

(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2004-531235

(P2004-531235A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/00	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 11/04	4 B O 6 4
A 6 1 P 11/04	A 6 1 P 17/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 21/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 29/00	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-566355 (P2002-566355)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月21日 (2002. 2. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年8月21日 (2003. 8. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2002/000207
 (87) 国際公開番号 W02002/066650
 (87) 国際公開日 平成14年8月29日 (2002. 8. 29)
 (31) 優先権主張番号 60/269, 840
 (32) 優先日 平成13年2月21日 (2001. 2. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592107462
 シャイアー バイオケム インコーポレイテッド
 カナダ国 エイチ7ブイ 4エイ7, ケベック, ラヴァル, アーモンド-フラッビア ブールバード 275
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稜
 (74) 代理人 100067035
 弁理士 岩崎 光隆
 (74) 代理人 100064610
 弁理士 中嶋 正二
 (74) 代理人 100072730
 弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

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

(57) 【要約】

【化1】

(SEQ ID NO:2)

```

1 MKKHLKTVL ILTIVSVVTR NQEVFSLVKE PILKQTOASS SISGADYAES SSKSKLKINE
51 TSGPVDITVT DLFSDKRTTP ERIKDNLAAG FREQELKAVT ENTESEKQIT SSGSQLEQSK
121 SLSLKTKVPS TSNWEICDPI TRGNLWGLS KSGVEKLSQT DRULVLPQAA DGTQLIQVBS
181 FAFTEKATA IASTSEAGE NGEISQJEDT GRGILNESEV FNSYLRKVT TPGYKHGOC
241 DAFVONKRIA EYVLPESLET ISDYAPALHA LKQIDLSDNL KAIGELAFD NQITGKLSLE
301 RQMLRLAERA FKNHKKIE PRGNSLRVIG SASFQNDLS QLMCPDGLEK TESAFTQNF
361 GDDHYNRVV LWTXSGKNPS GLATENTYVN POKSLWQSSP EIDYTKMLEB DFTYQKNSVT
421 GFSNKGQNV KRNHLEIPK QHNGVTITEI GDNAPRNVDV QNKTLRKYDL EYVLEPSTIR
481 KIGAFAPQSN NLKSFASDQ DEEKKEGAPM NNRIETLRLK QKLVITIGDAA PHIKKIYAV
541 LPEVQEIQR SAFRQNGANN LFFMGSKVKT LGEMAFLSNR LEHLDLSEQK QLTEIPVOAF
601 SDNALKEVLL PASLKYREE AFKKNHLKQL EVASALSHYA FNALDDNDGQ EQDQNKVYVK
661 THNNSVALAD GSHPIVDPEK LSSTIVDLER ILKLEGLDY STLKQTTQTO FQDMTTAGKA
721 LLSNSNLKRG EKKEFLQAAQ FFLGRVDLEK ALAKAEKALV TKKATNGQL LERSINKAVL
781 AYNSAIKKA NVKRLKSLD LLTGLVEGKG PLAQATMVQG VYLLKTPLEL PEYIQLNVE
841 FFKSKLIYA LMSDITIGR QKDAYGNPIL NVDEDNEGYH ALAVATLADY EBLDKTILN
901 SKLSQLTISR QVPTAAYHRA GTFQAIQNA ABAEQLLPKP GTHSEKSSSS ESANSKDRGL
961 QSNPKTNRGR HSAILPRTGS KGSFVYGLG IYTSVALLSLI TAIKKKRY*

```

本発明は抗原、より特にStreptococcus pyogenes (またグループA Streptococcus (GASと呼ばれる) 細菌性病原体の抗原であって予防、治療および/または診断のためのワクチン成分として有用であるものに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含むポリペプチドに結合特異性を有する抗体を生成できるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

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

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

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

から選択されるポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド。

10

20

【請求項 2】

(a) 配列番号 2 から選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 2 から選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

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

(d) 配列番号 2 から選択される配列を含むポリペプチドに結合特異性を有する抗体を惹起できるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

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

(f) 配列番号 1 から選択される配列を含むポリヌクレオチド、

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

から選択されるポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド。

30

【請求項 3】

当該ポリヌクレオチドが DNA である請求項 1 のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

当該ポリヌクレオチドが DNA である請求項 2 のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

当該ポリヌクレオチドが RNA である請求項 1 のポリヌクレオチド。

40

【請求項 6】

当該ポリヌクレオチドが RNA である請求項 2 のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

ストリンジェント条件下で、

(a) ポリペプチドをコードする DNA 配列または

(b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補物

のいずれかにハイブリダイズする請求項 1 のポリヌクレオチドであって、

ここで当該ポリペプチドが、配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含む、ポリヌクレオチド。

50

【請求項 8】

ストリンジェント条件下で、

- (a) ポリペプチドをコードする DNA 配列または
 - (b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補物
- のいずれかにハイブリダイズする請求項 2 のポリヌクレオチドであって、
ここで当該ポリペプチドが、配列番号 2 を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

ストリンジェント条件下で、

- (a) ポリペプチドをコードする DNA 配列または
 - (b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補物
- のいずれかにハイブリダイズする請求項 1 のポリヌクレオチドであって、
ここで当該ポリペプチドが、配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むポリペプチドからの少なくとも 10 連続アミノ酸残基を含む、ポリヌクレオチド。

10

【請求項 10】

ストリンジェント条件下で、

- (a) ポリペプチドをコードする DNA 配列または
 - (b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補物
- のいずれかにハイブリダイズする請求項 2 のポリヌクレオチドであって、
ここで当該ポリペプチドが、配列番号 2 を含むポリペプチドからの少なくとも 10 連続アミノ酸残基を含む、ポリヌクレオチド。

20

【請求項 11】

当該 DNA が発現制御領域に作動可能に連結されている、請求項 1 のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 12】

当該 DNA が、発現制御領域に作動可能に連結されている請求項 3 のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 13】

請求項 11 のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 14】

請求項 12 のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

30

【請求項 15】

当該ポリペプチドの発現に好適な条件下で請求項 13 の宿主細胞を培養することを含む、ポリペプチドを生産するための方法。

【請求項 16】

当該ポリペプチドの発現に好適な条件下で請求項 14 の宿主細胞を培養することを含む、ポリペプチドを生産するための方法。

【請求項 17】

- (a) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むアミノ酸配列を有する第 2 ポリペプチドに少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチド、
- (b) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含むアミノ酸配列を有する第 2 ポリペプチドに少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチド、
- (c) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含むポリペプチド、
- (d) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を有するポリペプチドに結合特異性を有する抗体を生成できるポリペプチド、
- (e) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を有するポリペプチドのエピトープを有する部分、
- (f) (a)、(b)、(c)、(d)、または(e)のポリペプチド、ここで該 N 末端 Met は欠失している、
- (g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)または(f)のポリペプチド、ここで該

40

50

分泌アミノ酸配列は欠失している、
から選択されるポリペプチドを含む単離ポリペプチド。

【請求項 18】

(a) 配列番号 2 を含むアミノ酸配列を有する第 2 ポリペプチドに少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号 2 を含むアミノ酸配列を有する第 2 ポリペプチドに少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号 2 から選択される配列を含むポリペプチド

(d) 配列番号 2 から選択される配列を有するポリペプチドに結合特異性を有する抗体を生成できるポリペプチド、

(e) 配列番号 2 から選択される配列を有するポリペプチドのエピトープを有する部分、
(f) (a)、(b)、(c)、(d)、または (e) のポリペプチド、ここで該 N 末端 Met は欠失している、

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

10

【請求項 19】

配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を有する 2 または 3 以上のポリペプチドを含むキメラポリペプチド；ただし該ポリペプチドは、キメラポリペプチドを形成するように連結されていることを条件とする。

20

【請求項 20】

配列番号 2 から選択される配列を有する 2 または 3 以上のポリペプチドを含むキメラポリペプチド；ただし該ポリペプチドは、キメラポリペプチドを形成するように連結されていることを条件とする。

【請求項 21】

請求項 17 ないし 20 のいずれかのポリペプチド、および薬学的に許容される担体、希釈剤またはアジュバントを含む医薬組成物。

【請求項 22】

丹毒、咽頭炎および膿痂疹、猩紅熱、および侵入性疾患、例えば菌血症および壊死性筋膜炎およびまた毒性ショックに感受性の宿主における、丹毒、咽頭炎および膿痂疹、猩紅熱、および侵入性疾患、例えば菌血症および壊死性筋膜炎の予防的または治療的処置のための方法であって、当該宿主に予防または治療的量の請求項 21 の組成物を投与することを含む方法。

30

【請求項 23】

Streptococcus pyogenes 感染に感受性の宿主における、*Sterptococcus pyogenes* 細菌性感性の予防または治療的処置のための方法であって、当該宿主に予防または治療的量の請求項 21 の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 24】

該宿主が動物である、請求項 22 の方法。

【請求項 25】

該宿主がヒトである請求項 22 の方法。

40

【請求項 26】

ストレプトコッカス性感染に感受性の宿主におけるストレプトコッカス性感染の診断のための方法であって、

(a) 宿主から生物学的サンプルを取得すること、

(b) 請求項 17 ないし 20 のいずれかのストレプトコッカス性ポリペプチドと反応性の抗体またはそのフラグメントを、該生物学的サンプルとインキュベートし、混合物を形成すること、

(c) 該混合物中の、特異的に結合した抗体または結合したフラグメントを検出し、これがストレプトコッカス性の存在を指摘すること、

50

を含む方法。

【請求項 27】

生物学的サンプル中のストレプトコッカス抗原に特異的な抗体の検出のための方法であって、

(a) 宿主から生物学的サンプルを取得すること、

(b) 請求項 17 ないし 20 のいずれかの、1 または 2 以上のストレプトコッカス性ポリペプチドを、生物学的サンプルとインキュベートし、混合物を形成すること、

(c) 該混合物中の、特異的に結合した抗体または結合したフラグメントを検出し、これがストレプトコッカスに特異的な抗体の存在を指摘すること

を含む方法。

10

【請求項 28】

ストレプトコッカス感染の予防または治療的処置のための医薬の製造における医薬組成物の使用。

【請求項 29】

ストレプトコッカス性感染の検出または診断のための、請求項 17 ないし 20 のいずれかのポリペプチドを含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

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

20

【0002】

発明の背景

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

【0003】

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

30

【0004】

S. pyogenes 感染から宿主を保護するワクチンを開発するため、努力が感染性因子、例えば型特異的 M タンパク質に焦点があった。しかし、M タンパク質のアミノ末端部分が、ヒト心筋、トロポミオシン、ミオシン、およびビメンチンと反応した交差反応性抗体を誘導し、これが自己免疫性疾患に関係し得ることが見出された。その他は、種々の血清型からの M タンパク質のアミノ末端ペプチドを含む複合ハイブリッドタンパク質を生産するための組み換え技法を使用した。しかし、すべての *S. pyogenes* 血清型を含む安全なワクチンは、生産および標準化するのに高度に複合的である。

40

【0005】

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

50

【 0 0 0 6 】

オクラホマ大学は、*S. pyogenes*菌株 M 1 G A S のためのゲノム配列決定プロジェクトを設けた (<http://dnal/chem.ou.edu/strep.html>)。

【 0 0 0 7 】

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

【 0 0 0 8 】

発明の要約

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

10

【 0 0 0 9 】

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

【 0 0 1 0 】

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

【 図面の簡単な説明 】

20

【 0 0 1 1 】

【 図 1 】 図 1 は、血清型 M 1 *S. pyogenes* 菌株 A T C C 7 0 0 2 9 4 由来の B V H - P 7 遺伝子の D N A 配列を示す；配列番号 1。配列の下線部分は、リーダーペプチドをコードする領域を示す。

【 図 2 】 図 2 は、血清型 M 1 *S. pyogenes* 菌株 A T C C 7 0 0 2 9 4 由来のアミノ酸配列 B V H - P 7 タンパク質を示す；配列番号 2。下線の配列は、21 アミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

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

30

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

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

40

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

50

センサラインがある。

【0012】

発明の詳細な記載

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

【0013】

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

【0014】

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

【0015】

1側面にしたがって、本発明は、配列番号2またはそのフラグメントまたはアナログを含む第2ポリペプチドに少なくとも90%同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0016】

1側面にしたがって、本発明は、配列番号2またはそのフラグメントまたはアナログを含む第2ポリペプチドに少なくとも95%同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0017】

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

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

【0018】

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

【0019】

1側面にしたがって、本発明は、配列番号2を含む第2ポリペプチドに少なくとも70%同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0020】

1側面にしたがって、本発明は、配列番号2を含む第2ポリペプチドに少なくとも80%同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0021】

1側面にしたがって、本発明は、配列番号2を含む第2ポリペプチドに少なくとも90%同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0022】

1側面にしたがって、本発明は、配列番号2を含む第2ポリペプチドに少なくとも95%同一性を有するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0023】

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

【0024】

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

【0025】

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

10

20

30

40

50

分に関する。

【0026】

1 側面にしたがって、本発明は、

(a) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、 10

(d) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログから選択される配列を含むポリペプチドに結合特異性を有する抗体を生成することのできるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

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

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

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) または (f) のポリヌクレオチドに相補 20

的であるポリヌクレオチドから選択されるポリペプチドを含む単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0027】

1 側面にしたがって、本発明は、

(a) 配列番号 2 から選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(b) 配列番号 2 から選択される配列を含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

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

(d) 配列番号 2 から選択される配列を含むポリペプチドについて結合特異性を有する抗体を惹起する (raise) ことのできるポリペプチドをコードするヌクレオチド 30

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

(f) 配列番号 1 から選択される配列を含むポリヌクレオチド

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) または (f) のポリヌクレオチドに相補 40

的であるポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0028】

1 側面にしたがって、本発明は、

(a) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチド 40

(b) 配列番号 2 またはそのフラグメントまたはアナログを含む第 2 ポリペプチドに少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチド、

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

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

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

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

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) または (f) のポリペプチド、ここで該 50

分泌アミノ酸配列は欠失している、
から選択されるポリペプチドを含む単離ポリペプチドを提供する。

【0029】

1側面にしたがって、本発明は、

(a) 配列番号2を含む第2ポリペプチドに少なくとも70%同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号2を含む第2ポリペプチドに少なくとも95%同一性を有するポリペプチド

(c) 配列場号2を含むポリペプチド

(d) 配列番号2を含むポリペプチドに結合特異性を有する抗体を惹起することのできるポリペプチド 10

(e) 配列番号2を含むポリペプチドのエピトープを有する部分

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

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

から選択されるポリペプチドを含む単離ポリペプチドを提供する。

【0030】

当業者は、本発明が、本特許出願にここに記載されるように、本発明がDNA分子、すなわちアナログ、例えばそのようなポリペプチドの突然変異体、変異体、ホモログ、および誘導体をコードする、ポリヌクレオチドおよびそれらの相補的配列を含むことを認識する。本発明はまた、本発明のDNA分子に対応するRNA分子を含む。DNAおよびRNA分子に加えて、本発明は、対応するポリペプチドおよびそのようなポリペプチドに特異的に結合するモノ特異的抗体を含む。 20

【0031】

さらなる実施態様では、本発明にしたがうポリペプチドは、抗原性である。

さらなる実施態様では、本発明にしたがうポリペプチドは、免疫原性である。

さらなる実施態様では、本発明にしたがうポリペプチドは、宿主の免疫応答性を誘起できる。 30

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

本発明にしたがって、生物学的研究における「保護」は、生存曲線、速度または期間の有意な増加によって定義される。それぞれ生存曲線を比較するためLog順位試験を使用する、および生存率および死亡への日数を比較するためフィッシャーの直接法を使用する統計学的分析は、P値を計算し、そして2群の間の相違が統計的に有意であるか決定しりために有用であり得る。0.05のP値は有意でないといみなされる。 40

【0035】

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

【0036】

本発明のフラグメントは、1または2以上のそのようなエピトープ性領域を含み、またはそれらの抗原性/免疫原性特性を保持するそのような領域に十分に類似するべきである。

こうして、本発明に従うフラグメントについて、同一性の程度は恐らく無関係であり、な 50

ぜならこれらがここに記載のような、ポリペプチドの特定部分またはそのアナログに100%同一であり得るからである。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列に由来する少なくとも10連続アミノ酸残基を有するフラグメントを提供する。1実施態様では、少なくとも15連続アミノ酸残基。1実施態様では、少なくとも20連続アミノ酸残基。

【0037】

主要な問題は、再び、フラグメントが抗原性/免疫原性特性を保持することである。当業者は、本発明のポリペプチドのアナログがまた、本発明の文脈で用途、すなわち抗原性/免疫原性材料としての用途を見出すことを認識する。こうして、例えば1または2以上の付加、欠失、置換またはその他を含むタンパク質またはポリペプチドは、本発明に含まれる。

10

【0038】

ここで使用するように、本発明のポリペプチドの「フラグメント」、「アナログ」または「誘導体」は、天然または非天然であり得る、1または2以上のアミノ酸残基が保存(同類)または非保存アミノ酸残基(好ましくは保存)で置換されている、これらのポリペプチドを含む。1実施態様では、本発明のペプチドの誘導体およびアナログは、図に示されるこれらの配列またはそのフラグメントと約70%同一性を有する。すなわち、残基の70%は同じである。さらなる実施態様では、ポリペプチドは80%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは85%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは90%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは95%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、ポリペプチドは99%より大きい同一性を有する。さらなる実施態様では、本発明のポリペプチドのアナログは、約20より少ないアミノ酸残基置換、修飾または欠失を有し、そしてより好ましくは10より少ない。

20

【0039】

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

30

【表1】

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

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

40

【0040】

代替的アプローチでは、本発明のポリペプチドのアナログは、図3に開示の置換を含む。代替的アプローチでは、アナログは、例えば、望まれるポリペプチドに効率的にタグを付加することによる、精製をより容易にさせる部分を含む、融合タンパク質であり得る。それは「タグ」を除去することが必要であり得、またはそれは融合ポリペプチドが有用であるのに十分な抗原性をそれ自体保持する場合であり得る。

【0041】

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

50

【0042】

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

10

【0043】

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

20

【0044】

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

【0045】

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

30

【0046】

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

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

【0047】

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

40

【0048】

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

【0049】

さらに、本発明のポリペプチドは、末端、-NH₂アシル化(例えばアセチル化、または

50

チオグリコール酸アミド化、末端カルボキシアミド化、例えばアンモニアまたはメチルアミンによる)によって修飾し、支持体または他の分子への連結または結合のための、安定性、増加された疎水性を提供できる。

【0050】

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

10

【0051】

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

【0052】

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

20

【0053】

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

【0054】

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

30

【0055】

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

【0056】

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

40

【0057】

本発明の別の側面では、また(i)本発明のポリペプチドを、担体、希釈剤またはアジュバントとともに含む事項の組成物、(ii)本発明のポリペプチドおよび担体、希釈剤またはアジュバントを含む医薬組成物、(iii)本発明のポリペプチドおよび担体、希釈

50

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

【0058】

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

10

【0059】

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

20

【0060】

さらなる側面にしたがって、1または2以上の本発明のストレプトコッカス性ポリペプチドを、薬学的に許容されるアジュバントとの混合物として含む医薬組成物を提供する。好適なアジュバントは、(1) 水中油型エマルジョン製剤、例えばMF59(登録商標)、SAF(登録商標)、Rib i(登録商標); (2) フロイントの完全または不完全アジュバント; (3) 塩、すなわちAlK(SO₄)₂、AlNa(SO₄)₂、AlNH₄(SO₄)₂、Al(OH)₃、AlPO₄、シリカ、カオリン; (4) サポニン誘導體、例えばStimulon(登録商標)またはそれから生成された粒子例えばISCOM(免疫刺激複合体); (5) サイトカイン、例えばインターロイキン、インターフェロン、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF); (6) 他の物質例えばカーボンポリヌクレオチド、すなわちポリICおよびポリAU、解毒化コレラ毒素(CTB)および粘膜性免疫の誘導のためのE.coli熱不安定性毒素を含む。アジュバントのより詳細な記載は、M.Z.I Khan et al.によるPharmaceutical Research, vol. 11, No. 1(1994). pp2-11中のレビューおよびまた Gupta et al., によるVaccine, vol. 13, No. 14, pp1263-1276(1995)の別のレビューおよび引用によりここに全体を含めるW O 9 9 / 2 4 5 7 8に利用可能である。好ましいアジュバントは、QUILA(登録商標)、QS21(登録商標)、Alhydrogel(登録商標)およびAdjuphos(登録商標)を含む。

30

40

【0061】

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

【0062】

本発明の医薬組成物を、ストレプトコッカス性感染および/またはストレプトコッカス性感染によって仲介される疾患または症状の処置または予防のために使用し、引用によりここに含める、P.R. Murray(Ed, in chef), E.J. Baron, M.A. Phaller, F.C. Tenover and R

50

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

10

【0063】

さらなる実施態様では、本発明はストレプトコッカス感染に感受性の宿主においてストレプトコッカス感染の予防または処置のための方法であって、当該宿主に本発明の組成物の治療または予防的量を投与することを含む方法を提供する。

【0064】

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

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

【0065】

医薬組成物は好ましくは、約0.001ないし100 μ g/kg(抗原/体重)およびより好ましくは、0.01ないし10 μ g/kgおよび最も好ましくは0.1ないし1 μ g/kgの単位用量形態で、免疫化の間約1ないし6週間間隔の間隔で1ないし3回である。

20

【0066】

医薬組成物は好ましくは、約0.1 μ gないし10mg、そしてより好ましくは1ないし1mgそして最も好ましくは10ないし100 μ gの単位用量形態で、免疫化の間約1ないし6週間間隔の間隔で1ないし3回である。

【0067】

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

30

【0068】

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

【0069】

図に示されるポリヌクレオチド配列が本発明のポリペプチドをなおもコードする縮重コドンで変化させ得ることが認識される。よって、本発明はさらに、配列間の50%同一性、1実施態様では配列間の少なくとも70%同一性、1実施態様では配列間の少なくとも75%同一性、1実施態様では配列間の少なくとも80%同一性、1実施態様では配列間の少なくとも85%同一性、1実施態様では配列間の少なくとも90%同一性を有する、前記のこのポリヌクレオチド配列(またはその相補的配列)にハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。さらなる実施態様では、ポリヌクレオチドは、ストリンジェント条件下でハイブリダイズ可能、すなわち少なくとも95%同一性を有するものである。更なる実施態様では、97%同一性より高い。

40

【0070】

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

【0071】

50

さらなる実施態様では、本発明は、

- (a) ポリペプチドをコードするDNA配列または
- (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補物

にストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供し、ここで当該ポリペプチドは、配列番号2またはそのフラグメントまたはアナログを含む。

【0072】

さらなる実施態様では、本発明は、

- (a) ポリペプチドをコードするDNA配列または
- (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補物

にストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供し、ここで当該ポリペプチドは配列番号2を含む。 10

【0073】

さらなる実施態様では、本発明は、

- (a) ポリペプチドをコードするDNA配列または
- (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補物

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

【0074】

さらなる実施態様では、本発明は、 20

- (a) ポリペプチドをコードするDNA配列または
- (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補物

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

【0075】

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

【0076】

さらなる実施態様では、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする配列番号1に示されるものまたはそのフラグメントまたはアナログである。 30

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

当業者によって容易に認識されるように、ポリヌクレチドはDNAおよびRNAの両方を含む。 40

【0080】

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

【0081】

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

【0082】

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

【0083】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの取得および評価のための一般方法は、以下の引用文献に記載される：引用によりここに含める Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Edited by Ausubel F. M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York; *PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering*, Edited by White B.A., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 pages ; *Protein Purification, Principles and Practices*, Scopes R. K., Springer-Verlag, New York, 3rd Edition, 1993, 380 pages; *Current Protocols in Immunology*, Edited by Coligan J. E. et al., John Wiley & Sons Inc., New York.

10

【0084】

組み換え体生産のために、宿主細胞を、ポリペプチドをコードするベクターでトランスフェクトし、それからプロモーターを活性化する、形質転換体を選択するまたは遺伝子を増幅するために適当に修飾された栄養培地で培養する。好適なベクターは、選択された宿主で生存可能および複製可能であるものであり、そして染色体的、非染色体的および合成 DNA 配列、例えば細菌性プラスミド、ファージ DNA、バキュロウイルス、コウボプラスミド、プラスミドおよびファージ DNA の組み合わせに由来するベクターを含む。ポリペプチド配列を、制限酵素を使用して適当な部位へベクターに取りこませ得、その結果それはプロモーター、リボゾーム結合部位（コンセンサス領域またはシャインダルガノ配列）、および所望によりオペレーター（制御エレメント）に作動可能に連結されている。所定の宿主およびベクターに適当である発現制御領域の個々の構成要素を、確立された分子生物学原理にしたがって選択できる（引用によりここに含める Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York）。好適なプロモーターは限定しないが、LTR または SV40 プロモーター、*E. coli lac*、*tac* または *trp* プロモーターおよびファージラムダ P_L プロモーターを含む。ベクターは好ましくは複製開始点並びに選択マーカー、すなわちアンブリコン抵抗性遺伝子を取りこむ。好適な細菌性ベクターは、pET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10 phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pkk223-3、pkka233-3、pDR540、pRIT5、および真核ベクター pBlueBacIII、pWLEO、pSV2CAT、pOG44、PXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG および pSVL を含む。宿主細胞は、細菌性、すなわち *E. coli*、*Bacillus subtilis*、*Streptomyces*；真菌性すなわち *Aspergillus niger*、*Aspergillus nidulins*；コウボすなわち *Saccharomyces* または真核性すなわち CHO、COS であり得る。

20

30

40

【0085】

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

50

て達成し得る。

【0086】

ポリペプチドを、リーダーまたは分泌配列を有してまたは有しないで発現させ得る。前者の場合、リーダーを、翻訳後プロセッシングを使用して除去し（引用によりここに含めるUS 4431739;US4425437およびUS4338397参照）または発現されたポリペプチドを精製するに続いて化学的に除去し得る。

【0087】

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

10

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

【0088】

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

20

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

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

【0089】

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

30

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

【0090】

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

40

【0091】

宿主中のストレプトコッカスの検出のためのさらなる診断方法は、

- a) 本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントと反応性の抗体を、検出可能標識で標識すること
- b) 該標識した抗体または標識されたフラグメントを、宿主に投与すること、および

50

c) 宿主中の特異的に結合した標識された抗体または標識されたフラグメントを検出し、それはストレプトコッカスの存在を指摘する、を含む。

【0092】

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

【0093】

本発明のさらなる側面は、診断のため、および特にストレプトコッカス感染の処置における特異的抗体の生産のための免疫原として本発明のストレプトコッカスポリペプチドの使用である。好適な抗体は、適当なスクリーニング方法を使用して、例えば特定の抗体の、試験モデルでストレプトコッカス感染に対して受動的に保護する能力を測定することによって決定し得る。動物モデルの1例は、ここでの例で記載するマウスモデルである。抗体は全体抗体または抗原に結合するそのフラグメントであり得、そして任意の免疫グロブリンクラスに属し得る。該抗体またはフラグメントは、動物起源の、具体的には哺乳動物起源の、より具体的にはマウス、ラットまたはヒト起源のものであり得る。それは天然抗体またはそのフラグメント、または望まれれば、組換え抗体または抗体フラグメントであり得る。用語組換え抗体または抗体フラグメントは、分子生物学的技法を使用して生産された抗体または抗体フラグメントを意味する。抗体または抗体フラグメントは、ポリクローナルまたは好ましくはモノクローナル抗体であり得る。それは、*S. pyogenes*ポリペプチドに付随するエピトープのある数に特異的であり得るが、好ましくは1つに特異的である。

【0094】

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

【0095】

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

【0096】

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

【0097】

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

【0098】

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

【0099】

実施例 1

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

【0100】

S. pyogenes BVH-P7(配列番号1)遺伝子のコード領域を、血清型M1 *S. pyogenes*菌株 ATCC / 00294のゲノムDNAからPCRによって増幅する(Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, CA)。表1に示す、制限部位NdeI (CATATG)およびNotI (GCGGCCGC)の付加のための塩基伸長物を含ませる以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用する: DMAR293およびDMAR294。PCR産物を、製造者の指示(Chatsworth, CA)にしたがって、QIAgenからのQIAquickゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製し、そしてNdeIおよびNotI

10

20

30

40

50

Iで消化する (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfe, Canada)。pET-21(+)ベクター (Novagen, Madison, WI)を、NdeIおよびNotIで消化し、そしてQIAgen(Chatsworth, CA)からのQIAquickゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製した。NdeI-NotI PCR産物を、NdeI-NotI pET-21b(+)発現ベクターにライゲートさせた。ライゲートされた産物を、Simanisの方法 (Hanahan, D. DNA Cloning, 1085, D.M. Glover(ed), pp.109-135) にしたがって

【化1】

E. coli 菌株 DH5•

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

10

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

【0101】

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

【表2】

20

遺伝子	プライマー ID (配列番号)	制限部位	ベクター	配列
BVH-P7	DMAR293 (3)	NdeI	pET21b	5'-GTAGTCACCCACCATATGGAAGTTTTTAG-3'
BVH-P7	DMAR294 (4)	NotI	pET21b	5'-TTTTTCTTTGCGGCCGCGAGTTATTAGT-3'
BVH-P7	DMAR480a (5)	BamHI	pCMV-GH	5'-GGGGATCCCACCCACAATCAGG-3'
BVH-P7	DMAR481a (6)	SalI	pCMV-GH	5'-GGTTGTCGACAGTAAAGCAACGCTAGTG-3'

30

【0102】

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

40

【化2】

(MKKHLKTVALTLTTSVVVTHN)

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

【0103】

BVH-P7 (配列番号1) 遺伝子のPCR増幅によって存在を確認するために、以下の

50

4つの血清学的に明瞭な*S. pyogenes*菌株を使用した：血清型M1 *S. pyogenes*菌株ATCC700294および血清型M3 *S. pyogenes*菌株ATCC12384を、アメリカンタイプカルチャーコレクション(Rockville, MD)から取得した；血清型M6 *S. pyogenes* SPY67臨床的単離株は、Centre de recherche en infectiologie du Centre hospitalier de l' universite Laval, Sainte-Foyによって提供された；およびマウスから当初単離された*S. pyogenes*菌株B514は、University of Alabama, BirminghamからSusan Hollingsheadによって提供された。*E. coli*菌株XL1-Blue MRFを、ネガティブコントロールとしてこれらの実験で使用した。染色体性DNAを、以前記載されたようにそれぞれの*S. pyogenes*菌株から単離した(Jayarao EM et al., 1991. J. Clin. Microbiol. 29:2774-2778)。BVH-P7(配列番号1)遺伝子を、4つの*S. pyogenes*菌株から精製されたゲノムDNAからPCR(Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, Lajolla, Ca)によって、そしてコントロール*E. coli*菌株をオリゴヌクレオチドプライマーDMAR293およびDMAR294(表1)を使用して増幅した。PCRを、45秒間の95、45秒間の50および2分間の72の30サイクルおよび7分間の72の最終伸長期間で実施した。PCR産物を、1%アガロースゲル中でサイズ分画化し、そして臭化エチジウム染色によって可視化した。これらのPCR増幅の結果を表2に表す。増幅産物の分析は、BVH-P7(配列番号1)遺伝子が試験された4つの*S. pyogenes*菌株のすべてのゲノム中に存在した。そのような産物を、コントロール*E. coli* DNAがこれらのオリゴヌクレオチドプライマーと同一のPCR増幅に服するとき検出した。

10

20

【0104】

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

【表3】

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

30

* マウス単離体

【0105】

実施例2

この例は、CMVプラスミドpCMV-GHにおける*S. pyogenes* BVH-P7遺伝子のクローニングを示す。

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

40

【0106】

リーダーペプチド領域を欠くBVH-P7(配列番号1)遺伝子のコード領域を、表1に記載の、制限部位BamHI(GGATCC)およびSalI(GTCGAC)の付加のための塩基伸長物を含んだオリゴヌクレオチドプライマーDMAR480aおよびDMAR481aを使用して、血清型M1 *S. pyogenes*菌株ATCC700294のゲノムDNAからPCR(Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, Lajolla, CA)によって増幅した。PCR産物を、QIAGEN(chatsworth, CA)からのQIAquickゲル抽出

50

キットを使用してアガロースゲルから精製し、制限酵素 (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baied'Uefe, Canada) で消化した。p C M V - G H ベクター (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas) を、B a m H I および S a l I で消化し、そして Q I A g e n (Chatsworth, CA) からの QIAquickゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製した。B a m H I - S a l I D N A フラグメントを、B a m H I - S a l I - p C M V - G H ベクターにライゲートし、C M V プロモーターの制御下の h G H - B V H - P 7 融合タンパク質を創出した。ライゲートした産物を、Simanisの方法 (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover(ed), pp. 109-135) にしたがって、

【化3】

E. coli 菌株 DH5*

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

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

【0107】

実施例 3

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

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

【0108】

実施例 4

この例は、S. pyogenes B V H - P 7 組み換え体タンパク質の生産および精製を示す。B V H - P 7 (配列番号 1) 遺伝子での組換え体 p E T - 2 1 b (+) プラスミドを使用し、エレクトロポレーション (Gene Pulser II apparatus, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canada) によって、E. coli 菌株 T u n e r (D E 3) (F⁻ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)gel dcm lacYI(DE)) (Novagen, Madison, WI) を形質転換した。E. coli のこの菌株において、組み換え体タンパク質の発現を制御する T 7 プロモーターは、遺伝子が、イソプロピル - d - チオ - ガラクトピラノシド (I P T G) によって誘導可能である l a c プロモーターの制御下である、T 7 R N A ポリメラーゼ (D E 3 プロファージ上に存在する) によって特異的に認識される。形質転換体 T u n e r (D E 3) / r p E T 2 1 (+) を、m l あたり 100 μ g のカルベニシリン (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Canada) を含む L B 培地 (ペプトン 10 g / L、コウボエキス 5 g / L、N a C l 10 g / L) 中で 250 r p m で撹拌しつつ 37 °C で、A₅₀₀ が 0.6 の値に達するまで成長させた。B V H - P 7 H i s タグ付加 S. pyogenes 組み換え体タンパク質の生産を誘導するために、細胞を 0.1 m M の最終濃度の I P T G の存在下もう 3 時間インキュベートした。500 m l 培養物から誘導された細胞を、遠心分離によってペレット化し、そして - 70

10

20

30

40

50

で凍結した。

【0109】

不溶性分画またはIPTGで誘導したTuner (DE3) / r p E T 2 1 b (+)からのBVH-P7 Hisタグ付加組換え体タンパク質の精製を、His・Tag配列(6連続ヒスチジン残基)の、His・Bind金属キレート化樹脂上に固定化された2価カチオンに結合する特性に基づいてアフィニティークロマトグラフィーによって実施した。簡単には、IPTGで誘導された500mL培養物から取得されたペレット化細胞を、6M グアニジン-HClを含む溶解バッファー(20mM Tris、500mM NaCl、10mM イミダゾール、pH7.9)中に再懸濁し、超音波処理し、そして12000Xgで20分間遠心分離し、細胞残骸を除去した。上清を、Ni-NTAアガロース樹脂(Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada)と45分間4 でインキュベートした。BVH-P7Hisタグ付加S. pyogenes組換え体タンパク質を、6M グアニジノ-HClおよび250mM イミダゾール-500mM NaCl-20mM Tris、pH7.9を含む溶液で樹脂から溶出させた。サンプルからの塩およびイミダゾールの除去を、10mM Trisおよび0.9% NaCl、pH7.9で終夜4 に対する透析によってなした。組換え体タンパク質の量を、MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois)によって評価した。

10

【0110】

実施例5

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

20

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

30

【0111】

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

【表4】

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

40

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

² BVH-P7 Hisタグ付加組換え体タンパク質の分子量を、SDS-PAGE後に評価した。

³ 健康ヒトボランティアから収集された血清を一緒に貯留し、そして1/500に希釈しイムノプロットを実施した。

50

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

【 0 1 1 2 】

実施例 6

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

細菌を、0.5% コウボエキス (Difco Laboratories) および 0.5% ペプトンエキス (Merck, Darmstadt, Germany) を有する Todd Hewitt (TH) 培地 (Difco Laboratories, Detroit, MI) 中で、37 °C で 8% CO₂ 雰囲気中で成長させ、0.600 の OD_{490nm} を与えた (~ 10⁸ CFU/ml)。抗 B V H - P 7 またはコントロール血清の希釈品を次いで添加し、そして細胞に結合させ、これを 2 時間 4 °C でインキュベートした。サンプルをブロッキングバッファー (2% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む燐酸バッファー生食水 (PBS)) で 4 回洗浄し、それからブロッキングバッファー中に希釈した 1 ml のヤギフルオレセイン (FITC) コンジュゲート抗マウス IgG + IgM を添加した。室温での追加的 60 分のインキュベーション後、サンプルをブロッキングバッファーで 4 回洗浄し、そして PBS バッファー中の 0.25% ホルムアルデヒドで 18 - 24 時間 4 °C で固定化した。細胞を PBS バッファーで 2 回洗浄し、そして PBS バッファーの 500 μl 中に再懸濁した。細胞を、フローサイトメトリー (Epics (登録商標) XL; Beckman Coulter, Inc.) によって分析するまで暗黒で 4 °C で保持した。サンプルあたり 1 万のインタクトな *S. pyogenes* 細胞を分析し、そして結果を標識された細胞の存在および蛍光指数として表現した。蛍光指数を、コントロールマウス血清について取得された蛍光値によって割った、免疫血清でストレプトコッカス性細胞を標識した後得られたメジアン蛍光値として算出した。1 の蛍光値は、インタクトのストレプトコッカス性細胞の表面の抗体の結合がないことを指摘した。

【 0 1 1 3 】

B V H - P 7 His タグ付加組換え体タンパク質で免疫化された 8 匹のマウスから収集した血清を、サイトフルオロメトリーによって分析し、そして結果を表 4 に表す。精製された B V H - P 7 His タグ付加タンパク質で免疫化されたマウスから収集された血清の全ては、試験した異種性 (ATCC 12384; 血清型 M3) *S. pyogenes* 菌株上の、それらの対応する表面曝露エピトープを効率的に認識する B V H - P 7 に特異的抗体を含んだ。蛍光指数は 10 から 18 まで変化した。分析した 10000 のこの *S. pyogenes* 細胞のうち 97% より多くが、B V H - P 7 特異的抗血清中に存在する抗体で標識された。これらの血清をまた貯留し、そして以下の *S. pyogenes* 菌株と反応させた: 血清型 M1 *S. pyogenes* 菌株 ATCC 700294、血清型 M3 および血清型 M18 *S. pyogenes* 菌株 ATCC 12357 を、アメリカンタイプカルチャーコレクション (Rockville, MD, USA) から取得した; 血清型 M6 *S. pyogenes* S P Y 69 および M2 *S. pyogenes* S P Y 68 臨床的単離株は、Centre de recherche en infectiologie du Centre hospitalier de l'universite Laval, Sainte-Foy によって提供された。精製された His タグ付加組換え体 B V H - P 7 タンパク質で免疫化後収集された血清の貯留物中に存在する B V H - P 7 - 特異的抗体は、4 から 9 までの間の蛍光指数を有するこれらのストレプトコッカス性菌株のそれぞれの細菌の表面に付着した。反対に、非免疫化または偽免疫化 (sham-immunized) マウスから収集した貯留物または血清を使用したとき、ストレプトコッカス性細胞の標識は認められなかった。これらの観察は明白に、B V H - P 7 タンパク質が表面に接近可能であり、ここにそれは抗体によって容易に認識されることができると実証する。抗 *S. pyogenes* 抗体は、*S. pyogenes* 感染に対する保護において重要な役割を演ずることを示した。

【 0 1 1 4 】

表 4 *S. pyogenes* ATCC 12384 菌株 (血清型 M3) のインタクトの細胞の表面の B V H - P 7 特異的抗体の付着の評価

10

20

30

40

50

【表 5】

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

10

¹ マウス S 1 ないし S 8 を皮下に、QuilA アジュバント (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada) の 10 μ g と混合した 20 μ g の精製された BVH - P 7 組換え体タンパク質の 20 μ g で 3 週間間隔で 3 回注射した。血清を 1 / 50 希釈した。

20

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

³ 分析した 10000 細胞からのストレプトコッカス標識した細胞の%

⁴ 非免疫化または偽免疫化されたマウスから収集された血清を、貯留 1 / 50 希釈し、そしてこのアッセイのためのネガティブコントロールとして使用した。

20 μ g の精製されたストレプトコッカス性組換え M タンパク質、すなわち周知の表面タンパク質で免疫化されたマウスから取得された血清を、1 / 200 希釈し、そしてアッセイのためのポジティブコントロールとして使用した。

30

【 0 1 1 5 】

実施例 7

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

ニュージーランドウサギ (Charles River Laboratories, St-Constant, Canada) を皮下に、実施例 4 に記載のように生産および精製し、そして Alhydrogel アジュバント (Superfos Biosector a/s) に吸着させた BVH - P 7 His タグ付加組換え体タンパク質の、50 μ g および 100 μ g で多重部位に注射した。ウサギを BVH - P 7 His タグ付加組換え体タンパク質で 3 週間間隔で 3 回免疫化した。血液サンプルを、第 3 注射の 3 週間後に収集した。該血清中に存在する抗体を、40% 飽和硫酸アンモニウムを使用する沈降によって精製した。10 匹のメスの CD - 1 マウス (Charles River) の群を静脈内に、BVH - P 7 His タグ付加組換え体タンパク質で免疫化されたウサギ、または関連のないコントロール組み換え体タンパク質で免疫化されたウサギから収集された精製された血清の 500 μ l で注射した。18 時間後、マウスを近似的に 2×10^7 CFU のタイプ 3 *S. pyogenes* 菌株 ATCC 12384 でチャレンジした。*S. pyogenes* チャレンジ接種物のサンプルを、アガープレート上に置き、CFU を決定し、そしてチャレンジ用量を確認した。死亡を、5 日の期間について記録した。

40

【 0 1 1 6 】

実施例 8

この例は、精製された組み換え体 BVH - P 7 タンパク質での免疫化によって誘導される

50

胎児S. pyogenes感染に対するマウスの保護を示す。

8匹のメスのBalb/c (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada)の群を皮下に、10µgのQuilAアジュバント(Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada)の存在下のアフィニティ精製されたBVH-P7 Hisタグ付加組換え体タンパク質の20µg、またはコントロールとしてPBS中のQuilAアジュバント単独で2週間間隔で3回免疫化した。血液サンプルを、それぞれの免疫化の前の第1、第14および28日に、第3注射の2週間後(第42日)に、眼窩洞(orbital sinus)から収集した。1週間後、マウスを、近似的に2x10^6 CFUのタイプ3S. pyogenes菌株ATCC 12384でチャレンジした。S. pyogenes チャレンジ接種物のサンプルを、血液アガープレート上に置き、CFUを決定しそしてチャレンジ用量を確認した。精製組換え体BVH-P7タンパク質で免疫化された、8匹のマウスのうち4匹は、致死チャレンジに対して保護され、アジュバント単独を受容したマウスのわずか12%(1/8)と対比される(表1)。

10

【0117】

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

【表6】

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

20

【図1】

Figure 1 (配列番号1)

```

1 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
2 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
3 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
4 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
5 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
6 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
7 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
8 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
9 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
10 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
11 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
12 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
13 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
14 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
15 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
16 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
17 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
18 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
19 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
20 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
21 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
22 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
23 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
24 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
25 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
26 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
27 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
28 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
29 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
30 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
31 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
32 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
33 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
34 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
35 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
36 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
37 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
38 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
39 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
40 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
41 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
42 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
43 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
44 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
45 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
46 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
47 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
48 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
49 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
50 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
51 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
52 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
53 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
54 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
55 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
56 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
57 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
58 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
59 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
60 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
61 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
62 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
63 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
64 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
65 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
66 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
67 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
68 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
69 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
70 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
71 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
72 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
73 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
74 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
75 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
76 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
77 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
78 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
79 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
80 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
81 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
82 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
83 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
84 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
85 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
86 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
87 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
88 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
89 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
90 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
91 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
92 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
93 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
94 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
95 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
96 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
97 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
98 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
99 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC
100 ATGAGAAAC AGCTTAAAC AGTGGCTTG ACCCTCACTA CAGTATGGGT AGTCACCCAC

```

【図2】

Figure 2 (配列番号2)

```

1 MKKHLKVAL TLTVSVVFR NQEVFLVKS PFKQTPASS SSGADYAES SGKSLKXNE
2 TSGFVDDVTV OLFSDKRTTP BKIKDMLAKG PRQELKAVT SNTESHQIT SSGSLKXNE
3 SLSLNKIVPS TSNWICDFP TKGFTLVGLS KSGVEKLSQT DRHLVLPDAA DGTQLIQVAS
4 PAFPPKXIA TAPYSHAGE NGEISQLEVD GREILNDEV FNSVLLKVT TPFYKIQGQ
5 DSVDMENIA EYNLPESELET ISDYAFAPLA LKQIDLEPDL KAIQELAFDQ NQITGKLSLP
6 RQLMRLABRA FKNHIXIE FRGNSLVIG BASFQDNDIS QMLMDFGLEK IESBAGTNP
7 GDDHYNRVV LMTXSGKNPS GLACENTYVN FOKSLWQSP ELDYTKWLEK DPFYQKISVT
8 GFSNKQLQKV KRNFQLEIPK QINGVYIIEI GDNAFRNVDF QNKTLRYDL SEVYKPSIR
9 KIGAFAPQSN NLSKFSRSDD LEEIKRGAZM NNRIETLEIK DKLVITIGDA PHINHYFAIV
10 LPESVQEIGR SAFRQNGANN LIFMGSKVKIT LGSMAFLSNR LSHLDLSECK QLTETPQAF
11 SDAALKEVLE PASLKTLEE AFKKNELKQL SVASALSHIA FNALDNDGD EQFNKVVVK
12 THMSYALAD GSEFVDEPK LSSIVDELEK LLLELELDY SFLRATPTGQ FRMNTAGRA
13 LLSKSNLRCG EKQKPEQEQ PFLRVDLDR AIKAKEXAVL TKKATNGQL LERSINKAVL
14 RYNSAIKKA NVKLSKSLD LLTGLVEGCK PLAQATMVQC VVLEKTPLEL PEYVIGLNVY
15 FDKSGKLIYA LDMSDTIGEG QKDAYGNPL NVDEDNESH ALAVATLADY EQLDIXIILN
16 SKLSQLTSEI QVETAAHYRA GTFQAQNAE AEAELLPKP GTHSBSKSSS ESANSKDRCL
17 QSNPKNRRG HSAIIPRTGS KSPFVYGLG YTSVALLSLI TALXKKKY*

```


【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066650 A2

(51) International Patent Classification: C12N 15/31, 15/63, C07K 14/315, 19/00, A61K 39/00, A61P 17/00. (74) Agents: MORROW, Joy, D. et al.; Simet & Biggar, P.O. Box 2909, St. Jean D, 900-55 Metcalfe Street, Ottawa, Ontario K1P 5Y6 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA02/00207 (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IB, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 21 February 2002 (21.02.2002) (25) Filing Language: English (26) Publication Language: English (30) Priority Data: 60/269,860 21 February 2001 (21.02.2001) US (71) Applicant (for all designated States except US): SHIRE BIOCHEM INC, [CA/CA]; 275 Armand Frappier Boulevard, LaSalle, Quebec H7V 4A7 (CA). (84) Designated States (regional): ARIPO patent: GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW; European patent: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UZ, TM; European patent (local): BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR; OAPI patent: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG.

(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): MARTIN, Denis [CA/CA]; 4728 44^e rue (Gabony, St-Augustin-de-Desmaures, Quebec G5A 1H9 (CA); RIOUX, Stephane [CA/CA]; 869 Avenue Des Financiers, Beausport, Quebec G1E 1B3 (CA); BRODEUR, Bernard, R. [CA/CA]; 2401 Marston, Silery, Quebec G1T 1N6 (CA); HAMEL, Josée [CA/CA]; 2401 Marston, Silery, Quebec G1T 1N6 (CA); RIEAULT, Patrick [CA/CA]; 44 rue Bélan, St-Hubert-de-Lévis, Quebec G1J 1P9 (CA). Published: without international search report and to be published upon receipt of that report. For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: STREPTOCOCCUS PYOGENES POLYPEPTIDES AND CORRESPONDING DNA FRAGMENTS

1 MKZHLKIVAL TLTTYSVYTH NQEVFSIVKE PILKQTAGE SIGGADYAES SGSKLKKINE
61 TESPVDITVT DLFSDKRTTF FETKDTLAKG PRFQELKAVT EMTSEBQIIT SGGLEQSKK
121 SLSLNKIVPS TSNWEICDPI TKGNLVLGLS KSGVKEISQT DHELVPSQRA DQELIQVAS
181 PAFVPMKXKA TARYSPRAGE NGEISQLDND GKRIINGGEV FNSYLLKAVT LPFGYKHIGQ
241 DAFVPMKNTA EVNLPSLET ISDYAFAPHLA LKQIDLFDNL KATCRLEAFPS NQTTCVTSIF
301 RQLMLAERA FKSNIKTLT FRGNSLKVIG EASFQDNDLS QLMPLDGLK IESEAFQGNP
361 GDDHYNHRVV LNTKSGKNPS CLAPENTYVN PDRSLWQESP EIDYTKWLEP DPTYCKNSVT
421 GFSNKGLOKV KRNKLELIPK QHNGVTITEI GDNAPRVVDP QNKTLRKYDL BEVVLPSITR
481 KIGAFAPQSN NLKSPFASDD LEEIKDGAFM NNRIETLEBK DKLVTIGDAA FHLNHIXALV
541 LPBSVQELGR SAFRQNGANN LIFMGSKVKT LGEMAPLSNR LEHLDSBQK QLTSLIPVQAF
601 SDNALKEVLL PASLKTREE AFKRNHLKQL EVASALSHIA FNALDDMDGD EQFDNKVVVK
661 THHSYALAD GEHFTVDPDX LSSTVDLEK ILKLEBGLDY STLQQTQTQ FRDMTAGKA
721 LLSKSNLRQG EKQNFLEQEAQ PFLGRVLELK AIAKAEKALV TKKATKNGQL LERSINQAVL
781 AYNSAKKA NYKLEKLELD LLTGLVDEGG PLGAGTMMQD VYLLKTPLEL PEYTIQNVY
841 PDKSGLIYA LEMSDTIGGG QKDAYSNPIL SVQDNEGTH ALNAVTLADY EQLDKITILN
901 SKLSQLSIR QVPTAYHRA GIPQAIQND AEEQLDPXG GTRSRKSSSS RSANSKTRGL
961 QSNPRTNRGR HSAILPRTGS KGSVYVGLG YTSVALLSLI TAIKKKKY*

(57) Abstract: The present invention relates to antigens, more particularly antigens of Streptococcus pyogenes (also called group A Streptococcus (GAS)), bacterial pathogen which are useful as vaccine component for prophylaxis, therapy and/or diagnostic.

WO 02/066650 A2

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

STREPTOCOCCUS PYOGENES POLYPEPTIDES
AND CORRESPONDING DNA FRAGMENTS

5 FIELD OF THE INVENTION

The present invention is related to polypeptides of Streptococcus pyogenes (Group A Streptococcus) which may be used to prevent, diagnose and/or treat streptococcal infection.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Streptococci are gram (+) bacteria which are differentiated by group specific carbohydrate antigens A through O which are found at the cell surface. S. pyogenes isolates are further distinguished by type-specific M protein antigens. M proteins are important virulence factors which are highly variable both in molecular weights and in sequences. Indeed, more than 80-M protein types have been identified on the basis of antigenic differences.

20

S. pyogenes is responsible for many diverse infection types, including pharyngitis, erysipelas and impetigo, scarlet fever, and invasive diseases such as bacteremia and necrotizing fasciitis. A resurgence of invasive disease in recent years has been documented in many countries, including those in North America and Europe. Although the organism is sensitive to antibiotics, the high attack rate and rapid onset of sepsis results in high morbidity and mortality.

30 To develop a vaccine that will protect hosts from S. pyogenes infection, efforts have focused on virulence factors such as the type-specific M proteins. However, the amino-terminal portion of M proteins was found to induce cross-reactive antibodies which reacted with human myocardium, tropomyosin, myosin, and vimentin, which might be implicated in autoimmune diseases. Others have used recombinant techniques to produce complex hybrid proteins containing amino-terminal peptides of M proteins from different serotypes. However, a safe vaccine containing all

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

S. pyogenes serotypes will be highly complex to produce and standardize.

In addition to the serotype-specific antigens, other S. pyogenes proteins have generated interest as potential vaccine candidates. The C5a peptidase, which is expressed by at least S. pyogenes 40 serotypes, was shown to be immunogenic in mice, but its capacity to reduce the level of nasopharyngeal colonization was limited. Other investigators have also focused on the streptococcal pyrogenic exotoxins which appear to play an important role in pathogenesis of infection. Immunization with these proteins prevented the deadly symptoms of toxic shock, but did not prevent colonization.

15 The University of Oklahoma has set up a genome sequencing project for S. pyogenes strain M1 GAS (<http://dnal.chem.ou.edu/strep.html>).

Therefore there remains an unmet need for S. pyogenes antigens that may be used vaccine components for the prophylaxis and/or therapy of S. pyogenes infection.

SUMMARY OF THE INVENTION

25 According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID No : 2 or fragments or analogs thereof.

30 According to one aspect, the present invention relates to polypeptides which comprise an amino acid sequence SEQ ID No : 2 or fragments or analogs thereof.

In other aspects, there are provided polypeptides encoded by 35 polynucleotides of the invention, pharmaceutical compositions, vectors comprising polynucleotides of the invention operably linked to an expression control region, as well as host cells transfected with said vectors and processes for producing polypeptides comprising culturing said host cells under 40 conditions suitable for expression.

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 represents the DNA sequence of BVH-P7 gene from serotype M1 S. pyogenes strain ATCC700294; SEQ ID NO: 1. The underlined portion of the sequence represents the region coding for the leader peptide.

Figure 2 represents the amino acid sequence BVH-P7 protein from serotype M1 S. pyogenes strain ATCC700294; SEQ ID NO: 2. The underline sequence represents the 21 amino acid residues leader peptide.

Figure 3 depicts the comparison of the predicted amino acid sequences of the BVH-P7 open reading frames from Spy74, Spy70, Spy69, Spy58, Spy 60, ATCC12357, ATCC700294 S. pyogenes strains by using the program Clustal W from MacVector sequence analysis software (version 6.5). Underneath the alignment, there is a consensus line where * and . characters indicate identical and similar amino acid residues, respectively.

20

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides purified and isolated polynucleotides, which encode Streptococcal polypeptides that may be used to diagnose, prevent, and/or treat Streptococcal infection.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs or thereof.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs or thereof.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

90% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs or thereof.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs or thereof.

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides characterized by the amino acid sequence comprising SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs or thereof.

According to one aspect, the present invention provides a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs or thereof.

According to one aspect, the present invention relates to epitope bearing portions of a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs or thereof.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 90% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides characterized by the amino acid sequence comprising SEQ ID NO: 2.

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

According to one aspect, the present invention provides a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

5

According to one aspect, the present invention relates to epitope bearing portions of a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

10 According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide chosen from:

- (a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
- 15 (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 85% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
- 20 (d) a polynucleotide encoding a polypeptide capable of generating antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
- 25 (e) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
- (f) a polynucleotide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 1 or fragments or analogs thereof;
- 30 (g) a polynucleotide that is complementary to a polynucleotide in (a), (b), (c), (d), (e) or (f).

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide chosen from:

- 35 (a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2;
- (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence
- 40 chosen from: SEQ ID NO: 2;

5

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2;
- 5 (e) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2;
- (f) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1;
- 10 (g) a polynucleotide that is complementary to a polynucleotide in (a), (b), (c), (d), (e) or (f).

According to one aspect, the present invention provides an isolated polypeptide comprising a polypeptide chosen from:

- 15 (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;
- (b) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;
- 20 (c) a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;
- (d) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;
- 25 (e) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;
- (f) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the N-terminal Met residue is deleted;
- 30 (g) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the secretory amino acid sequence is deleted.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polypeptide comprising a polypeptide chosen from:

- 35 (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2;
- (b) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NO: 2;
- (c) a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2;

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

- (d) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2;
- (e) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2;
- 5 (f) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the N-terminal Met residue is deleted;
- (g) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the secretory amino acid sequence is deleted.

10 Those skilled in the art will appreciate that the invention includes DNA molecules, i.e. polynucleotides and their complementary sequences that encode analogs such as mutants, variants, homologues and derivatives of such polypeptides, as described herein in the present patent application. The
15 invention also includes RNA molecules corresponding to the DNA molecules of the invention. In addition to the DNA and RNA molecules, the invention includes the corresponding polypeptides and monospecific antibodies that specifically bind to such polypeptides.

20

In a further embodiment, the polypeptides in accordance with the present invention are antigenic.

In a further embodiment, the polypeptides in accordance with the
25 present invention are immunogenic.

In a further embodiment, the polypeptides in accordance with the present invention can elicit an immune response in a host.

30 In a further embodiment, the present invention also relates to polypeptides which are able to raise antibodies having binding specificity to the polypeptides of the present invention as defined above.

35 An antibody that "has binding specificity" is an antibody that recognizes and binds the selected polypeptide but which does not substantially recognize and bind other molecules in a sample, e.g., a biological sample. Specific binding can be measured using an ELISA assay in which the selected polypeptide is used
40 as an antigen.

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

In accordance with the present invention, "protection" in the biological studies is defined by a significant increase in the survival curve, rate or period. Statistical analysis using the log rank test to compare survival curves, and Fisher exact test to compare survival rates and numbers of days to death, respectively, might be useful to calculate P values and determine whether the difference between the two groups is statistically significant. P values of 0.05 are regarded as not significant.

In an additional aspect of the invention there are provided antigenic/immunogenic fragments of the polypeptides of the invention, or of analogs thereof.

15

The fragments of the present invention should include one or more such epitopic regions or be sufficiently similar to such regions to retain their antigenic/immunogenic properties. Thus, for fragments according to the present invention the degree of identity is perhaps irrelevant, since they may be 100% identical to a particular part of a polypeptide or analog thereof as described herein. The present invention further provides fragments having at least 10 contiguous amino acid residues from the polypeptide sequences of the present invention. In one embodiment, at least 15 contiguous amino acid residues. In another embodiment, at least 20 contiguous amino acid residues.

The key issue, once again, is that the fragment retains the antigenic/immunogenic properties.

30

The skilled person will appreciate that analogs of the polypeptides of the invention will also find use in the context of the present invention, i.e. as antigenic/immunogenic material. Thus, for instance proteins or polypeptides which include one or more additions, deletions, substitutions or the like are encompassed by the present invention.

As used herein, "fragments", "analogs" or "derivatives" of the polypeptides of the invention include those polypeptides in which one or more of the amino acid residues are substituted

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably conserved) and which may be natural or unnatural. In one embodiment, derivatives and analogs of polypeptides of the invention will have about 70% identity with those sequences 5 illustrated in the figures or fragments thereof. That is, 70% of the residues are the same. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 80% identity. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 85% identity. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 90% identity. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 95% identity. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 99% identity. In a further embodiment, analogs of polypeptides of the invention will have fewer than about 20 amino acid residue substitutions, 15 modifications or deletions and more preferably less than 10.

These substitutions are those having a minimal influence on the secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide. Preferred substitutions are those known in the art as 20 conserved, i.e. the substituted residues share physical or chemical properties such as hydrophobicity, size, charge or functional groups. These include substitutions such as those described by Dayhoff, M. in Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978 and by Argos, P. in EMBO J. 8, 779-785, 1989. 25 For example, amino acids, either natural or unnatural, belonging to one of the following groups represent conservative changes:
 ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;
 cys, ser, tyr, thr;
 val, ile, leu, met, ala, phe;
 30 lys, arg, orn, his;
 and phe, tyr, trp, his.
 The preferred substitutions also include substitutions of D-enantiomers for the corresponding L-amino acids.

35 In an alternative approach, the analogs of the polypeptides of the invention comprise the substitutions disclosed in Figure 3.

In an alternative approach, the analogs could be fusion 40 proteins, incorporating moieties which render purification easier, for example by effectively tagging the desired

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

polypeptide. It may be necessary to remove the tag or it may be the case that the fusion polypeptide itself retains sufficient antigenicity to be useful.

5 The percentage of homology is defined as the sum of the percentage of identity plus the percentage of similarity or conservation of amino acid type.

In one embodiment, analogs of polypeptides of the invention will
10 have about 70% identity with those sequences illustrated in the figures or fragments thereof. That is, 70% of the residues are the same. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 75% homology. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 80% homology. In a further
15 embodiment, polypeptides will have greater than 85% homology. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 90% homology. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 95% homology. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 98% homology. In a further
20 embodiment, analogs of polypeptides of the invention will have fewer than about 20 amino acid residue substitutions, modifications or deletions and more preferably less than 10.

One can use a program such as the CLUSTAL program to compare
25 amino acid sequences. This program compares amino acid sequences and finds the optimal alignment by inserting spaces in either sequence as appropriate. It is possible to calculate amino acid identity or similarity (identity plus conservation of amino acid type) for an optimal alignment. A program like
30 BLASTx will align the longest stretch of similar sequences and assign a value to the fit. It is thus possible to obtain a comparison where several regions of similarity are found, each having a different score. Both types of identity analysis are contemplated in the present invention.

35

In an alternative approach, the analogs or derivatives could be fusion polypeptides, incorporating moieties which render purification easier, for example by effectively tagging the desired protein or polypeptide, it may be necessary to remove

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

the "tag" or it may be the case that the fusion polypeptide itself retains sufficient antigenicity to be useful.

It is well known that it is possible to screen an antigenic polypeptide to identify epitopic regions, i.e. those regions which are responsible for the polypeptide's antigenicity or immunogenicity. Methods for carrying out such screening are well known in the art. Thus, the fragments of the present invention should include one or more such epitopic regions or be sufficiently similar to such regions to retain their antigenic/immunogenic properties.

Thus, for fragments according to the present invention the degree of identity is perhaps irrelevant, since they may be 100% identical to a particular part of a polypeptide, analog as described herein.

Thus, what is important for analogs, derivatives and fragments is that they possess at least a degree of the antigenicity/immunogenicity of the protein or polypeptide from which they are derived.

Also included are polypeptides which have fused thereto other compounds which alter the polypeptides biological or pharmacological properties i.e. polyethylene glycol (PEG) to increase half-life; leader or secretory amino acid sequences for ease of purification; prepro- and pro- sequences; and (poly)saccharides.

Furthermore, in those situations where amino acid regions are found to be polymorphic, it may be desirable to vary one or more particular amino acids to more effectively mimic the different epitopes of the different Streptococcus strains.

Moreover, the polypeptides of the present invention can be modified by terminal -NH₂ acylation (eg. by acetylation, or thioglycolic acid amidation, terminal carboxy amidation, e.g. with ammonia or methylamine) to provide stability, increased hydrophobicity for linking or binding to a support or other molecule.

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

also contemplated are hetero and homo polypeptide multimers of the polypeptide fragments and analogues. These polymeric forms include, for example, one or more polypeptides that have been cross-linked with cross-linkers such as avidin/biotin, glutaraldehyde or dimethylsuberimidate. Such polymeric forms also include polypeptides containing two or more tandem or inverted contiguous sequences, produced from multicistronic mRNAs generated by recombinant DNA technology. In a further embodiment, the present invention also relates to chimeric polypeptides which comprise one or more polypeptides or fragments or analogs thereof as defined in the figures of the present application.

15 In a further embodiment, the present invention also relates to chimeric polypeptides comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof, provided that the polypeptides are linked as to form a chimeric polypeptide.

20

In a further embodiment, the present invention also relates to chimeric polypeptides comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 provided that the polypeptides are linked as to form a chimeric polypeptide.

25

Preferably, a fragment, analog or derivative of a polypeptide of the invention will comprise at least one antigenic region i.e. at least one epitope.

30 In order to achieve the formation of antigenic polymers (i.e. synthetic multimers), polypeptides may be utilized having bis(haloacetyl) groups, nitroarylhalides, or the like, where the reagents being specific for this groups. Therefore, the link between two mercapto groups of the different polypeptides may be
35 a single bond or may be composed of a linking group of at least two, typically at least four, and not more than 16, but usually not more than about 14 carbon atoms.

In a particular embodiment, polypeptide fragments and analogs of
40 the invention do not contain a methionine (Met) starting

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

residue. Alternatively, polypeptides will not incorporate a leader or secretory sequence (signal sequence). The signal portion of a polypeptide of the invention may be determined according to established molecular biological techniques. In general, the polypeptide of interest may be isolated from a streptococcal culture and subsequently sequenced to determine the initial residue of the mature protein and therefore the sequence of the mature polypeptide.

10 It is understood that polypeptides can be produced and/or used without their start codon (methionine or valine) and/or without their leader peptide to favor production and purification of recombinant polypeptides. It is known that cloning genes without sequences encoding leader peptides will restrict the polypeptides to the cytoplasm of *E. coli* and will facilitate their recovery (Glick, B.R. and Pasternak, J.T. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. In *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*, 2nd edition, ASM Press, Washington DC, p.109-143).

20

According to another aspect of the invention, there are also provided (i) a composition of matter containing a polypeptide of the invention, together with a carrier, diluent or adjuvant; (ii) a pharmaceutical composition comprising a polypeptide of the invention and a carrier, diluent or adjuvant; (iii) a vaccine comprising a polypeptide of the invention and a carrier, diluent or adjuvant; (iv) a method for inducing an immune response against *Streptococcus*, in a host, by administering to the host, an immunogenically effective amount of a polypeptide of the invention to elicit an immune response, e.g., a protective immune response to *Streptococcus*; and particularly, (v) a method for preventing and/or treating a *Streptococcus* infection, by administering a prophylactic or therapeutic amount of a polypeptide of the invention to a host in need.

35

According to another aspect of the invention, there are also provided (i) a composition of matter containing a polynucleotide of the invention, together with a carrier, diluent or adjuvant; (ii) a pharmaceutical composition comprising a polynucleotide of the invention and a carrier, diluent or adjuvant; (iii) a method

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

for inducing an immune response against streptococcus, in a host, by administering to the host, an immunogenically effective amount of a polynucleotide of the invention to elicit an immune response, e.g., a protective immune response to Streptococcus; and particularly, (iv) a method for preventing and/or treating a Streptococcus infection, by administering a prophylactic or therapeutic amount of a polynucleotide of the invention to a host in need.

Before immunization, the polypeptides of the invention can also be coupled or conjugated to carrier proteins such as tetanus toxin, diphtheria toxin, hepatitis B virus surface antigen, poliovirus virus VP1 antigen or any other viral or bacterial toxin or antigen or any suitable proteins to stimulate the development of a stronger immune response. This coupling or conjugation can be done chemically or genetically. A more detailed description of peptide-carrier conjugation is available in Van Regenmortel, M.H.V., Eriand C.P., Muller S., Plaue S., «Synthetic Polypeptides as antigens» in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 19 (ed.) Burdon, R.H. & Van Knippenberg P.H. (1988). Elsevier New York.

According to another aspect, there are provided pharmaceutical compositions comprising one or more Streptococcal polypeptides of the invention in a mixture with a pharmaceutically acceptable adjuvant. Suitable adjuvants include (1) oil-in-water emulsion formulations such as MF59[™], SAF[™], R'ini[™]; (2) Freund's complete or incomplete adjuvant; (3) salts i.e. $AlK(SO_4)_3$, $AlNa(SO_4)_3$, $AlNH_4(SO_4)_3$, $Al(OH)_3$, $AlPO_4$, silica, kaolin; (4) saponin derivatives such as Stimulon[™] or particles generated therefrom such as ISCOMs (immunostimulating complexes); (5) cytokines such as interleukins, interferons, macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF); (6) other substances such as carbon polynucleotides i.e. poly TC and poly AC, detoxified cholera toxin (CTB) and E.coli heat labile toxin for induction of mucosal immunity. A more detailed description of adjuvant is available in a review by M.Z.I Khan et al. in Pharmaceutical Research, vol. 11, No. 1 (1994) pp2-11, and also in another review by Gupta et al., in Vaccine, Vol. 13, No. 14, pp1263-1276 (1995) and in WO 99/24578, which are herein

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

incorporated by reference. Related compounds include QSP1™, QS21™, Alhydrogel™ and Adjuphos™.

Pharmaceutical compositions of the invention may be administered parenterally by injection, rapid infusion, nasopharyngeal absorption, dermoabsorption, or buccal or oral.

Pharmaceutical compositions of the invention are used for the treatment or prophylaxis of streptococcal infection and/or diseases and symptoms mediated by streptococcal infection as described in P.R. Murray (Ed. in chief), E.J. Baron, M.A. Tenover, P.C. Tenover and R.K. Tenover. Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, Washington, D.C. sixth edition, 1995, 1482p which are herein incorporated by reference. In one embodiment, pharmaceutical compositions of the present invention are used for the prophylaxis or treatment of pharyngitis, erysipelas and impetigo, scarlet fever, and invasive diseases such as bacteremia and necrotizing fasciitis and also toxic shock. In one embodiment, pharmaceutical compositions of the invention are used for the prophylaxis or treatment of Streptococcus infection and/or diseases and symptoms mediated by Streptococcus infection, in particular group A Streptococcus (Streptococcus pyogenes), group B Streptococcus (GBS or S. agalactiae), S. pneumoniae, S. dysgalactiae, S. uberis, 25 S. necardia as well as Staphylococcus aureus. In a further embodiment, the Streptococcus infection is S. pyogenes.

In a further embodiment, the invention provides a method for prophylaxis or treatment of Streptococcus infection in a host susceptible to Streptococcus infection comprising administering to said host a therapeutic or prophylactic amount of a composition of the invention.

As used in the present application, the term "host" includes mammals. In a further embodiment, the mammal is human.

In a particular embodiment, pharmaceutical compositions are administered to those hosts at risk of streptococcal infection such as infants, elderly and immunocompromised hosts.

40

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

Pharmaceutical compositions are preferably in unit dosage form of about 0.001 to 100 µg/kg (antigen/body weight) and more preferably 0.01 to 10 µg/kg and most preferably 0.1 to 1 µg/kg 1 to 3 times with an interval of about 1 to 6 week intervals between immunizations.

Pharmaceutical compositions are preferably in unit dosage form of about 0.1 µg to 10 mg and more preferably 1µg to 1 mg and most preferably 10 to 100 µg 1 to 3 times with an interval of about 1 to 6 week intervals between immunizations.

According to another aspect, there are provided polynucleotides encoding polypeptides characterized by the amino acid sequence comprising SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof.

15

In one embodiment, polynucleotides are those illustrated in SEQ ID No: 1 which may include the open reading frames (ORF), encoding the polypeptides of the invention.

20 It will be appreciated that the polynucleotide sequences illustrated in the figures may be altered with degenerate codons yet still encode the polypeptides of the invention. Accordingly the present invention further provides polynucleotides which hybridize to the polynucleotide sequences herein above described 25 (or the complement sequences thereof) having 50% identity between sequences. In one embodiment, at least 70% identity between sequences. In one embodiment, at least 75% identity between sequences. In one embodiment, at least 80% identity between sequences. In one embodiment, at least 85% identity 30 between sequences. In one embodiment, at least 90% identity between sequences. In a further embodiment, polynucleotides are hybridizable under stringent conditions i.e. having at least 95% identity. In a further embodiment, more than 97% identity.

35 Suitable stringent conditions for hybridization can be readily determined by one of skilled in the art (see for example Sambrook et al., (1989) Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Current Protocols in Molecular

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

MOLOGY, (1977) edited by AUSUBEL F.M. et al., JOHN WILEY & SONS, INC., N.Y.).

In a further embodiment, the present invention provides 5 polynucleotides that hybridize under stringent conditions to either

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

10 wherein said polypeptide comprises SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof.

In a further embodiment, the present invention provides 15 polynucleotides that hybridize under stringent conditions to either

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

wherein said polypeptide comprises SEQ ID NO: 2.

20

In a further embodiment, the present invention provides polynucleotides that hybridize under stringent conditions to either

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- 25 (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof.

30

In a further embodiment, the present invention provides polynucleotides that hybridize under stringent conditions to either

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- 35 (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

In a further embodiment, polynucleotides are those encoding polypeptides of the invention illustrated in SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof.

5 In a further embodiment, polynucleotides are those illustrated in SEQ ID NO: 1 encoding polypeptides of the invention or fragments or analogs thereof.

In a further embodiment, polynucleotides are those encoding 10 polypeptides of the invention illustrated in SEQ ID NO: 2.

In a further embodiment, polynucleotides are those illustrated in SEQ ID NO: 1 encoding polypeptides of the invention.

15 As will be readily appreciated by one skilled in the art, polynucleotides include both DNA and RNA.

The present invention also includes polynucleotides complementary to the polynucleotides described in the present 20 application.

In a further aspect, polynucleotides encoding polypeptides of the invention, or fragments, analogs or derivatives thereof, may be used in a DNA immunization method. That is, they can be 25 incorporated into a vector which is replicable and expressible upon injection thereby producing the antigenic polypeptide in vivo. For example polynucleotides may be incorporated into a plasmid vector under the control of the CMV promoter which is functional in eukaryotic cells. Preferably the vector is 30 injected intramuscularly.

According to another aspect, there is provided a process for producing polypeptides of the invention by recombinant techniques by expressing a polynucleotide encoding said 35 polypeptide in a host cell and recovering the expressed polypeptide product. Alternatively, the polypeptides can be produced according to established synthetic chemical techniques i.e. solution phase or solid phase synthesis of oligopeptides which are ligated to produce the full polypeptide (block 40 ligation).

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

General methods for obtention and evaluation of polynucleotides and polypeptides are described in the following references: Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York; PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering, Edited by White B.A., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 pages; Protein Purification, Principles and Practices, Scopes R.K., Springer-Verlag, New York, 3rd Edition, 1993, 380 pages; Current Protocols in Immunology, Edited by Coligan J.E. et al., John Wiley & Sons Inc., New York which are herein incorporated by reference.

15 For recombinant production, host cells are transfected with vectors which encode the polypeptide, and then cultured in a nutrient media modified as appropriate for activating promoters, selecting transformants or amplifying the genes. Suitable vectors are those that are viable and replicable in the chosen host and include chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences e.g. bacterial plasmids, phage DNA, baculovirus, yeast plasmids, vectors derived from combinations of plasmids and phage DNA. The polypeptide sequence may be incorporated in the vector at the appropriate site using restriction enzymes such 25 that it is operably linked to an expression control region comprising a promoter, ribosome binding site (consensus region or Shine-Dalgarno sequence), and optionally an operator (control element). One can select individual components of the expression control region that are appropriate for a given host 30 and vector according to established molecular biology principles (Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York incorporated herein by reference). Suitable 35 promoters include but are not limited to ETR or SV40 promoter, E.coli lac, tac or trp promoters and the phage Lambda P_L promoter. Vectors will preferably incorporate an origin of replication as well as selection markers i.e. ampicillin resistance gene. Suitable bacterial vectors include pMT, pQE70, 40 pQR60, pQE-9, pD10 phagescript, psiXL74, pbluescript SK, pbsks,

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

pBR322, pBR104, pBR105, pBR404, pBR395, pBR322-1, pBR322-2, pDR540, pRIT5 and eukaryotic vectors pBlueBacIII, pWLND0, pSV2CAT, pOG44, pXTL, pCG, pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL. Host cells may be bacterial i.e. E. coli, Bacillus subtilis,
 5 Streptomyces; fungal i.e. Aspergillus niger, Aspergillus nidulans; yeast i.e. Saccharomyces or eukaryotic i.e. CHO, COS.

Upon expression of the polypeptide in culture, cells are typically harvested by centrifugation then disrupted by physical
 10 or chemical means (if the expressed polypeptide is not secreted into the media) and the resulting crude extract retained to isolate the polypeptide of interest. Purification of the polypeptide from culture media or lysate may be achieved by established techniques depending on the properties of the
 15 polypeptide i.e. using ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Final purification may be achieved using
 20 HPLC.

The polypeptides may be expressed with or without a leader or secretion sequence. In the former case the leader may be removed using post-translational processing (see US 4,431,759;
 25 US 4,425,437; and US 4,338,397 incorporated herein by reference) or be chemically removed subsequent to purifying the expressed polypeptide.

According to a further aspect, the streptococcal polypeptides of
 30 the invention may be used in a diagnostic test for Streptococcus infection, in particular S. pyogenes infection. Several diagnostic methods are possible, for example detecting Streptococcus organism in a biological sample, the following procedure may be followed:

- 35 a) obtaining a biological sample from a host;
 b) incubating an antibody or fragment thereof reactive with a Streptococcus polypeptide of the invention with the biological sample to form a mixture; and

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

- c) detecting specifically bound antibody or bound fragment in the mixture which indicates the presence of Streptococcus.

5 Alternatively, a method for the detection of antibody specific to a Streptococcus antigen in a biological sample containing or suspected of containing said antibody may be performed as follows:

- a) obtaining a biological sample from a host;
10 b) incubating one or more Streptococcus polypeptides of the invention or fragments thereof with the biological sample to form a mixture; and
c) detecting specifically bound antigen or bound fragment in the mixture which indicates the presence of antibody
15 specific to Streptococcus.

One of skill in the art will recognize that this diagnostic test may take several forms, including an immunological test such as an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), a radioimmunoassay
20 or a latex agglutination assay, essentially to determine whether antibodies specific for the protein are present in an organism.

The DNA sequences encoding polypeptides of the invention may also be used to design DNA probes for use in detecting the
25 presence of Streptococcus in a biological sample suspected of containing such bacteria. The detection method of this invention comprises:

- a) obtaining the biological sample from a host;
b) incubating one or more DNA probes having a DNA sequence
30 encoding a polypeptide of the invention or fragments thereof with the biological sample to form a mixture; and
c) detecting specifically bound DNA probe in the mixture which indicates the presence of Streptococcus bacteria.
35

The DNA probes of this invention may also be used for detecting circulating Streptococcus i.e. S. pyogenes nucleic acids in a sample, for example using a polymerase chain reaction, as a method of diagnosing Streptococcus infections. The probe may be
40 synthesized using conventional techniques and may be immobilized

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

on a solid phase, or may be labelled with a detectable label. A preferred DNA probe for this application is an oligomer having a sequence complementary to at least about 6 contiguous nucleotides of the S. pyogenes polypeptides of the invention.

5

Another diagnostic method for the detection of Streptococcus in a host comprises:

- a) labelling an antibody reactive with a polypeptide of the invention or fragment thereof with a detectable label;
- 10 b) administering the labelled antibody or labelled fragment to the host; and
- c) detecting specifically bound labelled antibody or labelled fragment in the host which indicates the presence of Streptococcus.

15

According to one aspect, the present invention provides the use of an antibody for treatment and/or prophylaxis of streptococcal infections.

20

A further aspect of the invention is the use of the Streptococcus polypeptides of the invention as immunogens for the production of specific antibodies for the diagnosis and in particular the treatment of streptococcal infection. Suitable antibodies may be determined using appropriate screening methods, for example by measuring the ability of a particular antibody to passively protect against streptococcus infection in a test model. One example of an animal model is the mouse model described in the examples herein. The antibody may be a whole antibody or an antigen-binding fragment thereof and may belong to any immunoglobulin class. The antibody or fragment may be of animal origin, specifically of mammalian origin and more specifically of murine, rat or human origin. It may be a natural antibody or a fragment thereof, or if desired, a recombinant antibody or antibody fragment. The term recombinant antibody or antibody fragment means antibody or antibody fragment which was produced using molecular biology techniques. The antibody or antibody fragments may be polyclonal, or preferably monoclonal. It may be specific for a number of

25

30

35

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

epitopes associated with the *S. pyogenes* polypeptides but is preferably specific for one.

A further aspect of the invention is the use of the antibodies directed to the polypeptides of the invention for passive immunization. One could use the antibodies described in the present application.

A further aspect of the invention is a method for immunization, whereby an antibody raised by a polypeptide of the invention is administered to a host in an amount sufficient to provide a passive immunization.

In a further embodiment, the invention provides the use of a pharmaceutical composition in the manufacture of a medicament for the prophylactic or therapeutic treatment of streptococcal infection.

In a further embodiment, the invention provides a kit comprising a polypeptide of the invention for detection or diagnosis of streptococcal infection.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

EXAMPLE 1

This example illustrates the cloning and molecular characteristics of EVE-E7 gene and corresponding polypeptide.

The coding region of *S. pyogenes* EVE-E7 (SEQ ID NO: 1) gene was amplified by PCR (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, CA) from genomic DNA of serotype M1 *S.*

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

EXPERIMENTAL strain ATCC700794 using the following oligonucleotide primers that contained base extensions for the addition of restriction sites NdeI (CATATG) and NotI (GCGGCCGC): DMAR293 and DMAR294, which are presented in Table 1. PCR products were purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit from QIAGEN following the manufacturer's instructions (Chatsworth, CA), and digested with NdeI and NotI (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfe, Canada). The pET-21b(+) vector (Novagen, Madison, WI) was digested with NdeI and NotI and purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit from QIAGEN (Chatsworth, CA). The NdeI-NotI PCR products were ligated to the NdeI-NotI pET-21b(+) expression vector. The ligated products were transformed into E. coli strain DH5α [p806lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r_Km₊) deoR 15 thi-1 supE44 λgyrA96 relA1] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) according to the method of Simaris (Manahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pp. 109-135). Recombinant pET-21b(+) plasmid (xpET21b(+)) containing EVH-P7 gene was purified using a QIAGEN plasmid kit (Chatsworth, CA) and DNA insert was sequenced (Faq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA).

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR amplifications of *S. pyogenes* *BVH-P7* gene

Genes	Primers I.D. (SEQ ID NO)	Restric- tion site	Vector	Sequence
BVH-P7	DMAR293 (3)	<i>NdeI</i>	pET21b	5'- GTAGTCACCCACCATATGGAGTTTCTTAG- 3'
BVH-P7	DMAR294 (4)	<i>NotI</i>	pET21b	5'- CTTTTCTCTTCGGCCCGAGTTATTAGT 3'
BVH-P7	DMAR480a (5)	<i>BamHI</i>	pCMV- GH	5'-GGGATCCACCCCAATCAGG-3'
BVH-P7	DMAR481a (6)	<i>SalI</i>	pCMV- GH	5'- GGTTGTCGACATAAAGCAACGCTAGTG-3'

5 It was determined that the 3027-bp including a stop codon (TAA) open reading frame (ORF) of *BVH-P7* encodes a 1008 amino-acid-residues polypeptide with a predicted pI of 6.18 and a predicted molecular mass of 111,494.44 Da. Analysis of the predicted amino acid residues sequence (SEQ ID NO :2) using the PSORTII software 10 (Real World Computing Partnership (<http://psort.nibb.ac.jp>)) suggested the existence of a 21 amino acid residues signal peptide (MKKELKIVALELTTVSVVTHN), which ends with a cleavage site situated between an asparagine and a glutamine residues. Analysis of the amino-acid-residues sequence revealed the 15 presence of a cell wall anchoring motif (LFXTGX) located between residues 974 and 981.

To confirm the presence by PCR amplification of *BVH-P7* (SEQ ID NO :1) gene, the following 4 serologically distinct *S. pyogenes* 20 strains were used: the serotype M1 *S. pyogenes* strain ATCC700294 and the serotype M3 *S. pyogenes* strain ATCC12384 were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD); the serotype M6 *S. pyogenes* SPY67 clinical isolate was provided by the Centre de recherche en infectiologie du Centre hospitalier 25 de l'université Laval, Sainte-Foy; and *S. pyogenes* strain 3514 which was initially isolated from a mouse was provided by Susan Hollingshead, from University of Alabama, Birmingham. The g.

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

100.0 SOURCE: XCC-RT-PCR WAS USED IN THESE EXPERIMENTS AS
 negative control. Chromosomal DNA was isolated from each *S.*
pyogenes strain as previously described (Jayarao EM et al. 1991.
 J. Clin. Microbiol. 29:2774-2778). *BVH-E7* (SEQ ID NO :1) gene
 5 was amplified by PCR (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler,
 Stratagene, LaJolla, Ca) from the genomic DNA purified from the
 4 *S. pyogenes* strains, and the control *E. coli* strain using the
 oligonucleotide primers DMAR293 and DMAR294 (Table 1). PCR was
 performed with 30 cycles of 45 sec at 95°C, 45 sec at 50°C and 2
 10 min at 72°C and a final elongation period of 7 min at 72°C. The
 PCR products were size fractionated in 1% agarose gels and were
 visualized by ethidium bromide staining. The results of these
 PCR amplifications are presented in Table 2. The analysis of
 the amplification products revealed that *BVH-E7* (SEQ ID NO :1)
 15 gene was present in the genome of all of the 4 *S. pyogenes*
pyogenes strains tested. No such product was detected when the control *E.*
coli DNA was submitted to identical PCR amplifications with
 these oligonucleotide primers.

20 Table 2. Identification of *S. pyogenes* *BVH-E7* gene by PCR
 amplification in the genome of four serologically distinct *S.*
pyogenes strains

Strain Identification	Identification of <i>BVH-E7</i> gene
ATCC/33294 (M1)	+
ATCC/23884 (M3)	+
SPY67 (M6)	+
ES14*	-
<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'	-

*Mouse isolate

25 EXAMPLE 2

This example illustrates the cloning of *S. pyogenes* *BVH-E7* gene
 in CMV plasmid pCMV-OH.

The DNA coding region of *S. pyogenes* protein was inserted in
 30 phase downstream of a human growth hormone (hGH) gene which was
 under the transcriptional control of the cytomegalovirus (CMV)
 promoter in the plasmid vector pCMV-OH (Tang et al., Nature,

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

1992, see 152). The CMV promoter is a non-functional plasmid in *E. coli* cells but active upon administration of the plasmid in eukaryotic cells. The vector also incorporated the ampicillin resistance gene.

5

The coding regions of *BVE-P7* (SEQ ID NO: 1) gene without its leader peptide region was amplified by PCR (Robocycler Gradient 96 temperature cycler, Stratagene, LaJolla, CA) from genomic DNA of serotype M₁ *S. pyogenes* strain ATCC700294 using 10 oligonucleotide primers DMAR480a and DMAR481a that contained base extensions for the addition of restriction sites *Bam*HI (CCATCC) and *Sal*I (GTCGAC) which are described in Table 1. The PCR products were purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit from QIAGEN (Chatsworth, CA), digested with 15 restriction enzymes (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfe, Canada). The pCMV-GH vector (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas) was digested with *Bam*HI and *Sal*I and purified from agarose gel using the QIAquick gel extraction kit 20 from QIAGEN (Chatsworth, CA). The *Bam*HI-*Sal*I DNA fragment was ligated to the *Bam*HI-*Sal*I-pCMV-GH vector to create the pGH-BVE-P7 fusion protein under the control of the CMV promoter. The ligated product was transformed into *E. coli* strain DH5 α (ϕ 80 Δ lacZAM15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *ura*1 *rec*A1 *hsc*R17(*r_k-m_k*) *deo*R 25 *chi*-1 *sup*E44 *h₂gyr*A96 *rel*A1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) according to the method of Simanis (Manahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pp. 109-135). The recombinant pCMV plasmid was purified using a QIAGEN plasmid kit (Chatsworth, CA) and the nucleotide sequence of the DNA insert was verified by 30 DNA sequencing.

EXAMPLE 3

This example illustrates the use of DNA to elicit an immune 35 response to *S. pyogenes* BVE-P7 protein antigen.

Groups of 8 female BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were immunized by intramuscular injection of 100 μ l three times at two- or three-week intervals with 50 μ g of

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

recombinant pCMV-GH encoding BVH-P7 (SEQ ID NO: 1) gene in presence of 50 µg of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmid pCMV-GH-GM-CSF (laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas). As control, groups of mice were injected with 50 µg of pCMV-GH in presence of 50 µg of pCMV-GH-GM-CSF. Blood samples were collected from the orbital sinuses prior to each immunization and seven days following the third injection and serum antibody responses were determined by ELISA using the BVH-P7 His-tagged labeled *S. pyogenes* recombinant protein as coating antigen. The production and purification of this BVH-P7 His tagged labeled *S. pyogenes* recombinant protein is presented in Example 4.

15

EXAMPLE 4

This example illustrates the production and purification of *S. pyogenes* BVH-P7 recombinant protein.

The recombinant pET-21b(+) plasmid with BVH-P7 (SEQ ID NO: 1) gene was used to transform by electroporation (Gene Pulser TI apparatus, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canada) *E. coli* strain Tuner (DE3) (Fomp⁺ hsdS₁ (r⁺m⁺) gal dcm lacY1 (DE3)) (Novagen, Madison, WI). In this strain of *E. coli*, the T7 promoter controlling expression of the recombinant protein is specifically recognized by the T7 RNA polymerase (present on the λDE3 prophage) whose gene is under the control of the lac promoter which is inducible by isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG). The transformants Tuner (DE3)/rpkM21 were grown at 37°C with agitation at 250 rpm in TB broth (peptone 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 10g/L) containing 100 µg of carbenicillin (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Canada) per ml until the A₆₀₀ reached a value of 0.6. In order to induce the production of BVH-P7 His-tagged *S. pyogenes* recombinant protein, the cells were incubated for 3 additional hours in the presence of IPTG at a final concentration of 0.1 mM. Induced cells from a 500 ml culture were pelleted by centrifugation and frozen at -70°C. The purification of the BVH-P7 His-tagged recombinant protein

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

from the non-soluble fraction of IPTG-induced Tuner (DR3)/rpET21b(+) was done by affinity chromatography based on the properties of the His-tag sequence (6 consecutive histidine residues) to bind to divalent cations (Ni^{2+}) immobilized on the His-Bind metal chelation resin. Briefly, the pelleted cells obtained from a 500 mL culture induced with IPTG was resuspended in lysis buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.9) containing 6M Guanidine-HCl, sonicated and centrifuged at 12,000 X g for 20 min to remove debris. The supernatant was incubated with Ni-NTA agarose resin (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) for 45 min at 4°C. The BVH-P7 His-tagged S. pyogenes recombinant protein was eluted from the resin with a solution containing 6M Guanidine-HCl and 250 mM imidazole-500mM NaCl-20 mM Tris, pH 7.9. The removal of the salt and imidazole from the samples was done by dialysis against 10mM Tris and 0.9% NaCl, pH 7.9 overnight at 4°C. The amount of recombinant protein was estimated by MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois).

20 EXAMPLE 5

This example illustrates the reactivity of the BVH-P7 His-tagged S. pyogenes recombinant protein with human sera and sera collected from mice after immunization with S. pyogenes antigenic preparations.

25

As shown in Table 3, purified His-tagged BVH-P7 recombinant protein was recognized in immunoblots by the antibodies present in the pool of normal sera. This is an important result since it clearly indicates that human which are normally in contact with S. pyogenes do develop antibodies that are specific to that protein. These particular human antibodies might be implicated in the protection against S. pyogenes infection. In addition, immunoblots also revealed that sera collected from mice immunized with S. pyogenes antigenic preparations enriched with membrane proteins which protected mice against lethal challenge also developed antibodies that recognized BVH-P7 His-tagged recombinant protein. This result indicates that this protein was present in S. pyogenes antigenic preparation that protected mice against infection and that this streptococcal protein induced

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

antibodies that reacted with the corresponding His-tagged recombinant protein.

5 Table 3. Reactivity in immunoblots of human sera and sera collected from mice after immunisation with *S. pyogenes* antigenic preparations with BVH-P7 His-tagged recombinant protein.

Purified recombinant protein I.D. ¹	Apparent molecular weight (kDa) ²	Reactivity in immunoblots with	
		Human sera ³	Mouse sera ⁴
BVH-P7	10	+	+

¹BVH-P7 His-tagged recombinant protein produced and purified as described in Example 7 was used to perform the immunoblots.

²Molecular weight of the BVH-P7 His-tagged recombinant protein was estimated after SDS-PAGE.

³Two sera collected from healthy human volunteers were pooled together and diluted 1/500 to perform the immunoblots.

15 ⁴Mouse sera collected after immunization with *S. pyogenes* antigenic preparations enriched membrane proteins were pooled and diluted 1/500 to perform the immunoblots. These mice were protected against a lethal *S. pyogenes* challenge.

20

EXAMPLE 6

This example illustrates the accessibility to antibodies of the *S. pyogenes* BVH-P7 protein at the surface of intact streptococcal cells.

25

Bacteria were grown in Todd Hewitt (TH) broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) with 0.5% Yeast extract (Difco Laboratories) and 0.5% peptone extract (Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C in a 8% CO₂ atmosphere to give an OD₆₀₀ of 0.600
30 (-10⁸ CFU/ml). Dilutions of anti-BVH-P7 or control sera were then added and allowed to bind to the cells, which were incubated for 2 h at 4°C. Samples were washed 4 times in blocking buffer [phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% bovine serum albumin (BSA)], and then 1 ml of goat Fluorescein (FITC)-

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

conjugated anti-mouse IgG + IgM diluted in blocking buffer was added. After an additional incubation of 60 min at room temperature, samples were washed 4 times in blocking buffer and fixed with 0.25 % formaldehyde in PBS buffer for 18-24 h at 4°C. Cells were washed 2 times in PBS buffer and resuspended in 500 µl of PBS buffer. Cells were kept in the dark at 4°C until analyzed by flow cytometry (Fpica® XL; Beckman Coulter, Inc.). Ten thousands intact *S. pyogenes* cells were analyzed per sample and the results were expressed as percentage of labeled cells and fluorescence index. The fluorescence index was calculated as the median fluorescence value obtained after labeling the streptococcal cells with an immune serum divided by the fluorescence value obtained for a control mouse serum. A fluorescence value of 1 indicated that there was no binding of antibodies at the surface of intact streptococcal cells.

Sera collected from eight mice immunized with BVH-P7 His-tagged recombinant protein were analyzed by cytofluorometry and the results are presented in Table 4. All of the sera collected from mice immunized with purified BVH-P7 His-tagged protein contained BVH-P7-specific antibodies that efficiently recognized their corresponding surface exposed epitopes on the heterologous (ATCC12384; serotype M3) *S. pyogenes* strain tested. The fluorescence index varied from 10 to 18. It was determined that more than 97 % of the 10,000 *S. pyogenes* cells analyzed were labeled with the antibodies present in the BVH-P7 specific antisera. These sera were also pooled and reacted with the following *S. pyogenes* strains: serotype M1 *S. pyogenes* strain ATCC 700234, serotype M3 and serotype M18 *S. pyogenes* strain ATCC12357 were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA); the serotype M6 *S. pyogenes* SPY69 and M2 *S. pyogenes* SPY68 clinical isolates were provided by the Centre de recherche en infectiologie du Centre hospitalier de l'université Laval, Sainte-Foy. The BVH-P7-specific antibodies present in the pool of sera collected after immunization with the purified His-tagged recombinant BVH-P7 protein attached at the bacterial surface of each of these streptococcal strains with fluorescence index between 4 up to 9. On the contrary, no labeling of the streptococcal cells were

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

roted when pools of sera collected from unimmunized or sham-immunized mice were used. These observations clearly demonstrate that the BVH-P7 protein is accessible at the surface where it can be easily recognized by antibodies. Anti-*S. pyogenes* antibodies were shown to play an important role in the protection against *S. pyogenes* infection.

Table 4. Evaluation of the attachment of BVH-P7-specific antibodies at the surface of intact cells of *S. pyogenes* ATCC12384 strain (serotype M3).

Serum Identification	Fluorescence index ²	% of labeled cells ³
S1	11	97
S2	11	97
S3	13	98
S4	16	98
S5	10	97
S6	12	97
S7	13	98
S8	18	98
Pool of negative control sera ⁴	1	9
Positive control serum ⁵	12	98

¹ The mice S1 to S8 were injected subcutaneously three times at three-week intervals with 20 µg of purified BVH-P7 recombinant protein mixed with 10 µg of QuilA adjuvant (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada). The sera were diluted 1/50.

² The fluorescence index was calculated as the median fluorescence value obtained after labeling the streptococcal cells with an immune serum divided by the fluorescence value obtained for a control mouse serum. A fluorescence value of 1 indicated that there was no binding of antibodies at the surface of intact streptococcal cells.

³ % of streptococcal labeled cells out of the 10,000 cells analyzed.

⁴ Sera collected from unimmunized or sham-immunized mice were pooled diluted 1/50 and used as negative controls for this assay.

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

SERUM OBTAINED FROM A MOUSE IMMUNIZED WITH 20 µg OF PURIFIED streptococcal recombinant M protein, a well known surface protein, was diluted 1/200 and was used as a positive control for the assay.

5

EXAMPLE 7

This example illustrates the protection against fatal *S. pyogenes* infection induced by passive immunization of mice with rabbit hyper-immune sera.

New Zealand rabbits (Charles River laboratories, St-Constant, Canada) were injected subcutaneously at multiple sites with 50 µg and 100 µg of the BVH-P7 His-tagged recombinant protein that was produced and purified as described in Example 4 and adsorbed to Alhydrogel adjuvant (Superfos Biosector a/s). Rabbits were immunized three times at three-week intervals with the BVH-P7 His-tagged recombinant protein. Blood samples were collected three weeks after the third injection. The antibodies present in the serum were purified by precipitation using 40% saturated ammonium sulfate. Groups of 10 female CD-1 mice (Charles River) were injected intravenously with 500 µl of purified serum collected from rabbits immunized with the BVH-P7 His-tagged recombinant protein, or rabbits immunized with an unrelated control recombinant protein. Eighteen hours later the mice were challenged with approximately 2×10^7 CFU of the type 3 *S. pyogenes* strain ATCC12384. Samples of the *S. pyogenes* challenge inoculum were plated on blood agar plates to determine the CFU and to verify the challenge dose. Deaths were recorded for a period of 5 days.

EXAMPLE 8

This example illustrates the protection of mice against fatal *S. pyogenes* infection induced by immunization with purified recombinant BVH-P7 protein.

Groups of 8 female Balb/c mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were immunized subcutaneously three times at two-week intervals with 20 µg of affinity purified BVH-P7 His-

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

tagged recombinant protein in presence of 10 µg of QuilA adjuvant (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada) or, as control, with QuilA adjuvant alone in PBS. Blood samples were collected from the orbital sinus on day 1, 14 and 28 prior to each immunization and two weeks (day 42) following the third injection. One week later the mice were challenged with approximately 3×10^8 CFU of the type 3 *S. pyogenes* strain ATCC 12384. Samples of the *S. pyogenes* challenge inoculum were plated on blood agar plates to determine the CFU and to verify the challenge dose. Deaths were recorded for a period of 7 days. Four of eight mice immunized with purified recombinant BVH-P7 protein were protected against the lethal challenge, compared to only 12 % (1/8) of mice which received the adjuvant alone (Table 1).

15

Table 5. Ability of recombinant BVH-P7 protein to elicit protection against GAS strain ATCC 12384 (Type 3).

Immunogen	No. mice surviving	% survival
20 µg BVH-P7 + 10µg QuilA	4/8	50
QuilA adjuvant alone in PBS	1/8	12

20

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

what is claimed is:

1. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide chosen from:
 - (a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
 - (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
 - (c) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
 - (d) a polynucleotide encoding a polypeptide capable of generating antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
 - (e) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or fragments or analogs thereof;
 - (f) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1 or fragments or analogs thereof;
 - (g) a polynucleotide that is complementary to a polynucleotide in (a), (b), (c), (d), (e) or (f).
2. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide chosen from:
 - (a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2;
 - (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2;
 - (c) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2;
 - (d) a polynucleotide encoding a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2;
 - (e) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2;

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

- (f) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1;
- (g) a polynucleotide that is complementary to a polynucleotide in (a), (b), (c), (d), (e) or (f).
3. The polynucleotide of claim 1, wherein said polynucleotide is DNA.
4. The polynucleotide of claim 2, wherein said polynucleotide is DNA.
5. The polynucleotide of claim 1, wherein said polynucleotide is RNA.
6. The polynucleotide of claim 2, wherein said polynucleotide is RNA.
7. The polynucleotide of claim 1 that hybridizes under stringent conditions to either
- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide; wherein said polypeptide comprises SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof.
8. The polynucleotide of claim 2 that hybridizes under stringent conditions to either
- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide; wherein said polypeptide comprises SEQ ID NO: 2.
9. The polynucleotide of claim 1 that hybridizes under stringent conditions to either
- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide; wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof.
10. The polynucleotide of claim 2 that hybridizes under stringent conditions to either

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
 - (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;
wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.
- 11. A vector comprising the polynucleotide of claim 1, wherein said DNA is operably linked to an expression control region.
 - 12. A vector comprising the polynucleotide of claim 3, wherein said DNA is operably linked to an expression control region.
 - 13. A host cell transfected with the vector of claim 11.
 - 14. A host cell transfected with the vector of claim 12.
 - 15. A process for producing a polypeptide comprising culturing a host cell according to claim 13 under conditions suitable for expression of said polypeptide.
 - 16. A process for producing a polypeptide comprising culturing a host cell according to claim 14 under condition suitable for expression of said polypeptide.
 - 17. An isolated polypeptide comprising a polypeptide chosen from:
 - (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide having an amino acid sequence comprising: SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;
 - (b) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide having an amino acid sequence comprising: SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;
 - (c) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;
 - (d) a polypeptide capable of generating antibodies having binding specificity for a polypeptide having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;
 - (e) an epitope bearing portion of a polypeptide having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof;

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

- (f) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), or (e) wherein the N-terminal Met residue is deleted;
- (g) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e), or (f) wherein the secretory amino acid sequence is deleted.
18. An isolated polypeptide comprising a polypeptide chosen from:
- (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide having an amino acid sequence comprising: SEQ ID NO: 2;
- (b) a polypeptide having at least 55% identity to a second polypeptide having an amino acid sequence comprising: SEQ ID NO: 2;
- (c) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2;
- (d) a polypeptide capable of generating antibodies having binding specificity for a polypeptide having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2;
- (e) an epitope bearing portion of a polypeptide having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2;
- (f) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), or (e) wherein the N-terminal Met residue is deleted;
- (g) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e), or (f) wherein the secretory amino acid sequence is deleted.
19. A chimeric polypeptide comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, or fragments or analogs thereof; provided that the polypeptides are linked as to form a chimeric polypeptide.
20. A chimeric polypeptide comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2; provided that the polypeptides are linked as to form a chimeric polypeptide.
21. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide according to any one of claims 17 to 20 and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or adjuvant.

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

22. A method for prophylactic or therapeutic treatment of pharyngitis, erysipelas and impetigo, scarlet fever, and invasive diseases such as bacteremia and necrotizing fasciitis in a host susceptible to pharyngitis, erysipelas and impetigo, scarlet fever, and invasive diseases such as bacteremia and necrotizing fasciitis and also toxic shock comprising administering to said host a prophylactic or therapeutic amount of a composition according to claim 21.
23. A method for prophylactic or therapeutic treatment of Streptococcus pyogenes bacterial infection in a host susceptible to Streptococcus pyogenes infection comprising administering to said host a prophylactic or therapeutic amount of a composition according to claim 21.
24. A method according to claim 22 wherein the host is an animal.
25. A method according to claim 22 wherein the host is a human.
26. A method for diagnostic of streptococcal infection in a host susceptible to streptococcal infection comprising
- obtaining a biological sample from a host;
 - incubating an antibody or fragment thereof reactive with a streptococcal polypeptide of any of the claims 17 to 20 with the biological sample to form a mixture; and
 - detecting specifically bound antibody or bound fragment in the mixture which indicates the presence of streptococcal.
27. A method for detection of antibody specific to streptococcus antigen in a biological sample comprising
- obtaining a biological sample from a host;
 - incubating one or more streptococcal polypeptides of any of the claims 17 to 20 or fragments thereof with the biological sample to form a mixture; and
 - detecting specifically bound antigen or bound fragment in the mixture which indicates the presence of antibody specific to streptococcus.

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

28. Use of pharmaceutical composition in the manufacture of a medicament for the prophylactic or therapeutic treatment of streptococcal infection.
29. Kit comprising a polypeptide according to any one of claims 17 to 20 for detection or diagnosis of streptococcal infection.

WO 02/06660

PCT/CA02/00207

1/6

Figure 1 (SEQ ID NO:1)

```

1  ATGAGGAAAC ATCTTAAAC AGTGGCCTG ACCCTACTA CAGTATCGG AGTCACCCAC
61  AATCAGCAAG TTTTACTTT AGTCAAAGAG CCAATTCCTA AACAACTCA AGCTTCTTCA
121  TUGATPRTD GCGCTHACTA CCGGAAAGT ACCCTAABA GCAAGTTABA GATTAAATGA
181  ACTTCTGTC CCGTTGATGA TACGCTACG CACTTATTTT CGGATAAAG TACTACTCTT
241  GAAAAATAA AGCAATCTT TCCTAAAGGT CCGGAGAAC AGGATTAAG GGCAGTACG
301  GCGAATACG AATCAGAAAA CCGAATCTT TCTGGATCT AACCTGAACT ATCCTGAGN
361  TCTCTPCTT TAAACAAAC AGTACCACTA ACCTCTAAT UGGAAATTTG TGTATTAT
421  ACTAAGGGG AATCCCTGT TGGCTTCTA AAATCAGTTG TTGCAAGTT RTCTCAACT
481  GATGATCTG TATTGCTTAG TCAAGCAGCA GATGCAACT AATTCATACA ACTACTAGT
541  TTTGCTTTA TCCAGATAA AAGCAGGCA ATTCCAGAT ATACCAGTAG GCTGGAGAA
501  AATGGGGAA TAAGCAACT ACAATGGAT GGAAGAGAA TTACTAACA AGCTGAGGT
561  TTTAATCTT ATCTACTAA GAAGTAACT ATCCCAACT GTTAAACA TATTGCTCA
721  GATGCTTCT TGGACAAAT GAAATATGCT GAGTAAATC TTCTGAAAG CCTCGAGACT
781  ATCTCTGCT ATGCTTCTG TCACTACTG TCGAAACAG TCGATTTCG AGTAAATTA
841  AAGCGATTT GAGAAATAG TTTTPTGAT AATCAATTA CAGGTAAACT TTCTTGGCA
901  CCGCATTTA TCGATAGC AAGACTGCT TTTAATCTA ACCAATCAA AACCAATGAG
961  TTTAGGAAA ATACTCTA AACTGATAG CAACTCTCT TTCTAGATA TATCTGAT
1021  CACTACTCC TACTGACCG TCTGAAAAA ATAGAACTAG AAGCTTTAG AGGAAATCT
1081  GAGATGCCC ACTCAATAA CCGTGTGTT TCTGAGCAA AATCTGAAA AATCTCTCT
1141  GCGCTTCCG CTGAAATAC CTATGTTAAT CCGAAAGTT CACTATGCA GGAAGTCC
1201  GAGATTGAT ATACTAATG GTTAGAGGA GATTTAGCT ATCAAAAAA TAGTCTACA
1261  GCTTTTCAA ATAAAGCTT ACAAAAAGTA AAACGTAATA AAACTTAGA AACTCCAAA
1321  CAGCACAATG GGTACTACT TACTGAATT GGTGATATG CCTTCGCA TGTCTATTT
1381  CAAATAAAA CTTTACGTAA ATATGATTT GAGAAAGTA AGCTTCCCTC AACTATTGG
1441  AAAAAGGIG CTTTCTCT TCMCTAAT AACTGAAAT CTTTAAAGC AACTTACGAT
1501  TTGAAAGAG TAAAGAAAG AGCTTTATG AATAATCTA TTGAACTTT GGAATTAATA
1561  GATTAATAG TACTAATGG TATGCGGCT TTTCACTTA ATCAATTTA TGCCATGTT
1621  CTTCAGAT CTGTACAGA ATGAGGCTT TCGCATTC CCAAAATGG TGCATAAT
1681  CTACTTTTA TGGCACTAA GCTTAGAC TTACTGAAAG TGGCTTTT ATCAACTAG
1741  CTGAACTTC TGTCTCTTC TGAACAAA CAGTTACAG AGATCTCTT TCAAGCTTT
1801  TCGAACAAAG CTTGAAAGA ACTATATTA CCGCATCA TGAACAGAT TCGAAGAA
1861  GCTTCAAAA AGATCAATT AAACCACTG GAGTGGCT CCGCTTTC CCAATCTG
1921  TTTAATGCT TAGATATAA TGAATGAT GAACTTTT ATAAATAAG GATTGTAA
1981  ACCGATCAT ATCTACTGC ACTAGAGAT GGTGAGAT TATGATTA TCCAGAAAG
2041  TTTACTCTA CAATAGTAA CTTGAAAG ATTTAATAA TATCGAAG TTTAGACTAT
2101  TCTACTTAC GTGAGCTAC TCAACTCAG TTAGAGACA TACTACTGC AGTAAAGCG
2161  TTTTGTCAA NATCTAACC CCGAAGGA GAABACAA AATCTCTTA AGAAGCAAA
2221  TTTTCTCTG CCGCTGTTGA TTTGATAAA GCCATAGCTA AAGCTGAAA GGCCTTAGT
2281  ACCGAGAGG CACAGAGA TCTCAATTT CTTGAGAA CTACTAGAA AAGGTATTA
2341  GTTAAATA ATCTCTAT TAAABASCT ATGTTAGC CCTTCAAA AGGATGAG
2401  TTTGATCAG GATTTGTTA GGAABACCA CCAATGCTC AAGTCAAT GATCAAGAA
2461  GATTAATTA TAAGAGGCC TTTGCTCTG CCGATATTT ATACCGATT GAACTTTAT
2521  TTTGAAAT CTGAAATTT GATTTAGCA CTGATATGA CTGACTAT TGGGAGGGA
2581  CAAAGAGCT CTTATGTA TCTATATTA AATGTTAGC AGGATAATG AAGTTATAT
2641  CCTTGGCAG TTTCCACTT AGCTGATAC GAGGAGCTCG ACATCAAA AATTTAAT
2701  AGTAAGCTTA GTCAATTAAC ATCTATCTG CAGGATCGA CTGCAGCTA TCAATAGCC
2761  GATTTTCTC AAGCTATCCA AAATGCAAG CCAAGAGAG AAGCAATTA CCTAAACCA
2821  GATGAGCCT CTGAGAGTTC AAGCTCAAT GATCTGCTA ACTCTAAGA TAGAGGAT
2881  CAATCAAC CAAAGAGAA TAGAGGAGA CACTCTGCA TATTGCTAG GACAGGAT
2941  AAGCGACT TTTCTAGG AATCTTAGT TACTAGCG TTGCTTACT GTCAATAA
3001  ACTGCTATA AAAGAAATA AATATA

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WG 02/066650

PCT/CA02/00207

2/6

Figure 2 (SEQ ID NO:2)

```

1 MKKHIXVAL TLITVSVVTH NQSVPSLVKZ PIIKQTOASS SISGADYARS SCKSKLKENE
61 TSCQVDDIVT DLFSDKRTTF EKIKDNLAKG PRBOELKAVT ENTESEKQIT SCSOLEBSXE
121 SLGLMKTVES TSNWEICDFF TKGNTLVGLS XSGVEK.SQT DELVLPQAA DGTQLIQVAS
181 PAFTPKXKTA IAEYTSRAGE NGEISQLDVD CKREIINRGEV FNSVLLKRVY IPTQYKHQQ
241 DAFVDMKNIA EVNLEPSLET LSGYAFAHIA LKQIDLSDNL XAIGRLAPFD NQYIGK.SLEP
301 RQIMRARRA FKNHIRTIE FRGNSLKVIG EASPDNDIS QIMGFDKLEK LRSRFTNRP
361 GDDHYANRVV LNIKSGKNPS GLATLNTYVN PDKSLMQESP SIDYTKLEK DITVQRNEVT
421 GFSNGLQKV KRNKMLEPK QHNGVTIPI GDNAPRNVP QNKTLRKYDL REVKLPSEIR
481 KIGAFAPQSN NLKSPDASDD LEEIKEGAFM NNNIETL.LK DEKLVYIGDAA PHINELIYIV
541 LPSVQSEIGR SAFPQNGANN LIFMGSEKVT LGEMAFISMN LEHLDDSEKQ QITBI PVQAF
601 SDNALKEVLL PASLKTIRRE AFKXNHLKQL EVASALSILA FNALDDNDGD EQSDNEVVK
661 THHSVALAD GSHFVDDK LSETVDEK ILKLELDY SLRQITTFQ FSDMTAGKA
721 LSGSNLRQG EKOKPLGQAG TPLGRVLDLK ATAKAKALV TTKATKNSQL LRSIINKAVL
781 AYNNSAIKKA NVKRLKELD LLTGLVSKG FLAQATWCG VYLLKTEPLR PEYVIGLTVY
841 FOKSGLIYA LDMSDTIGEG QKDAYGNPL NVDENEGVH ALAVATLADY EGLDIKTLN
901 SKLSQLTIR QVPTAYHRA GTFQALQMAA ABEQLL.RKP GTHSEKSSS EASNSKDRGL
961 QSNPKINRGR HSAILPRGNS XGSPVYIGLG YTSVAL.S.LI TAIKKKKY*

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

3/6

Clustal W(1.4) multiple sequence alignment

7 Sequences Aligned, Alignment Score = 118839
Gaps Inserted = 0 Conserved Identities = 936

Pairwise Alignment Mode: Fast
Pairwise Alignment Parameters:
ktau = 1 Gap Penalty = 3 Top Diagonals = 5 Window Size = 5

Multiple Alignment Parameters:
Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 0.1
Delay Divergent = 40% Gap Distance = 8
Similarity Matrix: BLOSUM

Processing time: 12.9 seconds

Table with 5 columns: sequence ID, position, sequence, position, sequence ID. It shows multiple sequence alignments for various Spy and 700294_M1 sequences across different positions.

FIG. 3
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

4/6

Spy74_M3	156	NGEISQLDVGKELINEGEVFNSEYLLKXVTIPTGYKHIGQDAFVDMKNIA	205
Spy79_M5	175	NGEISQLDVGKBTINEGEVFNSEYLLKXVTIPTGYKHIGQDAFVDMKNIA	224
Spy69_M6	168	NGEISQLDVGKBTINEGEVFNSEYLLKXVTIPTGYKHIGQDAFVDMKNIA	217
Spy68_M2	175	NGEISQLDVGKELINEGEVFNSEYLLKXVTIPTGYKHIGQDAFVDMKNIA	224
Spy60_M1	175	NGEISQLDVGKBTINEGEVFNSEYLLKXVTIPTGYKHIGQDAFVDMKNIA	224
12357_M18	174	NGEISQLDVGKELINEGEVFNSEYLLKXVTIPTGYKHIGQDAFVDMKNIA	223
700294_M1	201	NGEISQLDVGKELINEGEVFNSEYLLKXVTIPTGYKHIGQDAFVDMKNIA	250

Spy74_M3	206	EVNLPESLETTISDYAFAPHLALKQIDLDPNLKAIIGELAFFDNQITGKLSLP	355
Spy70_M5	225	EVNLPESLETTISDYAFAPHLALKQIDLDPNLKAIIGELAFFDNQITGKLSLP	374
Spy69_M6	218	EVNLPESLETTISDYAFAPHLALKQIDLDPNLKAIIGELAFFDNQITGKLSLP	267
Spy68_M2	225	EVNLPESLETTISDYAFAPHLALKQIDLDPNLKAIIGELAFFDNQITGKLSLP	274
Spy60_M1	225	EVNLPESLETTISDYAFAPHLALKQIDLDPNLKAIIGELAFFDNQITGKLSLP	274
12357_M18	224	EVNLPESLETTISDYAFAPHLALKQIDLDPNLKAIIGELAFFDNQITGKLSLP	273
700294_M1	251	EVNLPESLETTISDYAFAPHLALKQIDLDPNLKAIIGELAFFDNQITGKLSLP	300

Spy74_M3	256	RQLMRLAERAFKSNHKTIBFRGNLKVIGBASFCQNDLSQLMLEJGLEK	325
Spy70_M5	275	RQLMRLAERAFKSNHKTIBFRGNLKVIGBASFCQNDLSQLMLEJGLEK	324
Spy69_M6	268	RQLMRLAERAFKSNHKTIBFRGNLKVIGBASFCQNDLSQLMLEJGLEK	317
Spy68_M2	275	RQLMRLAERAFKSNHKTIBFRGNLKVIGBASFCQNDLSQLMLEJGLEK	324
Spy60_M1	275	RQLMRLAERAFKSNHKTIBFRGNLKVIGBASFCQNDLSQLMLEJGLEK	324
12357_M18	274	RQLMRLAERAFKSNHKTIBFRGNLKVIGBASFCQNDLSQLMLEJGLEK	323
700294_M1	301	RQLMRLAERAFKSNHKTIBFRGNLKVIGBASFCQNDLSQLMLEJGLEK	350

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

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

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

FIG. 3
(continued)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/066650

PC/T/CA02/00207

5/6

Spy74_M3	456	LEBIEKEGAFMNNRIETLELEKDKLWVTIGDAAFHINHYYAVLPEBSVQEIQR	505
Spy70_M5	475	LEBIEKEGAFMNNRIETLELEKDKLWVTIGDAAFHINHYYAVLPEBSVQEIQR	524
Spy69_M6	468	LEBIEKEGAFMNNRIETLELEKDKLWVTIGDAAFHINHYYAVLPEBSVQEIQR	517
Spy68_M2	475	LEBIEKEGAFMNNRIETLELEKDKLWVTIGDAAFHINHYYAVLPEBSVQEIQR	524
Spy60_M1	475	LEBIEKEGAFMNNRIETLELEKDKLWVTIGDAAFHINHYYAVLPEBSVQEIQR	524
12357_M18	474	LEBIEKEGAFMNNRIETLELEKDKLWVTIGDAAFHINHYYAVLPEBSVQEIQR	523
700294_M1	531	LEBIEKEGAFMNNRIETLELEKDKLWVTIGDAAFHINHYYAVLPEBSVQEIQR	550

Spy74_M3	506	SAPRQNGANNLIFMGSKVRTIGEMAFLSNRLEHLDLSEQQQLTEIPVQAF	555
Spy70_M5	525	SAPRQNGANNLIFMGSKVRTIGEMAFLSNRLEHLDLSEQQQLTEIPVQAF	574
Spy69_M6	518	SAPRQNGANNLIFMGSKVRTIGEMAFLSNRLEHLDLSEQQQLTEIPVQAF	567
Spy68_M2	525	SAPRQNGANNLIFMGSKVRTIGEMAFLSNRLEHLDLSEQQQLTEIPVQAF	574
Spy60_M1	525	SAPRQNGANNLIFMGSKVRTIGEMAFLSNRLEHLDLSEQQQLTEIPVQAF	574
12357_M18	524	SAPRQNGANNLIFMGSKVRTIGEMAFLSNRLEHLDLSEQQQLTEIPVQAF	573
700294_M1	551	SAPRQNGANNLIFMGSKVRTIGEMAFLSNRLEHLDLSEQQQLTEIPVQAF	600

Spy74_M3	556	SDNALKEVLLPASKLTIREEAFKKNHLKQLEVASALSHLAFNALDDNDCD	605
Spy70_M5	575	SDNALKEVLLPASKLTIREEAFKKNHLKQLEVASALSHLAFNALDDNDCD	624
Spy69_M6	568	SDNALKEVLLPASKLTIREEAFKKNHLKQLEVASALSHLAFNALDDNDCD	617
Spy68_M2	575	SDNALKEVLLPASKLTIREEAFKKNHLKQLEVASALSHLAFNALDDNDCD	624
Spy60_M1	575	SDNALKEVLLPASKLTIREEAFKKNHLKQLEVASALSHLAFNALDDNDCD	624
12357_M18	574	SDNALKEVLLPASKLTIREEAFKKNHLKQLEVASALSHLAFNALDDNDCD	623
700294_M1	601	SDNALKEVLLPASKLTIREEAFKKNHLKQLEVASALSHLAFNALDDNDCD	650

Spy74_M3	606	EQFDNKVVVKTTHNSYALADGHEHFVDDPKLSSTVVDLEKILKLEGLDY	655
Spy70_M5	625	EQFDNKVVVKTTHNSYALADGHEHFVDDPKLSSTVVDLEKILKLEGLDY	674
Spy69_M6	618	EQFDNKVVVKTTHNSYALADGHEHFVDDPKLSSTVVDLEKILKLEGLDY	667
Spy68_M2	625	EQFDNKVVVKTTHNSYALADGHEHFVDDPKLSSTVVDLEKILKLEGLDY	674
Spy60_M1	625	EQFDNKVVVKTTHNSYALADGHEHFVDDPKLSSTVVDLEKILKLEGLDY	674
12357_M18	624	EQFDNKVVVKTTHNSYALADGHEHFVDDPKLSSTVVDLEKILKLEGLDY	673
700294_M1	651	EQFDNKVVVKTTHNSYALADGHEHFVDDPKLSSTVVDLEKILKLEGLDY	700

Spy74_M3	656	STLRQTQIQFRDMTACAKALLSKSNLRQSEKQXFLQBAQFFLGRVDLDK	705
Spy70_M5	675	STLRQTQIQFRDMTACAKALLSKSNLRQSEKQXFLQBAQFFLGRVDLDK	724
Spy69_M6	668	STLRQTQIQFRDMTACAKALLSKSNLRQSEKQXFLQBAQFFLGRVDLDK	717
Spy68_M2	675	STLRQTQIQFRDMTACAKALLSKSNLRQSEKQXFLQBAQFFLGRVDLDK	724
Spy60_M1	675	STLRQTQIQFRDMTACAKALLSKSNLRQSEKQXFLQBAQFFLGRVDLDK	724
12357_M18	674	STLRQTQIQFRDMTACAKALLSKSNLRQSEKQXFLQBAQFFLGRVDLDK	723
700294_M1	701	STLRQTQIQFRDMTACAKALLSKSNLRQSEKQXFLQBAQFFLGRVDLDK	750

Spy74_M3	706	ATAKABKALVTKKATKNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKKANVKRLEKELD	755
Spy70_M5	725	ATAKABKALVTKKATKNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKKANVKRLEKELD	774
Spy69_M6	718	ATAKABKALVTKKATKNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKKANVKRLEKELD	767
Spy68_M2	725	ATAKABKALVTKKATKNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKKANVKRLEKELD	774
Spy60_M1	725	ATAKABKALVTKKATKNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKKANVKRLEKELD	774
12357_M18	724	ATAKABKALVTKKATKNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKKANVKRLEKELD	773
700294_M1	751	ATAKABKALVTKKATKNGQLLERSINKAVLAYNNSAIKKANVKRLEKELD	800

FIG. 3
(continued)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

6/6

```

Spy74_M3 756 LLTGLVSGKGPLAQATMVCGVYLLKTFPLPLPEEYIIGLNWVYFDKSGKLIYA 805
Spy70_M5 775 LLTGLVSGKGPLAQATMVCGVYLLKTFPLPLPEEYIIGLNWVYFDKSGKLIYA 824
Spy69_M6 768 LLTGLVSGKGPLAQATMVCGVYLLKTFPLPLPEEYIIGLNWVYFDKSGKLIYA 817
Spy68_M2 775 LLTGLVSGKGPLAQATMVCGVYLLKTFPLPLPEEYIIGLNWVYFDKSGKLIYA 824
Spy60_M1 775 LLTGLVSGKGPLAQATMVCGVYLLKTFPLPLPEEYIIGLNWVYFDKSGKLIYA 824
12357_M18 774 LLTGLVSGKGPLAQATMVCGVYLLKTFPLPLPEEYIIGLNWVYFDKSGKLIYA 823
700294_M1 801 LLTGLVSGKGPLAQATMVCGVYLLKTFPLPLPEEYIIGLNWVYFDKSGKLIYA 850
*****

Spy74_M3 806 LDMSTTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNREGYHALAVATLADYEGLDCKTILN 956
Spy70_M5 825 LDMSTTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNREGYHALAVATLADYEGLDCKTILN 974
Spy69_M6 818 LDMSTTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNREGYHALAVATLADYEGLDCKTILN 867
Spy68_M2 825 LDMSTTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNREGYHALAVATLADYEGLDCKTILN 974
Spy60_M1 825 LDMSTTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNREGYHALAVATLADYEGLDCKTILN 974
12357_M18 824 LDMSTTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNREGYHALAVATLADYEGLDCKTILN 873
700294_M1 851 LDMSTTIGEGQKDAYGNPILNVDEDNREGYHALAVATLADYEGLDCKTILN 900
*****

Spy74_M3 856 SKLSQLTCSIRQVPTAAYHRAGIPQAIQNAAAEEAQLLPKPGTHSEKSSSS 905
Spy70_M5 875 SKLSQLTCSIRQVPTAAYHRAGIPQAIQNAAAFAEQILPKACTESEKSSSS 924
Spy69_M6 868 SKLSQLTCSIRQVPTAAYHRAGIPQAIQNAAAEEAQLLPKPGTHSEKSSSS 917
Spy68_M2 875 SKLSQLTCSIRQVPTAAYHRAGIPQAIQNAAAEEAQLLPKPGTHSEKSSSS 921
Spy60_M1 875 SKLSQLTCSIRQVPTAAYHRAGIPQAIQNAAAEEAQLLPKPGTHSEKSSSS 924
12357_M18 874 SKLSQLTCSIRQVPTAAYHRAGIPQAIQNAAAEEAQLLPKPGTHSEKSSSS 923
700294_M1 901 SKLSQLTCSIRQVPTAAYHRAGIPQAIQNAAAEEAQLLPKPGTHSEKSSSS 950
*****

Spy74_M3 906 ESANSKERGLCSNPRTNRRGRHSAILPRTGSKGSSFVYGI LGYTSVAL 951
Spy70_M5 925 ESANSKERGLCSNPRTNRRGRHSAILPRTGSKGSSFVYGI LGYTSVAL 970
Spy69_M6 918 ESANSKERGLCSNPRTNRRGRHSAILPRTGSKGSSFVYGI LGYTSVAL 963
Spy68_M2 925 ESANSKERGLCSNPRTNRRGRHSAILPRTGSKGSSFVYGI LGYTSVAL 971
Spy60_M1 925 ESANSKERGLCSNPRTNRRGRHSAILPRTGSKGSSFVYGI LGYTSVAL 971
12357_M18 924 ESANSKERGLCSNPRTNRRGRHSAILPRTGSKGSSFVYGI LGYTSVAL 969
700294_M1 951 ESANSKERGLCSNPRTNRRGRHSAILPRTGSKGSSFVYGI LGYTSVAL 1000
*****

Spy74_M3 952 951
Spy70_M5 971 970
Spy69_M6 964 963
Spy68_M2 972 971
Spy60_M1 972 971
12357_M18 970 969
700294_M1 1001 TAIKKKKY 1008

```

FIG. 3
 (continued)
 SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/06660

PCT/CA02/00207

1

SEQUENCE LISTING

<110> Shire Biochem Inc.

<120> Streptococcus Pyogenes Polypeptides and Corresponding DNA Fragments

<130> 74872-76

<150> US 60/269,840

<151> 2001-02-21

<160> 2

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 3027

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 1

```

atgaagaac atcttaaaac agttgecttg accctcacta cagtatgggt agtcaccac 60
aatnaggaag tttttagttt agtcaaaag ccaattctta aacaaactca agcttcttca 120
tcgatttctg ggcctgacta cgcagaaggt agcggtaaaa gcaagttaaa gattaatgaa 180
actcttggcc ctgttgatga tacagtcact gaottatttt cggataaaog tactactctc 240
gaaaaataaa aagataaatct tgctaaaggt ccgagagaac aagagttaaa ggcagtaaca 300
gagaatacac aacagaaaaa gcagatcact tctggatctc aactagaaca atcaaaagag 360
tctctttctt taataaaaaa agtgccatca acgtctaatt gggagatttg tgattttatt 420
actaagggga atacccttgt tggctcttca aaatcagggt ttgaaaagtt atctcaaac 480
gatcatctcg tattgctctg tcaagcagca gatggaactc aattgataca agtagctagt 540
tttcttttta ctccagataa aaagaacgca attgcagaat ataccagtag ggcaggagaa 600
aatggggaaa taagccaact agatgtggat gaaaaagaaa ttattaacga agtgagggtt 660
tttaattctt atctaactaa gaeggttaaca atcccaactg gttataaaca tattggtcaa 720
gatgcttttg tggacaataa gaatattgct gaggttaatr ttcttgaag cctcgagact 780
atttctgact atgcttttgc tcaactagct ttgaaacaga tctgatttgc agataattta 840
aaagcgattg gagaattagc tttttttgat aatcaaatca caggtaeact ttctttgcca 900
cgtcagttaa tgcgattagc agaactgtct tttaaatcaa cccatataca aacaaatgag 960
tltagaggaa atagtctaaa agtgataggg gaagctagtt tccaagataa tgaatctgag 1020
caactaatgc tacttgacgg tcttgaaaaa atagaataca aagcttttca aggaatcca 1080
ggagtgatc actcaataaa cctgtgtgtt ttgtggcaaa aatctggaaa aaatctctct 1140
ggctctgctc ctgaaaatac cttaagttat cctgataagt cactatggca ggaagctct 1200
gagattgatt atactaatg gttagaggaa gatrttact atcaaaaaa tagtgtaca 1260
ggttttcaa ataaaggctt acaaaagta aaacgtata aaaaacttag aattccaaa 1320
cagcaaatg gtgttactat tactgaaatt ggtgataatg cttttogcaa tgtgtatttt 1380
caaaataaaa cttaagctaa atatgatitg gaagaagtaa agcttccctc aactattcgg 1440
aaaatagggt cttttgctt tcaatctaat aacttgaat cttttgaagc agtgaogat 1500
ttagaagaaa ttaaaagggg agcctttatg aataatogta ttgaaacott ggaattaaa 1560
gataaattag ttaactattg tgatgggctc ttccatatta atcaatatta tgcattgtt 1620
cttccagaat ctgtacaaga aataggggtt taaagcttcc ggcataatgg tgcaaatat 1680
cttattttta tgggaagtaa ggttaagacc ttagggtgaa tggcatttt atcaaataga 1740
ctgaaacatc tggatctttr tgagcaaaaa cagttaacag agatctctgt tcaagccttt 1800
tcagaaatg ccttgaaga agraattata ccagcatcac tgaaaacgat tcgagaagaa 1860
gccttcaaaa agaatcattt aaacaactg gaagtgccat ctgctttgtc ccatattgct 1920
tllaatgctt tagatgataa tgatgggtat gaacaatttg ataataaag ggttgttaa 1980
acgcacata atlccatcgc actagcagat ggtgagcatt ttatcgttga tccagataag 2040
ttatcttcta caatagtaga ccttgaagag attttaaaca taactgaagg tttagattat 2100
ctacattac gtcagactac tcaaacctag tttagagaca tgaactctgc agttaaagcg 2160
ttgtgtcaa atcttaacct ccgacaagga gaaaaacaaa aattcttca agaacacaa 2220

```

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

2

```

tttttctctg gccgcgttga ttggataaa gccatagcta aagctgagaa ggcttttagt 2280
accaagaag caacaagaa tggkcaattg cttgaaagaa gattaacaa agcgggtatta 2340
gcttataata atagcgtat taasaaagct aatgtaagc gcttggaaaa agagtttagc 2400
ttgctaacag gattagtga ggaasagga ccattagcgc aagctacaat ggtacaagga 2460
gtttattat taagaagcgc ttgcnattg ccagaatatt atatcgatt gaacgtttat 2520
ttgacaagt cggaaaatt gattatgca cttgatatga gtgatactat tggcggagga 2580
caaaaagagc cttatggtaa tcttatatta aatgttgacy aggataatga agtttatcat 2640
gcctggcag ttgccacttt agctgattat gaggggctcg acatcaaac aattttaat 2700
agtaagotta gtcaattaac atctattcgt caggtaccga ctgcagocct tcatagagcc 2760
ggtattttcc aagctatcca aaatgcagcg gcaqaagcag agcagttatt gcotaaacca 2820
ggtaagcact ctgagaagtc aagctcaagt gaatctgcta actctaaaga tagaggattg 2880
caatcaacc caaaaacgaa tagaggacga cactctgcaa tattgcttag gacagggtca 2940
aaagcgagct tgtctatgg aatcttagt tacactagcg ttgctttact gtcactaata 3000
actgtataaa aaagaaaaa atattaa 3027

```

```

<210> 2
<211> 1008
<212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes

```

```

<400> 2
Met Lys Lys His Leu Lys Thr Val Ala Leu Thr Leu Thr Thr Val Ser
1 5 10 15
Val Val Thr His Asn Gln Glu Val Phe Ser Leu Val Lys Glu Pro Ile
20 25 30
Leu Lys Gln Thr Gln Ala Ser Ser Ser Ile Ser Gly Ala Asp Tyr Ala
35 40 45
Glu Ser Ser Gly Lys Ser Lys Leu Lys Ile Asn Glu Thr Ser Gly Pro
50 55 60
Val Asp Asp Thr Val Thr Asp Leu Phe Ser Asp Lys Arg Thr Thr Pro
65 70 75 80
Glu Lys Ile Lys Asp Asn Leu Ala Lys Gly Pro Arg Glu Gln Glu Leu
85 90 95
Lys Ala Val Thr Glu Asn Thr Glu Ser Glu Lys Gln Ile Thr Ser Gly
100 105 110
Ser Gln Leu Glu Gln Ser Lys Glu Ser Leu Ser Leu Asn Lys Thr Val
115 120 125
Pro Ser Thr Ser Asn Trp Glu Ile Cys Asp Phe Ile Thr Lys Gly Asn
130 135 140
Thr Leu Val Gly Leu Ser Lys Ser Gly Val Glu Lys Leu Ser Gln Thr
145 150 155
Asp His Leu Val Leu Pro Ser Gln Ala Ala Asp Gly Thr Gln Leu Ile
165 170 175
Gln Val Ala Ser Phe Ala Phe Thr Pro Asp Lys Lys Thr Ala Ile Ala
180 185 190
Glu Tyr Thr Ser Arg Ala Gly Glu Asn Gly Glu Ile Ser Gln Leu Asp
195 200 205

```

WG 02/066650

PCT/CA02/00207

3

Val Asp Gly Lys Glu Ile Ile Asn Glu Gly Glu Val Phe Asn Ser Tyr
 210 215 220
 Leu Leu Lys Lys Val Thr Ile Pro Thr Gly Tyr Lys His Ile Gly Gln
 225 230 235 240
 Asp Ala Phe Val Asp Asn Lys Asn Ile Ala Glu Val Asn Leu Pro Glu
 245 250 255
 Ser Leu Glu Thr Ile Ser Asp Tyr Ala Phe Ala His Leu Ala Leu Lys
 260 265 270
 Gln Ile Asp Leu Pro Asp Asn Leu Lys Ala Ile Gly Glu Leu Ala Phe
 275 280 285
 Phe Asp Asn Gln Ile Thr Gly Lys Leu Ser Leu Pro Arg Gln Leu Met
 290 295 300
 Arg Leu Ala Glu Arg Ala Phe Lys Ser Asn His Ile Lys Thr Ile Glu
 305 310 315 320
 Phe Arg Gly Asn Ser Leu Lys Val Ile Gly Glu Ala Ser Phe Gln Asp
 325 330 335
 Asn Asp Leu Ser Gln Leu Met Leu Pro Asp Gly Leu Glu Lys Ile Glu
 340 345 350
 Ser Glu Ala Phe Thr Gly Asn Pro Gly Asp Asp His Tyr Asn Asn Arg
 355 360 365
 Val Val Leu Trp Thr Lys Ser Gly Lys Asn Pro Ser Gly Leu Ala Thr
 370 375 380
 Glu Asn Thr Tyr Val Asn Pro Asp Lys Ser Leu Trp Gln Glu Ser Pro
 385 390 395 400
 Glu Ile Asp Tyr Thr Lys Trp Leu Glu Glu Asp Phe Thr Tyr Gln Lys
 405 410 415
 Asn Ser Val Thr Gly Phe Ser Asn Lys Gly Leu Gln Lys Val Lys Arg
 420 425 430
 Asn Lys Asn Leu Glu Ile Pro Lys Gln His Asn Gly Val Thr Ile Thr
 435 440 445
 Glu Ile Gly Asp Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Phe Gln Asn Lys Thr
 450 455 460
 Leu Arg Lys Tyr Asp Leu Glu Glu Val Lys Leu Pro Ser Thr Ile Arg
 465 470 475 480
 Lys Ile Gly Ala Phe Ala Phe Gln Ser Asn Asn Leu Lys Ser Phe Glu
 485 490 495
 Ala Ser Asp Asp Leu Glu Glu Ile Lys Glu Gly Ala Phe Met Asn Asn
 500 505 510
 Arg Ile Glu Thr Leu Glu Leu Lys Asp Lys Leu Val Thr Ile Gly Asp
 515 520 525

WO 02/066650

PCT/CA02/00207

4

Ala Ala Phe His Ile Asn His Ile Tyr Ala Ile Val Leu Pro Glu Ser
 530 535 540
 Val Gln Glu Ile Gly Arg Ser Ala Phe Arg Gln Asn Gly Ala Asn Asn
 545 550 555 560
 Leu Ile Phe Met Gly Ser Lys Val Lys Thr Leu Gly Glu Met Ala Phe
 565 570 575
 Leu Ser Asn Arg Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Glu Gln Lys Gln Leu
 580 585 590
 Thr Glu Ile Pro Val Gln Ala Phe Ser Asp Asn Ala Leu Lys Glu Val
 595 600 605
 Leu Leu Pro Ala Ser Leu Lys Thr Ile Arg Glu Glu Ala Phe Lys Lys
 610 615 620
 Asn His Leu Lys Gln Leu Glu Val Ala Ser Ala Leu Ser His Ile Ala
 625 630 635 640
 Phe Asn Ala Leu Asp Asp Asn Asp Gly Asp Glu Gln Phe Asp Asn Lys
 645 650 655
 Val Val Val Lys Thr His His Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Asp Gly Glu
 660 665 670
 His Phe Ile Val Asp Pro Asp Lys Leu Ser Ser Thr Ile Val Asp Leu
 675 680 685
 Glu Lys Ile Leu Lys Leu Ile Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Thr Leu Arg
 690 695 700
 Gln Thr Thr Gln Thr Gln Phe Arg Asp Met Thr Thr Ala Gly Lys Ala
 705 710 715 720
 Leu Leu Ser Lys Ser Asn Leu Arg Gln Gly Glu Lys Gln Lys Phe Leu
 725 730 735
 Gln Glu Ala Gln Phe Phe Leu Gly Arg Val Asp Leu Asp Lys Ala Ile
 740 745 750
 Ala Lys Ala Glu Lys Ala Leu Val Thr Lys Lys Ala Thr Lys Asn Gly
 755 760 765
 Gln Leu Leu Glu Arg Ser Ile Asn Lys Ala Val Leu Ala Tyr Asn Asn
 770 775 780
 Ser Ala Ile Lys Lys Ala Asn Val Lys Arg Leu Glu Lys Glu Leu Asp
 785 790 795 800
 Leu Leu Thr Gly Leu Val Glu Gly Lys Gly Pro Leu Ala Gln Ala Thr
 805 810 815
 Met Val Gln Gly Val Tyr Leu Leu Lys Thr Pro Leu Pro Leu Pro Glu
 820 825 830
 Tyr Tyr Ile Gly Leu Asn Val Tyr Phe Asp Lys Ser Gly Lys Leu Ile
 835 840 845

WG 02/066650

PCT/CA02/00207

5

Tyr Ala Leu Asp Met Ser Asp Thr Ile Gly Glu Gly Gln Lys Asp Ala
 850 855 860
 Tyr Gly Asn Pro Ile Leu Asn Val Asp Glu Asp Asn Glu Gly Tyr His
 865 870 875 880
 Ala Leu Ala Val Ala Thr Leu Ala Asp Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Lys
 885 890 895
 Thr Ile Leu Asn Ser Lys Leu Ser Gln Leu Thr Ser Ile Arg Gln Val
 900 905 910
 Pro Thr Ala Ala Tyr His Arg Ala Gly Ile Phe Gln Ala Ile Gln Asn
 915 920 925
 Ala Ala Ala Glu Ala Glu Gln Leu Leu Pro Lys Pro Gly Thr His Ser
 930 935 940
 Glu Lys Ser Ser Ser Ser Glu Ser Ala Asn Ser Lys Asp Arg Gly Leu
 945 950 955 960
 Gln Ser Asn Pro Lys Thr Asn Arg Gly Arg His Ser Ala Ile Leu Pro
 965 970 975
 Arg Thr Gly Ser Lys Gly Ser Phe Val Tyr Gly Ile Leu Gly Tyr Thr
 980 985 990
 Ser Val Ala Leu Leu Ser Leu Ile Thr Ala Ile Lys Lys Lys Lys Tyr
 995 1000 1005

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066650 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/31 (74) Agents: MORROW, Joy, D. et al.: Smart & Biggar, P.O. Box 2999, Station D, 900-55 Metcalfe Street, Ottawa, Ontario K1P 5Y6 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA02/00207 (51) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 21 February 2002 (21.02.2002) (51) Designated States (regional):ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(23) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/269,840 21 February 2001 (21.02.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): SHIRE BIOCHEM INC. [CA/CA], 275 Armand Frappier Boulevard, Laval, Quebec H7V 4A7 (CA).

(72) Inventors: and (75) Inventors/Applicants (for US only): MARTIN, Denis [CA/CA], 1728-G, rue Gaboury, St-Augustin-de-Desmaures, Quebec G5A 1E9 (CA); RIOUX, Stéphane [CA/CA], 899 Avenue Des Passens, Beauport, Quebec G1E 1J3 (CA); BRODEUR, Bernard, R. [CA/CA], 240 Marquis Sillery, Quebec G1T 1N6 (CA); HAMBLIN, Josée [CA/CA], 240, Marquis, Sillery, Quebec G1T 1N6 (CA); RHEAULT, Patrick [CA/CA], 24 rue Bégin, St-Etienne-de-Lançon, Quebec G5J 1P9 (CA).

Published: with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

[Continued on next page]

(54) Title: STREPTOCOCCUS PYOGENES POLYPEPTIDES AND CORRESPONDING DNA FRAGMENTS

(SEQ ID NO: 2)

1 MKKHLKTVAL TLTTYSVVTH NQVPSLVKE PFLKQIQASS SLSGADYAES SSKSKIKINE
61 TEGPVDDVVT DLPEDKRTFP SKIKDHLANG FRQCELEAVT EPTESKQIT SSSQLEQSKK
121 SLSLKTIVDS TSWREICDFI TRQNTLACLS SSGVCKLQGT DRIVLPQJAA DGTQLLQVAB
181 FAFPPDKRTA LRYTSEKAGE NGEISQLDVD GKEIINSEGV FNEYLKVPT TPTYSKIQG
241 DAFVNDKITA EYNLPESEET ISDYAFAPLA LKQIDLPDLK KAIQELAFD NQITKLSLP
301 RQMLRLAERA FKNLKTIE FRGNSLVKVG EAGFQNDLSS QMLPDLGLEK IESBAPKRP
361 GDDHYNNRVV LWTSGSKNPS CLATEYTVN PDKSLWQESD ELDYTRWLEB DPTVQKNSVT
421 GFNNKGIQNV KRNKNLEIFK QHNGVTITET GDNAPRVDF QKTLKTYDL EKVLPSTIR
481 KIGAPAFQSN SLSKSPASLD DEEIKGAFN NIKRITLBLEK DCLVTLGDAA PIRNHIYATV
541 LPESSWELGR SSGKQNDQNH LFMGSKVET LQDMFASNR LHHLLSQQK QLSSTPQNF
601 SNALKEVLL QASLKTREE AFKKNLKYQ EYASLSHIA FHALDPNSD EQPKNKVVK
661 THINGVALAD GSHFVDRPK LSHYIVDIEX LKRLIEGLDY STEKQTTQTO PRDMITAGKA
721 LLSKSNLRQG EKQFLQMAQ FFLGRVLDLK AIKAKRRLV TKKATYQQL LERSINKVVL
781 AYNSALRKA NYKRLKELD LLTSLVEGKG PLAKATMVGQ VYVLTPELP EYVIGLVNY
841 FRSKGLIYA LQSDITIGSG QKDAYGNEL NVDSNVEGYH ALAVATLADY EQLDIXTLN
901 SLSLQLSIR QVPTAAYHRA GTFQALQAAA AEAQLLEKFP GTHSKSSSS SSANSKDRGL
961 QSNPKTMGR HSAITPRTGS KSSPYVGLG YTSVALLSLI IATKKEK*

WO 02/066650 A3

(57) Abstract: The present invention relates to antigens, more particularly antigens of Streptococcus pyogenes (also called group A Streptococcus (GAS)) bacterial pathogen which are useful as vaccine component for prophylaxis, therapy and/or diagnostic.

WO 02/066650 A3 

(88) Date of publication of the international search report: 31 October 2002 *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

【手続補正書】

【提出日】平成14年11月4日(2002.11.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

【図1】図1は、血清型M1S. pyogenes菌株ATCC700294由来のBVH-P7遺伝子のDNA配列を示す；配列番号1。配列の下線部分は、リーダーペプチドをコードする領域を示す。

【図2】図2は、血清型M1S. pyogenes菌株ATCC700294由来のアミノ酸配列BVH-P7タンパク質を示す；配列番号2。下線の配列は、21アミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図3-1】図3-1は、Spy74(配列番号3)、Spy70(配列番号4)、Spy69(配列番号5)、Spy68(配列番号6)、Spy60(配列番号7)、ATCC12357(配列番号8)、ATCC700294(配列番号2)、S. pyogenes菌株由来のBVH-P7オープンリーディングフレームの推定アミノ酸配列の、MacVector配列分析ソフトウェア(バージョン6.5)からのプログラムClustal Wを使用することによる比較を示す。アラインメントの下で、*および.文字がそれぞれ同一および類似のアミノ酸残基を示すコンセンサスラインがある。

【図3-2】図3-2は、Spy74(配列番号3)、Spy70(配列番号4)、Spy69(配列番号5)、Spy68(配列番号6)、Spy60(配列番号7)、ATCC12357(配列番号8)、ATCC700294(配列番号2)、S. pyogenes菌株由来のBVH-P7オープンリーディングフレームの推定アミノ酸配列の、MacVector配列分析ソフトウェア(バージョン6.5)からのプログラムClustal Wを使用することによる比較を示す。アラインメントの下で、*および.文字がそれぞれ同一および類似のアミノ酸残基を示すコンセンサスラインがある。

【図3-3】図3-3は、Spy74(配列番号3)、Spy70(配列番号4)、Spy69(配列番号5)、Spy68(配列番号6)、Spy60(配列番号7)、ATCC12357(配列番号8)、ATCC700294(配列番号2)、S. pyogenes菌株由来のBVH-P7オープンリーディングフレームの推定アミノ酸配列の、MacVector配列分析ソフトウェア(バージョン6.5)からのプログラムClustal Wを使用することによる比較を示す。アラインメントの下で、*および.文字がそれぞれ同一および類似のアミノ酸残基を示すコンセンサスラインがある。

【図3-4】図3-4は、Spy74(配列番号3)、Spy70(配列番号4)、Spy69(配列番号5)、Spy68(配列番号6)、Spy60(配列番号7)、ATCC12357(配列番号8)、ATCC700294(配列番号2)、S. pyogenes菌株由来のBVH-P7オープンリーディングフレームの推定アミノ酸配列の、MacVector配列分析ソフトウェア(バージョン6.5)からのプログラムClustal Wを使用することによる比較を示す。アラインメントの下で、*および.文字がそれぞれ同一および類似のアミノ酸残基を示すコンセンサスラインがある。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0100】

S.pyogenes BVH-P7(配列番号1)遺伝子のコード領域を、血清型M1 S. pyogenes菌株ATCC/00294のゲノムDNAからPCRによって増幅する(Robocycler Gradien

t 96 Temperature cycler, Stratagene, Lajolla, CA)。表 1 に示す、制限部位 N d e I (C A T A T G) および N o t I (G C G G C C G C) の付加のための塩基伸長物を含ませる以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用する：D M A R 2 9 3 (配列番号 9) および D M A R 2 9 4 (配列番号 1 0)。P C R 産物を、製造者の指示 (Chatsworth, CA) にしたがって、QIAgenからのQIAquickゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製し、そしてN d e I およびN o t I で消化する (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfe, Canada)。p E T - 2 1 (+) ベクター (Novagen, Madison, WI)を、N d e I およびN o t I で消化し、そしてQIAgen(Chatsworth, CA)からのQIAquickゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製した。N d e I - N o t I P C R 産物を、N d e I - N o t I p E T - 2 1 b (+) 発現ベクターにライゲートさせた。ライゲートされた産物を、Simanisの方法 (Hanahan, D. DNA Cloning, 1085, D.M. Glover(ed), pp.109-135) にしたがって

【化 1】

E. coli 菌株 DH5•

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

に移入した。B V H - P 7 遺伝子を含む組み換え体 p E T - 2 1 b (+) プラスミド (r p E T 2 1 b (+)) をQIAgenプラスミドキット (Chatsworth, CA) を使用して精製し、そしてD N A インサートを配列決定した (Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA)。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 0 1】

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

【表 1】

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

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0103

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0103】

BVH-P7 (配列番号1) 遺伝子のPCR増幅によって存在を確認するために、以下の4つの血清学的に明瞭な*S. pyogenes*菌株を使用した: 血清型M1 *S. pyogenes*菌株ATCC700294および血清型M3 *S. pyogenes*菌株ATCC12384を、アメリカンタイプカルチャーコレクション(Rockville, MD)から取得した; 血清型M6 *S. pyogenes* S PY67臨床的単離株は、Centre de recherche en infectiologie du Centre hospitalier de l' universite Laval, Sainte-Foyによって提供された; およびマウスから当初単離された*S. pyogenes*菌株B514は、University of Alabama, BirminghamからSusan Hollingsheadによって提供された。E. coli菌株XL1-Blue MRFを、ネガティブコントロールとしてこれらの実験で使用した。染色体性DNAを、以前記載されたようにそれぞれの*S. pyogenes*菌株から単離した(Jayarao EM et al., 1991. J. Clin. Microbiol. 29:2774-2778)。BVH-P7 (配列番号1) 遺伝子を、4つの*S. pyogenes*菌株から精製されたゲノムDNAからPCR (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, Lajolla, Ca) によって、そしてコントロールE. coli菌株をオリゴヌクレオチドプライマーDMAR293 (配列番号9) およびDMAR294 (配列番号10) (表1) を使用して増幅した。PCRを、45秒間の95、45秒間の50 および2分間の7

2 の 30 サイクルおよび 7 分間の 72 の最終伸長期間で実施した。PCR 産物を、1% アガロースゲル中でサイズ分画化し、そして臭化エチジウム染色によって可視化した。これらの PCR 増幅の結果を表 2 に表す。増幅産物の分析は、BVH - P7 (配列番号 1) 遺伝子が試験された 4 つの *S. pyogenes* 菌株のすべてのゲノム中に存在した。そのような産物を、コントロール *E. coli* DNA がこれらのオリゴヌクレオチドプライマーと同一の PCR 増幅に服するとき検出した。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0106

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0106】

リーダーペプチド領域を欠く BVH - P7 (配列番号 1) 遺伝子のコード領域を、表 1 に記載の、制限部位 BamHI (GGATCC) および SalI (GTCGAC) の付加のための塩基伸長物を含んだオリゴヌクレオチドプライマー DMAR480a (配列番号 11) および DMAR481a (配列番号 12) を使用して、血清型 M1 *S. pyogenes* 菌株 ATCC700294 のゲノム DNA から PCR (Robocycler Gradient 96 Temperature cycler, Stratagene, LaJolla, CA) によって増幅した。PCR 産物を、QIAgen (Chatsworth, CA) からの QIAquick ゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製し、制限酵素 (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baied'Uefe, Canada) で消化した。pCMV - GH ベクター (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas) を、BamHI および SalI で消化し、そして QIAgen (Chatsworth, CA) からの QIAquick ゲル抽出キットを使用してアガロースゲルから精製した。BamHI - SalI DNA フラグメントを、BamHI - SalI - pCMV - GH ベクターにライゲートし、CMV プロモーターの制御下の hGH - BVH - P7 融合タンパク質を創出した。ライゲートした産物を、Simanis の方法 (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover(ed), pp. 109-135) にしたがって、

【化 2】

E. coli 菌株 DH5+

```
[φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(rk-mk+) deoR
thi-1 supE44 λgyrA96 relA1] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)
```

に形質転換した。組み換え体 pCMV プラスミドを、QIAgen プラスミドキット (Chatsworth, CA) を使用して精製しそして DNA インサートのヌクレオチド配列を、DNA 配列決定によって確認した。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 - 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 3 - 4 】

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

FIG. 3

(続き)

- 【 手続 補正書 】
- 【 提出日 】平成 15 年 5 月 13 日 (2003.5.13)
- 【 手続 補正 1 】
- 【 補正 対象 書類 名 】特許 請求 の 範囲
- 【 補正 対象 項目 名 】全文
- 【 補正 方法 】変更
- 【 補正 の 内容 】
- 【 特許 請求 の 範囲 】

【請求項 1】

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

【請求項 2】

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

【請求項 3】

請求項 1 または請求項 2 のポリペプチドの 2 または 3 以上を含むキメラポリペプチドであって、該ポリペプチドがキメラポリペプチドを形成するように連結されている、キメラポリペプチド。

【請求項 4】

- (a) 配列番号 1 のポリヌクレオチド、
 - (b) 配列番号 1 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および
 - (c) (a) または (b) のポリヌクレオチドに相補的であるポリヌクレオチド、
- から選択されるポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

- (a) 配列番号 1 を含むポリヌクレオチド、
 - (b) 請求項 2 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および
 - (c) (a) または (b) のポリヌクレオチドに相補的であるポリヌクレオチド、
- から選択されるポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項 6】

当該ポリヌクレオチドが DNA である、請求項 4 または請求項 5 のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

当該ポリヌクレオチドが RNA である、請求項 4 または請求項 5 のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

ストリンジェント条件下で、

- (a) ポリペプチドをコードする DNA 配列または
- (b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補物

にハイブリダイズする請求項 4 のポリヌクレオチドであって、
ここで当該ポリヌクレオチドが、配列番号 2 またはその抗原性または免疫原性フラグメントまたは抗原性または免疫原性アナログを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

ストリンジेंट条件下で、

- (a) ポリペプチドをコードする D N A 配列または
- (b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補物

にハイブリダイズする請求項 5 のポリヌクレオチドであって、
ここで当該ポリヌクレオチドが配列番号 2 を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

ストリンジेंट条件下で、

- (a) ポリペプチドをコードする D N A 配列または
- (b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補物

にハイブリダイズする請求項 4 のポリヌクレオチドであって、
ここで当該ポリペプチドが、配列番号 2 またはその抗原性または免疫原性フラグメントまたは抗原性または免疫原性アナログを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 11】

ストリンジेंट条件下で、

- (a) ポリペプチドをコードする D N A 配列または
- (b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補物

にハイブリダイズする請求項 5 のポリヌクレオチドであって、
ここで当該ポリペプチドが、配列番号 2 を含むポリペプチドからの少なくとも 10 連続アミノ酸残基を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 12】

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

【請求項 13】

請求項 12 のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 14】

当該ポリペプチドの発現に好適な条件下で請求項 13 の宿主細胞を培養することを含む、ポリペプチドを生産する方法。

【請求項 15】

請求項 1 または請求項 2 のポリペプチドまたは請求項 3 のキメラポリペプチド、および薬学的に許容される担体、希釈剤またはアジュバントを含む医薬組成物。

【請求項 16】

丹毒、咽頭炎および膿痂疹、猩紅熱、および侵入性疾患、例えば菌血症および壊死性筋膜炎およびまた毒性ショックに感受性の宿主における、丹毒、咽頭炎および膿痂疹、猩紅熱、および侵入性疾患、例えば菌血症および壊死性筋膜炎の予防的または治療的処置のための方法であって、当該宿主に予防または治療的量の請求項 15 の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 17】

Streptococcus pyogenes 感染に感受性の宿主における、*Streptococcus pyogenes* 細菌性感性の予防または治療的処置のための方法であって、当該宿主に予防または治療的量の請求項 15 の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 18】

該宿主が動物である、請求項 16 または請求項 17 の方法。

【請求項 19】

ストレプトコッカス性感染に感受性の宿主における、ストレプトコッカス性感染の診断方法であって、

- (a) 該宿主から生物学的サンプルを取得すること、

(b) 抗体または請求項 1 ないし 3 のいずれかのポリペプチドと反応性であるその機能性フラグメントを、該生物学的サンプルとインキュベートし、混合物を形成すること、および

(c) 該混合物中の、特異的に結合した抗体または結合した機能性フラグメントを検出し、これがストレプトコッカス性感染の存在を指摘すること、を含む方法。

【請求項 20】

生物学的サンプルにおける、ストレプトコッカス抗原に特異的な抗体の検出のための方法であって、

(a) 宿主から生物学的サンプルを取得すること、

(b) 請求項 1 ないし 3 のいずれかの 1 または 2 以上のポリペプチドを、該生物学的サンプルとインキュベートし、混合物を形成すること、および

(c) 該混合物中の特異的に結合した抗原を検出し、これがストレプトコッカスに特異的である抗体の存在を指摘すること、を含む方法。

【請求項 21】

請求項 1 ないし 3 のいずれかのポリペプチドの、ストレプトコッカス性感染の予防または治療的処置のための医薬の製造における使用。

【請求項 22】

請求項 1 ないし 3 のいずれかのポリペプチドの、ストレプトコッカス性感染の予防または治療的処置のための使用。

【請求項 23】

請求項 1 ないし 3 のいずれかのポリペプチドを含む、ストレプトコッカス性感染の検出または診断のためのキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

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

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

本発明の更なる側面にしたがって：(a) 配列番号 2 を含むポリペプチド、(b) (a) に少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチド、(c) (a) のポリペプチドに少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチド、(d) (a) のポリペプチドに結合特異性を有する抗体を生成できるポリペプチド、(e) (a) のポリペプチドのエピトープを有する

部分、(f)(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のいずれかのポリペプチド、ここで該N末端Met残基は、欠失されている、および(g)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)のいずれかのポリペプチド、ここで該分泌アミノ酸配列は欠失されている、から選択されるポリペプチドを含む単離ポリペプチドを提供する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/00207		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/31 C12N15/63 C07K14/315 C07K19/00 A61K39/09 A61P17/00 A61P31/00 G01N33/569				
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 7 C12N C07K				
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 practical, search terms used)				
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
P, X	DATABASE SWALL 'Online! EB1; 1 June 2001 (2001-06-01) "Hypothetical protein SPY0843 of S. pyogenes" Database accession no. Q9A0C0 XP002210858 ---	1-29		
A	NO 99 52939 A (ACTINOVA LTD ;BJORCK LARS HENRIK (SE); FRICK INGA MARIA (SE)) 21 October 1999 (1999-10-21) abstract --- ---	1-29		
-/--				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating 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 </td> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> *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 can only 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. *Z* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating 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 can only 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. *Z* document member of the same patent family
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating 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 can only 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. *Z* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report		
23 August 2002		13/09/2002		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentstrasse 2 NL - 2010 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340 2040, Tx: 31 651 894 01, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Mata Vicente, T.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 02/00207

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DREW G G: "A CENTRAL CONTROL FOR ESS" BELL LABORATORIES RECORD, BELL TELEPHONE LABORATORIES INC. MURRAY HILL, NEW JERSEY, US, February 1960 (1960-02), pages 49-53, XP000838613 abstract	1-29
A	DALE J B ET AL: "NEW PROTECTIVE ANTIGEN OF GROUP A STREPTOCOCCI" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 103, no. 9, May 1999 (1999-05), pages 1261-1268, XP000906614 ISSN: 0021-9738 abstract	1-29

Form PCT/ISA/210 (Continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 02/00207**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 22-25 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/CA 02 00207

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/AS/ 210

Continuation of Box I.2

The search was carried out assuming that claim 28 refers to the pharmaceutical composition according to claim 21.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 02/00207

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9952939 A	21-10-1999	AU 3433299 A	01-11-1999
		CA 2324981 A1	21-10-1999
		EP 1068229 A1	17-01-2001
		WO 9952939 A1	21-10-1999
		JP 2002511241 T	16-04-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	C 0 7 K 14/315	
C 0 7 K 14/315	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/569	F
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 デニ・マルタン

カナダ、ジー 3 エイ・ 1 イー 9、ケベック、サン - オーギュスタン - ドゥ - デスモーレ、リュ・ガブリー 4 7 2 8 - ジェ番

(72) 発明者 ステファヌ・リュウ

カナダ、ジー 1 イー・ 1 ジェイ 3、ケベック、ボーポール、アヴニユ・デ・パンソン 8 6 9 番

(72) 発明者 ベルナル・エール・プロドゥール

カナダ、ジー 1 ティ・ 1 エヌ 6、ケベック、シレリー、マリタン 2 4 0 1 番

(72) 発明者 ジョゼ・アメル

カナダ、ジー 1 ティ・ 1 エヌ 6、ケベック、シレリー、マリタン 2 4 0 1 番

(72) 発明者 パトリック・ルオー

カナダ、ジー 6 ジェイ・ 1 ピー 9、ケベック、サン - エティエンヌ - ドゥ - ローゾン、リュ・ベレール 4 4 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA03 CA07 CA12 CA20 DA06 EA04 FA01
GA14 GA19 HA03
4B064 AG31 CA02 CA19 CC01 CC24 CD30 CE12 DA01 DA15
4B065 AA01X AA49Y AA58X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 BA03 BB01
BC03 BC09 BD01 BD14 CA24 CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 CA04 DA42
NA14 ZA512 ZA592 ZA892 ZB112 ZB352
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA86 EA20 EA52 FA74
GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004531235A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002566355	申请日	2002-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	希雷生物化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	希雷生物化学公司		
[标]发明人	デニマルタン ステファージュリュウ ベルナールエールプロドゥール ジョゼアメル パトリックルオー		
发明人	デニマルタン ステファージュリュウ ベルナールエールプロドゥール ジョゼアメル パトリックルオー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61P11/04 A61P17/00 A61P21/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K14/315 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P11/04 A61P17/00 A61P21/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K14/315 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P11/04 A61P17/00 A61P21/00 A61P29/00 A61P31/04 C07K14/315 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.F C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA03 4B024/CA07 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/GA14 4B024/GA19 4B024/HA03 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CD30 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01X 4B065/AA49Y 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BB01 4B065/BC03 4B065/BC09 4B065/BD01 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA04 4C084/DA42 4C084/NA14 4C084/ZA512 4C084/ZA592 4C084/ZA892 4C084/ZB112 4C084/ZB352 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	小島 一晃		
优先权	60/269840 2001-02-21 US		
其他公开文献	JP2004531235A JP4281861B2		

摘要(译)

本发明涉及抗原，更特别地是化脓性链球菌（也称为A组链球菌（GAS））细菌病原体的抗原，其可用作预防，治疗和/或诊断的疫苗成分。

