



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0107121
(43) 공개일자 2012년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/09 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7019061

(22) 출원일자(국제) 2010년12월20일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2012년07월19일

(86) 국제출원번호 PCT/CA2010/001977

(87) 국제공개번호 WO 2011/075823

국제공개일자 2011년06월30일

(30) 우선권주장

61/289,236 2009년12월22일 미국(US)

61/325,660 2010년04월19일 미국(US)

(71) 출원인

사노피 파스퇴르 리미티드

캐나다 엠2알 3티4 온타리오 토론토 스티일스 에버뉴 웨스트 1755

(72) 발명자

갈리샹 스콧

캐나다 엘7피 오이1 온타리오 벌링턴 브린 마레인 1125

하퍼 케빈

캐나다 엘7시 1엔3 온타리오 첼트넘 크레디트뷰로드 14411

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

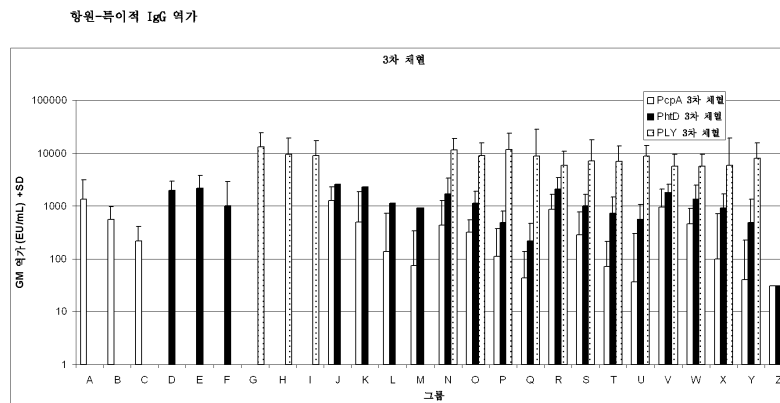
전체 청구항 수 : 총 80 항

(54) 발명의 명칭 면역원성 조성물

(57) 요약

본 명세서의 교시내용은 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니아 PcpA 폴리펩타이드 및 적어도 한 가지의 추가 항원(예를 들어, 폴리히스티딘 3중 계열의 단백질로 이루어진 그룹에서 선택된 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니아 폴리펩타이드(예를 들어, PhtD))를 포함하는 면역원성 조성물 및 이들 조성물을 스트렙토코커스 뉴모니아에 의해 발생된 질환을 예방 및 치료하는데 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도14



(72) 발명자

르쥬틱 벨마

캐나다 엠2엔 7시2 온타리오 토론토 3 에버슨 드
라이브 유닛 124

오취스 마르티나 오취스

프랑스 69280 마르시 레투와르 아브뉴 마르셀 메
리유 1541

모어필드 게리

미국 펜실베이니아주 18064 내저러스 이브닝 선
알디 2213

아우사르 페르난도

캐나다 엘6비1엘7 온타리오 마컴 개스 램프 레인
250

살라 마리-대니엘

캐나다 엠4지2알1 온타리오 토론토 브로드웨이 아
베 655

특허청구의 범위

청구항 1

분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에(*S. pneumoniae*) PcpA 폴리펩타이드 및 폴리히스티딘 3중 계열(polyhistidine triad family)의 단백질로 이루어진 그룹에서 선택된 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 PcpA 폴리펩타이드 및 폴리히스티딘 3중 계열의 단백질로 이루어진 그룹에서 선택된 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드를 포함하는, 스트렙토코커스 뉴모니에 감염에 의해 발생하는 질환에 대해 대상자에게 방어를 제공하는 면역원성 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물이 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 PcpA 폴리펩타이드 및 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 PhtD 폴리펩타이드 또는 이의 융합 단백질을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 PhtD 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는, 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 PhtD 폴리펩타이드가 재조합적으로 제조된 것인, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 재조합적으로 제조된 PhtD 폴리펩타이드가 시그널 펩타이드 서열이 결실된 N-말단 절두형인, 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 PhtD 단백질이 서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 7항중 어느 한 항에 있어서, 상기 PcpA 폴리펩타이드가 재조합적으로 제조된 것인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 PcpA 폴리펩타이드가 시그널 펩타이드 서열이 결실된 N-말단 절두형인, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 PcpA 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 PcpA 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 서열번호 7의 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는, 조성물.

청구항 12

서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 분리된 폴리펩타이드 및 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 분리된 폴리펩타이드를 포함하는

면역원성 조성물.

청구항 13

서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 분리된 폴리펩타이드 및 서열번호 7의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 분리된 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 14

서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 분리된 폴리펩타이드 및 서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 분리된 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 15

제3항에 있어서, 약 5 내지 100 μg /용량의 PhtD 폴리펩타이드 및 약 5 내지 100 μg /용량의 PcpA 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 뉴모라이신을 포함하는, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 뉴모라이신이 해독된 것인, 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 해독된 뉴모라이신이 야생형 서열의 65, 293 및 428 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 돌연변이 뉴모라이신 단백질인, 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 3개 아미노산 치환이 $T_{65} \rightarrow C$, $G_{293} \rightarrow C$ 및 $C_{428} \rightarrow A$ 를 포함하는, 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 조성물이 약 5 내지 100 μg /용량의 상기 뉴모라이신을 포함하는, 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 항원보강제(adjuvant)를 포함하는, 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 항원보강제가 수산화알루미늄, 알루미늄 포스페이트 및 포스페이트 처리된 수산화알루미늄으로 이루어진 그룹에서 선택되는, 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물 및 동시 투여 또는 연속 투여를 위한 항원보강제를 포함하는 백신 키트.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 백신.

청구항 25

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 약제학적으로 허용되는 부형제와 혼합하는 단계를 포함하는, 제24항의 백신을 제조하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물 또는 제24항에 따른 백신의 면역학적 유효량을 사람 대상자에게 투여하는 것을 포함하는, 스트렙토코커스 뉴모니에 감염에 의해 발생하는 질환에 대해 사람 대상자를 면역화하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 사람 대상자가 유아이고 상기 질환이 수막염 및/또는 균혈증인, 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 사람 대상자가 유아이고 상기 질환이 폐렴 및/또는 결막염인, 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 사람 대상자가 유아이고 상기 질환이 중이염인, 방법.

청구항 30

제26항에 있어서, 상기 질환이 폐렴 또는 침습성 폐렴구균성 질환인, 방법.

청구항 31

스트렙토코커스 뉴모니에 감염에 의해 발생하는 상기 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제22항의 면역원성 조성물의 용도.

청구항 32

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물 또는 제24항에 따른 백신의 면역학적 유효량을 포유동물에 투여하는 것을 포함하여 스트렙토코커스 뉴모니에에 대하여 포유동물에게 방어적 면역반응을 유도하는 방법.

청구항 33

대상자에게 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 면역학적 유효량을 투여하여 상기 대상자에게서 스트렙토코커스 뉴모니에 감염에 의해 발생하는 질환의 중증도를 예방 또는 감소시키기 위한 의약의 제조에서 상기 조성물의 용도.

청구항 34

제2항에 있어서, 스트렙토코커스 뉴모니에 감염에 의해 발생하는 질환에 대해 방어를 제공하는 적어도 한 가지의 추가적인 항원성 성분을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 35

제1항에 있어서, 상기 분리된 폴리펩타이드들 각각이 상기 폴리펩타이드의 개별 면역원성을 저해하지 않는 양으로 존재하는, 조성물.

청구항 36

포유동물에서 면역반응을 유도하는 의약의 제조에서의 제1항에 따른 조성물의 용도.

청구항 37

포유동물에서 폐렴구균성 감염에 대해 방어하는 면역반응을 유도하는 의약의 제조에서의 제1항에 따른 조성물의 용도.

청구항 38

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 유효량을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 면역반응을 유도하는 방법.

청구항 39

서열번호 1과 적어도 80%의 동일성을 갖는 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 항체 및 서열번호 2와 적어도 80%의 동일성을 갖는 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 항체를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 스트렙토코커스 세균종에 의한 포유동물의 감염을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 40

서열번호 5와 적어도 80%의 동일성을 갖는 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 항체 및 서열번호 7과 적어도 80%의 동일성을 갖는 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 항체를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 스트렙토코커스 세균종에 의한 포유동물의 감염을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 41

분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 PcpA 폴리펩타이드, 적어도 한 가지의 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드 및 수중유 항원보강제 에멀전을 포함하는 면역원성 조성물로서,

상기 수중유 항원보강제 에멀전은 적어도 스쿠알렌, 수성 용매, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 친수성 비이온성 계면활성제 및 소수성 비이온성 계면활성제를 포함하며, 상기 에멀전은 열가역적이고, 유적(oil drop) 집단의 용적의 90%가 200 nm 미만의 크기를 갖는, 면역원성 조성물.

청구항 42

분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 PcpA 폴리펩타이드 및 적어도 한 가지의 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드 및 수중유 항원보강제 에멀전을 포함하는 스트렙토코커스 뉴모니에 의해 발생하는 질환에 대해 대상자에게 방어를 제공하는 면역원성 조성물로서,

상기 수중유 항원보강제 에멀전은 적어도 스쿠알렌, 수성 용매, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 친수성 비이온성 계면활성제 및 소수성 비이온성 계면활성제를 포함하며, 상기 에멀전은 열가역적이고, 유적 집단의 용적의 90%가 200 nm 미만의 크기를 갖는, 스트렙토코커스 뉴모니에 의해 발생하는 질환에 대해 대상자에게 방어를 제공하는 면역원성 조성물.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 뉴모라이신을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 뉴모라이신이 해독된 것인, 면역원성 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 뉴모라이신이 유전학적으로 해독된 것인, 면역원성 조성물.

청구항 46

분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 PhtD 폴리펩타이드, 적어도 한 가지의 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드 및 수중유 항원보강제 에멀전을 포함하는 면역원성 조성물로서,

상기 수중유 항원보강제 에멀전은 적어도 스쿠알렌, 수성 용매, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 친수성 비이온성 계면활성제 및 소수성 비이온성 계면활성제를 포함하며, 상기 에멀전은 열가역적이고, 유적 집단의 용적의 90%가 200 nm 미만의 크기를 갖는, 면역원성 조성물.

청구항 47

분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 PhtD 폴리펩타이드, 적어도 한 가지의 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드 및 수중유 항원보강제 에멀전을 포함하는 스트렙토코커스 뉴모니에 의해 발생하는 질환

환에 대해 대상자에게 방어를 제공하는 면역원성 조성물로서,

상기 수중유 항원보강제 에멀전은 적어도 스쿠알렌, 수성 용매, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 친수성 비이온성 계면활성제 및 소수성 비이온성 계면활성제를 포함하며, 상기 에멀전은 열가역적이고, 유적 집단의 용적의 90%가 200 nm 미만의 크기를 갖는, 스트렙토코커스 뉴모니아에 의해 발생하는 질환에 대해 대상자에게 방어를 제공하는 면역원성 조성물.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 뉴모라이신을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 뉴모라이신이 해독된 것인, 면역원성 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 뉴모라이신이 유전학적으로 해독된 것인, 면역원성 조성물.

청구항 51

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로, 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니아 PhtD 폴리펩타이드를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 52

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로, 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니아 PcpA 폴리펩타이드를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 53

제3항에 있어서, 상기 조성물이 PhtD 폴리펩타이드 및 PcpA 폴리펩타이드 각각을 약 1 μg /용량 내지 약 10 μg /용량으로 포함하는, 조성물.

청구항 54

제3항에 있어서, 상기 조성물이 PhtD 폴리펩타이드 및 PcpA 폴리펩타이드 각각을 약 10 μg /용량 내지 약 100 μg /용량으로 포함하는, 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 조성물이 PhtD 폴리펩타이드 및 PcpA 폴리펩타이드 각각을 약 10 μg /용량으로 포함하는, 조성물.

청구항 56

제54항에 있어서, 상기 조성물이 PhtD 폴리펩타이드 및 PcpA 폴리펩타이드 각각을 약 25 μg /용량으로 포함하는, 조성물.

청구항 57

제54항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 뉴모라이신을 약 10 μg /용량 내지 약 100 μg /용량으로 포함하는, 조성물.

청구항 58

제55항 또는 제56항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 뉴모라이신을 포함하는, 조성물.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 뉴모라이신이 야생형 서열의 65, 293 및 428번 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 돌연변이 뉴모라이신 단백질인, 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 3개 아미노산 치환이 $T_{65} \rightarrow C$, $G_{293} \rightarrow C$ 및 $C_{428} \rightarrow A$ 를 포함하는, 조성물.

청구항 61

제54항에 있어서, 상기 조성물이 PhtD 폴리펩타이드 및 PcpA 폴리펩타이드 각각을 약 50 μg /용량으로 포함하는, 조성물.

청구항 62

면역원성 PcpA 폴리펩타이드 및 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물로서, 상기 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제는 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 없는 조성물에 비하여 면역원성 PcpA 폴리펩타이드의 열 안정성을 증가시키는, 조성물.

청구항 63

면역원성 PhtX 폴리펩타이드 및 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물로서, 상기 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제는 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 없는 조성물에 비하여 면역원성 PhtX 폴리펩타이드의 열 안정성을 증가시키는, 조성물.

청구항 64

해독된 뉴모라이신 폴리펩타이드 및 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물로서, 상기 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제는 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 없는 조성물에 비하여 면역원성 해독된 뉴모라이신 폴리펩타이드의 열 안정성을 증가시키는, 조성물.

청구항 65

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가, 상기 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 없는 조성물에 비하여 폴리펩타이드의 열 안정성을 0.5°C 이상까지 증가시키는, 조성물.

청구항 66

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 항원보강제를 포함하는, 조성물.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 항원보강제가 알루미늄 화합물을 포함하는, 조성물.

청구항 68

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 액체 형태인, 조성물.

청구항 69

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 무수 분말 형태이거나, 동결건조, 분무건조 또는 발포건조된 것인, 조성물.

청구항 70

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가, 완충제, 등장화제, 단순탄수화물, 당, 탄수화물 중합체, 아미노산, 올리고펩타이드, 폴리아미노산, 다가 알코올 및 이의 에테르, 세정제, 지질, 계면활성제, 항산화제, 염 또는 이들의 배합물로 이루어진 그룹에서 선택되는, 조성물.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 완충제가 트리스-HCL, NaCl 함유 트리스-HCL 및 HEPES로 이루어진 그룹에서 선택되고 5 내지 100 mM의 농도인, 조성물.

청구항 72

제70항에 있어서, 상기 당이 소르비톨, 트레할로즈 및 수크로스로부터 선택되고 1 내지 30%의 농도인, 조성물.

청구항 73

제70항에 있어서, 상기 한 가지 이상의 부형제가 표 11에 수록된 한 가지 이상의 부형제를 포함하는, 조성물.

청구항 74

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 소르비톨을 포함하는, 조성물.

청구항 75

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 5 내지 100 μg /용량의 폴리펩타이드 및 2 내지 20% 소르비톨, pH 5.5 내지 8.5를 포함하는, 조성물.

청구항 76

면역원성 PcpA 폴리펩타이드 및 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물의 제조 방법으로서, 상기 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제는 상기 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 없는 조성물에 비하여 PcpA 폴리펩타이드의 열 안정성을 증가시키며, 상기 방법은 면역원성 PcpA 폴리펩타이드를 제공하고 상기 폴리펩타이드를 상기 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제와 혼합하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 77

제62항 내지 제75항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 대상자에게 투여하는 것을 포함하는, 대상자에게 스트렙토코커스 뉴모니아에 대한 면역반응을 유도하는 방법.

청구항 78

제62항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 면역원성 PhtX 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 조성물이 면역원성 PhtD 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.

청구항 80

제62항, 제63항, 제78항 또는 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 해독된 뉴모라이신을 포함하는, 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 발명은 2009년 12월 22일에 출원된 미국특허출원 제61/289,236호 및 2010년 4월 19일에 출원된 미국특허출원 제61/325,660호에 대해 우선권을 주장하며, 이들 미국특허원의 전문은 본원에 참고로 인용된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 면역학 분야, 특히 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 항원 및 이들의 면역화 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 스트렙토코커스 뉴모니아(폐렴구균)는 건강한 아동 및 성인의 상기도(upper respiratory tract)에서 흔히 발

견되는 아주 흔한 사람 병원체이다. 이들 세균은 폐, 중추신경계(CNS), 중이 및 비도를 포함한 몇 가지 기관을 감염시켜 예를 들어 부비강 감염, 중이염, 기관지염, 폐렴, 수막염 및 균혈증(폐혈증)과 같은 부류의 질환(즉, 증후성 감염)을 일으킬 수 있다. 이와 같은 폐렴구균성 질환중 가장 심각한 형태인 폐렴구균성 수막염은 항생제 치료에도 불구하고 상당한 사망률 및 이환률과 연관이 있다(참조: Quagliarello et al., (1992) N. Engl. J. Med. 327:864-872). 특히 연령이 2살 미만인 아동과 노인은 증후성 폐렴구균성 감염에 민감하다.

[0006] 현재 폐렴구균 백신은 두 종류가 사용되고 있다. 한 가지는 23 가지 유형의 스트렙토코커스 뉴모니에로부터 유래되는 헤파다당류를 포함하며, 이들은 함께 폐렴구균성 감염의 원인 균주중 약 90%의 헤파 유형을 차지한다. 그러나, 이 백신은 2세 이전에 다당류 항원에 대해 양호한 면역반응을 유발하지 않기때문에 폐렴구균성 감염에 대해 민감성이 고조된 연령 집단인 어린 아동에게 상당한 면역성을 나타내지 않는다. 성인에게 이 백신은 균혈증성 폐렴에 대해 약 60% 효능을 보이는 것으로 알려져있으나 연령 또는 기초질환으로 인해 폐렴구균성 감염에 더 높은 위험으로 처해 있는 성인에게 효능은 더 낮다(참조: Fedson, and Musher, 2004, "Pneumococcal Polysaccharide Vaccine", pp. 529-588; In Vaccines. S.A. Plotikin and W.A. Orenstein(eds.), W.B. Saunders and Co., Philadelphia, PA; Shapiro et. al., N. Engl. J. Med. 325:1453-1460(1991)).

[0007] 다른 또 한 가지 사용되는 유형은 접합 백신이다. 단백질 담체에 결합된 혈청형 특이적 헤파(capsular) 다당류 항원을 포함하는 이들 백신은 혈청형-특이적 방어를 나타낸다(9). 현재 사용되고 있는 것은 7-가 및 13-가 접합 백신이다. 7-가는 7종 다당류 항원(혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F의 헤파으로부터 유도됨)을 포함하고 13-가는 13종 다당류 항원(7-가의 항원에 추가적으로 혈청형 1, 3, 5, 6A, 7F 및 19A의 헤파으로부터 유도됨)을 포함한다. 또한, 9-가 및 11-가 접합 백신이 개발되었으며, 각각은 7-가에 포함되지 않는 혈청형에 특이적인 다당류(즉, 9-가의 경우 혈청형 1 및 5이고 11-가의 경우 혈청형 3 및 7F)를 포함한다.

[0008] 접합 백신의 제조는 단백질 담체에 결합되는 각각의 상이한 7종(또는 9종 또는 11종)의 다당류를 제조해야 하기때문에 복잡하고 많은 비용이 든다. 또한 이와 같은 백신은 접합 백신에 의해 방어되지 않는 스트렙토코커스 뉴모니에의 혈청형이 아주 흔히 존재하는 후진국에서 감염을 퇴치하기 위한 방법으로 좋은 것은 아니다(참조: Di Fabio et al., Pediatr. Infect. Dis. J. 20:959-967(2001); Mulholland, Trop. Med. Int. Health 10:497-500(2005)). 또한, 7-가 접합 백신의 사용은 이 백신에 포함된 7종 다당류로 나타나지 않는 헤파 유형의 균주에 의한 집락형성 및 질환을 증가시키는 것으로 밝혀졌다(참조: Bogaert et al., Lancet Infect. Dis. 4:144-154(2004); Eskola et al., N. Engl. J. Med. 344-403-409(2001); Mbelle et al., J. Infect. Dis. 180: 1171-1176(1999)).

[0009] 현재 사용되고 있는 다당류 기본 백신의 대안으로서 많은 스트렙토코커스 뉴모니에 항원이 스트렙토코커스 뉴모니에에 대한 단백질 기본 백신의 가능한 후보물질로서 제시되어 왔다. 그러나, 현재까지 그러한 백신이 상업적으로 시판되고 있는 것은 없다. 따라서, 스트렙토코커스 뉴모니에의 효과적인 치료법이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0010] 요약

[0011] 스트렙토코커스 감염(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니에)에 대해 면역 반응을 유도하는 면역원성 조성물 및 방법이 기술된다. 더욱 자세하게는, 본 명세서의 교시내용은 면역원성 PcpA 폴리펩타이드 및/또는 폴리히스티딘 3중 계열(polyhistidine triad family)(PhtX: PhtA, B, D, E)의 면역원성 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물, 이의 제조 방법 및 그의 용도에 관한 것이다. 또한, 면역원성 PcpA 및 PhtX 폴리펩타이드(예를 들어, PhtD)(PcpA 및 PhtD의 단편 및 각각의 변이체를 포함) 및 이들 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산이 제공된다. 또한, 면역원성 PcpA 폴리펩타이드 및/또는 폴리히스티딘 3중 계열(PhtX: PhtA, B, D, E)의 면역원성 폴리펩타이드 및/또는 해독된 뉴모라이신을 포함한 면역원성 조성물이 제공된다. 또한, 스트렙토코커스 폴리펩타이드에 대한 항체를 제조하는 방법 및 이와 같은 항체를 사용하여 스트렙토코커스 감염(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니에 감염)을 치료 및/또는 예방하는 방법이 제공된다.

[0012] 또한, 한 가지 이상의 면역원성 PcpA 폴리펩타이드, PhtX 폴리펩타이드 및/또는 해독된 뉴모라이신 단백질을 포함하는 조성물, 예를 들어 약제학적 조성물(예를 들어, 백신 조성물)이 제공된다. 임의로 조성물은 항원보강제(adjuvant)를 포함할 수 있다. 또한 조성물은 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 함유되지 않은 조성물에 비하여 폴리펩타이드/단백질의 열안정성을 증가시켜 주는 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되

는 부형제를 포함할 수 있다. 한 가지 예로서, 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제는 이를 함유하지 않은 조성물에 비하여 PcpA, PhtX 및/또는 해독된 뉴모라이신 단백질의 열안정성을 0.5℃ 이상까지 증가시켜 준다. 조성물은 액체 형태, 무수 분말 형태, 동결건조, 분무건조 및/또는 무수 발포제 형태일 수 있다. 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제는 예를 들어 완충제, 등장화제, 단순탄수화물, 당, 탄수화물 중합체, 아미노산, 올리고펩타이드, 폴리아미노산, 다가 알코올 및 이의 에테르, 세정제, 지질, 계면활성제, 항산화제, 염, 사람 혈청 알부민, 젤라틴, 포름알데하이드 또는 이의 배합물로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있다.

[0013] 또한, 본원에 기술된 조성물을 대상자에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상자에게 스트렙토코커스 뉴모니아에 대한 면역반응을 유도하는 방법이 제공된다. 또한, 대상자에게 스트렙토코커스 뉴모니아에 대한 면역반응 유도하거나 이러한 목적에 사용하기 위한 의약을 제조하는데 사용하기 위한 본 발명의 조성물의 용도가 제공된다.

[0014] 본 발명은 몇 가지 이점을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 대상자에게 투여하는 것은 스트렙토코커스 뉴모니아의 많은 균주에 의한 감염에 대하여 면역반응을 유도한다. 또한, 본 발명의 다가 조성물은 투여되었을 경우 항원 간섭을 일으키지 않고 부가 효과를 제공할 수 있는 스트렙토코커스 뉴모니아의 면역원성 폴리펩타이드의 특정 조합을 포함한다. 본원에 기술된 부형제의 사용은 조성물내에서의 폴리펩타이드/단백질의 열안정성을 증가시켜줄 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 특징 및 장점들은 하기의 상세한 설명, 도면 및 청구범위로부터 명료하게 이해될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 본 발명은 도면에 대한 참조와 하기 설명으로부터 이해될 것이다.

도 1은 PcpA와 PhtD의 여러 용량으로 면역화된 마우스의 혈청 항-단백질 IgG 항체 역가를 보여준다(실시예 2). 이 연구에서, 제조한 PhtD와 PcpA는 A100H 항원보강제와 1가 또는 2가 제형으로서 배합되었다. Balb/c 마우스는 3주 간격으로 3회 피하로 면역화되었고 채혈은 일차 면역화 이전 및 일차, 이차 및 3차 면역화 후에 이루어졌다. IgG 역가는 종말점 ELISA에 의해 평가되었다. PcpA와 PhtD 단백질이 접종된 모든 마우스는 면역화 후 항원-특이적 항체를 생성하였다.

도 2a 내지 2d는 50 µg 항원/용량으로서 PcpA 및/또는 PhtD로 면역화된 랫트의 혈청 항-단백질 IgG 항체 역가를 보여준다. 이 연구에서, 랫트는 0일, 21일째 및 42일째에 50 µg 항원/용량으로서 트리스 완충 염수(10 mM 트리스 pH 7.4, 150 mM NaCl)의 대조군, 수산화알루미늄 항원보강제-첨가된 2가 PhtD와 PcpA, 무항원보강제의 2가 PhtD와 PcpA 또는 수산화알루미늄 항원보강제-첨가된 PcpA로 면역화되었다. 시험전의 혈청, 44일째 및 57일째의 혈액이 ELISA에 의해 PhtD와 PcpA 특이적 IgG 항체에 대해 시험되었다.

도 3은 면역화된 마우스의 각 그룹의 생존율을 보여준다(실시예 5). 이 연구에서, 제조한 PhtD와 PcpA의 2가 제형이 비내 시험 모델에 의해 평가되었다. 면역화된 동물은 스트렙토코커스 뉴모니아 균주(MD, 14453 또는 941192)의 치사 용량으로 시험되었다.

도 4a는 각 그룹에 대해 종말점 회색 ELISA에 의해 측정된 총 항원-특이적 IgG 역가 및 기하평균 역가(+/-SD)를 보여준다. 도 4b는 정량 ELISA에 의해 측정된 총 항원-특이적 역가를 보여준다. 이 연구(실시예 7)에서 PhtD와 PcpA의 2가 조성물이 제조되었고(PhtD 및 PcpA의 각각에 대해 두 가지 상이한 로트를 사용) 인산염 처리된 A100H(2 mM)과 함께 제형되었다. 6 마리 암컷 CBA/j 마우스의 그룹이 해당 제형으로 3주 간격으로 3회 근육내 또는 피하로 면역화되었다. 마우스는 3차(최종) 채혈 후 스트렙토코커스 뉴모니아 균주 MD의 치사 용량으로 시험되었다.

도 5는 각 그룹의 생존율을 보여준다. 이 연구(실시예 6)에서, PhtD와 PcpA의 2가 조성물이 제조되었고(PhtD 및 PcpA의 각각에 대해 두 가지 상이한 로트를 사용) 인산염 처리된 A100H(2 mM)과 함께 제형되었다. 6 마리 암컷 CBA/j 마우스의 그룹이 해당 제형으로 3주 간격으로 3회 근육내 또는 피하로 면역화되었다. 마우스는 3차 면역화후 채혈 후 스트렙토코커스 뉴모니아 균주 MD의 치사 용량으로 시험되었다.

도 6은 Mn2+ 결실된 배지에서 성장된 여러 폐렴구균 균주에 대한 상응하는 토끼 항혈청이 세균 표면상의 PcpA 및 PhtD를 인지하는 것을 보여준다(실시예 9).

도 7은 균주 WU2의 세균 세포 표면상의 단백질(PcpA, PhtD)으로의 정제된 사람 항-PcpA 및 항-PhtD 항체의 결합을 보여준다(실시예 9).

도 8은 투여된 혈청의 로그 희석당 관찰된 생존율(%)을 보여준다(실시예 10).

도 9는 ELISA에 의해 측정된 총 IgG 역가의 요약을 보여준다(실시예 11).

도 10a 내지 10f는 1가 및 2가 제형(A10(OH) 또는 인산염 처리된 A10(OH)(PTH)와 함께 제형됨)에서 PcpA 및 PhtD의 안정성을 보여준다. 제형은 A10(OH) 또는 2 mM 인산염의 최종 농도를 함유한 PTH로 제조된 다음 여러 온도(즉, 5℃, 25℃, 37℃ 또는 45℃)에서 항온처리되었다. 그런 후 온전한 항원 농도가 RP-HPLC에 의해 측정되었다.

도 11은 ELISA에 의해 측정된 것으로 스트레스 조건하에서의 PhtD 및 PcpA의 안정성을 보여준다. 100 µg/mL의 2가 제형이 37℃에서 12주간 항온처리되었고 항원성이 ELISA에 의해 측정되었다.

도 12a는 RP-HPLC에 의해 측정된 것으로 10% 소르비톨(■), 10% 트레할로즈(●), 10% 수크로즈(△), TBS pH 9.0(◆) 및 TBS pH 7.4(○)의 존재하에서의 PcpA(3일 동안 50℃에 저장됨)의 안정성에 관한 부형제 영향의 연구를 보여준다.

도 12b는 정량 ELISA 샌드위치에 의해 측정된 것으로 10% 소르비톨, 10% 트레할로즈, 10% 수크로즈, TBS pH 9.0 및 TBS pH 7.4의 존재하에서의 PcpA(3일 동안 50℃에 저장됨)의 항원성에 관한 부형제 영향의 연구를 보여준다. 제형은 3일 동안 50℃에 저장되었다. 항원성은 각 제형에 대해 0일(백색 막대) 및 3일 동안 저장 후(흑색 막대) 측정되었다.

도 13은 항원보강제-첨가된 단백질의 물리적 안정성에 미치는 pH의 영향을 보여준다. PcpA(A), PhtD(B) 및 PlyD1(C)은 상이한 pH 값의 수산화알루미늄 또는 인산알루미늄으로 항원보강되었고 Tm 값은 형광 흔적의 유도체 분석에 의해 측정되었다.

도 14는 각 그룹에 대해 종말점 희석 ELISA에 의해 측정된 총 항원-특이적 IgG 역가 및 기하평균 역가(+/-SD)를 보여준다.

도 15a, 15b 및 15c는 ELISA에 의해 측정된 것으로 마우스에 투여된 항원 용량당 유도된 총 항원-특이적 IgG 역가를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 포유동물(예를 들어, 사람)에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 대해 면역반응을 유도하고 스트렙토코커스 뉴모니아에 의해 유발된 질환을 치료 및 예방하는 조성물 및 방법이 기술된다. 면역원성 PcpA 폴리펩타이드 및/또는 폴리히스티딘 3중 계열(PhtX: PhtA, PhtB, PhtD, PhtE)의 면역원성 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물 및 이의 제조 방법 및 용도가 제공된다. 조성물은 해독된 뉴모라이신 또는 이의 면역원성 단편을 포함할 수 있다. 방법은 한 가지 이상의 실질적으로 정제된 연쇄상구균(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니아) 폴리펩타이드, 이들 폴리펩타이드에 대한 항체 또는 이들의 배합물을 포함하는 면역원성 조성물의 투여(예를 들어, 피하 또는 근육내)를 포함하는 수동 및 능동 면역화 방법을 포함한다. 또한, 본 발명은 스트렙토코커스 종(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니아) 폴리펩타이드, 스트렙토코커스 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 이와 같은 조성물 제조 방법 및 스트렙토커스(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니아) 항체를 제조하는 방법을 포함한다. 이들 방법 및 조성물은 하기에 추가로 기술된다.
- [0018] 본 발명의 조성물은 1중, 2중, 3중 또는 그 이상의 면역원성 폴리펩타이드를 포함한다. 조성물은 예를 들어 PcpA의 면역원성 폴리펩타이드; 폴리히스티딘 3중 계열 단백질(예를 들어, PhtA, PhtB, PhtD 및 PhtE, 본원에서 PhtX 단백질이라고 한다)의 일원인 면역원성 폴리펩타이드; 해독된 뉴모라이신 폴리펩타이드를 개별적으로 또는 조합하여 포함할 수 있다. 이들 폴리펩타이드의 면역원성 단편 및 융합체가 또한 조성물에 포함될 수 있다(예를 들어, PhtB와 PhtE의 융합체). 이들 면역원성 폴리펩타이드는 임의로 페렴구균 당류 또는 다른 페렴구균 폴리펩타이드와 배합하여 사용할 수 있다.
- [0019] 한 가지 복합-성분 예로서, 면역원성 조성물은 면역원성 PcpA 폴리펩타이드와 한 가지 이상의 면역원성 PhtX 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 조성물의 바람직한 양태는 면역원성 PhtD 폴리펩타이드와 면역원성 PcpA 폴리펩타이드를 포함한다. 다른 예로서, 조성물은 면역원성 PcpA 폴리펩타이드, 면역원성 PhtX 폴리펩타이드(예를 들어, PhtD) 및 해독된 뉴모라이신을 포함한다. 면역원성 조성물의 특정 양태(예를 들어, 2가 및 3가 형태)가 본원의 실시예에 기술된다.

- [0020] 폴리펩타이드
- [0021] 면역원성 PcpA 폴리펩타이드는 전장(full-length) PcpA 아미노산 서열(시그널 서열이 존재 또는 부재), 이의 단편 및 이의 변이체를 포함한다. 본원에 기술된 조성물에 사용하기에 적합한 PcpA 폴리펩타이드는 예를 들어 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 B6의 진뱅크 수탁번호 CAB04758, 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 TIGR4의 진뱅크 수탁번호 NP_ 및 스트렙토코커스 균주 R6의 진뱅크 수탁번호 NP_359536의 폴리펩타이드 및 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 14453의 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0022] 스트렙토코커스 뉴모니에 14453 계통에서 전장 PcpA의 아미노산 서열은 서열번호 2이다. 본 발명과 사용하는 데 바람직한 PcpA 폴리펩타이드는 서열번호 2 또는 서열번호 7과 50% 이상의 동일성(예를 들어, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5% 또는 그 이상)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명과 사용하는 데 바람직한 폴리펩타이드는 서열번호 2에서 적어도 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250개 또는 그 이상의 연속 아미노산의 단편을 포함한다. 바람직한 단편은 서열번호 2의 에피토프를 포함한다. 다른 바람직한 단편은 서열번호 2의 에피토프중 적어도 1개 이상을 포함하면서 서열번호 2의 N-말단에서 1개 이상의 아미노산(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25개 또는 그 이상) 및/또는 서열번호 2의 C-말단에서 1개 이상의 아미노산이 결실된 것이다. 추가로 바람직한 단편은 서열번호 2의 N-말단에서 시그널 서열이 결실된 것이다. 바람직한 PcpA 폴리펩타이드는 서열번호 7이다.
- [0023] 임의로, PcpA의 면역원성 폴리펩타이드는 하나 이상의 류신-풍부 영역(LRR)을 포함한다. 이들 LRR은 천연 PcpA에 존재하며 천연 LRR과 약 60 내지 약 99% 서열 동일성(예를 들어 80%, 85%, 90% 또는 95% 서열 동일성을 포함)을 갖는다. 성숙 PcpA 단백질(즉, 시그널 펩타이드가 결실된 단백질)의 LRR은 국제 특허 출원 공보 제WO 2008/022302호에 기술된 특정 서열(예를 들어, 국제 특허 출원 공보 제WO 2008/022302호의 서열번호 1, 2, 41 및 45)에서 발견될 수 있다.
- [0024] 임의로, PcpA의 면역원성 폴리펩타이드는 전형적으로 천연 성숙 PcpA 단백질에 존재하는 콜린 결합 도메인 고정 서열을 함유하지 않는다. 성숙 PcpA 단백질의 천연 콜린 결합 고정 서열은 국제 특허 출원 공보 제WO 2008/022302호에 서열번호 52로 기술되어 있다. 보다 자세하게는, 면역원성 폴리펩타이드는 1개 이상의 아미노산 치환 및 천연 PcpA와의 약 60% 내지 약 99% 서열 동일성 또는 예를 들어 80%, 85%, 90% 및 95% 서열 동일성 범위내의 임의의 서열 동일성을 갖는 천연 PcpA의 N-말단 영역을 포함한다. N-말단 영역은 1개 이상의 보존적 아미노산 치환의 존재 또는 부재하에서 및 시그널 서열의 존재 또는 부재하에서 서열번호 2(또는 국제 특허 출원 공보 제WO 2008/022302호의 서열번호 1, 2, 3, 4, 41 또는 45)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. N-말단 영역은 본원의 서열 목록에 기술된 서열번호 1 또는 7 또는 국제 특허 출원 공보 제WO 2008/022302호의 서열번호 1, 2, 3, 4 또는 41과 약 60 내지 약 99% 서열 동일성(또는 80% 내지 99% 동일성 범위내의 임의의 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0025] 서열번호 2 및 7의 면역원성 단편은 서열번호 2의 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 및 191개 아미노산 잔기 또는 아미노산 잔기 5개 내지 191개 사이의 임의의 갯수를 포함한다. PcpA의 면역원성 단편의 예는 국제 특허 출원 공보 제WO 2008/022302호에 기술되어 있다.
- [0026] 임의로, PcpA의 면역원성 폴리펩타이드는 LRR을 함유하지 않는다. LRR이 결실된 면역원성 폴리펩타이드의 예는 국제 특허 출원 공보 제WO 2008/022302호에 서열번호 29, 서열번호 30 및 서열번호 31에 기술되어 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물에 적합한 면역원성 PhtX 폴리펩타이드는 전장 PhtA, PhtB, PhtD 또는 PhtE 아미노산 서열(시그널 서열의 존재 또는 부재하에), 이의 면역원성 단편, 이의 변이체 및 이의 융합 단백질을 포함한다. 본원에 기술된 조성물에 사용하기에 적합한 PhtD 폴리펩타이드는 무엇보다도 예를 들면 진뱅크 수탁번호 AAK06760, YP816370 및 NP35851의 것을 포함한다. 스트렙토코커스 뉴모니에 14453 계통내 전장 PhtD의 아미노산 서열은 서열번호 1이다. 스트렙토코커스 뉴모니에 14453 계통으로부터 유도된 PhtD의 바람직한 폴리펩타이드는 서열번호 5이다.
- [0028] 본 발명의 PhtX 폴리펩타이드의 면역원성 단편은 상응하는 전장 성숙 아미노산 서열에 대해 특이적인 면역반응을 유도할 수 있다.
- [0029] 면역원성 PhtX(예를 들어, PhtD) 폴리펩타이드는 시그널 서열이 결함된 전장 단백질, 시그널 서열(예를 들어, N-말단의 20개 아미노산)이 제거된 성숙 전장 서열, PhtX의 변이체(천연 또는 기타(예를 들어, 합성적으로 유

도된 것)) 및 PhtX의 면역원성 단편(예를 들어, 천연 성숙 PhtX 단백질에 존재하는 적어도 15개 또는 20개 연속 아미노산을 포함한 단편)을 포함한다.

[0030] PhtD의 면역원성 단편의 예는 국제 특허 출원 공보 제WO 2009/012588호에 기술되어 있다.

[0031] 본 발명에 사용하는데 바람직한 PhtD 폴리펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 5와 50% 이상(예를 들어, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5% 또는 그 이상)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명에 사용하는데 바람직한 폴리펩타이드는 서열번호 1의 적어도 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250개 또는 그 이상의 연속 아미노산의 단편을 포함한다. 바람직한 단편은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 에피토프를 포함한다. 다른 바람직한 단편은 서열번호 1의 에피토프중 적어도 1개를 보유하면서 서열번호 1의 N-말단으로부터 1개 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25개 또는 그 이상)의 아미노산 및/또는 서열번호 1의 C-말단으로부터 1개 이상의 아미노산이 결실된 것이다. 추가로 바람직한 단편은 서열번호 1의 N-말단으로부터 시그널 서열이 결실된 것이다. 바람직한 PhtD 폴리펩타이드는 서열번호 5이다.

[0032] 뉴모라이신(Ply)은 섬모 박동의 억제 및 상피 세포사이의 조밀한 연결의 붕괴를 포함한 폐렴구균성 발병의 단계에 연루된 세포융해성-활성화 독소이다(참조: Hirst et al., Clinical and Experimental Immunology(2004)). 몇 가지 뉴모라이신이 알려져 있으며 해독 후 무엇보다도 예를 들면 진뱅크 수탁번호 Q04IN8, POC2J9, Q7ZAK5 및 ABO21381을 포함하여 본원에 기술된 조성물에 사용하는데 적합할 수 있다. 한 가지 양태로서, Ply는 서열번호 10에서 나타나는 아미노산 서열을 갖는다.

[0033] 본 발명에 사용하기 위한 면역원성 뉴모라이신 폴리펩타이드는 시그널 서열이 결합된 전장 단백질, 시그널 펩타이드가 제거된 성숙 전장 단백질, 뉴모라이신의 변이체(천연 또는 기타(예를 들어, 합성적으로 유도된 것)) 및 뉴모라이신의 면역원성 단편(예를 들어, 천연 성숙 뉴모라이신 단백질에 존재하는 적어도 15개 또는 20개 연속 아미노산을 포함한 단편)을 포함한다.

[0034] 본 발명의 면역원성 뉴모라이신 폴리펩타이드의 면역원성 변이체 및 단편은 상응하는 전장 성숙 아미노산 서열에 대해 특이적인 면역반응을 유도할 수 있다. 본 발명의 면역원성 뉴모라이신 폴리펩타이드는 해독된다. 즉, 이들은 스트렙토코커스 뉴모니에에 의해 생성되고 방출된 성숙 야생형 뉴모라이신 단백질과 비교하여 독성이 감소되었거나 무독성이다. 본 발명의 면역원성 뉴모라이신 폴리펩타이드는 예를 들어 화학적으로(예를 들어, 포름알데하이드 처리를 사용) 또는 유전적으로(예를 들어, 유전자 재조합에 의해 돌연변이 형태로 제조) 해독시킬 수 있다.

[0035] 본 발명에 사용하기에 바람직한 면역원성 해독된 뉴모라이신의 예는 국제 특허 출원 공보 제WO 2010/071986호에 기술되어 있다. 이 국제특허원에 기술된 바와 같이 해독된 뉴모라이신은 야생형 서열의 65번, 293번 및 428번 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 돌연변이 뉴모라이신 단백질일 수 있다. 바람직한 해독된 뉴모라이신 단백질의 경우 3개의 아미노산 치환은 T₆₅→C, G₂₉₃→C 및 C₄₂₈→A를 포함한다. 바람직한 면역원성 및 해독된 뉴모라이신 폴리펩타이드는 서열번호 9이다.

[0036] 본 발명에 사용기에 바람직한 뉴모라이신 폴리펩타이드는 서열번호 9 또는 서열번호 10과 50% 이상(예를 들어, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5% 또는 그 이상)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명에 사용하는데 바람직한 폴리펩타이드는 서열번호 9 또는 10에서 적어도 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250개 또는 그 이상의 연속 아미노산의 단편을 포함한다. 바람직한 단편은 서열번호 9 또는 서열번호 10의 에피토프를 포함한다. 다른 바람직한 단편은 서열번호 9 또는 10의 에피토프중 적어도 1개를 보유하면서 서열번호 9 또는 10의 N-말단으로부터 1개 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25개 또는 그 이상)의 아미노산 및/또는 서열번호 9 또는 10의 C-말단으로부터 1개 이상의 아미노산이 결실된 것이다. 추가로 바람직한 단편은 서열번호 10의 N-말단으로부터 시그널 서열이 결실된 것이다.

[0037] 본원에 기술된 PcpA, PhtX(예를 들어, PhtD) 및 뉴모라이신의 면역원성 폴리펩타이드는 변이체를 포함한다. 본원에 기술된 면역원성 폴리펩타이드의 그러한 변이체는 본 분야에 잘 알려진 방법에 의해 면역원성능에 대해 선별되고 1개 이상의 보존적 아미노산 변형을 포함할 수 있다. (PcpA, PhtD, 뉴모라이신의) 면역원성 폴리펩타이드의 변이체는 본원에 기술된 서열(예를 들어, 서열번호 2 또는 7(PcpA); 서열번호 1 또는 5(PhtD); 서열번호 9 또는 10(Ply))과 약 60% 내지 약 99% 서열 동일성(또는 60 내지 99%의 어떠한 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 아미노산 서열 변형은 치환, 삽입 또는 결실 변이를 포함한다. 치환, 결실, 삽입 또는 이의 임의의 조합은 변이체가 면역원성 폴리펩타이드이지만 하면 단일 변이체내에서 조합될 수 있다.

삽입은 아미노 및/또는 카복실 말단 융합뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 통상적으로 삽입은 아미노 또는 카복실 말단 융합의 삽입보다 작은 삽입일 것이다(예를 들어 약 1개 내지 4개 아미노산 잔기). 결실은 특징적으로 단백질 서열로부터 1개 이상의 아미노산 잔기가 제거되는 것으로 나타난다. 전형적으로, 단백질 분자내의 임의의 한 부위에서 단지 약 2 내지 6개 잔기가 결실된다. 통상적으로 이들 변이는 해당 단백질 암호화 DNA의 뉴클레오타이드를 부위-특이적 돌연변이유도하여 해당 변이체 암호화 DNA를 생성한 후 재조합 세포 항온처리에서 그 DNA를 발현시킴으로써 제조한다. 공지 서열을 갖는 DNA의 예정 부위에서 치환 돌연변이를 제조하는 기술은 잘 알려져 있으며 이들로 한정하는 것은 아니지만 M13 프라이머 돌연변이유도 및 PCR 돌연변이유도를 포함한다. 아미노산 치환은 전형적으로 단일 잔기에서 이루어지나 한번에 많은 상이한 위치에서 발생할 수 있다. 치환 변이체는 적어도 1개의 잔기가 제거되고 이 위치에 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 이러한 치환은 일반적으로 하기 표에 따라 제조되며 보존적 치환이라고 한다. 다른 치환들은 본 분야의 전문가에게 잘 알려져 있다.

[0038] 본원에 사용된 아미노산 치환은 보존적 또는 비보존적일 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 해당 위치에서 아미노산 잔기의 크기, 극성, 전하, 소수성 또는 친수성에 거의 또는 전혀 영향을 받지 않고 특히 면역원성이 감소되지 않도록 고유 아미노산 잔기가 비고유 아미노산 잔기로 치환되는 것을 포함할 수 있다. 적합한 보존적 아미노산 치환은 하기 표 1에 기술되어 있다.

[표 1]

고유 잔기	보존적 치환의 예	바람직한 보존적 치환
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino-butyric Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

[0041] 선택된 특정 아미노산 치환은 선택된 부위의 위치에 의해 좌우될 수 있다. 특정 양태로서, 폴리펩타이드 및/또는 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드는 유전암호의 축중을 기초로 치환된다(즉, "위블(Wobble)" 가설과 일치한다). 핵산이 세포내에서 폴리펩타이드를 발현하는데 유용한 재조합 DNA 분자(예를 들어, 발현 벡터)인 경우 위블형 치환은 DNA 분자에 의해 고유적으로 암호화된 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드의 발현을 유도할 것이다. 그러나, 상기된 바와 같은 치환들은 보존적이거나 비보존적이거나 이들의 임의 조합일 수 있다. 전문가는 공지 기술을 사용하여 본원에 제공된 폴리펩타이드 및/또는 단편의 적합한 변이체를 결정할 수 있다.

[0042] 유사체는 천연 스트렙토코커스 뉴모니아 폴리펩타이드와 아미노산 서열에서 및/또는 비서열 변형으로 인해 달라질 수 있다. 비서열 변형은 아세틸화, 메틸화, 인산화, 카복실화 또는 글리코실화에서의 변화를 포함한다. 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 "변형"은 1개 이상의 필수아미노산에서 화학적으로 또는 효소적으로 유도되는 폴리펩타이드(또는 이의 유사체, 예를 들어 그의 단편)를 포함한다. 이러한 변형은 예를 들어 측쇄 변형, 골격 변형 및 N- 및 C-말단 변형(예를 들어, 아세틸화, 하이드록실화, 메틸화, 아미드화, 및 탄수화물 또는 지질 잔기, 보조인자 등의 결합) 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명의 변형된 폴리펩타이드는 비변형

된 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 유지할 수 있거나 감소 또는 증가된 생물학적 활성을 나타낼 수 있다.

[0043] 두개의 폴리펩타이드간에 구조적 유사성은 이들 서열의 길이를 따라 동일한 아미노산의 수가 최적화되도록 두 폴리펩타이드들(예를 들어, 후보 폴리펩타이드 및 예를 들어, 서열 번호 2의 폴리펩타이드)의 잔기를 배열함으로써 결정할 수 있다. 어느 한쪽의 서열이나 양쪽 모두의 서열에서의 갭은 비록 각 서열에서의 아미노산이 적절한 순서를 유지해야 하지만 동일한 아미노산의 수를 최적화하기 위해 배열하는데 허용된다. 후보 폴리펩타이드는 참조 폴리펩타이드와 비교되는 폴리펩타이드이다. 후보 폴리펩타이드는 예를 들어 미생물로부터 분리될 수 있거나 재조합 기술 또는 화학적 또는 효소적 합성에 의해 제조될 수 있다.

[0044] 아미노산 서열의 쌍대비교 분석은 글로벌 알고리즘(예를 들어, Needleman-Wunsch)을 사용하여 실시할 수 있다. 또는, 폴리펩타이드는 로컬 얼라인먼트 알고리즘(local alignment algorithm)(예를 들어, BLAST 2 조사 알고리즘의 Blastp 프로그램을) 사용하여 비교할 수 있다. 상기 알고리즘은 문헌[참조: Tatiana et al., FEMS Microbiol. Lett, 174 247-250(1999)]에 기술되어 있고 국립 생명공학 정보 센터(National Centre for Biotechnology Information)(NCBI) 웹사이트에서 입수가능하다. 모든 BLAST 2 조사 변수에 대한 디폴트 값(매트릭스 = BLOSUM62; 오픈 갭 페널티 = 11; 익스텐션 갭 페널티(extension gap penalty) = 1; 갭 x 드롭오프 = 50; expect 10; 워드사이즈 = 3 및 필터 온(filter on)을 포함)이 사용될 수 있다. Smith 및 Waterman 알고리즘은 사용될 수 있는 다른 로컬 얼라인먼트 도구이다(1988).

[0045] 두 아미노산 서열의 비교에서, 구조적 유사성은 "동일성" 퍼센트 또는 "유사성" 퍼센트로 나타낼 수 있다. "동일성"은 동일한 아미노산의 존재를 가리킨다. "유사성"은 동일한 아미노산의 존재뿐만 아니라 보존적 치환의 존재를 가리킨다. 본 발명의 폴리펩타이드에서 아미노산의 보존적 치환은 표 1에 수록된 바와 같이 아미노산이 속하는 부류의 다른 일원중에서 선택될 수 있다.

[0046] 면역원성 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 이로써 한정되는 것은 아니며 예를 들면 야생형 또는 돌연변이형 스트렙토코커스 뉴모니에 세포로부터 분리할 수 있거나, 다른 방법으로는 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하거나 본 분야의 전문가에 의해 알려져 있는 다른 표준 기술을 사용함으로써 해당 DNA 유전자(예를 들어, *pcpA*, *phtD*, *ply*)를 갖는 스트렙토코커스 뉴모니에 균주의 DNA로부터 직접 획득할 수 있다. 사용가능한 균주로는 예를 들어 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 TIGR4 및 14453이 포함된다. 바람직한 양태로서, 폴리펩타이드는 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 14453으로부터 재조합적으로 유도된 것이다. 본 발명의 분리된 핵산 분자의 바람직한 예는 서열번호 3, 4, 6 및 8의 핵산 서열을 갖는다. 이들 서열의 서열-보존적 변이체 및 기능-보존적 변이체는 본 발명에 속한다.

[0047] 본 발명의 폴리펩타이드는 표준 분자 생물학 기술 및 발현 시스템을 사용하여 제조할 수 있다(예를 들어, 참조: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition by Sambrook et. al., Cold Spring Harbor Press, 2001). 예를 들면, 면역원성 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 단편을 분리하고 면역원성 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 임의의 시판용 발현 벡터(예를 들어, pBR322 및 pUC 벡터(참조: New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)) 또는 발현/정제 벡터(예를 들어, GST 융합 벡터(참조: Pfizer, Inc., Piscataway, N.J.))내로 클로닝한 후 적합한 원핵, 바이러스 또는 진핵 숙주내에 발현시킬 수 있다. 그런 다음 정제는 통상적인 수단에 의해 또는 시판용 발현/정제 시스템의 경우 제조사의 지침서에 따라 달성할 수 있다.

[0048] 또는, 변이체를 포함한 본 발명의 면역원성 폴리펩타이드는 이로써 한정하는 것은 아니고 예를 들면 야생형 또는 돌연변이형 스트렙토코커스 뉴모니에 세포로부터 및 시판용 자동화 방법(예를 들어, 배타성 고체상 합성, 부분 고체상 방법, 단편축합 또는 용액 합성)을 사용한 화학적 합성을 통해 분리할 수 있다.

[0049] 본 발명의 폴리펩타이드는 바람직하게는 면역원성 활성을 갖는다. "면역원성 활성"은 폴리펩타이드가 대상자에게 면역반응을 유도할 수 있는 능력을 가리킨다. 폴리펩타이드에 대한 면역학적 반응은 대상자에서 폴리펩타이드에 대한 세포성 및/또는 항체-매개성 면역반응이 발생한 것이다. 보통, 면역학적 반응은 이로써 한정되는 것은 아니지만 다음의 효과중 하나 이상을 포함한다: 폴리펩타이드의 에피토프(들)에 대한 항체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 억제 T 세포 및/또는 세포독성 T 세포의 생성. 용어 "에피토프"는 항체가 생성되도록 특이적 B 세포 및/또는 T 세포가 반응하는 항원상의 부위를 가리킨다. 면역원성 활성은 방어적일 수 있다. 용어 "방어적 면역원성 활성"은 스트렙토코커스 뉴모니에에 의한 감염(질환 유발)을 예방 또는 억제하는 면역반응을 대상자에서 유도하는 폴리펩타이드의 능력을 가리킨다.

- [0050] 조성물
- [0051] 기재된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드를 면역원성 조성물(예를 들어, 백신 조성물)을 제조하는데 사용한다. 면역원성 조성물은 대상자(예를 들어, 포유동물)에 투여했을 때 조성물내에 함유된 항원에 대한 면역반응을 유도하거나 강화시켜 주는 것이다. 이 반응은 항체의 형성(예를 들어, B 세포의 자극을 통해) 또는 T 세포-기초 반응(예를 들어, 세포용해 반응)을 포함할 수 있다. 이들 반응은 방어적 또는 중화적일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 방어적 또는 중화적 면역반응은 항원에 해당하는 감염성 유기체(예를 들어 이로부터 항원이 유도된다)에 유해하고 대상자에게 이로운 것이다(예를 들어 감염을 감소시키거나 예방함으로써). 본원에 사용된 방어성 또는 중화성 항체는 동물에서 시험한 경우 상응하는 야생형 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드(또는 이의 단편)에 반응적이고 상응하는 야생형 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드의 치사성을 감소 또는 억제할 수 있다. 숙주에 투여되었을 때 방어성 또는 중화성 면역반응을 유도하는 면역원성 조성물은 백신으로 고려될 수 있다.
- [0052] 상기 조성물은 대상자에게 투여되었을 때 면역반응을 유도하기에 충분한 양으로 면역원성 폴리펩타이드를 포함한다. 백신으로서 사용된 면역원성 조성물은 면역학적 유효량의 면역원성 폴리펩타이드뿐만 아니라 필요한 경우 임의의 다른 성분을 포함한다. "면역학적 유효량"은 이 양을 대상자에게 단일 용량으로 또는 일련의 일부로서 투여한 것이 치료 또는 예방에 효과적임을 의미한다.
- [0053] 2중, 3중 또는 그 이상의 면역원성 폴리펩타이드(예를 들어, PcpA, PhtD 및/또는 해독된 뉴모라이신)으로 구성된 조성물에서, 폴리펩타이드 성분들은 바람직하게는 혼화성을 나타내고 항원 간섭을 회피하고 임의의 가능한 상승효과를 최적화하기에 적절한 비율로 배합된다. 예를 들어, 각 성분의 양은 용량당 약 5 μg 내지 약 500 μg , 용량당 5 μg 내지 약 100 μg 또는 용량당 25 μg 내지 약 50 μg 의 범위일 수 있다. 바람직하게는 범위는 용량당 항원성 성분당 5 또는 6 μg 내지 50 μg 일 수 있다. 한 가지 예로서, 조성물은 PhtX(예를 들어, PhtD)의 면역원성 폴리펩타이드 25 μg 과 PcpA의 면역원성 폴리펩타이드 25 μg 을 포함한다. 다른 예로서 조성물은 또한 25 μg 의 뉴모라이신(예를 들어, 해독된 뉴모라이신; PlyD1(서열번호 9))을 포함한다.
- [0054] 하기 설명된 실시예에서, 동물 모델에서의 여러 항원 비율이 PhtX(예를 들어, PhtD)와 PcpA의 2중-성분 백신 조성물 및 PcpA, PhtX(예를 들어, PhtD)와 해독된 뉴모라이신(예를 들어, PlyD1)의 3중-성분 백신 조성물에 대해 비교되었다. 놀랍게도, 통계적으로 유의적인 항원 간섭이 시험된 항원 비율에서 관찰되지 않았다. 또한, 놀랍게도, 2가 조성물(또는 3가 조성물)로의 면역화에 대한 반응으로 유도된 항원-특이적 항체는 토끼 혈청을 사용한 마우스에서의 수동 면역화에서 상가(additive) 방식으로 작용하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 다가 성분 조성물에서 이들 성분들은 동일량(예를 들어, 1:1, 1:1:1)으로 존재할 수 있다. 성분들은 각 항원에 대해 예정된 최소 항원 용량을 기준으로 다른 비율(예를 들어, PcpA:PhtX(PhtD):뉴모라이신 = 약 1:1:1 내지 약 1:5:25)로 존재할 수 있다. 한 가지 예로서, 3가 조성물은 PcpA, PhtD와 뉴모라이신(예를 들어, PlyD1)을 1:4:8의 PcpA:PhtD:뉴모라이신의 비율의 양(μg /용량)으로 포함한다. 다른 예로서, PcpA:PhtD:뉴모라이신의 비율은 1:1:1이다.
- [0055] 본 발명의 조성물은 예를 들어 경피(예를 들어, 근육내, 정맥내, 복강내 또는 피하), 경피흡수, 점막(예를 들어, 비내) 또는 국소와 같은 적절한 경로를 통해 본 분야 전문가에 의해 적절한 것으로 결정된 양 및 용법으로 투여할 수 있다. 예를 들어, 조성물의 1 내지 250 μg 또는 10 내지 100 μg 이 투여될 수 있다. 예방 또는 치료요법의 목적을 위해 조성물은 1, 2, 3, 4회 이상의 횟수로 투여할 수 있다. 한 가지 예로서, 1회 이상의 투여는 "초회자극(prime-boost)" 프로토콜의 일부로서 진행할 수 있다. 다수의 용량이 투여되는 경우, 이들 용량은 개별적으로 예를 들어 1주, 1개월 또는 수 개월 간격을 두고 투여될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 조성물(예를 들어, 백신 조성물)은 항원보강제의 존재 또는 부재하에 투여될 수 있다. 일반적으로 항원보강제는 항원의 면역원성을 증강시킬 수 있는 물질이다. 항원보강제는 후천적 및 선천적 면역성(예를 들면, 킬-유사 수용체) 모두에서 작용할 수 있고 모든 것이 밝혀진 것을 아니지만 다양한 방식으로 기능할 수 있다.
- [0057] 많은 물질(천연 및 합성 모두)이 항원보강제로 작용하는 것으로 밝혀져 있다. 예를 들어, 항원보강제는 이로써 한정되는 것은 아니지만 무기염, 스쿠알렌 혼합물, 뮤라일 펩타이드, 사포닌 유도체, 마이코박테리아 세포벽 제제, 특정 에멀전, 모노프로스포릴 지질 A, 마이콜산 유도체, 비이온성 블록 공중합체 계면활성제, Quil A, 콜레라 독소 B 아단위, 폴리포스파젠 및 유도체, 면역자극 복합체(ISCOM), 사이토킨 항원보강제, MF59 항원보강제, 지질 항원보강제, 점막 항원보강제, 특정 세균 외독소 및 다른 성분들, 특정 올리고뉴클레오타이드, PLG 등을 포함한다. 이들 항원보강제는 본원에 기술된 조성물 및 방법에 사용될 수

있다.

[0058] 특정 양태로서, 상기 조성물은 적어도 스쿠알렌, 수성 용매, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 친수성 비이온성 계면활성제, 소수성 비이온성 계면활성제를 포함하고, 전상온도 방법에 의해 수득가능하며, 유적의 부피 기준으로 전체의 90%가 200 nm 미만의 크기 및 임의로 150 nm 미만의 크기를 갖는 수중유 에멀전을 포함하는 항원보강제의 존재하에 투여된다. 이러한 항원보강제는 국제 특허 출원 공보 제WO 2007006939호(Vaccine Composition Comprising a Thermo-inversable Emulsion)에 기술되어 있으며, 이 국제특허원의 전문은 본원에 참조로 인용된다. 또한, 조성물은 기술된 스쿠알렌 수중유 에멀전에 추가하여 또는 대신하여 물질 E6020(CAS 번호 287180-63-6)을 포함할 수 있다. 물질 E6020은 미국특허원 제US 2007/0082875호(이의 전문은 본원에 참조로 인용된다)에 기술되어 있다.

[0059] 특정 양태로서, 상기 조성물은 TLR 효능제(예를 들어, TLR4 효능제)를 단독으로 또는 항원보강제와 배합하여 포함한다. 예를 들어, 항원보강제는 TLR4 효능제(예를 들어, TLA4), 스쿠알렌, 수성 용매, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 화학 그룹에 속하는 비이온성 친수성 계면활성제, 비이온성 소수성 계면활성제를 포함할 수 있고 이는 열가역성이다. 이러한 항원보강제의 예는 국제 특허 출원 공보 제WO 2007080308호(Thermoreversible Oil-in-Water Emulsion)에 기술되어 있으며 이 국제특허원의 전문은 본원에 참조로 인용된다. 한 가지 양태로서, 조성물은 CpG와 알루미늄 염 항원보강제(예를 들어, 명반)의 배합물로 항원보강된다.

[0060] 본 발명을 실시하는데 사용되는 항원보강제 가운데 알루미늄 염 항원보강제(또는 화합물)이 있다. 사용될 수 있는 알루미늄 염 항원보강제의 예는 수산화알루미늄(예를 들어, 결정성 알루미늄 옥시하이드록사이드 $AlO(OH)$ 및 수산화알루미늄 $Al(OH)_3$)을 포함한다. 수산화알루미늄은 Al^{3+} 이온과 하이드록실 그룹(-OH)를 포함하는 알루미늄 화합물이다. 수산화알루미늄과 다른 알루미늄 화합물(예를 들어, 하이드록시포스페이트 또는 하이드록시셀레이트)의 혼합물이 또한 사용될 수 있으며 생성된 화합물은 하이드록실 그룹을 포함하는 알루미늄 화합물이다. 특정 양태로서, 알루미늄 항원보강제는 알루미늄 옥시하이드록사이드(예를 들어, Alhydrogel®)이다. 알루미늄 염 항원보강제를 함유한 조성물은 극한 온도, 즉 빙점(0°C) 이하 또는 극한 열(예를 들어, 70°C 이상)에 노출되어서는 안되는데, 그 이유는 이러한 노출은 흡수된 항원과 항원보강제 모두의 안정성 및 면역원성에 좋지않은 영향을 미칠 수 있기 때문인 것이 당업계에 익히 공지된다.

[0061] 본 발명자들은 수산화알루미늄 항원보강제($AlO(OH)$)로 항원보강된 경우 PcpA와 PhtD 폴리펩타이드의 분해율이 하기 실시예에서 기술하는 바와 같이 높다는 것을 주목하였다. 본 발명자들은 포스페이트, 카보네이트, 셀레이트, 카복실레이트, 디포스포네이트 또는 이들 화합물중 2가지 이상의 혼합물로 전처리된 수산화 그룹 함유 알루미늄 화합물(예를 들어, 수산화알루미늄 항원보강제)로 PcpA 및 PhtD 폴리펩타이드를 면역증강시킬 때 이들 폴리펩타이드의 안정성이 증가된다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명은 면역원성 PcpA 폴리펩타이드 또는 면역원성 PhtX 폴리펩타이드(예를 들어, PhtD) 및 포스페이트, 카보네이트, 셀레이트, 카복실레이트, 디포스포네이트 또는 이들 화합물중 2가지 이상의 혼합물로 처리된 수산화 그룹 함유 알루미늄 화합물을 포함하여 상기 면역원성 폴리펩타이드가 비처리된 알루미늄 화합물에 흡착되어 있는 조성물에 비하여 상기 면역원성 폴리펩타이드의 안정성이 증가된 조성물의 제형을 제공한다. 바람직한 양태로서, 알루미늄 화합물은 포스페이트로 처리된다. 또한, 본 발명은 PcpA와 PhtX(예를 들어, PhtD)의 면역원성 폴리펩타이드 둘 다와 포스페이트, 카보네이트, 셀레이트, 카복실레이트, 디포스포네이트 또는 이들 화합물중 2가지 이상의 혼합물로 처리된 수산화 그룹 함유 알루미늄 화합물을 포함하여 상기 면역원성 폴리펩타이드가 비처리된 알루미늄 화합물에 흡착되어 있는 조성물에 비하여 상기 면역원성 폴리펩타이드의 안정성이 증가된 다가 조성물을 제공한다.

[0062] 본 발명의 특정 양태로서, 알루미늄 화합물(예를 들어, 수산화알루미늄 항원보강제)는 포스페이트, 카보네이트, 셀레이트, 카복실레이트, 디포스포네이트 또는 이들 화합물중 2가지 이상의 혼합물로 처리된다. 이와 같이 알루미늄 화합물을 처리함으로써 알루미늄 화합물내의 많은 하이드록실 그룹(-OH)은 상응하는 이온(예를 들어, 포스페이트(PO_4))으로 처리된 것이 대체된다. 이러한 대체는 알루미늄 화합물의 PZC 및 화합물의 미세 환경의 pH를 강하시킨다. 포스페이트, 카보네이트, 셀레이트, 카복실레이트 또는 디포스포네이트 이온은 항원이 안정화되는 수준(즉, 항원 가수분해의 속도가 감소되는 수준)으로 미세환경의 pH를 강하시키기에 충분한 양으로 첨가된다. 필요한 양은 많은 요인, 예를 들어 연루된 항원, 항원 등전점, 항원 농도, 사용된 항원보강 방법 및 제형에 존재하는 임의의 추가 항원의 양 및 성질에 의해 좌우될 것이다. 백신 분야의 전문가들은 항원의 안정성을 증가시키기 위해 관련 요인을 평가하고 포스페이트, 카보네이트, 셀레이트, 카복실레이트, 디포스포네이트를 알루미늄 화합물에 첨가해야 하는 농도를 결정할 수 있으며, 이에 따라 상응하는 제형 및 조성물을 제조할 수 있다. 예를 들어, 적정 연구(즉, 알루미늄 화합물에 포스페이트 등의 점증 농도를 첨가

하는 연구)를 실시할 수 있다.

- [0063] 사용하기에 적합한 포스페이트 화합물은 인산과 연관된 화학적 화합물(예를 들어, 인산의 무기염 및 유기염) 어떠한 것도 포함한다. 포스페이트 염은 포스페이트 이온(PO_4^{3-}), 하이드로겐 포스페이트 이온(HPO_4^{2-}) 또는 디하이드로겐 포스페이트 이온(H_2PO_4^-)을 임의의 양이온과 함께 함유하는 무기 화합물이다. 포스페이트 에스테르는 인산의 수소가 유기 그룹으로 대체된 유기 화합물이다. 포스페이트 염 대신에 사용할 수 있는 화합물의 예는 음이온 아미노산(예를 들어, 글루타메이트, 아스파테이트) 및 인지질을 포함한다.
- [0064] 사용하기에 적합한 카복실레이트 화합물은 카복실산(예를 들어, 말산, 락트산, 푸마르산, 글루타르산, EDTA 및 EGTA)의 유기 에스테르, 염 및 음이온중 어떠한 것도 포함한다. 사용에 적합한 황 음이온은 황산의 염 또는 에스테르(예를 들어, 황산나트륨, 황산암모늄, 아황산염, 메타중아황산염, 티오황산염)와 같은 설페이트(SO_4 라디칼)를 함유하는 화합물을 어떠한 것도 포함한다. 사용에 적합한 디포스포네이트 화합물의 예는 클로드로네이트, 파미드로네이트, 티루드로네이트 및 알렌드로네이트를 포함한다.
- [0065] 본 발명의 바람직한 양태로서 포스페이트가 염의 형태로 수산화알루미늄 항원보강제에 첨가된다. 바람직하게는, 포스페이트 이온은 인산 이나트륨 일나트륨을 포함한 완충액에 의해 제공된다.
- [0066] 본원에 예시된 바와 같이 본 발명의 바람직한 실시에서, 알루미늄 화합물(예를 들어, 알루미늄 옥시하이드록사이드)이 포스페이트로(예를 들어, 실시예에 기술된 방법에 의해) 처리된다. 이 방법에서, 알루미늄 옥시하이드록사이드(약 20 mg/mL)의 수성 현탁액이 포스페이트 완충액(예를 들어, 약 400 mol/L)과 혼합된다. 바람직한 최종 포스페이트 농도는 약 2 mM 내지 20 mM이다. 그런 다음, 혼합물을 완충액(예를 들어, 트리스-HCl, 염수를 함유한 트리스-HCl, HEPES)으로 희석하여 알루미늄 옥시하이드록사이드와 포스페이트(PO_4)의 현탁액을 제조한다. 바람직하게는, 완충액은 10 mM 트리스-HCl 및 150 mM NaCl(약 pH7.4)이다. 그런 후, 현탁액을 실온에서 약 24시간 동안 혼합한다. 바람직하게는 최종 현탁액중의 원소 알루미늄의 농도가 약 0.28 mg/mL 내지 1.68 mg/mL이다. 더욱 바람직하게는 원소 알루미늄의 농도는 약 0.56 mg/mL이다.
- [0067] 그런 후 PcpA, PhtD 및 해독된 뉴모라이신의 면역원성 폴리펩타이드(개별적으로 또는 조합하여)는 처리된 수산화알루미늄에 흡착될 수 있다. 바람직하게는, 약 0.2 내지 0.4 mg/mL의 항원이 처리된 수산화알루미늄 항원보강제의 현탁액과 혼합된다(예를 들어, 실온 또는 2 내지 8°C, 와동 믹서에서 약 30분 또는 약 12 내지 15시간 또는 약 24시간).
- [0068] 항원 흡착율은 본 분야에 알려진 표준 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 항원/항원보강제 제제의 분액을 제거하고 원심분리(예를 들어, 10,000rpm)하여 항원보강제 현탁액(상청액)으로부터 비흡착 단백질(펠렛)을 분리할 수 있다. 상청액중의 단백질 농도는 비신코닌산 단백질 검사(BCA) 또는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하여 측정할 수 있다. 흡착율은 다음과 같이 계산한다: $\%A = 100 - ([\text{PrSN}] \times 100 / [\text{PrCtr}])$ (여기서, [PrSN]은 상청액중의 단백질 농도이고 [PrCtr]은 상응하는 비항원보강된 대조군중의 농도이다). 바람직한 양태로서, 흡착율(%)은 약 70% 내지 약 100%의 범위이다. 더욱 바람직한 양태로서, 흡착율(%)은 적어도 약 70%이다.
- [0069] 항원보강된 면역화의 한 가지 양태로서, 면역성 폴리펩타이드 및/또는 이의 단편은 세균 다당류에 공유결합되어 다당류 결합체를 형성할 수 있다. 이러한 결합체는 상기 폴리펩타이드 및/또는 이의 단편에 결합된 세균 다당류에 대한 T 세포 의존 면역원성 반응을 유도하기 위한 면역원으로서 유용할 수 있다.
- [0070] 기재된 제형은 통상적인 냉장 온도(예를 들어, 약 2°C 내지 약 8°C)에서 장기간 저장할 때 안정성을 유지한다. 제형은 적어도 6개월 또는 12개월, 바람직하게는 18개월 동안 입자 응집 및 항원 농도의 유의적 감소가 거의 발생하지 않거나 발생하지 않았으며, 상당한 수준의 면역원성 및/또는 항원성을 유지한다. 구절 "항원 농도의 유의적 감소가 없다"는 조성물이 처음 제형될 때 존재하는 고유 항원 농도의 적어도 50%, 60% 또는 70%, 더욱 바람직하게는 고유 항원 농도의 적어도 약 80%, 85% 또는 90%, 더욱 바람직하게는 고유 항원 농도의 적어도 약 91%, 92%, 98%, 99% 이상을 유지한다는 것을 의미한다. 항원 농도는 예를 들어 RP-HPLC, SDS-PAGE 또는 ELISA-기초 방법에 의해 측정할 수 있다.
- [0071] 안정 제형 또는 면역원성 조성물 함유 안정 제형은 실질적인 정도의 구조적 통합성을 유지한다(예를 들어, 실질적인 양의 고유 항원 농도 등을 유지한다).
- [0072] 안정성은 예를 들어 존재하는 항원의 농도를 측정함으로써(예를 들어, RP-HPLC에 의해) 또는 항원 분해를 예

를 들어 SDS-PAGE 분석에 의해 측정함으로써 평가할 수 있다. 제형 중의 항원 농도는 비처리된 것이라도 동일 알루미늄 화합물(즉, 포스페이트 또는 카보네이트 이온으로 처리되지 않은 것)로 제조된 제형의 것과 비교할 수 있다. 안정성 예측 및/또는 비교 도구는 예를 들어 안정성 시스템™(ScienTek Software, Inc.)을 포함하며, 이 도구의 경우 저장 온도(2℃ 내지 8℃)에서의 속도 상수를 예측하기 위해 아레니우스 처리를 사용한다. 항원 농도 및 면역원성을 측정하는 표준 검사는 본 분야에 알려져 있고 실시예에 기술되어 있다. 방어 효능은 예를 들어 제형에 존재하는 특정 항원에 해당하는 질환 유발 병원체 또는 독소로 시험한 후 면역화된 대상자 및 비면역화된 대상자의 생존율을 평가함으로써 결정할 수 있다.

[0073] 본 발명의 면역원성 조성물은 바람직하게는 액체 형태이지만, 동결건조(표준 방법에 따라) 또는 발포 건조(국제특허출원공보 제WO 2009012601호(Antigen-Adjuvant Compositions and Methods)에 기술된 바와 같이)될 수 있다. 본 발명의 한 가지 양태의 조성물은 액체 형태이다. 면역화 용량은 0.5 내지 1.0 ml의 용량으로 제형될 수 있다. 액체 제형은 예를 들어 액체 또는 현탁제를 포함하여 투여에 적합한 어떠한 형태일 수 있다. 따라서, 조성물은 완충될 수 있는 액체 매질(예를 들어, 염수 또는 물)을 포함할 수 있다.

[0074] 제형(및 조성물)의 pH는 바람직하게는 약 6.4 내지 약 8.4이다. 더욱 바람직하게는 pH는 약 7.4이다. 조성물의 예시적인 pH 범위는 5 내지 10이고, 예로는 5 내지 9, 5 내지 8, 5.5 내지 9, 6 내지 7.5 또는 6.5 내지 7이다. pH는 완충액의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0075] 본 발명의 면역원성 조성물의 약제학적 제형은 또한 임의로 당업계에 익히 공지된 한 가지 이상의 부형제(예를 들어, 희석제, 점증제, 완충제, 보존제, 계면활성제, 항원보강제, 세정제 및/또는 면역자극제)를 포함할 수 있다. 본 분야에 알려져 있듯이 적합한 부형제는 항원 및 알루미늄 항원보강제와 상용가능할 것이다. 희석제의 예는 결합제, 봉해제 또는 분산제(예를 들어, 전분, 셀룰로즈 유도체, 페놀, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 글리세린)을 포함한다. 약제학적 제형은 또한 항균제, 항염증제 및 마취제와 같은 한 가지 이상의 활성 성분을 포함할 수 있다. 세정제의 예는 트윈 80과 같은 트윈(폴리솔베이트)를 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함되기에 적합한 부형제는 본 분야에 잘 알려져 있다.

[0076] 본 발명은 PcpA, PhtX(예를 들어, PhtD) 및/또는 해독된 뉴모라이신 단백질 및 조성물에 유익한 특성을 제공하는(예를 들어, 조성물의 한 가지 이상의 단백질의 안정성을 증가시키는) 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 화합물 또는 부형제는 예를 들어 완충제(예를 들어, 글리신, 히스티딘); 등장화제(예를 들어, 만니톨); 당 또는 당 알코올과 같은 탄수화물(예를 들어, 소르비톨, 트레할로즈 또는 수크로즈; 1 내지 30%) 또는 탄수화물 중합체(예를 들어, 텍스트란); 아미노산, 올리고펩타이드 또는 폴리아미노산(100 mM 이하); 다가 알코올(예를 들어, 글리세롤 및 20% 이하의 농도); 세정제, 지질 또는 계면활성제(예를 들어, 0.5% 이하의 농도의 트윈 20, 트윈 80 또는 플루로닉); 항산화제; 염(예를 들어, 150 mM 이하의 염화나트륨, 염화칼륨, 염화마그네슘 또는 마그네슘 아세테이트); 또는 이들의 배합물을 포함한다.

[0077] 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 부형제의 예는 표 11에 수록된 것 및 하기 예시된 것을 포함한다. 여러 가지 예에서 부형제는 예를 들어 하기에 기술된 검사(예를 들어, SYPRO Orange의 외부 형광)에 의해 측정된 결과로서 열안정성을 증가시켜 주는(예를 들어, 적어도 0.5, 예를 들어 0.5 내지 5, 1 내지 4 또는 2 내지 3) 것일 수 있다.

[0078] 부형제 및 완충제의 예는 소르비톨(예를 들어, 4 내지 20%, 5 내지 10%)(표 11 참조)을 포함한다. 이들 부형제는 본 발명에서 표 11에 수록된 농도로 사용될 수 있다. 또는, 사용량이 본 분야에서 이해되는 바와 같이 예를 들어 0.1 내지 10배의 양으로 다양할 수 있다. 또한, 본 분야에 알려진 다른 탄수화물, 당 알코올, 계면활성제 및 아미노산이 본 발명의 조성물에 포함될 수 있다.

[0079] 부형제 및 완충제는 개별적으로 또는 배합하여 사용할 수 있다. 이러한 조성물의 pH는 예를 들어 5.5 내지 8.0 또는 6.5 내지 7.5일 수 있고, 조성물은 예를 들어 2 내지 8℃에서 액체 또는 동결건조 형태로 저장할 수 있다. 조성물의 변형에서, 소르비톨은 수크로즈(예를 들어, 4 내지 20% 또는 5 내지 10%) 또는 트레할로즈(예를 들어, 4 내지 20% 또는 5 내지 10%)로 대체될 수 있다. 상기 조성물의 다른 변형도 본 발명에 포함되며 본원에 수록된 다른 성분의 사용을 포함한다. 상기를 기초로 하여 본 발명의 예시적인 조성물은 10% 소르비톨(pH 7.4)을 포함한다.

[0080] 한 가지 양태로서, 일가 PlyD1 조성물은 약 10 mM 트리스 HCl 및 약 150 mM NaCl 중의(약 pH7.4에서) 용량당 5 내지 50 μg의 항원, PTH 항원보강제(2 mM 인산나트륨 완충액을 함유한 약 0.56 mg/mL 원소 알루미늄으로(약

pH7.5))를 포함할 수 있다.

- [0081] 다른 양태로서, 일가 PhtD 조성물은 약 10 mM 트리스 HCl 및 약 150 mM NaCl 중의(약 pH7.4에서) 용량당 5 내지 50 μ g의 항원, PTH 항원보강제(2 mM 인산나트륨 완충액을 함유한 약 0.56 mg/mL 원소 알루미늄으로(약 pH7.5))를 포함할 수 있다.
- [0082] 추가의 양태로서, 일가 PcpA 조성물은 약 10 mM 트리스 HCl 및 약 150 mM NaCl 중의(약 pH7.4에서) 용량당 5 내지 50 μ g의 항원, PTH 항원보강제(2 mM 인산나트륨 완충액을 함유한 약 0.56 mg/mL 원소 알루미늄으로(약 pH7.5))를 포함할 수 있다.
- [0083] 다른 양태로서, 이가 조성물 제형은 약 10 mM 트리스 HCl 및 약 150 mM NaCl 중의(약 pH7.4에서) 용량당 각각 5 내지 50 μ g/용량의 2종 단백질(PhtD, PlyD1 또는 PcpA 중에서 선택됨), PTH 항원보강제(2 mM 인산나트륨 완충액을 함유한 약 0.56 mg/mL 원소 알루미늄으로(약 pH7.5))를 포함할 수 있다.
- [0084] 추가의 양태로서, 삼가 조성물 제형은 약 10 mM 트리스 HCl 및 약 150 mM NaCl 중의(약 pH7.4에서) 용량당 각각 5 내지 50 μ g/용량의 3종 단백질(PhtD, PlyD1, PcpA), PTH 항원보강제(2 mM 인산나트륨 완충액을 함유한 약 0.56 mg/mL 원소 알루미늄으로(약 pH7.5))를 포함할 수 있다.
- [0085] 다른 예로서, 조성물은 소르비톨 또는 수크로스를 포함하며, 이는 안정성에 있어서 이점을 제공하는 것으로 나타났다(하기 참조). 이들 성분의 양은 예를 들어 5 내지 15%, 8 내지 12% 또는 10% 소르비톨 또는 수크로즈일 수 있다. 이들 성분이 10%로 존재하는 구체적 예가 하기에 기술되어 있다. 바람직한 양태로서 조성물은 10% 소르비톨 또는 10% 수크로스를 포함한다.
- [0086] 또한, 본 발명은 스트렙토코커스 뉴모니에 단백질(예를 들어, PcpA, PhtX(예를 들어, PhtD), 해독된 뉴모라이신)을 포함하고 향상된 특성을 갖는 조성물을 제조하기 위해 사용할 수 있는 부형제를 동정하는 방법을 포함한다. 이들 방법은 하기 기술된 것과 같은 선별 검사를 포함하며, 이들 검사는 조성물의 단백질 성분중 하나 이상의 안정성을 증가시켜 주는 조건의 동정을 용이하게 한다. 이들 방법은 하기에 추가로 기술된 안정성 검사를 포함한다. 또한, 본 발명은 용해성, 면역원성 및 점성 검사를 포함하여 목적하는 제제를 동정하기 위한 다른 검사의 사용을 포함한다.
- [0087] 본 발명에 따른 한 가지 양태의 조성물은(i) 수산화알루미늄 항원보강제를 포스페이트, 카보네이트, 셀레이트, 카복실레이트, 디포스페이트 또는 이들 화합물중 둘 이상의 혼합물로 처리하고,(ii) 처리된 수산화알루미늄 항원보강제를 면역원성 PcpA 폴리펩타이드 및/또는 면역원성 PhtX 폴리펩타이드와 혼합하여 제조할 수 있다. 바람직한 양태로서, 면역원성 PhtX 폴리펩타이드는 PhtD이다.
- [0088] 본 발명의 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드중 하나 이상을 함유하는 면역원성 조성물(예를 들어, 백신)은 스트렙토코커스 뉴모니에 감염을 예방 및/또는 치료하는데 사용할 수 있다. 본 발명의 예방 및 치료 방법은 예를 들어 치료 자체를 수행하거나, 후속 감염을 예방하거나, 수동 면역화에 후속적으로 사용하기 위한 항체를 제조함에 있어서 기재된 면역원성 폴리펩타이드중 하나 이상으로 예방접종하는 것을 포함한다.
- [0089] 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니에 감염과 연관되거나 이로 인한 질환, 장애, 병태 또는 증상을 예방 또는 치료하는 방법에 사용된다. 상기 용어인 질환, 장애 및 병태는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 구체적으로, 예방 및 치료 방법은 대상자에게 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 특정 양태로서, 스트렙토코커스 뉴모니에를 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다.
- [0090] 본원에 사용되는, 질환 또는 장애의 예방은 대상자를 스트렙토코커스 뉴모니에와 연관된 특정 질환 또는 장애의 발생으로부터 방어하기 위해 상기 대상자에게 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0091] 질환 또는 장애의 치료는 스트렙토코커스 뉴모니에에 의해 유발된 질환으로 고통받고 있거나 스트렙토코커스 뉴모니에에 노출된 대상자에게 본 발명의 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여하여 영향을 미치게 하여, 질환의 병태 또는 증상을 치료, 치유, 완화, 호전, 변화, 치료, 경감, 개선시키거나 그에 영향을 미치게 하는 것이 목적인 것으로 의도된다.
- [0092] 치료학적 유효량은 해당 병태에 대한 치료적 효과 및 투여 용법을 제공하는 양을 가리킨다. 치료학적 유효량은 환자의 특징(연령, 체중, 성별, 상태, 합병증, 기타 질환 등)을 기초로 하여 전문 의료인에 의해 결정될 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 조성물의 투여 경로에 의해 영향을 받을 수 있다.
- [0093] 또한, 본 발명은 대상자에게 기재된 면역원성 폴리펩타이드중 하나 이상을 포함한 면역원성 조성물을 투여함

을 포함하여, 상기 대상자에게 폐렴구균성 질환의 위험을 경감시키는 방법을 기재한다. 폐렴구균성 질환(즉, 증후성 감염)은 예를 들어 부비강 감염, 중이염, 기관지염, 폐렴, 수막염, 용혈성 요독증 및 균혈증(패혈증)을 포함한다. 이들 감염증 임의의 한 가지 이상의 위험이 본 발명의 방법에 의해 경감될 수 있다. 바람직한 방법은 면역원성 PcpA 폴리펩타이드와 면역원성 PhtX(예를 들어, PhtD) 폴리펩타이드를 포함한 면역원성 조성물을 대상자에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상자에게 침습성 폐렴구균성 질환 및/또는 폐렴의 위험을 경감시키는 방법을 포함한다. 다른 바람직한 방법으로서, 상기 조성물은 또한 해독된 뉴모라이신(예를 들어, PlyD1)을 포함한다.

[0094] 또한 본 명세서의 교시내용은 면역원성 조성물 또는 이의 제형을 대상자에게 투여하여 포유동물에서 면역반응을 유도하는 방법을 제공한다. 이것은 조성물의 약제학적으로 허용되는 제형을 대상자에게 투여하여 상기 대상자의 면역체계에 면역원성 폴리펩타이드 및/또는 항원보강제를 노출시킴에 영향을 미침으로써 달성할 수 있다. 투여는 1회 진행할 수 있거나 수회 진행할 수 있다. 한 가지 예로서, 1회 이상의 투여는 소위 "초회 자극(prime-boost)" 프로토콜의 일부로 진행할 수 있다. 다른 투여 시스템은 지속성-방출, 지연 방출 또는 서방형 방출 전달 시스템을 포함할 수 있다.

[0095] 면역원성 조성물은 면역원성 조성물 및 항원보강제 또는 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 희석제를 포함하여 통상적인 또는 다른 기구를 사용하여 포유동물에 투여하기 위한 조성물의 재구성을 촉진하는 재구성 용액을 포함하는 키트 형태로 제공될 수 있다. 이와 같은 키트는 임의로 조성물의 액체 형태의 투여를 위한 기구(예를 들어, 피하주사기, 미세침 어레이) 및/또는 사용 지침서를 포함할 수 있다.

[0096] 본원에 기술된 조성물 및 백신은 또한 여러 가지 전달 시스템내에 도입될 수 있다. 한 가지 예로서, 조성물은 투여를 위한 "미세침 어레이" 또는 "미세침 패치" 전달 시스템에 적용될 수 있다. 이들 미세침 어레이 또는 패치는 일반적으로 백킹재(backing material)에 부착되고 무수 형태의 백신으로 코팅된 다수의 침-유사 돌기를 포함한다. 포유동물의 피부에 적용될 때 침-유사 돌기는 피부를 관통하고 백신을 전달함을 성취하여 대상 포유동물을 면역화하는데 영향을 미친다.

[0097] 정의

[0098] 본원에 사용된 용어 "항원"은 포유동물에 도입된 경우 상응하는 면역체(항체)의 형성을 개시 및 중재할 수 있거나 구조적 적합성 복합체(MHC)에 의해 결합되어 T-세포에 제시될 수 있는 물질을 가리킨다. 항원은 다수의 항원 결정소를 보유하여 항원에 포유동물의 노출로 상이한 특이성을 갖는 다수의 상응하는 항체를 생성할 수 있다. 항원은 이로써 한정되는 것은 아니지만 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 핵산 및 단편, 변이체 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0099] 용어 "면역원"은 후천성 면역반응을 유도할 수 있는 물질이다.

[0100] 용어 펩타이드, 단백질 및 폴리펩타이드는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0101] "분리된" 폴리펩타이드는 이의 천연 환경으로부터 제거된 것이다. 예를 들어, 분리된 폴리펩타이드는 세포질로부터 또는 세포막으로부터 제거된 폴리펩타이드이고 이의 천연 환경의 폴리펩타이드, 핵산 및 기타 세포 물질의 다수가 더 이상 존재하지 않는다. "분리가 가능한" 폴리펩타이드는 특정 공급원으로부터 분리될 수 있는 폴리펩타이드이다. "정제된" 폴리펩타이드는 이들이 천연적으로 연루되어 있는 다른 성분들로부터 적어도 60% 유리, 바람직하게는 적어도 75% 유리, 가장 바람직하게는 적어도 90% 유리되어 있는 것이다. 폴리펩타이드가 천연적으로 존재하는 유기체외부에서 예를 들어 화학적 또는 재조합적 수단을 통해 제조되는 폴리펩타이드는 이들이 결코 천연 환경에 존재하지 않기때문에 분리 및 정제된 것으로 규정한다.

[0102] 본원에 사용된 용어 폴리펩타이드의 "단편"은 바람직하게는 적어도 약 40개 잔기 또는 60개 잔기, 및 바람직하게는 적어도 약 100개 잔기의 길이를 갖는다. 스트렙토코커스 뉴모니에 폴리펩타이드의 단편은 본 분야의 전문가에게 알려진 방법으로 제조할 수 있다.

[0103] 용어 "항체"는 비정제 형태, 또는 부분 정제 형태(즉, 하이브리도마 상청액, 복수, 다클론 항혈청) 또는 정제 형태의 완전한 또는 단편화된 항체를 포함한다. "정제된" 항체는 이 항체가 처음에 함께 발견되는 단백질중 적어도 약 50%로부터 분리된 것이다(즉, 하이브리도마 상청액 또는 복수제제의 일부로서).

[0104] 본원 명세서 및 청구범위에서 사용되는 단수 표현 "하나(a, an)" 및 "그(the)"는 문맥에서 명확하게 달리 언급하지 않는 한 복수를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 참조로 단편은 단편들의 혼합물을 포함할 수 있고 참

조로 약제학적 담체 또는 항원보강제는 그러한 담체 또는 항원보강제의 2종 이상의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0105] 본원에 사용된 대상자 또는 숙주는 개체를 의미한다.

[0106] 임의로는 후속으로 기재되는 사건 또는 상황이 일어날 수도 있고 일어나지 않을 수도 있음을 의미하며, 그 내용은 사건이나 상황이 발생하는 사례 및 발생하지 않은 사례를 포함한다. 예를 들어, "임의로 조성물이 배합물을 포함할 수 있다"라는 구절은 조성물이 상이한 분자들의 배합을 포함할 수 있거나 배합물을 포함하지 않을 수 있음에 따라 그 내용은 배합물 및 배합물의 부재(즉, 배합물의 개개 구성원) 모두를 포함한다는 것을 의미한다.

[0107] 범위는 대략적인 한 특정 값으로부터 및/또는 대략적인 다른 특정 값까지로서 본원에 표현될 수 있다. 이와 같은 범위가 표현된 경우, 다른 관점은 한 특정 값으로부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 마찬가지로 값이 이 숫자 앞에 약 또는 대략이 선행된 사용에 의한 근사치로서 표현된 경우, 특정 값은 다른 양상을 형성한다는 것으로 이해될 수 있다. 또한, 각 범위의 종말점은 다른 종말점과 연관되고, 다른 종말점에 독립적으로 유의적인 것으로 이해될 수 있다.

[0108] 해당 병태에 대한 해당 치료와 관련하여 본원에서 사용된 용어 예방하다, 예방하는, 및 예방(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니아 감염을 예방하는)은 치료 대상자의 병태가 임상적으로 관찰가능한 수준으로 전혀 발전하지 않거나 병태가 치료를 받지 않은 경우보다 더 느리게 및/또는 더 미미한 정도 발전한다는 것을 암시한다. 이들 용어는 대상자가 해당 병태의 양상을 전혀 경험하지 못한 상황으로만 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 만일 해당 병태의 증상을 발생할 것으로 예상될 수 있는 자극에 환자가 노출되는 동안 치료를 받고 예상보다 대상자가 그 병태의 증상을 적게 및/또는 미약하게 경험하는 결과로 나타나는 경우 치료는 그 병태를 예방한 것이라고 할 수 있다. 치료는 대상자에서 단지 미약한 명시적인 감염 증상만을 초래함으로써 감염을 "예방"할 수 있다. 이는 모든 세포에 감염 미생물의 침투가 없어야한다는 것을 암시하는 것이 아니다.

[0109] 마찬가지로, 본원에 사용된 해당 치료에 의한 감염 위험이 감소되다, 감소되는, 및 감소(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니아 감염의 위험 감소)는 대상자가 감염 치료(예를 들어, 면역원성 폴리펩타이드의 투여)의 부재로 감염이 발전하는 대조군 또는 기본 수준과 비교하여 더 서서히 또는 더 미약한 정도로 감염이 발전한다는 것을 의미한다. 감염 위험의 감소는 대상자에서 명시적인 감염 증상이 미약하게만 나타나거나 감염 증상이 지연되는 결과로 나타날 수 있다. 이는 모든 세포에 감염 미생물의 침투가 없어야한다는 것을 암시하는 것이 아니다.

[0110] 본 명세서의 교시내용에 기술된 모든 문헌들은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0111] 실시예

[0112] 상기 교시내용은 일반적으로 본 발명을 기술한다. 보다 완전한 이해는 하기 구체적 실시예를 참고하여 수득될 수 있다. 이들 실시예는 단지 예시적인 목적으로 기술되는 것으로 본 발명의 범위를 한정하려는 의도가 있는 것이 아니다. 상황에 따라 대안이 제시되거나 구현될 수 있음을 따라 형태의 변화 및 균등물의 치환이 고려된다. 비록 구체적 용어들이 본원에서 사용되고는 있으나 이러한 용어들은 설명을 위한 의도로서 제한적 목적을 위한 것이 아니다.

[0113] 본 발명에서 사용되지만 본 교시내용 및 하기 실시예에 자세하게 기술되어 있지 않은 분자 유전학, 단백질 생화학, 면역학 및 발효 기술의 방법들은 과학 문헌에 충분히 공개되어 있고 본 분야의 전문가에 의해 용이하게 구현될 수 있다.

[0114] 실시예 1A

[0115] 재조합 PcpA 및 PhtD 폴리펩타이드

[0116] 본 실시예는 PcpA 단백질 및 PhtD 단백질의 재조합 제조를 기술한다. 요컨대, 스트렙토코커스 뉴모니아(1997년 6월 27일에 ATCC 55987로 기탁된 균주 14453(마우스-맹독성 캡슐 혈청형 6B 균주))로부터 재조합적으로 유도된 단백질 항원인 PhtD(국제특허출원공보 제WO 2009/012588호) 및 PcpA(제WO 2008/022302호)는 이. 콜라이에서 재조합적으로 발현되고, 통상적인 정제 프로토콜에 따라 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리 및 정제되었다.

[0117] AccuPrime High Fidelity 폴리머라제(Invitrogen) 및 프라이머 Spn0211 및 Spn0213을 사용하여 스트렙토코커스 뉴모니에 14453 계놈으로부터 phtD 유전자(그러나 이의 고유 시그널 펩타이드는 제외)를 PCR 증폭하였다. Spn0211 및 Spn0213은 *Nco*I 및 *Xho*I 제한 부위를 각각 5' 및 3' 말단내로 도입하였다(표 2 참조). Q1Aquick PCR 정제 키트(Qiagen)을 사용하여 PCR 생성물을 정제하고 아가로즈 겔에 적용하여 크기를 확인하였다. PCR 생성물 및 pET28a(+) 벡터(Novagen) 둘다 *Nco*I 및 *Xho*I로 분해시킨 후 QIAEX 겔 추출 키트(Qiagen)를 사용하여 아가로즈 겔로부터 정제하였다. T4 DNA 리가제(Invitrogen)를 사용하여 분해된 벡터 및 유전자를 함께 연결하였다. 연결 혼합물을 화학적 컴피턴트(competent) 이. 콜라이 DH5 α로 형질전환시키고 50 μg/ml 카나마이신을 함유한 Luria 한천상에 플레이팅(plating)하여 양성 클론을 선별하였다. 플라스미드 클론 pBAC27로부터 DNA를 분리하고 서열분석하여 정확한 위치에 있는지 확인하였다.

[0118] 그런 후, 전기천공에 의해 이. 콜라이 BL21(DE3) 세포내로 플라스미드(pBAC27)을 도입하였다. 형질전환 균주를 약 37°C에서 성장시키고 1 mM IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 유전자 생성물의 발현은 SDS-PAGE 분석에 의해 정확한 크기(즉, 약 91.9kDa)의 유도된 단백질 밴드의 존재에 의해 검증되었다.

[0119] [표 2]

프라이머 명칭/번호	서열 5' → 3'
Spn0211	CTAGCCATGGGATCCTATGAACCTGGTCGTCACCAAG
Spn0213	AGTCCTCGAGCTACTGTATAGGAGCCGGTTG

[0120]

[0121] pBAC27의 폴리펩타이드의 추정된 아미노산 서열은 다음과 같다:

MGSYELGRHQAGQVKKESNRVSYIDGDQAGQKAENLTPDEVSKREGINAEQIVIKITDQGYVTSHGDHYHYH
NGKVPYDAIISELLMKDPNYQLKDSDIVNEIKGGYVIKVDGKYVYVYLDAAHADNIRTKKEIKRQKQEHSH
NHNSRADNAVAARAAGRYTTDDGYIFNADSDIEDTGDAYIVPHGDHYHYIPKNELSAELAAAEAYWNGKQ
GSRPSSSSSYNANPVQPRLSNHNLTVTPTYHQNGENISSLLRELYAKPLSERHVESDGLIFDPAQITSRT
ARGVAVPHGNHYHFIPYEQMSELEKRIARIPLRYSRNNHWVDSRPEQFSPQSTPEPSPSLQFAPNFPQAPPS
NPIDEKLVKEAVRKVGQGYVFEENGVSRYIPAKDLAETAAGIDSKLAKQESLSHKLGAKKTDLPSSDREFY
NKAYDLLARIHQDLLDNKGRQVDFEVLNLLERLKDVSDDKVKLVDDILAFAPIRHPERLKGKPNQAQITYTD
DEIQVAKLAGKYTTEDGYIFDPRDITSDGDAYVTPHMTSHWIKKDSLSEAERAAAQAYAKEKGLTPPSTD
HQDSGNTAEAGAEAIYNRVKAAKVPDRMPYNLQYTVKNGSLIIPHYDHYHNIKFEWFDEGLYEAPKGY
SLEDLLATVKYVVEHPNERPHSDNGFGNASDHVRKNKADQDSKPEDKEHDEVSEPTHPESDEKENHAGLNP
SADNLYKPSSTDTEETEEAEDTTDEAEPQVENSVINAKIADAEALLEKVTDPISIRQNAMETLTGLKSSLLL
GTDKNNTISAEVDSLLALLKESQPAPIQ (서열번호 5)

[0122]

[0123] Accuprime Taq DNA 폴리머라제(Invitrogen) 및 간소화된 클로닝을 위해 고안된 제한 엔도뉴클레아제 부위를 도입하는 PCR 프라이머(표 3 참조)를 사용하여 스트렙토코커스 뉴모니에 14453 계놈으로부터 pcpA 유전자(그러나 시그널 서열 및 콜린-결합 도메인은 제외)를 PCR 증폭하였다. pET-30a(+)(Novagen)의 플라스미드 DNA는 복제수가 낮은 플라스미드로서 정제되어 클로닝 벡터로 사용하기 위해 *Nde*I 및 *Xho*I로 분해시킨 후 겔 정제하여 제조하였다. 생성된 1335 염기쌍 단편은 *Xho*I(3'-말단) 및 *Nde*I(5'-말단) 제한 부위가 삽입인접(flan)된 pcpA(시그널 서열 및 콜린-결합 도메인은 제외)이었다. 증폭된 단편을 세정하고, *Nde*I 및 *Xho*I로 분해한 후, 겔 정제하고 pET-30a(+) 벡터내로 연결시켰다. 삽입체는 서열분석에 의해 검증되었고 신규 플라스미드는 pJMS87로 명명하였다.

[0124] [표 3]

(프라이머)

프라이머 명칭	서열 5' → 3'
UAB 3	TAGCCTCGAGTTAACCTTTGTCTTTAACCCAACCACTACTCCCTGATTAG
UAB-무태그5	CTAATGAACCACTATATGGCAGATACTCTAGTTCGGAAGTAATC

[0125]

[0126] pJMS87의 폴리펩타이드의 추정 아미노산 서열은 다음과 같다:

```
MADTPSSEVIKETKVGSIQQNNIKYKVLTVVEGNIGTVQVGNVTPVEFEAGQDGKPFPTIPTKITVGDQKVF
VTEVASQAFSYYPDETGRIVYYPSSITIPSSIKKIQKKGFHGSKAKTIIIDKGSQLEKIEDRAFDSELEEI
ELPASLEYIGTSAFSFSQKLKLTFSSSSKLELISHEAFANLSNLEKLTLPKSVKTLGSLNLFRLTTSCLKHVD
VEEGNESFASVDGVLFSKDKTQLIYYPSQKNDESYKTPKETKELASYSFNKNLSYLLKLELNEGLEKIGTF
ADAIKLEELISLNSLETIERLAFYGNLELKLILPDNVKNFVGKHMVNGLPKLSLTIGNNINSLP3FFLSGV
LDSLKEIHIKNKSTEFVSKKDTFAIPETVKFYVTSEHIKDVLSNLSSTNDIIVEKVDNIKQETDVAKPKKN
SNQGVVGWVKDKG (서열번호 7)
```

[0127]

[0128] 화학적 컴피턴트 이. 콜라이 BL21(DE3) 세포를 플라스미드 pJMS87 DNA로 형질전환시켰다. 유전자 생성물의 발현은 SDS-PAGE 분석에 의해 정확한 크기(즉, 약 49.4 kDa)의 유도된 단백질 밴드의 존재로 검증하였다.

[0129] 클로닝된 PcpA 폴리펩타이드는 시그널 서열 및 콜린-결합 도메인이 없기때문에 그의 아미노산 서열은 전장 PcpA 단백질의 아미노산 27 내지 470과 상호관련이 있다. 이 영역은 모든 조사된 균주에서 불과 8개의 가변 위치를 보이면서 상당히 보존적이다. 가장 이탈된 서열 쌍은 98.7% 동일성을 공유한다.

[0130] Vector NTi에 의한 재조합 PcpA 단백질 및 재조합 PhtD 단백질의 추정 등전점은 각각 7.19 및 5.16이었다.

[0131] pcpA 유전자 및 phtD 유전자는 각각 다음의 혈청형에서 검출되었다: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7, 7F, 9N, 9V, 11A/B, 11A/D/F, 12F/B, 14, 15B, 15B/C, 16, 18C, 19A, 19F, 22, 23, 23B, 23F, 33F, 34, 35B. 많은 이들 혈청형은 현재 시판되고있는 폐렴구균성 결합 백신 PCV7에 의해 방어되지 않는다.

[0132] 재조합 단백질 생성물은 표준 방법을 사용하여 발현, 분리 및 정제하였다.

[0133] 재조합 단백질중 어느 한 가지의 항원보강된 일가 조성물은 표준 방법을 사용하여 분리 정제된 단백질을 트리스 완충 염수(pH 7.4)중에서 항원보강제(예를 들어, 수산화알루미늄 항원보강제(예를 들어, 알하이드로겔 (Alhydrogel) 85 2%) 또는 $AlPO_4$)와 함께 제형함으로써 제조하였다. 제형된 물질들은 유리 바이알에 옮기고 2°C 내지 8°C에 저장하였다. PhtD와 PcpA 모두의 항원보강된 이가 조성물은 목적하는 농도의 각 항원보강된 일가 제형을 용기에 분취(aliquot)하고 Nutator로 실온에서 약 0.5 시간동안 혼합하여 제조하였다. 그런 후 목적하는 제형 용량을 멸균된 3 mL 유리 바이알에 분취하고 고무 마개로 막고 알루미늄 캡을 씌웠다. 또는, 이가 조성물은 목적하는 농도의 각 분리 정제된 단백질을 함께 혼합한 후 혼합물을 항원보강제와 트리스 완충 염수(pH 7.4)에서 제형함으로써 제조하였다.

[0134] 실시예 1B

[0135] 본 실시예는 표면 변형된 항원보강제의 제조 및 이 항원보강제와의 제형을 기술한다. 표면 변형된 항원보강제는 수산화알루미늄 항원보강제(AlhydrogelTM, Brenntag)를 포스페이트로 처리하여 제조하였다. 사용된 수산화알루미늄 항원보강제는 제조사에 따라 재고압밀균에는 견딜수 있지만 동결시에는 파괴되는 습윤 겔 현탁액이었다. 제조사에 따르면 pH가 5 내지 7로 유지될때 항원보강제는 양전하를 나타내고 음전하 항원(예를 들어, 중성 pH에서 산성 등전점을 갖는 단백질)을 흡착할 수 있다.

[0136] a) A10(OH)의 포스페이트 처리 - A10(OH)의 수성 현탁액(약 20 mg/mL)을 포스페이트 완충 원액(약 400 mol/L)과 혼합하고 약 pH7.4의 10 mM 트리스-HCl 완충액(Sigma Aldrich)로 희석하여 약 13 mg/mL A10OH/200 mM PO_4 를 갖는 포스페이트-처리된 A10(OH) 현탁액(본원에서 "PTH"라고 한다)을 제조하였다. 그런 다음 이 현탁액을 실온에서 약 30분 내지 24시간 동안 혼합하였다.

[0137] b) 항원 흡착 - 재조합적으로 유도된 PcpA 및 PhtD 항원(실시예 1A에 기술된 바와 같이 발현, 분리 및 정제됨)은 개별적으로 포스페이트-처리된 A10(OH)에 흡착되었다.

[0138] 각각 약 0.2 내지 0.4 mg/mL의 정제된 항원(즉, rPcpA 또는 rPhtD) 및 0.56 mg 원소 알루미늄/ml/ PO_4 mM의 PTH 현탁액을 함유하는 혼합물을 제조하였다. 또는, 표준 방법을 사용하여 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의 수산화알루미늄 항원보강제(Alhydrogel[®] 85 2%) 또는 $AlPO_4$ 와 함께 정제된 항원을 함유하는 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 와동 진탕기로 실온에서 약 30분 내지 24시간 동안 혼합하여 항원과 항원보강제의 결합을 촉진시켰다. 유사한 흡착물을 여러번 제조하였고 전형적인 예비흡착된 조성물은 다음과 같았다: 단백질(PhtD 또는 PcpA): 0.2 내지 0.4 mg/ml 포스페이트: 2 내지 20 80 mM(바람직하게는 2 내지 20 mM) 및 A10(OH): 1.25 - 25 -

mg/ml(0.56 mg의 원소 Al/ml). 제조된 항원 흡착 시료는 사용할 때까지 약 2℃ 내지 8℃에 저장해 두었다. 또는, 포스페이트 처리된 수산화알루미늄 항원보강제의 원액을 사용하여 항원을 함께 항원보강시켜 이가 제형을 제조하였다.

- [0139] c) 이가 제형의 제조 - PTH에 흡착된 PhtD 및 PTH에 흡착된 PcpA의 중간 벌크 로트(일가 제형)를 와동 진탕기로 실온에서 약 30분 동안 함께 블렌딩 및 혼합하여 이가 제형을 제조하였다. 전형적인 예비흡착된 제형 조성물은 다음과 같았다: 0.05 mg/ml의 각 단백질(rPhtD, rPcpA); 포스페이트: 2 내지 20 mM 및 1.25 mg/mL AlO(OH)(0.56 mg의 원소 Al/ml).
- [0140] 실시예 2
- [0141] **여러 용량의 PcpA 및 PhtD로 제형된 이가 조성물에 의한 항원 간섭 및 체액성 반응의 평가**
- [0142] 본 실시예는 동물에서 복합-성분 조성물의 면역원성의 분석을 기술한다. 정제된 PhtD 및 PcpA 단백질, 수산화알루미늄 항원보강제(Alhydrogel® 85 2%, 25.52 mg/mL), 트리스 완충 염수(10 mM 트리스-HCl pH 7.4/150 mM NaCl)를 사용하여 제형을 제조하였다(실시예 1에 기재된 대로). 이 제제는 약 30분 동안 Nutator로 혼합하고 유리 바이알에 분배하였다.
- [0143] 6 내지 8 주령의 암컷 마우스 Balb/c K-72(Charles River) 10 마리의 그룹을 다음의 제형으로 3주 간격으로 3회 피하(SC)로 면역화하였다:
- [0144] A. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(5 µg/mL의 PcpA + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0145] B. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 µg/mL의 PcpA + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0146] C. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 µg/mL의 PcpA + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0147] D. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(5 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0148] E. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0149] F. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0150] G. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(5 µg/mL의 PcpA + 5 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0151] H. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(5 µg/mL의 PcpA + 12.5 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0152] I. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(5 µg/mL의 PcpA + 25 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0153] J. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 µg/mL의 PcpA + 5 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0154] K. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 µg/mL의 PcpA + 12.5 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0155] L. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 µg/mL의 PcpA + 25 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0156] M. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 µg/mL의 PcpA + 5 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0157] N. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 µg/mL의 PcpA + 12.5 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0158] O. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 µg/mL의 PcpA + 25 µg/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)
- [0159] 일차 면역화 2일전 및 일차, 이차 및 삼차 면역화 후에 모든 동물로부터 혈액 시료를 채취하였다. 각 마우스로부터 채혈된 시료는 9,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하고 회수된 혈청은 -20℃에 저장하였다.
- [0160] 총 항원-특이적 IgG 역가를 수집된 면역화전혈액 및 일차, 이차 및 삼차 면역화 후 수거된 혈청에서 종말점 회색 ELISA에 의해 측정하였고 각 그룹의 기하평균 역가는 도 1에 나타내었다. 면역화전혈액중의 항체 역가는 검출 한계 미만(<100)으로 나타난 한편, PhtD 및 PcpA 일가 제형 둘 다에 대한 최종 채혈 혈액 역가는 본 발명 이전의 연구에서 관찰된 것과 일치하는 모든 그룹에서 두 항원에 대해 높게 나타났다. PhtD 및 PcpA-특이적 항체 ELISA 역가는 표 4에 요약한다.

[0161] [표 4]

일가 또는 이가 제형으로 면역화된 마우스 그룹에 대한 PcpA 및 PhtD-특이적 ELISA 역가

제형	혈액*	ELISA 역가	
		PcpA	PhtD
1 µg PcpA	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	77605	100
2.5 µg PcpA	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	110598	100
5 µg PcpA	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	191085	100
1 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	< 100	332699
2.5 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	< 100	540470
5 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	< 100	620838
1 µg PcpA+ 1 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	89144	289631
1 µg PcpA+ 2.5 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	3차 면역화 후	55834	265593
1 µg PcpA+ 5 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	89144	310419
2.5 µg PcpA+ 1 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	162550	301002
2.5 µg PcpA+ 2.5 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	126069	332699
2.5 µg PcpA+ 5 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	75250	378460
5 µg PcpA+ 1 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	238905	477810
5 µg PcpA+ 2.5 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	157922	579262
5 µg PcpA+ 5 µg PhtD	면역화전	< 100	< 100
	최종 채혈	117627	764341

* 최종 채혈 항-PcpA 및 PhtD 역가는 개개 마우스로부터 측정하였고 기하평균으로 나타나 있다.

[0162]

[0163]

ELISA 데이터의 통계 분석으로 일가 PhtD 제형에 의해 유도된 항-PhtD 반응에 비하여 이가 제형에 의해 유도된(삼차 면역화 후) 항-PhtD 반응에 미치는 PcpA 농도의 영향을 조사하였다. 유사하게, 일가 PcpA 제형에 의해 유도된 항-PcpA 반응에 비하여 이가 제형에 의해 유도된(삼차 면역화 후) 항-PcpA 반응에 미치는 PhtD 농도의 영향을 또한 평가하였다. 항-PcpA IgG 역가에 있어서, 일가 PcpA 제형에 의해 유도된 반응을 이가 제형에 의해 유도된 반응을 비교하였을 때 통계적으로 유의적인 차이는 전혀 관찰되지 않았다(9/9 그룹). 따라서, 검사된 어떠한 용량에서도 PhtD와 양성 또는 음성 모두에서 통계적으로 유의적인 상호작용이 관찰되지 않았다. 항-PhtD 역가에 있어서, 이가 제형에 의해 유도된 항-PhtD 역가(즉, 반응)와 상응하는 일가 PhtD 제형에 의해 유도된 역가사이의 대부분 비교에서 통계적으로 유의적인 역제가 나타나지 않았다(7/9 그룹). 두 경우의 예외가 관찰되었으며 각각은 항-PhtD 역가에서 2배 감소를 나타냈다: (i) 2.5 µg/용량의 PhtD의 일가 제형과 비교하여 1 µg/용량의 PcpA와 2.5 µg/용량의 PhtD를 함유하는 이가 제형(p=0.034); 및 (ii) 5.0 µg/용량의 PhtD의 일가 제형과 비교하여 1 µg/용량의 PcpA와 5.0 µg/용량의 PhtD를 함유하는 이가 제형(p=0.027). 1 µg/용량의 PhtD 또는 보다 고 용량의 PcpA(즉, 2.5 µg 및 5 µg)의 경우 통계적 유의성이 관찰되지 않았다. 그러나, 이와 같은 2배 감소는 모델의 변동성 범위내에 속하며 따라서 유의적인 수준의 간섭을 반영하는 것이 아니다.

[0164]

통계 분석에 의해 결정된 이가 조성물중의 각 항원(PcpA, PhtD)의 최적 농도는 25 µg/mL(즉, 5 µg/용량)이었다. 이러한 농도의 항원(즉, 25 µg/mL의 PcpA 또는 PhtD)을 함유한 일가 조성물은 또한 최고의 항원 특이적 IgG 역가를 유도하였다.

[0165] 실시예 3

[0166] **랫트에 이가 백신의 3회 근육내 주사 후 면역원성 연구**

[0167] 본 실시예에는 다른 동물 종(즉, 랫트)에서의 복합-성분 백신의 안전성 및 면역원성의 분석을 기술한다.

[0168] 4개의 그룹의 위스타 Cr1:WI(Han) 랫트(성별당 20 마리)에 대조군, 항원보강제를 함유하거나 함유하지 않은 이가 백신 조성물 또는 항원보강된 일가 PcpA 백신 조성물을 3주 간격으로 0일, 21일째 및 42일째에 3회 IM 주사하였다(하기 표 5의 연구 계획 참조). 마지막 투여 후 2일째 또는 15일째에 동물을 처사시켰다. 조성물은 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하였다. 항원보강된 조성물을 제조하기 위해 사용된 항원보강제는 수산화알루미늄(Alhydrogel®), Brenntag)이었다. 연구 계획의 개략적인 요약은 표 5를 참조한다.

[0169] [표 5](연구 계획)

그룹	용량 수준 (μg /용량/투여)	용량 수준(μg /동물)	동물 수	
			수컷	암컷
대조군(트리스 완충 염수)	0	2 x 250	20	20
항원보강제 함유 PhtD/PcpA	50	2 x 250	20	20
항원보강제 미함유 PhtD/PcpA	50	2 x 250	20	20
항원보강제 함유 PcpA	50	2 x 250	20	20

[0170]

[0171] 이환율/사망률 점검은 일일 적어도 2회 수행하였고 임상 시험은 매일 실시하였다. 연관된 치료에 따라 고려되는 조기 사망, 임상적 부작용 징후, 체중, 음식 소비, 임상 화학 또는 안과학에 미치는 영향은 발생하지 않았다.

[0172] ELISA로 PhtD 및 PcpA 특이적 IgG 항체 역가에 대해 혈청을 분석하였다. 결과는 도 2a 내지 2d에 나타나 있다. 치료받은 모든 동물들은, 비록 비항원보강된 그룹에서의 반응이 더 변동적이었으나, 강력한 항-PcpA 및 항-PhtD 반응을 보였다. 항원보강된 일가 PcpA 백신은 항원보강된 이가 백신과 균등한 면역반응을 유도하였으며, 이 결과는 이가 제형에서 PhtD에 의한 면역학적 간섭이 없음을 가리킨다.

[0173] 이가 및 PcpA 일가 백신 조성물은 각각 모든 동물에게 면역반응을 유도하였다. 본 발명의 결과에 따라 이가 및 PcpA 일가 백신 조성물은 랫트에게서 면역원성을 나타낸다. 항원보강된 조성물은 비항원보강된 조성물에 비해 더 면역원성을 나타냈다.

[0174] 실시예 4

[0175] **상이한 알루미늄-기본 항원보강제로 제형된 이가 조성물의 면역원성 평가**

[0176] 본 실시예에는 상이한 알루미늄-기본 항원보강제로 제형된 복합-성분 조성물의 면역원성 분석을 기술한다.

[0177] 한 가지 연구에서, 재조합 PhtD 및 PcpA(실시예 1에서 기술된 바와 같이 제조 및 정제됨)를 신선한 수산화알루미늄 항원보강제(Alhydrogel®), 약 6개월 동안 2 내지 8°C에서 항온처리된 오래된 수산화알루미늄 항원보강제(Alhydrogel®, Brenntag), 여러 농도의 포스페이트 PO₄(2 mM, 10 mM 및 20 mM)로 처리된 수산화알루미늄 항원보강제(Alhydrogel®, Brenntag) 또는 AlPO₄(Adjuphos®, Brenntag)와 함께 제형되었다. 제형은 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하였다. 수령했을 때 6 내지 8 주령된 5마리(또는 4 마리) 암컷 Balb/c 마우스(Charles River)의 그룹을 해당 제형으로 3주 간격으로 3회 근육내(IM) 면역화하였다. 각 그룹에 투여된 특정 제형은 표 6에 기술되어 있다.

[0178] 최종 채혈 후 PhtD 및 PcpA-특이적 항체 ELISA 역가는 표 6에 요약되어 있다. PcpA 및/또는 PhtD 단백질로 면역화된 마우스는 면역화 후 항원-특이적 항체 반응을 발생하였다. 신선한 또는 오래된 Al100H를 함유하는 이가 제형으로 면역화된 동물 또는 포스페이트(사용된 세 가지 농도중 임의의 농도에서)로 예비처리된 동물에서 항-PhtD 및 항-PcpA 역가의 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. AlPO₄(Al100H 보다 면역원성이 낮음)로

제형된 이가 조성물로의 면역화는 A100H 또는 PO₄-함유 A100H 항원보강제를 함유한 제형과 비교했을 때 유의하게 더 낮은 항-PhtD IgG 역가를 발생하였다. 이들 결과는 수산화알루미늄 항원보강제 및 AlPO₄ 항원보강제와 함께 제형된 이가 조성물과 비교한 다른 연구에서도 검증되었다.

[0179] 총론적으로, 제조합 PcpA와 PhtD 둘 다를 알루미늄-기본 항원보강제(수산화알루미늄 항원보강제, 여러 농도의 PO₄로 처리된 수산화알루미늄 항원보강제, AlPO₄)와 함께 제형된 면역원으로서 사용한 4 가지 연구가 완료되었다. 두 항원은 1 내지 5 µg/용량의 범위에서 다양한 용량으로 투여되었다. 특이적 PcpA 및 PhtD 항체 역가는 수집된 면역화전 혈액 및 3회 근육내(IM) 또는 피하(SC) 면역화 후 수거된 혈청에서 측정되었다. 면역화전 혈액의 항체 역가는 검출 한계 미만(<100)으로 나타난 한편, 최종 면역화 후 혈액 역가는 항-PcpA의 경우 124827 내지 204800의 범위로 나타났고 항-PhtD의 경우 36204 내지 97454의 범위로 나타났다.

[0180] 요약하면, 본 발명의 결과에 비추어 피검 항원보강제중 임의 것으로 제형된 조형물은 면역원성을 나타냈다. 수산화알루미늄 항원보강제(즉, 수산화알루미늄 항원보강제 및 포스페이트로 처리된 수산화알루미늄 항원보강제)와 함께 제형된 제조합 PhtD 및 PcpA 단백질로의 면역화는 AlPO₄ 제형으로의 면역화에 비하여 PcpA 및 PhtD 모두에 대해 유의하게 더 높은 항원-특이적 항체 반응(IgG 역가)을 발생하였다.

[0181] [표 6]

[0182] 위약(placebo) 또는 이가 백신 제형으로 면역화된 마우스 그룹에 대한 PcpA 및 PhtD-특이적 ELISA 역가

그룹	혈액*	ELISA 역가	
		PcpA	PhtD
5 µg PcpA+PhtD+A100H	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	152166	88266
5 µg PcpA+PhtD+A100H와 2mM PO ₄	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	204800	88266
5 µg PcpA+PhtD+A100H와 10mM PO ₄	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	204800	64508
5 µg PcpA+PhtD+A100H와 20mM PO ₄	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	176532	68910
10 µg PcpA+PhtD+신선한 A100H	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	176532	97454
10 µg PcpA+PhtD+오래된 A100H	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	168005	88266
5 µg PcpA+PhtD+AlPO ₄	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	124827	36204

[0183]

[0184] * 최종 채혈 항-PcpA 및 항-PhtD 역가는 개개 마우스로부터 측정되었고 기하평균으로서 나타내었다.

[0185] 실시예 5

[0186] 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 14453, MD 또는 941192로 시험 후 생존

[0187] 본 실시예는 마우스 비내 시험 모델에서 치명적인 폐렴구균 시험에 대한 복합-성분 백신의 방어 능력을 기술한다.

[0188] 제조합 PhtD와 PcpA의 이가 제형을 비내(IN) 시험 모델을 사용하여 평가하였다. 이 모델에서, 암컷 CBA/j 마우스 그룹(N = 그룹당 15 마리)을 5 µg/용량의 각각의 정제된 제조합 PhtD와 PcpA 단백질을 함유하고 항원보강제(2 mM PO₄(65 µg/용량)로 처리된 A100H)와 함께 TBS중에 제형된 이가 조성물로 근육내(IM)로 면역화하였다. 주사량은 용량당 50 µL였다. 음성 대조군으로서, PBS 위약-함유 알루미늄 항원보강제를 주사하였다. 동물은 연구의 개시 후 0, 3 및 6주시점에 근육내로 면역화시켰다. 9주째에, 동물에게 PBS 현탁액중의 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 MD, 균주 14453 또는 941192의 치사량(약 106 CFU)을 비내로 투여하였다(마우스당 40 µL 시험량). 일차 주사 4일전(0주에서의 예비면역화) 및 시험 4일전에 모든 동물로부터 시료 혈액을 채취하였다. 항체 ELISA 검사의 수단에 의해 혈청을 총 PhtD 및 PcpA-특이적 IgG 반응에 대해 분

석하였다.

[0189] 시험 후 마우스의 사망율을 매일 모니터링하였다. 살아있는 모든 마우스는 시험 후 11일째에 안락사시켰다. 면역화된 그룹에서의 생존과 위약 대조군을 비교함으로써 피서의 단측 정확검정법에 의해 방어력을 측정하였다(p 값이 <0.05 인 경우 유의적인 것으로 고려되었다). 연구 결과(생존율(%)로 표시됨)는 도 3 및 하기 표 7에 기재되어 있다.

[0190] [표 7]

[0191] 이가 백신 또는 위약으로 면역화된 마우스의 생존 결과

시험 후 경과일	이가 생존율(%)		위약 생존율(%)	
	균주 14453	균주 MD	균주 14453	균주 MD
0	100	100	100	100
1	100	100	100	100
2	100	93.3	73.3	20
3	100	93.3	40	6.7
4	86.7	93.3	40	6.7
5	86.7	93.3	40	6.7
6	86.7	93.3	40	6.7
7	86.7	93.3	40	6.7
8	86.7	93.3	40	6.7
9	86.7	93.3	40	6.7
10	86.7	93.3	40	6.7
11	86.7	93.3	40	6.7
p-값*	0.01	0.000		

[0192]

[0193] *p-값은 위약 그룹에 대하여 피서 정확검정법으로 계산되었다(시험 후 11일째 위약 그룹과의 차이).

[0194] 배합된 재조합 PhtD와 PcpA 단백질로의 면역화는 IN 시험 모델에서 스트렙토코커스 뉴모니애의 상이한 3종 균주의 치명적인 IN 시험에 대해 방어를 나타냈다. 14453 균주 또는 MD 균주로 시험된 그룹에 나타난 방어는 통계적으로 유의적이었다. 또한, 941192 균주로 시험된 그룹은 높은 생존율(%)을 나타냈지만 방어는 음성 대조군(항원보강제만으로 면역화된 그룹)에서 나타난 생존율에 비하여 통계적으로 유의적인 것으로 고려되지 않았다.

[0195] 실시예 6

[0196] 상이한 투여 경로(피하 또는 근육내)를 사용한 시험 후의 체액 반응 및 생존

[0197] 본 실시예는 마우스 비내 시험 모델에서 치명적인 폐렴구균 시험에 대한 복합-성분 백신의 방어력을 기술한다.

[0198] PhtD와 PcpA의 이가 조성물을 rPhtD 및 rPcpA의 각각의 상이한 두 가지 로트를 사용하여 제조하고 2 mM의 포스페이트로 전처리된 수산화알루미늄 항원보강제(A100H)와 함께 본원과 함께 동시 출원된 특허원에 기술된 방법에 따라 제형하였다. 제조된 제형은 문헌(참조: Zhang Y.A. et. al., *Infect. Immunol.* 69:3827-3836)에 기술된 모델을 기초로 한 마우스 능동 면역화 비내 시험 모델에서 평가하였다. 보다 자세하게는, 수령하였을 때 6 내지 8 주령된 암컷 CBA/j 마우스(Charles River) 6마리씩 16 그룹을 해당 제형으로 3주 간격으로 3회 근육내 또는 피하로 면역화하였다:

[0199] A. PcpA 로트 A, PhtD 로트 C, 비항원보강되고 피하주사(25 μ g/ml/단백질)

[0200] B. PcpA 로트 B, PhtD 로트 C, 비항원보강되고 피하주사(25 μ g/ml/단백질)

[0201] C. PcpA 로트 A, PhtD 로트 D, 비항원보강되고 피하주사(25 μ g/ml/단백질)

[0202] D. PcpA 로트 B, PhtD 로트 D, 비항원보강되고 피하주사(25 μ g/ml/단백질)

[0203] E. PcpA 로트 A, PhtD 로트 C + 2 mM 포스페이트 처리된 A100H, 피하주사(25 μ g/ml/단백질)

- [0204] F. PcpA 로트 B, PhtD 로트 C + 2 mM 포스페이트 처리된 A100H, 피하주사(25 μ g/ml/단백질)
- [0205] G. PcpA 로트 A, PhtD 로트 D + 2 mM 포스페이트 처리된 A100H, 피하주사(25 μ g/ml/단백질)
- [0206] H. PcpA 로트 B, PhtD 로트 D + 2 mM 포스페이트 처리된 A100H, 피하주사(25 μ g/ml/단백질)
- [0207] I. PcpA 로트 A, PhtD 로트 C, 비항원보강되고 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0208] J. PcpA 로트 B, PhtD 로트 C, 비항원보강되고 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0209] K. PcpA 로트 A, PhtD 로트 D, 비항원보강되고 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0210] L. PcpA 로트 B, PhtD 로트 D, 비항원보강되고 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0211] M. PcpA 로트 A, PhtD 로트 C + 2 mM 포스페이트 처리된 A100H, 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0212] N. PcpA 로트 B, PhtD 로트 C + 2 mM 포스페이트 처리된 A100H, 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0213] O. PcpA 로트 A, PhtD 로트 D + 2 mM 포스페이트 처리된 A100H, 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0214] P. PcpA 로트 B, PhtD 로트 D + 2 mM 포스페이트 처리된 A100H, 근육내주사(100 μ g/ml/단백질).
- [0215] 투여된 이가 제형 각각은 5 μ g/용량의 각 항원(즉, PhtD와 PcpA)를 포함하였고 TBS pH 7.4중의 항원보강제(2 mM 포스페이트로 전처리된 1.3 mg/mL의 A10(OH))와 함께 제형되었다. 마우스에게 3차(최종) 채혈 후 4일째 스트렙토코커스 뉴모니아 MD의 치사량 1×10^6 CFU를 투여하였다.
- [0216] 일차, 이차 및 삼차 면역화 하루 전 및 삼차 면역화 후 3주 시점에 모든 동물로부터 시료 혈액을 채취하였다. 각 마우스의 혈액 시료를 5분 동안 9,000 rpm으로 원심분리하고 회수된 혈청은 -20°C에 저장해 두었다.
- [0217] 종말점 회석 ELISA 및 정량 ELISA에 의해 총 항원-특이적 IgG 역가를 측정하였고 각 그룹에 대한 기하평균 역가는 도 4a 내지 4b에 도시되어 있다. 생존 결과는 도 5에 요약되어 있다.
- [0218] PcpA 및 PhtD의 상이한 로트에 의해 유도된 항-PcpA와 항-PhtD IgG 역가사이의 통계적 차이는 없었다. 항원 보강된 제형을 피하 투여함으로써 뚜렷한 이점이 있었다. 보다 자세하게는, 근육내 투여된 제형은 피하 투여된 제형보다 면역원성이 낮은 것으로 나타났다. 또한, 비항원보강된 제형은 항원보강된 제형보다 면역원성이 낮은 것으로 나타났다.
- [0219] 생존과 관련하여 피검 제형은 치명적인 스트렙토코커스 뉴모니아 시험에 대해 방어를 제공하였다(각각 100 μ g/mL의 각 PhtD와 PcpA 및 전처리된 A10(OH)의 제형으로 면역화된 그룹에서 생존율이 100%로 나타났다). 근육내 면역화한 그룹과 피하내 면역화한 그룹 사이의 생존율(%)에서 유의한 차이는 없었다. 두 가지 PhtD 로트로 면역화된 그룹의 생존율(%)은 유의하게 상이하지 않은 한편, 두 가지 PcpA 로트로 면역화된 그룹의 생존율(%)은 유의하게 상이하게 나타났다(로트 B는 유의하게 더 높은 생존을 제공하였다). 또한, PcpA 로트 B는 항원보강된 제형 대 비항원보강된 제형에서 유의하게 더 높은 생존율(%)을 제공하였다. 항원보강된 제제 대 비항원보강된 제제에서 다른 통계적 이점을 나타냈지 않았다.
- [0220] 이 연구에서 마우스의 시험을 위해 사용된 세균의 특정 로트는 본 발명 이전에 사용된 로트의 이 세균 균주보다 병독성이 떨어지는 것으로 밝혀졌다. 별도의 연구(또한 비내 시험 모델을 사용)에서, 트리스-HCl, 염수, 150 mM(pH=7.4)중의 100 μ g/mL의 각각의 PhtD와 PcpA + 1.3 mg/mL A10(OH)(Alhydrogel® "85" 2%, 25.08 mg/mL)의 제형으로 면역화시킨 마우스의 약 80%(p값 0.011)가 치명적인 스트렙토코커스 뉴모니아 시험에서 생존하였다.
- [0221] 실시예 7
- [0222] 본 실시예는 토끼 PhtD 및 PcpA 항-혈청의 제조를 기술한다. 표준 방법론에 의해 His-태그 PhtD, His-태그 PcpA 및 제조합 PhtD 및 PcpA 둘다를 사용하여 토끼에서 항혈청을 발생시켰다. 혈청중의 PhtD 및 PcpA 특이적 항체의 측정은 ELISA에 의해 결정하였다. 표 8에 기재된 바와 같이 PhtD의 예로서 고 역가의 PhtD 특이적 항체가 모든 면역화된 토끼의 혈청에서 검출되었으나 면역화전(예방주사 전) 채혈된 혈청에서는 검출되지 않았다. His-태그 PhtD 및 PhtD 단백질 둘 다 토끼 및 고 역가의 PhtD 특이적 항체를 갖는 항혈청에서 면역성

을 나타냈다. 유사한 결과가 His-PcpA 및 PcpA 단백질에서도 관찰되었다(데이터는 제시되지 않음).

[표 8] PhtD 토끼 항혈청의 생성

연구	토끼	면역화	혈액	ELISA 역가
1	7	His-태그 PhtD	면역화전	<100
1	7	His-태그 PhtD	최종 채혈	409,600
1	8	His-태그 PhtD	면역화전	<100
1	8	His-태그 PhtD	최종 채혈	819,200
8	3	PhtD	면역화전	<100
8	3	PhtD	최종 채혈	819,200
8	4	PhtD	면역화전	<100
8	4	PhtD	최종 채혈	409,600

[0225] 실시예 8

본 실시예는 사람 PhtD 및 PcpA 특이적 항체의 제조를 기술한다. 친화성 크로마토그래피를 사용하여 수집된 정상적인 성인 혈청으로부터 사람 다클론 항체를 정제하였다. 친화성 크로마토그래피 컬럼은 정제된 제조항원 단백질(PhtD 또는 PcpA)에 공유 결합되어 CNBr-활성화된 세파로즈 수지를 사용하여 제조하였다. 사람 AB 혈청(Sigma)은 친화성 컬럼에 결합된 후 세척하고 글리신-HCl 완충액으로 특이적 항체를 용출하였다.

한외여과 및 PBS로의 완충액 교환에 의해 수집된 용출 분획을 농축하여 최종 정제된 항체를 수득하였다. 항체 용액은 0.22 μ m 주사기 필터를 통해 여과에 의해 항체 용액을 멸균하였다. 총 단백질 농도는 UV 분광을 사용하여 측정하였다. 최종 항체 제제의 내독소 수준은 Charles River Laboratories의 Endosafe PTS 관독기로 측정하였다. 정제된 항체의 순도, 특이성 및 교차반응성은 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯 및 항체 ELISA 분석에 의해 측정하였다. 각 로트는 달리 언급되지 않는 한 사람 AB 혈청 100 mL부터 정제하였다.

[0228] 실시예 9

[0229] 항-PhtD 및 항-PcpA 항체의 표면 접근성 FACS 검사

본 실시예는 항-PhtD 및 항-PcpA 항체의 결합능의 분석을 기술한다. 완전 배지 또는 Mn^{2+} -결손 배지에서 동결 원형온처리물을 OD450 0.4-0.6으로 성장시켰다. 세균을 세척하고 PBS중의 다양한 농도의 사람 친화성 정제된 항체와 함께 항온처리하였다. PspA에 대한 사람 정제된 단클론 항체를 양성 대조군으로서 사용하였다. 세균에 결합하는 항체는 이차 항체인 FITC-결합된 항-사람 IgG를 사용하여 검출하고 유동세포분석으로 평가하였다. 유사하게, 항-PhtD 및 항-PcpA 특이적 토끼 혈청을 사용하였다. 세균에 결합하는 항체는 이차 항체인 FITC-결합된 항-사람 IgG를 사용하여 검출하고 유동세포분석으로 평가하였다.

정성 검사 관독으로서, 형광 신호가 검출될 경우 세균은 양성 판정하였다. 세균의 표면에 결합된 항체의 양을 측정하는 수단으로서 평균 형광 세기(MFI)를 분석하였다.

표면 접근성 검사('SASSY')를 수행하여 항원-특이적 토끼 혈청 및 정제된 사람 항체가 살아있는 온전한 스트렙토코커스 뉴모니애와 결합하는 능력을 측정하였다.

정제된 사람 항체 및 토끼 PhtD- 및 PcpA-항혈청(실시예 7 및 8에 기술된 바와 같이 제조됨)은 살아있는 스트렙토코커스 뉴모니애의 표면상의 단백질과 결합하였다. PhtD 및 PcpA 토끼 항혈청 둘 다는 실험실 및 임상 분리체를 포함하여 시험된 모든 균주의 스트렙토코커스 뉴모니애와 결합하였고, 단 균주 D39가 PcpA에 대해 음성적이었다. 그러나, 이것은 균주 D39(실험실 균주)가 pcpA 유전자의 PCR 증폭에 의해 pcpA-음성으로 나타났다라는 발견과 일치한다. PcpA의 경우, 세균이 결손된 Mn^{2+} 및 증가된 Zn^{2+} 의 조건에서 성장되었을 때 특히 인식되었다. 전체적으로 데이터는 제조항 단백질에 대해 유도된 항체 또는 천연 감염에 의해 발생된 항체가 고유 단백질을 인식하고 아주 다양한 임상 분리체상의 에피토프가 보존되어 있다는 증거를 제공한다. 또한 데이터는 PcpA와 PhtD 모두가 고도로 표면 접근성을 나타내는 것을 제시한다(도 6, 및 데이터 제시되지 않음). 토끼 면역전 혈청은 음성 대조군으로서 사용되었다.

사람 정제된 PhtD 및 PcpA 항혈청이 스트렙토코커스 뉴모니애와의 결합에 임의의 추가적으로 영향을 미치는지를 측정하기 위해 10 EU/ml 항-PhtD 항체를 증가량의 항-PcpA 항혈청이 함유된 각 시료로 스파이킹하였다.

세균에 결합된 총 항체의 양을 MFI로 측정하였다(도 7). 항-PcpA 항체는 살아있는 스트렙토코커스 뉴모니아와 용량-의존 방식으로 결합할 수 있었다. 항-PhtD 항체의 첨가는 시료의 MFI가 일관되게 증가되도록 유도하였고, 이것은 다수 표면 단백질에 대한 항체가 동시에 결합할 수 있고 이로 인해 세균의 표면에 결합되는 항체의 총량이 증가된다는 것을 증명한다.

[0235] 정제된 사람 항-PcpA 항체를 정제된 사람 항-PhtD 항체와 함께 또는 없이 다양한 농도에서 Mn^{2+} -결손 배지에서 항온처리된 살아있는 스트렙토코커스 뉴모니아 균주 WU2와 함께 항온처리하였다. 세균의 표면에 결합된 항체는 FITC-염소-항-사람 IgG를 사용하여 검출하였다. 도 7은 평균 형광 세기(MFI)를 보여준다. 항체 역가는 항-PcpA EU/ml(항-PcpA 및 항-PcpA + 항-PhtD 시료) 또는 항-PhtD EU/ml(항-PhtD 시료)로 제시된다.

[0236] 항-PhtD 및 항-PcpA 토끼 혈청 및 정제된 사람 항체를 사용한 표면 접근성 실험은 PcpA 및 PhtD 둘 다 표면 접근성을 나타낸다는 것을 보여주었다. 게다가, 사람 항-PcpA 및 항-PhtD 항체는 동시에 결합할 수 있었고, 이에 따라 세균에 결합된 항체의 총량을 증가시킬 수 있었다.

[0237] 실시예 10

[0238] 본 실시예는 다가 조성물에 의해 제공된 수동 방어의 분석을 기술한다.

[0239] 이 연구에서는 $AlPO_4$ 와 함께 제형된 재조합 PhtD와 PcpA의 이가 조성물을 사용하여 두 마리 뉴질랜드 화이트 토끼(Charles River)를 근육내로 면역화하고 항-PcpA/항-PhtD 다클론 혈청을 수득하였다. 각 토끼에 $AlPO_4(3 \text{ mg/ml})$ 중의 rPcpA $10 \text{ } \mu\text{g}$ /용량 및 rPhtD $10 \text{ } \mu\text{g}$ /용량을 근육내 주사하였다(총 $20 \text{ } \mu\text{g}$ 의 단백질, 총 $500 \text{ } \mu\text{l}$ 용량의 주사/토끼). $AlPO_4$ 중의 rPcpA $10 \text{ } \mu\text{g}$ /용량 및 rPhtD $10 \text{ } \mu\text{g}$ /용량으로 3주 간격을 두고 2회 연속 면역화하였다. 일차 및 이차 면역화 후 시료 혈액을 수집하였다. 최종 면역화 후 3주 시점에 최종 혈액을 수집하였다. 겔 분리기 튜브에 혈액을 수집한 후 응고되도록 두고 원심분리로 혈청을 획득하고 모아서 약 -20°C 에 저장하였다. PhtD 및 PcpA-특이적 총 IgG 항체 역가를 토끼 모두에 대해 평가하였다. 실험에서 사용된 토끼중 한 마리로부터 획득된 혈청은 ELISA에 의해 다음의 역가를 나타냈다: PhtD 204,800 및 PcpA 102,400.

[0240] 재조합 PhtD 단백질 및/또는 재조합 PcpA 단백질을 특정 혈청 시료에 첨가하여 혈청에 존재하는 상응하는 항체를 경쟁적으로 억제(차단)하였다. 대조군으로서, 재조합 단백질 어느 것도 특정 혈청 시료에 첨가하지 않았다. 이전에 공개된 문헌(참조: Briles DE et. al., *J. Infect Dis.* 2000 Dec.)을 기초로 수동 방어의 마우스 모델을 사용하여, 여러 희석율의 혈청 시료를 스트렙토코커스 뉴모니아로 시험된 마우스에 투여하였다. 투여된 혈청의 로그 희석당 관찰된 생존율(%)을 그래프로 도시하여 프로빗 용량 반응 곡선을 규명하였다(도 8 참조). 각 혈청 시료의 경우, ED50(50% 생존에 효과적인 로그 희석)을 계산하였다. 차단된 혈청과 비차단된 혈청사이의 ED50 차이를 통계 모델로 평가하였다(하기 표 9 참조).

[0241] [표 9]

[0242] 단백질 차단된 그룹과 비차단된 그룹사이의 통계적 비교

	차단된 단백질	ED50	83% CI(저)	83% CI(고)	결과
2가 비차단된 혈청의 ED50 = 44(36,55)	PcpA	17	15	20	S
	PhtD	35	27	46	NS
	PhtD와 PcpA 둘 다 $1:10^*$	--	--	--	S
PhtD와 PcpA 둘 다 $1:10^*$	PcpA	--	--	--	S
PhtD와 PcpA 둘 다 $1:10^*$	PhtD	--	--	--	S

[0243]

[0244] * : 피셔 정확검정법

[0245] PcpA 및 PhtD 특이적 항체 둘 다를 함유한 혈청중에서 PcpA 항체의 경쟁적 억제는 ED50(즉, 50% 생존에 효과

적인 혈청의 로그 회석)을 유의하게 감소시켰고 이 차이는 비차단된 혈청의 ED50에 비하여 통계적으로 유의적이었다. PcpA 및 PhtD 특이적 항체 둘 다를 함유한 혈청중에서 PhtD 항체의 경쟁적 억제능 또한 ED50을 감소시켰다(통계적으로 유의하지 않았다). PcpA와 PhtD 항체 모두가 경쟁적으로 억제된(혈청에 PhtD 및 PcpA 단백질 각각을 1:10의 단백질:혈청 비율로 첨가함으로써) 혈청 시료와 관련하여, 낮은 생존율(%)은 사용된 최고의 회석에서만 피쳐 정확검정법에 의해 통계적 유의성으로 획득되었고, 이에 따라 ED50은 결정할 수 없었다.

[0246] 총론적으로, PhtD 및 PcpA 항체 둘 다는 이가 제형에 대한 혈청에 의해 유도된 수동 방어에 기여하였다. 이가 제형에 대한 혈청에 의해 제공된 방어는 PhtD 및 PcpA 항체를 경쟁적으로 억제함으로써 차단되었고, 이 결과는 PhtD 또는 PcpA 항체중 하나만이 경쟁적으로 억제되었을 때 획득된 것과 유의하게 상이하였다. 유사한 결과가 동일한 수동 방어 모델에서 토끼 삼가 과다면역 혈청(PhtD, PcpA 및 PlyD1을 포함한 삼가 조성물을 사용하여 생성된 것)과 함께 PhtD 및 PcpA 단백질을 사용하여 획득되었다. 이 연구에서, PhtD 및 PcpA 단백질은 함께 삼가 과다면역 혈청의 방어능을 차단할 수 있었다. 이러한 수동 방어 모델로부터 얻은 이들 결과는 각 단백질-특이적 항체의 기여가 부가적임을 내포한다.

[0247] 실시예 11

[0248] **백신 제형의 면역원성에 미치는 알루미늄 농도의 영향**

[0249] 본 실시예는 포스페이트 전처리된 AlO(OH) 및 다양한 농도의 원소 알루미늄과 함께 제형된 복합-성분 조성물의 면역원성 분석을 기술한다.

[0250] 암컷 Balb/c 마우스를 사용하여 항원보강된 삼가 제형에 의해 유도된 면역반응을 평가하였다. 삼가 제형을 제조하기 위해, 재조합 PhtD, PcpA 및 효소적 불활성 뉴모라이신 돌연변이체(PlyD1, PCT/CA/2009/001843에 서열번호 44로 기술되어 있고 본원에서 서열번호 9에 해당한다)를 실시예 1에 기술된 바와 같이 AlO(OH)-함유 PO₄(2mM)와 함께 제형하였다. 제조된 제형의 시료는 연구 개시전에 2 내지 8℃에 저장하였다. Balb/c 마우스 그룹을 해당 제형으로 3주 간격으로 3회 근육내(IM)로 면역화하였다.

[0251] A. 비면역증강된(TBS pH 7.4중의 50 µg/mL의 PcpA 및 PhtD 및 100 µg/mL의 Ply 돌연변이체의 삼가 제형)

[0252] B. 트리스 염수 pH 7.4중의 50 µg/mL의 PcpA 및 PhtD 및 100 µg/mL의 Ply 돌연변이체 + 0.56 mg Al/mL PTH, P:A1 몰비 = 0.1(2 mM PO₄로 처리된 0.56 mg Al/mL AlO(OH))의 삼가 제형

[0253] C. 트리스 염수 pH 7.4중의 50 µg/mL의 PcpA 및 PhtD 및 100 µg/mL의 Ply 돌연변이체 + 0.28 mg Al/mL PTH, P:A1 몰비 = 0.1(1 mM PO₄로 처리된 0.28 mg Al/mL AlO(OH))의 삼가 제형

[0254] D. 트리스 염수 pH 7.4중의 50 µg/mL의 PcpA 및 PhtD 및 100 µg/mL의 Ply 돌연변이체 + 1.12 mg Al/mL PTH, P:A1 몰비 = 0.1(4 mM PO₄로 처리된 1.12 mg Al/mL AlO(OH))의 삼가 제형

[0255] E. 트리스 염수 pH 7.4중의 50 µg/mL의 PcpA 및 PhtD 및 100 µg/mL의 Ply 돌연변이체 + 1.68 mg Al/mL PTH, P:A1 몰비 = 0.1(6 mM PO₄로 처리된 1.68 mg Al/mL AlO(OH))의 삼가 제형.

[0256] 일차, 이차 및 삼차 면역화 후 혈청을 수거하였다. 정량 ELISA에 의해 총 항원-특이적 IgG 역가를 측정하였고 각 그룹에 대한 기하 평균 역가(+/- SD)를 계산하였다. 획득한 총 IgG 역가는 도 9에 요약되어 있다.

[0257] 모든 항원보강된 그룹(B, C, D 및 E)는 비항원보강된 그룹(A)보다 모든 3종 항원에 대해 유의하게 더 높은 역가를 생성하였다(p<0.001). 각 항원은 0.56 mg 원소 알루미늄/mL과 함께 PTH로 항원보강된 경우 역가 수준을 최고로 나타냈고, PhtD의 경우 알루미늄 0.56 mg/mL 및 두 가지 더 높은 농도로 유도된 역가사이의 차이는 통계적으로 유의했다. 유사하게, 각 항원은 0.28 mg 원소 알루미늄/mL과 함께 PTH로 항원보강된 경우 역가 수준을 더 낮았고, PcpA의 경우 그 차이는 통계적으로 유의했다. 이러한 발견을 놀라운 것이었다. 항체(IgG) 역가는 문헌(참조: Little S.F. et. al., Vaccine, 25:2771-2777(2007))에 공개된 바와 같이 알루미늄의 농도에 비례하여 증가하는 것으로 예상되었다. 놀랍게도, 비록 각 항원의 농도가 일정하게 유지될지라도 역가는 알루미늄 농도가 증가하면서 플레토(plateau)아래로 감소하였다(PhtD의 경우 이것은 통계적으로 유의했다).

[0258] 실시예 12

[0259] 본 실시예는 여러 가지 조건하에서의 항원보강된 백신 제형의 안정성을 평가한 것이다. 많은 PTH 흡착된 백

신 제형은 5일 동안 5℃, 25℃, 37℃에서(즉, 열가속 조건하에서) 항온처리되었다.

[0260] A10(OH) 또는 PTH중에 제형된 PcpA의 4가지 상이한 백신 제형의 안정성을 평가하기 위해 각각의 제형을 37℃에서 6주간 항온처리한 다음 RT-HPLC로 평가하였다. 수득된 안정성 결과는 표 10에 요약되어 있다. 비처리된 A10(OH)로부터의 회수는 항온처리 기간(37℃에서) 후 거의 50%까지 감소한 반면 PTH 함유 제형에서는 분해가 거의 또는 전혀 관찰되지 않았다.

[0261] [표 10]

[0262] 37℃에서의 6주간 항온처리 후 PcpA의 회수율 %(RP-HPLC)

제형	회수율(%)		흡착율(%)	
	T=0	T=42 일째	T=0	T=42 일째
1) 10 mM 트리스-HCl, pH7.4/150 mM NaCl/1.3 mg/mL A10(OH)중의 50 µg/mL PcpA	98	53	100	100
2) 10 mM 트리스-HCl, pH7.4/150 mM NaCl/1.3 mg/mL A10(OH)/2 mM 포스페이트 완충액 pH7.4중의 50 µg/mL PcpA	103	95	100	100
3) 10 mM 트리스-HCl, pH7.4/150 mM NaCl/1.3 mg/mL A10(OH)/20 mM 포스페이트 완충액 pH7.4중의 50 µg/mL PcpA	103	98	100	100
4) 10 mM 트리스-HCl, pH7.4/150 mM NaCl/1.3 mg/mL A10(OH)/80 mM 포스페이트 완충액 pH7.4중의 50 µg/mL PcpA	100	100	96	73

[0263]

[0264] A10(OH) 또는 PTH와 함께 제형된 일가 및 이가 제형중의 PcpA 및 PhtD의 안정성을 평가하기 위해 제형을 실시예 1에 기술된 바와 같이 A10(OH) 또는 2 mM 포스페이트로 포스페이트-처리된 A10(OH)를 사용하여 제조하고 시료를 여러 온도(즉, 5℃, 25℃, 37℃ 또는 45℃)에서 약 16주 동안 항온처리하였다. 그런 다음 RP-HPLC로 항원 농도를 평가하였다. 수득된 안정성 결과는 도 10a 내지 10f에 나타나 있다. 이들 도면에서 알 수 있듯이, 비처리된 A10(OH)로 항원보강된 제형과 비교하여 포스페이트 처리된 A10(OH)로 항원보강된 제형에서 PcpA 및 PhtD의 분해 속도는 특히 가속(스트레스) 조건(예를 들어, 25, 37, 45℃)하에서 유의하게 감소하였다.

[0265] 다가 제형(A10(OH) 또는 PTH와 함께 제형됨)중의 PcpA 및 PhtD의 항원성 안정성을 평가하기 위해 이가 제형(100 µg/mL)을 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조한 후 시료를 약 37℃에서 약 12주 동안 항온처리하였다. 각 제형의 항원성을 0시간 및 12주 항온처리 기간 후에 정량 ELISA 샌드위치 검사로 평가하였다. 결과를 도 11에 나타내었다. 37℃에서 12주 항온처리 기간 후 PcpA와 PhtD 모두의 항원성은 A10(OH)를 포함한 제형과 비교하여 PTH로 제형된 경우 유의하게 더 높게 나타났다.

[0266] 실시예 13

[0267] 본 실시예에는 많은 제형의 안정성에 미치는 여러 부형제의 영향에 대한 평가를 기술한다.

[0268] 여러 농도의 18종 GRAS(일반적으로 안전한 것으로 간주되는) 화합물을 스크리닝하였다. 평가하에서 각 단백질(즉, PcpA, PhtD 및 해독된 뉴모라이신 돌연변이체(PlyD1, PCT/CA/2009/001843(변형된 PLY 핵산 및 폴리펩타이드)에서 서열번호 44에 해당)의 열안정성을 증가시키는 화합물을 스크리닝하기 위해 검사를 실시하였다.

[0269] 각각의 단백질 항원은 이. 콜라이에서 재조합적으로 발현시키고, PhtD 및 PcpA의 경우 실시예 1에 기술된 바와 같이 PlyD1의 경우 PCT/CA/2009/001843(서열번호 44에 해당하고 본원에서는 서열번호 9에 해당한다)에 기술된 바와 같이 통상적인 정제 프로토콜에 따라 일련의 컬럼 크로마토그래피하여 정제하였다. 모든 3종 항원의 단백질 순도는 RP-HPLC 및 SDS-PAGE에 의해 평가했을 때 전형적으로 90%이상이었다. 150 mM 염화나트륨을 함유한 10 mM 트리스(pH 7.4)중에 약 1 mg/mL의 단백질 벌크가 공급되었다. 각 단백질은 10 mM 트리스 완충염수 pH 7.5(TBS)중의 적절한 부형제 용액(표 11에 기재된 농도로)으로 목적하는 농도로 희석하고(100 µg/mL PcpA; 100 µg/mL PhtD; 200 µg/mL PlyD1) 각 단백질 용액에 PTH를 첨가하여 0.6 mg의 원소 Al/mL의 최종 농도를 조성하였다. 또한, 해당 부형제가 함유되지 않은 대조 시료가 검사되었다. SYPRO® 오렌지, 5000X(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)를 DMSO(Sigma)로 500X로 희석한 다음 항원보강된 단백질 용액에 첨가하였다. 모든 경우에 SYPRO-오렌지의 최적 희석은 5000X의 시판 원액으로부터 10X이었다.

- [0270] 검사는 실시간 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 기기(Mx3005p QPCR 시스템, Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 96웰 폴리프로필렌 평판(Stratagene, La Jolla, CA)에서 실시하였다. 약 100 μ L의 시료 용량을 각 웰에 첨가한 다음 평판을 광학 캡 스트립(Stratagene, La Jolla, CA)으로 밀봉하여 시료 증발을 방지하였다. 96웰 평판 로우터(rotor)가 장착된 Contifuge Stratos 원심분리기(Heraeus Instruments, England)로 실온하에 1분 동안 200g로 평판을 원심분리하였다. 이어서, 평판을 25℃에서 96℃로 분당 1℃씩 가열하였다. 형광 여기 및 방출 필터를 각각 492 nm 및 610 nm로 설정하였다. 각각의 시료에 대해 25℃에서 형광 판독(610 nm에서 방출, 492 nm에서 여기)을 실시한 다음, 1℃씩 높이면서 매번 실시하였다.
- [0271] 형광의 최소치에 대한 일차 미분의 상응하는 온도를 사용하여 열전이(용점, T_m)를 수득하였다. 용융 곡선(또는 해리 곡선)으로부터 음성 일차 미분 윤곽의 최소치를 RT-PCR 시스템에 설치된 MxPro 소프트웨어로 계산하였다. T_m 은 열용융 중간점으로 정의되며 단백질의 고유 및 비고유 형태의 유리 에너지가 동일한 온도를 나타낸다. 각 부형제의 영향은 $\Delta T_m = T_m(\text{단백질} + \text{화합물 함유 시료}) - T_m(\text{단백질 대조 시료})$ 로 평가하였다. 수득된 결과의 요약은 표 11에 나타나 있다. 검사 민감성은 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 였다.
- [0272] 폴리올, 당당류 및 이당류는 농도 의존 양상으로 항원보강된 PlyD1의 T_m 을 증가시켰으며(즉, 약 4℃의 T_m 증가) 고농도의 당에서 최대 안정화가 관찰되었다. 비슷한 결과들이 PcpA와 PhtD 각각에 대해 탐지되었고, 예외적으로 아르기닌은 PhtD의 T_m 을 약 2℃까지 감소시켰다. 다음의 부형제들은 모든 3종 단백질의 열안정성을 효율적으로 증가시키는 것으로 밝혀졌다: 소르비톨(20%, 10%), 트레할로즈(20%), 텍스트로즈(20%, 10%), 수크로즈(10%, 5%) 및 10% 락토즈.
- [0273] 종전에 알려진 열안정성 영향과의 상관성을 알아보기 위해 스트레스 조건하에 저장된 PcpA의 물리적 안정성 및 항원성에 대한 선별 검사에서 동정된 몇 가지 부형제의 영향을 또한 연구하였다. 도면에 기술된 적절한 부형제 용액(10 mM 트리스 완충액 pH 7.4중의 10% 소르비톨, 10% 수크로즈, 10% 트레할로즈)으로 PcpA 단백질을 목적하는 농도(예를 들어, 약 100 $\mu\text{g/mL}$)로 희석시키고, 단백질 용액에 PTH를 첨가하여 원소 Al 0.6 mg/mL의 최종 농도를 조성하였다. 또한 대조 시료(부형제 미함유)도 연구에 포함되었다. 시료는 3일 동안 50℃에서 저장하였다. RP-HPLC에 의해 단백질 분해를 평가하였고, 정량 샌드위치 ELISA에 의해 항원성을 평가하였다. 결과는 도 12a 및 12b에 나타나 있다.
- [0274] 온전한 단백질의 농도를 다이오드 어레이 UV 검출기가 장착된 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용한 RP-HPLC로 측정하였다. 37℃의 PBS/Zwittergent 완충액중에서 5시간 동안 시료를 항원보강제로부터 탈착시키고 ACE C4 컬럼(Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, UK) 및 이동상 구배의 완충액 A(수중의 0.1% TFA) 및 완충액 B(CAN중의 0.1% TFA)(1 ml/분의 유속으로 30분에 걸쳐 분당 완충액 B의 0.75%의 구배를 사용)를 사용하여 분리하였다. 단백질을 210 nm에서 UV 흡광으로 모니터링하고 외부 표준치로 획득한 5-점 선형 보정곡선에 대해 정량하였다.
- [0275] 정량 항원 ELISA 샌드위치를 사용하여 0 시점 및 50℃에서 3일 항온처리 후 PcpA 제형의 항원성을 평가하였다. 토끼 IgG 항-PcpA 혈청을 항원 포획을 위해 사용하고 잘 성정확인된 단클론 항-PcpA를 검출을 위해 사용하였다. 간단히 설명하면, 96웰 평판을 0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 완충액중에 2 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 토끼 항-PhtD IgG로 실온(RT)에서 18시간 피복시키고 실온에서 1시간동안 1% BSA/PBS로 차단한 후 PBS/0.1% 트윈20의 세척 완충액(WB)중에서 2회 세척하였다. 시험 시료의 2배 희석물, 내부 대조군 및 알려진 농도의 정제된 PcpA의 참조 표준물을 0.1% BSA/PBS/0.1% 트윈 20(SB)중에서 제조하고 웰에 첨가한 다음, 실온에서 1시간 동안 항온처리한 후 WB에서 5회 세척하였다. 검출된 일차 mAb를 SB중에 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하고 실온에서 1시간 동안 항온처리한 후 WB에서 5회 세척하고 SB중의 1/40K 희석에 특이적인 F(ab')₂ 동키 항-마우스 IgG(H+L)를 첨가하였다. WB에서 5회 세척 후 TMB/ H_2O_2 기질을 웰에 첨가하고 실온에서 10분 동안 항온처리하였다. 1M H_2SO_4 를 첨가하여 반응 정지시켰다. ELISA 평판을 A450/540 nm에서 평판 판독기(SpectraMax, M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 판독하고 시험 시료 데이터를 소프트웨어 SoftMax PRO를 사용하여 4-변수 로지스틱이 사용된 표준 곡선으로부터 외삽에 의해 계산하였다.
- [0276] 도 12a에 도시된 바와 같이, RP-HPLC로부터 획득된 데이터는 항원보강된 PcpA의 T_m 을 증가시킨 부형제들은 3 일간에 걸쳐 50℃에서의 단백질 분해속도를 또한 감소시켰음을 증명하였다. 경과 시간에 따른 PcpA 단백질의 회수율로 결정된 가장 큰 안정성은 10% 소르비톨에 의해 제공되었다(도 12a에 도시됨). 또한, 항원보강된 PcpA의 면역원성이 이들 부형제에 의해 보존되었다(도 12b에 도시됨). RP-HPLC 결과와의 양호한 상관관계에서 소르비톨은 수크로즈 또는 트레할로즈보다 더 높은 정도로 항원성을 보존하였다.

[0277] 10% 소르비톨, 10% 수크로즈 또는 10% 트레할로즈의 첨가는 부형제가 없는 대조 시료와 비교했을 때 50℃에서의 속도상수를 감소시켰고 PcpA의 반감기를 증가시켰다(표 12). 완충액 pH9.0은 대조군의 것과 비교했을 때 단백질의 T_m을 감소시켰으나 50℃에서 분해를 가속시켰다(즉, 속도상수를 증가시켰다)(표 12). 종합적으로 이들 결과는 검사에 의해 탐지된 열안정성, RP-HPLC에 의해 탐지된 물리적 안정성 및 ELISA에 의해 검출된 면역원성사이의 양호한 상관관계를 제시한다.

[0278] 이들 연구에서 획득된 결과의 측면에서, 소르비톨, 수크로즈, 텍스트로즈, 락토즈 및/또는 트레할로즈는 PcpA, PhtD 및 해독된 뉴모라이신 단백질(예를 들어, PlyD1)의 일가 및 다가(예를 들어, 이가, 삼가) 제형에 포함되어 물리적 안정성을 증가시켜 줄수 있는 부형제의 예이다.

[0279] [표 11]

[0280] T_m에 미치는 GRAS 부형제의 영향(온도 범위에서 형광 방출을 모니터링하여 평가됨). 열안정성을 증가시키는 화합물은 양성 T_m 차등 값을 제공한다.

부형제	PcpA		PhtD		Ply 돌연변이체	
	T _m (℃)	ΔT _m (ΔT _m =T _m (부형제)-T _m (대조군))	T _m (℃)	ΔT _m (ΔT _m =T _m (부 형제)-T _m (대 조군))	T _m (℃)	ΔT _m (ΔT _m =T _m (부형제)-T _m (대조군))
대조군	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
5% 수크로즈	57.0	0.3	60.0	1.3	50.4	0.7
10% 수크로즈	58.4	1.7	60.0	1.3	52.1	2.4
20% 수크로즈	60.0	3.3	61.7	3.0	52.5	2.8
5% 텍스트로즈	57.7	1.0	58.7	0.0	49.7	0.0
10% 텍스트로즈	58.7	2.0	59.7	1.0	51.7	2.0
20% 텍스트로즈	60.7	4.0	60.7	2.0	53.7	4.0
5% 트레할로즈	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
10% 트레할로즈	57.7	1.0	58.7	0.0	50.7	1.0
20% 트레할로즈	58.7	2.0	60.7	2.0	51.7	2.0
5% 만니톨	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
10% 만니톨	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
20% 만니톨	56.7	0.0	58.7	0.0	50.7	1.0
5% 소르비톨	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
10% 소르비톨	58.7	2.0	59.7	1.0	51.7	2.0
20% 소르비톨	60.7	4.0	60.7	2.0	53.7	4.0
5% 글리세롤	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
10% 글리세롤	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
20% 글리세롤	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
0.05M 라이신	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
0.1M 라이신	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
5% 락토즈	56.7	0.0	58.7	0.0	50.7	1.0
10% 락토즈	58.7	2.0	60.7	2.0	50.7	1.0
0.05M 프롤린	56.7	0.0	58.7	0.0	48.7	-1.0
0.1M 프롤린	56.7	0.0	58.7	0.0	48.7	-1.0
0.05M 글리신	56.7	0.0	58.7	0.0	50.7	1.0
0.1M 글리신	56.7	0.0	58.7	0.0	50.7	1.0
0.01M 아스파르트레이트	56.7	0.0	58.7	0.0	48.7	-1.0
0.05M 글루타메이트	56.7	0.0	58.7	0.0	50.7	1.0
0.05M 락트산	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
0.05M 말산	58.7	2.0	58.7	0.0	48.7	-1.0
0.05M 아르기닌	56.7	0.0	58.7	0.0	48.7	-1.0
0.1M 아르기닌	56.7	0.0	56.7	-2.0	48.7	-1.0
0.05M 디에탄올아민	56.7	0.0	58.7	0.0	48.7	-1.0
0.1M 디에탄올아민	56.7	0.0	58.7	0.0	48.7	-1.0
0.05M 히스티딘	56.7	0.0	58.7	0.0	50.7	1.0
0.1M 히스티딘	56.7	0.0	58.7	0.0	49.7	0.0
0.15M 타우린	56.7	0.0	58.7	0.0	50.7	1.0

[0281]

[0282] [표 12]

[0283] 50℃에서 항온처리된 제형의 안정성 데이터로부터의 속도상수 값

제형	50℃에서의 k ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{일}^{-1}$)	50℃에서의 반감기 (일)	R^2
10% 소르비톨	7.5	7.3	0.99
10% 트레할로즈	9.8	5.6	0.95
10% 수크로즈	10.9	5.1	0.98
대조군(TBS pH 7.4)	13.4	4.1	0.94
TBS pH 9	16.2	3.4	0.93

[0284]

[0285] 50℃에서 항온처리된 제형의 속도상수는 0차 운동방정식(1) $[A_t] = -kt + [A_0]$ (여기서, A_t 는 주어진 시간에서의 항원 농도이고, A_0 은 초기 단백질 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)이며, t 는 시간(일)이고, R^2 는 방정식(1)을 사용한 데이터의 선형 회귀 값이다.)을 사용하여 도 12a에서 나타낸 RP-HPLC 안정성 데이터에 피팅함으로써 계산하였다.

[0286] 실시예14

[0287] 알루미늄 항원보강제와 함께 또는 없이 제형된 상이한 3종 항원의 안정성에 미치는 pH의 영향을 시험하였다. 평가하에 각 단백질(즉, PcpA, PhtD 및 해독된 뉴모라이신 돌연변이체(PlyD1, PCT/CA2009/001843(변형된 PLY 핵산 및 폴리펩타이드)에 서열번호 44로 기술되어 있고 본원에서 서열번호 9로 서열목록에 기재되어 있다)의 열안정성에 미치는 pH의 영향을 평가하는 검사를 사용하였다.

[0288] 단백질 항원 각각을 이. 콜라이에서 재조합적으로 발현시키고 PhtD 및 PcpA의 경우 실질적으로 실시예 1에 기술된 통상의 정제 프로토콜에 따라, PlyD1의 경우 PCT/CA2009/001843에 기술된 프로토콜에 따라 일련의 컬럼 크로마토그래피하여 정제하였다. 모든 3종 항원에 대한 단백질 순도는 RP-HPLC 및 SDS-PAGE에 의해 평가된 결과 전형적으로 90% 이상이었다. 단백질 벌크는 150 mM 염화나트륨을 함유한 pH 7.4의 10 mM 트리스 중의 약 1 mg/mL로 공급되었다. 각 단백질을 적절한 완충액(즉, 10 mM 트리스 완충액(pH 7.5 내지 9.0), 10 mM 포스페이트 완충액(pH 6.0 내지 7.0) 및 10 mM 아세트산 완충액(pH 5.0 내지 5.5)으로 목적하는 농도(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PcpA; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PhtD; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PlyD1)로 희석하고 단백질 용액에 알루미늄 항원보강제(즉, 수산화알루미늄(Alhydrogel, Brenntag Biosector, Denmark) 또는 알루미늄 포스페이트(Adju-Phos, Brenntag Biosector, Denmark) 또는 2 mM 포스페이트(PTH)로 전처리된 수산화알루미늄을 첨가하여 0.6 mg의 원소 Al/mL의 최종 농도를 조성하였다. 또한 해당 항원보강제가 없는 대조 시료를 검사하였다. SYPRO[®] 오렌지, 5000X(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)를 DMSO(Sigma)로 500X로 희석한 다음 항원보강된 단백질 용액에 첨가하였다. 모든 경우에 SYPRO-오렌지의 최적 희석은 5000X의 시판 원액으로부터 10X이었다.

[0289] 검사는 실시간 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 기기(Mx3005p QPCR 시스템, Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 96웰 폴리프로필렌 평판(Stratagene, La Jolla, CA)에서 실시하였다. 약 100 μL 의 시료 용량을 각 웰에 첨가한 다음 평판을 광학 캡 스트립(Stratagene, La Jolla, CA)으로 밀봉하여 시료 증발을 방지하였다. 96웰 평판 로우터가 장착된 Contifuge Stratos 원심분리기(Heraeus Instruments, England)로 실온에서 1분 동안 200g로 평판을 원심분리하였다. 이어서, 평판을 25℃에서 96℃로 분당 1℃씩 가열하였다. 형광 여기 및 방출 필터를 각각 492 nm 및 610 nm로 설정하였다. 각각의 시료에 대해 25℃에서 형광 관독(610 nm에서 방출, 492 nm에서 여기)을 실시한 다음, 1℃씩 높이면서 매번 실시하였다.

[0290] 형광의 최소치에 대한 일차 미분의 상응하는 온도를 사용하여 열전이(융점, T_m)를 획득하였다. 용융 곡선(또는 해리 곡선)으로부터 음성 일차 미분 윤곽의 최소치를 RT-PCR 시스템에 설치된 MxPro 소프트웨어로 계산하였다. T_m 은 열용융 중간점으로 정의되며 단백질의 고유 및 비고유 형태의 유리 에너지가 동일한 온도를 나타낸다. 획득된 결과의 요약은 표 13에 나타나 있다. 검사 민감성은 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 였다.

[0291] 대부분의 단백질의 경우, 용액 pH는 단백질 유형 및 충전하를 결정하므로 정전상호작용 및 총 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 항원보강된 단백질의 경우 용액 pH 및 완충액 종류는 알루미늄 항원보강제의 표면에서 미세환경 pH에 강력한 영향을 나타내며 궁극적으로 알루미늄 항원보강제에 흡착된 단백질의 분해율에 영향을 미칠 수 있다.

[0292] 모든 3종 단백질은 연구된 pH의 범위에서 수산화알루미늄에 90 내지 100% 흡착되었다. 알루미늄 포스페이트

에서, PcpA의 흡착은 80% 이상인 한편 PhtD 및 PlyD1(각각 산성 단백질)은 pH 5 이상에서 항원보강제에 거의 흡착되지 않았다(데이터 제시되지 않음).

[0293] 도 13은 항원보강제와 제형된 경우 및 비항원보강된 대조군에서 3종 항원 각각에 미치는 pH의 영향을 보여준다. 비항원보강된 항원은 이의 특징적인 pH 안정성 프로필을 나타냈다. PcpA는 6.0 내지 9.0의 광범위한 pH에서 정상 Tm 값을 나타냈고 pH가 6.0에서 5.0으로 떨어지면서 Tm 값이 감소하였다. 반면, 비항원보강된 PhtD 및 PlyD1의 열안정성은 산성 pH 이하에서 최대로 나타났다(도 13 참조). 비항원보강된 단백질의 열안정성 프로필은 알루미늄 항원보강제의 첨가 결과로서 유의하게 변화되었다. 비항원보강된 대조군과 비교하여, 수산화알루미늄은 pH가 5에서 9로 증가함에 따라 중성 근처 pH에서 최대 안정성을 나타내면서 상대적으로 높고 낮은 pH 값에서 모든 3종 단백질의 안정성을 감소시키는 벨모양(bell-shaped) 곡선을 나타냈다. 이들 데이터는 2 mM 포스페이트로 A100H의 전처리가 비처리된 A100H에 비하여 높고 낮은 pH에서 모든 3종 항원의 안정성을 유의하게 향상시켰음을 보여주었다(도 13a 내지 도 13c). 이 방법에서 pH 6.0 내지 7.5의 범위에서 유의적 변화는 관찰되지 않았다.

[0294] 비항원보강된 대조군과 비교하여, 알루미늄 포스페이트가 항원보강제로 사용된 경우 PcpA 및 PlyD1의 Tm 대 pH 프로필에서 주된 변화가 관찰되지 않았다(도 13a 및 13c). AP로 항원보강된 PhtD의 경우에 비항원보강된 대조군과 비교하여 Tm의 유의적 감소가 6 미만의 pH에서 관찰되었다(도 13b).

[0295] 실시예15

[0296] 본 실시예는 복합-성분 제형에서 여러 항원 배합의 효과에 대한 평가를 기술한다.

[0297] 3종의 구분된 스트렙토코커스 뉴모니에 항원을 실질적으로 상기 실시예에 기술된 바와 같이 일가, 이가 및 삼가 형태로 제형하고 IN 시험 모델을 사용하여 평가하였다. 항원보강제(2 mM PO₄로 처리된 A100H(0.56 µg Al/용량)) pH 7.4와 함께 TBS중의 정제된 재조합 PcpA, PhtD 및 PlyD1(해독된 뉴모라이신)의 차선 용량을 사용하여 일가, 이가 및 삼가 제형을 제조하였다. 추가의 효과를 검출하기 위해 한정된 방어 또는 무방어를 유도하는 것으로 밝혀진 각 항원의 차선 용량을 선택하였다. 단백질 항원 각각을 재조합적으로 이. 콜라이에서 발현시키고 실질적으로 앞서 기술된 바와 같이 통상적인 정제 프로토콜에 따라 일련의 컬럼 크로마토그래피하여 정제하였다. 모든 3종 항원의 단백질 순도는 RP-HPLC 및 SDS-PAGE로 평가된 것으로써 전형적으로 90% 이상으로 나타났다. 암컷 CBA/J 마우스(n=15/그룹)의 그룹(n=26)을 해당 제형(50 µL)으로의 각 면역화간에 3주 간격을 두고 3회 근육내 면역화하였다.

[0298] 마우스에 치사량의 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 14453, 혈청형 6B(1.5x10⁶ cfu/마우스)를 최종 면역화 후 3주 후에 투여하고 2주 동안 생존과 건강상태를 관찰하였다. 하기 표 13에 요약된 생존 결과는 피서 정확검정법으로 계산 및 통계분석하였다. 각 면역화 후 수거된 혈청으로부터의 총 항원-특이적 IgG 역가를 정량 ELISA로 측정하고 각 그룹에 대해 기하평균 역가(+/- SD)를 계산하였다. 수득된 총 IgG 역가는 도 14에 요약되어 있다.

[0299] [표 13]

그룹/투여한 제형	PcpA ($\mu\text{g}/50\mu\text{l}$)	PhtD ($\mu\text{g}/50\mu\text{l}$)	PlyD1 ($\mu\text{g}/50\mu\text{l}$)	생존율(%)	유의한 방어 피서 정확검 정법
A/일가	0.06			73.333333	+
B/일가	0.02			66.666667	+
C/일가	0.0067			66.666667	+
D/일가		0.25		20	-
E/일가		0.083		26.666667	-
F/일가		0.027		33.333333	-
G/일가			0.5	46.666667	-
H/일가			0.166	13.333333	-
I/일가			0.055	33.333333	-
J/이가	0.06	0.25		73.333333	+
K/이가	0.02	0.083		66.666667	+
L/이가	0.0067	0.027		33.333333	-
M/이가	0.00335	0.0135		40	-
N/삼가	0.06	0.25	0.5	90.909091	+
O/삼가	0.02	0.083	0.5	73.333333	+
P/삼가	0.0067	0.027	0.5	73.333333	+
Q/삼가	0.00335	0.0135	0.5	40	-
R/삼가	0.06	0.25	0.166	70	+
S/삼가	0.02	0.083	0.166	80	+
T/삼가	0.0067	0.027	0.166	73.333333	+
U/삼가	0.00335	0.0135	0.166	26.666667	-
V/삼가	0.06	0.25	0.055	69.230769	+
W/삼가	0.02	0.083	0.055	86.666667	+
X/삼가	0.0067	0.027	0.055	60	+
Y/삼가	0.00335	0.0135	0.055	46.666667	-
Z/위약 대조군				20	-

[0300]

[0301]

PcpA 일가 제형은 아주 낮은 용량에서 조차(및 낮은 항체 역가에도 불구하고) 방어적이었다. PcpA 일가 제형과 비교하여 삼가 제형은 비슷한 수준의 방어를 제공하였다. PhtD 및 PlyD1 일가 제형과 비교하여 삼가 제형은 유의하게 더 높은 방어를 제공하였다. 두 가지 삼가 제형(0.0067:0.027:0.5, 0.0067:0.027:0.166, PcpA:PhtD:PlyD1)을 이가 제형(0.0067:0.027, PcpA:PhtD)과 비교하였을 때, 삼가 제형은 이가 제형에 비하여 보다 높은 생존율을 유도하였다(차이는 통계적으로 유의했고 $p = 0.043$). 이가 제형은 PcpA 및 PhtD가 각각 0.0067 및 0.027 μg 에서 방어능이 나타내지 않았고 PcpA의 상기 양은 일가 제형으로서 투여되었을 때 방어 용량이었다. 그러나, 이들 두 그룹간의 생존율 차이는 통계적으로 유의적이지 않기때문에 일가/이가 제형간의 관찰된 차이는 검사 변동성에 기인하였다.

[0302]

이가 제형(0.0067:0.027, PcpA:PhtD) 및 삼가 제형중에서 PcpA 및 PhtD 각각이 치사 시험(ED60)으로부터 적어도 60%의 마우스를 방어하는데 유효한 중앙 용량을 계산하였다(하기 표 14 참조). PcpA 및 PhtD 각각의 경우 ED60은 상응하는 이가 제형에 비하여 삼가 제제에서 감소하였다. 이들 결과로부터, PlyD1의 첨가는 이가 제형(즉, PcpA + PhtD)에 평균 2배 용량 절약 효과를 나타냈다.

[0303]

이들 데이터는 삼가 제형으로의 번역화가 이가 제형에 비하여 보다 양호한 방어를 유도한다는 것을 보여준다. 삼가 제형중의 PlyD1의 도입은 전체 방어에 억제 효과를 나타내지 않는다.

[0304] [표 14]

그룹 PcpA:PhtD:PlyD1 (50 μ L 중의 μ g)	PcpA			PhtD			이가와 비교하 여 용량 의 배수 감소
	ED60	83% CI		ED60	83% CI		
		저	고		저	고	
L(PcpA:PhtD= 0.0067:0.027)	0.014	0.0085	0.0234	0.0567	0.0341	0.0943	
P(PcpA:PhtD:PlyD1= 0.0067:0.027:0.5)	0.0067	0.0041	0.0108	0.0269	0.0167	0.0434	2.105
T(PcpA:PhtD:PlyD1= 0.0067:0.027:0.166)	0.0074	0.0046	0.0119	0.0297	0.0185	0.0478	1.907
X(PcpA:PhtD:PlyD1= 0.0067:0.027:0.055)	0.0058	0.0036	0.0095	0.0236	0.0145	0.0383	2.404

[0305]

[0306] 실시예 16

[0307] 본 실시예는 최고 수준의 항체 반응을 유도하는 최소 유효 항원 용량의 평가를 기술한다.

[0308] 수행된 일가 연구로부터 실시된 항원 용량 당 총 항원-특이적 IgG 역가(ELISA로 측정)를 도시화하여 최고 역가를 유도하는 최소 유효 항원 용량을 플롯팅하였다. 대표적인 그래프가 도 15a, 15b, 15c에 나타나 있다. PcpA의 경우, 산정된 최소 항원 용량은 0.196 μg /마우스(0.147, 95% 낮음; 0.245, 95% 높음)로 평가되었고, PhtD의 경우 산정된 최소 항원 용량은 0.935 μg /마우스(0.533, 95% 낮음; 1.337, 95% 높음)로 평가되어 1:4의 PcpA:PhtD 비율을 제공한다. PlyD1의 최소 항원 용량은 $>5\mu\text{g}$ /마우스로 산정되었다. 항원사이의 면역학적 간섭은 예를 들어 실시예 15에서와 같이 실시된 이가 및 삼가 연구에서의 평가된 비율중 어느 것에서도 검출되지 않았기 때문에 PcpA:PhtD:PlyD1의 1:1:1 비율로 복합-성분 조성물에 사용될 수 있다.

[0309] 참조문헌

1. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*.
2. Park IH, Pritchard DG, Cartee R et al. 2007. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 45, 1225-1233.
3. World Health Organization. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization—WHO position paper. Wkly Epidemiol. Rec. 82, 93-104.
4. Plotkin, S.A. and Orenstein W.A. Vaccines. Editors W. B. Saunders Company, Third Edition 1999
5. Fedson, D.S. et al, (1999), The burden of pneumococcal disease among adults in developed and developing countries: what is known and what is not known. Vaccine 17, S11-S18.
6. Klein, D.L. (1999) Pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines. Microb. Drug Resist., 5, 147-157.
7. Rahav, G., et al, (1997) Invasive pneumococcal infection: A comparison between adults and children. Medicine 76, 295:303.
8. World Health Organization Bulletin 2004. Global estimate of the incidence of clinical pneumonia among children under five years of age. December 2004, 82 (12).
9. Siber GR, Klugman KP, Makela PH. Pneumococcal Vaccines: The Impact of Conjugate Vaccine. Washington DC: ASM Press; 2008
10. PREVNAR® (package insert). Wyeth Pharmaceuticals Inc. Philadelphia, PA. 2006
11. Clinical and Vaccine Immunology, June 2007, p.792-795; Pediatr. Infect. Dis. J. 16(4 Suppl.):S97-S102.
12. WHO (2005). Guidelines on nonclinical evaluations vaccines. Technical report series No. 927.

[0310]

SEQUENCE LISTING

<110> SANOFI PASTEUR, LTD

<120> Immunogenic Compositions

<130> APL-10-03-PCT

<150> US 61/289236

<151> 2009-12-22

<150> US 61/325660

<151> 2010-04-19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 838

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

Met Lys Ile Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Gly Ser Val Ala Val Leu Ala

1 5 10 15

Leu Ser Val Cys Ser Tyr Glu Leu Gly Arg His Gln Ala Gly Gln Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

[0311]

```

65              70              75              80
Thr Ser His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr
      85              90              95
Asp Ala Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Gln
      100              105              110
Leu Lys Asp Ser Asp Ile Val Asn Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Ile
      115              120              125
Lys Val Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala
      130              135              140
Asp Asn Ile Arg Thr Lys Glu Glu Ile Lys Arg Gln Lys Gln Glu His
      145              150              155              160
Ser His Asn His Asn Ser Arg Ala Asp Asn Ala Val Ala Ala Ala Arg
      165              170              175
Ala Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Ala Ser
      180              185              190
Asp Ile Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile Val Pro His Gly Asp
      195              200              205
His Tyr His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu Leu Ala
      210              215              220
Ala Ala Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly Ser Arg Pro Ser Ser
      225              230              235              240
Ser Ser Ser Tyr Asn Ala Asn Pro Val Gln Pro Arg Leu Ser Glu Asn
      245              250              255
His Asn Leu Thr Val Thr Pro Thr Tyr His Gln Asn Gln Gly Glu Asn
      260              265              270

```

[0312]

Ile Ser Ser Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Ala Lys Pro Leu Ser Glu Arg
275 280 285

His Val Glu Ser Asp Gly Leu Ile Phe Asp Pro Ala Gln Ile Thr Ser
290 295 300

Arg Thr Ala Arg Gly Val Ala Val Pro His Gly Asn His Tyr His Phe
305 310 315 320

Ile Pro Tyr Glu Gln Met Ser Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ala Arg Ile
325 330 335

Ile Pro Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val Pro Asp Ser Arg Pro
340 345 350

Glu Gln Pro Ser Pro Gln Ser Thr Pro Glu Pro Ser Pro Ser Leu Gln
355 360 365

Pro Ala Pro Asn Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn Pro Ile Asp Glu Lys
370 375 380

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

Glu Asn Gly Val Ser Arg Tyr Ile Pro Ala Lys Asp Leu Ser Ala Glu
405 410 415

Thr Ala Ala Gly Ile Asp Ser Lys Leu Ala Lys Gln Glu Ser Leu Ser
420 425 430

His Lys Leu Gly Ala Lys Lys Thr Asp Leu Pro Ser Ser Asp Arg Glu
435 440 445

Phe Tyr Asn Lys Ala Tyr Asp Leu Leu Ala Arg Ile His Gln Asp Leu
450 455 460

[0313]

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


```

        660                665                670
Ala Thr Val Lys Tyr Tyr Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His Ser
        675                680                685

Asp Asn Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys Ala
        690                695                700

Asp Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val Ser
        705                710                715                720

Glu Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly Leu
        725                730                735

Asn Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu
        740                745                750

Thr Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln
        755                760                765

Val Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu
        770                775                780

Leu Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr
        785                790                795                800

Leu Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn
        805                810                815

Thr Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser
        820                825                830

Gln Pro Ala Pro Ile Gln
        835

```

<210> 2

[0315]

```

<211> 641
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2
Met Lys Lys Thr Thr Ile Leu Ser Leu Thr Thr Ala Ala Val Ile Leu
1          5          10          15

Ala Ala Tyr Val Pro Asn Glu Pro Ile Leu Ala Asp Thr Pro Ser Ser
          20          25          30

Glu Val Ile Lys Glu Thr Lys Val Gly Ser Ile Ile Gln Gln Asn Asn
          35          40          45

Ile Lys Tyr Lys Val Leu Thr Val Glu Gly Asn Ile Arg Thr Val Gln
          50          55          60

Val Gly Asn Gly Val Thr Pro Val Glu Phe Glu Ala Gly Gln Asp Gly
65          70          75          80

Lys Pro Phe Thr Ile Pro Thr Lys Ile Thr Val Gly Asp Lys Val Phe
          85          90          95

Thr Val Thr Glu Val Ala Ser Gln Ala Phe Ser Tyr Tyr Pro Asp Glu
          100          105          110

Thr Gly Arg Ile Val Tyr Tyr Pro Ser Ser Ile Thr Ile Pro Ser Ser
          115          120          125

Ile Lys Lys Ile Gln Lys Lys Gly Phe His Gly Ser Lys Ala Lys Thr
          130          135          140

Ile Ile Phe Asp Lys Gly Ser Gln Leu Glu Lys Ile Glu Asp Arg Ala
145          150          155          160

Phe Asp Phe Ser Glu Leu Glu Glu Ile Glu Leu Pro Ala Ser Leu Glu
          165          170          175

```

[0316]

Tyr Ile Gly Thr Ser Ala Phe Ser Phe Ser Gln Lys Leu Lys Lys Leu
 180 185 190
 Thr Phe Ser Ser Ser Ser Lys Leu Glu Leu Ile Ser His Glu Ala Phe
 195 200 205
 Ala Asn Leu Ser Asn Leu Glu Lys Leu Thr Leu Pro Lys Ser Val Lys
 210 215 220
 Thr Leu Gly Ser Asn Leu Phe Arg Leu Thr Thr Ser Leu Lys His Val
 225 230 235 240
 Asp Val Glu Glu Gly Asn Glu Ser Phe Ala Ser Val Asp Gly Val Leu
 245 250 255
 Phe Ser Lys Asp Lys Thr Gln Leu Ile Tyr Tyr Pro Ser Gln Lys Asn
 260 265 270
 Asp Glu Ser Tyr Lys Thr Pro Lys Glu Thr Lys Glu Leu Ala Ser Tyr
 275 280 285
 Ser Phe Asn Lys Asn Ser Tyr Leu Lys Lys Leu Glu Leu Asn Glu Gly
 290 295 300
 Leu Glu Lys Ile Gly Thr Phe Ala Phe Ala Asp Ala Ile Lys Leu Glu
 305 310 315 320
 Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ser Leu Glu Thr Ile Glu Arg Leu Ala Phe
 325 330 335
 Tyr Gly Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu Ile Leu Pro Asp Asn Val Lys
 340 345 350
 Asn Phe Gly Lys His Val Met Asn Gly Leu Pro Lys Leu Lys Ser Leu
 355 360 365

[0317]

Thr Ile Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu Pro Ser Phe Phe Leu Ser Gly
370 375 380

Val Leu Asp Ser Leu Lys Glu Ile His Ile Lys Asn Lys Ser Thr Glu
385 390 395 400

Phe Ser Val Lys Lys Asp Thr Phe Ala Ile Pro Glu Thr Val Lys Phe
405 410 415

Tyr Val Thr Ser Glu His Ile Lys Asp Val Leu Lys Ser Asn Leu Ser
420 425 430

Thr Ser Asn Asp Ile Ile Val Glu Lys Val Asp Asn Ile Lys Gln Glu
435 440 445

Thr Asp Val Ala Lys Pro Lys Lys Asn Ser Asn Gln Gly Val Val Gly
450 455 460

Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser
465 470 475 480

Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn
485 490 495

Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp
500 505 510

Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp
515 520 525

Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly
530 535 540

Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser
545 550 555 560

Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn

[0318]

565 570 575

Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp
580 585 590

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

Ser Gly Lys Trp Tyr Tyr Thr Tyr Asn Ser Gly Asp Leu Leu Val Asn
610 615 620

Thr Thr Thr Pro Asp Gly Tyr Arg Val Asn Ala Asn Gly Glu Trp Val
625 630 635 640

Gly

<210> 3
<211> 2514
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3

atgaaaatca ataaaaata tctagcaggt tcagtggcag tccttgccct aagtgtttgt 60
tcctatgaac ttggtcgtca ccaagctggg caggtaaga aagagtctaa tcgagtttct 120
tatatagatg gtgatcaggc tgggtcaaaag gcagaaaatt tgacaccaga tgaagtcagt 180
aagagagagg ggatcaacgc cgaacaaatt gttatcaaga ttacggatca aggttatgtg 240
acctctcatg gagaccatta tcattactat aatggcaagg ttccttatga tgccatcatc 300
agtgaagaac ttctcatgaa agatccgaat tatcagttga aggattcaga cattgtcaat 360
gaaatcaagg gtggctatgt gattaaggta gacggaaaat actatgttta ccttaaagat 420
gcggcccatg cggacaatat tcggacaaaa gaagagatta aacgtcagaa gcaggaacac 480
agtcataatc ataactcaag agcagataat gctgttgctg cagccagagc ccaaggacgt 540
tatacaacgg atgatgggta tatcttcaat gcatctgata tcattgagga cacgggtgat 600
gcttatatcg ttcctcaggc cgaccattac cattacattc ctaagaatga gttatcagct 660
agcgagttag ctgctgcaga agcctattgg aatgggaagc agggatctcg tccttcttca 720
agttctagtt ataatgcaaa tccagttcaa ccaagattgt cagagaacca caatctgact 780

[0319]


```

gtcactccaa cttatcatca aaatcaaggg gaaaacattt caagcctttt acgtgaattg 840
tatgctaaac cttatcaga acgccatgta gaatctgatg gccttatttt cgaccagcg 900
caaatcacia gtcgaaccgc cagaggtgta gctgtccctc atggtaacca ttaccacttt 960
atcccttatg aacaaatgtc tgaattggaa aaacgaattg ctcgatttat tccccttcgt 1020
tatcgttcaa accattgggt accagattca agaccagaac aaccaagtcc acaatcgact 1080
ccggaaccta gtccaagtct gcaacctgca ccaaatcctc aaccagctcc aagcaatcca 1140
attgatgaga aattgggtcaa agaagctggt cgaagagtag gcgatgggta tgtctttgag 1200
gagaatggag ttctctgcta tatcccagcc aaggatcttt cagcagaaac agcagcaggc 1260
attgatgaga aactggccaa gcaggaaagt ttatctcata agctaggagc taagaaaact 1320
gacctcccat ctagtgatcg agaattttac aataaggctt atgacttact agcaagaatt 1380
caccaagatt tacttgataa taaaggtcga caagttgatt ttgaggtttt ggataacctg 1440
ttggaacgac tcaaggatgt ctcaagtgat aaagtcaagt tagtgatga tattcttgcc 1500
ttcttagctc cgattcgtca tccagaacgt ttaggaaaac caaatgcgca aattacctac 1560
actgatgatg agattcaagt agccaagttg gcaggcaagt acacaacaga agcgggttat 1620
atctttgatc ctctgtgatat aaccagtgat gaggggggatg cctatgtaac tccacatatg 1680
acccatagcc actggattaa aaaagatagt ttgtctgaag ctgagagagc ggcagcccag 1740
gcttatgcta aagagaaagg ttgacctcct ccttcgacag accatcagga ttcaggaaat 1800
actgaggcaa aaggagcaga agctatctac aaccgcgtga aagcagctaa gaaggtgcca 1860
cttgatcgta tgccttacaa tcttcaatat actgtagaag tcaaaaacg tagtttaatc 1920
atacctcatt atgaccatta ccataacatc aaatttgagt ggtttgacga aggcctttat 1980
gaggcaccta aggggtatag tcttgaggat cttttggcga ctgtcaagta ctatgtcgaa 2040
catccaaacg aacgtccgca ttcagataat ggttttggta acgctagtga ccatgttcgt 2100
aaaaataagg cagaccaaga tagtaaacct gatgaagata aggaacatga tgaagtaagt 2160
gagccaactc accctgaatc tgatgaaaaa gagaatcacg ctggttttaa tccttcagca 2220
gataatcttt ataaaccaag cactgatacg gaagagacag aggaagaagc tgaagatacc 2280
acagatgagg ctgaaattcc tcaagtagag aattctgtta ttaacgctaa gatagcagat 2340
gcgaggacct tgctagaaaa agtaacagat cctagtatta gacaaaatgc tatggagaca 2400
ttgactggtc taaaaagtag tcttcttctc ggaacgaaag ataataacac tatttcagca 2460
gaagtagata gtctcttggc ttgttataaa gaaagtcaac cggctcctat acag 2514

```

<210> 4

<211> 1923

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

```

atgaaaaaaa ctacaatat atcattaact acagctgcgg ttatttttagc agcatatgtc 60

```

[0320]

```

cctaataaac caatcctagc agatactcct agttcggag taatcaaaga gactaaagtt 120
ggaagtatta ttcaacaaaa taatatcaaa tataagggtc taactgtaga aggtaacata 180
agaactgttc aagtgggtaa tggagttact cctgtagagt ttgaagctgg tcaagatgga 240
aaaccattca cgattcctac aaaaatcaca gtaggtgata aagtatttac cgttactgaa 300
gtagctagtc aagcttttag ttattatcca gatgaaacag gtagaattgt ctactatcct 360
agctctatta ctatcccatc aagcataaaa aaaatacaaa aaaaaggctt ccatggaagt 420
aaagctaaaa ctattatatt tgacaaaggc agtcagctgg agaaaattga agatagagct 480
tttgattttt ctgaattaga agagattgaa ttgcctgcat ctctagaata tattggaaca 540
agtgcatatt cttttagtc aaaattgaaa aagctaacct ttctcctcaag ttcaaaatta 600
gaattaatat cacatgaggc ttttgctaatt ttatcaaatt tagagaaact aacattacca 660
aaatcggtta aaacattagg aagtaatcta tttagactca ctactagctt aaaacatgtt 720
gatgttgaag aaggaatga atcgtttgcc tcagttgatg gtgttttgtt ttcaaagat 780
aaaactcaat taatttatta tccaagtcaa aaaaatgacg aaagtataa aacgcctaag 840
gagacaaaaa aacttgcatc atattcgttt aataaaaatt ctacttgaa aaaactcgaa 900
ttgaatgaag gtttagaaaa aatcggtact tttgcatttg cggatgcat taaacttgaa 960
gaaattagct taccaaatag tttagaaact attgaacgtt tagcctttta cgttaattta 1020
gaattaaaag aacttatatt accagataat gttaaaaatt ttggtaaaca cgttatgaac 1080
ggtttaccaa aattaaaaag tttacaatt ggtaataata tcaactcatt gcgctccttc 1140
ttcctaagtg gcgtcttaga ttcatataag gaaattcata ttaagaataa agtacagag 1200
ttttctgtga aaaaagatag atttgcaatt cctgaaactg ttaagttcta tgtaacatca 1260
gaacatataa aagatgttct taaatcaaat ttatctacta gtaatgatat cattgttgaa 1320
aaagtagata atataaaaca agaaactgat gtagctaaac ctaaaagaa ttctaatacag 1380
ggagtagttg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1440
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1500
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1560
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaatga atcaggttca 1620
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1680
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1740
atggctactg gttgggttaa agacaaaggc ttatggtatt acttaaatga atcaggttca 1800
atggctactg gttgggttac agtttctggt aaatggtact atacctataa ttcaggagat 1860
ttattagtaa acacgactac acccgatggc tatcgagtca atgctaacgg tgagtgggta 1920
gga 1923

```

<210> 5

<211> 820

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

[0321]

```

<400> 5
Met Gly Ser Tyr Glu Leu Gly Arg His Gln Ala Gly Gln Val Lys Lys
1           5           10           15

Glu Ser Asn Arg Val Ser Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Ala Gly Gln Lys
20           25           30

Ala Glu Asn Leu Thr Pro Asp Glu Val Ser Lys Arg Glu Gly Ile Asn
35           40           45

Ala Glu Gln Ile Val Ile Lys Ile Thr Asp Gln Gly Tyr Val Thr Ser
50           55           60

His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr Asp Ala
65           70           75           80

Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Gln Leu Lys
85           90           95

Asp Ser Asp Ile Val Asn Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Ile Lys Val
100          105          110

Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala Asp Asn
115          120          125

Ile Arg Thr Lys Glu Glu Ile Lys Arg Gln Lys Gln Glu His Ser His
130          135          140

Asn His Asn Ser Arg Ala Asp Asn Ala Val Ala Ala Ala Arg Ala Gln
145          150          155          160

Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Ala Ser Asp Ile
165          170          175

Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile Val Pro His Gly Asp His Tyr
180          185          190

```

[0322]

His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu Leu Ala Ala Ala
195 200 205

Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly Ser Arg Pro Ser Ser Ser Ser
210 215 220

Ser Tyr Asn Ala Asn Pro Val Gln Pro Arg Leu Ser Glu Asn His Asn
225 230 235 240

Leu Thr Val Thr Pro Thr Tyr His Gln Asn Gln Gly Glu Asn Ile Ser
245 250 255

Ser Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Ala Lys Pro Leu Ser Glu Arg His Val
260 265 270

Glu Ser Asp Gly Leu Ile Phe Asp Pro Ala Gln Ile Thr Ser Arg Thr
275 280 285

Ala Arg Gly Val Ala Val Pro His Gly Asn His Tyr His Phe Ile Pro
290 295 300

Tyr Glu Gln Met Ser Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ala Arg Ile Ile Pro
305 310 315 320

Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val Pro Asp Ser Arg Pro Glu Gln
325 330 335

Pro Ser Pro Gln Ser Thr Pro Glu Pro Ser Pro Ser Leu Gln Pro Ala
340 345 350

Pro Asn Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn Pro Ile Asp Glu Lys Leu Val
355 360 365

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

[0323]

Gly Val Ser Arg Tyr Ile Pro Ala Lys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ala
385 390 395 400

Ala Gly Ile Asp Ser Lys Leu Ala Lys Gln Glu Ser Leu Ser His Lys
405 410 415

Leu Gly Ala Lys Lys Thr Asp Leu Pro Ser Ser Asp Arg Glu Phe Tyr
420 425 430

Asn Lys Ala Tyr Asp Leu Leu Ala Arg Ile His Gln Asp Leu Leu Asp
435 440 445

Asn Lys Gly Arg Gln Val Asp Phe Glu Val Leu Asp Asn Leu Leu Glu
450 455 460

Arg Leu Lys Asp Val Ser Ser Asp Lys Val Lys Leu Val Asp Asp Ile
465 470 475 480

Leu Ala Phe Leu Ala Pro Ile Arg His Pro Glu Arg Leu Gly Lys Pro
485 490 495

Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Gln Val Ala Lys Leu
500 505 510

Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Pro Arg Asp
515 520 525

Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His Met Thr His
530 535 540

Ser His Trp Ile Lys Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ala Glu Arg Ala Ala
545 550 555 560

Ala Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Leu Thr Pro Pro Ser Thr Asp
565 570 575

His Gln Asp Ser Gly Asn Thr Glu Ala Lys Gly Ala Glu Ala Ile Tyr

[0324]

580	585	590
Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys Lys Val Pro Leu Asp Arg Met Pro Tyr		
595	600	605
Asn Leu Gln Tyr Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Ser Leu Ile Ile Pro		
610	615	620
His Tyr Asp His Tyr His Asn Ile Lys Phe Glu Trp Phe Asp Glu Gly		
625	630	635 640
Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Leu Ala Thr		
645	650	655
Val Lys Tyr Tyr Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His Ser Asp Asn		
660	665	670
Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys Ala Asp Gln		
675	680	685
Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val Ser Glu Pro		
690	695	700
Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly Leu Asn Pro		
705	710	715 720
Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu Thr Glu		
725	730	735
Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln Val Glu		
740	745	750
Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu Leu Glu		
755	760	765
Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr Leu Thr		
770	775	780

[0325]

Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn Thr Ile
785 790 795 800

Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser Gln Pro
805 810 815

Ala Pro Ile Gln
820

<210> 6

<211> 2463

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 6

atgggatcct atgaacttgg tcgtcaccaa gctggtcagg ttaagaaaga gtctaatacga	60
gtttcttata tagatgggtga tcaggctggt caaaaggcag aaaatttgac accagatgaa	120
gtcagtaaga gagaggggat caacgccgaa caaattgtta tcaagattac ggatcaagggt	180
tatgtgacct ctcatggaga ccattatcat tactataatg gcaaggttcc ttatgatgcc	240
atcatcagtg aagaacttct catgaaagat ccgaattatc agttgaagga ttcagacatt	300
gtcaatgaaa tcaaggttgg ctatgtgatt aaggtagacg gaaaatacta tgtttacctt	360
aaagatgcgg cccatgcgga caatattcgg acaaaagaag agattaaacg tcagaagcag	420
gaacacagtc ataatacata ctcaagagca gataatgctg ttgctgcagc cagagcccaa	480
ggacgttata caacggatga tgggtatata ttcaatgcat ctgatatcat tgaggacacg	540
ggatgatgctt atatcgttcc tcacggcgac cattaccatt acattcctaa gaatgagtta	600
tcagctagcg agttagctgc tgcagaagcc tattggaatg ggaagcaggg atctcgctct	660
tcttcaagtt ctagttataa tgcaaatcca gttcaaccaa gattgtcaga gaaccacaat	720
ctgactgtca ctccaactta tcatcaaaat caaggggaaa acatttcaag ccttttacgt	780
gaattgtatg ctaaacccctt atcagaacgc catgtagaat ctgatggcct tattttcgac	840
ccagcgcaaa tcacaagtcg aaccgccaga ggtgtagctg tccctcatgg taaccattac	900
cactttatcc cttatgaaca aatgtctgaa ttggaaaaac gaattgctcg tattattccc	960
cttcgttata gttcaaacca ttgggtacca gattcaagac cagaacaacc aagtcacaaa	1020
tcgactccgg aacctagtcc aagctctgaa cctgcaccaa atcctcaacc agtccaagc	1080
aatccaattg atgagaaatt ggtcaaagaa gctgttcgaa aagtaggcga tggttatgtc	1140
tttgaggaga atggagtctc tcgttatata ccagccaagg atctttcagc agaaacagca	1200
gcaggcattg atagcaaaact ggccaagcag gaaagtttat ctcataagct aggagctaag	1260

[0326]

```

aaaactgacc tcccatctag tgatecgagaa ttttacaata aggccttatga cttactagca 1320
agaattcacc aagatttact tgataataaa ggtcgacaag ttgattttga ggttttggat 1380
aacctgttgg aacgactcaa ggatgtctca agtgataaag tcaagttagt ggatgatatt 1440
cttgccctct tagctccgat tcgtcatcca gaacgttttag gaaaaccaa tgcgcaaatt 1500
acctacactg atgatgagat tcaagtagcc aagttggcag gcaagtacac aacagaagac 1560
ggttatatct ttgatcctcg tgatataacc agtgatgagg gggatgccta tgtaactcca 1620
catatgaccc atagccactg gattaaaaaa gatagtttgt ctgaagctga gagagcggca 1680
gcccaggctt atgctaaaga gaaaggtttg acccctcctt cgacagacca tcaggattca 1740
ggaaatactg aggcaaaaagg agcagaagct atctacaacc gcgtgaaagc agctaagaag 1800
gtgccacttg atcgtatgcc ttacaatctt caatatactg tagaagtcaa aaacggtagt 1860
ttaatcatat ctcattatga ccattaccat aacatcaaat ttgagtgggt tgacgaaggc 1920
ctttatgagg cacctaaggg gtatagtctt gaggatcttt tggcgactgt caagtactat 1980
gtcgaacatc caaacgaacg tccgcattca gataatgggt ttggtaacgc tagtgaccat 2040
gttcgtaaaa ataaggcaga ccaagatagt aaacctgatg aagataagga acatgatgaa 2100
gtaagtgagc caactcacc tgaatctgat gaaaaagaga atcacgctgg tttaaatcct 2160
tcagcagata atctttataa accaagcact gatacggaag agacagagga agaagctgaa 2220
gataccacag atgaggctga aattcctcaa gtagagaatt ctgttattaa cgctaagata 2280
gcagatgcgg aggccttgct agaaaaagta acagatccta gtattagaca aaatgctatg 2340
gagacattga ctggtctaaa aagtagtctt cttctcggaa cgaaagataa taacactatt 2400
tcagcagaag tagatagtct cttggctttg ttaaaagaaa gtcaaccggc tcctatacag 2460
tag

```

<210> 7

<211> 445

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asn Ile Gly Thr Val Gln Val Gly Asn Gly Val Thr Pro Val Glu

35 40 45

[0327]

Phe Glu Ala Gly Gln Asp Gly Lys Pro Phe Thr Ile Pro Thr Lys Ile
 50 55 60
 Thr Val Gly Asp Lys Val Phe Thr Val Thr Glu Val Ala Ser Gln Ala
 65 70 75 80
 Phe Ser Tyr Tyr Pro Asp Glu Thr Gly Arg Ile Val Tyr Tyr Pro Ser
 85 90 95
 Ser Ile Thr Ile Pro Ser Ser Ile Lys Lys Ile Gln Lys Lys Gly Phe
 100 105 110
 His Gly Ser Lys Ala Lys Thr Ile Ile Phe Asp Lys Gly Ser Gln Leu
 115 120 125
 Glu Lys Ile Glu Asp Arg Ala Phe Asp Phe Ser Glu Leu Glu Glu Ile
 130 135 140
 Glu Leu Pro Ala Ser Leu Glu Tyr Ile Gly Thr Ser Ala Phe Ser Phe
 145 150 155 160
 Ser Gln Lys Leu Lys Lys Leu Thr Phe Ser Ser Ser Ser Lys Leu Glu
 165 170 175
 Leu Ile Ser His Glu Ala Phe Ala Asn Leu Ser Asn Leu Glu Lys Leu
 180 185 190
 Thr Leu Pro Lys Ser Val Lys Thr Leu Gly Ser Asn Leu Phe Arg Leu
 195 200 205
 Thr Thr Ser Leu Lys His Val Asp Val Glu Glu Gly Asn Glu Ser Phe
 210 215 220
 Ala Ser Val Asp Gly Val Leu Phe Ser Lys Asp Lys Thr Gln Leu Ile
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Pro Ser Gln Lys Asn Asp Glu Ser Tyr Lys Thr Pro Lys Glu

[0328]

245 250 255
 Thr Lys Glu Leu Ala Ser Tyr Ser Phe Asn Lys Asn Ser Tyr Leu Lys
 260 265 270
 Lys Leu Glu Leu Asn Glu Gly Leu Glu Lys Ile Gly Thr Phe Ala Phe
 275 280 285
 Ala Asp Ala Ile Lys Leu Glu Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ser Leu Glu
 290 295 300
 Thr Ile Glu Arg Leu Ala Phe Tyr Gly Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu
 305 310 315 320
 Ile Leu Pro Asp Asn Val Lys Asn Phe Gly Lys His Val Met Asn Gly
 325 330 335
 Leu Pro Lys Leu Lys Ser Leu Thr Ile Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu
 340 345 350
 Pro Ser Phe Phe Leu Ser Gly Val Leu Asp Ser Leu Lys Glu Ile His
 355 360 365
 Ile Lys Asn Lys Ser Thr Glu Phe Ser Val Lys Lys Asp Thr Phe Ala
 370 375 380
 Ile Pro Glu Thr Val Lys Phe Tyr Val Thr Ser Glu His Ile Lys Asp
 385 390 395 400
 Val Leu Lys Ser Asn Leu Ser Thr Ser Asn Asp Ile Ile Val Glu Lys
 405 410 415
 Val Asp Asn Ile Lys Gln Glu Thr Asp Val Ala Lys Pro Lys Lys Asn
 420 425 430
 Ser Asn Gln Gly Val Val Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly
 435 440 445

[0329]

<210> 8
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pneumoniae

<400> 8
 atggcagata ctccctagttc ggaagtaatc aaagagacta aagttggaag tattattcaa 60
 caaaataata tcaaatataa ggttctaact gtagaaggta acataggaac tgttcaagtg 120
 ggtaatggag ttactcctgt agagtttgaa gctgggtcaag atggaaaacc attcacgatt 180
 cctacaaaaa tcacagtagg tgataaagta ttaccggtta ctgaagtagc tagtcaagct 240
 tttagttatt atccagatga aacagggtaga attgtctact atcctagctc tattactatc 300
 ccatcaagca taaaaaaaaa aaaaaaaaaa ggcttccatg gaagtaaagc taaaactatt 360
 atttttgaca aaggcagtc gctggagaaa attgaagata gagcttttga tttttctgaa 420
 ttagaagaga ttgaattgcc tgcctctcta gaatatattg gaacaagtgc attttctttt 480
 agtcaaaaaa tgaaaaagct aaccttttcc tcaagttcaa aattagaatt aatatcacat 540
 gaggtttttg ctaattttatc aaatttagag aaactaacat taccaaaatc ggttaaaaca 600
 ttaggaagta atctatttag actcactact agcttaaac atgttgatgt tgaagaagga 660
 aatgaatcgt ttgacctcagt tgatggtggt ttgttttcaa aagataaac tcaattaatt 720
 tattatccaa gtcaaaaaaa tgacgaaagt tataaaacgc ctaaggagac aaaagaactt 780
 gcatcatatt cgtttaataa aaattcttac ttgaaaaaac tcgaattgaa tgaagggtta 840
 gaaaaaatc gtacttttgc atttgcggat gcgattaaac ttgaagaaat tagcttacca 900
 aatagtttag aaactattga acgttttagc ttttacggtta atttagaatt aaaagaactt 960
 atattaccag ataattgtta aaattttggt aaacacgta tgaacggttt accaaaatta 1020
 aaaagtttaa caattggtaa taatatcaac tcattgccgt ccttcttctc aagtggcgtc 1080
 ttagattcat taaaggaaat tcatattaag aataaaagta cagagttttc tgtgaaaaaa 1140
 gatacatttg caattcctga aactgttaag ttctatgtaa catcagaaca tataaaagat 1200
 gttcttaaat caaattttatc tactagtaat gatatcattg ttgaaaaagt agataatata 1260
 aaacaagaaa ctgatgtagc taaacctaaa aagaattcta atcaggaggt agttggttgg 1320
 gttaaagaca aagggttaa 1338

<210> 9
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae

[0330]


```

<400> 9
Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met Asn Tyr Asp
1      5      10      15

Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu Ser Ile Glu Asn Arg Phe
      20      25      30

Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg
      35      40      45

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

Cys Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val Asp Glu
65      70      75      80

Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala Val Asp Arg Ala Pro
      85      90      95

Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe
      100      105      110

Leu Gln Val Glu Asp Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn
      115      120      125

Asp Leu Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn Val
      130      135      140

Pro Ala Arg Met Gln Tyr Glu Lys Ile Thr Ala His Ser Met Glu Gln
145      150      155      160

Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu
      165      170      175

Asp Ile Asp Phe Asn Ser Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile
      180      185      190

```

[0331]

Val Asn Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys
195 200 205

Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu Asp Leu Lys
210 215 220

Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu Val Tyr Ile Ser Ser Val
225 230 235 240

Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser
245 250 255

Asp Glu Val Glu Ala Ala Phe Glu Ala Leu Ile Lys Gly Val Lys Val
260 265 270

Ala Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu Val Lys
275 280 285

Ala Val Ile Leu Cys Gly Asp Pro Ser Ser Gly Ala Arg Val Val Thr
290 295 300

Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe
305 310 315 320

Thr Ala Asp His Pro Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu
325 330 335

Arg Asp Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val Glu
340 345 350

Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu Leu Asp His Ser
355 360 365

Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile Thr Trp Asp Glu Leu Ser Tyr
370 375 380

Asp His Gln Gly Lys Glu Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn

[0332]

385 390 395 400

Gly Gln Asp Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly
 405 410 415

Asn Val Arg Asn Leu Ser Val Lys Ile Arg Glu Ala Thr Gly Leu Ala
 420 425 430

Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Tyr Glu Lys Thr Asp Leu Pro Leu Val
 435 440 445

Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gln Val
 450 455 460

Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp
 465 470

<210> 10
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae

<400> 10

Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met Asn Tyr Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu Ser Ile Glu Asn Arg Phe
 20 25 30

Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg
 35 40 45

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

[0333]

Thr Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val Asp Glu
 65 70 75 80

 Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala Val Asp Arg Ala Pro
 85 90 95

 Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe
 100 105 110

 Leu Gln Val Glu Asp Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn
 115 120 125

 Asp Leu Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn Val
 130 135 140

 Pro Ala Arg Met Gln Tyr Glu Lys Ile Thr Ala His Ser Met Glu Gln
 145 150 155 160

 Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu
 165 170 175

 Asp Ile Asp Phe Asn Ser Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile
 180 185 190

 Val Asn Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys
 195 200 205

 Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu Asp Leu Lys
 210 215 220

 Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu Val Tyr Ile Ser Ser Val
 225 230 235 240

 Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser
 245 250 255

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

[0334]

260 265 270

Ala Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu Val Lys
275 280 285

Ala Val Ile Leu Gly Gly Asp Pro Ser Ser Gly Ala Arg Val Val Thr
290 295 300

Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe
305 310 315 320

Thr Ala Asp His Pro Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu
325 330 335

Arg Asp Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val Glu
340 345 350

Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu Leu Asp His Ser
355 360 365

Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile Thr Trp Asp Glu Leu Ser Tyr
370 375 380

Asp His Gln Gly Lys Glu Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn
385 390 395 400

Gly Gln Asp Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly
405 410 415

Asn Val Arg Asn Leu Ser Val Lys Ile Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala
420 425 430

Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Tyr Glu Lys Thr Asp Leu Pro Leu Val
435 440 445

Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gln Val
450 455 460

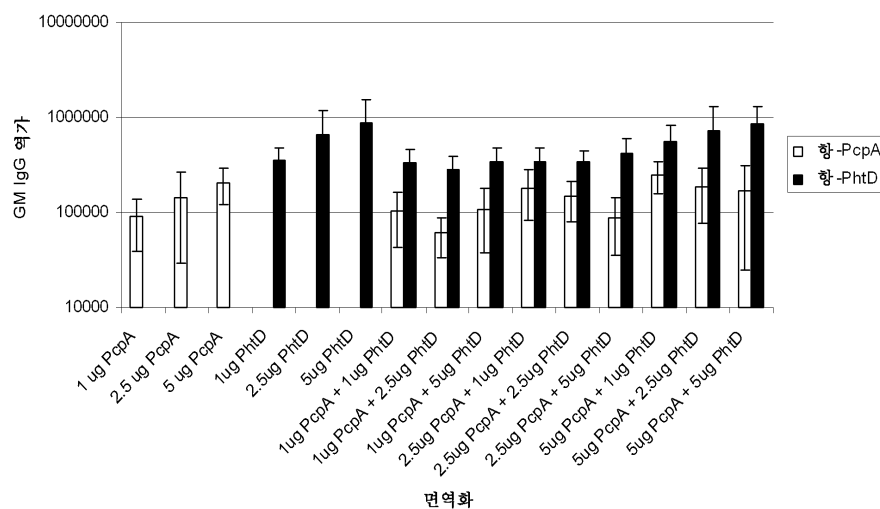
Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp
465 470

[0335]

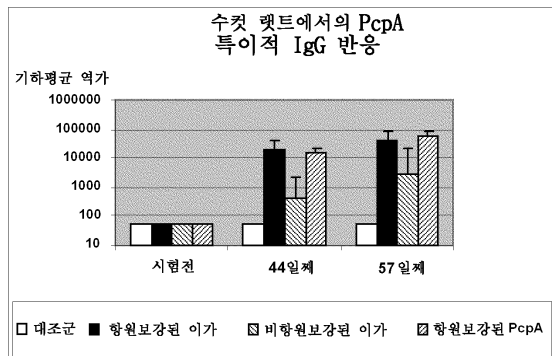
[0336]

도면

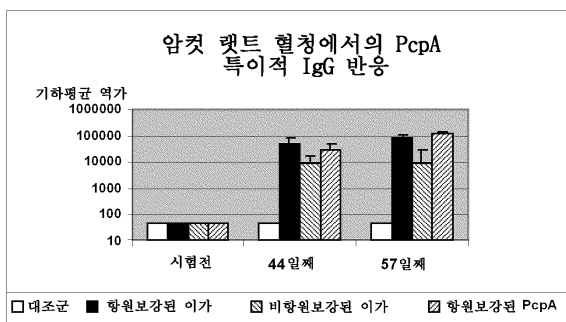
도면1



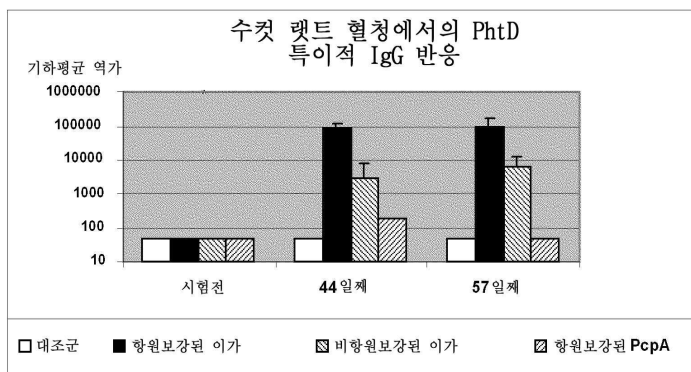
도면2a



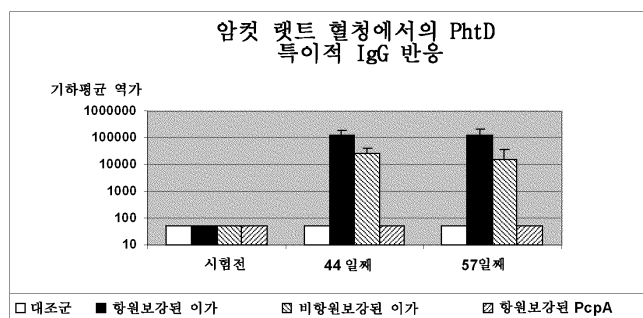
도면2b



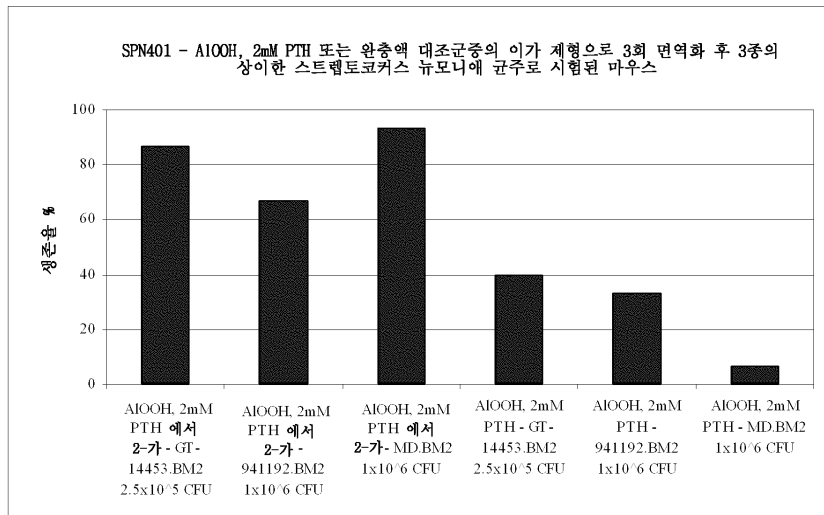
도면2c



도면2d



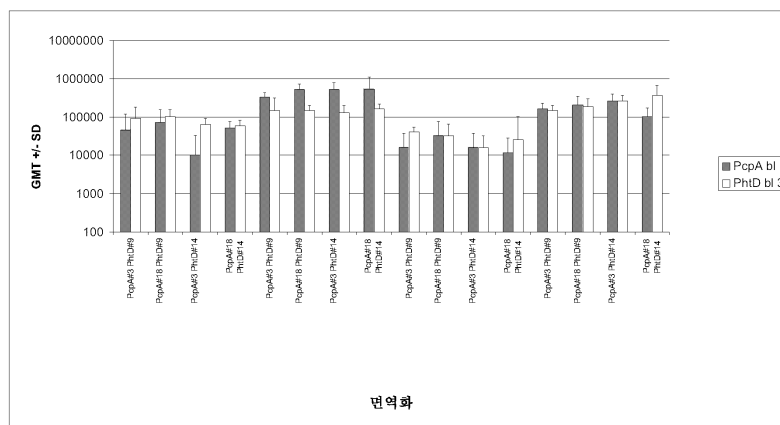
도면3



면역화 마우스의 각 그룹의 생존율(%)을 보여준다(실시예 6). 이 연구에서 비내 시험 모델을 사용하여 제조한 PhtD와 PcpA의 이가 제형을 평가하였다. 면역화된 동물을 스트렙토코커스 균주(MD, 14453 또는 941192)의 치사 용량으로 시험하였다.

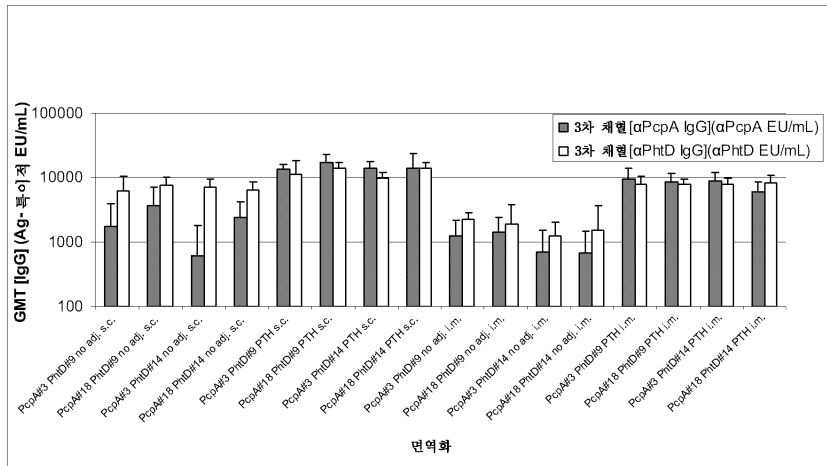
도면4a

항-PhtD, 항-PcpA 종말점 희석 ELISA



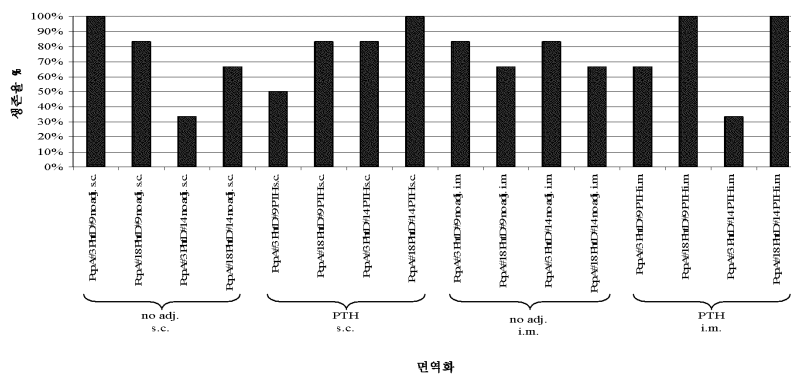
도면4b

정량 항-PhtD 및 항-PcpA ELISA



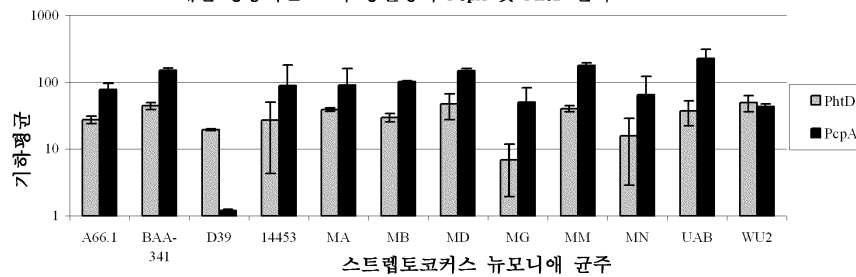
도면5

생존율 요약



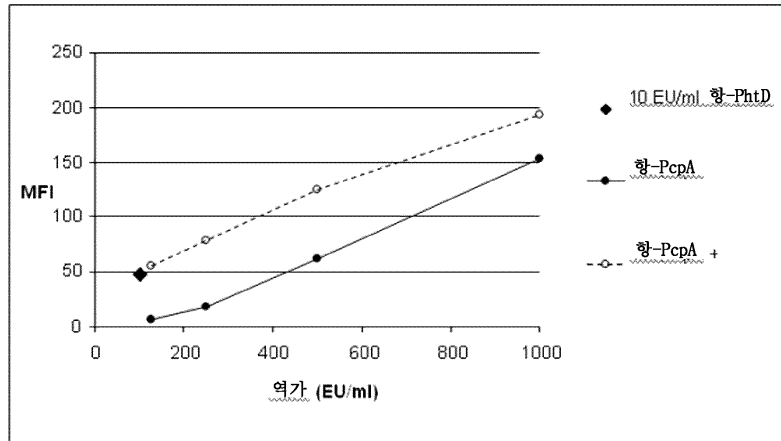
도면6

SASSY - Mn^{2+} 결손 배지에서 성장된 여러 포도상구균 균주에 대한 상응하는 토끼 항혈청의 PcpA 및 PhtD 인지



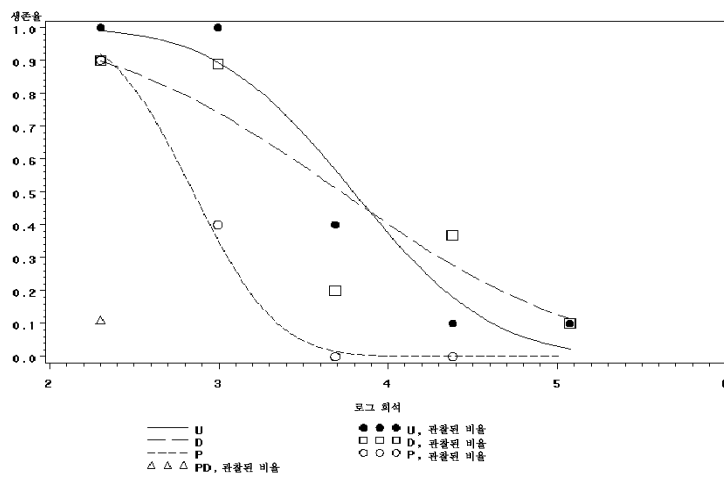
도면7

SASSY - 균주 WU2에 정제된 사람 항-PcpA 및 항-PhtD 항체의 결합



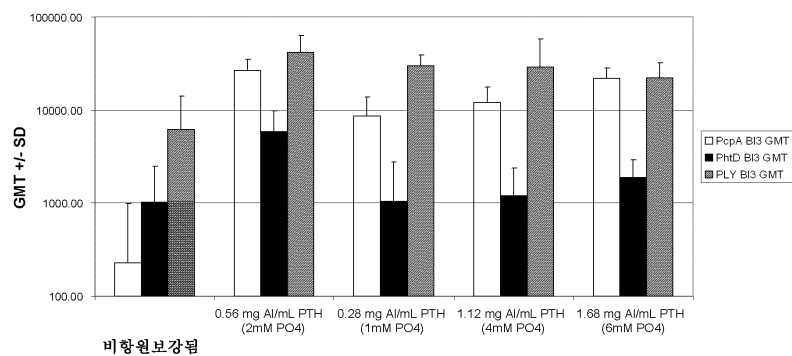
도면8

생존율 % vs. 로그 희석



도면9

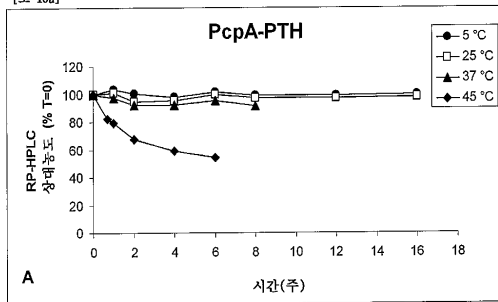
IgG 역가



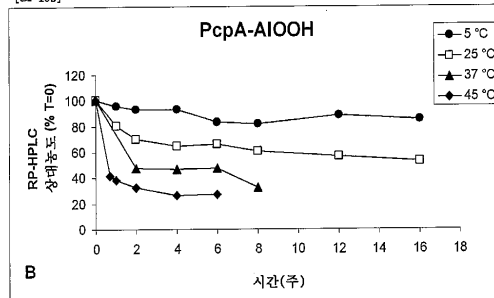
도면10

AIO(OH) 또는 2 mM PTH와 함께 제형된 PcpA의 안정성

[도 10a]

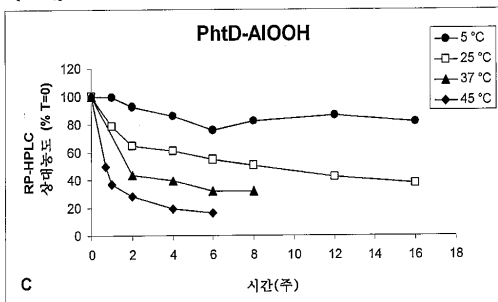


[도 10b]

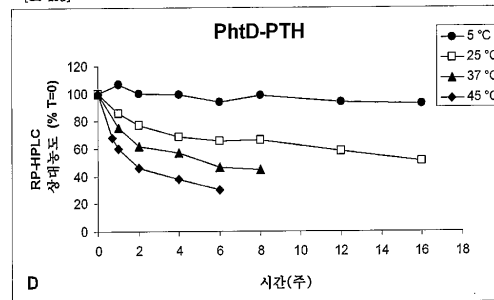


AIO(OH) 또는 2 mM PTH와 함께 제형된 PhtD의 안정성

[도 10c]

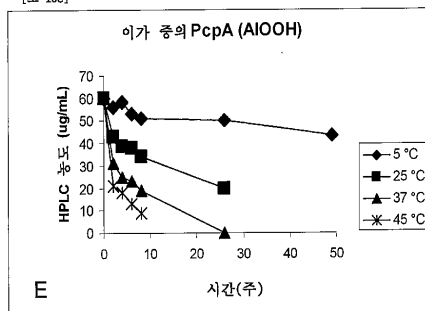


[도 10d]

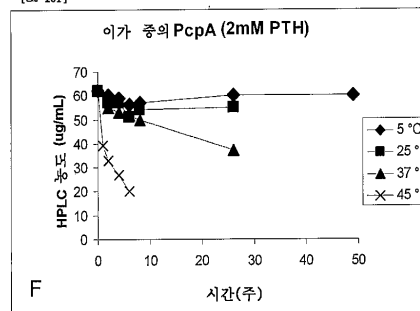


AIO(OH) 또는 2 mM PTH와 함께 제형된 PcpA의 안정성

[도 10e]

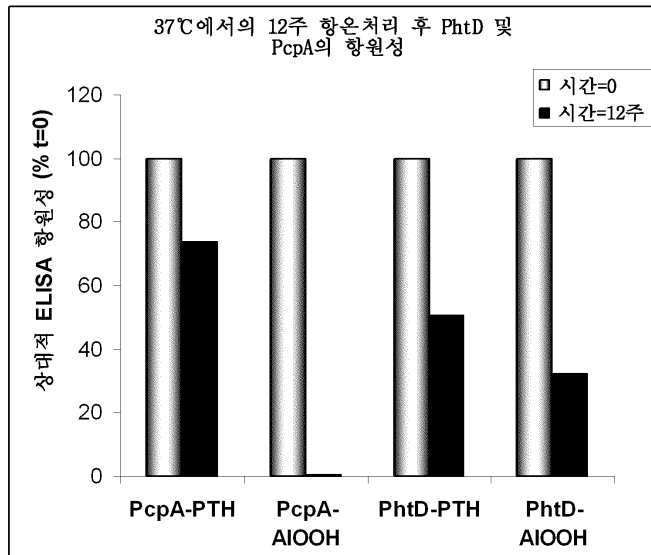


[도 10f]



도면11

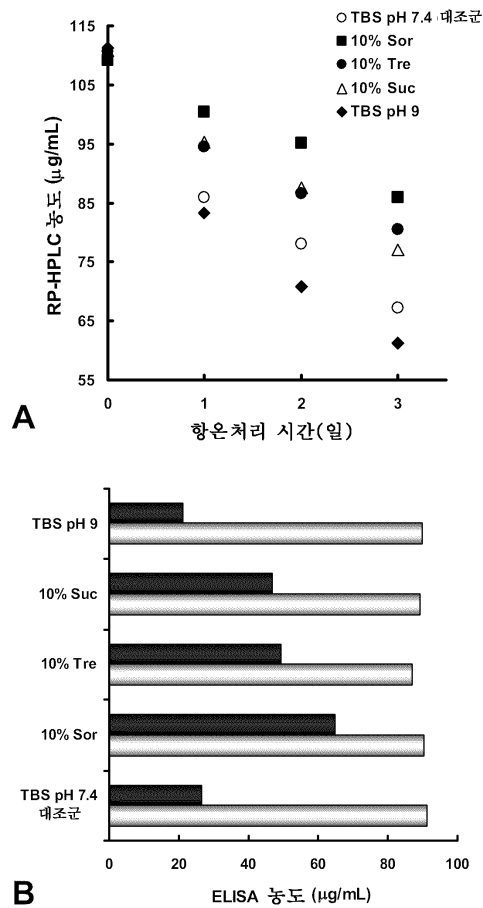
ELISA의 평가 결과로서 스트레스 조건하에서의 PhdD 및 PcpA의 안정성



100 μ g/mL의 이가 제형을 37℃에서 12주 동안 항온처리 하고 항원성을 ELISA로 평가하였다.

도면12

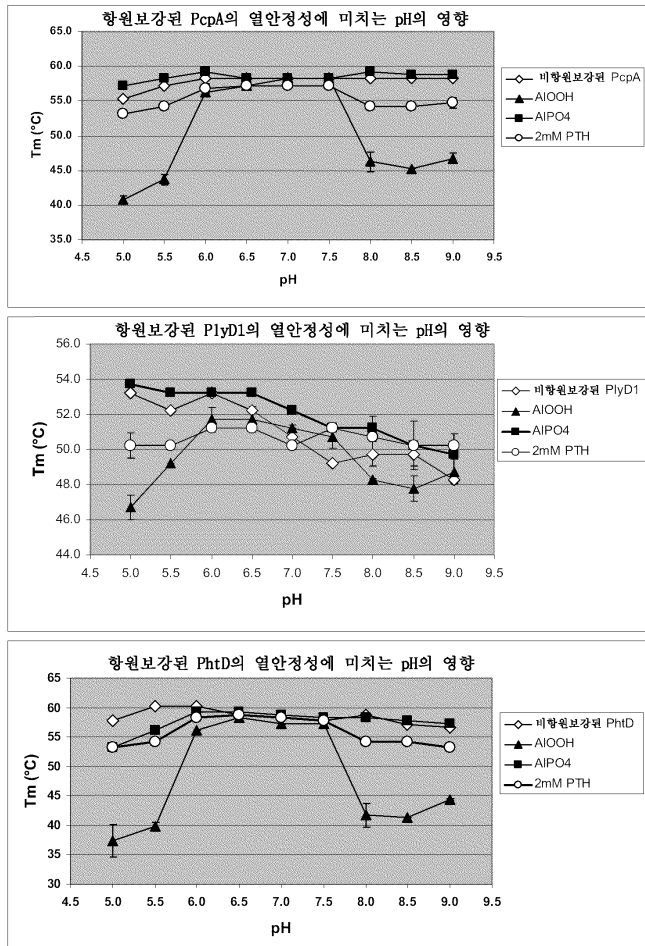
PcpA의 안정성 및 항원성에 미치는 선택된 GRAS 부형제 및 pH의 영향



100 $\mu\text{g/mL}$ 의 PcpA의 항원보강된 제형을 선택된 부형제의 존재하에 50°C에서 3일간 항온처리 하고 RP-HPLC로 화학적 무결성을 측정하였다(A). 50°C에서 항온처리 0일(흰색 막대) 및 3일째(검정 막대)에 정량 ELISA 샌드위치로 각 제형의 항원성을 평가하였다.

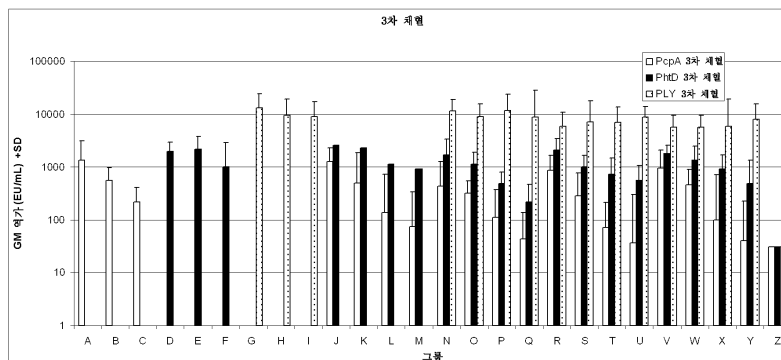
도면13

PcpA, PlyD1 및 PhtD의 열안정성에 미치는 pH의 영향

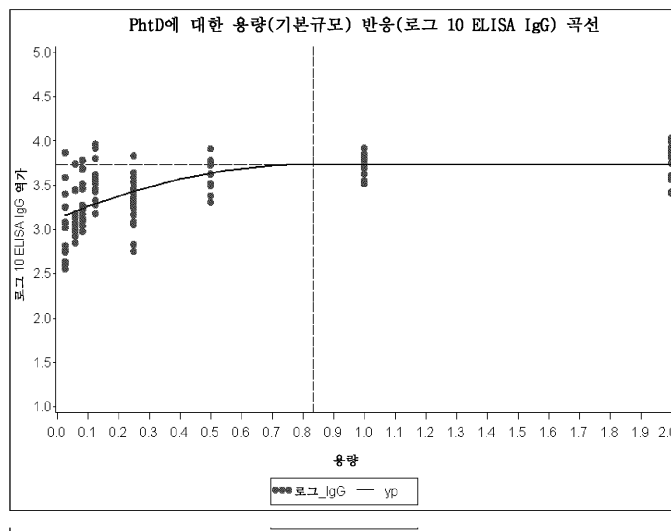


도면14

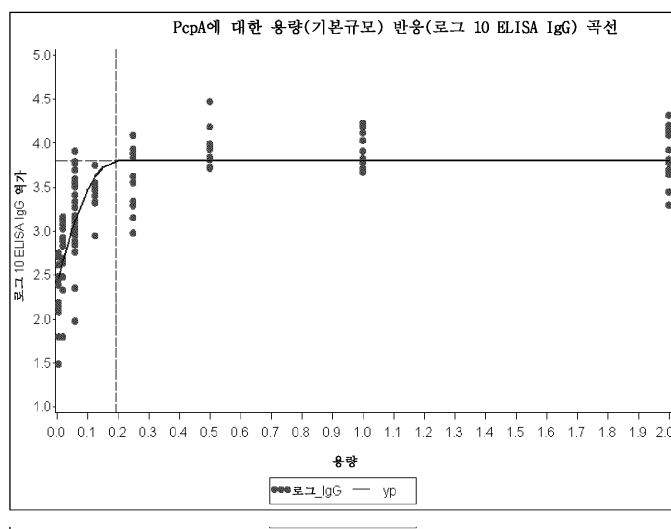
항원-특이적 IgG 역가



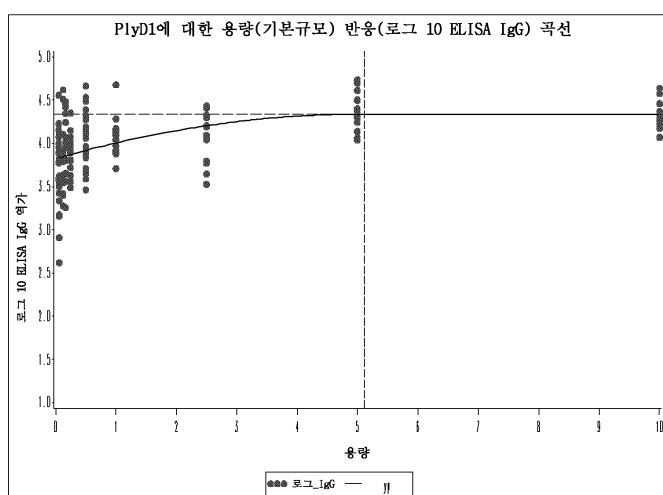
도면15a



도면15b



도면15c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SANOFI PASTEUR, LTD

<120> IMMUNOGENIC COMPOSITIONS

<130> APL-10-03-PCT

<150> US 61/289236

<151> 2009-12-22

<150> US 61/325660

<151> 2010-04-19

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 838

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

Met Lys Ile Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Gly Ser Val Ala Val Leu Ala

1 5 10 15

Leu Ser Val Cys Ser Tyr Glu Leu Gly Arg His Gln Ala Gly Gln Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Ser His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr

85 90 95

Asp Ala Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Gln

100 105 110

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

115 120 125

Lys Val Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala

130 135 140
 Asp Asn Ile Arg Thr Lys Glu Glu Ile Lys Arg Gln Lys Gln Glu His

 145 150 155 160
 Ser His Asn His Asn Ser Arg Ala Asp Asn Ala Val Ala Ala Ala Arg

 165 170 175
 Ala Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Ala Ser

 180 185 190
 Asp Ile Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile Val Pro His Gly Asp

 195 200 205
 His Tyr His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu Leu Ala

 210 215 220
 Ala Ala Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly Ser Arg Pro Ser Ser
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Tyr Asn Ala Asn Pro Val Gln Pro Arg Leu Ser Glu Asn

 245 250 255
 His Asn Leu Thr Val Thr Pro Thr Tyr His Gln Asn Gln Gly Glu Asn

 260 265 270
 Ile Ser Ser Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Ala Lys Pro Leu Ser Glu Arg

 275 280 285
 His Val Glu Ser Asp Gly Leu Ile Phe Asp Pro Ala Gln Ile Thr Ser
 290 295 300
 Arg Thr Ala Arg Gly Val Ala Val Pro His Gly Asn His Tyr His Phe
 305 310 315 320
 Ile Pro Tyr Glu Gln Met Ser Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ala Arg Ile

 325 330 335
 Ile Pro Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val Pro Asp Ser Arg Pro

 340 345 350
 Glu Gln Pro Ser Pro Gln Ser Thr Pro Glu Pro Ser Pro Ser Leu Gln
 355 360 365
 Pro Ala Pro Asn Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn Pro Ile Asp Glu Lys
 370 375 380

Leu Val Lys Glu Ala Val Arg Lys Val Gly Asp Gly Tyr Val Phe Glu
 385 390 395 400
 Glu Asn Gly Val Ser Arg Tyr Ile Pro Ala Lys Asp Leu Ser Ala Glu
 405 410 415
 Thr Ala Ala Gly Ile Asp Ser Lys Leu Ala Lys Gln Glu Ser Leu Ser
 420 425 430
 His Lys Leu Gly Ala Lys Lys Thr Asp Leu Pro Ser Ser Asp Arg Glu
 435 440 445
 Phe Tyr Asn Lys Ala Tyr Asp Leu Leu Ala Arg Ile His Gln Asp Leu
 450 455 460
 Leu Asp Asn Lys Gly Arg Gln Val Asp Phe Glu Val Leu Asp Asn Leu
 465 470 475 480
 Leu Glu Arg Leu Lys Asp Val Ser Ser Asp Lys Val Lys Leu Val Asp
 485 490 495
 Asp Ile Leu Ala Phe Leu Ala Pro Ile Arg His Pro Glu Arg Leu Gly
 500 505 510
 Lys Pro Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Gln Val Ala
 515 520 525
 Lys Leu Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Pro
 530 535 540
 Arg Asp Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His Met
 545 550 555 560
 Thr His Ser His Trp Ile Lys Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ala Glu Arg
 565 570 575
 Ala Ala Ala Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Leu Thr Pro Pro Ser
 580 585 590
 Thr Asp His Gln Asp Ser Gly Asn Thr Glu Ala Lys Gly Ala Glu Ala
 595 600 605
 Ile Tyr Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys Lys Val Pro Leu Asp Arg Met
 610 615 620
 Pro Tyr Asn Leu Gln Tyr Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Ser Leu Ile

625 630 635 640
 Ile Pro His Tyr Asp His Tyr His Asn Ile Lys Phe Glu Trp Phe Asp
 645 650 655
 Glu Gly Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Leu

 660 665 670
 Ala Thr Val Lys Tyr Tyr Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His Ser
 675 680 685
 Asp Asn Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys Ala
 690 695 700
 Asp Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val Ser
 705 710 715 720
 Glu Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly Leu

 725 730 735
 Asn Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu
 740 745 750
 Thr Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln
 755 760 765
 Val Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu
 770 775 780
 Leu Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr

 785 790 795 800
 Leu Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn
 805 810 815
 Thr Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser
 820 825 830
 Gln Pro Ala Pro Ile Gln
 835
 <210> 2
 <211> 641
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae
 <400> 2

Met Lys Lys Thr Thr Ile Leu Ser Leu Thr Thr Ala Ala Val Ile Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Lys Tyr Lys Val Leu Thr Val Glu Gly Asn Ile Arg Thr Val Gln

50 55 60

Val Gly Asn Gly Val Thr Pro Val Glu Phe Glu Ala Gly Gln Asp Gly

65 70 75 80

Lys Pro Phe Thr Ile Pro Thr Lys Ile Thr Val Gly Asp Lys Val Phe

85 90 95

Thr Val Thr Glu Val Ala Ser Gln Ala Phe Ser Tyr Tyr Pro Asp Glu

100 105 110

Thr Gly Arg Ile Val Tyr Tyr Pro Ser Ser Ile Thr Ile Pro Ser Ser

115 120 125

Ile Lys Lys Ile Gln Lys Lys Gly Phe His Gly Ser Lys Ala Lys Thr

130 135 140

Ile Ile Phe Asp Lys Gly Ser Gln Leu Glu Lys Ile Glu Asp Arg Ala

145 150 155 160

Phe Asp Phe Ser Glu Leu Glu Glu Ile Glu Leu Pro Ala Ser Leu Glu

165 170 175

Tyr Ile Gly Thr Ser Ala Phe Ser Phe Ser Gln Lys Leu Lys Lys Leu

180 185 190

Thr Phe Ser Ser Ser Ser Lys Leu Glu Leu Ile Ser His Glu Ala Phe

195 200 205

Ala Asn Leu Ser Asn Leu Glu Lys Leu Thr Leu Pro Lys Ser Val Lys

210 215 220

Thr Leu Gly Ser Asn Leu Phe Arg Leu Thr Thr Ser Leu Lys His Val

225 230 235 240

Asp Val Glu Glu Gly Asn Glu Ser Phe Ala Ser Val Asp Gly Val Leu

245 250 255
Phe Ser Lys Asp Lys Thr Gln Leu Ile Tyr Tyr Pro Ser Gln Lys Asn

260 265 270
Asp Glu Ser Tyr Lys Thr Pro Lys Glu Thr Lys Glu Leu Ala Ser Tyr

275 280 285
Ser Phe Asn Lys Asn Ser Tyr Leu Lys Lys Leu Glu Leu Asn Glu Gly

290 295 300
Leu Glu Lys Ile Gly Thr Phe Ala Phe Ala Asp Ala Ile Lys Leu Glu

305 310 315 320
Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ser Leu Glu Thr Ile Glu Arg Leu Ala Phe

325 330 335
Tyr Gly Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu Ile Leu Pro Asp Asn Val Lys

340 345 350
Asn Phe Gly Lys His Val Met Asn Gly Leu Pro Lys Leu Lys Ser Leu

355 360 365
Thr Ile Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu Pro Ser Phe Phe Leu Ser Gly

370 375 380
Val Leu Asp Ser Leu Lys Glu Ile His Ile Lys Asn Lys Ser Thr Glu

385 390 395 400
Phe Ser Val Lys Lys Asp Thr Phe Ala Ile Pro Glu Thr Val Lys Phe

405 410 415
Tyr Val Thr Ser Glu His Ile Lys Asp Val Leu Lys Ser Asn Leu Ser

420 425 430
Thr Ser Asn Asp Ile Ile Val Glu Lys Val Asp Asn Ile Lys Gln Glu

435 440 445
Thr Asp Val Ala Lys Pro Lys Lys Asn Ser Asn Gln Gly Val Val Gly

450 455 460
Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser

465 470 475 480
Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn

485 490 495

Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp
500 505 510
Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp
515 520 525
Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly
530 535 540
Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser
545 550 555 560
Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp Tyr Tyr Leu Asn
565 570 575
Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly Leu Trp
580 585 590
Tyr Tyr Leu Asn Glu Ser Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Phe Thr Val
595 600 605
Ser Gly Lys Trp Tyr Tyr Thr Tyr Asn Ser Gly Asp Leu Leu Val Asn
610 615 620
Thr Thr Thr Pro Asp Gly Tyr Arg Val Asn Ala Asn Gly Glu Trp Val
625 630 635 640
Gly

<210> 3

<211> 2514

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3

atgaaatca ataaaaata tctagcaggt tcagtggcag tccttgcct aagtgtttgt 60
tcctatgaac ttggtcgta ccaagctggt caggttaaga aagagtctaa tcgagtttct 120
tatatagatg gtgatacagg tggtaaaaag gcagaaaatt tgacaccaga tgaagtcagt 180
aagagagagg ggatcaacgc cgaacaaatt gttatcaaga ttacggatca aggttatgtg 240
acctctcatg gagaccatta tcattactat aatggcaagg ttcttatga tgccatcatc 300
agtgaagaac ttctcatgaa agatccgaat tatcagtga aggattcaga cattgtcaat 360
gaaatcaagg gtggctatgt gattaaggta gacggaaaat actatgttta ccttaaagat 420

gcggcccatg cggacaatat tcggacaaaa gaagagatta aacgtcagaa gcaggaacac 480
 agtcataatc ataactcaag agcagataat gctgttgctg cagccagagc ccaaggacgt 540
 tatacaacgg atgatgggta tatcttcaat gcatctgata tcattgagga cacgggtgat 600
 gcttatatcg ttcttcacgg cgaccattac cattacattc ctaagaatga gttatcagct 660
 agcgagttag ctgctgcaga agcctattgg aatgggaagc agggatctcg tcctttctca 720
 agttctagtt ataatgcaaa tccagttaa ccaagattgt cagagaacca caatctgact 780
 gtcactccaa cttatcatca aaatcaagg gaaaacattt caagcctttt acgtgaattg 840

tatgctaaac cttatcaga acgccatgta gaatctgatg gccttatttt cgaccagcg 900
 caaatcaciaa gtcgaaccgc cagaggtgta gctgtccctc atggtaacca ttaccacttt 960
 atcccttatg aacaaatgtc tgaattggaa aaacgaattg ctctgattat tccccctcgt 1020
 tatcgttcaa accattgggt accagattca agaccagaac aaccaagtcc acaatcgact 1080
 ccggaacctg gtccaagtct gcaacctgca ccaaatcctc aaccagctcc aagcaatcca 1140
 attgatgaga aattggtaaa agaagctgtt cgaaaagtag gcgatgggta tgtctttgag 1200
 gagaatggag ttctctgta tatcccagcc aaggatcttt cagcagaaac agcagcaggc 1260

attgatagca aactggccaa gcagaaagt ttatctcata agctaggagc taagaaaact 1320
 gacctccat ctagtatcg agaattttac aataaggctt atgacttact agcaagaatt 1380
 caccaagatt tacttgataa taaaggtcga caagttgatt ttgaggtttt ggataacctg 1440
 ttggaacgac tcaaggatgt ctcaagtgat aaagtcaagt tagtggatga tattcttgcc 1500
 ttcttagctc cgattcgta tccagaacgt ttaggaaaac caaatgcga aattacctac 1560
 actgatgatg agattcaagt agccaagttg gcaggcaagt acacaacaga agacggttat 1620
 atctttgatc ctctgatat aaccagtgat gagggggatg cctatgtaac tccacatatg 1680

acccatagcc actggattaa aaaagatagt ttgtctgaag ctgagagagc ggcagcccag 1740
 gcttatgcta aagagaaagg tttagccct ccttcgacag accatcagga ttcaggaaat 1800
 actgaggcaa aaggagcaga agctatctac aaccgcgtga aagcagctaa gaaggtgcca 1860
 cttagatgta tgccttacia tcttcaatat actgtagaag tcaaaaacgg tagtttaatc 1920
 atacctcatt atgaccatta ccataacatc aaatttgagt ggtttgacga aggcctttat 1980
 gaggcacctg aggggtatag tcttgaggat cttttggcga ctgtcaagta ctatgtcgaa 2040
 catccaaacg aacgtccgca ttacagataat ggttttggtg acgctagtga ccatgttcgt 2100

aaaaataagg cagaccaaga tagtaaacct gatgaagata aggaacatga tgaagtaagt 2160
 gagccaactc accctgaatc tgatgaaaaa gagaatcacg ctggtttaaa tccttcagca 2220

gataatcttt ataaaccaag cactgatacg gaagagacag aggaagaagc tgaagatacc 2280
acagatgagg ctgaaattcc tcaagtagag aattctgtta ttaacgctaa gatagcagat 2340
gcgagggcct tgctagaaaa agtaacagat cctagtatta gacaaaatgc tatggagaca 2400
ttgactggtc taaaaagtag tcttcttctc ggaacgaaag ataataacac tatttcagca 2460
gaagtagata gtctcttggc ttgttataaa gaaagtcaac cggctcctat acag 2514

<210> 4

<211> 1923

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

atgaaaaaaa ctacaatatt atcattaact acagctgcgg ttatttttagc agcatatgtc 60
cctaataaac caatcctagc agatactcct agttcggaag taatcaaaga gactaaagtt 120
ggaagtatta ttcaacaaaa taatatcaaa tataaggttc taactgtaga aggtaacata 180
agaactgttc aagtgggttaa tggagttact cctgtagagt ttgaagctgg tcaagatgga 240
aaaccattca cgattcctac aaaaatcaca gtaggtgata aagtatttac cgttactgaa 300
gtagctagtc aagcttttag ttattatcca gatgaaacag gtagaattgt ctactatcct 360

agctctatta ctatcccatc aagcataaaa aaaatacaaa aaaaaggctt ccatggaagt 420
aaagctaaaa ctattatfff tgacaaaggc agtcagctgg agaaaattga agatagagct 480
tttgatffff ctgaattaga agagattgaa ttgcctgcat ctctagaata tattggaaca 540
agtgcatfff cttttagfca aaaattgaaa aagctaacct ttccctcaag ttcaaaatta 600
gaattaatat cacatgaggc ttttgctaat ttatcaaatt tagagaaact aacattacca 660
aaatcggtta aaacattagg aagtaatcta tttagactca ctactagctt aaaacatggt 720
gatgttgaag aaggaaatga atcgtttggc tcagttgatg gtgttttgtt ttcaaaagat 780

aaaactcaat taatttatta tccaagtcaa aaaaatgacg aaagttataa aacgcctaag 840
gagacaaaag aacttgcac atattcgfff aataaaaaatt cttacttgaa aaaactcgaa 900
ttgaatgaag gtttagaaaa aatcggtact ttgcatfctg cggatgcgat taaacttgaa 960
gaaattagct taccaaatag tttagaaact attgaacgtt tagcctfctt cggtaatfct 1020
gaattaaaag aacttatatt accagataat gttaaaaatt ttggttaaaca cgttatgaac 1080
ggtttaccaa aattaaaaag tttacaatt ggtaataata tcaactcatt gccgtccttc 1140
ttcctaagtg gcgtcttaga ttcatfctaa gaaattcata ttaagaataa aagtacagag 1200

ttttctgtga aaaaagatac atttgcaatt cctgaaactg ttaagttcta tgtaacatca 1260

gaacatataa aagatgttct taaatcaaat ttatctacta gtaatgatat cattgttgaa 1320
aaagtagata atataaaaca agaaactgat gtagctaaac ctaaaaagaa ttctaatacag 1380
ggagtagttg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1440
atggctactg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1500
atggctactg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1560
atggctactg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaatga atcaggttca 1620

atggctactg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1680
atggctactg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaacga atcaggttca 1740
atggctactg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaatga atcaggttca 1800
atggctactg gttgggttaa agacaaaggt ttatggtatt acttaaatga atcaggttca 1860
ttattagtaa acacgactac acccgatggc tatcgagtca atgctaacgg tgagtgggta 1920
gga 1923

<210> 5

<211> 820

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 5

Met Gly Ser Tyr Glu Leu Gly Arg His Gln Ala Gly Gln Val Lys Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Glu Asn Leu Thr Pro Asp Glu Val Ser Lys Arg Glu Gly Ile Asn

35 40 45

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

50 55 60

His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr Asp Ala

65 70 75 80

Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Gln Leu Lys

85 90 95

Asp Ser Asp Ile Val Asn Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Ile Lys Val

100 105 110

Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala Asp Asn

115	120	125	
Ile Arg Thr Lys Glu Glu Ile Lys Arg Gln Lys Gln Glu His Ser His			
130	135	140	
Asn His Asn Ser Arg Ala Asp Asn Ala Val Ala Ala Ala Arg Ala Gln			
145	150	155	160
Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Ala Ser Asp Ile			
	165	170	175
Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile Val Pro His Gly Asp His Tyr			
	180	185	190
His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu Leu Ala Ala Ala			
	195	200	205
Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly Ser Arg Pro Ser Ser Ser Ser			
	210	215	220
Ser Tyr Asn Ala Asn Pro Val Gln Pro Arg Leu Ser Glu Asn His Asn			
225	230	235	240
Leu Thr Val Thr Pro Thr Tyr His Gln Asn Gln Gly Glu Asn Ile Ser			
	245	250	255
Ser Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Ala Lys Pro Leu Ser Glu Arg His Val			
	260	265	270
Glu Ser Asp Gly Leu Ile Phe Asp Pro Ala Gln Ile Thr Ser Arg Thr			
	275	280	285
Ala Arg Gly Val Ala Val Pro His Gly Asn His Tyr His Phe Ile Pro			
	290	295	300
Tyr Glu Gln Met Ser Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ala Arg Ile Ile Pro			
305	310	315	320
Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val Pro Asp Ser Arg Pro Glu Gln			
	325	330	335
Pro Ser Pro Gln Ser Thr Pro Glu Pro Ser Pro Ser Leu Gln Pro Ala			
	340	345	350
Pro Asn Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn Pro Ile Asp Glu Lys Leu Val			
	355	360	365

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

 Gly Val Ser Arg Tyr Ile Pro Ala Lys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ala
 385 390 395 400
 Ala Gly Ile Asp Ser Lys Leu Ala Lys Gln Glu Ser Leu Ser His Lys
 405 410 415
 Leu Gly Ala Lys Lys Thr Asp Leu Pro Ser Ser Asp Arg Glu Phe Tyr
 420 425 430
 Asn Lys Ala Tyr Asp Leu Leu Ala Arg Ile His Gln Asp Leu Leu Asp
 435 440 445

 Asn Lys Gly Arg Gln Val Asp Phe Glu Val Leu Asp Asn Leu Leu Glu
 450 455 460
 Arg Leu Lys Asp Val Ser Ser Asp Lys Val Lys Leu Val Asp Asp Ile
 465 470 475 480
 Leu Ala Phe Leu Ala Pro Ile Arg His Pro Glu Arg Leu Gly Lys Pro
 485 490 495
 Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Gln Val Ala Lys Leu
 500 505 510

 Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Pro Arg Asp
 515 520 525
 Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His Met Thr His
 530 535 540
 Ser His Trp Ile Lys Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ala Glu Arg Ala Ala
 545 550 555 560
 Ala Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Leu Thr Pro Pro Ser Thr Asp
 565 570 575

 His Gln Asp Ser Gly Asn Thr Glu Ala Lys Gly Ala Glu Ala Ile Tyr
 580 585 590
 Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys Lys Val Pro Leu Asp Arg Met Pro Tyr
 595 600 605
 Asn Leu Gln Tyr Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Ser Leu Ile Ile Pro

610 615 620
 His Tyr Asp His Tyr His Asn Ile Lys Phe Glu Trp Phe Asp Glu Gly
 625 630 635 640

 Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Leu Ala Thr
 645 650 655
 Val Lys Tyr Tyr Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His Ser Asp Asn
 660 665 670
 Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys Ala Asp Gln
 675 680 685
 Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val Ser Glu Pro
 690 695 700

 Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly Leu Asn Pro
 705 710 715 720
 Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu Thr Glu
 725 730 735
 Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln Val Glu
 740 745 750
 Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu Leu Glu
 755 760 765

 Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr Leu Thr
 770 775 780
 Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn Thr Ile
 785 790 795 800
 Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser Gln Pro
 805 810 815
 Ala Pro Ile Gln
 820

 <210> 6
 <211> 2463
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pneumoniae
 <400> 6

atgggatcct atgaacttgg tcgtcaccaa gctggtcagg ttaagaaaga gtctaatacga	60
gtttcttata tagatgggtga tcaggctggt caaaaggcag aaaatttgac accagatgaa	120
gtcagtaaga gagaggggat caacgccgaa caaattgtta tcaagattac ggatcaaggt	180
tatgtgacct ctcatggaga ccattatcat tactataatg gcaaggttcc ttatgatgcc	240
atcatcagtg aagaacttct catgaaagat ccgaattatc agttgaagga ttcagacatt	300
gtcaatgaaa tcaaggggtg ctatgtgatt aaggtagacg gaaaatacta tgtttacctt	360
aaagatgcgg cccatgcgga caatattcgg acaaaagaag agattaaacg tcagaagcag	420
gaacacagtc ataatacata ctcaagagca gataatgctg ttgctgcagc cagagcccaa	480
ggacgttata caacggatga tgggtatatc ttcaatgcat ctgatatcat tgaggacacg	540
ggtgatgctt atatcgttcc tcacggcgac cattaccatt acattcctaa gaatgagtta	600
tcagctagcg agttagctgc tgcagaagcc tattggaatg ggaagcaggg atctcgtcct	660
tcttcaagtt ctagttataa tgcaaatcca gtccaaccaa gattgtcaga gaaccacaat	720
ctgactgtca ctccaactta tcatcaaaat caaggggaaa acatttcaag ccttttacgt	780
gaattgtatg ctaaaccctt atcagaacgc catgtagaat ctgatggcct tattttcgac	840
ccagcgcaaa tcacaagtcg aaccgccaga ggtgtagctg tccctcatgg taaccattac	900
cactttatcc cttatgaaca aatgtctgaa ttggaaaaac gaattgctcg tattattccc	960
cttcgttacc gttcaaacca ttgggtacca gattcaagac cagaacaacc aagtcacaaa	1020
tcgactccgg aacctagtc aagtctgcaa cctgcaccaa atcctcaacc agctccaagc	1080
aatccaattg atgagaaatt ggtcaaagaa gctgttcgaa aagtaggcga tggttatgtc	1140
tttgaggaga atggagtctc tcgttatatc ccagccaagg atctttcagc agaaacagca	1200
gcaggcattg atagcaaact ggccaagcag gaaagtttat ctcataagct aggagctaag	1260
aaaactgacc tcccatctag tgatcgagaa ttttacaata aggcttatga ctactagca	1320
agaattcacc aagatttact tgataataaa ggtcgacaag ttgattttga ggttttggat	1380
aacctgttgg aacgactcaa ggatgtctca agtgataaag tcaagttagt ggatgatatt	1440
cttgccttct tagctccgat tcgtcateca gaacgttttag gaaaacaaa tgcgcaaatt	1500
acctacactg atgatgagat tcaagtagcc aagttggcag gcaagtacac aacagaagac	1560
ggttatatct ttgatcctcg tgatataacc agtgatgagg gggatgccta tgtaactcca	1620
catatgacct atagccactg gattaaaaaa gatagtttgt ctgaagctga gagagcggca	1680
gcccaggctt atgctaaaga gaaaggtttg acccctcctt cgacagacca tcaggattca	1740
ggaaatactg aggcaaaagg agcagaagct atctacaacc gcgtgaaagc agctaagaag	1800

gtgccacttg atcgtagcc ttacaatctt caatatactg tagaagtcaa aaacggtagt 1860
 ttaatcatac ctcatatga ccattacat aacatcaaat ttgagtgggt tgacgaaggc 1920
 ctttatgagg cacctaaggg gtatagtctt gaggatcttt tggcgactgt caagtactat 1980
 gtcgaacatc caaacgaacg tccgcattca gataatgggt ttggtaacgc tagtgacat 2040
 gttcgtaaaa ataaggcaga ccaagatagt aaacctgatg aagataagga acatgatgaa 2100

gtaagtgagc caactcaccc tgaatctgat gaaaaagaga atcacgctgg tttaaatcct 2160
 tcagcagata atctttataa accaagcact gatacggaag agacagagga agaagctgaa 2220
 gataccacag atgaggetga aattcctcaa gtagagaatt ctgttattaa cgctaagata 2280
 gcagatgcgg aggccttgct agaaaaagta acagatccta gtattagaca aaatgctatg 2340
 gagacattga ctggtctaaa aagtagtctt cttctcggaa cgaaagataa taacactatt 2400
 tcagcagaag tagatagtct cttggctttg ttaaaagaaa gtcaaccggc tcctatacag 2460
 tag 2463

<210> 7

<211> 445

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 7

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

115 120 125
 Glu Lys Ile Glu Asp Arg Ala Phe Asp Phe Ser Glu Leu Glu Glu Ile
 130 135 140
 Glu Leu Pro Ala Ser Leu Glu Tyr Ile Gly Thr Ser Ala Phe Ser Phe
 145 150 155 160
 Ser Gln Lys Leu Lys Lys Leu Thr Phe Ser Ser Ser Ser Lys Leu Glu
 165 170 175
 Leu Ile Ser His Glu Ala Phe Ala Asn Leu Ser Asn Leu Glu Lys Leu

 180 185 190
 Thr Leu Pro Lys Ser Val Lys Thr Leu Gly Ser Asn Leu Phe Arg Leu
 195 200 205
 Thr Thr Ser Leu Lys His Val Asp Val Glu Glu Gly Asn Glu Ser Phe
 210 215 220
 Ala Ser Val Asp Gly Val Leu Phe Ser Lys Asp Lys Thr Gln Leu Ile
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Pro Ser Gln Lys Asn Asp Glu Ser Tyr Lys Thr Pro Lys Glu

 245 250 255
 Thr Lys Glu Leu Ala Ser Tyr Ser Phe Asn Lys Asn Ser Tyr Leu Lys
 260 265 270
 Lys Leu Glu Leu Asn Glu Gly Leu Glu Lys Ile Gly Thr Phe Ala Phe
 275 280 285
 Ala Asp Ala Ile Lys Leu Glu Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ser Leu Glu
 290 295 300
 Thr Ile Glu Arg Leu Ala Phe Tyr Gly Asn Leu Glu Leu Lys Glu Leu

 305 310 315 320
 Ile Leu Pro Asp Asn Val Lys Asn Phe Gly Lys His Val Met Asn Gly
 325 330 335
 Leu Pro Lys Leu Lys Ser Leu Thr Ile Gly Asn Asn Ile Asn Ser Leu
 340 345 350
 Pro Ser Phe Phe Leu Ser Gly Val Leu Asp Ser Leu Lys Glu Ile His
 355 360 365

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

370

375

380

Ile Pro Glu Thr Val Lys Phe Tyr Val Thr Ser Glu His Ile Lys Asp

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

Ser Asn Gln Gly Val Val Gly Trp Val Lys Asp Lys Gly

435

440

445

<210> 8

<211> 1338

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 8

atggcagata ctctagttc ggaagtaatc aaagagacta aagttggaag tattattcaa 60

caaaataata tcaaatataa ggttctaact gtagaaggta acataggaac tgttcaagt 120

ggtaatggag ttactcctgt agagtttgaa gctgggtcaag atggaaaacc attcacgatt 180

cctacaaaaa tcacagtagg tgataaagta tttaccgtta ctgaagtagc tagtcaagct 240

tttagttatt atccagatga aacaggtaga attgtctact atcctagctc tattactatc 300

ccatcaagca taaaaaaat acaaaaaaa ggcttccatg gaagtaaagc taaaactatt 360

atttttgaca aaggcagtc gctggagaaa attgaagata gagcttttga tttttctgaa 420

ttagaagaga ttgaattgcc tgcattctta gaatatattg gaacaagtgc attttctttt 480

agtcaaaaat tgaaaaagct aaccttttcc tcaagttcaa aattagaatt aatatcacat 540

gaggcttttg ctaatttacc aaatttagag aaactaacat taccaaaatc ggttaaaaca 600

ttaggaagta atctatttag actcactact agcttaaaac atgttgatgt tgaagaagga 660

aatgaatcgt ttgcctcagt tgatgggtgt ttgttttcaa aagataaaac tcaattaatt 720

tattatccaa gtcaaaaaa tgacgaaagt tataaaacgc ctaaggagac aaaagaactt 780

gcatcatatt cgtttaataa aaattcttac ttgaaaaaac tcgaattgaa tgaaggttta 840

gaaaaaatcg gtacttttgc atttgcggat gcgattaaac ttgaagaaat tagcttacca 900

aatagtttag aaactattga acgttttagc ttttacggta atttagaatt aaaagaactt 960

atattaccag ataatgttaa aaatttttgt aaacacgtta tgaacggttt accaaaatta 1020
 aaaagttaa caattggtaa taatatcaac tcattgccgt cttcttcct aagtggcgtc 1080
 ttagattcat taaaggaaat tcatattaag aataaaagta cagagttttc tgtgaaaaaa 1140

gatacatttg caattcctga aactgttaag ttctatgtaa catcagaaca tataaaagat 1200
 gttcttaaat caaatttata tactagtaat gatatcattg ttgaaaaagt agataatata 1260
 aaacaagaaa ctgatgtagc taaacctaaa aagaattcta atcagggagt agttggttgg 1320
 gttaaagaca aaggttaa 1338

<210> 9

<211> 471

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 9

Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met Asn Tyr Asp

1 5 10 15

Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu Ser Ile Glu Asn Arg Phe

20 25 30

Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg

35 40 45

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

50 55 60

Cys Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val Asp Glu

65 70 75 80

Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala Val Asp Arg Ala Pro

85 90 95

Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe

100 105 110

Leu Gln Val Glu Asp Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn

115 120 125

Asp Leu Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn Val

130 135 140

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

145 150 155 160
 Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu
 165 170 175
 Asp Ile Asp Phe Asn Ser Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile
 180 185 190
 Val Asn Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys
 195 200 205

 Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu Asp Leu Lys
 210 215 220
 Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu Val Tyr Ile Ser Ser Val
 225 230 235 240
 Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser
 245 250 255
 Asp Glu Val Glu Ala Ala Phe Glu Ala Leu Ile Lys Gly Val Lys Val
 260 265 270

 Ala Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu Val Lys
 275 280 285
 Ala Val Ile Leu Cys Gly Asp Pro Ser Ser Gly Ala Arg Val Val Thr
 290 295 300
 Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe
 305 310 315 320
 Thr Ala Asp His Pro Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu
 325 330 335

 Arg Asp Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val Glu
 340 345 350
 Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu Leu Asp His Ser
 355 360 365
 Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile Thr Trp Asp Glu Leu Ser Tyr
 370 375 380
 Asp His Gln Gly Lys Glu Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Asp Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly
 405 410 415
 Asn Val Arg Asn Leu Ser Val Lys Ile Arg Glu Ala Thr Gly Leu Ala
 420 425 430
 Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Tyr Glu Lys Thr Asp Leu Pro Leu Val
 435 440 445
 Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gln Val
 450 455 460

Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp
 465 470

<210> 10

<211> 471

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 10

Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met Asn Tyr Asp
 1 5 10 15
 Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu Ser Ile Glu Asn Arg Phe
 20 25 30
 Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg
 35 40 45

Lys Lys Arg Ser Leu Ser Thr Asn Thr Ser Asp Ile Ser Val Thr Ala
 50 55 60
 Thr Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val Asp Glu
 65 70 75 80
 Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala Val Asp Arg Ala Pro
 85 90 95
 Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe
 100 105 110

Leu Gln Val Glu Asp Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn
 115 120 125
 Asp Leu Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn Val

130	135	140	
Pro Ala Arg Met Gln Tyr Glu Lys Ile Thr Ala His Ser Met Glu Gln			
145	150	155	160
Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu			
	165	170	175
Asp Ile Asp Phe Asn Ser Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile			
	180	185	190
Val Asn Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys			
	195	200	205
Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu Asp Leu Lys			
	210	215	220
Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu Val Tyr Ile Ser Ser Val			
225	230	235	240
Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser			
	245	250	255
Asp Glu Val Glu Ala Ala Phe Glu Ala Leu Ile Lys Gly Val Lys Val			
	260	265	270
Ala Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu Val Lys			
	275	280	285
Ala Val Ile Leu Gly Gly Asp Pro Ser Ser Gly Ala Arg Val Val Thr			
	290	295	300
Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe			
305	310	315	320
Thr Ala Asp His Pro Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu			
	325	330	335
Arg Asp Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val Glu			
	340	345	350
Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu Leu Asp His Ser			
	355	360	365
Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile Thr Trp Asp Glu Leu Ser Tyr			
	370	375	380

Asp His Gln Gly Lys Glu Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Asp Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly
 405 410 415
 Asn Val Arg Asn Leu Ser Val Lys Ile Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala
 420 425 430

 Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Tyr Glu Lys Thr Asp Leu Pro Leu Val
 435 440 445
 Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gln Val
 450 455 460
 Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp
 465 470