

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4080876号
(P4080876)

(45) 発行日 平成20年4月23日(2008.4.23)

(24) 登録日 平成20年2月15日(2008.2.15)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/315 (2006.01)	C O 7 K 14/315	
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
請求項の数 16 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-552000 (P2002-552000)	(73) 特許権者	505113687
(86) (22) 出願日	平成13年12月21日 (2001.12.21)		アイディー バイオメディカル コーポレ イション
(65) 公表番号	特表2004-524014 (P2004-524014A)		カナダ国, ケベック エイチ7ブイ 3エ ス8, ラバル, カルティエール プールバ ード ウエスト 525
(43) 公表日	平成16年8月12日 (2004.8.12)	(74) 代理人	100099759
(86) 国際出願番号	PCT/CA2001/001853		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開番号	W02002/050107	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成14年6月27日 (2002.6.27)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成16年12月9日 (2004.12.9)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	60/256,940		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成12年12月21日 (2000.12.21)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ストレプトコッカス・ピオゲネス抗原及び対応するDNAフラグメント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の：

(a) 配列番号10に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号10に示すアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、ここで、上記コードされるポリペプチドが、ヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネスに対する免疫応答を誘発することができ；

(c) 配列番号10に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、ここで、上記コードされるポリペプチドが、ヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネスに対する免疫応答を誘発することができ；及び

(d) 上記(a)、(b)又は(c)に記載のポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド、
から選ばれる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】

以下の：

(a) 配列番号9に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号9に示すヌクレオチド配列に対して少なくとも95%の同一性を有する

ヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであって、ここで、該ポリヌクレオチドが、ヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネスに対する免疫応答を誘発することができるポリペプチドをコードし；及び

(c) 上記(a)又は(b)に記載のポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド、

から選ばれる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】

前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】

前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項2に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項5】

前記ポリヌクレオチドがRNAである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

前記ポリヌクレオチドがRNAである、請求項2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

単離されたポリヌクレオチドであって、ストリンジェントな条件下で、配列番号9に示すヌクレオチド配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAにハイブリダイズし、ここで、該ポリヌクレオチドが、ヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネスに対する免疫応答を誘発することのできるポリペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチド。

20

【請求項8】

請求項1～7のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含むベクターであって、ここで前記ポリヌクレオチドが作動可能であるように発現コントロール領域に連結される、前記ベクター。

【請求項9】

請求項8に記載のベクターにより形質移入された宿主細胞。

【請求項10】

ポリペプチドを生産するための方法であって、前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で請求項9に記載の宿主細胞を培養することを含む、前記方法。

【請求項11】

単離されたポリペプチドであって、以下の：

(a) 配列番号10に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(b) 配列番号10に示すアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドが、ヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネスに対する免疫応答を誘発することができ；

(c) 配列番号10に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドが、ヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネスに対する免疫応答を誘発することができ；

(d) N-末端のMet残基が欠失されている、上記(a)、(b)、又は(c)に記載のポリペプチド；及び

40

(e) 分泌アミノ酸配列が欠失されている、上記(a)、(b)、又は(c)に記載のポリペプチド、

から選ばれる、前記ポリペプチド。

【請求項12】

2つ以上のポリペプチドフラグメントを含む、キメラのポリペプチドであって、ここで、前記2つ以上のポリペプチドフラグメントがそれぞれ、配列番号10に示すアミノ酸配列由来の少なくとも20の連続したアミノ酸を含み、ここで、前記ポリペプチドフラグメントがキメラのポリペプチドを形成するように連結され、さらにここで、前記キメラのポリペプチドが、ヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネスに対する免疫応答を誘発す

50

ることができる、前記キメラのポリペプチド。

【請求項 13】

2つ以上のポリペプチドを含むキメラのポリペプチドであって、ここで、前記2つ以上のポリペプチドのうち、1つのポリペプチドが配列番号10に示すアミノ酸配列からなり、かつ他のポリペプチドがそれぞれ、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16から選ばれるアミノ酸配列からなり、上記2つ以上のポリペプチドがキメラのポリペプチドを形成するように連結され、さらにここで、上記キメラのポリペプチドがヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネスに対する免疫応答を誘発することができる、前記キメラのポリペプチド。

【請求項 14】

ヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネスを検出するための診断薬であって、ヒト由来の診断サンプル中に存在する請求項11に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体を含む、前記診断薬。

【請求項 15】

ヒトにおいてストレプトコッカス・ピオゲネス抗原に特異的な抗体を検出するための診断薬であって、請求項11に記載のポリペプチドを含み、ここで、該ポリペプチドが、ヒト由来の診断サンプル中に存在するストレプトコッカス・ピオゲネス抗原に対して特異的な抗体に特異的に結合する、前記診断薬。

【請求項 16】

請求項14又は15に記載の診断薬を含む、ヒトにおけるストレプトコッカス感染の検出又は診断のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、抗原、より特別にはストレプトコッカス感染を予防、診断及び/又は治療するために使用されることのできる、ストレプトコッカスA群(S. ピオゲネス(S. pyogenes))細菌性病原体に属するBVH-P2、BVH-P3、BVH-P4、BVH-P5及びBVH-P6抗原に関する。

【0002】

発明の背景

ストレプトコッカスは、細菌表面に見出される、群特異的な炭水化物抗原AからOによって区別されるグラム(+)細菌である。S. ピオゲネス単離物はさらに型-特異的なMタンパク抗原によって識別される。Mタンパクは分子量及び配列の両方において高度に多様な、重要な病原性因子である。実際に、抗原としての相違に基いて80を越えるMタンパクの型が同定された。

【0003】

S. ピオゲネスは、咽頭炎、丹毒及び膿痂疹、猩紅熱、並びに菌血症及び壊死性の筋膜炎のような侵入型の疾患を含む多くの多様な感染症の型の原因である。近年における侵入型の疾患の復活は、北米及びヨーロッパ諸国を含む多くの国で証明されてきた。生物体が抗生物質に敏感であるにもかかわらず、高い罹患率及び敗血症の迅速な発生は、高い発病率及び死亡率に帰着する。

【0004】

S. ピオゲネス感染から宿主を守るワクチンを開発するために、型-特異的なMタンパクのような病原性因子に焦点を合わせた努力が払われた。しかしながら、Mタンパクのアミノ末端部分がヒト心筋、トロポミオシン、ミオシン、及びビメンチンと反応した交差反応抗体、これは自己免疫疾患と関係があるかも知れないとされる、を誘導することが見出された。他の者は異なる血清型からのM-タンパクのアミノ末端ペプチドを含む複合ハイブリッドタンパクを生産するために、組み換え技術を用いた。しかしながら、すべての血清型のS. ピオゲネスを含む安全なワクチンは、生産し規格化するのに高度に複雑であろう。

【 0 0 0 5 】

血清型 - 特異的な抗原に加えて、他の S. ピオゲネス タンパクは、潜在的なワクチン候補としての利益を生じさせた。少なくとも S. ピオゲネス 40 血清型により発現される C 5 a ペプチダーゼは、マウスにおいて免疫原性であることが示されたが、その鼻咽頭のコロニー形成レベルの低下能は限られたものであった。他の研究者はまた、感染の原因に重要な役割を演じると見られるストレプトコッカスの発熱性の菌体外毒素に注目した。これらのタンパクによる免疫化は、毒素ショックの致死性の症状を防止したが、コロニー形成は、防がなかった。

【 0 0 0 6 】

オクラホマ大学は、S. ピオゲネス M 1 G A S 系統のためのゲノム配列決定プロジェクトを設立した (<http://dnal.chem.ou.edu/strep.html>)。 10

【 0 0 0 7 】

したがって、S. ピオゲネス 感染の予防及び / 又は治療のためのワクチン成分として使用されることのできる S. ピオゲネス 抗原へのまだ対処されていない必要性が残っている。

【 0 0 0 8 】

発明の要約

1 の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって、配列番号 2、4、6、8、10、12、14 及び 16 或いはそのフラグメント又はアナログから選ばれる配列を含む第 2 のポリペプチドとの少なくとも 70 % の同一性を有するポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドを提供する。 20

【 0 0 0 9 】

1 の側面によれば、本発明は配列番号 2、4、6、8、10、12、14 及び 16 或いはそのフラグメント又はアナログ、から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。

【 0 0 1 0 】

他の側面によれば、本発明によるポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチド、医薬組成物、作働可能であるように、発現コントロール領域に連結される、本発明によるポリヌクレオチドを含むベクター、そして同様に前記ベクターで形質移入された宿主細胞及び発現に好適な条件下で前記宿主細胞を培養することを含む、ポリペプチドの製造方法が提供される。 30

【 0 0 1 1 】

図面の簡単な説明

図 1、3、5、7、9 中では、配列の下線を引いた部分は、リーダーペプチドをコードする領域を表す。図 2、4、6、8、10 中では、配列の下線を引いた部分は、リーダーペプチドを表す。

【 0 0 1 2 】

図 1 は、M 3 血清型 S. ピオゲネス A T C C 1 2 3 8 4 株からの B V H - P 2 遺伝子の DNA 配列；配列番号 1 を表す。

図 2 は、M 3 血清型 S. ピオゲネス A T C C 1 2 3 8 4 株からの B V H - P 2 ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号 2 を表す。 40

図 3 は、M 1 血清型 S. ピオゲネス A T C C 7 0 0 2 9 4 株からの B V H - P 3 遺伝子の DNA 配列；配列番号 3 を表す。

図 4 は、M 1 血清型 S. ピオゲネス A T C C 7 0 0 2 9 4 株からの B V H - P 3 ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号 4 を表す。

図 5 は、M 1 血清型 S. ピオゲネス A T C C 7 0 0 2 9 4 株からの B V H - P 4 遺伝子の DNA 配列；配列番号 5 を表す。

【 0 0 1 3 】

図 6 は、M 1 血清型 S. ピオゲネス A T C C 7 0 0 2 9 4 株からの B V H - P 4 ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号 6 を表す。

図 7 は、M 1 血清型 S. ピオゲネス A T C C 7 0 0 2 9 4 株からの B V H - P 5 遺伝子の 50

DNA配列；配列番号7を表す。

図8は、M1血清型 S. ピオゲネス ATCC 700294株からのBVH-P5ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号8を表す。

図9は、M1血清型 S. ピオゲネス ATCC 700294株からのBVH-P6遺伝子のDNA配列；配列番号9を表す。

図10は、M1血清型 S. ピオゲネス ATCC 700294株からのBVH-P6ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号10を表す。

【0014】

図11は、M3血清型 S. ピオゲネス ATCC 12384株からのBVH-P4遺伝子のDNA配列；配列番号11を表す。

図12は、M3血清型 S. ピオゲネス ATCC 12384株からのBVH-P4ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号12を表す。

図13は、M6血清型 S. ピオゲネス SPY 67株からのBVH-P4遺伝子のDNA配列；配列番号13を表す。

図14は、M3血清型 S. ピオゲネス SPY 67株からのBVH-P4ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号14を表す。

図15は、血清型 S. ピオゲネス B514株からのBVH-P4遺伝子のDNA配列；配列番号15を表す。

図16は、血清型 S. ピオゲネス B514株からのBVH-P4ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号16を表す。

【0015】

図17は、M1血清型 S. ピオゲネス ATCC 700294株、M3血清型 ATCC 12384株、M6血清型 SPY 77株及びマウス単離物B514からのBVH-P4遺伝子のヌクレオチド配列のMacVector配列分析ソフトウェア(バージョン6.5)からのプログラムClustal Wを用いた比較である。同一のヌクレオチドは*で表され、相違は空白スペースで示される。

図18は、M1血清型 S. ピオゲネス ATCC 700294株、M3血清型 ATCC 12384株、M6血清型 SPY 77株及びマウス単離物B514からのBVH-P4の部分的オープンリーディングフレームの予想されたアミノ酸配列のMacVector配列分析ソフトウェア(バージョン6.5)からのプログラムClustal Wを用いた比較である。列の下には、コンセンサスラインがある。同一のアミノ酸は*で表され、一方、相違はピリオドで示される。

【0016】

発明の詳細な説明

本発明は、精製され、単離されたDNA分子を提供し、これはストレプトコッカス感染を予防、治療、及び/又は診断するために用いられることのできるストレプトコッカスのポリペプチドをコードする。

当業者は、ここで本特許出願において記載するように、本発明が、そのようなポリペプチドの変異体、変種、同族体及び誘導体のようなアナログをコードするDNA分子を含むことを評価するだろう。本発明はまた、本発明によるDNA分子に対応するRNA分子をも含む。上記DNA及びRNA分子に加えて、本発明は、そのようなポリペプチドに特異的に結合する対応するポリペプチド及び単一特異性抗体を含む。

【0017】

1の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドに対する少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドを提供する。

1の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドに対する少なくとも80%の同一性を有するポ

10

20

30

40

50

リペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

1の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16 或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドに対する少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

【0018】

1の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16 或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドに対する少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

10

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16 或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

1の側面によれば、本発明は、ポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、又は16 或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を有するポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を産生することのできるポリペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

【0019】

1の側面によれば、本発明は、ポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14 又は16 或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を有するポリペプチドの部分を含むエピトープをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

20

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14 又は16 或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を有するポリペプチドの部分を含むエピトープに関する。

1の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14 又は16、から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドに対する少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

1の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14 又は16、から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドに対する少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

30

【0020】

1の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14 又は16、から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドに対する少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

1の側面によれば、本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14 又は16、から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドに対する少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

40

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14 又は16 或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

1の側面によれば、本発明は、ポリヌクレオチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14 又は16 から選ばれる配列を有するポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を産生することのできるポリペプチドをコードする、前記ポリヌクレオチドを提供する。

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14 又は

50

16、から選ばれる配列を有するポリペプチドの部分を含むエピトープをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0021】

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14又は16、から選ばれる配列を有するポリペプチドの部分を含むエピトープに関する。

本発明によれば、ポリペプチドをコードするすべてのポリヌクレオチドは本発明の範囲内にある。

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドに対する少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドに関する。

10

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドに対する少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドに関する。

【0022】

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16或いはそれらのフラグメント又はアナログ、からの配列を含むアミノ酸配列に特徴を有するポリペプチドに関する。

1の側面によれば、本発明は、ポリペプチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれる配列を有するポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を産生することのできる前記ポリペプチドに関する。

20

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16或いはそれらのフラグメント又はアナログ、から選ばれるポリペプチドの部分を含むエピトープに関する。

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16から選ばれるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドに対する少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドに関する。

【0023】

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16から選ばれるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドに対する少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドに関する。

30

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、からの配列を含むアミノ酸配列に特徴を有するポリペプチドに関する。

1の側面によれば、本発明は、ポリペプチドであって、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16から選ばれる配列を有するポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を産生することのできる前記ポリペプチドに関する。

1の側面によれば、本発明は、以下の：配列番号2、4、6、8、10、12、14、16から選ばれる配列を有するポリペプチドの部分を含むエピトープに関する。

【0024】

さらなる実施態様においては、本発明によるポリペプチドは抗原性がある。

40

さらなる実施態様においては、本発明によるポリペプチドは、免疫原性がある。

さらなる実施態様においては、本発明によるポリペプチドは、宿主において免疫応答を引き出すことができる。

さらなる実施態様においては、本発明はまた、上で定義された本発明によるポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を産生することのできるポリペプチドに関する。

“結合特異性を有する”抗体は、上記選択されたポリペプチドを認識し、結合するが、例えば、自然に上記選択されたペプチドを含む、生物学的サンプルであるサンプル中の他の分子を実質的に認識し、結合しない抗体である。特異的結合は、上記選択されたポリペプチドが抗原として用いられる、ELISAアッセイを用いて測定することができる。

【0025】

50

本発明によれば、生物学的研究において“保護”とは、生存曲線、生存率又は生存期間の有意な増加と定義される。生存曲線を比較する記録順位検定及び生存率及び死までの日数を比較するフィッシャーの正確検定をそれぞれ用いた統計分析は、P値を計算し、2の群の間の相違が統計学的に有意であるかを決定するのに有用であろう。0.05というP値は有意でないといみなされる。

本発明によれば、図17に示されたBVH-P4のコンセンサヌクレオチド配列が提供される。上記配列に見られるように、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、よく保存されている。本発明の範囲を非制限的なものとするにより、以下の表Aに、可能な変更を示す：

【表1】

10

<表A>

図17中の配列上の位置	可能性のあるヌクレオチド
74	G又はT
130	C又はT
253	C又はT
274	G又はA
412	C又はT
445	A又はG
841	T又はC
868	G又はA
917	C又はT

20

【0026】

本発明によれば、図18に示されたBVH-P4のコンセンサスアミノ酸配列が提供される。上記配列に見られるように、本発明のポリペプチドは、よく保存されている。本発明の範囲を非制限的なものとするにより、以下の表Bに可能な変更を示す：

30

【表2】

<表B>

図18中の配列上の位置	可能性のあるアミノ酸
25	S又はA

本発明の追加の側面においては、本発明のポリペプチド、又はそれらのアナログの抗原性の/免疫原性のフラグメントが提供される。

40

本発明のフラグメントは、1又はそれを越えるエピトープ領域を含むか又はそれらの抗原性の/免疫原性の性質を保持するためのそのような領域に十分に類似していなければならない。したがって、本発明によるフラグメントについては、同一性の程度はおそらく関連性がない、なぜならば、ここで記載されたように、それらはポリペプチド又はそれらのアナログの特別の部分と100%同一であることができるからである。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列からの、少なくとも10の近接するアミノ酸残基を有するフラグメントを提供する。1の実施態様においては、少なくとも15の近接するアミノ酸残基である。1の実施態様においては、少なくとも20の近接するアミノ酸残基である。

【0027】

当業者は本発明のポリペプチドのアナログが、本発明の関係においてその用途、すなわち

50

抗原性の / 免疫原性の物質として、をも見い出すことを評価するだろう。したがって、例えば1又はそれを越える付加、欠失、置換又はその他同種のものを含むタンパク又はポリペプチドは、本発明の範囲に含まれる。

これらの置換は、上記ポリペプチドの2次構造及び疎水性親水性指標の性質に最小の影響を有するものである。好ましい置換は、本分野において保存された、すなわち上記被置換残基が疎水性、サイズ、電荷又は官能基のような物理的又は化学的性質を共有する、ものであるとして知られている。これらは、Dayhoff, M. によりAtlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978 及びArgos, P. によりEMBO J. 8, 779-785, 1989に記載されたような置換を含む。例えば、以下の群：

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

10

の1に属する天然又は非天然のいずれかのアミノ酸は保存的な変化を示す。好ましい置換はまた、D-エナンチオマーの対応するL-アミノ酸への置換を含む。

【0028】

相同性のパーセンテージは、同一性のパーセンテージと類似性又はアミノ酸タイプの保存のパーセンテージの和として定義される。

代わりにアプローチにおいて、上記アナログは、例えば目的のポリペプチドを効果的にタグすることにより、精製を容易なものとする成分を含む融合タンパクであることができる。上記“タグ”を除去することが必要であるかも知れず、又は融合ポリペプチド自体が有用であるのに十分な抗原性を保持している場合であるかも知れない。

20

したがって、アナログ、誘導体そしてフラグメントにとって重要なのは、少なくともそれらが由来するタンパク又はポリペプチドの抗原性 / 免疫原性の程度をそれらが有することである。

【0029】

ここで用いられるように、本発明のポリペプチドの“フラグメント”、“アナログ”又は“誘導体”は、1又はそれを越えるアミノ酸残基が保存された又は非保存の（好ましくは保存された）アミノ酸残基と置換された、天然又は非天然のポリペプチドを含む。

30

1の実施態様において、本発明のポリペプチドのアナログは、図に表された配列又はそれらのアナログと約70%の同一性を有するだろう。すなわち、残基の70%が同一である。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは75%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは80%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは85%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは90%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは95%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは99%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、本発明のポリペプチドのアナログは、約20アミノ酸残基よりも少ない、そしてより好ましくは10アミノ酸残基よりも少ない置換、修飾又は欠失を有するだろう。

40

【0030】

さらなる実施態様においては、ポリペプチドは70%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは75%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは80%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは、85%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは、90%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは、95%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、ポリペプチドは、99%より大きい同一性を有するだろう。さらなる実施態様においては、本発明のポリペプチドの誘導体及びアナログは、

50

約20アミノ酸残基よりも少ない、そしてより好ましくは10アミノ酸残基よりも少ない置換、修飾又は欠失を有するだろう。好ましい置換は、本分野において保存された、すなわち上記被置換残基が疎水性、サイズ、電荷又は官能基のような物理的又は化学的性質を共有する、ものであるとして知られている。

【0031】

CLUSTALプログラムのようなプログラムをアミノ酸配列の比較に用いることができる。このプログラムはアミノ酸配列を比較し、いずれかの配列に適切にスペースを挿入することにより、最適の配列を見出す。最適の配列のためにアミノ酸の同一性又は類似性(同一性に加えてアミノ酸タイプの保存性)を計算することができる。BLASTXのようなプログラムは、最長の長さの類似する配列を整列化し、適合度を割り充てる。したがって、それぞれが異なるスコアを有する、類似した数領域が見出される比較を得ることができる。同一性分析の両方のタイプはともに本発明において、熟慮される。

本発明の追加の側面においては、本発明のポリペプチド又はそれらのアナログの抗原性の/免疫原性のフラグメントが提供される。

ここで記載されたポリペプチドのフラグメント又はそれらのアナログについては、未変性のタンパクとは状況がやや異なる。エピトープ領域、すなわち上記ポリペプチドの抗原性又は免疫原性の原因となる領域、を同定するための抗原性ポリペプチドをスクリーニングすることができることは周知である。そのようなスクリーニングを実行するための方法は本分野において周知である。したがって、本発明の上記フラグメントは、1又はそれを越えるそのようなエピトープ領域を含むか又はそれらの抗原性の/免疫原性の性質を保持するのに十分なほど、そのような領域に類似していなければならない。したがって、本発明のフラグメントについては、同一性の程度はおそらく関連性がない、なぜならば、ここで記載されたようにそれらはポリペプチド又はアナログの特別な部分と100%同一であることができるからである。

【0032】

上記ポリペプチドの生物学的又は薬理的性質を変える、他の化合物をそこへ融合させたポリペプチドもまた含まれ、それはすなわち、半減期を延長させるポリエチレングリコール(PEG); 精製を容易にするためのリーダー又は分泌性のアミノ酸配列; プレプロ-及びプロ-配列; 及び(ポリ)サッカライドである。

さらには、アミノ酸領域が多型であることが見出される状況において、異なるストレプトコッカス株の異なるエピトープをより効果的に擬態するために1又はそれを越える特別なアミノ酸を多様化することが望ましいかも知れない。

さらには、本発明のポリペプチドは、安定性、支持体又は他の分子への連結又は結合のための増加した疎水性を与えるために末端の-NH₂のアシル化(例えば、アセチル化又はチオグリコール酸によるアミド化、例えばアンモニア又はメチラミンによるカルボキシ末端のアミド化により)により修飾されることできる。

【0033】

上記ポリペプチドフラグメント及びアナログのヘテロ及びホモポリペプチド重合体もまた熟考される。これらの重合体は、例えば、アビジン/ビオチン、グルタルアルデヒド又はジメチルスペリミデートのようなクロスリンク剤とクロスリンクした1又はそれを越えるポリペプチドを含む。そのような重合体はまた、組み換えDNA技術により作られた多シストロンmRNAsから産生される2又はそれを越える直列の又は逆位の近接した配列を含むポリペプチドをも含む。さらなる実施態様においては、本発明はまた、本出願の図に定義されるような1又はそれを越えるポリペプチド或いはそれらのフラグメント又はアナログを含むキメラのポリペプチドにも関する。

さらなる実施態様においては、本発明はまた、以下のポリペプチドがキメラのポリペプチドを形成するように連結するという条件で以下の: 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16或いはそれらのフラグメント又はアナログから選ばれる配列を有する2又はそれを越えるポリペプチドを含むキメラのポリペプチドにも関する。

さらなる実施態様においては、本発明はまた、以下のポリペプチドがキメラのポリペプチ

10

20

30

40

50

ドを形成するように連結するという条件で以下の：配列番号 2、4、6、8、10、12、14 又は 16 から選ばれる配列を有する 2 又はそれを越えるポリペプチドを含むキメラのポリペプチドにも関する。

【0034】

抗原性のある重合体の形成（すなわち、合成多重合体）を達成するために、ポリペプチドをビスハロアセチル基、ニトロアセチルハライド又はそれと同様のものとともに利用することができ、ここで試薬はチオ基に対して特異的である。したがって、異なるポリペプチドの 2 のメルカプト基の間の連結は、一重結合又は少なくとも 2 の炭素原子からなる連結基、典型的には少なくとも 4 の炭素原子、そして 16 以下の炭素原子、しかし通常は、14 以下の炭素原子からなる連結基が構成されることができる。

特別な実施態様においては、本発明のポリペプチドフラグメント及びアナログはメチオニン（Met）又はバリン（Val）のような開始残基を含まない。

【0035】

好ましくは、ポリペプチドは、リーダー又は分泌性の配列（シグナル配列）を取り込まない。本発明のポリペプチドのシグナル部分は、確立された分子生物学の技術によって決定されることができる。問題の上記ポリペプチドはストレプトコッカスの培養から単離され、引き続き成熟したタンパクの最初の残基、そしてしたがって成熟ポリペプチド配列を決定するために配列決定される。

組み換えポリペプチドの生産及び精製の便宜のために、ポリペプチドが生産され及び/又はそれらの開始コドン（メチオニン又はバリン）なしに及び/又はそれらのリーダーペプチドなしに用いられることが理解されている。リーダーペプチドをコードする配列を含まない遺伝子のクローニングは、上記ポリペプチドを大腸菌（E. coli）の細胞質に限定し、それらの回収を促進することが知られている（Glick, B.R. and Pasternak, J.J. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. In "Molecular biotechnology : Principles and applications of recombinant DNA", 2nd edition, ASM Press, Washington DC, p.109~143)。

【0036】

上記ポリペプチドはリーダー又は分泌性の配列の存在下又は非存在下で発現することができる。前者の場合、リーダーは翻訳後プロセッシングを用いて除去することができ（ここに参考文献として援用されている米国特許第 4431739 号、同第 4425437 号及び同第 4338397 号を参照のこと）、又は発現したポリペプチドの精製に続いて化学的に除去することができる。

本発明の他の側面によれば、以下の：(i) 本発明のポリペプチドを担体、希釈剤又はアジュバントとともに含む組成物；(ii) 本発明のポリペプチド及び担体、希釈剤又はアジュバントを含む医薬組成物；(iii) 本発明のポリペプチド及び担体希釈剤又はアジュバントを含むワクチン；(iv) 例えば、ストレプトコッカスに対する防御的免疫応答を誘発するために免疫原として有効な量の本発明のポリペプチドを宿主に投与することにより、ストレプトコッカスに対する免疫応答を宿主中で誘導するための方法；(v) 必要としている宿主に本発明のポリペプチドの予防的又は治療的な量を投与することにより、ストレプトコッカス感染を予防及び/又は治療するための方法、もまた提供される。

【0037】

免疫化の前に、本発明のポリペプチドは、破傷風毒素、ジフテリア毒素、B 型肝炎ウイルス表面抗原、灰白髄炎ウイルス VP1 抗原、又は他のいずれかのウイルス性若しくは細菌性の毒素若しくは抗原、或いはより強い免疫応答の発生を刺激するいずれかの好適なタンパクのような担体タンパクに結合又は接合されることもできる。この結合又は接合は化学的又は遺伝的に行われることができる。さらに詳細なペプチド-担体接合についての記載は、Van Regenmortel, M.H.V., Briand J.P., Muller S., Plauee S., <<Synthetic Polypeptides as antigens>> is Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 19 (ed.) Burdou, R.H. & Van Knippenberg P.H. (1988), Elsevier New York において入手可能である。

10

20

30

40

50

【0038】

他の側面によれば、1又はそれを越える本発明のストレプトコッカスのポリペプチドを、薬剤として許容できるアジュバントとの混合物中に含む医薬組成物が提供される。好適なアジュバントは以下の：(1)MF59(商標)、SAF(商標)、Ribbi(商標)のような水中油型乳剤製剤；(2)フロイントの完全又は不完全アジュバント；(3)塩、すなわち $AlK(SO_4)_2$ 、 $AlNa(SO_4)_2$ 、 $AlNH_4(SO_4)_2$ 、 $Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$ 、シリカ、カオリン；(4)Stimulon(商標)又はISCOMs(immunostimulating complexes、免疫刺激複合体)；(5)インターロイキン、インターフェロン、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)のようなサイトカイン；(6)カーボンポリヌクレオチドのような他の物質、すなわちポリIC及びポリAU、解毒されたコレラ毒素(CTB)並びに粘膜の免疫の誘導のためのE.coliの非耐熱性毒素；を含む。さらに詳細なアジュバントについての記載は、ここに参考文献として援用されている、M.Z.I Kahn et al. in Pharmaceutical Research, Vol. 11, No. 1 (1994) pp2~11 による総説、及びまた、Gupta et al., in Vaccine, Vol. 13, No14, pp1263~1276 (1995)による総説、並びにPCT出願公開第99/24578号において入手可能である。好ましいアジュバントは、QuilA(商標)、QS21(商標)、Alhydrogel(商標)及びAdjuphos(商標)を含む。

10

【0039】

さらなる実施態様において、本発明のポリペプチドを、薬剤として許容できる希釈剤、賦型剤又はアジュバントと混合することを含む医薬組成物の製造方法が提供される。

20

さらなる側面においては、本発明は、宿主に、本発明の組成物の治療的又は予防的な量を投与することを含む、ストレプトコッカス感染の疑いのある宿主におけるストレプトコッカス細菌感染の予防的又は治療的処置のための方法を提供する。

本発明の医薬組成物は、非経口的に注射、高速輸注、鼻咽頭からの吸収、皮膚からの吸収により、又は舌下で或いは経口で投与されることができる。薬剤として許容できる担体もまた破傷風類毒素を含む。

【0040】

本発明の医薬組成物は、ストレプトコッカス感染症及び/又はストレプトコッカス感染症により仲介された疾患及び症状の治療又は予防のために用いられ、それはP.R. Murray(主筆)、E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover及びR.H. Yolkenに記載された通りである。Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, Washington, D.C. sixth edition, 1995, 1482pは、ここに参考文献として援用されている。1の実施態様において、本発明の医薬組成物は、咽頭炎、丹毒及び膿痂疹、猩紅熱、並びに菌血症及び壊死性の筋膜炎のような侵入性の疾患、そしてまた毒性ショックの治療又は予防のために使用される。1の実施態様においては、本発明の医薬組成物はストレプトコッカス感染症及び/又はストレプトコッカス感染症により仲介された疾患又は症状、特別には、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)と同様にストレプトコッカスA群(S. ピオゲネス)、ストレプトコッカスB群(GBS又はS. アガラクチエ(S. agalactiae))、S. ニューモニエ(S. pneumoniae)、S. ディスガラクチエ(S. dysgalactiae)、S. ウベリス(S. uberis)、S. ノカルジア(S. nocardia)、の治療又は予防に用いられる。さらなる実施態様においては、上記ストレプトコッカス感染はストレプトコッカス・ピオゲネスである。

30

40

【0041】

特別な実施態様においては、医薬組成物は乳児、高齢者、及び免疫無防備状態の宿主のようなストレプトコッカス感染の危険のある宿主に投与される。

さらなる側面によれば、本発明のストレプトコッカスのポリペプチドは、ストレプトコッカス感染症の検出又は診断のための本発明のポリペプチドを含むキット中で用いられることができる。

本出願中で用いられるように、“宿主”という用語は哺乳動物を含む。さらなる実施態様においては、上記哺乳動物はヒトである。

50

医薬組成物は好ましくは約 0.001 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (抗原/体重) そしてより好ましくは 0.01 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、そして最も好ましくは 0.1 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の単位用量の形態で免疫化の間に約 1 ~ 6 週の間隔をおいて 1 ~ 3 回投与する。

医薬組成物は好ましくは約 0.1 μg ~ 10 mg そしてより好ましくは 1 μg ~ 1 mg そして最も好ましくは 10 ~ 100 μg の単位用量の形態で、免疫化の間に約 1 ~ 6 週の間隔をおいて 1 ~ 3 回投与する。

【0042】

1 の実施態様において、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム (ORF) を含むことのできる配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15 中に表される。

図中に表されたポリヌクレオチド配列がそれでもまだ本発明のポリペプチドをコードする縮退コドンに変更されることが理解されるであろう。したがって、本発明は配列間で 50% の同一性、1 の実施態様においては配列間で少なくとも 70% の同一性、1 の実施態様においては配列間で少なくとも 75% の同一性、1 の実施態様においては配列間で少なくとも 80% の同一性、1 の実施態様においては配列間で少なくとも 85% の同一性、1 の実施態様においては配列間で少なくとも 90% の同一性、を有する、ここにおける上記のポリヌクレオチド配列をさらに提供する。さらなる実施態様においては、ストリンジェントな条件下、すなわち少なくとも 95% の同一性を有する、でポリペプチドはハイブリダイズすることができる。さらなる実施態様においては、97% を越える同一性である。

【0043】

ハイブリダイゼーションのための好適なストリンジェントな条件は、当業者によって容易に決定されることができ (例として Sambrook et al., (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology, (1999) Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons Inc., N.Y. を参照せよ)。

【0044】

さらなる実施態様においては、本発明は、ストリンジェントな条件下で以下の：

(a) ポリペプチドをコードする DNA 配列又は

(b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補的配列；

のいずれかにハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ここで前記ポリペプチドが配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16 或いはそれらのフラグメント又はアナログを含む前記ポリヌクレオチドを提供する。

【0045】

さらなる実施態様においては、本発明は、ストリンジェントな条件下で、以下の：

(a) ポリペプチドをコードする DNA 配列又は

(b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補的配列；

のいずれかにハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ここで前記ポリヌクレオチドが配列番号 2、4、6、8、10、12、14 又は 16 を含む前記ポリヌクレオチドを提供する。

【0046】

さらなる実施態様においては、本発明は、ストリンジェントな条件下で、以下の：

(a) ポリペプチドをコードする DNA 配列又は

(b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補的配列；

のいずれかにハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ここで前記ポリペプチドが配列番号 2、4、6、8、10、12、14 又は 16 或いはそれらのフラグメント又はアナログを含むポリペプチドからの少なくとも 10 の近接するアミノ酸残基を含む、前記ポリヌクレオチドを提供する。

【0047】

さらなる実施態様においては、本発明は、ストリンジェントな条件下で、以下の：

(a) ポリペプチドをコードする DNA 配列又は

(b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補的配列 ;

のいずれかにハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ここで前記ポリペプチドが配列番号 2、4、6、8、10、12、14又は16を含むポリペプチドからの少なくとも10の近接するアミノ酸残基を含む、前記ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 4 8 】

さらなる実施態様においては、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15に表されたポリヌクレオチドである。

当業者に容易に理解されるように、ポリヌクレオチドは、DNA及びRNAの両方を含む。

本発明はまた、本出願において記載されたポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む。

【 0 0 4 9 】

さらなる側面においては、本発明のポリペプチド又はそれらのフラグメント、アナログ或いはそれらの誘導体をコードするポリヌクレオチドはDNA免疫化法において用いられることができる。すなわち、それらは複製可能で発現可能なベクターに注射によって取り込まれることができ、それにより *in vivo* において抗原性のポリペプチドを産生する。例えばポリヌクレオチドは、真核細胞中で機能的であるCMVプロモーターの制御下でプラスミドベクターに取り込まれることができる。好ましくは上記ベクターは、筋肉内に注射される。

【 0 0 5 0 】

他の側面によれば、本発明のポリペプチドを生産するための、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを宿主細胞中で発現し、発現したポリペプチド産物を回収することによる組み換え技術による方法が提供される。代わりに、上記ポリペプチドは、確立された合成化学技術、すなわち完全なポリペプチドを生産するように結合されたオリゴペプチドの液相又は固相合成(ブロックライゲーション)、によって生産されることができる。

【 0 0 5 1 】

ポリヌクレオチド及びポリペプチドの入手及び評価の一般的な方法は以下の参考文献 : Sambrook et al, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York; PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering, Edited by White B.A., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 pages; Protein Purification, Principles and Practices, Scopes R.K., Springer-Verlag, New York, 3rd Edition, 1993, 380 pages; Current Protocols in Immunology, Edited by Coligan J.E. et al., John Wiley & Sons Inc., New York に記載されている。

【 0 0 5 2 】

組み換え体の生産のためには、上記ポリペプチドをコードするベクターで宿主細胞に形質移入し、その後、宿主細胞をプロモーターの活性化、形質転換体の選択又は遺伝子の増幅のために適切であるように変更された栄養培地中で培養する。好適なベクターは、選ばれた宿主中で生存可能及び複製可能な、染色体性のDNA配列、非染色体性のDNA配列及び合成DNA配列、例えば細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージDNAの組み合わせから誘導されたベクター、である。上記ポリペプチド配列はプロモーター、リボソーム結合部位(コンセンサス領域又はシャイン-ダルガノ配列)及び場合によりオペレーター(制御要素)を含む発現制御領域に、作働可能に連結するように、制限酵素を用いてベクターの適切な位置に取り込まれることができる。所定の宿主及びベクターに適切な、上記発現制御領域の各成分を確立された分子生物学の原理に従って選択することができる(Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. N

10

20

30

40

50

ew York)。好適なプロモーターはLTR又はSV40プロモーター、E. coli lac、tac又はtrpプロモーター及びファージラムダP_Lプロモーターを含むがこれらに限定されるものではない。ベクターは好ましくは、選択マーカー、すなわちアンピシリン耐性遺伝子と同様に複製開始点を取り込む。好適な細菌ベクターはpET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10 phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT5並びに真核細胞ベクターpBlueBacIII、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG及びpSVLを含む。宿主細胞は細菌性、すなわちE. コリ(E. coli)、バシラス・サブチルス(Bacillus subtilis)、ストレプトミセス(Streptomyces)；カビ、すなわちアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、アスペルギルス・ニデュリンス(Aspergillus nidulins)；酵母すなわちサッカロミセス(Saccharomyces)又は真核細胞、すなわちCHO、COSであることができる。

10

【0053】

培養中での上記ポリペプチドの発現の上で、典型的には細胞を遠心分離により集め、物理的又は化学的手段によって粉碎し(仮に発現したポリペプチドが培地中へ分泌されない場合)、そして得られた粗抽出物を対象のポリペプチドを単離するために保持する。培養液又は溶菌液からのポリペプチドの精製は、上記ポリペプチドの性質に依存して、確立された技術によって達成されることができ、それらはすなわち、硫酸アンモニウムの使用又はエタノールによる沈澱、酸による抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、

20

【0054】

さらなる側面によれば、本発明のストレプトコッカスのポリペプチドは、ストレプトコッカス感染、特別にはストレプトコッカス・ピオゲネス感染の診断テストにおいて使用されることができ、いくつかの診断方法が可能であり、例として、生物学的サンプル中のストレプトコッカス生体の検出については、以下の手順：

- a) 宿主からの生物学的サンプルを得ること；
- b) 本発明のストレプトコッカスのポリペプチドとの反応性のある抗体又はそのフラグメントと上記生物学的サンプルとを混合物を形成するためにインキュベートすること；そして
- c) ストレプトコッカスの存在を示す、上記混合物中の特異的に結合した抗体又は結合したフラグメントを検出すること、

30

に従うことができる。
代わりに、前記抗体を含むか、含む疑いのある生物学的サンプル中のストレプトコッカス抗原に特異的な抗体の検出方法は以下のように：

- a) 宿主から生物学的サンプルを得ること；
- b) 1又はそれを越える本発明のストレプトコッカスのポリペプチド又はそれらのフラグメントと上記生物学的サンプルとを混合物を形成するためにインキュベートすること；そして
- c) ストレプトコッカスに特異的な抗体の存在を示す、上記混合物中の特異的に結合した抗原又は結合したフラグメントを検出すること；

40

実行されることができ。

【0055】

この診断テストが、生体中に上記タンパクに特異的な抗体が存在するか否かを決定するのに必須な酵素結合免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ又はラテックス凝集アッセイのような免疫学的テストを含むいくつかの形態をとることができ、これを当業者は認識するであろう。

【0056】

50

本発明のポリペプチドをコードするDNA配列はまた、ストレプトコッカスの存在をそのような細菌を含む疑いのある生物学的サンプル中において、検出するのに使用するためのDNAプローブをデザインするのに用いられることができる。本発明の上記検出方法は、以下の：

- a) 宿主から生物学的サンプルを得ること；
- b) 本発明のポリペプチド又はそれらのフラグメントをコードするDNA配列を有する1又はそれを越えるDNAプローブと上記生物学的サンプルとを混合物を形成するためにインキュベートすること；そして
- c) ストレプトコッカス細菌の存在を示す、上記混合物中の特異的に結合したDNAプローブを検出すること、

10

【0057】

本発明の上記DNAプローブはまた、循環するストレプトコッカス、すなわちサンプル中のストレプトコッカス・ピオゲネスの核酸、の検出のために使用されることもでき、例えば、ストレプトコッカス感染症の診断方法として、ポリメラーゼ連鎖反応法を用いることである。上記プローブは慣用技術を用いて合成されることができ、固相に固定化されることができ、又は検出可能なラベルにより標識されることができ、本出願のために好ましいDNAプローブは本発明のストレプトコッカス・ピオゲネスポリペプチドの少なくとも約6の近接したヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴマーである。

【0058】

20

宿主中のストレプトコッカスの検出のための他の診断方法は以下の：

- a) 本発明のポリペプチド又はそのフラグメントとの反応性のある抗体を検出可能なラベルで標識すること；
- b) 宿主に標識された抗体又は標識されたフラグメントを投与すること；及び
- c) 宿主中の、ストレプトコッカスの存在を示す特異的に結合した標識された抗体又は標識されたフラグメントを検出すること、

【0059】

本発明のさらなる側面は、ストレプトコッカス感染症の診断及び特別には治療のための特異的な抗体の生産のための抗原としての本発明のストレプトコッカスのポリペプチドの使用である。好適な抗体は、適切なスクリーニング方法を用いて、例えば特別な抗体のストレプトコッカス感染に対して受動的に防御する能力をテストモデルにおいて測定することによって、決定されることができ、動物モデルの1の例は、ここにおいて実施例中に記載されたマウスモデルである。上記抗体は抗体全体又はその抗原結合フラグメントであることができ、いずれのイムノグロブリンクラスに属することもできる。上記抗体又はフラグメントは、動物由来であることができ、特別には哺乳動物由来そしてさらに特別にはマウス、ラット、又はヒト由来であることができる。それは自然抗体又はそのフラグメント、又は所望により組み換えの抗体又は抗体のフラグメントであることができる。組み換えの抗体又は抗体のフラグメントという用語は、分子生物学の技術を用いて生産された抗体又は抗体のフラグメントを意味する。上記抗体又は抗体のフラグメントは、ポリクローナル又は好ましくはモノクローナルであることができる。それは、ストレプトコッカス・ピオゲネスのポリペプチドと関連した数多くのエピトープに対して特異的であることができるが、好ましくは1に対して特異的である。

30

40

【0060】

本発明のさらなる側面は、受動的免疫化のための本発明の上記ポリペプチドに対する抗体の使用である。本出願中に記載された抗体を用いることができる。好適な抗体は、適切なスクリーニング方法、例えば特別な抗体のストレプトコッカス感染に対して受動的に防御する能力をテストモデルにおいて測定することによって、決定されることができ、動物モデルの1の例は、ここにおいて実施例中に記載されたマウスモデルである。上記抗体は抗体全体又はその抗原結合フラグメントであることができ、いずれのイムノグロブリン

50

ラスに属することもできる。上記抗体又はフラグメントは、動物由来であることができ、特別には哺乳動物由来、そしてさらに特別にはマウス、ラット又はヒト由来であることができる。それは自然抗体又はそのフラグメント、又は所望により組み換えの抗体又は抗体のフラグメントであることができる。組み換えの抗体又は抗体のフラグメントという用語は、分子生物学の技術を用いて生産された抗体又は抗体のフラグメントを意味する。上記抗体又は抗体のフラグメントは、ポリクローナル又は好ましくはモノクローナルであることができる。それは、ストレプトコッカスのポリペプチドと関連した数多くのエピトープに対して特異的であることができるが、好ましくは1に対して特異的である。

【0061】

1の側面によれば、本発明はストレプトコッカス感染症の治療及び/又は予防のための抗体の使用を提供する。

10

別に定義されない限り、ここにおいて用いられるすべての技術的及び科学的用語はこの発明が属する分野の当業者によって共通して理解されるのと同じ意味を持つ。ここで示されるすべての刊行物、特許出願、特許及び他の参考文献は完全な形で援用されている。矛盾する場合には、定義を含めた本明細書が制限される。加えて、材料、方法及び実施例は、例示的なものであり、制限的であることを意図したものではない。

【0062】

実施例 1

本実施例は、B V H - P 2 遺伝子及び対応するポリペプチドのクローニング及び分子的特徴を説明する。

20

S. ピオゲネス B V H - P 2 遺伝子(配列番号1)のコード領域をM3血清型S. ピオゲネス ATCC 12384株のゲノムDNAから、制限部位NdeI (CATATG)及びXhoI (CTCGAG)の付加のための塩基の延長を含む以下のオリゴヌクレオチドプライマー: DMAR124及びDMAR125、これらは表1に示されている、を用いてPCR (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, Ca)により増幅した。PCR産物をQIAGENからのQIAquickゲル抽出キットを用いて、製造者の指示に従い(Chatsworth, CA)アガロースゲルから精製し、NdeI及びXhoI (Pharmacia Canada Inc, Baie d'Urfee, Canada)で消化した。pET-21b(+)ベクター(Novagen, Madison, WI)がNdeI及びXhoIで消化し、そしてQIAGENからのQIAquickゲル抽出キット(Chatsworth, CA)を用いてアガロースゲルから精製した。NdeI-XhoI PCR産物をNdeI-XhoI pET-21b(+)発現ベクターに連結した。連結された産物をE. コリ(E. coli) DH5株[80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r-m+)deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1](Gibco BRL, Gaithersburg, MD)中へSimanisの方法に従って(Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M Glover (ed), pp.109~135)形質転換した。B V H - P 2 遺伝子を含む組み換えpET-21b(+)プラスミド(rpET21b(+))をQIAGENプラスミドキット(Chatsworth, CA)を用いて精製し、DNA挿入断片を配列決定した(Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, ABI, Foster City, CA)。

30

40

【表3】

<表1> S. ピオゲネス遺伝子のPCR増幅法のために用いられるオリゴヌクレオチドプライマー

遺伝子	プライマー名	制限部位	ベクター	配列	配列番号
BVH-PS	DMAR124	NdeI	pET21b	5' - CGGAGAGAACATA TGAAAAAGACATT AAC-3'	17
BVH-P2	DMAR125	XhoI	pET21b	5' - GGGCTCGAGCTGA AACAGTCCCTTAA AG-3'	18
BVH-P2	DMAR507	BamHI	pCMV-GH	5' - GAGCGGATCCTGA ACAAAGTAG-3'	19
BVH-P2	DMAR508	SaII	pCMV-GH	5' - GGGGTTCGACCTGA AACAGTCCCTTAA AG-3'	20

10

20

【表4】

<表1>のつづき

BVH-P3	DMAR188	NdeI	pET21b	5' - GATGGGAAAGCAT ATGAGCCTCATT TG-3'	21
BVH-P3	DMAR189	XhoI	pET21b	5' - GGCTCGAGTTTTG CTAGACCTTCAG- 3'	22
BVH-P4	DMAR192	NdeI	pET21b	5' - GGGTTTCATACATA TGAACAAGAAATT TATTGG-3'	23
BVH-P4	DMAR193	XhoI	pET21b	5' - GGCTCGAGTTTTT CAGGAACCTTAAT G-3'	24

30

40

【表5】

<表 1> のつづき

BVH-P4	DMAR509	BamHI	pCMV-GH	5' - GTTTGGATCCTTG TGGTAATCGTGG- 3'	25
BVH-P4	DMAR510	SaII	pCMV-GH	5' - GGGTCGACTTTTT CAGGAACTTTAAT G-3'	26
BVH-P5	DMAR200	NdeI	pET21b	5' - GGTTCATTTTCAT ATGAACAAAAAAG TAATG-3'	27
BVH-P5	DMAR201	XhoI	pET21b	5' - GGCTCGAGGTTTT CAGGAACTGTGAT GG-3'	28
BVH-P5	DMAR511	BamHI	pCMV-GH	5' - GGGGATCCTACCA ATAACTCCGCTAA ACA-3'	29

10

20

【表 6】

<表1>のつづき

BVH-P5	DMAR512	Sall	pCMV-GH	5' - CAGGTCGACTTTT CAGGAACTGTGAT GGTTC-3'	30
BVH-P6	DMAR235	NdeI	pET21b	5' - GGATAGTTTTTCAT ATGAATCAAGAGA TTAG-3'	31
BVH-P6	DMAR236	XhoI	pET21b	5' - CCCTCGAGATTGG TCTGATTCCAAC ATC-3'	32
BVH-P6	DMAR513	BamHI	pCMV-GH	5' - TTGGATCCTAAT CAAGAGATTAGAT ATTC-3'	33
BVH-P6	DMAR514	Sall	pCMV-GH	5' - CCGTCGACATTGG TCTGATTCCAAC ATC-3'	34

10

20

【0063】

BVH-P2をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)が633塩基対を含み、予測されるpIが6.40であり、分子量24,611.78Daと予測される210アミノ酸残基のポリペプチドをコードすることを決定した。予測されたアミノ酸残基の配列(配列番号2)のSpScan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group)を用いた分析は、22アミノ酸残基のシグナルペプチド(MKKTLTLLLLALFAIGVTSVRA)の存在を示唆し、それはアラニン及びグルタミン酸残基の間に位置する切断部位で終わっている。

30

【0064】

BVH-P2(配列番号1)遺伝子の存在をPCR増幅により確認するために、以下の4の血清学的に異なるS. ピオゲネス株: M1血清型S. ピオゲネス ATCC 700294株及びM3血清型S. ピオゲネス ATCC 12384株はAmerican Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)から入手した; M6血清型S. ピオゲネス SPY 67臨床的単離物はthe Centre de recherche en infectiologie du centre hospitalier de l'universitee Laval, Sainte-Foyより提供された; 最初にマウスから単離されたS. ピオゲネス B514株はUniversity of Alabama, BirminghamからのSusan Hollingsheadより提供された。E. coli XL1-Blue MRF'株をこれらの実験においてネガティブコントロールとして用いた。染色体DNAは各S. ピオゲネス株から前述のように単離された(Jayarao BM et al. 1991, J. Clin. Microbiol. 29: 2774~2778)。BVH-P2(配列番号1)遺伝子は、PCR(Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, Ca)により、上記4のS. ピオゲネス株から精製したゲノムのDNA及びコントロールE. coli株から、上記オリゴヌクレオチドプライマーDMAR124及びDMAR125(表1)を用いて増幅した。PCRは95°Cにおいて45秒、50

40

50

において45秒及び72において1分、を30サイクルと、72において7分の最終の伸長期間によって実施した。上記PCR産物は1%アガロースゲル中でサイズにより分画し、エチジウムブロマイド染色により可視化した。これらのPCR増幅の結果を表2に示す。増幅産物の分析により、BVH-P2 (配列番号1) 遺伝子が、テストされた4のS. ピオゲネス株すべてのゲノムに存在することが明らかとなった。コントロールE. coli DNAをこれらのオリゴヌクレオチドプライマーを用いた同一のPCR増幅に供した場合にはそのような産物は検出されなかった。

【表7】

<表2> PCR増幅法によるS. ピオゲネス遺伝子の同定

菌株の同定	PCR増幅法による同定				
	BVH-P2	BVH-P3	BVH-P4	BVH-P5	BVH-P6
ATCC700294 (M1)	+	+	+	+	+
ATCC12384 (M3)	+	+	+	+	+
SPY67 (M6)	+	+	+	+	+
B514*	+	+	+	+	+
<u>E. coli</u> XL1 Blue MRF'	-	-	-	-	-

* マウス単離物

【0065】

実施例2

本実施例は、BVH-P3 遺伝子及び対応するポリペプチドのクローニング及び分子的特徴を説明する。

S. ピオゲネス BVH-P3 遺伝子 (配列番号3) のコード領域をM1血清型S. ピオゲネス ATCC700294株のゲノムDNAから、制限部位Nde I (CATATG) 及びXho I (CTCGAG) の付加のための塩基の延長を含む以下のオリゴヌクレオチドプライマー: DMAR188及びDMAR189、これらは表1に示されている、用いてPCR (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, Ca) により増幅した。発現ベクターへのBVH-P3 のクローニング及び配列決定に用いた方法は、実施例1において記載された方法と同様である。

【0066】

BVH-P3 をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が921塩基対を含み、予測されるpIが5.73であり分子量が33,382.36Daと予測される306アミノ酸残基のポリペプチドをコードすることを決定した。予測されたアミノ酸残基の配列 (配列番号4) のSpScan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) を用いた分析は、27アミノ酸残基のシグナルペプチド (MSLILGAFLSVFLLVACSSSTGTKTAKS) の存在を示唆し、それはセリン及びアスパラギン酸残基の間に位置する切断部位で終わっている。オリゴヌクレオチドプライマーDMAR188及びDMAR189を用いたPCR増幅の後、上記BVH-P3 遺伝子が、テストされた4の血清学的なS. ピオゲネス株のすべてに存在することが示された (表2)。上記BVH-P3 遺伝子のPCR増幅のために用いられた方法は、実施例1において示された方法と同様であった。コントロールE. coli DNAをこれらのオリゴヌクレオチドプライマーを用いた同一のPCR増幅に供した場合には、そのような産物は検出されなかった。

【0067】

実施例3

本実施例は、B V H - P 4 遺伝子及び対応するポリペプチドのクローニング及び分子的特徴を説明する。

S. ピオゲネス B V H - P 4 遺伝子（配列番号 5）のコード領域を M 1 血清型 S. ピオゲネス A T C C 7 0 0 2 9 4 株のゲノム DNA から、制限部位 N d e I（C A T A T G）及び X h o I（C T C G A G）の付加のための塩基の延長を含む以下のオリゴヌクレオチドプライマー：D M A R 1 9 2 及び D M A R 1 9 3、これらは表 1 に示されている、を用いて P C R（Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, Ca）により増幅した。発現ベクターへの B V H - P 4 のクローニング及び配列決定に用いた方法は、実施例 1 において記載された方法と同様である。

【 0 0 6 8 】

B V H - P 4 をコードするオープンリーディングフレーム（O R F）が 1 0 5 3 塩基対を含み、予測される p I が 7 . 9 0 であり分子量が 3 6、3 9 2 . 5 0 Da と予測される 3 5 0 アミノ酸残基のポリペプチドをコードすることを決定した。予測されたアミノ酸残基の配列（配列番号 6）の Spscan software（Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group）を用いた分析は、1 9 アミノ酸残基のシグナルペプチド（M N K K F I G L G L A S V A V L S L A）の存在を示唆し、それは 2 のアラニン残基の間に位置する切断部位で終わっている。

【 0 0 6 9 】

オリゴヌクレオチドプライマー D M A R 1 9 2 及び D M A R 1 9 3 を用いた P C R 増幅の後、上記 B V H - P 4 遺伝子が、テストされた 4 の血清学的な S. ピオゲネス 株中に存在することが示された（表 2）。上記 B V H - P 4 遺伝子の P C R 増幅のために用いられた方法は、実施例 1 において示された方法と同様であった。コントロール E. coli DNA をこれらのオリゴヌクレオチドプライマーを用いた同一の P C R 増幅に供した場合には、そのような産物は検出されなかった。

【 0 0 7 0 】

他の株からの追加の B V H - P 4 遺伝子の配列決定により、この遺伝子の S. ピオゲネス 単離物間における高度の分子的な保存を確認した。A T C C 1 2 3 8 4 株（配列番号 1 1）、S P Y 6 7 株（配列番号 1 3）及び B 5 1 4 株（配列番号 1 5）からの S. ピオゲネス B V H - P 4 遺伝子の各コード領域をゲノム DNA から表 1 に示されているオリゴヌクレオチドプライマー D M A R 1 9 2 及び D M A R 1 9 3 を用いて P C R（Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, Ca）により増幅した。P C R 産物を Q I A g e n からの Q I A q u i c k ゲル抽出キットを用いて製造者の指示に従い（Chatsworth, CA）アガロースゲルから精製し、DNA 挿入断片を配列決定した（Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA）。A T C C 1 2 3 8 4 株（配列番号 1 2）、S P Y 6 7 株（配列番号 1 4）及び B 5 1 4 株（配列番号 1 6）からの予測されたアミノ酸配列は、以下の図 1 2、1 4 及び 1 6 にそれぞれ示す。図 1 8 は S. ピオゲネス B V H - P 4 について確立されたコンセンサスな予測アミノ酸配列を示す。これらの B V H - P 4 アミノ酸配列の対比較は、同一性のレベルが 9 9 % より高いこと、これが S. ピオゲネス 単離物間における B V H - P 4 の高レベルの保存性を示していることを明らかに示した。

【 0 0 7 1 】

実施例 4

本実施例は、B V H - P 5 遺伝子及び対応するポリペプチドのクローニング及び分子的特徴を説明する。

S. ピオゲネス B V H - P 5 遺伝子（配列番号 7）のコード領域を M 1 血清型 S. ピオゲネス A T C C 7 0 0 2 9 4 株のゲノム DNA から、制限部位 N d e I（C A T A T G）及び X h o I（C T C G A G）の付加のための塩基の延長を含む以下のオリゴヌクレオチドプライマー：D M A R 2 0 0 及び D M A R 2 0 1、これらは表 1 に示されている、を用いて P C R（Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, Ca）により増幅した。発現ベクターへの B V H - P 5 のクローニング及び配列決定に用いた方

10

20

30

40

50

法は、実施例 1 において記載された方法と同様である。

【 0 0 7 2 】

B V H - P 5 をコードするオープンリーディングフレーム (O R F) が 1 0 4 4 塩基対を含み、予測される p I が 5 . 6 5 であり、分子量が 3 6 , 8 0 8 . 9 1 Da と予測される 3 4 7 アミノ酸残基のポリペプチドをコードすることを決定した。予測されたアミノ酸配列の Spscan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) を用いた分析は、1 7 アミノ酸残基のシグナルペプチド (M N K K V M S L G L V S T A L F T) の存在を示唆し、それはトレオニン及びロイシン残基の間に位置する切断部位で終わっている。

【 0 0 7 3 】

オリゴヌクレオチドプライマー D M A R 2 0 0 及び D M A R 2 0 1 を用いた P C R 増幅の後、上記 B V H - P 5 遺伝子がテストされた 4 の血清学的な S . ピオゲネス 株中に存在することが示された (表 2) 。上記 B V H - P 5 遺伝子の増幅のために用いられた方法は、実施例 1 において示された方法と同様であった。コントロール E . c o l i D N A をこれらのオリゴヌクレオチドプライマーを用いた同一の P C R 増幅に供した場合には、そのような産物は検出されなかった。

【 0 0 7 4 】

実施例 5

本実施例は、B V H - P 6 遺伝子及び対応するポリペプチドのクローニング及び分子的特徴を説明する。

S . ピオゲネス B V H - P 6 遺伝子 (配列番号 9) のコード領域を M 1 血清型 S . ピオゲネス A T C C 7 0 0 2 9 4 株のゲノム D N A から、制限部位 N d e I (C A T A T G) 及び X h o I (C T C G A G) の付加のための塩基の延長を含む以下のオリゴヌクレオチドプライマー : D M A R 2 3 5 及び D M A R 2 3 6 、これらは表 1 に示されている、を用いて P C R (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, Ca) により増幅した。発現ベクターへの B V H - P 6 のクローニング及び配列決定に用いた方法は、実施例 1 において記載された方法と同様である。

【 0 0 7 5 】

B V H - P 6 をコードするオープンリーディングフレーム (O R F) が 1 0 2 0 塩基対を含み、予測される p I が 6 . 6 6 であり分子量が 3 8 , 0 1 7 . 7 8 Da と予測される 3 3 9 アミノ酸残基のポリペプチドをコードすることを決定した。予測されたアミノ酸残基の配列 (配列番号 1 0) の Spscan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) を用いた分析は、3 3 アミノ酸残基のシグナルペプチド (M R K R C Y S T S A A V L A A V T L F V L S V D R G V I A D S F S) の存在を示唆し、それはセリン及びアラニン残基の間に位置する切断部位で終わっている。オリゴヌクレオチドプライマー D M A R 2 3 5 及び D M A R 2 3 6 を用いた P C R 増幅の後、上記 B V H - P 6 遺伝子がテストされた 4 の血清学的な S . ピオゲネス 株中に存在することが示された (表 2) 。上記 B V H - P 6 遺伝子の P C R 増幅のために用いられた方法は、実施例 1 において示された方法と同様であった。コントロール E . c o l i D N A をこれらのオリゴヌクレオチドプライマーを用いた同一の P C R 増幅に供した場合には、そのような産物は検出されなかった。

【 0 0 7 6 】

実施例 6

本実施例は、C M V プラスミド p C M V - G H における S . ピオゲネス 遺伝子のクローニングを説明する。

S . ピオゲネス タンパクの D N A コード領域を、上記プラスミドベクター p C M V - G H (Tang et al., Nature, 1992, 356 : 152) 中のサイトメガロウイルス (C M V) プロモーターの転写制御下にあるヒト成長ホルモン (h G H) 遺伝子の下流に挿入した。上記 C M V プロモーターは、E . c o l i 細胞中では機能しないプラスミドであるが、真核細胞中への上記プラスミドの投与においては活性であった。上記ベクターはまたアンピシリン

10

20

30

40

50

耐性遺伝子をも組み入れた。

【0077】

リーダーペプチド領域を含まない B V H - P 2 (配列番号 1)、B V H - P 4 (配列番号 5)、B V H - P 5 (配列番号 7) 及び B V H - P 6 (配列番号 9) 遺伝子を M 1 血清型 S. ピオゲネス A T C C 7 0 0 2 9 4 株からのゲノム DNA から、制限部位 B a m H I (G G A T C C) 及び S a l I (G T C G A C) の付加のための塩基の延長を含むオリゴヌクレオチドプライマー、これらは表 1 に示されている、を用いて P C R (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, Ca) により増幅した。P C R 産物を Q I A g e n (Chatsworth, CA) からの Q I A q u i c k ゲル抽出キットを用いてアガロースゲルから精製し、制限酵素 (Pharmacia Canada Inc, Baie d'Urfe, Canada) により消化した。上記 p C M V - G H ベクター (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas) を B a m H I 及び S a l I により消化し、Q I A g e n からの Q I A q u i c k ゲル抽出キット (Chatsworth, CA) を用いてアガロースゲルから精製した。上記 B a m H I - S a l I DNA フラグメントを、h G H - B V H - P 2、h G H - B V H - P 4、h G H - B V H - P 5、及び h G H - B V H - P 6 融合タンパクを C M V プロモーターの制御下において作成するために、B a m H I - S a l I p C M V - G H ベクターに連結した。連結産物を E. coli DH5 株 [8 0 d l a c Z M 1 5 (l a c Z Y A - a r g F) U 1 6 9 e n d A 1 r e c A 1 h s d R 1 7 (r - m +) d e o R t h i - 1 s u p E 4 4 g y r A 9 6 r e l A 1] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 中へ S i m a n i s (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M Glover (ed), pp.109 ~ 135) の方法に従って形質転換した。上記組み換え p C M V プラスミドを Q I A g e n プラスミドキット (Chatsworth, CA) を用いて精製し、DNA 挿入断片のヌクレオチド配列を DNA 配列決定により確認した。

【0078】

実施例 7

本実施例は、S. ピオゲネス タンパク抗原に対する免疫応答を明らかにするための DNA の使用を説明する。

1 群あたり 8 の雌性 B A L B / C マウス (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) から成る群を 5 0 μ g の顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) を発現するプラスミド p C M V - G H - G M - C S F (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas) の存在下、B V H - P 2 (配列番号 1)、B V H - P 4 (配列番号 5)、B V H - P 5 (配列番号 7) 及び B V H - P 6 (配列番号 9) 遺伝子をコードする 5 0 μ g の組み換え p C M V - G H を含む 1 0 0 μ l を筋肉内に 2 又は 3 週間の間隔で 3 回注射することにより、免疫化した。血液サンプルを眼窩血洞より、各免疫化の前及び 3 度めの注射の 7 日後に採取し、血清抗体応答をヒスチジンでタグされた標識 S. ピオゲネス 組み換えタンパクをコーティング抗体として用いた E L I S A により決定した。これらのヒスチジンでタグされた標識 S. ピオゲネス 組み換えタンパクの生産及び精製は実施例 8 に表す。

【0079】

実施例 8

本実施例は、S. ピオゲネス 組み換えタンパクの生産及び精製を説明する。

B V H - P 2 (配列番号 1)、B V H - P 3 (配列番号 3)、B V H - P 4 (配列番号 5)、B V H - P 5 (配列番号 7) 及び B V H - P 6 (配列番号 9) を含む組み換え p E T - 2 1 b (+) プラスミドをエレクトロポレーション (Gene Pulser II apparatus, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canada) により、E. coli B L 2 1 株 (D E 3) (F o m p T h s d S_B (r⁻ m⁻) g a l d c m (D E 3)) (Novagen, Madison, WI) を形質転換するために用いた。E. coli のこの株において、上記組み換えタンパクの発現を制御している T 7 プロモーターは、その遺伝子が、イソプロピル - d - チオガラクトピラノシド (I P T G) により誘導されうる l a c プロモーターの制御下にあると

ころの T7 RNAポリメラーゼ (DE3プロファージ上に存在する) により特異的に認識される。上記形質転換体 BL21 (DE3) / r p E T を 1ml あたり 100 μ g のカルベニシリン (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Canada) を含む LB プロス (ペプトン 10 g / L、イーストエクストラクト 5 g / L、NaCl 10 g / L) 中で 37 で 250 rpm で振とうしながら A₆₀₀ が 0.6 の値になるまで増殖させた。ヒスチジンでタグされた S. ピオゲネス 組み換えタンパクの生産を誘導するために、上記細胞を最終濃度で 1mM の IPTG の存在下、さらに 3 時間インキュベートした。500ml の培養液からの誘導された細胞を遠心分離により沈澱させ、-70 で凍結した。

【0080】

IPTG 誘導された BL21 (DE3) / r p E T 21 b (+) の可溶性の細胞質画分からの組み換えタンパクの精製は、His・Tag 配列 (6 の連続したヒスチジン残基) の、His・Bind 金属キレート樹脂上に固定化された 2 価カチオン (Ni²⁺) に結合する性質に基いたアフィニティークロマトグラフィーにより行なう。要するに、IPTG により誘導された 500ml の培養液から得られた沈澱した細胞を 1mM の PMSF を含む溶解緩衝液 (20mM トリス、500mM NaCl、10mM イミダゾール、pH7.9) に再懸濁し、細片を除去するために、超音波処理し、12,000 × g で 20 分間遠心分離した。上清を Ni-NTA アガロースカラム (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) に加えた。ヒスチジンでタグされた標識 S. ピオゲネス 組み換えタンパクを 250mM イミダゾール - 500mM NaCl - 20mM トリス pH7.9 で溶出した。上記サンプルからの塩及びイミダゾールの除去は、PBS に対して、4 で透析することにより行った。E. coli の可溶性画分から得られた組み換えタンパクの量は Micro BCA (Pierce, Rockford, Illinois) により推定した。

【0081】

実施例 9

本実施例は、ヒスチジンでタグされた S. ピオゲネス 組み換えタンパクの、ヒト血清及び S. ピオゲネス 抗原調製物により免疫化後のマウスから採取した血清との反応性を説明する。

表 3 に示すように、すべての精製された組み換えタンパクが、正常血清のプール中に存在する抗体による免疫プロットにおいて認識された。それは、S. ピオゲネス と正常に接触するヒトは、これらのタンパクに特異的な抗体を産生することを示す。これらの特別なヒト抗体は S. ピオゲネス 感染に対する防御と結びつけられることができる。加えて、免疫プロットはまた、致死的な免疫試験からマウスを防御する膜タンパクに富む S. ピオゲネス 抗原調製物で免疫化されたマウスから採取した血清が、また BVH - P3、BVH - P4 及び BVH - P5 のヒスチジンでタグされた組み換えタンパクを認識する抗体をも産生したことを明らかにした。この結果は、マウスを感染から防御する S. ピオゲネス 抗原調製物中にこれらのタンパクが存在したこと、及びそれらが、対応するヒスチジンでタグされた組み換えタンパクと反応した抗体を誘導したことを示す。

【表 8】

10

20

30

<表3> ヒト血清及び S. ピオゲネス 抗原調製物により免疫化後のマウスから集められた血清と S. ピオゲネス のヒスチジンでタグされた融合組み換えタンパクとの免疫プロットにおける反応性

精製された組み換えタンパク名 ¹	見かけの分子量 (kDa) ²	免疫プロットにおける反応性	
		ヒト血清 ³ と	マウス血清 ⁴ と
BVH-P2	25	+	-
BVH-P3	34	+	+
BVH-P4	35	+	+
BVH-P5	34	+	+
BVH-P6	35	+	-

10

¹ 実施例 7 に記載されたように生産され、精製されたヒスチジンでタグされた組み換えタンパクを免疫プロットの実施に使用した。

² ヒスチジンでタグされた組み換えタンパクの分子量を SDS-PAGE 後に推定した。

³ 健康なヒトボランティアから採取した 2 の血清をあわせてプールし、免疫プロットを実施するために 1 / 500 に希釈した。

20

⁴ 膜タンパクに富む S. ピオゲネス 抗原調製物で免疫化後に採取されたマウス血清をプールし、免疫プロットを実施するために 1 / 500 に希釈した。これらのマウスは、致死的な S. ピオゲネス の免疫試験に対して防御された。

【 0 0 8 2 】

実施例 1 0

本実施例は、無処置のストレプトコッカス細胞表面における S. ピオゲネス BVH-P4 ポリペプチド抗体への接触性を説明する。

細菌を、0.5% イーストエクストラクト (Difco Laboratories) 及び 0.5% ペプトンエクストラクト (Merck, Darmstadt, Germany) を含む T o o d H e w i t t (T H) プロ素 (Difco Laboratories, Detroit MI) 中、37、8% CO₂ 大気中で OD_{490nm} が 0.600 (~ 10⁸ CFU/ml) となるまで増殖させた。抗-BVH-P4 又はコントロール血清の希釈物をその後加え、細胞に結合させ、これを 2 時間、4 でインキュベートした。サンプルをブロッキング緩衝液 [2% ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝食塩水 (P B S)] で 4 回洗浄し、その後 1ml のブロッキング緩衝液中のフルオレセイン (F I T C) - 抗マウス I g G + I g M ヤギ抗体複合体を加えた。室温における 60 分の追加のインキュベーションの後、サンプルをブロッキング緩衝液で 4 回洗浄し P B S 緩衝液中の 0.25% ホルムアルデヒドで 18 ~ 24 時間、4 で固定した。細胞を P B S 緩衝液中で 2 回洗浄し、500 µl の P B S 緩衝液に再懸濁した。細胞を暗所において 4 でフローサイトメトリー (E p i c s (登録商標) XL ; Beckman Coulter, Inc.) により分析するまで保存した。フローサイトメトリー分析は、BVH-P4 特異的な抗体がテストされた S. ピオゲネス の異種菌株 (A T C C 1 2 3 8 4 ; M 3 血清型) 上の表面に露出したそれらの対応するエピトープを効率的に認識したことを明らかにした。分析された 10、000 の S. ピオゲネス 細胞の 90% を越えるものが上記 BVH-P4 特異的な抗血清中に存在する抗体により標識されたことが判明した。上記 BVH-P4 ポリペプチドはそれが抗体により認識されうる表面において接触可能であると考えられる。

30

40

【 0 0 8 3 】

実施例 1 1

本実施例は、ウサギ過免疫血清によるマウス受動免疫によって誘導された致死的な S. ピオゲネス 感染に対する防御を説明する。

50

実施例 8 に記載されたように生産され、精製され、そして Alhydrogel アジュバント (Superfos Biosector a/s) に吸着されたヒスチジンでタグされた異なる S. ピオゲネス 組み換えタンパクの $50 \mu\text{g}$ 及び $100 \mu\text{g}$ を、New Zealand ウサギ (Charles River laboratories, St-Constant, Canada) の多数の部位に皮下注射する。ウサギをヒスチジンでタグされた異なる S. ピオゲネス 組み換えタンパクで、3 週間の間隔で 3 回免疫化する。3 回目の注射の 3 週間後に血液サンプルを採取する。上記血清中に存在する抗体を 40% 飽和硫酸アンモニウムを用いて沈澱により精製する。1 群あたり 10 の雌性 CD-1 マウス (Charles Rier) から成る群にヒスチジンでタグされた異なる S. ピオゲネス 組み換えタンパクで免疫化されたウサギ又は無関係のコントロール組み換えタンパクで免疫化されたウサギから採取した $500 \mu\text{l}$ の精製血清を静脈内注射する。18 時間後、上記マウスを約 2×10^7 CFU の 3 型 S. ピオゲネス ATCC 12384 株を用いた免疫試験に供する。CFU を決定し、免疫試験の用量を検証するために S. ピオゲネス 免疫試験の種菌のサンプルを血液寒天プレート上で培養する。5 日間の間、死を記録する。

10

【0084】

実施例 12

本実施例は、免疫化により誘導された致死的な S. ピオゲネス 感染に対するマウスの防御を説明する。

1 群あたり 8 の雌性 CD-1 マウス (Charles River) から成る群を、 $20 \mu\text{g}$ のアフィニティー精製された、ヒスチジンでタグされた S. ピオゲネス 組み換えタンパクを $10 \mu\text{g}$ の Quil A アジュバント (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada) の存在下、又はコントロールとして PBS 中の Quil A アジュバント単独で 3 週間の間隔で 3 回皮下に免疫化する。血液サンプルを眼窩血洞より第 1、22、43 日の各免疫化の前及び 3 回目の注射の 7 日後 (第 50 日) に採取する。2 週間後に上記マウスを約 2×10^7 CFU の 3 型 S. ピオゲネス ATCC 12384 株を用いた免疫試験に供する。CFU を決定し、免疫試験の用量を検証するために、S. ピオゲネス 免疫試験の種菌のサンプルを血液寒天プレート上で培養する。14 日間の間、死を記録する。

20

【 図 1 】

Figure 1; 配列番号:1

```

1 ATGAAAAGA CATTAACIT CTCTCTGCA CTCITGCGA TCGGGTAACT TAGTGCCTC
61 AGAGCGGAG ATGACAAAG TAGTACAGAA AAGCCAGTAA AATTTGATT GGTAGGACT
121 CACCAAAAA TTAAGATTA TTCCCTCAA GGTGCTGAG TCGTGAATA AATNARCA
181 AGTAAAGTAG TAAATATA TTCCCTCAA GGTGCTGAG TCGTGAATA AATNARCA
241 AATGAGTCT CTTAGCTCA AGATTNACA GGTGACTTT AATTTCTTA CTTAGGAGA
301 AATGAGTCT CTTAGCTCA AGATTNACA GGTGACTTT AATTTCTTA CTTAGGAGA
361 GATCCCTTGA AGAAGAGAGA AAGATTACT TTCTCATTTA AAGGAGAAGA CGGATTTAT
421 GTCCGTAGCT ATACTATAG AGACTCTGAT ACTATAAAA AAGAAAAGA ACCTGAAGA
481 GCACCTTCAA AAAAGGAGA GAAAAGCAA CAAAACAGC TAGAAGAAG CATCT'AAAG
541 CAGATAAGAG AAGAAAGCAA TAACTCTTG CATCCCGGT TAAAGTAGAG CATCCAGAT
601 CAGTGGTGA ACTTAAAGG ACTGTTTTCAG TGA

```

【 図 2 】

Figure 2; 配列番号:2

```

1 MKKTLILLIA LFAIGVTSVY EAPDESSTQ KPVAFDLGP OKRFDYGN TITLEDLYG
61 SKVKLYLPQ GNVVLYRQC DINSEKGIIL ASPLEKNIIT KDFYRQYIT GVPYILMDE
121 DPKKGRKLT FSNFSGDGF VSKLYRUSD TIKKEKENE ALQKKEENO QNLESMUK
181 QINEDHRAFV RQRJBSISIQ QWAFRGLFQ

```

【 図 3 】

Figure 3; 配列番号:3

```

1 ATGAGCCTCA TTTTGGTGC TTTTATCTI GTTTCTTII TAGTAGCTIS TTCTGCACTI
61 GGCAC'FAAA CTCCT'AGAG TATAAATTA AAGTGTGTG CACCAATTC AATPRTTGC
121 GACATGACA AAGCTRTTC TGTGTAAAA ATGACITGIC ACAGCATTT GGCATCTGC
181 GATGATGAT TGTGATGAT CATCTAGA GATGCGGCG AAGCTGTGT CACCAAACTA
241 GTGAAATAT CTCGAAATC GAAAACAAA GATTACTTIG CCGTGTCTGA TGGGATTAAT
301 GTGATTTACT TGGAAAGTGC AAGCGAAAA GAAAAGGAG ATCCAGTGC TTGGTTAAT
361 CTCGAAATC CTCGAAATC GAAAACAAA GATTACTTIG CCGTGTCTGA TGGGATTAAT
421 ATAAACAAAG AATCTATGA AAGAAGCTTA AAGACTTATG TGGTAAATTT GAAAAACTA
481 GACAAGGAG CCAATCAAA ATTTGATCT ATTGGGAAA ATPAAAAAT GATTTGACT
541 AGTAAGGCT GCTTCAGTA TTTTCAAAA GCTTAGGFG TCCCATCTG TTAATCTGG
61 GAATATACA CCGAGAGAA AGHAAACA GATCAATTT TCGATAGC CCHAA'GAA
66 GATGATGAT TGTGATGAT CATCTAGA GATGCGGCG AAGCTGTGT CACCAAACTA
721 ACTGTTCTA AAGTATGTC TATTCCTATT TTTCTGAGA TCTTACAGA TTAATTTCT
841 AAAAAAGTA AAGCTGAGG TAAATTAAT GCTATGATGA AATGGAACCT TGCAAAAT
901 TCTGAAGTIC TAGCAAAATA A

```

【 図 4 】

Figure 4; 配列番号:4

```

1 MSLLIGAFIS VELLVACSEI GTTKAKSDKL KVAIVNSLIA DMTRAIAGDK IDLHSLVPIG
61 QDPHEIEIPL EDVETKSMAD VIFPHINLE DGGQWPTKL KSMACMERK DIFANSDGID
121 GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG
181 KEAKSKEFA IAKNKLLVIT SECKEYPSK AYGVPSAYIA EINTSEETP DOLSSLEKL
241 KVIKPSALFV ESSVDRPME TVSKDSGIFI YSEI'FVDSIA KIGKFGDSYV AMKKNLDKI
301 SEGLAK

```

【 図 5 】

Figure 5; 配列番号:5

```

1 ATGAAACAGA AATTATATGG TCTTGCTTVA GCTTCAATGG CTTGCTGAG TTATAGCTCT
61 TGGGTATAC GTGGTCTTG TAAAGTGGG GCATCAGGA AACCTGATTT AAAAGTTGA
121 AAGGTACCG AACTGCTGG TTAGATGAC AAATCAATCA ACATCAGC ATGGGAAGCG
181 CTCAACTCT GGGTAAGA AATGGGCTT CAAAAGGA CAGTTTCCA TTATTTTCAA
241 TCTACAAGT AACTGATA TGCACACTAT CTCGATAGC CAGTTTCCG AGGTATCAA
301 CTGATTTAG GTATCGGTT TGCATTGAAA GATCTATTG CTAAAGGAG TGGAGTAAAT
361 GAGAGTTTA AGTTTGTAT TATGATGAT ATTATGAAG GAAGATRA TGTACCAAT
421 GTTACCTTTG CTTTCTGTTA GCGGCGCTT ATCGAAGCA CTGCTATAC TCGATTTG
481 TATGCTTTG CTTTCTGTTA GCGGCGCTT ATCGAAGCA CTGCTATAC TCGATTTG
541 AAGGTTTTC AASCAGSAGT TAAGTCTGTT GAACATCCA TCCGAGTTAA AGTTGATTA
601 CTGAGATCA TTGTTGAGCG TCCAAAGGA AAAACATCC CAGCAGTCA GTATGACGA
661 GCTGCTGATG TTATTTACCA GGCACAGGA GGCACCTGGG CAGGTGTATT TATGACGA
721 AAAGCTATA ATGAAAACG TAGTGAAGT GATAAAGTT GCGTTATTGG TGTGACCGT
781 GATCAAAAG ACGAAGAA ATACACTTCT AAGATGCGA AAGAAACAAA CTTTGTACT
841 GATCAAAAG ACGAAGAA ATACACTTCT AAGATGCGA AAGAAACAAA CTTTGTACT
901 AAAAAATCC CTGGAGAAA AACACTGTC TATGCTTAA AGATGGCGG TGTGAAATC
961 AAAAAATCC CTGGAGAAA AACACTGTC TATGCTTAA AGATGGCGG TGTGAAATC
1021 AATCTGTTG ACNTATAGT TCTGTGAAA TAG

```

【 図 6 】

Figure 6; 配列番号:6

```

1 MNKKEIGEL ASVAVLELAA CONRSASNG ASCKTDLVA WYITGGVDD KSFNSAMEG
61 KQKPKRAN KQKPKRAN LPTAASAKIT KTKTUVGK MEGTUTLPR
121 KQKPKRAN KQKPKRAN LPTAASAKIT KTKTUVGK MEGTUTLPR
181 KGFSAVAV DDTIOVVDY AGSFDAKGS KTLAAGQYAA GADYVQAG OTGAGVFNBA
241 MAINEKREEA DKWVIGVDR DQKDEGKVTG KQKKEAFVL ASSIKEVGA VOLINKQVAD
301 KXFPQKTV YGLKGGVVEI ATTVSKEAV MAIKSAKAKI KSGDIKVEK

```

【 図 7 】

Figure 7; 配列番号:7

```

1 ATGAAACAAA AAGTAAATGTC ACTTGGTCTT SFTTCACTG CCRATTCAC ATTASAGGC
61 TGTACCAATA ACTCCCTAAA ACMAACACT GACATTCAT TAAAATCCG TATGATPACT
121 AATCAGACGG GATTTATGTA CAGTCAATTT AACGATCAG CTTGGAGAG CTRAGAGCT
181 TGGGAAGAG AATGCAATTT CTTGATGTA CAGTCAATTT AACGATCAG CTRAGAGCT
241 TGGGAAGAG AATGCAATTT CTTGATGTA CAGTCAATTT AACGATCAG CTRAGAGCT
301 GGGATGGAT TTCCATACA TGAAGCTGTA GAAAAGTAG CCGCAACA TCTTGACAAC
361 GATTTGCAA TTGATGATA TGTGATATA GGTCAAAAA ATGTTGCAAG TATCACCTTT
421 TCAGACATG AAGGGCATA CTTCCAGCGT GTTCCAGCAG CTMAACGAC AAAAACCAAG
481 CAAAGTTGGT TTGATGGTG TATGGAAGTA GATTTGTTCA ASCCTTTGA TCCAGGTTT
541 GAAAGTTGGT TGAATCAGT AGATGATCC ATCAAAATTA GATTTGTTCA TCCAGGTTT
601 TTGCAATG TTGCCAAGG CAAGCCGAT GAGCTGTCT ATACGCTGA AGGCGRAT
661 GTTATTTAT ATGCCAGG ASGKACAGG CCGGTTTCT TTAGCAACC TACGATTA
721 GAGATGATA AATGCTGTA AAGATGAGC AAGTCACTA ATTTTTITTT GACCTCAAT
781 GAGATGATA AATGCTGTA AAGATGAGC AAGTCACTA ATTTTTITTT GACCTCAAT
841 ATCAGAGAG TGGGAAGC TTITGATAAA GTAGCGGTTA AAACTCAGA AGACCAATC
901 CAAAGTTGGT TGAATCAGT AGATGATCC ATCAAAATTA GATTTGTTCA TCCAGGTTT
961 CTTCTGACAC AAGACACTAA AAAAGCTATT GAGCTTCTTA AAAAAGCGT TATCAGGAA
1021 ACCATCACAG TTCCTGAAA CTA

```

【 図 8 】

Figure 8; 配列番号:8

```

1 MNKKEIGEL VSTRFLPLGG CTMNSAKQTT DNSIKIAMI NQSIDDKSF NQSAWELQ
61 KQKPKRAN KQKPKRAN LPTAASAKIT KTKTUVGK MEGTUTLPR
121 KQKPKRAN KQKPKRAN LPTAASAKIT KTKTUVGK MEGTUTLPR
181 EAGVAVDIT IKRVAVAGS FDBAKGKTI AQAQVAGSD VLVBAAGTG AOVFSEKSI
241 NEKREEDAV WLVGVDRDQS EDGKYTKDG KSAFVLTSB IKEVGALVX VAUKTSBQF
301 PGGQITTFGL KEGGVSUTLD ALTDQTKAI EAAKKALIEG TITVPE

```

【 図 9 】

Figure 9: 配列番号:9

```

1  ATGAGAGAAA GATGGTATTC  AGCTTACGCT  GGGTATGCG  GAGAGTACAG  TTTATATGTTT
61  TCGAGAGTAA  GAGCTTATTC  TTTAGAGAT  AGTATGAGG  CTAATCAGAG  GATTATAGAT
121  TCGAGAGTAA  GAGCTTATTC  TTTAGAGAT  AGTATGAGG  CTAATCAGAG  GATTATAGAT
181  AACTTCACCT  AAGSTGSAAG  TGTATTTTCC  GTTTCGAGCA  AAGGAGTTAC  TCTCCAGACA
241  GATATTACCA  AAGATTCAA  TGGAAAGAC  GATTCCTTT  TTTGTAACCA  AGATATGAT
301  AATATGCTTC  ACTGTGTGT  CGATCAAAAC  TTAAGACAAA  TTAAGACAAA  TTTGGAAGAG
361  CATCCAGAAA  AGCAAAAAT  AAATTCMAI  GGGAAAGAA  TGTTCAGCT  AAGAAAGCT
421  TTTCCCTATC  TACTACTTA  ACGCTTGGG  ATTTTCCCT  ATCATCTAA  TGGATGCTT
481  ATGAGAGTAA  GAGCTTATTC  TTTAGAGAT  AGTATGAGG  CTAATCAGAG  GATTATAGAT
541  TTTGAGAGTC  CCGATGATTT  TTTGAGAGC  GATTTTACA  GAGGTATCA  AGTATGACT
601  TTAAGAGTAA  CCGAAGGAA  GCGTCTAGC  CTATCAGCA  CTATCAGTAA  CTTACGCTATC
661  AAACATGTTA  TAAACTGTG  GGGAGTGCAC  TTTGATTTA  ACGGGAACTT  TAAGCTATT
721  TATGTAACAG  ACTCTGATG  TAATGCTATG  ATTTGATATA  AGAAATACCT  TTTGTGTGT
781  AATTCGGCTG  GAAAGTAGC  TATTTCTGCT  AAAGAAATA  AAGAAATA  TATTTGTGT
841  CAAGTACTAG  GGTATTATAC  ACTTTCAACA  GTTGGAAATA  GATCCAAITTA  961

```

【 図 10 】

Figure 10: 配列番号:10

```

1  MEKRCYETA  AVLAATLTV  LSHDRVJAD  SFSAQFERY  SEVTPRVTS  VTKKVTTPA
61  RFTQSEDFH  AFTVANQSM  DITKTFNGD  DLICGANTQ  NMLHWFUDN  KQQRITLBE
121  QKQKQKQK  QKQKQKQK  QKQKQKQK  QKQKQKQK  QKQKQKQK  QKQKQKQK
181  TSKYSLTN  HSPFPAKSS  KQRPGLSS  VFTGQSKA  LTFBDRHEK  MKHSTDLK
241  KSLTGRALG  LSHFYANVI  NHYINLAGD  FSSNGLKAI  VTTSDSNAS  IGMKXFPVY
301  NSAGKVAISA  KEIKEDNIGA  QVLGLTLLS  GQDSMNQTN

```

【 図 11 】

Figure 11: 配列番号:11

```

1  TCTTGGTTTA  GGTGCTAGG  CTGGCTGGG  TTTAGCTGCT  TENGSTATC  GTVSTGCTTC
61  TAAAGTGGG  GGTACAGGA  AACTGATTT  AAGATTTGCA  ATGGTACCG  ATACTGTGG
121  TGFAGATGAC  AATCAATCA  ACCAATCAG  ATGGGAGGC  CTGCAATCT  GGGTAAAGA
181  AATGGGCTT  CAAMAAGGA  CAGTTTCGA  TTTATTTCA  TCTACAAGT  AATCTGAGTA
241  TGCACATPAA  CTTGATAGG  CAGTTTCAG  TGGGATCAA  CTGATTTAG  GTATGSGCT
301  TGCATGAAA  GATGCTATG  CTAAGGAGC  TGGGATPAA  GAAGGATTA  AGTTGTGAT
361  TATCGATAT  ATTATCGAG  GAARAGTAA  TTTAGCAAT  GTTACTTIG  CTGACATTA
421  AGCTGCTTA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA
481  TAACTGCTT  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA
541  TAACTGCTT  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA  TTTGAGGAA
601  TGCMAAGGA  AARCAATCG  CAGCACTGCA  GTATGAGCA  GATGCTGAT  TTTATTTACA
661  GGCAGCAGGA  GCACTGGAG  CAGGTGAT  TATGAGCA  AAGCTATTA  ATGMAAGAA
721  TATGTAACAG  AAGTAAAGT  GGTATTTGG  TTTGACTT  GCATCATCA  TCAAGAAAT
781  ATACACTTCT  AAGATGCTA  AAGAAAGAA  CTTTGTACT  GCATCATCA  TCAAGAAAT
841  TGTAAAGCT  GTTCAATTA  TCAACAAKA  AGTAGAGAT  AAAAAATCC  CTGGAGAAA
901  AACACATGTC  TATGCTCTAA  AGATGGGGG  TCTTGTGANT  GNACTACCA  ATGTTTCAAA
961  AGAACCTGTT  AAGCCTATTA  AAGAGAGGA  AGC

```

【 図 12 】

Figure 12: 配列番号:12

```

1  LGLAVAVLS  LAACNRGAS  KGRASGKDL  KVAVTDTGG  VDKKSFNQA  WESLQSEKRE
61  HGLQKQK  VLSGKQK  VLSGKQK  VLSGKQK  VLSGKQK  VLSGKQK
121  VLSGKQK  VLSGKQK  VLSGKQK  VLSGKQK  VLSGKQK  VLSGKQK
181  KSVDTLQVK  VDYAGFEDA  AKKKTARQ  YAAAGAVLQ  AAGSTGAGVF  NEMALNEKR
241  SEADKVMVIG  VDRQKQSEK  VTSKQKREAN  FYLASSIIEV  GKAVOLINQ  VADKKFPGGK
301  TTVYGLKQGG  VELATTNWSK  EAVKAIKEAK

```

【 13 】

Figure 13; 配列番号:13

```

1 TCTTGGTTTA GCGTCAGTGG CTGTCGTGAG TTTAGTGTCT TGTGGTATC GTGGTCTTC
61 TAAAGTGGG GCACGAGAA AAATGRTT AAAGTTTCA ATGGTTACG ATAGTSTG
121 TGTAGATGAT AAATCAITCA ACCAATCAGC ATGGGAAGCC CTGCAATCTT GGGTAAAGA
181 AATGGCCCTT CAAAAGGAA CAGGTTTCCA TTAITTTTCA TCTACAGTG AATCTGAGTA
241 TGCAGACTAT CTGGATACG CAGTTTCAGG AGGATATCAA CTGATTTATG GTATCGGTT
301 TGCATGAAA GATGCTATG CTAAGCAGG TGGAGATAT GAGAGATTA AGTTTGTAT
361 TCAATGAAA GATGCTATG CTAAGCAGG TGGAGATAT GAGAGATTA AGTTTGTAT
421 AGCTGCTTAT CTGGAGGAA TTGCGCTG CTAAGCAGG TGGAGATTA AGTTTGTAT
481 CGTGGGGGCT ATGGAGGAA TTGCGCTG CTAAGCAGG TGGAGATTA AGTTTGTAT
541 TAAATCTGTT GACGATACAA TCCAGTTAA AGTTGATTA GCTGGATCAT TTGGTACGC
601 TCCAAAAGG AAAAAATCG CAGCAGTCA GTATGACCA AAGCTTATA ATGAAAACG
661 GCGACAGGA GCGACTGGG CAGGTTTAT TAAITGACCA AAGCTTATA ATGAAAACG
721 TAGTGAAGCT GATAAAGTT GGGTTATGG TTTGACCTT GATCAATCAA TCAAGAGAT
781 ATACCTTCTT AAAGATGCA AAGAGCAAA CTTTGTACTT AAATAATTCG CTGGAGGAA
841 TCAAGTCTAT TATGCTTAA TAGAGTGGG TGTGGATC GCACACTACAA ATGTTTCAAA
901 AACAGCTGCT TATGCTTAA TAGAGTGGG TGTGGATC GCACACTACAA ATGTTTCAAA
961 AAGAGCTGTT AAAGCTTATA AAGAGGCGAA AGC

```

【 14 】

Figure 14; 配列番号:14

```

1 LGLASVAVLS LAACGNGRAS KGGAGKTDL KVAWVTDGQ VDKSFNOSA WEGLSNGRKE
61 MGLQKSTGPD YFQSTSESEY ATNLDITAVSG GYQLVIGIF ALADALAKAA GDNBSGVRFVI
121 IDDLIEGKON VASVTFADHE AAYLAGIAAA KTKTKTVGF VCGMECTVIT RFEKGFAGV
181 KSVDDTQVK VDYAGSFGDA AKGKTIAMQ YARGNDVIYO AAGGTGAGVF NEAKAFNEER
241 SEADKVVWIG VDRQKQDEK YTSKQKHEAN FVLASSINEY GRVQLINKQ VADKRFPGK
301 TTVYGLKDGQ VEIATTVSK EAVKAIKEAK

```

【 15 】

Figure 15; 配列番号:15

```

1 TCTTGGTTTA GCGTCAGTGG CTGTCGTGAG TTTAGTGTCT TGTGGTATC GTGGTCTTC
61 TAAAGTGGG GCACGAGAA AAATGRTT AAAGTTTCA ATGGTTACG ATAGTSTG
121 TGTAGATGAT AAATCAITCA ACCAATCAGC ATGGGAAGCC CTGCAATCTT GGGTAAAGA
181 AATGGCCCTT CAAAAGGAA CAGGTTTCCA TTAITTTTCA TCTACAGTG AATCTGAGTA
241 TGCAGACTAT CTGGATACG CAGTTTCAGG AGGATATCAA CTGATTTATG GTATCGGTT
301 TGCATGAAA GATGCTATG CTAAGCAGG TGGAGATAT GAGAGATTA AGTTTGTAT
361 TCAATGAAA GATGCTATG CTAAGCAGG TGGAGATAT GAGAGATTA AGTTTGTAT
421 AGCTGCTTAT CTGGAGGAA TTGCGCTG CTAAGCAGG TGGAGATTA AGTTTGTAT
481 CGTGGGGGCT ATGGAGGAA TTGCGCTG CTAAGCAGG TGGAGATTA AGTTTGTAT
541 TAAATCTGTT GACGATACAA TCCAGTTAA AGTTGATTA GCTGGATCAT TTGGTACGC
601 TCCAAAAGG AAAAAATCG CAGCAGTCA GTATGACCA AAGCTTATA ATGAAAACG
661 GCGACAGGA GCGACTGGG CAGGTTTAT TAAITGACCA AAGCTTATA ATGAAAACG
721 TAGTGAAGCT GATAAAGTT GGGTTATGG TTTGACCTT GATCAATCAA TCAAGAGAT
781 ATACCTTCTT AAAGATGCA AAGAGCAAA CTTTGTACTT AAATAATTCG CTGGAGGAA
841 TCAAGTCTAT TATGCTTAA TAGAGTGGG TGTGGATC GCACACTACAA ATGTTTCAAA
901 AACAGCTGCT TATGCTTAA TAGAGTGGG TGTGGATC GCACACTACAA ATGTTTCAAA
961 AAGAGCTGTT AAAGCTTATA AAGAGGCGAA AGC

```

【 16 】

Figure 16; 配列番号:16

```

1 LGLASVAVLS LAACGNGRAS KGGAGKTDL KVAWVTDGQ VDKSFNOSA WEGLSNGRKE
61 MGLQKSTGPD YFQSTSESEY ATNLDITAVSG GYQLVIGIF ALADALAKAA GDNBSGVRFVI
121 IDDLIEGKON VASVTFADHE AAYLAGIAAA KTKTKTVGF VCGMECTVIT RFEKGFAGV
181 KSVDDTQVK VDYAGSFGDA AKGKTIAMQ YARGNDVIYO AAGGTGAGVF NEAKAFNEER
241 SEADKVVWIG VDRQKQDEK YTSKQKHEAN FVLASSINEY GRVQLINKQ VADKRFPGK
301 TTVYGLKDGQ VEIATTVSK EAVKAIKEAK

```

【 17 】

Figure 17

700294 1 TCTTGGTTTAGCGTCACTGGCTGTCTGAGTTTAGCGTCTTGTGGTAATC 50
 12384 1 TCTTGGTTTAGCGTCACTGGCTGTCTGAGTTTAGCGTCTTGTGGTAATC 50
 SPY67 1 TCTTGGTTTAGCGTCACTGGCTGTCTGAGTTTAGCGTCTTGTGGTAATC 50
 B514 1 TCTTGGTTTAGCGTCACTGGCTGTCTGAGTTTAGCGTCTTGTGGTAATC 50

700294 51 GTGGTGCCTTCAAAGTGGGGCATCAAGAAAACGATTTAAAAGTTGCA 100
 12384 51 GTGGTGCCTTCAAAGTGGGGCATCAAGAAAACGATTTAAAAGTTGCA 100
 SPY67 51 GTGGTGCCTTCAAAGTGGGGCATCAAGAAAACGATTTAAAAGTTGCA 100
 B514 51 GTGGTGCCTTCAAAGTGGGGCATCAAGAAAACGATTTAAAAGTTGCA 100

700294 101 ATGGTTACCGATCTGGTGGTGTGATGACAAATCAATCAACCAATCAGC 150
 12384 101 ATGGTTACCGATCTGGTGGTGTGATGACAAATCAATCAACCAATCAGC 150
 SPY67 101 ATGGTTACCGATCTGGTGGTGTGATGACAAATCAATCAACCAATCAGC 150
 B514 101 ATGGTTACCGATCTGGTGGTGTGATGACAAATCAATCAACCAATCAGC 150

700294 151 ATGGGAAGCCCTGCAATCTTGGGGTAAAGAAAGGCCCTTCAAAGGAA 200
 12384 151 ATGGGAAGCCCTGCAATCTTGGGGTAAAGAAAGGCCCTTCAAAGGAA 200
 SPY67 151 ATGGGAAGCCCTGCAATCTTGGGGTAAAGAAAGGCCCTTCAAAGGAA 200
 B514 151 ATGGGAAGCCCTGCAATCTTGGGGTAAAGAAAGGCCCTTCAAAGGAA 200

700294 201 CAGGTTTGCATATTTTCAATCTCAAGTGAATCTGAGTATGCAACTAAT 250
 12384 201 CAGGTTTGCATATTTTCAATCTCAAGTGAATCTGAGTATGCAACTAAT 250
 SPY67 201 CAGGTTTGCATATTTTCAATCTCAAGTGAATCTGAGTATGCAACTAAT 250
 B514 201 CAGGTTTGCATATTTTCAATCTCAAGTGAATCTGAGTATGCAACTAAT 250

700294 251 CTCGATACAGCAGTTTCAGGAGGATCAACTGATTTATGGTATCGGCT 300
 12384 251 CTCGATACAGCAGTTTCAGGAGGATCAACTGATTTATGGTATCGGCT 300
 SPY67 251 CTCGATACAGCAGTTTCAGGAGGATCAACTGATTTATGGTATCGGCT 300
 B514 251 CTCGATACAGCAGTTTCAGGAGGATCAACTGATTTATGGTATCGGCT 300

700294 301 TGCATTGAAGATGCTATCTGCTAAGCAGCTGGAGTAATGAAGAGTTA 350
 12384 301 TGCATTGAAGATGCTATCTGCTAAGCAGCTGGAGTAATGAAGAGTTA 350
 SPY67 301 TGCATTGAAGATGCTATCTGCTAAGCAGCTGGAGTAATGAAGAGTTA 350
 B514 301 TGCATTGAAGATGCTATCTGCTAAGCAGCTGGAGTAATGAAGAGTTA 350

700294 351 AGTTTGTATTTATCGATGATATTCGAAGAAAGATAATGTAGCCAGT 400
 12384 351 AGTTTGTATTTATCGATGATATTCGAAGAAAGATAATGTAGCCAGT 400
 SPY67 351 AGTTTGTATTTATCGATGATATTCGAAGAAAGATAATGTAGCCAGT 400
 B514 351 AGTTTGTATTTATCGATGATATTCGAAGAAAGATAATGTAGCCAGT 400

700294 401 GTTACTTTGCGCCACCAAGCTGCTTATCTTCGCAAGATTCAGCTG 450
 12384 401 GTTACTTTGCGCCACCAAGCTGCTTATCTTCGCAAGATTCAGCTG 450
 SPY67 401 GTTACTTTGCGCCACCAAGCTGCTTATCTTCGCAAGATTCAGCTG 450
 B514 401 GTTACTTTGCGCCACCAAGCTGCTTATCTTCGCAAGATTCAGCTG 450

700294 451 AAAAAACAACAAAACAACAGTTGGTTTCCTGGGGGTATGGAAGAA 500
 12384 451 AAAAAACAACAAAACAACAGTTGGTTTCCTGGGGGTATGGAAGAA 500
 SPY67 451 AAAAAACAACAAAACAACAGTTGGTTTCCTGGGGGTATGGAAGAA 500
 B514 451 AAAAAACAACAAAACAACAGTTGGTTTCCTGGGGGTATGGAAGAA 500

700294 501 CTGTCATACTCGATTTGAAAAGGTTTGAAGCAGGAGTTAAGTCTGTT 550
 12384 501 CTGTCATACTCGATTTGAAAAGGTTTGAAGCAGGAGTTAAGTCTGTT 550
 SPY67 501 CTGTCATACTCGATTTGAAAAGGTTTGAAGCAGGAGTTAAGTCTGTT 550
 B514 501 CTGTCATACTCGATTTGAAAAGGTTTGAAGCAGGAGTTAAGTCTGTT 550

700294 551 GACGATACAATCCAAGTAAAGTTGATTAAGTGGTATCAATTTGGTACGC 600
 12384 551 GACGATACAATCCAAGTAAAGTTGATTAAGTGGTATCAATTTGGTACGC 600
 SPY67 551 GACGATACAATCCAAGTAAAGTTGATTAAGTGGTATCAATTTGGTACGC 600
 B514 551 GACGATACAATCCAAGTAAAGTTGATTAAGTGGTATCAATTTGGTACGC 600

700294 601 TGCAAAAGGAAAACAATCGCAGCAGCTCAGTATGACAGGAGTCTGTATG 650
 12384 601 TGCAAAAGGAAAACAATCGCAGCAGCTCAGTATGACAGGAGTCTGTATG 650
 SPY67 601 TGCAAAAGGAAAACAATCGCAGCAGCTCAGTATGACAGGAGTCTGTATG 650
 B514 601 TGCAAAAGGAAAACAATCGCAGCAGCTCAGTATGACAGGAGTCTGTATG 650

700294 651 TTATTACAGGCGAGCAGGAGGACTCGAGCAGGTTATTTAATGAAGCA 700
 12384 651 TTATTACAGGCGAGCAGGAGGACTCGAGCAGGTTATTTAATGAAGCA 700
 SPY67 651 TTATTACAGGCGAGCAGGAGGACTCGAGCAGGTTATTTAATGAAGCA 700
 B514 651 TTATTACAGGCGAGCAGGAGGACTCGAGCAGGTTATTTAATGAAGCA 700

700294 701 AAAGCTATTAATGAAAACGTAAGTGAAGCTGATAAAGTTTGGTATTGG 750
 12384 701 AAAGCTATTAATGAAAACGTAAGTGAAGCTGATAAAGTTTGGTATTGG 750
 SPY67 701 AAAGCTATTAATGAAAACGTAAGTGAAGCTGATAAAGTTTGGTATTGG 750
 B514 701 AAAGCTATTAATGAAAACGTAAGTGAAGCTGATAAAGTTTGGTATTGG 750

700294 751 TGTTCAGCTGATCAAAAAGCAGGAAATACACTTCTAAGATGCGA 800
 12384 751 TGTTCAGCTGATCAAAAAGCAGGAAATACACTTCTAAGATGCGA 800
 SPY67 751 TGTTCAGCTGATCAAAAAGCAGGAAATACACTTCTAAGATGCGA 800
 B514 751 TGTTCAGCTGATCAAAAAGCAGGAAATACACTTCTAAGATGCGA 800

700294 801 AAGAAGCAAACTTTGACTTGCATCATCAATCAAGAAGTCGGTAAAGCT 850
 12384 801 AAGAAGCAAACTTTGACTTGCATCATCAATCAAGAAGTCGGTAAAGCT 850
 SPY67 801 AAGAAGCAAACTTTGACTTGCATCATCAATCAAGAAGTCGGTAAAGCT 850
 B514 801 AAGAAGCAAACTTTGACTTGCATCATCAATCAAGAAGTCGGTAAAGCT 850

700294 851 GTTCAGTTAATCAACAACAGTACAGATAAAAATTCCTGGAGGAAA 900
 12384 851 GTTCAGTTAATCAACAACAGTACAGATAAAAATTCCTGGAGGAAA 900
 SPY67 851 GTTCAGTTAATCAACAACAGTACAGATAAAAATTCCTGGAGGAAA 900
 B514 851 GTTCAGTTAATCAACAACAGTACAGATAAAAATTCCTGGAGGAAA 900

700294 901 AACCACTGCTATGCTTAAAGATGCGCGTGTGAATTCGCAACTACA 950
 12384 901 AACCACTGCTATGCTTAAAGATGCGCGTGTGAATTCGCAACTACA 950
 SPY67 901 AACCACTGCTATGCTTAAAGATGCGCGTGTGAATTCGCAACTACA 950
 B514 901 AACCACTGCTATGCTTAAAGATGCGCGTGTGAATTCGCAACTACA 950

700294 951 ATGTTTCAAAGAAAGCTGTTAAAGCTATTAAGAGAGCCAAAGC 993
 12384 951 ATGTTTCAAAGAAAGCTGTTAAAGCTATTAAGAGAGCCAAAGC 993
 SPY67 951 ATGTTTCAAAGAAAGCTGTTAAAGCTATTAAGAGAGCCAAAGC 993
 B514 951 ATGTTTCAAAGAAAGCTGTTAAAGCTATTAAGAGAGCCAAAGC 993

【 18 】

Figure 18

700294 1 LGLASVAVLSLAACNRGASKGGASGKTDLKVAMVDTGGVDDKSNQSA 50
 12384 1 LGLASVAVLSLAACNRGASKGGASGKTDLKVAMVDTGGVDDKSNQSA 50

SPY67 1 LGLASVAVLSLAACNRGASKGGASGKTDLKVAMVDTGGVDDKSNQSA 50
 B514 1 LGLASVAVLSLAACNRGASKGGASGKTDLKVAMVDTGGVDDKSNQSA 50

700294 51 WELQSWKEMGLQKGTGPDYFQSTSEBYATNLDIAVSGGYQLIYIGIF 100
 12384 51 WELQSWKEMGLQKGTGPDYFQSTSEBYATNLDIAVSGGYQLIYIGIF 100
 SPY67 51 WELQSWKEMGLQKGTGPDYFQSTSEBYATNLDIAVSGGYQLIYIGIF 100
 B514 51 WELQSWKEMGLQKGTGPDYFQSTSEBYATNLDIAVSGGYQLIYIGIF 100

700294 101 ALKDAIARAAGDNBSKVFV1DDIIEGKDNVAVSVPADHEAAYLAGIAAA 150
 12384 101 ALKDAIARAAGDNBSKVFV1DDIIEGKDNVAVSVPADHEAAYLAGIAAA 150
 SPY67 101 ALKDAIARAAGDNBSKVFV1DDIIEGKDNVAVSVPADHEAAYLAGIAAA 150
 B514 101 ALKDAIARAAGDNBSKVFV1DDIIEGKDNVAVSVPADHEAAYLAGIAAA 150

700294 151 KTKTKTVGVFVGMGEGTVITRFEKGFVAGVSVDDTIQKVDYAGSFGDA 200
 12384 151 KTKTKTVGVFVGMGEGTVITRFEKGFVAGVSVDDTIQKVDYAGSFGDA 200
 SPY67 151 KTKTKTVGVFVGMGEGTVITRFEKGFVAGVSVDDTIQKVDYAGSFGDA 200
 B514 151 KTKTKTVGVFVGMGEGTVITRFEKGFVAGVSVDDTIQKVDYAGSFGDA 200

700294 201 AKGKTTAAQYAAAGADVYQAAGGTGAGVFNKAKINERSEADKVVWIG 250
 12384 201 AKGKTTAAQYAAAGADVYQAAGGTGAGVFNKAKINERSEADKVVWIG 250
 SPY67 201 AKGKTTAAQYAAAGADVYQAAGGTGAGVFNKAKINERSEADKVVWIG 250
 B514 201 AKGKTTAAQYAAAGADVYQAAGGTGAGVFNKAKINERSEADKVVWIG 250

700294 251 VDRDQKDBKYSKDGKEANFVLAASSIKEVKAQVLINQVADKPPGK 300
 12384 251 VDRDQKDBKYSKDGKEANFVLAASSIKEVKAQVLINQVADKPPGK 300
 SPY67 251 VDRDQKDBKYSKDGKEANFVLAASSIKEVKAQVLINQVADKPPGK 300
 B514 251 VDRDQKDBKYSKDGKEANFVLAASSIKEVKAQVLINQVADKPPGK 300

700294 301 TTVYGLKDGVEIATTVNSKEAVKAKEAK 330
 12384 301 TTVYGLKDGVEIATTVNSKEAVKAKEAK 330
 SPY67 301 TTVYGLKDGVEIATTVNSKEAVKAKEAK 330
 B514 301 TTVYGLKDGVEIATTVNSKEAVKAKEAK 330

フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/04 (2006.01) C 1 2 Q 1/04
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D
G 0 1 N 33/569 (2006.01) G 0 1 N 33/53 N
G 0 1 N 33/569 F
- (74)代理人 100127085
弁理士 越阪部 倫子
- (74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
- (72)発明者 マルタン, デニ
カナダ国, ケベック ジー 3 エー 1 イー 9, サン - オーギュスタン - ドゥ - デスモール, 4 7 2
8 - ジェ ガブーリ
- (72)発明者 プロドゥール, ベルナル エール.
カナダ国, ケベック ジー 1 ティー 1 エヌ 6, シレリ, マリテン 2 4 0 1
- (72)発明者 アメル, ジョセ
カナダ国, ケベック ジー 1 ティー 1 エヌ 6, シレリ, マリテン 2 4 0 1
- (72)発明者 リウー, ステファヌ
カナダ国, ケベック ジー 1 イー 1 ジェイ 3, ポーポール, アブニュ デ パンソン 8 6 9
- (72)発明者 レオー, パトリック
カナダ国, ケベック ジー 6 ジェイ 1 ピー 9, サン - エティエンヌ - ドゥ - ローゾン, ベレール
4 4

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 国際公開第 9 9 / 5 2 9 3 9 (WO, A 1)
Clin.Microbiol.Rev., vol.13(3), pp.470-511 (July 2000)

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C12N 15/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq

专利名称(译)	化脓性链球菌抗原和相应的DNA片段		
公开(公告)号	JP4080876B2	公开(公告)日	2008-04-23
申请号	JP2002552000	申请日	2001-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	希雷生物化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	希雷生物化学公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾迪生物医药公司		
[标]发明人	マルタンデニ ブロドゥールベルナルエール アメルジョセ リウーステファヌ レオーパトリック		
发明人	マルタン,デニ ブロドゥール,ベルナル エール. アメル,ジョセ リウー,ステファヌ レオー,パトリック		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/315 C07K19/00 C12N1/15 C12P21/02 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/569 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/09 A61P11/04 A61P31/04 A61P39/02 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/31		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P11/04 C07K14/315 C07K2319/00 A61K39/0208 A61K39/092 A61K2039 /575 G01N33/56944 G01N2333/315 G01N2469/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/315 C07K19/00 C12N1/15 C12P21/02.C C12Q1/04 G01N33/53.D G01N33 /53.N G01N33/569.F		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 西山雅也		
优先权	60/256940 2000-12-21 US		
其他公开文献	JP2004524014A5 JP2004524014A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及抗原，更具体地涉及化脓性链球菌（也称为A组链球菌（GAS））细菌病原体的抗原，其可用作治疗和/或预防的疫苗组分。

<表A>

図17中の配列上の位置	可能性のあるヌクレオチド
74	G又はT
130	C又はT
253	C又はT
274	G又はA
412	C又はT
445	A又はG
841	T又はC
868	G又はA
917	C又はT