

(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2014-520122  
(P2014-520122A)

(43) 公表日 平成26年8月21日(2014.8.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00 H	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/04	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 5
<b>C 0 7 K 14/315 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/315 Z N A	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-516059 (P2014-516059)  
 (86) (22) 出願日 平成24年6月15日 (2012.6.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月15日 (2014.1.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/042782  
 (87) 国際公開番号 W02012/174455  
 (87) 国際公開日 平成24年12月20日 (2012.12.20)  
 (31) 優先権主張番号 61/498, 397  
 (32) 優先日 平成23年6月17日 (2011.6.17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/641, 448  
 (32) 優先日 平成24年5月2日 (2012.5.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504163771  
 ユニバーシティ オブ テネシー リサーチ  
 ファウンデーション  
 アメリカ合衆国 テネシー 37996-1527,  
 ノックスビル, スイート 403,  
 ホワイト アベニュー 1534  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A群連鎖球菌多価ワクチン

(57) 【要約】

A群連鎖球菌 (G A S) に対して特異的に免疫応答を誘発するのに有用な免疫原性組成物を提供する。本発明により提供される免疫原性組成物は多価であり、G A S に対して免疫応答を誘発する複数の免疫原性ペプチド、或いは免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチドを含む。本発明により提供される免疫原性組成物は、免疫原性組成物に含まれる (Mタンパク質又はSpaタンパク質に由来する) 免疫原性ペプチドにより表される G A S 血清型に対して免疫応答を誘発すると共に、免疫原性組成物に含まれる何れの免疫原性ペプチドにも表されない血清型に対しても免疫応答を誘発する。斯かる組成物を用いて、G A S に対する免疫応答を誘発し、或いは G A S 感染を治療し、又はその発生確率を低減する方法も提供される。

【選択図】 図 3

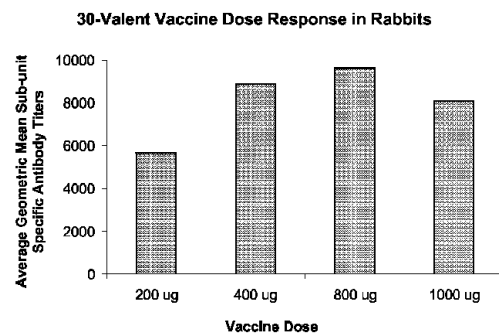


Fig. 3

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

少なくとも 31 の免疫原性ペプチドを含む免疫原性組成物であって、各免疫原性ペプチドは相違すると共に、異なる M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含み、異なる M タンパク質は各々独立に、A 群連鎖球菌 (A 群連鎖球菌 (group A Streptococcus) : GAS) 血清型 1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、及び 118 の M タンパク質から選択され、Spa タンパク質は GAS 血清型 18 から選択され、且つ、当該免疫原性組成物は GAS に対する免疫応答を誘導する、免疫原性組成物。

10

**【請求項 2】**

前記異なる免疫原性ペプチドのうち少なくとも 4 つが、タンデムに連結されて融合ポリペプチドを形成する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 3】**

前記免疫原性組成物が第 1 の融合ポリペプチド、第 2 の融合ポリペプチド、第 3 の融合ポリペプチド、及び第 4 の融合ポリペプチドを含み、これらの融合ポリペプチドは各々、タンデムに連結された少なくとも 6 つの前記異なる免疫原性ペプチドを含む、請求項 1 又は 2 に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 4】**

前記第 1 の融合ポリペプチドは、タンデムに連結された 8 つの前記異なる免疫原性ペプチドを含み、前記 8 つの免疫原性ペプチドが各々、異なる M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含み、異なる M タンパク質は各々独立に、GAS 血清型 1、2、3、6、12、18、及び 28 の M タンパク質から選択され、Spa タンパク質は GAS 血清型 18 から選択される、請求項 3 に記載の免疫原性組成物。

20

**【請求項 5】**

前記第 1 の融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する免疫原性ペプチドが、前記第 1 の融合ポリペプチドのアミノ末端に位置する免疫原性ペプチドの複製である、請求項 4 に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 6】**

前記複製される免疫原性ペプチドが、GAS 血清型 1 の M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む、請求項 5 に記載の免疫原性組成物。

30

**【請求項 7】**

前記第 2 の融合ポリペプチドが、タンデムに連結された前記異なる免疫原性ペプチドを 8 つ含み、ここで前記 8 つの免疫原性ペプチドの各々が、GAS 血清型 4、5、11、14、19、24、29、及び 75 の M タンパク質から独立に選択される異なる M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む、請求項 3 に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 8】**

前記第 2 の融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する免疫原性ペプチドが、前記第 2 の融合ポリペプチドのアミノ末端に位置する免疫原性ペプチドの複製である、請求項 7 に記載の免疫原性組成物。

40

**【請求項 9】**

前記複製される免疫原性ペプチドが、GAS 血清型 4 の M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む、請求項 8 に記載の免疫原性組成物。

**【請求項 10】**

前記第 3 の融合ポリペプチドが、タンデムに連結された前記異なる免疫原性ペプチドを 8 つ含み、ここで前記 8 つの免疫原性ペプチドの各々が、GAS 血清型 22、44、58、73、77、78、89、及び 118 の M タンパク質から独立に選択される異なる M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む、請求項 3 に記載

50

の免疫原性組成物。

【請求項 1 1】

前記第 3 の融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する免疫原性ペプチドが、前記第 3 の融合ポリペプチドのアミノ末端に位置する免疫原性ペプチドの複製である、請求項 1 0 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 2】

前記複製される免疫原性ペプチドが、G A S 血清型 7 7 の M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、請求項 1 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 3】

前記第 4 の融合ポリペプチドが、タンデムに連結された前記異なる免疫原性ペプチドを 7 つ含み、ここで前記 7 つの免疫原性ペプチドの各々が、G A S 血清型 4 9、8 1、8 2、8 3、8 7、9 2、及び 1 1 4 の M タンパク質から独立に選択される異なる M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、請求項 3 に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 1 4】

前記第 4 の融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する免疫原性ペプチドが、前記第 4 の融合ポリペプチドのアミノ末端に位置する免疫原性ペプチドの複製である、請求項 1 3 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 5】

前記複製される免疫原性ペプチドが、G A S 血清型 8 3 の M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、請求項 1 4 に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 1 6】

前記免疫原性ペプチドの各々が、( a ) 前記異なる M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を二重に；( b ) 前記異なる M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 4 0 のアミノ酸；( b ) 前記異なる M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 4 5 のアミノ酸；又は、( d ) 前記異なる M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 5 0 のアミノ酸を含む、請求項 1 又は 2 に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 1 7】

( a ) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 1 の融合ポリペプチド；  
 ( b ) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 2 の融合ポリペプチド；  
 ( c ) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 3 の融合ポリペプチド；及び  
 ( d ) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 4 の融合ポリペプチド  
 を含む免疫原性組成物であって、A 群連鎖球菌 ( group A Streptococcus ) に対する免疫応答を誘発する免疫原性組成物。

40

【請求項 1 8】

( a ) 前記第 1 の融合ポリペプチドが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含み；( b ) 前記第 2 の融合ポリペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含み；( c ) 前記第 3 の融合ポリペプチドが、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含み；( d ) 前記第 4 の融合ポリペプチドが、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 7 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 9】

( a ) 前記第 1 の融合ポリペプチドが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み；( b ) 前記第 2 の融合ポリペプチドが、配列番号 2 に

50

記載のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；(c)前記第3の融合ポリペプチドが、配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；(d)前記第4の融合ポリペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、請求項17に記載の免疫原性組成物。

【請求項20】

(a)前記第1の融合ポリペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含み；(b)前記第2の融合ポリペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含み；(c)前記第3の融合ポリペプチドが、配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含み；(d)前記第4の融合ポリペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含む、請求項17に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項21】

(a)前記第1の融合ポリペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含み；(b)前記第2の融合ポリペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含み；(c)前記第3の融合ポリペプチドが、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含み；(d)前記第4の融合ポリペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含む、請求項17に記載の免疫原性組成物。

【請求項22】

医薬的に許容可能な賦形剤を更に含む、請求項1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項23】

医薬的に許容可能なアジュバントを更に含む、請求項1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項24】

A群連鎖球菌(group A Streptococcus)に対する免疫応答が、GAS1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、及び118血清型のうち少なくとも何れかに対する免疫応答を含む、請求項1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項25】

対象においてA群連鎖球菌(group A Streptococcus)に対する免疫応答を誘発する方法であって、請求項1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物を対象に投与することを含む方法。

30

【請求項26】

対象においてA群連鎖球菌(group A Streptococcus)感染が生じる可能性を低減する方法であって、請求項1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物を対象に投与することを含む方法。

【請求項27】

対象においてA群連鎖球菌(group A Streptococcus)感染を予防又は治療する方法であって、請求項1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物を対象に投与することを含む方法。

40

【請求項28】

A群連鎖球菌(group A Streptococcus)感染を予防又は治療するために使用される、請求項1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項29】

A群連鎖球菌(group A Streptococcus)感染を予防又は治療するためのワクチンの製造のための、請求項1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物の使用。

【請求項30】

A群連鎖球菌(group A Streptococcus)感染を予防又は治療するための、請求項1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

50

## 【請求項 3 1】

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列 ;  
 (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列 ;  
 (c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列 ;  
 又は  
 (d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列  
 を含む融合ポリペプチドであって、  
 A 群連鎖球菌 (group A Streptococcus) に対する免疫応答を誘発する融合ポリペプチド  
 。

10

## 【請求項 3 2】

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列 ;  
 (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列 ;  
 (c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列 ; 又は  
 (d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列  
 を含む、請求項 3 1 に記載の融合ポリペプチド。

## 【請求項 3 3】

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列 ;  
 (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列 ;  
 (c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列 ; 又は  
 (d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列  
 を含む、請求項 3 1 に記載の融合ポリペプチド。

20

## 【請求項 3 4】

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列 ;  
 (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列 ;  
 (c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列 ; 又は  
 (d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列  
 を含む、請求項 3 1 に記載の融合ポリペプチド。

## 【請求項 3 5】

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列 ;  
 (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列 ;  
 (c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列 ; 又は  
 (d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列  
 を含む、請求項 3 1 に記載の融合ポリペプチド。

30

## 【請求項 3 6】

請求項 3 1 ~ 3 5 の何れか一項に記載の融合ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレ  
 オチド。

## 【請求項 3 7】

請求項 3 6 の単離ポリヌクレオチドと作動式に連結された少なくとも 1 つの発現調節領  
 域を含む組換発現ベクター。

40

## 【請求項 3 8】

請求項 3 7 の組換発現ベクターでトランスフェクト、形質導入 (transduced) 又は形質  
 転換 (transformed) された単離宿主細胞。

## 【請求項 3 9】

融合ポリペプチドを製造する方法であって :

(a) 請求項 3 8 の単離宿主細胞を培養し ;  
 (b) 宿主細胞の培養物から融合ポリペプチドを単離する  
 ことを含む方法。

## 【請求項 4 0】

請求項 3 1 ~ 3 5 の何れか一項に記載の融合ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、

50

当該抗体を含む可能性がある生物学的試料において検出する方法であって：

( a ) 生物学的試料を、

( i ) Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチドであって、ここでMタンパク質は、A群連鎖球菌 ( group A Streptococcus ) : G A S ) 血清型 1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、及び118のMタンパク質から選択され、Spaタンパク質はG A S血清型18から選択される、免疫原性ペプチド；

( ii ) 二量体ペプチドであって、前記二量体ペプチドの各ペプチドは相違すると共に、異なるMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含み、前記異なるMタンパク質は各々独立に、A群連鎖球菌 ( A群連鎖球菌 ( group A Streptococcus ) : G A S ) 血清型 1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、及び118のMタンパク質から選択され、前記Spaタンパク質はG A S血清型18から選択される、二量体ペプチド；又は

( iii ) 請求項31～35の何れか一項に記載の融合ポリペプチド

の何れかと接触させ；

( b ) 当該免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドと、生物学的試料との特異的結合を検出し、これにより生物学的試料が抗体を含むことが示される、ことを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は35U.S.C. § 119(e)の下、米国仮特許出願第61/498,397号(2011年6月17日出願)及び米国仮特許出願第61/641,448号(2012年5月2日)に基づく優先権を主張する。これらの出願はその全体が援用により本願明細書に組み込まれる。

【0002】

政府利益の宣言

本発明は国立衛生研究所の許可番号AI-010085、AI-060592及び5T35DK007405の下、政府支援により為されたものである。政府は本発明に対して一定の権利を有する。

【0003】

配列表に関する宣言

本願に関する配列表は紙コピーではなくテキスト形態で提供され、援用により本願明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイル名は920098\_414PC\_SEQUENCE\_LISTING.txtである。本テキストファイルは93KBであり、2012年6月14日に作成され、EFS-Webを介して電子的に提出される。

【0004】

技術分野

A群連鎖球菌 ( group A streptococcal : G A S ) 感染を予防するための安全且つ効果的なワクチンが求められている。本明細書において、多価ワクチンとは、複数のG A S血清型に対して免疫応答を誘発し、それを必要とする対象を免疫化するのに有用なワクチンを言う。

【背景技術】

【0005】

A群連鎖球菌 ( group A streptococcus : G A S ) 感染を予防するための安全且つ効果的なワクチンを開発する努力が、何十年にも亘って進められている。これまで多数のG A S抗原が潜在的なワクチン成分として特定されてきたが(例えばSteer et al, Curr. Opin. Infect. Dis. 22:544-52(2009)等参照)、リード候補は表面Mタンパク質のアミノ末端領域を提示するタイプ特異的ペプチドである(例えばKotloff et al, JAMA 292:709-15

10

20

30

40

50

(2004); McNeil et al, Clin. Infect. Dis. 41:1114-22 (2005) 等参照)。

【0006】

北米や欧州等の経済発展国や地域において疾患の大きな負担となっているのは、単純性咽頭炎及び重症侵襲的感染症である(例えばCarapetis et al, The Lancet Infectious Diseases 5:685-94 (2005)等参照)。GAS感染の世界的負担が最も顕著なのは、急性リウマチ熱(acute rheumatic fever: ARF)やリウマチ性心疾患(rheumatic heart disease: RHD)が蔓延する貧困国である(例えば上記Carapetis et al.等参照)。Mタンパク質系ワクチンを用いたARF誘発性感染のワクチン予防は、困難な課題だと考えられてきた。これは、発展途上国に存在するGASemmタイプが、世界の経済発展地域と比べて異なっているからである(例えばSteer et al., The Lancet Infectious Diseases 9:611-16 (2009)等参照)。26価Mタンパク質系ワクチンの免疫原性が、前臨床(例えば上記Hu et al等参照)及び臨床研究(例えば上記McNeil et al等参照)により報告されてきた。しかし、26価ワクチンでは、感染に対する保護を提供するための異なるGAS血清型の数が、発展途上国及び先進国の双方において、最適な効果を以って使用するのに十分であるとは言えない。従って、GAS感染を治療及び予防するための、安価に製造可能な改良された治療薬及びワクチンの開発が求められている。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

概説すると、本発明により提供されるのは、複数のGAS種に対して免疫応答を誘発することが可能な免疫原性ペプチド、融合ポリペプチド、並びに、これらの免疫原性ペプチド及び融合ポリペプチドを含む免疫原性組成物である。本明細書に記載の免疫原性組成物は、GAS感染を予防又は治療するための従前報告されてきた免疫原性組成物に対して、著しく改善されたものである。斯かる免疫原性組成物の使用方法も提供される。斯かる免疫原性ペプチド、融合ポリペプチド、免疫原性組成物及び方法の種々の態様を以下に要約する。

20

【0008】

態様1:少なくとも31の免疫原性ペプチドを含む免疫原性組成物であって、各免疫原性ペプチドは相違すると共に、異なるMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含み、異なるMタンパク質は各々独立に、A群連鎖球菌(A群連鎖球菌(group A Streptococcus): GAS)血清型1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、及び118のMタンパク質から選択され、Spaタンパク質はGAS血清型18から選択され、且つ、当該免疫原性組成物はGASに対する免疫応答を誘導する、免疫原性組成物。

30

【0009】

態様2:前記異なる免疫原性ペプチドのうち少なくとも4つが、タンデムに連結されて融合ポリペプチドを形成する、態様1に記載の免疫原性組成物。

【0010】

態様3:前記免疫原性組成物が第1の融合ポリペプチド、第2の融合ポリペプチド、第3の融合ポリペプチド、及び第4の融合ポリペプチドを含み、これらの融合ポリペプチドは各々、タンデムに連結された少なくとも6つの前記異なる免疫原性ペプチドを含む、態様1又は2に記載の免疫原性組成物。

40

【0011】

態様4:前記第1の融合ポリペプチドは、タンデムに連結された8つの前記異なる免疫原性ペプチドを含み、前記8つの免疫原性ペプチドが各々、異なるMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含み、異なるMタンパク質は各々独立に、GAS血清型1、2、3、6、12、18、及び28のMタンパク質から選択され、Spaタンパク質はGAS血清型18から選択される、態様3に記載の免疫原性組成物。

50

## 【 0 0 1 2 】

態様 5 : 前記第 1 の融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する免疫原性ペプチドが、前記第 1 の融合ポリペプチドのアミノ末端に位置する免疫原性ペプチドの複製である、態様 4 に記載の免疫原性組成物。

## 【 0 0 1 3 】

態様 6 : 前記複製される免疫原性ペプチドが、G A S 血清型 1 の M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、態様 5 に記載の免疫原性組成物。

## 【 0 0 1 4 】

態様 7 : 前記第 2 の融合ポリペプチドが、タンデムに連結された前記異なる免疫原性ペプチドを 8 つ含み、ここで前記 8 つの免疫原性ペプチドの各々が、G A S 血清型 4、5、1 1、1 4、1 9、2 4、2 9、及び 7 5 の M タンパク質から独立に選択される異なる M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、態様 3 に記載の免疫原性組成物。

10

## 【 0 0 1 5 】

態様 8 : 前記第 2 の融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する免疫原性ペプチドが、前記第 2 の融合ポリペプチドのアミノ末端に位置する免疫原性ペプチドの複製である、態様 7 に記載の免疫原性組成物。

## 【 0 0 1 6 】

態様 9 : 前記複製される免疫原性ペプチドが、G A S 血清型 4 の M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、態様 8 に記載の免疫原性組成物。

20

## 【 0 0 1 7 】

態様 1 0 : 前記第 3 の融合ポリペプチドが、タンデムに連結された前記異なる免疫原性ペプチドを 8 つ含み、ここで前記 8 つの免疫原性ペプチドの各々が、G A S 血清型 2 2、4 4、5 8、7 3、7 7、7 8、8 9、及び 1 1 8 の M タンパク質から独立に選択される異なる M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、態様 3 に記載の免疫原性組成物。

## 【 0 0 1 8 】

態様 1 1 : 前記第 3 の融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する免疫原性ペプチドが、前記第 3 の融合ポリペプチドのアミノ末端に位置する免疫原性ペプチドの複製である、態様 1 0 に記載の免疫原性組成物。

30

## 【 0 0 1 9 】

態様 1 2 : 前記複製される免疫原性ペプチドが、G A S 血清型 7 7 の M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、態様 1 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【 0 0 2 0 】

態様 1 3 : 前記第 4 の融合ポリペプチドが、タンデムに連結された前記異なる免疫原性ペプチドを 7 つ含み、ここで前記 7 つの免疫原性ペプチドの各々が、G A S 血清型 4 9、8 1、8 2、8 3、8 7、9 2、及び 1 1 4 の M タンパク質から独立に選択される異なる M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、態様 3 に記載の免疫原性組成物。

40

## 【 0 0 2 1 】

態様 1 4 : 前記第 4 の融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する免疫原性ペプチドが、前記第 4 の融合ポリペプチドのアミノ末端に位置する免疫原性ペプチドの複製である、態様 1 3 に記載の免疫原性組成物。

## 【 0 0 2 2 】

態様 1 5 : 前記複製される免疫原性ペプチドが、G A S 血清型 8 3 の M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含む、態様 1 4 に記載の免疫原性組成物。

## 【 0 0 2 3 】

態様 1 6 : 前記免疫原性ペプチドの各々が、( a ) 前記異なる M タンパク質又は Spa タン

50

パク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を二重に；(b)前記異なるMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも40のアミノ酸；(b)前記異なるMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも45のアミノ酸；又は、(d)前記異なるMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも50のアミノ酸を含む、態様1又は2に記載の免疫原性組成物。

【0024】

態様17：(a)配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む第1の融合ポリペプチド；

(b)配列番号2に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む第2の融合ポリペプチド；

(c)配列番号3に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む第3の融合ポリペプチド；及び

(d)配列番号4に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む第4の融合ポリペプチド

を含む免疫原性組成物であって、A群連鎖球菌(group A Streptococcus)に対する免疫応答を誘発する免疫原性組成物。

【0025】

態様18：(a)前記第1の融合ポリペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み；(b)前記第2の融合ポリペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み；(c)前記第3の融合ポリペプチドが、配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み；(d)前記第4の融合ポリペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、態様17に記載の免疫原性組成物。

【0026】

態様19：(a)前記第1の融合ポリペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；(b)前記第2の融合ポリペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；(c)前記第3の融合ポリペプチドが、配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；(d)前記第4の融合ポリペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、態様17に記載の免疫原性組成物。

【0027】

態様20：(a)前記第1の融合ポリペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含み；(b)前記第2の融合ポリペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含み；(c)前記第3の融合ポリペプチドが、配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含み；(d)前記第4の融合ポリペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含む、態様17に記載の免疫原性組成物。

【0028】

態様21：(a)前記第1の融合ポリペプチドが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含み；(b)前記第2の融合ポリペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含み；(c)前記第3の融合ポリペプチドが、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含み；(d)前記第4の融合ポリペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含む、態様17に記載の免疫原性組成物。

【0029】

態様22：医薬的に許容可能な賦形剤を更に含む、態様1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

## 【0030】

態様23：医薬的に許容可能なアジュバントを更に含む、態様1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

## 【0031】

態様24：A群連鎖球菌（group A Streptococcus）に対する免疫応答が、GAS1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、及び118血清型のうち少なくとも何れかに対する免疫応答を含む、態様1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

## 【0032】

態様25：対象においてA群連鎖球菌（group A Streptococcus）に対する免疫応答を誘発する方法であって、態様1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物を対象に投与することを含む方法。

## 【0033】

態様26：対象においてA群連鎖球菌（group A Streptococcus）感染が生じる可能性を低減する方法であって、態様1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物を対象に投与することを含む方法。

## 【0034】

態様27：対象においてA群連鎖球菌（group A Streptococcus）感染を予防又は治療する方法であって、態様1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物を対象に投与することを含む方法。

## 【0035】

態様28：A群連鎖球菌（group A Streptococcus）感染を予防又は治療するために使用される、態様1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

## 【0036】

態様29：A群連鎖球菌（group A Streptococcus）感染を予防又は治療するためのワクチンの製造のための、態様1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物の使用。

## 【0037】

態様30：A群連鎖球菌（group A Streptococcus）感染を予防又は治療するための、態様1、2、及び17の何れか一項に記載の免疫原性組成物。

## 【0038】

態様31：（a）配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも85%同一のアミノ酸配列；

（b）配列番号2に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも85%同一のアミノ酸配列；

（c）配列番号3に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも85%同一のアミノ酸配列；

又は

（d）配列番号4に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドであって、

A群連鎖球菌（group A Streptococcus）に対する免疫応答を誘発する融合ポリペプチド。

## 【0039】

態様32：（a）配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列；

（b）配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列；

（c）配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列；又は

（d）配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列

を含む、態様31に記載の融合ポリペプチド。

## 【0040】

態様33：（a）配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列；

- (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；
- (c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列；又は
- (d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む、態様 3 1 に記載の融合ポリペプチド。

【0041】

態様 3 4：(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列；

- (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列；
- (c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列；又は
- (d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 同一のアミノ酸配列を含む、態様 3 1 に記載の融合ポリペプチド。

10

【0042】

態様 3 5：(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；

- (b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列；
- (c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列；又は
- (d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む、態様 3 1 に記載の融合ポリペプチド。

【0043】

態様 3 6：態様 3 1 ~ 3 5 の何れか一項に記載の融合ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド。

20

【0044】

態様 3 7：態様 3 6 の単離ポリヌクレオチドと作動式に連結された少なくとも 1 つの発現調節領域を含む組換え発現ベクター。

【0045】

態様 3 8：態様 3 7 の組換え発現ベクターでトランスフェクト、形質導入 (transduced) 又は形質転換 (transformed) された単離宿主細胞。

【0046】

態様 3 9：融合ポリペプチドを製造する方法であって：

- (a) 態様 3 8 の単離宿主細胞を培養し；
- (b) 宿主細胞の培養物から融合ポリペプチドを単離することを含む方法。

30

【0047】

態様 4 0：態様 3 1 ~ 3 5 の何れか一項に記載の融合ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、当該抗体を含む可能性がある生物学的試料において検出する方法であって：

- (a) 生物学的試料を、

(i) Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチドであって、ここでMタンパク質は、A群連鎖球菌 (group A Streptococcus) : GAS) 血清型 1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、及び118のMタンパク質から選択され、Spaタンパク質はGAS血清型18から選択される、免疫原性ペプチド；

40

(ii) 二量体ペプチドであって、前記二量体ペプチドの各ペプチドは相違すると共に、異なるMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含み、前記異なるMタンパク質は各々独立に、A群連鎖球菌 (A群連鎖球菌 (group A Streptococcus) : GAS) 血清型 1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、及び118のMタンパク質から選択され、前記Spaタンパク質はGAS血清型18から選択される、二量体ペプチド；又は

- (iii) 態様 3 1 ~ 3 5 の何れか一項に記載の融合ポリペプチド

50

の何れかと接触させ；

(b) 当該免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドと、生物学的試料との特異的結合を検出し、これにより生物学的試料が抗体を含むことが示される、ことを含む方法。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1は、30価のMタンパク質に基づくGAS免疫原性組成物を含む4つのタンパク質の略図を示す。

【0049】

【図2A】図2A～2Hは、4つの合成ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列(図2A(配列番号17)；2C(配列番号18)；2E(配列番号19)；及び2G(配列番号20))と、コードされる成分組換えポリペプチドの各々のアミノ酸配列(図2B(配列番号9)；2D(配列番号10)；2F(配列番号11)；及び2H(配列番号12))を示す。各ポリヌクレオチドは、上流のT7プロモーター、リボゾーム結合部位、開始コドン(太字のATG、図2A、2C、2E、2Gの各々の108位で開始される)、3'ポリヒスチジンモチーフ、及び終止コドンを含むように合成された。

10

【図2B】同上。

【図2C】同上。

【図2D】同上。

【図2E】同上。

20

【図2F】同上。

【図2G】同上。

【図2H】同上。

【0050】

【図3】図3は、本明細書に記載の30価の免疫原性組成物で免疫したウサギにおける、抗体力価レベルの用量応答を示す。

【0051】

【図4】図4A～Bは、800 $\mu$ gの30価のGAS免疫原性組成物の3回の投与で免疫した後の、3羽のウサギで誘発した幾何平均抗体レベル( $\text{Log}_2$ )を示す。固相結合抗原は、組換え二量体ペプチド又は合成ペプチド(M44、M78、M118、M83、M81、M87、M49)を使用し、これらは、30価のGAS免疫原性組成物で使用する各ペプチドと同じアミノ酸配列を有した。図4Bは、30価のMタンパク質に基づくGAS免疫原性組成物により誘発された細菌の抗体レベルのグラフを示す。800 $\mu$ g用量の免疫原性組成物で免疫したウサギの1羽からの免疫血清が、免疫原性組成物中のGASのすべての血清型に対して、殺菌活性アッセイで使用された。死滅パーセントは、実施例に記載のように計算された。

30

【0052】

【図5A】図5A～Bは、30価の免疫原性組成物中のGASペプチドでは示されないGASの血清型に対する、30価の免疫原性組成物により誘発された殺菌性抗体のレベルを示す。

40

【図5B】同上。

【0053】

【図6】図6は、30価の免疫原性組成物に誘発された交差オブソニン性殺菌性抗体と、26価ワクチン(例えば、Hu et al., 前出；米国特許第7,270,827号を参照)により誘発された交差オブソニン性殺菌性抗体との比較を示す。融合ポリペプチド構築体にいづれによっても示されなかった10の血清型に対して、30価の免疫原性組成物により促進される殺菌性のレベルは、26価ワクチンで観察された殺菌性より有意に大きかった(平均64.9%対23.6%、 $p = 0.0008$ 、スチューデントt検定、対応のある両側検定)。

50

【発明を実施するための形態】

## 【0054】

本明細書と添付の特許請求の範囲において、単数形の「1つ(a)」、「1つ(an)」、及び「それ(the)」は、特に別に明示的に示さない場合は、複数形を含む。すなわち、例えば「1つの(a)ポリペプチド」は、1つ又はそれ以上のポリペプチド、すなわち複数のそのようなポリペプチドをいい、「1つの(a)細胞」又は「その(the)細胞」は、1つ又はそれ以上の細胞、及び当業者に公知のその同等物(例えば、複数の細胞)への言及などを含む。同様に、「1つの(a)組成物」への言及は、特に別に明示的に示さない場合は、複数のそのような組成物を含み、1つ又はそれ以上の組成物をいう。ある方法の工程が記載又は特許請求される時、及びそれらの工程が特定の順序で起きると記載されている時、第1の工程が第2の工程「以前に」(すなわち、前に)起きる(又は、行われる)という記載は、第2の工程が第1の工程の「次に」起きる(又は、行われる)と書き換えても、同じ意味を有する。ある数値又は数値範囲について言及する時の用語「約」は、言及されるその数値又は数値範囲が、実験的変動の範囲内(又は、統計的な実験的誤差内)の近似値であり、従ってその数値又は数値範囲が、記載の数値又は数値範囲の1%~15%の間で変動し得ることを意味する。用語「含む(comprising)」(及び、関連する用語である、「含む(comprise)」又は「含む(comprises)」又は「有する」又は「含む(including)」)は、他のいくつかの態様を排除することを意図するものではなく、例えば、本明細書に記載のある組成物、方法、又はプロセスなどの態様は、記載された特徴「からなる」か又は「から基本的になる」。

10

## 【0055】

本明細書において用語「単離された」は、ある物質が、その元々の環境(すなわち、天然に存在する場合は、天然の環境)から分離されることを意味する。例えば、生きた動物中に存在する天然に存在する核酸又はポリペプチドは単離されていないが、天然の系で同時に存在する物質の一部又はすべてから分離されている同じ核酸又はポリペプチドは、単離されている。そのような核酸は、ベクターの一部でもよく、及び/又はそのような核酸もしくはポリペプチドは組成物の一部でもよいが、ベクター又は組成物は、核酸もしくはポリペプチドの天然の環境の一部ではないという点で、単離されている。用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の生成に關与するDNAの一部を意味し、これは、コード領域の前及び後にある領域「リーダーとトレーラー」を、ならびに個々のコード部分(エクソン)の間の介在配列(イントロン)を含む。アミノ酸は本明細書において1文字コードと3文字コードで示されるが、これらは当該分野の一般的な教科書の情報に従って理解されるものであり、従って当業者は周知している。本明細書において用語「融合ポリペプチド」は、「融合タンパク質」と同義に使用され、特に別に明示的に示さない場合は、これらの2つの用語が、区別可能な性質又は特性を有する分子を意味するものではない。

20

30

## 【0056】

多くの株のA群連鎖球菌(group A Streptococcus: GAS)に対する免疫応答を誘発(すなわち、誘導)することができ、かつ当該分野で既に記載されている免疫原性組成物に対して顕著な改良である免疫原性組成物が、本明細書に提供される。本明細書において、多価の免疫原性組成物中の、GAS菌株から得られた免疫原性ペプチドの組合せは、この免疫原性ペプチドが誘導されたGAS菌株のみならず、この組成物中の免疫原性ペプチドでは示されないGASの複数の追加の菌株に対しても、免疫応答を誘発する。

40

## 【0057】

A群連鎖球菌(化膿性ブドウ球菌(Staphylococcus pyogenes))は、2つの主要な表面露出した抗食作用因子(カプセルとMタンパク質)を有し、これらは、これらの細菌が宿主中にコロニー形成し生存することを可能にする。A群連鎖球菌(GAS)の細胞表面Mタンパク質は、この病原体の主要な毒性因子の1つである。emm遺伝子によりコードされるMタンパク質は、細胞表面かららせんコイルドコイル二量体として伸長し、GAS細菌の表面上のフィブリルとして現れる。Mタンパク質は抗原性の多様な群を形成し、GAS菌株は、Mタンパク質血清型に従って血清型分類されている。120を超えるMタンパク質血清型が同定されており、一部の血清型では、サブタイプも同定されている。例え

50

ば、G A S 血清型 3 の M タンパク質は、3 . 0、3 . 1、3 . 2 などと呼ばれる関連する血清型を含む。M タンパク質に対する抗体は、血液中に存在する食細胞によるオプソニン食作用を促進することができる。

#### 【 0 0 5 8 】

本明細書に記載のように及び例として、北アメリカ、ヨーロッパ、及び開発途上国によく見られる G A S 血清型の M タンパク質から誘導される免疫原性ペプチドを含む 3 0 個の免疫原性組成物（これはまた、本明細書と当該分野においてワクチンとも呼ばれる）が構築された。この組成物中に示される血清型の選択は、北アメリカとヨーロッパ（例えば、Shulman et al, Clin. Infect. Dis. 39:325-32 (2004)); Shulman et al, Clin. Infect. Dis. 4P:78-84 (2009); O'Loughlin et al, Clin. Infect. Dis. 45:853-62 (2007); Luca-Harari et al, J. Clin. Microbiol. 47: 1155-65 (2009)を参照）、及び一部の開発途上国（例えば、Steer et al.、前出）における G A S 感染症の入手できる疫学と血清型の普及を基礎にした。これらの免疫原性組成物はまた、当該分野において Spa と呼ばれるタンパク質からの免疫原性ペプチドを含有し、これは、2 種以上の G A S 血清型と交差反応する抗体を誘発する。例えば 3 0 の異なる M タンパク質ペプチド免疫原と Spa ペプチド免疫原とを含む組成物のような、本明細書に記載の免疫原性組成物は、咽頭炎及び浸潤性 G A S 感染症の疫学を十分に示している。

10

#### 【 0 0 5 9 】

さらに、本明細書に記載の免疫原性組成物は、G A S 血清型 4 の M タンパク質から誘導される免疫原性ペプチドを含む。G A S 血清型 4 は、北アメリカの G A S 疾患の大部分と合併症のない咽頭炎の約 9 %、及びヨーロッパの侵襲性 G A S 感染症の 5 % を引き起こす（例えば、Shulman et al, Clin. Infect. Dis. 2009, 前出; Luca-Harari et al, 前出、を参照）。G A S 血清型 4 の細菌の細胞表面上に存在する A r p 4 と呼ぶ M タンパク質ファミリーのメンバー（例えば、Johnsson et al., J. Immunol. 153:3557-64 (1994)を参照）は、M タンパク質ファミリーの他のメンバー（例えば、Husmann et al., Infect. Immun. 63:345-48 (1995)を参照）とは異なり、最初は、毒性又は食作用に対する耐性には必要無いと考えられた。さらなる実験により、免疫された宿主においてオプソニン抗体を誘発する A r p 4 ( M 4 ) タンパク質のアミノ末端からの免疫原性ペプチドが同定された（例えば、Courtney et al, 前出、を参照）。G A S 免疫原性組成物に M 4 免疫原性ペプチドを添加すると、そのような多価の免疫原性組成物が免疫応答を誘導する G A S 菌株の数を、約 7 8 % から 9 0 % に上昇させることにより、合併症の無い及び合併症のある感染症に関して、多価ワクチンの有効性を改善させる。

20

30

#### 【 0 0 6 0 】

M タンパク質とは異なり、Spa（連鎖球菌防御性抗原）と呼ぶポリペプチドは、オプソニン性防御性抗体の産生を誘導するエピトープを含有する。Spa ポリペプチドは、血清型特異性（例えば、G A S 血清型 3 6 から単離された Spa ポリペプチド）の場合があり、一方、他の Spa ポリペプチド（例えば、G A S 血清型 1 8 から単離された Spa ポリペプチド）は、複数の G A S 血清型に結合する抗体を誘発する。G A S 血清型 1 8 の Spa ポリペプチドは、血清型 3 と 2 8 ならびに血清型 1 8 に結合し、これらに対して防御性である抗体を誘導する（例えば、米国特許第 7, 0 6 3, 8 5 0 号; Ahmed et al, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 29:51-57 (2010) Epub 2009 Oct 29; McLellan et al, Infect. Immun. 69:2943-49 (2001); Dale et al, J. Clin. Invest. 103:1261-68 (1999)を参照）。

40

#### 【 0 0 6 1 】

ある態様において、各々が、タンデムに連結された 7 又は 8 つの G A S M タンパク質又は G A S Spa タンパク質免疫原性断片を含む 4 つの異なる融合タンパク質を含む免疫原性組成物が提供される。ある組成物の例はウサギにおいて免疫原性であり、この組成物中に含まれる免疫原性ペプチドで示されるすべての血清型の G A S に対する殺菌性抗体を誘発した。さらに、予想外にかつ当該分野ですでに記載されている 2 6 個の免疫原性組成物とは異なり、本明細書に記載の 3 0 個の組成物例で免疫した動物から得られた抗血清は、

50

そこからの免疫原性ペプチド断片が組成物中に含まれなかったG A S血清型（すなわち、非ワクチンG A S血清型、又は示されていないG A S血清型）に対して、高レベルの殺菌性抗体を含有した。従って、本明細書に記載の免疫原性組成物（例えば、30個の免疫原性組成物）の効力の可能性は、サブユニットであるMペプチドやSpaペプチドで示される血清型をはるかに超えるかも知れない。

#### 【0062】

##### 免疫原性組成物

ある態様において、複数のG A S免疫原性ペプチドを含む免疫原性組成物が提供される。具体的態様において、免疫原性組成物は少なくとも31の異なる免疫原性ペプチドを含む。各免疫原性ペプチドは、それぞれ、31の異なるG A Sポリペプチドのアミノ（本明細書において及び当該分野において、NH<sub>2</sub>とも呼ばれる）末端に位置するアミノ酸配列を含む。具体的態様において、少なくとも30の異なる免疫原性ペプチドの各々は、それぞれ、30の異なるG A S血清型からの少なくとも30のMタンパク質のアミノ酸配列から誘導される。Mタンパク質の各々の免疫原性ペプチドは、Mタンパク質のアミノ末端部からの少なくとも25の連続するアミノ酸を含む。本明細書に記載の組成物はまた、Spaポリペプチドのアミノ末端部からの少なくとも25の連続するアミノ酸を含む免疫原性ペプチドも含み、これは、具体的態様において、G A S血清型M18菌株の細胞表面で発現され存在するSpaポリペプチドである。別の具体的態様において、複数の免疫原性ペプチド（例えば、G A S Spaタンパク質のG A S Mタンパク質から誘導される少なくとも31の異なる免疫原性ペプチド）を含む少なくとも4つの融合ポリペプチドを含む免疫原性組成物が提供される。

#### 【0063】

Mタンパク質のアミノ末端領域は、最大の殺菌（防御）活性を有する抗体を誘発し、ヒトの組織と交差反応する可能性が最も低いことが証明されている（例えば、Dale, Adv. Exp. Med. Biol. 609:53-63 (2008)を参照）。1つのアプローチは、A群連鎖球菌の疫学的に重要な血清型に対するオプソニン性抗体を誘発するように設計された多価ワクチンと一緒にしたMタンパク質ペプチドを含有する組換えハイブリッドタンパク質を構築することである（例えば、Dale, Inf. Dis. Clin. N. Amer. 13:227-43 (1999); Hu et al, Infect. Immun. 70:2171-77 (2002)を参照）。

#### 【0064】

本明細書に記載の抗G A S免疫原性組成物は、既に記載されているワクチン組成物と比較して、大きな改良を提供する。ある態様において、Mタンパク質免疫原性ペプチドで示される各々のG A S血清型に対してのみではなく、重要なことに、多くの非ワクチン血清型（すなわち、Mタンパク質免疫原性ペプチドやSpa免疫原性ペプチドによる免疫原性組成物中で示されないG A S血清型）に対する免疫応答を誘発したMタンパク質とSpaタンパク質の免疫原性ペプチドを含む30個の免疫原性組成物が提供される。さらに、重要なことに、本明細書に記載の免疫原性組成物は、G A S血清型4のMタンパク質からの免疫原性ペプチドを含む（例えば、Courtney et al, Molec. Microbiol. 59:936-47 (2006)を参照）。G A S血清型4は、北アメリカにおいて合併症の無い咽頭炎の約9%、及びヨーロッパの侵襲性G A S感染症の5%を引き起こす（例えば、Shulman et al, Clin. Infect. Dis. 2009, 前出; Luca-Harari et al, J. Clin. Microbiol. 47: 1155-65 (2009)、前出、を参照）。従って、M4免疫原性ペプチドの導入は、多価G A Sワクチンの効力を大幅に改善する。

#### 【0065】

本明細書に記載のG A S免疫原性ペプチドを含む免疫原性組成物は、G A Sに対する免疫応答を、さらに詳しくは、ワクチン中に示されそこから免疫原性ペプチドが誘導されるG A S血清型の各々に対する免疫応答を誘発する。さらに、本明細書に記載の免疫原性組成物は、そこから免疫原性ペプチドが得られなかった、従って免疫原性組成物中に含まれていなかったG A S血清型（本明細書において、非ウイルスG A S血清型、又は示されていないG A S血清型とも呼ばれる）に対する免疫応答を誘発する。ここで使用される「3

0 価」又は「26 価」のような用語は、そこから免疫原性ペプチドが得られたか又は誘導された G A S 血清型の数をいう。免疫原性組成物に含まれる免疫原性ペプチドの数は、記載の価より大きくても良い。例えば、本明細書に記載の 31 の免疫原性ペプチドを含む免疫原性組成物は、この組成物に含まれる Spa 免疫原性ペプチド（本明細書に及び当該分野で記載されている）は G A S 血清型 M 18 から得ることができ、血清型 M 18 の M タンパク質からの免疫原性ペプチドもまた、ワクチン組成物に含まれるため、30 価の組成物と呼んでもよい。

#### 【0066】

地理的位置とは無関係に、臨床的に関連する G A S 血清型の最大数に対する免疫応答を誘発する組成物を提供するように、免疫原性組成物が設計され構築された。従って、臨床的使用と効力を最大にするために、1つ又はそれ以上の地域で普及している G A S 血清型（これは、当該分野で入手できる疫学データから決定される）は、M タンパク質免疫原性断片又は他の G A S ポリペプチド免疫原性断片（例えば、Spa 免疫原性断片）の供給源として役立つことがある。本明細書に記載の免疫原性組成物中の免疫原性断片で示される G A S 血清型は、非侵襲的な感染症（例えば、咽頭炎、膿痂疹、丹毒、及び蜂巣炎）を引き起こす G A S 血清型、及び侵襲性感染（例えば、血液（菌血症）、筋肉、及び肺（肺炎）の G A S 血清型、壊死性筋膜炎、及び連鎖球菌毒素ショック症候群）、及び、急性リウマチ熱、反応性関節炎、糸球体腎炎などの非化膿後遺症を引き起こす G A S 血清型を含む（例えば、Cunningham, Clin. Microbiol. Rev. 13:470 (2000)を参照）。

10

#### 【0067】

疫学データは、公的な及び/又は私的な地方の、国の、及び国際的組織や研究者から得ることができる。例えば、免疫原性組成物で使用するために、そこから M タンパク質の免疫原性ペプチドが選択される G A S の血清型は、非侵襲性の感染症、例えば、北アメリカの小児対象における咽頭炎（例えば、Shulman et al, Clin. Infect. Dis. 2009、前出、を参照）、（2）侵襲性 G A S 感染症（例えば、Centers for Disease Control and Prevention 後援の Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network を参照）（例えば、O'Loughlin et al、前出、を参照）、（3）ヨーロッパにおける侵襲性感染症（例えば、StrepEuro 協会により報告されている、例えば Luca-Harari et al、前出、を参照）、及び/又は（4）開発途上国で普及している G A S 血清型（例えば、Steer et al, The Lancet Infectious Diseases 9:611-16 (2006)を参照）、の疫学に基づく。また本明細書に記載の免疫原性組成物（例えば、30 価のワクチン組成物）には、現在又は歴史的に「リウマチ発症性」であると考えられている G A S の血清型からの M ペプチドが含まれる（例えば、Shulman et al, Clin. Infect. Dis. 42:441-47 (2006)を参照）。さらに、A 群連鎖球菌の少なくとも数個の血清型（特に限定されないが、G A S 血清型 18、G A S 血清型 3、及び G A S 血清型 28）により発現される防御性抗原である Spa18 のアミノ末端ペプチド断片は、本明細書に記載の多価免疫原性組成物に含まれてよい（例えば、Dale et al, J. Clin. Invest. 103: 1261-68 (1999)、米国特許第 7,063,850 号、国際特許出願公報 W O 0 0 / 3 7 6 4 8 を参照）。

20

30

#### 【0068】

M タンパク質のアミノ酸配列と M タンパク質のサブタイプは、タンパク質データベース、例えば GenBank、GenEMBL、及び Swiss Prot データベースから入手できる。M タンパク質配列はまた、cdc.gov/ncidod/biotech/strep/emmtypes でインターネットにアクセスして見つかる Center for Disease Control (CDC) emm typing center のウェブサイトでも入手できる。Spa ポリペプチドのアミノ酸配列もまた、公のデータベースから入手でき、Dale et al., J. Clin. Invest. 103: 1261-68 (1999)、米国特許第 7,063,850 号、及び国際特許出願公報 W O 0 0 / 3 7 6 4 8 に記載されている。当該分野で現在使用されている G A S M 血清型のサブタイプ判定基準は、Facklam et al, Emerg. Infect. Dis. 5:247-53 (1999)により記載されている。

40

#### 【0069】

また当該分野において昔から知られているが、M タンパク質の領域は、宿主の組織、例

50

えばヒトの心臓（例えば、Dale et al, J. Exp. Med. 156: 1165-76 (1982); Dale et al, J. Exp. Med. 161 : 113-22 (1985)を参照）、脳（例えば、Bronze et al, J. Immunol. 151 :2820-28 (1993)）、筋肉、腎臓、及び軟骨、と交差反応する抗体を含むアミノ酸配列を含む。従って、本明細書に記載の多価免疫原性組成物の設計は、1つ又はそれ以上のヒトタンパク質とともに各Mタンパク質が5つ以上の連続するアミノ酸を有するかどうか、従って、どれがヒト組織と結合する可能性のある抗体を誘導し得るかを決定するための、Mタンパク質のアミノ酸配列の解析を含む。本明細書に記載の免疫原性組成物に含まれるMタンパク質の免疫原性ペプチドと、免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチドは、既知のヒトタンパク質の5つ以上の連続するアミノ酸と同一である5つ以上の連続するアミノ酸が欠如している。

10

**【0070】**

Mタンパク質とヒトタンパク質のアミノ酸配列の比較は、当業者が利用できるいくつかの整列プログラムの1つ又はそれ以上を使用して行われる。そのような整列手段（これはまた、Mタンパク質をコードするようなヌクレオチド配列を比較するのにも有用である）は、特に限定されないが、BlastP、BLAST、tBLAST、及びMegAlignなどのソフトウェアプログラムを含む。他のソフトウェアプログラムは、Lasergene バイオインフォマティクスコンピューティングスイート（DNASTAR（登録商標）Madison, Wisconsin）、CLUSTAL Wプログラム（例えば、Thompson et al, Nucleic Acids Res. 22:4673-80 (1991)を参照）、及び"GeneDoc" (Nicholas et al, EMBNEWNews 4: 14 (1991))で提供されている。ALIGNやBLASTなどのアルゴリズムの参照文献は、例えばAltschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; 及び Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992で見つかる。Align及びBLASTアルゴリズムを含むアルゴリズムは、NCBIウェブサイト（例えば、[オンライン]インターネット、ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST）で利用できる。デフォルトパラメータを使用してもよい。ヌクレオチド及びアミノ酸配列を比較し、最適な整列を決定するための当該分野で利用できる追加の方法は、例えばPeruski and Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wu et al. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," Methods in Gene Biotechnology 中, pages 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); and Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2nd Ed. (Academic Press, Inc. 1998)に記載された方法がある。

20

30

**【0071】**

本明細書に記載の多価ワクチン組成物（例えば、多価免疫原性組成物）で使用されるGAS免疫原性ペプチドは、完全長GASポリペプチドの免疫原性部分を含み、成熟ポリペプチド（すなわち、シグナルペプチド配列が除去されているポリペプチド）のアミノ末端部の少なくとも25、30、35、40、45、50、55、又は60以上の連続するアミノ酸（又は、25～30、30～35、35～40、40～45、45～50、40～55、もしくは55～60の間の任意の数のアミノ酸、又は60以上の連続するアミノ酸）を含んでよい。ある具体的態様において、免疫原性ペプチドは、Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から、少なくとも25、30、35、40、45、50、55、又は60以上の連続するアミノ酸（又は、Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から、25～30、30～35、35～40、40～45、45～50、40～55、もしくは55～60の間の任意の数のアミノ酸、又は60以上の連続するアミノ酸）を含んでよい。成熟又は完全長GASポリペプチドの免疫原性部分は、免疫応答を誘導する1つまたはそれ以上のエピトープを含み、この免疫応答は、免疫原性ペプチドに、成熟及び完全長ポリペプチド内の免疫原性部分に、及びこのポリペプチドを発現するGAS細菌に特異的に結合する抗体の産生を含む。多くの具体的態様において、免疫原性ペプチドは、Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端からの、少なくとも25又は少なくとも50の連続するアミノ酸を含む。ある具体的態様において、1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは、Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端からの、少なくとも25の連続するアミノ酸を含み、この免疫原性ペプチドは二重で存在し、複製物は直接タンデム

40

50

に連結されている。すなわち、例として、選択される免疫原性領域が、Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端のアミノ酸残基1～25を含む場合、二重の免疫原性ペプチドは、アミノ酸1～25の第2の繰り返し配列にタンデムに連結されたアミノ酸残基1～25を含む(すなわち、第1の複製のアミノ酸残基25は、第2の複製のアミノ酸残基1に直接結合する)。

#### 【0072】

ある態様において、多価免疫原性組成物は、代表的な(又は、から得られる、から誘導される)少なくとも30の異なるGAS血清型である免疫原性ペプチドを含む。より具体的な例において、本明細書に記載の免疫原性組成物で示されるGAS血清型の1つはM4であり、免疫原性ペプチドは、M4タンパク質のアミノ末端部からの少なくとも25の連続するアミノ酸を含むアミノ酸配列を含む。他の態様において、免疫原性組成物は、少なくとも30の異なるGAS血清型の代表的な少なくとも31の免疫原性ペプチドを含む。より具体的な例において、31の免疫原性ペプチドの各々のアミノ酸配列は異なり、各々は、GAS血清型M18などのGAS血清型からのSpaタンパク質のアミノ末端部からの、GAS血清型(1)M1;(2)M2;(3)M3;(4)M4;(5)M5;(6)M6;(7)M11;(8)M12;(9)M14;(10)M18;(11)M19;(12)M22;(13)M24;(14)M28;(15)M29;(16)M44;(17)M49;(18)M58;(19)M73;(20)M75;(21)M77;(22)M78;(23)M81;(24)M82;(25)M83;(26)M87;(27)M89;(28)M92;(29)M114;(30)M118,及び(31)の1つからの、Mタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25、30、35、40、45、50、55、又は60以上のアミノ酸(又は、25～30、30～35、35～40、40～45、45～50、40～55、もしくは55～60の間の任意の数のアミノ酸、又は60以上の連続するアミノ酸)を含む。別のさらに具体的な例において、1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは、少なくとも25の連続するアミノ酸を二重で含む。別の具体的態様において、1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは、少なくとも40の連続するアミノ酸、又は少なくとも45の連続するアミノ酸を含む。さらに別の具体的態様において、1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは少なくとも50の連続するアミノ酸を含む。本明細書において、血清型に従ってGAS細菌に言及する時、この細菌は、例えばGAS血清型3、GAS M血清型3、又はGAS血清型M3と呼ばれる。特定の血清型のMタンパク質に言及する時、そこからMタンパク質が誘導されるGAS血清型(例えばM3)の名称は、典型的には、文脈に応じてタンパク質又は免疫原性ペプチドという単語が続く(すなわち、M3タンパク質、又はM3免疫原性ペプチド)。

#### 【0073】

従って、言い換えると、上記した免疫原性組成物の態様は、少なくとも以下の免疫原性ペプチドを含む: GAS血清型1からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型2からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型3からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型4からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型5からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型6からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型11からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型12からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型14からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型18からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血清型19からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド; GAS血

10

20

30

40

50

清型 22 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 24 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 28 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 29 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 44 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 49 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 58 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 73 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 75 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 77 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 78 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 81 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 82 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 83 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 87 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 89 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 92 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 114 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型 118 からの M タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド； G A S 血清型、例えば G A S 血清型 18、からの Spa タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 25 のアミノ酸を含む免疫原性ペプチド。本明細書に記載のある具体的態様において、上記の各免疫原性ペプチドは、M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から、少なくとも 25、30、35、40、45、50、55、又は 60 以上の連続するアミノ酸（又は、M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から、25～30、30～35、35～40、40～45、45～50、40～55、もしくは 55～60 の間の任意の数のアミノ酸、又は 60 以上の連続するアミノ酸）を含んでよい。別の具体的態様において、1 つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは、少なくとも 25 の連続するアミノ酸を二重で含む。別の具体的態様において、1 つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは、少なくとも 40 の連続するアミノ酸、又は少なくとも 45 の連続するアミノ酸を含む。さらに別の具体的態様において、1 つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは少なくとも 50 の連続するアミノ酸を含む。

#### 【0074】

他のいくつかの態様において、免疫原性組成物は、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、又はそれ以上の異なる免疫原性ペプチドを含んでよい。この異なる免疫原性ペプチドは、G A S 血清型 1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、118 からの M タンパク質の、及び G A S 血清型 18（上記したように）からの Spa タンパク質の、アミノ末端部からの、31 の免疫原性ペプチドを含んでよく、さらに、少なくとも 1 つの追加の異なる G A S 血清型もしくはサブタイプからの M タンパク質のアミノ末端部からの免疫原性ペプチド、及び Spa タンパク質のアミノ末端部からの 1 つまたはそれ以上の追加の異なる免疫原性ペプチドを含んでよい。追加の免疫原性ペプチドの選択は、疫学データ、

10

20

30

40

50

G A S タンパク質の 5 つ又はそれ以上の連続するアミノ酸とヒトタンパク質との共有された同一性の欠如、細菌及びノ又は防御データ（免疫原性組成物による免疫に応答して産生される抗体により認識される示されていない G A S 血清型の数を増加させる 1 つまたはそれ以上の追加の免疫原性ペプチドの能力を含む）により、知ることができる。

【 0 0 7 5 】

本明細書に記載のように及び当業者に公知のように、M タンパク質と Spa タンパク質のアミノ末端部は 1 つまたはそれ以上の免疫原性エピトープを有する M タンパク質と Spa タンパク質の領域を含む。本明細書において、M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部は、成熟タンパク質をいい、これはシグナルペプチド配列が欠如した発現されたタンパク質である。当該分野において十分に理解されているように、分泌されるか又は膜結合タンパク質であるポリペプチドは、発生期のポリペプチドのアミノ末端でシグナルペプチドと相互作用する転位装置により、それぞれ膜を介するか又は膜に転位される。細菌では、シグナルペプチドの配列は、典型的には、生じたばかりの翻訳されたポリペプチドが細菌プロテアーゼによりインピボで切断されて、成熟ポリペプチドを形成する。従って、特に明記しない場合は、M タンパク質（例えば）の残基 1 ~ 5 0 のアミノ酸配列を含む免疫原性ペプチドとしての免疫原性ペプチドの本明細書での説明において、残基 1 は、シグナルペプチド配列の非存在下の M タンパク質のアミノ末端にある。免疫原性ペプチドのアミノ酸配列の例は、配列番号 2 9 ~ 5 9 に提供される（配列リストと表 1 を参照）。

10

【 0 0 7 6 】

M タンパク質又は Spa タンパク質の用語「アミノ末端部」は、ポリペプチドの半分のアミノ末端部に位置するポリペプチドの一部又は領域として、当業者には容易に理解される。M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部からのアミノ酸を含む本明細書に記載の免疫原性ペプチドは、特に限定されないが、各 M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸（すなわち、成熟ポリペプチドのアミノ酸 1 ~ 2 5 ）を含む。他の例では、免疫原性ペプチドは、成熟タンパク質のアミノ末端に位置する 1 つまたはそれ以上のアミノ酸が欠如した M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも 2 5 のアミノ酸を含んでよい（例えば、成熟ポリペプチドのアミノ酸 2 ~ 2 6 、 3 ~ 2 7 、 4 ~ 2 8 など）。他の態様において及び例として、少なくとも 2 5 の連続するアミノ酸は、アミノ酸位置 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 又は 2 5 で始まる M タンパク質又は Spa タンパク質のアミノ末端部から誘導されてよい。本明細書に記載の、各免疫原性ペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも一部は、少なくとも 1 つの免疫原性エピトープの存在、及び既知のヒトタンパク質中に存在する少なくとも 5 つの連続するアミノ酸と同一の少なくとも 5 つの連続するアミノ酸の欠如に基づいて選択される。

20

30

【 0 0 7 7 】

ある態様において、少なくとも 3 1 の異なる免疫原性ペプチドを含む免疫原性組成物は、個々の免疫原性ペプチドの各々を別々のペプチドとして含有する。ある態様において免疫原性組成物は、3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、 4 5 、 又はそれ以上の異なる免疫原性ペプチドを含んでもよく、個々の免疫原性ペプチドを別々のペプチドとして含有する。これらの免疫原性ペプチドの各々は、それぞれ化学合成されるか、又は本明細書で詳述され当該分野の技術と方法に従って組換え産生されてよい。個々のペプチドは一緒にされ、免疫原性組成物として調製される。また本明細書に詳述されるように、免疫原性組成物は、1 つまたはそれ以上の医薬的に適切な賦形剤を含んでもよく、さらに 1 つまたはそれ以上の医薬的に適切なアジュバントを含んでもよい。さらに別の態様において、免疫原性組成物は、少なくとも 3 1 の異なる免疫原性ペプチドを、個々の免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、及びノ又は三量体ペプチドの組合せとして含む。

40

【 0 0 7 8 】

さらに別の態様において、少なくとも 4 つの異なる免疫原性ペプチドと一緒にタンデム

50

に連結されて、免疫原性組成物に含めるための融合ポリペプチドを形成する。ある態様において、少なくとも31の異なる免疫原性ペプチド（例えば、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、又はそれ以上の異なる免疫原性ペプチド）を含む免疫原性組成物は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、又はそれ以上の融合ポリペプチドを含んでよく、ここで、各融合ポリペプチドは、一緒にタンデムに連結された少なくとも4つの異なる免疫原性ペプチドを含む。さらなる具体的態様において、免疫原性組成物に含まれる1つまたはそれ以上の融合ポリペプチドは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15、又はそれ以上の個々の、タンデムに連結された免疫原性ペプチドを含んでよい。さらなる具体的態様において、タンデムに連結された異なる免疫原性ペプチドを含み、本明細書に記載の免疫原性組成物で使用される各融合ポリペプチドは、少なくとも、6、7、8、9、又は10の異なる免疫原性ペプチドを含む。さらに本明細書に記載の具体的態様において、免疫原性組成物は、各々がG A S Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部由来の、少なくとも31の異なる免疫原性ペプチドを含み、少なくとも6、7、8、又は9つの異なる免疫原性ペプチドは、4つの融合ポリペプチドを提供するような方法で一緒に連結される。さらに別の具体的態様において、免疫原性組成物は、各々がG A S Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部由来の、少なくとも31の異なる免疫原性ペプチドを含み、7又は8つの異なる免疫原性ペプチドは、4つの融合ポリペプチドを提供するような方法で、融合ポリペプチド1つにつきタンデムに連結される。言い換えると、少なくとも31の異なる免疫原性ペプチドの各々は、これら4つの融合ポリペプチドの1つに含まれる。

10

20

**【0079】**

さらなる具体的態様において、免疫原性組成物は、少なくとも31の異なる免疫原性ペプチド（G A S M血清型1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、118からのMタンパク質の、及びG A S血清型18からのSpaタンパク質のアミノ末端部からの免疫原性ペプチド）を含み、ここで、少なくとも6、7、8、又は9つの異なる免疫原性ペプチドは、一緒にタンデムに連結されて、少なくとも4つの融合ポリペプチドを形成する。ある具体的態様において、4つの融合ポリペプチドの各々は、少なくとも7つ又は少なくとも8つの異なる免疫原性ペプチドを含む。ある態様において、この免疫原性組成物は、4つの融合ポリペプチド（これは、便宜上、第1の融合ポリペプチド、第2の融合ポリペプチド、第3の融合ポリペプチド、及び第4の融合ポリペプチドと呼ばれる）を含み、各融合ポリペプチドは、少なくとも31の異なる免疫原性ペプチドから独立に選択された7又は8つの異なる免疫原性ペプチドを含む。第1、第2、第3、及び第4の融合ポリペプチドの各々に含まれる免疫原性ペプチドと、及びこの免疫原性ペプチドが連結される順序とは、本明細書に記載されかつ当該分野でルーチンに行われている方法と技術を使用して当業者が容易に決定することができ、各ポリペプチドの免疫原性の最適化のために不当に経験的な試行錯誤的分析を必要としない。2つの異なる免疫原性ペプチドがタンデムに連結されているジャンクションに位置するアミノ酸が、ヒトタンパク質と同一性を共有する連続的5 - アミノ酸配列を導入しないことを決定するために、各融合ポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書に記載され当業者に公知のデータベースで入手できるヒトタンパク質の配列と比較される。

30

40

**【0080】**

G A S血清型からのMタンパク質及びSpaタンパク質のアミノ末端部からの3つ又はそれ以上の異なる免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチドは、アミノ末端に位置する免疫原性ペプチドが、融合ポリペプチドのカルボキシ末端で繰り返される（すなわち、複製される）ように、構築される。融合ポリペプチドのカルボキシ末端に複製された免疫原性ペプチドが存在しない場合、最後から2番目の及びカルボキシ末端のペプチドの免疫原性は低下しているか悪化していることがある。理論に拘束されるつもりはないが、カルボキシ末端でのアミノ末端ペプチドの繰り返しは、融合タンパク質に含まれるすべてのペプチドの免疫原性を保存し、目的の抗原に対する免疫応答を増強するために当該分野で使用され

50

る破傷風トキソイド、キーホールリンペットヘモシアニン、又は他のタンパク質もしくはタンパク質断片などの非GAS担体タンパク質を含める必要性を低下させるか又は不要にする。米国特許第6,716,433号及び7,402,316号を参照。

#### 【0081】

本明細書に記載のように、Mタンパク質とSpaタンパク質のアミノ酸配列は、当該分野において容易に入手できる。CDC emm typing centerのウェブサイトで提供されるようなデータベースにアクセスして、GAS血清型からのMタンパク質内の（本明細書において及び当該分野において、GASサブタイプと呼ばれる）又はGAS血清型からのSpaタンパク質内のアミノ酸配列変動を調べることができる。Mタンパク質（又はSpaタンパク質）のアミノ末端部の比較のための整列手段を使用して、変動可能なアミノ末端部内のアミノ酸残基を同定することができる。本明細書に記載の免疫原性ペプチドと融合ポリペプチドのアミノ酸配列は例であり、GASに対する免疫応答を誘導するのに有用な免疫原性ペプチドと融合ポリペプチドは、免疫原性ペプチドは融合ポリペプチドの免疫原性に悪影響（統計的に有意な方法で、又は生物学的もしくは臨床的に有意な方法で、減少させるか又は低下させる）を与えない1つまたはそれ以上のアミノ酸の置換、挿入、及び欠失を含んでよい。統計的に、生物学的に、又は臨床的に有意な方法で、それぞれ本明細書に記載された免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドの免疫原性と実質的に類似している変種ペプチド又は変種融合ポリペプチドの免疫原性が、好ましい。GAS M血清型1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、118からのMタンパク質の、及びGAS血清型18からのSpaタンパク質のアミノ末端部からの免疫原性ペプチドのアミノ酸配列の例は、表1に記載される。

10

20

#### 【0082】

また、さらなる具体的態様には、特定の地域で使用される免疫原性組成物が提供される。例えばある態様には、少なくとも23の異なる免疫原性ペプチド（GAS M血清型1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、58、73、75、77、78、89、118からのMタンパク質、及びGAS血清型18からのSpaタンパク質のアミノ末端部からの免疫原性ペプチド）を含む免疫原性組成物が提供され、ここで、少なくとも6、7、8、又は9つの異なる免疫原性ペプチドは一緒にタンデムに連結されて、少なくとも3つ又は少なくとも4つの融合ポリペプチドを形成する。ある具体的態様において、免疫原性組成物は、各々が少なくとも7つ又は少なくとも8つの異なる免疫原性ペプチドを含む各3つの融合ポリペプチドを含む。ある態様において免疫原性組成物は、3つの融合ポリペプチド（これは、便宜上、第1の融合ポリペプチド、第2の融合ポリペプチド、及び第3の融合ポリペプチドと呼ばれる）を含み、各融合ポリペプチドは7つ又は8つの異なる免疫原性ペプチドを含む。この免疫原性組成物の例は、ヨーロッパなどの他の地域より北アメリカのGAS感染症でより普及しているGAS血清型を含む。GAS M血清型（例えば、49、81、82、83、87、92、及び114）は、GAS感染症の原因として、北アメリカよりヨーロッパでより頻繁に同定されている。

30

#### 【0083】

ある態様において、本明細書に記載の免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドは、それぞれ、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換、挿入、又は欠失を含む、免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチド種（ここでは、変種とも呼ばれる）を含む。本明細書に記載の免疫原性ペプチド又はこの免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチド種は、それぞれ、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換、挿入、又は欠失を含む、免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチド種（ここでは、変種とも呼ばれる）を含む。免疫原性ペプチド変種は、免疫原性ペプチドについて本明細書に記載のアミノ酸配列の例とは異なるアミノ酸配列を含み、同じ各GAS血清型の異なるサブタイプのアミノ酸配列（Spaタンパク質又はMタンパク質のアミノ末端部の少なくとも25の連続連続するアミノ酸）を含むものである。融合ポリペプチド変種は、少なくとも1つの免疫原性ペプチド変種を含む種を含む。Mタンパク質サブ

40

50

タイプのアミノ酸配列は、C D C emm typing centerウェブサイト（前出）を含む公のデータベースから入手できる。

【0084】

免疫原性ペプチド変種と融合ポリペプチド変種はまた、化学合成又は組換え産生（特定の免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドを産生するのに、いずれの方法も使用される）される、アミノ酸置換、欠失、又は挿入を有するものを含む。G A Sに対する免疫応答を誘導するのに有用な免疫原性ペプチド変種及び融合ポリペプチド変種は、本明細書に記載され、統計的に、生物学的に、又は臨床的に有意な方法で、免疫原性ペプチドは融合ポリペプチドの免疫原性に悪い影響又は改変（減少又は低下）を与えない1つまたはそれ以上のアミノ酸の置換、挿入、及び欠失を含んでよい。言い換えると、本明細書に記載の免疫原性ペプチドの変種又は融合ポリペプチドの変種は、それぞれ免疫原性部分又は融合ポリペプチドが示す免疫原性を保持する。本明細書に記載のように、免疫原性の保持は、G A Sに対する免疫応答を誘発する能力、例えば同族の免疫原性ペプチド及び/又は融合ポリペプチド、同族の完全長もしくは成熟Mタンパク質又はSpaタンパク質（単離されているか、又はG A S細菌の細胞表面上に存在する）に特異的に結合する抗体を産生する能力を含み、この抗体は、殺菌活性及び食作用活性を含む。

10

【0085】

一般に、免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドに含まれてよいアミノ酸置換は、保存的置換である。アミノ酸の保存的置換は公知であり、Mタンパク質又はSpaポリペプチドで自然に存在するか、又はペプチドもしくは融合ポリペプチドが組換え産生される時、導入されてもよい。当業者により理解されている様々な基準は、免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチド中の特定の位置で置換されるアミノ酸が保存である（又は類似）であるかどうかを示す。例えば、類似のアミノ酸又は保存的アミノ酸置換は、あるアミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである。類似のアミノ酸は、以下の分類に含まれる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）；酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）；非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、ヒスチジン）；非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）； - 分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）；及び、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン）。分類することがより困難であると考えられるプロリンは、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（例えば、ロイシン、バリン、イソロイシン、及びアラニン）と性質を共有する。ある状況において、グルタミンをグルタミン酸で又はアスパラギンをアスパラギン酸で置換することは、グルタミンとアスパラギンが、それぞれグルタミン酸とアスパラギン酸のアミン誘導体であるという点で、類似置換であると考えられる。当該分野において理解されているように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、Align又はBLASTアルゴリズム、又は本明細書に記載され当該分野で実施されている他のアルゴリズムを使用して、ペプチド又はポリペプチドのアミノ酸配列及び保存的アミノ酸置換物を、それぞれ第2のペプチド又はポリペプチドの配列と比較することにより決定される。

20

30

40

【0086】

アミノ酸置換、欠失、及び付加は、免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの化学合成中に、その免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチド中に導入してもよい。あるいはアミノ酸置換、欠失、及び付加は、公知の及びルーチンに行われている突然変異誘発法（例えば、Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 2001を参照）を使用して、組換え的に免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチド中に導入してもよい。オリゴヌクレオチド指令部位特異的（又はセグメント特異的）突然変異誘発法を行って、所望の置換、欠失、又は挿入に従って改変された特定のコドンを含む改変ポリヌクレオチドを提供してもよい。あるいは、ランダム突然変異誘発法（例えば、アラニンスクラン突然変異誘発、エ

50

ラーが起きやすいポリマーゼ連鎖反応突然変異誘発、オリゴヌクレオチド指令突然変異誘発)を使用して、免疫原性ペプチド及び融合ポリペプチド変種を調製してもよい(例えば、Sambrook et al、前出、を参照)。免疫原性ペプチド変種又は融合ポリペプチド変種は、配列リスト中のもの(例えば、配列番号1~12で示される融合ポリペプチド、及び配列番号29~59で示される免疫原性ペプチド)を含む、本明細書に記載の免疫原性ペプチド及び融合ポリペプチドのアミノ酸配列のいずれかと、少なくとも85%、90%、92%、95%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有する、それぞれ免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドを含む。あるアミノ酸配列と1つまたはそれ以上の追加の配列との同一性パーセントは、本明細書に記載の及び当該分野で使用される整列手段のいずれかを使用して決定してもよい。

10

## 【0087】

免疫原性を示し、ヒトの細胞上に発現されるタンパク質と交差反応する抗体を誘導する不要なエピトープが欠如した、Mタンパク質とSpaタンパク質の領域についての当該分野と本明細書の記載から、当業者は、Mタンパク質とSpaタンパク質のアミノ末端部中のどのアミノ酸が改変(すなわち1つまたはそれ以上のアミノ酸の、置換、欠失、又は付加)をより受けやすいか、及びどのアミノ酸が変化を受けにくいかを、容易に決定することができる。また、ペプチド又はポリペプチドに変異を導入し、これらのペプチドやポリペプチド及びこれらの変種を単離し、これら进行分析するために、本明細書に記載され、多くの分子生物学、タンパク質発現、及びタンパク質分離技術及び方法に提供されているため、所望の免疫原性は、容易に、かつ過度に実験をすることなく、作成することができる。免疫原性の保持は、例えば、同族の免疫原性ペプチド及び/又は融合ポリペプチド、同族の成熟Mタンパク質又はSpaタンパク質(単離されているか、又はGAS細菌の細胞表面上に存在する)、又は同族の完全長Mタンパク質又はSpaタンパク質に特異的に結合する抗体の産生、及び殺菌活性及び食作用活性を有するものを含む抗体の産生などの、GASに対する免疫応答を誘発する能力を含む。

20

## 【0088】

Mタンパク質又はSpaタンパク質の免疫原性ペプチドの変種、又は免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチドが、折り畳まれて、非変種ペプチド又は融合ポリペプチドに匹敵するコンフォメーションを取るかどうかの評価するためのアッセイは、例えば、未変性のもしくは折り畳まれていないエピトープに特異的なモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体と反応するペプチドもしくは融合ポリペプチドの能力、リガンド結合機能の保持、及びプロテアーゼによる消化に対する変異ペプチドもしくは融合ポリペプチドの感受性もしくは耐性(例えば、Sambrook et al、前出、を参照)を含む。本明細書に記載の免疫原性ペプチド変種及び融合ポリペプチド変種は、当業者によりルーチンに実施されている、本明細書に記載のこれらの方法及び当該分野で公知の他の方法に従って、同定、性状解析、及び/又は作成することができる。

30

## 【0089】

個々の免疫原性ペプチドの及び免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチドの変種は、生じる分子の生物活性を変化させることなく(すなわち、統計的に、生物学的に、又は臨床的に有意な、又は生物学的に有意な方法で、1つまたはそれ以上の免疫原性を変化させることなく)調製することができる。例えば本明細書でより詳細に記載されるように、そのような置換は一般的に、あるアミノ酸を同じ群(例えば、極性残基、荷電残基、疎水性残基、及び/又は小さい残基などの群)内の別のアミノ酸と交換することにより作成される。アミノ酸置換の効果は、生じた改変ペプチドもしくは融合ポリペプチドを、生物学的アッセイで機能する能力、又は同族のリガンドもしくは標的分子(例えば、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体)に結合する能力を単に試験することにより、経験的に決定することができる。

40

## 【0090】

## 4つの融合ポリペプチドを含む抗GAS免疫原性組成物

ある具体的態様において、GASに対する免疫応答を誘導するのに有用な免疫原性組成

50

物は、31の異なる免疫原性ペプチドを含み、各免疫原性ペプチドは、4つの融合ポリペプチドのうちの一つに取り込まれる。各免疫原性ペプチドは、G A S M血清型1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、118の一つからのMタンパク質のアミノ末端部由来、又はG A S血清型18のSpaタンパク質のアミノ末端部由来である。3つの融合ポリペプチド（便宜上、それぞれ第1、第2、及び第3の融合ポリペプチドと呼ばれる）は、それぞれタンデムに連結された8つの異なる免疫原性ペプチドを含み、及び4つの融合ポリペプチドは、タンデムに連結された少なくとも7つの異なる免疫原性ペプチドを含む。具体的態様において、第1の融合ポリペプチドは、8つの免疫原性ペプチドを含み、これらは相違し、各免疫原性ペプチドは、G A S M血清型1、2、3、6、12、18、28の一つからのMタンパク質のアミノ末端部から、及びG A S血清型18のSpaタンパク質のアミノ末端部から、連続する少なくとも25のアミノ酸を含む。言い換えると、第1の融合ポリペプチドは、タンデムに連結された少なくとも8つの異なる免疫原性ペプチドを含み、各免疫原性ペプチドは、M1タンパク質、M2タンパク質、M3タンパク質、M6タンパク質、M12タンパク質、M18タンパク質、M28タンパク質、及びSpa18タンパク質の一つのアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む（すなわち、従って融合ポリペプチドは、M1タンパク質のアミノ末端部からの免疫原性ペプチド、M2タンパク質のアミノ末端部からの免疫原性ペプチド、M3タンパク質のアミノ末端部からの免疫原性ペプチドを含む、など）。免疫原性ペプチドの一つは、融合ポリペプチドのアミノ末端とカルボキシ末端の各々で繰り返される。さらなる具体的態様において、第1の融合ポリペプチドは、G A S血清型1からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチドの複製（繰り返し）を含み、1つの複製は、融合ポリペプチドのアミノ末端に位置し、第2の複製は、融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する。

10

20

**【0091】**

第2の融合ポリペプチドは、8つの免疫原性ペプチドを含み、これらは相違すると共に、各免疫原性ペプチドは、G A S M血清型4、5、11、14、19、24、29、及び75の一つからのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む。言い換えると、及び第1の融合ポリペプチドの説明と同様に、第2の融合ポリペプチドは、タンデムに連結された少なくとも8つの異なる免疫原性ペプチドを含み、各免疫原性ペプチドは、M4タンパク質、M4タンパク質、M11タンパク質、M14タンパク質、M19タンパク質、M24タンパク質、M29タンパク質、及びM25タンパク質の一つのアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む。免疫原性ペプチドの一つは、第2の融合ポリペプチドのアミノ末端とカルボキシ末端の各々で繰り返される。さらなる具体的態様において、第2の融合ポリペプチドは、G A S血清型4からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチドの複製（繰り返し）を含み、1つの複製は、融合ポリペプチドのアミノ末端に位置し、第2の複製は、融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する。

30

**【0092】**

ある態様において、第3の融合ポリペプチドは、8つの免疫原性ペプチドを含み、これらは相違すると共に、各免疫原性ペプチドは、G A S M血清型22、44、58、73、77、78、89、及び118の一つからのMタンパク質のアミノ末端部から、連続する少なくとも25のアミノ酸を含む。言い換えると、及び第3の融合ポリペプチドは、タンデムに連結された少なくとも8つの異なる免疫原性ペプチドを含み、各免疫原性ペプチドは、M22タンパク質、M44タンパク質、M58タンパク質、M73タンパク質、M77タンパク質、M78タンパク質、M89タンパク質、及びM118タンパク質の一つのアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む。免疫原性ペプチドの一つは、第3の融合ポリペプチドのアミノ末端とカルボキシ末端の各々で繰り返される。さらなる具体的態様において、第3の融合ポリペプチドは、G A S血清型77からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチドの複製

40

50

(繰り返し)を含み、1つの複製は、融合ポリペプチドのアミノ末端に位置し、第2の複製は、融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する。

【0093】

第4の融合ポリペプチドは、7つの免疫原性ペプチドを含み、これらは相違すると共に、各免疫原性ペプチドは、GAS M血清型49、81、82、83、87、92、及び114の1つからのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む。言い換えると、及び第4の融合ポリペプチドは、タンデムに連結された少なくとも8つの異なる免疫原性ペプチドを含み、各免疫原性ペプチドは、M49タンパク質、M81タンパク質、M82タンパク質、M83タンパク質、M87タンパク質、M92タンパク質、及びM114タンパク質の1つのアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む。免疫原性ペプチドの1つは、第4の融合ポリペプチドのアミノ末端とカルボキシ末端の各々で繰り返される。さらなる具体的態様において、第4の融合ポリペプチドは、GAS血清型83からのMタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチドの複製(繰り返し)を含み、1つの複製は、融合ポリペプチドのアミノ末端に位置し、第2の複製は、融合ポリペプチドのカルボキシ末端に位置する。

10

【0094】

第1、第2、第3、及び第4の融合ポリペプチドの各々の各免疫原性ペプチドは、各Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも25、30、35、40、45、50、55、又は60、又はそれ以上のアミノ酸(又は、各Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する25~30、30~35、35~40、40~45、45~50、40~55、もしくは55~60の間の任意の数のアミノ酸、又は60以上の連続するアミノ酸)を含んでよい。別のさらなる具体的態様において、1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは、少なくとも25の連続するアミノ酸を二重で含み、各複製はタンデムである(すなわち、融合タンパク質の異なるMタンパク質又はSpaタンパク質からの1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドにより分離されていない)。別の具体的態様において、1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは、各Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から、連続する少なくとも40のアミノ酸、又は少なくとも45のアミノ酸を含む。さらに別の具体的態様において、1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドは、各Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部から連続する少なくとも50のアミノ酸を含む。

20

30

【0095】

上記したように、ある具体的態様において、免疫原性ペプチドは各Mタンパク質のサブタイプから誘導されてよい。例えば、ある具体的態様において、GAS血清型3のMタンパク質からの免疫原性ペプチドはGAS血清型3.1から誘導される。他の具体的態様において、GAS血清型6のMタンパク質からの免疫原性ペプチドは、GAS血清型6.1から誘導される。さらに別の具体的態様において、GAS血清型5のMタンパク質からの免疫原性ペプチドは、GAS血清型5.0(親サブタイプ)から誘導される。ある具体的態様において、GAS血清型14のMタンパク質からの免疫原性ペプチドは、GAS血清型14.3から誘導される。さらに別の具体的態様において、GAS血清型29のMタンパク質からの免疫原性ペプチドは、GAS血清型29.2から誘導される。さらに別の具体的態様において、GAS血清型49のMタンパク質からの免疫原性ペプチドは、GAS血清型49.1から誘導される。さらに別の具体的態様において、GAS血清型83のMタンパク質からの免疫原性ペプチドは、GAS血清型83.1から誘導される。サブタイプが指定されない場合、Mタンパク質は、当該分野において「親」サブタイプと考えられているサブタイプ(例えば、M12.0、M18.0、M28.0など)から誘導される。

40

【0096】

さらなる具体的態様において、8つの免疫原性ペプチド(これらの免疫原性ペプチドは、独立に、上記した、GAS M血清型1、2、3、6、12、18、28の1つからの

50

Mタンパク質のアミノ末端部から誘導され、GAS血清型18からのSpaタンパク質のアミノ末端部から誘導される)を含む第1の融合ポリペプチドは、タンデムで以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へ連結される：M1、M3.1、M6.4、M2、M18、M28、M12、Spa、及びM1。M1、M18、M28、M12、及びSpa免疫原性ペプチドの各々は、各成熟Mタンパク質又はSpaタンパク質の各々からのアミノ酸残基1~50を含む。GAS血清型3.1である免疫原性ペプチドは、成熟M3.1タンパク質の22~71位にアミノ酸残基を含む。M3.1タンパク質とM6.4タンパク質の免疫原性ペプチドの各々は、残基1~25の複製(すなわち、繰り返し)と直接タンデムに連結された各成熟Mタンパク質のアミノ酸残基1~25を含む。M2タンパク質の免疫原性ペプチドは、残基2~26の複製(すなわち、繰り返し)と直接タンデムに連結された各成熟Mタンパク質のアミノ酸残基2~26を含む。8つの免疫原性ペプチド(これらの免疫原性ペプチドは、独立に、GAS M血清型4、5、11、14、19、24、29、及び75の1つからのMタンパク質のアミノ末端部から誘導される)を含む第2の融合ポリペプチドは、タンデムで以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へ連結される：M4、M5.0、M11、M75、M19、M29.2、M14.3、M24、及びM4。M4、M11、M75、M29.2、M14.3、及びM24免疫原性ペプチドの各々は、各成熟Mタンパク質のアミノ末端部からのアミノ酸残基1~50を含む。M5.0タンパク質とM19タンパク質の免疫原性ペプチドの各々は、残基1~25の複製(すなわち、繰り返し)と直接タンデムに連結された各成熟Mタンパク質のアミノ酸残基1~25を含む。8つの免疫原性ペプチド(これらの免疫原性ペプチドは、独立に、GAS M血清型22、44、58、73、77、78、89、及び118の1つからのMタンパク質のアミノ末端部から誘導される)を含む第3の融合ポリペプチドは、タンデムで以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へ連結される：M77、M22、M73、M89、M58、M44、M78、M118、及びM77。これらのMタンパク質免疫原性ペプチドの各々は、各成熟Mタンパク質のアミノ末端部でアミノ酸残基1~50を含む。7つの免疫原性ペプチド(これらの免疫原性ペプチドは、独立に、GAS M血清型49、81、82、83、87、92、及び114の1つからのMタンパク質のアミノ末端部から誘導される)を含む第4の融合ポリペプチドは、タンデムで以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へ連結される：M83.1、M82、M81、M87、M49.1、M92、M114、及びM83.1。これらのMタンパク質免疫原性ペプチドの各々は、各成熟Mタンパク質のアミノ末端部でアミノ酸残基1~50を含む。図1も参照されたい。

#### 【0097】

第1、第2、第3、及び第4の融合ポリペプチドの具体例の各々のアミノ酸配列の例は、それぞれ配列番号1、2、3、及び4に示される。発現、可溶化、安定化、単離、及び/又は検出を促進するために、免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、及び融合ポリペプチド(本明細書に記載の融合ポリペプチドの例を含む)は、アミノ末端又はカルボキシ末端のいずれか又は両方で、異種ペプチドもしくはポリペプチドをさらに含んでよい。例えば、免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドが組換え法に従って産生される時、アミノ末端の開始メチオニン残基が典型的に含まれる(例えば、第1、第2、第3、及び第4の融合ポリペプチドに対応する、それぞれ配列番号5、6、7、及び8を参照)。ペプチド又は融合ポリペプチドの単離、可溶化、安定化、及び/又は検出を促進するために、アミノ末端又はカルボキシ末端のいずれかに付加されるアミノ酸配列(ポリペプチドタグとも呼ばれる)の例は、ポリヒスチジンタグ(例えば、6-Hisタグ)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、FLAG(登録商標)エピトープタグ(DYKDDDDK、配列番号60)、ベータガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、キチン結合タンパク質(CBP)、XPRESS(登録商標)エピトープタグ(DLYDDDDK、配列番号61、Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオレドキシソ(可溶化タグ)、及びポリ(NANP)(可溶化タグ)を含む(例えば、米国特許第5,011,912号;Hopp et al, (Bio/Technology 6:1204 (1988)を参照)。ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドが組換え

10

20

30

40

50

法で産生される場合、ベクターにより親和性配列（例えば、ヘキサヒスチジンタグ）が、核酸コード配列を組換え法で生成するのに使用されるプライマー中に合成法で又は工学的（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して）に、付加される。ポリペプチドタグを使用するための追加の方法及び技術は、当該分野においてルーチンに実施されており、目的のペプチド又はポリペプチドにタグを付加するためのシステムやキットを製造している販売業者から入手できる。例えば、第1、第2、第3、及び第4の融合ポリペプチドは、精製を促進するためのポリヒスチジンを取り込んでよい（例えば、それぞれ配列番号9～12を参照）。

#### 【0098】

融合ポリペプチド変種は、配列リスト（例えば、配列番号1～12）のものを含む本明細書に記載の融合ポリペプチドアミノ酸配列の例のいずれかと少なくとも85%、90%、92%、95%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有する融合ポリペプチドを含む。GASに対する免疫応答を誘導するのに有用な融合ポリペプチドは、上記のアミノ酸配列のいずれかであり、融合ポリペプチドの免疫原性を、統計的、生物学的、又は臨床的に有意な方法で悪い影響を与えるか又は改変（減少又は低下）しない1つまたはそれ以上のアミノ酸の置換、挿入、及び欠失を含んでよい。言い換えると、本明細書に記載の融合ポリペプチドの変種は、親ポリペプチド又は非変種融合ポリペプチドにより示される免疫原性を保持する。本明細書に記載のように、免疫原性の保持は、例えば、同族の免疫原性ペプチド及び/又は融合ポリペプチド、同族の成熟もしくは完全長Mタンパク質もしくはSpaタンパク質（単離されているか、又はGAS細菌の細胞表面上に存在する）に特異的に結合する抗体の産生、及び殺菌活性と食作用活性を有するものを含む抗体の産生などの、GASに対する免疫応答を誘発する能力を含む。

#### 【0099】

実施例に記載されるように、上記の第1、第2、第3、及び第4の融合ポリペプチドの例の各々を含む免疫原性組成物を用いて動物を免疫すると、Mタンパク質免疫原性ペプチドとSpa免疫原性ペプチドで示される各GAS血清型（すなわち、GAS血清型1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、118）に特異的に結合する細菌抗体の産生を誘発した。さらに、免疫された動物からの抗血清は、いずれの融合ポリペプチドにおいてもMタンパク質又はSpaタンパク質からの免疫原性ペプチドが表れなかったGAS血清型の半分以上に対して、殺菌性であった。この改良された効力は、他の多価組成物を用いて既に記載された結果に基づいて、当業者が予測したものより大きい。すでに記載された26価ワクチン（例えば、米国特許第7,370,827号；Hu et al、前出、を参照）と比較すると、本明細書に記載の免疫原性ペプチドの特定の組合せは、より多くの非ワクチンGAS血清型を認識した（実施例4を参照）。26価ワクチンには含まれなかった本明細書に記載の30価の免疫原性組成物に示された血清型は、GAS M血清型4、29、58、44、49、73、78、81、82、83、87、118を含む。本明細書に記載の組成物中の免疫原性ペプチドで示されなかった26価組成物中の血清型は、GAS M血清型1、2、13、33、43、59、76、及び101を含む。

#### 【0100】

2つの異なる免疫原性ペプチドは、直接タンデムに連結されて二量体ペプチド（ジペプチドとも呼ばれる）を形成し、これは、ある態様において、免疫原性ペプチドに特異的な抗体を検出するのに有用である。二量体ペプチドは、本明細書及び当該分野で記載のように、当該分野でルーチンに使用されている方法と技術（例えば、Hu et al、前出、を参照）に従って、組換え法で産生される。あるいは、二量体ペプチドは、本明細書と当該分野で記載されている方法に従って化学合成される。二量体ペプチドは、本明細書に記載の任意の2つの異なる免疫原性ペプチドからなっており、例えば、二量体ペプチド（これは、免疫原性二量体ペプチドを含む）は、2つの2免疫原性ペプチドからなり、二量体ペプチドの各ペプチドは相違すると共に、異なるMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端

10

20

30

40

50

部から連続する少なくとも25のアミノ酸からなり、G A S血清型1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、及び118のMタンパク質から独立に選択され、Spaタンパク質はG A S血清型18から選択される。

#### 【0101】

##### 免疫原性ペプチドと融合ポリペプチドの産生

これらの免疫原性ペプチドを含むA群連鎖球菌の異なる血清型からのMタンパク質又はSpaタンパク質と、融合ポリペプチドとのアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を含む免疫原性ペプチドが、本明細書に提供される。免疫原性ペプチド、免疫原性二量体ペプチド(すなわち、2つの異なる免疫原性ペプチドを含むポリペプチド)、及び融合ポリペプチドの各々は、組換え法で産生されるか、又は化学合成してもよい。あるいは、個々の免疫原性ペプチド、免疫原性二量体ペプチド、及び融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、組換え法で構築されるか、又は化学合成され、構築又は合成されたポリヌクレオチドは、発現ベクターが導入されている宿主細胞中で、ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドの産生のための発現ベクター中に取り込まれてもよい。

#### 【0102】

ペプチド及びポリペプチドは、用手法又は自動化法により化学合成してもよい。自動化ペプチド合成装置は、Perkin-Elmer, Inc.やApplied BioSystems Division (Foster City, CA)のような業者により販売されており、製造業者の説明書に従って操作することができる。例えば、固相ペプチド合成は、1960年代初頭から行われている(例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963)を参照)。合成法には無数の改良法が開発されており、多くの方法は自動化されており、末端及び他の反応性基を保護するための化学が開発されている(例えば、Geysen et al, J. Immun. Meth. 102:259-274 (1987); Miranda et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1181-86 (1999); Frank et al, Tetrahedron 44:6031-6040 (1988); Hyrup et al, Bioorg. Med. Chem. 4:5-23 (1996); Perry-O'Keefe et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675 (1996); Schnolzer, et al. Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193 (1992); Hackeng et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7845-50 (1997); Creighton, T. E. Protein: Structures and Molecular Properties, pp. 55-60, W. H. Freeman and Co., New York, NY (1984))。自動合成を実施するための装置は、多くの製造業者から入手できる。合成されたペプチド、二量体ペプチド、及び融合ポリペプチドは、多くの異なるカスタムペプチド合成業者のいずれからでも得ることができる。必要であれば、合成されたペプチド又はポリペプチドは、分取逆相クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過、ゲル電気泳動、又はイオン交換クロマトグラフィー、又は当該分野で使用される他の方法を使用して、精製してもよい。

#### 【0103】

ポリヌクレオチドもまた、化学合成されるか、又は当業者に公知の組換え法により構築してもよい。ポリヌクレオチドはまた、自動合成機を使用して合成することもできる。ヌクレオチド配列は、所望の特定のアミノ酸配列用の適切なコドンを用いて設計することができる。一般に好適なコドンは、そこでヌクレオチド配列が発現される目的の宿主について選択される。ポリヌクレオチドを調製するための1つの組換え法は、完全なコード配列を与えるために、標準的方法により調製される重複するオリゴヌクレオチドからの集成体を含む(例えば、Au et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 248:200-203 (1998); Stemmer et al, Gene 164:49-53 (1995); Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., 1993)); Sambrook et al, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., (Cold Spring Harbor Laboratory 2001などを参照)。化学合成後又は組換え合成後にポリヌクレオチドを精製する方法は、当業者に公知である(例えば、Ausubel et al, 前出; Sambrook et al, 前出、を参照)。

## 【0104】

プライマーやプローブ用のオリゴヌクレオチドの化学合成は、当該分野において昔から行われている（例えば、Letsinger et al, J. Am. Chem. Soc. 98:3655-61 (1976); Matteucci et al, J. Am. Chem. Soc. 103:3185-9 (1981)を参照）。より迅速な結果と高い収率と長いポリヌクレオチドを提供するオリゴヌクレオチドとポリヌクレオチドを合成するための改良法が、開発され自動化されている（例えば、Gao et al, Biopolymers 73:579-96 (2004); Mueller et al, Chem. Biol. 16:337-47 (2009); Lee et al, Nucleic Acid Res. 38:2514-21 (2010)を参照）。本明細書に記載の免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、及び融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、商業的に合成してもよい（例えば、GENSCRIPT, Piscataway, NJを参照）。

10

## 【0105】

本明細書に記載の免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、種々の異なる宿主細胞中で組換え法で発現してもよい。組換え発現構築体を含む宿主細胞は、ベクター及び/又は発現構築体（例えば、クローニングベクター、シャトルベクター、又は発現構築体）を用いて、遺伝子工学的に作成される（形質導入、形質転換、又はトランスフェクションされる）。ベクター又は構築体は、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形でもよい。工学作成された宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体の選択、又は特定の遺伝子もしくはコーディングヌクレオチド配列の増幅に適するように修飾された従来の栄養培地で培養することができる。特定の宿主細胞の培養条件（例えば、温度、pHなど）の選択と維持は、当業者には明らかである。一般に、所望の宿主細胞は、充分量のペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドを発現することができる安定な細胞株を与えるように、培養物中での持続的増殖ができるように改変できるものである。ある態様において、細胞株は不死細胞株であり、これは、対数増殖期後の培養物中で繰り返し継代できる（生存能力を保持しながら、少なくとも10回）細胞株をいう。他の形態において、細胞株を作成するために使用される宿主細胞は、無制限な増殖が可能な細胞株、例えば癌細胞、形質転換された細胞、又は悪性腫瘍細胞である。

20

## 【0106】

有用な細菌発現構築体は、機能性プロモーターを有する機能性読み枠中に、適切な翻訳開始及び転写開始シグナルとともに、所望のペプチド又はポリペプチドをコードする構造DNA配列を、発現ベクター中に挿入することにより調製される。この構築体は、1つまたはそれ以上の表現型選択マーカーと、ベクター構築の維持を確実にし、所望であれば宿主内での増幅を提供する複製開始点とを含んでよい。形質転換のための適切な原核生物宿主は、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、及びシュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属、及びブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属内の種々の種を含むが、他の種も選択事項として使用される。他のプラスミド又はベクターも、宿主中で複製可能であり生存能力を有する限り、使用することができる。すなわち、例えば、ここで提供されるポリヌクレオチドは、種々の発現ベクター構築体のいずれにも、ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドを発現するための組換え発現構築体として、含まれてもよい。そのようなベクター及び構築体は、染色体性、非染色体性、及び合成のDNA配列、例えば細菌プラスミド；ファージDNA；パキユロウイルス；酵母プラスミド；プラスミドやファージDNAの組合せから誘導されるベクター；ウイルスDNA、例えばワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、及び仮性狂犬病ウイルスを含む。

30

40

## 【0107】

適切なDNA配列は、当業者に公知の種々の方法により、ベクター中に挿入することができる。ある例では、DNA配列は、当該分野で公知の方法により、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。特に、本明細書に記載の融合ポリペプチドは、融合ポリペプチドを含む免疫原性ペプチドのいずれにおいても、制限酵素部位が欠如している。制限部位と制限部位にコードされるアミノ酸配列の脱落は、所望の免疫原性エピトープが改悪

50

されるか又はエピトープが不注意に付加されて好ましくない免疫原性を有する可能性（例えば、通常のヒトタンパク質を認識する抗体の産生を含む）を排除することを意図する。クローニング、DNA単離、増幅、及び精製のための、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどを含む酵素反応のための標準的方法、及び種々の分離法は、当業者に公知で一般的に使用されているものである（例えば、Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., 1993)、及びSambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., (Cold Spring Harbor Laboratory 2001)）。

#### 【0108】

発現ベクター中のペプチド又はポリペプチドをコードするDNA配列は、少なくとも1つの適切な発現制御配列（例えば、プロモーター又は制御されたプロモーター）に機能できる形で結合して、mRNA合成を指令する。そのような発現制御配列の代表例は、LTR又はSV40プロモーター、大腸菌 (*E. coli*) *lac* 又は *trp*、ファージラムダP<sub>L</sub>プロモーター、及び原核生物もしくは真核生物又はこれらのウイルス中の遺伝子の発現を制御することが知られている他のプロモーターがある。プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコルトランスフェラーゼ）ベクター又は選択マーカーを有する他のベクターを使用して、所望の遺伝子から選択することができる。具体的なプロモーターは、*lacI*、*lacZ*、T3、T5、T7、*gpt*、ラムダPR、PL、及び*trp*を含む。適切なベクターやプロモーターの選択、及び本明細書に記載のポリヌクレオチドに機能できる形で結合している少なくとも1つのプロモーター又は制御されたプロモーターを含むいくつかの組換え発現構築体の調製は、当該分野における通常の技術レベル内である。

#### 【0109】

誘導性に制御されたプロモーター及び/又は厳密に制御されたプロモーターの設計と選択は、当該分野で公知であり、具体的な宿主細胞と発現系とに依存するであろう。pBAD発現系（Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）は、大腸菌 (*E. coli*) アラビノースオペロン（PBAD又はPARA）（例えば、Guzman et al, *J. Bacteriology* 177:4121-30 (1995); Smith et al, *J. Biol. Chem.* 253:6931-33 (1978); Hirsh et al, *Cell* 11 :545-50 (1977)を参照）を使用する厳密に制御された発現系の例であり、これは、アラビノース代謝経路を制御する。この系を使用するベクターベクターが市販されている。厳密に制御されたプロモーターに駆動される発現系の他の例は、Stratagene (La Jolla, CA)から入手できるPET発現系（米国特許第4,952,495号を参照）、又はtet制御された発現系（Gossen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-51 (1992); Gossen et al, *Science* 268: 1766-69 (1995)）を含む。pLP-TRE2アクセプターベクター（BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA）は、CLONTECHのCreator（登録商標）キットとともに使用するように設計されており、部位特異的Cre-Lox組換え系（例えば、Sauer, *Methods* 14:381-92 (1998); Furth, *J. Mamm. Gland Biol. Neoplas.* 2:373 (1997)を参照）を使用して、目的の遺伝子の厳密に制御された誘導性発現のための、テトラサイクリン制御発現構築体を迅速に作成し、これはまた宿主細胞の不死化にも使用される（例えば、Cascio, *Artif. Organs* 25:529 (2001)を参照）。

#### 【0110】

融合ポリペプチドの例（配列番号1～4）をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号13、17、21、及び25（配列番号1を含む融合ポリペプチドをコードする）、配列番号14、18、22、及び26（配列番号2を含む融合ポリペプチドをコードする）、配列番号15、19、23、及び27（配列番号3を含む融合ポリペプチドをコードする）、及び配列番号16、20、24、及び28（配列番号4を含む融合ポリペプチドをコードする）に与えられる。配列番号25、26、27、及び28の各々は、制御配列、開始メチオニン残基をコードするコドン、及びポリヒスチジントグをコードするコドンが欠如している。配列番号21、22、23、及び24の各々は、各融合ポリペプチドの開示メチオニン残基をコードするヌクレオチド配列を含むが、発現制御配列とポリヒスチジントグをコードする配列とが欠如している。配列番号17、18、19、及び20の各

10

20

30

40

50

々は、発現制御配列、開示メチオニン残基をコードするコドン、及びポリヒスチジンタグをコードするコドンを含む（また、図2A、2C、2E、及び2Fを参照）。配列番号13、14、15、及び16の各々は、発現制御配列と開示メチオニン残基をコードするコドンを含むが、ポリヒスチジンタグをコードするコドンが欠如している。

#### 【0111】

Mタンパク質とSpaタンパク質をコードするヌクレオチド配列の例は、本明細書に記載のように公のデータベースから容易に得ることができる（例えば、GenBank; GenEBML; CDC emm typing center ウェブサイト、インターネットで [cdc.gov/ncidod/biotech/strep/emmtypes](http://cdc.gov/ncidod/biotech/strep/emmtypes) でアクセスできる）。Mタンパク質変種又はSpaタンパク質変種のヌクレオチド配列（又は、Mタンパク質変種又はSpaタンパク質変種のアミノ末端部）は、変種をコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、特定のMタンパク質又はSpaタンパク質をコードする本明細書に記載の又は当該分野で公知のポリヌクレオチドと、本明細書に記載の及び当該分野で使用されている整列アルゴリズムの1つを使用して比較することにより、決定及び/又は同定することができる。こうして2つのポリヌクレオチド間の同一性パーセントを容易に決定することができる。一致が最大になるように整列した時に2つの配列のヌクレオチド残基が同じである場合、ポリヌクレオチドは100%のヌクレオチド配列同一性を有する。具体的態様において、Mタンパク質免疫原性ペプチド変種をコードするポリヌクレオチド又はSpaタンパク質免疫原性ペプチド変種をコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド配列、又はそこから免疫原性ペプチドが誘導されるMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部をコードするMタンパク質又はSpaタンパク質のポリヌクレオチドの領域のヌクレオチド配列は、各Mタンパク質とSpaタンパク質の免疫原性ペプチド（本明細書に記載される）をコードするポリヌクレオチド配列の1つまたはそれ以上と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、又は98%同一である。ポリヌクレオチド変種はまた、遺伝コードの縮重のためにヌクレオチド配列同一性が異なり、かつ本明細書に記載の又は当業者に公知のアミノ酸配列を有するMタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部をコードするヌクレオチド配列とは異なるポリヌクレオチドを含む。コーディングポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチド配列は、当業者が容易に決定することができる。免疫原性ペプチド又はその変種をコードするいくつかのポリヌクレオチドはまた、プローブ、プライマー、小干渉RNA (siRNA)、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドとしても使用できる。ポリヌクレオチドは、1本鎖DNA又はRNA（コーディング又はアンチセンス）又は2本鎖RNA（例えば、ゲノム又は合成）、又はDNA（例えば、cDNA又は合成）でもよい。

#### 【0112】

ポリヌクレオチド変種は、本明細書に記載の及び当該分野の整列法により、及びハイブリダイゼーション法により同定することができる。2つのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、適切な中程度の厳密条件、例えば、 $5 \times \text{SSC}$ 、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0) の溶液で前洗浄し、 $50 \sim 70^\circ\text{C}$ 、 $5 \times \text{SSC}$  で1~16時間ハイブリダイズし、次に0.05~0.1% SDSを含有する $2 \times$ 、 $0.5 \times$ 、及び $0.2 \times \text{SSC}$ の1つまたはそれ以上を用いて、 $22 \sim 65^\circ\text{C}$  で20~40分、1回又は2回洗浄する方法を使用して行うことができる。さらなる厳密性のためには、条件は、 $0.1 \times \text{SSC}$  と0.1% SDS中で $50 \sim 60^\circ\text{C}$  で15分の洗浄を含む。当業者には理解されるように、ハイブリダイゼーション条件の厳密性の変化は、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、及び洗浄工程で使用される時間、温度、及び/又は溶液の濃度を変化させることにより行われる。適切な条件はまた、一部は使用されるプローブの具体的なヌクレオチド配列（すなわち、例えばグアニン+シトシン (G/C) 対アデニン+チミジン (A/T) 含量) に依存することもある。従って、プローブの所望の選択性が特定されるなら、過度の実験をすることなく、適切な厳密性条件を容易に選択できることを、当業者は理解するであろう。

#### 【0113】

所望であれば、免疫原性ペプチド変種と融合ポリペプチド変種は、遺伝子工学と組換え

10

20

30

40

50

分子生物学の方法及び技術により、容易に調製できる。免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドの1次及び2次アミノ酸配列を解析しそれをコンピューターモデル化し、ポリペプチドの3次構造を解析することは、構造を変化させることなく置換、付加、又は欠失できるアミノ酸残基を同定することを助け、従ってペプチド又はポリペプチドの免疫原性の同定することを助けるであろう。免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチド変種をコードするポリヌクレオチド（例えばDNA）の修飾は、DNAの部位特異的又は部位指令突然変異誘発を含む種々の方法（これらの方法は、重複伸長によるPCRスプライシングのような、DNA鋳型に変化を導入し増幅するためのプライマーを使用するDNA増幅を含む）により行われる。変異は、非変種配列の断片への連結を可能にする制限部位が両側に位置する変異配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することにより、特定の位置に導入してもよい。連結後、生じる再構成された配列は、所望のアミノ酸挿入、置換、又は欠失を有する変種をコードする。本明細書に記載のように、突然変異誘発操作中に制限部位が導入される時、不要なエピトープを導入する可能性を下げるために、コードされるペプチド又は融合ポリペプチド中の制限部位のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸の含有は避けられる。

10

20

30

40

50

#### 【0114】

免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドの変種をコードするようなポリヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発は、本明細書に記載の及び当該分野で実施されている多数の方法のうちのいずれかに従って行われる（Kramer et al, *Nucleic Acids Res.* 12:9441 (1984); Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-92 (1985); Kunkel et al, *Methods Enzymol.* 154:367-82 (1987)）。変異（例えば、置換又は欠失）された時、リガンド（例えば、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体）への免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドの結合を変化させる残基を同定するためのランダム突然変異誘発法もまた、当業者によりルーチンに実施されている方法に従って行われる〔例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発；エラーの起きやすいポリメラーゼ連鎖反応突然変異誘発；及びオリゴヌクレオチド指令突然変異誘発（例えば、Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001)を参照）〕。免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドの変種が、GASに対する免疫応答を誘導するための免疫原性組成物の使用と目的とする時、変種は好ましくは、実質的に同様の方法（すなわち、統計的、生物学的、又は臨床的に有意な方法）で、非変種の免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドとして特異抗体に結合し、GAS細菌に結合しかつ細菌性である抗体の産生を誘発する。

#### 【0115】

##### 免疫原性ペプチド及び融合ポリペプチドの性状解析

本明細書で詳述されるように、免疫原性ペプチド及び免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチドは、ヒトのGAS感染症を引き起こす大部分のGAS血清型に対する免疫応答（特に防御性免疫応答）を誘導するための免疫原として使用することが意図される。免疫原性ペプチド及び融合ポリペプチドの免疫原性を決定し性状解析するために、当業者によりルーチンに実施されている方法に従って、免疫アッセイ、食作用、及び殺菌活性アッセイ、及び動物試験のいくつでも使用することができる。対象に投与される免疫原性組成物の安全性を評価するための追加の前臨床的試験が、典型的に行われる。最終的には、本明細書に記載の免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドを含む免疫原性組成物の安全性と効力は、規制機関によりモニターされる臨床試験により決定されるであろう。

#### 【0116】

免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチド（又はこれを含む免疫原性組成物）の免疫原性は、本明細書に記載の及び当該分野の免疫プロトコールに従って、宿主（又は対象、患者）に本明細書に記載の免疫原性組成物を投与することにより決定してもよい。典型的には、初期用量の免疫原性組成物を宿主に投与（1次免疫とも呼ばれる）後、免疫原性組成物の1回、2回、又はそれ以上の用量（追加用量又はブースター用量とも呼ばれる）が投与される。

## 【0117】

一般に、動物での前臨床的試験中に、免疫された宿主の免疫応答をモニターするために、最初の投与前（すなわち、免疫前血清）かつ最後の追加投与後に、動物から血清が得られる。血清はまた、初期投与と最終的追加投与の間の1回以上の追加投与後に得てもよい。臨床試験又は市販後調査中に、免疫された宿主の免疫応答をモニターするために、最初の免疫前に、及び免疫原性組成物の1回またはそれ以上の投与後に、血清を得てもよい。

## 【0118】

免疫原性ペプチド（及び、融合ポリペプチド、二量体ペプチド、完全長もしくは成熟タンパク質、又はこのタンパク質を発現するGAS細菌）に特異的に結合する抗体は、いずれかの免疫グロブリンクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、又はIgA）に属してもよい。本明細書に記載の免疫原性ペプチド及び融合ポリペプチドの性状解析のために、ポリクローナル抗体及び/又はモノクローナル抗体の使用が好ましい。抗体は、動物、例えば家禽（例えば、ニワトリ）、及び哺乳動物（これは、特に限定されないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は他のげっ歯動物、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ヒト、又は他の霊長類）から得られるか又は誘導されてよい。本明細書に記載のように、1つの免疫原性ペプチド、複数の免疫原性ペプチド、又は融合ポリペプチドもしくは複数の融合ポリペプチドを含む免疫原性組成物を用いて動物を免疫することにより、動物から、ポリクローナル抗血清が得られる。

## 【0119】

免疫された宿主（ヒト宿主を含む）中の免疫原性ペプチド特異的抗体の産生は、IgG、IgA、IgM、及び/又はIgEを含む任意のクラスの免疫グロブリン、及びこれらのクラス内のイソタイプの産生を含んでよい。特異的IgG、IgM、IgE、及びIgA（特に粘膜分泌物中）の存在は、免疫された宿主から得られる生物学的試料（例えば、血清、鼻洗浄液、肺洗浄液、又は他の組織）で検出してもよい。イムノアッセイにおける免疫原性ペプチド特異的及びGAS特異的抗体の検出のために、生物学的試料は、精製され、単離され、部分的に単離された抗原と、又はその断片と相互作用もしくは接触されるか、又は固定（エタノール又はホルムアルデヒドで）されているか又は固定されていないか又は変性されていない微生物と、相互作用もしくは接触されてもよい。粘膜分泌物は、呼吸器（鼻咽頭及び肺を含む）から採取されるものを含む。免疫原特異的抗体が、GASの食作用もしくはオプソニン作用を促進するか、又はGASの増殖を阻害するか、又は細菌を死滅させるか、又は宿主細胞へのGASの侵入を防ぐ能力のような、機能的アッセイを実施することもできる。そのような方法は、本明細書に記載されており、当業者によりルーチンに実施されている。

## 【0120】

免疫血清（すなわち、免疫原性組成物の1回またはそれ以上の投与により免疫後の宿主から得られる血清）又は他の生物学的試料は、免疫原性組成物（融合ポリペプチド中に取り込まれるものを含む）に含まれる任意の1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチドに特異的に結合する抗体（免疫グロブリン）の存在について評価することができる。本明細書に記載のイムノアッセイのような、生物学的試料中の特異抗体の存在を検出するためのアッセイもまた、成熟もしくは完全長Mタンパク質又はSpaタンパク質、及び/又はGAS細菌全体を使用してもよい。免疫原性組成物中の免疫原性ペプチドで示されるGAS血清型に免疫血清中の抗体が結合するレベル、及び組成物中の免疫原性ペプチドで示されないGAS血清型（非ワクチンGAS血清型とも呼ばれる）に抗体が結合するレベルを、測定してもよい。免疫原性ペプチド、融合ポリペプチド、Mタンパク質、Spaタンパク質、又はGAS細菌に抗体が結合するレベル（典型的には、力価と呼ばれる）は、当業者によりルーチンに実施されている任意の1つまたはそれ以上のイムノアッセイを使用して、容易に測定することができる。非限定例として、イムノアッセイは、ELISA、免疫プロット、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学、蛍光活性化細胞ソーター解析（FACS）、オクタロニーなどを含む。イムノアッセイは、免疫原性組成物に含まれ、アッセイで使われる1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチド（例えば個々の免疫原性ペプチド、二量体ペ

10

20

30

40

50

プチド、又は融合ポリペプチド)を使用して行ってもよい。

【0121】

ある態様において、抗体を検出するための方法が提供され、この抗体は、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体でもよく、いずれのクラスもしくはイソタイプでもよく、本明細書に記載の生物学的試料中に存在するかもしくは存在が疑われるものでもよく、この抗体は、任意の免疫原性ペプチド(例えば、配列番号29~59の何れか1つのアミノ酸配列を含む免疫原性ペプチドを含む)、二量体ペプチド、融合ポリペプチド(配列番号1、2、3、4、及び配列番号5~12のいずれか1つのアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドなどの、本明細書に記載の融合ポリペプチド例の任意の1つを含む)に結合する。この方法は、生物学的試料に、本明細書に記載の免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドを、試料中の抗体が、ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドと相互作用するのに十分な条件下かつ時間、接触させること(すなわち、混合、組合せ、又は生物学的試料と免疫原性ペプチド、融合ポリペプチド、もしくは二量体ペプチドが相互作用することを可能にする何らかの方法)を含む。ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドに特異的に結合する生物学的試料中に存在する抗体は、抗体-抗原結合を検出するための本明細書に記載の及び当該分野の検出法の例のいずれか1つを使用して、検出することができる。非限定例として、ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチドに結合した抗体は、抗体のFc部分などの抗体の保存領域に特異的な試薬を使用して検出ことができ、この試薬は典型的には抗体の起源に依存して(すなわち、抗体が、マウス、ラット、ヤギ、又はヒツジなどの動物由来であるか、又は抗体がヒト由来であるかにより)選択される。このような試薬は典型的には、検出可能な標識物、例えば酵素、蛍光標識物、発光標識物、又は放射性標識物を含む。試薬の追加の例は、抗体の特異的イソタイプ又はクラスを検出するものである。このような試薬の多くは、市販品から得られる。

10

20

【0122】

免疫前血清及び免疫血清内の抗体の完全性、及びアッセイに使用される抗原(これは、免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチド、Mタンパク質、Spaタンパク質、又は細菌でもよい)の完全性を維持する、温度、緩衝液(塩、カチオン、培地を含む)を含む具体的なアッセイの条件は、当業者に公知であり、及び/又は容易に決定することができる。血清などの生物学的試料は、抗原と試料中の抗体との相互作用を可能にするのに十分な条件かつ時間、抗原と接触(混合、組合せ、又は相互作用を可能にする何らかの方法)させられる。免疫血清試料(又は他の生物学的試料)中に存在する抗体への抗原の相互作用、又は結合レベルを測定し、免疫前の試料(又は他の適切な陰性対照)中に存在する抗体に各抗原が結合するレベルと比較してもよい。免疫前の血清試料と比較して、免疫血清試料への抗原の結合レベルが上昇していることは、免疫原性組成物が特異抗体の産生を誘発したことを示す。本明細書に記載のように、免疫された宿主からの試料中の抗体への免疫原の結合レベルは、当該分野において典型的には力価と呼ばれる。

30

【0123】

特異的抗原への抗体の相互作用又は結合は、一般的には静電的相互作用、水素結合、ファンデアワールス相互作用、及び疎水性相互作用を含む。抗体とその抗原との結合では、これらのいずれか又はその組合せが関与している。本明細書において、抗体が反応性免疫原と検出可能なレベルで、好ましくは親和性定数 $K_a$ が、約 $10^4 M^{-1}$ か又はそれ以上、約 $10^5 M^{-1}$ か又はそれ以上、約 $10^6 M^{-1}$ か又はそれ以上、約 $10^7 M^{-1}$ か又はそれ以上、又は約 $10^8 M^{-1}$ か又はそれ以上で、反応する時、抗体は、免疫原性ペプチド、免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチド、Mタンパク質、Spaタンパク質、又はGAS細菌に、「特異的」であるか又は「特異的に結合」と言われる。同族のリガンド(この場合、免疫原性ペプチド、融合ポリペプチド、Mタンパク質、Spaタンパク質、又は細菌)に結合する抗体の能力はまた、解離定数 $K_D$ として表わしてもよく、 $K_D$ が、 $10^{-4} M$ か又はそれ以下、約 $10^{-5} M$ か又はそれ以下、約 $10^{-6} M$ か又はそれ以下、約 $10^{-7} M$ か又はそれ以下、又は約 $10^{-8} M$ か又はそれ以下で結合するなら、抗体はその同族のリ

40

50

ガンドに特異的に結合と言われる。

【 0 1 2 4 】

免疫原性ペプチド又は免疫原性ペプチドを含むポリペプチド（例えば、本明細書に記載の融合ポリペプチド）に対する抗体の親和性は、例えばScatchard et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51 :660 (1949)) により記載された方法、及び表面プラズモン共鳴(SPR; BIAcore(TM), Biosensor, Piscataway, NJ)を使用して、容易に測定することができる。表面プラズモン共鳴については、標的分子は固相に固定化され、フローセルに沿って流れる移動相中でリガンドに暴露される。固定化された標的へのリガンドの結合が起きると、局所的な屈折率が変化して、SPR角度の変化が起き、これは、反射光の強度の変化を検出することによりリアルタイムでモニターすることができる。SPRシグナルの変化速度を分析して、結合反応の結合期と解離期の見かけの速度定数を得ることができる。これらの値の比は、見かけの平衡定数（親和性）を与える（例えば、Wolff et al, Cancer Res. 53:2560-65 (1993)を参照）。

10

【 0 1 2 5 】

本明細書に記載の及び当該分野でルーチンに実施されているいくつかのインビトロアッセイは、本明細書に記載の免疫原性及び融合ポリペプチドにより誘発される特異抗体の活性を測定するために使用することができる。アッセイ例は、オプソニン食作用アッセイであり、これは、抗血清中に存在するオプソニン抗体の存在により促進される食作用を検出する。簡単に説明すると、このアッセイは、免疫血清の存在下で細菌をプレインキュベートした後、好中球による細菌の食作用レベルを測定する。免疫前又は他の適切な陰性対照もまた、このアッセイ中に含まれる。プレインキュベートした細菌は次に、オプソニン防御が求められる宿主（例えば、ヒト）などの適切な宿主からの全血と混合されて、細菌細胞と結合する好中球のパーセント（これは、オプソニン抗体により促進された食作用活性の尺度である）が決定される。免疫血清とプレインキュベートした細菌に結合した好中球のパーセントは、免疫前血清（又は、抗GAS抗体を含有しないと考えられるか又はこれがわかっている他の適切な血清）とプレインキュベートされる細菌と結合した好中球のパーセントと比較することができる。免疫前血清とプレインキュベートした細菌と結合した好中球のパーセントと比較して、免疫血清とプレインキュベートした細菌と結合した好中球のパーセントが大きいこと（すなわち、統計的、生物学的、又は臨床的に有意に上昇したパーセント）は、試験免疫血清がオプソニン抗体を含有することを示す。

20

30

【 0 1 2 6 】

試料中に存在する抗体の殺菌活性を決定するインビトロアッセイの別の例は、殺菌活性アッセイである（例えば、Hu et al、前出；本明細書の実施例を参照）。GAS細菌は免疫血清、又は適切な対照血清（例えば、免疫前血清）とともにインキュベートされ、次にGASの増殖を可能にする培地（例えば、ヒツジ血液寒天）上に置かれる。典型的には、一晚インキュベート後、生存能力のある細菌の数を定量し、結果は死滅パーセントとして表される。死滅パーセントを表すための間接的な殺菌活性アッセイで一般的に使用される式は、 $[(\text{免疫前血清でプレインキュベートした細菌試料のCFU} - (\text{免疫血清でプレインキュベートした細菌試料のCFU})) \div \text{免疫前血清でプレインキュベートした細菌試料のCFU}] \times 100$ である。

40

【 0 1 2 7 】

オプソニン化、食作用、及び殺菌活性アッセイは、抗GAS予防的及び治療的処置の可能性の性状解析のための、当該分野に認められているインビトロ動物モデルである。予防的又は治療的使用のためのワクチンの有用性を当業者に示唆する1つまたはそれ以上のこれらのアッセイで得られる結果は、臨床試験の知見により支持される（例えば、米国特許第7,270,827号；Kotloff et al, 前出；McNeil et al, 前出）。免疫原性ペプチド、融合ポリペプチド、及びこれらを含む免疫原性組成物の免疫原性を性状解析するために使用できる動物モデルは、異なる免疫療法モデル（すなわち、動物は可能性のある免疫原性組成物候補で免疫され、次にGASで抗原刺激される）と考えられているもの、及び間接又は受動免疫療法モデル（すなわち、GAS抗原に特異的な免疫原性組成物候補又

50

はモノクローナル抗体で免疫した動物から得られた抗血清、又は抗血清から精製され単離された抗体は、G A S 抗原刺激細菌の前に、又はこれと同時に投与される)と考えられているものを含む。

#### 【0128】

非侵襲性G A S 疾患(例えば咽頭炎)を模倣する動物モデルは、げっ歯動物モデルで樹立することは困難であった。G A S 膿痂疹を研究するためのマウスモデルが、Scaramuzzi et al. (Infect. Immun. 68:2880-87 (2000))により記載されている。咽頭炎を研究するために開発が成功している非ヒト霊長類モデルは、ヒトの疾患を模倣する急性咽頭炎のマカクザル(cynomolgus macaque)を含む(例えば、Ashbaugh et al, Cellular Microbiol. 2:283-92 (2000); Sumbly et al, in Meth. Molec. Biol. 431 :255-67 (DeLeo et al. (ed.) Humana Press, Totowa NJ (2008))を参照)。当該分野で入手できる他の動物モデルは、侵襲性軟組織感染(例えば、Ashbaugh et al, J. Clin. Investig. 102:550-60 (1998); Boyle et al, J. Infect. Dis. 177:991-97 (1998)を参照)、敗血症(例えば、Goldmann et al, J. Inf. Dis. 187:854-61 (2003); Kapur et al, Microbiol. Pathogenesis 16:443-50 (1994); Medina et al, J. Infect. Dis. 184:846-52 (2001))、及び壊死性筋膜炎(Patel et al, J. Inf. Dis. 181 :230-34 (2000)を参照)などの侵襲性疾患の治療薬及び予防薬を評価するために開発されている。

10

#### 【0129】

免疫原性ペプチドに特異的に結合するポリクローナル抗体(及び、かかるポリクローナル抗体を含む免疫血清)は、本明細書に記載され当業者によりルーチンに実施されている方法を使用して調製することができる(例えば、Green et al., "Production of Polyclonal Antisera," in Immunochemical Protocols (Manson, ed.), pages 1-5 (Humana Press 1992); Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Williams et al, "Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al. (eds.), page 15 (Oxford University Press 1995))。また、例えば米国特許第7, 270, 827号、6, 716, 433号、7, 402, 316号、7, 063, 850号を参照。ポリクローナル抗体は典型的には、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ウシ、又はヒツジなどの動物で作成されるが、抗体はまた、ヒトに近い霊長類由来でもよい。ヒヒを免疫するための一般的な方法は、例えば、国際特許出願公報WO 91/11465(1991)、及びLosman et al, Int. J. Cancer 46: 10, 1990に見いだされる。

20

30

#### 【0130】

免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、融合ポリペプチド、又はこれらを含む免疫原性組成物の任意の1つので免疫される非ヒト動物は、非限定例として、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、フェレット、イヌ、ネコ、ラクダ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ニワトリ、及び非ヒト霊長類(例えば、マカクザル(cynomolgus macaque)、チンパンジー、アカゲザル(rhesus monkey)、オランウータン、及びヒヒ)を含む。本明細書に記載の免疫原性組成物の任意の1つのは、非経口(例えば、静脈内)、腹腔内、筋肉内、皮内、眼内、又は皮下経路により、動物を免疫するために投与されてもよい。免疫原性組成物はさらに、免疫原に対する免疫応答を増強するための適切なアジュバントを含んでよい。例えば、Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)を参照。非ヒト動物の免疫のために典型的に使用されるアジュバントは、特に限定されないが、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、モンタニドISA、Ribiアジュバント系(RAS)(GlaxoSmithKline, Hamilton, MT)、ニトロセルロース吸着抗原を含む。一般に、最初の注射後、動物は、好適なスケジュール(これは、特に免疫原、アジュバント(もしあれば)、及び/又は具体的な動物種)に従って、1回またはそれ以上の追加免疫を受ける。免疫応答は、動物を定期的に出血させ、採取した血液から血清を分離し、血清をイムノアッセイ(例えば、ELISA又はオクタロニー拡散アッセイなど)で分析して、特異抗体の力価を決定してもよい。十分な抗体

40

50

力価が確立されたら、動物を定期的に出血させて、ポリクローナル抗血清を蓄積する。

【0131】

次に、免疫原に特異的に結合するポリクローナル抗体は、適切な固相支持体上に固定化されたプロテインA又はプロテインGが固定化を使用して、親和性クロマトグラフィーにより免疫抗血清から精製してもよい(例えば、Coligan, 前出, p. 2.7.1-2.7.12; 2.9.1-2.9.3; Baines et al, Purification of Immunoglobulin G (IgG), in Methods in Molecular Biology, 10:9-104 (The Humana Press, Inc. (1992)を参照)。あるいは、特定の免疫動物種のIg定常領域に特異的な抗体が適切な固相支持体上に固定化されている、親和性クロマトグラフィーが行われる。親和性クロマトグラフィーはまた、1つまたはそれ以上の免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、又は融合ポリペプチド(これらは、特定の免疫原性ペプチドへの結合活性により、ポリクローナル抗体を分離するのに有用となり得る)の使用を含んでよい。

10

【0132】

免疫原性ペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体、及び所望の結合特異性を有するモノクローナル抗体を産生する不死化真核細胞細胞株(例えば、ハイブリドーマ)もまた、Kohler and Milsteinの方法(Nature, 25(5):495-97 (1976), Eur. J. Immunol. 6: 511-19 (1975))、及びこれらの改良法(例えば、Coligan et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, 1:2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991); 米国特許第4,902,614号、4,543,439号、及び4,411,993号; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett et al. (eds.) (1980); and Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.) , Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); see also, e.g., Brand et al, Plant a Med. 70:986-92 (2004); Pasqualini et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:257-59 (2004)を参照)を使用して、調製してもよい。モノクローナル抗体は、免疫原性ペプチド、融合ポリペプチド、及び複数の免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドを含む免疫原性組成物の免疫原性を測定しモニターするために使用することができる。

20

【0133】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養物などの真核細胞培養物の上清から単離してもよい。マウスモノクローナル抗体の産生のための別の方法は、ハイブリドーマ細胞を同系マウス、例えばモノクローナル抗体を含有する腹水の生成を促進するために処理された(プリスタンでプライムされた)マウスの腹腔内に注射することである。次に採取された腹水(通常1~3週間以内)から、クロマトグラフィー(例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー)、ゲル濾過、沈降、抽出などの従来法により、汚染物質が除去される(例えば、Coligan, 前出, p. 2.7.1-2.7.12; 2.9.1-2.9.3; Baines et al, Purification of Immunoglobulin G (IgG), in Methods in Molecular Biology, 10:9-104 (The Humana Press, Inc. (1992))。モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体の具体的な性質(例えば、重鎖又は軽鎖イソタイプ、結合特異性など)に基づいて選択される適切なリガンドを使用する親和性クロマトグラフィーにより精製してもよい。固相支持体に固定化された適切なリガンドの例は、プロテインA、プロテインG、抗定常領域(軽鎖又は重鎖)抗体、抗イソタイプ抗体、又はB細胞の供給源である動物を免疫するために使用されるペプチド又はポリペプチドを含む。

30

40

【0134】

所望であれば、ヒトモノクローナル抗体は、当業者が周知している多くの方法により作成してもよい。このような方法は、特に限定されないが、ヒト末梢血細胞(例えば、Bリンパ球を含む)のエプスタインバーウイルス(EBV)形質転換(例えば、米国特許第4,464,456号; Glasky et al, Hybridoma 8:377-89 (1989)を参照)、ヒトB細胞のインビトロ免疫、ヒト免疫グロブリン遺伝子が挿入された免疫されたトランスジェニックマウスからの脾細胞の融合、ヒト免疫グロブリンV領域ファージライブラリーの単離、又は当業者に公知の及び本明細書の開示に基づく他の方法を含む。例えば、トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法は、例えば、Green et al, Nature Genet. 7:13 (1

50

994); Lonberg et al, Nature 368:856 (1994); Taylor et al, Int. Immun. 6:579 (1994); 米国特許第 5, 877, 397 号; Bruggemann et al, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 455-58 (1997); Jakobovits et al, Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:525-35 (1995)に記載されている。ある態様において、所望の抗体を産生している B 細胞が選択され、当該分野で公知 (WO 92/02551; 米国特許第 5, 627, 052 号; Babcook et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48 (1996)) の及び本明細書に記載の分子生物学的技術に従って、軽鎖及び重鎖可変領域が B 細胞からクローン化される。またヒト化抗体を含むキメラ抗体を作成してもよい。キメラ抗体は、第 1 の哺乳動物種から誘導される少なくとも 1 つの定常領域ドメインと第 2 の異なる哺乳動物種から誘導される少なくとも 1 つの可変領域ドメインとを有する (例えば、Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984); Shin et al, Methods Enzymol. 178:459-76 (1989); Walls et al, Nucleic Acids Res. 21:2921-29 (1993); U.S. Patent No. 5,482,856 を参照)。非ヒト/ヒトキメラ抗体は、さらに遺伝子操作をして「ヒト化」抗体を作成してもよい (例えば、Jones et al, Nature 321:522-25 (1986); Riechmann et al, Nature 332:323-27 (1988))。ヒト化抗体を設計することは、例えばコンピューターモデル化により、非ヒト可変領域の CDR ループコンフォメーションと構造決定基を決定し、次に CDR ループ及び決定基を、既知のヒトの CDR ループ構造及び決定基と比較することを含む (例えば、Padlan et al, FASEB 9: 133-39 (1995); Chothia et al, Nature, 342:377-83 (1989); Bajorath et al., Ther. Immunol. 2:95-103 (1995); Davies et al, Ann. Rev. Biochem. 59:439-73, (1990); EP-0578515-A3 を参照)。

10

20

#### 【0135】

特定の用途について、抗体の抗原結合断片が好ましい場合がある。抗体断片である F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fab'、Fv、及びFd は、例えば抗体のタンパク質分解加水分解、例えば従来法による全抗体のペプシン又はパイン消化により得ることができる。抗体断片はまた、当該分野の多数の方法に従って、特定の抗原に結合して複合体を形成する点で抗体のような作用する合成又は遺伝子工学的作成されてもよい (例えば、Larrick et al, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106, (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166 (Cambridge University Press 1995); 及び Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al, (eds.), page 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995) を参照)。

30

#### 【0136】

抗体はまた、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、ウサギ免疫グロブリンライブラリーから、マウス免疫グロブリンライブラリーから、及び/又はニワトリ免疫グロブリンライブラリーから、同定し単離してもよい (例えば、Winter et al, Annu. Rev. Immunol. 12:433-55 (1994); Burton et al, Adv. Immunol. 57: 191-280 (1994); 米国特許第 5, 223, 409 号; Huse et al, Science 246: 1275-81 (1989); Schlebusch et al, Hybridoma 16:47-52 (1997)、及びそこに引用されている文献; Rader et al, J. Biol. Chem. 275: 13668-76 (2000); Popkov et al, J. Mol. Biol. 325:325-35 (2003); Andris-Widhopf et al, J. Immunol. Methods 242: 159-31 (2000) を参照)。非ヒト種又は非ヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体は、本明細書に記載の及び当該分野で公知の方法に従って遺伝子操作されて、抗体又はその断片が「ヒト化」されてもよい。免疫グロブリン可変領域遺伝子コンビナトリアルライブラリーは、ファージベクター中で作成してもよく、これはスクリーニングされて、本明細書に記載のように免疫原性ペプチドに特異的に結合する Ig 断片 (Fab、Fv、scFv、又はこれらのマルチマー) を選択することができる (例えば、米国特許第 5, 223, 409 号; Huse et al, Science 246:1275-81 (1989); Sastry et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-32 (1989); Alting-Mees et al, Strategies in Molecular Biology 3: 1-9 (1990); Kang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363-66 (1991); Hoogen

40

50

boom et al, J. Molec. Biol. 227:381-388 (1992); Schlebusch et al, Hybridoma 16:47-52 (1997) 及びそこに引用されている文献；米国特許第 6,703,015 号を参照）。

#### 【 0 1 3 7 】

##### 免疫原性組成物の調製

本明細書に記載の免疫原性組成物は、対象（ヒト又は非ヒト動物）を免疫して、GAS に対する免疫応答を誘導するために使用してもよい。免疫原性組成物は、ヒト又は非ヒト動物への投与のために、組成物が医薬的に又は生理学的許容し得るかもしくは適切な組成物、調製した、又は製剤であるように調製される。免疫原性組成物は、医薬的に許容し得る（すなわち、生理学的に適切であるか又は許容される）賦形剤と組合せてもよく、これは本明細書において詳述される。医薬組成物での使用が当業者に公知である生理学的又は医薬的に適切な賦形剤又は担体（すなわち、活性成分の活性を妨害しない非毒性物質）が、本明細書に記載の組成物に使用できる。賦形剤の例は、組成物の成分の安定性と完全性を維持する希釈剤や担体を含む。賦形剤の例は、タンパク質の安定性と完全性を維持する希釈剤や担体を含む。治療用途の賦形剤は周知されており、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 第21版. Mack Pub. Co., Easton, PA (2005)) に記載されており、これは、本明細書に詳細に記載される。賦形剤の選択は、免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドの安定性；投与経路；及び投与スケジュールを含むいくつかの要因に依存する。例えば、生理学的 pH での食塩水や PBS が使用できる。保存剤、安定剤、色素、及びさらには香味剤（経口投与される場合）を、組成物中に加えてもよい。

10

20

#### 【 0 1 3 8 】

本明細書に記載の免疫原性組成物はまた、適切なアジュバントを含んでよい。アジュバントは、免疫原性ペプチドとこのペプチドを含む融合ポリペプチドに対する免疫応答を増強（又は改善、強化）することが目的である（すなわち、アジュバントを投与しない場合の特異的免疫応答のレベルと比較して、統計的、生物学的、又は臨床的に有意に、免疫原性ペプチドに対する特異的免疫応答のレベルを上昇させる）。

#### 【 0 1 3 9 】

ヒトでの投与のために、医薬的に許容し得るアジュバントは、関連する規制組織により、ヒトへの投与が認可されているか又は許可されるものである。例えば、本明細書に記載の及び当業者に公知のように、完全フロイントアジュバントは、ヒトへの投与に適しない。所望のアジュバントは、定性的免疫応答に悪影響を与える可能性のある免疫原のコンフォメーションの変化を引き起こすことなく、免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドに対する応答を強化する。適切なアジュバントは、アルミニウム塩、例えばアラム（硫酸アルミニウムカリウム）、又は他のアルミニウム含有アジュバント、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、もしくは硫酸アルミニウムを含む。他の医薬的に許容し得るアジュバントは、非毒性の脂質 A 関連アジュバント、例えば非限定例として、非毒性モノホスホリル脂質 A（例えば、Persing et al, Trends Microbiol. 10:s32-s37 (2002) を参照）、例えば 3-デ-0-アシル化モノホスホリル脂質 A（例えば、英国特許出願第 GB 2220211 号を参照）を含む。他の有用なアジュバントは、南アメリカに存在するキラヤサポナリアモリナ（Quillaja saponaria Molina）の樹皮から単離されるトリテルペングリコシド又はサポニンを含む QS21 と QuilA を含む（例えば、Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach（編者 Powell and Newman, Plenum Press, NY, 1995）；米国特許第 5,057,540 号を参照）。他の適切なアジュバントは、例えばモノホスホリル脂質 A のような免疫刺激物質と任意に組合わされる水中油エマルジョンを含む（例えば、Stoute et al, N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997) を参照）。他の適切なアジュバントは、ポリマー性又はモノマー性アミノ酸、例えばポリグルタミン酸又はポリリジン、リポソーム、及び CpG を含む（例えば、Klinman, Int. Rev. Immunol. 25(3-4): 135-54 (2006)；U.S. Patent No. 7,402,572；European Patent No. 772 619 を参照）。

30

40

50

## 【0140】

本明細書に記載の免疫原性組成物は、複数の免疫原性ペプチド又は複数の融合ポリペプチドを、少なくとも1つの医薬的に許容し得る賦形剤と組合せることにより調製してもよい。本明細書に記載のように、免疫原性組成物はさらに、医薬的に許容し得るアジュバントを含んでよい。典型的には、宿主への投与を目的とするすべての免疫原性ペプチド又はすべての融合ポリペプチドは、単一の免疫原性組成物中に一緒にされ、これは、少なくとも1つの医薬的に許容し得る賦形剤と含み、さらに医薬的に適切なアジュバントを含んでよい。あるいは、例えば多数の免疫原性組成物が、本明細書に記載の及び当該分野で公知の任意の経路でもよく、連続もしくは同時でもよい、別の投与のために調製してもよい。

## 【0141】

本明細書に記載の免疫原性組成物は、無菌の水溶液もしくは非水溶液、懸濁物、又はエマルジョンとして調製され、これは、本明細書に記載のように、生理学的に許容し得る賦形剤（これは担体とも呼ばれる）及び/又は希釈剤をさらに含んでよい。免疫原性組成物は、固体、液体、又は気体（エアゾル）の形でもよい。あるいは、本明細書に記載の免疫原性組成物は、凍結乾燥物（すなわち、凍結乾燥された組成物）として調製してもよく、又は当業者に公知の技術を使用してリポソーム内に封入してもよい。免疫原性組成物はまた、他の成分（これは、生物学的に活性でも不活性化でもよい）を含有することもできる。このような成分は、特に限定されないが、緩衝液（例えば、中性の緩衝化食塩水又はリン酸緩衝化生理食塩水）、炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、ショ糖、デキストラン）、マンニトール、タンパク質（例えばアルブミン）、ポリペプチド、又はグリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、EDTA又はグルタチオンなどのキレート剤、安定剤、色素、香味剤、及び懸濁剤、及び/又は保存剤を含む。

## 【0142】

一般に、本明細書に記載のように、賦形剤のタイプは、投与モードに基づいて選択される。本明細書に記載の組成物と調製物は、任意の適切な投与方法（例えば、局所、頬、舌、口腔、鼻腔内、髄腔内、直腸、膺、眼内、結膜下、経皮、舌下または非経口投与（皮下、静脈内、筋肉内、胸骨内、海綿体内、外尿道口内、または尿道内注射または注入を含む））のために製剤化される。

## 【0143】

非経口投与（例えば、皮下注射又は筋肉内注射）には、担体又は賦形剤は、好ましくは水、食塩水、アルコール、脂肪、ワックス、又は緩衝液を含み、免疫原性組成物は無菌である。経口投与には、上記賦形剤のいずれか、又は、例えばマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、ショ糖、及び炭酸マグネシウムなどの固体担体を使用できる。生体分解性微小球（例えば、ポリ乳糖ガラクトイド）ならびにナノ粒子も、本明細書に記載の組成物用の担体として使用できる。例えば米国特許第4,897,268号及び5,075,109号に記載の適切な生体分解性微小球がある。組成物又は調製物が微小球と組合せられる具体的態様において、微小球は、約25ミクロンより大きい。本明細書に記載の免疫原性組成物は凍結乾燥されるか、又は1つまたはそれ以上の適切な賦形剤溶液（例えば、ショ糖、生理学的食塩水）を投与の希釈剤として使用して、凍結乾燥製品として調製してもよい。ナノ粒子は、凍結乾燥製品及び適切な賦形剤を送達するのに使用してもよい。

## 【0144】

本明細書に開示される免疫原性組成物は、粘膜組織への直接投与のような局所投与が意図され、この場合、担体は適切には、溶液、エマルジョン、軟膏剤、又はゲル基剤を含んでよい。例えば基剤は、以下の1つまたはそれ以上を含んでよい：ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、蜜蝋、鉱油、水及びアルコールなどの希釈剤、そして乳化剤及び安定剤。局所投与（例えば、口腔又は膺）のような医薬組成物中には、増粘剤が存在してもよい。本明細書に記載の免疫原性組成物は、本明細書に記載の及び当該分野で使用されているいくつかの送達ビヒクル（特に限定されないが、スポンジ、ゲルキャップ、坐剤、ガーゼ（又は、処置すべき組織への適用に適した布）、ナノ粒子、及びトローチ剤）の任

10

20

30

40

50

意のものを使用して局所投与してもよい。いくつかの送達ビヒクル（例えば、スポンジ、布、又はガーゼ）について、組成物又は調製物は、処理すべき組織との接触により、組成物又は調製物の放出を可能にするビヒクルへ、付着されるか、吸着されるか、吸収されるか、又は何らかの方法で適用される。

【0145】

本明細書に開示される免疫原性組成物は、例えば坐剤又はトローチ剤の形での、直腸、口腔、又は腔内投与が意図され、これは、それぞれ直腸、口腔、又は腔スペース中で溶解し、組成物の薬剤又は成分を放出する。経口投与される本明細書に記載の組成物又は調製物はまた、液体の形でもよい。直腸投与用の組成物又は調製物は、適当な非刺激性賦形剤として油性基剤を含有してもよい。このような塩基は、特に限定されないが、ラノリン、ココアバター、及びポリエチレングリコールを含む。

10

【0146】

本明細書に記載の免疫原性組成物は好ましくは、特に非経口投与される時、内毒素を含まない。内毒素不含組成物は、内毒素及び/又は関連する発熱性物質を実質的に含まない（すなわち、規制機関により認められている、内毒素が存在するかどうかを十分な感度で証明する方法によっても、非毒素が検出されない）。内毒素は、生存能力のある微生物中に存在する毒素を含み、微生物が細胞の完全性を無くすか又は死滅する時のみ放出される毒素を含む。発熱性物質は、細菌及び他の微生物の外膜に存在する熱誘導性の熱安定性物質（リポ多糖および糖タンパク質）を含む。これらの物質は、ヒトに投与されると、発熱、低血圧、およびショックを引き起こすことがある。内毒素不含組成物を製造することは、特殊な装置、熟練技術者を必要とし、内毒素不含ではない製剤を製造するよりはるかに高価になることがある。

20

【0147】

別の態様において、本明細書に記載の免疫原性組成物の製造法が提供される。製造法は、所望の複数の免疫原性ペプチド又は所望の融合ポリペプチドを組合せるか又は混合して、本明細書に記載の免疫原性組成物を提供することを含む。この製造法はさらに、本明細書に記載した1つまたはそれ以上の生理学的に適した（又は医薬的に適した）賦形剤を組合せるか又は混合することを含んでよい。この方法はさらに、所望の免疫原性ペプチド又は所望の融合ポリペプチドを含む免疫原性組成物を、医薬的に適切なアジュバントと組合せるか又は混合することを含み、少なくとも医薬的に適切な賦形剤を、アジュバントを含む免疫原性組成物と組合せるか又は混合してもよい。さらなる態様において、製造法は、所望の免疫原性ペプチド又は所望の融合ポリペプチドの化学合成又は組換え産生を含む。免疫原性ペプチド及び融合ポリペプチドの化学合成および組換え産生は、本明細書で詳述される。各免疫原性ペプチドと融合タンパク質の製造では、規制機関が要求する適切な製造プロセス（例えば、医薬品適正製造基準（Good Manufacturing Practices；GMP））が使用される。さらに当業者は、免疫原性組成物の製造中に、ペプチド又は融合ポリペプチドの安定性と完全性を維持するための技術や工程を周知している。

30

【0148】

免疫原性ペプチド、融合ポリペプチド、及び免疫原性組成物を使用する方法

複数のGAS免疫原性ペプチド、例えば、GAS Mタンパク質又はGAS Spaタンパク質から誘導される少なくとも31の異なる免疫原性ペプチドを含む本明細書に記載の免疫原性組成物、および複数の免疫原性ペプチド（GAS M血清型1、2、3、4、5、6、11、12、14、18、19、22、24、28、29、44、49、58、73、75、77、78、81、82、83、87、89、92、114、118からのMタンパク質の、又はGAS血清型18のSpaタンパク質の、1つのアミノ末端部から連続する少なくとも25のアミノ酸を、各々が独立に含む少なくとも31の異なる免疫原性ペプチド）を含む少なくとも4つの融合ポリペプチドを含む本明細書に記載の免疫原性組成物は、GASに対する免疫応答を誘導するのに使用し得る。従って、ある態様において、GAS細菌に対する免疫応答（体液性応答を含む）を誘発するのに適した方法で、ヒト宿主である宿主（又は対象）を免疫することを含む方法が、本明細書に提供される。従って本

40

50

明細書に記載のこれらの組成物は、G A S に対する免疫が不十分で感染症に罹りやすい処置の必要な宿主の、予防的及び / 又は治療的処置に有用である。

【 0 1 4 9 】

G A S に対する免疫応答を誘導するための、及び G A S 感染を予防（すなわち、発症の可能性を低下させる）及び / 又は治療するための、本明細書に記載の方法は、所望の抗 G A S 免疫応答を誘発し維持するのに適した時間間隔で、本明細書に記載の免疫原性組成物を宿主に、1 回、2 回、3 回、4 回、又はそれ以上投与することを含む。当該分野において長い間知られているように、G A S 感染に対する宿主の防御は一般に、G A S 血清型特異的 M タンパク質に対するオプソニン性抗体の産生と相関する（例えば、Lancefield, J. Immunol. 89:307, 1962 を参照）。さらに、宿主中の分泌性又は粘膜性抗 G A S 抗体の存在は、連鎖球菌（Streptococcus）による初期のコロニー化を防止し得る（発症の可能性を低下させるか減少させる）。複数の免疫原性ペプチドを含むか、又は複数の免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチドを含む、本明細書に記載の免疫原性組成物は、G A S 感染の予防、改善、又は治療のために使用されるため、この免疫原性組成物はまた、当業者によりワクチンとも呼ばれる。

10

【 0 1 5 0 】

各免疫原性組成物の用量、宿主に投与される投与回数、および組成物の 2 つの投与間の時間間隔を、当業者は決定することができる。宿主に投与される免疫原性組成物中の各免疫原性ペプチドの適切な量又は各融合ポリペプチドの量は、宿主もしくは患者（例えば、ヒト）の症状、すなわち疾患のステージ、全身の健康状態、ならびに年齢と体重、及び医学分野の当業者に公知の他の要因に依存し得る。本明細書に記載の免疫原性組成物で免疫される宿主又は対象は、ヒト及び非ヒト宿主及び対象を含む。ヒト宿主 / 対象は、幼児、小児、又は成人を含む。成人への投与に適した免疫原性組成物はさらに、その成人が若年であるか、中年であるか、又は高齢の成人であるかに依存して調製されることがある。

20

【 0 1 5 1 】

免疫原性組成物は、医学分野の当業者により決定されるように、治療（又は予防）すべき疾患に適した方法で投与される。適切な投与量と投与の適切な期間及び頻度は、患者の症状、患者の年齢、治療又は予防すべき患者の疾患の種類と重症度、活性成分の具体的な形態、及び投与方法などの要因により決定されるであろう。一般に、適切な投与量と治療処方は、治療的及び / 又は予防的利益を提供するのに十分な量の免疫原性組成物を提供する（例えば、改善される臨床的結果、全体的生存率、又は症状の重症度の低減）。予防的用途では、投与量は、統計的、生物学的、又は臨床的に有意な方法で感染の発症を予防するか又は遅延させるのに、及び / 又は重症度を低下させるのに充分である。

30

【 0 1 5 2 】

最適用量は一般に、インビトロ、インビボ、動物モデルでの実験、及び / 又はヒトの臨床試験で決定してもよい。最適用量は、宿主のボディマス、体重、又は血液容量に依存することがある。一般に、投与量中に存在する本明細書に記載の免疫原性ペプチド又は融合ポリペプチドの量は、約 1 0  $\mu$  g ~ 約 1 0 m g、約 1 0 0  $\mu$  g ~ 1 m g、約 1 5 0  $\mu$  g ~ 5 0 0  $\mu$  g、又は約 2 0 0  $\mu$  g ~ 約 4 0 0  $\mu$  g の範囲である。通常は、有効な治療及び / 又は予防を提供するのに十分な最小用量の使用が好ましい。患者は、治療又は予防される症状に適したアッセイ（このアッセイは当業者に公知である）を使用して、治療又は予防の有効性についてモニターされる。液体型で投与される時、適切な用量サイズは、患者の大きさにより変化するが、典型的には 1 0 ~ 6 0 k g の対象について約 1 m l ~ 約 5 0 0 m l（適切な用量を含む）である。

40

【 0 1 5 3 】

追加免疫は、約 2 週間 ~ 約 2 6 週間、例えば 2、4、8、12、16、又は 26 週間の間隔範囲の所望の時間間隔で、複数回（例えば、2 回又は 3 回又は 4 回又はそれ以上）投与してもよい。異なる投与間の時間間隔（例えば、初期投与と 2 回目の投与、又は 2 回目の投与と 3 回目の投与）は同じでなくてもよく、各 2 回の投与の時間間隔は、独立に決定してもよい。

50

## 【0154】

本明細書に記載の免疫原性組成物は、経口、経腸、非経口、経皮/経粘膜、および吸入を含む経路で投与してもよい。本明細書において経腸という用語は、薬剤が胃腸管又は口腔粘膜（経口、直腸内、および舌下を含む）を介して吸収される投与経路である。本明細書において非経口という用語は、胃腸管を迂回する投与経路を説明し、典型的には動脈内、皮内、皮下、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、静脈内、皮下、粘膜下、腔内、胸骨内、胸骨内、海綿、髄腔内、外尿道口内、及び尿道内注射を含む注射または注入によって投与される。本明細書において経皮/経粘膜という用語は、薬剤が局所投与を含む皮膚を介して又は皮膚によって投与される投与経路である。吸入という用語は、薬剤が、呼吸樹（肺内または肺を含む）中に導入される投与方法を包含し、鼻腔内投与を含む。より具体的な態様において、本明細書に記載の免疫原性組成物は、口腔、筋肉内、又は鼻腔内に投与されてもよい。ある態様において、異なる用量の免疫原性組成物は、例えば、経口、筋肉内、及び鼻腔内経路の2つ以上の経路などの、異なる経路によって送達されてもよい。

10

## 【0155】

本明細書に記載の免疫原性組成物は、GAS感染の発症の可能性を低下させるために、又は以下のいずれかを引き起こすGAS感染を治療するために使用してもよい：咽頭炎、猩紅熱、壊死性筋膜炎、蜂巣炎、髄膜炎、肺炎、連鎖球菌毒素性ショック症候群、菌血症、敗血症、敗血症性関節炎、膿皮症、皮膚感染（侵襲性及び非侵襲性）、膿痂疹、丹毒、軟部組織感染症、腎炎、およびGAS発熱性反応。GASに対する免疫応答を誘導するための、およびGAS感染の発症の可能性を低下させるための又は治療するための本明細書に記載の方法はまた、急性リウマチ熱、リウマチ性心疾患、反応性関節炎、および糸球体腎炎などの非化膿性続発症の発症の可能性又は重症度を低下させるのにも有効なことがある。

20

## 【0156】

免疫された対象は一般に、治療又は予防される感染又は症状に適したアッセイを使用して、治療的又は予防的有効性についてモニターされ、このアッセイは、当業者に公知であり、本明細書に記載される。上記方法に従って本明細書に記載の免疫原性組成物を投与することにより誘発される免疫応答は、体液性応答を含む適応免疫応答を含み、また免疫原性組成物で示される各免疫原性ペプチドに特異的な細胞応答（CD4免疫応答およびCD8免疫応答を含む）を含んでいてもよい。体液性免疫応答（すなわち、抗体応答）は、イムノアッセイ（例えばELISA、免疫ブロッティング）、インビトロ機能的アッセイ（例えば、オプソニン、食作用、及び死滅アッセイ、間接的な殺菌性アッセイ）などのいずれかを使用して、免疫プロトコールを通してモニターすることができる。このような方法は、免疫された宿主からの生物学的試料（例えば血清）中に存在する特異抗体の結合レベル（すなわち力価）をモニターし決定するのに有用である。これらのアッセイの1つ以上の結果に基づいて、次の投与の投与量やタイミング又はさらなる投与の必要性を決定することができる。

30

## 【0157】

細胞性免疫応答は、種々のタイプのT細胞（すなわちTリンパ球）を含む。細胞性応答において、T細胞はいくつかの機構により抗原を排除するように作用する。例えば、特異的抗原を認識することができるヘルパーT細胞は、サイトカインのような可溶性メディエーターを放出して、免疫系の追加の細胞を動員して免疫応答に参加させるように応答する。また細胞障害性T細胞は、抗原を特異的に認識ことができ、GAS細菌細胞のような抗原担持細胞に結合し、これを破壊又は傷害することにより応答する。

40

## 【0158】

細胞性免疫応答を調べるための当該分野においてルーチンに実施されているアッセイは、サイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、ならびに他のメディエーターなどの可溶性メディエーターの存在およびレベルを決定することを含む。イムノアッセイはまた、免疫細胞の変化した機能的または構造的な特性（細胞増殖、変化した運動性、特異的遺伝子発現もしくは細胞溶解的挙動などの特殊な活動の誘導；細胞成熟、お

50

よびTh1応答とTh2応答の関係の変化)を分析することによって免疫細胞の細胞の活性化状態の変化を決定することを含む、これらおよび類似のアッセイを行うための手順は、Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998)に見いだされる。またCurrent Protocols in Immunology; Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell and Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green and Reed, Science 281 : 1309 (1998) , およびそこに引用される文献を参照されたい。

#### 【0159】

本明細書に簡単に記載されるように、免疫原性ペプチドに対する、免疫原性ペプチドを含む融合ポリペプチドに対する、及び/又は完全長もしくは成熟ペプチド、又は本明細書に記載の免疫原性組成物を投与された対象中のGAS細菌に対する、免疫応答の存在及びレベルを測定するために、対象から得ることができる。本明細書において「生物学的試料」は、被験体または生物学的供給源からの、血液試料(そこから血清または血漿を調製される)、生検標本、体液(例えば、肺洗浄液、腹水、粘膜洗浄液、滑液)、骨髄、リンパ節、組織外植片、器官培養物、または任意の他の組織または細胞調製物でもよい。生物学的試料はまた、免疫原性組成物を投与される前の対象から得られ、この生物学的試料は、ベースライン(すなわち、免疫前)データを確立するための対照として有用である。

#### 【0160】

本明細書に記載の免疫原性組成物を用いる免疫の有効性を測定は、臨床的評価を含んでよい。例えば、GAS感染の存在は、臨床家が入手できるルーチンアッセイ(細菌細胞培養;免疫蛍光アッセイ)を行うことにより、体液中に体のある部位(例えば、喉、粘膜組織、又は皮膚)にGASが存在するかを迅速に測定することにより決定される。発熱、炎症、疼痛などの症状、およびGAS感染の種々の他のかつ多くの症状は、臨床分野の当業者がモニターすることができる。

#### 【0161】

本明細書に記載の免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、及び融合ポリペプチドは、試料中の特異抗体の存在及びレベルを検出するための試薬として使用してもよい。生物学的試料、非限定例として、免疫された宿主からの本明細書に記載の生物学的試料、又は特異的モノクローナル抗体を産生することが知られているか又は疑われる細胞株の細胞上清もしくは細胞溶解物が得られる。生物学的試料は、免疫原性ペプチド(又は各々が免疫原性ペプチドを含む、二量体ペプチド、融合ポリペプチド、成熟もしくは完全長タンパク質、又はGAS細菌)と、生物学的試料中の抗体と免疫原性ペプチド(単独で、又はより大きな分子の一部として)とが相互作用するのに十分な時間およびその条件下で、接触(すなわち、混合、組合せ、又は相互作用を可能にする何らかの方法)させられる。生物学的試料と免疫原性ペプチドとの相互作用のレベルが検出され、免疫原性ペプチドとベースライン又は陰性対照として機能する対照生物学的試料との相互作用のレベルと比較される。相互作用(すなわち、抗体と免疫原性ペプチドとの結合)のレベルは、本明細書に記載のおよび当業者に公知の多くのイムノアッセイ法の任意の1つにより決定することができる。

#### 【0162】

本明細書に記載の免疫原性ペプチド、二量体ペプチド、及び融合ポリペプチドはまた、免疫原性ペプチドに特異的結合するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を産生するための方法で使用してもよい。この方法の例は、本明細書で詳述される。

#### 【実施例】

#### 【0163】

##### 実施例1

##### GAS血清型4からのMタンパク質

本例は、GAS血清型4により発現されその細胞表面に存在するGAS抗原の性状解析を記載する。

#### 【0164】

後述される30価ワクチンの潜在的な防御効力は、タンパク質2の成分であるタンパク質Arp4のN-末端内のオブソニン性エピトープの発見によって増強された。Arp4はIgAと結合することがすでに示されていたが、食作用に対する病原性や抵抗のために必要とされなかった(例えば、Husmann et al, Infect. Immun. 63:345-348 (1995)を参照)。最も最近の疫学研究は、4型連鎖球菌感染症が、すべてのGAS感染症の最大9%を占めることを見いだした。Arp4(M4)のN末端内のオブソニン性エピトープを検出するために、(1)タンパク質のN末端の30アミノ酸である合成ペプチド、(2)Arp4ならびに5つの他のMペプチドの50アミノ酸残基を含有する組換え融合タンパク質、又は(3)無傷の組換えArp4タンパク質、に対するウサギ抗血清が作成された。すべての3つの抗血清は、インビトロ殺菌活性アッセイを使用して試験すると、有意な殺菌活性を示した(実験プロトコルの例3を参照):抗sM4(1~30)抗血清は、52%の死滅を与えた;6価融合タンパク質の成分として組換え50aa Arp4ペプチドで免疫したウサギから得られた抗血清は、82%の死滅を与えた;無傷の組換えArp4で免疫した動物からの抗血清は、85%の死滅を与えた。機能的死滅アッセイの結果は、Arp4(M4)のN末端ペプチドが、30価ワクチン中に含めるための適切な候補であることを示した。

#### 【0165】

##### 実施例2

##### 多価GASペプチド組成物の設計と構築

本例は、そこからMタンパク質免疫原性断片が選択されるであろうGAS血清型の選択を説明し、これらの免疫原性断片を含む融合ポリペプチドの構築を説明する。

#### 【0166】

(1)北アメリカの小児対象中の咽頭炎(例えば、Shulman et al, Clin. Infect. Dis. 2009、前出、を参照)、(2)侵襲性GAS感染症(例えば、Centers for Disease Control and Preventionにより後援されたActive Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Networkを参照)(例えば、O'Loughlin et al, 前出、を参照)、及び(3)ヨーロッパの侵襲性感染症(例えば、StrepEuro協会により報告されている、例えばLuca-Harari et al, 前出、を参照)の疫学に基づいて、GASの血清型からMペプチドが選択された。また30価のワクチン組成物に、現在又は歴史的に「リウマチ発症性」であると考えられているGASの血清型からのMペプチド(例えば、Shulman et al, Clin. Infect. Dis. 42:441-47 (2006)を参照)、及びSpa18のアミノ末端ペプチド断片(GAS血清型18からのSpaタンパク質、A群連鎖球菌の少なくとも数個の血清型により発現される防御性抗原(例えば、Dale et al, J. Clin. Invest. 103: 1261-68 (1999)、米国特許第7,063,850号、国際特許出願公報WO00/37648を参照)が含まれた。

#### 【0167】

免疫原性組成物に含めるために選択されたMタンパク質のアミノ酸配列は、cdc.gov/ncidod/biotech/strep/emmtypesでインターネットにアクセスして見つかるCenter for Disease Control (CDC) emm typing centerのウェブサイトから得られた。サブタイプが存在する場合は、ほとんどの場合、主要なサブタイプからのMタンパク質の配列が選択された。成熟Mタンパク質とSpaのアミノ末端領域が、GenBankデータベース中でBlastPにより検索されて、ヒトタンパク質と相同性の領域が同定された。ヒトタンパク質と同一の5つ又はそれ以上の連続するアミノ酸を有するアミノ末端領域は、ワクチンの設計に導入された。

#### 【0168】

組換え多価融合タンパク質の構築と発現。各emm遺伝子の特異的5'配列を使用して、4つのハイブリッドDNA分子を設計した。タンデムに連結された7又は8つのemm遺伝子断片、上流のT7プロモーター、および終止コドンが続く3'ポリヒスチジンモチーフを含有する各遺伝子が、化学合成(GENSCRIPT(登録商標), Piscataway, NJ)された。26価ワクチン(Hu et al, 前出; 米国特許第7,270,827号を参照)と異なり、

10

20

30

40

50

emm配列の間に連結コドンは挿入されなかった。大腸菌 (*E. coli*) のコドンの最適化は、以後の部位変異ではなく合成中に行われた。DNA鎖をアニーリングし、pUC57中に連結した。合成遺伝子配列の完全性は、ABI色素終止法を使用して配列決定することにより証明した。各多価融合タンパク質の発現は、IPTG誘導前及び後の全細胞溶解物を使用して、SDS-PAGE分析により検出された。6つのヒスチジン残基のポリペプチドタグ(すなわち、Hisタグ)を、当該分野でルーチンに実施されている方法に従ってニッケル親和性クロマトグラフィーによる精製を容易にするために、カルボキシ(本明細書においておよび当該分野において、COOHとも呼ばれる)末端に付加されている。

#### 【0169】

図1は、4つの融合タンパク質の各々についてコードされたMタンパク質免疫原性ペプチドの略図を示す。そこからのMタンパク質がワクチン組成物中に含まれる血清型は、アメリカ合衆国とカナダの咽頭炎のすべての奨励の98%、アメリカ合衆国の侵襲性疾患の90%、およびヨーロッパの侵襲性疾患の78%を占めるGAS血清型を含めた。図1では、各免疫原性ペプチドの記載の下の数は、Mタンパク質又はSpaタンパク質のアミノ末端部中のアミノ酸の位置を示す。例示と説明のために、タンパク質1において、MI免疫原性ペプチドは、GAS血清型1からのMタンパク質のアミノ末端から1~50位のアミノ酸を含有する; M3.1免疫原性ペプチドは、GAS血清型3.1からのMタンパク質のアミノ末端から22~71位のアミノ酸を含有する; M6.4は、GAS血清型6.4のアミノ末端部からの1~25位のアミノ酸のタンデム繰り返しを含有する、など。タンパク質1のカルボキシ末端では、MI免疫原性ペプチド(アミノ酸1~50)が繰り返される。各融合タンパク質中のアミノ酸の総数は、各タンパク質の略図の右端に示される。アミノ末端の開始メチオニン残基は、総アミノ酸数中に含まれる。

#### 【0170】

免疫原性ペプチドのアミノ酸配列は表1に提示される。完全長Mタンパク質の開始アミノ酸(典型的にはメチオニン)は、融合タンパク質の各ペプチドの免疫原性断片ペプチド配列中に含まれない(表1を参照)。4つの融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、図2A~2Hに示される。図2に示されるヌクレオチド配列は、コード領域の上流の発現制御配列と、Hisタグをコードするカルボキシ末端のヌクレオチドを含む(それぞれ、配列番号17~20、融合タンパク質1~4をコードするポリヌクレオチドを参照)。発現制御配列を含むがHisタグをコードするヌクレオチドは含まない融合タンパク質1~4をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号13~16に与えられる。発現制御配列を含まず、Hisタグをコードするヌクレオチドを含まず、かつアミノ末端メチオニンをコードするヌクレオチド(ATG)を含む融合タンパク質1~4をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号17~20に与えられる。発現制御配列を含まず、Hisタグをコードするヌクレオチドを含まず、かつアミノ末端メチオニンをコードするヌクレオチドを含まない融合タンパク質1~4をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号21~24に与えられる。

#### 【0171】

組換え多価ワクチン成分融合タンパク質の精製。各融合タンパク質は、すでに報告されている操作法(例えば、Hu et al, 前出、を参照)に従って、別々に精製された。純度はSDS-PAGEでモニターし、純粋な組換えタンパク質を含有する断片をプールし、使用するまで-20で保存した。

個々の組換え二量体Mペプチドの構築と発現。既に記載されている(例えば、Hu et al, 前出、を参照)ように、ワクチン成分ペプチドを含む個々の組換え二量体ペプチドを発現させ、血清学試薬として使用するために精製された。さらに、これらの試験のために、7つの新しいMペプチドが化学合成された(GENSCRIPT(登録商標), Piscataway, NJ)。

#### 【0172】

表1: Mタンパク質免疫原性ペプチドのアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【表 1 A】

Mタンパク質 (NH <sub>2</sub> 末端残基)	アミノ酸配列	融合タンパク質位置	配列識別子
M1 (1-50)	NGDGNPREVI EDLAANNPAI QNIRLRHENK DLKARLENAM EVAGRDFKRA	タンパク質1 (配列番号1) の1-50及び401-450	配列番号29
M3. 1 (22-71)	LLDQVTQLYT KHNSNYQQYN AQAGRLDLRQ KAEYLNKGLND WAERLLQELN	タンパク質1 (配列番号1) の51-100	配列番号30
M6. 4 (1-25) <sub>2</sub>	RVFPRGTVEN PDKARELLNK YDVENRVFPR GTVENPDKAR ELLNKYDVEN	タンパク質1 (配列番号1) の101-150	配列番号31
M2 (2-26) <sub>2</sub>	SKNPVPVKKE AKLSEAELHD KIKNLSKNPV PVKKEAKLSE AELHDKIKNL	タンパク質1 (配列番号1) の151-200	配列番号32
M18 (1-50)	APLTRATADN KDELIKRAND YEIQNHQLTV ENKCLKTDKE QLTKENDDLK	タンパク質1 (配列番号1) の201-250	配列番号33
M28 (1-50)	AESPKSTETS ANGADKLADA YNTLLTEHEK LRDEYYTLID AKEEPPRYKA	タンパク質1 (配列番号1) の251-300	配列番号34
M12 (1-50)	DHSDLVAEKQ RLEDLGQKFE RLKQRSELYL QQYYDNKSNQ YKGDWYVQQL	タンパク質1 (配列番号1) の301-350	配列番号35
SPA (1-50)	DSVSGLEVAD PSDSKKLIEL GLAKYLNDKL PFKTKEDSEI LSELROVLKN	タンパク質1 (配列番号1) の351-400	配列番号36
M4 (1-50)	AEIKKPQADS AWNWPKEYNA LLKENEELKV EREKYL SYAD DKEKDPQYRA	タンパク質1 (配列番号1) の1-50及び401-450	配列番号37
M5. 0 (1-25) <sub>2</sub>	AVTRGTINDP QRAKEALDKY ELENHAVTRG TINDPQRAKE ALDKYELENH	タンパク質1 (配列番号1) の51-100	配列番号38
M11 (1-50)	TEVKAAGQSA PKGTNVSADL YNSLWDENKT LREKQEEYIT KIQNEETKKNK	タンパク質1 (配列番号1) の101-150	配列番号39
M75 (1-50)	EEERTFTELP YEARYKAWKS ENDELRENYR RTLDKFNTEQ GKTTRLEEQN	タンパク質1 (配列番号1) の151-200	配列番号40

10

20

30

40

【表 1 B】

Mタンパク質 (NH <sub>2</sub> 末端残基)	アミノ酸配列	融合タンパク質位置	配列識別子
M19 (1-50)	RVRYTRHTPE DKLKKI IDDL DAKEHRVRYT RHTPEDKLKK I IDDLDAKEH	タンパク質2 (配列番号2) の201-250	配列番号41
M29. 2 (1-50)	RVYITRRMTK EDVEKIANDL DTENHGLKQQ NEQLSTEKQG LEEQNKQLST	タンパク質2 (配列番号2) の251-300	配列番号42
M14. 3 (1-50)	DRVSRSMSRD DLLNRAQDLE AKNHGLEHQN TKLSTENKTL QEQAEARQKE	タンパク質2 (配列番号2) の301-350	配列番号43
M24 (1-50)	VATRSQDTL EKVQERADKF EIENNTLKLK NSDLSFNKA LKDHNDLDELTE	タンパク質2 (配列番号2) の351-400	配列番号44
M77 (1-50)	EGVSVGSDAS LHNRIIDLEE EREKLLNKLD KVEEEHKKDH EQLEKKSESV	タンパク質3 (配列番号3) の1-50及び401-450	配列番号45
M22 (1-50)	ESSNNAESSN ISQESKLINT LTDENEKLRE ELQQYYALSD AKEEPPRYKA	タンパク質3 (配列番号3) の51-100	配列番号46
M73 (1-50)	DNQSPAPVKK EAKKLNEAEL YNKIQELEEG KAELFDKLEK VEEENKKVKE	タンパク質3 (配列番号3) の101-150	配列番号47
M89 (1-50)	DSDNINRSVS VKDNEKELHN KIADLEEEERG EHLDKIDELK EELKAKEKSS	タンパク質3 (配列番号3) の151-200	配列番号48
M58 (1-50)	DSSREVTNEL TASMWKAQAD SAKAKAKELE KQVEEYKKNY ETLEKGYDDL	タンパク質3 (配列番号3) の201-250	配列番号49
M44 (1-50)	AESRSVSQGS VSLELYDKLS DENDILREKQ DEYLTAKIDGL DKENKEYASQ	タンパク質3 (配列番号3) の251-300	配列番号50
M78 (1-50)	ESQNSRSITN EQLIDKLVEE NNDLKEERAK YLDLLDNREK DPQYRALMGE	タンパク質3 (配列番号3) の301-350	配列番号51
M118 (1-50)	AEKKVEVADS NASSVAKLYN QIADLTDKNG EYLERIEELE ERQKNLEKLE	タンパク質3 (配列番号3) の351-400	配列番号52
M83. 1 (1-50)	DNPRYTDAAH AVTQGRTPVPL QNLHMDKN GKLRSENEEL KADLQKKEQE	タンパク質4 (配列番号4) の1-50及び351-400	配列番号53
M82 (1-50)	DSSSRDITEA GVSFKWFSKF DAEQNRANEL EKKLSGYEKD YKTLEQEYEN	タンパク質4 (配列番号4) の51-100	配列番号54

10

20

30

40

【表 1 C】

Mタンパク質 (NH <sub>2</sub> 末端残基)	アミノ酸配列	融合タンパク質位置	配列識別子
M81(1-50)	AGSEENVPKQ QYNALWEENE DLRGRERKYI AKLEKEEIQN GELNEKNRKL	タンパク質4(配列番号4) の101-150	配列番号55
M87(1-50)	ESPREVTNEL AASVWKKKVE EAKEKASKLE KQLEEAQKDY SEIEGKLEQF	タンパク質4(配列番号4) の151-200	配列番号56
M49.1(1-50)	VEKKVEAAEN NVSSVARREK ELYDQIADLT DKNGEYLERI GELEERQKNL	タンパク質4(配列番号4) の201-250	配列番号57
M92(1-50)	DDRSVSTNSG SVSTPYNNLL NEYDDLAKH GELLSEYDAL KEKQDKNQEE	タンパク質4(配列番号4) の251-300	配列番号58
M114(1-50)	NSKNPAPAPA SAVPVKKEAT KLSEAELYNK IQELEEGKAE LFDKLEKVEE	タンパク質4(配列番号4) の301-350	配列番号59

10

20

## 【 0 1 7 3 】

## 実施例 3

## 多価 G A S ペプチド組成物の免疫原性

本例は、多価免疫原性組成物の免疫学的性質を性状解析するために行われた試験を説明する。

## 【 0 1 7 4 】

ワクチン製剤とウサギの免疫。4つのワクチン融合ポリペプチドを等モル量で混合し、アラム (REHYDRAGEL (登録商標), low viscosity, Reheis, Inc., Berkeley Heights, NJ) に吸着させた。各 0.5 ml 用量が、200 µg、400 µg、800 µg、又は 1000 µg のタンパク質と、質量ではほぼ等量のアラムを含有するように、ワクチンを調製した。3群のニュージーランド白色ウサギを、記載のプロトコールに従って、4つのワクチン用量で、筋肉内経路で、0、4、及び8週目に免疫した (例えば、Dale, Vaccine 17: 193-200 (1999) を参照)。最初の注射の前と、最後の注射の2週間後に、血清を得た。

30

## 【 0 1 7 5 】

タイプ特異的抗体の検出。免疫前血清および免疫ウサギ血清を使用して、既に記載されている方法 (例えば、Dale, Vaccine 17: 193-200 (1999) を参照) により、ELISA を行なった。ワクチンペプチドを含む精製された組換え二量体Mペプチド又は合成ペプチドを、固相抗原として使用した。

## 【 0 1 7 6 】

組織交差反応性抗体のアッセイ。ヒトの心臓、脳、および腎臓の凍結切片を使用して間接免疫蛍光アッセイにより、既に記載されている方法 (例えば、McNeil et al, 前出、を参照) により、組織交差反応性抗体の存在について、免疫血清を試験した。

40

## 【 0 1 7 7 】

30個ワクチンを含む4つの組換えワクチンタンパク質を精製し、アラムで4つの異なる濃度で調製した。0、4、及び8週目に200 µg、400 µg、800 µg、又は1000 µg を3回注射された3羽のウサギのセットを使用して、用量応答試験を行なった。最後の注射の2週間後に得られた血清を、ELISAにより、ワクチンサブユニットペプチドを試験抗原として使用して測定した。組換え二量体ペプチド又は合成ペプチドを、プレートに結合した抗原の供給源として使用した。アッセイで使用された合成ペプチドは、M44、M78、M118、M83、M81、M87、及びM49ペプチドであった。

50

ワクチンサブユニットペプチドに対する3つの抗血清の平均幾何平均抗体力価を計算することにより、用量応答を調べた：200 μg用量群 = 5651平均抗体力価、400 μg = 8868、800 μg = 9619、及び1,000 μg = 8071。これらのデータを示すグラフは図3に与えられる。関節免疫蛍光アッセイにより測定すると、どの免疫血清も、ヒトの脳、腎臓、又は心臓と交差反応する抗体を含有しなかった。用量応答曲線に基づいて、以後のすべての実験は、800 μg量のワクチンを投与されたウサギからの抗血清を使用して行なった。この用量は高度に免疫原性であり、図4Aに示されるように、ワクチン中に含有される各サブユニットペプチドに対して高レベルの抗体を誘発した。

#### 【0178】

間接殺菌活性試験。既に記載されている（例えば、Hu et al, 前出、を参照）ように、殺菌活性アッセイを行なった。簡単に説明すると、細菌を含有する0.05 mlのTodd-Hewittブrosを0.1 mlの試験血清と0.35 mlの血液に加え、混合物を37°Cで3時間回転させた。次に、この混合物の0.1 mlアリコート溶液を溶解させたヒツジ血液寒天に加え、4つのプレートを調製し、37°Cで一晩インキュベーション後、生存能力のある微生物（CFU）を計測した。試験した各血清型について、3つの異なる接種物を使用して、免疫前血清を含有する血液中の増殖が最適かつ定量可能であることを確認した。結果は死滅パーセントとして表し、これは以下の式を使用して計算される： $[(\text{免疫前血清で3時間増殖後のCFU}) - (\text{免疫血清で3時間増殖後のCFU}) \div \text{免疫前血清で3時間増殖後のCFU}] \times 100$ 。免疫前血清の存在下で少なくとも7世代に、試験菌株の増殖を与えたアッセイのみが、免疫血清の存在下での死滅パーセントを表すのに使用された。

#### 【0179】

ヒトの全血でインビトロのオプソニン食作用性死滅アッセイにより測定すると、800 μg量のワクチンは、GAS血清型のワクチン血清型に対して、高レベルの殺菌性抗体を誘発した。結果は図4Bに示される。免疫ウサギの1羽からの血清を使用して、GASの28/30ワクチン血清型について、50%を超える細菌死滅が観察された。50%未満の死滅である2つのワクチン血清型について、細菌死滅は35~40%であった（図4B、GAS M血清型77と44を参照）。すべてのワクチン血清型に対して観察された平均死滅は83%であった。

#### 【0180】

##### 実施例 4

##### 非ウイルス血清型に対する免疫血清の殺菌活性

本例は、30価ワクチンで免疫した動物からの免疫血清が、ワクチンで示されないGAS血清型に対して殺菌活性を示したことを説明する。これらのデータは、既に記載した26価ワクチンで免疫した動物から得られた免疫血清を使用して得られたデータとは異なる。

#### 【0181】

26価ワクチンには含有されず30価ワクチンで示されたGAS M血清型は、M4、M29、M73、M58、M44、M78、M118、M82、M83、M81、M87、及びM49である。30価ワクチンの成分ではない26価ワクチンで示される血清型は、M1.2、M43、M13、M59、M33、M101、及びM76である。Hu et al, 前出；米国特許第7,270,827号を参照。MI血清型のようないくつかの血清型は、現在使用されているemm型判定システムの前にサブタイプが決定された（Facklam et al, *Emerg. Infect. Dis.* 5:247-53 (1999)を参照）。M1.2と示される血清型は、血清型M1.0からは顕著なアミノ酸変化があり、より新しい型判定基準では、M1血清型と考えられない可能性がある（例えば、Dale et al, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12:833-36 (2005)を参照）。

#### 【0182】

非ワクチン血清型に対する抗血清の殺菌活性。実施例3に記載のように、殺菌活性アッセイを行なった。30価ワクチンで示されなかったGAS血清型のパネルに対する間接殺菌活性アッセイで、30価ワクチンに対する免疫血清（実施例3を参照）もまた使用され

10

20

30

40

50

た。図 5 A に示すように、最初の実験で、内部実験室コレクションからランダムに選択された 11 / 21 血清型に対して、50% 超の殺菌活性が観察された。50% 超の死滅を示した 11 の血清型について観察された平均は 80% の死滅であり、試験したすべての 21 の血清型では 50% であった。この免疫血清は、試験した 21 の非ワクチン血清型のうちの 4 つのみに対して殺菌活性が欠如していた。

【0183】

第 2 の実験では、ワクチンで示されないより多くの G A S 血清型が、殺菌活性アッセイに含まれた。図 5 B に示されるように、実験室のコレクションから選択された 33 / 47 血清型に対して 50% 超の殺菌活性が観察された。50% 超の死滅を示した 33 の血清型について観察された平均は 80% の死滅であり、試験したすべての 47 の血清型では 63% であった。この免疫血清は、試験した 47 の非ワクチン血清型のうちの 4 つのみに対して殺菌活性が欠如していた。

10

【0184】

非ワクチン血清型に対して 30 価ワクチン対 26 価ワクチンにより誘発された殺菌抗体活性の比較。30 価ワクチンにより誘発された交差オプソニン性抗体が、すでに報告された 26 価ワクチン (Hu et al, 前出; 米国特許第 7, 270, 827 号を参照) より、感染症に対してより広い防御を与える可能性があるかどうかを調べるために、同じ実験で両方の抗血清を用いて殺菌活性アッセイを行なった。30 価ワクチン又は 26 価ワクチンのいずれにも含まれない 21 の G A S 血清型が、この実験に含めるためにランダムに選択された。結果は図 6 に示される。いずれのワクチン構築体でも示されなかった 10 の血清型に対して、30 価ワクチンにより促進された殺菌死滅のレベルは、26 価抗血清で観察されたものより有意に大きかった (平均、64.9% 対 23.6%、 $p = 0.0008$ 、スチューデント t 検定、対応のある両側検定)。

20

【0185】

上記の種々の実験を組合せて、さらなる態様を提供することができる。本明細書で言及したか及び / 又は出願データシートで参照したすべての米国特許、米国仮特許出願公報、米国仮特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許刊行物は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。種々の特許、出願、刊行物の概念を使用して、さらなる態様を提供するために、必要であれば、態様の形態を変更することができる。

【0186】

上記の詳細な説明を考慮すると、本態様に対してこれら及び他の変更が可能である。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、特許請求の範囲を、明細書と特許請求の範囲に開示された具体例に限定するものと理解してはならず、このような特許請求の範囲が認められる同等物の全範囲とともに、すべての可能な態様を含むと理解すべきである。従って、この開示によって特許請求の範囲は限定されない。

30

【 図 1 】

融合ポリペプチド1									451 AA
M1	M3.1	M6.4	M2	M18	M28	M12	SPA	M1	
1-50	22-71	(1-25)2	(2-26)2	1-50	1-50	1-50	1-50	1-50	
融合ポリペプチド2									451 AA
M4	M5.0	M11	M75	M19	M29.2	M14.3	M24	M4	
1-50	(1-25)2	1-50	1-50	(1-25)2	1-50	1-50	1-50	1-50	
融合ポリペプチド3									451 AA
M77	M22	M73	M89	M58	M44	M78	M118	M77	
1-50	1-50	1-50	1-50	1-50	1-50	1-50	1-50	1-50	
融合ポリペプチド4									401 AA
M83.1	M82	M81	M87	M49.1	M92	M114	M83.1		
1-50	1-50	1-50	1-50	1-50	1-50	1-50	1-50		

Fig. 1

【 図 2 A 】

融合ポリペプチド1をコードするポリヌクレオチド(配列番号17)

```

AGATCTCGAT CCGCGGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG
CGGATAACAA TTCCTCTA GAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG
ATATCATATG AACGGTAGC GTAACCCGGG TGAAGTTATC GAAGACCTGG
CTGCTAACAA CCGGCTATC CAGAACATCC GTCTGCGTCA CGAAACAAA
GACCTGAAAG CTGCTGGA AAACGCTATG GAAAGTTGCTG TCTGCTGACTT
CAAACGTGCT CTGCTGGACC AGGTTACCCA GCTGTACACC AAAACAACCT
CCAACCTACA GCAGTACAAC GCTCAGGCTG TCGCTGCGA CCTGCTGCA
AAAGCTGAAT ACCTGAAAGG TCTGAACGAC TGGGCTGAAC GTCTGCTGCA
GGAAGTGAAC CGTGTTCCTC
CGCGTGGTAC CGTTGAAAC CCGGACAAAG CTCGTGAACCT GCTGAACAAA
TACGACGTTG AAAACCGTGT TTTCCCGCGT GGTACCGTTG AAAACCCGGA
CAAGACTCGT GAACCTGTA ACAAAATACGA CGTTGAAAC TCACAAAACC
CGGTTCCGGT TAAAAAGAA GCTAAACTGT CCGAAGCTGA ACTGCACGAC
AAAAACAATA ACCTGTCAA AAACCCGGTT CCGGTTAAAG AAGAGCTTAA
ACTGTCCGAA GCTGAACCTG ACGACAATA CAAAAACCTG GCTCCGCTGA
CCCGTGTAC CGTGACAAC AAAGACGAAC TGATCAAACG TGCTAACGAC
TACGAAATCC AGAACCAACA GCTGACCGTT GAAAAAAA AACTGAAAC
CGACAAAGAA CAGCTGACA
AAGAAAACGA CGACCTGAAA GCTGAATCCC CGAAATCCAC CGAAACCTCC
GCTAACGGTG CTGACAAACT GGCTGACGCT TACAACACCC TGCTGACCGA
ACACGAAAAA CTGCTGAGC AATACTACAC CCTGATCGAC GCTAAGGAG
AAGAACCCGC TTAACAAGCT GACCACTCCG ACCTGGTTGC TGAACAAACAG
CGTCTGGAAG ACCTGGGTCA GAAATTCGAA CGTGTGAAC AGCGTTCCGA
ACTGTACCTG CAGCAGTACT ACGACAACAA ATCCAACGCT TACAAGGTTG
ACTGTTACTG TCAGCAGCTG GACTCCGTTT CCGGTTCTGGA AGTTGCTGAC
CGTCCGACT CCAAAAAACT GATCGAAGT GGTCTGGCTA AATACCTGAA
CGACAAACTG CCGTTCAAAA
CCAAAGAAGA CTCGGAATC CTGTCCGAC TGCGTGACGT TCTGAAAAAC
AACGGTGACG GTAACCCGGG TGAAGTTATC GAAGACCTGG CTGCTAACAA
CCCGCTATC CAGAATATCC GTCTGCGTCA CGAAACAAA GACCTGAAAG
CTCGTCTGGA AAACGCTATG GAAAGTTGCTG GTCGTGACTT CAAACGTGCT
CACCACCACC ACCACCACTA G 1481

```

Fig. 2A

【 図 2 B 】

融合ポリペプチド1(MW : 52,782, pI : 6.48) (配列番号9)

```

MNGDGNPREV IEDLAANPA IQNIRLRHEN KDLKARLENA MEVAGRDFKR
ALLDQVTQLY TKHNSNYQY NAQAGRLDLR QKAEYLKGLN DWAERLLQEL
NRVFPRTVE NPKARELLN KYDVENRVPF RGTVENPDKA RELLNKYDVE
NSKNPVPVK EAKLSEALH DKIKNLKSNP VPKKAEKLS EAEHLDKTKN
LAPLTRATAD NKDELIKRAN DYEIQNHQLT VENKLLKTDK RQLTKENDDL
KAESPSTET SANGADKLD AYNTLLTEHE KLRDEYYTLI DAKEBEPYK
ADHSDLVAEK QRLEDLQKF ERLKQRSELY LQQYYDNKSN GYKGDWYVQQ
LDSVSGLEVA DPSDSKLLIE LGLAKYLNDR LPFKTKEDSE ILSELRLVLR
MNGDGNPREV IEDLAANPA
IQNIRLRHEN KDLKARLENA MEVAGRDFKR AHHHHHH 457

```

Fig. 2B

【 図 2 D 】

融合ポリペプチド2(MW : 54,174 ; pI : 5.87) (配列番号10)

```

MAEIKKPAD SAWNPKYEN ALLKENEELK VEREKYLSYA DDKEKDPQYR
AAVTRGTIND PQRALDLDK YELNHAIVR GTINDPQRAK EALDKYELEN
HTEVKAAGQS APKGTNSAD LYNLWDENK TLRKQBEYI TKIQNEBTKN
KEEBRTFTEL PYEARYKAWK SENDELRENY RRTLDKFNTE QKQTRLEBEQ
NRVYTRHTP EDLKKIIDD LDAKEHRVRY TRHPEDLKL KIIDDLDAKE
HRVYITRRMT KEDVEKIAND LDTENHGLKQ QNEQLSTEKQ GLEBQNKQLS
TDRVSRMSR DDLNRAQDL EAKNHGLEHQ NTKLSTENKT LQEQABARQK
EVATRSQDIT LEKVQERADK FEIENNTLKL KNSDLFNNK ALKDHNDLDT
MAEIKKPAD SAWNPKYEN
ALLKENEELK VEREKYLSYA DDKEKDPQYR AHHHHHH 457

```

Fig. 2D

【 図 2 C 】

融合ポリペプチド2をコードするポリヌクレオチド(配列番号18)

```

AGATCTCGAT CCGCGGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG
CGGATAACAA TTCCTCTA GAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG
ATATCATATG GCTGAAATCA AAAAACCCGCA GGCTGACTCC GCTPTGGAAC
GGCCGAAAGA ATACAACGCT CTGCTGAAAG AAACGAAAG AACTGAAAGTT
GAACGTGAAA AATACCTGTC CTACGCTGAC GACAAAGAAA AAGACCCGCA
GTACCGTGTCT GCTGTACCC GTGGTACCAT CAACGACCCG CAGCGTGCTA
AAGAAGCTCT GGACAAATAC GAACTGGAAA ACCACGCTGT TACCCGTGGT
ACCATCAACG ACCCGCAGCG TGCTAAAGAA GCTCTGGACA AATACGAACT
GGAAAACCCAC ACCGAAAGTTA AAGCTGCTGG TCAGTCCGCT CCGAAAAGGTA
CCAACCTTTC CGCTGACCTG TACAATCCCT TGTGGGACGA AAACAAAACC
CTGCGTGAAA AACAGGAGA ATACATCAC AAAATCCAGA ACGAAGAAAAC
CAAAAAAAA GAAGAAGAAC GTACCTTCAC CGAACTCCG TACGAAGCTC
GTTACAAAGC TTGGAATATC GAAAAAGCAG AACTCGGTGA AAACCTACCTG
CGTACCTGAC ACAAATCAA CACCGAAGC GGTAAACCA CCGCTGGA
AGAACAGAAC CGTGTTCGTT ACACCCGTC CAACCCGGA GACAAACTGA
AAAAATCAT CGACGACTG GACGCTAAAG AACACCGTGT TCGTTACACC
CGTCAACACC CGAAGACAA ACTGAAAAAA ATCATCGACG ACCTGGACGC
TAAAGAACAC CGTGTATACA TCACCCGTCG TATGACCAAA GAAGACGTTG
AAAAATCGC TAACGACCTG GACACCGAAA ACCACGCTCT GAAACAGCAG
AACGAACAGC TGTCCACCGA AAAACAGGGT CTGGAAGAAC AGAACAAACA
GCTGTCCACC GACCGTGTCT CCGTTCAT GTCCGTTGAC GACCTGCTGA
ACCTGTCTCA GGACCTGAAA GCTAAAACCC ACGCTGTGGA ACACGAGAAC
ACCAACTGCT CACCGAAA CAAACCTGT CAGGAAACGG CTGAGCTTGG
TCAGAAAGAA GTTGTCTACC GTTCCGACG CACACCCCTG GAAAAGTTC
AGBAAGCTGC TGACAAATTC GAAATCGAAA ACAACACCTC GAAACTGAAA
AACTCCGACC TGTCTTCAA CAAACAAGCT CTGAAAGACC ACAACGAGCA
ACTGACCGAA GCTGAAATCA AAAAACCCGCA GGCTGACTCC GCTTGGAACT
GGCCGAAAGA ATACAACGCT CTGCTGAAAG AAACGAAAG AACTGAAAGTT
GAACGTGAAA AATACCTGTC CTACGCTGAC GACAAAGAAA AAGACCCGCA
GTACCGTGTCT CACCACCACC ACCACCACTA G 1481

```

Fig. 2C

【 図 2 E 】

融合ポリペプチド3をコードするポリヌクレオチド(配列番号19)

AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG
CGGATAACAA TTCCTCTTA GAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG
ATATACCATG GAAGGTGTTT CCGTTGGTTC CGACGCTTCC CTGCACAACC
GTATCACCAG CCTGGAAGAA GAACGTGAAA AACTGCTGAA CAAACTGGAC
AAAGTTGAAG AAGAACAACA AAAAGACCAC GAACAGCTGG AAAAAAATC
CGAAGACGTT GAATCCTCCA ACAAGCTGTA ATCCTCCAAC ATCTCCAGG
AATCCAAACT GATCAACACC CTGACCGAGC AAAACGAAAA ACTGCGTGAA
GAACCTGACG AGTACTACGC TCTGTCCGAC GCTAAAGAA AAGAACCAGC
TTACAAAGCT GACAACAGT
CCCGGCTCC GGTAAAAA GAAGCTAAAA AACTGAACGA AGCTGAACTG
TACAACAAAA TCCAGGAACT GGAAGAAAGT AAAGCTGAAC TGTTCGACAA
ACTGGAAGAA GTTGAAGAAG AAAACA AAAAGTAAAGAA GACTCCGACA
ACATCAACCG TTCCTGTTCC GTTAAAGACA ACGAAAAAGA ACTGCACAAC
AAAAATCGCTG ACCTGAAGA AGAACGTGGT GAACACCTGG ACAAAATCGA
CGAACTGAAA GAAGAACTGA AAGCTAAA GA AAAATCCTCC GACTCCCTCC
GTGAAGTTAC CAACGAACTG ACCGCTTCCA TGTGGAAGC TCAGGCTGAC
TCCGCTAAAG CTAAGCTTAA AGAACTGGAA AAACAGGTTG AAGAATACAA
AAAAAATAC GAAACCCTGG
AAAAAGGTTA CGACGACCTG GCTGAATCCC GTTCCGTTTC CCAGGTTCC
GTTTCCCTGG AACTGTACGA CAAACTGTCC GACGAAAACG ACATCTGCG
TGAAAAACAG GACGAATACC TGACCAAAAAT CGACGGTCTG GACAAGAAAA
ACAAAAGATA CGCTTCCAG GAATCCCGAGA ACTCCGTTTC CATCAACCAAC
GAACAGCTGA TCGACAAA CTGTTGAAGAA AACACGACC TGAAAAGAGA
ACGTCTAAA TACTGGACC TGCTGGACAA CCGTGA AAAA GACCCGACT
ACCGTCTCT GATGGGTGAA GCTGAAAAA AAGTTGAAGT TGCTGACTCC
AACGCTTCT CCGTTGCTAA ACTGTACAAC CAGATCGCTG ACCTGACCGA
CAAAAACGGT GAATACCTGG
AACGTATCGA AGAACTGGAA GAACGTGAGA AAAACTGGA AAAACTGGAA
GAAGGTGTT CCGTTGGTTC CGACGCTTCC CTGCACAACC GTATCACCAG
CTTGAAGAA GAACGTGAAA AACTGCTGAA CAAACTGGAC AAAGTTGAAG
AAGAACAACA AAAAGACCAC GAACAGCTGG AAAAAAATC CGAAGACGTT
CACCACCACC ACCACCACTA G 1481

Fig. 2E

【 図 2 F 】

融合ポリペプチド3(MW : 53,086 ; pI : 4.68) (配列番号11)

MEGVSVGSDA SLHNRITDLE BEREKLLNKL DKVEEHHKD HEQLEKKS ED
VESSNNAESS NISQBSKLIN TLTDENELR BELQYYALS DAKEEPRVK
ADNQSAPVK KEAKLINEAE LYNKIQEELE GKAELEFDKLE KVEEENKVK
EDSDNINRSV SVKDNEKELH NKIADLEER GEHLDKIDEL KEELKKEKS
SDSSREVTNE LTASMWKAQA DSAKAKAKEL EKQVEEYKKN YETLEKGYDD
LAESRSVSQG SVSLELYDKL SDENDILREK QDEYLTKIDG LDKENKEYAS
QESQNSRIT NEQLIDKLV ENNDLKEERA KYLDLLDNR KDPQYRALMG
EAEKKVEVAD SNASSVAKLY NQIADLTDKN GEYLERIEEL EERQKNLEKL
EEGVSVGSDA SLHNRITDLE
EEREKLLNKL DKVEEHHKD HEQLEKKS ED VHHHHH 457

Fig. 2F

【 図 2 G 】

融合ポリペプチド4をコードするポリヌクレオチド(配列番号20)

AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG
CGGATAACAA TTCCTCTTA GAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG
ATATACCATG GAACACCCGC GTTACACCGA CGCTCACAAAC GCTGTACCC
AGGGTCTGAC CGTTCGCTG CAGAACCCTGC TGCACGAAAT GGACAAAAAC
GGTAAACTGC GTTCCGAAAA CGAAGAACTG AAAGCTGACC TGACGAAAAA
AGAACAGGAA GACTCCTCT CCGCTGACAT CACCGAAGCT GGTGTTTCCA
AAATTCTGAA ATCCAAATTC GACGCTGAAC AGAACCGTGC TAACGAACTG
GAAAAAAAC TGTCGGTTA CGAAAAAGAC TACAAAAACC TGGAACAGGA
ATACGAAAAC GCTGGTTCCG
AAGAAAACTG TCCGAAACAG CAGTACAACG CTCTGTGGGA AGAAAAAGAA
GACCTGCGTG GTCTGAAACG TAAATACATC GCTAAACTGG AAAAAAGAA
AATCCAGAAC GGTGAACTGA ACGAAAAAAA CCGTAAACTG GAATCCCGC
GTGAAGTTAC CAACGAACTG GCTGTCTCCG TTTGAAAAA AAAAGTTGAA
GAAGCTAAAG AAAAAAGCTT CAAAAGCTG AAAACAGCTG AAGAAGCTCA
GAAAGACTAC TCCGAAATCG AAGGTAAACT GGAACAGTTC GTTGAAAAAA
AAGTTGAAGC TGCTGAAAC AACTGTTCT CCGTTGCTCG TCGTGA AAAA
GAACGTATG ACCAGATCGC TGACCTGACC GACAAAAAGC GTGAATACCT
GGAACGTATG GGTGAACTGG
AAGAACGTCA GAAAAACCTG GACGACCGTT CCGTTTCCAC CAACTCCGGT
TCCGTTTCCA CCCCCTACAA CAACCTGCTG AACGAATACG ACAGCTGCT
GGCTAAACAC GGTGAACTGC TGTCCGAAATA CGACGCTCTG AAAGAAAAAC
AGGACAAAAA CCGAAGAA GAACCTCAAAA ACCCGGCTCC GGCTCCGGCT
TCCGCTGTTT CCGTTAAAAA AGAAGCTACC AAACTGCTCC AAGCTGAACI
GTACAACAAA ATCCAGGAAC TGAAGAAAGG TAAAGTGAA CTGTTGACGA
AACTGAAAAA AGTTGAAGAA GACAAACCCG GTTACACCGA CGCTACAAC
GCTGTTACCC AGGGTCTGAC GCTTCCGCTG CAGAACCTGC TGACGAAAT
GGACAAAAAC GGTAAACTGC
GTTCCGAAAA CGAAGAACTG AAAGCTGACC TGACGAAAAA AAGAACAGGAA
CACCACCACC ACCACCACTA G

Fig. 2G

【 図 2 H 】

融合ポリペプチド4(MW : 47,136 ; pI : 4.99) (配列番号12)

MDNPRYTDH NAVTQGRTP LQNLHEMDK NGKLRSENEE LKADLQKKEQ
EDSSSRDITE AGVSKFWKSK FDAEQNRANE LEKLSGYEK DYKLEQEYE
NAGSEENVPK QYINALWEEN EDLRGRERKY IAKLEKEIQ NGELNEKNRK
LESREVTNE LAASVWKKKV EAEKAKASKL EKQLEEAQD YSEIEKLEQ
FVEKKVEAAE NNVSSVARRB KELYDQIADL TDKNGEYLER IGELEERQKN
LDRRSVSTNS GSVSTPYNNL LNEYDDLLAK HGELLSBYDA LKEKQDKNQE
ENSKNPAPAP ASAVPVKKEA TKLSEALYN KIQBLEGKA ELFDKLEKVE
EDNPRYTDH NAVTQGRTP LQNLHEMDK NGKLRSENEE LKADLQKKEQ
EHHHHH 407

Fig. 2H

【 図 3 】

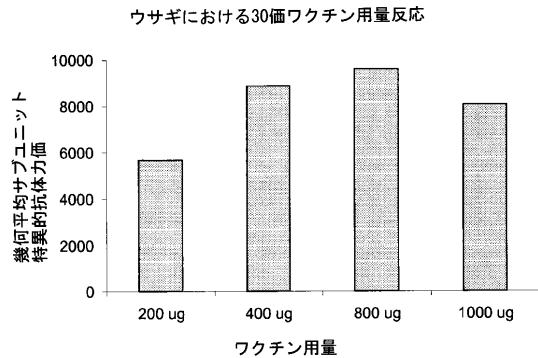


Fig. 3

【 图 4 】

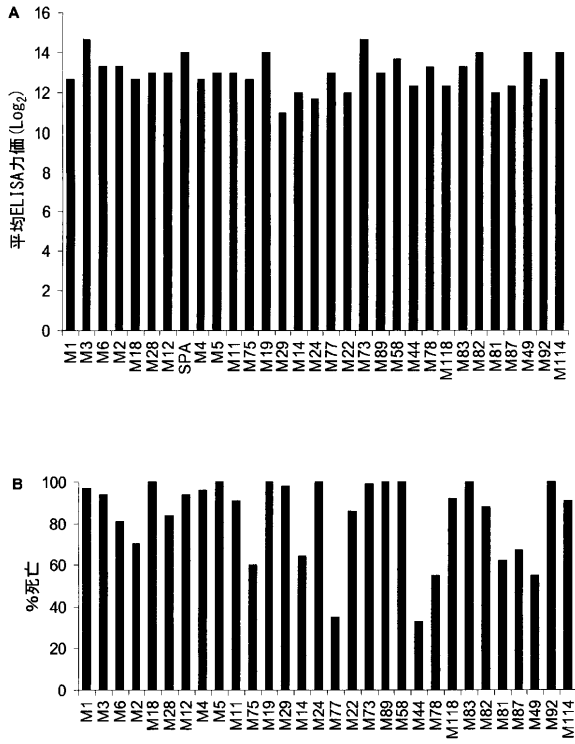


Fig. 4

【 图 5 A 】

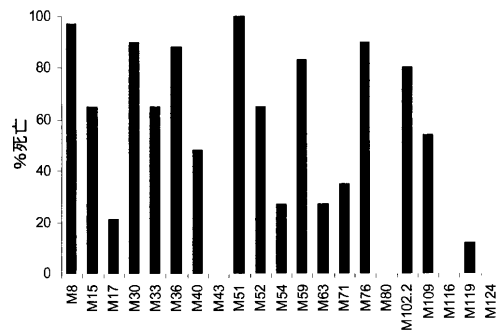


Fig. 5A

【 图 5 B 】

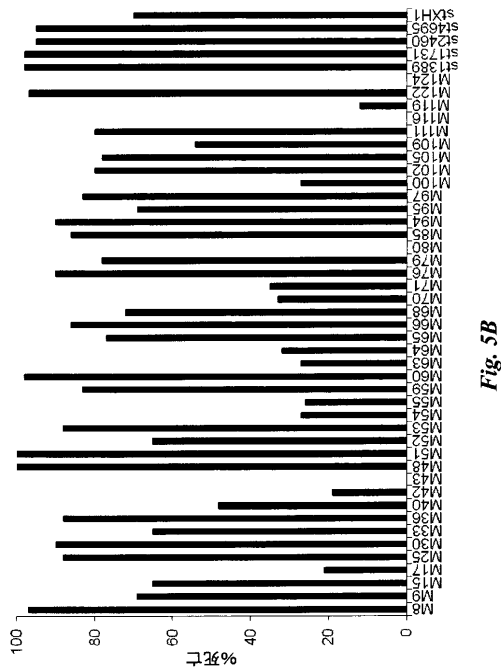


Fig. 5B

【 图 6 】

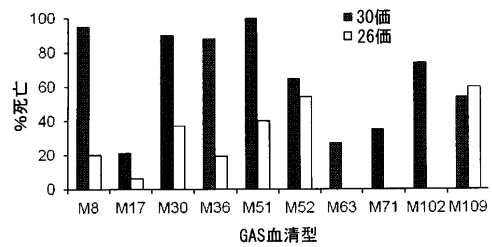




Fig. 6

【配列表】

2014520122000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2012/042782</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>A61K 38/16(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 39/40(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i, A61P 31/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38/16; C12P 21/04; C07K 14/315; A61K 39/02; A61K 39/00; A61K 39/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: group A streptococcus (GAS), multivalent vaccine, M protein, Spa protein, fusion protein		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MCNEIL et al., 'Safety and immunogenicity of 26-valent group A streptococcus vaccine in Healthy adult volunteers' Clinical Infectious Diseases, Vol.41, Issue 8, pp.1114-1122 (15 October 2005) See the whole document, especially figure 1.	1-24,28-40
A	US 2005-0220808 A1 (BEALL et al.) 06 October 2005 See claim 158.	1-24,28-40
A	US 7402316 B2 (DALE) 22 July 2008 See claim 1.	1-24,28-40
A	US 7838010 B2 (BENSI et al.) 23 November 2010 See the abstract and claim 1.	1-24,28-40
PX	DALE et al., 'New 30-valent M protein-based vaccine evokes cross-opsonic antibodies against non-vaccine serotypes of group A streptococci' Vaccine, Vol.29, pp.8175-8178 (13 September 2011) See the whole document, especially figure 1.	1-24,28-40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 JANUARY 2013 (29.01.2013)		Date of mailing of the international search report <b>29 JANUARY 2013 (29.01.2013)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Kim Seung Beom  Telephone No. 82-42-481-3488

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2012/042782**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 2005-0220808 A1	06.10.2005	CA 2447599 A1	28.11.2002		
		EP 1399181 A2	24.03.2004		
		EP 1399181 A4	28.06.2006		
		EP 1399181 B1	09.05.2012		
		US 2008-0279880 A1	13.11.2008		
		US 2011-0110969 A1	12.05.2011		
		US 7407664 B2	05.08.2008		
		US 7883710 B2	08.02.2011		
		WO 02-094851 A2	28.11.2002		
		WO 02-094851 A3	30.10.2003		
		US 7402316 B2	22.07.2008	US 2005-0063988 A1	24.03.2005
				US 2005-0202037 A1	15.09.2005
				US 2009-035259 A1	05.02.2009
US 6716433 B1	06.04.2004				
US 7255863 B2	14.08.2007				
US 7838010 B2	23.11.2010	AU 2005-294275 A1	20.04.2006		
		CA 2583803 A1	20.04.2006		
		EP 1807446 A2	18.07.2007		
		JP 2008-544949 A	11.12.2008		
		JP 2012-126742 A	05.07.2012		
		US 2009-0117113 A1	07.05.2009		
		WO 2006-042027 A2	20.04.2006		
		WO 2006-042027 A3	24.08.2006		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2012/042782****Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 25-27  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 25-27 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
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	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 ジェイムズ ビー・デイル

アメリカ合衆国, テネシー 3 8 1 1 1, メンフィス, セイント アンドリュース グリーン 3 8 8 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 CA07 DA06 EA04 GA11 HA01 HA06  
 4B065 AA26X AA49Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA45 CA46  
 4C085 AA04 BA14 BB11 EE03 GG02 GG03 GG04  
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA11 DA86 EA31 EA52 FA74

专利名称(译)	A组链球菌多价疫苗		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014520122A</a>	公开(公告)日	2014-08-21
申请号	JP2014516059	申请日	2012-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	田纳西大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	田纳西州研究基金会大学		
[标]发明人	ジェイムズビーデイル		
发明人	ジェイムズ ビー.デイル		
IPC分类号	A61K39/00 A61P37/04 A61P31/04 C07K14/315 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/092 C07K14/315 C07K2319/21 C07K2319/40 G01N33/56944 G01N2333/315 G01N2469/20 A61P31/00 A61P31/12 A61P37/00 A61P37/04 A61P31/04 C12N15/62		
FI分类号	A61K39/00.H A61P37/04 A61P31/04 C07K14/315.ZNA C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA06 4B065/AA26X 4B065/AA49Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA04 4C085/BA14 4C085/BB11 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 中岛胜		
优先权	61/498397 2011-06-17 US 61/641448 2012-05-02 US		
其他公开文献	JP6158796B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供可用于引发特异性针对A组链球菌 ( GAS ) 的免疫应答的免疫原性组合物。本发明提供的免疫原性组合物是多价的，并且包含多种引发针对GAS的免疫应答的免疫原性肽或包含免疫原性肽的融合多肽。本发明提供的免疫原性组合物引发针对免疫原性组合物中包含的免疫原性肽 ( 衍生自M蛋白或Spa蛋白 ) 所代表的GAS血清型的免疫应答。，以及针对免疫原性组合物中包含的任何免疫原性肽中未表示的血清型。还使用这样的组合物提供了诱导针对GAS的免疫应答或治疗GAS感染或降低其发生概率的方法。点域

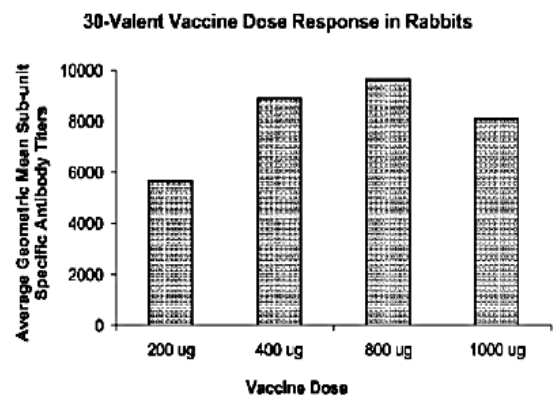


Fig. 3