

(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2004-503565
(P2004-503565A)
(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/00	C O 7 K 14/00 Z N A	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 H O 4 5
A 6 1 P 31/04	A 6 1 K 39/395 N	
C 0 7 K 1/00	A 6 1 P 31/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 148 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-510509 (P2002-510509)	(71) 出願人	502451742
(86) (22) 出願日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		サイトヴァックス・バイオテクノロジーズ・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月13日 (2002.12.13)		カナダ・T 6 E・6 S 4・アルバータ・エドモントン・ローパー・ロード・8 2 2 3
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/019168	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開番号	W02001/096368		弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)	(74) 代理人	100108578
(31) 優先権主張番号	60/211, 892		弁理士 高橋 詔男
(32) 優先日	平成12年6月14日 (2000.6.14)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 渡邊 隆
(31) 優先権主張番号	60/213, 387	(74) 代理人	100101465
(32) 優先日	平成12年6月23日 (2000.6.23)		弁理士 青山 正和
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100094400
			弁理士 鈴木 三義
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 構造特異的ペプチドを生産するためのコイルドコイル構造的骨格の使用

(57) 【要約】

式 I :

(A X X D X X X)_n I

[式中、

AはI l e、L e u、V a lまたはそれらの誘導体であり；

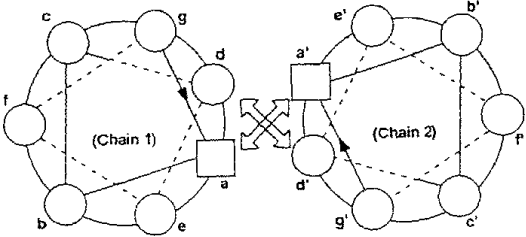
DはL e u、I l e、V a lまたはそれらの誘導体であり；

各Xは天然コイルドコイルタンパク質のエピトープのアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基またはそれらの誘導体であり；

各(A X X D X X X) リピート中のX残基は、X残基のセットを形成し；

nは1以上である]

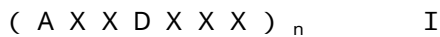
の合成ペプチド。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I :



[式中、

A は I l e、L e u、V a l またはそれらの誘導体であり；

D は L e u、I l e、V a l またはそれらの誘導体であり；

各 X は天然コイルドコイルタンパク質のエピトープのアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基またはそれらの誘導体であり；

各 (A X X D X X X) リピート中の X 残基は、X 残基のセットを形成し；

n は 1 以上である]

の合成ペプチド。

【請求項 2】

各 (A X X D X X X) リピートにおいて、A が I l e であり、D が L e u である、請求項 1 記載のペプチド

【請求項 3】

n が約 3 から 6 である、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 4】

前記 X 残基が、天然タンパク質のコイルドコイル領域において溶媒にさらされるアミノ酸である、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 5】

前記 X 残基のセットのそれぞれが、単一のタンパク質の同じエピトープから得られる、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 6】

異なる X 残基の少なくとも二つのセットを含む、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 7】

前記異なるセットのそれぞれが、同じタンパク質の異なるエピトープ、及び異なるタンパク質から得られるエピトープからなる群から独立に選択される、請求項 6 記載のペプチド。

【請求項 8】

ペプチドの C - 末端及び / または N - 末端で付加的なアミノ酸をさらに含む、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 9】

前記付加的なアミノ酸残基が、ペプチドの N - 末端での C N l e G である、請求項 8 記載のペプチド。

【請求項 10】

X 残基のセットが、天然コイルドコイルタンパク質の溶媒にさらされる残基のコンセンサス配列に対応する、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 11】

前記コイルドコイルタンパク質が、肺炎球菌表面タンパク質 A、肺炎球菌表面タンパク質 C、及び肺炎球菌アドヘシン A からなる群から選択される、請求項 10 記載のペプチド。

【請求項 12】

E E L X₁ X₂ K I D E L D X₃ E I A X₄ L E K X₅ (配列番号 5)、及び E E L X₁ X₂ K I D E L D (配列番号 5 の 1 - 11) [式中、X₁、X₂、X₃、X₄ または X₅ はいずれかのアミノ酸である] からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 11 記載のペプチド。

【請求項 13】

式中、

X₁ が S、Q、N、または D であり；X₂ が D、N、または K であり；

10

20

30

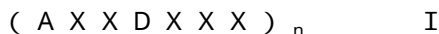
40

50

X_3 が A、または N であり；
 X_4 が K、E、または D であり；及び
 X_5 が N、D、または E である；
 請求項 12 記載のペプチド。

【請求項 14】

式 I：



[式中、

A は I l e、L e u、V a l またはそれらの誘導体であり；

D は L e u、I l e、V a l またはそれらの誘導体であり；

各 X は天然コイルドコイルタンパク質のエピトープのアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基またはそれらの誘導体であり、但し少なくとも一つの X が、荷電したアミノ酸と、反対の荷電の別のアミノ酸残基との間で塩架橋を形成するような態様で、荷電したアミノ酸残基で置換されて、その塩架橋がペプチドのコイルドコイル構造の推定を容易にすることを除く；

各 $(A X X D X X X)$ リピート中の X 残基は、X 残基のセットを形成し；

n は 1 以上である]

の合成ペプチド。

【請求項 15】

荷電したアミノ酸が、A s p、G l u、L y s、A r g、及び H i s からなる群から選択される、請求項 14 記載のペプチド。

【請求項 16】

a) コイルドコイルタンパク質のエピトープを選択する工程；

b) 前記エピトープのどのアミノ酸残基が溶媒にさらされるかを測定する工程；及び

c) 式 I の X 位置に前記溶媒にさらされるアミノ酸残基を挿入する工程；

を含む、式 I のペプチドの製造方法。

【請求項 17】

前記コイルドコイルタンパク質が細菌タンパク質である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記エピトープの選択工程が、コンピューターアルゴリズムを使用して実施される、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

エピトープアミノ酸の一つのセットが使用される、請求項 16 記載の方法。

【請求項 20】

前記セットのそれぞれが、同じタンパク質の異なるエピトープ、及び異なるタンパク質から得られるエピトープからなる群から独立に選択される、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

少なくとも一つの式 I のペプチドを含む、動物において免疫応答を刺激するのに有用な組成物。

【請求項 22】

前記式 I のペプチドが、キャリアタンパク質に接合されている、請求項 21 記載の組成物。

【請求項 23】

さらにアジュバントを含む、請求項 21 記載の組成物。

【請求項 24】

少なくとも二つの異なる X 残基のセットを含む、請求項 21 記載の組成物。

【請求項 25】

前記異なるセットのそれぞれが、同じタンパク質の異なるエピトープ、及び異なるタンパク質から得られるエピトープからなる群から独立に選択される、請求項 24 記載の組成物。

【請求項 26】

微生物の一つより多くの株及び／または種に対する免疫応答を刺激するのに有用である、請求項 24 記載の組成物。

【請求項 27】

動物に式 I のペプチドを投与することを含む、動物において免疫応答を引き出す方法。

【請求項 28】

式 I のペプチドを認識する抗体。

【請求項 29】

式 I のペプチドが、細菌タンパク質から得られる溶媒にさらされるアミノ酸を含む、請求項 28 記載の抗体。

【請求項 30】

微生物の一つより多くの株及び／または種に結合する、請求項 28 記載の抗体。

【請求項 31】

ポリクローナルまたはモノクローナルである、請求項 28 記載の抗体。

【請求項 32】

請求項 28 記載の抗体を含む製薬組成物。

【請求項 33】

製薬学的に許容可能な賦形剤またはキャリアーをさらに含む、請求項 32 記載の組成物。

【請求項 34】

免疫応答を刺激するために、動物に式 I のペプチドを投与することによって生産される抗体。

【請求項 35】

式 I のペプチドを含む、ワクチンとして有用な組成物。

【請求項 36】

一つより多くのエピトープアミノ酸のセットが、式 I のペプチドにおいて使用される、請求項 35 記載の組成物。

【請求項 37】

エピトープアミノ酸のセットが、微生物の異なる株及び／または種から得られる、請求項 36 記載の組成物。

【請求項 38】

一つより多くの微生物の株及び／または種に対する交差保護を提供する、請求項 35 記載の組成物。

【請求項 39】

一つより多くの微生物の株及び／または種に対する交差保護を提供する、請求項 36 記載の組成物。

【請求項 40】

一つより多くの微生物の株及び／または種に対する交差保護を提供する、請求項 37 記載の組成物。

【請求項 41】

製薬学的に許容可能な賦形剤またはキャリアーをさらに含む、請求項 35 記載の組成物。

【請求項 42】

細菌感染の疑いのある哺乳動物に式 I のペプチドを投与することを含む、細菌感染を防止する方法。

【請求項 43】

一つより多くのエピトープアミノ酸のセットが式 I のペプチドにおいて使用され、前記エピトープアミノ酸のセットが微生物の異なる株及び／または種から得られる、請求項 42 記載の方法。

【請求項 44】

いくつかの微生物の株及び／または種による感染を防止するのに有用である、請求項 42 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 5】

いくつかの微生物の株及び／または種による感染を防止するのに有用である、請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 6】

細菌感染の疑いのある、または細菌感染に罹患している動物において細菌感染を治療または防止する方法であって、動物に対して式 I のペプチドを投与することによって生産される細菌タンパク質に対する有効量の抗体を、前記動物に投与することを含む方法。

【請求項 4 7】

前記動物において感染の症状を防止する、請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

いくつかの微生物の株及び／または種による感染を治療または防止するのに有用である、請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 9】

a) 特定の微生物から得られるエピトープを含む式 I のペプチドに対する抗体と、サンプルを接触させる工程；及び
b) 前記抗体が前記サンプルの構成成分に結合するかを測定する工程；
を含む、サンプル中の特定の微生物の存在を測定する方法。

【請求項 5 0】

前記サンプルが生物学的サンプルである、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 1】

細菌感染の原因となる剤を決定するために使用される、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 2】

サンプル中のいくつかの微生物の株及び／または種の存在を同時に検出するために使用される、請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 3】

サンプル中のいくつかの微生物の株及び／または種の存在を同時に検出するために使用される、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 4】

サンプル中のいくつかの微生物の株及び／または種の存在を同時に検出するために使用される、請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 5】

生物学的サンプル中の細菌タンパク質に対する抗体の存在を測定する方法であって、
a) 前記細菌タンパク質から得られる少なくとも一つのエピトープを含む式 I のペプチドと、前記生物学的サンプルを接触させる工程；及び
b) 前記生物学的サンプル中の抗体が、前記ペプチドに結合するかを測定する工程；
を含む方法。

【請求項 5 6】

特定の微生物に対して動物をさらす前に測定するために使用される、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 7】

付加的アミノ酸が、ラクタム架橋の形成を通じてペプチドを安定化する、請求項 8 記載のタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

関連出願

本出願は、2000年6月14日に出願された米国仮出願第60/211,892号、及び2000年6月23日に出願された第60/213,387号の利益を享受する。これらの仮出願のそれぞれの完全な内容が、全体として参考としてここに取り込まれる。

【0002】

本発明は、天然に存在する微生物及び非微生物タンパク質抗原から由来する合成ペプチドを含む、構造特異的ペプチドを生産するためのコイルドコイル構造的骨格の使用に関する。前記合成ペプチドの構造は、天然のタンパク質のコイルドコイル領域から由来するエピトープがスプライスされた、7つ揃いのリピート単位の構造を利用する。生成したペプチドはより安定なコイルドコイル構造を有し、それ故ヘリックス構造におけるエピトープの提示を改良する。

【 0 0 0 3 】

【 参考文献 】

U.S. Patent No. 6,075,181.

U.S. Patent No. 6,150,584.

WO 96/11944, published April 25, 1996.

WO 01/00010, published January 4, 2001.

Alexander J. E., et al. *Infect. Immun.* 62: 5693-5688 (1994).

Baquero, F., et al. *J. Antimicrob. Chemother.* **28** (Suppl. C): 31-38 (1991).

Beuvery, E. C., et al. *Infect. Immun.* **37**: 15-22 (1982).

Briles D.E. et al. *Infect. Immun.* **57**(5): 1457-1464 (1989).

Briles, D.E. et al. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(4):645-657 (1998).

Briles, D. E., et al. In *Effects of microbes on the immune system* (Cunningham, M. W., Flinami, R.S. Eds) Philadelphia: Lippincott-Raven: pp 263-280 (1999).

10

Briles, D. E., et al. *Vaccine* **18**: 1707-1711 (2000).

Brooks-Walter, A., et al. *Infect. Immun.* **67**: 6533-6542 (1999).

Canvin, J. R., et al. *J. Infect. Dis.* **172**: 119-123 (1995).

Chang K, Pastan I. "Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a protein detected by the K1 antibody from an ovarian carcinoma (OVCAR-3) cell line", *Int J Cancer.* **57**(1):90-7 (1994).

20

Cowan, M. J., et al. *Pediatrics* **62**: 721-727 (1978).

Crain M. J., et al. *Microb. Pathog.* **21**: 265-275 (1996).

Davis, S., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Acheson, A., Compton, D.L., Jain, V., Ryan, T.E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C. and Yancopoulos, G.D. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87** (7): 1161-1169 (1996).

30

De, B. K., et al. *Pathobiology* **67**: 115-122 (1999).

Henrichsen, J., *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2759-2762 (1995).

Houston, M.E. et al. *Biochemistry* **35**: 10041-10050 (1996).

Kalin, M. Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax* **53**: 159-162 (1998).

Kapanadze B, Kashuba V, Baranova A, Rasool O, van Everdink W, Liu Y, Syomov A, Corcoran M, Poltarau A, Brodyansky V, Syomova N, Kazakov A,

40

Ibbotson R, van den Berg A, Gizatullin R, Fedorova L, Sulimova G, Zelenin A, Deaven L, Lehrach H, Grander D, Buys C, Oscier D, Zabarovsky ER, Yankovsky N. A cosmid and cDNA fine physical map of a human chromosome 13q14 region frequently lost in B-cell chronic lymphocytic leukemia and identification of a new putative tumor suppressor gene, Leu5. *FEBS Lett.* 426(2):266-70 (1998).

Lancet, *Lancet* 2: 699-701 (1985).

Lawrence, M. C., et al. *Structure* 6: 1553-1661 (1998).

10

Li Y, Kang J, Friedman J, Tarassishin L, Ye J, Kovalenko A, Wallach D, Horwitz MS. Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(3):1042-7 (1999).

Li,L., Li,X., Francke,U. and Cohen,S.N. The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer. *Cell* 88 (1): 143-154 (1997).

McDaniel. L. S., et al. *Microb. Pathog.* 17: 323-337 (1994).

20

McDaniel. L.S., et al. *Infect. Immun.* 59: 222-228 (1991).

Michon F., et al. *Vaccine* 16: 1732-41 (1998).

Miranda C, Minoletti F, Greco A, Sozzi G, Pierotti MA. "Refined localization of the human TPR gene to chromosome 1q25 by in situ hybridization", *Genomics* 23(3):714-5 (1994).

Nabors, G. S., et al. *Vaccine* 18: 1743-1754 (2000).

30

Nakashima,M., Sonoda,K. and Watanabe,T. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat. Med.* 5 (8): 938-942 (1999).

Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia PA 18th ed. (1990).

Robbins, J. B., et al. *J. Infect. Dis.* 148: 1136-1159 (1983).

Shapiro, E. D., et al. *N. Engl. J. Med.* 325: 1453-1460 (1991).

40

Shelly, M. A., et al. *Infect. Immun.* 65: 242-247 (1997).

Singh et al., "Advances in vaccine adjuvants", *Nat. Biotechnol.* 17(11):1075-81 (1999).

Spika, J. S., et al. *J. Infect. Dis.* 163: 1273-1278 (1991).

Takala. A. K., et al. *J. Infect. Dis.* 164: 982-986 (1991).

Talkington, D. F., et al. *Infect. Immun.* 59: 1285-1289 (1991).

10

Talkington, D. F., et al. *Microb. Pathog.* 21: 17-22 (1996).

Tart, R. C., et al. *J. Infect. Immun.* 173: 380-386 (1996).

Tripet, B. et al., *J. Mol. Biol.* 300: 377-402 (2000).

Wagschal, K. et al., *Protein Science* 8: 2312-2329 (1999).

Winter et al., *Nature* 349: 293 (1991).

20

Wolf, E. et al. MultiCoil: A program for predicting two- and three-stranded coiled coils". *Protein Science* 6: 1179-1189 (1997).

World Health Organization. *WHO* 9 (1995).

Yamada et al., "Identification of a novel autoantigen UACA in patients with panuveitis", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280(4):1169-76 (2001).

【 0 0 0 4 】

上述の文献、特許、及び特許出願の全ては、各個々の文献、特許出願、または特許の開示が、特定の且つ個々の全体として参考として取り込まれるように示されたのと同じ程度に、全体として参考としてここに取り込まれる。

30

【 0 0 0 5 】

【 従来の技術 】

Streptococcus pneumoniae は、肺炎、骨髄炎、及び菌血症のような生命を脅かす侵襲性の疾患を引き起こす重要な病原体である。米国では毎年100万以上のケースの肺炎球菌性肺炎が診断されており、これらの感染の0.7%が致死적であると見積もられている(Lancet, 1985)。発展途上国では、400万の死者が*S. pneumoniae*感染での肺炎によるものであり、死者の70%を数えると見積もられている(WHO, 1995)。*S. pneumoniae*はまた、中耳炎及び静脈洞炎のようなあまりひどくない疾患を引き起こし、それらはその罹患率のため、ヘルスケアシステムの有意な重荷となっている。肺炎球菌感染症と関連する高い罹患率と致死率は、その生物が複数の抗生物質に対する耐性を獲得する速度によって悪化している(Spika等, 1991; Baquero等, 1991)。かくして、肺炎球菌感染症に対する有効な治療のためのまだ見ぬ必要性が存在する。

40

【 0 0 0 6 】

ヒトにおける肺炎球菌感染症の予防のために利用されている現在のワクチンは、精製された莢膜ポリサッカリドに基づく。莢膜ポリサッカリドワクチンのデザインは、90の異なる莢膜タイプが存在し、莢膜によって引き出される保護はタイプ特異的であるという事実により複雑である(Henrichson, 1995)。これらの問題は、特定の莢膜

50

が他種よりもヒトの疾患とより一般的に関連しているという事実によって幾分緩和されており、それは最終的に、現在23価のワクチンにおける莢膜の封入を導いている(Robbins等, 1983)。しかしながら、莢膜ポリサッカリドは、複数の繰り返し単位を有するほとんどのポリマー状化合物と同様に、免疫応答及びIgGへのサブクラススイッチングの刺激について非効率的である(Beuvery等, 1982)。驚くべきことではないが、このワクチンは、成人における致死性肺炎球菌性菌血症の予防においてわずか60%のみ有効であり(Shapiro等, 1991)、2歳以下の子供では十分な抗体応答を引き出すことができない(Cowan等, 1978)。子供における微弱な免疫原性の問題は、このポリサッカリドをジフテリア及び破傷風菌トキソイドのようなタンパク質キャリアに接合することによって解決しようとしている(Shelly等, 1997)。最近の臨床試験では、7価の接合物ワクチンが、子供において免疫原性であり、侵襲性の肺炎球菌感染症に対して保護を引き出すことが示された。

10

【0007】

しかしながら、临床上の重要な感染が、子供の場合とは異なる莢膜タイプによって引き起こされるため、成人については別個のワクチンが必要とされるであろう。発展途上国における適用範囲は、肺炎球菌株の地理的なバリエーションのため、52%程度の低さであると予測される。さらに、接合物ワクチンは、発展途上国にはあまりに高価であると理解される。かくして、肺炎球菌性ワクチンの開発に対する代替的なアプローチに対する早急な必要性が存在する。

【0008】

ポリサッカリドワクチンと関連する欠点は、肺炎球菌性タンパク質抗原に基づくワクチンの開発の可能性における興味を引きつけている。考慮される肺炎球菌性タンパク質は、毒素、ニューモリシン(pneumolysin)、オートリシン(autolysin)、及び表面タンパク質を含む。今日までワクチンとして使用されている表面タンパク質は、肺炎球菌表面アドヘシンA(PsaA)、肺炎球菌表面タンパク質A(PspA)、及び肺炎球菌表面タンパク質C(PspC)を含む。これらの表面タンパク質は図1に示される。

20

【0009】

ニューモリシンは、S. pneumoniaeの実質上全ての临床上の単離物によって生産されるチオールサイトリシン(cytolysin)である。マウスを、明礬に吸着されたニューモリシンの遺伝学的に操作されたトキソイドバージョン(ニューモリソイド)で免疫化した場合、生存割合及び非生存者の死の速度(生存時間)は、コントロールのものより有意に大きかった。しかしながら、保護の度合いにおける有意な差異が、各種の株の間で記載された(Alexander等, 1994)。ニューモリソイドは、肺炎球菌莢膜ポリサッカリドのためのキャリアータンパク質として現在調査されている(Michon等, 1998)。一般的に、破傷風菌トキソイド接合物と比較すると、莢膜ポリサッカリドをニューモリシンの接合物として処方した場合、莢膜ポリサッカリドに対するより高い応答が観察された。オートリシンでの免疫化もまた、敗血症モデルにおいて保護的であることが示されている(Canvin等, 1995)。しかしながら、オートリシンに対する抗体は、ニューモリシンのオートリシン依存的放出を妨げるため、その効果を一部しか発揮しないようである。

30

40

【0010】

今日まで調査された全てのStreptococcus pneumoniae単離物は、リボタンパク質肺炎球菌表面アドヘシン(PsaA)を発現する。PsaAは37kDaの分子量であり、遺伝学的に保存されていると考慮される。PsaAの機能は、Zn結合膜輸送タンパク質の機能である(Lawrence等, 1998)。最近の研究では、天然PsaAでのマウスの免疫化が、S. pneumoniaeの毒性株でのチャレンジからマウスを保護する抗PsaA抗体を生産することが示されている(Talington等, 1996; De等, 1999)。マウス保菌モデルでは、PsaAが、保菌に対する保護を引き出す最も最適な肺炎球菌表面抗原の一つであることが示されてい

50

る。しかしながら P s a A は、ネズミ敗血症モデルまたはネズミ肺感染症モデルにおける保護の誘導では、P s p A ほど有効ではない (B r i l e s 等 , 2 0 0 0) 。

【 0 0 1 1 】

肺炎球菌表面タンパク質 A は、今日まで研究されている *S . p n e u m o n i a e* の全ての株で見出されており、完全な毒性のために必要とされる (C r a i n 等 , 1 9 9 0) 。 P s p A は、6 7 から 9 9 k D a の範囲の株依存的な分子量を有する一方、全てのタンパク質が、4 の別個のドメインからなる：N 末端の非常に荷電したドメイン、プロリンリッチドメイン、1 0 の非常に保存された 2 0 アミノ酸リピートを含むリピートドメイン、及び短い疎水性ドメイン (図 2) 。リピート領域は、コリン残基に対する非共有結合によって、*S . p n e u m o n i a e* の細胞表面に対するこのタンパク質の結合に関与する。

10

【 0 0 1 2 】

R x 1 株の P s p A のアミノ酸配列は、配列番号 1 としてここに含まれる。この P s p A の N 末端の配列分析 (残基 1 - 3 0 3) は、この配列がコイルドコイル構造を採用することを示した。コイルドコイル構造は、左巻きのスーパーツイストを有する互いに巻き付いた二つの両親媒性ヘリックスからなる (図 3) 。コイルドコイルは 7 つ揃いの繰り返し (a b c d e f g) によって特徴付けられ、そこでは a と d の位置が、典型的に疎水性アミノ酸によって占められる。これらの残基は、この構造の安定性に関与する疎水性表面を形成するように整列する。

【 0 0 1 3 】

P s p A の N 末端配列は、配列中に散在する 3 個のプロリンを含み、それらは連続するコイルドコイル中に小さな裂け目を形成すると解される。このタンパク質の流体力学的特徴、及びコンピューターモデリングから、P s p A が、3 個のプロリン領域の一つでそれ自体にホールディングし直すことによってコイルドコイルを形成することが提案されている。コイルドコイル領域は、細胞壁から広がって、おそらく莢膜の外側に突出していると解される。

20

【 0 0 1 4 】

P s p A の正確な機能は未知である。それは、血液からの肺炎球菌のクリアランスを遅延することが示されている (M c D a n i e l 等 , 1 9 8 7) 。毒性に対する P s p A の主要な効果は、相補的な固定を妨げることであろうと解されている。さらに、コイルドコイル領域の非常に陽性に荷電した性質が、陰性に荷電した莢膜と相互作用するであろうと解されている。この相互作用は、莢膜の構造を安定化するのである。

30

【 0 0 1 5 】

S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e は、P s p A と同様なドメイン構造を有するが、より大きいコイルドコイル領域を有し、全体のサイズがより大きい P s p C と称される別の表面タンパク質を有する (図 2) 。ヘリックスドメインの N 末端 1 5 0 アミノ酸は、非常に可変的なサイズと配列を有する。この超可変領域に隣接して、1 0 1 から 2 0 5 アミノ酸の長さの各種のサイズの、二つの繰り返し配列が存在する。最も大きい P s p C タンパク質では、P s p A において見出されるコイルドコイル領域の C 末端部分と相同なヘリックス領域が存在する。P s p C タンパク質と P s p A タンパク質の比較が、図 2 に示されている。現在では、*S . p n e u m o n i a e* のほとんどの株が、P s p A と P s p C の両者を生産するという証拠が存在する (B r o o k s - W a l t e r 等 , 1 9 9 9 ; C r a i n 等 , 1 9 9 6) 。P s p C の正確な機能は未知であるが、P s p A と類似する態様で機能すると解されている。

40

【 0 0 1 6 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、コイルドコイルタンパク質の特徴的な 7 つ揃いの繰り返し (a b c d e f g)_n (ここで a と d の位置は典型的に疎水性アミノ酸によって占められる) が、天然タンパク質のコイルドコイル領域または潜在的なコイルドコイル領域から由来するエピトープを、安定なコイルドコイル構造に固定し、天然タンパク質に基づく新規な合成ペプチドを形

50

成するためのテンプレートとして使用できるという、予期せぬ発見に関する。そのようなペプチドは、免疫化のために使用されても良い。天然コイルドコイルタンパク質の対応する部分から得られるアミノ酸残基は、溶媒にさらされる b、c、e、f 及び g 位置にスプライスされる一方、疎水性アミノ酸（特に I l e 及び L e u）が a 及び d 位置を占める。生成した新規なペプチドは、水溶液中で安定なコイルドコイル構造を維持し、天然タンパク質の特徴である免疫原性エピトープを提供する。

【0017】

【課題を解決するための手段】

従って、本発明の一つの特徴点は、下式（式 I）：

$(A X X D X X X)_n$ I (配列番号 15)

10

[式中、AはI l e、L e u、V a lまたはそれらの誘導体であり、DはL e u、I l e、V a lまたはそれらの誘導体であり、各Xは、天然のコイルドコイルタンパク質のエピトープのアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基またはそれらの誘導体であり、X残基のセットを形成し、nは1以上の整数である]

の合成ペプチドを提供する。好ましくは、各(A X X D X X X)リピートのセットにおいて、AはI l eであり、DはL e uである。nについての好ましい値は、2から100である。好ましい実施態様では、nは2から10であり、最も好ましくは約3から6である。

【0018】

好ましいX残基のセットは、天然タンパク質のコイルドコイル領域において溶媒にさらされるアミノ酸である。各Xアミノ酸残基のセットは、独立に選択され及び/または組み合わされて良い。言い換えると、それらは、同じタンパク質の同じエピトープ、同じタンパク質の異なるエピトープ、異なるタンパク質のエピトープ等から由来しても良い。

20

【0019】

前記ペプチドはさらに、ペプチドのN末端で、アミノ酸残基C N l e G - のような付加のアミノ酸を含んでも良い。前記ペプチドはまた、C末端で付加のアミノ酸を含んでも良い。付加のアミノ酸は、コイルドコイルを形成する傾向を有する配列で並んでも並ばなくても良く、各末端での付加のアミノ酸の数は、好ましくは100未満である。各末端での付加のアミノ酸の数は、より好ましくは50未満、さらにより好ましくは30未満、またさらにより好ましくは20未満、最も好ましくは10未満である。

30

【0020】

本発明は、天然状態においてコイルドコイル構造として存在する、微生物タンパク質に関する新規な合成ペプチドの作製のために特に使用されて良い。特に、微生物表面タンパク質、とりわけS . p n e u m o n i a e表面タンパク質A及びCのエピトープから得られるアミノ酸残基が、新規なペプチドにおいて使用されて良い。多くの微生物表面タンパク質が同様な構造を有し、長い自立したコイルドコイルとして存在する。

【0021】

X残基は、天然のコイルドコイルタンパク質、例えばP s p A及びP s p Cのコンセンサス配列から由来しても良い。P s p Aの好ましいコンセンサス配列は、E E L X₁ X₂ K I D E L D X₃ E I A X₄ L E K X₅（配列番号5）である。好ましくは、X₁はS、Q、NまたはDであり；X₂はD、NまたはKであり；X₃はAまたはNであり；X₄はK、EまたはDであり；X₅はN、DまたはEである。

40

【0022】

コイルドコイル構造の安定性を増大するために、e及びg位置のアミノ酸残基は、興味あるエピトープの一部でなければ、荷電したアミノ酸（例えばA s p、G l u、L y s、A r g及びH i s）で任意に置換されて良い。この置換は、一方のペプチド鎖中のe位置及び「相補的鎖」中のg'位置が、例えばA s pとL y sといった反対の荷電のアミノ酸によって占められるように実施されるべきである。同様に、一方の鎖のg位置及び相補的鎖のe'位置は、反対の荷電の残基によって置換され得る。例えば、図3の鎖1と鎖2は「相補的鎖」である。図3に示されるように、鎖1のe位置及び鎖2のg'位置が整列する

50

。それ故、反対の荷電を有するアミノ酸残基が、これらの二つの位置を占める場合、それらはその側鎖の間で塩架橋を形成し、それはコイルドコイル構造の安定性を増大する。

【0023】

これらの残基は、塩架橋が同じ鎖において3または4残基離れている二つの残基の間で形成できるように、荷電したアミノ酸によって置換されても良い。別法として、荷電したアミノ酸は、安定化した鎖において反対の荷電の残基と相互作用することによって、コイルドコイル構造を安定化しても良い。

【0024】

別の特徴点では、本発明は、コイルドコイルから由来する抗原性エピトープを選択する工程、アミノ酸残基が溶媒にさらされるかを測定する工程、及び式IのX位置中に前記溶媒にさらされるアミノ酸残基を挿入する工程を含む、式Iのペプチドの製造方法を提供する。特にエピトープの選択は、コンピュータアルゴリズムを使用して実施して良い。同じタンパク質または異なるタンパク質から由来する一つより多くのエピトープアミノ酸のセットが使用されて良い。さらにエピトープアミノ酸のセットは、微生物コイルドコイルタンパク質のエピトープが使用される場合、微生物の異なる株及び/または種から得られても良い。

10

【0025】

さらなる特徴点では、本発明は、式Iのペプチドを含む、動物における免疫応答を刺激するのに有用な組成物を提供する。一つより多くのエピトープアミノ酸のセットが式Iのペプチドにおいて使用され、このエピトープアミノ酸のセットが微生物の異なる株及び/または種から得られる場合、前記組成物は、一つより多くの微生物の株及び/または種に対する免疫応答を刺激するのに有用である。前記動物は、鳥類、哺乳類（ヒトを含む）、または免疫応答が可能ないずれの動物でも良い。

20

【0026】

式Iのペプチドの投与によって生産される抗体もまた、本発明の特徴点として提供される。そのような抗体は、ポリクローナルでもモノクローナルでも良い。そのような抗体を含む製薬組成物もまた提供される。一つより多くのエピトープアミノ酸のセットが式Iのペプチドにおいて使用され、このエピトープアミノ酸のセットが微生物の異なる株及び/または種から得られる場合、前記抗体は、一つより多くの微生物の株及び/または種に結合するであろう。

30

【0027】

またさらなる特徴点では、本発明は、式Iのペプチドを含む、ワクチンとして有用な組成物を提供する。一つより多くのエピトープアミノ酸のセットが式Iのペプチドにおいて使用され、このエピトープアミノ酸のセットが微生物の異なる株及び/または種から得られる場合、前記組成物は、一つより多くの微生物の株及び/または種に対する交差保護を提供するのに有用である。

【0028】

またさらなる特徴点では、本発明は、微生物感染に感受性な哺乳動物に式Iのペプチドを投与することを含む、微生物感染の予防方法を提供する。一つより多くのエピトープアミノ酸のセットが式Iのペプチドにおいて使用され、このエピトープアミノ酸のセットが微生物の異なる株及び/または種から得られる場合、前記組成物は、微生物のいくつかの株及び/または種による感染の予防に有用である。

40

【0029】

またさらなる特徴点では、本発明は、細菌感染の疑いのあるまたは細菌感染に罹患している動物における細菌感染の治療または予防方法を提供し、この方法は、細菌タンパク質に対する有効量の抗体を前記動物に投与することを含み、ここで前記抗体は、動物に式Iのペプチドを投与することによって生産される。特にそのような投与は、前記動物において受動免疫化を提供するため、及び/または前記動物における感染の症状を予防若しくは減弱するために使用されて良い。一つより多くのエピトープアミノ酸のセットが式Iのペプチドにおいて使用され、このエピトープアミノ酸のセットが微生物の異なる株及び/また

50

は種から得られる場合、前記方法は、いくつかの微生物の株及び／または種による感染を治療または予防するであろう。

【0030】

またさらなる特徴点では、本発明は、特定の微生物から得られるエピトープを含む式Ⅰのペプチドに対する抗体とサンプルを接触させる工程、及び前記抗体が前記サンプルの構成成分に結合するかを測定する工程を含む、サンプル中の特定の微生物の存在の測定方法を提供する。前記サンプルは、生物学的サンプルでも良い。前記方法は、微生物感染の原因となる剤を測定するために使用されても良い。一つより多くのエピトープアミノ酸のセットが式Ⅰのペプチドにおいて使用され、このエピトープアミノ酸のセットが微生物の異なる株及び／または種から得られる場合、前記方法は、サンプル中のいくつかの微生物の株及び／または種の存在を同時に検出するために使用されて良い。

10

【0031】

またさらなる特徴点では、本発明は、異なるタンパク質から得られるエピトープを有する式Ⅰのペプチドを動物に投与することを含む、動物の免疫系にさらすための複数のエピトープの生産方法を提供する。好ましい実施態様では、前記ペプチドエピトープは、単一の微生物の、または微生物の異なる株及び／または種から得られる異なるタンパク質から得られる。

【0032】

またさらなる特徴点では、本発明は、微生物タンパク質から得られる少なくとも一つのエピトープを含む式Ⅰのペプチドと生物学的サンプルを接触させる工程、及びペプチドに対する生物学的サンプル中の抗体の結合を測定する工程とを含む、生物学的サンプル中の微生物タンパク質に対する抗体の存在の測定方法を提供する。前記方法は、動物が微生物に対してさらされているかを測定するために使用されても良い。

20

【0033】

【発明の実施の形態】

本発明は、天然に存在するタンパク質抗原から由来する合成ペプチドを含む、構造特異的ペプチドを生産するためのコイルドコイル構造骨格の使用に関する。合成ペプチドの構造は、天然コイルドコイルタンパク質のエピトープをスプライスした、7つ揃いの繰り返し単位の骨格を利用する。

【0034】

特に前記合成ペプチドは、微生物タンパク質、特に表面タンパク質に基づき、それらは肺炎球菌表面タンパク質A及びCのようなコイルドコイル形態で天然に存在する。合成ペプチドは免疫原性であり、動物において免疫応答を引き出すために使用できる。従ってそれらは、ワクチンとして、または天然に存在するタンパク質を認識する抗体生産または細胞介在性免疫を刺激するために有用である。

30

【0035】

本発明をさらに詳細に記載する前に、本出願で使用される用語は、他に示すところがない限り以下のように定義される。

【0036】

定義

40

「天然タンパク質」は、天然に存在するタンパク質である。

【0037】

「コイルドコイルタンパク質」は、少なくとも一部としてコイルドコイルを形成するタンパク質である。コイルドコイルタンパク質は、コイルドコイルに加えて他の形態的構造を有しても良い。用語、コイルドコイルタンパク質に包含されるものは、コイルドコイル構造を想定されることが示されているタンパク質、及びコンピュータアルゴリズムを使用することによってコイルドコイルを形成すると予測されるタンパク質である。

【0038】

「微生物タンパク質」は、細菌、古細菌、真菌、ウイルス、原生動物、藻類、粘菌、またはプリオンのような微生物から由来するタンパク質である。

50

【0039】

ここで使用される「ペプチド」は、ペプチドまたはタンパク質である。言い換えると、本願において言及されるペプチドは、いずれかの数のアミノ酸を含んで良い。

【0040】

「式Ⅰのペプチド」は、式Ⅰからなる断片である合成断片を含むペプチドである。

【0041】

「エピトープ」は、抗原決定基であるタンパク質またはペプチドの一部である。

【0042】

アミノ酸の「誘導体」は、天然に存在しないアミノ酸残基または化学的に変性されたアミノ酸である。アミノ酸誘導体は、血清または組織におけるペプチドの半減期を増大するため、またはペプチドの抗原性を増大するために使用されて良い。 10

【0043】

天然に存在しないアミノ酸は、D - アイソマー、ノルロイシン、4 - アミノ酪酸、アミノイソ酪酸、4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 5 - フェニルペンタン酸、6 - アミノヘキサン酸、t - ブチルグリシン、ノルバリン、フェニルグリシン、オルニチン、サルコシン、4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 6 - メチルヘプタン酸、及び2 - チエニルアラニンに制限されなくて良い。

【0044】

化学的に改変されたアミノ酸は、側鎖修飾を有するアミノ酸である。例えば、リジンのアミノ基は、アルデヒド、引き続きNaBH₄での還元でのアルキル化；メチルアセトイミダートでのアミド化；無水酢酸でのアシル化；シアナートでのカルバモイル化；2, 4, 6 - トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)でのトリニトロベンジル化；無水コハク酸と無水テトラドロフタル酸でのアシル化；及びプリドキサル - 5' - ホスファート、引き続きNaBH₄での還元でのピリドキシル化によって改変されても良い。 20

【0045】

アルギニン残基のグアニジン基は、2, 3 - ブタンジオン、フェニルグリオキサル及びグリオキサルのような試薬での複素環縮合産物の形成によって改変されても良い。

【0046】

カルボキシ基は、O - アシルイソウレア形成を経たカルボジイミド活性化、引き続き例えば対応するアミンへの誘導体化によって改変されても良い。 30

【0047】

スルフィドリル基は、ヨード酢酸またはヨードアセタミドでのカルボキシメチル化；システイン酸への過ギ酸酸化；他のチオール化合物と混合したジスルフィドの形成；マレイミド、無水マレイン酸、または他の置換化マレイミドとの反応；4 - クロロメルクリベンゾアート、4 - クロロメルクリフェニルスルホン酸、フェニルメルクリクロリド、2 - クロロメルクリ - 4 - ニトロフェノール、及び他のメルクリアルを使用するメルクリアル誘導体の形成；またはアルカリpHでのシアナートでのカルバモイル化によって改変されても良い。

【0048】

トリプトファン残基は、例えばN - プロモスクシンイミドでの酸化、または2 - ヒドロキシ - 5 - ニトロベンジルプロミドまたはスルフェニルハライドでのインドール環のアルキル化によって改変されても良い。チロシン残基は、テトラニトロメタンでのニトロ化によって改変され、3 - ニトロチロシン誘導体を形成しても良い。 40

【0049】

ヒスチジン残基のイミダゾール環の改変は、ヨード酢酸誘導体またはジエチルピロカルボナートでのアルキル化によって達成されても良い。

【0050】

「ペプチド」は、天然に存在するアミノ酸またはアミノ酸誘導体を含むペプチドであっても良い。ペプチドはまた、ペプチドの異なる部分の間で架橋を含んでも良い。例えばコイルドコイル構造は、しばしば二本鎖または三本鎖からなる。コイルドコイルの異なる鎖は 50

ジスルフィド結合によって結合していることが好ましく、それはコイルドコイル構造を安定化する。より好ましくは、ペプチドは3または4残基離れて位置するリジンとグルタミン酸の側鎖の間でラクタム架橋を含む(Houston等, 1996)。これらのラクタム架橋は、好ましくはペプチドのN-及びC-末端で取り込まれ、エピトープが展示されている配列の領域には取り込まれない。

【0051】

「溶媒にさらされる」または「溶媒接近可能な」アミノ酸残基は、タンパク質またはペプチドが溶液中に存在する場合、溶媒にさらされるタンパク質またはペプチドのアミノ酸残基である。溶液は好ましくは水溶液であり、より好ましくは血液、リンパ液、または穏やかなバッファーのような生理学的に適合可能な溶液である。特に、「溶媒にさらされる」アミノ酸残基は、コイルドコイルを形成するまたは形成すると予測される天然エピトープのb、c、e、fまたはg位置での残基を指す。

10

【0052】

穏やかなバッファーは、リン酸緩衝生理食塩水である。本願で使用される「穏やかなバッファー」は、50 mM KH_2PO_4 、50 mM KCl 、pH 7.0である。

【0053】

「抗体」は、特異的な抗原と反応し、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMといった構造の特性に基づく5個の別個のクラスの一つに属するタンパク質分子である、

【0054】

「免疫応答」は、興味ある組成物またはワクチンに対する細胞性及び/または抗体介在性免疫応答の宿主における発達である。そのような応答は、以下の一つ以上の生産からなっても良い：興味ある組成物またはワクチンに含まれる抗原に特異的に向けられた、抗体、B細胞、ヘルパーT細胞、サプレッサーT細胞、及び/または細胞障害性T細胞。

20

【0055】

「ワクチン」は、病原体による感染を部分的または完全に予防する免疫応答を動物において引き出すことができる分子である。

【0056】

免疫応答と「引き出す」または「刺激する」とは、免疫原に対して免疫系をさらすことによって免疫応答を引き起こすことである。

【0057】

「免疫原」は、動物において免疫応答を引き出すことができる分子である。

30

【0058】

「細菌感染の予防」は、細菌感染の発達を完全にまたは部分的に予防することである。

【0059】

「微生物感染の治療」は、細菌感染の開始の後、細菌感染の症状を完全にまたは部分的に減少することである。

【0060】

「サンプル」は、物質、材料、または集団の等量部分または代表的部分である。例えばサンプルは、水、汚水、オイル、砂、血液、生物学的組織、尿、または排泄物のサンプルであって良い。

40

【0061】

「生物学的サンプル」は、動物、植物、または微生物のような生物学的主体から回収されるサンプルである。

【0062】

「有効量」は、企図される目的を達成するのに十分な量である。例えばワクチンの有効量は、標的の疾患と接触することから受容者を保護する、または疾患と関連する医学的状態を予防または減弱するための、ワクチンの受容者における免疫応答を引き出すのに十分なワクチンの量である。

【0063】

合成コイルドコイルペプチド

50

P s p Aは、S . p n e u m o n i a eの各種の株の中で非常に可変的であることが以前に示されている。P s p Aに対して生産されたモノクローナル抗体を使用するマッピング研究は、主な交差反応性エピトープが、コイルドコイルドメインの最後の100アミノ酸で見出されることを示す(配列番号1の192 - 270残基)(M c D a n i e l等, 1994)。この領域の配列に基づいて、P s p Aタンパク質を3つのファミリーを含む6のグレードにグループ分けすることが可能である。動物の研究では、P s p Aでの免疫化が、同じP s p Aファミリーにおける他の株に交差反応性である免疫応答を引き出すだけでなく、この交差反応性がファミリーの間で拡張されることを示している(B r i l e s等, 1999; M c D a n i e l等, 1991; T a r t等, 1996)。さらに、精製P s p C断片での免疫化が、敗血症に対して保護的であり、P s p Aと交差反応する抗体を生産する(B r o o k s - W a l t e r等, 1999)。交差保護の結果は、P s p A及びP s p Cに対するコイルドコイルドメインの間のバリエーションにも関わらず、保存されたエピトープが存在するに違いないことを示唆する。

10

20

30

【0064】

P s p Aに対する免疫が保護的であろうという第一の証拠は、P s p A特異的モノクローナル抗体(M A b s)が胎児敗血症からマウスを保護するという発見であった。その後、R x 1株から得たP s p Aに対するI g GまたはI g Mモノクローナル抗体での受動保護が、S . p n e u m o n i a e W U 2株のL D₅₀の10⁵倍でのi pまたはi vでチャレンジに引き続く死からマウスを保護することが示された(B r i l e s等, 1989)。このM A b sは、相補性介在性の機構によってチャレンジされたマウスの血液から肺炎球菌をクリアランスすることが示された。活性な免疫化の研究は、S . p n e u m o n i a e R x 1株から得たP s p Aの27kD a断片(配列番号1の1 - 245残基)を利用し、それはそのタンパク質のヘリックスドメインのほとんどを含む。F C Aアジュバントと組み合わせた5 µ gのこの断片でのC B A / Nマウスの免疫化、引き続きP B S中のブースター量での免疫化は、W U 2株の300 c f u (L D₅₀の30倍)のi vチャレンジから保護した(T a l k i n g t o n等, 1991)。ほとんどの最近の研究では、マウスが1から5 µ gのアジュバントなしの1 - 303残基を含む断片を受け取る場合、それはより悪性のA 66 . 1株の480 c f uでのi vチャレンジに引き続き胎児感染に対して保護を引き出した(B r i l e s等, 1998)。免疫化されたマウスまたはウサギから得た免疫血清でのマウスにおける受動保護の研究は、チャレンジ株のL D₅₀の10から100倍のチャレンジ量から胎児敗血症に対して保護できる。

【0065】

P s p Aが数多くの血清学的タイプに分割できる一方、それは非常に交差反応性タンパク質であることが示されている。R x 1株から得たP s p Aのヘリックス部分で免疫化された一匹のウサギから得た血清は、ウエスタンブロットにおいて全ての肺炎球菌から得たP s p Aを認識できる。C B A / NマウスをD 30、W U 2及びB G 9 7 3 9の各株から得たP s p Aでの免疫化に引き続き14の異なるS . p n e u m o n i a e株(~ 200 × L D₅₀量)でチャレンジした場合、各P s p Aは、ほとんどのチャレンジ株に対して交差保護を示した。R x 1株から得たP s p Aのヘリックスドメイン(配列番号1の1 - 314残基)が、ヒトボランティアにおける安全性と免疫原性について最近評価された(N a b o r s等, 2000)。水酸化アルミニウムに吸着された5から125 m gのこの断片で患者を免疫化した場合、R x 1断片に対する高レベルの循環抗体が引き出され、並びに異種P s p A分子に対する抗体も引き出された。

40

【0066】

S . p n e u m o n i a e R x 1株から得たP s p A配列を、B i o t o o l s I n cから得たP e p t o o l s プログラムを使用して分析した。P e p t o o l s 構造予測アルゴリズムは、4の予測されるアルゴリズムから得た結果に基づいて、コンセンサス予測と組み合わされた周知のタンパク質ホールディングモチーフを同定することに基づく。P e p t o o l s プログラムはまた、P s p AのN末端部分に対する300アミノ酸に亘る非常にヘリックス状の領域を予測する。P e p t o o l s プログラムはまた、各種の配

50

列の親水性、溶媒接近可能性、柔軟性、及びターンの傾向を測定することによって、そのタンパク質の部位が抗原性であるかを予測することが可能であり、さらに周知のB細胞エピトープのデータベースに対する配列をマッチする。Peptoolsは、添付資料1に示されたコイルドコイルドメインにおける数多くの潜在的なB細胞エピトープを同定した。

【0067】

P s p A及びP s p C（またはコイルドコイルとして存在する他のタンパク質）のコイルドコイルへのホールディングは、溶媒接近可能である特定の残基と、溶媒接近不可能である疎水性コアを形成する特定の残基を引き起こす。溶媒接近可能なアミノ酸は、7つ揃いのリピートのb、c、e、f及びg位置で位置し、一方でアミノ酸aとdは埋め込まれる。かくして溶媒接近可能な位置での残基は、例えば抗体生産といった免疫応答を介在するのに関与しているに違いない。コイルドコイル領域によって形成されるエピトープは、aおよびd残基がさらされていないため不連続であるに違いない。かくして、これらのタンパク質から得られるエピトープは、b、c、e、f及びgの溶媒接近可能な位置から由来するに違いない。

10

【0068】

我々は、コイルドコイルタンパク質の疎水性コアの安定性が、7つ揃いのリピートのa位置のI l e残基とd位置のL e u残基の取り込みによって最大化されていることを発見した。従って本発明は、式I：

(A X X D X X X)_n (配列番号15)

20

[式中、

AはI l eまたはその誘導体であり；

DはL e uまたはその誘導体であり；

各Xは天然コイルドコイルタンパク質のエピトープのアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基またはその誘導体であり；

各(A X X D X X X)リピート中のX残基は、X残基のセットを形成し；

nは1以上である]

を含む合成ペプチドを提供する。

【0069】

好ましい実施態様は、a位置でI l e、d位置でL e uを有する一方、本発明においては、aまたはa位置でV a l、I l eまたはL e uを含むペプチドも企図される。かくして、a位置でのアミノ酸はV a l、I l eまたはL e uであっても良く、d位置でのアミノ酸は独立にV a l、I l eまたはL e uであっても良い。

30

【0070】

P s p A及びP s p Cのコイルド領域は非常に長いが、合成コイルドコイル形成配列はより短くても良い。もしラクタム架橋が含まれるのであれば、合成コイルドコイルは14残基程度の短さであって良い(H o u s t o n等, 1996)。ラクタム架橋の不存在下では、我々は21アミノ酸を含むヘリックスペプチドが安定であることを見出した。さらに、分子内ジスルフィド結合による個々のヘリックス同士の結合は、これらの構造をさらに安定化する。小さなコイルドコイルは、P s p A及びP s p Cのような天然コイルドコイルタンパク質から得られるエピトープをスプライスする骨格として機能する。潜在的な骨格は以下の配列を有する：

40

C n l e G - (I X X L X X X)_n (配列番号16)

[式中、N l eは非分枝側鎖を含むロイシンのアイソマーであるノルロイシンである]。

P s p A及びP s p Cのような天然コイルドコイルタンパク質からエピトープを形成する残基(残基b、c、e、f及びg)は、X位置内に挿入されるであろう。残基エピトープは、Peptoolsのようなアルゴリズム及びバイオインフォマティックスプログラムを使用して決定できる可能性がある。エピトープは、B i a c o r e装置上の天然タンパク質に対して生産されたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗血清の分析によってマップできる。S . p n e u m o n i a eの各種の株から得られるもののような異なる

50

天然タンパク質から得られるエピトープは、新規な配列を生産するために共にスプライスできる。ペプチドは、当該技術分野で確立されたペプチド合成法によって合成されても良く、または興味あるペプチド配列をコードする発現ベクターを構築し、ペプチドを発現するために使用できる。この骨格中の I 及び L 残基は独立に、I、L または V から選択されるアミノ酸によって置換されても良い。

【0071】

本発明における b、c、e、f、及び g 位置でのアミノ酸は、興味ある特定のタンパク質の天然コイルドコイルから得られる溶媒にさらされるアミノ酸である。それ故、本発明は WO 01/00010 とは別個であり、コイルドコイルテンプレートにおける非コイルドコイルタンパク質から得られる溶媒にさらされるアミノ酸を展示するように配向する。その結果、非コイルドコイルエピトープは、コイルドコイル構造に変換され、コイルドコイル構造に対して生産された抗体は、元々の非コイルドコイルエピトープを認識しないであろう。対照的に、本発明の式 I に従って生産されたペプチドは、b、c、e、f、及び g 位置で、コイルドコイルタンパク質の b、c、e、f、及び g 位置から得られるアミノ酸を含む。生成したペプチドは、より免疫原性である一方で、特異性に関して元となるエピトープと同じ免疫応答を引き出すであろう。

10

【0072】

本発明はまた、一つのペプチドを別のものに埋め込むことに向けられた WO 96/11944 とは別個である。略記すると、WO 96/11944 は、興味あるペプチドと同じ構造を形成するような強い特性を有するアミノ酸とペプチドを隣接させ、それによってペプチドの構造を安定化することによって、ペプチドの免疫原性を増大することができることを開示する。例えば、コイルドコイルを形成するペプチドを、GCN4 のアミノ酸配列中に埋め込むことができ、それは比較的安定なコイルドコイルを形成する。生成したキメラペプチドは、ヘリックス誘導溶媒トリフルオロエタノール中に溶解した場合、高いヘリックス含量を有するが、水性条件下でのヘリックス含量は低い。本発明は他方で、別のアミノ酸配列中にペプチド断片を埋め込むものではない。代わりにペプチドの a 及び d 位置でのアミノ酸は、特異的に選択され、コイルドコイル構造の安定性を増大するために適切な場合置換され、生成したペプチドは水溶液中でさえ典型的にヘリックス状である。

20

【0073】

以下の実施例は、本発明の基本的特徴を説明する。前述のように、Rx1PspA タンパク質から得たコイルドコイルドメインの C 末端は、数多くの交差保護性エピトープを含むことが示されている。BioTools ソフトウェアは、コイルドコイル免疫原の構築を説明するために使用されるであろう 153-170 残基と 181-198 残基を含む数多くのそのようなエピトープを同定した（実施例 1）。これらのエピトープの a 及び d 位置は太字で強調され、溶媒接近可能なアミノ酸はイタリックで記載される。これらの位置は、テンプレートの a 位置で Ile、d 位置で Leu によって置換されている。潜在的なエピトープから得られる溶媒にさらされる残基を単純にスプライスし、この骨格にそれらを取り込むことによって、免疫原性である独特のポリペプチド配列を作成可能である。実施例 1 に記載されたコイルドコイルは、約 7,000 Da の分子量を有し、それ自体免疫応答を引き出すのに十分な長さであろう。代わりにこれらの分子は、破傷風菌トキソイドまたは KLH のようなキャリアタンパク質に結合することができ、または当業者に周知の方法を使用してリポソームに結合できる。

30

40

【0074】

例えばこのタンパク質から得られる c 残基が、式 I における c 残基に対応しなければならないように、残基をフェーズにおいて維持しなければならないことが強調されなければならない。二つの隣接する配列のそれぞれから得られる残基が、スプライスの間で生じるいずれかのギャップを埋めるために使用できる。コイルドコイルは二つのヘリックスからなるために、二つのヘリックス鎖は異なる配列を有することができ、かくして分子全体におけるエピトープの数を増大する。各種のクレードから得られる数多くのエピトープの取り込みを通じて、コイルドコイルペプチドは各種のクレードの間で交差反応するであろう

50

。

【 0 0 7 5 】

一定の疎水性コアを維持し、溶媒にさらされる残基のみにおいてスプライスし、及び各種のタンパク質から得られるエピトープを混合することによって、独特の配列が生産される。かくして、式 I のペプチドは、一方の 7 つ揃いのリピートにおいて P s p A の b、c、e、f 及び g 位置から得られるアミノ酸を有し、もう一方のリピートにおいて P s p C から得られるそれらを有しても良い。このペプチドがワクチンとして使用される場合、P s p A と P s p C の両者に対する免疫が誘導され、それによって S . P n e u m o n i a e に対する二重の保護が提供される。

【 0 0 7 6 】

特筆すべきアプローチは、表面タンパク質 (P s p A 及び P s p C のような) と表面アドヘシタンパク質 (P s a A) の両者から得られるアミノ酸を含むことである。アドヘシタンパク質は、鼻咽腔領域における S . p n e u m o n i a e の病原性に関与し、一方で表面タンパク質は、全身性の症状に関与する。P s a A は鼻咽腔保菌を予防するために有効なワクチンであり、一方で P s p A は全身性の感染のためのより最適なワクチンの候補である (B r i l l e s 等 , 2 0 0 0) 。それ故 P s a A 及び P s p A から得られるエピトープを含むペプチドは、最近による鼻咽腔感染及び全身性の感染の両者に対する防御を提供するであろう。これは、式 I のペプチドの一方の 7 つ揃いのリピート内に、P s a A のヘリックス領域から得られる溶媒にさらされるアミノ酸と、同じペプチドの他方の 7 つ揃いのリピート内に、P s p A のヘリックスから得られる溶媒にさらされるアミノ酸とをスプライスすることによって達成できる。同様に、P s p C エピトープと P s a A エピトープの両者を含むハイブリッドペプチドが調製できる。

【 0 0 7 7 】

別法として、式 I のペプチドは、微生物の異なる株、または異なる微生物から得られるタンパク質の溶媒にさらされるアミノ酸を含んでも良く、生成したワクチンは、使用される全ての株または微生物に対して有効であることができる。同様に、コンセンサス配列は、異なる株から得られる特定のタンパク質について推定され、全てのこれらの株に対するワクチンとして使用されても良い (実施例 3 参照) 。

【 0 0 7 8 】

ペプチドのヘリックス安定性を改良するために、式 I の 7 つ揃いのリピートの e 及び g 位置は、グルタミン酸とリジンとを含んでも良い。これらの残基は、一方の鎖の e と他方の鎖の g ' との間で塩架橋を形成し、並びに一方の鎖の g と他方の鎖の e ' の間でも塩架橋を形成する。これらの塩架橋は、コイルドコイル構造を安定化するのにさらに寄与する。個々のヘリックスを安定化するため、リジン残基とグルタミン酸残基は、3 - 4 残基離れた位置に導入でき、その側鎖の間の鎖間塩架橋の形成を容易にできる。アラニンまたはアミノイソ酪酸のような高いヘリックス特性を有するアミノ酸を含むことによって、コイルドコイルの安定性を増大できる。

【 0 0 7 9 】

別法として、エピトープを含まない安定化した鎖が使用されても良い。安定化した鎖の唯一の目的は、エピトープを含む鎖のヘリックス含量を増大することである。安定化した鎖は、エピトープ含有鎖のヘリックス構造の形成をサポートし安定化する非常に安定なヘリックスを形成可能である。好ましくはエピトープは、e 及び g 位置でリジン及び / またはグルタミン酸を有し、安定化した鎖は、e ' または g ' 位置で反対の荷電を有するアミノ酸を提供でき、鎖間塩架橋を形成する。安定化した鎖の例は以下の通りである：

C N l e G G G (E I E A L K K) ₅ (配列番号 2)

【 0 0 8 0 】

これらのペプチドの構造的及び立体構造的完全性は、円 2 色性 (C D) スペクトロスコピーによって容易に測定できる。本発明において有用なペプチドは、水溶液中でヘリックスの特徴を有する (実施例 2 及び 3 参照) 。それ故天然のエピトープは、生理学的環境において正確に存在できる。対照的に、以前に報告された合成コイルドコイルタンパク質は、

水溶液中でヘリックスを形成しない (WO 96/11944)。本発明において有用なペプチドは、CDスペクトロスコピーによって測定して、穏やかなバッファー中で少なくとも20%のヘリックス含量を有する。ヘリックス含量は、穏やかなバッファー中で好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも80%である。

【0081】

ペプチドの安定性は、熱変性アッセイ、または塩化グアニジン変性アッセイのような化学的変性アッセイによって測定されても良い。そのようなアッセイは、当業者に周知である。ペプチドの安定性は、阻害ELISAによって間接的に評価されても良く、そこでは抗原と抗体の間の相互作用を阻害するペプチドの能力が、抗体に対して抗原と競合するために必要な構造を仮定した場合に、ペプチドがどのくらい安定であるかの指標として機能する。

10

【0082】

他の細菌コイルドコイルタンパク質から得られるエピトープもまた、本発明において使用されて良い。特に、コイルドコイル構造を含む細菌表面タンパク質から得られるエピトープが使用されて良い。本発明において有用なタンパク質を有する微生物の例は、*Haemophilus influenza*、特にその仮定的タンパク質HI0500；ライム病スピロヘータ、即ち*Borrelia burgdorferi*、特にその表面リポタンパク質P27；*Legionella*、特にその仮定的タンパク質ppIB；大腸菌、特にその保存的YigNタンパク質；*Neisseria*種、特に*Neisseria meningitidis*、及びその推定ペリプラズムタンパク質；*Moraxella catarrhalis*、特にそのタンパク質UspA1及びUspA2；*Mycoplasma*種、特に*Mycoplasma pneumoniae*及びその仮定的タンパク質EO7；*Chlamydia*種mと国仮定的タンパク質CT825；*Plasmodium falciparum*、特にその仮定的タンパク質PFB01450、及び成熟寄生虫感染赤血球表面抗原；*Trypanosoma*種；*Staphylococcus aureus*；*Streptococcus mutans*；*Cryptococcus neoforms*；*Klebsiella pneumoniae*；*Pseudomonas aeruginosa*；ウイルス；真菌等を制限することなく含む。

20

【0083】

さらに、細菌起源から由来しない他のコイルドコイルタンパク質が同じ態様で使用されて良い。例えば、治療目的のためタンパク質に対する抗体を生産すること、またはこのタンパク質の機能を研究することは一般的である。しかしながら、全ての興味あるタンパク質が十分に免疫原性であるわけではなく、天然タンパク質の特定のコイルドコイル領域に対して特異的に向けられた抗体を生産することは困難であろう。本発明は、例えタンパク質がどんな起源、機能、または細胞内局在を有するかに関わらず、いずれのコイルドコイルタンパク質に対しても抗体調製を最適化するために使用されて良い。さらに本発明はまた、抗体を生産するために使用されるペプチド中の興味ある領域のみを含むことによって、特定のコイルドコイル領域に対して向けられた抗体の生産を可能にする。

30

【0084】

非細菌性のコイルドコイルタンパク質の例は、エストロゲンレセプター結合断片関連遺伝子9 (Nakashima等, 1999)、白血病関連タンパク質5 (Kapanaadze等, 1998)、ブドウ膜自己抗原 (Yamada等, 2001)、アンギオポエチン前駆体 (Davis等, 1996)、NF-カッパB必須モジュレーター (Li等, 1999)、腫瘍感受性遺伝子101タンパク質 (Li等, 1997)、細胞トリカルシノーマ抗原1 (Chang等, 1994)、TACC1 (Still, 1999)、及びTPR (Miranda等, 1994)を制限することなく含む。

40

【0085】

ここに挙げられた細菌及び非細菌タンパク質に加えて、当業者は、当該技術分野の確立された方法に従って、他のコイルドコイルタンパク質を同定できる。例えば、もしタンパク

50

質のアミノ酸配列が入手可能であれば、M u l t i c o i l または P e p t o o l のような各種のコンピューターアルゴリズムが、そのタンパク質がコイルドコイルを形成するかどうか予測するために使用できる。実質的に精製されたタンパク質については、C D スペクトロスコピーが、ここに記載された実際の構造を測定するために使用できる。

【0086】

組成物

式 I のコイルドコイルペプチドを含む組成物は、少なくとも二つの目的のため動物において免疫応答を引き出すために使用できる。組成物が動物における免疫応答を引き出すことによってワクチンとして機能する場合、生成した抗体または T 細胞介在性免疫は、同じエピトープを含むその後の攻撃から動物を保護できる（能動免疫）。別法として、組成物は、研究ツールとして使用できる、または同じエピトープを含む後の攻撃から第二の動物を保護するために第二の動物に投与できる抗体を生産するために使用できる（受動免疫）。

10

【0087】

引き出された免疫応答を増幅するために、式 I のペプチド、特により小さいペプチド（例えば）1 から 4 の 7 つ揃いのリピートを含むもの）をキャリアータンパク質に接合することが好ましいであろう。

【0088】

さらに、式 I のコイルドコイルペプチドまたはキャリアータンパク質とのそれらの接合体は、アジュバントが免疫保護化抗体力化または細胞介在性免疫応答を増大するため、免疫応答を引き出すためのアジュバントとさらに混合されても良い。そのようなアジュバントは、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウム、ジメチルジオクタデシル - アンモニウムブロミド、A d j u v a x （A l p h a - B e t a T e c h n o l o g y）、I n j e c t A l u m （P i e r c e）、M o n o p h o s p h o r y l L i p i d A （R i b i I m m u n o c h e m R e s e a r c h）、M P L + T D M （R i b i I m m u n o c h e m R e s e a r c h）、T i t e r m a x （C y t R x）、Q S 2 1、C p G 配列（S i n g h 等、1999）、毒素、トキシド、グリコプロテイン、リピド、グリコリピド、細菌細胞壁、サブユニット（細菌またはウイルス）、炭水化物分子（モノ -、ジ -、トリ -、テトラ -、オリゴ -、及びポリサッカリド）、各種のリポソーム製剤またはサポニンを制限することなく含む。各種のアジュバントの組み合わせは、免疫原製剤を調製するために抗原と共に使用されて良い。

20

30

【0089】

組成物は、脈管内、腹腔内、筋肉内、皮膚内、皮下、経口、鼻腔、または吸入を含む各種の輸送方法によって投与されて良い。組成物はさらに、製薬学的に許容可能な賦形剤及び / またはキャリアーを含んでも良い。そのような組成物は、霊長類、齧歯類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウサギ、ブタ、イヌ、及びトリ種のような、免疫応答を開始可能ないずれかの動物を免疫化するのに有用である。家畜動物と野生動物の両者が免疫化されて良い。組成物の正確な製剤は、特定のペプチドまたはペプチド - キャリアー接合物、免疫化される種、及び投与の経路に依存するであろう。

【0090】

コイルドコイルタンパク質に対して生産された抗体は、製薬組成物中に含ませることができ、動物に投与できる。製薬組成物は典型的に、製薬学的に許容可能なキャリアーを含み、製薬学的に許容可能な賦形剤を含んでも良い。製薬組成物は、脈管内、腹腔内、筋肉内、皮膚内、皮下、経口、鼻腔で投与でき、またはエアゾール吸入によっても投与できる。好ましくは製薬組成物は、脈管内、筋肉内、鼻腔、またはエアゾール吸入によって投与される。

40

【0091】

本発明によって、抗体、特にモノクローナル抗体もまた包含され、それは式 I のペプチドに対して生産された抗体から由来する。特に、ハイブリドーマは式 I のペプチドを使用して生産でき、組換え誘導体抗体は、周知の遺伝学的操作法に従ってこれらのハイブリドーマ

50

マを使用して生産できる（レビューとして、Winter等，1991参照）。例えば、モノクローナル抗体の可変領域をコードするDNA断片は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって得ることができる。PCRプライマーは、重鎖または軽鎖の定常領域に相補的であるオリゴヌクレオチドであることができ、PCRテンプレートは、ハイブリドーマから調製される全cDNAまたはゲノムDNAであることができる。別法として、cDNAライブラリーが、ハイブリドーマから調製でき、特定のハイブリドーマによって生産される重鎖または軽鎖のクローンを得るために、イムノグロブリン重鎖または軽鎖の定常領域に対応するプローブでスクリーニングできる。

【0092】

次に、可変領域に対するDNA断片は、発現ベクター内に挿入でき、選択された定常領域のcDNA配列とフレーム中で融合される。定常領域は、ヒト化抗体を生産するためにヒト定常配列、ヤギ抗体を生産するためにヤギ定常配列、式Iのペプチドを認識するIgEを生産するためにIgE定常配列等であることができる。かくして、同じ抗原認識能力を有するが、異なる定常領域を有する抗体が生産できる。特に興味があるのはヒト化抗体であり、それはヒト化定常領域に対する非所望の免疫応答を引き出すことなく、ヒトにおいて同系の抗原と関連する疾患に対する治療薬として使用できる。

【0093】

抗体をヒト化するため、またはヒト抗体を生産するための、当該技術分野で周知の他の方法が同様に利用でき、Abgenix Inc.によって開発された異種マウス法（米国特許第6,075,181号；第6,150,584号）、並びにBiovation、Bioinvent International AB、Protein Design Labs.、Applied Molecular Evolution, Inc.、ImmGenics Pharmaceuticals Inc.、Medarex, Inc.、Cambridge Antibody Technology、Elan、Eos Biotechnology、MedImmune、MorphoSys、またはUroGensys Inc.によって開発された方法を制限することなく含む。同様に、コイルドコイルペプチド抗原に対するヒト抗体分泌細胞をスクリーニングするための当該技術分野で周知の他の方法が利用できる。

【0094】

コイルドコイルペプチドまたはコイルドコイルペプチドに対する抗体のいずれかを含有組成物のための処方、投与経路、投与される動物のサイズと種類、及び投与の目的のような因子に依存して変化するであろう。本発明における使用のための適切な処方、Remington's Pharmaceutical Sciencesに見出すことができる。

【0095】

以下の実施例は、本発明を説明するために与えられ、本発明の範囲を制限するいずれの目的でも構成されるものではない。

【0096】

【実施例】

以下の実施例では、以下の略語は以下の意味を有する。定義されていない略語は、一般的に受け入れられている意味を有する。

	= 摂氏
h r	= 時
m i n	= 分
μ M	= マイクロモラー
m M	= ミリモラー
M	= モーラー
m l	= ミリリットル
μ l	= マイクロリットル
m g	= ミリグラム

10

20

30

40

50

μ m = マイクログラム
 r p m = 分当たりの回転
 I D = 内径
 T F E = トリフルオロエタノール
 E D T = エタレンジオール
 T F A = トリフルオロ酢酸
 P B S = リン酸緩衝生理食塩水
 - M E = -メルカプトエタノール
 D M S O = ジメチルスルホキシド
 N l e = ノルロイシン
 E L I S A = 酵素免疫検定法
 H R P = セイヨウワサビペルオキシダーゼ
 T D = 胸腺依存性
 T T = 破傷風菌トキソイド
 K L H = キーホールリンペットヘモシアニン
 B S A = ウシ血清アルブミン

10

【0097】

本願を通じた使用されるアミノ酸の一文字コード及び三文字コードは、以下に記載される：

A = A l a = アラニン
 C = C y s = システイン
 D = A s p = アスパラギン酸
 E = G l u = グルタミン酸
 F = P h e = フェニルアラニン
 G = G l y = グリシン
 H = H i s = ヒスチジン
 I = I l e = イソロイシン
 K = L y s = リジン
 L = L e u = ロイシン
 M = M e t = メチオニン
 N = A s n = アスパラギン
 P = P r o = プロリン
 Q = G l n = グルタミン
 R = A r g = アルギニン
 S = S e r = セリン
 T = T h r = トレオニン
 V = V a l = バリン
 W = T r y = トリプトファン
 Y = T y r = チロシン

20

30

【0098】

40

物質と方法

ペプチド合成と精製

A p p l i e d B i o s y s t e m 4 3 1 A ペプチド合成器で t - B o c 化学により、ペプチド類似体を調製した。ペプチド樹脂 (7 0 0 m g) を、0 - 4 で 1 時間、1 0 % アニゾールと 2 . 5 % E D T を含む 1 0 m L の H F で切断した。H F の除去の後、ペプチド / 樹脂をシンターガラス漏斗に移し、ジエチルエーテル (2 x 5 0 m L) 、引き続き氷冷酢酸 (2 x 5 0 m L) で洗浄した。次いで酢酸溶液を凍結乾燥した。粗ペプチドを、0 . 0 5 % T F A と 3 m L 酢酸を含む 1 5 m L の水に採取した。攪拌とソニケーションの後、混合物を 1 . 5 m L エピンドルフチューブに移し、1 3 0 0 0 r p m で遠心分離した。上清を回収し、M i l l i e x G V 0 . 2 2 μ m シリンジフィルターを通じて濾

50

過した。この溶液を、3 mL / 分の流速で5 mL 注入ループを通じてZ o r b a x R X - C 8 (2 2 . 1 m m I D × 2 5 0 m m 、 5 μ m の粒径) に乗せた。溶媒 A が水中に 0 . 0 5 % T F A であり、溶媒 B がアセトニトリル中に 0 . 0 5 % T F A である、0 . 1 % B / 分の直線状 A B 勾配を稼働することによって、精製を実施した。

【 0 0 9 9 】

リンカーとシステイン残基を取り込ませ、コイルドコイルの鎖をジスルフィド結合によって共に結合させた。ジスルフィド架橋化コイルドコイルを、1 0 0 m M N H ₄ H C O ₃ , p H 8 . 5 中の ~ 1 0 m g / m L のペプチドの室温で一晩の空気酸化によって形成した。全てのペプチドを、分析的 H P L C とエレクトロスプレーマスマススペクトロメトリーによって特徴付けし、タンパク質濃度並びにアミノ酸組成を、アミノ酸分析によって測定した。前述の従来の固相化学によって、ペプチドの N 末端に結合した光反応性試薬ベンゾイル安息香酸を生産するキャリアータンパク質破傷風菌トキソイドにペプチドを結合した。この光アフィニティープローブは、t - B o c 化学の条件下で安定である。ノルロイシン残基をペプチドのリンカー領域に取り込ませ、アミノ酸分析によってキャリアータンパク質に結合したペプチドの定量を可能にした。1 0 0 m m の N H ₄ H C O ₃ , p H 8 . 3 バッファー中に溶解した 1 0 m g の破傷風菌トキソイドに対して 6 m g のペプチドを加え、溶液を 3 5 0 n m の波長で 1 時間照射した。いずれの非反応性ペプチドをも除去し、溶液を 1 5 m L の透析カセットに移し、4 L の 2 0 m M N a H ₂ P O ₄ , p H 7 . 0 バッファーで透析した。この透析物の H P L C 分析を、照射溶液中に存在する非反応性ペプチドの量を測定するために使用した。残余のペプチドが H P L C クロマトグラムにおける曲線の下部の全部の領域の 1 % 未満である場合、透析は完成したと判断された。

10

20

【 0 1 0 0 】

C D スペクトロスコピー

円二色性 (C D) スペクトロスコピーを、J a s c o D P - 5 0 0 N データプロセッサを装備した J a s c o J - 5 0 0 C スペクトロポラリメーター (J a s c o , E a s t o n , M a r y l a n d) を使用して実施した。ジスルフィド結合化ペプチドの ~ 5 0 0 m M のストック溶液の 1 0 倍の希釈物を、0 . 0 2 c m の溶融シリカセルに乗せ、1 9 0 から 2 5 0 n m で楕円率をスキャンした。各ジスルフィド架橋化類似体を、穏やかな条件 (5 0 m M リン酸、1 0 0 m M K C l , p H 7 . 0) で且つ同じバッファー中の 5 0 % T F E の存在下で C D スペクトロスコピーによって分析した。ラウダ水浴 (モデル R M S , B r i n k m a n n I n s t r u m e n t s , R e x d a l e , O n t .) を使用して、セルの温度を制御した。C D スペクトルは、2 5 0 から 1 9 0 n m の 0 . 1 m m 間隔でのデータの回収によって得られた 4 のスキャンの平均であった。

30

【 0 1 0 1 】

H P L C

分析的 H P L C を、ダイオードアレー検出器を備えた B e c k m a n S y s t e m G o l d H P L C で実施した。分析は、Z o r b a x S B - C 8 カラム (4 . 5 m m I D × 1 5 0 , 3 . 5 μ m 粒径) で実施した。移動相は、A : 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸を含む脱イオン精製水 (1 8 M / c m) 、及び B : 0 . 0 5 % T F A を含むアセトニトリル (H P L C グレード , 9 9 . 9 9 %) であった。H P L C 操作条件は以下に挙げられる：

40

流速	1 m L / 時
注入容量	2 0 m L
検出波長	2 1 5 n m
勾配 2 . 5 % B / 分	
全稼働時間	2 0 分
挿入開始時	5 分
最小領域 (挿入)	2 5 0 0 0

【 0 1 0 2 】

実施例 1 : 合成肺炎球菌免疫原の構築

50

この実施例は、合成免疫原内に、P s p Aのコイルドコイル構造のb、c、e、fまたはg位置でのアミノ酸座菌をスプライスする方法を説明する。B i o t o o l sソフトウェアは、153 - 170残基と181 - 198残基とを含むP s p A中の多くのコイルドコイルモチーフを同定した。以下に示されるように、これらのモチーフのa及びd位置は太字で表され、溶媒接近可能なアミノ酸はイタリックである。明確化のためスペースが7つ揃いのリピートの間で挿入されている

L E E A E K K A T E A K Q K V D A

配列番号1の153 - 168残基

A E L E N Q V H R L E Q E L K E I D E S

配列番号1の181 - 198残基

【0103】

溶媒にさらされる残基は、a及びd位置のそれぞれでイソロイシン及びロイシンでコイルドコイルテンプレート内に取り込まれる。 10

LEEAEKK ATEAKQK VDA

153-168

AELNQ VHRLEQE LKEIDES

181-198

+

CN1eG-IXLXXX IXLXXX IXLXXX IXLXXX IXLXXX

コイルドコイルテンプレート

-

CN1eG IEELEKK ITELKQK I--LENQ IHRLEQE IKELDES

- 各配列から得られるアミノ酸でギャップを埋め

る

CN1eG IEELEKK ITELKQK IDALENQ IHRLEQE IKELDES

(試験ペプチド；配列番号3)

【0104】

このペプチドを、物質と方法に記載されているように合成する。a及びd位置でイソロイシン及びロイシンの代わりに天然の配列を含むコントロールペプチドも合成する：

C N l e G L E E A E K K A T E A K Q K V D A L E N Q V H R L E Q E L K E I D E S

(天然コントロール；配列番号4)

【0105】

ペプチドのCDプロフィールとヘリックス安定性を、物質と方法に記載されているように測定する。その結果は、試験ペプチドが、トリフルオロエタノール(TFE)の不存在下で穏やかなバッファー(50 mM K H₂ P O₄、50 mM K C L, p H 7.0)中でさえヘリックス形態で存在することを示す。対照的に、天然のコントロールは、ヘリックス構造を形成するためのTFEの存在を必要とする。同様に、試験ペプチドは、熱変性実験で試験すると天然コントロールよりずっと安定である 30

【0106】

実施例2：合成肺炎球菌P s p Aペプチド

合成ペプチドを、3種の異なる肺炎球菌表面タンパク質A(p s p A)から得たエピトープに基づいて調製した。3種のP s p Aタンパク質及びそれらの莢膜血清型は以下の通りである：

P s p A株

莢膜血清型

B G 8 7 4 6

2 3 F

E F 5 6 6 8

4

B G 8 0 9 0

1 9 F

【0107】

これらのタンパク質を、肺炎球菌感染におけるこれらの血清型の罹患率のため選択した(K a l i n, 1998)。図4に示されるB細胞エピトープを、バイオインフォマティックスソフトウェアP e p t o o l s (E d m o n t o n, A l b e r t a)を使用して同定した。3種のエピトープを、コイルドコイルリピートが記録上維持されるように共にスプライスした。リンカー及びシステイン残基を取り込ませ、コイルドコイルの鎖が 50

10

20

30

40

50

ジスルフィド結合によって共に結合するようにさせた。

【0108】

ペプチドのCDスペクトルが図5に示される。穏やかなバッファ（50 mM KH₂PO₄、50 mM KCl, pH 7.0）において、ペプチドはランダムコイルとアルファヘリックスの混在した構造を採用する。50%トリフルオロエタノール（TFE、これはアルファヘリックスにホールディングする特性を有するペプチド中のヘリックス構造を誘導する）の存在下で、ペプチドは高度にヘリックス状の構造を採用する。穏やかなバッファ中のヘリックス含量は、50% TFE中のものの17%であり、ペプチドがTFEを含まない生理学的に適合可能な溶液中でヘリックスを形成することを示す。それ故このペプチドは、生理学的条件下で免疫応答を引き出すために使用されて良い。

10

【0109】

実施例3：コンセンサスコイルドコイル配列の生産

今日まで、各種の株から得た肺炎球菌表面タンパク質Aの40分部分的及び完全配列が、各種の配列データベースに放出されている。これらのタンパク質は、リーダー配列、コイルドコイルドメイン、プロリンドメイン、及びコリン結合ドメインからなる共通の構造を共有する。プログラムMultiCoil（Wolf等, 1997）によるPspA配列の分析は、コイルドコイル領域がプロリン残基を含む部分によって破壊されていることを示す。ソフトウェアBiotooolsを使用した複数の配列分析は、印刷された配列が24.1%から97%まで相同性が変化することを示す。しかしながら、これらのタンパク質のヘリックスドメインの特定の領域は顕著に相同であり、これらの保存された領域がペプチドの機能に重要であることを示唆する。

20

【0110】

コンセンサス配列（図6）を、抗原活性を有することが示された保存領域から推定した。完全な及び部分的なPspA配列を、バイオインフォマティクスソフトウェアPeptools（Biotoools, Edmonton, Alberta）中のNational Library of Medicine PubMedウェブサイトからダウンロードした。全部で40の完全な及び部分的配列をソフトウェアのアライメントモジュールに移し、コンセンサスの域値を65%にセットした。コンセンサスの域値は、並べられた配列の群中の最小の残基複数性を規定する。要するに、コンセンサス域値は、不十分なマッチを排除するために機能し、配列内の保存残基を強調する。これは、視覚的観察により相同性の容易な同定を可能にする。

30

【0111】

コイルドコイル領域の最後の100アミノ酸は、この領域が交差反応性エピトープを有することが以前に示されているため、配列相同性の焦点であった。図6は、この領域内で見出される残基に対する配列アライメントを説明する。特にこのアライメントは、EELX₁X₂KIDELEDX₃EIX₄LEKX₅（配列番号5）のコンセンサス配列を生じ、個々では推定のa及びd位置が、それぞれイソロイシン及びロイシンであるように選択された。好ましくは、X₁がS、Q、N、またはDであり；X₂がD、N、またはKであり；X₃がA、またはNであり；X₄がK、E、またはDであり；及びX₅がN、D、またはEである。

40

【0112】

このコンセンサス領域の第一の部分を含む配列、EELSDKIDELED（配列番号6）を、抗原性研究のために選択した。Ser及びAsp残基は、これらの残基がアライメントされた配列の大多数で存在するため、この配列に含まれた。

【0113】

EELSDKIDELED（配列番号6）を含む合成ペプチドを、本発明の式Iに従って製造した。かくして、式Iに係る前記配列のN末端でイソロイシンが挿入され、ペプチドの長さを増大するために隣接配列が加えられた。このペプチドの完全な配列、CVX0270は以下の通りであり、コンセンサス配列から得られる残基は太字で強調されている：

アセチル - CNLeGEIEALKKKIEEELSDKIDELEKEIK - アミド

50

(配列番号 7)

【0114】

CDスペクトルを、穏やかな条件(50 mM KH₂PO₄、100 mM KCl, pH 7.0)の下で50% TFEを含む水溶液中で実施した。20 での穏やかな条件の下でペプチドCVX0270のCDスペクトルが図7に示される。CDスペクトルは、222 nm及び209 nmで最小値、200 nm以下で高いポジティブ楕円率を有するヘリックスペプチドの典型である。典型的に、222 nmでのモル楕円率([]₂₂₂)は、ペプチド中のヘリックス含量を測定するために使用されている。ペプチドCVX0270については、これは-29800の値に対応し、このペプチドが有意にヘリックスであることを示す。理論的には、27残基のペプチドについての[]₂₂₂の値は-33900である(Chen等, 1974)。それ故ペプチドCVX0270は88%ヘリックス状である。リンカー領域(Cys-Nle-Gly)はヘリックスではないようにデザインされ、それ故[]₂₂₂シグナルを減少することに注意すべきである。222と208でのモル楕円率の比([]₂₂₂/[]₂₀₈)は1.02より大きく、コイルドコイルについて以前に観察されたものと相同であり(Hodges等, 1988; Lau等, 1984; Zhou等, 1992)、[]₂₀₈が[]₂₂₂より大きい非相互作用性ヘリックスとは明らかに異なる。50% TFEの存在下では、ヘリックス含量は101%にわずかに増加した。このデータは、ペプチドCVX0270が高度にヘリックス状であり、水溶液の下でコイルドコイル構造で主に見出されることを示す。

10

【0115】

CVX0270の安定性を測定するために、熱変性実験を実施した。図8は、温度の関数として[]₂₂₂をモニターすることによって得られた変性曲線を示す。この研究は、ペプチドCVX0270が75 で元々のヘリックスの77%を示すペプチドで非常に安定であることを示す。前記の結果は、a位置でイソロイシン及びd位置でロイシン残基を有するコイルドコイル形成配列が、別のタンパク質配列から得られたヘリックスエピトープを与えるのに十分に安定であることを示す。

20

【0116】

実施例4: コイルドコイルタンパク質の免疫原性

実施例3に記載されたペプチド「Strep」(配列番号7)を、物質と方法に記載されたタンパク質キャリアー破傷風菌トキソイド((TT)に結合した。このペプチドの免疫原性を以下のように測定した。

30

【0117】

Balb/cマウス(6-8週齢、メス、Charles River)を、Strep-破傷風菌トキソイド(20、10または5 µg)及び非接合破傷風菌トキソイドと共に腹腔内注射(100 µLトータル、50% Alhydrogel 2% アジュバント、Cedarlane、カタログ番号SF2000-250)によって、0日目(1°一次免疫化)、7日目(2°二次免疫化)、28日目(3°三次免疫化)、及び42日目(追加免疫)に免疫化した。これらの抗原を0.9% NaCl中に各種の量で希釈し、0.9% NaClで注射されたマウスをネガティブコントロールとして使用した。マウスを、6、14、35、及び49日目に1°、2°、3°及び追加免疫に引き続き採血し、抗体力価(直接的ELISA)及び抗体アイソタイプ応答(アイソタイプピングELISA)についてのアッセイ、抗体特性(阻害ELISA)の測定、並びに免疫保護化抗体応答(殺菌アッセイ/オプソニン化アッセイ)の測定のために血清を回収した。

40

【0118】

典型的に免疫化スケジュールは表1に示される。当該技術分野で周知の各種の他の免疫化スケジュール及びアジュバント処方もまた有効であろう。脈管内、筋肉内、皮膚内、皮下、経口、鼻腔、エアゾール吸入経路を含む各種の輸送法もまた有効であろう。

【0119】

表1: I.P.で免疫化されたBALB/cマウス-Strep-TT免疫化スケジュール

50

【表 1】

日目	方法
0	腹腔内免疫化
6	採血
7	腹腔内免疫化
14	採血
28	腹腔内免疫化
35	採血
42	腹腔内免疫化
49	心臓採血

10

研究群：

(10A・BYマウス/群)

1. Strep-TT (20 µg/マウス) + アジュバント
2. Strep-TT (10 µg/マウス) + アジュバント
3. Strep-TT (5 µg/マウス) + アジュバント
4. 破傷風菌トキソイド (20 µg/マウス) + アジュバント
5. PBS (Alumなし)

20

【0120】

A. コイルドコイル抗原接合物によって引き出される抗体レベルの測定

抗体レベルを測定するために基本的な方法は、以下の直接的ELISAプロトコールによる：

1. 0.05 M 炭酸 - 二炭酸バッファー (pH 9.6、100 µL/ウェル) 中の 1.0 µg/mL (ウェル当たり 0.1 µg) の抗原でのEIAプレート(COSTAR)の被覆。

2. 4℃で一晩のプレートのインキュベーション。

3. 翌日、洗浄バッファー(PBS/0.05% Tween)での3回のプレートの洗浄。ベンチトップ上でプレートをたたくことによる過剰な液体の除去。

30

4. ウェル当たり 100 µL ブロッキングバッファー(PBS/2% BSA)でのプレートのブロック。37℃で1時間のプレートのインキュベーション。

5. 洗浄バッファー(PBS/0.05% Tween)で5回のプレートの洗浄。ベンチトップ上でプレートをたたくことによる過剰な液体の除去。

6. 希釈バッファー(PBS/0.1% Tween)で適切に希釈されたウェル当たり 100 µL の試験抗体の添加。37℃で60分のプレートのインキュベーション。

7. 洗浄バッファー(PBS/0.05% Tween)で3回のプレートの洗浄。ベンチトップ上でプレートをたたくことによる過剰な液体の除去。

8. 1:5000の濃度への希釈バッファー(PBS/0.1% Tween)中におけるHRP抗マウスIgG(Jackson Lab)の希釈。ウェル当たり 100 µL の添加と37℃で60分のインキュベーション。

40

9. 洗浄バッファー(PBS/0.05% Tween)で3回のプレートの洗浄。ベンチトップ上でプレートをたたくことによる過剰な液体の除去。

10. HRP基質の調製

0.01 M クエン酸ナトリウムバッファー中に溶解された 0.03% 過酸化水素(30%)と 1 mM ABTS (クエン酸ナトリウム(1.48 g)は 500 mL 蒸留水にクエン酸ナトリウムを溶解する。クエン酸は 750 mL 蒸留水にクエン酸を溶解する。pH 4.2を得るようにクエン酸ナトリウム溶液にクエン酸溶液を注ぐ)。各ウェルに 100 µL の添加、及び 30 分暗所で発色。

11. 30分405 nmでのELISAプレートリーダーでの吸光度の読み取り。

50

【0121】

Strept-TT接合物(20 μ g、10 μ g及び5 μ g)に対して抗血清で得られた平均のO.D.のELISAの読み取りが表2に示される。全ての3の投与量濃度(20 μ g、10 μ g及び5 μ g)でのStrept-TT接合物が、Strept(EIEALKKKIEELSDKIDELEKEIK)ハプテンに対して有意な抗体力価を引き出した。非接合破傷風菌トキソイドがコイルドコイルStrept抗原に対していずれか抗体または交差反応性の抗体をも引き出さないため、これらの抗体は抗原特異性である。

【0122】

表2. コイルドコイルStrept抗原に対するマウス血清抗体のELISAの結果

【表2】

血清 希釈	ネズミ血清(49日目)(OD 405nm, Strep-BSAコーティング抗原)				
	Strept-TT	Strept-TT	Strept-TT	TT*	PBS*
	(20 μ g)*	(10 μ g)*	(5 μ g)*		
1:2000	3.75	3.71	3.86	0.11	0.01
1:4000	3.57	3.60	3.61	0.04	0.00
1:8000	2.48	2.66	2.60	0.01	0.00
1:16000	1.14	1.59	1.50	0.06	0.00
1:32000	0.76	0.84	0.95	0.00	0.00
1:64000	0.36	0.42	0.41	0.00	0.00
1:128000	0.18	0.23	0.22	0.00	0.00
1:256000	0.04	0.10	0.12	0.00	0.00

*マウスは、Strept-TT+アジュバント、TT+アジュバント、またはPBSで0、7、28及び42日目に腹腔内で注射された。血清は49日目に回収された。

【0123】

B. コイルドコイル抗原接合物によって引き出される抗体アイソタイプレベルの測定
抗体アイソタイプレベルを測定するために基本的な方法は、コイルドコイル抗原接合物によって引き出されるIgM、IgG、及びIgAアイソタイプを提供するために以下の通りである：

1. 0.05M炭酸-二炭酸バッファー(pH9.6、100 μ L/ウェル)中の1.0 μ g/mL(ウェル当たり0.1 μ g)の抗原でのEIAプレート(COSTAR)の被覆。

2. 4で一晚のプレートのインキュベーション。

3. 翌日、洗浄バッファー(PBS/0.05%Tween)で3回のプレートの洗浄。ベンチトップ上でプレートをたたくことによる過剰な液体の除去。

4. ウェル当たり100 μ Lブロッキングバッファー(PBS/2%BSA)でのプレートのブロック。37で1時間のプレートのインキュベーション。

5. 洗浄バッファー(PBS/0.05%Tween)で5回のプレートの洗浄。ベンチトップ上でプレートをたたくことによる過剰な液体の除去。

6. 操作バッファー(PBS/0.1%Tween)中の1:250希釈マウス血清の調製。適切なウェル内への100 μ L/ウェルの添加。37で1時間のプレートのインキュベーション。

7. 洗浄バッファー(PBS/0.05%Tween)で3回のプレートの洗浄。ベンチトップ上でプレートをたたくことによる過剰な液体の除去。

8. HRP-ラベル化検出抗体(Southern Biotechnology Associates Inc.)の希釈。

適切なウェル内への100 μ L/ウェルの添加。37で1時間のプレートのインキュベーション。

10

20

30

40

50

9. 洗浄バッファー (PBS / 0.05% Tween) で3回のプレートの洗浄。ベンチトップ上でプレートをたたくことによる過剰な液体の除去。

10. HRP基質の調製

0.01 M クエン酸ナトリウムバッファー中に溶解された0.03% 過酸化水素 (30%) と 1 mM ABTS (クエン酸ナトリウム (1.48 g) は 500 mL 蒸留水にクエン酸ナトリウムを溶解する。クエン酸は 750 mL 蒸留水にクエン酸を溶解する。pH 4.2 を得るようにクエン酸ナトリウム溶液にクエン酸溶液を注ぐ)。各ウェルに 100 μ L の添加、及び 30 分暗所で発色。

11. 30 分 405 nm での ELISA プレートリーダーでの吸光度の読み取り。

【0124】

Strept-TT コイルドコイル抗原に対する IgG 抗体アイソタイプ応答は表 3 に示される。これらの結果は、二次免疫化の後 Strept コイルドコイル抗原に対する有意な IgG1 抗体レベルの存在を示す。IgG1 から IgG_{2a}、IgG_{2b} 及び IgG₃ への有意な IgG アイソタイプへのスイッチが、追加免疫注射の後観察された (29 日目の採血)。コイルドコイル Strept 抗原に対する観察された IgG 抗体の成熟は、TD 応答の典型例である。

【0125】

表 3. コイルドコイル Strept 抗原に対するマウス血清抗体のアイソタイプング ELISA

【表 3】

6 日目

に対する抗血清*	アイソタイプ (O.D.405nm)			
	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
Strept-TT (20 μ g)	0.14	0.01	0.04	0.04
Strept-TT (10 μ g)	0.12	0.01	0.03	0.04
Strept-TT (5 μ g)	0.14	0.05	0.08	0.10
TT (20 μ g)	0.06	0.02	0.01	0.01
PBS	0.03	0.00	0.00	0.01

*マウスは、Strept-TT + アジュバント、TT + アジュバント、または PBS で 0 日目に腹腔内で注射された。血清は 6 日目に回収された。

14 日目

に対する抗血清*	アイソタイプ (O.D.405nm)			
	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
Strept-TT (20 μ g)	2.00	0.71	0.95	1.08
Strept-TT (10 μ g)	1.84	0.91	1.01	2.22
Strept-TT (5 μ g)	1.69	0.62	0.95	1.23
TT (20 μ g)	0.05	0.00	0.00	0.01
PBS	0.03	0.00	0.00	0.00

*マウスは、Strept-TT + アジュバント、TT + アジュバント、または PBS で 0 及び 7 日目に腹腔内で注射された。血清は 14 日目に回収された。

35日目

に対する抗血清*	アイソタイプ(O.D.405nm)			
	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
Strep-TT (20 µg)	2.24	0.40	0.49	0.45
Strep-TT (10 µg)	2.07	0.56	0.59	1.00
Strep-TT (5 µg)	2.16	0.60	0.76	0.75
TT (20 µg)	0.08	0.01	0.01	0.01
PBS	0.01	0.00	0.00	0.01

*マウスは、Strep-TT+アジュバント、TT+アジュバント、またはPBSで0、7、28日目に腹腔内で注射された。血清は35日目に回収された。

10

49日目

に対する抗血清*	アイソタイプ(O.D.405nm)			
	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
Strep-TT (20 µg)	3.91	1.14	1.28	0.74
Strep-TT (10 µg)	3.85	1.35	2.01	1.28
Strep-TT (5 µg)	3.88	2.10	2.96	0.82
TT (20 µg)	0.44	0.03	0.02	0.05
PBS	0.01	0.01	0.01	0.02

*マウスは、Strep-TT+アジュバント、TT+アジュバント、またはPBSで0、7、28及び42日目に腹腔内で注射された。血清は49日目に回収された。

20

【0126】

C. コイルドコイル抗原接合物または遊離ペプチドでの組成物中の抗体結合の測定
抗血清の特異性を、コイルコイル構造を有するまたは有さないペプチドを使用して、阻害ELISAによってさらに調査した。この阻害ELISAについてのプロトコールは以下の通りである：

30

1. 炭酸 - 二炭酸バッファー中の1.0 µg/mL (ウェル当たり0.1 µg) へのコーティング抗原の希釈。ガラスチューブの使用。
2. プレートの各ウェルに100 µLのコーティング抗原の添加。4で一晩のプレートの貯蔵。
3. ウェルの攪拌と、キムワイプ上で逆さまにして除去。ウェル当たり~200 µLの洗浄バッファー (PBS / 0.05% Tween) (v/v) で3回のプレートの洗浄。
4. ウェル当たり200 µLのブロッキングバッファーの添加 (PBS / 2% BSA) (v/v)。37で60分のプレートのインキュベーション。
5. ウェルの攪拌と、キムワイプ上で逆さまにして除去。ウェル当たり~200 µLの洗浄バッファー (PBS / 0.05% Tween) (v/v) で5回のプレートの洗浄。
6. 希釈バッファー (PBS / 0.1% Tween) (v/v) で適切に希釈された、50 µLの選択された競合的接合物または遊離ペプチドの添加。(注意：競合的ペプチドは50 µL中で2倍の濃度を有する)
7. 希釈バッファー (PBS / 0.1% Tween) (v/v) で適切に希釈された、ウェル当たり50 µLの試験抗体の添加。(注意：試験抗体は50 µL中で2倍の濃度を有する) 各ウェルの最終容量は100 µLであった。
8. ELISAシェイカーでゆっくり攪拌しながら37で60分のプレートのインキュベーション。
9. ウェルの攪拌と、キムワイプ上で逆さまにして除去。ウェル当たり~200 µLの洗浄バッファー (PBS / 0.05% Tween) (v/v) で3回のプレートの洗浄。1

40

50

：5000の濃度に、希釈バッファー（PBS / 0.1% Tween）（v / v）中へのペルオキシダーゼ接合抗マウスIgGの希釈。ウェル当たり100μLの添加と、37で60分のインキュベーション。

10. ウェルの攪拌と、キムワイプ上で逆さまにして除去。ウェル当たり～200μLの洗浄バッファー（PBS / 0.05% Tween）（v / v）で3回のプレートの洗浄。

11. HRP基質の調製

0.01Mクエン酸ナトリウムバッファー中に溶解された0.03%過酸化水素（30%）と1mM ABTS（クエン酸ナトリウム（1.48g）は500mL蒸留水にクエン酸ナトリウムを溶解する。クエン酸は750mL蒸留水にクエン酸を溶解する。pH4.2を得るようにクエン酸ナトリウム溶液にクエン酸溶液を注ぐ）。各ウェルに100μLの添加、及び30分暗所で発色。

10

12. 30分405nmでのELISAプレートリーダーでの吸光度の読み取り。

【0127】

この阻害アッセイで使用されるStrep#1、#2及び#3遊離ペプチドの配列は以下の通りである：

Strep#1：ラクタムを有するコイルドコイルStrep抗原

EIEALKKKIEELSDKIDELEKEIK

Strep#2：ラクタムを有する一本鎖のStrep抗原

EEESDKKDEEDAEEKAE

Strep#3：コイルドコイルStrep抗原

EIEALKKKIEELSDKIDELEKEIK

20

【0128】

ラクタム架橋を形成する残基は、太字で強調されている。ラクタムは、グルタミン酸残基のカルボン酸側鎖をリジン残基のアミノ基側鎖と反応させることによって形成される。これらのラクタムは、それらが4残基離れて配置され、且つリジンの方向にグルタミン酸が配向されている場合、ヘリックスとコイルドコイルを安定化する。

【0129】

エピトープはイタリックの文字で強調されている。全ての3種の配列から、エピトープがリジン残基（L）が引き続く二つのグルタミン酸残基（EE）で開始することが分かる。一本鎖ペプチドの場合、ロイシン残基が、ラクタム架橋の一部であるグルタミン酸（E）残基によって置換されている。エピトープは、コイルドコイルにおいてSKDとイソロイシン（I）残基が引き続いて連続し、一本鎖ペプチドにおいてラクタム架橋に含まれるリジン残基が引き続く。エピトープの最後の二つの残基はDEである。

30

【0130】

表4は、3種の異なるStrepペプチド、Strep-TT免疫原、TT、及びBSAを使用する抗Strep血清の阻害ELISAの結果を示す。Strep#3ペプチド（免疫原として使用されるペプチド）は有意な阻害を示し、Strep#2（直鎖状ペプチド、低ヘリックス含量を有する）は阻害を示さなかった。それ故、免疫原Strep-TTは構造的（または3次元）エピトープ構造を認識する抗体を引き出すと解されていた。Strep-TT免疫原は、直鎖状エピトープに対して抗体を引き出さなかった。それ故これらの結果は、コイルドコイル抗原が構造的エピトープを認識する抗体を引き出すことを示唆する。阻害はまたStrep#1ペプチドでも観察され、そのペプチドはコイルドコイル抗原に対してさらなる安定性を加えるラクタム架橋を含む。

40

【0131】

表4：各種のStrep抗原インヒビターを使用する抗Strep（1：25，000の希釈、49日目）の阻害ELISA

【表4】

抗 Strep-TT (20 μ g の投与量)						
O.D. 405 nm						
Conc. (μ g per 100 μ L)	Strep. #1	Strep. #2	Strep. #3	Strep.- T.T.	T.T.	BSA
10	0.663	1.266	0.110	0.028	1.342	1.399
5	0.720	1.186	0.143	0.026	1.051	1.485
2.5	0.823	1.173	0.254	0.056	1.412	1.435
1	0.959	1.164	0.555	0.094	1.457	1.442
0.5	1.081	1.144	0.776	0.109	1.564	1.187
0.25	1.237	1.251	1.036	0.165	1.638	1.510

10

抗 Strep-TT (10 μ g の投与量)						
O.D. 405 nm						
Conc. (μ g per 100 μ L)	Strep. #1	Strep. #2	Strep. #3	Strep.- T.T.	T.T.	BSA
10	0.941	1.210	0.055	0.010	1.820	1.784
5	0.917	1.258	0.233	0.010	1.521	1.790
2.5	0.963	1.232	0.269	0.015	1.726	1.765
1	1.129	1.312	0.619	0.065	1.802	1.670
0.5	1.256	1.293	0.872	0.068	1.800	1.422
0.25	1.340	1.279	1.123	0.113	1.871	1.845

20

30

抗 Strep-TT (5 μ g の投与量)						
O.D. 405 nm						
Conc. (μ g per 100 μ L)	Strep. #1	Strep. #2	Strep. #3	Strep.- T.T.	T.T.	BSA
10	0.872	1.294	0.009	0.000	1.803	1.740
5	0.960	1.318	0.090	0.000	1.109	1.571
2.5	1.087	1.233	0.213	0.000	1.822	1.761
1	1.125	1.322	0.501	0.053	1.797	1.572
0.5	1.289	1.377	0.746	0.064	1.836	1.717
0.25	1.388	1.303	1.001	0.107	1.925	1.786

40

Strep # 1 = コイルドコイル + ラクタム架橋

Strep # 2 = 直鎖状配列

Strep # 3 = 配列番号 7

【 0 1 3 2 】

50

D．コイルドコイル抗原接合物によって引き出される免疫保護化抗体を測定するための殺菌アッセイとオプソニン化アッセイ

使用される基本的な殺菌アッセイとオプソニン化アッセイは以下の通りである：

殺菌アッセイ

- 1．各種のカルチャーコレクション（ATCC）から調達される所望のグラム陽性細菌でのアガープレートのストリーク。37℃で一晩のインキュベーション。
- 2．翌日、単離されたコロニーの取得と、滅菌試験チューブへの1.0 mlのTodd-Hewitt Broth（THB）+ Yeast Extraction（YE）中のイノキュレート。37℃で一晩のインキュベーション。
- 3．翌日、420 nmの波長でのイノキュレートされた細菌のO.D.の測定。ブランクとしてTHF + YE培地の使用。 10
- 4．滅菌平底96穴ウェルプレートに対して、各ウェルに滅菌した2.5 mmのガラスビーズの添加。
- 5．各ウェルに対して、5 µLの細菌、及び10 µLの試験されるマウス血清の添加。37℃で1時間のインキュベーション。注意：工程5と6は三重に実施される。
- 6．1時間のインキュベーション後、THB + YE中に無菌的に、1：20希釈した外因性補足物（Low Toxモルモット Complement、Cedarlane）の調製。50 µLの添加。37℃で1時間のインキュベーション。
- 7．補足インキュベーションの後、50 µLの等量物をガラススプレッダーを使用してアガープレートに配置。 20
- 8．プラスチックバッグに全てのアガープレートをラップ、37℃で一晩のインキュベーション。
- 9．翌日、コロニー形成ユニット（CFU）のカウント。

【0133】

オプソニン化アッセイ

- 1．各種のカルチャーコレクション（ATCC）から調達される所望のグラム陽性細菌でのアガープレートのストリーク。37℃で一晩のインキュベーション。
- 2．翌日、単離されたコロニーの取得と、滅菌試験チューブへの1.0 mlのTodd-Hewitt Broth（THB）+ Yeast Extraction（YE）中のイノキュレート。37℃で一晩のインキュベーション。 30
- 3．翌日、100 U/mlの滅菌ヘパリンの調製。
- 4．各マウス（5 - 10）の尾の静脈内に100 µLの滅菌ヘパリンの静脈内注射。10分後、滅菌チューブ内にマウスの心臓採血。
- 5．420 nmの波長でのイノキュレートされた細菌のO.D.の測定。ブランクとしてTHF + YE培地の使用。
- 6．滅菌平底96穴ウェルプレートに対して、各ウェルに滅菌した2.5 mmのガラスビーズの添加。
- 7．各ウェルに対して、50 µLのヘパリン処理血液、10 µLの試験されるマウス血清、5 µLの細菌の添加。37℃で1時間のインキュベーション。注意：この工程は三重に実施される。 40
- 8．1時間のインキュベーション後、蒸留水中に無菌的に、1：20希釈した外因性補足物（Low Toxモルモット Complement、Cedarlane）の調製。50 µLの添加。37℃で1時間のシェイカーでのインキュベーション（遅い動き）。
- 9．1時間後、100 µLの等量物をガラススプレッダーを使用してアガープレートに配置。
- 10．プラスチックバッグに全てのアガープレートをラップ、37℃で一晩のインキュベーション。
- 11．翌日、コロニー形成ユニット（CFU）のカウント。

【0134】

Strept-TT接合物（20、10、5 µgの投与量）で免疫化されたマウスから得た 50

血清は、オプソニン化アッセイによって測定すると免疫保護的であることが見出された。*Streptococcus pneumoniae* 血清型 (1, 3 及び 5) のコロニー形成ユニットの減少を示した。破傷風菌トキシソイドまたは PBS で注射されたマウスから得た血清では、ほとんどまたは全くコロニー形成ユニットの減少が観察されなかった。*Streptococcus pneumoniae* 接合物は、*S. pneumoniae* のコイルドコイル抗原に対する免疫保護化抗体を引き出した。

【0135】

表5：*Streptococcus pneumoniae* 血清型 (1, 3 及び 5) を使用する *Streptococcus pneumoniae* に対する抗血清のオプソニン化の結果

【表5】

10

CFU のパーセント減少			
に対する抗血清	タイプ1	タイプ3	タイプ5
Strep-TT (20 μ g)	58	49	45
Strep-TT (10 μ g)	22	50	24
Strep-TT (5 μ g)	30	48	24
TT	7	6	7
PBS	0	0	1

20

【0136】

添付資料1

30

S. pneumoniae Rx1 株から得られる PspA タンパク質の免疫原性領域の分析。免疫原性領域は、配列の株の星印によって示される。

【表6】

	10	20	30	40	50	
1	EESPVASQSKAEKDYDAAKDAKNAKKAVEDAQKALDDAKAAQKKYDEDQ					50
	5*****					52
	3*****			29*****		
51	KKTEEKAALKAASEEMDKAVAAVQOAYLAYQQATDKAAKDAADKMIDEA					100
	*****	66*****	73*****			
				78**		
101	KKREEEAKTKFNTVVRAMVPEPEQLAETKKKSEEAKQKAPELTKKLEAK					150
	91*****	95*****		123*****		
	****		101****	122*****		
	89*****		116*****			
151	AKLEEAEEKKATEAKQKVDAAEEVAPQAKIAELENQVHRLEQELKEIDSESES					200
	133*****		140*****	148***		
	130*****			145*****		
201	EDYAKEGFRAPLQSKLDAKKAKLSKLEELSDKIDELDAETAKLEDQLKAA					250
	*		168*****			
			166*****		1	
251	EENNNVEDYFKEGLEKTIAAKKAELEKTEADLKAVNEPEKPAPAPETPA					300
	179*****	185*****	195*****	206*****		
	76****	182*****				
301	PEAPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKPAPAEQPKPEKTDDQQAEEEDYARRSEEE					350

10

20

	10	20	30	40	50	
351	YNRLTQQQPPKAEKPAPAPKTGWKQENGWYFYNTDGSMATGWLQNNGSW					400
401	YYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYLNANGAMATGWAKVNGSWYYLNANGAMA					450
451	TGWLOQYNGSWYYLNANGAMATGWAKVNGSWYYLNANGAMATGWLQYNGSW					500
501	YYLNANGAMATGWAKVNGSWYYLNANGAMATGWVKDGDWYYLEASGAMK					550
551	ASQWFKVSDKWYFVNGLGALAVNTTVDGYKVNANGEWV					588

10

20

Motif #: 3 Range: 6 - 13
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 5 Range: 8 - 15
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 29 Range: 42 - 49
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST]

30

ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 52 Range: 49 - 56
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRS
 T]*[DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 66 Range: 63 - 70
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQR
 ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 73 Range: 81 - 88
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQR
 ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 78 Range: 97 - 104
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQR
 ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 89 Range: 104 - 111
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQR
 ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 91 Range: 107 - 114
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQR
 ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

10

20

Motif #: 95 Range: 119 - 125
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 101 Range: 127 - 133
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 116 Range: 132 - 139
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 122 Range: 139 - 146
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 123 Range: 142 - 149
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 130 Range: 153 - 160
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 133 Range: 160 - 167
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

10

20

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 140 Range: 181 - 188
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 145 Range: 192 - 199
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 148 Range: 195 - 201
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 166 Range: 226 - 233
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 168 Range: 229 - 236
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 176 Range: 250 - 256
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 179 Range: 252 - 259
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 182 Range: 260 - 267
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 185 Range: 261 - 268
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 195 Range: 275 - 282
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 206 Range: 288 - 295
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、微生物表面に存在するいくつかの抗原を表す、肺炎球菌表面の仮想図である。P s p A 及び P s p C から得られるコイルドコイル領域は、細胞壁から離れて突出していると解される。

【図2】図2は、P s p A 及び P s p C 分子の模式図であり、それらのホモロジー領域を強調している。各タンパク質は、コイルドコイルドメイン、プロリンリッチ領域、コリン結合領域、及び疎水性テールの4個のドメインからなる。高い配列ホモロジーが、P s p A 及び P s p C の間のコイルドコイルドメインの領域2の部分に存在する。

【図 3】図 3 は、二つのペプチド鎖からなるコイルドコイル構造の断面図を示す。鎖 1 における 7 つ揃いのリピートの 7 の位置は、a、b、c、d、e、f 及び g で表される一方、鎖 2 における 7 つ揃いのリピートの 7 の位置は、a'、b'、c'、d'、e'、f' 及び g' で表される。白い矢印は、a と a'、及び d と d' のそれぞれの間の疎水性相互作用を示す。

【図 4】図 4 は、S . p n e u m o n i a e のいくつかの臨床的に関連する株のエピトープを、コイルドコイルテンプレートに組み合わせ、免疫原性ペプチドを作製する工程を示す。

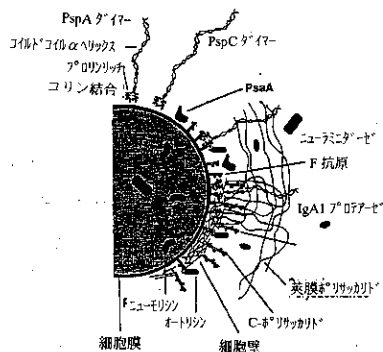
【図 5】図 5 は、T F E の存在下及び不存在下での、図 4 のペプチドの C D スペクトルを示す。

【図 6】図 6 は、非常に保存された P s p A の領域を示す。式 I を有することを確認するように選択されたコンセンサス配列も知られている。

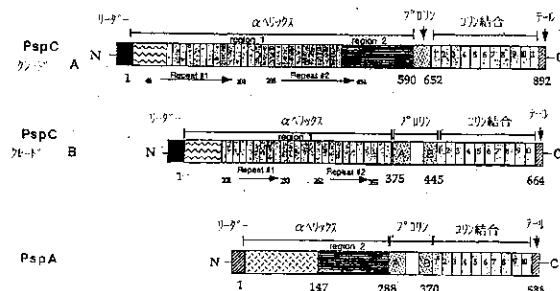
【図 7】図 7 は、ペプチド C V X 0 2 7 0 の C D スペクトルを示し、それは図 6 に示されたコンセンサス配列の一部を含む。

【図 8】 図 8 は、ペプチド C V X 0 2 7 0 の熱変性プロフィールを示す。

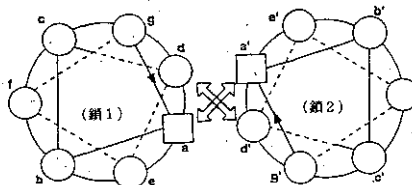
【 圖 1 】



【图 2】



【 圖 3 】



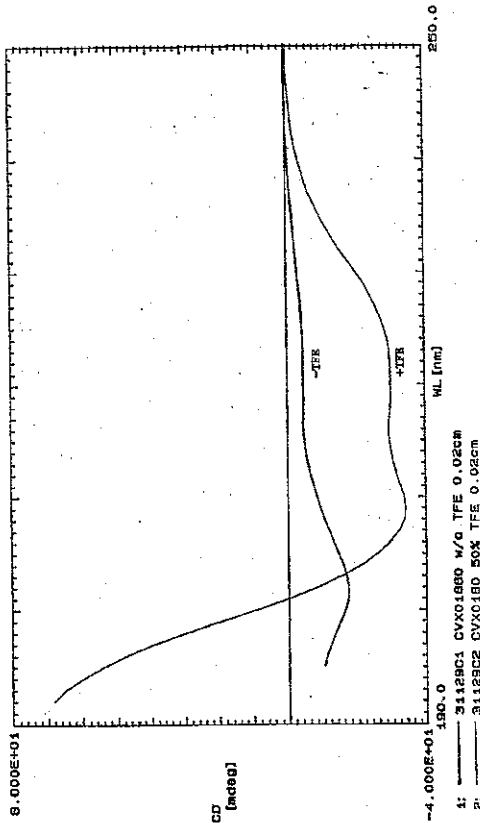
【 図 4 】

1. 臨床と関連のある株からPspA中の潜在的なエпитオープの同定
株BG8743(血清型23F)
defgabcdefgabcdefgab
LEKDVEDFKNSDGEQAEQVL (配列番号10)
残基293-301

株EF5668(血清型4)
defgabcdefgabcd
LEDNLKDAETNNVED (配列番号11)
残基30-344

株BG8090(血清型19F)
defgabcdef
IARKQTELEK (配列番号12)
残基267-276
2. エピトープを共にスプライス
DVEDFKNSDGELEDNLKDAETNNVEDARKQTELEK (配列番号13)
3. a及びd位置の置換(下線部)
DEFLDNLKDAETNNVEDFKNSDGELEKLETNIVELAKKITELEK (配列番号14)

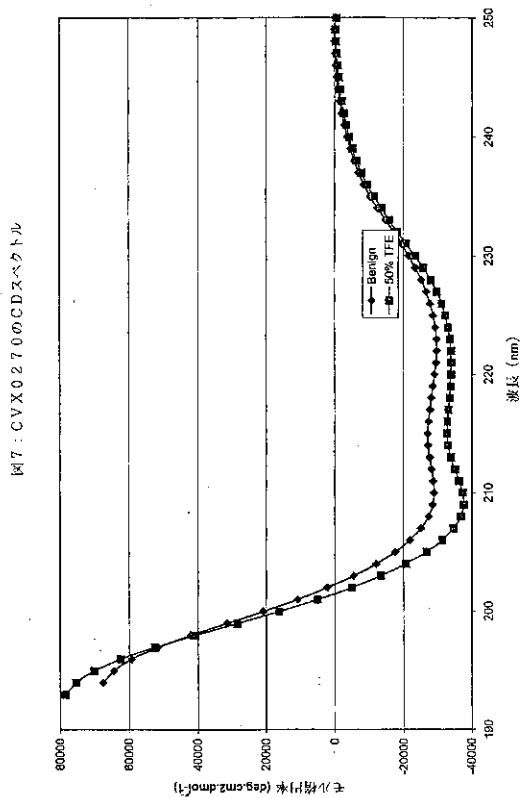
【図 5】



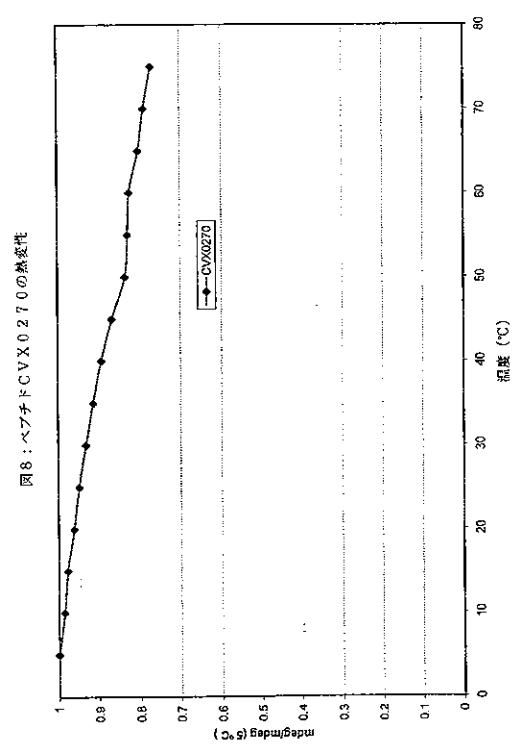
【図 6】

Consensus	E-L-KIDELD-ELA-LEK-V-E-E-X-E-E-Y	79
BG6692	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	299
Strain 23	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	135
Strain SP	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	135
Strain SP	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	135
BG8838	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	299
Strain 13	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	95
Strain SP	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	127
Strain 18	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	98
BG8743	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	307
Strain 16	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	143
Strain 90	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	121
Strain 13	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	120
Strain 11	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	85
Strain 43	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	99
Strain 23	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	84
BG11703	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	365
BG7617	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	366
Strain 18	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	122
BG9739	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	263
L81905	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	283
PspA AC94	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	280
Strain 15	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	145
ATCC6303	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	348
BG7561	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	366
Strain 23	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	133
Strain 18	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	135
SP 222	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	127
BG9163	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	237
EF6796	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	296
BG609C	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	414
EF3298	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	413
Rx1	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	261
DBL1	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	283
EF5668	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	347
Wu2	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	290
EF10197	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	282
PspA AC12	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	321
DBL5	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	284
DBL6A	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	356
BG6350	---S-D-T-F-I-D-A-T-A-K-L-K-M-V---E-D-F-T-S-N-S-Q-Q-E-Q-V-R	303

【図 7】



【図 8】



【国際公開パンフレット】

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

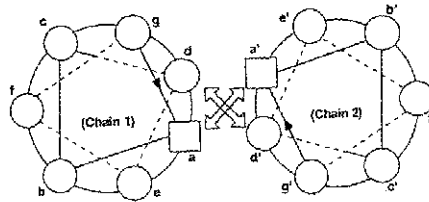
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96368 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 7/00
- (21) International Application Number: PCT/US91/0168
- (22) International Filing Date: 14 June 2001 (14.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/211,892 14 June 2000 (14.06.2000) US
60/213,387 23 June 2000 (23.06.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): CYTOVAX BIOTECHNOLOGIES, INC. [CA/CA], Suite 308, 8925 51 Avenue, Edmonton, Alberta T6E 5J3 (CA).
- (72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): HOUSTON, Michael, E. [CA/CA], 8767 Stralheim Drive, Edmonton, Alberta T6G 4C8 (CA); HODGES, Robert, S. [CA/US], 6881 East - 12th Avenue, Denver, CA 80220 (US).
- (74) Agents: SWISS, Gerald, F. et al.; Berns, Dome, Swecker & Mathis, LLP, P.O. Box 1404, Alexandria, VA 22313-1404 (US).
- (81) Designated States (internationally): AP, AT, AU, AM, AI, AL, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, 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.
- (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GT, GM, KE, LS, MW, NZ, 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, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 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.

(54) Title: USE OF COILED-COIL STRUCTURAL SCAFFOLD TO GENERATE STRUCTURE-SPECIFIC PEPTIDES



(57) Abstract: This invention relates to the use of a coiled-coil structural scaffold to generate structure-specific peptides, including synthetic peptides derived from naturally occurring proteins of various origin. The structure of the synthetic peptides utilizes a scaffold of heptad repeat units into which epitopes from coiled-coil regions of native proteins are spliced. In particular, the synthetic peptides may be based on microbial proteins, especially surface proteins, which occur naturally in the coiled-coil form such as pneumococcal surface proteins A and C. The synthetic peptides are immunogenic and can be used to elicit an immune response in an animal. Accordingly, they are useful as vaccines or to stimulate antibody production or cell mediated immunity to the naturally occurring protein.

WO 01/96368 A2

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-1-

USE OF COILED-COIL STRUCTURAL SCAFFOLD TO GENERATE
STRUCTURE-SPECIFIC PEPTIDES

Related Applications

5

This application claims the benefit of U.S. Provisional Applications Serial No. 60/211,892, filed June 14, 2000, and Serial No. 60/213,387, filed June 23, 2000. The entire content of each of these provisional applications is hereby incorporated by reference in its entirety.

10

Field of the Invention

This invention relates to the use of a coiled-coil structural scaffold to generate structure-specific peptides, including synthetic peptides derived from naturally occurring microbial and non-microbial protein antigens. The structure of the synthetic peptides utilizes a scaffold of heptad repeat units into which epitopes derived from coiled-coil regions of native proteins are spliced. The resulting peptide has a more stable coiled-coil structure, hence improving presentation of the epitopes in a helical conformation.

20

References

U.S. Patent No. 6,075,181.

U.S. Patent No. 6,150,584.

25

WO 96/11944, published April 25, 1996.

WO 01/00010, published January 4, 2001.

30

Alexander J. E., et al. *Infect. Immun.* 62: 5693-5688 (1994).

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-2-

- Baquero, F., et al. *J. Antimicrob. Chemother.* **28** (Suppl. C): 31-38 (1991).
- Beuvery, E. C., et al. *Infect. Immun.* **37**: 15-22 (1982).
- 5 Briles D.E. et al. *Infect. Immun.* **57**(5): 1457-1464 (1989).
- Briles, D.E. et al. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(4):645-657 (1998).
- 10 Briles, D. E., et al. In *Effects of microbes on the immune system* (Cunningham, M. W., Flinani, R.S. Eds) Philadelphia: Lippincott-Raven: pp 263-280 (1999).
- Briles, D. E., et al. *Vaccine* **18**: 1707-1711 (2000).
- 15 Brooks-Walter, A., et al. *Infect. Immun.* **67**: 6533-6542 (1999).
- Canvin, J. R., et al. *J. Infect. Dis.* **172**: 119-123 (1995).
- 20 Chang K, Pastan I. "Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a protein detected by the K1 antibody from an ovarian carcinoma (OVCAR-3) cell line", *Int J Cancer*. **57**(1):90-7 (1994).
- Cowan, M. J., et al. *Pediatrics* **62**: 721-727 (1978).
- 25 Crain M. J., et al. *Microb. Pathog.* **21**: 265-275 (1996).
- Davis, S., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Acheson, A., Compton, D.L., Jain, V., Ryan, T.E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C. and Yancopoulos, G.D.
- 30 Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87** (7): 1161-1169 (1996).
- De, B. K., et al. *Pathobiology* **67**: 115-122 (1999).
- 35 Henrichsen, J., *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2759-2762 (1995).
- Houston, M.E. et al. *Biochemistry* **35**: 10041-10050 (1996).
- Kalin, M. Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax* **53**: 159-162 (1998).
- 40 Kapanadze B, Kashtuba V, Baranova A, Rasool O, van Everdink W, Liu Y, Syomov A, Corcoran M, Poltarau A, Brodyansky V, Syomova N, Kazakov A,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-3-

- Ibbotson R, van den Berg A, Gizatullin R, Fedorova L, Sujimova G, Zelenin A, Deaven L, Lehrach H, Grandt D, Buys C, Oscier D, Zbarovsky ER, Yankovsky N. A cosmid and cDNA fine physical map of a human chromosome 13q14 region frequently lost in B-cell chronic lymphocytic leukemia and identification of a new putative tumor suppressor gene, Leu5. *FEBS Lett.* **426**(2):266-70 (1998).
- Lancet, Lancet* **2**: 699-701 (1985).
- 10 Lawrence, M. C., et al. *Structure* **6**: 1553-1661 (1998).
- Li Y, Kang J, Friedman J, Tarassishin L, Ye J, Kovalenko A, Wallach D, Horwitz MS. Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(3):1042-7 (1999).
- 15 Li, L., Li, X., Francke, U. and Cohen, S. N. The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer. *Cell* **88** (1): 143-154 (1997).
- 20 McDaniel, L. S., et al. *Microb. Pathog.* **17**: 323-337 (1994).
- McDaniel, L. S., et al. *Infect. Immun.* **59**: 222-228 (1991).
- 25 Michon F., et al. *Vaccine* **16**: 1732-41 (1998).
- Miranda C, Minoletti F, Greco A, Sozzi G, Pierotti MA. "Refined localization of the human TPR gene to chromosome 1q25 by in situ hybridization", *Genomics* **23**(3):714-5 (1994).
- 30 Nabors, G. S., et al. *Vaccine* **18**: 1743-1754 (2000).
- Nakashima, M., Sonoda, K. and Watanabe, T. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat. Med.* **5** (8): 938-942 (1999).
- 35 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Philadelphia PA 18th ed. (1990).
- 40 Robbins, J. B., et al. *J. Infect. Dis.* **148**: 1136-1159 (1983).
- Shapiro, E. D., et al. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1453-1460 (1991).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-4-

- Shelly, M. A., et al. *Infect. Immun.* **65**: 242-247 (1997).
- Singh et al., "Advances in vaccine adjuvants", *Nat. Biotechnol.* **17**(11):1075-81 (1999).
- 5 Spika, J. S., et al. *J. Infect. Dis.* **163**: 1273-1278 (1991).
- Takala, A. K., et al. *J. Infect. Dis.* **164**: 982-986 (1991).
- 10 Talkington, D. F., et al. *Infect. Immun.* **59**: 1285-1289 (1991).
- Talkington, D. F., et al. *Microb. Pathog.* **21**: 17-22 (1996).
- Tart, R. C., et al. *J. Infect. Immun.* **173**: 380-386 (1996).
- 15 Tripet, B. et al., *J. Mol. Biol.* **300**: 377-402 (2000).
- Wagschal, K. et al., *Protein Science* **8**: 2312-2329 (1999).
- 20 Winter et al., *Nature* **349**: 293 (1991).
- Wolf, E. et al. MultiCoil: A program for predicting two- and three-stranded coiled coils". *Protein Science* **6**: 1179-1189 (1997).
- 25 World Health Organization. *WHO* 9 (1995).
- Yamada et al., "Identification of a novel autoantigen UACA in patients with panuveitis", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**(4):1169-76 (2001).

30

All of the above publications, patents and patent applications are herein incorporated by reference in their entirety to the same extent as if the disclosure of each individual publication, patent application or patent was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety.

35

Background of the Invention

Streptococcus pneumoniae is an important pathogen causing life-threatening invasive diseases such as pneumonia, meningitis and bacteraemia. It is estimated

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-5-

that more than 1 million cases of pneumococcal pneumonia are diagnosed each year in the United States with 0.7% of these infections being fatal (Lancet, 1985). In developing countries, it is estimated that 4 million deaths are due to pneumonia, with *S. pneumoniae* infections accounting for 70% of the deaths (WHO, 1995). *S. pneumoniae* also causes less serious diseases such as otitis media and sinusitis which, due to their prevalence, are a significant burden on health care systems. The high morbidity and mortality rate associated with pneumococcal infections is exacerbated by the rate at which the organism acquires resistance to multiple antibiotics (Spika et al., 1991; Baquero et al., 1991). Thus, there is an unmet need for effective treatments for pneumococcal infections.

The current vaccine utilized for prevention of pneumococcal infection in humans is based on purified capsular polysaccharides. The design of a capsular polysaccharide vaccine is complicated by the fact that there are 90 different capsular types and the protection elicited by the capsule is type specific (Henrichson, 1995). These problems are somewhat mitigated by the fact that certain capsules are more commonly associated with human disease than others and which ultimately led to their inclusion into the current 23 valent vaccine (Robbins et al., 1983). However, capsular polysaccharides, like most polymeric compounds possessing multiple repeating units, are inefficient in stimulating immune responses and subclass switching to IgG (Beuvery et al., 1982). Not surprisingly, the vaccine is only 60% effective in preventing fatal pneumococcal bacteraemia in the elderly (Shapiro et al., 1991) and is unable to elicit adequate antibody responses in children under the age of 2 (Cowan et al., 1978). The problem of poor immunogenicity in children is being addressed by conjugation of the polysaccharides to protein carriers such as diphtheria and tetanus toxoids (Shelly et al., 1997). In a recent clinical trial, a seven valent conjugate vaccine

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-6-

was shown to be immunogenic in children and elicited protection against invasive pneumococcal infection.

However, a separate vaccine will be required for adults because clinically
5 important infections are caused by different capsular types than is the case for children. Coverage in the developing world is expected to be as low as 52% owing to geographical variation of pneumococcal strains. In addition, it is anticipated that the conjugate vaccines may be too expensive for the developing world. Thus, there is an urgent need for alternative approaches to the
10 development of pneumococcal vaccines.

The drawbacks associated with the polysaccharide vaccine have prompted interest in the possibility of developing vaccines based on pneumococcal protein antigens. Pneumococcal proteins under consideration have included the toxins,
15 pneumolysin, autolysin, and the surface proteins. The surface proteins which have been used as vaccines to date include pneumococcal surface adhesion A (PsaA), pneumococcal surface protein A (PspA) and pneumococcal surface protein C (PspC). The surface proteins are shown in Figure 1.

20 Pneumolysin is a thiol cytotoxin that is produced by virtually all clinical isolates of *S. pneumoniae*. When mice were immunized with a genetically engineered toxoid version of pneumolysin (pneumolysoid) absorbed onto alum, the survival rate and the time of death of non-survivors (survival time) was significantly greater than that of controls. However, significant differences in the
25 degree of protection were noted between different strains (Alexander et al., 1994). Pneumolysoid is currently being investigated as a carrier protein for pneumococcal capsular polysaccharides (Michon et al., 1998). In general, a higher response to

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-7-

the capsular polysaccharides was observed when they are formulated as conjugates of pneumolysin as compared to tetanus toxoid conjugates. Immunization with autolysin has also shown to be protective in a sepsis model (Canvin et al., 1995). However, antibodies to autolysin appear to exert their effect in part because they
5 prevent the autolysin dependent release of pneumolysin.

All *Streptococcus pneumoniae* isolates investigated to date express the lipoprotein pneumococcal surface adhesin A (PsaA). PsaA is 37 kDa in molecular weight and is thought to be generically conserved. The function of PsaA is that of
10 a Zn binding membrane transport protein (Lawrence, et al. 1998). Recent studies have shown that immunization of mice with native PsaA elicited anti-PsaA antibodies that protected mice from challenge with virulent strains of *S. pneumoniae* (Talkington et al., 1996; De et al., 1999). In a mouse carriage model, PsaA has been shown to be one of the best pneumococcal surface antigens
15 at eliciting protection against carriage. However, PsaA is not as effective as PspA in eliciting protection in a murine sepsis model or murine pulmonary infection model (Briles et al., 2000).

Pneumococcal surface protein A has been found on all strains of *S. pneumoniae* studied to date and is required for full virulence (Crain et al., 1990). While PspA has a strain-dependent molecular weight ranging from 67 to 99 kDa,
20 all proteins consist of four distinct domains: an N-terminal highly charged domain, a proline rich domain, a repeat domain comprising 10 highly conserved 20 amino acid repeats, and a short hydrophobic domain (Figure 2). The repeat
25 region is responsible for attachment of the protein to the cell surface of *S. pneumoniae* by non-covalent binding to choline residues.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-8-

The amino acid sequence of the Rx1 strain PspA is included herein as SEQ ID NO:1. Analysis of the sequence of the N-terminus of this PspA (residues 1-303) indicated that the sequence adopts a coiled-coil structure. The coiled-coil structure consists of two amphipathic α -helices wrapped around each other with a left handed supertwist (Figure 3). The coiled-coil is characterized by a heptad repeat (abcdefg), in which the a and d positions are typically occupied by hydrophobic amino acids. These residues are aligned such that they create a hydrophobic face that is responsible for the stability of this structure.

The N-terminal sequence of PspA contains three prolines interspersed throughout the sequence, which are believed to create small breaks in the otherwise continuous coiled-coil. It is proposed from hydrodynamic characterization of the protein and from computer modeling that PspA forms a coiled-coil by folding back onto itself at one of the three proline regions. It is thought that the coiled-coil region extends from the cell wall and possibly protrudes outside the capsule.

The exact function of PspA is not known. It has been shown to retard to clearance of pneumococci from the blood (McDaniel et al., 1987). It seems likely that the major effect of PspA on virulence may be due to interference with complement fixation. In addition, it is thought that the highly positively charged nature of the coiled-coil region may interact with the negatively charged capsule. This interaction may stabilize the capsular structure.

Streptococcus pneumoniae has another surface protein called PspC that has a similar domain structure as PspA, but has a larger coiled-coil region and is larger in overall size (Figure 2). The N-terminal 150 amino acids of the helical

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-9-

domain are highly variable in size and sequence. Adjacent to this hypervariable region are two repeating sequences that vary in size from 101 to 205 amino acids in length. In the larger PspC proteins, there exists a helical region similar to the C-terminal portion of the coiled-coil region found in PspA. A comparison of PspC and PspA proteins is shown in Figure 2. Evidence now exists that most strains of *S. pneumoniae* produce both PspA and PspC (Brooks-Walter et al., 1999; Crain et al., 1996). The exact function of PspC is not known, but it is believed to function in an analogous fashion as PspA.

10 Summary of the Invention

This invention relates to the unexpected discovery that the characteristic heptad repeat (abcdefg)_n of coiled-coil proteins, where the a and d positions are typically occupied by hydrophobic amino acids, can be used as a template to lock epitopes from coiled-coil regions or potential coiled-coil regions of native proteins into a stable coiled-coil structure to form novel synthetic peptides based on native proteins. Such peptides may be used for immunization. Amino acid residues from corresponding positions of native coiled-coil proteins are spliced into the solvent exposed b, c, e, f and g positions, while hydrophobic amino acids (in particular, Ile and Leu) occupy the a and d positions. The resulting novel peptides maintain a stable coiled-coil structure in aqueous solution, and present immunogenic epitopes characteristic of the native proteins.

Accordingly, one aspect of the invention provides for synthetic peptides of the following formula (formula I):



WO 01/96368

PCT/US01/19168

-10-

wherein A is Ile, Leu, Val or a derivative thereof, D is Leu, Ile, Val or a derivative thereof, each X is an amino acid residue or derivative thereof which corresponds to an amino acid residue of an epitope of a native coiled-coil protein to form a set of X residues, and n is an integer equal to or greater than 1.

- 5 Preferably, A is Ile and D is Leu in every set of the (AXXDXXX) repeat. Preferred values for n are 2 to 100. In a preferred embodiment, n is 2 to 10, most preferably about 3 to 6.

- 10 Preferred sets of X residues are amino acids that are solvent exposed in the coiled-coil region of the native protein. Each set of X amino acid residues may be selected and/or combined independently. In other words, they may come from the same epitope of the same protein, different epitopes of the same protein, epitopes of different proteins, or the like.

- 15 The peptides may further comprise additional amino acids, such as the amino acid residues C_NLeG₋, at the N-terminus of the peptide. The peptides may also comprise additional amino acids at the C-terminus. The additional amino acids may or may not be arranged in a sequence which has the propensity to form coiled-coils, and the number of additional amino acids at either terminus is preferably less than 100. The number of additional amino acids at either terminus is more preferably less than 50, yet more preferably less than 30, still more preferably less than 20, and most preferably less than 10.
- 20

- 25 This invention may particularly be used to create novel synthetic peptides relating to microbial proteins which exist as coiled-coil structures in the native state. In particular, amino acid residues from epitopes of microbial surface proteins, most particularly *S. pneumoniae* surface proteins A and C, may be used

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-11-

in the novel peptides. Many microbial surface proteins have similar architecture, existing as long, free-standing coiled-coils.

The X residues may come from consensus sequences of native coiled-coil proteins, for example PspA and PspC. A preferred consensus sequence of PspA is
 5 EELX₁X₂KIDELDX₃ELAX₄LEKX₅ (SEQ ID NO:5). Preferably, X₁ is S, Q, N or D; X₂ is D, N or K; X₃ is A or N; X₄ is K, E or D; and X₅ is N, D or E.

To increase the stability of the coiled-coil conformation, the amino acid
 10 residues at the e and g positions, if not part of the epitope of interest, may optionally be replaced with charged amino acids (e.g., Asp, Glu, Lys, Arg and His). The replacement should be performed such that the e position in one peptide strand and the g' position in the "complementary strand" are occupied by amino acids of opposite charges, for example Asp and Lys¹. Similarly, the residues at
 15 the g position of one strand and the e' position of the complementary strand can be replaced by residues of opposite charges.

The residues may also be replaced by charged amino acids such that a salt
 20 bridge can form between two residues which are 3 or 4 residues apart in the same strand. Alternatively, a charged amino acid may stabilize the coiled-coil structure by interacting with an oppositely-charged residue in a stabilizing strand.

In another aspect, the invention provides methods of making peptides of the formula I comprising the steps of selecting an antigenic epitope derived from a

¹For example, chain 1 and chain 2 in Figure 3 are "complementary strands". As illustrated in Figure 3, the e position in chain 1 and the g' position in chain 2 are aligned. Therefore, if amino acid residues with opposite charge occupy these two positions, they can form a salt bridge between their side chains, which increases the stability of the coiled-coil structure.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-12-

coiled-coil, determining which amino acid residues are solvent exposed, and inserting said solvent exposed amino acid residues into the X positions of formula I. In particular, the selection of epitopes may be performed using a computer algorithm. More than one set of epitopic amino acids derived from the same protein or different proteins may be used. Furthermore, the sets of epitopic amino acids may be from different strains and/or species of microorganism when epitopes of a microbial coiled-coil protein is used.

In a further aspect, the invention provides compositions useful to stimulate an immune response in an animal wherein said compositions comprise a peptide of formula I. When more than one set of epitopic amino acids is used in the peptide of formula I and the sets of epitopic amino acids are from different strains and/or species of microorganism, the composition is useful to stimulate an immune response to more than one strain and/or species of microorganism. The animal may be an avian, a mammal (including a human), or any animal capable of an immune response.

Antibodies raised by administration of a peptide of formula I are also provided as an aspect of the invention. Such antibodies may be polyclonal or monoclonal. Pharmaceutical compositions comprising such antibodies are also provided. When more than one set of epitopic amino acids is used in the peptide of formula I and the sets of epitopic amino acids are from different strains and/or species of microorganism, the antibody will bind to more than one strain and/or species of microorganism.

In yet a further aspect, the invention provides compositions useful as vaccines wherein said compositions comprise a peptide of formula I. When more

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-13-

than one set of epitopic amino acids is used in the peptide of formula I and the sets of epitopic amino acids are from different strains and/or species of microorganism, the composition is useful to provide cross protection to more than one strain and/or species of microorganism.

5

In still a further aspect, the invention provides methods of preventing a microbial infection comprising administering to a mammal susceptible to said infection a peptide of formula I. When more than one set of epitopic amino acids is used in the peptide of formula I and the sets of epitopic amino acids are from different strains and/or species of microorganism, the composition is useful to prevent infection by several strains and/or species of microorganism.

10

In yet another aspect, the invention provides a method of treating or preventing microbial infection in an animal susceptible to or suffering from such infection, comprising administering to said animal an effective amount of an antibody to a microbial protein, wherein said antibody is produced by administering a peptide of formula I to an animal. In particular, such administration may be used to provide passive immunization and/or prevent or alleviate symptoms of infection in said animal. When more than one set of epitopic amino acids is used in the peptide of formula I and the sets of epitopic amino acids are from different strains and/or species of microorganism, the method may treat or prevent infection by several strains and/or species of microorganism.

15

20

In still another aspect, the invention provides a method of determining the presence of a particular microorganism in a sample comprising contacting the sample with an antibody to a peptide of formula I which peptide comprises

25

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-14-

epitopes from the particular microorganism, and determining whether said antibody binds to a component of said sample. The sample may be a biological sample. The method may be used to determine the causative agent of a microbial infection. When more than one set of epitopic amino acids is used in the peptide of formula I and the sets of epitopic amino acids are from different strains and/or species of microorganism, the method may be used to simultaneously detect the presence of several strains and/or species of microorganism in the sample.

In a further still aspect, the invention provides a method for providing multiple epitopes for exposure to the immune system of an animal comprising administering to the animal a peptide of formula I wherein said peptide epitopes are from different proteins. In a preferred embodiment, the peptide epitopes are from different proteins of a single microorganism or from different strains and/or species of microorganisms.

In still a further aspect, the invention provides a method for determining the presence of antibodies to a microbial protein in a biological sample comprising contacting the sample with a peptide of formula I which peptide comprises at least one epitope from the microbial protein and determining binding of antibodies in the sample to the peptide. The method may be used to determine whether an animal has been exposed to a microorganism.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a hypothetical representation of the pneumococcal surface depicting several antigens present on the surface. The coiled-coil regions from PspA and PspC are believed to project away from cell wall.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-15-

Figure 2 is a diagrammatic representation of the PspA and PspC molecules highlighting their regions of homology. Each protein consists of 4 domains, a coiled-coil domain, a proline rich region, a choline binding region and a hydrophobic tail. High sequence homology exists in the region 2 sections of the coiled-coil domains between PspA and PspC.

Figure 3 depicts the cross-sectional view of a coiled-coil structure consisting of two peptide chains. The 7 positions of the heptad repeat in chain 1 are designated a, b, c, d, e, f and g, while the 7 positions of the heptad repeat in chain 2 are designated a', b', c', d', e', f' and g'. The open arrows indicate hydrophobic interactions between a and a', and d and d', respectively.

Figure 4 shows the steps of combining the epitopes of several clinically relevant strains of *S. pneumoniae* into a coiled-coil template to make an immunogenic peptide.

Figure 5 shows the CD spectrum of the peptide of Figure 4 in the presence and absence of TFE.

Figure 6 shows a region of PspA which is highly conserved. A consensus sequence which is selected such that it conforms with formula I is also shown.

Figure 7 shows the CD spectrum of peptide CVX0270, which contains a portion of the consensus sequence shown in Figure 6.

Figure 8 shows the thermal denaturation profile of peptide CVX0270.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-16-

Detailed Description of the Invention

This invention relates to the use of a coiled-coil structural scaffold to generate structure-specific peptides, including synthetic peptides derived from naturally occurring protein antigens. The structure of the synthetic peptides utilizes a scaffold of heptad repeat units into which epitopes of native coiled-coil proteins are spliced.

In particular, the synthetic peptides are based on microbial proteins, especially surface proteins, which occur naturally in the coiled-coil form, such as pneumococcal surface proteins A and C. The synthetic peptides are immunogenic and can be used to elicit an immune response in an animal. Accordingly, they are useful as vaccines or to stimulate antibody production or cell-mediated immunity which recognizes the naturally occurring protein.

Prior to describing the invention in further detail, the terms used in this application are defined as follows unless otherwise indicated.

Definitions

A "native protein" is a protein which exists in nature.

A "coiled-coil protein" is a protein which, at least in part, forms a coiled-coil. A coiled-coil protein may have other conformational structures in addition to the coiled-coil. Encompassed within the term coiled-coil proteins are the proteins which have been shown to assume a coiled-coil structure and the proteins which are predicted to form coiled-coils by using a computer algorithm.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-17-

A "microbial protein" is a protein derived from a microorganism such as a bacterium, archaeobacterium, fungus, virus, protozoan, parasite, alga, slime mold, or prion.

5 A "peptide" as used herein is a peptide or a protein. In other words, a peptide referred to in this application may contain any number of amino acids.

A "peptide of formula I" is a peptide which comprises a synthetic fragment, which fragment consists of formula I.

10

An "epitope" is a part of a protein or peptide which is an antigenic determinant.

15 A "derivative" of an amino acid is a non-naturally occurring amino acid residue or a chemically modified amino acid. Amino acid derivatives may be used to increase the half life of the peptide in serum or tissue, or to increase antigenicity of the peptide.

20 Non-naturally occurring amino acids may be but not limited to D-isomers, norleucine, 4-amino butyric acid, aminoisobutyric acid, 4-amino-3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid, 6-aminohexanoic acid, t-butylglycine, norvaline, phenylglycine, ornithine, sarcosine, 4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid and 2-thienyl alanine.

25 A chemically modified amino acid is an amino acid with a side chain modification. For example, the amino group of lysine may be modified by alkylation with an aldehyde followed by reduction with NaBH_4 , amidation with

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-18-

methyloacetimidate; acylation with acetic anhydride; carbamoylation with cyanate; trinitrobenzylation with 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS); acylation with succinic anhydride and tetrahydrophthalic anhydride; and pyridoxylation with pridoxal-5'-phosphate followed by reduction with NaBH_4 .

5

The guanidine group of arginine residues may be modified by the formation of heterocyclic condensation products with reagents such as 2,3-butanedione, phenylglyoxal and glyoxal.

10

The carboxyl group may be modified by carbodiimide activation via O-acylisourea formation followed by subsequent derivatization, for example, to a corresponding amide.

15

The sulfhydryl group may be modified by carboxymethylation with iodoacetic acid or iodoacetamide; performic acid oxidation to cysteic acid; formation of a mixed disulfide with other thiol compounds; reaction with maleimide, maleic anhydride or other substituted maleimide; formation of mercurial derivatives using 4-chloromercuribenzoate, 4-chloromercuriphenylsulphonic acid, phenylmercury chloride, 2-chloromercuri-4-nitrophenol and other mercurials; or carbamoylation with cyanate at an alkaline pH.

20

Tryptophan residues may be modified by, for example, oxidation with N-bromosuccinimide or alkylation of the indole ring with 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide or sulphenyl halides. Tyrosine residues may be altered by nitration with tetranitromethane to form a 3-nitrotyrosine derivative.

25

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-19-

Modification of the imidazole ring of a histidine residue may be accomplished by alkylation with iodoacetic acid derivatives or diethylpyrocarbonate.

5 A "peptide" may be a peptide containing naturally existing amino acids or amino acid derivatives. A peptide may also contain cross links between different portions of the peptide. For example, coiled-coil structures are often composed of two strands or three strands. It is preferable that the different strands of the coiled-coil are linked by disulfide bonds, which stabilize the coiled-coil structure.
10 More preferably, the peptide contains a lactam bridge between the sidechains of lysine and glutamic acid which are spaced 3 or 4 residues apart (Houston et al., 1996). These lactam bridges are incorporated preferably at the N- and C-termini of the peptide sequence and not in regions of the sequence where the epitope is being displayed.

15 A "solvent exposed" or "solvent accessible" amino acid residue is an amino acid residue of a protein or peptide which is exposed to the solvent when the protein or peptide exists in a solution. The solution is preferably an aqueous solution, more preferably a physiologically compatible solution, such as blood,
20 lymphatic fluid or the benign buffer. In particular, "solvent exposed" amino acid residues refer to the residues at the b, c, e, f or g positions of a native epitope which forms or is predicted to form a coiled-coil.

A benign buffer is a phosphate buffered solution. The "benign buffer" as
25 used in this application is 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM KCl, pH 7.0.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-20-

An "antibody" is a protein molecule that reacts with a specific antigen and belongs to one of five distinct classes based on structural properties: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM.

5 An "immune response" is the development in the host of a cellular and/or antibody-mediated immune response to a composition or vaccine of interest. Such a response may consist of the production of one or more of the following: antibodies, B cells, helper T cells, suppressor T cells, and/or cytotoxic T cells directed specifically to an antigen or antigens included in the composition or
10 vaccine of interest.

A "vaccine" is a molecule which is capable of eliciting in an animal an immune response which prevents, partially or completely, infection by a pathogen.

15 "Elicit" or "stimulate" an immune response is to cause an immune response by exposing an immune system to an immunogen.

An "immunogen" is a molecule which is capable of eliciting an immune response in an animal.

20

"Prevent a microbial infection" is to prevent, completely or partially, the development of a microbial infection.

"Treat a microbial infection" is to reduce, completely or partially, the
25 symptoms of a microbial infection after the onset of the microbial infection.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-21-

A "sample" is an aliquot or a representative portion of a substance, material, or population. For example, a sample may be a sample of water, sewage, oil, sand, blood, biological tissue, urine or feces.

5 A "biological sample" is a sample collected from a biological subject, such as an animal, plant or microorganism.

An "effective amount" is an amount which is sufficient to achieve the intended purposes. For example, an effective amount of a vaccine is an amount of
10 the vaccine sufficient to elicit an immune response in the recipient of the vaccine to protect the recipient from contracting the target disease or to prevent or alleviate medical conditions associated with the disease.

The synthetic coiled-coil peptide

15 It has been shown previously that PspA is highly variable among different strains of *S. pneumoniae*. Mapping studies using monoclonal antibodies raised against PspA indicate that the major cross-reactive epitopes are found in the last 100 amino acids of the coiled-coil domain (residues 192-270 of SEQ ID NO:1)
20 (McDaniel et al., 1994). Based on the sequence of this region, it has been possible to group PspA proteins into 6 clades, which comprise three families. Animal studies have shown that immunization with PspA elicits an immune response which is not only cross-reactive to other strains in the same PspA family, but that this cross-reactivity extends between families (Briles, et al. 1999; McDaniel et al.,
25 1991; Tart et al., 1996). In addition, immunization with purified PspC fragments generates antibodies that are protective against sepsis and cross react with PspA (Brooks-Walter et al., 1999). The cross-protection results suggest that despite the

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-22-

variation among the coiled-coil domain for PspA and PspC, there must be conserved epitopes.

The first evidence that immunity to PspA might be protective was the finding that PspA specific monoclonal antibodies (MAbs) protected mice from fatal sepsis. Subsequently, it was shown that passive protection with IgG or IgM monoclonal antibodies to PspA from strain Rx1 protected mice from death following ip or iv challenge with 10^5 times the LD_{50} of *S. pneumoniae* strain WU2 (Briles, et al. 1989). The MAbs were shown to clear the pneumococci from the blood of the challenged mice by a complement-mediated mechanism. Active immunization studies utilized a 27 kDa fragment of PspA from *S. pneumoniae* strain Rx1 (residues 1-245 of SEQ ID NO:1) which contain most of the helical domain of the protein. Immunization of CBA/N mice with 5 μ g of this fragment in combination with the adjuvant FCA followed by a booster dose in PBS were protected from an iv challenge of 300 cfu (30 times LD_{50}) of strain WU2 (Talkington et al., 1991). In more recent studies when mice received 1 or 5 μ g of a fragment comprising residues 1-303 with no adjuvant, it elicited protection against fatal infection following iv challenge with 480 cfu of the more virulent strain A66.1 (Briles et al. 1998). Passive protection studies in mice with immune sera from immunized mice or rabbits can protect against fatal sepsis from challenge doses of 10 to 100 times LD_{50} of the challenge strain.

While PspA can be divided into numerous serological types, it has been shown to be a highly cross-reactive protein. Sera from a single rabbit immunized with the helical portion of PspA from strain Rx1 can recognize PspA from all pneumococci in Western blots. When CBA/N mice were challenged with 14 different *S. pneumoniae* strains ($\sim 200 \times LD_{50}$ dose) following immunization with

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-23-

PspA from strains D30, WU2 and BG9739, each PspA exhibited cross-protection to most challenge strains. The helical domain of PspA from the strain Rx1 (residues 1-314 of SEQ ID NO:1) was recently evaluated for safety and immunogenicity in human volunteers (Nabors et al., 2000). When patients were immunized with 5 to 125 mg of this fragment absorbed onto aluminum hydroxide, high levels of circulating antibodies to the Rx1 fragment were elicited as well as antibodies reactive to heterologous PspA molecules.

The PspA sequence from *S. pneumoniae* strain Rx1 was analyzed using the Peptools program from Biotools Inc. The Peptools structure prediction algorithm is based on identifying known protein-folding motifs combined with consensus prediction based on the results from four prediction algorithms. The Peptools program also predicts a highly helical region that spans over 300 amino acids for the N-terminal portion of PspA. Peptools program is also capable of predicting which sites of proteins are antigenic by measuring hydrophilicity, solvent accessibility, flexibility, and turn propensity of various sequences, and in addition, matches sequences against a database of known B-cell epitopes. Peptools identified a number of potential B-cell epitopes in the coiled-coil domain which are listed in Appendix 1.

The folding of PspA and PspC (or other proteins which exist as coiled-coils) into a coiled-coil results in certain residues being solvent accessible and certain residues which form the hydrophobic core being solvent inaccessible. The solvent accessible amino acids are located at positions *b*, *c*, *e*, *f* and *g* of the heptad repeat while amino acids *a* and *d* are buried. Thus, residues at solvent accessible positions must be responsible for mediating an immune response, e.g., antibody production. The epitopes formed by the coiled-coil region must be discontinuous

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-24-

since the *a* and *d* residues are not exposed. Thus, the epitopes from these proteins must be derived from the solvent accessible positions *b*, *c*, *e*, *f* and *g*.

We discovered that the stability of the hydrophobic core of a coiled-coil protein may be maximized by incorporation of Ile residues at *a* positions and Leu residues at *d* positions of the heptad repeat. Accordingly, the present invention provides a synthetic peptide comprising formula I:

(AXXDXXX)_n (SEQ ID NO:15)

wherein

10 A is Ile or a derivative thereof;
 D is Leu or a derivative thereof;
 each X is an amino acid residue or derivative thereof which corresponds to an amino acid residue of an epitope of a native coiled-coil protein;
 15 the X residues in each (AXXDXXX) repeat form a set of X residues; and
 n is equal to or greater than 1.

20 While the preferred embodiment has Ile at the *a* position and Leu at the *d* position, also contemplated in the present invention are peptides containing Val, Ile or Leu at the *a* or *d* positions. Thus, the amino acid at the *a* position may be Val, Ile or Leu, and the amino acid at the *d* position may, independently, also be Val, Ile or Leu.

25 Although the coiled regions of PspA and PspC are quite long, synthetic coiled-coil forming sequences may be shorter. It has been shown that if lactam bridges are included, a synthetic coiled-coil may be as short as 14 residues

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-25-

(Houston et al., 1996). In the absence of lactam bridges, we have found that helical peptides containing 21 amino acids were stable. In addition, linking of the individual helices together by an intermolecular disulfide bond further stabilizes these structures. The small coiled-coils can serve as scaffolds into which epitopes from native coiled-coil proteins, such as PspA and PspC, are spliced. A potential scaffold has the following sequence:

CnleG-(LXXLXXX)_n (SEQ ID NO:16)

wherein Nle is norleucine, an isomer of leucine containing an unbranched side chain. Residues that make up epitopes from native coiled-coil proteins such as PspA and PspC (residues *b*, *c*, *e*, *f* and *g*) would be inserted into the X positions. The epitopes could potentially be determined by using algorithms and bioinformatics programs such as Peptools. Epitopes could also be mapped by monoclonal antibodies or by analysis of polyclonal antisera raised against native proteins on a Biacore instrument. Epitopes from different native proteins such as from different strains of *S. pneumoniae* could be spliced together to yield novel sequences. The peptide may be synthesized by peptide synthesis methods established in the art, or an expression vector encoding the peptide sequence of interest can be constructed and used to express the peptide. The I and L residues in this scaffold may, independently, be replaced by any amino acid selected from I, L or V.

The amino acids at the *b*, *c*, *e*, *f*, and *g* positions in the present invention are the solvent exposed amino acids from natural coiled-coils of the particular protein of interest. Therefore, the present invention is distinct from WO 01/00010, which is directed to displaying solvent exposed amino acids from a non-coiled-coil protein in a coiled-coil template. As a result, a non-coiled-coil epitope is converted to a coiled-coil conformation, and it is possible that antibodies raised

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-26-

against the coiled-coil conformation will not recognize the original, non-coiled-coil epitope. In contrast, a peptide made according to formula I of the present invention contains at the b, c, e, f, and g positions the amino acids from the b, c, e, f, and g positions of a coiled-coil protein. The resulting peptide, while being
5 more immunogenic, will elicit the same immune response as the original epitope with respect to specificity.

The present invention is also distinct from WO 96/11944, which is directed to embedding one peptide in another. Briefly, WO 96/11944 discloses that one
10 can enhance the immunogenicity of a peptide by flanking the peptide with amino acids which have a strong propensity to form the same conformation as the peptide of interest, thereby stabilizing the conformation of the peptide. For example, a peptide which may form a coiled-coil can be embedded in the amino acid sequences of GCN4, which forms relatively stable coiled-coils. The resulting
15 chimeric peptide had a high helical content when dissolved in the α -helix inducing solvent trifluoroethanol, but its helical content under aqueous conditions was low. The present invention, on the other hand, does not embed a peptide fragment in another amino acid sequence. Instead, the amino acids at the a and d positions of the peptide are specifically chosen and replaced where appropriate in order to
20 increase the stability of the coiled-coil conformation, and the resulting peptide is typically helical even in aqueous solutions.

The following example demonstrates the basic features of the present invention. As mentioned previously, the C-terminal portion of the coiled-coil
25 domain from the Rx1 PspA protein has been shown to contain a number of cross-protective epitopes. The Biotools software identified a number of such epitopes including residues 153-170 and residues 181-198 that will be used to illustrate the

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-27-

construction of a coiled-coil immunogen (Example 1). The *a* and *d* position of these epitopes are highlighted in bold text while the solvent accessible amino acids are in italics. These positions are replaced by Ile at *a* positions and Leu at *d* positions of the template. By simply splicing out the solvent exposed residues (italicized) from the potential epitopes and incorporating them into the scaffold, one is able to create unique polypeptide sequences which are immunogenic. The coiled-coils described in Example 1 will have approximate molecular weights of 7,000 Da and may be large enough to elicit an immune response on their own. Alternatively, these molecules could be coupled to carrier proteins such as tetanus toxoid or KLH, or attached to liposomes using techniques known to those of skill in the art.

It must be stressed that the residues must be kept in phase such that, for example, a *c* residue from the protein must correspond to an *c* residue in formula I. Residues from either of the two adjoining sequences can be used to fill any gaps that might arise during the splicing. Since the coiled-coil is composed of two α -helices, the two helical strands can bear different sequences, thus increasing the number of epitopes in the entire molecule. Through incorporation of a number of epitopes from different clades, the coiled-coil peptides will cross react among different clades.

By maintaining a constant hydrophobic core, splicing in only solvent exposed residues and mixing epitopes from different proteins, unique sequences are produced. Thus, a formula I peptide may have the amino acids from the b, c, c, f and g positions of PspA in one heptad repeat and those from PspC in another repeat. When this peptide is used as a vaccine, immunity against both PspA and PspC is induced, thereby providing double protection against *S. pneumoniae*.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-28-

A particularly appealing approach is to include amino acids from both the surface proteins (such as PspA and PspC) and the surface adhesin protein (PsaA). The adhesin protein is responsible for pathogenesis of *S. pneumoniae* in the nasopharyngeal area while the surface proteins are involved in systemic symptoms. It has been shown that PsaA may be an effective vaccine to prevent nasopharyngeal carriage while PspA is a better vaccine candidate for systemic infections (Briles et al., 2000). Therefore, a peptide comprising epitopes from both PsaA and PspA will provide a defense against both the nasopharyngeal and systemic infections by the bacteria. This can be achieved by splicing the solvent exposed amino acids from the α -helical region of PsaA into one heptad repeat of a Formula I peptide, and the solvent exposed amino acids from the α -helical region of PspA into another heptad repeat of the same peptide. Similarly, a hybrid peptide comprising both PspC epitopes and PsaA epitopes can be prepared.

Alternatively, the formula I peptide may contain the solvent exposed amino acids of proteins from different strains of a microorganism or from different microorganisms, and the resulting vaccine can be effective against all the strains or microorganisms used. Similarly, a consensus sequence may be deduced for a certain protein from different strains and used as a vaccine against all these strains (see Example 3).

In order to improve the helical stability of a peptide, the e and g positions of the heptad repeat of formula I may contain glutamic acid and lysine. These residues form salt bridges between e of one strand and g' of the other strand, as well as g of one strand and e' of the other strand. These salt bridges further help to stabilize the coiled-coil conformation. To stabilize individual α -helices, lysine residues and glutamic acid residues can be introduced at positions 3-4 residues

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-29-

apart to facilitate the formation of an intrastrand salt bridge between their sidechains. One can also increase the stability of the coiled-coil by the inclusion of amino acids with high helical propensity such as alanine or aminoisobutyric acid.

5 Alternatively, a stabilizing strand may be used which does not contain epitopes. The sole purpose of the stabilizing strand is to increase the helical content of the strand which contains the epitopes. A stabilizing strand is capable of forming a very stable helix which supports and stabilizes the helical structure formation of the epitope-containing strand. Preferably, the epitope has lysine
10 and/or glutamic acid at the e or g positions, and the stabilizing strand can provide an amino acid with the opposite charge at the e' or g' positions to form an interstrand salt bridge. An example of a stabilizing strand is:

CNleGGG(EIEALKK)₃ (SEQ ID NO:2)

15 The structural and conformational integrity of these peptides can be readily determined by circular dichroism (CD) spectroscopy. The peptides useful in the present invention have helical characteristics in aqueous solutions (see Examples 2 and 3). Therefore, the native epitopes can be correctly presented in a physiological environment. In contrast, previously reported synthetic coiled-coil
20 proteins do not form helices in aqueous solutions (WO 96/11944). Peptides useful in the present invention have a helical content of at least 20% in benign buffer as determined by CD spectroscopy. The helical content is preferably at least 40%, more preferably at least 60% and most preferably at least 80% in benign buffer.

25 The stability of the peptides may be determined by thermal denaturation assays or chemical denaturation assays such as the guanidine chloride denaturation assay. Such assays are known to those skilled in the art. The stability of the

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-30-

peptides may also be indirectly assessed by inhibition ELISA, wherein the ability of a peptide to inhibit the interaction between an antigen and an antibody serves as an indicator of how stable the peptide is in assuming the necessary conformation to compete with the antigen for the antibody.

5

Epitopes from other microbial coiled-coil proteins may also be used in the claimed invention. In particular, epitopes from microbial surface proteins which contain coiled-coil structures may be used. Examples of microorganisms whose proteins are useful in the claimed invention include, but are not limited to,

10 *Haemophilus influenza*, and particularly its hypothetical protein H0500; the Lyme disease spirochete, i.e., *Borrelia burgdorferi*, in particular its surface lipoprotein P27; *Legionella*, especially its hypothetical protein ppIB; *E. coli*, particularly its conserved YigN protein; *Neisseria* spp, and in particular *Neisseria meningitidis* and its putative periplasmic protein; *Moraxella catarrhalis*, especially its proteins
15 UspA1 and UspA2; *Mycoplasma* spp, and in particular, *Mycoplasma pneumoniae* and its hypothetical protein EO7; *Chlamydia* spp, particularly hypothetical protein CT825; *Plasmodium falciparum*, and particularly its hypothetical protein PFB01450 and mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen; *Trypanosoma* spp; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus*, particularly Group A and Group B;
20 *Bordetella pertussis*; *Salmonella*; *Streptococcus mutans*; *Cryptococcus neoformis*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; viruses; fungi; and the like.

Moreover, other coiled-coil proteins which do not come from a microbial origin may be used in the same fashion. For example, it is common to raise
25 antibodies to a protein for therapeutic purposes or to study the functions of this protein. However, not every protein of interest is sufficiently immunogenic, and it may be difficult to raise antibodies specifically directed to particular coiled-coil

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-31-

regions of the native protein. The present invention may be used to optimize antibody preparation for any coiled-coil protein no matter what origin, function or subcellular localization this protein may have. Moreover, the present invention also enables production of antibodies directed to particular coiled-coil regions, by including only the region of interest in the peptide used to raise antibodies.

Examples of non-microbial coiled-coil proteins include, without being limited to, estrogen receptor binding fragment associated gene 9 (Nakashima et al., 1999), leukemia associated protein 5 (Kapanadze et al., 1998), uveal autoantigen (Yamada et al., 2001), angiopoietin precursor (Davis et al., 1996), NF-kappa B essential modulator (Li et al., 1999), Tumor susceptibility gene 101 protein (Li et al., 1997), cytosolic ovarian carcinoma antigen 1 (Chang et al., 1994), TACC 1 (Still, 1999), and TPR (Miranda et al., 1994).

In addition to the microbial and non-microbial proteins listed herein, a skilled artisan can identify other coiled-coil proteins according to established methods in the art. For example, if the amino acid sequence of a protein is available, various computer algorithms such as Multicoil or Peptool can be used to predict if the protein forms a coiled-coil. For a protein which is substantially pure, CD spectroscopy can be used to determine its actual structure as described herein.

-32-

The compositions

A composition comprising the coiled-coil peptides of formula I can be used to elicit an immune response in an animal for at least two purposes. Where the composition acts as a vaccine by eliciting an immune response in the animal, the resulting antibodies or T-cell mediated immunity can protect the animal from a subsequent attack involving the same epitopes (active immunity). Alternatively, the composition can be used to produce antibodies which can be used as a research tool, or administered to a second animal to protect the second animal from a subsequent attack involving the same epitopes (passive immunity).

To augment the immune response elicited, it may be preferable to couple the peptides of formula I, especially the smaller peptides (e.g., those containing one to four heptad repeats), to a carrier protein.

In addition, the coiled-coil peptides of formula I or their conjugates with carrier proteins may be further mixed with adjuvants to elicit an immune response, as adjuvants may increase immunoprotective antibody titers or cell mediated immunity response. Such adjuvants may include, but are not limited to, Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, aluminum hydroxide, dimethyldioctadecyl-ammonium bromide, Adjuvax (Alpha-Beta Technology), Inject Alum (Pierce), Monophosphoryl Lipid A (Ribi Immunochem Research), MPL+TDM (Ribi Immunochem Research), Thermax (CytRx), QS21, the CpG sequences (Singh et al., 1999), toxins, toxoids, glycoproteins, lipids, glycolipids, bacterial cell walls, subunits (bacterial or viral), carbohydrate moieties (mono-, di-, tri-, tetra-, oligo- and polysaccharide), various liposome formulations or

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-33-

saponins. Combinations of various adjuvants may be used with the antigen to prepare the immunogen formulation.

5 The composition may be administered by various delivery methods including intravascularly, intraperitoneally, intramuscularly, intradermally, subcutaneously, orally, nasally or by inhalation. The composition may further comprise a pharmaceutically acceptable excipient and/or carrier. Such compositions are useful for immunizing any animal which is capable of initiating an immune response, such as primate, rodent, bovine, ovine, caprine, equine, 10 leporine, porcine, canine and avian species. Both domestic and wild animals may be immunized. The exact formulation of the compositions will depend on the particular peptide or peptide-carrier conjugate, the species to be immunized, and the route of administration.

15 The antibodies produced against a coiled-coil protein can be included in a pharmaceutical composition and administered to an animal. The pharmaceutical composition typically comprises a pharmaceutically acceptable carrier, and may include pharmaceutically acceptable excipients. The pharmaceutical composition can be administered intravascularly, intraperitoneally, intramuscularly, 20 intradermally, subcutaneously, orally, nasally or by aerosol inhalation. Preferably the pharmaceutical composition is administered intravascularly, intramuscularly, nasally or by aerosol inhalation.

Also encompassed by the present invention are antibodies, particularly 25 monoclonal antibodies, which are derived from the antibodies produced against a peptide of formula I. In particular, hybridomas can be generated using a peptide of formula I, and recombinant derivative antibodies can be made using these

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-34-

hybridomas according to well-known genetic engineering methods (for a review, see Winter et al., 1991). For example, the DNA fragment coding for the variable regions of the monoclonal antibodies can be obtained by polymerase chain reactions (PCR). The PCR primers can be oligonucleotides which are
5 complementary to the constant regions of the heavy chain or light chain, and the PCR template can be the total cDNA or genomic DNA prepared from the hybridomas. Alternatively, a cDNA library can be prepared from the hybridomas and screened with probes which correspond to the constant regions of immunoglobulin heavy chain or light chain to obtain clones of the heavy chain or
10 light chain produced by the particular hybridoma.

Subsequently, the DNA fragment for the variable regions can be inserted into an expression vector and joined in frame with the cDNA sequences of a selected constant region. The constant region can be the human constant
15 sequences to make humanized antibodies, the goat constant sequences to make goat antibodies, the IgE constant sequences to make IgE which recognizes the peptide of formula I, and the like. Thus, antibodies with the same antigen recognition ability but different constant regions can be produced. Of particular interest are humanized antibodies, which can be used as therapeutic agents against a disease
20 associated with the cognate antigen in humans without eliciting an undesired immune response against the humanized constant region.

Other methods known in the art to humanize antibodies or produce human antibodies can be utilized as well, including but not limited to the xenomouse
25 technology developed by Abgenix Inc. (U.S. Patent Nos. 6,075,181; 6,150,584) and the methods developed by Biovation, Bioinvent International AB, Protein Design Labs., Applied Molecular Evolution, Inc., ImmunGenics Pharmaceuticals

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-35-

Inc., Medarex, Inc., Cambridge Antibody Technology, Elan, Eos Biotechnology, MedImmune, MorphoSys or UroGensys Inc. Likewise, other methods known in the art to screen human antibody secreting cells to coiled-coil peptide antigens can also be utilized.

5

The formulation for the composition, comprising either a coiled-coil peptide or an antibody against a coiled-coil peptide, will vary depending on factors such as the administration route, the size and species of the animal to be administered, and the purpose of the administration. Suitable formulations for use in the present invention can be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

10

The following examples are offered to illustrate this invention and are not to be construed in any way as limiting the scope of the present invention.

15

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-36-

EXAMPLES

In the examples below, the following abbreviations have the following meanings. Abbreviations not defined have their generally accepted meanings.

	°C	=	degree Celsius
5	hr	=	hour
	min	=	minute
	μM	=	micromolar
	mM	=	millimolar
	M	=	molar
10	ml	=	milliliter
	μl	=	microliter
	mg	=	milligram
	μg	=	microgram
	rpm	=	revolutions per minute
15	ID	=	inner diameter
	TFE	=	trifluoroethanol
	EDT	=	ethane dithiol
	TFA	=	trifluoroacetic acid
	PBS	=	phosphate buffered saline
20	β-ME	=	β-mercaptoethanol
	DMSO	=	dimethylsulfoxide
	Nle	=	norleucine
	ELISA	=	enzyme linked immunosorbent assay
	HRP	=	horse radish peroxidase
25	TD	=	thymus dependent
	TT	=	tetanus toxoid
	KLH	=	keyhole limpet hemocyanin

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-37-

BSA = bovine serum albumin

The one letter code and the three letter code for amino acids used throughout this application are listed below:

5	
	A = Ala = Alanine
	C = Cys = Cysteine
	D = Asp = Aspartic Acid
	E = Glu = Glutamic Acid
10	F = Phe = Phenylalanine
	G = Gly = Glycine
	H = His = Histidine
	I = Ile = Isoleucine
	K = Lys = Lysine
15	L = Leu = Leucine
	M = Met = Methionine
	N = Asn = Asparagine
	P = Pro = Proline
	Q = Gln = Glutamine
20	R = Arg = Arginine
	S = Ser = Serine
	T = Thr = Threonine
	V = Val = Valine
	W = Try = Tryptophan
25	Y = Tyr = Tyrosine

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-38-

Materials and Methods

Peptide synthesis and purification

5 The peptide analogs were prepared by t-Boc chemistry on an Applied Biosystem 431 A peptide synthesizer. The peptide resin (700 mg) was cleaved with 10 mL of HF containing 10% anisole and 2.5% EDT for 1 h at 0-4°C. After removal of the HF the peptide/resin was transferred to a sintered glass funnel and washed with diethyl ether (2×50 mL) followed by glacial acetic acid (2×50 mL).
10 The acetic acid solution was then lyophilized. The crude peptide was taken up in 15 mL of water containing 0.05% TFA and 3mL acetic acid. After stirring and sonication, the mixture was transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and centrifuged at 13000 rpm. The supernatant was collected and filtered through a Millex GV 0.22 µm syringe filter. This solution was loaded onto a Zorbax RX-C8 (22.1 mm
15 ID×250 mm, 5 µm particle size) through a 5 mL injection loop at a flow rate of 3 mL/min. The purification was accomplished by running a linear AB gradient of 0.1% B/min where solvent A is 0.05% TFA in water and solvent B is 0.05% TFA in acetonitrile.

20 A linker and cysteine residue was incorporated to enable the strands of the coiled-coil to be linked together by a disulfide bond. The disulfide-bridged coiled-coils were formed by overnight air oxidation at room temperature of ~ 10 mg/mL peptide in 100 mM NH₄HCO₃, pH 8.5. All peptides were characterized by analytical HPLC and electrospray mass spectrometry, and protein concentrations
25 as well as amino acid composition were determined by amino acid analysis. Peptides were conjugated to the carrier protein tetanus toxoid rising the photoreactive reagent benzoylbenzoic acid which was coupled to the N-terminus of

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-39-

the peptide by conventional solid-phase chemistry described above. This photoaffinity probe is stable under the conditions of t-Boc chemistry. A norleucine residue is incorporated into the linker region of the peptide to enable the quantitation of the peptide attached to the carrier protein by means of amino acid analysis. To 10 mg of tetanus toxoid dissolved in 100 mm of NH_4HCO_3 pH 8.3 buffer was added 6 mg of peptide and the solution was irradiated for 1 h at a wavelength of 350 nm. To remove any unreacted peptide, the solution was transferred to a 15 mL dialysis cassette and dialyzed against 4 L of 20 mM NaH_2PO_4 pH 7.0 buffer. HPLC analysis of the dialysate was used to determine the amount of unreacted peptide present in the irradiated solution. The dialysis was deemed to be complete when residual peptide was less than 1% of the total area under the curve in the HPLC chromatogram.

CD spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectroscopy was performed using a Jasco J-500C spectropolarimeter (Jasco, Easton, Maryland) equipped with a Jasco DP-500N data processor. A 10-fold dilution of an ~500mM stock solution of the disulfide-linked peptide was loaded into a 0.02 cm fused silica cell and ellipticity scanned from 190 to 250 nm. Each disulfide-bridged analog was analyzed by CD spectroscopy under benign conditions (50 mM phosphate, 100 mM KCl, pH 7.0) and also in the presence of 50% TFE in the same buffer. A Lauda water bath (model RMS, Brinkmann Instruments, Rexdale, Ont.) was used to control the temperature of the cell. CD spectra were the average of four scans obtained by collecting data at 0.1 nm intervals from 250 to 190 nm.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-40-

HPLC

Analytical HPLC was performed on a Beckman System Gold HPLC equipped with a diode array detector. Analyses were performed on a Zorbax SB-C8 column (4.5 mm ID x 150, 3.5 μ m particle size). Mobile phases were A: deionized purified water (18 M Ω /cm) containing 0.05% trifluoroacetic acid and B: acetonitrile (HPLC grade, 99.99%) containing 0.05% TFA. HPLC operating conditions are listed below:

Flow rate	1 mL/min
Injection Volume	20 μ L
Detector Wavelength	215 nm
Gradient	2.5% B/min
Total run time	20 min
Integration Start Time	5 min
Minimum Area (Integration)	25000

15

Example 1 Construction of a synthetic pneumococcal immunogen

This Example illustrates the method of splicing the amino acid residues at the b, c, e, f or g positions of the coiled-coil structures of PspA into a synthetic immunogen. The Biotools software identified a number of coiled-coil motifs in PspA, including residues 153-170 and 181-198. As shown below, the a and d positions of these motifs are indicated in bold text while the solvent accessible amino acids are italicized. A space is inserted between the heptad repeats for clarity.

25

LEEAEKK <i>ATEAKQK</i> VDA	residues 153-168 of SEQ ID NO:1
AELENQ <i>VHRLEQE</i> LKEIDES	residues 181-198 of SEQ ID NO:1

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-41-

The solvent exposed residues are incorporated into the coiled-coil template with isoleucine and leucine at the a and d positions, respectively:

LEEAEKK ATEAKQK VDA 153-168
5 AELENQ VHRLEQE LKEIDES 181-198
+
CNleG-IXXLXXX IXXLXXX IXXLXXX IXXLXXX IXXLXXX
coiled-coil template
10 CNleG IEELEKK ITELKQK I-LENQ IHRLEQE IKELDES
- fill gap with aa from either sequence
CNleG IEELEKK ITELKQK IDALENQ IHRLEQE IKELDES
15 (test peptide; SEQ ID NO:3)

The peptide is synthesized as described in Materials and Methods. Also synthesized is a control peptide containing the native sequence instead of isoleucine and leucine at the a and d positions:

20 CNleG LEEAEKK ATEAKQK VDALENQ VHRLEQE LKEIDES
(native control; SEQ ID NO: 4)

The CD profile and helical stability of the peptides are determined as described in Materials and Methods. The results show that the test peptide exists in helical form even in benign buffer (50 mM KH_2PO_4 , 50 mM KCL, pH 7.0) in the absence of trifluoroethanol (TFE). By contrast, the native control needs the presence of TFE to form a helical structure. Similarly, the test peptide is much

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-42-

more stable than the native control when tested in a thermal denaturation experiment.

Example 2 A synthetic pneumococcal PspA peptide

5

A synthetic peptide was prepared based on epitopes from three different Pneumococcal surface proteins A (PspA). The three PspA proteins and their capsular serotype are as follows:

	<u>PspA Strain</u>	<u>Capsular Serotype</u>
10	BG 8743	23F
	EF5668	4
	BG8090	19F

15 These proteins were chosen because of the prevalence of these serotypes in pneumococcal infections (Kalin, 1998). B-cell epitopes, shown in Figure 4, were identified using the bioinformatics software Peptools (Edmonton, Alberta). The three epitopes were spliced together such that the coiled-coil repeat remained in register. A linker and cysteine residue was incorporated to enable the strands of the coiled-coil to be linked together by a disulfide bond.

20

The CD spectrum of the peptide is shown in Figure 5. In benign buffer (50 mM KH₂PO₄, 50 mM KCl, pH 7.0) the peptide adopts a conformation that is a mix of random coil and alpha helix. In the presence of 50% trifluoroethanol (TFE, which induces helical structure in peptides that have the propensity to fold
25 into an alpha helix), the peptide adopts a highly helical conformation. The helical content in benign buffer is 17% of that in 50% TFE, indicating that the peptide forms helices in a physiologically compatible solution without TFE. Therefore,

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-43-

the peptide may be used to elicit an immune response under physiological conditions.

5 **Example 3 Generation of a consensus coiled-coil sequence**

To date 40 partial and full sequences of pneumococcal surface protein A from various strains have been released to various sequence databases. Those proteins share a common architecture consisting of a leader sequence, a coiled-coil domain, a proline domain and a choline binding domain. Analysis of PspA sequences by the program MultiCoil (Wolf et al., 1997) indicates that the coiled-coil regions are broken up by sections which contain proline residues. Multiple sequence analysis using the software Biotoools indicates that the published sequences vary in similarity from 24.1% to 97%. However, certain regions of the helical domain of these proteins are remarkably similar, suggesting that these conserved regions are important to the function of the protein

A consensus sequence (Figure 6) was deduced from a conserved region which was shown to have antigenic activities. Complete and partial PspA sequences were downloaded from the National Library of Medicine PubMed web site into the bioinformatics software Peptools (Biotoools, Edmonton, Alberta). A total of 40 complete and partial sequences were transferred to the alignment module of the software and a consensus threshold was set to 65%. The consensus threshold defines the minimum residue plurality amongst a group of aligned sequences. In effect, the consensus threshold acts to filter out insignificant matches and highlights conserved residues within a sequence. This allows for easy identification of similarities by visual inspection.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-44-

The last 100 amino acids of the coiled-coil region were the focus of sequence similarities since this region has been shown previously to harbor cross reactive epitopes. Figure 6 illustrates the sequence alignment for residues found within this region. In particular, the alignment yielded a consensus sequence of
 5 EELX₁X₂KIDELDX₃EIAX₄LEKX₅ (SEQ ID NO:5), in which the putative a and d positions were selected to be isoleucine and leucine, respectively. Preferably, X₁ is S, Q, N or D; X₂ is D, N or K; X₃ is A or N; X₄ is K, E or D; and X₅ is N, D or E.

10 A sequence containing the first section of this consensus region, EELSDKIDELD (SEQ ID NO:6), was selected for antigenicity studies. The Ser and Asp residues were included into this sequence since these residues appear in the majority of sequences aligned.

15 A synthetic peptide containing EELSDKIDELD (SEQ ID NO:6) was made according to formula I of the present invention. Thus, an isoleucine was inserted at the N-terminus of the above sequence according to formula I and flanking sequences were added to increase the length of the peptide. The complete sequence of this peptide, CVX0270, is as follows, wherein the residues from the
 20 consensus sequence are highlighted in bold script:

Acetyl-CNleGEIEALKKKIE**EELSDKIDEL**KEIK-amide (SEQ ID NO:7)

The CD spectra were performed under benign conditions (50 mM
 25 KHEP04, 100 mM KCl, pH 7.0) and in aqueous buffer containing 50% TFE. The CD spectrum of peptide CVX0270 under benign conditions at 20 °C is shown in Figure 7. The CD spectra is typical of a helical peptide with minima at 222 nm

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-45-

and 209 nm and high positive ellipticity below 200 nm. Typically, the molar ellipticity at 222 nm ($[\theta]_{222}$) has been used to measure helical content in peptide. For peptide CVX0270 this corresponds to a value of -29800 which indicates that this peptide is predominantly α -helical. Theoretically, the $[\theta]_{222}$ value for a peptide of 27 residues is -33900 (Chen et al., 1974). Therefore peptide CVX0270 is 88 % helical. It should be noted that the linker region (Cys-Nle-Gly) is designed not to be helical and therefore decreases the $[\theta]_{222}$ signal. The ratio of the molar ellipticity at 222 and 208 ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$) is greater than 1.02 and similar to that observed before for coiled-coils (Hodges et al., 1988; Lau et al., 1984; Zhou et al., 1992) and distinctly different from non interacting α -helices in which the $[\theta]_{208}$ is greater than the $[\theta]_{222}$. In the presence of 50 % TFE, helical content increased slightly to 101 %. The data indicate that peptide CVX0270 is highly helical and found predominantly in the coiled-coil conformation under aqueous conditions.

In order to determine the stability of CVX0270, a thermal denaturation study was undertaken. Figure 8 shows the denaturation curve obtained by monitoring the $[\theta]_{222}$ as a function of temperature. The study indicates that peptide CVX0270 is very stable with the peptide exhibiting 77 % of its original helicity at 75 °C. The above results demonstrate that the coiled-coil forming sequence with isoleucine at a positions and leucine residues at d positions is sufficiently stable to house a helical epitope from another protein sequence.

25

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-46-

Example 4 Immunogenicity of Coiled-Coil Proteins

The peptide "Strep" (SEQ ID NO:7) as described in Example 3 was coupled to the protein carrier tetanus toxoid (TT) as described in Materials and Methods. Immunogenicity of this peptide was determined as follows.

Balb/c mice (6-8 weeks, female, Charles River) were immunized on day 0 (1° primary immunization), day 7 (2° secondary immunization), day 28 (3° tertiary immunization), and day 42 (boost) by intraperitoneal injection (100 μ L total, 50% Alhydrogel 2% adjuvant, Cedarlane, Catalog # SF2000-250) with Strep-tetanus toxoid (20, 10 or 5 μ g) and with unconjugated tetanus toxoid. These antigens were diluted to various doses in 0.9% NaCl and mice injected with 0.9% NaCl were used as negative controls. Mice were bled following the 1°, 2°, 3° and boost injections on days 6, 14, 35 and 49 to collect serum to assay for antibody titers (direct ELISA) and antibody isotype response (isotyping ELISA), determine antibody specificity (inhibition ELISA) and measure immunoprotective antibody responses (bactericidal/opsonization assays).

A typical immunization schedule is shown in Table 1. Various other immunization schedules and adjuvant formulations known in the art would also be effective. Various delivery methods including intravascular, intramuscular, intradermal, subcutaneous, oral, nasal and aerosol inhalation routes would also be effective.

25

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-47-

Table 1: BALB/c Mouse immunized I.P. - Strep-TT
Immunization Schedule

	Day	Procedure
5	0	Immunize i.p.
	6	Bleed
	7	Immunize i.p.
	14	Bleed
10	28	Immunize i.p.
	35	Bleed
	42	Immunize i.p.
	49	Cardiac Bleed

15

Study Groups:
(10 A.BY mice / group)

1. Strep-TT (20 μ g/mouse) + adjuvant
2. Strep-TT (10 μ g / mouse) + adjuvant
3. Strep-TT (5 μ g / mouse) + adjuvant
4. Tetanus toxoid (20 μ g/mouse) + adjuvant
5. PBS (without Alum)

30

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-48-

A. Determining Antibody Levels Elicited by Coiled-Coil Antigen Conjugates

The basic procedure to measure antibody levels is by the following direct ELISA protocol:

1. Coat EIA plates (COSTAR) with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (0.1 μg per well) of antigen in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6, 100 μL /well).
2. Incubate the plate(s) at 4°C. overnight.
3. On the next day, wash plates 3X with washing buffer (PBS / 0.05% Tween). Flick off excess liquid by tapping the plates on the bench top.
4. Block plates with 100 μL blocking buffer per well (PBS / 2% BSA). Incubate plates for 1 hour at 37°C.
5. Wash plates 5X with washing buffer (PBS / 0.05% Tween). Flick off excess liquid by tapping the plates on the bench top.
6. Add 100 μL per well of test antibody appropriately diluted in dilution buffer (PBS / 0.1% Tween). Incubate plates for 60 minutes at 37°C.
7. Wash plates 3X with washing buffer (PBS / 0.05% Tween). Flick off excess liquid by tapping the plates on the bench top.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-49-

8. Dilute HRP anti-mouse IgG (Jackson Lab) in dilution buffer (PBS / 0.1% Tween) to a concentration of 1:5000. Add 100 μ L per well and incubate at 37°C for 60 minutes.
- 5 9. Wash plates 3X with washing buffer (PBS / 0.05% Tween). Flick off excess liquid by tapping the plates on the bench top.
10. Prepare HRP substrate;
0.03% Hydrogen peroxide (30%) and 1 mM ABTS dissolved in 0.01 M Sodium citrate buffer (Sodium citrate (1.48 g) dissolve sodium citrate in 500 mL distilled H₂O. Citric acid (1.58 g) dissolve citric acid in 750 mL distilled H₂O. Pour citric acid solution into sodium citrate solution to get a pH 4.2). Add 100 μ L to each well and develop in a dark place for 30 minutes.
- 15 11. Read the absorbance with an ELISA plate reader at 405 nm at 30 minutes.

The mean O.D. ELISA readings obtained with antisera to the Strep-TT conjugates (20 μ g, 10 μ g and 5 μ g) is shown in Table 2. The Strep-TT conjugate at all three dose concentrations (20 μ g, 10 μ g and 5 μ g) elicited
20 significant antibody titers to the Strep (EIEALKKKIEELSDKIDELEKEIK) hapten. These antibodies were immunogen specific, as the unconjugated tetanus toxoid did not elicit any antibodies or cross-reactive antibodies to the coiled-coil Strep antigen.

25

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-50-

Table 2: ELISA Results of Mouse Serum Antibodies to the
Coiled-Coil Strep Antigen

5	Serum	Murine Sera (Day 49) (OD 405 nm, Strep-BSA coating antigen)				
	Dilutions	Strep-TT	Strep-TT	Strep-TT	TT*	PBS*
		(20 μ g)*	(10 μ g)*	(5 μ g)*		
	1:2000	3.75	3.71	3.86	0.11	0.01
	1:4000	3.57	3.60	3.61	0.04	0.00
10	1:8000	2.48	2.66	2.60	0.01	0.00
	1:16000	1.14	1.59	1.50	0.06	0.00
	1:32000	0.76	0.84	0.95	0.00	0.00
	1:64000	0.36	0.42	0.41	0.00	0.00
	1:128000	0.18	0.23	0.22	0.00	0.00
15	1:256000	0.04	0.10	0.12	0.00	0.00

* mice were i.p. injected on day 0, 7, 28 and 42 with Strep-TT +
adjuvant, TT + adjuvant or PBS. Sera were collected on day 49.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-51-

B. Determining Antibody Isotype Levels Elicited by Coiled-Coil Antigen Conjugates

5 The basic procedure to measure antibody isotype levels is as follows to quantify IgM, IgG, and IgA isotypes elicited by coil-coiled antigen conjugates.

1. Coat EIA plates (COSTAR) with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (0.1 μg per well) of antigen in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6, 100 $\mu\text{L/well}$.
10
2. Incubate the plate(s) at 4°C overnight.
3. On the next day, wash plates 3X with washing buffer (PBS / 0.05% Tween). Flick off excess liquid by tapping the plates on the bench top.
15
4. Block plates with 100 μL blocking buffer per well (PBS / 2% BSA). Incubate plates for 1 hour at 37°C.
5. Wash plates 5X with washing buffer (PBS / 0.05% Tween). Flick off excess
20 liquid by tapping the plates on the bench top.
6. Prepare 1:250 dilution mouse serum in the working buffer (PBS / 0.1% Tween). Add 100 $\mu\text{L/well}$ into the appropriate well. Incubate plates for 1 hour at 37°C.
25
7. Wash plates 3X with washing buffer (PBS / 0.05% Tween). Flick off excess liquid by tapping the plates on the bench top.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-52-

8. Dilute HRP-labeled detection antibodies (Southern Biotechnology Associates Inc.), add 100 μ L/well into the appropriate well. Incubate plates for 1 hour at 37°C.
9. Wash plates 3X with washing buffer (PBS / 0.05% Tween). Flick off excess liquid by tapping the plates on the bench top.
10. Prepare HRP substrate;
0.03% Hydrogen peroxide (30%) and 1mM ABTS dissolved in 0.01 M Sodium citrate buffer (Sodium citrate (1.48 g) dissolve sodium citrate in 500 mL distilled H₂O. Citric acid (1.58 g) dissolve citric acid in 750 mL distilled H₂O. Pour citric acid solution into sodium citrate solution to get a pH 4.2). Add 100 μ L to each well and develop in a dark place for 30 minutes.
11. Read the absorbance with an ELISA plate reader at 405 nm at 30 minutes.

The IgG antibody isotype response to the Strep-TT coiled-coil antigen is shown in Table 3. These results demonstrate the presence of significant IgG1 antibody levels to the Strep coiled-coil antigen after secondary immunization. A significant IgG isotype switch from IgG1 to IgG_{2a}, IgG_{2b}, and IgG₃ was seen after the booster injection (Day 49 bleed). The observed IgG antibody maturation to the coiled-coil Strep antigen is typical of a TD response.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-53-

Table 3: Isotyping ELISA of Mouse Serum Antibodies to the Coiled-Coil Strep
Antigen

5 DAY 6

	Antiserum to:*	Isotypes (O.D. 405 nm)			
		IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
10	Strep-TT (20 µg)	0.14	0.01	0.04	0.04
	Strep-TT (10 µg)	0.12	0.01	0.03	0.04
	Strep-TT (5 µg)	0.14	0.05	0.08	0.10
	TT (20 µg)	0.06	0.02	0.01	0.01
	PBS	0.03	0.00	0.00	0.01

15 * mice were i.p. injected on day 0 with Strep-TT + adjuvant, TT +
adjuvant or PBS. Sera were collected on day 6.

DAY 14

	Antiserum to:*	Isotypes (O.D. 405 nm)			
		IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
20	Strep-TT (20 µg)	2.00	0.71	0.95	1.08
	Strep-TT (10 µg)	1.84	0.91	1.01	2.22
	Strep-TT (5 µg)	1.69	0.62	0.95	1.23
	TT (20 µg)	0.05	0.00	0.00	0.01
	PBS	0.03	0.00	0.00	0.00

25 * mice were i.p. injected on day 0 and 7 with Strep-TT + adjuvant,
TT + adjuvant or PBS. Sera were collected on day 14

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-54-

Day 35

	Antiserum to:*	Isotypes (O.D. 405 nm)			
		IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
5	Strep-TT (20 µg)	2.24	0.40	0.49	0.45
	Strep-TT (10 µg)	2.07	0.56	0.59	1.00
	Strep-TT (5 µg)	2.16	0.60	0.76	0.75
	TT (20 µg)	0.08	0.01	0.01	0.01
	PBS	0.01	0.00	0.00	0.01

10 * mice were i.p. injected on day 0, 7 and 28 with Strep-TT +
adjuvant, TT + adjuvant or PBS. Sera were collected on day 35.

Day 49

	Antiserum to:*	Isotypes (O.D. 405 nm)			
		IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
15	Strep-TT (20 µg)	3.91	1.14	1.28	0.74
	Strep-TT (10 µg)	3.85	1.35	2.01	1.28
	Strep-TT (5 µg)	3.88	2.10	2.96	0.82
20	TT (20 µg)	0.44	0.03	0.02	0.05
	PBS	0.01	0.01	0.01	0.02

* mice were i.p. injected on day 0, 7, 28 and 42 with Strep-TT +
adjuvant, TT + adjuvant or PBS. Sera were collected on day 49.

25

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-55-

C. Determining Antibody Binding in Competition with Coiled-Coil
Antigen Conjugates or Free Peptides

5 The specificity of the antisera was further examined by inhibition
ELISA using peptides with or without a coiled-coil structure. The
protocol for this inhibition ELISA is as follows:

- 10 1. Dilute the coating antigen to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (0.1 μg per well) in
carbonate-bicarbonate buffer. Use glass tubes.
2. Add 100 μL of the coating antigen to each well of the plate.
Store the plate(s) overnight at 4°C.
- 15 3. Shake out the wells and tap upside-down onto Kimwipes.
Wash plate three times with ~200 μL wash buffer (PBS / 0.05 %
Tween)(v/v) per well.
4. Add 200 μL blocking buffer per well (PBS / 2 % BSA)(w/v).
20 Incubate plates for 60 minutes at 37°C.
5. Shake out the wells and tap upside-down onto Kimwipes.
Wash plate five times with ~200 μL wash buffer (PBS / 0.05 %
Tween)(v/v) per well.

25

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-56-

6. Add 50 μ L of selected competitive conjugates or free peptides appropriately diluted in dilution buffer (PBS / 0.1% Tween)(v/v). (NOTE: the competitive peptide has a x2 concentration in 50 μ L).
- 5 7. Added 50 μ L per well of test antibody appropriately diluted in dilution buffer (PBS / 0.1% Tween)(v/v). (NOTE: the test antibody has a x2 concentration in 50 μ L). The final volume in each well was 100 μ L.
- 10 8. Incubate plates for 60 minutes at 37°C with slow shaking on a ELISA shaker.
9. Shake out the wells and tap upside-down onto Kimwipes. Wash plate three times with ~200 μ L wash buffer (PBS / 0.05% Tween)(v/v) per well. Dilute Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG
15 in dilution buffer (PBS / 0.1% Tween)(v/v) to a concentration of 1:5000. Add 100 μ L per well and incubate at 37°C for 60 minutes.
10. Shake out the wells and tap upside-down onto Kimwipes.
20 Wash plate three times with ~200 μ L wash buffer (PBS / 0.05% Tween)(v/v) per well.
11. Prepare HRP substrate;
0.03% Hydrogen peroxide (30%) and 1mM ABTS dissolved in
25 0.01M Sodium citrate buffer (Sodium citrate (1.48 g) dissolve sodium citrate in 500 mL distilled H₂O. Citric acid (1.58 g) dissolve citric acid in 750 mL distilled H₂O. Pour citric acid solution into sodium

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-57-

citrate solution to get a pH 4.2).. Add 100 μ L to each well and develop in a dark place for 30 minutes

12. Read the absorbance with an ELISA plate reader at 405 nm at 30 minutes.

The sequences of the Strep #1, #2 and #3 free peptides used in this inhibition assay are:

Strep #1: Coiled-coil Strep antigen with lactams
EIEALKKKIEELSDKIDELEKEIK

Strep #2: Single stranded Strep antigen with lactams
EEESDKKDEEDAEKAE

Strep #3: Coiled coil Strep antigen
EIEALKKKIEELSDKIDELEKEIK

The residues that make up the lactam bridges are highlighted in a bold font. The lactams are formed by reacting the carboxylic acid side chains of glutamic acids residues with the side chain amino groups of lysine residues. These lactams stabilize α -helices and coiled coils when they are situated 4 residues apart and when they are oriented in the glutamic acid to lysine direction.

The epitope is highlighted in italicized script. From all three sequences it can be seen that the epitope begins with two glutamic acid residues (EE)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-58-

followed by a leucine residue (L). In the case of the single stranded peptide the leucine residue is replaced by a glutamic acid (E) residue which is part of the lactam bridge. The epitope continues with SKD followed by an isoleucine (I) in the coiled-coils and the lysine residue (K) which is involved in the lactam bridge in the single stranded peptide. The final two residues of the epitope are DE.

Table 4 shows the inhibition ELISA results of anti-Strep serum using 3 different Strep peptides, the Strep-TT immunogen, TT and BSA. The Strep #3 peptide (peptide used as the immunogen) showed significant inhibition, the Strep #2 peptide (linear peptide, which has low helical content) showed no inhibition. Therefore, it would seem that the immunogen Strep-TT elicited antibodies which recognize conformational (or 3D) epitope structures. The Strep-TT immunogen did not elicit antibodies to the linear epitope. These results therefore suggest that coiled-coil antigens elicit antibodies which recognize conformational epitopes. Inhibition was also seen with Strep #1 peptide, which peptide contains lactam bridges which adds further stability to the coiled-coil antigen.

20

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-59-

Table 4: Inhibition ELISA of Anti-Strep.(1:25,000 dilution, Day
49) Using Various Strep Antigen Inhibitors

Conc. (μ g per 100 μ L)	Anti-Strep.-T.T. (20 μ g Dose)					
	O.D. 405 nm					
	Strep. #1	Strep. #2	Strep. #3	Strep.- T.T.	T.T.	BSA
10	0.663	1.266	0.110	0.028	1.342	1.399
5	0.720	1.186	0.143	0.026	1.051	1.485
2.5	0.823	1.173	0.254	0.056	1.412	1.435
1	0.959	1.164	0.555	0.094	1.457	1.442
0.5	1.081	1.144	0.776	0.109	1.564	1.187
0.25	1.237	1.251	1.036	0.165	1.638	1.510

Conc. (μ g per 100 μ L)	Anti-Strep.-T.T. (10 μ g Dose)					
	O.D. 405 nm					
	Strep. #1	Strep. #2	Strep. #3	Strep.- T.T.	T.T.	BSA
10	0.941	1.210	0.055	0.010	1.820	1.784
5	0.917	1.258	0.233	0.010	1.521	1.790
2.5	0.963	1.232	0.269	0.015	1.726	1.765
1	1.129	1.312	0.619	0.065	1.802	1.670
0.5	1.256	1.293	0.872	0.068	1.800	1.422
0.25	1.340	1.279	1.123	0.113	1.871	1.845

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-60-

	Conc. (μ g per 100 μ L)	Anti-Strep.-T.T. (5 μ g Dose)					
		O.D. 405 nm					
		Strep. #1	Strep. #2	Strep. #3	Strep.- T.T.	T.T.	BSA
5	10	0.872	1.294	0.009	0.000	1.803	1.740
	5	0.960	1.318	0.090	0.000	1.109	1.571
10	2.5	1.087	1.233	0.213	0.000	1.822	1.761
	1	1.125	1.322	0.501	0.053	1.797	1.572
	0.5	1.289	1.377	0.746	0.064	1.836	1.717
	0.25	1.388	1.303	1.001	0.107	1.925	1.786

15

Strep. #1 = Coiled-coil + lactam bridges

Strep. #2 = Linear sequence

Strep. #3 = SEQ ID NO:7

20

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-61-

D. Bactericidal and Opsonization Assays to Measure Immunoprotective
Antibodies Elicited by Coil-Coiled Antigen Conjugates

5 The basic bactericidal and opsonization assays used are as follows:

Bactericidal Assay

1. Streak an agar plate with desired gram positive bacteria procured from various
culture collections (ATCC). Incubate at 37°C overnight.
- 10 2. On the next day, pick an isolated colony and inoculate it in 1.0 ml of Todd-
Hewitt Broth (THB) + Yeast Extraction (YE) media in a sterile test tube.
Incubate at 37°C overnight.
- 15 3. On the following day, measure O.D. of inoculated bacteria at 420 nm
wavelength. Use THB+YE media as blank.
4. To a sterile flat bottom 96-well plate, add a sterile 2.5 mm glass bead in each
well.
- 20 5. To each well, add:
5 µL of bacteria
10 µL of mouse serum to be tested
incubate at 37°C for 1 hour.
- 25 NOTE: Step 5 and 6 are done in triplicate.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-62-

6. After 1 hour incubation, prepare 1:20 dilution exogenous complement (Low-Tox guinea pig Complement, Cedarlane) sterilely in THB+YE. Add 50 μ L/well. Incubate at 37°C for 1 hour.
- 5 7. After complement incubation, 50 μ L aliquot is plated out on agar plates using glass spreader.
8. Wrap all agar plates in plastic bags and incubate at 37°C. overnight.
- 10 9. On the next day, count colony forming units (CFU).

Opsonization Assay

- 15 1. Streak an agar plate with desired gram positive bacteria procured from various culture collections (ATCC). Incubate at 37°C overnight.
2. On the next day, pick an isolated colony and inoculate it in 1.0 ml of Todd-Hewitt Broth (THB) + Yeast Extraction (YE) media in a sterile test
20 tube. Incubate at 37°C overnight.
3. The next day prepare 100 U/ml of sterile heparin.
4. I.V. inject 100 μ L of sterile heparin into tail vein of each mouse (5-10).
25 After 10 minutes, cardiac bleed mice into a sterile tube.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-63-

5. Measure O.D. of inoculated bacteria at 420 nm wavelength. Use THB+YE media as blank.
 6. To a sterile flat bottom 96-well plate, add a sterile 2.5 mm glass bead in each well.
 7. To each well, add:
 - 50 μ L of heparinized blood
 - 10 μ L of mouse serum to be tested
 - 5 μ L of bacteriaincubate at 37°C for 1 hour.
NOTE: Do this step in triplicate.
 8. After 1 hour incubation, prepare 1:20 dilution exogenous complement (Low-Tox guinea pig Complement, Cedarlane) sterilely in distilled water. Add 50 μ L/well. Incubate at 37°C for 1 hour on a shaker (slow motion).
 9. After one hour, 100 μ L aliquot is plated out on agar plates using glass spreader.
 10. Wrap all agar plates in plastic bags and incubate at 37°C overnight.
 11. On the next day, count colony forming units (CFU).
- Sera from mice immunized with the Strep-TT conjugates (20, 10, 5 μ g doses) were found to be immunoprotective as measured by the opsonization assay.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-64-

Antisera to Strep-TT showed reduction in colony forming units of representative *Streptococcus pneumoniae* serotypes (1, 3, and 5). Little or no reduction in colony forming units was seen with sera from mice injected with tetanus toxoid or with PBS. The Strep-TT conjugate elicited immunoprotective antibodies to coiled-coil antigens of *S. pneumoniae*.

Table 5: Opsonization Results of Antiserum to Strep-TT (Day 49) using *Streptococcus pneumoniae* serotypes (1, 3 and 5)

Antiserum to:	Percent Reduction of CFU		
	Type 1	Type 3	Type 5
Strep-TT (20 μ g)	58	49	45
Strep-TT (10 μ g)	22	50	24
Strep-TT (5 μ g)	30	48	24
TT	7	6	7
PBS	0	0	1

WO 01/46368

PCT/US01/19168

-65-

Appendix 1

5

Analysis of immunogenic regions of PspA proteins from *S. pneumoniae* strain Rx1. Immunogenic regions are indicated by asterisks underneath the sequence.

WO 01/46368

PCT/US01/19168

-66-

Name: PspA Rxl
Organism: *S. pneumoniae*

	10	20	30	40	50	
1	EESPVALSQSKAEKDYDAKKDAKNKAKVEDAQKALDDAKAAQKKYDEEQ					50
	5*****					52
	3*****					29*****
	10	20	30	40	50	
51	KKEEKAALKKAASEEMDKAVAVQQAYLAYQQATDKAAKDAADKMIDEA					100
	***** 66***** 73*****					78**
	10	20	30	40	50	
101	KKREBEAKTKFNTVRAMVVPEPEQLAETKKKSEAKQKAPELTKKLEBAK					150
	91***** 95***** 123*****					
	**** 101**** 122*****					
	89***** 116*****					
	10	20	30	40	50	
151	AKLEEAEEKKATEAKQKVDABEVPQAKIAELENOVHRLEQELKEIDSES					200
	133***** 140***** 149***					
	130***** 145*****					
	10	20	30	40	50	
201	EDYAKEGFRAPLQSKLDKAKKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEDQLKAA					250
	* 168*****					
	166***** 1					
	10	20	30	40	50	
251	EENNNVEDYFREGLEKTIAAKKAELEKTEADLKAVNEPEKPPAPAPETPA					300
	179***** 185***** 195***** 206*****					
	76**** 182*****					
	10	20	30	40	50	
301	PEAPAEQPKPPAPAPQPPAPAPKPEKPAPAEQPKPEKTDQQAEDYARRSEEE					350

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-67-

	10	20	30	40	50	
351	YNRLTQQQPPKAEKFPAPKPTGK(QENGMYFYNTDGS	MTGWLQNGSW				400
	10	20	30	40	50	
401	YYLNSNGAMATGWLQNGSWYYLNGAMATGWAKVNGSWYYLNGAMA					450
	10	20	30	40	50	
451	TGWLQNGSWYYLNGAMATGWAKVNGSWYYLNGAMATGWLQNGSW					500
	10	20	30	40	50	
501	YYLNGAMATGWAKVNGSWYYLNGAMATGWVKDGTWYYLEASGAMK					550
	10	20	30	40	50	
551	ASQWFKVSDKWYYVNLGALAVNTTVDGYKVNANGWV					588

Motif #: 3 Range: 6 - 13
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 5 Range: 8 - 15
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 29 Range: 42 - 49
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST]

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-63-

ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 52 Range: 49 - 56
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 66 Range: 63 - 70
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 73 Range: 81 - 88
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 78 Range: 97 - 104
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 89 Range: 104 - 111
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 91 Range: 107 - 114
 Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

WO 01/96368

PCT/US01/9168

-69-

Motif #: 95 Range: 119 - 125
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 101 Range: 127 - 133
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 116 Range: 132 - 139
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 122 Range: 139 - 146
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 123 Range: 142 - 149
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 130 Range: 153 - 160
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

Motif #: 133 Range: 160 - 167
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-70-

Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 140 Range: 181 - 188
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQR
 ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 145 Range: 192 - 199
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQR
 ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 148 Range: 195 - 201
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRS
 T][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 166 Range: 226 - 233
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQR
 ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 168 Range: 229 - 236
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQR
 ST][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 176 Range: 250 - 256
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRS
 T][DEHGKNPQRST]*
 Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
 Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
 Motif #: 179 Range: 252 - 259
 Motif: *[DEGHKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQR

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-71-

ST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
Motif #: 182 Range: 260 - 267
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQR
ST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
Motif #: 185 Range: 261 - 268
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST]*[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQR
ST][DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
Motif #: 195 Range: 275 - 282
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRS
T]*[DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN
Motif #: 206 Range: 288 - 295
Motif: *[DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRST][DEHGKNPQRS
T]*[DEHGKNPQRST]*
Ref.: WISHART, D.S. UNPUBLISHED
Name: GENERALIZED B CELL EPITOPE PATTERN

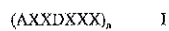
WO 01/96368

PCT/US01/19168

-72-

We claim:

1. A synthetic peptide of the formula I:



wherein

- 5 A is Ile, Leu, Val or a derivative thereof;
 D is Leu, Ile, Val or a derivative thereof;
 each X is an amino acid residue or derivative thereof which
 corresponds to an amino acid residue of an epitope of a native
 coiled-coil protein;
- 10 the X residues in each (AXDXDX) repeat form a set of X residues; and
 n is equal to or greater than 1.
2. The peptide of Claim 1 wherein A is Ile and D is Leu in every
 (AXDXDX) repeat.
- 15 3. The peptide of Claim 1 wherein n is about 3 to 6.
4. The peptide of Claim 1 wherein said X residues are amino acids that are
 solvent exposed in an coiled-coil region of the native protein.
- 20 5. The peptide of Claim 1 wherein each of said sets of X residues is from the
 same epitope of a single protein.
6. The peptide of Claim 1 which contains at least two different sets of X
25 residues.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-73-

7. The peptide of Claim 6 wherein each of said different sets is independently selected from the group consisting of different epitopes of the same protein and epitopes from different proteins.
8. The peptide of Claim 1 which further comprises additional amino acids at the C-terminus and/or N-terminus of the peptide.
9. The peptide of Claim 8 wherein said additional amino acid residues are CNIcG at the N-terminus of the peptide.
10. The peptide of Claim 1 wherein the set of X residues correspond to a consensus sequence of solvent exposed residues of native coiled-coil proteins.
11. The peptide of Claim 10 wherein the coiled-coil proteins are selected from the group consisting of Pneumococcal surface protein A, Pneumococcal surface protein C, and Pneumococcal adhesin A.
12. The peptide of Claim 11 wherein the peptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of EELX₁X₂KIDELDX₃EIAAX₄LEKX₅ (SEQ ID NO:5) and EELX₁X₂KIDELD (1-11 of SEQ ID NO:5), wherein X₁, X₂, X₃, X₄ or X₅ is any amino acid.
13. The peptide of Claim 12 wherein
 - X₁ is S, Q, N or D;
 - X₂ is D, N or K;
 - X₃ is A or N;

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-74-

X₄ is K, E or D; and

X₅ is N, D or E.

14. A synthetic peptide of the formula I:

5 (AXXDXXX)_n I

wherein

A is Ile, Leu, Val or a derivative thereof;

D is Leu, Ile, Val or a derivative thereof;

10 each X is an amino acid residue or derivative thereof which corresponds to an amino acid residue of an epitope of a native coiled-coil protein, except at least one X is replaced with a charged amino acid residue in a manner which allows a salt bridge to form between the charged amino acid and another amino acid residue of an opposite charge, which salt bridge facilitates the peptide to

15 assume a coiled-coil structure;

the X residues in each (AXXDXXX) repeat form a set of X residues; and n is equal to or greater than 1.

15. A peptide of Claim 14 wherein the charged amino acid is selected from the group consisting of Asp, Glu, Lys, Arg and His.

20

16. A method of making a peptide of the formula I comprising:

a) selecting an epitope of a coiled-coil protein;

b) determining which amino acid residues of said epitope are solvent exposed;

25 and

c) inserting said solvent exposed amino acid residues into the X positions of formula I.

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-75-

17. The method of Claim 16 wherein the coiled-coil protein is a microbial protein.
- 5 18. The method of Claim 16 wherein the selection of epitopes is performed using a computer algorithm.
19. The method of Claim 16 wherein more than one set of epitopic amino acids is used.
- 10 20. The method of Claim 19 wherein each of said sets is independently selected from the group consisting of different epitopes of the same protein and epitopes from different proteins.
- 15 21. A composition useful to stimulate an immune response in an animal, said composition comprising at least one peptide of formula I.
22. The composition of Claim 21 wherein the peptide of formula I is conjugated to a carrier protein.
- 20 23. The composition of Claim 21 further comprising an adjuvant.
24. The composition of Claim 21 which contains at least two different sets of X residues.
- 25

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-76-

25. The composition of Claim 24 wherein each of said different sets is independently selected from the group consisting of different epitopes of the same protein and epitopes from different proteins.
- 5 26. The composition of Claim 24 which is useful to stimulate an immune response to more than one strain and/or species of microorganism.
27. A method of eliciting an immune response in an animal, comprising administering a peptide of the formula I to said animal.
- 10 28. An antibody which recognizes a peptide of the formula I.
29. The antibody of Claim 28 wherein the peptide of the formula I contains solvent exposed amino acids from a microbial protein.
- 15 30. The antibody of Claim 28 which binds to more than one strain and/or species of microorganism.
31. The antibody of Claim 28 which is polyclonal or monoclonal.
- 20 32. A pharmaceutical composition comprising an antibody according to Claim 28.
33. The composition of Claim 32 which further comprises a pharmaceutically acceptable excipient or carrier.
- 25

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-77-

34. An antibody produced by administering a peptide of the formula I to an animal so as to stimulate an immune response.
35. A composition useful as a vaccine, wherein said composition comprises a peptide of formula I.
36. The composition of Claim 35 wherein more than one set of epitopic amino acids is used in the peptide of formula I.
37. The composition of Claim 36 wherein the sets of epitopic amino acids are from different strains and/or species of microorganism.
38. The composition of Claim 35 which provides cross protection to more than one strain and/or species of microorganism.
39. The composition of Claim 36 which provides cross protection to more than one strain and/or species of microorganism.
40. The composition of Claim 37 which provides cross protection to more than one strain and/or species of microorganism.
41. The composition of Claim 35 which further comprises a pharmaceutically acceptable excipient or carrier.
42. A method of preventing a microbial infection comprising administering to a mammal susceptible to said infection a peptide of formula I.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-78-

43. The method of Claim 42 wherein more than one set of epitopic amino acids is used in the peptide of formula I and the sets of epitopic amino acids are from different strains and/or species of microorganism.
- 5 44. The method of Claim 42 which is useful to prevent infection by several strains and/or species of microorganism.
45. The method of Claim 43 which is useful to prevent infection by several strains and/or species of microorganism.
- 10 46. A method of treating or preventing microbial infection in an animal susceptible to or suffering from such infection, comprising administering to said animal an effective amount of an antibody to a microbial protein, wherein said antibody is produced by administering a peptide of formula I to an animal.
- 15 47. The method of Claim 46 which prevents symptoms of infection in said animal.
- 20 48. The method of Claim 46 which is useful to treat or prevent infection by several strains and/or species of microorganism.
49. A method of determining the presence of a particular microorganism in a sample comprising:
- 25 a) contacting the sample with an antibody to a peptide of formula I which peptide comprises epitopes from the particular microorganism; and

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-79-

- b) determining whether said antibody binds to a component of said sample.
50. The method of Claim 49 wherein the sample is a biological sample.
51. The method of Claim 49 which is used to determine the causative agent of a microbial infection.
52. The method of Claim 51 which is used to simultaneously detect the presence of several strains and/or species of microorganism in the sample.
53. The method of Claim 50 which is used to simultaneously detect the presence of several strains and/or species of microorganism in the sample.
54. The method of Claim 51 which is used to simultaneously detect the presence of several strains and/or species of microorganism in the sample.
55. A method for determining the presence of antibodies to a microbial protein in a biological sample, comprising:
- a) contacting said biological sample with a peptide of formula I, which peptide comprises at least one epitope from said microbial protein; and
- b) determining whether antibodies in said biological sample bind to said peptide.
56. The method of Claim 55 which is used to determine prior exposure of an animal to a particular microorganism.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

-80-

Patent
Attorney Docket No. 003592-007

57. The protein of Claim 8 wherein the additional amino acids stabilize the peptide through the formation of lactam bridges.

5

10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

1/8

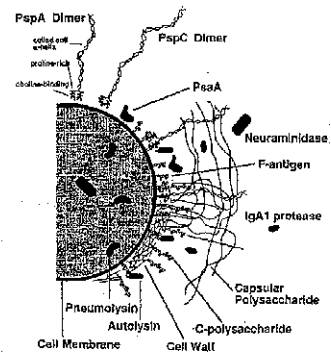


Figure 1

WO 01/96368

PCT/US01/19168

2/8

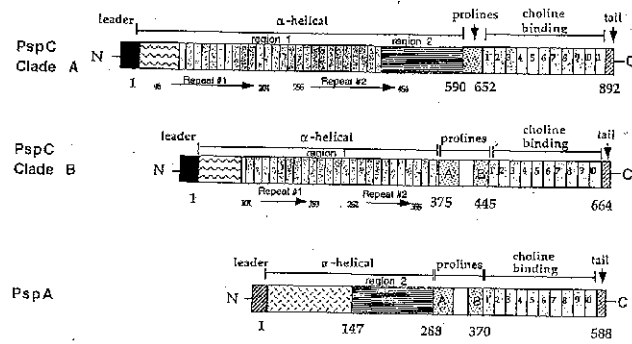


Figure 2

WO 01/96368

PCT/US01/19168

3/8

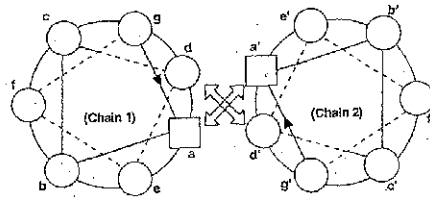


Figure 3

WO 01/96368

PCT/US01/19168

4/8

1. Identify Potential epitopes in PspA from Clinically Revelant Strains

Strain BG 8743 (Sterotype 23F)
 defgabcdefgabcdefgab
 LEKDVEDFKNSDGEQAEQVL (SEQ ID NO: 10)
 Residues 290-301

Strain EF5668 (Sterotype 4)
 defgabcdefgabcde
 LEDNLKDAETNNVED (SEQ ID NO: 11)
 Residues 330-344

Strain BG 8090 (Sterotype 19F)
 defgabcdef
 LAKKQTELEK (SEQ ID NO: 12)
 Residues 267-276

2. Splice Epitopes Together

DVEDFKNSDGELEDNLKDAETNNVEDAKKQTELEK (SEQ ID NO:
 13)

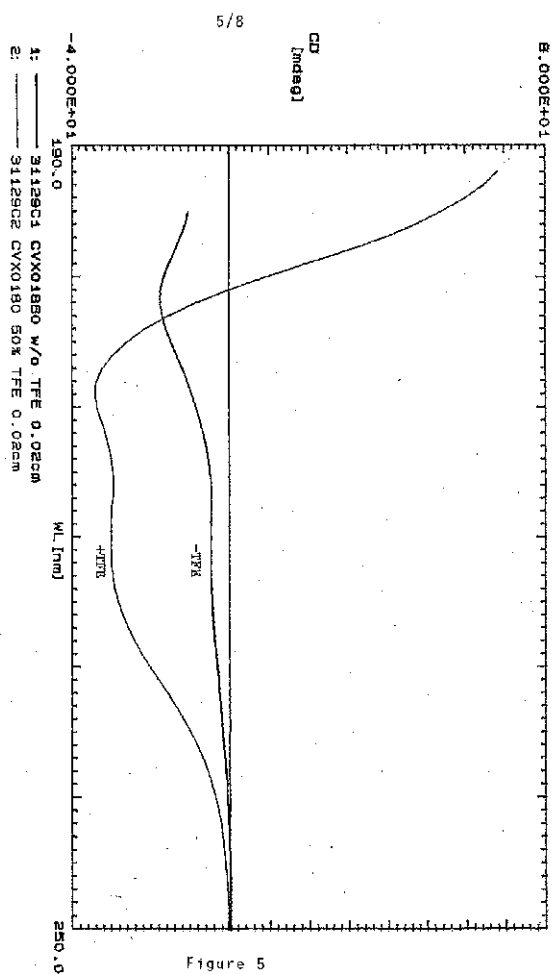
3. Replace a and d Positions (underlined)

DIEDLKNSIGLELEDNIKELETNIVELAKKITELEK (SEQ ID NO:
 14)

Figure 4

WO 01/96368

PCT/US01/19168



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/46368

PCT/US01/19168

5/8

Consensus	--E--L--KIDELD-EIA-LEK-V--E--K--E--E-Y--	79
BG6692	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--N--G--E--Q--A--Q--Y--R	299
Strain 23	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--N--G--E--Q--A--Q--Y--R	135
Strain SP	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Y--S--A--Q--Y--L	135
Strain SP	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Y--S--A--Q--Y--L	135
BG6838	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--N--G--E--Q--A--Q--Y--R	299
Strain 13	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--N--G--E--Q--A--Q--Y--R	95
Strain SP	--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	127
Strain 18	--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	98
BG6743	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	307
Strain 16	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	143
Strain 90	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	121
Strain 13	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	120
Strain 11	--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	86
Strain 43	--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	99
Strain 23	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	84
BG11703	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	366
BG7817	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	366
Strain 18	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	122
BG9739	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	283
L81905	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	283
PspA AC94	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--G--G--Y--S--A--Q--Y--L	280
Strain 15	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	145
ATCC6303	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	348
BG7561	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	366
Strain 23	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	133
Strain 18	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	135
SP 222	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	127
BG9163	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	297
BF6796	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	296
BG8090	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	414
EF3296	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	413
Rx1	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	261
DBL1	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	283
EF5668	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	347
Wu2	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	290
EF10197	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	282
PspA AC12	--A--A--A--A--L--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	321
DBL5	--S--D--K--I--D--E--D--A--T--A--K--E--K--V--E--D--F--K--N--S--D--E--Q--A--Q--Y--L	284
DBL6A	--E--D--E--R--N--Y--P--T--N--T--Y--K--T--D--E--E--S--D--V--K--R--L--E--L--V--K--E--E--A--K--E--S--R--K--E--K--V--K	366
BG6380	--G--E--T--L--I--L--A--I--Q--N--K--V--A--L--E--N--K--V--A--L--E--D--E--K--E--T--R--L--Q--S--D--L--K--D--A--E--N--N--V--E--D--Y--K	303

Figure 6

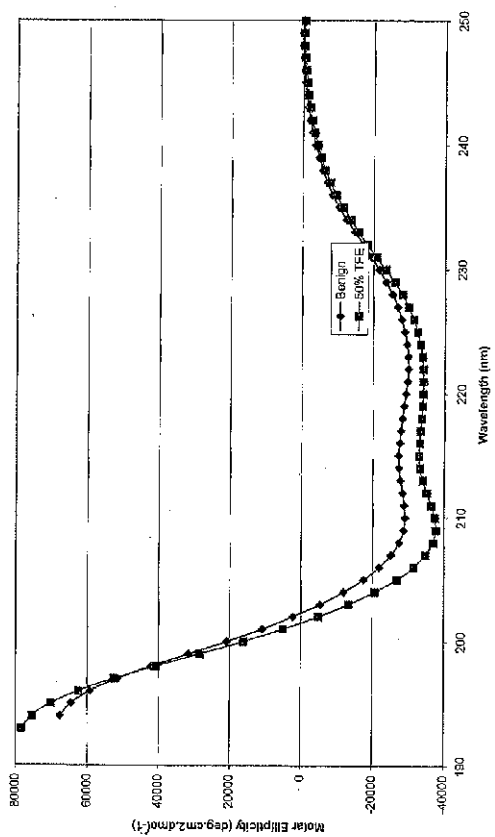
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

7/8

Figure 7: CD Spectrum of CVX0270



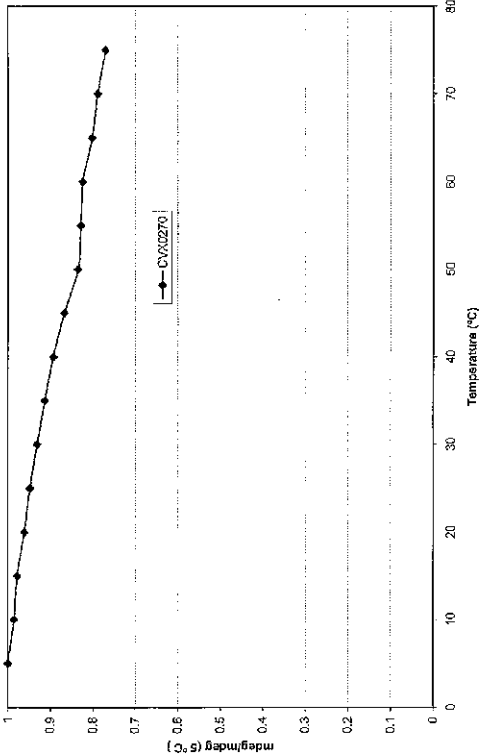
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

8/8

Figure 8: Thermal Denaturation of Peptide CVX0270



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96368

PCT/US01/19168

SEQUENCE LISTING

<110> Houston, Michael E.
 Hodges, Robert
 <120> Use of Coiled-Coil Structural Scaffold to Generate
 Structure-Specific Peptides
 <130> 003592-007
 <150> US 60/211,892
 <151> 2000-06-14
 <150> US 60/213,387
 <151> 2000-06-23
 <160> 16
 <170> PatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 619
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae
 <400> 1
 Met Asn Lys Lys Lys Met Ile Leu Thr Ser Leu Ala Ser Val Ala Ile
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Gly Phe Val Ala Ser Gln Pro Thr Val Val Arg Ala Glu
 20 25 30
 Glu Ser Pro Val Ala Ser Gln Ser Lys Ala Glu Lys Asp Tyr Asp Ala
 35 40 45
 Ala Lys Lys Asp Ala Lys Asn Ala Lys Lys Ala Val Glu Asp Ala Gln
 50 55 60
 Lys Ala Leu Asp Asp Ala Lys Ala Ala Gln Lys Lys Tyr Asp Glu Asp
 65 70 75 80
 Gln Lys Lys Thr Glu Glu Lys Ala Ala Leu Glu Lys Ala Ala Ser Glu
 85 90 95
 Glu Met Asp Lys Ala Val Ala Ala Val Gln Gln Ala Tyr Leu Ala Tyr
 100 105 110

WO 01/96368

PCT/US01/19168

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

WO 01/96368

PCT/US01/19168

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

WO 01/96368

PCT/US01/19168

```

<210> 2
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> stabilizing strand

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> Nle

<400> 2
Cys Xaa Gly Gly Gly Glu Ile Glu Ala Leu Lys Lys Glu Ile Glu Ala
1          5          10          15
Leu Lys Lys Glu Ile Glu Ala Leu Lys Lys Glu Ile Glu Ala Leu Lys
20          25          30
Lys Glu Ile Glu Ala Leu Lys Lys
35          40

<210> 3
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hybrid sequence

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> Nle

<400> 3
Cys Xaa Gly Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Thr Glu Leu Lys Gln
1          5          10          15
Lys Ile Asp Ala Leu Glu Asn Gln Ile His Arg Leu Glu Gln Glu Ile
20          25          30
Lys Glu Leu Asp Glu Ser

```


WO 01/46368

PCT/US01/19168

35

<210> 4
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> hybrid sequence

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)
 <223> Nle

<400> 4

Cys Xaa Gly Leu Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Thr Glu Ala Lys Gln
 1 5 10 15

Lys Val Asp Ala Leu Glu Asn Gln Val His Arg Leu Glu Gln Glu Leu
 20 25 30

Lys Glu Ile Asp Glu Ser
 35

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> consensus sequence

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (4)..(20)
 <223> Amino acids 4, 5, 12, 16 and 20 are Xaa wherein Xaa = any a
 mino acid

<400> 5

Glu Glu Leu Xaa Xaa Lys Ile Asp Glu Leu Asp Xaa Glu Ile Ala Xaa
 1 5 10 15

Leu Glu Lys Xaa
 20

WO 01/96368

PCT/US01/19168

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> consensus sequence

<400> 6

Glu Glu Leu Ser Asp Lys Ile Asp
 1 5

<210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> hybrid sequence

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)
 <223> Nle

<400> 7

Cys Xaa Gly Glu Ile Glu Ala Leu Lys Lys Lys Ile Glu Glu Leu Ser
 1 5 10 15

Asp Lys Ile Asp Glu Leu Glu Lys Glu Ile Lys
 20 25

<210> 8
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Haemophilus influenzae

<400> 8

Ile Lys Lys Val Leu Glu Ile Gly Leu Asn Met Ser Gln Glu Ala Ser
 1 5 10 15

Asn Leu Thr Ser Ala
 20

WO 01/96368

PCT/US01/19168

```

<210> 9
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hybrid sequence

<400> 9
Glu Ala Glu Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ile Ile Leu Asn Leu Ser Gln
1      5      10      15
Glu Ile Ser Asn Leu Thr Ser Ala Leu Lys Gly
      20      25

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 10
Leu Glu Lys Asp Val Glu Asp Phe Lys Asn Ser Asp Gly Glu Gln Ala
1      5      10      15
Glu Gln Val Leu
      20

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 11
Leu Glu Asp Asn Leu Lys Asp Ala Glu Thr Asn Asn Val Glu Asp
1      5      10      15

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 12
Leu Ala Lys Lys Gln Thr Glu Leu Glu Lys
1      5      10

```

WO 01/96368

PCT/US01/19168

<210> 13
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hybrid sequence

<400> 13
Asp Val Glu Asp Phe Lys Asn Ser Asp Gly Glu Leu Glu Asp Asn Leu
1 5 10 15
Lys Asp Ala Glu Thr Asn Asn Val Glu Asp Ala Lys Lys Gln Thr Glu
20 25 30
Leu Glu Lys
35

<210> 14
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hybrid sequence

<400> 14
Asp Ile Glu Asp Leu Lys Asn Ser Ile Gly Glu Leu Glu Asp Asn Ile
1 5 10 15
Lys Glu Leu Glu Thr Asn Ile Val Glu Leu Ala Lys Lys Ile Thr Glu
20 25 30
Leu Glu Lys
35

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Coiled-coil scaffold

<220>

WO 01/96368

PCT/US01/19168

```

<221> PEPTIDE
<222> (1)
<223> Amino acid 1 is Xaa wherein Xaa = A and A can be I, L or V.

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (2)..(7)
<223> Amino acids 2, 3, 5-7 are Xaa wherein Xaa = any amino acid.

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (4)
<223> Amino acid 4 is Xaa wherein Xaa = D and D can be I, L or V.

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
<223> Amino acids 1-7 can be repeated one or more times.

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Coiled-coil scaffold

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> Nle

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (5)..(10)
<223> Amino acids 5, 6, and 8-10 are Xaa wherein Xaa = any amino acid.

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (4)..(10)
<223> Amino acids 4-10 can be repeated one or more times.

```

WO 01/96368

PCT/US01/19168

<400> 16

Cys Xaa Gly Ile Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
1 5 10

【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
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96368 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/315,
A61K 39/09, G01N 33/68, A61P 31/04

(21) International Application Number: PCT/US01/19168

(22) International Filing Date: 14 June 2000 (14.06.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
68211892 14 June 2000 (14.06.2000) US
68211897 23 June 2000 (23.06.2000) US(71) Applicant, for all designated States except US: CY-
TOVAX, BIOFUTURES, INC. (CA/CA); 8223
Roper Road, Edmonton, Alberta T6E 6S4 (CA).(72) Inventors and
(75) Inventors/Applicants (for US only): HOUSTON,
Michael, E. (CA/CA); 8767 Strathmore Drive, Edmonton,
Alberta T6G 4C8 (CA); HODGINS, Robert, S. (CA/US);
6681 East - 12th Avenue, Denver, CO 80220 (US).(74) Agents: SWISS, Gerald, F. et al.; Burus, Deane, Swecker
& Mathis, LLP, P.O. Box 1404, Alexandria, VA 22313-
1404 (US).(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, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

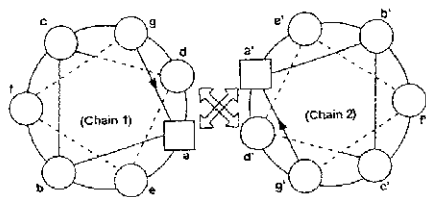
- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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

For new 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.

(54) Title: USE OF COILED COIL STRUCTURAL SCAFFOLD TO GENERATE STRUCTURE-SPECIFIC PEPTIDES

WO 01/96368 A3



coiled-coil form such as pneumococcal surface proteins A and C. The synthetic peptides are immunogenic and can be used to elicit an immune response in an animal. Accordingly, they are useful as vaccines or to stimulate antibody production or cell mediated immunity to the naturally occurring protein.

(57) Abstract: This invention relates to the use of a coiled-coil structural scaffold to generate structure-specific peptides, including synthetic peptides derived from naturally occurring proteins of various origin. The structure of the synthetic peptides utilizes a scaffold of heptad repeat units into which epitopes from coiled-coil regions of native proteins are grafted. In particular, the synthetic peptides may be based on microbial proteins, especially surface proteins, which occur naturally in the

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Serial Application No. PC1/US 01/19168
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/315 A61K39/09 G01N33/68 A61P31/04 <small>According to International Patent Classification (IPC) in both national classification and IPC.</small>		
B. FIELDS SEARCHED <small>The prior art documents searched to establish the status of the invention are indicated by classification symbols.</small> IPC 7 C07K <small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched.</small> <small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used):</small> EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <small>Category</small> <small>Relevance of document with indication, where appropriate, of the relevant passages</small> <small>Relevant to claim No.</small>		
X, P	WO 01 00010 A (HODGES ROBERT S.; IRVIN RANDALL T. (CA); KONDEJEWSKI LESLIE H. (CA)) 4 January 2001 (2001-01-04) page 6 -page 7; claims	1-10, 14-57
Y, P	---	11-13
X	WO 97 00267 A (PENCE INC) 3 January 1997 (1997-01-03) abstract	1-10, 14-57
Y	page 11 -page 12; example 6	11-13
A	WO 95 31480 A (HOUSTON MICHAEL E.; CACHIA PAUL J. (CA); KAY CYRIL M. (CA); ZHOU NIAN) 23 November 1995 (1995-11-23)	---
Y, P	WO 00 37105 A (MEDIMMUNE INC) 29 June 2000 (2000-06-29) the whole document	11-13

-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> <small>Further classifications are listed in the continuation of text.</small> <input checked="" type="checkbox"/> <small>Patent family members are listed in annex.</small>		
<small>Special categories of cited documents:</small> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. *E* search document not processed on or after the international filing date. *F* document which may have claims in priority, claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see Remarks). *G* document relevant to an oral disclosure, use, exhibition or other means. *H* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed. *I* document published after the international filing date of priority date and not in conflict with the applicant, but cited to establish the principle or theory underlying the invention. *J* 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. *K* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *L* document member of the same patent family.		
Date of the latest completion of the international search		Date of issuing of the international search report
25 February 2002		12/03/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office - P. B. 2018 Patentplan 2 Tel. + (49) 911 9100-1 Fax + (49) 911 9100-2000 Fax + (49) 911 9100-2000		Authorized officer Cervigni, S

Form PCT/ISA/210, second sheet (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/US 01/19168

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Full or partial document with indication of the type of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 11915 A (CONNAUGHT LAB.; BECKER ROBERT S (US); BRILES DAVID E (US); HOLLINGS) 26 March 1998 (1998-03-26) figures 3,4	11-13
Y	DOMINGUES H ET AL: "RATIONAL DESIGN OF A GCN4-DERIVED MIMETIC OF INTERLEUKIN-4" NATURE STRUCTURAL BIOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 7, July 1999 (1999-07), pages 652-656, XP000953440 ISSN: 1072-8368 abstract	11-13
A	HODGES R S: "DE NOVO DESIGN OF ALPHA-HELICAL PROTEINS: BASIC RESEARCH TO MEDICAL APPLICATIONS" BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE, XX, XX, vol. 74, no. 2, 1996, pages 133-154, XP000605834 ISSN: 0829-8211 page 149	1-57

International Application No. PCT/US 01/09168

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/AS/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-10,14-57 (all partially)

Present claims 1-10 relate to an extremely large number of possible products. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the products claimed. In the present case, a formula (I) consisting virtually entirely of variables, which are at least in part insufficiently or functionally defined (each X corresponds to any amino acid residued from any epitope of any native coiled coil protein) cannot be considered to represent a clear and concise definition of patentable subject-matter. The claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for the general concept underlying the application and for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, as further characterised in claims 11-13 and in the examples. Claims 14-57 have been searched in so far they related to searched subject-matter.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 65.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/19168

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0100010	A 04-01-2001	AU 5666300 A WO 0100010 A1	31-01-2001 04-01-2001
WO 9700267	A 03-01-1997	US 5824483 A AU 719469 B2 AU 6118196 A CA 2224086 A1 WO 9700267 A1 EP 0833836 A1 JP 11507648 T	20-10-1998 11-05-2000 15-01-1997 03-01-1997 03-01-1997 08-04-1998 06-07-1999
WO 9531480	A 23-11-1995	AT 196297 T AU 708472 B2 AU 2441895 A CA 2190494 A1 WO 9531480 A1 DE 69518838 D1 DE 69518838 T2 EP 0759941 A1 JP 10504018 T US 5824483 A	15-09-2000 05-08-1999 05-12-1995 23-11-1995 23-11-1995 19-10-2000 03-05-2001 05-03-1997 14-04-1998 20-10-1998
WO 0037105	A 29-06-2000	AU 2373100 A EP 1140157 A2 WO 0037105 A2	12-07-2000 10-10-2001 29-06-2000
WO 9811915	A 26-03-1998	US 5955089 A AU 726927 B2 AU 4428797 A EP 0956043 A1 HU 9902457 A2 JP 2000503676 T NO 991340 A WO 9811915 A1	21-09-1999 23-11-2000 14-04-1998 17-11-1999 29-11-1999 28-03-2000 18-05-1999 26-03-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 1/107	C 0 7 K 1/00	
C 0 7 K 7/00	C 0 7 K 1/107	
C 0 7 K 14/315	C 0 7 K 7/00	
C 0 7 K 16/12	C 0 7 K 14/315	
G 0 1 N 33/53	C 0 7 K 16/12	
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/569	B
	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,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,EC,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

(74)代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 マイケル・イー・ヒューストン

カナダ・T 6 G・4 C 8・アルバータ・エドモントン・ストレーザーン・ドライブ・8 7 6 7

(72)発明者 ロバート・エス・ホッジス

アメリカ合衆国・コロラド・8 0 2 2 0・デンヴァー・イースト・トゥエルフス・アヴェニュー・6 8 8 1

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA02 DA01 DA03 DA04 DA13 DA15

4C085 AA03 AA13 AA14 AA38 BB11 BB24 CC21 FF24

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA50 DA75 DA76 DA86

EA20 EA22 EA31 EA50 EA52 EA54 FA33 FA34 FA51 FA52

FA53 FA58 FA59 FA60 FA61 GA15 GA25

专利名称(译)	使用卷曲螺旋结构骨架生产结构特异性肽		
公开(公告)号	JP2004503565A	公开(公告)日	2004-02-05
申请号	JP2002510509	申请日	2001-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	网站瓦莱达奥箱生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	网站瓦莱达奥箱生物技术有限公司		
[标]发明人	マイケルイーヒューストン ロバートエスホッジス		
发明人	マイケル・イー・ヒューストン ロバート・エス・ホッジス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61P31/04 C07K1/00 C07K1/107 C07K7/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/315 C07K16/12 C12P21/08 G01N33/569		
CPC分类号	C07K7/06 A61K38/00 C07K7/08 C07K14/315 C07K14/3156		
FI分类号	C07K14/00.ZNA A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61P31/04 C07K1/00 C07K1/107 C07K7/00 C07K14/315 C07K16/12 G01N33/53.D G01N33/569.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/DA01 4B064/DA03 4B064/DA04 4B064/DA13 4B064/DA15 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/BB24 4C085/CC21 4C085/FF24 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/EA54 4H045/FA33 4H045/FA34 4H045/FA51 4H045/FA52 4H045/FA53 4H045/FA58 4H045/FA59 4H045/FA60 4H045/FA61 4H045/GA15 4H045/GA25		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	60/211892 2000-06-14 US 60/213387 2000-06-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一级方程式：(AXXDXXX)nI[在公式中，A是Ile，Leu，Val或其衍生物；D是Leu，Ile，Val或其衍生物；每个X是对应于天然卷曲螺旋蛋白或其衍生物的表位的氨基酸残基的氨基酸残基；每个(AXXDXXX)重复的X残基形成一组X残基；n大于或等于1]合成肽。

