된다.
- [0159] 상기 기재된 면역애쥬번트 화합물의 예시적 구체예는 본원의 실시예에 제시된 FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, 및 FliC_{Δ138-405}를 포함하고, 이는 또한 하기에 보다 상세히 기재된다.
- [0160] 또 다른 추가 구체예에서, 관심 면역애쥬번트 화합물의 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-173 및 401-494로 각각 구성된다.
- [0161] 또 다른 추가 구체예에서, 관심 면역애쥬번트 화합물의 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-160 및 406-494로 각각 구성된다.
- [0162] 또 다른 추가 구체예에서, 관심 면역애쥬번트 화합물의 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드는 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-137 및 406-494로 각각 구성된다.
- [0163] 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 면역애쥬번트 화합물은 특히 상기 화합물이 박테리아 세포에서 재조합 단백질로서 생성되는 경우 이의 N-말단에 추가의 메티오닌 잔기를 포함한다.

- [0164] 관심 면역에유버트 화합물의 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드가 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-173 및 401-494로 구성되는 구체예에서, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 아미노산 위치 174에서 아미노산 위치 400에 걸친 아미노산 서열이 결실된 서열 목록 번호:1의 아미노산으로 구성된다. 본 발명의 플라젤린-펩티드 서열은 또한 본 발명의 기재에서 "FliC_{Δ174-400}" 또는 "FliC_{Δ174-400} 플라젤린"으로 언급된다.
- [0165] 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명의 면역에유버트 화합물의 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드는 유리하게는 상기 언급된 스페이스 사슬인 NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH를 통해 서로 연결(즉, 결실된 서열 174-400의 치환에서)되고; 서열 목록 번호:1의 위치 488에 위치한 아스파라긴 아미노산 잔기가 또한 유리하게는 세린 잔기에 의해 치환된다.
- [0166] 이에 따라 수득된 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 271개의 아미노산 서열이고, 이의 펩티드 서열은 서열 목록 번호:2를 구성한다.
- [0167] 폴리펩티드 넘버링은 하기 기재되는 바와 같이 박테리아 숙주 세포에서 메티오닌 아미노펩티다아제에 의해 통상적으로 절단되는, 중국적인 N-말단 메티오닌(서열 목록 번호:2에 도시되지 않음) 뒤의 첫번째 아미노산에서 시작한다.
- [0168] 관심 면역에유버트 화합물의 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드가 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-160 및 406-494로 구성되는 구체예에서, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 아미노산 위치 161로부터 아미노산 위치 405에 걸친 아미노산 서열이 결실된 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열로 구성된다. 본 발명의 플라젤린-펩티드 서열은 또한 본 발명의 기재에서 "FliC_{Δ161-405}" 또는 "FliC_{Δ161-405} 플라젤린"으로 언급된다.
- [0169] 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명의 면역에유버트 화합물의 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드는 유리하게는 상기 언급된 스페이스 사슬인 NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH를 통해 서로 연결(즉, 결실된 서열 161-405의 치환에서)되고; 서열 목록 번호:1의 위치 488에 위치한 아스파라긴 아미노산 잔기는 또한 유리하게는 세린 잔기에 의해 치환된다.
- [0170] 이에 따라 수득된 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 253개의 아미노산 서열이고, 이의 펩티드 서열은 서열 목록 번호:25를 구성한다.
- [0171] 폴리펩티드 넘버링은 하기 기재되는 바와 같이 박테리아 숙주 세포에서 메티오닌 아미노펩티다아제에 의해 통상적으로 절단되는, 중국적인 N-말단 메티오닌(서열 목록 번호:25에 도시되지 않음) 뒤의 첫번째 아미노산에서 시작한다.
- [0172] 관심 면역에유버트 화합물의 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드가 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-137 및 406-494로 구성되는 구체예에서, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 아미노산 위치 138로부터 아미노산 위치 405에 걸친 아미노산 서열이 결실된 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열로 구성된다. 본 발명의 플라젤린-펩티드 서열은 또한 본 발명의 기재에서 "FliC_{Δ138-405}" 또는 "FliC_{Δ138-405} 플라젤린"으로 언급된다.
- [0173] 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명의 면역에유버트 화합물의 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드는 유리하게는 상기 언급된 스페이스 사슬인 NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH를 통해 서로 연결(즉, 결실된 서열 138-405의 치환에서)되고; 서열 목록 번호:1의 위치 488에 위치한 아스파라긴 아미노산 잔기는 또한 유리하게는 세린 잔기에 의해 치환된다.
- [0174] 이에 따라 수득된 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 230개의 아미노산 서열이고, 이의 펩티드 서열은 서열 목록 번호:26을 구성한다.
- [0175] 폴리펩티드 넘버링은 하기 기재되는 바와 같이 박테리아 숙주 세포에서 메티오닌 아미노펩티다아제에 의해 통상적으로 절단되는, 중국적인 N-말단 메티오닌(서열 목록 번호:26에 도시되지 않음) 뒤의 첫번째 아미노산에서 시작한다.
- [0176] 관심 면역에유버트 화합물의 상기 N-말단 및 C-말단 펩티드가 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-99 및 406-494로 구성되는 구체예에서, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 아미노산 위치 100으로부터 아미노산 위치 405에 걸친 아미노산 서열이 결실된 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열로 구성된다. 본 발명의 플라젤린-펩티드 서열은 또한 본 발명의 기재에서 "FliC_{Δ100-405}" 또는 "FliC_{Δ100-405} 플라젤린"으로 언급된다.

- [0177] 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명의 면역애주변트 화합물의 상기 N-말단 펩티드 및 상기 C-말단 펩티드는 유리하게는 상기 언급된 스페이스 사슬인 NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH를 통해 서로 연결(즉, 결실된 서열 100-405의 치환에서)되고; 서열 목록 번호:1의 위치 488에 위치한 아스파라긴 아미노산 잔기는 또한 유리하게는 세린 잔기에 의해 치환된다.
- [0178] 이에 따라 수득된 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 192개의 아미노산 서열이고, 이의 펩티드 서열은 서열 목록 번호:27을 구성한다.
- [0179] 폴리펩티드 넘버링은 하기 기재되는 바와 같이 박테리아 숙주 세포에서 메티오닌 아미노펩티다아제에 의해 통상적으로 절단되는, 종국적인 N-말단 메티오닌(서열 목록 번호:27에 도시되지 않음) 뒤의 첫번째 아미노산에서 시작한다.
- [0180] **본 발명의 면역애주변트 펩티드의 합성**
- [0181] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 유전공학, 또는 당업자에게 널리 공지된 화학 또는 효소 펩티드 합성을 위한 방법 중 어느 하나에 의해 수득된 재조합 세포에 의해 합성될 수 있다.
- [0182] 1. 재조합 세포의 합성
- [0183] 본 발명에 따른 플라젤린 유래 펩티드는 이의 아미노산 서열을 엔코딩하고 트랜스펙션된 세포 내에서 효과적인 생성을 가능케 하는 핵산을 이용하여 트랜스펙션된 재조합 세포에 의해 재조합적으로 생성될 수 있다.
- [0184] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열
- [0185] 상기 플라젤린 펩티드 서열의 변형은 재조합 DNA 돌연변이유발 기술을 이용하여 생성될 수 있다.
- [0186] DNA 서열을 제작하고 변형시키는 다수의 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 상기 재조합 방법의 선택은 당업자에 의해 공지될 것이다.
- [0187] "재조합 돌연변이유발" 기술은, 예를 들어, 부위 특이적 돌연변이유발 및 PCR 돌연변이유발을 포함한다(특히, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, 2007 by John Wiley and Sons, Inc., Chapter 8 and 15] 참조).
- [0188] 상기 증합효소 연쇄반응(PCR)은 매우 다양한 돌연변이 절차 및 적용에 특히 유용하다. PCR 돌연변이유발 절차는 임의의 표적 DNA를 용이하게 효과적으로 변형시키고 조작하는 것을 가능케 한다. 이는, 예를 들어, 점 돌연변이, 결실 또는 삽입의 도입을 포함한다.
- [0189] 이러한 기술은, 예를 들어, 서열 목록 번호:1에 의해 확인된 플라젤린 펩티드를 엔코딩하는 S. 티피뮤리움(S. Typhimurium) 균주 ATCC14028로부터 분리된 서열 목록 번호:3의 야생형 *fliC* 유전자에서 수행된다.
- [0190] 바람직한 구체예에서, 상기 언급된 *fliC* 유전자는 본 발명의 펩티드에 대해 탐색된 요망되는 N-말단 및 C-말단 서열의 기능에서 선택된 적합한 프라이머쌍을 이용한 PCR 돌연변이유발(특히, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, 2007 by John Wiley and Sons, Inc., Chapter 8 and 15] 참조)에 의해 길이의 중심 부분이 결실된다.
- [0191] 예를 들어, 서열 목록 번호:3의 상기 야생형 *fliC* 유전자를 지닌 pBR322 유래 플라스미드에 기초하여, 자체 프로모터의 조절하에서, 하기 프라이머쌍이 PCR 돌연변이유발 기술에 사용될 수 있다:
- [0192] - 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-99 및 401-494로 구성된 N-말단 및 C-말단 펩티드 각각에 대한, 서열 목록 번호:4 및 서열 목록 번호:5;
- [0193] - 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-99 및 406-494로 구성된 N-말단 및 C-말단 펩티드 각각에 대한, 서열 목록 번호:4 및 서열 목록 번호:6;
- [0194] - 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-137 및 401-494로 구성된 N-말단 및 C-말단 펩티드 각각에 대한, 서열 목록 번호:7 및 서열 목록 번호:5;
- [0195] - 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-137 및 406-494로 구성된 N-말단 및 C-말단 펩티드 각각에 대한, 서열 목록 번호:7 및 서열 목록 번호:6;
- [0196] - 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-160 및 401-494로 구성된 N-말단 및 C-말단 펩티드 각각에 대한, 서열

목록 번호:8 및 서열 목록 번호:5;

- [0197] - 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-160 및 406-494로 구성된 N-말단 및 C-말단 펩티드 각각에 대한, 서열 목록 번호:8 및 서열 목록 번호:6;
- [0198] - 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-173 및 401-494로 구성된 N-말단 및 C-말단 펩티드 각각에 대한, 서열 목록 번호:9 및 서열 목록 번호:5;
- [0199] - 서열 목록 번호:1의 아미노산 서열 1-173 및 406-494로 구성된 N-말단 및 C-말단 펩티드 각각에 대한, 서열 목록 번호:9 및 서열 목록 번호:6.
- [0200] 서열 목록 번호:1의 위치 488의 아스파라긴을 세린으로 변경시키기 위해, 예를 들어, 프라이머 서열 목록 번호:10 및 서열 목록 번호:11을 이용한 부위 특이적 돌연변이유발이 사용될 수 있다.
- [0201] 플라젤린 재조합 펩티드의 1-99, 1-137, 1-160 또는 1-173과 401-494 또는 406-494의 접합부에 NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH 링커를 도입시키기 위해, 다음과 같은 DNA 서열 GGTGCAGCTGGA이 서열 목록 번호:5 및 서열 목록 번호:6의 프라이머 서열의 5 말단에 첨가되어, 각각 서열 목록 번호:12의 서열의 "F-링커-401" 및 서열 목록 번호:13의 서열의 "F-링커-406"으로 언급되는 프라이머가 생성될 수 있다.
- [0202] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드 FliC_{Δ174-400}을 생성시키는데 적합한 DNA 서열은, 예를 들어, 서열 목록 번호:14의 서열이다.
- [0203] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드 FliC_{Δ161-405}를 생성시키는데 적합한 핵산은, 예를 들어, 서열 목록 번호:28의 서열이다.
- [0204] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드 FliC_{Δ138-405}를 생성시키는데 적합한 핵산은, 예를 들어, 서열 목록 번호:29의 서열이다.
- [0205] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드 FliC_{Δ100-405}를 생성시키는데 적합한 핵산은, 예를 들어, 서열 목록 번호:30의 서열이다.
- [0206] *복제가능한 벡터의 선택 및 사용*
- [0207] 관심 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 본원에 기재된 핵산 서열은 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터에 삽입될 수 있다.
- [0208] 다양한 벡터가 공적으로 이용가능하다. 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 과아지의 형태일 수 있다. 적절한 핵산 서열이 다양한 절차에 의해 벡터로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA는 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들)에 삽입된다.
- [0209] 벡터 성분은 일반적으로, 서열이 분비되는 경우 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0210] 하나 이상의 상기 성분을 함유하는 적합한 벡터의 제작은 당업자에게 공지된 표준 라이게이션 기술을 이용한다.
- [0211] 관심 플라젤린 유래 펩티드는 재조합적으로 직접 생성될 수 있을 뿐만 아니라, 성숙 단백질 또는 펩티드의 N-말단에 신호 서열 또는 특정 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드일 수 있는 이중성 폴리펩티드를 갖는 융합 폴리펩티드로서 생성될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 이는 벡터로 삽입되는 관심 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA의 일부일 수 있다. 신호 서열은, 예를 들어, 알칼리성 포스파타아제, 페니실리나아제, lpp, 또는 열 안정성 장독소 II 선도서열의 군으로부터 선택된 원핵생물 신호 서열일 수 있다. 효모 분비를 위해, 신호 서열은, 예를 들어, 효모 역전효소 선도서열, 알파 인자 선도서열(사카로마이세스(Saccharomyces) 및 클루이베로마이세스(Kluyveromyces) 알파 인자 선도서열을 포함함, 후자는 미국 특허 제 5,010,182호에 기재되어 있음), 또는 산성 포스파타아제 선도서열, C. 알비칸스(C. albicans) 글루코아밀라아제 선도서열(1990년 4월 4일에 공개된 EP 362,179), 또는 1990년 11월 15일에 공개된 WO 90/13646호에 기재된 신호일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 동일하거나 관련된 종의 분비 폴리펩티드로부터의 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비 선도서열로부터의 신호 서열과 같은 포유동물 신호 서열이 단백질의 분비를 유도하기 위해 사용될 수 있다.
- [0212] 발현 및 클로닝 벡터 둘 모두는 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 복제하는 것을 가능케 하는 핵산 서

열을 함유한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 널리 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람 음성 박테리아에 적합하고, 2.mu. 플라스미드 기점이 효모에 대해 적합하고, 다양한 바이러스 기점(SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV, 또는 BPV)이 포유동물 세포에서 클로닝 벡터에 유용하다.

- [0213] 발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 선택성 마커로도 언급되는 선택 유전자를 함유할 것이다. 통상적인 선택 유전자는, (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어, 앰피실린, 네오마이신, 메토틱세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 수여하거나, (b) 영양요구 결핍을 보충하거나, (c) 복합 배지에서 이용가능하지 않은 중요한 영양소, 예를 들어, 바실러스에 대한 D-알라닌 라세마아제를 엔코딩하는 유전자를 공급하는 단백질을 엔코딩한다.
- [0214] 포유동물 세포에 대한 적합한 선택가능한 마커의 예는 관심 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 핵산을 흡수하기에 적절한 세포의 확인을 가능하게 하는 것, 예를 들어, DHFR 또는 티미딘 키나아제이다. 야생형 DHFR이 사용되는 경우에 적절한 숙주 세포는 문헌[Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)]에 기재된 바와 같이 제조되고 증식된, DHFR 활성이 결핍된 CHO 세포주이다. 효모에서 사용하기에 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp 1 유전자이다. 문헌[Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10: 157 (1980)] 참조. trp1 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력이 결핍된 효모의 돌연변이 균주, 예를 들어, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다. 문헌[Jones, Genetics, 85: 12 (1977)] 참조.
- [0215] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 mRNA 합성을 유도하기 위해 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인지되는 프로모터가 널리 공지되어 있다. 원핵생물 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터는 베타-락타마아제 및 락토오스 프로모터 시스템 (Chang et al., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281: 544 (1979)), 알칼리성 포스포타아제, 트립토판(trp) 프로모터 시스템(Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776), 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어, tac 프로모터(deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983))를 포함한다. 박테리아 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 관심 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 DNA에 작동 가능하게 연결된 사인-달가노(S.D.) 서열을 함유할 것이다.
- [0216] 효모 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나아제(Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)) 또는 다른 해당 효소(Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)), 예를 들어, 에놀라아제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나아제, 핵소키나아제, 피루베이트 데카르복실라아제, 포스포프루토키나아제, 글루코오스-6-포스페이트 이소머라아제, 3-포스포글리세레이트 뮤타아제, 피루베이트 키나아제, 트리오포스페이트 이소머라아제, 포스포글루코오스 이소머라아제, 및 글루코키나아제에 대한 프로모터를 포함한다.
- [0217] 성장 조건에 의해 조절되는 전사의 추가 장점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알코올 데히드로게나아제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스포타아제, 질소 대사와 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나아제, 및 말토오스 및 갈락토오스 이용을 책임지는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657호에 추가로 기재된다.
- [0218] 포유동물 숙주 세포 내의 벡터로부터의 관심 핵산 전사는, 예를 들어, 폴리오마 바이러스, 조류폭스 바이러스 (1989년 7월 5일에 공개된 UK 2,211,504), 아데노바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 및 원숭이 바이러스 40(SV40)와 같은 바이러스의 유전체로부터 수득된 프로모터; 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들어, 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터; 및 열-충격 프로모터에 의해 조절되고, 제공된 상기 프로모터는 숙주 세포 시스템과 양립된다.
- [0219] 보다 고등한 진핵생물에 의한 관심 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 DNA의 전사는 벡터에 인헨서 서열을 삽입함으로써 증가될 수 있다. 인헨서는 전사를 증가시키기 위해 프로모터 상에 작용하는 보통 10 내지 300 bp의 DNA의 시스-작용 성분이다. 많은 인헨서 서열이 현재 포유동물 유전자(글로빈, 엘라스타아제, 알부민, 알파-태아단백질, 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 통상적으로, 진핵생물 세포 바이러스로부터의 인헨서가 사용될 것이다. 이의 예는 복제 기점의 뒷면(bp 100-270) 상의 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기점의 뒷면 상의 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 인헨서는 관심 폴리펩티드를 코딩하는 서열에 대해 5' 또는 3' 위치에서 벡터로 스플라이싱될 수 있으나, 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부위에 위치된다.

- [0220] 진핵생물 숙주 세포(효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 핵을 지닌 세포)에서 사용되는 발현 벡터는 또한 전사 종료 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 통상적으로 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 종종 3'의 비번역 영역으로부터 이용가능하다. 이러한 영역은 관심 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 mRNA의 비번역 부분 내의 아데닐중합체형성 단편과 같이 전사되는 뉴클레오티드 세그먼트를 함유한다.
- [0221] 재조합 척추동물 세포 배양에서 관심 플라젤린 유래 펩티드의 합성에 대한 적합에 적합한 또 다른 방법, 벡터 및 숙주 세포는 문헌[Gething et al., Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281: 40-46 (1979); EP 117,060; 및 EP 117,058]에 기재되어 있다.
- [0222] 숙주 세포의 선택 및 형질전환
- [0223] 숙주 세포는 플라젤린 유래 펩티드 생성을 위해 본원에 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 트랜스펙션되거나 형질 전환되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 요망되는 서열을 엔코딩하는 유전자를 증폭시키는 데 적합하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다.
- [0224] 배지, 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 과도한 실험 없이 당업자에 의해 선택될 수 있다. 일반적으로, 세포 배양의 생산성을 최대화시키기 위한 원리, 프로토콜 및 실시 기술은 문헌[Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)]에서 발견될 수 있다.
- [0225] 트랜스펙션 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어, CaPO₄ 처리 및 전기천공이 있다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 상기 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 문헌[Sambrook et al., 상기]에 기재된 바와 같은 염화칼슘을 이용한 칼슘 처리, 또는 전기천공이 보통 원핵세포 또는 풍부한 세포벽 장벽을 함유하는 다른 세포에 사용된다. 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)를 이용한 감염이 특정 식물 세포의 형질전환에 사용되고, 이는 문헌[Shaw et al., Gene 23: 315 (1983) 및 1989년 6월 29일에 공개된 WO 89/05859]에 기재되어 있다. 상기 세포벽이 없는 포유동물에 대해, 문헌[Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전 방법이 사용될 수 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질전환의 일반적인 양태는 미국 특허 4,399,216호에 기재되어 있다. 효모로의 형질전환은 통상적으로 문헌[Van Solingen et al., J. Bact., 130: 946 (1977) 및 Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979)]의 방법에 따라 수행된다. 그러나, 예를 들어, 핵 미세주입, 전기천공, 온전한 세포와의 박테리아 원형질체 융합, 또는 다중(polycation), 예를 들어, 폴리브렌 또는 폴리오르니틴과 같은 DNA를 세포로 도입시키는 다른 방법이 또한 사용될 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환시키는 다양한 기술을 위해서는, 문헌[Keown et al., Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) 및 Mansour et al., Nature, 336: 348-352 (1988)]을 참조하라.
- [0226] 벡터 내에 DNA를 클로닝시키거나 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 또는 보다 고등한 진핵생물 세포를 포함한다.
- [0227] 적합한 원핵생물은 유박테리아, 예를 들어, 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, 장내세균(Enterobacteriaceae), 예를 들어, E. 콜리(E. coli)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. E. 콜리 K12 균주 MM294(ATCC 31,446); E. 콜리 X1776(ATCC 31,537); E. 콜리 균주 W3110(ATCC 27,325); 및 K5772(ATCC 53,635)와 같은 다양한 E. 콜리 균주가 공적으로 이용가능하다. 다른 적합한 원핵생물 숙주 세포는 장내세균, 예를 들어, 에스케리키아(Escherichia), 예를 들어, E. 콜리, 엔테로박터, 어위니아(Erwinia), 클렙시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들어, 살모넬라 티피뮤리움, 세라티아(Serratia), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 및 시겔라(Shigella), 뿐만 아니라 바실러스, 예를 들어, B. 썩틸리스(B. subtilis) 및 B. 리케니포르미스(B. licheniformis)(예를 들어, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710호에 기재된 B. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(Pseudomonas), 예를 들어, P. 아에루기노사(P. aeruginosa), 및 스트렙토마이세스(Streptomyces)를 포함한다. 이러한 예는 예시이며, 제한이 아니다.
- [0228] 살모넬라 티피뮤리움의 균주 SIN41(*fliC fliJ*)가 플라젤린 유래 펩티드의 생성에 특히 흥미로운데, 이는 상기 원핵생물 숙주 세포가 어떠한 플라젤린도 분비하지 않기 때문이다(Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:13722-7). 그러나, 플라젤린은 소위 "유형 III 분비 시스템"의 특화된 분비 시스템을 통해 분비된다. 흥미롭게도, 균주 SIN41은 최적의 플라젤린 분비에 필요한 유형 III 분비 시스템의 모든 성분을 생성한다. *fliC* 프로모터 하에서 신규한 플라젤린 펩티드를 코딩하는 클로닝 서열은 균주 SIN41에서 대량의 관심 플라젤린 유래 펩티드를 분

비하는 것을 가능케 한다.

- [0229] 균주 W3110이 또한 흥미로운데, 이는 재조합 DNA 생성물 발효를 위한 통상적인 숙주 균주이기 때문이다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백질분해성 효소를 분비한다. 예를 들어, 균주 W3110은 숙주에 대해 내생인 단백질을 엔코딩하는 유전자에서 유전적 돌연변이를 발생시키기 위해 변형될 수 있고, 이러한 숙주의 예는 완전한 유전형 tonA를 갖는 E. 콜리 W3110 균주 1A2; 완전한 유전형 tonA ptr3을 갖는 E. 콜리 W3110 균주 9E4; 완전한 유전형 tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT kan.sup.r을 갖는 E. 콜리 W3110 균주 27C7(ATCC 55,244); 완전한 유전형 tona ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan.sup.r을 갖는 E. 콜리 W3110 균주 37D6; 비-카나마이신 내성 degP 결실 돌연변이를 갖는 균주 37D6인 E. 콜리 W3110 균주 40B4; 및 1990년 8월 7일에 반포된 미국 특허 제 4,946,783호에 기재된 돌연변이 원형질막 주위공간 프로테아제를 갖는 E. 콜리 균주를 포함한다. E. 콜리 균주 MG1655, MG1655 Δ *fimA-H* 또는 MKS12, *fliD*- 및 *-fimA-H*-결실 MG1655 균주가 또한 분비된 단백질로서 재조합 플라젤린의 생성을 위한 흥미로운 후보이다(Nat Biotechnol. 2005; (4):475-81). 대안적으로, 시험관내 클로닝 방법, 예를 들어, PCR 또는 다른 핵산 중합효소 반응이 적합하다.
- [0230] 원핵생물 외에, 사상 진균 또는 효모와 같은 진핵생물 미생물이 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다.
- [0231] 사카로마이세스 세레비지에는 통상적으로 사용되는 저등 진핵생물 숙주 미생물이다. 다른 사카로마이세스 세레비지에는 스킴조사카로마이세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe)(Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985년 5월 2일에 공개된 EP 139,383); 클루비베로마이세스(Kluyveromyces) 숙주(U.S. Pat. No. 4,943,529; Fleer et al., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)), 예를 들어, K. 락티스(K. lactis)(MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., 737 [1983]), K. 프라길리스(K. fragilis)(ATCC 12,424), K. 불가리쿠스(K. bulgaricus)(ATCC 16,045), K. 위케라미이(K. wickeramii)(ATCC 24,178), K. 왈티이(K. waltii)(ATCC 56,500), K. 드로소필라룸(K. drosophilaram)(ATCC 36,906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)), K. 썬모톨러란스(K. thermotolerans), 및 K. 마르크시아누스(K. marxianus); 야로위아(yarrowia)(EP 402,226); 피키아 파스토리스(Pichia pastoris)(EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); 캔디다(Candida); 트리코데르마 레에시아(Trichoderma reesia)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라싸(Neurospora crassa)(Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); 슈바니오마이세스(Schwanniomyces), 예를 들어, 슈바니오마이세스 옥시덴탈리스(Schwanniomyces occidentalis)(1990년 10월 31일에 공개된 EP 394,538); 및 사상 진균, 예를 들어, 뉴로스포라(Neurospora), 페니실리움(Penicillium), 톨리포클라둠(Tolypocladium)(1991년 1월 10일에 공개된 WO 91/00357호), 및 아스퍼길루스 숙주, 예를 들어, A. 니들란스(A. nidulans)(Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) 및 A. 니게르(A. niger)(Kelly and Hynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985])를 포함한다. 메틸요구(Methylotropic) 효모가 본원에 적합하고, 이는 한세놀라(Hansenula), 캔디다, 클로엑케라(Kloeckera), 피키아(Pichia), 사카로마이세스, 토룰롭시스(Torulopsis), 및 로도토룰라(Rhodotorula)로 구성된 속(genera)으로부터 선택된, 메탄올에서 성장할 수 있는 효모를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 부류의 효모의 예시인 특정 종의 목록은 문헌[C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)]에서 발견될 수 있다.
- [0232] 관심 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 핵산의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 곤충 세포, 예를 들어, 드로소필라(Drosophila) S2 및 스포도테라(Spodoptera) Sf9 뿐만 아니라 식물 세포를 포함한다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 차이니즈 햄스터(Chinese hamster) 난소(CHO) 및 COS 세포를 포함한다. 더욱 특정한 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59 (1977)); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); 마우스 세르톨리(sertoli) 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 및 마우스 유암(MMT 060562, ATCC CCL51)을 포함한다. 적절한 숙주 세포의 선택은 당 분야의 기술 범위 내로 간주된다.
- [0233] 관심 플라젤린 유래 펩티드의 정제를 위한 일반적인 방법
- [0234] 관심 플라젤린 유래 펩티드의 형태가 배지 또는 숙주 세포 용해질로부터 회수될 수 있다.
- [0235] 막 결합되는 경우, 이는 적합한 세제 용액(예를 들어, TRITON--X.TM. 100) 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터

방출될 수 있다.

- [0236] 관심 플라젤린 유래 펩티드를 엔코딩하는 핵산의 발현에서 사용되는 세포는 다양한 물리적 또는 화학적 수단, 예를 들어, 동결-해동 주기, 초음파처리, 기계적 파괴, 또는 세포 용해제에 의해 파괴될 수 있다.
- [0237] 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 관심 폴리펩티드를 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예시이다: 이온-교환 컬럼 상에서의 분획화; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 양이온-교환 수지, 예를 들어, DEAE에서의 크로마토그래피; 크로마토포커싱(chromatofocusing); SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 예를 들어, 세파텍스 G-75를 이용한 겔 여과; IgG와 같은 오염물질을 제거하기 위한 단백질 A 세파로오스 컬럼; 및 관심 플라젤린 유래 펩티드의 에피토프 태깅(tagging)된 형태에 결합하는 금속 킬레이트화 컬럼.
- [0238] 단백질 정제의 다양한 방법이 사용되고, 이러한 방법은 당 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag: New York, 1982)]에 기재되어 있다. 선택된 정제 단계(들)은, 예를 들어, 사용되는 생성 과정의 특성 및 생성되는 특정 플라젤린 유래 펩티드에 좌우될 것이다.
- [0239] 바람직한 구체예에서, 플라젤린 유래 펩티드는 실시예에 기재된 바와 같이 재조합 S. 티피뮤리움 SIN41(*fliC fliJ*)의 상층액으로부터 정제된다.
- [0240] 특히, 살모넬라는 교반과 함께 37°C에서 6-18시간 동안 루리아-베르타니(Luria-Bertani, LB) 브로쓰에서 성장되었다. 상층액은 여과되고, 60% 황산암모늄(Sigma Aldrich, USA)로 포화되었다. 침전된 물질은 원심분리, 20mM Tris/HCl pH7.5에서의 용해화 후, 투석에 의해 회수되었다. 단백질은 연속적인 라운드의 히드록시아파타이트, 음이온 교환, 및 크기 배제 크로마토그래피(Bio-Rad Laboratories, USA; GE Healthcare, Sweden)에 의해 추가로 정제되었다. 마지막으로, 단백질은 폴리믹신(polymyxin) B 컬럼(Pierce, USA)을 이용하여 지질다당류(LP S)가 제거되었다. 리몰루스(Limulus) 검정(Associates of Cape Cod Inc., USA)을 이용하여, 잔여 LPS 농도가 재조합 플라젤린 μg 당 30 pg 미만의 LPS인 것이 결정되었다.
- [0241] 면역친화성 크로마토그래피에 의한 관심 플라젤린 유래 펩티드의 정제
- [0242] 추가 구체예에서, 본 발명에 따른 플라젤린 유래 펩티드는 면역친화성 크로마토그래피 기질 상에서의 분리에 의해 정제될 수 있다.
- [0243] 상기 면역친화성 크로마토그래피 기질은 이에 고정된 항-플라젤린 항체를 포함한다. "항-플라젤린" 항체는, 본 발명에 의해 포함되는 것을 포함하는 천연 플라젤린 또는 과가변 영역이 결실된 플라젤린에 결합하는 항체를 의미한다.
- [0244] 바람직하게는, 항-플라젤린 항체는 마우스 항-플라젤린 항체를 포함하는 모노클로날 항체로 구성된다.
- [0245] 마우스를 본 명세서의 다른 곳에 기재된 과가변 영역이 결실된 플라젤린 $\text{FliC}_{\Delta 174-400}$ 으로 면역화시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득된 항-플라젤린 항체가 천연 플라젤린 및 본원에 기재되는 과가변 영역이 결실된 플라젤린 중 어느 하나를 인지하는 것이 본 발명에 따라 밝혀졌다.
- [0246] 따라서, 면역친화성 크로마토그래피 기질의 특정한 바람직한 구체예에서, 상기 기질은 $\text{FliC}_{\Delta 174-400}$ 에 대해 특이적인 마우스 모노클로날 항체를 포함한다.
- [0247] 상기 바람직한 면역친화성 크로마토그래피 기질은 하기와 같이 제조될 수 있다:
- [0248] - 항- $\text{FliC}_{\Delta 174-400}$ 모노클로날 항체를 함유하는 마우스 복수가 에코노-팩(Econo-Pac) 단백질 A 컬럼(# 732-2022 Affi-gel; Bio-Rad) 상에서 정제되었다.
- [0249] - 생성된 정제된 항- $\text{FliC}_{\Delta 174-400}$ 모노클로날 항체("B23C5"로도 언급될 수 있음)가 일차 아미노기를 통해 N-히드록시숙신이미드-활성화된 세파로오스™ 고성능 컬럼(GE 헬스케어(GE Healthcare)사로부터의 # 17-0716-01 하이 트랩(Hitrap) NHS 활성화된 HP)에 공유적으로 커플링되어, 플라젤린 특이적 친화성 컬럼이 생성되었다. 커플링 수율은 98%였다.
- [0250] 본원의 실시예에 제시된 바와 같이, 상기 플라젤린 특이적 친화성 컬럼은 천연 플라젤린의 고도로 특이적인 분리를 가능케 하고, 이에 따라 출발 샘플에 함유된 다른 단백질 성분 또는 비-단백질 성분으로부터 본원에 기재되는 과가변 영역이 결실된 플라젤린 중 어느 하나의 고도로 특이적인 분리를 가능케 한다.

- [0251] 플라젤린 또는 본원에 기재되는 과가변 영역이 결실된 플라젤린을 정제하는 방법은 하기와 같이 기재된다:
- [0252] - 제조합 S. 티피퓨리움 SIN41 또는 E.콜리의 배양으로부터의 플라젤린 함유 상층액이 원심분리되고, 0.22 μ m 막을 통해 여과되고, 결합 완충액(75mM Tris-HCl pH8)을 이용하여 1 대 1(one to one)로 희석되고, 상기 기재된 플라젤린 특이적 친화성 컬럼에 적용되었다.
- [0253] - 이후, 플라젤린 특이적 친화성 컬럼이 15-20 CV(컬럼 부피)의 결합 완충액으로 세척되었다.
- [0254] - 이후, 단백질이 3 CV의 용출 완충액(100mM 글리신-HCl, 0.5M NaCl, pH2.7)으로 용출되고, 산성 pH에 대한 연장된 노출을 회피하기 위해 500 μ l의 Tris 1.5M pH8.9로 분획이 즉시 중성화되었다.
- [0255] - 이후, 컬럼이 10 CV의 결합 완충액으로 재생되고, 0.02% 아지드화 나트륨과 함께 4 $^{\circ}$ C에서 저장되었다.
- [0256] 통상적인 크로마토그래피 프로파일이 도 13에 예시되어 있고, 이는 (i) 280 nm에서의 흡광도(O.D.) 곡선(채워진 사각형 박스를 갖는 선) 및 (ii) 전기 전도도 곡선 둘 모두를 도시한다. 도 13에서 화살표된 숫자는, 컬럼으로부터 흘러나오는 액체의 분획이 이의 플라젤린 함량의 추가 분석을 위해 연속적으로 수거되는 기간에 해당한다(도 14 및 하기 단락 참조). 넘버링된 수거된 분획은 각각 하기를 구성한다:
- [0257] - n $^{\circ}$ 1 - 적용 전의 5 μ l의 샘플(3 μ g) = 투입 전체량 = 900 μ g
- [0258] - n $^{\circ}$ 2 - 컬럼 이동(run) 후에 적용된 샘플로부터 20 μ l
- [0259] - n $^{\circ}$ 3 - 컬럼 세척으로부터 20 μ l
- [0260] - n $^{\circ}$ 4 - 컬럼 세척으로부터 20 μ l
- [0261] - n $^{\circ}$ 5, 6 & 7 - 용출 완충액 후의 각각의 분획으로부터 20 μ l: 전체량 \approx 900 μ g
- [0262] - n $^{\circ}$ 8 - 컬럼 재평형화로부터 20 μ l.
- [0263] 도 14는 각각의 출발 물질로서 도 13에 언급된 분획 1 내지 8을 이용하여 수행된 웨스턴 블롯 검정의 사진을 도시한다.
- [0264] **2. 화학적 합성**
- [0265] 특정 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 화학 펩티드 합성의 통상적인 기술을 통해 합성될 수 있다.
- [0266] 예를 들어, 관심 플라젤린 유래 펩티드 서열은 문헌[Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis (W.H. Freeman Co.: San Francisco, Calif., (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963); Fields GB, Noble RL; 1990; Int. J. Pept. Protein Res.; Vol. 35 : 161-214)]에 기재된 바와 같은 고상 기술을 이용하여 직접적인 펩티드 합성에 의해 생성될 수 있다.
- [0267] 시험관내 단백질 합성은 수작업 기술 또는 자동화에 의해 수행될 수 있다. 자동화된 합성은, 예를 들어, 제조업체의 설명서를 이용하여 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 펩티드 합성기(Foster City, Calif.)를 이용하여 달성될 수 있다.
- [0268] 관심 펩티드의 다양한 분획이 관심 전장 펩티드를 생성시키는 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 개별적 및 조합되어 화학적으로 합성될 수 있다.
- [0269] **본 발명의 플라젤린 유래 펩티드를 포함하는 조성물**
- [0270] 본 발명의 추가 목적은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제와 특히 조합된 본 발명의 명세서에 정의된 에쥬번트 화합물을 포함하는 조성물, 특히 약학적 조성물로 구성된다.
- [0271] 본 발명은 또한 하나 이상의 항원과 함께 본 명세서에 정의된 면역에쥬번트 화합물을 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.
- [0272] 피검체 또는 동물에 투여된 후, "면역원성 조성물"은 이에 포함되는 상기 하나 이상의 항원(들)에 대한 보호적 면역 반응을 발생시킨다.
- [0273] 본 발명은 또한 하나 이상의 항원과 함께 본 명세서에 정의된 면역에쥬번트 화합물을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0274] 피검체 또는 동물에 투여된 후, 본원에서 사용되는 바와 같은 백신 조성물은, 예를 들어, 미생물에 대해 보호적

면역 반응을 유도하거나, 감염에 대해 피검체 또는 동물을 효과적으로 보호한다.

- [0275] 백신 조성물은 면역 반응 조절에 유리하게 반응할 병리 질환을 예방하거나 개선시키는데 유용하다.
- [0276] *면역애주버트*
- [0277] 상기 언급된 바와 같이, 면역원성 조성물 또는 백신과 관련하여 언급되는 경우의 용어 "면역애주버트"는 일반적으로 항원에 대한 특정 면역 반응의 특성을 개선시키거나, 연장시키거나, 향상시키는 작용을 하는 물질을 의미한다.
- [0278] 면역애주버트는 유리하게는 또한 면역화의 수 또는 보호 면역화에 필요한 항체의 양을 감소시킨다.
- [0279] *항원*
- [0280] 면역원성 또는 백신 유형의 화합물 또는 제형에서 다양한 물질이 항원으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 약독화 및 비활성화된 바이러스 및 박테리아 병원체, 정제된 거대분자, 다당류, 특소이드, 재조합 항원, 병원체로부터의 외래 유전자를 함유하는 유기체, 합성 펩티드, 폴리핵산, 항체 및 종양세포가, (i) 개체에서 면역 반응을 유도하는데 유용한 면역원성 조성물 또는 (ii) 병리학적 질환을 치료하는데 유용한 백신을 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0281] 따라서, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 개체에서 면역 반응을 유도하는데 유용한 면역원성 조성물 또는 백신을 생성시키기 위해 매우 다양한 항원과 조합될 수 있다.
- [0282] 당업자는 특정 병리학적 질환을 치료하는데 적절한 항원을 선택할 수 있고, 미정제 또는 분리된 항원이 특정 백신 제형에 유리한지의 여부를 결정하는 방법을 알 것이다.
- [0283] 당업자는 또한 본 발명의 면역애주버트를 상기 하나 이상의 항원에 공유적으로 연결시키거나, 공유적으로 연결시키지 않는 것이 바람직한지의 여부를 결정할 수 있을 것이다.
- [0284] 본 발명의 생체내 시험은 점막 애주버트 활성이, 점막 경로, 및 특정 비내 경로를 통해 함께 투여되는 경우에 관심 플라젤린 유래 펩티드와 표적 항원 사이에 어떠한 연결도 필요로 하지 않는 것을 입증하였다.
- [0285] 분리된 항원은 당 분야에 널리 공지된 다양한 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 임의의 면역원성 폴리펩티드를 엔코딩하는 유전자가, 예를 들어, 당 분야에 널리 공지되고, 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1992) 및 Ansel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1998)]에 기재된 재조합 방법을 이용하여 박테리아, 효모, 곤충, 과충류 또는 포유동물 세포에서 분리되고 클로닝될 수 있다. 바이러스, 박테리아 및 원생동물 병원체로부터의 표면 항원을 엔코딩하는 다수의 유전자가 성공적으로 클로닝되었고, 발현되었고, 백신 개발을 위한 항원으로 사용되었다. 예를 들어, B형 간염 바이러스의 주요 표면 항원, HbsAg, 콜레라 독소의 P 서브유닛, E. 콜리의 장독소, 말라리아 기생충의 포자소체 단백질, 및 Epstein-Barr 바이러스로부터의 당단백질 막 항원 뿐만 아니라 종양 세포 항원이 다양한 널리 공지된 벡터/숙주 시스템에서 발현되었고, 정제되었고, 백신에 사용되었다.
- [0286] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 재조합 항원에 대한 면역 반응을 유리하게 향상시킬 수 있는 TLR5-매개 점막 시스템을 통해 선천 면역 반응을 유도한다.
- [0287] 백신에서 사용되는 병리학적 이상 세포가 병리학적 질환을 갖는 하나 이상의 개체, 또는 생성된 백신으로 치료되는 특정 개체를 포함하는 하나 이상의 상기 개체로부터 수득된 생체의 또는 시험관내 배양된 세포와 같은 임의의 소스로부터 수득될 수 있다.
- [0288] *면역조절 분자*
- [0289] 개체에서 면역 반응을 변경시키기 위해 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드와 함께 다양한 면역조절 분자가 또한 사용될 수 있다. 요망되는 변경의 유형은 본 발명의 상기 플라젤린 유래 펩티드와 조합되기 위해 선택되는 면역조절 분자의 유형을 결정할 것이다.
- [0290] 예를 들어, 선천 면역 반응을 향상시키기 위해, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 선천 면역 반응을 촉진하는 또 다른 면역조절 분자, 예를 들어, 다른 PAMP 또는 선천 면역 반응을 유도하는 것으로 공지되거나 유도하는 것으로 여겨지는 보존된 영역과 조합될 수 있다. 다양한 PAMP가 톨-유사 패밀리의 수용체의 다양한 일원의 활성을 자극하는 것으로 공지되어 있다.

- [0291] 이러한 PAMP는 이로운 사이토카인 프로파일을 유도하는 톨-유사 수용체의 특정 조합을 자극하기 위해 조합될 수 있다. 예를 들어, PAMP는 Th1 또는 Th2 면역 반응을 유도하는 사이토카인 프로파일을 자극하기 위해 조합될 수 있다.
- [0292] 체액성 또는 세포 매개 면역 반응을 촉진하는 면역조절 분자의 다른 유형이 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드와 조합될 수 있다. 예를 들어, Th1 및 Th2 면역 반응의 균형을 변경시키기 위해 사이토카인이 투여될 수 있다. 당업자는 특정 병리 질환에 대한 면역 반응에서 이로운 변경을 수득하기에 유용한 적절한 사이토카인을 결정하는 방법을 알 것이다.
- [0293] *본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 투여*
- [0294] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 하나 이상의 분자와 함께 면역 반응을 촉발시키는데 필요한 양, 예를 들어, 항원 또는 다른 면역조절 분자의 양을 의미하는 "면역원성 양"으로 투여될 것이다.
- [0295] 독립적인, 또는 하나 이상의 분자와 조합된 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 투여량은, 예를 들어, 치료되는 병리 질환, 개체의 체중 및 상태, 및 이전 또는 동시 요법에 좌우될 것이다. 상기 방법의 특정 적용을 위한 면역원성 용량으로 간주되는 적절한 양은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 당업자는 환자의 질환이 요법 과정 전체에 걸쳐 모니터링되는 것을 필요로 하고, 투여되는 조성물의 양이 요법에 대한 환자의 반응에 따라 조정될 수 있는 것을 이해할 것이다.
- [0296] 백신 면역에유버트로서, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는, 예를 들어, 고도로 정제된 항원 또는 재조합 항원과 같은 약한 항원의 면역원성을 향상시키거나, 면역 반응에 필요한 항원의 양을 감소시키거나, 보호 면역을 제공하는데 필요한 면역화의 빈도를 감소시킴으로써 백신의 효과에 기여할 수 있고, 감소된 면역 반응 또는 약화된 면역 반응을 갖는 개체, 예를 들어, 신생아, 나이들고 면역약화된 개체에서 백신의 효능을 개선시키고, 표적 조직의 면역성, 예를 들어, 점막 면역성을 향상시키거나, 특정 사이토카인 프로파일을 발생시킴으로써 세포 매개 또는 체액성 면역성을 촉진시킬 수 있다.
- [0297] 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드는 TLR5 시스템의 활성화, 특히 점막 경로에 의해 투여되는 경우에 TLR5 매개 점막 반응을 통해 선천 면역 반응을 유도한다.
- [0298] 특히, 생체내 시험은 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드가 표적 항원에 대한 전신 및 점막 반응에 효력을 더할 수 있는 점막 에유버트 활성을 나타내는 것을 나타낸다.
- [0299] 선천 면역 반응은 적응 면역 반응을 자극함으로써 항원에 대한 면역 반응을 증가시킨다. 따라서, 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드와 하나 이상의 항원의 조합물은 개체에서 면역 반응을 유도하기 위한 효과적인 면역원성 조성물 또는 백신을 제공한다.
- [0300] 항원 및/또는 면역조절 분자와 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 조합물은 당 분야에 널리 공지된 다양한 전임상의 독물학적 및 안전성 연구로 시험될 수 있다.
- [0301] 예를 들어, 이러한 조합물은 항원이 면역원성인 것으로 밝혀지고, 인간 임상 시험에 대해 제시된 동일한 경로에 의해 재현가능하게 면역화될 수 있는 동물 모델에서 평가될 수 있다.
- [0302] 항원 및/또는 면역조절 분자와 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 조합물은, 예를 들어, 미국 생물의약품평가연구센터/미국식품의약국 및 미국 국립 알레르기 전염병 연구소(Center for Biologics Evaluation and Research/Food and Drug Administration and National Institute of Allergy and Infectious Diseases)에 의해 기재되는 접근법에 의해 시험될 수 있다(Goldenthal, KL et al. AID Res Hum Retroviruses, 9: S45-9 (1993)).
- [0303] 당업자는 항원 및/또는 면역조절 분자와 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 특정 조합물, 적절한 항원 페이로드(payload), 면역화 경로, 투여 부위, 항원의 순도, 및 특정 동물 종에서 특정 병리 질환을 치료하는데 유용한 백신접종 요법을 결정하는 방법을 알 것이다.
- [0304] 면역 반응을 유도하기 위한 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신은 약학적으로 허용되는 매질과 함께 용액 또는 현탁액으로 투여될 수 있다.
- [0305] 이러한 약학적으로 허용되는 매질은, 예를 들어, 물, 인산염 완충 염수, 일반 염수 또는 다른 생리학적 완충 염수, 또는 다른 용매 또는 비히클, 예를 들어, 글리콜, 글리세롤, 및 오일, 예를 들어, 올리브 오일 또는 주사용 유기 에스테르일 수 있다. 약학적으로 허용되는 매질은 또한 리포솜 또는 미포(micelle)를 함유할 수 있고, 폴

리펩티드 또는 펩티드 항원과 세제 및 글리코사이드, 예를 들어, Quil A를 혼합시킴으로써 제조된 면역자극 복합체를 함유할 수 있다.

- [0306] 약학적으로 허용되는 매질 중의 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드를 제조하고 투여하는 추가 방법은 TLR5-매개 점막 반응을 유도하는 화합물과 관련하여 하기 제시된다.
- [0307] 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신은 면역 반응을 자극하기 위해 다양한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 이러한 면역조절 분자는 피하, 피내, 임파액내, 근내, 종양내, 방광내, 복막내 및 뇌내 전달될 수 있다.
- [0308] 당업자는 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드의 특정 제형을 위한 적절한 전달 경로를 선택하는 방법을 알 것이다.
- [0309] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 포유동물에서 감염을 치료하거나 예방하는 백신접종 방법은 특히 점막(예를 들어, 안구, 비내, 경구, 위, 폐, 장, 직장, 질, 또는 요로) 표면에 의해 투여되는 본 발명의 백신의 용도를 포함한다.
- [0310] 비내 전달 경로는 점막 및 전신 면역 반응 둘 모두를 유도하는데 유용할 수 있다. 비강 및 폐 조직으로의 제형의 편리하고 효과적인 전달을 위해 다양한 장치가 가능하다.
- [0311] 비내 전달 경로는 본원에서 특히 흥미로울 수 있는데, 이는 본 발명의 플라젤린 유래 펩티드가 어떠한 유의한 전신 전염증성 부작용이 없이 점막 구획에서 유의한 애쥬번트 활성을 나타내기 때문이다.
- [0312] 백신접종 프로토콜에서, 백신은 단일 용량으로 또는 바람직하게는 프라임/부스트 방식에 따라 1주 또는 1개월의 간격으로 수회, 예를 들어, 2회, 3회 또는 4회로 점막 경로에 의해 유리하게 투여될 수 있다. 적절한 투여량은 다양한 파라미터에 좌우된다.
- [0313] 백신접종 프로토콜은 엄격한 점막 프로토콜, 또는 백신의 프라이밍 용량이 점막, 예를 들어 비내 경로에 의해 투여되고, 부스팅 용량(들)이 비경구로 투여되거나, 반대로 프라이밍 용량이 비경구로 투여되고, 부스팅 용량(들)이 점막 경로에 의해 투여되는 혼합 프로토콜일 수 있다.
- [0314] 제형
- [0315] 약학적 제형 또는 조성물을 제조하는 방법은 활성 성분(들)을 담체, 및 임의로 하나 이상의 보조 성분과 회합시키는 단계를 포함한다.
- [0316] 일반적으로, 제형은 활성 성분(들)을 액체 담체, 또는 미세하게 분할된 고체 담체, 또는 둘 모두와 균일하고 밀접하게 회합시킨 후, 필요시 생성물을 성형시킴으로써 제조된다.
- [0317] 활성 성분의 경구 투여용 액체 투여 형태는 약학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서(elixir)를 포함한다. 활성 성분(들) 외에, 액체 투여 형태는 당 분야에서 통상적으로 사용되는 비활성 희석제, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유효제, 예를 들어, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유(germ oil), 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라히드로푸틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0318] 비활성 희석제 외에, 경구 조성물은 또한 애쥬번트, 예를 들어, 습윤제, 유효제 및 현탁제, 감미제, 착향제, 착색제, 착향제 및 보존제를 포함할 수 있다.
- [0319] 활성 성분(들) 외에 현탁액은 현탁제, 예를 들어, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가-아가 및 트래거캔스, 및 이의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0320] 직장 또는 질내 투여를 위한 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 활성 성분(들)과, 예를 들어, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌약 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체를 혼합시킴으로써 제조될 수 있고, 실온에서 고체이나 체온에서는 액체여서, 직장 또는 질내에서 용해되어 활성 성분(들)을 방출하는 좌약으로 제공될 수 있다. 질내 투여에 적합한 본 발명의 제형은 또한 페서리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 포움 또는 적절한 것으로 당 분야에 공지된 상기 담체를 함유하는 스프레이 제형을 포함한다.
- [0321] 비경구 투여에 적합한 본 발명의 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 또는 항산화제, 완충제, 제형이 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되

도록 하는 용질 또는 현탁제 또는 증점제를 함유할 수 있는 사용 직전에 멸균 주사용 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합된 활성 성분(들)을 포함한다.

- [0322] 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어, 올리브 오일, 및 주사용 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸 올리에이트를 포함한다. 적절한 유동성이, 예를 들어, 코팅 물질, 예를 들어, 레시틴의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0323] 이러한 조성물은 또한 애주번트, 예를 들어, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 또한, 등장제, 예를 들어, 당, 염화나트륨 등을 조성물에 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사용 약학적 형태의 연장된 흡수가 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 작용제의 포함에 의해 발생할 수 있다.
- [0324] 주사용 데포(depot) 형태는 폴리락티드-폴리글리콜라이드와 같은 생물분해성 중합체에서 활성 성분(들)의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성시킴으로써 제조된다. 활성 성분(들) 대 중합체의 비, 및 사용되는 특정 중합체의 특성에 따라, 활성 성분(들)의 방출 속도가 조절될 수 있다. 다른 생물분해성 중합체의 예는 폴리(오르토포스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 데포 주사용 제형은 또한 신체 조직과 양립되는 리포솜 또는 마이크로에멀전 내에 활성 성분(들)을 엔트랩핑(entraping)시킴으로써 제조된다. 주사용 물질은, 예를 들어, 박테리아 잔류 필터를 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다.
- [0325] 제형은 단위-용량 또는 다중-용량 밀봉 용기, 예를 들어, 앰플 및 바이알로 제공될 수 있고, 이는 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어, 주사용수의 첨가만을 필요로 하는 동결건조된 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사용액 및 현탁액이 상기 기재된 유형의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0326] 본 발명에 따른 백신 조성물 내의 항원, 및 면역애주번트 화합물의 양, 투여되는 투여량은 특정 항원, 특정 동물 또는 환자의 연령, 성별, 체중, 종 및 상태, 및 투여 경로와 같은 요인을 고려하여 약학 분야의 당업자에게 널리 공지된 기술에 의해 결정된다.
- [0327] 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 백신 조성물은 계면활성제, 흡수 촉진제, 물 흡수 중합체, 효소 분해를 억제하는 물질, 알코올, 유기 용매, 오일, pH 조절제, 보존제, 삼투압 조절제, 추진제, 물 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 추가로 포함한다.
- [0328] 본 발명에 따른 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 담체의 양은 다른 성분에 대해 선택된 양, 항원의 요망되는 농도, 투여 경로의 선택, 경구 또는 비경구 등에 좌우될 것이다. 담체는 임의의 편리한 시간에 백신에 첨가될 수 있다. 동결건조된 백신의 경우에서, 담체는, 예를 들어, 투여 직전에 첨가될 수 있다. 대안적으로, 최종 생성물은 담체와 함께 제조될 수 있다.
- [0329] 적절한 담체의 예는 멸균수, 염수, 완충액, 포스페이트 완충 염수, 완충 염화나트륨, 식물성 오일, 최소 필수 배지(MEM), HEPES 완충액을 갖는 MEM 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0330] 임의로, 본 발명의 백신 조성물은 애주번트 및 요망되는 결과에 따라 다양한 양의 통상적인 이차 애주번트를 함유할 수 있다. 통상적인 양은 다른 성분 및 요망되는 효과에 따라 약 0.02 중량% 내지 약 20 중량% 범위이다.
- [0331] 적합한 이차 애주번트의 예는 안정화제; 유화제; 수산화알루미늄; 인산알루미늄; pH 조정제, 예를 들어, 수산화나트륨, 염산 등; 계면활성제, 예를 들어, Tween.RTM. 80(폴리소르베이트 80, 시그마 케미칼 코퍼레이티드(Sigma Chemical Co.)사(St. Louis, Mo.)에서 시판됨); 리포솜; iscom 애주번트; 합성 당펩티드, 예를 들어, 무라밀 디펩티드; 연장제, 예를 들어, 텍스트란 또는, 예를 들어, 인산알루미늄과의 텍스트란 조합물; 카르복시 폴리메틸렌; 박테리아 세포벽, 예를 들어, 미코박테리아 세포벽 추출물; 이의 유도체, 예를 들어, 코리네박테리움 파르븀(Corynebacterium parvum); 프로피오니박테리움 아크네(Propionibacterium acne); 미코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis), 예를 들어, 소 칼메트 구에린(Bovine Calmette Guerin, BCG); 백시니아 또는 동물 폭스바이러스 단백질; 부바이러스(subviral) 입자 애주번트, 예를 들어, 오비바이러스; 콜레라 독소; N,N-디옥타데실-N',N'-비스(2-히드록시에틸)-프로판디아민(피리딘); 모노포스포릴 지질 A; 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(DDA, 코닥(Kodak)사(Rochester, N.Y.)에서 시판됨); 합성 물질 및 이의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 수산화알루미늄은 다른 이차 애주번트 또는 면역애주번트, 예를 들어, Quil A와 혼합된다.
- [0332] 적합한 안정화제의 예는 수크로오스, 젤라틴, 껍톤, 소화된 단백질 추출물, 예를 들어, NZ-아민 또는 NZ-아민

AS를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 유화제의 예는 광유, 식물성 오일, 땅콩유 및 주사 또는 비내 백신 조성물에 유용한 다른 표준의 대사가 가능한 비독성 오일을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0333] 본 발명의 목적상, 이러한 애주번트는 항원성 물질에 대한 체액성 면역 반응을 현저히 증가시키기 위한 항원성 물질과 조합된, 백신의 효과를 위한 백신 조성물 내의 필수 성분인 Rho GTPase 활성제로 구성되는, 상기 기재된 면역애주번트 화합물과 대조적으로 단지 "이차"적인 것으로 본원에서 확인된다. 이차 애주번트는 주로 가공 보조제로서 백신 제형에 포함되나, 특정 애주번트는 다소 면역학적으로 향상된 특성을 소유하고, 이중 목적을 갖는다.
- [0334] 통상적인 보존제가 약 0.0001 중량% 내지 약 0.1 중량% 범위의 유효량으로 백신 조성물에 첨가될 수 있다. 제형에 사용되는 보존제에 따라, 상기 범위 미만 또는 초과 양이 유용할 수 있다. 통상적인 보존제는, 예를 들어, 소르브산칼륨, 소듐 메타비술파이트, 페놀, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 티메로살 등을 포함한다.
- [0335] 비활성화된 형태, 변형된 형태 또는 다른 형태의 백신 조성물의 선택 및 본 발명의 개선된 백신 조성물 제형의 제조 방법은 공지되어 있거나, 당 분야의 숙련자에 의해 용이하게 결정된다.
- [0336] 본 발명에 따른 면역애주번트 화합물의 약리학적 유효량은 항원의 면역원성에 효력을 더하거나, 가속화시키거나, 연장시키기 위해 항원성 물질의 투여와 동시에, 이의 투여에 연속적으로, 또는 이의 투여 직후에, 예를 들어, 경구, 비경구 또는 달리 제공될 수 있고, 우선적으로 점막 경로를 통해 제공될 수 있다.
- [0337] 백신 조성물의 투여량은 특히 항원, 백신접종되었거나 백신접종되는 숙주의 종 등에 좌우되고, 백신 조성물의 약리학적 유효량의 투여량은 보통 용량당 약 0.01 μ g 내지 약 500 μ g(특히, 50 μ g 내지 약 500 μ g)의 면역애주번트 화합물의 범위일 것이다(특히, 도 6에 도시된 결과를 기초로 함).
- [0338] 조합물 내의 특정 항원성 물질의 양은 면역 반응을 개선시키는데 필요한 본 발명에 따른 면역애주번트 화합물의 양에 영향을 미칠 것이나, 전문의는 특정 상황을 충족시키기 위해 통상적인 시험을 통해 면역애주번트 화합물의 유효 투여량을 용이하게 조정할 수 있는 것이 고려된다.
- [0339] 일반적으로, 본 발명의 백신 조성물은 편리하게는 경구, 비경구(피하, 근내, 정맥내, 피내 또는 복막내), 협측, 비내 또는 경피 투여된다. 본 발명에 의해 고려되는 투여 경로는 항원성 물질 및 보조제(co-formulant)에 좌우될 것이다. 예를 들어, 백신 조성물이 경구 또는 비내로는 비독성인 사포닌을 함유하는 경우, 혈류로 사포닌 글리코시드를 주사하지 않게 주의해야 하는데, 이는 이들이 강한 용혈제이기 때문이다. 또한, 많은 항원은 경구 섭취되는 경우에 효과적이지 않을 것이다. 바람직하게는, 백신 조성물은 피하, 근내 또는 비내 투여된다.
- [0340] 백신 조성물의 투여량은 특히 선택 항원, 투여 경로, 종 및 다른 표준 요인에 좌우될 것이다. 당업자는 효과적인 면역화 양 및 투여 방법을 달성하기 위해 각각의 항원에 대한 면역원성 반응에 적절한 투여량을 용이하게 즉시 적정할 수 있음이 고려된다.
- [0341] 본 발명의 기재에서 이미 다른 곳에서 상술된 바와 같이, 본 발명의 추가 목적은 점막 표면으로 투여하기 위한 본 발명에 따른 백신 조성물이다.
- [0342] 이러한 투여 방식은 매우 흥미롭다. 또한, 점막은 우수한 항원 검출 및 항원 제시 세포인 수지상 세포 및 랑게르한스 세포를 함유한다. 점막은 또한 다른 점막 영역에 대한 면역 반응을 촉진시킬 수 있는 점막 관련 림프 조직으로 언급되는 림프 기관에 연결된다. 이러한 상피의 예는 사실상 상피 세포의 단층(거짓층상상피)으로 구성되는 비내 상피막이고, 상기도 내의 점막은 2개의 림프 조직, 아데노이드 및 편도에 연결된다. 고밀도의 B 및 T 세포의 비내 점막 하의 모세혈관의 광범위한 네트워크가 신속한 항원의 인지 및 신속한 면역학적 반응을 제공하기에 특히 적합된다.
- [0343] 바람직하게는, 점막 표면은 코, 폐, 입, 안구, 귀, 위장관, 생식관, 질, 직장 및 피부의 점막 표면으로 구성된 군으로부터 선택된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0344] **실시예**
- [0345] **실시예 1: 과가변 영역이 결실된 플라젤린의 면역애주번트 효과**
- [0346] **재료 및 방법**

- [0347] 재조합 플라젤린의 생성.
- [0348] 재조합 플라젤린은 *살모넬라 엔테리카* 세로바 티피큐리움 ATCC14028 플라젤린 FliC(등록 번호 AAL20871)로부터 유래된다.
- [0349] 플라젤린 FliC 및 FliC_{Δ205-293}을 기준에 기재(Yoshioka et al, 1995. Flagellar filament structure and cell motility of Salmonella typhimurium mutants lacking part of the outer domain of flagellin. J. Bacteriol. 177:1090-1093; Didierlaurent et al, 2004. Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Development of Th2-Type Response. J. Immunol. 172:6922-6930; Sierrro et al, 2001, Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:13722-13727)된 바와 같이 S. 티피큐리움 균주 SIN22(fliJB) 및 SJW46으로부터 분리시키거나, 알렉시스 바이오케미칼즈(Alexis Biochemicals)(Switzerland)사로부터 구입하였다.
- [0350] FliC_{Δ174-400} 및 FliC_{Δ191-352}를 엔코딩하는 작제물을 자체 프로모터의 조절하에서 다음과 같은 프라이머쌍을 이용하여 서열 목록 번호:3의 야생형 fliC 유전자를 지닌 pBR322-유래 플라스미드에서의 PCR에 의해 생성시켰다: AGCACcattcagcgtatccagacc(서열 목록 번호:15) / GCTGGTgctacaaccaccgaaac(서열 목록 번호:16), 및 TCGAGatatacctgtaacagttgcagcc(서열 목록 번호:17) / ACTCGAGgacggtacatcctaaaactgcac(서열 목록 번호:18)(링커를 엔코딩하는 염기는 이탤릭체이다).
- [0351] 비-신호전달 플라젤린으로부터의 해당 서열(DTVKVKAT)에 의한 TLR5 검출과 관련된 잔기 89-96(QRVRELAV)을 대체시키기 위해 FliC_{Δ174-400}을 지닌 플라스미드에서 부위 특이적 돌연변이유발을 또한 수행하였고; 생성된 단백질은 이에 따라 FliC_{Δ174-400/89-96*}이었다.
- [0352] FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ191-352} 및 FliC_{Δ174-400/89-96*}에서, 말단으로부터 6개의 잔기에 위치된 아스파라긴을 세린으로 변경시켰다.
- [0353] 트렁케이션된 플라젤린을 하기와 같이 재조합 S. 티피큐리움 SIN41(*fliC fliJB*)의 상층액으로부터 정제시켰다. 살모넬라를 교반과 함께 37°C에서 18시간 동안 루리아-베르타니(LB) 브로쓰에서 성장시켰다. 상층액을 여과시키고, 60% 황산암모늄(Sigma Aldrich, USA)으로 포화시켰다. 침전된 물질을 원심분리, 20mM Tris/HCl pH7.5에서의 용해화 후, 투석에 의해 회수하였다. 단백질을 연속적인 라운드의 히드록시아파타이트 및 음이온 교환 크로마토그래피(Bio-Rad Laboratories, USA)로 추가로 정제하였다. 마지막으로, 단백질을 폴리믹신 B 컬럼(Pierce, USA)을 이용하여 지질다당류(LPS)를 제거하였다. 리물루스(Limulus) 검정(Associates of Cape Cod Inc., USA)을 이용하여, 잔여 LPS 농도가 재조합 플라젤린 μg 당 30 pg 미만의 LPS인 것을 결정하였다.
- [0354] 상술하면, 플라젤린을 0.017% 트립신-EDTA(Invitrogen, USA)로 37°C에서 1시간 동안 처리하여 단백질을 전체적으로 가수분해시킨 후, 1시간 동안 70°C에서 가열하여 트립신을 비활성화시켰다. 표준 SDS-PAGE 및 FliC-특이적 폴리클로날 항체를 이용한 면역블로팅을 이용하여 단백질을 분석하였다.
- [0355] 동물 실험
- [0356] 암컷 NMRI 마우스(6-8주령)를 찰스 리버 래버러토리스(Charles River Laboratories)(France)사에서 구입하고, 승인된 체계(#A59107; Institut Pasteur de Lille)의 특정한 병원체가 없는 시설에서 유지시켰다. 모든 실험은 현재의 국가 및 기관 규제 및 윤리 지침에 부합하였다.
- [0357] 과면역화를 위해, 1일에 200 μl 의 완전 프로인트 애쥬번트(CFA)/PBS에 에멀전화된 플라젤린 FliC(주사 당 1 μg)를 피하(s.c.) 주사하고, 21, 35 및 49일에 200 μl 의 불완전 프로인트 애쥬번트(IFA)/PBS에 에멀전화된 플라젤린 FliC(주사 당 1 μg)를 피하주사하였다. 63일에, 마우스에 200 μl 의 플라젤린/PBS를 정맥내 투여하고, 혈청 및 조직 샘플링 및 분석을 위해 5mg의 소듐 펜토마르비탈(CEVA Sante Animale, France)의 복막내(i.p.) 주사 2시간 후에 희생시켰다.
- [0358] 점막 선천 반응 및 애쥬번트 특성을 특성규명하기 위해, 20 μl 의 PBS \pm 단백질을 동물 25g 당 1.5mg의 케타민(Merial, France) 및 0.3mg의 크실라진(Bayer, Germany)으로 복막내 마취된 마우스에 비내(i.n.) 투여하였다.
- [0359] 전염증성 반응을 연구하기 위해, 2시간(RNA 및 유전자 발현 검정을 위함) 또는 6시간(사이토카인 생성을 시험하기 위함)에 마우스에서 샘플을 취하였다.
- [0360] 면역화 검정을 위해, 1일 및 21일에 PBS \pm LPS-제거된 난알부민(OVA)(20 μg , Sigma, grade VII, USA) \pm 플라젤

린(1 μ g)을 마우스에 비내 투여하였다. 기관지폐포세척액(BAL) 및 혈청을 35일에 샘플을 취하였다.

- [0361] 중화를 평가하기 위해, 면역 및 모의 혈청을 56°C에서 30분 동안 가열하여 보체를 비활성화시켰다. 연속 혈청 희석액(200 μ l의 PBS 중)을 플라젤린을 이용한 전신 활성화 1시간 전에 정맥내 경로에 의해 동물로 수동 전달하였다. 일부 실험에서, 혈청을 PBS에 희석된 플라젤린과 혼합시키고, 점막 중화를 시험하기 위해 비내 투여하였다.
- [0362] 완전 프로테아제 억제제 각테일(Roche, Switzerland)을 갖는 1ml의 PBS의 기관내 주사 후에 BAL을 수거하고, 원심분리로 투명화시켰다.
- [0363] 혈액 샘플을 수거하고, 실온에서 응고시킨 후, 혈청을 원심분리에 의해 분리시켰다.
- [0364] 조직을 프로테아제 억제제가 보충된 2 ml의 T-PER 조직 단백질 추출 시약(Pierce, USA)으로 균질화시켜 폐 단백질 추출물을 제조하였다. 모든 샘플을 분석 전에 -80°C에 저장하였다.
- [0365] 항원 특이적 항체 반응의 분석.
- [0366] 혈청 및 BAL 샘플에서의 OVA 또는 플라젤린 특이적 항체의 수준을 ELISA를 이용하여 평가하였다.
- [0367] 간단히, 4°C에서 밤새 OVA(인산염 완충액 0.2M pH 6.5의 웰당 20 μ g) 및 플라젤린 FliC(PBS의 웰당 100ng)로 맥시소프(MaxiSorp) 마이크로플레이트(Nalge Nunc Int., USA)를 코팅하였다. 모든 마이크로플레이트를 PBS/Tween20 0.05%로 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 PBS/분유 1%로 차단시켰다.
- [0368] 샘플의 연속 희석액을 발달 전에 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 비오틴화된 항-마우스 IgG 또는 IgA 항체(Southern Biotechnology Associates, USA), HRP-컨쥬게이션된 스트렙타비딘(GE Healthcare, USA) 및 3,3',5,5' 테트라메틸벤지딘(Becton Dickinson Bioscience, USA)을 발달 시약으로 사용하였다. H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지시키고, 450nm에서 OD를 결정하였다.
- [0369] IgG 역가를 OVA에 대해 0.15 OD 및 FliC에 대해 0.5 OD의 흡광도 값을 발생시키는 가장 높은 샘플 희석액의 역수로 규정하였고, 참조 혈청과 체계적으로 비교하였다. 역가는 개별적 마우스로부터의 역가의 기하 평균으로 제공된다.
- [0370] BAL에서의 전체 IgA 및 OVA-특이적 IgA 수준을 측정하고, 시판되는 마우스 IgA(Sigma)를 이용한 교정 곡선을 이용하여 표준화시켰다. 각각의 마우스에 대해 특정 IgA 비(전체 IgA μ g 당 OVA 특이적 IgA의 ng으로 표현됨)를 결정하였다.
- [0371] 사이토카인 특이적 ELISA 및 유전자 발현
- [0372] 마우스 CXCL2 및 CCL20 및 인간 IL-8(CXCL8) 수준을 시판되는 ELISA 키트(R&D Systems, USA)를 이용하여 혈청, BAL, 전체 폐 및/또는 세포 배양 상층액에서 측정하였다.
- [0373] 마우스 폐로부터의 전체 RNA를 누클레오스핀(Nucleospin) RNA II 키트(Macherey Nagel, Germany)로 추출하고, 하이-캐퍼시티 cDNA 아카이브 키트(High-Capacity cDNA Archive Kit)(Applied Biosystems, USA)로 역전사시켰다. 생성된 cDNA를 SYBR 그린 기반의 실시간 PCR(Applied Biosystems)을 이용하여 증폭시켰다.
- [0374] 특정 프라이머는, CGTCATCCATGGCGAACTG(서열 목록 번호:19)/GCTTCTTGCAGCTCCTTCGT(서열 목록 번호:20)(ACTB, β -액틴을 코딩함), TTTTGGGATGGAATTGGACAC(서열 목록 번호:21)/TGCAGGTGAAGCCTCAACC(서열 목록 번호:22)(CCL20), 및 CCCTCAACGGAAGAACCAAAA(서열 목록 번호:23)/CACATCAGGTACGATCCAGGC(서열 목록 번호:24)(CXCL2)이다. 상대 mRNA 수준($2^{-\Delta\Delta Ct}$)을 이전에 기재된 바와 같이, (a) 관심 유전자 및 ACTB (ΔCt)에 대한 PCR 주기 역치(Ct) 및 (b) 처리군 및 대조군($\Delta\Delta Ct$)에 대한 ΔCt 값을 비교하여 결정하였다(Sierro et al, 2001, Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:13722-13727).
- [0375] 세포 기반 검정
- [0376] Caco-2 인간 결장 샘암종 세포주를 인간 CCL20 프로모터의 조절하에서 루시퍼라아제 유전자를 지닌 플라스미드로 안정적으로 트랜스펙션시켜(Rumbo et al, 2004, Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. Gastroenterol. 127:213-223), Caco-Rumbo 세포주를 생성시켰다.
- [0377] 이러한 장 상피 세포를 10% 우태아 혈청, 10 mM HEPES, 비필수 아미노산 1X, 페니실린(100U/ml) 및 스트렙토마

이신(100U/ml) 및 (트랜스진(transgene) 선택을 위해) 0.7 mg/mL의 G418(Invitrogen)로 보충된 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 성장시켰다.

- [0378] 인간 기관지 상피 세포주 BEAS-2B를 Caco-Rumbo 배지 + 1 mM 피루브산 나트륨 및 인슐린-트랜스페린-셀레늄 혼합물(Invitrogen)이 보충된 카이지(Kaigh) F12 영양소 배지에서 배양하였다.
- [0379] 세포를 루시페라아제 검정을 위해 6시간 동안, 또는 ELISA를 위해 상층액을 수거하기 전 16시간 동안 재조합 플라젤린으로 자극하였다.
- [0380] 세포 추출물에서의 루시페라아제 활성을 Bright Glo 루시페라아제 검정(Promega, USA)을 이용하여 측정하였다. 상대 발광(RLU)을 재조합 플라젤린을 이용한 활성화 시험에 대한 야생형 플라젤린을 이용한 최대 활성의 백분율로 표준화시켰다. 시험관내 증화 시험을 위해, RLU를 각각의 단백질에 대한 최대 활성의 백분율로 표준화시켰다: $[(RLU_{\text{처리}}/RLU_{\text{미처리}})/(RLU_{\text{최대}}/RLU_{\text{미처리}})] \times 100$.
- [0381] 통계 분석.
- [0382] 만-휘트니 검정을 이용하여 통계 차(Statistical difference)를 분석하고, 0.05 미만의 p 값을 유의한 것으로 간주하였다. 달리 특정되지 않는 한, 결과는 산술 평균 \pm 표준 오차로 표현된다.
- [0383] 결과
- [0384] 플라젤린 과가변 영역의 결실은 항원성을 손상시키나, TLR5-자극 활성을 변형시키지 않는다.
- [0385] 2개의 신규한 플라젤린 분자(각각 336 및 271개의 아미노산으로 구성된 FliC $_{\Delta 191-352}$ 및 FliC $_{\Delta 174-400}$)를 내부 결실로 제작하였다(도 1A).
- [0386] 대조군으로서, 본 발명자는 항원성 도메인에 부분적 결실을 갖는 이전에 특성규명된 변이체 FliC $_{\Delta 204-292}$ 를 사용하였다(Yoshioka et al, 1995, Flagellar filament structure and cell motility of Salmonella typhimurium mutants lacking part of the outer domain of flagellin. J. Bacteriol. 177:1090-1093)(도 1A).
- [0387] 시험관내 및 생체내 실험을 위한 음성 대조군으로서, TLR5 신호전달을 손상시키는 돌연변이를 FliC $_{\Delta 174-400}$ 에 도입시켜, 재조합 단백질 FliC $_{\Delta 174-400/89-96*}$ 을 생성시켰다.
- [0388] 각각의 플라젤린의 예측 구조는 모티프 89-96 및 보존된 영역의 전체 구조가 변경되지 않은 것을 나타내었다(도 1A).
- [0389] FliC $_{\Delta 204-292}$ 를 제외하고, 변이체는 플라젤린 결핍 박테리아의 운동성을 보충할 수 없었고, 배양 상층액으로 분비되었다.
- [0390] 다음으로, 본 발명자는 재조합 플라젤린의 내재 항원성을 평가하였다. 이를 위해, 포화 농도의 플라젤린을 마이크로플레이트에 코팅시키고, FliC 또는 FliC $_{\Delta 174-400}$ 에 대해 특이적인 과면역 혈청을 이용하여 ELISA에 의해 프로빙시켰다.
- [0391] 도 1B에 예시된 바와 같이, 본 발명자는 항-FliC 혈청이 FliC 변이체에 대해 적정되는 경우에 야생형 FliC에 비해 3 내지 10배 낮은 항체 역가를 관찰하였다.
- [0392] 대조적으로, FliC $_{\Delta 174-400}$ 에 대해 특이적인 과면역 혈청의 반응성은 표적 플라젤린이 무엇이든지 간에 유사하였다(도 1C).
- [0393] 이러한 결과는 중심 과가변 영역이 항-플라젤린 항체에 대한 주요 표적임을 암시한다.
- [0394] 마지막으로, 본 발명자는 재조합 분자가 임의의 TLR5-자극 활성을 보유하는지 아닌지의 여부를 확립하기 위해 조사하였다.
- [0395] Caco-Rumbo 리포터 세포 및 폐 상피 세포주 BEAS-2B를 이용하여 용량-반응 분석을 수행하였다. Caco-Rumbo 세포에서의 루시페라아제 활성 및 BEAS-2B 세포에 의한 IL-8 분비를 측정함으로써 활성화를 평가하였다(인간 장 상피 세포주는 "간 활성화 및 간 조절 케모카인" 또는 "LARC"로도 공지된 케모카인 CCL20, 및 IL-8의 발현을 기초로 하는 플라젤린/TLR5-자극 활성의 독특한 리포터이다).

- [0396] 도 2A-B에 도시된 바와 같이, FliC_{Δ204-292}, FliC_{Δ191-352} 및 FliC_{Δ174-400}은 모두 효능 있는 세포 활성화제이다. 플라겔린의 각각의 EC50 값은 세포 유형에 따라 약간 변하였으나, 기존에 기재된 ng/mL 범위 내에 해당하였다(Smith et al, 2003, Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin protofilament formation and bacterial motility. Nat. Immunol. 4:1247-1253).
- [0397] 재조합 플라겔린의 활성화는 TLR5에 완전히 의존하는 것으로 밝혀졌는데, 이는 FliC_{Δ174-400/89-96*}가 상피 세포를 활성화시킬 수 없었기 때문이다.
- [0398] TLR5 신호전달을 위한 필요조건을 TLR5-결핍 마우스로부터 유래된 골수 대식세포를 이용하여 추가로 확인하였고; 세포는 재조합 플라겔린으로 자극시 어떠한 IL-12 p40을 합성하지 않았다(데이터는 도시하지 않음).
- [0399] 결실된 플라겔린은 TLR5-의존성 점막 선천 반응을 자극한다.
- [0400] 이후, 재조합 플라겔린에 의한 TLR5 자극을 점막 경로에 의해 생체내에서 연구하였다.
- [0401] 이를 위해, 플라겔린으로 비내 처리된 마우스의 폐에서의 CCL20 및 CXCL2 발현을 qRT-PCR을 이용하여 정량하였다(도 2C).
- [0402] 2시간 이내에, CCL20 mRNA 폐 수준은 모의 처리된 동물보다 야생형 또는 재조합 플라겔린이 처리된 동물에서 약 30배 더 높았다.
- [0403] 또한, CCL20 케모카인 생성을 폐 균질액 및 BAL 둘 모두에서 점적주입 6시간 후에 검출하였다(도 2D). 대조 실험에서, FliC_{Δ174-400/89-96*} 및 트립신 소화된 플라겔린은 상기 유형의 효과를 유도하지 않았다. CXCL2에 대해 유사한 연구결과가 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음).
- [0404] 이러한 결과는 생체내 전염증성 반응이 오로지 재조합 플라겔린으로 인해서인 것을 입증하였다.
- [0405] 전체적으로, 과가변 영역에 결실을 갖는 플라겔린은 야생형 FliC 대응부와 동등한 점막 전염증성 특성을 나타내었다.
- [0406] 재조합 플라겔린은 점막 애주버트 활성을 나타낸다.
- [0407] 본 발명의 재조합 분자의 애주버트 특성을 특성규명하기 위해, 혈청 및 분비액에서의 항체 반응을 비내 면역화 후에 연구하였다.
- [0408] 표준 점막 애주버트로서 다양한 플라겔린 또는 콜레라 독소(CT)와 함께 제형화되거나 이와 함께 제형화되지 않은 난알부민(OVA)을 모델 항원으로 사용하였다.
- [0409] FliC와 OVA의 공동 투여는 OVA 단독으로 면역화된 동물에 비해 OVA-특이적 IgG 반응을 현저히 증가(혈청 및 BAL 둘 모두에서, 각각 약 300 및 100배)시켰다(도 3A-B).
- [0410] 또한, OVA-특이적 IgA 반응이 BAL에서 향상되었고, 이는 FliC가 점막 애주버트의 원형 분비 항체 반응을 촉진하는 것을 암시한다(도 3C). 흥미롭게도, FliC의 효과는 CT의 효과와 유사하였다.
- [0411] FliC와 같이, 재조합 플라겔린 FliC_{Δ204-292}, FliC_{Δ191-352} 및 FliC_{Δ174-400}은 따라서 전신 및 점막 반응에 효력을 더할 수 있었다.
- [0412] 대조적으로, FliC_{Δ174-400/89-96*} 및 트립신 처리된 플라겔린은 효능이 결핍되었다(도 3 및 표 1).
- [0413] 그러므로, 플라겔린의 과가변 영역의 결실은 TLR5-매개 점막 애주버트 특성에 현저한 영향을 미치지 않았다. 본 발명의 데이터는 또한 선천 및 적응 면역성에 대한 재조합 분자의 각각의 효과가 서로 관련이 있는 것을 나타내었다.
- [0414] 과가변 영역의 결실은 항-플라겔린 항체를 유도하는 능력을 손상시킨다.
- [0415] 항원성 도메인의 결실은 특히 반복된 투여를 이용하여, 플라겔린 특이적 면역 반응을 감소시킴으로써 TLR5-매개 면역성의 임의의 중화를 감소시키는 것으로 예상된다.
- [0416] 본 발명자는 따라서 FliC-특이적 항체의 유도에 관한 비내 면역화의 효능을 평가하기로 하였다.

- [0417] 도시된 바와 같이, FliC는 혈청 및 BAL에서 강한 IgG 반응을 유도하였다(표 1 및 도 4). 대조적으로, FliC_{Δ204-292}는 FliC보다 둘 모두의 유체에서 10배 낮은 항체 수준을 촉발시켰고, FliC_{Δ191-352} 및 FliC_{Δ174-400}을 이용한 면역화 후에 더욱 명백한 결과가 관찰되었다.
- [0418] 결론적으로, 플라젤린의 항원성 및 면역자극성 도메인은 기능적으로 연결되지 않는다. 따라서, FliC_{Δ191-352} 및 FliC_{Δ174-400}은 중화 활성을 갖는 플라젤린 특이적 항체의 생성을 방지하거나 약화시키는 관심 분자이다.
- [0419] 플라젤린 특이적 항체는 TLR5-매개 신호전달을 중화시킨다.
- [0420] 박테리아 플라젤린은 주로 과가변 영역에 대해 정해지는 강한 항체 반응을 유도하는 것으로 공지되어 있다. 본 발명자는 항-플라젤린 항체가 플라젤린의 TLR5-자극 활성을 중화시키는 것으로 가정하였다.
- [0421] 그러므로, 플라젤린 FliC 또는 모의 제조물(PBS 단독 또는 CFA에 제형화된 관련이 없는 항원 난알부민(OVA))로 마우스를 피하 면역화시킨 후, IFA를 이용하여 부스팅시켰다. ELISA 분석은 항-FliC 혈청이 10⁶을 초과하는 특이적 IgG 역가를 나타낸 반면, 모의 혈청 역가는 검정의 검출 역치(10²) 미만인 것을 나타내었다.
- [0422] 상기 언급된 바와 같이, 인간 장 상피 세포주는 케모카인 CCL20("간 활성화 및 조절 케모카인", LARC로도 공지됨)의 발현을 기초로 하는, 플라젤린/TLR5-자극 활성의 독특한 리포터로서 유용하다.
- [0423] 따라서, *CCL20* 프로모터의 조절하에서 루시페라아제 유전자를 지닌 Caco-Rumbo 세포를 이용하여, 항-FliC 혈청이 FliC의 TLR5 효능체 활성을 완전히 중화시킬 수 있는 것을 본원에서 입증하였다(도 5A).
- [0424] 이후, TLR5 신호전달에 대한 FliC-특이적 항체의 중화 효과를 면역화된 동물에서 직접 평가하였다. 이를 위해, 마우스에서의 전신 전염증성 반응(CCL20 및 CXCL2 케모카인의 생성)을 FliC의 정맥내 주사 후에 연구하였다(도 5B-C).
- [0425] 모의 면역화된 동물에서, FliC 공격은 PBS 공격에 비해 CCL20 및 CXCL2의 혈청 수준에서 현저한 증가를 촉발시켰다.
- [0426] 대조적으로, FliC-면역화된 동물에서의 케모카인 생성은 어떠한 공격에 의해 향상되지 않았다. 나이브(naive) 동물에서의 수동 혈청 전달을 이용하여, 도 5D에 도시된 바와 같이 주사된 항체의 양과 전신 선천 반응 사이에 밀접한 상관관계가 발견되었다.
- [0427] 결론적으로, 플라젤린에 대해 이미 존재하는 면역성은 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 플라젤린의 TLR5-자극 활성을 중화시킬 수 있다.
- [0428] 이는, 도 4에 따라 상기 기재된 바와 같이, 중화 항체를 포함하는 플라젤린 특이적 항체의 생성을 촉진시키는 능력이 크게 손상된 FliC_{Δ174-400}의 경우는 아니다.
- [0429] 비내 경로에 의한 TLR5 매개 선천 반응을 개시하는데 필요한 유효 용량을 결정하였다. FliC 및 FliC_{Δ174-400}은 유사한 용량-반응 프로파일을 나타내었고, 후속 중화 검정을 위해 0.1 μ g의 용량을 선택하였다(도 6).
- [0430] 이를 위해, 동물을 FliC로 비내 과면역화시켜 강한 FliC-특이적 점막 IgG 반응(평균 역가 ~ 45,000)을 유도시킨 후, 0.1 μ g의 FliC 또는 FliC_{Δ174-400} 플라젤린으로 비내 공격하였다. BAL에서의 전염증성 케모카인 생성을 모니터링하였다.
- [0431] FliC 또는 FliC_{Δ174-400}을 이용한 공격은 나이브 동물에서 관찰되는 바와 같이 CCL20를 생성시켰다(모의 및 FliC-면역화 마우스에서 각각 4.28 \pm 1.98 vs 1.08 \pm 0.54 ng/ml 및 2.48 \pm 1.22 vs 0.93 \pm 0.48 ng/ml).
- [0432] 점막 및 전신 TLR5-의존성 반응은 과가변 플라젤린 영역 상의 다양한 범위에 의존한다.
- [0433] 본 발명자는 또한 재조합 플라젤린의 정맥내 주사 후에 유도된 TLR5-의존성 반응의 플라젤린 특이적 항체에 의한 중화를 연구하고자 하였다.
- [0434] 선천 면역의 전신 활성화를 분석하기 위해, 순환 전염증성 케모카인 CCL20 및 CXCL2에서의 생성을 혈청 중에서 ELISA에 의해 측정하였다(도 7).
- [0435] 예기치 않게, 본 발명자는 FliC_{Δ174-400}이 야생형 FliC에 비해 전신 전염증성 효과를 촉발하는 능력이 약 100배

손상된 것을 관찰하였다.

- [0436] 10 μ g의 FliC $_{\Delta 174-400}$ 은 약간의 케모카인 생성을 자극한 반면, TLR5 모티프 FliC $_{\Delta 174-400/89-96}$ 내에서 변이된 변이체는 활성이 결여되었다(CCL20에 대해 0.85 \pm 0.27 vs 0.02 \pm 0.00 ng/ml).
- [0437] 이는 FliC와 같은 효능 있는 활성제인 FliC $_{\Delta 204-292}$ 및 FliC $_{\Delta 191-352}$ 와 대조적이다.
- [0438] 그러므로, 과가변 영역 상의 특정 분자 결정인자(또는 과가변 영역에 의존적인 분자 결정인자)가 전신 TLR5 자극에 필요하나, 점막 TLR5 자극에는 필요하지 않다. 전체적으로 볼 때, 본 발명의 결과는 점막 및 전신 구획 내의 TLR5 활성이 별개의 메커니즘에 의해 조절되는 것을 나타낸다.
- [0439] **실시예 2: FliC $_{\Delta 174-400}$, FliC $_{\Delta 161-405}$ 및 FliC $_{\Delta 138-405}$ 로 구성된 군으로부터 선택된 과가변 영역이 결실된 플라젤린의 생물학적 활성.**
- [0440] 제조합의 과가변 영역이 결실된 플라젤린의 생성.
- [0441] 상기 실시예 1에 기재된 것과 동일한 방법을 수행하여 다양한 과가변 영역이 결실된 플라젤린, 즉, FliC $_{\Delta 174-400}$, FliC $_{\Delta 161-405}$, 및 FliC $_{\Delta 138-405}$ 및 FliC $_{\Delta 100-405}$ 를 제조합적으로 생성시켰다.
- [0442] 도 8 및 9는 상기 제조합적으로 생성된 단백질의 분석을 도시한다.
- [0443] 도 8은 TCA를 이용한 단백질 침전 단계 후의 상응하는 제조합 *S. 티피유리움* SIN41 박테리아 세포로부터의 배양 상층액으로부터 수거된 제조합 단백질에서 수행된 SDS PAGE 전기영동의 결과를 도시한다.
- [0444] 도 9는 TCA를 이용한 단백질 침전 단계 후의 상응하는 제조합 *S. 티피유리움* SIN41 박테리아 세포로부터의 배양 상층액에 대해 수행된 항-FliC 폴리클로날 항체를 이용한 웨스턴 블로팅 검정의 결과를 도시한다.
- [0445] 과가변 영역이 결실된 플라젤린 FliC $_{\Delta 174-400}$, FliC $_{\Delta 161-405}$, 및 FliC $_{\Delta 138-405}$ 의 생물학적 활성.
- [0446] 실시예 1에 기재된 사이토카인 특이적 ELISA 검정을 수행함으로써 CCL20 및 CXCL2의 유도에 대한 FliC $_{\Delta 174-400}$, FliC $_{\Delta 161-405}$, 및 FliC $_{\Delta 138-405}$ 의 효과를 검정하였다.
- [0447] 간단히, 10 μ g의 위치 174-400, 161-405, 및 138-405가 결실된 다양한 제조합 플라젤린을 복막내 주사하였다.
- [0448] 2시간 후, 혈청을 샘플링하고, 사이토카인 특이적 ELISA를 위해 처리하였다(CCL20 및 CXCL2).
- [0449] 플라젤린 제조물은 황산암모늄으로 미리 침전되고, 투석된 제조합 살모넬라의 상층액으로부터 유래되었다(도 8 및 9). 이러한 미정제 제조물은 내독소로 오염될 수 있기 때문에, 본 발명자는 TR4 신호전달이 결여된 마우스를 사용하였는데, 이는 LPS가 상기 미정제 제조물에서 주요 오염물질일 수 있기 때문이다. 또한, 본 발명자는 생물학적 활성이 미정제 제조물의 단백질 분획에 존재하는 것을 입증하기 위해 트립신-처리를 이용하였다.
- [0450] 결과는 도 10(CCL20의 유도) 및 11(CXCL2의 유도)에 도시되어 있다.
- [0451] 도 10 및 11의 결과는 제조합 플라젤린 FliC $_{\Delta 161-405}$ 및 FliC $_{\Delta 138-405}$ 가 FliC $_{\Delta 174-400}$ 에 대해 기재된 바와 같이 생체내 신호전달에 대해 적격임을 암시한다.
- [0452] 이러한 결과는 FliC $_{\Delta 161-405}$ 및 FliC $_{\Delta 138-405}$ 가 효과적인 TLR5 효능제이고, 이에 따라 효과적인 애쥬번트 화합물일 수 있음을 암시한다.
- [0453] **실시예 3: HIV1 바이러스로부터의 gp140 항원에 대한 면역 반응에 대한 FliC $_{\Delta 174-400}$ 의 애쥬번트 활성.**
- [0454] 면역화 프로토콜 및 항원 특이적 항체 반응의 분석은 하기 상술되는 특정한 특징을 제외하고는 실시예 1에 기재된 것과 동일하다.
- [0455] 간단히, HIV1 항원 gp140에 대한 천연 플라젤린 FliC 및 제조합 FliC $_{\Delta 174-400}$ 의 애쥬번트 활성을 다음과 같이 수행하였다: NMRI 마우스(n=8)를 1일 및 21일에 FliC 또는 FliC $_{\Delta 174-400}$ (마우스당 1 μ g)을 갖거나 갖지 않는 gp140(마우스당 5 μ g)을 함유하는 20 μ l의 PBS로 비내 면역화시켰다.
- [0456] 혈청 및 기관지폐포세척액(BAL)을 35일에 샘플링하고, gp140-특이적 ELISA에 의해 항체 역가를 결정하였다.

- [0457] 결과는 도 12에 도시되어 있고, 여기서 각각의 기호는 개별적 마우스를 나타내고, 막대는 기하 평균을 나타낸다.
- [0458] 기호는 (i) 원: HIV1 gp140 단독; (ii) 다이아몬드: HIV1 gp140 + FliC_{Δ174-400}; (iii) 삼각형: gp140 + FliC 각 각으로 비내 투여된 마우스를 의미한다.
- [0459] 혈청 샘플로부터의 항체 역가는 도 12의 좌측 부분 상의 채워진 기호로 제시된다(밀폐된 기호). 기관지폐포세 척액 샘플로부터의 항체 역가는 도 12의 우측 부분 상의 빈 기호로 제시된다.
- [0460] 결과는 본 명세서에서 규정된 바와 같은 다양한 과가변 영역이 결실된 플라젤린이 효과적인 면역에슈먼트 화합 물을 구성함을 나타낸다.
- [0461] **표 1: 재조합 플라젤린에 의해 유도된 프로테아제 민감성 면역 반응***

	비내 면역화*		항-OVA IgG**				항-FliC IgG**			
	혈청		BAL		혈청		BAL			
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD		
PBS	ND***	0.0	ND	0.0	ND	0.0	ND	0.0		
OVA	2.4	0.8	1.1	0.7	ND	0.0	ND	0.0		
FliC + OVA	5.7	0.1	3.9	0.5	5.9	0.6	3.0	0.7		
FliC _{Δ204-292} + OVA	5.5	0.9	3.4	0.8	3.3	0.8	1.0	0.5		
FliC _{Δ191-352} + OVA	4.5	1.3	2.9	0.9	2.2	0.3	ND	0.0		
FliC _{Δ174-400} + OVA	4.9	0.9	2.7	0.9	2.0	0.1	0.1	0.2		
TRP + OVA	3.4	1.2	1.3	0.8	ND	0.0	ND	0.0		
FliC/TRP + OVA	2.8	0.5	1.1	0.6	ND	0.0	0.3	0.3		
FliC _{D204-292} /TRP + OVA	3.0	1.4	0.8	1.0	ND	0.0	ND	0.0		
FliC _{D191-352} /TRP + OVA	2.6	0.7	0.8	0.9	ND	0.0	ND	0.0		
FliC _{D174-400} /TRP + OVA	2.6	0.4	1.1	0.9	ND	0.0	ND	0.0		

- [0462]
- [0463] * 마우스(n=8)를 1일 및 21일에 PBS, 난알부민(OVA), OVA + 플라젤린/플라젤린 유래 펩티드 또는 OVA + 트립신 처리된 플라젤린(TRP)로 비내 면역화시켰다. 35일에, OVA-특이적 IgG 및 FliC-특이적 IgG 역가를 혈청 및 BAL 에서 측정하였다.
- [0464] 통계적 유의성(p>0.05)을 만-휘트니 검정으로 결정하였다. **값은 Log10 (역가의 역수) ± 표준 편차(SD)로 표현된다. 혈청 및 BAL에서, 검출 한도는 각각 2 및 0.3(1/100 혈청 희석 및 1/2 BAL 희석)이다.
- [0465] ***"ND"는 "검출되지 않음"을 나타낸다.

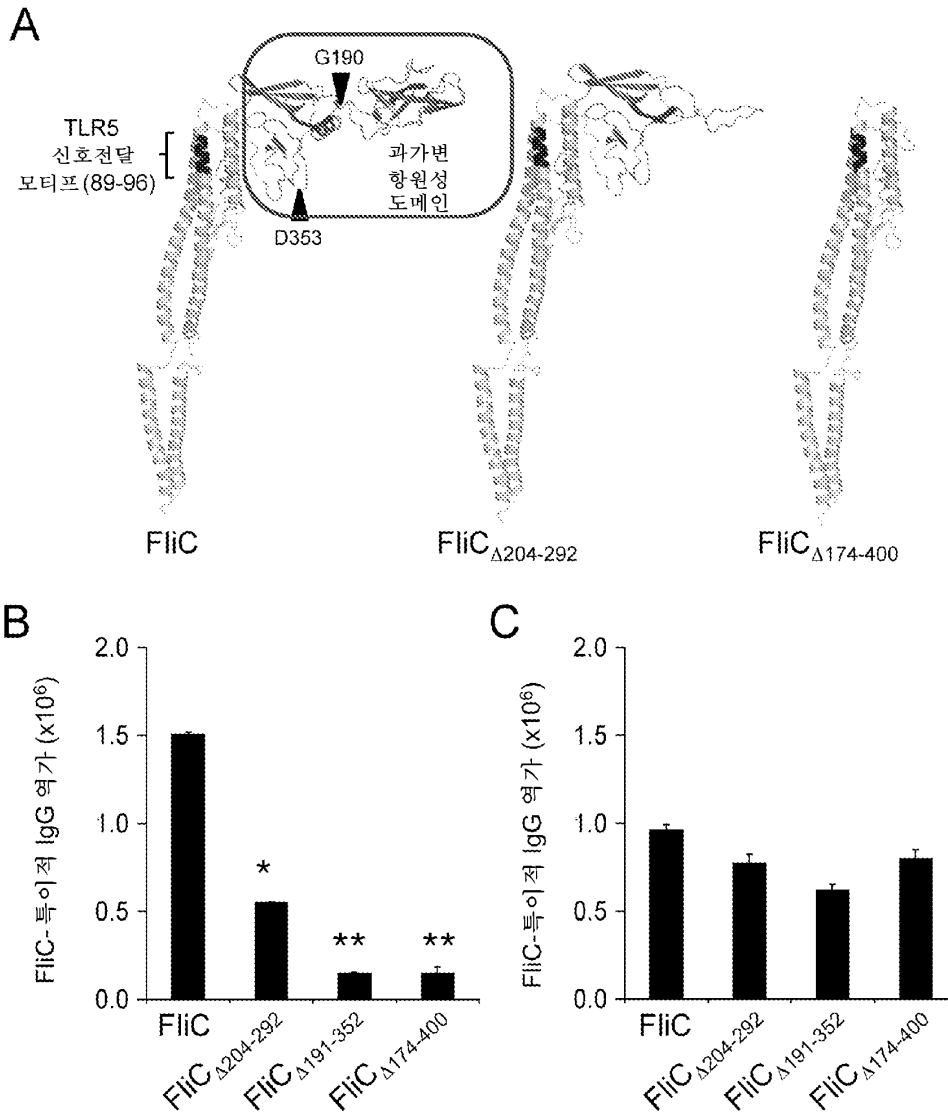
[0466] 표 2: 서열

SEQ ID N°	유형	기재
1	펩티드	플라겔린 (FliC)
2	펩티드	FliC _{Δ174-400}
3	핵산	플라겔린 (FliC)
4	핵산	프라이머
5	핵산	프라이머
6	핵산	프라이머
7	핵산	프라이머
8	핵산	프라이머
9	핵산	프라이머
10	핵산	프라이머
11	핵산	프라이머
12	핵산	프라이머
13	핵산	프라이머
14	핵산	FliC _{Δ174-400}
15	핵산	프라이머
16	핵산	프라이머
17	핵산	프라이머
18	핵산	프라이머
19	핵산	프라이머
20	핵산	프라이머
21	핵산	프라이머
22	핵산	프라이머
23	핵산	프라이머
24	핵산	프라이머
25	펩티드	FliC _{Δ161-405}
26	펩티드	FliC _{Δ138-405}
27	펩티드	FliC _{Δ100-405}
28	핵산	FliC _{Δ161-405}
29	핵산	FliC _{Δ138-405}
30	핵산	FliC _{Δ100-405}

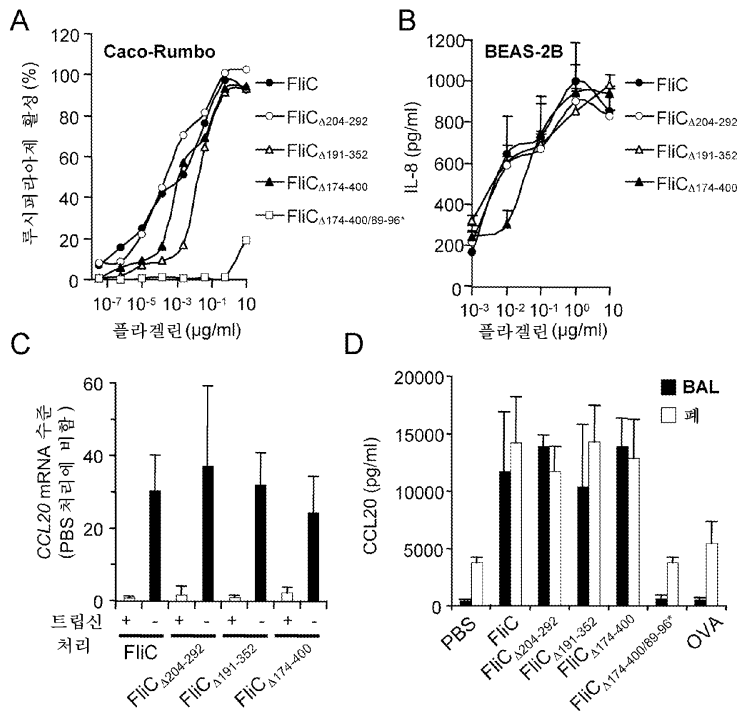
[0467]

도면

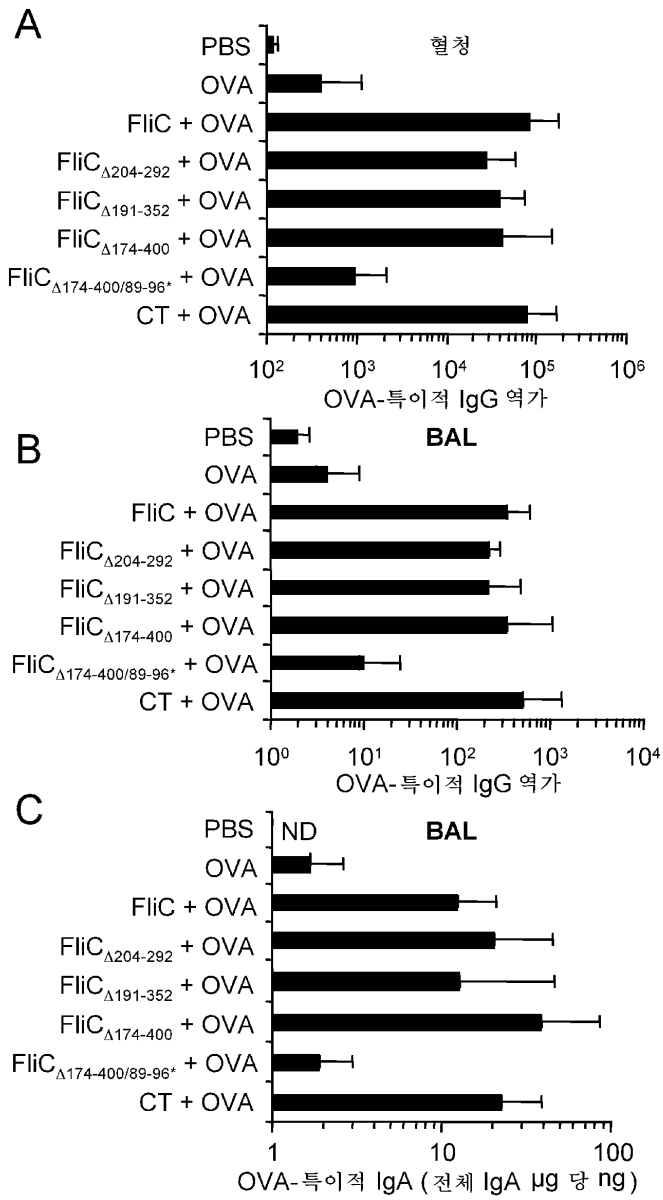
도면1



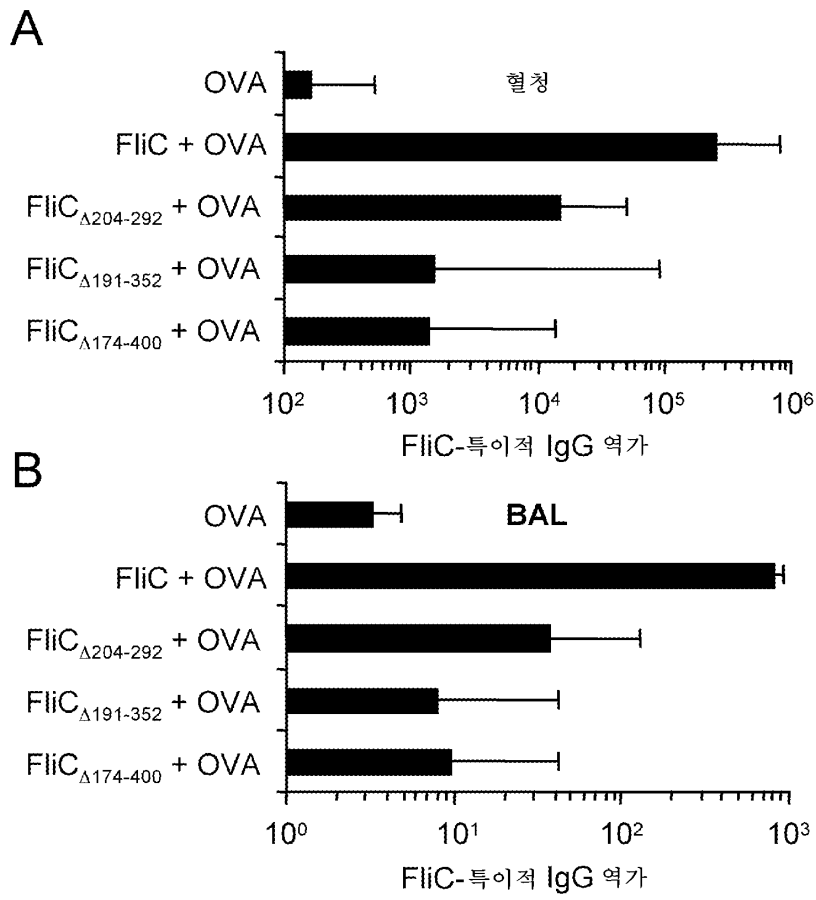
도면2



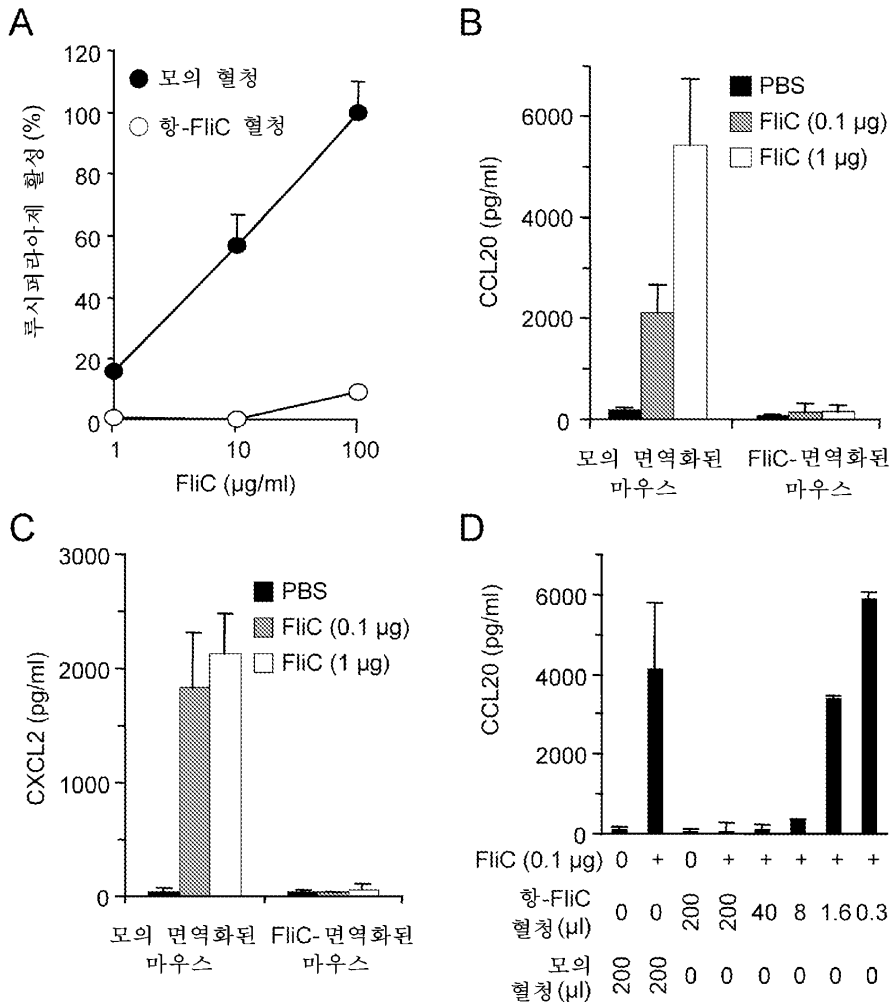
도면3



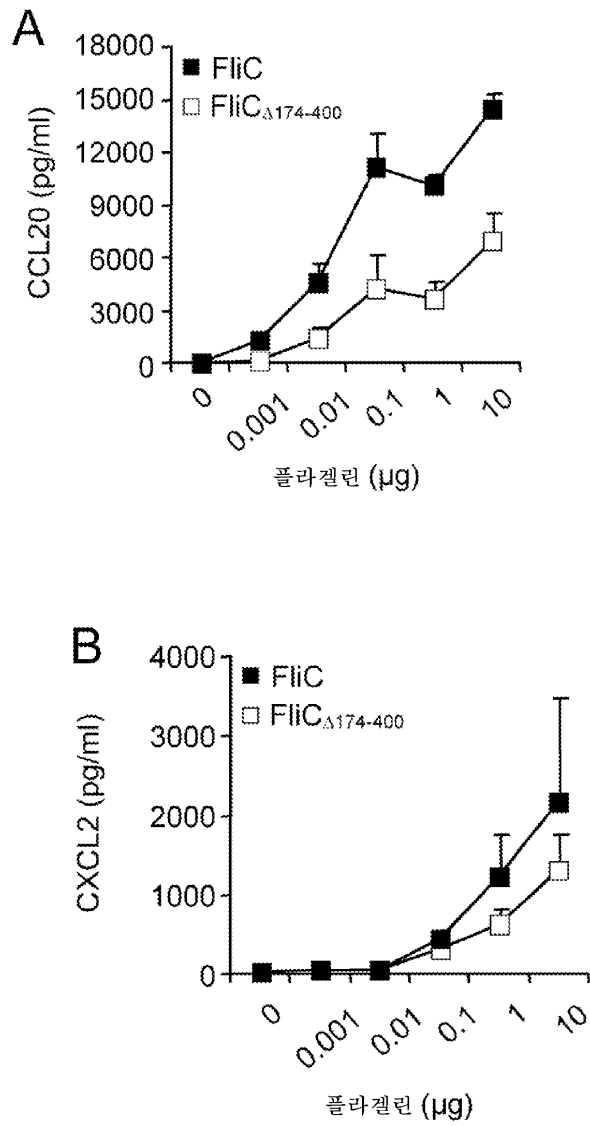
도면4



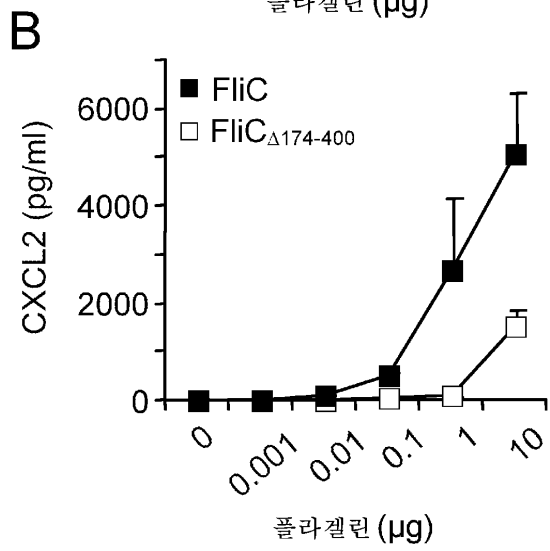
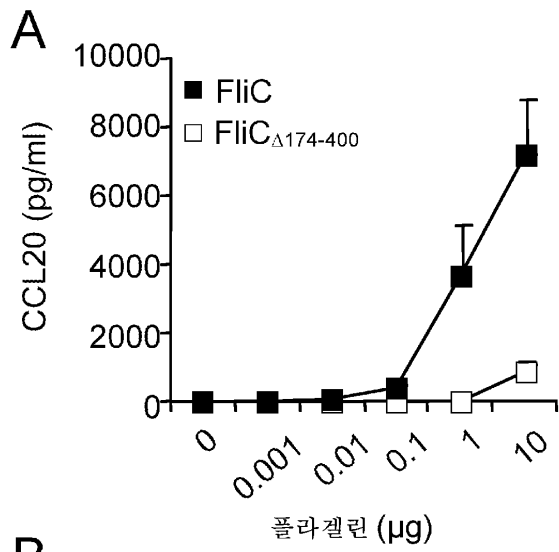
도면5



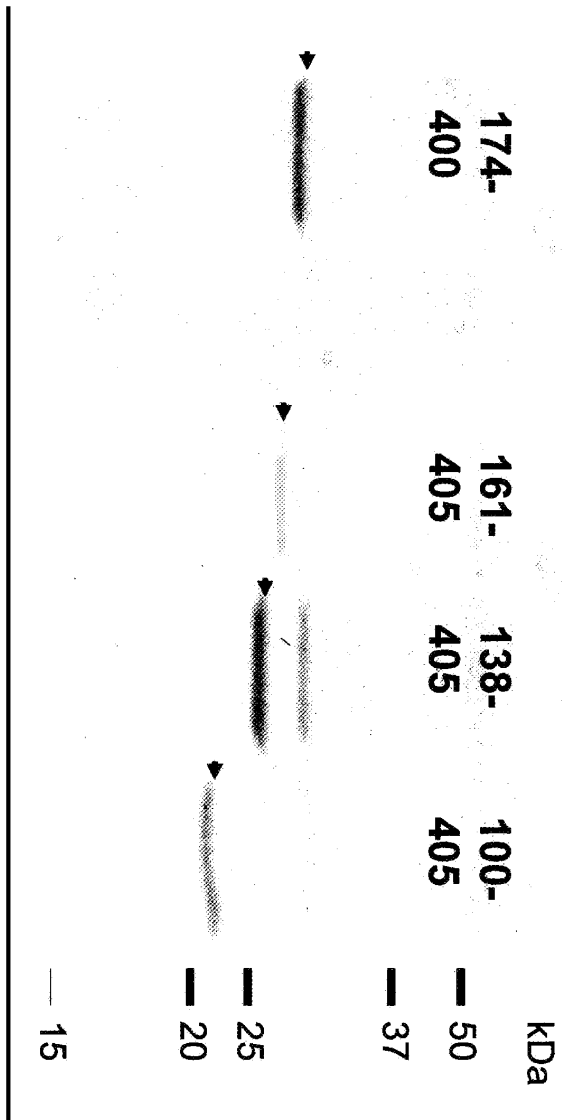
도면6



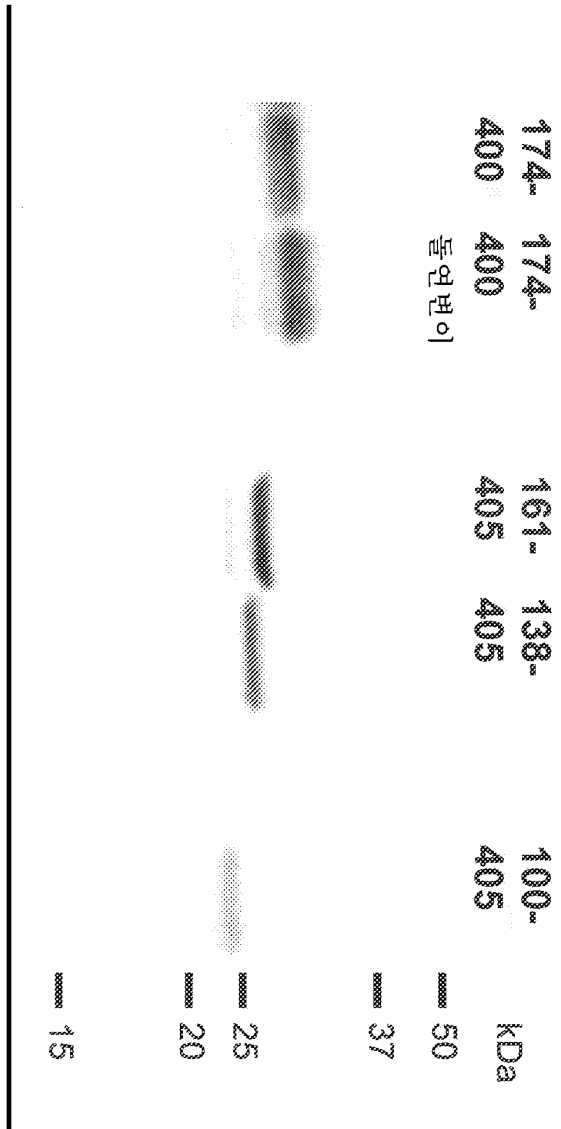
도면7



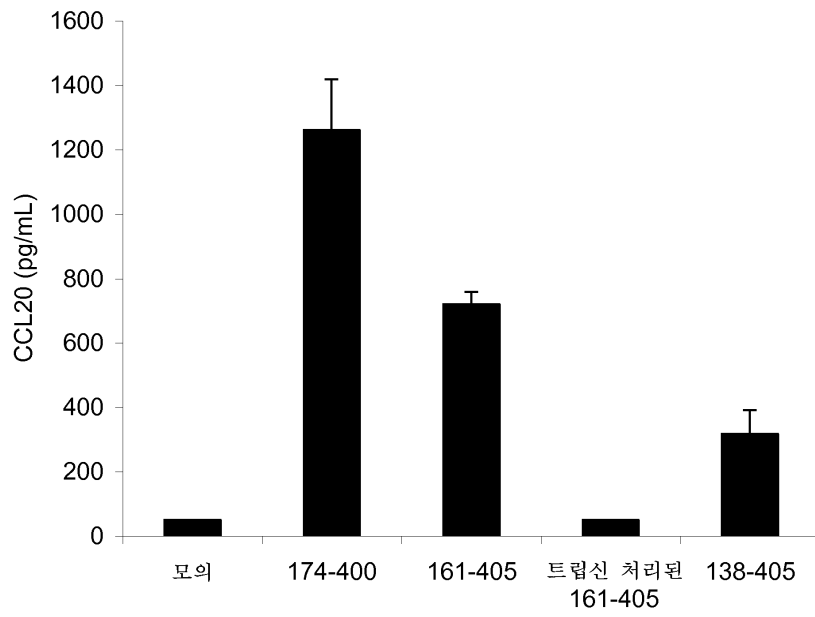
도면8



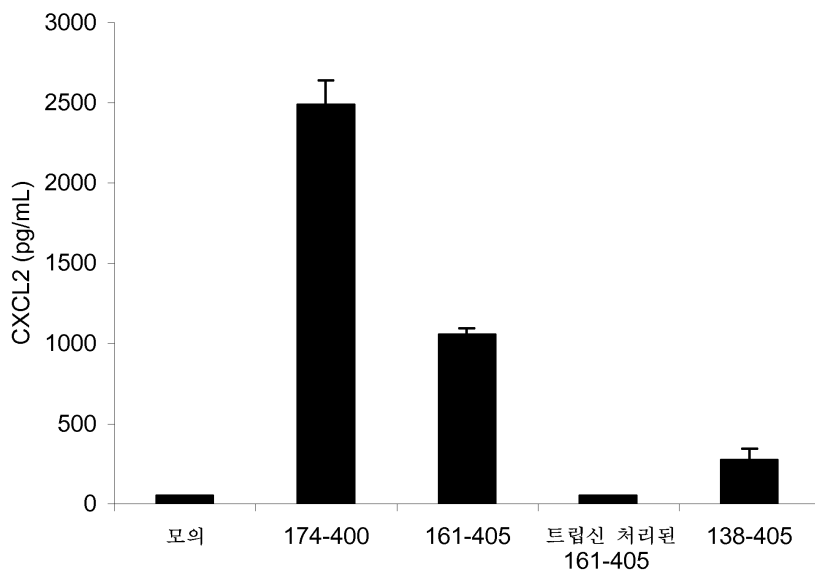
도면9



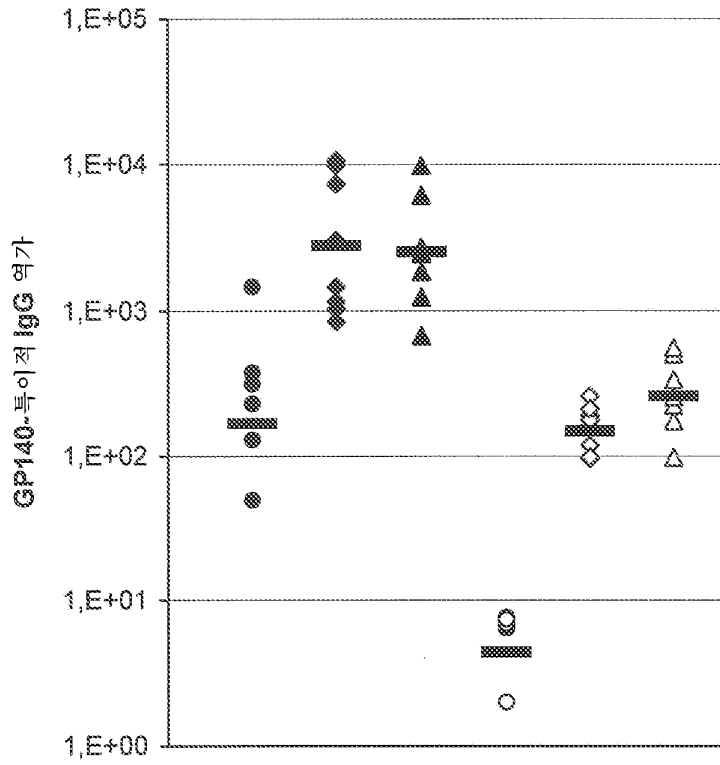
도면10



도면11

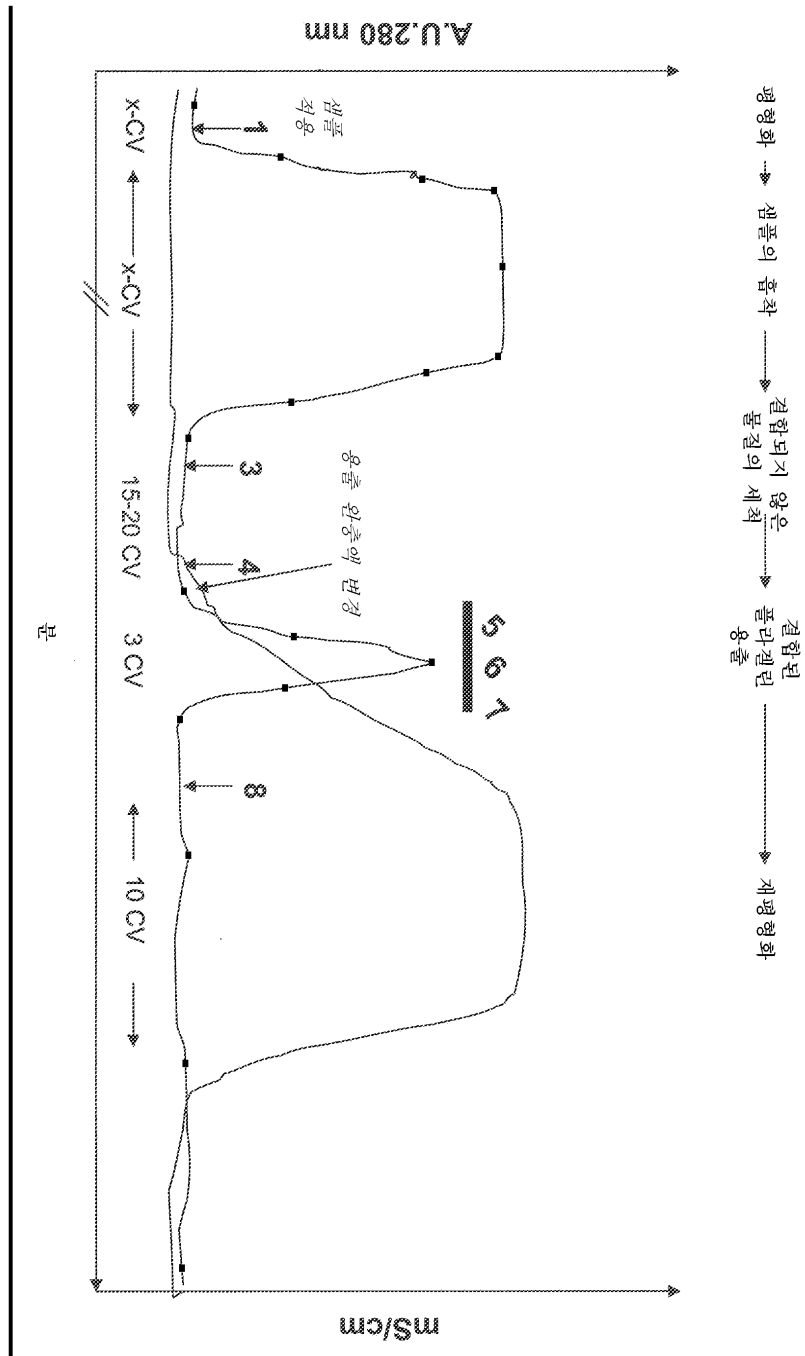


도면12

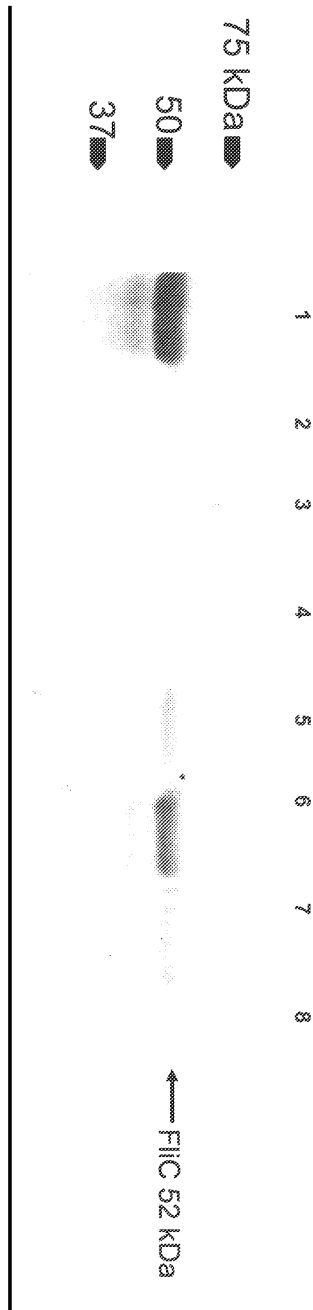


GP140	+	+	+	+	+	+
FIICΔ174-400	-	+	-	-	+	-
FIIC	-	-	+	-	-	+

도면13



도면14



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
(INSERM)
- <120> Novel immunoadjuvant compounds and use thereof
- <130> V882EU - INSERM
- <160> 30

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 494

<212> PRT

<213> Salmonella enterica

<400> 1

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn

1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser

20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala

35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser

50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala

65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val

85 90 95

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

100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln

115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala Asp

180 185 190

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

195 200 205

165 170 175
 Gly Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu
 180 185 190
 Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg
 195 200 205
 Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr
 210 215 220

Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser
 225 230 235 240
 Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu
 245 250 255
 Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
 260 265 270

<210> 3

<211> 1488

<212> DNA

<213> Salmonella enterica

<400> 3

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60

tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt cgggtctgcg tatcaacagc 120

gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt 180

ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc 240

gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggg tcagtctgct 300

aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360

aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420

gacaacaccc tgaccatcca ggttgggtgcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg 480

aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacgtga atgtgcaaca aaaatataag 540

gtcagcgata cggtgcaac tgttacagga tatgccgata ctacgattgc tttagacaat 600

agtactttta aagcctcggc tactggtctt ggtgggtactg accagaaaat tgatggcgat 660

ttaaaatttg atgatacgac tggaaaatat tacgcaaag ttaccgttac ggggggaact 720

ggtaaagatg gctattatga agtttccgtt gataagacga acggtgaggt gactcttgct 780

ggcgggtgca cttccccgct tacaggtgga ctacctgca cagcaactga ggatgtgaaa 840

aatgtacaag ttgcaaatgc tgatttgaca gaggctaaag cgcattgac agcagcaggt 900

gttaccggca cagcatctgt tgtaaatg tcttatactg ataataacgg taaaactatt 960

gatgggtggt tagcagttaa ggtaggcgat gattactatt ctgcaactca aaataaagat 1020

ggttccataa gtattaatac tacgaaatac actgcagatg acggtacatc caaaactgca 1080

ctaaacaaa tgggtggcgc agacggcaaa accgaagtg tttctattgg tggtaaaact 1140

tacgctgcaa gtaaagccga aggtcacaac tttaaagcac agcctgatct ggcggaagcg 1200

gctgctacaa ccaccgaaaa cccgctgcag aaaattgatg ctgctttggc acaggttgac 1260

acgttacgtt ctgacctggg tgcggtacag aaccgtttca actccgctat taccaacctg 1320

ggcaacaccg taacaacct gacttctgcc cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg 1380

accgaagttt ccaacatgtc tcgcgcgcag attctgcagc aggccggtac ctccgttctg 1440

gcgcaggcga accaggttcc gcaaaacgtc ctctctttac tgcgttaa 1488

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 4

agcagactga accgccag 18

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 5

gctacaacca ccgaaaacc 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 6

aaccgctgc agaaaattg 19

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 caggactttc acgccgtt 18
 <210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 cttcagatcg atatcgatag tttcac 26

 <210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 attcagcgta tccagacc 18
 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 gttccgaaa gcgtcctctc tttactg 27
 <210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 11

cagtaaagag aggacgcttt gcggaac 27

<210> 12
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 ggtgcagctg gagctacaac caccgaaaac c 31

<210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 ggtgcagctg gaaacccgct gcagaaaatt g 31

<210> 14
 <211> 819
 <212> DNA
 <213> Salmonella enterica
 <400> 14
 atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt cgggtctgcg tatcaacagc 120

gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg ctccccgtaa gcgtaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc 240
 gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggg tcagtctgct 300
 aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360
 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420
 gacaacacce tgaccatcca ggttgggtgcc aacgacgggtg aaactatcga tatcgatctg 480
 aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatagctga atggtgctgc tgggtgctaca 540

accaccgaaa acccgctgca gaaaattgat gctgctttgg cacaggttga cacgttacgt 600
 tctgacctgg gtgcggtaca gaaccgtttc aactccgcta ttaccaacct gggcaacacc 660
 gtaaacaccc tgacttctgc ccgtagccgt atcgaagatt ccgactacgc gaccgaagtt 720

tccaacatgt ctcgcgcgca gattctgcag caggccggta cctccgttct ggcgaggcg 780

aaccaggttc cgcaaagcgt cctctcttta ctgcgttaa 819

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 15

agcaccattc agcgtatcca gacc 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 16

gctggtgcta caaccaccga aaac 24

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 17

tcgagatata ctgtaacagt tgcagcc 27

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 18

actcaggac ggtacatcca aaactgcac 29

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 cgtcatccat ggcgaaactg 19
 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 gcttctttgc agctccttcg t 21
 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 ttttgggatg gaattggaca c 21

 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 tgcagtgaa gccttcaacc 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 ccctcaacgg aagaacaaaa 20
 <210> 24
 <211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 24

cacatcaggt acgatccagg c

21

<210> 25

<211> 253

<212> PRT

<213> Salmonella enterica

<400> 25

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn

1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser

 20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala

 35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser

 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala

65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val

 85 90 95

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

 100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln

 115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr

 130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln

 165 170 175

Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn
 180 185 190
 Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala
 195 200 205
 Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met
 210 215 220
 Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln
 225 230 235 240
 Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
 245 250
 <210> 26
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Salmonella enterica
 <400> 26
 Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15
 Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30
 Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
 35 40 45
 Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80
 Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95
 Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110
 Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
 115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu
 130 135 140
 Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp
 145 150 155 160
 Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly
 165 170 175

 Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser
 180 185 190
 Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln
 195 200 205
 Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser
 210 215 220
 Val Leu Ser Leu Leu Arg
 225 230
 <210> 27
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> *Salmonella enterica*

 <400> 27
 Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15
 Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30
 Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
 35 40 45
 Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60

 Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80
 Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95
 Gln Ser Ala Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala

100 105 110
 Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn
 115 120 125

Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu
 130 135 140

Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val
 145 150 155 160

Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val
 165 170 175

Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
 180 185 190

<210> 28

<211> 765

<212> DNA

<213> Salmonella enterica

<400> 28

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt cccgtctgcg tatcaacagc 120
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgvcgagac cactgaaggc 240
 gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtctgct 300
 aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgctg 360

 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420
 gacaacacce tgaccatcca ggttgggtgcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg 480
 aagggtgcag ctggaaacce gctgcagaaa attgatgctg ctttggcaca ggttgacacg 540
 ttacgttctg acctgggtgc ggtacagaac cgtttcaact ccgctattac caacctgggc 600
 aacaccgtaa acaacctgac ttctgcccgt agccgtatcg aagattccga ctacgcgacc 660
 gaagtttcca acatgtctcg cgcgagatt ctgcagcagg ccggtacctc cgttctggcg 720
 caggcgaacc aggttccgca aagcgtctc tctttactgc gtaa 765

<210> 29

<211> 696

<212> DNA

<213> Salmonella enterica

<400> 29

```

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa    60
tcccagtcgg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt cgggtctgcg tatcaacagc    120
gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt    180
ctgactcagg ctccccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgvcgagac cactgaaggc    240
gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtctgct    300
aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgctg    360

aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctgggtgca    420
gctggaaacc cgctgcagaa aattgatgct gctttggcac aggttgacac gttacgttct    480
gacctgggtg cggtaacagaa ccgtttcaac tccgctatta ccaacctggg caacaccgta    540
aacaacctga ctctgcccg tagccgtatc gaagattccg actacgcgac cgaagtttcc    600
aacatgtctc gcgcgcagat tctgcagcag gccggtaact ccgttctggc gcaggcgaac    660
caggttccgc aaagcgtcct ctctttactg cgttaa                                696

```

<210> 30

<211> 582

<212> DNA

<213> Salmonella enterica

<400> 30

```

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa    60
tcccagtcgg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt cgggtctgcg tatcaacagc    120
gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt    180
ctgactcagg ctccccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgvcgagac cactgaaggc    240
gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtctgct    300
ggtgcagctg gaaaccgcgt gcagaaaatt gatgctgctt tggcacaggt tgacacgtta    360
cgttctgacc tgggtgcggt acagaaccgt ttcaactccg ctattacaa cctgggcaac    420

accgtaaaca acctgacttc tgcccgtagc cgtatcgaag attccgacta cgcgaccgaa    480
gtttccaaca tgtctcgcgc gcagattctg cagcaggccg gtacctcgt tctggcgcag    540
gcgaaccagg ttccgcaaag cgtcctctct ttactgcgtt aa                                582

```