(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월19일
(11) 등록번호 10-2744193
(24) 등록일자 2024년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/09 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) *C07K 14/315* (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/092 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7007349(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년04월15일
심사청구일자 2023년03월29일
(85) 번역문제출일자 2023년02월28일
(65) 공개번호 10-2023-0039751
(43) 공개일자 2023년03월21일
(62) 원출원 특허 10-2016-7031477
원출원일자(국제) 2015년04월15일
심사청구일자 2020년02월28일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2015/050174
(87) 국제공개번호 WO 2015/157820
국제공개일자 2015년10월22일
(30) 우선권주장
2014901382 2014년04월15일 오스트레일리아(AU)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Immunol Cell Biol. 80(2):178-87 (2002.4)
vaccine, 27, 4923-4929 (2009)

(73) 특허권자
그리피스 유니버시티
오스트레일리아 퀸즈랜드 4111 나탄 커셀스 로드 170
(72) 발명자
판데이 마니샤
오스트레일리아 퀸즐랜드 4111 네이선 케슬스 로드 170 그리피스 유니버시티
배츠로프 마이클
오스트레일리아 퀸즐랜드 4111 네이선 케슬스 로드 170 그리피스 유니버시티
굿 마이클
오스트레일리아 퀸즐랜드 4111 네이선 케슬스 로드 170 그리피스 유니버시티
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 최연정

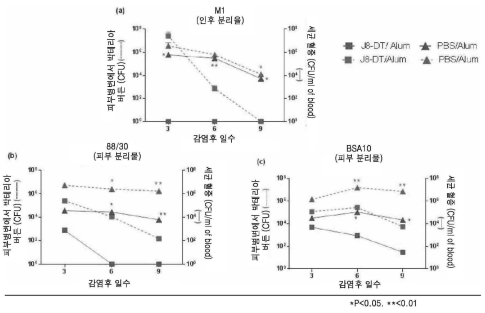
(54) 발명의 명칭 **그룹 A 스트렙토코쿠스 백신**

(57) 요 약

포유동물에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아(group A streptococcal bacteria)에 대한 면역 반응을 유도하는 방법 및 조성물이 제공되며, 상기 포유동물에 M 단백질 단편, 그 변이체 또는 유도체 및 SpyCEP 단백질 또는 펩티드 단편, 또는 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하기 위한 SpyCEP 단백질에 대한 항체 또는 단편을 투여하는

(뒷면에 계속)

대 표 도



단계를 포함한다. 또한 SpyCEP의 면역우세 펩티드 단편이 제공된다.

(52) CPC특허분류
A61P 31/04 (2018.01)
A61P 37/04 (2018.01)
C07K 14/315 (2013.01)
C07K 16/1275 (2013.01)
C12Y 304/22 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(30) 우선권주장
2014903042 2014년08월06일 오스트레일리아(AU)
2014904453 2014년11월05일 오스트레일리아(AU)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 단편을 포함하는 그룹 A 스트렙토코쿠스 M 단백질의 면역원성 M 단백질 단편; 및

서열번호: 18의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제(agent)를 포함하는,

포유동물에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아(group A streptococcal bacteria)에 대한 면역 반응 유도용 조성물.

청구항 2

서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 단편을 포함하는 그룹 A 스트렙토코쿠스 M 단백질의 면역원성 M 단백질 단편; 및

서열번호: 18의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 포함하는,

그룹 A 스트렙토코칼 박테리아에 대해 포유류를 면역화하기 위한 조성물.

청구항 3

서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 단편을 포함하는 그룹 A 스트렙토코쿠스 M 단백질의 면역원성 M 단백질 단편; 및

서열번호: 18의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 포함하는,

포유류에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아 감염의 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 4

서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 단편을 포함하는 그룹 A 스트렙토코쿠스 M 단백질의 면역원성 M 단백질 단편; 및

서열번호: 18의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 코딩하는 하나 이상의 분리된 핵산을 포함하는,

포유류에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아에 대한 면역 반응을 유도하거나, 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아에 대해 포유류를 면역화하거나, 또는 포유류에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아 감염을 치료 또는 예방하기 위한 조성물.

청구항 5

서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 단편을 포함하는 그룹 A 스트렙토코쿠스 M 단백질의 면역원성 M 단백질 단편; 및

서열번호: 18의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 포함하는,

그룹 A 스트렙토코칼 박테리아 감염의 치료 또는 예방을 위해 포유류에게 투여하기 위해 제제화된 조성물.

청구항 6

서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 단편을 포함하는 그룹 A 스트렙토코쿠스 M 단백질의 면역원성 M 단백질 단편; 및

서열번호: 18의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체를 포함하는 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 코딩하는 하나 이상의 분리된 핵산을 포함하는,

그룹 A 스트렙토코칼 박테리아 감염의 치료 또는 예방을 위해 포유류에게 투여하기 위해 제제화된 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원성 M 단백질 단편 및/또는 상기 제제는 톡소이드 또는 독소의 돌연변이 교차반응성 물질에 컨쥬게이션된 것인 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 톡소이드는 디프테리아 톡소이드인 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물은 인간인 것인 조성물.

청구항 10

서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 단편으로 구성된 그룹 A 스트렙토코쿠스 M 단백질의 면역원성 M 단백질 단편; 및

서열번호: 18의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체로 구성된 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 포함하는,

포유동물에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아에 대한 면역 반응 유도용 조성물.

청구항 11

서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 단편으로 구성된 그룹 A 스트렙토코쿠스 M 단백질의 면역원성 M 단백질 단편; 및

서열번호: 18의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체로 구성된 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 포함하는,

그룹 A 스트렙토코칼 박테리아에 대해 포유동물을 면역화하기 위한 조성물.

청구항 12

서열번호: 56의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 단편으로 구성된 그룹 A 스트렙토코쿠스 M 단백질의 면역원성 M 단백질 단편; 및

서열번호: 18의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 18의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 그의 변이체로 구성된 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 포함하는,

포유류에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아 감염의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 13

청구항 10 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원성 M 단백질 단편 및/또는 상기 제제는 톡소이드 또는 독소의 돌연변이 교차반응성 물질에 컨쥬게이션된 것인 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 톡소이드는 디프테리아 톡소이드인 것인 조성물.

청구항 15

청구항 10 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물은 인간인 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 감염성 질환의 예방 및 치료 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 그룹 A 스트렙토코쿠스 스트렙토코쿠스-관련(streptococcus-associated) 질환 및 상태를 치료 또는 예방하는 백신에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] *스트렙토코쿠스 피오게네스*(*Streptococcus pyogenes*)(the Lancefield group A streptococcus: GAS)에 대한 백신은 상기 박테리아에 의해 야기되는 쇠약성 질환(debilitating diseases), 특히 류마티스 열 및 류마티스 심장병 때문에 오랫동안 연구되어 왔다. 류마티스 열은 대부분의 선진국에서는 오늘날 드문 질환이지만, 개발도상국에서는 어린이, 청소년 및 청년층에서 후천성 심장병의 주된 원인으로 남아 있다. 또한, 침습적 GAS 질환은 어린이 및 성인에서 종종 패혈증의 원인이 되며, 고-증례 치사율(high-case fatality rate)을 갖는다. 또한 GAS 질환의 부담에 추가로 스트렙토코칼 감염후 사구체신염(post-streptococcal glomerulonephritis)이 있고, 이는 아마도 많은 GAS 발병 지역에서 말기 신부전이 높은 비율로 발생되는 원인이 된다. 매년 GAS 감염 중 GAS 인두

염(pharyngitis) 및 농가진(impetigo)이 가장 많은 절대적 숫자를 차지한다. GAS 인두염은 연간 학령기 어린이의 약 8%-15%에 영향을 주며, GAS 농가진은 어린이에서 10-50%의 유병율의 매우 일반적인 감염증이다. GAS-관련 질환은 개발도상국에서 심각한 문제일 뿐만 아니라 심지어 선진국에서 조차도 표준 항생제 요법에 내성이 있고 중증 괴사근막염(severe necrotizing fasciitis)과 같은 쇠약성 질환을 일으키는 특히 전염성인 강한 GAS 균주가 출현하였다.

[0003] GAS의 중요한 발병인자(virulence factor)는 M 단백질이며, 이는 강한 항포식성(antiphagocytic)이 있고, 혈청 인자 H에 결합하여 C3-컨버타제(convertase)를 파괴하고 C3b에 의한 옵소닌화(opsonization)를 방해한다. M 단백질의 보존된 C-반복 부분으로부터의 면역원성 펩티드를 포함하는 백신들이 개발되었는 바, 예를 들어 C-반복 영역으로부터의 T 및 B-세포 에피토프들, 또는 상기 C-반복 영역으로부터의 단일 최소 B 세포 에피토프를 함유하는 J8 및 J14 펩티드 백신이 개발되었다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0004] 놀랍게도, 본 발명자들은 그룹 A 스트렙토코쿠스에 대한 면역성을 유도하는 J8-펩티드내 중요 인자는 호중구 활성(neutrophil activity)이라는 것을 발견하였다. *인 비트로*(*in vitro*) 옵소닌화 분석은 호중구 및 보체(complement)의 공급원으로서 전혈(whole blood)을 사용하지만, 호중구가 *인 비보*(*in vivo*) 보호를 위해 요구되는지는 알려져 있지 않다. 또한, 옵소닌화 분석은 상대적으로 적당한 CFU 감소(통상적으로 10배 미만)를 나타내지만, 반면에 *인 비보* J8-유도 보호는 박테리아 바이오버든(bacterial bio-burden)을 수 로그값 정도로 감소시킨다. 특히, 본 발명자들은 호중구 화학주성제(neutrophil chemotactic agent) 인터루킨 8을 불활성화하는 SpyCEP와 같은 호중구 억제제가 그룹 A 스트렙토코쿠스에 대한 면역성을 유도하는데 있어서 J8에 대해서 억제 작용을 나타낸다.

[0005] 광의로, 본 발명은 그러므로 호중구 활성을 회복 또는 증대시킴으로써, 그룹 A 스트렙토코쿠스에 대한 M 단백질-유도 면역성을 보조하는 것에 관한 것이다.

[0006] 본 발명의 일 양태는 포유동물에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아에 대한 면역 반응을 유도하는(eliciting) 방법을 제공하며, 상기 방법은 포유동물에게: M 단백질 단편, 그 변이체 또는 유도체, 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제(agent)를 투여함으로써 포유동물내에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아에 대한 면역반응을 유도하는 단계를 포함한다.

[0007] 본 발명의 다른 양태는 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아에 대해서 포유동물을 면역화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 포유동물에게: M 단백질, 그 단편, 변이체 또는 유도체; 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 투여함으로써 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아에 대해 포유동물을 면역화하는 단계를 포함한다.

[0008] 본 발명의 또 다른 양태는 포유동물에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 포유동물에게 M 단백질 단편, 그 변이체 또는 유도체, 또는 이에 대한 항체 또는 항체 단편; 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 투여함으로써 포유동물내에서 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아 감염을 치료 또는 예방하는 단계를 포함한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 양태는 포유동물에 투여하기에 적당한 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 M 단백질 단편, 그 변이체 또는 유도체, 또는 이에 대한 항체 또는 항체 단편; 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 포함한다.

[0010] 본 발명의 관련 양태는 M 단백질 단편, 그 변이체 또는 유도체를 코딩하는 하나 이상의 분리된 핵산 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제 또는 이를 포함하는 조성물을 투여하는 방법을 제공한다.

[0011] 특정 구현예에서, M 단백질 단편은 M 단백질의 보존 영역이거나 또는 이를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 단편은 p145 펩티드를 포함하거나 또는 p145 펩티드내에 함유된 면역원성 단편이다. 특정 구현예에서, 상기 면역원성 단편은 J8 펩티드 또는 그 변이체내에 있거나 또는 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 변이체는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열; 또는 그 단편 또는 그 변이체를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나 또는 이루어진다: SREAKKQSREAKKQVEKALKQVEKALC (서열번호: 59); SREAKKQSREAKKQVEKALKQSREAKC (서열번호:60); SREAKKQVEKALKQSREAKKQVEKALC (서열번호:61); 및 SREAKKQVEKALDASREAKKQVEKALC (서열번호: 62).

[0012] 넓은 일 구현예에서, 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제는 단백질 또는 그 단편이며, 이는 호중구

또는 호중구 활성을 통상 직접적 또는 간접적으로 저해 또는 억제한다. 적당하게, 상기 단백질 또는 그 단편을 투여함으로써 상기 단백질 및/또는 그룹 A 스트렙토코쿠스에 대한 면역 반응을 유도한다.

[0013] 넓은 다른 구현예에서, 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제는 단백질 또는 그 단편과 결합하는 항체 또는 항체 단편이며, 이는 호중구 또는 호중구 활성을 통상 직접적 또는 간접적으로 저해 또는 억제한다.

[0014] 특정 구현예에서, 상기 단백질은 SpyCEP 또는 그 단편이다.

[0015] 바람직한 구현예에서, 상기 단편은 아미노산 서열 NSDNIKENQFEDFDEDWENF (서열번호: 18)을 포함한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그 단편 또는 그 변이체를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나 또는 이루어지는 분리된 펩티드를 제공한다: NSDNIKENQFEDFDEDWENF (서열번호: 18); SREAKKQSREAKKQVEKALKQVEKALC (서열번호:59); SREAKKQSREAKKQVEKALKQSREAKC (서열번호:60); SREAKKQVEKALKQSREAKKQVEKALC (서열번호:61); 및 SREAKKQVEKALDASREAKKQVEKALC (서열번호: 62).

[0017] 관련 양태는 상기 양태의 분리된 펩티드를 코딩하는 분리된 핵산, 상기 분리된 핵산을 포함하는 유전자 구조체 및/또는 상기 유전자 구조체를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[0018] 또 다른 관련 양태는 상기 양태의 분리된 펩티드와 결합하거나 또는 이에 대항하여 발생하는 항체 또는 항체 단편을 제공한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 양태는 전술한 양태의 분리된 펩티드, 분리된 핵산, 유전자 구조체, 숙주 세포 및/또는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 명세서에 사용되는, 부정관사 'a' 및 'an'은 단수 또는 복수의 요소들 또는 특징들을 나타내거나 또는 포함하는데 사용되며, "하나" 또는 "단일" 요소 또는 특징을 의미하거나 또는 정의하는데 간주되어서는 안된다.

[0021] 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 용어 "포함하는(comprise)", "포함하는(comprises)" 및 "포함하는(comprising)", 또는 유사한 용어들은 비배타적 포함(non-exclusive inclusion)을 의미하며, 요소들 또는 특징들의 열거 목록은 명시 또는 열거된 요소들만을 포함하는 것이 아니라, 명시되거나 또는 열거되지 않은 다른 요소들 또는 특징들을 포함할 수 있다.

[0022] 아미노산 서열의 문맥에서 "필수적으로 이루어지는(consisting essentially of)"이라는 표현은 열거된 아미노산 서열과 더불어 N-말단 또는 C-말단에서 부가의 1개, 2개 또는 3개의 아미노산을 함께 갖는 것을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1: J8-DT/Alum 백신화(vaccination)의 보호 효능(Protective efficacy).

도 2: J8-DT 매개 면역에서 호중구. E: 표피(epidermis); D: 진피(dermis); SC: 피하층(sub-cut layer)

도 3: J8-DT 백신화의 호중구 고갈 및 효능.

도 4: CovR/S 돌연변이체 GAS, M1T1 분리물에서 향상된 유전자 발현의 개요.

도 5: 5448AP에 대한 보호에 있어서 J8-DT의 효능.

도 6: 다양한 GAS 균주들에 의한 IL-8 분해.

도 7: 다양한 GAS 균주들에 의한 MIP-2 분해.

도 8: 다양한 GAS 균주들에 의한 KC 분해.

도 9: 케모킨(chemokines)의 화학주성능(chemotactic ability)에 대한 다양한 GAS 분리물의 효과.

도 10: J8-DT-rSpyCEP/Alum에 의한 면역화에 의해서 GAS 5448AP 균주에 대한 보호.

도 11: 항원-특이적 IgG 생성에 의해서 측정되는 J8-DT-SpyCEP의 면역원성.

도 12: rSpyCEP 항혈청(antisera)에 의한 SpyCEP의 IL-8 분해 활성의 억제.

도 13: SpyCEP의 잔기 35-587에 걸친 중첩된 20량체(20mer) 펩티드(10개의 아미노산이 중첩)의 에피토프 맵핑(epitope mapping)(내림차순으로 서열번호: 1-55). 굵게 표시된 펩티드는 에피토프 맵핑에 의해서 선택된 펩티

드이다.

도 14: 개별 펩티드 에피토프와 항-재조합 SpyCEP 항혈청 반응성. SpyCEP의 B-세포 에피토프 맵핑(553개의 아미노산)은 펩티드 어레이(peptide array)를 사용하여 실시하였다. 도 13에 개시된 바와 같이 10개의 아미노산에 의해 중첩된 20량체 펩티드는 rSpyCEP 항혈청에 의해서 탐색되었다.

도 15: 항-재조합 SpyCEP 항혈청과 강한 반응성을 보이는 6개의 에피토프의 동정(identification). S1 = 서열번호: 15; S2 = 서열번호: 18; S3 = 서열번호: 19; S4 = 서열번호: 24; S5 = 서열번호: 30; 및 S6 = 서열번호: 54.

도 16: SpyCEP 에피토프 항혈청에 의한 면역원성 및 모 펩티드 인식(parent peptide recognition).

도 17: SpyCEP 에피토프 항혈청에 의한 IL-8 분해의 억제.

도 18: 자가 펩티드 및 교차 인식 ELISA(cross recognition ELISAs)에 대한 쥐과(murine) α-p145-DT 및 α-J8-DT 역가(titres).

도 19: 자가 펩티드에 대한 쥐과 α-J8i변이체-DT 역가.

도 20: 교차 인식 ELISA.

도 21: recSpyCEP에서 면역우세 에피토프(immunodominant epitope)의 동정. recSpyCEP에서 면역우세 에피토프를 동정하기위해서, 펩티드 억제 ELISA를 실시하였다. 한 무리의 BALB/c 마우스(4-6 주령)를 0일, 21일 및 28일에 SpyCEP 에피토프-DT 콘쥬게이트 또는 SpyCEP로 피하에 면역화시켰다. 마지막 접종하고 1주일 후에, 하악하 채혈(submandibular bleed)을 통해서 마우스에서 채혈하여 항혈청을 수집하였다. 에피토프 항혈청은 5 또는 0.5 ㎍/ml 농도의 자가-펩티드와 배양하고, 자가-펩티드 인식의 억제를 평가하였다(A). 상기 펩티드 항혈청은 또한 5 또는 0.5 ㎍/ml 농도의 SpyCEP와 배양하였다. 그 후 상기 혈청을 고정된 펩티드에 대한 ELISA에서 사용하였다(B). 최종적으로, SpyCEP 항혈청을 5 또는 0.5 ㎍/ml 농도의 각각의 펩티드(S1-S6) 또는 recSpyCEP와 배양하고, 각각 독립적인 대응 펩티드 또는 SpyCEP에 대한 그 결합을 평가하였다(C). 각 막대에 대한 데이터는 평균 ± SEM이다. 상기 그룹들 사이의 유의성(significance)을 결정하기 위해서 본페로니 다중 비교 시험(Bonferroni's multiple comparison test)에 의한 이원분산분석법(two-way ANOVA)을 사용하여 통계학적 분석을 실시하였다. *p<0.05 및 **p<0.01, ***p<0.001. ns는 p<0.05이다.

도 22: 다양한 GAS 균주에 대한 SpyCEP 및 SpyCEP 에피토프 항혈청의 결합 효율. 다양한 GAS 균주에 대한 recSpyCEP 또는 SpyCEP 에피토프 항혈청의 특이성을 결정하기 위해서 유세포측정법(flow cytometry)을 실시하였다. 상기 분석은 SpyCEP 항혈청과 비교하여 FITC 콘쥬게이트된 IgG를 통한 에피토프 항혈청(S1-S6)의 결합을 측정하였다. 5448과 그 동물 계대 유도체(animal passaged derivative)의 결합(A), BSA10과 그 계대 유도체의 결합(B) 및 인후 분리물(pM1)과 피부 분리물(88/30)의 결합(C)을 나타내었다. 각 막대에 대한 데이터는 평균 ± SEM이다. 통계학적 분석은 PBS 대조군과 비교하여 유의성을 결정하기 위해서 양측 t-시험(two-tailed t-test)을 사용하여 실시하였다. *p<0.05, **p<0.01 및 ***p<0.001.

도 23: GAS에 대한 보호에 있어서 J8-DT+S2-DT의 보호 효능. 한 무리의 BALB/c 마우스(4-6 주령)를 0일, 21일 및 28일에 J8-DT, J8-DT+SpyCEP, J8-DT+S2-DT, SpyCEP 또는 PBS 제제(formulation)로 피하에 면역화시켰다. 마지막 접종하고 2주일 후에, GAS 5448AP로 피부 감염 경로를 통해서 상기 마우스를 감염시켰다(A 및 B). 감염시키고 6일 후에, 그룹 당 5마리의 마우스를 희생시키고 시료를 수집하여, 피부(A) 및 혈액(B)에서 GAS 바이오-버든을 측정하였다. 데이터는 2개 이상의 독립적인 실험을 나타내며, 결과는 각 그룹에서 4-5 마리의 마우스에 대해서 평균 ± SD로 나타내었다. 백신화된 그룹과 대조군 사이의 유의성을 결정하기 위해서 이원분산분석법을 사용했다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. ns는 p<0.05이다.

도 24: GAS에 대한 보호에 있어서 J8-DT+S2-DT의 보호 효능. 한 무리의 BALB/c 마우스(4-6 주령)를 0일, 21일 및 28일에 J8-DT, J8-DT+SpyCEP, J8-DT+S2-DT, SpyCEP 또는 PBS 제제로 피하에 면역화시켰다. 마지막 접종하고 2주일 후에, GAS NS22.8로 피부 감염 경로를 통해서 상기 마우스를 감염시켰다(A, B 및 C). 감염시키고 3일 및 6일 후에, 그룹 당 5마리의 마우스를 희생시키고, 시료를 수집하여 피부(A), 혈액(B) 및 비장(C)에서 GAS 바이오-버든을 측정하였다. 결과는 각 그룹에서 4-5 마리의 마우스에 대해서 평균 ± SD로 나타내었다. 백신화된 그룹과 대조군 사이의 유의성을 결정하기 위해서 이원분산분석법을 사용했다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. ns는 p<0.05이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 그룹 A 스트렙토코시(streptococci)에 대해 J8 펩티드를 사용하여 성공적인 면역화시키기 위해서는, 호중구 활성이 중요하다는 발견에 적어도 부분적으로 기반한다. 특히, 그룹 A 스트렙토코시의 특정 프로테아제(proteases), 가령 SpyCEP는 호중구 화학주성제인 인터루킨 8을 단백질분해로 불활성화시킴으로써, 호중구에 대해서 유해하거나 또는 억제하는 효과를 발휘한다는 것을 파악하였다. 그러므로, J8 펩티드, 또는 다른 M 단백질 단편, 및 또한 SpyCEP로 면역화시킴으로써, SpyCEP에 대한 면역 반응이 유도되고, 이는 인터루킨 8을 불활성화시키는 SpyCEP의 능력을 적어도 일부 감소시키며, 이에 의해서 호중구 반응을 억제시킨다. 따라서, 이는 J8 면역화의 면역학적 효과를 상승적으로 향상시킬 것이다. 관련된 구현예에서, 항-SpyCEP 항체는 치료적으로 투여되어 J8 펩티드에 대한 향상된 면역 반응을 유도할 수 있다. 또한, SpyCEP의 면역우세 에피토프를 동정하였다. 특정 형태에서, 본 발명은 그룹 A 스트렙토코칼 감염에 사용되는 통상적인 항생제 치료에 내성이 있는 그룹 A 스트렙토코시의 특히 전염성이 강한 균주 또는 분리물에 의한 감염증을 치료 또는 예방하는데 적당할 수 있다. 상기 균주 또는 분리물은 통상적으로 피부에 심각한 감염증을 일으키며(예컨대, 괴사근막염), 일부 경우에 CovR/SCovR/S 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0025] 따라서, 본 발명의 특정 양태는 포유동물에 M 단백질 단편, 그 변이체 또는 유도체와, 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 투여함으로써 포유동물 내에서 면역반응을 유도하는 것에 관한 것이다.

[0026] 본 발명의 목적에 있어서, "*분리된(isolated)*"은 그 자연적 상태로부터 제거된 물질 또는 그밖의 방법으로 인간 조작이 가해진 물질을 의미한다. 분리된 물질은 그 자연 상태에서 통상적으로 수반되는 성분들이 실질적으로 또는 본질적으로 존재하지 않거나 또는 그 자연 상태에서 통상적으로 수반되는 성분들과 함께 인공 상태에 있도록 조작될 수 있다. 분리된 물질은 자연적, 화학합성 또는 재조합 형태일 수 있다.

[0027] "*단백질(protein)*"은 아미노산 폴리머를 의미한다. 상기 아미노산은 천연 또는 비천연 아미노산일 수 있으며, D-아미노산 또는 L-아미노산이 당분야에 잘 알려져 있다.

[0028] 용어 "*단백질(protein)*"은 일반적으로 50개 이하의 아미노산을 갖는 단백질을 기술하는데 사용되는 "*펩티드(peptide)*"와, 일반적으로 50개 초과의 아미노산을 갖는 단백질을 기술하는데 사용되는 "*폴리펩티드(polypeptide)*"를 포함 및 포괄한다.

[0029] "*단편(fragment)*"은 단백질의 분절(segment), 도메인(domain), 부분(portion) 또는 영역(region) (가령, M 단백질, p145, J14 또는 J8 또는 SpyCEP 또는 SpyCEP 펩티드 또는 에피토프)이며, 상기 단백질의 100% 미만의 아미노산 서열로 이루어진다. 상기 단편은 단일 단편일 수 있거나 또는 단독 또는 다른 단편과 함께 반복될 수 있다.

[0030] 일반적으로, 단편들은 전장 단백질 중에 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550 또는 1600개 미만의 아미노산을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나 또는 이루어질 수 있다.

[0031] 적당하게, 상기 단편은 면역원성 단편이다. 본 발명에서, 본 명세서에 사용되는 용어 "*면역원성(immunogenic)*"은, 포유동물에 면역원성 단편을 투여하는 경우, 그룹 A 스트렙(Strep) 또는 그 분자 성분, 가령 M 단백질에 대한 면역 반응을 일으키거나 또는 유도할 수 있는 능력 또는 포텐셜을 나타낸다. 바람직하게, 상기 면역원성 단편에 의해서 유도된 면역 반응은 보호적(protective)이다.

[0032] "*면역반응의 유도(elicit an immune response)*"는 세포성 면역계, 항체 및/또는 천연 면역계를 포함하는 면역계의 하나 이상의 요소들의 생성 또는 활성을 발생 또는 자극하는 것을 의미한다. 적당하게, 상기 면역계의 하나 이상의 요소들은 B 림프구(lymphocytes), 항체 및 호중구를 포함한다.

[0033] 본 명세서에서 일반적으로 사용되는 용어인 "*면역화(immunize)*", "*백신화(vaccinate)*" 및 "*백신(vaccine)*"은 그룹 A 스트렙에 대한 보호 면역 반응을 유도함으로써, 그룹 A 스트렙에 의한 후속 감염을 적어도 일부 예방하거나 또는 최소화시키는 방법 및/또는 조성물을 나타낸다.

[0034] 본 명세서에서 사용된 용어인 "*그룹 A 스트렙토코쿠스(group A Streptococcus)*", "*그룹 A 스트렙토코시(Group A Streptococci)*", "*그룹 A 스트렙토코칼(Group A Streptococcal)*", "*그룹 A 스트렙(Group A Strep)*" 및 약어 "GAS"는 랜스필드 혈청군 A의 스트렙토코칼 박테리아를 의미하며, 이는 *스트렙토코쿠스 피오게네스(Streptococcus pyogenes)* 종의 그람 양성 β-용혈성 박테리아이다. GAS의 중요한 발병 인자는 M 단백질이며,

이는 강한 항포식작용을 하고, 혈청 인자 H에 결합하여 C3-컨버타제를 파괴하고 C3b에 의한 옵소닌화를 방지한다. 이는 또한 전염성 "돌연변이(mutants)" 가령 CovR/S 또는 CovRS 돌연변이(가령 Graham *et al.*, 2002, PNAS USA **99** 13855에 기술됨)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 그룹 A 스트렙토코시에 의해 야기되는 질환 및 상태는 연조직염(cellulitis), 얕은연조직염(erysipelas), 농가진(impetigo), 성홍열(scarlet fever), 인후 감염증(throat infections), 가령 급성 인두염(acute pharyngitis) ("패혈성 인두염(strep throat)"), 세균혈증(bacteremia), 독소충격증후군(toxic shock syndrome), 괴사근막염(necrotizing fasciitis), 급성 류마티스열(acute rheumatic fever) 및 급성 사구체신염(acute glomerulonephritis)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 명세서에 사용된 "*호중구(neutrophils)*" 또는 호중구 과립구(neutrophil granulocytes)는 호염기구(basophils) 및 호산구(eosinophils)와 함께 다형핵 세포 패밀리(polymorphonuclear cell family, PMNs)의 일부를 형성하는 세포이다. 호중구는 골수 줄기세포에서 형성되는 상대적으로 단명하는 포식세포이며, 통상적으로 포유동물에서 백혈구의 40% 내지 75%를 구성한다. 포식성 호중구는 가용성 항생물질(예컨대, 과립 단백질)을 분비할 뿐만 아니라, 호중구 세포외 트랩(neutrophil extracellular traps)을 생성한다. 호중구는 상처 및/또는 급성 염증 부위에 호중구 화학주성을 촉진하는 인터루킨-8(IL-8), C5a, fMLP 및 류코트리엔 B4와 같은 분자에 반응한다.

[0037] 본 명세서에 사용된 "*호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제(agent that facilitates restoring or enhancing neutrophil activity)*"는 호중구 및/또는 호중구들의 하나 이상의 면역학적 활성의 생성, 이동 및/또는 화학주성을 직접 또는 간접적으로 적어도 일부 증가, 증대 또는 회복시키는 분자이다. 일 구현예에서, 상기 제제는 호중구 억제제에 대한 면역반응을 유도한다. 다른 구현예에서, 상기 제제는 상기 호중구 억제제와 결합하고 적어도 일부 불활성화시켰다. 상기 호중구 억제제는 그룹 A 스트렙토코칼 박테리아로부터 유래되거나 또는 기원하는 분자일 수 있다. 일 특정 형태에서, 상기 호중구 억제제는 인터루킨 8을 단백질분해로 절단하는 세린 프로테아제, 또는 그 단편이다. 일 특정 구현예에서, 상기 호중구 억제제는 SpyCEP 또는 그 단편이다. SpyCEP는 인간 병원체 *스트렙토코쿠스 피오게네스*의 표면에서 발현되는 170-kDa 멀티도메인(multidomain) 세린 프로테아제이며, 이는 호중구 화학유인물질인 인터루킨-8의 절단 및 불활성화를 촉매함으로써 감염에서 중요한 역할을 한다. SpyCEP 아미노산 서열의 비제한적인 예는 접근번호(accession number) YP597949.1 및 (*S. pyogenes* MGAS10270) 및 YP596076.1 (*S. pyogenes* MGAS9429)에서 찾을 수 있다. 따라서, 일 특정 구현예에서, 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제는 SpyCEP 또는 그 면역원성 단편이다. 다른 구현예에서, 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제는 SpyCEP와 결합하는 항체 또는 항체 단편이다. SpyCEP 단편의 특정 구현예는 도 13에 나타내었다(서열번호: 1-55). 바람직한 SpyCEP 단편은 서열번호: 18 (NSDNIKENQFEDFDEDWENF)에 개시된 아미노산 서열이거나 또는 이를 포함한다. 이후에 더 상세하게 기술하겠지만, 항-서열번호: 18 펩티드 항혈청은 항-rSpyCEP 항체만큼 효과적으로 IL8의 분해를 차단할 수 있다. 그러므로 서열번호: 18은 기능성 항체를 유도할 수 있는 SpyCEP 상의 우성 에피토프(dominant epitope)이거나 또는 이를 포함한다.

[0038] 본 명세서에 사용된 "*M 단백질 단편(M protein fragment)*"은 면역원성이고 및/또는 항체 또는 항체 단편에 의해서 결합할 수 있는 GAS M 단백질의 단편이다. 통상적으로, 상기 단편은 GAS M 단백질의 C-반복 영역의 아미노산 서열 또는 그 단편이거나, 이를 포함하거나, 또는 이에 포함될 수 있다. 비제한적인 예는 아미노산 서열 LRRDLDASREAKKQVEKALE (서열번호: 56)을 갖는 20량체인 p145를 포함한다. 이러한 관점에서, p145 아미노산 서열의 단편은 J14 또는 J8 펩티드내에 존재할 수 있다.

[0039] 본 명세서에 사용된 "*J14 펩티드*"는 아미노산 서열 KQAEDKVK**ASREAKKQVEKALE**QLEDRVK (서열번호: 57) 또는 그 단편 또는 변이체를 포함할 수 있고, p145 내에 최소 B 및 T 세포 에피토프를 갖는 펩티드는 잠재적으로 유해한 T 세포 오토에피토프(autoepitopes)가 없지만, 옵소닌 B 세포 에피토프를 함유하는 GAS M 단백질 C-영역 펩티드로 확인되었다. J14는 M 단백질 C-영역으로부터 14개의 아미노산을 함유하는 키메라 펩티드(chimeric peptide)이며 (굵게 표시함), 상기 펩티드의 올바른 나선형 접힘 및 입체형태적 구조를 유지하는데 필요한 효모-유래 GCN4 서열에 인접한다(flanked).

[0040] 본 명세서에 사용된 "*J8 펩티드*"는 GAS M 단백질 C-영역 펩티드로부터 적어도 일부 유래하거나 또는 이에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드이다. J8 펩티드는 입체형태적 B-세포 에피토프를 적당하게 포함하며, 잠재적으로 유해한 T-세포 오토에피토프는 갖지 않는다. 바람직한 J8 펩티드 아미노산 서열은 QAEDKVKQ**SREAKKQVEKAL**KQLEDKVQ (서열번호: 58) 또는 그 단편 또는 변이체이며, 여기서 굵게 표시된 잔기는 GAS M 단백질의 잔기 344 내지 355에 해당한다. 본 구현예에서, J8은 상기 J8 펩티드의 올바른 나선형 접힘 및 입체

형태적 구조 유지를 보조하는 GCN4 DNA-결합 단백질 서열을 인접하여 추가로 포함하는 키메라 펩티드이다.

[0041] 본 명세서에 사용된, 단백질 "*변이체(variant)*"는 대조군 아미노산 서열과 한정가능한 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 관계를 공유한다. 상기 대조군 아미노산 서열은 전술한 바와 같이 M 단백질, SpyCEP 또는 이들의 단편의 아미노산 서열일 수 있다. 상기 "*변이체*" 단백질은 결실 또는 상이한 아미노산에 의해서 치환된 하나 또는 복수의 대조군 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부의 아미노산은 면역원성 단편 및/또는 단백질의 활성을 변경하지 않고 치환 또는 결실될 수 있다는 것이 당분야에 잘 알려져 있다(보존적 치환). 바람직하게, 단백질 변이체는 적어도 70% 또는 75%, 바람직하게 적어도 80% 또는 85%, 또는 더 바람직하게 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 대조군 아미노산 서열과 공유한다.

[0042] 특정 일 구현예에서, 변이체 단백질 또는 펩티드는 그 N-말단 및/또는 C-말단에 하나 또는 복수의 리신 잔기를 포함할 수 있다. 상기 복수의 리신 잔기(예컨대, 폴리리신)는 선형의 리신 잔기 서열일 수 있거나 또는 분지쇄형의 리신 잔기 서열일 수 있다. 이러한 부가적인 리신 잔기는 펩티드 가용성 증가를 촉진할 수 있다.

[0043] J8 펩티드 변이체의 비제한적인 예는 하기를 포함한다:

[0044] SREAKKQSREAKKQVEKALKQVEKALC (서열번호:59)

[0045] SREAKKQSREAKKQVEKALKQSREAKC (서열번호:60)

[0046] SREAKKQVEKALKQSREAKKQVEKALC (서열번호:61)

[0047] SREAKKQVEKALDASREAKKQVEKALC (서열번호:62)

[0048] 다른 변이체는 Cooper et al., 1997에 기술된 바와 같이 헵타드(heptads)에 기반할 수 있다.

[0049] 예를 들면, 에피토프가 α-나선형 단백질 구조적 형태 내에 존재하는 것이 알려져 있다면, 모델 펩티드를 합성하여 이러한 형태로 접히도록 할 수 있다. 본 발명자들은 GCN4 류신 지퍼(leucine zipper)의 구조에 기반하여 모델 α-나선형 코일드 코일(coiled coil) 펩티드를 고안하였다(O'Shea *et al.*, 1991). 제1 헵타드는 서열 MKQLEDK (서열번호:63)를 포함하며, 이는 안정한 코일드 코일 헵타드 반복 모티프 (*a-b-c-d-e-f-g*)n에서 발견되는 몇몇 특성들을 포함한다(Cohen & Parry, 1990). 이러한 특성들에는 *a* 및 *d* 위치에서 커다란 비극성 잔기, *e* 및 *g* 위치에서 산/염기 쌍(Glu/Lys)(통상 사슬간 이온결합에 유리함), 및 b, c, f 위치에서 극성기가 포함된다(Lupas *et al.* (1991)의 예측과 일치됨). 상기 GCN4 펩티드는 상기 *a* 위치에서 공통되는 발린을 또한 포함한다. *a* 및 *d* 위치에 V 및 L이 존재하면, 코일드 코일 이량체가 선호된다고 알려져 있다(Harbury *et al.*, 1994). 모델 헵타드 반복(heptad repeat)은 이러한 GCN4 류신 지퍼 펩티드: (VKQLEDK; 서열번호: 64)의 공통된 특성으로부터 유래되며, α-나선형 코일드 코일을 형성할 수 있는 포텐셜을 갖는다. 상기 펩티드는 골격 펩티드(framework peptide)가 된다. 연구 중인 입체형태적 에피토프의 중첩된 단편을 상기 코일드 코일 펩티드 모델내에 끼워넣음으로써 키메라 펩티드를 제조하였다. 올바른 나선형 코일드 코일 형태가 되도록 고안된 아미노산 치환(Cohen & Parry, 1990)은 동일한 잔기가 나선형 모델 펩티드와 에피토프 서열 양쪽에서 발견될 때마다 키메라 펩티드로 포함된다. 하기의 치환이 일반적으로 사용된다: a위치에서 V를 I로 치환; b위치에서 K를 R로 치환; c위치에서 Q를 N으로 치환; d위치에서 L을 A로 치환; e위치에서 E를 Q로 치환; f위치에서 D를 E로 치환; g위치에서 K를 R로 치환. 상기 모든 대체 잔기는 코일드 코일 단백질내 이들 각각의 위치에서 일반적으로 발견된다(Lupas *et al.*, 1991).

[0050] 개별 단백질과 핵산 사이의 서열 관계를 기술하기 위하여 본 명세서에 일반적으로 사용된 용어는 "비교 창(comparison window)", "서열 동일성(sequence identity)", "서열 동일성의 백분율(percentage of sequence identity)" 및 "실질적 동일성(substantial identity)"을 포함한다. 각각의 핵산/단백질은 (1) 핵산/단백질에 의해서 공유되는 완전한 핵산/단백질 서열의 하나 또는 그 이상의 일부분, 및 (2) 핵산/단백질 사이에서 벗어나는 하나 또는 그 이상의 일부분을 포함할 수 있으며, 서열 비교는 서열 유사성(sequence similarity)의 국소 영역을 확인하고 비교하기 위해 "비교 창"에 대한 서열들을 비교함으로써 통상적으로 수행된다. "*비교 창(comparison window)*"은 대조군 서열과 비교되는 일반적으로 6개, 9개 또는 12개의 연속하는 잔기의 개념적인 분절(conceptual segment)을 나타낸다. 상기 비교 창은 개별 서열의 최적 배열에 있어서 대조군 서열과 비교하여 약 20% 이하의 추가 또는 결실(즉, 갭(gaps))을 포함할 수 있다. 비교 창을 배열하기 위한 서열의 최적 배열은 알고리즘의 컴퓨터 구현에 의해서 실시할 수 있거나(Geneworks program by Intelligenetics; GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA, 참조에 의해서 본 명세서에 포함됨) 또는 선택된 다양한 방법들 중 임의의 것에 의해서 생성되는 최선의 배열 및 검사(즉, 비교 창에 대해서 최고 백분율의 상동성을 야기함)에 의해서 실시

할 수 있다. 예를 들면 Altschul *et al*, 1997, Nucl. Acids Res. **25** 3389에 기술된 바와 같은 프로그램의 BLAST 패밀리를 참조할 수 있으며, 이는 참조에 의해서 본 명세서에 포함된다. 서열 분석에 대한 상세한 설명은 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al*. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999)의 유닛 19.3에서 찾을 수 있다.

[0051] 용어 "*서열 동일성*(*sequence identity*)"은 광의로는, 표준 알고리즘을 사용한 적절한 배열면에서, 또한 비교 창에 걸쳐서 동일한 서열 면에서, 정확히 부합되는 뉴클레오티드 또는 아미노산의 수를 포함한다. 그러므로, "*서열 동일성의 백분율*(*percentage of sequence identity*)"은, 비교 창에 걸쳐서 2개의 최적으로 배열된 서열들을 비교하고, 양 서열 모두에서 동일한 핵산 염기(예컨대, A, T, C, G, I)가 나타나는 위치의 수를 결정함으로써 부합되는 위치의 수를 알아내며, 부합된 위치의 수를 비교 창에서 전체 위치의 수(즉, 창 크기)로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 수득함으로써 산출한다. 예를 들면 "*서열 동일성*"은 DNASIS 컴퓨터 프로그램 (Version 2.5 for windows; available from Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA)에 의해서 산출되는 "부합 백분율(match percentage)"을 의미하는 것으로 이해할 수 있다.

[0052] 본 명세서에 사용된 "*유도체*(*derivatives*)"는 당분야에서 알려져 있는 바와 같은 다른 화학적 잔기와 콘쥬게이션(conjugation) 또는 착화(complexing)에 의하거나, 해독후 변형(post-translational modification) (예컨대, 인산화, 아세틸화 등), 글리코실화의 변형(예컨대 글리코실화를 추가, 제거 또는 대체), 지질화(lipidation) 및/또는 추가적인 아미노산 서열의 포함에 의해서 변화되는 단백질, 그 단편 또는 변이체와 같은 분자이다. 특정 일 구현예에서, 추가적인 아미노산 서열은 그 N-말단 및/또는 C-말단에 하나 또는 복수의 리신 잔기를 포함할 수 있다. 복수의 리신 잔기(예컨대, 폴리리신)는 선형의 리신 잔기 서열일 수 있거나 또는 분지쇄형 리신 잔기 서열일 수 있다. 상기 추가의 리신 잔기는 펩티드 가용성의 증가를 촉진할 수 있다.

[0053] Olive *et al*., 2002, Infect & Immun. **70** 2734에 기술된 하나의 특정 J8 펩티드 유도체는 "지질 코어 펩티드(lipid core peptide)"이다. 일 구현예에서, 지질 코어 펩티드는 친지성 앵커에 결합된 분지쇄형 폴리리신 코어의 각 리신의 2개의 아미노기상에서 직접 합성된 복수의 J8 펩티드(예컨대, 4개의 J8 펩티드)를 포함할 수 있다.

[0054] 부가의 아미노산 서열은 융합 단백질을 형성하는 융합 파트너 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 융합 파트너 아미노산 서열(fusion partner amino acid sequences)은 분리된 융합 단백질의 검출 및/또는 정제에 도움을 줄 수 있다. 비제한적인 예로는 금속-결합(예컨대, 폴리히스티딘) 융합 파트너, 말토스 결합 단백질(MBP), 단백질 A, 글루타티온 S-트란스퍼라제(GST), 형광 단백질 서열(예컨대, GFP), 에피토프 태그(tag), 가령 myc, FLAG 및 헤마글루티닌 태그(haemagglutinin tags)를 포함한다.

[0055] 본 발명에 의해서 의도되는 기타 유도체는, 이에 한정되는 것은 아니지만, 곁사슬에의 변형, 펩티드 또는 단백질 합성 중의 비천연 아미노산 및/또는 이들의 유도체의 도입, 및 본 발명의 면역원성 단백질, 단편 및 변이체에 입체형태적 강제를 부과하는 가교제 및 기타 방법의 사용을 포함한다.

[0056] 이와 관련하여, 당분야의 통상의 지식을 가진 사람은 단백질의 화학적 변형과 관련된 더 광범위한 방법론에 있어서 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Eds. Coligan *et al*. (John Wiley & Sons NY 1995-2008)의 제15장을 참고할 수 있다.

[0057] 본 발명의 분리된 면역원성 단백질, 단편 및/또는 유도체는 당분야에 알려져 있는 수단, 이에 한정되는 것은 아니지만, 화학합성, 재조합 DNA 기술 및 펩티드 단편을 제조하기 위한 단백질분해성 절단(proteolytic cleavage)을 포함하는 수단에 의해서 제조할 수 있다.

[0058] 화학합성은 고상(solid phase) 및 용액상(solution phase) 합성을 포함한다. 상기 방법은 당분야에 잘 알려져 있으며, SYNTHETIC VACCINES Ed. Nicholson (Blackwell Scientific Publications)의 제9장 및 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al*, (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)의 제15장에 제공되는 화학합성 기술의 예들을 참고할 수 있다. 이러한 관점에서, 국제공개공보 WO 99/02550 및 국제공개공보 WO 97/45444를 참고할 수 있다.

[0059] 재조합 단백질은 예를 들면 Sambrook *et al*, MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), 특히 섹션 16 및 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al*, (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008), 특히 제10장 및 제16장; 및 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al, (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008), 특히 제1장, 제5장 및 제6장에 기술된 바

와 같은 표준 프로토콜을 사용하여 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에 의해서 편리하게 제조할 수 있다. 통상적으로, 재조합 단백질 제조는 적당한 숙주 세포에서 단백질을 코딩하는 핵산을 발현시키는 것을 포함한다.

[0060] 특정 양태 및 구현예는 M 단백질 단편, 그 변이체 또는 유도체를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제 또는 상기를 포함하는 조성물을 투여함으로써 GAS에 대한 면역 반응을 유도 및/또는 GAS 감염에 대한 면역화에 관한 것이다.

[0061] 본 명세서에 사용된 용어 "*핵산(nucleic acid)*"은 단일-가닥 또는 이중-가닥 DNA 및 RNA를 나타낸다. DNA는 게놈성(genomic) DNA 및 cDNA를 포함한다. RNA는 mRNA, RNA, RNAi, siRNA, cRNA 및 자기촉매(autocatalytic) RNA를 포함한다. 핵산은 또한 DNA-RNA 하이브리드(hybrids)일 수 있다. 핵산은 A, G, C, T 또는 U 염기를 포함하는 뉴클레오티드를 통상적으로 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 그러나, 뉴클레오티드 서열은 변형된 퓨린(예를 들면 이노신, 메틸이노신 및 메틸아데노신) 및 변형된 피리미딘(예를 들면 티오우리딘 및 메틸시토신)과 같은 다른 염기들을 포함할 수도 있다.

[0062] 바람직한 형태에서, M 단백질 단편, 그 변이체 또는 유도체를 코딩하는 하나 이상의 분리된 핵산 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제는 포유동물, 가령 인간에게 투여하기에 적당한 유전자 구조체의 형태이다. 바람직하게, 유전자 구조체는 포유동물, 가령 인간의 DNA 백신화에 적당하다.

[0063] 적당하게, 상기 유전자 구조체는 당분야에 잘 이해되는 바와 같이 플라스미드, 박테리오파아지, 코스미드, 효모(yeast) 또는 박테리아성 인공 염색체의 형태이거나 또는 그 유전자 성분들을 포함한다. 유전자 구조체는 재조합 DNA 기술에 의한 조작을 위해서, 박테리아 또는 다른 숙주 세포 중에 분리된 핵산을 유지 및 증식하기에도 적당할 수 있다.

[0064] 단백질 발현에 있어서, 상기 유전자 구조체는 발현 구조체이다. 적당하게, 상기 발현 구조체는 발현 벡터에서 하나 이상의 부가적인 서열에 구동적으로 연결된(operably linked) 하나 이상의 핵산을 포함한다. "*발현 벡터(expression vector)*"는 자기-복제 염색체외 벡터(self-replicating extra-chromosomal vector), 가령 플라스미드이거나, 또는 숙주 게놈에 통합되는 벡터일 수 있다.

[0065] "*구동적으로 연결된(operably linked)*"은 전사(transcription)를 개시, 조절 또는 기타 제어를 위해서 본 발명의 핵산에 대해서 부가적인 뉴클레오티드 서열(들)이 위치하는 것을 의미한다.

[0066] 조절형 뉴클레오티드 서열(regulatory nucleotide sequences)은 발현이 요구되는 숙주세포 또는 조직에 대해 일반적으로 적당할 것이다. 수많은 형태의 적당한 발현 벡터 및 적당한 조절형 서열이 다양한 숙주 세포에 대해서 당분야에 알려져 있다.

[0067] 통상적으로, 상기 하나 이상의 조절형 뉴클레오티드 서열은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보좀 결합 부위, 전사 개시 및 종결 서열, 해독 개시 및 종결 서열, 및 인헨서(enhancer) 또는 활성자(activator) 서열을 포함할 수 있다. 당분야에 알려져 있는 항시성(constitutive) 또는 유도성(inducible) 프로모터도 본 발명에 포함된다. 상기 발현 구조체는 융합 파트너(통상적으로 발현 벡터에 의해서 제공됨)를 코딩하는 부가적인 뉴클레오티드 서열을 포함함으로써, 본 발명의 재조합 단백질이 전술한 바와 같이 융합 단백질로서 발현된다.

[0068] M 단백질, 그 단편, 변이체 또는 유도체를 코딩하는 분리된 핵산 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제(예컨대, SpyCEP 또는 그 면역원성 단편)는 개별의 발현 구조체에 의해서 투여할 수 있거나 또는 동일한 발현 구조체(예컨대, 다중-시스트론 발현 구조체)내에 존재할 수 있다.

[0069] 적당하게, DNA 백신화는 하나 이상의 플라스미드 DNA 발현 구조체에 의해 달성된다. 플라스미드는 통상적으로 바이러스성 프로모터(가령 SV40, RSV 또는 CMV 프로모터)를 포함한다. 인트론 A는 mRNA 안정성을 향상시킴으로써 단백질 발현을 증가시키기 위해서 포함될 수도 있다. 플라스미드는 다중 클로닝 부위, 강한 폴리아데닐화/전사 종결 신호, 가령 우 성장 호르몬 또는 토끼 베타-글로불린 폴리아데닐화 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 플라스미드는 HIV rev 증가된 엔벨로프 발현(envelope expression)을 갖거나 또는 갖지 않는 Mason-Pfizer 원숭이 바이러스 *cis*-작용 전사인자(MPV-CTE)를 추가로 포함할 수 있다. 발현을 향상시킬 수 있는 부가적인 변형은 인헨서 서열, 합성 인트론, 아데노바이러스 삼부 리더(adenovirus tripartite leader: TPL) 서열의 삽입 및/또는 폴리아데닐화로의 변형 및/또는 전사 종결 서열을 포함한다. DNA 백신 플라스미드의 비제한적인 예로는 Invivogen에서 상업적으로 이용가능한 pVAC이다.

[0070] DNA 백신학을 기술하는 유용한 참고문헌으로는 DNA Vaccines, Methods and Protocols, Second Edition (Volume

127 of Methods in Molecular Medicine series, Humana Press, 2006)이 있다.

[0071] 전술한 바와 같이, 본 발명은 포유동물에서 그룹 A 스트렙-관련 질환, 장애 또는 상태를 예방 또는 치료하는 조성물 및/또는 방법을 제공한다.

[0072] 본 명세서에 사용된 "*치료하는*(*treating*)", "*치료*(*treat*)" 또는 "*치료*(*treatment*)"는 그룹 A 스트렙-관련 질환, 장애 또는 상태가 발병한 이후에 그 증상 또는 병리학적 징후를 적어도 일부 완화, 제거 또는 감소시키는 치료적 개입을 나타낸다. 치료는 피험체에 절대적으로 유익할 필요는 없다. 상기 유익한 효과는 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 알려져 있는 방법 또는 표준을 사용하여 측정할 수 있다.

[0073] 본 명세서에 사용된 "*예방하는*(*preventing*)", "*예방*(*prevent*)" 또는 "*예방*(*prevention*)"은 감염을 예방 및/또는 증상 및 병리적 징후를 감소시키기 위하여 그룹 A 스트렙에 감염 또는 노출 이전 및/또는 그룹 A 스트렙-관련 질환, 장애 또는 상태의 증상 또는 병리학적 징후의 개시 전에 시작된 일련의 활동을 나타낸다. 이러한 예방은 피험체에 절대적으로 유익할 필요는 없다고 이해된다. "*예방적*(*prophylactic*)" 치료는 그룹 A 스트렙-관련 질환, 장애, 또는 상태의 예후를 나타내지 않거나 또는 초기 예후만을 나타내는 피험체에 그룹 A 스트렙-관련 질환, 장애 또는 상태의 증상 또는 병리학적 예후가 진전되는 위험을 감소시킬 목적으로 투여하는 치료이다.

[0074] 본 발명의 문맥에서, "*그룹 A 스트렙-관련 질환, 장애 또는 상태*(*group A-strep-associated disease, disorder or condition*)"는 그룹 A 스트렙에 의한 감염으로부터 기인되는 임상 병리를 의미하며, 연조직염, 얕은연조직염, 농가진, 성홍열, 인후 감염증, 가령 급성 인두염 ("패혈성 인두염"), 세균혈증, 독소충격증후군, 괴사근막염, 급성 류마티스열 및 급성 사구체신염을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 전술한 바와 같이, 본 명세서에 기술된 치료 및/또는 면역화 방법은 포유동물에게 M 단백질 단편, 변이체 또는 유도체 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 개별적으로 또는 조합하여 투여함으로써 포유동물에 의한 면역 반응을 유도하는 것을 포함한다. 대안으로서 전술한 바와 같이, 치료 및/또는 면역화 방법은 M 단백질 단편, 그 변이체 또는 유도체를 코딩하는 하나 이상의 분리된 핵산 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 개별적으로 또는 조합하여 투여함으로써 포유동물에 의한 면역 반응을 유도하는 것을 포함한다.

[0076] 본 명세서에 기술된 바와 같이, 본 발명의 다른 특정 양태 및 구현예는 감염 부위(예컨대, 피부)에서 SpyCEP를 표적으로 함으로써 GAS 감염을 치료적으로 치료하기 위해서 사용되는 항체 또는 항체 단편의 용도에 관한 것이다. 이는 M 단백질 단편 면역화 및/또는 항-M 단백질 단편 항체 또는 항체 단편의 투여와 조합하여 수행될 수 있다.

[0077] 항체 및 항체 단편은 다중클론(polyclonal) 또는 단일클론(monoclonal), 천연(native) 또는 재조합(recombinant)일 수 있다. 항체 단편은 Fc, Fab 또는 F(ab)2 단편을 포함 및/또는 단쇄 Fv 항체(scFvs)를 포함할 수 있다. 이러한 scFvs는 예를 들면 미국특허 제5,091,513호, 유럽특허 제239,400호, 또는 논문 Winter & Milstein, 1991, Nature 349:293에 각각 기술된 방법에 따라서 제조할 수 있다. 항체는 복수의 scFvs를 포함하는 다가(multivalent) 재조합 항체 단편, 가령 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies) 및/또는 테트라바디(tetrabodies), 뿐만 아니라 이량체화-활성화된 데미바디(demibodies)를 포함할 수 있다(예컨대, WO/2007/062466). 예를 들면, 이러한 항체는 Holliger et al, 1993 Proc Natl Acad Sci USA **90** 6444; 또는 Kipriyanov, 2009 Methods Mol Biol **562** 177에 기술된 방법에 따라 제조할 수 있다. 항체 제조, 정제 및 사용에 적용가능한 잘-알려진 프로토콜은 예를 들면 Coligan *et al*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1991-1994)의 제2장 및 Harlow, E. & Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988에서 찾을 수 있다.

[0078] 다중클론 항체를 제조하는 방법은 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 잘 알려져 있다. 사용할 수 있는 예시적인 프로토콜이 예를 들면 Coligan *et al*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, *supra*, 및 Harlow & Lane, 1988, *supra*에 기술되었다. 특정 구현예에서, 항-SpyCEP 다중클론 항체는 그룹 A 스트렙에 노출되거나 또는 감염된 개체로부터 사람의 혈청으로부터 수득하거나 또는 정제할 수 있다. 대안으로서, 다중클론 항체는 말과 같은 생산 종(production species)에서, 정제 또는 재조합 SpyCEP 또는 그 면역원성 단편에 대해서 증식된 후에 연이어 투여 전에 정제될 수 있다.

[0079] 단일클론 항체는 예를 들면 논문 Koehler & Milstein, 1975, Nature **256**, 495에 기술된 표준 방법, 또는 예를 들면 Coligan *et al*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, supra에 기술된 최근의 이의 변형 방법을 사용함으로써 제조할 수 있는 바, 본 발명의 분리된 단백질, 단편, 변이체 또는 유도체 중 하나 이상으로 접종되어진 생산 종으로부터 유래된 불멸화된 비장 또는 다른 항체 생산 세포에 의해서 제조할 수 있다. 따라서, 단일클론 항체

는 본 발명에 따른 사용을 위해서 M 단백질 단편, 변이체 또는 유도체 및/또는 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제(예컨대, SpyCEP)에 대해서 증식될 수 있다. 특정 구현예에서, 단일클론 항체 또는 그 단편은 재조합 형태일 수 있다. 이는 단일클론 항체가 인간이 아닌 포유동물의 비장 세포에 의해서 초기에 생산된 경우, 상기 단일클론 항체 또는 단편을 "*인간화*(*humanizing*)"하기에 특히 유리하다.

[0080] 치료적 항체에 관한 구현예에 있어서, 바람직한 M 단백질 단편은 p145 펩티드일 수 있다.

[0081] SpyCEP의 바람직한 단편은 아미노산 서열 NSDNIKENQFEDFDEDWENF (서열번호: 18)을 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다.

[0082] 특정 양태 및 구현예에서, 전술한 바와 같이 항체 또는 항체 단편을 포함하는, M 단백질 단편, 변이체 또는 유도체 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제는 포유동물에 개별적으로 또는 조합하여 조성물의 형태로 투여할 수 있다.

[0083] 바람직한 형태에서, 상기 조성물은 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0084] "*허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제*(*acceptable carrier, diluent or excipient*)"는 전신투여(systemic administration)에 안전하게 사용할 수 있는 고상 또는 액상 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질(encapsulating substance)을 의미한다. 특정 투여 경로에 따라서, 당분야에 잘 알려져 있는 다양한 담체, 희석제 및 부형제를 사용할 수 있다. 이는 당, 전분, 셀룰로스 및 그 유도체, 맥아, 젤라틴, 탈크, 칼슘 술페이트, 식물성 오일, 합성 오일, 폴리올, 알긴산, 인산염 완충 용액, 유화제, 등장 식염수 및 염, 가령 히드로클로리드, 브로마이드 및 술페이트를 포함하는 무기산염, 가령 아세테이트, 프로피오네이트 및 말로네이트를 포함하는 유기산, 물 및 발열성 물질제거수(pyrogen-free water)를 포함하는 그룹으로부터 선택할 수 있다.

[0085] 허용가능한 담체, 희석제 및 부형제를 서술한 유용한 참고문헌으로는 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)가 있고, 이는 참조에 의해서 본 명세서에 포함된다.

[0086] 바람직하게, 면역 반응을 유도하는 목적을 위하여, 특정 면역 제제가, J8 펩티드, 단편, 변이체 또는 유도체 및 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제, 또는 이들을 코딩하는 하나 이상의 유전자 구조체와 조합하여 사용할 수 있다.

[0087] 용어 "*면역 제제*(*immunological agent*)"는 그 범위 내에서 당분야에 잘 알려져 있는 담체, 전달 제제(delivery agents), 면역자극제(immunostimulants) 및/또는 아쥬반트를 포함한다. 당분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 면역자극제 및 아쥬반트는 조성물의 면역원성 및/또는 효능을 향상시키는 하나 이상의 물질을 나타내거나 또는 포함한다. 적당한 면역자극제 및 아쥬반트의 비제한적인 예로는 스쿠알란 및 스쿠알렌 (또는 식물 기원 또는 동물 기원의 기타 오일); 블록 코폴리머(block copolymers); 계면활성제, 가령 Tween®-80; Quil® A, 미네랄 오일, 가령 드라케올(Drakeol) 또는 마르콜(Marcol), 식물성 오일, 가령 땅콩유; *코리네박테리움*-유래 아쥬반트(*Corynebacterium*-derived adjuvants), 가령 *코리네박테리움 파르붐*(*Corynebacterium parvum*); *프로피오니박테리움*-유래 아쥬반트(*Propionibacterium*-derived adjuvants), 가령 *프로피오니박테리움 액니*(*Propionibacterium acne*); *미코박테리움 보비스*(*Mycobacterium bovis*) (Bacille Calmette 및 Guerin 또는 BCG); *보르데텔라 페르투시스*(*Bordetella pertussis*) 항원; 테타누스 톡소이드(tetanus toxoid); 디프테리아 톡소이드(diphtheria toxoid); 표면활성 물질, 가령 헥사데실아민, 옥타데실아민, 옥타데실 아미노산 에스테르, 리소레시틴, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, *N,N*-디옥타데실-N', N'비스(2-히드록시에틸-프로판디아민), 메톡시헥사데실글리세롤 및 플루로닉 폴리올(pluronic polyols); 폴리아민, 가령 피란, 덱스트란술페이트, 폴리 IC 카르보폴; 펩티드, 가령 무라밀 디펩티드 및 유도체, 디메틸글리신, 투프트신; 오일 유화제(oil emulsions); 및 미네랄 겔, 가령 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 히드록시드 또는 알룸(alum); 인터루킨, 가령 인터루킨 2 및 인터루킨 12; 모노킨(monokines), 가령 인터루킨 1; 종양 괴사 인자; 인터페론, 가령 감마 인터페론; 면역자극 DNA, 가령 CpG DNA, 조합물, 가령 사포닌-알루미늄 히드록시드 또는 퀼(Quil)-A 알루미늄 히드록시드; 리포좀; ISCOM® 및 ISCOMATRIX® 아쥬반트; 미코박테리아(mycobacterial) 세포벽 추출물; 합성 글리코펩티드, 가령 무라밀 디펩티드 또는 기타 유도체; 아브리딘(Avridine); 지질 A 유도체; 덱스트란 술페이트; DEAE-덱스트란 단독 또는 알루미늄 포스페이트와의 조합체; 카르복시폴리메틸렌, 가령 카르보폴(Carbopol)' EMA; 아크릴 코폴리머 유화제, 가령 네오크릴 A640(예컨대, 미국특허 제5,047,238호); 유중수형 유화제, 가령 몬타니드(Montanide) ISA 720; 폴리오바이러스, 박시니아(vaccinia) 또는 동물 폭스바이러스(poxvirus) 단백질; 또는 그 혼합물을 포함한다.

[0088] 면역 제제는 담체, 가령 티로글로불린; 알부민, 가령 인간 혈청 알부민; 파상풍, 디프테리아, 백일해, *슈도모나스*(*Pseudomonas*), 대장균(*E. coli*), *스타필로코쿠스*(*Staphylococcus*) 및 *스트렙토코쿠스*(*Streptococcus*)로부터

의 독소, 톡소이드 또는 상기 독소의 돌연변이 교차반응성 물질(CRM); 폴리아미노산, 가령 폴리(리신:글루탐산); 인플루엔자; 로타바이러스 VP6, 파르보바이러스 VP1 및 VP2; 간염 B 바이러스 코어 단백질; 간염 B 바이러스 재조합 백신 등을 포함할 수 있다. 대안으로서, 담체 단백질 또는 다른 면역원성 단백질의 단편 또는 에피토프를 사용할 수 있다. 예를 들면, 박테리아성 독소, 톡소이드 또는 CRM의 T 세포 에피토프를 사용할 수 있다. 이러한 점에서, 미국특허 제5,785,973호를 참고할 수 있으며, 이는 본 명세서에 참조에 의해서 포함된다.

[0089] 백신 조성물을 제조하는데 적당한 방법을 고려할 수 있다. 예시적인 방법은 예를 들면 New Generation Vaccines (1997, Levine *et al*, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong)에 기술된 것을 포함하며, 이는 본 명세서에 참조에 의해서 포함된다.

[0090] 일부 구현예에서, 조성물 및 백신은 포유 동물에게 J8 펩티드, 단편, 변이체 또는 유도체 및/또는 호중구 활성의 회복 또는 증대를 촉진하는 제제를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있는 약독화되거나 또는 불활성화된 박테리아의 형태로 투여될 수 있다. 약독화 박테리아의 비제한적인 예로는 *살모넬라종*(*Salmonella* species), 예를 들면 *살모넬라 엔테리카*(*Salmonella enterica*) 변이체 티피무리움(Typhimurium) 또는 *살모넬라 티피*(*Salmonella typhi*)를 포함한다. 대안으로서, 기타 장내 병원체, 가령 *시겔라*(*Shigella*)종 또는 대장균을 약독화 형태로 사용할 수 있다. 약독화 *살모넬라* 균주는 방향족 아미노산 생합성 경로에서 유전자를 불활성화시킴으로써(Alderton *et al*, Avian Diseases **35** 435), 방향족 아미노산 생합성 경로에서(가령 미국특허 제5,770,214호에 기술됨) 또는 다른 유전자 가령 *htrA* (가령 미국특허 제5,980,907호에 기술됨)에서 또는 외부 멤브레인 단백질을 코딩하는 유전자, 가령 *ompR* (가령 미국특허 제5,851,519호에 기술됨)에서 2개의 유전자로 돌연변이를 도입함으로써 제조된다.

[0091] 안전한 투여 경로로서 경구, 직장, 비경구, 설하, 구강, 정맥내, 관절내, 근육내, 피부내, 피하, 흡입, 안구내, 복강내, 뇌실내, 국소, 점막 및 경피 투여를 포함하여 사용할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0092] 투여 제형(dosage forms)은 정제, 분산액, 현탁제, 주사제, 액제, 시럽제, 트로키제, 캡슐제, 비강 분무제, 좌약, 에어로졸, 경피 패치 등을 포함한다. 상기 투여 제형은 또한 상기 목적을 위해서 특별히 고안된 주입 또는 이식 제어방출 장치 또는 상기 형태로 추가로 작용하도록 변형된 다른 임플란트 형태를 포함할 수 있다. 제어 방출은 아크릴 수지, 왁스, 고급 지방산 알콜, 폴리락트산 및 폴리글리콜산을 포함하는 소수성 폴리머 및 특정 셀룰로스 유도체, 가령 히드록시프로필메틸 셀룰로스로 코팅함으로써 달성될 수 있다. 또한, 상기 제어 방출은 다른 폴리머 매트릭스, 리포좀 및/또는 마이크로스피어를 사용함으로써 달성될 수 있다.

[0093] 조성물은 가령 본 발명의 하나 이상의 치료제의 미리 정해진 양을 각각 함유하는 캡슐, 사세, 기능성 식품/사료 또는 정제와 같은 개별 단위로서, 분말 또는 과립으로서, 또는 수성액, 비수성액, 수중유형 유제 또는 유중수형 액상 유제내 액제 또는 현탁제로서 제공할 수 있다. 상기 조성물은 제약 방법에 의해서 제조할 수 있지만, 모든 방법은 하나 이상의 필수 성분을 구성하는 담체와 전술한 하나 이상의 제제를 조합하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 상기 조성물은 본 발명의 제제와 액상 담체 또는 미세한 고상 담체 또는 둘다와 균일하고 조밀하게 혼합하고, 그 후 필요하다면 상기 생성물을 목적하는 제형으로 성형함으로써 제조한다.

[0094] 상기 조성물은 투여 제제와 상용성이 있는 방법 및 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 문맥에서 질환자에게 투여되는 투여량은 적당한 기간에 걸쳐서 질환자에게 유익한 반응을 일으키기에 충분해야 한다. 투여될 제제(들)의 양은 연령, 성별, 체중 및 일반적인 건강 상태, 임상의 판단에 따라 달라질 수 있는 요소를 포함하여 치료될 질환자에 따라 다를 수 있다.

[0095] 본 명세서에 일반적으로 사용된 용어 "*질환자*(*patient*)", "*개체*(*individual*)" 및 "*피험체*(*subject*)"는 전술한 조성물 또는 치료를 포유동물이 수용하는 의미로 사용된다. 따라서, 본 명세서에 기술된 방법 및 조성물은 의약적 및/또는 수의학적 용도로 사용할 수 있다. 바람직한 형태에서 상기 포유동물은 인간이다.

[0096] 본 발명을 완전히 이해하고 실제적 효과를 나타내기 위해서 하기 비제한적인 실시예를 참고한다.

[0097] 실시예

[0098] **물질 및 방법**

[0099] **동물:** BALB/c 마우스(암컷, 4-6주령)를 동물자원센터(Animal Resource centre(ARC), Perth, Western Australia)에서 공급받았다. 모든 프로토콜은 오스트레일리아 가이드라인의 National Health and Medical Research Council(NHMRC)에 따라 그리피스 유니버시티의 동물 윤리 위원회(Griffith University's Animal Ethics Committee)에 의해서 승인받았다.

[0100] **박테리아 균주 및 배양 배지:** 다양한 공급원으로부터 수득된 복수의 GAS 분리물을 연구에 사용하였다. 에스. 피오게네스 M1 (*emm*1), 88/30 (*emm* 97), BSA10 (*emm* 124) 및 NS27 (*emm* 91), NS1 (*emm* 100) 및 90/31 (*emm* 57)을 오스트레일리아 다윈의 Menzies School of Health Research로부터 얻었다. 균주 5448AP (*emm*1)를 Mark Walker 교수(University of Queensland, Brisbane, Australia) 연구실에서 얻었다. 모든 균주는 마우스에서 계대배양하고, 이를 연속적으로 증가되는 스트렙토마이신 농도로 재플레이팅(replating)시킴으로써 스트렙토마이신(200 ㎍/ml) 내성으로 만들었다. 유발 접종(challenge inoculum)을 제조하기 위해서, GAS 균주를 1% 네오펩톤(Difco)이 보충된 Todd-Hewitt 배양액(THB; Oxoid, Australia)을 함유하는 액체 배지에서 37℃로 배양하였다. 감염 후에 박테리아 바이오-버든 측정을 위해서, 상기 시료를 2% 아가, 200 ㎍/ml 스트렙토마이신 및 2% 말피를 갖는 전술한 액체 배지로 이루어진 혈액 아가 플레이트상에 플레이트하였다.

[0101] **펩티드 합성 및 백신 제제:** 펩티드 J8을 합성하고, Batzloff et al, 2003에 서술된 바와 같이, Auspep Pty Ltd(오스트레일리아)에 의한 DT에 콘쥬게이트시켰다. 상기 재조합 SpyCEP는 GenScript USA Inc.에 의해서 발현시키고 정제하였다. 모든 펩티드를 -80 ℃에서 동결건조 또는 용액으로 보관하였다. 마우스는 30 ㎍/마우스의 투여량으로 J8-DT 또는 재조합 SpyCEP로 백신접종하였다. 조합된 단백질-펩티드 콘쥬게이트 백신으로 백신접종하기 위해서, 마우스당 30 ㎍의 펩티드 콘쥬게이트 J8-DT 및 30 ㎍의 재조합 SpyCEP를 혼합하고 1:1 (v/v)의 비율로 알루미늄 히드록시드(Alhydrogel, alum)상에 흡착시켰다.

[0102] **표재성 피부 감염 모델의 수립:** GAS에 대한 표재성 피부 감염 모델을 개발하기 위해서, 근교계 암컷 마우스(inbred female) BALB/c 및 비근교계 스위스 마우스(outbred Swiss mice) (4-6주령)를 사용하였다. 마우스는 케타민(100 mg/ml 스톡)/크실라짘-20(20 mg/ml 스톡)/물을 1:1:10의 비율로 복강내(IP) 주입(100 ㎕/10g 마우스)으로 마취하였다. 마우스의 등 허리 부분의 털을 클리퍼 및 면도기를 사용하여 제거하였다. 상기 피부를 에탄올 소독면으로 깨끗히 닦아내고, 금속 파일을 사용하여 기계적으로 난절하였다. 피부에 찰과상(abrasion)을 입히고, 상기 마우스를 GAS로 감염시켰다. GAS의 알려진 CFU 카운트를 함유하는 접종물(20 ㎕)을 난절한 피부상에 국소 도포하였다. 접종물이 상기 피부에 완전히 흡수되면, 상처난 부위에 일시적으로 커버를 덮고 마우스는 개별 케이지에 수용하였다. 외관상 감염된 무리 뿐만 아니라, 한무리의 기낭 감염된 마우스를 양성 대조군으로 사용하였다. 상기 마우스는 Raeder and Boyle (1993)의 방법에 따라 감염시켰다. 마우스는 승인된 스코어 시트에 따라 감염된 병변 뿐만 아니라 질병 징후에 대해서 매일 모니터하였다. 상기 상처난 부위는 감염 상태를 평가하기 위해서 긴밀하게 모니터하였다.

[0103] **조직검사 섹션:** 감염후 3일째에, GAS 피부 감염을 갖거나 또는 갖지 않는 난절된 마우스(그룹 당 n=3)를 희생시켰다. 상기 감염된 부위로부터 조직의 피부 시료를 수집하고, 완충된 포르말린으로 고정하고, Haematoxylin & eosin (H&E) 염색을 위해서 파라핀에 담갔다. 그 후 5 ㎛ 두께의 조직 섹션을 슬라이스하고, 그람-양성 생물체를 가시화하기 위해서 H & E 염색 뿐만 아니라 김자(Giemsa) 염색 및 그람(Gram) 염색으로 염색하였다. 상기 섹션을 스캐닝하고, ImageScope 소프트웨어를 사용하여 고배율로 해독하였다. 면역조직화학을 위해서, 시료를 OCT에서 동결하였다. 호중구 및 마크로파아지 고갈 이후에 다양한 시점에서 조직검사(histology)를 또한 실시하였다. 양성 세포를 스캐닝된 슬라이드의 5개 영역에서 계수하고, ImageJ를 사용하여 10,000 um^2 당 양성 세포의 평균 수로 표시하였다(National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

[0104] **마우스 면역화 및 유발 프로토콜:** BALB/c 마우스를 30 ㎍의 J8-DT, 30 ㎍의 rSpyCEP, 또는 30 ㎍의 J8-DT 및 30 ㎍의 rSpyCEP를 함유하는 제제 60 ㎍으로 0일에 꼬리 기저(tail base)에 피하로 면역화시켰다. PBS에서 모든 항원 제제를 아쥬반트로서 알히드로겔(Alhydrogel) 중에 제제화시켰다. 마우스에게 21일 및 28일에 추가접종하였다. 대조군 마우스는 아쥬반트만 접종하였다. 최종 면역화하고 2주일 후에, 마우스를 피부 감염 경로를 사용하여 GAS로 유발시켰다. 감염후에 상기 마우스를 긴밀하게 모니터하고, 질병 징후를 나타내는 마우스(GU 동물윤리 위원회에 의해서 승인된 스코어 시트에 근거함)를 희생시켰다.

[0105] **시료 수집 및 CFU 측정:** 감염 후 정해진 시점에서(3일, 6일 및 9일), 각 그룹에서 5마리의 마우스를 추려내었다. 혈액 시료를 심장천자를 통해서 수집하고, 감염된 마우스의 등 허리에서 감염된 병변으로부터 피부 조직을 절개하였다. 상기 피부 시료를 칭량하고 식염수에서 균질화하였다. 그 후 감염된 병변에서 박테리아 로드를 측정하기 위해서 스트렙토마이신-혈액-아가 플레이트상에 적당한 희석물을 반복하여 플레이트하였다. 혈액 시료를 PBS에서 희석하고, 혈액내 박테리아 로드를 측정하기 위해서 스트렙토마이신-혈액-아가 플레이트상에 적당한 희석물을 반복하여 플레이트하였다.

[0106] **세포 고갈 연구:** 기존에 보고된 바와 같이 카라기난(CGN)의 IP 투여를 통해서 마크로파아지가 고갈되었다(Goldmann et al, 2004). 피부 마크로파아지의 고갈을 위해서, CGN을 피하로 매 72시간 마다 주사하여, 피부 잔

류 마크로파아지가 >95% 고갈되었다. CGN 주입을 위한 투여량 및 시간 과정은 FITC-콘쥬게이트된 항-마우스 Mac-1 및 APC 콘쥬게이트된 F4/80으로 표지한 후에 비장 세포의 유세포측정 분석을 사용하여 최적화하였다(BD Biosciences, New Jersey, USA). 호중구를 고갈시키기 위해서, 항-Ly6G mAb (클론 1A8)를 기존에 보고된 바와 같이 사용하였다(Eyles, et al, 2008). 호중구의 고갈은 CD11b-perCp-cy5.5 및 Gr-1-APC mAbs를 사용하여 혈액, 골수 및 비장 세포의 유세포 분석에 의해서 확인하였다.

[0107] ***인 비트로* 케모킨 분해의 분석:** IL-8, MIP-2 및 KC 분해를 실시하고, 기존에 보고된 바와 같이 Quantikine kit(R & D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하는 ELISA에 의해서 정량화하였다(Hidalgo-Grass et al, 2004). 상기 방법을 사용하여, GAS 배양 상등액(S/N)으로 배양한 후에 분해되지 않은 케모킨(IL-8, MIP-2 및 KC)의 양을 측정하였다. 간단하게, 배양액 S/N을 수집하기 위해서, 다양한 GAS 균주를 중간-로그 상(OD_{600} 0.5)으로 성장시키고, 새로운 THB로 재접종하고, 37 ℃에서 밤새도록 성장시켰다. 그 후 각 균주로부터 무세포 GAS 배양액 S/N을 재조합 케모킨(IL-8, MIP-2 및 KC)의 알려진 농도로 37 ℃에서 배양하였다. 2h, 4h, 8h 또는 24h에서 시료를 수집하고, 전술한 바와 같이 분해되지 않은 케모킨의 양을 ELISA(R & D Systems)에 의해서 측정하였다.

[0108] **호중구 분리 및 트랜스웰 이동 분석(transwell migration assays):** 호중구를 호중구 분리 키트를 사용하여 마우스의 골수로부터 분리하였다(Miltenyi Biotech, Germany). 호중구(100 ㎕ 배지내 $2.5x10^5$)를 트랜스웰 시스템의 상부 챔버(Costar 24-well transwell, Corning NY)에 첨가하고, 그 후 배지 단독 또는 온전한 또는 분해된 케모킨을 함유하는 하부 챔버에 넣었다. 양성 대조군으로서, 각 재조합 케모킨의 알려진 농도를 함유하는 웰을 또한 사용하였다. 37 ℃에서 2시간 배양한 후에, 상부 및 하부 챔버들에서 세포를 수집하고, 이동된 살아있는 호중구의 수를 트립판 블루 배제법(trypan blue exclusion)을 사용하여 측정하였다. 이동하는 호중구의 백분율은 이동하는 호중구의 수를 전체 존재하는 호중구의 수로 나눔으로써 산출하였다.

[0109] **SpyCEP 중화 분석(neutralization assays):** rSpyCEP 항혈청의 SpyCEP 중화 능력을 평가하기 위해서, rSpyCEP에 대한 과다-면역 혈청을 BALB/C 마우스에서 증식시켰다. 90/31, BSA10 및 5448AP를 포함하는 GAS 균주의 패널을 정지상(stationary phase)까지 성장시켰다. 무세포 GAS 배양 상등액을 재조합 케모킨 및 50% 정상 또는 항-SpyCEP 혈청과 함께 37 ℃에서 16시간 동안 공동 배양하였다. 분해되지 않은 IL-8을 Quantikine ELISA 키트(R & D Systems)를 사용하여 측정하였다.

[0110] **SpyCEP 에피토프 맵핑(Epitope mapping):** SpyCEP의 N-말단 영역으로부터 553개의 아미노산을 포함하는 펩티드 어레이(peptide array)를 GenScript에서 합성하였다(Genscript USA Inc). 전체 55개의 펩티드에서(서열번호: 1-55), 10개씩 중첩된 각 20량체를 멤브레인상에 블로팅하였다. ELISA 프로토콜에 따라서, 상기 멤브레인을 rSpyCEP/Alum 제제의 30 ㎍/투여량으로 3번 면역화시킨 마우스로부터의 항혈청으로 탐침하였다. SpyCEP 항혈청으로 가장 강하게 인식되는 6개의 펩티드가 추가 연구를 위해 수득되었다(서열번호: 15, 18, 19, 24, 30 및 54).

[0111] **펩티드 합성 및 백신 제제:** 에피토프 맵핑(상기에 토의됨)에 의해 동정된 6개의 펩티드(각 20-량체)를 GenScript에서 유리 펩티드로서 또는 C-말단에서 추가의 시스테인 잔기를 갖도록 합성하였다. C-말단을 갖는 펩티드는 그 후에 DT에 콘쥬게이트시키고, 마우스에서 *인 비보* 면역원성 연구를 위해서 사용하였다. 모든 펩티드를 동결건조하거나 또는 -20 ℃에서 용액으로 보관하였다. 마우스는 30 ㎍/마우스의 투여량에서 rSpyCEP 또는 SpyCEP 펩티드 (S1-S6)-DT 콘쥬게이트로 3번 백신접종하였다.

[0112] **개별 펩티드의 면역원성의 측정:** 혈청 시료를 각 접종 이전 및 이후에 수집하여 면역 펩티드 뿐만 아니라 모(parent) 단백질(rSpyCEP)에 대한 항체 역가를 측정하였다. 펩티드 특이적 IgG 역가를 측정하기 위해서, 6개의 펩티드(S1-S6) 각각의 5 ㎍/ml로 플레이트를 코팅하였다. 각 펩티드에 대해서 증가된 항혈청의 2배 일련의 희석물을 사용하여 ELISA를 실시하였다. rSpyCEP에 의한 SpyCEP 펩티드 인식을 측정하기 위하여, rSpyCEP 항혈청의 2배 일련의 희석물을 사용하였다. 마지막으로, 펩티드 항-혈청의 모 펩티드 인식을 측정하기 위하여, 상기 플레이트를 rSpyCEP로 코팅하고, 펩티드 항혈청을 사용하여 rSpyCEP의 결합/인식을 평가하였다.

[0113] ***인 비트로* IL-8 보호에 대한 분석:** IL-8 분해를 억제하는데 펩티드 항혈청의 능력을 평가하기 위해서, *인 비트로* IL-8 보호 분석을 실시하였다. GAS 배양 상등액(S/N)은 기지 농도의 재조합 IL-8 및 펩티드 항혈청(S1-S6)의 1:2 희석물과 함께 배양하였다. 상기 반응 혼합물내 분해되지 않은 IL-8의 양을 기존에 보고된 바와 같이 Quantikine kit(R & D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하는 ELISA에 의해 정량화시켰다(Hidalgo-Grass et al, 2004). 요약하면, 배양액 S/N을 수집하기 위해서, 다양한 GAS 균주를 미드-로그 상(OD_{600} 0.5)으로 성장

시키고, 신선한 THB에 재접종하고, 37 ℃에서 밤새도록 성장시켰다. 그 후 각각의 균주로부터 무세포 GAS 배양액 S/N을 기지 농도의 재조합 케모킨(IL-8)과, 각 펩티드로부터의 항혈청을 갖거나 또는 갖지 않는 것과 함께 37 ℃에서 배양하였다. 시료를 배양하고 16시간 후에 수집하고 분해되지 않은 케모킨의 양은 전술한 바와 같이 ELISA(R & D Systems)에 의해서 측정하였다.

[0114] **펩티드 억제 ELISA:** 펩티드 억제 ELISA 분석을 위해서, 4 ℃에서 밤새도록 pH 9.6의 75 mM 소듐 카르보네이트 완충액 중 5 ㎍/ml의 최종 농도에서 펩티드 S1 내지 S6 또는 recSpyCEP의 100 ㎕로 마이크로타이터 플레이트(microtiter plates)를 코팅하였다. 플레이트를 완충액(0.05 % Tween 20을 갖는 PBS, pH 7.2)으로 세척하고, 37 ℃에서 90분 동안 5% 탈지유가 보충된 완충액(블로킹 완충액(blocking buffer))으로 블로킹하였다. 항-펩티드 또는 recSpyCEP 혈청을 37 ℃에서 30분 동안 자가-펩티드 또는 recSpyCEP 각각의 5 또는 2.5 ㎍/ml와 사전-배양하였다. 그 후 시험 항혈청을 블로킹된 플레이트에 첨가하고, 37 ℃에서 90분 동안 배양하였다. 상기 플레이트를 4번 세척하고, HRP-콘쥬게이트된 염소의 항-마우스-IgG(Biorad, Australia)를 첨가하고, 37 ℃에서 또 다른 90분 동안 배양하였다. 추가의 세척 이후에, 상기 플레이트를 전술한 바와 같이 발색시키고 OD450을 측정하였다.

[0115] **유세포측정 분석:** GAS 세포 표면에 대한 recSpyCEP 또는 SpyCEP 에피토프 항체의 결합을 유세포측정에 의해서 분석하였다. 상기 박테리아를 밤새도록 1% 네오펩톤을 갖는 THB에서 성장시키고, PBS로 세척하였다. 그 후, 박테리아($1x10^7$ 콜로니 형성 유닛; cfu)는 비-특이적 결합 부위를 블로킹하기 위해서 RT에서 15분 동안 Fc 블로커(blocker) 100 ㎕와 사전-배양하였다. 이어서, 펩티드 항혈청을 1:20으로 희석하여 첨가하였다. RT에서 1시간 동안 배양한 후에, 상기 박테리아를 PBS로 2번 세척하고 FITC-콘쥬게이트된 항-마우스 IgG(2% BSA를 갖는 PBS에서 1/50으로 희석)와 배양하였다. 마지막으로, 상기 박테리아를 세척하고 RT에서 15분 동안 1% 포름알데히드(PBS 중)에서 배양하였다. 상기 시료를 CyAn ADP 분석기(Beckman Coulter, Inc.)에서 분석하였다. 상기 FITC-콘쥬게이트된 항-마우스 IgG를 각 분석된 균주에 대해서 음성 대조군으로 개별적으로 첨가하고, 또한 비-특이적 마우스 IgG를 대조군으로 포함시켰다.

[0116] **백신 효능을 평가하기 위한 감염 모델(challenge model):** 근교배 암컷 BALB/c 마우스(4-6주령)는 케타민(100 mg/ml 스톡)/크실라질-20 (20 mg/ml 스톡)/물을 1:1:10 비율로 복강내(IP) 주입(100 ㎕/10g 마우스)으로 마취시켰다. 마우스의 목덜미 털을 클리퍼 및 면도기를 사용하여 제거하였다. 피부의 표재성 난절 이후에, $1x10^6$ CFU 카운트를 함유하는 GAS의 접종물(20 ㎕)을 국소적으로 도포하였다. 상기 접종물이 피부에 완전하게 흡수된 후, 상처난 부위에 임시적 커버를 도포하고, 마우스를 개별 케이지 내에 수용하였다. 마우스를 감염시키기 24시간 전에 스트렙토마이신(200 ㎍/ml) 물을 먹이고 연구 과정을 통해서 그대로 유지하였다. 그리피스 유니버시티 IBC에 의해서 승인된 스코어 시트에 따라서 감염된 병변 뿐만 아니라 질병의 징후에 대해서 마우스를 매일 모니터하였다. 상기 상처난 부위는 감염의 상태를 평가하기 위해서 긴밀하게 모니터하였다.

[0117] **기관 수집 및 CFU 측정:** 감염후 다양한 시점에서(3일, 6일 및 9일), 각 그룹으로부터 정해진 수의 마우스를 희생시켰다. 혈액 시료는 심장천자를 통해서 수집하고, 비장을 제거하고 목덜미에서 감염된 병변으로부터의 피부 생검 시료를 수득하였다. 상기 피부 및 비장 시료를 균질화하고, 그 후 적당한 희석액을 스트렙토마이신-혈액-아가 플레이트상에 반복하여 플레이트하였다. 감염 후에 마우스를 긴밀하게 모니터하고 질병의 징후를 보이는 마우스(스코어 시트에 근거함)를 희생시켰다.

[0118] **결과**

[0119] 도 1에서, J8-DT/Alum 백신화의 보호 효능을 상이한 GAS 균주 M1(인후 분리물) 및 피부 분리물 88/30 및 BSA10을 비교함으로써 도시하였다. J8-DT/Alum 백신화는 M1과 비교하여 피부 분리물들 모두에 대해서 덜 효과적이었다. 도 2에 도시된 바와 같이, J8 면역화의 효과는 GAS 감염된 마우스의 피부에서 호중구(PMN) 존재와 연관성이 있다.

[0120] 따라서, J8-DT/Alum에 대한 반응시에 호중구 고갈의 효과를 측정하기 위해서 실험을 실시하였으며, 결과를 도 3에 도시하였다. 호중구 고갈은 J8-DT/Alum 백신접종의 효능에 유해한 효과를 미쳤다.

[0121] 도 1 내지 도 3에서 데이터는 호중구가 GAS 감염에 대한 J8 면역화의 효능을 결정하는데 역할을 한다고 암시하였다. 도 4는 CovR/S 돌연변이를 갖는 GAS 분리물 가령 5448AP (M1T1 분리물)에서 상승조절(upregulated) 발현되는 박테리아 유전자의 개요를 나타낸다. 도 5에 도시된 바와 같이, GAS 분리물 5448AP에 대한 J8-DT/Alum 보호의 효능이 상대적으로 떨어진다. 호중구가 J8 펩티드에 대한 면역 반응을 보조하는 것으로 보인다는 점을 고려할 때, GAS 분리물 5448AP에서 높게 발현되는 후보 박테리아 유전자는 SpyCEP로서, 이는 호중구 화학유인물질

인터루킨 8을 분해 및 불활성화하는 70 kD 세린 프로테아제이다(도 4 참조). 도 6은 5448AP가 특히 강하게 IL-8 분해 특성을 나타내는 실험의 결과를 나타내었다. 상기 5448AP 분리물은 또한 IL-8의 쥐과 기능성 상동체: CXCL1/MIP-2(도 7) 및 CXCL1/KC(도 8)에 대한 강한 분해 활성을 나타내었다. 기능적으로, 상기 분해는 도 9에 개시된 바와 같이 억제 호중구 화학주성과 상관관계가 있다.

[0122] 도 1 내지 도 9의 데이터에서는 세린 프로테아제인 SpyCEP가 단백질분해적 분해를 통해서 IL-8을 네가티브하게 조절하는 CovR/SCovR/S 돌연변이 GAS 박테리아에 의해서 높게 발현되고, 이를 통해서 호중구 화학주성을 저해 또는 억제하는 것을 나타내었다. 그러므로, SpyCEP을 표적으로 하는 것이 J8 펩티드에 대한 면역반응을 향상, 회복 또는 증대시키는지의 여부를 결정하기 위해서 실험을 수행하였다. 도 10에 개시된 결과는 J8-DT-재조합 SpyCEP/Alum에 의한 면역화는 J8-DT펩티드-콘쥬게이트 또는 재조합 SpyCEP 단독에 의한 면역화보다는 훨씬 더 효과적이며, J8 펩티드와 재조합 SpyCEP의 조합물은 5448AP GAS 박테리아에 의한 감염을 보호하기 위해 상승작용한다는 것을 보여준다. 상기에 추가로, 도 11은 J8-DT-rSpyCEP에 의한 면역화가 J8-DT 또는 SpyCEP 단독으로 사용하는 것 보다 더 강한 IgG 항체 반응을 나타내는 것을 보여준다. 상기 데이터는 SpyCEP에 대한 항체는 GAS 감염 부위(피부)에 직접 투여하여 상기 감염을 치료할 수 있는 치료제로서 유용할 수 있다는 가능성을 높여준다. 도 12에 도시된 바와 같이, 항-SpyCEP 항체(재조합 SpyCEP로 면역화된 마우스로부터의 항혈청 형태)는 SpyCEP의 IL-8 분해 활성을 억제하였다.

[0123] 본 발명자들은 recSpyCEP 항혈청에 의해서 무엇이 인식되는 지를 측정하기 위해서 SpyCEP의 잔기 35-587(도 13에서 서열번호: 1-55)로부터 일련의 중첩된 20량체 펩티드(니트로셀룰로스 멤브레인상에 펩티드 배열)를 만들었다. 도 14의 데이터로부터, 본 발명자들은 도 15에 도시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 6개의 추정의 펩티드 에피토프를 동정하였다(S1-6; 서열번호: 15, 18, 19, 24, 30 및 54). 그 후 본 발명자들은 개개의 합성 펩티드를 만들고 DT에 각각 콘쥬게이트시켰다. 마우스를 면역화시켰으며, 비록 일부는 다른 것보다 더 강하지만, 항혈청이 recSpyCEP를 인식할 수 있다는 점을 나타내었다(도 16). 그 후 본 발명자들은 IL-8 보호 분석을 실시하였으며, 항-펩티드 항체는 다양한 정도로 SpyCEP에 의한 IL-8의 분해를 차단할 수 있다는 점을 입증하였지만, 하나의 펩티드(S2; 서열번호: 18) 항혈청은 항-recSpyCEP 만큼 효과적으로 IL8의 분해를 블로킹할 수 있었다(도 17). 그러므로, 본 발명자들은 기능성 항체를 유도할 수 있는 SpyCEP(서열번호: 18)상에서 우세한 에피토프를 확인하였다.

[0124] 도 18-20에 도시된 데이터는 하기에 나타낸 p145, J8 및 J8 펩티드 변이체의 면역원성을 시험하였다:

[0125] • p145 LRRDLDASREAKKQVEKALE (서열번호:56)

[0126] • J8 QAEDKVKQSREAKKQVEKALKQLEDKVQ (서열번호:58)

[0127] • J8i V1 SREAKKQSREAKKQVEKALKQVEKALC (서열번호:59)

[0128] • J8i V2 SREAKKQSREAKKQVEKALKQSREAKC (서열번호:60)

[0129] • J8i V3 SREAKKQVEKALKQSREAKKQVEKALC (서열번호:61)

[0130] • J8i V4 SREAKKQVEKALDASREAKKQVEKALC (서열번호: 62).

[0131] 28일 면역화 프로토콜 이후에 과다면역 혈청을 4-6주령 암컷 Balb/c 마우스에서 제조하였다. PBS 및 Alum내에 DT 콘쥬게이트된 펩티드(J8, p145, J8iV1, J8iV2, J8iV3 또는 J8iV4)의 30 ㎍으로 피하로 마우스를 면역화시켰다. 면역화는 0일, 21일, 28일에 실시하였다. 혈액/혈청을 수집하기 위한 하악하 채혈을 35일, 42일 및 49일에 실시하였다.

[0132] 본 발명자들은 마우스와 사람 양쪽에서, J8-DT에 의한 백신화에 의해서 유도되는 항체는 단지 불량한 정도로 천연 서열, p145를 인식한다는 사실을 이전에 관찰한 바 있다. 그러므로, 본 발명자들은 12량체 J8 삽입 서열에 기반하는 4개의 변이체 펩티드를 고안하고, 상기 펩티드의 알파-나선형 구조를 보존하기 위해서 소수성 및 친수성 아미노산의 헵타드 주기성(heptad periodicity)을 유지하도록 고안하였다. 이들은 상기에 열거된 J8iV1, J8iV2, J8iV3 및 J8iV4 펩티드이다. 도 18(오른쪽 패널)은 J8-DT 백신화에 의해 유도된 p145-특이적 항체의 역가가 매우 낮은 것을 보여준다(평균 약 2000, 몇몇의 마우스는 200 이하임). 대조적으로, J8-특이적 항체의 역가는 J8-DT 백신화 후에 약 600,000이다. J8에 대한 높은 역가는 대부분의 항체가 J8의 아미노-말단 및 카르복실-말단 부위에서 비-스트렙토코칼 인접한 서열들을 인식하는 것을 의미하지만, 이는 아직 공식적으로 입증된

것은 아니다.

[0133] 도 19는 J8iV1, J8iV2, J8iV3 및 J8iV4 모두는 그들 자체에 높은 역가의 항체를 유도하는 것을 보여준다(약 100,000). 중요하게, 모두는 p145에 대한 높은 역가(>10,000)를 유도하며 J8iV3-DT는 약 30,000의 역가를 유도하였다(도 20의 오른쪽 패널). 새로운 펩티드의 이들 자체에 대한 역가는 p145에 대한 역가보다 더 높으며, 이는 p145가 신규 펩티드에서 발견되지 않는 부가의 아미노산을 함유하며, 이들 중 일부는 신규 변이체에 대한 항혈청에 의해서 인식되는 에피토프를 차폐할 수 있기 때문이다. 그러나 변이체 J8 펩티드의 이들 자체에 대한 높은 역가(약 100,000)는 그것이 스트렙토코칼 서열로부터 배타적으로 유래되기 때문에 중요하다. 그러므로, 신규 변이체는 스트렙 서열을 인식하는 모든 항체에 대해 100,000의 역가를 유도하며, 반면에 J8은 약 2,000의 스트렙토코칼 역가를 유도하였다.

[0134] S2의 면역우세(immunodominance)는 펩티드 억제 분석을 사용하여 추가로 분석하였다. recSpyCEP 및 개별의 에피토프에 대한 항혈청을 면역 항원들 각각과 함께 사전-배양하였으며, 그 후 항원에 대한 이들의 결합을 분석하였다. 고정된 자가-펩티드에 대한 에피토프 항혈청의 결합은 자가-펩티드와의 사전-배양 후에 크게 감소하였다(40-80% 억제)(도 21A). recSpyCEP와 에피토프 항혈청을 사전-배양함으로써, 고정된 자가-펩티드에 의한 인식의 억제를 유도하였으며, S2-DT에 대한 항혈청이 recSpyCEP와 배양될 때(도 21B) 가장 높은 억제가 관찰되었고, 이는 S2-DT 면역화에 의해서 인식된 에피토프가 recSpyCEP의 표면에서 발현되는 것을 나타낸다. 또한, SpyCEP에 대한 항혈청을 6개의 펩티드들 각각과 배양할 때, 본 발명자들은 펩티드 S2(서열번호: 18)가 결합을 가장 크게 억제하였으며, 이는 recSpyCEP에 의해 야기되는 억제와 비교할 만한 정도였다(도 21C). 상기 데이터는 ELISA에 있어서, SpyCEP에 대한 면역 반응이 S2의 항체 인식에 의해서 주로 결정되며(서열번호: 18) 및 S2(서열번호: 18)는 전체 recSpyCEP에 대한 유사한 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 나타낸다. 그러므로 S2(서열번호: 18)는 SpyCEP의 면역우세 에피토프이다.

[0135] 이 후, 본 발명자들은 SpyCEP의 결합 효능 및 다양한 GAS 균주에 대한 에피토프 항혈청을 시험하였다. SpyCEP가 GAS의 표면에 발현되고, 또한 발산된다. 천연 항원의 인식을 측정하기 위해서, 다양한 GAS 균주에 대한 상이한 에피토프 특이적 항체의 결합을 FACS 분석을 사용하여 비교하였다. GAS 균주 5448을 그 동물 계대배양된 유도체 5448AP와 함께 사용하였다(높은 수준의 SpyCEP를 발현하는 것으로 알려져 있는 CovR/S 돌연변이). 유사하게, 야생형 BSA10을 그 동물 계대배양된 유도체 pBSA10(또한 CovR/S 돌연변이)과 병행하여 사용하였다. 대조군 균주 2031(emm1) 및 오스트레일리아의 노던 테리토리(Northern Territory of Australia) 피부 분리물, 88/30을 또한 포함시켰다. 본 발명자들의 데이터는 모든 경우에서 S2-DT 면역화에 의해서 유도되는 항체와 비교될 정도로 recSpyCEP에 의한 백신화에 의해서 유도되는 항체의 GAS 분리물이 결합을 나타낸다는 것을 보여준다. 다른 에피토프에 대한 항체는 GAS에 대한 결합면에서 다양한 수준을 보여준다(도 22A, 22B 및 22C). 또한, S2 뿐만아니라 SpyCEP의 표면 발현은 평균 형광 강도(mean fluorescence intensity: MFI) 데이터(데이터는 도시되지 않음)에 의해서 측정된 바와 같이 시험된 모든 균주에서 가장 높게 발견되었다. 상기 데이터는 천연 SpyCEP상에서 S2 에피토프의 면역우세를 보여주는 것이다. 그러나, 상기 데이터는 S2 에피토프에 대한 항체는 SpyCEP의 CXC 케모킨 프로테아제를 기능적으로 손상하는 사실을 뒷받침하는 것은 아니다.

[0136] 이어서, 본 발명자들은 S2-DT가 J8-DT 백신의 효과를 증진하는지 여부를 알아보았다. 본 발명자들은 기존에 J8-DT와 조합된 recSpyCEP가 GAS의 CovR/S 돌연변이 균주에 의한 침습적 감염에 대해서 J8-DT 단독 또는 recSpyCEP 단독보다 현저하게 우수한 보호를 야기한다는 것을 보고한 바 있다(원고 제출). J8-DT 및 recSpyCEP 또는 S2-DT를 중량 기준 1:1의 비율로 혼합하고, 본 발명자들이 최근에 개발한 피부 감염 모델에서 시험하였다(원고 제출). 대조군 마우스를 개별의 항원 또는 PBS에 의해서 백신화시켰다. 백신화 이후 마우스를 5448AP GAS에 의해서 감염시켰다. J8-DT+S2-DT에 의한 백신화는 5448AP-감염된 마우스의 혈중에서 뿐만 아니라 피부에서도 박테리아 바이오-버든을 상당히 감소시켰다(도 23A 및 도 23B). 또한 J8-DT+S2-DT 백신화에 의해서 제공되는 보호 수준은 J8-DT+SpyCEP 백신화에 의해 제공되는 보호 수준에 필적하는 것으로 나타났다. 상기 사실을 확인하기 위해서, 상기 감염 실험을 다른 CovR/S 돌연변이 균주 NS88.2로 반복하였다(도 24A 및 24B). 본 발명에서 본 발명자들은 J8-DT+SpyCEP 또는 J8-DT+S2-DT에 의한 백신화는 J8-DT 단독과 비교하여 현저하게 향상된 보호 효과를 나타내는 것을 발견하였다. J8-DT 또는 SpyCEP 단독에 의한 백신화는 PBS 대조군과 비교하여 보호능을 제공하지 않았다.

[0137] **결론**

[0138] 호중구 활성은 J8 펩티드에 의한 백신화 효능에서 중요한 요인인 것으로 나타났다. SpyCEP는 전염성 GAS 박테리아 가령 CovR/S 돌연변이를 갖는 것에 의해서 높게 발현되는 IL-8 분해 프로테아제이다. J8 펩티드 및 rSpyCEP

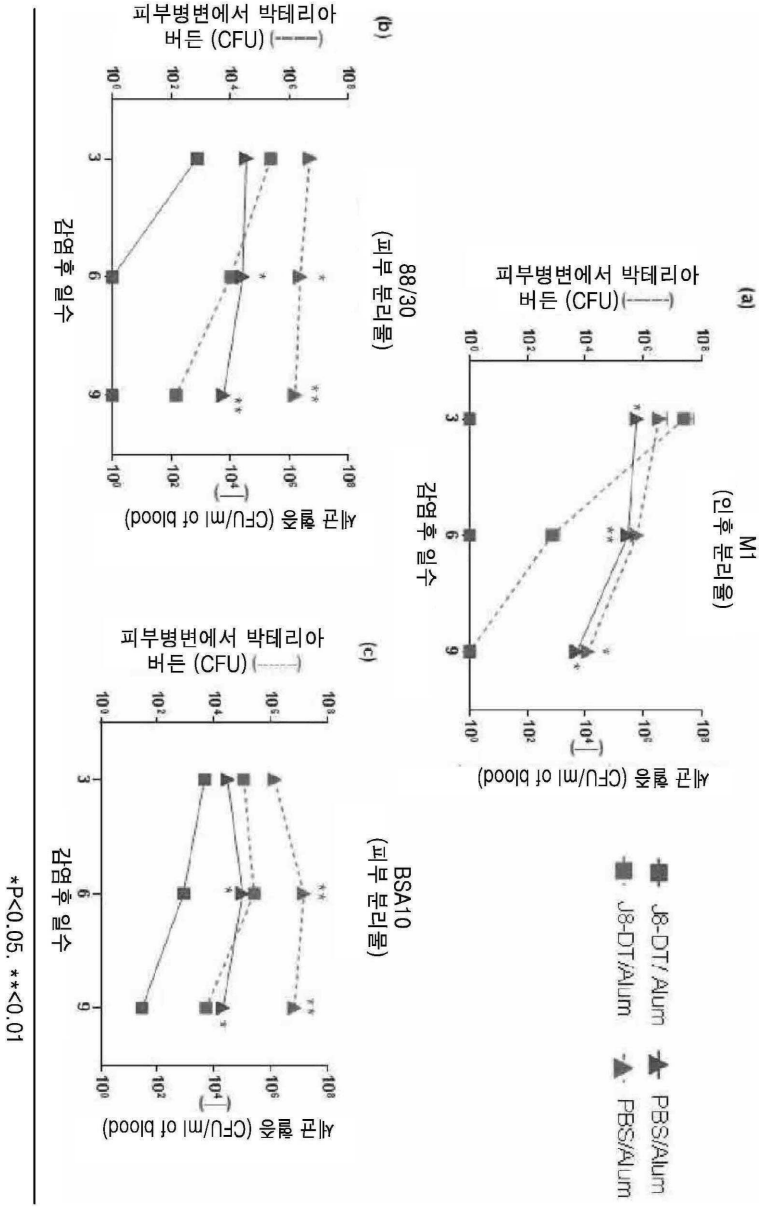
와 조합에 의한 면역화는 J8 펩티드 또는 SpyCEP 단독과 비교하여 CovR/S GAS 돌연변이 5448AP에 의한 GAS 감염에 대해서 상승효과를 갖는다. 또한, 항-SpyCEP 항체는 SpyCEP의 IL-8 분해 활성을 효과적으로 중화함으로써 기존의 GAS 감염에 대한 치료적 개입을 제공할 수 있음이 명백하다. 또한, 본 발명자들은 기능성 항체를 유도할 수 있는 SpyCEP상의 주요 에피토프(서열번호: 18)를 동정하였다. 현재 본 발명자들은 GAS 감염에 의한 능동 및 수동 백신 연구를 계획하고 있다. 상기 에피토프의 이점은 백신에서 전체 재조합 SpyCEP 단백질을 사용하지 않아도 되기 때문에 안정성 프로파일을 개선할 수 있다는 점이다. 본 발명자들은 최적 백신은 J8과 상기 에피토프의 혼합물인 것으로 판단한다. 상기 예측을 확인하는데 있어서, J8-DT+SpyCEP 또는 J8-DT+S2-DT에 의한 백신화는 J8-DT 단독인 경우와 비교하여 현저하게 향상된 보호 효능을 나타내었다. 또한, 이들 자체 및 스트렙토코칼 펩티드 p145에 대한 높은 역가를 유도하는 변이체 J8 펩티드를 개발하였는 바, 이는 이들이 스트렙토코칼 p145 아미노산 서열로부터 독점적으로 유래되기 때문이다.

[0139] 본 명세서를 통해서, 본 발명이 일 구현예 또는 특성들의 특정 집합 중 어느 하나에 제한되지 않고 본 발명의 바람직한 구현예를 기술하는데 목적이 있다. 본 발명의 넓은 개념 및 범위로부터 벗어나지 않고 본 명세서에 기술되고 도시된 구현예에 대한 다양한 변경 및 변형이 가해질 수 있다.

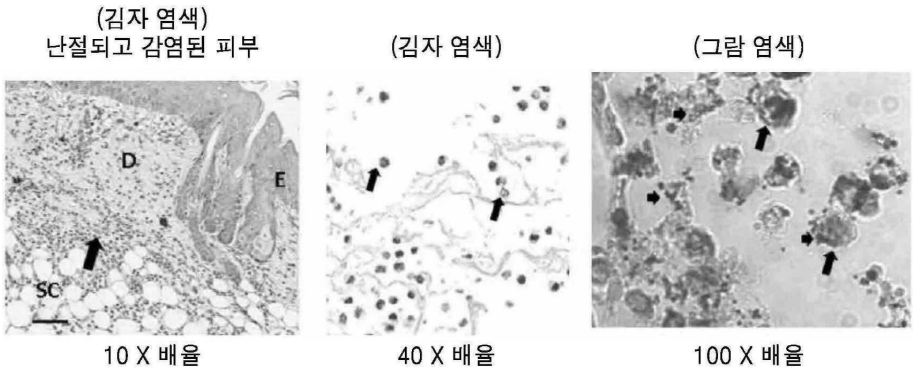
[0140] 본 명세서에 언급된 모든 컴퓨터 프로그램, 알고리즘, 특허 및 과학 문헌은 이들의 전문이 참조에 의해서 본 명세서에 포함된다.

도면

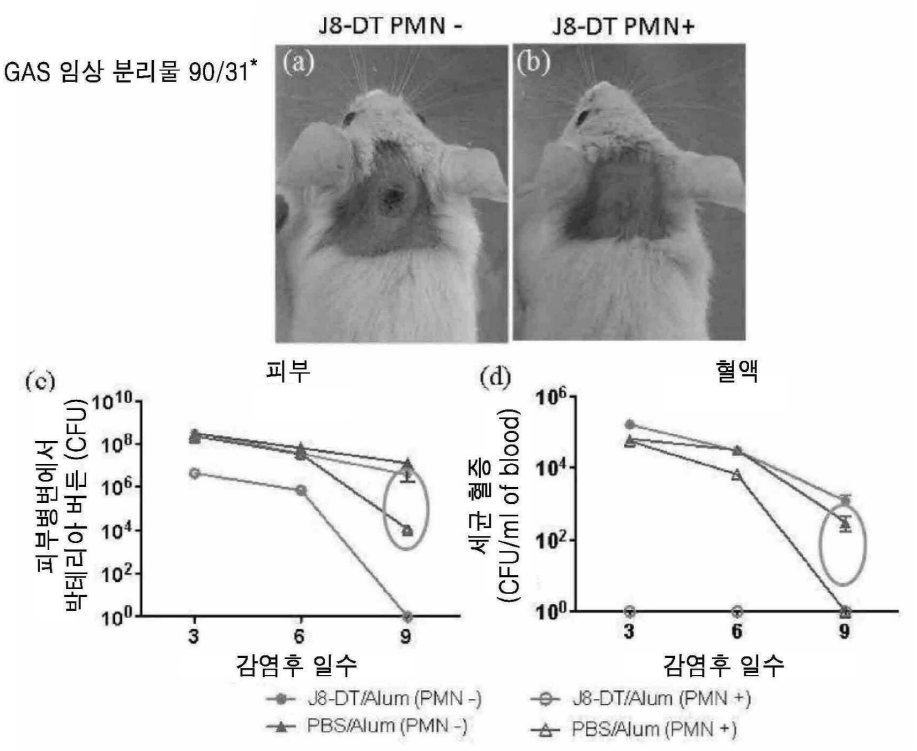
도면1


(a)
피부병변에서 박테리아 버든 (CFU)
M1 (인후 분리물)
감염후 일수
세균 콜중 (CFU/ml of blood)
(b)
피부병변에서 박테리아 버든 (CFU)
88/30 (피부 분리물)
감염후 일수
세균 콜중 (CFU/ml of blood)
(c)
피부병변에서 박테리아 버든 (CFU)
BSA10 (피부 분리물)
감염후 일수
세균 콜중 (CFU/ml of blood)
J8-DT/ Alum
PBS/Alum
J8-DT/Alum
PBS/Alum
*P<0.05. **<0.01

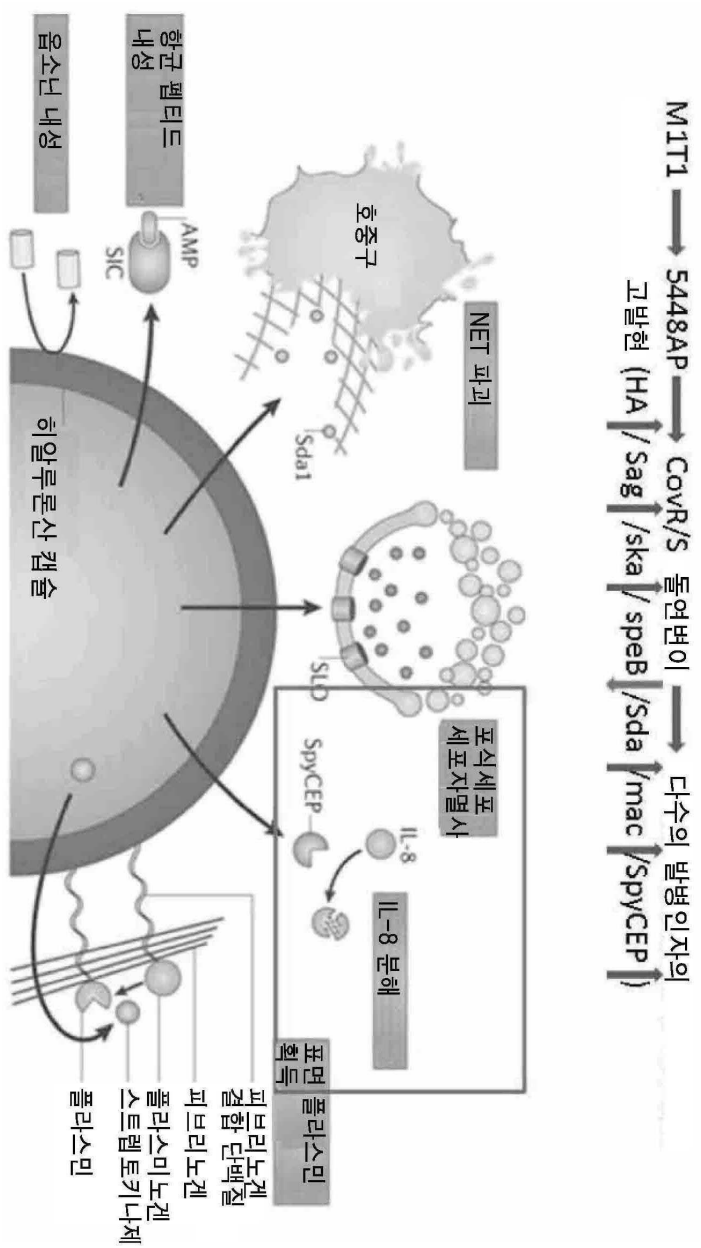
도면2


(김자 염색)
난절되고 감염된 피부
(김자 염색)
(그람 염색)
D
E
SC
10 X 배율
40 X 배율
100 X 배율

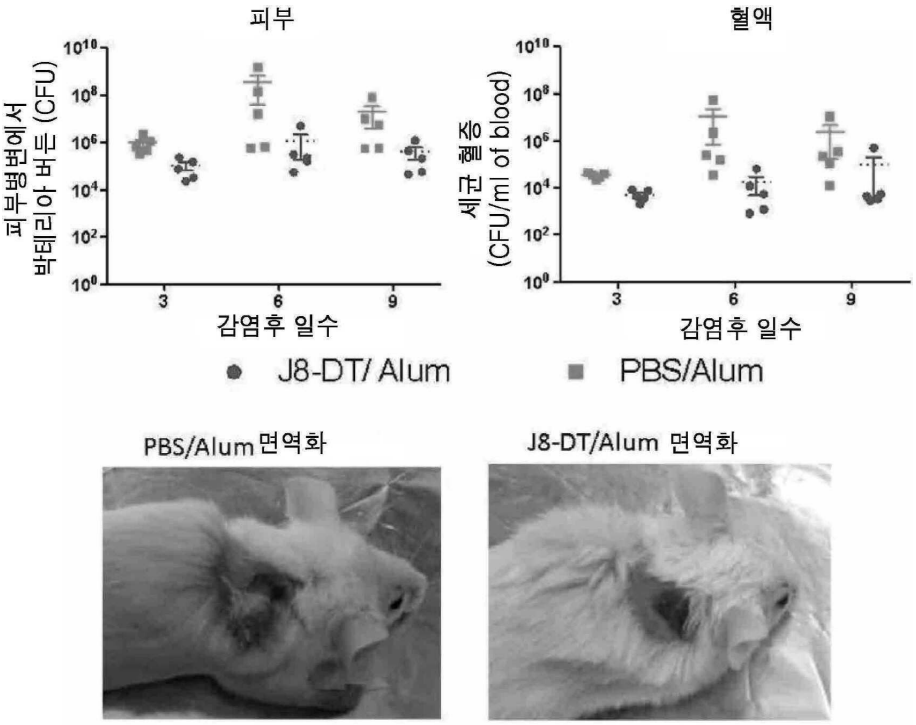
도면3


J8-DT PMN -
J8-DT PMN+
GAS 임상 분리물 90/31*
(a)
(b)
(c)
피부
피부병변에서 박테리아 버든 (CFU)
감염후 일수
(d)
혈액
체균 혈중 (CFU/ml of blood)
감염후 일수
J8-DT/Alum (PMN -)
PBS/Alum (PMN -)
J8-DT/Alum (PMN +)
PBS/Alum (PMN +)

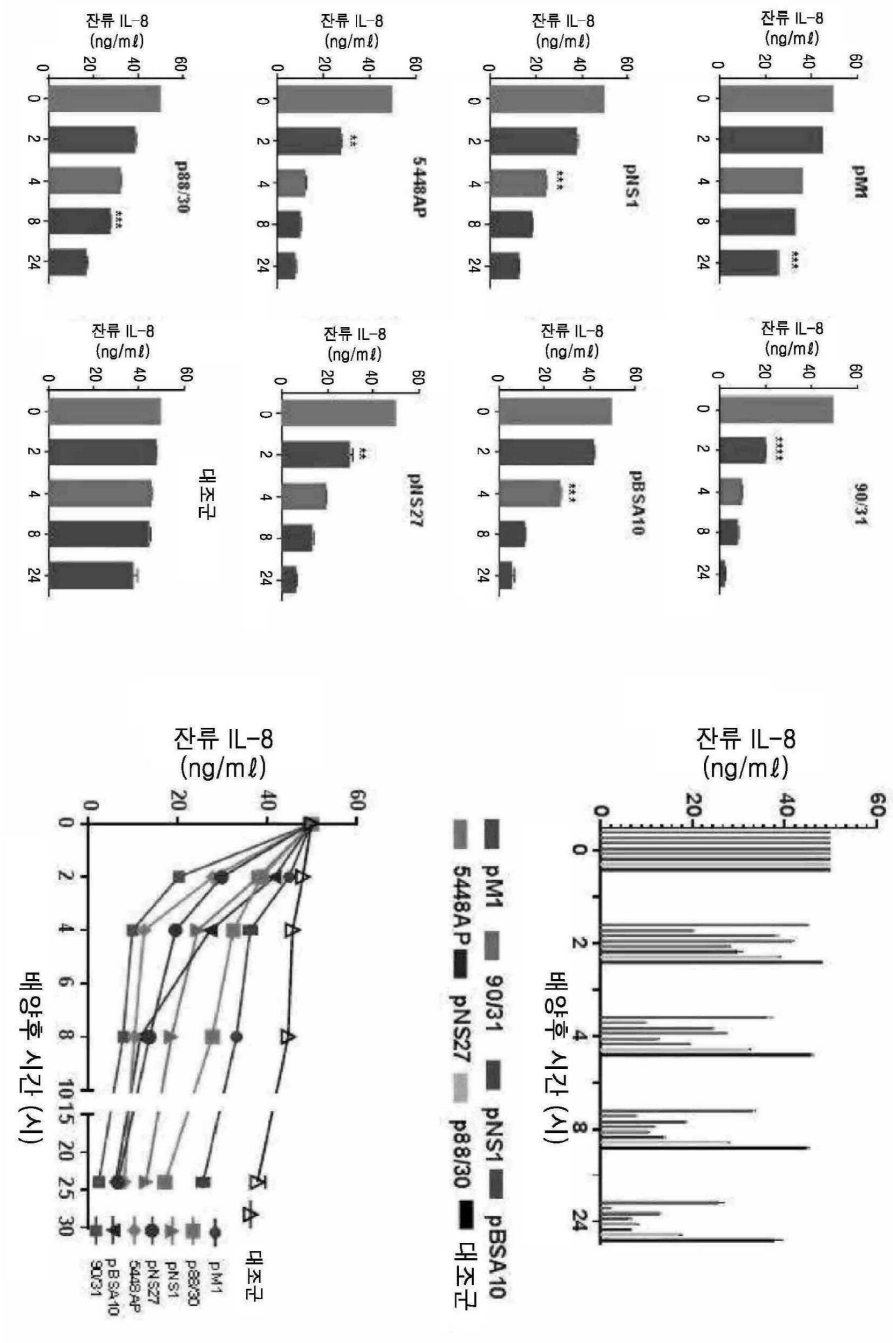
도면4


M1T1 → 5448AP → CovR/S 돌연변이 → 다수의 발병인자의 고발현 (HA / Sag / ska / speB / Sda / mac / SpyCEP)
호중구
NET 파괴
Sda1
히알루론산 캡슐
SLO
SpyCEP
IL-8
표식세포 세포자멸사
IL-8 분해
표면 플라스민 획득
AMP
SIC
항균 펩티드 내성
옵소닌 내성
피브리노겐 결합 단백질
피브리노겐
플라스미노겐 스트렙토키나제
플라스민

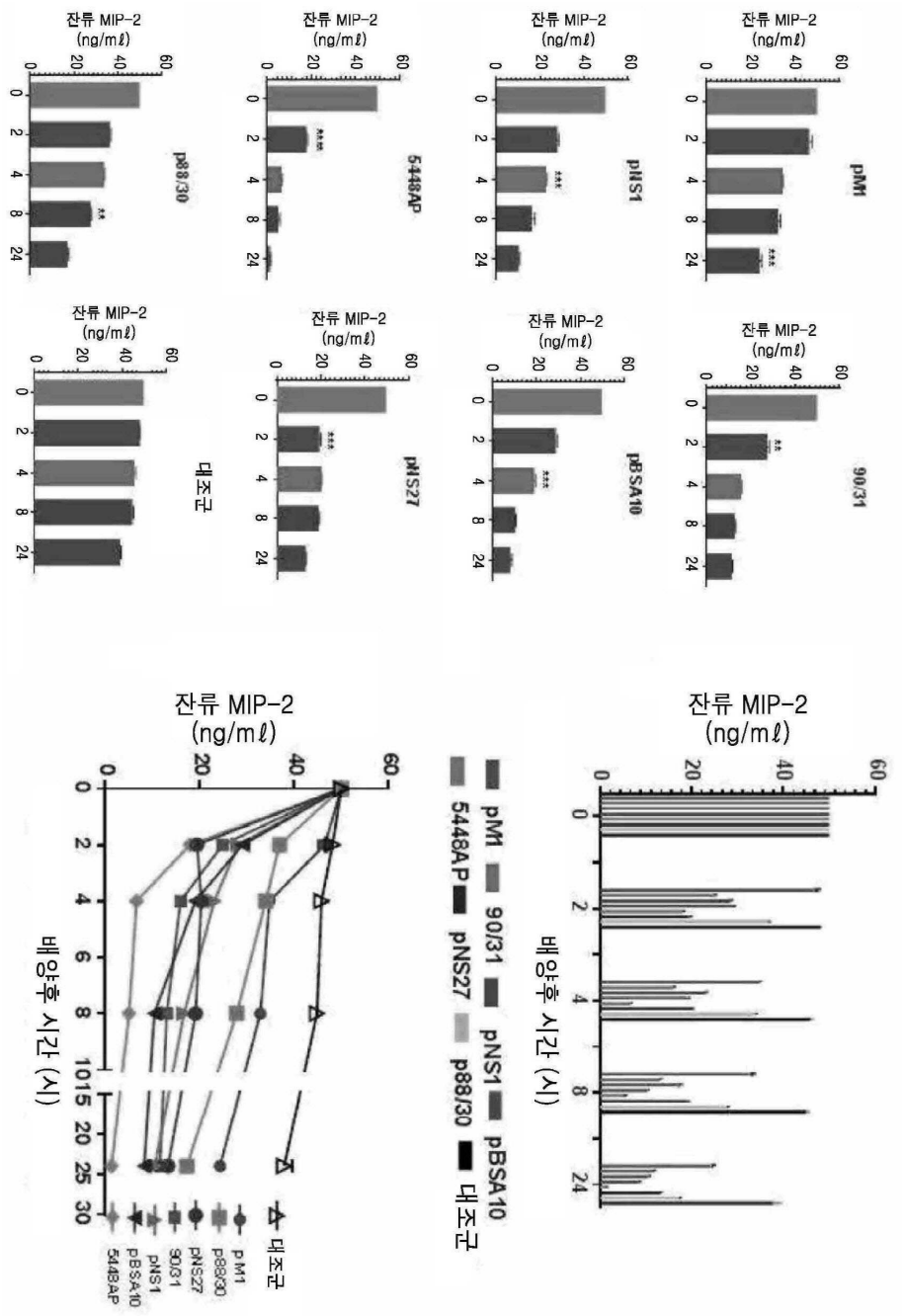
도면5


피부
혈액
피부병변에서 박테리아 버든 (CFU)
세균 혈중 (CFU/ml of blood)
감염후 일수
감염후 일수
J8-DT/ Alum
PBS/Alum
PBS/Alum 면역화
J8-DT/Alum 면역화

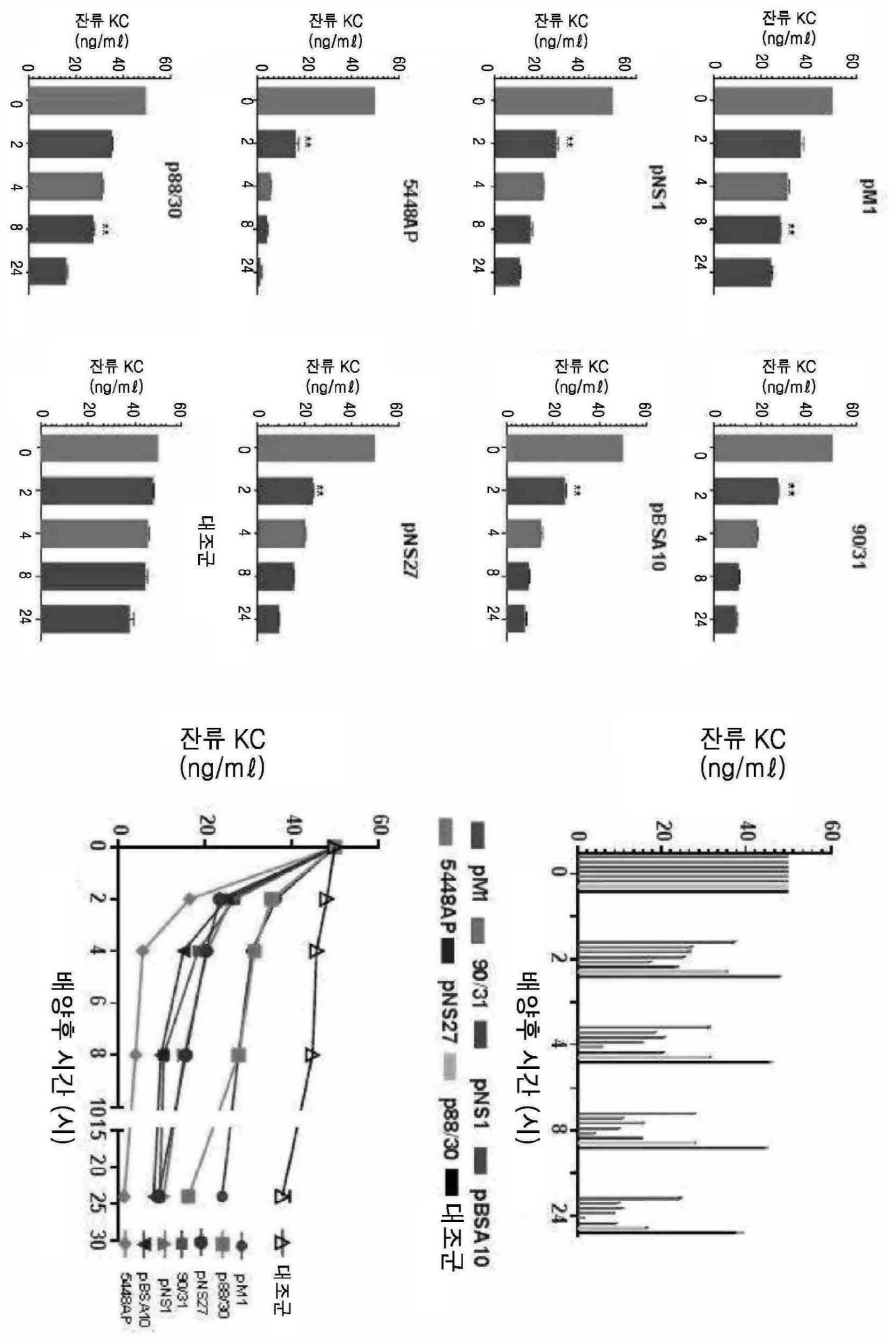
도면6


잔류 IL-8 (ng/mℓ)
pM1
pNS1
p88/30
90/31
5448AP
pBSA10
pNS27
대조군
베양후 시간 (시)

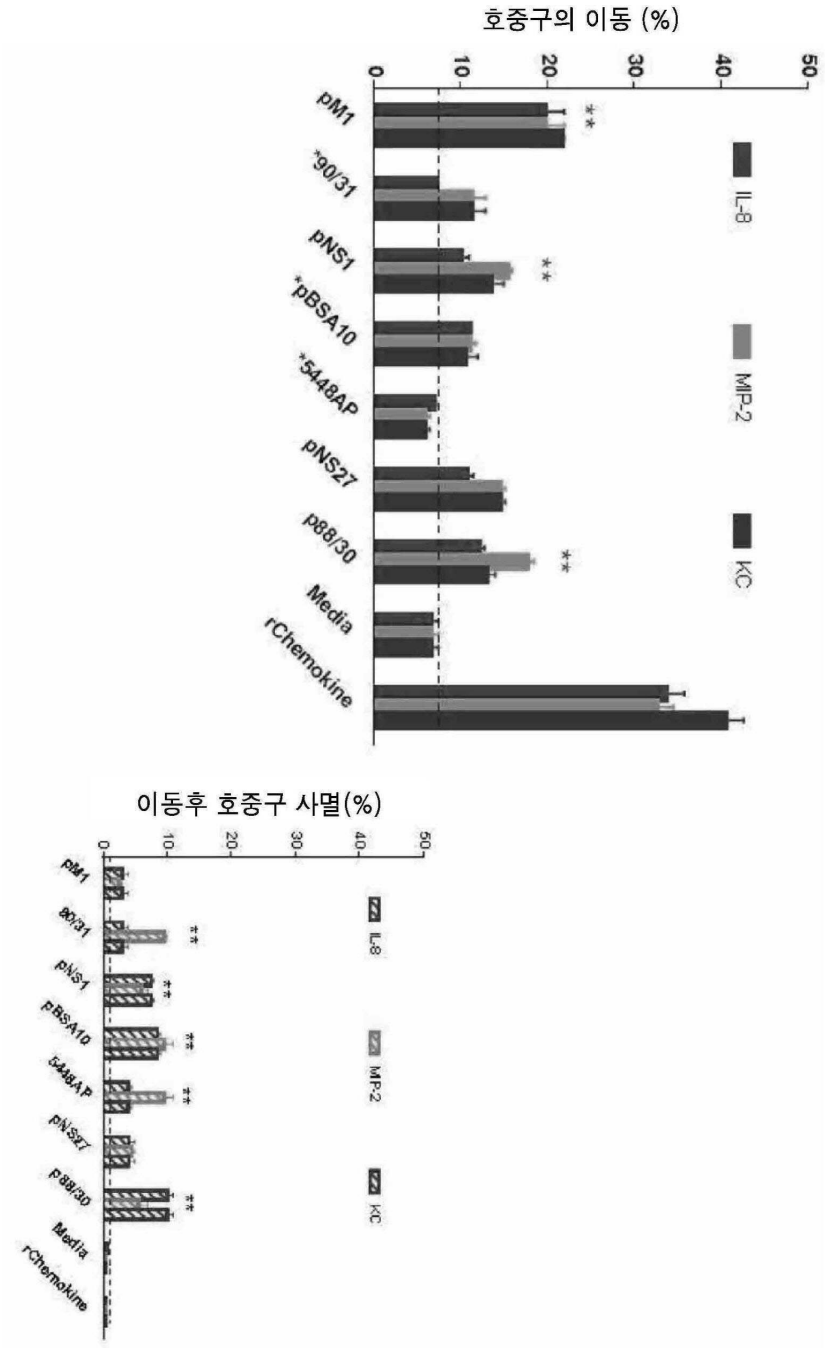
도면7


잔류 MIP-2 (ng/mℓ)
pM1
pNS1
90/31
pBSA10
5448AP
pNS27
p88/30
대조군
배양후 시간 (시)

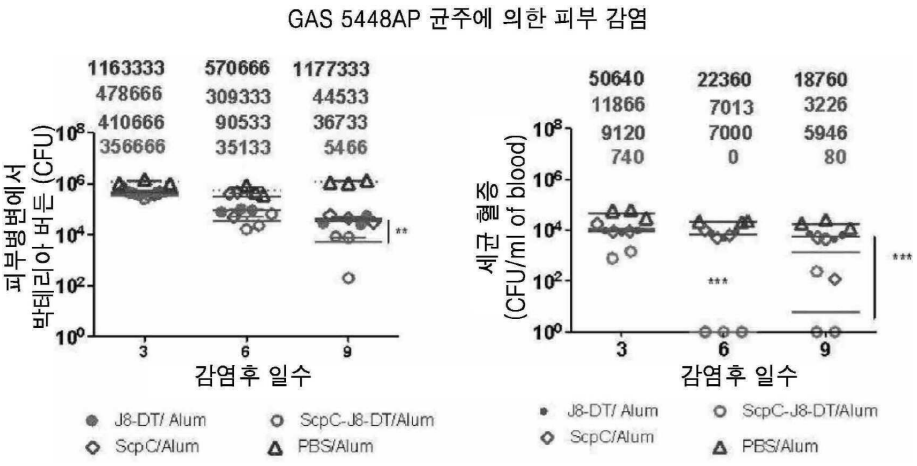
도면8


잔류 KC (ng/mℓ)
pM1
pNS1
pBSA10
90/31
p88/30
5448AP
pNS27
대조군
배양후 시간 (시)

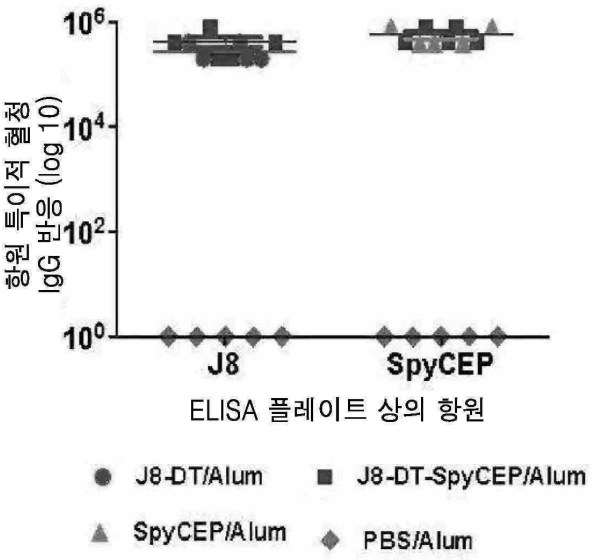
도면9


호중구의 이동 (%)
0
10
20
30
40
50
pM1
*30/31
pNS1
*pBSA10
*5448AP
pNS27
p88/30
Media
rChemokine
**
IL-8
MP-2
KC
이동후 호중구 사멸(%)
0
10
20
30
40
50
pM1
80/31
pNS1
pBSA10
5448AP
pNS27
p88/30
Media
rChemokine
**
IL-8
MP-2
KC

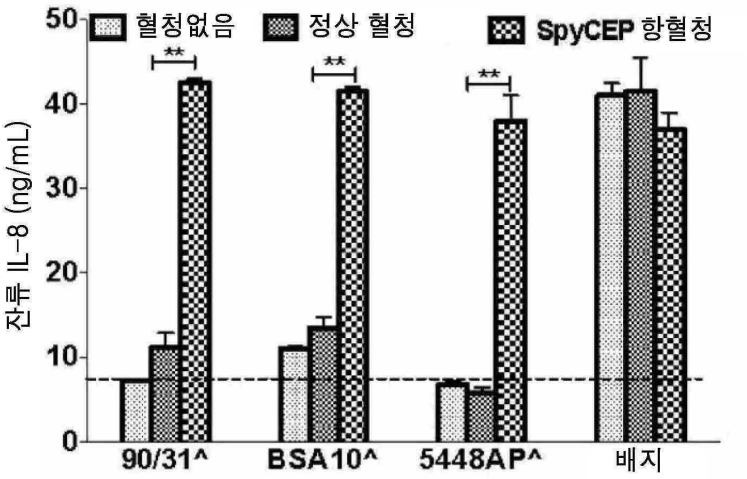
도면10



도면11



도면12



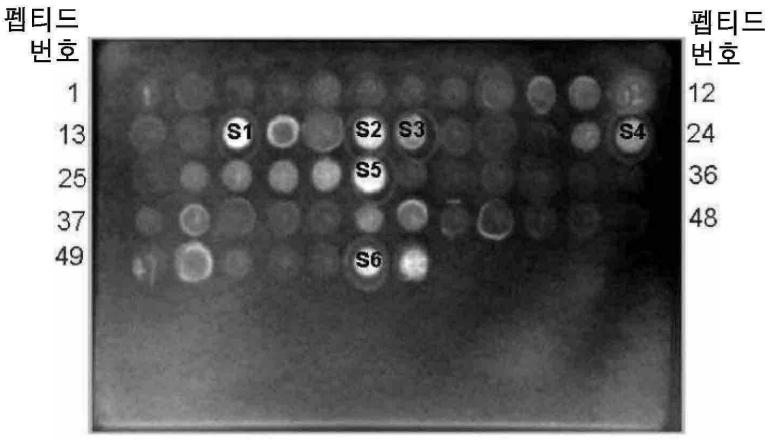
도면13a

펩티드 번호	서열
1	DELSTMSEPTITNHAQQQAQ
2	ITNHAQQQAQHLTNTELSSA
3	HLTNTELSSAESQSPDTSQI
4	ESQSPDTSQITLKTNREKEQ
5	TLKTNREKEQSQDLVSEPTT
6	SQDLVSEPTTTELADTDSAP
7	TELADTDSAPMANTGPDATQ
8	MANTGPDATQKSASLPPVNT
9	KSASLPPVNTDVHDWVKTKG
10	DVHDWVKTKGAWDKGYKGQG
11	AWDKGYKGQGKVVAVIDTGI
12	KVVAVIDTGIDPAHQSMRIS
13	DPAHQSMRISDVSTAKVKSK
14	DVSTAKVKSKEDMLARQKAA
15	EDMLARQKAAGINYGSWIND
16	GINYGSWINDKVVFAHNYVE
17	KVVFAHNYVENSDNIKENQF
18	NSDNIKENQFEDFDEDWENF
19	EDFDEDWENFEFDAEPKAIK
20	EFDAEPKAIKKHKIYRPQST
21	KHKIYRPQSTQAPKETVIKT
22	QAPKETVIKTEETDGSHDID
23	EETDGSHDIDWTQTDDETKY
24	WTQTDDETKYESHGMHVTGI
25	ESHGMHVTGIVAGNSKEAAA
26	VAGNSKEAAATGERFLGIAP
27	TGERFLGIAPEAQVMFMRVF

도면13b

펩티드 번호	서열
28	EAQVMFMRVFANDVMGSAES
29	ANDVMGSAESLFIKAIEDAV
30	LFIKAIEDAVALGADVINLS
31	ALGADVINLSLGTANGAQLS
32	LGTANGAQLSGSKPLMEAIE
33	GSKPLMEAIEKAKKAGVSVV
34	KAKKAGVSVVVAAGNERVYG
35	VAAGNERVYGSDHDDPLATN
36	SDHDDPLATNPDYGLVGSPS
37	PDYGLVGSPSTGRTPTSVAA
38	TGRTPTSVAAINSKWVIQRL
39	INSKWVIQRLMTVKELENRA
40	MTVKELENRADLNHGKAIYS
41	DLNHGKAIYSESVDFKDIKD
42	ESVDFKDIKDSLGYDKSHQF
43	SLGYDKSHQFAYVKESTDAG
44	AYVKESTDAGYKAQDVKGKI
45	YKAQDVKGKIALIERDLNKT
46	ALIERDLNKTYDEMIALAKK
47	YDEMIALAKKHGALGVLIFN
48	HGALGVLIFNNKPGQSNRSM
49	NKPGQSNRSMRLTANGMGVP
50	RLTANGMGVPSAFISHEFGK
51	SAFISHEFGKAMSQLNGNGT
52	AMSQLNGNGTGSLEFDSVVS
53	GSLEFDSVVSKAPSQKGNEM
54	KAPSQKGNEMNHFSNWGLTS
55	SQKGNEMNHFSNWGLTSDGY

도면14

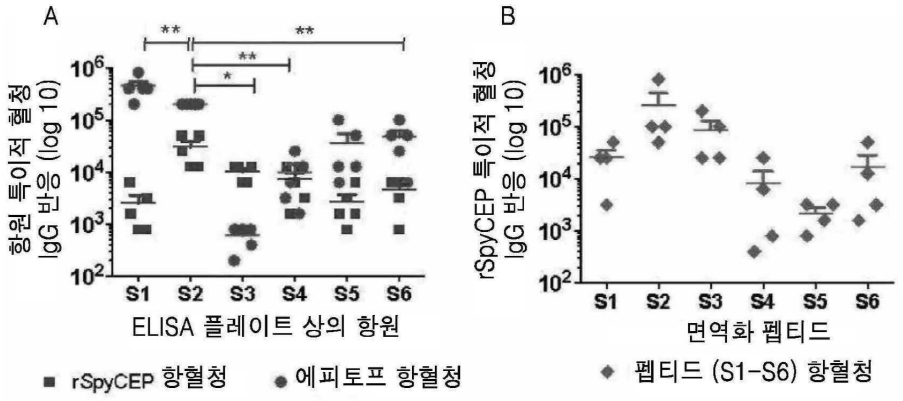


S1-S6의 에피토프

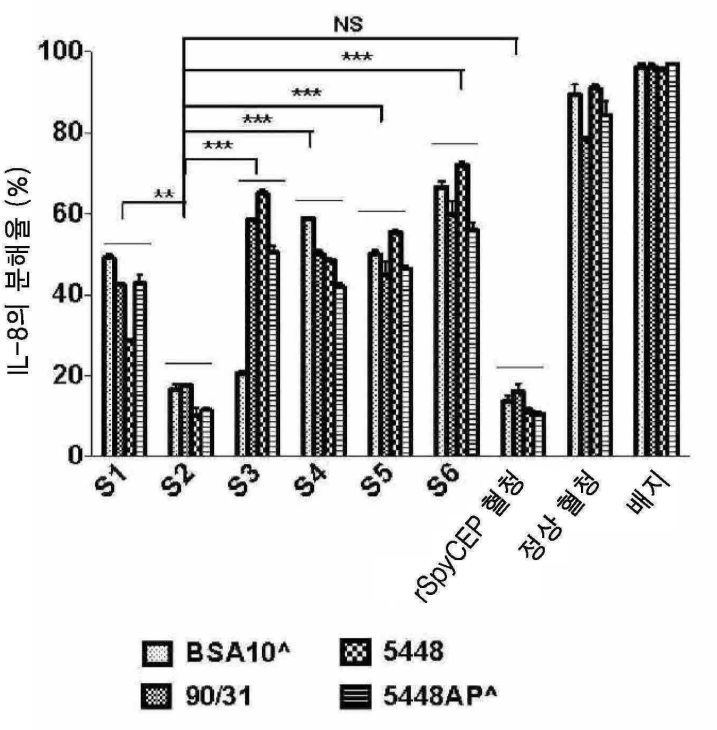
도면15

에피토프	아미노산 수	서열
S1	175-194	EDMLARQKAAGINYGSWIND
S2	205-224	NSDNIKENQFEDFDEDWENF
S3	215-234	EDFDEDWENFEFDAEPKAIK
S4	265-284	WTQTDDETKYESHGMHVTGI
S5	325-344	LFIKAIEDAVALGADVINLS
S6	565-584	KAPSQKGNEMNHFSNWGLTS

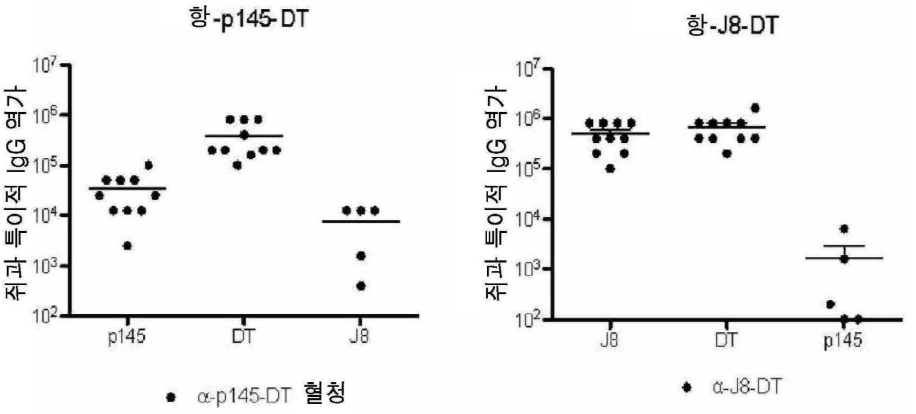
도면16



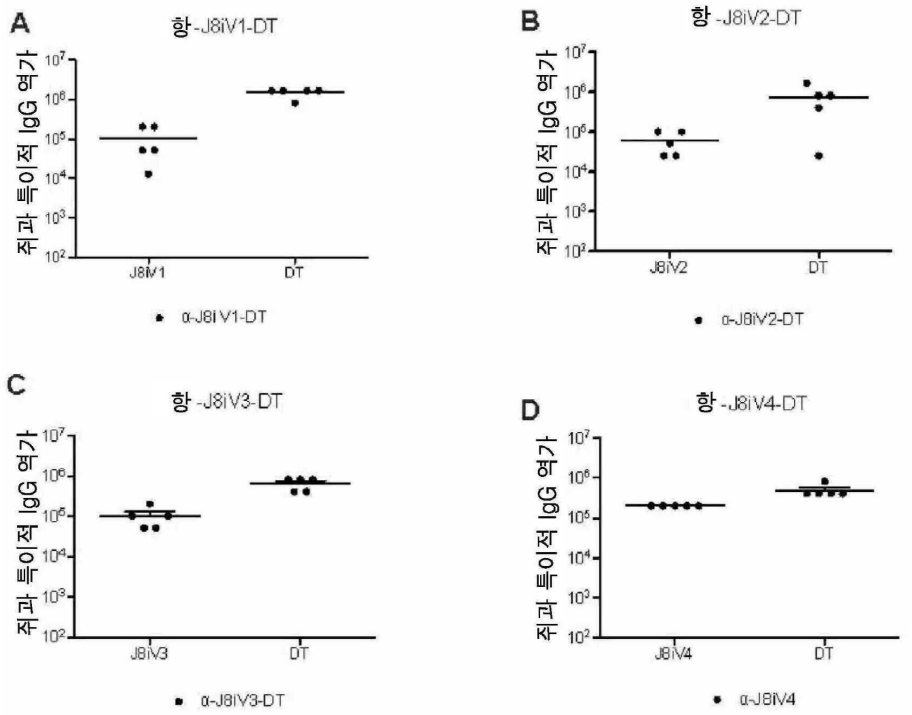
도면17


NS
***
***
***
***
**
IL-8의 분해율 (%)
100
80
60
40
20
0
S1
S2
S3
S4
S5
S6
rSpyCEP 혈청
정상 혈청
배지
BSA10^
5448
90/31
5448AP^

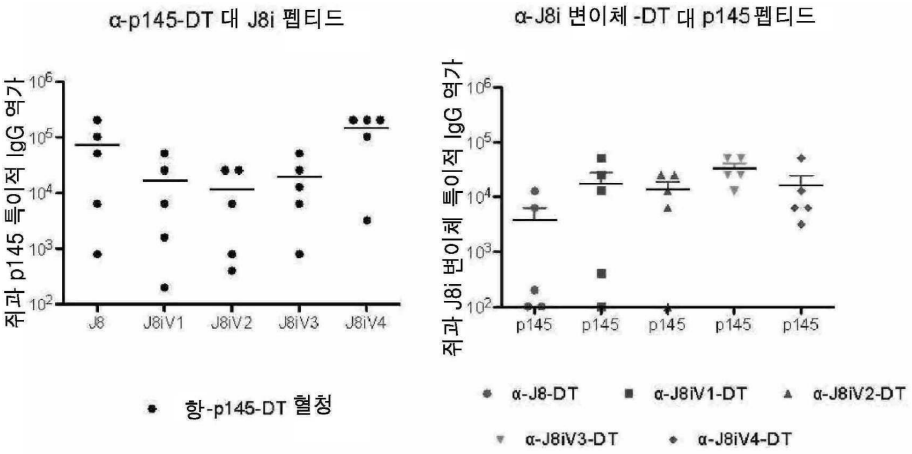
도면18


항-p145-DT
항-J8-DT
쥐과 특이적 IgG 역가
p145
DT
J8
α-p145-DT 혈청
α-J8-DT

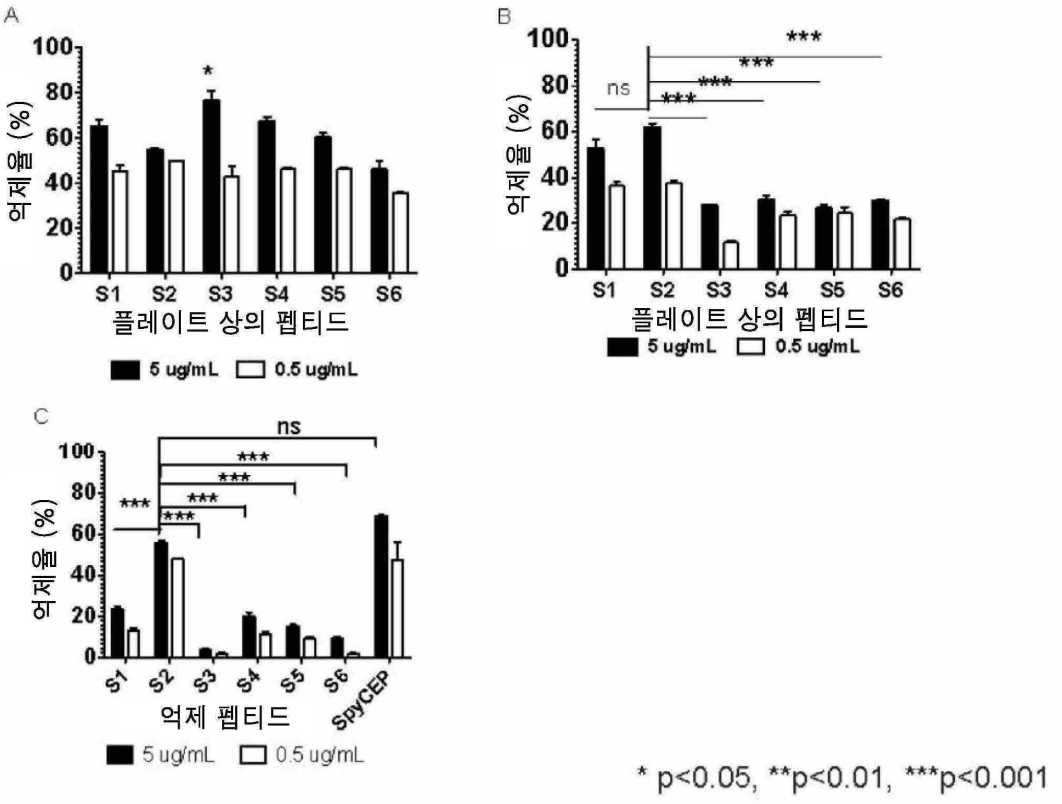
도면19


A
항-J8iV1-DT
쥐과 특이적 IgG 역가
J8iV1
DT
α-J8iV1-DT
B
항-J8iV2-DT
쥐과 특이적 IgG 역가
J8iV2
DT
α-J8iV2-DT
C
항-J8iV3-DT
쥐과 특이적 IgG 역가
J8iV3
DT
α-J8iV3-DT
D
항-J8iV4-DT
쥐과 특이적 IgG 역가
J8iV4
DT
α-J8iV4

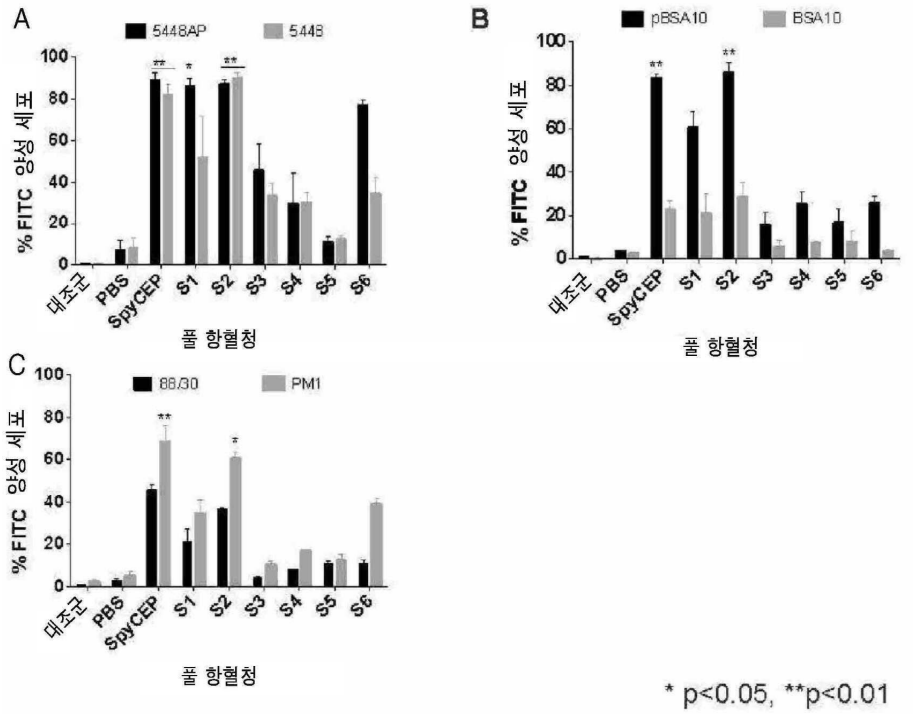
도면20


α-p145-DT 대 J8i 펩티드
쥐과 p145 특이적 IgG 역가
J8
J8iV1
J8iV2
J8iV3
J8iV4
항-p145-DT 혈청
α-J8i 변이체 -DT 대 p145 펩티드
쥐과 J8i 변이체 특이적 IgG 역가
p145
α-J8-DT
α-J8iV1-DT
α-J8iV2-DT
α-J8iV3-DT
α-J8iV4-DT

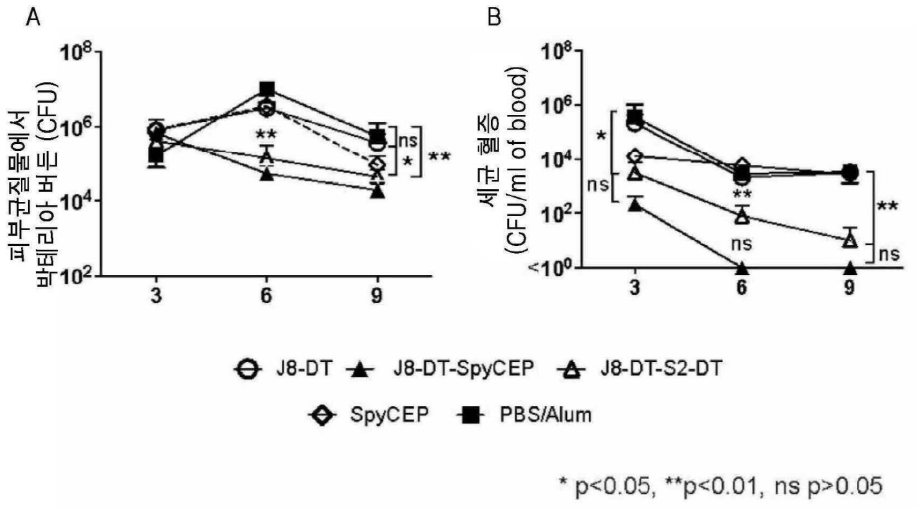
도면21


A
억제율 (%)
플레이트 상의 펩티드
S1 S2 S3 S4 S5 S6
5 ug/mL
0.5 ug/mL
B
ns
***
억제율 (%)
플레이트 상의 펩티드
S1 S2 S3 S4 S5 S6
5 ug/mL
0.5 ug/mL
C
ns
***
억제율 (%)
억제 펩티드
S1 S2 S3 S4 S5 S6 SpyCEP
5 ug/mL
0.5 ug/mL
* p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

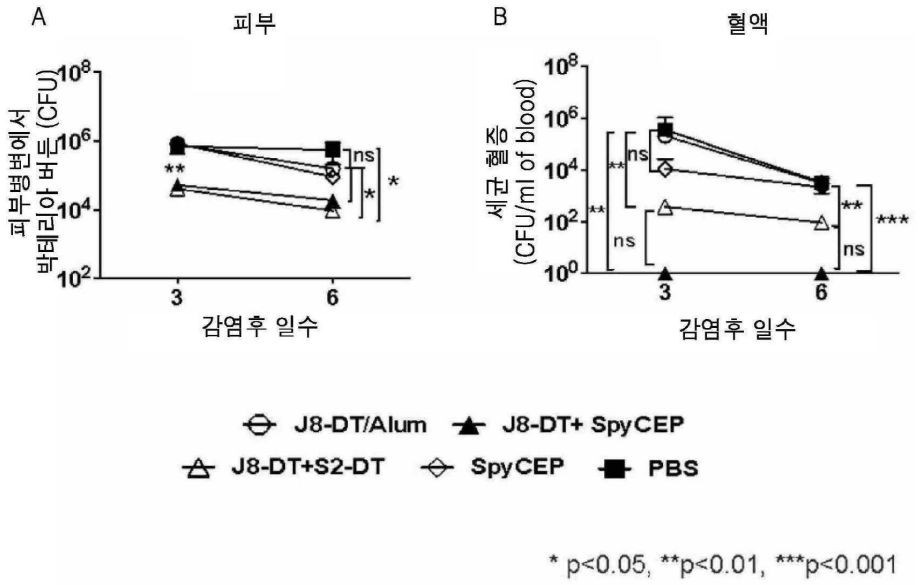
도면22


A
5448AP
5448
% FITC 양성 세포
대조군 PBS SpyCEP S1 S2 S3 S4 S5 S6
풀 항혈청
B
pBSA10
BSA10
% FITC 양성 세포
대조군 PBS SpyCEP S1 S2 S3 S4 S5 S6
풀 항혈청
C
88/30
PM1
% FITC 양성 세포
대조군 PBS SpyCEP S1 S2 S3 S4 S5 S6
풀 항혈청
* p<0.05, **p<0.01

도면23



도면24



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GRIFFITH UNIVERSITY

<120> GROUP A STREPTOCOCCUS VACCINE

<130> 28864

<150> AU2014901382

<151> 2014-04-15

<150> AU2014904453

<151> 2014-11-05

<150> AU2014903042

<151> 2014-08-06

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 1

Asp Glu Leu Ser Thr Met Ser Glu Pro Thr Ile Thr Asn His Ala Gln

1 5 10 15

Gln Gln Ala Gln

20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 2

Ile Thr Asn His Ala Gln Gln Gln Ala Gln His Leu Thr Asn Thr Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Ala

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 3

His Leu Thr Asn Thr Glu Leu Ser Ser Ala Glu Ser Gln Ser Pro Asp

1 5 10 15

Thr Ser Gln Ile

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Lys Glu Gln

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 5

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

1 5 10 15

Glu Pro Thr Thr

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 6

Ser Gln Asp Leu Val Ser Glu Pro Thr Thr Thr Glu Leu Ala Asp Thr

1 5 10 15

Asp Ser Ala Pro

20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 7

Thr Glu Leu Ala Asp Thr Asp Ser Ala Pro Met Ala Asn Thr Gly Pro
1 5 10 15

Asp Ala Thr Gln
20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 8

Met Ala Asn Thr Gly Pro Asp Ala Thr Gln Lys Ser Ala Ser Leu Pro
1 5 10 15

Pro Val Asn Thr
20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 9

Lys Ser Ala Ser Leu Pro Pro Val Asn Thr Asp Val His Asp Trp Val
1 5 10 15

Lys Thr Lys Gly
20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 10

Asp Val His Asp Trp Val Lys Thr Lys Gly Ala Trp Asp Lys Gly Tyr

1 5 10 15

Lys Gly Gln Gly

20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 11

Ala Trp Asp Lys Gly Tyr Lys Gly Gln Gly Lys Val Val Ala Val Ile

1 5 10 15

Asp Thr Gly Ile

20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 12

Lys Val Val Ala Val Ile Asp Thr Gly Ile Asp Pro Ala His Gln Ser

1 5 10 15

Met Arg Ile Ser

20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 13

Asp Pro Ala His Gln Ser Met Arg Ile Ser Asp Val Ser Thr Ala Lys

1 5 10 15

Val Lys Ser Lys

20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 14

Asp Val Ser Thr Ala Lys Val Lys Ser Lys Glu Asp Met Leu Ala Arg

1 5 10 15

Gln Lys Ala Ala

20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 15

Glu Asp Met Leu Ala Arg Gln Lys Ala Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Ser

1 5 10 15

Trp Ile Asn Asp

20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 16

Gly Ile Asn Tyr Gly Ser Trp Ile Asn Asp Lys Val Val Phe Ala His

1 5 10 15

Asn Tyr Val Glu

20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 17

Lys Val Val Phe Ala His Asn Tyr Val Glu Asn Ser Asp Asn Ile Lys
1 5 10 15

Glu Asn Gln Phe
20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 18

Asn Ser Asp Asn Ile Lys Glu Asn Gln Phe Glu Asp Phe Asp Glu Asp
1 5 10 15

Trp Glu Asn Phe
20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 19

Glu Asp Phe Asp Glu Asp Trp Glu Asn Phe Glu Phe Asp Ala Glu Pro
1 5 10 15

Lys Ala Ile Lys
20

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 20

Glu Phe Asp Ala Glu Pro Lys Ala Ile Lys Lys His Lys Ile Tyr Arg

1 5 10 15

Pro Gln Ser Thr

20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 21

Lys His Lys Ile Tyr Arg Pro Gln Ser Thr Gln Ala Pro Lys Glu Thr

1 5 10 15

Val Ile Lys Thr

20

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 22

Gln Ala Pro Lys Glu Thr Val Ile Lys Thr Glu Glu Thr Asp Gly Ser

1 5 10 15

His Asp Ile Asp

20

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 23

Glu Glu Thr Asp Gly Ser His Asp Ile Asp Trp Thr Gln Thr Asp Asp

1 5 10 15

Glu Thr Lys Tyr

20

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 24

Trp Thr Gln Thr Asp Asp Glu Thr Lys Tyr Glu Ser His Gly Met His

1 5 10 15

Val Thr Gly Ile

20

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 25

Glu Ser His Gly Met His Val Thr Gly Ile Val Ala Gly Asn Ser Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala

20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 26

Val Ala Gly Asn Ser Lys Glu Ala Ala Ala Thr Gly Glu Arg Phe Leu

1 5 10 15

Gly Ile Ala Pro

20

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 27

Thr Gly Glu Arg Phe Leu Gly Ile Ala Pro Glu Ala Gln Val Met Phe
1 5 10 15

Met Arg Val Phe
20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 28

Glu Ala Gln Val Met Phe Met Arg Val Phe Ala Asn Asp Val Met Gly
1 5 10 15

Ser Ala Glu Ser
20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 29

Ala Asn Asp Val Met Gly Ser Ala Glu Ser Leu Phe Ile Lys Ala Ile
1 5 10 15

Glu Asp Ala Val
20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 30

Leu Phe Ile Lys Ala Ile Glu Asp Ala Val Ala Leu Gly Ala Asp Val

1 5 10 15

Ile Asn Leu Ser

20

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 31

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

1 5 10 15

Ala Gln Leu Ser

20

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 32

Leu Gly Thr Ala Asn Gly Ala Gln Leu Ser Gly Ser Lys Pro Leu Met

1 5 10 15

Glu Ala Ile Glu

20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 33

Gly Ser Lys Pro Leu Met Glu Ala Ile Glu Lys Ala Lys Lys Ala Gly

1 5 10 15

Val Ser Val Val

20

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 34

Lys Ala Lys Lys Ala Gly Val Ser Val Val Val Ala Ala Gly Asn Glu

1 5 10 15

Arg Val Tyr Gly

20

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 35

Val Ala Ala Gly Asn Glu Arg Val Tyr Gly Ser Asp His Asp Asp Pro

1 5 10 15

Leu Ala Thr Asn

20

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 36

Ser Asp His Asp Asp Pro Leu Ala Thr Asn Pro Asp Tyr Gly Leu Val

1 5 10 15

Gly Ser Pro Ser

20

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 37

Pro Asp Tyr Gly Leu Val Gly Ser Pro Ser Thr Gly Arg Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Val Ala Ala
20

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 38

Thr Gly Arg Thr Pro Thr Ser Val Ala Ala Ile Asn Ser Lys Trp Val
1 5 10 15

Ile Gln Arg Leu
20

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 39

Ile Asn Ser Lys Trp Val Ile Gln Arg Leu Met Thr Val Lys Glu Leu
1 5 10 15

Glu Asn Arg Ala
20

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 40

Met Thr Val Lys Glu Leu Glu Asn Arg Ala Asp Leu Asn His Gly Lys

1 5 10 15

Ala Ile Tyr Ser

20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 41

Asp Leu Asn His Gly Lys Ala Ile Tyr Ser Glu Ser Val Asp Phe Lys

1 5 10 15

Asp Ile Lys Asp

20

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 42

Glu Ser Val Asp Phe Lys Asp Ile Lys Asp Ser Leu Gly Tyr Asp Lys

1 5 10 15

Ser His Gln Phe

20

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 43

Ser Leu Gly Tyr Asp Lys Ser His Gln Phe Ala Tyr Val Lys Glu Ser

1 5 10 15

Thr Asp Ala Gly

20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 44

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

1 5 10 15

Lys Gly Lys Ile

20

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 45

Tyr Lys Ala Gln Asp Val Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Asp

1 5 10 15

Leu Asn Lys Thr

20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 46

Ala Leu Ile Glu Arg Asp Leu Asn Lys Thr Tyr Asp Glu Met Ile Ala

1 5 10 15

Leu Ala Lys Lys

20

<210> 47

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 47

Tyr Asp Glu Met Ile Ala Leu Ala Lys Lys His Gly Ala Leu Gly Val
1 5 10 15

Leu Ile Phe Asn
20

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 48

His Gly Ala Leu Gly Val Leu Ile Phe Asn Asn Lys Pro Gly Gln Ser
1 5 10 15

Asn Arg Ser Met
20

<210> 49

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 49

Asn Lys Pro Gly Gln Ser Asn Arg Ser Met Arg Leu Thr Ala Asn Gly
1 5 10 15

Met Gly Val Pro
20

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 50

Arg Leu Thr Ala Asn Gly Met Gly Val Pro Ser Ala Phe Ile Ser His

1 5 10 15

Glu Phe Gly Lys

20

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 51

Ser Ala Phe Ile Ser His Glu Phe Gly Lys Ala Met Ser Gln Leu Asn

1 5 10 15

Gly Asn Gly Thr

20

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 52

Ala Met Ser Gln Leu Asn Gly Asn Gly Thr Gly Ser Leu Glu Phe Asp

1 5 10 15

Ser Val Val Ser

20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 53

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

1 5 10 15

Gly Asn Glu Met

20

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 54

Lys Ala Pro Ser Gln Lys Gly Asn Glu Met Asn His Phe Ser Asn Trp

1 5 10 15

Gly Leu Thr Ser

20

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 55

Ser Gln Lys Gly Asn Glu Met Asn His Phe Ser Asn Trp Gly Leu Thr

1 5 10 15

Ser Asp Gly Tyr

20

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 56

Leu Arg Arg Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Glu

20

<210> 57

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 57

Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln

1 5 10 15

Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Arg Val Lys

20 25

<210> 58

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 58

Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Gln Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val

1 5 10 15

Glu Lys Ala Leu Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Gln

20 25

<210> 59

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 59

Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu Cys

20 25

<210> 60

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 60

Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Lys Gln Ser Arg Glu Ala Lys Cys
20 25

<210> 61

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 61

Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu Lys Gln Ser Arg
1 5 10 15

Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu Cys
20 25

<210> 62

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 62

Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu Asp Ala Ser Arg
1 5 10 15

Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu Cys
20 25

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 63

Met Lys Gln Leu Glu Asp Lys
1 5

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 64

Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys

1 5