



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0092282
(43) 공개일자 2011년08월17일

(51) Int. Cl.

A61K 39/095 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7011885

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년10월26일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년05월25일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2009/051439

(87) 국제공개번호 WO 2010/046715

국제공개일자 2010년04월29일

(30) 우선권주장

0819633.9 2008년10월25일 영국(GB)

(71) 출원인

임페리얼 이노베이션스 리미티드

영국 런던 에스더블유7 2피지 사우스 켄싱턴 엑서
비션 로드 프린시즈 게이트 52

(72) 발명자

엑슬리 라첼

영국 런던 에스더블유7 2에이제트 임페리얼 컬리
지 런던 암스트롱 로드 플라워스 빌딩 센터 포 몰
래클라 마이크로바이올로지 앤드 인픽션

탕 크리스토프

영국 런던 에스더블유7 2에이제트 임페리얼 컬리
지 런던 암스트롱 로드 플라워스 빌딩 센터 포 몰
래클라 마이크로바이올로지 앤드 인픽션

리 수잔 엠.

영국 오엑스1 3알이 옥스포드 써 월리암 턴 스쿨
오브 패슬로지

(74) 대리인

정삼영, 송봉식

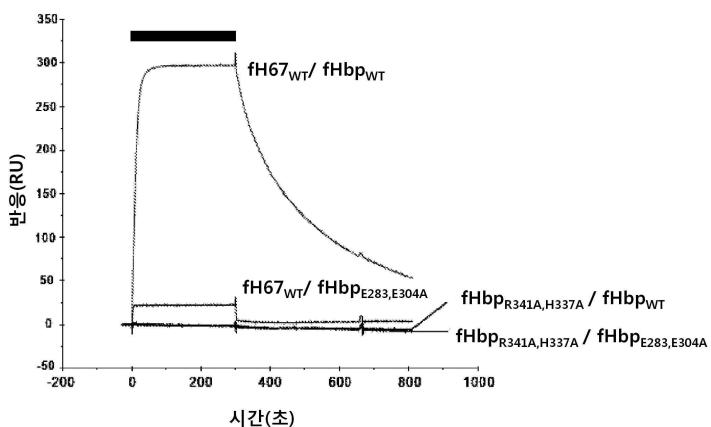
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 들연변이 인자 H 결합 단백질을 포함하는 백신 조성물

(57) 요약

본 발명은 적어도 하나의 변형된 인자 H 결합 단백질을 포함하는, 인간 또는 비-인간 동물에 투여되었을 때 면역 반응을 유발할 수 있는 면역원성 조성물; 및 관련 조성물, 용도 및 키트에 대한 것이다.

대 표 도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

적어도 하나의 변형된 인자 H 결합 단백질을 포함하는, 인간 또는 비-인간 동물에 투여되었을 때 면역 반응을 유발할 수 있는 면역원성 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 인자 H 결합 단백질은 나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 또는 나이세리아 고노레아(*Neisseria gonorrhoeae*)로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 조성물은 나이세리아 메닌지티디스 또는 나이세리아 고노레아 중 하나 또는 둘 다에 대한 면역 반응을 유발하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 면역 반응은 나이세리아 메닌지티디스 또는 나이세리아 고노레아에 의한 감염을 저해하거나 예방하는데 충분한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 인자 H 결합 단백질은 인자 H 결합 단백질에 대한 인자 H의 결합을 예방 또는 감소시키기 위하여 변형된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 인자 H 결합 단백질은 야생형 단백질과 비교하여 단백질의 하나 이상의 위치에서 변형된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 인자 H 결합 단백질은 야생형 단백질의 아미노산과 비교하여 적어도 하나의 아미노산이 변경된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 변경된 하나 이상의 아미노산은 인자 H 결합 단백질이 인자 H와의 복합체 일 때 분리된 야생형 인자 H 결합 단백질과 비교하여 감소된 표면 노출을 갖는 아미노산 잔기인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 7항 또는 제 8항에 있어서, 인자 H 결합 단백질에서 변경된 하나 이상의 아미노산은 도 6에 나타낸 아미노산 위치 번호 103, 106, 107, 108, 109, 145, 147, 149, 150, 154, 156, 157, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 191, 193, 194, 195, 196, 199, 262, 264, 266, 267, 268, 272, 274, 283, 285, 286, 288, 289, 302, 304, 306, 311 및 313의 아미노산 잔기를 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 인자 H 결합 단백질은 도 6의 서열과 적어도 60% 서열 동일성을 갖고, 인자 H 결합이 없거나 유의하게 감소된 인자 H 결합을 가져오는 적어도 하나의 위치의 변경된 아미노산을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 유발/생성할 수 있는 면역 반응은 보호성 면역 반응인

것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 나이세리아 메닌지티디스 또는 나이세리아 고노레아에 대한 예방용 또는 치료용 백신으로서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

적어도 하나의 변형된 인자 H 결합 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 15

면역 반응을 유발하기 위한 약제의 제조에서 하나 이상의 변형된 인자 H 결합 단백질의 용도.

청구항 16

제 15항에 있어서, 약제는 나이세리아 메닌지티디스 또는 나이세리아 고노레아에 대한 예방용 또는 치료용 접종으로서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 17

제 16항에 있어서, 백신은 나이세리아 메닌지티디스에 의해 유발되는 뇌수막염, 패혈증 및/또는 패혈성 쇼크를 예방 또는 저해하기 위한 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 18

나이세리아 메닌지티디스 또는 나이세리아 고노레아에 대한 면역 반응을 일으키는데 사용하기 위한 하나 이상의 변형된 인자 H 결합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 19

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 인간 또는 비-인간 동물에 투여하는 단계를 포함하는 나이세리아 메닌지티디스 또는 나이세리아 고노레아에 의한 감염의 영향으로부터 인간 또는 비-인간 동물을 보호하는 방법.

청구항 20

인간 또는 비-인간 동물에 대하여 제 13항 또는 제 14항에 따른 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 인간 또는 비-인간 동물에서 면역 반응을 일으키는 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 면역 반응은 보호성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

나이세리아 메닌지티디스 또는 나이세리아 고노레아에 의한 감염에 대하여 인간 또는 비-인간 포유류의 면역화에서 사용하기 위한 약제의 제조에서 하나 이상의 변형된 인자 H 결합 단백질의 용도.

청구항 23

제 1항 내지 제 22항 중 어느 한 항에 따른 조성물 및 투여와 관련된 지침서를 포함하는, 유기체에서 면역 반응을 유도하는데 사용하기 위한 키트.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 병원성 유기체에 대한 면역 반응을 유발하는데 사용하기 위한 면역원성 조성물, 특히 보호성 면역 반응을 유발할 수 있는 면역원성 조성물에 대한 것이다.

배경기술

[0002]

나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*)(meningococcus)는 인간의 코인두(nasopharynx)에 서식하는 캡슐에 싸인 그람-음성 쌍구균 박테리아이다. 일반적인 개체군에서의 보균율은 일반적으로 10% 내외이다. 복잡한 숙주-병원체 유연 관계는 일반적으로 공생적 특성을 갖는다. 그러나 때때로, 수막염균 보균은 침습성 질환으로 이어질 수 있다. 이 현상은 일반적으로 적은 수의 고병원성 클론 계통에 속하는 균주와 관련된다(Caugant, D. A. et al. (1987) *J Bacteriol* 169:2781-2792). *N. 메닌지티디스*는 전세계적으로 화농성 뇌수막염의 주된 원인이고, 뇌수막염 및 폐혈증의 발생시킬 수 있는 유일한 박테리아이다. 발병률은 한 지역학적 위치에서 질병의 풍토병 또는 유행병의 유형에 의존하여 10^5 개체군 당 1-3 사이로 다양하다. 따라서, 침습성 수막염균성 질환의 발생, 사망률 및 질병률을 감소시키기 위한 예방용 및 치료용 전략의 개발이 필요하다.

[0003]

나이세리아 메닌지티디스 유기체는 몇몇의 최전선의 항생제에 민감하지만, 그럼에도, 수막염균성 감염으로 진단된 유의한 수의 환자가 압도적인 질환 또는 심각한 합병증으로 사망한다. 사망률은 합병증을 수반하지 않는 뇌수막염의 경우 2-3%, 폐혈성 쇼크의 경우 50% 또는 그 이상으로 다양하다(Cartwright, K. A. 및 D. A. Ala'Aldeen(1997) *J Infect* 34:15-19).

[0004]

최근의 허가된 백신은 박테리아 외막을 둘러싸는 탄수화물 캡슐에 기반을 두고, 따라서 오직 상응하는 캡슐을 발현하는 균주의 부분 집합에 대해서만 보호를 제공한다. 추가로, 부유한 국가에서 수막염균성 질환의 가장 일반적인 원인인 B 나이세리아 메닌지티디스의 혈청군에 대하여 널리 효과적인 백신은 없다. 이것은 B 캡슐 혈청군이 유년기 및 배아 발달 동안에 발현되는 인간 신경 세포 부착 분자의 변형과 구조적으로 연관된 살리실산의 중합체로 구성되었기 때문이다. 이것은 이 항원을 사용한 면역화가 자가면역 반응을 유발할 수 있음과 관련된다.

발명의 내용

[0005]

본 발명은 변형된 인자 H 결합 단백질을 포함하는 신규한 조성물, 특히 신규한 면역원성 조성물, 및 나이세리아 메닌지티디스에 대한 면역 반응을 유발하기 위한 이들 조성물의 용도에 대한 것이다.

[0006]

본 발명의 한 목적은 나이세리아 메닌지티디스에 대한 보호성 면역 반응을 유발하는데 사용할 수 있는 하나 이상의 조성물을 제공하는 것이다.

[0007]

첫 번째 측면에 따라, 본 발명은 적어도 하나의 변형된 인자 H 결합 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하고, 인간 또는 비-인간 동물에게 투여되었을 때, 조성물은 면역 반응을 유발할 수 있다.

[0008]

본 발명에서 바람직하게 언급된 인자 H 결합 단백질은 나이세리아 메닌지티디스 또는 나이세리아 고노레아(*Neisseria gonorrhoeae*)로부터 나온 인자 H 결합 단백질을 지칭한다.

[0009]

나이세리아 메닌지티디스는 숙주를 모사하는 것에 의해 숙주 유기체의 면역 반응을 잃게 한다. 나이세리아 메닌지티디스는 숙주 보체 조절자인 인자 H를 보충하기 위해 전극화된-탄수화물의 화학적 성질 대신에 인자 H 결합 단백질의 형태로 단백질을 사용한다.

[0010]

건강한 개체에서, 보체의 활성화는 인자 H(fH)를 포함하는 막-결합 및 가용성 혈청-조절 단백질을 통해 정확히 조절된다. 인자 H는 12개 도메인(보체 조절 단백질 반복, 또는 CCP로 명명)으로 구성된 155 kDa의 단백질이다. 몇몇의 병원균이 그들의 표면에 인자 H를 격리하는 것에 의해 보체-매개 죽음을 피하는 것을 채택하였다.

[0011]

앞에서 논의한 바와 같이, 나이세리아 메닌지티디스는 박테리아성 뇌수막염 및 폐혈성 쇼크의 주요한 원인으로서 세계적으로 중요한 인간-적응 병원체이다(Stephens et al. (2007) *Lancet* 369, 2196-210). 나이세리아 균주 변화에 따라, 수막염균성 질환에 대하여 최근에 사용하는 백신은 광범위한 보호를 제공하지 않고, 따라서 사용이 제한된다. 한 접근에서 백신 조성물의 항원으로서 인자 H 결합 단백질을 사용하였다(fHbp, GNA 1870, 또는 R2086로 알려짐). 인자 H 결합 단백질은 보호성 살균 항체들을 유발하는 *N. 메닌지티디스*의 표면에 널리 존재하

는, 27 kDa의 표면 지질단백질이다(Fletcher et al.(2004) *Infect Immun* 72, 2088-100; Massignani et al.(2003) *J Exp Med* 197, 789-99). 인자 H 결합 단백질은 보체의 음성 조절자인 인자 H를 박테리아 표면에 보충하고, 인간 혈청에서 보체-매개 용해를 억제함으로써 선천성 면역 반응을 피하기 위한 수막염균 (*meningococcus*)의 능력에 기여한다(Madico et al.(2006) *J Immunol* 177, 501-10; Schneider et al.(2006) *J Immunol* 176, 7566-75).

[0012] 본 발명에서 적어도 하나의 변형된 인자 H 결합 단백질은 항원으로서 사용된다. 단백질은 단백질에 대한 인자 H의 결합을 예방하거나 감소시키기 위해 변형된다. 백신 제형에서 인자 H 결합 단백질을 피험체로 투여한 후 인자 H 결합 단백질에 대한 인자 H의 결합은 백신의 성공을 감소시키는 것으로 믿어진다. 첫째, 인자 H 결합 단백질에서의 인자 H의 존재가 숙주 면역계에 의한 인자 H 결합 단백질 위의 결정적인 에피토프의 인식을 제한할 수 있다. 이들 에피토프에 대하여 생성된 항체는 살균 및 보체 매개 용해에 그들을 민감하게 하는 박테리아에 대한 결합의 억제 인자 H 모두 일 수 있다. 둘째, 인자 H 결합 단백질에 대한 면역 반응은 합텐과 유사한 방법으로 결합된 인자 H에 대한 반응을 또한 유발할 수 있다. 이것은 가능하지만 원하지 않는 자가 면역 반응으로 이어질 수 있다. 마지막으로, 보체 활성화는 보체 단백질이 아주번트 활성이 있으므로 면역 반응에 포함된다. 인자 H의 보충에 의한 면역화 부위에서의 보체 활성화의 감소는 뒤이은 접종에서 얻어지는 면역의 수준을 감소시킬 수 있다.

[0013] 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 변형된 인자 H 결합 단백질은 단백질의 하나 이상의 위치에서 변형된다.

[0014] 바람직하게는, 변형된 인자 H 결합 단백질은 야생형 단백질의 아미노산과 비교하여 변경된 적어도 하나의 아미노산을 갖는다.

[0015] 바람직하게는 변형된 하나 이상의 아미노산은 분리된 인자 H 결합 단백질과 비교하여 인자 H 결합 단백질이 인자 H와의 복합체에 있을 때, 감소된 표면 노출을 갖는 아미노산 잔기이다.

[0016] 인자 H 결합 단백질에서 변경된 하나 이상의 아미노산은 도 6(서열 번호 1)에 정의된 바와 같이 위치 번호 103, 106, 107, 108, 109, 145, 147, 149, 150, 154, 156, 157, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 191, 193, 194, 195, 196, 199, 262, 264, 266, 267, 268, 272, 274, 283, 285, 286, 288, 289, 302, 304 306, 311 및 313의 아미노산으로 구성되는 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0017] 인자 H 결합 단백질에서 변경된 하나 이상의 아미노산은 야생형 단백질에서 인자 H와 수소 결합을 형성하는 하나 이상의 아미노산일 수 있다.

[0018] 인자 H 결합 단백질에서 변경된 하나 이상의 아미노산은 도 6(서열 번호 1)에서 정의된 바 아미노산 번호 103, 106, 107, 108, 180, 181, 183, 184, 185, 191, 193, 195, 262, 264, 266, 272, 274, 283, 286, 304 및 306으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0019] 전술한 아미노산의 두 개 또는 그 이상, 세 개 또는 그 이상, 네 개 또는 그 이상, 또는 다섯 개 또는 그 이상은 본 발명에서 사용하기 위해 변경된 인자 H 결합 단백질에서 바뀔 수 있다. 바람직하게는 인자 H 결합 단백질에서 하나 이상의 아미노산을 바꾸는 것에 의해 인자 H에 대한 결합이 예방되거나 유의하게 감소될 수 있다.

[0020] 한 구체예에서, 아미노산 번호 283 및 204의 적어도 하나는 글루탐산 대신에 알라닌으로 돌연변이/변경된다. 바람직하게는 이 돌연변이는 인자 H 결합의 완전한 제거를 야기한다.

[0021] 바람직하게는 변형된 인자 H 결합 단백질에 대한 인자 H의 결합은 야생형 인자 H 결합 단백질의 결합보다 적어도 5배 더 적고, 바람직하게는 적어도 10배 더 적고, 바람직하게는 적어도 어떤 수치에서 그 20배까지 더 적다. 바람직하게는 결합에서의 감소는 약 50 nM의 농도의 분석물을 사용하여 측정된다. 이 지시의 결합에서의 감소는 유의한 감소로 고려될 것이다.

[0022] 인자 H 결합을 예방하거나 억제하기 위해 만들어진 인자 H 결합 단백질에 대한 변형에 더하여, 단백질은 또한 N. 메닌지티디스에 의한 감염에 대한 면역원으로서 활동하기 위한 단백질의 능력에 영향을 주지 않는 다른 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 다른 보존적 단백질 변경이 단백질에서 만들어질 수 있다. 유사하게, 단백질에 대한 삽입 또는 결실이 단백질의 면역원성에 영향을 주지않게 만들어질 수 있다.

[0023] 바람직하게는, 변형된 인자 H 결합 단백질은 도 6의 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상 서열 동일성을 갖지만, 변형되고, 바람직하게는 인자 H 결합을 없애거나 유의하게 감소시키는 적어도 하나의 위

치에서 다른 아미노산을 갖는다.

- [0024] 퍼센트 서열 동일성은 서열을 정렬하고 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하는데 필요하다면 캡을 도입한 다음 준비된 서열에서 아미노산이 동일한 서열의 아미노산의 퍼센트로서 정의된다. 퍼센트 서열 동일성을 결정하는 목적을 위한 정렬은 당업자에게 잘 알려진 많은 방법으로 달성될 수 있으며, 예를 들어, BLAST를 포함한다 (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool).
- [0025] 퍼센트 동일성에서의 변화는 예를 들어, 아미노산 치환, 삽입 또는 결실에 의한 것일 수 있다. 아미노산 치환은 자연에서 보존된, 치환된 아미노산이 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 것일 수 있고, 예를 들어, 루신의 이소루신으로의 치환이 보존적 치환이다.
- [0026] 면역원성 조성물은 조성물이 개체에 투여되었을 때 적어도 하나의 변형된 인자 H 결합 단백질에 대한 면역 반응을 유발할 수 있는 능력이 있는 조성물이다. 바람직하게는 개체는 인간 또는 비-인간 동물, 더욱 바람직하게는 인간 또는 비-인간 포유류이다.
- [0027] 바람직하게는 본 발명의 조성물에 의해 유발된 면역 반응은 면역화된 인간에게 감염하기 위한 N. 메닌지티디스의 능력에 영향을 미친다. 바람직하게는 본 발명의 조성물로 면역화된 인간에게 감염하기 위한 N. 메닌지티디스의 능력을 저해하거나 예방한다. 이것은 많은 방법으로 성취될 수 있다. 유발된 면역 반응은 N. 메닌지티디스를 인식하고 박멸할 수 있다. 선택적으로, 또는 추가적으로, 유발된 면역 반응은 N. 메닌지티디스의 복제를 저해하거나 예방할 수 있다. 선택적으로, 또는 추가적으로, 유발된 면역 반응은 인간 또는 비-인간 동물에서 질환을 유발하는 N. 메닌지티디스를 저해 또는 예방할 수 있다.
- [0028] 변형된 인자 H 결합 단백질은 제조합적으로 생산되거나(예컨대, 유전학적으로 처리된 발현 시스템), 예를 들어, 시험관내 펩티드 합성 또는 시험관 내 번역과 같이 합성하여 생산될 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 변형된 인자 H 결합 단백질에 추가로 하나 이상의 항원을 더 포함할 수 있다. 또한, 추가적인 항원은 N. 메닌지티디스로부터 유도될 수 있고, N. 메닌지티디스에 대한 면역 반응을 유발할 수 있다.
- [0030] 조성물은 개체에게 투여되었을 때 보호성 면역 반응을 유발/생산하기 위해 사용될 수 있다. 보호성 면역 반응은 감염시키는 개체에서 N. 메닌지티디스를 죽일 수 있거나, N. 메닌지티디스가 복제 및/또는 질병을 유발하는 것을 예방 또는 억제할 수 있다.
- [0031] 조성물은 N. 메닌지티디스에 대한 예방용 또는 치료용 백신으로서 사용될 수 있다.
- [0032] 나아간 측면에 따라서, 본 발명은 적어도 하나의 변형된 인자 H 결합 단백질 또는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0033] 바람직하게는 약학적 조성물은 본 발명의 첫 번째 측면에 따른 조성물을 포함한다.
- [0034] 바람직하게는 약학적 조성물은 N. 메닌지티디스에 대한 보호성 면역 반응을 생성할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 사용된 바 문구 "보호성 면역 반응을 생성하는 것"은 조성물이 투여된 인간 또는 비-인간 포유류와 같은 숙주 유기체에서 보호성 반응을 생성할 수 있음을 의미한다. 바람직하게는 보호성 면역 반응은 N. 메닌지티디스에 의한 이후의 감염을 막는다. 보호성 면역 반응은 병을 감소시키기 위해 N. 메닌지티디스의 복제를 감소시키거나 N. 메닌지티디스의 작용 방법에 영향을 주어 감염의 수준을 제거하거나 감소시킬 수 있다.
- [0036] 적당한 허용가능한 부형제 및 담체는 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다. 이들은 고체 또는 액체 담체를 포함할 수 있다. 적당한 액체 담체는 물 및 살린을 포함한다. 조성물의 단백질은 애멸전으로 제형화될 수 있거나 그들은 생분해성 미세구체 또는 리포좀으로 제형화될 수 있다.
- [0037] 조성물은 아주번트를 더 포함할 수 있다. 적당한 아주번트는 당업자에게 잘 알려져 있을 것이고, 후룬즈 불완전 아주번트(동물에서 사용하기 위함), 알루미늄과 같은 금속염 또는 칼슘 염을 포함할 수 있다.
- [0038] 또한, 조성물은 조성물의 일관성을 조절하기 위해서 및/또는 조성물로부터 항원/분비된 단백질의 분비를 조절하기 위해서 중합체 또는 다른 제제를 포함할 수 있다.
- [0039] 또한, 조성물은 물, 살린, 글리세롤 또는 다른 적당한 알코올 등을 포함할 수 있는 희석제와 같은 다른 제제를 포함할 수 있다; 습윤제 또는 유제; 완충제; 농후화제 예를 들어 셀룰로오스 또는 셀룰로오스 유도체; 방부제; 계면 활성제, 항균제; 등.

- [0040] 바람직하게는 조성물에서 유효성분은 50% 이상 순수하고, 일반적으로 80% 이상 순수하고, 종종 90% 이상 순수하고, 그리고 더욱 바람직하게는 95%, 98% 또는 99% 순수하다. 예를 들어 약 99.5% 순수하거나 약 99.9% 순수한, 100% 순수함에 다가가는 유효성분이 가장 자주 사용된다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 N. 메닌지티디스에 의해 유발되는 감염에 대한 백신으로서 사용될 수 있다. 조성물은 뇌수막염 또는 폐혈증 또는 폐혈성 쇼크를 포함하는 다른 침습성 수막염균성 질환에 대한 백신으로서 사용될 수 있다. 백신은 그들을 N. 메닌지티디스에 대한 노출의 위험에 대하여 그들에 대하여 예방용으로, 및/또는 N. 메닌지티디스에 대해 이미 노출된 사람에 대하여 치료용으로 투여할 수 있다.
- [0042] 바람직하게는, 만약 조성물이 백신으로서 사용된다면, 조성물은 항원의 면역학적 유효량을 포함하고, 조성물은 적어도 하나의 변형된 인자 H 결합 단백질을 포함한다. 항원의 "면역학적 유효량"은 단일 투여량 또는 연속된 투여량 중 어느 하나로 개체에게 투여되었을 때 N. 메닌지티디스에 의한 감염을 치료 또는 예방하는데 효과적인 양이다. 이 양은 처리될 개체의 건강 및 생리적 조건 및 항원에 의존하여 변할 것이다. 유기체에 투여하기 위한 면역원성 또는 백신 조성물의 유효량의 정의는 당업자의 능력 내에서 충분하다.
- [0043] 본 발명에 따른 조성물은 경구, 전신, 비경구, 국부, 점액, 근육내, 정맥내, 복막내, 피하, 비강내, 질내, 직장내, 피부, 설하선, 흡입 또는 에어로졸 투여를 위한 것일 수 있다.
- [0044] 조성물은 단일 투여량으로서 또는 다중 투여량 스케줄의 일부로서 투여되도록 준비될 수 있다. 다중 투여량은 초기 면역화 이후의 하나 이상의 부스터 면역화로서 투여될 수 있다. 초기 및 부스팅 면역화 사이의 적당한 타이밍은 일상적으로 결정될 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 조성물은 분리하여, 또는 하나 이상의 다른 면역원성 또는 백신 조성물, 및/또는 하나 이상의 다른 치료 요법과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 조성물은 혈청 살균 항체 반응을 유도하고, 피험체에 투여된 후 옵소노파고시토시스 (opsonophagocytosis)를 매개하는 항체를 유도할 수 있다. 이를 반응은 마우스에서 편리하게 측정되고, 그 결과는 백신 효능의 표준 지시자이다.
- [0047] 또한, 또는 선택적으로 본 발명의 조성물은 박테리아 단백질 또는 다른 분자를 중화하는 면역 반응을 유발할 수 있고, 그것으로 인해 그들의 정상 기능을 갖는 것으로부터 그들을 예방하고, 병원성 유기체/박테리아, 이 경우 N. 메닌지티디스를 파괴할 필요 없이 질병의 진행을 예방하거나 감소시킬 수 있다.
- [0048] 나아간 측면에 따라서, 본 발명은 면역 반응을 유발하기 위한 약제의 제조에서 하나 이상의 변형된 인자 H 결합 단백질의 용도를 제공한다. 약제는 N. 메닌지티디스에 대한 피험체의 예방용 또는 치료용 접종을 위해 사용될 수 있다. 약제는 예방용 또는 치료용 백신일 수 있다. 백신은 N. 메닌지티디스에 의해 유발되는 뇌수막염/폐혈증 및/또는 폐혈성 쇼크에 대한 것일 수 있다.
- [0049] 더 나아간 측면에 따라서, 본 발명은 N. 메닌지티디스에 대한 면역 반응을 생산하는데 사용하기 위한 하나 이상의 변형된 인자 H 결합 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다. 면역 반응은 예방용 또는 치료용일 수 있다. 조성물은 백신으로서 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0050] 더 나아간 측면에 따라서, 본 발명은 본 발명의 임의의 다른 측면에 따른 인간 또는 비-인간 동물 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 N. 메닌지티디스에 의한 감염의 효과로부터 인간 또는 비-인간 동물을 보호하는 방법을 제공한다. 조성물은 백신일 수 있다.
- [0051] 다른 측면에 따라서, 본 발명은 인간 또는 비-인간 동물에 대하여 본 발명에 따른 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 인간 또는 비-인간 동물에서 면역 반응을 일으키기 위한 방법을 제공한다. 면역 반응은 바람직하게는 보호성이다. 방법은 이미 초기 접종된 환자에서 부스터 반응을 일으킬 수 있다. 면역 반응은 예방용 또는 치료용이다.
- [0052] 본 발명에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 치료용 처치의 효능을 확인하는 한 방법은 조성물의 투여 후에 N. 메닌지티디스 감염에 대하여 모니터링하는 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 예방용 처치의 효능을 확인하는 한 방법은 조성물의 투여 후에 나이세리아 메닌지티디스에 대한 면역 반응을 모니터링하는 단계를 포함한다.
- [0053] 다른 측면에 따라서, 본 발명은 N. 메닌지티디스에 의한 감염에 대한 인간 또는 비-인간 포유류의 면역화에서 사용하기 위한 약제의 제조에서 하나 이상의 변형된 인자 H 결합 단백질의 용도를 제공한다.

- [0054] 나아간 측면에 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 면역원성 또는 백신 조성물 및 투여와 관련된 지침서를 포함하는, 유기체에서 면역 반응을 유도하는데 사용하기 위한 키트를 제공한다.
- [0055] 백신으로서의 그들의 잠재적 용도에 추가하여, 본 발명에 따른 조성물은 진단용 제제로서 및 백신의 면역 능력의 측정으로서 유용할 수 있다.
- [0056] 상술한 발명의 모든 진술 및 바람직한 특징이 N. 메닌지티디스를 지칭하더라도, 당업자는 그들이 N. 고노로이에 대하여 동등하게 적용할 수 있음을 올바로 인식할 것이다.
- [0057] 당업자는 그들이 상술한 바람직한 특징을 본 발명의 임의의 측면에 적용할 수 있음을 올바로 인식할 것이다.
- [0058] 본 발명의 바람직한 구체예를 하기 도면 및 실시예에 대한 언급과 함께 단지 예시의 방법으로서 지금부터 기술할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0059] 도 1a 내지 1f – 도 1a 내지 1f는 인자 H의 CCP6에 위치하고, 인자 H 결합 단백질의 완전한 세포밖 부분에 필요한 인자 H 결합 단백질 결합 부위를 나타낸다. 도 1a는 완전한 인자 H 결합 단백질 및 이의 불완전 버전(가리키는 바)의 과 웨스턴(Far Western) 분석을 보여준다. 막을 α -fH pAb와 함께 검출된 정제된 인자 H와 배양하였다. 결합은 완전한 27 kDa 인자 H 결합 단백질에 대해서만 관찰되었다(화살표와 함께 보여줌). 도 1b는 N. 메닌지티디스 및 인자 H 사이의 결합을 검출하는 α -fH pAb를 사용한 FACS 분석 결과를 보여준다. 도 1c는 인자 H 결합 단백질이 오직 CCP6를 함유하는 인자 H 컨스트럭트에만 결합할 수 있음을 증명하는 SPR 결과를 사용한다. 삽입은 역학 매개 변수를 결정하기 위하여 인자 H 결합 단백질 표면을 넘어 주입된 일련의 fH67 희석에 대한 1:1 랭뮤어(Langmuir) 적합도를 보여준다. 도 1d는 짧은 fH67 컨스트럭트(~0.3 및 30 μ M 사이)가 전장 인자 H의 결합과 완전히 떨어질 수 있음을 증명하는 FACS 경쟁 연구(CCP5에 대하여 검출된 α -fH mAb를 사용하였으므로, fH67 컨스트럭트를 인식할 수 없음) 결과를 보여주고, 이 컨스트럭트가 전체 인자 H 결합 단백질 결합 부위를 함유하는 것을 증명한다. 나타낸 값은 세 번 반복 실험의 평균 형광 세기 \pm s.d이다. 도 1e는 CCP6의 존재가 인자 H 결합 단백질에 대한 고친화성 결합에 필요하고 충분하다는 것 및 CCP7(402His/Tyr)에서의 공통 인자 H 다형성이 fHbp 결합의 친화성을 유의하게 변화시키기 않는다는 것을 SPR 확인을 사용한 정량을 보여준다. 도 1f는 유체상에서 침의 표면 및 인자 H 컨스트럭트에서 인자 H 결합 단백질을 이용한 표면 플라스몬 공명을 사용하여 얻어진 결합 상수를 나타내는 표이다. 적합도는 BiaEvaluation 2.0 소프트웨어 및 1:1 랭뮤어 모델을 사용하여 만들어졌다. 보여준 값은 평균 \pm 표준 편차이고, 카이2는 BiaEvaluation 2.0 내에서 주어진 적합도 지시자의 절이다.
- 도 2a 내지 2c – 인자 H 결합 단백질 및 그의 fH67과의 복합체의 구조를 나타낸다. 도 2a는 인자 H 결합 단백질(잔기 80 내지 320)의 만화 표현의 두 가지 관점을 보여준다. A, B 및 C 부위를 가리킨다. 도 2b는 인자 H 결합 단백질 및 인자 H로부터 나온 CCP6 및 7 사이의 fHbp:fH67 복합체의 만화를 보여준다. 상호작용 표면을 가로지르는 염 결합을 형성하는데 포함되는 두 단백질 모두로부터 나온 결쇄는 볼- 및-스틱 표현으로서 보여준다(삽입 박스에서 확대 및 새로운 방향으로 나타냄). 도 2c는 인자 H 결합 단백질 및 fH67의 위상학, 단백질 사이의 H-결합 또는 염-결합 상호작용 중 어느 하나에 포함되는 잔기를 가리킨다. 채워진 원은 그들의 파트너와 함께 수소 결합을 만드는 잔기를 가리킨다. 채워진 별은 그들의 파트너와 함께 염-결합을 만드는 잔기를 가리킨다. 별은 복합체 구조의 독립적 카페의 일부에서 오직 보여지는 상호작용을 가리킨다.
- 도 3 – 인자 H 결합 단백질 및 인자 H 사이의 경계면에 대한 것이고, 야생형 KD 근처의 농도에서 그들의 파트너의 야생형에 대한 각각의 결합의 폐지를 유발하는, 인자 H 및 인자 H 결합 단백질 모두에서 전극을 띤 결쇄를 알라닌으로 교체한 위치-지정 돌연변이를 설명한다. 검은색 바는 인자 H 분석물이 인자 H 결합 단백질 표면을 넘어 주입된(50 nM, 40 μ l.min⁻¹으로) 시간 기간을 가리킨다.
- 도 4 – 두 개의 결정형으로부터 fH67/fHbp 복합체의 결정학적으로 독립적인 카페인 7개의 오버레이를 사용한 fH67/fHbp 복합체에서의 유연성을 고려한다(P1 형태에서의 복합체의 4가지 카페 및 C2 형태에서의 3가지 카페). 매우 다른 포장 환경에도 불구하고 유사성의 높은 정도는 복합체가 생물학적으로 적절함을 가리킨다. 복합체 내에서 단백질의 재배열은 CCP6 및 인자 H 결합 단백질에 관련된 fH67의 CCP7의 위치에서의 적은 양의 이동에 제한된다. CCP7과 가까이 포장된 인자 H 결합 단백질의 루프는 또한 그들의 더 높은 온도 인자에 의해 나타내는 바 상대적으로 이동가능하다(여기서 "두꺼운" 퍼티 표현으로서 나타냄).
- 도 5 – 인자 H 결합 단백질의 표면에서 매핑된 항체 에피토프의 위치를 보여준다. 12, 20, 21에서 탈CCP화된

(deCCPibed) 보호성 에피토프에서의 잔기를 요소에 의해 채색된(C 녹색, N 파란색, O 빨간색) CPK 표현으로 보여준다(Glu 211, Arg 214 및 Arg 269). 인자 H 결합을 막는 항체에 대한 에피토프는 인자 H 결합 단백질의 채색에 따라 채색된 CPK로서 나타낸다(부위 "A" 노란색, "B" 부위 녹색, "C" 부위 청록색). 이들 에피토프가 인자 H 인식 부위에 직접적인 지도를 만드는 것이 아니지만, 그들은 모두 충분히 더 큰 항체의 결합이 인자 H의 인식을 방해할 만큼 가까이 있다. 인자 H의 다형성 잔기 402에서의 히스티딘 결쇄를 CPK 표현으로서 보여준다. 비록 이들 잔기가 인자 H 결합 단백질과 거의 이차적인 접촉에 가까이 있더라도, 두 개의 다형성 형태의 SPR로부터의 증거는 이것이 중요한 접촉이 아님을 시사한다. 또한, 이것은 복합체의 이 부위가 다른 하나와 접촉하는 두 개의 단백질이 복합체의 결정학적으로 독립적인 카페들 사이의 이 관점에서 보이는 이 방법에서 충분한 변화량을 보이는 가장 움직일 수 있는 부위라는 사실을 뒷받침한다(도 4).

도 6 - 인자 H 결합 단백질의 아미노산 서열이다(서열 번호 6). 이 단백질은 GenBank 기탁 번호 AAF42204를 갖는다.

도 7 - fHbp:fH67 복합체의 구조. 도 7A - 만화로서 나타낸 fHbp(녹색은 패밀리 사이에서 보존된 잔기이고 빨간색은 보존되지 않은 잔기이다) 및 표면 모델로서 나타낸 fH67. 도 7B - 설치류 및 인간 fH 사이에서 차이가 있는 잔기를 빨간색으로 보여줌; 본 발명자들의 연구는 노란색 잔기가 fH 결합에 영향을 주는 것을 보여주었다.

도 8 - fH678을 이용하여 변이체 1, 2 및 3으로부터의 fHbp의 결합을 SPR에 의해 결정하였다. 임균(gonococcal) 상동체, NG00033와의 상호작용도 또한 시험하였다.

도 9A, 등온선 적정 열량측정은 fHbp/fH 상호작용이 용액에서 nM KD로 특징화됨을 확인하였다. 도 9B, 이중으로 Glu에서 Ala로 돌연변이시킨 fHbp의 구조가 오직 구조적 변경만이 돌연변이 결쇄(FO-FC, αC 맵에서 빨간 차이 전자 농도에 의해 나타낸)에서 일어나는 것을 확인했다. 도 9C, WT 및 돌연변이 fHbp 위를 흐르는 5 nM 인자 H 도메인 5, 6 및 7로부터 나온 반응(상위 데이터 라인 = fHbp 변이체 1, 하위 데이터 라인 = fHbp 변이체 1 DM). 도 9D, WT 및 돌연변이 fHbp 위를 흐르는 20 nM 인자 H 도메인 5, 6 및 7로부터 나온 반응(상위 데이터 라인 = fHbp 변이체 1, 하위 데이터 라인 = fHbp 변이체 1 DM).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060]

도 1에서 주어진 서열인, 인자 H 결합 단백질의 기능은 이전에 "A", "B" 및 "C"로 이름 붙여진, 전체 세포밖 도메인을 커버하는 일련의 부위로 단백질을 나누는 것에 의해 연구되었다(Gluliani et al.(2005) *Infect Immun* 73, 1151-60). 웨스턴 블로트 분석은 모든 세 가지 부위가 인자 H 및 인자 H 결합 단백질 사이에서 높은 친화성 상호작용을 필요로 하고(도 1a), 이것은 인자 H 결합 단백질이 그것의 전체 표면에 인자 H에 대한 연정된 인식 부위를 가지는 것을 의미하는 것을 증명하였다.

[0061]

인자 H의 20개 CCP 도메인 중 어떤 것이 인자 H 결합 단백질과의 상호작용을 매개하는지 확인하기 위하여 하기 기술을 사용하였다: 과 웨스턴 분석; FACS 분석(도 1b); 및 표면 플라스몬 공명(도 1c). 얻어진 결과는 인자 H 결합 단백질에 의해 인식된 인자 H의 중요 부위가 6번째 도메인, CCP6이고, CCP6을 함유하는 컨스트럭트는 인자 H 및 N-메닌지티디스 사이의 인자 H 결합-의존성 상호작용을 억제할 수 있음을 증명한다(도 1d). 상호작용의 정량은 모든 CCP6 함유 컨스트럭트에 대하여 ~ 5nM(도 1c, 1e 및 1f)의 해리 상수를 증명한다. 이 상호작용은 고염(IM NaCl, 데이터 없음) 또는 4 내지 8 범위의 pH(데이터 없음)에 의해 해리되지 않았고, 이는 결합 이벤트의 높은 친화성 특성에 대한 추가적인 증거를 제공한다.

[0062]

도 9A-D에 대한 언급과 함께, 표면 플라스몬 공명은 fHbp 이중 돌연변이가 20배 만큼 높은 KD로 인자 H 도메인 6 & 7과 결합하는 것을 증명한다. 또한, 돌연변이는 야생형 fHbp보다 더 긴 컨스트럭트(도메인 5, 6 및 7을 포함) 및 전장 인자 H(혈청으로부터 분리)에 더 약하게 결합한다.

[0063]

인자 H의 CCP 67(이후에 fH67로서 알려짐) 사이의 복합체 및 부위 A, B 및 C를 포함하는 인자 H 결합 단백질의 세포밖 부분의 결정 구조를 얻었고, 인자 H 결합 단백질 및 fH67에 대한 모델을 구축하였고, 복합체의 전체 7개의 독립적인 카페로 두 개의 크리스탈 형태에서 2.35 Å으로 정제되었다(도 2a, b 및 c).

[0064]

도 2a에서 볼 수 있는 바와 같이, 인자 H 결합 단백질의 세포밖 부위는 "A" 및 "B"의 일부 부위를 구성하는 N-말단 원통과 함께 두 개의 β-원통을 형성하기 위하여 접하고, C-말단 원통은 "B"의 나머지 및 "C" 부위로 구성된다. 가까운 구조적 상동체가 드러나지 않은 N-말단 원통 및 β-원통의 독특한 위상학을 사용한 구조적 데이터 베이스의 조사(도 2c)는 그들이 유전자 복사 이벤트에 의해 생겨난 것이 아님을 시사한다.

[0065]

fH67:fHBP(인자 H:인자 H 결합 단백질) 복합체는 인자 H 결합 단백질의 두 β-원통 및 인자 H CCP6 사이의 광대

한 상호작용에 의해 함께 유지되고(도 2b), 이것은 결합 연구와 일치한다. 특히, CCP6의 이차 β -가닥으로의 나선의 삽입(이 CCP 도메인의 비일반적인 특징)은 복합체에서 중심에 위치한다. PISA 서버에 의한 분석은 복합체에 파물인 인자 H 결합 단백질의 평균 표면 영역($2860 \pm 177\text{Å}^2$)이 대부분의 항체: 항원 복합체에 파물인 것보다 더 크다는 것과 함께, 1.0의 유의한 점수(즉 생물학적으로 매우 유의한 것으로 여겨짐)를 모든 7개의 독립적인 복합체에게 주었다. 게다가, 복합체의 정보에 대한 구조에 기반하여 예측한 ΔG (6 kcal/mol)는 결합 연구로부터 유도한 친화성과 잘 맞고(-11 kcal/mol, 도 1e에서 나타낸 KD로부터 계산함), 결정화된 복합체의 생리학적 관련에 대하여 추가적인 증거를 제공한다. 상호작용 표면은 다수의 수소 결합 및 염 결합을 포함하는 다양한 정전기 상호작용과 함께 좋은 형태 상보성을 보인다(도 2c). 연령 관련 시력 감퇴와 연관된 인자 H 402His/Tyr 이 소형 사이의 결합에서 어떠한 차이도 발견하지 못한 fHbp:fH 상호작용 연구(도 1e, 도 4 및 도 5)와 일치한다. His402는 인자 H 결합 단백질과의 상호작용에서 오직 주변에 포함되고, 인자 H 결합 단백질의 N-말단 β -원통의 가닥 1 및 2 사이의 구부리기 쉬운 루프와 접촉한다(도 4).

[0066] 상호작용 표면을 더 규명하기 위해, 두 단백질의 이중 돌연변이/치환 형태를 생성하였고, 그것의 전자를 떤 결쇄를 작은 소수성 잔기인 일라닌으로 교체하였다(A). fH67에서, 만들어진 돌연변이는 R341A 및 H337A였고, 및 인자 H 결합 단백질에서, 만들어진 돌연변이는 E283A 및 E304A였다. 돌연변이 단백질 및 그들의 야생형 파트너 사이의 상호작용을 연구하기 위한 SPR의 사용은 두 돌연변이 형태의 친화성이 20배 이상 감소된 것을 나타내었고, 야생형 KD의 10배 정도인 분석물 농도(~ 50 nM)에서 상호작용이 거의 관찰되지 않았다(도 3a). 천배 더 높은 분석물 농도(μM 범위)에서 두 단백질의 돌연변이 형태는 야생형 파트너와 상호작용 하였다: fHbpE283A,E304A는 정성적으로 유사한 결합-속도(on-rate)를 유지하였지만, 야생형과 비교하여 해리속도(off-rate)가 증가했고, fH67R341A,H337A는 그의 해리-속도에서 야생형 상호작용과 더욱 유사하였으나, 결합-속도에서 상당히 감소하였다(도 1e).

[0067] 다른 패밀리로부터 나온 fHbp는 결합 특성을 공유한다

[0068] N. 메닌지티디스의 계통은 세 가지 변이체 패밀리, 변이체 1, 변이체 2 및 변이체 3 중 하나에 속하는 단일 fHbp를 발현한다. 본 발명자들의 연구는 변이체 1이 질병 격리 집단에서 가장 우세한 패밀리이기 때문에 이것에 초점을 맞췄다. 도 7은 복합체의 구조에 매핑된 세 가지 패밀리 사이의 서열 변화량을 보여주고, 이것은 서열 보존의 수준이 높을지라도(>60% 동일성), fH-결합 부위 주변에 유의한 변화량이 있음을 증명한다. 따라서 본 발명자들은 fH 인식의 방법이 다른 fHbp 패밀리 사이에 보존되어 있는지, 동일한 fHbp 및 fH 잔기가 결합에 중요한지 결정하였다. 이것은 백신으로 평가하기 위한 fHbp의 감소된 결합 변이체를 생성하기 위한 필수적 정보이다.

[0069] 이 때문에, 본 발명자들은 변이체 2 및 변이체 3으로부터 fHbp의 클론을 만들고, 발현시키고, 정제하였고, fH와의 그들의 상호작용을 특징화하기 시작했다(도 8). 이날까지의 본 발명자들의 SPR 연구는 인식의 방법은 유사하고; 친화도는 동일한 정도이고, 그리고 fH의 동일한 잔기의 돌연변이는 모든 패밀리로부터 fHbp의 결합에 극적인 효과를 가지는 것을 가리킨다(데이터 없음). 중요하게는, 나이세리아 고노레아 fHbp 상동체(NG00033)가 변이체 3과 매우 가까이 연관되어 있지만(91% 아미노산 동일성), 정제된 단백질은 어떤 감지할 수 있을 정도의 범위로 fH와 상호작용하는데 실패했다(도 8).

[0070] fHbpE283A,E304A 돌연변이는 그것의 원자 구조를 계속 유지한다

[0071] fHbpE283A,E304A 돌연변이(이중 돌연변이, DM)가 나노몰(nM) 범위의 해리 상수(KD)로 fH67과 결합하는데 실패한 이유의 잠재적 설명은 아미노산 변경이 단백질의 전체적 구조를 붕괴시킨 것이다. 이것을 설명하기 위하여, fH67과의 복합체에서 fHbpE283A,E304A 돌연변이의 결정 구조를 결정하였다.

[0072] 결과는 fHbp에 대한 구조적 변화가 오직 돌연변이 결쇄에 대한 것임을 확인하였다(도 9B). 추가적으로 본 발명자들은 fH5,6,7 및 전장 fH에 대한 결합에서 이들 돌연변이의 관련성을 결정하였다(도 9C 및 D). 10 nM 범위의 fH의 농도는 야생형 단백질과 상호작용할 수 있는 것으로 보였고, 이것은 전장 fH의 친화성이 유사한 절편에 대한 것과 동일한 범위인 것을 시사한다(예컨대 fH5,6,7). 그러나, fHbpE283A,E304A 단백질의 결합 친화성은 야생형 단백질과 비교하여 극적으로 감소된다.

[0073] 구조에서 살균 항체(Gluliani et al.(2005) Infect Immun 73, 1151-60; Cantini et al.(2006) J Biol Chem 281, 7220-7)를 유발할 수 있는 인자 H 결합 단백질의 발표된 에피토프의 매핑은 여태까지 특징화된 어떤 사이트도 인자 H 인식 부위에 직접적으로 존재하지 않는 것을 증명한다. 그러나, 인자 결합에 영향을 주는 항체에 의해 인식되는 에피토프는 인식 부위의 가장자리 주변에 위치하고, 따라서 입체 장애에 의해 인자 H 결합을 방

해하는 것으로 보인다(도 5).

[0074] fHbp 단일 및 이중 돌연변이는 그들의 면역원성을 유지한다

E283A 및 E304A 아미노산 변경의 영향을 시험하기 위하여, 이를 치환이 있는 변이체 1에서 나온 단백질을 분리하거나(즉 fHbp_{E283A}, 및 fHbp_{E304A}) 조합하여(fHbp_{E283A,E304A}) 발현시키고, 정제하였다. 야생형 fHbp 및 이들 단백질을 마우스의 면역화 그룹에 사용하였고(5/그룹), 면역 혈청에서 살균 항체의 존재를 결정하였다. 결과(표 1)는 야생형 혈청군 B N. 메닌지티디스(균주 H44/76)를 50% 또는 그 이상 죽이도록 주어진 혈청의 가장 높은 희석액의 역수로서 표현하였다. 전-면역 혈청은 죽이지 않는 것으로 주어졌다.

표 1

[0076] 야생형 또는 돌연변이 fHbp로 면역화된 동물에서의 혈청 살균 항체(SBA) 역가

혈청	H44/76에 대하여 증가된 SBA 역가
fHbp	64
fHbp _{E283A,E304A}	64
fHbp _{E283A}	256
fHbp _{E304A}	64

[0077] 결과는 돌연변이 단백질이 야생형 단백질로서 혈청군 B N. 메닌지티디스에 대하여 SBA 역가를 유발하는데 적어도 동일한 능력을 가지고 있음을 보여준다.

[0078] 방법

[0079] 웨스턴 블로트 분석: 단백질 샘플을 SDS-PAGE로 분리하였고, 이후 15V에서 60분간 PVDF 막으로 옮겼다. 막을 PBS에 있는 5% 밀크로 4°C에서 밤새 차단시키고, PBSTM(PBS, 0.05% Tween20, 0.5% 스킴 밀크)으로 한번 행궈준 다음, 일차 항체 또는 fH의 소스로 1 내지 2시간 동안 상온에서 배양시켰다. PBSTM으로 세 번 씻어준 다음, 막을 PBS에 있는 염소 α -인간 fH pAb(1:1000 최종 희석) 또는 젖과 α -fHbp pAb(1:10,000 최종 희석)과 함께 배양하였다. 결합을 1:500 희석으로 사용된 α -토끼 폐록시다아제 접합 IgG(Dakocytomation)으로 검출하였다.

[0080] 유세포분석기 분석: 총 10⁸의 N. 메닌지티디스를 10 μ l의 정제된 fH(2 μ M) 또는 CCP(최종 농도, 3 mM)와 함께 37°C에서 30분간 배양하였다. PBS-0.1% Tween20(PBST)로 세 번 세척한 다음, 박테리아를 PBS에 있는 mAb MRC 0X241 또는 α -인간 인자 H pAb와 함께 30분간 배양하였다. PBST로 세 번 세척한 다음, 세포를 이차, FITC-접합 항체로 4°C, 어둠에서 30분 동안 배양하였다. 수막염균에 결합된 인자 H를 FACS Calibur 분석기(Becton Dickinson)를 사용한 유세포분석에 의해 검출하였다. 억제 분석을 위하여, 전장 인자 H를 지시된 것과 같이 CCP67의 증가된 농도로 박테리아와 함께 배양하였다.

[0081] 단백질의 발현 및 복합체의 정제: 인자 H 결합 단백질 및 상기 단백질의 불완전한 버전을 그들의 C 말단에 폴리히스티딘이 표지된 단백질로서 대장균 BL21(DE3) 숙주 세포에서 발현시켰다(Masignani et al(2003) J Exp Med Vol 197, No 6, 789-97). 균주의 배양은 중간-로그기까지 성장시키고, 발현은 이소프로필-D-티오갈락토사이드(IPTG, 1 mM 최종 농도)로 유도된다. 단백질은 제조사의 지침서(GE Healthcare)에 따라 His-Trap 컬럼에서 친화성 크로마토그래피에 의해 정제되고, 250 mM 이미다졸로 컬럼으로부터 용리된다. 인자 H 컨스트럭트는 이전에 기술된바와 같이(두 개의 CCP 절편 내의 네 개의 이항화 결합이 정확히 형성되도록 하는 재접합) 대장균에서 발현되고, 헤파린 컬럼 친화성 정제 또는 크기 배제 크로마토그래피 중 어느 하나에 의해 정제된다. fH67과 fHbp의 혼합 이후(더 큰 몰로 초과하여), 복합체는 복합체를 함유하고 초과분 fH67을 함유하는 피크의 좋은 분리점을 보장하는, 복합체를 이루지 않은 fH67 및 컬럼 매트릭스 사이에서 강력한 상호작용을 보일 때, 크기 배제 크로마토그래피(Superdex S-200, GE Healthcare Inc., Buffer Tris pH 7.5, 150mM NaCl)에 의해 정제된다. 추정된 복합체 피크에서 두 단백질의 존재는 SDS-PAGE 및 질량분석기에 의해 확인하였다(데이터 없음).

[0082] 위치-지정 돌연변이: 이중 돌연변이를 QuikChange 위치-지정 돌연변이 키트(Stratagene)를 사용한 연속된 방법에서 생성되었다.

[0083] fH67의 R341A, H337A 이중 돌연변이형을 하기 프라이머를 사용하여 생성하였다:

- [0084] H337A 정방향, 5'AAACATGGAGGTCTATGCTGAGAATATGCG태그ACCATACTTCC3'(서열 번호 2);
- [0085] H337A 역방향, 5'TTTGTAACCTCCAGATACGACTCTTATACGCATCTGGTATGAAAGG3'(서열 번호 3).
- [0086] R341A 정방향, 5'GGTCTATATCATGAGAATATGGC태그ACCATACTTCCAGTAGC3'(서열 번호 4);
- [0087] R341A 역방향, 5'CCAGATATAGTACTCTTATACCGATCTGGTATGAAAGGTATCG3'(서열 번호 5).
- [0088] 돌연변이의 도입은 서열분석에 의해 확인하였다. 재조합 돌연변이 fH67 절편은 이전에 기술된 바와 같이 발현되고 봉입체로부터 재접합된다(Prosser et al(2007) *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Common Jun* 1:63(PT6) :480-3).
- [0089] E283A, E304A 인자 H 결합 단백질의 생성을 위해 사용된 프라이머는:
- [0090] E283A 정방향, 5'ACAACCAAGCCCGAAAGGCAGTTAC3';
- [0091] E283A 역방향, 5'GTAACCTGCCTTCGCGGCTTGGTTGT3';
- [0092] E304A 정방향, 5'TGCCGGCAGCGCGAGTGAAAACCG5';
- [0093] E304A 역방향, 5'CGGTTTCACTGCCGCGCTGCCGCA3'이고,
- [0094] 단백질은 상술한 바와 같이 발현 및 정제되었다.
- [0095] 표면 플라스몬 공명: 인자 H 결합 단백질 또는 인자 H 컨스트럭트 중 어느 하나를 표준 아민 결합 프로토콜을 사용하여 센서 표면(CM5 칩)에 결합시켰다. 적절한 리간드를 이후 40 μ l/min의 유속으로 유체상에서 흘려보냈다. 강력한 상호작용은 고/저 염(0 내지 3 M NaCl) 또는 극단적 pH(4 내지 8의 범위를 시험) 중 어느 하나를 사용하여 봉괴되지 않았고, 따라서 증가된 해리 시간(60분)을 연속되는 주입 사이에 사용하였다. 유체상에서 더 큰 인자 H 결합 단백질을 사용하여 얻어진 데이터는 단순 1:1 모델을 사용하여 충분히 맞출 수 없었고(아마 더 큰 단백질의 이동의 문제 또는 칩 표면으로 더 작은 단백질의 결합에 의해 도입된 인자 H 결합 부위 중 어느 하나 때문), 근처-평형값의 미숙한 분석이 수십 내지 수백의 nM 범위로 KD 값을 제안한다(사용된 인자 H 컨스트럭트에 의존하여). 일단 상호작용이 취소되면(칩에서 fH와의), 데이터는 ~3의 χ^2 을 사용한 1:1 행렬 모델을 사용하여 충분히 맞춰질 수 있고(도 1f), 이것은 CCP6을 함유하는 컨스트럭트에 대한 진짜 KD가 대개 5 nM 정도임을 나타낸다(도 1f를 참조하라). fH67 및 인자 H 결합 단백질 이중 돌연변이는 또한 칩 표면에 결합된 fHbp 파트너와 함께 분석되었다(채널 1과 결합한 fHbp_{WT} ~800 RU, 채널 2와 결합한 fHbp_{E283A, E304A} ~1500 RU). 이후, fH67(WT 및 돌연변이)은 50 μ M의 농도로 흘려졌고(천연 K_D 의 ~10배), WT 쌍에서 보여지는 상호작용의 정도와 비교하여 돌연변이와 그들의 WT 파트너는 상호작용이 적거나 없는 것으로 나타났다. fHbp_{WT}에 대한 fH67_{R341A, H337A}의 친화성을 계산하기 위하여, 250 nM 내지 20 μ M의 농도 범위의 범위로 일련의 주입(2배씩)을 사용하였고, 도 1f에서 보여진 값을 제공하기 위하여 BiaEvaluation 소프트웨어를 사용하여 맞추었다.
- [0096] 결정화 및 X-ray 데이터 수집: 결정은 0.2 μ l 복합체 + 0.2 μ l 모액 방울로부터 시팅 드롭 증기(sitting drop vapour) 확산 방법을 사용하여 자랐다(2.2의 가정된 소멸 계수(extinction coefficient)를 사용하여 계산된 4.5 mg/ml의 복합체, JCSG-plus 조건 15 정도로 최적화된 모액, 20% 폴리에틸렌 글리콜 6000 MW, 0.1M Bicine pH 9.0). 결정의 회수 및 SDS-PAGE로 fH67 및 인자 H 결합 단백질이 존재함을 확인하였다(데이터 없음). 결정(보통 50 x 10 x 5 μ m)은 15% 에틸렌 글리콜을 사용하여 동결방지시킨 후 액체 질소에서 급속 냉각시켰다. 데이터를 ESRF 및 Diamond 모두에서 결정을 120K로 유지시키는 0.5 또는 1 정도의 진동 범위 중 어느 하나를 사용한 회전 방법에 의해 수집하였다. 원래의 P1 데이터는 람다 0.9523 Å와 함께 범라인 ID14eh4(ESRF)에서 수집하였고, 원래의 C2 및 Pt 세트는 람다 0.9814 Å와 함께 범라인 103(Diamond)에서, 람다 1.003 Å와 함께 범라인 BM14(ESRF)에서의 Hg 세트 및 람다 1.8 Å와 함께 ID29(ESRF)에서의 S-SAD를 수집하였다. 데이터는 삽입을 위한 프로그램 XDS4 및 프레임 내 축소를 위한 프로그램 Scala5의 사용을 강제하기 위하여 -3d 옵션을 사용한 xia2를 이용하여 통합되고 축소되었다.
- [0097] 구조 용액 및 정제: fH67/fHbp 복합체의 구조를 fH67의 구조와 함께 분자 교체(수크로오즈 옥타실페이트, SOS와의 복합체에서 fH67의 더 이전의 구조로부터 빼았음, SOS, PDBID:2UWN) 및 Pt, Hg 유도체를 사용한 MIRAS 방법 및 C2 비대칭 유닛에 존재하는 황의 33개 중 31개로부터의 예외적 분산의 조합에 의한 C2 결정형에서 용해시켰다. fH67의 세 카페를 MolRep7(CCP4 Program Suite)을 사용하여 발견하였고, 두 개의 CCP 도메인 강체(rigid body)를 행방불명 원자의 모델링을 제외한 Buster-TNT에서 정제하였다. 이를 상은 이후 SHARP 상 작업으

로 통합되었고, 다른 결정에서 중원자(heavy atom)이 위치한 곳에서 사용되었다(6 Pt, 1Hg 및 31 S). 중원자 모델은 3.2 Å에 대한 데이터를 사용하여 SHARP(각각의 결정에 대한 Wilson 값으로 고정된 B 인자와 함께)에서 정제되었고, 생성된 상은 0.54의 우수한 도면(가장 높은 해상도 웰 3.3-3.2 Å에 대하여 0.35)와 함께 상을 생성하기 위해 SHARP 내에서 분자 교체로부터 이들과 함께 조합되었다. 유도체에 대한 파우더의 페이징(phasing)(예외적(anomalous)/동정형(isomorphous))은 Pt에 대하여 0.7/2.4, Hg에 대하여 0.2/0.3 및 예외적 황 신호에 대하여 0.3/0.0이었다. 이들 상을 사용하여 얻어진 맵은 SHARP 내에서 용매를 단순화하였으며, 인자 H 결합 단백질, 인자 H CCP6 및 인자 H CCP7 부위에 대한 세 가지 분리된 조작자를 사용하여 DM에서 평균화하였다. 인자 H 결합 단백질의 C-말단 원통에 대한 NMR 모델(Cantini et al(2006) J Biol Chem Mar 17:281(11) :7220-7)은 이 밀도에 위치할 수 없었고(가닥이 곡해되어 보였다), 따라서 모델은 Coot 프로그램을 사용하여 손으로 구축되었다. 40 내지 2.35의 범위에서의 데이터를 사용한 재구축 및 정제는 Coot를 사용하여 진행되었고, 결정학적 대칭이 없는 Buster-TNT는 각각의 도메인의 중심을 유지하기 위해 사용되었지만, R/Rfree가 라만찬드란 조사구의 허용되지 않은 범위에 있는 잔기가 없는 25.5/27.1일 때까지, 더 많은 변화량이 루프 부위 사이에 허용되었다(MolProbity에 의해 결정된 바, 가장 후할 때 94.6%). 모델인 fH의 모든 잔기 및 인자 H 결합 단백질의 N-말단에서 모두 이지만 다섯 개의 잔기 및 분자의 모든 카페에서 무질서한 친화성 태그의 여섯 개 히스티딘을 함유한다. 프로그램 MolRep을 사용한 개별 도메인(인자 H CCP6 및 CCP7 및 인자 H 결합 단백질)의 분자 교체는 P1 결정형의 용액을 허용한다(다른 포장 배열에서 복합체의 네 가지의 독립적인 카페). Coot/Buster-TNT를 사용한 루프 부위의 작은 재건 및 정제(90 내지 2.35Å)는 라만찬드란 조사구의 허용되지 않는 범위에 있는 잔기가 없을 때 다시 23.2/26.3의 R/Rfree를 야기한다. 구조적 도면은 프로그램 PyMol을 사용하여 그려졌다.

[0098]

면역화 프로토콜

[0099]

7주령 BALB/C 마우스를 0 및 10일 째에 피하로 후룬즈 아주반트와 함께 정제된 fHbp 또는 돌연변이 fHbp로 파하루트에 의해 면역화되었다. 각각의 동물은 전체 부피가 200 마이크로리터가 되도록 동일한 부피의 아주반트와 함께 PBS에서 단백질의 25 마이크로그램을 받았다. 14일 째에, 동물을 희생시키고, 혈청을 마우스로부터 수집한 다음, 모아 분주하고, -80°C에 저장하였다.

[0100]

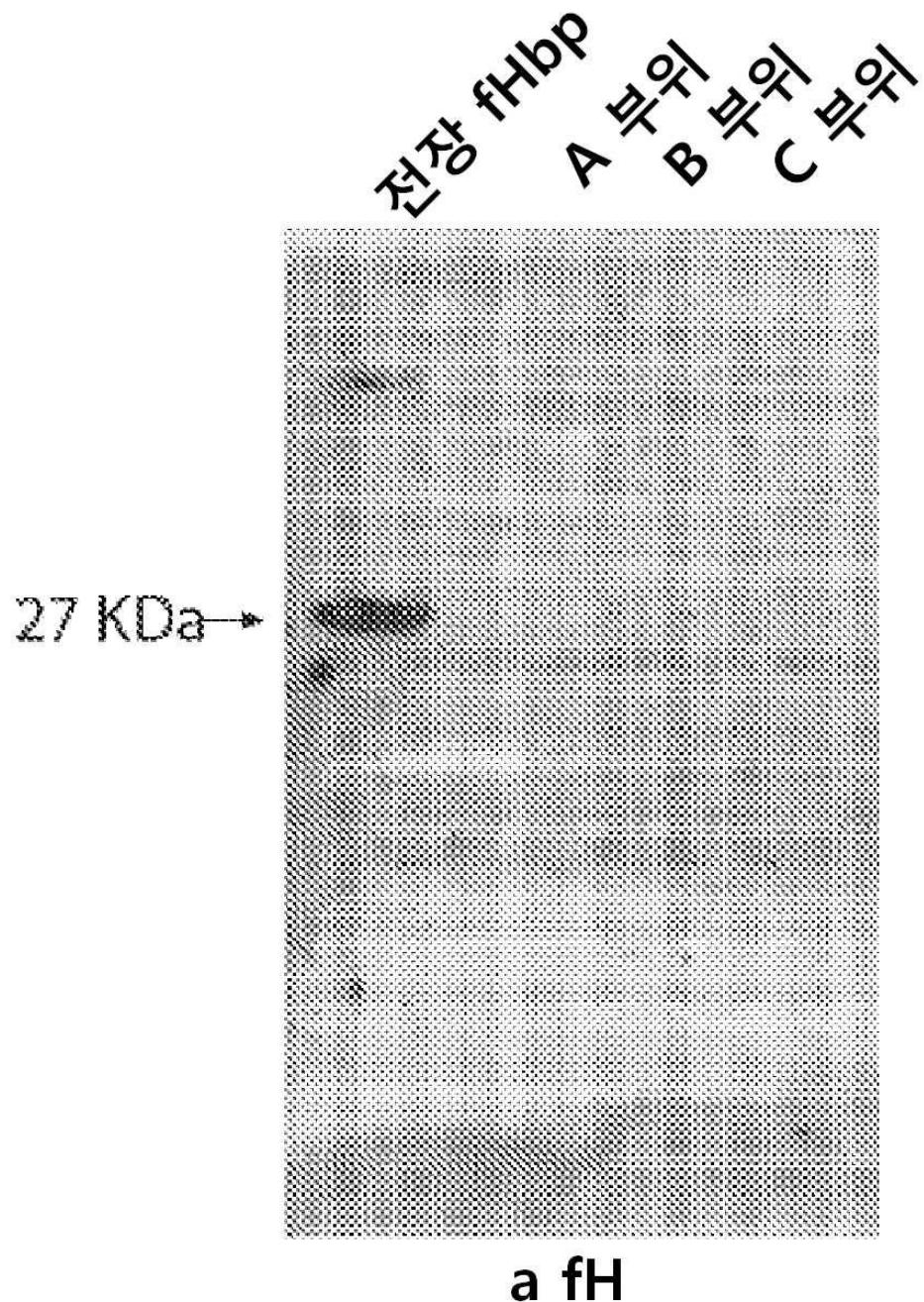
혈청 살균 활성(SBA)

[0101]

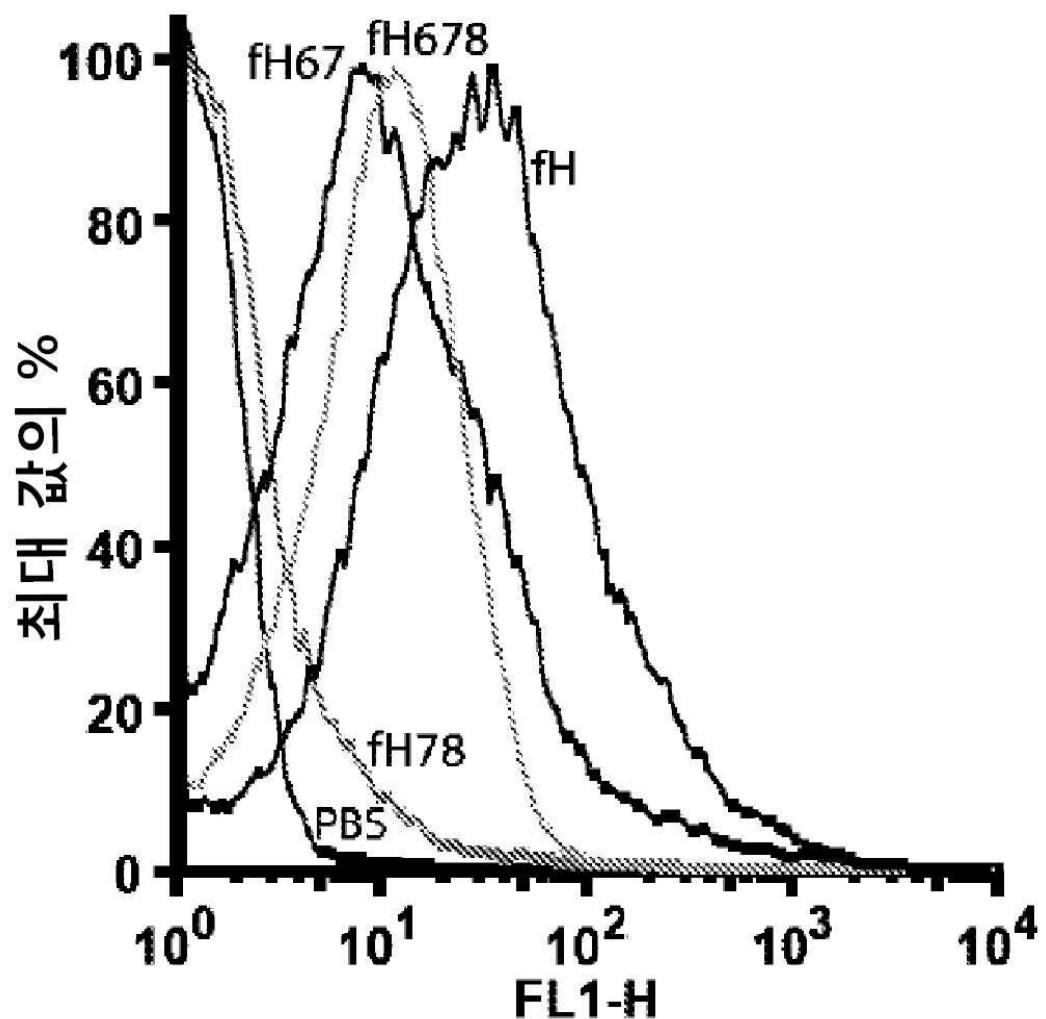
혈청군 B 나이세리아 메닌지티디스 균주 H44/76를 고체 배지에서 밤새 키웠고, PBS에 희수하였고, 콜로니 형성 유니트의 수를 정량하였다. 혈청의 일련의 희석을 박테리아(SBA 베퍼에서 10^4 CFU) 및 아기 토끼 보체(Pelfreeze, 최종 희석 8에서 1)에 1시간 동안 첨가하였고, 박테리아의 살아있는 수를 고체 배지에 플레이팅하여 결정하였다.

도면

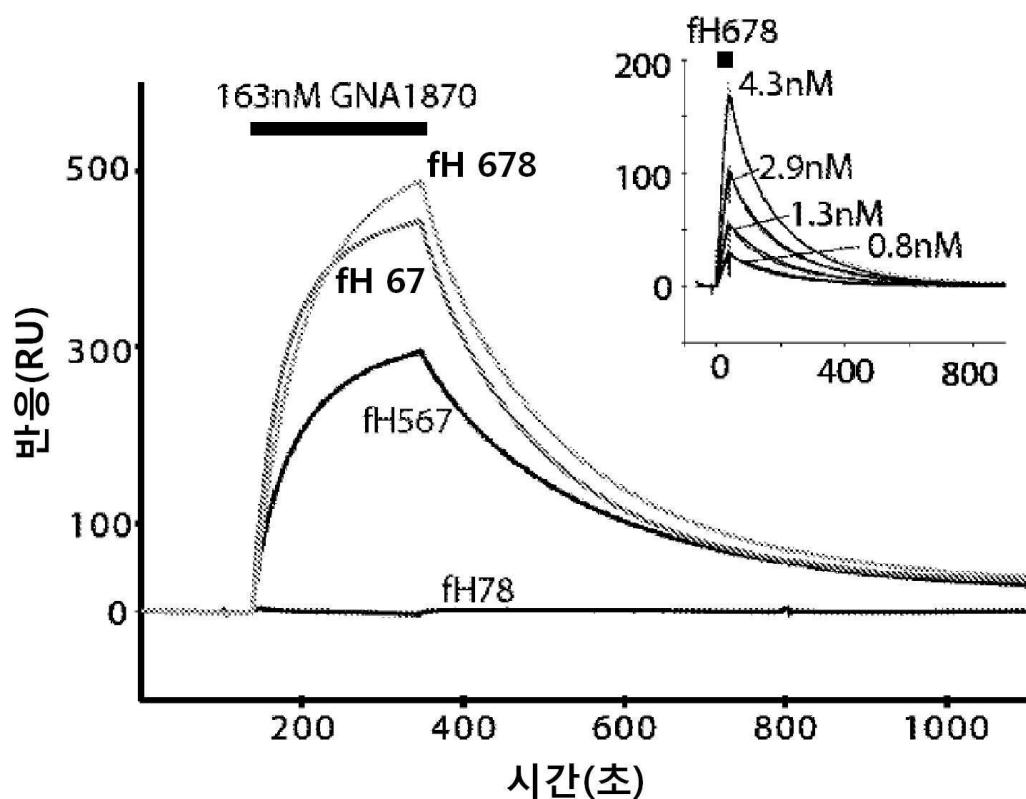
도면 1a



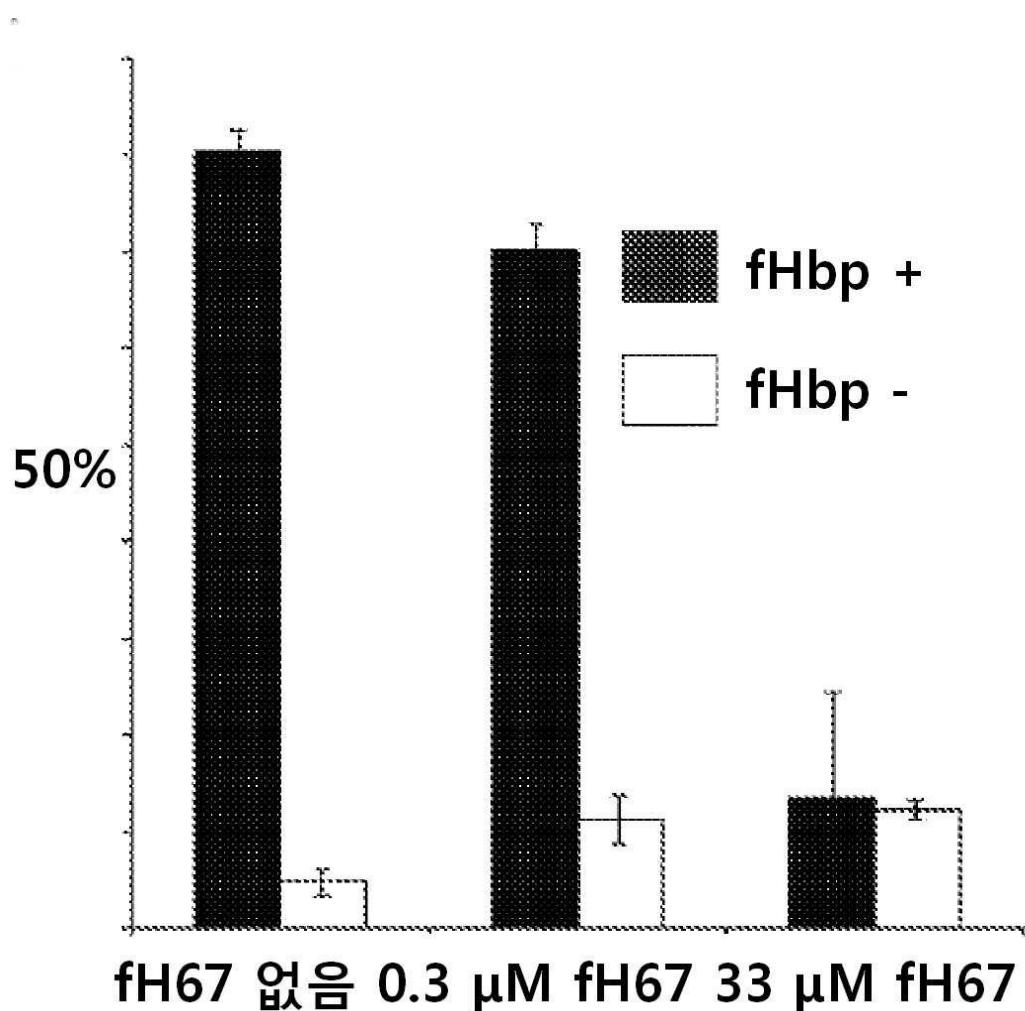
도면1b



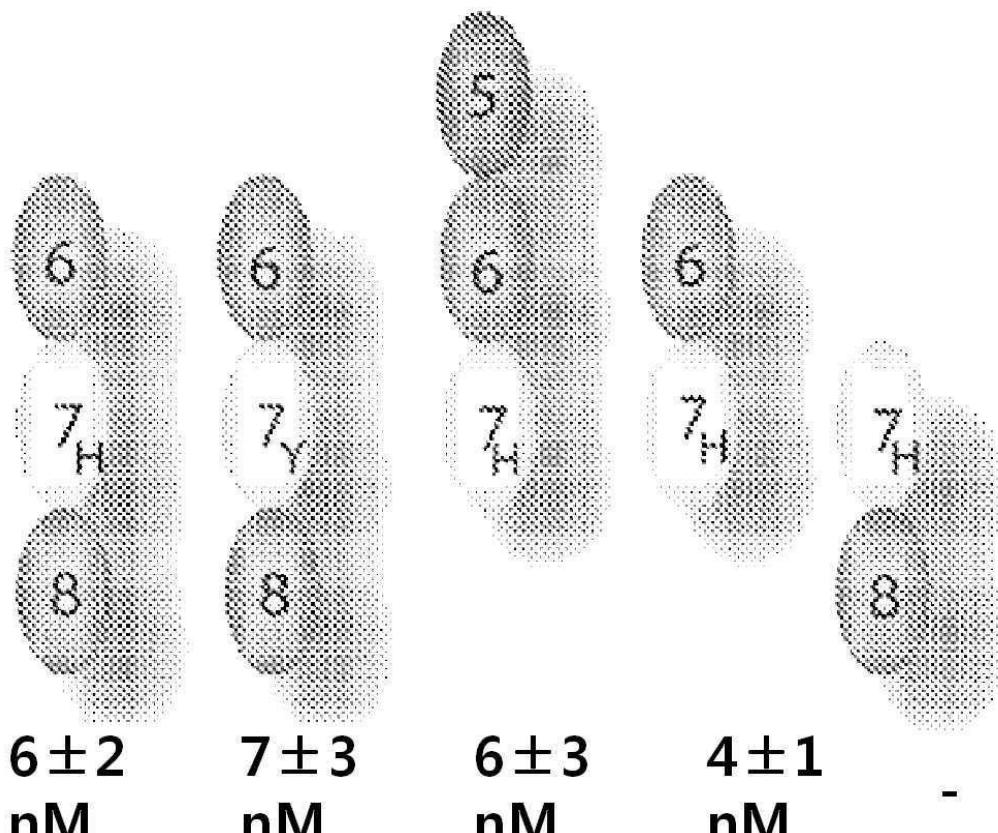
도면1c



도면 1d



도면1e

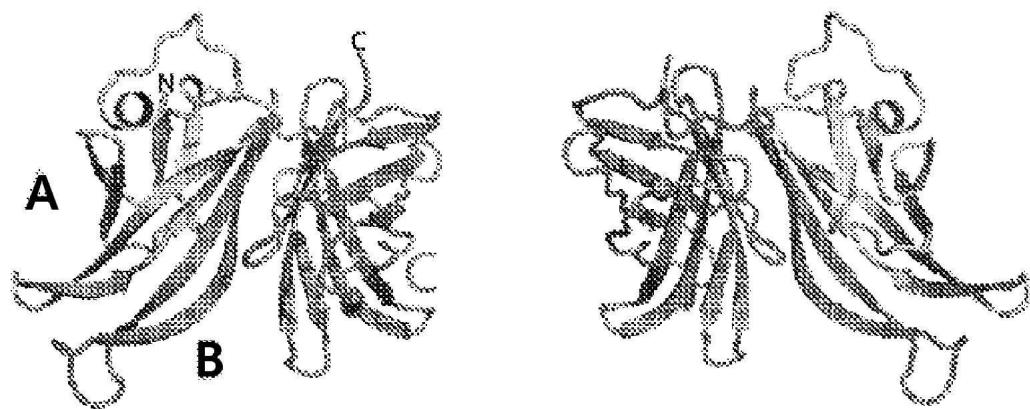


도면1f

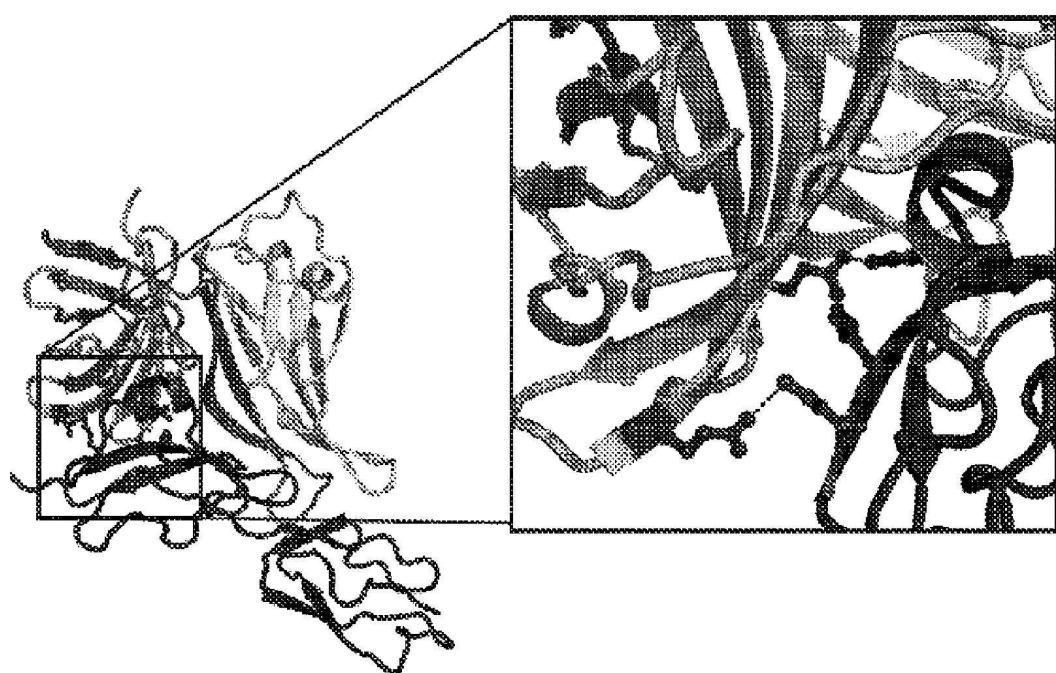
컨스트렉트	ka ($M s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)	χ^2
fH567	$3.5e^3 \pm 2.2e^3$	$1.8e^{-3} \pm 3.6e^{-3}$	$6.1e^{-3} \pm 2.5e^{-3}$	2.1 ± 1.1
fH678 His 402	$3.6e^5 \pm 4.4e^4$	$1.9e^{-3} \pm 3.4e^{-4}$	$5.7e^{-9} \pm 2.3e^{-9}$	3.5 ± 2.2
fH676 Tyr 402	$3.0e^5 \pm 1.9e^5$	$1.7e^{-3} \pm 2.8e^{-4}$	$7.2e^{-9} \pm 2.7e^{-9}$	4.3 ± 1.0
fH67	$7.2e^5 \pm 1.5e^5$	$2.9e^{-3} \pm 6.4e^{-4}$	$4.0e^{-9} \pm 0.5e^{-10}$	2.1 ± 1.3
fH67 _{R341A,H337A}	$1.4e^3, 1.7e^3$	$4.6e^{-3}, 6e^{-3}$	$2.7e^{-6}, 2.8e^{-6}$	$2.3, 4.7$
fH78	결합 검출 없음			

*나타낸 값은 두 번의 독립적인 실험으로부터 나옴

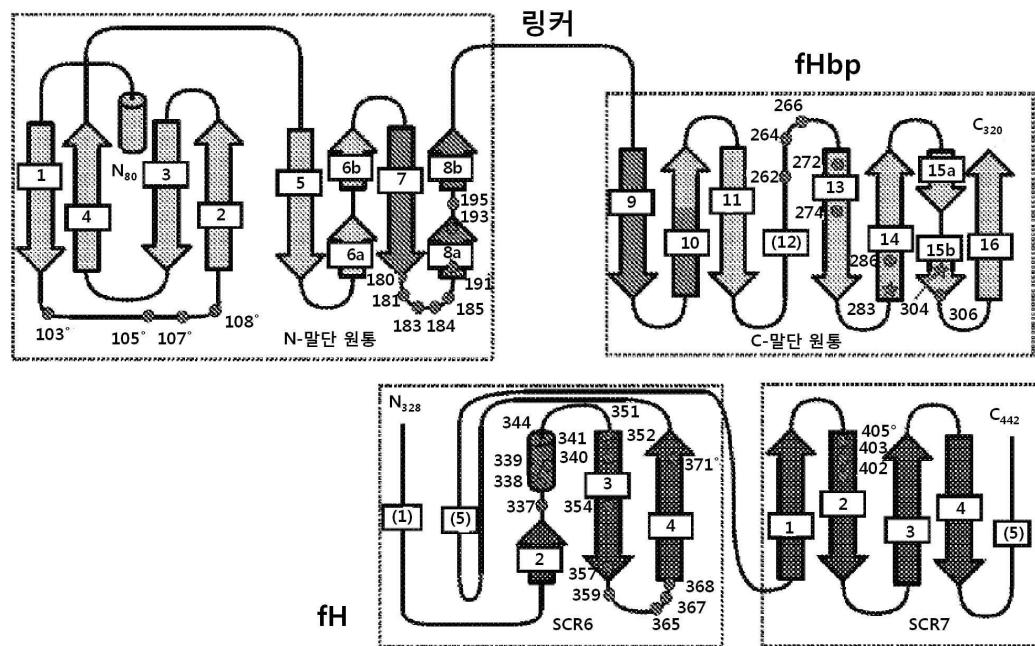
도면2a



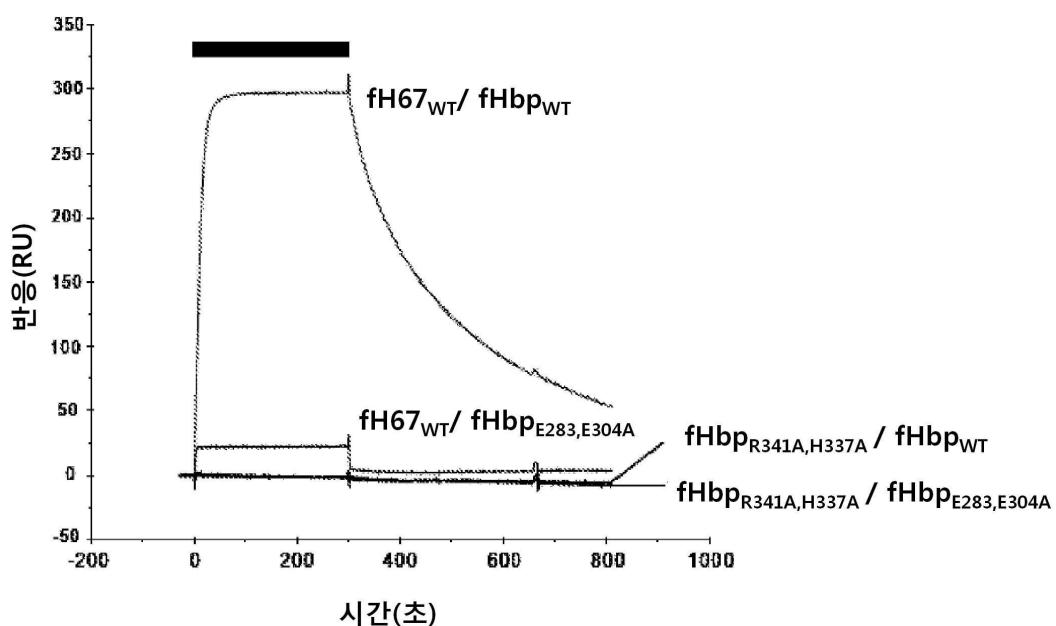
도면2b



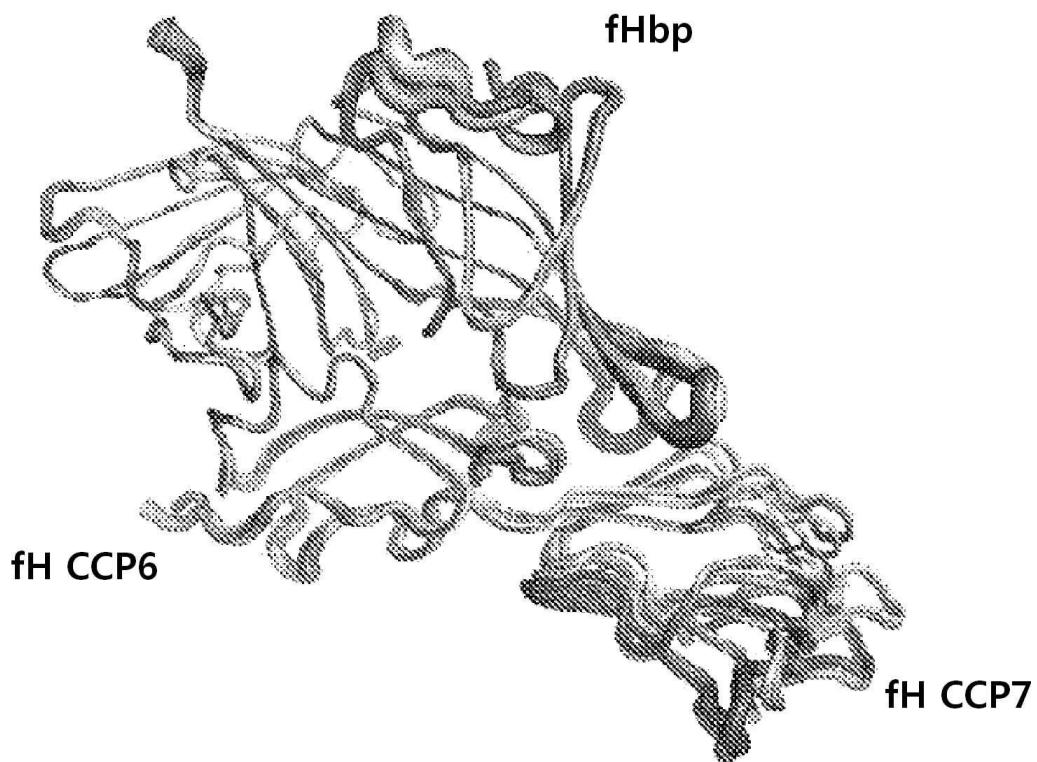
도면2c



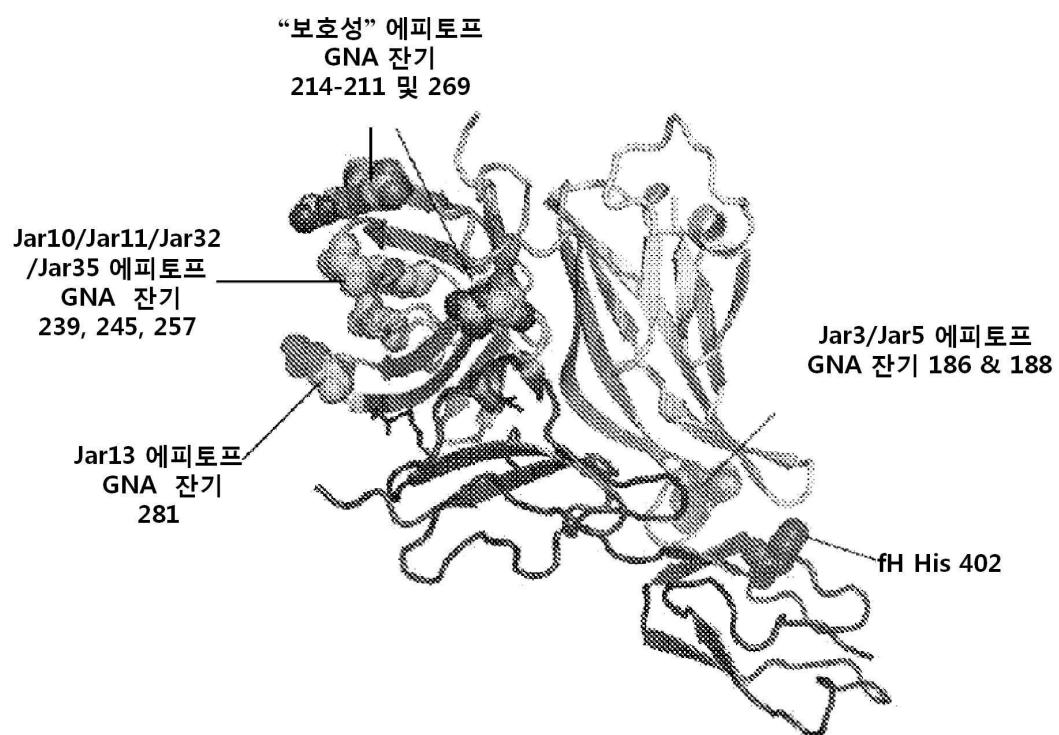
도면3



도면4



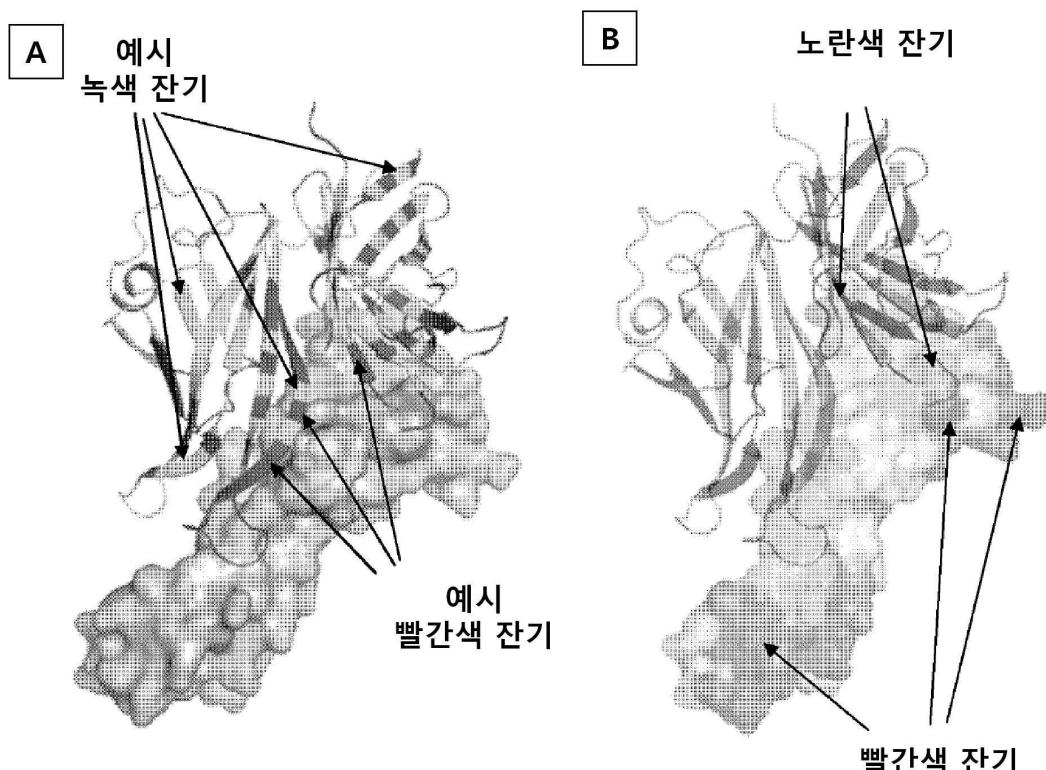
도면5



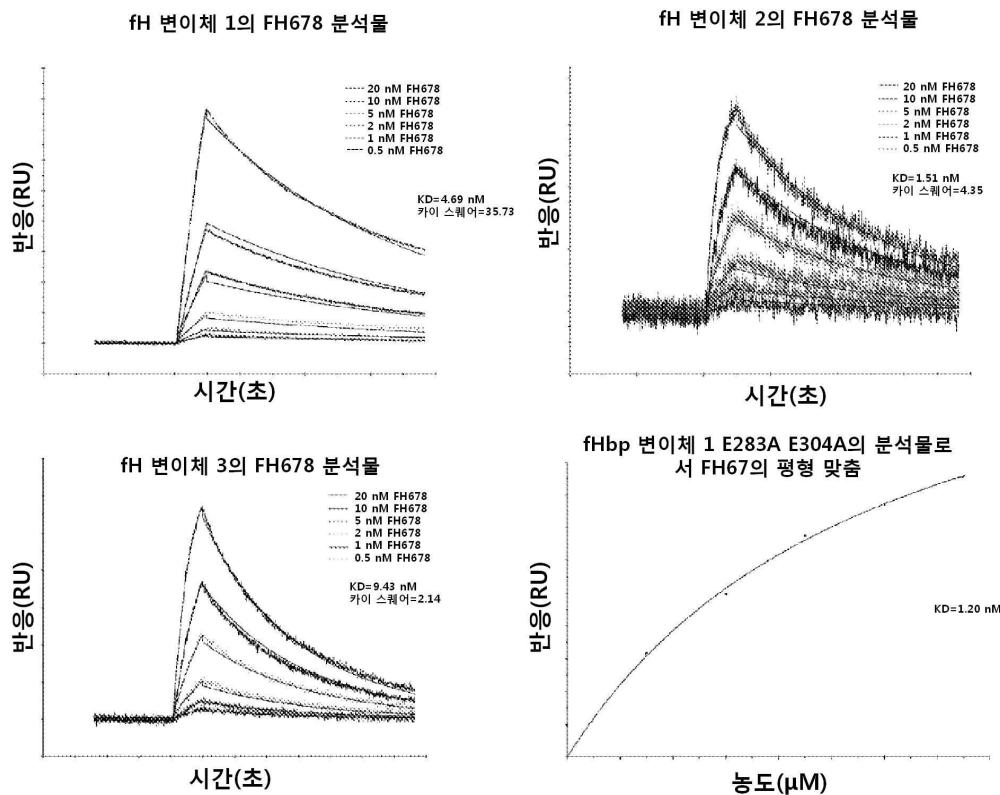
도면6

1 MPSEPPFGRH LIFASLTCLI DAVCKKRYHN QNVYILSILR MTRS KPVNRT AFCCLS LT
 61 LILTACSSGG GGVAADIGAG LADALTAPLD HKDKGLQSLT LDQSVRKNEK LKLAQGAEK
 121 TYGNGDSLNT GKLKNDKVSR FDFIRQIEVD GQLITLESGE FQVYKQSHSA LTAFQTEQIQ
 181 DSEHSGKMVA KRQFRIGDIA GEHTSFDKLP EGGRATYRGT AFGSDDAGGK LTYTIDFAAK
 241 QGNGKIEHLK SPELNVDLAA ADIKPDGKRH AVISGSVLYN QAEKGSYSLG IFGGKAQEV
 301 GSAEVKTVNG IRHIGLAAKQ

도면7

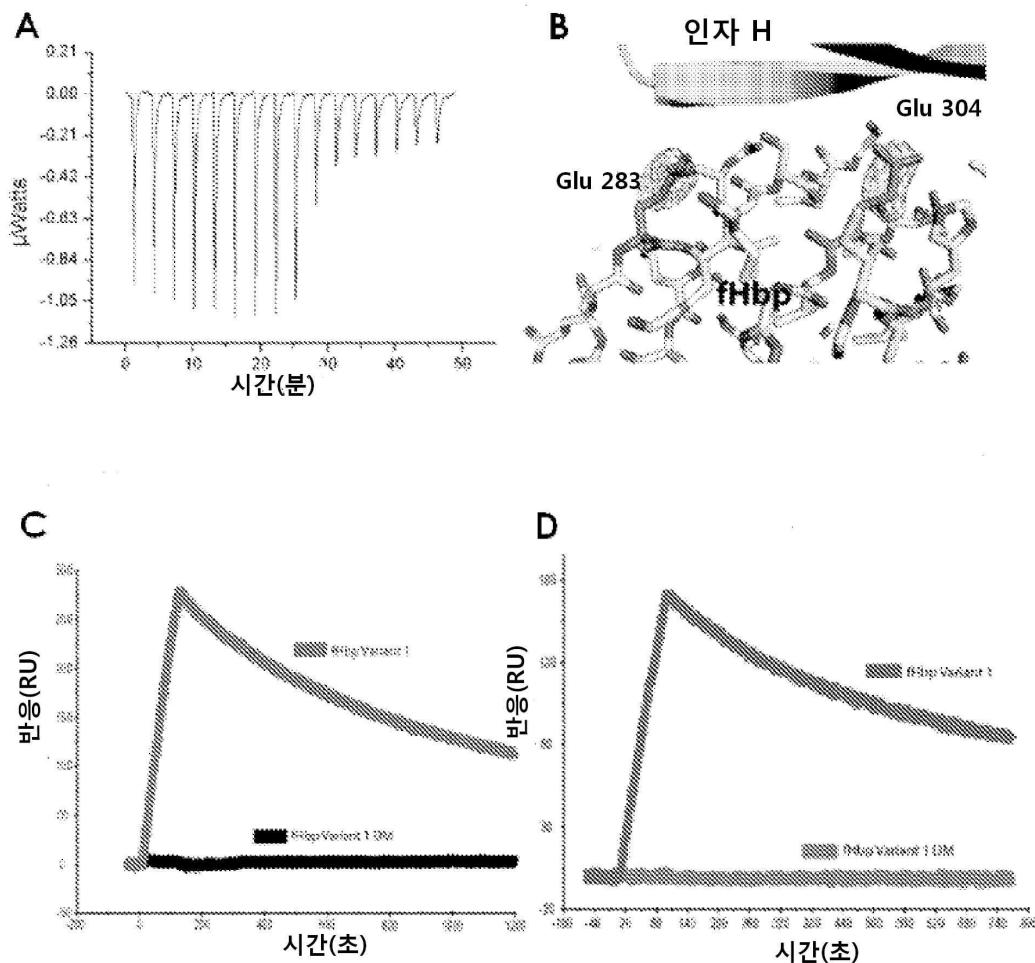


도면8



	fHbp 변이체 1	fHbp 변이체 2	fHbp 변이체 3	fHbp E283A E304A	NGO0033
FH67	5nM	2nM	3nM	1.2μM	6μM
FH678	5nM	2nM	3nM		
FH67 K351N Y452K	결합이 검출되지 않음				
FH67 N339E M340S	67nM	44nM	165nM	결합이 검출되지 않음	
FH67 H337Y R341L	결합이 검출되지 않음				

도면9



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED

<120> COMPOSITION

<130> GB11P0450

<150> GB0819633.9

<151> 2008-10-25

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 320

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

Met Pro Ser Glu Pro Pro Phe Gly Arg His Leu Ile Phe Ala Ser Leu

1 5 10 15

Thr Cys Leu Ile Asp Ala Val Cys Lys Lys Arg Tyr His Asn Gln Asn

20 25 30

Val Tyr Ile Leu Ser Ile Leu Arg Met Thr Arg Ser Lys Pro Val Asn

35 40 45

Arg Thr Ala Phe Cys Cys Leu Ser Leu Thr Thr Ala Leu Ile Leu Thr

50 55 60

Ala Cys Ser Ser Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly

65 70 75 80

Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu

85 90 95

Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys

100 105 110

Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr

165 170 175

Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg

180 185 190

Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys

195 200 205

Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser

210 215 220

Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys

225 230 235 240

Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val

245 250 255

Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val

260 265 270

Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser

275 280 285

Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu
290 295 300

Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
305 310 315 320

<210> 2

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

aaacatggag gtctatatgc tgagaatatg cgttagaccat actttcc 47

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

tttgtacctc cagatacgac tcttatacgc atctggtagt aaagg 45

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

ggcttatatac atgagaatat ggcttagacca tactttccag tagc 44

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

ccagatatag tactttata ccgatctggc atgaaaggc atcg 44