

(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2008-500007

(P2008-500007A)

(43) 公表日 平成20年1月10日(2008.1.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/315 (2006.01)	C O 7 K 14/315	4 B O 2 4
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C O 8 4
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-529922 (P2006-529922)	(71) 出願人	502270718 インターツェル・アクチェンゲゼルシャフト I N T E R C E L L A G オーストリア、アー-1030ヴィエナ、 キャンパス・ヴィエナ・バイオセンター6 番
(86) (22) 出願日	平成16年5月26日 (2004. 5. 26)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成18年1月25日 (2006. 1. 25)	(74) 代理人	100072730 弁理士 小島 一晃
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/005664	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(87) 国際公開番号	W02004/106367	(74) 代理人	100127638 弁理士 志賀 美苗
(87) 国際公開日	平成16年12月9日 (2004. 12. 9)		
(31) 優先権主張番号	03450137.9		
(32) 優先日	平成15年5月30日 (2003. 5. 30)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腸球菌抗原

(57) 【要約】

本発明は、大便連鎖球菌由来の過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする単離核酸分子および過免疫血清反応性抗原またはその断片、かかる抗原の単離方法およびその特定の使用を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下からなる群から選択される核酸配列を含む過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする単離核酸分子：

a) 配列番号 1-2、4-8、10、12-18、20-23、25-26、29-43、45-62、64-74、76-77、79-83、85-89、91-92、94-114、117-126、128-146、148-170、373、375、379-381、387、392、394、397-399、407-408、410-411および415-424から選択される核酸分子に対して少なくとも70%の配列同一性を有する核酸分子、

b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、

c) a)またはb)の核酸分子の少なくとも15の連続する塩基を含む核酸分子、

d) a)、b)、またはc)の核酸分子とストリンジントなハイブリダイゼーション条件下でアニールする核酸分子、

e) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c)またはd)の核酸分子とハイブリダイズしうる核酸分子。

10

【請求項 2】

配列同一性が少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%、特に100%である請求項1の単離核酸分子。

【請求項 3】

以下からなる群から選択される核酸配列を含む過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする単離核酸分子：

a) 配列番号 3、9、11、24、27、44、63、75、84、115-116、127、374、376-378、382-386、388-391、393、395-396、400-406、409および412-414から選択される核酸分子に対して少なくとも96%、好ましくは少なくとも98%、特に100%の配列同一性を有する核酸分子、

b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、

c) a)またはb)の核酸分子の少なくとも15の連続する塩基を含む核酸分子、

d) a)、b)、またはc)の核酸分子とストリンジントなハイブリダイゼーション条件下でアニールする核酸分子、

e) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c)またはd)の核酸分子とハイブリダイズしうる核酸分子。

20

30

【請求項 4】

以下からなる群から選択される核酸配列を含む単離核酸分子：

a) 配列番号 90、147から選択される核酸分子、

b) a)の核酸と相補的な核酸分子、

c) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c)またはd)の核酸とハイブリダイズしうる核酸分子。

【請求項 5】

核酸がDNAである請求項1、2、3または4のいずれかの核酸分子。

【請求項 6】

核酸がRNAである請求項1、2、3、4、または5のいずれかの核酸分子。

40

【請求項 7】

核酸分子がゲノムDNA、特に大便連鎖球菌ゲノムDNAから単離されたものである請求項1～5のいずれかの単離核酸分子。

【請求項 8】

請求項1～7のいずれかの核酸分子を含むベクター。

【請求項 9】

ベクターが請求項1～7のいずれかの核酸分子によってコードされる過免疫血清反応性抗原またはその断片の組換え発現に適したものである請求項8のベクター。

【請求項 10】

請求項8または9のベクターを含む宿主細胞。

50

【請求項 1 1】

請求項1、2、5、6または7のいずれかの核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含む過免疫血清反応性抗原およびその断片、ここで、アミノ酸配列は配列番号 171-172、174-178、180、182-188、190-193、195-196、199-213、215-232、234-244、246-247、249-253、255-259、261-262、264-284、287-296、298-316、318-340、425、427、431-433、439、444、446、449-451、459-460、462-463 および 467-476からなる群から選択される。

【請求項 1 2】

請求項3、5、6、または7のいずれかの核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含む過免疫血清反応性抗原およびその断片、ここでアミノ酸配列は配列番号 173、179、181、194、197、214、233、245、254、285-286、297、426、428-430、434-438、440-443、445、447-448、452-458、461および464-466からなる群から選択される。

【請求項 1 3】

請求項4、5、6、または7のいずれかの核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含む過免疫血清反応性抗原およびその断片、ここでアミノ酸配列は配列番号 260、317からなる群から選択される。

【請求項 1 4】

以下からなる群から選択される過免疫血清反応性抗原の断片；表 1a および表 1cの「予測免疫原性アミノ酸」および「同定された免疫原性領域の位置」の列のアミノ酸配列を含むペプチド；表 2の血清反応性エピトープ、特に以下のアミノ酸を含むペプチド； 4-10、14-21、30-36、59-68、77-82、87-93、96-105、112-121、125-133、135-141、150-162、164-183、192-203、207-213、215-226、228-234、241-247、250-285、302-308 および 135-148（配列番号 171）；15-57、60-73、77-101、108-134、136-177、185-201、203-217、226-240、244-254、272-277、283-288、292-343、354-370、380-398、406-437、439-453、473-490、532-538、584-590、595-601、606-612、664-677、679-704、715-724、731-753、759-772、786-794、814-862 および 657-684（配列番号 172）；4-9、15-36、41-47、54-60、75-81、114-120、131-146、152-158、174-182、194-202、208-215、218-226、255-271、276-285、290-295、302-311、318-328、330-344、352-359、365-377、388-395、398-405、426-432、439-449、455-500、505-513、531-537、542-552、554-561、587-595、606-612、718-734、763-771、775-782、792-801、805-812、822-828、830-843、849-863、876-894、905-911、919-926、935-947、949-958、968-979、1009-1016、1029-1045、1047-1056、1076-1081、1092-1106、1123-1133、1179-1200、1202-1211、1215-1223、1287-1299、1301-1306、398-431 および 1224-1237（配列番号 173）；17-47、74-80、90-97、126-133、137-148、167-173、179-185、214-223、250-255、270-283、329-338、342-350、352-358、360-367、372-383、398-404、411-421、426-432、435-446、452-462、472-479、515-521、582-592、611-618、623-629、642-659、666-673、678-689、704-725、732-737、744-757、768-789、824-834、842-849、862-868、877-887、904-916、923-928、941-947、962-974、982-992、1019-1030、1032-1044、1046-1052、1065-1075、1077-1087、1108-1121、1124-1132、1137-1151、1170-1182、1190-1206、1208-1214、1227-1233、1242-1251、1254-1273、1282-1298 および 792-825（配列番号 174）；19-31、39-67、82-91、104-110、113-128、149-155、161-181 および 137-155（配列番号 175）；6-18、54-63、69-85、110-127、142-156、158-167、169-211、238-246、248-257、276-311、339-349、371-380、385-391、394-403、421-438、451-456、483-489 および 449-468（配列番号 176）；5-15、24-34、50-56、61-83、98-121、123-136、149-162、166-194、202-215、221-227、229-332、337-360、367-402、404-415、427-433、444-462、471-478、487-498、511-518、521-544、550-563、568-574、580-587、597-607、610-616、624-629 および 468-498（配列番号 177）；11-19、32-49、57-63、65-71、80-89、91-133、166-181、183-191、201-230、234-257、264-291、297-303、305-314、316-335、337-354、359-366、368-374、383-388、394-405、408-442、446-470、483-490、499-505、513-538、544-555、557-563、568-590、598-608、617-623、627-636、641-647、667-685、687-693、710-723、733-739、742-754、769-815 および 366-388（配列番号 178）；4-16、30-35、42-

53、67-76、82-87、101-108、112-130、132-138、147-152、161-183、187-208、218-225
、265-281、295-303、305-317、322-334、338-357、360-368、370-383、387-394、400-41
9、421-430 および 255-336 (配列番号 179) ; 19-27、36-47、59-66、76-83、101-112
、118-125、142-147、162-180、185-196、225-240、246-263、286-304、314-319、327-33
3、353-367 および 194-214 (配列番号 180) ; 14-43、70-76、83-89、111-117、122-12
8、136-145、163-170、175-182、210-219、246-251、266-279、325-331、338-346、348-3
54、356-363、368-379、422-428、431-441、450-456、466-473、509-515、532-542、549-
556、576-586、605-612、617-623、636-653、660-667、674-686、698-719、726-731、738
-745、762-783、818-828、836-843、856-862、871-881、903-910、917-922、935-941、95
6-968、976-986、1013-1024、1026-1038、1059-1069、1071-1081、1102-1115、1118-1126 10
、1131-1145、1164-1176、1187-1200、1202-1208、1221-1227、1236-1245、1248-1267、1
273-1292、252-287 および 805- 844 (配列番号 181) ; 4-18、21-28、37-43、56-70、1
01-113、131-140、142-150、162-170、172-184、193-204、209-227、233-238、246-264
および 93-168 (配列番号 182) ; 14-20、44-50、61-70、77-96、99-106、129-142、168
-181、187-196、205-221、225-241、277-296 および 257-281 (配列番号 183) ; 18-29
、43-54、64-76、78-84、88-103、125-149、159-176、198-218、230-242、256-271、279-
285、287-293、300-306、325-331、344-351、357-364、371-397、400-414、419-464、485
-515、517-526、529-537、548-553、573-580、584-590、603-620、639-661、676-681、68
7-700、716-761、772-780、785-790、795-803、823-836、848-853 および 106-134 (配
列番号 184) ; 7-13、19-42、44-51、55-75、87-97、99-110、112-118、129-135、141-15 20
6、158-178、213-220、230-286、294-308、323-338、345-352、355-365、370-392、394-4
19、437-446、454-460、474-497、515-526、528-546、569-575 および 128-141 (配列番
号 185) ; 12-20、24-33、45-70、73-84、86-94、103-116、118-124、135-142、163-170
、176-200、202-224、226-234、237-248、250-262、265-287、296-307、334-341、347-35
6、361-369、382-396、405-415、418-427、431-439、443-449、452-461、467-474 および
113-146 (配列番号 186) ; 13-38、44-50、52-59、66-72、83-94、103-110、116-124、
131-137、158-180、199-204、218-233、241-264、269-317、326-342、350-356 および 70
-86 (配列番号 187) ; 29-35、49-59、63-84、86-97、103-111、113-126、130-144、150
-158、174-198、221-231、250-264、266-273、291-298、310-318 および 70-90 (配列番
号 188) ; 19-25、28-52、60-66、71-76、131-142、149-155、157-178、181-213、218-22 30
3、237-242、250-257、260-266、272-279、282-290、321-330、373-385、393-407、441-4
53、461-475、509-521、529-542、577-589、597-610、643-655、663-677、703-718、729-
734、358-464、495-570 および 604-685 (配列番号 189) ; 4-29、51-76、116-136、158
-173、179-193、207-215 および 86-111 (配列番号 190) ; 5-23、45-70、79-90、93-10
7、114-122、142-151 および 18-36 (配列番号 191) ; 9-51、68-120、133-149、158-18
0、186-206、211-220、222-237、248-293、296-310、317-339 および 248-260 (配列番
号 192) ; 14-24、44-63、69-98、108-119、123-136、155-161、164-176、180-193、203-
208、215-223、239-247、274-281、283-289、296-304、306-313、315-327、331-341、343
-353、357-386、392-405 および 205-246 (配列番号 193) ; 5-13、16-23、36-42、53-6
3、70-83、96-102 および 14-34 (配列番号 194) ; 4-13、19-35、49-56、59-76、83-10 40
7、121-134、144-153、157-164、166-186、194-202、209-216、231-253、257-264 および
98-134 (配列番号 195) ; 16-32、38-47、58-68、78-89、98-114、117-123、132-141、
146-156、164-170、179-188、196-212、219-230、232-237、244-263、265-274、278-293
、297-303、306-326、339-349、352-359、362-367、373-379、384-394、396-406、423-44
3、451-461、465-484、490-497、504-511、523-533、537-547、550-556、558-566、573-5
79、586-593、598-609、615-642、647-665、671-686、693-713、723-728 および 332-378
(配列番号 196) ; 6-21、34-44、58-64、66-74、79-87、114-127、129-143、154-162、
174-189、205-214、241-262、266-273、278-297、319-324、328-338、342-351、390-398
、409-415、422-435、458-464、471-477、481-486、506-531、534-540、542-550 および
315-389 (配列番号 197) ; 4-28、39-45、52-58、69-82、93-115、122-128、135-140、1 50

46-163、177-192、209-215、221-232、271-284、331-337、341-352、360-378、383-390、392-401、409-422、428-435、462-470、474-480、482-496、531-539、541-549、551-560、562-569、576-582、598-618 および 98-127 (配列番号 198) ; 14-27、33-47、61-79、94-104、119-133 および 36-60 (配列番号 199) ; 11-22、29-40、48-62、68-73、96-106、108-118、125-149 および 102-126 (配列番号 200) ; 4-11、45-55、76-83、86-102、105-112、138-144、147-153 および 20-48 (配列番号 201) ; 12-20、28-56、62-68、72-82、93-99、101-107、120-133、135-145、178-186、208-232、279-292 および 36-64 (配列番号 202) ; 6-14、23-48、65-82、92-134、140-181、188-219、228-238、244-253、255-261 および 124-145 (配列番号 203) ; 11-25、31-38、53-59、62-71、89-99、125-133、151-157、182-190、195-203、208-215、219-229、249-262、267-275、287-295、298-316、318-325、328-334、344-353、357-363、371-377、385-391、396-415、425-436、438-457、471-485、538-552、554-561、606-625、630-636、646-653、669-679、695-704、706-715、722-747、763-773 および 714-738 (配列番号 204) ; 10-29、33-45、50-60、70-79、83-95、118-124、136-157、176-184、192-205、207-216、223-234、240-246、258-268、275-283 および 37-56 (配列番号 205) ; 4-24、27-38、46-54、66-72、81-97、112-119、128-137、152-157、173-179、185-214、219-225、227-248、262-284、286-295、301-307 および 117-134 (配列番号 206) ; 26-43、49-56、60-71、74-82、87-98、110-116、131-146、154-164、169-178、183-189、205-214、241-246、255-268、275-292、305-314、316-323、326-340、346-363、397-402、419-429、440-446、452-461、467-475 および 29-66 (配列番号 207) ; 7-16、21-39、48-58、61-78、82-89、109-136、138-150、152-176、182-247、255-261、267-332、336-345、347-358、362-368、371-392、394-404、407-472、490-498、505-513、527-544、554-582、603-611、614-620、632-638 および 500-523 (配列番号 208) ; 24-46、77-83、90-97、99-118、123-166、168-177、204-212、229-239、248-262、273-282、287-293、300-319、321-337、340-352、357-366、391-402、411-428、442-450、464-471、479-489 および 19-40 (配列番号 209) ; 9-23、25-34、53-58、70-86、90-97、99-116、118-128、131-141、185-191、228-233、237-253、255-261、264-271、273-280、302-312、319-349、351-359、362-369、376-383、387-394、398-406、419-434 および 20-31 (配列番号 210) ; 15-22、37-43、71-87、105-115、121-127、135-142、152-158 および 32-52 (配列番号 211) ; 6-12、18-29、37-47、50-58、65-83、85-91、94-99、108-123、142-150、156-163、183-193、215-222、242-249、252-258、261-270、285-308、318-326 および 1-95 (配列番号 212) ; 9-61、65-133、144-155、166-173、175-221、233-276、278-313、329-368 および 210-233 (配列番号 213) ; 11-29、33-39、46-51、65-93、107-113、134-143、147-154、166-177、181-188、214-220、233-243、263-269 および 112-128 (配列番号 214) ; 8-46、110-134、155-167、174-183、188-201、210-230、253-258、267-282、289-299、312-319、322-327、330-337、365-381、389-402、405-411、419-425、439-447、465-472、489-512、525-532、540-554、577-589、591-599、605-614、616-624、633-649 および 503-529 (配列番号 215) ; 34-49、64-70、90-118、124-131、141-152、159-165 および 112-128 (配列番号 216) ; 5-15、26-45、55-72、80-85、93-100、121-133、142-148、154-167、198-205、209-215、241-254、260-265、271-279 および 244-270 (配列番号 217) ; 4-36、38-54、67-83、122-153、159-178、205-212、232-242、244-253、259-268、281-288、298-309、324-331、334-370、372-381、389-401、403-429、441-450、456-462、465-471、473-479、483-504、508-518、537-543、553-565、578-584、592-609、619-625、658-667、669-679、712-719、722-729、737-744、746-752、758-765 および 180-226 (配列番号 218) ; 6-17、23-32、49-56、61-67、76-83、85-103、105-111、120-132、145-171、175-185、191-225、231-246 および 99-128 (配列番号 219) ; 4-24、28-48、52-58、64-79、87-100、104-120、136-152、159-166 および 150-163 (配列番号 220) ; 15-27、65-71、77-99、104-121、128-154、183-216、223-229、234-255、277-287、296-308 および 77-97 (配列番号 221) ; 8-18、44-76、102-109 および 49-57 (配列番号 222) ; 5-14、28-40、42-51、54-60、77-83、89-100、1

10

20

30

40

50

17-124、146-172、176-204、216-231、237-244、267-278、324-334、342-348、396-401、
427-433、438-450、452-457、465-471、473-481、491-500、509-515、523-544、550-556
、558-569、589-595、606-618、625-632、640-649、665-671、678-688、691-698、717-72
3、728-734、781-789、800-805、812-821、833-868、873-879、889-905、929-939、988-9
98、1046-1061、1073-1079、1089-1096、1115-1124、1132-1140、1172-1196、1220-1226
、1231-1249、1269-1277、1287-1301、1307-1330、1350-1361、1369-1378、1387-1412、1
414-1420、1422-1439、1484-1491、1513-1529、1552-1561、1576-1583、1606-1613、1617
-1640、1647-1654、1665-1679、1686-1698、1709-1727、1736-1743、1750-1757、1771-17
90、1801-1807、1817-1823、1831-1842、1859-1868、1870-1882、1884-1891、1900-1906
、1909-1914、1929-1935、1952-1960、1974-1988、2002-2011、2032-2063、2071-2081、2 10
116-2124、2139-2147、2149-2159、2163-2190、2209-2215、2245-2253、2282-2287、2331
-2342、2360-2370、2379-2393、2402-2408、2414-2421、2423-2430、2433-2439、2442-24
50、2472-2478、2485-2493、2495-2503、2506-2512、2547-2554、2558-2564、2615-2625
、2637-2652、2692-2698、2700-2706、2711-2723、2731-2740、2748-2753、2756-2762、2
765-2772、2781-2798、2810-2824、2844-2852、2885-2899、2912-2922、2937-2944、2947
-2970、2988-2998、3016-3025、3032-3037、3062-3071、3129-3148、3156-3161 および 5
30-607 (配列番号 223) ; 31-36、57-62、79-85、90-96、99-112、120-146、162-185、1
93-203、208-217、219-226、239-253、283-290、298-304、306-321、340-349、351-361、
365-372、386-395、407-438、473-486、537-551、558-568、576-594、598-604 および 75
-95 (配列番号 224) ; 14-19、24-30、34-42、45-52、54-64、66-82、95-105、107-118 20
、126-163、171-177、184-201、210-215、260-269、273-279、288-304、321-327、358-36
4、370-375、380-387、394-404、407-413、421-431、436-451、465-474、504-511、531-5
52、578-587、614-626、629-636、638-671、691-715、719-729、733-745、752-759、768-
777、785-792、794-802、805-824、844-854、867-880、885-891、893-902、907-924、939
-948、955-964、966-975、987-1000、1012-1017、1023-1028、1050-1071、1083-1098、11
02-1115、1133-1146、1170-1183、1204-1211、1213-1223、1262-1311、1313-1319、1346-
1355、1366-1371、1383-1405、1409-1414 および 776-819 (配列番号 225) ; 12-27、30
-38、54-61、64-74、82-96、103-110、117-125、134-140、147-158、185-201、218-225、
232-253、265-280、319-325、350-362、366-372、376-386、464-483、485-490、511-521
、531-537、542-559、564-574、593-609、613-619、637-642、668-677 および 195-214 30
(配列番号 226) ; 4-21、59-67、73-79、84-91、141-151、186-197、203-214、222-227
、237-245、255-260、281-292、294-311、336-344、346-355、422-437、459-466、484-49
1 および 77-109 (配列番号 227) ; 10-45、52-61、63-70、74-102、112-122、124-132
、164-178、181-205、212-240、246-256 および 226-247 (配列番号 228) ; 38-50、53-
63、78-87、89-111、126-152、169-176、179-186、193-228、254-267、275-282、288-304
、309-318、325-341、346-353、358-367、384-395、404-427、429-435、456-465、467-50
1、510-521、523-536、541-548、552-560、563-584、589-595、597-620、625-637、639-6
45、661-666、712-729、734-741、743-750、775-806、809-816、818-840、842-850 およ
び 693-714 (配列番号 229) ; 5-17、30-37、52-75、77-86、88-107、112-135、151-160
、178-222、226-246、263-270、279-294、306-314、327-342、345-352、374-381、389-41 40
6、422-429、435-449、453-467、473-500、512-522、524-531、542-549、552-560、565-5
71、575-586、594-600、613-619、625-633、635-641、647-653、667-674、680-699、711-
729、735-741、764-775、781-786、792-798、805-813、817-825、833-842、850-855、860
-866、869-910、917-930、949-990 および 533-562 (配列番号 230) ; 7-14、39-46、61
-74、83-89、93-99、110-121、136-150、172-180、182-200、207-216、223-236、238-251
、265-271、280-288、294-309、320-336、339-354、362-377、383-389、401-407、435-44
1、446-453、460-465、472-487、499-511、518-528、533-540、557-570、572-587、631-6
37、643-658、663-669、672-678、681-687、695-706、714-728 および 118-139 (配列番
号 231) ; 5-19、24-30、56-64、69-79、93-100、102-111、117-123、125-133、174-182
、185-199、205-224、268-275、311-336 および 102-125 (配列番号 232) ; 6-35、39-4 50

5、57-62、80-85、92-106、117-122、126-171、214-223、253-260、268-273、285-291、295-306、315-320、325-336、361-366 および 172-202 (配列番号 233) ; 4-13、24-37、45-51、58-66、84-92、112-121、132-141、151-171、175-195、204-212、222-240、262-268、276-295、305-336、338-348、354-362 および 160-183 (配列番号 234) ; 10-16、24-35、41-73、78-104、111-121、124-139、141-148、150-164、196-215、224-241、249-282、299-307、315-357、368-378、393-401 および 345-367 (配列番号 235) ; 4-32、48-53、61-67、84-104、112-118 および 106-130 (配列番号 236) ; 21-28、31-36、65-81、98-105、115-121、123-131、136-142、155-161、177-190 および 201-232 (配列番号 237) ; 4-15、21-27、33-39、42-56、58-64、68-82、84-90、92-98、113-122、146-162、168-175、177-189、191-203、249-268、279-285、287-304、328-342、349-358、371-378、387-393、404-413、419-425、467-479、487-498、513-524、528-539、541-565、572-579、595-606、626-635、637-642 および 612-626 (配列番号 238) ; 7-13、52-70、76-82、97-106、110-117 および 13-45 (配列番号 239) ; 5-10、12-48、59-64、87-102、107-128、131-140、154-161、165-171、173-215 および 54-74 (配列番号 240) ; 4-11、19-28、34-40、74-81、87-98、126-147、163-171、184-193、205-213 および 49-124 (配列番号 241) ; 7-14、23-29、35-40、61-67、99-106、111-122、124-133、135-161、187-206、216-229、236-245、262-268、271-280 および 256-273 (配列番号 242) ; 4-13、17-37、47-54、85-99、105-113、120-132、147-166、180-186、192-199、204-216 および 127-144 (配列番号 243) ; 14-27、29-37、52-62、68-76、89-96、117-123、125-131、137-145、166-195、205-212、214-222、228-235、258-264、271-281、288-296、308-324、332-339、355-361、365-371 および 268-293 (配列番号 244) ; 4-21、30-42、54-60、78-85、90-110、141-147、160-168、176-185、194-206、218-225、230-245、251-261、287-293、295-304、320-326、334-347、351-362、386-402、413-423、427-433、439-453、456-477、480-493、507-513、526-539、574-581、591-598、600-609、614-632、655-665、685-691、703-712、742-747、757-775、797-803、813-819、823-829、880-887、901-906、930-944、948-958、962-968、971-995、1002-1009、1017-1023、1036-1053、1069-1081、1107-1124、1129-1152、1178-1195、1211-1223、1249-1266、1271-1288、1334-1340、1346-1367、1-63 および 171-189 (配列番号 245) ; 4-22、52-63、70-75、94-104、112-125、133-141、176-199、209-216、244-259、287-299、336-352、366-372、386-399、421-436、444-449、457-466、481-487、506-529、531-540 および 295-378 (配列番号 246) ; 9-30、43-49、58-75、86-96、119-131、138-147、162-167、181-201、208-214 および 16-121 (配列番号 247) ; 4-27、52-58、80-90、92-100、108-114、118-143、169-176、189-198、247-261、281-287、307-317、323-329、352-363、372-381、396-411、413-426、429-440、442-450、456-461、468-479 および 1-73 (配列番号 248) ; 4-32、47-52、57-63、71-78、92-104、126-142、153-175 および 145-163 (配列番号 249) ; 17-23、35-41、51-70、73-86、104-125 および 105-129 (配列番号 250) ; 25-32、41-50、75-85、87-103、115-122、138-149、164-171、188-210、212-220、224-234、256-273、288-299、304-310、330-336、357-365、382-390、399-405、414-421、440-446、454-461、480-486、502-514、518-540、543-553、561-567、572-580、582-588、595-630、633-651、672-681、691-709、760-767、813-832、841-848、852-866、873-893、919-925、927-933、940-955、957-978、984-997、1000-1010、1035-1040、1044-1051、1058-1064、1081-1091、1097-1124、1129-1138、1144-1150、1158-1165、1170-1180、909-936 および 1001-1031 (配列番号 251) ; 4-12、19-26、31-41、49-64、66-86、101-117、119-127、134-142、152-161、163-172、179-188、209-218、234-241、276-291、294-300、307-320、324-341、346-356、373-387、389-397、410-416、418-436、444-454、460-472、481-486、500-507、511-535、541-549、553-559、579-586、602-607、613-620、628-640、654-663、671-678、681-691、709-722、741-754、766-774、778-786、797-803 および 212-226 (配列番号 252) ; 4-10、15-27、34-54、60-73、79-88、101-115、120-136、154-162、167-172、222-240 および 126-195 (配列番号 253) ; 5-16、18-25、29-35、57-63、86-91、107-121、123-131、170-179、185-199、204-226、250-255、262-274、291-296、325-347 および 1-38

(配列番号 254) ; 7-19、22-34、36-42、48-54、60-66、71-76、104-110、118-133、135-145、158-164、167-174、182-193、196-204、217-229、251-290、293-299、309-315 および 288-318 (配列番号 255) ; 43-51、55-61、66-73、80-90、103-127、133-142、174-180、185-196、203-210、229-235、239-251、258-266、272-278、289-314、316-326、340-346、355-361 および 14-27 (配列番号 256) ; 4-25、27-33、35-41、52-74、76-89、99-124、138-144、146-159、167-182、184-191、193-206、211-223、232-240、249-257、270-279、281-287、293-310、322-341、347-356 および 292-322 (配列番号 257) ; 5-13、28-38、43-60、67-72、98-116、122-134、137-151、167-174、177-195、197-216 および 99-195 (配列番号 258) ; 15-33、35-42、48-57、62-68、73-91、107-119、121-153、173-194、205-210、223-228、234-241、243-259、275-298、308-315、327-340、342-370、376-391、398-404、410-419 および 71-122 (配列番号 259) ; 12-39、43-64、87-95、99-105、114-126、128-136、139-147、212-225 および 107-141 (配列番号 260) ; 6-33、40-45、60-75、79-86、121-129、131-137、161-167、172-178、186-195、203-212、236-244、257-264、278-294、306-312、345-358、368-381、386-395、404-410、412-418 および 198-270 (配列番号 261) ; 18-31、34-41、50-56、69-83、99-106、129-141、147-153、159-168、170-178、190-198、200-212、221-232、237-255、261-266、274-292 および 118-216 (配列番号 262) ; 17-47、61-67、87-93、115-121、126-132、140-148、167-173、179-186、214-223、250-255、264-272、282-294、306-318、338-353、358-377、385-401、414-420、433-441、451-457、470-480、505-511、544-550、571-581、600-607、612-618、631-648、655-662、669-681、693-714、721-726、733-740、757-778、813-823、831-838、851-857、866-876、893-905、912-917、930-936、951-963、971-981、1008-1019、1021-1033、1035-1041、1054-1064、1066-1076、1097-1110、1113-1121、1126-1140、1159-1171、1182-1195、1197-1203、1216-1222、1231-1240、1243-1262、1268-1287 および 738-828 (配列番号 263) ; 19-28、40-46、51-57、68-74、81-87、98-108、111-121 および 20-36 (配列番号 264) ; 4-17、19-44、60-69、80-86、110-116 および 33-60 (配列番号 265) ; 8-16、18-28、42-50、53-75、79-86、94-99、122-128、136-142、149-163、166-173、198-212、254-272、288-295、304-318、324-329、343-348、351-364、367-383、389-395、411-420、427-436 および 11-56 (配列番号 266) ; 19-25 および 6-24 (配列番号 267) ; 6-39、59-68 および 44-63 (配列番号 268) ; 5-14、21-28、38-53 および 29-41 (配列番号 269) ; 4-13、31-41、56-65 および 32-56 (配列番号 270) ; 5-12 および 4-21 (配列番号 271) ; 4-18 および 17-32 (配列番号 272) ; 4-10、23-33 および 14-30 (配列番号 273) ; 26-34、44-53 および 35-52 (配列番号 274) ; 1-19 (配列番号 275) ; 4-17、23-30、32-37 および 6-23 (配列番号 276) ; 5-33、40-58、61-66 および 45-66 (配列番号 277) ; 15-41、61-67 および 41-65 (配列番号 278) ; 4-12、16-23、26-37 および 10-29 (配列番号 279) ; 23-39 および 37-55 (配列番号 280) ; 12-20 および 38-55 (配列番号 281) ; 22-37 および 7-22 (配列番号 282) ; 3-14 (配列番号 283) ; 6-16、43-65、71-76 および 17-31 (配列番号 284) ; 4-13、27-39、42-69 および 17-32 (配列番号 285) ; 4-12、26-39 および 10-25 (配列番号 286) ; 2-31 (配列番号 287) ; 6-38、49-62 および 39-55 (配列番号 288) ; 4-10、24-30 および 2-19 (配列番号 289) ; 12-17、25-46 および 15-30 (配列番号 290) ; 4-13 および 2-28 (配列番号 291) ; 30-38 および 17-45 (配列番号 292) ; 24-33、55-61 および 31-61 (配列番号 293) ; 4-26、34-48 および 15-33 (配列番号 294) ; 9-15 および 1-22 (配列番号 295) ; 4-31 および 14-33 (配列番号 296) ; 5-34、49-55、64-82 および 69-83 (配列番号 297) ; 33-45 および 21-39 (配列番号 298) ; 7-14、24-32、42-65、79-86 および 50-64 (配列番号 299) ; 13-27、33-43、45-62 および 12-37 (配列番号 300) ; 4-15、17-32 および 10-26 (配列番号 301) ; 4-9、11-43、45-75 および 47-69 (配列番号 302) ; 4-18、22-37 および 17-34 (配列番号 303) ; 4-14 および 5-24 (配列番号 304) ; 7-33、35-46 および 1-19 (配列番号 305) ; 13-37、69-75 および 51-69 (配列番号 306) ; 14-24、26-34、37-49、66-78 および 2-25 (配

10

20

30

40

50

列番号 307) ; 17-46、52-57、59-64 および 54-68 (配列番号 308) ; 4-22 および 13-25 (配列番号 309) ; 8-40、53-63 および 29-50 (配列番号 310) ; 16-28 および 32-40 (配列番号 311) ; 14-20、22-28、39-45 および 2-22 (配列番号 312) ; 4-13 および 12-31 (配列番号 313) ; 15-21 および 2-17 (配列番号 314) ; 4-17 および 20-36 (配列番号 315) ; 4-19 および 9-18 (配列番号 316) ; 4-14 および 3-19 (配列番号 317) ; 4-21、32-40 および 21-39 (配列番号 318) ; 4-13 および 10-27 (配列番号 319) ; 18-31、39-47、75-87、89-98 および 79-99 (配列番号 320) ; 15-21 および 9-24 (配列番号 321) ; 4-14、18-27、30-53、55-64、68-74、81-98 および 22-40 (配列番号 322) ; 7-24、44-51 および 35-60 (配列番号 323) ; 10-47 および 23-37 (配列番号 324) ; 4-10、12-46 および 7-22 (配列番号 325) ; 20-27 および 1-13 (配列番号 326) ; 6-19、41-51 および 9-37 (配列番号 327) ; 4-9、11-17 および 9-23 (配列番号 328) ; 4-17、23-38、46-66、68-85 および 34-46 (配列番号 329) ; 4-18、34-59、75-81 および 61-84 (配列番号 330) ; 6-17 および 7-28 (配列番号 331) ; 4-32、56-61 および 35-52 (配列番号 332) ; 4-14、27-71、74-88、93-110、115-120、124-130、139-154、161-172 および 146-171 (配列番号 333) ; 4-21 および 3-15 (配列番号 334) ; 12-17 および 9-26 (配列番号 335) ; 10-21、45-58 および 51-67 (配列番号 336) ; 59-66、68-84 および 13-42 (配列番号 337) ; 11-16 および 1-16 (配列番号 338) ; 4-19、23-37 および 10-30 (配列番号 339) ; 19-27、35-46、48-66、82-88、99-105、113-119 および 42-59 (配列番号 340) ; 135-147 (配列番号 171) ; 658-682 (配列番号 172) ; 411-427 および 1226-1246 (配列番号 173) ; 794-817 および 801-824 (配列番号 174) ; 468-492 および 474-495 (配列番号 177) ; 366-388 (配列番号 178) ; 266-291、287-312 および 308-333 (配列番号 179) ; 197-213 および 195-211 (配列番号 180) ; 252-275、262-285 および 812-830 (配列番号 181) ; 94-112、97-120 および 104-128 (配列番号 182) ; 257-281 (配列番号 183) ; 106-134 (配列番号 184) ; 70-86 (配列番号 187) ; 358-383、378-402、397-421、499-524、520-545、541-566、622-646、641-665 および 660-684 (配列番号 189) ; 248-260 (配列番号 192) ; 15-34 (配列番号 194) ; 112-129 (配列番号 195) ; 333-358 および 353-378 (配列番号 196) ; 316-343、339-366 および 362-389 (配列番号 197) ; 98-123 および 104-126 (配列番号 198) ; 20-43 および 23-48 (配列番号 201) ; 124-145 (配列番号 203) ; 717-738 (配列番号 204) ; 37-56 (配列番号 205) ; 118-134 (配列番号 206) ; 500-522 (配列番号 208) ; 32-47 (配列番号 211) ; 25-51、47-73 および 69-95 (配列番号 212) ; 503-529 (配列番号 215) ; 112-128 (配列番号 216) ; 181-199 (配列番号 218) ; 109-121 (配列番号 219) ; 150-163 (配列番号 220) ; 77-97 (配列番号 221) ; 564-586 (配列番号 223) ; 75-94 (配列番号 224) ; 776-798、784-808 および 794-815 (配列番号 225) ; 196-212、78-100 および 85-107 (配列番号 226) ; 536-553 (配列番号 230) ; 102-125 (配列番号 232) ; 178-198 (配列番号 233) ; 612-626 (配列番号 238) ; 171-187 (配列番号 245) ; 296-320、315-339、334-358 および 353-377 (配列番号 246) ; 47-71 (配列番号 247) ; 1-25、20-45 および 40-64 (配列番号 248) ; 146-161 (配列番号 249) ; 910-935 および 1007-1030 (配列番号 251) ; 212-226 (配列番号 252) ; 126-152、148-173 および 169-195 (配列番号 253) ; 288-310 および 293-316 (配列番号 255) ; 293-312 (配列番号 257) ; 154-170 (配列番号 258) ; 72-95、90-112 および 97-121 (配列番号 259) ; 135-150 および 146-163 (配列番号 262) ; 799-827 (配列番号 263) ; 23-43 および 33-53 (配列番号 266) ; 44-62 (配列番号 268) ; 6-22 (配列番号 276) ; 37-54 (配列番号 280) ; 40-54 (配列番号 281) ; 7-21 (配列番号 282) ; 4-11、16-34、48-55、67-77、87-106 および 153-183 (配列番号 425) ; 22-40、49-65、70-91、95-109、111-125、146-207、209-216、219-225、229-244、251-270、274-286、292-309、316-329、335-355、358-370、376-388、392-419、425-430、435-441、448-455、464-478、486-515 および 437-465 (配列番号 426) ; 5-19、25-31、43-48、60-79、88-100、105-129、148-171、187-193、243-263、316-322、334-340、345-351、369-378、381-391、399-404、474-483

、 502-517、 525-530、 558-568、 579-596、 622-627、 631-638、 644-651、 653-660、 674-680、 687-693、 721-728、 743-753、 760-775、 788-795、 806-813、 821-828、 835-842、 847-859、 868-887 および 300-347 (配列番号 427) ; 5-26、 37-44、 89-97、 112-118、 121-128、 138-154、 157-165、 176-181、 188-198、 205-218、 223-243、 247-253、 260-279 および 76-155 (配列番号 428) ; 4-29、 41-46、 49-68、 82-88、 121-147、 158-164、 187-193、 195-208、 229-236、 244-249、 251-263、 269-275、 307-313、 337-343、 348-381、 392-398、 402-408、 432-438、 85-117 および 194-239 (配列番号 429) ; 5-12、 14-22、 28-34、 40-46、 70-79、 84-129、 152-165、 174-182 および 37-109 (配列番号 430) ; 5-16、 18-52、 54-72、 81-86、 118-126、 136-145、 151-157、 168-180、 209-233、 244-270、 295-302、 315-326、 329-337、 345-352、 364-373、 397-402、 408-418、 424-431、 435-443、 472-480、 483-489、 504-510、 519-527、 549-564、 576-599、 605-637、 641-673 および 91-98 (配列番号 431) ; 23-36、 42-52、 133-140、 151-157、 242-247、 267-277、 295-301、 320-328、 333-339、 345-352、 365-371、 397-403、 415-428、 456-465、 481-487、 489-495、 508-516、 518-527、 585-592、 606-614、 631-637、 643-658、 665-670、 723-728、 737-744、 752-759、 787-793、 835-841、 873-885、 918-928、 938-945、 951-966、 978-988、 1015-1020、 1030-1036、 1044-1052、 1058-1069、 1071-1079、 1081-1088、 1113-1119、 1125-1138、 1141-1147、 1164-1170、 1172-1177、 1190-1200、 1214-1220、 1230-1236、 1239-1245、 1262-1268、 1270-1275、 1288-1298、 1312-1318、 1328-1334、 1337-1343、 1360-1366、 1368-1373、 1386-1396、 1410-1416、 1426-1432、 1435-1441、 1458-1464、 1466-1471、 1484-1494、 1508-1514、 1524-1530、 1533-1539、 1556-1562 および 307-340 (配列番号 432) ; 19-25、 35-41、 44-50、 66-72、 74-79、 92-102、 116-122、 132-138、 141-147、 164-170、 172-177、 190-200、 214-220、 230-236、 239-245、 262-268、 270-275、 288-298、 312-318、 328-334、 337-343、 360-366、 368-373、 386-396、 410-416、 426-432、 435-441、 458-464、 466-478、 504-524、 79-148、 177-246、 275-344 および 373-442 (配列番号 433) ; 7-14、 16-23、 33-39、 46-53、 72-79、 92-115、 123-130、 156-175、 179-187、 214-220、 239-246、 266-274、 302-325、 338-354、 360-370、 375-390、 392-401、 421-428、 430-463 および 29-58 (配列番号 434) ; 4-9、 22-39、 58-65、 72-82、 87-92、 99-104、 107-119、 143-166、 171-177、 194-202、 205-213、 220-228、 231-240、 247-263、 309-315、 317-323、 336-343 および 294-320 (配列番号 435) ; 4-10、 12-18、 24-29、 34-43、 50-65、 70-76、 111-117、 129-138、 152-159、 166-171、 184-195、 200-210、 224-236、 241-251、 274-283、 285-296、 313-319、 332-341、 348-355、 378-386、 410-416、 433-445、 475-482、 523-529、 531-540、 584-596、 626-633、 674-680、 682-688、 738-750、 780-787、 828-834、 836-842、 853-862、 882-887、 893-912 および 604-676 (配列番号 436) ; 15-38、 49-57、 60-99、 103-119、 124-194、 200-206、 215-249、 251-291、 307-313、 315-347、 369-378、 383-390、 393-400、 405-411、 423-435、 440-447、 454-460、 470-486、 490-503、 532-539、 542-549、 551-567、 579-592 および 509-583 (配列番号 437) ; 38-44、 47-88、 95-103、 157-172、 235-240、 250-260、 263-276、 294-300、 312-317、 331-337、 369-391、 412-419、 442-448、 453-463、 490-529、 537-555、 571-580、 600-617、 619-627、 642-648、 682-687、 693-700、 716-722、 738-748、 756-763、 779-789、 796-802、 820-828、 833-840、 846-853、 862-872、 880-887、 894-899、 924-937、 957-963、 1006-1012、 1043-1049、 1063-1069、 1076-1097 および 124-147 (配列番号 438) ; 4-28、 31-49、 60-71、 75-102、 104-114、 134-144、 160-184、 250-257、 277-285、 287-294、 330-338、 345-351、 367-374、 381-388、 393-399、 402-407、 420-426、 443-448、 458-464、 411-436 および 454-488 (配列番号 439) ; 20-27、 45-55、 57-64、 66-77、 98-106、 130-137、 155-165、 167-174、 176-187、 194-203、 208-223、 227-238、 245-251、 257-270、 273-278、 287-299、 330-345、 352-358、 363-385、 392-399、 410-417、 437-443、 467-484、 486-492、 495-500、 504-516、 526-536 および 219-270 (配列番号 440) ; 11-22、 24-31、 46-63、 65-71、 73-88、 95-109、 174-181、 183-201、 204-212、 216-222、 228-233、 241-247 および 142-221 (配列番号 441) ; 8-28、 51-59、 67-84、 93-98、 140-152、 154-162、 183-188 および 91-125 (配列番号 442) ; 10-22、 27-61 および 69-100 (配列番号 443) ; 7-15、 18-26、 94-100、 126-131、 152-

165、219-228、254-263、274-292、297-308、333-340、342-352、354-371、373-379、403-410、420-438、450-456、463-470、489-495、503-512 および 97-173 (配列番号 444) ; 4-21、37-43、49-65、67-7

4、76-90、113-119、131-141、155-173、175-189、192-199、207-221、247-254、266-276、317-322、337-343、387-393、408-428、439-448、451-460、469-479、482-487、493-501、517-523、533-542 および 480-503 (配列番号 445) ; 11-26、40-46、78-86、93-103、121-126、132-138、166-177、183-196、203-212、214-221、228-263、304-311、323-338、345-351、357-363、379-393、420-434、442-448、518-527、547-553、581-591、602-609、637-645、665-674、687-692、701-708、730-739、796-802、844-857、882-888、903-914、944-950、976-983、1027-1033、1049-1057、1066-1072、1085-1092、1120-1127、1137-1144、1153-1158、1165-1176、1181-1187、1221-1230、1238-1244、1269-1274 および 605-632 (配列番号 446) ; 6-47、57-65、83-95、109-121、138-147、154-164、167-177、194-200、202-212、227-234、240-253、260-267、283-291、320-329、340-347、356-364、412-422、430-436、441-459、465-475、478-486、498-507 および 59-84 (配列番号 447) ; 10-21、58-83、88-97、120-126 および 21-51 (配列番号 448) ; 5-39、56-62、76-88、90-114、138-162、170-195、202-221、228-250、264-270、304-355、374-387、391-416、462-471、526-546、554-561、574-579、639-645、651-660、674-682、689-694 および 666-697 (配列番号 449) ; 6-30、36-42、143-157、176-197、202-209、216-233、241-246、275-287、292-299、315-325、343-350、375-380、397-403、411-420、422-434、441-448、467-474、477-499、555-568、591-597、601-609、623-644、667-688、692-698、703-718、736-747、757-766、782-791、795-801、832-840、859-865 および 226-269 (配列番号 450) ; 6-23、43-51、61-67、73-82、91-97、123-130、149-158、164-175、228-234、240-246、248-255、262-272、326-332、340-347、365-371、377-388、409-419、425-431、438-445、449-457、464-470、496-507、559-568、575-581、603-608、617-623、633-639、648-654、659-670、695-701、734-752、806-814、816-829、861-868、891-899、904-909、937-945、947-960、978-983、992-999、1022-1031、1068-1076、1078-1091、1109-1114、1123-1130、1153-1162、1199-1207、1209-1222、1254-1261、1284-1293、1330-1338、1340-1353、1371-1376、1385-1392、1415-1421、1433-1438、1460-1465、1470-1492 および 1422-1458 (配列番号 451) ; 82-94、111-118、125-131、206-212、261-266、310-320、328-338、345-351、353-360、414-420、424-434、440-447、451-500、506-516、548-561、566-572、584-591、601-622、630-636、650-659、661-667、674-699、703-711、717-729、736-744、752-759、765-771、813-822、826-842、852-868、870-877、881-895、897-906、913-922 および 602-671 (配列番号 452) ; 12-18、20-25、43-54、56-65、73-79、82-88、99-111、136-142、153-169、171-183、195-223、229-248、255-260、272-277、281-292、298-319、322-329、332-351、363-379、381-389 および 275-304 (配列番号 453) ; 4-9、34-48、65-77、101-106、111-131、138-153、186-191、230-250 および 148-219 (配列番号 454) ; 4-23、30-35、42-53、67-76、82-87、101-108、112-130、132-138、147-152、161-183、187-208、218-225、265-283、295-303、306-317、322-334、338-357、360-368、370-383、387-398、400-419、421-430、104-182 および 240-304 (配列番号 455) ; 4-12、63-69、94-102、146-164、166-173、175-181、193-207、263-281、286-295、301-306、330-343、369-378、382-388、414-420、422-430、438-454、456-462、472-531、543-560、581-591、596-605、614-623、626-635、656-662、669-676、683-690、693-698、705-711、728-736、752-764 および 69-102 (配列番号 456) ; 6-12、43-53、141-147、164-179、185-195、197-206、227-235、237-271、288-305、308-317、335-341、351-357、365-376、386-395、397-416、422-447 および 11-35 (配列番号 457) ; 16-24、50-65、73-84、88-99、114-124、130-146、181-187、193-203、214-220、236-247、250-258、287-297 および 50-113 (配列番号 458) ; 4-25、50-55、76-82、117-123、131-137、139-148、157-166、239-245、253-258、266-275、277-292、300-306、51-83 および 93-161 (配列番号 459) ; 6-22、34-43、51-86、93-100、110-116、150-161、164-171、180-187、197-218 および 168-237 (配列番号 460) ; 4-27、55-60、74-82

および 10-46 (配列番号 461); 6-19、25-31、43-49、60-79、88-100、105-129、148-161、164-171、187-193、243-263、316-322、334-340、369-378、381-391、398-404、460-466、474-483、502-509、511-517、525-530、558-567、579-596、622-627、631-638、641-651、653-659、674-680、687-693、710-716、720-727、743-753、760-775、788-795、806-813、821-828、836-842、847-860、865-880 および 258-377 (配列番号 462); 4-11、25-64、71-79、88-94、107-120、123-132、167-188、231-237、240-246、261-267、306-311、330-342、351-358、389-395、406-418、429-434、439-448、483-501、511-520 および 71-143 (配列番号 463); 4-18、22-27、53-64、94-100、121-127、133-139、155-164、177-182、187-196、206-218、224-242、248-253、258-277 および 184-253 (配列番号 464); 10-17、56-67、72-82、94-99、106-113、166-173、229-235、243-283、295-301、313-321、326-331、342-348、396-414、423-435、446-452、454-462、496-502、511-534、543-556、563-570、586-593、616-626、638-645、653-662、679-696、731-737、766-774、776-782、790-796、810-817、825-835、837-846 および 540-615 (配列番号 465); 13-24、30-36、73-81、89-95、109-115、117-143、161-173、179-189、226-244、251-261、275-281、298-305、307-315、323-328、364-374、69-186 および 264-354 (配列番号 466); 19-25 および 6-22 (配列番号 467); 6-39、59-68 および 43-62 (配列番号 468); 6-14、22-32 および 1-27 (配列番号 469); 4-41 および 28-40 (配列番号 470); 8-14 および 4-19 (配列番号 471); 4-10、12-22、30-35 および 6-33 (配列番号 472); 4-16、24-33 および 37-54 (配列番号 473); 2-23 (配列番号 474); 4-21、27-33、36-41 および 14-34 (配列番号 475); 4-14、24-30、37-42、57-78、83-89、94-103、113-131 および 100-122 (配列番号 476)。

10

20

【請求項 15】

請求項1~7のいずれかの核酸分子を発現させることを含む請求項11~14のいずれかの大便連鎖球菌過免疫血清反応性抗原またはその断片の生産方法。

【請求項 16】

請求項8または請求項9のベクターで好適な宿主細胞を形質転換または形質移入することを含む請求項11~14のいずれかの大便連鎖球菌過免疫血清反応性抗原またはその断片を発現する細胞の生産方法。

【請求項 17】

請求項11~14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片または請求項1~7のいずれかの核酸分子を含む医薬組成物、特にワクチン。

30

【請求項 18】

ポリカチオン性ポリマー、特にポリカチオン性ペプチド、免疫賦活性デオキシヌクレオチド(ODN)、少なくとも2つのLysLeuLysモチーフを含むペプチド、向神経活性化合物、特にヒト成長ホルモン、ミョウバン、フロイント完全または不完全アジュバントまたはそれらの組み合わせを含む群から好ましくは選択される免疫賦活性物質をさらに含む請求項17の医薬組成物、特にワクチン。

【請求項 19】

請求項1~7のいずれかの核酸分子または請求項11~14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片の、医薬調製物、特に腸球菌感染症に対するワクチンの製造のための使用。

40

【請求項 20】

請求項11~14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片の少なくとも選択的部分に結合する抗体、またはその少なくとも有効な部分。

【請求項 21】

抗体がモノクローナル抗体である請求項20の抗体。

【請求項 22】

該有効な部分がFab断片を含む請求項20または21の抗体。

【請求項 23】

抗体がキメラ抗体である請求項20~22のいずれかの抗体。

50

【請求項 24】

抗体がヒト化抗体である請求項 20～23のいずれかの抗体。

【請求項 25】

請求項 20～24のいずれかの抗体を産生するハイブリドーマ細胞株。

【請求項 26】

以下の工程によって特徴づけられる請求項 20の抗体の生産方法：

請求項11～14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片を非ヒト動物に投与することにより、該非ヒト動物において免疫応答を開始させる工程、

抗体を含有する体液を該動物から取り出す工程、および、

抗体を含有する該体液をさらに精製工程に供することにより抗体を生産する工程。

10

【請求項 27】

以下の工程によって特徴づけられる請求項 21の抗体の生産方法：

請求項12～15のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片を非ヒト動物に投与することにより、該非ヒト動物において免疫応答を開始させる工程、

該動物から脾臓または脾臓細胞を取り出す工程、

該脾臓または脾臓細胞のハイブリドーマ細胞を生産する工程、

該過免疫血清反応性抗原またはその断片に特異的なハイブリドーマ細胞を選択およびクローン化する工程、

該クローン化されたハイブリドーマ細胞の培養および所望によりさらなる精製工程により抗体を生産する工程。

20

【請求項 28】

腸球菌感染症の治療または予防用医薬の調製のための請求項 20～24のいずれかの抗体の使用。

【請求項 29】

請求項11～14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片に結合するアンタゴニスト。

【請求項 30】

以下の工程を含む請求項11～14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片に結合することが出来るアンタゴニストの同定方法：

a) 単離または固定化した請求項11～14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片を候補アンタゴニストと、該候補アンタゴニストの該過免疫血清反応性抗原または断片への結合を可能とする条件下で、候補アンタゴニストの該過免疫血清反応性抗原またはその断片への結合に応答して検出可能なシグナルを提供することが出来る成分の存在下で接触させる工程；および、

b) アンタゴニストの過免疫血清反応性抗原またはその断片への結合に応答して生じるシグナルの存在または不在を検出する工程。

【請求項 31】

以下の工程を含む請求項11～14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片とその相互作用パートナーとの相互作用活性を低減または阻害することが出来るアンタゴニストの同定方法：

a) 請求項11-14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその過免疫断片を提供する工程、

b) 該過免疫血清反応性抗原またはその断片に対する相互作用パートナー、特に請求項 20～24のいずれかの抗体を提供する工程、

c) 該過免疫血清反応性抗原またはその断片と該相互作用パートナーとを相互作用させ、相互作用複合体を形成させる工程、

d) 候補アンタゴニストを提供する工程、

e) 候補アンタゴニストと相互作用複合体の間で競合反応を起こさせる工程、

f) 候補アンタゴニストが過免疫血清反応性抗原またはその断片と相互作用パートナーとの相互作用活性を阻害または低減するかを判定する工程。

40

50

【請求項 3 2】

過免疫血清反応性抗原またはその断片の相互作用パートナーの単離および/または精製および/または同定のための請求項11~14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片の使用。

【請求項 3 3】

請求項1~7のいずれかの過免疫血清反応性抗原および断片をコードする核酸配列の存在または請求項11-14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片の存在を判定することを含む、請求項11~14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片の発現に関連する疾患をインビトロで診断する方法。

【請求項 3 4】

請求項1~7のいずれかの過免疫血清反応性抗原および断片をコードする核酸配列の存在または請求項11-14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片の存在を分析することを含む、細菌感染症、特に腸球菌感染症をインビトロで診断する方法。

【請求項 3 5】

過免疫血清反応性抗原またはその断片に結合するペプチドの作成のための請求項11~14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片の使用、ここで該ペプチドはアンチカリンを含む群から選択される。

【請求項 3 6】

請求項11~14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片の機能的核酸の製造のための使用、ここで該機能的核酸はアプタマーおよびスピーゲルマーを含む群から選択される。

【請求項 3 7】

機能的リボ核酸の製造のための請求項11~14のいずれかの核酸分子の使用、ここで該機能的リボ核酸はリボザイム、アンチセンス核酸およびsiRNAを含む群から選択される。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腸球菌によって引き起こされる細菌感染症の予防および治療のための医薬の調製における使用に好適な腸球菌、例えば大便連鎖球菌(*Enterococci faecalis*)の抗原をコードする単離核酸分子に関する。

【背景技術】

【0002】

腸球菌は、ヒトおよび動物の消化管に通常生息するグラム陽性細菌である。それは感染性心内膜炎の原因であると1世紀以上認識されており{Murray、B.、1990}、ここ20年の間に院内感染、および手術部位感染にみられるもっとも多い病原菌であるということが知られるようになった{Richards、M. et al.、2000}。院内病原体として腸球菌がより重要となってきたことは部分的には固有および後天性抗生物質耐性に起因する{Murray、B.、1990}; {Rice、L.、2001}。多剤耐性腸球菌感染症の治療はかなり医師にとっての問題となっており{Cetinkaya、Y. et al.、2000}; {Gold、H.、2001}、これら生物が抗生物質耐性遺伝子の貯蔵所として働く能力が非常に興味をもたれている {French、G.、1998}; {Noble、W. et al.、1992}; {Poyart、C. et al.、1997}。

【0003】

グループD連鎖球菌として腸球菌が分類されたのは1930年代前半にさかのぼる。1984年に、腸球菌は連鎖球菌との関係がより遠いことを示すいくつかの実験後に正式に属としての地位を与えられた。

【0004】

腸球菌は一般にヒトを含む様々な生物の胃腸管の共生動物と考えられている。14を超える腸球菌の種が存在するが、大便連鎖球菌およびエンテロコッカス・フィシウム(*E. faecium*)がヒトにおいてもっとも一般的にみられる種である。腸球菌のいくつかの固有の特徴により、この属のメンバーは長期間生存することが出来、その持続および院内伝搬が導

10

20

30

40

50

かれる。界面活性剤の存在下で適応、持続できる腸球菌の能力により、不十分な清掃方法では生存することが出来、これが院内での持続に寄与している。腸球菌の固有の耐久性はまたアミノグリコシド、 β -ラクタムおよびキノロンを含むいくつかのクラスの抗生物質に対する異常なレベルの耐性を付与する。例えば、腸球菌のアミノグリコシドに対する耐性は、腸球菌が細胞壁においてその薬剤の取り込みを阻害する能力に起因する。高レベルの耐性のメカニズムは二機能性酵素の結果であることが判明しているが{Ferretti, J. et al., 1986}、腸球菌の低レベルのアミノグリコシドに対する固有の耐性の分子的基礎はわかっていない。

【0005】

腸球菌のなかでも、エンテロコッカス・フィシウムは特徴的である。というのはそれは発酵食品の製造に通常用いられており、プロバイオティクス細菌としても用いられているからである。近年、エンテロコッカス・フィシウムは食品発酵生物としてあまり受け入れられなくなってきた。それはこの細菌がヒト感染症に關与する細菌の抗生物質耐性の伝搬の中間宿主であるかもしれないという懸念による。かかる懸念にもかかわらず、エンテロコッカス・フィシウムは依然として乳酸菌によって発酵する食品にもっともよくみられる細菌である。エンテロコッカス・フィシウムの多くの分離株が、病原体、例えば、リステリア、クロストリジウム、桿菌、およびブドウ球菌を殺菌またはその増殖を阻害することができるバクテリオシン（抗菌ペプチド）を生産することが示されている。かかるバクテリオシンは食品の発酵の保存効果に寄与し得、それはこの菌が発酵食品の生産のスタータ・カルチャーとして選択されている理由の1つである。最近、エンテロシンがウシの乳腺炎の治療に用いられて成功している。

【0006】

プロバイオティクスとしての食品製造への適用および動物疾患の治療への適用の他に、より重要なことに、腸球菌は日和見性ヒト病原体である。これはその固有の病原能力に起因し、さらに抗生物質耐性遺伝子を迅速に獲得する能力に起因する。エンテロコッカス・フィシウムおよび大便連鎖球菌は、重複感染を含む院内感染の大部分の原因菌である。

【0007】

腸球菌は通常ヒトの胃腸管に定着する。それらはヒトの大便に比較的豊富にみられる。腸球菌とその宿主の間に密接な関係が存在するようであり、そうでなければ菌は通常の腸の運動により排出されてしまうであろう。多くの感染-誘導性腸球菌分離株がクローン性であることが見いだされており、院内感染を示す。さらに、多数の研究により入院後の患者への定着が報告されており、多剤耐性株による定着がさらなる感染のための素因であることが示された。

【0008】

簡単に説明できない院内腸球菌感染の謎の一つは同じ種のメンバーによって既に占められている生態への迅速な定着である。上記のように、実質的に抗腸球菌活性を欠く抗生物質（即ち、既存の腸球菌に有害作用を及ぼさない抗生物質）が感染の重要な素因である。かかる感染はしばしば外因的に獲得された多剤耐性腸球菌分離株によって引き起こされ、直接の選択の非存在下では既存の腸球菌に競合するようである。

【0009】

外因性の、多剤耐性、院内感染腸球菌が胃腸管に有効に定着するという事実はそれが常在株と同じ生態学的地位を直接に競合しているわけではないということを示唆する。

【0010】

腸球菌属によって引き起こされる感染には、a) 菌血症、b) 尿路感染症 c) 眼内炎、d) 心内膜炎および創傷および内臓感染が含まれる。感染症のおよそ4分の3が大便連鎖球菌種により引き起こされ、残りがエンテロコッカス・フィシウムにより引き起こされる。

【0011】

a) 菌血症

1986年10月から1997年4月の院内監視データには、院内菌血症の第三に多い原因として腸球菌が挙げられており、全分離株の12.8%を占める。無傷の腸上皮バリアを横切る腸球

菌の移動は原因不明の菌血症の多くを引き起こすと考えられる。腸球菌菌血症に関連する死亡の危険因子には、疾患の重篤度、患者の年齢、および例えば第三世代のセファロスポリンまたはメトロニダゾール等の広範な抗生物質の使用が含まれる。これらの研究は高レベルのアミノグリコシド耐性は臨床転帰に影響を及ぼさず、大便連鎖球菌の細胞溶解素(溶血素)の存在が感染症の重篤度を増すことを示唆する。

【0012】

b) 尿路感染症

腸球菌は米国で毎年110,000例の尿路感染症 (UTI)の原因であると見積もられている。いくつかの研究が腸球菌と尿路上皮組織との相互作用の理解を目的として行われている。腸球菌の腎臓上皮細胞への付着におけるプラスミドにコードされる凝集物質 (aggregation substance)の可能性がある役割が示されている。フェロモン応答性プラスミド pAD1、または様々な同質遺伝子誘導体を担持する大便連鎖球菌は、培養ブタ尿細管細胞株、LLC-PK 10 に対して、プラスミドを有さない細胞よりも良好に結合することができた。これらの知見はまたフィブロネクチンモチーフ、Arg-Gly-Asp-Serを含む合成ペプチドが結合を阻害することが出来ることを示した。この構造モチーフはフィブロネクチンとインテグリンファミリーの真核生物表面受容体との相互作用を媒介する。

【0013】

c) 眼内炎

宿主組織の定着が眼内炎の病因において役割を果たし得る。腸球菌は白内障手術の術後合併症を引き起こすもっとも破壊性の病原である。凝集物質標的化大便連鎖球菌が目のなかの解剖学的構造を変化させるかを調べるために設計した実験により、腸球菌がガラス体 20 における膜構造に結合することが示されたが、かかる接着は凝集物質の存在に依存しなかった。

【0014】

d) 心内膜炎

腸球菌によって引き起こされる様々な感染症のなかで、感染性心内膜炎 (IE)は治療上もっともやっかいなものの1つである。腸球菌は感染性心内膜炎の第三番目の原因であり、自然弁IEの症例の5-20%、および人工弁心内膜炎の6-7%の原因である。フェロモン応答性 プラスミド pAD1の存在は腸球菌心内膜炎の生育(vegetation)形成を促進する。大便連鎖球菌心内膜炎の患者からの血清が血清において選択的に発現しているがブロス培養にはない抗原を同定するのに用いられた{Lowe, A. et al., 1995}。EfaAと称されるこのタンパク質抗原はいくつかの連鎖球菌の付着因子とかなりの配列類似性を有しており、心 30 内膜炎における重要な付着因子として機能しているようである。

【0015】

アンピシリンが腸球菌感染症の治療に選択されている。重篤な腸球菌感染症、特に心内膜炎には、アミノグリコシドがペニシリンまたはアンピシリンとの併用療法の一部として重要である。腸球菌は本質的に低レベルのアミノグリコシドに耐性であるが、アミノグリコシドと細胞壁阻害剤の併用により、2つの抗菌剤の相乗作用による殺菌の上昇がもたらされる。アミノグリコシドおよびペニシリンに対する高レベルの耐性が多く出現するようになったため、バンコマイシンが腸球菌感染症の治療に唯一用いられる選択肢となった。 40 その後、バンコマイシン耐性が1988年に腸球菌の臨床分離株にて報告され、バンコマイシン-耐性腸球菌 (VRE)により引き起こされる大流行が起こった。米国の病院ではバンコマイシンに耐性の院内腸球菌の割合は1989年の0.3%から1993年には7.9%に上昇した。集中治療室での院内感染の患者の上昇はさらに劇的であり、1989年の0.4%から1993年には13.6%に上昇し、その4年間で34倍の上昇を示した。

【0016】

高い死亡率に加えて、バンコマイシン-耐性腸球菌感染症の治療費は平均約 25,000ドルを超え、患者の入院期間も倍増した。

【0017】

特にエンテロコッカス・フィシウム分離株でのバンコマイシン耐性の劇的な増加は、腸 50

球菌感染症は将来より脅威を引き起こすであろうことを示す。明らかな治療の選択肢は保護免疫応答を誘導する目的の感染症を予防または軽減するワクチン接種である。

【0018】

ワクチン開発は腸球菌感染症に対する保護免疫の要素に関する十分な知識の欠落により阻止されている。抗-腸球菌抗体がオプソニン食作用 (opsonophagocytic) 殺菌による菌の排除の促進において重要であるという証拠が最近報告されているが {Gagliani, M. et al., 1997}、好中球に媒介される腸球菌の殺菌が主に補体の機能であり、抗体はそれほど必須ではないが潜在的に重要な役割を果たしているという報告がある。

【0019】

ヒト免疫における表面タンパク質の腸球菌に対する重要性は既に理解されている。すべての臨床分離株が宿主免疫防御に関連する活性を有する表面タンパク質を発現することが明らかである。腸球菌表面タンパク質 (Esp) {Shankar, V. et al., 1999}、ゼラチナーゼ、細胞溶解素 {Haas, W. et al., 2002} および凝集物質 (AS) 表面タンパク質 {Sussumuth, S. et al., 2000} は生化学的および遺伝学的によく特徴づけられており、免疫原性であることが示されている {Xu, Y. et al., 1997}。感染性心内膜炎の動物モデルにおいて凝集物質に対する特異的抗体は保護を示さなかった {McCormick, J. et al., 2001}。

【0020】

したがって腸球菌感染症の予防または軽減のための有効な処置がいまだに望まれている。ヒト感染を引き起こす腸球菌株の大部分に対する交差保護を示すことが出来るワクチンはその他の腸球菌種、特に大便連鎖球菌およびエンテロコッカス・フィシウムによって起こる感染症の予防または軽減に有用であり得る。

【0021】

ワクチンはいろいろな種類の抗原を含みうる。抗原の例としては、死滅または弱毒化した生物体、これら生物/組織の細画分、タンパク質、またはそのもっとも単純な形態において、ペプチドが挙げられる。抗原はグリコシル化タンパク質またはペプチドの形態で免疫系によって認識され得、多糖または脂質であってもよいし、それらを含んでもよい。短いペプチドも利用できる。というのは例えば、細胞障害性T細胞 (CTL) は主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) と結合した通常8-11アミノ酸長のペプチドの短い形態における抗原を認識するからである。B-細胞は4-5アミノ酸といった短い直鎖状エピトープおよび三次元構造 (高次構造エピトープ) を認識することが出来る。持続性の、抗原-特異的免疫応答を得るためには、アジュバントが、免疫系のすべての必要な細胞を伴う免疫カスケードをトリガーする必要がある。第一に、アジュバントはその作用機序に限定されず、いわゆる抗原提示細胞 (APC) に作用する。これら細胞は通常まず抗原に遭遇し、次いで加工されたかまたは非修飾の抗原を免疫エフェクター細胞に提示する。中間細胞タイプも関与しうる。適切な特異性を有するエフェクター細胞のみが生産的 (productive) 免疫応答において活性化される。アジュバントはまた、抗原および共注入されたその他の因子を局所的に保持しうる。さらに、アジュバントはその他の免疫細胞に対する化学誘引物質としても作用し得、あるいは免疫系の刺激剤として局所的小および/または全身的に作用しうる。

【0022】

腸球菌感染症に対するワクチンは現在開発の研究段階にあるに過ぎない。免疫原として荚膜多糖 (CPS) {Huebner, J. et al., 2000} だけでなく、病原因子および膜/表面タンパク質に注目する努力がなされている。

【0023】

タンパク質接合ワクチンの開発は、疑いなく腸球菌感染症に対する戦いにおいてアママトリウム (amarmorium) に追加される強力な新兵器であるが、ワクチンは限られた数の腸球菌タンパク質しか含まず、適当な生態学的圧力を与えられると、非ワクチン臨床分離株による病原性島 (pathogenicity island) およびプラスミドの変異が現実的な脅威として残る。さらに能動免疫に用いられる多糖抗原はヒトに免疫記憶を提供しない。CPSの非-腸球菌関連免疫原性タンパク質キャリア (例えば、破傷風毒素、コレラ毒素Bサブユニットなど) との接合はワクチンにおける抗体濃度を高めるのに有用であることが示されて

10

20

30

40

50

いるが、それはもっとも有効な宿主応答を支持する記憶Bおよび T 細胞を実際の感染において動員する病原体特異的 B 細胞および T 細胞エピトープを提供しない。これら基準を満たすタンパク質による腸球菌 ワクチンの増強を可能とするためには、保存された免疫原性腸球菌-特異的表面タンパク質の同定が必要である。

【0024】

受動抗体に基づく治療法の大きな潜在的可能性がある。ヒト静脈内免疫グロブリン (IVIG) 調製物を予防に使用する試みが既になされている。モノクローナル抗体産生技術の最近の進展は、ヒト抗体医薬の作成および再導入抗体療法的手段を提供する一方、血清療法に伴う毒性の問題を回避できる。免疫グロブリンは非常に多様なクラスの抗菌タンパク質であり、増えつつある感染性疾患の予防および治療に用いることが出来る。抗体療法は {Burnie, J. et al., 1998} に概説されている多様な微生物に対して有効であった。抗-腸球菌 mAb は臓器移植、癌、HIV 感染およびその他の原因の免疫抑制患者に治療的に与えることが出来る。

10

【0025】

グラム陽性生物の表面に提示されるいくつかのタンパク質または酵素はかなり病原性に寄与しており、かかる病原体によっておこる疾患プロセスに関与している。しばしば、これらタンパク質は、宿主組織との直接相互作用または宿主の防御機構からの細菌表面の保護に関与している {Navarre, W. et al., 1999}。大便連鎖球菌はこの点で例外ではない。いくつかの表面タンパク質が、腸球菌病原性に重要な病原性因子として特徴づけられており、{Jedrzejewski, M., 2001} に要約されている。これらタンパク質に対する抗体がヒトに対して多糖よりもより良好な保護を付与するのであれば、抗体はより伝統的な莢膜多糖ワクチンとともに、あるいはそれにとってかわって用いられる、新規なタンパク質に基づく腸球菌ワクチンのソースを提供しうる。潜在的ワクチンのための抗原としての上記タンパク質のいくつか、および多数のさらなる候補の使用は、同定の容易性または入手の機会に基づいた選択に主によるものである。より網羅的なやり方で、大便連鎖球菌に対する関連抗原を同定することが求められている。

20

【0026】

本発明者らは、特定の病原体、特に黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌からの過免疫血清反応性抗原の同定、単離および産生方法を開発した (WO 02/059148)。しかし、生物学的特性、病原性機能および遺伝的背景の相違により、大便連鎖球菌はブドウ球菌株とは異なっている。関連する血清ソースを同定するために、主な3つのタイプのヒト血清を、健康な成人、腸球菌感染症患者であって未処置の個体、5から10月齢の子供であって、すでに母親からの抗体を失っているもの(陰性対照として)から収集した。個体の大部分は宿主において抗体を誘導できる環境下で腸球菌に曝される。主に病院で起こる疾患は、腸球菌に対する特異的抗体レベルの低さと関連しており、食作用による排除が効率的でなくなっている。適切なスクリーニング試薬を選択するために、一連のイムノアッセイ (主に ELISA および イムノプロットティング) を細菌可溶化液および培養上清タンパク質について行って抗-大便連鎖球菌 IgG 抗体レベルを測定した。高力価の個体からの血清をゲノムに基づく抗原の同定に含めた。

30

【0027】

2つの細菌種、大便連鎖球菌および黄色ブドウ球菌のゲノムはそれ自体で多くの重要な相違を示す。大便連鎖球菌のゲノムはおよそ3.22 Mb含むが、黄色ブドウ球菌は2.85 Mb有する。それらの平均GC含量はそれぞれ37.5および33%であり、コードされる遺伝子のおよそ1/3は2種の病原体間で共有されていない。さらに、2つの細菌種は増殖のために異なる培養条件と培地を要求する。2つの病原体によって与えられ得るもっとも重要な疾患のリストを以下に示す。黄色ブドウ球菌はおもに以下の院内、日和見感染をもたらす: 膿瘍、毛囊炎、膿瘍、皮膚膿瘍 (boils)、感染裂傷、心内膜炎、髄膜炎、敗血症、関節炎、肺炎、骨髄炎、熱傷様皮膚症候群 (SSS)、毒素性ショック症候群。大便連鎖球菌は主に高度に毒性、高度に侵入性または高度に感染性というわけではない感染症をもたらす。しかしそれらは、かなりのヒト疾患、例えば、菌血症、尿路感染症、心内膜炎および内臓感

40

50

染症を引き起こす。

【0028】

大便連鎖球菌 V583と称されるバンコマイシン-耐性臨床分離株の完全なゲノム配列を、ランダムショットガンシーケンシング戦略（染色体およびプラスミドについてのGenBank 受託番号：AE016830（染色体）、AE016833（pTEF1）、AE016831（pTEF2）、AE016832（pTEF3））；www.tigr.org/tigrscripts/CMR2/CMRHomePage.spl参照{Paulsen, I. et al., 2003}）により決定した。

【0029】

エンテロコッカス・フィシウム 株 DO（ATCC BAA-472、TEX16、TX0016）の完全なゲノムは推定ゲノムサイズ2.8 Mbpであり、これを配列決定した。ゲノムはコンピュータ解析され、Baylor College of Medicine's Human Genome Sequencing Center およびUniversity of Texas Center for the Study for Emerging and Re-emerging Pathogens（CSERP）によりアノテーションされている；www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbial/Efaecium/参照。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0030】

本発明の基礎となる課題は大便連鎖球菌感染症に対するワクチンなどの医薬の開発手段を提供することである。より具体的には、課題は医薬の製造に用いることが出来る効率的に関連する網羅的セットの大便連鎖球菌由来の核酸分子または過免疫血清反応性抗原を提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0031】

それゆえ、本発明は、以下からなる群から選択される核酸配列を含む、過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする単離核酸分子を提供する：

- a) 配列番号 1-2、4-8、10、12-18、20-23、25-26、29-43、45-62、64-74、76-77、79-83、85-89、91-92、94-114、117-126、128-146、148-170、373、375、379-381、387、392、394、397-399、407-408、410-411および415-424から選択される核酸分子に対して少なくとも70%の配列同一性を有する核酸分子、
- b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、
- c) a)またはb)の核酸分子の少なくとも15の連続する塩基を含む核酸分子、
- d) a)、b)、またはc)の核酸分子とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でアニールする核酸分子、
- e) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c)またはd)の核酸分子とハイブリダイズしうる核酸分子。

30

【0032】

本発明の好ましい態様によると、配列同一性は少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%、特に100%である。

【0033】

さらに、本発明は以下からなる群から選択される核酸配列を含む過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする単離核酸分子を提供する：

- a) 配列番号 3、9、11、24、27、44、63、75、84、115-116、127、374、376-378、382-386、388-391、393、395-396、400-406、409および412-414から選択される核酸分子に対して少なくとも96%、好ましくは少なくとも98%、特に100%の配列同一性を有する核酸分子、
- b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、
- c) a)またはb)の核酸分子の少なくとも15の連続する塩基を含む核酸分子、
- d) a)、b)、またはc)の核酸分子とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でアニールする核酸分子、
- e) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c) またはd)の核酸とハイブリダイズしうる核酸分子。

40

50

【 0 0 3 4 】

別の態様によると、本発明は以下からなる群から選択される核酸配列を含む単離核酸分子を提供する：

- a) 配列番号 90、147から選択される核酸分子、
- b) a)の核酸と相補的な核酸分子、
- c) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c) またはd)の核酸とハイブリダイズしうる核酸分子。

【 0 0 3 5 】

好ましくは、核酸分子はDNAまたはRNAである。

【 0 0 3 6 】

本発明の好ましい態様によると、核酸分子は、ゲノムDNA、特に大便連鎖球菌ゲノムDNAから単離されたものである。

【 0 0 3 7 】

本発明によると、本発明のいずれかによる核酸分子を含むベクターが提供される。

【 0 0 3 8 】

好ましい態様において、ベクターは本発明による核酸分子によってコードされる過免疫血清反応性抗原またはその断片の組換え発現に適するものである。

【 0 0 3 9 】

本発明はまた、本発明によるベクターを含む宿主細胞を提供する。

【 0 0 4 0 】

別の態様によると、本発明はさらに、本発明による核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含む過免疫血清反応性抗原を提供する。

【 0 0 4 1 】

好ましい態様において、アミノ酸配列 (ポリペプチド)は、配列番号 171-172、174-178、180、182-188、190-193、195-196、199-213、215-232、234-244、246-247、249-253、255-259、261-262、264-284、287-296、298-316、318-340、425、427、431-433、439、444、446、449-451、459-460、462-463および467-476からなる群から選択される。

【 0 0 4 2 】

別の好ましい態様において、アミノ酸配列 (ポリペプチド)は、配列番号173、179、181、194、197、214、233、245、254、285-286、297、426、428-430、434-438、440-443、445、447-448、452-458、461および464-466からなる群から選択される。

【 0 0 4 3 】

さらに好ましい態様において、アミノ酸配列 (ポリペプチド)は、配列番号 260、317からなる群から選択される。

【 0 0 4 4 】

さらなる態様によると、本発明は、表 1aおよび表 1cの「予測免疫原性アミノ酸」および「同定された免疫原性領域の位置」の列のアミノ酸配列を含むペプチド；表 2の血清反応性エピトープ、特に以下のアミノ酸を含むペプチドからなる群から選択される過免疫血清反応性抗原の断片を提供する：4-10、14-21、30-36、59-68、77-82、87-93、96-105、112-121、125-133、135-141、150-162、164-183、192-203、207-213、215-226、228-234、241-247、250-285、302-308 および 135-148 (配列番号 171)；15-57、60-73、77-101、108-134、136-177、185-201、203-217、226-240、244-254、272-277、283-288、292-343、354-370、380-398、406-437、439-453、473-490、532-538、584-590、595-601、606-612、664-677、679-704、715-724、731-753、759-772、786-794、814-862 および 657-684 (配列番号 172)；4-9、15-36、41-47、54-60、75-81、114-120、131-146、152-158、174-182、194-202、208-215、218-226、255-271、276-285、290-295、302-311、318-328、330-344、352-359、365-377、388-395、398-405、426-432、439-449、455-500、505-513、531-537、542-552、554-561、587-595、606-612、718-734、763-771、775-782、792-801、805-812、822-828、830-843、849-863、876-894、905-911、919-926、935-947、949-958、968-979、1009-1016、1029-1045、1047-1056、1076-1081、1092-1106、1123-1133、1

10

20

30

40

50

179-1200、1202-1211、1215-1223、1287-1299、1301-1306、398-431 および 1224-1237
 (配列番号 173) ; 17-47、74-80、90-97、126-133、137-148、167-173、179-185、214-2
 23、250-255、270-283、329-338、342-350、352-358、360-367、372-383、398-404、411-
 421、426-432、435-446、452-462、472-479、515-521、582-592、611-618、623-629、642
 -659、666-673、678-689、704-725、732-737、744-757、768-789、824-834、842-849、86
 2-868、877-887、904-916、923-928、941-947、962-974、982-992、1019-1030、1032-104
 4、1046-1052、1065-1075、1077-1087、1108-1121、1124-1132、1137-1151、1170-1182、
 1190-1206、1208-1214、1227-1233、1242-1251、1254-1273、1282-1298 および 792-825
 (配列番号 174) ; 19-31、39-67、82-91、104-110、113-128、149-155、161-181 および
 137-155 (配列番号 175) ; 6-18、54-63、69-85、110-127、142-156、158-167、169-21 10
 1、238-246、248-257、276-311、339-349、371-380、385-391、394-403、421-438、451-4
 56、483-489 および 449-468 (配列番号 176) ; 5-15、24-34、50-56、61-83、98-121、
 123-136、149-162、166-194、202-215、221-227、229-332、337-360、367-402、404-415
 、427-433、444-462、471-478、487-498、511-518、521-544、550-563、568-574、580-58
 7、597-607、610-616、624-629 および 468-498 (配列番号 177) ; 11-19、32-49、57-6
 3、65-71、80-89、91-133、166-181、183-191、201-230、234-257、264-291、297-303、3
 05-314、316-335、337-354、359-366、368-374、383-388、394-405、408-442、446-470、
 483-490、499-505、513-538、544-555、557-563、568-590、598-608、617-623、627-636
 、641-647、667-685、687-693、710-723、733-739、742-754、769-815 および 366-388
 (配列番号 178) ; 4-16、30-35、42-53、67-76、82-87、101-108、112-130、132-138、1 20
 47-152、161-183、187-208、218-225、265-281、295-303、305-317、322-334、338-357、
 360-368、370-383、387-394、400-419、421-430 および 255-336 (配列番号 179) ; 19-
 27、36-47、59-66、76-83、101-112、118-125、142-147、162-180、185-196、225-240、2
 46-263、286-304、314-319、327-333、353-367 および 194-214 (配列番号 180) ; 14-4
 3、70-76、83-89、111-117、122-128、136-145、163-170、175-182、210-219、246-251、
 266-279、325-331、338-346、348-354、356-363、368-379、422-428、431-441、450-456
 、466-473、509-515、532-542、549-556、576-586、605-612、617-623、636-653、660-66
 7、674-686、698-719、726-731、738-745、762-783、818-828、836-843、856-862、871-8
 81、903-910、917-922、935-941、956-968、976-986、1013-1024、1026-1038、1059-1069
 、1071-1081、1102-1115、1118-1126、1131-1145、1164-1176、1187-1200、1202-1208、1 30
 221-1227、1236-1245、1248-1267、1273-1292、252-287 および 805- 844 (配列番号 18
 1) ; 4-18、21-28、37-43、56-70、101-113、131-140、142-150、162-170、172-184、193
 -204、209-227、233-238、246-264 および 93-168 (配列番号 182) ; 14-20、44-50、61
 -70、77-96、99-106、129-142、168-181、187-196、205-221、225-241、277-296 および
 257-281 (配列番号 183) ; 18-29、43-54、64-76、78-84、88-103、125-149、159-176、
 198-218、230-242、256-271、279-285、287-293、300-306、325-331、344-351、357-364
 、371-397、400-414、419-464、485-515、517-526、529-537、548-553、573-580、584-59
 0、603-620、639-661、676-681、687-700、716-761、772-780、785-790、795-803、823-8
 36、848-853 および 106-134 (配列番号 184) ; 7-13、19-42、44-51、55-75、87-97、9 40
 9-110、112-118、129-135、141-156、158-178、213-220、230-286、294-308、323-338、3
 45-352、355-365、370-392、394-419、437-446、454-460、474-497、515-526、528-546、
 569-575 および 128-141 (配列番号 185) ; 12-20、24-33、45-70、73-84、86-94、103-
 116、118-124、135-142、163-170、176-200、202-224、226-234、237-248、250-262、265
 -287、296-307、334-341、347-356、361-369、382-396、405-415、418-427、431-439、44
 3-449、452-461、467-474 および 113-146 (配列番号 186) ; 13-38、44-50、52-59、66
 -72、83-94、103-110、116-124、131-137、158-180、199-204、218-233、241-264、269-3
 17、326-342、350-356 および 70-86 (配列番号 187) ; 29-35、49-59、63-84、86-97、
 103-111、113-126、130-144、150-158、174-198、221-231、250-264、266-273、291-298
 、310-318 および 70-90 (配列番号 188) ; 19-25、28-52、60-66、71-76、131-142、14 50
 9-155、157-178、181-213、218-223、237-242、250-257、260-266、272-279、282-290、3

21-330、373-385、393-407、441-453、461-475、509-521、529-542、577-589、597-610、643-655、663-677、703-718、729-734、358-464、495-570 および 604-685 (配列番号 189) ; 4-29、51-76、116-136、158-173、179-193、207-215 および 86-111 (配列番号 190) ; 5-23、45-70、79-90、93-107、114-122、142-151 および 18-36 (配列番号 191) ; 9-51、68-120、133-149、158-180、186-206、211-220、222-237、248-293、296-310、317-339 および 248-260 (配列番号 192) ; 14-24、44-63、69-98、108-119、123-136、155-161、164-176、180-193、203-208、215-223、239-247、274-281、283-289、296-304、306-313、315-327、331-341、343-353、357-386、392-405 および 205-246 (配列番号 193) ; 5-13、16-23、36-42、53-63、70-83、96-102 および 14-34 (配列番号 194) ; 4-13、19-35、49-56、59-76、83-107、121-134、144-153、157-164、166-186、194-202、209-216、231-253、257-264 および 98-134 (配列番号 195) ; 16-32、38-47、58-68、78-89、98-114、117-123、132-141、146-156、164-170、179-188、196-212、219-230、232-237、244-263、265-274、278-293、297-303、306-326、339-349、352-359、362-367、373-379、384-394、396-406、423-443、451-461、465-484、490-497、504-511、523-533、537-547、550-556、558-566、573-579、586-593、598-609、615-642、647-665、671-686、693-713、723-728 および 332-378 (配列番号 196) ; 6-21、34-44、58-64、66-74、79-87、114-127、129-143、154-162、174-189、205-214、241-262、266-273、278-297、319-324、328-338、342-351、390-398、409-415、422-435、458-464、471-477、481-486、506-531、534-540、542-550 および 315-389 (配列番号 197) ; 4-28、39-45、52-58、69-82、93-115、122-128、135-140、146-163、177-192、209-215、221-232、271-284、331-337、341-352、360-378、383-390、392-401、409-422、428-435、462-470、474-480、482-496、531-539、541-549、551-560、562-569、576-582、598-618 および 98-127 (配列番号 198) ; 14-27、33-47、61-79、94-104、119-133 および 36-60 (配列番号 199) ; 11-22、29-40、48-62、68-73、96-106、108-118、125-149 および 102-126 (配列番号 200) ; 4-11、45-55、76-83、86-102、105-112、138-144、147-153 および 20-48 (配列番号 201) ; 12-20、28-56、62-68、72-82、93-99、101-107、120-133、135-145、178-186、208-232、279-292 および 36-64 (配列番号 202) ; 6-14、23-48、65-82、92-134、140-181、188-219、228-238、244-253、255-261 および 124-145 (配列番号 203) ; 11-25、31-38、53-59、62-71、89-99、125-133、151-157、182-190、195-203、208-215、219-229、249-262、267-275、287-295、298-316、318-325、328-334、344-353、357-363、371-377、385-391、396-415、425-436、438-457、471-485、538-552、554-561、606-625、630-636、646-653、669-679、695-704、706-715、722-747、763-773 および 714-738 (配列番号 204) ; 10-29、33-45、50-60、70-79、83-95、118-124、136-157、176-184、192-205、207-216、223-234、240-246、258-268、275-283 および 37-56 (配列番号 205) ; 4-24、27-38、46-54、66-72、81-97、112-119、128-137、152-157、173-179、185-214、219-225、227-248、262-284、286-295、301-307 および 117-134 (配列番号 206) ; 26-43、49-56、60-71、74-82、87-98、110-116、131-146、154-164、169-178、183-189、205-214、241-246、255-268、275-292、305-314、316-323、326-340、346-363、397-402、419-429、440-446、452-461、467-475 および 29-66 (配列番号 207) ; 7-16、21-39、48-58、61-78、82-89、109-136、138-150、152-176、182-247、255-261、267-332、336-345、347-358、362-368、371-392、394-404、407-472、490-498、505-513、527-544、554-582、603-611、614-620、632-638 および 500-523 (配列番号 208) ; 24-46、77-83、90-97、99-118、123-166、168-177、204-212、229-239、248-262、273-282、287-293、300-319、321-337、340-352、357-366、391-402、411-428、442-450、464-471、479-489 および 19-40 (配列番号 209) ; 9-23、25-34、53-58、70-86、90-97、99-116、118-128、131-141、185-191、228-233、237-253、255-261、264-271、273-280、302-312、319-349、351-359、362-369、376-383、387-394、398-406、419-434 および 20-31 (配列番号 210) ; 15-22、37-43、71-87、105-115、121-127、135-142、152-158 および 32-52 (配列番号 211) ; 6-12、18-29、37-47、50-58、65-83、85-91、94-99、108-123、142-150、156-163、183-193、215-222、242-249、252-258、261-270、285-308、318-326 および 1-95 (配列

10

20

30

40

50

番号 212) ; 9-61、65-133、144-155、166-173、175-221、233-276、278-313、329-368
および 210-233 (配列番号 213) ; 11-29、33-39、46-51、65-93、107-113、134-143、1
47-154、166-177、181-188、214-220、233-243、263-269 および 112-128 (配列番号 21
4) ; 8-46、110-134、155-167、174-183、188-201、210-230、253-258、267-282、289-29
9、312-319、322-327、330-337、365-381、389-402、405-411、419-425、439-447、465-4
72、489-512、525-532、540-554、577-589、591-599、605-614、616-624、633-649 およ
び 503-529 (配列番号 215) ; 34-49、64-70、90-118、124-131、141-152、159-165 お
よび 112-128 (配列番号 216) ; 5-15、26-45、55-72、80-85、93-100、121-133、142-1
48、154-167、198-205、209-215、241-254、260-265、271-279 および 244-270 (配列番
号 217) ; 4-36、38-54、67-83、122-153、159-178、205-212、232-242、244-253、259-2 10
68、281-288、298-309、324-331、334-370、372-381、389-401、403-429、441-450、456-
462、465-471、473-479、483-504、508-518、537-543、553-565、578-584、592-609、619
-625、658-667、669-679、712-719、722-729、737-744、746-752、758-765 および 180-2
26 (配列番号 218)
; 6-17、23-32、49-56、61-67、76-83、85-103、105-111、120-132、145-171、175-185、
191-225、231-246 および 99-128 (配列番号 219) ; 4-24、28-48、52-58、64-79、87-1
00、104-120、136-152、159-166 および 150-163 (配列番号 220) ; 15-27、65-71、77-
99、104-121、128-154、183-216、223-229、234-255、277-287、296-308 および 77-97
(配列番号 221) ; 8-18、44-76、102-109 および 49-57 (配列番号 222) ; 5-14、28-4 20
0、42-51、54-60、77-83、89-100、117-124、146-172、176-204、216-231、237-244、267
-278、324-334、342-348、396-401、427-433、438-450、452-457、465-471、473-481、49
1-500、509-515、523-544、550-556、558-569、589-595、606-618、625-632、640-649、6
65-671、678-688、691-698、717-723、728-734、781-789、800-805、812-821、833-868、
873-879、889-905、929-939、988-998、1046-1061、1073-1079、1089-1096、1115-1124、
1132-1140、1172-1196、1220-1226、1231-1249、1269-1277、1287-1301、1307-1330、135
0-1361、1369-1378、1387-1412、1414-1420、1422-1439、1484-1491、1513-1529、1552-1
561、1576-1583、1606-1613、1617-1640、1647-1654、1665-1679、1686-1698、1709-1727
、1736-1743、1750-1757、1771-1790、1801-1807、1817-1823、1831-1842、1859-1868、1
870-1882、1884-1891、1900-1906、1909-1914、1929-1935、1952-1960、1974-1988、2002
-2011、2032-2063、2071-2081、2116-2124、2139-2147、2149-2159、2163-2190、2209-22 30
15、2245-2253、2282-2287、2331-2342、2360-2370、2379-2393、2402-2408、2414-2421
、2423-2430、2433-2439、2442-2450、2472-2478、2485-2493、2495-2503、2506-2512、2
547-2554、2558-2564、2615-2625、2637-2652、2692-2698、2700-2706、2711-2723、2731
-2740、2748-2753、2756-2762、2765-2772、2781-2798、2810-2824、2844-2852、2885-28
99、2912-2922、2937-2944、2947-2970、2988-2998、3016-3025、3032-3037、3062-3071
、3129-3148、3156-3161 および 530-607 (配列番号 223) ; 31-36、57-62、79-85、90-
96、99-112、120-146、162-185、193-203、208-217、219-226、239-253、283-290、298-3
04、306-321、340-349、351-361、365-372、386-395、407-438、473-486、537-551、558-
568、576-594、598-604 および 75-95 (配列番号 224) ; 14-19、24-30、34-42、45-52 40
、54-64、66-82、95-105、107-118、126-163、171-177、184-201、210-215、260-269、27
3-279、288-304、321-327、358-364、370-375、380-387、394-404、407-413、421-431、4
36-451、465-474、504-511、531-552、578-587、614-626、629-636、638-671、691-715、
719-729、733-745、752-759、768-777、785-792、794-802、805-824、844-854、867-880
、885-891、893-902、907-924、939-948、955-964、966-975、987-1000、1012-1017、102
3-1028、1050-1071、1083-1098、1102-1115、1133-1146、1170-1183、1204-1211、1213-1
223、1262-1311、1313-1319、1346-1355、1366-1371、1383-1405、1409-1414 および 776
-819 (配列番号 225) ; 12-27、30-38、54-61、64-74、82-96、103-110、117-125、134-
140、147-158、185-201、218-225、232-253、265-280、319-325、350-362、366-372、376
-386、464-483、485-490、511-521、531-537、542-559、564-574、593-609、613-619、63
7-642、668-677 および 195-214 (配列番号 226) ; 4-21、59-67、73-79、84-91、141-1 50

51、186-197、203-214、222-227、237-245、255-260、281-292、294-311、336-344、346-355、422-437、459-466、484-491 および 77-109 (配列番号 227) ; 10-45、52-61、63-70、74-102、112-122、124-132、164-178、181-205、212-240、246-256 および 226-247 (配列番号 228) ; 38-50、53-63、78-87、89-111、126-152、169-176、179-186、193-228、254-267、275-282、288-304、309-318、325-341、346-353、358-367、384-395、404-427、429-435、456-465、467-501、510-521、523-536、541-548、552-560、563-584、589-595、597-620、625-637、639-645、661-666、712-729、734-741、743-750、775-806、809-816、818-840、842-850 および 693-714 (配列番号 229) ; 5-17、30-37、52-75、77-86、88-107、112-135、151-160、178-222、226-246、263-270、279-294、306-314、327-342、345-352、374-381、389-416、422-429、435-449、453-467、473-500、512-522、524-531、542-549、552-560、565-571、575-586、594-600、613-619、625-633、635-641、647-653、667-674、680-699、711-729、735-741、764-775、781-786、792-798、805-813、817-825、833-842、850-855、860-866、869-910、917-930、949-990 および 533-562 (配列番号 230) ; 7-14、39-46、61-74、83-89、93-99、110-121、136-150、172-180、182-200、207-216、223-236、238-251、265-271、280-288、294-309、320-336、339-354、362-377、383-389、401-407、435-441、446-453、460-465、472-487、499-511、518-528、533-540、557-570、572-587、631-637、643-658、663-669、672-678、681-687、695-706、714-728 および 118-139 (配列番号 231) ; 5-19、24-30、56-64、69-79、93-100、102-111、117-123、125-133、174-182、185-199、205-224、268-275、311-336 および 102-125 (配列番号 232) ; 6-35、39-45、57-62、80-85、92-106、117-122、126-171、214-223、253-260、268-273、285-291、295-306、315-320、325-336、361-366 および 172-202 (配列番号 233) ; 4-13、24-37、45-51、58-66、84-92、112-121、132-141、151-171、175-195、204-212、222-240、262-268、276-295、305-336、338-348、354-362 および 160-183 (配列番号 234) ; 10-16、24-35、41-73、78-104、111-121、124-139、141-148、150-164、196-215、224-241、249-282、299-307、315-357、368-378、393-401 および 345-367 (配列番号 235) ; 4-32、48-53、61-67、84-104、112-118 および 106-130 (配列番号 236) ; 21-28、31-36、65-81、98-105、115-121、123-131、136-142、155-161、177-190 および 201-232 (配列番号 237) ; 4-15、21-27、33-39、42-56、58-64、68-82、84-90、92-98、113-122、146-162、168-175、177-189、191-203、249-268、279-285、287-304、328-342、349-358、371-378、387-393、404-413、419-425、467-479、487-498、513-524、528-539、541-565、572-579、595-606、626-635、637-642 および 612-626 (配列番号 238) ; 7-13、52-70、76-82、97-106、110-117 および 13-45 (配列番号 239) ; 5-10、12-48、59-64、87-102、107-128、131-140、154-161、165-171、173-215 および 54-74 (配列番号 240) ; 4-11、19-28、34-40、74-81、87-98、126-147、163-171、184-193、205-213 および 49-124 (配列番号 241) ; 7-14、23-29、35-40、61-67、99-106、111-122、124-133、135-161、187-206、216-229、236-245、262-268、271-280 および 256-273 (配列番号 242) ; 4-13、17-37、47-54、85-99、105-113、120-132、147-166、180-186、192-199、204-216 および 127-144 (配列番号 243) ; 14-27、29-37、52-62、68-76、89-96、117-123、125-131、137-145、166-195、205-212、214-222、228-235、258-264、271-281、288-296、308-324、332-339、355-361、365-371 および 268-293 (配列番号 244) ; 4-21、30-42、54-60、78-85、90-110、141-147、160-168、176-185、194-206、218-225、230-245、251-261、287-293、295-304、320-326、334-347、351-362、386-402、413-423、427-433、439-453、456-477、480-493、507-513、526-539、574-581、591-598、600-609、614-632、655-665、685-691、703-712、742-747、757-775、797-803、813-819、823-829、880-887、901-906、930-944、948-958、962-968、971-995、1002-1009、1017-1023、1036-1053、1069-1081、1107-1124、1129-1152、1178-1195、1211-1223、1249-1266、1271-1288、1334-1340、1346-1367、1-63 および 171-189 (配列番号 245) ; 4-22、52-63、70-75、94-104、112-125、133-141、176-199、209-216、244-259、287-299、336-352、366-372、386-399、421-436、444-449、457-466、481-487、506-529、531-540 および 295-378 (配列番号 246) ; 9-30、43-49、58-75、86-96、119-131、138-147、162-

167、181-201、208-214 および 16-121 (配列番号 247); 4-27、52-58、80-90、92-100、108-114、118-143、169-176、189-198、247-261、281-287、307-317、323-329、352-363、372-381、396-411、413-426、429-440、442-450、456-461、468-479 および 1-73 (配列番号 248); 4-32、47-52、57-63、71-78、92-104、126-142、153-175 および 145-163 (配列番号 249); 17-23、35-41、51-70、73-86、104-125 および 105-129 (配列番号 250); 25-32、41-50、75-85、87-103、115-122、138-149、164-171、188-210、212-220、224-234、256-273、288-299、304-310、330-336、357-365、382-390、399-405、414-421、440-446、454-461、480-486、502-514、518-540、543-553、561-567、572-580、582-588、595-630、633-651、672-681、691-709、760-767、813-832、841-848、852-866、873-893、919-925、927-933、940-955、957-978、984-997、1000-1010、1035-1040、1044-1051、1058-1064、1081-1091、1097-1124、1129-1138、1144-1150、1158-1165、1170-1180、909-936 および 1001-1031 (配列番号 251); 4-12、19-26、31-41、49-64、66-86、101-117、119-127、134-142、152-161、163-172、179-188、209-218、234-241、276-291、294-300、307-320、324-341、346-356、373-387、389-397、410-416、418-436、444-454、460-472、481-486、500-507、511-535、541-549、553-559、579-586、602-607、613-620、628-640、654-663、671-678、681-691、709-722、741-754、766-774、778-786、797-803 および 212-226 (配列番号 252); 4-10、15-27、34-54、60-73、79-88、101-115、120-136、154-162、167-172、222-240 および 126-195 (配列番号 253); 5-16、18-25、29-35、57-63、86-91、107-121、123-131、170-179、185-199、204-226、250-255、262-274、291-296、325-347 および 1-38 (配列番号 254); 7-19、22-34、36-42、48-54、60-66、71-76、104-110、118-133、135-145、158-164、167-174、182-193、196-204、217-229、251-290、293-299、309-315 および 288-318 (配列番号 255); 43-51、55-61、66-73、80-90、103-127、133-142、174-180、185-196、203-210、229-235、239-251、258-266、272-278、289-314、316-326、340-346、355-361 および 14-27 (配列番号 256); 4-25、27-33、35-41、52-74、76-89、99-124、138-144、146-159、167-182、184-191、193-206、211-223、232-240、249-257、270-279、281-287、293-310、322-341、347-356 および 292-322 (配列番号 257); 5-13、28-38、43-60、67-72、98-116、122-134、137-151、167-174、177-195、197-216 および 99-195 (配列番号 258); 15-33、35-42、48-57、62-68、73-91、107-119、121-153、173-194、205-210、223-228、234-241、243-259、275-298、308-315、327-340、342-370、376-391、398-404、410-419 および 71-122 (配列番号 259); 12-39、43-64、87-95、99-105、114-126、128-136、139-147、212-225 および 107-141 (配列番号 260); 6-33、40-45、60-75、79-86、121-129、131-137、161-167、172-178、186-195、203-212、236-244、257-264、278-294、306-312、345-358、368-381、386-395、404-410、412-418 および 198-270 (配列番号 261); 18-31、34-41、50-56、69-83、99-106、129-141、147-153、159-168、170-178、190-198、200-212、221-232、237-255、261-266、274-292 および 118-216 (配列番号 262); 17-47、61-67、87-93、115-121、126-132、140-148、167-173、179-186、214-223、250-255、264-272、282-294、306-318、338-353、358-377、385-401、414-420、433-441、451-457、470-480、505-511、544-550、571-581、600-607、612-618、631-648、655-662、669-681、693-714、721-726、733-740、757-778、813-823、831-838、851-857、866-876、893-905、912-917、930-936、951-963、971-981、1008-1019、1021-1033、1035-1041、1054-1064、1066-1076、1097-1110、1113-1121、1126-1140、1159-1171、1182-1195、1197-1203、1216-1222、1231-1240、1243-126

2、1268-1287 および 738-828 (配列番号 263); 19-28、40-46、51-57、68-74、81-87、98-108、111-121 および 20-36 (配列番号 264); 4-17、19-44、60-69、80-86、110-116 および 33-60 (配列番号 265); 8-16、18-28、42-50、53-75、79-86、94-99、122-128、136-142、149-163、166-173、198-212、254-272、288-295、304-318、324-329、343-348、351-364、367-383、389-395、411-420、427-436 および 11-56 (配列番号 266); 19-25 および 6-24 (配列番号 267); 6-39、59-68 および 44-63 (配列番号 268); 5-14、21-28、38-53 および 29-41 (配列番号 269); 4-13、31-41、56-65 および 32-5

6 (配列番号 270); 5-12 および 4-21 (配列番号 271); 4-18 および 17-32 (配列番号 272); 4-10、23-33 および 14-30 (配列番号 273); 26-34、44-53 および 35-52 (配列番号 274); 1-19 (配列番号 275); 4-17、23-30、32-37 および 6-23 (配列番号 276); 5-33、40-58、61-66 および 45-66 (配列番号 277); 15-41、61-67 および 41-65 (配列番号 278); 4-12、16-23、26-37 および 10-29 (配列番号 279); 23-39 および 37-55 (配列番号 280); 12-20 および 38-55 (配列番号 281); 22-37 および 7-22 (配列番号 282); 3-14 (配列番号 283); 6-16、43-65、71-76 および 17-31 (配列番号 284); 4-13、27-39、42-69 および 17-32 (配列番号 285); 4-12、26-39 および 10-25 (配列番号 286); 2-31 (配列番号 287); 6-38、49-62 および 39-55 (配列番号 288); 4-10、24-30 および 2-19 (配列番号 289); 12-17、25-46 および 15-30 (配列番号 290); 4-13 および 2-28 (配列番号 291); 30-38 および 17-45 (配列番号 292); 24-33、55-61 および 31-61 (配列番号 293); 4-26、34-48 および 15-33 (配列番号 294); 9-15 および 1-22 (配列番号 295); 4-31 および 14-33 (配列番号 296); 5-34、49-55、64-82 および 69-83 (配列番号 297); 33-45 および 21-39 (配列番号 298); 7-14、24-32、42-65、79-86 および 50-64 (配列番号 299); 13-27、33-43、45-62 および 12-37 (配列番号 300); 4-15、17-32 および 10-26 (配列番号 301); 4-9、11-43、45-75 および 47-69 (配列番号 302); 4-18、22-37 および 17-34 (配列番号 303); 4-14 および 5-24 (配列番号 304); 7-33、35-46 および 1-19 (配列番号 305); 13-37、69-75 および 51-69 (配列番号 306); 14-24、26-34、37-49、66-78 および 2-25 (配列番号 307); 17-46、52-57、59-64 および 54-68 (配列番号 308); 4-22 および 13-25 (配列番号 309); 8-40、53-63 および 29-50 (配列番号 310); 16-28 および 32-40 (配列番号 311); 14-20、22-28、39-45 および 2-22 (配列番号 312); 4-13 および 12-31 (配列番号 313); 15-21 および 2-17 (配列番号 314); 4-17 および 20-36 (配列番号 315); 4-19 および 9-18 (配列番号 316); 4-14 および 3-19 (配列番号 317); 4-21、32-40 および 21-39 (配列番号 318); 4-13 および 10-27 (配列番号 319); 18-31、39-47、75-87、89-98 および 79-99 (配列番号 320); 15-21 および 9-24 (配列番号 321); 4-14、18-27、30-53、55-64、68-74、81-98 および 22-40 (配列番号 322); 7-24、44-51 および 35-60 (配列番号 323); 10-47 および 23-37 (配列番号 324); 4-10、12-46 および 7-22 (配列番号 325); 20-27 および 1-13 (配列番号 326); 6-19、41-51 および 9-37 (配列番号 327); 4-9、11-17 および 9-23 (配列番号 328); 4-17、23-38、46-66、68-85 および 34-46 (配列番号 329); 4-18、34-59、75-81 および 61-84 (配列番号 330); 6-17 および 7-28 (配列番号 331); 4-32、56-61 および 35-52 (配列番号 332); 4-14、27-71、74-88、93-110、115-120、124-130、139-154、161-172 および 146-171 (配列番号 333); 4-21 および 3-15 (配列番号 334); 12-17 および 9-26 (配列番号 335); 10-21、45-58 および 51-67 (配列番号 336); 59-66、68-84 および 13-42 (配列番号 337); 11-16 および 1-16 (配列番号 338); 4-19、23-37 および 10-30 (配列番号 339); 19-27、35-46、48-66、82-88、99-105、113-119 および 42-59 (配列番号 340); 135-147 (配列番号 171); 658-682 (配列番号 172); 411-427 および 122-6-1246 (配列番号 173); 794-817 および 801-824 (配列番号 174); 468-492 および 474-495 (配列番号 177); 366-388 (配列番号 178); 266-291、287-312 および 308-333 (配列番号 179); 197-213 および 195-211 (配列番号 180); 252-275、262-285 および 812-830 (配列番号 181); 94-112、97-120 および 104-128 (配列番号 182); 257-281 (配列番号 183); 106-134 (配列番号 184); 70-86 (配列番号 187); 35-8-383、378-402、397-421、499-524、520-545、541-566、622-646、641-665 および 660-684 (配列番号 189); 248-260 (配列番号 192); 15-34 (配列番号 194); 112-129 (配列番号 195); 333-358 および 353-378 (配列番号 196); 316-343、339-366 および 362-389 (配列番号 197); 98-123 および 104-126 (配列番号 198); 20-43 および 23-48 (配列番号 201); 124-145 (配列番号 203); 717-738 (配列番号 204); 3-7-56 (配列番号 205); 118-134 (配列番号 206); 500-522 (配列番号 208); 32-47

10

20

30

40

50

(配列番号 211) ; 25-51、47-73 および 69-95 (配列番号 212) ; 503-529 (配列番号 215) ; 112-128 (配列番号 216) ; 181-199 (配列番号 218) ; 109-121 (配列番号 219) ; 150-163 (配列番号 220) ; 77-97 (配列番号 221) ; 564-586 (配列番号 223) ; 75-94 (配列番号 224) ; 776-798、784-808 および 794-815 (配列番号 225) ; 196-212、78-100 および 85-107 (配列番号 226) ; 536-553 (配列番号 230) ; 102-125 (配列番号 232) ; 178-198 (配列番号 233) ; 612-626 (配列番号 238) ; 171-187 (配列番号 245) ; 296-320、315-339、334-358 および 353-377 (配列番号 246) ; 47-71 (配列番号 247) ; 1-25、20-45 および 40-64 (配列番号 248) ; 146-161 (配列番号 249) ; 910-935 および 1007-1030 (配列番号 251) ; 212-226 (配列番号 252) ; 126-152、148-173 および 169-195 (配列番号 253) ; 288-310 および 293-316 (配列番号 255) ; 293-312 (配列番号 257) ; 154-170 (配列番号 258) ; 72-95、90-112 および 97-121 (配列番号 259) ; 135-150 および 146-163 (配列番号 262) ; 799-827 (配列番号 263) ; 23-43 および 33-53 (配列番号 266) ; 44-62 (配列番号 268) ; 6-22 (配列番号 276) ; 37-54 (配列番号 280) ; 40-54 (配列番号 281) ; 7-21 (配列番号 282) ; 4-11、16-34、48-55、67-77、87-106 および 153-183 (配列番号 425) ; 22-40、49-65、70-91、95-109、111-125、146-207、209-216、219-225、229-244、251-270、274-286、292-309、316-329、335-355、358-370、376-388、392-419、425-430、435-441、448-455、464-478、486-515 および 437-465 (配列番号 426) ; 5-19、25-31、43-48、60-79、88-100、105-129、148-171、187-193、243-263、316-322、334-340、345-351、369-378、381-391、399-404、474-483、502-517、525-530、558-568、579-596、622-627、631-638、644-651、653-660、674-680、687-693、721-728、743-753、760-775、788-795、806-813、821-828、835-842、847-859、868-887 および 300-347 (配列番号 427) ; 5-26、37-44、89-97、112-118、121-128、138-154、157-165、176-181、188-198、205-218、223-243、247-253、260-279 および 76-155 (配列番号 428) ; 4-29、41-46、49-68、82-88、121-147、158-164、187-193、195-208、229-236、244-249、251-263、269-275、307-313、337-343、348-381、392-398、402-408、432-438、85-117 および 194-239 (配列番号 429) ; 5-12、14-22、28-34、40-46、70-79、84-129、152-165、174-182 および 37-109 (配列番号 430) ; 5-16、18-52、54-72、81-86、118-126、136-145、151-157、168-180、209-233、244-270、295-302、315-326、329-337、345-352、364-373、397-402、408-418、424-431、435-443、472-480、483-489、504-510、519-527、549-564、576-599、605-637、641-673 および 91-98 (配列番号 431) ; 23-36、42-52、133-140、151-157、242-247、267-277、295-301、320-328、333-339、345-352、365-371、397-403、415-428、456-465、481-487、489-495、508-516、518-527、585-592、606-614、631-637、643-658、665-670、723-728、737-744、752-759、787-793、835-841、873-885、918-928、938-945、951-966、978-988、1015-1020、1030-1036、1044-1052、1058-1069、1071-1079、1081-1088、1113-1119、1125-1138、1141-1147、1164-1170、1172-1177、1190-1200、1214-1220、1230-1236、1239-1245、1262-1268、1270-1275、1288-1298、1312-1318、1328-1334、1337-1343、1360-1366、1368-1373、1386-1396、1410-1416、1426-1432、1435-1441、1458-1464、1466-1471、1484-1494、1508-1514、1524-1530、1533-1539、1556-1562 および 307-340 (配列番号 432) ; 19-25、35-41、44-50、66-72、74-79、92-102、116-122、132-138、141-147、164-170、172-177、190-200、214-220、230-236、239-245、262-268、270-275、288-298、312-318、328-334、337-343、360-366、368-373、386-396、410-416、426-432、435-441、458-464、466-478、504-524、79-148、177-246、275-344 および 373-442 (配列番号 433) ; 7-14、16-23、33-39、46-53、72-79、92-115、123-130、156-175、179-187、214-220、239-246、266-274、302-325、338-354、360-370、375-390、392-401、421-428、430-463 および 29-58 (配列番号 434) ; 4-9、22-39、58-65、72-82、87-92、99-104、107-119、143-166、171-177、194-202、205-213、220-228、231-240、247-263、309-315、317-323、336-343 および 294-320 (配列番号 435) ; 4-10、12-18、24-29、34-43、50-65、70-76、111-117、129-138、152-159、166-171、184-195、200-210、224-236、241-251、274-283、285-296、313-319、332-341、348-355、378-386、41

10

20

30

40

50

0-416、433-445、475-482、523-529、531-540、584-596、626-633、674-680、682-688、738-750、780-787、828-834、836-842、853-862、882-887、893-912 および 604-676 (配列番号 436) ; 15-38、49-57、60-99、103-119、124-194、200-206、215-249、251-291、307-313、315-347、369-378、383-390、393-400、405-411、423-435、440-447、454-460、470-486、490-503、532-539、542-549、551-567、579-592 および 509-583 (配列番号 437) ; 38-44、47-88、95-103、157-172、235-240、250-260、263-276、294-300、312-317、331-337、369-391、412-419、442-448、453-463、490-529、537-555、571-580、600-617、619-627、642-648、682-687、693-700、716-722、738-748、756-763、779-789、796-802、820-828、833-840、846-853、862-872、880-887、894-899、924-937、957-963、1006-1012、1043-1049、1063-1069、1076-1097 および 124-147 (配列番号 438) ; 4-28、31-49、60-71、75-102、104-114、134-144、160-184、250-257、277-285、287-294、330-338、345-351、367-374、381-388、393-399、402-407、420-426、443-448、458-464、411-436 および 454-488 (配列番号 439) ; 20-27、45-55、57-64、66-77、98-106、130-137、155-165、167-174、176-187、194-203、208-223、227-238、245-251、257-270、273-278、287-299、330-345、352-358、363-385、392-399、410-417、437-443、467-484、486-492、495-500、504-516、526-536 および 219-270 (配列番号 440) ; 11-22、24-31、46-63、65-71、73-88、95-109、174-181、183-201、204-212、216-222、228-233、241-247 および 142-221 (配列番号 441) ; 8-28、51-59、67-84、93-98、140-152、154-162、183-188 および 91-125 (配列番号 442) ; 10-22、27-61 および 69-100 (配列番号 443) ; 7-15、18-26、94-100、126-131、152-165、219-228、254-263、274-292、297-308、33-340、342-352、354-371、373-379、403-410、420-438、450-456、463-470、489-495、503-512 および 97-173 (配列番号 444) ; 4-21、37-43、49-65、67-74、76-90、113-119、131-141、155-173、175-189、192-199、207-221、247-254、266-276、317-322、337-343、387-393、408-428、439-448、451-460、469-479、482-487、493-501、517-523、533-542 および 480-503 (配列番号 445) ; 11-26、40-46、78-86、93-103、121-126、132-138、166-177、183-196、203-212、214-221、228-263、304-311、323-338、345-351、357-363、379-393、420-434、442-448、518-527、547-553、581-591、602-609、637-645、665-674、687-692、701-708、730-739、796-802、844-857、882-888、903-914、944-950、976-983、1027-1033、1049-1057、1066-1072、1085-1092、1120-1127、1137-1144、1153-1158、1165-1176、1181-1187、1221-1230、1238-1244、1269-1274 および 605-632 (配列番号 446) ; 6-47、57-65、83-95、109-121、138-147、154-164、167-177、194-200、202-212、227-234、240-253、260-267、283-291、320-329、340-347、356-364、412-422、430-436、441-459、465-475、478-486、498-507 および 59-84 (配列番号 447) ; 10-21、58-83、88-97、120-126 および 21-51 (配列番号 448) ; 5-39、56-62、76-88、90-114、138-162、170-195、202-221、228-250、264-270、304-355、374-387、391-416、462-471、526-546、554-561、574-579、639-645、651-660、674-682、689-694 および 666-697 (配列番号 449) ; 6-30、36-42、143-157、176-197、202-209、216-233、241-246、275-287、292-299、315-325、343-350、375-380、397-403、411-420、422-434、441-448、467-474、477-499、555-568、591-597、601-609、623-644、667-688、692-698、703-718、736-747、757-766、782-791、795-801、832-840、859-865 および 226-269 (配列番号 450) ; 6-23、43-51、61-67、73-82、91-97、123-130、149-158、164-175、228-234、240-246、248-255、262-272、326-332、340-347、365-371、377-388、409-419、425-431、438-445、449-457、464-470、496-507、559-568、575-581、603-608、617-623、633-639、648-654、659-670、695-701、734-752、806-814、816-829、861-868、891-899、904-909、937-945、947-960、978-983、992-999、1022-1031、1068-1076、1078-1091、1109-1114、1123-1130、1153-1162、1199-1207、1209-1222、1254-1261、1284-1293、1330-1338、1340-1353、1371-1376、1385-1392、1415-1421、1433-1438、1460-1465、1470-1492 および 1422-1458 (配列番号 451) ; 82-94、111-118、125-131、206-212、261-266、310-320、328-338、345-351、353-360、414-420、424-434、440-447、451-500、506-516、548-561、566-572、584-591、601-622、630

-636、650-659、661-667、674-699、703-711、717-729、736-744、752-759、765-771、813-822、826-842、852-868、870-877、881-895、897-906、913-922 および 602-671 (配列番号 452) ; 12-18、20-25、43-54、56-65、73-79、82-88、99-111、136-142、153-169、171-183、195-223、229-248、255-260、272-277、281-292、298-319、322-329、332-351、363-379、381-389 および 275-304 (配列番号 453) ; 4-9、34-48、65-77、101-106、111-131、138-153、186-191、230-250 および 148-219 (配列番号 454) ; 4-23、30-35、42-53、67-76、82-87、101-108、112-130、132-138、147-152、161-183、187-208、218-225、265-283、295-303、306-317、322-334、338-357、360-368、370-383、387-398、400-419、421-430、104-182 および 240-304 (配列番号 455) ; 4-12、63-69、94-102、146-164、166-173、175-181、193-207、263-281、286-295、301-306、330-343、369-378、382-388、414-420、422-430、438-454、456-462、472-531、543-560、581-591、596-605、614-623、626-635、656-662、669-676、683-690、693-698、705-711、728-736、752-764 および 69-102 (配列番号 456) ; 6-12、43-53、141-147、164-179、185-195、197-206、227-235、237-271、288-305、308-317、335-341、351-357、365-376、386-395、397-416、422-447 および 11-35 (配列番号 457) ; 16-24、50-65、73-84、88-99、114-124、130-146、181-187、193-203、214-220、236-247、250-258、287-297 および 50-113 (配列番号 458) ; 4-25、50-55、76-82、117-123、131-137、139-148、157-166、239-245、253-258、266-275、277-292、300-306、51-83 および 93-161 (配列番号 459) ; 6-22、34-43、51-86、93-100、110-116、150-161、164-171、180-187、197-218 および 168-237 (配列番号 460) ; 4-27、55-60、74-82 および 10-46 (配列番号 461) ; 6-19、25-31、43-49、60-79、88-100、105-129、148-161、164-171、187-193、243-263、316-322、334-340、369-378、381-391、398-404、460-466、474-483、502-509、511-517、525-530、558-567、579-596、622-627、631-638、641-651、653-659、674-680、687-693、710-716、720-727、743-753、760-775、788-795、806-813、821-828、836-842、847-860、865-880 および 258-377 (配列番号 462) ; 4-11、25-64、71-79、88-94、107-120、123-132、167-188、231-237、240-246、261-267、306-311、330-342、351-358、389-395、406-418、429-434、439-448、483-501、511-520 および 71-143 (配列番号 463) ; 4-18、22-27、53-64、94-100、121-127、133-139、155-164、177-182、187-196、206-218、224-242、248-253、258-277 および 184-253 (配列番号 464) ; 10-17、56-67、72-82、94-99、106-113、166-173、229-235、243-283、295-301、313-321、326-331、342-348、396-414、423-435、446-452、454-462、496-502、511-534、543-556、563-570、586-593、616-626、638-645、653-662、679-696、731-737、766-774、776-782、790-796、810-817、825-835、837-846 および 540-615 (配列番号 465) ; 13-24、30-36、73-81、89-95、109-115、117-143、161-173、179-189、226-244、251-261、275-281、298-305、307-315、323-328、364-374、69-186 および 264-354 (配列番号 466) ; 19-25 および 6-22 (配列番号 467) ; 6-39、59-68 および 43-62 (配列番号 468) ; 6-14、22-32 および 1-27 (配列番号 469) ; 4-41 および 28-40 (配列番号 470) ; 8-14 および 4-19 (配列番号 471) ; 4-10、12-22、30-35 および 6-33 (配列番号 472) ; 4-16、24-33 および 37-54 (配列番号 473) ; 2-23 (配列番号 474) ; 4-21、27-33、36-41 および 14-34 (配列番号 475) ; 4-14、24-30、37-42、57-78、83-89、94-103、113-131 および 100-122 (配列番号 476) 。

【 0 0 4 5 】

本発明はまた、好適な発現系において本発明による 1 以上の核酸分子を発現させることを含む本発明による大便連鎖球菌過免疫血清反応性抗原またはその断片の産生方法も提供する。

【 0 0 4 6 】

さらに、本発明は、本発明によるベクターによって好適な宿主細胞を形質転換または形質移入することを含む、本発明による大便連鎖球菌過免疫血清反応性抗原またはその断片を発現する細胞の生産方法を提供する。

【 0 0 4 7 】

本発明によると、医薬組成物、特に、本発明の過免疫血清反応性抗原またはその断片または本発明の核酸分子を含むワクチンが提供される。

【0048】

好ましい態様において、医薬組成物はさらに、好ましくは以下を含む群から選択される免疫賦活物質を含む：ポリカチオン性ポリマー、特にポリカチオン性ペプチド、免疫賦活性デオキシヌクレオチド(ODN)、少なくとも2つのLysLeuLysモチーフを含むペプチド、特にKLKL5KLLK、向神経活性化合物、特にヒト成長ホルモン、ミョウバン(alumn)、フロイント完全または不完全アジュバントまたはそれらの組み合わせ。

【0049】

より好ましい態様において、免疫賦活物質は、ポリカチオン性ポリマーと免疫賦活性デオキシヌクレオチドの組み合わせまたは少なくとも2つのLysLeuLysモチーフを含むペプチドと免疫賦活性デオキシヌクレオチドの組み合わせのいずれかである。 10

【0050】

より好ましい態様において、ポリカチオン性ポリマーはポリカチオン性ペプチド、特にポリアルギニンである。

【0051】

本発明によると、本発明による核酸分子または本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片の、医薬調製物の製造、特に腸球菌感染症に対するワクチンの製造のための使用が提供される。

【0052】

また、少なくとも本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片の選択的部分に結合する抗体、または少なくともその有効な部分が提供される。 20

【0053】

好ましい態様において、抗体はモノクローナル抗体である。

【0054】

別の好ましい態様において、抗体の有効な部分はFab断片を含む。

【0055】

さらに好ましい態様において、抗体はキメラ抗体である。

【0056】

より好ましい態様において、抗体はヒト化抗体である。 30

【0057】

本発明はまた、本発明による抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を提供する。

【0058】

さらに、本発明は以下の工程によって特徴づけられる本発明による抗体の生産方法を提供する：

本発明において規定される過免疫血清反応性抗原またはその断片を非ヒト動物に投与することにより、非ヒト動物において免疫応答を開始させる工程、
抗体を含有する体液を該動物から取り出す工程、および、
該抗体を含有する体液をさらなる精製工程に供することにより抗体を生産する工程。

【0059】

したがって、本発明はまた、以下の工程によって特徴づけられる本発明による抗体の生産方法も提供する：

本発明の過免疫血清反応性抗原またはその断片を非ヒト動物に投与することによって非ヒト動物において免疫応答を開始させる工程、
該動物から脾臓または脾臓細胞を取り出す工程、
該脾臓または脾臓細胞のハイブリドーマ細胞を作る工程、
該過免疫血清反応性抗原またはその断片に特異的なハイブリドーマ細胞を選択し、クローン化する工程、

該クローン化したハイブリドーマ細胞の培養、そして所望によりさらなる精製工程により抗体を産生する工程。 40

【0060】

上記方法によって提供または生産された抗体は腸球菌感染症の治療または予防のための医薬の調製に使用されうる。

【0061】

別の態様によると本発明は、本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片に結合するアンタゴニストを提供する。

【0062】

本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片に結合することが出来るかかるアンタゴニストは以下の工程を含む方法によって同定されうる：

- a) 単離または固定化された本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片を、候補アンタゴニストと、該候補アンタゴニストと該過免疫血清反応性抗原または断片の結合を可能とする条件下で、候補アンタゴニストの該過免疫血清反応性抗原またはその断片への結合に応答した検出可能なシグナルを提供できる成分の存在下で接触させる工程；および、
- b) アンタゴニストの過免疫血清反応性抗原またはその断片への結合に応答して生じたシグナルの存在または不在を検出する工程。

【0063】

本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片とその相互作用パートナーとの相互作用活性を低減または阻害することができるアンタゴニストは以下の工程を含む方法によって同定されうる：

- a) 本発明による過免疫血清反応性抗原またはその過免疫断片を提供する工程、
- b) 該過免疫血清反応性抗原またはその断片に対する相互作用パートナー、特に本発明による抗体を提供する工程、
- c) 該過免疫血清反応性抗原またはその断片の該相互作用パートナーとの相互作用を可能にして相互作用複合体を形成させる工程、
- d) 候補アンタゴニストを提供する工程、
- e) 候補アンタゴニストと相互作用複合体との間で競合反応を起こさせる工程、
- f) 過免疫血清反応性抗原またはその断片と相互作用パートナーとの相互作用活性を候補アンタゴニストが阻害または低減するかを判定する工程。

【0064】

本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片は、該過免疫血清反応性抗原またはその断片の相互作用パートナーの単離および/または精製および/または同定のために用いることが出来る。

【0065】

本発明は、本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする核酸配列の存在または本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片の存在を判定することを含む、本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片の発現に関連する疾患をインビトロで診断する方法も提供する。

【0066】

本発明はまた、本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする核酸配列の存在または本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片の存在を分析することを含む、細菌感染症、特に腸球菌感染症をインビトロで診断する方法も提供する。

【0067】

さらに、本発明は該過免疫血清反応性抗原またはその断片に対して結合するペプチドを作るための本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片の使用を提供し、ここで該ペプチドはアンチカリン(anticaline)である。

【0068】

本発明はまた、本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片の、機能的核酸の製造のための使用を提供し、ここで該機能的核酸は、アプタマーおよびスピーゲルマー(spiegelmer)を含む群から選択される。

【0069】

本発明による核酸分子はまた、機能的リボ核酸の製造のためにも使用することができ、ここで該機能的リボ核酸はリボザイム、アンチセンス核酸およびsiRNAを含む群から選択される。

【0070】

本発明は、多数のヒト血漿プールからの抗体の調製物および大便連鎖球菌のゲノム由来の表面発現ライブラリーを用いて大便連鎖球菌から同定された有効かつ関連する網羅的セットの単離核酸分子およびそれらにコードされる過免疫血清反応性抗原またはその断片を有利なことに提供する。したがって、本発明は大便連鎖球菌抗原、ワクチン、診断および抗体の調製および腸球菌感染症に対して有効な化合物の同定の手順において有用な産物に対する広く感じられていた要求を満たすものである。

【0071】

有効なワクチンは、すべての株によって発現され、大便連鎖球菌の細胞表面成分に対する高親和性の豊富な抗体を誘導することが出来るタンパク質またはポリペプチドから構成されるべきである。抗体はオプソニン作用のためにはIgG1 および/または IgG3であるべきであり、付着および毒素作用の中和のためにはいずれかのIgG サブタイプおよびIgAであるべきである。化学的に規定されたワクチンは、全細胞ワクチン(弱毒化または死滅化)と比較して明確に優れていなければならない。というのはヒト組織と交差反応するかオプソニン作用を阻害する大便連鎖球菌の成分が排除でき(Whitnack, E et Al, 1985)、保護抗体および/または保護免疫応答を誘導する個々のタンパク質を選択できるからである。

【0072】

本発明に用いられたアプローチは、腸球菌タンパク質またはペプチドとヒト血清に存在する抗体との相互作用に基づく。ヒト免疫系によって大便連鎖球菌に対して産生され、ヒト血清中に存在する抗体は、抗原性タンパク質のインピボでの発現およびその免疫原性を示す。さらに、あらかじめ選択された血清のプールを用いて細菌表面ディスプレイ発現ライブラリーによって同定された抗原性タンパク質は、個々の選択または生成された血清による第二および第三ラウンドのスクリーニングによって加工される。したがって本発明は、医薬組成物、特に大便連鎖球菌による感染症の予防用ワクチンとしての有効かつ関連する網羅的セットの腸球菌抗原を供給する。

【0073】

本発明による網羅的なセットの抗原を同定するための抗原同定プログラムにおいて、少なくとも2種類の細菌表面発現ライブラリーは、いくつかの血清プールまたは血漿画分またはその他のプールされた抗体を含有する体液(抗体プール)によってスクリーニングされる。抗体プールは、大便連鎖球菌の抗原性化合物、例えば全細胞抽出物および培養上清タンパク質に対して試験された血清収集物由来である。好ましくは、2種類の血清収集物を用いる: 1.非常に安定な抗体レパートリーを備えたもの:通常の成人であって、臨床的に健康なヒトであって、大便連鎖球菌の保因者ではなく以前に大便連鎖球菌に遭遇して克服したもの、または現在大便連鎖球菌の保因者であって急性の疾患および症状を有さないもの、2.病原性微生物の存在によって急性に誘導された抗体を備えたもの:様々な徴候を有する急性疾患の患者(例えば、大便連鎖球菌 心内膜炎、尿路感染症および菌血症)。血清は過免疫であると考えられるためには複数の腸球菌-特異的抗原と反応する必要があり、それゆえ本発明に適用するスクリーニング方法に適切である。ヒト免疫系によって腸球菌に対して作成されヒト血清中存在する抗体は、抗原性タンパク質のインピボでの発現およびその免疫原性を示す。

【0074】

本発明に用いられる発現ライブラリーはすべての可能性のある抗原の発現を可能とするもの、例えば大便連鎖球菌のすべての表面タンパク質に由来するものでなければならない。細菌表面ディスプレイライブラリーは、細菌宿主膜における多数の選択された外膜タンパク質(LamB、BtuB、FhuA)上に腸球菌の(すべての)セットの発現するペプチド配列をディスプレイする細菌宿主の組換えライブラリーによって表される{Georgiou, G., 1997; Etz, H. et al., 2001}。組換え発現ライブラリーを用いる利点の一つは、同定された過

10

20

30

40

50

免疫血清反応性抗原を、さらなる組換えDNA技術またはクローニング工程を必要とせずに、過免疫血清反応性抗原を発現するスクリーニングおよび選択されたクローンのコード配列の発現によってすぐに産生できることである。

【0075】

本発明による上記のプログラムによって同定された網羅的なセットの抗原をさらに1以上のさらなるラウンドのスクリーニングによって分析する。それゆえ、免疫原性であると同定された選択されたペプチドに対して作られた個体の抗体調製物または抗体が用いられる。好ましい態様によると第二ラウンドのスクリーニングのための個体の抗体調製物は、腸球菌による急性感染症を患ったことのある患者、特に一定の最低レベルを超える抗体力価を示す患者、例えば抗体力価が試験したヒト(患者または健康個体)血清の80パーセント、好ましくは90パーセント、特に95パーセントを超える患者に由来する。かかる高力価の個体の抗体調製物を第二スクリーニングラウンドに用いることにより、大便連鎖球菌からの過免疫血清反応性抗原およびその断片の非常に選択性の高い同定が可能となる。

10

【0076】

網羅的なスクリーニング手順の後、組換えタンパク質として、またはインビトロ翻訳産物として発現した選択された抗原性タンパク質(原核発現系で発現出来ない場合)、または同定された抗原性ペプチド(合成により作られたもの)を、一連のELISAおよびウェスタンブロッティングアッセイによる第二スクリーニングにて試験し、大きなヒト血清収集体(>100健康血清、>50患者血清)を用いてその免疫原性を評価する。

20

【0077】

個体の抗体調製物(選択された血清でもよい)は、第一ラウンドからのすべての有望な候補からのすべての過免疫血清反応性抗原のなかでもっとも有望な候補の選択的同定を可能にするものであることが重要である。それゆえ、好ましくは少なくとも10個体の抗体調製物(即ち、選択された病原菌の感染症を患ったことがある少なくとも10の異なる個体からの抗体調製物(例えば血清))を第二スクリーニングラウンドにおいてかかる抗原の同定に用いるべきである。もちろん、10個体未満の調製物を使用することも可能であるが、しかし工程の選択性は少ない個体数の抗体調製物では最適とならない。一方、ある過免疫血清反応性抗原(またはその抗原性断片)が少なくとも10個体の抗体調製物、好ましくは少なくとも30、特に少なくとも50個体の抗体調製物によって認識されるなら、過免疫血清反応性抗原の同定は適切な同定に十分に選択的である。過免疫血清-反応性はもちろん、可能な限り多くの個体の調製物を用いて試験するとよい(例えば、100を超えるか、あるいは1,000を超える)。

30

【0078】

それゆえ、本発明の方法による過免疫血清-反応性抗体調製物の関連する部分は、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも30、特に少なくとも50個体の抗体調製物であるべきである。あるいは(または組み合わせで)過免疫血清反応性抗原は好ましくは第二スクリーニングラウンドに用いられるすべての個体の抗体調製物の少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、特に少なくとも40%によって同定されるのがよい。

【0079】

本発明の好ましい態様によると、第二ラウンドのスクリーニングのための個体の抗体調製物が調製される(または抗体調製物として用いられる)血清は、大便連鎖球菌(例えば、この病原菌の調製物、例えば溶解液、細胞壁成分および組換えタンパク質)に対するその力価によって選択される。好ましくは、ELISAにおける抗原として微生物全体(全溶解液または全細胞)が用いられる場合、総IgG力価10,000Uを超え、特に12,000Uを超える(U=ユニット、一定の希釈度でのOD_{405nm}の読みから計算)ものが選択される。

40

【0080】

ヒト免疫系によって腸球菌に対して産生され、ヒト血清に存在する抗体は、抗原性タンパク質のインビボ発現およびその免疫原性を示す。抗体による直線状エピトープの認識は4-5アミノ酸程度の短い配列に基づきうる。もちろん、かかる短いペプチドが所与の抗体

50

をインピボで誘導できるということを必ずしも意味しない。そのため、規定されたエピトープ、ポリペプチドおよびタンパク質をさらに、選択されたタンパク質に対する抗体をインピボで誘導する能力について動物(主にマウス)で実験すべきである。

【0081】

好ましい抗原は細胞表面に位置するか分泌されており、それゆえ細胞外で接近可能なものである。細胞壁タンパク質に対する抗体は2つの目的に役立つと考えられる：付着の阻害および食作用の促進である。分泌タンパク質に対する抗体は、毒素または病原性成分としてのその機能の中和において有用である。細菌は分泌タンパク質を介して互いに情報交換していることも知られている。これらタンパク質に対する中和抗体は、腸球菌種間または種内の成長を促進するクロストークを妨害する。生物情報分析(シグナル配列、細胞壁局在化シグナル、膜貫通ドメイン)は、細胞表面局在または分泌の評価に非常に有用であることが判明している。実験アプローチは、対応するエピトープによるヒト血清からの抗体の単離、および細菌表面ディスプレイスクリーニングにより選択された(ポリ)ペプチドに対するマウスにおける免疫血清の作成を含む。

10

【0082】

この目的のために、細菌である大腸菌クローンをマウスに直接注入し、免疫血清を採取し、関連するインピトロアッセイにおいて機能的オプソニンまたは中和抗体について試験する。あるいは、特異的抗体をヒトまたはマウス血清から基質としてペプチドまたはタンパク質を用いて精製してもよい。

【0083】

大便連鎖球菌に対する宿主防御は主に自然免疫機構に依存する。オプソニンおよび中和タイプの高親和性抗体をワクチン接種により誘導することにより、自然免疫系が細菌および毒素を排除することが助けられる。これによって本発明による方法は腸球菌抗原性タンパク質の同定の最適手段となる。

20

【0084】

皮膚および粘膜は腸球菌による侵入に対して恐るべき障壁である。しかしいったん皮膚または粘膜を超えられると、非-適応細胞防御の最前線は補体および食細胞、特に多核白血球(PMN)を介した協調作用を開始する。かかる細胞は侵入する細菌の排除における基盤であると考えられる。腸球菌は本来細胞外病原菌であるため、主な抗-腸球菌適応応答は免疫系の体液性の武器から生じ、それは3つの主要な機構によって媒介される：オプソニン作用、毒素中和の促進、および付着の阻害。オプソニン作用は特に重要であると考えられている。というのはそれは有効な食作用に必要であるからである。有効なオプソニン作用のためには微生物表面は、IgG分子のFc断片または活性化C3bに対する受容体を介するPMNによる認識のために抗体および補体因子によって被覆されなければならない。オプソニン作用の後、腸球菌は貪食され、殺される。細菌の細胞表面の特定の抗原に結合した抗体は、PMNへの結合のためのリガンドとして作用し、食作用を促進する。アドヘシンおよびその他の細胞表面タンパク質に結合した全く同じ抗体は付着を中和し、定着を防ぐと考えられる。本発明によって提供されるような抗原の選択は、動物モデルまたはヒトにおける感染症に対する防御を導くものの同定に非常に適している。

30

【0085】

ここで用いた抗原同定方法によると、本発明は驚くべきことに、とりわけ以下に記載するようにして大便連鎖球菌の一連の網羅的な新規な核酸および新規な過免疫血清反応性抗原およびその断片を提供することが出来る。一つの態様によると、本発明は特に過免疫血清反応性抗原をコードするヌクレオチド配列(その配列は配列表の配列番号：1-170、373-424に示される)および過免疫血清反応性抗原を表す対応するコードされるアミノ酸配列(その配列は配列表の配列番号171-340および425-476に示される)に関する。

40

【0086】

本発明の好ましい態様において、配列番号 1-2、4-8、10、12-18、20-23、25-26、29-43、45-62、64-74、76-77、79-83、85-89、91-92、94-114、117-126、128-146、148-170、373、375、379-381、387、392、394、397-399、407-408、410-411および415-424に示す又

50

クレオチド配列に対してその全長にわたって70%の同一性を示す核酸分子が提供される。もっとも好ましいのは配列番号 1-2、4-8、10、12-18、20-23、25-26、29-43、45-62、64-74、76-77、79-83、85-89、91-92、94-114、117-126、128-146、148-170、373、375、379-381、387、392、394、397-399、407-408、410-411 および 415-424に示す核酸分子に対してその全長に渡って少なくとも 80% または少なくとも 85% 同一である領域を含む核酸である。これに関して、同核酸分子に対してその全長に渡って少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、または96% 同一である核酸分子が特に好ましい。さらに、少なくとも 97% 同一であるものが非常に好ましく、少なくとも 98% および少なくとも 99% 同一であるものが特に好ましく、少なくとも 99% または 99.5% 同一であるのがきわめて好ましく、100% 同一であるのが特に好ましい。さらに、この点に関して好ましい態様は、配列番号 1-2、4-8、10、12-18、20-23、25-26、29-43、45-62、64-74、76-77、79-83、85-89、91-92、94-114、117-126、128-146、148-170、373、375、379-381、387、392、394、397-399、407-408、410-411 および 415-424に示す核酸によってコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生理機能または活性を保持する過免疫血清反応性抗原またはその断片 (ポリペプチド) をコードする核酸である。

10

【0087】

当該技術分野で知られているように、ここで用いる同一性とは、2以上のポリペプチド配列または2以上のポリヌクレオチド配列の、配列を比較して測定される関係である。当該技術分野において、同一性はまた、場合によってはかかる配列の文字列の間的一致によって判定される、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の間の配列関連性の程度を意味する。同一性は容易に計算することが出来る。2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列の間の同一性を測定する多くの方法が存在するが、この用語は当業者に周知である (例えば、Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje、G.、Academic Press、1987)。同一性を判定する好ましい方法は試験する配列間の最大的一致を与えるよう設計されたものである。同一性の判定方法はコンピュータ・プログラムにおいて体系化されている。2つの配列の間の同一性の判定の好ましいコンピュータ・プログラ方法としては、これらに限定されないが、GCGプログラムパッケージ {Devereux、J. et al.、1984}、BLASTP、BLASTN、および FASTA {Altschul、S. et al.、1990} が含まれる。

20

【0088】

本発明の別の態様によると、配列番号 3、9、11、24、27、44、63、75、84、115-116、127、374、376-378、382-386、388-391、393、395-396、400-406、409 および 412-414に示す核酸配列と少なくとも96%、好ましくは少なくとも 98%、特に 100%の同一性を示す核酸分子が提供される。

30

【0089】

本発明のさらなる態様によると、配列番号90、147に示す核酸配列と同一な核酸分子が提供される。

【0090】

本発明による核酸分子は、二番目の選択として、一番目の選択として上記した核酸に少なくとも実質的に相補的な核酸分子であってもよい。本明細書において用いる、相補的とは、核酸鎖がワトソン・クリック塩基対形成を介して第二の核酸鎖と塩基対形成することを意味する。本明細書において用いる、実質的に相補的とは、それぞれの鎖のすべての塩基について塩基対形成が起こっているわけではなく、一定数または一定率の塩基が対形成していないかまちがって対形成していることを意味する。正しく対形成している塩基のパーセンテージは、好ましくは少なくとも 70%、より好ましくは 80%、さらに好ましくは 90%、そしてもっとも好ましくは90%を超えるパーセンテージである。70%が一致する塩基のパーセンテージは相同性であると考えられ、この程度に一致する塩基対を有するハイブリダイゼーションはストリンジェントであると考えられる。この種のストリンジェントなハイブリダイゼーションのハイブリダイゼーション条件は、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons、Inc.、1987)に記載されている。より具体的には、ハイブリダイゼーション条件は以下のようにすればよい：

40

50

例えば、5 x SSPE、5 x デンハルト試薬、0.1% SDS、100 g/mLの剪断 (sheared) DNA 中で68 で行うハイブリダイゼーション

0.2xSSC、0.1% SDS中、42 での中程度のストリンジェンシーの洗浄、

0.1xSSC、0.1% SDS中、68 での高いストリンジェンシーの洗浄。

【0091】

GC含量が50%のゲノムDNAは T_m がおよそ96 である。1%のミスマッチについて、 T_m はおよそ1 低くなる。

【0092】

さらに、本明細書に記載するその他のハイブリダイゼーション条件のいずれも理論的には同様に用いることが出来る。

【0093】

もちろん、本発明によって同定されたものと同じポリペプチド分子をコードするすべての核酸配列分子が所与のコード配列の開示によって包含される。というのは、遺伝暗号の縮重は、かかる縮重核酸分子の数が多いとしても、所与のポリペプチド分子をコードするすべての可能な核酸分子を明らかに決定するために直接適用できるからである。断片が例えば能動または受動ワクチンのようにワクチン接種に関連して用いるのに好適なポリペプチドをコードするかぎり、所与のポリペプチドの断片に対してもこれは適用できる。

【0094】

本発明による核酸分子は、三番目の選択として、上記本発明による核酸分子の第一および第二の選択による核酸分子の少なくとも 15 塩基のストレッチを含む核酸であってもよい。好ましくは、塩基は連続するストレッチの塩基を形成する。しかし、ストレッチが、いくつかの塩基によって分離されている2以上の部分からなる場合も本発明の範囲に含まれる。

【0095】

本発明の核酸は好ましくは、少なくとも 20、より好ましくは少なくとも 30、特に少なくとも 50の本明細書に開示の配列からの連続塩基からなる。好適な長さは計画する使用領域によって容易に最適化できよう(例えば(PCR) プライマー、プローブ、捕捉分子(例えば(DNA)チップ上)などとして)。好ましい核酸分子は、表1および2に挙げる1以上の予測免疫原性アミノ酸配列、特に表2の配列であってスコア10を超え、好ましくは20を超え、特にスコア25を超えるものの少なくとも連続する15塩基部分を含む。特に好ましいのは公表された大便連鎖球菌株 V583 ゲノム {Paulsen, I. et al., 2003}; GenBank accession AE016830 (染色体)、AE016833 (pTEF1)、AE016831 (pTEF2)、AE016832 (pTEF3)、および/またはいずれかのその他の公表された大便連鎖球菌ゲノム配列またはその部分と比較して1以上、好ましくは2より多い、特に5より多い非同ー核酸残基を示す本願の配列プロトコールにおけるいずれかの配列のDNA配列の連続部分を含む核酸である。特に好ましい非同ー核酸残基は、非同ーアミノ酸残基を導く残基である。好ましくは、核酸配列は上記の公表された化膿連鎖球菌対応物と比較して少なくとも 1、好ましくは 少なくとも 2、好ましくは 少なくとも 3の異なるアミノ酸残基を有するポリペプチドをコードする。また本明細書で言及する、例えば配列表に挙げるタンパク質の断片である(または全タンパク質)かかる単離ポリペプチドであって少なくとも 6、7、または8 アミノ酸残基を有し、か

【0096】

本発明による核酸分子は、四番目の選択として、上記第一、第二および第三の選択による本発明の核酸のいずれかとストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でアニールする核酸分子であってもよい。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は典型的には本明細書に記載するものである。

【0097】

最後に、本発明による核酸分子は、五番目の選択として、上記第一、第二、第三および第四の選択による本発明のいずれかの核酸分子による核酸分子のいずれかと遺伝暗号の縮重がなければ、ハイブリダイズしうる核酸分子であってもよい。この種の核酸分子は、好

10

20

30

40

50

ましくは本発明による核酸が、本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードすることをいう。この種の核酸分子は本発明による核酸分子の検出に特に有用であり、したがって、対応する微生物、例えば、大便連鎖球菌およびこの種の微生物が関与する疾患または疾患状態の診断に有用である。好ましくは、ハイブリダイゼーションは四番目の選択について記載したストリンジェントな条件下でおこるが行われる。

【0098】

本明細書において用いる核酸分子は、一般にリボ核酸分子またはデオキシリボ核酸分子のいずれかであり、非修飾 RNA または DNA あるいは修飾 RNA または DNA であってもよい。したがって例えば、本明細書において用いる核酸分子は、とりわけ、一本鎖および二本鎖 DNA、一本鎖および二本鎖 RNA の混合物である DNA、および一本鎖および二本鎖領域の混合物である RNA、一本鎖またはより典型的には二本鎖または三本鎖または一本鎖および二本鎖領域の混合物であってもよい DNA および RNA を含むハイブリッド分子である。さらに、本明細書において用いる核酸分子は、RNA または DNA あるいは RNA と DNA との両方を含む三本鎖領域もさす。かかる領域における鎖は同一分子由来でも異なる分子由来でもよい。領域は 1 以上の分子のすべてを含んでもよいが、より典型的にはいくつかの分子の領域のみを含む。三重らせん領域の分子の 1 つはしばしばオリゴヌクレオチドである。本明細書において用いる、核酸分子の語は、1 以上の修飾塩基を含む上記の DNA または RNA を含む。したがって、安定性またはその他の理由で修飾された骨格を有する DNA または RNA は本明細書でいうところの「核酸分子」である。さらに、珍しい塩基、例えばイノシン、または修飾塩基、例えば、トリチル化塩基を含む DNA または RNA は、二例を挙げただけだが、本明細書でいうところの核酸分子である。多くの有用な目的に役立つ DNA および RNA に対する様々な修飾がなされていることは当業者に知られている。核酸分子の語は、本明細書で用いる場合、かかる化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態の核酸分子、およびとりわけウイルスおよび、単細胞および多細胞を含む細胞に特徴的な化学形態の DNA および RNA を含む。核酸分子の語はまた、オリゴヌクレオチドとしばしば称される短い核酸分子も含む。「ポリヌクレオチド」および「核酸」または「核酸分子」は本明細書において互換的に用いられる。

10

20

【0099】

本発明において提供される核酸分子は多数の独特の断片を含み、それらには大便連鎖球菌コード領域の配列表に示す核酸分子配列より長いものも短いものもあり、標準的クローニング方法によって作成できるものである。独特であるためには、断片はその他の既知の核酸配列と区別するのに十分な大きさである必要があり、その違いはコンピュータ・データベース、例えば、GenBank におけるヌクレオチド配列に対して選択した大便連鎖球菌断片を比較することによって簡単に決定される。

30

【0100】

さらに、本発明に含まれる核酸分子およびポリペプチドに対して修飾を行ってもよい。例えば、核酸によってコードされるポリペプチドを変更しないヌクレオチド置換を行ってもよく、したがって、過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードするあらゆる核酸分子が本発明に含まれる。

【0101】

さらに本発明によって提供される過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする核酸分子はいずれも、標準的技術、例えば標準的クローニング技術を用いて、あらゆる所望の調節配列に機能的に連結させてもよく、これは大便連鎖球菌調節配列または異種調節配列、異種リーダー配列、異種マーカー配列または融合タンパク質を作る異種コード配列であってもよい。

40

【0102】

本発明の核酸分子は RNA の形態、例えば、mRNA または cRNA、あるいは DNA の形態、例えば、クローニングによって得られるか、化学合成技術によって製造されるかまたはその組み合わせによって作られる cDNA およびゲノム DNA であってもよい。DNA は、三本鎖、二本鎖または一本鎖であってもよい。一本鎖 DNA はセンス鎖としても知られているコード鎖であっ

50

てもよいし、アンチセンス鎖として知られている非コード鎖であってもよい。

【0103】

本発明はさらに、配列表に示す推定大便連鎖球菌アミノ酸配列を有する過免疫血清反応性抗原およびその断片の、断片、アナログおよび誘導体をコードする上記の核酸分子の変異形にも関する。核酸分子の変異形は、天然の変異形、例えば、天然の対立遺伝子変異形でもよいし、天然には起こることが知られていない変異形であってもよい。かかる核酸分子の非天然の変異形は、例えば核酸分子、細胞または生物体に対して行われる突然変異誘発技術によって作ることが出来る。

【0104】

これに関する変異形は、ヌクレオチド置換、欠失または付加によって上記核酸分子と異なる変異形である。置換、欠失または付加は1以上のヌクレオチドを伴いうる。変異形はコードまたは非コード領域において変わっているものでも両方が変わっているものでもよい。コード領域における変化は、保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失または付加を作りうる。配列表に示す大便連鎖球菌配列を有する、変異形、アナログ、誘導体または断片、あるいは断片の変異形、アナログまたは誘導体をコードする核酸分子が好ましく、ここでいくつかの、数個、5~10、1~5、1~3、2、1または0のアミノ酸が置換、欠失または付加されているかあるいはその組み合わせである。このなかで特に好ましいのは、サイレントな置換、付加および欠失であり、これらは配列表に示す大便連鎖球菌ポリペプチドの性質および活性を変化させない。この点で特に好ましいのは、保存的置換である。

【0105】

本発明によるペプチドおよび断片はまた修飾エピトープを含み、ここで所与のエピトープの好ましくは1または2のアミノ酸が、例えば{Tourdot, S. et al., 2000}に開示の規則にしたがって、修飾されるか、置換されている。かかる修飾エピトープをコードする核酸配列も同様である。

【0106】

アミノ酸置換による本発明のエピトープに由来するエピトープであって、エピトープのT細胞活性化能力を向上、保存または少なくとも有意に阻害しないものも本発明によるエピトープに含まれることが明らかである。それゆえ、本発明のエピトープは大便連鎖球菌由来の元の配列を含まないが、T細胞応答をトリガーし、好ましくはT細胞応答を向上させるエピトープも含む。これらエピトープは「ヘテロクリティック」と称される；これらはMHC/HLA分子に対して同様のまたは好ましくはより高い親和性を有している必要があり、元のエピトープに対するT細胞受容体(TCR)を同様にまたは好ましくはより強く刺激する能力を有する必要がある。

【0107】

ヘテロクリティックエピトープは、合理的設計により得ることが出来る。即ち例えば{Rammensee, H. et al., 1999}に記載のように個々の残基のMHC/HLAへの結合に対する寄与を考慮し、それとともにTCRとの相互作用の能力がある残基を系統的に交換し、その結果得られた配列を元のエピトープに対するT細胞を用いて試験するとよい。かかる設計は過度の実験をしなくても当業者に可能である。

【0108】

もう一つの可能性は、元のエピトープに対するT細胞によるペプチドライブラリーのスクリーニングを含む。好ましい方法は合成ペプチドライブラリーの位置スキヤニング(positional scanning)である。かかるアプローチは、例えば{Hemmer, B. et al., 1999}およびそのなかの引用文献に詳細に記載されている。

【0109】

本発明由来のアミノ酸配列またはヘテロクリティックエピトープによって代表されるエピトープの代わりに、これらエピトープを模倣する物質、例えば、「ペプチド疑似体」または「レトロ逆転(retro-inverso)-ペプチド」も利用できる。

【0110】

改良エピトープの設計のその他の態様は、そのT細胞の刺激能力を向上させる物質によ

10

20

30

40

50

る製剤または修飾である。これらにはヘルパーT細胞エピトープ、脂質またはリポソームまたはWO 01/78767に記載の好ましい修飾が含まれる。

【0111】

エピトープのT細胞刺激能力を上昇させるもう一つの方法は、それらを免疫刺激物質、例えば、サイトカインまたはケモカイン、例えば、インターロイキン-2、-7、-12、-18、クラスIおよびIIインターフェロン(IFN)、特にIFN-ガンマ、GM-CSF、TNF-アルファ、flt3-リガンドその他とともに製剤することである。

【0112】

本発明の核酸分子アッセイについてさらに説明すると、例えば、上記の本発明の核酸分子は、本発明のポリペプチドをコードする全長cDNAおよびゲノムクローンの単離および本発明の核酸分子と高い配列類似性を有するその他の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンの単離のためのRNA、cDNAおよびゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして用いることが出来る。かかるプローブは一般に少なくとも15塩基を含む。好ましくは、かかるプローブは、少なくとも20、少なくとも25または少なくとも30塩基を有し、少なくとも50塩基を有することもある。特に好ましいプローブは少なくとも30塩基であって50塩基以下、例えば、30、35、40、45、または50塩基である。

10

【0113】

例えば、本発明の核酸分子のコード領域はオリゴヌクレオチドプローブの合成のための既知のDNA配列を用いて関連ライブラリーをスクリーニングすることによって単離することが出来る。本発明の遺伝子の配列と相補的配列を有する標識化オリゴヌクレオチドを用いて次にcDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーをスクリーニングし、ライブラリーのどのメンバーにプローブがハイブリダイズするかを判定する。

20

【0114】

本発明の核酸分子およびポリペプチドは、とりわけ核酸分子アッセイに関してさらに説明するように、疾患、特にヒト疾患の治療および診断の開発用試薬および材料として用いることが出来る。

【0115】

オリゴヌクレオチドである本発明の核酸分子は、上記方法に用い、好ましくはPCRに用いて、全体または部分を本明細書において同定した大便連鎖球菌遺伝子が存在するか、および/または、血液などの感染組織において転写されているかを判定することが出来る。かかる配列は感染の段階および病原菌が達成した感染の種類診断における有用性も有することが認識される。この目的および他の目的のために本明細書に記載する本発明による少なくとも1つの核酸を含むアレイを利用することが出来る。

30

【0116】

本発明による核酸分子は、核酸分子およびこれら核酸を含む生物またはサンプルの検出に用いることが出来る。好ましくはかかる検出は診断のためであり、より好ましくは大便連鎖球菌の存在または量に関連または運動する疾患の診断のためである。

【0117】

大便連鎖球菌により感染した真核生物(「個体」とも称する)、特に哺乳類、特にヒトを、様々な技術によってDNAレベルで検出される本発明による核酸分子のいずれかを検出することによって同定することが出来る。大便連鎖球菌をその他の生物と区別するための好ましい核酸分子候補を得ることが出来る。

40

【0118】

本発明は大便連鎖球菌による感染によって生じる疾患の診断方法を提供し、該方法は、配列表に示す核酸分子の配列を有する核酸分子の発現レベルの上昇を、個体から単離または由来したサンプルから判定することを含む。核酸分子の発現は核酸分子の定量的ための当該技術分野に周知の方法のいずれかを用いて測定することが出来、例えば、PCR、RT-PCR、Rnase 保護、ノザンプロットティング、その他のハイブリダイゼーション方法および本明細書に記載するアレイが挙げられる。

【0119】

50

本明細書において用いる単離とは、その天然の状態から「人の手によって」分離されていることを意味する；即ち、それが天然に存在する場合、その元の環境から変化または取り出されているか、その両方である。例えば、天然状態において生体に天然に存在する天然の核酸分子またはポリペプチドは「単離」されていないが、同じ核酸分子またはポリペプチドがその天然状態で共に存在する物質から分離されていると、ここで用いる用語では「単離」されていることになる。単離の一部としてまたは単離の後に、かかる核酸分子に例えば、融合タンパク質を形成させるための突然変異誘発のために、そして宿主での増殖または発現のために、DNA等のその他の核酸分子を結合させてもよい。単離核酸分子は単独でまたはベクター等のその他の核酸分子と結合させて、培養中または生体全体における宿主細胞に導入することが出来る。培養中または生体全体における宿主細胞に導入されても、かかるDNAは本明細書の意味ではいまだに単離されたままである。というのはそれらは天然の形態または環境にはないからである。同様に核酸分子およびポリペプチドは組成物、例えば、培地製剤、核酸分子またはポリペプチドの、例えば細胞への導入用の溶液、化学反応または酵素反応のための組成物または溶液中にあってよく、これらは天然の組成物ではなく、そして本明細書の意味によるとそこでも核酸分子またはポリペプチドは単離された状態である。

10

【0120】

本発明による核酸は化学合成してもよい。あるいは核酸は当業者に知られた方法によって大便連鎖球菌から単離してもよい。

【0121】

本発明の別の態様によると、本明細書に記載の抗原同定方法の使用により、新規な過免疫血清反応性抗原およびその断片の網羅的セットが提供される。本発明の好ましい態様において、本明細書に記載の核酸分子のいずれかによってコードされるアミノ酸配列を含む過免疫血清反応性抗原およびその断片が提供される。本発明の別の好ましい態様において、配列番号171-172、174-178、180、182-188、190-193、195-196、199-213、215-232、234-244、246-247、249-253、255-259、261-262、264-284、287-296、298-316、318-340、425、427、431-433、439、444、446、449-451、459-460、462-463 および 467-476に示されるポリペプチド配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む新規なセットの過免疫血清反応性抗原およびその断片が提供される。本発明のさらに好ましい態様において、配列番号 173、179、181、194、197、214、233、245、254、285-286、297、426、428-430、434-438、440-443、445、447-448、452-458、461および464-466に示されるポリペプチド配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む過免疫血清反応性抗原およびその断片が提供される。本発明のより好ましい態様において、配列番号 260、317に示されるポリペプチド配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む過免疫血清反応性抗原およびその断片が提供される。

20

30

【0122】

本発明において提供される過免疫血清反応性抗原およびその断片には、配列表に示すあらゆるポリペプチド、および配列表に示すポリペプチドに対して少なくとも 70%の同一性を有するポリペプチド、配列表に示すポリペプチドに対して好ましくは少なくとも 80%または85%の同一性を有するポリペプチド、より好ましくは配列表に示すポリペプチドに対して少なくとも 90%の類似性(より好ましくは少なくとも 90%の同一性)、さらにより好ましくは配列表に示すポリペプチドに対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%または99.5%の類似性(さらにより好ましくは少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、または 99.5%の同一性)を有するポリペプチドが含まれ、また、かかるポリペプチドの部分も含まれ、ここでポリペプチドの部分は一般に少なくとも 4 アミノ酸、より好ましくは少なくとも 8、より好ましくは少なくとも 30、さらにより好ましくは少なくとも 50 アミノ酸、例えば4、8、10、20、30、35、40、45または50 アミノ酸を含む。

40

【0123】

本発明はまた、これら過免疫血清反応性抗原およびその断片の、断片、アナログ、および誘導体に関する。アミノ酸配列が配列表に示される抗原について用いられる、「断片」

50

、「誘導体」および「アナログ」の語は、かかる過免疫血清反応性抗原およびその断片と実質的に同一または類似の生理機能または活性を保持するポリペプチドを意味する。

【0124】

過免疫血清反応性抗原およびその断片の、断片、誘導体またはアナログは以下であり得る：1) 1以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸残基（好ましくは保存的アミノ酸残基）によって置換されており、かかる置換アミノ酸残基が遺伝暗号によってコードされるものであってもなくてもよいもの、または2) 1以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または3) 成熟過免疫血清反応性抗原またはその断片が別の化合物、例えば、過免疫血清反応性抗原およびその断片の半減期を上昇させる化合物（例えば、ポリエチレングリコール）と融合しているもの、または4) 追加のアミノ酸（リーダーまたは分泌配列または成熟過免疫血清反応性抗原またはその断片の精製に利用される配列あるいはプロタンパク質配列）が成熟過免疫血清反応性抗原またはその断片に融合しているもの。かかる断片、誘導体およびアナログは本明細書の教示から当業者の技術範囲内である。

10

【0125】

本発明はまた、様々な大便連鎖球菌分離株の抗原に関する。かかるホモログは容易に本明細書に開示の核酸およびアミノ酸配列に基づいて単離することが出来る。したがっていずれの抗原の存在も各M血清型について判定することが出来る。さらに様々な血清型における特定の抗原の変異性をsic 遺伝子について記載されているようにして判定することも可能である{Hoe, N. et al., 2001}。異なる血清型の異なる腸球菌感染症への寄与は年齢群および地域群が異なると変化する。もっとも価値ある保護抗原は様々な臨床株の間で保存されていると考えられることが重要な側面である。

20

【0126】

この点で本発明の特に好ましい態様は、配列表に示す過免疫血清反応性抗原、その変異形、アナログ、誘導体および断片、ならびに断片の変異形、アナログおよび誘導体である。さらに過免疫血清反応性抗原、その変異形、アナログ、誘導体および断片、断片の変異形、アナログおよび誘導体を含む融合ポリペプチドも本発明に含まれる。かかる融合ポリペプチドおよびタンパク質、ならびにそれらをコードする核酸分子は標準的技術を用いて容易に作ることが出来、かかる技術としては、融合タンパク質をコードする組み換えポリ核酸の産生および発現のための標準的組換え技術が含まれる。

【0127】

変異形のなかで好ましいのは保存的アミノ酸置換によって基準（reference）と異なるものである。かかる置換はポリペプチド中の所与のアミノ酸を類似の特徴を有する別のアミノ酸で置換するものである。保存的置換として典型的にみられるのは、脂肪族アミノ酸、Ala、Val、LeuおよびIle内での互いの置換；ヒドロキシル残基SerおよびThrの交換、酸性残基AspおよびGluの交換、アミド残基AsnおよびGlnの置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、および芳香族残基PheおよびTyrの置換である。

30

【0128】

この点でさらに特に好ましいのは、配列表に示すいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列を有する、変異形、アナログ、誘導体および断片、そして断片の変異形、アナログおよび誘導体であって、いくつかの、数個、5～10、1～5、1～3、2、1または0のアミノ酸残基が置換、欠失または付加された、あるいはその組み合わせのものである。なかでも特に好ましいのは本発明のポリペプチドの性質および活性を変化させないサイレントな置換、付加および欠失である。この点で特に好ましいのは保存的置換である。もっとも好ましいのは配列表に示すアミノ酸配列を有し、置換を有さないポリペプチドである。

40

【0129】

本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片は好ましくは単離形態で提供され、好ましくは均一に精製されたものである。

【0130】

本発明の好ましい態様は、配列表に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドの断片を含むポリペプチド、および配列表に示すポリペプチドの変異形および誘導体の断片である。

50

【0131】

この点で断片とは、上記過免疫血清反応性抗原およびその断片、およびその変異形または誘導体、アナログ、断片のアミノ酸配列のすべてではないが一部と全く同じであるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。かかる断片は「独立」であり得る。即ち、その他のアミノ酸またはポリペプチドの一部ではなくてもよいし、それに融合しているわけではなくてもよいし、それらが一部または領域を形成するより大きいポリペプチドに含まれていてもよい。本発明のこの点で好ましいのは本発明のポリペプチドの構造または機能特性によって特徴づけられる断片、即ち、本発明のポリペプチドのアルファヘリックスおよびアルファヘリックス形成領域、ベータシートおよびベータシート形成領域、ターン・ターン-形成領域、コイル・コイル-形成領域、親水性領域、疎水性領域、アルファ両親媒性領域、ベータ-両親媒性領域、可動性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高い抗原性指数領域を含む断片、およびかかる断片の組み合わせである。好ましい領域は本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片の活性を媒介する領域である。この点でもっとも好ましいのは本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片の化学、生物またはその他の活性を有する断片であり、例えば、類似の活性または向上した活性、または低下した望ましくない活性を有する断片である。特に好ましいのは大便連鎖球菌の生存に必須な機能またはヒトにおける疾患を引き起こす能力を付与する受容体または酵素のドメインを含む断片である。さらに好ましいポリペプチド断片は、動物、特にヒトにおける抗原または免疫原決定基を含むものである。

10

【0132】

抗原性断片とは、それ自体が抗原性であるかハプテンとして提供されると抗原性となる、同定された抗原の断片として定義される。それゆえ、1または(より長い断片については)数個のみのアミノ酸交換を示す抗原または抗原性断片が本発明の範囲で可能であるが、ただし、アミノ酸交換を有するかかる断片の抗原能力が交換によってひどく損なわれていないことを条件とする。即ち、この抗原によってワクチン接種された個体における適当な免疫応答の誘発に好適であり、個体の血清からの個体の抗体調製物によって同定されるものである。

20

【0133】

過免疫血清反応性抗原のかかる断片の好ましい例は、表 1a および表 1cの「予測免疫原性アミノ酸」および「同定された免疫原性領域の位置」の列のアミノ酸配列を含むペプチド;表 2の血清反応性エピトープ、特に以下のアミノ酸を含むペプチドからなる群から選択される: 4-10、14-21、30-36、59-68、77-82、87-93、96-105、112-121、125-133、135-141、150-162、164-183、192-203、207-213、215-226、228-234、241-247、250-285、302-308 および 135-148 (配列番号 171); 15-57、60-73、77-101、108-134、136-177、185-201、203-217、226-240、244-254、272-277、283-288、292-343、354-370、380-398、406-437、439-453、473-490、532-538、584-590、595-601、606-612、664-677、679-704、715-724、731-753、759-772、786-794、814-862 および 657-684 (配列番号 172); 4-9、15-36、41-47、54-60、75-81、114-120、131-146、152-158、174-182、194-202、208-215、218-226、255-271、276-285、290-295、302-311、318-328、330-344、352-359、365-377、388-395、398-405、426-432、439-449、455-500、505-513、531-537、542-552、554-561、587-595、606-612、718-734、763-771、775-782、792-801、805-812、822-828、830-843、849-863、876-894、905-911、919-926、935-947、949-958、968-979、1009-1016、1029-1045、1047-1056、1076-1081、1092-1106、1123-1133、1179-1200、1202-1211、1215-1223、1287-1299、1301-1306、398-431 および 1224-1237 (配列番号 173); 17-47、74-80、90-97、126-133、137-148、167-173、179-185、214-223、250-255、270-283、329-338、342-350、352-358、360-367、372-383、398-404、411-421、426-432、435-446、452-462、472-479、515-521、582-592、611-618、623-629、642-659、666-673、678-689、704-725、732-737、744-757、768-789、824-834、842-849、862-868、877-887、904-916、923-928、941-947、962-974、982-992、1019-1030、1032-1044、1046-1052、1065-1075、1077-1087、1108-1121、1124-1132、1137-1151、1170-1182、1190-1206、1208-121

30

40

50

4、1227-1233、1242-1251、1254-1273、1282-1298 および 792-825 (配列番号 174) ; 1
9-31、39-67、82-91、104-110、113-128、149-155、161-181 および 137-155 (配列番号
175) ; 6-18、54-63、69-85、110-127、142-156、158-167、169-211、238-246、248-257
、276-311、339-349、371-380、385-391、394-403、421-438、451-456、483-489 および
449-468 (配列番号 176) ; 5-15、24-34、50-56、61-83、98-121、123-136、149-162、1
66-194、202-215、221-227、229-332、337-360、367-402、404-415、427-433、444-462、
471-478、487-498、511-518、521-544、550-563、568-574、580-587、597-607、610-616
、624-629 および 468-498 (配列番号 177) ; 11-19、32-49、57-63、65-71、80-89、91
-133、166-181、183-191、201-230、234-257、264-291、297-303、305-314、316-335、33
7-354、359-366、368-374、383-388、394-405、408-442、446-470、483-490、499-505、5
13-538、544-555、557-563、568-590、598-608、617-623、627-636、641-647、667-685、
687-693、710-723、733-739、742-754、769-815 および 366-388 (配列番号 178) ; 4-1
6、30-35、42-53、67-76、82-87、101-108、112-130、132-138、147-152、161-183、187-
208、218-225、265-281、295-303、305-317、322-334、338-357、360-368、370-383、387
-394、400-419、421-430 および 255-336 (配列番号 179) ; 19-27、36-47、59-66、76-
83、101-112、118-125、142-147、162-180、185-196、225-240、246-263、286-304、314-
319、327-333、353-367 および 194-214 (配列番号 180) ; 14-43、70-76、83-89、111-
117、122-128、136-145、163-170、175-182、210-219、246-251、266-279、325-331、338
-346、348-354、356-363、368-379、422-428、431-441、450-456、466-473、509-515、53
2-542、549-556、576-586、605-612、617-623、636-653、660-667、674-686、698-719、7
26-731、738-745、762-783、818-828、836-843、856-862、871-881、903-910、917-922、
935-941、956-968、976-986、1013-1024、1026-1038、1059-1069、1071-1081、1102-1115
、1118-1126、1131-1145、1164-1176、1187-1200、1202-1208、1221-1227、1236-1245、1
248-1267、1273-1292、252-287 および 805- 844 (配列番号 181) ; 4-18、21-28、37-4
3、56-70、101-113、131-140、142-150、162-170、172-184、193-204、209-227、233-238
、246-264 および 93-168 (配列番号 182) ; 14-20、44-50、61-70、77-96、99-106、12
9-142、168-181、187-196、205-221、225-241、277-296 および 257-281 (配列番号 183
) ; 18-29、43-54、64-76、78-84、88-103、125-149、159-176、198-218、230-242、256-
271、279-285、287-293、300-306、325-331、344-351、357-364、371-397、400-414、419
-464、485-515、517-526、529-537、548-553、573-580、584-590、603-620、639-661、67
6-681、687-700、716-761、772-780、785-790、795-803、823-836、848-853 および 106-
134 (配列番号 184) ; 7-13、19-42、44-51、55-75、87-97、99-110、112-118、129-135
、141-156、158-178、213-220、230-286、294-308、323-338、345-352、355-365、370-39
2、394-419、437-446、454-460、474-497、515-526、528-546、569-575 および 128-141
(配列番号 185) ; 12-20、24-33、45-70、73-84、86-94、103-116、118-124、135-142、
163-170、176-200、202-224、226-234、237-248、250-262、265-287、296-307、334-341
、347-356、361-369、382-396、405-415、418-427、431-439、443-449、452-461、467-47
4 および 113-146 (配列番号 186) ; 13-38、44-50、52-59、66-72、83-94、103-110、1
16-124、131-137、158-180、199-204、218-233、241-264、269-317、326-342、350-356
および 70-86 (配列番号 187) ; 29-35、49-59、63-84、86-97、103-111、113-126、130
-144、150-158、174-198、221-231、250-264、266-273、291-298、310-318 および 70-90
(配列番号 188) ; 19-25、28-52、60-66、71-76、131-142、149-155、157-178、181-21
3、218-223、237-242、250-257、260-266、272-279、282-290、321-330、373-385、393-4
07、441-453、461-475、509-521、529-542、577-589、597-610、643-655、663-677、703-
718、729-734、358-464、495-570 および 604-685 (配列番号 189) ; 4-29、51-76、116
-136、158-173、179-193、207-215 および 86-111 (配列番号 190) ; 5-23、45-70、79-
90、93-107、114-122、142-151 および 18-36 (配列番号 191) ; 9-51、68-120、133-14
9、158-180、186-206、211-220、222-237、248-293、296-310、317-339 および 248-260
(配列番号 192) ; 14-24、44-63、69-98、108-119、123-136、155-161、164-176、180-1
93、203-208、215-223、239-247、274-281、283-289、296-304、306-313、315-327、331- 50

341、343-353、357-386、392-405 および 205-246 (配列番号 193) ; 5-13、16-23、36-42、53-63、70-83、96-102 および 14-34 (配列番号 194) ; 4-13、19-35、49-56、59-76、83-107、121-134、144-153、157-164、166-186、194-202、209-216、231-253、257-264 および 98-134 (配列番号 195) ; 16-32、38-47、58-68、78-89、98-114、117-123、132-141、146-156、164-170、179-188、196-212、219-230、232-237、244-263、265-274、278-293、297-303、306-326、339-349、352-359、362-367、373-379、384-394、396-406、423-443、451-461、465-484、490-497、504-511、523-533、537-547、550-556、558-566、573-579、586-593、598-609、615-642、647-665、671-686、693-713、723-728 および 332-378 (配列番号 196) ; 6-21、34-44、58-64、66-74、79-87、114-127、129-143、154-162、174-189、205-214、241-262、266-273、278-297、319-324、328-338、342-351、390-398、409-415、422-435、458-464、471-477、481-486、506-531、534-540、542-550 および 315-389 (配列番号 197) ; 4-28、39-45、52-58、69-82、93-115、122-128、135-140、146-163、177-192、209-215、221-232、271-284、331-337、341-352、360-378、383-390、392-401、409-422、428-435、462-470、474-480、482-496、531-539、541-549、551-560、562-569、576-582、598-618 および 98-127 (配列番号 198) ; 14-27、33-47、61-79、94-104、119-133 および 36-60 (配列番号 199) ; 11-22、29-40、48-62、68-73、96-106、108-118、125-149 および 102-126 (配列番号 200) ; 4-11、45-55、76-83、86-102、105-112、138-144、147-153 および 20-48 (配列番号 201) ; 12-20、28-56、62-68、72-82、93-99、101-107、120-133、135-145、178-186、208-232、279-292 および 36-64 (配列番号 202) ; 6-14、23-48、65-82、92-134、140-181、188-219、228-238、244-253、255-261 および 124-145 (配列番号 203) ; 11-25、31-38、53-59、62-71、89-99、125-133、151-157、182-190、195-203、208-215、219-229、249-262、267-275、287-295、298-316、318-325、328-334、344-353、357-363、371-377、385-391、396-415、425-436、438-457、471-485、538-552、554-561、606-625、630-636、646-653、669-679、695-704、706-715、722-747、763-773 および 714-738 (配列番号 204) ; 10-29、33-45、50-60、70-79、83-95、118-124、136-157、176-184、192-205、207-216、223-234、240-246、258-268、275-283 および 37-56 (配列番号 205) ; 4-24、27-38、46-54、66-72、81-97、112-119、128-137、152-157、173-179、185-214、219-225、227-248、262-284、286-295、301-307 および 117-134 (配列番号 206) ; 26-43、49-56、60-71、74-82、87-98、110-116、131-146、154-164、169-178、183-189、205-214、241-246、255-268、275-292、305-314、316-323、326-340、346-363、397-402、419-429、440-446、452-461、467-475 および 29-66 (配列番号 207) ; 7-16、21-39、48-58、61-78、82-89、109-136、138-150、152-176、182-247、255-261、267-332、336-345、347-358、362-368、371-392、394-404、407-472、490-498、505-513、527-544、554-582、603-611、614-620、632-638 および 500-523 (配列番号 208) ; 24-46、77-83、90-97、99-118、123-166、168-177、204-212、229-239、248-262、273-282、287-293、300-319、321-337、340-352、357-366、391-402、411-428、442-450、464-471、479-489 および 19-40 (配列番号 209) ; 9-23、25-34、53-58、70-86、90-97、99-116、118-128、131-141、185-191、228-233、237-253、255-261、264-271、273-280、302-312、319-349、351-359、362-369、376-383、387-394、398-406、419-434 および 20-31 (配列番号 210) ; 15-22、37-43、71-87、105-115、121-127、135-142、152-158 および 32-52 (配列番号 211) ; 6-12、18-29、37-47、50-58、65-83、85-91、94-99、108-123、142-150、156-163、183-193、215-222、242-249、252-258、261-270、285-308、318-326 および 1-95 (配列番号 212) ; 9-61、65-133、144-155、166-173、175-221、233-276、278-313、329-368 および 210-233 (配列番号 213) ; 11-29、33-39、46-51、65-93、107-113、134-143、147-154、166-177、181-188、214-220、233-243、263-269 および 112-128 (配列番号 214) ; 8-46、110-134、155-167、174-183、188-201、210-230、253-258、267-282、289-299、312-319、322-327、330-337、365-381、389-402、405-411、419-425、439-447、465-472、489-512、525-532、540-554、577-589、591-599、605-614、616-624、633-649 および 503-529 (配列番号 215) ; 34-49、64-70、90-118、124-131、141-152、159-165 および 112-128 (配列番号 216)

6) ; 5-15、26-45、55-72、80-85、93-100、121-133、142-148、154-167、198-205、209-215、241-254、260-265、271-279 および 244-270 (配列番号 217) ; 4-36、38-54、67-83、122-153、159-178、205-212、232-242、244-253、259-268、281-288、298-309、324-331、334-370、372-381、389-401、403-429、441-450、456-462、465-471、473-479、483-504、508-518、537-543、553-565、578-584、592-609、619-625、658-667、669-679、712-719、722-729、737-744、746-752、758-765 および 180-226 (配列番号 218) ; 6-17、23-32、49-56、61-67、76-83、85-103、105-111、120-132、145-171、175-185、191-225、231-246 および 99-128 (配列番号 219) ; 4-24、28-48、52-58、64-79、87-100、104-120、136-152、159-166 および 150-163 (配列番号 220) ; 15-27、65-71、77-99、104-121、128-154、183-216、223-229、234-255、277-287、296-308 および 77-97 (配列番号 221) ; 8-18、44-76、102-109 および 49-57 (配列番号 222) ; 5-14、28-40、42-51、54-60、77-83、89-100、117-124、146-172、176-204、216-231、237-244、267-278、324-334、342-348、396-401、427-433、438-450、452-457、465-471、473-481、491-500、509-515、523-544、550-556、558-569、589-595、606-618、625-632、640-649、665-671、678-688、691-698、717-723、728-734、781-789、800-805、812-821、833-868、873-879、889-905、929-939、988-998、1046-1061、1073-1079、1089-1096、1115-1124、1132-1140、1172-1196、1220-1226、1231-1249、1269-1277、1287-1301、1307-1330、1350-1361、1369-1378、1387-1412、1414-1420、1422-1439、1484-1491、1513-1529、1552-1561、1576-1583、1606-1613、1617-1640、1647-1654、1665-1679、1686-1698、1709-1727、1736-1743、1750-1757、1771-1790、1801-1807、1817-1823、1831-1842、1859-1868、1870-1882、1884-1891、1900-1906、1909-1914、1929-1935、1952-1960、1974-1988、2002-2011、2032-2063、2071-2081、2116-2124、2139-2147、2149-2159、2163-2190、2209-2215、2245-2253、2282-2287、2331-2342、2360-2370、2379-2393、2402-2408、2414-2421、2423-2430、2433-2439、2442-2450、2472-2478、2485-2493、2495-2503、2506-2512、2547-2554、2558-2564、2615-2625、2637-2652、2692-2698、2700-2706、2711-2723、2731-2740、2748-2753、2756-2762、2765-2772、2781-2798、2810-2824、2844-2852、2885-2899、2912-2922、2937-2944、2947-2970、2988-2998、3016-3025、3032-3037、3062-3071、3129-3148、3156-3161 および 530-607 (配列番号 223) ; 31-36、57-62、79-85、90-96、99-112、120-146、162-185、193-203、208-217、219-226、239-253、283-290、298-304、306-321、340-349、351-361、365-372、386-395、407-438、473-486、537-551、558-568、576-594、598-604 および 75-95 (配列番号 224) ; 14-19、24-30、34-42、45-52、54-64、66-82、95-105、107-118、126-163、171-177、184-201、210-215、260-269、273-279、288-304、321-327、358-364、370-375、380-387、394-404、407-413、421-431、436-451、465-474、504-511、531-552、578-587、614-626、629-636、638-671、691-715、719-729、733-745、752-759、768-777、785-792、794-802、805-824、844-854、867-880、885-891、893-902、907-924、939-948、955-964、966-975、987-1000、1012-1017、1023-1028、1050-1071、1083-1098、1102-1115、1133-1146、1170-1183、1204-1211、1213-1223、1262-1311、1313-1319、1346-1355、1366-1371、1383-1405、1409-1414 および 776-819 (配列番号 225) ; 12-27、30-38、54-61、64-74、82-96、103-110、117-125、134-140、147-158、185-201、218-225、232-253、265-280、319-325、350-362、366-372、376-386、464-483、485-490、511-521、531-537、542-559、564-574、593-609、613-619、637-642、668-677 および 195-214 (配列番号 226) ; 4-21、59-67、73-79、84-91、141-151、186-197、203-214、222-227、237-245、255-260、281-292、294-311、336-344、346-355、422-437、459-466、484-491 および 77-109 (配列番号 227) ; 10-45、52-61、63-70、74-102、112-122、124-132、164-178、181-205、212-240、246-256 および 226-247 (配列番号 228) ; 38-50、53-63、78-87、89-111、126-152、169-176、179-186、193-228、254-267、275-282、288-304、309-318、325-341、346-353、358-367、384-395、404-427、429-435、456-465、467-501、510-521、523-536、541-548、552-560、563-584、589-595、597-620、625-637、639-645、661-666、712-729、734-741、743-750、775-806、809-816、818-840、842-

850 および 693-714 (配列番号 229); 5-17、30-37、52-75、77-86、88-107、112-135
、151-160、178-222、226-246、263-270、279-294、306-314、327-342、345-352、374-38
1、389-416、422-429、435-449、453-467、473-500、512-522、524-531、542-549、552-5
60、565-571、575-586、594-600、613-619、625-633、635-641、647-653、667-674、680-
699、711-729、735-741、764-775、781-786、792-798、805-813、817-825、833-842、850
-855、860-866、869-910、917-930、949-990 および 533-562 (配列番号 230); 7-14、
39-46、61-74、83-89、93-99、110-121、136-150、172-180、182-200、207-216、223-236
、238-251、265-271、280-288、294-309、320-336、339-354、362-377、383-389、401-40
7、435-441、446-453、460-465、472-487、499-511、518-528、533-540、557-570、572-5
87、631-637、643-658、663-669、672-678、681-687、695-706、714-728 および 118-139 10
(配列番号 231); 5-19、24-30、56-64、69-79、93-100、102-111、117-123、125-133
、174-182、185-199、205-224、268-275、311-336 および 102-125 (配列番号 232); 6
-35、39-45、57-62、80-85、92-106、117-122、126-171、214-223、253-260、268-273、2
85-291、295-306、315-320、325-336、361-366 および 172-202 (配列番号 233); 4-13
、24-37、45-51、58-66、84-92、112-121、132-141、151-171、175-195、204-212、222-2
40、262-268、276-295、305-336、338-348、354-362 および 160-183 (配列番号 234);
10-16、24-35、41-73、78-104、111-121、124-139、141-148、150-164、196-215、224-2
41、249-282、299-307、315-357、368-378、393-401 および 345-367 (配列番号 235);
4-32、48-53、61-67、84-104、112-118 および 106-130 (配列番号 236); 21-28、31-
36、65-81、98-105、115-121、123-131、136-142、155-161、177-190 および 201-232 (20
配列番号 237); 4-15、21-27、33-39、42-56、58-64、68-82、84-90、92-98、113-122、
146-162、168-175、177-189、191-203、249-268、279-285、287-304、328-342、349-358
、371-378、387-393、404-413、419-425、467-479、487-498、513-524、528-539、541-56
5、572-579、595-606、626-635、637-642 および 612-626 (配列番号 238); 7-13、52-
70、76-82、97-106、110-117 および 13-45 (配列番号 239); 5-10、12-48、59-64、87
-102、107-128、131-140、154-161、165-171、173-215 および 54-74 (配列番号 240);
4-11、19-28、34-40、74-81、87-98、126-147、163-171、184-193、205-213 および 49-
124 (配列番号 241); 7-14、23-29、35-40、61-67、99-106、111-122、124-133、135-1
61、187-206、216-229、236-245、262-268、271-280 および 256-273 (配列番号 242);
4-13、17-37、47-54、85-99、105-113、120-132、147-166、180-186、192-199、204-216 30
および 127-144 (配列番号 243); 14-27、29-37、52-62、68-76、89-96、117-123、12
5-131、137-145、166-195、205-212、214-222、228-235、258-264、271-281、288-296、3
08-324、332-339、355-361、365-371 および 268-293 (配列番号 244); 4-21、30-42、5
4-60、78-85、90-110、141-147、160-168、176-185、194-206、218-225、230-245、251-2
61、287-293、295-304、320-326、334-347、351-362、386-402、413-423、427-433、439-
453、456-477、480-493、507-513、526-539、574-581、591-598、600-609、614-632、655
-665、685-691、703-712、742-747、757-775、797-803、813-819、823-829、880-887、90
1-906、930-944、948-958、962-968、971-995、1002-1009、1017-1023、1036-1053、1069
-1081、1107-1124、1129-1152、1178-1195、1211-1223、1249-1266、1271-1288、1334-13
40、1346-1367、1-63 および 171-189 (配列番号 245); 4-22、52-63、70-75、94-104 40
、112-125、133-141、176-199、209-216、244-259、287-299、336-352、366-372、386-39
9、421-436、444-449、457-466、481-487、506-529、531-540 および 295-378 (配列番
号 246); 9-30、43-49、58-75、86-96、119-131、138-147、162-167、181-201、208-214
および 16-121 (配列番号 247); 4-27、52-58、80-90、92-100、108-114、118-143、1
69-176、189-198、247-261、281-287、307-317、323-329、352-363、372-381、396-411、
413-426、429-440、442-450、456-461、468-479 および 1-73 (配列番号 248); 4-32、
47-52、57-63、71-78、92-104、126-142、153-175 および 145-163 (配列番号 249); 1
7-23、35-41、51-70、73-86、104-125 および 105-129 (配列番号 250); 25-32、41-50
、75-85、87-103、115-122、138-149、164-171、188-210、212-220、224-234、256-273、
288-299、304-310、330-336、357-365、382-390、399-405、414-421、440-446、454-461 50

、480-486、502-514、518-540、543-553、561-567、572-580、582-588、595-630、633-651、672-681、691-709、760-767、813-832、841-848、852-866、873-893、919-925、927-933、940-955、957-978、984-997、1000-1010、1035-1040、1044-1051、1058-1064、1081-1091、1097-1124、1129-1138、1144-1150、1158-1165、1170-1180、909-936 および 1001-1031 (配列番号 251) ; 4-12、19-26、31-41、49-64、66-86、101-117、119-127、134-142、152-161、163-172、179-188、209-218、234-241、276-291、294-300、307-320、324-341、346-356、373-387、389-397、410-416、418-436、444-454、460-472、481-486、500-507、511-535、541-549、553-559、579-586、602-607、613-620、628-640、654-663、671-678、681-691、709-722、741-754、766-774、778-786、797-803 および 212-226 (配列番号 252) ; 4-10、15-27、34-54、60-73、79-88、101-115、120-136、154-162、167-172、222-240 および 126-195 (配列番号 253) ; 5-16、18-25、29-35、57-63、86-91、107-121、123-131、170-179、185-199、204-226、250-255、262-274、291-296、325-347 および 1-38 (配列番号 254) ; 7-19、22-34、36-42、48-54、60-66、71-76、104-110、118-133、135-145、158-164、167-174、182-193、196-204、217-229、251-290、293-299、309-315 および 288-318 (配列番号 255) ; 43-51、55-61、66-73、80-90、103-127、133-142、174-180、185-196、203-210、229-235、239-251、258-266、272-278、289-314、316-326、340-346、355-361 および 14-27 (配列番号 256) ; 4-25、27-33、35-41、52-74、76-89、99-124、138-144、146-159、167-182、184-191、193-206、211-223、232-240、249-257、270-279、281-287、293-310、322-341、347-356 および 292-322 (配列番号 257) ; 5-13、28-38、43-60、67-72、98-116、122-134、137-151、167-174、177-195、197-216 および 99-195 (配列番号 258) ; 15-33、35-42、48-57、62-68、73-91、107-119、121-153、173-194、205-210、223-228、234-241、243-259、275-298、308-315、327-340、342-370、376-391、398-404、410-419 および 71-122 (配列番号 259) ; 12-39、43-64、87-95、99-105、114-126、128-136、139-147、212-225 および 107-141 (配列番号 260) ; 6-33、40-45、60-75、79-86、121-129、131-137、161-167、172-178、186-195、203-212、236-244、257-264、278-294、306-312、345-358、368-381、386-395、404-410、412-418 および 198-270 (配列番号 261) ; 18-31、34-41、50-56、69-83、99-106、129-141、147-153、159-168、170-178、190-198、200-212、221-232、237-255、261-266、274-292 および 118-216 (配列番号 262) ; 17-47、61-67、87-93、115-121、126-132、140-148、167-173、179-186、214-223、250-255、264-272、282-294、306-318、338-353、358-377、385-401、414-420、433-441、451-457、470-480、505-511、544-550、571-581、600-607、612-618、631-648、655-662、669-681、693-714、721-726、733-740、757-778、813-823、831-838、851-857、866-876、893-905、912-917、930-936、951-963、971-981、1008-1019、1021-1033、1035-1041、1054-1064、1066-1076、1097-1110、1113-1121、1126-1140、1159-1171、1182-1195、1197-1203、1216-1222、1231-1240、1243-1262、1268-1287 および 738-828 (配列番号 263) ; 19-28、40-46、51-57、68-74、81-87、98-108、111-121 および 20-36 (配列番号 264) ; 4-17、19-44、60-69、80-86、110-116 および 33-60 (配列番号 265) ; 8-16、18-28、42-50、53-75、79-86、94-99、122-128、136-142、149-163、166-173、198-212、254-272、288-295、304-318、324-329、343-348、351-364、367-383、389-395、411-420、427-436 および 11-56 (配列番号 266) ; 19-25 および 6-24 (配列番号 267) ; 6-39、59-68 および 44-63 (配列番号 268) ; 5-14、21-28、38-53 および 29-41 (配列番号 269) ; 4-13、31-41、56-65 および 32-56 (配列番号 270) ; 5-12 および 4-21 (配列番号 271) ; 4-18 および 17-32 (配列番号 272) ; 4-10、23-33 および 14-30 (配列番号 273) ; 26-34、44-53 および 35-52 (配列番号 274) ; 1-19 (配列番号 275) ; 4-17、23-30、32-37 および 6-23 (配列番号 276) ; 5-33、40-58、61-66 および 45-66 (配列番号 277) ; 15-41、61-67 および 41-65 (配列番号 278) ; 4-12、16-23、26-37 および 10-29 (配列番号 279) ; 23-39 および 37-55 (配列番号 280) ; 12-20 および 38-55 (配列番号 281) ; 22-37 および 7-22 (配列番号 282) ; 3-14 (配列番号 283) ; 6-16、43-65、71-76 および 17-31 (配列番号 284) ; 4-

10

20

30

40

50

13、27-39、42-69 および 17-32 (配列番号 285); 4-12、26-39 および 10-25 (配列番号 286); 2-31 (配列番号 287); 6-38、49-62 および 39-55 (配列番号 288); 4-10、24-30 および 2-19 (配列番号 289); 12-17、25-46 および 15-30 (配列番号 290); 4-13 および 2-28 (配列番号 291); 30-38 および 17-45 (配列番号 292); 24-33、55-61 および 31-61 (配列番号 293); 4-26、34-48 および 15-33 (配列番号 294); 9-15 および 1-22 (配列番号 295); 4-31 および 14-33 (配列番号 296); 5-34、49-55、64-82 および 69-83 (配列番号 297); 33-45 および 21-39 (配列番号 298); 7-14、24-32、42-65、79-86 および 50-64 (配列番号 299); 13-27、33-43、45-62 および 12-37 (配列番号 300); 4-15、17-32 および 10-26 (配列番号 301); 4-9、11-43、45-75 および 47-69 (配列番号 302); 4-18、22-37 および 17-34 (配列番号 303); 4-14 および 5-24 (配列番号 304); 7-33、35-46 および 1-19 (配列番号 305); 13-37、69-75 および 51-69 (配列番号 306); 14-24、26-34、37-49、66-78 および 2-25 (配列番号 307); 17-46、52-57、59-64 および 54-68 (配列番号 308); 4-22 および 13-25 (配列番号 309); 8-40、53-63 および 29-50 (配列番号 310); 16-28 および 32-40 (配列番号 311); 14-20、22-28、39-45 および 2-22 (配列番号 312); 4-13 および 12-31 (配列番号 313); 15-21 および 2-17 (配列番号 314); 4-17 および 20-36 (配列番号 315); 4-19 および 9-18 (配列番号 316); 4-14 および 3-19 (配列番号 317); 4-21、32-40 および 21-39 (配列番号 318); 4-13 および 10-27 (配列番号 319); 18-31、39-47、75-87、89-98 および 79-99 (配列番号 320); 15-21 および 9-24 (配列番号 321); 4-14、18-27、30-53、55-64、68-74、81-98 および 22-40 (配列番号 322); 7-24、44-51 および 35-60 (配列番号 323); 10-47 および 23-37 (配列番号 324); 4-10、12-46 および 7-22 (配列番号 325); 20-27 および 1-13 (配列番号 326); 6-19、41-51 および 9-37 (配列番号 327); 4-9、11-17 および 9-23 (配列番号 328); 4-17、23-38、46-66、68-85 および 34-46 (配列番号 329); 4-18、34-59、75-81 および 61-84 (配列番号 330); 6-17 および 7-28 (配列番号 331); 4-32、56-61 および 35-52 (配列番号 332); 4-14、27-71、74-88、93-110、115-120、124-130、139-154、161-172 および 146-171 (配列番号 333); 4-21 および 3-15 (配列番号 334); 12-17 および 9-26 (配列番号 335); 10-21、45-58 および 51-67 (配列番号 336); 59-66、68-84 および 13-42 (配列番号 337); 11-16 および 1-16 (配列番号 338); 4-19、23-37 および 10-30 (配列番号 339); 19-27、35-46、48-66、82-88、99-105、113-119 および 42-59 (配列番号 340); 135-147 (配列番号 171); 658-682 (配列番号 172); 411-427 および 1226-1246 (配列番号 173); 794-817 および 801-824 (配列番号 174); 468-492 および 474-495 (配列番号 177); 366-388 (配列番号 178); 266-291、287-312 および 308-333 (配列番号 179); 197-213 および 195-211 (配列番号 180); 252-275、262-285 および 812-830 (配列番号 181); 94-112、97-120 および 104-128 (配列番号 182); 257-281 (配列番号 183); 106-134 (配列番号 184); 70-86 (配列番号 187); 358-383、378-402、397-421、499-524、520-545、541-566、622-646、641-665 および 660-684 (配列番号 189); 248-260 (配列番号 192); 15-34 (配列番号 194); 112-129 (配列番号 195); 333-358 および 353-378 (配列番号 196); 316-343、339-366 および 362-389 (配列番号 197); 98-123 および 104-126 (配列番号 198); 20-43 および 23-48 (配列番号 201); 124-145 (配列番号 203); 717-738 (配列番号 204); 37-56 (配列番号 205); 118-134 (配列番号 206); 500-522 (配列番号 208); 32-47 (配列番号 211); 25-51、47-73 および 69-95 (配列番号 212); 503-529 (配列番号 215); 112-128 (配列番号 216); 181-199 (配列番号 218); 109-121 (配列番号 219); 150-163 (配列番号 220); 77-97 (配列番号 221); 564-586 (配列番号 223); 75-94 (配列番号 224); 776-798、784-808 および 794-815 (配列番号 225); 196-212、78-100 および 85-107 (配列番号 226); 536-553 (配列番号 230); 102-125 (配列番号 232); 178-198 (配列番号 233); 612-626 (配列番号 238); 171-187 (配列番号 245); 296-320、315-339、334-358 および 353-377 (配列番号 246); 47-71 (配列番号 247); 1

-25、20-45 および 40-64 (配列番号 248); 146-161 (配列番号 249); 910-935 およ
び 1007-1030 (配列番号 251); 212-226 (配列番号 252); 126-152、148-173 およ
び 169-195 (配列番号 253); 288-310 および 293-316 (配列番号 255); 293-312 (配
列番号 257); 154-170 (配列番号 258); 72-95、90-112 および 97-121 (配列番号 2
59); 135-150 および 146-163 (配列番号 262); 799-827 (配列番号 263); 23-43
および 33-53 (配列番号 266); 44-62 (配列番号 268); 6-22 (配列番号 276); 37
-54 (配列番号 280); 40-54 (配列番号 281); 7-21 (配列番号 282); 4-11、16-34
、48-55、67-77、87-106 および 153-183 (配列番号 425); 22-40、49-65、70-91、95-
109、111-125、146-207、209-216、219-225、229-244、251-270、274-286、292-309、316
-329、335-355、358-370、376-388、392-419、425-430、435-441、448-455、464-478、48
6-515 および 437-465 (配列番号 426); 5-19、25-31、43-48、60-79、88-100、105-12
9、148-171、187-193、243-263、316-322、334-340、345-351、369-378、381-391、399-4
04、474-483、502-517、525-530、558-568、579-596、622-627、631-638、644-651、653-
660、674-680、687-693、721-728、743-753、760-775、788-795、806-813、821-828、835
-842、847-859、868-887 および 300-347 (配列番号 427); 5-26、37-44、89-97、112-
118、121-128、138-154、157-165、176-181、188-198、205-218、223-243、247-253、260
-279 および 76-155 (配列番号 428); 4-29、41-46、49-68、82-88、121-147、158-164
、187-193、195-208、229-236、244-249、251-263、269-275、307-313、337-343、348-38
1、392-398、402-408、432-438、85-117 および 194-239 (配列番号 429); 5-12、14-2
2、28-34、40-46、70-79、84-129、152-165、174-182 および 37-109 (配列番号 430);
5-16、18-52、54-72、81-86、118-126、136-145、151-157、168-180、209-233、244-270
、295-302、315-326、329-337、345-352、364-373、397-402、408-418、424-431、435-44
3、472-480、483-489、504-510、519-527、549-564、576-599、605-637、641-673 およ
び 91-98 (配列番号 431); 23-36、42-52、133-140、151-157、242-247、267-277、295-3
01、320-328、333-339、345-352、365-371、397-403、415-428、456-465、481-487、489-
495、508-516、518-527、585-592、606-614、631-637、643-658、665-670、723-728、737
-744、752-759、787-793、835-841、873-885、918-928、938-945、951-966、978-988、10
15-1020、1030-1036、1044-1052、1058-1069、1071-1079、1081-1088、1113-1119、1125-
1138、1141-1147、1164-1170、1172-1177、1190-1200、1214-1220、1230-1236、1239-124
5、1262-1268、1270-1275、1288-1298、1312-1318、1328-1334、1337-1343、1360-1366、
1368-1373、1386-1396、1410-1416、1426-1432、1435-1441、1458-1464、1466-1471、148
4-1494、1508-1514、1524-1530、1533-1539、1556-1562 および 307-340 (配列番号 432
) ; 19-25、35-41、44-50、66-72、74-79、92-102、116-122、132-138、141-147、164-17
0、172-177、190-200、214-220、230-236、239-245、262-268、270-275、288-298、312-3
18、328-334、337-343、360-366、368-373、386-396、410-416、426-432、435-441、458-
464、466-478、504-524、79-148、177-246、275-344 および 373-442 (配列番号 433);
7-14、16-23、33-39、46-53、72-79、92-115、123-130、156-175、179-187、214-220、2
39-246、266-274、302-325、338-354、360-370、375-390、392-401、421-428、430-463
および 29-58 (配列番号 434); 4-9、22-39、58-65、72-82、87-92、99-104、107-119
、143-166、171-177、194-202、205-213、220-228、231-240、247-263、309-315、317-32
3、336-343 および 294-320 (配列番号 435); 4-10、12-18、24-29、34-43、50-65、70
-76、111-117、129-138、152-159、166-171、184-195、200-210、224-236、241-251、274
-283、285-296、313-319、332-341、348-355、378-386、410-416、433-445、475-482、52
3-529、531-540、584-596、626-633、674-680、682-688、738-750、780-787、828-834、8
36-842、853-862、882-887、893-912 および 604-676 (配列番号 436); 15-38、49-57
、60-99、103-119、124-194、200-206、215-249、251-291、307-313、315-347、369-378
、383-390、393-400、405-411、423-435、440-447、454-460、470-486、490-503、532-53
9、542-549、551-567、579-592 および 509-583 (配列番号 437); 38-44、47-88、95-1
03、157-172、235-240、250-260、263-276、294-300、312-317、331-337、369-391、412-
419、442-448、453-463、490-529、537-555、571-580、600-617、619-627、642-648、682

10

20

30

40

50

-687、693-700、716-722、738-748、756-763、779-789、796-802、820-828、833-840、846-853、862-872、880-887、894-899、924-937、957-963、1006-1012、1043-1049、1063-1069、1076-1097 および 124-147 (配列番号 438) ; 4-28、31-49、60-71、75-102、104-114、134-144、160-184、250-257、277-285、287-294、330-338、345-351、367-374、381-388、393-399、402-407、420-426、443-448、458-464、411-436 および 454-488 (配列番号 439) ; 20-27、45-55、57-64、66-77、98-106、130-137、155-165、167-174、176-187、194-203、208-223、227-238、245-251、257-270、273-278、287-299、330-345、352-358、363-385、392-399、410-417、437-443、467-484、486-492、495-500、504-516、526-536 および 219-270 (配列番号 440) ; 11-22、24-31、46-63、65-71、73-88、95-109、174-181、183-201、204-212、216-222、228-233、241-247 および 142-221 (配列番号 441) ; 8-28、51-59、67-84、93-98、140-152、154-162、183-188 および 91-125 (配列番号 442) ; 10-22、27-61 および 69-100 (配列番号 443) ; 7-15、18-26、94-100、126-131、152-165、219-228、254-263、274-292、297-308、333-340、342-352、354-371、373-379、403-410、420-438、450-456、463-470、489-495、503-512 および 97-173 (配列番号 444) ; 4-21、37-43、49-65、67-74、76-90、113-119、131-141、155-173、175-189、192-199、207-221、247-254、266-276、317-322、337-343、387-393、408-428、439-448、451-460、469-479、482-487、493-501、517-523、533-542 および 480-503 (配列番号 445) ; 11-26、40-46、78-86、93-103、121-126、132-138、166-177、183-196、203-212、214-221、228-263、304-311、323-338、345-351、357-363、379-393、420-434、442-448、518-527、547-553、581-591、602-609、637-645、665-674、687-692、701-708、730-739、796-802、844-857、882-888、903-914、944-950、976-983、1027-1033、1049-1057、1066-1072、1085-1092、1120-1127、1137-1144、1153-1158、1165-1176、1181-1187、1221-1230、1238-1244、1269-1274 および 605-632 (配列番号 446) ; 6-47、57-65、83-95、109-121、138-147、154-164、167-177、194-200、202-212、227-234、240-253、260-267、283-291、320-329、340-347、356-364、412-422、430-436、441-459、465-475、478-486、498-507 および 59-84 (配列番号 447) ; 10-21、58-83、88-97、120-126 および 21-51 (配列番号 448) ; 5-39、56-62、76-88、90-114、138-162、170-195、202-221、228-250、264-270、304-355、374-387、391-416、462-471、526-546、554-561、574-579、639-645、651-660、674-682、689-694 および 666-697 (配列番号 449) ; 6-30、36-42、143-157、176-197、202-209、216-233、241-246、275-287、292-299、315-325、343-350、375-380、397-403、411-420、422-434、441-448、467-474、477-499、555-568、591-597、601-609、623-644、667-688、692-698、703-718、736-747、757-766、782-791、795-801、832-840、859-865 および 226-269 (配列番号 450) ; 6-23、43-51、61-67、73-82、91-97、123-130、149-158、164-175、228-234、240-246、248-255、262-272、326-332、340-347、365-371、377-388、409-419、425-431、438-445、449-457、464-470、496-507、559-568、575-581、603-608、617-623、633-639、648-654、659-670、695-701、734-752、806-814、816-829、861-868、891-899、904-909、937-945、947-960、978-983、992-999、1022-1031、1068-1076、1078-1091、1109-1114、1123-1130、1153-1162、1199-1207、1209-1222、1254-1261、1284-1293、1330-1338、1340-1353、1371-1376、1385-1392、1415-1421、1433-1438、1460-1465、1470-1492 および 1422-1458 (配列番号 451) ; 82-94、111-118、125-131、206-212、261-266、310-320、328-338、345-351、353-360、414-420、424-434、440-447、451-500、506-516、548-561、566-572、584-591、601-622、630-636、650-659、661-667、674-699、703-711、717-729、736-744、752-759、765-771、813-822、826-842、852-868、870-877、881-895、897-906、913-922 および 602-671 (配列番号 452) ; 12-18、20-25、43-54、56-65、73-79、82-88、99-111、136-142、153-169、171-183、195-223、229-248、255-260、272-277、281-292、298-319、322-329、332-351、363-379、381-389 および 275-304 (配列番号 453) ; 4-9、34-48、65-77、101-106、111-131、138-153、186-191、230-250 および 148-219 (配列番号 454) ; 4-23、30-35、42-53、67-76、82-87、101-108、112-130、132-138、147-152、161-183、187-208、218-225、265-283、29

5-303、306-317、322-334、338-357、360-368、370-383、387-398、400-419、421-430、104-182 および 240-304 (配列番号 455); 4-12、63-69、94-102、146-164、166-173、175-181、193-207、263-281、286-295、301-306、330-343、369-378、382-388、414-420、422-430、438-454、456-462、472-531、543-560、581-591、596-605、614-623、626-635、656-662、669-676、683-690、693-698、705-711、728-736、752-764 および 69-102 (配列番号 456); 6-12、43-53、141-147、164-179、185-195、197-206、227-235、237-271、288-305、308-317、335-341、351-357、365-376、386-395、397-416、422-447 および 11-35 (配列番号 457); 16-24、50-65、73-84、88-99、114-124、130-146、181-187、193-203、214-220、236-247、250-258、287-297 および 50-113 (配列番号 458); 4-25、50-55、76-82、117-123、131-137、139-148、157-166、239-245、253-258、266-275、277-292、300-306、51-83 および 93-161 (配列番号 459); 6-22、34-43、51-86、93-100、110-116、150-161、164-171、180-187、197-218 および 168-237 (配列番号 460); 4-27、55-60、74-82 および 10-46 (配列番号 461); 6-19、25-31、43-49、60-79、88-100、105-129、148-161、164-171、187-193、243-263、316-322、334-340、369-378、381-391、398-404、460-466、474-483、502-509、511-517、525-530、558-567、579-596、622-627、631-638、641-651、653-659、674-680、687-693、710-716、720-727、743-753、760-775、788-795、806-813、821-828、836-842、847-860、865-880 および 258-377 (配列番号 462); 4-11、25-64、71-79、88-94、107-120、123-132、167-188、231-237、240-246、261-267、306-311、330-342、351-358、389-395、406-418、429-434、439-448、483-501、511-520 および 71-143 (配列番号 463); 4-18、22-27、53-64、94-100、121-127、133-139、155-164、177-182、187-196、206-218、224-242、248-253、258-277 および 184-253 (配列番号 464); 10-17、56-67、72-82、94-99、106-113、166-173、229-235、243-283、295-301、313-321、326-331、342-348、396-414、423-435、446-452、454-462、496-502、511-534、543-556、563-570、586-593、616-626、638-645、653-662、679-696、731-737、766-774、776-782、790-796、810-817、825-835、837-846 および 540-615 (配列番号 465); 13-24、30-36、73-81、89-95、109-115、117-143、161-173、179-189、226-244、251-261、275-281、298-305、307-315、323-328、364-374、69-186 および 264-354 (配列番号 466); 19-25 および 6-22 (配列番号 467); 6-39、59-68 および 43-62 (配列番号 468); 6-14、22-32 および 1-27 (配列番号 469); 4-41 および 28-40 (配列番号 470); 8-14 および 4-19 (配列番号 471); 4-10、12-22、30-35 および 6-33 (配列番号 472); 4-16、24-33 および 37-54 (配列番号 473); 2-23 (配列番号 474); 4-21、27-33、36-41 および 14-34 (配列番号 475); 4-14、24-30、37-42、57-78、83-89、94-103、113-131 および 100-122 (配列番号 476)、および該配列の少なくとも 6、好ましくは 8 を超える、より好ましくは 10 アミノ酸を超える、好ましくは 70 アミノ酸以下、50、40、20、15、11 アミノ酸を含む断片。これらすべての断片は個々にそれぞれ独立に本発明の好ましい選択された態様を形成する。

【0134】

特定の抗原のすべての直鎖状の過免疫血清反応性断片は少なくとも 10 アミノ酸の長さの 1 アミノ酸がオーバーラップするペプチドのセットによってタンパク質抗原の全体の配列を分析することによって同定できる。その後、非直鎖状エピトープは、発現した全長タンパク質またはそのドメインポリペプチドを用いて過免疫血清によってタンパク質抗原を分析することによって同定できる。タンパク質の異なるドメインはネイティブなタンパク質とは独立な 3D 構造を形成するのに十分であるとすると、それぞれ組換えまたは合成により作ったドメインポリペプチドの過免疫血清による分析により、マルチドメインタンパク質の個々のドメイン内の高次構造エピトープの同定が可能となるであろう。ドメインが直鎖状および高次構造エピトープを有する抗原については、直鎖状エピトープに対応するペプチドによる競合実験を用いて、高次構造エピトープの存在を確認することが出来る。

【0135】

本発明はまた、とりわけ、上記断片をコードする核酸分子、該断片をコードする核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、特にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

核酸分子、および断片をコードする核酸分子を増幅するためのPCRプライマー等の核酸分子にも関することが理解されよう。この点に関して、好ましい核酸分子は上記の好ましい断片に対応するものである。

【0136】

本発明はまた、本発明の1以上の核酸分子を含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作された宿主細胞、および組換え技術による過免疫血清反応性抗原およびその断片の産生にも関する。

【0137】

非常に様々な発現ベクターを用いて本発明による過免疫血清反応性抗原またはその断片を発現させることが出来る。一般に、宿主においてポリペプチドを発現するために核酸を維持、増殖または発現させるのに好まないずれのベクターを発現に用いてもよい。本発明のこの態様によると、ベクターは例えば、プラスミドベクター、一本鎖または二本鎖ファージベクター、一本鎖または二本鎖RNAまたはDNAウイルスベクターであってよい。ここに開示の開始プラスミドは市販されているか、公共のものか、あるいは、周知の公表された手順を常套に適用することによって入手可能なプラスミドから構築できるものである。好ましいベクターは、特定の態様では、本発明の核酸分子および過免疫血清反応性抗原またはその断片の発現のためのものである。宿主細胞中の核酸コンストラクトは組換え配列によってコードされる遺伝子産物を産生するための常套方法によって用いることが出来る。あるいは、本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片は常套のペプチド合成器によって合成的に生産することも出来る。成熟タンパク質は適当なプロモーターの制御下で、哺乳類細胞、酵母、細菌またはその他の細胞中で発現させうる。かかるタンパク質を産生するのに本発明のDNAコンストラクト由来のRNAを用いて無細胞翻訳系を用いてもよい。

【0138】

宿主細胞を遺伝子操作して核酸分子を組み込み、本発明の核酸分子を発現させることが出来る。適当な宿主の代表例には、細菌細胞、例えば腸球菌、ブドウ球菌、大腸菌、ストレプトマイセスおよび枯草菌細胞；真菌細胞、例えば酵母細胞およびコウジカビ細胞；昆虫細胞、例えばシヨウジョウバエ S2 および スポドプテラ Sf9 細胞；動物細胞、例えば CHO、COS、Hela、C127、3T3、BHK、293 および Bowes メラノーマ細胞；および植物細胞が含まれる。

【0139】

本発明はまた、大便連鎖球菌過免疫血清反応性抗原およびその断片の生産方法も提供し、該方法は本発明によって提供される核酸分子によってコードされる過免疫血清反応性抗原またはその断片を宿主細胞から発現させることを含む。本発明はさらに大便連鎖球菌過免疫血清反応性抗原またはその断片を発現する細胞の生産方法も提供し、該方法は、好適な宿主細胞に本発明によるベクターを形質転換または形質移入して、形質転換または形質移入された細胞にベクターに含まれる核酸によってコードされるポリペプチドを発現させることを含む。

【0140】

ポリペプチドは修飾形態、例えば融合タンパク質として発現させてもよく、分泌シグナルだけでなくさらなる異種機能性領域を含んでいてもよい。したがって例えば、さらなるアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域を、ポリペプチドのN-またはC-末端に付加して、精製または続く操作および保存の際の宿主細胞における安定性および持続性を向上させてもよい。また、精製を容易にするために領域をポリペプチドに付加してもよい。かかる領域はポリペプチドの最終調製の前に除くとよい。分泌または排出を起こすため、安定性を向上させるため、または精製を促進するための、ペプチド部分のポリペプチドへの付加はよく知られており、当該技術分野で常套の技術である。好ましい融合タンパク質は、ポリペプチドの可溶化または精製に有用な免疫グロブリンからの異種領域を含む。例えば、EP-A-0 464 533 (カナダ対応2045869)は、免疫グロブリン分子の定常部の様々な部分とともにその他のタンパク質またはその部分を含む融合タンパク質を開示している。創薬において、例えば、タンパク質を抗体Fc部分と融合させて、アンタゴニストの同定のためのハイス

10

20

30

40

50

ルーブットスクリーニングアッセイが行われている。例えば{Bennett、D. et al.、1995}および{Johanson、K. et al.、1995}を参照されたい。

【0141】

大便連鎖球菌過免疫血清反応性抗原またはその断片は組換え細胞培養物から周知の方法によって回収および精製できる。かかる方法は例えば、硫酸またはエタノール沈殿、酸抽出、陽イオンまたは陰イオン交換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である。

【0142】

本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片は化学合成および生物学手段によって作ることが出来る。後者は、本発明による核酸を含むベクターによる宿主細胞の形質移入または形質転換、および、形質移入または形質転換された宿主細胞の当業者に知られた条件下での培養を含む。産生方法は作るべきポリペプチドの精製または単離のために精製工程を含んでいてもよい。好ましい態様において、ベクターは本発明によるベクターである。

【0143】

本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片は生物またはそれ由来のポリペプチドを含むサンプルにおける1以上の生物の検出にも用いることが出来る。好ましくはかかる検出は診断のためであり、より好ましくは疾患の診断のためであり、もっとも好ましくは、グラム陽性細菌、特に腸球菌、ブドウ球菌およびラクトコッカスを含む群から選択される細菌の存在または量に関連または関連する疾患の診断のためである。より好ましくは、微生物はストレプトコッカス・アガラクティエ、肺炎連鎖球菌およびミュータンス連鎖球菌を含む群から選択され、特に、微生物は大便連鎖球菌である。

【0144】

本発明はまた、細胞および組織における本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片のレベルの検出のための定量および診断アッセイといった診断アッセイにも関し、レベルが正常であるか異常であるかの判定も含む。したがって、例えば、正常対照組織サンプルと比較したポリペプチドの過剰発現を検出するための本発明による診断アッセイを用いて感染の存在を検出することが出来、例えば、感染生物を同定することが出来る。宿主に由来するサンプルにおけるポリペプチドのレベルの測定のために用いることが出来るアッセイ技術は当業者に周知である。かかるアッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。なかでも、ELISAはしばしば好ましい。ELISAアッセイはまず、ポリペプチドに対して特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体の調製を含む。さらに、モノクローナル抗体に結合するレポーター抗体が一般に調製される。レポーター抗体は、検出可能な試薬、例えば、放射性、蛍光性またはセイヨウワサビペルオキシダーゼ酵素などの酵素試薬、に結合している。

【0145】

本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片はアレイの目的で、またはアレイと組み合わせて用いてもよい。より具体的には、少なくとも1つの本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片を支持体に固定化すればよい。該支持体は典型的には多様な過免疫血清反応性抗原およびその断片を含み、その多様性は1または数個の本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片および/または異なる過免疫血清反応性抗原およびその断片の使用によって作ることが出来る。かかるアレイおよび一般のアレイの特徴は、該支持体またはその表面上の特有の、またはあらかじめ決められた領域または位置において、特有のポリペプチドが固定化されているということである。このためアレイの特有の位置または領域のあらゆる活性を特定のポリペプチドに関連づけることが出来る。支持体に固定化された異なる過免疫血清反応性抗原およびその断片の数は10~数千種類の範囲の過免疫血清反応性抗原およびその断片でありうる。1 cm²当たりの過免疫血清反応性抗原およびその断片の密度は、好ましい態様において、1 cm²当たり10ペプチド/ポリペプチド~1 cm²当たり少なくとも400種類のペプチド/ポリペプチドであり、より具体的には1 c

10

20

30

40

50

m² 当たり少なくとも 1000種類の過免疫血清反応性抗原およびその断片である。

【0146】

かかるアレイの製造は当業者に知られており、例えば、米国特許 5744309号に記載されている。アレイは好ましくは少なくとも第一の表面を有する平面状、多孔性または非孔性固体支持体を含む。本明細書に開示する過免疫血清反応性抗原およびその断片を該表面に固定化する。好ましい支持体材料は、特に、ガラスまたはセルロースである。アレイを本明細書に記載する診断用途のいずれに用いる場合も本発明に含まれる。本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片だけでなく、本発明による核酸分子も上記のアレイの作成に用いることが出来る。本明細書に記載する抗体、好ましくはモノクローナル抗体でできたアレイにもこれは当てはまる。

10

【0147】

さらなる態様において、本発明は、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片、その誘導体または断片に対する抗体にも関する。本発明には例えば、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、およびFab断片、またはFab発現ライブラリーの生成物も含まれる。抗体がキメラである場合、即ち、その異なる部分が異なる種由来である場合、または少なくともそれぞれの配列が異なる種から得られたものである場合も本発明に含まれる。

【0148】

本発明の配列に対応する過免疫血清反応性抗原およびその断片に対する抗体は、過免疫血清反応性抗原およびその断片の動物への直接の注射、または過免疫血清反応性抗原およびその断片の動物、好ましくは非-ヒトへの投与により得ることが出来る。そうして得られた抗体は過免疫血清反応性抗原およびその断片自体に結合する。このようにして、過免疫血清反応性抗原およびその断片の、断片のみをコードする配列であっても、全体のネイティブな過免疫血清反応性抗原およびその断片に結合する抗体の作成に用いることが出来る。かかる抗体はかかる過免疫血清反応性抗原およびその断片を発現する組織からの過免疫血清反応性抗原およびその断片の単離に用いることが出来る。

20

【0149】

モノクローナル抗体の調製のために、連続的な細胞株培養によって作られる抗体を提供する当該技術分野で知られているあらゆる技術を用いることが出来る (元々 {Kohler, G. et al., 1975} に記載されている)。

30

【0150】

一本鎖抗体の産生について記載されている技術(米国特許第4946778号)は本発明による免疫原性過免疫血清反応性抗原およびその断片に対する一本鎖抗体の作成に適用することが出来る。また、トランスジェニックマウス、またはその他の哺乳類などのその他の生物を用いて、本発明による免疫原性過免疫血清反応性抗原およびその断片に対するヒト化抗体を発現させることができる。

【0151】

あるいは、ファージディスプレイ技術またはリボゾームディスプレイ (ribosomal display) を用いて、それぞれの標的抗原を有するようにスクリーニングされたヒトからのリンパ球のPCR増幅されたv-遺伝子のレパートリー、または未処置ライブラリーのいずれかから、過免疫血清反応性抗原およびその断片に対して結合活性を有する抗体遺伝子を選択することが出来る {McCafferty, J. et al., 1990}; {Marks, J. et al., 1992}。かかる抗体の親和性は、鎖シャフリング (chain shuffling) によっても増強することが出来る {Clackson, T. et al., 1991}。

40

【0152】

2つの抗原結合ドメインが存在する場合、各ドメインは異なるエピトープに対するものでもよく、「二重特異的」抗体と称される。

【0153】

上記抗体を用いて過免疫血清反応性抗原およびその断片を発現するクローンの単離または同定、あるいは本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片の精製を行ってもよく、

50

これは、単離のための固体支持体への抗体の結合および/または親和性クロマトグラフィーによる精製による。

【0154】

したがって、とりわけ、本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片に対する抗体は感染、特に細菌感染症、特に大便連鎖球菌による感染症の阻害および/または治療に用いることが出来る。

【0155】

過免疫血清反応性抗原およびその断片は、抗原的に、エピトープ的に (epitopically) または免疫学的に同等な誘導体を含み、これらは本発明の特定の態様を形成する。本明細書において用いる「抗原的に同等な誘導体」の語は、本発明によるタンパク質または過免疫血清反応性抗原およびその断片に対して生じた場合、病原菌と哺乳類宿主との相互作用に干渉する特定の抗体によって特異的に認識される過免疫血清反応性抗原およびその断片またはその同等物を含む。本明細書において用いる「免疫学的に同等な誘導体」の語は、脊椎動物において抗体をつくるための好適な製剤中で用いられた場合、抗体が病原菌と哺乳類宿主との相互作用を干渉するよう作用するペプチドまたはその同等物を含む。

【0156】

過免疫血清反応性抗原およびその断片、例えば、抗原的または免疫学的に同等なその誘導体または融合タンパク質はマウスまたはその他の動物、例えばラットまたはニワトリの免疫化のための抗原として用いることが出来る。融合タンパク質は過免疫血清反応性抗原およびその断片に安定性を付与しうる。抗原は、例えば、免疫原性キャリアタンパク質、例えばウシ血清アルブミン (BSA) またはキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と、接合によって、結合させることが出来る。あるいは、多コピーのタンパク質または過免疫血清反応性抗原およびその断片、あるいは抗原的または免疫学的に同等な過免疫血清反応性抗原およびその断片を含む抗原性ペプチドは、キャリアの使用が不要となるよう免疫原性を向上させるよう十分に抗原性であり得る。

【0157】

好ましくは、抗体またはその誘導体は個体中で免疫原性が低くなるよう改変する。例えば、個体がヒトの場合、抗体はもっとも好ましくは「ヒト化」し、ここで例えば {Jones, P. et al., 1986} または {Tempest, P. et al., 1991} に記載のように、ハイブリドーマ由来抗体の相補性決定領域をヒトモノクローナル抗体に移植する。

【0158】

遺伝子による免疫法における本発明のポリヌクレオチドの使用には、好ましくは好適な送達方法を用いる。例えば、筋肉へのプラスミド DNA の直接注射、特定のタンパク質キャリアと複合化した DNA の送達、DNA とリン酸カルシウムとの共沈、様々な形態のリポソーム中への DNA のカプセル封入、微粒子銃 {Tang, D. et al., 1992}、{Eisenbraun, M. et al., 1993} およびクローン化されたレトロウイルスベクターを用いたインビボ感染等である {Seeger, C. et al., 1984}。

【0159】

さらなる態様において、本発明は、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片のいずれかに結合するペプチド、およびかかるペプチドの製造方法に関し、ここでその方法は、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片の使用および当業者に知られた基本的工程の使用を特徴とする。

【0160】

かかるペプチドは当該技術分野の最新の方法、例えばファージディスプレイまたはリボゾームディスプレイを用いて作ることが出来る。ファージディスプレイの場合、基本的にはファージの形態においてペプチドのライブラリーを作り、この種のライブラリーを標的分子、ここでは本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片と接触させる。標的分子に結合するペプチドは次いで、好ましくは標的分子との複合体として、それぞれの反応から取り出す。結合特性は、少なくともある程度は、具体的に実施した実験設定、例えば、塩濃度等に依存することが当業者に知られている。高い親和性即ち強い力によって標的

10

20

30

40

50

分子に結合するペプチドを、ライブラリーの非結合メンバーから分離した後、そして所望により標的分子とペプチドの複合体から標的分子を除いた後、それぞれのペプチドを特徴づけるとよい。特徴付けに先立って、所望により増幅工程をおこなってもよく、例えば、ペプチドをコードするファージを増殖させる。特徴付けは好ましくは標的結合ペプチドの配列決定を含む。基本的には、ペプチドは長さによって制限されないが、しかし、好ましくは約8~20 アミノ酸の長さを有するペプチドが好ましくはそれぞれの方法において得られる。ライブラリーのサイズは約 $10^2 \sim 10^{18}$ 、好ましくは $10^8 \sim 10^{15}$ 種類のペプチドであるが、それに限定されない。

【0161】

特定の形態の標的結合過免疫血清反応性抗原およびその断片はいわゆる「アンチカリン」であり、独特許出願DE 197 42 706に記載されている。 10

【0162】

さらなる態様において、本発明は、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片のいずれかと相互作用する機能的核酸、およびかかる機能的核酸の製造方法に関し、ここで該方法は、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片および当業者に知られた基本的工程の使用を特徴とする。機能的核酸は好ましくはアプタマーおよびスピーゲルマーである。

【0163】

アプタマーは、一本鎖または二本鎖であって、標的分子と特異的に相互作用するD-核酸である。アプタマーの製造または選択は、例えば欧州特許 EP 0 533 838に記載されている。基本的には以下の工程を実施する。第一に、核酸の混合物、即ち潜在的アプタマーを提供し、ここで各核酸は典型的には数個、好ましくは少なくとも8の続くランダムなヌクレオチドのセグメントを含む。この混合物をついで標的分子と接触させ、これによって例えば候補混合物と比較して標的に対する高い親和性または強い力に基づいて核酸が標的分子に結合する。結合核酸を次いで混合物の残りから分離する。所望により、こうして得られた核酸を、例えばポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅する。これらの工程を数回繰り返して最終的に標的に特異的に結合する核酸の比が上昇した混合物が得られ、これから最終的な結合核酸が所望により選択される。かかる特異的に結合する核酸は、アプタマーと称される。アプタマーの作成または同定方法のいずれの段階においても、個々の核酸の混合物のサンプルを採取して、標準的技術を用いて配列を調べることが出来ることが明らかである。例えば、アプタマーの作成の当業者に知られた特定の化学基を導入することによってアプタマーが安定化されていてもよく、これも本発明に含まれる。かかる修飾は例えばヌクレオチドの糖部分の2'-位へのアミノ基の導入である。アプタマーは現在治療薬として用いられている。しかし標的パリテーションのため、および/または、医薬、好ましくは低分子に基づく医薬の開発のためのリード物質として、選択または作成したアプタマーを用いることができるということも本発明に含まれる。これは実際は競合アッセイにより行われ、ここで、標的分子とアプタマーとの特異的相互作用が候補薬剤によって阻害され、標的とアプタマーの複合体からのアプタマーの置換により、それぞれの薬剤候補が標的とアプタマーの間の相互作用の特異的阻害を可能にすると考えられ、その相互作用が特異的である場合、該候補薬剤は、少なくとも理論的には、標的の阻害に好適であり、したがってかかる標的を含むそれぞれの系における生物学的有効性または活性を減少させる。このように得られた低分子を次いでさらなる誘導体化および修飾に供し、その物理的、化学的、生物学的および/または医学的特徴、例えば、毒性、特異性、生分解性およびバイオアベイラビリティを最適化するとよい。 30 40

【0164】

スピーゲルマーおよびその作成または製造は同様の原理に基づく。スピーゲルマーの製造は国際特許出願 WO 98/08856に記載されている。スピーゲルマーはL-核酸であり、アプタマーがD-ヌクレオチドから構成されるのに対してL-ヌクレオチドから構成されることを意味する。スピーゲルマーは生物系において非常に高い安定性を有することを特徴とし、アプタマーと同様、それが向けられた標的分子と特異的に相互作用する。スピーゲルマー 50

の作成工程において、D-核酸の不均一な集団を作り、この集団を標的分子の光学異性体、この場合例えば、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片の天然のL-エナンチオマーのD-エナンチオマーと接触させる。次いで、標的分子の光学異性体と相互作用しないD-核酸を除く。しかし、標的分子の光学異性体と相互作用するD-核酸を分離し、所望により同定および/または配列決定し、次いで対応するL-核酸をD-核酸から得られた核酸配列情報に基づいて合成する。標的分子の光学異性体と相互作用する上記のD-核酸と配列の点では同じであるこれらL-核酸はその光学異性体ではなく、天然の標的分子と特異的に相互作用する。アプタマーの作成方法と同様に、様々な工程を数回繰り返して、標的分子の光学異性体に特異的に相互作用する核酸を濃縮することが可能である。

【0165】

さらなる態様において、本発明は本発明による核酸分子のいずれかと相互作用する機能的核酸およびかかる機能的核酸の作成方法に関し、ここで該方法は本発明による核酸分子とそのそれぞれの配列および当業者に知られた基本的工程の使用を特徴とする。機能的核酸は好ましくはリボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびsiRNAである。

【0166】

リボザイムは触媒的に活性の核酸であり、好ましくはRNAからなり、基本的には2つの部分を含む。第一の部分は触媒活性を示し、第二の部分は標的核酸、この場合本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片をコードする核酸との特異的相互作用を担当する。典型的には、2つのハイブリダイズする鎖上の塩基の実質的に相補的なストレッチのハイブリダイゼーションとワトソン・クリック塩基対形成による、標的核酸とリボザイムの第二の部分との相互作用により、触媒活性部分が活性となる。即ち、リボザイムの触媒活性がホスホジエステラーゼ活性の場合、それが分子内または分子間的に標的核酸を触媒する。次いで、さらに標的核酸の分解が起こり、最終的には標的核酸ならびに標的核酸に由来するタンパク質が分解される。リボザイム、その使用および設計原理は当業者に知られており、例えば、{Doherty, E. et al., 2001}および{Lewin, A. et al., 2001}に記載されている。

【0167】

医薬の製造のため、および診断薬としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性および設計はそれぞれ同様の作用機序に基づく。基本的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは塩基相補性に基づき、標的RNA、好ましくはmRNAにハイブリダイズし、それによってRNase Hを活性化する。RNase Hはホスホジエステルおよびホスホロチオエート連結DNAの両方によって活性化される。ホスホジエステル-連結DNAはしかし、細胞内ヌクレアーゼによって容易に分解されるがホスホロチオエート連結DNAはそうではない。これらの耐性の、非-天然のDNA誘導体はRNAとのハイブリダイゼーションによってRNase Hを阻害しない。言い換えると、アンチセンスポリヌクレオチドはDNA RNA ハイブリッド複合体としてのみ有効である。この種のアンチセンスオリゴヌクレオチドの例は、米国特許5,849,902および5,989,912に記載されている。言い換えると、この場合は本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片に対する核酸分子である標的分子の核酸配列に基づいて、それぞれの核酸配列が論理的に推定された標的タンパク質から、あるいは、核酸配列、特にmRNA自体を知ることにより、好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドが塩基相補性の原理に基づいて設計できる。

【0168】

短いストレッチのホスホロチオエート DNA (3~9塩基)を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドが特に好ましい。細菌RNase Hの活性化には最低3 DNA 塩基が必要であり、哺乳類RNase Hの活性化には最低5塩基が必要である。これらキメラオリゴヌクレオチドにおいて、RNase Hに対する基質を形成しない修飾ヌクレオチドからなるハイブリダイズする「腕」によって挟まれているRNase Hに対する基質を形成する中心領域がある。キメラオリゴヌクレオチドのハイブリダイズする腕は例えば2'-O-メチルまたは2'-フルオロによって修飾されていてもよい。別のアプローチでは、メチルホスホネートまたはホスホラミダート結合を該腕において用いた。本発明の実施に有用なアンチセンスオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドのさらなる態様はP-メトキシオリゴヌクレオチド、部分P-メトキシオリゴデオキシリボヌクレオチドまたはP-メトキシオリゴヌクレオチドである。

【0169】

本発明に特に関連する用途はより具体的には上記2つの米国特許に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。これらオリゴヌクレオチドは天然の5' 3'-連結ヌクレオチドを含まない。そうではなく、オリゴヌクレオチドは2タイプのヌクレオチドを有する：RNase Hを活性化する2'-デオキシホスホロチオエート、および活性化しない2'-修飾ヌクレオチドである。2'-修飾ヌクレオチド間の連結は、ホスホジエステル、ホスホロチオエートまたはP-エトキシホスホジエステルでありうる。RNase Hの活性化は近接するRNase H-活性化領域によって達成され、これは細菌RNase Hの活性化には3~5の2'-デオキシホスホロチオエートヌクレオチドを含み、真核生物、特に哺乳類RNase Hの活性化のためには5~10の2'-デオキシホスホロチオエートヌクレオチドを含む。分解からの保護は5' および3' 末端塩基を高度にヌクレアーゼに耐性にし、そして所望により3' 末端保護基をつけることによって達成する。

10

【0170】

より具体的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは5' 末端および3' 末端；そして位置11 ~ 59に2'-修飾ホスホジエステルヌクレオチドおよび2'-修飾 P-アルキルオキシホスホトリエステルヌクレオチドからなる群から独立に選択される5' 3'-連結ヌクレオチド；を含み、ここで5' 末端ヌクレオチドは3~10の近接するホスホロチオエート連結デオキシリボヌクレオチドのRNase H-活性化領域に連結し、該オリゴヌクレオチドの3'-末端は以下からなる群から選択される：逆位 (inverted) デオキシリボヌクレオチド、近接するストレッチの1~3のホスホロチオエート2'-修飾リボヌクレオチド、ピオチン基およびP-アルキルオキシホスホトリエステルヌクレオチド。

20

【0171】

5' 末端ヌクレオチドが RNase H-活性化領域に連結しておらず、3' 末端ヌクレオチドが上記のようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることも出来る。また、オリゴヌクレオチドの3' 末端ではなく5' 末端が特定の基から選択されるものでもよい。

【0172】

本発明による核酸および過免疫血清反応性抗原およびその断片は、医薬組成物、特にワクチンの製造に用いることが出来る。好ましくはかかる医薬組成物、好ましくはワクチンは大便連鎖球菌によって引き起こされる、または関連する疾患の予防または治療用である。さらなる態様において本発明は、個体、特に哺乳類において免疫応答を誘導する方法に関し、該方法は、感染、特に腸球菌感染症、そしてもっとも具体的には大便連鎖球菌感染症から個体を保護するための抗体の産生に適当な本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片、またはその断片または変異形を個体に接種することを含む。

30

【0173】

本発明のさらに別の態様は、個体における免疫応答の誘導方法に関し、該方法は、遺伝子療法その他を介して、過免疫血清反応性抗原およびその断片、またはその断片または変異形をインビボで発現する過免疫血清反応性抗原およびその断片、またはその断片または変異形を機能的にコードする核酸を、抗体を産生する免疫応答または、サイトカイン産生T細胞または細胞障害性T細胞のいずれかの細胞媒介T細胞応答を誘導するために送達することを含み、疾患から該個体を保護するためのものである。ここで疾患は既に個体に確立しているものでもそうでなくてもよい。遺伝子の投与の1つの方法は、粒子の被覆その他として所望の細胞へとそれを加速させることによる。

40

【0174】

本発明のさらなる態様は免疫学的組成物に関し、そのなかで免疫応答を誘導することが出来る宿主に導入すると、かかる宿主に免疫応答を起こすものであり、ここで該組成物は本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片の抗原をコードおよび発現する組換え DNAを含む。免疫応答は治療的または予防的に用いてもよく、抗体免疫または細胞性免疫、例えばCTL またはCD4+ T細胞によるもののいずれの形態でもよい。

50

【0175】

本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片またはその断片はそれ自体では抗体を産生できないが、第一のタンパク質を安定化させることが出来、免疫原性および保護特性を有する融合タンパク質を作るような共-タンパク質と融合させてもよい。この融合組換えタンパク質は好ましくはさらに、抗原性共-タンパク質、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) または ベータ・ガラクトシダーゼ、タンパク質を可溶化し、その産生および精製を容易にする比較的大きい共-タンパク質を含んでもよい。さらに共-タンパク質は免疫系の全身刺激を提供する意味でアジュバントとしても作用しうる。共-タンパク質は第一のタンパク質のアミノまたはカルボキシ末端のいずれに結合させてもよい。

【0176】

また、本発明によって、大便連鎖球菌による感染の動物モデルにおける遺伝子による免疫法の実験における上記核酸分子またはその特定の断片の使用方法も提供される。かかる断片は予防的または治療的免疫応答を誘発することができるタンパク質エピトープの同定に特に有用である。このアプローチにより、哺乳類、特にヒトにおける腸球菌感染症の予防薬または治療薬の開発のために、感染に抵抗し、排除することが出来る動物の要求される器官から、特に有用なモノクローナル抗体の調製が可能となる。

【0177】

過免疫血清反応性抗原およびその断片は、細菌の侵入から保護する、例えば、細菌の損傷組織への付着を阻害する特異的抗体を産生するための、宿主のワクチン接種のための抗原として利用できる。組織損傷の例には、例えば、機械的、化学的または熱的損傷による、または留置装置の埋め込みによる皮膚または結合組織の創傷、あるいは粘膜の損傷、例えば口腔、乳腺、尿道または膣の損傷が含まれる。

【0178】

本発明はまた、免疫原性組換えタンパク質と好適なキャリアを含むワクチン製剤も含む。タンパク質は胃で分解されるので、それは好ましくは非経口的に投与し、例えば、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、鼻腔内または経皮投与が挙げられる。非経口投与に好適な製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および、製剤を個体の体液、好ましくは血液と等張にする溶質を含んでもよい、水性または非水性無菌注射溶液；懸濁剤または増粘剤を含んでもよい水性および非水性無菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量または複数用量の例えば、密封アンプルおよびバイアルなどの容器において提供されてもよいし、使用の直前に無菌の液体のキャリアを添加するだけでよい凍結乾燥状態で保存してもよい。ワクチン製剤は製剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系を含んでもよく、例えば水中油系および当該技術分野で知られているその他の系が挙げられる。用量はワクチンの特定の活性に依存し、常套の実験によって容易に決定できる。

【0179】

本発明は別の態様によると、大便連鎖球菌のための本発明において提供される過免疫血清反応性抗原またはその断片を含む医薬組成物に関する。かかる医薬組成物は大便連鎖球菌に対する1つ、好ましくは少なくとも2以上の過免疫血清反応性抗原またはその断片を含んでもよい。所望により、かかる大便連鎖球菌過免疫血清反応性抗原またはその断片はその他の病原菌に対する抗原を組み合わせ医薬組成物中にて混合したものでもよい。好ましくは、該医薬組成物は、大便連鎖球菌および/またはその抗原がワクチンに含まれているその他の病原菌によって引き起こされる感染症の予防または治療用のワクチンである。

【0180】

さらなる態様によると、本発明は大便連鎖球菌について同定された過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする核酸分子を含む医薬組成物に関する。かかる医薬組成物は1以上の大便連鎖球菌に対する過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする核酸分子を含んでもよい。所望により、かかる過免疫血清反応性抗原またはその断片をコードする大便連鎖球菌核酸分子はその他の病原菌に対する抗原をコードする核酸分子を組み合わせ医薬組成物中にて混合したものでもよい。好ましくは、該医薬組成物は、大便連鎖球

10

20

30

40

50

菌および/またはその抗原がワクチンに含まれているその他の病原菌によって引き起こされる感染症の予防または治療用のワクチンである。

【0181】

医薬組成物はいずれの好適な補助物質を含んでいてもよく、例えば、緩衝物質、安定剤またはさらなる活性成分、特に医薬組成物および/またはワクチン産生に関連して知られている成分が挙げられる。

【0182】

本発明による過免疫血清反応性抗原、その断片またはそれをコードする核酸分子のための好ましいキャリアまたは賦形剤は、所与の過免疫血清反応性抗原、その断片またはそれをコードする核酸分子に対する免疫応答をさらに刺激する免疫賦活性化化合物である。好ましくは本発明による医薬調製物における免疫賦活性化化合物は以下からなる群から選択される：ポリカチオン性物質、特にポリカチオン性ペプチド、免疫賦活性化核酸分子、好ましくは免疫賦活性化デオキシヌクレオチド、ミョウバン、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、向神経活性化化合物、特にヒト成長ホルモン、またはそれらの組み合わせ。

10

【0183】

本発明による過免疫血清反応性抗原、その断片および/またはそれをコードする核酸分子以外に、生物学的または医薬上活性なその他の化合物を含む医薬組成物、特にワクチンも本発明に含まれる。好ましくは、ワクチン組成物は少なくとも1つのポリカチオン性ペプチドを含む。本発明によって用いられるポリカチオン性化合物はW0 97/30721に記載の特徴的な効果を示すいずれのポリカチオン性化合物でもよい。好ましいポリカチオン性化合物は塩基性ポリペプチド (polypeptides)、有機性ポリカチオン、塩基性ポリアミノ酸またはそれらの混合物から選択される。かかるポリアミノ酸は少なくとも4アミノ酸残基の長さの鎖を有さなければならない(W0 97/30721)。特に好ましいのはポリリジン、ポリアルギニンなどの物質および、20%より多い、特に50%より多い塩基性アミノ酸を含み、8を超える、特に20を超えるアミノ酸残基のポリペプチドまたはその混合物である。その他の好ましいポリカチオンおよびその医薬組成物はW0 97/30721 (例えば、ポリエチレンジイミン)および W0 99/38528に記載されている。好ましくはかかるポリペプチドは20~500アミノ酸残基、特に30~200残基を含む。

20

【0184】

かかるポリカチオン性化合物は化学的または組換え的に作ってもよいし、天然源由来のものでもよい。

30

【0185】

カチオン性 (ポリ)ペプチドは{Ganz, T., 1999}に概説されている性質を有し、抗菌性でもありうる。これら(ポリ)ペプチドは原核生物または動物または植物のいずれの由来であってもよく、化学的に合成しても組換えにより作ってもよい(W0 02/13857)。ペプチドはデフェンシンのクラスに属するものでもよい(W0 02/13857)。かかるペプチドの配列は例えば、以下のインターネットアドレスのAntimicrobial Sequence Databaseにおいてみられる：<http://www.bbcm.univ.trieste.it/tossi/pag2.html>。

【0186】

かかる宿主防御ペプチドまたは防御物質 (defensives) もまた本発明によるポリカチオン性ポリマーの好ましい形態である。一般に、最終産物として、好ましくはAPC(樹状細胞を含む)によって媒介される適応性免疫系の活性化(または下方制御)を可能とする化合物が、ポリカチオン性ポリマーとして用いられる。

40

【0187】

本発明におけるポリカチオン性物質としての使用に特に好適なのは、カテリシジン (cathelicidin) 由来の抗菌ペプチドまたはその誘導体 (国際特許出願 W0 02/13857、引用により本明細書に含める)、特に哺乳類カテリシジン由来の抗菌ペプチド、好ましくはヒト、ウシまたはマウス由来のものである。

【0188】

50

天然源由来のポリカチオン性化合物には、HIV-REVまたは HIV-TAT (由来カチオン性ペプチド、アンテナペディアペプチド、キトサンまたはその他のキチンの誘導体)あるいはこれらペプチドまたはタンパク質由来の生化学的または組換え産生によるその他のペプチドが挙げられる。その他の好ましいポリカチオン性化合物はカテリン (cathelin) またはカテリンに関連または由来する物質である。例えば、マウスカテリンはアミノ酸配列NH₂-RLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGOKIKNFFQKLVPQPE-COOHを有するペプチドである。関連または由来カテリン物質は少なくとも 15-20 アミノ酸残基を有するカテリン 配列の全部または一部を含む。誘導には20の標準アミノ酸以外のアミノ酸による天然のアミノ酸の置換または修飾が含まれる。さらに、さらなるカチオン性残基をかかるとカテリン分子に導入してもよい。これらカテリン分子は抗原との混合に好ましい。これらカテリン分子は驚くべきことに、さらなるアジュバントを添加しなくても抗原のためのアジュバントとして有効であることが判明した。それゆえ、さらなる免疫賦活性物質とともに、またはそれをともなわずに、ワクチン製剤中に有効なアジュバントとしてかかるカテリン分子を用いることが出来る。

10

【0189】

本発明により用いられる別の好ましいポリカチオン性物質は、3 ~ 7の疎水性アミノ酸のリンカーによって分離されている少なくとも 2のKLK-モチーフを含む合成ペプチドである (国際特許出願 WO 02/32451、引用により本明細書に含める)。

【0190】

本発明の医薬組成物はさらに免疫賦活性核酸を含んでいてもよい。免疫賦活性核酸は例えば、天然または合成のCpG含有核酸、非脊椎動物由来の短いストレッチの核酸、または非メチル化シトシン-グアニンジ-ヌクレオチド(CpG)を特定の塩基中に含む短いオリゴヌクレオチド(ODN)の形態である(例えば、WO 96/02555に記載)。あるいは、例えばWO 01/93903に記載のイノシンおよびシチジンに基づく核酸、またはデオキシ-イノシンおよび/または デオキシウリジン残基を含むデオキシ核酸(WO 01/93905 および PCT/EP 02/05448に記載、引用により本明細書に含める)が好ましくは本発明の免疫賦活性核酸として用いることが出来る。好ましくは、異なる免疫賦活性核酸の混合物を本発明によって用いる。

20

【0191】

上記のいずれかのポリカチオン性化合物が上記のいずれかの免疫賦活性核酸と組み合わせられたものも本発明に含まれる。好ましくは、かかる組み合わせはWO 01/93905、WO 02/32451、WO 01/54720、WO 01/93903、WO 02/13857およびPCT/EP 02/05448および豪特許出願 A 1924/2001に記載のものであり、引用により本明細書に含める。

30

【0192】

さらにまたはあるいは、かかるワクチン組成物は本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片、およびそれをコードする核酸分子の他に向神経活性化合物を含んでいてもよい。好ましくは、向神経活性化合物は例えばWO 01/24822に記載のヒト成長因子である。また好ましくは、向神経活性化合物は上記のいずれかのポリカチオン性化合物および/または免疫賦活性核酸と組み合わせられる。

【0193】

さらなる態様において、本発明は医薬組成物に関する。かかる医薬組成物は例えば、本明細書に記載するワクチンである。また、医薬組成物は、以下の化合物またはその組み合わせのいずれかを含む医薬組成物である: 本発明による核酸分子、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片、本発明によるベクター、本発明による細胞、本発明による抗体、本発明による機能的核酸、本発明によるアンチカリンなどの結合性ペプチド、本明細書に記載するようにスクリーニングされたいずれかのアゴニストおよびアンタゴニスト。それらに関連してこれら化合物のいずれも、非無菌または無菌の1以上の細胞、組織または生物用キャリア、例えば、対象への投与に好適な医薬用キャリアと組み合わせ用いることが出来る。かかる組成物は例えば、培地添加剤(media additive)または治療上有効量の本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片および医薬上許容されるキャリアまたは賦形剤を含む。かかるキャリアにはこれらに限定されないが、生理食塩水、緩衝食塩

40

50

水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせが含まれる。製剤は投与様式に適合したものでなければならない。

【0194】

医薬組成物は有効な便宜な方法で投与すればよく、例えば、局所、経口、肛門、膣、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内、または皮内経路によって投与すればよい。

【0195】

治療または予防において、活性薬剤は、注射可能組成物、例えば好ましくは等張の無菌水性分散液として個体に投与すればよい。

【0196】

あるいは、組成物は局所用に製剤してもよく、例えば、軟膏、クリーム、ローション、眼軟膏、点眼剤、点耳剤、洗口、浸透性包帯剤および縫合およびエアロゾルの形態であって、適宜便宜な以下のような添加剤を含んでいてもよい：例えば、保存料、薬剤浸透を補助する溶媒、および軟膏およびクリームにおける緩和剤。かかる局所製剤は適合性の常套のキャリア、例えばクリームまたは軟膏基剤、およびローション用のエタノールまたはオレイルアルコールを含んでいてもよい。かかるキャリアは製剤の約 1 重量% ~ 約 98 重量%を構成するのがよい；より通常は製剤の約 80 重量%までを構成する。

10

【0197】

上記治療に加えて、本発明の組成物は、創傷組織において曝されたマトリックスタンパク質への細菌の付着を妨げる創傷治療剤としても一般に使用でき、抗菌予防法のかわりに、またはそれと組み合わせて歯科治療において予防的に用いることも出来る。

20

【0198】

ワクチン組成物は便宜に注射可能形態である。常套のアジュバントを用いて免疫応答を増強させることが出来る。ワクチン接種のための好適な単位用量は0.05-5 μg 抗原 / kg 体重であり、かかる用量を好ましくは1-3 週間の間をあけて1-3回投与する。

【0199】

示された用量範囲において、好適な個体への投与が妨げられるような有害な毒性作用は本発明の化合物によって観察されるべきではない。

【0200】

さらなる態様において、本発明は本発明の上記組成物の1以上の成分を入れた1以上の容器を含む診断および医薬パックおよびキットに関する。成分は有用な量、用量、剤形または組み合わせで存在すればよい。かかる容器には、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を管理する政府機関によって規定された形態の指示書をつけて、ヒト投与用の製品の製造、使用または販売が政府によって許可されたことを示してもよい。

30

【0201】

本発明に関して本明細書に開示する疾患に関連する使用、例えば、医薬組成物またはワクチンの使用は、特に腸球菌、より好ましくは、大便連鎖球菌によってもたらされるか、それに関連する疾患または疾患状態である。それに関して、大便連鎖球菌は本明細書に開示するものを含む複数の株を含むことに注意されたい。本発明によって予防および/または治療すべき細菌感染症によって引き起こされるか、それに関する疾患としては、ヒトにおける、細菌性咽頭炎、猩紅熱、とびひ、リウマチ熱、壊死性筋膜炎および敗血症が含まれる。

40

【0202】

さらなる態様において本発明は、本発明による過免疫血清反応性抗原または核酸のいずれかを用いるスクリーニング方法に関する。スクリーニング方法自体は当業者に知られており、アゴニストまたはアンタゴニストがスクリーニングされるように設計すればよい。好ましくは、この場合、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片の相互作用パートナーへの結合を阻害または防止するアンタゴニストをスクリーニングする。かかる相互作用パートナーは天然の相互作用パートナーであっても非天然の相互作用パートナーであってもよい。

【0203】

50

本発明はまた、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片または核酸分子の機能、例えば、その結合性分子との相互作用を増強する(アゴニスト)または阻害する(アンタゴニスト)ものを同定するための化合物のスクリーニング方法を提供する。スクリーニング方法はハイスループットのものも含みうる。

【0204】

例えば、アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするために、本発明による核酸分子および核酸の相互作用パートナーはそれぞれ、合成反応混合物、細胞内区画、例えば、膜、細胞外皮または細胞壁または、その調製物であってよく、本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片に結合する分子を発現する細胞から調製できる。調製物をアゴニストまたはアンタゴニストの候補分子の不在下または存在下で、標識した過免疫血清反応性抗原およびその断片とともにインキュベートする。候補分子の結合性分子に対する結合能力は、標識したリガンドの結合の減少によって反映される。意味無く結合する分子、即ち、過免疫血清反応性抗原およびその断片の機能性効果を誘導しないものはおそらく良好なアンタゴニストであろう。良好に結合し、過免疫血清反応性抗原およびその断片と同じまたは密接に関連する機能性効果を誘発する分子は良好なアゴニストである。

10

【0205】

潜在的アゴニストおよびアンタゴニストの機能性効果は、例えば、候補分子と細胞または適当な細胞調製物との相互作用を追跡するレポーターシステムの活性の測定、およびその効果を本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片または、過免疫血清反応性抗原およびその断片と同一の効果を誘発する分子による効果と比較することによって測定できる。この点で有用なレポーターシステムにはこれらに限定されないが、生成物に変換される比色標識された基質、過免疫血清反応性抗原およびその断片の機能的活性の変化に应答するレポーター遺伝子、および当該技術分野で知られた結合アッセイが含まれる。

20

【0206】

アンタゴニストのアッセイの別の例は競合アッセイであり、これは、本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片および潜在的アンタゴニストと、膜結合型結合性分子、組換え結合性分子、天然の基質またはリガンドまたは基質またはリガンド疑似体とを、競合阻害アッセイに適当な条件下で混合するものである。過免疫血清反応性抗原およびその断片を放射能または比色化合物によって標識し、結合性分子に結合したか、または生成物に変換された過免疫血清反応性抗原およびその断片の分子数を正確に測定し、潜在的アンタゴニストの有効性を評価することが出来る。

30

【0207】

潜在的アンタゴニストには、本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片に結合し、それによってその活性を阻害または消失させる、有機低分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。潜在的アンタゴニストはまた、本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片の機能的活性を誘導することなく、結合性分子の同じ部位に結合する有機低分子、ペプチド、ポリペプチド、例えば密接に関連するタンパク質または抗体であってもよい。

【0208】

潜在的アンタゴニストには、過免疫血清反応性抗原およびその断片の結合部位に結合してその部位を占有し、それによって細胞の結合性分子への結合を阻害し、正常の生理活性を妨げる低分子も含まれる。低分子の例としては、これらに限定されないが、有機低分子、ペプチドまたはペプチド-様分子が挙げられる。

40

【0209】

その他の潜在的アンタゴニストにはアンチセンス分子が含まれる(かかる分子の説明については{Okano, H. et al., 1991}; OLOGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION; CRC Press, Boca Ration, FL (1988)、を参照されたい)。

【0210】

好ましい潜在的アンタゴニストには本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片の誘導体が含まれる。

50

【0211】

本明細書において用いる、本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片の活性は、その相互作用パートナーのいずれかと結合するその能力または、そのまたはいずれかの相互作用パートナーと結合するかかる能力の程度である。

【0212】

特定の態様において、本発明は、本発明の過免疫血清反応性抗原およびその断片、核酸分子または阻害剤の、感染の後遺症の原因である病原菌と哺乳類宿主との最初の物理的相互作用を阻害するための使用を提供する。特に本発明の分子は以下のように用いられる：

i) 大便連鎖球菌の、留置装置上の哺乳類細胞外マトリックスタンパク質または創傷における細胞外マトリックスタンパク質への付着の阻害； ii) 例えば、哺乳類チロシンキナーゼのリン酸化の開始によるタンパク質に媒介される哺乳類細胞の侵入の阻害 {Rosenshine、I. et al.、1992}； 哺乳類細胞外マトリックスタンパク質と組織損傷を媒介する細菌タンパク質の間の細菌の付着の阻害； iv) 留置装置の埋め込みまたはその他の外科技術による以外によって引き起こされる感染症における病原の正常の進行の阻害。

【0213】

ここで提供されるDNAコード配列はいずれも抗細菌化合物の発見と開発に用いることが出来る。コードされるタンパク質は発現すると、抗細菌薬のスクリーニングのための標的として用いることが出来る。さらに、コードされるタンパク質のアミノ末端領域をコードするDNA配列またはShine-Delgarno配列またはその他のそれぞれのmRNAの翻訳促進配列を用いて問題のコード配列の発現を制御するアンチセンス配列を設計することが出来る。

【0214】

アンタゴニストおよびアゴニストは、例えば、腸球菌、特に大便連鎖球菌による感染に起因する疾患、例えば敗血症を阻害するために用いることが出来る。

【0215】

さらなる態様において、本発明は親和性装置に関し、かかる親和性装置は、少なくとも支持体材料および支持体材料に結合させた本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片のいずれかを含む。その標的細胞または標的分子またはその相互作用パートナーに対する本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片の特異性のために、過免疫血清反応性抗原およびその断片は、結合のための条件が合えば、支持体材料に適用したいずれかのサンプルから相互作用パートナーを選択的に取り出すことを可能とする。サンプルは生物サンプルまたは医学サンプルでよく、これらに限定されないが、発酵ブロス、細胞細片、細胞調製物、組織調製物、器官調製物、血液、尿、リンパ液、髄液などが含まれる。

【0216】

過免疫血清反応性抗原およびその断片はマトリックスに共有または非共有結合させればよい。好適な支持体材料は当業者に知られており、セルロース、シリコン、ガラス、アルミニウム、常磁性ビーズ、デンプンおよびデキストランを含む群から選択される。

【0217】

本発明はさらに、以下の図面、実施例および配列表によって説明され、そこから特徴、態様および利点が理解される。本実施例は説明の目的であって開示を限定するものではないことを理解されたい。

【0218】

本発明に関して、

図1は、大便連鎖球菌特異的ヒト血清の特徴付けを示す。

【0219】

図2は、大便連鎖球菌 V583からの小断片ゲノムライブラリー、LEF-70の特徴付けを示す。

【0220】

図3は、ビオチン化ヒトIgGを用いるMACSによる細菌細胞の選択を示す。

【0221】

表1は、ゲノム大便連鎖球菌ライブラリーおよびヒト血清および相同性探索によって同

10

20

30

40

50

定したエンテロコッカス・フィシウム タンパク質を用いて行った全てのスクリーニングの要約を示す。

【0222】

表 2は、ヒト血清によるエピトープ血清学を示す。

【0223】

明細書において参照される図を以下により詳細に記載する。

【0224】

図 1は、抗-大便連鎖球菌抗体についての免疫アッセイによって測定したヒト血清の特徴付けを示す。全抗-大便連鎖球菌IgG 抗体レベルを被覆抗原としての大腸連鎖球菌株 V583から調製した全細菌可溶化液または培養上清画分を用いる標準的ELISAによって測定した。(A) 代表的実験の結果を健康な成人の血清について示す。データは検出が線形範囲である2つの血清希釈度(2,000X および 10,000X)での405nmの吸光度から計算したELISAユニットとして表す。(B) イムノプロット分析を、タンパク質抗原との多重免疫反応性を確実にするためにELISAによって選択した健康な成人からの高力価血清を用いて行った。全細菌可溶化液および選択されたヒト血清を5,000X希釈度で用いた代表的実験の結果を示す。プロットは抗-ヒト IgG 二次抗体試薬で現像した。レーン 1-4:スクリーニングプールに含まれる個体の高力価血清(N1-4)、レーン 5: 低力価血清 (N5)、レーン 6: 陰性対照、(血清無し、二次抗体のみ)。Mw: 分子量マーカー。(C)は健康な成人からの血清により得られたIgG 力価(N、番号付けは(B)と同じ)と腸球菌感染症(例えば創傷感染、菌血症、感染カテーテル)の急性期患者(P)のIgG 力価の比較を示す。データはELISAユニットとして示し、(A)と同様に計算した。(D)は、心内膜炎患者からの回復期血清による実験の結果を示す。データはELISAユニットとして示し、検出が線形の範囲である血清希釈度(2,000X)での405nmの吸光度から計算した。(E) イムノプロット分析をタンパク質抗原との多重免疫反応性を確実にするために、心内膜炎患者からの高力価血清によって行った。全細菌可溶化液および選択されたヒト血清を5,000X 希釈度で用いた代表的実験の結果を示す。プロットは抗-ヒト IgG 二次抗体試薬で現像した。レーン 1-16: 心内膜炎患者からの個体の血清。Mw: 分子量マーカー。

10

20

【0225】

図 2 (A)は、大腸連鎖球菌 V583 小断片ゲノムライブラリー、LEF-70の断片サイズ分布を示す。576 のランダムに選択されたクローンの配列決定の後、配列を切ってベクター残基を除き、様々なゲノム断片サイズのクローンの数をプロットした。(B)は、大腸連鎖球菌V583 染色体にわたる一連のLEF-70の483のランダムに配列決定したクローンの分布のグラフ表示である。四角はアノテーションされた ORFと一致する配列を示し、菱形は非コード染色体配列とそれぞれ +/+または +/-方向で完全に一致したクローンを表す。丸はキメラ配列を有するすべてのクローンの位置を示す。塩基対における数値距離は一方向で環状ゲノムにわたって示す。様々なクローンセットのライブラリー内での分配は図の下に数とパーセンテージで示す。

30

【0226】

図 3Aはビオチン化ヒト IgGによる MACS 選択を示す。pMAL9.1内のLEF-70 ライブラリーを20µgのビオチン化ヒト血清(IC10-IgG)で第一および第二選択ラウンドのスクリーニングをした。陰性対照では、スクリーニングのためのライブラリー細胞に血清を添加しなかった。ラウンド1についての第一および第二の溶出後、そしてラウンド2についての第一から第四の溶出の後に選択された細胞の数をIgG添加またはIgG非添加の選択について示す。図 3Bは、MACSによる選択に1:3,000希釈のヒト血清(IC10-IgG、およそ 4 µg/µl)を用いた、2ラウンドの細菌表面ディスプレイの後に単離した特定のクローン(1-26)のウェスタンプロット分析により分析した反応性を示す。ローディング対照として同じプロットをプラットフォームタンパク質 LamBに対する抗体を希釈度 1:5,000で用いて分析した。LB、外来ペプチドインサートを有さないLamBを発現するクローンからの抽出物。

40

【0227】

表 1:細菌表面ディスプレイによって同定された免疫原性タンパク質

50

1aは、高い抗-腸球菌力価を有する健康な成人からの血清によって同定された抗原を示す。A、fhuA中の大便連鎖球菌V583からのLEF-300ライブラリーと、IC10-IgG (723)、B、FhuA中のLEF-300ライブラリーと、IC9-IgG (389)、C、LamB中のLEF-70ライブラリーと、IC10-IgG (1096)、D、LamB中のLEF-70ライブラリーと、IC9-IgG (1065)。表1aに挙げる大便連鎖球菌抗原に対して最低70%の同一性を有する相同性探索によって同定されたエンテロコッカス・フィシウムタンパク質を示す。コンピュータプログラム TBLASTNを、大便連鎖球菌とエンテロコッカス・フィシウム配列の同一性の判定に用いた (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbial/microbialblast.cgi?organism=Efaecium>)。アミノ酸配列同一性は、対応する大便連鎖球菌抗原の完全なORF配列に基づいて計算した。1cは、抗-腸球菌力価が高い回復期心内膜炎患者からの血清により同定された抗原を示す。E、LamB中の大便連鎖球菌V583からのLEF-70ライブラリーと、P25-IgG (843); F、LamB中のLEF-70ライブラリーと、P26-IgG (845); G、FhuA中のLEF-300ライブラリーと、P25-IgG (691); H、FhuA中のLEF-300ライブラリーと、P26-IgG (770); *、5アミノ酸より長い抗原性配列の予測はプログラムANTIGENICを用いて行った{Kolaskar, A. et al., 1990}。

10

【0228】

表2: ヒト血清によるエピトープ血清学

個々のヒト血清により選択されたエピトープを表す個々の合成ペプチドとの免疫反応性を示す。反応性の程度は色の濃さで示す; 白: - (<100 U)、淡灰色: + (100-249 U)、濃灰色: ++ (250-349 U)、黒: +++ (>350 U)。ELISAユニット(U)は OD_{405nm} の読みと血清希釈度から計算する。スコアは全反応性の和として計算する (- = 0; + = 1; ++ = 2; +++ = 3)。N1 ~ N10 血清はIC9- および IC10 IgG プールとのスクリーニングに用いた健康な成人からの高力価血清である。P1-P11は大便連鎖球菌感染症患者からの血清である。V583株のゲノムアノテーションによる抗原性ORF内の合成ペプチドの位置を、最初と最後のアミノ酸残基を示すことによって示す。ペプチド名: EF0020.1は染色体上のアノテーションされたORF EF0020に存在する; ARF0679.1は EF0679の選択的読み枠における可能性がある新規ORFに存在する; EFC0034.1はプラスミド CからのアノテーションされたORFに存在する; ARFC0021.1はプラスミド CからのARFC0021の選択的読み枠における可能性がある新規ORFに存在する。

20

【実施例】

30

【0229】

実施例1: 抗-大便連鎖球菌抗体に基づくヒト血清ソースの特徴付けおよび選択、抗体スクリーニング試薬の調製

実験手順

酵素結合免疫測定法 (ELISA)

ELISA プレート (Maxisorb、Millipore)を、被覆バッファー (0.1M 炭酸ナトリウム pH 9.2)に希釈した5-10 $\mu\text{g/ml}$ の全タンパク質で被覆した。3つの希釈度の血清(2,000X、10,000X、50,000X)をPBS-BSA中に作った。高度特異的セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)-結合抗-ヒト IgGまたは抗-ヒト IgA 二次抗体 (Southern Biotech)を製造業者の指示に従って用いた(希釈: 1,000x)。抗原-抗体複合体を、基質(ABTS)の着色生成物への変換を、自動ELISAリーダー(TECAN SUNRISE)による OD_{405nm} の読みに基づいて測定することによって定量した。

40

【0230】

細菌抗原抽出物の調製

全細菌可溶化液: 細菌を一晩BHI (Brain-heart Infusion)中で培養し、凍結乾燥サイクルを繰り返すことによって溶解した:ドライアイス/エタノール-混合物で凍結するまでインキュベーションし(1分)、37 で解凍した(5分):これを3回繰り返した。この後超音波処理し、上清を遠心分離 (3,500 rpm、15分、4)によって回収した。

培養上清: 遠心分離によって細菌を除いた後、一晩培養した細菌培養物の上清を氷冷エタノールを用いて1部の上清と3部の無水エタノールを混合することによって沈殿させ、一

50

晩-20 でインキュベートした。沈殿を遠心分離 (2,600 g、15分)で回収した。乾燥ペレットをELISA のためにはPBSに、またはSDS-PAGEおよびイムノブロットングのためには尿素および SDS-サンプルバッファーに溶解した。サンプルのタンパク質濃度はBradfordアッセイによって測定した。

【0231】

イムノブロットング

全細菌可溶化液および培養上清サンプルをインビトロで培養した大便連鎖球菌株 V583 から調製した。10~25 µgの全タンパク質/レーンをBioRad Mini-Protean 3 Cell電気泳動システムを用いてSDS-PAGE によって分離し、タンパク質をニトロセルロースメンブレン (ECL、Amersham Pharmacia)にトランスファーした。5%ミルク中での一晚のブロッキングの後、ヒト血清を2,000x 希釈で添加し、HRPO 標識抗-ヒト IgGを用いて検出した。

10

【0232】

ゲノムスクリーニングのための抗体の精製

患者群および健康群の両方からの5つの血清をスクリーニング手順に用いる血清プールについての総抗-大便連鎖球菌力価に基づいて選択した。大腸菌タンパク質に対する抗体を熱不活性化血清と全細胞大腸菌細胞 (DH5アルファ、pHIE11で形質転換、細菌表面ディスプレイに用いたものと同じ条件下で培養)とをインキュベートすることによって除いた。プールされた、枯渇血清からのIgGの高度に濃縮された調製物を製造業者 (UltraLink Immobilized Protein G、Pierce)の指示に従ったタンパク質 G 親和性クロマトグラフィーによって作成した。枯渇および精製の有効性をSDS-PAGE、ウェスタンブロットング、ELISAおよびタンパク質濃度測定により確認した。

20

【0233】

結果

ヒト免疫系によって大便連鎖球菌に対して産生され、ヒト血清に存在する抗体は、抗原性タンパク質のインビボ発現とその免疫原性を示す。これらの分子は特異的抗-腸球菌抗体と対応する腸球菌ペプチドまたはタンパク質との相互作用に基づく本発明に記載のアプローチにおける個々の抗原の同定に必須である。関連する抗体レパートリーを得るために、ヒト血清を、健康な成人、腸球菌感染症患者および未処置の個体、5~10月齢の母親の抗体を既に失った後の子供から収集した。

【0234】

病原体に曝された個体において誘導された血清およびその他の体液中の抗体は、抗原同定に重要である。腸球菌に曝される結果、無症候性の定着が起こり、現在または過去の急性または慢性感染症となる。大便連鎖球菌定着および感染症は一般的であり、以前の攻撃からの自然免疫の結果として抗体が存在する。腸球菌は(偏性ではなく)日和見性病原体であるため、健康個体からの血清も関連する抗体をおそらくは含んでいる。

30

【0235】

健康な成人からの70の血清および大便連鎖球菌によって起こった心内膜炎回復期患者からの16の血清そして急性感染症患者(主に創傷および菌血症)からの8の血清を一連の免疫アッセイによって抗-大便連鎖球菌抗体について特徴づけた。最初の特徴付けは2種類の抗原調製物、例えば、大便連鎖球菌V583 株から調製した全細菌抽出物および培養上清タンパク質を用いてELISAによって行った。健康な成人集団 (図1A)および心内膜炎患者 (図1D)からの血清を用いた代表的実験を図1に示す。抗体力価は応答が線形である所与の希釈度にて比較した。血清を2つの複雑な抗原混合物に対するIgG 反応性に基づいてランク付けし、最高のものをさらなるイムノブロットング試験に選択した。この分析により、複数の腸球菌タンパク質に対するあらかじめ選択された血清の、特に選択されなかった低力価血清と比較した場合の、高い抗体反応性が確認された(図 1B&E)。血清のELISAによるランク付けはイムノブロットシグナルと常に相関しているわけではなく、非-タンパク質成分 (例えば、リポテイコ酸、ペプチドグリカンなど)に対する抗体が全細菌抽出物に対するELISAの全反応性に寄与していることが示唆された。したがって抗体-プールに含めるべき血清の最終的な選択はイムノブロットング実験における複数の免疫原性バンドに主に

40

50

基づくものであった。この広範な抗体特徴付けアプローチにより、抗-大便連鎖球菌過免疫血清の明確な同定が導かれた。健康な成人からのこれらの選択された血清を様々な急性腸球菌感染症、例えば創傷感染症、菌血症およびカテーテル関連感染症、を患う患者からの血清と比較した。抗-大便連鎖球菌抗体力価は急性患者群において低いことが明らかであり、疾患は低力価個体において起こりうることを示唆していた(図1C)。かかる患者血清を主に、同定されたエピトープに対する抗体レベルを測定するバリデーションの目的で用いた。しかし、大便連鎖球菌によって起こる心内膜炎患者(常套の微生物学的診断により確認)は回復期において高レベルの抗体を作り、それはここで分析した16サンプルにおける高力価血清の高い割合によって示される(図1E&D)。

【0236】

健康な成人から10の血清が選択され、心内膜炎ドナー群の回復期患者からの10の血清が選択された。血清をプールし(5サンプル/プール)、IgGを細菌表面ディスプレイによる抗原同定のために精製した。プールされた血清から親和性クロマトグラフィーによってIgG抗体を精製し、大腸菌-反応性抗体を枯渇させて細菌表面ディスプレイスクリーニングにおけるバックグラウンドを避けた(2つのIgGプール: NEf9、NEf10)。

【0237】

実施例2: 大便連鎖球菌の、高度にランダムな、フレーム選択された、小断片ゲノムDNAライブラリーの作成

実験手順

腸球菌 ゲノムDNAの調製

50 mlのBrain heart infusion (BHI)培地に、凍結穿刺からの大便連鎖球菌V583細菌を播き、18時間37°Cで通気および攪拌しながら培養した。培養物を回収し、1,600x gで15分遠心分離し、上清を除いた。細菌ペレットを3回PBSで洗浄し、注意深く0.5 mlのリゾチム溶液(100 mg/ml)に再懸濁した。0.1 mlの10 mg/ml熱処理RNase Aおよび20 UのRNase T1を添加し、注意深く混合し、溶液を1時間37°Cでインキュベートした。0.2 mlの20% SDS溶液および0.1 mlのプロテイナーゼ K (10 mg/ml)を添加した後、チューブを一晩55°Cでインキュベートした。1/3容積の飽和NaClを添加し、溶液を20分間4°Cでインキュベートした。抽出物を微量遠心管(13,000 rpm)でペレットにし、上清を新しいチューブに移した。溶液をPhOH/CHCl₃/IAA (25:24:1)およびCHCl₃/IAA (24:1)で抽出した。DNAを室温で0.6x容積のイソプロパノールを添加することにより沈殿させ、無菌パスツールピペットで溶液から巻き取り、80%氷冷エタノールを含むチューブに移した。DNAを沈殿を10-12,000x gで遠心分離することにより回収し、次いで風乾し、ddH₂Oに溶解した。

【0238】

小ゲノムDNA断片の調製

ゲノムDNA断片をcup horn超音波処理器を用いて機械的に剪断して150~300 bpのサイズの範囲の断片にするか(BB5 cup hornを備えたBandelin Sonoplus UV 2200超音波処理器、10秒、100%出力でパルス)、または穏やかなDNase I処理(Novagen)によって50~70 bpのサイズの断片にした。DNAを150-300 bpサイズ範囲の断片にした場合、超音波処理によっては非常にタイトな断片サイズ分布が生じることが観察された。しかし、DNAを超音波-誘導性機械的剪断力に広範にさらしたにもかかわらず、その結果としての断片サイズの低下は十分ではなく、再現性が達成されなかった。それゆえ、50~70 bpサイズの断片をNovagenショットガン切断キットを用いた穏やかなDNase I処理によって得た。キットに備えられたDNase Iの1:20希釈液を調製し、消化は60 µl容積中MnCl₂の存在下20で5分間行い、酵素による二本鎖切断を確実にした。反応を2 µlの0.5 M EDTAによって停止し、断片化効率を2% TAE-アガロースゲルで評価した。この処理の結果、ほぼ50-70 bp断片を生ずるゲノムDNAの全断片化が起こった。断片をT4 DNAポリメラーゼを100 µMの各dNTPの存在下で用いて2回平滑末端化し、末端の効率的なフラッシングを確実にした。断片をすぐにライゲーション反応に用いるか、または次に使用するまで-20°Cで凍結した。

【0239】

10

20

30

40

50

ベクターの説明

ベクター pMAL4.31をベータ・ラクタマーゼ (bla)遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子と交換した pASK-IBAバックボーン上に構築した {Skerra, A., 1994}。さらに bla遺伝子をマルチクローニングサイトにクローニングした。成熟ベータ・ラクタマーゼをコードする配列の前にompAのリーダーペプチド配列があるため、細胞膜を横切る効率的な分泌が可能である。さらに、成熟ベータ・ラクタマーゼの最初の 12 アミノ酸 (スパーサー配列)をコードする配列がompAリーダーペプチド配列の後にあるため、リーダーペプチダーゼ切断部位の直後の配列の融合が避けられる。というのは、例えばこの領域における正に荷電したアミノ酸のクラスターは細胞膜を横切る転移を減少または無くする可能性があるからである {Kajava, A. et al., 2000}。SmaI 切断部位はライブラリー挿入に役立つ。選択された断片の回収のために用いる上流のFseI 部位および下流のNotI 部位が、SmaI 部位を挟んでいる。3つの切断部位は、12 アミノ酸スパーサー配列をコードする配列の後に、bla遺伝子が-1 読み枠で転写される結果、NotI 部位の15 bp後に停止コドンがくるように挿入されている。+1 bp挿入により、bla ORFが回復し、ベータ・ラクタマーゼタンパク質が産生される結果、アンピシリン耐性が獲得される。

10

【0240】

ベクター pMAL9.1はlamB遺伝子をpEH1 {Hashemzadeh-Bonehi, L. et al., 1998}のマルチクローニングサイトにクローニングすることにより構築した。次いで、切断部位 FseI、SmaIおよびNotIを含む配列をlamBのアミノ酸 154の後に挿入した。この挿入のための読み枠は、プラスミド pMAL4.31からFseIおよびNotIでの消化によって切り出されたフレーム選択されたDNA断片の移動の結果、lamBおよび対応するインサートの連続した読み枠が生じるように構築した。

20

【0241】

ベクター pHIE11は、fhuA遺伝子をpEH1のマルチクローニングサイトにクローニングすることによって構築した。その後、切断部位 FseI、XbaIおよびNotIを含む配列をfhuA中のアミノ酸 405の後に挿入した。この挿入の読み枠は、プラスミド pMAL4.31からFseI および NotIによる消化により切り出されたフレーム選択された DNA断片の移動により、fhuAおよび対応するインサートの連続する読み枠が生じるように選択した。

【0242】

フレーム選択のためのライブラリーのクローニングおよび評価

30

ゲノム大便連鎖球菌DNA断片をベクター pMAL4.31のSmaI 部位にライゲーションした。組換え DNAをDH10B エレクトロコンピテント大腸菌細胞 (GIBCO BRL)にエレクトロポレーションし、形質転換体をカナマイシン (50 μ g/ml)およびアンピシリン (50 μ g/ml)を追加したLB-寒天培地に播いた。プレートを37 °Cで一晩インキュベートし、コロニーを回収してラージスケールDNA抽出に用いた。代表的なプレートを保存し、コロニー PCR 分析およびラージスケール配列決定のためのコロニーの回収のために保存した。簡便なコロニー PCR アッセイを用いてまず、だいたいの断片サイズ分布および挿入効率を判定した。配列決定データから、正確な断片サイズを評価し、挿入部位での接合の正確さおよびフレーム選択の精度を評価した(3n+1規則)。

【0243】

40

細菌表面ディスプレイのためのライブラリーのクローニングおよび評価

ゲノムDNA断片を大便連鎖球菌ライブラリーを含むpMAL4.31 ベクターから、制限酵素 FseIおよび NotIによって切り出した。断片の全集団を、FseIおよび NotIで消化しておいた、プラスミドpMAL9.1 (LamB)または pHIE11 (FhuA)に移した。8 bp GCリッチ配列を認識するこれら2つの制限酵素を用いることにより、pMAL4.31 ベクターにおいて選択された読み枠が、プラットフォームベクターのそれぞれにおいて維持された。プラスミドライブラリーを次いで大腸菌 DH5 細胞にエレクトロポレーションによって形質転換した。細胞を50 μ g/ml カナマイシンを追加した大きいLB-寒天培地プレートに播き、明らかに目視できるシングルコロニーが生じる密度で一晩37 °Cで培養した。細胞を次にこれらプレートの表面から掻き取り、新しい LB培地で洗浄し、アリコート中でライブラリースクリ

50

ーニング用に -80 で保存した。

【0244】

結果

フレーム選択のためのライブラリー

それぞれおよそ 70および300 bpのサイズの3つのライブラリー (LEF-70およびLEF-300)をpMAL4.31ベクター中に作成した。両方のライブラリーについておよそ 1 μ gのpMAL4.31プラスミドDNAおよび50 ngの断片化ゲノム大腸菌DNAをライゲーションおよび形質転換し、フレーム選択後のおよそ $1.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ のクローンを得た。ライブラリーのランダムさを評価するために、576のランダムに選んだLEF-70のクローンを配列決定した。これら配列のうち、483をうまく切り出すことが出来、さらに生物情報分析に供した。結果はこれらクローンのうちわずかのみが2回以上存在することを示すものであった。さらに、クローンの73%がサイズ範囲 25 ~ 100 bpであり、平均するとクローンのサイズは 82 bpであることが示された (図 2)。ほとんどすべての配列が3n+1規則にしたがっており、すべてのクローンが適切にフレーム選択されたことが示される。

10

【0245】

細菌表面ディスプレイライブラリー

ペプチドの大腸菌表面へのディスプレイには、LSPyライブラリーからのインサートをフレーム選択ベクター pMAL4.31からディスプレイプラスミドpMAL9.1 (LamB)またはpHIE11 (FhuA)に移す必要がある。ゲノムDNA断片を FseIおよび NotI制限酵素によって切り出し、5 ngのインサートと0.1 μ gのプラスミドDNAをライゲーションし、DH5アルファ細胞を形質転換したところ、 $7 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ のクローンが生じた。クローンをLBプレートから掻き取り、さらに増幅せずに冷凍した。これら細胞は次のスクリーニング手順のためのライブラリーとして働く。

20

【0246】

実施例3

細菌表面にディスプレイしたゲノムライブラリーとヒト血清とを用いた、大腸菌からの高度に免疫原性のペプチド配列の同定

実験手順

MACS スクリーニング

所与のライブラリーからのおよそ 2.5×10^8 細胞を 50 μ g/ml カナマイシンを追加した 5 ml LB-培地で2時間37 で培養した。発現は 1 mM IPTGの添加により30分間誘導した。細胞を新しいLB培地で2回洗浄し、およそ 2×10^7 細胞を 100 μ lのLB培地に再懸濁し、エペンドルフチューブに移した。

30

【0247】

血清から精製した 20 μ gのビオチン化ヒトIgGを細胞に添加し、懸濁液を4 で穏やかに振盪しながら一晩インキュベートした。900 μ lのLB培地を添加し、懸濁液を混合し、次いで10分間、6,000 rpm、4 で遠心分離した。抗体反応性陽性クローンをビオチン化抗-ヒト-IgG二次抗体で捕捉した。細胞を 1 ml LBで1回洗浄し、100 μ l LB培地に再懸濁した。ストレプトアビジン (Miltenyi Biotech, Germany)に結合した 10 μ lのMACS マイクロビーズを添加し、インキュベーションを20分間4 で続けた。その後、900 μ lのLB培地を添加し、MACS マイクロビーズ細胞懸濁液を磁石に固定化した平衡化したMSカラム (Miltenyi Biotech, Germany)にローディングした (MSカラムは、1 ml 70% EtOHで1回、2 ml LB培地で2回洗浄することによって平衡化した)。

40

【0248】

カラムを次いで 3 ml LB培地で3回洗浄した。磁石を除いた後、細胞を 2 ml LB培地で洗浄することにより溶出させた。3 ml LB培地でカラムを洗浄した後、2 mlの溶出液を再び同じカラムにローディングし、洗浄および溶出工程を繰り返した。場合によっては洗浄および溶出工程は4回まで行い、選択手順の特異性を上昇させた結果、最終溶出液 2 mlを得た。

【0249】

50

第二ラウンドのスクリーニングは以下のように行った。最終溶出液からの細胞を遠心分離で回収し、50 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを追加した1 ml LB 培地に再懸濁した。培養物を37 で90分間インキュベートし、1 mM IPTGで30分間誘導した。細胞を回収し、1 ml LB 培地で1回洗浄し、10 μl LB 培地に懸濁した。第二ラウンドのスクリーニングには同量 (20 μg) のヒトビオチン化 IgGを添加し、懸濁液を一晚4 で穏やかに振盪しながらインキュベートした。すべてのさらなる工程は、第一の選択ラウンドと全く同じようにして行った。ただし、洗浄、ローディングおよび溶出サイクルの数はそれぞれ個々のスクリーニングラウンドにあうようにした。2ラウンドの選択の後に選択した細胞を50 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを追加したLB-寒天培地プレートに播き、一晚37 で培養した。

【0250】

選択されたクローンの配列決定およびウェスタンブロット分析による評価

選択されたクローンを一晚37 で50 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを追加した3 ml LB 培地で培養し、プラスミド DNAを標準的手順で調製した。配列決定はMWG (Germany)または TIGR (U.S.A.)と連携して行った。

【0251】

ウェスタンブロット分析のために、およそ10~20 μg の全細胞タンパク質を10% SDS-PAGEで分離し、HybondC メンブレン (Amersham Pharmacia Biotech, England)にブロッティングした。LamBまたは FhuA 融合タンパク質をヒト血清を一次抗体としておよそ1:3,000 ~ 1:5,000希釈で、そしてHRPと結合した抗-ヒト IgG抗体を1:5,000希釈で二次抗体として用いて検出した。検出はECL 検出キット (Amersham Pharmacia Biotech, England)を用いて行った。あるいは、ウサギ 抗-FhuAまたはマウス 抗-LamB抗体を一次抗体として、それぞれHRPに結合した二次抗体と組み合わせて用いて融合タンパク質を検出した。

【0252】

結果

ビオチン化 Igを用いた磁気活性化細胞ソーティング(MACS)による細菌表面ディスプレイライブラリーのスクリーニング

pMAL9.1中のライブラリー LEF-70およびpHIE11中のライブラリー LEF-300を、健康個体からの血清(表 1a)または回復期心内膜炎患者の血清(表 1c)からの ビオチン化ヒト IgGのプールを用いてスクリーニングした(実施例1:ヒト血清からの抗体の調製を参照)。選択手順は実験手順に記載のように行った。図 3Aは、LEF-70 ライブラリーおよび IC10-IgGを用いたスクリーニングの代表例を示す。MACS スクリーニングからの第一の選択サイクル後のコロニー数から理解されるように、最終的に回収された細胞の総数は 1×10^7 細胞からおよそ 5×10^4 細胞と劇的に減少したが、抗体を添加しなかった選択では約 6×10^3 細胞にまで減少した(図 3A)。第二スクリーニングラウンドのために、 2×10^5 細胞をカラムにローディングし、ほとんどすべて(1×10^5)が IC10-IgGによってローディング、洗浄および溶出の4サイクル後には回収されたのに対し、100細胞未満しかヒト血清からのIgGを添加しなかった場合には回収されなかった。この結果は明らかに選択が大便連鎖球菌特異的抗体に依存していたことを示す。典型的には、選択の結果、適用した血清 IgGにより特異的に選択されるクローンのおよそ30~70%が得られた。各スクリーニングのために、400 ~ 1200のクローンをDNA 配列決定にかけ、得られた配列を大便連鎖球菌 V583ゲノムに対してブラストにかけた。この生物情報分析により、ヒト IgGの添加により選択された個々のクローンの頻度に基づくスクリーニングの評価が可能となる。スクリーニングの性能がよいことを確認するために、2回以上選択されたすべてのクローンを取り出し、同じプールされた血清 IgGによるウェスタンブロット分析にかけた(図 3B)。より高頻度で選択されたクローン(> 5x)の分析により、これら選択されたクローンの90%より多くが、関連する血清に存在する抗体と反応性を示す一方、大便連鎖球菌特異的インサートを含まないLamBを発現する対照株は同じ血清 IgGと反応しなかった。一般に、低い頻度で(< 5x)

選択されたクローンは、適用した血清 IgGとの反応性の割合が低いことが示された。コロニーPCR 分析により、すべての選択され、試験されたクローンが、予想されるサイズ範囲にインサートを含んでいることが示された。

10

20

30

40

50

【0253】

多数のランダムに取り出されたクローン(400~1200/スクリーニング)の配列決定により、スクリーニングに用いたヒト血清 IgG によって特異的に認識される遺伝子および対応するペプチドまたはタンパク質配列が同定された。特定のクローンが選択される頻度は少なくとも部分的には選択に用いられた血清中のこのクローンによって提示されるエピトープを認識する特異的抗体の量および/または親和性を反映する。この点でいくつかのORF(例えばEF3060、EFA0042)由来のクローンが2回以上のスクリーニングにおいて複数回取り上げられたことは驚くべきであり、その高度な免疫原性の性質が示される。表1aに健康な成人血清からの血清によって行った4回のスクリーニングによって得られたデータを要約し、表1cに回復期心内膜炎患者血清による4回のスクリーニングによって得られたデータを要約する。後者の表は表1aに挙げられたものと比べて新規な抗原のみを含んでいた。26の抗原が両方の血清によって同定され、71および42の特有の抗原性ORFがそれぞれ健康な成人血清および患者血清によって選択された。

10

【0254】

表1に示されるすべてのクローンはシングルクローンからの全細胞抽出物を用いたウェスタンブロット分析により、それぞれのスクリーニングに用いたヒト血清のプールと反応性を示すことが示された。表1から理解されるように、同定されたORFの異なる領域は免疫原性であると同定される。というのは、タンパク質のサイズの異なる断片がプラットフォームタンパク質によって表面にディスプレイされているからである。

【0255】

細菌表面ディスプレイスクリーニングによって同定された遺伝子の多くは、大便連鎖球菌の表面に付着および/または分泌されるタンパク質をコードすることは注目値する。これは表面付着または分泌タンパク質の大便連鎖球菌の病原性において予測される役割と一致する。

20

【0256】

表1bは、表1aに挙げる大便連鎖球菌抗原に対して最少で70%の同一性を有する相同性探索によって同定されたエンテロコッカス・フィシウムタンパク質を示す。コンピュータプログラム TBLASTNを用いて大便連鎖球菌とエンテロコッカス・フィシウム配列との同一性を判定した(<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbial/microbialblast.cgi?organism=Efaecium>)。アミノ酸配列同一性是对應する大便連鎖球菌抗原の完全なORF配列に基づいて計算した。結果は、エンテロコッカス・フィシウムは臨床的に密接に関連した種である大便連鎖球菌と構造的に関連したタンパク質を含むことを示す。大便連鎖球菌における相同的タンパク質は本発明において過免疫血清反応性抗原として提供されているため、表1bで特定するエンテロコッカス・フィシウムタンパク質は同じ有用性を提供し、特に医薬組成物、例えば腸球菌感染症に対するワクチンに含まれる抗原としての有用性を提供する。

30

【0257】

実施例4:個体のヒト血清による高度に免疫原性のペプチド配列の反応性の評価

実験手順

ペプチド合成

ペプチドはRinkアミド樹脂(PepChem、Tubingen、Germany)上の標準的 F-moc 化学を用いて、Syroll 合成機(Multisyntech、Witten、Germany)を用いてスモールスケール(4 mg 樹脂並行して 288まで)で合成した。配列を集めた後、ペプチドを Fmoc-イプシロン-アミノヘキサン酸(リンカー)およびピオチン(Sigma、St. Louis、MO;通常のアミノ酸のように活性化)によって伸長させた。ペプチドを樹脂から、93% TFA、5% トリエチルシラン、および2%を用いて1時間かけてはずした。ペプチドを減圧下で乾燥させ、アセトニトリル/水(1:1)から3回凍結乾燥させた。正しい質量の存在をReflex III MALDI-TOF(Bruker、Bremen Germany)での質量分析によって確認した。ペプチドはさらに精製せずに用いた。

40

【0258】

50

酵素結合免疫測定法 (ELISA)

ビオチン標識化ペプチド(N-末端)をストレプトアビジン ELISA プレート (EXICON)に10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で製造業者の指示に従って被覆した。高特異性セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)-結合抗-ヒト IgG 二次抗体 (Southern Biotech) を製造業者の推奨にしたがって用いた(希釈: 1,000x)。血清は2種類の血清希釈、200X および 1,000Xで試験した。手操作での被覆の後、ペプチドプレートを内蔵ELISAリーダー(GENIOS、TECAN)を備えた Gemini 160 ELISA ロボット(TECAN)で加工および分析した。

【0259】

結果

選択されたクローンの生物情報分析の後、対応するペプチドを設計し、合成した。26 アミノ酸 残基を超えるエピトープの場合には、オーバーラップするペプチドを作成した。すべてのペプチドはN-末端ビオチンタグを有するように合成し、ストレプトアビジン被覆ELISA プレートにおける被覆試薬として用いた。

10

【0260】

選択されたエピトープの免疫原性を確認するために、細菌表面ディスプレイスクリーニングにおける同定に用いたIC9- およびIC10 IgG プールに含まれていた個々のヒト血清を用いたペプチド ELISAにより特異的抗体レベルを測定した。104のペプチドの血清反応性の要約は10の健康な成人スクリーニング血清 (N1-N10)および11の異なる大便連鎖球菌感染症患者からの血清(P1-P11)によって 61の大便連鎖球菌抗原を示した。これらペプチドを陽性スクリーニング血清の数および反応性の程度に基づいて各ペプチドについて計算したスコアにより比較した。ペプチドのなかには高度に広く反応性のものから弱い陽性のものまでであった。最も高いスコアのペプチドエピトープとして、表面タンパク質、例えば、LPXTG 細胞壁 タンパク質 (EF0490.3およびEFA0042.1-2)、分泌タンパク質(EF0360.1 および EF0792.1)および仮想タンパク質(EF0428.1-2、EF3207.2およびEFC0034.1-2)が見いだされた。興味深いことに、2つの顕著なエピトープが選択的読み枠であるARF0679(40アミノ酸長)および ARF2052 (54アミノ酸長)に属しており、これらタンパク質が定着および/または感染においてインピボで実際に存在し、発現していることが示唆される。高力価健康血清と比較して患者血清の総大便連鎖球菌-抗体レベルが低いことにより示唆されるように(図. 1C)、ペプチド反応性も患者血清の方が低かった。

20

【0261】

表 1a: 細菌表面ディスプレイによって同定された免疫原性タンパク質

30

【0262】

【表 1 a - 1】

表1a

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EF0020	PTS システム 成分	4-10,14-21,30-36,59-68,77-82,87-93,96-105,112-121,125-133,135-141,150-162,164-183,192-203,207-213,215-226,228-234,241-247,250-285,302-308	B:1, C:10, D:1	135-148	1, 171
EF0032	膜タンパク質, 推定	15-57,60-73,77-101,108-134,136-177,185-201,203-217,226-240,244-254,272-277,283-288,292-343,354-370,380-398,406-437,439-453,473-490,532-538,584-590,595-601,606-612,664-677,679-704,715-724,731-753,759-772,786-794,814-862	A:1, C:2	657-684	2, 172
EF0062	2,3-環状ヌクレオチド 2-ホスホジエステラーゼ, 推定	4-9,15-36,41-47,54-60,75-81,114-120,131-146,152-158,174-182,194-202,208-215,218-226,255-271,276-285,290-295,302-311,318-328,330-344,352-359,365-377,388-395,398-405,426-432,439-449,455-500,505-513,531-537,542-552,554-561,587-595,606-612,718-734,763-771,775-782,792-801,805-812,822-828,830-843,849-863,876-894,905-911,919-926,935-947,949-958,968-979,1009-1016,1029-1045,1047-1056,1076-1081,1092-1106,1123-1133,1179-1200,1202-1211,1215-1223,1287-1299,1301-1306	A:3, B:1, C:16, D:1	398-431, 1224-1237	3, 173
EF0149	凝集物質 ASP1	17-47,74-80,90-97,126-133,137-148,167-173,179-185,214-223,250-255,270-283,329-338,342-350,352-358,360-367,372-383,398-404,411-421,426-432,435-446,452-462,472-479,515-521,582-592,611-618,623-629,642-659,666-673,678-689,704-725,732-737,744-757,768-789,824-834,842-849,862-868,877-887,904-916,923-928,941-947,962-974,982-992,1019-1030,1032-1044,1046-1052,1065-1075,1077-1087,1108-1121,1124-1132,1137-1151,1170-1182,1190-1206,1208-1214,1227-1233,1242-1251,1254-1273,1282-1298	A:5, C:2	792-825	4, 174
EF0196	部位特異的のリコンビナーゼファミリータンパク質	19-31,39-67,82-91,104-110,113-128,149-155,161-181	C:3	137-155	5, 175
EF0253	アルデヒドデヒドロゲナーゼ	6-18,54-63,69-85,110-127,142-156,158-167,169-211,238-246,248-257,276-311,339-349,371-380,385-391,394-403,421-438,451-456,483-489	C:2	449-468	6, 176
EF0270	PTS システム 成分	5-15,24-34,50-56,61-83,98-121,123-136,149-162,166-194,202-215,221-227,229-332,337-360,367-402,404-415,427-433,444-462,471-478,487-498,511-518,521-544,550-563,568-574,580-587,597-607,610-616,624-629	A:1, B:2, C:2, D:2	468-498	7, 177
EF0298	カチオン輸送 ATPase, E1-E2 ファミリー	11-19,32-49,57-63,65-71,80-89,91-133,166-181,183-191,201-230,234-257,264-291,297-303,305-314,316-335,337-354,359-366,368-374,383-388,394-405,408-442,446-470,483-490,499-505,513-538,544-555,557-563,568-590,598-608,617-623,627-636,641-647,667-685,687-693,710-723,733-739,742-754,769-815	D:24	366-388	8, 178
EF0355	エンドリシン	4-16,30-35,42-53,67-76,82-87,101-108,112-130,132-138,147-152,161-183,187-208,218-225,265-281,295-303,305-317,322-334,338-357,360-368,370-383,387-394,400-419,421-430	A:1, B:3	255-336	9, 179
EF0428	保存仮想タンパク質	19-27,36-47,59-66,76-83,101-112,118-125,142-147,162-180,185-196,225-240,246-263,286-304,314-319,327-333,353-367	A:1, C:23	194-214	10, 180
EF0485 (EF0005)	凝集物質	14-43,70-76,83-89,111-117,122-128,136-145,163-170,175-182,210-219,246-251,266-279,325-331,338-346,348-354,356-363,368-379,422-428,431-441,450-456,466-473,509-515,532-542,549-556,576-586,605-612,617-623,636-653,660-667,674-686,698-719,726-731,738-745,762-783,818-828,836-843,856-862,871-881,903-910,917-922,935-941,956-968,976-986,1013-1024,1026-1038,1059-1069,1071-1081,1102-1115,1118-1126,1131-1145,1164-1176,1187-1200,1202-1208,1221-1227,1236-1245,1248-1267,1273-1292	C:3, D:4	252-287, 805-844	11, 181

10

20

30

40

【表 1 a - 2】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EF0490	LPXTG-モチーフ 細胞壁 アンカー ドメイン タンパク質	4-18,21-28,37-43,56-70,101-113,131-140,142-150,162-170,172-184,193-204,209-227,233-238,246-264	A:2, C:10	93-168	12, 182
EF0517	2-デヒドロバントエート 2-レダクターゼ, 推定	14-20,44-50,61-70,77-96,99-106,129-142,168-181,187-196,205-221,225-241,277-296	C:4	257-281	13, 183
EF0570	浸透圧感受性 K+ チャネルセンサー ヒストジニキナーゼ,	18-29,43-54,64-76,78-84,88-103,125-149,159-176,198-218,230-242,256-271,279-285,287-293,300-306,325-331,344-351,357-364,371-397,400-414,419-464,485-515,517-526,529-537,548-553,573-580,584-590,603-620,639-661,676-681,687-700,716-761,772-780,785-790,795-803,823-836,848-853	A:2	106-134	14, 184
EF0584	ABC トランスポーター, ATP-結合タンパク質	7-13,19-42,44-51,55-75,87-97,99-110,112-118,129-135,141-156,158-178,213-220,230-286,294-308,323-338,345-352,355-365,370-392,394-419,437-446,454-460,474-497,515-526,528-546,569-575	C:3	128-141	15, 185
EF0668	UDP-N-アセチルムラモイルアラニル-D-グルタメート-2,6-ジアミノピメラートリガーゼ	12-20,24-33,45-70,73-84,86-94,103-116,118-124,135-142,163-170,176-200,202-224,226-234,237-248,250-262,265-287,296-307,334-341,347-356,361-369,382-396,405-415,418-427,431-439,443-449,452-461,467-474	D:2	113-146	16, 186
EF0792	パーミアラーゼ, 推定	13-38,44-50,52-59,66-72,83-94,103-110,116-124,131-137,158-180,199-204,218-233,241-264,269-317,326-342,350-356	C:2	70-86	17, 187
EF0795	保存 仮想 タンパク質	29-35,49-59,63-84,86-97,103-111,113-126,130-144,150-158,174-198,221-231,250-264,266-273,291-298,310-318	A:1, C:3	70-90	18, 188
EF0799	オートリシン	19-25,28-52,60-66,71-76,131-142,149-155,157-178,181-213,218-223,237-242,250-257,260-266,272-279,282-290,321-330,373-385,393-407,441-453,461-475,509-521,529-542,577-589,597-610,643-655,663-677,703-718,729-734	A:8, B:5	358-464,495-570,604-685	19, 189
EF0851	仮想 タンパク質	4-29,51-76,116-136,158-173,179-193,207-215	C:2	86-111	20, 190
EF0861	アセチルトランスフェラーゼ, GNAT ファミリー	5-23,45-70,79-90,93-107,114-122,142-151	C:3	18-36	21, 191
EF0922	保存 仮想 タンパク質	9-51,68-120,133-149,158-180,186-206,211-220,222-237,248-293,296-310,317-339	C:2	248-260	22, 192
EF0996	細胞分裂 タンパク質 FtsA	14-24,44-63,69-98,108-119,123-136,155-161,164-176,180-193,203-208,215-223,239-247,274-281,283-289,296-304,306-313,315-327,331-341,343-353,357-386,392-405	C:1, D:3	205-246	23, 193
EF1012	PTS システム 成分	5-13,16-23,36-42,53-63,70-83,96-102	C:2	14-34	24, 194
EF1026	保存 仮想 タンパク質	4-13,19-35,49-56,59-76,83-107,121-134,144-153,157-164,166-186,194-202,209-216,231-253,257-264	C:21	98-134	25, 195
EF1032	ダウノルピシン 耐性 タンパク質	16-32,38-47,58-68,78-89,98-114,117-123,132-141,146-156,164-170,179-188,196-212,219-230,232-237,244-263,265-274,278-293,297-303,306-326,339-349,352-359,362-367,373-379,384-394,396-406,423-443,451-461,465-484,490-497,504-511,523-533,537-547,550-556,558-566,573-579,586-593,598-609,615-642,647-665,671-686,693-713,723-728	A:2	332-378	26, 196
EF1060	ペプチド ABC トランスポーター, ペプチド-結合タンパク質, 推定	6-21,34-44,58-64,66-74,79-87,114-127,129-143,154-162,174-189,205-214,241-262,266-273,278-297,319-324,328-338,342-351,390-398,409-415,422-435,458-464,471-477,481-486,506-531,534-540,542-550	A:4	315-389	27, 197

10

20

30

40

【表 1 a - 3】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EF1093	LPXTG-モチーフ 細胞壁 アンカー ドメイン タンパク質	4-28,39-45,52-58,69-82,93-115,122-128,135-140,146-163,177-192,209-215,221-232,271-284,331-337,341-352,360-378,383-390,392-401,409-422,428-435,462-470,474-480,482-496,531-539,541-549,551-560,562-569,576-582,598-618	C:17	98-127	28, 198
EF1141	MutT/nudix ファミリー タンパク質	14-27,33-47,61-79,94-104,119-133	C:2	36-60	29, 199
EF1182	自己誘導物質-2 産生 タンパク質 LuxS	11-22,29-40,48-62,68-73,96-106,108-118,125-149	C:3	102-126	30, 200
EF1277	転写制御因子	4-11,45-55,76-83,86-102,105-112,138-144,147-153	D:9	20-48	31, 201
EF1289	保存 ドメイン タンパク質	12-20,28-56,62-68,72-82,93-99,101-107,120-133,135-145,178-186,208-232,279-292	C:2	36-64	32, 202
EF1386	ホーメート/ニトライト トランスポーター ファミリー タンパク質	6-14,23-48,65-82,92-134,140-181,188-219,228-238,244-253,255-261	C:6	124-145	33, 203
EF1404	MutS2 ファミリー タンパク質	11-25,31-38,53-59,62-71,89-99,125-133,151-157,182-190,195-203,208-215,219-229,249-262,267-275,287-295,298-316,318-325,328-334,344-353,357-363,371-377,385-391,396-415,425-436,438-457,471-485,538-552,554-561,606-625,630-636,646-653,669-679,695-704,706-715,722-747,763-773	C:6	714-738	34, 204
EF1561	シキミ酸 5-デヒドロゲナーゼ	10-29,33-45,50-60,70-79,83-95,118-124,136-157,176-184,192-205,207-216,223-234,240-246,258-268,275-283	C:1, D:29	37-56	35, 205
EF1584	システイン シンターゼ A	4-24,27-38,46-54,66-72,81-97,112-119,128-137,152-157,173-179,185-214,219-225,227-248,262-284,286-295,301-307	C:6	117-134	36, 206
EF1597	カタラーゼ	26-43,49-56,60-71,74-82,87-98,110-116,131-146,154-164,169-178,183-189,205-214,241-246,255-268,275-292,305-314,316-323,326-340,346-363,397-402,419-429,440-446,452-461,467-475	C:3	29-66	37, 207
EF1601	PTS システム 成分	7-16,21-39,48-58,61-78,82-89,109-136,138-150,152-176,182-247,255-261,267-332,336-345,347-358,362-368,371-392,394-404,407-472,490-498,505-513,527-544,554-582,603-611,614-620,632-638	A:1, B:2, C:9	500-523	38, 208
EF1624	アルデヒド デヒドロゲナーゼ, 推定	24-46,77-83,90-97,99-118,123-166,168-177,204-212,229-239,248-262,273-282,287-293,300-319,321-337,340-352,357-366,391-402,411-428,442-450,464-471,479-489	D:2	19-40	39, 209
EF1646	熱ショック タンパク質 HslVU, ATPase サブユニット HslU	9-23,25-34,53-58,70-86,90-97,99-116,118-128,131-141,185-191,228-233,237-253,255-261,264-271,273-280,302-312,319-349,351-359,362-369,376-383,387-394,398-406,419-434	C:3	20-31	40, 210
EF1692	仮想 タンパク質	15-22,37-43,71-87,105-115,121-127,135-142,152-158	D:4	32-52	41, 211
EF1741	異化産物 調節 タンパク質	6-12,18-29,37-47,50-58,65-83,85-91,94-99,108-123,142-150,156-163,183-193,215-222,242-249,252-258,261-270,285-308,318-326	A:4	1-95	42, 212
EF1798	仮想 タンパク質	9-61,65-133,144-155,166-173,175-221,233-276,278-313,329-368	C:2	210-233	43, 213
EF1817	セリン プロテイナーゼ ホモログ	11-29,33-39,46-51,65-93,107-113,134-143,147-154,166-177,181-188,214-220,233-243,263-269	A:2, B:1, D:3	112-128	44, 214
EF1823	オートリシン	8-46,110-134,155-167,174-183,188-201,210-230,253-258,267-282,289-299,312-319,322-327,330-337,365-381,389-402,405-411,419-425,439-447,465-472,489-512,525-532,540-554,577-589,591-599,605-614,616-624,633-649	D:7	503-529	45, 215
EF1978	DNA-3-メチルアデニン グリコシラーゼ	34-49,64-70,90-118,124-131,141-152,159-165	C:6	112-128	46, 216
EF2005	保存 仮想 タンパク質	5-15,26-45,55-72,80-85,93-100,121-133,142-148,154-167,198-205,209-215,241-254,260-265,271-279	C:2	244-270	47, 217

10

20

30

40

【表 1 a - 4】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EF2052	細胞分裂タンパク質 FtsK	4-36,38-54,67-83,122-153,159-178,205-212,232-242,244-253,259-268,281-288,298-309,324-331,334-370,372-381,389-401,403-429,441-450,456-462,465-471,473-479,483-504,508-518,537-543,553-565,578-584,592-609,619-625,658-667,669-679,712-719,722-729,737-744,746-752,758-765	C:6	180-226	48, 218
EF2074	ABC トランスポーター, ATP-結合タンパク質	6-17,23-32,49-56,61-67,76-83,85-103,105-111,120-132,145-171,175-185,191-225,231-246	C:23	99-128	49, 219
EF2266	2-デヒドロ-3-デオキシホスホグルコナートアルドラーゼ	4-24,28-48,52-58,64-79,87-100,104-120,136-152,159-166	C:4	150-163	50, 220
EF2305	トブリムドメインタンパク質	13-27,65-71,77-99,104-121,128-154,183-216,223-229,234-255,277-287,296-308	C:10	77-97	51, 221
EF2306	保存 仮想 タンパク質	8-18,44-76,102-109	C:2	49-57	52, 222
EF2307	保存 仮想 タンパク質	5-14,28-40,42-51,54-60,77-83,89-100,117-124,146-172,176-204,216-231,237-244,267-278,324-334,342-348,396-401,427-433,438-450,452-457,465-471,473-481,491-500,509-515,523-544,550-556,558-569,589-595,606-618,625-632,640-649,665-671,678-688,691-698,717-723,728-734,781-789,800-805,812-821,833-868,873-879,889-905,929-939,988-998,1046-1061,1073-1079,1089-1096,1115-1124,1132-1140,1172-1196,1220-1226,1231-1249,1269-1277,1287-1301,1307-1330,1350-1361,1369-1378,1387-1412,1414-1420,1422-1439,1484-1491,1513-1529,1552-1561,1576-1583,1606-1613,1617-1640,1647-1654,1665-1679,1686-1698,1709-1727,1736-1743,1750-1757,1771-1790,1801-1807,1817-1823,1831-1842,1859-1868,1870-1882,1884-1891,1900-1906,1909-1914,1929-1935,1952-1960,1974-1988,2002-2011,2032-2063,2071-2081,2116-2124,2139-2147,2149-2159,2163-2190,2209-2215,2245-2253,2282-2287,2331-2342,2360-2370,2379-2393,2402-2408,2414-2421,2423-2430,2433-2439,2442-2450,2472-2478,2485-2493,2495-2503,2506-2512,2547-2554,2558-2564,2615-2625,2637-2652,2692-2698,2700-2706,2711-2723,2731-2740,2748-2753,2756-2762,2765-2772,2781-2798,2810-2824,2844-2852,2885-2899,2912-2922,2937-2944,2947-2970,2988-2998,3016-3025,3032-3037,3062-3071,3129-3148,3156-3161	A: 8, B:1, C: 2,	530-607	53, 223
EF2326	逆転写酵素	31-36,57-62,79-85,90-96,99-112,120-146,162-185,193-203,208-217,219-226,239-253,283-290,298-304,306-321,340-349,351-361,365-372,386-395,407-438,473-486,537-551,558-568,576-594,598-604	D:40	75-95	54,224
EF2378	DNA ポリメラーゼ III, アルファ サブユニット, グラム陽性型	14-19,24-30,34-42,45-52,54-64,66-82,95-105,107-118,126-163,171-177,184-201,210-215,260-269,273-279,288-304,321-327,358-364,370-375,380-387,394-404,407-413,421-431,436-451,465-474,504-511,531-552,578-587,614-626,629-636,638-671,691-715,719-729,733-745,752-759,768-777,785-792,794-802,805-824,844-854,867-880,885-891,893-902,907-924,939-948,955-964,966-975,987-1000,1012-1017,1023-1028,1050-1071,1083-1098,1102-1115,1133-1146,1170-1183,1204-1211,1213-1223,1262-1311,1313-1319,1346-1355,1366-1371,1383-1405,1409-1414	D:38	776-819	55, 225
EF2476	ペニシリン結合タンパク質 2, 推定	12-27,30-38,54-61,64-74,82-96,103-110,117-125,134-140,147-158,185-201,218-225,232-253,265-280,319-325,350-362,366-372,376-386,464-483,485-490,511-521,531-537,542-559,564-574,593-609,613-619,637-642,668-677	A:3, C:8	195-214	56, 226

10

20

30

40

【表 1 a - 5】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EF2556	コハク酸デヒドロゲナーゼ/フマル酸レダクターゼ, フラボタンパク質 サブユニット	4-21,59-67,73-79,84-91,141-151,186-197,203-214,222-227,237-245,255-260,281-292,294-311,336-344,346-355,422-437,459-466,484-491	A:1, C:3	77-109	57, 227
EF2563	保存 仮想 タンパク質	10-45,52-61,63-70,74-102,112-122,124-132,164-178,181-205,212-240,246-256	C:2	226-247	58, 228
EF2570	キサンチンデヒドロゲナーゼ	38-50,53-63,78-87,89-111,126-152,169-176,179-186,193-228,254-267,275-282,288-304,309-318,325-341,346-353,358-367,384-395,404-427,429-435,456-465,467-501,510-521,523-536,541-548,552-560,563-584,589-595,597-620,625-637,639-645,661-666,712-729,734-741,743-750,775-806,809-816,818-840,842-850	C:3	693-714	59, 229
EF2581	オキシドレダクターゼ, ピリジン スクレオチド-ジスルフィド	5-17,30-37,52-75,77-86,88-107,112-135,151-160,178-222,226-246,263-270,279-294,306-314,327-342,345-352,374-381,389-416,422-429,435-449,453-467,473-500,512-522,524-531,542-549,552-560,565-571,575-586,594-600,613-619,625-633,635-641,647-653,667-674,680-699,711-729,735-741,764-775,781-786,792-798,805-813,817-825,833-842,850-855,860-866,869-910,917-930,949-990	A:1, C:7	533-562	60, 230
EF2617	リボヌクレアーゼ R	7-14,39-46,61-74,83-89,93-99,110-121,136-150,172-180,182-200,207-216,223-236,238-251,265-271,280-288,294-309,320-336,339-354,362-377,383-389,401-407,435-441,446-453,460-465,472-487,499-511,518-528,533-540,557-570,572-587,631-637,643-658,663-669,672-678,681-687,695-706,714-728	C:2	118-139	61, 231
EF2682	保存 仮想 タンパク質	5-19,24-30,56-64,69-79,93-100,102-111,117-123,125-133,174-182,185-199,205-224,268-275,311-336	D:20	102-125	62, 232
EF2703	転写制御因子	6-35,39-45,57-62,80-85,92-106,117-122,126-171,214-223,253-260,268-273,285-291,295-306,315-320,325-336,361-366	A:1, B:2, D:12	172-202	63, 233
EF2724	エンドグルカナーゼ, 推定	4-13,24-37,45-51,58-66,84-92,112-121,132-141,151-171,175-195,204-212,222-240,262-268,276-295,305-336,338-348,354-362	C:2	160-183	64, 234
EF2782	ガラクトース-1-ホスフェート ウリジルトランスフェラーゼ	10-16,24-35,41-73,78-104,111-121,124-139,141-148,150-164,196-215,224-241,249-282,299-307,315-357,368-378,393-401	D:2	345-367	65, 235
EF2787	ロダナーゼファミリー タンパク質	4-32,48-53,61-67,84-104,112-118	D:21	106-130	66, 236
EF2812	仮想 タンパク質	21-28,31-36,65-81,98-105,115-121,123-131,136-142,155-161,177-190	D:15	201-232	67, 237
EF2858	スレオニルtRNA シンゼターゼ	4-15,21-27,33-39,42-56,58-64,68-82,84-90,92-98,113-122,146-162,168-175,177-189,191-203,249-268,279-285,287-304,328-342,349-358,371-378,387-393,404-413,419-425,467-479,487-498,513-524,528-539,541-565,572-579,595-606,626-635,637-642	C:8	612-626	68, 238
EF2893	仮想 タンパク質	7-13,52-70,76-82,97-106,110-117	D:6	13-45	69, 239
EF2927	ヒドロラーゼ, ハロ酸デハロゲナーゼ様ファミリー	5-10,12-48,59-64,87-102,107-128,131-140,154-161,165-171,173-215	C:2	54-74	70, 240
EF2951	仮想 タンパク質	4-11,19-28,34-40,74-81,87-98,126-147,163-171,184-193,205-213	B:1, C:2	49-124	71, 241
EF2961	リボキナーゼ	7-14,23-29,35-40,61-67,99-106,111-122,124-133,135-161,187-206,216-229,236-245,262-268,271-280	C:2	256-273	72, 242
EF2986	ABC トランスポーター, ATP-結合タンパク質	4-13,17-37,47-54,85-99,105-113,120-132,147-166,180-186,192-199,204-216	C:2	127-144	73, 243
EF2987	保存 仮想 タンパク質	14-27,29-37,52-62,68-76,89-96,117-123,125-131,137-145,166-195,205-212,214-222,228-235,258-264,271-281,288-296,308-324,332-339,355-361,365-371	A:1, C:2	268-293	74, 244

10

20

30

40

【表 1 a - 6】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EF3023	多糖リアーゼ, ファミリー 8	4-21,30-42,54-60,78-85,90-110,141-147,160-168,176-185,194-206,218-225,230-245,251-261,287-293,295-304,320-326,334-347,351-362,386-402,413-423,427-433,439-453,456-477,480-493,507-513,526-539,574-581,591-598,600-609,614-632,655-665,685-691,703-712,742-747,757-775,797-803,813-819,823-829,880-887,901-906,930-944,948-958,962-968,971-995,1002-1009,1017-1023,1036-1053,1069-1081,1107-1124,1129-1152,1178-1195,1211-1223,1249-1266,1271-1288,1334-1340,1346-1367	A:9, D:6	1-63, 171-189	75, 245
EF3041	ペプチド ABC トランスポーター, ペプチド-結合タンパク質	4-22,52-63,70-75,94-104,112-125,133-141,176-199,209-216,244-259,287-299,336-352,366-372,386-399,421-436,444-449,457-466,481-487,506-529,531-540	A:2, B:1	295-378	76, 246
EF3051	仮想タンパク質	9-30,43-49,58-75,86-96,119-131,138-147,162-167,181-201,208-214	A:4, C:3	16-121	77, 247
EF3060	分泌抗原 SagA, 推定	4-27,52-58,80-90,92-100,108-114,118-143,169-176,189-198,247-261,281-287,307-317,323-329,352-363,372-381,396-411,413-426,429-440,442-450,456-461,468-479	A:14, B:6, C:1	1-73	78, 248
EF3073	シグナルペプチダーゼ I	4-32,47-52,57-63,71-78,92-104,126-142,153-175	B:3, C:3	145-163	79, 249
EF3086	保存仮想タンパク質	17-23,35-41,51-70,73-86,104-125	C:2	105-129	80, 250
EF3096	染色体分離 SMC タンパク質, 推定	25-32,41-50,75-85,87-103,115-122,138-149,164-171,188-210,212-220,224-234,256-273,288-299,304-310,330-336,357-365,382-390,399-405,414-421,440-446,454-461,480-486,502-514,518-540,543-553,561-567,572-580,582-588,595-630,633-651,672-681,691-709,760-767,813-832,841-848,852-866,873-893,919-925,927-933,940-955,957-978,984-997,1000-1010,1035-1040,1044-1051,1058-1064,1081-1091,1097-1124,1129-1138,1144-1150,1158-1165,1170-1180	C:14	909-936, 1001-1031	81, 251
EF3125	ブライモソームタンパク質 N	4-12,19-26,31-41,49-64,66-86,101-117,119-127,134-142,152-161,163-172,179-188,209-218,234-241,276-291,294-300,307-320,324-341,346-356,373-387,389-397,410-416,418-436,444-454,460-472,481-486,500-507,511-535,541-549,553-559,579-586,602-607,613-620,628-640,654-663,671-678,681-691,709-722,741-754,766-774,778-786,797-803	C:4	212-226	82, 252
EF3177	仮想タンパク質	4-10,15-27,34-54,60-73,79-88,101-115,120-136,154-162,167-172,222-240	A:3	126-195	83, 253
EF3183	LPXTG-モチーフ細胞壁アンカードメインタンパク質	5-16,18-25,29-35,57-63,86-91,107-121,123-131,170-179,185-199,204-226,250-255,262-274,291-296,325-347	A:2, B:1	1-38	84, 254
EF3207	保存仮想タンパク質	7-19,22-34,36-42,48-54,60-66,71-76,104-110,118-133,135-145,158-164,167-174,182-193,196-204,217-229,251-290,293-299,309-315	C:1, D:5	288-318	85, 255
EF3276	保存仮想タンパク質	43-51,55-61,66-73,80-90,103-127,133-142,174-180,185-196,203-210,229-235,239-251,258-266,272-278,289-314,316-326,340-346,355-361	A:1	14-27	86, 256
EF3290	センサーヒスチジンキナーゼ	4-25,27-33,35-41,52-74,76-89,99-124,138-144,146-159,167-182,184-191,193-206,211-223,232-240,249-257,270-279,281-287,293-310,322-341,347-356	C:14	292-322	87, 257
EF3295	仮想タンパク質	5-13,28-38,43-60,67-72,98-116,122-134,137-151,167-174,177-195,197-216	B:1, C:4	99-195	88, 258
EF3319	クエン酸リアーゼ, アルファサブユニット	15-33,35-42,48-57,62-68,73-91,107-119,121-153,173-194,205-210,223-228,234-241,243-259,275-298,308-315,327-340,342-370,376-391,398-404,410-419	A:1, C:50	71-122	89, 259
EFB0002	トランスボザーゼ	12-39,43-64,87-95,99-105,114-126,128-136,139-147,212-225	A:1, C:3	107-141	90, 260

10

20

30

40

【表 1 a - 7】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EFA0041	保存 仮想 タンパク質	6-33,40-45,60-75,79-86,121-129,131-137,161-167,172-178,186-195,203-212,236-244,257-264,278-294,306-312,345-358,368-381,386-395,404-410,412-418	A:4, B:5, D:3	198-270	91, 261
EFA0042	LPXTG-モチーフ 細胞壁 アンカー ドメイン タンパク質	18-31,34-41,50-56,69-83,99-106,129-141,147-153,159-168,170-178,190-198,200-212,221-232,237-255,261-266,274-292	A:3, B:2, C:26	118-216	92, 262
EFA0047	凝集 物質 前駆体	17-47,61-67,87-93,115-121,126-132,140-148,167-173,179-186,214-223,250-255,264-272,282-294,306-318,338-353,358-377,385-401,414-420,433-441,451-457,470-480,505-511,544-550,571-581,600-607,612-618,631-648,655-662,669-681,693-714,721-726,733-740,757-778,813-823,831-838,851-857,866-876,893-905,912-917,930-936,951-963,971-981,1008-1019,1021-1033,1035-1041,1054-1064,1066-1076,1097-1110,1113-1121,1126-1140,1159-1171,1182-1195,1197-1203,1216-1222,1231-1240,1243-1262,1268-1287	A:4, D:2	738-828	93, 263
EFC0015	仮想 タンパク質	19-28,40-46,51-57,68-74,81-87,98-108,111-121	D:3	20-36	94, 264
EFC0025	仮想 タンパク質	4-17,19-44,60-69,80-86,110-116	A:1, B:1, C:2	33-60	95, 265
EFC0034	仮想 タンパク質	8-16,18-28,42-50,53-75,79-86,94-99,122-128,136-142,149-163,166-173,198-212,254-272,288-295,304-318,324-329,343-348,351-364,367-383,389-395,411-420,427-436	C:10, D:150	11-56	96, 266
ARFC0021.1	保存 ドメイン タンパク質	19-25	D:5	6-24	97, 267
ARFC0021.2	保存 ドメイン タンパク質	6-39,59-68	D:3	44-63	98, 268
ARF0031	仮想 タンパク質	5-14,21-28,38-53	B:1, C:2	29-41	99, 269
ARF0066	仮想 タンパク質	4-13,31-41,56-65	C:14	32-56	100, 270
ARF0076	仮想 タンパク質	5-12	A:1, C:8	4-21	101, 271
ARF0180	仮想 タンパク質	4-18	A:1, C:15	17-32	102, 272
ARF0275	仮想 タンパク質	4-10,23-33	C:2	14-30	103, 273
ARF0283	仮想 タンパク質	26-34,44-53	D:2	35-52	104, 274
ARF0375	仮想 タンパク質	無し	C:3	1-19	105, 275
ARF0679	仮想 タンパク質	4-17,23-30,32-37	D:17	6-23	106, 276
ARF0721	仮想 タンパク質	5-33,40-58,61-66	C:6	45-66	107, 277
ARF1090	仮想 タンパク質	15-41,61-67	C:5	41-65	108, 278
ARF1583	仮想 タンパク質	4-12,16-23,26-37	C:4	10-29	109, 279
ARF2052	仮想 タンパク質	23-39	C:37	37-55	110, 280
ARF2125	仮想 タンパク質	12-20	D:8	38-55	111, 281
ARF2307.1	仮想 タンパク質	22-37	C:4	7-22	112, 282
ARF2307.2	仮想 タンパク質	無し	C:2	3-14	113, 283
ARF2323	仮想 タンパク質	6-16,43-65,71-76	C:14	17-31	114, 284
ARF2505	仮想 タンパク質	4-13,27-39,42-69	B:1, C:2	17-32	115, 285
ARF2802	仮想 タンパク質	4-12,26-39	A:1, B:1, C:3	10-25	116, 286
ARF2902	仮想 タンパク質	無し	C:2	2-31	117, 287
ARF3079	仮想 タンパク質	6-38, 49-62	D:4	39-55	118, 288
ARF3157	仮想 タンパク質	4-10,24-30	A:1, C:2	2-19	119, 289
ARF3182	仮想 タンパク質	12-17,25-46	A:2, C:2	15-30	120, 290
ARF3314	仮想 タンパク質	4-13	A:2, B:1, C:3, D:1	2-28	121, 291

10

20

30

40

【表 1 a - 8】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
ARFA0022	仮想タンパク質	30-38	C:2	17-45	122, 292
CRF0022	仮想タンパク質	24-33,55-61	C:6	31-61	123, 293
CRF0073	仮想タンパク質	4-26,34-48	D:2	15-33	124, 294
CRF0096	仮想タンパク質	9-15	D:3	1-22	125, 295
CRF0115	仮想タンパク質	4-31	C:2	14-33	126, 296
CRF0202	仮想タンパク質	5-34,49-55,64-82	C:3	69-83	127, 297
CRF0249	仮想タンパク質	33-45	D:2	21-39	128, 298
CRF0258	仮想タンパク質	7-14,24-32,42-65,79-86	C:3	50-64	129, 299
CRF0264	仮想タンパク質	13-27,33-43,45-62	C:3	12-37	130, 300
CRF0339	仮想タンパク質	4-15,17-32	C:3	10-26	131, 301
CRF0399	仮想タンパク質	4-9,11-43,45-75	C:4	47-69	132, 302
CRF0682	仮想タンパク質	4-18,22-37	C:12	17-34	133, 303
CRF0783	仮想タンパク質	4-14	D:6	5-24	134, 304
CRF0801	仮想タンパク質	7-33,35-46	C:31	1-19	135, 305
CRF0892	仮想タンパク質	13-37,69-75	C:9	51-69	136, 306
CRF1041	仮想タンパク質	14-24,26-34,37-49,66-78	C:5	2-25	137, 307
CRF1049	仮想タンパク質	17-46,52-57,59-64	C:3	54-68	138, 308
CRF1327	仮想タンパク質	4-22	C:2	13-25	139, 309
CRF1593	仮想タンパク質	8-40,53-63	D:3	29-50	140, 310
CRF1610	仮想タンパク質	16-28	C:2	32-40	141, 311
CRF1732	仮想タンパク質	14-20,22-28,39-45	C:5, D:9	2-22	142, 312
CRF1830	仮想タンパク質	4-13	C:2	12-31	143, 313
CRF1992	仮想タンパク質	15-21	D:11	2-17	144, 314
CRF2074	仮想タンパク質	4-17	D:2	20-36	145, 315
CRF2099	仮想タンパク質	4-19	C:2	9-18	146, 316
CRF2298	仮想タンパク質	4-14	D:2	3-19	147, 317
CRF2318	仮想タンパク質	4-21,32-40	C:2	21-39	148, 318
CRF2568	仮想タンパク質	4-13	C:2	10-27	149, 319
CRF2573	仮想タンパク質	18-31,39-47,75-87,89-98	C:3	79-99	150, 320
CRF2581	仮想タンパク質	15-21	C:12, D:29	9-24	151, 321
CRF2647	仮想タンパク質	4-14,18-27,30-53,55-64,68-74,81-98	C:7	22-40	152, 322
CRF2706	仮想タンパク質	7-24,44-51	C:2	35-60	153, 323
CRF2751	仮想タンパク質	10-47	C:3	23-37	154, 324
CRF2768	仮想タンパク質	4-10,12-46	C:3	7-22	155, 325
CRF2778	仮想タンパク質	20-27	C:3	1-13	156, 326
CRF2790	仮想タンパク質	6-19,41-51	C:12	9-37	157, 327
CRF2899	仮想タンパク質	4-9,11-17	C:2	9-23	158, 328
CRF2935	仮想タンパク質	4-17,23-38,46-66,68-85	D:26	34-46	159, 329
CRF2966	仮想タンパク質	4-18,34-59,75-81	D:31	61-84	160, 330
CRF3074	仮想タンパク質	6-17	C:2	7-28	161, 331
CRF3084	仮想タンパク質	4-32, 56-61	D:6	35-52	162, 332
CRF3120	仮想タンパク質	4-14,27-71,74-88,93-110,115-120,124-130,139-154,161-172	C:4	146-171	163, 333
CRF3276	仮想タンパク質	4-21	C:39	3-15	164, 334
CRF3277	仮想タンパク質	12-17	C:11	9-26	165, 335
CRF3281	仮想タンパク質	10-21,45-58	C:3	51-67	166, 336
CRF3285	仮想タンパク質	59-66,68-84	D:2	13-42	167, 337
CRFC0021	仮想タンパク質	11-16	C:3	1-16	168, 338

10

20

30

40

【表 1 a - 9】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
CRFC0046	仮想タンパク質	4-19,23-37	C:4	10-30	169, 339
NRF0001	仮想タンパク質	19-27,35-46,48-66,82-88,99-105,113-119	C:1	42-59	170, 340

10

【0271】

表 1b. 同定された大便連鎖球菌抗原との相同性探索によって同定されたエンテロコッカス・フィシウムタンパク質

【0272】

【表 1 - b】

表1b.

エンテロコッカス・フィシウム	推定機能 (大便連鎖球菌との相同性による)	大便連鎖球菌抗原性タンパク質	配列番号 (DNA、タンパク質)	大便連鎖球菌との同一性(%)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EFN0001	PTS システム 成分	EF0020	1, 171	78	341, 357
EFN0002	保存 仮想タンパク質	EF0428	10, 180	80	342, 358
EFN0003	2-デヒドロバントエート 2-レダクターゼ, 推定	EF0517	13, 183	77	343, 359
EFN0004	保存 仮想タンパク質	EF0795	18, 188	80	344, 360
EFN0005	細胞分裂 タンパク質 PtsA	EF0996	23, 193	78	345, 361
EFN0006	PTS システム 成分	EF1012	24, 194	87	346, 362
EFN0007	LPXTG-モチーフ 細胞壁 アンカー ドメイン タンパク質	EF1093	28, 198	74	347, 363
EFN0008	MutS2 ファミリー タンパク質	EF1404	34, 204	77	348, 364
EFN0009	異化産物 調節 タンパク質	EF1741	42, 212	80	349, 365
EFN0010	2-デヒドロ-3-デオキシホスホグルコナート アルドラーゼ	EF2266	50, 220	76	350, 366
EFN0011	DNA ポリメラーゼ III, アルファ サブユニット, グラム陽性型	EF2378	55, 225	82	351, 367
EFN0012	ロダナーゼ ファミリー タンパク質	EF2787	66, 236	70	352, 368
EFN0013	スレオニルtRNA シンゼターゼ	EF2858	68, 238	89	353, 369
EFN0014	保存 仮想タンパク質	EF3207	85, 255	85	354, 370
EFN0015	センサー ヒスチジンキナーゼ	EF3290	87, 257	73	355, 371
EFN0016	トランスボザーゼ	EFB0002	90, 260	83	356, 372

20

30

40

【0273】

表 1c: 細菌表面ディスプレイによって心内膜炎患者血清により同定された免疫原性タンパク質

【0274】

【表 1 c - 1】

表1c:

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EF0008	一本鎖結合タンパク質	4-11, 16-34, 48-55, 67-77, 87-106	E:8	153-183	373, 425
EF0028	PTS システム 成分	22-40, 49-65, 70-91, 95-109, 111-125, 146-207, 209-216, 219-225, 229-244, 251-270, 274-286, 292-309, 316-329, 335-355, 358-370, 376-388, 392-419, 425-430, 435-441, 448-455, 464-478, 486-515	F:1	437-465	374, 426
EF0146	表面排除タンパク質 Seal 推定	5-19, 25-31, 43-48, 60-79, 88-100, 105-129, 148-171, 187-193, 243-263, 316-322, 334-340, 345-351, 369-378, 381-391, 399-404, 474-483, 502-517, 525-530, 558-568, 579-596, 622-627, 631-638, 644-651, 653-660, 674-680, 687-693, 721-728, 743-753, 760-775, 788-795, 806-813, 821-828, 835-842, 847-859, 868-887	F:13, H:3	300-347	375, 427
EF0153	LPXTG-モチーフ 細胞壁 アンカー ドメイン タンパク質	5-26, 37-44, 89-97, 112-118, 121-128, 138-154, 157-165, 176-181, 188-198, 205-218, 223-243, 247-253, 260-279	H:1	76-155	376, 428
EF0394	分泌抗原 SagA e.feaciumに対して44% 相同性	4-29, 41-46, 49-68, 82-88, 121-147, 158-164, 187-193, 195-208, 229-236, 244-249, 251-263, 269-275, 307-313, 337-343, 348-381, 392-398, 402-408, 432-438	E:96, G:2	85-117, 194-239	377, 429
EF0443	LysM ドメイン タンパク質 に対して相同性	5-12, 14-22, 28-34, 40-46, 70-79, 84-129, 152-165, 174-182	G:2	37-109	378, 430
EF0568	カリウム-輸送 ATPase サブユニット B	5-16, 18-52, 54-72, 81-86, 118-126, 136-145, 151-157, 168-180, 209-233, 244-270, 295-302, 315-326, 329-337, 345-352, 364-373, 397-402, 408-418, 424-431, 435-443, 472-480, 483-489, 504-510, 519-527, 549-564, 576-599, 605-637, 641-673	E:2	91-98	379, 431
EF0591	リポタンパク質 推定	23-36, 42-52, 133-140, 151-157, 242-247, 267-277, 295-301, 320-328, 333-339, 345-352, 365-371, 397-403, 415-428, 456-465, 481-487, 489-495, 508-516, 518-527, 585-592, 606-614, 631-637, 643-658, 665-670, 723-728, 737-744, 752-759, 787-793, 835-841, 873-885, 918-928, 938-945, 951-966, 978-988, 1015-1020, 1030-1036, 1044-1052, 1058-1069, 1071-1079, 1081-1088, 1113-1119, 1125-1138, 1141-1147, 1164-1170, 1172-1177, 1190-1200, 1214-1220, 1230-1236, 1239-1245, 1262-1268, 1270-1275, 1288-1298, 1312-1318, 1328-1334, 1337-1343, 1360-1366, 1368-1373, 1386-1396, 1410-1416, 1426-1432, 1435-1441, 1458-1464, 1466-1471, 1484-1494, 1508-1514, 1524-1530, 1533-1539, 1556-1562	F:3	307-340	380, 432
EF0592	LPXTG-モチーフ 細胞壁 アンカー ドメイン タンパク質 (回復ドメイン)	19-25, 35-41, 44-50, 66-72, 74-79, 92-102, 116-122, 132-138, 141-147, 164-170, 172-177, 190-200, 214-220, 230-236, 239-245, 262-268, 270-275, 288-298, 312-318, 328-334, 337-343, 360-366, 368-373, 386-396, 410-416, 426-432, 435-441, 458-464, 466-478, 504-524	H:1	79-148, 177-246, 275-344, 373-442	381, 433
EF0658	仮想 タンパク質	7-14, 16-23, 33-39, 46-53, 72-79, 92-115, 123-130, 156-175, 179-187, 214-220, 239-246, 266-274, 302-325, 338-354, 360-370, 375-390, 392-401, 421-428, 430-463	F:2	29-58	382, 434
EF0727	保存 仮想 タンパク質	4-9, 22-39, 58-65, 72-82, 87-92, 99-104, 107-119, 143-166, 171-177, 194-202, 205-213, 220-228, 231-240, 247-263, 309-315, 317-323, 336-343	E:1	294-320	383, 435

10

20

30

40

【表 1 c - 2】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EF0775	凝集物質-キメラ	4-10, 12-18, 24-29, 34-43, 50-65, 70-76, 111-117, 129-138, 152-159, 166-171, 184-195, 200-210, 224-236, 241-251, 274-283, 285-296, 313-319, 332-341, 348-355, 378-386, 410-416, 433-445, 475-482, 523-529, 531-540, 584-596, 626-633, 674-680, 682-688, 738-750, 780-787, 828-834, 836-842, 853-862, 882-887, 893-912	H:2	604-676	384, 436
EF0779	保存ドメインタンパク質	15-38, 49-57, 60-99, 103-119, 124-194, 200-206, 215-249, 251-291, 307-313, 315-347, 369-378, 383-390, 393-400, 405-411, 423-435, 440-447, 454-460, 470-486, 490-503, 532-539, 542-549, 551-567, 579-592	H:2	509-583	385, 437
EF1091	仮想タンパク質	38-44, 47-88, 95-103, 157-172, 235-240, 250-260, 263-276, 294-300, 312-317, 331-337, 369-391, 412-419, 442-448, 453-463, 490-529, 537-555, 571-580, 600-617, 619-627, 642-648, 682-687, 693-700, 716-722, 738-748, 756-763, 779-789, 796-802, 820-828, 833-840, 846-853, 862-872, 880-887, 894-899, 924-937, 957-963, 1006-1012, 1043-1049, 1063-1069, 1076-1097	F:4	124-147	386, 438
EF1323	保存仮想タンパク質 真正点突然変異	4-28, 31-49, 60-71, 75-102, 104-114, 134-144, 160-184, 250-257, 277-285, 287-294, 330-338, 345-351, 367-374, 381-388, 393-399, 402-407, 420-426, 443-448, 458-464	F:8	411-436, 454-488	387, 439
EF1355	ビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 E2	20-27, 45-55, 57-64, 66-77, 98-106, 130-137, 155-165, 167-174, 176-187, 194-203, 208-223, 227-238, 245-251, 257-270, 273-278, 287-299, 330-345, 352-358, 363-385, 392-399, 410-417, 437-443, 467-484, 486-492, 495-500, 504-516, 526-536	E:2	219-270	388, 440
EF1699	転写制御因子 MerR ファミリー	11-22, 24-31, 46-63, 65-71, 73-88, 95-109, 174-181, 183-201, 204-212, 216-222, 228-233, 241-247	H:2	142-221	389, 441
EF1744	一般ストレスタンパク質	8-28, 51-59, 67-84, 93-98, 140-152, 154-162, 183-188	F:3	91-125	390, 442
EF1752	保存仮想タンパク質	10-22, 27-61	F:6	69-100	391, 443
EF1753	保存仮想タンパク質	7-15, 18-26, 94-100, 126-131, 152-165, 219-228, 254-263, 274-292, 297-308, 333-340, 342-352, 354-371, 373-379, 403-410, 420-438, 450-456, 463-470, 489-495, 503-512	G:2	97-173	392, 444
EF1791	ペプチドABCトランスポーター ペプチド-結合タンパク質	4-21, 37-43, 49-65, 67-74, 76-90, 113-119, 131-141, 155-173, 175-189, 192-199, 207-221, 247-254, 266-276, 317-322, 337-343, 387-393, 408-428, 439-448, 451-460, 469-479, 482-487, 493-501, 517-523, 533-542	F:1	480-503	393, 445
EF1800	保存仮想タンパク質	11-26, 40-46, 78-86, 93-103, 121-126, 132-138, 166-177, 183-196, 203-212, 214-221, 228-263, 304-311, 323-338, 345-351, 357-363, 379-393, 420-434, 442-448, 518-527, 547-553, 581-591, 602-609, 637-645, 665-674, 687-692, 701-708, 730-739, 796-802, 844-857, 882-888, 903-914, 944-950, 976-983, 1027-1033, 1049-1057, 1066-1072, 1085-1092, 1120-1127, 1137-1144, 1153-1158, 1165-1176, 1181-1187, 1221-1230, 1238-1244, 1269-1274	E:1	605-632	394, 446
EF1818	ゼラチナーゼ	6-47, 57-65, 83-95, 109-121, 138-147, 154-164, 167-177, 194-200, 202-212, 227-234, 240-253, 260-267, 283-291, 320-329, 340-347, 356-364, 412-422, 430-436, 441-459, 465-475, 478-486, 498-507	F:14	59-84	395, 447
EF1850	保存仮想タンパク質	10-21, 58-83, 88-97, 120-126	F:1	21-51	396, 448
EF1877	保存仮想タンパク質	5-39, 56-62, 76-88, 90-114, 138-162, 170-195, 202-221, 228-250, 264-270, 304-355, 374-387, 391-416, 462-471, 526-546, 554-561, 574-579, 639-645, 651-660, 674-682, 689-694	E:10	666-697	397, 449

10

20

30

40

【表 1 c - 3】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質))
EF2174	仮想タンパク質	6-30, 36-42, 143-157, 176-197, 202-209, 216-233, 241-246, 275-287, 292-299, 315-325, 343-350, 375-380, 397-403, 411-420, 422-434, 441-448, 467-474, 477-499, 555-568, 591-597, 601-609, 623-644, 667-688, 692-698, 703-718, 736-747, 757-766, 782-791, 795-801, 832-840, 859-865	F:119	226-269	398, 450
EF2224	LPXTG-モチーフ細胞壁アンカードメインタンパク質	6-23, 43-51, 61-67, 73-82, 91-97, 123-130, 149-158, 164-175, 228-234, 240-246, 248-255, 262-272, 326-332, 340-347, 365-371, 377-388, 409-419, 425-431, 438-445, 449-457, 464-470, 496-507, 559-568, 575-581, 603-608, 617-623, 633-639, 648-654, 659-670, 695-701, 734-752, 806-814, 816-829, 861-868, 891-899, 904-909, 937-945, 947-960, 978-983, 992-999, 1022-1031, 1068-1076, 1078-1091, 1109-1114, 1123-1130, 1153-1162, 1199-1207, 1209-1222, 1254-1261, 1284-1293, 1330-1338, 1340-1353, 1371-1376, 1385-1392, 1415-1421, 1433-1438, 1460-1465, 1470-1492	F:2	1422-1458	399, 451
EF2318	ペプチダーゼ M23/M37ファミリーV	82-94, 111-118, 125-131, 206-212, 261-266, 310-320, 328-338, 345-351, 353-360, 414-420, 424-434, 440-447, 451-500, 506-516, 548-561, 566-572, 584-591, 601-622, 630-636, 650-659, 661-667, 674-699, 703-711, 717-729, 736-744, 752-759, 765-771, 813-822, 826-842, 852-868, 870-877, 881-895, 897-906, 913-922	H:5	602-671	400, 452
EF2704	A/G-特異的アデニングリコシラーゼ	12-18, 20-25, 43-54, 56-65, 73-79, 82-88, 99-111, 136-142, 153-169, 171-183, 195-223, 229-248, 255-260, 272-277, 281-292, 298-319, 322-329, 332-351, 363-379, 381-389	F:5	275-304	401, 453
EF2713	LPXTG-モチーフ細胞壁アンカードメインタンパク質	4-9, 34-48, 65-77, 101-106, 111-131, 138-153, 186-191, 230-250	H:1	148-219	402, 454
EF2802	エンドリシン	4-23, 30-35, 42-53, 67-76, 82-87, 101-108, 112-130, 132-138, 147-152, 161-183, 187-208, 218-225, 265-283, 295-303, 306-317, 322-334, 338-357, 360-368, 370-383, 387-398, 400-419, 421-430	H:2	104-182, 240-304	403, 455
EF2813	保存仮想タンパク質	4-12, 63-69, 94-102, 146-164, 166-173, 175-181, 193-207, 263-281, 286-295, 301-306, 330-343, 369-378, 382-388, 414-420, 422-430, 438-454, 456-462, 472-531, 543-560, 581-591, 596-605, 614-623, 626-635, 656-662, 669-676, 683-690, 693-698, 705-711, 728-736, 752-764	E:4	69-102	404, 456
EF2820	仮想タンパク質	6-12, 43-53, 141-147, 164-179, 185-195, 197-206, 227-235, 237-271, 288-305, 308-317, 335-341, 351-357, 365-376, 386-395, 397-416, 422-447	E:1	11-35	405, 457
EF3082	鉄化合物ABCトランスポーター基質-結合タンパク質	16-24, 50-65, 73-84, 88-99, 114-124, 130-146, 181-187, 193-203, 214-220, 236-247, 250-258, 287-297	F:92	50-113	406, 458
EF3256	リボタンパク質 推定	4-25, 50-55, 76-82, 117-123, 131-137, 139-148, 157-166, 239-245, 253-258, 266-275, 277-292, 300-306	F:5, G:3	51-83, 93-161	407, 459
EFA0021	仮想タンパク質	6-22, 34-43, 51-86, 93-100, 110-116, 150-161, 164-171, 180-187, 197-218	H:2	168-237	408, 460
EFA0044	仮想タンパク質	4-27, 55-60, 74-82	E:6	10-46	409, 461
EFA0052	表面排除タンパク質 Sea1	6-19, 25-31, 43-49, 60-79, 88-100, 105-129, 148-161, 164-171, 187-193, 243-263, 316-322, 334-340, 369-378, 381-391, 398-404, 460-466, 474-483, 502-509, 511-517, 525-530, 558-567, 579-596, 622-627, 631-638, 641-651, 653-659, 674-680, 687-693, 710-716, 720-727, 743-753, 760-775, 788-795, 806-813, 821-828, 836-842, 847-860, 865-880	H:10	258-377	410, 462

10

20

30

40

【表 1 c - 4】

大便連鎖球菌抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸*	ORFおよびスクリーニング当たりの選択されたクローン数	同定された免疫原性領域の位置 (aa)	配列番号 (DNA、タンパク質)
EFC0004	TraC タンパク質	4-11, 25-64, 71-79, 88-94, 107-120, 123-132, 167-188, 231-237, 240-246, 261-267, 306-311, 330-342, 351-358, 389-395, 406-418, 429-434, 439-448, 483-501, 511-520	G:1	71-143	411, 463
EFC0012	LPXTG-モチーフ 細胞壁 アンカー ドメイン タンパク質	4-18, 22-27, 53-64, 94-100, 121-127, 133-139, 155-164, 177-182, 187-196, 206-218, 224-242, 248-253, 258-277	H:1	184-253	412, 464
EFC0021	保存ドメイン タンパク質	10-17, 56-67, 72-82, 94-99, 106-113, 166-173, 229-235, 243-283, 295-301, 313-321, 326-331, 342-348, 396-414, 423-435, 446-452, 454-462, 496-502, 511-534, 543-556, 563-570, 586-593, 616-626, 638-645, 653-662, 679-696, 731-737, 766-774, 776-782, 790-796, 810-817, 825-835, 837-846	H:5	540-615	413, 465
EFC0053	トランスポザーゼ ミューター ファミリー	13-24, 30-36, 73-81, 89-95, 109-115, 117-143, 161-173, 179-189, 226-244, 251-261, 275-281, 298-305, 307-315, 323-328, 364-374	G:6, H:12	69-186, 264-354	414, 466
ARFC0021.1	仮想タンパク質	19-25	D:5	6-22	415, 467
ARFC0021.2	仮想タンパク質	6-39, 59-68	D:3	43-62	416, 468
ARF0324	仮想タンパク質	6-14, 22-32	F:2	1-27	417, 469
ARF1627	仮想タンパク質	4-41	E:127	28-40	418, 470
ARF1650	仮想タンパク質	8-14	F:5	4-19	419, 471
CRF0097	仮想タンパク質	4-10, 12-22, 30-35	E:78	6-33	420, 472
CRF0257	仮想タンパク質	4-16, 24-33	F:21	37-54	421, 473
CRF0635	仮想タンパク質	無し	E:7	2-23	422, 474
CRF1152	仮想タンパク質	4-21, 27-33, 36-41	E:16	14-34	423, 475
CRF1720	仮想タンパク質	4-14, 24-30, 37-42, 57-78, 83-89, 94-103, 113-131	E:5	100-122	424, 476

10

20

【 0 2 7 8 】

表 2: ヒト血清によるエピトープ血清学

【 0 2 7 9 】

30

【表 2 - 1】

表 2:

ペプチド	配列番号	タンパク質に おける位置 (aa)	S	タンパク質に おける位置 (aa)																			
				N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
EF0020.1	171	135-147	12																				
EF0032.1	172	658-682	15																				
EF0062.1	173	411-427	16																				
EF0062.2	173	1226-1246	7																				
EF0149.1	174	794-817	11																				
EF0149.2	174	801-824	10																				
EF0270.1	177	468-492	24																				
EF0270.2	177	474-495	7																				
EF0298.1	178	366-388	12																				
EF0355.1	179	266-291	8																				
EF0355.2	179	287-312	8																				
EF0355.3	179	308-333	5																				
EF0428.1	180	197-213	26																				
EF0428.2	180	195-211	31																				
EF0485.1	181	252-275	8																				
EF0485.2	181	262-285	12																				
EF0485.3	181	812-830	8																				
EF0490.1	182	94-112	9																				
EF0490.2	182	97-120	15																				
EF0490.3	182	104-128	20																				
EF0517.1	183	257-281	14																				
EF0570.1	184	106-134	14																				
EF0792.1	187	70-86	28																				
EF0799.1	189	358-383	8																				
EF0799.2	189	378-402	5																				
EF0799.3	189	397-421	5																				
EF0799.4	189	499-524	10																				
EF0799.5	189	520-545	8																				
EF0799.6	189	541-566	9																				
EF0799.7	189	622-646	4																				
EF0799.8	189	641-665	7																				
EF0799.9	189	660-684	8																				
EF0922.1	192	248-260	15																				
EF1012.1	194	15-34	4																				
EF1026.1	195	112-129	10																				
EF1032.1	196	333-358	12																				
EF1032.2	196	353-378	3																				
EF1060.1	197	316-343	7																				
EF1060.2	197	339-366	8																				
EF1060.3	197	362-389	16																				
EF1093.1	198	98-123	11																				
EF1093.2	198	104-126	7																				
EF1277.1	201	20-43	15																				
EF1277.2	201	23-48	15																				
EF1386.1	203	124-145	6																				
EF1404.1	204	717-738	4																				
EF1561.1	205	37-56	4																				
EF1584.1	206	118-134	17																				
EF1601.1	208	500-522	5																				
EF1692.1	211	32-47	16																				
EF1741.1	212	25-51	10																				
EF1741.2	212	47-73	7																				
EF1741.3	212	69-95	11																				
EF1823.1	215	503-529	11																				
EF1978.1	216	112-128	14																				
EF2052.1	218	181-199	8																				
EF2074.1	219	109-121	17																				

10

20

30

40

- Ferretti, J., et al. (1986). *J Bacteriol* 167: 631-8.
- French, G. (1998). *Clin Infect Dis* 27: S75-83.
- Gagliani, M., et al. (1997). *J Clin Immunol* 17: 478-84.
- Ganz, T. (1999). *Science* 286: 420-421.
- Georgiou, G. (1997). *Nature Biotechnology* 15: 29-34.
- Gold, H. (2001). *Clin Infect Dis* 33: 210-9.
- Haas, W., et al. (2002). *Nature* 415: 84-7.
- Hancock, L.E., et al. (2000) pp251-258. In Fischetti, V.A., et al. (ed.), *Gram-positive pathogens*. AMS Press.
- Hashemzadeh-Bonehi, L., et al. (1998). *Mol Microbiol* 30: 676-678. 10
- Hemmer, B., et al. (1999). *Nat Med* 5: 1375-82.
- Hoe, N., et al. (2001). *J Infect Dis* 183: 633-9.
- Huebner, J., et al. (2000). *Infect Immun* 68: 4631-6.
- Jett, B., et al. (1994). *Clin Microbiol Rev* 7: 462-78.
- Johanson, K., et al. (1995). *J Biol Chem* 270: 9459-71.
- Jones, P., et al. (1986). *Nature* 321: 522-5.
- Kajava, A., et al. (2000). *J Bacteriol* 182: 2163-9.
- Kohler, G., et al. (1975). *Nature* 256: 495-7.
- Lewin, A., et al. (2001). *Trends Mol Med* 7: 221-8.
- Lowe, A., et al. (1995). *Infect Immun* 63: 703-6. 20
- Marks, J., et al. (1992). *Biotechnology (N Y)* 10: 779-83.
- McCafferty, J., et al. (1990). *Nature* 348: 552-4.
- McCormick, J., et al. (2001). *Infect Immun* 69: 3305-14.
- Murray, B. (1990). *Clin Microbiol Rev* 3: 46-65.
- Navarre, W., et al. (1999). *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 174-229.
- Noble, W., et al. (1992). *FEMS Microbiol Lett* 72: 195-8.
- Okano, H., et al. (1991). *J Neurochem* 56: 560-7.
- Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*; CRC Press, Boca Ration, FL (1988) for a description of these molecules.
- Paulsen, I., et al. (2003). *Science* 299: 2071-4. 30
- Poyart, C., et al. (1997). *Antimicrob Agents Chemother* 41: 24-9.
- Rammensee, H., et al. (1999). *Immunogenetics* 50: 213-9.
- Rice, L. (2001). *Emerg Infect Dis* 7: 183-7.
- Richards, M., et al. (2000). *Infect Control Hosp Epidemiol* 21: 510-5.
- Rosenshine, I., et al. (1992). *Infect Immun* 60: 2211-7.
- Seeger, C., et al. (1984). *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5849-52.
- Shankar, V., et al. (1999). *Infect Immun* 67: 193-200.
- Skerra, A. (1994). *Gene* 151: 131-5.
- Sussmuth, S., et al. (2000). *Infect Immun* 68: 4900-6.
- Tang, D., et al. (1992). *Nature* 356: 152-4. 40
- Tempest, P., et al. (1991). *Biotechnology (N Y)* 9: 266-71.
- Tourdot, S., et al. (2000). *Eur J Immunol* 30: 3411-21.
- Whitnack, E., et al. (1985). *J Exp Med* 162: 1983-97.
- Whiley, J., et al. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Xu, Y., et al. (1997). *Infect Immun* 65: 4207-15.

【図面の簡単な説明】

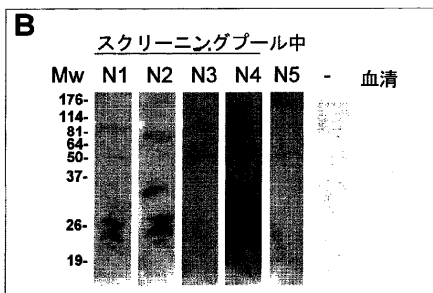
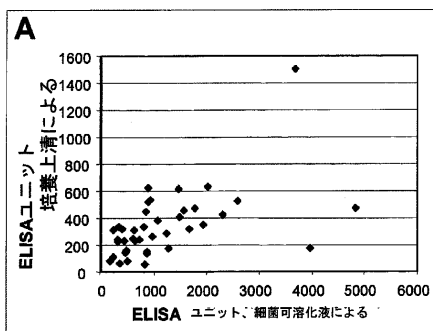
【 0 2 8 2 】

【図 1】図1は、大便連鎖球菌特異的ヒト血清の特徴付けを示す。

【図 2】図2は、大便連鎖球菌V583からの小断片ゲノムライブラリー、LEF-70の特徴付けを示す。

【 図 3 】 図3は、ビオチン化ヒトIgGを用いるMACSによる細菌細胞の選択を示す。

【 図 1 - 1 】



【 図 1 - 2 】

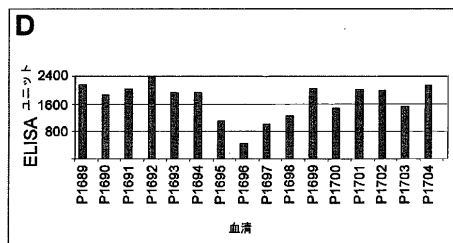
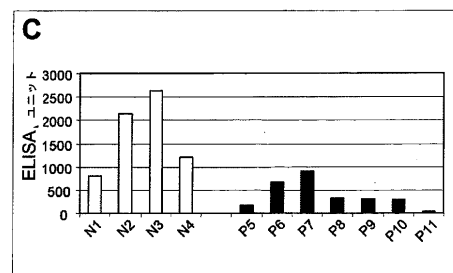


Fig. 1

Fig. 1

【 図 1 - 3 】

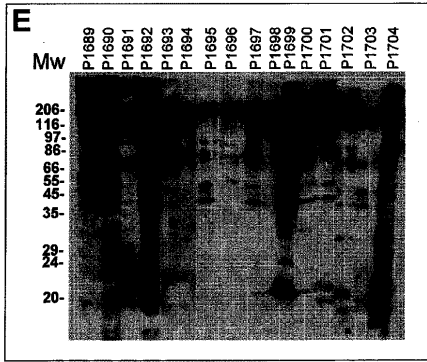


Fig. 1

【 図 2 】

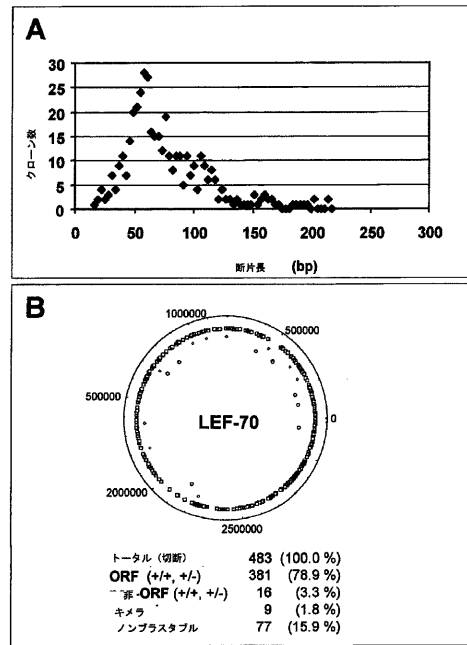


Fig. 2

【 図 3 】

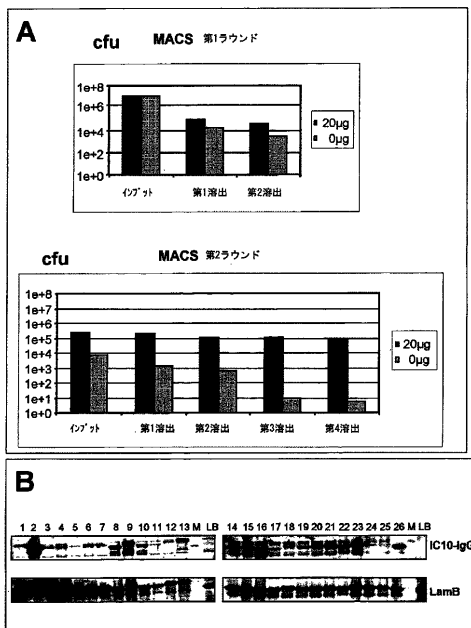


Fig. 3

【配列表】

2008500007000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年1月25日(2006.1.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008500007000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/005664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/315 C12N15/31 C12Q1/68 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 C07K C12N		
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, Sequence Search, PAJ, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq 'Online! 19 June 2003 (2003-06-19), "Protein encoded by Prokaryotic essential gene #14577." XP002303524 retrieved from EBI accession no. GSN:ABU29050 Database accession no. ABU29050 The sequence is 100% identical with SEQ ID NO: 171 & WO 02/077183 A (MALONE CHERYL ; OHLSEN KARI L (US); WALL DANIEL (US); XU H HOWARD (US)) 3 October 2002 (2002-10-03) ----- -/--	1,2, 5-28, 30-37
<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:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 November 2004	Date of mailing of the international search report 28. 01. 05	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Grosskopf, R	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/005664

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt 'Online! 1 June 2003 (2003-06-01), "PTS system, mannose-specific IIAB components. VLFLVDLWGG TPFNQANSL EDHKDKWAIV AGMNLPMVIE AYASRFSMES AQEIATHILE" XP002303525 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q839X9 Database accession no. Q839X9 The sequence is 100% identical with SEQ ID NO: 171 -----	1,2, 5-28, 30-37
X	DATABASE Geneseq 'Online! 22 April 2004 (2004-04-22), "Enterococcus faecalis polypeptide #1547." XP002303526 retrieved from EBI accession no. GSN:ADH87067 Database accession no. ADH87067 100% identity with SEQ ID NO: 171 & US 6 617 156 B1 (DOUCETTE-STAMM LYNN A ET AL) 9 September 2003 (2003-09-09) -----	1,2, 5-28, 30-37
X	DATABASE Geneseq 'Online! 1 January 2004 (2004-01-01), "E. faecium protein sequence SEQ ID 6586." XP002303527 retrieved from EBI accession no. GSN:ADC96959 Database accession no. ADC96959 The sequence has 86% identity with SEQ ID NO: 171 & US 6 583 275 B1 (DOUCETTE-STAMM LYNN A ET AL) 24 June 2003 (2003-06-24) -----	1,2, 5-28, 30-37
X	DATABASE Geneseq 'Online! 18 December 2002 (2002-12-18), "Enterococcus faecalis contig sequence #464." XP002303528 retrieved from EBI accession no. GSN:ABS99196 Database accession no. ABS99196 The sequence is 100% identical with SEQ ID NO: 1 ----- -/--	1,2,5-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/005664

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE UniProt 'Online! 1 October 2001 (2001-10-01), "Mannose-specific phosphotransferase system component IIAB. VLFLVDLWGG TPFNQANSLF EEHKDKWAIIV AGMNLPMVIE AYGARLSMES AHEIAASIIS" XP002303529 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q97TN2 Database accession no. Q97TN2	
A	HENICS T ET AL: "Small-fragment genomic libraries for the display of putative epitopes from clinically significant pathogens" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 35, no. 1, July 2003 (2003-07), pages 196-200,202,20, XP002293668 ISSN: 0736-6205	
T	MEINKE ANDREAS ET AL: "Bacterial genomes pave the way to novel vaccines" CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, vol. 7, no. 3, June 2004 (2004-06), pages 314-320, XP002303523 ISSN: 1369-5274	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/005664**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: 29
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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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.:
- 1, 2, 5-28, 30-37 (all partially)

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/EP2004/005664

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1, 2, 5-28, 30-37 (all partially)

Claims relating to a nucleotide sequence and the corresponding proteins sequence having SEQ ID NOs: 1 and 171, the use of said sequences and antibodies directed against said protein

Inventions 2 to 166: Claims 1, 2, 5-28, 30-37 (all partially)

Claims relating to the nucleotide sequences and the corresponding proteins sequence having SEQ ID NOs: 2 to 170 and 172 to 340 (with the exception of SEQ ID NOs: 19, 28, 78, 93 respectively 189, 198, 248 and 263), the use of said sequences and antibodies directed against said protein

Inventions 167-218: Claims 3, 5-28, 30-37 (all partially)

Claims relating to a nucleotide sequences and the corresponding proteins sequence having SEQ ID NOs: 373 to 424 and 425 to 476 respectively, the use of said sequences and antibodies directed against said protein

4. claims: Inventions 219-220: Claims 4-28, 30-37 (all partially)

Claims relating to a nucleotide sequences and the corresponding proteins sequence having SEQ ID NOs: 90 and 147 and 260 and 317 respectively, the use of said sequences and antibodies directed against said protein

International Application No. PCT/EP2004 /005664

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 29

Claim 29 relates to an agonist which lacks any meaningful technical characterisation. Therefore a search for accordingly defined compounds was not possible

The applicant's attention is drawn to the fact that 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. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/005664

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 02077183	A	03-10-2002	US 2002061569 A1	23-05-2002
			WO 02077183 A2	03-10-2002
			US 2004029129 A1	12-02-2004
US 6617156	B1	09-09-2003	NONE	
US 6583275	B1	24-06-2003	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	B
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	C
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
	A 6 1 K	39/395	D
	A 6 1 K	39/395	N

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72) 発明者 アンドレアス・マインケ

オーストリア、アー - 3 0 1 3 プレスバウム、ピエッテガッセ 2 6 / 1 番

(72) 発明者 エステル・ナデュ

オーストリア、アー - 1 0 3 0 ヴィエナ、クリムシュガッセ 3 0 / 2 番

(72) 発明者 マルクス・ハンナー

オーストリア、アー - 1 0 3 0 ヴィエナ、ヤッククヴィンガッセ 5 / 6 番

(72) 発明者 ディーター・ゲルプマン

オーストリア、アー - 7 1 6 3 アンダウ、ウンガーガッセ 5 番

F ターム(参考) 2G045 AA40

4B024 AA01 BA31 BA50 CA01 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04

GA11 GA14 HA08

4B064 AG27 AG31 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA01Y AA26X AA57X AA87X AB01 BA01 CA24 CA25 CA44

CA45

4C084 AA13 NA14 ZB351

4C085 AA03 AA13 AA14 BB11 BB23 EE06 FF01 FF03 FF13 FF14

FF18

4H045 AA11 AA20 BA09 CA11 CA40 DA76 DA86 EA29 EA31 FA74

GA20 GA26