

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-510991
(P2010-510991A)

(43) 公表日 平成22年4月8日(2010.4.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09 Z N A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/315 (2006.01)	C 0 7 K 14/315	4 B 0 6 3
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-538555 (P2009-538555)
 (86) (22) 出願日 平成19年7月19日 (2007.7.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年7月28日 (2009.7.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/BR2007/000184
 (87) 国際公開番号 W02008/064440
 (87) 国際公開日 平成20年6月5日 (2008.6.5)
 (31) 優先権主張番号 P10604997-4
 (32) 優先日 平成18年11月30日 (2006.11.30)
 (33) 優先権主張国 ブラジル (BR)

(71) 出願人 509257695
 グリエルミ, ルイーザ ギリエルミ
 ブラジル連邦共和国 サンパウロ州 O 5
 4 0 3 - 0 0 0, サンパウロ市 セルケイ
 ラ セザル, アベニータ ドクトル エネ
 アス デ カルヴァーリョ アギアール,
 4 4
 (71) 出願人 509257709
 フィーリョ, ジョルジ エリアス カリル
 ブラジル連邦共和国 サンパウロ州 O 5
 4 0 3 - 0 0 0, サンパウロ市 セルケイ
 ラ セザル, アベニータ ドクトル エネ
 アス デ カルヴァーリョ アギアール,
 4 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A型β溶血性連鎖球菌に対するワクチン及びその取得方法

(57) 【要約】

A型 溶血性連鎖球菌に対するワクチンとその取得方法は、e mm 5 遺伝子からクローニングされた組換えタンパク質を予測する。それは、e mm 5 遺伝子は防御能のある52及び87アミノ酸残基に対応するオリゴヌクレオチドの配列を含んでおり、健常人とリウマチ熱患者からの抗体とTリンパ球により同定される1つだけアミノ酸が異なるMタンパク質C末端のエピトープを同定するシーケンス分子同定の後に単離され、Tリンパ球に依存した抗体による防御反応を発生させることができる。選択されたエピトープによる自己免疫疾患の発症の予防は、リウマチ熱で傷害された心組織のTリンパ球を用いてインビトロで評価した。

【選択図】 図1

Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Glu-Arg-Ala-Lys-
 Lys-Gln-Leu-Glu-Ala-Glu-Gln-Gln-Lys-Leu-Glu-Glu-Gln-Asn-
 Lys-Ile-Ser-Glu-Ala-Ser-Arg-Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-
 Asp-Ala-Ser-Arg-Glu-Ala-Lys-Lys-Gln-Val

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 のモデルでは、M タンパク質のカルボキシ末端領域からの 5 2 個のアミノ酸残基（エピトープ T、8 個の中間残基及びエピトープ B）から成るセグメント、第 2 のモデルでは、M タンパク質のカルボキシ末端領域からの 8 7 個のアミノ酸残基（エピトープ T、8 個の中間残基、ハイブリッド T - B、8 個の中間残基及びエピトープ B）から成るセグメント、すなわち、いわゆる M タンパク質カルボキシ領域からのアミノ酸残基を含み、抗体及び CD 4 陽性 T リンパ球により媒介される免疫応答を誘発することができ、防御的であり、自己免疫疾患を発症させないことを特徴とする、A 型 溶血性連鎖球菌に対するワクチン。

10

【請求項 2】

健常人及びリウマチ熱保有者の、抗体及び T リンパ球により同定され、1 アミノ酸残基が異なる、M タンパク質カルボキシ末端領域（5 2 及び 8 7 残基）のシーケンスに関する分子同定を行い、リンパ球に依存する抗体による防御的応答を誘発することができることを特徴とする、請求項 1 に記載の A 型 溶血性連鎖球菌に対するワクチン。

【請求項 3】

前記第 1 モデルにおける、M タンパク質カルボキシ末端領域中の選択された残基（エピトープ T 及び B）の配列が：

Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Glu-Arg-Ala-Lys-Lys-Gln-Leu-Glu-Ala-Glu-Gln-Gln-Lys-Leu-Glu-Glu-Gln-Asn-Lys-Ile-Ser-Glu-Ala-Ser-Arg-Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Arg-Glu-Ala-Lys-Lys-Gln-Val

20

であることを特徴とする、請求項 1 に記載の A 型 溶血性連鎖球菌に対するワクチン。

【請求項 4】

前記第 2 モデルにおける、M タンパク質カルボキシ末端領域中の選択された残基（エピトープ T 及び B）の配列が：

Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Glu-Arg-Ala-Lys-Lys-Gln-Leu-Glu-Ala-Glu-His-Gln-Lys-Leu-Glu-Glu-Gln-Asn-Lys-Ile-Ser-Glu-Ala-Ser-Arg-Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Glu-Arg-Ala-Lys-Lys-Gln-Leu-Glu-Ala-Glu-Gln-Gln-Lys-Leu-Glu-Glu-Gln-Asn-Lys-Ile-Ser-Glu-Ala-Ser-Arg-Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Arg-Glu-Ala-Lys-Lys-Gln-Val

30

であることを特徴とする、請求項 1 に記載の A 型 溶血性連鎖球菌に対するワクチン。

【請求項 5】

第 1 段階：組換えタンパク質の生産のために、エピトープ T 及び B を含む 1 5 6 b p（5 2 アミノ酸残基）と 2 6 1 b p（8 7 アミノ酸残基）の領域（両製剤とも、請求項 3 及び 4 により保護）をクローニングする、

第 2 段階：実験動物、好ましくはマウスでの試験、

第 3 段階：安全性試験：動物試験及びそれに続くインビトロ試験であって、心臓にリウマチ性疾患のある患者の心組織から外科的に摘出した組織片の病巣内 T リンパ球の系列を用いた、ワクチンエピトープによる自己抗原性の防止についての試験（細胞増殖試験及びサイトカインの測定）、

40

を行うことを特徴とする、A 型 溶血性連鎖球菌に対するワクチンの取得方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願人は、2005年3月24日に出願された「A 型 溶血性連鎖球菌に対するワクチン及びその取得方法」に係る特許出願 P I 0 5 0 1 2 9 0 - 2 を持っている。この特許は、その目的が同じ新規なワクチン及び該新規なワクチンを得る新規な方法に係る。

【背景技術】

【0002】

前特許出願 P I 0 5 0 1 2 9 0 - 2 において、A 型 溶血性連鎖球菌のワクチンの技術

50

水準について十分に記述した。本発明の主題は同じであるため、この技術水準を再度記述することにする。

【0003】

この分野において知られているように、リウマチ熱（RF）はA型溶血性連鎖球菌や化膿連鎖球菌に感染することで引き起こされる。この病気は、遺伝的に感受性が高く、適切な治療を施されなかった3歳から18歳の子供に現れる。この病気の初期の臨床的所見は多発性関節炎（大きな関節の痛み）、次の段階ではシドナム舞蹈病とリウマチ性心炎の2つの主な所見が現れる。

【0004】

舞蹈病は、リウマチ熱（RF）を持つ患者の20から30%に発症する。影響を受ける器官は中枢神経系（CNS）であり、不随意運動と精神障害が認められる。これらの症状は適切な処置により消失する。

10

【0005】

リウマチ性心炎は、リウマチ熱（RF）を持つ患者の約30から45%に発症する。初期症状は心筋の急性心炎を特徴とし、重大影響を及ぼすような、進行性の永久的な弁組織の損傷を引き起こす。主に影響を受ける弁は僧帽弁、大動脈弁であり、慢性リウマチ性心疾患（RHD）を引き起こす。進行したRHDの治療は、外科的なものになる。7歳から12歳というこの病気の発症年齢を考慮すると、弁組織の矯正手術は頻繁に行わなければならない（Snitcowski, 1996）。

20

【0006】

ブラジルでは、子供の心臓手術の90%はリウマチ性弁損傷に起因する。また、大人では心臓手術の30%に相当する（保健省データ, DATA-SUS）。

【0007】

疫学的特徴

【0008】

発展途上国及び低開発国では未だに、リウマチ熱（RF）と慢性リウマチ性心疾患（RHD）は公衆衛生問題として考えられている。WHOの最近の報告によると、世界ではリウマチ熱（RF）の患者は5000万人以上いると推測され、慢性リウマチ性心疾患（RHD）患者は1400万人いるとの記録がある。イラン、タイ、中国、ポリビア、パキスタン、インド、オーストラリア、アルジェリア、エジプト、モロッコでは、慢性リウマチ性心疾患（RHD）の罹患率は、リウマチ熱（RF）をもつ子供1000人に対し10人以上である。ブラジルでは、1000人のリウマチ熱（RF）患者のうち、慢性リウマチ性心疾患（RHD）患者の小児は平均6.5人である。WHOが2004年に発表したところによると、年間の連鎖球菌類への感染は1800万件以上であり、そのうち50万件以上は死亡が確認されている。

30

【0009】

発症原因

【0010】

リウマチ熱（RF）は、A型溶血性連鎖球菌や化膿連鎖球菌への免疫的防御反応によって引き起こされる自己免疫疾患と考えられている。そして、それは、生物学的模倣メカニズムを介して、個体（この病気に対する感受性を有する）内において、その生物の自己タンパク質に対する攻撃反応を引き起こす。

40

【0011】

現在では、抗体とTリンパ球に媒介される免疫は、ヒト組織（心臓、関節、腎臓、脳）のタンパク質との交差反応に関与しているということが知られている（Cunninghamにより改訂、2000年；Guilhermesら, 1995年）。これらの交差反応は特に連鎖球菌のMタンパク質に、構造的又はアミノ酸残基的に類似していることに起因している。

【0012】

50

Mタンパク質の配列は、1980年代に解析され公表されている(Manjil aとPhili p i s , 1984, 及び Miller ら, 1998)。いくつかのグループによって発表された多くの科学的業績により、病気を引き起こす領域の知見が大いに進歩した。

【0013】

Mタンパク質は、アミノ酸残基の反復配列を含んでおり、アミノ末端部分とカルボキシ末端部分に細分化される。アミノ末端部分には連鎖球菌のセロタイプを決めているアミノ酸残基がある。カルボキシ末端部分は異なるセロタイプ間によく保存されており、2回以上の繰り返しを持つアミノ酸グループがある(Fis ch e t t i , 1991)。

【0014】

アミノ末端領域のいくつかのセグメントは記載されている。なぜなら、それらは、特に、心臓組織タンパク質との交差反応(Cunni nghamにより改訂、2000年; Guil herme ら, 2005年)を介して、該疾病(リウマチ熱及び/又は慢性リウマチ性心疾患)の発症に関与しているからである。

【0015】

80年代までは、連鎖球菌とヒト組織のタンパク質の交差反応は、抗体媒介性の免疫反応のみに起因すると考えられてきたことは興味深い。CD4陽性T細胞優勢の心組織中では炎症性浸潤を呈するという記述(Raizada ら, 1983, Keme ny ら, 1989)から、本出願人は、心臓の傷害はこれらの細胞(CD4陽性T細胞)に媒介されるということを実証した。その証拠は、傷害を受けた弁を外科的に形成する際に得られたRHD患者の、傷害を受けた心組織(心筋と弁)の断片に浸潤しているT細胞から単離したタンパク質間の交差反応の免疫応答を検出した(Guil herme ら, 1995)ことである。次に、本出願人は、特にリウマチ性心疾患患者の心組織(心筋、僧帽弁及び/又は大動脈弁)中に、炎症性サイトカイン(インターフェロン , IFN γ 、及び腫瘍壊死因子 , TNF α)を生産する多くの単核球が存在することを記載した。この研究に関連のある発見は、心筋中に、炎症を調節するサイトカイン(インターロイキン10及び4、IL-10、IL-4)を産生する多数の細胞が存在し、弁組織中に、IL-4調節サイトカインを産生する珍しい細胞が存在するという観察である。この発見は、なぜ連鎖球菌感染による心筋炎がおおよそ4週間で治癒し、僧帽弁及び/又は大動脈弁の損傷が緩やかに、進行的、永続的に続くかを示している(Guil herme ら, 2004)。

【0016】

リウマチ熱が自己免疫疾患であることを考慮すれば、その病因を理解することは、予防の基本である。なぜなら、それは自己免疫疾患を発症させないという意味で、その病原、すなわち、A型溶血性連鎖球菌や化膿連鎖球菌、に対するワクチンを製造することに注力することにつながるからである。

【0017】

A型溶血性連鎖球菌に対しては、すでに様々なワクチンがある。

【0018】

James B. Dale博士(テネシー大学研究財団)は連鎖球菌の特異性を与える、Mタンパク質のアミノ末端の配列に基づいてワクチンを製造する研究を行っている。彼はいくつかの研究結果を発表している(Beache y ら, 1987; Dale ら, 1993; DaleとChang, 1995; Dale ら, 1999, a, b, c)。そして、彼はすでに26種類の異なるセロタイプのモデル動物における応答能の分析をしている。彼のために出願されたいくつかの特許があり、その中に1998年9月10日に出願され、2004年4月6日に特許になった米国特許第6,716,433号(「A型連鎖球菌ワクチン」)というものがある。

【0019】

最近では、博士のグループは6つのセロタイプのN末端セグメントを含んだ組換えタンパク質の形態にある、6つの異なるセロタイプを含むワクチン製剤を利用した「第1相試験」の研究結果を発表している。交差反応の対照はヒト組織切片で行われ、体液性応答(

10

20

30

40

50

抗体により媒介)だけの評価した(Kotloff, 2004)。化膿連鎖球菌の26種類のセロタイプに対する連鎖球菌の感染を予防するために製造された多価ワクチンは、第I相の臨床試験が進んでいる。

【0020】

Vincent Fischetti教授(ロックフェラー大学)は、連鎖球菌特異性を付与する、Mタンパク質のカルボキシ末端残基の配列を基にワクチンを製造する研究を行っている。M6タンパク質(N末端及びC末端部分)をコードしている遺伝子をクローニングすることにより、このグループは、56種類の異なる連鎖球菌のセロタイプが、カルボキシ末端領域のアミノ酸配列において相同性を有することを見出した(Scottら, 1985と1986)。Fischetti教授のグループは、ウサギにM6タンパク質のカルボキシ末端領域のペプチドを鼻腔内接種することにより、A型連鎖球菌のコロニーが変化する可能性を示した(BessenとFischetti, 1988, a and b)。CTBコレラ毒素のサブユニットに共有結合で結合された、共通配列を有する合成ペプチドを有するワクチンを用いることで、彼らは、マウスの血清及び唾液中に、防御活性を有する、Mタンパク質に特異的なIgA抗体の形成を誘導した(BessenとFischetti, 1990; Fluckigerら, 1998)。

10

【0021】

その後の研究で、これらの著者らは、M6タンパク質のC末端部分の全配列を含んだワクシニアウイルスをベクターに使用することで、組換えワクチン-VV:M6、を製造し、1回の鼻腔内投与で、異種の連鎖球菌のコロニーが形成されないことを示した。皮内免疫は無効であった(Fischettiら, 1985)。結合のコストが高く、ワクシニアウイルスを鼻腔内接種に利用するので、前記モデルでは、これらの抗体を、安全に効果的にそして経済的にも利用しやすいワクチンとして使用することは制限されている。共生細菌をベクターとして用いた実験も行われた(Fischettiら, 1993; Medaglianiら, 1995)。この共生細菌をワクチンのベクターに用いることは、現在分析中である。予備的結果は、150人の健康なボランティアに経口投与又は鼻腔内投与でワクチンを投与した場合、そのベクターは安全で十分許容性があるということが示唆されている(Kotloffら, 2005)。

20

【0022】

彼の名で出願された特許の中で、1995年1月6日に出願され、2003年8月5日に特許された米国特許第6,602,507号(「連鎖球菌Mタンパク質からの合成ペプチド及びそれから調製されたワクチン」というものがある。ストレプトコッカス・ゴードニ(*Streptococcus gordonii*)の表面上の融合タンパク質と同様に発現するC末端部分のワクチン製剤は、現在第I相臨床試験が行われている(WHO, 2006)。

30

【0023】

M. Good教授は、オーストラリアにおいて、ワクチンへ利用できそうなものとして、C末端部分のペプチドを利用するアプローチをしている。オーストラリアは、原住民であるアボリジニへの連鎖球菌の感染率が高く、そのことによりリウマチ熱の発症率が高い地域である。オーストラリアの研究者たちは、免疫されたマウス中において、オブソニン化した抗体を産生することができる、C末端の9個のアミノ酸からなるペプチドを同定した。この抗体はまた、健康人やリウマチ性疾患の患者の血清中にも存在する(Pruksakornら, 1994、Brandtら, 1997)。最近では、そのグループは、オーストラリアでは一般的なセロタイプのアミノ末端部分のセグメントとカルボキシ末端のセグメントの組合せに関して研究している。これは、J14とよばれている(Dunnら, 2002、Oliveら, 2002)。そのグループの最新の研究成果では、J14セグメント(29のアミノ酸からなる)は、マウスを用いた実験モデル中での食作用を誘発することのできる防御抗体の発現に有利に働くことが示された。この防御抗体は、オーストラリアで流行していた土地から分離した様々な化膿連鎖球菌の株に対するものである。マウスを用いた*in vivo*でのこれらの実験では、いくつかの製剤において、J14

40

50

ペプチドの防御能力が確認された(V o h r a ら , 2 0 0 5、 B a t z l o f f ら , 2 0 0 5、 O l i v e ら , 2 0 0 5)。

【発明の概要】

【0024】

本発明の目的は、A型 溶血性連鎖球菌に対する新規なワクチン及びその新規な製造方法を提供することである。後者は2つの製剤を提供し、前記方法は、先の特許出願P I 0 5 0 1 2 9 0 - 2において出願人により考えられていた取得方法を修飾したものである。

【図面の簡単な説明】

【0025】

本発明の、より正しい認識と多くの利点は、以下の詳細な説明と添付の図を組み合わせることで容易に理解できるであろう。

【図1】添付の図1は、第1のモデル(第1の製剤)において選択された残基の配列を示す。

【図2】添付の図2は、第1のモデル(第1の製剤)において選択された残基の配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明の目的は、A型 溶血性連鎖球菌に対する新規なワクチン及びその新規な製造方法を提供することである。後者は2つの製剤を提供し、前記方法は、先の特許出願P I 0 5 0 1 2 9 0 - 2において出願人により考えられていた取得方法を修飾したものである。

【0027】

短く言うと、エピトープBの配列は、620人(健常人とリウマチ熱保有者)の血清中にある1つのアミノ酸残基が異なる79の合成ペプチドを分析することで同定された。エピトープTは、次いで、258人(健常人とリウマチ熱保有者)の末梢血の単核細胞を用いることで同定された。そして、エピトープBを同定するために試験された79のペプチドから選択された、Mタンパク質のカルボキシ末端部分の38の合成されたペプチドに対する試験がされた(G u i l h e r m e ら , 2 0 0 6、特許出願P I 0 5 0 1 2 9 0 - 2)。

【0028】

この特許では、以下のものを含む、合成ペプチド及び/又は組換えタンパク質の形態にある2つのワクチンモデルの構築が意図される。

【0029】

1. 156bp(52のアミノ酸に対応)から成り、エピトープTに対応する22残基、並びにそれに続く8個の中間残基及びエピトープBの22残基のアミノ酸配列を意図する、Mタンパク質のカルボキシ末端領域にあるエピトープTおよびエピトープB、並びに、

【0030】

2. 261bp(87のアミノ酸に対応)から成り、エピトープTに対応する22残基、並びにそれに続く8個の中間残基、ハイブリッドT-Bエピトープの27残基及びエピトープBの22残基のアミノ酸配列を意図する、Mタンパク質のカルボキシ末端領域にあるエピトープTおよびエピトープB。

【0031】

第1のモデルでは、合成ペプチド及び/又は組換えタンパク質としてのワクチンは、Mタンパク質のカルボキシ末端領域(エピトープT、8個の中間残基及びエピトープB)からの52のアミノ酸残基のセグメントを含む。

【0032】

添付の図1は、このモデルで選択された残基の配列を示す。

【0033】

第2のモデルでは、合成ペプチド及び組換えタンパク質としてのワクチンはMタンパク質のカルボキシ末端領域(エピトープT、8個の中間残基、ハイブリッドT-B、8個の中間残基及びエピトープB)の87個のアミノ酸残基のセグメントを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

添付の図 2 はこのモデルで選択された残基の配列を示す。

【 0 0 3 5 】

これらの M タンパク質のカルボキシ末端領域からのアミノ酸残基は、抗体及び C D 4 陽性 T 細胞に媒介される応答を誘発させることができ、防御的に働いて自己免疫疾患を引き起こさない。

【 0 0 3 6 】

これらの配列は以前に用いられていたワクチンの調製用のものとは異なる。そのことについては、下に示す。

【 0 0 3 7 】

James B. Dale は様々なセロタイプのアミノ末端領域を使用した（米国特許第 6, 716, 433 号）。

【 0 0 3 8 】

Vincent A. Fischetti は M 6 タンパク質のカルボキシ末端領域を使用した（米国特許第 6, 602, 507 号）。それは、6 つのグループのポリペプチドからなる。グループ 4 は、本出願人により選択されたエピトープ T とエピトープ B が含まれたセグメント（Guilherme ら, 2006）の 19 アミノ酸残基の成分と同一性を有する。

【 0 0 3 9 】

M. Good は、オーストラリアのアボリジニに流行した連鎖球菌株のアミノ末端に結合されたカルボキシ末端領域を使用した。彼は、本出願人により選択されたエピトープ T とエピトープ B（Guilherme ら, 2006）を含むセグメントの 18 アミノ酸残基成分との同一性を示した。その中の 14 のアミノ酸残基は、V. A. Fischetti により同定された、M 6 タンパク質のグループ 4 と共通のものであった。

【 0 0 4 0 】

第 1 段階：組換えタンパク質の生産のために、52 アミノ酸残基 87 アミノ酸残基の領域をクローニングする；

第 2 段階：実験動物、好ましくはマウスでの試験；

第 3 段階：安全性試験：動物試験及びそれに続くインビトロ試験であって、心臓にリウマチ性疾患のある患者の心組織から外科的に摘出した組織片の病巣内 T リンパ球の系列を用いた、ワクチンエピトープによる自己抗原性の防止についての試験（細胞増殖試験及びサイトカインの測定）、

からなる革新的なワクチンの新規な製造方法を開示する。

【 0 0 4 1 】

今回革新されたワクチンは、下に示すようなモデル系に対して有利な点をもたらすということで、既存のワクチンとは異なっている。

【 0 0 4 2 】

防御性エピトープの選択は、M 5 タンパク質（Robinson ら, 1991）を変化させた、公表された配列をもとに行われた。M 5 タンパク質は、病原性のあるエピトープ（N 末端領域）と C 末端領域からのエピトープを評価するための合成ペプチドの調製に使用した（Guilherme ら 1995 と 2001）ものであって、該疾病に対して防御することができるものであり、多くのサンプルを用いた *in vitro* の試験で評価された（620 人の血清と 258 人の T リンパ球を使用）（Guilherme ら, 2006）。

【 0 0 4 3 】

カルボキシ末端領域（240 から 350 の残基）を調べることは、わずか 1 個のアミノ酸残基が異なる 20 アミノ酸からなる 79 の合成ペプチドを用いることで行われた。この方法は独特であり防御性をもつタンパク質領域を見つけるために用いられる（Guilherme ら, 2006；特許出願 P I 0 5 0 1 2 9 0 - 2）。

【 0 0 4 4 】

10

20

30

40

50

交差反応試験は、先に記載したように (Guilhermeら, 1995)、20人のRHD患者から弁形成術の手術を行う際に得られた心組織中の浸潤性リンパ球の系列をインビトロで増殖させたものを分析することにより行われた。

【0045】

合成ペプチドを用いて行った研究は、M5株のタンパク質の公表された配列に基づいて行ったので、組換えタンパク質は、M5株で生産した (Robinsonら, 1991)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0046】

【特許文献1】1995年1月6日に出願され、2003年8月5日に特許された米国特許第6,602,507号

【特許文献2】1998年9月10日に出願され、2004年4月6日に特許された米国特許第6,716,433号

【特許文献3】1999年1月28日に出願され、2002年3月19日に特許された米国特許第6,358,704号

【非特許文献】

【0047】

【非特許文献1】Beachey EH, Seyer JM, Dale JB: "Protective immunogenicity and T lymphocyte specificity of a trivalent hybrid peptide containing NH₂-terminal sequences of types 5, 6 and 24 M proteins synthesized in tandem". J. Exp. Med. 1987; 166:647-656.

【非特許文献2】Bessen D, Fischetti VA: "Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M protein on mucosal colonization by group A streptococci". Infect. Immun. 1988; 56: 2666-2672.

【非特許文献3】Bessen D, Fischetti VA: "Passive acquired mucosal immunity to group A streptococci by secretory immunoglobulin". A. J. Exp. Med. 1988; 167: 1945-1949.

【非特許文献4】Bessen D, Fischetti VA: "Synthetic peptide vaccine against mucosal colonization by group A streptococci. I. protection against a heterologous M serotype with shared C repeated region epitopes". J. Immunol. 1990; 145 (4): 1251-12.

【非特許文献5】Brandt ER, Hayman WA, Currie B, Pruksakorn S, Good MF: "Human antibodies to the conserved region of the M protein: opsonization of heterologous strains of group A streptococci". Vaccine 1997; 15: 1805-1812.

【非特許文献6】Cunningham, M.W. (2000): "Pathogenesis of group A streptococcal infections". Clin. Microbiol. Rev. 470-511.

【非特許文献7】Dale JB, Chang EC: "Intranasal immunization with recombinant group A streptococcal M fragment fused to the B subunit of Escherichia coli labile toxin protects mice against systemic challenge infections". J. Infect. Dis. 1995; 171: 1038-1041.

【非特許文献8】Dale JB, Chang EY, Lederer JW. "Recombinant tetravalent group A streptococcal M protein vaccine". J. Immunol. 1993, 151 (4): 2188-2194.

【非特許文献9】Dale JB, Simmons M, Chiang EC, Chiang EY: "Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine". Vaccine. 1999, 17 (10): 944-948.

【非特許文献10】Dale, JB: "Multivalent group A streptococcal vaccine designed to optimize the immunogenicity of six tandem M protein fragments". Vaccine, 1999. 17:193-200.

【非特許文献11】Dale, JB, Chiang EY., Liu S., Courtney HS., Hastly, DL. "New protective antigen of group A streptococci". J. Clin. Invest. 1999. 103:1261-1268

10

20

30

40

50

【非特許文献 1 2】Dunn, LA, McMillan DJ, Batzloff M, Zeng W, Jackson DCJ, Upcroft JA, Upcroft P, Olive C: "Parenteral and mucosal delivery of a novel multi-epitope M protein-based group A streptococcal vaccine construct: investigation of immunogenicity in mice". *Vaccine*, 2002, 20: 2635-2640.

【非特許文献 1 3】Fischetti VA, Jones KF, Scott JR.: "Size variation of the M protein in group A streptococci". *J. Exp. Med.* 1985, 161 : 1384-1401.

【非特許文献 1 4】Fischetti VA, Medaglini D, Oggioni M, Pozzi G: "Expression of foreign proteins on gram - positive commensal bacteria for mucosal delivery". *Curr. Opin Biotech.* 1993, 4:503-610.

【非特許文献 1 5】Fischetti, V.: "Streptococcal M protein". *Sci. Am.*:1991 264(6) : 32-39.

【非特許文献 1 6】Fluckiger, U.; Jones KF; Fischetti, VA: "Immunoglobulins to group A streptococcal surface molecules decrease adherence to and invasion of human pharyngeal cells". *Infect. Immun.* 1998. 66: 974-979.

【非特許文献 1 7】Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowsky R, Pomerantzeff P. MA, Assis RV, Pedra F, Neumann J, Goldberg A, Patarroyo ME, Pillegi F, Kalil J: "Human -infiltrating T cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins". *Circulation* 1995; 92: 415-420.

【非特許文献 1 8】Guilherme, L., Oshiro, S. E., Fae, K.C., Cunha-Neto, E., Renato, G et al: "T cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery mirrors reactivity of heart infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients". *Infect. Immun*, 2001 , 69: 5345-5351.

【非特許文献 1 9】Guilherme L., P. Cury, L.M. Demarchi, V. Coelho, L. Abel, AP. Lopez, S. E. Oshiro, S. Aliotti, E. Cunha-Neto, P.M. Pomerantzeff, A.C. Tanaka and J. Kalil: Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol*, 2004, 165:1583-91.

【非特許文献 2 0】Guilherme, L Fae, KC, Oshiro, SE, Kalil, J: Molecular pathogenesis of Rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Exp. Rev Mol Med*, 2005, 7(28): 1-15.

【非特許文献 2 1】Guilherme, L Fae, KC, Higa F, Chaves, L, Oshiro, SE, Freschi de Barros.S , Puschel.C, Juliano, MA, Tanaka, AC, Spina, G, Kalil, J: Towards a vaccine against rheumatic fever. *Clin Dev Immunol*, 2006,XX 1-8.

【非特許文献 2 2】Kemeny, E., Grieve, T., Marcus, R., Sareli, P., Zabriskie, JB: "Identification of mononuclear cells and T cell subsets in rheumatic valvulitis".*Clin. Immunol. Immunopathol.* 1989,52:225-237.

【非特許文献 2 3】Kotloff K1 Correti M, Palmer K, Campbell JD, Reddish MA, Hu MC , Wasserman SS, Dale JB: "Safety and immunogenicity of a recombinant multivalent group A streptococcal vaccine in healthy adults". *J. Am. Med. Assoc (JAMA)*, 2004, 11 : 709-715.

【非特許文献 2 4】Kotloff KL, Wasserman SS, Jones KF, Livio S1 Hruby DE1 Franke CA, Fischetti VA: Clinical and microbiological responses of volunteers to combined intranasal and oral inoculation with a *Streptococcus gordonii* carrier strain intended for future use as a group A streptococcus vaccine. *Infect Immun*, 2005, 73(4):2360-6.

【非特許文献 2 5】Manjula, B. N., Acharya, A.S., Mische, M.S., Fairwell, T. and Fischetti, V.A.: "The complete amino acid sequence of a biologically active 197 - residue fragment of M protein isolated from type 5 group A streptococci". *J. Biol. Chem.*, 1984,259, 3686-3693.

10

20

30

40

50

【非特許文献 2 6】Medaglini D, Pozzi G, King TP, Fischetti VA: "Mucosal and systemic immune response to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordonii* after oral colonization". Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1995, 92: 6868-6872.

【非特許文献 2 7】McNeil SA, Halperin SA, Langley JM, Smith B, Warren A, Sharratt GP, Baxendale DM, Reddish MA, Hu MC, Strop SD, Linden J, Fries LF, Vink PE, Dale JB.: Safety and immunogenicity of 26-valent group A streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. Clin Infect Dis, 2005, 41 (8):1114-22.

【非特許文献 2 8】Miller, L.C., Gray, E.D., Beachey, E. H. and Kehoe, M.A.: "Antigenic variation among group A streptococcal M proteins: nucleotide sequence of the serotype 5 M protein gene and its relationship with genes encoding types 6 and 24 M proteins". J. Biol. Chem., 1988, 263, 5668- 5673.

【非特許文献 2 9】Olive C, Clair T, Yarwood P, Good M: "Protection of mice from group A streptococcal infection by intranasal immunisation with a peptide vaccine that contains a conserved M protein B cell epitope and lacks a T cell autoepitope". Vaccine, 2002, 20: 2816-2825.

【非特許文献 3 0】Olive C, Hsien K, Horvath A, Clair T, Yarwood P, Toth I, Good MF. Protection against group A streptococcal infection by vaccination with self-adjuvanting lipid core M protein peptides. Vaccine, 2005 23(17-18):2298-303.

【非特許文献 3 1】Pruksakorn S, Currie B, Brandt ER, Martin D, Galbraith A, Phornphutkul CH, Hunsakunachai S, Manmontri A, Good MF: "Towards a vaccine for rheumatic fever: Identification of a conserved target epitope on M protein of group A streptococci". The Lancet, 1994; 344:639-642.

【非特許文献 3 2】Raizada, V., Williams, R.C. Jr., Chopra, P., Gopinath, N., Prakash, K. et al: "Tissue distribution of lymphocytes in rheumatic heart valves as defined by monoclonal anti-T cells antibodies". Am. J. Med., 1983, 74, 90- 96.

【非特許文献 3 3】Robinson, J. H., Atherton, M. C, Goodacre, J.A., Pinkney, M., Weightman, H. and Kehoe, M.A. (1991): "Mapping T-cell epitopes in group A streptococcal type 5 M protein". Infect. Immun. 59, 4324-4.

【非特許文献 3 4】Scott, JR.; Hollingshead SK.; Fischetti VA: "Homologous regions within M protein genes in group A streptococci of different serotypes". Infect. Immun. 1986, 52: 609-613.

【非特許文献 3 5】Scott, JR.; Pulliam, WN.; Hollingshead SK.: "Fischetti VA. Relationship of M protein genes in group A streptococci". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985, 82: 1822- 1827.

【非特許文献 3 6】Snitcovsky, R.: "Rheumatic fever prevention in industrializing countries: problems and approaches". Pediatrics. 1996, 97(6): 996-998.

【非特許文献 3 7】Vohra H, Dey N, Gupta S, Sharma AK, Kumar R, McMillan D, Good M F.: M protein conserved region antibodies opsonise multiple strains of *Streptococcus pyogenes* with sequence variations in C-repeats. Res Microbiol., 2005, 156(4):575-82.

【非特許文献 3 8】WHO, IVR: New vaccines against infectious diseases: research and development status, April, 2005, updated February 2006.

10

20

30

40

【 1 】

FIG. 1

Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Glu-Arg-Ala-Lys-
Lys-Gln-Leu-Glu-Ala-Glu-Gln-Gln-Lys-Lys-Leu-Glu-Gln-Gln-Asn-
Lys-Ile-Ser-Glu-Ala-Ser-Arg-Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-
Asp-Ala-Ser-Arg-Glu-Ala-Lys-Lys-Gln-Val

【 2 】

FIG. 2

Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Glu-Arg-Ala-Lys-
Lys-Gln-Leu-Glu-Ala-Glu-Gln-His-Gln-Lys-Leu-Glu-Gln-Asn-
Lys-Ile-Ser-Glu-Ala-Ser-Arg-Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-
Asp-Ala-Ser-Glu-Arg-Ala-Lys-Lys-Gln-Gln-Ala-Glu-Gln-
Gln-Lys-Leu-Glu-Gln-Asn-Lys-Ile-Ser-Glu-Ala-Ser-Arg-
Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Arg-Glu-Ala-Lys-
Lys-Gln-Val

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/BR 2007/000184
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC ^B : A61K 39/09 (2006.01); A61K 38/16 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC ^B : A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BLASTn, STN-registry, WPI, Medline		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/0002956 A1 (LOWELL et al.) 6 January 2005 (06.01.2005) <i>claims 1-3</i>	1, 5
A	WO 2004/014956 A1 (THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH) 19 February 2004 (19.02.2004) <i>claims 1, 27, 28</i>	1, 2, 5
A	US 2002/0176863 A1 (DALE) 28 November 2002 (28.11.2002) <i>claim 1</i>	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 September 2007 (13.09.2007)		Date of mailing of the international search report 3 October 2007 (03.10.2007)
Name and mailing address of the ISA/ AT Austrian Patent Office Dresdner Straße 87, A-1200 Vienna Facsimile No. +43 / 1 / 534 24 / 535		Authorized officer MOSSER R. Telephone No. +43 / 1 / 534 24 / 437

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/BR 2007/000184

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US A 2005002956		US A1 2005002956	2005-01-06
		AU A1 2002302132	2004-06-03
WO A 2004014956		US A1 2007066534	2007-03-22
		KR A 20050053608	2005-06-08
		JP T 2006513140T	2006-04-20
		CN A 1688606	2005-10-26
		EP A1 1543039	2005-06-22
		CA A1 2494192	2004-02-19
US A 2002176863		US A1 2007053937	2007-03-08
		US A1 2002176863	2002-11-28
		US B1 6419932	2002-07-16
		WO A1 9406465	1994-03-31
		EP A1 0618813	1994-10-12
		DK T3 618813T	2002-03-11

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 25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	1 0 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	P
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	C
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	

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

(74) 代理人 100096024

弁理士 柏原 三枝子

(72) 発明者 グリエルミ, ルイーザ ギリエルミ

ブラジル連邦共和国 サンパウロ州 05403-000, サンパウロ市 セルケイラ セザル, アベニーダ ドクトル エネアス デ カルヴァーリョ アギアール, 44

(72) 発明者 フィーリョ, ジョルジ エリアス カリル

ブラジル連邦共和国 サンパウロ州 05403-000, サンパウロ市 セルケイラ セザル, アベニーダ ドクトル エネアス デ カルヴァーリョ アギアール, 44

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA02 HA01

4B063 QA05 QQ79 QR72 QR77

4C085 AA03 BA08 BA14 CC07 EE03

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA11 DA86 EA31 FA20 FA74

专利名称(译)	针对A型β溶血性链球菌的疫苗及其获得方法		
公开(公告)号	JP2010510991A	公开(公告)日	2010-04-08
申请号	JP2009538555	申请日	2007-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	格里斯Erumi路易莎吉利鲁米 费滨海略Giorgi的埃利亚斯·哈利勒		
申请(专利权)人(译)	古列尔米, 路易莎Giryerumi 菲略, 豪尔赫·埃利亚斯·哈利勒		
[标]发明人	グリエルミルイーザギリエルミ フィーリョジョルジエリアスカリル		
发明人	グリエルミ,ルイーザ ギリエルミ フィーリョ,ジョルジ エリアス カリル		
IPC分类号	A61K39/09 C07K14/315 A61P25/14 A61P31/04 A61P19/02 A61P25/00 G01N33/53 G01N33/569 C12N15/09 C12Q1/02		
CPC分类号	A61K39/092 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/14 A61P31/04 A61P37/00 A61P37/04		
FI分类号	A61K39/09.ZNA C07K14/315 A61P25/14 A61P31/04 A61P19/02 A61P25/00.101 G01N33/53.P G01N33/569.C C12N15/00.A C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/HA01 4B063/QA05 4B063/QQ79 4B063 /QR72 4B063/QR77 4C085/AA03 4C085/BA08 4C085/BA14 4C085/CC07 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA20 4H045 /FA74		
优先权	PI0604997 2006-11-30 BR		
其他公开文献	JP5410294B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

针对A型β溶血性链球菌的疫苗及其预测方法预测了从emm5基因克隆的重组蛋白。这是因为emm5基因含有对应于具有保护能力的52和87个氨基酸残基的寡核苷酸序列,并且仅由健康受试者鉴定的一个氨基酸和来自风湿热患者和T淋巴细胞的抗体是不同的识别M蛋白质C末端表位的序列在鉴定分子后能够通过依赖于T淋巴细胞的抗体产生保护性应答时分离的蛋白质。使用由风湿热损伤的心脏组织的T淋巴细胞在体外评估通过选择的表位预防自身免疫疾病的发作。 点域1

ly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Ala-Ser-Glu-Arg-Ala-Lys-
ln-Leu-Glu-Ala-Glu-Gln-Gln-Lys-Leu-Glu-Glu-Gln-Asn-
le-Ser-Glu-Ala-Ser-Arg-Lys-Gly-Leu-Arg-Arg-Asp-Leu-
la-Ser-Arg-Glu-Ala-Lys-Lys-Gln-Val