



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

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

(51) 국제특허분류(Int. C1.)
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 패스퇴르 리미티드
캐나다 엠2알 3티4 온타리오 토론토 스티일스 에
버뉴 웨스트 1755

(72) 발명자
갈리샹 스콧
캐나다 엘7피 오이1 온타리오 벌링턴 브린 마 레
인 1125
하퍼 케빈
캐나다 엘7시 1엔3 온타리오 첼트넘 크레디트뷰
로드 14411
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
장훈

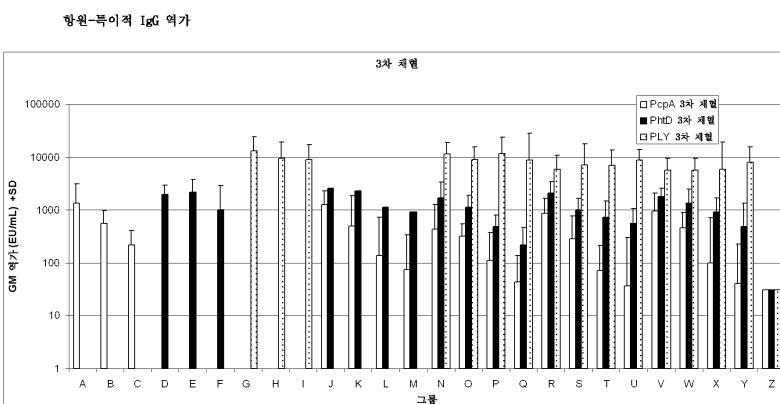
전체 청구항 수 : 총 80 항

(54) 발명의 명칭 면역원성 조성물

(57) 요 약

본 명세서의 교시내용은 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니아 PcpA 폴리펩타이드 및 적어도 한 가지의 추가 항원(예를 들어, 폴리히스티딘 3종 계열의 단백질로 이루어진 그룹에서 선택된 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니아 폴리펩타이드(예를 들어, PhtD))을 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 앰2엔 7시2 온타리오 토론토 3 에버슨 드
라이브 유닛 124

오취스 마르티나 오취스

프랑스 69280 마르시 레투와르 아브뉘 마르셀 메
리유 1541

모어필드 게리

미국 웨슬리아주 18064 내저러스 이브닝 선
알디 2213

아우사르 페르난도

캐나다 앤6비1엘7 온타리오 마컴 개스 램프 레인
250

살라 마리-대니엘

캐나다 앤4지2알1 온타리오 토론토 브로드웨이 아
베 655

특허청구의 범위

청구항 1

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

청구항 2

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

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물이 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니애 PcpA 폴리펩타이드 및 분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니애 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 웨이드 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 웨이드 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 제15항 중 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 $\text{T}_{65} \rightarrow \text{C}$, $\text{G}_{293} \rightarrow \text{C}$ 및 $\text{C}_{428} \rightarrow \text{A}$ 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 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 뉴모니애 감염에 의해 발생되는 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 뉴모니애 감염에 의해 발생되는 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 뉴모니애에 대하여 포유동물에게 방어적 면역반응을 유도하는 방법.

청구항 33

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

청구항 34

제2항에 있어서, 스트렙토코커스 뉴모니애 감염에 의해 발생되는 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 뉴모니애 PcpA 폴리펩타이드, 적어도 한 가지의 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니애 폴리펩타이드 및 수중유 항원보강제 에멀젼을 포함하는 면역원성 조성물로서,

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

청구항 42

분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니애 PcpA 폴리펩타이드 및 적어도 한 가지의 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니애 폴리펩타이드 및 수중유 항원보강제 에멀젼을 포함하는 스트렙토코커스 뉴모니애에 의해 발생되는 질환에 대해 대상자에게 방어를 제공하는 면역원성 조성물로서,

상기 수중유 항원보강제 에멀젼은 적어도 스쿠알렌, 수성 용매, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 친수성 비이온성 계면활성제 및 소수성 비이온성 계면활성제를 포함하며, 상기 에멀젼은 열가역적이고, 유적 집단의 용적의 90%가 200 nm 미만의 크기를 갖는, 스트렙토코커스 뉴모니애에 의해 발생되는 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 뉴모니애 PhtD 폴리펩타이드, 적어도 한 가지의 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니애 폴리펩타이드 및 수중유 항원보강제 에멀젼을 포함하는 면역원성 조성물로서,

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

청구항 47

분리된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니애 PhtD 폴리펩타이드, 적어도 한 가지의 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니애 폴리펩타이드 및 수중유 항원보강제 에멀젼을 포함하는 스트렙토코커스 뉴모니애에 의해 발생되는 질

환에 대해 대상자에게 방어를 제공하는 면역원성 조성물로서,

상기 수중유 항원보강제 에멀젼은 적어도 스쿠알렌, 수성 용매, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 친수성 비이온성 계면활성제 및 소수성 비이온성 계면활성제를 포함하며, 상기 에멀젼은 열가역적이고, 유적 집단의 용적의 90%가 200 nm 미만의 크기를 갖는, 스트렙토코커스 뉴모니애에 의해 발생되는 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 뉴모니애 PhtD 폴리펩타이드를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 52

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

청구항 53

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

청구항 54

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

청구항 55

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

청구항 56

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

청구항 57

제54항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 뉴모라이신을 약 10 μ g/용량 내지 약 100 μ g/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 이상 까지 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 밸포건조된 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 수크로즈로부터 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 뉴모니애에 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**기술분야**

[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 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 항원 및 이들의 면역화 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0005]

스트렙토코커스 뉴모니애(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, 중후성 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 중후성 폐렴구균성 감염에 민감하다.

[0006] 현재 폐렴구균 백신은 두 종류가 사용되고 있다. 한 가지는 23 가지 유형의 스트렙토코커스 뉴모니애로부터 유래되는 협막다당류를 포함하며, 이들은 함께 폐렴구균성 감염의 원인 균주중 약 90%의 협막 유형을 차지한다. 그러나, 이 백신은 2세 이전에 다당류 항원에 대해 양호한 면역반응을 유발하지 않기 때문에 폐렴구균성 감염에 대해 민감성이 고조된 연령 집단인 어린 아동에게 상당한 면역성을 나타내지 않는다. 성인에게 이 백신은 균혈증성 폐렴에 대해 약 60% 효능을 보이는 것으로 알려져 있으나 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. Plotkin 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 협막(capsular) 다당류 항원을 포함하는 이를 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 협막으로부터 유도됨)을 포함하고 13-가는 13종 다당류 항원(7-가의 항원에 추가적으로 혈청형 1, 3, 5, 6A, 7F 및 19A의 협막으로부터 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 하기 때문에 복잡하고 많은 비용이 듈다. 또한 이와 같은 백신은 접합 백신에 의해 방어되지 않는 스트렙토코커스 뉴모니애의 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 협막 유형의 균주에 의한 접락형성 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 뉴모니애 항원이 스트렙토코커스 뉴모니애에 대한 단백질 기본 백신의 가능한 후보물질로서 제시되어 왔다. 그러나, 현재까지 그러한 백신이 상업적으로 시판되고 있는 것은 없다. 따라서, 스트렙토코커스 뉴모니애의 효과적인 치료법이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0010] 요약

[0011] 스트렙토코커스 감염(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니애)에 대해 면역 반응을 유도하는 면역원성 조성물 및 방법이 기술된다. 더욱 자세하게는, 본 명세서의 교시내용은 면역원성 PcpA 폴리펩타이드 및/또는 폴리히스티딘 3종 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 3종 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 뉴모니애 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 부형체를 포함할 수 있다. 한 가지 예로서, 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형체는 이를 함유하지 않은 조성물에 비하여 PcpA, PhtX 및/또는 해독된 뉴모라이신 단백질의 열안정성을 0.5°C 이상까지 증가시켜 준다. 조성물은 액체 형태, 무수 분말 형태, 동결건조, 분무건조 및/또는 무수 발포제 형태일 수 있다. 한 가지 이상의 약제학적으로 허용되는 부형체는 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 뉴모니애에 대한 면역반응을 유도하는 방법이 제공된다. 또한, 대상자에게 스트렙토코커스 뉴모니애에 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 뉴모니애의 많은 균주에 의한 감염에 대하여 면역반응을 유도한다. 또한, 본 발명의 다가 조성물을 투여되었을 경우 항원 간섭을 일으키지 않고 부가 효과를 제공할 수 있는 스트렙토코커스 뉴모니애의 면역원성 폴리펩타이드의 특정 조합을 포함한다. 본원에 기술된 부형체의 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, 재조합 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, 재조합 PhtD와 PcpA의 2가 제형이 비내 시험 모델에 의해 평가되었다. 면역화된 동물은 스트렙토코커스 뉴모니애 균주(MD, 14453 또는 941192)의 치사 용량으로 시험되었다.

도 4a는 각 그룹에 대해 종말점 희석 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 뉴모니애 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 뉴모니애 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°C, 25°C, 37°C 또는 45°C)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°C에서 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°C에 저장됨)의 안정성에 관한 부형제 영향의 연구를 보여준다. 제형은 3일 동안 50°C에 저장되었다. 항원성은 각 제형에 대해 0일(백색 막대) 및 3일 동안 저장 후(흑색 막대) 측정되었다.

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°C에 저장됨)의 항원성에 관한 부형제 영향의 연구를 보여준다. 제형은 3일 동안 50°C에 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 수득되었다.

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 뉴모니애에 대해 면역반응을 유도하고 스트렙토코커스 뉴모니애에 의해 유발된 질환을 치료 및 예방하는 조성물 및 방법이 기술된다. 면역원성 PcpA 폴리펩타이드 및/또는 폴리히스티딘 3종 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 뉴모니애) 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 뉴모니애) 폴리펩타이드, 스트렙토코커스 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 이와 같은 조성물 제조 방법 및 스트렙토코커스(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니애) 항체를 제조하는 방법을 포함한다. 이들 방법 및 조성물은 하기에 추가로 기술된다.

[0018]

본 발명의 조성물은 1종, 2종, 3종 또는 그 이상의 면역원성 폴리펩타이드를 포함한다. 조성물은 예를 들어 PcpA의 면역원성 폴리펩타이드; 폴리히스티딘 3종 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 폐렴구균 당류 또는 다른 폐렴구균 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 뉴모니애 균주 B6의 진뱅크 수탁번호 CAB04758, 스트렙토코커스 뉴모니애 균주 TIGR4의 진뱅크 수탁번호 NP_ 및 스트렙토코커스 균주 R6의 진뱅크 수탁번호 NP_359536의 폴리펩타이드 및 스트렙토코커스 뉴모니애 균주 14453의 폴리펩타이드를 포함한다.

[0022] 스트렙토코커스 뉴모니애 14453 계놈에서 전장 PcpA의 아미노산 서열은 서열번호 2이다. 본 발명과 사용하는데 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 사용하는데 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 에피토프종 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. 이를 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 뉴모니애 14453 계놈내 전장 PhtD의 아미노산 서열은 서열번호 1이다. 스트렙토코커스 뉴모니애 14453 계놈으로부터 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 결합된 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 에피토프 중 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 연접의 봉괴를 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 AB021381을 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 뉴모니애에 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 에피토프 중 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 폴리펩타이드이기만 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 보전적 또는 비보전적일 수 있다. 보전적 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 비교유 아미노산 잔기로 치환되는 것을 포함할 수 있다. 적합한 보전적 아미노산 치환은 하기 표 1에 기술되어 있다.

[0039] [표 1]

고유 잔기	보전적 치환의 예	바람직한 보전적 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

[0040]

[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 보전적이거나 비보전적이거나 이들의 임의 조합일 수 있다. 전문가는 공지 기술을 사용하여 본원에 제공된 폴리펩타이드 및/또는 단편의 적합한 변이체를 결정할 수 있다.

[0042] 유사체는 천연 스트렙토코커스 뉴모니아에 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)을 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 캡은 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 프로그램)을 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 입수 가능하다. 모든 BLAST 2 조사 변수에 대한 디폴트 값(매트릭스 = BLOSUM62; 오픈 캡 폐널티 = 11; 익스텐션 캡 폐널티(extension gap penalty) = 1; 캡 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 뉴모니애 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 뉴모니애 균주의 DNA로부터 직접 획득할 수 있다. 사용 가능한 균주로는 예를 들어 스트렙토코커스 뉴모니애 균주 TIGR4 및 14453이 포함된다. 바람직한 양태로서, 폴리펩타이드는 스트렙토코커스 뉴모니애 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 뉴모니애 세포로부터 및 시판용 자동화 방법(예를 들어, 배타성 고체상 합성, 부분 고체상 방법, 단편축합 또는 용액 합성)을 사용한 화합적 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 뉴모니애에 의한 감염(질환 유발)을 예방 또는 억제하는 면역반응을 대상자에서 유도하는 폴리펩타이드의 능력을 가리킨다.

[0050]

조성물

[0051]

기재된 면역원성 스트렙토코커스 뉴모니애 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, 세포융해 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 뉴모니애 폴리펩타이드(또는 이의 단편)에 반응적이고 상응하는 야생형 스트렙토코커스 뉴모니애 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 필요할 경우 임의의 다른 성분을 포함한다. "면역학적 유효량"은 이 양을 대상자에게 단일 용량으로 또는 일련의 일부로서 투여한 것이 치료 또는 예방에 효과적임을 의미한다.

[0053]

2종, 3종 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 2종-성분 백신 조성물 및 PcpA, PhtX(예를 들어, PhtD)와 해독된 뉴모라이신(예를 들어, PlyD1)의 3종-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($\mu\text{g}/\text{용량}$)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, 툴-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, 뮤라밀 펩타이드, 사포닌 유도체, 마이코박테리아 세포벽 제제, 특정 에멀젼, 모노프로스포릴 지질 A, 마이콜산 유도체, 비이온성 블록 공중합체 계면활성제, Quil A, 콜레라 독소 B 아단위, 폴리포스파坦 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 에멀젼을 포함하는 항원보강제의 존재하에 투여된다. 이러한 항원보강제는 국제 특허 출원 공보 제WO 2007006939호(Vaccine Composition Comprising a Thermoinsversible Emulsion)에 기술되어 있으며, 이 국제특허원의 전문은 본원에 참조로 인용된다. 또한, 조성물은 기술된 스쿠알렌 수중유 에멀젼에 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 Al³⁺ 이온과 하이드록실 그룹(-OH)을 포함하는 알루미늄 화합물이다. 수산화알루미늄과 다른 알루미늄 화합물(예를 들어, 하이드록시포스페이트 또는 하이드록시설페이트)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 좋지 않은 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, 설플레이트, 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, 설플레이트, 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, 설플레이트, 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, 설플레이트, 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(PO₄))으로 처리된 것이 대체된다. 이러한 대체는 알루미늄 화합물의 PZC 및 화합물의 미세환경의 pH를 강하시킨다. 포스페이트, 카보네이트, 설플레이트, 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 전문가는 항원의 안정성을 증가시키기 위해 관련 요인을 평가하고 포스페이트, 카보네이트, 설플레이트, 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($\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$)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, 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, 메타종아황산염, 티오황산염)와 같은 실페이트(SO_4 라디칼)을 함유하는 화합물을 어떠한 것도 포함한다. 사용에 적합한 디포스포네이트 화합물의 예는 클로드로네이트, 파미드로네이트, 텔루드로네이트 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 혼탁액이 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 혼탁액을 제조한다. 바람직하게는, 완충액은 10 mM 트리스-HCl 및 150 mM NaCl(약 pH7.4)이다. 그런 후, 혼탁액을 실온에서 약 24시간 동안 혼합한다. 바람직하게는 최종 혼탁액중의 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 혼탁액과 혼합된다(예를 들어, 실온 또는 2 내지 8°C, 와동 빙서에서 약 30분 또는 약 12 내지 15시간 또는 약 24 시간).

[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 혼탁액(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 [PfCtr]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°C 내지 8°C)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 혼탁제를 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, 세룰로즈 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)을 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 폴루로닉); 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 측정한 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°C에서 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 수크로즈를 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% 수크로즈를 포함한다.

[0086] 또한, 본 발명은 스트렙토코커스 뉴모니애 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, 설페이트, 카복실레이트, 디포스페이트 또는 이들 화합물중 둘 이상의 혼합물로 처리하고,(ii) 처리된 수산화 알루미늄 항원보강제를 면역원성 PcpA 폴리펩타이드 및/또는 면역원성 PhtX 폴리펩타이드와 혼합하여 제조할 수 있다. 바람직한 양태로서, 면역원성 PhtX 폴리펩타이드는 PhtD이다.

[0088] 본 발명의 스트렙토코커스 뉴모니애 폴리펩타이드중 하나 이상을 함유하는 면역원성 조성물(예를 들어, 백신)은 스트렙토코커스 뉴모니애 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 뉴모니애 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 뉴모니애를 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다.

[0090] 본원에 사용되는, 질환 또는 장애의 예방은 대상자를 스트렙토코커스 뉴모니애와 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 뉴모니애에 의해 유발된 질환으로 고통받고 있거나 스트렙토코커스 뉴모니애에 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, 중후성 감염)은 예를 들어 부비강 감염, 중이염, 기관지염, 폐렴, 수막염, 용혈성 요독증 및 균혈증(폐혈증)을 포함한다. 이들 감염중 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 주조직 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. "분리가능한" 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 않기 때문에 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 뉴모니아 폴리펩타이드의 단편은 본 분야의 전문가에게 알려진 방법으로 제조할 수 있다.

[0103] 용어 "항체"는 비정제 형태, 또는 부분 정제 형태(즉, 하이브리도마 상청액, 복수, 다크론 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 뉴모니에 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. 이를 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 뉴모니에 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. 이를 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 뉴모니에(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 뉴모니애 14453 계놈으로부터 phtD 유전자(그러나 이의 고유 시그널 웨პ타이드는 제외)를 PCR 증폭하였다. Spn0211 및 Spn0213은 NocI 및 XhoI 제한 부위를 각각 5' 및 3' 말단내로 도입하였다(표 2 참조). QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen)을 사용하여 PCR 생성물을 정제하고 아가로즈 겔에 적용하여 크기를 확인하였다. PCR 생성물 및 pET28a(+) 벡터(Novagen) 둘다 NcoI 및 XhoI으로 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 α 로 형질전환시키고 50 μ g/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	CTAGCCATGGGATCCTATGAACCTGGTCGTACCAAG
Spn0213	AGTCCTCGAGCTACTGTATAGGAGCCGGTTG

[0120]

[0121] pBAC27의 폴리펩타이드의 추정된 아미노산 서열은 다음과 같다:

MGSYELGRHQAGQVKKESNRVSYIDGDQAGQKAENLTPDEVSREGINAEQIVIKITDQGYVTSQGDHYHYY
NGKVPYDAIISSELMKDPNYQLKSDIVNEIKGGYVIKVDGKYYVYLKDAAHADNIRTKEEIKRQKQEHSH
NHNSRADNAAAARAQGRYTTDDGYIFNNSDIIEDTGDAYIVPHGDHYHYIPKNEELSASELAAEAYWNGKQ
GSRPSSSSSYNANPVQPRLENHNLTVTPTYHQNQGENISSSLRELYAKPLSERHVESDGLIFDPAQITSRT
ARGVAVPHGNHYHFIPIYQSELEKRIARIIPLYRSNHWVPSRPEQPSQSTPEEPSLQCPAPNPQAPAPS
NPIDEKLVKEAVRKVGDGYVFEENGVSRYIPIAKDLAETAAGIDSKLAKQESLSHKGAKKTDLPSSEDREFY
NKAYDLLARIHQDLNDNKGQVDPEVLDNLLERLKDVSSTDKVKLVDDILAFLAPIRHLPERLGKPNQITYTD
DEIQVAKLAGYTTEDGYIFDPDRTITSDEGDAYVTPHMTHSHWIKKDSLSEAERAQQAYAKEKGLTPPSTD
HQDSGNTEAKGAEAIYNRVKAACKVPLDRMPYNLQYTVEVKNGSLIIPHYDHYHNKFEFWFDEGLYEAPKGY
SLEDLLATVKKYVHEPNERPHSDNGFGNASHVRKNKADQDSKPDEDKEHDESEPTHPESDEKENHAGLNP
SADNLYKPSTDTEETEEAEDTDEAETPQVENSVINAKIADAEEALLEKVTDPISIQNAMELTGLKSSL
GTKDNNTISAEVDSLLALLKESQPAPIQ (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 뉴모니애 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 NdeI 및 XhoI로 분해시킨 후 겔 정제하여 제조하였다. 생성된 1335 염기쌍 단편은 XhoI(3'-말단) 및 NdeI(5'-말단) 제한 부위가 삽입인접(flank)된 pcpA(시그널 서열 및 콜린-결합 도메인은 제외)이었다. 증폭된 단편을 세정하고, NdeI 및 XhoI으로 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	TAGCCTCGAGTTAACCTTGTCTTAACCCAACCAACTACTCCCTGATTAG
UAB-무태그 5	CTAATGAACCACATATGGCAGATACTCCTAGTTCGGAAGTAATC

[0125]

[0126] pJMS87의 폴리펩타이드의 추정 아미노산 서열은 다음과 같다:

MADTPSSEVIKETKVGSIQQNNIKYKVLTVEGNI GTVQVGNGVTPVEFEAGQDGKPFTIPTKITVGDKVFT
VTEVASQAFSYYPPDETGRIVYYPPSSITIPSSSIKKIQQKGFHGSKAKTIIIFDKGSQLEKIEDRAFDSELEEI
ELPASLEYIGTSAFSFSQKLKKLTFSSSSKLELISHEAFANLSNLEKLTLPKSVKTLGSNLFRITTSLKHV
VEEGNESFASVVGVLFSKDKTQLIYYPQSQKNDESYKTPKETKELASYSFNKNSYLKKLENEGKIGTF
ADAIIKLEEISLPNSLETIERLAFYGNLELKEELLPDNVKNFGKHMGLPKLKSLTIGNNINSLPSFFLSGV
LDSLKEIHIKNKSTEFSVKKDTFAIPETVKFYVTSEHIKDVLKSNLSTSNDIIVEKVDNIKQETDVAKPKKN
SNQGVVVGWVKDKG (서열번호 7)

[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 없기 때문에 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 시판되고 있는 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 AlPO₄)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 멀균된 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 된 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 재고암열균에는 견딜수 있지만 동결시에는 파괴되는 습윤 겔 혼탁액이었다. 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) Al(OH)의 포스페이트 처리 - Al(OH)의 수성 혼탁액(약 20 mg/mL)을 포스페이트 완충 원액(약 400 mol/L)과 혼합하고 약 pH 7.4의 10 mM 트리스-HCl 완충액(Sigma Aldrich)로 희석하여 약 13 mg/mL AlOOH/200 mM PO₄를 갖는 포스페이트-처리된 Al(OH) 혼탁액(본원에서 "PTH"라고 한다)을 제조하였다. 그런 다음 이 혼탁액을 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 Al(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/PO₄ mM의 PTH 혼탁액을 함유하는 혼합물을 제조하였다. 또는, 표준 방법을 사용하여 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의 수산화알루미늄 항원보강제(Alhydrogel[®] 85 2%) 또는 AlPO₄와 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 Al(OH): 1.25

mg/ml(0.56 mg의 원소 Al/ml). 제조된 항원 흡착 시료는 사용할 때까지 약 2°C 내지 8°C에 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 Al(OH)(0.56 mg의 원소 Al/ml).

[0140] 실시예 2

[0141] 여러 용량의 PcpA 및 PhtD로 제형된 이가 조성물에 의한 항원 간섭 및 채액성 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 μ g/mL의 PcpA + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0145] B. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 μ g/mL의 PcpA + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0146] C. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 μ g/mL의 PcpA + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0147] D. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(5 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0148] E. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0149] F. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0150] G. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(5 μ g/mL의 PcpA + 5 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0151] H. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(5 μ g/mL의 PcpA + 12.5 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0152] I. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(5 μ g/mL의 PcpA + 25 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0153] J. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 μ g/mL의 PcpA + 5 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0154] K. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 μ g/mL의 PcpA + 12.5 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0155] L. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(12.5 μ g/mL의 PcpA + 25 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0156] M. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 μ g/mL의 PcpA + 5 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0157] N. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 μ g/mL의 PcpA + 12.5 μ g/mL의 PhtD + 1.3 mg/mL AlOOH)

[0158] O. 트리스 완충 염수(pH 7.4)중의(25 μ g/mL의 PcpA + 25 μ g/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°C에 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
1μg 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+ 2.5ug PhtD	면역화전	< 100	< 100
	3차 면역화 후	55834	265593
1 μg PcpA+ 5ug 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)과 상응하는 일가 PhtD 제형에 의해 유도된 역가사이의 대부분 비교에서 통계적으로 유의적인 억제가 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 1μg/용량의 PcpA와 2.5μg/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 실시예는 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 치사시켰다. 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(μl /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 실시예는 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®, Brenntag), 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 AlOOH를 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(AlOOH 보다 면역원성이 낮음)로

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

[0179] 총론적으로, 재조합 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 μ g/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 재조합 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 μ g PcpA+PhtD+AlOOH	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	152166	88266
5 μ g PcpA+PhtD+AlOOH와 2mM PO ₄	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	204800	88266
5 μ g PcpA+PhtD+AlOOH와 10mM PO ₄	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	204800	64508
5 μ g PcpA+PhtD+AlOOH와 20mM PO ₄	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	176532	68910
10 μ g PcpA+PhtD+신선한 AlOOH	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	176532	97454
10 μ g PcpA+PhtD+오래된 AlOOH	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	168005	88266
5 μ g PcpA+PhtD+AlPO ₄	면역화전	<100	<100
	최종 채혈	124827	36204

* 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] 재조합 PhtD와 PcpA의 이가 제형을 비내(IN) 시험 모델을 사용하여 평가하였다. 이 모델에서, 암컷 CBA/j 마우스 그룹(N = 그룹당 15 마리)을 5 μ g/용량의 각각의 정제된 재조합 PhtD와 PcpA 단백질을 함유하고 항원보강제(2 mM PO₄, 65 μ g/용량)로 처리된 AlOOH)와 함께 TBS중에 제형된 이가 조성물로 근육내(IM)로 면역화하였다. 주사량은 용량당 50 μ L였다. 음성 대조군으로서, PBS 위약-함유 알루미늄 항원보강제를 주사하였다. 동물은 연구의 개시 후 0, 3 및 6주시점에 근육내로 면역화시켰다. 9주째에, 동물에게 PBS 혼탁액중의 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 MD, 균주 14453 또는 941192의 치사량(약 106 CFU)을 비내로 투여하였다(마우스당 40 μ L 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 표 3 및 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 뉴모니아의 상이한 3종 균주로의 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 AlOOH, 피하주사(25 μ g/ml/단백질)
- [0205] G. PcpA 로트 A, PhtD 로트 D + 2 mM 포스페이트 처리된 AlOOH, 피하주사(25 μ g/ml/단백질)
- [0206] H. PcpA 로트 B, PhtD 로트 D + 2 mM 포스페이트 처리된 AlOOH, 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 AlOOH, 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0212] N. PcpA 로트 B, PhtD 로트 C + 2 mM 포스페이트 처리된 AlOOH, 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0213] O. PcpA 로트 A, PhtD 로트 D + 2 mM 포스페이트 처리된 AlOOH, 근육내주사(100 μ g/ml/단백질)
- [0214] P. PcpA 로트 B, PhtD 로트 D + 2 mM 포스페이트 처리된 AlOOH, 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 Al(OH))와 함께 제형되었다. 마우스에게 3차(최종) 채혈 후 4일째 스트렙토코커스 뉴모니에 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 희석 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 뉴모니에 시험에 대해 방어를 제공하였다(각각 100 μ g /mL의 각 PhtD와 PcpA 및 전처리된 Al(OH)의 제형으로 면역화된 그룹에서 생존율이 100%로 나타났다). 근육내 면역화한 그룹과 피하내 면역화한 그룹 사이의 생존률(%)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 생존율을 제공하였다). 또한, PcpA 로트 B는 항원보강된 제형 대 비항원보강된 제형에서 유의하게 더 높은 생존율(%)을 제공하였다. 항원보강된 제제 대 비항원보강된 제제에서 다른 통계적 이점을 나타났지 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 Al(OH)(Alhydrogel® "85" 2%, 25.08 mg/mL)의 제형으로 면역화시킨 마우스의 약 80%(p값 0.011)가 치명적인 스트렙토코커스 뉴모니에 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 재조합 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).

[0223]

[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

[0224]

실시예 8

[0226]

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 재조합 항원 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.

[0227]

한의여과 및 PBS로의 완충액 교환에 의해 수집된 용출 분획을 농축하여 최종 정제된 항체를 수득하였다. 항체 용액은 0.22 μm 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 판독기로 측정하였다. 정제된 항체의 순도, 특이성 및 교차반응성은 SDS-PAGE, 웨스턴 블로트 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

[0230]

본 실시예는 항-PhtD 및 항-PcpA 항체의 결합능의 분석을 기술한다. 완전 배지 또는 Mn^{2+} -결손 배지에서 동결 원항온처리물을 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.

[0231]

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

[0232]

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

[0233]

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 나타났다는 발견과 일치한다. PcpA의 경우, 세균이 결손된 Mn^{2+} 및 증가된 Zn^{2+} 의 조건에서 성장되었을 때 특히 인식되었다. 전체적으로 데이터는 재조합 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.

[0234]

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 뉴모니애와 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 Mn²⁺-결손 배지에서 항온처리된 살아있는 스트렙토코커스 뉴모니애 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 다가 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 AlPO₄와 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 AlPO₄(3 mg/ml)중의 rPcpA 10 µg/용량 및 rPhtD 10 µg/용량을 근육내 주사하였다(총 20 µg의 단백질, 총 500 µl 용량의 주사/토끼). AlPO₄중의 rPcpA 10 µg/용량 및 rPhtD 10 µg/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 투브에 혈액을 수집한 후 응고되도록 두고 원심분리로 혈청을 획득하고 모아서 약 -20°C에 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 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 뉴모니애로 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
	PhtD	--	--	--	S

[0243] * : 괴서 정확검정법

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

적인 혈청의 로그 희석)을 유의하게 감소시켰고 이 차이는 비차단된 혈청의 ED50에 비하여 통계적으로 유의적이었다. PcpA 및 PhtD 특이적 항체 둘 다를 함유한 혈청중에서 PhtD 항체의 경쟁적 억제는 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 희석에서만 피서 정확검정법에 의해 통계적 유의성으로 수득되었고, 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 수득된 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 수득되었다. 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

백신 제형의 면역원성에 미치는 알루미늄 농도의 영향

[0249] 본 실시예는 포스페이트 전처리된 Al(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 서 열번호 44로 기술되어 있고 본원에서 서열번호 9에 해당한다)를 실시예 1에 기술된 바와 같이 Al(OH)-함유 PO₄(2mM)와 함께 제형하였다. 제조된 제형의 시료는 연구 개시전에 2 내지 8°C에 저장하였다. Balb/c 마우스 그룹을 해당 제형으로 3주 간격으로 3회 근육내(IM)로 면역화하였다.

[0251] A. 비면역증강됨(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:Al 몰비 = 0.1(2 mM PO₄로 처리된 0.56 mg Al/mL Al(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:Al 몰비 = 0.1(1 mM PO₄로 처리된 0.28 mg Al/mL Al(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:Al 몰비 = 0.1(4 mM PO₄로 처리된 1.12 mg Al/mL Al(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:Al 몰비 = 0.1(6 mM PO₄로 처리된 1.68 mg Al/mL Al(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. 수득한 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 나타났고, 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°C, 25°C, 37°C에서(즉, 열가속 조건하에서) 항온처리되었다.

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

[0261] [표 10]

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

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

[0263]

[0264] AlO(OH) 또는 PTH와 함께 제형된 일가 및 이가 제형중의 PcpA 및 PhtD의 안정성을 평가하기 위해 제형을 실시 예 1에 기술된 바와 같이 AlO(OH) 또는 2 mM 포스페이트로 포스페이트-처리된 AlO(OH)를 사용하여 제조하고 시료를 여러 온도(즉, 5°C, 25°C, 37°C 또는 45°C)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 AlO(OH)로 항원보강된 제형과 비교하여 포스페이트 처리된 AlO(OH)로 항원보강된 제형에서 PcpA 및 PhtD의 분해 속도는 특히 가속(스트레스) 조건(예를 들어, 25, 37, 45°C)하에서 유의하게 감소하였다.

[0265] 다가 제형(AlO(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°C에서 약 12주 동안 항온처리하였다. 각 제형의 항원성을 0시간 및 12주 항온처리 기간 후에 정량 ELISA 샌드위치 검사로 평가하였다. 결과를 도 11에 나타내었다. 37°C에서 12주 항온처리 기간 후 PcpA와 PhtD 모두의 항원성은 AlO(OH)를 포함한 제형과 비교하여 PTH로 제형된 경우 유의하게 더 높게 나타났다.

[0266] 실시예 13

[0267] 본 실시예는 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 제조합적으로 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 별크가 공급되었다. 각 단백질은 10 mM 트리스 완충 염수 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°C에서 96°C로 분당 1°C씩 가열하였다. 형광 여기 및 방출 필터를 각각 492 nm 및 610 nm로 설정하였다. 각각의 시료에 대해 25°C에서 형광 판독(610 nm에서 방출, 492 nm에서 여기)을 실시한 다음, 1°C씩 높이면서 매번 실시하였다.
- [0271] 형광의 최소치에 대한 일차 미분의 상응하는 온도를 사용하여 열전이(융점, 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 +/- 0.5°C였다.
- [0272] 폴리올, 단당류 및 이당류는 농도 의존 양상으로 항원보강된 PlyD1의 T_m 을 증가시켰으며(즉, 약 4°C의 T_m 증가) 고농도의 당에서 최대 안정화가 관찰되었다. 비슷한 결과들이 PcpA와 PhtD 각각에 대해 탐지되었고, 예외적으로 아르기닌은 PhtD의 T_m 을 약 2°C까지 감소시켰다. 다음의 부형제들은 모든 3종 단백질의 열안정성을 효율적으로 증가시키는 것으로 밝혀졌다: 소르비톨(20%, 10%), 트레할로즈(20%), 텍스트로즈(20%, 10%), 수크로즈(10%, 5%) 및 10% 라토즈.
- [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 μ 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°C에서 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°C의 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°C에서 3일 항온처리 후 PcpA 제형의 항원성을 평가하였다. 토끼 IgG 항-PcpA 혈청을 항원 포획을 위해 사용하고 잘 성성확인된 단클론 항-PcpA를 검출을 위해 사용하였다. 간단히 설명하면, 96웰 평판을 0.05M Na₂CO₃/NaHCO₃ 완충액중에 2 μ g/mL 농도의 토끼 항-PhtD IgG로 실온(RT)에서 18시간 희석시키고 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 μ g/mL의 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/H₂O₂ 기질을 웰에 첨가하고 실온에서 10분 동안 항온처리하였다. 1M H₂SO₄를 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°C에서의 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°C에서의 속도상수를 감소시켰고 PcpA의 반감기를 증가시켰다(표 12). 완충액 pH9.0은 대조군의 것과 비교했을 때 단백질의 T_m을 감소시켰으나 50°C에서 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, 엑스트로즈, 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 (°C)	△T _m (△T _m =T _m (부형제)-T _m (대조군))	T _m (°C)	△T _m (△T _m =T _m (부형제)-T _m (대조군))	T _m (°C)	△T _m (△T _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% 엑스트로즈	57.7	1.0	58.7	0.0	49.7	0.0
10% 엑스트로즈	58.7	2.0	59.7	1.0	51.7	2.0
20% 엑스트로즈	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 아스파르테이트	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°C에서 항온처리된 제형의 안정성 데이터로부터의 속도상수 값

제형	50°C에서의 k ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{일}^{-1}$)	50°C에서의 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°C에서 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 선형회귀 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 아세테이트 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 중발을 방지하였다. 96웰 평판 로우터가 장착된 Contifuge Stratos 원심분리기(Heraeus Instruments, England)로 실온에서 1분 동안 200g로 평판을 원심분리하였다. 이어서, 평판을 25°C에서 96°C로 분당 1°C씩 가열하였다. 형광 여기 및 방출 필터를 각각 492 nm 및 610 nm로 설정하였다. 각각의 시료에 대해 25°C에서 형광 관독(610 nm에서 방출, 492 nm에서 여기)을 실시한 다음, 1°C씩 높이면서 매번 실시하였다.

[0290] 형광의 최소치에 대한 일차 미분의 상응하는 온도를 사용하여 열전이(융점, T_m)을 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. 수득된 결과의 요약은 표 13에 나타나 있다. 검사 민감성은 +/- 0.5°C였다.

[0291] 대부분의 단백질의 경우, 용액 pH는 단백질 유형 및 총전하를 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 T_m 값을 나타냈고 pH가 6.0에서 5.0으로 떨어지면서 T_m 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 AlOOH의 전처리가 비처리된 AlOOH에 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 T_m 대 pH 프로필에서 주된 변화가 관찰되지 않았다(도 13a 및 13c). AP로 항원보강된 PhtD의 경우에 비항원보강된 대조군과 비교하여 T_m 의 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 뉴모니아 항원을 실질적으로 상기 실시예에 기술된 바와 같이 일가, 이가 및 삼가 형태로 제형하고 IN 시험 모델을 사용하여 평가하였다. 항원보강제(2 mM PO₄로 처리된 AlOOH(0.56 μ g 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 μ L)으로의 각 면역화간에 3주 간격을 두고 3회 근육내 면역화하였다.

[0298] 마우스에 치사량의 스트렙토코커스 뉴모니에 균주 14453, 혈청형 6B(1.5×10^6 cfu/마우스)를 최종 면역화 후 3주 후에 투여하고 2주 동안 생존과 건강상태를 관찰하였다. 하기 표 13에 요약된 생존 결과는 피셔 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 (μ g/50 μ l)	PhtD (μ g/50 μ l)	PlyD1 (μ g/50 μ 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(몇 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 μ g에서 방어능이 나타내지 않았고 PcpA의 상기 양은 일가 제형으로서 투여되었을 때 방어 용량이었다. 그러나, 이들 두 그룹간의 생존율 차이는 통계적으로 유의적이지 않기 때문에 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 제형에서 감소하였다. 이들 결과로부터, PlyD1의 첨가는 이가 제형(즉, PcpA + PhtD)에 평균 2배 용량 절약 효과를 나타냈다.

[0303]

이들 데이터는 삼가 제형으로의 면역화가 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

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 그레프가 도 15a, 15b, 15c에 나타나 있다. PcpA의 경우, 산정된 최소 항원 용량은 $0.196 \mu\text{g}/\text{마우스}$ ($0.147, 95\% \text{ 낮음}; 0.245, 95\% \text{ 높음}$)로 평가되었고, PhtD의 경우 산정된 최소 항원 용량은 $0.935 \mu\text{g}/\text{마우스}$ ($0.533, 95\% \text{ 낮음}; 1.337, 95\% \text{ 높음}$)로 평가되어 1:4의 PcpA:PhtD 비율을 제공한다. PlyD1의 최소 항원 용량은 $>5\mu\text{g}/\text{마우스}$ 로 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 15Leu Ser Val Cys Ser Tyr Glu Leu Gly Arg His Gln Ala Gly Gln Val
20 25 30Lys Lys Glu Ser Asn Arg Val Ser Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Ala Gly
35 40 45Gln 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 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

[0314]

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 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															

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 Leu 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 tctaggcagg tcagtggcag tccttgcct aagtgttgc 60
tcctatgaac ttggcgtca ccaagctgg caggtaaga aagagtctaa tcgagttct 120
tatatacatgt gtgatcaggc tggtaaaaag gcagaaaatt tgacaccaga tgaagtca 180
aagagagagg ggtatcaacgc cgaacaaatt gtatcaaga ttacggatca aggttatgtg 240
acccatcatg gagaccatta tcattactat aatggcaagg ttccatcatc 300
atgaaagaac ttctcatgaa agatccgaat ttcagttga aggattcaga cattgtcaat 360
gaaatcaagg gtggctatgt gatataaggta gacggaaaat actatgttta ccttaaagat 420
gcggccatcg cggacaatat tcggacaaaa gaagagatta aacgtcagaa gcaggaacac 480
agtcataatc ataaactcaag agcagataat gctgttgctg cagccagacgc ccaaggacgt 540
tatacaacgg atgatgggta tatcttcaat gcatctgata tcattgggca cacgggtgat 600
gtttatatacg ttccatcatcg cggaccattac cattacatc ctaagaatgat gttatcagct 660
agcgagtttag ctgctgcaga agcctattgg aatgggaagc agggatctcg ttccatcatcg 720
agttcttagt ataatgcaaa tccagttcaa ccaagattgt cagagaacca caatctgact 780

[0319]

gtcaactccaa	cttatcatca	aaatcaaggg	gaaaacattt	caagcctttt	acgtgaattt	840
tatgctaaac	ccttatcaga	acgcatgt	aatctgatg	gccttatttt	cgaccaggcg	900
caaatacaca	gtcgaaccgc	cagaggtgt	gctgtccctc	atggtaacca	ttaccacttt	960
atcccttatg	aacaatgtc	tgaattggaa	aaacgaattt	ctcgatttat	tcccttcgt	1020
tatcggttcaa	accattgggt	accagattca	agaccagaac	aaccaggctcc	acaatcgact	1080
ccggaaaccta	gtccaagtct	gcaaccctgc	ccaaatccctc	aaccaggctcc	aagcaatcc	1140
attgatgaga	aattggtcaa	agaagctgtt	cggaaagttag	gcgtgggta	tgtctttgag	1200
gagaatggag	tttctcgta	tatcccagcc	aaggatcttt	cagcagaaac	agcagcaggc	1260
attgatagca	aactggccaa	gcagggaaagt	ttatctcata	agctaggagc	taagaaaact	1320
gacctcccat	ctagtatcg	agaattttac	aataaggctt	atgacttact	agcaagaatt	1380
caccaagatt	tacttgataa	taaaggctcg	caagttgatt	ttgaggtttt	ggataacctg	1440
tttggacac	tcaaggatgt	ctcaagtat	aaagtcaagt	tagtggatg	tattcttgcc	1500
tttttagctc	cgattcgta	tccagaaatgt	ttaggaaaac	caaatgcgc	aattacctac	1560
actgatgatg	agattcaagt	agccaagttt	gcaggcaagt	acacaacaga	agacggttat	1620
atctttgatc	ctcgatgat	aaccagtat	gagggggatg	cctatgtaac	tccacatatg	1680
accatagcc	actggattaa	aaaagatgt	ttgtctgaag	ctgagagagc	ggcagccccag	1740
gcttatgcta	aagagaaaagg	tttgccctt	ccttcgacag	accatcgag	ttcaggaaat	1800
actgaggccaa	aaggagcaga	agctatctac	aaccgcgtga	aagcagctaa	gaagggtgcca	1860
cttgatcgta	tgccttacaa	tcttcaat	actgttagaa	tcaaaaaacgg	tagttaatc	1920
atacctcatt	atgaccatta	ccataacatc	aaatttgagt	gttgcgac	aggcctttat	1980
gaggcaccta	agggtatag	tcttgaggat	cttttggcga	ctgtcaagta	ctatgtcgaa	2040
catccaaacg	aacgtccgc	ttcagataat	ggttttggta	acgcttagtga	ccatgttcgt	2100
aaaaataagg	cagaccaaga	tagtaaacct	gatgaagata	aggaacatga	tgaagtaagt	2160
gagccaaactc	acctgtatc	tgataaaaa	gagaatcagc	ctggttaaa	tccttcagca	2220
gataatctt	ataaaaaaag	cactgtatc	gaagagacag	aggaagaagc	tgaagatacc	2280
acagatgagg	ctgaaattcc	tcaagtagag	aattctgtt	ttaacgctaa	gatgcagat	2340
gcggggcct	tgttagaaaa	agtaacagat	cctgtat	gacaaaatgc	tatggagaca	2400
ttgactggtc	taaaaatgt	tcttcttc	ggaaacgaaag	ataataaacac	tatccagca	2460
gaagtagata	gtctcttggc	tttggaaaa	gaaagtcaac	cggtccctat	acag	2514

<210> 4
<211> 1923
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4
atgaaaaaaaaa ctacaatatt atcattaact acagctgcgg ttattttagc agcatatgtc 60

[0320]

cctaatgaac	caatccatgc	agatactcct	agttcggaaag	taatcaaaga	gactaaagg	120
ggaagtattta	ttcaacaaaa	taatatcaaa	tataagggttc	taactgtaga	aggttaacata	180
agaactgttc	aagtggtaa	tggagttact	cctgttagagt	ttgaagctgg	tcaagatgga	240
aaaccatcca	cgattcctac	aaaatcaca	gtaggtgata	aagtatttc	cgttactgaa	300
gtagctagtc	aagcttttag	ttattatcca	gatgaaacag	gtagaattgt	ctactatcct	360
agctctatta	ctatccatc	aagcataaaa	aaaataca	aaaaggcctt	ccatggaagt	420
aaagctaaaa	ctattat	tgacaaaggc	agttagctgg	agaaaattga	agatagagct	480
tttgat	tttctgaa	agagattgaa	ttgcctgc	ctctagaata	tattggaaca	540
agtgcattt	cttttagtca	aaaattgaaa	aagctaac	tttcc	tcagtttcaag	600
gaattaat	cacatgaggc	tttgctaat	ttatcaaatt	tagagaaact	aacattacca	660
aaatcggtt	aaacattagg	aagtaatc	tttagactca	ctactagtt	aaaacatgtt	720
gatgttgaag	aggaaatgat	atcg	tttgc	tcagttgt	gtgtttgtt	780
aaaactcaat	taatttattta	tccaa	gttgc	tttgc	tttgc	840
gagacaaaag	aacttgc	atattcgtt	aaaaat	tttgc	tttgc	900
ttgaatgaag	gttttagaaa	aatcgt	tttgc	tttgc	tttgc	960
gaaat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1020
gaattaat	aaat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1080
ggtttacca	attaaaaa	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1140
ttccta	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1200
ttttctgt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1260
gaacatataa	aaat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1320
aaagtagata	atataaa	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1380
ggagtagtt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1440
tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1500
atggctact	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1560
atggctact	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1620
atggctact	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1680
atggctact	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1740
atggctact	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1800
atggctact	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1860
tttattat	aaat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1920
gg	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	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 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
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
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 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 ttaagaaaaga gtctaattcg 60
 gtttcttata tagatggtga tcaggctggt caaaaggcag aaaatttgc accagatgaa 120
 gtcagtaaga gagagggat caacgcccga caaattgtta tcaagattac ggatcaaggt 180
 tatgtgacct ctcatggaga ccattatcat tactataatg gcaagggtcc ttatgtgcc 240
 atcatcgtg aagaacttct catgaaagat cccaatttac agttgaagga tttagacatt 300
 gtcaatgaaa tcaagggtgg ctatgtgatt aaggtagacg gaaaatacta tgtttacatt 360
 aaagatgcgg cccatgcgga caatattcg acaaaaagaag agattaaacg tcagaagcag 420
 gaacacagtc ataatacataa ctcaagagca gataatgctg ttgctgcacg cagagccaa 480
 ggacgttata caacggatga tgggtatata ttcaatgcat ctgatatacat tgaggacacg 540
 ggtgatgctt atatcggtcc tcacggcgc acattaccatt acattccaa gaatgagtt 600
 tcagctagcg agttagctgc tgcaagaagcc tatttggatg ggaaggcaggg atctcgct 660
 tcttcaagtt ctatgttataa tgcaaatcca gttcaaccaa gattgtcaga gaaccacaaat 720
 ctgactgtca ctccaactta tcatcaaaaat caagggaaa acatttcaag cctttacgt 780
 gaattgtatg ctaaaccctt atcagaacgc catgtagaat ctgatggcct tattttcgac 840
 ccacgcacaa tcacaagtgc aaccgcgcaga ggtgtagctg tccctcatgg taaccattac 900
 cactttatcc cttatgaaca aatgtctgaa ttggaaaaac gaattgtcg tattttccc 960
 cttcgttatac gttcaaacca ttgggtacca gattcaagac cagaacaacc aagtccacaa 1020
 tcgactccgg aacctagtcc aagtctgca cctgcaccaa atcctcaacc agctccaacg 1080
 aatccaattt atgagaaatt ggtcaagaa gctgtcgaa aagtaggcga tggttatgtc 1140
 tttgaggaga atggagttc tcgttatac ccagccaagg atcttcacg agaaacacgca 1200
 gcaggcattt atgcaactt ggccaaggcag gaaagtttat ctcataagct aggagctaag 1260

[0326]

aaaactgacc	tcccatctag	tgatcgagaa	ttttacaata	aggcttatga	cttactagca	1320
agaattcacc	aagatttact	tgataataaa	ggtcgacaag	ttgatttga	ggttttggat	1380
aacctgttgg	aacgactcaa	ggatgtctca	agtgataaaag	tcaagtttagt	ggatgatatt	1440
cttgccttct	tagctccat	tgcgtatcca	gaacgtttag	gaaaacccaa	tgcgcaaatt	1500
acctacactg	atgatgagat	tcaagtagcc	aagttggcag	gcaagtagcac	aacagaagac	1560
gttataatct	ttgatccctcg	tgatataacc	agtgtatggg	gggatgccta	tgtaactcca	1620
catatgaccc	atagccactg	gattaaaaaa	gatagttgt	ctgaagctga	gagagcggca	1680
gccaggcctt	atgctaaaga	gaaaggtttg	accctccctt	cgacagacca	tcaggattca	1740
gaaataactg	aggcaaaaagg	agcagaagct	atctacaacc	gcgtgaaagc	agctaagaag	1800
gtgccacttg	atcgatgcc	ttacaatctt	caataactg	tagaagtcaa	aaacggtagt	1860
ttaatcatac	ctcattatga	ccattaccat	aacatcaa	tttagtgggt	tgacgaaggc	1920
ctttatgagg	cacctaaggg	gtatagttt	gaggatctt	tggcactgt	caagtactat	1980
gtcgaacatc	caaacaacg	tccgcattca	gataatgggtt	ttggtaacgc	tagtgaccat	2040
gttcgtaaaa	ataaggcaga	ccaaagatgt	aaacctgtat	agataagga	acatgtgaa	2100
gtatgtggc	caactcaccc	tgaatctgtat	gaaaaagaga	atcacgctgg	tttaaatcct	2160
tcagcagata	atcttataa	accaagcact	gatacggaa	agacagagga	agaagctgaa	2220
gataccacag	atgaggctg	aattcctaa	gtagagaatt	ctgttattaa	cgctaagata	2280
gcagatgcgg	aaggcttgct	agaaaaagta	acagatccctaa	gtatttagaca	aaatgctatg	2340
gagacattg	ctggctaaa	aagtgtctt	cttctcggaa	cgaaagataa	taacactatt	2400
tcagcagaag	tagatagtct	cttgccttgg	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

[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 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	ctcctagttc	ggaagtataatc	aaagagacta	aagtttgaag	tattattcaa	60
caaaaataata	tcaaatataaa	ggttctaact	gtagaaggta	acataggAAC	tgttcaagtg	120
ggtaatggag	ttactcctgt	agagtttgaa	gctggtcaag	atggaaaacc	attcacgatt	180
cctacaaaaa	tcacagtagg	tgataaaagta	tttacccgtta	ctgaagtagc	tagtcaagct	240
tttagttatt	atccagatga	aacaggtaga	attgtctact	atccatagctc	tattactatc	300
ccatcaagca	taaaaaaaat	acaaaaaaaaa	ggcttccatg	gaagtaaagc	taaaactatt	360
attttgaca	aaggcagtca	gctggagaaa	attgaagata	gagctttga	tttttctgaa	420
ttagaagaga	ttgaatttgc	tgcataatct	aatatatttgc	aaacaagtgc	attttctttt	480
agtcaaaaat	tggaaaagct	aaccctttcc	tcaagttcaa	aattagaatt	aatatcacat	540
gaggcttttgc	ctaattttatc	aaatttagag	aaactaacaat	tacaaaaatc	ggttaaaaca	600
tttagaaagta	atctatatttgc	actcactact	agctaaaaac	atgttgatgt	tgaagaaggaa	660
aatgaatcgt	ttgcctcagt	tgatgggttt	ttgttttcaa	aagataaaac	tcaattaatt	720
tattatccaa	gtcaaaaaaa	tgacgaaagt	tataaaacgc	ctaaggagac	aaaagaactt	780
gcatcatatt	cgttataaa	aaatttttac	ttgaaaaaac	tcgaattgaa	tgaaggttt	840
gaaaaaatcg	gtacttttgc	atttgcggat	gchgattaaac	ttgaagaaaat	tagcttacca	900
aatagtttag	aaactattga	acgtttagcc	ttttacggta	atttagaatt	aaaagactt	960
atattaccag	ataatgttaa	aaattttgg	aaacacgtta	tgaacggttt	acccaaattt	1020
aaaagttaa	caattttgtaa	taatatcaac	tcatttgcgt	ccttcttcc	aatgtggcg	1080
tttagattcat	taaaggaaat	tcatattaag	ataaaaagta	cagagtttc	tgtaaaaaaa	1140
gatacatttgc	caatttgcgt	aactgttaag	ttctatgtta	catcagaaca	tataaaagat	1200
gttcttaat	caaattttatc	tacttagtaat	gatatcatttgc	ttgaaaaagt	agataatata	1260
aaacaagaaa	ctgatgtac	taaacctaaa	aagaattctt	atcaggagg	atgtgggttgg	1320
gttaaagaca	aaggtaa					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

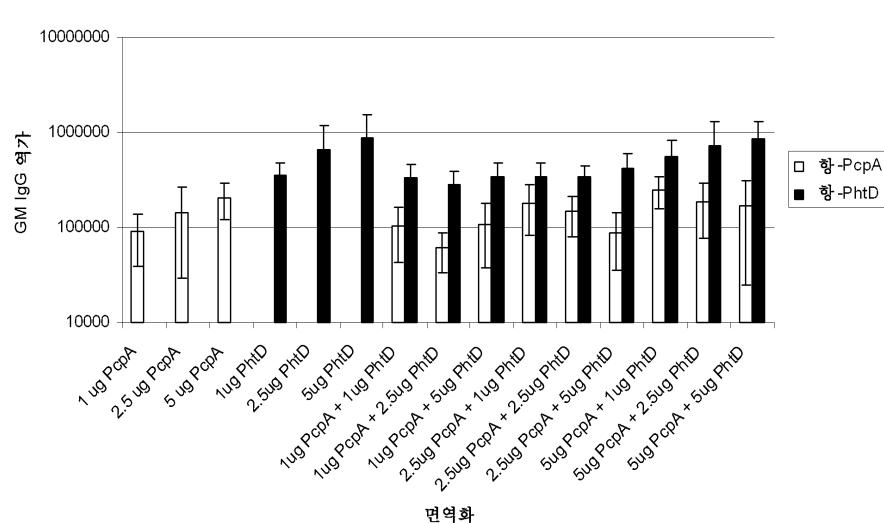
[0334]

Ala Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu Val Lys	260	265	270	
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	

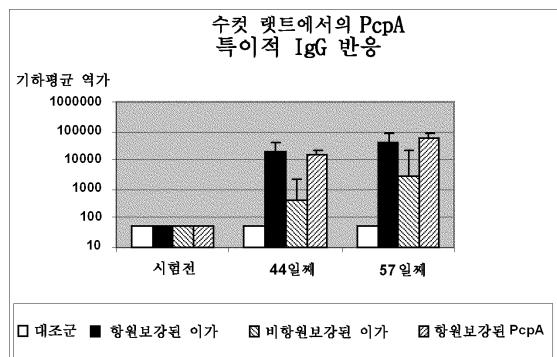
Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp
465 470

二

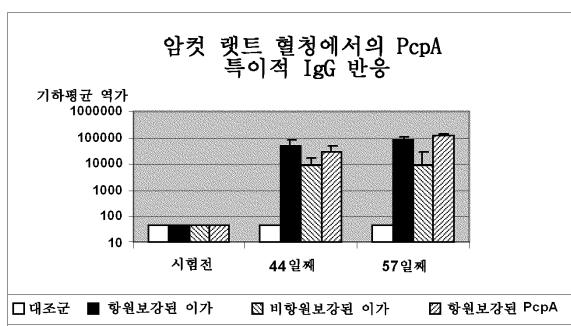
五四



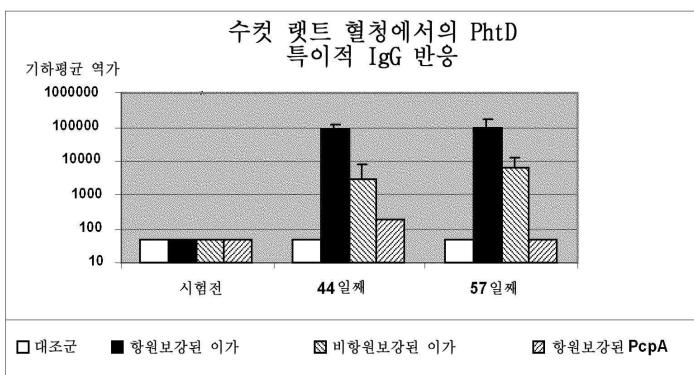
도면2a



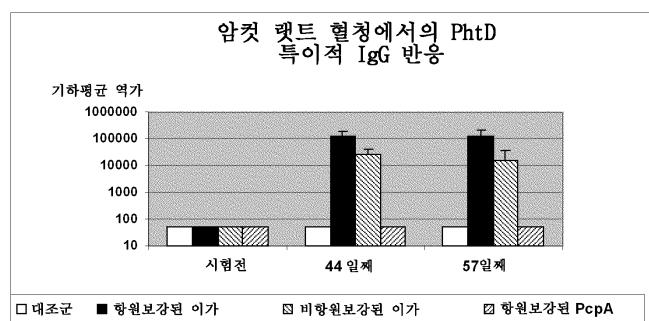
도면2b



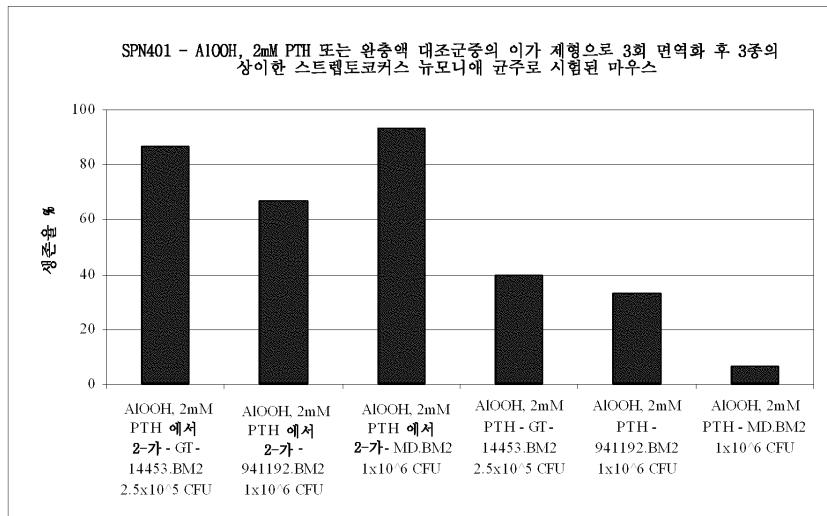
도면2c



도면2d



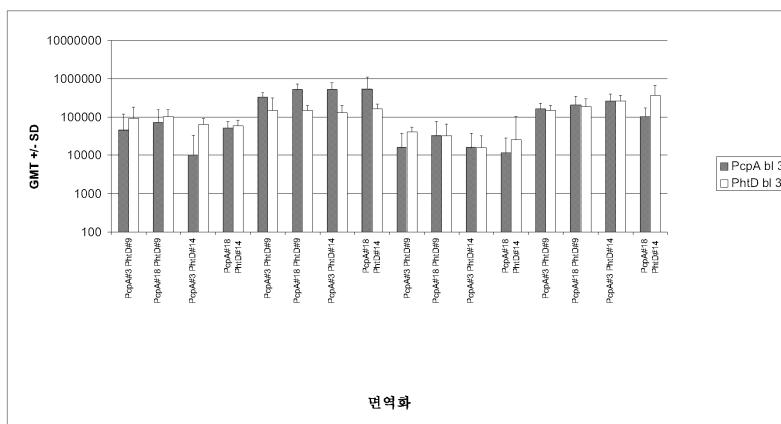
도면3



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

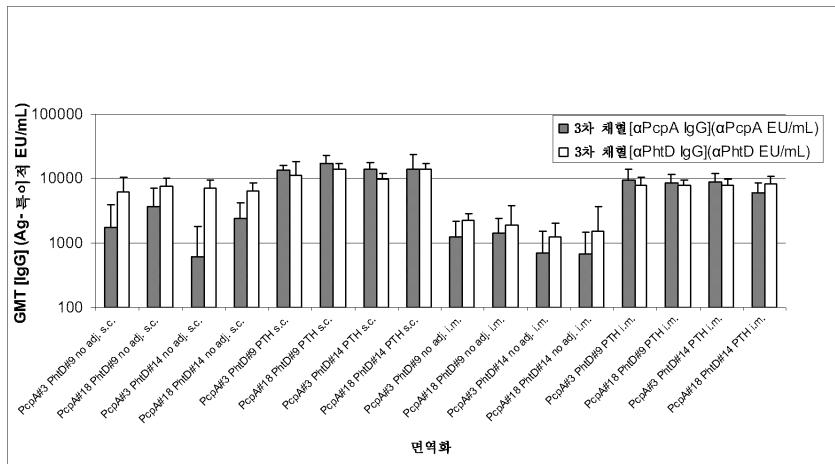
도면4a

항-PhtD, 항-PcpA 종말점 희석 ELISA



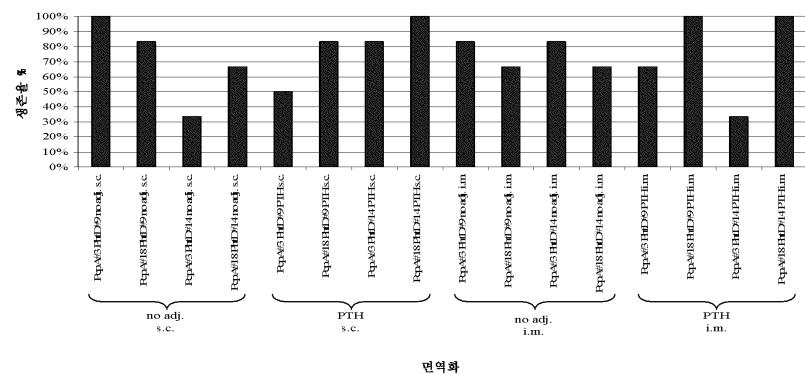
도면4b

정량 항-PhtD 및 항-PcpA ELISA

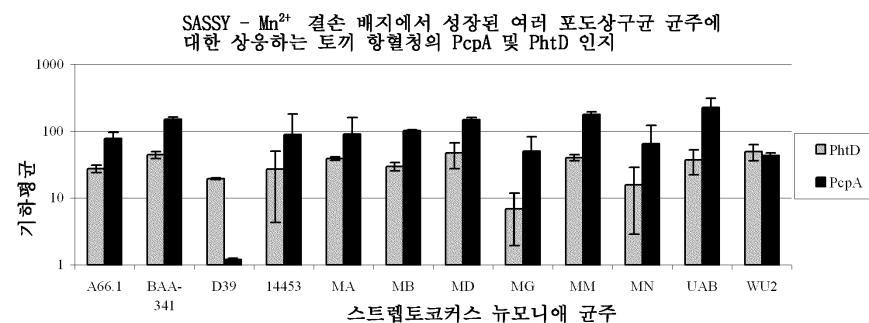


도면5

생존율 요약

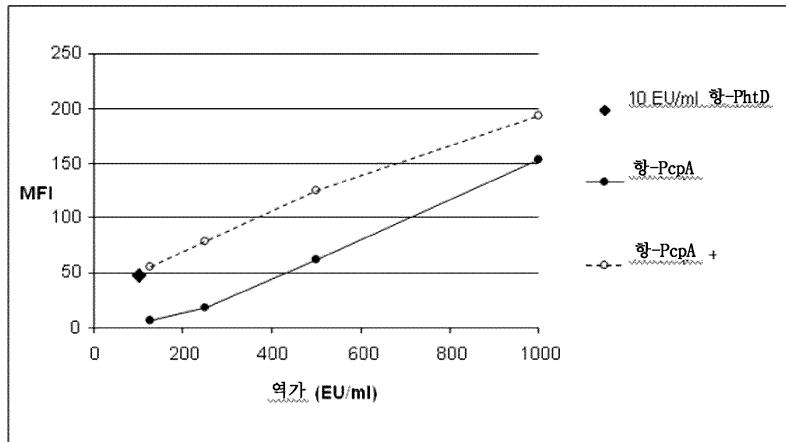


도면6

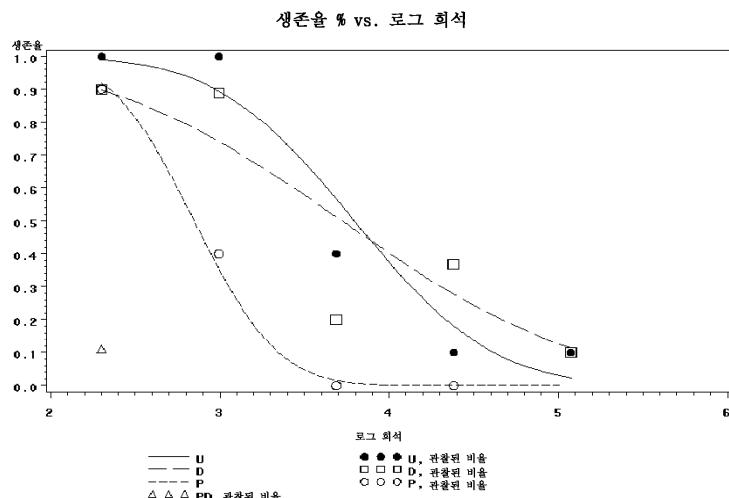


도면7

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

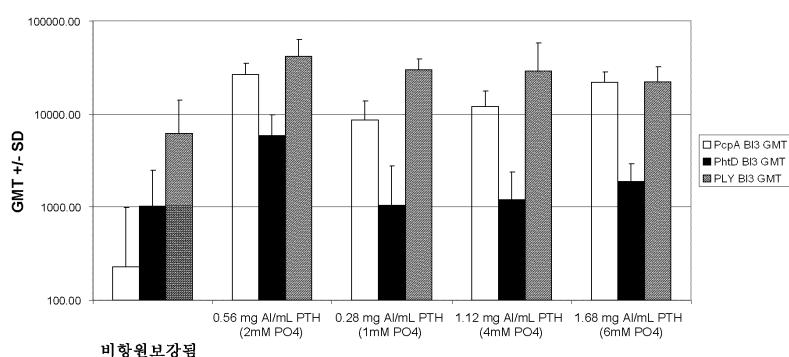


도면8



도면9

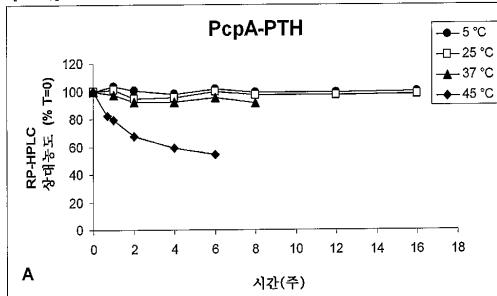
IgG 역가



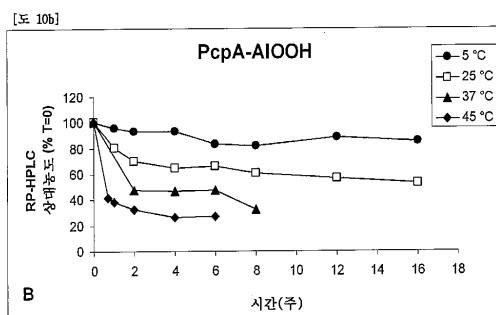
도면10

Al(OH) 또는 2 mM PTH와 함께 제형된 PcpA의 안정성

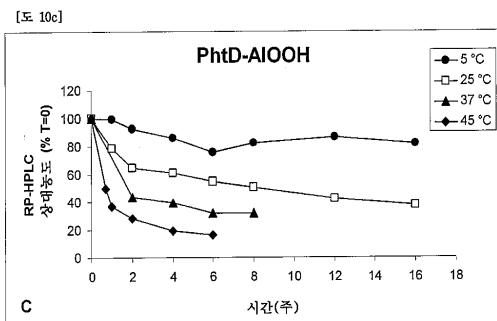
[도 10a]



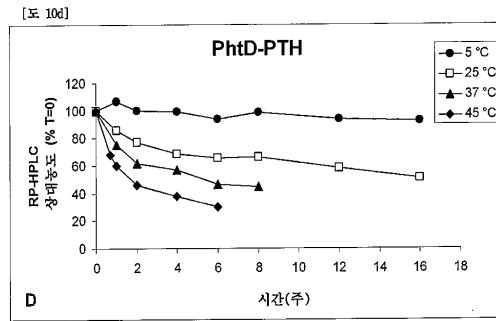
[도 10b]



[도 10c]

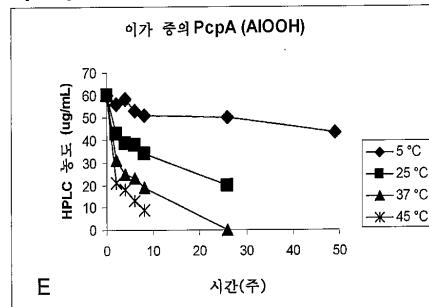


[도 10d]

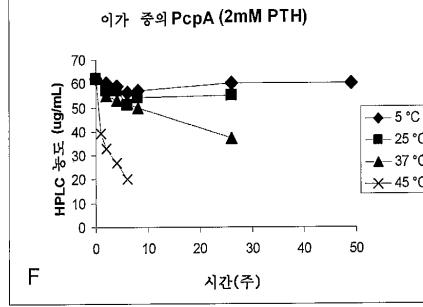


Al(OH) 또는 2 mM PTH와 함께 제형된 PcpA의 안정성

[도 10e]

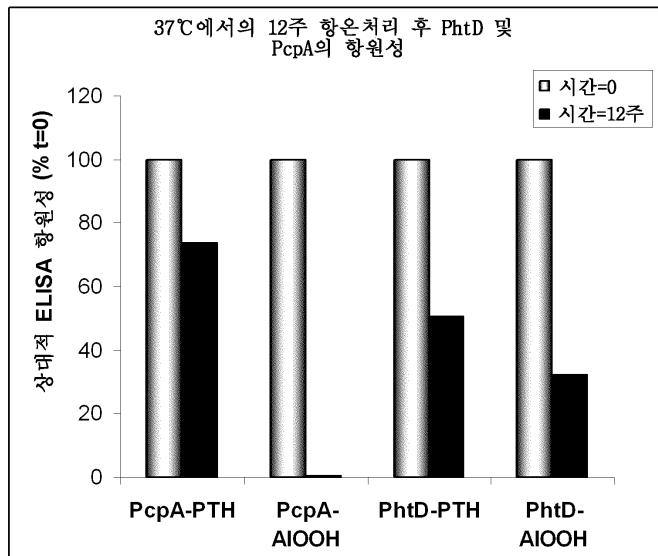


[도 10f]



도면11

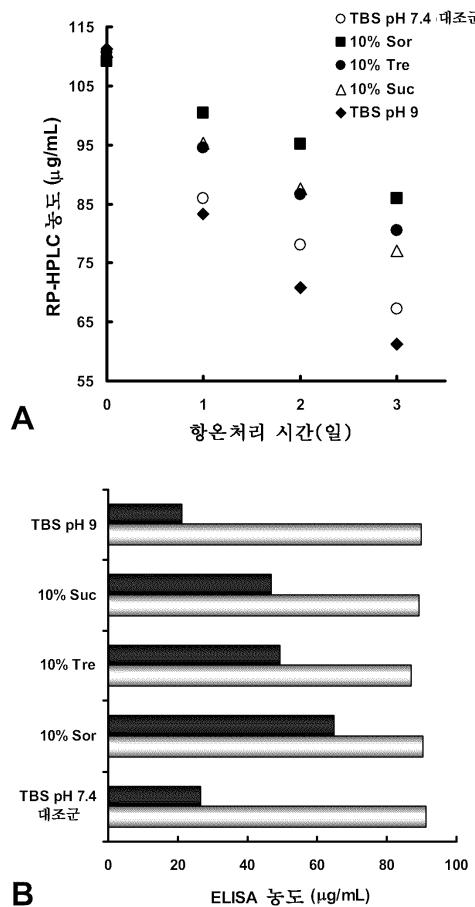
ELISA의 평가 결과로서 스트레스 조건하에서의 PhtD 및 PcpA의 안정성



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

도면12

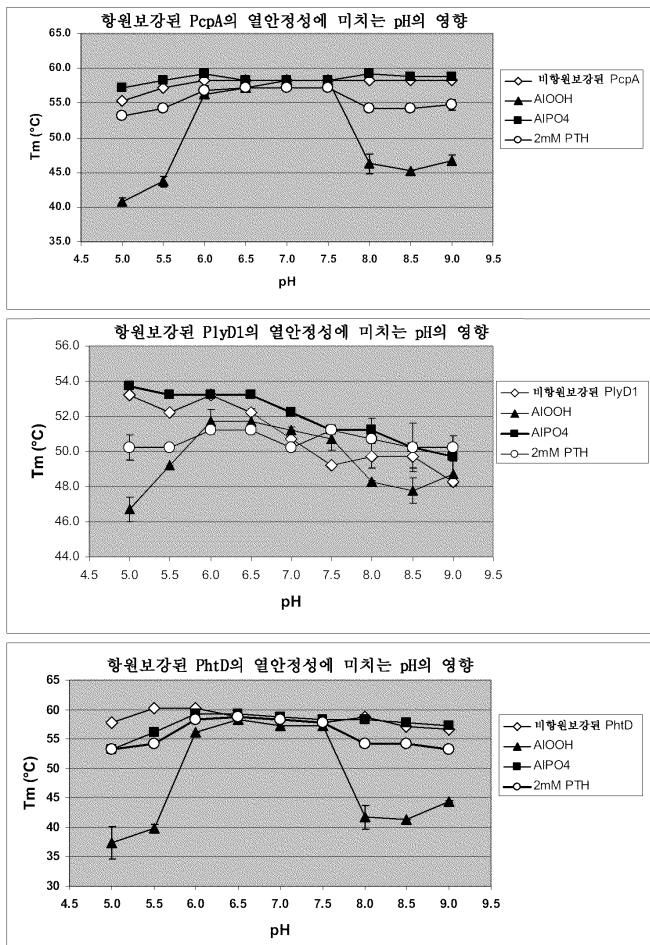
PcpA의 안정성 및 항원성에 미치는 선택된 GRAS 부형제 및 pH의 영향



100 μ g/mL의 PcpA의 항원보강된 제형을 선택된 부형제의 존재하에 50°C에서 3일간 항온처리하고 RP-HPLC로 화학적 무결성을 측정하였다(A). 50°C에서 항온처리 0일(회색 막대) 및 3일째(검정 막대)에 정량 ELISA 샌드위치로 각 제형의 항원성을 평가하였다.

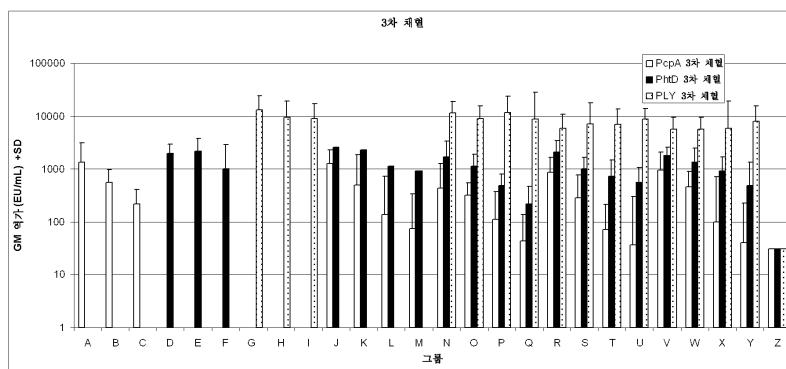
도면13

PcpA, PlyD1 및 PhtD의 열안정성에 미치는 pH의 영향

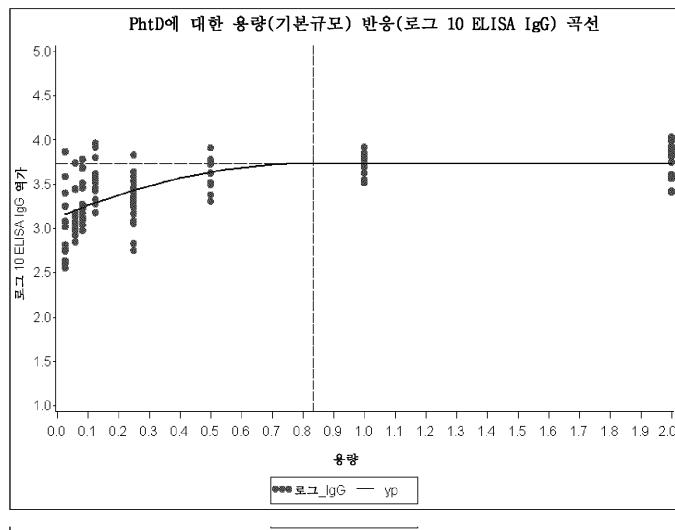


도면14

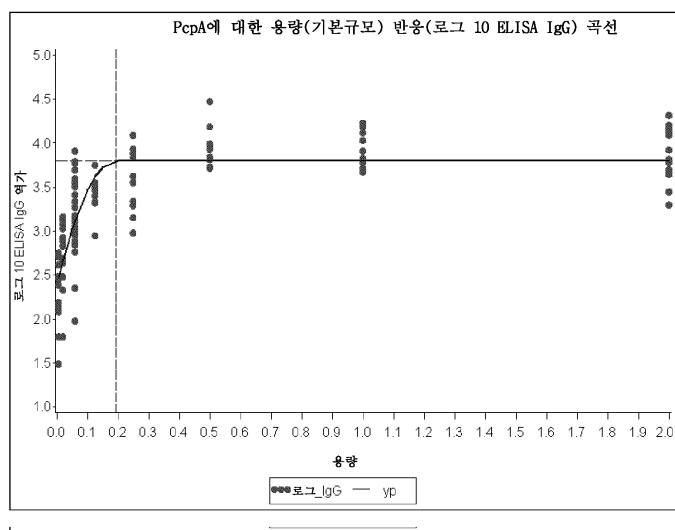
항원-특이적 IgG 억가



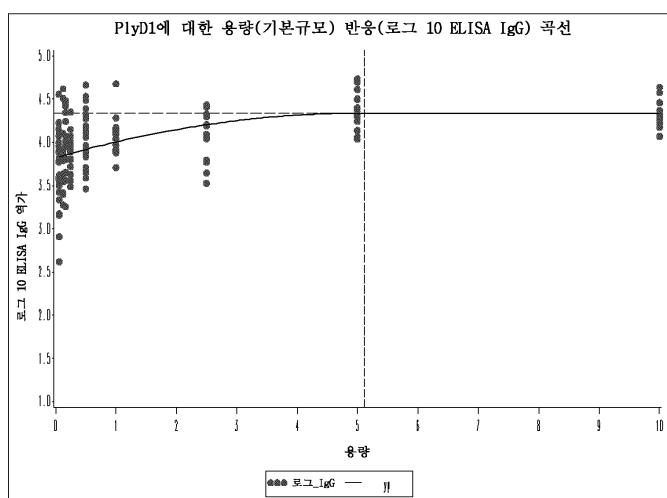
도면15a



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> Kopatent In 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
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
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
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 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 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 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 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 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
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

atgaaaatca ataaaaaata tctagcaggt tcagtggcag tccttgcctt aagtgtttgt	60
tcctatgaac ttggtcgtca ccaagctggc caggtaaga aagagtcata tcgagtttct	120
tatatacatgt gtgtcaggc tggtaaaaag gcagaaaatt tgacaccaga tgaagtca	180
aagagagagg ggtcaacgc cgaacaaatt gttatcaaga ttacggatca aggttatgtg	240
acctctcatg gagaccatta tcattactat aatggcaagg ttccttatga tgccatcatc	300
agttaagaac ttctcatgaa agatccgaat tatcagtta aggattcaga cattgtcaat	360
gaaatcaagg gtggctatgt gattaaggta gacggaaaat actatgtta ccttaagat	420

gcggccatg cgacaaat tcggacaaa gaagagatta aacgtcagaa gcaggaacac	480
agtataatc ataactcaag agcagataat gctgtgcgt cagccagac ccaaggacgt	540
tatacaacgg atgatggta tatcttcaat gcatctgata tcattgagga cacgggtgat	600
gcttatatcg ttccacgg cgaccattac cattacattc ctaagaatga gttatcagct	660
agcgagttt ctgctcaga agcctattgg aatggaaagc agggatctcg tccttctca	720
agttcttagtt ataatgaaa tccagttca ccaagattgt cagagaacca caatctgact	780
gtcactcaa ctatcatca aatcaaggg gaaaacattt caagccttt acgtgaattt	840
tatgctaaac cttatcaga acgcatgt aatctgatg gccttatttt cgaccagcg	900
caaatacaca gtcgaaccgc cagaggtgt a gctgtccctc atgtaacca ttaccattt	960
atcccttatg aacaatgtc tgaattggaa aacgaattt ctgttattt tcccttcgt	1020
tatcgtaaa accattgggt accagattca agaccagaac aaccaagtcc acaatcgact	1080
ccgaaacctt gtccaaagtct gcaacctgca ccaaattctc aaccagctcc aagcaatcca	1140
attgatgaga aattggtaa agaagctttt cgaaaagttag gcatggta tgtcttgag	1200
gagaatggag ttctcgta tatccagcc aaggatctt cagcagaaac agcagcaggc	1260
attgatagca aactggccaa gcaggaaagt ttatctcata agctaggagc taagaaaact	1320
gacctccat ctatgtatcg agaattttac aataaggctt atgacttact agcaagaatt	1380
cccaagatt tacttgataa taaaggtcga caagttgatt ttgaggtttt ggataacctg	1440
ttgaaacgac tcaaggatgt ctcaagtgtt aaagtcaagt tagtggatga tatttttgc	1500
ttcttagctc cgattcgta tccagaacgt ttagggaaac caatgcgc aattacctac	1560
actgatgtt agattcaagt agccaagttt gcaggcaagt acacaacaga agacggtt	1620
atcttgatc ctcgtat aaccagtgtt gaggggatg cctatgtaac tccacatgt	1680
accatagcc actggattaa aaaagatgt ttgtctgaag ctgagagagc ggcagccag	1740
gcttatgcta aagagaaagg ttgaccctt cttcgacag accatcagga ttcagggaaat	1800
actgaggcaa aaggcaga agctatctac aaccgcgtga aagcagctaa gaagggtccaa	1860
cttgcgttataa tttcaatactgttgcgtt aaaaacgg tagttatc	1920
ataccctattt atgaccattt ccataacatc aaatttgatgtt gtttgcgtt accgcctt	1980
gaggcaccta agggatgtt ttttgcgtt ctgtcaagttt ctatgtcgaat	2040
catccaaacg aacgtccgca ttcaatgtt gttttggta acgttgttgcgtt	2100
aaaaataagg cagaccaaga tagtaaacctt gatgtttttt aggaacatgt tgaagttttt	2160
gagccaaactc accctgtatcg tttttttttt gagaatcactt ctggttttttt tccttcgtt	2220

gataatctt ataaaccaag cactgatacg gaagagacag aggaagaagc tgaagatacc	2280
acagatgagg ctgaaattcc tcaagtagag aattctgtta ttaacgctaa gatagcagat	2340
gcggaggcct tgctagaaaa agtaacagat cctagtatta gacaaaatgc tatggagaca	2400
ttgactggtc taaaaagtag tcttctc ggaacgaaag ataataacac tattcagca	2460
gaagtagata gtctctggc tttgtaaaa gaaagtcaac cggetcttat acag	2514

<210> 4

<211> 1923

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 4

atgaaaaaaaaa	ctacaatatt	atcattaact	acagctgcgg	ttattttagc	agcatatgtc	60
cctaatgaac	caatccttagc	agatactcct	agttcggaaag	taatcaaaga	gactaaagt	120
ggaagtattt	ttcaacaaaa	taatatcaa	tataagggtc	taactgtaga	aggtaacata	180
agaactgttc	aagtggtaa	tggagttact	cctgttagagt	ttgaagctgg	tcaagatgga	240
aaaccattca	cgattcctac	aaaaatcaca	gtaggtgata	aagtattac	cgttactgaa	300
gtagctagtc	aagcttttag	ttattatcca	gatgaaacag	gtagaattgt	ctactatcct	360

agctctatta ctatccatc aagcataaaa aaaatacataaaa aaaaaggctt ccatggaagt	420
aaagctaaaa ctattatTTT tgacaaaggc agtcagctgg agaaaattga agatagagct	480
tttgattttt ctgaattaga agagattgaa ttgcctgcat ctctagaata tattggaaca	540
agtgcatTTT ctTTtagtca aaaattgaaa aagctaacct tttcctcaag ttcaaaattta	600
gaatttaatat cacatgaggc ttttgctaatttcaatt tagagaaact aacattacca	660
aaatcggtta aaacattagg aagtaatctat ttttagactca ctactagttt aaaaacatgtt	720
gatgttgaag aagggaaatga atcgttgcctc tcaatgtatgtt gttttttttt ttcaaaagat	780

ttttctgtga aaaaagatac atttgcaatt cctgaaactg ttaagttcta tgtaacatca 1260

gaacatataa aagatgttct taaatcaa at ttatctacta gtaatgat at cattgttcaa	1320
aaagtatata atataaaaca agaaaactgat gtagctaaac ctaaaaagaa ttctaatcag	1380
ggagtagttg gtgggttaa agacaaagg ttaggttatt acttaaacga atcaggttca	1440
atggctactg gtgggttaa agacaaagg ttaggttatt acttaaacga atcaggttca	1500
atggctactg gtgggttaa agacaaaggc ttatgttatt acttaaacga atcaggttca	1560
atggctactg gtgggttaa agacaaaggc ttatgttatt acttaaatga atcaggttca	1620

atggctactg gtgggttaa agacaaaggc ttatgttatt acttaaacga atcaggttca	1680
atggctactg gtgggttaa agacaaaggc ttatgttatt acttaaacga atcaggttca	1740
atggctactg gtgggttaa agacaaaggc ttatgttatt acttaaatga atcaggttca	1800
atggctactg gtgggttac agttctgtt aatggact atacctataa ttcaaggat	1860
ttattatgaa acacgactac acccgatggc tatcgactca atgtaacgg tgagtggta	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

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 gtctaatcga	60
gtttcttata tagatggta tcaggctggt caaaaggcag aaaattgac accagatgaa	120
gtcagtaaga gagagggat caacgccaa caaattgtt acaagattac ggatcaaggt	180
tatgtgacct ctcatggaga ccattatcat tactataatg gcaaggttcc ttatgtgcc	240
atcatcagt aagaacttct catgaaagat ccgaattatc agttgaagga ttcagacatt	300
gtcaatgaaa tcaagggtgg ctatgtgatt aaggtagacg gaaaatacta tgttacctt	360
aaagatgcgg cccatgcgga caatattcgg acaaaagaag agattaaacg tcagaagcag	420
gaacacagtc ataatcataa ctcagaagca gataatgctg ttgctgcagc cagagccaa	480
ggacgttata caacggatga tgggtatatc ttcaatgcat ctgatatcat tgaggacacg	540
ggtgtatgctt atatcggtcc tcacggcgac cattaccatt acattctaa gaatgagttt	600
tcaagctcg agttagctgc tgcagaagcc tattggaatg ggaagcaggg atctcgctt	660
tcttcaagtt ctatgttataa tgcaaatcca gttcaaccaa gattgtcaga gaaccacaat	720
ctgactgtca ctccaactta tcatcaaaat caagggaaa acatttcaag cctttacgt	780
gaattgtatg ctaaacccctt atcagaacgc catgtagaat ctgatggcct tatttcgac	840
ccagcgc当地 tcacaagtcg aaccgc当地 ggtgtagctg tccctcatgg taaccattac	900
cactttatcc ctatgttataa aatgtctgaa ttggaaaaac gaattgtcgt tattttccc	960
cttcgttatac gttcaaccaa ttgggtacca gattcaagac cagaacaacc aagtccacaa	1020
tcgactccgg aaccttagtcc aagtctgcaa cctgc当地 accctcaacc agtccaacg	1080
aatccaaattt atgagaattt ggtcaagaa gctgttgc当地 aagttaggc当地 tggttatgtc	1140
tttggaggaga atggagtttcc tcttataatc ccagccagg acccttcagc agaaacagca	1200
gcaggcattt atgcaactt ggccaggcag gaaagttt ctcataagct aggagctaa	1260
aaaactgacc tcccatctag tgatcgagaa ttttacaata aggcttatga cttactagca	1320
agaatttacc aagatttact tgataataaa ggtcgacaaat ttgattttga ggtttggat	1380
aacctgttgg aacgactcaa ggatgtctca agtgc当地 aatcgtttagt ggtatgtt	1440
cttgc当地 tct tagctcgat tcgtcatcca gaacgtttag gaaaacccaa tgc当地	1500
accttacgt atgatgagat tcaagtagcc aagtggcag gcaagtttcc aacagaagac	1560
ggttatatct ttgatcctcg tgatataacc agtgc当地 gggatgc当地 tgtaactcca	1620
catatgaccc atagccactg gattaaaaaa gatagtttctt gatgttgc当地 gagagcggca	1680
gcccaggc当地 atgctaaaga gaaaggttt acccccttcc cgacagacca tcaggattca	1740
ggttatatct ttgatcctcg tgatataacc agtgc当地 gggatgc当地 tgtaactcca	1800

gtgccactt atcgatgcc ttacaatctt caatatactg tagaagtcaa aaacggtagt	1860
ttaatcatac ctcattatga ccattaccat aacatcaa at ttgagtggtt tgacgaaggc	1920
ctttatgagg cacctaaggg gtatagtctt gaggatctt tggcactgt caagtactat	1980
gtcgaacatc caaacgaacg tccgcattca gataatggtt ttggtaacgc tagtgaccat	2040
gttcgtaaaa ataaggcaga ccaagatagt aaacctgatg aagataagga acatgatgaa	2100

gtaagtgagc caactcaccc tgaatctgat gaaaaagaga atcacgctgg tttaaatcct	2160
tcagcagata atcttataa accaaggact gatacggaa agacagagga agaagctgaa	2220
gataccacag atgaggctga aattcctcaa gttagagaatt ctgttattaa cgctaagata	2280
gcagatgcgg aggccttgct agaaaaagta acagatccta gtattagaca aaatgctatg	2340
gagacattga ctggtctaaa aagtagtctt cttctcgaa cgaaagataa taacactatt	2400
tcagcagaag tagatagtct ctggcttg 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 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
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	ctcctagttc	ggaagtaatc	aaagagacta	aagtttggaa	tattattcaa	60
caaataata	tcaaataata	ggttctaact	gtagaaggta	acataggaac	tgttcaagt	120
ggtaatggag	ttactcctgt	agagttgaa	gctggtcaag	atggaaaacc	attcagcatt	180
cctacaaaaaa	tcacagtagg	tgataaagta	tttaccgtta	ctgaagtagc	tagtcaagct	240
tttagttatt	atccagatga	aacaggtaga	atttgtctact	atcctagtc	tattactatc	300
ccatcaagca	taaaaaaaaaat	acaaaaaaaaaa	ggcttccatg	gaagtaaagc	taaaaactatt	360
attttgaca	aaggcagtca	gctggagaaaa	attgaagata	gagctttga	ttttctgaa	420
tttagaagaga	ttgaattgcc	tgcatctcta	gaatataattg	gaacaagtgc	atttctttt	480
agtcaaaaaat	tgaaaaagct	aacctttcc	tcaagttcaa	aattagaatt	aatatcacat	540
gaggcttttgc	ctaatttatac	aaatttagag	aaactaacat	taccaaaatc	ggttaaaacaa	600
tttaggaagta	atctatttag	actcactact	agctaaaac	atgttgcgt	tgaagaagga	660
aatgaatcgt	ttgcctcagt	tgatgggtt	ttgtttcaa	aagataaaac	tcaattaatt	720
tattatccaa	gtcaaaaaaa	tgacgaaagt	tataaaacgc	ctaaggagac	aaaagaactt	780
gcatcatatt	cgttaataa	aaattttac	ttgaaaaaac	tcaatttgc	tgaagggttta	840
gaaaaaaatcg	gtactttgc	atttcggt	gcgattaaac	ttgaagaaat	tagcttacca	900
aatagtttag	aaactattga	acgttttagcc	ttttacggta	atttagaaatt	aaaagaactt	960

atattaccag ataatgttaa aaattttgtt aaacacgtt tgaacggttt accaaaatta	1020
aaaagtttaa caattggtaa taatatcaac tcattggcg ccttcttcct aagtggcg	1080
tttagattcat taaaggaaat tcatattaag aataaaagta cagagtttc tgtgaaaaaa	1140

gatacatttga caattcctga aactgttaag ttctatgtta catcagaaca tataaaagat	1200
gttcttaat caaatttatac tactagtaat gatatcattt ttgaaaaagt agataatata	1260
aaacaagaaa ctgatgtac taaacctaaa aagaattcta atcagggagt agttgggtgg	1320
gttaaagaca aaggtaa	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
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
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
Thr Ala Asp His Pro Gly Leu Pro Ile Ser Tyr 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