

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 39/09 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년08월30일 10-0582138 2006년05월15일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-1998-0705574	(65) 공개번호	10-1999-0081863
(22) 출원일자	1998년07월21일	(43) 공개일자	1999년11월15일
번역문 제출일자	1998년07월21일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/001056	(87) 국제공개번호	WO 1997/26008
국제출원일자	1997년01월21일	국제공개일자	1997년07월24일

(81) 지정국 국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본,

 AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 케냐,

 EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스,

 EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 오스트리아, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 영국,

(30) 우선권주장 08/589,756 1996년01월22일 미국(US)

(73) 특허권자 리전즈 오브 더 유니버시티 오브 미네소타
미국,미네소타,미니애폴리스,오크 스트리트 사우쓰이스트 200,맥나마라 얼럼나이 센터 450

(72) 발명자 클리어리, 파울, 피.
미국 55112 미네소타주 쇼어뷰 잔사 드라이브 288

(74) 대리인 김영
 주성민

심사관 : 임혜준

(54) 연쇄상구균C5a펩티다제백신

요약

β-용혈성 연쇄상구균 (Streptococcus)의 전이증식 또는 감염을 억제하기 위한 신규 백신이 개시되어 있다. 이 백신에는 연쇄상구균 C5a 펩티다제 또는 그의 단편 또는 돌연변이체의 면역유발량이 함유되어 있다. 이러한 백신을 투여함으로써 β-용혈성 연쇄상구균 전이증식 또는 감염에 민감한 포유동물을 보호하는 방법도 개시되어 있다.

대표도

도 1

명세서

배경기술

β -용혈성 연쇄상구균은 이미 여러 종이 밝혀져 있다. A군 연쇄상구균이라고도 불리는 화농성 연쇄상구균 (*Streptococcus pyogenes*)은 사람에게 있어서 흔한 세균성 병원체이다. 주로 어린이 질병으로서, 이 균은 사람의 인두염, 농가진 및 패혈증을 비롯한 각종 감염을 유발한다. 감염 후에는, 사람의 경우 류마티스성 발열 및 급성 사구체신염과 같은 자동면역 합병증이 유발될 수 있다. 이 병원체는 또한 성홍열, 괴사성 근막염 및 독성 쇼크와 같은 심각한 급성 질병을 일으킨다.

"패혈성 인두염"으로 통칭되는 A군 연쇄상구균에 의해 유발되는 인후염은 계절에 따라 다르지만, 일반 의료 업무 중 진료의 16% 이상에 해당한다 (Hope-Simpson, E., "Streptococcus pyogenes in the throat: A study in a small population", 1962-1975, J. Hyg. Camb., 87: 109-129 (1981)). 상기 종은 또한 최근 북미와 다른 4개 대륙에서 괴사성 근막염을 수반하는 독성 쇼크가 되살아 오는 원인이기도 하다 (Stevens, D. L., "Invasive group A streptococcus infections" Clin. Infect. Dis., 14:2-13 (1992)). 패혈성 인두염을 유발하거나 때로 독성 쇼크를 일으키는데 있어서, C군 및 G군 연쇄상구균도 관련이 있다 (Hope-Simpson, E., "Streptococcus pyogenes in the throat: A study in a small population", 1962-1975, J. Hyg. Camb., 87: 109-129 (1981)).

스트렙토코커스 아갈락티에 (*Streptococcus agalactiae*)로도 알려진 B군 연쇄상구균은 신생아 패혈증 및 뇌막염의 원인이다 (T. R. Martin 등, "The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B streptococci from the lung of infant and adult rats", J. Infect Dis., 165:306-314 (1992)). 성인 여성의 질 점막 플로라 (vaginal mucosal flora)의 일종으로, 출산시에 감염되면 신생아 1000명당 0.1 내지 0.5명이 심각한 질병에 걸리게 된다. B군 연쇄상구균 감염의 높은 사망률에도 불구하고, 발병 메커니즘은 거의 알려지지 않았다 (Martin T. R 등, "The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of Group B streptococci from the lung of infant and adult rats", J. Infect Dis., 165: 306-314 (1992)).

연쇄상구균 감염은 현재 항생제 요법으로 치료되고 있다. 그러나, 치료받는 이들 가운데 25-30%가 질병이 재발하고(거나) 점막 분비물에 섞여 있는 상태로 균을 방출한다. 현재는 연쇄상구균의 감염을 막을 이용가능한 방법이 없다. 역사적으로, 연쇄상구균 백신 개발은 이 박테리아의 세포 표면 M 단백질에 그 초점이 맞춰져 있었다 (Bessen, D. 등, "Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M protein mucosal colonization by group A streptococci", Infect. Immun., 56: 2666-2672 (1988); Bronze, M. S. 등, "Protective immunity evoked by locally administered group A streptococcal vaccines in mice", Journal of Immunology, 141: 2767-2770 (1988)).

M 단백질 백신의 경우, 두 가지 주요한 문제가 사용 및 판매와 아마도 FDA 허가에 있어서, 걸림돌이 될 것이다. 첫째, 화농성 연쇄상구균은 80개 이상의 M 혈청형이 존재하며, 계속해서 새로운 혈청형이 생겨나고 있다 (Fischetti, V. A., "Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior", Clin. Microbiol. Rev., 2: 285-314 (1989)). 따라서, 한 종류의 혈청형 특이성 M 단백질을 접종한다면 다른 M 혈청형을 예방하는데 있어서는 효과가 없을 것이다. 두번째 문제는 M 단백질 백신의 안정성에 관한 것이다. M 단백질의 여러 영역에는 사람의 조직, 특히 심장 조직과 면역적으로 교차반응을 하는 항원성 에피토프가 있다. M 단백질의 N-말단은 그 서열과 항원 특이성이 매우 다양하다. A군 연쇄상구균 감염을 폭넓게 예방하기 위해서는, 상기와 같은 다양한 서열을 대표하는 80종 이상의 다른 펩티드를 백신에 포함시킬 필요가 있을 것이다. 새로운 M 단백질 변이체는 꾸준히 발생할 것이고, 연쇄상구균 질병의 지속적인 감독과 백신 조성물의 변화가 필요하다. 이와 반대로, M 단백질의 카르복실 말단 서열은 보존되어 있다. 그러나, M 단백질의 이 영역에는 면역적으로 사람 심장 조직과 교차반응을 일으키는 아미노산 서열이 있다. M 단백질의 이런 특성이 류마티스성 발열을 수반하는 심장 판막 손상을 일으키는 것으로 생각된다 (P. Fenderson 등, "Tropomyosinsharies immunologic epitopes with group A streptococcal M proteins", J. Immunol. 142: 2475-2481 (1989)). 초기 시행에서, 1979년 M 단백질로 백신 접종을 받은 어린이들은 심장 판막 손상을 동반한 류마티스성 발열의 10 배 이상의 발병율을 보였다 (Massell, B. F. 등, "Rheumatic fever following streptococcal vaccination, JAMA, 207:1115-1119 (1969)).

백신 개발에서 고려되고 있는 다른 단백질로는 홍반유발성 독소, 화농성 연쇄상구균 외독소 A 및 화농성 연쇄상구균 외독소 B가 있다 (Lee, P. K. 등, "Quantification and toxicity of group A streptococcal pyrogenic exotoxins in an animal

model of toxic shock syndrome-like illness", J. Clin. Microb., 27:1890-1892 (1989)). 이들 단백질에 대한 면역성은 독성 쇼크라는 치명적 증상은 막을 수 있으나, 연쇄상구균의 전이증식을 막거나 패혈성 인두염의 발생율을 낮출 수는 없을 것이다. 독성 쇼크 감염의 발생율은 100,000명당 10 내지 20명의 환자인 것으로 추정되고 있기 때문에, 이런 단백질을 사용하여 독성 쇼크 억제제를 위해 일반인을 면역시키는 것은 실제로 가능하지도 경제적으로 유리하지도 않다.

따라서, 연쇄상구균 감염을 예방 및 개선하는 유효한 수단에 대한 요구가 계속되어 왔다. 더욱 구체적으로, 연쇄상구균이 숙주 조직에서 전이증식하는 것을 예방하거나 개선에 유용한 백신 조성물을 개발함으로써, 패혈성 인두염 및 농가진의 발생율을 낮출 필요가 있다. 유기체의 보균 및 급성 감염의 발생율을 감소시킨 직접적인 결과는 류마티스성 발열, 급성 사구체신염, 패혈증, 독성 쇼크 및 괴사성 근막염과 같은 후유증의 일소일 것이다. 또한, 모든 β -용혈성 연쇄상구균 중, 즉 A, B, C 및 G군에 의한 감염의 예방 및 개선에 유용한 백신 조성물의 개발 역시 필요하다.

발명의 요약

본 발명은 사람을 비롯해서 개, 소, 돼지, 말과 같은 가축 등 β -용혈성 연쇄상구균에 민감한 포유동물에게서 β -용혈성 연쇄상구균에 의한 발병율을 예방 또는 저하시키는데 유효한 백신 및 그 접종 방법을 제공한다. 이 백신에는 연쇄상구균 C5a 펩티다제 (SCP) 또는 그의 하나 이상의 면역원성 단편 또는 변이체의 면역유발량 및 생리적으로 허용가능한 무독성 부형제가 함께 함유되어 있다. 이 백신은 SCP 효소 활성이 결여된 단편 또는 SCP 변이체(dSCP)를 함유할 수 있다. 또한 아쥘반트 (immunological adjuvant)도 함유할 수 있다. 이 백신은 A군 연쇄상구균, B군 연쇄상구균, C군 연쇄상구균 또는 G군 연쇄상구균의 전이증식을 예방하는데 사용될 수 있다. 이 백신은 면역원성 펩티드 또는 면역원성 다당류에 접합 또는 연결된 면역원성 재조합 연쇄상구균 C5a 펩티다제를 함유할 수 있다.

연쇄상구균 C5a 펩티다제 백신은 피하 또는 근육내 주사를 통해 투여될 수 있다. 또한, 경구 섭취나 비내 접종을 통해 투여될 수 있다.

하기 실시예에 기재된 바와 같이, SCP 유전자 (scpA49)를 대장균 발현 벡터 (pGEX-4T-1)로 클로닝했다. 대장균 클론에서 트랜스퍼라제-SCP 융합체를 발현시키고 이를 정제했다. 그 다음, 정제된 재조합 SCP (dSCP)를 사용하여 마우스를 면역화했다. 백신 접종된 마우스와 대조용 마우스에 야생형 연쇄상구균을 항원투여(challenge)했다. 재조합 SCP 백신 접종을 받은 마우스에서는 감염 후 곧 연쇄상구균이 없어지지만, 대조용 마우스의 30 내지 50 %는 수일 동안 양성이었다. 따라서, 재조합 SCP는 β -용혈성 연쇄상구균에 대한 유효한 백신이었다.

또한 scpA49 유전자의 2908 bp 단편인 Δ SCPA49를 발현 벡터인 pGEX-4T-1에 라이제이션시키고, 대장균에서 발현시켰다. 이의 정제 단백질은 동형 M49 연쇄상구균 혈청형 및 이형 혈청형 M1, M6 및 M12와 결합된 시험관내 펩티다제 활성을 중화시킬 수 있는 토끼 항체를 높은 역가(titer)로 유도했다. Δ SCPA49 면역원을 사용한 마우스의 비내 면역화는 특이적인 타액 IgA 및 혈청 IgG 항체를 상당한 수준으로 자극하고, 야생형 M1, M2, M6, M11, M49 연쇄상구균의 전이증식력을 저하시켰다. 따라서, SCP 단백질은 연쇄상구균의 각종 혈청형에 대한 백신으로서 유효했다.

도면의 간단한 설명

도 1은 β -용혈성 연쇄상구균에서 얻은 C5a 펩티다제의 구조이다. (D)는 아스파르트산 잔기를, (H)는 히스티딘을, (S)는 세린을, (L)은 루이신을, (P)는 프롤린을, (T)는 트레오닌을, (N)은 아스파라진을 나타낸다. R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 반복 서열을 나타낸다. 숫자는 펩티다제 내에서 아미노산 잔기의 위치를 의미한다.

도 2는 A군 연쇄상구균 균주 49, A군 연쇄상구균 균주 12, 및 B군 연쇄상구균에서 얻은 SCP의 아미노산을 정렬한 것이다 (각각 서열 1, 2, 및 3). 서열은 지시된 아미노산 위치만 제외하면 동일하다. 삼각형 (∇)은 신호 펩티다제의 절단점으로 예상되는 위치를 지시한다. 효소의 활성 부위에 위치하는 것으로 예측되는 아미노산을 '*'로 표시했다. 아미노산 서열의 결실은 점선으로 나타내고, 박스로 처리했다.

도 3은 SCP 삽입 및 결실 변이체 제작 과정이다. 검은 박스는 결실되는 영역을 나타낸다.

도 4는 단색 FACS 분석결과이다. 형광 데이터는 PMN 상에서 게이팅 (gating)시켜 분석했다. 제2 게이트를 조절하여 제1 게이트에 의해 한정된 잘 염색된 세포를 세었다. 기낭을 1×10^6 CFU로 접종했다.

도 5는 비내 감염 후의 야생형 및 SCPA⁻의 존속율을 보여준다.

도 6은 SPCA 단백질을 비내 접종하여 CD-1 마우스를 면역시키면 M49형 연쇄상구균의 구강내 전이증식이 억제된다는 것을 보여준다.

도 7은 비내 주사 후, A군 연쇄상구균의 SPCA⁻ 및 M⁻ 돌연변이체가 마우스 내에서 전이증식하는 능력을 비교한 것이다. M6 연쇄상구균 2×10^7 CFU로 접종된 BALB/c 마우스 (각 실험군에 10 마리씩 사용)를 비교한다. 목구멍을 면봉으로 긁어내어 스트렙토마이신이 함유된 혈액 아가 플레이트 상에서 각각 하루씩 배양했다. 플레이트에 β -용혈성 콜로니 하나가 형성되면 마우스는 양성인 것으로 판단했다. 데이터를 χ^2 시험을 통해 통계적으로 분석했다.

도 8은 Δ SCPA49 백신의 제작 및 면역화 프로토콜을 보여준다.

도 9는 정제된 Δ SCPA49 단백질로 마우스를 비내 면역화시킨 후의 혈청 IgG 및 분비 IgA 반응을 보여준다. SPCA49에 특이적인 IgG의 혈청 및 타액내 양을 간접 ELISA로 측정했다. 각각의 마우스에서 얻은 혈청을 PBS 중에 1 : 2,560으로 희석했고, 타액은 PBS 중에 1 : 2로 희석시켰다.

도 10은 혈청형 M49 연쇄상구균이 면역 CD1 암컷 마우스 및 비면역 CD1 암컷 마우스에서 전이증식하는 능력을 비교한 것이다. 각 실험군에는 13 마리의 마우스가 사용되었고, 이 마우스들을 2.0×10^8 CFU로 비내 (i.n.) 감염시켰다. 이 데이터를 χ^2 시험을 통해 통계적으로 분석했다. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001.

발명의 상세한 설명

많은 박테리아 병원체에 의한 감염을 방어하기 위한 중요한 출발선은 감염 부위에 식세포 다형핵 백혈구 (PMN) 및 단핵 세포를 축적하는 것이다. 이들 세포는 숙주 인자 또는 침입 유기체가 분비하는 인자와 같은 화학주성 자극에 의해 유인된다. C5a 화학주성인자는 포유동물의 이런 염증 반응을 자극하는데 있어서 중심축이 된다. C5a는 보체의 제5 성분 (C5)으로부터 절단된 74개의 잔기로 된 당펩티드이다. 식세포는 C5a의 증감에 대해 직접적인 방식으로 반응하며, 감염 부위에 축적된다. C5a는 염증시에 식세포의 가장 즉각적인 유인자가 될 수 있다. PMN은 염증성 병변에 침투할 때 IL8과 같은 다른 화학운동인자 (chemokine)를 분비함으로써, 염증 반응을 더욱 강화한다.

연쇄상구균 C5a 펩티다제 (SCP)는 병원성 연쇄상구균의 표면에 위치한 단백질 가수분해 효소로서, C5a가 국소적으로 생성될 때 C5a를 파괴한다. SCP는 PMN 결합 부위 (C5a의 His⁶⁷-Lys⁶⁸ 잔기)에서 C5a 화학주성물질질을 특이적으로 절단하여 C5a의 C-최말단 잔기 7개를 제거한다. 이렇게 PMN 결합 부위를 절단하면 화학주성 신호를 제거하게 된다 (Cleary, P. 등, "Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase", *Infect. Immun.*, 60:5219-5223 (1992); Wexler, D.E. 등, "Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8144-8148 (1985)).

A군 연쇄상구균에서 얻은 SCP는 분자량 (M_r)이 124,814 Da인 서브틸리신-유사 세린 프로테아제로서, 많은 그램 양성 박테리아 표면 단백질에 흔한 세포벽 고정 모티프를 갖고 있다. C5a 펩티다제의 구조는 도 1에서 보여준다. 화농성 연쇄상구균의 연쇄상구균 C5a 펩티다제 유전자의 전체 뉴클레오티드 서열은 공개된 바 있다 (Chen, C. 및 Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*", *J. Biol. Chem.*, 265:3161-3167 (1990)). 서브틸리신과 반대로, SCP는 기질 특이성이 매우 협소하다. 이런 협소한 특이성은 이들의 촉매 도메인 사이에 현저한 유사성을 고려한다면 놀라운 일이다 (Cleary, P. 등, "Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase", *Infect. Immun.*, 60:5219-5223 (1992)). 전하 운반 잔기는 보존적이며, 이 잔기들은 결합 주머니의 양쪽에 위치하지만, SCP의 나머지 아미노산 서열은 서브틸리신의 서열과 관련이 없다. 40개 이상의 A군 연쇄상구균의 혈청형이 SCP 단백질을 생성하거나 그 유전자를 함유하는 것으로 밝혀졌다 (Clearly, P. 등, "A streptococcal inactivator of chemotaxis: a new virulence factor specific to group A streptococci", *Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Disease*, 179-180쪽 (S. Kotami 및 Y. shiokawa 편; Reedbooks Ltd., Berkshire, England; 1984); Podbielski, A. 등, "The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes", *Infect. Immun.*, 63: 9-20 (1995))

B군 연쇄상구균과 관련된 C5a 펩티다제 효소도 밝혀져 있다 (Hill, H. R. 등, "Group B streptococci inhibit the chemotactic activity of the fifth component of complement", *J. Immunol.* 141:3551-3556 (1998)). 제한 지도 작성 (restriction mapping) 및 scpB 뉴클레오티드 서열의 완성을 통해 scpB가 scpA와 97-98% 유사하다는 것이 밝혀졌다. 도

2를 참조하면, A군 연쇄상구균 균주 49, A군 연쇄상구균 균주 12, 및 B군 연쇄상구균 (각각 서열 1, 2, 및 3)의 SCP의 아미노산 서열이 비교되어 있다. B군 연쇄상구균의 모든 혈청형을 대표하는 30가지 이상의 균주가 scpB 유전자를 보유하고 있다 (Cleary P.P. 등, "Similarity between the Group B and A streptococcal C5a Peptidase genes", *Infect. Immun.* 60:4239-4244 (1992); Suvorov A. N. 등, "C5a peptidase gene from group B streptococci" *Genetics and Molecular Biology of streptococci, Lactococci and Enterococci*, 230-232쪽 (G. Dunny, P. Cleary and L McKay (편); American Society for Microbiology, Washington, D. C.; 1991).

또한, G군 및 C군 연쇄상구균의 인체 단리물은 scpA-유사 유전자를 함유한다. 일부 G군 균주는 이들의 표면에서 C5a 특이적 프로테아제 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다 (Cleary, P.P. 등, "Virulent human strains of group G streptococci express a C5a peptidase enzyme similar to that produced by group A streptococci", *Infect. Immun.*, 59:2305-2310 (1991)). 따라서, A군 연쇄상구균, B군 연쇄상구균, C군 연쇄상구균 및 G군 연쇄상구균의 모든 혈청형 (>80)은 SCP 효소를 생성한다.

SCP는 식세포 백혈구가 감염 부위에 유입되는 것을 억제하여 비인두 점막과 같은 잠재적 감염 부위에서 연쇄상구균이 전이증식할 수 있도록 돕는다. 이는 숙주가 초기에 연쇄상구균을 제거하는 것을 방해한다. 프로테아제 구조 유전자에 명확한 (well-defined) 돌연변이가 일어난 연쇄상구균 균주를 사용하여 염증, C5a 백혈구 화학주성 및 연쇄상구균 유독성에 대한 SCP의 영향을 검사했다. SCP 돌연변이체는 표적화된 플라스미드를 삽입하고 야생형 유전자를 특이적 내부 결실을 갖는 scpA로 치환시켜 제작되었다. 이 돌연변이체는 C5a 프로테아제 활성이 없으며, 사람 또는 마우스 PMN의 C5a에 대한 시험관내 화학주성 반응을 억제하지 않았다.

마우스 결합 조직 기낭 모델을 사용하여 SCP가 감염 부위에서 식세포의 유입 및 연쇄상구균의 제거를 지연시킨다는 것을 확인했다. 25 게이지 바늘로 소량의 공기와 PBS (이 안에 연쇄상구균이 함유되어 있거나 함유되어 있지 않음)를 마우스의 등 피하로 주사하여 결합조직 기낭을 발생시켰다 (Boyle, M.D.P. 등, "Measurement of leukocyte chemotaxis in vivo", *Meth. Enzymol.* 162:101-115 (1988)). 실험의 마지막에 마우스를 경부 탈구시켜 죽이고, 기낭을 이 마우스로부터 해부해내어 완충액 중에 균질화시켰다. 기낭 모델의 이점은 기낭이 수일 동안 팽창된 채로 유지되며 자극제를 주입하지 않는다면 염증이 없다는 것이다. 따라서 주입된 박테리아와 이로인해 야기되는 염증 반응은 짧은 감염 기간 동안 국소적으로 유지된다.

기낭 모델을 변형하여, 야생형 SCP⁺ 및 SCP⁻ 연쇄상구균 (즉, SCP의 비기능성 돌연변이형을 보유한 A군 연쇄상구균)의 제거율을 비교하고 감염의 초기 단계에서 세포내 침윤물을 분석했다. 조직 현탁액을 혈액 아가 플레이트 상에서 살아있는 연쇄상구균에 대해 분석하고, 세포내 침윤물을 형광 활성화 세포 분류기 (FACS)를 통해 분석했다. FACS 분석에서, 현탁액 중의 개별 세포는 특이적 모노클로날 항체로 표지했다. 표지된 세포의 일부를 FAC-스캔 유식세포측정기 (flowcytometer) 또는 형광 활성화 세포 분류기에 주입하여 이들의 독특한 형광을 기준으로 세포의 개수를 세었다. 기낭 모델을 사용한 실험 결과, SCP⁺ 인 연쇄상구균은 SCP⁻인 연쇄상구균 보다 독성이 강한 것으로 드러났다.

사람의 혈청 및 타액에서 SCP에 대한 사람의 항체인 IgG 및 IgA 둘다의 생성을 측정하는 연구를 수행했다 (O'Connor, SP 등, "The Human Antibody Response to Streptococcal C5a Peptidase", *J. Infect. Dis.* 163:109-16(1991)). 통상적으로, 감염되지 않은 어린 아이의 혈청 및 타액에는 SCP에 대한 항체가 없다. 반대로 건강한 성인에서 추출한 대부분의 혈청 및 타액 표본에는 항-SCP IgG 및 SCP-특이성 분비 IgA (항-SCP IgA)가 측정가능한 수준으로 존재했다. 연쇄상구균성 인두염을 앓는 급성 환자 및 회복기 환자의 혈청에는 건강한 사람의 혈청에서 보다 상당히 많은 항-SCP IgG가 있었다. 항-SCP 면역글로불린이 고농도로 함유된 혈청은 SCP 활성을 중화시킬 수 있었다. 최근에 연쇄상구균성 인두염을 앓은 적이 있는 어린이의 타액 표본에서 이 항체가 90% 이상인 것으로 검출되었는데, 이는 어린이가 항체 반응을 일으킬 수 있음을 입증한다.

사람이 천연 연쇄상구균 감염에 반응하여 SCP에 대한 IgG 및 IgA를 생성한다고 하더라도, 항-SCP 면역글로불린이 감염에 대한 임의의 방어 기능을 제공할 수 있을지에 대해서는 밝혀지지 않았다. 자연 감염 뒤의 연쇄상구균 감염에 대한 면역성의 원리는 잘 이해되고 있지 못하다. 또한, SCP 단백질이 β-용혈성 연쇄상구균 전이증식 또는 감염에 대한 백신으로 작용할 수 있는지도 알려진 바 없었다. 먼저, 비인강의 전이증식에서 SCP의 역할을 검사하는 연구를 수행했다. 살아있는 A군 연쇄상구균을 비내 주사한 후, 열흘 동안 매일 목구멍 샘플을 채취했다. 야생형 및 동계 (同系) SCP-결핍 돌연변이체 연쇄상구균이 이 10 일 동안 목구멍에서 존속할 수 있는 능력을 비교했다. 이미 예측한 바와 같이, SCP 결핍 돌연변이체 연쇄상구균이 더욱 신속하게 비인강에서 제거되었다.

면역성을 유도함으로써 전이증식을 억제하는 SCP의 능력을 동일한 비내 마우스 모델을 사용하여 시험했다. 재조합 scpA49 유전자의 돌연변이 형태 (유전자에서 5' 말단의 848-1033 뉴클레오티드 및 3' 말단의 3941-4346 뉴클레오티드가 없음)를 고도 발현 벡터 pGEX-4T-1로 클로닝하여 발현시켰다. 효소활성이 결여된 SCP 단백질 (dSCP)을 친화성 크로마토그래피에 의해 대장균 재조합체로부터 정제했다. 이 단백질 제제로 피내 백신 접종된 토끼 혈청은 시험관내 SCP 활성을 중화시켰다. 정제된 단백질 (40 μ g)을 5 주에 걸쳐 마우스에 비내 투여했다. 면역화된 마우스는 1-2 일 안에 연쇄상구균을 제거한 반면, 비면역 마우스의 목구멍 세포 배양물은 10 일까지 양성이 없다. 실험을 3개 군의 마우스에 대해 반복하여 이 마우스들에게 SCP 단백질의 3개의 별개 제제를 백신 접종시켰다.

추가 실험으로 하나의 A군 혈청형의 연쇄상구균 C5a 펩티다제로 한 동물을 면역화시키면, 이중 혈청형의 전이증식을 예방할 수 있는지 여부를 알아보았다. scpA49 유전자의 2908 bp 단편을 발현 벡터에 클로닝하여, 대장균에서 발현시켰다. 친화성 정제된 Δ SCPA49 단백질은 마우스 및 토끼에서 고도의 면역원성이 입증되었다. 정제된 Δ SCPA49 면역원은 효소 활성이 없지만, M1, M6, M12 및 M49 연쇄상구균과 관련된 시험관내 펩티다제 활성을 중화시킬 수 있는 토끼 항체를 높은 역가로 유도했다. 이는 항-펩티다제 항체가 교차-중화 항체 활성을 갖고 있음을 의미한다. 그 다음, 4개 군의 마우스를 Δ SCPA49로 비내 면역화시키고, 이들 각각을 A군 연쇄상구균의 다른 혈청형으로 항원투여했다. SCPA49 단백질의 결실형태를 사용한 마우스의 면역화는 특이적 타액 IgA 및 혈청 IgG 항체를 상당 수준으로 자극했고, M1, M2, M6, M11 및 M49 연쇄상구균의 전이증식 잠재성을 저하시켰다. 이런 실험을 통해, 연쇄상구균 C5a 펩티다제 백신을 이용한 면역화는 비인간의 전이증식 예방에 유효함이 확인되었다.

따라서, 본 발명은 β -용혈성 연쇄상구균 전이증식 또는 감염에 대한 포유동물 보호에 사용하기 위한 백신을 제공한다. 본 발명의 한 실시태양에서, 통상적인 백신이 그러하듯이, 연쇄상구균 C5a 펩티다제, 그의 변이체 또는 단편이 약학적으로 허용가능한 부형제와 함께 포유동물로 전달된다. 당업자라면, 전체 단백질을 사용할 필요는 없음을 이해할 것이다. 폴리펩티드 중 선택된 일부 (예를 들면, 연쇄상구균 C5a 펩티다제의 일부에 상응하는 합성 면역원성 폴리펩티드)를 사용할 수 있다.

또한, 당업자라면, 천연 SCP 아미노산 서열과 동일한 폴리펩티드를 사용할 필요는 없음을 이해할 것이다. 면역원성 폴리펩티드의 아미노산 서열은 천연 SCP 아미노산 서열에 본질적으로는 상응할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "본질적으로 상응한다"란 폴리펩티드 서열이 천연 SCP에 의해 발생하는 반응과 적어도 실질적으로 동등한 보호성 면역학적 반응을 유발함을 의미한다. 조성물 또는 백신에 대한 면역 반응은 숙주에서 해당 폴리펩티드 또는 백신에 대한 세포 매개 및(또는) 항체 매개 면역 반응을 통해 발생한다. 통상적으로 상기 반응에는 해당 조성물 또는 백신에 포함된 항원(들)에 특이적으로 지시된 항체를 생성하는 주체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 서프레스어 T 세포 및(또는) 세포독성 T 세포가 참여한다. 또한, 본 발명의 백신은 면역 반응을 향상시키는 것으로 알려져 있는 면역 아조반트의 유효량을 함유한다.

별법으로, SCP는 다른 펩티드 또는 다당류에 접합 또는 연결될 수 있다. 예를 들면, 당업계에 "담체"라고도 공지된 면역원성 단백질을 사용할 수 있다. 유용한 면역원성 단백질에는 키홀-립펩 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA), 난백알부민, 사람의 혈청 알부민, 사람의 감마 글로불린, 닭 면역글로불린 G 및 소 감마 글로불린 등이 있다. 유용한 면역원성 다당류로는 A군 연쇄상구균 다당류, B군 연쇄상구균의 C-다당류, 폐렴연쇄상구균 (*Streptococci pneumoniae*)의 피막 다당류 등이 있다. 또한, 백신으로 사용되는 다른 병원체의 다당류도 SCP에 접합 또는 연결될 수 있다.

환자를 면역화시키기 위해, SCP 또는 그의 면역학적 활성 단편 또는 돌연변이체를 비경구, 통상적으로는 적합한 부형제와 함께 근육내 또는 피하 주사로(parenterally) 투여한다. 그러나, 경구 전달 또는 비내 전달 등과 같은 다른 투여 방식도 이용가능하다. 백신 제제에는 부형제 중에 활성 성분을 유효량 함유할 것이며, 이 유효량은 당업자에 의해 쉽게 결정된다. 활성 성분은 전형적으로 조성물의 약 1% 내지 약 95%(w/w) 범위이며, 적합하다면 이보다 적거나 또는 많을 수도 있다. 투여량은 동물 또는 사람 대상체의 연령, 체중, 신체적 상태 등 접종시 고려되는 요인들에 따라 달라진다. 또한 투여량은 동물 면역계가 항체를 합성할 수 있는 능력 및 원하는 보호 정도에 따라서 달라진다. 당업자라면, 투여량 반응 곡선을 얻는 통상의 과정을 통해 유효한 투여량을 쉽게 결정할 수 있다. SCP 또는 그 단편을 1회 용량 이상 투여하여 대상체를 면역화시킨다. 연쇄상구균에 대한 면역 상태를 유지하기에 필요하다면 다중 용량을 투여할 수 있다.

비내 제제는 코의 점막에 자극을 일으키지도 섬모 기능을 심각하게 방해하지도 않는 부형제를 함유할 수 있다. 물, 염수 수용액 또는 다른 공지 물질 등의 희석제도 본 발명에 사용할 수 있다. 비내 제제는 또한 클로로부탄올 및 벤즈알코늄 클로라이드와 같은 방부제도 함유할 수 있는데, 방부제는 이것으로 제한되는 것은 아니다. 코 점막에 의한 시험 단백질의 흡수 향상을 위한 계면활성제도 함유할 수 있다.

경구 액체 제제는 예를 들면 수성 또는 오일성 현탁액제, 용액제, 에멀전제, 시럽제 또는 엘릭시르제 등의 형태이거나, 또한 건조하여 정제형 또는 사용 전에 물또는 다른 적당한 부형제를 타서 액상으로 되돌릴 수 있는 제품으로 제공될 수도 있다. 상기 액체 제제는 현탁제 (suspending agent), 에멀전화제, 비수성 부형제 (식용 오일을 포함할 수 있음), 또는 방부제 등의 통상적인 첨가제를 함유할 수 있다.

백신을 제조하기 위해서, 정제된 SCP, 그의 서브유닛 또는 돌연변이체를 단리하고, 동결건조시켜, 안정화할 수 있다. 이어서, SCP 펩티드를 적당한 농도로 조절하고, 경우에 따라 적당한 백신 아ジュ반트와 조합하여, 사용을 위해 포장할 수 있다. 적당한 아ジュ반트로는 헥사데실아민, 옥타데실아민, 리소lesi틴, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, N,N-디옥타데실-N'-N-비스(2-히드록시에틸-프로판 디아민), 메톡시헥사데실-글리세롤, 플루로닉 폴리올 등의 계면 활성제, 피란, 텍스트란 술페이트, 폴리 IC, 폴리아크릴산, 카르보폴 등의 폴라니온(polyanion), 무르아밀 디펩티드, 아이메틸글리신, 투프트신, 오일 에멀전, 알룸 등의 펩티드 및 이들의 혼합물 등이 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다. 다른 가능한 아ジュ반트로는 대장균의 열 불안정성 독소의 B 펩티드 서브유닛 또는 콜레라 독소의 B 펩티드 서브유닛 등이 있다 (McGhee, J. R. 등, "On vaccine development", Sem. Hematol., 30:3-15 (1993)). 마지막으로, 면역원성 생성물을 백신 제제용 리포솜으로 혼입시키거나 또는 키홀-림팻 헤모시아닌 (KLH) 또는 사람의 혈청 알부민 (HSA)과 같은 단백질 또는 다른 중합체와 접합시킬 수 있다.

전이증식을 억제하기 위한 포유동물의 백신 접종용으로 SCP, 이의 서브유닛 또는 돌연변이체를 사용하면, 다른 백신 후보들보다 나은 이점이 있다. 단일 단백질로 접종하여 전이증식 또는 감염을 예방하는 것은 패혈성 인두염 및 농가진 등 매우 통상적인 문체 질병의 발생율을 저하시킬뿐 아니라 류마티스성 발열, 급성 사구체신염, 패혈증, 독성 쇼크 및 괴사성 근막염 등과 같은 후유증도 없앨 수 있다.

다음의 실시예는 본 발명을 설명하고자 함이며, 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

<실시예 1>

scpA49 및 scpA6에서 삽입 및 결실 돌연변이체의 제작

a) 박테리아 균주 및 배양 조건: 화농성 연쇄상구균 균주 CS101은 혈청형 M49 및 OF⁺ 균주이다. CS159는 M 유전자 클러스터 및 scpA를 통해 연장된 결실이 일어난 임상 단리물이다. 정상(stationary) 배양물로부터의 연쇄상구균을 스트렙토마이신 (200 μg/ml) 함유 트립토스 혈액 아가 상에 플레이팅하여 CS101 균주에서 유래된 자발적인 스트렙토마이신 내성 유도체인 CS101Sm을 선택했다. CS101::pG⁺ 숙주5는 pG⁺ 숙주5가 scpA와 emm 유전자 클러스터의 외부에 있는 미지의 위치에서 염색체로 통합된 CS101 균주이다. 대장균 균주 ER1821 (New England Biolabs, Inc. 제품, 미국 매사추세츠주 버버리 소재)을 자살 벡터 (suicide vector), 플라스미드 pG⁺ 숙주5 (Appligene, Inc. 제품, 미국 캘리포니아주 플레슨톤 소재)를 위한 수용체로 사용했다. 연쇄상구균을 2 % 네오펩톤 또는 1 % 효모 추출물로 보충된 토드-헤윅 브로스(Todd-Hewitt broth) 또는 5 % 양 혈액이 함유된 트립토스 아가 플레이트 상에서 성장시켰다. 플라스미드 pG⁺ 숙주5가 함유된 대장균 균주 ER1821은 에리트로마이신 (300 μg/ml)이 함유된 LB 브로스에서 증식시켰다. 플라스미드 pG⁺ 숙주5를 함유한 연쇄상구균은 1 % 효모 추출물 (THY) 및 에리트로마이신 (Erm) 1 μg/ml이 함유된 토드-헤윅 배양액에서 배양했다.

SCP는 통상적으로 β-용혈성 연쇄상구균의 연쇄상구균 C5a 펩티다제를 지칭한다. SCPA12, SCPA49, SCPA6은 각각 A군 연쇄상구균 M형 12, 49 및 6 균주의 특이적인 펩티다제들이다. 용어 scpA란 A군 연쇄상구균의 SCP를 코딩하는 유전자를 지칭한다. ScpA12, scpA6 및 scpA49는 SCPA12, SCPA49 및 SCPA6 펩티다제를 코딩하는 유전자들이다. SCPB 및 scpB란 B군 연쇄상구균의 펩티다제 및 유전자를 지칭한다. SCPA49 (서열 1), SCPA12(서열 2) 및 SCPB (서열 3)의 아미노산 서열은 도 2에 나타났다.

b) scpA 삽입 돌연변이체의 제작: scpA의 명확한 삽입 돌연변이체는 플라스미드 삽입 및 유전자 치환 방법을 통해 제작되었다. 내부 scpA49 BglIII-BamHI 단편인 삽입 표적을 열민감성 셔틀 벡터 pG⁺ 숙주5에 라이게이션시켜 플라스미드 pG⁺::scpA1.2를 형성하고, 이를 사용하여 대장균 ER1821을 형질전환시켰다 (도 3). pG⁺ 숙주5 벡터에는 대장균의 복제 기점, 온도 민감성 그램 양성의 복제 기점 (연쇄 상구균에서는 30 °C에서 활성, 39 °C에서는 불활성) 및 선별을 위한 에리트로마이신 내성 유전자가 포함되어 있다. 고온을 가해서, 10⁻² 내지 10⁻³ 빈도의 상동성 재조합 (homologous recombinant)으로 플라스미드가 A군 연쇄상구균의 염색체 DNA에 통합되도록 한다.

제조합 플라스미드 DNA pG::scpA1.2를 CS101 수용체 세포로 전기천공 (electroporation)시켰다. 30 °C에서 1 µg/ml 에리트로마이신이 함유된 THY-아가 플레이트 상에서 형질전환체를 선별했다. 플라스미드 삽입부와 염색체 scpA 사이의 재조합으로 생성된 염색체 통합체 (integrant)를 39 °C에서 에리트로마이신 내성을 이용해 선별했다. 두 개의 삽입 돌연변이체, M14 및 M16을 분석했다. 30 °C에서 M14 및 M16 균주의 EmrS 복귀변이체를 항생제가 없는 THY에 통과시켜 얻고, 마지막으로 Erm 선별없이 37 °C에서 플레이트했다. 플라스미드를 상실한 콜로니를 단리하여, 이 돌연변이체 표현형이 동시에 일어난 관련없는 돌연변이에 의한 것이 아니라 플라스미드를 scpA49에 삽입시켜서 발생한 것임을 확인했다.

c) scpA로의 명백한 결실 (defined deletion) 도입: scpA 내부에 명백한 결실이 있는 돌연변이 균주를 제작하여, scpA 내에 삽입이 말단에 일어나서 하류 유전자 (이 유기체의 독성에 기여할 수 있는 미지의 유전자)의 발현을 감소시킬 가능성을 배제했다. 우선, 프라이머 1 (5'-GGGGGGGAATTCGTAGCGGGTATCATGGGAC-3') (서열 4) 및 프라이머 2 (5'-GGGGGGGAATTCGGGTGCTGCAATATC-TGGC-3') (서열 5)를 사용한 인사이드-아웃 PCR (inside-out PCR)로 scpA의 BglIII-HindIII 단편에서 명백한 결실을 일으켰다. 밀줄친 뉴클레오티드는 각각 scpA 서열의 배위 2398 및 2322에 상응하며, 굵게 나타낸 뉴클레오티드는 EcoRI 인식 부위에 상응한다. scpA 유전자에 플레임 내부 결실을 발생시키는 프라이머를 선택했다. 이들 프라이머는 플라스미드 DNA를 반대 방향으로 카피하며, 결실의 경계를 한정한다 (Innis, M. A. 등, (편), PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Academic Press, 1990)). 플라스미드 pG::scpA1.2 DNA를 주형으로 사용했다.

증폭된 생성물을 EcoRI로 절단하고, 플라스미드 pG⁺ 숙주5에 라이게이션시켰다. 이로써 생성된 플라스미드 pG::ΔscpA1.1은 scpA 내부에 76 bp 결실을 함유했다. 상기 플레임 내부 결실로 인해, 세린 프로테아제의 촉매 중심으로 예측되는 부분을 형성하는 세린을 비롯한 25개 아미노산이 제거되었다 (Chen, C. 및 Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*", J. Biol. Chem., 265:3161-3167 (1990)). EcoRV 부위는 결실 지점에서 생성되었다. 결실부와 겹쳐지는 DNA를 서열분석해서, 결실의 경계를 확인했다.

결실부를 함유하는 플라스미드 pG::scpA1.1로 대장균 ER1821을 형질전환시켰다. 콜로니를 ErmR에 대해 선별한 후, EcoRI로 절단된 플라스미드 DNA 미니프렙 (miniprep)을 사용하여 적합한 scpA 결실을 스크리닝했다. 결실부의 정확한 경계를 DNA 서열분석으로 확인했다. 상기한 바와 같이, 플라스미드 pG::ΔscpA1.1을 균주 CS101Sm로 전기천공시킨 후, 39 °C에서 Erm 상에서 성장시켜 통합체를 선별했다. 고온 선별법을 사용하여 플라스미드를 M49 균주 CS101Sm의 염색체에 고온 선별을 사용하여 통합시켰다. 삽입 위치는 PCR로 확인했다. CS101Sm (pG::scpA1.1)을 에리트로마이신 선별 없이 저온에서 성장시켜, 삽입에 의해 생긴 이중 scpA 서열 간의 재조합으로 인한 제거에 의해 또는 무작위적 결실에 의해 플라스미드를 상실한 ErmS 복귀변이체가 높은 빈도로 분리되었다. 2 가지 결실 돌연변이체, MJ2-5 및 MJ3-15를 확인하고 더 연구했다. 플라스미드 pG::scpA1.1의 재조합적 제거 후 남은 염색체 결실부는 PCR과 EcoRV 절단 DNA에 대한 서던 (Southern) 혼성화에 의해 분명해졌다.

d) SCP에 대한 시험관내 영향: 상기 삽입 및 결실이 SCP 항원의 발현 및 펩티다제 활성에 미치는 영향을 웨스턴 블롯팅 및 PMN 부착 분석으로 평가했다. 37 °C에서 연쇄상구균을 THY 100 ml 중에서 밤새 인큐베이션시켰다. 배양물의 펠렛을 0.2 M 냉각 아세트산나트륨 (pH 5.2) 5ml로 2회 세척한 후, TE-수크로스 완충액 (20 % 수크로스 10 mM 트리스, 1 mM EDTA, pH 7.0) 1 ml 및 뮤타놀리신 40 µl에 현탁시켰다. 혼합물을 37 °C에서 2 시간 동안 회전시킨 후, 5 분 동안 4500 rpm으로 원심분리시켰다. 상층물에 프로테아제 억제제인 100 mM의 페닐메틸 술폰닐 플루오라이드 (PMSF)를 첨가했다. 전기영동 및 웨스턴 블롯팅 방법을 문헌 (Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature 227:680-685 (1970))에 기재된 바와 같이 수행했다. 콜로니 블롯팅을 위해, 콜로니를 THY 아가 플레이트 상에서 성장시키고, 니트로셀룰로스막 (BioBlot-Nc 제품, 미국 매사추세츠주 캠프리지 코스터 소재)상으로 프린트하고, 10 분 동안 적외선 램프 아래에 고정시켰다가 항체에 노출시켰다 (O'Connor, S.P. 및 Cleary, P.P., "In vivo *Streptococcus pyogenes* C5a peptidase activity", J. Infect. Dis. 156:495-506 (1987)). 웨스턴 및 콜로니 블롯팅에서 SCP 단백질 검출에 사용된 1차 항혈청은 토끼를 정제된 제조합 SCP 단백질로 면역화시켜서 제조했다. 결합 여부는 항-토끼 항체 알칼리성 포스파타제 접합체로 검출했다.

C5a 펩티다제 활성을 PMN 부착 분석으로 측정했다 (Booth, S.A. 등, "Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherence function", J. Invest. Dermatol. 98:135-140 (1992)). C5a (Sigma 제품, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)를 연쇄상구균 추출물 또는 정제된 프로테아제와 인큐베이션시킨 후의 잔류 C5a는 PMN을 활성화시켜서 이것이 BSA로 코팅된 웰에 부착되도록 할 수 있다. 우선, 마이크로타이터 웰을 PBS 중의 0.5 % BSA로 코팅한 후 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션시켰다. 사람의 PMN을 피콜 하이파크 (Ficoll Hypaque, Sigma 제품, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) 중에서 원심분리시켜 단리했다. 무손상 연쇄상구균 또는 단백질 추출물 40 µl을 1 % 포도당 및 0.1 % CaCl₂를 함유

한 PBS 340 μ l 중의 5 μ M C5a 20 μ l과 함께 37 °C에서 45분 동안 인큐베이션시켰다. BSA로 -코팅된 웰을 PBS로 세척하고, PMN을 재현탁하고, 잔류 C5a를 웰에 첨가했다. 혼합물을 37 °C, 7 % CO₂ 중에서 인큐베이션시켰다. 마지막으로, 웰을 세척하여 미부착 PMN을 제거했다. 부착된 PMN을 크리스탈 바이올렛으로 염색하고, ELISA 판독기로 OD_{570nm}을 판독했다. 흡광도는 잔류 C5a의 양에 비례하거나, SCP 활성화량에 반비례한다.

삽입 돌연변이체는 SCPA49 항원을 완전히 상실한 반면, 결실 돌연변이체인 MJ2-5 및 MJ3-15는 예상된 바와 같이, SCP 항원을 생성했다. 완전한 세포 및 M14, M16, M2-5 및 MJ3-15로부터의 뮤타놀리신 단백질 추출물 모두 마이크로타이터 플레이트에서 rC5a에 의해 활성화된 PMN의 부착을 파괴할 능력이 없었다. 돌연변이체 추출물과 관련된 소량의 잔류 억제 활성 (10-15 %)은 호중구에 대한 추출물의 독성 효과에 기인한 것일 수 있다.

<실시예 2>

피하 주입 부위에서 SCP에 의한, 식세포의 동원 및 연쇄상구균의 제거 지연

SCP가 C5a의 불활성화를 담당함을 입증하기 위해, scpA 삽입 및 결실 돌연변이체를 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 제작하고, 활성을 시험했다. scpA내로 삽입 또는 결실이 도입되는 경우, 돌연변이체 SCP는 C5a에 의해 활성화된, 마이크로타이터 플레이트로의 PMN 부착을 C5a 파괴할 수 없었다.

연쇄상구균이 국소적으로 머물러 있고 염증 세포의 유입을 분석할 수 있는 동물 모델을 사용하여 scpA의 돌연변이가 독성에 미치는 영향을 시험했다. SCP가 유기체 제거 지연의 매우 초기에 기능한다는 가설을 시험하기 위해, 결합조직 기낭에 SCP⁺ 및 SCP⁻ 연쇄상구균을 접종한지 4 시간 후, 이들의 생사를 비교했다. 또한, 이렇게 짧은 감염 기간 이후 림프절 및 비장으로 연쇄상구균이 퍼져나가는 것도 평가했다. 모든 실험에 CD1 수컷 이계교배(異系交配) 마우스 (25 g) (Charles River Breeding Laboratory 제공, 미국 매사추세츠주 윌밍톤 소재)를 사용했다. 25 개지 바늘로 공기 0.9 ml 및 PBS에 희석된 A군 연쇄상구균 0.1 ml를 마우스의 등 피하로 주사하여 결합조직 기낭을 발생시켰다. 일부 실험에서

SCP⁺ CS101::pG⁺ 숙주5를 양성 대조구로 사용했다. 다른 실험에서는 CS101Sm를 양성 대조구로 사용했다. 마우스를 주사 4 시간 후 경부 탈구로 죽였다. 표시된 4개의 모든 사타구니 림프절, 비장 및 기낭을 동물로부터 절개해 내고, PBS 중에서 균질화했다. 조직 현탁액을 1 μ g/ml 에리트로마이신 또는 200 μ g/ml 스트렙토마이신을 함유하는 혈액 아가 플레이트 상에서 살아있는 콜로니 형성 유닛 (CFU)에 대해 분석했다.

예비 실험에서, 기낭을 슬라이드 상에 고정시키고, 라이트 염색 (Wright's stain)으로 염색하고, 현미경으로 검사했다. 이 방법으로 과립구의 수는 신뢰할 수 없지만, 고정된 조직에서 야생형 연쇄상구균 보다 잔류 SCP⁻가 훨씬 적은 것으로 나타났다. 추가의 실험을 수행하여 이 차이를 측정하고자했다. 기낭을 PBS 중에서 분쇄하고 나일론 모노필라멘트 메시 (TETKO Co. 제품, 미국 뉴욕 소재)에 통과시켜 기낭의 세포들을 분산시켰다.

세포를 5 분 동안 300 x g으로 원심분리하여 펠렛화하고, FACS 완충액 (페놀 레드가 없는 헵크 균형 염 용액, 0.1 % NaN₃, 1.0 % BSA 분획 V) 1 ml 당 세포수 5 x 10⁶으로 재현탁시켰다. 세포 (1.0 x 10⁶)를 1 μ g FITC 항-마우스 Mac-1으로 직접 염색하거나 또는 1 μ g 바이오틴 접합 항-마우스 Gr-1으로 간접 염색한 후, 형광 또는 FITC로 표지된 스트렙타비딘 1 μ g로 염색했다. 모노클로날 항체인 Mac-1 및 Gr-1은 파밍겐 인크 (Pharmingen, Inc., 미국 캘리포니아주 소재)로부터 구입했다. 표지된 세포를 1.0 % 파라포름알데히드 중에 고정시켰다. FAC-스캔 유식 세포 측정기 및 콘솔트 (Consort) 32 소프트웨어 (Becton Dickinson 제품)를 사용하여 형광 프로필을 작성했다. 마우스 PMN을 피콜 하이파크 밀도 구배 원심분리를 통해 온전한 세포로부터 정제하고, 혼합 집단 중의 정의된 PMN에 대한 표준으로 사용했다. 특정 표지된 세포를 확인하기 위해, 각 항체 마커에 대한 평균 형광을 결정했고, 게이트를 진하게 표지된 세포를 반영하도록 설정했다. 대조구에는 염색하지 않은 세포와 단지 스트렙타비딘 FITC에만 노출된 세포가 포함되었다.

2 가지 실험을 수행했다. 첫번째 실험은 scpA49 삽입 돌연변이체 M16을 그것의 SCP⁺ 모배양물인 균주 CS101과 비교하는 것이었다. 두번째 실험은 scpA49 결실 돌연변이체 MJ3-15를 그것의 모체인 균주 CS101Sm과 비교하는 것이었다 (표 1). 두 실험에서, 약 4시간 후에 함유된 연쇄상구균의 개수는 SCP⁻ 연쇄상구균으로 접종된 마우스에서 얻은 균질화된 기낭의 경우가 야생형 연쇄상구균으로 접종한 기낭의 더 적었다. 첫번째 실험에서는 2배 감소를 보였고, 두번째 실험에서는 4배 감소를 보였다. 이런 차이는 언페어드 (Unpaired) t-시험을 사용하여 각각 P<0.05 및 P<0.01일 때 통계적으로 의미가 있다. 야생형 SCP⁺ 연쇄상구균이 마우스 8 마리 중 7 마리로부터의 비장 균질물에서 발견된 반면, SCP⁻ 돌연변이체는

비장에서 거의 발견되지 않았다. 림프절 균질물의 경우에는 반대로 나타났다. SCP⁻ 연쇄상구균으로 감염시킨 16 마리의 마우스 중 10 마리의 림프절에는 살아있는 연쇄상구균이 함유되어 있는 반면, 야생형 연쇄상구균으로 감염시킨 마우스는 16마리 중 단지 4 마리의 림프절에만 살아있는 박테리아가 함유되어 있었다. 이런 차이는 피셔 (Fisher) 정밀 검사를 사용하여 P < 0.05일 때 통계적으로 의미있는 것으로 결정했다.

[표 1]

SCP⁺ 및 SCP⁻ 연쇄상구균을 기낭 주입한지 4 시간 후, 이들의 분포

균주	생쥐 ^a 의 수	양성 배양물 수		균질화된 기낭 ^c
		지라 ^b	림프절	
CS101pG (SCP ⁺)	8	7	2	1.3x10 ⁸ ± 2.2x10 ⁷
M16 (SCP ⁻)	8	0	5	6.0x10 ⁷ ± 1.3x10 ⁷
CS101Sm (SCP ⁺)	8	6	2	1.6x10 ⁸ ± 2.6x10 ⁷
MJ3-15 (SCP ⁻)	8	1	5	3.7x10 ⁷ ± 1.5x10 ⁷

a 각각의 생쥐에는 정상(stationary phase) 연쇄상구균을 3 x10⁸ CFU로 접종시켰다.
 b SCP⁻ 연쇄상구균의 경우에 대한 지라로부터의 SCP⁺ 연쇄상구균 단리 빈도의 차이는 피셔의 정밀 시험에 의한 각각의 실험에서 통계적으로 중요했다 (P < 0.05)
 c 언페어드 t 시험에 의한 각각의 실험에서 균질화된 기낭 (평균 ± SEMs)에서 단리된 CFU의 차이는 균주 CS101pG (SCP⁺) 및 M16 (SCP⁻) 및 MJ3-15 (SCP⁻)에서 의미가 있었다 (P < 0.001)

PMN이 더욱 많이 동원될수록 기낭으로부터의 연쇄상구균 제거는 더욱 신속해진다. 기낭 내의 전체 세포집단, Mac-1 양성 과립구의 백분율 (Springer, G 등, "Mac-1: macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody", Eur. J. Immunol. 9:301-306 (1979)), 및 Gr-1 양성 PMN의 백분율 (Brummer, E. 등, "Immunological activation of polymorphonuclear neutrophils for fungal killing: studies with murine cells and blastomyces dermatitidis in vitro", J. Leuko. Bio, 36:505-520 (1984))을 단색 FACS 분석을 통해 비교했다 (Clark, J. M., "A new method for quantitation of cell-mediated immunity in the mouse", J. Reticuloendothel. Soc. 25:255-267 (1979)). 간단하게 말하자면, FACS 분석에서, 현탁액 중의 개별 세포를 특이적 형광 모노클로날 항체로 표지했다. 표지된 세포 일부를 취해 FAC-스캔 유식세포측정기 또는 형광 활성화 세포 분류기 내로 주입하여 이들의 독특한 형광을 근거로 세포의 개수를 세었다.

SCP⁻ 결실 돌연변이체를 주입한 기낭에는 SCP⁺ 연쇄상구균을 접종한 기낭보다 2배 많은 염증 세포가 함유되어 있었다 (도 4). 접종물 규모를 100배 증가시켜도 이 차이가 변하지 않았다. 1 x 10⁶ SCP⁻ 세포, MJ3-15 균주를 주입한 기낭은 SCP⁺ 배양물로 접종한 것보다 3배 더 많은 Gr-1 양성 세포를 함유했다. SCP⁺ 연쇄상구균을 접종한 기낭에서는 대략 6%의 세포가 PMN이었고, 21%가 PMN을 비롯한 다른 종류의 Mac-1⁺ 과립구였다. 반대로, SCP⁻ 연쇄상구균을 접종한 기낭에는 주로 PMN이 함유되어 있었다. Gr-1 양성 세포는 Mac-1 양성 세포의 수와 같거나 그 보다 많았다. 유식세포측정기 게이트는 단지 고도 염색 과립구만을 측정하도록 설정되었다. 어느 항체로도 염색되지 않는 나머지 70 내지 80%의 세포는 저염색 과립구, 적혈구 또는 림프구였을 것이다. 많은 림프구가 라이트 염색 기낭 표본에서 현미경으로 관찰되었다.

비장 균질물에서 발생한 연쇄상구균 SCP⁺ 콜로니는 물방울 모양으로 고도로 캡슐화되어 있었다. 반대로, 림프절에서 발생한 SCP⁻ 콜로니는 그 접종물과 거의 유사하지 않았다. 이것들은 비점액질 및 중간 점액질 콜로니의 혼합물이었다. 이런 데이터는 M⁺SCP⁺로 캡슐화된 연쇄상구균이 주입 4 시간 이내에 적응하고, 증식하고, 혈류로 침투한다는 것을 의미한다. 돌연변이체 및 야생형 연쇄상구균의 교통(trafficking)에 차이가 나는 것은 SCP⁻ 박테리아에 반응하여 식세포가 보다 격렬하게 유입되기 때문일 수 있다. 대식세포 및(또는) 피부 수상돌기 세포는 더욱 신속하게 SCP 연쇄상구균을 탐식(engulf)하여 이들을 림프절로 전달할 수 있다. 야생형 연쇄상구균에 비해 연쇄상구균 돌연변이체의 감소는 예상치 못한 발견인데, 왜냐하면 SCP⁻ 연쇄상구균은 M⁺이고, 사람의 호중구에 의한 시험관내 식세포 작용에 대한 내성이 있기 때문이다.

<실시예 3>

마우스 비인강의 전이증식에서의 SCP 필요성

야생형 (SCP⁺) 및 SCP⁻ 연쇄상구균을 마우스에 비내로 접종하여, 비인강에서 이들의 전이증식 능력을 상대적으로 평가했다. 스트렙토마이신 내성 M49 균주 CS101 및 결실 돌연변이체 MJ3-15를 이 실험에 사용했다. 유일하게 마우스에게 독성일 수 있고 동물에서 존속하기 위해 M 단백질 및(또는) SCP에 더 이상 의존적이지 않을 수 있는 변이체를 선택하지 않기 위해 배양물을 마우스에 통과시키지 않았다.

CD1 이계교배 마우스를 정상 CFU 2×10^8 로 비내 접종했다. 마취된 마우스의 비인강을 8 내지 10 일 동안 매일 면봉으로 긁어내어 스트렙토마이신이 함유된 혈액 아가 상에 스트리킹(streaking)했다. SCP⁺ 및 SCP⁻ 사이의 차이는 1일에 분명하게 드러났으나, 통계적으로 의미가 있는 차이는 3일 및 4일까지는 나타나지 않았다 (도 5). 4일까지, M⁺SCP⁺ 연쇄상구균으로 감염된 마우스 18 마리 중 9 마리가 양성 목구멍 배양물을 생성한 반면, M⁺SCP⁻ 균주로 감염된 마우스는 18 마리 중 단지 2 마리만 그 목구멍에 연쇄상구균을 보유하고 있었다. SCP⁺ 연쇄상구균으로 감염된 마우스 18 마리 중 4 마리는 상기 감염으로 인해 죽었다. SCP⁻ 박테리아로 감염된 마우스는 감염 후 한 마리도 죽지 않았다. 혈액 아가 플레이트 상의 콜로니의 수는 SCP⁻ 연쇄상구균이 더 신속하게 제거되는 것과는 일치했다. 예를 들면, 3일째 되는 날 7 마리의 마우스로부터 얻은 배양물에 함유된 SCP⁺는 > 100 CFU였지만, SCP⁻ 연쇄상구균으로 접종된 경우에는 단지 한 마리의 마우스만이 > 100 CFU를 함유하고 있었다.

M49 연쇄상구균은 피부 감염과 더욱 흔히 관련이 있기 때문에, 목구멍 감염에 더욱 흔히 관련된 혈청형인 M6 균주를 가지고 상기 실험을 반복했다. 실시예 1에 이미 기재된 방법으로, M6 균주 UAB200을 사용하여 삽입 돌연변이체인 균주 AK1.4를 제작했다. 균주 AK1.4는 또한 야생형 M6 배양물보다 비인강으로부터 더 신속하게 제거되었다. 상기 실험을 통해, A군 연쇄상구균이 마우스 비인강에서 존속하기 위해 SCP에 의존한다는 것을 확인했다. 상기 실험에 사용된 모든 SCP⁻ 돌연변이체는 M⁺로서, 이들은 신선한 사람 혈액에 의한 식세포 작용에 저항했다. 그러나, 이들은 비인두 점막으로부터 제거되었다.

<실시예 4>

정제된 재조합 SCPA49를 사용한 마우스의 비내 면역화에 의한, 비내 항원 투여 후의 전이증식 차단

scpA49 유전자의 결실 형태에 상응하는 PCR 단편을 CS101 M49 A군 연쇄상구균 (dSCP)로부터 클로닝했다. 이 단편을 뉴클레오티드 1033에서 시작되는 전방향 프라이머와 뉴클레오티드 3941에서 시작하는 역방향 프라이머를 사용한 PCR로 증폭시켰다 (뉴클레오티드 번호는 Chen, C. 및 Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*", *J. Biol. Chem.*, 265:3161-3167 (1990)에 따름). 상기 단편을 고도 발현 벡터인 pGEX-4T-1 (Pharmacia Inc. 제품) 상의 글루타티온 트랜스퍼라제 유전자의 트롬빈 결합 부위에 라이게이션시켰다. pJC6라고 명명된 scpA를 함유하는 플라스미드는 1996년 10월 15일, 부다페스트 조약의 규정에 따라 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection, 미국 20852 메릴랜드주 록빌 파크론 드라이브 12301 소재)에 ATCC 수탁번호 98225로 기탁되었다.

하나의 대장균 클론으로부터 트랜스퍼라제-SCP 융합 단백질을 발현시키고, 글루타티온 세파로스 4b 칼럼 상에서 친화성 크로마토그래피를 통해 정제했다. 제조업자 (Pharmacia)가 기재한 방법대로 수행했다. 트롬빈을 사용하여 dSCP를 혼성 단백질로부터 절단했다. 벤즈아미딘 세파로스 6B 칼럼 (Pharmacia 제품) 상에서의 크로마토그래피로, 용출된 SCP로부터 트롬빈을 제거했다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅을 통해 친화성 정제된 단백질이 순수한 SCPA49임을 확인했다. 정제된 SCPA49에 대해 지시된 초면역 (hyperimmune) 항혈청을 토끼에서 제조했다. 재조합 SCP는 펩티다제로 기능하지 않았다.

2개 균의 마우스 각각에 코구멍으로 총 단백질량 40 μ g을 10 μ l씩 5 주 동안 4회 투여하여 면역화했다. 대조용 마우스에는 PBS만 투여했다. 감염시키기 전에, 마우스 5 마리씩의 군으로부터 혈청을 풀링(pooling)하고, 이를 ELISA로 검사하여 항-SCPA49 항체가 높은 역가로 함유되어 있음을 확인했다 (표 2).

[표 2]

SCP에 대한 항체 (IgG)의 역가

실험	샘플	면역전	면역후
I SCP	I	< 1 : 10	1 : 320 - 1 : 640
	II	< 1 : 10	1 : 320
	III	< 1 : 10	1 : 640 - 1 : 1,280
I PBS	I	< 1 : 10	< 1 : 10
	II	< 1 : 10	< 1 : 10
	III	< 1 : 10	< 1 : 10
II SCP	I	< 1 : 10	1 : 5,120
	II	< 1 : 10	1 : 2,560
	III	< 1 : 10	1 : 5,120
II PBS	I	< 1 : 10	< 1 : 10
	II	< 1 : 10	< 1 : 10
	III	< 1 : 10	< 1 : 10
III SCP	I	< 1 : 10	1 : 800
	II	< 1 : 10	1 : 800
III PBS	I	< 1 : 10	< 1 : 10

마지막 백신 부스팅한지 7일 후, 마우스에 야생형 CS101Sm 균주 3×10^8 CFU로 항원투여했다. 두 개의 별개 실험에서, 면역화된 마우스는 감염 48 시간 후, 연쇄상구균이 없었다 (도 6, 표 3 및 4). 반대로, 백신 접종을 받지 않은 대조군의 경우에는 30 내지 50 %가 6일 동안 양성 배양물로 남아있었고, 몇몇은 감염 10일 후까지도 양성이었다. 차이는 피셔 정밀 실험을 통해 통계적으로 의미있는 것으로 확인되었다. 면역화된 마우스 및 대조용 마우스의 제3군의 감염 결과도 이와 유사했다.

상기 돌연변이체 SCPA49 단백질에 대해 지시된 높은 역가의 토끼 혈청은 무손상 M1, M12 및 M6 연쇄상구균과 관련한 펩티다제 활성을 시험관내 중화시킬 수 있었으며, 이는 펩티다제가 혈청형 특이성을 상실했음을 의미한다. 따라서, 펩티다제로 기능하지 않는 SCP도 백신으로 효과가 있다. 마우스를 비내 접종하기 전에 토끼 항-SCP과 M49 연쇄상구균의 예비 인큐베이션은 전이증식을 감소시키지 않았다는 것을 주지해야 한다.

[표 3]

대장균 DH5a에서 발현된 SCP 또는 PBS로 비내 백신 접종된 마우스의 비내 항원 투여 후, 연쇄상구균에 대한 목구멍 배양물

생쥐	항원투여 후의 경과일									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBST-II										
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	77	>200	150	4	11	3	0	51	97	53
4	9	>200	>200	3	11	3	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	4	6	45	47	3	>200	29	>200	83	70
7	15	194	>200	9	172	10	5	3	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	32	4	4	0	0	0	0	0	0
10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	127	4	0	0	0	0	0	0	0	0
양성 개수	8	6	5	5	4	4	2	3	2	2
SCPAD-II										
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
양성 개수	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

[표 4]

대장균 DH5a에서 발현된 SCP 또는 PBS로 비내로 백신 접종된 마우스의 비내 항원투여 후, 연쇄상구균에 대한 목구멍 배양물

생쥐*	항원투여 후의 경과일									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBSCT-I										
1	112	143	85	16	0	0	0	0	0	0
2	127	27	18	89	3	7	7	7	70	3
3	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	108	>200	66
4	31	200	4	2	0	0	0	0	0	0
5	4	0	0	3	3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	>200	>200	120	125	91	145	>200	>200	>200	166
8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	37	>200	194	16	>200	47	>200	101	>200	>200
양성 개수	8	6	6	7	5	4	4	4	4	4
SCPAD-I										
1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	105	41	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	9	0	11	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	19	0	0	5	57	0	0	21	91
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
양성 개수	7	2	1	0	1	1	0	0	1	1

* 첫번째 접종시 박테리아 투여량이 너무 적었기 때문에 이 생쥐는 두번 접종했다.

<실시예 5>

B군 연쇄상구균으로부터의 C5a 펩티다제는 M12 및 M19 A군 연쇄상구균과 서열이 거의 동일함

B군 연쇄상구균 C5a 펩티다제 (SCPB) 유전자를 클로닝하고, 서열분석하고, 혈청형 A

군 연쇄상구균 M12 및 M49의 서열과 비교했다. 상기 실시예 4에 기재된 방법대로, scpA12 서열 일부에 상응하는 프라이머를 사용한 PCR로 전체 scpB 유전자를 증폭시켰다. SCPB 유전자는 분자량 (Mr)이 126,237 Da이고 1150개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 지정하는 3450 bp의 오픈 리딩 프레임 (open reading frame, ORF)을 코딩한다. SCPB의 아미노산 서열은 도 2에 나타났다. scpB 뉴클레오티드 및 추정 아미노산 서열을 M12 및 M49 A군 연쇄상구균의 서열과 비교하면 각각 98 % 및 97 %의 큰 유사성을 보인다. scpB는 C-말단 반복부가 2번 중첩되는 50 bp 결실을 함유하며, scpA 유전자와 비교할 때 몇 가지 다른 근소한 차이점이 있었다. 서열 정렬은 scpA12가 계통발생학적으로 scpA49 보다는 scpB에 실질적으로 근접함을 나타냈다. 혈청형 III, III/R, II, Ia/c, NT/c, NT/c/R1을 대표하는 30개 균주는 scpB의 카피 하나를 보유한다.

제조합 SCP는 발현 벡터 플라스미드 pGEX-4T-1 (ATCC 수탁번호 98225)를 사용하여 대장균에서 발현시켰으며, 모체인 B군 연쇄상구균 균주 78-471 (타입 II a+ b)에서 추출한 효소와 동일한 것으로 드러났다. 웨스턴 블롯팅 분석 결과 제조합 SCP는 B군 연쇄상구균에서 미리 정제해 둔 C5a 펩티다제 효소와 동일했다.

<실시예 6>

SCP을 이용한 비내 면역화에 의한, 연쇄상구균 감염에 대한 혈청형-독립성 면역 유도

a) 박테리아 균주: 연쇄상구균 균주 CS101, CS210 및 CS463은 각각 혈청 탁도 양성 (OF⁺), 클래스 II, 혈청형 M49, M2 및 M11 균주로부터의 자발적 스트렙토마이신 내성 유도체이다. 상기 실시예 1에 기재한 MJ3-15는 SCPA49 유전자의 내부 인프레임 (inframe) 결실이 있는 CS101 균주이다. 연쇄상구균 균주 90-131 및 UAB200은 A군 연쇄상구균의 OF⁻, 클래스 I, 혈청형 M1 및 M6 사람 단리물 각각으로부터의 자발적 스트렙토마이신 내성 유도체이다. 연쇄상구균을 2 % 네오 펩톤 또는 1 % 효모 추출물 (THY)로 보충한 토드-헤윗 브로스 중에서 배양하거나 양 혈액 아가 상에서 배양했다. 일부 실험에서, 연쇄상구균을 스트렙토마이신 (200 µg/ml) 또는 에리트로마이신 (1 µg/ml)이 함유된 배양 배지에서 성장시켰다. 대장균 ER1821 (New England Biolabs, Inc. 제품, 미국, 매사추세츠주 버버리 소재)을 열민감성 자살 벡터, 플라스미드 pG⁺ 숙주5에 대한 수용체로 사용했다. pG⁺ 숙주5는 미국 캘리포니아주 플레슨튼 소재의 어플라이진 인크 (Appligene, Inc.)에서 구입했다. 플라스미드 pG⁺ 숙주5를 함유한 대장균 ER1821을 39 °C에서 에리트로마이신 (Erm, 300 µg/ml)을 함유한 루리아-베르타니 (Luria Bertani) 브로스 중에서 성장시켰다.

b) scpA 삽입 돌연변이체의 제작: scpA6 삽입 돌연변이체 AK1.4를 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 제작했다. 재조합 플라스미드 DNA인 pG::scpA1.2는 scpA 유전자의 내부 BglIII-HindIII 단편을 함유했다. 이 플라스미드를 UAB200 수용체 세포로 전기천공시키고, 형질전환체를 30 °C에서 에리트로마이신을 함유하는 THY 아가 플레이트 상에서 선별했다. 플라스미드 삽입체와 염색체 scpA6 사이의 재조합에 의해 생성된, pG::scpA1.2의 염색체 통합체인 균주 AK1.4는 39 °C에서 에리트로마이신을 함유하는 아가 배지 상에서 성장시켜 선별했다. scpA6으로의 삽입은 scpA를 프로브로 사용한 서던 블롯팅, 및 플라스미드에 특이적인 M13 일반 프라이머 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') (서열 6) 및 GAS의 염색체 scpA에 특이적인 scpA For835 프라이머 (5'-AAGGACGACACATTGCGTA-3') (서열 7)를 사용한 PCR을 통해 확인했다.

c) ΔSCPA의 제작, 발현 및 정제: BamHI 인식 서열을 함유하는 scpA 전방향 프라이머 (5'-CCCCCGGATCCACCAAAACCCCAAACTC-3') (서열 8) 및 scpA 역방향 프라이머 (5'-GAGTGGCCCTCCAATAGC-3') (서열 9)를 사용한 PCR을 통해 scpA49의 2.9 kb 단편 (1033 bp 내지 3941 bp)을 증폭시켰다. 생성된 PCR 산물에서 SCPA 단백질의 신호 펩티드 및 막 앵커(anchor) 영역을 코딩하는 서열을 결실시켰다. PCR 산물을 BamHI으로 절단하고, pGEX-4T-1 고도 발현 벡터 (Pharmacia Inc. 제품, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재) 상의 글루타티온 S-트랜스퍼라제 유전자의 트롬빈 인식 부위에 라이게이션시켰다. 재조합 플라스미드로 대장균 DH5α를 형질전환시켰다. 하나의 형질전환체 대장균 (pJC6)으로부터의 ΔSCPA 융합 단백질을 글루타티온 세파로스 4B 칼럼 상에서의 친화성 크로마토그래피로 정제했다. 트롬빈으로 절단한 후, 벤즈아미드-세파로스 6B 칼럼으로 크로마토그래피시켜 트롬빈을 제거했다. 제조업자가 기재한 방법대로, 발현 및 정제했다. 이 친화성 정제된, 말단이 절단된 (truncated) ΔSCPA 단백질은 PMN 부착 분석 (상기 실시예 1에 기재)으로 시험했을 때 펩티다제 활성이 없었다.

d) 웨스턴 블롯팅 기술: 상기 실시예 1에 기재한 바와 같이, 연쇄상구균으로부터 뮤타놀리신 추출물을 제조했다. 간단하게 말하자면, 연쇄상구균을 밤새 배양시킨 배양물 100 ml를 펠렛화하고, 빙냉 0.2 M 아세트산나트륨 (pH 5.2)로 2회 세척했다. 펠렛을 뮤타놀리신 40 µl를 함유하는 TE-수크로스 완충액 (1 mM 트리스, 1mM EDTA 및 20% 수크로스) 중에 현탁했다. 37 °C에서 2 시간 동안 회전시킨 다음, 혼합물을 5 분 동안 1500 x g에서 원심분리했다. 이렇게 얻은 상층액에 페닐 메틸술폰닐 플루오라이드 (100 mM)를 첨가했다. 상기 실시예 1에 기재한 바와 같이 웨스턴 블롯팅을 수행했다. 친화성 정제된 재조합 ΔSCPA 단백질로 토끼를 면역화시켜 항-SCPA 항체를 제조했다.

e) PMN 부착 및 중화 분석: PMN 부착 분석을 사용하여 SCPA 활성을 측정했다. 재조합 사람 C5a (rhC5a; C5788; Sigma 제품, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)를 온전한 박테리아 세포와 함께 37 °C에서 45 분 동안 인큐베이션시켰다. 잔류 rhC5a를, PMN을 활성화시켜 마이크로타이터 플레이트의 소 혈청 알부민 (BSA) 코팅웰에 부착되게 하는 그의 능력을 이용하여 측정했다 (S.A. Booth 등, "Dapsone Suppresses Integrin-Mediated Neutrophil Adherence Function", J. Invest. Dermatol. 98, 135-140쪽 (1992)). 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이, 신선한 사람 혈액을 피콜 하이파크중에서의 밀도 구배 원심분리를 통해 PMN을 분리했다. 토끼의 항-SCPA 혈청에 의한 SCPA 활성의 중화율은 PMN 부착 분석을 사용하여 분석했다. 0.5 % BSA-PBS 중에서 열 사멸시킨 (heat-killed)의 대략 1 x 10⁷ 개의 박테리아를 토끼 항-ΔSCPA49 혈청 또는 정상 토끼 혈청 1.4 ml와 함께 37 °C에서 1 시간 동안 회전시켰다. 그 다음, 상기 박테리아를 0.5 % BSA-PBS 완충액 40 µl 중에 재현탁하고, 45 분 동안 rhC5a와 함께 인큐베이션시킨 후, PMN 부착 분석을 통해 잔류 케모카인을 측정했다.

f) 식세포 작용 분석: 사람 혈액의 시험관내 식세포 작용을 문헌 (R.C. Lancefield, "Differentiation of Group A streptococci with a Common R antigen into Three Serological Types, with special Reference to Bactericidal

Test", J. Exp. Med. 106, 525-685쪽 (1957))에 기재된 바와 같이 분석했다. 간단하게 말하자면, A군 연쇄상구균의 로그 단계 (log phase) 배양물을 THY 중에서 10^3 내지 10^4 CFU/ml이 되도록 희석했다. 희석된 배양물 1/10 ml 및 사람 혈액 0.9 ml를 혼합하고, 37 °C에서 3 시간 동안 회전시켰다. 희석된 샘플을 혈액 아가 상에 플레이팅하여 살아있는 균을 처음과, 3 시간 회전 후에 세었다.

g) 마우스 비내 감염 모델: 20 % 정상 토끼 혈청을 함유하는 토드-헤윗 브로스 중에서 성장시킨 항원투여용 연쇄상구균 균주 ($1 \times 10^8 - 9 \times 10^8$ CFU)의 16 시간 배양물을 PBS 10 μ l에 재현탁시켜, 25 g 암컷 CD1 (Charles River Breeding Laboratories, Inc.에서 구입, 미국 매사추세츠주 윌밍톤 소재) 또는 BALB/c 마우스 (Sasco에서 구입, 미국 네브라스카주 오마하 소재)로 비내 투여했다. 배양물을 희석하여 혈액 아가 플레이트 상에 플레이팅하여 살아있는 세포수를 세었다. 집중한지 6 내지 10일 동안 매일, 마취시킨 마우스의 목구멍을 면봉으로 긁어내어, 스트렙토마이신 200 μ g/ml을 함유하는 혈액 아가 플레이트로 스트리킹했다. 접종물을 37 °C에서 밤새 인큐베이션시키고, 플레이트 상의 β -용혈성 콜로니의 수를 세었다. 모든 항원투여용 균주는 스트렙토마이신 내성이어서 이들은 정상 플로라에서 존속할 수 있는 β -용혈성 박테리아와 구분되었다. 목구멍을 면봉으로 긁어낸 것을 스트렙토마이신을 함유한 혈액 아가 상에서 배양했다. 하나의 β -용혈성 콜로니가 존재하면 양성 배양물로 간주했다.

h) 면역화 및 항원투여 프로토콜: 4 주된 이계교배 CD1 암컷 마우스 각각의 코구멍에 10 μ l PBS 중의 친화성 정제된 Δ SCPA49 20 μ g을 투여하여 면역화했다. 마우스를 다른 날(alternating days)에 3 회 면역화시키고, 세번째 면역한지 3주 후에 다시 부스팅했다. 2주 후, 마우스를 다시 부스팅했다 (D. Bessen 등, "Influence of Intranasal Immunization with Synthetic Peptides Corresponding to Conserved Epitopes of M protein on Mucosal Colonization by Group A Streptococci", Infect. Immun., 56, 2666-2672 (1988)). 대조용 마우스에는 PBS만 투여했다. 감염시키기 전에, Δ SCPA 단백질로 면역화한 모든 마우스를 ELISA를 통해 검사하여, 이들의 혈청 및 타액에 Δ SCPA 항원에 대한 항체가 높은 역가로 존재함을 확인했다. A군 연쇄상구균, 균주 CS101 (2.0×10^8 CFU), CS210 (3.6×10^8 CFU), CS463 (7.8×10^8 CFU), 90-131 (3.4×10^8 CFU) 및 UAB200 (9.6×10^8 CFU)으로, 마지막 백신 부스팅 후 7일이 지난 다음 마우스에 비내 항원투여했다. 동물 연구는 미국립보건원(National Institutes of Health)의 지침을 따랐다.

i) 샘플 수집 및 ELISA: 면역화한 후에 마취시킨 마우스에서 혈액 및 타액 샘플을 수집했다. 상기 기재한 바와 같이 (S.P. O'Connor 등, "The Human Antibody Response to Streptococcal C5a Peptidase", J. Infect. Dis., 163, 109-116쪽 (1990)) 모든 혈청을 ELISA를 통해 SCPA49 항체의 존재 여부에 관해 시험했다. 0.05 M 중탄산 완충액 (pH 9.6) 중의 정제된 SCPA49 단백질 500 ng을 첨가하여 이를 마이크로타이터 웰에 결합시켰다. 4 °C에서 밤새 인큐베이션시킨 후, 웰을 세척하고, PBS 중의 0.5 % BSA로 1 시간 동안 차단시켰다. 마우스에게 0.1 % 필로카르핀 (Sigma 제품) 용액 100 μ l을 피하 주사하여 타액 분비를 자극했다. 타액 샘플을 모아, 에펜도르프(Eppendorf) 마이크로원심분리기 중에서 14,000 rpm으로 5 분 동안 스핀닝 (spinning)했다. 상층액을 ELISA를 통해 시험하여 Δ SCPA49 단백질에 대한 분비 IgA의 존재 여부에 대해 조사했다. ELISA 역가는 OD₄₀₅가 0.1 이상일 때 개별 혈청 및 타액의 최고 희석율을 나타낸다.

j) 통계 분석: χ^2 시험을 사용하여 동물 실험 데이터를 분석했다. P < 0.05일 때 의미가 있는 것으로 간주했다.

우선, 야생형 및 동계 (同系) SCPA⁻ 돌연변이체 연쇄상구균이 마우스의 비인강에서 전이증식하는 능력을 연구했다. 모체 및 돌연변이체 배양물로부터의 세포 표면 단백질의 류타놀리신 추출물을 SCPA 특이적 혈청을 사용한 웨스턴 블롯팅을 통해 분석했다. 돌연변이체는 SCPA가 없는 것으로 확인되었다. SCPA⁻ 돌연변이체 AK1.4 및 MJ3-15의 추출물은 항-SCPA 혈청과 반응하지 않았다. 야생 균주 CS101 및 UAB200으로부터의 추출물에서 예상 크기의 SCPA 단백질이 관찰되었다. 돌연변이체 균주 AK1.4 및 MJ3-15가 C5a 펩티다제 활성이 없음은 이들의 rhC5a 파괴능과 비교함으로써 입증되었다. 단리된 PMN을 rhC5a에 노출시키면, 이는 BSA로 코팅된 마이크로타이터 웰에 부착되었다. 연쇄상구균 또는 정제된 SCPA와 함께 인큐베이션시키면, rhC5a를 특이적으로 절단했고, PMN 활성화에 대한 잠재력이 변형되었다. 잔류 rhC5a에 반응하고 BSA로 코팅된 웰에 결합된 PMN을 염색한 후, 분광광도측정법으로 분석했다. rhC5a를 모체 배양물, UAB200 및 CS101과 인큐베이션시키면, rhC5a를 파괴했고, 각각 58.8 % 및 54.5 %까지 PMN 부착을 억제했다. SCPA⁻ 돌연변이체와 반대로, AK1.4 및 MJ3-15는 rhC5a, 또는 PMN가 BSA로 코팅된 벽에 부착하는 것을 변경시키지 않았다 (표 5). 이 실험은 상기 웨스턴 블롯팅으로 확인했고, SCPA⁻ 배양물에는 rhC5a를 파괴할 수 있는 다른 프로테아제가 없음을 입증했다.

[표 5]

야생균주 및 돌연변이 균주의 식세포 작용 분석 및 PMN 부착 분석

균주	세부사항	콜로니 형성 단위 (cfu/ml)		증가 배수 (cfu/ml)	C5a로 유도된 PMN 부착의 억제율* (%)
		시간=0시간	시간=3시간		
UAB200	M6 ⁺ , SCPA ⁺	1.8x10 ³	7.2x10 ⁴	40	58.8
AK1.4	M6 ⁺ , SCPA ⁻	1.2x10 ³	4.5x10 ⁴	37.5	0
CS101	M49 ⁺ , SCPA ⁺	1.0x10 ⁴	4.9x10 ⁵	49	54.5
MJ3-15	M49 ⁺ , SCPA ⁻	1.5x10 ⁴	2.1x10 ⁵	14	0

*억제율(%)=[(C5a 단독에 의해 활성화된 PMN의 OD_{570nm} - 박테리아와 함께 에비인큐베이션된 C5a에 의해 활성화된 PMN의 OD_{570nm}/C5a 단독에 의해 활성화된 PMN의 OD_{570nm})]x100%

M 단백질 발현이 scpA에서의 돌연변이에 의해 영향을 받을 것으로 예상하지는 않았지만, SCPA⁻ 돌연변이체 연쇄상구균이 M 단백질을 여전히 발현하는지와 식세포 작용에 대한 저항력이 있는지에 관해 평가하기 위해 분석을 수행했다. 3 시간 인큐베이션시키는 동안 신선한 사람 혈액 중에서의 연쇄상구균 성장은 이들의 표면 상에 항-식세포 M 단백질이 있음을 나타낸다 (R.C. Lancefield, "Differentiation of Group A streptococci with a Common R Antigen into Three Serological Types, with Special Reference to Bactericidal Test", J. Exp. Med., 106, 525-685쪽 (1957)). 예상했던 바와 같이, 모체 연쇄상구균, UAB200 및 CS101은 각각 40 및 49 배 증가했다 (표 5). M⁺SCP A⁻ 배양물, 균주 AK1.4 및 MJ3-15는 각각 37.5 및 14배 증가했으며, 이는 scpA 돌연변이가 온전한 사람 혈액 내에서 식세포 작용에 대한 내성 및 M 단백질 발현에 별다른 영향을 주지 않는다는 것을 의미한다. 순환된 혈액에서 두 돌연변이 균주의 어느 정도 열악한 성장은 재현될 수 있었으며, 이는 예상치 못한 것이었다. 사람 혈장에서 돌연변이체 및 모체 배양물의 성장 속도에는 차이가 없었다. SCPA의 불활성화로 인해 C5a는 순환된 혈액 내에 축적되어 PMN을 활성화시켰다. 활성화된 PMN은 더욱 식세포 작용이 왕성해지며, M⁺ 연쇄상구균을 더 잘 사멸시킬 수 있다. 항-M49 및 항-M6 항혈청을 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 분석하면 표면 단백질 추출물에는 M6 및 M49 항원이 함유되어 있는데, 이는 SCPA의 돌연변이가 M 단백질 발현을 변경시키지 않았음을 의미한다.

다음에는, C5a 펩티다제가 비인두 전이증식에 필요한지 여부를 결정했다. CD-1 이계교배 마우스를 비내 접종하여, 야생형 연쇄상구균 및 SCPA⁻ 연쇄상구균이 비인강에서 전이증식하는 상대적인 능력을 평가했다. 1일 내지 10일 동안 매일, 마취시킨 마우스의 목구멍을 면봉으로 긁어내어, 문제의 균주에 선택적인 항생제가 함유된 혈액 아가 플레이트 상에 스트리킹했다. 이 균주를 사용한 이전의 연구를 따르기 위해, BALB/c 마우스를 사용하여 M6 균주 UAB200으로 감염시켰다 (D. Bessen 등, "Influence of Intranasal Immunization with Synthetic Peptides Corresponding to Conserved Epitopes of M protein on Mucosal Colonization by Group A streptococci", Infect. Immun., 56, 2666-2672쪽 (1988)). 우선, 5일 이내에 대략 50%의 마우스에 전이증식을 일으키는 접종물의 양을 결정했다. M⁺SCP A⁺ 및 M⁺SCP A⁻형 49 연쇄상구균 사이의 상당한 차이가 접종 3 내지 9일 후 관찰되었다. 4일까지 CS101 균주로 감염된 마우스 50% (9/18)는 여전히 양성 목구멍 배양물을 생성했고, MJ3-15 균주로 감염된 마우스는 단지 11% (2/18)만이 이들을 목구멍에 연쇄상구균을 보유하고 있었다. 또한, 혈액 아가 플레이트 상에서의 콜로니 개수 차이는 M⁺SCP A⁻ 연쇄상구균이 보다 신속하게 제거되는 것과는 일치했다. 야생형 연쇄상구균으로 감염된 마우스로부터의 양성 배양물 중 59% (31/54)는 100 CFU 이상을 함유했던 반면, SCPA⁻ 연쇄상구균으로 감염된 마우스로부터의 양성 배양물은 단지 14% (2/14)만이 100 CFU 이상을 함유하고 있었다 (P < 0.001까지는 통계적으로 의미가 있음). 또한, 마우스의 22% (4/18)가 M⁺SCP A⁺ 감염으로 죽었다. M⁺SCP A⁺ 연쇄상구균 감염으로 죽은 마우스는 없었다. 이 차이도 통계적으로 의미가 있다 (P < 0.05). CS101 균주의 SCAP49⁺ 및 SCPA49⁻ 돌연변이체를 2 회 이상 반복 비교한 결과는 유사했다.

OF⁺ 및 OF⁻ 균주에 의해 유발된 질병의 스펙트럼은 상당히 다르기 때문에, OF⁺ 혈청형, M6형에 의한 전이증식에 대한 SCPA의 영향도 연구했다 (도 7). 본래대로, SCPA6⁻ 균주 AK1.4는 모체 균주 UAB200 보다 더 신속하게 제거되었다. 접종 4일 후, 모든 마우스의 목구멍에서 SCPA⁻ 연쇄상구균은 완전히 제거된 반면, 야생형 연쇄상구균으로 감염된 마우스 중 30%는 양성으로 남아있었다. 모든 양성 배양물의 98% 이상이 혈액 아가 플레이트 상에 한 개 이상의 콜로니를 가졌다. 이 실험에서, 모든 마우스에 접종 후 5일까지 연쇄상구균이 없었다.

다음 단계는 SCP가 동물 면역화에 사용할 수 있는지를 결정하는 것이었다. 우선, 면역화 연구에 사용하기 위해 효소적으로 불활성화된 형태의 SCPA49 단백질을 제작했다. 추가의 BamHI 인식 서열이 있는 2908 bp scpA49 단편을 PCR로 얻

고, BamHI 및 SmaI로 미리 절단시킨 플라스미드 pGEX-4T-1에 라이게이션시켰다. 이 구조물에서, 플라스미드 pJC6, scpA49 서열은 글루타티온 트랜스퍼라제 유전자로 인프레임 융합되었다. 연쇄상구균 삽입체는 scpA 신호 또는 세포벽 앵커 서열을 포함하지 않았다 (도 8). 정제된 ΔSCPA49 단백질의 백신 제제는 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅으로 평가하여 순도를 확인했다. 정제된 ΔSCPA49 제제 내의 각종 단백질 밴드는 재조합 ΔSCPA49 단백질에 대해 지시된 폴리클로날 토끼 항혈청과 반응했다. 주요 밴드의 크기는 SCPA49의 결실 형태의 추정 크기인 대략 100 kD이었다. 더 작은 밴드는 대장균에서 과발현된 단백질의 일반적인 형태인, SCPA 분해 산물인 것으로 추정되었다. 항혈청은 연쇄상구균 삽입체가 없는 대장균 DH5α (pGEX-4T-1)로부터 단리된 어떠한 단백질과도 반응하지 않았다. 상기 기재한 과정을 통해 배양물 1 l 에서 고순도의 ΔSCPA49 단백질 2-3 mg씩을 얻었다. 정제된 ΔSCPA49 단백질은 PMN 부착 분석으로 분석했을 때 C5a 펩티다제 활성이 없는 것으로 밝혀졌다.

두번째, 서브유닛 ΔSCPA49 백신의 면역원성을 평가했다. 토끼를 정제된 ΔSCPA49로 면역화시켰다. 토끼는 ELISA로 결정된 바와 같이 ΔSCPA49 단백질에 대한 항체를 높은 수준으로 발생시켰다. 정제된 ΔSCPA49 면역원에 기능적 활성이 없었지만, 초면역 토끼 항혈청은 정제된 야생형 SCPA49 효소의 펩티다제 활성을 시험관내 중화시킬 수 있다. 또한, ΔSCPA49 단백질에 대한 희석되지 않은 토끼 항혈청은 이중 혈청형과 관련된 C5a 펩티다제 활성을 중화시킬 수 있었다. 무손상 M1, M6 및 M12 연쇄상구균과 관련된 C5a 펩티다제 활성은 이 항혈청으로 억제되며, 이는 ΔSCPA49 단백질에 대한 항체가 많은 다른 혈청형에 대해 넓은 교차-반응성을 갖는다는 것을 의미한다.

또한, 10 마리의 면역화 마우스 및 10 마리의 대조용 마우스로부터 얻은 혈청 및 타액 샘플을 아췌반트 없이 비내 경로로 투여하여, ΔSCPA49 단백질의 면역원성을 평가했다. PBS로 면역화된 대조용 마우스와 비교했을 때 정제된 ΔSCPA49 단백질로 면역화된 마우스의 혈청 내에는 SCPA-특이적 IgG가 높은 역가로 발생되어 있었다. ΔSCPA49에 대해 지시된 혈청 IgG의 역가는 1 : 10,240 내지 1 : 20,480의 범위였다. 반대로, 대조용 마우스의 SCPA49-특이적 IgG의 역가는 혈청에서 검출되지 않았다. 정제된 ΔSCPA49 단백질로 면역화된 마우스는 또한 대조용 마우스에 비해 SCPA49 특이적 타액 IgA가 상당히 증가하는 것으로 나타났다. 면역화된 마우스의 타액에서 특이적 IgA 역가는 1 : 16 보다 높았다. 반대로, 대조용 마우스의 타액에서 SCPA49에 대해 지시된 IgA는 검출할 수 없었다. 1/2560으로 희석된 혈청 및 1/2로 희석된 타액 각각에서 IgG 및 IgA의 상대 농도를 도 9에 나타냈다. 이 결과는 정제된 ΔSCPA49 단백질을 마우스에 비내 투여할 때, 이는 특이적인 전신 반응 및 분비 항체 반응의 유도를 위한 유효한 면역원임을 입증한다.

세번째, C5a 펩티다제를 이용한 면역화가 비인강으로부터의 연쇄상구균 제거를 향상시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위한 실험을 수행했다. 높은 수준의 항-SCP 항체를 함유하는 초면역 토끼 및 사람 혈청 모두 SCPA 활성을 시험관내 중화시킬 수 있다 (S.P. O'Connor 등, "The Human Antibody Response to Streptococcal C5a Peptidase", J. Infect. Dis., 163, 109 내지 116쪽 (1990)). SCPA가 구강 점막의 전이증식을 상당히 촉진시킬 수 있다는 것은, 정제된 ΔSCPA49로 마우스를 면역화시키는 것이 연쇄상구균이 비인강에서 전이증식하는 능력을 감소시킬 수 있다는 것을 의미한다. 이 가능성을 시험하기 위해, 친화성 정제된, 유전적으로 불활성화된 SCPA를 비내 투여하여 마우스를 면역화시켰다. 말단이 절단된 단백질 ΔSCPA49를 아췌반트 또는 담체 없이 비내 투여했다. 정제된 ΔSCPA49 단백질의 두 개의 다른 제제로 백신 접종된 마우스를 사용한 3회의 독립적인 실험에서, 야생형 M⁺ SCPA⁺ 연쇄상구균으로 백신 접종된 마우스의 인두에서의 전이증식은 PBS로 면역화된 것과 상당히 달랐다 (대표적인 데이터를 도 10에 나타냄). ΔSCPA49 단백질로 면역화시킨 마우스 13 마리 중 단지 1 마리만이 접종 10 일 후 연쇄상구균에 대해 양성이었다 (도 10). 반대로, 백신 접종하지 않은 대조구 중 30 내지 58 %는 6일 동안 양성인 상태로 남아있었고, 일부는 감염 10 일 후에도 여전히 양성이었다. 혈액 아가 플레이트 상의 β-용혈성 스트렙토마이신 내성 콜로니의 개수도 또한 ΔSCPA49로 백신 접종된 마우스와 대조용 마우스 사이에서 심각한 차이를 나타냈다. 다른 균의 면역화된 마우스는 면역화되지 않은 대조구 보다 이들의 비인강으로부터 훨씬 더 신속하게 혈청형 M49 연쇄상구균을 제거했다.

마지막으로, 한 혈청형의 SCP를 사용한 동물 접종이 그 동물에서 다른 혈청형에 대한 백신화로 작용하는지 여부에 대해 검사했다. A군 연쇄상구균에는 80가지 이상의 다른 혈청형이 있다. 유효한 백신은 하나 이상의 연쇄상구균 혈청형의 감염을 예방해야 한다. 혈청형 M2, M11, M1 및 M6 A군 연쇄상구균 전이증식에 방어적인 교차-보호가 관찰되었다. 혈청형 M49 연쇄상구균으로부터의 ΔSCPA49 단백질에 대해 지시된 토끼 혈청이 여러 다른 혈청형과 관련된 펩티다제 활성을 중화시킨다는 사실은, 단일 서브유닛 백신을 사용한 비내 면역화가 인두에서 그 혈청형에 의한 전이증식을 감소 또는 일소할 수 있다는 것을 의미한다. 이 가능성을 밝히기 위해, 20 마리의 마우스로 구성된 4개 군을 상기한 바와 같이 친화성 정제된 ΔSCPA49 단백질로 비내 접종하여 면역화시켰다. 대조용 마우스에게는 PBS를 투여했다. 연쇄상구균으로 항원투여하기 전에, 무작위로 선택된, 면역화된 마우스 및 대조용 마우스의 혈청 및 타액 샘플을 항-SCPA 항체에 대해 분석했다. 시험한 모든 면역화된 마우스는 강력한 혈청 항체 반응 및 측정가능한 타액 항체 반응을 일으켰다. ΔSCPA49 단백질로 면역화된 마우스의 인두에서 모두 4개의 혈청형 균주의 전이증식은 면역화되지 않은 대조구에 비해 감소되었다. 그 차이는 접종 3 일 후 및 5일 후에 가장 컸다 (표 6).

[표 6]

면역 보호력은 혈청형과 무관하다

	접종 3일 후				접종 5일 후			
	비면역		면역		비면역		면역	
	(+/총량)	%	(+/총량)	%	(+/총량)	%	(+/총량)	%
M2	10/19	52.6	2/19*	10.5	3/19	15.8	1/19	5.2
M11	17/20	85	11/20*	55	8/20	40	2/20*	10
M1	16/19	84.2	11/19*	57.9	7/19	37	2/19*	10.5
M6	14/20	70	12/19	63.2	8/20	40	4/19	21.1

+ 평균 배양 양성 생쥐
 * 면역화된 마우스와 면역화되지 않은 마우스 사이의 차이가 통계적으로 유의미하다 (P < 0.05). P 값은 χ^2 분석으로 계산했다.

혈청형 M2, M11 및 M1 균주로 접종하여 면역화된 마우스와 대조용 마우스 사이에서 통계적으로 의미있는 차이가 관찰되었다. 그러나, 면역화된 마우스에서 OF⁺ 혈청형 M2 및 M11은 OF⁻ 균주인 M1 및 M6 보다 더 효과적으로 제거되었다. 면역화된 마우스에서 M1 연쇄상구균 전이증식은 대조용 마우스에 비해 상당히 감소되었다. 면역화된 마우스 중 10.5 %만이 면역 접종 5일 후 양성이었다. 면역화된 마우스는 M6 연쇄상구균을 보다 신속하게 일소하는 것처럼 보이지만, 그 차이는 통계적으로 의미 있는 것이 아니었다. 상기 실험에서와 같이, 혈액 아가 플레이트 상에서 β -용혈성 연쇄상구균 콜로니의 수는 대조용 동물에서 채취한 것보다 백신 접종된 마우스에서 채취한 샘플에서 훨씬 더 적었다. 따라서, Δ SCPA49 단백질은 다른 연쇄상구균 혈청형에 대해 교차-보호를 제공하는 유효한 백신이었다.

본 발명은 각종 특이적이고 바람직한 실시태양 및 기술과 관련하여 기재되었다. 그러나, 본 발명의 범위 내에서 많은 변이와 변형이 가능하다는 것이 이해되어야 한다.

<서열표>

(1) 일반적 정보 :

(i) 출원인: 리전즈 오브 더 유니버시티 오브 미네소타

(ii) 발명의 명칭: 연쇄상구균 C5a 펩티다제 백신

(iii) 서열수: 9

(iv) 통신 주소:

(A) 수신인: 스웨그만, 룬드버그, 외스너 앤드 크루쓰, 피. 에이.

(B) 거리: 피.오. 박스 2938

(C) 도시: 미네아폴리스

(D) 주: 미네소타주

(E) 국가: 미국

(F) 우편번호: 55402

(v) 컴퓨터 판독 형태

- (A) 매체 유형: 플로피 디스켓
- (B) 컴퓨터: IBM PC 호환형
- (C) 작동 시스템: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 소프트웨어: 패턴트인 릴리스 #1.0, 버전 #1.30 (EPO)

(vi) 현 출원 정보

출원번호: 모름

(vii) 우선권 정보

- (A) 출원번호: 08/589,756
- (B) 출원일: 1996년 1월 22일

(vii) 대리인 정보:

- (A) 이름: 앤 에스. 빅스닉스
- (B) 등록번호: 37,748
- (C) 관리번호: 600. 349WO1

(ix) 전자통신 정보:

- (A) 전화: 612-359-3260
- (B) 팩스: 612-359-3263
- (C) 텔렉스:

(2) 서열 1에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

- (A) 길이: 1164 아미노산
- (B) 유형: 아미노산
- (C) 가닥수: 단일
- (D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 형태: 단백질

(xi) 서열 설명:

<서열 1a>

Leu Arg Lys Lys Gln Lys Leu Pro Phe Asp Lys Leu Ala Ile Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Thr Ser Ile Leu Leu Asn Ala Gln Ser Asp Ile Lys Ala Asn
 20 25 30
 Thr Val Thr Glu Asp Thr Pro Ala Thr Glu Gln Ala Val Glu Thr Pro
 35 40 45
 Gln Pro Thr Thr Val Ser Glu Glu Val Pro Ser Ser Lys Glu Thr Lys
 50 55 60
 Thr Pro Gln Thr Pro Asp Asp Ala Glu Glu Thr Val Ala Asp Asp Ala
 65 70 75 80
 Asn Asp Leu Ala Pro Gln Ala Pro Ala Lys Thr Pro Asp Thr Ser Ala
 85 90 95
 Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg Asp Leu Asn Asp Pro Ser Gln Val Lys
 100 105 110
 Thr Leu Gln Glu Lys Ala Gly Lys Gly Ala Gly Thr Val Val Ala Val
 115 120 125
 Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp
 130 135 140
 Lys Ala Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu Trp Val Asn Asp Lys Val Ala
 165 170 175
 Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu
 180 185 190
 His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu
 195 200 205
 Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu
 210 215 220
 Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg
 225 230 235 240
 Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala Val Asn Leu Gly Ala Lys Val
 245 250 255
 Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro
 260 265 270
 Asp Glu Thr Lys Lys Pro Phe Val Tyr Ala Lys Ser Lys Gly Val Arg
 275 280 285

<서열 1b>

Ile Val Thr Thr Ala Gly Asn Asp Ser Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg
 290 295 300

Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr Gly Val Val Gly Thr Pro Ala
 305 310 315 320

Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala Ser Tyr Ser Pro Asp Asn Gln
 325 330 335

Leu Thr Glu Thr Ala Met Val Lys Thr Asp Asp Gln Gln Asp Lys Glu
 340 345 350

Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp
 355 360 365

Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Met Lys Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val
 370 375 380

Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Ser Asp Ile Asp Phe Thr Asp
 385 390 395 400

Lys Ile Ala Asn Ala Lys Lys Ala Gly Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr
 405 410 415

Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln
 420 425 430

Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp
 435 440 445

Asn Ser Gln Lys Thr Ile Thr Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro
 450 455 460

Thr Ala Ser Gly Thr Lys Leu Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr
 465 470 475 480

Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile
 485 490 495

Leu Ser Ser Ala Ala Asn Asn Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser
 500 505 510

Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Val Ile Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln
 515 520 525

Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr Gln Ser Glu Arg Leu Asp Leu
 530 535 540

Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp
 545 550 555 560

Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp
 565 570 575

<서열 1c>

Ala Lys Lys Ala Ser Glu Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn
 580 585 590

Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val
 595 600 605

Thr Val Thr Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro His Glu Leu Tyr Tyr
 610 615 620

Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys His Phe Ala Leu
 625 630 635 640

Ala Pro Lys Ala Leu Ile Glu Thr Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro
 645 650 655

Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Ile Pro Ile Asp Ile Ser Gln Phe
 660 665 670

Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly
 675 680 685

Phe Val Arg Ile Lys Gln Asp Pro Thr Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile
 690 695 700

Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu
 705 710 715 720

Lys Pro Leu Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Glu
 725 730 735

Ile Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr
 740 745 750

Ala Leu Lys Asn Asp Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp
 755 760 765

Thr Ile Ile Asn Val Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile
 770 775 780

Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Phe Ala Gly Thr Phe Ala Lys
 785 790 795 800

Gln Asp Asp Asp Arg His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Lys
 805 810 815

Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val
 820 825 830

Gln Phe His Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu
 835 840 845

Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu
 850 855 860

<서열 1d>

Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser
 865 870 875 880

Thr Arg Phe Glu Ile Ser Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Ala Lys
 885 890 895

Val Val Ala Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile
 900 905 910

Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp
 915 920 925

Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp
 930 935 940

Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Gln Thr Ser Gln Pro Val Tyr
 945 950 955 960

Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr
 965 970 975

Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu
 980 985 990

Ala Glu Thr Met Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe
 995 1000 1005

Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val
 1010 1015 1020

Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser
 1025 1030 1035 1040

Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Gln Asp Gly
 1045 1050 1055

Ser Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Gly Gln Asp
 1060 1065 1070

Gly Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Lys
 1075 1080 1085

Asp Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln Pro
 1090 1095 1100

Ser Arg Thr Leu Glu Lys Arg Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr Lys
 1105 1110 1115 1120

Ala Ser Thr Arg Asp Gln Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr Asn
 1125 1130 1135

Arg Leu His Leu Leu Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Leu Gly Leu
 1140 1145 1150

Val Ala His Ile Phe Lys Thr Lys Arg Thr Glu Asp
 1155 1160

(2) 서열 2에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1167 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(C) 가닥수: 단일

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 형태: 단백질

(xi) 서열 설명:

<서열 2a>

Leu Arg Lys Lys Gln Lys Leu Pro Phe Asp Lys Leu Ala Ile Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Thr Ser Ile Leu Leu Asn Ala Gln Ser Asp Ile Lys Ala Asn
 20 25 30
 Thr Val Thr Glu Asp Thr Pro Val Thr Glu Gln Ala Val Glu Thr Pro
 35 40 45
 Gln Pro Thr Ala Val Ser Glu Glu Val Pro Ser Ser Lys Glu Thr Lys
 50 55 60
 Thr Pro Gln Thr Pro Asp Asp Ala Glu Glu Thr Ile Ala Asp Asp Ala
 65 70 75 80
 Asn Asp Leu Ala Pro Gln Ala Pro Ala Lys Thr Ala Asp Thr Pro Ala
 85 90 95
 Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg Asp Leu Asn Asp Pro Ser Gln Val Lys
 100 105 110
 Thr Leu Gln Glu Lys Ala Gly Lys Gly Ala Gly Thr Val Val Ala Val
 115 120 125
 Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp
 130 135 140
 Lys Thr Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu Trp Val Asn Asp Lys Val Ala
 165 170 175
 Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu
 180 185 190
 His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu
 195 200 205

<서열 2b>

Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu
 210 215 220
 Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg
 225 230 235 240
 Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala Val Asn Leu Gly Ala Lys Val
 245 250 255
 Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro
 260 265 270
 Asp Glu Thr Lys Lys Ala Phe Asp Tyr Ala Lys Ser Lys Gly Val Ser
 275 280 285
 Ile Val Thr Ser Ala Gly Asn Asp Ser Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg
 290 295 300
 Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr Gly Val Val Gly Thr Pro Ala
 305 310 315
 Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala Ser Tyr Ser Pro Asp Lys Gln
 325 330 335
 Leu Thr Glu Thr Ala Met Val Lys Thr Asp Asp Gln Gln Asp Lys Glu
 340 345 350
 Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp
 355 360 365
 Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Met Lys Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val
 370 375 380
 Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Gly Asp Ile Asp Phe Lys Asp
 385 390 395 400
 Lys Val Ala Asn Ala Lys Lys Ala Gly Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr
 405 410 415
 Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln
 420 425 430
 Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp
 435 440 445
 Asn Pro Gln Lys Thr Ile Thr Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro
 450 455 460
 Thr Ala Ser Gly Thr Lys Leu Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr
 465 470 475 480
 Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile
 485 490 495

<서열 2c>

Leu Ser Ser Val Ala Asn Asn Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser
 500 505 510

Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Gly Ile Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln
 515 520 525

Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr Pro Ser Glu Arg Leu Asp Leu
 530 535 540

Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp
 545 550 555 560

Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp
 565 570 575

Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn
 580 585 590

Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val
 595 600 605

Thr Val Thr Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro Gln Glu Leu Tyr Tyr
 610 615 620

Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys His Phe Ala Leu
 625 630 635 640

Ala Pro Lys Val Leu Tyr Glu Ala Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro
 645 650 655

Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Val Pro Ile Asp Ala Ser Arg Phe
 660 665 670

Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly
 675 680 685

Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp Pro Thr Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile
 690 695 700

Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Val Glu
 705 710 715 720

Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Ala
 725 730 735

Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr
 740 745 750

Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp
 755 760 765

Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile
 770 775 780

<서열 2d>

Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Phe Ala Gly Thr Phe Ala Lys
785 790 795 800

Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Glu
805 810 815

Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val
820 825 830

Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu
835 840 845

Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu
850 855 860

Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser
865 870 875 880

Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Gly Lys
885 890 895

Val Val Ala Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile
900 905 910

Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp
915 920 925

Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp
930 935 940

Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Lys Thr Ser Gln Pro Val Tyr
945 950 955 960

Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr
965 970 975

Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu
980 985 990

Ala Glu Thr Met Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe
995 1000 1005

Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val
1010 1015 1020

Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser
1025 1030 1035 1040

Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Gln Asp Gly
1045 1050 1055

Ser Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Gln Asp
1060 1065 1070

<서열 2e>

Gly Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Lys
1075 1080 1085

Asp Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln Pro
1090 1095 1100

Ser Arg Thr Leu Glu Lys Arg Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr Lys
1105 1110 1115 1120

Ala Ser Thr Arg Asp Gln Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr Asn
1125 1130 1135

Arg Leu His Leu Leu Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Phe Gly Leu
1140 1145 1150

Val Ala His Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gln Lys Glu Thr Lys Lys
1155 1160 1165

(2) 서열 3에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1150 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(C) 가닥수: 단일

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 형태: 단백질

(xi) 서열 설명:

<서열 3a>

```

Leu Arg Lys Lys Gln Lys Leu Pro Phe Asp Lys Leu Ala Ile Ala Leu
1           5           10           15
Met Ser Thr Ser Ile Leu Leu Asn Ala Gln Ser Asp Ile Lys Ala Asn
20           25           30
Thr Val Thr Glu Asp Thr Pro Ala Thr Glu Gln Thr Val Glu Thr Pro
35           40           45
Gln Pro Thr Ala Val Ser Glu Glu Ala Pro Ser Ser Lys Glu Thr Lys
50           55           60
Thr Pro Gln Thr Pro Ser Asp Ala Gly Glu Thr Val Ala Asp Asp Ala
65           70           75           80
Asn Asp Leu Ala Pro Gln Ala Pro Ala Lys Thr Ala Asp Thr Pro Ala
85           90           95
Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg Asp Leu Asn Asp Pro Ser Gln Val Lys
100          105          110
Thr Leu Gln Glu Lys Ala Gly Lys Gly Ala Gly Thr Val Val Ala Val
115          120          125
    
```

<서열 3b>

Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp
 130 135 140

Lys Thr Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu Trp Val Asn Asp Lys Val Ala
 165 170 175

Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu
 180 185 190

His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu
 195 200 205

Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu
 210 215 220

Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg
 225 230 235 240

Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala Ile Asn Leu Gly Ala Lys Val
 245 250 255

Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro
 260 265 270

Asp Glu Thr Lys Lys Ala Phe Asp Tyr Ala Lys Ser Lys Gly Val Ser
 275 280 285

Ile Val Thr Ser Ala Gly Asn Asp Ser Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg
 290 295 300

Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr Gly Val Val Gly Thr Pro Ala
 305 310 315 320

Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala Ser Tyr Ser Pro Asp Lys Gln
 325 330 335

Leu Thr Glu Thr Val Arg Val Lys Thr Ala Asp Gln Gln Asp Lys Glu
 340 345 350

Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp
 355 360 365

Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Thr Lys Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val
 370 375 380

Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Gly Asp Ile Asp Phe Lys Asp
 385 390 395 400

Lys Ile Ala Lys Ala Lys Lys Ala Gly Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr
 405 410 415

<서열 3c>

Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln
 420 425 430
 Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp
 435 440 445
 Asn Pro Gln Lys Thr Ile Thr Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro
 450 455 460
 Thr Ala Ser Gly Thr Lys Leu Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr
 465 470 475 480
 Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile
 485 490 495
 Leu Ser Ser Val Ala Asn Asn Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser
 500 505 510
 Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Gly Ile Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln
 515 520 525
 Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr Pro Ser Glu Arg Leu Asp Leu
 530 535 540
 Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp
 545 550 555 560
 Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp
 565 570 575
 Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn
 580 585 590
 Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val
 595 600 605
 Thr Val Asn Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro Gln Glu Leu Tyr Tyr
 610 615 620
 Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys His Phe Ala Leu
 625 630 635 640
 Ala Pro Lys Val Leu Tyr Glu Ala Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro
 645 650 655

<서열 3d>

Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Val Pro Ile Asp Ala Ser Arg Phe
 660 665 670

Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly
 675 680 685

Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp Pro Lys Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile
 690 695 700

Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu
 705 710 715 720

Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Ala
 725 730 735

Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr
 740 745 750

Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp
 755 760 765

Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile
 770 775 780

Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Leu Ala Gly Thr Phe Ala Lys
 785 790 795 800

Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Lys
 805 810 815

Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val
 820 825 830

Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu
 835 840 845

Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu
 850 855 860

Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser
 865 870 875 880

Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Gly Lys
 885 890 895

Val Val Ala Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile
 900 905 910

Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp
 915 920 925

Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp
 930 935 940

<서열 3e>

Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Lys Thr Ser Gln Pro Val Tyr
 945 950 955 960

Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr
 965 970 975

Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu
 980 985 990

Ala Glu Thr Thr Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe
 995 1000 1005

Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val
 1010 1015 1020

Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser
 1025 1030 1035 1040

Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Gln Asp Gly
 1045 1050 1055

Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Thr Glu Thr Lys Pro Glu Lys Asp
 1060 1065 1070

Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln Pro Ser
 1075 1080 1085

Arg Thr Leu Glu Lys Arg Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr Lys Ala
 1090 1095 1100

Ser Thr Arg Asp Gln Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr Asn Arg
 1105 1110 1115 1120

Leu His Leu Leu Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Leu Gly Leu Val
 1125 1130 1135

Ala His Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gln Lys Glu Thr Lys Lys
 1140 1145 1150

(2) 서열 4에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 31 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 가닥수: 단일

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열 설명:

<서열 4>

GGGGGGGAAT TCGTAGCGGG TATCATGGGA C

31

(2) 서열 5에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 31 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 가닥수: 단일

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열 설명:

<서열 5>

GGGGGGGAAT TCGGGTGCTG CAATATCTGG C

31

(2) 서열 6에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 16 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 가닥수: 단일

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열 설명:

<서열 6>

GTAAAACGACG GCCAGT

16

(2) 서열 7에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 18 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 가닥수: 단일

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열 설명:

<서열 7>

AAGGACGACAC ATTGCGTA

18

(2) 서열 8에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

- (A) 길이: 31 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 가닥수: 단일
- (D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열 설명:

<서열 8>

CCCCCGGAT CCACCAAAC CCCACAACT C

31

(2) 서열 9에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

- (A) 길이: 18 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 가닥수: 단일
- (D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 형태: cDNA

(xi) 서열 설명:

<서열 9>

GAGTGGCCCT CCAATAGC

18

미생물 기탁 표시

(PCT 규칙 13bis)

A. 하기 지시한 사항은 24쪽 15-18줄 및 30쪽 18-20줄의 발명의 상세한 설명에 언급된 미생물에 관한 것이다.		
B. 기탁 증명		
기탁기관명: 아메리칸 타입 컬처 콜렉션		
기탁기관의 주소 (우편번호 및 국명 포함) 미국 20852 메릴랜드주 록크빌 파크로운 드라이브 12301		
기탁일 1996년 10월 15일	수탁번호 98225	
C. 추가 표시 사항 (없으면 빈칸으로 남겨둠) 이 정보는 별지에 계속됨 ()		
D. 지시 사항 접수 지정국 (모든 지정국에 해당하지 않을 경우에만)		
E. 별도 표시 사항 (없으면 빈칸으로 남겨둠)		

하기 표시 사항은 추후에 국제사무국에 제출 예정임 (수탁번호와 같은 표시 사항의 일반 특징을 명기할 것)	
수리관청용 (X) 이 용지는 국제 출원과 함께 접수됨	
담당관 (서명)	

양식 PCT/RO/134 (1992년 7월)

(57) 청구의 범위

청구항 1.

β -용혈성 연쇄상구균에 민감한 포유동물에서 β -용혈성 연쇄상구균의 전이증식 (colonization) 또는 감염의 발생을 감소시키거나 그에 대해 보호하기에 유효한 면역유발량의 불활성 연쇄상구균 C5a 펩티다제 (SCP) 또는 이의 단편 또는 돌연변이체를 생리적으로 허용가능한 무독성 부형제와 함께 포함하는 백신.

청구항 2.

제1항에 있어서, 유효량의 면역 아췌반트를 추가로 포함하는 백신.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 포유동물이 사람, 개, 소, 돼지 및 말로 이루어진 군에서 선택된 것인 백신.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 포유동물이 사람인 백신.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 β -용혈성 연쇄상구균이 A군 연쇄상구균, B군 연쇄상구균, C군 연쇄상구균 및 G군 연쇄상구균으로 이루어진 군에서 선택된 것인 백신.

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 β -용혈성 연쇄상구균이 A군 연쇄상구균인 백신.

청구항 7.

제1항에 있어서, 펩티드에 접합 또는 연결된 재조합 연쇄상구균 C5a 펩티다제, 또는 이의 단편 또는 돌연변이체를 포함하는 백신.

청구항 8.

제1항에 있어서, 다당류에 접합 또는 연결된 상기 연쇄상구균 C5a 펩티다제, 또는 이의 단편 또는 돌연변이체를 포함하는 백신.

청구항 9.

β -용혈성 연쇄상구균에 민감한 비-인간 포유동물에서 β -용혈성 연쇄상구균의 전이증식 또는 감염의 발생을 감소시키거나 그에 대해 보호하기에 유효한 면역유발량의 불활성 연쇄상구균 C5a 펩티다제 (SCP) 또는 이의 단편 또는 돌연변이체를 생리적으로 허용가능한 무독성 부형제와 함께 포함하는 백신의 유효량을 상기 비-인간 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 비-인간 포유동물을 β -용혈성 연쇄상구균의 전이증식 또는 감염에 대해 보호하는 방법.

청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 백신이 유효량의 면역 아ジュ반트를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11.

제9항에 있어서, 상기 백신이 피하 또는 근육내 주사에 의해 투여되는 방법.

청구항 12.

제9항에 있어서, 상기 백신이 경구 섭취에 의해 투여되는 방법.

청구항 13.

제9항에 있어서, 상기 백신이 비내 투여되는 방법.

청구항 14.

제9항에 있어서, 상기 β -용혈성 연쇄상구균이 A군 연쇄상구균, B군 연쇄상구균, C군 연쇄상구균 및 G군 연쇄상구균으로 이루어진 군에서 선택된 것인 방법.

청구항 15.

제14항에 있어서, 상기 β -용혈성 연쇄상구균이 A군 연쇄상구균인 방법.

청구항 16.

제9항에 있어서, 상기 포유동물이 개, 소, 돼지 및 말로 이루어진 군에서 선택된 것인 방법.

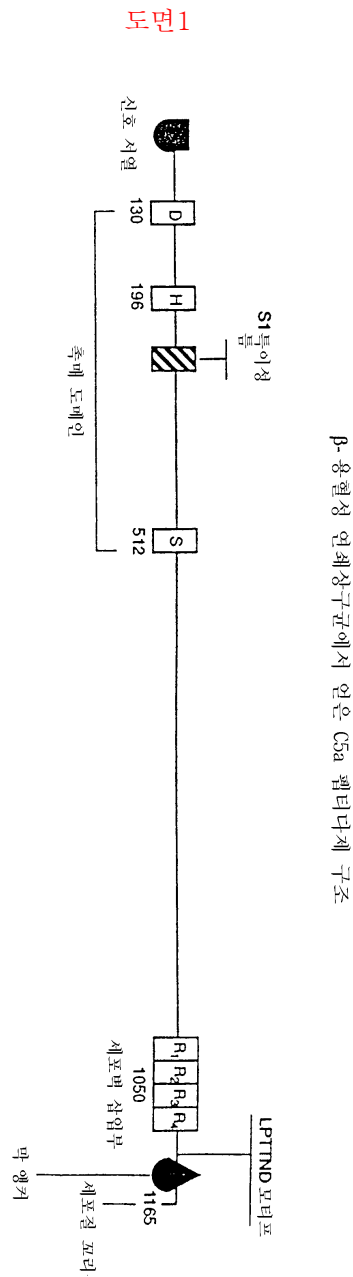
청구항 17.

제9항에 있어서, 상기 백신이 펩티드에 접합 또는 연결된 재조합 연쇄상구균 C5a 펩티다제 또는 이의 단편 또는 돌연변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 18.

제9항에 있어서, 상기 백신이 다당류에 접합 또는 연결된 재조합 연쇄상구균 C5a 펩티다제 또는 이의 단편 또는 돌연변이체를 포함하는 것인 방법.

도면



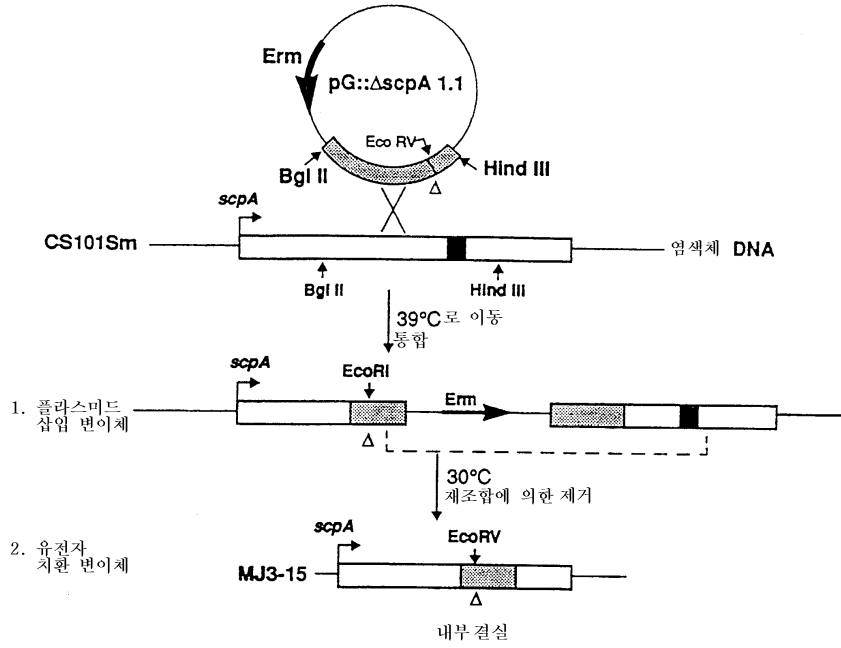
도면2

```

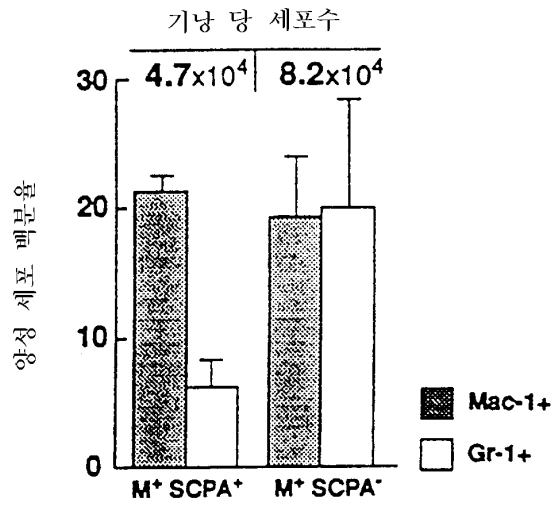
1
SCPA49 LP KLPFDKLAIALHSTSI LLNAQSDIKANTV TETDPATEQAVETPC
SCPA12 -----V-----
SCPB -----T-----A-----A-----
61
KDTKTPOTPDAAEETVADDANDLAPQAPAKTPOTSATSKATIRDLNDP SOVKTLQEKAGK
-----I-----A-----P-----
-----S-----G-----A-----P-----
121
*
GAGTVVAVIDAGFDKNHEAHLTDKAKARYOSKEDLEKAKKEHGITYGEMVNDKVAYYHD
-----T-----
181
*
YSKDCKTAVDQEGHGHVSGILSGHAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLHRVEIVNGLADYAR
-----T-----
241
NYAQAIRDAVNLGAKVINHMSFGNAALAYANLPDETCKKPFVYAKSGVRI VTTAGNDSSEFG
-----I-----A-----D-----S-----S-----
-----A-----D-----S-----S-----
301
GKTRLP LADHPDYGVVGTAAAADSTLTVASYSPDNQLTETAMVKTDQDDQDKEMPVLSINR
-----K-----VR-----A-----
361
FEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGIALERSD IDFTDKIANAKKAGAVGLIYDNQD
-----T-----G-----K-----V-----K-----
421
KGFPIELPNVDQHPAAFISRKDGLLLKDN SQKTIIFNATPKVLPTASGTKLSRFSSWGLT
-----P-----
-----P-----
481
*
ADGNIKPDIAAPGODILSSAANKYAKLSGTSMSAPLVAVIMGLLOKQYETQYDPDMTQSE
-----V-----G-----
-----V-----G-----P-----
541
RLDLAKKVLMS SATALYDEDEKAYFSPROQGAGAVDAKKASEATHYVTDKDN TSSKVBHLN
-----A-----
-----A-----
601
NVSDKFEVITVHNKSDKPHELYQATVOTDKV DGHFALAPKALIE TSWOKITIPANSS
-----O-----Y-----A-----
-----N-----O-----V-----Y-----A-----
661
KQVTIPIDISQF SKD LLAQMKNGYFLEGFVRIKODPTKEELMSIPYIGR GDFGNLSALE
-----V-----A-----R-----F-----V-----
-----V-----A-----R-----F-----K-----
721
KPLYDSKDGSSYYHEEISDAKDQLDGDGLQFYALKNDFALT TSNPWTIINVVKEGVEN
-----I-----AN-----N-----N-----KA-----
-----I-----AN-----N-----N-----KA-----
781
IEDIESSEITETIFAGTFAKQDDRRHYI IRRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFHGTF LR
-----S-----E-----Q-----
-----L-----S-----E-----Q-----
841
NAKNLVAEVL DKEGHNVMTESEVTEQVVKXNYNNDLASTLGSTRFEISRWDGCKDKDAKVVAN
-----K-----T-----G-----
-----K-----T-----G-----
901
GYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDVIDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASKPQTSQPVY
-----K-----
-----K-----
961
RERIAYYMOEDLP TTEYISPNEGTF TLP EEAETMEGATVPLKMSDFTYVVEDMAGNIT
-----T-----
1021
YTPVTKLLEGH SNKPEODGSDQAPDKKPKETKPEODGSDQAPDKKPKETKPGDQSGGOTPK
-----D-----T-----A-----A-----E-----
-----D-----T-----A-----A-----E-----
1081
KPETKPEKDSGGOTPKTPOKGPSRTLEKRS SKRALATKASTRDQLPTINDKDTNRLHL
-----T-----
1141
LKLVMHTFFLGLVAHIFKTKR...TED
-----F-----OKE-KK
-----OKE-KK

```

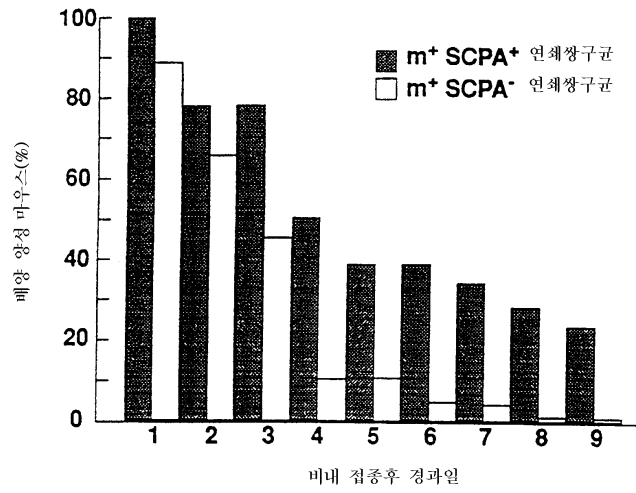
도면3



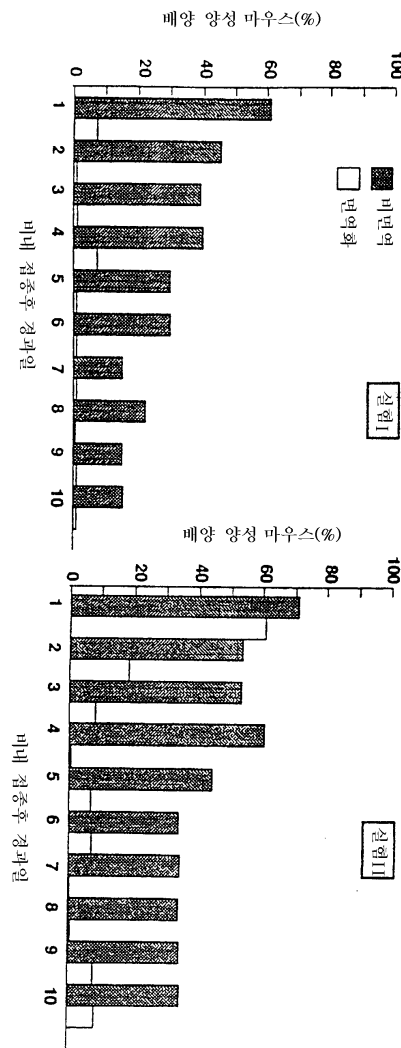
도면4



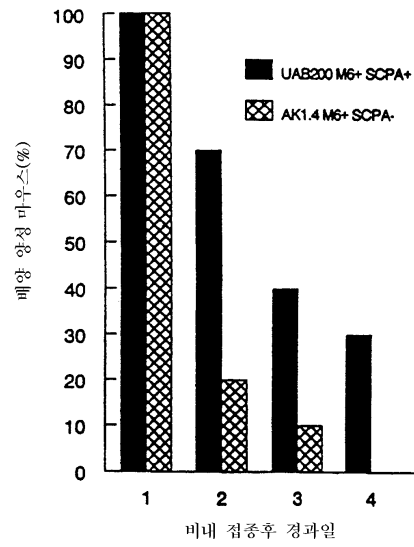
도면5



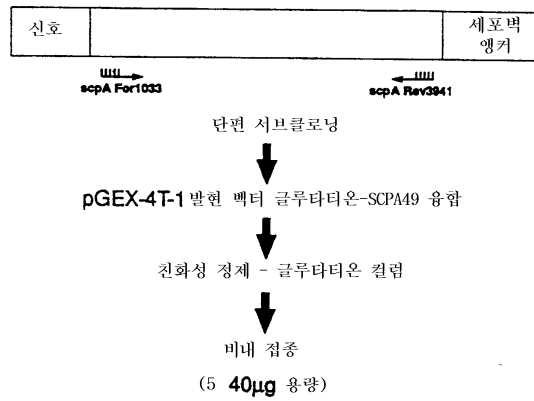
도면6



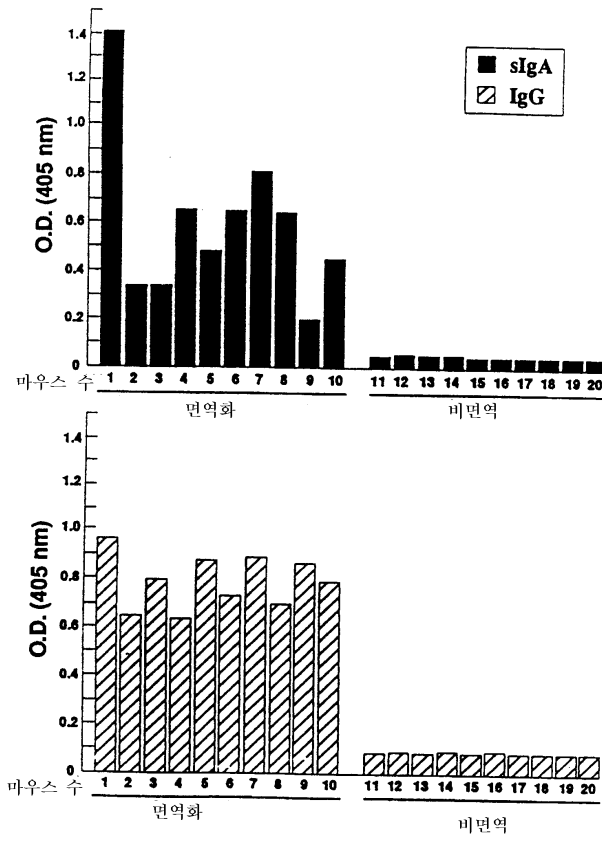
도면7



도면8



도면9



도면10

