

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(21) 출원번호	10-2000-7011206	(65) 공개번호	10-2001-0052244
(22) 출원일자	2000년10월07일	(43) 공개일자	2001년06월25일
변역문 제출일자	2000년10월07일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/007669	(87) 국제공개번호	WO 1999/51188
국제출원일자	1999년04월07일	국제공개일자	1999년10월14일

AP ARIPO특허 : 캐냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨, 시에라리온,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

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

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우.

(30) 우선권주장 60/080,878 1998년04월07일 미국(US)  
09/056,019 1998년04월07일 미국(US)

(73) 특허권자 세인트 쥐드 칠드런즈 리서치 호스피탈  
미국 테네시주 38105-2794 멤피스 노쓰 라우더데일 스트리트 332

메디뮨 인코포레이티드  
미국 메릴랜드 20878 게이테르스부르크 웨스트 앤키스 밀 로드 35

(72) 발명자 투오마넨엘레인아이  
미국테네시주38139계르마타운도브메도우코브웨스트9600

마수어에이치로버트  
미국테네시주38139게르만타운도브메도우코브웨스트9600

비제만테 래사엠  
미국미들랜드주20878노오쓰포타막피치리프코트9

존슨레슬릭시드너  
미국미들랜드주20874제르만타운앰베서더드라이브13545

쾨니히스콧  
미국미들랜드주20852록크빌랄스톤로드10901

(74) 대리인  
이병호  
김영관  
홍동오  
정상구

심사관 : 박정웅

#### (54) N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드, 이로부터 유도된 백신 및 이를 포함하는 약제학적 조성물

#### 요약

본 발명은 서열 1, 3 내지 7 또는 9 내지 11에 기술된 아미노산 서열을 갖는, N-말단 콜린 결합 단백질 A의 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공하며, 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 유사체 또는 유도체를 포함한다. 또한 본 발명은 아미노산 서열이 서열 24에 제시되고, 폴리펩티드가 이의 천연 3차 구조를 갖는, N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 및 이의 제조 방법을 제공한다. 본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공하는데, 이때, 폴리펩티드는 렉틴 활성을 보유하고 콜린에 결합하지 않는다. 본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 면역원성 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 최종적으로 본 발명은 약제학적 조성물, 백신 및 진단 및 치료학적 방법에서의 용도를 제공한다.

#### 대표도

도 1

#### 색인어

폐렴구균, N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물, 콜린, 렉틴

#### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 일반적으로, N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물(truncate)의 폴리펩티드에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 세균 감염, 특정하게는 폐렴구균(*pneumococcus*)에 대한 보호를 제공하거나 이러한 감염에 대한 보호 항체를 유도하는 백신, 및 진단 및 수동 면역요법에 사용하기 위한, 상기 폴리펩티드에 대한 항체 및 길항제에 관한 것이다. 당해 폴리펩티드 및/또는 이러한 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 또한, 폐렴구균의 세균성 부착소(adhesion)의 경쟁적 억제제로서 유용하다. 마지막으로, 본 발명은 이러한 폴리펩티드를 사용하는 치료법에 관한 것이다.

#### 배경기술

스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)는 폐혈증, 수막염, 중이염 및 대엽성 폐렴과 같은 침입성 감염의 주요 원인인 그람 양성 세균이다[참조: Tuomanen et al NEJM 322:1280-1284, 1995]. 폐렴구균은 상부 및 하부 기도 세포에 친화적으로 결합된다. 대부분의 세균과 마찬가지로, 폐렴구균이 사람 세포에 부착하는 것은 진핵성 탄수화물에 레시틴-유사 방식으로 결합되는 세균성 표면 단백질의 제시에 의해 이루어진다[참조: Cundell, D. & Tuomanen, E. (1994) *Microb Pathog* 17:361-374]. 폐렴구균은 염증이 유발되지 않은 상피에 결합되는데, 이는 무증상 보균(asymptomatic carriage)으로서 여겨질 수 있는 과정이다. 침입성 질환으로의 전환은 사람 세포를 활성화시키면서 이러한 사람 세포 상에서 이용될 수 있는 수용체의 수와 형태를 변화시키는 염증 인자가 국부적으로 발생되는 것을 포함한다고 제안된 바 있다 [참조: Cundell, D. et al. (1995) *Nature*, 377:435-438]. 이러한 새로운 설정에서 한 가지 가능성으로 제시된 것은 폐렴 구균이 이를 비-조절된 수용체, 즉 혈소판 활성화 인자(PAF) 수용체를 이용하고, 이를 중 하나와 관계된 것으로 여겨진다는 것이다[참조: Cundell et al. (1995) *Nature*, 377:435-438]. PAF 수용체가 나타난지 수분이내에, 폐렴구균은 한층 더 고조된 부착과 침입을 진행하게 된다. 예를 들면, 가용성 수용체 유사체에 의해 활성화된 세포에 대한 세균성 결합을 억제시키는 것은 동물 모델에서 질환으로의 진행을 차단시켜준다[참조: Idanpaan-Heikkila, I. et al. (1997) *J. Infect. Dis.*, 176:704-712]. 이와 관련하여 특히 유효한 것은, 시험관내 사람 세포에 대한 폐렴구균의 부착을 예방하고 생체내 폐에서의 콜로니형성(colonization)을 예방하는 부가의 시알산을 지니거나 지니지 않는 락토-N-네오테트라오스를 함유하는 가용성 탄수화물이다.

#### **콜린 결합 단백질: 후보 부착소 유전자:**

폐렴구균은 세포벽 테이코산 또는 리포테이코산에 대한 비-공유 결합에 의해 세균성 표면에 결합할 수 있는 표면 단백질 계열을 생성한다. 스트렙토코커스 뉴모니애의 표면은 포스포릴콜린에 비-공유적으로 결합되는 CBP(콜린 결합 단백질) 계열로 덮힌다. CbpA는 키메라 구조를 나타내는 75kD 표면-노출된 콜린 결합 단백질이다. 이에는 독특한 N-말단 도메인 프롤린 풍부 영역에 이어서 콜린에 대한 결합과 관련된 10개의 반복 영역으로 구성된 C-말단 도메인이 있다.

CbpA는 진핵 세포의 표면 상에 존재하는 당접합체 함유 수용체에 대한 부착소(리간드)이다. cbpA에 결합있는 돌연변이체는 비강인두 콜로니형성에 대한 유아 랫트 모델에서 발병력 저하를 나타내었다. 이러한 결합은 테이코산으로 덮혀진 콜린 결정기에 대해 지시된 것이며 이러한 단백질 계열의 구성원 각각에서 특징적인 콜린 결합 도메인에 의해 매개된다. 이러한 콜린 결합 도메인은 로페즈(Lopez) 등의 자가분해성 효소에 관한 연구에서 발견되었고 이의 특징이 완전히 확인되었다[참조: Ronda et al.(1987) *Eur. J. Biochem*, 164:621-624]. 이러한 도메인을 함유하는 기타 단백질에는 폐렴구균성 파아지의 자가용해물질 및 보호성 항원인 폐렴구균성 표면 단백질 A(PspA)가 포함된다[참조: Ronda, C. et al. (1987) *Eur. J. Biochem.*, 164:621-624 and McDaniel, L.S.,et al. (1992) *Microb. Pathog*, 13:261-269]. CbpA는 이의 기타 계열 구성원 C 말단과 공유되지만 이의 사람 세포에 대한 결합 활성이 이의 독특한 N-말단 도메인으로부터 발생되는 비강인두 도메인을 콜로니형성시키지 못한다. 이러한 콜로니형성 과정과 질환으로의 진행이, 1차 단계로서 사람 세포에 대한 폐렴구균의 부착에 좌우되기 때문에, 교차 반응성 항체 또는 이러한 도메인을 묘사하는 웹티드와의 경쟁적 억제에 의해 상기 N-말단 도메인의 기능을 방해하는 것이 질환을 차단하는데 결정적일 수 있다.

항-폐렴구균성 백신에 대한 콜린 결합 단백질은 PCT 국제특허출원 PCT/US 97/07198에 기재되어 있고, 이러한 PCT 출원은 본원에 참조문헌으로 삽입되어 있다. 에스. 뉴모니애(*S. pneumoniae*)에 대한 최근 백신은 상기 세균의 가장 공통적인 23개 혈청형 캡슐의 정제된 탄수화물을 이용하고 있지만, 이러한 백신은 예방율이 단지 50% 정도이고[참조: Shapiro et al. NJEM 325:1453, 1991], 2세 이하에서는 면역원성이 아니다. 추가로, 치료학적 폴리펩티드는 다중 내성 유기체로의 감염의 경우에는 치료학적 옵션을 부여할 수도 있다. 따라서, 본 발명은 예방용 백신을 제공함으로써 오래전부터의 필요를 충족시켜준다.

#### **발명의 요약**

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 이러한 폴리펩티드는 서열 1, 3 내지 7 또는 9 내지 11에 제시된 아미노산 서열, 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 유사체 또는 유도체를 포함한다. 또한, 본 발명은 서열 24에 제시된 아미노산을 갖는 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는, 3차 구조를 나타내는 분리된 폴리펩티드, 및 이러한 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다. 당해 분리된 폴리펩티드는 동물과 사람을 세균 감염, 바람직하게는 폐렴구균 감염으로부터 면역시키는데 사용하기에 적합하다.

추가의 양태에서, 본 발명은 렉틴 활성을 지니지만 콜린 결합 활성을 지니지 않는 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 면역원성 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물 또는 이의 단편을 제공한다.

또한, 본 발명은 당해 분리된 폴리펩티드를 암호화하거나 이러한 폴리펩티드의 활성을 경쟁적으로 억제시키는 분리된 핵산, 예를 들면, 재조합 DNA 분자 또는 클로닝된 유전자, 또는 이의 축퇴성 변이체, 돌연변이체, 유사체 또는 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, 이의 축퇴물, 변이체, 돌연변이체, 유사체 또는 단편을 포함하는 분리된 핵산은 서열 12, 14 내지 17, 19 내지 22 또는 23에 제시된 서열을 갖는다. 본 발명의 추가의 양태에서는, 이와 같이 결정된 재조합 DNA 분자 또는 클로닝된 유전자의 완전한 DNA 서열을, 적당한 숙주 내로 도입될 수 있는 발현 조절 서열과 작동적으로 연결시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은, 본 발명을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 클로닝된 유전자 또는 재조합 DNA 분자로 형질전환된 단세포 숙주, 및 더욱 특히, 앞서 제시된 바와 같은 서열로부터 결정된 DNA 서열 또는 이의 단편을 포괄한다.

이러한 분리된 폴리펩티드에 대한 항체에는 천연 발생의 항체 및 재조합적으로 제조된 항체가 포함된다. 이들은 공지된 유전 공학 기술에 의해 제조된 폴리클로날 및 모노클로날 항체 뿐만 아니라 이중-특이적(키메라) 항체, 및 경쟁 제제로서 작용하는 것을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 세균 부착을 조절하는 능력과 함께 진단용으로 사용하도록 만드는 기타 작용기를 포함하는 항체를 포함할 수 있다.

본 발명의 추가의 목적은 침입성, 자발성 또는 특발성 병리학적 상태의 유해 결과를 치료하거나 피하기 위한, 상기 세균 또는 이의 아단위의 양 또는 활성을 조절하는 포유류의 치료 방법을 제공하는 것이다. 본 발명은 당해 분리된 폴리펩티드, 이의 아단위 또는 결합 파트너를 포함하거나 이에 근거한 치료법으로 사용하기 위한 약제학적 조성물을 제공한다.

마지막으로, 본 발명은 약제학적 조성물, 백신, 및 이의 진단 및 치료 방법 용도를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 및 재조합 절두물 R1(도 2에 제시된 바와 같은 CbpA의 N-말단으로부터 약 16번 아미노산 내지 321번 아미노산) 및 R2(도 2에 제시된 바와 같은 CbpA의 N-말단으로부터 약 16번 아미노산 내지 444번 아미노산)을 도식적으로 나타낸 것이다. 도메인 A는 도 2에 제시된 바와 같은 CbpA 아미노산 서열의 N-말단으로부터 약 153번 아미노산 내지 321번 아미노산이고; 도메인 B는 도 2에 제시된 바와 같은 CbpA 아미노산 서열의 N-말단으로부터 약 270번 아미노산 내지 326번 아미노산이며; 도메인 C는 도 2에 제시된 바와 같은 CbpA 아미노산 서열의 N-말단으로부터 약 327번 아미노산 내지 433번 아미노산이다.

도 2A 내지 B는 CbpA의 N-말단 영역의 핵산과 아미노산 서열의 각종 혈청형의 상동성을 비교한 것이다.

도 3은 재조합 R1 및 R2의 발현과 정제를 도시한 것이다.

도 4는 마우스에서의 수동 보호 결과를 나타낸 것이다. 재조합 R2에 대한 면역 혈청은 치사 에스. 뉴모니에 챠린지로부터 마우스를 보호하였다.

도 5는 LNnT-HSA 피복된 플레이트에 대한 R6x 부착에 대한 항-R2 항체의 역ガ를 나타낸 것이다.

도 6은 LNnT-HSA 피복된 플레이트에 대한 폐렴구균의 부착을 차단하는 활성에 대한 항-CbpA 및 흡착된 항-CbpA 항체의 역ガ를 나타낸 것이다.

도 7은 마우스에서의 능동 보호 결과를 나타낸 것이다. 재조합 R1에 대한 면역 혈청은 치사 에스. 뉴모니에 챠린지로부터 마우스를 보호하였다(챌린지 560cfu 혈청형 6B).

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드에 관한 것이다. 당해 폴리펩티드는 폐렴구균성 감염에 대하여 동물을 면역시키는데 사용하기에 적합하다. 이들 폴리펩티드 또는 이의 웨პ티드 단편은 이들이 적당한 애주번트와 제형화된 경우, 폐렴구균에 대한 예방용 백신 및 교차 반응성 단백질을 이용한 기타 세균에 대한 예방용 백신으로 사용된다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 이러한 폴리펩티드는 서열 1, 3 내지 5, 7, 또는 9 내지 11에 제시된 아미노산 서열, 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 유사체 또는 유도체를 포함한다. 또 다른 양태에서, 당해 폴리펩티드는 아미노산 KXXE(서열 6)을 갖는다.

본 발명은 도 2에 제시된 바와 같은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 이러한 폴리펩티드는 도 2에 제시된 바와 같은 보존된 영역인 아미노산 서열을 갖는다. 예를 들면, 이러한 보존된 영역에는 아미노산 서열 158 내지 210; 158 내지 172; 300 내지 321; 331 내지 339; 355 내지 365; 367 내지 374; 379 내지 389; 409 내지 427; 및 430 내지 447번이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 도 2는 본 발명에 의해 고려되는 CbpA의 N-말단 영역의 핵산과 아미노산 서열의 각종 혈청형의 상동성을 나타낸 것이다.

추가로, 본 발명은 서열 24에 제시된 아미노산을 갖는 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는, 3차 구조를 나타내는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 상기 폴리펩티드는 이의 유사체, 단편, 돌연변이체 또는 변이체이다. 고려된 변이체가 도 2에 제시되어 있다. 본 발명은 또한, 도 2에 제시된 바와 같은 혈청형 4의 위치 16 내지 약 위치 475 아미노산 또는 도 2에 제시된 바와 같은 혈청형 4의 상응하는 아미노산을 갖는 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는, 3차 구조를 나타내는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 3차 구조는 천연 단백질에 존재하는 구조에 상응한다.

폴리펩티드의 제조방법은, 예를 들면, 다음과 같다: 콜린 결합 단백질 A의 전체 길이를 하이드록실아민으로 절단하는데, 하이드록실아민은 콜린 결합 단백질 A를 혈청형(serotype) R6x 및 혈청형 4의 위치 475의 아미노산 아스파라긴(N)에서 절단하거나 도 2에 도시한 상이한 혈청물에서 혈청형 R6x 또는 혈청형 4의 상응하는 아미노산을 절단함으로써 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물을 제조한다. 절두된 콜린 결합 단백질 A 또는 이의 단편을 제조하고 천연의 3차 구조를 유지시키는(즉, 전장 콜린 결합 단백질 A의 3차 구조) 대안적 방법이 고려되고 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 폴리펩티드가 이의 3차 구조를 유지하기 때문에, 분리된 폴리펩티드는 세균 감염, 바람직하게는 폐렴구균에 대해 동물과 사람에 면역성을 주는 면역원으로서 사용되기에 적합하다.

콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 아미노산 서열은 다음과 같다:

```
ENEGATQVPTSSNRANESQAEGEQPKKLDSERDKARKEVEEYVKIVGESY
AKSTKKRHTITVALVNEELNNIKNEYLNKIVESTSESQQLQILMMESRSKVDEAV
SKFEKDSSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTEPGEKVAEAKKKVEEAEKKAKD
QKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVKKAELELVVKVANEPRDEQKIKQAE
AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAEAAKRRADAKEQGKPKGRAKRGVPHEL
ATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPSLKPEKKVAEAEKKVEEAKKAEDQKE
EDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKERNEEKVKQAKAE
VESKKAETRLEKIKTDRKKAEEEAKRKAEEEDKVKEKPAEQQPAPAPKAE
KPAPAPKPE (서열 24).
```

"폴리펩티드 R2"는 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4(도 1)의 N-말단 절두물의 위치 16 내지 위치 444의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

```
ENEGATQVPTSSNRANESQAEGEQPKKLDSERDKARKEVEEYVKIVGESY
AKSTKKRHTITVALVNEELNNIKNEYLNKIVESTSESQQLQILMMESRSKVDEAV
SKFEKDSSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTEPGEKVAEAKKKVEEAEKKAKD
QKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVKKAELELVVKVANEPRDEQKIKQAE
AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAEAAKRRADAKEQGKPKGRAKRGVPHEL
ATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPSLKPEKKVAEAEKKVEEAKKAEDQKE
EDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKERNEEKVKQAKAE
VESKKAETRLEKIKTDRKKAEEEAKRKAEEEDKVKEKPA (서열번호 1).
```

콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 N-말단 절두물의 폴리펩티드 R2를 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

GAGAACGGAGGGAGCTACCCAAGTACCCACTTCTTAATAGGGCAAATGA  
AAGTCAGGCAGAACAAAGGAGAACACCTAAAAACTCGATTAGAACGA  
GATAAGGCAGGAAAGAGGTGAGGAATATGTAAAAAAATAGTGGGTG  
AGAGCTATGCAAAATCAACTAAAAAGCGACATACAATTACTGTAGCTCA  
GTTAACGAGTTGAACACATTAGAACGAGTATTGAATAAAATAGTGTGA  
ATCAACCTCAGAAAGCCAACACAGATACTGATGATGGAGAGTCGATCAA  
AAGTAGATGAAGCTGTCTAAGTTGAAAAGGACTCATCTCTCGTCAA  
GTTCAAGACTCTTCACTAAACCGGAAGCTCAGATACAGCGAAGCCAAAC  
AAGCCGACAGAACCAAGGAGAAAAGGTAGCAGAACGTAAGAAGAAGGTG  
AAGAAGCTGAGAAAAAGCCAAGGATCAAAAGAAGAAGATCGTCGAA  
CTACCCAACCATTACTTACAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTCG  
ATGTGGAAGTTAAAAAGCGGAGCTTGAACTAGTAAAGTGAAGCTAA  
CGAACCTCGAGACGAGCAAAAAATTAGCAAGCAGAACGGGAAGTTGAG  
AGTAAACAAGCTGAGGCTACAAGGTTAAAAAAATCAAGACAGATCGTG  
AAGAAGCAGAAGAAGAAGCTAACGAAGAGCAGATGCTAAAGAGCAAG  
GTAAACCAAAGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCTGGAGAGCTAGCAAC  
ACCTGATAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTCAGATTCTAGCGTAGGTG  
AAGAAAATCTTCCAAGCCCACCCCTGAAACCAGAAAAAAAGGTAGCAGA  
AGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAACGAGGATCAAAAA  
GAAGAAGATCGCCGTAACTACCCAAACCAACTTACAAAACGCTTGAAC  
TGAAATTGCTGAGTCGATGTGGAGTTAAAAAGCGGAGCTGAACTAG  
TAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTGAAACGAGGAAAAGTTAAGCAAGC  
AAAAGCGGAAGTTGAGAGTAAAAAGCTGAGGCTACAGGTTAGAAAAA  
ATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAACAGAACGCTAACGAAAAGCAG  
CAGAACAGAACGCTG (서열번호 12).

#### 혈청형 4의 CbpA의 아미노산 서열:

ENEQATQVPTSSNRANESQAEEQGEQPDKLDSERDKARKEVEEYVKIVGESY  
AKSTKKRHTITVALVNELNNIKNEYLNKIVESTSESQQLQILMMESRSKVDEAV  
SKFEKDSSSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTEPGEKVAEAKKVVEAEKKAKD  
QKEEDRRNYPNTTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVVKVANEPRDEQKIKQAE  
AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAEEEAKRADAKEQGKPKGRAKRGVPGEL  
ATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPSLKPEKKVAEAKKVVEEAKKAEDQKE  
EDRRNYPNTTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKPRNEEKVKQAKAE  
VESKKAEARTRLEKIKTDRKKAEEEAKRKAEEEDKVKEKPAEQQPAPAPRAE  
KPAPAPKPNPAAEQPKAEKPADQQAEEDYARRSEEEYNRLTQQQPKTEKPA  
QPSTPKTGWKQENGWMWFYNTDGSMATGWLQNNGSWYYLNNSNGAMATG  
WLQNNGSWYYLNANGSMATGWLQNNGSWYYLNANGSMATGWLQYNGS  
WYYLNANGSMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATGWWVKDGDWTYYLEAS  
GAMKASQWFKVSDKWYYVNGSGALAVNTTVDGYGVNANGEWVN. (서열번호  
2)

헬청형 4의 CbpA의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열:

GAGAACGAGGGAGCTACCAAGTACCCACTTCTTAATAGGGCAAATGA  
 AAGTCAGGCAGAACAAAGGAGAACAACTAAAAACTCGATTAGAACGA  
 GATAAGGCAAGGAAAGAGGTCGAGGAATATGTAAAAAATAGTGGGTG  
 AGAGCTATGCAAAATCAACTAAAAGCGACATACAATTACTGTAGCTA  
 GTTAACGAGTTGAAACAACATTAAGAACGAGTATTGAATAAAATAGTGA  
 ATCAACCTCAGAAAGCCAACATACAGATACTGATGATGGAGAGTCGATCAA  
 AAGTAGATGAAGCTGTCTAAGTTGAAAAGGACTCATCTCTCGTCAA  
 GTTCAGACTCTTCACTAAACCGGAAGCTTCAGATACAGCGAAGCCAAAC  
 AAGCCGACAGAACCAAGGAGAAAAGGTAGCAGAACGTAAGAAGAAGGTG  
 AAGAAGCTGAGAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGAA  
 CTACCCAACCATTACTTACAAAACGCTGAACTTGAAATTGCTGAGTCCG  
  
 ATGTGGAAGTTAAAAAGCGGAGCTGAACTAGTAAAAGTGAAGCTAA  
 CGAACCTCGAGACGAGCAAAAATTAAGCAAGCAGAACGCGAAGTTGAG  
 AGTAAACAAGCTGAGGCTACAAGGTTAAAAAATCAAGACAGATCGTG  
 AAGAACGAGAACAGAGCTAACGAAAGAGCAGATGCTAAAGAGCAAG  
 GTAAACCAAAGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCTGGAGAGCTAGCAAC  
 ACCTGATAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTCAGATTCTAGCGTAGGTG  
 AAGAAAATCTTCAAGCCCATCCCTGAAACCAGAAAAAAGGTAGCAGA  
 AGCTGAGAACAGGTTGAAGAACGTAAGAAAAAGCCGAGGATCAAAA  
 GAAGAACGATGCCGTAACTACCCAAACCAACTTACAAAACGCTGAACT  
 TGAAATTGCTGAGTCCGATGTGGAAGTTAAAAAGCGGAGgCTGAACTA  
 GTAAAAGAGGAAGCTAACCGAACCTCGAAACGAGGAAAAGTTAACGAAAG  
 CAAAAGCGGAAGTTGAGAGTAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAA  
 AATCAAGACAGATCGTAAAAAGCAGAACGAGAACGCTAAACGAAAAGCA  
 GCAGAACGAGATAAGTTAAAGAAAAACAGCTGAACAACCACACCAG  
 CGCCGGCTCCAAAAGCAGAAAAACAGCTCCAGCTCCAAAACCGAGGAA  
 TCCAGCTGAACAACCAAAAGCAGAAAACAGCTGATCAACAAGCTGAA  
 GAAGACTATGCTCGTAGATCAGAACGAGAACATATAATCGCTGACTCAACA  
 GCAACCGCCAAAACGCTGAAAAACAGCACACCCATCTACTCCAAAACA  
 GGCTGGAAACAAGAAAACGGTATGTGGTACTTCTACAATACTGATGGTTC  
 AATGGCGACAGGATGGCTCCAAAACAAAGCTCAAGCTACCTACAG  
 CAATGGCGCTATGGCGACAGGATGGCTCCAAAACAATGGTTCATGGTACT  
 ATCTAAACGCTAATGGTCAATGGCAACAGGATGGCTCCAAAACAATGGT  
 TCATGGTACTACCTAACGCTAATGGTCAATGGCGACAGGATGGCTCCA  
 ATACAATGGCTCATGGTACTACCTAACGCTAATGGTCAATGGCGACAG  
 GATGGCTCCAATACAATGGCTCATGGTACTACCTAACGCTAACGGT  
 ATGGCGACAGGTTGGGTGAAAGATGGAGAACCTGGTACTATCTTGAAGC  
 ATCAGGTGCTATGAAAGCAAGCCAATGGTCAAAGTATCAGATAATGGT  
 ACTATGTCAATGGCTCAGGTGCCCTGAGTCACACAACTGTAGATGGC  
 TATGGAGTCATGCCAATGGTGAATGGTAAACTAA (서열번호 13).

"폴리펩티드 R1"은 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 N-말단 절두물의 위치 16 내지 위치 321의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

ENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSERDKARKEVEEYVKKIVGESY  
 AKSTKKRHTITVALVNELNNIKNEYLNKJVESTSESQQLQILMMESRSKVDEAV  
 SKFEKDSSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTEPGEKVAEAKKKVEEAEKKA  
 QKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVKVKAEEAKRDEQKIKQAE  
 AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAEAKRADAQEQQGPKGRKGVPGE  
 ATPDKKENDAKSSDSSVGEETL (서열번호 3).

폴리펩티드 R1을 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

GAGAACGAGGGAGCTACCCAAAGTACCCACTTCTAATAGGGCAAATGA  
 AAGTCAGGCAGAACAAAGGAGAACAAACCTAAAAACTCGATTAGAACGA  
 GATAAGGCAAGGAAAGAGGTCGAGGAATATGTAAAAAAAATAGTGGTG  
 AGAGCTATGCAAAATCAACTAAAAGCGACATACAATTACTGTAGCTCA  
 GTTAACGAGTTGAAACAACATTAAGAACGAGTATTGAATAAAATAGTTGA  
 ATCAACCTCAGAAAGCCAACACTACAGATACTGATGATGGAGAGTCGATCAA  
 AAGTAGATGAAGCTGTCTAAGTTGAAAAGGACTCATCTTCTCGTCAA  
 GTTCAGACTCTTCACTAAACCGGAAGCTTCAGATACAGCGAAGCCAAAC  
 AAGCCGACAGAACCAAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTG  
 AAGAAGCTGAGAAAAAAAGCCAAGGATCAAAAGAAGAAGATCGTGTAA  
 CTACCCAACCATTACTTACAAAACGCTGAACTTGAAATTGCTGAGTCCG  
 ATGTGGAAGTTAAAAAAAGCGGAGCTGAACTAGTAAAAGTGAAGCTAA  
 CGAACCTCGAGACGAGCAAAAAATTAGCAAGCAGAACCGGAAGTTGAG  
 AGTAAACAAGCTGAGGCTACAAGGTTAAAAAAAATCAAGACAGATCGTG  
 AAGAAGCAGAAGAAGAAGCTAACGAAGAGCAGATGCTAAAGAGCAAG  
 GTAAACCAAAGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCTGGAGAGCTAGCAAC  
 ACCTGATAAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTCAGATTCTAGCGTAGGTG  
 AAGAAAACCTCTC (서열번호 14).

"폴리펩티드 C/R2"는 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 N-말단의 위치 327 내지 위치 433의 아미노산 서열을 갖는, R2 내 반복 영역 C를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

KPEKKVAEAEKKVEEAKKKaedQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVK  
 KAELELVKEEAKPRNEEKVKQAKAEVESKKAETRLEKIKTDRKKAEAAK  
 RKA (서열번호 4).

폴리펩티드 C/R2의 DNA 서열:

AAACCAGAAAAAAAGGTAGCAGAAGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAACGTA  
 AGAAAAAAAGCCGAGGATCAAAAGAAGAACGATGCCGTAACCTACCCAAAC  
 CAATACTTACAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTCCGATGTGGAAG  
 TTAAAAAAAGCGGAGCTGAACTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCG  
 AAACGAGGAAAAAGTTAAGCAAGCAGAACCGGAAGTTGAGAGTAAAAAA  
 GCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAAATCAAGACAGACAGATCGTAAAAAAGCAG  
 AAGAAGAAGCTAACGAAAAGCA (서열번호 15)

"폴리펩티드 A/R2"은 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 N-말단의 위치 153 내지 위치 269의 아미노산 서열을 갖는, R2 내 반복 영역 A를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

**TEPGEKVAEAKKKVEEAEEKKAKDQKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVK  
KAELELVKVKANEPRDEQKIKQAEAEVESKQAEATRLKKIKTDREEAEEEAK  
RRADA (서열번호 5).**

도 1에 도시된 바와 같이, 폴리펩티드 R2의 영역 A는 R1 내의 영역 A와 동일하다.

폴리펩티드 A/R2를 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

ACAGAACCCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAA  
GCTGAGAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACCTACC  
CAACCATTACTTACAAAACGCTTGAACITGAAATTGCTGAGTCCGATGTG  
GAAGTTAAAAAGCGGAGCTTGAACTAGTAAAAGTGAAGCTAACGAAC  
CTCGAGACGAGCAAAAAATTAAAGCAAGCAGAAGCGGAAGTTGAGAGTAA  
ACAAGCTGAGGCTACAAGGTTAAAAAAATCAAGACAGATCGTGAAGAA  
GCAGAAGAAGCTAACGAAGAGCAGATGCT (서열번호 16).

하나 이상의 아미노산 잔기의 종류 또는 위치는 변이체, 예를 들어 단백질에 대해 특정화된 모든 잔기보다 적게 함유하는 결실물, 특정화된 하나 이상의 잔기가 다른 잔기로 대체된 치환물, 및 하나 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩티드의 말단 또는 중간 위치에 부가된 부가물을 포함하도록 변화되거나 변형된다(도 2 참조). 이러한 분자에는 다음이 포함된다: 선택된 포유동물이외의 숙주에 의해 발현되는 "바람직한" 코돈의 삽입, 제한 엔도뉴클레아제 효소에 의한 절단용 위치의 제공 및 용이하게 발현된 벡터의 작제를 돋는 추가의 개시, 말단 또는 중간 DNA 서열의 제공. 구체적으로, 혈청형 4의 아미노산 치환의 예는 다음과 같으나, 이에 제한되지 않는다: 위치 154의 E는 K로 치환됨; 위치 155의 P는 L로 치환됨; 위치 156의 G는 E로 치환됨; 위치 157의 E는 K로 치환됨; 위치 181의 K는 E로 치환됨; 위치 182의 D는 A로 치환됨; 위치 187의 R은 Y, H 또는 L로 치환됨; 위치 194의 I는 N으로 치환됨; 위치 200의 E는 D로 치환됨; 위치 202의 E는 D로 치환됨; 위치 209의 E는 K로 치환됨; 위치 212의 K는 E로 치환됨; 위치 218의 V는 L로 치환됨; 위치 220의 V는 K 또는 E로 치환됨; 위치 221의 K는 E로 치환됨; 위치 223의 N은 D 또는 K로 치환됨; 위치 225의 P는 S, T 또는 R로 치환됨; 위치 227의 D는 N으로 치환됨; 위치 228의 E는 K로 치환됨; 위치 229의 Q는 E, G 또는 D로 치환됨; 위치 230의 K는 T로 치환됨; 위치 232의 K는 N으로 치환됨; 위치 235의 E는 K로 치환됨; 위치 236의 A는 E로 치환됨; 위치 237의 E는 K로 치환됨; 위치 240의 S는 N으로 치환됨; 위치 241의 K는 E로 치환됨; 위치 242의 Q는 K로 치환됨; 위치 249의 K는 E로 치환됨; 위치 250의 K는 N으로 치환됨; 위치 257의 E는 Q 또는 K로 치환됨; 위치 263의 A는 L로 치환됨; 위치 264의 K는 E로 치환됨; 위치 265의 R은 N으로 치환됨; 위치 266의 R은 I로 치환됨; 위치 267의 A는 K 또는 V로 치환됨; 위치 258의 D는 T로 치환됨; 위치 269의 A는 D로 치환됨; 위치 291의 A는 T, V, P, G 또는 X로 치환됨; 위치 294의 G는 G, A 또는 E로 치환됨; 위치 295의 V는 D 또는 A로 치환됨; 위치 295의 P는 L 또는 F로 치환됨; 위치 299의 L은 P 또는 Q로 치환됨; 위치 328의 P는 S로 치환됨; 위치 329의 E는 G로 치환됨; 위치 340의 E는 A로 치환됨; 위치 343의 K는 E 또는 D로 치환됨; 위치 347의 E는 K로 치환됨; 위치 349의 D는 A로 치환됨; 위치 354의 R은 H로 치환됨; 위치 366의 E는 D로 치환됨; 위치 375의 E는 K로 치환됨; 위치 378의 K는 E로 치환됨; 위치 390의 E는 G로 치환됨; 위치 391의 P는 S로 치환됨; 위치 393의 N은 D로 치환됨; 위치 397의 V는 I로 치환됨; 및 위치 408의 K는 Q로 치환됨.

"폴리펩티드 R2 혈청형-R6x"는 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 R6x의 N-말단 절두물의 위치 16 내지 위치 444의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

ENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVAL  
NIKLSAIKTKYLRELNVLEEKSKDELPSEIKAKLDAAFEKFKDKTLKPGEKVA  
EAKKKVVEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAELELVK  
EEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAEATRLENKTDRKKAEEEAKRKADAKLK  
EANVATSDQGKPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSSSLK  
SGKKVAEAEKKVEEAEEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLDLEIAESDVKVKE  
AELELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESKKAEATRLENKTDRKKAEEEAKR  
KAAEEDKVKEKPA (서열번호 7)

폴리펩티드 R2 혈청형 R6x를 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

GAAAACGAAGGAAGTACCAAGCAGCCACTCTTCTAATATGGCAAAGAC  
 AGAACATAGGAAAGCTGCTAAACAAGTCGTCGATGAATATATAGAAAAA  
 ATGTTGAGGGAGATTCAACTAGATAGAAGAAAACATAACCCAAAATGTCGC  
 CTTAACATAAAGTTGAGCGCAATTAAAACGAAGTATTGCGTGAATTAA  
 ATGTTTACAAGAGAAGTCGAAAGATGAGTTGCCGTAGAAATAAAAGCA  
 AAGTTAGACGCAGCTTGAGAAGTTAAAAAGATACTTGAACCCAGG  
 AGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAA  
 GCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACACCCAAACCAACTTA  
 CAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTCGATGTGAAAGTTAAAGAAG  
 CGGAGCTTGAACCTAGTAAAGAGGAAGCTAAAGAACTCGAACGAGGGC  
 ACAATTAAAGCAAGCAAAAGAGAAGATGAGACTAAAGAACTCGAACGAGGGC  
 CAAGGTTAGAAAACA~~t~~AGACAGA~~t~~CGTAAAAAAGCAGAAGAAGAGCT  
 AAACGAAAAGCAGATGCTAAGTTGAAGGAAGCTAATGTAGCGACTTCAG  
~~t~~CAAGGTTAAACCAAAGGGCGGGCAAAACGAGGAGTCCTGGAGAGCTA  
 GCAACACCTGATAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGT  
 AGGTGAAGAAACTCTTCCAAGCTCATCCCTGAAATCAGGAAAAAGGTAG  
 CAGAAGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTGAGAAAAAGCCAAGGATCA  
 AAAAGAAGAAGATCGCCGTAACACCCAAACCAACTTACAAAACGCTTG  
 ACCTTGAATTGCTGAGTCGATGTGAAAGTTAAAGAAGCGGAGCTTGA  
 CTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAGACGAGGAAAAATTAAAGC  
 AAGCAAAAGCGAAAGTTGAGAGTAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTTAGA  
 AAACATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGCTAAACGAAAAA  
 GCAGCAGAAGAAGATAAAGTTAAAGAAAAACCAGCTG (서열번호 17)

삭제

혈청형 R6x의 CbpA의 아미노산 서열:

ENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAQVVDIEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVAL  
 NIKLSAIKTYLRELNVLEEKSKDELPSEIKAKLDAAFEKFKDTLKPGEKVA  
 EAKKKVEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAELELVK  
 EEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAETRLENKTDRKKAEEEAKRKADAKLK  
 EANVATSDQGPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSSSLK  
 SGKKVAEAEEKVVEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLDLEIAESDVVKVE  
 AELELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESKKAETRLENKTDRKKAEEEAKR  
 KAAEEDKVKEKPAEQPQPAPATQPEKPAKPEKPAEQPKAEKTDDQQAEEDY  
 ARRSEEEYNRLTQQQPKTEKPAQPSTPKTGWLQNGMWYFYNTDGSMAT  
 GWLQNNGSWYYLNANGAMATGWLQNNGSWYYLNANGSMATGWLQNN  
 SWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYLN  
 NGDMATGWLQNNGSWYYLNANGDMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATG  
 WVKGDTWYYLEASGAMKASQWFKVSDKWYYVNGSGALAVNTVDGYG  
 VNANGEWVN (서열번호 8).

삭제

혈청형 R6x의 CbpA의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

GAAAACGAAGGAAGTACCCAAGCAGCCACTTCTTAATATGGCAAAGAC  
 AGAACATAGGAAAGCTGCTAAACAAGTCGTGATGAATATATAGAAAAAA  
 ATGTTGAGGGAGATTCAACTAGATAGAAGAAAACATAACCCAAATGTCGC  
 CTTAAACATAAAGTTGAGCGCAATTAAAACGAAGTATTTGCGTGAATTAA  
 ATGTTTAGAAGAGAAGTCGAAAGATGAGTTGCCGTAGAAATAAAAGCA  
 AAGTTAGACGCAGCTTTGAGAAGTTAAAAAGATACATTGAAACCAGG  
 AGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAA  
 GCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGCTAACTACCCAAACCAACTTAA  
 CAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTCGATGTGAAAGTTAAAGAAG  
 CGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGAAAGCTGAGGCTA  
 ACAATTAAAGCAAGCAAAAGAGAAAGTTGAGAGTAAAAAGCTGAGGCTA  
 CAAGGTTAGAAAACA:CAAGACAGA:CGTAAAAAGCAGAAGAAGCTA  
 AAACGAAAAGCAGATGCTAAGTTGAAGGAAGCTAATGTAGCGACT:CAGA  
 tCAAGGTTAAACCAAAGGGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCTGGAGAGCTAG  
 CAACACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGTA  
 GGTGAAGAAAActCTTCCAAGCTCATCCCTGAAATCAGGAAAAAGGTAGC  
 AGAAGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTGAGAAAAAGCCAAGGATCAA  
 AAAGAAGAAGATGCCGTAACTACCCAAACCAACTTACAAAACGCTTGA  
 CCTTGAAATTGCTGAGTCGATGTGAAAGTTAAAGAAGCGGAGCTTGAAC  
 TAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAGACGAGGAAAAATTAAAGCA  
 AGCAAAAGCGAAAGTTGAGAGTAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTAGAA  
 AACATCAAGACAGATCGTAAAAAGCAGAAGAAGCTAACGAAAAG  
 CAGCAGAAGAAGATAAAGTTAAAGAAAAACCGAGCTGAACAAACCACAACC  
 AGCGCCGGCTACTCAACCAGAAAAACAGCTCCAAAACCAAGAGAAGCCA  
 GCTGAACAACCAAAGCAGAAAAACAGATGATCAACAAGCTGAAGAAG  
 ACTATGCTCGTAGATCAGAAGAAGAATATAATCGCTTGACTIONCAACAGCAA

CCGCCAAAAACTGAAAACCAGCACAAACCATCTACTCCAAAAACAGGCT  
 GGAAACAAGAAAACGGTATGTTACTTCTACAATACTGATGGTTCAATG  
 GCAACAGGATGGCTCCAAAACAACGGTTCATGGTACTATCTAAACGCTAA  
 TGGTCTATGGCGACAGGATGGCTCCAAAACAATGGTCTATGGTACTATC  
 TAAACGCTAATGGTCAATGGCAACAGGATGGCTCCAAAACAATGGTCA  
 TGGTACTACCTAACGCTAATGGTCTATGGCGACAGGATGGCTCCAAATA  
 CAATGGTCTATGGTACTACCTAACAGCAATGGCGCTATGGCGACAGGAT  
 GGCTCCAAATACAATGGCTCATGGTACTACCTCAACGCTAATGGTATATG  
 GCGACAGGATGGCTCCAAAACAACGGTTCATGGTACTACCTCAACGCTAA  
 TGGTATATGGCGACAGGATGGCTCCAAATACAACGGTTCATGGTATTACC  
 TCAACGCTAATGGTATATGGCGACAGGTTGGGTGAAAGATGGAGATACC  
 TGGTACTATCTGAAGCATCAGGTGCTATGAAAGCAAGCCAATGGTCAA  
 AGTATCAGATAAATGGTACTATGTCATGGCTCAGGTGCCCTGAGTCA  
 ACACAACGTAGATGGCTATGGAGTCAATGCCAATGGTGAATGGTAAAC  
 TAA (서열번호 18).

"폴리펩티드 R1 혈청형 R6x"는 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 R6x의 N-말단 절두물의 위치 16 내지 위치 321의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

**ENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAQKVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVAL  
NIKLSAIKTKYLRELNVLEEKSKDELPSEIKAKLDAAFEFKKDTLKPGKVA  
EAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAEELVK  
EEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEAKRKADAKLK  
EANVATSDQGKPKGRAKRGVPGEATPDKKENDAKSSDSSVGEETL (서열번호  
9).**

폴리펩티드 R1을 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

**GAAAACGAAGGAAGTACCCAAGCAGCCACTTCTTAATATGGCAAAGAC  
AGAACATAGGAAAGCTGCTAAACAAGTCGTCGATGAATATATAGAAAAAA  
ATGTTGAGGGAGATTCAACTAGATAGAAGAAAACATACCCAAAATGTCGC  
CTTAAACATAAAAGTTGAGCGCAATTAAAACGAAGTATTGCGTGAATTAA  
ATGTTTTAGAAGAGAAGTCGAAAGATGAGTTGCCGTAGAAATAAAAGCA  
AAGTTAGACGCAGCTTTGAGAAGTTAAAAAAGATACATTGAAACCAGG  
AGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAA  
GCCGAGGATCAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACTACCCACCAACTTA  
CAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTTCGATGTGAAAGTTAAAGAAG  
CGGAGCTTGAACTAGTAAAAGAGGAAGCTAAAGAATCTCGAAACGAGGG  
CACAAATTAAAGCAAGCAAAAGAGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCT  
ACAAGGTAGAAAACAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAG  
CTAAACGAAAAGCAGATGCTAAGTTGAAGGAAGCTAATGTAGCGACTTCA  
GATCAAGGTAAACCAAAGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCCCTGGAGAGC  
TAGCAACACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGC  
GTAGGTGAAGAAACTCTTC (서열번호 19).**

#### 작제

"폴리펩티드 C/R2 혈청형 R6x"는 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 R6x의 N-말단 절두물의 위치 327 내지 위치 433의 아미노산 서열을 갖는, R2 내 반복 영역 C를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

**KSGKKVAAEAKKVEEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLDLEIAESDVKVK  
EAEELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEAK  
RKA (서열번호 10)**

폴리펩티드 C/R2 혈청형 R6x의 DNA 서열은 다음과 같다:

**AAATCAGGAAAAAAGGTAGCAGAAGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTG  
AGAAAAAAAGCCAAGGATCAAAAGAAGAAGATGCCGTAACTACCCAAC  
CAATACTTACAAACGCTTGACCTTGAAATTGCTGAGTCCGATGTGAAAG  
TTAAAGAAGCGGAGCTTGAACTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCG  
AGACGAGGAAAAAATTAAGCAAGCAGAAAGCAGAAAGTTGAGAGTAAAAAA  
GCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAACATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAG  
AAGAAGAAGCTAAACGAAAAGCA (서열번호 20).**

"폴리펩티드 A/R2 혈청형 R6x"는 폴리펩티드를 다음 서열을 갖는 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 R6X의 N-말단의 위치 155 내지 위치 265의 아미노산 서열을 갖는, R2 내 반복 영역 A를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

PGEKVAEAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPNTNYKITLELEIAEFDVKVKE  
AEELVKEEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAEATRLENIKTDRKKAEAAKR  
KADA (서열번호 11)

폴리펩티드 A/R2 혈청형 R6x를 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

CCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGGTAGAAGAAGCTAAGA  
AAAAAGCCGAGGATCAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACCTACCCAACCAA  
TACTTACAAAACGCTTGAACITGAAATTGCTGAGTTGATGTGAAAGTTA  
AAGAAGCGGAGCTTGAACTAGTAAAAGAGGAAGCTAAAGAACTCGAAC  
GAGGGCACAAATTAGCAAGCAAGAAAAGAGAAAGTTGAGAGTAAAAAGCTG  
AGGCTACAAAGGTTAGAAAACATAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGA  
AGAAGCTAAACGAAAAGCAGATGCT (서열번호 21).

#### 삭제

본 발명은 분리된 폴리펩티드에 관한 것으로, 여기서 분리된 폴리펩티드는 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 유사체 또는 유도체를 포함하는, 서열번호 22 또는 23에 제시된 것과 같은 아미노산 서열로 이루어진다.

SPSLKPEKKVAEAEKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPNTNYKITLELEIAESDV  
EVKKAEELVKEEAKEPREEVKVKQAKAEVESKKAEATRLEKIKTDRKKAE  
EAKRKAAEEDKVKEKPA (서열번호 22; 혈청형 4; 위치 323-434); 또는  
PSSSLKSGKKVAEAEKKVEEAKKAKDQKEEDRRNYPNTNYKTLDEIAESD  
VKVKEAEELVKEEAKEPREEKIKQAKAKVESKKAEATRLENIKTDRKKAE  
EEAKRKAAEEDKVKEKRA (서열번호 23, 혈청형 R6x; 위치 322-434).

"폴리펩티드 B/R2"는 도 2에 제시된 것과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 N-말단 절두물의 위치 270 내지 위치 326의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. "폴리펩티드 B/R2 혈청형-R6x"는 도 2에 제시된 것과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 R6x의 N-말단 절두물의 위치 264 내지 위치 326의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 본 발명은 도 1에 제시된 바와 같은 영역 A, B, C, A+B, B+C, A+C의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 고려하고 있다.

또한, 본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 폴리펩티드는 아미노산 KXXE(서열번호 6)를 갖는다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것으로, 아미노산 서열이 도 2에 제시되어 있다. 한 양태에서, 폴리펩티드는 도 2에 제시된 것과 같은 보존된 영역인 아미노산 서열을 갖는다. 예를 들면, 보존된 영역은 아미노산 서열 158 내지 172, 300 내지 321, 331 내지 339, 355 내지 365, 367 내지 374, 379 내지 389, 409 내지 427 및 430 내지 447번을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 도 2는 본 발명에서 고려되는 CbpA의 N-말단 영역의 핵산과 아미노산 서열의 각종 혈청형의 상동체를 제시한다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 폴리펩티드는 렉틴 활성을 가지고 콜린에 결합하지 않는다. 한 양태에서, 폴리펩티드는 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 동족체 또는 유도체를 포함하는 서열 1, 3 내지 5, 7 또는 9 내지 11에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는다.

본원에 사용된, "렉틴 활성을 갖는 폴리펩티드"는 탄수화물에 비공유결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 단백질을 의미한다. 본원에 정의된, "부착"은 세척을 견디기에 충분히 안정한 사람 세포 또는 분비물에 대한 세균의 비공유 결합을 의미한다. 본원에 정의된 "LNnT에 결합"은 알부민-대조군보다 락토-N-네오테트라오스- 피복된 기질에 더 잘 결합하는 것을 의미한다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 면역원성 폴리펩티드를 제공한다. 면역원성 폴리펩티드는 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 유사체 또는 유도체를 포함하는 서열 1, 3 내지 5, 7 또는 9 내지 11에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 것으로 본 발명에서 고려된다. 본 발명은 도 2에 제시된 것과 같은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 폴리펩티드는 도 2에 제시된 것과 같은 보존된 영역인 아미노산 서열을 갖는다.

본 발명은 상기 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 유사체에 관한 것이다. 유사체 폴리펩티드는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 N 또는 COOH 말단에 임의로 부착된 N-말단 메티오닌 또는 N-말단 폴리히스티딘을 가질 수 있다.

다른 양태에서, 본 발명은 폴리펩티드의 단백질분해 생성물로부터 수득된 폴리펩티드의 펩티드 단편에 관한 것이다. 다른 양태에서, 폴리펩티드의 유도체는 당해 폴리펩티드에 부착된 하나 이상의 화학적 잔기를 갖는다. 다른 양태에서, 화학적 잔기는 수용성 중합체이다. 다른 양태에서, 화학적 잔기는 폴리에틸렌 글리콜이다. 다른 양태에서, 화학적 잔기는 모노, 디-, 트리- 또는 테트라페길화(pegylate)된다. 다른 양태에서, 화학적 잔기는 N-말단 모노페길화된다.

화합물에 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 부착은 PEG가 포유류에서 매우 독성이 낮기 때문에 특히 유용하다[참조: Carpenter et al., 1971]. 예를 들면, 아데노신 디아미나제의 PEG 부가물은 중증 복합 면역결핍증의 치료용으로 사람에 사용되기 위해 미국에서 승인되었다. PEG 결합에 의해 제공된 두번째 이점은 이종 화합물의 면역원성과 항원성을 효과적으로 감소시키는 것이다. 예를 들면, 사람 단백질의 PEG 부가물은 중증 면역 반응을 일으킬 위험 없이 다른 포유동물종에서 질병 치료에 유용할 수 있다. 본 발명의 화합물은 당해 화합물에 대한 또는 당해 화합물을 생산할 수 있는 세포에 대한 숙주 면역 반응을 감소시키거나 방지하기 위해 미세캡슐화 장치에 운반될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 막에 미세캡슐화되어(예를 들면, 리포좀) 운반될 수 있다.

단백질과 직접 반응하기에 적절한 PEG의 많은 활성 형태가 기술되었다. 단백질 아미노 그룹과의 반응을 위해 유용한 PEG 제제는 카복실산의 활성 에스테르나 탄산염 유도체를 포함하고, 특히 이탈 그룹이 N-하이드록시석신이미드, p-니트로페놀, 이미다졸 또는 1-하이드록시-2-니트로벤젠-4-설포네이트이다. 말레이미도 또는 할로아세틸 그룹을 함유하는 PEG 유도체가 단백질 유리 설프하이드릴 그룹을 변형시키기에 유용한 제제이다. 유사하게, 아미노 하이드라진이나 하이드라지드 그룹을 함유하는 PEG 제제는 단백질의 탄수화물 그룹의 과요오드산염 산화에 의해 생성된 알데히드와의 반응에 유용하다.

한 양태에서, 본원에 기술된 폴리펩티드의 아미노산 잔기는 "L" 이성체형이 바람직하다. 다른 양태에서, "D" 이성체형의 잔기는 렉틴 활성의 목적하는 작용성이 폴리펩티드에 의해 보유되는 한, 임의의 L-아미노산 잔기를 대신할 수 있다. NH<sub>2</sub>는 폴리펩티드의 아미노 말단에 존재하는 유리 아미노 그룹을 나타낸다. COOH는 폴리펩티드의 카복시 말단에 존재하는 유리 카복시 그룹을 나타낸다. 본원에 사용된 약어는 표준 폴리펩티드 명명을 따르고 있다[참조: *J. Biol. Chem.*, 243: 3552-59 (1969)].

모든 아미노산 잔기 서열은 왼쪽 및 오른쪽 방향이 아미노 말단에서 카복시 말단으로의 통상적인 방향인 식에 의해 본원에 표시됨을 주목해야 한다. 또한, 아미노산 잔기 서열의 처음 또는 끝에서 '-(dash)'는 하나 이상의 아미노산 잔기의 다른 서열에 대한 펩티드 결합을 나타냄에 주목해야 한다.

고상, 액상 또는 펩티드 축합 기술 또는 이의 임의의 배합의 익히 공지된 방법을 사용하여 제조된 합성 폴리펩티드는 천연 또는 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 펩티드 합성을 위해 사용된 아미노산은, Merrifield[참조: 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154]의 원래 고상 방법의 표준 탈보호, 중화, 커플링 및 세척 프로토콜에 이용되는 표준 Boc(N<sup>a</sup>-아미노 보호된 N<sup>a</sup>-t-부틸옥시카보닐)아미노산 수지이거나, Carpino 및 Han[참조: 1972, *J.Org. Chem.* 37:3403-3409]에 의해 최초로 기술된 염기-불안정한 N<sup>a</sup>-아미노 보호된 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc) 아미노산일 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 특별한 성질을 전달하는 D-아미노산, D- 및 L-아미노산의 배합 및 다양한 "디자이너" 아미노산(예를 들

면,  $\beta$ -메틸아미노산,  $\alpha$ -메틸아미노산 및  $\text{Na}-\text{메틸아미노산}$  등)을 포함할 수 있다. 합성 아미노산은 라이신용 오르니틴, 페닐알라닌용 플루오로페닐알라닌 및 루신이나 이소루신용 노르루신을 포함한다. 또한, 특정 커플링 단계에 특정 아미노산을 지정함으로써,  $\alpha$ -헬릭스,  $\beta$ -턴,  $\beta$ -시트(sheet),  $\gamma$ -턴(turn) 및 사이클릭 웨티드가 생성될 수 있다.

본 발명의 하나의 양태에서, 웨티드는  $\text{CO}_2\text{H}$  또는  $\text{CONH}_2$  측쇄를 삽입하여 유리 글리신 또는 글리신 아미드 그룹을 모의(simulate)하는 특별한 아미노산을 C-말단에 포함할 수 있다. 달리, 비드(bead)에 대한 결합 또는 링커로 이루어진 측쇄를 가진 D 또는 L 아미노산 유사체가 또한 이러한 특별한 잔기로 고려될 수 있다. 하나의 양태에서, 슈도-유리 C-말단 잔기는 D 또는 L 광학 배열이며, 다른 양태에서는 D 및 L- 이성체의 라세미체 혼합물을 사용할 수 있다.

또다른 양태에서는, 피로글루타메이트가 웨티드의 N-말단 잔기로 포함될 수 있다. N-말단 피로글루타메이트를 갖는 소정의 비드상에 웨티드의 단지 50%만이 치환되도록 한정함으로써 피로글루타메이트가 에드만(Edman) 분해에 의한 서열을 따를 수는 없지만, 서열화를 위한 비드상에는 충분한 비-피로글루타메이트 웨티드가 잔류할 것이다. 당해 기술분야 숙련가라면 이러한 기술을 사용하여 N-말단에서 에드만 분해에 내성인 잔기를 삽입하는 임의의 웨티드를 서열화할 수 있음을 용이하게 인식할 것이다. 목적하는 활성을 나타내는 개개의 웨티드를 특정짓는 기타 방법은 하기 상세하게 기술하고 있다. 차단된 N-말단 그룹, 예를 들면, 피로글루타메이트를 포함하는 웨티드의 특이 활성은, 특정 N-말단 그룹이 웨티드의 50% 내에서 존재하는 경우, 완전 차단된 웨티드(100%)를 차단되지 않은 웨티드(0%)와 비교함으로써 용이하게 나타낼 수 있다.

또한, 본 발명은 보다 명백하게 특정된 구조적 특성을 갖는 웨티드를 제조하고, 신규의 특성을 갖는 웨티드를 제조하기 위하여 웨티드 모사체, 에스테르 결합과 같은 웨티드 모사체 결합을 사용하려는 것이다. 다른 양태에서, 웨티드는 환원된 웨티드 결합, 즉,  $\text{R}_1-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{R}_2$ (여기서,  $\text{R}_1$  및  $\text{R}_2$ 는 아미노산 잔기 또는 서열이다)을 삽입하여 웨티드를 생성시킬 수 있다. 환원 웨티드 결합은 디웨티드 아단위으로 도입될 수 있다. 이러한 분자는 웨티드 결합의 가수분해, 예를 들면 프로테아제 활성에 대한 내성을 갖는다. 이 웨티드는 대사의 파괴 또는 프로테아제 활성에 대한 내성으로 인하여, 생체내에서의 반감기를 연장시키는 등의 특별한 기능 및 활성을 리간드에 부여한다. 더욱이, 특정한 시스템에서는 구속된(constrained) 웨티드가 증가된 기능적 활성을 나타낸다는 것이 잘 알려져 있다[참조: Hurby, 1982, Life Sciences 31:189-199; Hraby et al., 1990, Biochem J. 268:249-262]. 본 발명은 모든 다른 위치에 무작위 서열을 삽입하는 구속된 웨티드를 생성하는 방법을 제공한다.

구속형(constrained), 고리형 또는 경직형(rigidized) 웨티드는, 아미노산 또는 아미노산 유사체가 웨티드의 서열 중 둘 이상의 위치에서 삽입되어 처리후 가교 결합을 형성함으로써 웨티드의 구속화, 고리화 또는 경직화하도록 가교-결합할 수 있는 화학작용그룹을 제공하는 한, 합성에 의하여 제조될 수 있다. 회전에 의하여 유도된 아미노산이 삽입되는 경우 고리화가 바람직할 것이다. 웨티드를 가교결합할 수 있는 아미노산의 예로는 디설파이드 결합을 형성하는 시스테인, 락톤 또는 락타아제를 형성하는 아스파르트산, 및 전이 금속을 칼레이트화하여 가교결합을 형성하는  $\gamma$ -카복실-글루탐산(Gla)(Bachem)과 같은 칼레이트인자를 들 수 있다. 보호된  $\gamma$ -카복실-글루탐산은 지챙(Zee-Cheng)과 올손(Olson)[참조: 1980, Biophys. Biochem. Res. Commun. 94:1128-1132]에 의하여 기술된 합성을 변형하여 제조할 수 있다. 그 웨티드 서열이 두 개 이상의 가교결합할 수 있는 아미노산을 포함하는 웨티드는 예를 들면 시스테인 잔기의 산화로 디설파이드를 형성하거나 또는 금속이온을 첨가하여 칼레이트를 형성하여 처리할 수 있으며, 그 결과 웨티드를 가교하여 구속형, 고리형 또는 경직형 웨티드를 형성한다.

본 발명은 가교결합을 구조적으로 만들 수 있는 방법을 제공한다. 예를 들면, 4개의 시스테인 잔기가 웨티드 서열에 삽입되는 경우 상이한 보호 그룹을 사용할 수 있다[참조: Hiskey, 1981, in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press: New York, pp. 137-167; Ponsanti et al., 1990, Tetrahedron 46:8255-8266)]. 시스테인의 첫번째 쌍은 탈보호되고 산화될 수 있으며, 다음 두번째 세트가 탈보호 및 산화될 수 있다. 이러한 방식으로 특정의 디설파이드 가교결합이 형성될 수 있다. 대안으로는, 시스테인 한쌍과 콜라팅(collating) 아미노산 유사체 한쌍이 삽입되어 가교 결합은 상이한 화학적 성질을 가질 수 있다.

다음의 비-통상적인 아미노산이 특정 구조적 모티프를 도입하기 위하여 웨티드에 삽입될 수 있다: 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실레이트[참조: Kazmierski et al., 1991, J. Am. Chem. Soc. 113:2275-2283]; (2S,3S)-메틸-페닐알라닌, (2S,3R)-메틸-페닐알라닌, (2R,3S)-메틸-페닐알라닌 및 (2R,3R)-메틸-페닐알라닌[참조: Kazmierski and Hraby, 1991, Tetrahedron Lett.]; 2-아미노테트라하이드로나프탈렌-2-카복실산[참조: Landis, 1989, Ph.D. Thesis, University of Arizona]; 하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실레이트[참조: Miyake et al., 1989,

J. Takeda Res. Labs. 43:53-76];  $\beta$ -카볼린(D 및 L)[참조: Kazmierski, 1988, Ph.D. Thesis, University of Arizona]; HIC(히스티딘 이소퀴놀린 카복실산)[참조: Zechel et al., 1991, Int. J. Pep. Protein Res. 43] 및 HIC(히스티딘 사이클릭 우레아)(Dharanipragada).

하기 아미노산 유사체 및 펩티도 모사체는 펩티드에 삽입되어 특이적 2차 구조를 유도하거나 보조할 수 있다: LL-Acp (LL-3-아미노-2-프로페니돈-6-카복실산);  $\beta$ -턴 유도 디펩티드 유사체[참조: Kemp et al., 1985, J. Org. Chem. 50:5834-5838];  $\beta$ -시트 유도 유사체[참조: Kemp et al., 1988, Tetrahedron Lett. 29:5081-5082];  $\beta$ -턴 유도 유사체 [참조: Kemp et al., 1988, Tetrahedron Lett. 29:5057-5060];  $\alpha$ -나선 유도 유사체[참조: Kemp et al., 1988, Tetrahedron Lett. 29:4935-4938];  $\gamma$ -턴 유도 유사체[참조: Kemp et al., 1989, J. Org. Chem. 54:109:115] 및 하기 문헌에서 제공된 유사체들[참조: Nagai and Sato, 1985, Tetrahedron Lett 26:647-650; DiMaio et al., 1989, J. Chem. Soc. Perkin Trans. p.1687]; 또한, Gly-Ala-회전 유사체[참조: Kahn et al., 1989, Tetrahedron Lett. 30:2317]; 아미드 결합 동소체[참조: Jones et al., 1988, Tetrahedron Lett. 29:3853-3856]; 트레트라졸[참조: Zabrocki et al., 1988, J. Am. Chem. Soc. 110:5875-5880]; DTC[참조: Samanen et al., 1990, Int. J. Protein Pep. Res. 35:501:509]; 및 문헌[참조: Olson et al., 1990, J. Am. Chem. Sci. 112:323-333 and Garvey et al., 1990, J. Org. Chem. 56:436]에 개시된 유사체. 형태가 한정된 베타 턴 및 베타 볐즈(bulge)의 모사체 및 이들을 함유하는 펩티드는 1995년 8월 8일자로 칸 등에 의하여 특허된 미국특허 제5,440,013호에 개시되었다.

본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드 또는 펩티드의 변형 또는 유도체화를 제공한다. 펩티드의 변형은 당해 기술분야 숙련가에게 익히 공지되어 있으며, 인산화, 카복시메틸화 및 아실화 등을 들 수 있다. 변형은 화학적 또는 효소적 수단에 의하여 이루어질 수 있다. 다른 양태에서, 글리코실화되거나 지방 아실화된 펩티드 유도체가 제조될 수 있다. 글리코실화되거나 지방 아실화된 펩티드의 제조는 당업계에 익히 공지되어 있다. 지방 아실 펩티드 유도체 또한 제조될 수 있다. 예를 들면, 제한 없이, 유리 아미노 그룹(N-말단 또는 라이실)은 아실화, 예를 들면 미리스토일화될 수 있다. 다른 양태로는, 구조가  $(CH_2)_nCH_3$ 인 지방족 측쇄를 포함하는 아미노산은 펩티드에 삽입될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 이 펩티드 지방산 접합체 및 기타 펩티드 지방산 접합체는 영국특허 제8809162.4호, 국제특허출원 PCT/AU89/00166 및 상기 참고문헌 5에 기재되어 있다.

폴리펩티드를 암호화하는 핵산에 돌연변이가 만들어져 특정 코돈을 상이한 아미노산을 암호화하는 코돈으로 변화시킬 수 있다. 이러한 돌연변이는 일반적으로 거의 뉴클레오티드의 가능한 변화가 없도록 하여 만들어진다. 이러한 부류의 돌연변이의 치환은 생성되는 단백질에서 아미노산이 비-보존적 방식(즉, 특정의 크기와 특성을 갖는 아미노산 그룹에 속하는 아미노산으로부터 또 다른 그룹에 속하는 아미노산으로 코돈을 변화시킴)에 의하여, 또는 보존적 방식(즉, 특정의 크기와 특성을 갖는 아미노산 그룹에 속하는 아미노산으로부터 동일한 그룹에 속하는 아미노산으로 코돈을 변화시킴)에 의하여 변화되도록 할 수 있다. 그러한 보존적 변화는 일반적으로 생성되는 단백질을 구조 및 기능면에서 덜 변화하도록 한다. 비-보존적 변화는 생성되는 단백질의 구조, 활성 또는 기능을 보다 변화시킨다. 본 발명은 생성되는 단백질의 결합 특성 또는 활성을 현저하게 변화시키지 않는 보존적 변화를 함유하는 서열을 포함하도록 고려되어야 한다. 서열내에서 아미노산에 대한 치환체는 다른 종류의 구성원에서부터 아미노산이 속하는 종류 중에서 선택될 수 있다. 예를 들면, 비극성(소수성) 아미노산에는 알라닌, 루신, 이소루신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌 등이 포함된다. 방향족 환을 갖는 아미노산으로는 페닐알라닌, 트립토판 및 트립신이 있다. 극성 천연 아미노산으로는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민이 있다. 양전하성(염기성) 아미노산으로는 아르기닌, 라이신 및 히스티딘 등이 포함된다. 음전하성(산성) 아미노산으로는 아스파르트산 및 글루탐산 등이 포함된다. 그러한 변형은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법 또는 등전위점법에 의하여 측정되는 명백한 분자량에 영향을 끼치지 않을 것으로 생각된다.

특히 바람직한 치환체는:

Arg를 치환하는 Lys, 즉 양전하가 유지될 수 있는 치환체;

Asp를 치환하는 Glu, 즉 음전하가 유지될 수 있는 치환체;

Thr를 치환하는 Ser, 유리 -OH가 유지될 수 있는 치환체; 및

Asn를 치환하는 Gln, 유리 NH<sub>2</sub>가 유지될 수 있는 치환체이다.

작제

합성 DNA 서열은 유사체 또는 "뮤테인(mutein)"을 발현하는 유전자의 편리한 작제을 가능케 한다. 비천연 아미노산을 단백질에 위치 특이적으로 삽입하는 일반적인 방법은 문헌[참조: Noren, et al. Science, 244: 182-188(April 1989)]에 기재되어 있다. 이 방법은 비천연 아미노산의 유사체를 작제하기 위해 사용될 수 있다.

본 발명에 따르면, 당해 기술분야내에서의 통상의 문자 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 사용할 수 있다. 이러한 기술은 문헌에 자세하게 기재되어 있다.[참조 Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M. ed. (1994); "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III J.E. Celis, ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan, J.E., ed. (1994); "Oligonucleotide Synthesis" M.J. Gait ed. 1984; "Nucleic Acid Hybridization" B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985); "Transcription And Translation" B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984); "Animal Cell Culture" R.I. Freshney, ed. (1986); "Immobilized Cells And Enzymes" IRL Press, (1986); B.Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984)].

추가의 양태에 있어서, 피로글루타메이트는 웨티드의 N-말단 잔기로서 포함될 수 있다. N-말단 피로글루타메이트를 갖는 소정의 비드상에 웨티드의 단지 50%만이 치환되도록 한정함으로써 피로글루타메이트가 에드만 분해에 의한 서열을 따를 수는 없지만, 서열화를 위한 비드상에는 충분한 비-피로글루타메이트 웨티드가 잔류할 것이다. 이러한 기술을 사용하여 N-말단에서 에드만 분해에 내성인 잔사를 혼입하는 임의의 웨티드를 서열화할 수 있음을 통상적인 숙련가들은 쉽게 인식 할 것이다. 목적하는 활성을 나타내는 개개의 웨티드를 특정짓는 기타 방법은 하기 상세하게 기술하고 있다. 특정 N-말단 그룹이 웨티드의 50%내에 존재하는 경우, 차단된 N-말단 그룹(예: 피로글루타메이트)을 포함하는 웨티드의 특이적 활성은 차단되지 않은(0%) 웨티드와 완전히(100%) 차단된 웨티드의 활성을 비교함으로써 쉽게 설명된다.

### 유도체화용 화학 잔기

유도체화에 적합한 화학 잔기는 수용성 중합체중에서 선택될 수 있다. 선택된 중합체는 수용성이여서, 부착되는 성분은 수성 환경(예: 생리학적 환경)에서 침전되지 않는다. 바람직하게는, 말단 생성물 제조의 치료적 용도에 있어서, 중합체는 약제학적으로 허용될 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가들은 중합체/성분 접합체가 치료학적으로 사용될 수 있고, 목적하는 투여량, 순환 시간, 단백질 가수분해에 대한 내성 및 기타 사항을 고려하여 목적하는 중합체를 선택할 수 있을 것이다. 당해 성분(들)에 있어서, 이들은 본원에 제공된 분석을 사용하여 확인될 수 있다.

수용성 중합체는, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 엑스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 랜덤 공중합체) 및 엑스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 단독중합체, 프롤릴프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리비닐 알콜로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 수중에서의 안정성 때문에 제조시 이 점을 가질 수 있다.

중합체는 특정 문자량일 수 있고, 측쇄이거나 비측쇄일 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜에 있어서, 취급 및 제조 용이성을 위해 바람직한 문자량은 약 2 내지 약 100kDa(용어 "약"은 폴리에틸렌 글리콜의 제조시 몇몇 문자량이 표준 문자량에 비해 좀 더 많거나, 좀 더 적음을 나타낸다)이다. 기타 크기는 목적하는 치료학적 프로파일(예: 목적하는 서방출 기간, 효과, 경우에 따라, 생물학적 활성, 취급 용이성, 항원성의 정도 또는 부족 및 치료학적 단백질류에 대한 기타 공지된 폴리에틸렌 글리콜의 효과)에 좌우되어 사용될 수 있다.

부착된 중합체 문자의 수는 변할 수 있고, 당해 기술분야의 숙련가들은 작용시 효과를 확신할 수 있을 것이다. 모노-유도체일 수 있거나, 디-, 트리-, 테트라- 또는 동일하거나 상이한 화학적 잔기(예: 상이한 중량의 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체)를 갖는 유도체의 몇몇 배합물일 수 있다. 반응 혼합물에서 이들의 농도일 수 있기 때문에, 중합체 문자 대 성분 또는 성분 문자의 비율은 변할 수 있다. 일반적으로, 최적비(과량의 비반응 성분(들) 및 중합체가 존재하지 않는 반응의 효율에 있어서)는 목적하는 유도체화 정도(예: 모노-, 디-, 트리- 등), 중합체가 측쇄거나 비측쇄인지 간에 선택된 중합체의 문자량 및 반응 조건과 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

폴리에틸렌 글리콜 문자(또는 기타 화학 잔기)는 단백질의 작용 또는 항원 도메인에서의 효과를 고려하여 성분(들)에 부착되어야 한다. 당해 기술분야의 숙련가들에게 유용한 다수의 부착 방법은, 예를 들면, 본원에 참조로 인용된 EP 제0 401 384호(PEG를 G-CSF에 커플링시킴), 말리크(Malik) 등의 문헌[참조: 1992, Exp. Hematol, 20:1028-1035](트리실 클로라이드를 사용하는 GM-CSF의 폐길화를 보고함)에 있다. 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜은 반응성 그룹(예: 유리 아미노

또는 카복실 그룹)을 통해 아미노산 잔기를 통해 공유 결합될 수 있다. 반응성 그룹에 활성화된 폴리에틸렌 글리콜 분자가 결합될 수 있다. 유리 아미노 그룹을 갖는 아미노산 잔기는 라이신 잔기 및 말단 아미노산 잔기를 포함하고, 유리 카복실 그룹을 갖는 아미노산 잔기는 아스파르트산 잔기, 글루탐산 잔기 및 C-말단 아미노산 잔기를 포함한다. 또한, 설프하이드릴 그룹은 폴리에틸렌 글리콜 분자(들)을 부착시키기 위한 반응성 그룹으로서 사용될 수 있다. 치료학적 목적으로 바람직한 것은 N-말단 또는 라이신 그룹에서의 부착과 같은, 아미노 그룹에서의 부착이다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 도 2에 제시된 바와 같이 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 하나의 양태에 있어서, 핵산은 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 유사체 또는 유도체를 포함하여, 서열 12, 14 내지 17 또는 19 내지 21에 제시되어 있다. 핵산은 DNA, cDNA, 계놈 DNA, RNA이다. 또한, 분리된 핵산은 RNA 전사의 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 핵산이 랙틴 활성을 경쟁적으로 억제하는데 사용된다고 여겨진다.

"벡터"는 부착된 절편을 복제시키기 위해 부착될 수 있는 또 다른 DNA 절편인 레플리콘(예: 플라스미드, 파지 또는 코스미드)이다.

"DNA"는 일본쇄형 또는 이본쇄 나선형의 데옥시리보뉴클레오티드(아데닌, 구아닌, 티민 또는 사이토신)의 중합체 형태를 나타낸다. 이러한 용어는 단지 분자의 1차 및 2차 구조만을 나타내고, 기타 특정 3차 구조에 제한하지 않는다. 따라서, 이러한 용어는 밝혀진 이본쇄 DNA, 그 중에서도 선형 DNA 분자(예: 제한 단편), 바이러스, 플라스미드 및 염색체를 포함한다. 특정 이본쇄 DNA 분자의 구조를 토의할 때, 서열은 전사되지 않은 DNA 쇄(즉, mRNA와 상동인 서열을 갖는 쇄)를 따라 5' 내지 3' 방향에서 서열만을 제공하는 정상적 변환에 따라 본원에 기재될 수 있다.

DNA 서열은, 발현 조절 서열이 DNA 서열의 전사 및 해독을 조절하는 경우, 발현 조절 서열에 대해 "작동적으로 연결된다". "작동적으로 연결된"이라는 용어는 발현될 DNA 서열의 앞에 적합한 개시 시그날(예: ATG)을 가지며, 발현 조절 서열의 조절하에 DNA 서열의 발현을 가능하게 하는 정확한 판독 프레임 및 DNA 서열에 의해 암호화된 목적하는 생성물의 생성을 유지함을 나타낸다. 재조합 DNA 분자내로 삽입시킬 목적하는 유전자가 적합한 개시 시그날을 함유하지 않는 경우, 이러한 개시 시그날이 유전자의 앞에 삽입될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 기재한 핵산 분자를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 프로모터는 세균, 효모, 곤충 또는 포유류 프로모터이거나, 이와 동일할 수 있다. 또한, 벡터는 플라스미드, 코스미드, 효모 인공 염색체(YAC), 박테리오파지 또는 진핵 세포 바이러스성 DNA일 수 있다.

발현 단백질에 유용한, 당해 기술분야에 공지된 기타 다수의 벡터 주체가 사용될 수 있다. 이러한 벡터로 아데노바이러스 (AV), 아데노-수반(adeno-associated) 바이러스(AAV), 원숭이 바이러스 40(SA40), 사이토메갈로바이러스(CMV), 마우스 유방암 바이러스(MMTV), 몰로니(Molony) 쥐 백혈병 바이러스, DNA 운반 시스템, 즉 리포솜 및 발현 플라스미드 운반 시스템을 포함하지만, 이로써 한정되는 것은 아니다. 또한, 벡터의 하나의 부류는 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 바클로 바이러스, 레트로 바이러스 또는 셀리기 포레스트(Semliki Forest) 바이러스를 포함한다. 이러한 벡터는 시판되거나 당해 기술분야에서 익히 공지된 방법에 의해 기재된 서열로부터 조립할 수 있다.

또한, 본 발명은 적합한 숙주 세포의 벡터를 포함하는 폴리펩티드를 생성하기 위한 숙주 벡터 시스템을 제공한다. 적합한 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포, 예를 들면, 세균 세포(그람 양성 세포를 포함함), 효모 세포, 진균 세포, 곤충 세포 및 동물 세포를 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다. 다수의 포유류 세포는 마우스 섬유아 세포 NIH 3T3, CHO 세포, HeLa 세포, Ltk 세포, Cos 세포 등을 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다.

광범위한 숙주/발현 벡터 배합물을 본 발명의 DNA 서열을 발현하는 데 사용될 수 있다. 유용한 발현 벡터는, 예를 들면, 염색체, 비염색체 및 합성 DNA 서열의 절편으로 이루어질 수 있다. 적합한 벡터는 SV40의 유도체 및 공지된 세균 플라스미드, 예를 들면, 이. 콜라이(E. coli) 플라스미드 col El, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체, PR4와 같은 플라스미드; 파지 DNAS, 예를 들면, 파지 λ의 다수의 유도체, 예를 들면, NM989 및 기타 파지 DNA, 예를 들면, M13 및 필라멘트성 일본쇄 파지 DNA; 효모 플라스미드(예. 2μ 플라스미드) 또는 이들의 유도체; 진핵 세포에서 유용한 벡터(예: 곤충 또는 포유류 세포에서 유용한 벡터); 플라스미드와 파지 DNA의 배합물로부터 유도된 벡터(예: 파지 DNA 또는 기타 발현 조절 서열을 사용하기 위해 변형된 플라스미드) 등을 포함한다.

광범위한 임의의 발현 조절 서열-이에 작동적으로 연결된 DNA 서열의 발현을 조절하는 서열-은 이러한 벡터에서 사용되어 본 발명의 DNA 서열을 발현시킬 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열은, 예를 들면, SV40, CMV, 백시니아, 폴리오

마 또는 아데노바이러스, lac 시스템, trp 시스템, TAC 시스템, TRC 시스템, LTR 시스템, 과지  $\lambda$ 의 주 오퍼레이터 및 프로모터, fd 코트 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나아제 또는 기타 해당계 효소용 프로모터, 산 포스파타제(예: Pho 5)의 프로모터, 효모  $\alpha$ -교배 인자의 프로모터 및 원핵 세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 발현을 조절하기 위해 공지된 기타 서열, 및 다양한 이들의 배합을 포함한다.

광범위한 단세포 숙주 세포는 또한 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 유용한다. 이러한 숙주는 이 콜리, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스와 같은 익히 공지된 진핵 세포 및 원핵 세포; 효모와 같은 진균; CHO, R1.1, B-W 및 L-M 세포와 같은 동물 세포; 아프리카 녹색 원숭이(African Green Monkey)의 신장 세포(예: COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 및 BMT10), 곤충 세포(예: Sf9) 및 사람 세포 및 조직 배양물 중의 식물 세포를 포함한다.

모든 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주는 본 발명의 DNA 서열을 발현하는 데 있어서 균일하게 잘 작용할 것으로 이해된다. 모든 숙주가 동일한 발현 시스템을 사용하여 균일하게 잘 작용하는 것은 아니다. 그러나, 당해 기술분야의 숙련가는 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서 목적하는 발현을 성취하는데 부적당한 실험없이 적합한 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주를 선택할 수 있을 것이다. 예를 들면, 벡터 선택시, 벡터가 숙주내에서 작용해야 하기 때문에, 숙주는 반드시 고려되어야 한다. 벡터 복사수, 복사수 조절하는 능력 및 벡터에 의해 암호화된 기타 단백질의 발현(예: 항생제 마커)이 또한 고려될 것이다.

발현 조절 서열 선택시, 다양한 인자가 일반적으로 고려될 것이다. 이는, 예를 들면, 시스템의 상대적인 강도, 이의 제어력, 및 특히 잠재적 2차 구조로서 발현될 특정 DNA 서열 또는 유전자와의 적합성을 포함한다. 적합한 단세포 숙주는, 예를 들면, 이들의 선택된 벡터와의 적합성, 이들의 분비 특성, 단백질을 정확하게 풀딩하는 능력, 이들의 발효 요구성 및 발현될 DNA 서열에 의해 암호화된 생성물의 숙주에 대한 독성, 및 발현 생성물의 정체의 용이성을 고려하여 선택될 것이다.

본 발명은 또한 폴리펩티드의 생성을 가능하게 하고, 이와 같이 제조된 폴리펩티드를 회수하기에 적합한 조건하에, 상기 기재한 숙주 벡터 시스템을 성장시키는 단계를 포함하는, 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 분리된 폴리펩티드를 특이적으로 인지하거나 결합시킬 수 있는 항체를 제공한다. 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 또한, 항체는 방사성, 발색, 형광 또는 발광 마커인 검출 마커를 사용하여 표지할 수 있다. 표지된 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 하나의 양태에 있어서, 표지된 항체는 정제된 표지된 항체이다. 항체 표지화 방법은 당해 기술분야에 익히 공지되어 있다.

용어 "항체"는, 예를 들면, 천연 발생 항체 및 천연적으로 발생하지 않는 항체를 둘 다 포함한다. 특히, 용어 "항체"는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 및 이들의 분획물을 포함한다. 또한, 용어 "항체"는 키메라 항체 및 전체적인 합성 항체, 및 이들의 분획물을 포함한다. 이러한 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, 일본쇄, Fab 단편 및 Fab 발현 라이브러리를 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다.

당해 기술분야에 공지된 다양한 방법은 폴리펩티드에 대한 폴리클로날 항체 또는 이의 유도체 또는 유사체를 제조하는 데 사용될 수 있다[참조: Antibodies - A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Ne York, 1988]. 항체를 제조하기 위해, 래비트, 마우스, 랫트, 양, 염소 등을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는 다양한 숙주 동물을 절단된 CbpA 또는 이들의 유도체(예: 분획 또는 융합 단백질)를 사용하여 주사함으로써 면역시킬 수 있다. 하나의 양태에 있어서, 폴리펩티드는 면역원성 담체, 예를 들면, 소 혈청 알부민(BSA) 또는 키홀 립펫 해모시아닌(KLH)에 접합될 수 있다. 다양한 애주번트는 숙주 종류에 좌우되어 면역원성 반응을 증가시키는 데 사용될 수 있다.

모노클로날 항체, 분획물, 유사체 또는 이들의 유도체를 제조하기 위해, 배양균에서 연속 세포주에 의해 항체 분자를 제조하기 위해 제공되는 기술이 사용될 수 있다[참조: Antibodies - A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Ne York, 1988]. 이는 원래 콜러(Kohler)와 밀스타인(Milstein) [참조: 1975, Nature 256: 495-497]에 의해 개발된 하이브리도마 기술, 트리오마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술 [참조: Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72] 및 사람 모노클로날 항체를 제조하기 위한 EBV-하이브리도마 기술[참조: Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96]을 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다. 본 발명의 부가의 양태에 있어서, 모노클로날 항체는 최근 기술(PCT/US90/02545)을 사용하여 무균 동물에서 제조될 수 있다. 본 발명에 따라, 사람 항체가 사용될 수 있고, 사람 하이브리도마를 사용[참조: Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2026-2030]하거나, 시험관내 EBV 바이러스를 갖는 사람 B 세포를 형질전환[참조: Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77-96]시킴으로써 수득할 수 있다. 실제로, 본 발명에 따라, 적절한 생물학적 활성의 사람 항체 분자로부터의 유전자와 함께 폴리펩티드에 대해 특이적인 마우스 항체 분자로부터의 유전자를 스플라이싱하여 "키메라 항체"의 제조를 위해 개발된 기술[참조:

Morrison et al., 1984, J. Bacteriol. 159:870; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452-454]이 사용될 수 있으며; 당해 항체는 본 발명의 범주내이다. 이러한 사람 또는 사람화된 키메라 항체는 사람 질병 또는 질환(아래에 기재되어 있음)을 치료하는데 사용하기에 바람직한데, 이는 사람 또는 사람화된 항체가 면역 반응, 특히 알레르기성 반응 자체를 유도하기에는 이종 항체보다 덜 적합하기 때문이다. 본 발명의 부가의 양태는 Fab 밸현 라이브러리[참조: Huse et al., 1989, Science 246; 1275-1281]의 작제에 대해 기재되어 있는 기술을 이용하여 폴리펩티드 또는 이의 유도체 또는 유사체에 대한 바람직한 특이성과 모노클로날 Fab 단편의 신속하고도 용이한 확인을 가능하게 한다.

항체 분자의 이디오타입(idiotypic)을 함유하는 항체 단편은 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 이러한 단편은 다음을 포함하지만, 이로써 제한되는 것은 아니다: 항체 분자의 펩신 소화에 의해 제조될 수 있는  $F(ab')_2$  단편;  $F(ab')_2$  단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 생성될 수 있는 Fab' 단편, 및 항체 분자를 파파인 및 환원제로 처리함으로써 생성될 수 있는 Fab 단편.

항체의 제조에 있어서, 바람직한 항체에 대한 스크리닝은 당해 분야에서 공지된 기술[예: 방사선 면역 측정법, ELISA(효소-결합 면역 흡착 측정법), "샌드위치" 면역 측정법, 면역 방사 측정법, 갤 확산 침강 반응, 면역 확산 측정법, 동일 반응계 내에서의 면역 측정법(예를 들면, 콜로이드 금, 효소 또는 방사성 동위 원소 표지를 사용함), 웨스턴 블롯, 침강 반응, 응집 측정법(예: 갤 응집 측정법, 적혈구 응집 측정법), 보체 고정 측정법, 면역 형광 측정법, 단백질 A 측정법 및 면역 전기 영동법 등]에 의해 달성될 수 있다. 한 가지 양태에 있어서, 항체 결합은 일차 항체에서 표지를 검출함으로써 검출된다. 또 다른 양태에 있어서, 일차 항체는 이차 항체의 결합 또는 일차 항체에 대한 시약을 검출함으로써 검출된다. 또 다른 양태에 있어서, 이차 항체가 표지화된다. 다수의 수단은 면역 측정에서 결합을 검출하기 위해 공지되어 있으며 본 발명의 범주내이다.

항체는 시험관내에서, 예를 들면, 표지(예: 효소, 형광단(fluorophores), 발색단, 방사성 동위 원소, 염료, 콜로이드성 금, 라텍스 입자 및 화학 발광제)을 사용하여 표지될 수 있다. 대안으로, 항체는 검출을 위해 생체내에서, 예를 들면, 방사성 동위 원소(바람직하게는 테크네튬 또는 요오드); 자기 공명 이동제(예: 가돌리늄 및 마그네슘); 또는 방사선 불투명화제를 사용하여 표지될 수 있다.

이러한 연구를 위해 가장 통상적으로 사용되는 표지는 방사 활성 요소, 효소, 자외선 광에 노출되는 경우에 형광 현상을 나타내는 화학 물질 등이다. 다수의 형광 물질은 공지되어 있으며 표지로서 사용될 수 있다. 이들은, 예를 들면, 플루오레세인, 로다민, 아우라민, 텍사스 레드(Texas Red), AMCA 블루 및 루시퍼 엘로우(Lucifer Yellow)를 포함한다. 특정 검출 물질은 염소에서 제조되고 이소티오시아네이트를 통해 플루오레세인과 결합된 항-래비트 항체이다. 폴리펩티드는 또한 방사 활성 요소 또는 효소를 사용하여 표지된다. 방사 활성 표지는 현재 이용되는 임의의 계수 과정에 의해 검출될 수 있다. 바람직한 동위 원소는  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  및  $^{186}\text{Re}$ 로부터 선택될 수 있다.

효소 표지가 마찬가지로 유용하며, 현재 이용되는 비색법, 분광 광도법, 형광 분광 광도법, 암페어법 또는 가스 측정법에 의해 검출될 수 있다. 효소는 브릿지 분자(예: 카보디이미드, 디이소시아네이트, 글루타르알데하이드 등)와의 반응에 의해 선택된 입자에 접합된다. 이러한 과정에서 사용될 수 있는 다수의 효소는 공지되어 있으며 이용될 수 있다. 퍼옥시다제,  $\beta$ -글루쿠로니다제,  $\beta$ -D-글루코시다제,  $\beta$ -D-갈락토시다제, 우레아제, 글루코스 옥시다제와 퍼옥시다제 및 알칼리성 포스파타제가 바람직하다. 미국 특히 제3,654,090호, 제3,850,752호 및 제4,016,043호에는, 별도의 표지화 물질과 방법에 대한 기재에 대해 예로써 언급된다.

본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 의학 전문의가 사용하기에 적합한 통상적인 시험 키트는 추측되는 표적 세포에 소정의 결합 활성 또는 소정의 결합 활성 수용 능력의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 제조될 수 있다. 위에서 토의한 시험 기술에 따라, 이러한 키트 중의 한 가지 그룹은, 물론 선택된 방법(예: "경쟁적", "샌드위치", "DASP" 등)에 따라, 하나 이상의 표지된 폴리펩티드 또는 이의 결합 파트너, 예를 들면, 이에 대한 항체 특이성 및 사용법을 함유할 것이다. 이러한 키트는 또한 주위 시약(예: 완충제, 안정화제 등)을 함유할 수도 있다.

따라서, 시험 키트는 다음을 포함하는 소정의 세균성 결합 활성에 대해 세포의 존재 또는 수용 능력을 입증하기 위해 제조될 수 있다:

(a) 폴리펩티드 또는 이에 대한 특이적 결합 파트너의 존재에 대한 직간접 결합에 의해 수득된 소정량의 하나 이상의 표지된 면역 화학적 반응성 성분,

(b) 기타 시약 및

(c) 위의 키트를 사용하기 위한 사용법.

본 발명은 웨티드 단편, 모사체, 핵산 분자, 리보자임, 폴리웨티드, 소분자, 탄수화물 분자, 모노사카라이드, 올리고사카라이드 또는 항체를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는 길항체 또는 차단체를 제공한다. 또한, 폐렴구균성 세균을 경쟁적으로 차단하거나 억제하는 시약은 본 발명에 의해 예상된다. 본 발명은 무기 화합물, 핵산 분자, 올리고뉴클레오티드, 유기 화합물, 웨티드, 웨티드 모사체 화합물 또는 폴리웨티드를 억제하는 단백질을 포함하는 시약을 제공한다.

본 발명은 임의의 서열 1, 3 내지 7, 9 내지 11, 22 및 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 폴리웨티드 및 약제학적으로 허용되는 애주번트 또는 담체를 포함하는 백신을 제공한다. 폴리웨티드는 도 2에 제시된 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명은 도 2에 제시된 보존 영역을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 폴리웨티드 및 약제학적으로 허용되는 애주번트 또는 담체를 포함하는 백신을 제공한다. 예를 들면, 보존 영역은 아미노산 서열 158 내지 172; 300 내지 321; 331 내지 339; 355 내지 365; 367 내지 374; 379 내지 389; 409 내지 427 및 430 내지 447번을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 본 발명은 폴리웨티드를 암호화하는 분리된 핵산 및 약제학적으로 허용되는 애주번트 또는 담체를 포함하는 백신을 제공한다.

그럼 양성 세균, 특히 폐렴구균에 대한 활성 면역성은 면역원성 양의 폴리웨티드 또는 웨티드 유도체 또는 이의 단편과 애주번트를 사용하여 면역화(백신접종)에 의해 유도될 수 있으며, 여기서, 폴리웨티드 또는 이의 항원 유도체 또는 이의 단편은 백신의 항원 성분이다.

본 발명의 폴리웨티드, 이의 유도체 또는 이의 단편은 백신을 제조하기 위해 애주번트와 혼합하여 제조될 수 있다. 바람직하게는, 백신의 항원 성분으로서 사용되는 이의 유도체 또는 이의 단편은 부착소(adhesion)이다. 보다 바람직하게는, 백신의 항원 성분으로서 사용되는 폴리웨티드 또는 이의 웨티드 유도체 또는 이의 단편은 그람 양성 세균의 종류의 전체 또는 다수의 균주에 공통적인 항원 또는 밀접하게 관련된 세균의 종류에 공통적인 항원이다. 가장 바람직하게는, 백신의 항원 성분은 공통 항원인 부착소이다.

본 발명의 핵산계 백신을 함유하는 벡터는 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들면, 형질감염, 전기천공, 미세주입법, 형질도입, 세포 융합, DEAE 텍스트란, 칼슘 포스페이트 침전, 리포펙션(리소좀 융합), 유전자 총(gun)의 사용 또는 DNA 벡터 전달자에 의해 [참조: Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:963-967; Wu and Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263: 14621-14624; Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990]로 목적하는 숙주내로 도입될 수 있다.

백신은 근육내, 복막내, 정맥내 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는 임의의 비경구 경로로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 백신접종의 바람직한 결과가 항원에 대한 면역 반응을 설명하는 것이므로, 병원성 생물에게 직접 투여하거나, 간접적으로 립프계 조직(예: 립프 결절 또는 비장)에 바이러스성 백터의 선택 또는 표적화에 의해 바람직하다. 면역 세포는 계속해서 복제하기 때문에, 이들은 레트로바이러스성 백터계 핵산 백신에 대한 이상적인 표적인데, 이는 레트로바이러스가 복제 세포를 필요로 하기 때문이다.

수동 면역은 본 발명의 폴리웨티드에 대한 항혈청, 폴리클로날 항체 또는 중화 모노클로날 항체를 그람 양성 세균, 바람직하게는 연쇄구균, 보다 바람직하게는 폐렴 구균에 감염된 것으로 의심되는 환자에게 투여함으로써, 동물 개체에게 제공될 수 있다. 수동 면역은 장기간 보호되지 않지만, 백신접종되지 않은 개체의 세균 감염 치료를 위한 유용한 수단일 수 있다. 수동 면역은 그람 양성 세균의 항생제 내성 균주의 치료용으로 특히 중요한데, 이는 다른 어떠한 치료법도 이용할 수 없기 때문이다. 바람직하게는, 수동 면역 치료를 위해 투여된 항체는 자가 항체이다. 예를 들면, 개체가 사람인 경우, 바람직하게는 항체는 사람 기원의 항체이거나 항체에 대한 면역 반응 가능성을 최소화하기 위해 "사람화"된다. 본 발명의 능동 또는 수동 백신, 또는 부착소의 투여는 그람 양성 세균, 바람직하게는 연쇄상 구균, 보다 바람직하게는 폐렴 구균의 감염으로부터 동물 개체를 보호하는 데 사용될 수 있다.

본 발명은 일정량의 기술된 폴리웨티드 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

예를 들면, 점막 표면에 폐렴구균 부착을 방지하기 위한 이러한 약제학적 조성물은 렉틴 도메인에 대한 항체 및/또는 가용성 과량의 렉틴 도메인 단백질에 대한 항체를 포함할 수 있다. 어떠한 기작에 의해서도 부착을 차단함으로써 감염에서의 초기단계가 차단되어 콜로니형성을 감소시키게 된다. 이는 다시 사람을 매개로한 전염을 감소시키게 되어 증후성 질환의 발병을 예방하게 된다.

본 발명은 일정량의 약제학적 조성물을 개체에게 투여하여 면역 반응을 유도함을 포함하는 폐렴구균으로 감염되거나 이에 노출된 개체에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

본 발명은 폐렴구균 세균 부착을 예방하기에 효과적인 양의 약제학적 조성물의 일정량을 개체에게 투여하여 폐렴구균세균에 의한 감염을 예방함을 포함하는, 개체에서 폐렴구균에 의한 감염을 예방하는 방법을 제공한다.

본 발명은 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성을 일정량을 개체에게 투여하여 폐렴구균세균에 의한 감염을 예방함을 포함하는, 개체에서 폐렴구균에 의한 감염을 예방하기 위한 방법을 제공한다.

본 발명은 본 발명의 치료학적 유효량의 백신을 개체에게 투여하여 개체를 치료함을 포함하는, 폐렴구균 세균에 감염되거나 이에 노출된 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 서열 1, 3 내지 5, 7 또는 9 내지 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물의 일정량을 개체에게 투여하여 면역 반응을 유도함을 포함하는, 폐렴구균 세균에 감염되거나 이에 노출된 개체의 숙주 세포의 콜로니형성을 억제하는 방법을 제공한다. 콜로니형성을 차단하는 치료적 웹티드는 호흡기 점막에 의해 전달된다. 약제학적 조성물은 도 2에 나타낸 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 포함한다.

본원에 사용된, "약제학적 조성물"은 예를 들어, 폐렴구균의 콜로니형성을 방지함으로써 치료적 효과 또는 이점을 제공하기에 유용한 적합한 희석제, 방부제, 가용화제, 에멀젼제, 보조제 및/또는 담체와 함께 본 발명의 치료학적 유효량의 폴리펩티드 생성물을 의미한다. 본원에 사용된, "치료학적 유효량"은 주어진 상태 및 투여 방법에서 치료적 효과를 제공하는 양을 나타낸다. 이러한 조성물은 액체이거나, 동결건조 또는 건조된 제형으로, 완충액 함량, pH 및 이온 농도가 다양한 희석제(예: 트리스-HCl, 아세테이트, 인산염), 표면으로의 흡착을 방지하는 알부민 또는 젤라틴과 같은 부가제, 세제[예: 트윈(Tween) 20, 트윈 80, 플루로닉(Pluronic) F68, 담즙산염], 가용화제(예: 글리세롤, 폴리에틸렌 글리세롤), 산화방지제(예: 아스코르브산, 나트륨 메타비설파이트), 방부제(예: 티메로살, 벤질 알콜, 파라벤), 벌킹(bulking) 물질 또는 삼투 조절제(예: 락토즈, 만니톨), 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체와 단백질과의 공유 결합, 금속 이온과의 착물화, 또는 물질의 폴리락트산, 폴리글리콜산, 하이드로겔 등과 같은 중합체 화합물의 미립자 제제 속으로의 또는 그 위로의 혼입, 또는 리포솜, 미세에멀젼, 미셀(micelle), 단층 또는 다층 소포, 적혈구 고스트 또는 스페로플라스트(spheroplast) 위로의 혼입이 포함된다. 이러한 조성물은 물리적 상태, 용해도, 안정성, 생체내 방출 속도, 및 치료제의 생체내 제거율에 영향을 미친다. 조성물의 선택은 치료 활성을 갖는 단백질의 물리적 및 화학적 특성에 좌우될 것이다. 예를 들면, 막 결합된 활성형으로부터 유도된 생성물은 세제를 함유하는 제형을 필요로 할 수 있다. 조절되거나 지속된 방출 조성물은 제형을 친지성 저장소(예: 지방산, 와스, 오일)에 포함한다. 또한, 중합체(예: 폴록사민 또는 폴록사민)로 피복된 미립자 조성물이고 조직 특이적 수용체, 리간드 또는 항원에 대해 지시된 항체에 커플링되거나 조직 특이적 수용체의 리간드에 커플링된 활성형이 본 발명에 의해 이해된다. 본 발명의 조성물의 다른 양태에서는 비경구, 폐, 비강 및 경구를 포함하는 다양한 투여 경로에 대한 보호 피막, 프로테아제 억제제 또는 침투 증강제를 형성하는 미립자를 도입시킨다.

또한, 본원에 사용된, "약제학적으로 허용되는 담체"는 당해 분야의 숙련가에게 익히 공지되어 있고 이에는 0.01 내지 0.1M, 바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액 또는 0.8%의 염수가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 추가로, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 수용액 또는 비수용액, 혼탁액 및 에멀젼일 수 있다. 비수성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성유, 및 에틸 올레이트와 같은 주사용 유기 에스테르가 있다. 수성 담체에는 염수 및 완충 매질을 포함한 물, 알콜성/수용액, 에멀젼 또는 혼탁액이 포함된다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로즈, 텍스트로즈 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거액 또는 비휘발성 오일을 포함한다. 정맥내 비히클은 유동 영양 보충물, 링거 텍스트로즈와 같은 전해질 보충물 등을 포함한다. 방부제 및 기타 부가제가 또한 존재할 수 있고, 예를 들면, 항균제, 산화방지제, 콜레이트화제, 불활성 기체 등일 수 있다.

용어, "애주번트"는 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 화합물 또는 혼합물을 나타낸다. 애주번트는 항원을 서서히 방출시키는 조직 저장소로서 및 면역 반응을 비특이적으로 증강시키는 림프계 활성인자로서 제공될 수 있다[참조: Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p.384]. 종종 애주번트의 부재하에서의 항원 단독의 주요 캘린지는 체액 또는 세포 면역 반응을 유도하는데 실패한다. 애주번트는 완전 프로인트(Freund)

애주번트, 불완전 프로인트 애주번트, 사포닌, 무기질 겔(예: 산화알루미늄), 표면 활성 물질(예: 리소레시틴, 폴루론산 폴리올, 다중 음이온, 펩티드, 오일 또는 탄화수소 에멀젼), 키홀 림피트 혜모시아닌, 디니트로페놀 및 잠재적으로 유용한 사람 애주번트[예: BCG(바실 칼메테-구에린)] 및 코리네박테리움 파르븀을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 애주번트는 약제학적으로 허용된다.

조절 또는 지속된 방출 조성물은 친지성 저장소(예: 지방산, 왁스, 오일)를 포함한다. 또한, 중합체(예: 폴록사민 또는 폴록사민)로 피복된 미립자 조성물이고, 조직-특이적 수용체, 리간드 또는 항원에 대해 지시된 항체에 커플링되거나 조직-특이적 수용체의 리간드에 커플링된 화합물도 본 발명에 의해 이해된다. 본 발명의 조성물의 기타 양태는 비경구, 폐, 비강 및 경구를 포함한 다양한 경로의 투여를 위한 미립형 보호 피복제, 프로테아제 억제제 또는 침투 증진제를 혼입한다.

투여하는 경우, 화합물은 종종 점막 표면 또는 순환으로부터 신속하게 제거되고, 따라서, 비교적 단수명의 약제학적 활성을 유도해낼 수 있다. 결과적으로, 종종 생체활성 화합물의 비교적 다향의 투여가 치료적 효율을 지속시키는 데 필요할 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜과의 공중합체, 카복시메틸 셀룰로스, 텍스트란 폴리비닐 알콜, 폴리비닐피롤리돈 또는 폴리프롤린 등의 수용성 중합체를 공유적으로 부착시킴으로써 변형된 화합물은 상응하는 변형되지 않은 화합물보다 정맥내 주사 후 혈액에서 실질적으로 보다 긴 반감기를 나타내는 것으로 공지되어 있다[참조: Abuchowski et al., 1981; Newmark et al., 1982; and Katre et al., 1987]. 상기한 변형은 또한 수용액 중의 화합물의 용해도를 증가시키고, 응집물을 제거하며, 화합물의 물리 화학적 안정성을 향상시키고 화합물의 면역원성 및 반응성을 크게 감소시킬 수 있다. 결과적으로, 목적한 생체내 생물학적 활성은 상기한 중합체-화학물 부산물을 비변형된 화학물보다 덜 자주 또는 적은 투여량으로 투여함으로써 달성된다.

투여량. 유효량은 약 1 $\mu$ g/kg 내지 약 1000mg/kg일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 투여량은 10mg/kg일 수 있다. 약제학적으로 허용되는 조성물 형태는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

위에서 언급한 바와 같이, 본 발명은 숙주 세포에의 부착과 같은, 폐렴 구균의 병원성 활성에 대항하기 위한, 벡터, 백신, 폴리펩티드, 핵산 및 항체, 항-항체 및 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 포함하는 치료 조성물을 제공한다.

활성 성분을 함유하는 치료 조성물의 제조는 당해 기술분야에서 잘 이해되고 있다. 통상적으로, 이러한 조성물은 비강인두에 전달되는 폴리펩티드의 에어로졸로서, 주사제로서, 액체 용액 또는 혼탁액으로서 제조되지만, 주사하기 전 액체인 용액 또는 혼탁액으로 제조하기에 적합한 고체 형태로서도 제조될 수 있다. 제제는 또한 에멀젼화될 수 있다. 치료 활성 성분은 종종 약제학적으로 허용되고 활성 성분과 혼화성인 부형제와 혼합된다. 적합한 부형제는, 예를 들면, 물, 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등 또는 이들의 배합물이다. 또한, 필요한 경우, 조성물은 활성 성분의 효과를 증진시키는 습윤제 또는 유화제, pH 완충제를 소량으로 함유할 수 있다.

활성 성분은 중화된 약제학적으로 허용되는 염 형태로서 치료 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 산부가염(폴리펩티드 또는 항체 분자의 유리 아미노 그룹으로 형성된다)을 포함하고, 이는 예를 들면, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산으로 형성된다. 유리 카복실산 그룹으로부터 형성된 염은 또한 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 또는 철 수산화물과 같은 무기 염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다.

조성물 중에 단백질, DNA, 벡터(A 및 B가 속하는 종의 카테고리에 좌우된다)의 약 75중량% 이상이 "A"인 경우, "A"(여기서, "A"는 단일 단백질, DNA 문자, 벡터 등이다)를 포함하는 조성물은 실질적으로 "B"(여기서, "B"는 하나 이상의 오염 단백질, DNA 문자, 벡터 등이다)를 함유하지 않는다. 바람직하게는, "A"는 조성물 속의 A+B 종의 약 90중량% 이상을 차지하고, 가장 바람직하게는 약 99중량% 이상을 차지한다.

본원에 사용된, "치료적 유효량"은 숙주의 활성, 작용 및 반응을 약 15% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상 감소시키기에 충분한 양, 가장 바람직하게는 임상적으로 유의적 결핍을 방지하기에 충분한 양을 의미한다. 대안으로, 치료적 유효량은 숙주에서 임상적으로 유의적인 상태를 향상시키기에 충분하다. 본 발명에 있어서, 숙주의 반응에 있어서의 결핍은 세균 감염의 계속 또는 분산에 의해 입증된다. 숙주에서 임상적으로 유의적인 상태의 향상은 세균 부하의 감소, 콜로니형성된 균주 세포로부터 세균의 투명화, 감염과 관련된 열 또는 염증의 감소 또는 세균 감염과 관련된 임의의 증상의 감소를 포함한다.

본 발명에 따라서, 본 발명의 치료적 조성물의 성분 또는 성분들은, 비경구, 점막, 예를 들면, 경구, 비강, 폐, 직장 또는 경피로 도입될 수 있다. 비경구, 예를 들면, 정맥내 주사, 및 비제한적으로 동맥내, 근육내, 피내, 피하, 복막내, 심실내 및 두개내 투여가 바람직하다. 경구 또는 폐 전달은 점막 면역성을 활성화하는 데 바람직 할 수 있고, 폐렴구균이 일반적으로 비강인두 및 폐 점막에서 콜로니를 형성하기 때문에 점막 면역은 특히 효과적인 예방치료법일 수 있다. 용어 "단위 용량"은

본 발명의 치료 조성물에 대하여 사용되는 경우, 사람에 대한 단일 용량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위를 의미하며, 각각의 단위는 필요한 희석제, 즉, 담체 또는 비히클과 함께 목적하는 치료 효과를 생성시키기 위해 계산된 예정된 양의 활성 물질을 함유한다.

또 다른 양태에서, 활성 화합물은 소포, 특히 리포좀으로 전달될 수 있다[참조: Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327].

또 다른 양태에서, 치료 조성물은 조절 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드는 정맥내 주입, 이식성 삼투성 펌프, 경피 패치, 리포좀 또는 기타 투여 방식을 사용하여 투여될 수 있다. 하나의 양태에서, 펌프가 사용될 수 있다 [참조: Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)]. 또 다른 양태에서, 종합체성 물질이 사용될 수 있다[참조: Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)]. 또 다른 양태에서, 조절 방출 시스템은 치료 표적, 즉 뇌 근처에 위치하여 시스템 용량의 단편만을 요구할 수 있다[참조: Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)]. 바람직하게는, 조절 방출 장치는 개체의 부적합한 면역 활성화 또는 종양 부위 근처에 도입된다. 다른 조절 방출 시스템은 랑거의 문헌[참조: Langer, Science 249:1527-1533 (1990)]에서 논의되고 있다.

위에서 언급한 활성 성분의 투여가 세균 감염에 대한 효과적인 치료 섭식인 개체는 바람직하게는 사람이지만, 임의의 동물일 수 있다. 따라서, 당해 기술분야의 숙련가들이 쉽게 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 방법 및 약제학적 조성물은 임의의 동물, 특히 고양이 또는 개와 같은 가축, 비제한적으로, 소, 말, 염소, 양, 및 돼지와 같은 가축, 야생동물(야생 또는 동물원의 동물), 마우스, 래트, 래비트, 염소, 양, 돼지, 개, 고양이 등과 같은 수의학용 연구 동물 등을 포함하는 포유 동물에게 투여하기에 특히 적합하다.

본 발명의 치료 방법 및 조성물에서, 활성 성분의 치료학적 유효량이 제공된다. 치료학적 유효량은 당해 기술분야에 익히 공지되어 있는 바와 같이 의료인에 의해 환자 특성(연령, 체중, 성별, 상태, 합병증, 다른 질환 등)을 근거로 하여 결정될 수 있다. 또한, 또 다른 경로 연구가 수행되기 때문에, 보다 구체적인 정보는 각종 환자의 각종 상태의 치료에 적합한 용량 수준에 대해 분명해질 것이고, 당해 기술분야의 숙련가들은 수혜자의 치료 경위, 연령 및 일반적인 건강을 고려하여 적합한 용량을 알아낼 수 있다. 일반적으로, 정맥내 주사 또는 주입용 용량이, 복막내, 근육내 또는 다른 투여 경로의 용량보다 적을 수 있다. 투여 스케줄은 순환 반감기 및 사용되는 제형에 따라서 다를 수 있다. 조성물은 치료학적 유효량의 용량 제형에 적합한 방식으로 투여된다. 투여하는 데 필요한 정확한 양의 활성 성분은 수행자의 판단에 좌우되고 개인에 따라 특수하다. 그러나, 적합한 용량은 1일당 개인 체중 1kg당 약 0.1 내지 20, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 10, 보다 바람직하게는 1 내지 수mg의 활성 성분일 수 있고 투여 경로에 좌우된다. 초기 투여 및 추가접종(booster) 주사에 적합한 방법이 또한 다양하지만, 초기 투여 후 1시간 이상의 간격으로 주사 또는 다른 투여로 반복 투여되는 것으로 유형화된다. 대안으로, 혈액 내에서 10나노몰 내지 10마이크로몰 농도를 유지시키기에 충분한 연속 정맥내 주입이 고려된다.

**다른 화합물과 함께 투여:** 세균 감염 치료를 위해서, 본 발명의 활성 화합물을 비제한적으로 (1) 항생제, (2) 가용성 탄수화물 세균 부착소 억제제, (3) 다른 소분자량 세균 부착소 억제제, (4) 세균 대사, 수송 또는 형질전환 억제제, (5) 세균 용해자극제 또는 (6) 다른 세균 항원에 대한 항세균제, 항체 또는 백신을 포함하는 세균 감염을 치료하는 데 사용되는 하나 이상의 약제학적 조성물과 함께 투여할 수 있다. 다른 잠재적 활성 성분은 스테로이드 및 비스테로이드 항염증 약물과 같은 소염제를 포함한다. 동시에 투여(예를 들면, 본 활성 성분과 항생제의 혼합물의 투여)하거나 따로 투여할 수 있다.

따라서, 특정 양태에서, 치료 조성물은 유효량의 활성 성분 및 하나 이상의 다음 활성 성분을 추가로 포함할 수 있다: 항생제, 스테로이드제, 등. 예시적인 제형은 다음과 같다:

정맥내 제형 I

성분 mg/ml

세포탁심 250.0

폴리펩티드 10.0

텍스트로즈 USP 45.0

아황산나트륨 USP 3.2

에데테이트 이나트륨 USP 0.1

주사용수 1.0ml

정맥내 제형 II

성분 mg/ml

암피실린 250.0

폴리펩티드 10.0

아황산나트륨 USP 3.2

이나트륨 에데테이트 USP 0.1

주사용수 1.0ml

정맥내 제형 III

성분 mg/ml

젠타마이신(황산염으로서 충전) 40.0

폴리펩티드 10.0

아황산나트륨 USP 3.2

이나트륨 에데테이트 USP 0.1

주사용수 1.0ml

정맥내 제형 IV

성분 mg/ml

폴리펩티드 10.0

텍스트로즈 USP 45.0

아황산나트륨 USP 3.2

에데테이트 이나트륨 USP 0.1

주사용수 1.0ml

정맥내 제형 V

성분 mg/ml

폴리펩티드 길항제 5.0

아황산나트륨 USP 3.2

이나트륨 에데테이트 USP 0.1

주사용수 1.0ml

따라서, 숙주 세포와 세균과의 세균 매개된 결합으로부터 발생하는 감염을 감소시키거나 억제하는 데 필요하거나 이에 대한 항체 또는 이의 리간드 또는 이 리간드에 대한 항체가 필요한 특정한 경우, 폴리펩티드를 도입시켜 세균과 숙주 세포의 상호작용을 차단시킨다.

본 발명의 부착소 억제제(또는 이의 유도체)로서 작용하는 렉틴 활성을 갖는 본 폴리펩타이드의 폐 전달이 또한 고려된다. 부착소 억제제(또는 유도체)는 포유 동물의 폐로 전달되어 세균, 즉 연쇄상 구균 및 바람직하게는 폐렴 구균과 숙주 세포와의 결합을 억제할 수 있다. 다른 폐 전달용 단백질 제조에 대한 보고가 선행 기술분야에서 발견된다[참조: Adjei et al. Pharmaceutical Research, 7:565-569 (1990); Adjei et al., International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144 (1990) (leuprolide acetate); Braquet et al., Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13 (suppl. 5): 143-146 (1989)(endothelin-1); Hubbard et al., Annals of Internal Medicine, Vol. III, pp. 206-212 (1989)(α1-antitrypsin); Smith et al., J. Clin. Invest. 84:1145-1146 (1989) (α-1-proteinase); Oswein et al., "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (1990) (recombinant human growth hormone); Debs et al., J. Immunol. 140:3482-3488 (1988)(interferon-γ and tumor necrosis factor alpha); Platz et al., U.S. Patent No. 5,284,656 (granulocyte colony stimulating factor)]. 약물의 폐 전달 방법 및 이를 위한 조성물이 웅(Wong) 등에게 허여된 미국 특허 제5,451,569호(1995.9.19)에 기재되어 있다.

이러한 모든 장치는 부착소 억제제(또는 유도체)의 분산에 적합한 제형의 사용을 필요로 한다. 통상적으로, 각각의 제형은 사용되는 장치의 유형에 특이적이며 특히 치료에 유용한 통상적인 희석제, 보조제 및/또는 담체 이외에 적합한 분사제 물질을 포함할 수 있다. 또한, 복합체를 포함하여 리포좀, 미세캡슐 또는 미세구 또는 다른 유형의 담체의 사용이 또한 고려된다. 화학적으로 변형된 부착소 억제제는 화학적 변형의 유형 또는 사용되는 장치의 유형에 따라서 다른 제형으로 제조될 수도 있다.

분무기(nebulizer), 제트 또는 초음파와 함께 사용하기에 적합한 제형은 통상적으로 용액 1ml당 생물학적 활성 부착소 억제제 약 0.1 내지 25mg의 농도로 물 속에 용해된 부착소 억제제(또는 유도체)를 포함한다. 제형은 또한 완충제 및 단순 당(예: 부착소 억제제 안정화 및 삼투압 조절을 위해서)을 포함할 수 있다. 분무기 제형은 또한 에어로졸 형성시 용액의 분무에 의해 발생되는 부착소 억제제의 표면 유도된 응집을 감소시키거나 방지하기 위해서 계면활성제를 함유할 수 있다.

계량 용량 흡입 장치와 함께 사용하기 위한 제형은 일반적으로 계면 활성제와 함께 분사제에 혼탁된 부착소 억제제(또는 유도체)를 함유하는 미분 분말을 포함한다. 분사제는 이러한 목적에 통상적으로 사용되는 임의의 물질, 예를 들면, 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본 또는, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄을 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄을 포함하는 탄화수소, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트 및 콩 레시틴을 포함한다. 올레산이 또한 계면활성제로서 유용할 수 있다.

액체 에어로졸 제형은 생리학적으로 허용되는 희석제 속에 부착소 억제제와 분산제를 함유한다. 본 발명의 무수 분말 에어로졸 제형은 미분된 고체 형태의 부착소 억제제와 분산제로 이루어진다. 액체 또는 무수 분말 에어로졸 제형에 있어서, 제형을 에어로졸화한다. 즉, 에어로졸화된 용량이 실제로 비강 또는 폐의 점막에 확실하게 도달하도록 액체 또는 고체 입자도 파쇄되어야 한다. 용어 "에어로졸 입자"는 본원에서 비강 또는 폐 투여에 적합한, 즉 점막에 도달하는 액체 또는 고체 입자를 기재하는 데 사용된다. 전달 장치의 구성, 제형에서의 추가 성분 및 입자 특성과 같은 기타 고려사항이 중요하다. 약물의 폐 투여에 대한 이러한 양태는 당해 기술분야에 공지되어 있으며 제형화 처리, 에어로졸화 수단 및 전달 장치의 구조는 당해 기술분야 숙련가에 의해 대부분의 일반적 실험에서 필요로 한다. 특정 양태에서, 약물 입자가 폐포에 확실히 도달하도록 질량 평균 동적 지름은 5 마이크로미터 이하일 것이다[참조: Wearley, L.L., Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems 8:333(1991)].

에어로졸 운반 시스템, 예를 들면 가압 측정량 흡입 및 무수 분말 흡입이 뉴만(Newman), S.P.의 문헌[참조: Hewman S.P., Aerosols and the Lung, Clarke, S.W. and Davia, D. editors, pp 197-22]에 기술되어 있으며 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다.

추가의 양태에서, 아래에 자세히 기술된 바와 같이 본 발명의 에어로졸 제제는 부착소 억제제 외에 치료학적 또는 약리학적 활성 인자, 예를 들면 비제한적으로 항생제, 스테로이드, 비-스테로이드성 소염제 등을 포함할 수 있다.

액상 에어로졸 제형. 본 발명은 에어로졸 제형을 제공하며 용량은 세균, 예를 들어 연쇄구균, 특히 폐렴구균 감염으로 고통 받는 개체 치료에 사용하도록 정한다. 일반적으로, 이러한 제형은 약제학적으로 허용되는 희석제 중의 부착소 억제제를 함유한다. 약제학적으로 허용되는 희석제는 중류수, 염수, 완충된 염수, 렉스트로즈 용액 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 양태에서, 본 발명에 사용될 수 있는 희석제 또는 본 발명의 약제학적 제제는 포스페이트 완충된 염수 또는 일반적으로 pH 7.0 내지 8.0 범위의 완충된 염 용액 또는 물이다.

#### 작제

본 발명의 액상의 에어로졸 제형은 임의적인 성분으로서 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 가용화제 또는 유화제, 계면활성제 및 부형제를 포함할 수 있다. 상기 제형은 담체를 포함할 수 있다. 담체는 순환계에서 용해되고 생리학적으로 허용되는 거대분자이며, 여기서 생리학적으로 허용된다 함은 당해 기술분야 숙련자가 치료적 섭식의 일부로서 환자에게 상기 담체를 주사할 수 있음을 의미한다. 바람직하게는, 담체는 제거를 위한 허용되는 혈장 반감기를 갖는 순환계에서 비교적 안정하다. 상기한 거대분자는 콩 레시틴, 올레산 및 소르비탄 트리올레이트를 포함하지만, 이에 제한되지 않고, 소르비탄 트리올레이트가 바람직하다.

본 발명의 양태의 제형은 또한 pH 유지, 용액 안정화, 또는 삼투압 조절에 유용한 기타 제제를 포함할 수 있다. 이러한 제제의 예에는 염화나트륨 또는 염화칼륨과 같은 염 및 글루코스, 갈락토스 또는 만노스와 같은 탄수화물 등이 포함되지만 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명은 또한 부착소 억제제 및 다른 치료학적 유효 약물, 예를 들어 항생제, 스테로이드, 비스테로이드성 소염제 등을 포함하는 액상 에어로졸 제형을 고려한다.

에어로졸 무수 분말 제형. 본 에어로졸 제형은 부착소 억제제의 미분된 분말 형태 및 분산제를 포함하는, 무수 분말 제형으로서 제조될 수 있는 것으로 간주된다.

분말 흡입 장치로부터 분산시키기 위한 제형은 부착소 억제제(또는 유도체)를 함유하는 미분된 무수 분말을 포함하고, 또한 락토즈, 소르비톨, 슈크로즈 또는 만니톨과 같은 벌크화제를 장치로부터 분말의 분산을 촉진시키는 양, 예를 들어 제형의 50 내지 90중량%의 양으로 포함할 수 있다. 부착소 억제제(또는 유도체)는 말단 폐로의 가장 효과적인 전달을 위해 가장 유리하게는 평균 입자 크기가 10mm(또는  $\mu$ ) 미만, 가장 바람직하게는 0.5 내지 5mm의 미립자 형태로 제조되어야 한다. 또 다른 양태에서, 무수 분말 제형은 부착소 억제제를 함유하는 미분된 무수 분말, 분산제 및 또한 벌크화제를 포함할 수 있다. 본 발명의 제형과의 혼합물로서 유용한 벌크화제는 락토즈, 소르비톨, 슈크로즈 또는 만니톨과 같은 제제를 장치로부터 분말의 분산을 촉진시키는 양으로 포함한다.

본 발명은 또한 부착소 억제제와 치료학적으로 유효한 약물, 예를 들어 항생제, 스테로이드, 비스테로이드성 소염제 등을 포함하는 무수 분말 제형을 고려한다.

일반적으로, 본원에 참조로 인용된 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990(Mack Publishing Co. Easton PA 18042) at Chapter 89]에 기술된 경구 고체 투여 제형이 본원에서 사용하기 위해 고려된다. 고체 제형은 정제, 캡슐제, 환제, 트로치 또는 로젠지, 카쉐 또는 펠럿을 포함한다. 또한, 리포소멀 또는 프로테노이드 캡슐화는 본 발명의 조성물을 제형화하는데 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,925,673호에 보고된 프로테노이드 미세구). 리포소멀 캡슐화가 사용될 수 있고, 리포솜은 각종 중합체를 사용하여 유도될 수 있다(예: 미국 특허 제5,013,556호). 치료를 위한 가능한 고체 제형의 설명은 본원에 참조로 인용된 문헌[참조: Marshall, K. In: Modern Pharmaceutics Edited by G.S. Bunker and C.T. Rhodes Chapter 10, 1979]에 기재되어 있다. 일반적으로 제형은 위 환경을 보호하고 생물학적 활성 물질을 장애 방출시키는 성분(들)(또는 이의 화학적으로 변형된 형태) 및 불활성 성분을 포함한다.

또한, 상기 유도된 성분(들)의 경구 제형이 구체적으로 고려된다. 성분(들)은 화학적으로 변형되어 유도체의 경구 전달에 효과적일 수 있다. 일반적으로, 고려되는 화학적 변형은 성분 분자 그 자체에 하나 이상의 잔기가 부착되는 것이고, 이러한 잔기는 (a) 단백질 분해를 억제하고, (b) 위 또는 장으로부터 혈류속으로의 섭취를 가능하게 한다. 또한, 성분(들)의 전체적 안정성을 증가시키고, 신체 내에서의 순환 시간을 증가시키는 것이 바람직하다. 이러한 잔기의 예에는 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸 셀룰로즈, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리프롤린이 포함된다[참조: Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" In: Enzymes as Drugs, Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4: 185-189]. 사용될 수 있는 기타 중합체는 폴리-1,3-디옥솔란 및 폴리-1,3,6-트리옥소간이다. 상기 한 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜 잔기가 약제학적 용도로 바람직하다.

성분(또는 유도체)의 방출 위치는 위, 소장(십이지장, 공장 또는 회장) 또는 대장일 수 있다. 당해 기술분야 숙련가는 위에 용해되지 않지만 십이지장 또는 그밖의 장에 물질을 방출시키는 제형을 이용할 수 있다. 바람직하게는, 방출은 단백질(또는 유도체)의 보호에 의해 또는 위 환경 이외, 예를 들어 장에 생물학적 활성 물질을 방출시킴으로써 위 환경의 유해한 효과를 피한다.

pH 5.0 이상에서 불침투성인 피복물의 완전한 위 내성을 보장하는 것이 필수적이다. 장용피로서 사용되는 보다 통상적인 불활성 성분의 예에는 셀룰로즈 아세테이트 트리멜리테이트(CAT), 하이드록시프로필메틸셀룰로즈 프탈레이트(HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(PVAP), 유드라기트(Eudragit) L30D, 아쿠아티릭(Aquateric), 셀룰로즈 아세테이트 프탈레이트(CAP), 유드라기트 L, 유드라기트 S 및 셀락이 포함된다. 이러한 피복물은 혼합 필름으로서 사용될 수 있다.

피복 또는 피복물 혼합물은 정제 상에 사용될 수 있으나, 이는 위에 대한 보호로 의도되는 것은 아니다. 이는 당의정, 또는 정제를 삼키기 쉽게 만드는 코팅을 포함할 수 있다. 캡슐제는 무수 치료제(예, 분말)의 전달을 위한 경질 켈(젤라틴 같은)로 이루어질 수 있고, 액상 형에 대해서 연질 젤라틴 켈을 사용할 수 있다. 카세의 켈 물질은 농후 전분 또는 기타 식용 페이퍼일 수 있다. 환제, 로젠지제, 성형 정제 또는 정제 연마분인 경우, 습윤피 기술을 사용할 수 있다.

펩티드 치료제는 약 1mm 입자 크기의 과립 또는 웨이브 형태로 미세 다중입자로서 제형중에 포함될 수 있다. 캡슐제 투여용 물질의 제형은 또한 산제, 가볍게 압착된 플러그제 또는 정제도 될 수 있다. 치료제는 압착에 의해 제조될 수 있다.

착색제 및 향미제를 모두 포함할 수 있다. 예를 들면, 단백질(또는 유도체)은 제형화될 수 있고(예를 들면 리포좀 또는 미세 구 캡슐화) 이후 식용 제품, 예를 들면 착색제 및 향미제를 함유하는 냉장 음료 내에 추가로 함유될 수 있다.

불활성 물질로 치료제의 용적을 희석 또는 증가시킬 수 있다. 이들 희석제는 탄수화물, 특히 만니톨, α-락토즈, 무수 락토즈, 셀룰로즈, 슈크로즈, 변형된 텍스트란 및 전분을 포함할 수 있다. 특정 무기염을 또한 충전제로 사용할 수 있으며, 여기에는 삼인산칼슘, 탄산 마그네슘 및 염화나트륨을 포함한다. 몇몇 시판 중인 희석제는 Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, 엠콤프레스 및 아비셀이다.

붕해제는 치료제를 고체 투여형으로 제형화하는 중에 첨가할 수 있다. 붕해제로 사용되는 물질은 전분을 기본으로 하는 시판 중인 붕해제 엑스플로탭(Explatab)을 포함하는 전분을 포함하거나 이에 제한되지 않는다. 나트륨 전분 글리콜레이트, 앰벌라이트, 나트륨 카복실메틸셀룰로즈, 울트라밀로펙틴, 알긴산나트륨, 젤라틴, 오렌지 필, 산 카복시메틸셀룰로즈, 천연스폰지 및 벤토나이트를 모두 사용할 수 있다. 또 다른 형태의 붕해제는 불용성 양이온 교환 수지이다. 분말화된 검을 붕해제 및 결합제로서 사용할 수 있고 이들은 아가, 카라야 또는 트라가칸트와 같은 분말화 검을 포함할 수 있다. 알긴산 및 이의 나트륨 염은 또한 붕해제로서 유용하다. 결합제는 치료제를 한데 결합시켜 경질 정제를 형성하는데 사용할 수 있고 아카시아, 트라가칸트, 전분 및 젤라틴과 같은 천연 산물로부터의 물질을 포함할 수 있다. 기타로는 메틸셀룰로즈(MC), 에틸셀룰로즈(EC) 및 카복시메틸셀룰로즈(CMC)를 포함한다. 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 하이드록시프로필메틸셀룰로즈(HPMC)가 둘다 알콜 용액중에 사용되어 치료제를 과립화시킬 수 있다.

제형화 과정중에 들리붙는 것을 방지하기 위해 치료제 제형중에 마찰방지제를 포함시킬 수 있다. 윤활제는 치료제와 주형벽 사이의 충으로서 사용될 수 있고, 이들은 마그네슘 및 칼슘염을 포함하는 스테아르산, 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 액체 파라핀, 식물성 오일 및 왁스를 포함하거나 이에 제한되지 않는다. 나트륨 라우릴 설페이트, 마그네슘 라우릴 설페이트, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, 카보왁스 4000 및 6000과 같은 가용성 윤활제를 사용할 수 있다.

제형화 중에 약물의 유동 특성을 증진시키고 압축 동안 재배열을 보조할 수 있는 활주제를 첨가할 수 있다. 활주제는 전분, 훈석, 발열성 실리카 및 수화 실리코알루미네이트를 포함할 수 있다.

치료제가 수성 환경 내로 분해되는 것을 돋기위해 계면활성제를 습윤제로서 부가할 수 있다. 계면활성제는 나트륨 라우릴 살레이트, 디옥틸 나트륨 살포석시네이트 및 디옥틸 나트륨 살포네이트와 같은 음이온 세제를 포함할 수 있다. 양이온성 세제가 사용될 수 있으며, 이에는 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드가 포함된다. 계면활성제로서 제형중에 포함될 수도 있는 잠재적 비이온성 세제의 예로는 라우로마크로골 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 슈크로즈 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로즈 및 카복시메틸 셀룰로즈이다. 이들 계면활성제는 단백질 또는 유도체의 제형중에 단독으로 또는 상이한 비율의 혼합물로서 존재할 수 있다.

폴리펩티드(또는 유도체)의 흡수를 잠재적으로 증진시킬 수 있는 부가제는 예를 들면 지방산 올레산, 리놀레산 및 리놀렌산이다.

**폐 전달.** 본 발명에서는 또한 폴리펩티드(또는 이의 유도체)의 폐 전달을 고려하고 있다. 폴리펩티드(또는 이의 유도체)는 흡입하는 동안 포유동물의 폐로 전달되어 폐포의 점막 표면을 피복하게 된다. 하기 문헌에 이것이 포함되어 있다:[참조: Adjei et al., 1990, Pharmaceutical Research, 7:565-569; Adjei et al., 1990, International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144(류프롤리드 아세테이트); Braquet et al., 1989, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13(suppl.5): 143-146(엔도텔린-I); Hubbard et al., 1989, Annals of Internal Medicine, Vol.III, pp206-212(aI-안티트립신); Smith et al., 1989, J. Clin. Invest. 84:1145-1146(a-1-프로테이나제); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (재조합 사람 성장 호르몬); Debs et al., 1988, J. Immunol. 140:3482-3488(인터페론-g 및 종양괴사 인자 알파) 및 Platz et al., U.S. Patent No. 5,284,656(과립구 콜로니 자극 인자)]. 전신 효과를 위한 약물의 폐 전달을 위한 방법 및 조성물에 대해서는 1995년 9월 19일 용(Wong et al.)에게 허여된 미국 특허 제5,451,569호에 기술되어 있다.

## 작제

본 발명의 수행을 위해 분무기, 계량된 용량 흡입기, 및 분말 흡입기를 포함하나 이에 제한되지 않는, 치료제의 폐 전달을 위해 고안된 다양한 기계 장치의 사용을 고려되며, 이들은 모두 당해 기술분야 숙련가에게 친숙하다.

분무기(제트 또는 초음파)를 사용하기에 적합한 제형은 용액 ml당 생물학적 활성 단백질 약 0.1 내지 25mg 농도로 물에 용해된 폴리펩티드(또는 유도체)를 포함하는 것이 일반적이다. 제형은 또한 완충액 및 단순 당을 포함할 수 있다(예를 들면, 단백질 안정화 및 삼투압 조절을 위해). 분무기용 제형은 또한 에어로졸을 제조하는데 있어 용액의 분무에 의해 야기되는 표면 유도된 단백질의 응집을 방지하거나 감소시키기 위해 계면활성제를 함유할 수도 있다.

계량된 용량 흡입기로 사용하기 위한 제형은 일반적으로 계면활성제의 보조로 분사제중에 혼탁되는 폴리펩티드(또는 유도체)를 함유하는 미분 분말을 포함하게 된다. 분사제는 이러한 목적을 위해 사용될 수 있는 통상의 물질, 예를 들면, 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본 또는 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄올 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄 또는 이의 배합물을 포함하는 탄화수소이다. 적합한 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트 및 콩 래시틴을 포함한다. 올레산은 계면활성제로서 유용할 수 있다.

분말 흡입기로부터 분산하기 위한 제형은 폴리펩티드(또는 유도체)를 함유하는 미분 무수 분말을 포함하게 되며, 또한 락토즈, 소르비톨, 슈크로즈 또는 만니톨과 같은 벌크제를 장치로부터 분말의 분산을 용이하게 하는 양(예를 들면 제형의 50 내지 90중량%)으로 포함할 수 있다. 단백질(또는 유도체)은 말단 폐로 가장 효율적인 전달을 위해 가장 유리하게는 평균 입자 크기 10mm(또는 마이크론) 미만, 가장 바람직하게는 0.5 내지 5mm의 미립자 형태로 제조해야 한다.

**비내 전달.** 폴리펩티드(또는 유도체)의 비내 또는 비강 인두 전달 또한 고려된다. 비내 전달로, 폐내 생성물을 침착시킬 필요없이, 코로 치료제를 투여한 후 상부 기도 점막상으로 직접 폴리펩티드를 통과시킬 수 있게 된다. 비내 투여를 위한 제형은 텍스트란 또는 사이클로텍스트란을 포함한다.

## 작제

하기 실시예는 본 발명의 바람직한 양태를 보다 충분히 설명하기 위해 제시된다. 하지만 이들은 발명의 광범위한 영역을 제한하는 것으로 간주될 수 없다.

[실시예]

### 실험 상세 부분

#### 실시예 1: 콜린 결합 단백질 A(CbpA)의 웨პ티드 절두물

CbpA의 절두된 N-말단 단편(혈청형 4)를 포함하는 폴리펩티드를 생성시킨다. 전체 길이 CbpA는 PCR 프라이머 SJ533 및 SJ537을 사용하여 증폭되고, 프라이머는 CbpA 폴리펩티드의 유도된 N-말단 아미노산 서열을 기준으로 하여 디자인된다. 5' 정방향 프라이머 SJ533= 5' GGC GGA TCC ATG GA(A,G) AA(C,T) GA(A,G) GG 3'. 아미노산 서열 XENEG로부터 디자인된 이러한 축퇴 프라이머 BamHI 및 NcoI 제한 부위 및 ATG 개시 코돈 둘 다를 삽입한다. 3' 역방향 프라이머 SJ537 = 5' GCC GTC GAC TTA GTT TAC CCA TTC ACC ATT GGC 3'. 이 프라이머는 클로닝 목적을 위한 SalI 제한 부위 및 CbpA로부터 천연 종결 코돈을 삽입하고, 4 및 R6x 서열의 두 유형을 기본으로 한다.

PCR 생성물은 주형으로서 어닐링 온도 50°C에서 High Fidelity 효소(베링거 만하임)를 사용하여 30사이클 증폭된 프라이머 SJ533 및 SJ537을 사용하여 게놈 DNA로부터 생성된다. 생성되는 PCR 생성물은 QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen, Inc.)를 사용하여 정제한 다음, BamHI 및 SalI 제한 효소를 사용하여 분해하고, BamHI, XbaI 및 SmaI 제한 효소로 분해된 pQE30 발현 벡터(Qiagen, Inc.) 내에 클로닝한다.

#### 폴리펩티드 R2:

제2 반복 영역의 말단에서의 천연 발생 PvuII 부위, 즉 도 1에 도시된 바와 같은 C 영역(타입 4 서열의 핵산 1228)을 이용하여 유전자의 5' 영역만을 함유하는 cbpA 유전자의 절두형을 생성시킨다. 절두물 클론을 생성시키기 위해, 전체 길이 클론 PMI580(타입 4) 또는 PMI581(R6x)를 PvuII 및 XbaI를 사용하여 분해하고, 생성된 단편을 발현 벡터, PQE30에 결합시키고, 적합한 숙주내로 형질전환시킨다. 단백질을 발현시키고 정제한다. 이러한 경우에 발현 벡터에 의해 사용되는 종결 코돈은 삽입물의 하류에 있고, 발현된 단백질은 클로닝 부위의 5' 말단에서 추가의 핵산으로 인해 삽입물 예상된 크기보다 크다. 폴리펩티드 R2의 아미노산 서열은 서열 1에 나타난다.

#### 폴리펩티드 R1:

유사한 전략을 사용하여 CbpA의 N-말단 영역 내의 제1 반복 영역, 즉 폴리펩티드 R1의 A 영역만을 발현시킨다. 여기서, 2개의 아미노 반복(타입 4 서열의 핵산 856) 사이의 천연 발생의 XmnI 부위를 사용한다. cbpA 전체 길이 클론 PMI580은 XmnI 및 AatII를 사용하여 분해한다. 벡터 pQE30은 AatII 및 SmaI를 사용하여 분해한다. 다시 한번 2개의 일정 크기의 단편을 결합시키고, 이. 콜라이로 형질전환시키고, 클론을 삽입물에 대해 스크리닝한다. 하나의 양성 클론을 선택하고, 재조합 단백질을 상기한 균주로부터 정제한다.

모든 폴리펩티드를 이. 콜라이 및 pQE30벡터를 사용하여 Qia 발현 시스템(Qiagen)을 사용하여 발현 및 정제한다. His 태그(Tag)된 단백질의 아미노 말단을 숙주 및 항-히스틴 항체 및 단백질 특이적 항체를 사용하는 웨스턴 분석을 사용하여 검출한다.

#### R1 및 R2의 정제

이. 콜라이로부터 재조합 단백질을 제조하고 정제하기 위해 단일 콜로니를 재조합 플라스미드를 함유하는 도말된 세균으로부터 선택하고 37°C에서 50ug/ml 카나마이신 및 100ug/ml 암피실린과 함께 LB 완충액 6.0ml중에서 밤새 성장시킨다. 이러한 6.0ml 배양물을 상기 농도의 항생제와 함께 1L LB에 가한다. 배양물을  $A_{600} = \sim 0.400$ 이 될 때까지 37°C에서 진탕한다. 1M IPTG를 1L 배양물에 1mM의 최종 농도로 가한다. 이후 배양물을 37°C에서 3 내지 4시간 동안 진탕한다. 1L 배양물을 모델 J-6B 원심분리기에서 4000rpm에서 15분간 회전한다. 상등액을 버리고 펠렛을 -20°C에서 보관한다.

1L 펠렛을 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 6M GuCl, 300mM NaCl, pH 8.0(완충액 A) 25ml중에 재현탁시킨다. 이 혼합물을 실온에서 30분간 회전시키고 마이크로 텁을 사용하여 초음파기(VibraCell Sonicator(Sonics and Materials, Inc., Dnabury, CT))를 사용하여 2회, 30초간 50% 큐티 사이클에서 배출 설정을 7로 하여 초음파분쇄 한다. 혼합물을 JA20 회

전기에서 10K에서 5분간 회전시키고 상등액을 제거하여 버린다. 상등액을 GradiFrac System(Pharmacia Biotech, Upsala Sweden)에 부착된 10ml Talon(Clonetech, Palo Alto, CA)수지 컬럼으로 부하한다. 컬럼은 100ml 완충액 A로 평형화시키고 추가 완충액 200ml로 세척한다. 용적은 100% 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8M 우레아, 20mM MES, pH 6.0(완충액 B)를 사용하여 pH 구배를 기초하였으며, 최종 목적 완충액으로서 총 부피 100ml에 걸쳐 실행시킨다. 단백질은 ~30% 완충액 B에서 용출되었다. 용출된 퍼크를 수거하여 모았다.

리폴딩을 위해, 분자량이 14,000인 투석 튜브를 사용하여 약 3시간 동안 실온에서 용적 2L의 PBS로 투석을 수행한다. 이어서 시료를 4°C의 PBS 2L에서 밤새 투석한다. 단백질이 농축되는 동안 센트리프레프-30 스피n(Centrifrep-30 spin) 컬럼을 사용하여 PBS에 방사된 보관액을 첨가하고 재방사시킴으로써 추가의 완충 교환을 수행한다. 단백질 농도는 BCA 단백질 분석으로 결정하며 순도는 쿠마지(Coomassie) 착색된 4 내지 20% SDS-PAGE 겔(도 3)을 사용하여 가시화한다.

#### 실시예 2: 폴리펩티드 R1과 R2의 렉틴 활성

LNnt는 진핵 세포 상에 존재하는 폐렴구균에 대한 수용체의 탄수화물 유사체이다. CbpA 불완전 폐렴구균 돌연변이체는 진핵 세포나 CbpA의 부착 리간드로 알려진 고정된 당에 부착될 수 없다는 것이 알려져 있다. CbpA는 2개의 영역으로 나눌 수 있는 조절 단백질이다: N-말단 작용 도메인과 C-말단 콜린 부착 도메인(도 1). 폴리펩티드 R1과 R2를 완전한 CbpA의 활성이 특이적 N 말단(예 R2)이나 그의 단편(예 R1)에 존재하는지 여부를 결정하기 위해 생물학적 활성을 분석 한다. 단지 N 말단 도메인(R2)만이 콜린 결합 도메인(CBD) 없이 렉틴 결합을 위한 생물학적 활성을 가지는지 여부를 판단한다. 이것은 CbpA 전체 길이 및 폴리펩티드 R2(프롤린 농후 영역에서 Pvu II 부위 하의 CBD 영역이 손실된 절두물)를 사용하여 시험한다.

분석은 CbpA에 의해 인식된다고 알려진 당접합체를 사용하여 막 조직 배양 웰(coat tissue culture well)로 행한다: LNNT-알부민, 3' 시알릴 락토스-알부민 및 음성 대조 알부민. 이어서 플레이트를 알부민으로 차단하고 세척한 후 전체 길이 CbpA 폴리펩티드 R2나 폴리펩티드 R1을 15분에 걸쳐 첨가한 후(0.8μg/ml) 세척없이 플루오레세인으로 표지된 R6 폐렴구균을 30분에 걸쳐 첨가하고 세척한 후 부착된 세균을 눈으로 계수한다.

어떠한 웹티드의 첨가도 없이 탄수화물로 R6이 결합하는 것은 양성 대조군이며 이것은 100%(표 1)에서 대응된다. 3개의 개별적 실험에서, CbpA 전체 길이 또는 폴리펩티드 R2는 폐렴구균이 LNNT 피복된 표면에 결합되는 것을 경쟁적으로 억제시킨다. 전장 CbpA는 대조군의 71, 64% 및 63%으로 억제시킨다: 폴리펩티드 R2는 대조군의 65%, 53% 및 74%로 억제한다. CbpA 및 R2와 등가의 활성은 콜린 결합 도메인이, CbpA의 LNNT 렉틴 활성에 필요로 되지 않으며 R2가 후보 LNNT 렉틴임을 나타낸다.

LNNT에 결합과는 대조적으로, 폐렴구균을 3' 시알릴 락토스에 부착시키는 것은 전체 길이 CbpA(74 및 66%)와 비교하여 R2(79 및 101%)에 의해 억제된다. 이것은 CBD가 손실될 때 시알산 인지 활성이 손실됨을 의미한다. 반대로, R1이 시알산 인지에 활성이 있으며 이러한 특성은 CbpA와 공유하나 R2에서는 완전히 감추어진다. 이것은 폴리펩티드를 작용 도메인내 폴딩시키는 것이 조성물 및 폴리펩티드의 길이에 영향을 받음을 나타낸다. 약간의 서열 변형이 다른 균주에서 발견된다(도 2 참조). R1과 R2 간 서열의 상동성이 높을 때, R1 및 R2 모두 렉틴 활성에 필요하거나 이들이 약간 다른 특성을 갖는 렉틴일 가능성도 있다(土시알산).

**[표 1]**  
**가용성 CbpA 형태에 의한 R6 폐렴구균과 정제된 당접합체와의 결합 억제**

	LNNT	3' 시알릴 락토스	
Cbp 형태	단일총 당 폐렴구균 수(SD)	대조군(%)	단일총 당 폐렴구균 수 각 웰 당 대조군(%)
무 웹티드	3282 2421(489) 2210(350)	100%	2611 2115(125) 100%
전체 길이의 CbpA	2075 1740(167) 1415(50)	63, 71, 64	1933 1405(240) 74 66
	2461 1288(672)		

	1440(530)			
풀리펩티드 R1	3002 2245(182) 2500(310)	91, 92, 112	1052 1445(526)	40 68

N은 3이며 각 3개 웨일의 LNnt를 측정함

N은 2이며 각 3개 웨일의 SiL을 측정함

#### 세포 결합 활성과 연관된 렉틴 활성

사람 세포는 탄수화물(당단백질 및 당지질)을 함유하는 표면 분자를 포함하며 세균은 매우 상이한 단백질 및 지질 골격임에도 불구하고 이러한 탄수화물에 의해 당접합체에 부착한다. 그러므로, 시험관 내에서 세균 활성이 있는 폴리펩티드를 함유하는 세균은 사람 세포 표면에 부착할 수 있다. 시험관 내에서 렉틴의 활성과 세포 결합 작용 사이의 이러한 직접적 관련성은 폐렴구균에 대해 알려져 있다. 예를 들면 LNNT는 A549 사람의 폐 세포로 활성화된 TNF에 폐렴구균이 부착되는 것을 경쟁적으로 억제하며 생체 내에서는 폐렴의 진행을 차단시킨다. CbpA 절두물의 렉틴 활성이 세포 결합 활성을 반영한다는 것을 확립하기 위해, CbpA 및 절두물에 대해 폐렴구균이 폐 세포에 결합되는 것을 억제하는지에 대해 시험한다(표 2). 전체 길이 CbpA 및 폴리펩티드 R2는 각각 대조군의 58% 및 63%로 경쟁적으로 폐렴구균이 폐 세포에 부착되는 것을 억제한다. 폴리펩티드 R1은 유효하지 않으며 이는 R2의 LNnt 결합 활성이 필요함을 나타내며 폐렴구균의 폐 세포에의 결합을 서술한다.

**[표 2]**  
**R6 폐렴구균과 TNF 활성화된 사람 폐 세포와의 결합**

	A549 폐	
Cbp 형태	단일층 당 폐렴구균 수(평균)	대조군 %
무 펩티드	697, 704, 674 702, 722 (700)	100%
전체 길이 CbpA	376, 431 (403)	58%
폴리펩티드 R2	517, 693 314, 342, 350 (443)	63%
폴리펩티드 R1	696, 642, 552 (630)	90%

N은 2이며 각 2 또는 3 웨일에서 실험함

#### R2 의존성 LNNT 렉틴 활성

CbpA의 N-말단 영역은 각 ~110 아미노산의 두개의 반복단위를 함유한다(도 1 참조, 폴리펩티드 R2 내에서의 영역 A 및 C). 두 도메인의 생체 활성 R1에의 상대적 기여도를 연구하기 위해, 도메인 A만을 함유하는 것을 R2 및 전체 길이 CbpA와 비교한다. 부착도 분석 실험에서, 폴리펩티드 R1은 LNNT에의 부착을 전혀 억제시키지 못했다(야생형의 91, 92 및 112%). 그러나, 폴리펩티드 R1은 시알릴 락토스에의 부착을 일부 억제함을 나타내었다(대조군의 68% 및 40%). 이것은 폴리펩티드 R2가 LNNT 렉틴 활성에 필요하며 R2가 후보자 LNNT 렉틴 도메인임을 나타낸다. 반대로, R1은 시알산 인지에 활성적인 것 같다.

#### CbpA 차단 세포 결합의 N-말단 도메인에 대한 항체

CbpA의 N-말단 도메인을 세포에 결합시킬 때, N-말단 도메인 활성과의 저해는 세균이 세포나 정제된 당접합체에 부착되는 것을 예방 또는 방해할 것이다. 이러한 하나의 저해 기작이 항체이다.

[표 3]

## 항-CbpA R2 항체에 의한 R6 폐렴구균과 LNnT 피복된 표면과의 결합 억제

	단일총 당 폐렴구균 수(SD)	대조군 %(평균)
예비면역 항체	198(64), 88(4)	100%
절두물 R2에 대한 항체	56(11); 9(2)	28%; 10%

희석되지 않은 래비트 항체 5μl + 2 x 10<sup>7</sup> R6 x 5μl, RT에서 6x30분간 예비 항온 처리한 후 LNnT 피복된 웰을 부착 분석을 위해 첨가한다. 2개의 다른 실험을 수행한다.

CbpA(R2)의 재조합 N-말단 도메인에 부각된 항혈청(antisera)으로 폐렴구균의 LNnT에의 부착 억제 능력을 시험한다. 래비트 폴리클로날 항 CbpA 항혈청(5μl) 및 표지된 세균 2x10<sup>7</sup> 5μl을 실온에서 30분간 항온처리한다. 이 혼합물을 고정된 LNnT 상에 30분간 적가한 후 PBS로 3회 세척하여 결합되지 않은 세균을 제거한다. 플레이트에 결합된 세균을 현미경으로 계수하고 결과를 6개 웰로부터 나온 평균과 표준 편차로 나타낸다. 표 3에 나타난 결과로부터 R2 폴리펩티드에 대해 부각된 항혈청은 폐렴구균이 LNnT에 부착되는 것을 억제함을 알 수 있다. 도 5는 폐렴구균 R6x가 예시된 수용체 LNnT에의 부착 억제를 위한 예비면역물 대 항-CbpA R2 항체의 역가 곡선을 나타낸다. 폐렴구균 부착이 70%를 초과하면 1:100 및 1:200의 희석 액에서 항-R2에 의해 차단된다. 또한 1:400으로 희석하면 특이적 효과를 나타내는 활성이 제거된다.

표 3 및 도 5에 제시된 항혈청을 제조하기 위해 사용된 CbpA를 혈청형 4로부터 CbpA에 대해 증가시킨다. 부착 억제 분석에 사용된 R6x 폐렴구균 균주는 혈청형 2로부터 유도된다. 이 종혈청형 세균의 부착을 차단하는 상기 항체의 능력은 혈청형에 걸쳐서 교차 보호활성이 있다는 것을 의미한다. 이러한 활성은 효과적인 백신 면역원을 위해 매우 바람직한 활성이�다.

## CbpA N-말단의 원래 입체 구조에 대한 항체 활성

로즈나우(Rosenow)등의 논문에 기재된 바와 같이, 콜린 친화성 칼럼을 이용하여 CbpA를 천연 숙주 즉 폐렴구균로부터 정제할 수 있다. 대안으로, 폴리히스티딘 태그를 유전자 끝에 공학적으로 부착시켜 전사된 단백질이 수개의 히스티딘 잔기에 의해 연장되도록 할 수 있다. 이 잔기들은, 보다 짧은 절두물이 그 천연 3차 구조를 유지하도록 하는 것과는 대조적으로, 전체 길이의 폴리펩티드가 니켈 친화성 매트릭스 정제에 의한 정제를 촉진시킨다. 이러한 생화학적 방법에 의해 특별히 폐렴구균 뿐 아니라 이 콜라이 또는 다른 숙주 세균로부터 정제된 CbpA는, 그 천연 3차 구조를 유지한다. 천연적으로 폴딩 구조인 CbpA는 면역원으로 사용되는 경우에 항체를 생산하는데 이 항체는 다른 방식으로 폴딩될 수도 있는 절두물로 면역화시켜 유도된 것들과는 잠재적으로 다르다. 마찬가지로, 치료제로 사용된 CbpA는 절두물로 다른 3차 구조를 가질 수 있는데 이는 부착을 차단하는 능력을 증진시킬 수 있다. 이러한 사항들을 고려하면, CbpA를 그 천연의 3차구조로 폴딩되도록하는 전체길이 단백질로서 생산하여 C 말단(CBD)을 생화학적으로 절단하는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어, 하이드록실아민으로 처리하면, 혈청형 R6x 및 혈청형 4인 콜린 결합 단백질 A의 아미노산 위치 475에서 CbpA가 절단되어 N 말단과 C 말단이 분리될 것이다. 이 N 말단 단편은 치료제 또는 면역원으로서 적절하다.

대안으로, 천연 CbpA는 활성 구조에 대한 면역원 및 항혈청으로 사용될 수 있다. 이 혼합물내의 생체활성 항-N-말단 항체는 흡착에 의해 BD에 대한 항체를 제거함으로써 농후해질 수 있다. 이러한 항체는 200ul의 혈청을 1x10<sup>8</sup> CbpA 결합-세균과 함께 R1에서 1시간동안 항온배양하여 제조할 수 있다. 이 변이체상의 다른 콜린 결합 단백질들은 항-CBD 항체를 흡수한 후 원심분리 및 세균 제거에 의해 항혈청으로부터 제거된다.

흡수된 항CbpA 항체의 생체활성을 증명하기 위해, 폐렴구균이 모델 수용체 LNnT에 부착하는 것을 차단하는 흡수된 항혈청의 능력을 측정하였다. R6x 폐렴구균을 1:600 희석한 항혈청과 항온배양한 후 LNnT 알부민으로 피복된 웰에 부가하였다.

**[표 4]**  
**흡수된 항 CbpA 항혈청의 부착 차단**

항혈청(1:600)	웰당 폐렴구균 수 ± SD (대조 %)
항체 없음	563 ± 11 (100%)
예비면역 항체	479 ± 11 (85%)
항 CbpA 항혈청	294 ± 72 (52%)
CBD 항체 제거를 위해 흡수된 항 CbpA 항혈청	175 ± 38 (31%)

이러한 결과는 천연입체구조로 있는 Cbp/A의 N 말단 도메인에 대한 항체가 부착을 강하게 차단한다는 것을 의미한다. 이러한 활성은 1:600 희석에서 불활성인 도 5의 절두물 활성보다 큰 것이다. 흡수된 항 CbpA 항혈청의 이러한 활성은 도 5의 역가 연구에 의해 더욱 증명된다. 폐렴구균 4형이 LNnT-피복된 웰로의 최저 부착은 삼각형으로 표시된다. 폐렴구균과 비흡수된(사각형) 또는 흡수된(마름모형) 항혈청을 다양한 희석에서 전-배양(pre-incubation)한 결과는 부착의 감소를 얻었다는 것을 의미한다. 두 항혈청이 부착에 있어서 유사한 감소를 보였다는 사실은 CbpA에 대한 항체의 차단활성의 대부분이 N-말단에 존재한다는 것을 증명해준다(즉 흡수에 의해 콜린 결합 도메인으로 항체를 제거하는(옮기는) 것이 생체활성을 감소시키지 않는다).

#### 실시예 3 : 항-R2 항혈청을 이용한 수동 보호

##### 래비트의 면역항체 생성

폴리펩티드 R2(CbpA 절두물) 및 CbpA에 대한 래비트의 면역 항체가 코반스(덴버, 펜실바니아)에서 생산되었다. 면역 전 항체를 수집한 후, 양 아미노산 말단 반복부위(제조 483:58 상기)을 함유하는, 완전 프로인트 애주번트(Complete Freund's Adjuvant)중의 R2 250ug을 뉴질랜드 흰 래비트에 면역화하였다. 이 래비트에 불완전 프로인트 애주번트 (Incomplete Freund's Adjuvant)중의 R2 125ug 증대량을 21일째에 주입하고 31일째에 채혈하였다. 마찬가지로 두번째 래비트를 정제된 CbpA로 면역화하였다.

##### 마우스에서의 수동 보호

1:2 희석한 래비트 항 R2 또는 멸균 PBS (예비-면역 및 31일 면역 혈청)상태의 면역전 혈청 100ul를 C3H/HeJ 마우스(5/그룹) 복강내로 수동적으로 면역화하였다. 혈청 투여 1시간 후에, 1600CFU 스트렙토코쿠스 뉴모니애 혈청형 6B(SP317 균주)를 마우스에 접종하였다. 14일동안 마우스 생존을 모니터링하였다. 폴리펩티드 R2에 대한 래비트의 면역 혈청으로 면역화시킨 마우스의 80%가 생존하였다(도 4). 면역전 래비트 혈청으로 면역화한 마우스는 모두 7일내에 사망하였다.

이 데이터는, CbpA 특이적 항체는 전신성 폐렴구균 감염을 보호한다는 것을 보여준다. 또한, 이 데이터는 콜린-결합 영역이 보호에 필수적인 것이 아니라는 것을 보여주는데, 왜냐면 콜린 결합 반복부 보존성이 없는 절두된 단백질인 폴리펩티드 R2에 특이적인 항체도 보호에 충분했기 때문이다. 또한, 혈청형 4의 CbpA에 대한 혈청은 혈청형 6B로의 캐린지에 대한 보호효과를 보였다.

#### 실시예 4 : 항-R1 항혈청을 이용한 능동 보호

CbpA 절두물 단백질 R1(50 $\mu$ l PBS중의 15 $\mu$ g과 50 $\mu$ l의 완전 프로인트 애주번트)을 C3H/HeJ 마우스(10마리/그룹) 복강 내에 투여하여 면역화하였다. 10마리의 허위(sham)-면역화한 마우스 그룹에 PBS와 애주번트를 투여하였다. 4주후에, 15  $\mu$ g 단백질과 불완전 프로인트 애주번트(IFN)로 복강을 통해 두번째 면역화를 실시하였다(PBS와 IFN를 투여한 위면역화). 3, 6 및 9주째에 채혈(반궤도 채혈)하여 면역반응 분석을 하였다. 9주째에 CbpA 면역화 마우스 10마리로부터 얻은 혈청의 ELISA 종말점 항-CbpA 절두물 역가는 4,096,000이었다. 허위-면역화 마우스로부터 얻은 혈청에서는 항체가 검출되지 않았다. 10주째에 560 CFU 스트렙토코쿠스 뉴모니애 혈청형 6B (SPS12P균주, 테네시주 멤피스의 성 주드 아동 병원의 피.프플린이 제공함)로 마우스를 캐린지하였다. 14일 동안 마우스의 생존을 모니터링하였다. CbpA 절두물 단백질 R1으로 면역화한 마우스의 80%가 생존하였다. 허위-면역화한 마우스는 모두 8일내에 사망하였다(도 7).

이 데이터는, CbpA 재조합 단편으로 면역화하면 전신성 폐렴구균 감염 및 사망을 보호할 수 있는 특이적 항체의 생산을 유도한다는 것을 증명해준다. 또한 이 데이터는 콜린-결합 영역이 보호에 필수적인 것이 아니라는 것을 보여주는데, 왜냐하면 사용된 면역원이 절두물 단백질 R1이기 때문이다. 또한, 이 결과는 보호 반응을 유도하는데 있어서 단일의 아미노산 말단 반복부만으로도 충분할 수 있다는 것을 시사한다. 교차 보호효과 역시 증명되었는데, 혈청형 4 DNA 서열에 기초하여 재조합 폐렴구균 단백질이 생성되었고 혈청형 6B 단리물로 접종한 후에 보호효과가 관찰되었기 때문이다.

#### 실시예 5 : 새끼 랫트에서 비강인두에 콜로니형성 예방

시험관내에서, CbpA 의 N-말단 도메인은 폐렴구균 부착을 경쟁적으로 억제하였다. 이러한 활성을 갖는 웨티드의 치료 유용성을 증명하기 위하여, 새끼 랫트에 절두물 웨티드를 투여한 후 폐렴구균으로 챌린지한 후 비강인두에 있는 콜로니를 측정하였다.

0.8 $\mu$ g의 폴리웨티드 R2 또는 R1을 함유하거나 또는 단백질을 함유하지 않는 10ul의 PBS를 랫트 비강내로 투여하였다. 15분후에, 3형 폐렴구균(SIII 군주)(1x10<sup>5</sup> cfu를 함유하는 10ul)을 비강내로 도입하였다. 폐렴구균의 부착 및 콜로니형성을 경쟁적으로 억제하는 폴리웨티드의 능력을 측정하기 위하여, 72시간째에 비강세척을 한 후 발견되는 폐렴구균 수를 그룹당 각 4마리에 대하여 정량하였다. SIII만을 투여받은 랫트는 10ul 당 2200, 6500, 6900 및 8700(평균 6075)의 콜로니 수를 보였다. 절두물 R2로 처리한 동물이 가장 큰 세균수 감소를 보였는데(3600, 3500, 2500, 2100) 평균이 10ul 당 2925(대조군의 48%)이었다. 절두물 R1으로 처리한 동물 역시 콜로니형성의 감소(5000, 4800, 3500, 1600)를 보였는데 그 평균이 3725(대조군의 61%)이었다.

이 실험은, 치료연구 디자인에서 본 발명의 웨티드를 동물에 투여하면 그 후의 폐렴구균 챌린지에 대해 보호효과를 갖는다는 것을 보여준다.

#### 논의

실험에 의해 증명된 바와 같이, 폴리웨티드 R2는, 1) 백신으로서 투여되는 경우에 보호 항체를 유도하므로 백신 제형으로서 바람직한 조성물이고; 2) 웨티드로서 호흡기 및/또는 비강인두 수용체에 전달되는 경우, 폐렴구균의 부착을 경쟁적으로 방지하므로 콜로니형성 또는 침입성 질환에 대한 예방 및 치료제로 바람직한 조성물이다. 또한, CbpA 절두물은 CBD 없이 렉틴으로서 작용한다. 두개의 탄수화물이 인식되는데: 양 N-말단 반복부(A 및 C)를 함유하는 웨티드에 의한 LNnT(도 1) 와 단일 N-최말단 반복부(A)만을 함유하는 웨티드에 의한 시알산이다. N-말단 반복부를 함유하는 절두물인 폴리웨티드 R1 및 R2 또한 세포배양 분석에서 렉틴활성을 보인다.

폴리웨티드 R2 활성의 중요한 특성은, 1) 동물모델의 폐세포에 있는 정제된 당접합체 수용체의 인식을 위해 폴리웨티드 R2 및 전체길이 CbpA 생체활성의 완전한 상관관계 특성으로 상관관계는 이들에 대한 항체에서도 보여진다. 2) 다른 혈청형(예, 6B 및 2)을 이용한 시험관내 분석에서 4형 유도 물질과 세균간의 교차 보호 특성으로 이는 유용한 백신, 예방 및 치료모델에 있어서 중요하다.

본 발명은 여기서 다양한 구체적인 물질, 방법 및 실시예에 의해 참조로 예시되고 설명되었으나, 본 발명은 이러한 특정 물질 및 그 배합 및 이러한 목적을 위해 선택된 방법에 국한되지 않는 것으로 이해된다. 이러한 세부사항의 다양한 변화는 당해 기술분야 숙련가에 의해 인식될 수 있을 것이다. 마찬가지로, 여기서 인용한 어떠한 참고문헌도 본 발명의 개시와 관련되는 한도에서 여기에 기재된 것으로 간주되어야 한다.

#### [서열 목록]

<110> St. Jude Children's Research Hospital; Medimmune, Inc.

<120> POLYPEPTIDE COMPRISING THE AMINO ACID OF AN N-TERMINAL CHOLINE BINDING

PROTEIN A TRUNCATE, VACCINE DERIVED THEREFROM AND USES THEREOF

<130> 5-2000-045336-1; 5-2000-043861-8

<140> 60/080,878

<141> 1998-04-07

<140> 09/056,019

<141> 1998-04-07

<160> 39

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 1

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn

1

5

10

15

Glu Ser Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp Ser Glu  
 20 25 30

Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val  
 35 40 45

Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val  
 50 55 60

Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys  
 65 70 75 80

Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu  
 85 90 95

Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser  
 100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp  
 115 120 125

Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu  
 130 135 140

Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys  
 145 150 155 160

Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu

165                    -170                    175

Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu  
 180                    185                    190

Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys  
 195                    200                    205

Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu  
 210                    215                    220

Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Ala Lys Arg  
 225                    230                    235                    240

Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg  
 245                    250                    255

Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Glu Asn Asp Ala  
 260                    265                    270

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser  
 275                    280                    285

Leu Lys Pro Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu  
 290                    295                    300

Ala Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Asp Arg Arg Asn Tyr  
 305                    310                    315                    320

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp

325 330 335

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Ala Lys

340 345 350

Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu

355 360 365

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg

370 375 380

Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys

385 390 395 400

Val Lys Glu Lys Pro Ala

405

<210> 2

<211> 655

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn

1 5 10 15

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

20

25

30

Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val  
 35                    40                    45

Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val  
 50                    55                    60

Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys  
 65                    70                    75                    80

Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu  
 85                    90                    95

Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser  
 100                  105                  110

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp  
 115                  120                  125

Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu  
 130                  135                  140

Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys  
 145                  150                  155                  160

Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu  
 165                  170                  175

Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu

180 185 190

Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys

195 200 205

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

210 215 220

Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Ala Lys Arg

225 230 235 240

Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg

245 250 255

Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Glu Asn Asp Ala

260 265 270

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser

275 280 285

Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu

290 295 300

Ala Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr

305 310 315 320

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp

325 330 335

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys  
 340 345 350

Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu  
 355 360 365

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg  
 370 375 380

Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys  
 385 390 395 400

Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys  
 405 410 415

Ala Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln  
 420 425 430

Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala  
 435 440 445

Arg Arg Ser Glu Glu Tyr Asn Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro  
 450 455 460

Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr Pro Lys Thr Gly Trp Lys  
 465 470 475 480

Gln Glu Asn Gly Met Trp Tyr Phe Tyr Asn Thr Asp Gly Ser Met Ala

485                    490                    495

Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ser Asn  
500                    505                    510

Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr  
515                    520                    525

Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly  
530                    535                    540

Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu  
545                    550                    555                    560

Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala  
565                    570                    575

Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn  
580                    585                    590

Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr  
595                    600                    605

Leu Glu Ala Ser Gly Ala Met Lys Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser  
610                    615                    620

Asp Lys Trp Tyr Tyr Val Asn Gly Ser Gly Ala Leu Ala Val Asn Thr  
625                    630                    635                    640

Thr Val Asp Gly Tyr Gly Val Asn Ala Asn Gly Glu Trp Val Asn

645 650 655

<210> 3

<211> 284

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val

35 40 45

Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val

50 55 60

Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys

65 70 75 80

Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu

85 90 95

Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser

100                    105                    110

Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp

115                    120                    125

Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu

165                    170                    175

Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu

180                    185                    190

Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys

195                    200                    205

Gin Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu

210                    215                    220

Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Ala Lys Arg

225                    230                    235                    240

Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg

245                    250                    255

Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala

260

265

270

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu

275

280

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 4

Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala

1

5

10

15

Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro

20

25

30

Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val

35

40

45

Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu

50

55

60

Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser

65

70

75

80

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys

85

90

95

Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala

100

105

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 5

Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Val Glu Glu

1

5

10

15

Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr

20

25

30

Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp

35

40

45

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Val Lys Ala Asn

50

55

60

Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu

65

70

75

80

Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg

85

90

95

Glu Glu Ala Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala

100

105

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 6

Lys Xaa Xaa Glu

1



<210> 7

<211> 376

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 7

Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met Ala Lys

1

5

10

15

Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu

20

25

30

Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn

35

40

45

Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg

50 55 60

Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr

85 90 95

Leu Lys Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu

100 105 110

Ala Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr

115 120 125

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Phe Asp

130 135 140

Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg

180 185 190

Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala Lys Leu Lys

195

200

205

Glu Ala Asn Val Ala Thr Ser Asp Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala  
 210 215 220

Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn  
 225 230 235 240

Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser  
 245 250 255

Ser Ser Leu Lys Ser Gly Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val  
 260 265 270

Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg  
 275 280 285

Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu  
 290 295 300

Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu  
 305 310 315 320

Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys  
 325 330 335

Val Glu Ser Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr  
 340 345 350

Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu

355                    360                    365

Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala

370                    375

<210> 8

<211> 663

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 8

Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met Ala Lys

1                    5                    10                    15

Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu

20                    25                    30

Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn

35                    40                    45

Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg

50                    55                    60

Glu Leu Asn Val Leu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro Ser Glu

65                    70                    75                    80

Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr

85

90

95

Leu Lys Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Val Glu Glu  
 100 105 110

Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr  
 115 120 125

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Phe Asp  
 130 135 140

Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys  
 145 150 155 160

Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Lys Gln Ala Lys Glu Lys Val Glu  
 165 170 175

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg  
 180 185 190

Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala Lys Leu Lys  
 195 200 205

Glu Ala Asn Val Ala Thr Ser Asp Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala  
 210 215 220

Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn  
 225 230 235 240

Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser  
 245                    250                    255

Ser Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val  
 260                    265                    270

Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg  
 275                    280                    285

Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu  
 290                    295                    300

Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu  
 305                    310                    315                    320

Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys  
 325                    330                    335

Val Glu Ser Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr  
 340                    345                    350

Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu  
 355                    360                    365

Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala  
 370                    375                    380

Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln  
 385                    390                    395                    400

Pro Lys Ala Glu Lys Thr Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala  
405 410 415

Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro  
420 425 430

Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr Pro Lys Thr Gly Trp Lys  
435 440 445

Gln Glu Asn Gly Met Trp Tyr Phe Tyr Asn Thr Asp Gly Ser Met Ala  
450 455 460

Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn  
465 470 475 480

Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr  
485 490 495

Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly  
500 505 510

Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu  
515 520 525

Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ser Asn Gly Ala Met Ala  
530 535 540

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

545                    550                    555                    560

Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr  
                       565                    570                    575

Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly  
                       580                    585                    590

Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Val  
                       595                    600                    605

Lys Asp Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Glu Ala Ser Gly Ala Met Lys  
                       610                    615                    620

Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser Asp Lys Trp Tyr Tyr Val Asn Gly  
                       625                    630                    635                    640

Ser Gly Ala Leu Ala Val Asn Thr Thr Val Asp Gly Tyr Gly Val Asn  
                       645                    650                    655

Ala Asn Gly Glu Trp Val Asn  
                       660

<210> 9

<211> 254

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 9

Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met Ala Lys

5 10 15

Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu

20 25 30

Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn

35 40 45

Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg

50 55 60

Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr

85 90 95

Leu Lys Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu

100 105 110

Ala Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr

115 120 125

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Phe Asp

130 135 140

Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys

145                    150                    155                    160

Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Lys Gln Ala Lys Glu Lys Val Glu  
                         165                    170                    175

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg  
                         180                    185                    190

Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala Lys Leu Lys  
                         195                    200                    205

Glu Ala Asn Val Ala Thr Ser Asp Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala  
                         210                    215                    220

Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn  
                         225                    230                    235                    240

Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu  
                         245                    250

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 10

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

Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro  
 20 25 30

Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val  
 35 40 45

Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu  
 50 55 60

Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser  
 65 70 75 80

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Lys  
 85 90 95

Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala  
 100 105

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 11

Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys  
 1 5 10 15

Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr  
 20 25 30

Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Phe Asp Val Lys  
 35 40 45

Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser  
 50 55 60

Arg Asn Glu Gly Thr Ile Lys Gln Ala Lys Glu Lys Val Glu Ser Lys  
 65 70 75 80

Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys  
 85 90 95

Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala  
 100 105

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 1219

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 12

gagaacgagg gagctaccca agtacccact tcttctaata gggcaaatga aagtcaggca 60  
 gaacaaggag aacaacctaa aaaactcgat tcagaacgag ataaggcaag gaaagaggc 120  
 gaggaatatg taaaaaaaaat agtgggtgag agctatgcaa aatcaactaa aaagcgacat 180  
 acaattactg tagtctagt taacgagttg aacaacatta agaacgagta tttaataaa 240

atagttgaat caacccctcaga aagccaaacta cagataactga tgatggagag tcgcataaaaa 300  
gtagatgaag ctgtgtctaa gtttgaaaag gactcatctt cttcgtaag ttccagactct 360  
ttccactaaac cggaagcttc agatacagcg aagccaaaca agccgacaga accaggagaa 420  
taggttagcg aagctaagaa gaagggttcaa gaagctgaga aaaaagccaa ggatcaaaaa 480  
gaagaagatc gtcgttaacta cccaaaccatt acttacaaaaa cgcttgaact taaaattgtct 540  
gagtcccgatg tggaaagttaa aaaagcggag cttgaacttag taaaagtgaa agcttaacgaa 600  
ccttcgagacg agcaaaaaat taagcaagca gaagcggaaag ttgagagtaa acaagctgag 660  
gctacaaggtaaaaaaaat caagacagat cgtgaagaag cagaagaaga agcttaacgaa 720  
agagcagatg ctaaaagagca aggttaaacca aaggggcggg caaaacgagg agttccctgga 780  
gagcttagcaa cacctgtataa aaaagaaaaat gatgcgaagt cttcagattc tagcgttaggt 840  
gaagaaaactc ttccaagccc atccccgtaaa ccagaaaaaa aggttagcaga agctgagaag 900  
aagggttgaag aagctaagaa aaaagccgag gatcaaaaaag aagaagatcg cctgttaactac 960  
ccaaaccaata cttacaaaaac gcttgaactt gaaattgtcg agtccgatgt ggaagttaaa 1020  
aaagcggagc ttgtacttagt aaaagagggaa gctaaggaaac ctcgaaacgaa ggaaaaaagtt 1080  
aegcaagcaa aagcggaaatg tgagagttaa aaagctgagg ctacaaggaa agaaaaaaatc 1140  
aagacagatc gtaaaaaaaaaagc agaagaagaa gctaaacgaa aagcagcaga agaagataaa 1200  
gtttaagaaaa aaccagctg 1219

1219

<210> 13

<211> 1969

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 13

gagaacgagg gagcttaccca agtacccact tctttctaata gggcaaatga aagtcaggca 60  
gaacaaggag aacaacctaa aaaaactcgat tcagaacgag ataaggcaag gaaaagggtc 120  
gaggaatatg taaaaaaaaat agtgggtgag agcttatgcaa aatcaactaa aaagcgcacat 180  
aca&ttactg tagctctagt taacgagttg aacaacatca agaacgagta tttgaataaa 240  
atagttgtaat caaacctcaga aagccaaacta cagatactga tgatggagag tcgcataaaaa 300

gtagatgaag ctgcgtctaa gtttggaaaag gactcatctt cttcgtaag ttcagactct 360  
 tccactaaac cggaagcttc agatacagcg aagccaaaca agccgacaga accaggagaa 420  
 aaggtagcag aagctaagaa gaagggttgaa gaagctgaga aaaaagccaa ggatcaaaaa 480  
 gaagaagatc gtcgtacta cccaaaccatt acttacaaaaa cgcttgaact taaaattgct 540  
 gagtccgatg tggaaagttaa aaaagcgag cttgaacttag taaaagtgaa agctaacgaa 600  
 ccrcgagacg agcaaaaaat taagcaagca gaagcggaag ttgagagata acaagctgag 660  
 gctacaaggtaaaaaaaaaat caagacagat cgtgaagaag cagaagaaga agctaaacga 720  
 agagcagatg ctaaagagca aggttaaacc aaggggcggg caaaacgagg agttccctgga 780  
 gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaaat gatgcgaagt cttcagatc tagcgttaggt 840  
 gaagaaaaatc ttccaagccc atccctgaaa ccagaaaaaa aggttagcaga agctgagaag 900  
 aagggttgaag aagctaagaa zaaagccgag gatcaaaaaag aagaagatcg ccgtaaactac 960  
 ccaaccaata cttacaaaaac gcttgaactt gaaattgctg agtccgatgt ggaagttaaa 1020  
 aaaggcgagg cttgaacttag taaaagagga agcttaaggaa cttcgaaacg aggaaaaaagt 1080  
 taagcaagca aaagcggaag ttgagagataa aaaagctgag gctacaaggt tagaaaaaaat 1140  
 caagacagat cgtaaaaaaag cagaagaaga agctaaacga aaagcagcag aagaagataa 1200  
 agttaaagaa aaaccagctg aacaaccaca accagcgccc gtcacaaatc cagaaaaacc 1260  
 agctccagct cccaaaccag agaatccagc tgaacaacca aaagcagaaaa aaccagctga 1320  
 tcaacaagct gaagaagact atgctcgttag atcagaagaa gaatataatc gettgactca 1380  
 acagcaaccg cccaaactg aaaaaccagc acaaccatctt actccaaaaa caggctggaa 1440  
 acaagaaaaac ggtatgtggt acttctacaa tactgatggt tcaatggcga caggatggct 1500  
 cccaaacaat ggctcatggt actacctcaa cagcaatggc gctatggcga caggatggct 1560  
 cccaaacaat ggctcatggt actatctaaa cgctaatggt tcaatggcga caggatggct 1620  
 cccaaacaat ggctcatggt actacctaaa cgctaatggt tcaatggcga caggatggct 1680  
 ccaatacaat ggctcatggt actacctaaa cgctaatggt tcaatggcga caggatggct 1740  
 ccaatacaat ggctcatggt actacctaaa cgctaatggt gatatggcga caggatggct 1800  
 gaaagatgga gatacctgggt actatcttga agcatcaggt gctatggaaag caagccaaatg 1860  
 gttcaagatc tcaagataat ggtactatgt caatggctca ggtgccctg cagtcaacac 1920  
 aactgttagat ggctatggag tcaatgccaa tggtaatgg gtaaaactaa 1969

<210> 14  
<211> 853  
<212> DNA  
<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 14

```

gagaacgagg gagctaccca agtacccact tttctaata gggcaaatga aagtcaggca 60
gaacaaggag aacaaccta aaaaactcgat tcagaacgag ataaggcaag gaaagaggtc 120
gaggaatatg taaaaaaaaat agtgggttag agctatgcaa aatcaactaa aaagcgacat 180
acaattactg tagctctagt taacgaggta aacaacatta agaacgagta ttgtataaaa 240
atagttgaat caacctcaga aagccaacta cagatactga tgatggagag tcgatcaaaa 300
gtagatgaag ctgtgtctaa gtttgaaaag gactcatctt ctgcgtcaag ttccagactct 360
tccactaaac cggaagcttc agatacagcg aagccaaaca agccgacaga accaggagaa 420
aaggtagcag aagctaagaa gaaggttga aagctgaga aaaaagccaa ggatcaaaaa 480
gaagaagatc gtcgttaacta cccaaaccatt acttacaaaa cgcttgaact tgaaattgct 540
gagtcccgatg tggaaagttaa aaaagcggag ctgtaaactag taaaagtga aagctaacgaa 600
cctcgagacg agcaaaaaat taagcaagca gaagcggaaat ttgagatgaa acaagctgag 660
gctacaagat taaaaaaaaat caagacagat cgtgaagaag cagaagaaga agctaaacgaa 720
agagcagatg cttaagagca aggttaaacc aaggggcggg caaaacgagg agttccctgga 780
gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaaat gatgcgaagt ctgcgtatcc tagcgttaggt 840
gaagaaaactc ttc

```

853

<210> 15  
<211> 318  
<212> DNA  
<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 15

```

aaaccagaaa aaaaggttagc agaagctgag aagaaggttt aagaagctaa gaaaaaagcc 60

```

gaggatcaa aagaagaaga tcgcccgtaac taccacca atacttacaa aacgcttgaa 120  
 cttgaaattt ctgaatcccgtaatggaaagg aaaaaagcg agcttgaact agtaaaagag 180  
 gaagcttaagg aacctcgaa cgaggaaaaa gtttagcaag caaaagcgga agttgagagt 240  
 zaaaaagctg aggetacaazg gttagaaaaa atcaagacag atcgtaaaaa agcagaagaa 300  
 gaagcttaaac gaaaagca

318

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

&lt;400&gt; 16

acagaaccag gagaaaagg agcagaagct aagaagaagg ttgaagaagc tgagaaaaaa 60  
 gccaaggatc aaaaagaaga agatcgctgt aactacccaa ccattactta caaaacgctt 120  
 gaacctgaaa ttgctgagtc cgatgtggaa gttaaaaaaag cgagcttga actagtaaaa 180  
 gtgaaagcta acgaacctcg agacgagcaa aaaactaagc aagcagaagc ggaagttgag 240  
 agtaaacaag ctgaggctac aaggttaaaa aaaatcaaga cagatcggtga agaagcagaa 300  
 gaagaagcta aacgaagagc agatgct

327

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1129

&lt;212&gt; DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

&lt;400&gt; 17

gaaaaacgaag gaagtaccca aacccact tcttctaata tggcaaagac agaacatagg 60  
 aaagctgcata aacaagtgcgt cgatgaatat atagaaaaaa ttttgaggga gtttcaacta 120  
 gatagaagaa aacataccca aaatgtcgcc ttaaacataa agttgagcgc aattaaaacg 180  
 aagtatggc gtgaatttata ttttttagaa gagaagtcga aagatgatgtt ggcgtcagaa 240

ataaaagcaa agtttagacgc agctttttagag aagtttaaaa aagatacatt gaaaccaggaa 300  
 gaaaaggtag cagaagctaa gaagaaggcc gaagaagcta agaaaaaagc cgaggatcaa 360  
 aaagaagaag atcgctgtaa ctacccaacc aataacttaca aaacgcttga acttgaaatt 420  
 gctgagttcg atgtgaaagt taaaagaagcg gagcttgaac tagtaaaaga ggaagctaaa 480  
 gaatctcgaa acggggcac aattaagcaa gcaaaagaga aagtttagag taaaaaagct 540  
 gaggctacaa ggtagaaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa 600  
 cgaaaagcag atgctaagtt gaaggaagct aatgttagcga cttcagatca aggttaacca 660  
 aaggggcggg caaaacgagg agttcctgga gagctgcaaa cacctgataa aaaaagaaaat 720  
 gatgcgaatc cttcagattc tagcgttagt gaagaaaactc ttccaaagctc atccctgaaa 780  
 tcaggaaaaa aggttagcaga agcttagaag aaggttgaag aagctgagaa aaaagccaag 840  
 gatcaaaaag aagaagatcg ccgttaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgacctt 900  
 gaaattgctg agtccgatgt gaaagttaa gaagcggagc ttgaactagt aaaagaggaa 960  
 gctaagggAAC ctcgagacga ggaaaaaaatt aagcaagcaa aagcggaaagt tgagagtaaa 1020  
 aaagctgagg ctacaaggtt agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa 1080  
 gctaaacgaa aagcagcaga agaagataaa gttaaagaaa aaccagctg 1129

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1992

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 18

gaaaacgaag gaagtaccca agcagccact tcttctataa tggcaaagac agaacatagg 60  
 aaagctgcta aacaagtcgt cgatgaatat atagaaaaaa tggaggaa gattcaacta 120  
 gatagaagaa aacataacca aatgtcgcc ttaaacataa agttgagcgc aattaaaacg 180  
 aagtatttgc gtgaattaaa tggggtagaa gagaagtcga aagatgagtt gccgtcagaa 240  
 ataaaagcaa agtttagacgc agctttttagag aagtttaaaa aagatacatt gaaaccaggaa 300  
 gaaaaggtag cagaagctaa gaagaaggcc gaagaagcta agaaaaaagc cgaggatcaa 360  
 aaagaagaag atcgctgtaa ctacccaacc aataacttaca aaacgcttga acttgaaatt 420

gctgagttcg atgtgaaagt taaaagaacgc gagcttgaac tagtaaaaga ggaagctaaa 480  
 gaatctcgaa acgaggcac aattaagcaa gcaaaagaga aagtttagagag taaaaaagct 540  
 gaggctacaa gtttagaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa 600  
 cggaaagcag atgctaagt gaaggaagct aatgttagcga cttagatca agttaaacca 660  
 aaggggcggg caaaacgagg agttccctgga gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaaat 720  
 gatgcgaagt cttagatcc tagcgttagt gaagaaactc ttccaaagctc atccctgaaa 780  
 tcaggaaaaa aggttagcaqa agctgagaag aaggttgaag aagctgagaa aaaagcdaag 840  
 gatcaaaaag aagaagatcg ccgttaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgacett 900  
 gaaattgtcg agtcccgatgt gaaagttaaa gaagcggagc ttgactagt aaaagaggaa 960  
 gctaaggAAC ctccgagacga ggaaaaaatt aagcaagcaa aagcgaaagt tgagataaa 1020  
 aaagctgagg ctacaaggct agaaaaacatt aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa 1080  
 gctaaacgaa aagcagcaga agaagataaa gttaaagaaa aaccagctga acaaccacaa 1140  
 ccagcgcgg ctactcaacc agaaaaacca gctccaaaac cagagaagcc agctgaacaa 1200  
 cccaaagcag aaaaaacaga tcatcaacaa gctgaagaag actatgtcg tagatcagaa 1260  
 gaagaatata atcgcttgc tcaacagcaa ccgcacaaaaa ctgaaaaacc agcacaacca 1320  
 tctactccaa aaacaggctg gaaaaaagaa aacggatgt ggtacttcta caatactgt 1380  
 ggttcaatgg caacaggatg gctccaaaac aacggttcat ggtactatct aaacgctaat 1440  
 ggtgctatgg cgacaggatg gctccaaaac aatggttcat ggtactatct aaacgctaat 1500  
 ggttcaatgg caacaggatg gctccaaaac aatggttcat ggtactacct aaacgctaat 1560  
 ggtgctatgg cgacaggatg gctccaaatc aatggttcat ggtactacct aaacgcaat 1620  
 ggcgctatgg cgacaggatg gctccaaatc aatggttcat ggtactacct caacgctaat 1680  
 ggtgatatgg cgacaggatg gctccaaaac aacggttcat ggtactacct caacgctaat 1740  
 ggtgatatgg cgacaggatg gctccaaatc aacggttcat ggtattacct caacgctaat 1800  
 ggtgatatgg cgacaggatg ggttttttgg gtagataccc ggtactatct tgaagcatca 1860  
 ggtgctatga aagcaagcca atggttcaaa gtatcagata aatggtacta tgcataatggc 1920  
 tcaaggtgcccttgcagtcata cacaactgtatg gatggctatg gatgtcaatgc caatggtgaa 1980  
 tgggtaaaact aa 1992

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 763

&lt;212&gt; DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

&lt;400&gt; 19

gaaaacgaag gaagtaccca agcagccact ttttctaata tggcaaagac agaacatagg 60  
 aaagctgcta aacaagtgcgt cgatgaatat atagaaaaaa tggtgaggga gattcaacta 120  
 gatagaagaa aacataccca aaatgtcgcc ttaaacatata agttgagcgc zatzaaaacg 180  
 aagtatttgc gtgaatttaaa tgtttttagaa gagaagtcga aagatgagtt gccgtcagaa 240  
 ataaaaagcaa agtttagacgc agtttttgag aagtttaaaa aagatacatt gaaaccagga 300  
 gaaaaggtag cagaagctaa gaagaaggtt gaagaagcta agaaaaaagc cgaggatcaa 360  
 aaagaagaag atcgctgtaa ctacccaacc aatacttaca aaacgcttga acttgaatt 420  
 gctgagttcg atgtgaaagt taaagaagcg gagcttgaac tagtaaaaaga ggaagctaaa 480  
 gaatctcgaa acgagggcac aattaagcaa gcaaaagaga aagttgagag taaaaaagct 540  
 gaggctacaa gtttagaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa 600  
 cggaaagcag atgctaaggc gaagggaaagct aatgttagcga cttcagatca aggttaaacc 660  
 aaggggcggg caaaacgagg agttcctgga gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaaat 720  
 gatgcgaagt cttcagattc tagcgttaggt gaagaaactc ttc 763

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

&lt;400&gt; 20

aaatcaggaa aaaaggtagc agaagctgag aagaagggtt aagaagctga gaaaaaaagcc 60  
 aaggatcaa aagaagaaga tggccgttaac tacccaaacca atacttacaa aacgcttgac 120  
 cttgaaatttgc tggagtccga tggaaaggaa aagaagcgg agcttgaact agtaaaagag 180  
 gaagctaaagg aacctcgaga cgaggaaaaa attaagcaag caaaagcgaag agttgagagt 240

aaaaaaagctcg aggctacaag gtttagaaaaac atcaagacag atcgtaaaaa agcagaagaa 300  
gaagctaaac gaaaagca

318

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

&lt;400&gt; 21

ccaggagaaaa aggttagcaga agctaagaag aaggttgaag aagctaagaa aaaagccgag 60  
gatcaaaaag aagaagatcg tctgttaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgaactt 120  
gaaattgctg agttcgatgt gaaagttaaa gaagcggagc ttgaactagt aaaagaggaa 180  
gctaaagaat ctgcgaaacga gggcacaatt aagcaagcaa aagagaaaagt tgagagtaaa 240  
aaagctgagg ctacaaggct agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaaaaa agaagaagaa 300  
gctaaacgaa aagcagatgc t

321

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

&lt;400&gt; 22

Ser Pro Ser Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala

35

40

45

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

50

55

60

Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala

65

70

75

80

Glu Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys

85

90

95

Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu

100

105

110

Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala

115

120

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 23

Pro Ser Ser Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys

1

5

10

15

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

20

25

30

Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Glu Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys

65 70 75 80

Ala Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile

85 90 95

Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala

100 105 110

Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Arg Ala.

115 120

<210> 24

<211> 428

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 24

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn

1 5 10 15

Glu Ser Gln Ala Glu Glr Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp Ser Glu

20 25 30

Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val

35 40 45

Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val

50 55 60

Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys

65 70 75 80

Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu

85 90 95

Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser

100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp

115 120 125

Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu

165 170 175

Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu

180 185 190

Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys

195 200 205

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

210 215 220

Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Ala Lys Arg

225 230 235 240

Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg

245 250 255

Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala

260 265 270

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser

275 280 285

Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu

290 295 300

Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr

305 310 315 320

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp

325

330

335

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys

340

345

350

Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gin Ala Lys Ala Glu Val Glu

355

360

365

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg

370

375

380

Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys

385

390

395

400

Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys

405

410

415

Ala Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Asn

420

425

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 25

ggcggatcca tggaraayga rgg

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

&lt;400&gt; 26

gccccgtcgact tagttttaccc atttcaccatt ggc

33

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

&lt;400&gt; 27

Xaa Glu Asn Glu Gly

1

5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 439

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

&lt;400&gt; 28

Ala Val Ala Ser Leu Phe Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu Lys

1

5

10

15

Glu Val Thr Thr Gln Val Ala Thr Ser Ser Asn Lys Ala Asn Lys Ser

20

25

30

Gln Thr Glu His Met Lys Ala Ala Lys Gln Val Asp Glu Tyr Ile Lys  
 35                  40                  45

Lys Lys Leu Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu  
 50                  55                  60

Leu Thr Lys Leu Gly Val Ile Lys Thr Glu Tyr Leu His Gly Leu Ser  
 65                  70                  75                  80

Val Ser Lys Lys Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Ala  
 85                  90                  95

Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Asp Thr Leu Pro Thr  
 100                105                110

Glu Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala  
 115                120                125

Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Lys Asp Leu Arg Asn Tyr Pro  
 130                135                140

Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Asp Ile Ala Glu Ser Asp Val  
 145                150                155                160

Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu  
 165                170                175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

Glu Val Xaa Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala

245

250

255

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Thr Ser Pro Ser

260

265

270

Leu Lys Pro Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Val Glu Glu

275

280

285

Ala Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Asp Arg Arg Asn Tyr

290

295

300

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp

305

310

315

320

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys

325

330

335

Glu Ser Arg Asn Glu Glu Lys Ile Lys Gln Val Lys Ala Lys Val Glu  
 340                    345                    350

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg  
 355                    360                    365

Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Ala Glu Glu Asp  
 370                    375                    380

Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro  
 385                    390                    395                    400

Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala Pro Ala Pro  
 405                    410                    415

Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Lys Pro Lys Ala Glu Lys Pro  
 420                    425                    430

Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu  
 435

<210> 29

<211> 437

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 29

Ala Val Ala Ser Leu Phe Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu Lys

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

Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu  
 165                    170                    175

Ser Arg Asp Glu Lys Lys Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Asn  
 180                    185                    190

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Asn Ile Lys Thr Asp Arg Glu  
 195                    200                    205

Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys Leu Gln Glu Ala  
 210                    215                    220

Asn Val Ala Thr Ser Glu Gln Asp Lys Ser Lys Arg Arg Ala Lys Arg  
 225                    230                    235                    240

Glu Val Leu Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala  
 245                    250                    255

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Thr Ser Pro Ser  
 260                    265                    270

Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu  
 275                    280                    285

Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr  
 290                    295                    300

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp  
 305                    310                    315                    320

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys  
 325                    330                    335

Glu Ser Arg Asn Glu Glu Lys Ile Lys Gln Val Lys Ala Lys Val Glu  
 340                    345                    350

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg  
 355                    360                    365

Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Ala Glu Glu Asp  
 370                    375                    380

Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro  
 385                    390                    395                    400

Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala Pro Ala Pro  
 405                    410                    415

Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Lys Pro Lys Ala Glu Lys Pro  
 420                    425                    430

Ala Asp Gln Gln Ala  
 435

<210> 30

<211> 439

<212> PRT

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 30

Val Ala Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu  
 1                5                10                15

Lys Glu Val Thr Thr Gln Val Ala Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn Glu  
 20                25                30

Ser Gln Ala Gly His Arg Lys Ala Ala Glu Gln Phe Asp Glu Tyr Ile  
 35                40                45

Lys Thr Met Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Phe Ala  
 50                55                60

Leu Asn Ile Lys Leu Ser Arg Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Arg Lys Leu  
 65                70                75                80

Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Ala Glu Leu Pro Ser Glu Thr Lys  
 85                90                95

Lys Glu Ile Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Asn Arg  
 100              105              110

Thr Lys Lys Thr Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys  
 115              120              125

Lys Lys Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp His Arg Asn Tyr Pro Thr  
 130              135              140

Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu  
 145 150 155 160

Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser  
 165 170 175

Arg Asp Asp Glu Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Lys Val Glu Ser Lys  
 180 185 190

Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Glu Lys  
 195 200 205

Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Glu Ala Lys Leu Lys Glu Ala  
 210 215 220

Val Glu Lys Asn Val Ala Thr Ser Glu Gln Asp Lys Pro Lys Gly Arg  
 225 230 235 240

Arg Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu  
 245 250 255

Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Ala Leu Pro  
 260 265 270

Ser Pro Ser Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys  
 275 280 285

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

290

295

300

Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala  
 305 310 315 320

Glu Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu  
 325 330 335

Glu Ala Lys Glu Ser Arg Asn Glu Glu Lys Val Asn Gln Ala Lys Ala  
 340 345 350

Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys  
 355 360 365

Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu  
 370 375 380

Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro  
 385 390 395 400

Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala Pro  
 405 410 415

Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Thr  
 420 425 430

Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu  
 435

<210> 31

<211> 419

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 31

Ala Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu Asn  
 1                5                10                15

Glu Gly Thr Thr Gln Ala Pro Thr Ser Ser Asn Arg Gly Asn Glu Ser  
20 25 30

Lys Met Leu Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu  
50 55 60

Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Arg Gly Leu Ser  
65 70 75

Val Ser Lys Glu Lys Ser Thr Ala Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Glu  
85 90 95

Lys Leu Thr Ala Ala Phe Lys Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys Pro  
 100 105 110

115

120

125

Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile  
 130                    135                    140

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

Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg  
 165                    170                    175

Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Lys  
 180                    185                    190

Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Lys Ala  
 195                    200                    205

Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Val Asp Ala Lys Glu Gln Asp Glu Ser  
 210                    215                    220

Ser Lys Arg Arg Lys Ser Arg Val Lys Arg Gly Asp Val Gly Glu Gln  
 225                    230                    235                    240

Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser  
 245                    250                    255

Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys Pro Gly Lys Lys  
 260                    265                    270

Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Asp Lys Lys Ala Lys  
 275                    280                    285

Ala Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys  
 290                    295                    300

Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala  
 305                    310                    315                    320

Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asn Glu Glu  
 325                    330                    335

Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala  
 340                    345                    350

Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu  
 355                    360                    365

Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala  
 370                    375                    380

Glu Gln Pro Lys Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro  
 385                    390                    395                    400

Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Asp  
 405                    410                    415

Gln Gln Ala

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 437

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 32

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

Val Thr Thr Gln Val Ala Thr Ser Ser Asn Lys Ala Asn Lys Ser Gln  
 20               25                           30

Thr Glu His Met Lys Ala Ala Lys Gln Val Asp Glu Tyr Ile Lys Lys  
 35               40                           45

Lys Leu Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu Leu  
 50               55                           60

Thr Lys Leu Gly Val Ile Lys Thr Glu Tyr Leu His Gly Leu Ser Val  
 65               70                           75                           80

Ser Lys Lys Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Ala Lys  
 85               90                           95

Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Pro Thr Glu  
 100              105                           110

Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys  
 115                    120                    125

Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Lys Asp Leu Arg Asn Tyr Pro Thr  
 130                    135                    140

Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Asp Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu  
 145                    150                    155                    160

Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser  
 165                    170                    175

Arg Asp Glu Lys Lys Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Asn Lys  
 180                    185                    190

Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Asn Ile Lys Thr Asp Arg Glu Lys  
 195                    200                    205

Ala Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys Leu Gln Glu Ala Asn  
 210                    215                    220

Val Ala Thr Ser Glu Gln Asp Lys Ser Lys Arg Arg Ala Lys Arg Glu  
 225                    230                    235                    240

Val Phe Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys  
 245                    250                    255

Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Thr Ser Pro Ser Leu  
 260                    265                    270

Lys Pro Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala  
275 280 285

Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro  
290 295 300

Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val  
305 310 315 320

Glu Val Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu  
325 330 335

Ser Arg Asn Glu Glu Lys Ile Lys Gln Val Lys Ala Lys Val Glu Ser  
340 345 350

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Lys  
355 360 365

Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Ala Glu Glu Asp Lys  
370 375 380

Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln  
385 390 395 400

Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala Pro Ala Pro Ala  
405 410 415

Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Lys Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala

420

425

430

Asp Gln Gln Ala Glu

435

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 433

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 33

Cys Thr Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu  
 1            5            10            15

Asn Glu Arg Thr Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Gly Lys Pro  
 20            25            30

Glu Arg Arg Lys Ala Ala Glu Gln Phe Asp Glu Tyr Ile Asn Lys Met  
 35            40            45

Ile Gln Leu Asp Lys Arg Lys His Thr Gln Asn Leu Ala Phe Asn Ile  
 50            55            60

Gln Leu Ser Arg Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Asn Gly Leu Lys Glu Lys  
 65            70            75            80

Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Lys Ile Lys Ala Glu Leu Asp Ala Ala  
 85            90            95

Phe Lys Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Pro Thr Glu Pro Glu Lys Lys  
 100 105 110

Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Val Ala  
 115 120 125

Glu Ala Lys Lys Lys Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp His Arg Asn  
 130 135 140

Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu Phe  
 145 150 155 160

Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Lys Glu Ala  
 165 170 175

Asp Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val  
 180 185 190

Glu Ser Glu Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp  
 195 200 205

Arg Glu Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys  
 210 215 220

Glu Gln Asp Glu Ser Lys Arg Arg Lys Ser Arg Gly Lys Arg Gly Ala  
 225 230 235 240

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

Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys

260 265 270

Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Asp

275 280 285

Lys Lys Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr

290 295 300

Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Lys

305 310 315 320

Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser

325 330 335

Arg Asn Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys

340 345 350

Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys

355 360 365

Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys

370 375 380

Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu

385 390 395 400

Lys Pro Ala Glu Glu Pro Glu Asn Pro Val Pro Ala Pro Lys Pro Glu  
 405                    410                    415

Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala  
 420                    425                    430

Glu

<210> 34

<211> 427

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 34

Val Ala Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu  
 1                    5                    10                    15

Lys Glu Val Thr Thr Gln Val Pro Thr Tyr Ser Asn Met Ala Lys Thr  
 20                    25                    30

Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu Lys  
 35                    40                    45

Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Phe  
 50                    55                    60

Ala Phe Asn Met Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Tyr Gly

65

70

75

80

Leu Lys Glu Lys Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Glu Val Lys Ala Lys

85

90

95

Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys Leu Gly

100

105

110

Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys

115

120

125

Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr

130

135

140

Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys

145

150

155

160

Lys Ala Glu Leu Glu Leu Leu Lys Glu Glu Ala Lys Thr Arg Asn Glu

165

170

175

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

180

185

190

Ala Thr Lys Leu Glu Glu Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu

195

200

205

Glu Ala Lys Arg Lys Ala Glu Ala Glu Asp Lys Val Lys Asp Lys

210

215

220

Leu Lys Arg Arg Thr Lys Arg Ala Val Pro Gly Glu Pro Ala Thr Pro  
 225                    230                    235                    240

Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu  
 245                    250                    255

Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu  
 260                    265                    270

Ala Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys  
 275                    280                    285

Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp  
 290                    295                    300

Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu  
 305                    310                    315                    320

Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Gly Ser Arg Asn Glu Glu Lys Ile Asn  
 325                    330                    335

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

Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg  
 355                    360                    365

Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro  
 370                    375                    380

Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu  
 385            390            395            400

Asn Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys  
 405            410            415

Ala Glu Lys Thr Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu  
 420            425

<210> 35

<211> 413

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 35

Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met Ala Lys  
 1            5            10            15

Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu  
 20            25            30

Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn  
 35            40            45

Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg  
 50            55            60

Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro Ser Glu  
 65                    70                    75                    80

Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr  
 85                    90                    95

Leu Lys Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu  
 100                105                110

Ala Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr  
 115                120                125

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Phe Asp  
 130                135                140

Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys  
 145                150                155                160

Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Lys Gln Ala Lys Glu Lys Val Glu  
 165                170                175

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg  
 180                185                190

Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala Lys Leu Lys  
 195                200                205

Glu Ala Asn Val Ala Thr Ser Asp Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala  
 210                215                220

Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn  
 225                    230                    235                    240

Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser  
 245                    250                    255

Ser Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val  
 260                    265                    270

Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg  
 275                    280                    285

Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu  
 290                    295                    300

Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu  
 305                    310                    315                    320

Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys  
 325                    330                    335

Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr  
 340                    345                    350

Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu  
 355                    360                    365

Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala

Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln

385                   390                   395                   400

Pro Lys Ala Glu Lys Thr Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu

405                   410

<210> 36

<211> 425

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 36

Tyr Ile Ala Ser Leu Phe-Leu Gly Gly Val Val His Ala Glu Gly Val

1                   5                   10                   15

Arg Ser Glu Asn Asn Pro Thr Val Thr Ser Ser Gly Gln Asp Ile Ser

20                   25                   30

Lys Lys Tyr Ala Asp Glu Val Lys Ser His Leu Glu Lys Ile Leu Ser

35                   40                   45

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

50                   55                   60

Leu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Ile Lys Arg Thr Tyr Leu Tyr Glu Leu

65                   70                   75                   80

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

Ala Glu Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Pro  
 100                105                110

Thr Glu Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu  
 115                120                125

Ala Glu Lys Lys Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp Tyr Arg Asn Tyr  
 130                135                140

Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp  
 145                150                155                160

Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Lys Glu Ala Asp  
 165                170                175

Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu  
 180                185                190

Ser Glu Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg  
 195                200                205

Glu Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln  
 210                215                220

Asp Glu Ser Lys Arg Arg Lys Ser Arg Val Lys Arg Gly Asp Phe Gly

225	230	235	240
<b>Glu Pro Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp</b>			
245	250	255	
<b>Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys Pro Gly</b>			
260	265	270	
<b>Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys</b>			
275	280	285	
<b>Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp His Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr</b>			
290	295	300	
<b>Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys</b>			
305	310	315	320
<b>Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Gly Ser Arg Asn</b>			
325	330	335	
<b>Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser Lys Lys Ala</b>			
340	345	350	
<b>Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu</b>			
355	360	365	
<b>Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys</b>			
370	375	380	

Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro  
 385                   390                   395                   400

Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu  
 405                   410                   415

Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu  
 420                   425

<210> 37

<211> 439

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 37

Ala Ser Leu Phe Leu Gly Gly Val Val His Ala Glu Gly Val Arg Ser  
 1                   5                   10                   15

Gly Asn Asn Ser Thr Val Thr Ser Ser Gly Gln Asp Ile Ser Lys Lys  
 20                   25                   30

Tyr Ala Asp Glu Val Glu Ser His Leu Gln Ser Ile Leu Lys Asp Val  
 35                   40                   45

Asn Lys Asn Leu Lys Lys Val Gln His Thr Gln Asn Ala Asp Phe Asn  
 50                   55                   60

Lys Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Tyr Glu Leu Asn Val

65	70	75	80
Leu Glu Glu Lys Ser Glu Ala Glu Leu Thr Ser Lys Thr Lys Glu Thr			
85	90	95	
Lys Glu Glu Leu Thr Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu			
100	105	110	
Ser Thr Glu Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu			
115	120	125	
Glu Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Lys Asp Arg Arg Asn			
130	135	140	
Tyr Pro Thr Ile <sup>*</sup> Thr Tyr <sup>*</sup> Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser			
145	150	155	160
Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Val Lys Ala			
165	170	175	
Asn Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Lys Val			
180	185	190	
Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp			
195	200	205	
Arg Glu Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg			
210	215	220	

Glu Gln Ala Glu Glu Ala Lys Val Lys Asp Glu Pro Lys Lys Arg  
 225 230 235 240

Thr Lys Arg Gly Val Leu Gly Pro Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu  
 245 250 255

Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Thr Leu Pro  
 260 265 270

Ser Pro Ser Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys  
 275 280 285

Val Glu Glu Ala Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg  
 290 295 300

Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala  
 305 310 315 320

Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu  
 325 330 335

Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala  
 340 345 350

Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys  
 355 360 365

Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu  
 370 375 380

Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro  
 385                   390                   395                   400

Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Pro  
 405                   410                   415

Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Pro  
 420                   425                   430

Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu  
 435

<210> 38

<211> 460

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 38

Cys Ile Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu  
 1                   5                   10                   15

Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn Glu  
 20                   25                   30

Ser Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp Ser Glu Arg  
 35                   40                   45

Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val Gly  
 50                    55                    60

Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val Ala  
 65                    70                    75                    80

Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys Ile  
 85                    90                    95

Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu Ser  
 100                  105                  110

Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser Ser  
 115                  120                  125

Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp Thr  
 130                  135                  140

Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala  
 145                  150                  155                  160

Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu  
 165                  170                  175

Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu  
 180                  185                  190

Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu  
 195                  200                  205

Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys Gln  
 210                    215                    220

Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys  
 225                    230                    235                    240

Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Ala Lys Arg Arg  
 245                    250                    255

Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg Gly  
 260                    265                    270

Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys  
 275                    280                    285

Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu  
 290                    295                    300

Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala  
 305                    310                    315                    320

Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro  
 325                    330                    335

Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val  
 340                    345                    350

Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu

Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser  
 370                    375                    380

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

Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val  
 405                    410                    415

Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Ala  
420 425 430

Glu Lys Pro Ala Pro Ala-Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro  
435 440 445

<210> 39

<211> 459

<212> BBT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 39

Ile Val Al

1

Ile Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu Asn  
 1                   5                   10                   15

Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn Glu Ser  
 20 25 30

Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp Ser Glu Arg Asp  
 35 40 45

Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val Gly Glu  
 50 55 60

Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val Ala Leu  
 65 70 75 80

Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Val  
 85 90 95

Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu Ser Arg  
 100 105 110

Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser Ser Ser  
 115 120 125

Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp Thr Ala  
 130 135 140

Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys  
 145 150 155 160

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

165                  170                  175  
Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu  
180                  185                  190  
  
Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val  
195                  200                  205  
  
Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Lys Gln Lys Ile Lys Gln Ala  
210                  215                  220  
  
Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys  
225                  230                  235                  240  
  
Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala  
245                  250                  255  
  
Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Pro Lys Arg Gly Val  
260                  265                  270  
  
Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser  
275                  280                  285  
  
Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys  
290                  295                  300  
  
Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys  
305                  310                  315                  320

Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr  
 325 330 335

Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu  
 340 345 350

Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Pro  
 355 360 365

Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser Lys  
 370 375 380

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

Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys  
 405 410 415

Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Thr Glu  
 420 425 430

Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys  
 435 440 445

Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu  
 450 455

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

서열 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 22, 23 또는 24에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 분리된 폴리펩티드.

#### 청구항 2.

서열 1, 3, 4, 5, 22 또는 24의 아미노산 서열로 이루어지고, 하기의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 치환 1 내지 57개를 갖는 분리된 폴리펩티드:

- (a) 서열 40의 아미노산 잔기 154에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (b) 서열 40의 아미노산 잔기 155에 상응하는 위치에서의 루신 치환,
- (c) 서열 40의 아미노산 잔기 156에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (d) 서열 40의 아미노산 잔기 157에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (e) 서열 40의 아미노산 잔기 181에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,

- (f) 서열 40의 아미노산 잔기 182에 상응하는 위치에서의 알라닌 치환,
- (g) 서열 40의 아미노산 잔기 187에 상응하는 위치에서의 트립토판, 히스티딘 또는 루신 치환,
- (h) 서열 40의 아미노산 잔기 194에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (i) 서열 40의 아미노산 잔기 200에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (j) 서열 40의 아미노산 잔기 202에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (k) 서열 40의 아미노산 잔기 209에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (l) 서열 40의 아미노산 잔기 212에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (m) 서열 40의 아미노산 잔기 218에 상응하는 위치에서의 루신 치환,
- (n) 서열 40의 아미노산 잔기 220에 상응하는 위치에서의 라이신 또는 글루탐산 치환,
- (o) 서열 40의 아미노산 잔기 221에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (p) 서열 40의 아미노산 잔기 223에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 또는 라이신 치환,
- (q) 서열 40의 아미노산 잔기 225에 상응하는 위치에서의 세린, 트레오닌 또는 아르기닌 치환,
- (r) 서열 40의 아미노산 잔기 227에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (s) 서열 40의 아미노산 잔기 228에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (t) 서열 40의 아미노산 잔기 229에 상응하는 위치에서의 글루탐산, 글리신 또는 아스파르트산 치환,
- (u) 서열 40의 아미노산 잔기 230에 상응하는 위치에서의 트레오닌 치환,
- (v) 서열 40의 아미노산 잔기 232에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (w) 서열 40의 아미노산 잔기 235에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (x) 서열 40의 아미노산 잔기 236에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (y) 서열 40의 아미노산 잔기 237에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (z) 서열 40의 아미노산 잔기 240에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (aa) 서열 40의 아미노산 잔기 241에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (bb) 서열 40의 아미노산 잔기 242에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (cc) 서열 40의 아미노산 잔기 249에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (dd) 서열 40의 아미노산 잔기 250에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (ee) 서열 40의 아미노산 잔기 257에 상응하는 위치에서의 글루타민 또는 라이신 치환,
- (ff) 서열 40의 아미노산 잔기 263에 상응하는 위치에서의 루신 치환,

- (gg) 서열 40의 아미노산 잔기 264에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (hh) 서열 40의 아미노산 잔기 265에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (ii) 서열 40의 아미노산 잔기 266에 상응하는 위치에서의 이소루신 치환,
- (jj) 서열 40의 아미노산 잔기 267에 상응하는 위치에서의 라이신 또는 발린 치환,
- (kk) 서열 40의 아미노산 잔기 258에 상응하는 위치에서의 트레오닌 치환,
- (ll) 서열 40의 아미노산 잔기 269에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (mm) 서열 40의 아미노산 잔기 291에 상응하는 위치에서의 트레오닌, 발린, 프롤린 또는 글리신 치환,
- (nn) 서열 40의 아미노산 잔기 294에 상응하는 위치에서의 알라닌 또는 글루탐산 치환,
- (oo) 서열 40의 아미노산 잔기 295에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 또는 알라닌 치환,
- (pp) 서열 40의 아미노산 잔기 295에 상응하는 위치에서의 루신 또는 페닐알라닌 치환,
- (qq) 서열 40의 아미노산 잔기 328에 상응하는 위치에서의 세린 치환,
- (rr) 서열 40의 아미노산 잔기 329에 상응하는 위치에서의 글리신 치환,
- (ss) 서열 40의 아미노산 잔기 340에 상응하는 위치에서의 알라닌 치환,
- (tt) 서열 40의 아미노산 잔기 343에 상응하는 위치에서의 글루탐산 또는 아르파르트산 치환,
- (uu) 서열 40의 아미노산 잔기 347에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (vv) 서열 40의 아미노산 잔기 349에 상응하는 위치에서의 알라닌 치환,
- (ww) 서열 40의 아미노산 잔기 354에 상응하는 위치에서의 히스티딘 치환,
- (xx) 서열 40의 아미노산 잔기 366에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (yy) 서열 40의 아미노산 잔기 375에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (zz) 서열 40의 아미노산 잔기 378에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (aaa) 서열 40의 아미노산 잔기 390에 상응하는 위치에서의 글리신 치환,
- (bbb) 서열 40의 아미노산 잔기 391에 상응하는 위치에서의 세린 치환,
- (ccc) 서열 40의 아미노산 잔기 393에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (ddd) 서열 40의 아미노산 잔기 397에 상응하는 위치에서의 이소루신 치환, 및
- (eee) 서열 40의 아미노산 잔기 408에 상응하는 위치에서의 글루타민 치환.

### 청구항 3.

삭제

#### 청구항 4.

삭제

#### 청구항 5.

서열 7, 9, 10, 11 또는 23의 아미노산 서열로 이루어지고, 하기의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 치환 1 내지 57개를 갖는 분리된 폴리펩티드:

- (a) 서열 40의 아미노산 잔기 154에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (b) 서열 40의 아미노산 잔기 155에 상응하는 위치에서의 루신 치환,
- (c) 서열 40의 아미노산 잔기 156에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (d) 서열 40의 아미노산 잔기 157에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (e) 서열 40의 아미노산 잔기 181에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (f) 서열 40의 아미노산 잔기 182에 상응하는 위치에서의 알라닌 치환,
- (g) 서열 40의 아미노산 잔기 187에 상응하는 위치에서의 트립토판, 히스티딘 또는 루신 치환,
- (h) 서열 40의 아미노산 잔기 194에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (i) 서열 40의 아미노산 잔기 200에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (j) 서열 40의 아미노산 잔기 202에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (k) 서열 40의 아미노산 잔기 209에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (l) 서열 40의 아미노산 잔기 212에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (m) 서열 40의 아미노산 잔기 218에 상응하는 위치에서의 루신 치환,
- (n) 서열 40의 아미노산 잔기 220에 상응하는 위치에서의 라이신 또는 글루탐산 치환,
- (o) 서열 40의 아미노산 잔기 221에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (p) 서열 40의 아미노산 잔기 223에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 또는 라이신 치환,
- (q) 서열 40의 아미노산 잔기 225에 상응하는 위치에서의 세린, 트레오닌 또는 아르기닌 치환,
- (r) 서열 40의 아미노산 잔기 227에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (s) 서열 40의 아미노산 잔기 228에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (t) 서열 40의 아미노산 잔기 229에 상응하는 위치에서의 글루탐산, 글리신 또는 아스파르트산 치환,
- (u) 서열 40의 아미노산 잔기 230에 상응하는 위치에서의 트레오닌 치환,
- (v) 서열 40의 아미노산 잔기 232에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,

- (w) 서열 40의 아미노산 잔기 235에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (x) 서열 40의 아미노산 잔기 236에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (y) 서열 40의 아미노산 잔기 237에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (z) 서열 40의 아미노산 잔기 240에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (aa) 서열 40의 아미노산 잔기 241에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (bb) 서열 40의 아미노산 잔기 242에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (cc) 서열 40의 아미노산 잔기 249에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (dd) 서열 40의 아미노산 잔기 250에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (ee) 서열 40의 아미노산 잔기 257에 상응하는 위치에서의 글루타민 또는 라이신 치환,
- (ff) 서열 40의 아미노산 잔기 263에 상응하는 위치에서의 루신 치환,
- (gg) 서열 40의 아미노산 잔기 264에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (hh) 서열 40의 아미노산 잔기 265에 상응하는 위치에서의 아스파라긴 치환,
- (ii) 서열 40의 아미노산 잔기 266에 상응하는 위치에서의 이소루신 치환,
- (jj) 서열 40의 아미노산 잔기 267에 상응하는 위치에서의 라이신 또는 발린 치환,
- (kk) 서열 40의 아미노산 잔기 258에 상응하는 위치에서의 트레오닌 치환,
- (ll) 서열 40의 아미노산 잔기 269에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (mm) 서열 40의 아미노산 잔기 291에 상응하는 위치에서의 트레오닌, 발린, 프롤린 또는 글리신 치환,
- (nn) 서열 40의 아미노산 잔기 294에 상응하는 위치에서의 알라닌 또는 글루탐산 치환,
- (oo) 서열 40의 아미노산 잔기 295에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 또는 알라닌 치환,
- (pp) 서열 40의 아미노산 잔기 295에 상응하는 위치에서의 루신 또는 페닐알라닌 치환,
- (qq) 서열 40의 아미노산 잔기 328에 상응하는 위치에서의 세린 치환,
- (rr) 서열 40의 아미노산 잔기 329에 상응하는 위치에서의 글리신 치환,
- (ss) 서열 40의 아미노산 잔기 340에 상응하는 위치에서의 알라닌 치환,
- (tt) 서열 40의 아미노산 잔기 343에 상응하는 위치에서의 글루탐산 또는 아르파르트산 치환,
- (uu) 서열 40의 아미노산 잔기 347에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (vv) 서열 40의 아미노산 잔기 349에 상응하는 위치에서의 알라닌 치환,
- (ww) 서열 40의 아미노산 잔기 354에 상응하는 위치에서의 히스티딘 치환,

- (xx) 서열 40의 아미노산 잔기 366에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (yy) 서열 40의 아미노산 잔기 375에 상응하는 위치에서의 라이신 치환,
- (zz) 서열 40의 아미노산 잔기 378에 상응하는 위치에서의 글루탐산 치환,
- (aaa) 서열 40의 아미노산 잔기 390에 상응하는 위치에서의 글리신 치환,
- (bbb) 서열 40의 아미노산 잔기 391에 상응하는 위치에서의 세린 치환,
- (ccc) 서열 40의 아미노산 잔기 393에 상응하는 위치에서의 아스파르트산 치환,
- (ddd) 서열 40의 아미노산 잔기 397에 상응하는 위치에서의 이소루신 치환, 및
- (eee) 서열 40의 아미노산 잔기 408에 상응하는 위치에서의 글루타민 치환.

#### 청구항 6.

제1항, 제2항 또는 제5항에 있어서, 당해 폴리펩티드에 부착된 폴리에틸렌 글리콜 또는 수용성 중합체로부터 선택된 화학적 잔기를 포함하는 분리된 폴리펩티드.

#### 청구항 7.

삭제

#### 청구항 8.

삭제

#### 청구항 9.

삭제

#### 청구항 10.

삭제

#### 청구항 11.

제1항, 제2항 또는 제5항에 있어서, 당해 폴리펩티드에 부착된 N-말단 메티오닌 또는 N-말단 폴리히스티딘을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

#### 청구항 12.

서열 24의 138 내지 428 연속 아미노산으로 이루어진 단편으로 이루어지고, 콜린에 결합하지 않는 분리된 폴리펩티드.

#### 청구항 13.

삭제

#### 청구항 14.

제1항, 제2항, 제5항 또는 제12항에 있어서, 전장의 CbpA 폴리펩티드와 상호작용할 수 있는 항체와 상호작용하는 분리된 폴리펩티드.

**청구항 15.**

삭제

**청구항 16.**

삭제

**청구항 17.**

삭제

**청구항 18.**

삭제

**청구항 19.**

서열 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 22, 23 또는 24에 제시된 아미노산 서열로 이루어지고 콜린에 결합하지 않는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산 분자.

**청구항 20.**

제19항에 있어서, 서열 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20 또는 21로 이루어진 분리된 핵산 분자.

**청구항 21.**

서열 24의 138 내지 428 연속 아미노산으로 이루어지고 콜린에 결합하지 않는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드로 이루어진 분리된 핵산 분자.

**청구항 22.**

콜린에 결합하지 않는 폴리펩티드를 암호화하고 서열 12의 318 내지 1219 연속 뉴클레오티드로 이루어진 뉴클레오티드 서열로 이루어진 분리된 핵산 분자.

**청구항 23.**

삭제

**청구항 24.**

제19항 내지 제22항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA인 분리된 핵산 분자.

**청구항 25.**

제19항 내지 제22항 중의 어느 한 항에 있어서, cDNA인 분리된 핵산 분자.

**청구항 26.**

삭제

**청구항 27.**

제19항 내지 제22항 중의 어느 한 항에 있어서, 프로모터에 작동적으로 결합된 분리된 핵산 분자.

**청구항 28.**

제27항에 있어서, 프로모터가 RNA 전사의 프로모터인 분리된 핵산 분자.

**청구항 29.**

제19항 내지 제22항 중의 어느 한 항에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터.

**청구항 30.**

삭제

**청구항 31.**

제29항에 있어서, 플라스미드, 코스미드, 효모 인공 염색체(YAC), 박테리오파지 또는 진핵 세포성 바이러스 DNA인 벡터.

**청구항 32.**

적합한 비-사람 숙주 세포 내에 제29항의 벡터를 포함하는, 폴리펩티드를 생성하기 위한 숙주 벡터 시스템.

**청구항 33.**

제32항에 있어서, 적합한 비-사람 숙주 세포가 원핵 세포 또는 진핵 세포를 포함하는 숙주 벡터 시스템.

**청구항 34.**

제29항의 벡터를 포함하는 비-사람 세포주.

**청구항 35.**

(a) 제29항에 따른 벡터를 적합한 숙주 세포내로 도입시키는 단계;

(b) 생성된 숙주 세포를 배양하여 폴리펩티드를 생산하는 단계;

(c) 단계 (b)에서 생산된 폴리펩티드를 회수하는 단계; 및

(d) 단계 (c)에서 회수된 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함하여, 폴리펩티드를 정제된 형태로 수득하는 방법.

### 청구항 36.

제1항, 제2항, 제5항 또는 제12항 중의 어느 한 항에 따른 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있으며, N-말단 콜린 결합 단백질 A 절두물(truncate)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 결합하는 항체를 포함하고, 이때 분리된 항체가 콜린 결합 도메인에 결합하지 않으며 콜린 결합 도메인에 결합하는 항체가 실질적으로 부존재하는, 폐렴구균(*pneumococcal* bacterium)에 의한 감염을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 37.

제36항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 약제학적 조성물.

### 청구항 38.

제36항에 있어서, 항체가 폴리클로날 항체인 약제학적 조성물.

### 청구항 39.

제36항에 있어서, 항체가 키메라성(이중 특이적) 항체인 약제학적 조성물.

### 청구항 40.

삭제

### 청구항 41.

제1항, 제2항, 제5항 또는 제12항 중의 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는, 폐렴구균에 의한 감염을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 42.

삭제

### 청구항 43.

제36항에 있어서, 기도 또는 비강인두에 전달되는 약제학적 조성물.

### 청구항 44.

삭제

### 청구항 45.

제1항, 제2항, 제5항 또는 제12항 중의 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용되는 에주번트 또는 담체를 포함하는 백신.

### 청구항 46.

## 작제

청구항 47.

서열 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 및 39로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용되는 애주번트 또는 담체를 포함하는 백신.

청구항 48.

작제

청구항 49.

작제

청구항 50.

제19항, 제20항, 제21항 또는 제22항 중의 어느 한 항에 따른 분리된 핵산 분자 및 약제학적으로 허용되는 애주번트 또는 담체를 포함하는 백신.

청구항 51.

작자

청구항 52.

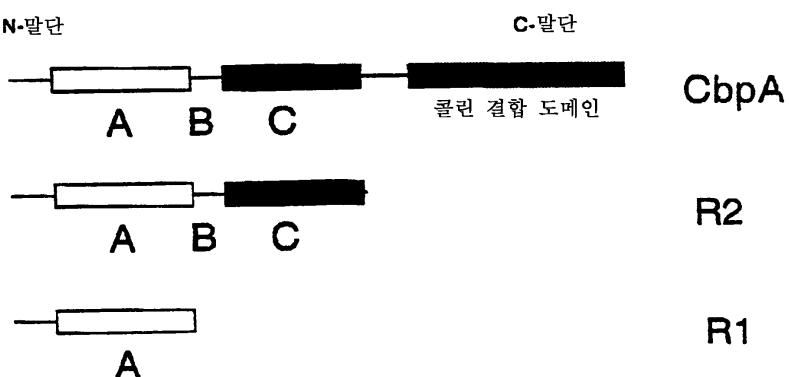
제29항에 따른 백터 및 약제학적으로 허용되는 애주번트 또는 담체를 포함하는 백신.

청구항 53.

제45항에 따른 백신을 포함하는, 폐렴구균에 감염되거나 이에 노출된 개체를 치료하거나 예방하기 위한 약제학적 조성물.

도면

도면1

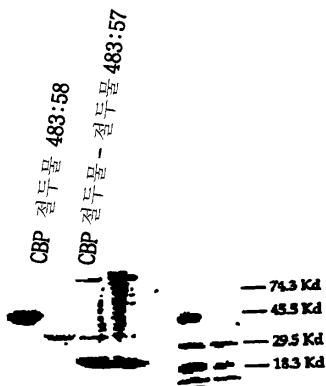


## 도면2a

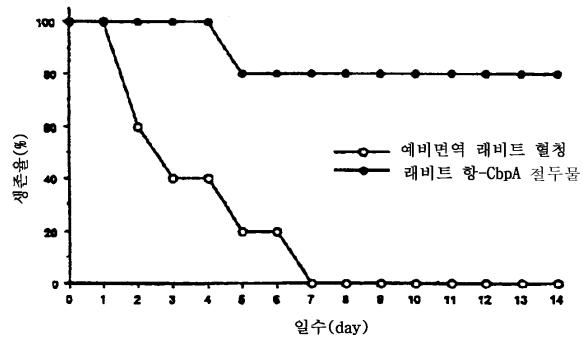
-AVASLVMGSVVHATENEVITTOVATSSNRANESQTEHKAALQ-										H	
10	20	30	40	50	60	70	-VDEYIKNML-		Q-L		
SPB328 (23F) Cbp	-AVASLVMGSVVHATEKEVTTQVATSSNRANKSQTEHKAALQ-						-VDEYIKNKL-		Q-L	53	
SPB365 (23F) Cbp	-AVASLVMGSVVHATEKEVTTQVATSSNRANKSQTEHKAALQ-						-VDEYIKNKL-		Q-L	53	
SPB105 (6B) CbpA	AVASLVMGSVVHATEKEVTTQVATSSNRANKSQTEHKAALQ-						-DEYIKIMI-		Q-L	54	
SPSJ12 (19A) CbpA	-AVASLVMGSVVHATEKEVTTQVATSSNRANKSQTEHKAALQ-						-VDEYIKNML-		Q-L	53	
SPB331 (14) CbpA	--VASLVMGSVVHATEKEVTTQVATSSNRANKSQTEHKAALQ-						-VDEYIKNKL-		Q-L	52	
SPR332 (5V) CbpA	CTAVASLVMGSVVHATEKEVTTQVATSSNRANKSQTEHKAALQ-						-DEYINRM-		Q-L	51	
ATCC2 CbpA tru	AVASLVMGSVVHATEKEVTTQVPTYSNPK--TEHKAALQV-						-VDEYIKNMLREIQ-		Q-L	55	
R6X(2) CbpA tru	--ENGSTGATSSNPK--TEHKAALQV-						-VDEYIKNMLREIQ-		Q-L	40	
SPSJ9 (14) CbpA	Y-TASLFLGGVVRAE---GVRSGNNSTVTSQQDILSKKYADE-						-VKSHEKTLSEKIVJNL-		54		
ATCC68 CbpA tru	--ASLFLOGGVVRAE---GVRSGNNSTVTSQQDILSKKYADE-						-VKSHEKTLSEKIVJNL-		52		
Nttype4 CbpA tru	CIVASLVMGSVVHATENEGATQVPTSSNRANESQAEGEQPKLDSERDKARKEVEVVKCIVGESYAKS								70		
ATCC4 CbpA tru	-IVASLVMGSVVHATENEGATQVPTSSNRANESQAEGEQPKLDSERDKARKEVEVVKCIVGESYAKS								69		
DRRKGTQVALNTKLSAIKITEYLGLSVLEKSEAEELPSEIKA--KLDAAFEQFKKUL-											
80	90	100	110	120	130	140					
SPB328 (23F) Cbp	DRRKGTQVALNTKLSAIKITEYLGLSVLEKSEAEELPSEIKA-						-KLDAAFEQFKKUL-			111	
SPB365 (23F) Cbp	DRRKGTQVALNTKLGTQVINTTGLSVLEKSEAEELPSEIKA-						-KLDAAFEQFKKUL-			111	
SPB105 (6B) CbpA	DRRKGTQVALNTKLSAIKITEYLGLSVLEKSEAEELPSEIKA--						-KLDAAFEQFKKUL-			113	
SPSJ12 (19A) CbpA	DRRKGTQVALNTKLGTQVINTTGLSVLEKSEAEELPSEIKA-						-KLTAAFFQFKKUL-			111	
SPB331 (14) CbpA	DRRKGTQVALNTKLGTQVINTTGLSVLEKSEAEELPSEIKA-						-KLDAAFEQFKKUL-			110	
SPR332 (5V) CbpA	DRRKGTQVALNTKLGTQVINTTGLSVLEKSEAEELPSEIKA--						-ELDAAFQFKKUL-			106	
ATCC2 CbpA tru	DRRKGTQVALNTKLGTQVINTTGLSVLEKSEAEELPSEIKA--						-ELDAAFQFKKUL-			110	
R6X(2) CbpA tru	DRRKGTQVALNTKLGTQVINTTGLSVLEKSEAEELPSEIKA--						-ELDAAFQFKKUL-			98	
SPSJ9 (14) CbpA	DRRKGTQVALNTKLGTQVINTTGLSVLEKSEAEELPSEIKA--						-ELDAAFQFKKUL-			112	
ATCC68 CbpA tru	DRRKGTQVALNTKLGTQVINTTGLSVLEKSEAEELPSEIKA--						-ELDAAFQFKKUL-			113	
Nttype4 CbpA tru	TKRKGETTVALVNELNQNEYN--KIVESTSESQLILAKMERSKVKDEVASKFKEDOSSSSSSDSSTK									136	
ATCC4 CbpA tru	TKRKGETTVALVNELNQNEYN--KIVESTSESQLILAKMERSKVKDEVASKFKEDOSSSSSSDSSTK									137	
-PTEPGKVAEAKKVEEAKKK-										-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV	
150	160	170	180	190	200	210					
SPB328 (23F) Cbp	-PTEPGKVAEAKKVEEAKKK-						-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			162	
SPB365 (23F) Cbp	-PTEPGKVAEAKKVEEAKKK-						-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			162	
SPB105 (6B) CbpA	-TK--KTVAAEAKKVEEAKKK-						-AKAQEEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			161	
SPSJ12 (19A) CbpA	-KPKKVAEAKKVAEAKKK-						-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			160	
SPB331 (14) CbpA	-PTEPGKVAEAKKVEEAKKK-						-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			161	
SPR332 (5V) CbpA	-PTEPGKVAEAKKVEEAKKK-						-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			164	
ATCC2 CbpA tru	-KLGKVVAEAKKVAEAKKK-						-AKAQEEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			159	
R6X(2) CbpA tru	-KPGEVVAEAKKVAEAKKK-						-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			147	
SPSJ9 (14) CbpA	-PTEPGKVAEAKKVAEAKKK-						-AKAQEEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			163	
ATCC68 CbpA tru	-STEPEKVAEAKKVAEAKKK-						-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			164	
Nttype4 CbpA tru	PEASDIAKPNKPTEPGEKVAEAKKVEEAKKK-						-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			201	
ATCC4 CbpA tru	PEASDIAKPNKPTEPGEKVAEAKKVEEAKKK-						-ADQKEEDRRNYPITTYKTLLELIAESDVEV			200	

## 도면 2b

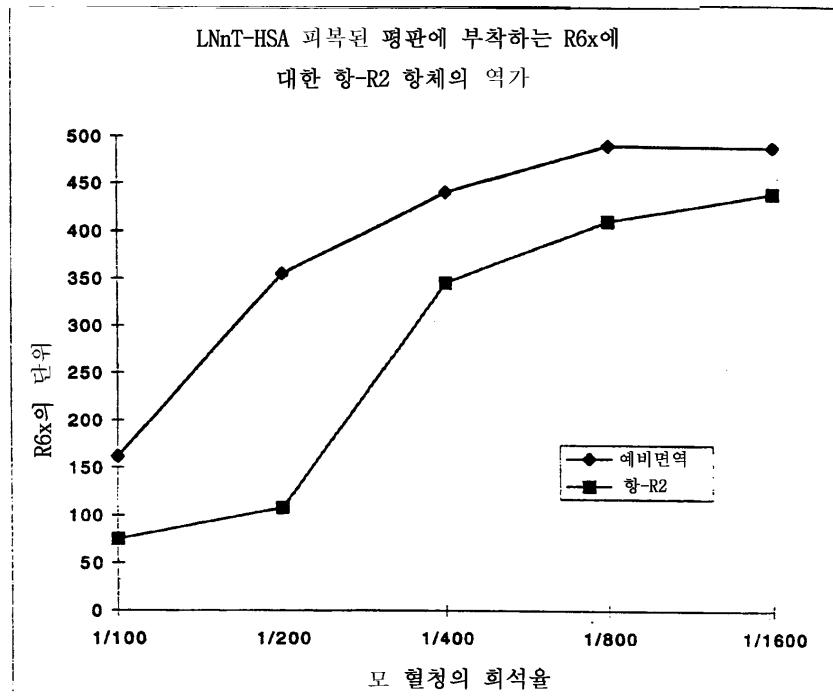
도면3



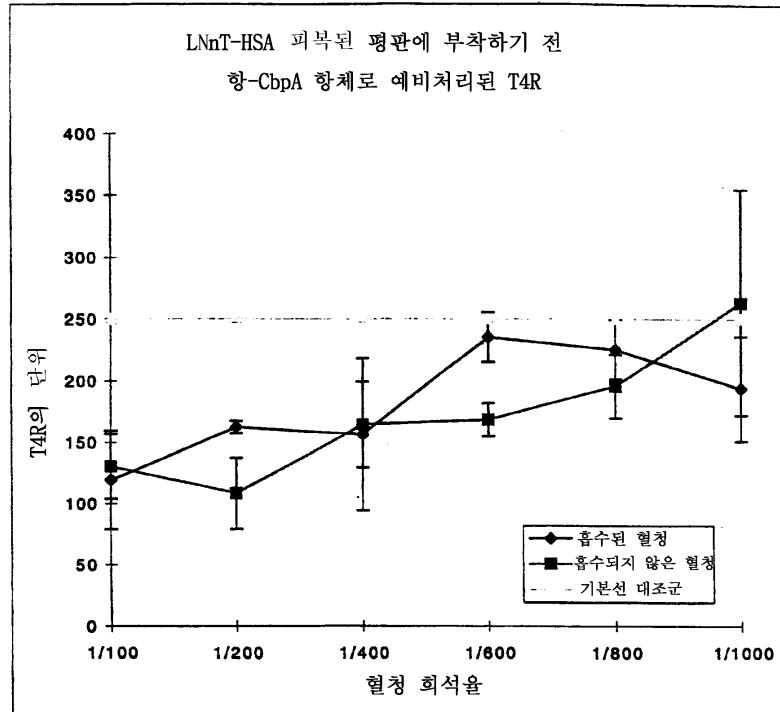
도면4



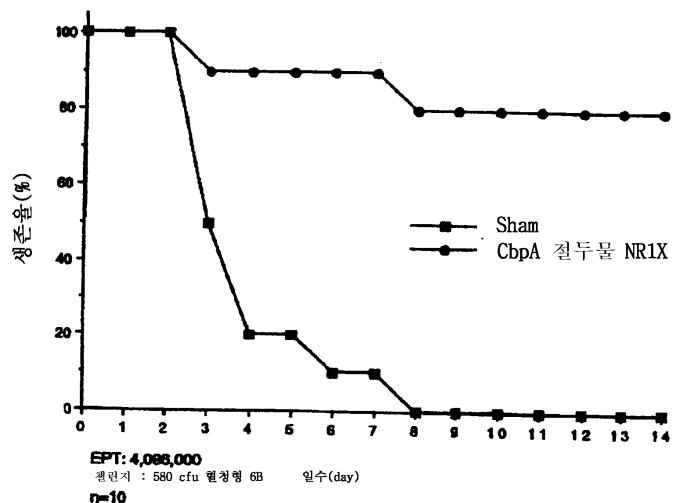
도면5



도면6



도면7

능동 보호

## 서열목록

서열목록 전자파일 첨부