

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4739521号

(P4739521)

(45) 発行日 平成23年8月3日(2011.8.3)

(24) 登録日 平成23年5月13日(2011.5.13)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K	39/09	(2006.01)	A 6 1 K 39/09
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04

請求項の数 10 (全 120 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-541960 (P2000-541960)
(86) (22) 出願日	平成11年4月7日(1999.4.7)
(65) 公表番号	特表2002-516662 (P2002-516662A)
(43) 公表日	平成14年6月11日(2002.6.11)
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/007669
(87) 国際公開番号	W01999/051188
(87) 国際公開日	平成11年10月14日(1999.10.14)
審査請求日	平成18年4月7日(2006.4.7)
(31) 優先権主張番号	60/080, 878
(32) 優先日	平成10年4月7日(1998.4.7)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	09/056, 019
(32) 優先日	平成10年4月7日(1998.4.7)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	593230316
	セント・ジュード・チルドレンズ・リサーチ・ホスピタル
	St. Jude Children's Research Hospital
	アメリカ合衆国・テネシー・38105-2794・メンフィス・ノース・ローダーデイル・ストリート・332
(73) 特許権者	500471799
	メディムミューン リミテッド ライアビリティ カンパニー
	アメリカ合衆国 メリーランド州 20878 ゲイザースバーグ ウェスト ワトキンズ ミル ロード 35

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸を含むポリペプチド、それに由来するワクチンおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、コリンに結合しないポリペプチドと、医薬的に許容できる担体又は希釈剤とを含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 2】

肺炎連鎖球菌に暴露されたか又は感染した対象者において免疫反応を誘発するための医薬の製造のための医薬組成物の使用であって、前記医薬組成物が、コリンに結合しないN-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、前記ポリペプチドが、配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする使用。

【請求項 3】

前記医薬が、防御免疫応答を誘導するものである請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

対象者における肺炎連鎖球菌による感染を防止するための医薬の製造のための医薬組成物の使用であって、前記医薬組成物が、コリンに結合しないN-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、前記ポリペプチドが、配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする使用。

【請求項 5】

前記医薬組成物が、気道又は鼻咽頭に送達されるためのものである請求項 4 に記載の使

用。

【請求項 6】

ポリペプチド及び医薬的に許容できるアジュバント又は担体を含むワクチンであって、前記ポリペプチドが、配列番号 1 又は 3 で規定されるアミノ酸配列からなり、コリンに結合しないことを特徴とするワクチン。

【請求項 7】

ポリペプチドをコードする単離された核酸配列分子と、医薬的に許容できるアジュバント又は担体とを含むワクチンであって、前記ポリペプチドが、配列番号 1 又は 3 で規定されるアミノ酸配列からなり、コリンに結合しないことを特徴とするワクチン。

【請求項 8】

肺炎連鎖球菌に暴露されたか又は感染した対象者を治療するための医薬の製造のための、請求項 6 又は 7 のいずれか 1 項に記載のワクチンの使用。

10

【請求項 9】

肺炎連鎖球菌に暴露されたか又は感染した対象者における免疫応答を誘導するための医薬の製造のための、医薬組成物の使用であって、前記医薬組成物が、配列番号 1 又は 3 で規定されるアミノ酸配列からなり、コリンに結合しないポリペプチドを有することを特徴とする使用。

【請求項 10】

対象者における肺炎連鎖球菌による感染防止のための医薬の製造のための医薬組成物の使用であって、前記医薬組成物が、配列番号 1 又は 3 で規定されるアミノ酸配列からなり、コリンに結合しないポリペプチドを含むことを特徴とする使用。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

一般に本発明は、N-末端コリン結合プロテインA切端形ポリペプチドに関する。本発明はまた、細菌感染（特に肺炎球菌）に対する防御を提供するかまたは防御抗体を誘発するワクチン、並びに診断および受動免疫療法で使用する前記ポリペプチドに対する抗体および拮抗物質に関する。前記ポリペプチドおよび/または前記ポリペプチドをコードする核酸は、肺炎球菌の細菌性付着因子の競合性抑制物質としてもまた有用である。本発明の最後の目的は、前記ポリペプチドを用いる治療法である。

【0002】

30

従来技術

肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は、侵襲性感染（例えば敗血症、髄膜炎、中耳炎および大葉性肺炎）の主要原因であるグラム陽性菌である (Tuomanen et al., NEJM 322:1280-1284(1995))。肺炎球菌は上下気道の細胞に強力に結合する。ほとんどの細菌のように、肺炎球菌のヒト細胞への付着は、真核細胞の炭水化物にレクチン様態様で結合する細菌表面蛋白質が表出されることによって達成される (D. Cundell & E. Tuomanen, Microb. Pathog. 17:361-374(1994))。肺炎球菌は、無症候性態様とみなされる経過の1つである非炎症上皮と結合する。侵襲性疾患への変化は、ヒト細胞を活性化させてヒトの細胞上で利用可能なレセプターの数および型を変化させる炎症因子の局所産生を伴う (D. Cundell et al., Nature 377:435-438(1995))。この新しい設定で機会を与えられ、肺炎球菌はこれらの未調節レセプターの1つ、血小板活性化因子 (PAF) レセプターを利用しこれと嵌合するようである (Cundell et al., Nature 377:435-438(1995))。PAFレセプターが出現してから数分以内に、一挙に肺炎球菌の吸着および侵入が強化される。例えば、可溶性レセプター類似体による活性化細胞への細菌結合の抑制は、動物モデルでは疾患の進行を阻害する (I. Idanpaan-Heikkila, J. Infect. Dis. 176:704-712(1997))。これについて特に有効なものは、シアリン酸付加または非付加ラクト-N-ネオテトラオース含有可溶性炭水化物で、これは肺炎球菌のヒト細胞への *in vitro* 結合を防ぎ、肺での *in vivo* コロニー形成を予防する。

40

【0003】

コリン結合蛋白質：付着因子候補構造遺伝子：

50

肺炎球菌は、細胞壁のテイコイル酸またはリポテイコイル酸との非共有結合によって細菌表面と結合できる表面蛋白質類を産生する。肺炎連鎖球菌の表面は、ホスホリルコリンと非共有結合によって結合するコリン結合蛋白質(CBP)類で修飾されている。cbpAは、キメラ構造を示す75kDの表面露出コリン結合蛋白質である。固有のN-末端ドメインプロリン富裕領域とそれに続くコリン結合に必要な10の反復領域で構成されるC-末端ドメインが存在する。

【0004】

cbpAは、真核細胞の表面に存在する糖共役物含有レセプターに対する付着因子(リガンド)である。cbpAに欠損がある変異体は、幼獣ラットモデルの鼻咽頭コロニー形成で毒性の低下を示した。この結合は、テイコイル酸を修飾するコリン決定基を標的とし、同種類の蛋白質のそれぞれに存在する象徴部コリン結合ドメインによって仲介される。このコリン結合ドメインは自己溶解に関する実験でLopezらによって発見され完全に性状が明らかにされた(Ronda et al., Eur. J. Biochem. 164:621-624(1987))。このドメインを含む他の蛋白質には、肺炎球菌ファージのオートリシンおよびその防御抗原、肺炎球菌表面蛋白質A(PspA)が含まれる(C. Ronda et al., Eur. J. Biochem. 164:621-624(1987); L.S. McDaniel et al., Microb. Pathog. 13:261-269(1992))。

【0005】

同種類の他のものとC-末端を共有するが、ヒト細胞との結合活性がその固有のN-末端ドメインから生ずるcbpAは鼻咽頭領域でコロニーを形成することができない。コロニー形成過程と発症は第一のステップとしてヒト細胞への肺炎球菌の結合に依存するので、交差反応抗体またはこのドメインを模倣したペプチドの競合抑制によるN-末端ドメインの機能の妨害は疾患の阻止に極めて重要であろう。抗肺炎球菌ワクチンのためのコリン結合蛋白質については国際出願PCT/US97/07198号で考察されている(このPCT出願は参照により本明細書に含まれる)。肺炎連鎖球菌に対する現在のワクチンは、この菌の非常に一般的な23の血清型の莢膜の精製炭水化物を利用するが、そのようなワクチンは50%しか防御能をもたず(Shapiro et al., NJEM 325:1453(1991))、2才以下では免疫原性をもたない。さらに、多剤耐性微生物の感染では、治療用ペプチドはオプシオンとして治療に用いられるであろう。したがって、本発明は、防御ワクチンを提供することにより長い間希求されてきたものに応える。

【0006】

発明が解決しようとする課題

本発明は、N-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。本ポリペプチドは、配列番号1、3-7または9-11に示されるアミノ酸配列(そのフラグメント、変異体、変種、類似体または誘導体を含む)を含む。さらに、本発明は、その三次元構造を表示する配列番号24に示すアミノ酸をもつN-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドおよびそのようなポリペプチドの製造方法を提供する。本単離ポリペプチドは、細菌感染、好ましくは肺炎球菌に対する動物およびヒトの免疫に適している。

本発明のまた別の目的は、レクチン活性をもちコリン結合活性をもたないN-末端コリン結合プロテインA切端形である。本発明はさらに免疫原性N-末端コリン結合プロテインA切端形またはそのフラグメントを提供する。

【0007】

本発明はまた単離核酸、例えばリコンビナントDNAもしくはクローン化遺伝子、またはその縮重変種、変異体、類似体、フラグメントに関する。これらは、本単離ポリペプチドをコードするか、または本ポリペプチドの活性を競合的に抑制する。その縮重物、変種、変異体、類似体またはフラグメントを含む本単離核酸は、好ましくは、配列番号12、14-17、19-22または23に示す配列を有する。本発明の別の実施態様では、リコンビナントDNA分子またはそのようなクローン化遺伝子の完全なDNA配列は発現制御配列に機能的に連結され、適切なホストに導入される。したがって本発明は、本発明をコードするDNA配列、より具体的には上記に示した配列から決定されたDNA配列または

10

20

30

40

50

そのフラグメントを含むクローン化遺伝子またはリコンビナントDNA分子で形質転換した単細胞ホストを包含する。

【0008】

本単離ポリペプチドに対する抗体には、自然な状態で生成された抗体および遺伝子組換えによって製造された抗体が含まれる。これらにはポリクローナル抗体および既知の遺伝子技術によって製造されるモノクローナル抗体の両方、並びに二特異性（キメラ）抗体が含まれ、さらに細菌の付着を調節する能力と一緒に診断的用途に適した他の機能も含む抗体、例えば競合剤（ただしこれに限定されない）も含まれる。

【0009】

本発明のさらに別の目的は、細菌またはそのサブユニットの量または活性を制御するために哺乳類を処置し、侵襲性、偶発性、または特発性病状を治療し、またはそれらの不本意な結果を回避する方法を提供する。本発明は治療で使用する医薬組成物を提供する。これら医薬組成物は、本単離ポリペプチド、それらのサブユニットまたはそれらの結合相手を主成分とする。

最後に、本発明は医薬組成物、ワクチンおよび診断薬並びにそれらを使用する治療方法を提供する。

【0010】

課題を解決する手段

本発明の目的は、N-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドである。本ポリペプチドは肺炎球菌の感染に対して動物を免疫する場合の使用に適している。これらのポリペプチドまたはそのフラグメントは、適切なアジュバントとともに製剤化される場合、肺炎球菌および交差反応性蛋白質をもつ他の細菌に対する防御用ワクチンとして用いることができる。

【0011】

本発明は、N-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。ある実施態様では、本ポリペプチドは、配列番号1、3-5、7または9-11のいずれかに示すアミノ酸配列（そのフラグメント、変異体、変種、類似体またはその誘導体を含む）を有する。別の実施態様では、本ポリペプチドはアミノ酸KXXE（配列番号6）を有する。

【0012】

本発明は、図2に示すN-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。ある実施態様では、本ポリペプチドは図2に示す保存領域であるアミノ酸配列を有する。例えば、保存領域にはアミノ酸配列158から210；158から172；300から321；331から339；355から365；367から374；379から389；409から427；および430から447が含まれるが、ただしこれらに限定されない。図2は、本発明に包含されるCbpaのN-末端領域の核酸およびアミノ酸配列の種々の血清型の相同性を示す。

【0013】

さらに、本発明は、その三次元構造を表示する配列番号24に示すアミノ酸配列をもつN-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。ある実施態様では、ポリペプチドはその類似体、フラグメント、変異体または変種である。包含される変種は図2に示されている。本発明はまた、図2に示す血清型4の約16位から約475位のアミノ酸、または図2に示す血清型4に対応するアミノ酸を有するN-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。ある実施態様では三次元構造は天然の蛋白質に存在するものと一致する。

【0014】

本ポリペプチドの製造方法は例えば以下のとおりである：ヒドロキシルアミンで完全長のコリン結合プロテインAを切断する。この場合、ヒドロキシルアミンは、血清型R6xおよび血清型4の475位のアミノ酸アスパラギン（N）でコリン結合プロテインAを切断するか、または図2に示す異なる血清型の場合は血清型R6xまたは血清型4に対応する

10

20

30

40

50

アミノ酸で切断し、それによってN - 末端コリン結合プロテインA切端形を生成する。コリン結合プロテインA切端形またはそのフラグメントを作製し、さらに天然の三次元構造（すなわち完全長のコリン結合プロテインAの構造）を保持するまた別の方法も意図されており、当業者には明らかである。本ポリペプチドはその三次元構造を保持するので、単離されたポリペプチドは、動物およびヒトを細菌感染（好ましくは肺炎球菌）に対して免疫する場合の免疫原としての使用に適している。

【 0 0 1 5 】

コリン結合プロテインA（C b p A）の血清型4のアミノ酸配列を含むポリペプチドは以下のとおりである：

ENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSEKDKARKEVEEYVKKIVGESY
AKSTKKRHTITVALVNLNLIKNEYLNKIVESTSESQQLQLMMESRSKVDEAV
SKFEKDSSSSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTEPGEKVAEAKKKVEEAEEKKAKD
QKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKVKANEPREQKIKQAE
AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAEKRRADAKEQKPKGRAKRGVPGEL
ATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPSLKPEKKVAEAEKKVEEAKKKAEDQKE
EDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKPRNEEKVKQAKAE
VESKKAETRLEKIKTDRKKAEEEEAKRKAEEEDKVKEKPAEQQPAPAPKAE
KPAPAPKPEN(配列番号24)。

10

【 0 0 1 6 】

"ポリペプチドR2"は、以下の配列を有するコリン結合プロテインA（C b p A）血清型4のN - 末端切端形（図1参照）の16位から444位のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す：

ENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSEKDKARKEVEEYVKKIVGESY
AKSTKKRHTITVALVNLNLIKNEYLNKIVESTSESQQLQLMMESRSKVDEAV
SKFEKDSSSSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTEPGEKVAEAKKKVEEAEEKKAKD
QKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKVKANEPREQKIKQAE
AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAEKRRADAKEQKPKGRAKRGVPGEL
ATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPSLKPEKKVAEAEKKVEEAKKKAEDQKE
EDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKPRNEEKVKQAKAE
VESKKAETRLEKIKTDRKKAEEEEAKRKAEEEDKVKEKPA(配列番号1)。

20

30

【 0 0 1 7 】

コリン結合プロテインA（C b p A）血清型4のN - 末端切端形のポリペプチドR2をコードするDNA配列は以下のとおりである：

GAGAACGAGGGAGCTACCCAAGTACCCACTTCTTCTAATAGGGCAAATGA
AAGTCAGGCAGAACAAGGAGAACAACCTAAAAAACTCGATTGAGAACGA
GATAAGGCAAGGAAAGAGGTGCGAGGAATATGTAAAAAAATAGTGGGTG
AGAGCTATGCAAAATCAACTAAAAAGCGACATACAATTAAGTGTAGCTCTA
GTAAACGAGTTGAACAACATTAAGAACGAGTATTTGAATAAAATAGTTGA
ATCAACCTCAGAAAGCCAACACTACAGATACTGATGATGGAGAGTCGATCAA
AAGTAGATGAAGCTGTGTCTAAGTTTAAAAGGACTCATCTTCTTCGTCAA
GTTGAGACTCTTCCACTAAACCGAAGCTTCAGATACAGCGAAGCCAAAC
AAGCCGACAGAACCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGTTG
AAGAAGCTGAGAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAA
CTACCCAACCATTACTTACAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTCCG
ATGTGGAAGTTAAAAAGCGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGTGAAAGCTAA
CGAACCTCGAGACGAGCAAAAAATTAAGCAAGCAGAAGCGGAAGTTGAG
AGTAAACAAGCTGAGGCTACAAGTTAAAAAAATCAAGACAGATCGTG
AAGAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAGAGCAGATGCTAAAGAGCAAG
GTAAACCAAAGGGCGGCAAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGCTAGCAAC
ACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGTAGGTG

40

50

AAGAACTCTTCCAAGCCCATCCCTGAAACCAGAAAAAAGGTAGCAGA
 AGCTGAGAAGAAGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAGCCGAGGATCAAAAA
 GAAGAAGATCGCCGTAACCTACCCAACCAATACTTACAAAACGCTTGA
 TCAAATTGCTGAGTCCGATGTGGAAGTTAAAAAGCGGAGCTTGA
 TAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAAACGAGGAAAAAGTTAAGCAAGC
 AAAAGCGGAAGTTGAGAGTAAAAAGCTGAGGCTACAAGTTAGAAAA
 ATCAAGACAGATCGTAAAAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAAAGCAG
 CAGAAGAAGATAAAGTTAAAGAAAAACCAGCTG(配列番号12)。

【 0 0 1 8 】

血清型4のCbPAのアミノ酸配列は以下のとおりである：

10

ENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKLDSERDKARKEVEEYVKKIVGESY
 AKSTKKRHTITVALVNLNNIKNEYLNKIVESTSESQLQILMMESRSKVDEAV
 SKFEKDSSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTPEGKVAEAKKKVEEAEKKAKD
 QKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKVKANEPREDEQIKQAE
 AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAEKRRADAKEQKPKGRAKRGVPGEL
 ATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPLKPEKKVAEAEKKVEEAKKKAEDQKE
 EDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKEPRNEEKVKQAKAE
 VESKKAATRLKIKTDRKAEKRAAEEEDKVKEKPAEQPPAPAPKAE
 KPAPAPKPENPAEQPKAEKPADQQAEEEDYARRSEEEYNRLTQQPPKTEKPA
 QPSTPKTGWKQENGMWYFYNTDGSMTGWLQNNGSWYYLNSNGAMATG
 WLQNNGSWYYLNANGSMATGWLQNNGSWYYLNANGSMATGWLQYNGS
 WYYLNANGSMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATGWVKDGDWYYLEAS
 GAMKASQWFKVSDKWYYVNGSGALAVNTTVDGYGVNANGWVN(配列番号2)。

20

【 0 0 1 9 】

血清型4のCbPAのアミノ酸配列をコードするDNA配列は以下のとおりである：

GAGAACGAGGGAGCTACCCAAGTACCCACTTCTTCTAATAGGGCAAATGA
 AAGTCAGGCAGAACCAAGGAGAACCACTAAAAACTCGATTCAGAACGA
 GATAAGGCAAGGAAAGAGGTGCGAGGAATATGTAAAAAATAGTGGGTG
 AGAGCTATGCAAAATCACTAAAAAGCGACATACAATTACTGTAGCTCTA
 GTTAACGAGTTGAACAACATTAAGAACGAGTATTTGAATAAAATAGTTGA
 ATCAACCTCAGAAAGCCAACCTACAGATACTGATGATGGAGAGTCGATCAA
 AAGTAGATGAAGCTGTGTCTAAGTTTGAAAAGGACTCATCTTCTTCGTCAA
 GTTCAGACTCTTCCACTAAACCGGAAGCTTCAGATACAGCGAAGCCAAAC
 AAGCCGACAGAACCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGTTG
 AAGAAGCTGAGAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAA
 CTACCCAACCATTACTTACAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTCCG
 ATGTGGAAGTTAAAAAGCGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGTGAAAGCTAA
 CGAACCTCGAGACGAGCAAAAAATTAAGCAAGCAGAAGCGAAGTTGAG
 AGTAAACAAGCTGAGGCTACAAGTTAAAAAATCAAGACAGATCGTG
 AAGAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAGAGCAGATGCTAAAGAGCAAG
 GTAAACCAAGGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCTGGAGAGCTAGCAAC
 ACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGTAGGTG
 AAGAACTCTTCCAAGCCCATCCCTGAAACCAGAAAAAAGGTAGCAGA
 AGCTGAGAAGAAGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAGCCGAGGATCAAAAA
 GAAGAAGATCGCCGTAACCTACCCAACCAATACTTACAAAACGCTTGA
 TCAAATTGCTGAGTCCGATGTGGAAGTTAAAAAGCGGAGgCTTGAAC
 TAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAAACGAGGAAAAAGTTAAGCAAG
 CAAAAGCGAAGTTGAGAGTAAAAAGCTGAGGCTACAAGTTAGAAAA
 AATCAAGACAGATCGTAAAAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAAAGCA
 GCAGAAGAAGATAAAGTTAAAGAAAAACCAGCTGAACAACCACAACCAG

30

40

50

CGCCGGCTCCAAAAGCAGAAAAACCAGCTCCAGCTCCAAAACCAGAGAA
 TCCAGCTGAACAACCAAAAAGCAGAAAAACCAGCTGATCAACAAGCTGAA
 GAAGACTATGCTCGTAGATCAGAAGAAGAATATAATCGCTTGACTCAACA
 GCAACCGCCAAAAACTGAAAAACCAGCACAACCATCTACTCCAAAAACA
 GGCTGGAACAAGAAAACGGTATGTGGTACTTCTACAATACTGATGGTTC
 AATGGCGACAGGATGGCTCCAAAACAA tGGCTCA tGGTA cTAC cTCAACAG
 CAATGGCGCTATGGCGACAGGATGGCTCCAAAACAATGGTTCATGGTACT
 ATCTAAACGCTAATGGTTCAATGGCAACAGGATGGCTCCAAAACAATGGT
 TCATGGTACTACCTAAACGCTAATGGTTCAATGGCGACAGGATGGCTCCA
 ATACAATGGCTCATGGTACTACCTAAACGCTAATGGTTCAATGGCGACAG
 GATGGCTCCAATACAATGGCTCATGGTACTACCTAAACGCTAATGGTGAT
 ATGGCGACAGGTTGGGTGAAAGATGGAGATACCTGGTACTATCTTGAAGC
 ATCAGGTGCTATGAAAGCAAGCCAATGGTTCAAAGTATCAGATAAATGGT
 ACTATGTCAATGGCTCAGGTGCCCTTGCAGTCAACACAACCTGTAGATGGC
 TATGGAGTCAATGCCAATGGTGAATGGGTAAACTAA (配列番号13)。

10

【 0 0 2 0 】

"ポリペプチド R 1" は、以下の配列を有する N - 末端切端形 / コリン結合プロテイン A (C b p A) 血清型 4 の 1 6 位から 3 2 1 位のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す :

ENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSEKDKARKEVEEYVKK I VGESY
 AKSTKKRHT I TVALVNELNN I KNEYLNK I VESTSEQLQ I LMESRSKVD EAV
 SKFEKDS SSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTPEGEKVAEAKKKVEEA EKKAKD
 QKEEDRRNYPT I TYKTLELE I AESDVEVKKAELELVKVKANEP RDEQK I KQAE
 AEVESKQAEATRLKK I KTDREEAE EEAARRADAKEQKPKGRAKRGVPGEL
 ATPDKKENDAKSSDSSVGEETL (配列番号3)。

20

【 0 0 2 1 】

ポリペプチド R 1 をコードする D N A 配列は以下のとおりである :

GAGAACGAGGGAGCTACCCAAGTACCCACTTCTTCTAATAGGGCAAATGA
 AAGTCAGGCAGAACAAGGAGAACAACCTAAAAAACTCGATTGAGAACGA
 GATAAGGCAAGGAAAGAGGTGCGAGGAATATGTA AAAAAAATAGTGGGTG
 AGAGCTATGCAAAATCAACTAAAAAGCGACATACAATTACTGTAGCTCTA
 GTTAACGAGTTGAACAACATTAAGAACGAGTATTTGAATAAAATAGTTGA
 ATCAACCTCAGAAAGCCAACCTACAGATACTGATGATGGAGAGTCGATCAA
 AAGTAGATGAAGCTGTGTCTAAGTTTGAAAAGGACTCATCTTCTTCGTCAA
 GTTCAGACTCTTCCACTAAACCGAAGCTTCAGATACAGCGAAGCCAAAC
 AAGCCGACAGAACCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTG
 AAGAAGCTGAGAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAA
 CTACCAACCACTTACTTACAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTCCG
 ATGTGGAAGTTAAAAAGCGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGTAAAAGCTAA
 CGAACCTCGAGACGAGCAAAAAATTAAGCAAGCAGAAGCGGAAGTTGAG
 AGTAAACAAGCTGAGGCTACAAGTTAAAAAAATCAAGACAGATCGTG
 AAGAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAGAGCAGATGCTAAAGAGCAAG
 GTAAACCAAGGGGCGGCAAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGCTAGCAAC
 ACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGTAGGTG
 AAGAACTCTTC (配列番号14)。

30

40

【 0 0 2 2 】

"ポリペプチド C / R 2" は、R 2 内に繰り返し領域 C を含むポリペプチドを指し、ここで繰り返し領域 C は、血清型 4 の N - 末端コリン結合プロテイン A (C b p A) の 3 2 7 位から 4 3 3 位のアミノ酸配列を有し、これは以下の配列をもつ :

KPEKKVAEAEKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELE I AESDVEVK
 KAELELVKEEAKPRNEEKVKQAKAEVESKKAETRLEK I KTD RKKAE EEA K

50

RKA(配列番号4)。

【0023】

ポリペプチドC/R2のDNA配列は以下のとおりである：

AAACCAGAAAAAAGGTAGCAGAAGCTGAGAAGAAGTTGAAGAAGCTA
AGAAAAAGCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGCCGTAACACCCAAC
CAATACTTACAAAACGCTTGAAGTTGAAATTGCTGAGTCCGATGTGGAAG
TTAAAAAGCGGAGCTTGAAGTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCG
AAACGAGGAAAAAGTTAAGCAAGCAAAAGCGGAAGTTGAGAGTAAAAAA
GCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAAATCAAGACAGATCGTAAAAAGCAG
AAGAAGAAGCTAAACGAAAAGCA(配列番号15)。

10

【0024】

"ポリペプチドA/R2"は、R2内に繰り返し領域Aを含むポリペプチドを指し、ここで繰り返し領域Aは、血清型4のN-末端コリン結合プロテインA(Cbpa)の153位から269位のアミノ酸配列を有し、これは以下の配列をもつ：

TEPGEKVAEAKKKVEEAEEKKAKDQKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVK
KAELELVKVKANEPDEQKIKQAEAEVESKQAEATRLKKIKTDREEAESEEAK
RRADA(配列番号5)。

図1に示すようにポリペプチドR2の領域AはR1内の領域Aと同じである。

【0025】

ポリペプチドA/R2をコードするDNA配列は以下のとおりである：

20

ACAGAACCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGTTGAAGAA
GCTGAGAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACACTACC
CAACCATTACTTACAAAACGCTTGAAGTTGAAATTGCTGAGTCCGATGTG
GAAGTTAAAAAGCGGAGCTTGAAGTAGTAAAAGTGAAGCTAACGAAC
CTCGAGACGAGCAAAAAATTAAGCAAGCAGAAGCGGAAGTTGAGAGTAA
ACAAGCTGAGGCTACAAGGTTAAAAAAAATCAAGACAGATCGTGAAGAA
GCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAGAGCAGATGCT(配列番号16)。

【0026】

1つまたは2つ以上のアミノ酸残基の同一性または位置を変更もしくは改変して、例えば欠失、置換および付加のような変形を含むことができる。欠失は当該蛋白質に固有の全残基より残基の数が少ないものを含み、置換では、特定の1つまたは2つ以上の残基が他の残基で置き換えられ、付加では1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が当該ポリペプチドの末端または中央部に付加される(図2参照)。これらの分子には以下が含まれる：選択した非哺乳類ホストによる発現に好ましいコドンの取り込み；制限エンドヌクレアーゼ酵素による切断用部位の提供；発現が容易なベクターの構築を促進する開始、末端または中間部DNA付加配列の提供。特に、血清型4のアミノ酸置換の例には以下が含まれる(ただしこれらに限定されない)：154位のEがKで置換；155位のPがLで置換；156位のGがEで置換；157位のEがKで置換；181位のKがEで置換；182位のDがAで置換；187位のRがY、HまたはLで置換；194位のIがNで置換；200位のEがDで置換；202位のEがDで置換；209位のEがKで置換；212位のKがEで置換；218位のVがLで置換；220位のVがKで置換；221位のKがEで置換；223位のNがDまたはKで置換；225位のPがS、TまたはRで置換；227位のDがNで置換；228位のEがKで置換；229位のQがE、GまたはDで置換；230位のKがTで置換；232位のKがNで置換；235位のEがKで置換；236位のAがEで置換；237位のEがKで置換；240位のSがNで置換；241位のKがEで置換；242位のQがKで置換；249位のKがEで置換；250位のKがNで置換；257位のEがQまたはKで置換；263位のAがLで置換；264位のKがEで置換；265位のRがNで置換；266位のRがIで置換；267位のAがKまたはVで置換；258位のDがTで置換；269位のAがDで置換；291位のAがT、V、P、GまたはXで置換；294位のGがG、AまたはEで置換；295位のVがDまたはAで置換；295位の

30

40

50

PがLまたはFで置換；299位のLがPまたはQで置換；328位のPがSで置換；329位のEがGで置換；340位のEがAで置換；343位のKがEまたはDで置換；347位のEがKで置換；349位のDがAで置換；354位のRがHで置換；366位のEがDで置換；375位のEがKで置換；378位のKがEで置換；390位のEがGで置換；391位のPがSで置換；393位のNがDで置換；397位のVがIで置換および408位のKがQで置換。

【0027】

"ポリペプチドR2血清型R6x"は、以下の配列を有するコリン結合プロテインA(Cb p A)血清型R6xのN-末端切端形の16位から444位のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す：

ENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALL
 NIKLSAIKTKYLRELVLEEKSKDELPSKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEKVA
 EAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLLELEIAEFDVKVKEAELELVK
 EEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEEAKRKADAKLK
 EANVATSDQGPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSSSLK
 SGKKVAEAEKKVEEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLLELEIAESDVKVK
 AELELVKEEAKPRDEEKIKQAKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEEAKR
 KAAEEDKVKPKPA(配列番号7)。

【0028】

ポリペプチドR2血清型R6xをコードするDNA配列は以下のとおりである：

GAAAACGAAGGAAGTACCCAAGCAGCCACTTCTTCTAATATGGCAAAGAC
 AGAACATAGGAAAGCTGCTAAACAAGTCGTCGATGAATATATAGAAAA
 ATGTTGAGGGAGATTCAACTAGATAGAAGAAAACATACCCAAAATGTCGC
 CTTAAACATAAAGTTGAGCGCAATTAACGAAGTATTTGCGTGAATTA
 ATGTTTTAGAAAGAGAAGTCGAAAGATGAGTTGCCGTCAGAAATAAAGCA
 AAGTTAGACGCAGCTTTTGAGAAGTTTAAAAAAGATACATTGAAACCAGG
 AGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGTTGAAGAAGCTAAGAAAAA
 GCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACCTACCCAACCAATACTTA
 CAAAACGCTTGAACCTTGAATTGCTGAGTTGATGTGAAAGTTAAAGAAG
 CGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGAGGAAGCTAAAGAACTCGAAACGAGGGC
 ACAATTAAGCAAGCAAAAAGAGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCTA
 CAAGGTTAGAAAACA t CAAGACAGA t CGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAGCT
 AAACGAAAAGCAGATGCTAAGTTGAAGGAAGCTAATGTAGCGACTTCAG
 A t CAAGGTTAAACAAAGGGCGGGCAAAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGCTA
 GCAACACCTGATAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGT
 AGGTGAAGAAACTCTTCCAAGCTCATCCCTGAAATCAGGAAAAAAGGTAG
 CAGAAGCTGAGAAGAAGTTGAAGAAGCTGAGAAAAAAGCCAAGGATCA
 AAAAGAAGAAGATCGCCGTAACCTACCCAACCAATACTTACAAAACGCTTG
 ACCTTGAATTGCTGAGTCCGATGTGAAAGTTAAAGAAGCGGAGCTTGAA
 CTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAGACGAGGAAAAAATTAAGC
 AAGCAAAAAGCGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTTAGA
 AAACATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAAA
 GCAGCAGAAGAAGATAAAGTTAAAGAAAAACCAGCTG(配列番号17)。

【0029】

血清型R6xのCb p Aのアミノ酸配列：

ENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALL
 NIKLSAIKTKYLRELVLEEKSKDELPSKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEKVA
 EAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLLELEIAEFDVKVKEAELELVK
 EEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEEAKRKADAKLK
 EANVATSDQGPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSSSLK

10

20

30

40

50

SGKKVAEAEKKEVEAEKKAQKEDRRNYPTNTYKTLBLE I AESDVKVKKE
 AELELVKEEAEKPRDEEK I KQAKAKVESKKAETRLEN I KTDRKKAEEEEAKR
 KAAEEDKVKEKPAEQPPAPATQPEKPAPKPEKPAEQPKAEKTDDQQAEEEDY
 ARRSEEEYNRLTQQQPPKTEKPAQPSTPKTGWKQENGMWYFYNTDGSMT
 GWLQNNGSWYYLNANGAMATGWLQNNGSWYYLNANGSMATGWLQNNG
 SWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYLNA
 NGDMATGWLQNNGSWYYLNANGDMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATG
 WVKDGDWYYLEASGAMKASQWFKVSDKWYVNGSGALAVNTTVDGYG
 VNANGEWVN(配列番号8)。

【 0 0 3 0 】

10

血清型 R 6 x の C b p A の アミノ酸配列をコードする D N A 配列 :

GAAAACGAAGGAAGTACCCAAGCAGCCACTTCTTCTAATATGGCAAAGAC
 AGAACATAGGAAAGCTGCTAAACAAGTCGTCGATGAATATATAGAAAA
 ATGTTGAGGGAGATTCAACTAGATAGAAGAAAACATACCCAAAATGTCGC
 CTAAACATAAAGTTGAGCGCAATTAACAAGGATTTTGCCTGAATTA
 ATGTTTTAGAAGAGAAGTCGAAAGATGAGTTGCCGTCAGAAATAAAGCA
 AAGTTAGACGCAGCTTTTGAGAAGTTTAAAAAAGATACATTGAAACCAGG
 AGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAA
 GCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACCTACCCAACCAATACTTA
 CAAAACGCTTGAAGTTGAAATTGCTGAGTTGATGTGAAAGTTAAGAAG
 CGGAGCTTGAAGTAAAGAGGAGGAGCTAAAGAA tCTCGAAACGAGGGC
 ACAATTAAGCAAGCAAAAAGAGAAAAGTTGAGAGTAAAAAGCTGAGGCTA
 CAAGTTAGAAAACA tCAAGACAGA tCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAGCT
 AAACGAAAAGCAGATGCTAAGTTGAAGGAAGCTAATGTAGCGACT tCAGA
 tCAAGGTAACCAAGGGGGCGGGCAAAAACGAGGAGTTCTCGGAGAGCTAG
 CAACACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGTA
 GGTGAAGAACTCTTCCAAGCTCATCCCTGAAATCAGGAAAAAAGGTAGC
 AGAAGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTGAGAAAAAAGCCAAGGATCAA
 AAAGAAGAAGATCGCCGTAACCTACCCAACCAATACTTACAAAACGCTTGA
 CCTTGAAATTGCTGAGTCCGATGTGAAAGTTAAGAAGCGGAGCTTGAAC
 TAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAGACGAGGAAAAAATTAAGCA
 AGCAAAAAGCGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTTAGAA
 AACATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAAAG
 CAGCAGAAGAAGATAAAGTTAAGAAAAAACCAGCTGAACAACCACAACC
 AGCGCCGGCTACTCAACCAGAAAAACCAGCTCCAAAACCAGAGAAGCCA
 GCTGAACAACCAAAAAGCAGAAAAAACAGATGATCAACAAGCTGAAGAAG
 ACTATGCTCGTAGATCAGAAGAAGATAAATCGCTTACTCAACAGCAA
 CCGCAAAAACCTGAAAAACCAGCACAACCATCTACTCAAAAACAGGCT
 GGAAACAAGAAAACGGTATGTGGTACTTCTACAATACTGATGGTTCAATG
 GCAACAGGATGGCTCCAAAACAACGGTTCATGGTACTATCTAAACGCTAA
 TGGTGCTATGGCGACAGGATGGCTCCAAAACAATGGTTCATGGTACTATC
 TAAACGCTAATGGTTCAATGGCAACAGGATGGCTCCAAAACAATGGTTCA
 TGGTACTACCTAAACGCTAATGGTGCTATGGCGACAGGATGGCTCCAATA
 CAATGGTTCATGGTACTACCTAAACAGCAATGGCGCTATGGCGACAGGAT
 GGCTCCAATACAATGGCTCATGGTACTACCTCAACGCTAATGGTGATATG
 GCGACAGGATGGCTCCAAAACAACGGTTCATGGTACTACCTCAACGCTAA
 TGGTGATATGGCGACAGGATGGCTCCAATACAACGGTTCATGGTATTACC
 TCAACGCTAATGGTGATATGGCGACAGGTTGGGTGAAAGATGGAGATACC
 TGGTACTATCTTGAAGCATCAGGTGCTATGAAAGCAAGCCAATGGTTCAA
 AGTATCAGATAAATGGTACTATGTCAATGGCTCAGGTGCCCTTGCAGTCA

20

30

40

50

ACACAACGTAGATGGCTATGGAGTCAATGCCAATGGTGAATGGGTAAAC
TAA(配列番号18)。

【 0 0 3 1 】

ポリペプチド R 1 血清型 R 6 x は、以下の配列を有するコリン結合プロテイン A (C b p A) 血清型 R 6 x の N - 末端切端形 / 切端形の 1 6 位から 3 2 1 位のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す :

ENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALL
NIKLSAIKTKYLRELVLEEKSKDELPSKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEKVA
EAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLLELEIAEFDVKVKEAELELVK
EEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEEAKRKADAKLK
EANVATSDQGPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETL(配列番号9)。

10

【 0 0 3 2 】

ポリペプチド R 1 をコードする D N A 配列は以下のとおりである :

GAAAACGAAGGAAGTACCCAAGCAGCCACTTCTTCTAATATGGCAAAGAC
AGAACATAGGAAAGCTGCTAAACAAGTCGTCGATGAATATATAGAAAA
ATGTTGAGGGAGATTCAACTAGATAGAAGAAAACATACCCAAAATGTCGC
CTTAAACATAAAGTTGAGCGCAATTAACGAAGTATTTGCGTGAATTAA
ATGTTTTAGAAAGAGAAGTCGAAAGATGAGTTGCCGTCAGAAATAAAGCA
AAGTTAGACGCAGCTTTTGAAGTTTAAAAAAGATACATTGAAACCAGG
AGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGTTGAAGAAGCTAAGAAAAA
GCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACCTACCCAACCAATACTTA
CAAAACGCTTGAACCTTGAATTGCTGAGTTGATGTGAAAGTTAAAGAAG
CGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGAGGAAGCTAAAGAATCTCGAAACGAGGG
CACAATTAAGCAAGCAAAAAGAGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCT
ACAAGTTAGAAAACA t CAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAG
CTAAACGAAAAGCAGATGCTAAGTTGAAGGAAGCTAATGTAGCGACTTCA
GATCAAGGTAAACCAAGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGC
TAGCAACACCTGATAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGC
GTAGGTGAAGAACTCTTC(配列番号19)。

20

【 0 0 3 3 】

"ポリペプチド C / R 2 血清型 R 6 x " は、以下の配列を有するコリン結合プロテイン A (C b p A) 血清型 R 6 x の N - 末端の 3 2 7 位から 4 3 3 位のアミノ酸配列を有する繰り返し領域 C を R 2 内に含むポリペプチド (図 2 参照) を指す :

KSGKKVAEAEKKVVEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLGLEIAESDVKVK
EAELELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEEAK
RKA(配列番号10)。

30

【 0 0 3 4 】

ポリペプチド C / R 2 血清型 R 6 x の D N A 配列 :

AAATCAGGAAAAAAGGTAGCAGAAGCTGAGAAGAAGTTGAAGAAGCTG
AGAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGCCGTAACCTACCCAAC
CAATACTTACAAAACGCTTGACCTTGAATTGCTGAGTCCGATGTGAAAG
TTAAAGAAGCGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCG
AGACGAGGAAAAAATTAAGCAAGCAAAAGCGAAAGTTGAGAGTAAAAA
GCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAACATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAG
AAGAAGAAGCTAAACGAAAAGCA(配列番号20)。

40

【 0 0 3 5 】

"ポリペプチド A / R 2 血清型 R 6 x " は、以下の配列を有するコリン結合プロテイン A (C b p A) 血清型 R 6 x の N - 末端の 1 5 5 位から 2 6 5 位のアミノ酸配列を有する繰り返し領域 A を R 2 内に含むポリペプチド (図 2 参照) を指す :

PGEKVAEAKKKVVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLLELEIAEFDVKVKE

50

AELELVKEEAKESRNEG I KQAKEKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEEAKR
KADA(配列番号11)。

【0036】

ポリペプチドA/R2血清型R6xをコードするDNA配列:

CCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGA
AAAAAGCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACCTACCCAACCAA
TACTTACAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTTCGATGTGAAAGTTA
AAGAAGCGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGAGGAAGCTAAAGAACTCGAAAC
GAGGGCACAAATTAAGCAAGCAAAAAGAGAAAGTTGAGAGTAAAAAGCTG
AGGCTACAAGGTTAGAAAACAACAAGACAGATCGTAAAAAGCAGAAGA
AGAAGCTAAACGAAAAGCAGATGCT(配列番号21)。

10

【0037】

本発明は単離ポリペプチドを目的とし、本単離ポリペプチドは、配列番号22または23に示すアミノ酸配列(そのフラグメント、変異体、変種、類似体または誘導体を含む)から成る。

SPSLKPEKKVAEAEKKVVEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLLEIAESDV
EVKKAEELELVKEEAKEPRNEEKVKQAKAEVESKKAETRLEIKTDRKKAEE
EAKRKAEEEDKVKEKPA(配列番号22、血清型4、部位323-434);または
PSSSLKSGKKVAEAEKKVVEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLGLEIAESD
VKVKEAELELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAEE
EEAKRKAEEEDKVKEKRA(配列番号23;血清型R6x;322-434位)。

20

【0038】

"ポリペプチドB/R2"は、図2に示すコリン結合プロテインA(CbpA)血清型4のN-末端切端形の270位から326位のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。"ポリペプチドB/R2血清型R6x"は、図2に示すコリン結合プロテインA(CbpA)血清型R6xのN-末端切端形の264位から326位のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。本発明は、図1に示すように領域A、B、C、A+B、B+C、A+Cのアミノ酸配列を有するポリペプチドを意図する。

さらに本発明は、N-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供し、ここで本ポリペプチドはアミノ酸KXXE(配列番号6)を有する。

30

【0039】

本発明は、図2に示したN-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含むポリペプチドを目的とする。ある実施態様では、本ポリペプチドは、図2に示す保存領域であるアミノ酸配列を有する。例えば、保存領域には158から172;300から321;331から339;355から365;367から374;379から389;409から427;および430から447のアミノ酸配列が含まれるが、ただしこれらに限定されない。図2は、本発明に包含されるCbpAの種々の血清型のN-末端領域の核酸およびアミノ酸配列の相同性を示す。

【0040】

本発明は、レクチン活性をもつがコリンには結合しない、N-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。ある実施態様では、本ポリペプチドは、配列番号1、3-5、7、または9-11のいずれかに示すアミノ酸配列(そのフラグメント、変異体、変種、類似体誘導体を含む)を有する。

40

【0041】

本明細書で用いられるように、"レクチン活性を有するポリペプチド"とは、炭水化物と非共有結合によって結合するポリペプチド、ペプチドまたは蛋白質を指す。本明細書で定義されるように、"付着(因子)"とは、細菌とヒト細胞との非共有結合、または十分に安定で洗浄に耐える分泌物を指す。本明細書で定義されるように、"LNnTと結合"とは、アルブミンコントロール以上にラクト-N-ネオテトラオース被覆基材に結合することを意味する。

50

【 0 0 4 2 】

本発明は、N - 末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離された免疫原性ポリペプチドを提供する。本発明が意図するところでは、本免疫原性ポリペプチドは、配列番号1、3 - 7、または9 - 11のいずれかに示すアミノ酸配列（そのフラグメント、変異体、変種、類似体または誘導体を含む）を有する。本発明は、図2に示すN - 末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。ある実施態様では、本ポリペプチドは、図2に示す保存領域であるアミノ酸配列を有する。本発明の目的は上記で説明したアミノ酸配列を含むポリペプチドの類似体である。類似体ポリペプチドには、場合によって前記のアミノ酸配列を含むポリペプチドのNまたはCOOH末端にN - 末端メチオニンまたはN - 末端ポリヒスチジンを結合させてもよい。

10

【 0 0 4 3 】

別の実施態様では、本発明は、前記のポリペプチドの蛋白分解消化生成物に由来するペプチドフラグメントを提供する。別の実施態様では、前記ポリペプチドの誘導体はそれに結合させた1つまたは2つ以上の化学分子部分を有する。別の実施態様では、この化学分子部分は水溶性ポリマーである。別の実施態様では、この化学分子部分はポリエチレングリコールである。別の実施態様では、この化学分子部分はモノ -、ジ -、トリ - またはテトラペジル化（tetrapegylated）されている。別の実施態様では、この化学分子部分はN - 末端でモノペジル化されている。

【 0 0 4 4 】

ポリエチレングリコール（PEG）の化合物への結合は、PEGは哺乳類で非常に毒性が低いので特に有用である（Carpenter et al., (1971)）。例えば、アデノシンデアミナーゼのPEGアダクトは、米国で重篤な複合性免疫不全症候群の治療のためにヒトで使用することが承認された。PEGの結合によって得られる第二の利点は、異種化合物の免疫原性および抗原性を効果的に低下させるということである。例えば、ヒトの蛋白質のPEGアダクトは、哺乳類の他の種で重篤な免疫反応を惹起するリスクをもたらさずに疾患の治療に有用であろう。本発明の化合物は、ミクロ被包化手段でドラッグデリバリーを実施して、この化合物またはこの化合物を産生する細胞に対するホストの免疫反応を低下または防止することができる。本発明の化合物はまた、膜（例えばリポソーム）内にミクロ被包化することによって輸送することができる。

20

【 0 0 4 5 】

蛋白質との直接反応に適した多くのPEG活性化形が報告された。蛋白質のアミノ基との反応のために有用なPEG試薬には、カルボン酸の活性エステルまたは炭酸塩誘導体、特に脱離基がN - ヒドロキシスクシンイミド、p - ニトロフェノール、イミダゾールまたは1 - ヒドロキシ - 2 - ニトロベンゼン - 4 - スルホネートであるものが含まれる。マレイミドまたはハロアセチル基を含むPEG誘導体が、蛋白質の遊離スルフヒドリルの改変に有用な試薬である。同様に、アミノヒドラジンまたはヒドラジド基を含むPEG試薬は、蛋白質中の炭水化物基の過ヨウ素酸酸化によって生成されるアルデヒドとの反応に有用である。

30

【 0 0 4 6 】

ある実施態様では、本明細書で開示するポリペプチドのアミノ酸残基は"L"異性体形であるのが好ましい。別の実施態様では、レクチン活性に関する所望の機能特性をポリペプチドが維持するがぎり、"D"異性体形の残基がL - アミノ酸残基のいずれかと置換される。NH₂は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指す。COOHは、ポリペプチドのカルボキシ末端の遊離カルボキシ基を指す。本明細書で用いられる略語は標準的ポリペプチド命名法に準ずる（J. Biol. Chem. 243:3552-59(1969)）。本明細書では全てのアミノ酸残基配列は、その左から右の方向がアミノ末端からカルボキシ末端の通常方向である式で示されことに留意されたい。さらにまた、アミノ酸残基配列の先頭または最後のダッシュ記号は、ペプチド結合または1つもしくは2つ以上のアミノ酸残基をもつ別の配列を示す。

40

【 0 0 4 7 】

50

合成ポリペプチド（固相、液相の周知の技術またはペプチド縮合技術、またはその任意の組合せを用いて製造される）は、天然または非天然アミノ酸を含むことができる。ペプチド合成に用いられるアミノ酸は、標準的なBoc（N-アミノ保護N-t-ブチルオキシカルボニル）アミノ酸樹脂（最初のメリーフィールドの固相法の標準的脱保護、中性化、共役および洗浄プロトコルを用いる（Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963)）、または易塩基性N-アミノ保護9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）アミノ酸（最初Carpino & Han(J. Org. Chem. 37:3403-3409(1972)）が報告）であろう。したがって、本発明のポリペプチドは、D-アミノ酸、D-およびL-アミノ酸の組合せ、および種々の"デザイナー"アミノ酸（例えば、 α -メチルアミノ酸、 β -メチルアミノ酸、およびN-メチルアミノ酸など）を含み、特定の特性を伝達することができる。合成アミノ酸は、リジンの代わりにオルニチンを、フェニルアラニンの代わりにフルオロフェニルアラニンを、およびロイシンまたはイソロイシンの代わりにノルロイシンを含む。さらに、特定のアミノ酸を特定の共役工程に割り当てて、 α -螺旋、 β -ターン、 γ -シート、 δ -ターンおよび環状ペプチドを生成することができる。

【0048】

本発明の特徴の1つでは、本ポリペプチドは、特別なアミノ酸をC-末端に含むことができる。この特別なアミノ酸は、遊離グリシンまたはグリシン-アミド基を刺激するために、 CO_2H または CONH_2 側鎖のどちらかを含む。この特別な残基に関心をもつまた別の場合は、リンカーまたはビーズとの結合部から成る側鎖をもつDまたはLアミノ酸類似体としてであろう。ある実施態様では、この擬似-遊離C末端残基はDまたはL型光学構造をもつであろう。別の実施態様では、DおよびL異性体のラセミ混合物を用いることができる。

【0049】

さらに別の実施態様では、ピログルタメートが本ペプチドのN-末端残基として含まれる。ピログルタメートはエドマン分解による連続反応には馴染みにくいが、N-末端ピログルタメートを含むあるビーズ上のペプチドの50%だけに置換を限定することによって、シーケンシングのためにビーズに十分な非ピログルタメートペプチドが残るであろう。N-末端にエドマン分解耐性残基を含むいずれのペプチドのシーケンシングにもこの技術を用いることができることは当業者には容易に理解されよう。所望の活性を示す個々のペプチドの性状を調べる他の方法は以下で詳細に述べる。封鎖N-末端基（例えばピログルタメート）を含むペプチドの比活性は、特定のN-末端基が50%のペプチドに存在する場合は、完全に（100%）封鎖されたペプチドの活性を非封鎖（0%）ペプチドと比較することによって容易に明らかにされるであろう。

【0050】

さらに、本発明は、より厳密に規定された構造特性を有するペプチドの製造、およびペプチド模倣物の使用、さらに新規な特性を有するペプチドを製造するためにペプチド様結合（例えばエステル結合）を使用することを意図する。別の実施態様では、還元ペプチド結合（すなわち $\text{R}_1-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{R}_2$ ）を包含するペプチドを生成できる。式中、 R_1 および R_2 はアミノ酸残基または配列である。還元ペプチド結合は、ジペプチドサブユニットとして導入してもよい。そのような分子はペプチド結合加水分解（例えばプロテアーゼ活性）に対して抵抗性をもつであろう。そのようなペプチドは、固有の機能および活性（例えば代謝性分解またはプロテアーゼ活性に対する抵抗性によるin vivoでの半減期の延長）をもつリガンドを提供するであろう。さらにまた、ある種の系では束縛（constrained）ペプチドは機能的活性の強化を示すことがよく知られている（Hruby, Life Sciences 31:189-199(1982); Hruby et al., Biochem. J. 268:249-262(1990)）。本発明は、他の全ての位置に任意の配列を取り込んでいる束縛ペプチドを製造する方法を提供する。

【0051】

束縛ペプチド、環状ペプチドまたは剛直（regidized）ペプチドは、架橋形成処理後にペプチドを束縛、環状化または剛直化させるために架橋を形成することができる化学官能基を提供するアミノ酸またはアミノ酸類似体がペプチド配列内の少なくとも2箇所に挿入され

10

20

30

40

50

ることを条件として合成によって製造できる。環状化は、ターン誘発アミノ酸が取り込まれたときに促進される。ペプチドを架橋することができるアミノ酸の例はジスルフィドを形成するシステイン、ラクtoonまたはラクターゼを形成するアスパラギン酸、および遷移金属をキレートして架橋を形成するキレーター（例えば -カルボキシル-グルタミン酸（G1a）（Bachem））である。保護 -カルボキシルグルタミン酸は、Zee-Cheng & Olson(Biophys. Res. Commun. 94:1128-1132(1980))が記載した合成を改変して製造できる。ペプチド配列が架橋を形成できる少なくとも2つのアミノ酸を含むペプチドは、例えばジスルフィド結合を形成するためにシステイン残基を酸化するか、またはキレートを形成するために金属イオンを付加して処理し、それによってペプチドを架橋して束縛、環状または剛直ペプチドを生成することができる。

10

【0052】

本発明は、系統的に架橋を形成する方法を提供する。例えば、4つのシステイン残基がペプチド配列に取り込まれる場合は、異なる保護基を用いることができる(Hiskey, in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol.3, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press: New York, pp.137-167(1981); Ponsanti et al., Tetrahedron 46:8255-8266(1990))。第一のシステイン対を脱保護しさらに酸化し、続いて第二のセットを脱保護し酸化することができる。このようにして、一定のジスルフィド架橋セットを形成できる。また別には、架橋が異なる化学的性状をもつことができるように、システイン対および照合アミノ酸類似体対を取り込ませることができる。

【0053】

特定の構成モチーフを導入するために以下の非古典的アミノ酸をペプチドに取り込ませることができる: 1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート(Kazmierski et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2275-2283(1991)); (2S, 3S)-メチル-フェニルアラニン、(2S, 3R)-メチル-フェニルアラニン、(2R, 3S)-メチル-フェニルアラニンおよび(2R, 3R)-メチル-フェニルアラニン(Kazmierski & Hruby, Tetrahedron Lett. (1991)); 2-アミノテトラヒドロナフタレン-2-カルボン酸(Landis, Ph.D.Thesis, University of Arizona(1989)); ヒドロキシ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート(Miyake et al., J. Takeda Res. Labs. 43:53-76(1989)); -カルボリン(DおよびL)(Kazmierski, Ph.D. Thesis, University of Arizona(1988)); HIC(ヒスチジンイソキノリンカルボン酸)(Zechel et al., Int. J. Pep. Protein Res. 43(1991)); およびHIC(ヒスチジンサイクリックウレア)(Dharanipragada)。

20

【0054】

以下のアミノ酸類似体およびペプチド模倣物をペプチドに導入して特異的な二次構造を誘発または促進することができる: LL-Acp(LL-3-アミノ-2-プロペニドン-6-カルボン酸)、ターン誘発ジペプチド類似体(Kemp et al., J. Org. Chem. 50:5834-5838(1985)); シート誘発類似体(Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:5081-5082(1988)); ターン誘発類似体(Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:5057-5060(1988)); 螺旋誘発類似体(Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:4935-4938(1988)); ターン誘発類似体(Kemp et al., J. Org. Chem. 54:109-115(1989)); および以下の参考文献によって提供される類似体(Nagai & Sato, Tetrahedron Lett. 26:647-650(1985); DiMaio et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. P.1687(1989)); Gly-Alaターン類似体(Kahn et al., Tetrahedron Lett. 30:2317(1989)); アミド結合同配体(Jones et al., Tetrahedron Lett. 29:3853-3856(1988)); テトラゾル(Zabrocki et al., J. Am. Chem. Soc. 110:5875-5880(1988)); DTC(Samanen et al., Int. J. Protein Pep. Res. 35:501-509(1990)); および以下の参考文献によって開示される類似体(Olson et al., J. Am. Chem. Soc. 112:323-333(1990); Garvey et al., J. Org. Chem. 56:436(1990))。

40

ターンおよび張り出しの構成限定模倣並びにそれらを含むペプチドが米国特許第5440013号(Kahn, 1995年8月8日)に記載されている。

【0055】

50

本発明はさらに、本発明のポリペプチドまたはペプチドの改変または誘導を提供する。ペプチドの改変は当業者には周知で、これには燐酸化、カルボキシメチル化およびアシル化が含まれる。改変は化学的または酵素的手段で実施できる。別の特徴では、糖化または脂肪アシル化ペプチド誘導体を製造できる。糖化または脂肪アシル化ペプチドの製造は当技術分野で周知である。脂肪アシルペプチド誘導体もまた製造できる。例えば、遊離アミノ基（N - 末端またはリシル）はアシル化（例えばミリストイル化）できる。別の実施態様では、構造が $(CH_2)_n CH_3$ の脂肪族側鎖を含むアミノ酸をペプチドに取り込ませることができ。本発明の使用に適したこのようなおよび他のペプチド - 脂肪酸共役物は、英国特許 GB - 8809162 . 4号、国際特許出願 PCT / AU 89 / 00166号および参考文献5（上掲書）に開示されている。

10

【0056】

突然変異は、ポリペプチドをコードする核酸で、特定のコドンを変化するアミノ酸のためのコドンに変化させて実施できる。一般にそのような変異は、もっとも少ないヌクレオチド変化を可能にさせることによって実施される。この種の置換変異は、生成される蛋白質のアミノ酸を非保存的態様で（すなわち、特定のサイズまたは性状を有するアミノ酸の群に属するアミノ酸から別の群に属するアミノ酸へとコドンを変化させることによる）変化させるか、または保存的態様で（すなわち、特定のサイズまたは性状を有するアミノ酸の群に属するアミノ酸から同じ群に属するアミノ酸へとコドンを変化させることによる）変化させて実施できる。一般にそのような保存的变化では、得られる蛋白質の構造および機能の変化は少ない。

20

【0057】

非保存的变化は、得られる蛋白質の構造、活性または機能をより一層変化させる。本発明は、得られる蛋白質の活性または結合特性を顕著には変化させない保存的变化を含む配列を含むと考えられる。配列内のあるアミノ酸の置換は、当該アミノ酸が属するクラスの他のアミノ酸から選択することができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸にはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが含まれる。芳香環構造を含むアミノ酸は、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンである。極性中性アミノ酸にはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが含まれる。陽性荷電（塩基性）アミノ酸にはアルギニン、リジンおよびヒスチジンが含まれる。陰性荷電（酸性）アミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。そのような変化は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または等電点によって決定されるように、見かけの分子量に影響を与えることはないであろう。

30

【0058】

特に好ましい置換は以下のとおりである：

- Arg の代わりに Lys およびその逆で、陽性荷電は維持できる；
- Asp の代わりに Glu およびその逆で、陰性荷電は維持できる；
- Thr の代わりに Ser で、遊離 - OH は維持できる；さらに
- Asn の代わりに Gln で遊離 NH_2 は維持される。

【0059】

合成 DNA 配列は、類似体または"ムテイン"を発現させる遺伝子の簡便な構築を可能にする。蛋白質に非天然アミノ酸を位置特異的に取り込ませる一般的な方法は Noren ら (Science 244:182-188(1989)) が記載した。この方法は非天然アミノ酸を含む類似体を作製するために用いることができる。

40

本発明にしたがえば、当技術分野内の通常の分子生物学、微生物学および遺伝子組換え DNA 技術を用いることができる。そのような技術は文献に完全に説明されている。例えば以下を参照されたい：Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology", Vol. I-III (R.M. Ausubel, ed.(1994)); "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Vol. I-III (J.E. Celis, ed.(1994)); "Current Protocols in Immunology", Vol. I-III (J.E. Coligan, ed.(1994)); "Oligonucleo-

50

eotide Synthesis", (M.J. Gait, ed.(1984)); "Nucleic Acid Hybridization"(B.D. Hames & S.J. Higgins, ed.(1985)); "Transcription and Translation" (B.D. Hames & S.J. Higgins, ed.(1984)); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed.(1986)); "Immobilized Cells and Enzymes" (IRL Press, (1986)); B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning"(1984)。

【0060】

別の実施態様では、ピログルタメートを本ペプチドのN-末端残基として含むことができる。ピログルタメートはエドマン分解による連続反応に馴染まないが、N-末端ピログルタメートをもつあるペプチドの50%だけに置換を制限することによって、ペプチド上に十分な非ピログルタメートペプチドがシーケンシングのために残るであろう。この技術はエドマン分解に耐性を有する残基をN-末端に取り込んでいるいずれのペプチドのシーケンシングにも用いることができることは、当業者には理解されよう。所望の活性を示す個々のペプチドの性状を調べる他の方法は以下で詳細に述べる。封鎖N-末端基(例えばピログルタメート)を含むペプチドの比活性は、当該個々のN-末端基がペプチドの50%に存在する場合は、完全(100%)封鎖ペプチドの活性を非封鎖(0%)ペプチドと比較することによって容易に明らかにされるであろう。

10

【0061】

誘導用化学分子部分：誘導に適した化学分子部分は水溶性ポリマーから選択できる。選択するポリマーは、このポリマーを結合させる成分が水性環境下(例えば生理学的環境)下で沈澱しないように水溶性でなければならない。好ましくは、最終生成物を治療に使用するために、ポリマーは医薬的に許容できるものでであろう。当業者は、ポリマー/成分結合物が治療に用いられるか否か、もしそうであるならば所望用量、循環時間、蛋白分解に対する抵抗性および他の事柄を考慮して所望のポリマーを選択できる。本成分については、これらは本明細書で開示するアッセイを用いて確認できる。

20

【0062】

水溶性ポリマーは、例えばポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、およびデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリビニルアルコールから成る群から選ばれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドが、水中での安定性のために製造に有利であろう。

30

【0063】

ポリマーの分子量はいずれでもよく、さらにポリマーは分枝していても分枝してなくともよい。ポリエチレングリコールの場合、取り扱いおよび製造の容易さのために好ましい分子量は約2kDaから約100kDaである("約"という用語はポリエチレングリコールの製造で、いくつかの分子は前述の分子量より重く、いくつかの分子はそれより軽いことを示す)。所望の治療プロフィール(例えば所望される放出持続時間、生物学的活性に対する影響が有る場合はその影響、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または欠如および治療用蛋白質または類似体に対するポリエチレングリコールのその他の既知作用)にしたがって、他のサイズも用いることができる。

40

【0064】

結合させるポリマー分子の数は多様で、機能に対する影響を当業者は確認することができる。同じまたは異なる化学分子部分(例えばポリマーで例えば異なる分子量のポリエチレングリコール)を用いて、モノ-、ジ-、トリ-またはいくつかの組合せの誘導体を製造できる。ポリマー分子の成分分子に対する割合は多様で、反応混合物中のそれらの割合にしたがうであろう。一般に、最適比(過剰な未反応成分およびポリマーが存在しない反応効率に関して)は、例えば所望される誘導の程度(例えばモノ、ジ、トリ、など)、選択

50

されるポリマーの分子量、ポリマーが分枝しているか否か、さらに反応条件のような要件によって決定される。

【0065】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学分子部分）は、蛋白質の機能ドメインまたは抗原性ドメインに対する影響を考慮して成分に結合させなければならない。当業者が利用できる多数の結合方法がある。例えばEP401384号（この文献は参照により本明細書に含まれる）はG-C-S-FへのPEGのカップリングを述べ、Malikら（Exp. Hematol. 20:1028-1035(1992)）はトレシルクロリドを用いるGM-C-S-Fのペジル化を報告する。例えば、ポリエチレングリコールは、反応基（例えば遊離アミノまたはカルボキシル基）を介してアミノ酸残基と共有結合される。反応基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合する基である。遊離アミノ基をもつアミノ酸残基には、リジン残基およびN-末端アミノ酸残基が含まれる。遊離カルボキシル基をもつアミノ酸残基は、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、およびC-末端アミノ酸残基が含まれる。スルフヒドリル基もまた、ポリエチレングリコール分子を結合させるための反応基として用いることができる。治療目的で好ましいものは、アミノ基での結合、例えばN-末端またはリジン基での結合である。

10

【0066】

本発明は、N-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。本発明は、図2に示すN-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。ある実施態様では、本核酸は、配列番号12、14-17、または19-21のいずれか（そのフラグメント、変異体、変種、類似体または誘導体を含む）に示されるものである。核酸は、DNA、cDNA、ゲノムDNA、RNAである。さらに、単離核酸はRNA転写プロモーターに機能的に連結させることができる。本核酸をレクチン活性を競合的に抑制するために用いることも意図される。

20

【0067】

"ベクター"とはレプリコン、例えばプラスミド、ファージまたはコスミドで、それに別のDNAセグメントを結合させて当該結合セグメントを複製させることができる。

"DNA"とは、デオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）のポリマー形で、一本鎖形でも二本鎖螺旋のどちらかを指す。この用語は当該分子の一次および二次構造を指し、いずれの特定の三次構造にも限定されない。したがって、この用語にはとりわけ直鎖DNA分子（例えば制限フラグメント）として見出される二本鎖DNA、ウイルス、プラスミドおよび染色体が含まれる。具体的な二本鎖DNA分子の構造を考察する場合、本明細書では配列は、非転写DNA鎖（すなわちmRNAと相同な配列を有する鎖）の5'から3'方向での配列のみを示す通常の方法で記載される。

30

【0068】

DNA配列の転写および翻訳を発現コントロール配列が制御するとき、当該DNA配列は、当該発現コントロール配列に"機能的に連結"されている。"機能的に連結"という用語は、発現されるべきDNA配列の前に適切な開始シグナル（例えばATG）を有し、さらに当該発現制御配列の制御下で当該DNA配列を発現させ、当該DNA配列によってコードされる所望の生成物を産生させるために正確な読み枠を維持することを含む。リコンビナントDNA分子に挿入することを所望する遺伝子が適切な開始シグナルを含まない場合、そのような開始シグナルを当該遺伝子の前に挿入できる。

40

【0069】

さらにまた本発明は、上記の核酸分子を含むベクターを提供する。プロモーターは細菌、酵母、昆虫または哺乳類のプロモーターであるか、またはそれらと同一のものであろう。さらに、ベクターはプラスミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、細菌ファージ、または真核細胞ウイルスDNAであらう。

蛋白質の発現に有用なものとして当技術分野で知られている他の多くのベクター骨格を用いることができる。そのようなベクターには、アデノウイルス（AV）、アデノ付随ウイ

50

ルス(AAV)、シミアンウイルス40(SV40)、サイトメガロウイルス(CMV)、マウス乳癌ウイルス(MMTV)、モロニーネズミ白血病ウイルス、DNAデリバリー系(すなわちリポソーム)、および発現プラスミドデリバリー系が含まれるが、ただしこれらに限定されない。さらに、あるクラスのベクターは、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルスまたはセムリキ森林ウイルスのようなウイルスに由来するDNAエレメントを含む。そのようなベクターは市販品を入手するか、当技術分野で周知の方法によって記載の配列を組み立ててもよい。

【0070】

本発明はまた、適切な宿主細胞のベクターを含むポリペプチド産生用宿主ベクター系を提供する。適切な宿主細胞には、原核細胞または真核細胞、例えば細菌細胞(グラム陽性菌を含む)、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞および動物細胞が含まれるが、ただしこれらに限定されない。宿主として、例えばマウス線維芽細胞NIH3T3、CHO細胞、HeLa細胞、Ltk⁻細胞、Cos細胞(ただしこれらに限定されない)を含む多数の哺乳類細胞を用いることができる。

10

【0071】

多様な宿主/発現ベクター組合せを本発明のDNA配列の発現に用いることができる。有用な発現ベクターは、例えば染色体セグメント、非染色体DNA配列および合成DNA配列から成るであろう。適切なベクターには、SV40の誘導體および既知の細菌プラスミド、例えば大腸菌(E. coli)プラスミドのcolE1、pCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導體、プラスミド、例えばPR4;ファージDNA、例えば多数のファージ誘導體、例えばNM989および他のファージDNA、例えばM13および糸状一本鎖ファージDNA;酵母プラスミド、例えば2 μ プラスミドまたはその誘導體;真核細胞に有用なベクター、例えば昆虫または哺乳類細胞で有用なベクター;プラスミドおよびファージDNAの組合せに由来するベクター、例えばファージDNAまたは他の発現制御配列を利用するために改変されたプラスミドなどが含まれる。

20

【0072】

多様な発現制御配列(当該配列に機能的に連結されたDNA配列の発現を制御する配列)のいずれもこれらのベクターで使用して、本発明のDNA配列を発現させることができる。そのような有用な発現制御配列には、例えばSV40、CMV、ワクシニア、ポリオーマまたはアデノウイルスの初期または後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、LTR系、ファージの主要オペレーターおよびプロモーター領域、fdコート蛋白質の制御領域、3-ホスホグリシレートキナーゼまたは他の糖分解酵素のためのプロモーター、酸ホスファターゼのプロモーター(例えばPho5)、酵母-交配因子のプロモーター、原核もしくは真核細胞またはウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列、およびそれらの種々の組合せが含まれる。

30

【0073】

多様な単細胞宿主もまた本発明のDNA配列の発現に有用である。これらの宿主には周知の真核および原核細胞、例えば大腸菌株、シュードモナス、パチルス、ストレプトミセス、真菌(例えば酵母)、および動物細胞(例えばCHO、R1.1、B-WおよびL-M細胞、アフリカミドリザル腎細胞(例えばCOS1、COS7、BSC1、BSC40およびBMT10)、昆虫細胞(例えばSf9)、ヒト細胞および組織培養の植物細胞が含まれる。

40

【0074】

全てのベクター、発現制御配列およびホストの全てが本発明のDNA配列を発現するために等しく良好に機能するわけではないことは理解されよう。さらに同じ発現系に関して全ての宿主が等しく良好に機能するわけではない。しかしながら、当業者は、煩雑な実験を行うことなく適切なベクター、発現コントロール配列およびホストを選択し、本発明の範囲から外れることなく所望の発現を達成できる。例えば、ベクターを選択する場合には宿主を考慮しなければならないが、それはベクターがその中で機能するからである。ベクターのコピー数、当該コピー数を制御する能力、当該ベクターによってコードされる他

50

のいずれかの蛋白質の発現（例えば抗生物質マーカー）もまた考慮する。

【 0 0 7 5 】

発現制御配列を選択する場合、多様な要素が通常考慮される。これらには、例えば系の相対的な強さ、その制御性、および発現されるべき個々のDNA配列または遺伝子との適合性（特に潜在的二次構造に関して）が含まれる。適切な単細胞ホストは、例えば選択したベクターとそれらホストとの適合性、それらの分泌特性、それらの正確な蛋白質折り畳み能、およびそれらの醗酵要件の他に発現されるべきDNA配列によってコードされる生成物のホストに対する毒性、および発現生成物の精製の容易さを考慮して選択される。

【 0 0 7 6 】

本発明はさらにポリペプチドを製造する方法を提供する。本方法は、上記のホストベクター系を当該ポリペプチドの産生を許容する適切な条件下で増殖させ、さらにそのようにして製造されたポリペプチドを回収することを含む。

本発明はさらに、当該単離されたポリペプチドを特異的に認識または結合することができる抗体を提供する。当該抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。さらに当該抗体は、放射能を有するマーカー、比色測定マーカー、蛍光マーカー、または化学発光マーカーのいずれかである検出可能なマーカーで標識できる。標識抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。ある実施態様では、標識抗体は精製標識抗体である。抗体を標識する方法は当技術分野では周知である。

【 0 0 7 7 】

"抗体"という用語には、例えば天然に存在する抗体および天然には存在しない抗体の両方が含まれる。特に、"抗体"という用語にはポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体並びのそのフラグメントが含まれる。さらにまた、"抗体"という用語にはキメラ抗体および完全合成抗体並びにそのフラグメントが含まれる。そのような抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、単一鎖、F a bフラグメントおよびF a b発現ライブラリーが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【 0 0 7 8 】

当技術分野で知られている種々の方法をポリペプチドまたはその誘導体もしくは類似体に対するポリクローナル抗体の製造に用いることができる（例えば以下を参照されたい：Antibodies--A Laboratory Manual, Harlow & Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 1988）。抗体を産生するためには、種々のホスト動物を切端系C b p Aまたはその誘導体（例えばフラグメントまたは融合蛋白質）を注射して免疫することができる。これらのホスト動物にはウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどが含まれる。ある実施態様では、ポリペプチドは免疫原性担体、例えばウシ血清アルブミン（B S A）またはキーホールリンペットヘモシアニン（K L H）と共役させることができる。種々のアジュバントを用いてホストの種に応じて免疫学的反応を高めることができる。

【 0 0 7 9 】

モノクローナル抗体またはそのフラグメント、類似体もしくは誘導体の製造のためには、持続的細胞株の培養によって抗体分子を産生するいずれの技術も用いることができる（例えば以下を参照されたい：Antibodies--A Laboratory Manual, Harlow & Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 1988）。これらの技術には、最初にKohler & Milstein(Nature 256:495-497(1975))が報告したハイブリドーマ技術の他に、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today 4:72(1983))およびヒトモノクローナル抗体を産生するE B V - ハイブリドーマ技術(Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【 0 0 8 0 】

本発明のさらに別の実施態様では、モノクローナル抗体は最近の技術（P C T / U S 9 0 / 0 2 5 4 5）を用いて無菌動物で製造できる。本発明にしたがえば、ヒト抗体を用いることができ、ヒト抗体はヒトハイブリドーマを用いるか(Cote et al., Proc. Natl. Aca

10

20

30

40

50

d. Sci. USA, 80:2026-2030(1983))、またはヒトB細胞をEBVウイルスでin vitroで形質転換させて得ることができる(Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp.77-96(1985))。実際、本発明にしたがえば、適切な生物活性をもつヒト抗体分子に由来する遺伝子と一緒に、ポリペプチドに対して特異的なマウス抗体分子の遺伝子をスプライシングする"キメラ抗体"の製造のために開発された技術(Morrison et al., J. Bacteriol. 159-870(1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608(1984); Takeda et al., Nature 314:452-454(1985))を用いることができ、そのような抗体は本発明の範囲に包含される。そのようなヒト抗体またはヒト化キメラ抗体は、免疫反応、特にアレルギー反応の誘発が外因性抗体よりもはるかに少ないので、ヒトの疾患(下記で述べる)の治療に使用する場合に好ましい。本発明のまた別の実施態様では、Fab発現ライブラリー(Huse et al., Science 246:1275-1281(1989))の構築のための技術を利用する。この技術は、ポリペプチドまたはその誘導体もしくは類似体に対して所望の特異性をもつモノクローナルFabフラグメントの迅速で容易な特定を可能にする。

【0081】

抗体分子のイディオタイプを含む抗体フラグメントは既知の技術によって生成できる。例えば、そのようなフラグメントには、F(ab')₂フラグメント(抗体分子のペプシン消化によって製造できる); Fab'フラグメント(F(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元して生成できる); およびFabフラグメント(抗体分子をパインおよび還元剤で処理して製造できる)が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【0082】

抗体の製造では、所望の抗体のためのスクリーニングは例えば以下のような当分野で既知の技術によって達成できる:放射能免疫アッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、“サンドイッチ”免疫アッセイ、免疫放射能測定アッセイ、ゲル拡散沈殿反応、免疫拡散アッセイ、in situ免疫アッセイ(例えばコロイド状金、酵素または放射性同位元素標識を用いる)、ウェスタンブロット、沈殿反応、凝集アッセイ(例えばゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなど。ある実施態様では、一次抗体は、二次抗体または試薬の一次抗体への結合を検出することによって検出される。また別の実施態様では、二次抗体は標識される。免疫アッセイで結合を検出する多くの手段が当分野で知られており、本発明の範囲内である。

【0083】

in vivoでの検出のために抗体は例えば以下のようなもので標識される:酵素、発蛍光団、発色団、放射性同位元素、色素、コロイド状金、ラテックス粒子、および化学発光剤。また別には、抗体はin vivoでの検出のために例えば以下のようなもので標識される:放射性同位元素(好ましくはテクネチウムまたはヨウ素)、磁気共鳴シフト試薬(例えばガドリニウムおよびマンガン)、または放射能非透過試薬。

【0084】

これらの実験で用いられる非常に一般的な標識は放射能元素、酵素、紫外線に暴露したとき蛍光を発する化学物質、およびその他のものである。多数の蛍光物質が知られており、標識として利用できる。これらには、例えばフルオレセイン、ローダミン、オーラミン、テキサスレッド、AMCA青およびルシファー黄である。具体的な検出用物質は、ヤギで作製し、イソチオシアネートによってフルオレセインと共役させた抗ウサギ抗体である。ポリペプチドはまた放射性元素または酵素で標識できる。放射能標識は、現在利用可能な計測方法のいずれでも検出できる。好ましいアイソトープは、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹Iおよび¹⁸⁶Rcから選択できる。

【0085】

酵素標識も同様に有用で、現在利用可能な比色法、分光測定法、蛍光スペクトル測定法、電流測定法、ガス圧測定法のいずれによっても検出できる。酵素は、選択した粒子と架橋分子(例えばカルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒドなど)との反応に

10

20

30

40

50

よって共役させる。これらの方法で用いることができる多くの酵素が知られており利用することができる。好ましいものは、ペルオキシダーゼ、 α -グルクロニダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼとペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼである。例えば、米国特許第3654090号、同3850752号、および同4016043号は代替標識物質および方法について開示している。

【0086】

本発明の別の実施態様では、疑わしい標的細胞の予め定めた結合活性の有無または結合活性の能力を決定するために医療専門家が使用できる市販用テストキットが製造される。上記で述べた検査技術にしたがって、そのようなキットのある種類は少なくとも標識ポリペプチドまたはそれに対して特異的な結合パートナー（例えば当該ポリペプチドに特異的な抗体）および指示書（例えば"競合"、"サンドイッチ"、"DASP"などの選択した方法にしたがう）を含む。このキットはまた周辺試薬（例えば緩衝液、安定剤など）を含む。

10

【0087】

したがって、以下を含むテストキットは、予め定めた細菌の結合活性の存在、または当該活性に対する細胞の能力を表示するために製造できる：

(a) 本発明のポリペプチドの直接または間接的結合によって得られる予め定めた量の少なくとも1つの標識した免疫化学反応性を有する成分またはそれに対して、検出可能な標識に対して特異的な結合パートナー；

(b) 他の試薬；および

20

(c) 当該キットを使用するための指示書。

【0088】

本発明は、以下を含む（ただしこれらに限定されない）拮抗薬または阻害剤を提供する：ペプチドフラグメント、模倣体、核酸分子、リボザイム、ポリペプチド、小分子、炭水化物分子、炭糖類、オリゴ糖、または抗体。肺炎球菌を競合的に封鎖または抑制する薬剤もまた本発明で意図される。本発明は、当該ポリペプチドを抑制する無機化合物、核酸分子、オリゴヌクレオチド、有機化合物、ペプチド、ペプチド模倣化合物または蛋白質を含む薬剤を提供する。

【0089】

本発明は、配列番号：1、3-7、9-11、22および23のいずれかに示すアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび医薬的に許容できるアジュバントまたは担体を含むワクチンを提供する。本ポリペプチドは、図2に示すN-末端コリン結合プロテインA切端形のアミノ酸配列を含むことができる。本発明は、図2に示す保存領域を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび医薬的に許容できるアジュバントまたは担体を含むワクチンを提供する。例えば、保存領域には、アミノ酸配列158から172；300から321；331から339；355から365；367から374；379から389；409から427；および430から447が含まれるが、ただしこれらに限定されない。本発明は、本ポリペプチドをコードする単離核酸および医薬的に許容できるアジュバントまたは担体を含むワクチンを提供する。

30

【0090】

グラム陽性細菌（特に肺炎球菌）に対する能動的免疫は、免疫誘発量の本ポリペプチドもしくはペプチド誘導體またはそのフラグメントおよびアジュバントによる免疫（ワクチン接種）によって誘発できる。この場合、本ポリペプチドまたはその抗原性誘導體もしくはフラグメントが当該ワクチンの抗原性成分である。本発明のポリペプチドまたはその誘導體もしくはフラグメントは、ワクチンを製造するためにアジュバントとの混合物として製造される。好ましくは、ワクチンの抗原性成分として用いられる本発明のポリペプチドの誘導體またはフラグメントは付着因子である。より好ましくは、ワクチンの抗原性成分として用いられる本発明のポリペプチドの誘導體またはフラグメントは、グラム陽性細菌の全株または多くの株に共通の抗原であるか、または菌の近縁種と共通の抗原である。最も好ましくは、ワクチンの抗原性成分は、共通抗原である付着因子である。

40

50

【0091】

本発明の核酸主剤ワクチンを含むベクターは、当分野で既知の方法（例えば核酸感染（トランスフェクション）、電気穿孔、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈澱、リポフェクション（リソソーム融合）、遺伝子銃の使用、またはDNAベクタートランスポーター（例えば以下を参照されたい：Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963-967(1992); Wu & Wu, J. Biol. Chem. 263:14621-14624(1988); Hartmut et al., カナダ特許出願2012311号（1990年3月15日出願））によって所望のホストに導入できる。

【0092】

ワクチンはいずれの非経口的ルートで投与してもよい。これらのルートには、筋肉内、腹腔内、静脈内などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。ワクチン接種の所望の結果は抗原、したがって病原性生物に対する免疫反応を誘発することであるので、好ましくは、投与は、直接的（またウイルスベクターの標的への誘導または選択による）、または間接的（類リンパ組織（例えばリンパ節または脾臓）への投与）なものが所望される。免疫細胞は持続的に複製しているので、それらはレトロウイルス主剤核酸ワクチンに理想的な標的である（なぜならばレトロウイルスは複製細胞を必要とする）

【0093】

受動免疫は、本発明のポリペプチドに対する抗血清、ポリクローナル抗体または中和モノクローナル抗体を対象患者に投与することによって、グラム陽性菌（好ましくは連鎖球菌、より好ましくは肺炎球菌）の感染が疑われる対象動物に付与される。受動免疫は長期の防御を付与しないので、受動免疫は、ワクチン接種を受けていない対象者の細菌感染の治療に有用なツールである。受動免疫は、利用可能なそれ以外の治療がないので抗生物質耐性グラム陽性細菌株の治療に特に重要である。好ましくは、受動免疫療法のために投与される抗体は自系抗体である。例えば、対象者がヒトの場合は、抗体に対する免疫反応を可能性を最小限にするために、抗体は好ましくはヒト由来または"ヒト化"されている。本発明の能動ワクチンもしくは受動ワクチン、または付着因子の投与は、グラム陽性菌（好ましくは連鎖球菌、より好ましくは肺炎球菌）の感染から対象動物を防御するために用いることができる。

【0094】

本発明は、ある量の本発明のポリペプチドおよび医薬的に許容できる担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。

例えば、肺炎球菌の粘膜面への付着を予防するそのような医薬組成物は、レクチンドメインに対する抗体および/または可溶性の過剰なレクチンドメイン蛋白質を含むことができる。どちらかのメカニズムによって付着を封鎖して、感染の最初のステップを阻害し、それによってコロニー形成を減少させる。これによって順次ヒトからヒトへの伝達を減少させ、症状の進展を予防する。

【0095】

本発明は、肺炎球菌に暴露されたかまたは感染した対象者に免疫反応を誘発する方法を提供する。この方法は、対象者にある量の医薬組成物を投与し、それによって免疫反応を誘発することを含む。

本発明は、対象者で肺炎球菌による感染を予防する方法を提供する。この方法は、対象者に肺炎球菌の付着を防御するために有効な量の医薬組成物を投与し、それによって肺炎球菌による感染を予防することを含む。

【0096】

本発明は、対象者で肺炎球菌による感染を予防する方法を提供する。この方法は、対象者に抗体および医薬的に許容できる担体または希釈剤を含むある量の医薬組成物を投与し、それによって肺炎球菌による感染を予防することを含む。

本発明は、肺炎球菌に暴露されたかまたは感染した対象者を治療する方法を提供する。この方法は、治療的に有効な量の本発明のワクチンを対象者に投与し、それによって対象者を治療することを含む。

【 0 0 9 7 】

本発明は、肺炎球菌に暴露されたかまたは感染した対象者で宿主細胞のコロニー形成を抑制する方法を提供する。この方法は、配列番号 1、3 - 5、7 または 9 - 11 のいずれかに示すアミノ酸配列から成るポリペプチドを含むある量の医薬組成物を対象者に投与し、それによって免疫反応を誘発することを含む。コロニー形成を阻害する治療用ペプチドは呼吸系粘膜によって輸送される。医薬組成物は図 2 に示すアミノ酸配列から成るポリペプチドを含む。

【 0 0 9 8 】

本明細書で用いられるように、"医薬組成物"とは、例えば肺炎球菌のコロニー形成を予防する治療効果または利益を付与する本発明のポリペプチド生成物の治療的に有効な量と一緒に適切な希釈剤、保存料、安定剤、乳化剤、アジュバントおよび/または担体をその中に含むものを意味する。本明細書で用いられるように、"治療的に有効な量"とは、ある条件および投与計画について治療効果を提供する量を指す。そのような組成物は液体、または凍結乾燥製剤、またはそうでなければ乾燥製剤で、種々の緩衝成分（例えばトリス HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pH およびイオン強度、表面への吸収を防ぐアルブミンまたはゼラチンのような添加剤、洗剤（例えばトウィーン 20、トウィーン 80、プルロニック F68、胆汁酸塩）、可溶化剤（例えばグリセロール、ポリエチレングリセロール）、抗酸化剤（例えばアスコルビン酸、メタ亜硫酸ナトリウム）、保存料（例えばチメロサル、ベンジルアルコール、パラベン）、膨張剤または張度調節剤（例えばラクトース、マンニトール）、ポリマー（例えばポリエチレングリコール）の蛋白質への共有結合、金属イオンとの錯塩化、またはポリマー化合物（例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなど）の粒子化調製物またはリポソーム、マイクロ乳剤、ミセル、単層もしくは多層小胞、赤血球ゴーストまたはスフェロプラストへの当該材料の取り込みを含む。

【 0 0 9 9 】

そのような組成物は、治療剤の生理的状态、可溶性、安定性、in vivo遊離速度、in vivo クリアランス速度に影響を与えるであろう。組成物の選択は、治療活性を有する蛋白質の物理的および化学的特性に左右されるであろう。例えば、活性物質の膜結合形に由来する生成物は洗剤含有製剤を必要とする。制御または持続放出組成物は親油性デポット（例えば脂肪酸、ワックス、油）製剤を含む。さらに本発明が意図するものは、ポリマー（例えばポロキサマーまたはポロキサミン）および、組織特異的レセプター、リガンドまたは抗原に対して誘導した抗体に結合させた活性物質または組織特異的レセプターのリガンドに結合させた活性物質で被覆した粒子化組成物である。ある実施態様では、本発明の組成物は、保護皮膜、プロテアーゼ抑制物質、または種々の投与経路（非経口、経肺、経鼻、および経口投与を含む）のための浸透強化物質をもつ粒子化形を含む。

【 0 1 0 0 】

さらに、本明細書で用いられるように、"医薬的に許容できる担体"は当業者には周知で、0.01 - 0.1 M、好ましくは 0.05 M の燐酸緩衝液または 0.8% 食塩水を含む。さらに、そのような医薬的に許容できる担体は水溶液または非水性溶液、懸濁液および乳液であろう。非水性溶媒の例はプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えばオリーブ油）、注射用有機エステル（例えばオレイン酸エチル）である。水性担体には水、アルコール水溶液、乳液または懸濁液（食塩水および緩衝媒体を含む）が含まれる。非経口賦形剤には塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースと塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液または固定油が含まれる。静脈内賦形剤には、水分栄養補充液、電解質補充液（例えばリンゲルデキストロースを主剤とするもの）などが含まれる。保存料および他の添加剤、例えば抗菌剤、抗酸化剤、照合剤、不活性ガスなどもまた含まれる。

【 0 1 0 1 】

"アジュバント"は、抗原に対する免疫反応を強化する化合物または混合物を指す。アジュバントは、抗原をゆっくりと放出する組織デポットとして、または免疫反応を非特異的に強化する類リンパ系活性化物質として機能することができる（Hood et al., Immunology,

10

20

30

40

50

Second Ed., Benjamin/Cummings:Menlo Park, California, p.384(1984))。アジュバントを含まない抗原単独による初回チャレンジは、しばしば液性または細胞性免疫反応を誘発することができない。アジュバントにはフロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント、サポニン、鉍物ゲル(例えば水酸化アルミニウム)、界面活性剤(例えばリゾレシチン)、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油または炭化水素乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールおよび潜在的に有用なヒトアジュバント(例えばBCG(bacille Calmette-Guerin)およびコリネバクテリウム=パルブム(*Corynebacterium parvum*))が含まれるが、ただしこれらに限定されない。好ましくはアジュバントは医薬的に許容できるものである。

【0102】

制御放出組成物または持続放出組成物は、親油性デポット(例えば脂肪酸、ワックス、油)としての製剤を含む。さらに本発明に含まれるものは、ポリマー(例えばポロキサマーまたはポロキサミン)および化合物で被覆した粒子化組成物であるが、当該化合物は、組織特異的レセプター、リガンドもしくは抗原に対して誘導した抗体と共役されているか、または組織特異的レセプターのリガンドと共役されている。本発明の組成物の他の実施態様では、防御皮膚膜、プロテアーゼ抑制物質または種々の投与ルート(非経口、経鼻および経口ルートを含む)のための浸透強化物質を有する粒子化形を含む。

【0103】

投与したとき、化合物はしばしば粘膜表面または循環系から迅速に除去され、したがって薬理活性は比較的短時間である。結果として、治療効果を維持するために、生物活性物質の比較的大量の投与量を何度も投与する必要がある。水溶性ポリマー(例えばポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンまたはポリプロリン)の共有結合による化合物の改変が、対応する未改変化合物よりも静脈注射後実質的により長時間の血中半減期を示すことが知られている。(Abuchowski et al., (1981); Newmark et al., (1982); Katre et al., (1987))。そのような改変はまた、水溶液中での化合物の可溶性を高め、凝集を防止し、化合物の物理的および化学的安定性を強化し、さらに化合物の免疫原性および反応性を極めて低下させる。結果として、未改変化合物の場合よりも投与回数の少ないまたは投与量の少ない当該ポリマー化合物アダクツの投与によって、所望のin vivo生物学的活性が達成できる。

【0104】

投与量：十分な量には約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から約1000 mg/kg が含まれるが、ただしこの量に限定されない。この量は10 mg/kg であろう。医薬的に許容できる形態の組成物は医薬的に許容できる担体を含む。上記に記載したように、本発明は、ベクター、ワクチン、ポリペプチド、核酸および抗体、抗抗体および、病原活性(例えば宿主細胞への付着)について肺炎球菌と競合する薬剤を含む医薬組成物を含む治療組成物を提供する。

【0105】

活性成分を含む治療用組成物の製造は当分野では周知である。典型的には、そのような組成物は、鼻咽頭に投与されるポリペプチドのエアロゾルとして、または液体溶液もしくは懸濁液のどちらかとして注射できるように製造できるが、注射の前の溶液、懸濁液、液状物に適した固形製剤もまた製造できる。調製物を乳化してもよい。治療のための活性成分はしばしば、医薬的に許容でき、活性成分と適合する賦形剤と混合される。適切な賦形剤は、例えば水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組合せである。さらに、所望する場合は、組成物は微量の補助物質(例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤(これらは活性成分の有効性を高める)を含むことができる。

【0106】

活性成分は、医薬的に許容できる中性塩として治療用組成物に製剤化できる。医薬的に許容できる塩には酸付加塩(ポリペプチドまたは抗体分子の遊離アミノ基で形成される)および無機酸(例えば塩酸、リン酸)または有機酸(例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、マン

10

20

30

40

50

デル酸など)で形成されるものが含まれる。遊離カルボキシル基から形成される塩も、例えば水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または鉄のような無機塩基から、さらにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導できる。

【0107】

組成物の蛋白質、DNA、ベクターの重量で少なくとも約75%が"A"("A"はただ1つの蛋白質、DNA分子、ベクターなど)であるとき(AおよびBが属する種の分類に応じて)、“A”を含む組成物は実質的に“B”("B"は1つまたは2つ以上の夾雑蛋白質、DNA分子、ベクターなど)を含まない。好ましくは“A”は、組成物中のA+Bの物質の重量で少なくとも約90%含まれ、最も好ましくは少なくとも重量で約99%含まれる。

10

【0108】

本明細書では“治療的に有効な量”という語句は、少なくとも約15%まで、好ましくは50%まで、より好ましくは少なくとも90%まで、もっとも好ましくはホストの活性、機能および反応における臨床的に有意な欠如を防止する。また別には治療的に有効な量は、ホストの臨床状態におけるに有意な改善をもたらすために十分である。本発明では、ホストの反応の欠如は持続的または伝播する細菌感染によって明白である。ホストの臨床状態におけるに有意な改善には、細菌負荷の減少、コロニーを形成したホスト細胞から細菌の除去、感染に伴う発熱または炎症の低下、または感染に伴う症状のいずれかの減少が含まれる。

【0109】

本発明にしたがえば、本発明の治療用組成物の成分は非経口的に、経粘膜的に(例えば経口、経鼻、経肺または経腸的)、経皮的に導入できる。好ましくは、投与は非経口的、例えば静脈注射、動脈内、筋肉内皮内、皮下、腹腔内、心室内、および頭蓋内を含むがただしこれらに限定されない。経口または肺投与は、粘膜免疫を活性化するために好ましい。なぜならば肺炎球菌は一般に鼻咽頭および肺粘膜でコロニーを形成するので、粘膜免疫は特に有効な防御処置である。本発明の治療用組成物に関して用いられる場合は、“単位投与量”という用語は、ヒトの1回分の投与量として物理的に分離したユニットを指し、各ユニットは、所望の治療効果を生じるために計算した予め定められた量の活性物質を必要な希釈剤(すなわち担体または賦形剤)と合わせて含有する。

20

【0110】

別の実施態様では、活性化化合物は、賦形剤、特にリポソームとして輸送される(以下の文献を参照されたい:Langer, *Science* 249:1527-1533(1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein & Fidler(eds.), Liss, New York, pp.353-365(1989); Lopez-Berestein, 同書、pp.317-327; 一般的には同書を参照のこと)。

30

【0111】

さらに別の実施態様では、治療用化合物は制御放出系で輸送される。例えば、ポリペプチドは、静脈内輸液、埋め込み浸透圧ポンプ、経皮貼付薬、リポソーム、または他の投与態様を用いて投与できる。ある実施態様では、ポンプを用いることができる(以下の文献を参照されたい:Langer, 上掲書; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201(1978); Buchwald et al., *Surgery* 88:507(1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574(1989))。別の実施態様では、ポリマー物質を用いることができる(例えば以下の文献を参照されたい: *Medical Applications of Controlled Release*, Langer & Wise, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida(1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen & Ball, eds., Wiley, New York(1984); Ranger & Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61(1983); Levy et al., *Science* 228:190(1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25:351(1989); Howard et al., *Neurosurg.* 71:105(1989))。

40

【0112】

また別の実施態様では、制御放出系は治療標的(例えば脳)の近傍に静置し、したがって

50

全身投与量の一部分のみを必要とするだけである（例えば以下の文献を参照されたい：Go odson, in Medical Applications of Controlled Release, 上掲書、vol.2, pp.115-138(1984)）。好ましくは、制御放出装置は、対象者の免疫活性化が不適切な部位または腫瘍の 近傍に導入される。他の制御系はLangerによって概説されている（Science 249:1527-153 3(1990)）。

【 0 1 1 3 】

上記で説明した活性成分の投与が細菌感染について有効な治療となる対象者はヒトである が、対象はいずれの動物でもよい。したがって、当業者には容易に理解できるところである が、本発明の方法および医薬組成物は、任意の動物、特に以下を含む哺乳類（ただしこれらに限定されない）に動物医療用途のために投与されるのに適している：家畜動物（例 10 えばネコまたはイヌ、ただしこれらに限定されない）、牧畜動物（例えば、ウシ、ウマ、 ヤギ、ヒツジおよびブタ、ただしこれらに限定されない）、野性動物（原野かまたは動物園かにかかわらず）、研究用動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ 、イヌ、ネコなど）。

【 0 1 1 4 】

本発明の治療方法および組成物では、活性成分の治療的に有効な量が提供される。治療的 に有効な投与量は、当分野の医療従事者には、当技術分野で周知のように患者の特性（年 令、体重、性別、状態、合併症、他の疾患など）を基にして容易に決定できる。さらにまた、 日常的な検査を実施しながら、より具体的な情報が、多様な患者における多様な症状 の治療について適切な投与レベルに関する情報が得られ、さらに当業者は、治療の内容、 20 年令および患者の一般的状態を考慮しながら適切な投与量を確認することができる。

【 0 1 1 5 】

一般には、静脈内注射または輸液のためには、投与量は腹腔内、筋肉内、または他の投与 ルートより少ないであろう。投与計画は、循環半減期および用いられた剤形したがって変 動するであろう。組成物は、剤形に適合する態様で治療的に有効な量で投与されるであろ う。投与に必要な活性成分の正確な量は臨床医の判断にしたいがい、各人に固有である。し かしながら、適切な投与量は約 0 . 1 から 2 0 m g、好ましくは約 0 . 5 から約 1 0 m g 、より好ましくは 1 から数 m g の活性成分 / k g 体重 / 人 / 日で、投与経路によって左右 される。投与開始および追加投与についての適切な計画もまた変動するが、典型的には開 始投与に続いて、1 時間またはそれ以上の間隔で反復投与がその後続くか、または他の 30 投与が実施される。また別には、血中で 1 0 ナノモルから 1 0 マイクロモル濃度を維持す るために十分な連続静脈内輸液も意図される。

【 0 1 1 6 】

他の化合物との投与：細菌感染の治療のために、細菌感染の治療に用いられる以下を含む （ただしこれらに限定されない）1 つまたは 2 つ以上の医薬組成物と併用して、本発明の 活性成分を投与することができる：（ 1 ）抗生物質；（ 2 ）細菌の付着を抑制する可溶性 炭水化物；（ 3 ）細菌の付着を抑制する他の小分子；（ 4 ）細菌の代謝、輸送、形質転換 を抑制する物質；（ 5 ）細菌溶解促進物質；または（ 6 ）抗細菌抗体または他の細菌抗原 に対するワクチン。他の可能な活性成分には、抗炎症剤、例えばステロイドおよび非ステ 40 ロイド抗炎症薬が含まれる。投与は同時でも（例えば本発明の活性成分および抗生物質の 混合物の投与）、または連続的でよい。

【 0 1 1 7 】

したがって、特定の実施態様では、治療組成物はさらに有効量の活性成分および 1 つまた は 2 つ以上の以下の活性成分を含むことができる：抗生物質、ステロイドなど。典型的な 製剤は以下に示される：

静脈内製剤 I :

成分	m g / m l
セフトキシム	2 5 0 . 0
ポリペプチド	1 0 . 0
デキストロース U S P	4 5 . 0

10

20

30

40

50

重亜硫酸ナトリウム U S P 3 . 2
 エディテート二ナトリウム U S P 0 . 1
 適量の注射用水を加えて調節 1 . 0 m l

【 0 1 1 8 】

静脈内製剤 I I

成分 m g / m l
 アンピシリン 2 5 0 . 0
 ポリペプチド 1 0 . 0
 重亜硫酸ナトリウム U S P 3 . 2
 二ナトリウムエディテート U S P 0 . 1
 適量の注射用水を加えて調節 1 . 0 m l

10

【 0 1 1 9 】

静脈内製剤 I I I

成分 m g / m l
 ゲンタマイシン (硫酸塩として) 4 0 . 0
 ポリペプチド 1 0 . 0
 重亜硫酸ナトリウム U S P 3 . 2
 二ナトリウムエディテート U S P 0 . 1
 適量の注射用水を加えて調節 1 . 0 m l

20

【 0 1 2 0 】

静脈内製剤 I V

成分 m g / m l
 ポリペプチド 1 0 . 0
 デキストロース U S P 4 5 . 0
 重亜硫酸ナトリウム U S P 3 . 2
 エディテート二ナトリウム U S P 0 . 1
 適量の注射用水を加えて調節 1 . 0 m l

【 0 1 2 1 】

静脈内製剤 V

成分 m g / m l
 ポリペプチド拮抗物質 5 . 0
 重亜硫酸ナトリウム U S P 3 . 2
 二ナトリウムエディテート U S P 0 . 1
 適量の注射用水を加えて調節 1 . 0 m l

30

【 0 1 2 2 】

したがって、細菌のホスト細胞への細菌仲介結合によって生じる感染を減少または抑制することを所望するか、または当該細菌に対する抗体もしくはそのリガンドもしくは当該リガンドに対する抗体を所望する特定の事例では、ポリペプチドが、ホスト細胞と細菌の相互作用を阻害するために導入される。

【 0 1 2 3 】

本明細書でさらに意図するものは、付着因子抑制剤としてレクチン活性をもつ本発明のポリペプチドまたはその誘導体の肺デリバリーである。付着因子抑制剤 (またはその誘導体) が哺乳類の肺に輸送され、ここで細菌 (すなわち連鎖球菌、好ましくは肺炎球菌) のホスト細胞への結合に干渉する。肺デリバリーのための蛋白質の調製に関する他の報告が当技術分野で見出される (Adjei et al., Pharmaceutical Research, 7:565-569(1990); Adjei et al., International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144(1990) (リュープロリドアセテート); Braquet et al., J. Cardiovascular Pharmacology, 13(suppl.5):143-146(1989)(エンドセリン - 1); Hubbard et al., Annals Int. Med. Vol.III, pp.206-212(1989) (1 - アンチトリプシン); Smith et al., J. Clin. Invest. 84:1145-1146(1989)(1 - プロテイナーゼ); Oswein et al., "Aerosolization of Proteins", Pro

40

50

ceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (1990)(リコンビナントヒト成長因子); Debs et al., J. Immunol. 140:3482-3488(1988)(インターフェロン - および腫瘍壊死因子); Platz et al., 米国特許第5284656号(顆粒球コロニー刺激因子)。薬剤の肺デリバリーのための方法および組成物が米国特許第5451569号(1995年9月19日、Wong et al.)に記載されている。

【0124】

そのような装置の全てが付着因子抑制剤(またはその誘導体)の分散に適した製剤の使用を必要とする。典型的には、各製剤は使用する装置のタイプに固有で、治療に有用な通常の希釈剤、アジュバント、および/または担体以外に適切な噴射剤の使用を必要とする。さらにまた、リポソーム、マイクロカプセルまたはマイクロスフェア、封入複合体または他のタイプの担体も意図される。化学的に改変した付着因子抑制剤もまた、化学的改変のタイプまたは用いる装置のタイプにしたがって種々の剤形で製造できる。

10

【0125】

ネブライザー(ジェット式または超音波式のどちらか)と一緒に使用するために適した製剤は、典型的には付着因子抑制剤(またその誘導体)を含む。付着因子は溶液1mlにつき約0.1から25mgの生物学的に活性な付着因子抑制剤の濃度で水に溶解される。製剤はまた緩衝液および単糖(例えば付着因子抑制剤安定化および浸透圧の調節のため)を含むことができる。ネブライザー製剤はまた界面活性剤を含み、エアロゾルを形成する際の溶液の霧状化によって惹起される付着因子抑制剤の面誘発凝集を低下または防止することができる。

20

【0126】

用量計量吸入装置を使用する製剤は一般に、界面活性剤と一緒に噴射剤に懸濁させた付着因子抑制剤(またはその誘導体)を含む微細分割粉末を含む。噴射剤はこの目的のために使用されるいずれの一般的物質でもよい。例えばクロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボンまたはヒドロカーボン(トリクロロフルオロメタン、ジクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノールおよび1,1,1,2-テトラフルオロメタンを含む)またはその組合せである。適切な界面活性剤はソルピタントリオレートおよびダイズレシチンである。オレイン酸もまた界面活性剤として有用である。

【0127】

液体エアロゾル製剤は、医薬的に許容できる希釈剤中に付着因子抑制剤および分散剤を含む。本発明の乾燥粉末エアロゾル製剤は、付着因子抑制剤の微細分割固形物および分散剤から成る。液体または乾燥粉末エアロゾル製剤のどちらかを用いて、製剤は噴霧化されなければならない。すなわち、噴霧化投与量が実際に鼻腔または肺の粘膜に到達したことを担保するために、製剤は液体または固形粒子に細分化されなければならない。"エアロゾル粒子"という用語は、経鼻投与または肺投与に適した(すなわち粘膜に到達する)液体粒子または固形粒子を指すために本明細書では使用される。他の考慮すべき事柄、例えばデリバリー装置の構築、製剤の追加成分、および粒子の性状も重要である。薬剤の肺投与の特徴は当分野で周知であるが、製剤化処理、噴霧化手段およびデリバリー装置の構築では当業者の極めて日常的な実験を必要とする。特定の実施態様では、物質の平均動的直径は、肺胞に薬剤粒子が到達することを担保するために5マイクロメートルまたはそれより小さいであろう(L.L. Wearley, Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems 8:333(1991))。

30

40

【0128】

エアロゾルデリバリー系、例えば加圧用量計量吸入装置および乾燥粉末吸入装置は文献に開示され(S.P. Newman, Aerosols and the Lung, S.W. Clarke & D. Davia, eds., pp.197-22)、本発明で用いることができる。

また別の実施態様では、下記で詳細に考察するように、本発明のエアロゾル製剤は、付着因子抑制剤の他に他の治療的または薬理的に活性な成分(例えば抗生物質、ステロイド、非ステロイド性抗炎症剤など(ただしこれらに限定されない))を含むことができる。

50

【 0 1 2 9 】

液体エアロゾル製剤：本発明は、エアロゾル製剤および細菌感染（例えば連鎖球菌、特に肺炎球菌）に罹患している対象者の治療に使用する剤形を提供する。一般にそのような剤形は医薬的に許容できる希釈剤中に付着因子抑制剤を含む。医薬的に許容できる希釈剤には、滅菌水、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース溶液などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。個々の実施態様では、本発明または本発明の医薬製剤で使用できる希釈剤は、燐酸緩衝食塩水または緩衝食塩水溶液（一般にpHは7.0から8.0）、または水である。

【 0 1 3 0 】

本発明の液体エアロゾル製剤は、任意の成分として医薬的に許容できる担体、希釈剤、可溶化剤または乳化剤、界面活性剤および賦形剤を含むことができる。製剤は担体を含むことができる。担体は循環系に溶解でき、生理学的に許容できる巨大分子であるが、ここで生理学的に許容できるとは、当業者が治療計画の一部として患者に当該担体の注射を許容することを意味する。好ましくは、担体は、クリアランスに対して許容できる血中半減期をもち循環系で比較的安定である。そのような巨大分子にはダイズレシチン、オレイン酸およびソルビタントリオレエートが含まれるが、ただしこれらに限定されない。ソルビタントリオレエートが好ましい。

10

【 0 1 3 1 】

本発明の製剤はまた、pH維持、溶液の安定化、または浸透圧の調節に有用な他の薬剤を含むことができる。例えばそのような薬剤には、塩（例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム）、炭水化物（例えばグルコース、ガラクトースまたはマンノース）などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

20

本発明はさらに、付着因子抑制剤および治療的に有効な別の薬剤（例えば抗生物質、ステロイド、非ステロイド性抗炎症剤など）を含む液体エアロゾル製剤を意図する。

【 0 1 3 2 】

エアロゾル乾燥粉末製剤：本エアロゾル製剤は、付着因子抑制剤および分散剤の微細分割粉末形を含む乾燥粉末製剤として製造することもまた意図される

粉末吸入装置から配分される製剤は、付着因子抑制剤（または誘導体）を含有する微細分割乾燥粉末を含み、さらに、粉末を装置から分散させやすくするために、膨張剤、例えばラクトース、ソルビトール、ショ糖またはマンニトールを例えば製剤重量の50から90%の量で含むことができる。付着因子抑制剤（または誘導体）は、末端の肺への最も効果的なデリバリーのために最も有利なようには平均粒子サイズが10mm（またはミクロン）未満、最も好ましくは0.5から5mmの粒子化形で製造されるべきである。別の実施態様では、乾燥粉末製剤は微細分割乾燥粉末を含むことができ、当該微細分割乾燥粉末は、付着因子抑制剤、分散剤さらにまた膨張剤を含む。本製剤との併用に有用な膨張剤には、ラクトース、ソルビトール、ショ糖、またはマンニトールのような薬剤が含まれる。当該膨張剤の量は、装置から粉末を配分しやすくする量である。

30

本発明はさらに、付着因子抑制剤および治療的に有効な別の薬剤（例えば抗生物質、ステロイド、非ステロイド系抗炎症剤など）を含む乾燥粉末製剤を意図する。

【 0 1 3 3 】

本明細書で用いようとするものは経口用剤形で、当該剤形は一般的に成書に記載されている（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990(Mack Publishing Co. Easton PA 18042), Chapter89: 本文献は参照により本明細書に含まれる）。固形剤形には、錠剤、カプセル、ピル、トローチまたはロゼンジ、カシェーまたはペレットが含まれる。さらにまたリポソーム小胞または類蛋白質小胞も本組成物の製剤化に用いることができる（例えば類蛋白質マイクロソフェアは米国特許第4925637号に報告されている）。リポソーム被包化を用いてもよく、リポソームは種々のポリマーで誘導できる（例えば米国特許第5013556号）。可能な治療用固形剤形については成書に記載されている（K. Marshall, in: Modern Pharmaceutics, G.S. Banker & C.T. Rhodes, eds., Chapter 10, 1979: この文献は参照により本明細書に含まれる）。一般には、当該製剤は本成分（ま

40

50

たはその化学的改変形)および不活性成分を含み、不活性成分は胃内環境を保護し、生物学的活性物質を腸内に遊離させる。

【0134】

さらにまた特に意図されるものは上記の誘導成分の経口用剤形である。誘導体の経口デリバリーが有効であるように、当該成分は化学的に改変できる。一般に、意図される化学改変は少なくとも1つの分子部分を成分分子自体に結合させるものである。この場合、当該分子部分は(a)蛋白分解の抑制;および(b)胃または腸から血流への取り込みを可能にする。さらに所望されることは、成分の全体的な安定性の増加および体内循環時間の増加である。そのような分子部分には、ポリエチレングリコール、エチレングリコールおよびプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびポリプロリンが含まれる(Abuchowski & Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", In:Enzymes as Drugs, Hocenberg & Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp.367-383;Newmark, et al., J. Appl. Biochem. 4:185-189(1982))。使用できる他のポリマーは、ポリ-1,3-ジオキソレンおよびポリ-1,3,6-チオキソケンである。医薬用途で好ましいものは、上記で示したようにポリエチレングリコール分子部分である。

10

【0135】

当該成分(誘導体)の場合、放出の場所は胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)または大腸であろう。当業者には胃で溶解せず十二指腸または小腸の他の場所で放出される製剤が利用可能である。好ましくは、放出による胃環境の有害な作用は、当該蛋白質(または誘導体)の保護によって、または胃環境より先(例えば小腸)で生物学的活性物質を放出することによって回避されるであろう。

20

【0136】

胃酸に対する完全な耐性を担保するために、少なくともpH5.0では非透過性の被覆が必要である。腸溶皮として用いられるより一般的な不活性成分の例は、セルロースアセテートトリメリテート(CAT)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート(HPMCP)、HPMCP50、HPMCP55、ポリビニルアセテートフタレート(PVAP)、ユードラジット(Eudragit)L30D、アクトリック(Aquateric)、セルロースアセテートフタレート(CAP)、ユードラジットL、ユードラジットS、およびシェルラック(Shellac)である。これらの被覆は混合フィルムとして用いることができる。

30

【0137】

被覆または被覆混合物は錠剤にも用いることができるが、これは胃からの保護を意図していない。これには糖被覆、または錠剤を飲み込みやすくする被覆が含まれる。カプセルには、乾燥治療薬(すなわち粉末)デリバリー用の硬質殻(例えばゼラチン)、液状剤形用に軟質ゼラチン殻を用いることができる。カプセルの殻材料は厚手の澱粉または他の食用紙であろう。ピル、ロゼンジ、型抜き錠剤または粉薬錠剤の場合、湿潤集積技術を用いることができる。

【0138】

ペプチド治療薬は、粒子サイズ約1mmの微細マルチ微粒子として顆粒またはペレット状製剤中に含ませることができる。カプセル投与用物質の製剤化は、粉末、軽度圧縮プラグまたは錠剤として実施してもよい。治療薬は圧縮によって製造してもよい。着色剤および香料を含むことができる。例えば、本蛋白質(または誘導体)を製剤化し(例えばリポソームまたはマイクロスフェア小胞)、続いて食用生成物(例えば着色剤および香料を含む冷飲料)に混合することができる。

40

【0139】

治療薬を不活性物質で希釈またはその容積を増加させることができる。これらの希釈剤には、炭水化物、特にマンニトール、α-ラクトース、ラクトース無水物、セルロース、ショ糖、改変デキストランおよび澱粉が含まれる。ある種の無機塩もまた充填剤として用いることができる。これら充填剤には、三リン酸カルシウム、炭酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムが含まれる。いくつかの市販希釈剤はファストフロ(Fast-Flo)、エムデックス

50

(Emdex)、S T A - R x 1 5 0 0、エムコンプレス (Emcompress)、およびアビセル (Avicell)である。

【 0 1 4 0 】

崩壊剤は、固形剤形の治療薬製剤に含ませることができる。崩壊剤として用いられる物質には、澱粉（澱粉を基剤とする市販の崩壊剤エクスプロタブ (Explotab) を含む）が含まれる。ナトリウム澱粉グリコレート、アンバーライト、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ウルトラミロベクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸カルボキシメチルセルロース、天然スポンジおよびベントナイトも全て用いることができる。

【 0 1 4 1 】

崩壊剤の別の形態は不溶性陽イオン交換樹脂である。粉末ゴムを崩壊剤および結合剤として用いることができる。さらにこれら結合剤には、寒天、カラヤ、トラガカントゴムのような粉末ゴムが含まれる。アルギン酸およびそのナトリウム塩もまた崩壊剤として有用である。結合剤は治療薬と一緒に保持して硬質錠剤を形成することができる。結合剤はアラビアゴム、トラガカントゴム、澱粉およびゼラチンのような天然生成物由来に物質を含む。その他のものにはメチルセルロース (MC)、エチルセルロース (EC) およびカルボキシメチルセルロース (CMC) が含まれる。ポリビニルピロリドン (PVP) およびヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) は両方ともアルコール溶液中で用いて、治療薬を顆粒化することができる。

【 0 1 4 2 】

減摩剤を治療薬製剤に含有させ製剤化工程中の粘着を防止することができる。潤滑剤も治療薬と金型壁との間の層として用いることができる。これら潤滑剤には、ステアリン酸（マグネシウム塩およびカルシウム塩を含む）、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、液体パラフィン、植物油およびワックスが含まれる。可溶性潤滑剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、種々の分子量のポリエチレングリコール、カルボワックス 4000 および 6000 もまた用いることができる。製剤化時の薬剤の流れ特性を改善し、圧縮時の再配合を促進する滑り剤を添加してもよい。滑り剤には澱粉、タルク、発熱シリカ、水和シリコアルミネートが含まれる。

【 0 1 4 3 】

治療薬を水性環境に溶解させやすくするために、湿潤剤として界面活性剤を添加できる。界面活性剤には、陰イオン洗剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルナトリウムスルホスクシネートおよびジオクチルナトリウムスルホネート）が含まれる。陽イオン洗剤を用いてもよい。これには塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウムが含まれる。界面活性剤として製剤に含むことができる可能な非イオン性洗剤は、ラウロマクロゴル 400、ポリオキシ 40 ステアレート、ポリオキシエチレン水和ひまし油 10、50 および 60、グリセロールモノステアレート、ポリソルベート 40、60、65 および 80、ショ糖脂肪酸エステル、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースである。これらの界面活性剤は、単独または種々の割合の混合物として蛋白質またはその誘導体製剤中に含まれるであろう。

本ポリペプチド（または誘導体）の取り込みを強化しえる添加物は、例えば脂肪酸のオレイン酸、リノール酸、リノレン酸である。

【 0 1 4 4 】

肺デリバリー：さらにまた本明細書で意図されるものは、本ポリペプチド（またはその誘導体）の肺デリバリーである。本ポリペプチド（または誘導体）は、吸入時に哺乳類の肺に輸送され、肺胞の粘膜表面を被覆する。これに関する他の報告には以下が含まれる：Adjei et al., *Pharmaceutical Research*, 7:565-569(1990); Adjei et al., *International J. Pharmaceutics*, 6:135-144(1990)(リュープロリドアセテート); Braquet et al., *J. Cardiovascular Pharmacology* 13(suppl.5):143-146(1989) (エンドテリン - 1); Hubbard et al., *Annals of Internal Medicine*, vol.III, pp.206-212(1989) (a1 - アンチトリプシン); Smith et al., *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146(1989)(a1 - プロテ

10

20

30

40

50

ナーゼ) ; Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (リコンビナントヒト成長ホルモン) ; Debs et al., J. Immunol. 140:3482-3488(1988) (インターフェロン - および腫瘍壊死因子) および Platz et al., 米国特許第 5 2 8 4 6 5 6 号 (顆粒球コロニー刺激因子)。全身的作用のための薬剤の肺デリバリーのための方法および組成物は米国特許第 5 4 5 1 5 6 9 号 (1995年9月19日、Wong et al.) に記載されている。

【 0 1 4 5 】

本発明の実施で使用することを意図されるものは、治療用生成物の肺デリバリーのための広範囲の機械装置で、これら装置にはネブライザー、用量計量吸入装置、および粉末吸入装置が含まれる(ただしこれらに限定されない)が、これらすべては当業者には周知である。

10

ネブライザー(ジェット式または超音波式のどちらか)と一緒に使用するために適した製剤は、典型的には溶液 1 ml 当たり約 0.1 から 2.5 mg の濃度で生物学的に活性な蛋白質を水に溶解したポリペプチド(または誘導体)を含むであろう。製剤はまた緩衝液および単糖(例えば蛋白質安定化および浸透圧の調節のために)を含むことができる。ネブライザー製剤はまた界面活性剤を含み、エアロゾル形成時の溶液の霧状化によって生じる表面誘発凝集を低下または防止することができる。

【 0 1 4 6 】

一般に用量計量吸入装置と一緒に使用する製剤は、界面活性剤の補助を得て噴射薬に懸濁させたポリペプチド(または誘導体)を含有する微細分割粉末を含むであろう。噴射薬は、この目的に用いられる一般的な物質のいずれでもよく、例えばクロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、またはヒドロカーボンで、これらにはトリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、および 1, 1, 1, 2 - テトラフルオロエタン、またはその組合せが含まれる。適切な界面活性剤にはソルビタントリオレートおよびダイズレシチンが含まれる。オレイン酸もまた界面活性剤として有用であろう。

20

【 0 1 4 7 】

粉末吸入装置から投与される製剤は、ポリペプチド(または誘導体)含有微細分割乾燥粉末を含むであろう。当該製剤はまた、装置から粉末を分散させやすくするために、増量剤、例えばラクトース、ソルビトール、ショ糖またはマンニトールを製剤の重量で約 50 から 90% 含むことができる。本蛋白質(または誘導体)は、もっとも有利には、末端の肺へのもっとも効果的なデリバリーのために平均粒子サイズが 10 μm (またはミクロン) 未満、最も好ましくは 0.5 から 5 μm の粒状形で製造されるべきである。

30

【 0 1 4 8 】

経鼻デリバリー:

本ポリペプチド(または誘導体)の経鼻または鼻咽頭デリバリーもまた意図される。経鼻デリバリーは、治療薬を鼻に投与した後、直接上気道粘膜に本ポリペプチドを運搬することを可能にし、直接肺に本生成物を投与する必要がない。経鼻デリバリー用製剤にはデキストランまたはシクロデキストランを含有する製剤が含まれる。

以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様をより完全に説明するために提示されるが、本発明の範囲を限定するものと解してはならない。

40

【 0 1 4 9 】

実施例

実験の詳細な説明

実施例 1: コリン結合プロテイン A (Cb p A) のペプチド切端形

Cb p A (血清型 4) の切端 N - 末端フラグメントを含むポリペプチドを作製した。PCR プライマー S J 5 3 3 および S J 5 3 7 で完全長の Cb p A を増幅させ、誘導した Cb p A の N - 末端アミノ酸配列を基にしてプライマーをデザインした。5' 前進プライマー S J 5 3 3 は、5' G G C G G A T C C A T G G A (A , G) A A (C , T) G A (A , G) G G 3' であった。X E N E G のアミノ酸配列からデザインしたこの縮重プライマー

50

に B a m H I および N c o I 制限部位の両方並びに A T G 開始コドンを取り込ませた。3'逆プライマー S J 5 3 7 は 5' G C C G T C G A C T T A G T T T A C C C A T T C A C C A T T G G C 3' であった。このプライマーには、クローニング用 S a l I 制限部位および C b p A 由来の天然の終止コドンを取り込ませた。このプライマーはタイプ 4 および R 6 x 配列の両方を基にしている。

【 0 1 5 0 】

P C R 生成物は、鑄型としてゲノム D N A からプライマー S J 5 3 3 および S J 5 3 7 を用い、ハイフィデリティー酵素 (Boehringer Mannheim) を使用しアニーリング温度 5 0 で 3 0 サイクル増幅させて作製した。生じた P C R 生成物を Q I A クイック P C R 精製キット (Qiagen, Inc) を用いて精製し、続いて B a m H I および S a l I 制限酵素で消化し、さらに B a m H I、X b a I および S m a I 制限酵素で消化した p Q E 3 0 発現ベクター (Qiagen, Inc) でクローニングした。

10

【 0 1 5 1 】

ポリペプチド R 2 :

第二の繰り返し領域の末端の天然に存在する P v u I I 部位、すなわち図 1 に示す C 領域 (4 型の配列の核酸 1 2 2 8) を利用して、遺伝子の 5' 部分のみを含む C b p A 遺伝子の切端形を作製した。切端形クローンを作製するために、完全長クローン P M I 5 8 0 (4 型) または P M I 5 8 1 (R 6 x) を P v u I I および X b a I を用いてデザインし、生じたフラグメントを発現ベクター p Q E 3 0 に連結し、適切なホストを形質転換した。蛋白質を発現させ精製した。この事例では、発現ベクターによって利用された終止コドンは挿入物の下流にあり、したがって発現された蛋白質は、クローニング部位の 5' 末端の追加核酸のために挿入物の予想サイズよりも大きい。ポリペプチド R 2 のアミノ酸配列は配列番号 1 に示されている。

20

【 0 1 5 2 】

ポリペプチド R 1 :

同様な方法を用いて、C b p A の N - 末端領域内の最初の繰り返し領域のみ (すなわちポリペプチド R 1 の A 領域) を発現させた。2つのアミノリピートの間の天然に存在する X m n I 部位 (4 型配列の核酸 8 5 6) を用いた。C b p A 完全長クローン P M I 5 8 0 を X m n I および A a t I I で消化した。ベクター p Q E 3 0 を A a t I I および S m a I で消化した。もう一度この 2つのサイズのフラグメントを連結して大腸菌を形質転換し、挿入物についてクローンをスクリーニングした。1つの陽性クローンを選別し、リコンビナント蛋白質を当該菌株から精製した。

30

全てのポリペプチドを発現させ、キア (Qia) 発現システム (Qiagen) で大腸菌および p Q E 3 0 ベクターを用いて精製した。抗ヒスチジン抗体および蛋白特異抗体の両方を用い H i s 貼付蛋白質のアミノ末端がホストおよびウェスタン分析によって検出される。

【 0 1 5 3 】

R 1 および R 2 の精製 :

リコンビナント蛋白質の大腸菌からの産生を誘発し精製するために、単一コロニーをリコンビナントプラスミドを含む平板培養細菌から選別し、5 0 μ g / m l のカナマイシンおよび 1 0 0 μ g / m l のアンピシリンを含む 6 m l の L B 緩衝液中で 3 7 °C で一晩増殖させた。この 6 . 0 m l の培養液を上記の濃度の抗生物質を含む 1 L の L B に加えた。培養を 3 7 °C で A₆₀₀ = 0 . 4 0 0 まで震盪した。1 M の 1 P T G を 1 L の培養に最終濃度 1 m M で加えた。続いて培養を 3 7 °C で 3 - 4 時間震盪した。1 L の培養をモデル J - 6 B 遠心器で 4 0 0 0 r p m で 1 5 分回転させた。上清を捨てペレットを - 2 0 °C に保存した。

40

【 0 1 5 4 】

1 L のペレットを 2 5 m l の 5 0 m M の N a H₂P O₄、1 0 m M トリス、6 M G u C l、3 0 0 m M N a C l、p H 8 . 0 (緩衝液 A) に再懸濁させた。この混合物を室温で 3 0 分遠心し、ピラセルソニケーター (VibraCell Sonicator) (Sonics and Materials, Inc., Danbury, CT) でマイクロチップを用いて 2 回 3 0 秒間 5 0 % キューティサイクル (Cu

50

ty Cycle) でアウトプット設定 7 で超音波処理した。混合物を 5 分、10 K で JA 20 ローターで遠心し、上清を除去し廃棄した。上清をグラディフラク (GradiFrac) システム (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) に結合させた 10 ml のタロン (Talon) (Clonetechnology, Palo Alto, CA) 樹脂カラムにロードした。このカラムを 100 ml の緩衝液 A で平衡させ、さらに 200 ml のこの緩衝液で洗浄した。最終目標緩衝液として 100% の 50 mM NaH₂PO₄、8 M ウレア、20 mM の MES、pH 6.0 (緩衝液) を用いて容積基準 pH 勾配を総容積 100 ml で流した。約 30% 緩衝液 B 溶出ピークで溶出した蛋白質を集めて一緒にした。

【0155】

再折り畳みのために、2 L の PBS で室温で約 3 時間、14000 の分子量カットオフの透析チューブを用いて透析を実施した。続いてサンプルを 2 L の PBS で 4 で一晩透析した。セントリプレップ (Centriprep) - 30 スピンカラムによる蛋白質濃縮中に回転減速および再回転時に PBS を添加することによって追加の緩衝液交換を実施した。蛋白質濃度を BCA 蛋白質アッセイで決定し、さらに純度はクマシー染色 4 - 20% SDS-PAGE ゲルを用いて可視化した (図 3)。

【0156】

実施例 2 : ポリペプチド R1 および R2 のレクチン活性

LNnt は真核細胞上に存在する肺炎球菌のためのレセプターの炭水化物類似体である。Cbpa 欠損肺炎球菌変異体は真核細胞または固定した糖のどちらにも付着することができず、Cbpa は付着リガンドであることが示された。Cbpa はモジュール蛋白質で以下の 2 つの領域に分割される : N - 末端の機能性ドメインおよび C - 末端コリン結合ドメイン (図 1)。完全な Cbpa の活性が固有の N - 末端 (R2 によってモデル化) またはそのフラグメント (R1 によってモデル化) に局在しているか否かを決定するために、ポリペプチド R1 および R2 を生物学的活性について分析した。コリン結合ドメイン (CBD) の非存在下で N - 末端ドメインだけ (R2) がレクチン結合生物学的活性をもつのかを調べた。これは完全長 Cbpa およびポリペプチド R2 (プロリン富裕領域の PvuII 部位を越える CBD 領域を失った切端形) を用いて調べた。

【0157】

アッセイでは、Cbpa によって認識されることが知られている以下の糖共役物で組織培養穴 (ウェル) で被覆した : LNnt - アルブミン、3'シアルルクトース - アルブミンおよび陰性コントロールアルブミン。続いてプレートをアルブミンで封鎖し洗浄し、完全長 Cbpa ポリペプチド R2 またはポリペプチド R1 のどちらかを 15 分加え (0.8 μg/ml)、続いて洗浄せずにフルオレセイン標識 R6 肺炎球菌を 30 分加え、洗浄して付着細菌を目でみて数えた。

【0158】

ペプチドを添加していない場合の R6 の炭水化物との結合は陽性コントロールで、これを 100% とした (表 1)。3 つの別々の実験で、Cbpa 完全長またはポリペプチド R2 は、肺炎球菌と表面に被覆した LNnt との結合を競合的に抑制した。Cbpa 完全長はコントロールの 71.64% および 63% を抑制し、ポリペプチド R2 はコントロールの 65%、53% および 74% を抑制した。Cbpa および R2 の同等な活性は、コリン結合ドメインは Cbpa の LNnt レクチン活性に必要ではなく、さらに R2 は LNnt レクチンの候補物質であることを示している。

【0159】

LNnt との結合と対照的に、肺炎球菌の 3'シアルルクトースへの結合は、完全長 Cbpa (74% および 66%) と比較して R2 によって抑制されなかった (79% および 101%)。これは、CBD が除かれたときシアリン酸認識活性は失われることを示している。対照的に、R1 はシアリン酸の認識で活性を有するよう思われ、この特性は Cbpa と共有されるが、明らかに R2 で隠蔽されている。このことは、ポリペプチドの機能的ドメインへの折り畳みはポリペプチドの組成および長さによって影響を受けることを示している。わずかな配列の変化が他の株で発見された (図 2 参照)。R1 と R2 との間で

10

20

30

40

50

高い相同性が与えられる場合、R1およびR2の両方がレクチン活性に必要とされるか、またはそれらは両方ともわずかに異なる特性をもつレクチン（ \pm シアリン酸）であるということがさらに可能である。

【0160】

表1 精製糖共役物とR6肺炎球菌との結合のCbpa可溶形による抑制

	LNnT	LNnT	3' シアリルラクトース	3' シアリルラクトース	
Cbpa形	肺炎球菌数/単層培養 (SD)	%コントロール	肺炎球菌数/単層培養	%コントロール/ウェル	10
ペプチドなし	3282 2421 (489) 2210 (350)	100%	2611 2115 (125)	100%	
完全長Cbpa	2075 1740 (167) 1415 (50)	63, 71, 64	1933 1405 (240)	74 66	20
ポリペプチドR2	2461 1288 (672) 1440 (530)	74, 53, 65	2639 1670 (420)	101 79	
ポリペプチドR1	3002 2245 (182) 2500 (310)	91, 92, 112	1052 1445 (526)	40 68	30

N = 3 LNnt実験、各3ウェル

N = 2 シアリルラクトース実験、各3ウェル

【0161】

レクチン活性は細胞結合活性と相関する：

ヒト細胞は、炭水化物（糖蛋白質および糖脂質）を含む表面分子をもち、細菌は、非常に異なる蛋白質または脂質の骨組みにかかわらずこの炭水化物によってこれら糖共役物と結合する。したがって、*in vitro*でレクチン活性を有するポリペプチドをもつ細菌は、ヒトの細胞表面に付着することができる。*in vitro*レクチン活性と細胞結合作用との間の正比例関係は肺炎球菌について知られている。例えば、LNntは、TNF活性化A549ヒト肺細胞との肺炎球菌の結合を競合的に抑制し、*in vivo*で肺炎の進行を阻止する。Cbpa切端形のレクチン活性は細胞結合活性を反映するということを確認するために、Cbpaおよび切端形を肺炎球菌と肺細胞との結合の抑制についてテストした（表2）。完全長CbpaおよびポリペプチドR2は、肺炎球菌の肺細胞への付着をコントロールに対してそれぞれ58%および63%抑制した。ポリペプチドR1は有効ではなく、R2のLNNT結合活性が必要とするものを示唆し、肺炎球菌の肺細胞との結合を説明する。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 2 】

表 2

	A 5 4 9 肺	A 5 4 9 肺
C b p 形	肺炎球菌数／単層培養 (平均)	肺炎球菌数／単層培養
ペプチドなし	697,704,674 702,722 (700)	100%
完全長C b p A	376,431 (403)	58%
ポリペプチドR 2	517,693 314,342,350 (443)	63%
ポリペプチドR 1	696,642,552 (630)	90%

10

20

N = 2 各々 2 又は 3 ウェルの実験

【 0 1 6 3 】

L N n t レクチン活性は R 2 に依存する :

C b p A の N - 末端領域は、各々約 1 1 0 アミノ酸の 2 つの繰り返しを含んでいる (図 1 参照、ポリペプチド 2 内の領域 A および C) 。この 2 つのドメインの生物活性に対する相対的寄与を調べるために、ドメイン A のみを含む R 1 を R 2 および完全長 C b p A と比較した。付着アッセイでテストしたとき、ポリペプチド R 1 は L N n t への付着を全く抑制しなかった (野性型の 9 1 、 9 2 および 1 1 2 %) 。しかしながら、ポリペプチド R 1 はシアリルラクトースへの結合に関してはある程度の抑制を示した (コントロールの 6 8 および 4 0 %) 。これは、ポリペプチド R 2 は L N n t レクチン活性に必要で、R 2 は L N n t レクチンドメインの候補物質であることを示している。対照的に R 1 はシアリン酸の認識で活性を有するようである。

30

【 0 1 6 4 】

C b p A の N - 末端ドメインに対する抗体は細胞結合を阻止する :

C b p A の N - 末端ドメインが細胞と結合するならば、N - 末端ドメイン活性に関する干渉は、細胞または精製糖共役物と細菌の結合を防止または逆行させるであろう。そのような干渉メカニズムの 1 つは抗体である。

40

【 0 1 6 5 】

表 3 抗 C b p A R 2 抗体による L N n T 被覆表面への R 6 肺炎球菌の結合抑制

	肺炎球菌数／単層培養 (SD)	%コントロール (平均)
免疫前抗体	198 (64) 88 (4)	100%
切端形 R 2 に対する抗体	56 (11) 9 (2)	28% 10%

10

未希釈の $5 \mu\text{l}$ のウサギ抗体 + $5 \mu\text{l}$ の 2×10^7 R 6 x を室温で 30 分予備保温、続いて L N n t 被覆ウェルに加えて付着アッセイ。別個の 2 実験を示す。

【 0 1 6 6 】

C b p A (R 2) のリコンビナント N - 末端ドメインに対して作製した抗血清を肺炎球菌の L N n t への付着を阻止する能力についてテストした。ウサギのポリクローナル抗 C b p A 抗血清 ($5 \mu\text{l}$) + $5 \mu\text{l}$ の 2×10^7 標識細菌を室温で 30 分保温した。この混合物を固定 L N n t 上に 30 分重層し、続いて 3 回 P B S で洗浄して未結合細菌を除去した。プレートに結合した細菌を顕微鏡で数え、結果を平均値 + 6 ウェルの標準偏差として示す。表 3 に示した結果は、R 2 に対して作製した抗血清は肺炎球菌の L N n t への結合を阻止することを明示している。図 5 は、肺炎球菌 R 6 x の L N n t モデルレセプターへの結合抑制について免疫前と抗 C b p A R 2 抗体の定量曲線を示している。70% 以上の肺炎球菌の付着が、1 : 100 および 1 : 200 の希釈で抗 R 2 によって阻止された。さらに 1 : 400 の希釈では活性が失われるということはこの作用の特異性を示している。

20

【 0 1 6 7 】

表 3 および図 5 で示した抗血清を製造するために用いた C b p A は血清型 4 の C b p A であった。付着抑制アッセイで用いた肺炎球菌 R 6 x 株は血清型 2 に由来している。異種血清型の細菌の付着を阻止する抗体の能力は、活性型を越える交差防御活性を示している。そのような活性は効果的なワクチン免疫のために極めて望ましい。

30

【 0 1 6 8 】

C b p A の N - 末端の天然の構造に対する抗体の活性 :

C b p A は、Rosenow らが記載したように、その天然のホスト、肺炎球菌からコリンアフィニティーカラムで精製できる。また別には、ポリヒスチジンタグは、転写される蛋白質がいくつかのヒスチジン残基によって伸長されるように、当該遺伝子の末端の操作で付加できる。これらの残基は完全長ポリペプチドのニッケル親和性マトリックス精製を容易にし、この完全長ポリペプチドは、より短い切端形と異なり天然の三次元構造の保持に有利である。特に肺炎球菌だけでなく大腸菌または他のホスト細菌からこれら生化学的手段によって精製された C b p A は、その天然の三次元構造を保持する。免疫原として用いた場合、自然の状態で折り畳まれた C b p A は、折り畳みが異なる可能性がある切端形による免疫で誘発される抗体とは潜在的に異なる抗体を産生する。同様に、治療薬として用いられる C b p A は、付着を阻止するその能力が改善された切端形とは異なる三次元構造を有するであろう。これらを斟酌するならば、その天然の三次元構造で折り畳むことを可能にする完全長蛋白質として C b p A を生成し、続いて生化学的に C - 末端 (C B D) を切断するのが有利であろう。例えば、ヒドロキシルアミンによる処置は、コリン結合プロテイン A の血清型 R 6 x および血清型 4 のアミノ酸 475 位で C b p A を切断し、N - 末端および C - 末端を分離させるであろう。その結果 N - 末端フラグメントは治療薬または免疫原として適切である。

40

【 0 1 6 9 】

また別には、天然の C b p A は免疫原として用いることができ、活性な構造に対する抗血

50

清が得られる。この混合物中の生物活性を有する抗 N - 末端抗体は吸収により B D に対する抗体を除去することによって濃縮することができる。そのような抗体は $200 \mu\text{l}$ の血清を 1×10^8 の C b p A 不完全細菌と一緒に室温で 1 時間保温して調製した。この変異体のその他のコリン結合蛋白質は抗 C B D 抗体で吸収して除去し、遠心して細菌を除去することによって抗血清から除かれた。

吸収抗 C b p A 抗体の生物活性を明示させるために、L N n t モデルレセプターへの肺炎球菌の付着を阻止する吸収抗血清の能力を調べた。R 6 x 肺炎球菌を 1 : 600 の希釈の抗血清と保温し、L N n t アルブミンで被覆したウェルに添加した。

【 0 1 7 0 】

表 4 吸収抗 C b p A 抗血清は付着を阻害する

抗血清 (1 : 600)	肺炎球菌数 / ウェル ± S D (コントロールに対する%)
抗体なし	563 ± 11 (100%)
免疫前抗血清	479 ± 11 (85%)
抗 C b p A 抗血清	294 ± 72 (52%)
C B D 抗体を除去するために吸収した抗 C b p A 抗血清	175 ± 38 (31%)

【 0 1 7 1 】

これらの結果は、その天然の構造をもつ C b p / A の N - 末端ドメインに対する抗体は付着を強力に阻止することを示している。この活性は、図 5 の切端形の活性よりはるかに高い (後者は 1 : 600 の希釈で活性を示さなかった)。吸収抗 C b p A 抗血清のこの活性は、図 5 の力価測定実験でもまた明瞭に示された。肺炎球菌タイプ 4 の L N n t 被覆ウェルに対するベースライン付着は三角記号で示されている。肺炎球菌と未吸収 (四角記号) または吸収 (ダイヤ型記号) 抗血清との種々の希釈での予備保温によって、得られる付着が減少することが示された。両抗血清が同様な付着の減少を示すという事実は、C b p A に対する抗体の阻止活性の大半は N - 末端に存在することを示している (すなわち、吸収によるコリン結合ドメインに対する抗体の除去は生物活性を減少させない)。

【 0 1 7 2 】

実施例 3 : 抗 R 2 抗血清による受動防御 :

ウサギ免疫血清の作製 :

ポリペプチド R 2 (C b p A 切端形) および C b p A に対するウサギ免疫血清をコバンス (Covance) (Denver, PA) で作製した。免疫前血清を採集した後、ニュージーランド白色ウサギを、フロイントの完全アジュバント中の $250 \mu\text{g}$ の R 2 (両方のアミノ末端繰り返しを含む、上記の調製物 483 : 58) で免疫した。21 日目にフロイントの不完全アジュバント中の $125 \mu\text{g}$ の R 2 でウサギを追加免疫し 31 日目に採血した。第二のウサギは精製 C b p A で同様に免疫した。

【 0 1 7 3 】

マウスの受動防御 :

C 3 H / H e J マウス (5 匹 / 群) の腹腔に滅菌 P B S 中の (免疫前および 31 日目免疫血清) $100 \mu\text{l}$ の 1 : 2 希釈のウサギ抗 R 2 血清または免疫前血清を投与し受動免疫を施した。血清投与後 1 時間で、マウスを 1600 C F U の肺炎連鎖球菌血清型 6 B (S P 317 株) で攻撃した。マウスを 14 日間生存についてモニターした。ポリペプチド R 2 に対して作製したウサギ免疫血清で免疫したマウスの 80% が攻撃に対して生存した (図

4)。免疫前ウサギ血清で免疫したマウスは全て7日目までに死亡した。この結果は、C b p Aに特異的な抗体は全身的肺炎球菌感染に対して防御作用を有することを示している。さらにこの結果は、コリン結合領域は防御に不要であることを示している。なぜならば、防御のためには、切端蛋白質であるポリペプチドR 2（保存コリン結合繰り返しを欠く）に特異的な抗体で十分であるからである。さらに、C b p A血清型4に対して誘導された血清は血清型6 Bによる攻撃に対して防御作用を示した。

【0174】

実施例4：抗R 1抗血清による能動防御：

C 3 H / H e Jマウス（10匹/群）の腹腔にC b p A切端形蛋白質R 1（50 μ lのP B S中の15 μ g、および50 μ lのフロイントの完全アジュバント）を投与し受動免疫を施した。10匹のシャム免疫マウス群にはP B Sおよびアジュバントを投与した。第二の免疫は4週間後に、15 μ gの蛋白質をフロイントの不完全アジュバントとともに腹腔に投与して実施した（シャム免疫群はP B Sおよびフロイントの不完全アジュバント（I F A）を投与）。免疫反応の分析のために3、6、および9週目に血液を採取した（眼窩後方採血）。10匹のC b p A免疫マウスから9週目に集めた血清の抗C b p A切端形のE L I S A終末点力価は4096000であった。シャム免疫マウスから得た血清では抗体は検出されなかった。マウスを10週目に560 C F Uの肺炎連鎖球菌血清型6 B（S P S J 2 p株、P. Flynn（St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN）から提供）で攻撃した。マウスを14日間生存についてモニターした。C b p A切端形蛋白質R 1で免疫したマウスの80%が攻撃に対して生存した。全てのシャム免疫マウスは8日目までに死亡した（図7）。

【0175】

この結果は、C b p Aのリコンビナントフラグメントは、肺炎球菌の全身感染および致死に対して防御することができる特異的な抗体の産生を誘発することを示している。さらにこの結果は、免疫原は切端蛋白質R 1であるので、コリン結合領域は防御に不要であることを示している。さらにこの結果は、防御反応を誘発するためにはただ1回のアミノ末端繰り返しで十分であることを提唱している。リコンビナント肺炎球菌蛋白質が血清型4のD N A配列を基に作製され、血清型6 B単離株による攻撃に続いて防御が認められたので、交差防御もまた明らかである。

【0176】

実施例5：幼獣ラットの鼻咽頭コロニー形成の予防：

C b p AのN - 末端ドメインは、in vitroで肺炎球菌の付着を競合的に抑制した。この活性を有するペプチドの治療的有用性を明らかにするために、幼獣ラットに切端形ペプチドを投与し、続いて肺炎球菌で攻撃して鼻咽頭のコロニー形成を調べた。

0.8 μ gのポリペプチドR 2またはR 1を含む10 μ lのP B S、または蛋白質を含まない10 μ lのP B Sをラットに経鼻的に投与した。15分後に、3型肺炎球菌（S I I I株）（ 1×10^5 c f e rを含む10 μ l）を経鼻的に導入した。競合的に肺炎球菌の付着およびコロニー形成を抑制するポリペプチドの能力を決定するために、鼻洗浄を72時間を実施し、各群につき4匹の動物の各々について回収肺炎球菌数を定量した。S I I Iのみを与えられたラットは10 μ lにつき2200、6500、6900および8700（平均6075）コロニーを示した。切端形R 2で処理した動物は、最大の減少（3600、3500、2500、2100）を示し、平均は10 μ lにつき2925の細菌（コントロールの48%）であった。切端形R 1で処置した動物もまたコロニー形成の減少を示し（5000、4800、3500、1600）、平均は3725（コントロールの61%）であった。

この実験は、動物の治療実験デザインにおける本発明のペプチドの動物への投与で、その後の肺炎球菌の攻撃から動物を防御することができることを示した。

【0177】

考察：

これらの実験が示すように、ポリペプチドR 2は：1）ワクチン抗原として投与されると

き、防御抗体を誘発し、ワクチン製剤として好ましい組成であり；2)ペプチドとして気道および/または鼻咽頭レセプターに輸送されるとき、肺炎球菌の付着を競合的に防止し、コロニー形成および侵襲性症状に対して予防薬および治療薬として好ましい組成物である。さらにまた、CbpA切端形は、CBDのないレクチンとして機能する。2つの炭水化物が認識される：図1の両方のN-末端繰り返し(AおよびC)を含むペプチドによってLNntが、さらに最もN-末端側のN-末端のただ1つの繰り返しのみ(A)を含むペプチドによってシアリン酸が認識される。N-末端繰り返しポリペプチドR1およびR2を含む切端形は細胞培養アッセイで同様にレクチン活性を示す。

【0178】

ポリペプチドR2活性の重要な特性には以下が含まれる：1)精製糖共役物レセプター類似体、肺細胞および動物モデルの認識についてポリペプチドR2および完全長CbpAの生物活性の完全な相関関係。相関関係はまた、それらに対する抗体についても明らかである。2)4型由来菌および他の血清型(例えば6Bおよび2)を用いたin vitroアッセイの菌との間の交差防御。これは有用なワクチン、予防薬および治療薬には重要なことである。

10

【0179】

本発明は詳細に説明され、さらに種々の具体的な材料、方法および実施例を参考に詳述してきたが、本発明は特定の材料、材料の組合せ、およびその目的のために選択された方法に限定されないことは理解されよう。当業者には理解されるところであるが、多数の変型が暗示されている。同様に本発明の開示に関して本明細書に引用した一切の文献は参照により本明細書に含まれる。

20

【0180】

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、コリン結合プロテインA(CbpA)、リコンビナント切端形R1(図2に示すCbpAのN-末端の約アミノ酸16からアミノ酸321)、およびR2(図2に示すCbpAのN-末端の約アミノ酸16からアミノ酸444)を模式的に示している。ドメインAは、図2に示すCbpAアミノ酸配列のN-末端の約アミノ酸153からアミノ酸321である。ドメインBは、図2に示すCbpAアミノ酸配列のN-末端の約アミノ酸270からアミノ酸326である。Cは、図2に示すCbpAアミノ酸配列のN-末端の約アミノ酸327からアミノ酸433である。

30

【図2】 図2A-Bは、CbpAのN-末端領域の核酸およびアミノ酸配列の多様な血清型における相同性の比較である。

【図3】 図3は、リコンビナントR1およびR2の発現および精製を示す。

【図4】 図4は、マウスでの受動的防御の結果である。リコンビナントR2に対する免疫血清は肺炎連鎖球菌による致死性攻撃からマウスを防御した。

【図5】 図5は、LNnT-HSA被覆プレートへのR6x付着に対する抗R2抗体の力価測定を示す。

【図6】 図6は、LNnT-HSA被覆プレートへの肺炎球菌吸着を阻止する活性について抗CbpA抗体および吸収抗CbpA抗体の力価を測定したものである。

【図7】 図7は、マウスでの能動的防御の結果を示す。リコンビナントR1に対する免疫血清は肺炎連鎖球菌による致死性攻撃からマウスを防御した(攻撃は血清型6Bで560cfu)。

40

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Tuomanen, Elaine I.
 Wizemann, Theresa
 Masure, H. R.
 Johnson, Leslie S.
 Koenig, Scott

<120> POLYPEPTIDE COMPRISING THE AMINO ACID OF AN N-TERMINAL
 CHOLINE BINDING PROTEIN A TRUNCATE, VACCINE DERIVED
 THEREFROM AND USES THEREOF

10

<130> 1340-1-017 msc

<140> 09/056,019

<141> 1998-04-07

20

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

30

<400> 1

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

1

5

10

15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

10

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

20

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

115 120 125

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

130 135 140

30

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

145 150 155 160

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

	165		170		175	
Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu						
	180		185		190	
Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys						
	195		200		205	
Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu						10
	210		215		220	
Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg						
	225		230		235	240
Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg						
	245		250		255	20
Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala						
	260		265		270	
Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser						
	275		280		285	
Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu						
	290		295		300	30
Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr						
	305		310		315	320

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp
 325 330 335

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

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

10

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

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

Val Lys Glu Lys Pro Ala
 405

20

<210> 2

<211> 655

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

30

<400> 2

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn
 1 5 10 15

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

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

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

10

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

20

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

275 280 285

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

290 295 300

30

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

10

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

20

Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala

435 440 445

Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro

450 455 460

30

Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr Pro Lys Thr Gly Trp Lys

465 470 475 480

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

	485		490		495	
Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ser Asn						
	500		505		510	
Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr						
	515		520		525	
Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly						10
	530		535		540	
Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu						
545		550		555		560
Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala						
	565		570		575	20
Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn						
	580		585		590	
Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr						
	595		600		605	
Leu Glu Ala Ser Gly Ala Met Lys Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser						30
	610		615		620	
Asp Lys Trp Tyr Tyr Val Asn Gly Ser Gly Ala Leu Ala Val Asn Thr						
625		630		635		640

Thr Val Asp Gly Tyr Gly Val Asn Ala Asn Gly Glu Trp Val Asn
 645 650 655

<210> 3

<211> 284

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

10

<400> 3

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn
 1 5 10 15

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

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

20

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

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

30

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

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

100	105	110	
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp			
115	120	125	
Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu			
130	135	140	
Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys			10
145	150	155	160
Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu			
165	170	175	
Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu			20
180	185	190	
Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys			
195	200	205	
Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu			
210	215	220	
Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg			30
225	230	235	240
Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg			
245	250	255	

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

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

<210> 4

10

<211> 106

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

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

20

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

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

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

30

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

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

85 90 95

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

<210> 5

<211> 109

10

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 5

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

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

20

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

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

30

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

Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg
85 90 95

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

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

10

<400> 6

Lys Xaa Xaa Glu

1

<210> 7

<211> 376

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

20

<400> 7

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

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

30

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

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

10

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

20

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

145 150 155 160

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

165 170 175

30

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

180 185 190

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

195	200	205	
Glu Ala Asn Val Ala Thr Ser Asp Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala			
210	215	220	
Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn			
225	230	235	10
Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser			
245	250	255	
Ser Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val			
260	265	270	
Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg			
275	280	285	20
Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu			
290	295	300	
Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu			
305	310	315	320
Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys			
325	330	335	30
Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr			
340	345	350	

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

Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala
 370 375

<210> 8

10

<211> 663

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 8

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

20

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

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

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

30

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

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

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

10

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

20

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

340 345 350

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

355 360 365

30

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro

420 425 430

Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr Pro Lys Thr Gly Trp Lys

435 440 445

10

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

20

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

500 505 510

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

515 520 525

30

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

 565 570 575

Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly

 580 585 590

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

 595 600 605

Lys Asp Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Glu Ala Ser Gly Ala Met Lys

 610 615 620

Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser Asp Lys Trp Tyr Tyr Val Asn Gly

625 630 635 640

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

 645 650 655

Ala Asn Gly Glu Trp Val Asn

 660

<210> 9

<211> 254

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

10

20

30

<400> 9

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

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

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

10

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

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

20

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

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

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

30

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

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

145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 10

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

10

20

30

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

10

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala

100

105

20

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

30

<400> 11

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

10

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala

100

105

20

<210> 12

<211> 1219

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

30

<400> 12

gagaacgagg gagctaccca agtaccact tcttctaata gggcaaatga aagtcaggca 60

gaacaaggag aacaacctaa aaaactcgat tcagaacgag ataaggcaag gaaagaggtc 120

gaggaatgat taaaaaaaaat agtgggtgag agctatgcaa aatcaactaa aaagcgacat 180

acaattactg tagctctagt taacgagttg aacaacatta agaacgagta tttgaataaa 240

atagttgaat caacctcaga aagccaacta cagatactga tgatggagag tcgatcaaaa 300
 gtgatgaag ctgtgtctaa gtttgaaaag gactcatctt ctctgtcaag ttcagactct 360
 tccactaaac cggaagcttc agatacagcg aagccaaaca agccgacaga accaggagaa 420
 aaggtagcag aagctaagaa gaaggttgaa gaagctgaga aaaaagccaa ggatcaaaaa 480
 gaagaagatc gtcgtaacta cccaaccatt acttacaaaa cgcttgaact tgaattgct 540
 gagtccgatg tggaagttaa aaaagcggag cttgaactag taaaagttaa agctaacgaa 600
 cctcgagacg agcaaaaaat taagcaagca gaagcggag ttgagagtaa acaagctgag 660
 gctacaaggt taaaaaaat caagacagat cgtgaagaag cagaagaaga agctaacga 720
 agagcagatg ctaaagagca aggtaaacca aagggcgagg caaacgagg agttcctgga 780
 gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaat gatgcgaagt ctccagattc tagcgtaggt 840
 gaagaaactc ttccaagccc atccctgaaa ccagaaaaaa aggtagcaga agctgagaag 900
 aaggttgaag aagctaagaa aaaagccgag gatcaaaaag aagaagatcg ccgtaactac 960
 ccaaccaata cttacaaaac gtttgaactt gaaattgctg agtccgatgt ggaagttaa 1020
 aaagcggagc ttgaactagt aaaagaggaa gctaaggaac ctcgaaacga ggaaaaagtt 1080
 aagcaagcaa aagcggaggt tgagagtaaa aaagctgagg ctacaagggt agaaaaatc 1140
 aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa gctaaacgaa aagcagcaga agaagataaa 1200
 gttaaagaaa aaccagctg 1219

10

20

<210> 13

<211> 1969

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 13

gagaacgagg gagctacca agtaccact ttttctaata gggcaaatga aagtcaggca 60
 gaacaaggag aacaacctaa aaaactcgat tcagaacgag ataaggcaag gaaagaggtc 120
 gaggaatatg taaaaaaat agtgggtgag agctatgcaa aatcaactaa aaagcgacat 180
 acaattactg tagctctagt taacgagttg aacaacatta agaacgagta tttgaataaa 240
 atagttgaat caacctcaga aagccaacta cagatactga tgatggagag tcgatcaaaa 300

30

gtagatgaag ctgtgtctaa gtttgaaaag gactcatcct cttcgtcaag ttcagactct 360
 tccactaaac cggaagcttc agatacagcg aagccaaaca agccgacaga accaggagaa 420
 aaggtagcag aagctaagaa gaaggttgaa gaagctgaga aaaaagccaa ggatcaaaaa 480
 gaagaagatc gtcgtaacta cccaaccatt acttacaaaa cgcttgaact tgaattgct 540
 gagtccgatg tggaaagtaa aaaagcggag cttgaactag taaaagttaa agctaacgaa 600
 cctcgagacg agcaaaaaat taagcaagca gaagcgggaag ttgagagtaa acaagctgag 660
 gctacaaggt taaaaaaaaat caagacagat cgtgaagaag cagaagaaga agctaaacga 720
 agagcagatg ctaaagagca aggtaaacca aagggcggg caaacgagg agttcctgga 780
 gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaat gatgccaagt cttcagattc tagcgtaggt 840
 gaagaaactc ttccaagccc atccctgaaa ccagaaaaaa aggtagcaga agctgagaag 900
 aaggttgaag aagctaagaa aaaagccgag gatcaaaaag aagaagatcg ccgtaactac 960
 ccaaccaata cttacaaaac gcttgaactt gaaattgctg agtccgatgt ggaagttaa 1020
 aaagcggagg cttgaactag taaaagagga agctaaggaa cctcgaaacg aggaaaaagt 1080
 taagcaagca aaagcgggaag ttgagagtaa aaaagctgag gctacaaggt tagaaaaaat 1140
 caagacagat cgtaaaaaag cagaagaaga agctaacgaa aaagcagcag aagaagataa 1200
 agttaaagaa aaaccagctg aacaaccaca accagcgcg gctccaaaag cagaaaaacc 1260
 agtccagct ccaaaaccag agaatccagc tgaacaacca aaagcagaaa aaccagctga 1320
 tcaacaagct gaagaagact atgctcgtag atcagaagaa gaatataatc gcttgactca 1380
 acagcaaccg caaaaaactg aaaaaccagc acaaccatct actccaaaaa caggctgga 1440
 acaagaaaac ggtatgtggt acttctacaa tactgatggt tcaatggcga caggatggct 1500
 caaaaacaat ggctcatggt actacctcaa cagcaatggc gctatggcga caggatggct 1560
 caaaaacaat ggttcatggt actatctaaa cgctaaggt tcaatggcaa caggatggct 1620
 caaaaacaat ggttcatggt actacctaaa cgctaaggt tcaatggcga caggatggct 1680
 ccaatacaat ggctcatggt actacctaaa cgctaaggt tcaatggcga caggatggct 1740
 ccaatacaat ggctcatggt actacctaaa cgctaaggt gatatggcga caggatgggt 1800
 gaaagatgga gatacctggt actatcttga agcatcaggt gctatgaaag caagccaatg 1860
 gttcaaagta tcagataaat ggtactatgt caatggctca ggtgcccttg cagtcaacac 1920
 aactgtagat ggctatggag tcaatgccaa tggatgaatgg gtaactaa 1969

10

20

30

<210> 14

<211> 853

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 14

gagaacgagg gagctaccca agtaccact tcttctaata gggcaaatga aagtcaggca 60
gaacaaggag aacaacctaa aaaactcgat tcagaacgag ataaggcaag gaaagaggtc 120
gaggaatatg taaaaaaaaat agtgggtgag agctatgcaa aatcaactaa aaagcgacat 180
acaattactg tagctctagt taacgagttg aacaacatta agaacgagta tttgaataaa 240
atagttgaat caacctcaga aagccaacta cagatactga tgatggagag tcgatcaaaa 300
gtagatgaag ctgtgtctaa gtttgaaaag gactcatctt cttcgtcaag ttcagactct 360
tccactaaac cgggaagcttc agatacagcg aagccaaaca agccgacaga accaggagaa 420
aaggtagcag aagctaagaa gaaggttgaa gaagctgaga aaaaagccaa ggatcaaaaa 480
gaagaagatc gtcgtaacta cccaaccatt acttcaaaaa cgcttgaact tgaaattgct 540
gagtccgatg tggaagttaa aaaagcggag cttgaactag taaaagttaa agctaacgaa 600
cctcgagacg agcaaaaaat taagcaagca gaagcgggaag ttgagagtaa acaagctgag 660
gctacaaggt taaaaaaaaat caagacagat cgtgaagaag cagaagaaga agctaaacga 720
agagcagatg ctaaagagca aggtaaacca aagggcggg caaaacgagg agttcctgga 780
gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaat gatgcgaagt cttcagattc tagcgtaggt 840
gaagaaactc ttc 853

10

20

<210> 15

<211> 318

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 15

aaaccagaaa aaaaggtagc agaagctgag aagaaggttg aagaagctaa gaaaaagcc 60

30

gaggatcaaa aagaagaaga tcgccgtaac tacccaacca atacttacia aacgcttgaa 120
 cttgaaattg ctgagtcoga tgtggaagtt aaaaaagcgg agcttgaact agtaaaagag 180
 gaagctaag aacctcgaaa cgaggaaaaa gttaagcaag caaaagcggg agttgagagt 240
 aaaaaagctg aggctacaag gttagaaaaa atcaagacag atcgtaaaaa agcagaagaa 300
 gaagctaac gaaaagca 318

<210> 16

<211> 327

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

10

<400> 16

acagaaccag gagaaaaggt agcagaagct aagaagaagg ttgaagaagc tgagaaaaaa 60
 gccaaaggatc aaaaagaaga agatcgtcgt aactacccaa ccattactta caaaacgctt 120
 gaacttgaaa ttgctgagtc cgatgtggaa gttaaaaaag cggagcttga actagtaaaa 180
 gtgaaagcta acgaacctcg agacgagcaa aaaattaagc aagcagaagc ggaagttgag 240
 agtaaacaag ctgaggctac aaggttaaaa aaaatcaaga cagatcgtga agaagcagaa 300
 gaagaagcta aacgaagagc agatgct 327

20

<210> 17

<211> 1129

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

30

<400> 17

gaaaacgaag gaagtacca agcagccact tcttctaata tggcaaagac agaacatagg 60
 aaagctgcta aacaagtcgt cgatgaatat atagaaaaaa tggtgagggg gattcaacta 120
 gatagaagaa aacataccca aaatgtcgcc ttaaacataa agttgagcgc aattaaaacg 180
 aagtatttgc gtgaattaaa tgttttagaa gagaagtcga aagatgagtt gccgtcagaa 240

ataaaagcaa agttagacgc agcttttgag aagtttaaaa aagatacatt gaaaccagga 300
 gaaaaggtag cagaagctaa gaagaagggt gaagaagcta agaaaaaagc cgaggatcaa 360
 aaagaagaag atcgtcgtaa ctaccaacc aatacttaca aaacgcttga acttgaaatt 420
 gctgagttcg atgtgaaagt taaagaagcg gagcttgaac tagtaaaaga ggaagctaaa 480
 gaatctcgaa acgagggcac aattaagcaa gcaaaagaga aagttgagag taaaaaagct 540
 gaggctacaa ggtagaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa 600
 cgaaaagcag atgctaagtt gaaggaagct aatgtagcga cttcagatca aggtaaacca 660
 aaggggctgg caaaacgagg agttcctgga gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaat 720
 gatgccaagt cttcagattc tagcgtaggt gaagaaactc ttccaagctc atccctgaaa 780
 tcaggaaaaa aggtagcaga agctgagaag aaggttgaag aagctgagaa aaaagccaag 840
 gatcaaaaag aagaagatcg ccgtaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgacctt 900
 gaaattgctg agtccgatgt gaaagttaaa gaagcggagc ttgaaactagt aaaagaggaa 960
 gctaaggaac ctcgagacga ggaaaaaatt aagcaagcaa aagcgaaggt tgagagttaa 1020
 aaagctgagg ctacaagggt agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa 1080
 gctaaacgaa aagcagcaga agaagataaa gttaaagaaa aaccagctg 1129

10

<210> 18

<211> 1992

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

20

<400> 18

gaaaacgaag gaagtaccca agcagccact tcttctaata tggcaaagac agaacatagg 60
 aaagctgcta aacaagtctg cgatgaatat atagaaaaaa tgttgaggga gattcaacta 120
 gatagaagaa aacataccca aaatgtcgcc ttaaacataa agttgagcgc aattaaaacg 180
 aagtatttgc gtgaattaaa tgttttagaa gagaagtcga aagatgagtt gccgtcagaa 240
 ataaaagcaa agttagacgc agcttttgag aagtttaaaa aagatacatt gaaaccagga 300
 gaaaaggtag cagaagctaa gaagaagggt gaagaagcta agaaaaaagc cgaggatcaa 360
 aaagaagaag atcgtcgtaa ctaccaacc aatacttaca aaacgcttga acttgaaatt 420

30

gctgagttcg atgtgaaagt taaagaagcg gagcttgaac tagtaaaaga ggaagctaaa 480
gaatctcgaa acgagggcac aattaagcaa gcaaaagaga aagttgagag taaaaaagct 540
gaggctacaa ggtagaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa 600
cghaaagcag atgctaagtt gaaggaagct aatgtagcga cttcagatca aggtaaacca 660
aaggggaggc caaaacgagg agttcctgga gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaat 720
gatgcgaagt cttcagattc tagcgtaggt gaagaaactc ttccaagctc atccctgaaa 780
tcaggaaaaa aggtagcaga agctgagaag aaggttgaag aagctgagaa aaaagccaag 840
gatcaaaaag aagaagatcg ccgtaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgacctt 900
gaaattgctg agtccgatgt gaaagttaaa gaagcggagc ttgaaactagt aaaagaggaa 960
gctaaggaac ctcgagacga ggaaaaaatt aagcaagcaa aagcgaaggt tgagagtaaa 1020
aaagctgagg ctacaagggt agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa 1080
gctaaacgaa aagcagcaga agaagataaa gttaaagaaa aaccagctga acaaccacaa 1140
ccagcgccgg ctactcaacc agaaaaacca gctccaaaac cagagaagcc agctgaacaa 1200
ccaaaagcag aaaaaacaga tgatcaacaa gctgaagaag actatgctcg tagatcagaa 1260
gaagaatata atcgcttgac tcaacagcaa ccgcaaaaaa ctgaaaaacc agcacaacca 1320
tctactcaa aaacaggctg gaaacaagaa aacgggtatgt ggtacttcta caatactgat 1380
ggttcaatgg caacaggatg gctccaaaac aacggttcat ggtactatct aaacgctaata 1440
ggtgctatgg cgacaggatg gctccaaaac aatggttcat ggtactatct aaacgctaata 1500
ggttcaatgg caacaggatg gctccaaaac aatggttcat ggtactacct aaacgctaata 1560
ggtgctatgg cgacaggatg gctccaatac aatggttcat ggtactacct aaacgctaata 1620
ggcgctatgg cgacaggatg gctccaatac aatggttcat ggtactacct caacgctaata 1680
ggtgatatgg cgacaggatg gctccaaaac aacggttcat ggtactacct caacgctaata 1740
ggtgatatgg cgacaggatg gctccaatac aacggttcat ggtactacct caacgctaata 1800
ggtgatatgg cgacagggtt ggtgaaagat ggagataacct ggtactatct tgaagcatca 1860
ggtgctatga aagcaagcca atggttcaaa gtatcagata aatggtacta tgtcaatggc 1920
tcaggtgcc ttgcagtcaa cacaactgta gatggctatg ggtcaatgc caatggtgaa 1980
tgggtaaaact aa 1992

10

20

30

<211> 763

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 19

gaaaacgaag gaagtaccca agcagccact tcttctaata tggcaaagac agaacatagg 60
 aaagctgcta aacaagtcgt cgatgaatat atagaaaaaa tgttgaggga gattcaacta 120
 gatagaagaa aacataccca aaatgtcgcc ttaaacataa agttgagcgc aattaaaacg 180
 aagtatttgc gtgaattaaa tgtttttagaa gagaagtcga aagatgagtt gccgtcagaa 240
 ataaaagcaa agttagacgc agcttttgag aagtttaaaa aagatacatt gaaaccagga 300
 gaaaaggtag cagaagctaa gaagaagggt gaagaagcta agaaaaaagc cgaggatcaa 360
 aaagaagaag atcgtcgtaa ctacccaacc aatacttaca aaacgcttga acttgaaatt 420
 gctgagttcg atgtgaaagt taaagaagcg gagcttgaac tagtaaaaga ggaagctaaa 480
 gaatctcgaa acgagggcac aattaagcaa gcaaaagaga aagttgagag taaaaaagct 540
 gaggtacaa ggtagaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa 600
 cgaaaagcag atgctaagtt gaaggaagct aatgtagcga cttcagatca aggtaaacca 660
 aagggcgagg caaaacgagg agttcctgga gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaat 720
 gatgcgaagt cttcagattc tagcgtaggt gaagaaactc ttc 763

10

20

<210> 20

<211> 318

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 20

aaatcaggaa aaaaggtagc agaagctgag aagaaggttg aagaagctga gaaaaaagcc 60
 aaggatcaaa aagaagaaga tcgccgtaac tacccaacca atacttaca aacgcttgac 120
 cttgaaattg ctgagtcgga tgtgaaagtt aaagaagcgg agcttgaact agtaaaagag 180
 gaagctaagg aacctcgaga cgaggaaaaa attaagcaag caaaagcgaa agttgagagt 240

30

aaaaaagctg aggctacaag gttagaaaac atcaagacag atcgtaaaaa agcagaagaa 300
 gaagctaaac gaaaagca 318

<210> 21

<211> 321

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

10

<400> 21

ccaggagaaa aggtagcaga agctaagaag aaggttgaag aagctaagaa aaaagccgag 60
 gatcaaaaag aagaagatcg tcgtaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgaactt 120
 gaaattgctg agttcgatgt gaaagttaa gaagcggagc ttgaactagt aaaagaggaa 180
 gctaaagaat ctcgaaacga gggcacaatt aagcaagcaa aagagaaaagt tgagagtaaa 240
 aaagctgagg ctacaagggt agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa 300
 gctaaacgaa aagcagatgc t 321

20

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 22

Ser Pro Ser Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys
 1 5 10 15

30

Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg
 20 25 30

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

35 40 45
 Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu
 50 55 60

Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala
 65 70 75 80

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

Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu
 100 105 110

Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala
 115 120

<210> 23

<211> 122

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 23

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

Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp
 20 25 30

10

20

30

Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile
 35 40 45

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

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

10

Ala Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile
 85 90 95

Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala
 100 105 110

Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Arg Ala
 115 120

20

<210> 24

<211> 428

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

30

<400> 24

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn
 1 5 10 15

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

10

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

20

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

275 280 285

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

290 295 300

30

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

305 310 315 320

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

325 330 335
 Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys
 340 345 350

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

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

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

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

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

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 25

ggcggatcca tggaraayga rgg

23

10

20

30

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 26

gccgctcgact tagtttaccc attcaccatt ggc

33

10

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 27

Xaa Glu Asn Glu Gly

1

5

20

<210> 28

<211> 439

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 28

30

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu

50 55 60

Leu Thr Lys Leu Gly Val Ile Lys Thr Glu Tyr Leu His Gly Leu Ser

65 70 75 80

10

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

20

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

130 135 140

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

145 150 155 160

30

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

165 170 175

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

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

10

20

30

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

340

345

350

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

355

360

365

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

370

375

380

10

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

20

Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu

435

<210> 29

<211> 437

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

30

<400> 29

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

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

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

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

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

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

10

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

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

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

20

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

Ala Asp Gln Gln Ala
 435

30

<210> 30

<211> 439

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 30

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

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

30

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

290	295	300	
Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala			
305	310	315	320
Glu Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu			
	325	330	335
Glu Ala Lys Glu Ser Arg Asn Glu Glu Lys Val Asn Gln Ala Lys Ala			10
	340	345	350
Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys			
	355	360	365
Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu			
	370	375	380
			20
Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro			
385	390	395	400
Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala Pro			
	405	410	415
Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Thr			
	420	425	430
			30
Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu			
	435		

<210> 31

<211> 419

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 31

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

115	120	125	
Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile			
130	135	140	
Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val			
145	150	155	160
Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg			10
	165	170	175
Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Lys			
	180	185	190
Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Lys Ala			
	195	200	205
Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Val Asp Ala Lys Glu Gln Asp Glu Ser			
	210	215	220
Ser Lys Arg Arg Lys Ser Arg Val Lys Arg Gly Asp Val Gly Glu Gln			
	225	230	235
Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser			
	245	250	255
Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys Pro Gly Lys Lys			
	260	265	270
			30

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

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

10

Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asn Glu Glu

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

20

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

370

375

380

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

385

390

395

400

30

Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Asp

405

410

415

Gln Gln Ala

<210> 32

<311> 437

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 32

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

10

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

20

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

210

215

220

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

225

230

235

240

30

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

245

250

255

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

260

265

270

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

420

425

430

Asp Gln Gln Ala Glu

435

<210> 33

<211> 433

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

10

<400> 33

Cys Thr Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu

1

5

10

15

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

20

25

30

20

Glu Arg Arg Lys Ala Ala Glu Gln Phe Asp Glu Tyr Ile Asn Lys Met

35

40

45

Ile Gln Leu Asp Lys Arg Lys His Thr Gln Asn Leu Ala Phe Asn Ile

50

55

60

30

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

	245		250		255	
Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys						
	260		265		270	
Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Asp						
	275		280		285	
Lys Lys Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr						10
	290		295		300	
Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Lys						
	305		310		315	
Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser						
		325		330		335
						20
Arg Asn Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys						
	340		345		350	
Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys						
	355		360		365	
Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys						
	370		375		380	
						30
Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu						
	385		390		395	
						400

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

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

Glu

10

<210> 34

<211> 427

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 34

20

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

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

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

30

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

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

65		70		75		80	
Leu Lys Glu Lys Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Glu Val Lys Ala Lys							
		85		90		95	
Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys Leu Gly							
	100		105		110		
							10
Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys							
	115		120		125		
Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr							
	130		135		140		
Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys							
145		150		155		160	20
Lys Ala Glu Leu Glu Leu Leu Lys Glu Glu Ala Lys Thr Arg Asn Glu							
	165		170		175		
Asp Thr Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu							
	180		185		190		
Ala Thr Lys Leu Glu Glu Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu							
	195		200		205		30
Glu Ala Lys Arg Lys Ala Glu Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Asp Lys							
	210		215		220		

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

10

<210> 36

<211> 425

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 36

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

1

5

10

15

20

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

20

25

30

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

35

40

45

30

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

10

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

20

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

180 185 190

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

195 200 205

30

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

210 215 220

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

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

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

Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu
 420 425

10

<210> 37

<211> 439

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 37

20

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

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

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

30

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

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

65	70	75	80	
Leu Glu Glu Lys Ser Glu Ala Glu Leu Thr Ser Lys Thr Lys Glu Thr				
	85	90	95	
Lys Glu Glu Leu Thr Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu				
	100	105	110	
Ser Thr Glu Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu				10
	115	120	125	
Glu Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Lys Asp Arg Arg Asn				
	130	135	140	
Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser				
145	150	155	160	20
Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Val Lys Ala				
	165	170	175	
Asn Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Lys Val				
	180	185	190	
Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp				
	195	200	205	30
Arg Glu Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg				
	210	215	220	

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

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

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

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

10

Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu
 435

<210> 38

<211> 460

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

20

<400> 38

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

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

30

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

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

10

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

20

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

145 150 155 160

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

165 170 175

30

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

180 185 190

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

195 200 205

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

10

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

420

425

430

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

435

440

445

20

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

450

455

460

<210> 39

<211> 459

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

30

<400> 39

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

1

5

10

15

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

165

170

175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

10

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

20

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

420 425 430

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

435 440 445

30

Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu

450 455

【図1】

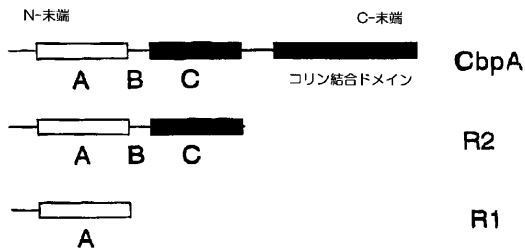


Figure 1

【図2A-1】

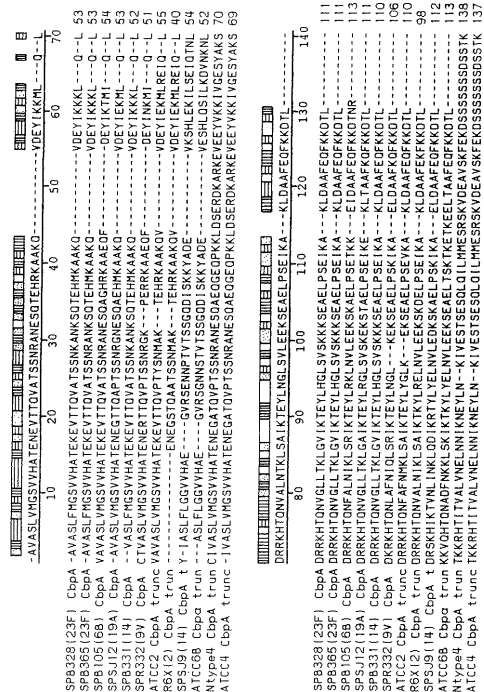
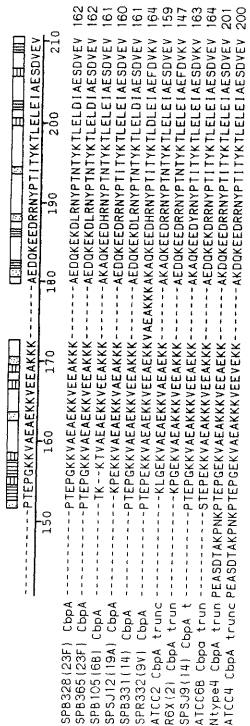


FIG. 2A-1

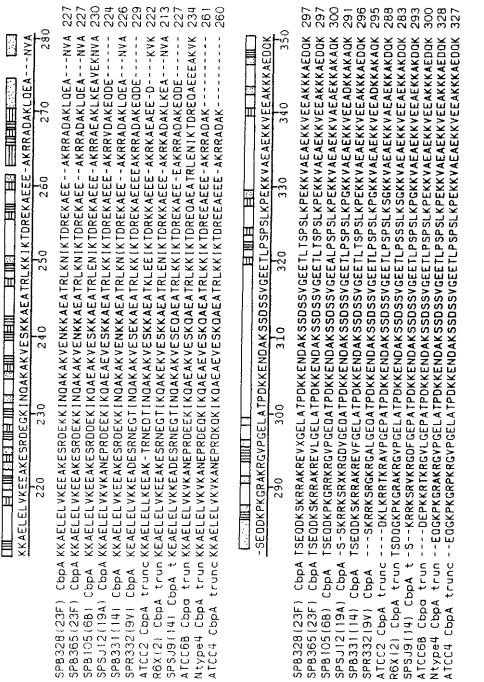
【図2A-2】

FIG. 2A-2



【図2B-1】

FIG. 2B-1



【 図 5 】

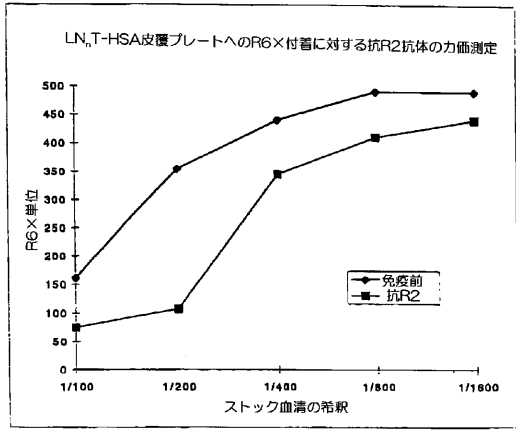


Figure 5

【 図 6 】

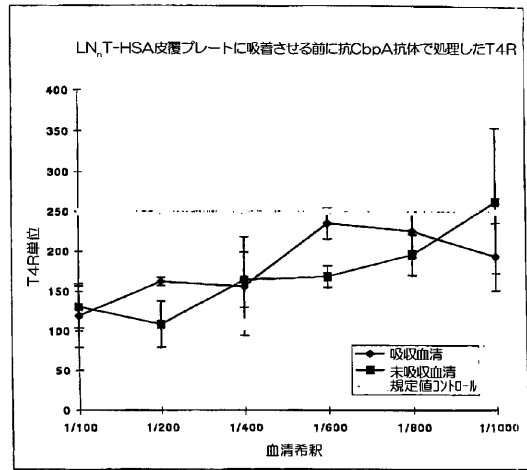


Figure 6

【 図 7 】

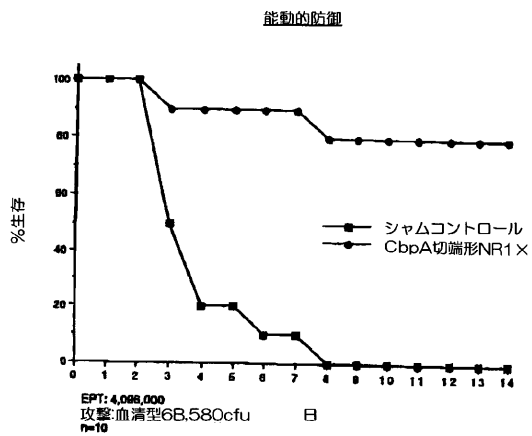


Figure 7

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/315 (2006.01) C 0 7 K 14/315
- (74)代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
- (74)代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
- (74)代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
- (74)代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100086771
 弁理士 西島 孝喜
- (74)代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
- (72)発明者 テュオマネン エレイン アイ
 アメリカ合衆国 テネシー州 3 8 1 3 9 ジャーマンタウン ドーヴ メドー コーヴ ウェス
 ト 9 6 0 0
- (72)発明者 マーシュア エイチ ロバート
 アメリカ合衆国 テネシー州 3 8 1 3 9 ジャーマンタウン ドーヴ メドー コーヴ ウェス
 ト 9 6 0 0
- (72)発明者 ワイズマン テレサ エム
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 8 ノース ポータマック ピーチ リーフ コート
 9
- (72)発明者 ジョンソン レスリー シドナー
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 4 ジャーマンタウン アムバサダー ドライヴ 1
 3 5 4 5
- (72)発明者 ケーニグ スコット
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 2 ロックヴィル ラルストン ロード 1 0 9 0 1

審査官 野村 英雄

- (56)参考文献 国際公開第97/041151(WO, A1)
 ROSENOW, C. et al., Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colon
 ization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. , MOL. MICROBIOL. , 1997年
 9月, Vol.25, No.5, p.819-829

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
 C07K 1/00-19/00
 UniProt/GeneSeq
 PubMed
 WPI