

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4281861号
(P4281861)

(45) 発行日 平成21年6月17日(2009.6.17)

(24) 登録日 平成21年3月27日(2009.3.27)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 A

A 6 1 P 11/04 (2006.01)

A 6 1 P 11/04

A 6 1 P 17/00 (2006.01)

A 6 1 P 17/00

A 6 1 P 21/00 (2006.01)

A 6 1 P 21/00

請求項の数 19 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-566355 (P2002-566355)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月21日(2002.2.21)
 (65) 公表番号 特表2004-531235 (P2004-531235A)
 (43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2002/000207
 (87) 国際公開番号 W02002/066650
 (87) 国際公開日 平成14年8月29日(2002.8.29)
 審査請求日 平成17年2月21日(2005.2.21)
 (31) 優先権主張番号 60/269,840
 (32) 優先日 平成13年2月21日(2001.2.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 505330594
 アイディ・バイオメディカル・コーポレイ
 ション
 I D B i o m e d i c a l C o r p o
 r a t i o n
 カナダ、エイチ7ブイ・3エス8、ケベッ
 ク、ラヴァル、カルティエ・ブルヴァ
 ール・ウエスト 525番
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 STREPTOCOCCUS PYOGENESポリペプチドおよび対応するDNAフラグメン
ト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号2のアミノ酸22からアミノ酸1008までのアミノ酸配列からなる単
離ポリペプチド；(b) 配列番号2のアミノ酸22からアミノ酸1008までのアミノ酸配列と少なくとも
99%同一なアミノ酸配列からなる単離ポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸配
列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体を惹起することができる、単離ポリペ
プチド；および(c) 配列番号2のアミノ酸22からアミノ酸1008までのアミノ酸配列において20
以下のアミノ酸置換または欠失を有するアミノ酸配列からなり、(a)に記載のポリペ
プチドのアナログである単離ポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸配列からなるポ
リペプチドに特異的に結合する抗体を惹起することができる、単離ポリペプチド、
から選択される単離ポリペプチド。

【請求項2】

Streptococcus pyogenesに対する免疫応答を惹起することができる、請求項1に記載の
単離ポリペプチド。

【請求項3】

(a) 請求項1に記載のポリペプチド；

(b) 配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリ
ペプチドであって、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗

10

20

体を惹起することができるポリペプチド；および

(c) 配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体を惹起することができるポリペプチド、
から選択される2以上のポリペプチドを含むキメラポリペプチド。

【請求項4】

(a) 請求項1に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または
(b) 請求項1に記載のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列、からなる単離ポリヌクレオチド。

【請求項5】

該ポリヌクレオチドがDNAである、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

該ポリヌクレオチドがRNAである、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

該ポリヌクレオチドが発現制御領域に作動可能に連結されている、請求項4または請求項5に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項8】

請求項7に記載のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項9】

該ポリペプチドの発現に好適な条件下で請求項8に記載の宿主細胞を培養することを含む、請求項1に記載のポリペプチドを製造する方法。

【請求項10】

薬学的に許容される担体、希釈剤またはアジュバントおよび

(a) 請求項1に記載のポリペプチド；

(b) 配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体を惹起することができるポリペプチド；および

(c) 配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体を惹起することができるポリペプチド、
から選択されるポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項11】

ポリペプチドが、*Streptococcus pyogenes*に対する免疫応答を惹起する、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】

薬学的に許容される担体、希釈剤またはアジュバントおよび請求項3のキメラポリペプチドを含む医薬組成物であって、該キメラポリペプチドが、*Streptococcus pyogenes*に対する免疫応答を惹起することができる、医薬組成物。

【請求項13】

医薬組成物がワクチンである、請求項10 - 12のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項14】

宿主における*Streptococcus pyogenes*感染の予防または治療的処置のための、請求項10 - 13のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項15】

*Streptococcus pyogenes*感染が、咽頭炎、丹毒、膿痂疹、猩紅熱、菌血症、毒性ショックまたは壊死性筋膜炎である、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

該宿主がヒトである、請求項14または請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】

生物学的サンプルにおける、*Streptococcus pyogenes*のインビトロ検出方法であって、

10

20

30

40

50

該方法が、

(a) 請求項 1 に記載のポリペプチドに反応する抗体またはその抗原結合性フラグメントを該生物学的サンプルとインキュベートし、混合物を形成すること；および

(b) 該混合物中で、*Streptococcus pyogenes* の存在を示す、特異的に結合した抗体または結合した抗原結合性フラグメントを検出すること、を含む、方法。

【請求項 18】

生物学的サンプルにおける、*Streptococcus pyogenes* 抗原に特異的な抗体のインビトロ検出方法であって、

(a) 請求項 1 のポリペプチドまたは請求項 3 のキメラポリペプチドを、宿主から取得した生物学的サンプルとインキュベートし、混合物を形成すること；および

(b) 該混合物中の、*Streptococcus pyogenes* 抗原に特異的である抗体の存在を示す、特異的に結合したポリペプチドまたはキメラポリペプチドを検出すること、を含む方法。

【請求項 19】

請求項 3 のキメラポリペプチドまたは、

(a) 請求項 1 に記載のポリペプチド；

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体を惹起することができるポリペプチド；および

(c) 配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体を惹起することができるポリペプチド、

から選択される単離ポリペプチドを含む、*Streptococcus pyogenes* 感染の検出または診断のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、*Streptococcus pyogenes* (グループ A ストレプトコッカス) のポリペプチドに関し、これを使用し、ストレプトコッカス性感染を予防、診断および/または処置し得る。

【0002】

発明の背景

Streptococci は、細胞表面で見出される、群特異的炭水化物抗原 A ないし O によって分化されるグラム陽性細菌である。*S. pyogenes* 単離株はさらに、型特異的 M タンパク質抗原によって区別される。分子量および配列の両方において高度に変化し得る重要な感染性因子である。実際に、80 より多い M タンパク質型が、抗原性差異に基づいて同定された。

【0003】

S. pyogenes は、咽頭炎、丹毒および膿痂疹、猩紅熱および侵入性疾患、例えば菌血症および壊死性筋膜炎を含む、多くの広範な感染型の原因菌である。近年の侵入性疾患の再帰が、北アメリカおよびヨーロッパの国を含む多くの国で報告された。該生物は抗生物質に感受性であるが、高攻撃率および腐敗症の急速な開始は、高発症および死亡率という結果となる。

【0004】

S. pyogenes 感染から宿主を保護するワクチンを開発するため、努力が感染性因子、例えば型特異的 M タンパク質に焦点があった。しかし、M タンパク質のアミノ末端部分が、ヒト心筋、トロポミオシン、ミオシン、およびビメンチンと反応した交差反応性抗体を誘導し、これが自己免疫性疾患に関係し得ることが見出された。その他は、種々の血清型が

10

20

30

40

50

らのMタンパク質のアミノ末端ペプチドを含む複合ハイブリッドタンパク質を生産するための組み換え技法を使用した。しかし、すべての*S. pyogenes*血清型を含む安全なワクチンは、生産および標準化するのに高度に複合的である。

【0005】

血清型特異的抗原に加えて、他の*S. pyogenes*タンパク質が、ワクチン候補としての興味を生じた。C5aペプチダーゼ、これは少なくとも*S. pyogenes* 40血清型によって発現されるものは、マウスで免疫原性であることが示されたが、鼻咽腔転移増殖 (colonization) のレベルを減少させる能力は限定的であった。他の研究者はまた、感染の病原性において重要な役割を演ずるようであるストレプトコッカスピロゲニックスエキソトキシン (pyrogenic exotoxins) に焦点が合った。これらのタンパク質での免疫化は、毒性ショックの致命的症状を防止したが、定着化 (colonization) を防止しなかった。

10

【0006】

オクラホマ大学は、*S. pyogenes* 菌株 M1 GAS のためのゲノム配列決定プロジェクトを設けた (<http://dnal/chem.ou.edu/strep.html>)。

【0007】

したがって、*S. pyogenes* 感染の予防および/または治療のため使用されるワクチン成分であり得る*S. pyogenes* 抗原の満たされない必要性が残存する。

【0008】

発明の要約

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

20

【0009】

1 側面にしたがって、本発明は、アミノ酸配列配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むポリペプチドに関する。

【0010】

他の側面では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、医薬組成物、発現制御領域に作動可能に連結される本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、並びに当該ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞および当該宿主細胞を、発現に好適な条件下で培養することを含むポリペプチドを生産するための方法を提供する。

30

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】図 1 は、血清型 M1 *S. pyogenes* 菌株 ATCC 700294 由来の BVH - P7 遺伝子の DNA 配列を示す；配列番号 1。配列の下線部分は、リーダーペプチドをコードする領域を示す。

【図 2】図 2 は、血清型 M1 *S. pyogenes* 菌株 ATCC 700294 由来のアミノ酸配列 BVH - P7 タンパク質を示す；配列番号 2。下線の配列は、21 アミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図 3 - 1】図 3 - 1 は、Spy 74 (配列番号 3)、Spy 70 (配列番号 4)、Spy 69 (配列番号 5)、Spy 68 (配列番号 6)、Spy 60 (配列番号 7)、ATCC 12357 (配列番号 8)、ATCC 700294 (配列番号 2)、*S. pyogenes* 菌株由来の BVH - P7 オープンリーディングフレームの推定アミノ酸配列の、MacVector 配列分析ソフトウェア (バージョン 6.5) からのプログラム Clustal W を使用することによる比較を示す。アラインメントの下で、* および . 文字がそれぞれ同一および類似のアミノ酸残基を示すコンセンサスラインがある。

40

【図 3 - 2】図 3 - 2 は、Spy 74 (配列番号 3)、Spy 70 (配列番号 4)、Spy 69 (配列番号 5)、Spy 68 (配列番号 6)、Spy 60 (配列番号 7)、ATCC 12357 (配列番号 8)、ATCC 700294 (配列番号 2)、*S. pyogenes* 菌株由来の BVH - P7 オープンリーディングフレームの推定アミノ酸配列の、MacVector 配列分析ソフトウェア (バージョン 6.5) からのプログラム Clustal W を使用することによる比較を示す。

50

よる比較を示す。アラインメントの下で、*および.文字がそれぞれ同一および類似のアミノ酸残基を示すコンセンサスラインがある。

【図3-3】図3-3は、S p y 7 4（配列番号3）、S p y 7 0（配列番号4）、S p y 6 9（配列番号5）、S p y 6 8（配列番号6）、S p y 6 0（配列番号7）、A T C C 1 2 3 5 7（配列番号8）、A T C C 7 0 0 2 9 4（配列番号2）、S. pyogenes菌株由来のB V H - P 7オープンリーディングフレームの推定アミノ酸配列の、MacVector配列分析ソフトウェア（バージョン6.5）からのプログラムClustal Wを使用することによる比較を示す。アラインメントの下で、*および.文字がそれぞれ同一および類似のアミノ酸残基を示すコンセンサスラインがある。

【図3-4】図3-4は、S p y 7 4（配列番号3）、S p y 7 0（配列番号4）、S p y 6 9（配列番号5）、S p y 6 8（配列番号6）、S p y 6 0（配列番号7）、A T C C 1 2 3 5 7（配列番号8）、A T C C 7 0 0 2 9 4（配列番号2）、S. pyogenes菌株由来のB V H - P 7オープンリーディングフレームの推定アミノ酸配列の、MacVector配列分析ソフトウェア（バージョン6.5）からのプログラムClustal Wを使用することによる比較を示す。アラインメントの下で、*および.文字がそれぞれ同一および類似のアミノ酸残基を示すコンセンサスラインがある。

【0012】

発明の詳細な記載

本発明は、ストレプトコッカス性感染を診断、予防、および/または処置するために使用し得るストレプトコッカス性ポリペプチドをコードする精製され、かつ単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0013】

1側面にしたがって、本発明は、配列番号2またはそのフラグメントまたはアナログを含む第2ポリペプチドに少なくとも70%同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0014】

1側面にしたがって、本発明は、配列番号2またはそのフラグメントまたはアナログを含む第2ポリペプチドに少なくとも80%同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

本発明の1側面にしたがって：(a)配列番号2を含むポリペプチド、(b)(a)のポリペプチドの少なくとも10連続アミノ酸残基を有する抗原性または免疫原性フラグメントを含むポリペプチド、(c)(a)または(b)のポリペプチドに少なくとも70%同一性を有する抗原性または免疫原性アナログを含むポリペプチド、(d)(a)または(b)のポリペプチドに少なくとも95%同一性を有する抗原性または免疫原性アナログを含むポリペプチド、(e)(a)、(b)、(c)および(d)のいずれかのポリペプチドに少なくとも95%同一性を有する抗原性または免疫原性アナログを含むポリペプチド、(f)(a)、(b)、(c)および(d)のいずれかのポリペプチドのエピトープを有する部分、(g)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)のいずれかのポリペプチド、ここで該N末端Met残基は欠失している、および(h)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)および(g)のいずれかのポリペプチド、ここで該分泌アミノ酸配列は欠失されている、から選択されるポリペプチドを含む単離ポリペプチドを提供する。

本発明の更なる側面にしたがって：(a)配列番号2を含むポリペプチド、(b)(a)に少なくとも70%同一性を有するポリペプチド、(c)(a)のポリペプチドに少なくとも95%同一性を有するポリペプチド、(d)(a)のポリペプチドに結合特異性を有する抗体を生成できるポリペプチド、(e)(a)のポリペプチドのエピトープを有する部分、(f)(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のいずれかのポリペプチド、ここで該N末端Met残基は、欠失されている、および(g)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)のいずれかのポリペプチド、ここで該分泌アミノ酸配列は欠失されている、から選択されるポリペプチドを含む単離ポリペプチドを提供する。

【 0 0 1 5 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 9 0 % 同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 6 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 9 5 % 同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 7 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むアミノ酸配列によって特徴付けられるポリペプチドに関する。

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むポリペプチドのエピトープを有する部分をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 8 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むポリペプチドのエピトープを有する部分に関する。

【 0 0 1 9 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 7 0 % 同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 0 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 8 0 % 同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 1 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 9 0 % 同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 2 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 9 5 % 同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 3 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 を含むアミノ酸配列によって特徴付けられるポリペプチドに関する。

【 0 0 2 4 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 を含むポリペプチドのエピトープを有する部分をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 5 】

1 側面にしたがって、本発明は、配列番号 2 を含むポリペプチドのエピトープを有する部分に関する。

【 0 0 2 6 】

1 側面にしたがって、本発明は、
(a) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 7 0 % 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
(b) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 9 5 % 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
(c) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
(d) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含むポリペプチドに結合特異性を有する抗体を生成することのできるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

(e) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含むポリペプチドのエピトープを有する部分をコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号 1 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含むポリヌクレオチド

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) または (f) のポリヌクレオチドに相補的であるポリヌクレオチド

から選択されるポリペプチドを含む単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 7 】

1 側面にしたがって、本発明は、

(a) 配列番号 2 から選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 7 0 % 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

10

(b) 配列番号 2 から選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 9 5 % 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 2 から選択される配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号 2 から選択される配列を含むポリペプチドについて結合特異性を有する抗体を惹起する (raise) ことのできるポリペプチドをコードするヌクレオチド

(e) 配列番号 2 から選択される配列を含むポリペプチドのエピトープを有する部分をコードするポリヌクレオチド

(f) 配列番号 1 から選択される配列を含むポリヌクレオチド

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) または (f) のポリヌクレオチドに相補的であるポリヌクレオチド

20

から選択されるポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 8 】

1 側面にしたがって、本発明は、

(a) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 7 0 % 同一性を有するポリペプチド

(b) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 9 5 % 同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むポリペプチド

(d) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むポリペプチドに結合特異性を有する抗体を惹起することのできるポリペプチド

30

(e) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むポリペプチドのエピトープを有する部分

(f) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) または (f) のポリペプチド、ここで該 N 末端メチオニン残基は欠失している、

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) または (f) のポリペプチド、ここで該分泌アミノ酸配列は欠失している、

から選択されるポリペプチドを含む単離ポリペプチドを提供する。

【 0 0 2 9 】

1 側面にしたがって、本発明は、

40

(a) 配列番号 2 を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 7 0 % 同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号 2 を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 9 5 % 同一性を有するポリペプチド

(c) 配列場号 2 を含むポリペプチド

(d) 配列番号 2 を含むポリペプチドに結合特異性を有する抗体を惹起することのできるポリペプチド

(e) 配列番号 2 を含むポリペプチドのエピトープを有する部分

(f) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) または (f) のポリペプチド、ここで該 N 末端メチオニンは、欠失している、

50

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)または(f)のポリペプチド、ここで該分泌アミノ酸配列は欠失している、から選択されるポリペプチドを含む単離ポリペプチドを提供する。

【 0 0 3 0 】

当業者は、本発明が、本特許出願にここに記載されるように、本発明がDNA分子、すなわちアナログ、例えばそのようなポリペプチドの突然変異体、変異体、ホモログ、および誘導体をコードする、ポリヌクレオチドおよびそれらの相補的配列を含むことを認識する。本発明はまた、本発明のDNA分子に対応するRNA分子を含む。DNAおよびRNA分子に加えて、本発明は、対応するポリペプチドおよびそのようなポリペプチドに特異的に結合するモノ特異的抗体を含む。

10

【 0 0 3 1 】

さらなる実施態様では、本発明にしたがうポリペプチドは、抗原性である。

さらなる実施態様では、本発明にしたがうポリペプチドは、免疫原性である。

さらなる実施態様では、本発明にしたがうポリペプチドは、宿主の免疫応答性を誘起できる。

【 0 0 3 2 】

さらなる実施態様では、本発明はまた、前定義のような本発明のポリペプチドに結合特異性を有する抗体を惹起することのできるポリペプチドに関する。

【 0 0 3 3 】

「結合特異性を有する」抗体は、選択されたポリペプチドを認識し結合するが、サンプル、例えば生物学的サンプル中の他の分子を実質的に認識し結合しない抗体である。特異的結合は、選択されたポリペプチドが抗原として使用されるELISAアッセイを使用して測定できる。

20

【 0 0 3 4 】

本発明にしたがって、生物学的研究における「保護」は、生存曲線、速度または期間の有意な増加によって定義される。それぞれ生存曲線を比較するためLog順位試験を使用する、および生存率および死亡への日数を比較するためフィッシャーの直接法を使用する統計学的分析は、P値を計算し、そして2群の間の相違が統計的に有意であるか決定し、ために有用であり得る。0.05のP値は有意でないとみなされる。

【 0 0 3 5 】

30

本発明の追加的側面では、本発明のポリペプチドの、またはそのアナログの抗原性/免疫原性フラグメントを提供する。

【 0 0 3 6 】

本発明のフラグメントは、1または2以上のそのようなエピトープ性領域を含み、またはそれらの抗原性/免疫原性特性を保持するそのような領域に十分に類似するべきである。こうして、本発明に従うフラグメントについて、同一性の程度は恐らく無関係であり、なぜならこれらがここに記載のような、ポリペプチドの特定部分またはそのアナログに100%同一であり得るからである。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列に由来する少なくとも10連続アミノ酸残基を有するフラグメントを提供する。1実施態様では、少なくとも15連続アミノ酸残基。1実施態様では、少なくとも20連続アミノ酸残基。

40

【 0 0 3 7 】

主要な問題は、再び、フラグメントが抗原性/免疫原性特性を保持することである。

当業者は、本発明のポリペプチドのアナログがまた、本発明の文脈で用途、すなわち抗原性/免疫原性材料としての用途を見出すことを認識する。こうして、例えば1または2以上の付加、欠失、置換またはその他を含むタンパク質またはポリペプチドは、本発明に含まれる。

【 0 0 3 8 】

ここで使用するように、本発明のポリペプチドの「フラグメント」、「アナログ」または「誘導体」は、天然または非天然であり得る、1または2以上のアミノ酸残基が保存(同類)または非保存アミノ酸残基(好ましくは保存)で置換されている、これらのポリペ

50

プチドを含む。1実施態様では、本発明のペプチドの誘導体およびアナログは、図に示されるこれらの配列またはそのフラグメントと約70%同一性を有する。すなわち、残基の70%は同じである。さらなる実施態様では、ポリペプチドは80%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは85%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは、90%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは、95%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは99%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、本発明のポリペプチドのアナログは、約20より少ないアミノ酸残基置換、修飾または欠失を有し、そしてより好ましくは10より少ない。

【0039】

10

これらの置換は、ポリペプチドの2次構造および水治療的(hydropathic)性質への最小影響を有するものである。好ましい置換は、保存として当業界で知られるものであり、すなわち置換された残基は、物理的または化学的特性、例えば疎水性、大きさ、荷電または官能基をとともに持つ。これらは、置換、例えばAtlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978中Dayhoff, MによっておよびEMBO J. 8, 779-785, 1989中Argos, P.によって記載されるものを含む。例えば、以下の群のいずれかに属する、天然または非天然であるアミノ酸は、保存的变化を表す：

【表1】

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;
cys, ser, tyr, thr;
val, ile, leu, met, ala, phe;
lys, arg, orn, his;
and phe, tyr, trp, his

20

好ましい置換はまた、対応するL-アミノ酸についてのD-エナンチオマーの置換を含む。

【0040】

代替的アプローチでは、本発明のポリペプチドのアナログは、図3に開示の置換を含む。

30

代替的アプローチでは、アナログは、例えば、望まれるポリペプチドに効率的にタグを付加することによる、精製をより容易にさせる部分を含む、融合タンパク質であり得る。それは「タグ」を除去することが必要であり得、またはそれは融合ポリペプチドが有用であるのに十分な抗原性をそれ自体保持する場合であり得る。

【0041】

相同性のパーセンテージは、アミノ酸型の、同一性のパーセンテージ加えて類似性または保存のパーセンテージとして定義される。

【0042】

ある実施態様では、本発明のアナログまたはポリペプチドは、図に示されるこれらの配列またはそのフラグメントと約70%同一性を有する。すなわち、残基の70%は同じである。さらなる実施態様では、ポリペプチドは、75%より大きい相同性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは80%より大きい相同性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは、85%より大きい相同性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは、90%より大きい相同性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは、95%より大きい相同性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは、99%より大きい相同性を有する。さらなる実施態様では、本発明のポリペプチドのアナログは、約20より少ないアミノ酸残基置換、修飾または欠失を有し、そしてより好ましくは10より少ない。

40

【0043】

プログラム、例えばCLUSTALプログラムを使用し、アミノ酸配列を比較すること

50

ができる。このプログラムは、アミノ酸配列を比較し、そして適当なようにいずれかの配列中にスペースを挿入することによって至適アラインメントを見出す。至適アラインメントのためにアミノ酸同一性または類似性(アミノ酸型の、同一性加えて保存)を計算することが可能である。BLASTxのようなプログラムは、類似配列の最長のストレッチをアラインメントし、そしてフィットに値を割り当てる。こうして、類似性のいくつかの領域が見出される比較であって、それぞれが異なるスコアを有するものを取得することが可能である。同一性分析の両方の型を本発明で企図する。

【0044】

代替的アプローチでは、アナログまたは誘導体は、例えば望まれるタンパク質またはポリペプチドに効率的にタグ付加することによって、精製をより容易にさせる部分を取りこませる融合ポリペプチドであり得、「タグ」を除去することが必要であり得、またはそれは融合ポリペプチドそれ自体が有用であるのに十分な抗原性を保持する場合であり得る。

10

【0045】

抗原性ポリペプチドをスクリーニングし、エピトープ性領域、すなわちポリペプチドの抗原性または免疫原性の原因となるこれらの領域を同定することが可能であることが周知である。そのようなスクリーニングを実施するための方法が、当業界で周知である。こうして、本発明のフラグメントは、1または2以上のそのようなエピトープ性領域を含むべきであり、またはそれらの抗原性/免疫原性特性を保持するそのような領域に十分に類似であるべきである。

【0046】

20

こうして、本発明のフラグメントのために、同一性の程度は恐らく重要でなく、なぜなら、これらはここに記載のようなポリペプチド、アナログの特定の部分に100%同一であり得るからである。

こうして、アナログ、誘導体およびフラグメントとに重要であるのは、これらが、これらが誘導されるタンパク質またはポリペプチドの抗原性/免疫原性の少なくともある程度を保有することである。

【0047】

またポリペプチドは、それに混合された、ポリペプチド生物学的または薬理学的特性を変化させる他の化合物、すなわち半減期を増加させるためポリエチレングリコール(PEG)；精製の容易さのためリーダーまたは分泌アミノ酸配列；prepro-またはpro-配列；および(多)糖類を含む。

30

【0048】

さらに、アミノ酸領域が多型性であると見出される場合のこれらの状況では、ことなるストレプトカッカス菌株の異なるエピトープをより効率的に模倣する1または2以上の特定のアミノ酸を変化することが望ましくあり得る。

【0049】

さらに、本発明のポリペプチドは、末端、-NH₂アシル化(例えばアセチル化、またはチオグリコール酸アミド化、末端カルボキシアミド化、例えばアンモニアまたはメチルアミンによる)によって修飾し、支持体または他の分子への連結または結合のための、安定性、増加された疎水性を提供できる。

40

【0050】

またポリペプチドフラグメントおよびアナログのヘテロおよびホモポリペプチドマルチマーを企図する。これらのポリマー性形態は、例えば架橋剤、例えばアビジン/ビオチン、グルタルアルデヒド(gluteraldehyde)またはジメチルスーパーイミデートで架橋された1または2以上のポリペプチドを含む。そのようなポリマー性形態はまた、組み換えDNA技法によって生成されたマルチシストロン性mRNAから生産された、2または3以上のタンデムまたは逆連続配列を含むポリペプチドを含む。さらなる実施態様では、本発明はまた、本出願の図に定義のような1または2以上のポリペプチドそのフラグメントまたはアナログを含むキメラポリペプチドに関する。

【0051】

50

さらなる実施態様では、本発明はまた、配列番号 2、またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を有する、2 または 3 以上のポリペプチドを含むキメラポリペプチドに関する。ただし、該ポリペプチドがキメラポリペプチドを形成するように連結されることを条件とする。

【0052】

さらなる実施態様では、本発明はまた、配列番号 2 から選択された配列を有する 2 または 3 以上のポリペプチドを含むキメラポリペプチドに関する。ただし、ポリペプチドがキメラポリペプチドを形成するように連結されることを条件とする。

【0053】

好ましくは、本発明のポリペプチドのフラグメント、アナログまたは誘導体は、少なくとも 1 つの抗原性領域、すなわち少なくとも 1 つのエピトープを含む。

10

【0054】

抗原性ポリマー（すなわち合成マルチマー）の形成を達成するために、ビスハロアセチル基、ニトロアリアルハライドなどを有するポリペプチドを利用し得、ここで該試薬は、チオ基に特異的である。したがって、異なるポリペプチドの 2 つのメルカプト基の間の連結は、一重結合であり得、または少なくとも 2、典型的には少なくとも 4、かつ 16 を超えないが、通常は約 14 を超えない炭素原子連結基からなり得る。

【0055】

特定の実施態様では、本発明のポリペプチドフラグメントおよびアナログは、メチオニン（Met）出発残基を含まない。好ましくは、ポリペプチドは、リーダーまたは分泌配列（シグナル配列）を取りこまない。本発明のポリペプチドのシグナル部分は、確立された分子生物学的技法にしたがって決定し得る。一般に、目的のポリペプチドは、ストレプトコッカス性培養物から単離され、そしてその後配列決定され、成熟タンパク質の当初残基そしてしたがって成熟ポリペプチドの配列を決定し得る。

20

【0056】

ポリペプチドは、それらの開始コドン（メチオニンまたはバリン）なくおよび/または組み換え体ポリペプチドの生産および精製に資するためのこれらのリーダーペプチドなく生産および/または使用することができることが理解される。リーダーペプチドをコードする配列なく遺伝子をクローニングすることは、E. coli の細胞質へポリペプチドを制限し、そしてこれらの回収を容易化することが知られる（Glick, B.R. and Pasternak, J.J. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. In 'Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA' 2nd edition, ASM Press, Washington DC, p.109-143）。

30

【0057】

本発明の別の側面では、また（i）本発明のポリペプチドを、担体、希釈剤またはアジュバントとともに含む事項の組成物、（ii）本発明のポリペプチドおよび担体、希釈剤またはアジュバントを含む医薬組成物、（iii）本発明のポリペプチドおよび担体、希釈剤またはアジュバントを含むワクチン、（iv）宿主において、ストレプトコッカスに対する免疫応答を誘導する方法であって、免疫応答、例えばストレプトコッカスへの保護的免疫応答を誘起するのに免疫原的に有効量の本発明のポリペプチドを投与することによる方法、および（v）ストレプトコッカス感染を予防および/または処置するための方法であって、必要のある宿主に本発明のポリペプチドの予防または治療的量を投与することによる方法、を提供する。

40

【0058】

本発明のさらなる側面にしたがってまた、（i）本発明のポリヌクレオチドを、担体、希釈剤またはアジュバントといっしょに含む事項の組成物、（ii）本発明のポリペプチドおよび担体、希釈剤またはアジュバントを含む医薬組成物、（iii）宿主の、ストレプトコッカスに対する免疫応答を誘導するための方法であって、宿主に、免疫応答、例えばストレプトコッカスへの保護的免疫応答を誘起するための本発明のポリヌクレオチドの免疫原性有効量を投与することによる方法、および特に、（iv）ストレプトコッカス感

50

染を予防および／または処置するための方法であって、必要のある宿主に本発明のポリペプチドの予防または治療的量を投与することによる方法、を提供する。

【 0 0 5 9 】

免疫化の前に、本発明のポリペプチドをまた、担体タンパク質、例えば破傷風毒素、ジフテリア毒素、B型肝炎ウイルス表面抗原、小児麻痺ウイルスVP1抗原または任意の他のウイルスまたは細菌性毒素または抗原またはより強い免疫応答の発生を刺激するための任意の好適なタンパク質ヘカップリングまたはコンジュゲートできる。このカップリングまたはコンジュゲーションを、化学的または遺伝子的に実施できる。ペプチド-担体コンジュゲーションのより詳細な記載は、Van Regenmortel, M.H.V., Briand J.P., Muller S., Plaue S. <<Synthetic Polyptides as antigens>> in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 19(ed.) Burdou, R. H. & Van Knippenberg P .H.(1988), Elsevier New Yorkに利用可能である。

10

【 0 0 6 0 】

さらなる側面にしたがって、1または2以上の本発明のストレプトコッカス性ポリペプチドを、薬学的に許容されるアジュバントとの混合物として含む医薬組成物を提供する。好適なアジュバントは、(1)水中油型エマルジョン製剤、例えばMF59(登録商標)、SAF(登録商標)、Rib i(登録商標);(2)フロイントの完全または不完全アジュバント;(3)塩、すなわちAlK(SO₄)₂、AlNa(SO₄)₂、AlNH₄(SO₄)₂、Al(OH)₃、AlPO₄、シリカ、カオリン;(4)サポニン誘導体、例えばStimulon(登録商標)またはそれから生成された粒子例えばISCO M(免疫刺激複合体);(5)サイトカイン、例えばインターロイキン、インターフェロン、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF);(6)他の物質例えばカーボンポリヌクレオチド、すなわちポリICおよびポリAU、解毒化コレラ毒素(CTB)および粘膜性免疫の誘導のためのE.coli熱不安定性毒素を含む。アジュバントのより詳細な記載は、M.Z.I Khan et al.によるPharmaceutical Research, vol. 11, No. 1 (1994). pp2-11中のレビューおよびまた Gupta et al., によるVaccine, vol. 13, No. 14, pp1263-1276(1995)の別のレビューおよび引用によりここに全体を含めるWO99/24578に利用可能である。好ましいアジュバントは、QUILA(登録商標)、QS21(登録商標)、Alhydrogel(登録商標)およびAdjuphos(登録商標)を含む。

20

30

【 0 0 6 1 】

本発明の医薬組成物を、注射、急速点滴、鼻咽喉吸収、皮膚吸収によって非経腸にまたは口内または経口投与し得る。

【 0 0 6 2 】

本発明の医薬組成物を、ストレプトコッカス性感染および／またはストレプトコッカス性感染によって仲介される疾患または症状の処置または予防のために使用し、引用によりここに含める、P.R. Murray(Ed, in chef), E.J. Baron, M.A. Phaller, F.C. Tenover and R.H. Yolken. Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, Washington, D.C. sixth edition, 1995, 1482に記載される通りである。1実施態様では、本発明の医薬組成物を、咽頭炎、丹毒および膿痂疹、しょう紅熱、および侵入性疾患、例えば菌血症および壊死性筋膜炎およびまた毒性ショックの予防または処置のために使用する。1実施態様では、本発明の医薬組成物を、ストレプトコッカス感染および／またはストレプトコッカス感染、特にグループAストレプトコッカス(Streptococcus pyogenes)、グループBストレプトコッカス(GBSまたはS. agalactinae)、S. pneumoniae、S. dysgalactinae、S. uberis、S. nocardia並びにStaphylococcus aureusによって仲介される疾患または症状の処置または予防のために使用する。さらなる実施態様では、該ストレプトコッカス感染は、S. pyogenesである。

40

【 0 0 6 3 】

さらなる実施態様では、本発明はストレプトコッカス感染に感受性の宿主においてストレプトコッカス感染の予防または処置のための方法であって、当該宿主に本発明の組成物

50

の治療または予防的量を投与することを含む方法を提供する。

【 0 0 6 4 】

本出願で使用するように、用語「宿主」は、哺乳動物を含む。さらなる実施態様では、該動物はヒトである。

特定の実施態様では、医薬組成物をストレプト感染のリスクのあるこれらの宿主、例えば幼児、年輩および免疫妥協宿主に投与する。

【 0 0 6 5 】

医薬組成物は好ましくは、約 0 . 0 0 1 ないし 1 0 0 μ g / k g (抗原 / 体重) およびより好ましくは、 0 . 0 1 ないし 1 0 μ g / k g および最も好ましくは 0 . 1 ないし 1 μ g / k g の単位用量形態で、免疫化の間約 1 ないし 6 週間間隔の間隔で 1 ないし 3 回である。

10

【 0 0 6 6 】

医薬組成物は好ましくは、約 0 . 1 μ g ないし 1 0 m g 、そしてより好ましくは 1 ないし 1 m g そして最も好ましくは 1 0 ないし 1 0 0 μ g の単位用量形態で、免疫化の間約 1 ないし 6 週間間隔の間隔で 1 ないし 3 回である。

【 0 0 6 7 】

さらなる側面にしたがって、配列番号 2 のアミノ酸配列またはそのフラグメントまたはアナログによって特徴付けられるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 6 8 】

20

1 実施態様では、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム (O R F) を含み得る、配列番号 1 に示されるものである。

【 0 0 6 9 】

図に示されるポリヌクレオチド配列が本発明のポリペプチドをなおもコードする縮重コドンで変化させ得ることが認識される。よって、本発明はさらに、配列間の 5 0 % 同一性、1 実施態様では配列間の少なくとも 7 0 % 同一性、1 実施態様では配列間の少なくとも 7 5 % 同一性、1 実施態様では配列間の少なくとも 8 0 % 同一性、1 実施態様では配列間の少なくとも 8 5 % 同一性、1 実施態様では配列間の少なくとも 9 0 % 同一性を有する、前記のここのポリヌクレオチド配列 (またはその相補的配列) にハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。さらなる実施態様では、ポリヌクレオチドは、ストリンジェント条件下でハイブリダイズ可能、すなわち少なくとも 9 5 % 同一性を有するものである。更なる実施態様では、9 7 % 同一性より高い。

30

【 0 0 7 0 】

ハイブリダイゼーションのための好適なストリンジェント条件は、当業者によって容易に決定できる (例えば、Sambrook et al., (1989)Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology, (1999) Editea by Ausbel F.M. te al., John Wiley & Sons, Inc., N.Y.) 。

【 0 0 7 1 】

さらなる実施態様では、本発明は、
(a) ポリペプチドをコードする D N A 配列または
(b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補物
にストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供し、ここで当該ポリペプチドは、配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含む。

40

【 0 0 7 2 】

さらなる実施態様では、本発明は、
(a) ポリペプチドをコードする D N A 配列または
(b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補物
にストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供し、ここで当該ポリペプチドは配列番号 2 を含む。

【 0 0 7 3 】

50

さらなる実施態様では、本発明は、

(a) ポリペプチドをコードするDNA配列または

(b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補物

にストリンジェント条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供し、ここで当該ポリペプチドは、配列番号2またはそのフラグメントまたはアナログを含むポリペプチドからの少なくとも10連続アミノ酸残基を含む。

【0074】

さらなる実施態様では、本発明は、

(a) ポリペプチドをコードするDNA配列または

(b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補物

にストリンジェント条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供し、ここで当該ポリペプチドは、配列番号2を含むポリペプチドからの少なくとも10連続アミノ酸残基を含む。

【0075】

さらなる実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号2またはそのフラグメントまたはアナログに示される本発明のポリペプチドをコードするものである。

【0076】

さらなる実施態様では、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする配列番号1に示されるものまたはそのフラグメントまたはアナログである。

【0077】

さらなる実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号2に示される本発明のポリペプチドをコードするものである。

【0078】

さらなる実施態様では、ポリヌクレオチドは本発明のポリペプチドをコードする配列番号1に示されるものである。

【0079】

当業者によって容易に認識されるように、ポリヌクレチドはDNAおよびRNAの両方を含む。

【0080】

本発明はまた、本出願に記載のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレチドを含む。

【0081】

さらなる側面では、本発明のポリペプチドまたはそのフラグメント、アナログまたは誘導体をコードするポリヌクレオチドを、DNA免疫化方法で使用し得る。すなわち、これらを、注射すると複製可能および発現可能であるベクターに取りこませ、それによってインピボで抗原性ポリペプチドを生産し得る。例えばポリヌクレオチドを、真核細胞で機能的であるCMVプロモーターの制御下でプラスミドベクターに取り込ませ得る。好ましくはベクターを筋肉内に注射する。

【0082】

さらなる側面にしたがって、組み換え技法による本発明のポリペプチドを生産するための方法を提供し、ここで当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを宿主細胞へ発現させること、および発現されたポリペプチド産物を回収することによる。代替的にポリペプチドを、確立された合成的化学技法、すなわち完全ポリペプチドを生産するためにライゲートされる、オリゴペプチドの溶液相または固相合成にしたがって生産することができる(ブロックライゲーション)。

【0083】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの取得および評価のための一般方法は、以下の引用文献に記載される：引用によりここに含めるSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by Ausubel F. M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York; PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering, Edi

10

20

30

40

50

ted by White B.A., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 pages ;Protein Purification, Principles and Practices, Scopes R. K., Springer-Verlag, New York, 3rd Edition, 1993, 380 pages; Current Protocols in Immunology, Edited by Coligan J.E. et al., John Wiley & Sons Inc., New York.

【 0 0 8 4 】

組み換え体生産のために、宿主細胞を、ポリペプチドをコードするベクターでトランスフェクトし、それからプロモーターを活性化する、形質転換体を選択するまたは遺伝子を増幅するために適当に修飾された栄養培地で培養する。好適なベクターは、選択された宿主で生存可能および複製可能であるものであり、そして染色体的、非染色体的および合成DNA配列、例えば細菌性プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、コウボプラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクターを含む。ポリペプチド配列を、制限酵素を使用して適当な部位へベクターに取りこませ得、その結果それはプロモーター、リボゾーム結合部位（コンセンサス領域またはシャインダルガノ配列）、および所望によりオペレーター（制御エレメント）に作動可能に連結されている。所定の宿主およびベクターに適当である発現制御領域の個々の構成要素を、確立された分子生物学原理にしたがって選択できる（引用によりここに含めるSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York）。好適なプロモーターは限定しないが、LTRまたはSV40プロモーター、E. coli lac、tacまたはtrpプロモーターおよびファージラムダP_Lプロモーターを含む。ベクターは好ましくは複製開始点並びに選択マーカー、すなわちアンプリコン抵抗性遺伝子を取りこむ。好適な細菌性ベクターは、pET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10 phagescript、pSiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pkk223-3、pka223-3、pDR540、pRIT5、および真核ベクターpBlueBacIII、pWLEO、pSV2CAT、pOG44、PXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVLを含む。宿主細胞は、細菌性、すなわちE. coli、Bacillus subtilis、Streptomyces；真菌性すなわちAspergillus niger、Aspergillus nidulins；コウボすなわちSaccharomycesまたは真核性すなわちCHO、COSであり得る。

【 0 0 8 5 】

培養でポリペプチドを発現すると、細胞を典型的には、遠心分離によって収集し、次いで物理学的または化学的手段によって分解し（もし発現されたポリペプチドが、培地中に分泌されていないならば）、そして得られた粗抽出物が保持され、所望のポリペプチドを単離する。粗培地または細胞溶解物からのポリペプチドの精製を、ポリペプチドの特性に依存して確立された技法によって達成し得、すなわち硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降、酸抽出、アニオンまたはカチオン荷電クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを使用する。最終精製を、HPLCを使用して達成し得る。

【 0 0 8 6 】

ポリペプチドを、リーダーまたは分泌配列を有してまたは有しないで発現させ得る。前者の場合、リーダーを、翻訳後プロセッシングを使用して除去し（引用によりここに含めるUS4431739;US4425437およびUS4338397参照）または発現されたポリペプチドを精製するに続いて化学的に除去し得る。

【 0 0 8 7 】

さらなる側面にしたがって、本発明のストレプトコッカス性ポリペプチドを、ストレプトコッカス感染、特にS. pyogenes感染についての診断試験において使用し得る。いくつかの診断方法、例えば生物学的サンプル中のストレプトコッカス生物を検出することが可能であり、以下の手法に従う：

a) 宿主から生物学的サンプルを取得する

- b) 本発明のストレプトコッカスポリペプチドと反応性の抗体またはそのフラグメントと、生物学的サンプルをインキュベートし混合物を形成する、および
- c) 混合物中の特異的に結合した抗体または結合フラグメントを検出し、それはストレプトコッカスの存在を指摘する。

【0088】

代替的に、当該抗体を含むまたは含むと疑われる生物学的サンプル中のストレプトコッカス抗原に特異的な抗体の検出方法は、以下のように実施され得る：

- a) 宿主から生物学的サンプルを取得する、
- b) 1または2以上の本発明のストレプトコッカスポリペプチドまたはそのフラグメントを、生物学的サンプルとインキュベートし、混合物を形成する、および
- c) 混合物中の特異的に結合した抗原または結合フラグメントを検出し、それはストレプトコッカスの存在を指摘する。

10

当業者は、この診断試験が、免疫的試験、例えばエライザアッセイ (E L I S A)、放射性免疫アッセイまたはラテックス接合アッセイを含む幾つかの形態をとり、タンパク質に特異的な抗体が生物中に存在するか本質的に決定し得る。

【0089】

本発明のポリペプチドをコードするDNA配列をまた使用し、そのような細菌を含むまたは疑われる生物学的サンプル中のストレプトコッカスの存在を検出することにおける使用のためのDNAプローブを設計し得る。この発明の検出方法は

- a) 宿主から生物学的サンプルを取得する、
- b) 本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするDNA配列を有する1または2以上のDNAプローブを、生物学的サンプルとインキュベートし、混合物を形成する、および
- c) 混合物中の特異的に結合したDNAプローブを検出し、それはストレプトコッカスの存在を指摘する、を含む。

20

【0090】

本発明のDNAプローブはまた、例えばストレプトコッカス感染を診断する方法として、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して、サンプル中の循環するストレプトコッカス、すなわち *S. pyogenes* 核酸を検出するために使用し得る。プローブを、慣行技法を使用して合成し得、そして固相上に固定化し、または検出可能標識で標識し得る。この適用のための好ましいDNAプローブは、本発明の *S. pyogenes* ポリペプチドの少なくとも約6連続ヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴマーである。

30

【0091】

宿主中のストレプトコッカスの検出のためのさらなる診断方法は、

- a) 本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントと反応性の抗体を、検出可能標識で標識すること
- b) 該標識した抗体または標識されたフラグメントを、宿主に投与すること、および
- c) 宿主中の特異的に結合した標識された抗体または標識されたフラグメントを検出し、それはストレプトコッカスの存在を指摘する、を含む。

40

【0092】

さらなる側面にしたがって、本発明は、ストレプトコッカス性感染の処置および/または予防のための抗体の使用 (用途) を提供する。

【0093】

本発明のさらなる側面は、診断のため、および特にストレプトコッカス感染の処置における特異的な抗体の生産のための免疫原として本発明のストレプトコッカスポリペプチドの使用である。好適な抗体は、適当なスクリーニング方法を使用して、例えば特定の抗体の、試験モデルでストレプトコッカス感染に対して受動的に保護する能力を測定することによって決定し得る。動物モデルの1例は、ここでの例で記載するマウスモデルである。抗

50

体は全体抗体または抗原に結合するそのフラグメントであり得、そして任意の免疫グロブリンクラスに属し得る。該抗体またはフラグメントは、動物起源の、具体的には哺乳動物起源の、より具体的にはマウス、ラットまたはヒト起源のものであり得る。それは天然抗体またはそのフラグメント、または望まれれば、組換え抗体または抗体フラグメントであり得る。用語組換え抗体または抗体フラグメントは、分子生物学的技法を使用して生産された抗体または抗体フラグメントを意味する。抗体または抗体フラグメントは、ポリクローナルまたは好ましくはモノクローナル抗体であり得る。それは、*S. pyogenes*ポリペプチドに付随するエピトープのある数に特異的であり得るが、好ましくは1つに特異的である。

【0094】

10

本発明のさらなる側面は、受動的免疫化のための本発明のポリペプチドに指向化された(directed)抗体の使用である。本出願で記載された抗体を使用し得る。

【0095】

本発明のさらなる側面は、免疫化の方法であって、ここに本発明のポリペプチドによって惹起された(raised)抗体を、受動的免疫化を提供するのに十分量で宿主に投与する。

【0096】

さらなる実施態様では、本発明は、ストレプトコッカス性感染の予防または治療的処置のための医薬の製造における医薬組成物の使用を提供する。

【0097】

更なる実施態様では、本発明は、ストレプトコッカス感染の検出または診断のための本発明のポリペプチドを含むキットを提供する。

20

【0098】

特に定義しない場合、ここの全ての技術および科学用語は、本発明の属する当業者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。すべての刊行物、特許出願、特許および他のここに述べた引用は、引用により全体を含める。抵触の場合は、定義を含む本明細書が制御する。加えて材料、方法および例は、例示のみであり、限定を意図しない。

【0099】

実施例 1

この例は、BVH-P7遺伝子および対応するポリペプチドのクローニングおよび分子特徴を示す。

30

【0100】

S. pyogenes BVH-P7 (配列番号1) 遺伝子のコード領域を、血清型M1 *S. pyogenes*菌株ATCC/00294のゲノムDNAからPCRによって増幅する(Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, La Jolla, CA)。表1に示す、制限部位NdeI (CATATG) およびNotI (GCGGCCGC) の付加のための塩基伸長物を含ませる以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用する: DMAR293 (配列番号9) およびDMAR294 (配列番号10)。PCR産物を、製造者の指示(Chatsworth, CA)にしたがって、QIAgenからのQIAquickゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製し、そしてNdeIおよびNotIで消化する(Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfe, Canada)。pET-21(+)ベクター(Novagen, Madison, WI)を、NdeI およびNotIで消化し、そしてQIAgen(Chatsworth, CA)からのQIAquickゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製した。NdeI - NotI PCR産物を、NdeI - NotI pET-21b(+)発現ベクターにライゲートさせた。ライゲートされた産物を、Simanisの方法(Hanahan, D. DNA Cloning, 1085, D.M. Glover(ed), pp.109-135)にしたがって

40

【化1】

E. coli 菌株 DH5+

[ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r_x-m_x+) deoR thi-1 supE44 λ gyrA96 relA1] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)

50

に移入した。BVH-P7遺伝子を含む組み換え体pET-21b(+)プラスミド(r pET21b(+))をQIAgenプラスミドキット(Chatsworth, CA)を使用して精製し、そしてDNAインサートを配列決定した(Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA)。

【0101】

表1 PCR増幅またはS. pyogenes BVE-P7遺伝子のために使用されるオリゴヌクレオチドプライマー

【表1】

遺伝子	プライマー ID (配列番号)	制限部位	ベクター	配列
BVH-P7	DMAR293 (3) 配列番号9	NdeI	pET21b	5' - GTAGTCACCCACCATATGGAAGTTTTAG- 3'
BVH-P7	DMAR294 (4) 配列番号10	NotI	pET21b	5' - TTTTTCTTTGCGGCCGCAGTTATTAGT- 3'
BVH-P7	DMAR480a (5) 配列番号11	BamHI	pcMV- GH	5' -GGGGATCCACCCACAATCAGG-3'
BVH-P7	DMAR481a (6) 配列番号12	SalI	pcMV- GH	5' - GGTTGTCGACAGTAAAGCAACGCTAGTG- 3'

【0102】

BVH-P7のオープンリーディングフレーム(ORF)停止コドン(TAA)を含む3027bpは、6.18の予測されたpIおよび111494.44Daの予測された分子量を有する1008アミノ酸残基ポリペプチドをコードする。PSORTIIソフトウェア(Real World Computing Partnership(<http://psort.nibb.ac.jp>))を使用する予測されたアミノ酸残基配列(配列番号2)の分析は、アスパラギンとグルタミン残基の間に位置する切断部位で終わる21アミノ酸残基シグナルペプチド

【化2】

(MKKHLKTVALTLTVSVVTHN)

の存在を示唆した。アミノ酸残基配列の分析は、残基9746と981の間に位置する細胞壁アンカーモチーフ(LPXTGX)の存在をあきらかにした。

【0103】

B V H - P 7 (配列番号 1) 遺伝子の P C R 増幅によって存在を確認するために、以下の 4 つの血清学的に明瞭な *S. pyogenes* 菌株を使用した：血清型 M 1 *S. pyogenes* 菌株 A T C C 7 0 0 2 9 4 および血清型 M 3 *S. pyogenes* 菌株 A T C C 1 2 3 8 4 を、アメリカンタイプカルチャーコレクション (Rockville, MD) から取得した；血清型 M 6 *S. pyogenes* SPY67 臨床の単離株は、Centre de recherche en infectiologie du Centre hospitalier de l' universite Laval, Sainte-Foy によって提供された；およびマウスから当初単離された *S. pyogenes* 菌株 B 5 1 4 は、University of Alabama, Birmingham から Susan Hollingshead によって提供された。E. coli 菌株 X L 1 - B l u e M R F を、ネガティブコントロールとしてこれらの実験で使用した。染色体性 D N A を、以前記載されたようにそれぞれの *S. pyogenes* 菌株から単離した (Jayarao EM et al., 1991. J. Clin. Microbiol. 29:2774-2778)。B V H - P 7 (配列番号 1) 遺伝子を、4 つの *S. pyogenes* 菌株から精製されたゲノム D N A から P C R (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, Lajolla, Ca) によって、そしてコントロール E. coli 菌株をオリゴヌクレオチドプライマー D M A R 2 9 3 (配列番号 9) および D M A R 2 9 4 (配列番号 1 0) (表 1) を使用して増幅した。P C R を、4 5 秒間の 9 5 、4 5 秒間の 5 0 および 2 分間の 7 2 の 3 0 サイクルおよび 7 分間の 7 2 の最終伸長期間で実施した。P C R 産物を、1 % アガロースゲル中でサイズ分画化し、そして臭化エチジウム染色によって可視化した。これらの P C R 増幅の結果を表 2 に表す。増幅産物の分析は、B V H - P 7 (配列番号 1) 遺伝子が試験された 4 つの *S. pyogenes* 菌株のすべてのゲノム中に存在した。そのような産物を、コントロール E. coli D N A がこれらのオリゴヌクレオチドプライマーと同一の P C R 増幅に服するとき検出した。

【 0 1 0 4 】

表 2 4 つの血清学的に明瞭な *S. pyogenes* 菌株のゲノムにおける、P C R 増幅による *S. pyogenes* BVH-P7 遺伝子の同定

【表 3】

菌株同定	BVH-P7 遺伝子の同定
ATCC700294 (M1)	+
ATCC12384 (M3)	+
SPY67 (M6)	+
B514*	+
E. coli XL1 Blue MRF'	-

* マウス単離体

【 0 1 0 5 】

実施例 2

この例は、C M V プラスミド p C M V - G H における *S. pyogenes* BVH-P7 遺伝子のクローニングを示す。

S. pyogenes タンパク質の D N A コード領域を、プラスミドベクター p C M V - G H (Tang et al., Nature, 1992, 356:152) のサイトメガロウイルス (C M V) プロモーターの転写制御下にあるヒト成長ホルモン (h G H) 遺伝子の下流の相 (phase) に挿入した。該 C M V プロモーターは、E. coli 細胞において非機能性プラスミドであるが、真核細胞においてプラスミドを投与すると活性である。該ベクターはまた、アンシピリン抵抗性遺伝子を取りこんだ。

【 0 1 0 6 】

リーダーペプチド領域を欠く B V H - P 7 (配列番号 1) 遺伝子のコード領域を、表 1 に記載の、制限部位 B a m H I (G G A T C C) および S a l I (G T C G A C) の付加のための塩基伸長物を含んだオリゴヌクレオチドプライマー D M A R 4 8 0 a (配列番号 1 1) および D M A R 4 8 1 a (配列番号 1 2) を使用して、血清型 M 1 *S. pyogenes*

菌株 A T C C 7 0 0 2 9 4 のゲノム D N A から P C R (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, Lajolla, CA)によって増幅した。P C R 産物を、QIAgen(chat sworth, CA)からのQIAquickゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製し、制限酵素 (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baied'Uefe, Canada)で消化した。p C M V - G H ベクター (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas)を、B a m H I および S a l I で消化し、そして Q I A g e n (Chatsworth, CA)からのQIAquickゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製した。B a m H I - S a l I D N A フラグメントを、B a m H I - S a l I - p C M V - G H ベクターにライゲートし、C M V プロモーターの制御下の h G H - B V H - P 7 融合タンパク質を創出した。ライゲートした産物を、Simanisの方法 (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover(ed), pp. 109-135)にしたがって、

【化 2】

E. coli 菌株 DH5.

[ϕ 80dlacZAM15 Δ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17($r_k^-m_k^+$) deoR thi-1 supE44 λ gyrA96 relA1] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)

に形質転換した。組み換え体 p C M V プラスミドを、Q I A g e n プラスミドキット (Chatsworth, CA) を使用して精製しそして D N A インサートのヌクレオチド配列を、D N A 配列決定によって確認した。

【 0 1 0 7 】

実施例 3

この例は、S. pyogenes BVH-P7タンパク質抗原への免疫応答を誘起する D N A の使用を記載する。

8 匹のメス B A L B / c マウス (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) の群を、50 μ g の顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) を発現するプラスミド p C M V - G H - G M - C S F (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas)の存在下の、B V H - P 7 (配列番号 1) 遺伝子をコードする組み換え体 p C M V - G H の 50 μ g の 2 または 3 週間間隔での、100 μ l 3 回の筋肉内注射によって免疫化した。コントロールとして、マウスの群に、50 μ g の p C M V - G H - G M - C S F の存在下の 50 μ g の p C M V - G H を注射した。血液サンプルを、それぞれの免疫化に先立ちおよび第 3 注射の 7 日後に眼窩洞 (orbital sinus) から収集し、コート抗原として BVH-P7 His タグ付加標識した S. pyogenes 組み換え体タンパク質を使用して E L I S A によって決定した。この BVH-P7 His タグ付加標識した S. pyogenes 組み換え体タンパク質の生産および精製を実施例 4 に提示する。

【 0 1 0 8 】

実施例 4

この例は、S. pyogenes B V H - P 7 組み換え体タンパク質の生産および精製を示す。

B V H - P 7 (配列番号 1) 遺伝子での組換え体 p E T - 2 1 b (+) プラスミドを使用し、エレクトロポレーション (Gene Pulser II apparatus, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canada) によって、E. coli 菌株 T u n e r (D E 3) (F^{ompT} hsdS_B(r⁻_Bm⁻_B)gel dc m lacYI(DE)) (Novagen, Madison, WI) を形質転換した。E. coli のこの菌株において、組み換え体タンパク質の発現を制御する T 7 プロモーターは、遺伝子が、イソプロピル - d - チオ - ガラクトピラノシド (I P T G) によって誘導可能である l a c プロモーターの制御下である、T 7 R N A ポリメラーゼ (D E 3 プロファージ上に存在する) によって特異的に認識される。形質転換体 T u n e r (D E 3) / r p E T 2 1 (+) を、m l あたり 100 μ g のカルベニシリン (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Canada) を含む L B 培地 (ペプトン 10 g / L、コウボエキス 5 g / L、N a C l 10 g / L) 中で 250 r p m で撹拌しつつ 37 で、A₅₀₀ が 0.6 の値に達するまで成長させ

た。BVH-P7 His タグ付加S. pyogenes組換え体タンパク質の生産を誘導するために、細胞を0.1 mMの最終濃度のIPTGの存在下もう3時間インキュベートした。500 mL培養物から誘導された細胞を、遠心分離によってペレット化し、そして-70 で凍結した。

【0109】

不溶性分画またはIPTGで誘導したTuner (DE3) / r p E T 2 1 b (+)からのBVH-P7 His タグ付加組換え体タンパク質の精製を、His・Tag配列(6連続ヒスチジン残基)の、His・Bind金属キレート化樹脂上に固定化された2価カチオンに結合する特性に基づいてアフィニティークロマトグラフィーによって実施した。簡単には、IPTGで誘導された500 mL培養物から取得されたペレット化細胞を、6 M グアニジン・HClを含む溶解バッファー(20 mM Tris、500 mM NaCl、10 mM イミダゾール、pH 7.9)中に再懸濁し、超音波処理し、そして12000 X gで20分間遠心分離し、細胞残骸を除去した。上清を、Ni-NTAアガロース樹脂(Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada)と45分間4 でインキュベートした。BVH-P7 His タグ付加S. pyogenes組換え体タンパク質を、6 M グアニジノ-HClおよび250 mM イミダゾール-500 mM NaCl-20 mM Tris、pH 7.9を含む溶液で樹脂から溶出させた。サンプルからの塩およびイミダゾールの除去を、10 mM Trisおよび0.9% NaCl、pH 7.9で終夜4 に対する透析によってなした。組換え体タンパク質の量を、Micro BCA (Pierce, Rockford, Illinois)によって評価した。

【0110】

実施例 5

この例は、ヒト血清および、S. pyogenes抗原性調製品での免疫化後のマウスから収集した血清でのBVH-P7 His タグ付加S. pyogenes組換え体タンパク質の反応性を示す。

表3に示すように、精製されたHis タグ付加BVH-P7組換え体タンパク質を、通常の血清の貯留物中に存在する抗体によるイムノプロットにおいて認識した。これは重要な結果であり、なぜならそれはS. pyogenesと通常接触するヒトが、そのタンパク質へ特異的である抗体を発生させることを明かに示すからである。これらの特定のヒト抗体は、S. pyogenes感染に対する保護を暗示し得る。加えて、イムノプロットはまた、マウスを致死チャレンジに対して保護する、膜タンパク質富化されたS. pyogenes抗原性調製品で、免疫化されたマウスから収集された血清が、BVH-P7 His タグ付加組換え体タンパク質を認識する抗体をまた発生させたことを明かにした。この結果は、このタンパク質が感染に対してマウスを保護したS. pyogenes 抗原性調製品中に存在すること、およびこのストレプトコッカス性タンパク質が、対応するHis タグ付加組換え体タンパク質と反応する抗体を誘導したことを指摘する。

【0111】

表3 ヒト血清および、BVH-P7 His タグ付加組換え体タンパク質でS. pyogenes抗原性調製品で免疫化後の、マウスから収集された血清のイムノプロットの反応性

【表 4】

精製された 組換え タンパク質 ¹	見かけの 分子量 (kDa) ²	でのイムノプロットでの反応性	
		ヒト血清 ³	マウス血清 ⁴
BVH-P7	110	+	+

¹ 実施例 7 に記載されたように生産および精製されたBVH-P7 His タグ付加組換え体タンパク質を使用し、イムノプロットを実施した。

² B V H - P 7 H i s タグ付加組換え体タンパク質の分子量を、S D S - P A G E 後に評価した。

³ 健康ヒトボランティアから収集された血清を一緒に貯留し、そして1 / 5 0 0 に希釈しイムノプロットを実施した。

⁴ 膜タンパク質富化S. pyogenes抗原性調製品で免疫化後収集されたマウス血清を貯留し、そして1 / 5 0 0 希釈し、イムノプロットを実施した。これらのマウスは、致死S. pyogenesチャレンジに対して保護された。

【 0 1 1 2 】

実施例 6

この例は、インタクトのストレプトコッカス性細胞の表面のS. pyogenes B V H - P 7 タンパク質の抗体への接近可能性を示す。

細菌を、0 . 5 % コウボエキス(Difco Laboratories)および0 . 5 % ペプトンエキス(Merck, Darmstadt, Germany)を有するTood Hewitt (TH)培地(Difco Laboratories, Detroit, MI)中で、3 7 °Cで8 % C O ₂ 雰囲気中で成長させ、0 . 6 0 0 のO D _{4 9 0 n m}を与えた(~ 1 0 ⁸ C F U / m l)。抗B V H - P 7またはコントロール血清の希釈品を次いで添加し、そして細胞に結合させ、これを2時間4 °Cでインキュベートした。サンプルをブロッキングバッファー(2 % ウシ血清アルブミン(B S A)を含む燐酸バッファー生食水(P B S))で4回洗浄し、それからブロッキングバッファー中に希釈した1 m l のヤギフルオレセイン(F I T C)コンジュゲート抗マウスI g G + I g Mを添加した。室温での追加的6 0 分のインキュベーション後、サンプルをブロッキングバッファーで4回洗浄し、そしてP B S バッファー中の0 . 2 5 % ホルムアルデヒドで1 8 - 2 4時間4 °Cで固定化した。細胞をP B S バッファーで2回洗浄し、そしてP B S バッファーの5 0 0 μ l 中に再懸濁した。細胞を、フローサイトメトリー(Epics(登録商標)XL; Beckman Coulter, Inc.)によって分析するまで暗黒で4 °Cで保持した。サンプルあたり1万のインタクトなS. pyogenes細胞を分析し、そして結果を標識された細胞の存在および蛍光指数として表現した。蛍光指数を、コントロールマウス血清について取得された蛍光値によって割った、免疫血清でストレプトコッカス性細胞を標識した後得られたメジアン蛍光値として算出した。1の蛍光値は、インタクトのストレプトコッカス性細胞の表面の抗体の結合がないことを指摘した。

【 0 1 1 3 】

B V H - P 7 H i s タグ付加組換え体タンパク質で免疫化された8匹のマウスから収集した血清を、サイトフルオロメトリーによって分析し、そして結果を表4に表す。精製されたB V H - P 7 H i s タグ付加タンパク質で免疫化されたマウスから収集された血清の全ては、試験した異種性(A T C C 1 2 3 8 4 ; 血清型M 3)S. pyogenes菌株上の、それらの対応する表面曝露エピトープを効率的に認識するB V H - P 7 に特異的抗体を含んだ。蛍光指数は1 0 から1 8 まで変化した。分析した1 0 0 0 0 このS. pyogenes細胞のうち9 7 % より多くが、B V H - P 7 特異的抗血清中に存在する抗体で標識された。これらの血清をまた貯留し、そして以下のS. pyogenes菌株と反応させた：血清型M 1 S. pyogenes菌株A T C C 7 0 0 2 9 4、血清型M 3 および血清型M 1 8 S. pyogenes 菌株A T C C 1 2 3 5 7 を、アメリカンタイプカルチャーコレクション(Rockville, MD, USA)から取得した；血清型M 6 S. pyogenes S P Y 6 9 およびM 2 S. pyogenes S P Y 6 8 臨床的単離株は、Centre de recherche en infectiologie du Centre hospitalier de l'universite Laval, Sainte-Foyによって提供された。精製されたH i s タグ付加組換え体B V H - P 7 タンパク質で免疫化後収集された血清の貯留物中に存在するB V H - P 7 - 特異的抗体は、4 から9 までの間の蛍光指数を有するこれらのストレプトコッカス性菌株のそれぞれの細菌の表面に付着した。反対に、非免疫化または偽免疫化(sham-immunized)マウスから収集した貯留物または血清を使用したとき、ストレプトコッカス性細胞の標識は認められなかった。これらの観察は明白に、B V H - P 7 タンパク質が表面に接近可能であり、ここにそれは抗体によって容易に認識されることができるとを実証する。抗S. pyogenes抗体は、S. pyogenes感染に対する保護において重要な役割を演ずるこ

とを示した。

【 0 1 1 4 】

表 4 S. pyogenes A T C C 1 2 3 8 4 菌株 (血清型 M 3) のインタクトの細胞の表面の B V H - P 7 特異的抗体の付着の評価

【 表 5 】

血清同定	蛍光指数 ²	標識された細胞の% ³
S1 ¹	11	97
S2	11	97
S3	13	98
S4	16	99
S5	10	97
S6	12	97
S7	13	98
S8	18	99
ネガティブコントロール血清	1	9
ポジティブコントロール血清 ⁵	12	98

¹ マウス S 1 ないし S 8 を皮下に、QuilA アジュバント (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada) の 1 0 μ g と混合した 2 0 μ g の精製された B V H - P 7 組換え体タンパク質の 2 0 μ g で 3 週間間隔で 3 回注射した。血清を 1 / 5 0 希釈した。

² 蛍光指数を、コントロールマウスについて取得された蛍光値によって分割された免疫血清でストレプトコッカス性細胞を標識した後取得されたメジアン蛍光値として算出した。1 の蛍光値は、インタクトなストレプトコッカス性細胞の表面の抗体の結合がないことを示した。

³ 分析した 1 0 0 0 0 細胞からのストレプトコッカス標識した細胞の %

⁴ 非免疫化または偽免疫化されたマウスから収集された血清を、貯留 1 / 5 0 希釈し、そしてこのアッセイのためのネガティブコントロールとして使用した。

2 0 μ g の精製されたストレプトコッカス性組換え M タンパク質、すなわち周知の表面タンパク質で免疫化されたマウスから取得された血清を、1 / 2 0 0 希釈し、そしてアッセイのためのポジティブコントロールとして使用した。

【 0 1 1 5 】

実施例 7

この例は、ウサギハイパー免疫血清でのマウスの受動的免疫化によって誘導された胎児 S. pyogenes 感染に対する保護を示す。

ニュージーランドウサギ (Charles River Laboratories, St-Constant, Canada) を皮下に、実施例 4 に記載のように生産および精製し、そして Alhydrogel アジュバント (Suprefos Biosector a/s) に吸着させた B V H - P 7 H i s タグ付加組換え体タンパク質の、5 0 μ g および 1 0 0 μ g で多重部位に注射した。ウサギを B V H - P 7 H i s タグ付加組換え体タンパク質で 3 週間間隔で 3 回免疫化した。血液サンプルを、第 3 注射の 3 週間後に収集した。該血清中に存在する抗体を、4 0 % 飽和硫酸アンモニウムを使用する沈降によって精製した。1 0 匹のメスの C D - 1 マウス (Charles River) の群を静脈内に、B V H - P 7 H i s タグ付加組換え体タンパク質で免疫化されたウサギ、または関連のないコントロール組み換え体タンパク質で免疫化されたウサギから収集された精製された血清の 5 0 0 μ l で注射した。1 8 時間後、マウスを近似的に 2 X 1 0 ⁷ C F U のタイプ 3 S. pyogenes 菌株 A T C C 1 2 3 8 4 でチャレンジした。S. pyogens チャレンジ接種物のサンプルを、アガープレート上に置き、C F U を決定し、そしてチャレンジ用

量を確認した。死亡を、5日の期間について記録した。

【0116】

実施例 8

この例は、精製された組み換え体BVH-P7タンパク質での免疫化によって誘導される胎児*S. pyogenes*感染に対するマウスの保護を示す。

8匹のメスのBalb/c (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada)の群を皮下に、10 µgのQuilAアジュバント (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada)の存在下のアフィニティ精製されたBVH-P7 Hisタグ付加組換え体タンパク質の20 µg、またはコントロールとしてPBS中のQuilAアジュバント単独で2週間間隔で3回免疫化した。血液サンプルを、それぞれの免疫化の前の第1、第14および28日に、第3注射の2週間後(第42日)に、眼窩洞 (orbital sinus) から収集した。1週間後、マウスを、近似的に 3×10^6 CFUのタイプ3*S. pyogenes*菌株ATCC 12384でチャレンジした。*S. pyogenes* チャレンジ接種物のサンプルを、血液アガープレート上に置き、CFUを決定しそしてチャレンジ用量を確認した。精製組換え体BVH-P7タンパク質で免疫化された、8匹のマウスのうち4匹は、致死チャレンジに対して保護され、アジュバント単独を受容したマウスのわずか12% (1/8)と対比される(表1)。

10

【0117】

表5 組換え体BVH-P7タンパク質の、GAS菌株ATCC 12384 (タイプ3)に対する保護を誘起する能力

20

【表6】

免疫原	マウス生存数	% 生存
20 µg BVH-P7 + 10% QuilA	4/8	50
QuilAアジュバント単独、PBS中	1/8	12

【図 1】

Figure 1 (配列番号 1)

```

1 ATGAAGAAGC ATCTTAAAC AGTGTGCTTG ACCCTCACTA CAGTATCGGT AGTCAACCCAC
61 AATCAGAGAG TTTTATAGTT AGTCAAGAG CCAATCTCTA AACCAACTCA AGCTTATCTA
121 TCGATTCTTG GCGTCACTA CCGCAAGAGT AGCGTAAAG CCAAGTTTAA GATCTATCTA
181 ACTCTCGGCG CTGTTGATGA TACATGCACT GACTTACTTT CGGATAAAGC TACTACTCCT
241 GAAAGAAATA AGATTAATCT TGCTTAAGAT CCGAGAGAAC AAGAGTTTAA GCGAGTAACA
301 GAGATAACAG AATCAAGAAA CGAGATCACT TCGTGATCTC AACTAGACAA ATCAAGAGAG
361 TCTCTTTCTT TAAATAAAGC AGTGCATCA AGCTTAATTT GGGAGATTTG TGAATTTATTT
421 ACAGAGAGAG ATCTGATCTT TGGTCTTCA AACTCAGGTT TGAGAAAGTT ATCTGATCTT
481 GATCATCTGCT TATTGCTTAG TCAAGCAGCA GATGGAATCT AATTGATACA AAGAGCTAGT
541 TTTGCTTTTA TCCAGATATA AAGAGCGGCA ATTGCAGAA ATACAGTAGT GCGTCGAGAA
601 AATGGGAGAA TAGGCCAATC AGATGTGAT GGAAGAGAAA TATTAAAGCA AGGTGAGGTT
661 TTTAATCTTT ATCTCATAAA GAGGTGACA ATCCCACTG GTTAPACAA TATGTGCTCA
721 GATGCTTTTG TGACAAATTA GAATATTGCT GAGGTTAATC TTCTCGAAGC CCGTGAGACT
781 ATTTCTGACT ATGCTTTTGC TCACCTAGCT TTGAACAGCA TCGATTTGCC AGATAATTTA
841 AAGAGGATTG GAGAATTAGC TTTTTFGTAT AATCAAAATTA CAGGTAAACT TTCTTTGCCA
901 CCGTAGATTA TCGCATAGC AGAAGTCTCT TTTAAATCAA ACCATACAA AACCAATTAG
961 TTTAGAGGGA ATAGCTTAAA AGTGAATAGG GAGCTAGATT TCGAAGATTA TACTCTAGAT
1021 CAATCAATGC TACCTGAGCG TCTTGAAGAA ATAGAATCAG AAGCTTTTAC AGGAATATCA
1081 GGAGATGATC ACTACATAAA CCGTGTGTTT TTGTGACAAA AATCTGAGAA AATCTCTCTT
1141 GGTCTTGCTA CTGAAGATAC CTATGTATAT CTGATAAGT CATATAGCCA GAAAGATCTT
1201 GAATGTGAT ATACTATAAT GTTAGAGGA GTTTTAACT ATCAAAATA TATGTATACA
1261 GOTTTTTCAA ATAAAGGCTT ACAAAAGATA AAAGCTAATA AAACCTTAGA AATTCGAAA
1321 CAGCAAGATG GTGTTACTAT TACTGAATTT GGTGATAATG CTTTTCGCAA TGTGATTTT
1381 CAAAATATAA CTTTACGTAA ATATGATTG GAGAGATGAA AGCTTCCCTC AACTATCTCG
1441 AAAATAGGTT CTTTCTCTTT TCAATCTAT AACTGTAAAT CTTTGAAGC AAGTACGAT
1501 TTAGAGGAGA TTAAGAGGAG AGCCTTTATG AATAATGTA TGAAGACCTT GAAATTAATA
1561 GATAAATTAG TACTATTGTT TGATGCGGCT TTCCATATTA ATCATATTTA TGCAATCTGT
1621 CTTCAGAGAT CTGATCAAGA AATAGAGGCT TCAGCATTTT GCGCAAAATG TCACAAATAT
1681 CTTACTTTTA TGGAAGATGA GATTAGAGCC TTAGGTGAGA TGCGATTTT ATCAATATGA
1741 CTGAGCATC TGAATCTTTC TGACCAAAAA CAGTTAACAG AGATTCTGTG TCAGCTCTTT
1801 TCAGCAATG CCGTTAAGAA AGTATTATTA CCGCATCAC TGAAAACGAT TCAGAGAGAA
1861 GCGTTCAAAA AGAATCAATT AAAACAACCT GAGTGGCAT CTGCTTTGTC CCAATTTGCT
1921 TTTAATGCTT TGAATGATA TGATGTGAT GACAAATTT ATAAATAGT GGTGTTTAAA
1981 ACCGATCAT ATTCCTGCTC ACTACGAT GTGAGGAT TTATGTGTA TCGCAGAG
2041 TTATCTCTTA CAAATAGTAG CTTTGAAGAG ATTTTAAAC TAATCGAAGG TTTAGATTAT
2101 TCTCAATTAC GTCCAGCTAC TCAAGCTCAG TTAGAGACA TGACTACTGC AGGTAAAGCG
2161 TTTGTTGCTA AATCTTACCT CCGACAGAGA GAAAGACAAA AATCTCTTCA AGAAGACCAA
2221 TTTTCTCTTC TGCGATGATA GTTAGATAA CCAATGATA AGCATGATA GCGCTTATG
2281 ACCAAGAGAG CAACAAGAAA TGCTCACTGT CTTGAAGAAA GTATTAAACA AGCGGTATTA
2341 GCTTATAATA ATAGCGCTAT TAAAAAGCTT AATGTTAAGC GCTTGAAGAA AGAGTTAGAC
2401 TTGCTACAG GATTATGTTA GGGAAAGAGA CATTAGGCG AGCTCAATAT GGTACAGAGA
2461 GTTATTATAT TAAAGAGGCT TTGCGCTAT CCGAAATATT ATATCGGAT GACCTTTTAT
2521 TTTGCAAGT CTGGAATAT GATTATATTA CTGATATTA GTGACATAT TGGCAGAGAA
2581 CAAAAGAGCG CTATAGGTA TCTTATATTA AATGTTGAC AGGATAATGA AGGTATATAT
2641 GCGTTGCGAC TGCCACTTT AGCTGATATT GAGGGGCTCG ACATCAAAAC AATTITAAAT
2701 AGTAAGCTTA GTATATTAAT ATCTATCTGT CAGGTACGGA CTGACGCTTA TCAATAGAGTA
2761 GGTATTCTTC AAGCTATCA AATGCGAGC GCGAGAGCGT AGCACTATT CCGTAAACCA
2821 GGTACGCACT CTGAGAGGTC AAGCTCAAGT GAATCTGCTA ACTTAAGAGA TAGAGAGTTG
2881 CAATCAAGCC CAAGAAGGTA TAGAGAGGCA CACTCTGCAA TATTGCGTAC GACAGAGTCA
2941 AAGCGAGGCT TGTCTATGAG AATCTTAGT TACACTAGCG TTGCTTTACT GCTCAATATA
3001 ACTGCTATAA AAGAGAAAA ATATATA

```

【図 2】

Figure 2 (配列番号 2)

```

1 MKKHLKVAL TLTTVSVVTH NQEVFSLVKE FILKQTOASS SISGADYABS SGKSLKINE
61 TSGFVDDTDT DLFSKRTPT EIKKMLAG PRQELKAVT BMTSEKQIT SGSLQBSKE
121 SLGSLKTVPS SNWICDPT TKGNLVLGLS KSGVSLKQCT DHLVLPQAA DQGLQVQAS
181 PAFPTDKKTA IAEYTSRAGE NGEISQLDVG KREIINBGEV FNSYLLKXVT IPTGKXHQ
241 DAFVNDKNIA EVNLPESELT ISDYAFALHA LKQIDLPDNL KAIGELAFFND NQITGKLSLP
301 RQLMRLAERA FKSNIHKTIE FRGNSLKVIG BASPQNDLS QLMPLDGLKX ISEAPQGNP
361 GDDHYNNRVV LWTSGKGNPS GLATENTYVN PDKSLWQESP EIDYTKWLEZ DPTYQKNSVT
421 GFSNKLQKQV KRNKMLEIPK QHNGVTITZI GDNAPNVDPF QNKTLKXYDL SEVKLPSTIR
481 KIGAPAPQSN MLKSFEASDD LEEIKEGAFH NNIETLLEK DLVLTIGDAA FHINHTAIV
541 LPESVQELGR SIFRQGNHNN LIFGSGKVT LQMAFLSNR LSHLDLSKQK QLTETPQAF
601 SDNALKEVLL PASLKTIRE AFKNMLKQL EVASALSHIA FNALDNDKDG EQPDKVVKV
661 THMNSYALAD GHEFIVDPDK LSTIVDLKX ILRLLEGLDY STLRQTTQCT PRMTTAGKA
721 LLSKSNLRQG SKQKFLQSAQ PFLGRVLDLK AIAKAKALV TKAATKNGQL LERSINKAVL
781 AYNNSAIKKA NVKRLKEBLD LLTGLVEGKG PLAQATMVQG VVLLKTPLEL PEYIIGLVY
841 FDKSGKLIYA LDMSDTIGEG QKDAYNPIL NVDEBDEGHH ALAVATLADY EGLDIXTLN
901 SKLSQLTSIR QVPTAYHRA GIFQAIQMAA AEAQQLPKP GTHSEKSSSS ESANSKDRGL
961 QSNFKNNGR HSAILPKTGS KGSFVYGLIG TVTVALLSIL TAICKKKK*

```

【図 3 - 1】

Clustal W(1.4) マルチプル配列アラインメント

7 配列アラインメントした
ギャップ挿入 = 0

アラインメントスコア = 118839
保存されたアイデンティティ = 936

ベアウィズアラインメントモード : Fast

ベアウィズアラインメントパラメータ :

kdup = 1 Gap Penalty = 3 Top Diagonals = 5 Window Size = 5

マルチプルアラインメントパラメータ :

Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 0.1

Delay Divergent = 40% Gap Distance = 8

Similarity Matrix: blosum

プロセッシング時間 : 12.9 秒

```

Spy74_M3 1 DVAES 5
Spy70_M5 1 LVKEPILKQTOASSISGADYABS 24
Spy69_M6 1 KQTQASSISGADYABS 17
Spy68_M2 1 LVKEPILKQTOASSISGADYABS 24
Spy60_M1 1 LVKEPILKQTOASSISGADYABS 23
12357_M18 1 VKPEILKQTOASSISGADYABS 23
700294_M1 1 MKKHLKVALTLTTVSVVTHNQEVFSLVKEPILKQTOASSISGADYABS 50
*****

Spy74_M3 6 SGKSLKINESTGPDVDTVDLFSKRTPTPEKIKMLAGPREQELKAVT 55
Spy70_M5 25 SGKSLKINESTGPDVDTVDLFSKRTPTPEKIKMLAGPREQELKAVT 74
Spy69_M6 18 SGKSLKINESTGPDVDTVDLFSKRTPTPEKIKMLAGPREQELKAVT 67
Spy68_M2 25 SGKSLKINESTGPDVDTVDLFSKRTPTPEKIKMLAGPREQELKAVT 74
Spy60_M1 25 SGKSLKINESTGPDVDTVDLFSKRTPTPEKIKMLAGPREQELKAVT 74
12357_M18 24 SGKSLKINESTGPDVDTVDLFSKRTPTPEKIKMLAGPREQELKAVT 73
700294_M1 51 SGKSLKINESTGPDVDTVDLFSKRTPTPEKIKMLAGPREQELKAVT 100
*****

Spy74_M3 56 ENTSESEKQINSQSGLQBSKESLSLNKRVFSTSNWICDPTFKGNTLVGLS 105
Spy70_M5 75 ENTSESEKQINSQSGLQBSKESLSLNKRVFSTSNWICDPTFKGNTLVGLS 124
Spy69_M6 68 ENTSESEKQINSQSGLQBSKESLSLNKRVFSTSNWICDPTFKGNTLVGLS 117
Spy68_M2 75 ENTSESEKQINSQSGLQBSKESLSLNKRVFSTSNWICDPTFKGNTLVGLS 124
Spy60_M1 74 ENTSESEKQINSQSGLQBSKESLSLNKRVFSTSNWICDPTFKGNTLVGLS 123
12357_M18 74 ENTSESEKQINSQSGLQBSKESLSLNKRVFSTSNWICDPTFKGNTLVGLS 123
700294_M1 101 ENTSESEKQINSQSGLQBSKESLSLNKRVFSTSNWICDPTFKGNTLVGLS 150
*****

Spy74_M3 106 KSQVSKLQSDHVLVPSQAADGTQLQVASFPTPKKTAIAEYTSRAGE 155
Spy70_M5 125 KSQVSKLQSDHVLVPSQAADGTQLQVASFPTPKKTAIAEYTSRAGE 174
Spy69_M6 118 KSQVSKLQSDHVLVPSQAADGTQLQVASFPTPKKTAIAEYTSRAGE 167
Spy68_M2 125 KSQVSKLQSDHVLVPSQAADGTQLQVASFPTPKKTAIAEYTSRAGE 174
Spy60_M1 124 KSQVSKLQSDHVLVPSQAADGTQLQVASFPTPKKTAIAEYTSRAGE 174
12357_M18 124 KSQVSKLQSDHVLVPSQAADGTQLQVASFPTPKKTAIAEYTSRAGE 173
700294_M1 151 KSQVSKLQSDHVLVPSQAADGTQLQVASFPTPKKTAIAEYTSRAGE 200
*****

```

FIG. 3

【図 3 - 2】

```

Spy74_M3 156 NGEISQLDVGKREIINBGEVFNYSYLLKXVTPTGTXHIGQDAFVNKNIA 205
Spy70_M5 175 NGEISQLDVGKREIINBGEVFNYSYLLKXVTPTGTXHIGQDAFVNKNIA 224
Spy69_M6 158 NGEISQLDVGKREIINBGEVFNYSYLLKXVTPTGTXHIGQDAFVNKNIA 217
Spy68_M2 175 NGEISQLDVGKREIINBGEVFNYSYLLKXVTPTGTXHIGQDAFVNKNIA 224
Spy60_M1 175 NGEISQLDVGKREIINBGEVFNYSYLLKXVTPTGTXHIGQDAFVNKNIA 223
12357_M18 174 NGEISQLDVGKREIINBGEVFNYSYLLKXVTPTGTXHIGQDAFVNKNIA 224
700294_M1 201 NGEISQLDVGKREIINBGEVFNYSYLLKXVTPTGTXHIGQDAFVNKNIA 250
*****

Spy74_M3 206 EVNLPESELTISDYAFALHAKQIDLPDNLKAIGELAFFNQITGKLSLP 255
Spy70_M5 225 EVNLPESELTISDYAFALHAKQIDLPDNLKAIGELAFFNQITGKLSLP 274
Spy69_M6 218 EVNLPESELTISDYAFALHAKQIDLPDNLKAIGELAFFNQITGKLSLP 267
Spy68_M2 225 EVNLPESELTISDYAFALHAKQIDLPDNLKAIGELAFFNQITGKLSLP 274
Spy60_M1 225 EVNLPESELTISDYAFALHAKQIDLPDNLKAIGELAFFNQITGKLSLP 274
12357_M18 224 EVNLPESELTISDYAFALHAKQIDLPDNLKAIGELAFFNQITGKLSLP 273
700294_M1 251 EVNLPESELTISDYAFALHAKQIDLPDNLKAIGELAFFNQITGKLSLP 300
*****

Spy74_M3 256 RQMLAERAFKSNHIKTIIFRGNLSKVIIEASFPQNDLSQMLPDGLEK 305
Spy70_M5 275 RQMLAERAFKSNHIKTIIFRGNLSKVIIEASFPQNDLSQMLPDGLEK 324
Spy69_M6 268 RQMLAERAFKSNHIKTIIFRGNLSKVIIEASFPQNDLSQMLPDGLEK 317
Spy68_M2 275 RQMLAERAFKSNHIKTIIFRGNLSKVIIEASFPQNDLSQMLPDGLEK 324
Spy60_M1 275 RQMLAERAFKSNHIKTIIFRGNLSKVIIEASFPQNDLSQMLPDGLEK 324
12357_M18 274 RQMLAERAFKSNHIKTIIFRGNLSKVIIEASFPQNDLSQMLPDGLEK 323
700294_M1 301 RQMLAERAFKSNHIKTIIFRGNLSKVIIEASFPQNDLSQMLPDGLEK 350
*****

Spy74_M3 306 IESEAFNPGDDHYNNRVVLTGSGKNPGLATENTYVNPDKSLWQESP 355
Spy70_M5 325 IESEAFNPGDDHYNNRVVLTGSGKNPGLATENTYVNPDKSLWQESP 374
Spy69_M6 318 IESEAFNPGDDHYNNRVVLTGSGKNPGLATENTYVNPDKSLWQESP 367
Spy68_M2 325 IESEAFNPGDDHYNNRVVLTGSGKNPGLATENTYVNPDKSLWQESP 374
Spy60_M1 325 IESEAFNPGDDHYNNRVVLTGSGKNPGLATENTYVNPDKSLWQESP 374
12357_M18 324 IESEAFNPGDDHYNNRVVLTGSGKNPGLATENTYVNPDKSLWQESP 373
700294_M1 351 IESEAFNPGDDHYNNRVVLTGSGKNPGLATENTYVNPDKSLWQESP 400
*****

Spy74_M3 356 EIDYTKWLEEDPTYQKNSVTGFSKGLQKVKKNHLEIPKHNGVTITTEI 405
Spy70_M5 375 EIDYTKWLEEDPTYQKNSVTGFSKGLQKVKKNHLEIPKHNGVTITTEI 424
Spy69_M6 368 EIDYTKWLEEDPTYQKNSVTGFSKGLQKVKKNHLEIPKHNGVTITTEI 417
Spy68_M2 375 EIDYTKWLEEDPTYQKNSVTGFSKGLQKVKKNHLEIPKHNGVTITTEI 424
Spy60_M1 375 EIDYTKWLEEDPTYQKNSVTGFSKGLQKVKKNHLEIPKHNGVTITTEI 424
12357_M18 374 EIDYTKWLEEDPTYQKNSVTGFSKGLQKVKKNHLEIPKHNGVTITTEI 423
700294_M1 401 EIDYTKWLEEDPTYQKNSVTGFSKGLQKVKKNHLEIPKHNGVTITTEI 450
*****

Spy74_M3 406 GDNAPFNVDPQNKTLRKLYDLEVKLPSTIRKIGAFAPQSNLNKSEASDD 455
Spy70_M5 425 GDNAPFNVDPQNKTLRKLYDLEVKLPSTIRKIGAFAPQSNLNKSEASDD 474
Spy69_M6 418 GDNAPFNVDPQNKTLRKLYDLEVKLPSTIRKIGAFAPQSNLNKSEASDD 467
Spy68_M2 425 GDNAPFNVDPQNKTLRKLYDLEVKLPSTIRKIGAFAPQSNLNKSEASDD 474
Spy60_M1 425 GDNAPFNVDPQNKTLRKLYDLEVKLPSTIRKIGAFAPQSNLNKSEASDD 473
12357_M18 424 GDNAPFNVDPQNKTLRKLYDLEVKLPSTIRKIGAFAPQSNLNKSEASDD 473
700294_M1 451 GDNAPFNVDPQNKTLRKLYDLEVKLPSTIRKIGAFAPQSNLNKSEASDD 500

```

FIG. 3

(続き)

【図 3 - 3】

```

Spy74_M3 456 LERIKGAFMNNRIETLEKDKLVTIGDAAPHINHIYAIIVLPSVQSIGR 505
Spy70_M5 475 LERIKGAFMNNRIETLEKDKLVTIGDAAPHINHIYAIIVLPSVQSIGR 524
Spy69_M6 468 LERIKGAFMNNRIETLEKDKLVTIGDAAPHINHIYAIIVLPSVQSIGR 517
Spy68_M2 475 LERIKGAFMNNRIETLEKDKLVTIGDAAPHINHIYAIIVLPSVQSIGR 524
Spy60_M1 475 LERIKGAFMNNRIETLEKDKLVTIGDAAPHINHIYAIIVLPSVQSIGR 524
12357_M18 474 LERIKGAFMNNRIETLEKDKLVTIGDAAPHINHIYAIIVLPSVQSIGR 523
700294_M1 501 LERIKGAFMNNRIETLEKDKLVTIGDAAPHINHIYAIIVLPSVQSIGR 550
*****
Spy74_M3 506 SAFRQNGANNLIIPGSKVKTIGEMAFLSRLHLLDLSEBQKLTIPVQAF 555
Spy70_M5 525 SAFRQNGANNLIIPGSKVKTIGEMAFLSRLHLLDLSEBQKLTIPVQAF 574
Spy69_M6 518 SAFRQNGANNLIIPGSKVKTIGEMAFLSRLHLLDLSEBQKLTIPVQAF 567
Spy68_M2 525 SAFRQNGANNLIIPGSKVKTIGEMAFLSRLHLLDLSEBQKLTIPVQAF 574
Spy60_M1 525 SAFRQNGANNLIIPGSKVKTIGEMAFLSRLHLLDLSEBQKLTIPVQAF 574
12357_M18 524 SAFRQNGANNLIIPGSKVKTIGEMAFLSRLHLLDLSEBQKLTIPVQAF 573
700294_M1 551 SAFRQNGANNLIIPGSKVKTIGEMAFLSRLHLLDLSEBQKLTIPVQAF 600
*****
Spy74_M3 556 SDNALKEVLLPASLKTIRESAFKKHLLKQLEVASALSHIAFNALDDNDGD 605
Spy70_M5 575 SDNALKEVLLPASLKTIRESAFKKHLLKQLEVASALSHIAFNALDDNDGD 624
Spy69_M6 568 SDNALKEVLLPASLKTIRESAFKKHLLKQLEVASALSHIAFNALDDNDGD 617
Spy68_M2 575 SDNALKEVLLPASLKTIRESAFKKHLLKQLEVASALSHIAFNALDDNDGD 624
Spy60_M1 575 SDNALKEVLLPASLKTIRESAFKKHLLKQLEVASALSHIAFNALDDNDGD 624
12357_M18 574 SDNALKEVLLPASLKTIRESAFKKHLLKQLEVASALSHIAFNALDDNDGD 623
700294_M1 601 SDNALKEVLLPASLKTIRESAFKKHLLKQLEVASALSHIAFNALDDNDGD 650
*****
Spy74_M3 606 BQFQNVVVKTHNSVALADGSHFIVDPKLSSTIVOLEKILKILBGLDY 655
Spy70_M5 625 BQFQNVVVKTHNSVALADGSHFIVDPKLSSTIVOLEKILKILBGLDY 674
Spy69_M6 618 BQFQNVVVKTHNSVALADGSHFIVDPKLSSTIVOLEKILKILBGLDY 667
Spy68_M2 625 BQFQNVVVKTHNSVALADGSHFIVDPKLSSTIVOLEKILKILBGLDY 674
Spy60_M1 625 BQFQNVVVKTHNSVALADGSHFIVDPKLSSTIVOLEKILKILBGLDY 674
12357_M18 624 BQFQNVVVKTHNSVALADGSHFIVDPKLSSTIVOLEKILKILBGLDY 673
700294_M1 651 BQFQNVVVKTHNSVALADGSHFIVDPKLSSTIVOLEKILKILBGLDY 700
*****
Spy74_M3 656 STLRQTTQTOFRDMTTAGKALLSKSNLRQGBKQFLQEAQFFLGRVLDLK 705
Spy70_M5 675 STLRQTTQTOFRDMTTAGKALLSKSNLRQGBKQFLQEAQFFLGRVLDLK 724
Spy69_M6 668 STLRQTTQTOFRDMTTAGKALLSKSNLRQGBKQFLQEAQFFLGRVLDLK 717
Spy68_M2 675 STLRQTTQTOFRDMTTAGKALLSKSNLRQGBKQFLQEAQFFLGRVLDLK 724
Spy60_M1 675 STLRQTTQTOFRDMTTAGKALLSKSNLRQGBKQFLQEAQFFLGRVLDLK 724
12357_M18 674 STLRQTTQTOFRDMTTAGKALLSKSNLRQGBKQFLQEAQFFLGRVLDLK 723
700294_M1 701 STLRQTTQTOFRDMTTAGKALLSKSNLRQGBKQFLQEAQFFLGRVLDLK 750
*****
Spy74_M3 706 AIAKAKALVTKATNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKCANVKELEKELD 755
Spy70_M5 725 AIAKAKALVTKATNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKCANVKELEKELD 774
Spy69_M6 718 AIAKAKALVTKATNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKCANVKELEKELD 767
Spy68_M2 725 AIAKAKALVTKATNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKCANVKELEKELD 774
Spy60_M1 724 AIAKAKALVTKATNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKCANVKELEKELD 774
12357_M18 724 AIAKAKALVTKATNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKCANVKELEKELD 773
700294_M1 751 AIAKAKALVTKATNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKCANVKELEKELD 800
*****

```

FIG. 3

(続き)

【図 3 - 4】

```

Spy74_M3 756 LLTGLVEGKGPLAQATMVQGVYLLKTPLPLPEYYIIGLVNFYFQKSGKLIYA 805
Spy70_M5 775 LLTGLVEGKGPLAQATMVQGVYLLKTPLPLPEYYIIGLVNFYFQKSGKLIYA 824
Spy69_M6 768 LLTGLVEGKGPLAQATMVQGVYLLKTPLPLPEYYIIGLVNFYFQKSGKLIYA 817
Spy68_M2 775 LLTGLVEGKGPLAQATMVQGVYLLKTPLPLPEYYIIGLVNFYFQKSGKLIYA 824
Spy60_M1 775 LLTGLVEGKGPLAQATMVQGVYLLKTPLPLPEYYIIGLVNFYFQKSGKLIYA 824
12357_M18 774 LLTGLVEGKGPLAQATMVQGVYLLKTPLPLPEYYIIGLVNFYFQKSGKLIYA 823
700294_M1 801 LLTGLVEGKGPLAQATMVQGVYLLKTPLPLPEYYIIGLVNFYFQKSGKLIYA 850
*****
Spy74_M3 806 LDMSDTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNEGYHALAVATLADYEGLDIKTILN 855
Spy70_M5 825 LDMSDTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNEGYHALAVATLADYEGLDIKTILN 874
Spy69_M6 818 LDMSDTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNEGYHALAVATLADYEGLDIKTILN 867
Spy68_M2 825 LDMSDTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNEGYHALAVATLADYEGLDIKTILN 874
Spy60_M1 825 LDMSDTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNEGYHALAVATLADYEGLDIKTILN 874
12357_M18 824 LDMSDTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNEGYHALAVATLADYEGLDIKTILN 873
700294_M1 851 LDMSDTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNEGYHALAVATLADYEGLDIKTILN 900
*****
Spy74_M3 856 SKLSQLTSIRQVPTAAYHRAGIFQAIQNAAAEEQLLPKPGTHSEKSSSS 905
Spy70_M5 875 SKLSQLTSIRQVPTAAYHRAGIFQAIQNAAAEEQLLPKPGTHSEKSSSS 924
Spy69_M6 868 SKLSQLTSIRQVPTAAYHRAGIFQAIQNAAAEEQLLPKPGTHSEKSSSS 917
Spy68_M2 875 SKLSQLTSIRQVPTAAYHRAGIFQAIQNAAAEEQLLPKPGTHSEKSSSS 924
Spy60_M1 875 SKLSQLTSIRQVPTAAYHRAGIFQAIQNAAAEEQLLPKPGTHSEKSSSS 924
12357_M18 874 SKLSQLTSIRQVPTAAYHRAGIFQAIQNAAAEEQLLPKPGTHSEKSSSS 923
700294_M1 901 SKLSQLTSIRQVPTAAYHRAGIFQAIQNAAAEEQLLPKPGTHSEKSSSS 950
*****
Spy74_M3 906 ESANSKDRGLQSNPKTNRGRHSAILPRTGSKGSFVYGIIGYTSVAL 951
Spy70_M5 925 ESANSKDRGLQSNPKTNRGRHSAILPRTGSKGSFVYGIIGYTSVAL 970
Spy69_M6 918 ESANSKDRGLQSNPKTNRGRHSAILPRTGSKGSFVYGIIGYTSVAL 963
Spy68_M2 925 ESANSKDRGLQSNPKTNRGRHSAILPRTGSKGSFVYGIIGYTSVAL 971
Spy60_M1 925 ESANSKDRGLQSNPKTNRGRHSAILPRTGSKGSFVYGIIGYTSVAL 971
12357_M18 924 ESANSKDRGLQSNPKTNRGRHSAILPRTGSKGSFVYGIIGYTSVAL 969
700294_M1 951 ESANSKDRGLQSNPKTNRGRHSAILPRTGSKGSFVYGIIGYTSVALLSLI 1000
*****
Spy74_M3 952 951 ( 配列番号 3 )
Spy70_M5 971 970 ( 配列番号 4 )
Spy69_M6 964 963 ( 配列番号 5 )
Spy68_M2 972 971 ( 配列番号 6 )
Spy60_M1 972 971 ( 配列番号 7 )
12357_M18 970 969 ( 配列番号 8 )
700294_M1 1001 TAIKXKKY 1008 ( 配列番号 2 )

```

FIG. 3

(続き)

【配列表】

0004281861000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
C 0 7 K 14/315	(2006.01)	C 0 7 K 14/315	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/569	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
		G 0 1 N 33/569	C

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 デニ・マルタン

カナダ、ジー・3エイ・1イー9、ケベック、サン・オーギュスタン・ドゥ・デスモーレ、リュ・ガ
ブーリー4728 - ジェ番

(72)発明者 ステファヌ・リュ

カナダ、ジー・1イー・1ジェイ3、ケベック、ボーポール、アヴニユ・デ・パンソン869番

(72)発明者 ベルナル・エール・プロドゥール

カナダ、ジー・1ティ・1エヌ6、ケベック、シレリー、マリタン2401番

(72)発明者 ジョゼ・アメル

カナダ、ジー・1ティ・1エヌ6、ケベック、シレリー、マリタン2401番

(72)発明者 パトリック・ルオー

カナダ、ジー・6ジェイ・1ピー9、ケベック、サン・エティエンヌ・ドゥ・ローゾン、リュ・ベレ
ール44番

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第01/032882 (WO, A1)

国際公開第99/052939 (WO, A1)

J. Clin. Invest., (1999), 103, [9], p.1261-1268

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed