

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504056

(P2004-504056A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 11/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 31/04	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 97 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-513909 (P2002-513909)	(71) 出願人	503024457
(86) (22) 出願日	平成13年7月19日 (2001.7.19)		ハンサ メディカル アクチボラゲット
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月17日 (2003.1.17)		スウェーデン国、ルンド、エディソン パーク
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/008409	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開番号	W02002/008426		弁理士 浅村 皓
(87) 国際公開日	平成14年1月31日 (2002.1.31)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	0002728.4		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成12年7月20日 (2000.7.20)	(74) 代理人	100088926
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
		(72) 発明者	ビョルク、ラルス
			スウェーデン国 ルンド、マグレ ストラ
			キルコガタ 10
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、3型肺炎連鎖球菌に由来するタンパク質およびペプチドを提供するが、これらはすべて補体H因子 (fH) を結合する。これらのタンパク質およびペプチドは、本明細書で配列番号1として開示する配列のThr38~Lys149の部分配列との相同性が少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも70%である。上記の部分配列は、3型肺炎連鎖球菌から単離された表面タンパク質のアミノ末端に位置しており、fHの結合と深く関連している。他の態様では、本発明は、Hicタンパク質、すなわち配列番号1として開示するアミノ酸配列との相同性が少なくとも85%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%であるタンパク質およびペプチドに関する。本発明は、上記のタンパク質およびペプチドを含むワクチン組成物も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H 因子結合能を有する、予防または治療に使用するためのポリペプチドであって、
 (a) 配列番号 1 の T h r 3 8 ~ L y s 1 4 9 のアミノ酸配列、
 (b) H 因子を結合できる (a) の変異体、または
 (c) H 因子を結合できる、少なくともアミノ酸 2 0 個の長さの (a) もしくは (b) の断片、
 を含む上記ポリペプチド。

【請求項 2】

(a) 配列番号 1 の T h r 3 8 ~ L y s 1 4 9 のアミノ酸配列、
 (b) 肺炎連鎖球菌に対して免疫応答を生じる、または抗 H i c タンパク質抗体に結合することのできる (a) の変異体、あるいは
 (c) 肺炎連鎖球菌に対して免疫応答を生じる、または抗 H i c タンパク質抗体に結合することのできる、少なくともアミノ酸 6 個の長さの (a) もしくは (b) の断片、
 から選沢されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むワクチン組成物。

【請求項 3】

変異体 (b) の配列 (a) との配列同一性が、少なくとも 5 0 %、好ましくは少なくとも 6 0 %、最も好ましくは少なくとも 7 0 % である請求項 1 または請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列、または
 (b) (a) との配列同一性が少なくとも 8 5 %、好ましくは少なくとも 9 5 %、最も好ましくは少なくとも 9 9 % であるポリペプチド、
 を含む、アミノ酸 1 5 ~ 8 0 0 個の長さのポリペプチド。

【請求項 5】

ポリペプチドが、
 (i) 配列番号 4 のヌクレオチド・コード配列またはこれに相補的な配列、
 (i i) 前記配列 (i) と選択的にハイブリッド形成するヌクレオチド配列またはその断片、あるいは
 (i i i) (i) もしくは (i i) の前記配列にコードされているものと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
 を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項で定義したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 6】

配列番号 1 の配列の T h r 3 8 ~ L y s 1 4 9 の部分配列との相同性が少なくとも 5 0 %、好ましくは少なくとも 6 0 %、最も好ましくは少なくとも 7 0 % であるアミノ末端アミノ酸配列を含む、医療用の H 因子結合性タンパク質。

【請求項 7】

2 0 ~ 2 0 0 個のアミノ酸を含む、医療用の H 因子結合性ペプチドであって、配列番号 1 の配列の T h r 3 8 ~ L y s 1 4 9 の部分配列との相同性が少なくとも 5 0 %、好ましくは少なくとも 6 0 %、最も好ましくは少なくとも 7 0 % であるペプチド。

【請求項 8】

1 5 ~ 8 0 0 個のアミノ酸を含む、H i c タンパク質由来のポリペプチドであって、配列番号 1 のアミノ酸配列との相同性が少なくとも 8 5 %、好ましくは少なくとも 9 5 %、最も好ましくは 9 9 % であるポリペプチド。

【請求項 9】

医療用の請求項 4 または 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 0】

請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の H 因子結合性タンパク質またはペプチドをコードする核酸配列。

【請求項 1 1】

請求項 5 または 1 0 に記載のポリヌクレオチドを含む組換え型ベクター。

【請求項 1 2】

ベクターが発現ベクターであり、前記のポリヌクレオチドが制御配列に作動可能に結合している請求項 1 1 記載のベクター。

【請求項 1 3】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項 1 4】

請求項 1 ～ 4 および請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドを特異的に結合する単離された抗体、好ましくはモノクローナル抗体。

10

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 4 および請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドと共に薬剤として許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む薬剤組成物。

【請求項 1 6】

肺炎連鎖球菌感染に対するワクチン組成物を調製するための、請求項 1 ～ 4 または請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 1 7】

(a) 請求項 1 ～ 4 または請求項 6 ～ 8 に定義したポリペプチドを得ること、
(b) 前記のポリペプチドを H 因子および試験薬品と共にインキュベートすること、
(c) H 因子の (a) のポリペプチドへの結合をモニターし、それによって試験薬品が H 因子の (a) のポリペプチドへの結合を阻害したか否かを決定すること、
を含む、H 因子の肺炎連鎖球菌への結合を阻害する薬剤を同定する方法。

20

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載の H 因子の結合を阻害する物質を同定すること、およびそうして同定された薬剤を使用して H 因子の肺炎連鎖球菌への結合を阻害することを含む、肺炎連鎖球菌による H 因子の結合を阻害する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、H 因子結合性タンパク質およびペプチド、このようなタンパク質およびペプチドをコードする核酸配列、これに特異的に結合する抗体、ならびにこれを含む薬剤組成物、特にワクチン組成物に関する。

30

【0002】

(発明の背景)

肺炎連鎖球菌は、有効な抗生物質および多価莢膜多糖体ワクチンが利用できるにもかかわらず、依然として病的状態および死亡の重大な原因であり、中耳炎、市中感染性肺炎、敗血症、および髄膜炎などの状態を引き起こしている。乳幼児、高齢者、および免疫無防備状態の患者は、肺炎球菌感染に特にかかりやすい。

【0003】

肺炎球菌の多糖体莢膜は、長い間主な病原性決定因子とみなされてきた (1)。病原性は莢膜血清型によって様々であるが、血清型変換実験によって、莢膜よりも他の因子が重要な役割を担っていることがはっきりと実証された (2)。いくつかの非莢膜病原因子が遍く調査されている。肺炎球菌の病原性への相対的な寄与は依然として不確かであるが、P s p A、ニューモリジン、P s a A などのタンパク質が肺炎球菌の病原性において役割を担っていることは明らかである (3～5)。

40

【0004】

補体の古典経路および第二経路は、先天免疫系の一部であり、肺炎球菌感染から防御する重要な系統を構成している (6、7)。細菌が補体系機能を妨害できる多くの戦略が存在する ((8) で概説)。たとえば、いくつかのグループが補体制御タンパク質 f H の細菌表面タンパク質への結合を記載しているが ((9) で概説)、このような結合の正確な因

50

果関係は依然としてつかめないままである。fHは、20個の短い共通反復単位からなる150kDaの血漿タンパク質であり、H因子タンパク質ファミリーで最もよく特徴付けられたメンバーである(10)。fHは、補体制御において非常に重要なタンパク質である。第二経路の増幅ループでの決定的ステップは、表面に沈着したC3bとB因子からC3転換酵素(C3bBb)が形成されることである。fHは、B因子とC3bの結合を妨げ、因子IによるC3b分解で補因子として働き、さらにC3/C5転換酵素からのBbの解離を促進することによって補体活性化を阻害する。

【0005】

fHと相互に作用する細菌表面構造の例には、S. pyogeneのMタンパク質およびM様タンパク質が含まれる(11、12)。さらに、Yersinia enterocoliticaのYadAは、細菌表面をfHで被覆することによって補体活性化を阻害することを示した(13)。最近では、2つのグループが、それぞれ独立に、3型肺炎球菌での補体を媒介とするオプソニン食作用(opsonophagocytosis)の阻害を記載している。一方の研究(14)は、PspAがC3bの沈着を妨げ、かつ/または第二経路C3転換酵素を阻害することを提示している。もう一方の研究(15)は、肺炎球菌の耐食作用性が、現段階では知られていないfH結合性表面タンパク質を媒介していることを主張する。PspA欠損変異株が親株と同様に、またはそれより大量にfHを結合するので、PspAは、この相互作用に寄与しない。

【0006】

現在使用されている肺炎連鎖球菌ワクチンは、すべて莢膜構造(炭水化物抗原)に基づくものである。各血清型は、特有の莢膜構造を有する。したがって、肺炎連鎖球菌のワクチン組成物は、最もよくある血清型群から防御するために、多種類の異なる莢膜抗原を含有する。やはり、このような組成物は、すべての個人に十分な防御性をもたらしていない。

【0007】

特に、補体の欠損を示すような患者では、このようなワクチン組成物によって十分に防御されない者もいる。3型肺炎球菌からの防御は、特に不十分である。したがって、改良された肺炎連鎖球菌ワクチン組成物が求められている。

【0008】

(発明の概要)

本発明は、H因子結合能を有するポリペプチドであって、(a)配列番号1のThr38~Lys149のアミノ酸配列、(b)H因子を結合できる(a)の変異体、または(c)H因子を結合できる、少なくともアミノ酸20個の長さの(a)もしくは(b)の断片を含む、予防または治療に使用するためのポリペプチドを提供する。

【0009】

本発明は、(a)配列番号1のThr38~Lys149のアミノ酸配列、(b)肺炎連鎖球菌に対して免疫応答を生じる、または抗Hicタンパク質抗体に結合することのできる(a)の変異体、あるいは(c)肺炎連鎖球菌に対して免疫応答を生じる、または抗Hicタンパク質抗体に結合することのできる、少なくともアミノ酸6個の長さの(a)もしくは(b)の断片から選沢されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むワクチン組成物も提供する。

【0010】

もう一つの態様では、本発明は、(a)配列番号1のアミノ酸配列、または(b)(a)との配列同一性が少なくとも85%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%のポリペプチドを含む、アミノ酸15~800個の長さのポリペプチドを提供する。このポリペプチドは、H因子結合能を有することが好ましい。

【0011】

本発明は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供するが、このポリヌクレオチドは、(i)配列番号4のヌクレオチド・コード配列またはこれに相補的な配列、(ii)前記配列(i)と選択的にハイブリッド形成するヌクレオチド配列またはその断片、あるいは(iii)前記配列(i)もしくは(ii)にコードされているものと同じアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0012】

本発明は、補体H因子（fH）を結合する、3型肺炎連鎖球菌に由来するタンパク質およびペプチドを提供する。このタンパク質およびペプチドは、本明細書に配列番号1として開示する配列のThr38～Lys149の部分配列との相同性が少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも70%である。上記の部分配列は、3型肺炎連鎖球菌から単離した表面タンパク質のアミノ末端に位置し、fHの結合に深く関連している。もう一つの態様では、本発明は、Hicタンパク質、すなわち配列番号1として開示するアミノ酸配列との相同性が少なくとも85%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%であるタンパク質およびペプチドに関する。本発明は、上記のタンパク質およびペプチドを含むワクチン組成物も提供する。

【0013】

（配列の説明）

配列番号1は、Hicタンパク質のアミノ酸配列である。

配列番号2および3は、Hicのタンパク質の増幅に使用したプライマーである。

配列番号4は、Hicタンパク質をコードするDNA配列である。

配列番号5および6は、それぞれPspC6Aのためのアミノ酸配列およびコードDNA配列である。

配列番号7および8は、それぞれPspC2のためのアミノ酸配列およびコードDNA配列である。

配列番号9は、PspC19のアミノ酸配列である。

配列番号10は、PspC19TIGRのアミノ酸配列である。

配列番号11は、SpsA1のアミノ酸配列である。

【0014】

（発明の詳細な説明）

一般用語および序文

この出願では以下の略語、すなわち、fH：補体H因子、PspA：肺炎球菌表面タンパク質A、PsaA：肺炎球菌表面抗原A、PspC：肺炎球菌表面タンパク質C、CbpaA：コリン結合タンパク質A、SpsA：肺炎連鎖球菌分泌IgA結合タンパク質、GST：グルタチオンS転移酵素、PCR：ポリメラーゼ連鎖反応、SDS-PAGE：ナトリウムドデシル硫酸塩ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を使用する。

【0015】

上述のとおり、第一の態様では、この出願は、fHを結合するタンパク質およびペプチドに関する。このタンパク質およびペプチドはすべて、Hicタンパク質アミノ末端のThr38～Lys149の部分配列誘導体を含み、そのHicタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1として本明細書に含まれる。この第一の態様によるタンパク質およびペプチドは、本明細書で配列番号1として開示する配列の部分配列Thr38～Lys149との相同性が少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも70%である。以下で、Hicタンパク質のアミノ末端部分がfHの結合に関連していることを示す。また、アミノ末端のアミノ酸配列が、おそらくはそれもfHを結合するであろう他の数種の肺炎球菌表面タンパク質とかなり類似していることも示す。

【0016】

本発明の第一の態様によるポリペプチドは、1つまたは複数の以下の特性を有する。第一に、このポリペプチドは、fH結合能を有する。以下で示すように、このポリペプチドは、この特徴のために肺炎球菌のワクチン候補として関心を集めている。第二に、本発明によるペプチドは、T細胞応答を刺激する能力を有する。第三に、本発明のペプチドは、B細胞応答を刺激する。

【0017】

第二の態様では、本発明は、少なくとも15個のアミノ酸を含むペプチドおよびタンパク質に関するものであり、このペプチドおよびタンパク質は、配列番号1として開示するH

i c タンパク質のアミノ酸配列との相同性が少なくとも 85%、好ましくは少なくとも 95%、最も好ましくは少なくとも 99% である。

【0018】

本発明の第二の態様によるポリペプチドは、H i c タンパク質に対して高い相同性を示し、そのために肺炎球菌のワクチン候補として関心を集めている。第二に、本発明のこの態様によるペプチドは、T 細胞応答を刺激する能力を有する。第三に、本発明のこの態様のペプチドは、B 細胞応答を刺激する。

【0019】

代替の態様では、本発明は、

- (a) 配列番号 1 の T h r 3 8 ~ L y s 1 4 9 のアミノ酸配列、
- (b) H 因子を結合できる (a) の変異体、または
- (c) H 因子を結合できる、少なくともアミノ酸 20 個の長さの (a) もしくは (b) の断片を含むポリペプチドを提供する。

10

【0020】

もう一つの態様では、本発明は、ポリペプチドを含むワクチン組成物に関するものであり、そのポリペプチドは、

- (a) 配列番号 1 の T h r 3 8 ~ L y s 1 4 9 のアミノ酸配列、
- (b) 肺炎球菌に免疫応答を発生させる、または抗 H i c 抗体に結合することのできる (a) の変異体、あるいは
- (c) 肺炎球菌に対して免疫応答を発生させる、または抗 H i c 抗体に結合することのできる、少なくともアミノ酸 6 個の長さの (a) もしくは (b) の断片を含む。

20

【0021】

H 因子結合能は、何らかの適切な方法によってモニターすることができる。特に、標識した H 因子、たとえば、放射能標識で標識したものを使用し、調査中のペプチドへの結合をモニターして、アッセイを実施することができる。同様に、ペプチドが抗 H i c 抗体を結合する能力は、何らかの適切なアッセイを利用して、特に配列番号 1 で示す全長 H i c タンパク質または配列番号 1 の T h r 3 8 ~ L y s 1 4 9 の配列を含むその断片に対して産生された抗体を使用してモニターできる。同様に、動物に調査中のペプチドを投与すること、抗体産生を通して、または細胞障害性 T 細胞応答など、T 細胞応答の発生を通して免疫応答の発生をモニターすることを含む、マウスのモデルなどの適切な動物モデルを使用して、ペプチドが免疫応答を発生させる能力を試験することができる。防御免疫応答を発生させることのできる好ましいペプチドは、動物に致死量の肺炎球菌接種を施すことによって特定できる。同様に、ペプチドが抗 H i c タンパク質抗体に結合する能力は、i n v i t r o で検定することができる。抗 H i c タンパク質抗体は、配列番号 1 のタンパク質を使用して適切な抗体を発生させる標準の技術によって生成できる。

30

【0022】

別の態様では、本発明は、以下の配列、すなわち、

- (i) 配列番号 4 のヌクレオチド・コード配列またはこれに相補的な配列、
- (i i) 前記配列 (i) と選択的にハイブリッド形成するヌクレオチド配列またはその断片、あるいは
- (i i i) 前記配列 (i) もしくは (i i) によってコードされたものと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する新規のポリヌクレオチドに関する。

40

【0023】

本発明のポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドを提供する。また本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明は、
—ポリヌクレオチドが制御配列に操作可能に結合した発現ベクターなど、本発明のポリヌクレオチドを含む組換え型ベクター、
—本発明のポリヌクレオチド用に形質転換した宿主細胞、
—本発明のポリヌクレオチドで形質転換した宿主細胞をポリペプチドの発現をもたらす条

50

件下に保つことを含む、本発明のポリペプチドの産生方法、
—本発明によるポリペプチドに特異的な、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、
—患者に肺炎球菌感染のワクチンを接種する方法であって、患者に有効量の本発明による
ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを投与することを含む方法も提供する。

【0024】

もう一つの態様では、本発明は、H因子のH i cタンパク質への結合を阻害する薬品を特定するアッセイに関する。このアッセイは、試験中の基質の存在下、H因子結合能を有する本発明のポリペプチドをH因子と共にインキュベートすること、および本発明のポリペプチドのH因子への結合をモニターすることを含む。タンパク質相互作用をモニターする方法は、当技術分野でよく知られている。本発明のポリペプチドは、単離された形で得られる。あるいは、本発明のポリペプチドを発現する細菌を得、H因子と共にインキュベートしてもよい。H因子の本発明のポリペプチドへの結合を阻害する特定された物質は、抗生物質として使用しても、肺炎球菌感染に罹患している個人の治療に使用してもよい。

【0025】

本発明は、H因子の本発明のポリペプチドへの結合阻害薬として特定された薬品を薬剤として許容される担体と処方することも提供する。

【0026】

したがって、本発明は、肺炎連鎖球菌感染の治療方法を提供するものであり、この方法は、H因子が本発明のポリペプチドに結合するのを阻害する物質を特定すること、およびこれを必要とする患者に治療有効量のこの物質を投与することを含む。この物質の治療有効量は、肺炎連鎖球菌感染の症状を緩和する、あるいは肺炎連鎖球菌感染に罹患している患者の状態を改善する量である。患者に投与する物質は、薬剤として許容される担体と共に処方されていることが好ましい。

【0027】

H i cタンパク質をコードするDNA配列は、配列番号4として開示する。本発明の核酸配列は、DNAであることが好ましいが、RNAでもよい。当分野の技術者には、本発明によるRNA配列のT残基がUで置換されることは明らかであろう。本発明の核酸配列は、通常は単離された形またはほぼ単離された形である。たとえば、通常、本発明の核酸調製物中の核酸材料の最高で80%、90%、95%、または100%が、本発明による核酸である。本発明による核酸配列の変更、単離、または合成は、何らかの従来法、たとえば、Sambrook等の方法（「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、1989年）によって実施してよい。

【0028】

本発明の配列には、たとえば、本発明のタンパク質もしくはペプチドをコードするものまたはその相補鎖と選択的にハイブリッド形成でき、1つまたは複数の上記で定義した特性を有するポリペプチドをコードする配列が含まれる。

【0029】

そのようなハイブリッド形成は、当技術分野で知られている何らかの適切な条件下（Sambrook等（1989年）の「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」を参照のこと）で実施してよい。たとえば、求められる厳密性が高い場合、適切な条件には60℃の0.2×SSCがある。求められる厳密性が低い場合、適切な条件には60℃の2×SSCがある。

【0030】

本発明のポリヌクレオチドは、バックグラウンドをかなり上回るレベルで、配列番号4またはその相補配列とハイブリッド形成できることが好ましい。バックグラウンド・ハイブリダイゼーションは、たとえばcDNAライブラリーに存在する他のcDNAのために起こる。本発明のポリヌクレオチドと配列番号4の配列の相互作用によって発生したシグナル・レベルは、通常は少なくとも10倍、好ましくは少なくとも100倍であり、他のポリヌクレオチドと配列番号4の配列の相互作用と同じく強い。相互作用の強さは、たとえば、プローブをたとえば³²Pで放射能標識することによって測定してよい。選択的なハ

イブリダイゼーションは、通常、中程度から高度の厳密性（たとえば、約 50℃～約 60℃の 0.1～0.2×SSC）の条件を利用して実現される。

【0031】

配列番号 4 の DNA 配列またはそのコード配列に相補的な配列と選択的にハイブリッド形成できるヌクレオチド配列は、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個、たとえば少なくとも 40 個、60 個、もしくは 100 個以上の隣接するヌクレオチドの領域において、実際は、コード配列の全長において、配列番号 4 の配列またはその相補配列と、一般に少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95% 相同的である。したがって、このような領域において、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% のヌクレオチド同一性が存在する。

10

【0032】

本発明のポリヌクレオチドを定義するには、上記で触れた相同性の度合いと最小サイズをどのように組み合わせて使用してもよいが、より厳密な組合せ（すなわち、より長い長さでより高い相同性）が好ましい。したがって、たとえば、25 個、好ましくは 30 個のヌクレオチドにおいて少なくとも 85% 相同的なポリヌクレオチドが本発明の一態様となり、40 個のヌクレオチドにおいては、少なくとも 90% 相同的なポリヌクレオチドであれば同様である。

【0033】

たとえば、UWGC G Package が BESTFIT プログラムを提供しているが、これを使用すると、（たとえば、デフォルト設定上で使用される）相同性が算出できる（Devereux 等（1984 年）の Nucleic Acids Research 第 12 巻、387～395 ページ）。たとえば、Altschul S. F.（1993 年）の J Mol Evol 第 36 巻、290～300 ページ；Altschul, S, F 等（1990 年）の J Mol Biol 第 215 巻、403～10 ページに記載されているように、PILEUP および BLAST アルゴリズムを使用すると、（（通常はそのデフォルト設定上で）等価なまたは対応する配列を同定するなど、）相同性の算出または配列の整列を行うことができる。

20

【0034】

BLAST 解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を通して公的に入手できる。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードに一直線に合わせたときに、ある正の閾値スコア T に一致するまたはそれを満たす、照会配列中の長さ W の短いワードを識別することによって、ハイスコアリング・シーケンス対 (HSPs) を特定することを第一に含む。T は、近傍ワード・スコア閾値を指す（上記 Altschul 等を参照されたい）。このような初期近傍ワード・ヒットは、これらを含む HSPs を発見する検索を開始するためのシードとして働く。ワード・ヒットは、累積整列スコアが増大する限り、各配列に沿って両方向に伸展する。各方向のワード・ヒットの伸展は、累積整列スコアがその最大達成値から数量 X だけ低下したとき；1 または複数の負のスコアリング剰余整列が累積したために、累積スコアがゼロ以下になったとき；あるいはどちらかの配列の末端に到達したときに停止する。BLAST アルゴリズム・パラメータ W、T、および X は、整列の感度および速度を決定する。BLAST プログラムでは、ワード長さ (W) の 11、BLOSUM 62 スコアリング・マトリックス (Henikoff および Henikoff (1992 年) の Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第 89 巻、10915～10919 ページを参照のこと) 整列 (B) の 50、期待値 (E) の 10、M=5、N=4、および両方の鎖の比較がデフォルトとして使用される。

30

40

【0035】

BLAST アルゴリズムは、2 種の配列の類似性を統計的に解析する。たとえば、Karlin および Altschul (1993 年) の Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第 90 巻、5873～5787 ページを参照されたい。BLAST アルゴリズム

50

によって得られる類似性の一尺度は、ヌクレオチドまたはアミノ酸の2配列の一致が偶然に生じる確率を示す最小確率和 ($P(N)$) である。たとえば、第一の配列の第二の配列に対する最小確率和が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは0.001未満である場合、ある配列がもう一方の配列と類似していると見なされる。

【0036】

本発明の範囲には、遺伝暗号の縮重のために上記で定義したものと異なり、上記で定義した特性を1つまたは複数有する同じポリペプチドをコードする配列も含まれる。

【0037】

本発明の核酸配列は、少なくとも塩基30個、たとえば、最高で塩基50個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、800個、1000個、最高で塩基2000個、または最高で塩基3000個の長さであることが好ましい。 10

【0038】

本発明の核酸配列は、5'および3'末端のいずれかまたは両方を伸長させてよい。そうした伸長はどんな長さでもよい。たとえば、伸長部分は、最高で10個、20個、50個、100個、200個、または500個以上の核酸を含む。したがって、本発明の核酸配列は、何らかの非野生型配列によって5'および3'末端のいずれかまたは両方を伸長させてよい。

【0039】

本発明のポリペプチドは、配列番号1として示すアミノ酸配列に由来する。したがって、本発明のポリペプチドは、配列番号1のポリペプチドに限らない。むしろ、本発明のポリペプチドには、fHを結合できる、配列番号1と近い関係にある配列を有するポリペプチドも含まれる。あるいは、本発明のポリペプチドは、fHに結合しないにもかかわらず、Hicタンパク質に非常に類似したまたは同一の抗原決定基を含む。これらの配列はすべて、何らかの従来法によって配列番号1の配列を変更して調製しても、生物体から単離しても、合成で作製してもよい。このような変更、単離、または合成は、何らかの従来法、たとえばSambrook等の方法(「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、1989年)によって実施してよい。特に、Hicタンパク質をコードするDNA配列を修飾して、組換えによりポリペプチドを発現させることによって、配列番号1に関連したポリペプチドを調製してよい。 20 30

【0040】

そのため、本発明のポリペプチドは、配列番号1との配列同一性が100%未満となる。したがって、本発明のポリペプチドは、fH結合能を損なわない限り、またはHicタンパク質と同様な抗原特性を示す限り、配列番号1との区別を表す置換、欠失、または挿入を含む。

【0041】

置換、欠失、または挿入には、適切には1個または複数のアミノ酸、通常は1~5個、1~10個、または1~20個のアミノ酸が関与し、たとえば、1個、2個、3個、4個、5個、8個、10個、15個、または20個のアミノ酸の置換、欠失、または挿入となる。通常、本発明の第一の態様のfH結合性ポリペプチドは、配列番号1の部分配列thr38~lys149との配列同一性が少なくとも50%、少なくとも60%、または少なくとも70%である。このポリペプチドと配列番号1の同一性が少なくとも80%、90%、95%、97%、または99%であることが好ましい。通常、本発明の第二の態様のポリペプチドは、配列番号1の配列のあらゆる部分から誘導できる部分配列、好ましくは配列番号1の15~600個の隣接するアミノ酸配列との配列同一性が少なくとも85%、少なくとも95%、または少なくとも99%である。 40

【0042】

一般に、本発明のポリペプチドには、配列番号1の配列の物理化学的性質が保たれるべきである。一般に、そうした配列の電荷、疎水性、およびサイズは、配列番号1に似るであろう。アミノ酸配列の物理化学的性質に大きな影響を及ぼさない置換の例は、以下の各群 50

、すなわち、
H、R、およびK
I、L、V、およびM
A、G、S、およびT
D、E、Q、およびN

のうちの1種のアミノ酸が、その同じ群の異なるアミノ酸に置換される場合である。

【0043】

本発明のポリペプチドを化学的に合成する場合、（天然には存在しない）D-アミノ酸を、アミノ酸配列中のポリペプチドの生物学的特性に影響を及ぼさない部位に組み込んでよい。これにより、レシピエントのプロテアーゼによるタンパク質分解に対するポリペプチドの感受性が低減される。 10

【0044】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、何らかの非野生型配列によって一方または両方の末端で伸長させてよい。

【0045】

したがって、本発明のポリペプチドは、いずれかの長さのアミノ酸配列によってC末端を伸長させてよい。たとえば、1回の伸長は、最高で5個、10個、20個、50個、100個、または200個以上のアミノ酸を含む。C末端伸長部分は、元のHicタンパク質中の本発明の配列（またはその起源となる元の配列）に対するC末端とは異なる任意の配列を含んでいてもよい。したがって、本発明のポリペプチドは、何らかの非野生型配列によってC末端を伸長させてよい。 20

【0046】

本発明のポリペプチドは、その抗原特性を高める他のポリペプチド、タンパク質、または炭水化物に結合させてよい。したがって、本発明のポリペプチドは、1個または複数の他の抗原性ポリペプチドに結合させてよい。このような追加の抗原性ポリペプチドは、肺炎連鎖球菌または別の生物体に由来する。考えられる追加の抗原性ポリペプチドには、他の肺炎連鎖球菌タンパク質由来の、または肺炎連鎖球菌以外の種に由来する異種T細胞エпитープが含まれる。異種B細胞エпитープを使用してもよい。そのような異種のT細胞エпитープおよび／またはB細胞エпитープは、どんな長さでもよく、最高でアミノ酸5個、10個、または20個の長さのエピトープが特に好ましい。付加できると考えられる炭水化物は、莢膜抗原である。このような追加の抗原性ポリペプチドは、本発明のポリペプチドに化学的に結合させてよい。あるいは、1個または複数の追加の抗原配列または炭水化物基が本発明のポリペプチドへの伸長部分を含んでもよい。 30

【0047】

本発明のポリペプチドには、グリコシル化、硫酸化、COOHアミド化、またはアシル化など、1種または複数の化学修飾を施してよい。特に、N末端をアセチル化したポリペプチドは好ましく、C末端アミド基を有するポリペプチドも好ましい。好ましいポリペプチドは、1種または複数のこのような修飾を受けている。たとえば、特に好ましいポリペプチドは、C末端アミド基を有し、N末端のアセチル化を受けている。

【0048】

本発明のポリペプチドは、本明細書で定義するいずれかの手段で、1または複数の配列番号1の配列またはそれと関係のある配列の多重コピーを含むより大きなポリペプチドの部分形成してよい。 40

【0049】

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも15個のアミノ酸、たとえば、15～20個、20～50個、50～100個、100～200個、200～300個、300～400個、400～500個、500～600個、600～700個、または700～800個のアミノ酸を含む。

【0050】

本発明によるポリペプチドは、精製する、またはほとんど精製してよい。一般に、ほとん 50

ど精製された形のポリペプチドは、調製物中の90%超、たとえば最高で95%、98%、または99%のペプチド材料が1種または複数の本発明のポリペプチドである調製物の部分を形成する。

【0051】

本発明の核酸配列およびポリペプチドは、もともと肺炎連鎖球菌に由来する。しかし、本発明の核酸配列および／またはポリペプチドは、他の生物体、通常は細菌、特に他の連鎖球菌から得てもよい。従来のクローン技術によって、または本発明による核酸配列でゲノムライブラリーもしくはcDNAライブラリーを探索することによってこれを得てよい。Sambrook等の方法(「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、1989年)など、何らかの従来法によってこれを行うことができる。 10

【0052】

本発明による核酸配列は、ベクター、適切には複製可能なベクター、たとえば複製可能な発現ベクターに含まれていてもよい。

【0053】

複製可能な発現ベクターは複製開始点を含むので、細菌宿主細胞など、宿主細胞中でベクターが複製できる。また適切なベクターは、通常、普通は5'～3'の配列中に以下の要素、すなわち、核酸配列の発現を指令するプロモータおよび任意選択のプロモータ制御因子、翻訳開始コドン、およびHiタンパク質の生物学的特性を1つまたは複数有するポリペプチドをコードする本発明による核酸配列も含む。複製不能なベクターは、適切な複製開始点を欠き、一方非発現ベクターは、有効なプロモータを欠いている。 20

【0054】

ベクターは、細菌の形質転換体を特定するための1種または複数の選択可能な標識遺伝子、たとえば、アンピシリン耐性遺伝子を含有していてもよい。考えられる別の標識遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子である。ベクターは、任意選択で、プロモータのエンハンサも含んでよい。真核細胞中で本発明の核酸配列を発現させることを望むなら、ベクターは、機能性タンパク質をコードする核酸に3'が操作可能に連結されたポリアデニル化シグナルを含んでもよい。ベクターは、本発明のポリペプチドをコードする配列に対する転写ターミネータ3'も含んでよい。

【0055】

ベクターは、本発明のポリペプチドをコードする配列に対する1つまたは複数の非コード配列3'を含んでもよい。これらは、このベクターで形質転換されることになる肺炎連鎖球菌(本発明の配列はこの生物に由来する)または宿主生物に、あるいは別の生物体由来してよい。 30

【0056】

発現ベクターでは、本発明の核酸配列が、この配列を発現できるプロモータに操作可能に結合している。「操作可能に結合している」とは、プロモータと本発明のポリペプチドをコードする核酸配列とがプロモータの制御下でコード配列の発現を可能にする関係にある近位を指す。したがって、プロモータとコード配列間に5'非コード配列などの要素が存在してもよい。このような要素は、肺炎連鎖球菌またはプロモータ配列の起源である生物体、またはその両者以外に本来備わったものであってよい。プロモータによるコード配列の正しい制御が向上し、またはそれが損なわれないなら、ベクターにこのような配列が含まれていてよい。 40

【0057】

ベクターはどんなタイプでもよい。線形でも環形でもよい。たとえば、ベクターをプラスミド・ベクターとしてよい。当分野の技術者は、広範囲で入手可能なベクターから始め、これをSambrook等の「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、1989年に記載のものなど、遺伝子工学技術によって改変して、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含む適切なベクターを調製できるであろう。好ましい出発ベクターには、カナマイシン耐性を与え、tacプロモータを介し 50

て本発明のポリペプチドの発現を指令するプラスミドがある。

【0058】

発現ベクターでは、宿主細胞中で本発明の配列の発現を指令できる何らかのプロモータが、本発明の核酸配列に操作可能に結合してよい。適切なプロモータには、t a c プロモータが含まれる。

【0059】

このようなベクターを使用して、宿主細胞に形質移入または形質転換を施すことができる。ベクターのタイプによるが、これをクローニング・ベクターとして使用して、本発明によるDNA配列を増幅させても、そのDNAを宿主細胞中に発現させてもよい。

【0060】

本発明の別の実施形態は、本発明の核酸配列を複製し、かつ／または発現させるための、本発明のベクターを収容した宿主細胞、すなわち、ベクターで形質転換または形質移入を施した細胞を提供する。細胞は、ベクターと適合するように選択するが、たとえば細菌細胞でよい。形質転換または形質移入を施した細菌細胞、たとえば大腸菌細胞は、本発明の核酸配列を増幅させるだけでなく、それをポリペプチドとして発現させるために特に有用となろう。

【0061】

Sambrook等の「Molecular cloning: A Laboratory Manual」、1989年に記載の方法など、何らかの適切な方法によって、細胞に形質転換または形質移入を施してもよい。たとえば、本発明による核酸配列を含むベクターは、感染性のウイルス粒子、たとえばレトロウイルス粒子にパッケージングしてよい。たとえば、電子穿孔法、リン酸カルシウム沈殿法、および微粒子銃法によって、または溶液中で裸の核酸ベクターと細胞を接触させることによってこの作製物を導入してもよい。

【0062】

宿主細胞を形質転換し、または宿主細胞に形質移入する前記の核酸ベクターの核酸は、DNAでもRNAでもよく、DNAが好ましい。

【0063】

宿主細胞を形質転換し、または宿主細胞に形質移入するベクターは、適切などんなタイプでもよい。ベクターは、宿主細胞ゲノムに本発明の核酸配列を組み込むことができても、細胞質中で遊離したままであってもよい。たとえば、形質転換に使用するベクターを、本明細書で定義する発現ベクターにしてよい。

【0064】

本発明は、本発明によるポリペプチドの産生方法も提供する。このプロセスは、通常、本発明による核酸配列を含むベクターで宿主細胞に形質転換もしくは形質移入を施すこと、および宿主細胞中でその核酸配列を発現させることを含む。この場合、核酸配列は、宿主細胞中でその発現を指令できるプロモータに操作可能に連結される。そのプロモータは、宿主細胞中で高レベルな発現を実現できる「強力な」プロモータであることが望ましい。本発明によるポリペプチドが宿主細胞中で過剰発現させることが望ましい。この目的に適した宿主細胞には、酵母細胞および細菌細胞、たとえば大腸菌細胞が含まれ、特に好ましい大腸菌株は、大腸菌K12株BL21である。しかし、他の発現系を使用することもでき、たとえばバキュロウイルス系では、ベクターは、そのゲノムに本発明のポリペプチドをコードする核酸を有するバキュロウイルスであり、そのバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させたときに発現が起こる。

【0065】

そうして産生された本発明のポリペプチドは、当技術分野で知られている何らかの方法によって回収してよい。そうして回収されたポリペプチドは、任意選択で、何らかの適切な方法、たとえばSambrook等（「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」）による方法で精製してよい。

【0066】

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドは、標準のペプチド合成技術を使用して、化学的に合成してもよい。より短いポリペプチドでは、組換え体の発現に化学合成が好ましい。特に、アミノ酸残基が最高で20個または40個の長さのペプチドは、化学的に合成することが好ましい。

【0067】

本発明の核酸配列を使用して、プローブおよびプライマーを調製してよい。これらは、たとえば、配列番号4に類似の配列を有する遺伝子の単離に有用となる。そのようなプローブおよびプライマーは、適切などんな長さでもよいが、塩基10～100個、たとえば10～20個、20～50個、または50～100個の長さであることが望ましい。このようなプローブの例を、本明細書の配列番号2および配列番号3として開示する。

【0068】

本発明のポリヌクレオチドまたはプライマーには、露出する標識が付けられていてよい。適切な標識には、 ^{32}P や ^{35}S などの放射性同位元素、酵素標識、またはビオチンなどの他のタンパク質標識が含まれる。このような標識は、本発明のポリヌクレオチドまたはプライマーに加えてよく、それ自体が知られている技術を利用して検出することができる。

10

【0069】

本発明のポリヌクレオチドもしくはプライマーまたはその断片は、標識されたものでも未標識のものでも、核酸を基にした試験において当分野の技術者が試料中のHicタンパク質を検出し、または配列決定するために使用されてよい。

【0070】

このような検出試験は、一般に、ハイブリッド形成条件下、DNAまたはRNAを含有する試料を本発明のポリヌクレオチドまたはプライマーを含むプローブに接触させること、および試料中のプローブと核酸の間に形成した二重鎖を検出することを含む。PCRなどの技術を利用して、あるいは固体担体にプローブを固定化し、プローブとハイブリッド形成していない試料中の核酸を除去し、次いでプローブとハイブリッド形成した核酸を検出することによって、このような検出が実施できる。あるいは、固体担体に試料の核酸を固定化し、その担体に結合したプローブの量を検出してもよい。

20

【0071】

本発明のプローブは、試験キットの形で適切な容器に納めると好都合である。キットが、固体担体への結合を必要とするアッセイ型式用に設計されている場合、プローブは、固体担体に結合していてよい。このキットは、探索する試料の処理に適する試薬、プローブと試料中の核酸のハイブリッド形成に適する試薬、制御試薬、および説明書なども含んでよい。

30

【0072】

本発明のポリヌクレオチドは、組換え型の複製可能なベクターに組み込むことができる。そのベクターを使用して、適合する宿主細胞中で核酸を複製してよい。したがって、本発明の別の実施形態は、本発明のポリヌクレオチドを複製可能なベクターに導入し、そのベクターを適合する宿主細胞に導入し、さらにベクターの発現を引き起こす条件下でその宿主細胞を成長させることによって本発明のポリヌクレオチドを作製する方法を提供する。ベクターは、その宿主細胞から回収してよい。適切な宿主細胞は、発現ベクターと共に述べる。

40

【0073】

本発明は、本発明のポリペプチドの抗体も提供する。この抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよい。本発明の意図では、用語「抗体」には、標的抗原への結合活性を保持する抗体全体の断片が含まれる。そのような断片には、Fv、F(ab')、およびF(ab')₂断片、ならびに単鎖抗体が含まれる。

【0074】

抗体は、Sambrook等の方法（「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」；1989年）など、当技術分野で知られている何らかの方法によって生成してよい。たとえば、従来のハイブリドーマ技術によって、または

50

、改変された抗体もしくは断片の場合、組換えDNA技術によって、たとえばプロモータに操作可能に結合した改変された抗体もしくは断片をコードするDNA作製物を適切な宿主ベクター中に発現させることによって抗体を調製してよい。適切な宿主細胞には、細菌（たとえば、大腸菌）、酵母、昆虫、および哺乳類の細胞が含まれる。また、宿主動物、たとえばラットまたはウサギに本発明のペプチドを接種すること、および免疫血清を回収することを含む従来の手段によって、ポリクローナル抗体を調製してもよい。

【0075】

本発明は、本発明のポリペプチドを含む薬剤組成物も提供する。本発明のポリペプチドを含む組成物は、T細胞および／またはB細胞エпитープを含み、肺炎球菌によって引き起こされる感染のワクチンとして使用してよい。

10

【0076】

本発明のポリペプチドを使用すると、ある範囲の哺乳類の種に、3型肺炎球菌によって引き起こされる感染のワクチン接種を施すことができる。ヒトへのワクチン接種が特に望ましい。

【0077】

本発明の組成物は、適切な何らかの経路によってヒトを含む哺乳動物に投与してよい。適切な経路には、口腔への局所的塗布、錠剤もしくはカプセル剤による経口的送達、皮下、筋肉内、静脈内、および皮内送達を含む非経口的送達が含まれる。好ましい投与経路は、全身免疫化をもたらすことを考えて、注射、通常は皮下もしくは筋肉内注射である。

【0078】

先に示したように、本発明によるポリペプチドは、異なる免疫原性の他の抗原と混合してもよい。

20

【0079】

本発明の組成物は、対象者に、単独で、リポソームの形で、または他の送達分子と結合させて投与してよい。有効投与量は、送達分子の使用の有無、送達経路、ワクチン接種する哺乳動物の大きさなど、多くの要因に応じて変わる。典型的な用量は、1回に本発明のポリペプチドを0.1～100mg、たとえば1回0.1～1mg、1～5mg、5～10mg、および10～100mgである。1～5mgの用量が好ましい。

【0080】

投与スケジュールは、たとえば、投与経路、レシピエントの種、およびレシピエントの状態により様々である。しかし、1回式投与および複数回式投与が、1日、1週間、または1ヶ月単位の期間におよぶものと考えられる。若年のヒトの患者への本発明のワクチン組成物の投与レジメンを6ヶ月、2年、5年、および10年とし、初回分にはアジュバントを加え、後続分を初回分のポリペプチド量の約1/2～1/4とすると好都合である。しかし、投与頻度は、患者の抗体量をモニターすることによって決定する。

30

【0081】

本発明のポリペプチドは、単独での投与が可能であるが、処方製剤として与えることが好ましい。本発明の処方は、少なくとも1種の活性成分、すなわち本発明のポリペプチドと共に、1種または複数のその許容される担体、および任意選択の他の治療用成分を含む。担体は、処方の他の成分と適合し、かつそのレシピエントに有害でないという意味で、「許容される」ものでなければならない。

40

【0082】

免疫原性ポリペプチドを活性成分として含有するワクチン製剤は、当分野の技術者に知られている。通常、このようなワクチンは、液状の溶液または懸濁液の注射剤として調製されるが、溶液または懸濁液に適する、注射前に液体に入れる固体に調製してもよい。製剤は、乳化されていても、このタンパク質がリポソームにカプセル封入されていてもよい。活性免疫原性成分は、しばしば、薬剤として許容され、かつ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、たとえば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、およびこれらの混合物などである。さらに、望むならワクチンは、二次的な量の、湿潤剤や乳化剤などの補助的物質、pH緩衝剤、および／またはワクチンの有効性

50

を高めるアジュバントを含有してよい。

【0083】

有効となるアジュバントの例には、それだけに限らないが、水酸化アルミニウム、N-アセチル- α -D-グルタミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (th r-MDP)、N-アセチル- α -D-グルタミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (CGP11637、n-MDPと呼ぶ)、N-アセチル- α -D-グルタミル-L-アラニル-D-イソグルタムニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン (CGP19835A、MTP-PEと呼ぶ)、およびRIBIが含まれ、このRIBIは、2%のスクアレン/Tween80乳濁液中に、細菌から抽出した3種の成分、すなわちモノホスホリル脂質A、トレハロースジミコラート、および細胞壁骨格(MPL+TDM+CWS)を含有する。様々なアジュバントも含むワクチンの形のHi c抗原配列含有免疫原性ポリペプチドを投与した結果として生じる、このポリペプチドを標的とする抗体量を測定することによって、アジュバントの有効性が決定される。

【0084】

ワクチンは、注射、たとえば皮下または筋肉内によって非経口投与すると好都合である。他の投与方式に適する処方には、座剤、および場合によっては経口の処方が含まれる。座剤の伝統的な結合剤および担体には、たとえばポリアルキレングリコール、またはトリグリセリドが含まれ、このような座剤は、0.5%~10%、好ましくは1%~2%の範囲で活性成分を含む混合物から生成できる。経口処方は、たとえば、製薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなど、通常使用される賦形剤を含む。このような組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放処方、または粉末の形をとり、活性成分を10%~95%、好ましくは25%~70%含有する。ワクチン組成物を凍結乾燥した場合、凍結乾燥材料は、投与前に、たとえば懸濁液として再構成することができる。緩衝液中で再構成を行うことが好ましい。

【0085】

患者に経口投与するためのカプセル剤、錠剤、および丸剤は、たとえば、Eudragit "S"、Eudragit "L"、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、またはヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む腸溶コーティングを施して提供してよい。

【0086】

本発明のポリペプチドは、中性または塩の形のワクチンに処方してよい。薬剤として許容される塩には、(ペプチドの遊離アミノ酸基と形成した)酸の付加塩が含まれるが、これは、たとえば塩酸またはリン酸などの無機酸とも、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸などの有機酸とも形成される。遊離カルボキシル基と形成した塩は、たとえばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、もしくは第二鉄の水酸化物など、無機塩基からも、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、有機塩基からも誘導できる。

【0087】

非経口投与に適した処方には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、殺菌性抗生物質、およびその処方を目的のレシピエントの血液と等張にする溶質を含有する水性および非水性の無菌注射溶液、ならびに懸濁化剤、増粘剤、およびその化合物が血液成分または1種または複数の臓器を標的とするように設計したリポソームもしくは他の微粒子系を含む水性および非水性の無菌懸濁液が含まれる。

【0088】

考えられる処方の、発熱物質を含まない無菌の水溶液および非水性溶液が好ましい。同様に好ましいものは、本発明のポリペプチドがリポソームに含まれている処方である。注射溶液および懸濁液は、先に記載した種類の無菌の粉末、顆粒、および錠剤から即座に調製することができる。

【0089】

経口的な投与方法では、全身的作用が生じる。経口的に活性な製剤は、ゲル、練り歯磨き、口腔洗浄剤、またはチューインガムなど、何らかの適切な担体に含ませて処方してよい。

【0090】

問題の処方のタイプは顧慮されるが、本発明の処方が、上記で特に述べた成分に加えて、当技術分野で慣習的な他の薬品も含んでよいことを知っておくべきである。

【0091】

したがって、本発明は、哺乳類の宿主に肺炎球菌によって引き起こされる感染のワクチン接種を施し、またはそのような感染を治療する方法を提供するが、この方法は、宿主に有効量の上述の薬剤組成物、たとえばワクチン組成物を投与することを含む。

10

【0092】

受動免疫化向けには、モノクローナル抗体を含む抗体、およびFab断片など、その断片が、本発明のポリペプチドを含む処方について上記で示したように処方される。好ましい受動免疫化用処方には、ゲル、練り歯磨き、口腔洗浄剤、またはチューインガムなど、固体または液体処方が含まれる。

【0093】

本発明の別の態様は、裸の(naked)核酸ワクチンである。この実施形態では、ワクチン組成物は、ポリペプチドよりもむしろ核酸、通常は単離された核酸、好ましくはDNAを含む。核酸は、哺乳類の宿主に注射され、in vivoで発現して、本発明のポリペプチドを生じる。これがT細胞応答を刺激し、本発明のポリペプチドを直接ワクチン接種したのと同じように、肺炎連鎖球菌、たとえば、う蝕に対する防御免疫をもたらす。

20

【0094】

核酸ワクチン接種は、T細胞および／またはB細胞応答を刺激するポリペプチドをコードしさえすれば、本発明によるどんな核酸でも実施できる。このような核酸は、通常は上記で定義した発現ベクターの範囲に含まれよう。そのような発現ベクターでは、本発明による核酸が、通常は、哺乳類の宿主細胞中で発現を指令できるプロモータに操作可能に結合する。たとえば、サイトメガロウイルス(CMV)前初期遺伝子プロモータなど、哺乳類細胞中で発現するウイルス遺伝子由来プロモータが適切である。同様に適切なものは、「ハウスキーピング」遺伝子プロモータなど、哺乳類細胞型の多くまたは全ての中で発現する哺乳類遺伝子由来プロモータである。一つのそのようなプロモータは、p-ヒドロキシメチルCoA還元酵素(HMG)プロモータである(Gautier等(1989年)の「Nucleic Acids Research」第17巻、8839ページ)。

30

【0095】

裸の核酸のワクチン接種では、本発明による核酸配列がプラスミド・ベクターに組み込まれていることが好ましい。共有結合性閉サイクル(CCC)・プラスミドDNAは、直接に筋細胞によって吸収され、細胞のゲノムDNAに組み込まれることなく発現し得ることが判明したからである(Ascadì等(1991年)の「The New Biologist」、第3巻、71～81ページ。裸の核酸ワクチンは、従来のポリペプチドを基にしたワクチンに関して上記で述べた処方型のいずれかとして調製してよい。しかし、非経口的注射、特に筋肉内注射に適する処方が好ましい。裸の核酸ワクチンは、ポリペプチドを基にした従来のワクチンに関して上記で述べた手段のいずれかで送達してよいが、筋肉内注射が好ましい。

40

【0096】

あるいは、核酸ワクチンは、微粒子銃による投与向けに、あるいはリポソーム、リポフェクシンなどのカチオン性リピド処方、または他の適切な担体を含む処方で提供してもよい。

【0097】

したがって、本発明は、上述の核酸配列もしくはベクター、および許容される担体を含むワクチン組成物を提供する。

【0098】

50

実験的研究への導入

補体依存的なオプソニン食作用は、肺炎連鎖球菌感染からの非常に重要な防御策である（33）。最近の2つの研究が、3型連鎖球菌がどのようにして補体系の正常な機能を破壊するかを論じている。一方の研究（14）は、補体第二経路が細菌の効率的な排除に不可欠であること、および肺炎球菌による補体活性化への介入が病原性決定要因であることを示す。研究者等は、P s p A 陰性変異体と野生型細菌の比較に基づいて、知られていない機構によってP s p A が第二経路の動員をブロックすると主張している。他の研究（15）は、補体因子Hが、先の補体活性化とは無関係に肺炎球菌表面のトリプシン感受性構造に結合することを述べている。この研究が、f Hの結合に関して、P s p Aの主たる寄与があり得ないとしていることは注目に値する。これらの発見は、H因子結合タンパク質が独立した病原因子であるかもしれないことを示唆する。

10

【0099】

この調査は、3型肺炎球菌でのf H結合の原因である新規の肺炎球菌表面タンパク質を記載する。このタンパク質（H i c）をコードする遺伝子は、p s p Cの座位、すなわち考えられる病原性決定要因および感染防御抗原中に見出されるが、以前に述べられたp s p Cアレルより顕著に非定型特性を示す。いくつかのp s p Cアレルを配列決定した研究（16）では、P s p C抗原と反応するタンパク質が存在せず、PCR実験によりp s p C遺伝子が増幅されなかったため、3型株は、p s p C陰性であるとみなされた。タンパク質のNH₂末端部分の領域は別として、H i cとP s p Cには配列相同性がほとんどなかった。さらに、H i cは、L P X T G Xモチーフの存在によって細胞壁に固定されるが、P s p Cは、コリン結合性モチーフを収容する。これに関して、H i cは、同様にf Hに結合することが知られているS. p y o g e n e s中Mタンパク質に類似している（11）。H i c欠損変異株は、野生型株とは対照的に、ヒト血漿からf Hを吸収しなかった。この変異株は、放射能標識したf Hに結合せず、f HのP R 2 1 8細菌への結合の大部分またはすべてが、肺炎球菌表面のH i cの存在によるものであることを示唆した。徹底的なスクリーニングは実施していないが、調べた株の大部分がf Hを結合し、この表現型が3型株に限らないことを示唆した。さらに、H i cの組換え型f H結合性断片は、放射能標識したf Hの、別の血清型の肺炎球菌への結合と競合する。P s p Cは、H i cに類似した領域によって肺炎球菌にf Hを結合させるが、他の表面構造が、H i cのように、f Hの同じ部分と相互に作用することも除外できない。G S TおよびNH₂末端H i c領域（G S T : H i c^{3 9 - 2 6 1}）とf H間の融合の表面プラスモン共鳴実験は、相互作用の融和性が高いことを示した。

20

30

【0100】

様々なP s p Cタンパク質およびH i cのNH₂末端部分における類似領域の存在は、組換えによって発現させたH i c断片中に含まれるこの幾分可変性の領域が、多くの肺炎球菌株でのH因子結合の原因であるという興味深い可能性を提示する。P s p Cは感染防御抗原であり、NH₂末端領域は、特定の抗体の誘発を避けるために、おそらくかなりの遺伝的変異を受けなければならないことが以前に示されている。しかしこれは、f Hの特異的結合を妨げない。比較として、S. p y o g e n e sのM5およびM6タンパク質が、その高頻度可変領域によってH因子様タンパク質1に結合することを示した（12）。同様に、数種のM様タンパク質は、高頻度可変性NH₂末端領域によって別の補体制御タンパク質、すなわちC4結合タンパク質に結合する（34）。我々は、P s p CのNH₂末端切断型を発現させる2型変異株が、親株D39とは異なり、血漿からf Hを吸収しないことを発見した。切断にはH i cに相同性を示さないP s p Cの部分も関与するので確証的なものではないが、この実験は、f H結合がs p CおよびH i cのNH₂末端領域に媒介され得るという考えを支持する。

40

【0101】

補体系機能の妨害が肺炎球菌の病原性に深く関連した側面であることを多くの研究が示している。より具体的には、f Hの結合が、オプソニン食作用への抵抗性と相互に関連していると示されている。先の研究は、細胞壁と莢膜の両方にC3bが沈着したにもかかわらず

50

ず、3型肺炎球菌が食作用に強く抵抗したことを示した(29)。我々のデータは、h i c、すなわち非定形性の強いp s p Cアレルが3型肺炎球菌の主要なf H結合タンパク質をコードすることを示す。f Hの補体阻害機能は、H i cとの相互作用による影響を受けない。H i cは、肺炎球菌表面で活性補体阻害物を蓄積することによって、単独またはP s p Aと共同で作用して、C 3 bの沈着および随伴するオプソニン食作用を阻害する。以前に述べられているように、3型、4型、および14型肺炎球菌の推定上のC 3 プロテイナーゼ(35)は、同様の作用を有するはずである。H i cの領域が内在性の第二経路阻害能を示すというこの観察によって、この病原性機構の重要性が強調される。結論として、肺炎球菌は、補体系を妨害する傾向が強いようである。f Hの結合は、異なる機構によるものが、A群肺炎球菌(11)、Y. エンテロコリチカ(13)、および淋菌についても述べられており(36, 37)、細菌のヒト宿主への順応において一般化した題目としても差し支えない。 10

【0102】

以下では、添付の図を参照しながら本発明を開示する。

【0103】

(実験手順)

細菌株

この研究で使用した肺炎連鎖球菌株を表1に記載する。非被包性株P R 2 0 1、P R 2 1 2、P R 2 1 5、およびP R 2 1 8では、莢膜座位全体を欠失させ、(F. I a n e l l i、B. J. P e a r c e、およびG. P o z z iより提供された)カナマイシン(Km 20)耐性カセットで置換した。3%のウマ血液を補充したT S B (D i f c o)中またはT S A (寒天添加T S B)上、37℃で肺炎球菌を成長させた。適切であるなら、カナマイシン(500 μg/ml)またはクロラムフェニコール(3 μg/ml)を加えた。結合アッセイに使用する細菌は、0.2%のY e a s t e x t r a c t (D i f c o)を補充したT o d d - H e w i t t b r o t h (D i f c o)中で成長させた。大腸菌株D H 5 αは、p G E Xを含有する場合はアンプシリン(50 μg/ml)を補充したL u r i a - B r o t h (D i f c o)中またはL B寒天上で成長させた。

【0104】

DNA法、クローニング、および配列決定

P C R S O E i n g (19)によって、クロラムフェニコール転移酵素カセットを、h i c 30の上流および下流に見出される配列の側に配置した。この作製物でP R 2 1 8を形質転換した。その結果、二重交差突然変異誘発法によって、h i c 遺伝子がこのc a t カセットで置換されて、h i c 欠損変異株F P 1 3を産生した。

【0105】

それぞれB a m H I およびE c o R I 制限部位を含む、オリゴヌクレオチドH I C f l (5'-T G G G A T C C C A G A G A A G G A G G T A A C T A C 3'、配列番号2) およびH I C r l (5'-G G A G C C T G A A T T C G A C G A A G - 3'、配列番号3)をポリメラーゼ鎖反応(P C R)に使用して、H i cのアミノ酸39~261に対応するDNAを増幅した。このP C Rは、T a q ポリメラーゼ(G i b c o B R L)で実施し、94℃で1分間、50℃で1分間、さらに72℃で1分間の30サイクルからなり 40、その後72℃で7分間、最終的に伸展させる。細菌コロニーを水中に再懸濁させ、5分間沸騰させ、13000×gの遠心分離によって細菌細片を除去して鋳型を調製した。P C Rで増幅された断片を、S e p h a g l a s B a n d p r e p (P h a r m a c i a B i o t e c h)でゲル精製し、B a m H I およびE c o R I (P h a r m a c i a B i o t e c h)と共に消化し、T 4 D N A リガーゼ(P h a r m a c i a B i o t e c h)を使用して、同様に消化したベクターp G E X - 5 X - 3 (P h a r m a c i a B i o t e c h)と結合させた。次いで、G S T 遺伝子融合系プロトコル(P h a r m a c i a B i o t e c h)に従って、D H 5 α大腸菌に電気穿孔してプラスミドp G E X - S X 3 : h i c (39~261)を入れた。プラスミド・ミニプレップおよび制限酵素消化による挿入の存在について形質転換体をスクリーニングした。このプラスミドを精 50

製し、挿入断片の全部を配列決定することによって、融合タンパク質 GST: Hic³⁹⁻²⁶¹ の過剰発現に使用したクローンを検証した。GST 遺伝子融合系マニュアル (Pharmacia Biotech) の指示に従って、融合タンパク質をアフィニティー精製にかけた。

【0106】

リガンド結合およびタンパク質法

対数相肺炎球菌 (OD およそ 0.4) で血漿吸収実験を実施した。0.05% の Tween 20 を含む pH 7.4 の PBS (PBST) 中で細菌を 2 回洗浄し、細菌濃度を 2×10^{10} 細胞/ml に調節した。細菌 100 μ l をヒト血漿 100 μ l と共に 1 時間インキュベートした。細菌を PBST で 5 回洗浄し、pH 2.0 の 0.1 M グリシン/HCl 100 μ l で、結合したタンパク質を溶離させた。溶離した材料の pH を 1 M のトリスで 7 付近に調節した。C3 欠損血清は、スウェーデンの Huddinge Hospital の G. Eggertsen 博士の好意による提供で、C3 が選択的に完全に欠損した (C3 < 1 mg/リットル) 患者から得た。

【0107】

8~12% のアクリルアミドを含む SDS-PAGE (20) によってタンパク質試料を分離した。(21) に記載のとおり、タンパク質を Immobilon-P (商標) PVDF 膜 (Millipore) にブロットした。1:1000 に希釈した fH に対するウサギポリクローナル抗血清を一次抗体源とした。西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した抗ウサギ・ヤギ抗体 (Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, CA) を二次抗体として使用し、(22) に記載のように、化学発光によって免疫反応性バンドを検出した。

【0108】

Iodobeads kit (Pierce) を使用して ¹²⁵I で放射能標識した fH (Sigma) の、スロット・ブロット、ウェスタン・ブロット、および細菌結合アッセイを行った。Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech) でのゲル濾過によって、組み込まれなかった ¹²⁵I を除去した。スロット・ブロット装置 (Schleicher & Schuell) のニトロセルロース膜に 5、1、0.02、および 0.004 μ g の精製したタンパク質を塗布することによって、スロット・ブロットを行った。0.25% (w/v) のゼラチン (Difco) を含む PBST 中で膜を 4 $\times$ 20 分間ブロックした。次いで放射能標識した fH (200000 cpm/ml) を加え、室温で 1 時間膜をインキュベートした。PBST、0.5 M NaCl 中で、4 $\times$ 20 分間膜を洗浄し、ホスホイメージング・プレート (フジ写真フィルム) への露出によって、膜と関連性のある放射能活性を視覚化した。ウェスタン・ブロット膜も同様に処理した。肺炎球菌の結合アッセイは、対数相細菌 (OD₆₀₀ およそ 0.4) を使用して、(23) に記載のとおり実施した。

【0109】

製造者の説明書に従い、アフィニティー精製した抗 GST 抗体 (Biacore) を標準のアミン結合によってセンサ・チップ CM5 (Biacore) に結合させることにより表面プラズモン共鳴を行った。およそ 10000 共鳴単位 (RU) の抗体を結合させた。次いで、500~1500 RU の GST または GST: Hic³⁹⁻²⁶¹ (10 g/ml) を固定化することによって、各分析サイクルを開始し、その後 fH (2~0.127 μ M) を注入した。PBST 中で動力学研究を実施した。チップを 10 mM のグリシン pH 2.2 で再生することによって、各サイクルを停止した。BiaEvaluation 3.0 の多重モデルを用いて大域データ解析を実現した。

【0110】

溶血アッセイ

fH を媒介とする第二経路阻害について以前に述べられたアッセイを利用した (24)。ウサギ赤血球 (National Institute of Veterinary Medicine、スウェーデン、ウプサラ) を洗浄し、 5×10^8 細胞/ml で懸濁さ

せた。ホモ接合性 C 2 を欠損した患者の血清 (25) を補体供給源として使用した。高度に精製した fH も、好意で Truedsson 博士から提供を受けた。ペロナル緩衝食塩水中、16 mM の EGTA、4 mM の Mg^{2+} 、および 0.1% のゼラチンを用いて溶血反応を実施した。予備実験において、このアッセイ系で約 80% の溶血を発生させる C 2 欠損血清濃度を決定した。最終的なインキュベーション混合物は、追加のタンパク質 (それぞれ 30、90、または 60 μM の fH、GST、または GST: Hic³⁹⁻²⁶¹) を添加したまたは無添加の 1/12 (200 μl) 希釈 C 2 欠損血清、および 2.5×10^7 個のウサギ赤血球 (50 μl) を含有していた。赤血球は、他の試薬の 5 分後に加えた。5~40 分後、750 μl の冷 VBS、10 mM の EDTA を加えて反応を停止した。試料を 5 分間 3000 rpm で遠心分離し、上清を除去して、412 nm の吸光度を測定した。

10

【0111】

生物情報学

MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular、英国オックスフォード) での配列比較を行った。データベース検索には、The National Institute for Biotechnology Information の Entrez server を利用した。4 型肺炎球菌由来の PspC 配列は、<http://www.tigr.org> の The Institute for Genomic Research website から得た。

【0112】

20

結果

肺炎連鎖球菌による補体因子 H の結合

我々の研究所での以前の観察は、肺炎連鎖球菌がヒト血清からタンパク質を吸収できることを示唆した (非公表の結果)。このような相互作用の性質をより適切に調査するために、被包性および非被包性の一連の菌株 (表 1) を血清と共にインキュベートした。

表 1 - 肺炎連鎖球菌株

細菌株	関連する特性	参考文献の出所	
A66	被包性臨床株(3型)	(38, 39)	
PR218	Km ^R . A66 の非被包性誘導株	Iannelli, Pearce, および Pozzi (非公開)	
FP13	Cm ^R , Km ^R , Hic, hic が欠失し、 cat カセットで置換された PR218の変異株	この研究	10
D39	被包性臨床株(2型)	(38, 40)	
Rx1	D39の非被包性誘導株	(41)	
PR201	Km ^R . D39 の非被包性誘導株	Iannelli, Pearce, および Pozzi (非公開)	
FP7	Rx1の PspC の欠失変異株 (ヌクレオチド 124~1338の インフレーム欠失、GenBank 受入れ 番号 AF067128)	この研究	20
G54	被包性臨床株(19f型)	(39)	
PR212	Km ^R . G54 の非被包性誘導株	Iannelli, Pearce, および Pozzi (非公開)	
3496	被包性(3型)	(39)	
PR215	Km ^R . 3496 の非被包性誘導株	Iannelli, Pearce, および Pozzi (非公開)	30

【0113】

肺炎球菌に結合した血漿タンパク質を、洗浄後、溶離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって分離した。特に、D39、HB565、3496、G54、PR201、PR212、PR218、およびFP13によって吸収され、これらから溶離した血漿タンパク質のSDS-PAGE分析を実施した。希釈した血漿およびpHもゲル上を移動した。菌株D39(2型、被包性)、および4種の非被包性株すべて(血清型2、3、3、および19)が推定分子量140kDaのタンパク質を吸収した。繰り返した実験では、PR218、すなわちAvery株A66の非被包性派生株(Pearce、IannelliおよびPozzi、manuscript in preparation)が、140kDaタンパク質の最も顕著な吸収を一貫して示した。PR218によって吸収されたタンパク質をゲル内トリプシン消化にかけ、エドマン分解によって6本の内部フラグメントを配列決定した。

【0114】

これらの配列は、ヒト補体因子Hの様々な領域との同一性が100%であった。電気ブロット法によって、得られたゲルの複製をPVD膜に移し、ウサギ抗fH抗血清で探索した。抗血清は、前述の140kDaバンド、血漿中の同様サイズのバンド、および精製したfHと反応した。50kDa付近に相当するバンドとも弱い反応性があった。NH₂末

端配列決定にかけると、このバンドは、ヒト免疫グロブリン重鎖として特定され、免疫グロブリンの肺炎球菌への特異的または非特異的結合、および後続する次のヤギ抗ウサギ抗体との交差反応性を示唆した。

【0115】

fHの結合が補体活性化および細菌表面でのC3沈着に従属的であることを退けるために、C3欠損血清を使用して、菌株D39での血漿吸収を繰り返した。正常なヒト血漿とC3欠損血清の吸収の結果を比較すると、抗E抗体と反応するタンパク質の存在量は等しく（データ表示なし）、fHの結合がC3と無関係であることを示した。

【0116】

放射能標識したfHの結合について肺炎連鎖球菌株群を調べた。結合の度合いは菌株同士でかなり様々であったが、大部分の菌株が有意なfH結合を示した（表2）。 10

表 2. 放射能標識したfHの肺炎球菌への結合

球 菌	型	fH結合 (5)*	
		被包性	非被包性
D39/PR201	2	2.3	3.6
3496/PR215	3	15.4	26.6
HB565/PR218	3	27.6	40.8
G54/PR212	19	33.9	35.9

* 4組の被包性／非被包性株を調べた。結合は、加えられた放射能の百分率として表す。結果は、複製試料での2回の実験の平均である。

【0117】

被包性株は一般に、対応する非被包性株よりも結合性が多少弱かった。結合がタンパク質構造に媒介されるのか調査するために、細菌を異なるプロテアーゼで処理してから、fHの菌株PR218への結合を調べた（データ表示なし）。結合は、パパインでの前処理によって、ほとんど完全に不能になった。トリプシンでも半分以上に低下したが、ペプシンではそれほど効果がなかった（＜50%の低下）。これらの結果は、細菌をトリプシンで前処理することによってfH結合を不能にできるという先の観察の裏づけになる（15）。

【0118】

fH結合性タンパク質をコードする候補遺伝子の同定および配列分析
最近の論文（15）が、3型肺炎球菌は、fHがタンパク質の表面構造に結合するために、補体活性化および食作用に耐性であると提唱している。fHと相互に作用することが知られている以前に述べられた細菌表面タンパク質には、連鎖球菌Mタンパク質（11）およびY. エンテロコリチカ由来のYadA（13）が含まれる。YadA、M1、M1.1（26）、M6（27）、およびM様タンパク質H（28）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を使用して、The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org>) から入手した肺炎球菌（4型株JNR. 7/87）ゲノム・データベースを検索した。すべてのプローブで最高スコアの相同性が、2106bpのオープン・リーディング・フレーム（ORF）に見出され、アミノ酸（aa）702個の推定上のタンパク質をコードした。肺炎球菌タンパク質と検索に使用したfH結合性タンパク質との相同性の度合いは低かったが、配列全体を比較する 30 40 50

と有意であった。しかし、相同性の著しく高い数箇所の限定された領域が存在していた。この推定上のタンパク質での G E N B A N K 検索によって、P s p C アレルとして特定され、同じく S p s A、C b p A、または P b c A を表示した (16)。次いで P s p C を逆に S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s ゲノム配列決定プロジェクトの検索に使用し、最高スコアの組合せが M 1 タンパク質をコードすることが判明した。

【0119】

我々は、A v e r y 株 A 6 6 (3 型) およびその誘導株 P R 2 1 8 の p s p C 遺伝子の染色体座位を配列決定することにした。血清型 3 は食作用に強力に抵抗し (29)、P R 2 1 8 はヒト血漿由来の f H の吸収が顕著であった。この座は、6 1 2 a a の推定上のタンパク質をコードする 1 8 3 6 b p の O R F を含んでいた。H 因子結合性補体阻害因子であるので、この遺伝子を仮に h i c と名付けた。(G e n B a n k 受入れ番号 A F 2 5 2 8 5 7)。H i c タンパク質 (図 1 の上方に略図を示す) は、アミノ酸 1 1 個の反復単位 2 2 個からなるプロリン高含有領域を含む。C O O H 末端付近には、共通配列 L P S T G S、すなわちグラム陽性細胞壁に固定されたタンパク質の典型的なものが存在する (30)。この配列が疎水性の C O O H 末端に続く。この H i c 配列を使用して、肺炎球菌ゲノムプロジェクト・データベースを検索し、M タンパク質を最適な組合せとして同定した。数種の肺炎球菌表面タンパク質が H i c に相同的であることが判明した。2 型および 4 7 型肺炎球菌由来の S p s A は、H i c との相同性が高い領域を含む。S p s A は、分泌型 I g A およびその分泌成分を結合する (17)。C b p A (18)、すなわち、2 型肺炎球菌のアドヘシンかつ病原性決定因子もこの領域を含み、P b c A (G E N B A N K からの非公表の配列) も同様である。S p s A 2、C b p A、および P b c A は、一緒になって P s p C アレルの D 3 9 系列を形成する (16)。H i c の予想される 3 7 a a のリーダー・ペプチドを含む 1 4 9 a a の長さの N H 2 末端領域は、血清型 1、2、4、6 A、および 1 9 由来の P s p C タンパク質中の対応する領域と整合していた (図 2)。P s p C タンパク質中のこの領域についての特定の機能は、これまでに提唱されていない。興味深いことに、H i c の残部は、P s p C プロリン高含有領域中のより短い配列単位を除く P s p C タンパク質との相同性をそれほど示さなかった。H i c とは対照的に (図 1、下)、P s p C タンパク質は、一連の反復単位と共にコリン結合性モチーフ、すなわち、表面付着のための異なる仕組みを含む。二次構造をコンピュータで予測すると (31、32)、H i c (a a 4 0 ~ 2 7 0) および P s p C (a a 5 0 ~ 2 5 0) の N H 2 末端領域中の α ヘリックス構造の有力な予測がもたらされた。

【0120】

H i c 欠損変異株の構造および特性

肺炎球菌の f H 結合への考えられる H i c の寄与を調査するために、さらなる研究では、ヒト血漿から最も顕著に f H を吸収する非被包性株 P R 2 1 8 (血清型 3) を選択した。重複伸長によるスプライシング (遺伝子 S O E i n g) (19) を利用して、抗生物質耐性カセットを h i c 遺伝子の上流および下流に見出される配列の側に配置した。P R 2 1 8 をこの作製物で形質転換し、二重交差突然変異誘発法によって h i c 遺伝子を欠失させた。得られた菌株 F P 1 3 は、通常の成長培地中で親株と同じくらいよく成長した。h i c の欠失を P C R 実験によって確認した。

【0121】

この変異株で上述のものと同一の血漿吸収実験を行った。親株とは対照的に、抗 f H 抗血清では f H の位置のバンドが検出されなかった。さらに、細菌を連続的に希釈して、放射能標識した f H の野生型および変異型細菌への結合を調べた (図 3)。親株 P R 2 1 8 とは異なり、変異株 F P 1 3 の f H 結合は、最高の細菌濃度でも、バックグラウンド・レベルであった。また、p s p C 遺伝子が切断されているために、P s p C の 4 0 5 個の N H 2 末端アミノ酸を欠いている D 3 9 変異誘導株を作製することによって、肺炎球菌 f H 結合への考えられる P s p C の寄与も調べた。F P 7 と称したこの変異株を血漿吸収実験に使用したが、抗 f H 抗体と反応したバンドは溶出しなかった (データ表示なし)。

【0122】

10

20

30

40

50

H i c の H 因子結合性領域の地図作成 (m a p p i n g)

我々は、H i c、P s p C、C b p A、S p s A、および P b c A に共有される部分を含む H i c 非反復領域の結合特性を調査することにした。そのため、H i c の N H₂ 末端部分をコードする h i c 領域 (a a 3 9 ~ 2 6 1) をベクター p G E X 中にクローン化して、G S T をコードする遺伝子と融合させた。この挿入の対照配列決定によって、部分的な h i c 遺伝子の存在を検証すると、菌株 A 6 6 からの D N A 配列との同一性が 1 0 0 % であった。G S T : H i c^{3 9 - 2 6 1} および G S T を過剰発現させ、アフィニティー精製にかけ、S D S - P A G E によって分析した。一部は分解されたが、主要なタンパク質バンドの質量は期待通り (5 4 k D a) であった。同一のゲルを膜にブロットし、次いでこれを放射能標識した f H と共にインキュベートし、洗浄し、オートラジオグラフィにかけた。f H は G S T : H i c^{3 9 - 2 6 1} には結合したが、G S T には結合しなかった。連続希釈物 (5、1、0. 2、0. 0 4 μ g) の形の融合タンパク質および G S T 対照もニトロセルロース膜に塗布した。膜を放射能標識した f H で探索すると、融合タンパク質に結合し、G S T には結合しなかった。さらに、融合タンパク質を競合結合アッセイに使用して、G S T : H i c^{3 9 - 2 6 1} が P R 2 1 8 細菌への f H 結合と競合し得るかを調査した。結果 (図 4) は、融合タンパク質の H i c ドメインは細菌の f H 結合をブロックするが、G S T 単独では結合に影響を及ぼさないことを示している。肺炎連鎖球菌株 3 4 9 6、G 5 4、P R 2 1 5、および H B 5 6 5 でも同様の実験を行った。その実験でも、G S T : H i c^{3 9 - 2 6 1} は f H の試験菌株への結合をブロックしたが、G S T は影響を及ぼさなかった (データ表示なし)。G 5 4 株は血清型 1 9 であり、H i c と 1 9 型肺炎球菌 P s p C の類似性 (図 1 B を参照のこと) は、非 3 型株への f H 結合が H i c と相同的な P s p C 領域を媒介とすることを示唆する。

10

20

30

【0 1 2 3】

表面プラズモン共鳴によって G S T : H i c^{3 9 - 2 6 1} と f H の相互作用をさらに調べた。抗 G S T 抗体をカルボキシメチルデキストラン・チップに結合させてから、リガンドとしての G S T : H i c^{3 9 - 2 6 1} を固定化した。高度に精製した f H を様々な濃度の分析物として使用した。f H は、全濃度範囲 (0. 1 ~ 2 μ M) で G S T : H i c と相互に作用し、最高の f H 濃度で部分的に飽和した。チップへの結合をそれぞれ独立にして、実験を 3 回繰り返した。1 つのチップを連続して再生する代表的な実験を示す (図 5)。対照として、G S T を抗 G S T 抗体チップに同様に固定化した。流体相 f H の結合はなかった (データ表示なし)。標準の L a n g m u i r 1 : 1 モデルを適用して、データの包括的解析を行って、会合／解離の速度定数、会合定数、および解離定数を決定した。値は、3 種の異なる実験の平均 ± 標準偏差である。

	$k_a (10^4 \times \text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_d (10^{-4} \times \text{s}^{-1})$	$K_A (10^7 \times \text{M}^{-1})$	$K_D (10^{-8} \times \text{M})$
Hic + fH	2.8 ± 0.24	6.1 ± 2.4	5.0 ± 1.9	2.3 ± 1.1

40

【0 1 2 4】

H i c および補体阻害

機能の観点からの重要な問題は、H i c の f H への結合が f H の補体阻害機能に影響を及ぼすかである。この論点に取り組むために、f H を加えることによってウサギ血清中赤血球の補体を媒介とする溶解を阻害する、以前に述べられた方法論を適応させた (2 4)。C 2 欠損血清を補体供給源として使用して、古典経路からの影響を排除した。最初の実験を行い、f H を加えると、第二経路を媒介とする溶血が用量依存的に阻害された (データ表示なし)。反応物中の f H の濃度を (血清中の f H の) 3 倍に増大させることによって、溶血の完全な抑制を実現した。f H の増加がこれより少ないと、溶血の抑制は部分的と

50

なる。GST:HiC³⁹⁻²⁶¹、GST、またはfHとGST:HiC³⁹⁻²⁶¹（モル比1:2）が溶血に及ぼす影響を調査した。fHとGST:HiC³⁹⁻²⁶¹の相互作用を平衡にするために、プレインキュベーションのステップ（5分間）に若干の時間をとった。溶血の動力学研究は、fHを媒介とする補体活性化阻害が、反応物中のGST:HiC³⁹⁻²⁶¹の存在によって低下しないことを示した。むしろ、fHとGST:HiC³⁹⁻²⁶¹が同時に存在することによって、抑制の増強がもたらされる。興味深いことに、GST:HiC³⁹⁻²⁶¹を（過剰なfHを加えずに）単独で加えたときに部分的に溶血が抑制されたので、この融合タンパク質は、内在性の補体阻害作用を有するようである（図6）。

【0125】

10

（参考文献）

1. AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A. F. M., Verhoef, J., and Snippe, H. (1995) *Microbiol. Rev.* 59(4), 591-603
2. Kelly, T., Dillard, J. P., and Yother, J. (1994) *Infect. Immun.* 62(5), 1813-1819
3. Berry, A. M., Yother, J., Briles, D. E., Hansman, D., and Paton, J. C. (1989) *Infect. Immun.* 57, 2037-2042
4. McDaniel, L. S., Yother, J., Vijayakumar, M., McGarry, L., Guild, W. R., and Briles, D. E. (1987) *J. Exp. Med.* 165, 381-394
5. Berry, A. M., and Paton, J. C. (1996) *Infect. Immun.* 64(12), 5255-5262
6. Brown, E. J. (1985) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 121, 159-187
7. Gordon, D. L., Rice, J., Finlay-Jones, J. J., McDonald, P. J., and Hostetter, M. K. (1988) *J. Infect. Dis.* 157, 697-704
8. Wurznier, R. (1999) *Mol. Immunol.* 36, 249-260
9. Zipfel, P. F., Hellwage, J., Friese, M. A., Hegasy, G., Jokiranta, S. T., and Meri, S. (1999) *Mol. Immunol.* 36, 241-248

20

30

10. Morgan, B. P., and Harris, C. L. (1999) Complement regulatory proteins, Academic press, San Diego
11. Horstmann, R. D., Sievertsen, H. J., Knobloch, J., and Fishetti, V. A. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1657-1661
12. Johnsson, E., Berggård, K., Kotarsky, H., Hellwage, J., Zipfel, P. F., Sjöbring, U., and Lindahl, G. (1998) J. Immunol. 161, 4894-4901
13. China, B., Sory, M.-P., N'guyen, B. T., De Bruyere, M., and Cornelis, G. R. (1993) Infect. Immun. 61(8), 3129-3136
14. Tu, A.-H. T., Fulgham, R. L., McCrory, M. A., Briles, D. E., and Szalai, A. J. (1999) Infect. Immun. 67(9), 4720-4724
15. Neeleman, C., Geelen, S. P. M., Aerts, P. C., Daha, M. R., Mollnes, T. E., Roord, J. J., Posthuma, G., Van Dijk, H., and Fleer, A. (1999) Infect. Immun. 67(9), 4517-4524
16. Brooks-Walter, A., Briles, D. E., and Hollingshead, S. K. (1999) Infect. Immun. 67(12), 6533-6542
17. Hammerschmidt, S., Talay, S. R., Brandtzaeg, P., and Chhatwal, G. S. (1997) Mol. Microbiol. 25(6), 1113-1124
18. Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., and Masure, R. (1997) Mol. Microbiol. 25(5), 819-829
19. Horton, R. M. (1995) Mol. Biotechnol. 3, 93-99
20. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
21. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(9), 4350-4354
22. Nesbitt, S. A., and Horton, M. A. (1992) Anal. Biochem. 206, 267-272
23. Åkesson, P., Cooney, J., Kishimoto, F., and Björck, L. (1990) Mol. Immunol. 27(6), 523-531
24. Nydegger, U. E., Fearon, D. T., and Austen, K. F. (1978) J. Immunol. 120, 1404-1408
25. Truedsson, L., Alper, C. A., Awdeh, Z. L., Johansen, P., Sjöholm, A. G., and Sturfelt, G. (1993) J. immunol. 151, 5856-5863
26. Harbaugh, M. P., Podbielski, A. P., Hugl, S., and Cleary, P. (1993) Mol. Microbiol. 8, 981-991

10

20

30

40

27. Hollingshead, S. K., Fischetti, V. A., and Scott, J. R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 1677-1686
28. Gomi, H., Hozumi, T., Hattori, S., Tagawa, C., Kishimoto, F., and Björck, L. (1990) *J. Immunol.* 144, 4046-4052
29. Hostetter, M. K. (1986) *J. Infect. Dis.* 153, 682-693
30. Navarre, W. W., and Schneewind, O. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(1), 174-229
31. Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47, 45-148
32. Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978) *J. Mol. Biol.* 120, 97-120
33. Bruyn, G. A. W., Zegers, B. J. M., and van Furth, R. (1992) *Clin. Infect. Dis.* 14, 251-262
34. Johnsson, E., Thern, A., Dahlbäck, B., Hedén, L.-O., Wikström, M., and Lindahl, G. (1996) *J. Immunol.* 157, 3021-3029
35. Angel, C. S., Ruzek, M., and Hostetter, M. K. (1994) *J. Infect. Dis.* 170, 600-608
36. Ram, S., Mcquillen, D. P., Gulati, S., Elkins, C., Pangburn, M. K., and Rice, P. A. (1998) *J. Exp. Med.* 188, 671-680
37. Ram, S., Sharma, A. K., Simpson, S. D., Gulati, S., Mcquillen, D. P., Pangburn, M. K., and Rice, P. A. (1998) *J. Exp. Med.* 187, 743-752
38. Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944) *J. Exp. Med.* 79, 137-158
39. Pozzi, G., Masala, L., Iannelli, F., Manganelli, R., Havarstein, L. S., Piccoli, L., Simon, D., and Morrison, D. A. (1996) *J. Bacteriol.* 178, 6087-6090
40. Iannelli, F., Pearce, B. J., and Pozzi, G. (1999) *J. Bacteriol.* 81, 2652-2654
41. Shoemaker, N. B., and Guild, W. R. (1974) *Mol. Gen. Genet.* 128, 283-290

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

H i c と P s p C の比較を示す H i c と P s p C の略図である。シグナル・ペプチド (S P) および壁貫通領域 (W) を表示する。 40

【図 2】

H i c と P s p C の対立配列変異体、すなわち P s p C 6 A (配列番号 5)、P s p C 2 (配列番号 7)、P s p C 1 9 (配列番号 9)、P s p C 1 9 T I G R (配列番号 10)、および S p s A 1 (配列番号 11) の配列の比較を示す図であり、H i c (血清型 3)、および S p s A を含む P s p C 対立配列変異体由来の N H₂ 末端領域の C l u s t a l W アラインメントである。同一または類似の残基に、それぞれ濃い陰および淡い陰をかけた。タンパク質名中の数字は、その配列の入手元の菌株血清型を示す。P s p C . T I G R は、血清型 4 の菌株由来である。G e n B a n k / E M B L 受入れ番号は、P s p C 2 が A F 0 6 8 6 4 5、P s p C 6 A が A F 0 6 8 6 4 5、P s p C 1 9 が A F 0 6 8 6 4 50

8、SpsA1がY10818である。

【図3】

放射能標識したH因子のHic欠損変異株への結合に関するグラフである。PR218 (□) およびHic欠損変異株FP13 (◆) の連続希釈物を放射能標識したfHと共にインキュベートした。結合は、加えられた放射能の百分率として示す。データの点は、複製試料での3回の実験の平均である。標準偏差を誤差バーで示した。

【図4】

H因子のHicへの結合を示すグラフである。競合結合アッセイは、非標識のfH (○)、GST (□)、およびGST:Hic (3^9-2^61) (◆) の次第に増大する濃縮物の存在下、PR218細菌 (10^9 CFU/ml) を放射能標識したfHと共にインキュベートすることによって実施した。 10

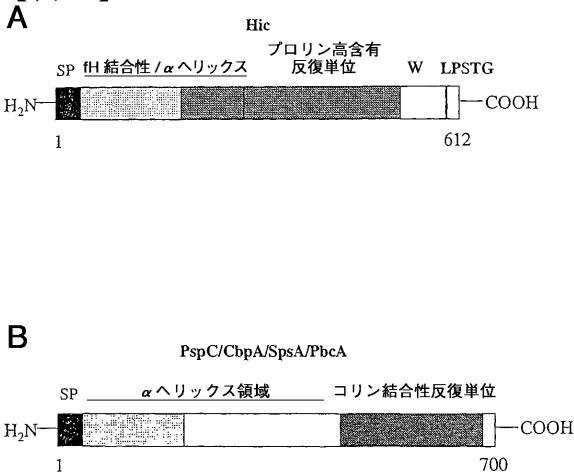
【図5】

表面プラズモン共鳴によるHicとH因子の相互作用の動力学分析を示す図である。(3つの中から) 1つの代表的なセンサグラフを示す。分析物 (fH) の濃度は、2000、667、333、167、および83 nMとし、時間の尺度を0が注入開始点を表すように調節した。

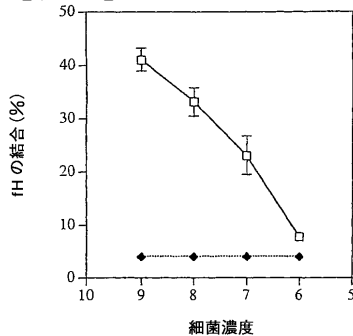
【図6】

HicおよびH因子が第二経路溶血を阻害したことを示すグラフである。ウサギ赤血球をC2欠損血清と共にインキュベートし、溶血の動力学研究を行った。fH、GST、および/またはGST:Hic 3^1-2^61 の溶血への影響を調査した。数字は、溶血を対照での最大溶血画分として表す (90~95%)。示したデータは、1つの代表的な実験からのものである (n=3)。曲線は、対照の反応 (□)、fHとの反応 (◆)、GST:Hic 3^9-2^61 (□)、GST (△)、およびfHとGST:Hic 3^9-2^61 の組合せ (○) を表す。 20

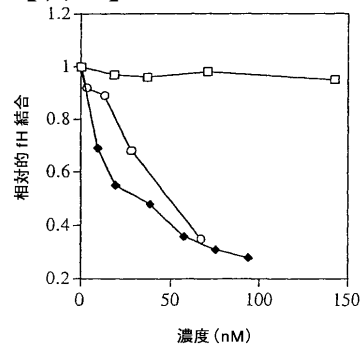
【図1】



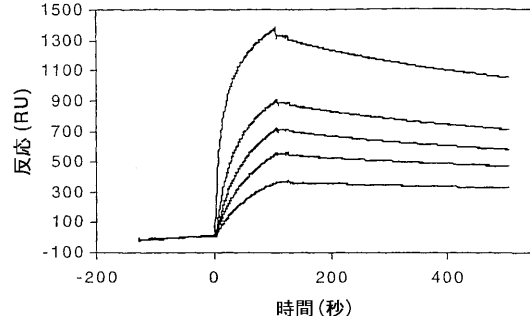
【図3】



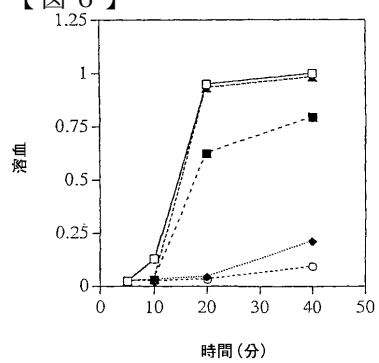
【図4】



【図5】



【図 6】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08426 A2

(51) International Patent Classification: C12N 15/31, 15/63, C07K 14/315, 16/12, A61K 31/711, 39/09 (74) Agent: WOODS, Geoffrey, Corlett, J.A. Kemp & Co., 14 South Square, Gray's Inn, London WC1R 5JJ (GB).

(21) International Application Number: PCT/EP01/08409

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date: 19 July 2001 (19.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0002738.4 20 July 2000 (20.07.2000) SE

(71) Applicant (for all designated States except US): HANSA MEDICAL AB [SE/SE]; Box 784, S-220 07 Lund (SE).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BJORCK, Lars [SE/SE]; Magle Stora Kyrkogata 10, S-223 50 Lund (SE). SJOHOLM, Anders [SE/SE]; Karl XI-gatan 7, S-222 28 Lund (SE). JANULCZYK, Robert [SE/SE]; Vildanden W304, S-227 34 Lund (SE). POZZI, Gianni [IT/IT]; Valli a Toliano, 238, I-53018 Soncillo (IT). IANNELLI, Francesco [IT/IT]; Vicco 10 Mancini, 9, I-83040 Andretta (IT).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/08426 A2

(54) Title: PROTEIN

(57) Abstract: The present invention provides proteins and peptides derived from *Streptococcus pneumoniae*, type 3, which all the complement factor H (fH). These proteins and peptides show a homology of at least 50 %, preferably at least 60 %, and most preferably at least 70 % with the subsequence from Thr38 to Lys 149 of the sequence disclosed herein as SEQ ID NO:1. The above subsequence, which is located in the amino-terminal of a surface protein isolated from *Streptococcus Pneumoniae*, type 3, is highly associated with binding of fH. In another aspect, the invention relates to proteins and peptides showing a homology of at least 85 %, preferably at least 95 %, and most preferably at least 99 % with the fHc protein, the amino acid sequence of which is disclosed as SEQ ID NO:1. The invention also provides vaccine compositions comprising the above proteins and peptides.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

PROTEINField of the Invention

The present invention relates to factor H-binding proteins and peptides,
5 nucleic acid sequences encoding these proteins and peptides, antibodies specifically
binding them and pharmaceutical compositions, especially vaccine compositions,
containing them.

Background of the Invention

10 Despite the availability of effective antibiotics and polyvalent capsular
polysaccharide vaccines, *Streptococcus pneumoniae* remains a significant cause of
morbidity and mortality, causing conditions such as otitis media, community-
acquired pneumoniae, septicemia and meningitis. Infants, the elderly and
immunocompromised patients are particularly susceptible to pneumococcal
15 infection.

The polysaccharide capsule of the pneumococcus has long been recognized
as the major virulence determinant (1). Virulence varies with capsular serotype, but
experiments with conversion of serotypes clearly demonstrate that other factors than
the capsule play a significant role (2). A number of non-capsular virulence factors
20 have also been extensively examined. Although their relative contribution to
pneumococcal virulence remains unclear, it is apparent that proteins such as PspA,
pneumolysin and PsaA play a role in pneumococcal virulence (3-5).

The classical and alternative pathways of complement are part of the innate
immune system, and constitute an important line of defense against pneumococcal
25 infection (6,7). There are many strategies by which bacteria can interfere with the
function of the complement system (reviewed in (8)). For example, binding of the
complement regulatory protein fH to bacterial surface proteins has been described by
several groups (reviewed in (9)), although the precise consequences of such binding
remain elusive. fH is a 150 kDa plasma protein composed of 20 short consensus
30 repeats, and is the best characterised member of the factor H protein family (10). fH
is a crucial protein in the regulation of complement. The critical step in the
amplification loop of the alternative pathway is the formation of C3 convertase

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

2

(C3bBb) from surface-deposited C3b and factor B. fH inhibits complement activation by preventing association of factor B with C3b, acting as a cofactor in C3b degradation by factor I, and promoting the dissociation of Bb from both C3 and C5 convertase.

5 Examples of bacterial surface structures interacting with fH include M and M-like proteins of *S. pyogenes* (11,12). Furthermore, YadA in *Yersinia enterocolitica* has been shown to inhibit complement activation by coating the bacterial surface with fH (13). Recently, two groups independently described inhibition of complement-mediated opsonophagocytosis in type 3 pneumococci. One study (14)
10 suggested that PspA interferes with deposition of C3b and/or inhibits the alternative pathway C3 convertase. Another study (15) claimed that pneumococcal resistance to phagocytosis is mediated by hitherto unknown surface proteins binding fH. PspA does not contribute to this interaction, as a PspA-deficient mutant bound similar or even larger amounts of fH than the parent strain.

15 Vaccines against *Streptococcus pneumoniae* that are currently in use are all based upon capsule structures (carbohydrate antigens). Each serotype has a unique capsule structure. Therefore, vaccine compositions against *Streptococcus pneumoniae* contain numerous different capsular antigens in order to protect against the most common serotypes. Still, these compositions fail to provide an adequate
20 protection in all individuals.

In particular some patients, such as those showing complement deficiency, are not sufficiently protected by these vaccine compositions. The protection against type 3 pneumococci is especially insufficient. Accordingly, there is a need for improved *Streptococcus pneumoniae* vaccine compositions.

25

Summary of the invention

The present invention provides a polypeptide having the ability to bind factor H comprising: (a) the amino acid sequence of Thr38 to Lys149 of SEQ ID NO: 1
30 (b) a variant of (a) which is capable of binding factor H, or (c) a fragment of (a) or (b) of at least 20 amino acids in length which is capable of binding factor H, for use in prophylaxis or therapy.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

3

The present invention also provides a vaccine composition comprising a polypeptide having an amino acid sequence selected from: (a) the amino acid sequence of Thr38 to Lys149 of SEQ ID NO: 1, (b) a variant of (a) which is capable of generating an immune response to *Streptococcus pneumoniae* or binding to an anti-protein Hic antibody, or (c) a fragment of (a) or (b) of at least 6 amino acids in length which is capable of generating an immune response against *Streptococcus pneumoniae*, or of binding to an anti protein Hic antibody.

In another aspect the invention provides a polypeptide of 15 to 800 amino acids in length comprising: (a) the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or (b) a polypeptide showing sequence identity of at least 85%, preferably at least 95%, and most preferably at least 99% sequence identity with (a). Preferably the polypeptide has the ability to bind factor H.

The invention also provides a polynucleotide encoding a polypeptide, the polynucleotide comprising: (i) the nucleotide coding sequence of SEQ ID NO: 4 or a sequence complementary thereto, (ii) a nucleotide sequence which selectively hybridizes to said sequence (i) or a fragment thereof, or (iii) a nucleotide sequence which codes for a polypeptide having the same amino acid sequence as that encoded by a said sequence of (i) or (ii).

The present invention provides proteins and peptides derived from *Streptococcus pneumoniae*, type 3, which bind the complement factor H (fH). These proteins and peptides show a homology of at least 50 %, preferably at least 60 %, and most preferably at least 70 % with the subsequence from Thr38 to Lys149 of the sequence disclosed herein as SEQ ID NO: 1. The above subsequence, which is located in the amino-terminal of a surface protein isolated from *Streptococcus pneumoniae*, type 3, is highly associated with binding of fH. In another aspect, the invention relates to proteins and peptides showing a homology of at least 85 %, preferably at least 95 %, and most preferably at least 99 % with the Hic protein, the amino acid sequence of which is disclosed as SEQ ID NO: 1. The inventions also provides vaccine compositions comprising the above proteins and peptides.

30

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

4

Description of the Figures

Fig. 1 discloses a comparison of Hic and PspC. Schematic representation of Hic and PspC. The signal peptide (SP) and the wall spanning region (W) are indicated;

Fig. 2 shows a sequence comparison of Hic and allelic variants of PspC, namely PspC6A (SEQ ID NO: 5), PspC2 (SEQ ID NO: 7), PspC19 (SEQ ID NO: 9), PspC19TIGR (SEQ ID NO: 10) and SpsA1 (SEQ ID NO: 11). ClustalW alignment of the NH₂-terminal region from Hic (serotype 3) and allelic variants of PspC, including SpsA. Identical and similar residues are shaded in dark and light, respectively. Numbers in the protein names indicate the serotype of the strain from which the sequence was obtained. PspC.TIGR is from a serotype 4 strain. GenBank/EMBL accession numbers are as follows: PspC2, AF068645; PspC6A, AF068645; PspC19, AF068648; SpsA1, Y10818;

Fig. 3 relates to binding of radiolabelled factor H to a Hic-deficient mutant. Serial dilutions of PR218 (□) and the Hic-deficient mutant FP13 (♦) were incubated with radiolabelled fH. Binding is expressed as the percentage of added radioactivity. The data points are averages of three experiments with duplicate samples. Standard deviation is indicated by error bars;

Fig. 4 discloses binding of factor H to Hic. A competitive binding assay was performed by incubating PR218 bacteria (10⁹ CFU/ml) with radiolabelled fH in the presence of increasing concentrations of unlabelled fH (○), GST (□), and GST:Hic⁽³⁹⁻²⁶¹⁾ (♦);

Fig. 5 presents kinetic analysis of the interaction between Hic and factor H by surface plasmon resonance. One representative sensorgram (out of three) is shown. The concentration of the analyte (fH) was 2000, 667, 333, 167 and 83 nM, and the time scale has been adjusted so that 0 s represents the injection starting point.

Fig. 6 shows that Hic and factor H inhibit alternative pathway hemolysis. Rabbit erythrocytes were incubated with C2-deficient serum and a kinetic study of hemolysis was performed. The influence of fH, GST, and/or GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ on hemolysis was studied. Numbers represent hemolysis as a fraction of maximum hemolysis in the control (90-95%). Data shown are from one representative

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

5

experiment (n=3). The curves represent control reaction (□), reaction with fH (◆), GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ (□), GST (Δ), and a combination of fH and GST:Hic 39-261 (O).

Description of the Sequences

- 5 SED ID NO: 1 is the amino acid sequence of protein Hic.
 SED ID NOs: 2 and 3 are the primers used to amplify a portion of Hic.
 SED ID NO: 4 is the DNA sequence encoding protein Hic.
 SED ID NOs: 5 and 6 are the amino acid and encoding DNA sequence respectively for PspC6A.
 10 SED ID NO: 7 and 8 are the amino acid and encoding DNA sequence respectively for PspC2.
 SED ID NO: 9 is the amino acid sequence of PspC19.
 SED ID NO: 10 is the amino acid sequence of PspC19 TIGR.
 SED ID NO: 11 is the amino acid sequence of SpsA1.

15

Detailed description of the invention

General terms and introduction

- The following abbreviations are used throughout the present application: fH, complement factor H; PspA, pneumococcal surface protein A; PsaA, pneumococcal surface antigen A; PspC, pneumococcal surface protein C; CbpA, choline-binding protein A; SpsA, *Streptococcus pneumoniae* secretory IgA binding protein; GST, glutathione S-transferase; PCR, polymerase chain reaction; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis.

- As disclosed above, in a first aspect, the present application relates to proteins and peptides binding fH. These proteins and peptides are all comprise a derivative of the subsequence from thr38 to lys149 of amino-terminal of the Hic protein, whose amino acid sequence is enclosed herein as SEQ ID NO: 1. Peptides and proteins according to this first aspect show a homology of at least 50 %, preferably at least 60 %, and most preferably at least 70 % with the subsequence from Thr38 to Lys149 of the sequence disclosed herein as SEQ ID NO: 1. Below, it will be shown that the amino-terminal part of the Hic protein is associated with binding fH. It will also be

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

6

shown that the amino-terminal amino acid sequences shows substantial similarities with several other pneumococcal surface proteins, which probably also bind fH.

The polypeptides according to the first aspect of the invention have one or more of the following properties. Firstly, they may have the ability to bind to fH. As
5 will be shown below, this feature makes them interesting as vaccine candidates against pneumococci. Secondly, peptides according to the invention may have the ability to stimulate a T-cell response. Thirdly, the peptides of the invention may stimulate a B-cell response.

In a second aspect, the present invention relates to peptides and proteins
10 comprising at least 15 amino acids and which peptides and proteins show a homology of at least 85 %, preferably at least 95 %, and most preferably at least 99 % with the amino acid sequence of the Hic protein disclosed as SEQ ID NO: 1.

The polypeptides according to the second aspect of the invention show a high
homology to the Hic protein, which makes them interesting as vaccine candidates
15 against pneumococci. Secondly, peptides according to this aspect of the invention may have the ability to stimulate a T-cell response. Thirdly, the peptides of this aspect of the invention may stimulate a B-cell response.

In an alternative aspect, the invention provides a polypeptide which comprises:

- 20 (a) the amino acid sequence of Thr38 to Lys149 of SEQ ID NO: 1,
(b) a variant of (a) which is capable of binding factor H, or
(c) a fragment of (a) or (b) of at least 20 amino acids in length which is capable of binding factor H.

In another aspect, the invention relates to a vaccine composition comprising a
25 polypeptide which comprises:

- (a) the amino acid sequence of Thr38 to Lys149 of SEQ ID NO: 1,
(b) a variant of (a) which is capable of generating an immune response to pneumococci, or binding to an anti-Hic antibody, or
(c) a fragment of (a) or (b) of at least 6 amino acids in length which is
30 capable of generating an immune response against a pneumococcus, or of binding to an anti-Hic antibody.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

7

The ability to bind factor H can be monitored by any suitable method. In particular, assays can be carried out using labelled factor H, for example, labelled with a radio label and monitoring binding to a peptide under investigation. Similarly, the ability of the peptides to bind anti-Hic antibodies can be monitored using any suitable assay, and in particular using antibodies which have been generated against full length protein Hic as shown in SEQ ID NO: 1 or a fragment thereof comprising the sequence of Thr38 to Lys149 of SEQ ID NO: 1. Similarly, the capability of the peptide to generate an immune response can be tested using a suitable animal model such as a murine model comprising administering the peptide under investigation to the animal, monitoring the generation of an immune response, either through the production of antibodies or through the production of T-cell responses such as cytotoxic T-cell responses. Preferred peptides which are able to generate a protective immune response can be identified by subjecting an animal so vaccinated with a lethal challenge of pneumococci. Similarly, the ability of the peptide to bind to anti-protein Hic antibodies can be assayed *in vitro*. An anti-protein Hic antibody can be generated by standard techniques using a protein of SEQ ID NO: 1 to generate a suitable antibody.

In a further aspect, the invention relates to a novel polynucleotide having a sequence which is:

- (i) the nucleotide coding sequence of SEQ ID NO: 4 or a sequence complementary thereto,
- (ii) a nucleotide sequence which selectively hybridizes to said sequence (i) or a fragment thereof, or
- (iii) a nucleotide sequence which codes for a polypeptide having the same amino acid sequence as that encoded by a said sequence of (i) or (ii).

Polypeptides are provided which are encoded by a polynucleotide of the invention. The invention also relates to polynucleotides which encode a polypeptide of the invention. The invention also provides:

- a recombinant vector comprising a polynucleotide of the invention, such as an expression vector in which the polynucleotide is operably linked to a regulatory sequence;

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

8

- a host cell which is transformed for the polynucleotide of the invention;
 - a process of producing a polypeptide of the invention comprising maintaining a host cell transformed with a polynucleotide of the invention under conditions to provide expression of the polypeptide;
 - an antibody, monoclonal or polyclonal, specific for a polypeptide in accordance with the invention;
 - a method of vaccinating a patient against pneumococcal infection which method comprises administering to the patient an effective amount of a polypeptide or polynucleotide according to the invention.
- In another aspect, the invention relates to an assay to identify an agent which inhibits the binding of factor H to protein Hic. The assay may comprise incubating a polypeptide of the invention having the ability to bind factor H with factor H in the presence of the substance under test and monitoring for binding of the polypeptide of the invention to factor H. Methods for monitoring protein interactions are well known in the art. The polypeptide of the invention may be provided in isolated form. In the alternative, a bacterium expressing a polypeptide of the invention may be provided and incubated with factor H. Substances which are identified which inhibit the binding of factor H to a polypeptide of the invention may be used as an antibiotic or in the treatment of an individual suffering from pneumococcal infection.
- The invention also provides formulating an agent identified as an inhibitor of the binding of factor H to a polypeptide of the invention with a pharmaceutically acceptable carrier.
- Accordingly, the present invention provides a method for the treatment of a *Streptococcus pneumoniae* infection, which method comprises identifying a substance which inhibits binding of factor H to a polypeptide of the invention and administering a therapeutically effective amount of the substance to a patient in need thereof. A therapeutically effective amount of the substance is an amount which alleviates the symptoms of the *Streptococcus pneumoniae* infection or otherwise improves the condition of the patient suffering from a *Streptococcus pneumoniae* infection. Preferably the substance administered to a patient is formulated with a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

9

A DNA sequence encoding the Hic protein is disclosed as SEQ ID NO: 4.

The nucleic acid sequences of the present invention are preferably DNA, though they may be RNA. It will be obvious to those of skill in the art that, in RNA sequences according to the invention, the T residues will be replaced by U. Nucleic acid sequences of the invention will typically be in isolated or substantially isolated form. For example up to 80, up to 90, up to 95 or up to 100% of the nucleic acid material in a preparation of a nucleic acid of the invention will typically be nucleic acid according to the invention. Alterations, isolations or syntheses of nucleic acid sequences according to the invention may be performed by any conventional method, for example by the methods of Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 1989).

For example, the sequences of the invention include sequences that are capable of selective hybridisation to those encoding the proteins or peptides of the invention or the complementary strands thereof and that encode a polypeptide having one or more of the properties defined above.

Such hybridisation may be carried out under any suitable conditions known in the art (see Sambrook et al (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual). For example, if high stringency is required, suitable conditions include 0.2 X SSC at 60 °C. If lower stringency is required, suitable conditions include 2X SSC at 60 °C.

Preferably, a polynucleotide of the invention can hybridize to SEQ ID NO: 4, or its complement at a level significantly above background. Background hybridization may occur, for example, because of other cDNAs present in a cDNA library. The signal level generated by the interaction between a polynucleotide of the invention and the sequence of SEQ ID NO: 4 is typically at least 10 fold, preferably at least 100 fold, as intense as interactions between other polynucleotides and the sequence of SEQ ID NO: 4. The intensity of interaction may be measured, for example, by radiolabelling the probe, e.g. with ³²P. Selective hybridization is typically achieved using conditions of medium to high stringency (for example 0.1 to 0.2 x SSC at from about 50°C to about 60°C).

A nucleotide sequence capable of selectively hybridizing to the DNA sequence of SEQ ID NO: 4 or to the sequence complementary to that coding sequence will be generally at least 80%, preferably at least 90% and more preferably

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

10

at least 95%, homologous to the sequence of SEQ ID NO: 4 or its complement over a region of at least 20, preferably at least 30, for instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides or, indeed, over the full length of the coding sequence. Thus there may be at least 85%, at least 90% or at least 95% nucleotide identity over such regions.

Any combination of the above mentioned degrees of homology and minimum size may be used to define polynucleotides of the invention, with the more stringent combinations (i.e. higher homology over longer lengths) being preferred. Thus for example a polynucleotide which is at least 85% homologous over 25, preferably over 30, nucleotides forms one aspect of the invention, as does a polynucleotide which is at least 90% homologous over 40 nucleotides.

For example the UWGCG Package provides the BESTFIT program which can be used to calculate homology (for example used on its default settings) (Devereux *et al* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395). The PILEUP and BLAST algorithms can be used to calculate homology or line up sequences (such as identifying equivalent or corresponding sequences (typically on their default settings), for example as described in Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F *et al* (1990) *J Mol Biol* 215:403-10.

Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pair (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence that either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighbourhood word score threshold (Altschul *et al*, supra). These initial neighbourhood word hits act as seeds for initiating searches to find HSP's containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Extensions for the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T and X determine the sensitivity and speed of

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

11

the alignment. The BLAST program uses as defaults a word length (W) of 11, the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=4, and a comparison of both strands.

5 The BLAST algorithm performs a statistical analysis of the similarity between two sequences; see e.g., Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787. One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences
10 would occur by chance. For example, a sequence is considered similar to another sequence if the smallest sum probability in comparison of the first sequence to the second sequence is less than about 1, preferably less than about 0.1, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

Also included within the scope of the invention are sequences that differ from
15 those defined above because of the degeneracy of the genetic code and encode the same polypeptide having one or more of the properties defined above.

Nucleic acid sequences of the invention will preferably be at least 30 bases in length, for example up to 50, up to 100, up to 200, up to 300, up to 400, up to 500, up to 600, up to 800, up to 1000 bases, up to 2000 bases or up to 3000 bases.

20 Nucleic acid sequences of the invention may be extended at either or both of the 5' and 3' ends. Such extensions may be of any length. For example, an extension may comprise up to 10, up to 20, up to 50, up to 100, up to 200 or up to 500 or more nucleic acids. Thus, the nucleic acid sequences of the invention may be extended at either or both of the 5' and 3' ends by any non-wild-type sequence.

25 The polypeptides of the invention are derived from the amino acid sequence shown as SEQ ID NO: 1. Thus, the polypeptides of the invention are not limited to the polypeptide of SEQ ID NO: 1. Rather, the polypeptides of the invention also include polypeptides with sequences closely related to that of SEQ ID NO: 1 that are able to bind fH. Alternatively, the polypeptides of the invention comprises very
30 similar or identical antigenic determinants compared to the Hic protein despite the fact that they do not bind to fH. All these sequences may be prepared by altering that of SEQ ID NO: 1 by any conventional method, or isolated from any organism or

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

12

made synthetically. Such alterations, isolations or syntheses may be performed by any conventional method, for example by the methods of Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 1989). In particular, polypeptides related to that of SEQ ID NO: 1 may be prepared by modifying a DNA sequence encoding the Hic protein expressing them recombinantly.

The polypeptides of the invention may accordingly have less than 100% sequence identity with that of SEQ ID NO: 1. Thus, polypeptides of the invention may include substitutions, deletions, or insertions that distinguish them from SEQ ID NO: 1 as long as these do not destroy the ability to bind fH, or as long as they show similar antigenic properties as the Hic protein.

A substitution, deletion or insertion may suitably involve one or more amino acids, typically from one to five, one to ten or one to twenty amino acids, for example, a substitution, deletion or insertion of one, two, three, four, five, eight, ten, fifteen, or twenty amino acids. Typically, a fH-binding polypeptide of the first aspect of the invention has at least 50%, at least 60%, or at least 70% sequence identity to the subsequence from thr38 to lys149 of SEQ ID NO: 1. Preferably the polypeptide has at least 80%, 90%, 95%, 97% or 99% identity with SEQ ID NO: 1. Typically, a polypeptide of the second aspect of the invention has at least 85 %, at least 95, or at least 99 % sequence identity to a subsequence that can be derived from all parts of the sequence of SEQ ID NO: 1, and preferably to a sequence of 15 to 600 contiguous amino acids of SEQ ID NO: 1.

In general, the physicochemical nature of the sequence of SEQ ID NO: 1 should be preserved in a polypeptide of the invention. Such sequences will generally be similar in charge, hydrophobicity and size to that of SEQ ID NO: 1. Examples of substitutions that do not greatly affect the physicochemical nature of amino acid sequences are those in which an amino acid from one of the following groups is substituted by a different amino acid from the same group:

H, R and K
I, L, V and M
A, G, S and T

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

13

D, E, Q and N.

Where polypeptides of the invention are synthesised chemically, D-amino acids (which do not occur in nature) may be incorporated into the amino acid sequence at sites where they do not affect the polypeptides biological properties. This reduces the polypeptides' susceptibility to proteolysis by the recipient's proteases.

The nucleic acid sequences encoding the polypeptides of the invention may be extended at one or both ends by any non-wild-type sequence.

Thus, the polypeptides of the invention may be extended at the C-terminal by an amino acid sequence of any length. For example, an extension may comprise up to 5, up to 10, up to 20, up to 50, or up to 100 or 200 or more amino acids. A C-terminal extension may have any sequence apart from that which is C-terminal to the sequence of the invention (or the native sequence from which it is derived) in native Hic protein. Thus, the polypeptides of the invention may be extended at the C-terminal by any non-wild-type sequence.

The polypeptides of the invention may be attached to other polypeptides, proteins or carbohydrates that enhance their antigenic properties. Thus, polypeptides of the invention may be attached to one or more other antigenic polypeptides. These additional antigenic polypeptides may be derived from *S. pneumoniae* or from another organism. Possible additional antigenic polypeptides include heterologous T-cell epitopes derived from other *S. pneumoniae* proteins or from species other than *S. pneumoniae*. Heterologous B-cell epitopes may also be used. Such heterologous T-cell and or B-cell epitopes may be of any length and epitopes of up to 5, up to 10 or up to 20 amino acids in length are particularly preferred. Possible carbohydrates that can be added are capsular antigens. These additional antigenic polypeptides may be attached to the polypeptides of the invention chemically. Alternatively, one or more additional antigenic sequences or carbohydrate groups may comprise an extension to a polypeptide of the invention.

A polypeptide of the invention may be subjected to one or more chemical modifications, such as glycosylation, sulphation, COOH-amidation or acylation. In particular, polypeptides that are acetylated at the N-terminus are preferred, as are polypeptides having C-terminal amide groups. Preferred polypeptides may have one

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

14

or more of these modifications. For example, particularly preferred peptides may have a C-terminal amide group and N-terminal acetylation.

A polypeptide of the invention may form part of a larger polypeptide comprising multiple copies of the sequence of one or more of SEQ ID NO: 1 or a
5 sequences related to them in any of the ways defined herein.

Polypeptides of the invention typically comprise at least 15 amino acids, for example 15 to 20, 20 to 50, 50 to 100 or 100 to 200 or 200 to 300 or 300 to 400 or 400 to 500 or 500 to 600 or 600 to 700 or 700 to 800 amino acids.

Polypeptides according to the invention may be purified or substantially
10 purified. Such a polypeptide in substantially purified form will generally form part of a preparation in which more than 90%, for example up to 95%, up to 98% or up to 99% of the peptide material in the preparation is that of a polypeptide or polypeptides according to the invention.

The nucleic acid sequences and polypeptides of the invention were originally
15 derived from *S. pneumoniae*. However, nucleic acid sequences and/or polypeptides of the invention may also be obtained from other organisms, typically bacteria, especially other streptococci. They may be obtained either by conventional cloning techniques or by probing genomic or cDNA libraries with nucleic acid sequences according to the invention. This can be done by any conventional method, such as
20 the methods of Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 1989).

A nucleic acid sequence according to the invention may be included within a vector, suitably a replicable vector, for instance a replicable expression vector.

A replicable expression vector comprises an origin of replication so that the vector can be replicated in a host cell such as a bacterial host cell. A suitable vector
25 will also typically comprise the following elements, usually in a 5' to 3' arrangement: a promoter for directing expression of the nucleic acid sequence and optionally a regulator of the promoter, a translational start codon and a nucleic acid sequence according to the invention encoding a polypeptide having one or more of the biological properties of Hic protein. A non-replicable vector lacks a suitable origin of
30 replication whilst a non-expression vector lacks an effective promoter.

The vector may also contain one or more selectable marker genes, for example an ampicillin resistance gene for the identification of bacterial

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

15

transformants. Another possible marker gene is the kanamycin resistance gene.

Optionally, the vector may also comprise an enhancer for the promoter. If it is desired to express the nucleic acid sequence of the invention in a eucaryotic cell, the vector may also comprise a polyadenylation signal operably linked 3' to the nucleic acid encoding the functional protein. The vector may also comprise a transcriptional terminator 3' to the sequence encoding the polypeptide of the invention.

The vector may also comprise one or more non-coding sequences 3' to the sequence encoding the polypeptide of the invention. These may be from *S. pneumoniae* (the organism from which the sequences of the invention are derived) or the host organism, which is to be transformed with the vector or from another organism.

In an expression vector, the nucleic acid sequence of the invention is operably linked to a promoter capable of expressing the sequence. "Operably linked" refers to a juxtaposition wherein the promoter and the nucleic acid sequence encoding the polypeptide of the invention are in a relationship permitting the coding sequence to be expressed under the control of the promoter. Thus, there may be elements such as 5' non-coding sequence between the promoter and coding sequence. These elements may be native either to *S. pneumoniae* or to the organism from which the promoter sequence is derived or to neither organism. Such sequences can be included in the vector if they enhance or do not impair the correct control of the coding sequence by the promoter.

The vector may be of any type. The vector may be in linear or circular form. For example, the vector may be a plasmid vector. Those of skill in the art will be able to prepare suitable vectors comprising nucleic acid sequences encoding polypeptides of the invention starting with widely available vectors which will be modified by genetic engineering techniques such as those described by Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 1989). Preferred starting vectors include plasmids that confer kanamycin resistance and direct expression of the polypeptide of the invention via a tac promoter.

In an expression vector, any promoter capable of directing expression of a sequence of the invention in a host cell may be operably linked to the nucleic acid sequence of the invention. Suitable promoters include the tac promoter.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

16

Such vectors may be used to transfect or transform a host cell. Depending on the type of vector, they may be used as cloning vectors to amplify DNA sequences according to the invention or to express this DNA in a host cell.

5 A further embodiment of the invention provides host cells harbouring vectors of the invention, i.e. cells transformed or transfected with vectors for the replication and/or expression of nucleic acid sequences according to the invention. The cells will be chosen to be compatible with the vector and may for example be bacterial cells. Transformed or transfected bacterial cells, for example *E. coli* cells, will be particularly useful for amplifying nucleic acid sequences of the invention as well as
10 for expressing them as polypeptides.

The cells may be transformed or transfected by any suitable method, such as the methods described by Sambrook et al (Molecular cloning: A Laboratory Manual; 1989). For example, vectors comprising nucleic acid sequences according to the invention may be packaged into infectious viral particles, such as retroviral particles.
15 The constructs may also be introduced, for example, by electroporation, calcium phosphate precipitation, and biolistic methods or by contacting naked nucleic acid vectors with the cells in solution.

In the said nucleic acid vectors with which the host cells are transformed or transfected, the nucleic may be DNA or RNA, preferably DNA.

20 The vectors with which the host cells are transformed or transfected may be of any suitable type. The vectors may be able to effect integration of nucleic acid sequences of the invention into the host cell genome or they may remain free in the cytoplasm. For example, the vector used for transformation may be an expression vector as defined herein.

25 The present invention also provides a process of producing polypeptides according to the invention. Such a process will typically comprise transforming or transfecting host cells with vectors comprising nucleic acid sequences according to the invention and expressing the nucleic acid sequence in these cells. In this case, the nucleic acid sequence will be operably linked to a promoter capable of directing its expression in the host cell. Desirably, such a promoter will be a "strong" promoter capable of achieving high levels of expression in the host cell. It may be desirable to overexpress the polypeptide according to the invention in the host cell. Suitable host
30

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

17

cells for this purpose include yeast cells and bacterial cells, for example *E. coli* cells, a particularly preferred *E. coli* strain being *E. coli* K12 strain BL 21. However, other expression systems can also be used, for example baculovirus systems in which the vector is a baculovirus having in its genome nucleic acid encoding a polypeptide of the invention and expression occurs when the baculovirus is allowed to infect insect cells.

The thus produced polypeptide of the invention may be recovered by any suitable method known in the art. Optionally, the thus recovered polypeptide may be purified by any suitable method, for example a method according to Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual).

The polypeptides of the invention may also be synthesised chemically using standard techniques of peptide synthesis. For shorter polypeptides, chemical synthesis may be preferable to recombinant expression. In particular, peptides of up to 20 or up to 40 amino acid residues in length may desirably be synthesised chemically.

The nucleic acid sequences of the invention may be used to prepare probes and primers. These will be useful, for example, in the isolation of genes having sequences similar to that of SEQ ID NO: 4. Such probes and primers may be of any suitable length, desirably from 10 to 100, for example from 10 to 20, 20 to 50 or 50 to 100 bases in length. Examples of such probes are disclosed herein as SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3.

Polynucleotides or primers of the invention may carry a revealing label. Suitable labels include radioisotopes such as ^{32}P or ^{35}S , enzyme labels or other protein labels such as biotin. Such labels may be added to polynucleotides or primers of the invention and may be detected using techniques known *per se*.

Polynucleotides or primers of the invention or fragments thereof, labelled or unlabelled, may be used by a person skilled in the art in nucleic acid-based tests for detecting or sequencing protein Hic in a sample.

Such tests for detecting generally comprise bringing a sample containing DNA or RNA into contact with a probe comprising a polynucleotide or primer of the invention under hybridizing conditions and detecting any duplex formed between the probe and nucleic acid in the sample. Such detection may be achieved using

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

18

techniques such as PCR or by immobilizing the probe on a solid support, removing nucleic acid in the sample which is not hybridized to the probe, and then detecting nucleic acid which has hybridized to the probe. Alternatively, the sample nucleic acid may be immobilized on a solid support, and the amount of probe bound to such a support can be detected.

The probes of the invention may conveniently be packaged in the form of a test kit in a suitable container. In such kits the probe may be bound to a solid support where the assay formats for which the kit is designed requires such binding. The kit may also contain suitable reagents for treating the sample to be probed, hybridizing the probe to nucleic acid in the sample, control reagents, instructions, and the like.

Polynucleotides of the invention can be incorporated into a recombinant replicable vector. The vector may be used to replicate the nucleic acid in a compatible host cell. Thus in a further embodiment, the invention provides a method of making polynucleotides of the invention by introducing a polynucleotide of the invention into a replicable vector, introducing the vector into a compatible host cell, and growing the host cell under conditions which bring about replication of the vector. The vector may be recovered from the host cell. Suitable host cells are described in connection with expression vectors.

The present invention also provides antibodies to the polypeptides of the invention. These antibodies may be monoclonal or polyclonal. For the purposes of this invention, the term "antibody", includes fragments of whole antibodies which retain their binding activity for a target antigen. Such fragments include Fv, F(ab') and F(ab')₂ fragments, as well as single chain antibodies.

The antibodies may be produced by any method known in the art, such as the methods of Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 1989). For example, they may be prepared by conventional hybridoma techniques or, in the case of modified antibodies or fragments, by recombinant DNA technology, for example by the expression in a suitable host vector of a DNA construct encoding the modified antibody or fragment operably linked to a promoter. Suitable host cells include bacterial (for example *E. coli*), yeast, insect and mammalian cells. Polyclonal antibodies may also be prepared by conventional means which comprise inoculating

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

19

a host animal, for example a rat or a rabbit, with a peptide of the invention and recovering immune serum.

The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising polypeptides of the invention. Compositions comprising polypeptides of the invention that include T-cell and/or B-cell epitopes may be used as vaccines against infections caused by pneumococci.

A range of mammalian species can be vaccinated against infections caused by type 3 streptococci using the polypeptides of the invention. Vaccination of humans is particularly desirable.

The compositions of the invention may be administered to mammals including humans by any route appropriate. Suitable routes include topical application in the mouth, oral delivery by means of tablets or capsule and parenteral delivery, including subcutaneous, intramuscular, intravenous and intradermal delivery. Preferred routes of administration are injection, typically subcutaneous or intramuscular injection, with a view to effecting systemic immunisation.

As previously indicated, polypeptides according to the invention may also be mixed with other antigens of different immunogenicity.

The compositions of the invention may be administered to the subject alone or in a liposome or associated with other delivery molecules. The effective dosage depends on many factors, such as whether a delivery molecule is used, the route of delivery and the size of the mammal being vaccinated. Typical doses are from 0.1 to 100 mg of the polypeptide of the invention per dose, for example 0.1 to 1 mg, and 1 to 5 mg, 5 to 10 mg and 10 to 100 mg per dose. Doses of from 1 to 5 mg are preferred.

Dosage schedules will vary according to, for example, the route of administration, the species of the recipient and the condition of the recipient. However, single doses and multiple doses spread over periods of days, weeks or months are envisaged. A regime for administering a vaccine composition of the invention to young human patients will conveniently be :6 months, 2 years, 5 years and 10 years, with the initial dose being accompanied by adjuvant and the subsequent doses being about 1/2 to 1/4 the level of polypeptide in the initial dose.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

20

The frequency of administration can, however, be determined by monitoring the antibody levels in the patient.

While it is possible for polypeptides of the invention to be administered alone it is preferable to present them as pharmaceutical formulations. The formulations of the present invention comprise at least one active ingredient, a polypeptide of the invention, together with one or more acceptable carriers thereof and optionally other therapeutic ingredients. The carrier or carriers must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation and not deleterious to the recipients thereof, for example, liposomes.

The preparation of vaccines which contain an immunogenic polypeptide(s) as active ingredient(s), is known to one skilled in the art. Typically, such vaccines are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection may also be prepared. The preparation may also be emulsified, or the protein encapsulated in liposomes. The active immunogenic ingredients are often mixed with excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the active ingredient. Suitable excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol, or the like and combinations thereof. In addition, if desired, the vaccine may contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, and/or adjuvants which enhance the effectiveness of the vaccine.

Examples of adjuvants which may be effective include but are not limited to: aluminium hydroxide, N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (CGP 11637, referred to as nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (CGP 19835A, referred to as MTP-PE), and RIBI, which contains three components extracted from bacteria, monophosphoryl lipid A, trehalose dimycolate and cell wall skeleton (MPL+TDM+CWS) in a 2% squalene/Tween 80 emulsion. The effectiveness of an adjuvant may be determined by measuring the amount of antibodies directed against an immunogenic polypeptide containing Hic antigenic sequence resulting from administration of this polypeptide in vaccines which are also comprised of the various adjuvants.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

21

The vaccines are conventionally administered parentally, by injection, for example, either subcutaneously or intramuscularly. Additional formulations which are suitable for other modes of administration include suppositories and, in some cases, oral formulations. For suppositories, traditional binders and carriers may include, for example, polyalkylene glycols or triglycerides; such suppositories may be formed from mixtures containing the active ingredient in the range of 0.5% to 10%, preferably 1% to 2%. Oral formulations include such normally employed excipients as, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, and the like. These compositions take the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations or powders and contain 10% to 95% of active ingredient, preferably 25% to 70%. Where the vaccine composition is lyophilised, the lyophilised material may be reconstituted prior to administration, e.g. as a suspension. Reconstitution is preferably effected in buffer.

Capsules, tablets and pills for oral administration to a patient may be provided with an enteric coating comprising, for example, Eudragit "S", Eudragit "L", cellulose acetate, cellulose acetate phthalate or hydroxypropylmethyl cellulose.

The polypeptides of the invention may be formulated into the vaccine as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with free amino groups of the peptide) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids such as acetic, oxalic, tartaric and maleic. Salts formed with the free carboxyl groups may also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine and procaine.

Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats, bactericidal antibiotics and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents and thickening agents, and

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

22

liposomes or other microparticulate systems which are designed to target the compound to blood components or one or more organs.

Of the possible formulations, sterile pyrogen-free aqueous and non-aqueous solutions are preferred. Also preferred are formulations in which the polypeptides of the invention are contained in liposomes. Injection solutions and suspensions may be prepared extemporaneously from sterile powders, granules and tablets of the kind previously described.

Oral methods of administration may produce a systemic effect. Orally active preparations can be formulated in any suitable carrier, such as a gel, toothpaste, mouthwash or chewing gum.

It should be understood that in addition to the ingredients particularly mentioned above the formulations of this invention may include other agents conventional in the art having regard to the type of formulation in question.

Accordingly, the present invention provides a method of vaccinating a mammalian host against infections caused by pneumococci or treating such infections, which method comprises administering to the host an effective amount of a pharmaceutical composition as described above, for example a vaccine composition.

Antibodies, including monoclonal antibodies, and fragments thereof such as Fab fragments can be formulated for passive immunisation as indicated above for the formulation of including polypeptides of the invention. Preferred formulations for passive immunisation include solid or liquid formulations such as gels, toothpastes, mouth-washes or chewing gum.

A further aspect of the present invention is a naked nucleic acid vaccine. In this embodiment, the vaccine composition comprises a nucleic acid, typically an isolated nucleic acid, preferably DNA, rather than a polypeptide. The nucleic acid is injected in to a mammalian host and expressed in vivo, generating a polypeptide of the invention. This stimulates a T-cell response, which leads to protective immunity against *Streptococcus pneumoniae*, for example against dental caries, in the same way as direct vaccination with a polypeptide of the invention.

Nucleic acid vaccination can be carried out with any nucleic acid according to the invention as long as it encodes a polypeptide that stimulates a T-cell and or B-

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

23

cell response. These nucleic acids will typically be included within an expression vectors as defined above. In such an expression vector, the nucleic acid according to the invention will typically be operably linked to a promoter capable of directing its expression in a mammalian host cell. For example, promoters from viral genes that are expressed in the mammalian cells such as the cytomegalovirus (CMV) immediate early gene promoter are suitable. Also suitable are promoters from mammalian genes that are expressed in many or all mammalian cell types such as the promoters of "housekeeping" genes. One such promoter is the p-hydroxymethyl-CoA-reductase(HMG) promoter (Gautier et al (1989): Nucleic Acids Research; 17,8839).

For naked nucleic acid vaccination, it is preferred that the nucleic acid sequence according to the invention is incorporated into a plasmid vector, since it has been found that covalent closed circle (CCC) plasmid DNA can be taken up directly by muscle cells and expressed without being integrated into the cells' genomic DNA (Ascadi et al (1991): The New Biologist; 3, 71-81). Naked nucleic acid vaccine may be prepared as any of the types of formulation mentioned above in respect of conventional polypeptide-based vaccines. However, formulations suitable for parenteral injection, especially intramuscular injection, are preferred. Naked nucleic acid vaccines may be delivered in any of the ways mentioned above in respect of conventional polypeptide-based vaccines but intramuscular injection is preferred.

Alternatively, nucleic acid vaccines may be provided suitable for administration by particle bombardment, or in formulations comprising liposomes or cationic lipid formulation such as lipofectin or other suitable carriers.

Accordingly, the present invention provides a vaccine composition comprising a nucleic acid sequence or vector as described above and an acceptable carrier.

Introduction to the experimental work

Complement-dependent opsonophagocytosis is a crucial defense against infection with *Streptococcus pneumoniae* (33). Two recent studies discuss how type 3 pneumococci may subvert the normal function of the complement system. One study (14) showed that the alternative pathway of complement is essential for efficient clearance of bacteria, and that pneumococcal interference with complement

activation is a virulence determinant. Based on comparisons of PspA-negative mutants with wild type bacteria the researchers claim that PspA blocks recruitment of the alternative pathway, by an unknown mechanism. Another study (15) describes the binding of complement factor H to trypsin-sensitive structures at the surface of pneumococci, independent of previous activation of complement. Notably, the study rules out any major contribution of PspA with respect to binding of fH. The findings indicate that factor H binding proteins might constitute an independent virulence factor.

The present investigation describes a novel pneumococcal surface protein, responsible for the binding of fH in type 3 pneumococci. The gene encoding the protein (Hic) is found in the locus of *pspC*, a possible virulence determinant and protective antigen, but shows highly atypical characteristics compared to previously described *pspC* alleles. In a study where a number of *pspC* alleles were sequenced (16) the type 3 strain was considered *pspC*-negative, since there was no protein reacting with PspC-antibodies and PCR experiments failed to amplify the *pspC* gene. Apart from a region in the NH₂-terminal part of the protein, there is little sequence homology between Hic and PspC. Furthermore, Hic is anchored to the cell wall by the presence of an LPXTGX motif while PspC harbors the choline binding motif. In this respect, Hic is similar to the M protein in *S. pyogenes*, also known to bind fH (11). A Hic-deficient mutant failed to absorb fH from human plasma, in contrast to the wild type strain. This mutant did not bind radiolabelled fH, indicating that most or all of the fH binding to PR218 bacteria is due to the presence of Hic at the pneumococcal surface. Although an extensive screening was not performed, most of the strains examined showed binding of fH, suggesting that this phenotype is not confined to type 3 strains. Furthermore, the recombinant fH-binding fragment of Hic could compete with binding of radiolabelled fH to pneumococci of different serotypes. PspC may confer fH binding to pneumococci by virtue of the region similar to Hic, but it cannot be excluded that other surface structures interact with the same part of fH as Hic does. Surface plasmon resonance experiments with the fusion between GST and the NH₂-terminal Hic region (GST:Hic³⁹⁻²⁶¹) and fH showed that the interaction has high affinity.

The presence of a similarity region in the NH₂-terminal part of various PspC proteins and Hic, offers the interesting possibility that this rather variable region, contained in the recombinantly expressed Hic fragment, is responsible for factor H binding in many pneumococcal strains. It has previously been shown that PspC is a protective antigen, and the NH₂-terminal region probably has to undergo significant genetic variation in order to avoid eliciting specific antibodies. This, however, does not preclude specific binding of fH. In comparison, the M5 and M6 proteins of *S. pyogenes* have been shown to bind factor H-like protein 1 by their hypervariable region (12). Similarly, several M-like proteins bind another complement regulatory protein, C4 binding protein (34), by the hypervariable NH₂-terminal region. We found that a type 2 mutant strain that expressed an NH₂-terminally truncated form of PspC failed to absorb fH from plasma, unlike the parent strain D39. Although not conclusive, since the truncation also involved a part of PspC that shows no homology with Hic, this experiment supports the idea that fH binding could be mediated by the NH₂-terminal regions of both PspC and Hic.

Many studies have showed that interference with the function of the complement system is a highly relevant aspect of pneumococcal virulence. More specifically, the binding of fH has been shown to correlate with resistance to opsonophagocytosis. A previous study showed that type 3 pneumococci, despite C3b deposition on both cell wall and capsule, strongly resist phagocytosis (29). Our data show that hic, a highly atypical pspC allele, encodes the major fH-binding protein of type 3 pneumococci. The complement inhibitory function of fH is unaffected by the interaction with Hic. By accumulating an active complement inhibitor at the pneumococcal surface, Hic may act alone or in concert with PspA to block deposition of C3b and concomitant opsonophagocytosis. As previously described, a putative C3 proteinase in types 3, 4 and 14 pneumococci (35) should have similar effects. The present observation that a region of Hic shows an intrinsic capacity to inhibit the alternative pathway further underlines the significance of this virulence mechanism. In conclusion, pneumococci appear highly prone to interfere with the complement system. Binding of fH, by different mechanisms, has also been described for group A streptococci (11), *Y. enterocolitica* (13), and *N. gonorrhoeae*

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

26

(36,37) and may represent a widespread theme in bacterial adaptation to the human host.

The present invention will now be described with reference to the enclosed figures, in which:

5

Experimental procedures

Bacterial strains

Strains of *S. pneumoniae* used in this study are described in Table 1. In unencapsulated strains PR201, PR212, PR215, and PR218 the whole capsule locus is
 10 deleted and substituted with a kanamycin (Km) resistance cassette (provided by F. Ianelli, B. J. Pearce and G. Pozzi). Pneumococci were grown at 37°C in TSB (Difco) or on TSA (TSB with agar) supplemented with 3% horse blood. Where appropriate, kanamycin (500 µg/ml) or chloramphenicol (3 µg/ml) was added. Bacteria used for binding assays were grown in Todd-Hewitt broth (Difco), supplemented with 0.2%
 15 Yeast extract (Difco). *Escherichia coli* strain DH5α was grown in Luria-Broth (Difco) or on LB-agar, supplemented with ampicillin (50 µg/ml) when containing pGEX.

DNA methods, cloning, and sequencing

20 By PCR SOEing (19), a chloramphenicol transferase cassette was flanked by sequences found up-and downstream of *hic*. PR218 was transformed with this construct. By double cross-over mutagenesis the *hic* gene was consequently replaced with the cat cassette, generating the *hic*-deficient mutant FP13.

Oligonucleotides HICf1 (5'-TGGGATCCCAGAGAAGGAGGTAAC TAC-
 25 3', SEQ ID NO: 2) and HICr1 (5'-GGAGCCTGAATTCGACGAAG-3', SEQ ID NO: 3), containing *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites respectively, were used in a polymerase chain reaction (PCR) to amplify DNA corresponding to amino acids 39 to 261 in Hic. The PCR was performed with Taq polymerase (Gibco BRL), and consisted of 30 cycles at 94°C for 1 min., 50°C for 1 min., and 72°C for 1 min.,
 30 followed by a final extension at 72°C for 7 min. Template was prepared by resuspending bacterial colonies in water, boiling for 5 min., and removal of bacterial debris by centrifuging at 13000 x g. The PCR-amplified fragment was gel-purified

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

27

with Sephaglas Bandprep (Pharmacia Biotech), digested with *Bam*HI and *Eco*RI (Pharmacia Biotech) and ligated with likewise digested vector pGEX-5X-3 (Pharmacia Biotech) using T4 DNA ligase (Pharmacia Biotech). Plasmid pGEX-5X-3:*hic*(39-261) was then electroporated into DH5 α *E. coli* according to the GST gene fusion system protocol (Pharmacia Biotech). Transformants were screened for presence of insert by plasmid mini-preps and restriction enzyme digestion. The clone used for overexpression of the fusion protein GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ was verified by purifying the plasmid and sequencing the complete insert. Fusion protein was affinity purified according to the instructions in the GST gene fusion system manual (Pharmacia Biotech).

Ligand binding and protein methods

Plasma adsorption experiments were performed with log-phase pneumococci (OD₆₀₀ appr. 0.4). Bacteria were washed twice in PBS, pH 7.4, containing 0.05 % Tween 20 (PBST), and the bacterial concentration was adjusted to 2×10^{10} cells/ml. 100 μ l of bacteria were incubated for 1 h with 100 μ l of human plasma. Bacteria were washed five times with PBST, and bound proteins were eluted from the cells with 100 μ l 0.1 M glycine/HCl, pH 2.0. The pH of the eluted material was adjusted to appr. 7 with 1 M Tris. C3-deficient serum was obtained from a patient with selective complete C3 deficiency (C3 < 1 mg/liter), kindly provided by Dr. G. Eggertsen, Huddinge Hospital, Sweden.

Protein samples were separated by SDS-PAGE (20) containing 8-12% acrylamide. Proteins were blotted onto an Immobilon-PTM PVDF-membrane (Millipore) as described (21). Rabbit polyclonal antiserum against fH diluted 1:1000 was the source of primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit goat antibodies (Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, CA) were used as secondary antibodies, and detection of immuno-reactive bands was performed by chemiluminescence as described (22).

Slot blot, Western blot and bacterial binding assays were performed with fH (Sigma), radiolabelled with ¹²⁵I using the Iodobeads kit (Pierce). Unincorporated ¹²⁵I was removed by gel filtration on Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech). Slot blots were performed by applying 5, 1, 0.02 and 0.004 μ g of purified protein onto

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

28

nitrocellulose membranes in a slot blot apparatus (Schleicher & Schuell). The membrane was blocked for 4 x 20 min. in PBST containing 0.25% (w/v) gelatin (Difco). Radiolabelled fH (200000 cpm/ml) was then added, and the membrane was incubated for 1 h at room temperature. The membrane was washed for 4 x 20 min. in PBST, 0.5 M NaCl, and membrane-associated radioactivity was visualized by exposure onto a phosphoimaging plate (Fuji Photo Film). Western blot membranes were treated in the same way. Binding assays with pneumococci were performed as described (23), using log-phase bacteria (OD₆₀₀ appr. 0.4).

Surface plasmon resonance was performed by coupling affinity-purified anti-GST antibodies (Biacore) onto sensor chip CM5 (Biacore) by standard amine coupling, according to the manufacturers instructions. Appr. 10000 resonance units (RU) of antibodies were coupled. Each cycle of analysis was then commenced by immobilization of 500-1500 RU of GST or GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ (10 µg/ml), followed by injection of fH (2 - 0.127 µM). The kinetic studies were performed in PBST. Each cycle was terminated by the regeneration of the chip with 10 mM glycine pH 2.2. Global analysis of data was performed with multiple models in BiaEvaluation 3.0.

Hemolysis assay

A previously described assay for the measurement of fH-mediated inhibition of the alternative pathway was employed (24). Rabbit erythrocytes (National Institute of Veterinary Medicine, Uppsala, Sweden) were washed and suspended at 5×10^8 cells/ml. The serum of a patient with homozygous C2-deficiency (25) was used as a source of complement. Highly purified fH was also kindly provided by Dr. L. Truedsson. The hemolytic reaction was performed in veronal-buffered saline with 16 mM EGTA, 4 mM Mg²⁺ and 0.1 % gelatine. The concentration of C2-deficient serum producing about 80% hemolysis in the assay system was determined in preliminary experiments. Final incubation mixtures contained C2-deficient serum diluted 1/12 (200 µl) with or without additional proteins (fH, GST, or GST:Hic³⁹⁻²⁶¹, at 30, 90 or 60 µM, respectively) and 2.5×10^7 rabbit erythrocytes (50 µl). The erythrocytes were added 5 min after the other reagents. After 5-40 min reactions were stopped by the addition of 750 µl cold VBS, 10 mM EDTA. Samples were

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

29

centrifuged at 3000 rpm for 5 min., and the supernatants were removed for measurement of light absorbance at 412 nm.

Bioinformatics

- 5 Sequence comparisons were performed with MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular, Oxford, United Kingdom). Database searches utilized the Entrez server at The National Institute for Biotechnology Information. The sequence of PspC from the type 4 pneumococcus was obtained from The Institute for Genomic Research website at <http://www.tigr.org>.

10

Results

Binding of complement factor H by S. pneumoniae

- Previous observations in our laboratory indicated that *S. pneumoniae* is capable of absorbing proteins from human plasma (unpublished results). To better
15 investigate the nature of these interactions, a series of strains (Table 1), both encapsulated and unencapsulated, was incubated with plasma.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

30

Table 1 -- Streptococcus pneumoniae strains

Bacterial Strains	Relevant Properties	Source of Reference
A66	Capsulated clinical strain (type 3)	(38, 39)
PR218	Km ^R . Unencapsulated derivative of A66	Iannelli, Pearce, and Pozzi (unpublished)
FP13	Cm ^R , Km ^R , Hic, Mutant of PR218 in which <i>hic</i> is deleted and substituted with a <i>cat</i> cassette.	This work
D39	Capsulated clinical strain (type 2)	(38, 40)
Rx1	Unencapsulated derivative of D39	(41)
PR201	Km ^R . Unencapsulated derivative of D39	Iannelli, Pearce, and Pozzi (unpublished)
FP7	<i>PspC</i> deletion mutant of Rx1 (in-frame deletion of nucleotides 124 to 1338, GenBank accession no. AF067128)	This work
G54	Capsulated clinical strain (type 19f)	(39)
PR212	Km ^R . Unencapsulated derivative of G54	Iannelli, Pearce, and Pozzi (unpublished)
3496	Capsulated (type 3)	(39)
PR215	Km ^R . Unencapsulated derivative of 3496	Iannelli, Pearce, and Pozzi (unpublished)

After washing, plasma proteins bound to the pneumococci were eluted and separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). In particular SDS-PAGE analysis of plasma proteins absorbed by and eluted from D39, HB565, 3496, G54, PR201, PR212, PR218 and FP13 was carried out. Diluted plasma and pH were also ran on the gel. Strains D39 (type 2, encapsulated), and all four unencapsulated strains (serotypes 2, 3, 3, and 19) absorbed a protein with an estimated molecular mass of 140 kDa. In repeated experiments PR218, an unencapsulated derivative (Pearce, Iannelli and Pozzi, manuscript in preparation) of Avery strain A66,

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

31

consistently showed the most prominent absorption of the 140 kDa protein. The protein absorbed by PR218 was subjected to trypsin-in-gel digestion, and six internal fragments were sequenced by Edman degradation.

These sequences showed 100% identity to various regions in human complement factor H. A replica of the gel obtained was transferred to a PVDF membrane by electroblotting, and probed with a rabbit anti-fH antiserum. The antiserum reacted with the aforementioned 140 kDa band, a band of similar size in plasma, and purified fH. There was also a weak reactivity with a band corresponding to appr. 50 kDa. When subjected to NH₂-terminal sequencing, the band was identified as human immunoglobulin heavy chains, suggesting specific or unspecific binding of immunoglobulins to pneumococci, and subsequent crossreactivity with the secondary goat anti-rabbit antibodies.

To exclude that binding of fH was secondary to complement activation and deposition of C3 at the bacterial surface, the plasma absorption with strain D39 was repeated using a C3-deficient serum. The protein reacting with anti-fH antibodies was present in equal amounts when comparing results from absorptions of normal human plasma and the C3-deficient serum (data not shown), showing that fH binding is independent of C3.

A group of *S. pneumoniae* strains was examined for binding of radiolabelled fH. Most strains showed significant binding of fH, although the degree of binding varied considerably between strains (Table 2).

Table 2. Binding of radiolabelled fH to pneumococci

Strain	type	fH binding (5)*	
		encaps.	unencaps.
D39/PR201	2	2.3	3.6
3496/PR215	3	15.4	26.6
HB565/PR218	3	27.6	40.8
G54/PR212	19	33.9	35.9

25

* Four pairs of encapsulated/unencapsulated strains were examined. Binding is expressed as the percentage of added radioactivity. Results are means of two experiments with duplicate samples.

5 Encapsulated strains generally bound somewhat less than the corresponding unencapsulated strains. To investigate whether the binding was mediated by proteinaceous structures, binding of fH to strain PR218 was examined following treatment of bacteria with different proteases (data not shown). Binding was almost completely abolished by pretreatment with papain. Trypsin also caused a major
10 decrease, whereas pepsin had a moderate effect (<50% decrease). These results confirm a previous observation (15) that fH binding can be abolished by pretreatment of bacteria with trypsin.

Identification and sequence analysis of a candidate gene encoding a fH-binding protein
15

A recent paper (15) suggests that type 3 pneumococci are resistant to complement activation and phagocytosis by virtue of fH binding to proteinaceous surface structures. Previously described bacterial surface proteins known to interact with fH include streptococcal M proteins (11) and YadA (13) from *Y. enterocolitica*.
20 Nucleotide and amino acid sequences of YadA, M1, M1.1 (26), M6 (27), and the M-like protein H (28), were used to search a pneumococcal (type 4 strain JNR. 7/87) genome database obtained from The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org>). The highest scoring homology for all the probes was found in a 2106 bp open reading frame (ORF), encoding a putative protein of 702 amino acids
25 (aa). The degree of homology between the pneumococcal protein and the fH-binding proteins used for searching was low, but significant, when comparing the full sequences. However, there were several limited regions of markedly higher homology. A GENBANK search with this putative protein identified it as an allele of PspC, also denoted SpsA, CbpA, or PbcA (16). PspC was then conversely used to
30 search the *Streptococcus pyogenes* genome sequencing project, and the highest scoring match was found to encode the M1 protein.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

33

We chose to sequence the chromosomal locus of the *pspC* gene in Avery strain A66 (type 3) and its derivative PR218. Serotype 3 strains strongly resist phagocytosis (29), and PR218 shows a prominent absorption of fH from human plasma. The locus contained a 1836 bp ORF, encoding a putative protein of 612 aa. The gene was tentatively named *hic*, for factor H binding inhibitor of complement (GenBank accession number AF252857). The Hic protein (schematically depicted in fig. 1, top) contains a proline-rich region consisting of 22 repeats of 11 amino acids. Near the COOH-terminus there is a consensus sequence LPSTGS, typical of Gram-positive cell wall-anchored proteins (30). This sequence is followed by a hydrophobic COOH-terminal tail. The Hic sequence was used to search the streptococcal Genome Project database, and identified M protein as the best match. Several pneumococcal surface proteins were found to be homologous to Hic. SpsA from type 2 and type 47 pneumococci contains a region highly homologous to Hic. SpsA binds secretory IgA and its secretory component (17). CbpA (18), an adhesin and virulence determinant in type 2 pneumococci, also contains this region, as does PbcA (unpublished sequence from GENBANK). SpsA2, CbpA, and PbcA together form the D39-lineage of PspC alleles (16). The 149 aa long NH₂-terminal region of Hic, including the predicted 37 aa leader peptide, was aligned with the corresponding region in PspC proteins from serotypes 1, 2, 4, 6A, and 19 (Fig. 2). No particular function has previously been suggested for this region in the PspC proteins. Interestingly, the remainder of Hic showed no significant homology to the PspC proteins except for shorter stretches in the proline-rich region of PspC. In contrast to Hic (Fig. 1, bottom), the PspC proteins contain a series of repeats with choline-binding motifs, a different mechanism for surface attachment. Computer predictions (31,32) of the secondary structure resulted in strong predictions of α -helical structure in the NH₂-terminal region of both Hic (aa 40 - 270) and PspC (aa 50 - 250).

Construction and properties of a Hic-deficient mutant strain

To investigate the possible contribution of Hic to pneumococcal fH-binding, the unencapsulated strain PR218 (serotype 3), showing the most pronounced absorption of fH from human plasma, was chosen for further studies. Splicing by overlap extension (gene SOEing) (19) was used to flank an antibiotic resistance

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

34

cassette with sequences found up- and downstream of the *hic* gene. PR218 was transformed with this construct and the *hic* gene was deleted by double cross-over mutagenesis. The resulting strain, FP13, grew as well as the parent strain in ordinary growth media. The deletion of *hic* was confirmed by PCR experiments.

5 The mutant strain was subjected to plasma absorption experiments identical to those described above. In contrast to the parent strain, no band at the position of fH was detected with the anti-fH antiserum. Furthermore, the binding of radiolabelled fH to wild type and mutant bacteria was examined using serial dilutions of bacteria (Fig. 3). Unlike the parent strain PR218, the mutant strain FP13 showed
10 background levels of fH binding even at the highest bacterial concentration. The possible contribution of PspC to pneumococcal fH binding was also examined by constructing a mutant derivative of D39, where the *pspC* gene has been truncated so that the 405 NH₂-terminal amino acids are missing in PspC. This mutant, called FP7, was used in plasma absorption experiments, and no band reacting with the anti-
15 fH antibodies was eluted (data not shown).

Mapping of the factor H-binding region of Hic

We decided to investigate the binding properties of the non-repeat region of Hic, including the part shared by Hic, PspC, CbpA, SpsA, and PbcA. Therefore, the
20 *hic* region encoding the NH₂-terminal part of Hic (aa 39 - 261) was cloned into the vector pGEX, resulting in a fusion with the gene encoding GST. Control sequencing of the insert verified the presence of the partial *hic* gene, showing 100 % identity with the DNA sequence from strain A66. GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ and GST were overexpressed, affinity purified, and analysed by SDS-PAGE. Although partly
25 degraded, the main protein band had the expected mass (54 kDa). An identical gel was blotted to a membrane, which was then incubated with radiolabelled fH, washed, and subjected to autoradiography. fH bound to GST:Hic³⁹⁻²⁶¹, but not to GST. The fusion protein and the GST control were also applied in serial dilutions (5, 1, 0.2 and 0.04 µg) onto a nitrocellulose membrane. The membrane was probed with
30 radiolabelled fH, which showed binding to the fusion protein, and no binding to GST. Furthermore, the fusion protein was used in a competitive binding assay to investigate whether GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ could compete with fH binding to PR218 bacteria.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

35

The result (Fig. 4) shows that the Hic domain of the fusion protein blocks bacterial fH binding, whereas GST alone does not affect binding. Similar experiments were performed with *S. pneumoniae* strains 3496, G54, PR215, and HB565. Also in these experiments GST:Hic 39-261 blocked the binding of fH to the tested strains, whereas GST had no effect (data not shown). The G54 strain is of serotype 19, and the similarity between Hic and PspC of a type 19 pneumococcus (see Fig. 1B) implicates that fH binding to non type 3 strains is mediated by the PspC region homologous to Hic.

The interaction between GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ and fH was further examined by surface plasmon resonance. Anti-GST antibodies were coupled to a carboxymethyl dextrane chip, followed by the immobilization of GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ as the ligand. Highly purified fH was used as the analyte at various concentrations. fH interacted with GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ over the whole range of concentrations (0.1 - 2 μ M), showing partial saturation at the highest fH concentration. The experiment was repeated three times, with independent couplings onto the chips. A representative experiment with consecutive regenerations of one chip is shown (Fig. 5). As a control, GST was similarly immobilized on an anti-GST antibodies chip. No binding of fluid phase fH was obtained (data not shown). A global analysis of data was performed to determine rate constants of association/dissociation and constants of association and dissociation, applying the standard Langmuir 1:1 model. Values are mean $\pm$ SD from three different experiments.

	k_a ($10^4 \times \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d ($10^{-4} \times \text{s}^{-1}$)	K_A ($10^7 \times \text{M}^{-1}$)	K_D ($10^{-8} \times \text{M}$)
Hic + fH	2.8 ± 0.24	6.1 ± 2.4	5.0 ± 1.9	2.3 ± 1.1

Hic and complement inhibition

From a functional point of view, an important question is whether the binding of Hic to fH affects the complement inhibitory function of fH. To address this issue we adapted a previously described methodology where complement-mediated lysis of rabbit erythrocytes in serum is inhibited by the addition of fH (24). By using a C2-

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

36

deficient serum as a source of complement, any influence from the classical pathway was excluded. Initial experiments were performed and showed a dose-dependent inhibition of alternative-pathway mediated hemolysis when fH was added (data not shown). By increasing the concentration of fH in the reaction threefold (relative to fH in serum), a complete inhibition of hemolysis was achieved. Smaller fH increments resulted in partial inhibition of hemolysis. The effect of GST:Hic³⁹⁻²⁶¹, GST, or fH and GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ (1:2 molar ratio) on hemolysis was investigated. A preincubation step (5 min) allowed some time for equilibration of the fH and GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ interaction. A kinetic study of hemolysis showed that the presence of GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ in the reaction did not decrease the fH-mediated inhibition of complement activation. Rather, the simultaneous presence of fH and GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ resulted in increased inhibition. Interestingly, GST:Hic³⁹⁻²⁶¹ seems to have an intrinsic complement inhibitory effect, as hemolysis was partially inhibited when the fusion protein alone (with no surplus fH) was added (Fig. 6).

References

1. AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A. F. M., Verhoef, J., and Snippe, H. (1995) *Microbiol. Rev.* 59(4), 591-603
2. Kelly, T., Dillard, J. P., and Yother, J. (1994) *Infect. Immun.* 62(5), 1813-1819
3. Berry, A. M., Yother, J., Briles, D. E., Hansman, D., and Paton, J. C. (1989) *Infect. Immun.* 57, 2037-2042
4. McDaniel, L. S., Yother, J., Vijayakumar, M., McGarry, L., Guild, W. R., and Briles, D. E. (1987) *J. Exp. Med.* 165, 381-394
5. Berry, A. M., and Paton, J. C. (1996) *Infect. Immun.* 64(12), 5255-5262
6. Brown, E. J. (1985) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 121, 159-187
7. Gordon, D. L., Rice, J., Finlay-Jones, J. J., McDonald, P. J., and Hostetter, M. K. (1988) *J. Infect. Dis.* 157, 697-704
8. Wurznier, R. (1999) *Mol. Immunol.* 36, 249-260
9. Zipfel, P. F., Hellwage, J., Friese, M. A., Hegasy, G., Jokiranta, S. T., and Meri, S. (1999) *Mol. Immunol.* 36, 241-248

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

37

10. Morgan, B. P., and Harris, C. L. (1999) Complement regulatory proteins, Academic press, San Diego
11. Horstmann, R. D., Sievertsen, H. J., Knobloch, J., and Fishetti, V. A. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1657-1661
- 5 12. Johnsson, E., Berggård, K., Kotarsky, H., Hellwage, J., Zipfel, P. F., Sjöbring, U., and Lindahl, G. (1998) J. Immunol. 161, 4894-4901
13. China, B., Sory, M.-P., N'guyen, B. T., De Bruyere, M., and Cornelis, G. R. (1993) Infect. Immun. 61(8), 3129-3136
14. Tu, A.-H. T., Fulgham, R. L., McCrory, M. A., Briles, D. E., and Szalai, A. J. (1999) Infect. Immun. 67(9), 4720-4724
- 10 15. Neeleman, C., Geelen, S. P. M., Aerts, P. C., Daha, M. R., Mollnes, T. E., Roord, J. J., Posthuma, G., Van Dijk, H., and Fleer, A. (1999) Infect. Immun. 67(9), 4517-4524
16. Brooks-Walter, A., Briles, D. E., and Hollingshead, S. K. (1999) Infect. Immun. 67(12), 6533-6542
- 15 17. Hammerschmidt, S., Talay, S. R., Brandtzaeg, P., and Chhatwal, G. S. (1997) Mol. Microbiol. 25(6), 1113-1124
18. Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., and Masure, R. (1997) Mol. Microbiol. 25(5), 819-829
- 20 19. Horton, R. M. (1995) Mol. Biotechnol. 3, 93-99
20. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
21. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(9), 4350-4354
22. Nesbitt, S. A., and Horton, M. A. (1992) Anal. Biochem. 206, 267-272
- 25 23. Åkesson, P., Cooney, J., Kishimoto, F., and Björck, L. (1990) Mol. Immunol. 27(6), 523-531
24. Nydegger, U. E., Fearon, D. T., and Austen, K. F. (1978) J. Immunol. 120, 1404-1408
25. Truedsson, L., Alper, C. A., Awdeh, Z. L., Johansen, P., Sjöholm, A. G., and Sturfelt, G. (1993) J. immunol. 151, 5856-5863
- 30 26. Harbaugh, M. P., Podbielski, A. P., Hugl, S., and Cleary, P. (1993) Mol. Microbiol. 8, 981-991

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

38

27. Hollingshead, S. K., Fischetti, V. A., and Scott, J. R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 1677-1686
28. Gomi, H., Hozumi, T., Hattori, S., Tagawa, C., Kishimoto, F., and Björck, L. (1990) *J. Immunol.* 144, 4046-4052
- 5 29. Hostetter, M. K. (1986) *J. Infect. Dis.* 153, 682-693
30. Navarre, W. W., and Schneewind, O. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(1), 174-229
31. Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47, 45-148
- 10 32. Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978) *J. Mol. Biol.* 120, 97-120
33. Bruyn, G. A. W., Zegers, B. J. M., and van Furth, R. (1992) *Clin. Infect. Dis.* 14, 251-262
34. Johnsson, E., Thern, A., Dahlbäck, B., Hedén, L.-O., Wikström, M., and Lindahl, G. (1996) *J. Immunol.* 157, 3021-3029
- 15 35. Angel, C. S., Ruzek, M., and Hostetter, M. K. (1994) *J. Infect. Dis.* 170, 600-608
36. Ram, S., Mcquillen, D. P., Gulati, S., Elkins, C., Pangburn, M. K., and Rice, P. A. (1998) *J. Exp. Med.* 188, 671-680
37. Ram, S., Sharma, A. K., Simpson, S. D., Gulati, S., Mcquillen, D. P., Pangburn, M. K., and Rice, P. A. (1998) *J. Exp. Med.* 187, 743-752
- 20 38. Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944) *J. Exp. Med.* 79, 137-158
39. Pozzi, G., Masala, L., Iannelli, F., Manganeli, R., Havarstein, L. S., Piccoli, L., Simon, D., and Morrison, D. A. (1996) *J. Bacteriol.* 178, 6087-6090
40. Iannelli, F., Pearce, B. J., and Pozzi, G. (1999) *J. Bacteriol.* 81, 2652-2654
- 25 41. Shoemaker, N. B., and Guild, W. R. (1974) *Mol. Gen. Genet.* 128, 283-290

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

39

Claims

1. A polypeptide having the ability to bind factor H comprising:
 - (a) the amino acid sequence of Thr38 to Lys149 of SEQ ID NO: 1
 - (b) a variant of (a) which is capable of binding factor H, or
 - (c) a fragment of (a) or (b) of at least 20 amino acids in length which is capable of binding factor H, for use in prophylaxis or therapy.
2. A vaccine composition comprising a polypeptide having an amino acid sequence selected from:
 - (a) the amino acid sequence of Thr38 to Lys149 of SEQ ID NO: 1,
 - (b) a variant of (a) which is capable of generating an immune response to *Streptococcus pneumoniae* or binding to an anti-protein Hic antibody, or
 - (c) a fragment of (a) or (b) of at least 6 amino acids in length which is capable of generating an immune response against *Streptococcus pneumoniae*, or of binding to an anti protein Hic antibody.
3. A polypeptide according to claim 1 or claim 2, wherein the variant (b) has at least 50%, preferably at least 60%, and most preferably at least 70% sequence identity with the sequence (a).
4. A polypeptide of 15 to 800 amino acids in length comprising:
 - (a) the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or
 - (b) a polypeptide showing sequence identity of at least 85%, preferably at least 95%, and most preferably at least 99% sequence identity with (a).
5. A polynucleotide encoding a polypeptide as defined in any one of claims 1 to 4, the polynucleotide comprising:
 - (i) the nucleotide coding sequence of SEQ ID NO: 4 or a sequence complementary thereto,
 - (ii) a nucleotide sequence which selectively hybridizes to said sequence (i) or a fragment thereof, or

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

40

(iii) a nucleotide sequence which codes for a polypeptide having the same amino acid sequence as that encoded by a said sequence of (i) or (ii).

5 6. A factor H-binding protein comprising an amino-terminal amino acid sequence showing a homology of at least 50 %, preferably at least 60 %, and most preferably at least 70 % with the subsequence from Thr38 to Lys149 of the sequence of SEQ ID NO: 1, for medical use.

10 7. A factor H-binding peptide comprising 20 – 200 amino acids, said peptide showing a homology of at least 50 %, preferably at least 60 %, and most preferably at least 70 % with the subsequence from Thr38 to Lys149 of the sequence of SEQ ID NO: 1, for medical use.

8. A Hic protein-derived polypeptide comprising 15 – 800 amino acids which polypeptide shows a homology of at least 85%, preferably at least 95 %, and most preferably at least 99 % with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

15 9. A polypeptide according to claim 4 or 8, for medical use.

10' 10. A nucleic acid sequence encoding a factor H-binding protein or peptide according to any one of claims 6 to 8.

11. A recombinant vector comprising a polynucleotide according to claim 5 or claim 10.

20 12. A vector according to claim 11 wherein the vector is an expression vector and said polynucleotide is operably linked to a regulatory sequence.

13. A host cell transformed with a vector according to claim 11 or claim 12.

25 14. An isolated antibody, preferably a monoclonal antibody, specifically binding a polypeptide according to any one of claims 1 to 4 or 6 to 8.

15. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide according to any one of claims 1 to 4 or claims 6 to 8, together with a pharmaceutically acceptable carrier, excipient or diluent.

30 16. Use of a polypeptide according to anyone of claims 1 to 4 or claims 6 to 8 for preparing a vaccine composition against *Streptococcus pneumoniae* infections.

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

41

17. A method of identifying an agent which inhibits binding of factor H to *Streptococcus pneumoniae* comprises:

- (a) providing a polypeptide as defined in claims 1 to 4 or 6 to 8,
- (b) incubating said polypeptide with factor H and a test agent,
- 5 (c) monitoring for binding of factor H to the polypeptide of (a) and determining thereby whether the test agent inhibits binding of factor H to the polypeptide of (a).

18. A method of inhibiting the binding of factor H by *Streptococcus pneumoniae* comprising identifying a substance which inhibits the binding of factor
- 10 H according to claim 17, and using an agent so identified to inhibit binding of factor H to *Streptococcus pneumoniae*.

WO 02/08426

1/4

PCT/EP01/08409

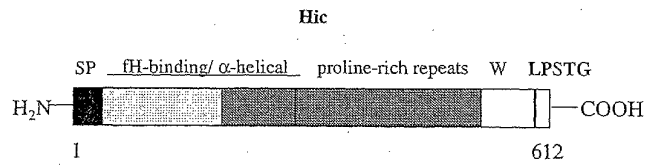


FIG. 1A

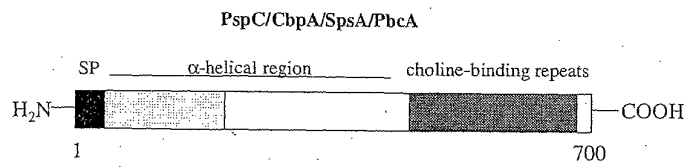


FIG. 1B



WO 02/08426

3/4

PCT/EP01/08409

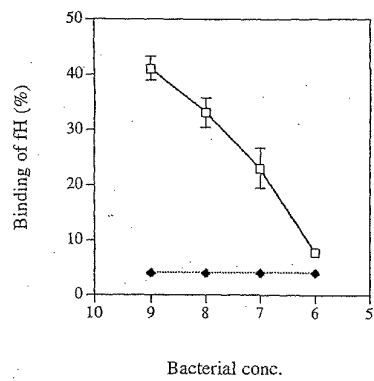


FIG. 3

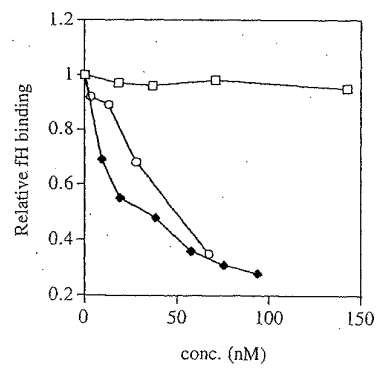


FIG. 4

WO 02/08426

4/4

PCT/EP01/08409

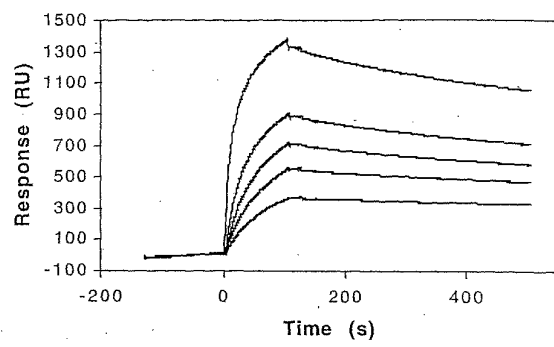


FIG. 5

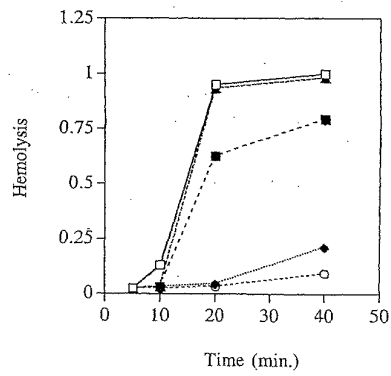


FIG. 6

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

SEQUENCE LISTING

<110> Hanes Medical AB
 Janulczyk, Robert
 Iannelli, Francesco
 Sjöholm, Anders
 Pozzi, Gianni
 Björck, Lars

<120> Protein

<130> N82915 GCW

<140>
 <141>

<150> SE 0002728-4
 <151> 2000-07-20

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 612
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1
 Met Phe Ala Phe Lys Lys Arg Arg Lys Val His Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15
 Phe Ser Ile Gly Val Ala Ser Val Ala Val Ala Ser Leu Phe Met Gly
 20 25 30
 Ser Val Val His Ala Thr Glu Lys Glu Val Thr Thr Gln Val Ala Thr
 35 40 45
 Ser Ser Asn Lys Ala Asn Lys Ser Gln Thr Glu His Met Lys Ala Ala
 50 55 60
 Lys Gln Val Asp Glu Tyr Ile Glu Lys Met Leu Ser Glu Ile Gln Leu
 65 70 75 80
 Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu Leu Thr Lys Leu Gly
 85 90 95
 Ala Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Arg Gly Leu Ser Val Ser Lys Glu Lys
 100 105 110
 Ser Thr Ala Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Glu Lys Leu Thr Ala Ala
 115 120 125
 Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala
 130 135 140

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

Glu Ala Gln Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Ala Lys Gln Glu Ile
 145 150 155 160
 Glu Ala Leu Ile Val Lys His Lys Gly Arg Glu Ile Asp Leu Asp Arg
 165 170 175
 Lys Lys Ala Lys Ala Ala Val Thr Glu His Leu Lys Lys Leu Leu Asn
 180 185 190
 Asp Ile Glu Lys Asn Leu Lys Lys Glu Gln His Thr His Thr Val Glu
 195 200 205
 Leu Ile Lys Asn Leu Lys Asp Ile Glu Lys Thr Tyr Leu His Lys Leu
 210 215 220
 Asp Glu Ser Thr Gln Lys Ala Gln Leu Gln Lys Leu Ile Ala Glu Ser
 225 230 235 240
 Gln Ser Lys Leu Asp Glu Ala Phe Ser Lys Phe Lys Asn Gly Leu Ser
 245 250 255
 Ser Ser Ser Asn Ser Gly Ser Ser Thr Lys Pro Glu Thr Pro Gln Pro
 260 265 270
 Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Leu Glu Thr Pro Lys Pro
 275 280 285
 Glu Val Lys Pro Glu Pro Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu
 290 295 300
 Pro Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Leu Glu Thr Pro Lys
 305 310 315 320
 Pro Glu Val Lys Pro Glu Pro Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro
 325 330 335
 Glu Pro Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Pro Glu Thr Pro
 340 345 350
 Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Leu Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys
 355 360 365
 Pro Glu Leu Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Pro Glu Thr
 370 375 380
 Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Leu Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val
 385 390 395 400
 Lys Pro Glu Pro Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Leu Glu
 405 410 415
 Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Pro Glu Thr Pro Lys Pro Glu
 420 425 430
 Val Lys Pro Glu Leu Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Pro
 435 440 445

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr Pro Lys Pro
450 455 460

Glu Val Lys Pro Glu Pro Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu
465 470 475 480

Leu Glu Thr Pro Lys Gln Lys Val Lys Pro Glu Pro Glu Thr Pro Lys
485 490 495

Pro Glu Val Lys Pro Glu Pro Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro
500 505 510

Glu Leu Glu Thr Pro Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Leu Glu Ile Pro
515 520 525

Lys Pro Glu Val Lys Pro Asp Asn Ser Lys Pro Gln Ala Asp Asp Lys
530 535 540

Lys Pro Ser Thr Pro Asn Asn Leu Ser Lys Asp Lys Gln Ser Ser Asn
545 550 555 560

Gln Ala Ser Thr Asn Glu Asn Lys Lys Gln Gly Pro Ala Thr Asn Lys
565 570 575

Pro Lys Lys Ser Leu Pro Ser Thr Gly Ser Ile Ser Asn Leu Ala Leu
580 585 590

Glu Ile Ala Gly Leu Leu Thr Leu Ala Gly Ala Thr Ile Leu Ala Lys
595 600 605

Lys Arg Met Lys
610

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2
tgggatccca gagaaggagg taactac 27

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3
ggagcctgaa ttgcacgaag 20

<210> 4
<211> 1839
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4
atgtttgcat tcaaaaaacg aagaaaagta cattattcaa ttcgtaaatt tagtattgga 60

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

gtagctagtg tagctgttgc cagtctttt atgggaagtg tggtoatgc gacagagaag
120
gaggtaacta cccaagtagc cacttcttct aataaggcaa ataaaagtca gacagaacat
180
atgaaagctg ctaaacagt cgatgaatat atagaaaaa tgttgagtga gatccaatta
240
gataagaaga aacataccca aaatgtcggc ttactcaca agtggggcgc aattaaaacg
300
gagtatttgc gtggattaag tgtttcaaaa gagaagtoga cagctgagtt gccgtcagaa
360
ataaaagaaa agttaacgcg agcttttgag cagtttaaaa aagatacatt gaaatcagga
420
aaaaaggtag cagaagctca gaaaaaaccc aaggatcaaa aagaagctaa acaggagata
480
gaagctotaa tcgttaaca taaggggcga gaaatcgatt tagatcagaa gaaggcaaaag
540
gtgcagctta ctgaacatct aaaaaaatta ttgaatgaca tcgagaaaaa tttaaaaaa
600
gagcaacata cccatctgt agagttaatt aaaaacttga aagatattga aaaaacttat
660
ttgcataagt tagatgaatc aacgcaaaa gcccaactac agaaactgat cgcagaaaag
720
caatcaaaa tagatgaagc tttttctaaa tttaaaatg gcttatcttc ttogtcgaat
780
tcaggctcct ccactaaacc agaaactccg cagccggaaa caccaaaacc agaggttaaa
840
ccagagctgg aaacaccaa accagaggtt aaaccagagc cggaaacacc aaaaccagag
900
gttaaacccg agccggaaac accaaaacca gaggttaaac cagagctgga aacacaaaaa
960
ccagaggtta aaccagagcc ggaaacacca aaaccagagg ttaaacocaga gccggaaaca
1020
ccaaaaccag aggttaaaccc agagccggaa acaccaaacc cagaggttaa accagagctg
1080
gaaacaccaa aaccagaggt taaaccagag ctggaacac caaaaccaga ggttaaacca
1140
gagccggaaa caccaaaacc agaggttaaa ccagagctgg aaacaccaa accagaggtt
1200
aaaccagagc cggaaacacc aaaccagag gttaaacccg agctggaaac accaaaacca
1260
gaggttaaac cagagccgga aacacaaaa ccagaggtta aaccagagct ggaacacca
1320
aaaccagagg ttaaacocaga gccggaaca ccaaaaccag aggttaaac accagcggaa
1380
acaccaaacc cagaggttaa accagagccg gaaacaccaa aaccagaggt taaaccagag
1440
ctggaacac caaaacagaa ggttaaacca gagccggaaa caccaaaacc agaggttaaa
1500
ccagagccgg aaacaccaa accagaggtt aaaccagagc tggaaacacc aaaaccagag
1560
gttaaacccg agctggaaat accaaaacca gaggttaaac cagataatag caagccacaa
1620
gcagatgata agaagccatc aactccaaat aatttaagca aggacaagca atcttctaac
1680
caagcttcaa caaaogaaaa caagaagcaa ggtccagcaa caaataaacc gaagaagtca
1740

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

ttgccatcaa ctggatctat ttcaaatcta gcacttgaaa ttgcaggtct tottaccttg
 1800
 gcggggggcaa ccattcttgc taagaaaaga atgaaatag
 1839

<210> 5
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae

<400> 5
 Met Phe Ala Ser Lys Ser Glu Arg Lys Val His Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15
 Phe Ser Ile Gly Val Ala Ser Val Ala Val Ala Ser Leu Phe Leu Gly
 20 25 30
 Gly Val Val His Ala Glu Gly Val Arg Ser Glu Asn Thr Pro Lys Val
 35 40 45
 Thr Ser Ser Gly Asp Glu Val Asp Glu Tyr Ile Lys Lys Met Leu Ser
 50 55 60
 Glu Ile Gln Leu Asp Lys Arg Lys His Thr His Asn Phe Ala Leu Asn
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Arg Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Tyr Lys Leu Lys Val
 85 90 95
 Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Ala Glu Leu Thr Ser Lys Thr Lys
 100 105 110
 Lys Glu Val Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys
 115 120 125
 Leu Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Gln Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys
 130 135 140
 Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp His Arg Asn Tyr Pro Thr
 145 150 155 160
 Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Lys
 165 170 175
 Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Leu Lys Glu Glu Ala Lys Thr Arg
 180 185 190
 Asn Glu Asp Thr Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Lys Ser Glu Gln
 195 200 205
 Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Gln Ala
 210 215 220
 Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Glu Lys Ala Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Lys Arg Lys Ala Glu Ala Glu Glu Val Lys Asp Lys Leu Lys

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

```

                245                250                255
Arg Arg Thr Lys Arg Ala Val Pro Gly Glu Pro Ala Thr Pro Asp Lys
260                265                270
Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr
275                280                285
Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Gln
290                295                300
Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu
305                310                315                320
Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu
325                330                335
Ile Ala Glu Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val
340                345                350
Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala
355                360                365
Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys
370                375                380
Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Ala
385                390                395                400
Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala
405                410                415
Pro Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala
420                425                430
Pro Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys
435                440                445
Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu
450                455                460
Glu Tyr Asn Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro Lys Thr Glu Lys Pro
465                470                475                480
Ala Gln Pro Ser Thr Pro Lys Thr
485

```

<210> 6

<211> 1464

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 6

```

atgttttgcac cyaaaagcga aaaaaagta cattattcaa ttogtaaaatt tagtattgga 60
gtagctagtg tagctgttgc tagcttgttc ttaggaggag tagtccatgc agaagggggtt
120

```

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

agaagtgaga ataccccca gggtacatct agtggggatg aagtogatga atatataaaa
 180
 aaaatgttga gtgagatcca attagataaa agaaaacata cccacaattt cgccttaaac
 240
 ctaaaagttga gcagaattaa aacggagtat ttgtataaat taaaagttaa tggttttagaa
 300
 gaaaagtcaa aagctgagtt gacgtcaaaa acaaaaaaag aggtagacgc agcttttgag
 360
 aagtttaaaa aagatacatt gaaactagga gaaaaggtag cagaagctca gaagaagggt
 420
 gaagaagcta agaaaaaagc caaggatcaa aaagaagaag atcaaccgtaa ctaccacaacc
 480
 aatacttaca aaacgcttga acttgaaatt gctgagtcog atgtgaaagt taaagaagcg
 540
 gagcttgaac tattgaaga ggaagctaaa actcgaacgc aggcacacat taaccaagca
 600
 aaagcgaaag ttaagagtga acaagctgag gctacaaggt taaaaaaat caagacagat
 660
 cgtgaacaag ctgaggtctac aaggttagaa aacatcaaga cagatcgtga aaaagcagaa
 720
 gaagcttaaac gaaaagcaga agcagaagaa gttaaaagata aactaaagag gggacacaaa
 780
 cgaagcagttc ctggagagcc agcaaacacc gataaaaaag aaaatgatgc gaagtcttca
 840
 gatcttagcg taggtgaaga aactcttoca agcccatccc tgaaatcagc aaaaaggta
 900
 gcagaagctc agaagaaggt agcagaagct gagaaaaaag ocaaggatca aaaagaagaa
 960
 gatcgccgta actacccaac caatacttac aaaacgcttg acctgaaat tgctgagtc
 1020
 gatgtgaaag ttaaaagaagc ggagcttgaa ctagttaaag aggaagctaa ggaatctoga
 1080
 aacggagaaa aagttaagca agcaaaagcg aaagttgaga gtaaaaaagc tgaggctaca
 1140
 aggttagaaa aaatcaagac agatcgtaaa aaagcagaag aagctaaacg aagagcagca
 1200
 gaagaagata aagttaaga aaaaccagct gaacacccac aaccagcgcc ggctcctcaa
 1260
 ccagaaaaac caactgaaga gcttgagaat ccagctccag ctccaaaaac tgagaatcca
 1320
 gctgaacaac caaaagcaga aaaaccagct gatcaacaag ctgaagaaga ctatgctcgt
 1380
 agatcagaag aagaatataa tcgcttgact caacagcaac cgccaaaaac tgaaaaacca
 1440
 gcacaacccat ctactccaaa aaca
 1464

<210> 7

<211> 701

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 7

Met Phe Ala Ser Lys Ser Glu Arg Lys Val His Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15

Phe Ser Ile Gly Val Ala Ser Val Ala Val Ala Ser Leu Val Met Gly

PCT/EP01/08409

8

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

```

325          330          335
Asp Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu
340          345          350
Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile
355          360          365
Lys Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg
370          375          380
Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys
385          390          395          400
Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln
405          410          415
Pro Gln Pro Ala Pro Ala Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro Lys Pro
420          425          430
Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Thr Asp Asp Gln Gln
435          440          445
Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu
450          455          460
Thr Gln Gln Gln Pro Pro Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr
465          470          475          480
Pro Lys Thr Gly Trp Lys Gln Glu Asn Gly Met Trp Tyr Phe Tyr Asn
485          490          495
Thr Asp Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp
500          505          510
Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn
515          520          525
Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly
530          535          540
Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ala
545          550          555          560
Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn
565          570          575
Ser Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp
580          585          590
Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn
595          600          605
Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly
610          615          620
Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp

```

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

625 630 635 640

Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Gly Xaa Thr Trp Tyr Tyr Leu Lys
645 650 655

Ala Ser Gly Ala Met Lys Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser Asp Lys
660 665 670

Trp Tyr Tyr Val Asn Gly Ser Gly Ala Leu Ala Val Asn Thr Thr Val
675 680 685

Asp Gly Tyr Gly Val Asn Ala Asn Gly Glu Trp Val Asn
690 695 700

<210> 8
<211> 2106
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 8
atgtttgcat caaaaagcga aagaaaagta cattattcaa ttcgtaaatt tagtattgga 60
gtagctagtg tagctgttgc cagtcttgtt atgggaagtg tggttcatgc gacagagaac
120
gagggaagta cccaagcagc cacttcttct aatatggcaa agacagaaca taggaagct
180
gctaaacaag togtcgatga atatatagaa aaaatgttga gggagattca actagataga
240
agaaaacata cccaaaatgt ogccttaaac ataaagttga ggcgaattaa aacgaagtat
300
ttgcgtgaat taaatgtttt agaagagaag tcgaagatg agttgcctgc agaaataaaa
360
gcaaagttag acgcagcttt tgagaagttt aaaaaagata cattgaaacc aggagaaaaa
420
gtagcagaag ctaagaagaa ggttgaagaa gctaagaaaa aagccgagga tcaaaaagaa
480
gaagatcgtc gtaactaccc aaccaatact tacaaaaagc ttgaacttga aattgctgag
540
ttcgatgtga aagttaaaga agcggagctt gaactagtaa aagaggaagc taaagaatct
600
cgaaacgagg gcacaattaa gcaagcaaaa gagaagtg agagtaaaaa agctgaggct
660
acaaggttag aaacatcaa gacagatcgt aaaaaagcag aagaagaagc taaacgaaaa
720
gcagatggtg agttgaagga agctaagtga gcgaactcag atcaaggtaa accaaagggg
780
cgggcaaaac gaggagtcc tggagagcta gcaacacctg ataaaaaaga aaatgatgog
840
aagtcttcag attctagcgt aggtgaagaa actcttccaa gctcatccct gaaatcagga
900
aaaaaggtag cagaagctga gaagaaggtt gaagaagctg agaaaaaagc aaaggatcaa
960
aaagaagaag atcgccgtaa ctaccaaac aatacttaca aaacgcttga ccttgaaatt
1020
gctgagtcog atgtgaaagt taaagaagcg gagcttgaa tagtaaaaga ggaagctaa
1080

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

gaacctcgag acgaggaaaa aattaagcaa gcaaaagoga aagttgagag taaaaaagct
 1140
 gagggctacaa ggtagaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa
 1200
 cgaaaagcag cagaagaaga taaagttaa gaaaaaccag ctgaacaacc acaaccagcg
 1260
 cgggctactc aaccagaaaa accagctcca aaaccagaga agccagctga acaacaaaaa
 1320
 gcagaaaaaa cagatgatca acaagctgaa gaagactatg ctgtagatc agaagaagaa
 1380
 tataatcgct tgactcaaca gcaaccgcca aaaactgaaa aaccagcaca accatctact
 1440
 ccaaaaacag gctggaaca agaaaacggg atgtggtact totacaatac tgatggttca
 1500
 atggcaacag gatggctcca aaacaatggg tcatggtact atctaaacgc taatggtgct
 1560
 atggcgacag gatggctcca aaacaatggg tcatggtact atctaaacgc taatggttca
 1620
 atggcaacag gatggctcca aaacaatggg tcatggtact atctaaacgc taatggtgct
 1680
 atggcgacag gatggctcca atacaatggg tcatggtact atctaaacgc caatggcgct
 1740
 atggcgacag gatggctcca atacaatggg tcatggtact atctaaacgc taatggtgat
 1800
 atggcgacag gatggctcca aaacaatggg tcatggtact atctaaacgc taatggtgat
 1860
 atggcgacag gatggctcca atacaatggg tcatggtact atctaaacgc taatggtgat
 1920
 atggcgacag gttgggtgaa agatgganac acotggtact atctaaacgc atcaggtgct
 1980
 atgaaagcaa gccaatgggt caaagtatca gataaatggg actatgtcaa tggctcagggt
 2040
 gcccttgacg tcaacacaa tgtagatggc tatggagtca atgccaatgg tgaatgggta
 2100
 aactaa
 2106

<210> 9

<211> 487

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 9

Met Phe Ala Ser Lys Asn Glu Arg Lys Val His Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15

Phe Ser Ile Gly Val Ala Ser Val Ala Val Ala Ser Leu Phe Met Gly
 20 25 30

Ser Val Val His Ala Thr Glu Lys Glu Val Thr Thr Gln Val Ala Thr
 35 40 45

Ser Phe Asn Lys Ala Asn Lys Ser Gln Thr Glu His Met Lys Ala Ala
 50 55 60

Lys Gln Val Asp Glu Tyr Ile Thr Lys Lys Leu Gln Leu Asp Arg Arg
 65 70 75 80

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu Leu Thr Lys Leu Gly Val Ile Lys
 85 90 95
 Thr Glu Tyr Leu His Arg Leu Ser Val Ser Lys Glu Lys Ser Glu Ala
 100 105 110
 Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln
 115 120 125
 Phe Lys Lys Asp Thr Leu Pro Thr Glu Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu
 130 135 140
 Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Glu 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 Glu Glu Ala Lys Gly Ser Arg Asn Glu Gln Lys Val Asn
 195 200 205
 Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu
 210 215 220
 Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Gln Ala Glu Thr Thr Arg Leu Glu
 225 230 235 240
 Asn Ile Lys Thr Asp Arg Glu Lys Ala Glu Ala Lys Arg Lys Ala
 245 250 255
 Asp Ala Lys Glu Gln Asp Glu Ser Lys Arg Arg Val Lys Gly Gly Val
 260 265 270
 Pro Gly Glu Gln Ala Thr Leu 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
 Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu
 305 310 315 320
 Lys Lys Ala Lys 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 Lys
 340 345 350
 Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser
 355 360 365
 Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser Lys
 370 375 380

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

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

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

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

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

Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser
 450 455 460

Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro Lys Thr Glu
 465 470 475 480

Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr
 485

<210> 10
 <211> 693
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae

<400> 10
 Met Phe Ala Ser Lys Ser Glu Arg Lys Val His Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15

Phe Ser Val Gly Val Ala Ser Val Val Val Ala Ser Leu Val Met Gly
 20 25 30

Ser Val Val His Ala Thr Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr
 35 40 45

Ser Ser Asn Arg Ala Asn Glu Ser Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro
 50 55 60

Lys Lys Leu Asp Ser Glu Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu
 65 70 75 80

Tyr Val Lys Lys Ile Val Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys
 85 90 95

Arg His Thr Ile Thr Val Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys
 100 105 110

Asn Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu
 115 120 125

Gln Ile Leu Met Met Glu Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser
 130 135 140

Lys Phe Glu Lys Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

145 150 155 160
 Lys Pro Glu Ala Ser Asp Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro
 165 170 175
 Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys
 180 185 190
 Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile
 195 200 205
 Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val
 210 215 220
 Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg
 225 230 235 240
 Asp Glu Gln Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln
 245 250 255
 Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala
 260 265 270
 Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys Glu Glu Gly Lys Pro
 275 280 285
 Lys Gly Arg Ala Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp
 290 295 300
 Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu
 305 310 315 320
 Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala
 325 330 335
 Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu
 340 345 350
 Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu
 355 360 365
 Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu
 370 375 380
 Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln
 385 390 395 400
 Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu
 405 410 415
 Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys
 420 425 430
 Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ala Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

450 455 460
 Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln
 465 470 475 480
 Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu
 485 490 495
 Thr Gln Gln Gln Pro Pro Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr
 500 505 510
 Pro Lys Thr Gly Trp Lys Gln Glu Asn Gly Met Trp Tyr Phe Tyr Asn
 515 520 525
 Thr Asp Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Gly Ser Trp
 530 535 540
 Tyr Tyr Leu Asn Ser Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn
 545 550 555 560
 Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly
 565 570 575
 Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser
 580 585 590
 Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn
 595 600 605
 Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp
 610 615 620
 Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp
 625 630 635 640
 Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Glu Ala Ser Gly Ala Met Lys Ala Ser
 645 650 655
 Gln Trp Phe Lys Val Ser Asp Lys Trp Tyr Tyr Val Asn Gly Ser Gly
 660 665 670
 Ala Leu Ala Val Asn Thr Thr Val Asp Gly Tyr Gly Val Asn Ala Asn
 675 680 685
 Gly Glu Trp Val Asn
 690

<210> 11

<211> 523

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 11

Met Phe Ala Ser Lys Ser Glu Arg Lys Val His Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

Phe Ser Ile Gly Val Ala Ser Val Val Val Ala Ser Leu Val Met Gly
 20 25 30
 Ser Val Val His Ala Thr Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr
 35 40 45
 Phe Ser Asn Met Ala Asn Lys Ser Gln Thr Glu Gln Gly Glu Ile Asn
 50 55 60
 Ile Glu Arg Asp Lys Ala Lys Thr Ala Val Ser Glu Tyr Lys Glu Lys
 65 70 75 80
 Lys Val Ser Glu Ile Tyr Thr Lys Leu Glu Arg Asp Arg His Lys Asp
 85 90 95
 Thr Val Asp Leu Val Asn Lys Leu Gln Glu Ile Lys Asn Glu Tyr Leu
 100 105 110
 Asn Lys Ile Val Gln Ser Thr Ser Lys Thr Glu Ile Gln Gly Leu Ile
 115 120 125
 Thr Thr Ser Arg Ser Lys Leu Asp Glu Ala Val Ser Lys Tyr Lys Lys
 130 135 140
 Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala
 145 150 155 160
 Ser Asp Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Leu Glu Lys Lys Val
 165 170 175
 Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Lys Asp
 180 185 190
 Gln Lys Glu Glu Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr
 195 200 205
 Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu
 210 215 220
 Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys
 225 230 235 240
 Val Lys Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Glu Glu Thr Glu Ala Thr
 245 250 255
 Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala
 260 265 270
 Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu
 275 280 285
 Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn
 290 295 300
 Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro
 305 310 315 320

WO 02/08426

PCT/EP01/08409

Ser Thr Pro Lys Thr Gly Trp Lys Gln Glu Asn Gly Met Trp Tyr Phe
 325 330 335
 Tyr Asn Thr Asp Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly
 340 345 350
 Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ser Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu
 355 360 365
 Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala
 370 375 380
 Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn
 385 390 395 400
 Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr
 405 410 415
 Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly
 420 425 430
 Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Leu
 435 440 445
 Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala
 450 455 460
 Thr Gly Trp Val Lys Asp Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Glu Ala Ser
 465 470 475 480
 Gly Ala Met Lys Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser Asp Lys Trp Tyr
 485 490 495
 Tyr Val Asn Gly Ser Gly Ala Leu Ala Val Asn Thr Thr Val Asp Gly
 500 505 510
 Tyr Gly Val Asn Ala Asn Gly Glu Trp Val Asn
 515 520

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08426 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/31, 15/63, C07K 14/315, 16/12, A61K 31/711, 39/09 (74) Agent: WOODS, Geoffrey, Corlett, J.A. Kemp & Co., 14 South Square, Gray's Inn, London WC1R 5J1 (GB).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/08409 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 19 July 2001 (19.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0002728.4 20 July 2000 (20.07.2000) SE (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (73) Applicant (for all designated States except US): HANSA MEDICAL AB [SE/SE]; Box 784, S-220 07 Lund (SE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BJÖRCK, Lars [SE/SE]; Magle Stora Kyrkogata 10, S-223 50 Lund (SE); SJÖHOLM, Anders [SE/SE]; Karl XI-gatan 7, S-222 28 Lund (SE); JANULCZYK, Robert [SE/SE]; Vildanden W304, S-227 34 Lund (SE); POZZI, Gianni [IT/IT]; Valli a Toiano, 238, I-53018 Souicille (IT); IANNELLI, Francesco [IT/IT]; Vicco 10 Mancini, 9, I-83040 Andretta (IT).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 30 May 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/08426 A3

(54) Title: FH-BINDING PROTEIN OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

(57) Abstract: The present invention provides proteins and peptides derived from *Streptococcus pneumoniae*, type 3, which bind the complement factor H (FH). These proteins and peptides show a homology of at least 50 %, preferably at least 60 %, and most preferably at least 70 % with the subsequence from Thr38 to Lys 149 of the sequence disclosed herein as SEQ ID NO:1. The above subsequence, which is located in the amino-terminal of a surface protein isolated from *Streptococcus Pneumoniae*, type 3, is highly associated with binding of FH. In another aspect, the invention relates to proteins and peptides showing a homology of at least 85 %, preferably at least 95 %, and most preferably at least 99 % with the Hic protein, the amino acid sequence of which is disclosed as SEQ ID NO:1. The invention also provides vaccine compositions comprising the above proteins and peptides.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/08409
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/31 C12N15/63 C07K14/315 C07K16/12 A61K31/711 A61K39/09		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALEXIS BROOKS-WALTER ET AL.: "The pspC gene of Streptococcus pneumonia encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteraemia" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 67, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 6533-6542, XP002190970 abstract page 6534, left-hand column, paragraphs 4-6 page 6534, right-hand column, paragraph 4 -page 6535, right-hand column, paragraph 2; figure 2 page 6539, right-hand column, paragraph 2 -page 6542, left-hand column, paragraph 1 --- -/--	1-16
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 February 2002		08/03/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montero Lopez, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/08409

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Database Entry AF154024, 7 June 2000 (2000-06-07) IANWELLI F. ET AL.: "Allelic variation in the highly polymorphic locus pspC of Streptococcus pneumoniae" Database accession no. AF154024 XP002190972 the whole document	1-16
X	WO 98 39450 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH) 11 September 1998 (1998-09-11) page 5, paragraph 2 page 5, paragraph 7 page 6, paragraph 3 - paragraph 6 page 6, last paragraph -page 7, paragraph 2; figure 2	2, 14-16
A	WO 99 51187 A (ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL) 14 October 1999 (1999-10-14) page 3, line 12 -page 4, line 21 page 5, line 29 -page 21, line 11	1-18
P,X	ROBERT JANULCZYK ET AL.: "Hic, a novel surface protein of Streptococcus pneumoniae that interferes with complement function" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 47, 24 November 2000 (2000-11-24), pages 37257-37263, XP001053486 the whole document	1-18
P,X	SANDHYA DAVE ET AL.: "PspC, a pneumococcal surface protein, binds human Factor H" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 69, no. 5, May 2001 (2001-05), pages 3435-3437, XP002190971 page 3435, left-hand column, paragraph 3 page 3436, left-hand column, paragraph 1 -page 3437, right-hand column, paragraph 1	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No.
 PCT/EP 01/08409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9839450	A	11-09-1998	DE 19708537 A1 10-09-1998
			WO 9839450 A2 11-09-1998
			EP 0991762 A2 12-04-2000
			JP 2001524073 T 27-11-2001
WO 9951187	A	14-10-1999	AU 3479699 A 25-10-1999
			AU 3479799 A 25-10-1999
			BR 9909910 A 15-01-2002
			HU 0102306 A2 28-09-2001
			NO 20005081 A 06-12-2000
			WO 9951187 A2 14-10-1999
			WO 9951188 A2 14-10-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/315	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/315	C 0 7 K 16/12	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/12	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/15 Z	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00 A	
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 スヨホルム、アンデルス
スウェーデン国 ルンド、カール スイエーテ ー ガタン 7
(72)発明者 ヤヌルクジク、ロベルト
スウェーデン国 ルンド、ヴィルダンデン ダブリュ 3 0 4
(72)発明者 ポッツィ、ジャンニ
イタリア国 ソウイッレ、ヴァッリ ア トゥイアーノ 2 3 8
(72)発明者 イアネッリ、フランチェスコ
イタリア国 アンドレッタ、ヴィッコ 1 0 マンチーニ、9

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB10 BB14 BB20 BB50 BB51 FB02 FB03 FB08
GC10 JA01
4B024 AA01 BA31 BA48 CA04 CA05 CA09 DA06 EA04 GA11 GA19
HA03 HA08 HA14
4B063 QA01 QA18 QQ20 QR48 QR69 QR75 QS12 QX07
4B064 AG27 CA20 CC24 DA01
4B065 AA26X AA49Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45
4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA04 DA42 NA14
ZB351 ZB352 ZC022
4C085 AA03 CC07
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA50 DA76 DA86 EA31 FA72
FA74

专利名称(译)	蛋白质		
公开(公告)号	JP2004504056A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2002513909	申请日	2001-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	汉萨医疗公司		
申请(专利权)人(译)	汉莎医疗激活宝来获得		
[标]发明人	ビヨルクラルス スヨホルムアンデルス ヤヌルクジクロベルト ポッツイジャンニ イアネッリフランチェスコ		
发明人	ビヨルク、ラルス スヨホルム、アンデルス ヤヌルクジク、ロベルト ポッツイ、ジャンニ イアネッリ、フランチェスコ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/09 A61K45/00 A61P11/00 A61P31/04 A61P43/00 C07K C07K14/315 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12N15/63 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K45/00 A61P11/00 A61P31/04 A61P43/00.111 C07K14/315 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/GC10 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/BA48 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QR48 4B063/QR69 4B063/QR75 4B063/QS12 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA49Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA04 4C084/DA42 4C084/NA14 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C084/ZC022 4C085/AA03 4C085/CC07 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	池田幸		
优先权	0002728 2000-07-20 SE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了衍生自3型肺炎链球菌的蛋白质和肽，它们全部结合补体因子H (fH)。 这些蛋白质和肽与本文公开为SEQ ID NO : 1 的序列的Thr38至Lys149的部分序列具有至少50%，优选至少60%，最优选至少70%的同源性。 上述部分序列位于分离自3型肺炎链球菌的表面蛋白的氨基末端，并与fH结合紧密相关。 在另一方面，本发明涉及Hic蛋白，即与SEQ ID NO : 1公开的氨基酸序列至少85%同源的蛋白和肽，优选至少95%，最优选至少99%。 本发明还提供了包含上述蛋白质和肽的疫苗组合物。

特許庁				
(P2004-5040)				
(43) 公表日 平成18年2月12日 (2004.2.12)				
(51) Int. Cl. ⁷	F 1		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5	
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	H	4 B O 2 4	
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 45/00		4 B O 6 3	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 11/00		4 B O 6 4	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 31/04		4 B O 6 5	
審査請求 未請求		予備審査請求 有 (全 97 頁) 最終頁に		
(21) 出願番号	特願2002-513909 (P2002-513909)	(71) 出願人	503024457	
(86) (22) 出願日	平成13年7月19日 (2001.7.19)		ハンサ メディカル アクチボラゲッ	
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月17日 (2003.1.17)		スウェーデン国、ルンド、エディソン	
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/008409		ーク	
(87) 国際公開番号	W02002/008426	(74) 代理人	100066692	
(87) 国際公開日	平成14年1月31日 (2002.1.31)		弁理士 浅村 皓	
(31) 優先権主張番号	0002728.4	(74) 代理人	100072040	
(32) 優先日	平成12年7月20日 (2000.7.20)		弁理士 浅村 肇	
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100088926	
			弁理士 長沼 暉夫	
		(74) 代理人	100102897	
			弁理士 池田 幸弘	
		(72) 発明者	ビョルク、ラルス	
			スウェーデン国 ルンド、マグレ ス	
			キルコガタ 1 0	
最終頁に続				