

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-67810

(P2009-67810A)

(43) 公開日 平成21年4月2日(2009.4.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00 ZNA	4C085
C07K 14/315 (2006.01)	C07K 14/315	4H045
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00 H	
A61K 39/09 (2006.01)	A61K 39/09	
A61P 33/10 (2006.01)	A61P 33/10	

審査請求 有 請求項の数 18 O L (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-284793 (P2008-284793)
 (22) 出願日 平成20年11月5日 (2008.11.5)
 (62) 分割の表示 特願平8-512795の分割
 原出願日 平成7年10月16日 (1995.10.16)
 (31) 優先権主張番号 PM8851
 (32) 優先日 平成6年10月14日 (1994.10.14)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア(AU)

(71) 出願人 505013561
 ザ・カウンシル・オブ・ザ・クィーンズランド・インスティテュート・オブ・メディカル・リサーチ
 オーストラリア国・クィーンズランド・4029・ハーストン・ハーストン・ロード・300
 (71) 出願人 305039998
 コモンウェルス サイエントフィック
 アンド インダストリアル リサーチ オーガニゼーション
 オーストラリア国 2602 オーストラリアン キャピタル テリトリー キャンプベル ライムストーン アヴェニュー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成ペプチドとそれを含むワクチン

(57) 【要約】

【課題】コイルドコイル構造内にエピトープをマッピングすることは一般的に困難である。さらに、保護エピトープは、抗体結合等による免疫学的認識のために、正しいコンホメーションで存在する必要がある。これは、安定な最少のエピトープを定義すること、並びにワクチンとしてそれを用いる際に特に重要である。

【解決手段】本発明によれば、配座エピトープから誘導された重複ペプチドが、類似した未変性のコンホメーションを備えたペプチドの内部に埋め込まれている。このアプローチは、ある領域の配座エピトープのマッピング、並びに、G A Sおよび種々の他の病原体に対するワクチン候補として最小エピトープを設計することに用いられる可能性を備えている。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 未変性コンホメーションにおいて配位 (構造) エピトープを示す第一のアミノ酸配列 ; および

(i i) 前記第一のアミノ酸配列の未変性コンホメーションと類似するフレームワークコイルドコイルコンホメーションをとり得る第二のアミノ酸配列 ;

を含むキメラペプチドであって、

前記第一のアミノ酸配列と前記第二のアミノ酸配列とが異なるペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に由来し又は基づき、且つ、前記第一のアミノ酸配列が前記配位エピトープを示すように、第一のアミノ酸配列が第二のアミノ酸配列のフレームワークコイルドコイルコンホメーション内に挿入されているキメラペプチド。

10

【請求項 2】

第二のアミノ酸配列が、ヘリックスコイルドコイルコンホメーションをとる、請求項 1 記載のキメラペプチド。

【請求項 3】

第一のアミノ酸配列が、連鎖球菌属の M タンパク質から誘導された、請求項 1 記載のキメラペプチド。

【請求項 4】

第一のアミノ酸配列が、アミノ酸配列 L R R D L D A S R E A K K Q V E K A L E [S E Q I D N O : 1]、もしくはその類似体 (analogues) に由来する B 細胞配位エピトープを含む、請求項 3 記載のキメラペプチド。

20

【請求項 5】

第一のアミノ酸配列が、Caenorhabditis elegans から誘導された、請求項 1 記載のキメラペプチド。

【請求項 6】

第一のアミノ酸配列が、アミノ酸配列 C K Q L E E K V D R L T E K L N I Q K R Q L A Q L Q D K V K [S E Q I D N O : 2 8]、もしくはその類似体 (analogues) に由来する配位 B 細胞エピトープを含む、請求項 5 記載のキメラペプチド。

【請求項 7】

第一のアミノ酸配列が、アミノ酸配列 M A Q D T A D R L T E K L N I Q K R Q L A [S E Q I D N O : 4 3] に由来する配位 B 細胞エピトープを含む、請求項 5 記載のキメラペプチド。

30

【請求項 8】

第一のアミノ酸配列が、アミノ酸配列 A D R L T E K L N I Q K R Q [S E Q I D N O : 2 6]、もしくはその類似体 (analogues) に由来する配位 B 細胞エピトープを含む、請求項 5 記載のキメラペプチド。

【請求項 9】

第一のアミノ酸配列が、アミノ酸配列 R L T E K L N I Q K R Q [S E Q I D N O : 2 7]、もしくはその類似体 (analogues) に由来する配位 B 細胞エピトープを含む、請求項 5 記載のキメラペプチド。

40

【請求項 10】

抗原ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、もしくはタンパク質の一部上の最小エピトープを決定する方法であって、

推定上のエピトープを有する前記ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、もしくはタンパク質の一部の未変性のコンホメーションを調べること、

前記ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、もしくはタンパク質の一部の、推定上のエピトープを有するペプチドフラグメントを調製すること、

前記最初のペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質に類似した未変性のコンホメーションを備えた別のペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質から誘導もしくは基づいて得られ、フレームワークコイルドコイルコンホメーションをとり得る第二のペプチド中に

50

、前記ペプチドフラグメントを、ペプチドフラグメント上の推定上のエピトープが免疫学的相互作用ができるコンホメーションで存在するように、挿入もしくは提示させること、並びに、

前記ペプチドフラグメントを免疫学的相互作用について調べることを含む方法。

【請求項 1 1】

アミノ酸配列 L R R D L D A S R E A K K Q V E K A L E [S E Q I D N O : 1] の内部から選択されたアミノ酸を備えた第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドを含み、前記アミノ酸は連鎖球菌属の M タンパク質の配位 B 細胞エピトープを構成し、前記第一のアミノ酸配列はフレームワークコイルドコイルコンホメーションに保持可能な第二のアミノ酸配列の内部に挿入され、さらに一つ以上の薬学的に使用できるキャリアおよび/または希釈剤を含む、グループ A 連鎖球菌属に対して用いられるワクチン。

10

【請求項 1 2】

アミノ酸配列 C K Q L E E K V D R L T E K L N I Q K R Q L A Q L Q D K V K [S E Q I D N O : 2 8] の内部から選択されたアミノ酸を備えた第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドを含み、前記アミノ酸は *C.elegans unc-15* タンパク質の配位 B 細胞エピトープを構成し、前記第一のアミノ酸配列はフレームワークコイルドコイルコンホメーションに保持可能な第二のアミノ酸配列の内部に挿入され、さらに一つ以上の薬学的に使用できるキャリアおよび/または希釈剤を含む、*Caenorhabditis elegans* に対して用いられるワクチン。

20

【請求項 1 3】

アミノ酸配列 M A Q D T A D R L T E K L N I Q K R Q L A [S E Q I D N O : 4 3] の内部から選択されたアミノ酸を備えた第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドを含み、前記アミノ酸は *c.elegans unc-15* タンパク質の配位 B 細胞エピトープを構成し、前記第一のアミノ酸配列はフレームワークコイルドコイルコンホメーションに保持可能な第二のアミノ酸配列の内部に挿入され、さらに一つ以上の薬学的に使用できるキャリアおよび/または希釈剤を含む、*Caenorhabditis elegans* に対して用いられるワクチン。

30

【請求項 1 4】

アミノ酸配列 A D R L T E K L N I Q K R Q [S E Q I D N O : 2 6] の内部から選択されたアミノ酸を備えた第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドを含み、前記アミノ酸は *C.elegans unc-15* タンパク質の配位 B 細胞エピトープを構成し、前記第一のアミノ酸配列はフレームワークコイルドコイルコンホメーションに保持可能な第二のアミノ酸配列の内部に挿入され、さらに一つ以上の薬学的に使用できるキャリアおよび/または希釈剤を含む、*Caenorhabditis elegans* に対して用いられるワクチン。

40

【請求項 1 5】

アミノ酸配列 R L T E K L N I Q K R Q [S E Q I D N O : 2 7] の内部から選択されたアミノ酸を備えた第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドを含み、前記アミノ酸は *c.elegans unc-15* タンパク質の配位 B 細胞エピトープを構成し、前記第一のアミノ酸配列はフレームワークコイルドコイルコンホメーションに保持可能な第二のアミノ酸配列の内部に挿入され、さらに一つ以上の薬学的に使用できるキャリアおよび/または希釈剤を含む、*Caenorhabditis elegans* に対して用いられるワクチン。

40

【請求項 1 6】

抗体に認識されるペプチド、ポリペプチド、タンパク質、若しくはタンパク質の一部における両親媒性ヘリックスの領域をマッピングする方法であって、推定上のエピトープを有する前記ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、もしくはタンパク質の一部の未変性のコンホメーションを調べること、前記ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、もしくはタンパク質の一部の、推定上のエピトープを有するペプチドフラグメントを調製すること、前記最初のペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質に類似した未変性のコンホメーションを備えた別のペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質から誘導もしくは基づいて得られ、フレームワークコイルドコイルコンホメーションをとり得る第二のペプチド中に

50

、前記ペプチドフラグメントを、ペプチドフラグメント上の推定上のエピトープが免疫学的相互作用ができるコンホメーションで存在するように、挿入もしくは提示させること、次いで、

前記ペプチドフラグメントを免疫学的相互作用について調べることを含む方法。

【請求項 17】

前記第一のアミノ酸配列が、配列番号 23 から 34 のいずれか 1 つで表わされる配列からなる、請求項 1 記載のキメラペプチド。

【請求項 18】

配列番号 13 から 21 のいずれか 1 つで表わされる配列からなる、請求項 1 記載のキメラペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

合成ペプチドとそれを含むワクチン 本願発明は、免疫学的相互作用を可能にする形態に一つ以上の保護エピトープを含むキメラペプチド、およびそれを含むワクチン組成物に関連する。本発明は、特に、グループ A 連鎖球菌属に対する保護抗体を含むキメラペプチドに向けられている。

【0002】

本願明細書に記載された参考文献の詳細は、この記載の最後にまとめられている。明細書中に記載されたアミノ酸配列の配列番号 (SEQ ID NO) は、参考文献の次に定義されている。

【0003】

この明細書を通じて、文脈に別のことが要求されない限り、用語“含む (comprise)”、あるいはその変形である“含む (comprises)”または“含む (comprising)”は、定められた要素もしくは完全体あるいは要素もしくは完全体の群の含有を意味するが、他の要素もしくは完全体または要素もしくは完全体の群の排除を意味するものではないと解する。

【0004】

いくつかの疾患に対して使用できるワクチン候補多くのタンパク質が、コイルしたコイル構造 (コイルドコイル構造 (a coiled-coil structure)) を備え、構造的に重要で生物学的に豊富なモチーフが、種々のグループのタンパク質に見出された (Cohen と Parry, 1990, 1986)。200 以上のタンパク質が、コイルドコイルドメインを含むと推定されている (Lupas ら, 1991)。これらは、連鎖球菌属のプロテイン A および M タンパク質等のある種のバクテリアの表面タンパク質; インフルエンザ等のウイルス赤血球凝集素、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 糖タンパク質 gp45; およびトリパノソーマ (Trypanosomes) の VSG 等のプロトゾアを含む。全てのコイルドコイルモチーフは、特徴的な 7 つのアミノ酸残基の繰り返し (a-b-c-d-e-f-g)_n を有する。いくつかのコイルドコイルドメインの X 線構造が得られ、これらは、酵素の転写因子 GCN4 ダイマーのロイシンジッパー部位 (O'Shea ら, 1991) - スペクトリンの繰り返しモチーフ (Yan, 1993) を含み、GCN4 ロイシンジッパートリマー (Harbury ら, 1994) および テトラマー (Harbury ら, 1993) 変異体をともなう。

【0005】

これらのタンパク質に基づくサブユニットワクチンの開発において、コイルドコイル構造内にエピトープをマッピングすることは一般的に困難である。さらに、保護エピトープは、抗体結合等による免疫学的認識のために、正しいコンホメーションで存在する必要がある。これは、安定な最少のエピトープを定義すること、並びにワクチンとしてそれを用いる際に特に重要である。

【背景技術】

【0006】

グループ A 連鎖球菌属 (以降“GAS”と称する) は、いくつかのヒト疾患の原因であ

10

20

30

40

50

り、深刻な熱病を引き起こす急性リウマチ熱を導くことがある。リウマチ熱は、連鎖球菌属のMタンパク質と心臓の抗原との間の交差相互作用によって開始される自己免疫疾患を示す(Beacheyら, 1988)。Mタンパク質は、七つの残基の周期を含み、これは、この分子の中心的なロッド領域がコイルドコイルコンホメーションであることを強力に示唆している(ManulaとFischetti, 1980)。この領域にまたがるオーバーラップしたペプチドが作製されており(国際特許出願PCT/AU93/00131[W093/21220]を参照)、高度に保存されたC末端領域に由来する合成20マーペプチド("p145"と称される)に対して産生されたマウス抗体は、オプソニン作用を促進してGASの多重単離物を殺すことが可能である。さらに、p145は、ヒト血清に仲介されたin vitro殺傷を阻害することが可能である。重要なことは、p145が心臓交差反応性T細胞をも刺激してしまうことである(Pruksakornら, 1992; 1994b)。

10

【0007】

切断されたペプチドが保護抗体反応を引き出せないことから、p145内のB細胞エピトープは配座し得る(conformational)と考えられる(Pruksakorn, 1994)。それゆえ、オプソニン作用を有する抗体を誘導するのに必要とされるp145の最小領域を定義する必要があり、これはワクチンの基礎を形成することができる。このような方法は、病原体のタンパク質のある領域から最小エピトープ領域を同定することを可能にする。

【0008】

抗原から最小のエピトープをマッピングするために用いられてきた一つの方法が、PEPSCAN法(Geyssenら, 1987)である。しかしながら、短いペプチドを用いた場合には、連続的なエピトープを示すのみである。配座エピトープ(conformational epitopes)、すなわちタンパク質の3次元構造によって形成されたエピトープ、を決定する別の方法は、ミモトープ法(mimotope strategies)による。ミモトープは、抗体を誘導するエピトープを模造したものである。ペプチドは、20の普通のアミノ酸を用いて作製されるオクタペプチドの全レパートリー、すなわち20⁸ペプチドをカバーするポリプロピレンのピンに合成することができる(Geyssenら, 1987)。

20

【0009】

あるいは、繊維状ファージクローンの莫大な混合物からなるエピトープライブラリーであって、ビリオン表面に一つのペプチド配列をそれぞれ示すものを、抗体認識について調べることができる(scottとsmith, 1990)。

30

【特許文献1】国際特許出願PCT/AU93/00131

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本願発明によれば、配座エピトープから誘導された重複ペプチドが、類似した未変性のコンホメーションを備えたペプチドの内部に埋め込まれている。このアプローチは、ある領域の配座エピトープのマッピング、並びに、GASおよび種々の他の病原体に対するワクチン候補として最小エピトープを設計することに用いられる可能性を備えている。

【0011】

従って、本願発明の一つの態様は、第二のアミノ酸配列に挿入された配座エピトープを含む第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドであり、前記第一および第二のアミノ酸配列は、類似した未変性のコンホメーションを備えたペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質から誘導される。

40

【0012】

本発明の態様によれば、第二のアミノ酸配列は“フレームワークペプチド”を構成し、キメラペプチドに適切なコンホメーションを提供する。フレームワークペプチドは、自然に生じる形態で最初のアミノ酸配列に類似したコンホメーションを提供するために、選択もしくは設計される。最も好ましい実施態様では、フレームワークペプチドは、ヘリックスコイルドコイルコンホメーションをとるものであり、それゆえ、類似したコンホメーション、すなわちヘリックスコイルドコイルコンホメーションで第一のアミ

50

ノ酸配列に存在するエピトープを提示するのに使用することができる。

【0013】

本願発明の好ましい態様によれば、第二のアミノ酸配列内に挿入された配座エピトープを含む第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドが提供され、前記第二のアミノ酸配列は - ヘリックスコイルドコイルコンホメーションに保持される。

【0014】

本願発明を、連鎖球菌属のMタンパク質から誘導され、特に以下のアミノ酸配列(アミノ酸残基の一文字略記を使用): LRRDL D A S R E A K K Q V E K A L E (S E Q I D N O : 1) もしくは、これらのアミノ酸残基の一つ以上の機能的および/または化学的等価物の内部のB細胞配座エピトープを含む第一のアミノ酸配列を用いて、以下に例示する。

【0015】

従って、本願発明の特に好ましい実施態様は、以下の配列 LRRDL D A S R E A K K Q V E K A L E (S E Q I D N O : 1) の内部から選択された少なくとも3つのアミノ酸を備えた第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドに向けられ、前記少なくとも3つのアミノ酸は、連鎖球菌属のMタンパク質の配座B細胞エピトープを構成し、前記第一のアミノ酸配列は、 - ヘリックスコイルドコイルコンホメーションに保持することができる第二のアミノ酸配列の内部に挿入されている。好ましくは、第一のアミノ酸配列は、少なくとも5、好ましくは少なくとも10、そしてさらに好ましくは少なくとも15の連続するアミノ酸残基を含む。

【0016】

あるいは、ヘリックスの外表面上等であって、活性に必要もしくは十分である様な、不連続のアミノ酸を選択してもよい。

【0017】

フレームワークペプチドの構成は、七つのアミノ酸残基の繰り返し (a-b-c-d-e-f-g)_n に基づくものであって、aとdの位置は好ましくは大きな無極性残基を備え、b、cおよびfの位置は一般的に極性かつ帯電しており、eおよびgの位置は一般的に鎖間のイオン相互作用に寄与する。特に好ましいフレームワークペプチドは、GCN4ロイシンジッパー (O Sheaら, 1989; 1991) もしくはそのトリマー (Harbury ら, 1994) またはテトラマー (Harbury ら, 1993) および - スペクトリンの繰り返しモチーフ (Yan, 1993) に対応するペプチドの構造に基づく。GCN4ロイシンジッパーは特に好ましく、GCN4ロイシンジッパーペプチドに共通の特徴から誘導された模範的な7つの繰り返し (a model heptad repeat) は、以下の配列: V K Q L E D K (S E Q I D N O : 2) を含み、これは、ここで (GCN4)₄ と称される4つの7つの繰り返しのフレームワークペプチドを与える。要求されるものは、フレームワークペプチドが、もはや4つの繰り返しより長くすることができること、もしくはそうする必要のあるかもしれないことである。

最初のアミノ酸配列は、キメラペプチドを与えるフレームワークコイルドコイルペプチドの内部に埋め込まれる。

【0018】

本願発明のキメラペプチドは、組換え手段で産生することができ、また、例えば、固相ペプチド合成技術を用いて、決められた順番で一つ以上のアミノ酸残基を段階的に付加して化学的に合成しても良い。ペプチドを他のタンパク質と組み合わせて合成し、次いで化学的切断によって単離してもよく、また、ペプチドもしくは多価ペプチドを多重繰り返しユニットで合成してもよい。ペプチドは、未変性に生じるアミノ酸残基を含んでもよく、また、D型異性体もしくは化学的に修飾された未変性残基のように未変性には産生されないアミノ酸残基を含んでも良い。未変性には生じないアミノ酸残基は、例えば、ペプチドに配座の束縛および/または限定を促進または提供する必要があるかもしれない。主題のペプチドを産生する方法の選択は、ペプチドの所望のタイプ、量および純度等のファクター、並びに産生の簡便さおよび便利さによる。

10

20

30

40

50

【0019】

ペプチドそのものが十分に長い血清および/または組織半減期を備えていないために、本願発明のキメラペプチドは、*in vivo* で用いるための化学的な修飾を最初に必要とするかもしれない。主題のペプチドの化学的修飾は、ペプチドのある領域が、Bおよび/またはT細胞エピトープとして作用する能力を含めた抗原性を改良するためにも重要である。このように化学的に修飾されたキメラペプチドは、ここでは“類似体(analogues)”と称する。用語“類似体”は、本願発明のキメラペプチドのあらゆる機能的な化学的もしくは組換え等価物にまで拡張され、最も好ましい実施態様では、GASのMタンパク質の少なくとも一つのB細胞エピトープを備え、かつ、B細胞エピトープに反応する抗体がヒトの心臓の組織と最小限に反応することを特徴とする。用語“類似体”は、上記ペプチドのあらゆるアミノ酸誘導体にまで拡張して用いられる。

10

【0020】

ここで考慮されるキメラペプチドの類似体は、側鎖の修飾、ペプチド合成中における未変性に生じないアミノ酸および/またはその誘導体の取り込み、並びにペプチドもしくはその類似体における配座を束縛する架橋剤および他の方法の使用を含むが、これらに限定されるものではない。

【0021】

本発明で考慮される側鎖修飾の例は、アルデヒドとの反応の後にNaBH₄を用いて還元する還元的アルキル化；メチルアセチミダート(methylacetimidate)を用いたアミジネーション(amidination)；無水酢酸を用いたアシル化；シアナートを用いたアミノ基のカルバモイル化；2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)を用いたアミノ基のトリニトロベンジル化；無水スクシン酸および無水テトラヒドロフタル酸を用いたアミノ基のアシル化；およびピリドキサル-5'-ホスファートでリシンをピリドキシル化した後にNaBH₄を用いて還元する等のアミノ基の修飾を含む。アルギニン残基のグアニジン基を、2, 3-ブタンジオン、フェニルグリオキサルおよびグリオキサル等の試薬を用いて複素環縮合生成物を形成することによって修飾しても良い。

20

【0022】

カルボキシ基を、O-アシルソウレア(O-acylisourea)形成を介したカルボジイミド活性化の後に、例えば対応するアミドをデリビチゼーション(derivitisation)することによって修飾しても良い。

30

【0023】

スルフヒドリル基を、ヨード酢酸もしくはヨードアセトアミドを用いたカルボキシメチル化；システイン酸の過ギ酸酸化；他のチオール化合物を用いた混合ジスルヒドの形成；マレイミド、無水マレイン酸もしくは他の置換されたマレイミドとの反応；4-クロロメルクリベンゾアート、4-クロロメルクリフェニルスルホン酸、フェニルメルクリクロリド、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノールおよび他のメルクリアルを用いたメルクリアル誘導体の形成；アルカリ性pHにおけるシアナートを用いたカルバモイル化等の方法で修飾してもよい。

【0024】

トリプトファン残基を、例えば、N-ブロモスクシンイミドを用いた酸化、あるいは、2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルプロミドまたはハロゲン化スルフェニルを用いたインドール環のアルキル化で修飾してもよい。一方、チロシン残基を、テトラニトロメタンでニトロ化して3-ニトロチロシン誘導体を形成してもよい。ヒスチジン残基のイミダゾール環の修飾を、ヨード酢酸誘導体を用いたアルキル化もしくはジエチルピロカルボナートを用いたN-カルボエトキシル化(N-carbethoxylation)によって行ってもよい。

40

【0025】

ペプチド合成中における未変性のないアミノ酸および誘導体の取り込みの例は、ノルロイシン、4-アミノ酪酸、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸、6-

50

アミノヘキサ酸、t-ブチルグリシン、ノルバリン、フェニルグリシン、オルニチン、サルコシン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸、2-チエニルアラニン(thienylalanine)および/またはアミノ酸のD型異性体を含むが、これらに限定されるものではない。

【0026】

架橋結合材を、例えば、3次元コンホメーションを安定化させるために用いることができ、 $n = 1$ から $n = 6$ の $(CH_2)_n$ スペーサー基を備えた二価性のイミドエステル等のホモ二価性架橋結合材、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、およびN-ヒドロキシスクシンイミド等のアミノ反応部と、マレイミドもしくはジチオ部(SH)またはカルボジイミド(COOH)等の他の基に特異的な反応部を含むヘテロ二価性試薬が用いられる。さらに、ペプチドを配座的に強制させることもできる。例えば、C および N -メチルアミノ酸の取り込み、アミノ酸のC とC 原子間の二重結合の導入、N および C 末端の間、二つの側鎖の間、もしくは側鎖とN またはC 末端との間にアミド結合を形成するなどして、共有結合を導入することによって環状ペプチドまたは類似体を形成することもできる。

10

【0027】

しかして本願発明は、エピトープが免疫学的に相互作用し得る機能的配座状態で提供されるようなハイブリッド分子における連鎖球菌属のMタンパク質等の配座エピトープを提供する。

しかして本願発明は、抗原ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質の最小エピトープを決定する方法に係り、この方法は、前記ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質、もしくはエピトープを保有すると推定されるこれらの一部の未変性のコンホメーションを決定すること；前記ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質のペプチドフラグメントを調製すること；前記ペプチドフラグメントを、最初に言及されたペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質と似た未変性のコンホメーションを備えた別のペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質から誘導もしくは基づいて得られた第二ペプチド中に挿入もしくは提示して、ペプチドフラグメントの推定上のエピトープを、免疫学的相互作用が可能なコンホメーションで提示されるようにすること；および免疫学的相互作用について前記ペプチドフラグメントを調べることを含む。

20

【0028】

本願発明に関連する態様としては、抗体に認識されるペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質における両親媒性ヘリックスの領域をマッピングする方法を提供することであり、この方法は、前記ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質、もしくはエピトープを保有すると推定されるこれらの一部の未変性のコンホメーションを決定すること；前記ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質のペプチドフラグメントを調製すること；前記ペプチドフラグメントを、最初に言及されたペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質と似た未変性のコンホメーションを備えた別のペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質から誘導もしくは基づいて得られた第二ペプチド中に挿入もしくは提示して、ペプチドフラグメントの推定上のエピトープを、免疫学的相互作用が可能なコンホメーションで提示されるようにすること；および免疫学的相互作用について前記ペプチドフラグメントを調べることを含む。

30

40

【0029】

抗体に認識される両親媒性ヘリックスは、価値あるワクチン候補となり得る。

【0030】

両親媒性ヘリックスは、タンパク質における一般的な構造部であり、表面に曝されるか(抗原性)もしくは他のタンパク質と相互作用しうる。螺旋のコイルドコイルは、ホモダイマー、トリマーおよびテトラマーに相互作用するヘリックスのより複雑な形態である。

【0031】

“免疫学的相互作用”は、免疫細胞または免疫エフェクター細胞との相互作用のあらゆる形態、および/またはあらゆる形態の免疫応答を意味する。一般的に、免疫学的相互作用

50

用は、抗体結合もしくはペプチドフラグメントとの相互作用によって測定される。しかしながら、免疫学的相互作用は、細胞性免疫応答を測定することにも拡張される。

【0032】

治療および診断の開発においては、免疫学的相互作用を提供することができ、かつ、治療において保護免疫反応を誘導し得る最小エピトープを決定することが重要である。従って、本願発明のキメラペプチドは、その製造方法も含めて、特にワクチンの開発に使用することができる。その例示的かつ好ましい形態では、本願発明は、GASに対するワクチンに使用するためのキメラペプチドを提供する。しかしながら、これは、本願発明が、バクテリア、寄生虫、酵母、真菌および原生動物を含む病原性微生物、もしくはレトロウイルス、インフルエンザウイルス、肝炎ウイルスおよびHIV等の免疫不全ウイルス等のウイルスに対する保護免疫応答を誘導するのに使用できるキメラペプチドにも拡張することができるという理解のもとに行われる。

10

【0033】

従って、本願発明の好ましい態様は、グループA連鎖球菌属に対して使用できるワクチンを提供するものであり、このワクチンは、以下の配列；

L R R D L D A S R E A K K Q V E K A L E (S E Q I D N O : 1)

の内部から選択された少なくとも3つのアミノ酸を備えた第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドを含み、前記の少なくとも3つのアミノ酸は、連鎖球菌属のMタンパク質の配座B細胞エピトープを構成し、前記第一のアミノ酸配列は、ヘリックスコイルドコイルコンホメーションをとり得る第二のアミノ酸配列の内部に挿入され、前記ワクチンは、一つ以上の薬学的に使用可能なキャリアおよび/または希釈剤をさらに含む。このワクチンは、アジュバントおよび/または他の免疫刺激分子をさらに含んでも良い。好ましくは、第二のアミノ酸配列が、GCN4から誘導されたフレームワークペプチドを形成する。上述したように、SEQ ID NO: 1の連続もしくは非連続なアミノ酸を選択することもできる。

20

【0034】

本願発明の別の態様は、Mタンパク質に対する体液性免疫の開発に使用できるが、心臓の組織と最小限に交差反応するワクチンであって、このワクチンは、Mタンパク質の少なくとも一つのB細胞エピトープを有する第一のアミノ酸配列を含むキメラペプチドを含み、前記B細胞エピトープと反応する抗体は心臓の組織と最小限に反応する。前記第一のアミノ酸配列は、ヘリックスコイルドコイル形態をとり得る第二のアミノ酸配列の内部に挿入され、前記ワクチンは、一つ以上の薬学的に使用可能なキャリアおよび/または希釈剤をさらに含む。

30

【0035】

ワクチンは、一種類のペプチドもしくは別異もしくは類似のエピトープをカバーするある範囲のペプチドを含んでもよい。さらに、もしくは、単一のポリペプチドに多重のエピトープが設けられてもよい。この場合のワクチンは、多価ワクチンと称される。多重エピトープは、二つ以上の繰り返しエピトープを含む。

【0036】

ワクチンの作製は、当該技術分野で一般に既知であり、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, USAを参照することができる。

40

【0037】

本願発明は、薬学的組成物もしくはワクチン組成物であり、体液性免疫の発達に有効量のキメラペプチド(上記の通り)またはその誘導體、類似体もしくは相同体および/またはこれらの組み合わせを含み、他の活性分子および一つ以上の薬学的に使用できるキャリアおよび/または希釈剤を含む。キメラペプチドを含む薬学的組成物の活性成分は、例えば、特定のケースに依存した量で投与された場合に、連鎖球菌属のMタンパク質に対する抗体の発達において優れた治療活性を示すが、これらの抗体が心臓組織とは最小限の反応性を示すと考えられる。例えば、一日に体重一キログラム当たり約0.5 μg ~ 20 mg

50

を投与してもよい。

【0038】

投与方法は、最適な治療反応を提供できるように調製しても良い。例えば、投与量をいくつかに分けて毎日投与してもよく、治療状況に示されるように比例的に減少させることもできる。活性化合物は、経口、静脈内（水溶性）、筋肉内、皮下、鼻腔内、皮膚内もしくは座薬経路あるいは移植（例えば、核酸遅延分子を用いる）等の慣例的な方法で投与することができる。投与経路によっては、キメラペプチドを含む活性成分を、酵素、酸、並びに成分を不活性化する別の自然の条件の作用から前記成分を保護する材料で被覆する必要があるかもしれない。例えば、キメラペプチドの親油性が低いと、ペプチド結合を切断することのできる酵素によって胃腸で破壊され、または胃で酸加水分解される。非経口投与以外でキメラペプチドを投与するために、その不活性化を妨げるための材料で被覆するか、もしくは共に投与される。例えば、キメラペプチドを、アジュバントで投与しても、酵素阻害剤と共に投与しても、リポソームで投与してもよい。アジュバントはその最も広い意味で用いられ、インターフェロン等のあらゆる免疫刺激化合物を含む。ここで言及されるアジュバントは、レゾルシノール、ポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテル等の非イオン界面活性剤を含む。酵素阻害剤は、膵臓のトリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロホスファート（DFP）およびトラシロールを含む。リポソームは、ウォーター・イン・オイル・イン・ウォーター型エマルションおよび従来のリポソームを含む。

10

【0039】

活性化合物は、非経口的もしくは腹腔内に投与することもできる。分散物を、グリセロール、液状ポリエチレングリコールおよびこれらの混合物中に、かつ油中に調製することもできる。貯蔵および使用の通常の下では、微生物の成長を妨げるために、これらの調製物は防腐剤を含む。

20

【0040】

注入に適した薬学的形態は、無菌の注入可能な溶液または分散物の即席の調製のための、無菌の水溶液（水溶性）もしくは分散物および無菌のパウダーを含む。どの場合でも、その形態は無菌でなければならず、容易に注入できるように液体でなくてはならない。製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、バクテリアや真菌等の微生物の混入作用に対して保護されていなければならない。キャリアは、溶剤もしくは分散物媒体とすることができ、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液状ポリエチレングリコール等）、これらの適切な混合物および植物油である。例えば、リシチン(lecithin)等の被覆を使用することにより、分散物の場合には必要な粒子サイズを維持することにより、また、界面活性剤を使用することによって、適切な流動性を維持することができる。微生物の作用を妨げることは、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チルメロサル(thimerosal)等の種々の抗菌および抗カビ試薬によってもたらすことができる。多くの場合に、糖もしくは塩化ナトリウム等の等張試薬を含むことが好ましい。注入可能な組成物の長い吸収は、例えばアルミニウムモノステアレートおよびゼラチン等の吸収遅延試薬を組成物中に用いることによってもたらされる。

30

40

【0041】

無菌の注入可能な溶液は、上記とは別の種々の成分を含んだ適切な溶剤に必要な量の活性化合物を取り込み、必要であれば、濾過された滅菌を行うことによって調製される。一般的に、分散物は、種々の無菌活性成分を無菌ビヒクルに導入することによって調製され、基礎的な分散媒体と上記とは別の必要な成分を含む。

無菌の注入可能な溶液の調製のための無菌パウダーの場合には、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、活性成分のパウダーと前記無菌濾過溶液のさらなる所望の成分が得られる。

【0042】

キメラペプチドを上記のように適切に保護した場合には、例えば、不活性な希釈剤もし

50

くは吸収できる食用キャリアと共に活性化化合物を経口投与することができ、硬いもしくは柔軟な殻のゼラチンカプセルに内包することもでき、タブレットに圧縮してもよく、食事の食品に直接取り込まれても良い。経口治療投与では、活性化化合物は賦形剤と共に取り込まれてもよく、摂取できるタブレット、頬のタブレット(buccal tablets)、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウェハース等の形態で用いられても良い。このような組成物および調製物は、少なくとも1重量%の活性化化合物を含むべきである。組成物及び調製物のパーセントは、もちろん、変えることができ、ユニットの約5~80重量%の間とすることができる。このような治療に用いられる組成物の活性化化合物の量は、適切な投与量が得られるものである。本願発明に係る好ましい組成物もしくは調製物は、経口投与ユニット形態が0.1 μ g~2000mgの間の活性化化合物を含むように調製される。

10

【0043】

タブレット、トローチ、丸薬、カプセル等は以下を含んでも良い。トラガカントゴム、アカシア、コーンスターチもしくはゼラチン等の結合材；リン酸ジカルシウム等の賦形剤；コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸等の分解試薬；ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；およびスクロース、ラクトースもしくはサッカリン等の甘味料を添加しても良く、ペパーミント、ウィンターグリーン油、もしくはチェリー香料等の香料を添加しても良い。投与ユニット形態がカプセルである場合には、上記のタイプの材料に液状キャリアを含んでも良い。種々の他の材料が、コーティングとして、あるいは投与ユニットの物理的形態を修飾するために含有されてもよい。例えば、タブレット、丸薬もしくはカプセルを、セラック、糖、またはその両方で被覆しても良い。シロップまたはエリクサが、活性化化合物、甘味料としてスクロース、防腐剤としてメチルおよびプロピルパラベン、チェリーまたはオレンジの香料等の着色料および香料を含んでも良い。もちろん、あらゆる投与ユニット形態の調製に用いられる全ての材料は、薬学的に純粋で、用いられる分量で実質的に無毒であるべきである。さらに、活性化化合物を、放出持続調製物および薬剤に取り込まれてもよい。

20

【0044】

ここで用いられる“薬学的に使用できるキャリアおよび/または希釈剤”とは、あらゆる、そして全ての溶剤、分散媒体、コーティング、抗菌および抗カビ剤、等張および吸収遅延剤等を含む。このような媒体および試薬の薬学的活性物質における使用は当該技術分野において周知である。活性成分に適さない従来の媒体以外は、治療組成物においてそれらを使用することが考えられる。補足的活性成分も組成物中に取り込むことができる。

30

【0045】

投与しやすく、かつ、一定量で投与できる投与ユニット形態をとる非経口組成物を調剤することが特に有利である。ここで用いられる投与ユニット形態とは、処置される哺乳動物への一回の投与に適した物理的に独立したユニットを指す。

【0046】

各ユニットは、必要とされる薬学的キャリアとともに、所望の薬学的効果を生じるように計算された所定量の活性剤を含む。本発明の新規の投与ユニット形態についての明細は、(a)活性剤の独特の特徴および達成される特定の治療効果と、(b)ここで詳細に記載したように、健康が害される疾患状態にある患者における疾患を治療するための活性物質等を含む当該技術分野における固有の限定によって決められ、これらに直接的に依存する。

40

【0047】

主な活性成分は、都合よくかつ効果的な投与のために、上記のような投与ユニット形態で適切な薬学的に利用できるキャリアと共に有効量で調合される。ユニット投与形態は、たとえば、0.5 μ g~約2000mgの範囲の量で主な活性化化合物を含むことができる。比率で表すと、活性化化合物は一般的に約0.5 μ g~約2000mg/mlキャリアで存在する。補足的活性成分を含む組成物の場合には、投与量は、通常の投与量および前記成分の投与方法を参照して決定される。

50

【0048】

本願発明の別の態様は、キメラペプチドに対する抗体に向けられている。このような抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであってもよく、Mタンパク質に対して自然に生じた抗体から選択されても、また、キメラペプチドに対して特異的に生じたものであってもよい。後者の場合には、最初に、ペプチドをキャリア分子と結合する必要があるかもしれない。本願発明の抗体および/またはキメラペプチドは、特に免疫治療および予防接種に使用することができ、感染の診断、または予防接種もしくは治療体制の進行を観察するための道具として用いることもできる。

【0049】

例えば、キメラペプチドは、Mタンパク質に対して自然に生じた抗体を調べるために用いることができる。あるいは、特異的抗体はMタンパク質を調べるために用いることができる。このようなアッセイ技術は、当該技術分野において周知であり、例えば、サンドウィッチアッセイやELISAを含む。

10

【0050】

本願発明のこの態様に基づいて、キメラペプチドはMタンパク質に対する抗体を調べるのに特に使用可能であり、連鎖球菌属の感染を検出する診断プロトコルを提供する。また、血清、唾液、組織および組織抽出物等の生物学的サンプルを、Mタンパク質について、キメラペプチドに対して生じた抗体を用いて直接的に調べることができる。

【0051】

従って、抗体 - キメラペプチド複合体を形成するのに十分な時間および条件下で有効量のキメラペプチドを結合する抗体と、患者の生物学的サンプルとを接触させ、次いで前記複合体を検出することを含む、患者の連鎖球菌属の感染の診断方法を提供する。

20

【0052】

患者の血清、組織、組織抽出物もしくは他の体液中のMタンパク質抗体の存在を、米国特許第4016043、4424279および4018653に記載されているような広範囲の免疫アッセイ技術を用いて検出することができる。これは、非競合型の、一および二つの両方の部位の、すなわち“サンドウィッチ”アッセイと、慣例の競合結合アッセイを含む。サンドウィッチアッセイは、最も使用でき、かつ一般に用いられるアッセイであり、本願発明においても使用することが望ましい。多数の種類のアッセイ技術が存在し、その全てを本願発明に取り込む。簡単に、典型的な先のアッセイでは、キメラペプチドを固相に固定して最初の複合体を形成し、Mタンパク質抗体について調べるサンプルをその結合分子と接触させる。インキュベーションに適した時間、すなわち、キメラペプチド - 抗体の第二の複合体を形成するのに十分な時間でインキュベーションする。検出可能なシグナルを生じうるレポーター分子でラベルされた抗イムノグロブリン抗体を添加して十分にインキュベートして、キメラペプチド - 抗体 - ラベルされた抗体の第三の複合体を形成させる。全ての未反応の物質を洗浄し、レポーター分子によって生じるシグナルを観察することによって、第一抗体の存在を調べる。その結果は、視認できるシグナルを単に観察することによっても、あるいは、既知の量のハプテンを含む対照サンプルと比較することによっても定量することができる。先のアッセイの変化は、サンプルとラベルされた抗体の両方を結合抗体に同時に添加する同時アッセイ、もしくは、ラベルされた抗体と調べるサンプルを最初に結合させ、インキュベートして、結合抗体に同時に添加するリバースアッセイを含む。これらの技術は当業者に周知であり、小さい変更の可能性は容易に明らかである。類似したアプローチをMタンパク質の検出に適用してもよい。用いられる抗体は、モノクローナルであっても、ポリクローナルであってもよい。

30

40

【0053】

固相基質は、典型的にガラスまたはポリマーであり、最も一般に用いられるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルもしくはポリプロピレンである。固相支持体は、チューブ、ビーズ、円盤もしくはマイクロプレート、あるいはイムノアッセイを行うのに適したあらゆる他の表面の形態をとることができる。結合方法は当該技術分野で周知であり、一般的に架橋結合、共有結合、もしくは不溶性キ

50

キャリアに分子を物理的に吸着することからなる。

【0054】

本願明細書で用いられる“レポーター分子”とは、その化学的性質により、抗原-結合抗体を検出する分析的に同定可能なシグナルを生じる分子を意味する。

【0055】

検出は定量的であっても定性的であってもよい。この種のアッセイで最も一般的に用いられるレポーター分子は、酵素、フルオロフォア (fluorophores)、もしくは放射性核種含有分子 (すなわち、放射性同位元素) である。酵素イムノアッセイの場合には、グルタルアルデヒドもしくは過ヨウ素酸塩によって、酵素を第二抗体に接合する。しかしながら、容易に認識されるように、当業者に容易に利用できる広範囲の種々の接合技術が存在する。一般的に用いられる酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼ等を含む。特異的な酵素と共に用いられる基質は、一般的に、対応する酵素による加水分解により、検出可能な色の変化を生じるように選択される。また、蛍光生成物を生じる蛍光基質を用いることもできる。

10

【0056】

また、フルオレセインやローダミン等の蛍光化合物を、抗体の結合力を変えずに抗体に化学的に結合させてもよい。特定の波長の光を照射して活性化した際に、蛍光色素ラベルされた抗体が光エネルギーを吸収し、分子の励起状態を誘導し、光学顕微鏡で視覚的に検出可能な特徴的な色の光を発する。EIAでは、蛍光ラベルされた抗体は第一抗体-ハプテン複合体に結合する。未結合試薬を洗浄した後に、残存した3つの複合体を適切な波長の光に曝し、観察された蛍光が関心のハプテンの存在を示す。免疫蛍光法およびEIA技術は共に当該技術分野でよく確立されており、現行の方法では特に好ましい。しかしながら、放射性同位元素、化学発光分子もしくは生物学的発光分子等の他のレポーター分子も用いることができる。必要な目的に合うように方法をどのように変えるかは、当業者には容易に明らかであろう。キメラペプチドをラベルするため、並びにMタンパク質抗体の検出に直接的に同じものを使用するために、前述のことが用いられることも明らかであろう。

20

【0057】

本願発明のさらなる態様は、GASに対するワクチンとして使用される医薬の製造において記載されるキメラペプチドの使用である。

30

【0058】

関連する実施態様では、本願発明は、GASに対するワクチンとして使用できることが記載されたキメラペプチドを含む試薬を提供する。

【0059】

本願発明を、以下の非限定的な図面および実施例によってさらに記載する。以下の一および三文字略号をアミノ酸残基に用いた。

【0060】

【表 1】

アミノ酸	三文字略号	一文字記号	
アラニン	A l a	A	
アルギニン	A r g	R	
アスパラギン	A s n	N	10
アスパラギン酸	A s p	D	
システイン	C y s	C	
グルタミン	G l n	Q	
グルタミン酸	G l u	E	
グリシン	G l y	G	
ヒスチジン	H i s	H	20
イソロイシン	I l e	I	
ロイシン	L e u	L	
リシン	L y s	K	
メチオニン	M e t	M	
フェニルアラニン	P h e	F	
プロリン	P r o	P	
セリン	S e r	S	30
トレオニン	T h r	T	
トリプトファン	T r p	W	
チロシン	T y r	Y	
バリン	V a l	V	
あらゆる残基	X a a	X	40

【実施例】

【0061】

実施例 1

化学薬品

以下の実施例で用いられる全ての化学薬品および溶剤は、別に言及しない限り分析用である。ポリスチレン(1% v/vジビニルベンゼン)p-メチルベンズヒドリルアミンヒドロクロリド樹脂(0.81meq/gまたは樹脂置換)、tert-ブチルオキシカルボニル(t-Boc)アミノ酸、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)、N-ヒ

ドロキシベンゾトリアゾール (H O B T)、トリフルオロ酢酸 (T F A) を Auspep (オーストラリア) から購入した。

【 0 0 6 2 】

実施例 2

患者

原住民患者であって、あるものは現在もしくは過去において R F / R H D の経歴をもつ、オーストラリアのノーザンテリトリーの連鎖球菌属の風土の地域の居住者を研究した。これらの患者の 90% 以上が、p 1 4 5 に対する未変性に生じる抗体を備えていることが見いだされた (Pruksakorn ら, 1994a)。ドナーからの血清は、使用まで - 20 で貯蔵した。

【 0 0 6 3 】

実施例 3

マウス p 1 4 5 に応答することがわかっている B 1 0 . B R マウス (Animal Resources Centre, Willetton, Western Australia) を免疫化の研究のために用いた。

【 0 0 6 4 】

実施例 4

ペプチド合成

ペプチドを、Houghten (1985) の同時多重ペプチド合成 “ティーバッグ” 法を用いた手動の固相技術で合成した。出発樹脂は p - メチルベンズヒドロリルアミンヒドロクロリドであり、慣例的な N - tert - ブチルオキシカルボニル (t - B o c) 化学物質を用いた (Merrifield, 1963)。全てのアミノ酸基をそのアミノ位において t - B o c 基で保護し、以下の側鎖保護基、すなわちベンジルエステル (G l u、A s p)、2 - クロロベンジルオキシカルボニル (L y s)、ベンジル (S e r)、トシル (A r g) を用いた。

【 0 0 6 5 】

アミノ酸カップリングを、ジクロロメタン中の 1, 3 - ジイソプロピルカルボジイミドを用いて行い、t - B o c 基を 55% v / v の T F A / ジクロロメタンを用いて各サイクルにおいて除去した。N - ヒドロキシベンゾトリアゾールを A s n と G l n を用いたカップリングに添加した。ペプチドを、フッ化水素で処理して樹脂から切断し、ジエチルエーテルで沈降させ、10% v / v 酢酸から凍結乾燥させた。

【 0 0 6 6 】

粗なペプチドを、水中に 2% v / v アセトニトリルから 100% v / v アセトニトリル (両方の溶剤が 0.1% v / v T F A を含む) の線形勾配を使用した半調製用 C 1 8 逆相 H P L C カラム (Biorad) で精製した。精製されたペプチドは逆相 H P L C およびフライトマススペクトロメトリー (flight mass spectrometry) のレーザー脱着時間 (LaserMat, FinniganMat, UK) で調べたところ均一であった。

【 0 0 6 7 】

本願発明に基づいて合成されたペプチドは、表 1 A、1 B および 1 C に示されている。ペプチド 1 4 4、1 4 5 および 1 4 6 は、M タンパク質の保存された C 末端領域内に含まれた重複ペプチドである。J c o n は、7 つの繰り返し酵母タンパク質、G C N 4 に基づいたモデルペプチドである。ペプチド J₁ - J₉ は J c o n ペプチドと p 1 4 5 に基づいたハイブリッドペプチドである。1 4 5 . 1 - 1 4 5 . 5 および J₁ - J₉ は、p 1 4 5 配列内部の短い配列を示す。ペプチド 1 6 9 と 1 7 1 は、それぞれヒト心筋ミオシン (Liew ら, 1990) およびヒト骨格筋ミオシン (Saez ら, 1986) から誘導され、これらのタンパク質と p 1 4 5 との間の優れた相同性を示した。

【 0 0 6 8 】

実施例 5

T 細胞増殖アッセイ

マウスの T 細胞を刺激するために、動物を 30 μ g の乳濁したペプチドで尾の付け根において免疫し、排出されたリンパ節細胞を 8 日目に採取して、先に記載した抗原で in vitro で刺激した (Pruksakorn ら, 1994b)。4 日後、増殖の程度を調べるために 0.5 μ C

10

20

30

40

50

iの³H-チミジンを培養に加えた。リンパ球の活性化を、刺激インデックス[SI]を評価することによって測定した(特異的ペプチドの存在下における増殖/ペプチドを欠いた増殖)。

【0069】

ヒトペプチド特異的T細胞増殖を、ペプチドを含む(もしくは対照のためにペプチドを含まない)ヒト末梢血液リンパ球(PBL)を培養し、かつ、記載の通りに(Pruksakornら,1994b)、6日後にリンパ球の増殖を評価することによって調べた。リンパ球の活性化を、マウスアッセイについて上述したようにして調べた。

【0070】

実施例6

タンパク質配列の比較

ヒト心筋ミオシンとヒト骨格筋ミオシンのタンパク質配列を、GCG(Wisconsin)プログラム、BESTFITを用いてp145について20アミノ酸配列との相同性を調べた。p145と相同な領域は二つのペプチド169と171(表1C)で表されている。

【0071】

実施例7

円偏光二色性(CD)スペクトル(CIRCULAR DICHROISM SPECTRA)

これらは、室温で、Aviv 62DS CDスペクトロメーター(Lakewood, NJ)を用いて記録された。ペプチドは、10mMリン酸ナトリウムバッファー、pH7.0、50%v/vトリフルオロエタノール中に20mMもしくは40mMの濃度とされた。データは、250nm~190nmの間で1nmごとに収集した。楕円率は、平均残基楕円率[]として表示されている。

【0072】

実施例8

マウス抗血清の調製

B10.BRおよびB10.D2マウスを尾の付け根において皮下に免疫した(Pruksakornら,1992)。PBSに溶解され完全フロイントアジュバントに乳濁された30μgのペプチドを含む50μlの全量を与えた。ペプチド145.1-145.5を、免疫の前に、グルタルアルデヒド固定を用いてジフテリアトキソイド(DT)に接合させたが、他の全てのペプチドは未接合のまま投与された。マウスにPBS中の30μgの接合ペプチドを与えた。

【0073】

実施例9

ELISA ELISAのプロトコルは先に記載されている(Pruksakornら,1992;1994a)。ペプチドを、ペプチド145.1-145.5を除いて0.5μg/mlの濃度で被覆し、J₁1-J₁9は1μg/mlを用いた。

【0074】

正常なマウス血清の平均もしくはヒト血清のバックグラウンド(血清含まず)以上の3つの標準偏差より大きければ意味があるとして、マウスおよびヒト血清に対する力価を計算した。ペプチド特異的抗体枯渇アッセイを、特異的結合がほぼ消耗されるまで、ペプチド(p145)被覆プレート中でインキュベーションすることによってヒト血清を用いて行った。負の対照として、血清を、無関係の住血吸虫属(schistosoma)ペプチドで被覆されたプレート中で同様にインキュベートした。p145を欠いた、もしくは住血吸虫属を欠いた血清を、テストペプチドに対する抗体の存在について調べるためにテストペプチドで被覆されたプレートに移した。全ての反応をOPD基質キット(Sigma Chemical Co)で現像し、450nmにおいて吸収を読みとった。

【0075】

実施例10

オプソニン作用のペプチド阻害

ヒト血清を、60、15分間で、加熱不活性化した。GASと新鮮なドナーの全体の

10

20

30

40

50

ヘパリン処理した血液とを添加する前に30分間100 μ gのペプチドもしくはPBSと共にインキュベートした。阻害率を、ペプチドの存在および非存在下で生育するコロニー形成ユニットと無添加ヒト血清の対照とを比較することによって計算した。

【0076】

実施例11

キメラペプチドの設計原理

もしエピトープがヘリックスコイルドコイル等の特定のタンパク質構造コンホメーション内に存在することがわかっているなら、このコンホメーションを保持するようにモデルペプチドを合成することができる。このペプチドはフレームワークペプチドとなる。

ヘリックスコイルドコイルに保持するモデルペプチドが研究されている。平行な二本鎖コイルドコイルモチーフの設計において、7つの一般的な考察が重要である (Cohen と Parry, 1990)。aとd位は、大きな非極性残基を備え、b、cおよびf位は、一般的に極性かつ帯電しており、eおよびg位は、通常鎖間イオン相互作用を支持する(すなわち、Glu/Lysの酸/塩基対)。aおよびd位がVとL、もしくはIとLに占有されたときには、コイルドコイルダイマーが支持されるが、IとIはトリマーの形成を支持し、LとIはテトラマー相互作用を支持することもわかっている (Harbury ら, 1994)。

【0077】

モデルヘリックスコイルドコイルペプチドはGCN4ロイシンジッパーに対応するペプチドの構造に基づいて設計された (O'Shea ら 1989; 1991)。このペプチドは7残基ロイシン繰り返し(d位)とa位に共通のValを備えている。最初の7つは以下の配列を含む。

【0078】

MKQLEDK (SEQ ID NO: 3)

【0079】

この配列は安定なコイルドコイル7つの繰り返しに見られるいくつかの特徴を含む。これらは、eおよびg位に酸/塩基対(Glu/Lys)を含み、b、cおよびf位に極性基を含む (Lupas ら (1991)の推定と一致する)。モデル7つの繰り返しは、GCN4ロイシンジッパーペプチドの共通の特徴から誘導される。

【0080】

VKQLEDK (SEQ ID NO: 2)

【0081】

繰り返しモデルペプチド(VKQLEDK)_nを与えた場合に、ヘリックスコイルドコイルを形成する能力を備える。4つの7つの繰り返しからなるこのようなモデルペプチドは(GCN4)₄と称される [図1A]。研究中の配位エピトープの重複フラグメントは、モデルコイルドコイルペプチドの内部に埋め込まれ、7つの繰り返しと共に登録され、キメラペプチドを与える。

【0082】

実施例12

連鎖球菌属のMタンパク質ペプチド

連鎖球菌属のMタンパク質ペプチドp145を、先に記載されているように調製し (Pruksakorn ら, 1992, 国際特許出願第 PCT/AU93/00131 [WO93/21220])、表1Aおよび1Bに示された切断されたフラグメント145.1、145.2、145.4、145.5、145.12、145.13、145.14 (Pruksakorn, 1994)を調製した。

【0083】

ペプチドp145の領域における連鎖球菌属のMタンパク質の配列を、コイルドコイル7つの繰り返しについて分析し、推定される7つの位置aからgを指定した (図1B)。ペプチドp145を1残基が重複する9つの12マーペプチドに分け、隣接するGCN4ペプチドを添加することによって、図1Cに示すように9つのJキメラペプチド(J1-J9)を与えるために(GCN4)₄に埋め込んだ。同じ残基がGCN4モデルペプチド

10

20

30

40

50

と p 1 4 5 配列の両方に見いだされた場合は常に、保存的アミノ酸置換を J ペプチド中に取り込んだ。対照ペプチド (J c o n) を、図 1 A に示された G C N 4 モデルペプチドに基づいて合成し、これは、前記の全ての保存的アミノ酸置換も含有されている (図 1 D)

【 0 0 8 4 】

キメラペプチド J 1 - 4 および対照ペプチド J c o n を、H P L C で精製した。ペプチド J 5 - 9 を合成されたものとして使用した。

【 0 0 8 5 】

実施例 1 3

ペプチド 1 4 5 の免疫優勢エピトープは配座である

p 1 4 5 内部の重複する 8 マーおよび 1 2 マー (ペプチド 1 4 5 . 1 - 1 4 5 . 5、J₁、J₅、J₇ (表 1 A および 1 B)) を用いて p 1 4 5 内部の最小エピトープをマップすることを最初に試みた。ジフテリアトキソイドに接合した二つの短いペプチド (1 4 5 . 1、1 4 5 . 5) を用いると p 1 4 5 特異的免疫応答をマウスに生じさせることができるにも関わらず、マウス抗 p 1 4 5 抗血清は、重複する p 1 4 6 (表 1 C) も、p 1 4 5 内部の短いペプチドのいずれをも認識しなかった (表 2)。結果は、免疫するペプチドがジフテリアトキソイドに接合されているか未接合であるかによらず類似していた。G A S に高度に曝される地域に生活する 9 0 % 以上のヒトが p 1 4 5 に対する抗体を備えているが、p 1 4 5 に対して高い力価 (> 6 4 0 0) を備えたヒト血清の大半は、より短いペプチド (J₁ - J₉) と反応しなかった (表 1 B、3)。これらの結果は、p 1 4 5 の内部に一つ以上の線形エピトープがあるが、p 1 4 5 で免疫した後もしくは G A S に対する未変性の暴露の後に認識される優勢配位エピトープもあることを示している。円偏光二色性は、p 1 4 5 がヘリックス傾向を備えるが (5 0 % T F E 中)、短い 1 2 マーペプチド (J₁ : L R R D L D A S R E A K [S E Q I D N O : 2 3]) は備えていないこと (図 4) ことを示し、p 1 4 5 によって示される免疫優勢エピトープは配位であることを示唆した。

【 0 0 8 6 】

実施例 1 4

配位エピトープのマッピング

疎水性およびヘリックス形成残基を備えた M タンパク質に類似した 7 つの周期性を示す無関係のタンパク質を用い、かつ、他のペプチドの内部に p 1 4 5 の配列を埋め込むための方法を開発した。選択されたペプチドは G C N 4 のロイシンジッパーモチーフ、酵母の D N A 結合タンパク質に基づくものである (o s h e a r , 1991)。G C N 4 に存在する 7 つの繰り返しの共通配列は、V a l - L y s - G l n - L e u - G l u - A s p - L y s であり、この繰り返しの基づく 2 8 アミノ酸ペプチドは、“ J c o n ” と称されるペプチドを与えるためにいくつか置換して設計された (表 1 B)。ペプチド 1 4 5 配列の 1 2 アミノ酸ウィンドウは、あらゆる潜在的ヘリックス構造を保存するように J c o n ペプチドに挿入された。このウィンドウは、完全な p 1 4 5 配列を示す 9 つのペプチド (J 1 - J 9) を与えるように一度に一つの残基がずれている。対応する 1 2 アミノ酸挿入配列 (J₁ - J₉) も、対照とする目的のために合成した (表 1 B)。

【 0 0 8 7 】

p 1 4 5 は、J キメラペプチドに対するある程度の反応性を示した (図 2)。

【 0 0 8 8 】

これらの J ペプチドのあるもの (すなわち J 7、J 8) は、上記 (それぞれ、1 4 5 . 1 2、1 4 5 . 1 3、1 4 5 . 1 4) と同じ 1 2 マー配列を含むが、G C N 4 フレームワーク内部にある。ある血清は、p 1 4 5 の N 末端残基を示す J ペプチドと反応し (すなわち J 1、J 2)、あるものは C 末端残基と反応し、そしてあるものは両方と反応した (すなわち J 1、J 2、J 4、J 7、J 8) (図 2)。どの血清も J c o n 配列とは反応しなかった。

【 0 0 8 9 】

10

20

30

40

50

高力価 1 4 5 抗体を含むヒト血清は、ペプチド特異的抗体の“フィンガープリント”を与える J ペプチドに対する特異性の類似したスペクトルを示した。全てのヒト血清は J 2 と反応した (図 3)。二つの血清は、全ての J ペプチドおよび J c o n ペプチドと反応した。これらの場合では、J ペプチドに対する特異的反応が、G C N 4 様構造に対する交差反応性によって覆い隠されるかもしれない。

【 0 0 9 0 】

全ての残りのヒト血清は、p 1 4 5 配列に特異的応答を示す G ペプチドと反応できなかった。

【 0 0 9 1 】

高い連鎖球菌属の暴露の地域にすむヒトおよび p 1 4 5 で免疫されたマウスからの血清を、これらのキメラペプチドを結合する能力について調べた。6 4 0 0 以上のペプチド 1 4 5 に対する力価を備えた 2 3 人の血清を調べた (表 3)。これらの血清の 1 9 の抗体が、同様に高い力価で一つ以上のキメラペプチドを結合したが、重複する 8 マーペプチド 1 4 5 . 1 1 4 5 . 5 のいずれも全く認識しなかった。4 つの血清が、> 3 2 0 0 の力価で、9 つの重複する 1 2 マー試験ペプチド (J₁, J₉) の一つ (J₃) と反応した (表 3)。p 1 4 5 に対する抗体を含まない 1 1 の試験血清は、あらゆるキメラペプチドに対する抗体を含んでおらず、p 1 4 5 と反応する抗体がキメラペプチドとも反応していることを強力に示唆した。抗ペプチド 1 4 5 + v e 抗血清によって最も広く認識されたキメラペプチドは J 2 であり、J 1 と J 3 はいくらか認識された (表 3)。p 1 4 5 特異的抗体が J 2 を認識していることを確かめるために、p 1 4 5 吸収研究を行い、p 1 4 5 涸 20 渴ヒト血清が、本来認識された J 2 キメラペプチドに結合する能力を失ったことが示された (表 4)。しかして認識された核心の残基は、R R D L D A S R E A K K [S E Q I D N O : 2 4] からなるが、ある人 (J 1 または J 3 ではなく J 2 を認識したヒト) では、核心の残基は R D L D A S R E A K [S E Q I D N O : 2 5] であった。この距離は ヘリックスの 3 と 3 . 3 ターンの間に対応する。抗体フットプリントは、ペプチドのヘリックス保持によってもたらされる不連続な残基を認識するようである。円偏光二色性は、キメラペプチド J 1 J 4 が 5 0 % T F E 中でヘリックス形成の傾向を備えることを示した。

【 0 0 9 2 】

ミオシンもコイルドコイル分子であり、ヒトの筋肉から誘導されたペプチドが p 1 4 5 と類似した配列を備えているため (表 1 B)、これらのヒト血清は交差反応エピトープを認識する可能性を備えている。たった二つの血清しかこれらのペプチド (1 6 9 と 1 7 1) と反応しなかった (表 3)、p 1 4 5 および J 2 を認識する抗体と p 1 6 9 および p 1 7 1 との間の交差反応はほとんどない。

【 0 0 9 3 】

実施例 1 5

配座が維持されたペプチド J 2 はオプソニン作用を備えた抗体と結合することができる

ペプチド J 2 に特異的なヒト抗体がオプソニン作用を仲介するか否かを定めるため、遊離した J 2 ペプチドがヒト抗血清によるオプソニン作用を阻害できるか否かを調べた。このアッセイは、p 1 4 5 そのものがオプソニン作用を備えたヒト抗体の標的であることを調べるために用いられた。オプソニン作用に与える影響を調べるために p 1 4 5 に対する高力価の抗体を含む血清に J 2 (1 0 0 μ g / m l) を添加し、J 2 に対する抗体を含有した 3 つの血清のうち 3 つによるオプソニン作用を阻害することがわかったが (表 5)、抗 J 2 抗体を含まない血清ではそのようにならなかった。非連鎖球菌属の配列をコピーする 2 0 マーの無関係のペプチドは、オプソニン作用を阻害しなかった。

【 0 0 9 4 】

実施例 1 6

ペプチド 1 4 5 上の T 細胞エピトープは、B 細胞エピトープから区別することができる

T 細胞が、同じ領域のペプチドを決定的な抗体結合ペプチドとして認識するか否かを調べるために、応答する B 1 0 . B R マウスを p 1 4 5 で免疫し、排出されたリンパ節細胞

10

20

30

40

50

を p 1 4 5 , J 2 および J₁ 2 で刺激した。これらはほとんど J 2 および J₁ 2 を認識しなかった (表 6)。2 1 人の R H D 原住民患者および 8 人の対照原住民患者の末梢血液 T 細胞もペプチド J 2 に対する反応を試験した。対照群からはペプチドに対して全く反応がなかった、そしてペプチド J 2 には応答しなかった。

【 0 0 9 5 】

実施例 1 7

P 1 4 5、J 2 および J 7 に対するヒト抗体は、ヒト好中球の存在下において、グループ A 連鎖球菌属をオプソナイズ (opsonise) する

p 1 4 5 に対する抗体を、p 1 4 5 の多重コピーを示すカラムを用いて親和精製した。プロテイン A 精製抗体をカラムに通して、p 1 4 5 特異的抗体を溶出した。カラムを通す前に、p 1 4 5 を認識した抗体と破傷風トキソイドをイムノグロブリン調製に存在させた。通過後、p 1 4 5 に対する抗体はまだ存在するが、破傷風トキソイドに対する抗体はもはや検出できなかった。これらの抗体と、p 1 4 5 への反応性のない等量のヒト抗体の対照調製物をオプソニン作用アッセイに用いた。表 1 0 に示されているように、精製された抗 p 1 4 5 抗体は、対照イムノグロブリンと比較して 5 8 ~ 9 4 % (平均 8 0 %) の間でタイプ 5 グループ A 連鎖球菌属のコロニーの総数を減少することができた。

10

【 0 0 9 6 】

種々の合成ペプチドをこれらの精製された抗体に添加し、オプソニン作用に与える影響を調べた (表 1 1)。使用されたペプチドは、p 1 4 5 , J 2 , J 7 および住血吸虫の配列をコピーする非特異的ペプチドであった。遊離した p 1 4 5 は、非特異的ペプチドと比べて 7 3 - 8 8 % (平均 8 3 %) でオプソニン作用を阻害することができ、遊離の J 2 は 8 9 - 9 3 % (平均 9 2 %) でオプソニン作用を阻害することができ、遊離の J 7 は 8 2 - 8 6 % (平均 8 4 %) でオプソニン作用を阻害することができた。これらのデータは、p 1 4 5 , J 2 および J 7 に特異的なヒト抗体がグループ A 連鎖球菌属をオプソナイズすることができることを示している。

20

【 0 0 9 7 】

実施例 1 8

ヘリックスコイルドコイルタンパク質内部のエピトープをマッピングする試みを説明するために、Caenorhabditis elegans パラミオシンタンパク質内部のある領域を詳細に研究した。他のコイルドコイル含有タンパク質に共通するように、ネマトーダパラミオシンは、分子の大部分がコイルドコイルコンホメーションをとることを強力に示唆する 7 残基の周期性を含む。多くの無脊椎動物の太いフィラメントの中心タンパク質であるパラミオシンは、C.elegans に単一遺伝子 u n c - 1 5 によってコードされている (waterston ら, 1977)。いくつかの u n c - 1 5 変異体は、高度に組織化されていない筋構造において見られる変わった表現形を有する。これらの一つである対立遺伝子 e 1 2 1 5 は、弱い未修飾の表現形を備えていることが示され、遺伝子の解析は⁸⁰⁹Q から R への一つのアミノ酸置換を示唆した (Gengyo-Ando と Kagawa, 1991)。e 1 2 1 5 変異体のパラミオシンと反応しないモノクローナル抗体 (m A b) N E 1 - 6 B 2 によって認識されたエピトープは、このポイント変異にマッピングされた。

30

【 0 0 9 8 】

用いられたアプローチは、ヘリックスコイルドコイルコンホメーションエピトープから誘導された重複ペプチドを用いて、類似した未変性のコンホメーションを備えた完全に無関係のタンパク質から誘導されたヘリックス隣接ペプチド間にこれらのペプチドを埋め込むことである。得られたキメラペプチドを、免疫活性、すなわち抗原性 (m A b による認識) もしくは免疫原性 (適切な抗体応答の生成) について調べることができる。C.elegans パラミオシンタンパク質である u n c - 1 5 の場合には、構造はヘリックスコイルドコイルであると考えられ、このコンホメーションは m A b によって認識されるエピトープに関して最適な免疫学的応答をするために存在する必要があるのかもしれない。u n c - 1 5 に基づいた一連のキメラペプチドは、m A b N E 1 - 6 B 2 によって認識された最小 B 細胞エピトープの細かいマッピングを可能にした。このアプローチは、配位エピト

40

50

ープをマッピングし、かつワクチン候補として用いるための最小エピトープを設計する可能性を備えている。

【0099】

(i) キメラペプチドの設計原理

もし、エピトープがヘリックス等のある特定のタンパク質構造コンホメーションの内部に存在することがわかっているなら、このコンホメーションを保持するようにモデルペプチドを合成することができる。このペプチドはフレームワークペプチドとなる。ヘリックスコイルドコイルに保持するモデルペプチドが研究されている。平行な二本鎖コイルドコイルモチーフ (a-b-c-d-e-f-g)_n の設計において、7つの一般的な考察が重要である (Cohen と Parry, 1990)。a と d 位は、大きな非極性残基を備え、b、c および f 位は、一般的に極性かつ帯電しており、e および g 位は、通常鎖間イオン相互作用を支持する (すなわち、G l u / L y s の酸 / 塩基対)。a および d 位が V と L、もしくは I と L に占有されたときには、コイルドコイルダイマーが支持されるが、I と I はトリマーの形成を支持し、L と I はテトラマー相互作用を支持することもわかっている (Harbury ら, 1994)。

10

【0100】

モデルヘリックスコイルドコイルペプチドは G C N 4 ロイシンジッパーに対応するペプチドの構造に基づいて設計された (o Shea ら 1989;1991)。このペプチドは7残基ロイシン繰り返し (d 位) と a 位に共通の V a l を備えている。最初の7つは以下の配列: M K Q L E D K (S E Q I D N O : 3) を含む。この配列は安定なコイルドコイル7つの繰り返しに見られるいくつかの特徴を含む。これらは、e および g 位に酸 / 塩基対 (G l y / L y s) を含み、b、c および f 位に極性基を含む。モデル7つの繰り返しは、G C N 4 ロイシンジッパーペプチドの共通の特徴から誘導される: V K Q L E D K (S E Q I D N O : 3)。繰り返しがモデルペプチド (V K Q L E D K)_n を与えた場合に、ヘリックスコイルドコイルを形成する能力を備える。研究中の配位エピトープの重複フラグメントは、モデルコイルドコイルペプチドの内部に埋め込まれ、キメラペプチドを与える。

20

【0101】

(ii) u n c - 1 5 の重複フラグメントをマッピングする未変性ペプチドエピトープ

m A b N E 1 - 6 B 2 によって認識されたエピトープの領域における C.elegans u n c - 1 5 パラミオシンタンパク質の配列を、コイルドコイルの7つの繰り返しについて分析し、推定される7つの位置 a から 9 を指定した (表 7 A)。

30

【0102】

u n c - 1 5 タンパク質内部の m A b N E 1 - 6 B 2 エピトープをマップする最初の試みにおいて、1つのアミノ酸残基がずれた重複する 2 1 マーのペプチドを合成し (表 7 B)、E L I S A でアッセイした。ペプチド b a 3 9 は、最も高度な E L I S A 活性を備えており、2 1 マーのペプチドがエピトープの認識に十分な長さであることを示唆している。モノクローナル抗体の反応性は、ペプチド b a 3 7 ~ c 9 に制限された (図 5)。ペプチド b a 3 6 の m A b の負の反応性は、タンパク質の C 末端に対するエピトープの範囲を描写し、エピトープ内部の⁸⁰⁹Q 残基の必要性を確実にする (Gengyo-Ando と Kagawa, 1991)。抗体反応性は、ペプチドが N 末端から切断されるにつれて減少し、ペプチド c 9 では弱く認識されるのみであり、このことは、最小エピトープ残基がペプチド b a 3 7 と c 8 の重複の間の 1 4 マーペプチド A D R L T E K L N I Q K R Q [S E Q I D N O : 2 6] であることを示唆している。しかしながら、最大の反応性はペプチド b a 3 9 に見いだされ、ずっと長い 2 1 マーペプチド M A Q D T A D R L T E K L N I Q K R Q L A [S E Q I D N O : 4 3] であり、最適な未変性のエピトープであると考えられる。

40

【0103】

(iii) u n c - 1 5 のキメラペプチドエピトープマッピング

m A b N E 1 - 6 B 2 エピトープを含む u n c - 1 5 タンパク質領域は、5残基ずつずれた6つの15マーペプチドに分けられており、ヘキサマーヘリックス隣接ペプチドの

50

添加によって、キメラペプチド b d 1 0 , b d 1 1 , b c 1 8 , b c 2 3 , b d 1 4 および b d 1 5 を与えるべく ヘリックスコイルドコイルフレームワークに埋め込まれている (表 8 A)。この変化するウィンドウの 1 5 残基は、ヘリックスの 4 つ以上の完全なターンを含む (ターン当たり 3 . 5 残基)。ペプチド b c 1 8 , b c 2 3 および b d 1 4 は、必須残基⁸⁰⁹Qを含む。

【 0 1 0 4 】

ヘリックス隣接ペプチドは、模範的なヘリックスコイルドコイルペプチド (V K Q L E D K)_nに基づいており、u n c - 1 5 のコイルドコイルタンパク質の 7 つの繰り返し周期を備えたフレームに添加された。ヘリックスモデルペプチドと u n c - 1 5 配列の両方に同じ残基が見いだされた場合には、保存アミノ酸置換をキメラペプチドに取り込んだ。これらの置換は、正しいヘリックスコイルドコイルコンホメーションを確実にするように設計された (Cohen と Parry, 1990)。以下の置換を用いた: 位置 a、V から I (疎水性残基、ダイマー支持); b、K から R (類似したチャージの官能基); c、Q から N (同じ官能基); d、L から A (疎水性残基); e、E から Q (類似したサイズの残基); f、D から E (同じチャージの官能基); g、K から R (類似したチャージの官能基)。これらの置換残基の全ては、コイルドコイルタンパク質のそれぞれの位置において共通して見いだされる (Lupas ら, 1991)。キメラペプチド b c 1 8 のみが、m A b N E 1 - 6 B 2 による E L I S A で認識された (図 6)。この粗なエピトープマッピングは、ペプチド b d 1 1 と b c 2 3 から誘導された⁷⁹⁰V と⁸¹⁴E の間に 2 5 マーペプチドが重複し、エピトープを含むことを示唆した。(V K Q L E D K)_nモデルペプチドと (V K Q L E D K)₃ (ペプチド b a 4 8) に基づく対照ペプチド a v 8 5 と a v 8 6 は、m A b N E 1 - 6 B 2 に認識されなかった。

10

20

【 0 1 0 5 】

u n c - 1 5 タンパク質は、より正確に m A b N E 1 - 6 B 2 エピトープをマップするように 1 残基ずつずれた 1 5 マーペプチドに分けられている。表 8 B に挙げたキメラペプチドを与えるように、各フラグメントをヘリックス隣接ペプチド内部に埋め込んだ。m A b N E 1 - 6 B 2 との最大の E L I S A 反応性を、ペプチド b c 2 0 に対して得た (図 6)。キメラペプチド内部に埋め込まれた u n c - 1 5 ペプチドの C 末端に⁹⁰⁸Q 残基を移動 (ペプチド b c 1 7) および N 末端に⁷⁹⁸R 残基を移動 (ペプチド b c 2 2) した後、活性は最小であった。

30

【 0 1 0 6 】

このことは、残基⁷⁹⁸R と⁸⁰⁹Q との間に最小エピトープ、1 2 マーペプチド: R L T E K L N I Q K R Q [S E Q I D N O : 2 7] があることを示している。

【 0 1 0 7 】

このエピトープは上記の未変性のエピトープマッピングから調べられたものより 2 残基短い (図 5)。

【 0 1 0 8 】

(iv) u n c - 1 5 のキメラペプチド最小エピトープマッピング

キメラペプチドアプローチを用いて、m A b N E 1 - 6 B 2 に認識される最小エピトープをよりよく調べるために、ペプチド b c 2 0 内部に含まれた最適エピトープを切りつめた。合成されたキメラペプチドは表 9 A に挙げられている。

40

【 0 1 0 9 】

N 末端の切りつめ (ペプチド b e 3 9) と同様に、C 末端の埋め込まれたエピトープの切りつめ (ペプチド b d 3、b d 4) は、E L I S A 活性を低減させた (図 7 A)。エピトープの N または C 末端の残基のさらなる切りつめ (ペプチド b d 5、b d 6、c 4、c 5) は、耐性がなかった。しかしながら、残基⁸⁰¹E から⁸¹¹A を含むペプチド c 6 は、まだ E L I S A に反応性があった。しかして、重複フラグメントエピトープマッピングは、R L T E K L N I Q K R Q が最小エピトープであることを示唆したが、切りつめマッピングは、この領域に隣接する残基⁷⁹⁷D、⁸¹⁰L および⁸¹¹A が重要であることを示している。これは、配列 D R L T E K L N I Q K R Q L A [S E Q I D N O : 9 5] が最小の最

50

適なエピトープであることを定義する。さらに、最適なエピトープ^{797D}から^{811A}からなる15マーペプチド(ペプチドc1)は、キメラペプチドbc20に埋め込まれた同じペプチドより低い度合いに認識された。これは、最大の反応性を確実にするために隣接領域が必要であることを強調する。

【0110】

E L I S A 反応性のためにm A b N E 1 - 6 B 2 エピトープに要求される決定的な残基のマッピングを、各残基の保存的置換によって行った。置換マッピングはキメラペプチドbc20(最適なエピトープを含む)に基づいており、合成されたペプチドは表9Bに挙げられている。ヘリックスフレームワーク残基を、上記モデルペプチドルール;位置a, V; b, K; c, Q; d, L; e, E; f, D; g, Kに基づいてエピトープ残基に代

10

【0111】

置換が、それぞれペプチドbe40, be43, be47, be50およびbe51の残基^{798R}, ^{901E}, ^{805I}, ^{808R}および^{809Q}に対してなされた場合には、E L I S A 反応性は廃止された(図7B)。エピトープ反応性の減少は、二つの別の置換、すなわちペプチドbe39とbe53における797Dと811Aに対しても見いだされた。興味深いことに、802K(KからD)および810L(LからV)における置換は反応性を増大させた。これらの結果は図8Aに示されている。

20

【0112】

m A b N E 1 - 6 B 2 エピトープを含むu n c - 1 5 の配列を円筒状ネットとして図示すると(図8B)、全ての決定的な残基がヘリックスの親水性の表面に見いだされる。

【0113】

(v) キメラペプチドの免疫原性

エピトープ特異的抗体反応を誘導する能力を調べるために、Quackenbushマウスをキメラペプチドで免疫した。キメラペプチドbc20を、M C S リンケージを介してジフテリアアトキソイドにカップリングさせるためにN末端システイン残基を用いて合成した(ペプチドbd1, C K Q L E E K V D R L T E K L N I Q K R Q L A Q L Q D K V K [S E Q I D N O : 2 8])。マウスを、ジフテリアアトキソイドに接合され、完全フロイントア

30

【0114】

ペプチドbd1に対して生じた抗血清は、ペプチドbc20を認識したが、ペプチドba39もしくはペプチドc1を認識しなかった(図9)。一方、適切にアミノ酸が置換されたモデルヘリックスペプチドに基づく対照キメラペプチド(ペプチドbd2, C K Q L E E K V D R L T E K L N I Q K R Q L A Q L Q D K V K)に対して生じた抗血清は、ペプチドbc20を認識したが、ペプチドba39もしくはペプチドc1を認識しなかった。しかして、キメラペプチドbd1を用いて生じた抗体反応は、ペプチドbc20およびba39に見いだされる配位エピトープに対してのみであった。

40

【0115】

当業者であれば、ここに記載された本願発明に、特に記載されたもの以外の変更および修飾を行うことができることを理解するであろう。本願発明はそのような変化および修飾の全てを含むことが理解される。また本発明は、本明細書に、個々にもしくは集合的に記載もしくは示唆された全ての段階、特徴、組成物および化合物、そして前記段階もしくは特徴のあらゆる二つ以上のあらゆる組み合わせも含む。

【0116】

【表 2】

表 1 A

p 1 4 5 の重複する合成フラグメントのリスト

ペプチド	配列	SEQ ID NO:
	337	356
145	L R R D L D A S R E A K K Q V E K A L E	1
145.1	L R R D L D A S	4
145.2	R D L D A S R E	5
145.3	L D A S R E A K	6
145.4	A S R E A K K Q	7
145.5	R E A K K Q V E	8
145.12	L R R D L D A S R E A K	9
145.13	L D A S R E A K K Q V E	10
145.14	A S R E A K K Q V E K A	11

10

20

グループ A 連鎖球菌属の M タンパク質の p 1 4 5 領域を示す重複ペプチド；アミノ酸 3 3
7 位から 3 5 6 位

【 0 1 1 7 】

30

【表 3】

表 1 B
合成ペプチド

		SEQ ID NO.	
145	LRRDLLASREAKKQVEKALE	1	
145.1	LRRDLLAS	4	
145.2	RDLLASRE	5	10
145.3	LDASREAK	6	
145.4	ASREAKKQ	7	
145.5	REAKKQVE	8	
Jcon	DKVKQAEDKVKQLEDKVEELQDKVKOLE	22	
J1	QLEDKVKQLRRDLLASREAKEELQDKVK	13	
J2	LEDKVKQARRDLLASREAKEELQDKVKQ	14	
J3	EDKVKQAERDLLASREAKKQLQDKVKQL	15	
J4	DKVKQAEDDLLASREAKKQVQDKVKQLE	16	
J5	KVKQAEDKLDASREAKKQVEDKVKQLED	17	20
J6	VKQAEDKVDASREAKKQVEKKVKQLEDK	18	
J7	KQAEDKVKASREAKKQVEKAVKQLEDKV	19	
J8	QAEDKVKQSREAKKQVEKALKQLEDKVO	20	
J9	AEDKVKQLREAKKQVEKALEQLEDKVL	21	
J ₁ 1	LRRDLLASREAK	23	
J ₁ 2	RRDLLASREAKK	24	
J ₁ 3	RDLLASREAKKQ	25	
J ₁ 4	DLASREAKKQV	29	30
J ₁ 5	LDASREAKKQVE	30	
J ₁ 6	DASREAKKQVEK	31	
J ₁ 7	ASREAKKQVEKA	32	
J ₁ 8	SREAKKQVEKAL	33	
J ₁ 9	REAKKQVEKALE	34	

脚注：一文字アミノ酸コード：A，アラニン；D，アスパラギン酸；E，グルタミン酸；
G，グリシン；K，リシン；L，ロイシン；N，アスパラギン；Q，グルタミン；R，ア
ルギニン；S，セリン；V，バリン；太字の残基はMタンパク質配列を示す。

【表 4】

表 1 C
合成ペプチド

ペプチド		SEQ ID NOs:	
p145	LRRDLASREAKKQVEKALE	1	
p169	LRRDIDDLELTLAKVEKEKH	35	10
p171	LRSDLSRELEEISERLEEAV	36	
144	NKISEASRKGLRRDLASRE	37	
146	AKKQVEKALEEANSKLALE	38	

【 0 1 1 9 】

【表 5】

表 2
P145誘導ペプチドに対するP145誘導ペプチド抗血清の反応性

血清	ペプチドに対する平均吸収率 (405) (1:100)													
	145	145.1	145.2	145.3	145.4	145.5	145.12	145.13	145.14	J ₁	J ₅	J ₇		
(NMS)	0.9±0.01	0.08±0.003	0.08±0.006	0.22±0.03	0.17±0.05	0.08±0.001	0.07±0.002	0.08±0.01	0.08±0.01	0.07±0.002	0.8±0.01	0.08±0.01		
DT	0.09±0.01	0.08±0.002	0.09±0.002	0.15±0.09	0.22±0.07	0.08±0.001	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
145	1.44±0.41	0.09±0.002	0.1±0.003	0.19±0.11	0.16±0.06	0.13±0.07	0.11±0.002	0.09±0.004	0.19±0.001	0.11±0.002	0.09±0.004	0.19±0.001		
DT-145.1	1.57	2.00	0.100	0.32	0.34	0.08	1.11±0.01	0.09±0.009	0.08±0.002	1.11±0.01	0.09±0.009	0.08±0.002		
DT-145.2	0.11±0.05	0.09±0.003	1.53±0.49	0.15±0.4	1.46±0.4	0.39±0.21	0.12±0.006	0.112±0.009	0.11±0.005	0.12±0.006	0.112±0.009	0.11±0.005		
DT-145.3	0.09±0.002	0.09±0.003	0.08±0.001	2.00±0	0.2±0.11	0.08±0.003	0.1±0.01	0.5±0.04	0.09±0.006	0.1±0.01	0.5±0.04	0.09±0.006		
DT-145.4	0.09±0.01	0.1±0.005	1.44±0.61	0.19±0.07	1.11±0.23	0.64±0.52	0.1±0.01	0.1±0.005	0.103±0.005	0.1±0.01	0.1±0.005	0.103±0.005		
DT-145.5	0.41±0.28	0.13±0.06	0.26±0.16	0.27±0.02	0.2±0.03	1.97±0.05	0.114±0.001	0.115±0.009	0.12±0.02	0.114±0.008	0.115±0.009	0.12±0.02		

脚注：B10, BRマウスを所定の免疫原で免疫し、捕獲抗原として未接合のペプチドと

1:100に希釈した血清を用いたELISAで抗体を調べた。

NMS、正常なマウス血清；DT、ジフテリアトキソイド；ND、未処理。太字は、対照

NMS血清より大きいELISAのD.を示す(平均+3SD)。

【表 6】

表 3

キメラペプチドに対するヒト血清の特異性

血清	144	p145	146	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	f1	J12	J13	J19	Jeun	MyuPep
A11	++	+++	-	+++				++							++			
A12	+	+++	+	+++											++			
A13		+++	+++	+++											++			
A14	++	+++	+++	+++											++			
A15	+++	+++	+++	+++											++			
A16	+++	+++	+++	+++											++			
A17	+++	+++	+++	+++											++			
A18	+++	+++	+++	+++											++			
A19	+++	+++	+++	+++											++			
A110	+++	+++	+++	+++											++			
A111	+	+++		+++											++			
A112		+++		+++											++			
A113		+++		+++											++			
A114		+++		+++											++			
A115		+++		+++											++			
A116		+++		+++											++			
A117		+++		+++											++			
A118		+++		+++											++			
NA11	++	+++		+++											++			
NA12		+++		+++											++			
A119	++	+++		+++											++			
A120	++	+++		+++											++			
A121	+++	+++		+++											++			
A122	+++	+++		+++											++			
A123	++	+++		+++											++			
A124	+	+++		+++											++			
A125	++	+++		+++											++			
A126		+++		+++											++			
A127	+++	+++		+++											++			
NA13	++	+++		+++											++			
A128		+++		+++											++			
A129		+++		+++											++			
A130		+++		+++											++			
A131		+++		+++											++			
NA14		+++		+++											++			
A132		+++		+++											++			
A133		+++		+++											++			
A134		+++		+++											++			
A136		+++		+++											++			

+++、力価 \geq 12800 ++、12800>力価 \geq 6400
 +、6400>力価 \geq 3200 -、力価 \leq 1600

10

20

30

40

【表 7】

表 4

p 1 4 5 もしくは住血吸虫属ペプチドと予めインキュベーションした後の J 2 力価における変化

血清	インキュベーション前の J 2 力価	住血吸虫属ペプチドを用いた吸収後の J 2 力価	p 1 4 5 を用いた吸収後の J 2 力価
Gumb	>12,800	6400	400
TB	>12,800	3200	<400
ME	>12,800	3200	400
GW	>12,800	800	<400

10

脚注：血清を 1 : 2 0 0 で希釈し、p 1 4 5 もしくは無関係の住血吸虫属ペプチドで被覆された E L I S A プレート上でインキュベートした。血清を 5 回連続して濯湯させ、p 1 4 5 特異的抗体力価が各回と共に実質的に下がる事が見られた。次いで血清を J 2 で被覆されたプレートに移し、力価を調べた。

20

【 0 1 2 2 】

【表 8】

表 5

ペプチド J 2 に対する力価

30

患者 (状態)	p J 2 に対する力価	CFU ¹	CFU	%
		ペプチド無し	ペプチド J 2	阻害
JL (RHD)	12800	230	940	76
NH (RHD)	6400	90	355	75
ME (RHD)	6400	45	245	82

40

脚注：¹CFU、2つのプレートの平均コロニー数×希釈ファクター。M5 GAS接種サイズ=27.5。

【 0 1 2 3 】

【表 9】

表 6

p145で免疫されたB10.BRマウスから誘導されたリンパ節細胞の刺激インデックス(SI)

刺激ペプチド	刺激インデックス
p145	29
J2	7.8
J ₁ 2	6.45
Tet tox (-ve 対照)	0.69
PPD (+ve 対照)	22

脚注：記述の通り p145 でマウスを免疫し、排出されたリンパ節細胞を、最適であることがわかった濃度の抗原を用いて *in vitro* でチャレンジした。合成ペプチドでは、用いた濃度は 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【 0 1 2 4 】

10

20

【表 10】

表7

未変性のC.elegans unc-15から誘導された合成ペプチドのリスト

SEQ ID NO:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
ba36	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
ba37	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
ba38	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
ba39	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
ba40	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
ba41	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
c7	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
az70	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
c8	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
c9	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
az71	a	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d

推定される7つの繰り返しの位置aとgは、未変性のunc-15配列の上に示されている。アミノ酸残基の番号はGengyo-AndoとKagawa(1991)に基づく。必須g1n残基¹⁰⁰Qは太字で示されている。

【 0 1 2 5 】

10
20
30
40

【表 1 3】

表 1 0

145親和精製された動物 (p145に対する力価)	平均CFU	非オプソニックドナーIgG (p145に対する力価)	平均CFU	CFUにおける差異%	全IgG力価
P101 (3200)	540	C1(<100)	4880	89	3200
P101 (3200)	540	C2(<100)	9000	94	3200
P105 (3200)	2040	C1(<100)	4880	58	3200
P105 (3200)	2040	C2(<100)	9000	77	3200

10

【 0 1 2 8】

【表 1 4】

表 1 1
 原住民患者のペプチド 1 4 5 に対する親和精製された抗体を用いた M5 GAS に対するオ
 プニン作用ペプチド阻害アッセイ

患者	非特異的ペプチド を用いた平均 CFU ¹ (NS)	ペプチドを含まない 平均 CFU (NP)	ペプチド 1 4 5			ペプチド J 2			ペプチド J 7		
			Mean CFU P145	% ¹ to NB	% ² to NP	Mean CFU PJ2	% ¹ to NS	% ¹ to NP	Mean CFU PJ7	% ¹ to NB	% ¹ to NP
A17 (C) ^a	3050	3450	11400	73	70	42500	93	92	nt	nt	nt
A101 (OHD)†	940	540	7360	87	93	13800	93	96	6920	86	92
A105 (RHD)†	1120	2040	9400	68	76	10520	89	81	6200	82	67
C1†	3780	4100	2440	ni	ni	3980	ni	ni	5600	32	27
C1	5120	4880	3200	ni	ni	nt	nt	nt	nt	nt	nt
C2†	4800	4000	3200	ni	ni	4600	ni	13	4400	ni	9
C2	9690	9000	9840	8	9	nt	nt	nt	nt	nt	nt

【 0 1 2 9】

10

20

30

40

【表 15】

表 11 (続き)

患者	非特異的ペブチドを用いた平均CFU ¹ (NS)	ペブチドを含まない平均CFU (NP)	ELISA力価				
			P145	PJ2	PJ7	IT	全IGG
A17 (C)°	3050	3450	6400	3200	nt	<200	6400
A101 (OHD)†	940	540	3200	800	3200	<200	3200
A105 (RHD)†	1120	2040	3200	1600	3200	<200	3200
C1†	3780	4100	400	<200	<200	>2650 0	6784000
C1	5120	4880	<100	nt	nt	nt	3200
C2†	4800	4000	800	400	400	>2650 0	1696000
C2	9690	9000	<100	nt	nt	nt	3200

1. CFU、2つのプレートの平均コロニー数×希釈ファクター。nt = 試験せず。M5 GAS接種サイズ実験 = 73。M5 GAS接種サイズ実験† = 36。

2. %NS = 平均CFU非特異的ペブチドに対して計算された殺菌効果の阻害率。ni = 阻害無し

3. %1 NP = ペブチドを含まないCFUに対して計算された阻害率。

[参考文献]

- Beachy EH, Bronze M, Dale JB, Kraus W, Poirier T and Sargent S, (1988) *Vaccine* 6: 192-196.
- Cohen C and Parry DAD (1990) *Proteins: structure, functional and genetics* 7: 1-15.
- Cohen C and Parry DAD (1986) *TIBS* 11: 245-248.
- Gengyo-Ando K and Kagawa H (1991) *J. Mol. Biol.* 219: 429-441.
- Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G and Schoofs PG (1987) *J. Immunological Methods* 102: 259-274. 10
- Harbury PB, Kim PS and Alber T (1994) *Nature* 371: 80-83.
- Harbury PB, Zhang T, Kim PS and Alber T (1993) *Science* 262: 1401-1407.
- Houghten RA (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5131-5135.
- Liew CC *et al* (1990) *Nucl. Acids. Res.* 18: 3647.
- Lupas A, van Dyke M and Stock J (1991) *Science* 252: 1162-1164.
- Manula and Fischetti (1980) *J. Exp. Med.* 151: 695-708.
- Merrifield RB, (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154. 20
- O'Shea EK, Rutkowski R and Kim PS (1989) *Science* 243: 538-542.
- O'Shea EK, Klemm JD, Kim PS and Alber T (1991) *Science* 254: 539-544.
- Pruksakorn S, Galbraith A, Houghten RA and Good MF (1992) *J. Immunol.* 149: 2729-2735.
- Pruksakorn S, (1994) PhD thesis, University of Queensland.
- Pruksakorn S, Currie B, Brandt E, Martin D, Galbraith A, Phomphutkul C, Hunsakunachai S, Manmontri A and Good MF (1994a) *Lancet* 344: 639-642. 30
- Pruksakorn S, Currie B, Brandt E, Phomphutkul C, Hunsakunachai S, Manmontri A, Robinson JH, Kehoe MA, Galbraith A and Good MF (1994b) *Intl. Immunol.* 6: 1235-1244.
- Saez, L *et al* (1990) *Nucl. Acids. Res.* 14: 2951.
- Scott JK and Smith GP, (1990) *Science* 249: 386-390.
- Waterston RH *et al* (1977) *J. Mol. Biol.* 177: 679-697.
- Yan Y, Winograd E, Viel A, Cronin T, Harrison SC and Branton D, (1993) *Science* 262: 2027-3030. 40

[配列表]

(1) 一般情報

(i) 出願人 :

(米国以外の国)

THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH

(米国のみ)

COOPER, J A; RELF, W A; GOOD, M F; および SAUL A J

(ii) 発明の名称 : 合成ペプチドとそれを含むワクチン 10

(iii) 配列の数 : 94

(IV) 該当する住所

(A) 受信人 : DAVIES COLLISON CAVE

(B) 街名 : 1 LITTLE COLLINS STREET

(C) 都市名 : メルボルン

(D) 州 : ビクトリア

(E) 国名 : オーストラリア

(F) 郵便番号 (ZIP) : 3000 20

(v) コンピューターが読み込むことのできる形態 :

(A) 媒体種 : フロッピーディスク

(B) コンピューター : IBM PC 互換機

(C) オペレーティングシステム : PC-DOS / MS-DOS

(D) ソフトウェア : パテントイン (PatentIn) リリース # 1. 0、

バージョン # 1. 25

(vi) 現在の出願データ :

(A) 出願番号 : PCT インターナショナル 30

(B) 出願日 : 1995年10月16日

(vii) 優先日 :

(A) 出願番号 : PM 8851

(B) 出願日 : 1994年10月14日

(viii) 代理人の情報 :

(A) 名称 : HUGHES DR, E JOHN L

(C) 参照番号 : EJH/EK 40

(ix) 通信情報 :

(A) 電話 : +61 3 9254 2777

(B) FAX : +61 3 9254 2770

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 1 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 20 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 1 :

```

Leu Arg Arg Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu
1          5          10          15
Lys Ala Leu Glu
                20

```

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 2 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 7 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 2 :

```

Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys
1          5

```

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 7 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 3 :

```

Met Lys Gln Leu Glu Asp Lys
1          5

```

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 4 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 8 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 4 :

```
Leu Arg Arg Asp Leu Asp Ala Ser
1           5
```

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 5 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 8 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 5 :

```
Arg Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu
1           5
```

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 6 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 8 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 6 :

```
Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys
1           5
```

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 13 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 13 :

Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys Gln Leu Arg Arg Asp Leu Asp Ala Ser
 1 5 10 15
 Arg Glu Ala Lys Lys Glu Glu Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 14 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 14 :

Leu Glu Asp Lys Val Lys Gln Ala Arg Arg Asp Leu Asp Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 Glu Ala Lys Lys Glu Leu Gln Asp Lys Val Lys Gln
 20 25

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 15 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

40

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 15 :

Glu Asp Lys Val Lys Gln Ala Glu Arg Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu
 1 5 10 15
 Ala Lys Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys Gln Leu
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 16 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 16 :

```

Asp Lys Val Lys Gln Ala Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala
1           5           10           15
Lys Lys Gln Val Gln Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu
20           25

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 17 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 17 :

```

Lys Val Lys Gln Ala Glu Asp Lys Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys
1           5           10           15
Lys Gln Val Glu Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu Asp
20           25

```

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 18 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 18 :

```

Val Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys
1           5           10           15
Gln Val Glu Lys Lys Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys
20           25

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 19 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 19 :

Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys
 1 5 10 15

Gln Val Glu Lys Lys Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 20 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 20 :

Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Gln Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val
 1 5 10 15

30

Glu Lys Ala Leu Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 21 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 21 :

Ala Glu Asp Lys Val Lys Gln Leu Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys Gln
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 22 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 22 :

```

Asp Lys Val Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys
1           5           10           15
Val Glu Glu Leu Gln Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu
20           25

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 23 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 12 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 23 :

```

Leu Arg Arg Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys
1           5           10

```

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 24 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 12 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 24 :

```

Arg Arg Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys
1           5           10

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 25 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 12 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 25 :

```

Arg Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln
1           5           10

```

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 26 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 14 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 26 :

```

Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln
1           5           10

```

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 27 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 12 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 27 :

```

Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln
1           5           10

```

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 28 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 30 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 28 :

```

Cys Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn
1          5          10          15
Ile Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
      20          25          30

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 29 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 12 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 29 :

```

Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val
1          5          10

```

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 30 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 12 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 30 :

```

Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu
1          5          10

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 31 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 12 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 31 :

Asp Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu Lys
 1 5 10

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 32 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 12 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 32 :

Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu Lys Ala
 1 5 10

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 33 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 12 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 33 :

Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu
 1 5 10

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 34 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 12 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 34 :

```

Arg Glu Ala Lys Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu Glu
1           5           10

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 35 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

- (A) 長さ : 20 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 35 :

```

Leu Arg Arg Asp Ile Asp Asp Leu Glu Leu Thr Leu Ala Lys Val Glu
1           5           10           15
Lys Glu Lys His
                20

```

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 36 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 20 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 36 :

```

Leu Arg Ser Asp Leu Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Ser Glu Arg Leu
1           5           10           15
Glu Glu Ala Val
                20

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 37 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 20 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 37 :

```

Asn Lys Ile Ser Glu Ala Ser Arg Lys Gly Leu Arg Arg Asp Leu Asp
1           5           10           15
Ala Ser Arg Glu
                20

```

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 38 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 20 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 38 :

```

Ala Lys Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu Glu Glu Ala Asn Ser Lys Leu
1           5           10           15
Ala Ala Leu Glu
                20

```

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 39 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 35 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 39 :

```

Asn Phe Val Met Ala Gln Asp Thr Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu
1           5           10           15
Asn Ile Gln Lys Arg Gln Leu Ala Glu Ser Glu Ser Val Thr Met Gln
                20           25           30
Asn Leu Gln
                35

```

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 43 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 43 :

```

Met Ala Gln Asp Thr Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln
1           5           10           15
Lys Arg Gln Leu Ala
                20

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 44 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 21 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 44 :

```

Ala Gln Asp Thr Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys
1           5           10           15
Arg Gln Leu Ala Glu
                20

```

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 45 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

40

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 45 :

```

Gln Asp Thr Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg
1           5           10           15
Gln Leu Ala Glu Ser
                20

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 46 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 46 :

Asp Thr Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln
 1 5 10 15
 Leu Ala Glu Ser Glu
 20

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 47 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 47 :

Thr Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Ser Glu Ser
 20

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 48 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 48 :

Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln Leu Ala
 1 5 10 15
 Glu Ser Glu Ser Val
 20

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 49 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 21 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 49 :

Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln Leu Ala Glu
 1 5 10 15

Ser Glu Ser Val Thr
 20

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 50 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 21 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 50 :

Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln Leu Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Met
 20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 51 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 51 :

Leu Glu Asp Lys Ile Lys Gln Glu His Lys Asn Phe Val Met Ala Gln
 1 5 10 15

Asp Thr Ala Asp Arg Leu Glu Asp Arg Val Lys Gln Leu
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 52 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 52 :

Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Val Met Ala Gln Asp Thr Ala Asp Arg
 1 5 10 15

Leu Thr Glu Lys Leu Asn Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 53 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 53 :

Lys Val Lys Gln Leu Glu Glu Thr Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu
 1 5 10 15

Asn Ile Gln Lys Arg Gln Val Lys Gln Leu Gln Asp Lys
 20 25

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 54 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 54 :

Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg
 1 5 10 15

Gln Leu Ala Glu Ser Glu Asp Lys Val Lys Asn Leu Glu
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 55 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 55 :

Gln Ala Glu Asp Arg Val Lys Ile Gln Lys Arg Gln Leu Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Met Gln Leu Glu Asp Lys Ile Lys Gln
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 56 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 56 :

Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys Leu Ala Glu Ser Glu Ser Val Thr Met
 1 5 10 15

Gln Asn Leu Gln Arg Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val
 20 25

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 57 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

40

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 57 :

Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu Asp Thr Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys
 1 5 10 15

Leu Asn Ile Gln Lys Arg Lys Val Lys Gln Leu Gln Asp
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 58 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 58 :

Lys Val Lys Gln Leu Glu Glu Thr Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu
 1 5 10 15

Asn Ile Gln Lys Arg Gln Val Lys Gln Leu Gln Asp Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 59 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 59 :

Val Lys Gln Leu Glu Glu Lys Ala Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn
 1 5 10 15

Ile Gln Lys Arg Gln Leu Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val
 20 25

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 60 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 60 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 61 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 61 :

Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln
 1 5 10 15
 Lys Arg Gln Leu Ala Glu Leu Gln Asp Lys Val Lys Gln
 20 25

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 62 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 62 :

Leu Glu Glu Lys Val Lys Gln Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys
 1 5 10 15
 Arg Gln Leu Ala Glu Ser Gln Asp Lys Val Lys Gln Leu
 20 25

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 63 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸残基

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 63 :

Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg
 1 5 10 15
 Gln Leu Ala Glu Ser Glu Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu
 20 25

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 64 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 64 :

Glu Lys Val Lys Gln Ala Glu Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Glu Ser Glu Ser Lys Val Lys Gln Leu Glu Asp
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 65 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 65 :

Lys Val Lys Gln Ala Glu Asp Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln Leu
 1 5 10 15

30

Ala Glu Ser Glu Ser Val Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 66 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 28 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 66 :

Asp Lys Val Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys
 1 5 10 15

Val Glu Glu Leu Gln Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 67 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ: 28 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO : 67 :

```

Asp Lys Val Lys Gln Ala Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ser Arg Glu Ala
1           5           10           15
Lys Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu
          20           25

```

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 68 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ: 21 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO : 68 :

```

Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
1           5           10           15
Gln Leu Glu Asp Lys
          20

```

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 69 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ: 29 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO : 69 :

```

Lys Gln Leu Glu Gln Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
1           5           10           15
Gln Lys Arg Gln Leu Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
          20           25

```

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 70 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 70 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15
 Gln Lys Arg Gln Val Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 71 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 71 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15
 Gln Lys Arg Gln Leu Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 72 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

40

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 72 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Gln Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15
 Gln Lys Arg Gln Leu Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 73 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 29 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 73 :

```

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Thr Glu Lys Leu Asn Ile
1           5           10           15
Gln Lys Arg Gln Leu Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
20           25

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 74 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

- (A) 長さ : 29 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 74 :

```

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Glu Glu Lys Leu Asn Ile
1           5           10           15
Gln Lys Arg Gln Leu Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
20           25

```

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 75 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 29 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 75 :

```

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Thr Glu Lys Leu Asn Ile
1           5           10           15
Gln Lys Arg Gln Val Lys Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
20           25

```

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 76 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 76 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 77 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 77 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Gln Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 78 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 78 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 79 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 79 :

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

Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 80 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 15 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 80 :

Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile Gln Lys Arg Gln Leu Ala
 1 5 10 15

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 81 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 81 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Lys Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 82 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 29 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 82 :

```

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Gln Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
1          5          10          15
Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
20          25

```

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 83 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 29 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 83 :

```

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Ala Thr Glu Lys Leu Asn Ile
1          5          10          15
Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
20          25

```

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 84 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 29 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 84 :

```

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Glu Glu Lys Leu Asn Ile
1          5          10          15
Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
20          25

```

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 85 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 85 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Asp Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 86 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 86 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Arg Leu Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 87 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸残基

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ヘプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 87 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Val Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 88 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 29 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 88 :

```

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Lys Ile
1           5           10           15
Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
                20           25

```

10

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 89 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 29 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 89 :

```

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Gln
1           5           10           15
Gln Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
                20           25

```

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 90 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 29 アミノ酸残基
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 90 :

```

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
1           5           10           15
Leu Lys Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
                20           25

```

40

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 91 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 91 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Glu Arg Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 92 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 92 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15

30

Gln Lys Asp Gln Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 93 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 93 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Lys Leu Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 94 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 29 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 94 :

Lys Gln Leu Glu Glu Lys Val Asp Arg Leu Thr Glu Lys Leu Asn Ile
 1 5 10 15
 Gln Lys Arg Gln Val Ala Gln Leu Gln Asp Lys Val Lys
 20 25

10

【図面の簡単な説明】

【0130】

【図1】キメラペプチドのアミノ酸配列。示された全ての配列は、以下に示された、ヘリックスコイルドコイルの7つの繰り返し(a-b-c-d-e-f-g)に関係する。A. ヘリックスコイルドコイルGCN4ロイシンジッパーペプチド(O'Sheaら, 1991)から得られたモデルGCN4ペプチドの配列。B. 推定上のコイルドコイル7つの繰り返しをそらえた連鎖球菌属のMタンパク質ペプチドp145 (Pruksakornら, 1992)の配列。C. キメラJペプチド(J1-9)の配列。p145ペプチドの重複する12マーフラグメントが太字で示されている。保存されたアミノ酸残基に下線が付されている。D. 対照GCN4モデルペプチドJcon(G)の配列。

20

【図2】Jペプチドに対する抗p145マウス血清の反応性。反応性は405nmの波長における平均吸収値としてプロットされている。血清は1:100に希釈され、代表値が示されている。ジフテリアトキソイド(DT)に接合した血清を示した。NMS、正常なマウス血清。

30

【図3】Jペプチドに対する高力価抗p145ヒト血清の反応性。平均吸収値(450nm)は1:100に希釈された血清についてプロットされている。代表的なサンプルが示されている(GBD、MT、MY、FL、TB、MG)。NHS、正常なヒト血清。

【図4】図4は、ヘリックス誘導剤、50%のトリフルオロエタノール(TFE)の存在下におけるペプチドの円偏光二色性スペクトル(circular dichroism spectra)を示したものである。A, J1; B, J2; C, Jcon; D, p145。モル楕円率。ペプチドは、水溶液中ではヘリックス形態を示さなかった。ペプチドJ1, J3およびJ4も試験され、これらはJ2に似たプロフィールを示した。

【図5】図5は、未変性エピトープマッピングELISAを示す図である。c.elegans unc-15の合成ペプチドフラグメント(表7B)をマイクロタイタープレート上に被覆し(ウェル当たり2μg)、モノクローナル抗体(mAb)NE1-6B2と共にインキュベートし、結合抗体を抗マウス抗体と450nmにおけるOPD比色アッセイで検出した。

40

【図6】図6は、キメラエピトープマッピングELISAを示す図である。モデルヘリックスペプチドに埋め込まれたc.elegans unc-15の重複フラグメント(表8)をマイクロタイタープレート上に被覆し(ウェル当たり2μg)、mAb NE1-6B2と共にインキュベートし、結合抗体を抗マウス抗体と450nmにおけるOPD比色アッセイで検出した。ペプチドbd10、bd11、bc18、bc23、bd14、bd15は5残基ずつずれている。ペプチドbc17からbc25は1残基ずつずれている。対照ペプチドav85、av86およびba48は、モデルヘリックスペプチド残基のみを含む。

50

【 図 3 】

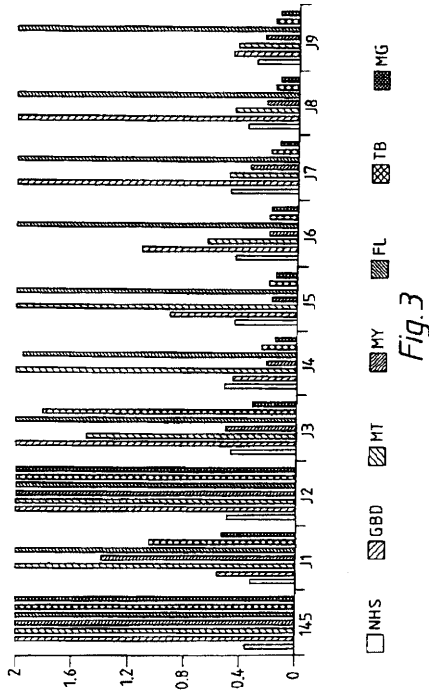


Fig.3

【 図 4 】

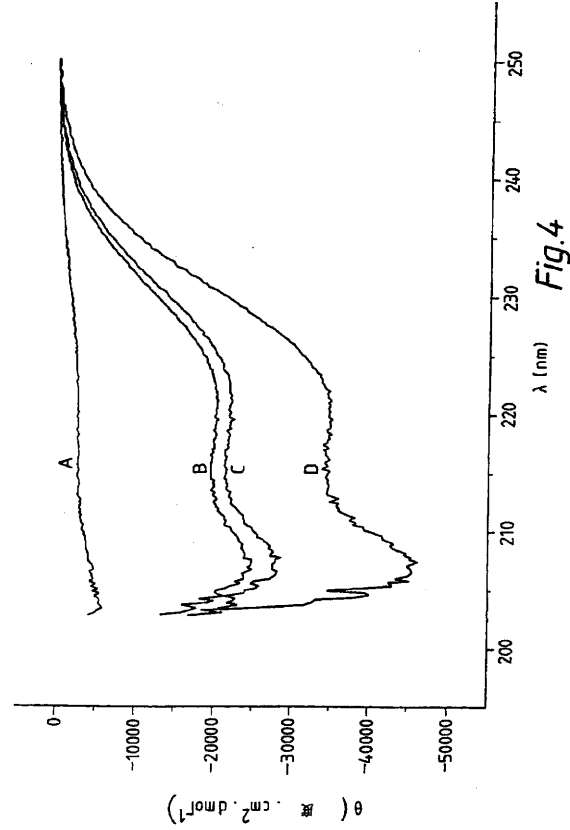


Fig.4

【 図 5 】

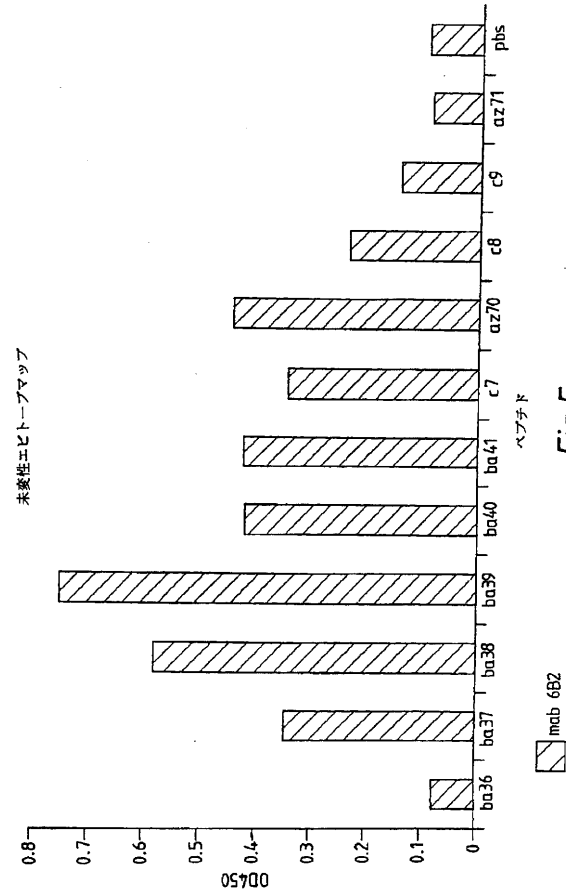


Fig.5

【 図 6 】

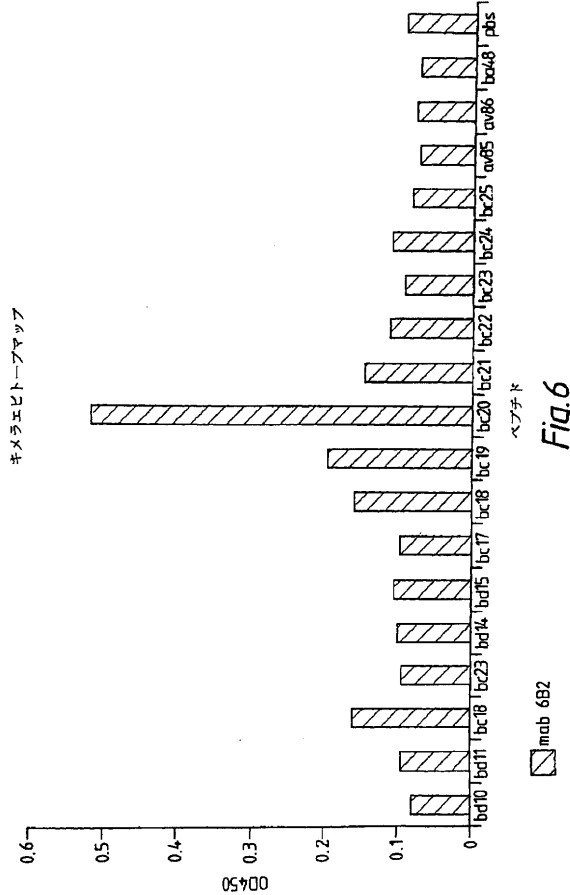


Fig.6

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/04	(2006.01)		A 6 1 P 31/04		
G 0 1 N 33/53	(2006.01)		G 0 1 N 33/53	D	

(71)出願人 500074981

ザ ユニバーシティー オブ メルボルン
オーストラリア国 3 0 5 2 ヴィクトリア州, パークヴィル, ロイヤル パレード

(71)出願人 508300231

ザ・ウォルター・アンド・エリザ・ホール・インスティテュート・オブ・メディカル・リサーチ
オーストラリア国・ヴィクトリア・3 0 5 2・パークヴィル・ロイヤル・パレイド・1 ジー

(71)出願人 507013833

パイオテック・オーストラリア・ピーティワイ・リミテッド
オーストラリア国・ニュー・サウス・ウェールズ・2 0 6 9・ローズヴィル・バーカー・ストリート・2 8

(71)出願人 500021413

シーエスエル、リミテッド
オーストラリア連邦ビクトリア州、パークビル、ポプラー、ロード、4 5

(74)代理人 100064908

弁理士 志賀 正武

(74)代理人 100089037

弁理士 渡邊 隆

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 クーパー, ジュアン アントン

オーストラリア国 キーンズランド 4 0 5 1 アルダーリー プリマス ストリート 4 0

(72)発明者 レルフ, ウェンディ アンネ

オーストラリア国 ニュー サウス ウェールズ 2 0 3 7 グレベ フェリー ロード 6 7

(72)発明者 グッド, マイケル フランシス

オーストラリア国 キーンズランド 4 0 6 1 ザ ギャップ ウィーメラ ストリート 4 6

(72)発明者 サウル, アラン ジェイムズ

オーストラリア国 キーンズランド 4 0 6 1 ザ ギャップ ダジャラ ストリート 1 4

Fターム(参考) 4C085 AA03 BA14 BA99 CC32 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA05 BA10 BA41 CA11 DA86 EA31 FA33

FA74

专利名称(译)	合成肽和含有它的疫苗		
公开(公告)号	JP2009067810A	公开(公告)日	2009-04-02
申请号	JP2008284793	申请日	2008-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	昆士兰医学研究所理事会 联邦科学和工业研究组织 墨尔本大学 澳大利亚生物技术复制三通怀有限公司 CSL有限公司		
申请(专利权)人(译)	理事会医学研究昆士兰学院 联邦科学与工业研究の蟹和灰THEY 墨尔本大学 沃尔特伊丽莎堂研究院医学研究 澳大利亚生物技术有限公司Pitiwai CS萨尔瓦多有限公司		
[标]发明人	クーパー・ジュアン・アントン レルフ・ウェンディ・アンネ グッド・マイケル・フランスイス サウル・アラン・ジェームズ		
发明人	クーパー, ジュアン アントン レルフ, ウェンディ アンネ グッド, マイケル フランスイス サウル, アラン ジェームズ		
IPC分类号	C07K19/00 C07K14/315 A61K39/00 A61K39/09 A61P33/10 A61P31/04 G01N33/53 A61P31/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/11 C07K14/155 C07K14/435 C07K14/705		
CPC分类号	A61K39/00 C07K14/315 C07K14/43545 C07K14/705 C07K2319/00		
FI分类号	C07K19/00.ZNA C07K14/315 A61K39/00.H A61K39/09 A61P33/10 A61P31/04 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BA14 4C085/BA99 4C085/CC32 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA05 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA33 4H045/FA74		
代理人(译)	渡边 隆 村山 彦		
优先权	1994PM8851 1994-10-14 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通常难以在卷曲螺旋结构内绘制表位。此外，受保护的表位必须以正确的构象存在，用于免疫识别，例如通过抗体结合。这在定义最小稳定表位以及其作为疫苗的用途中特别重要。根据本发明，衍生自构象表位的重叠肽嵌入具有相似天然构象的肽内。该方法有可能用于绘制区域的构象表位，以及设计最小表位作为GAS和各种其他病原体的候选疫苗。【选择图】无

表2

P145標準バイトに対するP145標準バイトの直線の近似

直線	バイトに対する平均誤差率 (1:100)															
	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20
MS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PT	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD11	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD13	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD14	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD16	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD17	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD18	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD19	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PD20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

備考: P10, P15, P20を元の直線で近似し、補間法として残りのバイトと
 1:100に近似した直線を用いたELISAで検定された。
 MS, 標準偏差; PT, シフトアウト; PD, 未処理; PC, 処理
 MS直線より大きいELISA00.D.を示す(平均+SD)。