

(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2007-524366

(P2007-524366A)

(43) 公表日 平成19年8月30日(2007.8.30)

(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	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 3
C O 7 K 14/195 (2006.01)	C O 7 K 14/195	4 B O 6 4
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12	4 B O 6 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 102 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-505226 (P2006-505226)	(71) 出願人	502270718
(86) (22) 出願日	平成16年4月22日 (2004. 4. 22)		インターツェル・アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月16日 (2005. 12. 16)		ト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/004255		I N T E R C E L L A G
(87) 国際公開番号	W02004/094467		オーストリア、アー-1030ヴィエナ、
(87) 国際公開日	平成16年11月4日 (2004. 11. 4)		キャンパス・ヴィエナ・バイオセンター6
(31) 優先権主張番号	03450097.5		番
(32) 優先日	平成15年4月22日 (2003. 4. 22)	(74) 代理人	100081422
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100072730
			弁理士 小島 一晃
		(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100127638
			弁理士 志賀 美苗
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピロリ菌抗原

(57) 【要約】

本発明は、ピロリ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 3-4、16、19-21、28-29、33-38、41-42、44、48-52、55、57-58、61、63、65、67-68、72、74-75、81、84、91、94、96-97、101、105-108、112、115-117、119、123-178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。

【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 8-10、13-15、17-18、24、27、32、39-40、45-47、56、59、62、69-70、73、77、79、82、85-86、88、90、103、109-110、114、121から選択される核酸分子に対して少なくとも96%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。

【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 5、7、30-31、53、60、66、76、83、87、92、99、120から選択される核酸分子、
- b) a)の核酸に相補的な核酸分子、
- 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。

【請求項 7】

核酸分子がゲノムDNA、特にピロリ菌ゲノム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。

【請求項 11】

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 181-182、194、197-199、206-207、211-216、219-220、222、226-230、233、235-236、239、241、243、245-246、250、252-253、259、262、269、272、274-275、279、283-286、290、293-295、297、301-356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 186-188、191-193、195-196、202、205、210、217-218、223-225、234、237、240、247-248、251、255、257、260、263-264、266、268、281、287-288、292、299からなる群から選択される。

10

【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 183、185、208-209、231、238、244、254、261、265、270、277、298からなる群から選択される。

【請求項 1 4】

表 1 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 3 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： 63-91、95-101、110-116、134-148、150-156、158-164、188-193、197-209、226-241、247-254、291-297、312-319、338-346、351-358、366-378、404-410、420-438、448-454、465-473、482-488、490-498、503-510、512-519、531-543、547-554、568-575、589-604、610-631 および 239-308 (配列番号 179)； 16-29、35-47、50-68、70-79、91-101、143-149、158-163、185-191、196-206、215-224、230-237、244-251、258-278、290-311、319-325、338-351、365-385、396-429、445-454、458-466、491-499、501-521、17-79 および 218-233 (配列番号 180)； 4-10、16-41、46-66、77-84、91-97、102-118、125-144、187-200、202-214、245-253、255-261、286-295、300-330、335-342、350-361、363-381、385-392、396-416、435-450 および 460-470 (配列番号 181)； 11-19、27-48、52-59、77-82、84-107、118-125、127-154、178-183、192-209、215-221、286-295、302-313、350-357、402-415、417-431、453-463、465-493 および 313-331 (配列番号 182)； 19-26、30-43、47-55、63-68、72-80、97-104、107-119、129-146、160-175、194-216、231-251、254-260 および 26-43 (配列番号 183)； 7-13、29-37、65-81、110-120、123-131、135-152、230-249、254-260、284-290、292-299、317-326、329-336、403-444、452-458、466-477、490-498、510-519、541-550、557-566 および 533-567 (配列番号 184)； 5-47、71-77、79-86、89-95、120-126、137-144、176-181、184-196、202-208、211-232、236-282、301-313、317-325、341-347、353-384、394-400、412-433、436-443 および 59-75 (配列番号 185)； 4-18、22-38、59-69、106-112、116-130、138-149、156-170、175-197、200-214、216-223、233-244、255-261、266-276、279-286、325-333、342-348、366-399、402-420、429-441、1-104 および 130-147 (配列番号 186)； 50-58、69-95、97-113、131-136、157-163、170-175、188-212、220-226、254-259、265-277、283-289、297-308、311-318、347-358、360-369、378-401、416-421、440-450、454-462、470-476、493-502、506-514、536-567、585-590、598-607、613-618、653-659 および 35-46 (配列番号 187)； 16-29、32-60、65-87、89-123、128-134、137-158、162-173、178-196、210-216、218-228 および 206-225 (配列番号 188)； 10-20、26-35、51-64、86-91、94-100、113-122、154-160、185-191、193-201、211-217、225-230、237-246、251-257、298-304、306-312、316-328、340-348、357-389、391-397、415-421、449-456、458-471、488-495、502-511、24-55 および 236-341 (配列番号 189)； 5-22、41-51、87-93、114-122、127-136、150-156、158-166、223-233、245-263、291-296、9-126 および 127-285 (配列番号 190)； 30-43、46-56、61-70、72-83、85-93、103-113、119-125、151-166、179-191、212-218、225-231、236-243、262-267、291-307、331-344、349-355、366-372、380-386、414-422、4

20

30

40

50

28-447、459-464、469-478、507-519、525-544、563-569、576-590、620-626、633-643、654-659、665-671、684-707、717-723、725-733、747-779、782-801 および 347-361 (配列番号 191) ; 4-12、14-26、37-80、107-115、133-139、144-150、154-165、173-180、191-199、205-211、221-231、237-244、254-284、307-340、342-353、360-368、370-380、479-493、495-503、509-522、525-536、539-547、554-560、565-573、578-583、7-23 および 465-479 (配列番号 192) ; 4-17、47-55、76-83、85-100、104-112、117-123、126-135、142-148、156-167、174-182、267-273 および 258-283 (配列番号 193) ; 8-32、36-42、65-88、102-108、112-140、147-163、170-179、183-193 および 117-124 (配列番号 194) ; 12-18、45-50、62-77、82-95、99-113、115-123、125-147、155-177、187-209、211-223、244-253、259-270、278-297、302-307、311-318、329-334、350-356、359-365、390-400、402-413 および 333-350 (配列番号 195) ; 4-13、15-27、30-46、53-58、68-74、82-95、115-126、134-139、148-153、159-176、182-199、201-217、220-225、227-235、237-248、253-266、300-315、322-336、390-396、412-426、438-445、448-459、477-484、502-508、515-527、529-537、553-568、643-651、658-667、690-703 および 376-400 (配列番号 196) ; 4-10、24-32、38-55、59-67、70-77、80-87、89-97、123-129、134-151、166-172、178-189、191-216、218-235、245-259、271-315、326-339、341-360 および 73-94 (配列番号 197) ; 13-25、31-38、43-57、79-85、92-99、106-112、117-128、130-139、146-158、160-175、194-204、211-222、225-232、234-242、263-270、278-292、299-320、322-333 および 240-256 (配列番号 198) ; 4-17、55-63、66-101、109-131、135-143、145-151、155-161、164-170、177-185、192-198、213-218、223-238、246-256、258-268、273-283、309-314、322-328 および 195-221 (配列番号 199) ; 13-24、31-39、41-50、63-69、90-96、104-109、116-141、148-153、161-167、173-178、190-209、253-258、265-272、279-289、295-312、317-343、355-366、376-389、400-407、430-451、453-464、466-472、487-493、499-505、523-538、554-559、568-579、584-601 および 344-363 (配列番号 200) ; 5-22、30-36、53-59、61-70、82-92、99-106、120-131、135-148、154-167、169-183、187-199、204-212、231-247 および 111-249 (配列番号 201) ; 17-36、40-66、71-144、148-171、173-191、199-214、220-252、265-272、278-288、298-333、342-385 および 287-307 (配列番号 202) ; 4-16、22-28、30-36、42-48、95-116、154-162、164-174、239-252、258-263、273-285、306-313、323-333、341-357、363-369、372-379、395-401、430-436、438-453、464-480、33-44、233-258 および 349-369 (配列番号 203) ; 4-21、30-37、46-53、59-68、80-92、98-104、118-143、150-160、165-185、187-200、204-211、224-236、241-246、252-258、271-280、288-294、311-320、335-341 および 191-350 (配列番号 204) ; 4-16、37-59、64-70、79-87、93-102、107-127、143-165、172-188、197-204、207-218、221-227、242-248、258-277、289-296、298-316、332-338、344-365、367-373、375-382、400-408、415-425、438-446 および 235-250 (配列番号 205) ; 4-37、39-66、84-98、101-127、140-149、157-163、166-172、175-182、184-193、203-208、215-232、234-247、250-299、303-345 および 183-204 (配列番号 206) ; 10-20、41-61、73-87、112-141、176-192、194-201、205-222、230-237、257-264、276-282、284-310、312-318、330-337、349-357 および 304-328 (配列番号 207) ; 4-31、42-103、105-113、121-153、160-181、188-196、210-226、231-264、272-287、297-304、328-336 および 304-318 (配列番号 208) ; 21-43、46-52、54-70、72-79、94-107、133-141、160-166、217-253、311-317、359-365、374-381、390-395、434-440、488-494、497-502、511-522、554-563、565-574、577-585、591-598、601-606、617-625、633-643、658-664、676-682、694-702、710-719、754-760、782-788、802-808、916-921、942-948、955-964、973-979、992-998、1006-1011、1016-1023、1030-1038、1046-1053、1059-1066、1088-1098、1119-1126、1129-1135、1156-1171、1173-1181、1202-1210、1255-1261、1268-1280、1295-1310、1312-1320、1375-1381、1406-1417、1450-1471、1478-1492、1498-1506、1569-1578、1603-1608、1611-1624、1648-1655、1663-1670、1680-1698、1702-1707、1713-1719、1737-1742、1747-1753、1762-1769、1771-1785、1790-1804、1811-1818、1830-1836、1838-1852、1874-1886、1893-1899、1902-1909、1942-19

48、1952-1962、1980-1986、2001-2017、2020-2028、2042-2050、2052-2068、2074-2079
、2083-2095、2107-2113、2147-2155、2177-2194、2203-2211、2236-2241、2251-2258、2
267-2274、2285-2292、2314-2328、2330-2340、2358-2365、2390-2401、2408-2418、2432
-2453、2463-2476、2486-2507、2528-2537、2540-2548、2552-2558、2568-2576、2596-26
01、2610-2622、2629-2638、2653-2669、2718-2727、2749-2767、2777-2784、2789-2795
、2806-2815、2817-2824、2835-2843、2847-2854、2860-2881、511-523、612-630 および
1790-1803 (配列番号 209) ; 4-54、61-68、72-82、86-93、100-108、115-130、147-15
4、187-194、196-207、224-229、236-251、275-287 および 96-109 (配列番号 210) ; 3
1-39、62-69、91-101、158-172、175-180、186-193、201-208、210-223、243-250、273-2
86、293-299、319-325、343-354、356-365、368-384、414-435、471-491、512-518、550- 10
556、567-581、584-589、633-639、680-692、697-708、716-721、747-754、779-786、810
-816 および 366-503 (配列番号 211) ; 5-20、22-48、57-65、96-101、111-122、130-1
45、154-164、170-181、193-199、201-216、224-241、244-262、281-323、342-351、359-
367、369-396、406-416、424-433、450-456、485-491、493-499、501-515、517-535 およ
び 289-305 (配列番号 212) ; 4-17、22-44、53-60、66-83、87-94、101-106、110-116
、131-137、148-183、189-207、209-215、233-242、251-262、264-272、290-296、308-32
7、359-373、375-380、397-405、415-420、426-433、444-475、478-484、529-536、548-5
58 および 106-126 (配列番号 213) ; 4-38、42-50、58-64、72-81、92-118、140-146、
157-165、172-192、198-204、208-216、227-234、238-258、271-278、288-293、311-322
、327-346、357-370、375-383、395-409、411-417、425-432、436-445、109-129 および 20
370-380 (配列番号 214) ; 23-30、36-49、52-64、86-94、97-104、121-129、257-272、
279-286、288-294、307-327、334-340、369-375、377-386、406-412、418-423、430-438
、441-447、459-465、469-476、482-488、510-546、550-580、584-622、638-645、653-65
9、675-683、692-705、723-731、752-761、788-795 および 54-72 (配列番号 215) ; 11
-33、36-46、88-104、116-126、134-170、189-195、199-217、225-250、255-261、266-27
3、280-291、296-313、334-341、343-349、354-360、362-369、373-380、387-401、406-4
20 および 259-273 (配列番号 216) ; 9-14、28-44、57-64、72-79、86-93、104-111、1
16-126、142-150、159-164 および 61-86 (配列番号 217) ; 10-17、26-33、43-61、69-
95、101-107、109-125、129-135、137-144、147-153、158-169、177-187、209-219、221-
232、235-247、261-268、271-282、296-302、306-347、355-362、364-379、386-399、409 30
-418、424-442、451-460、467-479、490-498 および 60-74 (配列番号 218) ; 8-14、20
-31、65-84、94-99、154-179、193-207、238-253 および 96-118 (配列番号 219) ; 4-2
4、30-44、47-62、84-93、108-116、124-133、136-141、201-209、217-223、228-235、23
8-245、247-270、275-285、290-314、328-338、342-349、353-365、375-383、386-392、3
94-402、417-427、443-459、465-481、492-514、516-524、550-566、602-617、630-639、
666-676、687-693、719-730、747-753、783-790、799-816、824-831、837-842 および 16
7-189 (配列番号 220) ; 6-15、18-28、58-66、84-101、106-129、136-151、154-165、1
82-203、205-211、214-220、222-228、233-240、251-260、270-277、284-291、306-315、
322-328、363-369、378-388、392-405、443-452、495-501、512-523、574-583 および 36
2-375 (配列番号 221) ; 5-25、27-34、47-59、64-70、76-86、145-158、166-183、189- 40
202、217-231、235-242、260-270、278-309 および 1-102 (配列番号 222) ; 4-19、24-
76、78-83、90-99、102-109、114-122、137-147、154-174、177-188、203-212、217-223
、227-239 および 226-325 (配列番号 223) ; 7-37、71-90、94-109、117-128、141-153
、179-192、199-206、225-231、237-243、258-264 および 40-51 (配列番号 224) ; 13-1
9、25-30、46-59、
75-91、101-107、114-124、129-135、137-145、160-167、171-179、187-194、209-215、2
17-222、229-239、243-249、257-265、269-275、299-308、310-327 および 282-300 (配
列番号 225) ; 86-100、216-230、342-369、382-388、424-430、438-445、452-458、488-
494、501-518、554-560、568-574、584-592、603-609、611-629、639-645、652-661、669
-699、708-714、726-738、747-753、763-775、785-791、794-807、815-824、826-845、85 50

4-860、863-868、870-883、892-898、901-906、909-921、930-937、946-959、968-974、977-990、998-1007、1009-1027、1037-1043、1046-1051、1053-1066、1075-1081、1084-1089、1092-1103、1113-1119、1122-1135、1143-1152、1154-1172、1182-1188、1191-1196、1200-1210、1220-1226、1229-1235、1237-1249、1259-1265、1268-1281、1289-1298、1305-1318、1328-1334、1337-1343、1345-1357、1367-1373、1390-1396、1405-1411、1418-1423、1426-1435、1445-1455、1474-1483、1493-1500、1505-1512、1517-1524、1538-1544、1568-1578、1595-1601、1674-1682、1687-1720、1728-1736、1738-1744、1754-1761、1764-1774、1798-1824、1836-1842、1886-1893、1895-1903、366-781、782-1518 および 1731-1747 (配列番号 226) ; 4-17、20-39、46-55、60-66、102-110、114-122、125-131、161-167、172-178、185-190、195-202、218-232、236-252、264-291、293-302、309-315、324-339 および 169-381 (配列番号 227) ; 5-10、13-40、42-53、69-75、83-89、120-135、150-161、174-190、203-225、229-247、257-287、318-348 および 30-200 (配列番号 228) ; 7-19、43-53、64-72、124-139、52-84 および 120-131 (配列番号 229) ; 12-19、39-48、58-100、117-123、154-162、164-187、189-195、202-216、218-235、241-246、262-278、315-328、333-347、354-366、372-379、391-405、422-429、431-442、444-450、458-466、478-485、494-501、504-510、520-535、573-580、589-598、615-625、666-676、686-698、722-729、737-746、756-767、787-796、805-816、824-829、833-848、856-864、866-876、879-886、898-904、918-924、927-934、941-960、967-978 および 561-575 (配列番号 230) ; 11-29、49-55、70-77、84-100、102-112、148-155、160-177、181-204 および 1-104 (配列番号 231) ; 27-44、64-71、122-133、151-156、164-178、214-220、226-232、235-244、253-262、282-288、294-310、317-325、350-356、362-368、376-383、438-443、449-454、459-464、492-498、500-511、529-535、538-546、567-573、597-603、660-665、674-679、724-734、763-769、773-784、791-801、807-815、821-826、840-848、863-868、897-902、908-928、932-953、956-975、980-987、990-996、1012-1018、1042-1063、1095-1116、1149-1157、1160-1167、110-357、358-501 および 502-1161 (配列番号 232) ; 4-21、64-71、73-84、128-138、144-162、203-217、240-263、288-298、300-308、310-317、325-351、369-380、391-411 および 330-345 (配列番号 233) ; 5-11、25-31、39-48、51-79、89-98、100-122、135-148、166-201、203-227、230-250、254-260、266-272、274-282、299-305、328-337 および 31-45 (配列番号 234) ; 12-23、29-48、51-60、66-72、75-81、83-93、103-115、133-148、168-174、195-204、222-229、231-240、242-251、270-280、286-305、322-344、349-360、364-370、378-400、421-441、448-484、486-493、495-501、504-534、547-561、567-590、597-607、621-635、643-649、658-685、688-694、702-711、717-731、737-742、759-765、767-772、776-786、803-809、815-825、854-908、910-919、923-930、942-948、961-975、994-1014 および 915-940 (配列番号 235) ; 4-9、32-47、51-61、75-96、139-191 および 1-124 (配列番号 236) ; 4-13、17-38、43-49、55-76、88-95、110-121、128-146、151-157、162-214、222-240、243-249、251-273、275-281、292-298、300-309、312-320、322-331、355-369、376-408、446-460、471-482、485-509 および 191-203 (配列番号 237) ; 4-21、72-82、89-103、106-115、118-124、140-146、174-184、191-200、204-213、218-224、261-266、282-293、299-309、311-340、342-358、362-372、381-389、391-402、413-421、438-447、457-464、470-478、501-507、545-560、578-624、631-641、658-670、680-689、717-738、753-759、795-805、816-822、830-838、842-848、869-881、892-898、33-51 および 818-835 (配列番号 238) ; 4-21、79-85、156-177、183-188、206-214、243-249、261-269、287-292、315-322、334-345、360-366、374-390、402-411、37-97 および 260-399 (配列番号 239) ; 4-9、19-54、58-78、97-104、111-120、126-134、137-145、163-173、178-188、193-203、211-224、246-286、288-324、337-346、355-362、374-390、392-398、409-417 および 240-249 (配列番号 240) ; 5-12、14-31、35-41、43-61、82-92、97-105、134-145、155-166、184-203、215-223、225-251、272-279、281-306、310-345、358-418、435-473、482-490、525-532、538-547、549-563、578-604、613-639 および 144-154 (配列番号 241) ; 53-59、64-72、74-100、133-152、154-172、176-181、207-2

10

20

30

40

50

14、225-238、275-297、304-310、331-340、362-367、384-395、403-410、437-443、448-456、482-490、579-597、602-610、625-630、633-651、699-707、709-715、734-743、750-762 および 544-685 (配列番号 242) ; 12-18、22-40、45-83、89-97、103-109、147-153、159-173、195-204、210-219、243-253、259-265、273-282、303-309、315-325、332-340、346-358、362-367、377-390、393-402、418-426、447-455、467-480、505-512、514-525、548-561、566-576、584-596、619-626、638-645、649-659、661-680、699-708、714-720、753-759、766-772、775-781、801-808、202-218、282-299、339-350 および 617-628 (配列番号 243) ; 5-33、52-62、87-101、111-135、137-143、145-152、190-202、209-221、233-245、253-270 および 151-215 (配列番号 244) ; 19-29、32-39、42-48、75-94、124-135、137-145、152-160、176-182、193-203、215-236、266-273、275-291、297-306、311-319、322-342、348-360、369-378、394-401 および 48-64 (配列番号 245) ; 4-11、13-33、36-43、53-63、65-80、112-129、134-141、143-155、157-168、178-188、191-199、201-207、215-229、242-255、263-270、283-315、320-329、333-338、340-349、412-426、465-478、485-490、498-512、540-554 および 390-516 (配列番号 246) ; 4-18、23-32、41-47、54-70、88-99、104-111、118-138、143-148、150-162、168-175、181-188、203-211、214-220、227-245、251-268、275-281、287-296、323-333 および 1-90 (配列番号 247) ; 8-34、38-49、72-83、85-91、94-104、112-125、134-142、148-168、181-189、191-198、202-214、222-233、242-254、256-262、273-278、287-294、314-325 および 141-159 (配列番号 248) ; 4-24、30-36、47-75、82-105、124-134、151-157、192-202、208-214、219-226、234-247、285-290、318-324、332-340、343-349、380-386、453-462、472-478、484-501、531-540、550-557、604-612、620-625、642-648、652-671、64-84、93-180 および 181-446 (配列番号 249) ; 12-18、24-32、68-75、77-83、96-101、109-116、129-136、152-164、175-184、190-199、206-215、224-233、241-250、258-264、273-292、302-312、319-331、334-346、348-368、387-395、408-416、420-429、437-452 および 364-374 (配列番号 250) ; 11-28、36-52、60-67、74-79、108-116 および 61-76 (配列番号 251) ; 20-27、38-49、69-74、84-107、138-145、161-168、179-195、210-226、228-252、267-281、283-296、305-311、333-340、342-356、361-372、380-399、401-414、458-466、475-481、492-507、515-520 および 146-160 (配列番号 252) ; 43-61、68-74、76-90、120-128、130-149、156-161、164-182、206-234、242-252、269-274、291-304、332-345、349-355、360-371、374-388、434-440、447-453、459-465、469-496、504-522 および 261-285 (配列番号 253) ; 4-17、24-30、37-49、87-98、118-124、126-136、144-171、176-188、206-214、216-228、233-240、246-252、262-271、277-297、307-330、333-342、346-352、355-361、368-386、391-400、413-420、474-480 および 401-427 (配列番号 254) ; 15-26、31-46、51-72、80-93、96-109、131-137、150-158、179-185、189-209、211-219、221-234、241-247、255-262、265-271、283-288 および 173-190 (配列番号 255) ; 28-37、39-45、51-58、77-84、89-97、132-148、171-180、199-205、212-218、220-226、257-265、273-300、307-327、334-340、344-365、385-390、402-408、426-436、450-468、476-485 および 425-497 (配列番号 256) ; 4-25、70-76、80-88、90-100、120-128、162-169、183-203、261-277、279-289、291-297、302-308、321-327、339-353、358-377、392-401、404-410、414-422、443-450、456-461、470-488、490-497、510-535、570-611、618-630、639-647、649-660、668-690、702-716、718-724、737-747、750-764 および 497-509 (配列番号 257) ; 12-48、50-64、99-108、216-223、235-241、244-254、262-274、287-293、310-316、320-326、361-366、377-383、390-395、408-414、418-425、438-444、462-469、494-505、524-530、536-547、551-566、592-598、601-613、678-685、687-695、709-717、727-737、751-757、760-765、772-778、782-788、801-807、822-830、859-868、870-878、884-890、898-903、909-919、953-969、973-980、990-1000、1002-1019、1041-1047、1059-1065、1090-1095、1116-1127、1130-1139、1143-1149、1151-1168、1178-1183、1188-1195、1197-1209、1213-1220、1226-1234、1236-1247、1255-1274、1276-1282、76-100、270-284、309-438、493-505、786-942 および 947-967 (配列番号 258) ; 4-9、24-34、46-95、97-109、119-130 および 138-156

(配列番号 259) ; 9-26、28-35、43-53、55-68、83-92、99-105、110-135、139-149、157-162、164-170、173-183、193-208、210-230、239-245、253-259、263-271、293-305、310-320、322-331、336-343、351-364、367-376、92-107 および 154-173 (配列番号 260) ; 19-39、52-62、108-117、145-152、160-168、194-203、229-240、252-268、280-287、308-316、333-339、383-390、403-412、414-424、438-445、464-472、479-484、489-505、510-526 および 247-260 (配列番号 261) ; 5-17、25-52、60-77、105-113、118-125、162-167、228-234、272-279、328-334、341-357、381-395、400-406、512-518、557-569、586-592、645-651、690-695、701-709、720-726、733-743、751-758、781-786、879-886、929-934、939-944、952-960、965-975、994-1001、1039-1045、1102-1109、1164-1181、1198-1206、1223-1229、1253-1259、1283-1292、1312-1317、1339-1349、1360-1370、1389-1398、1400-1412、1452-1465、1470-1484、1490-1497、1519-1525、1554-1564、1578-1591、1623-1636、1638-1646、1669-1679、1685-1697、1704-1711、1713-1720、1730-1736、1738-1749、1756-1764、1778-1786、1796-1803、1817-1826、1849-1866、1975-1993、2017-2032、2044-2053、2070-2086、2091-2109、2116-2127、2156-2167、2182-2188、2197-2202、2244-2252、2281-2287、2290-2307、2350-2361、2383-2404、2425-2433、2445-2455、2495-2505 および 394-549 (配列番号 262) ; 9-24、31-53、57-67、69-79、84-114、133-141、144-172、178-186 および 13-46 (配列番号 263) ; 4-25、27-35、43-52、59-70、79-91、115-130、136-152、154-163、170-179 および 1-58 (配列番号 264) ; 4-30、49-55、71-80、96-105、111-126、139-146、149-162、239-245、279-285、290-296、300-307、331-337、343-350 および 250-351 (配列番号 265) ; 9-27、34-41、43-51、92-111、114-120、123-131、139-150、156-171、176-186、188-204、229-241、252-258、266-279、288-297、319-334、338-348、373-379、389-398、431-439、479-484 および 214-398 (配列番号 266) ; 4-15、18-27、47-52、68-83、91-97、104-110、115-121、139-147、157-164、198-206、227-236、241-254、264-273、278-289、311-320、353-361、372-383、405-420、426-434 および 232-386 (配列番号 267) ; 4-10、24-34、91-97、129-141、156-163、184-190、205-219、229-235、256-273、278-285 および 93-116 (配列番号 268) ; 7-29、35-54、71-83、85-91、104-111、122-134、138-144、146-154、158-174、177-183、186-201、207-215、223-235、240-247、262-273、275-283、287-292 および 48-66 (配列番号 269) ; 7-27、31-47、49-70、75-102、110-149、157-171、217-223、235-251、294-302、358-364、367-375、387-393、395-412、423-430、441-451、456-470、472-486、488-495、499-509、515-529、536-549、556-570、574-603、607-615、625-633、642-658、670-676、683-702、708-716、720-726、747-756、763-784、803-812、815-826 および 475-490 (配列番号 270) ; 7-22、30-38、53-59、64-75、83-95、97-112、120-131、133-142、145-151、154-166、172-180、189-203、227-238、277-287、9-156 および 174-287 (配列番号 271) ; 13-23、25-32、111-117、150-164、185-193、207-212、216-224、230-236、263-272、304-311、342-348、374-385、391-407、444-458、480-487、489-499、523-542、544-558、572-579、620-640、686-696、703-710、742-755、765-772、817-822、830-837、865-872、931-937 および 66-86 (配列番号 272) ; 4-27、49-56、62-70、86-92、121-127、151-163、170-182、195-202、212-226、237-243 および 234-254 (配列番号 273) ; 4-10、13-24、39-51、62-78、92-104、107-117、134-141、156-161、166-181、210-216、222-229、256-266、273-280、297-304、313-330、336-349、371-376、433-439、443-448、488-493、506-515、527-534、560-572、575-583、587-593 および 252-483 (配列番号 274) ; 4-15、21-38、45-56、81-95、102-108、118-130、133-147、152-162、166-171、199-204、211-218、230-240、253-261、274-283、288-294、312-317、325-336、344-357、391-414 および 24-146 (配列番号 275) ; 26-31、38-56、65-82、90-101、112-119、123-153、175-188、197-216、234-242、249-265、273-286、290-305、327-335、338-346、361-372、394-404 および 290-306 (配列番号 276) ; 17-26、43-48、50-73、81-93、95-107、139-146、158-168、171-176、190-196、202-212、216-223、243-266、274-282、308-313、324-330、344-378、380-387、403-422、427-443、448-455、457-465、49

1-515、517-528、553-567、589-599、610-617、642-648、670-697、709-717、726-743、745-759、769-803、807-823、840-849 および 820-851 (配列番号 277) ; 4-18、39-48、53-63、66-90、102-117、125-134、137-145、156-162、169-197、26-40 および 56-80 (配列番号 278) ; 21-33、36-42、49-60、68-76、91-105、123-130、141-161、169-178、185-190、192-199、205-214、223-233、239-247、260-269、284-293、300-314、324-352、357-364、373-382、389-403、420-432、438-446、466-471、477-484、503-509、549-556、558-576、600-623、625-635、654-661、663-669、671-687、702-716、735-741、744-750、757-766、776-786、807-815、824-832、854-860、863-897、909-915、920-946、952-959、982-997、1024-1038、1049-1055、1071-1085、1104-1113、1121-1132、1138-1150、1187-1196、1212-1221、1227-1236、1257-1262、1264-1278、1282-1294、1307-1318、1353-1370、1382-1388、1396-1409、1434-1440、1446-1454、1465-1478、1485-1513、1516-1529、1540-1545、1563-1568、1575-1593、1607-1616、1628-1645、1648-1661、1676-1682、1689-1697、1713-1719、1739-1749、1753-1758、1763-1774、1797-1803、1807-1846、1855-1874、1877-1891、1893-1907、1912-1925、1931-1943、1955-1965、1976-1990、2032-2043、2045-2051、2099-2105、2131-2138、2161-2179、2188-2199、2205-2216、2219-2227、2235-2245、2247-2267、2277-2288、2294-2304、2314-2326、2346-2358、2365-2377、2383-2402、2407-2423、2437-2450、2454-2473、2489-2497、2525-2531、2557-2570、2580-2587、2589-2599、2621-2641、2647-2653、2661-2677、2685-2690、2697-2717、2722-2733、2739-2777、2786-2793、2801-2808、2811-2822、2825-2835、2838-2845、2859-2871、2877-2883、213-344、954-1080 および 2524-2733 (配列番号 279) ; 10-16、18-23、28-41、63-69、77-91、101-109、118-136、146-153、155-162、168-179、192-207、217-226、229-235、239-254、279-286、294-307、313-319、334-341、344-353、363-377、390-396 および 178-328 (配列番号 280) ; 18-42、68-84、89-95、100-105、107-115、125-135、154-177、189-195、205-228、236-243、252-259、279-300、309-316、323-331、340-351、353-364、377-402 および 85-97 (配列番号 281) ; 4-18、26-32、66-76、100-126、151-159、178-186、188-194、200-210、241-248、253-259、262-279、284-291、307-313、315-322、327-337、376-386、399-407、432-441、467-473、487-497、499-505、543-549、560-568、585-593、598-604、608-614、630-642、647-653、690-703、717-730、21-200 および 468-480 (配列番号 282) ; 17-49、52-58、62-73、78-97、100-117、122-172、185-190、193-217、225-236 および 33-42 (配列番号 283) ; 7-39、50-58、73-89、96-107、109-120、126-142、152-170、178-202、205-211、224-244、249-259、261-270、300-310、312-325 および 158-169 (配列番号 284) ; 4-31、40-64、71-82、85-92、102-124、126-139、147-152、159-173、176-188、195-207、210-216、234-241、249-256、258-276、279-293、296-302、310-315、349-356、363-378、380-403、411-426、435-441、448-459、463-476、488-494 および 201-221 (配列番号 285) ; 5-13、15-74、87-104、107-120、123-129、136-145、150-191、193-206、227-248、250-264、278-302、304-323、332-378、384-407、409-419、425-457、462-471、474-497、511-545、555-564、571-578、585-598、640-647、669-675、682-691、693-705、729-743、752-761、772-780、786-804、808-818、822-846、858-880、884-900、910-939、941-947、962-971、973-988、998-1003、1007-1027 および 236-259 (配列番号 286) ; 4-19、27-68、81-111、121-160 および 60-79 (配列番号 287) ; 4-37、40-46、52-57、199-205、222-229、236-244、250-267、269-282 および 27-197 (配列番号 288) ; 4-16、24-30、32-38、63-75、86-92、98-111、113-126、160-165、170-180、198-204、227-233、239-245、253-273、308-314、352-365、382-387、395-403、423-429、472-482、484-493、501-507、518-526、536-541、543-550、556-562、586-600、626-633、649-661、680-688 および 546-559 (配列番号 289) ; 16-33、48-59、63-71、77-92、94-109、117-124、139-151、169-181、184-227、233-249、251-261、263-275、282-294、297-321、326-332、341-355、383-399 および 258-272 (配列番号 290) ; 11-26、31-39、43-52、55-62、64-70、80-94、123-133、135-141、172-181、185-206、209-218、224-230、238-244、251-262、264-271、290-301、306-324、333-340、350-357、367-375、390-397、434-441、

443-448、77-226 および 350-429 (配列番号 291); 4-13、22-27、31-45、50-59、72-96、99-114、131-141、143-150、159-176、180-186、189-198、208-214、234-253、271-287、294-299、310-366、382-390、398-416、424-443 および 283-305 (配列番号 292); 9-26、30-53、62-72、86-95、112-122、136-145、153-160、209-221、227-237、241-268、281-288、291-298、308-314、321-328、336-346、351-379、388-397、409-416、423-433、443-481、511-519 および 213-232 (配列番号 293); 12-18、25-31、38-50、59-67、71-82、96-126 および 76-88 (配列番号 294); 4-25、39-44、64-71、74-88、100-113、128-138、151-162、164-177、185-190、204-213、233-239、246-254、281-286、293-306、309-318、333-347、349-359、385-398、404-423、458-465、477-484、490-499、501-533、554-566、582-590、596-616、624-629、631-639、654-680、694-720、735-743 および 2-100 (配列番号 295); 4-16、36-41、52-75、98-107、109-117、122-128、133-139、141-155、159-165、169-182、187-193、195-201、211-224、230-236、247-269、278-290 および 75-92 (配列番号 296); 7-21、25-33、37-43、87-94、103-120、131-147、168-174、197-203、207-212、227-237、247-257、263-271、279-287、298-306、320-325、332-340、363-374、379-384、390-401、403-414、428-433、448-457、462-475、483-490、513-519、525-535、543-554、559-566、571-620、625-631、636-642、659-670、688-706、708-723、770-779、787-793、796-807、820-840、848-854、863-874、895-905、912-919、934-942、968-975、983-1000、1012-1019、1026-1036、1050-1060、1064-1070、1081-1091、1094-1108、1112-1118、1140-1152、1164-1169、1172-1180、1187-1192 および 732-748 (配列番号 297); 23-40、42-59、66-73、78-97、111-128、130-141、157-166、178-183 および 53-71 (配列番号 298); 4-27、38-44、47-57、59-85、99-106、114-121、154-166、181-186、193-198、238-244、253-262、272-278、287-299、314-320、338-350、358-368、382-388、407-416、433-446、456-461、463-473 および 86-195 (配列番号 299); 5-24、38-59、64-80、87-99、105-126、134-142、149-163、165-179、181-202、205-220、227-233、243-250、257-263 および 87-245 (配列番号 300); 5-32、47-53、66-79、81-97、115-151、155-174、183-188、196-210、215-226、230-238、253-258、263-270、276-282、295-301、304-325、334-344、360-390、397-412、425-432、434-462、478-494、508-526、539-564、571-579、347-371 および 375-386 (配列番号 301); 4-15、36-44、49-56、60-66、68-82、84-103、109-115、118-141、147-154、160-168、176-185 および 26-39 (配列番号 302); 7-13、23-33 および 13-21 (配列番号 303); 2-10 (配列番号 304); 4-9、12-18、35-42、49-62 および 6-18 (配列番号 305); 19-25 および 1-13 (配列番号 306); 15-21、27-45 および 12-25 (配列番号 307); 14-20 および 1-14 (配列番号 308); 4-18 および 13-26 (配列番号 309); 8-21 および 2-20 (配列番号 310); 4-14 および 4-16 (配列番号 311); 3-12 (配列番号 312); 6-14、6-25、35-57 および 2-14 (配列番号 313); 6-25、35-57 および 17-31 (配列番号 314); 14-25、32-46 および 5-19 (配列番号 315); 18-31 および 5-16 (配列番号 316); 19-24 および 4-26 (配列番号 317); 13-21、29-34、47-58、61-73 および 36-47 (配列番号 318); 4-15 および 5-24 (配列番号 319); 6-18 (配列番号 320); 13-20 および 4-13 (配列番号 321); 15-23 (配列番号 322); 4-9 および 7-21 (配列番号 323); 1-10 (配列番号 324); 4-14 (配列番号 325); 4-17、35-41、46-89、93-98 および 70-88 (配列番号 326); 1-13 (配列番号 327); 4-16、26-32 および 25-38 (配列番号 328); 8-15、23-28 および 4-17 (配列番号 329); 4-12 および 1-15 (配列番号 330); 4-29、31-42、52-58 および 6-16 (配列番号 331); 4-9、24-32 および 9-19 (配列番号 332); 4-12、18-27 および 5-18 (配列番号 333); 4-11、37-56、58-92 および 18-29 (配列番号 334); 8-28 および 20-35 (配列番号 335); 4-15 (配列番号 336); 4-23、27-39、55-63 および 35-58 (配列番号 337); 6-26、28-54 および 28-47 (配列番号 338); 4-10、38-52、58-82 および 30-49 (配列番号 339); 4-22、29-35、44-50、53-68、70-80 および 20-33 (配列番号 340); 22-28、30-36 および 18-33 (配列番号 341); 4-11、13-21、25-30 および 20-30 (配列番号 342); 10-22 および 10-23 (配列番号 343); 4-11 および 9-20 (配列番号 344); 14-2

5、32-46 および 6-19 (配列番号 345); 5-30 および 14-33 (配列番号 346); 4-15、28-35、46-55、59-65、76-84 および 9-24 (配列番号 347); 27-33 および 5-19 (配列番号 348); 5-13 および 8-18 (配列番号 349); 9-22、24-34 および 21-40 (配列番号 350); 4-17、35-41、46-89、93-98 および 71-89 (配列番号 351); 4-12、14-24 および 2-17 (配列番号 352); 9-17 および 5-16 (配列番号 353); 7-41、48-58、63-75、80-89 および 43-53 (配列番号 354); 4-22、25-30 および 4-14 (配列番号 355); 4-55 および 18-33 (配列番号 356); 262-280 (配列番号 179); 131-146 (配列番号 186); 207-224 (配列番号 188); 27-50、203-217 および 313-325 (配列番号 189); 110-129 (配列番号 192); 156-179、174-197、192-215、210-233、228-251 および 246-267 (配列番号 190); 377-400 (配列番号 196); 34-43、234-257 および 350-367 (配列番号 203); 304-327 (配列番号 207); 25-48、43-66 および 61-82 (配列番号 222); 398-421、416-439、434-457、452-475、470-493、488-511、506-529、524-547、621-644、639-664、707-730、725-748、743-766、761-784、779-802、797-820、984-1007、1002-1025、1020-1043、1038-1061、1056-1079、1074-1097、1092-1115、1286-1309、1304-1327、1322-1345、1340-1363、1358-1381、1376-1399、1394-1417、1412-1435、1430-1453、1448-1471、1466-1489 および 1484-1507 (配列番号 226); 188-211、206-229、224-247、242-265、260-283 および 278-296 (配列番号 227); 56-79 および 122-132 (配列番号 229); 35-46 (配列番号 231); 178-201、196-219、214-237、232-255、250-273、268-291、379-402、397-420、415-438、433-456、451-474、642-665、660-683、678-701、696-719、714-737、732-755、750-773、768-791、899-922、917-940、935-958、1037-1060、1055-1078、1073-1096 および 1091-1114 (配列番号 232); 330-346 (配列番号 233); 571-594、589-612、607-630、625-648、643-666 および 661-684 (配列番号 242); 188-207 (配列番号 244); 61-84、308-331、326-349、344-367、362-385、380-403 および 398-421 (配列番号 249); 79-98、345-366、844-867、870-887 および 890-905 (配列番号 258); 94-109 (配列番号 268); 188-207 (配列番号 272); 290-306 (配列番号 276); 826-849 (配列番号 277); 228-252、247-270、265-288、283-306、301-324、955-978、973-996、991-1014、1009-1032、1027-1050、1045-1068、2533-2556、2551-2574、2569-2592、2587-2610、2605-2628 および 2623-2646 (配列番号 279); 86-109 および 104-127 (配列番号 288); 546-560 (配列番号 289); 260-271 (配列番号 290); 106-129、124-147、142-165、160-183、178-201 および 375-398 (配列番号 291); 284-307 (配列番号 292); 362-385 (配列番号 301)。

【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のいずれかのピロリ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のいずれかのピロリ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。

【請求項 18】

免疫賦活性物質、好ましくは以下を含む群から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：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。

【請求項 19】

医薬調製物の製造のため、特にピロリ菌感染症に対するワクチンの製造のための、請求

10

20

30

40

50

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使用。

【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少なくともその有効部分。

【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。

【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】

以下の工程を特徴とする請求項 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って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
該抗体を含有する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。

【請求項 27】

以下の工程を特徴とする請求項 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って該非ヒト動物において免疫応答を開始させる工程、
脾臓または脾臓細胞を該動物から取り出す工程、
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。

【請求項 28】

ピロリ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) 単離または固定化された請求項 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と候補アンタゴニストとを、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その断片に対する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に対する結合に应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に対する結合に应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

10

20

30

40

50

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と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どうかを判定する工程。 10

【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のインビトロ診断方法。 20

【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、特にピロリ菌感染症のインビトロ診断方法。

【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ルリンを含む群から選択される。

【請求項 3 6】

機能的核酸の製造のための請求項 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。 30

【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、ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) によってもたら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、ピロリ菌の抗原をコードする単離核酸分子に関する。 40

【背景技術】

【0002】

ピロリ菌はグラム陰性、微好気性 (microaerobic)、らせん状の鞭毛細菌であり、世界中の人間のおよそ半分が感染している非常によくみられるヒト病原体である。感染はほとんどの場合、幼児期 (10歳未満) に起こるようであり、病原体は胃に特異的に定着し、そこで生息する。定着は数年または数十年続くが、生涯にわたって持続し得、しかし定着した個体の約70-80%は、無症候性のままであり、疾患が発症しない。ピロリ菌と胃上皮との長期にわたる相互作用は複雑で動的な工程であり、10-20%の場合において胃粘膜の慢性急性炎症および消化性潰瘍の発症を導くことが今では明らかである。ほとんどすべての 50

十二指腸潰瘍はピロリ菌により引き起こされ、胃においては潰瘍が0,1-4 %の頻度で胃腺癌へと進行しうる。この数の重要さは、ここ20年間、胃癌は肺癌に次ぐ第二のもっとも多い致死性の癌であり、世界のあらゆる死因のなかで8番目であると予測されるということである。ピロリ菌感染はまた、約90%の粘膜関連リンパ組織リンパ腫(MALT)にも関連している。ピロリ菌感染症患者は、高力価の主にIgGおよびIgA抗体を作るが、細菌に対する免疫応答におけるその役割は知られていない。粘膜上皮における細菌の存在は、大規模な好中球浸潤に関係する。顕著なIFN- γ 産生を伴うピロリ菌-誘導性Th1-偏向(biased) CD4⁺ T細胞応答が、組織損傷につながる局所免疫反応の結果における強力な寄与因子であるかもしれないことを示すかなりの証拠が存在する。

【0003】

ピロリ菌は、ヒトにおける生存と長期定着を導くよう、病原体が胃粘膜環境に独特に適応するのを可能にする一連の非常に強力な因子と機構を固有に備えている。しかし、既知の病原性因子は疾患のリスクの上昇に関係しているにすぎず、絶対的なものではない。おそらく、ピロリ菌が発達させているもっとも明白なシステムは強力なウレアーゼ酵素であり、これは、尿素をアンモニアと二酸化炭素に変換することにより、酸性条件下での生存を可能にする。細胞質のアポ酵素の発現は構成的であり、その量は、全ピロリ菌タンパク質の15%にも達しうる。酵素活性は低pHで上昇し、内膜のコンダクタンスは低pH条件下で尿素についても上昇する。生成したNH₃は周辺質へと拡散し、それによって細菌を極度に酸性の環境から保護する{Prinz, C. et al., 2003}。ピロリ菌のvacA遺伝子の細胞空胞化毒素生成物は、空胞形成を誘導し、そして、上皮細胞における構造と機能のかく乱をもたらす。vacA遺伝子はすべての株に存在するがその発現は様々である。VacAはG-タンパク質共役受容体キナーゼ-インタラクター(interactor)1上のそのチロシンリン酸化活性を上昇させることにより、Z-型タンパク質チロシンホスファターゼ受容体を介して作用して、基底膜からの胃上皮細胞の顕著な脱落を導くことが知られており、これは、ピロリ菌-誘導性上皮細胞消滅およびその結果の消化性潰瘍形成の元となる機構である可能性がある{Fujikawa, A. et al., 2003}。ピロリ菌における主な病原性-関連遺伝要素は、ほとんどの株に含まれている、40 Kbp 病原性島、Cag(細胞毒素関連遺伝子)PAIである。PAIは約30の遺伝子を有しており、1つの遺伝子産物であるCagAは最初、血清学研究において、ピロリ菌感染個体における疾患の転帰の重要な決定因子として同定された。Cag PAIは、細菌エフェクタータンパク質の真核宿主細胞への直接輸送の機構を提供することが知られているIV型分泌システムと、密接な配列類似性を有する遺伝子を含む。それゆえ、CagAタンパク質が、付着ピロリ菌を上皮細胞へとインピトロで転移させるエフェクタータンパク質であることが示されたことは驚くべきことではない。次いでリン酸化されたCagAが宿主細胞骨格を再編成し、細菌に隣接した台(pedestal)の形成が導かれる{Bjorkholm, B. et al., 2003}。それはVacAを発現する株において存在するが、cagA遺伝子はvacAと染色体上で連鎖しているわけではない。cagA PAIおよびvacA遺伝子型を示す株(I型株)は、CagAおよびVacAを欠く株(II型株)と比べて、十二指腸潰瘍、萎縮性胃炎および胃癌を患う患者と高頻度に関連している{Censini, S. et al., 1996}。遠い地理的地域におけるヒト集団は、cag PAIの右端に位置する遺伝子型変異に基づいて異なるものになっている可能性がある{Kersulyte, D. et al., 2000}。

【0004】

胃上皮へのピロリ菌の付着は多くの因子によって促進される。Hpa血球凝集素は赤血球のシアル酸成分に結合し、babA2にコードされるBabA接着分子(adhesion)は胃上皮細胞に存在する組織血液型抗原Lewis^bに結合する。babA2-陽性株はI型株と比べて、消化性潰瘍および胃癌の患者からより高頻度に単離され、そしてbabA2を欠くI型株と比較すると、babA2遺伝子も有するI型分離株は、萎縮性胃炎および腸上皮化生の患者により多くみられる。SabA接着タンパク質は、発達中の胎児胃上皮の未熟細胞および癌性および前癌性病巣の迅速に増殖している未分化細胞上に発現している癌胎児性表面抗原sialyl-Le^x上の複合糖質と結合することが示されている{Dubreuil, J. et al., 2002}。

【0005】

10

20

30

40

50

ピロリ菌にある別の強力な病原性-関連機構は、その形質転換に対する天然の適格性ととも、病原体のあらゆる既知の細菌種との組換えの非常に高い率である。この機構により、ピロリ菌は水平遺伝子移動を介して新規な遺伝物質を獲得することが可能になり、これは、個体への定着の際の一般的な現象であり、この結果、病原性マーカー、例えば、cag PAI における顕著な変化を示す新規な病原体サブタイプを生成することが出来る(疑似種) {Loughlin, M. et al., 2003}。いずれの分離株もその他の株から容易にDNA フィンガープリント法によって識別可能であるような、かかる極度の遺伝的変異性が、多くの細胞表面結合または分泌タンパク質の発現多様性の原因であると提唱されている {Ferrero, R. et al., 2001}。感染集団の比較的少ない割合のみが臨床的に明らかな疾患を発症する理由はいまだに明らかではないが、上記病原体-関連因子と、新しい宿主-特異的特徴、例えば、IL-1 プロモーター対立遺伝子多型がともに、おそらく、ピロリ菌の病原性の基礎となる複雑な機構に寄与しているのであろう {Blaser, M., 2000}。 10

【0006】

現在、ピロリ菌感染症であると診断された患者は、1または2の抗生物質とプロトンポンプ阻害剤またはビスマスの組み合わせによって治療されている。多くの標準的組み合わせがあるが、再感染(根絶が起こらなかった胃の部分からおそらくおこる)が起こりうる。現在の組み合わせ治療法により、ほとんどの場合では80-90%の根絶率が達成されるがあらゆる組み合わせ治療に現在含まれている1以上の抗生物質に対して抵抗性のピロリ菌株が出現しているため、ピロリ菌感染症を予防または回復させる有効な治療のための新規な戦略の開発が緊急に必要とされている。ワクチンはヘリコバクターによる感染を予防 20
できるだけでなく、より具体的に、宿主組織への定着を予防または回復させるため、それによって胃萎縮症、消化性潰瘍および胃癌の発生を低下させることが出来る。重篤な慢性症状の排除は、急性感染の発症および生物の保因の低減の直接の結果であろう。

【0007】

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、死んだまたは弱毒化した生物全体、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、多糖または脂質でもよくそれらを含んでいてもよい。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 30
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、必要な免疫系のすべての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。 40

【0008】

ヘリコバクターワクチンを開発する試みでは、主に全細胞および弱毒化またはサブユニットワクチンアプローチが注目されてきた。ピロリ菌ワクチンを作るための最初の「原理の証明」研究は、不活化全細胞調製物と、粘膜アジュバントとしてのコレラ毒素を用いて行われた。かかるワクチンはマウスにおける胃の感染に対する防御免疫の誘導において非常に有効であったが、その安全性および使用許可ならびにピロリ菌調製物をインビトロで大規模で作るのが困難であることから、ヒト試験には適用されなかった {Ferrero, R. et al., 2001}; {Sutton, P., 2001}。第二世代のサブユニットワクチンのための、候補抗原が、経験的アプローチによって同定された。これら抗原の選択基準は、細菌病原性におけるタンパク質の既知のまたは予測される役割に関連していた。かかる候補には、ウレアー 50

ゼホロ酵素およびそのサブユニット、UreAおよびUreB、シャペロニン GroELおよび GroESの熱ショックタンパク質ホモログ、VacA 細胞毒素およびカタラーゼ (KatA) (Prinz, C. et al., 2003); (Svennerholm, A., 2003) およびその中に引用されている文献)が含まれる。別のセットの候補タンパク質がインビトロアッセイにおけるその免疫反応性に基づくその後の研究において同定された。ピロリ菌ゲノム発現ライブラリーをコレラ毒素の存在下でピロリ菌全細胞超音波破碎液 (sonicates) または外膜小胞で免疫したマウスからの抗体を用いてスクリーニングした。抗原性タンパク質を選択した大腸菌クローンから精製し、その実体をN-末端配列決定により判定した。UreA、UreB、GroEL ホモログおよびLp p20 リポタンパク質などの既知の抗原のなかで、4つの以前に特徴づけられていないタンパク質も同定された。1つはL7/L12 リボゾームタンパク質に対して相同性を有し、残りは機能が不明であった。同様のスクリーニング戦略をキメラ融合技術と組み合わせて、Lp p20 タンパク質がワクチン候補抗原であることが確認された (Oliaro, J. et al., 2000)。多パラメータ選択基準を用いる最近の同定に基づいて、ワクチン開発のために考慮できるその他のタンパク質もあった。これらにはHpa ホモログ (HP0410) および機能未知の新規タンパク質 (HP0231) が含まれ、両方が高い予防効果を備えている (Sabarth, N. et al., 2002)。数々の研究において示されているように動物における予防および治療ワクチン化には利点があるにもかかわらず、細菌根絶 (殺菌免疫 (sterilizing immunity)) はヒトにおいて記載されていない。

10

【0009】

上記同定方法は経験的であるかまたは特定の選択基準に限定されているので、効率的かつ網羅的な同定および確証技術を用いて、さらなるピロリ菌関連抗原を同定することが望まれている。

20

【0010】

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、単離および生産方法を開発した (W0 02/059148)。しかし、生物学的特性、病原性の強度および遺伝的背景における相違を考慮すると、ピロリ菌はブドウ球菌株とは全く異なる。重要なことに、ピロリ菌からの抗原の同定のための血清の選択は、黄色ブドウ球菌スクリーニングに適用したものと異なる。

【0011】

3つの主な型のヒト血清をこの目的のために収集した。まず、45歳未満の健康な成人を、ピロリ菌-特異的 IgGおよびIgA 血清抗体レベルについて、全細菌溶解液および培養上清タンパク質を用いたELISAによって試験した。高力価の個体を問診し、ピロリ菌疾患に関連する病歴、症状または愁訴の不在に基づいて選択した。相関データに基づくと、保護 (定着中和) 抗体は、ピロリ菌の保因者でない、またはピロリ菌による疾患にかかりやすい、曝された個体に存在しているようである。症状を有さない健康な成人からの高力価血清をゲノムに基づく抗原同定に含めた。ヒト血清の選択のためのこのアプローチは、保因状態か非保因状態かが抗体レベルと関連づけられない、黄色ブドウ球菌に用いられたものと基本的に全く異なる。

30

【0012】

第二に、胃癌患者からの血清サンプルを抗ピロリ菌抗体力価についてELISAを用いて特徴付けし、高力価血清をスクリーニングのために選択した。第三の群の血清サンプルは十二指腸潰瘍の個体から得、ELISAによって判定された高力価血清をスクリーニングのために選択した。

40

【0013】

2つの細菌種、ピロリ菌と黄色ブドウ球菌とのゲノムはそれ自体多数の重要な相違を示す。ピロリ菌のゲノムはおよそ 1.65 Mb の配列情報を含むが、黄色ブドウ球菌は約 2.85 Mbを有する。それらの平均GC含量はそれぞれ39および33%である。さらに、2つの細菌種は増殖のために異なる培養条件および培地を要求する。ピロリ菌は厳密にヒト病原体であるが、黄色ブドウ球菌はある範囲の温血動物に感染することが判明している。この2つの病原体によって与えられうるもっとも重要な疾患を以下に挙げる。黄色ブドウ球菌は主

50

に院内、日和見感染：膿痂疹、毛囊炎、膿瘍、腫れ (boils)、感染裂傷、心内膜炎、髄膜炎、敗血症性関節炎、肺炎、骨髄炎、熱傷様皮膚症候群 (SSS)、毒素性ショック症候群、を引き起こす。ピロリ菌はおそらく地域感染型胃腸感染：自己限定性旅行者下痢症、体部優勢胃炎 (corpus predominant) または汎胃炎 (pangastritis)、消化性潰瘍 (胃および十二指腸)、胃癌 (腺癌)、慢性萎縮性胃炎 (CAG) および MALT (粘膜関連リンパ組織、非ホジキン型B細胞リンパ腫)、を引き起こす。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の基礎となる問題は、ピロリ菌感染症に対する医薬、例えばワクチンの開発手段を提供することであった。特に、問題は、該医薬の製造に使用できるピロリ菌からの有効かつ関連する網羅的セットの核酸分子または抗原を提供することであった。

10

【課題を解決するための手段】

【0015】

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 3-4、16、19-21、28-29、33-38、41-42、44、48-52、55、57-58、61、63、65、67-68、72、74-75、81、84、91、94、96-97、101、105-108、112、115-117、119、123-178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、

20

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ジेंट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。

【0016】

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。

【0017】

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：

30

a) 配列番号 8-10、13-15、17-18、24、27、32、39-40、45-47、56、59、62、69-70、73、77、79、82、85-86、88、90、103、109-110、114、121から選択される核酸分子に対して少なくとも96%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ジेंट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

【0018】

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 5、7、30-31、53、60、66、76、83、87、92、99、120から選択される核酸分子、

b) a)の核酸に相補的な核酸分子、

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。

【0019】

好ましくは、核酸分子はDNAまたはRNAである。

50

【 0 0 2 0 】

本発明の好ましい態様によると、核酸分子はゲノムDNA、特にピロリ菌ゲノムDNAから単離される。

【 0 0 2 1 】

本発明によると、本発明のいずれかの態様による核酸分子を含むベクターが提供される。

【 0 0 2 2 】

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 2 3 】

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 2 4 】

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 2 5 】

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 181-182、194、197-199、206-207、211-216、219-220、222、226-230、233、235-236、239、241、243、245-246、250、252-253、259、262、269、272、274-275、279、283-286、290、293-295、297、301-356からなる群から選択される。

【 0 0 2 6 】

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 186-188、191-193、195-196、202、205、210、217-218、223-225、234、237、240、247-248、251、255、257、260、263-264、266、268、281、287-288、292、299からなる群から選択される。

【 0 0 2 7 】

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 183、185、208-209、231、238、244、254、261、265、270、277、298からなる群から選択される。

【 0 0 2 8 】

さらなる態様によると、本発明は、表1の列「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」のアミノ酸配列、表3の血清反応性エピトープ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、特に以下のアミノ酸を含むペプチドを提供する：63-91、95-101、110-116、134-148、150-156、158-164、188-193、197-209、226-241、247-254、291-297、312-319、338-346、351-358、366-378、404-410、420-438、448-454、465-473、482-488、490-498、503-510、512-519、531-543、547-554、568-575、589-604、610-631 および 239-308（配列番号 179）；16-29、35-47、50-68、70-79、91-101、143-149、158-163、185-191、196-206、215-224、230-237、244-251、258-278、290-311、319-325、338-351、365-385、396-429、445-454、458-466、491-499、501-521、17-79 および 218-233（配列番号 180）；4-10、16-41、46-66、77-84、91-97、102-118、125-144、187-200、202-214、245-253、255-261、286-295、300-330、335-342、350-361、363-381、385-392、396-416、435-450 および 460-470（配列番号 181）；11-19、27-48、52-59、77-82、84-107、118-125、127-154、178-183、192-209、215-221、286-295、302-313、350-357、402-415、417-431、453-463、465-493 および 313-331（配列番号 182）；19-26、30-43、47-55、63-68、72-80、97-104、107-119、129-146、160-175、194-216、231-251、254-260 および 26-43（配列番号 183）；7-13、29-37、65-81、110-120、123-131、135-152、230-249、254-260、284-290、292-299、317-326、329-336、403-444、452-458、466-477、490-498、510-519、541-550、557-566 および 533-567（配列番号 184）；5-47、71-77、79-86、89-95、120-126、137-144、176-181、184-196、202-208、211-232、236-282、301-313、317-325、341-347、353-384、394-400、412-433、436-443 および 59-75（配列番号 185）；4-18、22-38、59-69、106-112、116-130、138-149、156-170、175-197、200-214、216-223、233-244、255-261、266-276、279-286、325-333、342-348、366-399、402-420、429-441、1-104 および 130-147（配列

10

20

30

40

50

番号 186) ; 50-58、69-95、97-113、131-136、157-163、170-175、188-212、220-226、254-259、265-277、283-289、297-308、311-318、347-358、360-369、378-401、416-421、440-450、454-462、470-476、493-502、506-514、536-567、585-590、598-607、613-618、653-659 および 35-46 (配列番号 187) ; 16-29、32-60、65-87、89-123、128-134、137-158、162-173、178-196、210-216、218-228 および 206-225 (配列番号 188) ; 10-20、26-35、51-64、86-91、94-100、113-122、154-160、185-191、193-201、211-217、225-230、237-246、251-257、298-304、306-312、316-328、340-348、357-389、391-397、415-421、449-456、458-471、488-495、502-511、24-55 および 236-341 (配列番号 189) ; 5-22、41-51、87-93、114-122、127-136、150-156、158-166、223-233、245-263、291-296、9-126 および 127-285 (配列番号 190) ; 30-43、46-56、61-70、72-83、85-93、103-113、119-125、151-166、179-191、212-218、225-231、236-243、262-267、291-307、331-344、349-355、366-372、380-386、414-422、428-447、459-464、469-478、507-519、525-544、563-569、576-590、620-626、633-643、654-659、665-671、684-707、717-723、725-733、747-779、782-801 および 347-361 (配列番号 191) ; 4-12、14-26、37-80、107-115、133-139、144-150、154-165、173-180、191-199、205-211、221-231、237-244、254-284、307-340、342-353、360-368、370-380、479-493、495-503、509-522、525-536、539-547、554-560、565-573、578-583、7-23 および 465-479 (配列番号 192) ; 4-17、47-55、76-83、85-100、104-112、117-123、126-135、142-148、156-167、174-182、267-273 および 258-283 (配列番号 193) ; 8-32、36-42、65-88、102-108、112-140、147-163、170-179、183-193 および 117-124 (配列番号 194) ; 12-18、45-50、62-77、82-95、99-113、115-123、125-147、155-177、187-209、211-223、244-253、259-270、278-297、302-307、311-318、329-334、350-356、359-365、390-400、402-413 および 333-350 (配列番号 195) ; 4-13、15-27、30-46、53-58、68-74、82-95、115-126、134-139、148-153、159-176、182-199、201-217、220-225、227-235、237-248、253-266、300-315、322-336、390-396、412-426、438-445、448-459、477-484、502-508、515-527、529-537、553-568、643-651、658-667、690-703 および 376-400 (配列番号 196) ; 4-10、24-32、38-55、59-67、70-77、80-87、89-97、123-129、134-151、166-172、178-189、191-216、218-235、245-259、271-315、326-339、341-360 および 73-94 (配列番号 197) ; 13-25、31-38、43-57、79-85、92-99、106-112、117-128、130-139、146-158、160-175、194-204、211-222、225-232、234-242、263-270、278-292、299-320、322-333 および 240-256 (配列番号 198) ; 4-17、55-63、66-101、109-131、135-143、145-151、155-161、164-170、177-185、192-198、213-218、223-238、246-256、258-268、273-283、309-314、322-328 および 195-221 (配列番号 199) ; 13-24、31-39、41-50、63-69、90-96、104-109、116-141、148-153、161-167、173-178、190-209、253-258、265-272、279-289、295-312、317-343、355-366、376-389、400-407、430-451、453-464、466-472、487-493、499-505、523-538、554-559、568-579、584-601 および 344-363 (配列番号 200) ; 5-22、30-36、53-59、61-70、82-92、99-106、120-131、135-148、154-167、169-183、187-199、204-212、231-247 および 111-249 (配列番号 201) ; 17-36、40-66、71-144、148-171、173-191、199-214、220-252、265-272、278-288、298-333、342-385 および 287-307 (配列番号 202) ; 4-16、22-28、30-36、42-48、95-116、154-162、164-174、239-252、258-263、273-285、306-313、323-333、341-357、363-369、372-379、395-401、430-436、438-453、464-480、33-44、233-258 および 349-369 (配列番号 203) ; 4-21、30-37、46-53、59-68、80-92、98-104、118-143、150-160、165-185、187-200、204-211、224-236、241-246、252-258、271-280、288-294、311-320、335-341 および 191-350 (配列番号 204) ; 4-16、37-59、64-70、79-87、93-102、107-127、143-165、172-188、197-204、207-218、221-227、242-248、258-277、289-296、298-316、332-338、344-365、367-373、375-382、400-408、415-425、438-446 および 235-250 (配列番号 205) ; 4-37、39-66、84-98、101-127、140-149、157-163、166-172、175-182、184-193、203-208、215-232、234-247、250-299、303-345 および 183-204 (配列番号 206) ; 10-20、41-61、73-87、112-141、176-192、194-201、205-222、230-237、257

10

20

30

40

50

-264、276-282、284-310、312-318、330-337、349-357 および 304-328 (配列番号 207)
); 4-31、42-103、105-113、121-153、160-181、188-196、210-226、231-264、272-287
、297-304、328-336 および 304-318 (配列番号 208); 21-43、46-52、54-70、72-79
、94-107、133-141、160-166、217-253、311-317、359-365、374-381、390-395、434-440
、488-494、497-502、511-522、554-563、565-574、577-585、591-598、601-606、617-62
5、633-643、658-664、676-682、694-702、710-719、754-760、782-788、802-808、916-9
21、942-948、955-964、973-979、992-998、1006-1011、1016-1023、1030-1038、1046-10
53、1059-1066、1088-1098、1119-1126、1129-1135、1156-1171、1173-1181、1202-1210
、1255-1261、1268-1280、1295-1310、1312-1320、1375-1381、1406-1417、1450-1471、1
478-1492、1498-1506、1569-1578、1603-1608、1611-1624、1648-1655、1663-1670、1680 10
-1698、1702-1707、1713-1719、1737-1742、1747-1753、1762-1769、1771-1785、1790-18
04、1811-1818、1830-1836、1838-1852、1874-1886、1893-1899、1902-1909、1942-1948
、1952-1962、1980-1986、2001-2017、2020-2028、2042-2050、2052-2068、2074-2079、2
083-2095、2107-2113、2147-2155、2177-2194、2203-2211、2236-2241、2251-2258、2267
-2274、2285-2292、2314-2328、2330-2340、2358-2365、2390-2401、2408-2418、2432-24
53、2463-2476、2486-2507、2528-2537、2540-2548、2552-2558、2568-2576、2596-2601
、2610-2622、2629-2638、2653-2669、2718-2727、2749-2767、2777-2784、2789-2795、2
806-2815、2817-2824、2835-2843、2847-2854、2860-2881、511-523、612-630 および 17
90-1803 (配列番号 209); 4-54、61-68、72-82、86-93、100-108、115-130、147-154
、187-194、196-207、224-229、236-251、275-287 および 96-109 (配列番号 210); 3 20
1-39、62-69、91-101、158-172、175-180、186-193、201-208、210-223、243-250、273-2
86、293-299、319-325、343-354、356-365、368-384、414-435、471-491、512-518、550-
556、567-581、584-589、633-639、680-692、697-708、716-721、747-754、779-786、810
-816 および 366-503 (配列番号 211); 5-20、22-48、57-65、96-101、111-122、130-
145、154-164、170-181、193-199、201-216、224-241、244-262、281-323、342-351、359
-367、369-396、406-416、424-433、450-456、485-491、493-499、501-515、517-535 お
よび 289-305 (配列番号 212); 4-17、22-44、53-60、66-83、87-94、101-106、110-1
16、131-137、148-183、189-207、209-215、233-242、251-262、264-272、290-296、308-
327、359-373、375-380、397-405、415-420、426-433、444-475、478-484、529-536、548
-558 および 106-126 (配列番号 213); 4-38、42-50、58-64、72-81、92-118、140-14 30
6、157-165、172-192、198-204、208-216、227-234、238-258、271-278、288-293、311-3
22、327-346、357-370、375-383、395-409、411-417、425-432、436-445、109-129 およ
び 370-380 (配列番号 214); 23-30、36-49、52-64、86-94、97-104、121-129、257-2
72、279-286、288-294、307-327、334-340、369-375、377-386、406-412、418-423、430-
438、441-447、459-465、469-476、482-488、510-546、550-580、584-622、638-645、653
-659、675-683、692-705、723-731、752-761、788-795 および 54-72 (配列番号 215)
; 11-33、36-46、88-104、116-126、134-170、189-195、199-217、225-250、255-261、26
6-273、280-291、296-313、334-341、343-349、354-360、362-369、373-380、387-401、4
06-420 および 259-273 (配列番号 216); 9-14、28-44、57-64、72-79、86-93、104-1
11、116-126、142-150、159-164 および 61-86 (配列番号 217); 10-17、26-33、43-6 40
1、69-95、101-107、109-125、129-135、137-144、147-153、158-169、177-187、209-219
、221-232、235-247、261-268、271-282、296-302、306-347、355-362、364-379、386-39
9、409-418、424-442、451-460、467-479、490-498 および 60-74 (配列番号 218); 8
-14、20-31、65-84、94-99、154-179、193-207、238-253 および 96-118 (配列番号 21
9); 4-24、30-44、47-62、84-93、108-116、124-133、136-141、201-209、217-223、228
-235、238-245、247-270、275-285、290-314、328-338、342-349、353-365、375-383、38
6-392、394-402、417-427、443-459、465-481、492-514、516-524、550-566、602-617、6
30-639、666-676、687-693、719-730、747-753、783-790、799-816、824-831、837-842
および 167-189 (配列番号 220); 6-15、18-28、58-66、84-101、106-129、136-151、
154-165、182-203、205-211、214-220、222-228、233-240、251-260、270-277、284-291 50

、 306-315、 322-328、 363-369、 378-388、 392-405、 443-452、 495-501、 512-523、 574-583
 3 および 362-375 (配列番号 221) ; 5-25、 27-34、 47-59、 64-70、 76-86、 145-158、 166-183、
 189-202、 217-231、 235-242、 260-270、 278-309 および 1-102 (配列番号 222) ; 4-19、
 24-76、 78-83、 90-99、 102-109、 114-122、 137-147、 154-174、 177-188、 203-212、
 217-223、 227-239 および 226-325 (配列番号 223) ; 7-37、 71-90、 94-109、 117-128、
 141-153、 179-192、 199-206、 225-231、 237-243、 258-264 および 40-51 (配列番号 224) ; 13-19、
 25-30、 46-59、 75-91、 101-107、 114-124、 129-135、 137-145、 160-167、 171-179、 187-194、
 209-215、 217-222、 229-239、 243-249、 257-265、 269-275、 299-308、 310-327 および 282-300
 (配列番号 225) ; 86-100、 216-230、 342-369、 382-388、 424-430、 438-445、 452-458 10
 、 488-494、 501-518、 554-560、 568-574、 584-592、 603-609、 611-629、 639-645、 652-661、
 669-699、 708-714、 726-738、 747-753、 763-775、 785-791、 794-807、 815-824、 826-845、
 854-860、 863-868、 870-883、 892-898、 901-906、 909-921、 930-937、 946-959、 968-974、
 977-990、 998-1007、 1009-1027、 1037-1043、 1046-1051、 1053-1066、 1075-1081、 1084-1089、
 1092-1103、 1113-1119、 1122-1135、 1143-1152、 1154-1172、 1182-1188、 1191-1196、
 1200-1210、 1220-1226、 1229-1235、 1237-1249、 1259-1265、 1268-1281、 1289-1298、
 1305-1318、 1328-1334、 1337-1343、 1345-1357、 1367-1373、 1390-1396、 1405-1411、
 1418-1423、 1426-1435、 1445-1455、 1474-1483、 1493-1500、 1505-1512、 1517-1524、 1538-1544、
 1568-1578、 1595-1601、 1674-1682、 1687-1720、 1728-1736、 1738-1744、 1754-1761、
 1764-1774、 1798-1824、 1836-1842、 1886-1893、 1895-1903、 366-781、 782-1518 20
 および 1731-1747 (配列番号 226) ; 4-17、 20-39、 46-55、 60-66、 102-110、 114-122、
 125-131、 161-167、 172-178、 185-190、 195-202、 218-232、 236-252、 264-291、 293-302、
 309-315、 324-339 および 169-381 (配列番号 227) ; 5-10、 13-40、 42-53、 69-75、 83-89、
 120-135、 150-161、 174-190、 203-225、 229-247、 257-287、 318-348 および 30-200 (配列番号
 228) ; 7-19、 43-53、 64-72、 124-139、 52-84 および 120-131 (配列番号 229) ; 12-19、
 39-48、 58-100、 117-123、 154-162、 164-187、 189-195、 202-216、 218-235、 241-246、
 262-278、 315-328、 333-347、 354-366、 372-379、 391-405、 422-429、 431-442、 444-450、
 458-466、 478-485、 494-501、 504-510、 520-535、 573-580、 589-598、 615-625、 666-676、
 686-698、 722-729、 737-746、 756-767、 787-796、 805-816、 824-829、 833-848、 856-864、
 866-876、 879-886、 898-904、 918-924、 927-934、 941-960、 967-978 および 561-575 (配列番号
 230) ; 11-29、 49-55、 70-77、 84-100、 102-112、 148-155、 160-177、 181-204 および 1-104 (配列番号
 231) ; 27-44、 64-71、 122-133、 151-156、 164-178、 214-220、 226-232、 235-244、 253-262、
 282-288、 294-310、 317-325、 350-356、 362-368、 376-383、 438-443、 449-454、 459-464、 492-498、
 500-511、 529-535、 538-546、 567-573、 597-603、 660-665、 674-679、 724-734、 763-769、
 773-784、 791-801、 807-815、 821-826、 840-848、 863-868、 897-902、 908-928、 932-953、
 956-975、 980-987、 990-996、 1012-1018、 1042-1063、 1095-1116、 1149-1157、 1160-1167、
 110-357、 358-501 および 502-1161 (配列番号 232) ; 4-21、 64-71、 73-84、 128-138、
 144-162、 203-217、 240-263、 288-298、 300-308、 310-317、 325-351、 369-380、 391-411 および
 330-345 (配列番号 233) ; 5-11、 25-31、 39-48、 51-79、 89-98、 100-122、 135-148、 166-201 40
 、 203-227、 230-250、 254-260、 266-272、 274-282、 299-305、 328-337 および 31-45 (配列番号
 234) ; 12-23、 29-48、 51-60、 66-72、 75-81、 83-93、 103-115、 133-148、 168-174、
 195-204、 222-229、 231-240、 242-251、 270-280、 286-305、 322-344、 349-360、 364-370、
 378-400、 421-441、 448-484、 486-493、 495-501、 504-534、 547-561、 567-590、 597-607、
 621-635、 643-649、 658-685、 688-694、 702-711、 717-731、 737-742、 759-765、 767-772、
 776-786、 803-809、 815-825、 854-908、 910-919、 923-930、 942-948、 961-975、 994-1014
 および 915-940 (配列番号 235) ; 4-9、 32-47、 51-61、 75-96、 139-191 および 1-124 (配列番号
 236) ; 4-13、 17-38、 43-49、 55-76、 88-95、 110-121、 128-146、 151-157、 162-214、
 222-240、 243-249、 251-273、 275-281、 292-298、 300-309、 312-320、 322-331、 355-369、
 376-408、 446-460、 471-482、 485-509 および 191-203 (配列 50

番号 237) ; 4-21、72-82、89-103、106-115、118-124、140-146、174-184、191-200、204-213、218-224、261-266、282-293、299-309、311-340、342-358、362-372、381-389、391-402、413-421、438-447、457-464、470-478、501-507、545-560、578-624、631-641、658-670、680-689、717-738、753-759、795-805、816-822、830-838、842-848、869-881、892-898、33-51 および 818-835 (配列番号 238) ; 4-21、79-85、156-177、183-188、206-214、243-249、261-269、287-292、315-322、334-345、360-366、374-390、402-411、37-97 および 260-399 (配列番号 239) ; 4-9、19-54、58-78、97-104、111-120、126-134、137-145、163-173、178-188、193-203、211-224、246-286、288-324、337-346、355-362、374-390、392-398、409-417 および 240-249 (配列番号 240) ; 5-12、14-31、35-41、43-61、82-92、97-105、134-145、155-166、184-203、215-223、225-251、272-279、281-306、310-345、358-418、435-473、482-490、525-532、538-547、549-563、578-604、613-639 および 144-154 (配列番号 241) ; 53-59、64-72、74-100、133-152、154-172、176-181、207-214、225-238、275-297、304-310、331-340、362-367、384-395、403-410、437-443、448-456、482-490、579-597、602-610、625-630、633-651、699-707、709-715、734-743、750-762 および 544-685 (配列番号 242) ; 12-18、22-40、45-83、89-97、103-109、147-153、159-173、195-204、210-219、243-253、259-265、273-282、303-309、315-325、332-340、346-358、362-367、377-390、393-402、418-426、447-455、467-480、505-512、514-525、548-561、566-576、584-596、619-626、638-645、649-659、661-680、699-708、714-720、753-759、766-772、775-781、801-808、202-218、282-299、339-350 および 617-628 (配列番号 243) ; 5-33、52-62、87-101、111-135、137-143、145-152、190-202、209-221、233-245、253-270 および 151-215 (配列番号 244) ; 19-29、32-39、42-48、75-94、124-135、137-145、152-160、176-182、193-203、215-236、266-273、275-291、297-306、311-319、322-342、348-360、369-378、394-401 および 48-64 (配列番号 245) ; 4-11、13-33、36-43、53-63、65-80、112-129、134-141、143-155、157-168、178-188、191-199、201-207、215-229、242-255、263-270、283-315、320-329、333-338、340-349、412-426、465-478、485-490、498-512、540-554 および 390-516 (配列番号 246) ; 4-18、23-32、41-47、54-70、88-99、104-111、118-138、143-148、150-162、168-175、181-188、203-211、214-220、227-245、251-268、275-281、287-296、323-333 および 1-90 (配列番号 247) ; 8-34、38-49、72-83、85-91、94-104、112-125、134-142、148-168、181-189、191-198、202-214、222-233、242-254、256-262、273-278、287-294、314-325 および 141-159 (配列番号 248) ; 4-24、30-36、47-75、82-105、124-134、151-157、192-202、208-214、219-226、234-247、285-290、318-324、332-340、343-349、380-386、453-462、472-478、484-501、531-540、550-557、604-612、620-625、642-648、652-671、64-84、93-180 および 181-446 (配列番号 249) ; 12-18、24-32、68-75、77-83、96-101、109-116、129-136、152-164、175-184、190-199、206-215、224-233、241-250、258-264、273-292、302-312、319-331、334-346、348-368、387-395、408-416、420-429、437-452 および 364-374 (配列番号 250) ; 11-28、36-52、60-67、74-79、108-116 および 61-76 (配列番号 251) ; 20-27、38-49、69-74、84-107、138-145、161-168、179-195、210-226、228-252、267-281、283-296、305-311、333-340、342-356、361-372、380-399、401-414、458-466、475-481、492-507、515-520 および 146-160 (配列番号 252) ; 43-61、68-74、76-90、120-128、130-149、156-161、164-182、206-234、242-252、269-274、291-304、332-345、349-355、360-371、374-388、434-440、447-453、459-465、469-496、504-522 および 261-285 (配列番号 253) ; 4-17、24-30、37-49、87-98、118-124、126-136、144-171、176-188、206-214、216-228、233-240、246-252、262-271、277-297、307-330、333-342、346-352、355-361、368-386、391-400、413-420、474-480 および 401-427 (配列番号 254) ; 15-26、31-46、51-72、80-93、96-109、131-137、150-158、179-185、189-209、211-219、221-234、241-247、255-262、265-271、283-288 および 173-190 (配列番号 255) ; 28-37、39-45、51-58、77-84、89-97、132-148、171-180、199-205、212-218、220-226、257-265、273-300、307-327、334-340、344-365、385-390、402-408、426-436、450-468、476-485 お

10

20

30

40

50

よび 425-497 (配列番号 256); 4-25、70-76、80-88、90-100、120-128、162-169、183-203、261-277、279-289、291-297、302-308、321-327、339-353、358-377、392-401、404-410、414-422、443-450、456-461、470-488、490-497、510-535、570-611、618-630、639-647、649-660、668-690、702-716、718-724、737-747、750-764 および 497-509 (配列番号 257); 12-48、50-64、99-108、216-223、235-241、244-254、262-274、287-293、310-316、320-326、361-366、377-383、390-395、408-414、418-425、438-444、462-469、494-505、524-530、536-547、551-566、592-598、601-613、678-685、687-695、709-717、727-737、751-757、760-765、772-778、782-788、801-807、822-830、859-868、870-878、884-890、898-903、909-919、953-969、973-980、990-1000、1002-1019、1041-1047、1059-1065、1090-1095、1116-1127、1130-1139、1143-1149、1151-1168、1178-1183、1188-1195、1197-1209、1213-1220、1226-1234、1236-1247、1255-1274、1276-1282、76-100、270-284、309-438、493-505、786-942 および 947-967 (配列番号 258); 4-9、24-34、46-95、97-109、119-130 および 138-156 (配列番号 259); 9-26、28-35、43-53、55-68、83-92、99-105、110-135、139-149、157-162、164-170、173-183、193-208、210-230、239-245、253-259、263-271、293-305、310-320、322-331、336-343、351-364、367-376、92-107 および 154-173 (配列番号 260); 19-39、52-62、108-117、145-152、160-168、194-203、229-240、252-268、280-287、308-316、333-339、383-390、403-412、414-424、438-445、464-472、479-484、489-505、510-526 および 247-260 (配列番号 261); 5-17、25-52、60-77、105-113、118-125、162-167、228-234、272-279、328-334、341-357、381-395、400-406、512-518、557-569、586-592、645-651、690-695、701-709、720-726、733-743、751-758、781-786、879-886、929-934、939-944、952-960、965-975、994-1001、1039-1045、1102-1109、1164-1181、1198-1206、1223-1229、1253-1259、1283-1292、1312-1317、1339-1349、1360-1370、1389-1398、1400-1412、1452-1465、1470-1484、1490-1497、1519-1525、1554-1564、1578-1591、1623-1636、1638-1646、1669-1679、1685-1697、1704-1711、1713-1720、1730-1736、1738-1749、1756-1764、1778-1786、1796-1803、1817-1826、1849-1866、1975-1993、2017-2032、2044-2053、2070-2086、2091-2109、2116-2127、2156-2167、2182-2188、2197-2202、2244-2252、2281-2287、2290-2307、2350-2361、2383-2404、2425-2433、2445-2455、2495-2505 および 394-549 (配列番号 262); 9-24、31-53、57-67、69-79、84-114、133-141、144-172、178-186 および 13-46 (配列番号 263); 4-25、27-35、43-52、59-70、79-91、115-130、136-152、154-163、170-179 および 1-58 (配列番号 264); 4-30、49-55、71-80、96-105、111-126、139-146、149-162、239-245、279-285、290-296、300-307、331-337、343-350 および 250-351 (配列番号 265); 9-27、34-41、43-51、92-111、114-120、123-131、139-150、156-171、176-186、188-204、229-241、252-258、266-279、288-297、319-334、338-348、373-379、38

9-398、431-439、479-484 および 214-398 (配列番号 266); 4-15、18-27、47-52、68-83、91-97、104-110、115-121、139-147、157-164、198-206、227-236、241-254、264-273、278-289、311-320、353-361、372-383、405-420、426-434 および 232-386 (配列番号 267); 4-10、24-34、91-97、129-141、156-163、184-190、205-219、229-235、256-273、278-285 および 93-116 (配列番号 268); 7-29、35-54、71-83、85-91、104-111、122-134、138-144、146-154、158-174、177-183、186-201、207-215、223-235、240-247、262-273、275-283、287-292 および 48-66 (配列番号 269); 7-27、31-47、49-70、75-102、110-149、157-171、217-223、235-251、294-302、358-364、367-375、387-393、395-412、423-430、441-451、456-470、472-486、488-495、499-509、515-529、536-549、556-570、574-603、607-615、625-633、642-658、670-676、683-702、708-716、720-726、747-756、763-784、803-812、815-826 および 475-490 (配列番号 270); 7-22、30-38、53-59、64-75、83-95、97-112、120-131、133-142、145-151、154-166、172-180、189-203、227-238、277-287、9-156 および 174-287 (配列番号 271); 13-23、25-32、111-117、150-164、185-193、207-212、216-224、230-236、263-272、304-311、342-348、374-385、391-407、444-458、480-487、489-499、523-542、544-558、572-579、620-626

40、686-696、703-710、742-755、765-772、817-822、830-837、865-872、931-937 およ
び 66-86 (配列番号 272); 4-27、49-56、62-70、86-92、121-127、151-163、170-182
、195-202、212-226、237-243 および 234-254 (配列番号 273); 4-10、13-24、39-51
、62-78、92-104、107-117、134-141、156-161、166-181、210-216、222-229、256-266、
273-280、297-304、313-330、336-349、371-376、433-439、443-448、488-493、506-515
、527-534、560-572、575-583、587-593 および 252-483 (配列番号 274); 4-15、21-
38、45-56、81-95、102-108、118-130、133-147、152-162、166-171、199-204、211-218
、230-240、253-261、274-283、288-294、312-317、325-336、344-357、391-414 および
24-146 (配列番号 275); 26-31、38-56、65-82、90-101、112-119、123-153、175-188
、197-216、234-242、249-265、273-286、290-305、327-335、338-346、361-372、394-40
4 および 290-306 (配列番号 276); 17-26、43-48、50-73、81-93、95-107、139-146
、158-168、171-176、190-196、202-212、216-223、243-266、274-282、308-313、324-33
0、344-378、380-387、403-422、427-443、448-455、457-465、491-515、517-528、553-5
67、589-599、610-617、642-648、670-697、709-717、726-743、745-759、769-803、807-
823、840-849 および 820-851 (配列番号 277); 4-18、39-48、53-63、66-90、102-11
7、125-134、137-145、156-162、169-197、26-40 および 56-80 (配列番号 278); 21-
33、36-42、49-60、68-76、91-105、123-130、141-161、169-178、185-190、192-199、20
5-214、223-233、239-247、260-269、284-293、300-314、324-352、357-364、373-382、3
89-403、420-432、438-446、466-471、477-484、503-509、549-556、558-576、600-623、
625-635、654-661、663-669、671-687、702-716、735-741、744-750、757-766、776-786
、807-815、824-832、854-860、863-897、909-915、920-946、952-959、982-997、1024-1
038、1049-1055、1071-1085、1104-1113、1121-1132、1138-1150、1187-1196、1212-1221
、1227-1236、1257-1262、1264-1278、1282-1294、1307-1318、1353-1370、1382-1388、1
396-1409、1434-1440、1446-1454、1465-1478、1485-1513、1516-1529、1540-1545、1563
-1568、1575-1593、1607-1616、1628-1645、1648-1661、1676-1682、1689-1697、1713-17
19、1739-1749、1753-1758、1763-1774、1797-1803、1807-1846、1855-1874、1877-1891
、1893-1907、1912-1925、1931-1943、1955-1965、1976-1990、2032-2043、2045-2051、2
099-2105、2131-2138、2161-2179、2188-2199、2205-2216、2219-2227、2235-2245、2247
-2267、2277-2288、2294-2304、2314-2326、2346-2358、2365-2377、2383-2402、2407-24
23、2437-2450、2454-2473、2489-2497、2525-2531、2557-2570、2580-2587、2589-2599
、2621-2641、2647-2653、2661-2677、2685-2690、2697-2717、2722-2733、2739-2777、2
786-2793、2801-2808、2811-2822、2825-2835、2838-2845、2859-2871、2877-2883、213-
344、954-1080 および 2524-2733 (配列番号 279); 10-16、18-23、28-41、63-69、77
-91、101-109、118-136、146-153、155-162、168-179、192-207、217-226、229-235、239
-254、279-286、294-307、313-319、334-341、344-353、363-377、390-396 および 178-3
28 (配列番号 280); 18-42、68-84、89-95、100-105、107-115、125-135、154-177、1
89-195、205-228、236-243、252-259、279-300、309-316、323-331、340-351、353-364、
377-402 および 85-97 (配列番号 281); 4-18、26-32、66-76、100-126、151-159、17
8-186、188-194、200-210、241-248、253-259、262-279、284-291、307-313、315-322、3
27-337、376-386、399-407、432-441、467-473、487-497、499-505、543-549、560-568、
585-593、598-604、608-614、630-642、647-653、690-703、717-730、21-200 および 468
-480 (配列番号 282); 17-49、52-58、62-73、78-97、100-117、122-172、185-190、1
93-217、225-236 および 33-42 (配列番号 283); 7-39、50-58、73-89、96-107、109-
120、126-142、152-170、178-202、205-211、224-244、249-259、261-270、300-310、312
-325 および 158-169 (配列番号 284); 4-31、40-64、71-82、85-92、102-124、126-1
39、147-152、159-173、176-188、195-207、210-216、234-241、249-256、258-276、279-
293、296-302、310-315、349-356、363-378、380-403、411-426、435-441、448-459、463
-476、488-494 および 201-221 (配列番号 285); 5-13、15-74、87-104、107-120、12
3-129、136-145、150-191、193-206、227-248、250-264、278-302、304-323、332-378、3
84-407、409-419、425-457、462-471、474-497、511-545、555-564、571-578、585-598、

10

20

30

40

50

640-647、669-675、682-691、693-705、729-743、752-761、772-780、786-804、808-818
、822-846、858-880、884-900、910-939、941-947、962-971、973-988、998-1003、1007-
1027 および 236-259 (配列番号 286) ; 4-19、27-68、81-111、121-160 および 60-79
(配列番号 287) ; 4-37、40-46、52-57、199-205、222-229、236-244、250-267、269-
282 および 27-197 (配列番号 288) ; 4-16、24-30、32-38、63-75、86-92、98-1
11、113-126、160-165、170-180、198-204、227-233、239-245、253-273、308-3
14、352-365、382-387、395-403、423-429、472-482、484-493、501-507、518-5
26、536-541、543-550、556-562、586-600、626-633、649-661、680-688 および
546-559 (配列番号 289) ; 16-33、48-59、63-71、77-92、94-109、117-124、139-151
、169-181、184-227、233-249、251-261、263-275、282-294、297-321、326-332、341-35
5、383-399 および 258-272 (配列番号 290) ; 11-26、31-39、43-52、55-62、64-70、
80-94、123-133、135-141、172-181、185-206、209-218、224-230、238-244、251-262、2
64-271、290-301、306-324、333-340、350-357、367-375、390-397、434-441、443-448、
77-226 および 350-429 (配列番号 291) ; 4-13、22-27、31-45、50-59、72-96、99-11
4、131-141、143-150、159-176、180-186、189-198、208-214、234-253、271-287、294-2
99、310-366、382-390、398-416、424-443 および 283-305 (配列番号 292) ; 9-26、3
0-53、62-72、86-95、112-122、136-145、153-160、209-221、227-237、241-268、281-28
8、291-298、308-314、321-328、336-346、351-379、388-397、409-416、423-433、443-4
81、511-519 および 213-232 (配列番号 293) ; 12-18、25-31、38-50、59-67、71-82
、96-126 および 76-88 (配列番号 294) ; 4-25、39-44、64-71、74-88、100-113、128
-138、151-162、164-177、185-190、204-213、233-239、246-254、281-286、293-306、30
9-318、333-347、349-359、385-398、404-423、458-465、477-484、490-499、501-533、5
54-566、582-590、596-616、624-629、631-639、654-680、694-720、735-743 および 2-1
00 (配列番号 295) ; 4-16、36-41、52-75、98-107、109-117、122-128、133-139、141
-155、159-165、169-182、187-193、195-201、211-224、230-236、247-269、278-290 お
よび 75-92 (配列番号 296) ; 7-21、25-33、37-43、87-94、103-120、131-147、168-1
74、197-203、207-212、227-237、247-257、263-271、279-287、298-306、320-325、332-
340、363-374、379-384、390-401、403-414、428-433、448-457、462-475、483-490、513
-519、525-535、543-554、559-566、571-620、625-631、636-642、659-670、688-706、70
8-723、770-779、787-793、796-807、820-840、848-854、863-874、895-905、912-919、9
34-942、968-975、983-1000、1012-1019、1026-1036、1050-1060、1064-1070、1081-1091
、1094-1108、1112-1118、1140-1152、1164-1169、1172-1180、1187-1192 および 732-74
8 (配列番号 297) ; 23-40、42-59、66-73、78-97、111-128、130-141、157-166、178-
183 および 53-71 (配列番号 298) ; 4-27、38-44、47-57、59-85、99-106、114-121、
154-166、181-186、193-198、238-244、253-262、272-278、287-299、314-320、338-350
、358-368、382-388、407-416、433-446、456-461、463-473 および 86-195 (配列番号
299) ; 5-24、38-59、64-80、87-99、105-126、134-142、149-163、165-179、181-202、
205-220、227-233、243-250、257-263 および 87-245 (配列番号 300) ; 5-32、47-53
、66-79、81-97、115-151、155-174、183-188、196-210、215-226、230-238、253-258、2
63-270、276-282、295-301、304-325、334-344、360-390、397-412、425-432、434-462、
478-494、508-526、539-564、571-579、347-371 および 375-386 (配列番号 301) ; 4-
15、36-44、49-56、60-66、68-82、84-103、109-115、118-141、147-154、160-168、176-
185 および 26-39 (配列番号 302) ; 7-13、23-33 および 13-21 (配列番号 303) ;
2-10 (配列番号 304) ; 4-9、12-18、35-42、49-62 および 6-18 (配列番号 305) ;
19-25 および 1-13 (配列番号 306) ; 15-21、27-45 および 12-25 (配列番号 307)
; 14-20 および 1-14 (配列番号 308) ; 4-18 および 13-26 (配列番号 309) ; 8-21
および 2-20 (配列番号 310) ; 4-14 および 4-16 (配列番号 311) ; 3-12 (配列
番号 312) ; 6-14、6-25、35-57 および 2-14 (配列番号 313) ; 6-25、35-57 および
17-31 (配列番号 314) ; 14-25、32-46 および 5-19 (配列番号 315) ; 18-31 およ
び 5-16 (配列番号 316) ; 19-24 および 4-26 (配列番号 317) ; 13-21、29-34、47 50

-58、61-73 および 36-47 (配列番号 318); 4-15 および 5-24 (配列番号 319); 6-18 (配列番号 320); 13-20 および 4-13 (配列番号 321); 15-23 (配列番号 322); 4-9 および 7-21 (配列番号 323); 1-10 (配列番号 324); 4-14 (配列番号 325); 4-17、35-41、46-89、93-98 および 70-88 (配列番号 326); 1-13 (配列番号 327); 4-16、26-32 および 25-38 (配列番号 328); 8-15、23-28 および 4-17 (配列番号 329); 4-12 および 1-15 (配列番号 330); 4-29、31-42、52-58 および 6-16 (配列番号 331); 4-9、24-32 および 9-19 (配列番号 332); 4-12、18-27 および 5-18 (配列番号 333); 4-11、37-56、58-92 および 18-29 (配列番号 334); 8-28 および 20-35 (配列番号 335); 4-15 (配列番号 336); 4-23、27-39、55-63 および 35-58 (配列番号 337); 6-26、28-54 および 28-47 (配列番号 338); 4-10、38-52、58-82 および 30-49 (配列番号 339); 4-22、29-35、44-50、53-68、70-80 および 20-33 (配列番号 340); 22-28、30-36 および 18-33 (配列番号 341); 4-11、13-21、25-30 および 20-30 (配列番号 342); 10-22 および 10-23 (配列番号 343); 4-11 および 9-20 (配列番号 344); 14-25、32-46 および 6-19 (配列番号 345); 5-30 および 14-33 (配列番号 346); 4-15、28-35、46-55、59-65、76-84 および 9-24 (配列番号 347); 27-33 および 5-19 (配列番号 348); 5-13 および 8-18 (配列番号 349); 9-22、24-34 および 21-40 (配列番号 350); 4-17、35-41、46-89、93-98 および 71-89 (配列番号 351); 4-12、14-24 および 2-17 (配列番号 352); 9-17 および 5-16 (配列番号 353); 7-41、48-58、63-75、80-89 および 43-53 (配列番号 354); 4-22、25-30 および 4-14 (配列番号 355); 4-55 および 18-33 (配列番号 356); 262-280 (配列番号 179); 131-146 (配列番号 186); 207-224 (配列番号 188); 27-50、203-217 および 313-325 (配列番号 189); 110-129 (配列番号 192); 156-179、174-197、192-215、210-233、228-251 および 246-267 (配列番号 190); 377-400 (配列番号 196); 34-43、234-257 および 350-367 (配列番号 203); 304-327 (配列番号 207); 25-48、43-66 および 61-82 (配列番号 222); 398-421、416-439、434-457、452-475、470-493、488-511、506-529、524-547、621-644、639-664、707-730、725-748、743-766、761-784、779-802、797-820、984-1007、1002-1025、1020-1043、1038-1061、1056-1079、1074-1097、1092-1115、1286-1309、1304-1327、1322-1345、1340-1363、1358-1381、1376-1399、1394-1417、1412-1435、1430-1453、1448-1471、1466-1489 および 1484-1507 (配列番号 226); 188-211、206-229、224-247、242-265、260-283 および 278-296 (配列番号 227); 56-79 および 122-132 (配列番号 229); 35-46 (配列番号 231); 178-201、196-219、214-237、232-255、250-273、268-291、379-402、397-420、415-438、433-456、451-474、642-665、660-683、678-701、696-719、714-737、732-755、750-773、768-791、899-922、917-940、935-958、1037-1060、1055-1078、1073-1096 および 1091-1114 (配列番号 232); 330-346 (配列番号 233); 571-594、589-612、607-630、625-648、643-666 および 661-684 (配列番号 242); 188-207 (配列番号 244); 61-84、308-331、326-349、344-367、362-385、380-403 および 398-421 (配列番号 249); 79-98、345-366、844-867、870-887 および 890-905 (配列番号 258); 94-109 (配列番号 268); 188-207 (配列番号 272); 290-306 (配列番号 276); 826-849 (配列番号 277); 228-252、247-270、265-288、283-306、301-324、955-978、973-996、991-1014、1009-1032、1027-1050、1045-1068、2533-2556、2551-2574、2569-2592、2587-2610、2605-2628 および 2623-2646 (配列番号 279); 86-109 および 104-127 (配列番号 288); 546-560 (配列番号 289); 260-271 (配列番号 290); 106-129、124-147、142-165、160-183、178-201 および 375-398 (配列番号 291); 284-307 (配列番号 292); 362-385 (配列番号 301)。

【0029】

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ピロリ菌過免疫血清反応性抗原またはその断片の生産方法を提供する。

【0030】

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、本発明によるピロリ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。

【0031】

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。

【0032】

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。

10

【0033】

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。

【0034】

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。

20

【0035】

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、特にピロリ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。

【0036】

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。

【0037】

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。

【0038】

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。

30

【0039】

さらに好ましい態様において、抗体はキメラ抗体である。

【0040】

より好ましい態様において、抗体はヒト化抗体である。

【0041】

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。

【0042】

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：

40

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。

【0043】

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、

50

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。

【0044】

上記方法によって提供または生産された抗体はピロリ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。

【0045】

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。

10

【0046】

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成したシグナルの存在または不在を検出する工程。

20

【0047】

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。

30

【0048】

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。

【0049】

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。

40

【0050】

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、特にピロリ菌感染症をインビトロで診断する方法も提供する。

【0051】

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。

50

【0052】

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。

【0053】

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。

【0054】

本発明は、複数のヒト血漿プールからの抗体の調製物およびピロリ菌のゲノム由来の表面発現ライブラリーを用いてピロリ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、本発明はピロリ菌抗原、ワクチン、診断および抗体の調製およびピロリ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。

【0055】

有効なワクチンは、すべての株によって発現され、ピロリ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(弱毒化または死んだ)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ピロリ菌の成分が排除でき、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。

【0056】

本発明に用いられたアプローチは、ピロリ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ピロリ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ビ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、特にピロリ菌による感染症の予防用ワクチンの有望な候補としておよび開発のためとしての有効かつ関連する網羅的セットのピロリ菌抗原を供給する。

【0057】

本発明による網羅的セットの抗原の同定の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を、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)でスクリーニングする。抗体プールはピロリ菌の抗原性化合物、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した血清収集物に由来する。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るもの: 正常な成人、臨床的に健康な人であって、非保因者であり、以前の攻撃を克服しているか、急性疾患および症状を有さない現在ピロリ菌保因者であるもの、2. 病原性生物の存在によって急性に誘導された抗体を備えるもの: 顕著な疾患(例えば、ピロリ菌胃炎、消化性潰瘍または胃癌)の患者。血清は、過免疫であると考えられ、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ために、多数のピロリ菌-特異的抗原と反応する必要がある。ヒト免疫系によってピロリ菌に対して作られ、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の発現とその免疫原性を示す。

【0058】

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、例えばピロリ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、FhuA)上にピロリ菌の(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。

【0059】

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、ピロリ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、ピロリ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

【0060】

ハイスループット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(原核発現系で発現できない場合)、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(> 50 非感染、> 100 患者血清)を用いてその免疫原性を評価する。

20

【0061】

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過免疫血清反応性抗原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。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。それゆえ、ある過免疫血清反応性抗原(またはその抗原性断片)の少なくとも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る認識は、同定工程における選択性を適切に付与する。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

【0062】

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(または組み合わせて)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。

40

【0063】

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、ピロリ菌(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IgA力価4,000Uを超え、特に6,000Uを超え、および/または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。

50

【0064】

ヒト免疫系によってヘリコバクターに対して産生され、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。直線状エピトープの抗体による認識は4-5 アミノ酸程度の短い配列に基づきうる。しかし、かかる短いペプチドが所与の抗体をインビボで誘導できるということ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、インビボで選択されたタンパク質に対する抗体を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。

【0065】

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、そして食作用の促進または補体媒介殺菌である。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、ヘリコバクター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およびタンパク質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。これらの血清は次いで以下のアッセイにおける試薬として第三ラウンドのスクリーニングに用いられる:様々な条件下で培養したヘリコバクターの細胞表面染色(FACS、顕微鏡観察)、中和能力(毒素、付着)の測定、およびオプソニン作用および食作用(インビトロ食作用アッセイ)の促進。

【0066】

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、関連するインビ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。

【0067】

ピロリ菌に対する宿主防御がどの程度自然免疫または適応免疫機構に依存しているかについては明らかではない。粘膜および胃の酸性環境はヘリコバクターによる侵入に対して恐るべき障壁である。しかし、いったん粘膜がこえらえると、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。これはピロリ菌の存在に応答した胃粘膜の大規模な好中球浸潤によって示される。ピロリ菌の付着は強い炎症性サイトカイン放出を誘導し、これには、顆粒球などの免疫-エフェクター細胞に対する局所走化性効果を媒介しうる TNF- α 、IL-1 および IL-8が含まれる{Prinz, C. et al., 2003}; {Sutton, P., 2001}。これら細胞は侵入する細菌の排除において要であると考えられる。ピロリ菌はもっぱら細胞外病原体であると考えられているので、主な抗-ヘリコバクター適応反応は免疫系の体液性の武器から生じ、これはピロリ菌感染症において患者において主に高力価のIgGおよびIgA抗体が生じることと一致していると考えられる{Prinz, C. et al., 2003}; {Sutton, P., 2001}。高力価 IgGおよび分泌IgA型抗体応答の誘導はこの生物に対する免疫応答における適応性機構の重要性を反映しているのかもしれない。原則として、これら抗体の効果は3つの主要な機構によって媒介されている: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、細菌は貪食され、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。アドヘン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。

【0068】

ワクチン接種による、オプソニンおよび中和型の高親和性抗体の誘導は、自然免疫系が細菌および毒素を排出するのを助ける。これによって本発明による方法はピロリ菌抗原性タンパク質の同定のために最適となる。本発明によって提供されるような抗原の選択はしたがって、動物モデルまたはヒトにおける感染に対する保護を導く抗原の同定に非常に適している。

【0069】

しかし、抗体は胃のヘリコバクターに対する免疫化により誘導される有効な免疫に必要なではないことを示す多くの証拠がある。実際、インビトロ研究により、定着しているピロリ菌集団のうち少しは上皮細胞に入っているであろうことが示され、これは、ピロリ菌は一般に、通常、侵入細菌に関連するTヘルパー1(Th1)型免疫応答を主に誘導するという事実と一致する。感染した動物およびヒトから単離した胃のT細胞はTNF- α およびIFN- γ を産生するがIL-4は産生せず、これはTh1-偏向(biased)応答に典型的である。この炎症促進性Th1応答は明らかに感染に対して有効ではない{Prinz, C. et al., 2003}; {Sutton, P., 2001}。現在のワクチン接種プロトコール、例えば、組換えUreBによる免疫化は、極性(polarized)Th2表現型に対する免疫応答を駆動しうる。ノックアウトマウスを用いた研究によるとウレアーゼによる免疫化は、Th2応答がない場合は可能であることが示された。それゆえ、強いTh1-偏向(biased)応答を誘導することが出来る新規抗原および好適なアジュバントを用いるワクチン開発は、ピロリ菌による疾患保護において有用である。

【0070】

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、ピロリ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1-178に示される)、また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(配列表の配列番号179-356に示される)に関する。

【0071】

本発明の好ましい態様において、配列番号3-4、16、19-21、28-29、33-38、41-42、44、48-52、55、57-58、61、63、65、67-68、72、74-75、81、84、91、94、96-97、101、105-108、112、115-117、119、123-178に示すヌ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3-4、16、19-21、28-29、33-38、41-42、44、48-52、55、57-58、61、63、65、67-68、72、74-75、81、84、91、94、96-97、101、105-108、112、115-117、119、123-178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3-4、16、19-21、28-29、33-38、41-42、44、48-52、55、57-58、61、63、65、67-68、72、74-75、81、84、91、94、96-97、101、105-108、112、115-117、119、123-178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。

【0072】

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の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もっとも大きい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・プログラム方法としては、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。

【0073】

本発明の別の態様によると、配列番号 8-10、13-15、17-18、24、27、32、39-40、45-47、56、59、62、69-70、73、77、79、82、85-86、88、90、103、109-110、114、121に示す核酸配列に対して少なくとも 96%の同一性を示す核酸分子が提供される。

【0074】

本発明のさらなる態様によると、配列番号 5、7、30-31、53、60、66、76、83、87、92、99、120に示す核酸配列と同一の核酸分子が提供される。

【0075】

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：

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。

【0076】

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

【0077】

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。

【0078】

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。

【0079】

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

10

20

30

40

50

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、多数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。

【0080】

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、本発明の用途の配列プロトコールにおいて、公表されたピロリ菌株26695およびJ99ゲノム(Nature、388: 539-547 (1997)、4658-4663; GenBank accession AE000511 および Nature、397: 176-180 (1999)、GenBank accession AE001439) および/またはその他の公表されたピロリ菌ゲノム配列またはその部分と比較して1以上またはより好ましくは2を超え、特に5を超える、非同一核酸残基を示すいずれかの配列のDNA配列の連続部分を含む核酸である。特に好ましい非同一核酸残基は、非同一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ピロリ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

10

20

【0081】

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。

【0082】

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、ピロリ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。

30

【0083】

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

40

50

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典型的な化学形態の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。

【0084】

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、それらにはピロリ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有る必要があり、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ピロリ菌断片を比較することによって簡単に決定される。

10

【0085】

さらに、修飾は、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。

【0086】

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、これはピロリ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よい。

20

【0087】

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。

30

【0088】

本発明はさらに、配列表に示す推定ピロリ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。

【0089】

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。配列表に示すピロリ菌配列を有する、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ピロリ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。

40

【0090】

50

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{Tourdou, 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。

【0091】

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ピロリ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。

10

【0092】

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。

【0093】

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。

20

【0094】

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。

【0095】

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。

30

【0096】

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。

【0097】

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。

40

【0098】

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

50

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。

【0099】

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できる。

【0100】

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ピロリ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。

10

【0101】

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、より好ましくはピロリ菌の存在または量に関連または連動する疾患の診断のためである。

【0102】

ピロリ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。ピロリ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。

20

【0103】

本発明はピロリ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のための当該技術分野に周知の方法のいずれかを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。

【0104】

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もよく、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。

30

40

【0105】

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ピロリ菌から単離してもよい。

【0106】

50

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 181-182、194、197-199、206-207、211-216、219-220、222、226-230、233、235-236、239、241、243、245-246、250、252-253、259、262、269、272、274-275、279、283-286、290、293-295、297、301-356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 186-188、191-193、195-196、202、205、210、217-218、223-225、234、237、240、247-248、251、255、257、260、263-264、266、268、281、287-288、292、299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 183、185、208-209、231、238、244、254、261、265、270、277、298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。

【0107】

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。

【0108】

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」、「誘導体」および「アナログ」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。

【0109】

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。

【0110】

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。さらにかかる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。

【0111】

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。

【0112】

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。

【0113】

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。

【0114】

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。

【0115】

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なくてもよく、それに融合しているわけでもなく、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。特に好ましいのはピロリ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。

【0116】

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。

【0117】

過免疫血清反応性抗原のかかる断片の好ましい例は、表1の列、「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」、表3の血清反応性エピトープのアミノ酸配列を含むペプチドからなる群から選択され、特に以下のアミノ酸を含むペプチド：63-91、95-101、110-116、134-148、150-156、158-164、188-193、197-209、226-241、247-254、291-297、312-319、338-346、351-358、366-378、404-410、420-438、448-454、465-473、482-488、490-498、503-510、512-519、531-543、547-554、568-575、589-604、610-631 および 239-308 (配列番号 179)；16-29、35-47、50-68、70-79、91-101、143-149、158-163、185-191、196-206、215-224、230-237、244-251、258-278、290-311、319-325、338-351、365-385、396-429、445-454、458-466、491-499、501-521、17-79 および 218-233 (配列番号 180)；4-10、16-41、46-66、77-84、91-97、102-118、125-144、187-200、202-214、245-253、255-261、286-295、300-330、335-342、350-361、363-381、385-392、396-416、435-450 および 460-470 (配列番号 181)；11-19、27-48、52-59、77-82、84-107、118-125、127-154、178-183、192-209、215-221、286-295、302-313、350-357、402-415、417-431、453-463、465-493 および 313-331 (配列番号 182)；19-26、30-43、47-55、63-68、72-80、97-104、107-119、129-146、160-175、194-216、231-251、254-260 および 26-43 (配列番号 183)；7-13、29-37、65-81、110-120、123-131、135-152、230-249、254-260、284-290、292-299、317-326、329-336、403-444、452-458、466-477、490-498、510-519、541-550、557-566 および 533-567 (配列番号 184)；5-47、71-77、79-86、89-95、120-126、137-144、176-181、184-196、202-208、211-232、236-282、301-313、317-325、341-347、353-384、394-400、412-433、436-443 および 59-75 (配列番号 185)；4-18、22-38、59-69、106-112、116-130、138-149、156-170、175-197、200-214、216-223、233-244、255-261、266-276、279-286、325-333、342-348、366-399、402-420、429-441、1-104 および 130-147 (配列番号 186)；50-58、69-95、97-113、131-136、157-163、170-175、188-212、220-226、254-259、265-277、283-289、297-308、311-318、347-358、360-369、378-401、416-421、440-450、454-462、470-476、493-502、506-514、536-567、585-590、598-607、613-618、653-659 および 35-46 (配列番号 187)；16-29、32-60、65-87、89-123、128-134、137-158、162-173、178-196、210-216、218-228 および 206-225 (配列番号 188)；10-20、26-35、51-64、86-91、94-100、113-122、154-160、185-191、193-201、211-217、225-230、237-246、251-257、298-304、306-312、316-328、340-348、357-389、391-397、415-421、449-456、458-471、488-495、502-511、24-55 および 236-341 (配列番号 189)；5-22、41-51、87-93、114-122、127-136、150-156、158-166、223-233、245-263、291-296、9-126 および 127-285 (配列番号 190)；30-43、46-56、61-70、72-83、85-93、103-113、119-125、151-166、179-191、212-218、225-231、236-243、262-267、291-307、331-344、349-355、366-372、380-386、414-422、428-447、459-464、469-478、507-519、525-544、563-569、576-590、620-626、633-643、654-659、665-671、684-707、717-723、725-733、747-779、782-801 および 347-361 (配列番号 191)；4-12、14-26、37-80、107-115、133-139、144-150、154-165、173-180、191-199、205-211、221-231、237-244、254-284、307-340、342-353、360-368、370-380、479-493、495-503、509-522、525-536、539-547、554-560、565-573、578-583、7-23 および 465-479 (配列番号 192)；4-17、47-55、76-83、85-100、104-112、117-123、126-135、142-148、156-167、174-182、267-273 および 258-283 (配列番号 193)；8-32、36-42、65-88、102-108、112-140、147-163、170-179、183-193 および 117-124 (配列番号 194)；12-18、45-50、62-77、82-95、99-113、115-123、125-147、155-177、187-209、211-223、244-253、259-270、278-297、302-307、311-318、329-334、350-356、359-365、390-400、402-413 および 333-350 (配列番号 195)；4-13、15-27、30-46、53-58、68-74、82-95、115-126、134-139、148-153、159-176、182-199、201-217、220-225、227-235、237-248、253-266、300-315、322-336、390-396、412-426、438-445、448-459、477-484、502-508、515-527、529-537、553-568、643-651、658-667、690-703 および 376-400 (配列番号 196)；4-10、24-32、38-55、59-67、70-77、80-87、89-97、123-129、134-151、166-172、178-189、191-216、218-235、245-259、271-3

15、326-339、341-360 および 73-94 (配列番号 197) ; 13-25、31-38、43-57、79-85、92-99、106-112、117-128、130-139、146-158、160-175、194-204、211-222、225-232、234-242、263-270、278-292、299-320、322-333 および 240-256 (配列番号 198) ; 4-17、55-63、66-101、109-131、135-143、145-151、155-161、164-170、177-185、192-198、213-218、223-238、246-256、258-268、273-283、309-314、322-328 および 195-221 (配列番号 199) ; 13-24、31-39、41-50、63-69、90-96、104-109、116-141、148-153、161-167、173-178、190-209、253-258、265-272、279-289、295-312、317-343、355-366、376-389、400-407、430-451、453-464、466-472、487-493、499-505、523-538、554-559、568-579、584-601 および 344-363 (配列番号 200) ; 5-22、30-36、53-59、61-70、82-92、99-106、120-131、135-148、154-167、169-183、187-199、204-212、231-247 および 111-249 (配列番号 201) ; 17-36、40-66、71-144、148-171、173-191、199-214、220-252、265-272、278-288、298-333、342-385 および 287-307 (配列番号 202) ; 4-16、22-28、30-36、42-48、95-116、154-162、164-174、239-252、258-263、273-285、306-313、323-333、341-357、363-369、372-379、395-401、430-436、438-453、464-480、33-44、233-258 および 349-369 (配列番号 203) ; 4-21、30-37、46-53、59-68、80-92、98-104、118-143、150-160、165-185、187-200、204-211、224-236、241-246、252-258、271-280、288-294、311-320、335-341 および 191-350 (配列番号 204) ; 4-16、37-59、64-70、79-87、93-102、107-127、143-165、172-188、197-204、207-218、221-227、242-248、258-277、289-296、298-316、332-338、344-365、367-373、375-382、400-408、415-425、438-446 および 235-250 (配列番号 205) ; 4-37、39-66、84-98、101-127、140-149、157-163、166-172、175-182、184-193、203-208、215-232、234-247、250-299、303-345 および 183-204 (配列番号 206) ; 10-20、41-61、73-87、112-141、176-192、194-201、205-222、230-237、257-264、276-282、284-310、312-318、330-337、349-357 および 304-328 (配列番号 207) ; 4-31、42-103、105-113、121-153、160-181、188-196、210-226、231-264、272-287、297-304、328-336 および 304-318 (配列番号 208) ; 21-43、46-52、54-70、72-79、94-107、133-141、160-166、217-253、311-317、359-365、374-381、390-395、434-440、488-494、497-502、511-522、554-563、565-574、577-585、591-598、601-606、617-625、633-643、658-664、676-682、694-702、710-719、754-760、782-788、802-808、916-921、942-948、955-964、973-979、992-998、1006-1011、1016-1023、1030-1038、1046-1053、1059-1066、1088-1098、1119-1126、1129-1135、1156-1171、1173-1181、1202-1210、1255-1261、1268-1280、1295-1310、1312-1320、1375-1381、1406-1417、1450-1471、1478-1492、1498-1506、1569-1578、1603-1608、1611-1624、1648-1655、1663-1670、1680-1698、1702-1707、1713-1719、1737-1742、1747-1753、1762-1769、1771-1785、1790-1804、1811-1818、1830-1836、1838-1852、1874-1886、1893-1899、1902-1909、1942-1948、1952-1962、1980-1986、2001-2017、2020-2028、2042-2050、2052-2068、2074-2079、2083-2095、2107-2113、2147-2155、2177-2194、2203-2211、2236-2241、2251-2258、2267-2274、2285-2292、2314-2328、2330-2340、2358-2365、2390-2401、2408-2418、2432-2453、2463-2476、2486-2507、2528-2537、2540-2548、2552-2558、2568-2576、2596-2601、2610-2622、2629-2638、2653-2669、2718-2727、2749-2767、2777-2784、2789-2795、2806-2815、2817-2824、2835-2843、2847-2854、2860-2881、511-523、612-630 および 1790-1803 (配列番号 209) ; 4-54、61-68、72-82、86-93、100-108、115-130、147-154、187-194、196-207、224-229、236-251、275-287 および 96-109 (配列番号 210) ; 31-39、62-69、91-101、158-172、175-180、186-193、201-208、210-223、243-250、273-286、293-299、319-325、343-354、356-365、368-384、414-435、471-491、512-518、550-556、567-581、584-589、633-639、680-692、697-708、716-721、747-754、779-786、810-816 および 366-503 (配列番号 211) ; 5-20、22-48、57-65、96-101、111-122、130-145、154-164、170-181、193-199、201-216、224-241、244-262、281-323、342-351、359-367、369-396、406-416、424-433、450-456、485-491、493-499、501-515、517-535 および 289-305 (配列番号 212) ; 4-17、22-44、53-60、66-83、87-94、101-106、110-116、131-137、148-183、189-207、209-215、233-242、251-262、264-27

10

20

30

40

50

2、290-296、308-327、359-373、375-380、397-405、415-420、426-433、444-475、478-484、529-536、548-558 および 106-126 (配列番号 213) ; 4-38、42-50、58-64、72-81、92-118、140-146、157-165、172-192、198-204、208-216、227-234、238-258、271-278、288-293、311-322、327-346、357-370、375-383、395-409、411-417、425-432、436-445、109-129 および 370-380 (配列番号 214) ; 23-30、36-49、52-64、86-94、97-104、121-129、257-272、279-286、288-294、307-327、334-340、369-375、377-386、406-412、418-423、430-438、441-447、459-465、469-476、482-488、510-546、550-580、584-622、638-645、653-659、675-683、692-705、723-731、752-761、788-795 および 54-72 (配列番号 215) ; 11-33、36-46、88-104、116-126、134-170、189-195、199-217、225-250、255-261、266-273、280-291、296-313、334-341、343-349、354-360、362-369、373-380、387-401、406-420 および 259-273 (配列番号 216) ; 9-14、28-44、57-64、72-79、86-93、104-111、116-126、142-150、159-164 および 61-86 (配列番号 217) ; 10-17、26-33、43-61、69-95、101-107、109-125、129-135、137-144、147-153、158-169、177-187、209-219、221-232、235-247、261-268、271-282、296-302、306-347、355-362、364-379、386-399、409-418、424-442、451-460、467-479、490-498 および 60-74 (配列番号 218) ; 8-14、20-31、65-84、94-99、154-179、193-207、238-253 および 96-118 (配列番号 219) ; 4-24、30-44、47-62、84-93、108-116、124-133、136-141、201-209、217-223、228-235、238-245、247-270、275-285、290-314、328-338、342-349、353-365、375-383、386-392、394-402、417-427、443-459、465-481、492-514、516-524、550-566、602-617、630-639、666-676、687-693、719-730、747-753、783-790、799-816、824-831、837-842 および 167-189 (配列番号 220) ; 6-15、18-28、58-66、84-101、106-129、136-151、154-165、182-203、205-211、214-220、222-228、233-240、251-260、270-277、284-291、306-315、322-328、363-369、378-388、392-405、443-452、495-501、512-523、574-583 および 362-375 (配列番号 221) ; 5-25、27-34、47-59、64-70、76-86、145-158、166-183、189-202、217-231、235-242、260-270、278-309 および 1-102 (配列番号 222) ; 4-19、24-76、78-83、90-99、102-109、114-122、137-147、154-174、177-188、203-212、217-223、227-239 および 226-325 (配列番号 223) ; 7-37、71-90、94-109、117-128、141-153、179-192、199-206、225-231、237-243、258-264 および 40-51 (配列番号 224) ; 13

-19、25-30、46-59、75-91、101-107、114-124、129-135、137-145、160-167、171-179、187-194、209-215、217-222、229-239、243-249、257-265、269-275、299-308、310-327 および 282-300 (配列番号 225) ; 86-100、216-230、342-369、382-388、424-430、438-445、452-458、488-494、501-518、554-560、568-574、584-592、603-609、611-629、639-645、652-661、669-699、708-714、726-738、747-753、763-775、785-791、794-807、815-824、826-845、854-860、863-868、870-883、892-898、901-906、909-921、930-937、946-959、968-974、977-990、998-1007、1009-1027、1037-1043、1046-1051、1053-1066、1075-1081、1084-1089、1092-1103、1113-1119、1122-1135、1143-1152、1154-1172、1182-1188、1191-1196、1200-1210、1220-1226、1229-1235、1237-1249、1259-1265、1268-1281、1289-1298、1305-1318、1328-1334、1337-1343、1345-1357、1367-1373、1390-1396、1405-1411、1418-1423、1426-1435、1445-1455、1474-1483、1493-1500、1505-1512、1517-1524、1538-1544、1568-1578、1595-1601、1674-1682、1687-1720、1728-1736、1738-1744、1754-1761、1764-1774、1798-1824、1836-1842、1886-1893、1895-1903、366-781、782-1518 および 1731-1747 (配列番号 226) ; 4-17、20-39、46-55、60-66、102-110、114-122、125-131、161-167、172-178、185-190、195-202、218-232、236-252、264-291、293-302、309-315、324-339 および 169-381 (配列番号 227) ; 5-10、13-40、42-53、69-75、83-89、120-135、150-161、174-190、203-225、229-247、257-287、318-348 および 30-200 (配列番号 228) ; 7-19、43-53、64-72、124-139、52-84 および 120-131 (配列番号 229) ; 12-19、39-48、58-100、117-123、154-162、164-187、189-195、202-216、218-235、241-246、262-278、315-328、333-347、354-366、372-379、391-405、422-429、431-442、444-450、458-466、478-485、494-501、504-510、520-535、573-580

、 589-598、 615-625、 666-676、 686-698、 722-729、 737-746、 756-767、 787-796、 805-816、 824-829、 833-848、 856-864、 866-876、 879-886、 898-904、 918-924、 927-934、 941-960、 967-978 および 561-575 (配列番号 230) ; 11-29、 49-55、 70-77、 84-100、 102-112、 148-155、 160-177、 181-204 および 1-104 (配列番号 231) ; 27-44、 64-71、 122-133、 151-156、 164-178、 214-220、 226-232、 235-244、 253-262、 282-288、 294-310、 317-325、 350-356、 362-368、 376-383、 438-443、 449-454、 459-464、 492-498、 500-511、 529-535、 538-546、 567-573、 597-603、 660-665、 674-679、 724-734、 763-769、 773-784、 791-801、 807-815、 821-826、 840-848、 863-868、 897-902、 908-928、 932-953、 956-975、 980-987、 990-996、 1012-1018、 1042-1063、 1095-1116、 1149-1157、 1160-1167、 110-357、 358-501 および 502-1161 (配列番号 232) ; 4-21、 64-71、 73-84、 128-138、 144-162、 203-217、 240-263、 288-298、 300-308、 310-317、 325-351、 369-380、 391-411 および 330-345 (配列番号 233) ; 5-11、 25-31、 39-48、 51-79、 89-98、 100-122、 135-148、 166-201、 203-227、 230-250、 254-260、 266-272、 274-282、 299-305、 328-337 および 31-45 (配列番号 234) ; 12-23、 29-48、 51-60、 66-72、 75-81、 83-93、 103-115、 133-148、 168-174、 195-204、 222-229、 231-240、 242-251、 270-280、 286-305、 322-344、 349-360、 364-370、 378-400、 421-441、 448-484、 486-493、 495-501、 504-534、 547-561、 567-590、 597-607、 621-635、 643-649、 658-685、 688-694、 702-711、 717-731、 737-742、 759-765、 767-772、 776-786、 803-809、 815-825、 854-908、 910-919、 923-930、 942-948、 961-975、 994-1014 および 915-940 (配列番号 235) ; 4-9、 32-47、 51-61、 75-96、 139-191 および 1-124 (配列番号 236) ; 4-13、 17-38、 43-49、 55-76、 88-95、 110-121、 128-146、 151-157、 162-214、 222-240、 243-249、 251-273、 275-281、 292-298、 300-309、 312-320、 322-331、 355-369、 376-408、 446-460、 471-482、 485-509 および 191-203 (配列番号 237) ; 4-21、 72-82、 89-103、 106-115、 118-124、 140-146、 174-184、 191-200、 204-213、 218-224、 261-266、 282-293、 299-309、 311-340、 342-358、 362-372、 381-389、 391-402、 413-421、 438-447、 457-464、 470-478、 501-507、 545-560、 578-624、 631-641、 658-670、 680-689、 717-738、 753-759、 795-805、 816-822、 830-838、 842-848、 869-881、 892-898、 33-51 および 818-835 (配列番号 238) ; 4-21、 79-85、 156-177、 183-188、 206-214、 243-249、 261-269、 287-292、 315-322、 334-345、 360-366、 374-390、 402-411、 37-97 および 260-399 (配列番号 239) ; 4-9、 19-54、 58-78、 97-104、 111-120、 126-134、 137-145、 163-173、 178-188、 193-203、 211-224、 246-286、 288-324、 337-346、 355-362、 374-390、 392-398、 409-417 および 240-249 (配列番号 240) ; 5-12、 14-31、 35-41、 43-61、 82-92、 97-105、 134-145、 155-166、 184-203、 215-223、 225-251、 272-279、 281-306、 310-345、 358-418、 435-473、 482-490、 525-532、 538-547、 549-563、 578-604、 613-639 および 144-154 (配列番号 241) ; 53-59、 64-72、 74-100、 133-152、 154-172、 176-181、 207-214、 225-238、 275-297、 304-310、 331-340、 362-367、 384-395、 403-410、 437-443、 448-456、 482-490、 579-597、 602-610、 625-630、 633-651、 699-707、 709-715、 734-743、 750-762 および 544-685 (配列番号 242) ; 12-18、 22-40、 45-83、 89-97、 103-109、 147-153、 159-173、 195-204、 210-219、 243-253、 259-265、 273-282、 303-309、 315-325、 332-340、 346-358、 362-367、 377-390、 393-402、 418-426、 447-455、 467-480、 505-512、 514-525、 548-561、 566-576、 584-596、 619-626、 638-645、 649-659、 661-680、 699-708、 714-720、 753-759、 766-772、 775-781、 801-808、 202-218、 282-299、 339-350 および 617-628 (配列番号 243) ; 5-33、 52-62、 87-101、 111-135、 137-143、 145-152、 190-202、 209-221、 233-245、 253-270 および 151-215 (配列番号 244) ; 19-29、 32-39、 42-48、 75-94、 124-135、 137-145、 152-160、 176-182、 193-203、 215-236、 266-273、 275-291、 297-306、 311-319、 322-342、 348-360、 369-378、 394-401 および 48-64 (配列番号 245) ; 4-11、 13-33、 36-43、 53-63、 65-80、 112-129、 134-141、 143-155、 157-168、 178-188、 191-199、 201-207、 215-229、 242-255、 263-270、 283-315、 320-329、 333-338、 340-349、 412-426、 465-478、 485-490、 498-512、 540-554 および 390-516 (配列番号 246) ; 4-18、 23-32、 41-47、 54-70、 88-99、 104-111、 118-138、 143-148、 150-162、 168-175、 181-188、 203-211、 214-220、 227-245、 251-268、 275-281、 287-296、

323-333 および 1-90 (配列番号 247); 8-34、38-49、72-83、85-91、94-104、112-125、134-142、148-168、181-189、191-198、202-214、222-233、242-254、256-262、273-278、287-294、314-325 および 141-159 (配列番号 248); 4-24、30-36、47-75、82-105、124-134、151-157、192-202、208-214、219-226、234-247、285-290、318-324、332-340、343-349、380-386、453-462、472-478、484-501、531-540、550-557、604-612、620-625、642-648、652-671、64-84、93-180 および 181-446 (配列番号 249); 12-18、24-32、68-75、77-83、96-101、109-116、129-136、152-164、175-184、190-199、206-215、224-233、241-250、258-264、273-292、302-312、319-331、334-346、348-368、387-395、408-416、420-429、437-452 および 364-374 (配列番号 250); 11-28、36-52、60-67、74-79、108-116 および 61-76 (配列番号 251); 20-27、38-49、69-74、84-107、138-145、161-168、179-195、210-226、228-252、267-281、283-296、305-311、333-340、342-356、361-372、380-399、401-414、458-466、475-481、492-507、515-520 および 146-160 (配列番号 252); 43-61、68-74、76-90、120-128、130-149、156-161、164-182、206-234、242-252、269-274、291-304、332-345、349-355、360-371、374-388、434-440、447-453、459-465、469-496、504-522 および 261-285 (配列番号 253); 4-17、24-30、37-49、87-98、118-124、126-136、144-171、176-188、206-214、216-228、233-240、246-252、262-271、277-297、307-330、333-342、346-352、355-361、368-386、391-400、413-420、474-480 および 401-427 (配列番号 254); 15-26、31-46、51-72、80-93、96-109、131-137、150-158、179-185、189-209、211-219、221-234、241-247、255-262、265-271、283-288 および 173-190 (配列番号 255); 28-37、39-45、51-58、77-84、89-97、132-148、171-180、199-205、212-218、220-226、257-265、273-300、307-327、334-340、344-365、385-390、402-408、426-436、450-468、476-485 および 425-497 (配列番号 256); 4-25、70-76、80-88、90-100、120-128、162-169、183-203、261-277、279-289、291-297、302-308、321-327、339-353、358-377、392-401、404-410、414-422、443-450、456-461、470-488、490-497、510-535、570-611、618-630、639-647、649-660、668-690、702-716、718-724、737-747、750-764 および 497-509 (配列番号 257); 12-48、50-64、99-108、216-223、235-241、244-254、262-274、287-293、310-316、320-326、361-366、377-383、390-395、408-414、418-425、438-444、462-469、494-505、524-530、536-547、551-566、592-598、601-613、678-685、687-695、709-717、727-737、751-757、760-765、772-778、782-788、801-807、822-830、859-868、870-878、884-890、898-903、909-919、953-969、973-980、990-1000、1002-1019、1041-1047、1059-1065、1090-1095、1116-1127、1130-1139、1143-1149、1151-1168、1178-1183、1188-1195、1197-1209、1213-1220、1226-1234、1236-1247、1255-1274、1276-1282、76-100、270-284、309-438、493-505、786-942 および 947-967 (配列番号 258); 4-9、24-34、46-95、97-109、119-130 および 138-156 (配列番号 259); 9-26、28-35、43-53、55-68、83-92、99-105、110-135、139-149、157-162、164-170、173-183、193-208、210-230、239-245、253-259、263-271、293-305、310-320、322-331、336-343、351-364、367-376、92-107 および 154-173 (配列番号 260); 19-39、52-62、108-117、145-152、160-168、194-203、229-240、252-268、280-287、308-316、333-339、383-390、403-412、414-424、438-445、464-472、479-484、489-505、510-526 および 247-260 (配列番号 261); 5-17、25-52、60-77、105-113、118-125、162-167、228-234、272-279、328-334、341-357、381-395、400-406、512-518、557-569、586-592、645-651、690-695、701-709、720-726、733-743、751-758、781-786、879-886、929-934、939-944、952-960、965-975、994-1001、1039-1045、1102-1109、1164-1181、1198-1206、1223-1229、1253-1259、1283-1292、1312-1317、1339-1349、1360-1370、1389-1398、1400-1412、1452-1465、1470-1484、1490-1497、1519-1525、1554-1564、1578-1591、1623-1636、1638-1646、1669-1679、1685-1697、1704-1711、1713-1720、1730-1736、1738-1749、1756-1764、1778-1786、1796-1803、1817-1826、1849-1866、1975-1993、2017-2032、2044-2053、2070-2086、2091-2109、2116-2127、2156-2167、2182-2188、2197-2202、2244-2252、2281-2287、2290-2307、2350-2361、2383-2404、2425-2433、2445-2455、2495-2505 および 394-549 (配列番号 262); 9-24、31

-53、57-67、69-79、84-114、133-141、144-172、178-186 および 13-46 (配列番号 263) ; 4-25、27-35、43-52、59-70、79-91、115-130、136-152、154-163、170-179 および 1-58 (配列番号 264) ; 4-30、49-55、71-80、96-105、111-126、139-146、149-162、239-245、279-285、290-296、300-307、331-337、343-350 および 250-351 (配列番号 265) ; 9-27、34-41、43-51、92-111、114-120、123-131、139-150、156-171、176-186、188-204、229-241、252-258、266-279、288-297、319-334、338-348、373-379、389-398、431-439、479-484 および 214-398 (配列番号 266) ; 4-15、18-27、47-52、68-83、91-97、104-110、115-12

1、139-147、157-164、198-206、227-236、241-254、264-273、278-289、311-320、353-361、372-383、405-420、426-434 および 232-386 (配列番号 267) ; 4-10、24-34、91-97、129-141、156-163、184-190、205-219、229-235、256-273、278-285 および 93-116 (配列番号 268) ; 7-29、35-54、71-83、85-91、104-111、122-134、138-144、146-154、158-174、177-183、186-201、207-215、223-235、240-247、262-273、275-283、287-292 および 48-66 (配列番号 269) ; 7-27、31-47、49-70、75-102、110-149、157-171、217-223、235-251、294-302、358-364、367-375、387-393、395-412、423-430、441-451、456-470、472-486、488-495、499-509、515-529、536-549、556-570、574-603、607-615、625-633、642-658、670-676、683-702、708-716、720-726、747-756、763-784、803-812、815-826 および 475-490 (配列番号 270) ; 7-22、30-38、53-59、64-75、83-95、97-112、120-131、133-142、145-151、154-166、172-180、189-203、227-238、277-287、9-156 および 174-287 (配列番号 271) ; 13-23、25-32、111-117、150-164、185-193、207-212、216-224、230-236、263-272、304-311、342-348、374-385、391-407、444-458、480-487、489-499、523-542、544-558、572-579、620-640、686-696、703-710、742-755、765-772、817-822、830-837、865-872、931-937 および 66-86 (配列番号 272) ; 4-27、49-56、62-70、86-92、121-127、151-163、170-182、195-202、212-226、237-243 および 234-254 (配列番号 273) ; 4-10、13-24、39-51、62-78、92-104、107-117、134-141、156-161、166-181、210-216、222-229、256-266、273-280、297-304、313-330、336-349、371-376、433-439、443-448、488-493、506-515、527-534、560-572、575-583、587-593 および 252-483 (配列番号 274) ; 4-15、21-38、45-56、81-95、102-108、118-130、133-147、152-162、166-171、199-204、211-218、230-240、253-261、274-283、288-294、312-317、325-336、344-357、391-414 および 24-146 (配列番号 275) ; 26-31、38-56、65-82、90-101、112-119、123-153、175-188、197-216、234-242、249-265、273-286、290-305、327-335、338-346、361-372、394-404 および 290-306 (配列番号 276) ; 17-26、43-48、50-73、81-93、95-107、139-146、158-168、171-176、190-196、202-212、216-223、243-266、274-282、308-313、324-330、344-378、380-387、403-422、427-443、448-455、457-465、491-515、517-528、553-567、589-599、610-617、642-648、670-697、709-717、726-743、745-759、769-803、807-823、840-849 および 820-851 (配列番号 277) ; 4-18、39-48、53-63、66-90、102-117、125-134、137-145、156-162、169-197、26-40 および 56-80 (配列番号 278) ; 21-33、36-42、49-60、68-76、91-105、123-130、141-161、169-178、185-190、192-199、205-214、223-233、239-247、260-269、284-293、300-314、324-352、357-364、373-382、389-403、420-432、438-446、466-471、477-484、503-509、549-556、558-576、600-623、625-635、654-661、663-669、671-687、702-716、735-741、744-750、757-766、776-786、807-815、824-832、854-860、863-897、909-915、920-946、952-959、982-997、1024-1038、1049-1055、1071-1085、1104-1113、1121-1132、1138-1150、1187-1196、1212-1221、1227-1236、1257-1262、1264-1278、1282-1294、1307-1318、1353-1370、1382-1388、1396-1409、1434-1440、1446-1454、1465-1478、1485-1513、1516-1529、1540-1545、1563-1568、1575-1593、1607-1616、1628-1645、1648-1661、1676-1682、1689-1697、1713-1719、1739-1749、1753-1758、1763-1774、1797-1803、1807-1846、1855-1874、1877-1891、1893-1907、1912-1925、1931-1943、1955-1965、1976-1990、2032-2043、2045-2051、2099-2105、2131-2138、2161-2179、2188-2199、2205-2216、2219-2227、2235-2245、2247-2267、2277-2288、2294-2304、2314-2326

、 2346-2358、 2365-2377、 2383-2402、 2407-2423、 2437-2450、 2454-2473、 2489-2497、 2525-2531、 2557-2570、 2580-2587、 2589-2599、 2621-2641、 2647-2653、 2661-2677、 2685-2690、 2697-2717、 2722-2733、 2739-2777、 2786-2793、 2801-2808、 2811-2822、 2825-2835、 2838-2845、 2859-2871、 2877-2883、 213-344、 954-1080 および 2524-2733 (配列番号 279) ; 10-16、 18-23、 28-41、 63-69、 77-91、 101-109、 118-136、 146-153、 155-162、 168-179、 192-207、 217-226、 229-235、 239-254、 279-286、 294-307、 313-319、 334-341、 344-353、 363-377、 390-396 および 178-328 (配列番号 280) ; 18-42、 68-84、 89-95、 100-105、 107-115、 125-135、 154-177、 189-195、 205-228、 236-243、 252-259、 279-300、 309-316、 323-331、 340-351、 353-364、 377-402 および 85-97 (配列番号 281) ; 4-18、 26-32、 66-76、 100-126、 151-159、 178-186、 188-194、 200-210、 241-248、 253-259、 262-279、 284-291、 307-313、 315-322、 327-337、 376-386、 399-407、 432-441、 467-473、 487-497、 499-505、 543-549、 560-568、 585-593、 598-604、 608-614、 630-642、 647-653、 690-703、 717-730、 21-200 および 468-480 (配列番号 282) ; 17-49、 52-58、 62-73、 78-97、 100-117、 122-172、 185-190、 193-217、 225-236 および 33-42 (配列番号 283) ; 7-39、 50-58、 73-89、 96-107、 109-120、 126-142、 152-170、 178-202、 205-211、 224-244、 249-259、 261-270、 300-310、 312-325 および 158-169 (配列番号 284) ; 4-31、 40-64、 71-82、 85-92、 102-124、 126-139、 147-152、 159-173、 176-188、 195-207、 210-216、 234-241、 249-256、 258-276、 279-293、 296-302、 310-315、 349-356、 363-378、 380-403、 411-426、 435-441、 448-459、 463-476、 488-494 および 201-221 (配列番号 285) ; 5-13、 15-74、 87-104、 107-120、 123-129、 136-145、 150-191、 193-206、 227-248、 250-264、 278-302、 304-323、 332-378、 384-407、 409-419、 425-457、 462-471、 474-497、 511-545、 555-564、 571-578、 585-598、 640-647、 669-675、 682-691、 693-705、 729-743、 752-761、 772-780、 786-804、 808-818、 822-846、 858-880、 884-900、 910-939、 941-947、 962-971、 973-988、 998-1003、 1007-1027 および 236-259 (配列番号 286) ; 4-19、 27-68、 81-111、 121-160 および 60-79 (配列番号 287) ; 4-37、 40-46、 52-57、 199-205、 222-229、 236-244、 250-267、 269-282 および 27-197 (配列番号 288) ; 4-16、 24-30、 32-38、 63-75、 86-92、 98-111、 113-126、 160-165、 170-180、 198-204、 227-233、 239-245、 253-273、 308-314、 352-365、 382-387、 395-403、 423-429、 472-482、 484-493、 501-507、 518-526、 536-541、 543-550、 556-562、 586-600、 626-633、 649-661、 680-688 および 546-559 (配列番号 289) ; 16-33、 48-59、 63-71、 77-92、 94-109、 117-124、 139-151、 169-181、 184-227、 233-249、 251-261、 263-275、 282-294、 297-321、 326-332、 341-355、 383-399 および 258-272 (配列番号 290) ; 11-26、 31-39、 43-52、 55-62、 64-70、 80-94、 123-133、 135-141、 172-181、 185-206、 209-218、 224-230、 238-244、 251-262、 264-271、 290-301、 306-324、 333-340、 350-357、 367-375、 390-397、 434-441、 443-448、 77-226 および 350-429 (配列番号 291) ; 4-13、 22-27、 31-45、 50-59、 72-96、 99-114、 131-141、 143-150、 159-176、 180-186、 189-198、 208-214、 234-253、 271-287、 294-299、 310-366、 382-390、 398-416、 424-443 および 283-305 (配列番号 292) ; 9-26、 30-53、 62-72、 86-95、 112-122、 136-145、 153-160、 209-221、 227-237、 241-268、 281-288、 291-298、 308-314、 321-328、 336-346、 351-379、 388-397、 409-416、 423-433、 443-481、 511-519 および 213-232 (配列番号 293) ; 12-18、 25-31、 38-50、 59-67、 71-82、 96-126 および 76-88 (配列番号 294) ; 4-25、 39-44、 64-71、 74-88、 100-113、 128-138、 151-162、 164-177、 185-190、 204-213、 233-239、 246-254、 281-286、 293-306、 309-318、 333-347、 349-359、 385-398、 404-423、 458-465、 477-484、 490-499、 501-533、 554-566、 582-590、 596-616、 624-629、 631-639、 654-680、 694-720、 735-743 および 2-100 (配列番号 295) ; 4-16、 36-41、 52-75、 98-107、 109-117、 122-128、 133-139、 141-155、 159-165、 169-182、 187-193、 195-201、 211-224、 230-236、 247-269、 278-290 および 75-92 (配列番号 296) ; 7-21、 25-33、 37-43、 87-94、 103-120、 131-147、 168-174、 197-203、 207-212、 227-237、 247-257、 263-271、 279-287、 298-306、 320-325、 332-340、 363-374、 379-384、 390-401、 403-414、 428-433、 448-457、 462-475、 483-490、 513-519、 525-535、 543-554、 559-566、 571-620、 625-631、 636-64

2、659-670、688-706、708-723、770-779、787-793、796-807、820-840、848-854、863-874、895-905、912-919、934-942、968-975、983-1000、1012-1019、1026-1036、1050-1060、1064-1070、1081-1091、1094-1108、1112-1118、1140-1152、1164-1169、1172-1180、1187-1192 および 732-748 (配列番号 297) ; 23-40、42-59、66-73、78-97、111-128、130-141、157-166、178-183 および 53-71 (配列番号 298) ; 4-27、38-44、47-57、59-85、99-106、114-121、154-166、181-186、193-198、238-244、253-262、272-278、287-299、314-320、338-350、358-368、382-388、407-416、433-446、456-461、463-473 および 86-195 (配列番号 299) ; 5-24、38-59、64-80、87-99、105-126、134-142、149-163、165-179、181-202、205-220、227-233、243-250、257-263 および 87-245 (配列番号 300) ; 5-32、47-53、66-79、81-97、115-151、155-174、183-188、196-210、215-226、230-238、253-258、263-270、276-282、295-301、304-325、334-344、360-390、397-412、425-432、434-462、478-494、508-526、539-564、571-579、347-371 および 375-386 (配列番号 301) ; 4-15、36-44、49-56、60-66、68-82、84-103、109-115、118-141、147-154、160-168、176-185 および 26-39 (配列番号 302) ; 7-13、23-33 および 13-21 (配列番号 303) ; 2-10 (配列番号 304) ; 4-9、12-18、35-42、49-62 および 6-18 (配列番号 305) ; 19-25 および 1-13 (配列番号 306) ; 15-21、27-45 および 12-25 (配列番号 307) ; 14-20 および 1-14 (配列番号 308) ; 4-18 および 13-26 (配列番号 309) ; 8-21 および 2-20 (配列番号 310) ; 4-14 および 4-16 (配列番号 311) ; 3-12 (配列番号 312) ; 6-14、6-25、35-57 および 2-14 (配列番号 313) ; 6-25、35-57 および 17-31 (配列番号 314) ; 14-25、32-46 および 5-19 (配列番号 315) ; 18-31 および 5-16 (配列番号 316) ; 19-24 および 4-26 (配列番号 317) ; 13-21、29-34、47-58、61-73 および 36-47 (配列番号 318) ; 4-15 および 5-24 (配列番号 319) ; 6-18 (配列番号 320) ; 13-20 および 4-13 (配列番号 321) ; 15-23 (配列番号 322) ; 4-9 および 7-21 (配列番号 323) ; 1-10 (配列番号 324) ; 4-14 (配列番号 325) ; 4-17、35-41、46-89、93-98 および 70-88 (配列番号 326) ; 1-13 (配列番号 327) ; 4-16、26-32 および 25-38 (配列番号 328) ; 8-15、23-28 および 4-17 (配列番号 329) ; 4-12 および 1-15 (配列番号 330) ; 4-29、31-42、52-58 および 6-16 (配列番号 331) ; 4-9、24-32 および 9-19 (配列番号 332) ; 4-12、18-27 および 5-18 (配列番号 333) ; 4-11、37-56、58-92 および 18-29 (配列番号 334) ; 8-28 および 20-35 (配列番号 335) ; 4-15 (配列番号 336) ; 4-23、27-39、55-63 および 35-58 (配列番号 337) ; 6-26、28-54 および 28-47 (配列番号 338) ; 4-10、38-52、58-82 および 30-49 (配列番号 339) ; 4-22、29-35、44-50、53-68、70-80 および 20-33 (配列番号 340) ; 22-28、30-36 および 18-33 (配列番号 341) ; 4-11、13-21、25-30 および 20-30 (配列番号 342) ; 10-22 および 10-23 (配列番号 343) ; 4-11 および 9-20 (配列番号 344) ; 14-25、32-46 および 6-19 (配列番号 345) ; 5-30 および 14-33 (配列番号 346) ; 4-15、28-35、46-55、59-65、76-84 および 9-24 (配列番号 347) ; 27-33 および 5-19 (配列番号 348) ; 5-13 および 8-18 (配列番号 349) ; 9-22、24-34 および 21-40 (配列番号 350) ; 4-17、35-41、46-89、93-98 および 71-89 (配列番号 351) ; 4-12、14-24 および 2-17 (配列番号 352) ; 9-17 および 5-16 (配列番号 353) ; 7-41、48-58、63-75、80-89 および 43-53 (配列番号 354) ; 4-22、25-30 および 4-14 (配列番号 355) ; 4-55 および 18-33 (配列番号 356) ; ; 262-280 (配列番号 179) ; 131-146 (配列番号 186) ; 207-224 (配列番号 188) ; 27-50、203-217 および 313-325 (配列番号 189) ; 110-129 (配列番号 192) ; 156-179、174-197、192-215、210-233、228-251 および 246-267 (配列番号 190) ; 377-400 (配列番号 196) ; 34-43、234-257 および 350-367 (配列番号 203) ; 304-327 (配列番号 207) ; 25-48、43-66 および 61-82 (配列番号 222) ; 398-421、416-439、434-457、452-475、470-493、488-511、506-529、524-547、621-644、639-664、707-730、725-748、743-766、761-784、779-802、797-820、984-1007、1002-1025、1020-1043、1038-1061、1056-1079、1074-1097、1092-1115、1286-1309、1304-1327、1322-1345、1340-1363、1358-1381、1376-1399、1394-1417、1412

10

20

30

40

50

-1435、1430-1453、1448-1471、1466-1489 および 1484-1507 (配列番号 226); 188-211、206-229、224-247、242-265、260-283 および 278-296 (配列番号 227); 56-79 および 122-132 (配列番号 229); 35-46 (配列番号 231); 178-201、196-219、214-237、232-255、250-273、268-291、379-402、397-420、415-438、433-456、451-474、642-665、660-683、678-701、696-719、714-737、732-755、750-773、768-791、899-922、917-940、935-958、1037-1060、1055-1078、1073-1096 および 1091-1114 (配列番号 232); 330-346 (配列番号 233); 571-594、589-612、607-630、625-648、643-666 および 661-684 (配列番号 242); 188-207 (配列番号 244); 61-84、308-331、326-349、344-367、362-385、380-403 および 398-421 (配列番号 249); 79-98、345-366、844-867、870-887 および 890-905 (配列番号 258); 94-109 (配列番号 268); 188-207 (配列番号 272); 290-306 (配列番号 276); 826-849 (配列番号 277); 228-252、247-270、265-288、283-306、301-324、955-978、973-996、991-1014、1009-1032、1027-1050、1045-1068、2533-2556、2551-2574、2569-2592、2587-2610、2605-2628 および 2623-2646 (配列番号 279); 86-109 および 104-127 (配列番号 288); 546-560 (配列番号 289); 260-271 (配列番号 290); 106-129、124-147、142-165、160-183、178-201 および 375-398 (配列番号 291); 284-307 (配列番号 292); 362-385 (配列番号 301)、および、該配列の少なくとも 6、好ましくは 8 より長い、特に 10 より長いアミノ酸を含む断片である。これら断片はすべて個々にそしてそれぞれが独立して本発明の好適な態様を形成する。

【0118】

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。

【0119】

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。

【0120】

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。

【0121】

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。

【0122】

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、例えば連鎖球菌、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 ショウジョウバエ 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。

10

【0123】

本発明はまた、ピロリ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。本発明はさらにピロリ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。

20

【0124】

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クリーン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。

30

【0125】

ピロリ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。

40

【0126】

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。

【0127】

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

50

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、グラム陰性細菌、特にヘリコバクター、カンピロバクターおよびアルコバクター (*Archaeobacter*) 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連関する疾患の診断のためである。より好ましくは、微生物はヘリコバクター・シナエディ (*Helicobacter cinaedi*) およびヘリコバクター・ファナリアエ (*Helicobacter fannelliae*) を含む群から選択され、特に微生物はピロリ菌である。

【0128】

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。

【0129】

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 cm² 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。

【0130】

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。

【0131】

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。

【0132】

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。

10

【0133】

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)。

【0134】

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。

20

【0135】

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uffling (chain shuffling) によっても増強することが出来る {Clackson、T. et al.、1991}。

【0136】

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。

30

【0137】

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、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。

【0138】

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、特にピロリ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。

40

【0139】

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作られた場合、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。

【0140】

50

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。

【0141】

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。

【0142】

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}。

【0143】

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。

【0144】

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り標的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。

【0145】

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。

【0146】

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

10

20

30

40

50

ーである。

【0147】

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、例えばポリマ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。

【0148】

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。

【0149】

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。

【0150】

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

10

20

30

40

50

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。

10

【0151】

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。

20

【0152】

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。

30

【0153】

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。

40

【0154】

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

50

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。

【0155】

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。

10

【0156】

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ピロリ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、特にヘリコバクター感染、そしてもっとも具体的にはピロリ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。

【0157】

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。

20

【0158】

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。

30

【0159】

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。

40

【0160】

また、本発明によって、ピロリ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、特にヒトにおけるピロリ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。

50

【0161】

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。

【0162】

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いてもよい、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いて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いてもよく、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。

【0163】

本発明は別の態様によると、ピロリ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ピロリ菌に対する1の、好ましくは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いてもよい。所望により、かかるピロリ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、ピロリ菌および/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。

【0164】

さらなる態様によると、本発明はピロリ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以上のピロリ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いてもよい。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ピロリ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、ピロリ菌および/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。

【0165】

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。

【0166】

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。

【0167】

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

10

20

30

40

50

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リッペチド (polypeptide)、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。

10

【0168】

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。

【0169】

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>。

20

【0170】

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。

【0171】

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。

30

【0172】

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、またはそれをとまわずに、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。

40

【0173】

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

50

る (国際特許出願 WO 02/32451、引用により本明細書に含める)。

【0174】

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。

10

【0175】

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。

【0176】

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化合物を含んでいてもよい。好ましくは、向神経活性化化合物は例えば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/

20

【0177】

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。

30

【0178】

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、膺、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。

【0179】

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。

40

【0180】

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。

【0181】

50

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。

【0182】

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。

【0183】

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。

10

【0184】

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、ヒト投与への製品の製造、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。

【0185】

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、特にヘリコバクター、より好ましくは、ピロリ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、ピロリ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、それに加えてヒトにおける消化性潰瘍および関連する癌 (associated cancer) が含まれる。

20

【0186】

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つてもよい。

30

【0187】

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。

【0188】

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、その調製物であつてよく、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。

40

【0189】

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

50

の効果をも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生ずる分子による効果を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ตอบสนอง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。

【0190】

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と、潜在的アンタゴニスト、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切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。

10

【0191】

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。

20

【0192】

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。

【0193】

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)。

【0194】

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。

30

【0195】

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。

【0196】

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) 留置装置上の哺乳類細胞外マトリックスタンパク質へのまたは粘膜創傷における細胞外マトリックスタンパク質へのピロリ菌の付着の予防； ii) 組織損傷を媒介する哺乳類細胞外マトリックスタンパク質と細菌タンパク質の細菌付着の阻害のための、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、哺乳類細胞侵入によって媒介されるタンパク質の阻害{Rosenshine, I. et al., 1992}； iv) 留置装置の移植またはその他の外科技術以外によって開始される感染における病因の正常の進行の阻害。

40

【0197】

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

50

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。

【0198】

アンタゴニストおよびアゴニストは、例えば、ヘリコバクター、特にピロリ菌による感染に起因する疾患、例えば消化性潰瘍および胃癌を阻害するために用いることが出来る。

【0199】

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 10
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。

【0200】

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。

【0201】

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、 20
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。

【0202】

本発明に関して、

図1は、ピロリ菌特異的ヒト血清の特徴付けを示す。

【0203】

図2は、ピロリ菌分離株 KTH-Ca1からの小断片ゲノムライブラリー LHP1-50の特徴付けを示す。

【0204】

図3は、ピロリ菌分離株 KTH-Duからの小断片ゲノムライブラリー LHP2-50の特徴付け 30
を示す。

【0205】

図4は、ビオチン化ヒト IgGを用いたMACSによる細菌細胞の選択を示す。

【0206】

表1は、ゲノムピロリ菌ライブラリーとヒト血清を用いて行ったすべてのスクリーニングの要約を示す。

【0207】

表2は、個々の分離株からのゲノムピロリ菌DNAおよび遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを用いて行ったすべての遺伝子分布実験の要約を示す。

【0208】

表3は、ヒト血清によるエピトープ血清学分析の要約を示す。 40

【0209】

明細書に言及される図を以下により詳細に説明する。

【0210】

図1は、免疫アッセイによって測定した抗-ピロリ菌抗体についてのヒト血清の特徴付けを示す。全抗-ピロリ菌 IgGおよびIgA抗体レベルを、被覆抗原としてのピロリ菌 KTH Ca1 株から調製した全細菌溶解液を用いた標準的 ELISAにより測定した。(A)ランダムに選択した 54 人の成人からの血清サンプルを抗体レベルについて分析し、その後、症状 (胃の痛み)およびピロリ菌感染症の病歴について問診した。4名の個体は、高い抗体力価を有し症状または疾患を有しないと同定され (S-)、4名は急性症状または既知の臨床疾患 50

を有すると同定された (S+)。(B)ピロリ菌疾患の典型的症状を示す患者からの血清をIgG およびIgA レベルについて分析し、医者によって行われたウレアーゼ試験においける結果の陰性または陽性に基づいて群分けした。ELISA ユニットは2つの血清希釈度 (10.000X および50.000X)における吸光度の読みから計算する。2つの異なる群の平均を示す。(C) イムノブロット分析をELISAによってあらかじめ選択された血清に対して行って、タンパク質抗原との多重 (multiple) 免疫反応性を確認した。ピロリ菌 KTH Ca1 株から調製された全細菌溶解液と5.000X希釈の選択された血清を用いて行った代表的実験の結果を示す。血清サンプルは; レーン 1: 高力価 S- 個体、レーン 2: 高力価ウレアーゼ -患者、レーン 3および4:高力価ウレアーゼ + 患者。レーン 1-3は抗-ヒト IgG 二次抗体で、レーン 4は抗-ヒト IgA 二次抗体で現像した。Mw: 分子量マーカー。

10

【0211】

図 2は、KTH-Ca1 ピロリ菌株小断片ゲノムライブラリー、LHP1-50の断片サイズ分布を示す。576のランダムに選択したクローンを配列決定した後、配列を切って(trimmed)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) 同じセットのピロリ菌染色体にわたってランダムに配列決定したLHP1-50のクローンの分布のグラフ表示。青い丸は、+/+および+/-の両方向に割り当てたORFと一致する配列を示す。赤い四角は、+/+および+/-の両方向における非コード染色体配列に完全に一致するクローンを示す。緑の菱形は、キメラ配列を有するすべてのクローンを位置づける。塩基対における数の距離はそれぞれの環状ゲノムを一方向にて示す。様々なクローンセットのライブラリーにおける分配を図の下に数とパーセンテージで示す。

20

【0212】

図 3は、KTH-Du ピロリ菌株小断片ゲノムライブラリー、LHP2-50の断片サイズ分布を示す。576のランダムに選択したクローンの配列決定の後、配列切って(trimmed)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) 同じセットのピロリ菌染色体にわたってランダムに配列決定したLHP2-50のクローンの分布のグラフ表示。青い丸は、+/+および+/-の両方向に割り当てたORFと一致する配列を示す。赤い四角は、+/+および+/-の両方向における非コード染色体配列に完全に一致するクローンを示す。緑の菱形は、キメラ配列を有するすべてのクローンを位置づける。塩基対における数の距離はそれぞれの環状ゲノムを一方向にて示す。様々なクローンセットのライブラリーにおける分配を図の下に数とパーセンテージで示す。

30

【0213】

図 4Aは、ビオチン化ヒト IgGによるMACS 選択を示す。pMAL9.1中の LHP1-50 ライブラリーをまず10 μ g ビオチン化ヒト血清 (P6-IgG)で、次いで第二の選択ラウンドにおいて10 μ gでスクリーニングした。陰性対照には、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。第一および第二の溶出後の選択された細胞の数を各選択ラウンドについて示す。図 4Bは、1:3,000希釈でMACSによる選択に用いたヒト血清 (P6-IgG)によるウェスタンブロット分析によって分析した細菌表面ディスプレイによって単離された特定のクローン(1-26)の反応性を示す。ローディング対照として同じブロットをプラットフォームタンパク質 LamBに対する1:5,000希釈の抗体によって分析した。LB、外来ペプチドインサートを含まないLamBを発現するクローンからの抽出物。

40

【0214】

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。

A、fhuA中のピロリ菌 KTH Ca1の300bp ライブラリーとIC7-IgG (757)、B、fhuA中のピロリ菌 KTH Ca1の300bp ライブラリーとP5-IgG (729)、C、fhuA中のピロリ菌 KTH Ca1の300bp ライブラリーとP9-IgG (441)、D、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとIC7-IgG (448)、E、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとP5-IgA (1130)、F、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとP5-IgG (911)、G、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとP6-IgA (1135)、H、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとP6-IgG (844)、I、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーと P9-IgG (1121)、J、fhuA中のピロリ菌 KTH Duの300bp ライブラリーとP6-IgG (433)、K、fhu

50

A中のピロリ菌 KTH Duの300bp ライブラリーと P8-IgG (550)、L、IamB中のピロリ菌 KTH Duの50bp ライブラリーとP6-IgG (1077)、M、IamB中のピロリ菌 KTH Duの50bp ライブラリーとP8-IgG (740); *、プログラム ANTIGENIC {Kolaskar, A. et al., 1990}により行った5 アミノ酸より長い抗原性配列の予測。

【0215】

表2:ピロリ菌株における遺伝子分布。

28のピロリ菌株(ピロリ菌 KTH-Ca1および KTH-Duを含む。実施例2参照)を関連抗原をコードする遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドを用いたPCRによって試験した。1つの選択されたPCR断片のPCR断片を配列決定し、正しいDNA断片が増幅されているかを確認した。*、ピロリ菌株 KE26695 (aa、アミノ酸)と比較した、癌患者由来のピロリ菌株におけるアミノ酸置換の数。#、代わりにの株を配列決定に用いた。

10

【0216】

表3: ヒト血清によるエピトープ血清学

選択されたエピトープを表す個々の合成ペプチドと個々のヒト血清との免疫反応性を示す。反応性の程度を色で示す; 白: 陰性 (<500)、明灰色: + (500-650)、暗灰色: ++ (650-800)、および黒: +++ (>800)。数は、血清希釈 200XにおいてOD_{405nm}を測定することにより得たELISAの読みを表す。Sは、全反応性の和として計算したスコアを表す(すべての+の数の和); P1~P18血清は、十二指腸または胃潰瘍であると明らかに臨床的に診断された患者からであり、N1-4血清は、抗ピロリ菌抗体力価が高く、ピロリ菌疾患の臨床症状を示さない健康な成人からである。ピロリ菌株 26695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fromおよび toの列に示し、それぞれ最初と最後のアミノ酸残基を示す。ペプチド名: HP0009.1はアノテーションされたORF HP0009に存在する。

20

【実施例】

【0217】

実施例 1: ヒト血清に基づく抗-ピロリ菌抗体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)中に希釈した5-10µg/mlの全タンパク質で被覆した。3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) を製造業者の推奨に従って用いた (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ELIAS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り定量した。

30

【0218】

細菌抗原抽出物の調製

ピロリ菌 KTH DUまたはKTH Ca1 株を48時間寒天プレートで培養し、細胞を収集し、凍結乾燥サイクルの繰り返しにより溶解した:ドライアイス/エタノール-混合物中で凍結するまでインキュベーション(1分)し、37 (5分)で解凍した: 3回繰り返した。その後超音波処理し、上清を遠心分離 (3,500 rpm、15分、4)により回収した。

40

【0219】

イムノプロットティング

全細菌溶解液調製物をインビトロで培養したピロリ菌 KTH DUまたはKTH Ca1 株から調製した。10 ~ 25µgの全タンパク質/レーンをSDS-PAGEでBioRad Mini-Protean 3 Cell電気泳動システムを用いて分離し、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。一晚5%ミルク中でブロッキングした後、ヒト血清を 2,000x 希釈で添加し、HRP0標識化抗-ヒト IgGを検出に用いた。

【0220】

ゲノムスクリーニングのための抗体の精製

50

患者群と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た血清プールについての全抗-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を全細胞大腸菌細胞(細菌表面ディスプレイに用いたのと同じ条件下で培養したpHIE11で形質転換したDH5)とインキュベートすることにより除いた。プールされた枯渇血清からの高度に濃縮されたIgG調製物を、製造業者の指示に従ってタンパク質 G 親和性クロマトグラフィーにより作成した(UltraLink Immobilized Protein G、Pierce)。IgA 抗体もストレプトアビジン-アガロース (GIBCO BRL)に固定化したビオチン標識化抗-ヒト IgA (Southern Biotech)を用いた親和性クロマトグラフィーにより精製した。枯渇および精製の有効性を、SDS-PAGE、ウェスタンブロットティング、ELISA およびタンパク質濃度測定により確認した。

10

【0221】

結果

ヒト免疫系によってピロリ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。これら分子は本発明に記載の、特異的抗体と対応するピロリ菌ペプチドまたはタンパク質との相互作用に基づくアプローチにおける個々の抗原同定に必須である。関連抗体レパートリーを得るために、ヒト血清を以下から収集した：

I. 54人のランダムに選択した健康な成人。個体に臨床症状の存在または不在、そして以前にピロリ菌感染症であると診断されたかについて問診した。

II. 十二指腸潰瘍患者。

20

III. 胃潰瘍および癌患者。

患者群については、ピロリ菌感染症を確認し、医学的診断は医学的微生物試験、ウレアーゼ試験、組織診または胃内視鏡に基づいた。全部で191の患者からの血清を分析に含めた。

【0222】

血清を一連のELISAおよびイムノブロットティングアッセイによって抗-ピロリ菌抗体について特徴づけた。この目的のために2種類の抗原調製物を用いた：ピロリ菌株KTH-Ca1 およびKTH-Duから全細胞抽出物を調製し、IgGおよびIgAの両方の抗体レベルを測定した。抗体力価は応答が線形である2種類の希釈度 - IgG については10.000Xおよび 50.000X、IgAについては1.000Xおよび5.000X -での吸光度の読みから計算したユニットとして表した(図1Aおよび B)。高力価のランダムに選んだ個体のなかで、顕著に高いIgGおよびIgA 抗体レベルを示す54人の中の8人を含めた(15%)。これら個体の半分は急性的または以前にピロリ菌「患者」であったと知られており、残る半分は病歴も愁訴も無かった。これらの4人の個体からの血清をプールし抗原同定のために調製した。ピロリ菌感染症は一般的であるので、抗体は結果として保因者とならなくてもヘリコバクターとの以前の遭遇からの自然免疫の結果として存在する。用いたELISA アッセイの値を活動性の疾患のある、またはない患者の血清を分析することによってさらに明らかにした。ウレアーゼ試験陽性およびウレアーゼ試験陰性個体の抗体レベルを比較することにより、有意に高い抗体レベルがウレアーゼ + 群において測定された(図 1B)。文献データによると、偽陰性の例(~10%)が偽陽性よりこの試験ではとても多く、ELIAS アッセイがおそらく活動性ピロリ菌感染 症をより強力に予測することが示唆される。両方の抗体クラスにおける全溶解液調製物に対する反応性に基づいて血清をランク付けし、すべての3つの血清ドナー群からの最高の1つをイムノブロットティングによるさらなる分析のために選択した。後者のアッセイは多数のピロリ菌タンパク質に対する免疫反応性を確認し、図1Cに例示する。

30

40

【0223】

大規模な抗体特徴付けアプローチにより抗-ヘリコバクター過免疫血清の明白な同定が導かれ、5つのドナープールの調製が可能となった。

【0224】

実施例 2: 高度にランダムな、フレーム選択された、ピロリ菌の小断片ゲノムDNA ライブラリーの作成

50

実験手順

ヘリコバクターゲノムDNAの調製。

ピロリ菌KTH-Ca1および KTH-Du 臨床分離株からの十分な量の細菌ペレットを Dr. Lars Engstrandから得た。細菌ペレットを3回PBSで洗浄し、注意深く0.5 mlのリゾチーム溶液 (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)の添加後、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)中にペレットにし、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0.6x 10
容積のイソプロパノールの添加により室温で沈殿させ、溶液から無菌パスツールピペットで取り出し、80%氷冷エタノールを含むチューブに移した。DNAを10-12,000x gで沈殿を遠心分離することにより回収し、風乾し、ddH₂Oに溶解した。

10

【0225】

小ゲノムDNA断片の調製

ゲノムDNAをcup-horn超音波処理器 (BB5 cup horn を備えたBandelin Sonoplus UV 22 00 超音波処理器、10秒、100 %出力でパルス)を用いて150~300 bpのサイズ範囲の断片に機械的に剪断するか、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。超音波処理によってDNAを150-300 bpサイズ範囲の断片に切った場合よりタイトな断片サイズ分布が確認された。しかし、DNAを超音波-誘導性機械的剪断力に強く曝したにも拘わらず、結果的な断片サイズの低下は有効ではなく、再現性も得られなかった。それゆえ、50~70 bpのサイズの断片をNovagenショットガン切断キットを用いた穏やかなDNase I処理により得た。キットに備えられていたDNase Iの1:20希釈を調製し、消化をMnCl₂の存在下で60 μl容積で20 °Cで5分行い、酵素による二本鎖の切断を確実にした。反応を2 μlの0.5 M EDTAで停止させ、断片化効率を2% TAE-アガロースゲルで評価した。この処理により、ゲノムDNAのほぼ50-70 bp断片への全断片化が達成された。断片を100 μMの各dNTPの存在下でT4 DNAポリメラーゼを用いることにより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で保存した。

20

【0226】

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で交換したASK-IBA バックボーン {Skerra, A., 1994}上に構築した。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を配置し、細胞膜を横切る効率的な分泌を可能とした。さらに、成熟ベータ・ラクタマーゼの最初の12アミノ酸 (スペーサー配列)をコードする配列を ompAリーダーペプチド配列の後に配置させることにより、リーダーペプチド切断部位の直後の配列の融合を避けた。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からである {Kajava, A. et al., 2000}。SmaI 制限部位はライブラリー挿入に利用した。選択され
た断片の回収に用いる上流のFseI 部位および下流のNotI 部位が SmaI 部位を挟んでいる。この3つの制限部位を12アミノ酸 スペーサー配列をコードする配列の後に挿入し、bla遺伝子が -1 読み枠にて転写される結果、NotI 部位の15 bp後が停止コドンとなるようにした。+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、アンピシリン耐性を獲得するようになる。

40

【0227】

ベクター pMAL9.1を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、制限部位、FseI、SmaI および NotIを含む配列をlamB中のアミノ酸154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と NotIで消化することにより切り出したフレーム

50

選択された DNA 断片の移動の結果、*lamB*およびそれぞれのインサートの連続した読み枠が生じるように構築した。

【0228】

ベクター pHE11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、制限部位 *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*と *NotI*での消化により切り出されたフレーム-選択された DNA 断片の移動の結果、*fhuA*とそれぞれのインサートの連続する読み枠が生じるように選択した。

【0229】

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

10

ピロリ菌 DNAのゲノム断片を、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 $\mu\text{g/ml}$) とアンピシリン (50 $\mu\text{g/ml}$) を追加した LB-寒天培地に播いた。プレートを一晩 37 でインキュベートし、ラージスケール DNA 抽出のためにコロニーを回収した。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を回収するために保存した。簡便なコロニー PCR アッセイを最初に用いておおまかな断片サイズ分布と挿入効率を測定した。配列決定データから、正確な断片サイズを評価し、挿入部位における接合部の正確さとフレーム選択の正確さを評価した (3n+1規則)。

【0230】

20

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 断片をピロリ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* を用いて切り出した。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 pHE11 (*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て、pMAL4.31 ベクターにおいて選択された読み枠をそれぞれのプラットフォームベクター中で維持した。プラスミドライブラリーを大腸菌 DH5 細胞にエレクトロポレーションにより形質転換した。細胞を 50 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを追加した大きい LB-寒天プレートに播き、一晩 37 で明らかに目視できるシングルコロニーができる密度で培養した。細胞をこれらのプレートの表面から掻き取り、新しい LB培地で洗浄し、アリコートにおいてライブラリースクリーニングのために -80 で保存した。

30

【0231】

結果

フレーム選択のためのライブラリー

それぞれサイズがおよそ 50および 300 bpの 4つのライブラリー (LHP1-50、LHP2-50、LHP1-300および LHP2-300) を pMAL4.31 ベクター中に作成した。各ライブラリーについて、ライゲーションおよび、およそ 1 μg の pMAL4.31 プラスミド DNA および 50 ng の断片化ゲノムピロリ菌 DNA による形質転換により、フレーム選択後の $4 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ クローンが生じた。ライブラリーのランダムさを評価するために、LHP1-50 および LHP2-50 のおよそ 600 のランダムに選んだクローンを配列決定した。生物情報分析により、これらクローンのうちほんのわずかだけが 2 回以上存在することが示された。さらに、例えば、LHP2-50 では 90% のクローンがサイズ範囲 19 ~ 64 bp にあり、平均サイズが 28 bp であることが示された (図 2、3)。すべての配列は「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た。

40

【0232】

細菌表面ディスプレイライブラリー

大腸菌表面上にペプチドをディスプレイするには、LHP 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 pHE11 (*FhuA*) に移す必要があった。ゲノム DNA 断片を *FseI* および *NotI* 制限酵素で切り出し、5ng インサートと 0.1 μg プラスミド DNA をライゲーションし、次いで DH5 細胞に形質転換した結果、 $2-5 \times 10^6$ クローンが得られた。クローンを LB プレートから掻き取

50

り、さらに増幅させずに冷凍した。

【0233】

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およびヒト血清を用いたピロリ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 $50 \mu\text{g/ml}$ カナマイシンを追加した 5 ml LB培地で2時間37 °Cで培養した。発現を 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 $100 \mu\text{l}$ LB培地に再懸濁し、エッペンドルフチューブに移した。

10

【0234】

血清から精製した $10 \mu\text{g}$ のビオチン化ヒト IgGを細胞に添加し、懸濁液を一晩4 °Cで穏やかに振盪しながらインキュベートした。 $900 \mu\text{l}$ の LB培地を添加し、懸濁液を混合し、ついで 10 分 $6,000 \text{ rpm}$ で4 °Cで遠心分離した (IgA スクリーニングについては、 $10 \mu\text{g}$ の精製IgAを用い、ビオチン化抗-ヒトIgA 二次抗体で捕捉した)。細胞を 1 ml LBで1回洗浄し、 $100 \mu\text{l}$ LB培地に再懸濁した。 $10 \mu\text{l}$ のストレプトアビジン (Miltenyi Biotech, Germany)に結合した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 °Cで続けた。その後、 $900 \mu\text{l}$ 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した平衡化 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)。

20

【0235】

カラムを 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した。 3 ml LB培地でカラムを洗浄した後、 2 ml の溶出液を同じカラムに再びローディングし、洗浄および溶出工程を繰り返した。ローディング、洗浄および溶出工程は3回行い、最終溶出液は 2 ml となった。

【0236】

第二ラウンドのスクリーニングを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 °Cで90分インキュベートし、 1 mM IPTG で30分間誘導した。細胞をついで回収し、 1 ml LB培地で1回洗浄し、 $10 \mu\text{l}$ LB培地に懸濁した。容積が減ったため、 $10 \mu\text{g}$ のヒト、ビオチン化 IgGを添加し、懸濁液を一晩4 °C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選択ラウンドと全く同じであった。2ラウンドの選択後に選択された細胞を $50 \mu\text{g/ml}$ カナマイシンを追加したLB-寒天プレートに播き一晩37 °Cで培養した。

30

【0237】

配列決定およびウェスタンブロット分析による選択されたクローンの評価

選択されたクローンを一晩37 °C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、標準的手順を用いてプラスミド DNAを調製した。配列決定はMWG (Germany)で行った。

【0238】

ウェスタンブロット分析のために、およそ $10 \sim 20 \mu\text{g}$ 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 $1:5,000$ 希釈で、HRP結合抗-ヒト IgGまたはIgA 抗体を二次抗体として $1:5,000$ 希釈で用いて検出した。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のHRP結合二次抗体と組み合わせて融合タンパク質を検出した。

40

【0239】

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

50

ライブラリーのスクリーニング

pMAL9.1中のライブラリー LHP1-50およびLHP2-50およびpHIE11中のLHP1-300およびLHP2-300を患者血清または健康個体血清からのピオチン化ヒト IgGおよびIgA 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参照)。選択手順は実験手順に記載のように行った。図 4Aは、LHP1-50 ライブラリーおよび P6-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、最後に回収された全細胞数はおよそ $1 \sim 2 \times 10^7$ 細胞からおよそ 10^4 細胞に減っており、血清の存在下での選択により、抗体の非存在下におけるよりもわずかに多い数の細胞が得られた(図 4A)。しかし第二ラウンドのスクリーニング後は、同様の数の細胞がP6-IgGにより回収されたのに対し、ヒト血清からのIgGが添加されない場合に回収された細胞は数百のみであり、選択がピロリ菌特異的抗体に依存していたことが明らかに示される。スクリーニングの性能を評価するために、およそ 50の選択されたクローンをランダムに取り出し、同じプールされた血清によるウェスタンブロット分析に供した(図 4B)。この分析により、70%の選択されたクローンが関連する血清に存在する抗体と反応性を示すが、ピロリ菌特異的インサートを有さないLamBを発現する対照株は同じ血清と反応しないことが明らかになった。一般に、反応率は35~75%の範囲であることが観察された。コロニーPCR 分析により、選択されたクローンのすべてが予測サイズ範囲のインサートを含んでいることが確認された。

【0240】

次いで多数のランダムに取り上げたクローン(600~1200/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によって特異的に認識された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、選択に用いた血清における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/または親和性を少なくとも部分的に反映する。この点で、いくつかのORF(例えば、HP0527、HP0547およびHP1341)由来のクローンが100回以上取り上げられたのは驚くべきことであり、その高度な免疫原性を示している。表1は全部で13回行ったスクリーニングについて得られたデータを要約する。表1におけ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によるウェスタンブロット分析によって確認され、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の反応性が示された。表1から理解されるように、様々なサイズのタンパク質断片がプラットフォームタンパク質の表面にディスプレイされたため、同定されたORFの異なる領域が免疫原性であると同定された。

【0241】

さらに細菌表面ディスプレイスクリーニングにより同定された遺伝子のほとんどが、ピロリ菌表面結合および/または分泌タンパク質をコードするということは注目に値する。これはピロリ菌の病原性における表面結合または分泌タンパク質の推定された役割と一致する。

【0242】

実施例 4:ピロリ菌から同定された高度免疫原性タンパク質による遺伝子分布研究

実験手順

PCRによるピロリ菌抗原の遺伝子分布

同定されたピロリ菌抗原をコードする遺伝子がピロリ菌株に普遍的に存在するのかを確認するために、PCRを目的の遺伝子に特異的なプライマーを用いて一連の独立したピロリ菌分離株に対して行った。ピロリ菌分離株はピロリ菌感染症に関連する様々な疾患症状を網羅する患者から得た(癌患者: 11 株、十二指腸潰瘍: 6、萎縮性胃炎: 5、胃炎: 3、裂孔ヘルニア: 1、正常対照: 2)。プライマーとしてのオリゴヌクレオチド配列は可能であればすべての同定された免疫原性エピトープを網羅する、およそ 1,000 bpの産物を生じるすべての同定されたORFについて設計した。すべてのピロリ菌株のゲノムDNAを実施例 2に記載のように調製した。PCRは反応容積 25 μ l中、Taq ポリメラーゼ (1U)、200 nM dNTP、10 pMolの各オリゴヌクレオチドおよびキットを用いて製造業者の指示に従って行った(Invitrogen、The Netherlands)。個々のプライマー対に条件を設定する必要がある場

10

20

30

40

50

合を除き、標準として、30サイクル (1x: 5分. 95、30x: 30秒95、30秒56、30秒72、1x 4分72)を行った。

【0243】

結果

免疫原性タンパク質をコードする同定された遺伝子を、28種類のピロリ菌株での存在についてPCRにより試験した(表2)。理想的なワクチン抗原はワクチンが向けられる標的生物のすべてまたは大多数の株に存在している抗原であろう。多数の抗原について、PCR反応により、28の選択したピロリ菌株(例えば、HP0563、HP0887、HP1341)について正確なサイズのDNA断片が増幅した。個々の株からの1つのPCR断片の配列決定は、増幅されたDNA断片は正しい遺伝子に対応することを示すが、それはまた、この特定の遺伝子内の変動のレベルの評価も可能とする。いくつかの遺伝子は2つの比較した株(例えばHP0121、HP0413、HP1374)において完全に同一のアミノ酸配列を有するが、ほとんどの抗原は表2に示すような程度の変動を示した。配列決定によりすべての抗原のおよそ80%のアミノ酸配列は2つの分析した株において95%を超える同一性を有し、1株のみが85%未満の同一性のレベルを示すことが明らかになった。

10

【0244】

全部で106の分析した遺伝子のなかで、76は試験したすべての株に存在しており、14は80%をこえる株に存在しており、16遺伝子のみが試験した28株のうち20%以上で存在していなかった(表2)。さらに、9遺伝子のみ(例えば、HP115、HP717、HP887、HP913およびHP1119)がサイズにおける明らかな変動を示したが、すべてまたはほとんどのピロリ菌分離株に存在していた。重要なことに、同定された抗原の多くは配列およびサイズにおいてすべての株でよく保存されており、それゆえピロリ菌による感染を予防するための新規なワクチン候補である。

20

【0245】

実施例 5:個々のヒト血清とのピロリ菌からの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)上で SyroII合成機(Multisyntech、Witten、Germany)で標準的 F-moc化学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。配列を編集した後、ペプチドをFmoc-イプシロン-アミノヘキサ酸(リンカーとして)およびビオチン(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93%TFA、5%トリエチルシラン、および2%水で1時間で樹脂から切断した。ペプチドを減圧乾燥し、アセトニトリル/水(1:1)から3回凍結乾燥した。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。

30

【0246】

酵素結合免疫測定法 (ELISA)

ビオチン標識化ペプチド(N-末端)で、製造業者の指示に従って10 μg/ml濃度でストレプトアビジン ELISA プレート(EXICON)上を被覆した。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 二次抗体(Southern Biotech)を製造業者の推奨に従って用いた(希釈:1,000x)。血清を2つの血清希釈度、200Xおよび1,000Xで試験した。手作業での被覆の後、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)によって加工および分析した。

40

【0247】

結果

選択されたクローンの生物情報分析にしたがって、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は、オーバーラップするペプチドを作った。すべてのペプチドはN-末端 ビオチン-タグを備えるように合成し、ストレプトアビジン-被覆ELISA プレート上の被覆試薬として用いた。

50

【 0 2 4 8 】

分析は144 ペプチドおよび細菌表面ディスプレイのためのIgGおよびIgAスクリーニング試薬の調製のために用いた血清プールに含まれていた22 個体のヒト血清サンプルを用いて行った。ヒト血清により分析したゲノムスクリーニングからのピロリ菌エピトープを表すペプチドの血清反応性の要約を表3に示す。ペプチドは陽性血清の数および反応性の程度に基づいて各ペプチドのために計算したスコアによって比較した。ペプチドは高度に広く反応性のものから弱く陽性のものまで色々であった。もっとも反応性のもののなかに、既知の抗原があり、そのいくつか、例えば、CagA (HP0547)および細胞空胞化毒素 (HP0887)は動物攻撃モデルにおいても保護を示した。既知の抗原の他に、いくつかの新規な高度に免疫原性のタンパク質およびそのなかのエピトープが同定された。とりわけ、親鉄剤 (siderophore) -媒介鉄輸送タンパク質 (HP1341)、フマル酸還元酵素フラボタンパク質サブユニット (frdA) (HP0192)およびHP0087仮想タンパク質である。

【 0 2 4 9 】

参考文献

- Altschul, S., et al. (1990). *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10.
- Bennett, D., et al. (1995). *J Mol Recognit* 8: 52-8.
- Bjorkholm, B., et al. (2003). *J Intern Med* 253: 102-19.
- Blaser, M. (2000). *Nat Med* 6: 376-7.
- Censini, S., et al. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14648-53.
- Clackson, T., et al. (1991). *Nature* 352: 624-8. 20
- Devereux, J., et al. (1984). *Nucleic acids research* 12: 387-95.
- Doherty, E., et al. (2001). *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 457-475.
- Dubreuil, J., et al. (2002). *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 617-29.
- Eisenbraun, M., et al. (1993). *DNA Cell Biol* 12: 791-7.
- Etz, H., et al. (2001). *J Bacteriol* 183: 6924-35.
- Ferrero, R., et al. (2001). *Scand J Immunol* 53: 443-8.
- Fujikawa, A., et al. (2003). *Nat Genet* 33: 375-81.
- Ganz, T. (1999). *Science* 286: 420-421.
- Georgiou, G. (1997). *Nature Biotechnology* 15: 29-34.
- Hancock, R. E., et al. (1999). *Drugs* 57: 469-473 30
- Hashemzadeh-Bonehi, L., et al. (1998). *Mol Microbiol* 30: 676-678.
- Heinje, von G (1987) e.g *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press
- Hemmer, B., et al. (1999). *Nat Med* 5: 1375-82.
- Johanson, K., et al. (1995). *J Biol Chem* 270: 9459-71.
- John Wiley & Sons (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*
- Jones, P., et al. (1986). *Nature* 321: 522-5.
- Kajava, A., et al. (2000). *J Bacteriol* 182: 2163-9.
- Kersulyte, D., et al. (2000). *J Bacteriol* 182: 3210-8.
- Kohler, G., et al. (1975). *Nature* 256: 495-7.
- Kolaskar, A., et al. (1990). *FEBS Lett* 276: 172-4. 40
- Lewin, A., et al. (2001). *Trends Mol Med* 7: 221-8.
- Loughlin, M., et al. (2003). *Infect Immun* 71: 2022-31.
- Marks, J., et al. (1992). *Biotechnology (N Y)* 10: 779-83.
- McCafferty, J., et al. (1990). *Nature* 348: 552-4.
- Okano, H., et al. (1991). *J Neurochem* 56: 560-7.
- Oliaro, J., et al. (2000). *J Med Microbiol* 49: 643-50.
- Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression; CRC Press, Boca Ration, FL (1988) for a description of these molecules.
- Prinz, C., et al. (2003). *Trends Microbiol* 11: 134-8.
- Rammensee, H., et al. (1999). *Immunogenetics* 50: 213-9. 50

- Rosenshine, I., et al. (1992). *Infect Immun* 60: 2211-7.
 Sabarth, N., et al. (2002). *Infect Immun* 70: 6499-5303.
 Seeger, C., et al. (1984). *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5849-52.
 Shibuya, A., et al. (2000) *Nature Immunology* 1: 441-446
 Skerra, A. (1994). *Gene* 151: 131-5.
 Sutton, P. (2001). *Vaccine* 19: 2286-90.
 Svennerholm, A. (2003). *Vaccine* 21: 347-53.
 Tang, D., et al. (1992). *Nature* 356: 152-4.
 Tempest, P., et al. (1991). *Biotechnology (N Y)* 9: 266-71.
 Tourdot, S., et al. (2000). *Eur J Immunol* 30: 3411-21.

10

【 0 2 5 0 】

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

A、fhuA中のピロリ菌 KTH Ca1の300bp ライブラリーと IC7-IgG (757)、B、fhuA中のピロリ菌 KTH Ca1 の300bp ライブラリーとP5-IgG (729)、C、fhuA中のピロリ菌 KTH Ca1 の300bp ライブラリーと P9-IgG (441)、D、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとIC7-IgG (448)、E、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとP5-IgA (1130)、F、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとP5-IgG (911)、G、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとP6-IgA (1135)、H、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとP6-IgG (844)、I、IamB中のピロリ菌 KTH Ca1の50bp ライブラリーとP9-IgG (1121)、J、fhuA中のピロリ菌 KTH Duの300bp ライブラリーとP6-IgG (433)、K、fhuA中のピロリ菌 KTH Duの300bp ライブラリーとP8-IgG (550)、L、IamB中のピロリ菌 KTH Duの50bp ライブラリーとP6-IgG (1077)、M、IamB中のピロリ菌 KTH Duの50bp ライブラリーとP8-IgG (740); *、5 アミノ酸より長い抗原性配列の予測はプログラム ANTIGENIC (K olaskar and Tongaonkar、1990)を用いて行った。

20

【 0 2 5 1 】

【表 1 - 1】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローンの 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)
HP0009	外膜タンパク質 (omp1)	63-91,95-101,110-116,134-148,150-156,158-164,188-193,197-209,226-241,247-254,291-297,312-319,338-346,351-358,366-378,404-410,420-438,448-454,465-473,482-488,490-498,503-510,512-519,531-543,547-554,568-575,589-604,610-631	G: 1, H: 2, K: 2, M: 38	239-308	1, 179
HP0010	シャペロンおよび 熱ショックタンパク質 (groEL)	16-29,35-47,50-68,70-79,91-101,143-149,158-163,185-191,196-206,215-224,230-237,244-251,258-278,290-311,319-325,338-351,365-385,396-429,445-454,458-466,491-499,501-521	K: 1	17-79, 218-233	2, 180
HP0043	マンノース-6-ホスフェートイソメラーゼ (pmi)	4-10,16-41,46-66,77-84,91-97,102-118,125-144,187-200,202-214,245-253,255-261,286-295,300-330,335-342,350-361,363-381,385-392,396-416,435-450	G: 1	460-470	3, 181
HP0063	仮想タンパク質	11-19,27-48,52-59,77-82,84-107,118-125,127-154,178-183,192-209,215-221,286-295,302-313,350-357,402-415,417-431,453-463,465-493	D: 4, E: 1, G: 2	313-331	4, 182
HP0067	ウレアーゼアタセ サリータンパク質 (ureH)	19-26,30-43,47-55,63-68,72-80,97-104,107-119,129-146,160-175,194-216,231-251,254-260	H: 1	26-43	5, 183
HP0072	ウレアーゼベータ サブユニット (尿素 アミドヒドロラーゼ) (ureB)	7-13,29-37,65-81,110-120,123-131,135-152,230-249,254-260,284-290,292-299,317-326,329-336,403-444,452-458,466-477,490-498,510-519,541-550,557-566	E: 2, G: 3, H: 1, M: 2	533-567	6, 184
HP0086	保存仮想タンパク質	5-47,71-77,79-86,89-95,120-126,137-144,176-181,184-196,202-208,211-232,236-282,301-313,317-325,341-347,353-384,394-400,412-433,436-443	B: 3, C: 1, I:	59-75	7, 185
HP0087	仮想タンパク質	4-18,22-38,59-69,106-112,116-130,138-149,156-170,175-197,200-214,216-223,233-244,255-261,266-276,279-286,325-333,342-348,366-399,402-420,429-441	A: 2, B: 2, E: 2, F: 1, G: 2, I: 1, L: 2	1-104, 130-147	8, 186
HP0088	RNAポリメラーゼ シグマ-70因子 (rpoD)	50-58,69-95,97-113,131-136,157-163,170-175,188-212,220-226,254-259,265-277,283-289,297-308,311-318,347-358,360-369,378-401,416-421,440-450,454-462,470-476,493-502,506-514,536-567,585-590,598-607,613-618,653-659	A: 2, B: 9, D: 2, F: 3, H: 4	35-46	9, 187
HP0089	pfsタンパク質 (pfs)	16-29,32-60,65-87,89-123,128-134,137-158,162-173,178-196,210-216,218-228	E: 11, G: 2	206-225	10, 188

10

20

30

40

【表 1 - 2】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローン の数	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)
HP0115	フラゲリン B (flaB)	10-20,26-35,51-64,86-91,94-100,113-122,154-160,185-191,193-201,211-217,225-230,237-246,251-257,298-304,306-312,316-328,340-348,357-389,391-397,415-421,449-456,458-471,488-495,502-511	F: 2, H: 1, K: 1, L: 52	24-55, 236-341	11, 189
HP0175	細胞結合性因子 2	5-22,41-51,87-93,114-122,127-136,150-156,158-166,223-233,245-263,291-296	A: 11, C: 7, K: 2	9-126, 127-285	12, 190
HP0121	ホスホエノールピルビン酸シンターゼ (ppsA)	30-43,46-56,61-70,72-83,85-93,103-113,119-125,151-166,179-191,212-218,225-231,236-243,262-267,293-307,331-344,349-355,366-372,380-386,414-422,428-447,459-464,469-478,507-519,525-544,563-569,576-590,620-626,633-643,654-659,665-671,684-707,717-723,725-733,747-779,782-801	H: 3, I: 4, K: 3	347-361	13, 191
HP0123	スレオニル-tRNA シンゼターゼ (thrS)	4-12,14-26,37-80,107-115,133-139,144-150,154-165,173-180,191-199,205-211,221-231,237-244,254-284,307-340,342-353,360-368,370-380,479-493,495-503,509-522,525-536,539-547,554-560,565-573,578-583	D: 6, F: 1, H: 2, M: 1	7-23, 465-479	14, 192
HP0130	仮想タンパク質	4-17,47-55,76-83,85-100,104-112,117-123,126-135,142-148,156-167,174-182,267-273	A: 1, C: 1, I: 1, K: 1, M: 3	258-283	15, 193
HP0150	仮想タンパク質	8-32,36-42,65-88,102-108,112-140,147-163,170-179,183-193	A: 1, B: 1, D: 1, J: 1, L: 2	117-124	16, 194
HP0183	セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (glyA)	12-18,45-50,62-77,82-95,99-113,115-123,125-147,155-177,187-209,211-223,244-253,259-270,278-297,302-307,311-318,329-334,350-356,359-365,390-400,402-413	I: 5	333-350	17, 195
HP0192	フマル酸レダクターゼ, フラボタンパク質サブユニット (frdA)	4-13,15-27,30-46,53-58,68-74,82-95,115-126,134-139,148-153,159-176,182-199,201-217,220-225,227-235,237-248,253-266,300-315,322-336,390-396,412-426,438-445,448-459,477-484,502-508,515-527,529-537,553-568,643-651,658-667,690-703	H: 1, I: 4, L: 20	376-400	18, 196
HP0197	S-アデノシルメチオニンシンゼターゼ 2 (metX)	4-10,24-32,38-55,59-67,70-77,80-87,89-97,123-129,134-151,166-172,178-189,191-216,218-235,245-259,271-315,326-339,341-360	F: 1, H: 1, I: 8	73-94	19, 197
HP0201	脂肪酸/リン脂質合成タンパク質 (plsX)	13-25,31-38,43-57,79-85,92-99,106-112,117-128,130-139,146-158,160-175,194-204,211-222,225-232,234-242,263-270,278-292,299-320,322-333	L: 5	240-256	20, 198

10

20

30

40

【表 1 - 3】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローン の数	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)
HP0202	ベータ-ケトアシル- アシルキャリアタンパク質 シンターゼ III	4-17,55-63,66-101,109-131,135-143,145-151,155-161,164-170,177-185,192-198,213-218,223-238,246-256,258-268,273-283,309-314,322-328	F: 1, I: 3	195-221	21, 199
HP0210	シャペロンおよび熱 ショックタンパク質 C62.5 (htpG)	13-24,31-39,41-50,63-69,90-96,104-109,116-141,148-153,161-167,173-178,190-209,253-258,265-272,279-289,295-312,317-343,355-366,376-389,400-407,430-451,453-464,466-472,487-493,499-505,523-538,554-559,568-579,584-601	F: 1, M: 2	344-363	22, 200
HP0211	保存 仮想 分泌タン パク質	5-22,30-36,53-59,61-70,82-92,99-106,120-131,135-148,154-167,169-183,187-199,204-212,231-247	A: 1, C: 1, K: 1	111-249	23, 201
HP0228	保存 仮想 内在性膜 タンパク質	17-36,40-66,71-144,148-171,173-191,199-214,220-252,265-272,278-288,298-333,342-385	A: 1, E: 6, F: 1	287-307	24, 202
HP0229	外膜タンパク質 (omp6)	4-16,22-28,30-36,42-48,95-116,154-162,164-174,239-252,258-263,273-285,306-313,323-333,341-357,363-369,372-379,395-401,430-436,438-453,464-480	E: 1, F: 1, L: 14	33-44, 233-258, 349-369	25, 203
HP0235	保存 仮想 分泌タン パク質	4-21,30-37,46-53,59-68,80-92,98-104,118-143,150-160,165-185,187-200,204-211,224-236,241-246,252-258,271-280,288-294,311-320,335-341	B: 5	191-350	26, 204
HP0239	グルタミル-tRNA シクターゼ (hemA)	4-16,37-59,64-70,79-87,93-102,107-127,143-165,172-188,197-204,207-218,221-227,242-248,258-277,289-296,298-316,332-338,344-365,367-373,375-382,400-408,415-425,438-446	H: 2	235-250	27, 205
HP0258	保存 仮想 内在性膜 タンパク質	4-37,39-66,84-98,101-127,140-149,157-163,166-172,175-182,184-193,203-208,215-232,234-247,250-299,303-345	H: 1, L: 1	183-204	28, 206
HP0266	ジヒドロオロターゼ (pyrC)	10-20,41-61,73-87,112-141,176-192,194-201,205-222,230-237,257-264,276-282,284-310,312-318,330-337,349-357	M: 21	304-328	29, 207
HP0279	リボ多糖ヘプトシ ルトランスフェラー ゼ-1 (rfaC)	4-31,42-103,105-113,121-153,160-181,188-196,210-226,231-264,272-287,297-304,328-336	G: 1, L: 6	304-318	30, 208

10

20

30

40

【表 1 - 4】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローン の数	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)
HP0289	毒素様外膜タンパク質	21-43,46-52,54-70,72-79,94-107,133-141,160-166,217-253,311-317,359-365,374-381,390-395,434-440,488-494,497-502,511-522,554-563,565-574,577-585,591-598,601-606,617-625,633-643,658-664,676-682,694-702,710-719,754-760,782-788,802-808,916-921,942-948,955-964,973-979,992-998,1006-1011,1016-1023,1030-1038,1046-1053,1059-1066,1088-1098,1119-1126,1129-1135,1156-1171,1173-1181,1202-1210,1255-1261,1268-1280,1295-1310,1312-1320,1375-1381,1406-1417,1450-1471,1478-1492,1498-1506,1569-1578,1603-1608,1611-1624,1648-1655,1663-1670,1680-1698,1702-1707,1713-1719,1737-1742,1747-1753,1762-1769,1771-1785,1790-1804,1811-1818,1830-1836,1838-1852,1874-1886,1893-1899,1902-1909,1942-1948,1952-1962,1980-1986,2001-2017,2020-2028,2042-2050,2052-2068,2074-2079,2083-2095,2107-2113,2147-2155,2177-2194,2203-2211,2236-2241,2251-2258,2267-2274,2285-2292,2314-2328,2330-2340,2358-2365,2390-2401,2408-2418,2432-2453,2463-2476,2486-2507,2528-2537,2540-2548,2552-2558,2568-2576,2596-2601,2610-2622,2629-2638,2653-2669,2718-2727,2749-2767,2777-2784,2789-2795,2806-2815,2817-2824,2835-2843,2847-2854,2860-2881	B: 1, E: 2, H: 2, I: 3, L:	511-523, 612-630, 1790-1803	31, 209
HP0292	仮想タンパク質	4-54,61-68,72-82,86-93,100-108,115-130,147-154,187-194,196-207,224-229,236-251,275-287	E:14	96-109	32, 210
HP0295	フラゲリン B ホモログ (fla)	31-39,62-69,91-101,158-172,175-180,186-193,201-208,210-223,243-250,273-286,293-299,319-325,343-354,356-365,368-384,414-435,471-491,512-518,550-556,567-581,584-589,633-639,680-692,697-708,716-721,747-754,779-786,810-816	A: 1, B: 2, C: 3	366-503	33, 211
HP0349	CTP シンゼターゼ (pyrG)	5-20,22-48,57-65,96-101,111-122,130-145,154-164,170-181,193-199,201-216,224-241,244-262,281-323,342-351,359-367,369-396,406-416,424-433,450-456,485-491,493-499,501-515,517-535	M:2	289-305	34, 212

10

20

30

40

【表 1 - 5】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたりの 選択されたクローンの 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)
HP0351	鞭毛基底小体 M-環 タンパク質 (flf)	4-17,22-44,53-60,66-83,87-94,101-106,110-116,131-137,148-183,189-207,209-215,233-242,251-262,264-272,290-296,308-327,359-373,375-380,397-405,415-420,426-433,444-475,478-484,529-536,548-558	G: 9, E: 1	106-126	35, 213
HP0380	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (gdhA)	4-38,42-50,58-64,72-81,92-118,140-146,157-165,172-192,198-204,208-216,227-234,238-258,271-278,284-293,311-322,327-346,357-370,375-383,395-409,411-417,425-432,436-445	H: 6, E: 1, L: 1	109-129, 370-380	36, 214
HP0392	ヒスチジンキナーゼ (cheA)	23-30,36-49,52-64,86-94,97-104,121-129,257-272,279-286,288-294,307-327,334-340,369-375,377-386,406-412,418-423,430-438,441-447,459-465,469-476,482-488,510-546,550-580,584-622,638-645,653-659,675-683,692-705,723-731,752-761,788-795	B: 1, F: 2	54-72	37, 215
HP0401	3-ホスホシキミ酸 1- カルボキシビニルト ランスフェラーゼ (aroA)	11-33,36-46,88-104,116-126,134-170,189-195,199-217,225-250,255-261,266-273,280-291,296-313,334-341,343-349,354-360,362-369,373-380,387-401,406-420	E: 1, M: 12	259-273	38, 216
HP0406	仮想タンパク質	9-14,28-44,57-64,72-79,86-93,104-111,116-126,142-150,159-164	M: 2	61-86	39, 217
HP0409	GMP シンターゼ (guaA)	10-17,26-33,43-61,69-95,101-107,109-125,129-135,137-144,147-153,158-169,177-187,209-219,221-232,235-247,261-268,271-282,296-302,306-347,355-362,364-379,386-399,409-418,424-442,451-460,467-479,490-498	B: 1, F: 1	60-74	40, 218
HP0413	トランスボサーゼ- 様タンパク質, PS3IS	8-14,20-31,65-84,94-99,154-179,193-207,238-253	E: 9, F: 1, G: 1	96-118	41, 219
HP0459	virB4 ホモログ (virB4)	4-24,30-44,47-62,84-93,108-116,124-133,136-141,201-209,217-223,228-235,238-245,247-270,275-285,290-314,328-338,342-349,353-365,375-383,386-392,394-402,417-427,443-459,465-481,492-514,516-524,550-566,602-617,630-639,666-676,687-693,719-730,747-753,783-790,799-816,824-831,837-842	M: 6	167-189	42, 220
HP0480	GTP結合性タンパク質, fusA-ホモログ (yihK)	6-15,18-28,58-66,84-101,106-129,136-151,154-165,182-203,205-211,214-220,222-228,233-240,251-260,270-277,284-291,306-315,322-328,363-369,378-388,392-405,443-452,495-501,512-523,574-583	H: 1	362-375	43, 221

10

20

30

40

【表 1 - 6】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクロー ンの数	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)
HP0485	カタラーゼ様タン パク質	5-25,27-34,47-59,64-70,76-86,145-158,166-183,189- 202,217-231,235-242,260-270,278-309	A: 1, B: 2, C: 3, K: 2	1-102	44, 222
HP0508	仮想タンパク質	4-19,24-76,78-83,90-99,102-109,114-122,137-147,1 54-174,177-188,203-212,217-223,227-239	A: 1	226-325	45, 223
HP0519	保存仮想タンパク 質	7-37,71-90,94-109,117-128,141-153,179-192,199-20 6,225-231,237-243,258-264	B: 2, H: 1	40-51	46, 224
HP0525	virB11 ホモログ	13-19,25-30,46-59,75-91,101-107,114-124,129-135, 137-145,160-167,171-179,187-194,209-215,217-222, 229-239,243-249,257-265,269-275,299-308,310-327	D: 5	282-300	47, 225
HP0527	cag 病原性島タンパ ク質 (cag7-cagY)	86-100,216-230,342-369,382-388,424-430,438-445,4 52-458,488-494,501-518,554-560,568-574,584-592,6 03-609,611-629,639-645,652-661,669-699,708-714,7 26-738,747-753,763-775,785-791,794-807,815-824,8 26-845,854-860,863-868,870-883,892-898,901-906,9 09-921,930-937,946-959,968-974,977-990,998-1007, 1009-1027,1037-1043,1046-1051,1053-1066,1075-1 081,1084-1089,1092-1103,1113-1119,1122-1135,11 43-1152,1154-1172,1182-1188,1191-1196,1200-121 0,1220-1226,1229-1235,1237-1249,1259-1265,1268- 1281,1289-1298,1305-1318,1328-1334,1337-1343,1 345-1357,1367-1373,1390-1396,1405-1411,1418-14 23,1426-1435,1445-1455,1474-1483,1493-1500,150 5-1512,1517-1524,1538-1544,1568-1578,1595-1601, 1674-1682,1687-1720,1728-1736,1738-1744,1754-1 761,1764-1774,1798-1824,1836-1842,1886-1893,18 95-1903	A: 316, B: 366-781, 88, C: 61, F: 782-1518, 12, G: 1, H: 1731-1747 1, I: 7, J: 274, K: 93, L: 14, M: 12	366-781, 782-1518, 1731-1747	48, 226
HP0540	cag 病原性島タンパ ク質 (cag19)	4-17,20-39,46-55,60-66,102-110,114-122,125-131,1 61-167,172-178,185-190,195-202,218-232,236-252,2 64-291,293-302,309-315,324-339	A: 2, B: 6, C: 2, I: 1	169-381	49, 227
HP0541	cag 病原性島タンパ ク質 (cag20)	5-10,13-40,42-53,69-75,83-89,120-135,150-161,174- 190,203-225,229-247,257-287,318-348	B: 2, G: 1	30-200	50, 228
HP0542	cag 病原性島タンパ ク質 (cag21-cagG)	7-19,43-53,64-72,124-139	B: 2, L: 18, M: 2	52-84, 120-131	51, 229

10

20

30

40

【表 1 - 7】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローン の数	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)
HP0544	cag 病原性島タンパク質 (cag23-cagE)	12-19,39-48,58-100,117-123,154-162,164-187,189-195,202-216,218-235,241-246,262-278,315-328,333-347,354-366,372-379,391-405,422-429,431-442,444-450,458-466,478-485,494-501,504-510,520-535,573-580,589-598,615-625,666-676,686-698,722-729,737-746,756-767,787-796,805-816,824-829,833-848,856-864,866-876,879-886,898-904,918-924,927-934,941-946,967-978	H: 1	561-575	52, 230
HP0545	cag 病原性島タンパク質 (cag24)	11-29,49-55,70-77,84-100,102-112,148-155,160-177,181-204	A: 1, B: 3, E: 2, K: 1	1-104	53, 231
HP547	cag 病原性島タンパク質 (cag26-cagA)	27-44,64-71,122-133,151-156,164-178,214-220,226-232,235-244,253-262,282-288,294-310,317-325,350-356,362-368,376-383,438-443,449-454,459-464,492-498,500-511,529-535,538-546,567-573,597-603,660-665,674-679,724-734,763-769,773-784,791-801,807-815,821-826,840-848,863-868,897-902,908-928,932-953,956-975,980-987,990-996,1012-1018,1042-1063,1095-1116,1149-1157,1160-1167	A: 72, B: 65, C: 175, D: 74, F: 51, G: 108, J: 9, K: 23, L: 33, M: 129	110-357, 358-501, 502-1161	54, 232
HP0563	仮想タンパク質	4-21,64-71,73-84,128-138,144-162,203-217,240-263,288-298,300-308,310-317,325-351,369-380,391-411	L: 134	330-345	55, 233
HP0604	ウロポルフィリノーゲン デカルボキシラーゼ (hemE)	5-11,25-31,39-48,51-79,89-98,100-122,135-148,166-201,203-227,230-250,254-260,266-272,274-282,299-305,328-337	A: 2, B: 1, F: 1, K: 2	31-45	56, 234
HP0607	アクリフラビン 抵抗性タンパク質 (acrB)	12-23,29-48,51-60,66-72,75-81,83-93,103-115,133-148,168-174,195-204,222-229,231-240,242-251,270-280,286-305,322-344,349-360,364-370,378-400,421-441,448-484,486-493,495-501,504-534,547-561,567-590,597-607,621-635,643-649,658-685,688-694,702-711,717-731,737-742,759-765,767-772,776-786,803-809,815-825,854-908,910-919,923-930,942-948,961-975,994-1014	F: 2, G: 1, I: 1, L: 2	915-940	57, 235
HP0630	薬剤活性モジュレーター (mda66)	4-9,32-47,51-61,75-96,139-191	A: 1, F: 1, H: 2, I: 1	1-124	58, 236
HP0635	仮想タンパク質	4-13,17-38,43-49,55-76,88-95,110-121,128-146,151-157,162-214,222-240,243-249,251-273,275-281,292-298,300-309,312-320,322-331,355-369,376-408,446-460,471-482,485-509	F: 2, H: 1	191-203	59, 237

10

20

30

40

【表 1 - 8】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローンの 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)
HP0655	保護表面抗原 D15	4-21,72-82,89-103,106-115,118-124,140-146,174-184,191-200,204-213,218-224,261-266,282-293,299-309,311-340,342-358,362-372,381-389,391-402,413-421,438-447,457-464,470-478,501-507,545-560,578-624,631-641,658-670,680-689,717-738,753-759,795-805,816-822,830-838,842-848,869-881,892-898	G: 1, H: 2	33-51, 818-835	60, 238
HP0659	仮想タンパク質	4-21,79-85,156-177,183-188,206-214,243-249,261-269,287-292,315-322,334-345,360-366,374-390,402-411	A: 4, B: 1, K: 2	37-97, 260-399	61, 239
HP0683	UDP-N-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼ (glmU)	4-9,19-54,58-78,97-104,111-120,126-134,137-145,163-173,178-188,193-203,211-224,246-286,288-324,337-346,355-362,374-390,392-398,409-417	G:8	240-249	62, 240
HP0687	鉄(II)輸送タンパク質 (feoB)	5-12,14-31,35-41,43-61,82-92,97-105,134-145,155-166,184-203,215-223,225-251,272-279,281-306,310-345,358-418,435-473,482-490,525-532,538-547,549-563,578-604,613-639	F: L, L: 3	144-154	63, 241
HP0696	N-メチルヒグントイナーゼ	53-59,64-72,74-100,133-152,154-172,176-181,207-214,225-238,275-297,304-310,331-340,362-367,384-395,403-410,437-443,448-456,482-490,579-597,602-610,625-630,633-651,699-707,709-715,734-743,750-762	A: 5, B: 6, C: 13, E: 2, F: 1, G: 1, L:	544-685	64, 242
HP0701	DNA ジャイレース, サブ A (gyrA)	12-18,22-40,45-83,89-97,103-109,147-153,159-173,195-204,210-219,243-253,259-265,273-282,303-309,315-325,332-340,346-358,362-367,377-390,393-402,418-426,447-455,467-480,505-512,514-525,548-561,566-576,584-596,619-626,638-645,649-659,661-680,699-708,714-720,753-759,766-772,775-781,801-808	G: 2, H: 2, I: J: 3, L: 1	202-218, 282-299, 339-350, 617-628	65, 243
HP0706	外膜タンパク質 (omp15)	5-33,52-62,87-101,111-135,137-143,145-152,190-202,209-221,233-245,253-270	J: 1, K: 1, L: 37	151-215	66, 244
HP0714	RNAポリメラーゼ シグマ-54 因子 (rpoN)	19-29,32-39,42-48,75-94,124-135,137-145,152-160,176-182,193-203,215-236,266-273,275-291,297-306,311-319,322-342,348-360,369-378,394-401	F: 7	48-64	67, 245
HP0717	DNAポリメラーゼ III ガンマおよび タウサブユニット (dnaX)	4-11,13-33,36-43,53-63,65-80,112-129,134-141,143-155,157-168,178-188,191-199,201-207,215-229,242-255,263-270,283-315,320-329,333-338,340-349,412-426,465-478,485-490,498-512,540-554	A: 2, B: 3, M: 2	390-516	68, 246

10

20

30

40

【表 1 - 9】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローン の数	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)
HP0723	L-アスパラギナーゼ III (ansB)	4-18,23-32,41-47,54-70,88-99,104-111,118-138,143-148,150-162,168-175,181-188,203-211,214-220,227-245,251-268,275-281,287-296,323-333	B: 1, F: 1, H: 1-90 6, K: 2	1-90	69, 247
HP0727	転写制御因子, 推定	8-34,38-49,72-83,85-91,94-104,112-125,134-142,146-168,181-189,191-198,202-214,222-233,242-254,256-262,273-278,287-294,314-325	B: 2, G: 2, I: 2	141-159	70, 248
HP0752	鞭毛 フック結合タンパク質 2 (fliD)	4-24,30-36,47-75,82-105,124-134,151-157,192-202,208-214,219-226,234-247,285-290,318-324,332-340,343-349,380-386,453-462,472-478,484-501,531-540,550-557,604-612,620-625,642-648,652-671	A:7, B:4, C:2, G:1, H:1, I:3, J:1, K:2	64-84, 93-180, 181-446	71, 249
HP0760	保存 仮想タンパク質	12-18,24-32,68-75,77-83,96-101,109-116,129-136,152-164,175-184,190-199,206-215,224-233,241-250,258-264,273-292,302-312,319-331,334-346,348-368,387-395,408-416,420-429,437-452	F: 3, G: 1	364-374	72, 250
HP0836	仮想タンパク質	11-28,36-52,60-67,74-79,108-116	B: 1, L: 4	61-76	73, 251
HP0850	I型制限酵素 M タンパク質 (hsdM)	20-27,38-49,69-74,84-107,138-145,161-168,179-195,210-226,228-252,267-281,283-296,305-311,333-340,342-356,361-372,380-399,401-414,458-466,475-481,492-507,515-520	H: 2	146-160	74, 252
HP0853	ABC トランスポーター, ATP結合性タンパク質 (yheS)	43-61,68-74,76-90,120-128,130-149,156-161,164-182,206-234,242-252,269-274,291-304,332-345,349-355,360-371,374-388,434-440,447-453,459-465,469-496,504-522	M: 15	261-285	75, 253
HP0863	仮想タンパク質	4-17,24-30,37-49,87-98,118-124,126-136,144-171,176-188,206-214,216-228,233-240,246-252,262-271,277-297,307-330,333-342,346-352,355-361,368-386,391-400,413-420,474-480	E: 1, M: 11	401-427	76, 254
HP0874	仮想タンパク質	15-26,31-46,51-72,80-93,96-109,131-137,150-158,179-185,189-209,211-219,221-234,241-247,255-262,265-271,283-288	F: 2	173-190	77, 255
HP0875	カタラーゼ	28-37,39-45,51-58,77-84,89-97,132-148,171-180,199-205,212-218,220-226,257-265,273-300,307-327,334-340,344-365,385-390,402-408,426-436,450-468,476-485	K: 6	425-497	78, 256

10

20

30

40

【表 1 - 10】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローンの 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)
HP0876	鉄-制御外膜タンパク質 (frpB)	4-25,70-76,80-88,90-100,120-128,162-169,183-203,261-277,279-289,291-297,302-308,321-327,339-353,358-377,392-401,404-410,414-422,443-450,456-461,470-488,490-497,510-535,570-611,618-630,639-647,649-660,668-690,702-716,718-724,737-747,750-764	B: 1, E: 1, G: 1, I: 1	497-509	79, 257
HP0887	細胞空胞化毒素	12-48,50-64,99-108,216-223,235-241,244-254,262-274,287-293,310-316,320-326,361-366,377-383,390-395,408-414,418-425,438-444,462-469,494-505,524-530,536-547,551-566,592-598,601-613,678-685,687-699,709-717,727-737,751-757,760-765,772-778,782-799,801-807,822-830,859-868,870-878,884-890,898-903,909-919,953-969,973-980,990-1000,1002-1019,1041-1047,1059-1065,1090-1095,1116-1127,1130-1139,1143-1149,1151-1168,1178-1183,1188-1195,1197-1209,1213-1220,1226-1234,1236-1247,1255-1274,1276-1282	A: 1, B: 5, C: 2, D: 3, E: 5, G: 2, H: 3, I: 2, K: 1, L: 29, M: 7	76-100, 270-284, 309-438, 493-505, 786-942, 947-967	80, 258
HP0891	保存仮想タンパク質	4-9,24-34,46-95,97-109,119-130	F: 2	138-156	81, 259
HP0910	アデニン特異的DNAメチルトランスフェラーゼ (HINDIIM)	9-26,28-35,43-53,55-68,83-92,99-105,110-135,139-149,157-162,164-170,173-183,193-208,210-230,239-245,253-259,263-271,293-305,310-320,322-331,336-343,351-364,367-376	E: 33, H: 1	92-107, 154-173	82, 260
HP0913	外膜タンパク質 (omp21)	19-39,52-62,108-117,145-152,160-168,194-203,229-240,252-268,280-287,308-316,333-339,383-390,403-412,414-424,438-445,464-472,479-484,489-505,510-526	C: 1, I: 1	247-260	83, 261

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

ピロリ菌 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 ングあたり の選択され たクローン の数	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)
HP0922	毒素様外膜タンパク質	5-17,25-52,60-77,105-113,118-125,162-167,228-234,272-279,328-334,341-357,381-395,400-406,512-518,557-569,586-592,645-651,690-695,701-709,720-726,733-743,751-758,781-786,879-886,929-934,939-944,952-960,965-975,994-1001,1039-1045,1102-1109,1164-1181,1198-1206,1223-1229,1253-1259,1283-1292,1312-1317,1339-1349,1360-1370,1389-1398,1400-1412,1452-1465,1470-1484,1490-1497,1519-1525,1554-1564,1578-1591,1623-1636,1638-1646,1669-1679,1685-1697,1704-1711,1713-1720,1730-1736,1738-1749,1756-1764,1778-1786,1796-1803,1817-1826,1849-1866,1975-1993,2017-2032,2044-2053,2070-2086,2091-2109,2116-2127,2156-2167,2182-2188,2197-2202,2244-2252,2281-2287,2290-2307,2350-2361,2383-2404,2425-2433,2445-2455,2495-2505	A: 1, B: 3, D: 1, F: 4, G: 2	394-549	84, 262
HP0925	組換え DNA 修復タンパク質 (recR)	9-24,31-53,57-67,69-79,84-114,133-141,144-172,178-186	E: 1, G: 1	13-46	85, 263
HP0953	仮想タンパク質	4-25,27-35,43-52,59-70,79-91,115-130,136-152,154-163,170-179	J: 3	1-58	86, 264
HP0973	仮想タンパク質	4-30,49-55,71-80,96-105,111-126,139-146,149-162,239-245,279-285,290-296,300-307,331-337,343-350	B: 3, K: 2	250-351	87, 265
HP0977	保存仮想分泌タンパク質	9-27,34-41,43-51,92-111,114-120,123-131,139-150,156-171,176-186,188-204,229-241,252-258,266-279,288-297,319-334,338-348,373-379,389-398,431-439,479-484	A: 2	214-398	88, 266
HP1019	セリンプロテアーゼ (htrA)	4-15,18-27,47-52,68-83,91-97,104-110,115-121,139-147,157-164,198-206,227-236,241-254,264-273,278-289,311-320,353-361,372-383,405-420,426-434	A: 3, H: 1, I: 1	232-386	89, 267
HP1024	コ-シヤベロン-彎曲 DNA 結合性タンパク質 A (CbpA)	4-10,24-34,91-97,129-141,156-163,184-190,205-219,229-235,256-273,278-285	E: 1, G: 1, L: 1	93-116	90, 268
HP1052	UDP-3-O-アシル N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ (envA)	7-29,35-54,71-83,85-91,104-111,122-134,138-144,146-154,158-174,177-183,186-201,207-215,223-235,240-247,262-273,275-283,287-292	E: 1, F: 5, G: 1, H: 1	48-66	91, 269

10

20

30

40

【表 1 - 1 2】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローン の数	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)
HP1090	細胞分裂タンパク質 (ftsK)	7-27,31-47,49-70,75-102,110-149,157-171,217-223,235-251,294-302,358-364,367-375,387-393,395-412,423-430,441-451,456-470,472-486,488-495,499-509,515-529,536-549,556-570,574-603,607-615,625-633,642-658,670-676,683-702,708-716,720-726,747-756,763-784,803-812,815-826	D: 2, F: 1, G: 1, H: 1	475-490	92, 270
HP1098	保存 仮想 分泌タンパク質	7-22,30-38,53-59,64-75,83-95,97-112,120-131,133-142,145-151,154-166,172-180,189-203,227-238,277-287	A: 4, B: 1, F: 1, I: 2, K: 1	9-156, 174-287	93, 271
HP1116	仮想タンパク質	13-23,25-32,111-117,150-164,185-193,207-212,216-224,230-236,263-272,304-311,342-348,374-385,391-407,444-458,480-487,489-499,523-542,544-558,572-579,620-640,686-696,703-710,742-755,765-772,817-822,830-837,865-872,931-937	I: 1, K: 2, L: 1	66-86	94, 272
HP1117	保存 仮想 分泌タンパク質	4-27,49-56,62-70,86-92,121-127,151-163,170-182,195-202,212-226,237-243	A: 1, F: 4	234-254	95, 273
HP1119	鞭毛フック結合タンパク質 1 (HAP1) (flgK)	4-10,13-24,39-51,62-78,92-104,107-117,134-141,156-161,166-181,210-216,222-229,256-266,273-280,297-304,313-330,336-349,371-376,433-439,443-448,481-493,506-515,527-534,560-572,575-583,587-593	A: 7, B: 1, D: 1, F: 3, J: 1	252-483	96, 274
HP1126	コリシン耐性様タンパク質 (tolB)	4-15,21-38,45-56,81-95,102-108,118-130,133-147,152-162,166-171,199-204,211-218,230-240,253-261,274-283,288-294,312-317,325-336,344-357,391-414	A: 3, B: 2, J: 1	24-146	97, 275
HP1152	シグナル認識粒子タンパク質 (ffh)	26-31,38-56,65-82,90-101,112-119,123-153,175-188,197-216,234-242,249-265,273-286,290-305,327-335,338-346,361-372,394-404	D: 1, F: 4, G: 10	290-306	98, 276
HP1153	バリル-tRNA シンセターゼ (valS)	17-26,43-48,50-73,81-93,95-107,139-146,158-168,171-176,190-196,202-212,216-223,243-266,274-282,308-313,324-330,344-378,380-387,403-422,427-443,448-455,457-465,491-515,517-528,553-567,589-599,610-617,642-648,670-697,709-717,726-743,745-759,769-803,807-823,840-849	F: 4, G: 3, L: 1	820-851	99, 277
HP1186	脱炭酸酵素	4-18,39-48,53-63,66-90,102-117,125-134,137-145,156-162,169-197	D: 5, H: 1	26-40, 56-80	100, 278

10

20

30

40

【表 1 - 1 3】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローンの数	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)
HP1198	DNA-指向RNAポリメラーゼ, ベータサブユニット (rpoB)	21-33,36-42,49-60,68-76,91-105,123-130,141-161,169-178,185-190,192-199,205-214,223-233,239-247,260-269,284-293,300-314,324-352,357-364,373-382,389-403,420-432,438-446,466-471,477-484,503-509,549-556,558-576,600-623,625-635,654-661,663-669,671-687,702-716,735-741,744-750,757-766,776-786,807-815,824-832,854-860,863-897,909-915,920-946,952-959,982-997,1024-1038,1049-1055,1071-1085,1104-1113,1121-1132,1138-1150,1187-1196,1212-1221,1227-1236,1257-1262,1264-1278,1282-1294,1307-1318,1353-1370,1382-1388,1396-1409,1434-1440,1446-1454,1465-1478,1485-1513,1516-1529,1540-1545,1563-1568,1575-1593,1607-1616,1628-1645,1648-1661,1676-1682,1689-1697,1713-1719,1739-1749,1753-1758,1763-1774,1797-1803,1807-1846,1855-1874,1877-1891,1893-1907,1912-1925,1931-1943,1955-1965,1976-1990,2032-2043,2045-2051,2099-2105,2131-2138,2161-2179,2188-2199,2205-2216,2219-2227,2235-2245,2247-2267,2277-2288,2294-2304,2314-2326,2346-2358,2365-2377,2383-2402,2407-2423,2437-2450,2454-2473,2489-2497,2525-2531,2557-2570,2580-2587,2589-2599,2621-2641,2647-2653,2661-2677,2685-2690,2697-2717,2722-2733,2739-2777,2786-2793,2801-2808,2811-2822,2825-2835,2838-2845,2859-2871,2877-2883	A: 26, B: 14, C: 25, D: 3, F: 1, G: 3, I: 3, J: 31, K: 2	213-344, 954-1080, 2524-2733	101, 279
HP1205	翻訳伸長因子 EF-Tu (tufB)	10-16,18-23,28-41,63-69,77-91,101-109,118-136,146-153,155-162,168-179,192-207,217-226,229-235,239-254,279-286,294-307,313-319,334-341,344-353,363-377,390-396	A: 4, B: 1	178-328	102, 280
HP1229	アスパルトキナーゼ (lysC)	18-42,68-84,89-95,100-105,107-115,125-135,154-177,189-195,205-228,236-243,252-259,279-300,309-313,323-331,340-351,353-364,377-402	E: 1, K: 1, L: 3	85-97	103, 281
HP1243	外膜タンパク質 (omp28)	4-18,26-32,66-76,100-126,151-159,178-186,188-194,200-210,241-248,253-259,262-279,284-291,307-313,315-322,327-337,376-386,399-407,432-441,467-473,487-497,499-505,543-549,560-568,585-593,598-604,608-614,630-642,647-653,690-703,717-730	B: 3, F: 1, G: 1, H: 1	21-200, 468-480	104, 282

10

20

30

40

【表 1 - 1 4】

ビロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローン の数	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)
HP1254	ビオチン合成タンパク質 (bioC)	17-49,52-58,62-73,78-97,100-117,122-172,185-190, 193-217,225-236	H: 2, I: 2	33-42	105, 283
HP1265	仮想タンパク質	7-39,50-58,73-89,96-107,109-120,126-142,152-170, 178-202,205-211,224-244,249-259,261-270,300-310,1 312-325	F: 2, G: 6, I: 1	158-169	106, 284
HP1282	アントラニル酸シ ンターゼコンポー ネント I (trpE)	4-31,40-64,71-82,85-92,102-124,126-139,147-152,1 59-173,176-188,195-207,210-216,234-241,249-256,2 58-276,279-293,296-302,310-315,349-356,363-378,3 80-403,411-426,435-441,448-459,463-476,488-494	E: 20, G: 1, I: 1	201-221	107, 285
HP1329	カチオン流出システ ムタンパク質 (czcA)	5-13,15-74,87-104,107-120,123-129,136-145,150-19 1,193-206,227-248,250-264,278-302,304-323,332-37 8,384-407,409-419,425-457,462-471,474-497,511-54 5,555-564,571-578,585-598,640-647,669-675,682-69 1,693-705,729-743,752-761,772-780,786-804,808-81 8,822-846,858-880,884-900,910-939,941-947,962-97 1,973-988,998-1003,1007-1027	B: 2, F: 1, J: 1, L: 2	236-259	108, 286
HP1339	バイオポリマー輸 送タンパク質 (exbB)	4-19,27-68,81-111,121-160	F: 5, I: 4	60-79	109, 287
HP1341	シデロホア-媒介鉄 輸送タンパク質	4-37,40-46,52-57,199-205,222-229,236-244,250-267 269-282	A: 20, B: 23, C: 30, E: 31, F: 5, G: 3, H: 6, I: 1, J: 2, K: 5	27-197	110, 288
HP1342	外膜タンパク質 (omp29)	4-16, 24-30, 32-38, 63-75, 86-92, 98-111, 113-126, 160-165, 170-180, 198-204, 227-233, 239-245, 253-273, 308-314, 352-365, 382-387, 395-403, 423-429, 472-482, 484-493, 501-507, 518-526, 536-541, 543-550, 556-562, 586-600, 626-633, 649-661, 680-688	A: 1, B: 3, C: 1, D: 1, E: 1, F: 2, H: 7	546-559	111, 289
HP1345	ホスホグリセリン酸 キナーゼ	16-33,48-59,63-71,77-92,94-109,117-124,139-151,1 69-181,184-227,233-249,251-261,263-275,282-294,2 97-321,326-332,341-355,383-399	D: 20, I: 6	258-272	112, 290
HP1350	プロテアーゼ	11-26,31-39,43-52,55-62,64-70,80-94,123-133,135-1 41,172-181,185-206,209-218,224-230,238-244,251-2 62,264-271,290-301,306-324,333-340,350-357,367-3 75,390-397,434-441,443-448	A: 3, B: 1, C: 1, G: 1, K: 2, M: 12	77-226, 350-429	113, 291

10

20

30

40

【表 1 - 15】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクロー ンの数	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)
HP1374	ATP-依存性 プロテ アーゼ ATPase サブ ユニット (clpX)	4-13,22-27,31-45,50-59,72-96,99-114,131-141,143-1 50,159-176,180-186,189-198,208-214,234-253,271-2 87,294-299,310-366,382-390,398-416,424-443	G: 9, M: 2	283-305	114, 292
HP1393	DNA 修復 タンパク 質 (recN)	9-26,30-53,62-72,86-95,112-122,136-145,153-160,2 09-221,227-237,241-268,281-288,291-298,308-314,3 21-328,336-346,351-379,388-397,409-416,423-433,4 43-481,511-519	E: 1, F: 2, G: 7, I: 1	213-232	115, 293
HP1448	リボスクレアーゼ P, タンパク質 コンポ ーネント (mpA)	12-18,25-31,38-50,59-67,71-82,96-126	G: 6	76-88	116, 294
HP1453	保存 仮想 タンパク 質	4-25,39-44,64-71,74-88,100-113,128-138,151-162,1 64-177,185-190,204-213,233-239,246-254,281-286,2 93-306,309-318,333-347,349-359,385-398,404-423,4 58-465,477-484,490-499,501-533,554-566,582-590,5 96-616,624-629,631-639,654-680,694-720,735-743	B: 1, D: 4, F: 2, J: 1, K: 11, L: 3	2-100	117, 295
HP1454	仮想 タンパク質	4-16,36-41,52-75,98-107,109-117,122-128,133-139, 141-155,159-165,169-182,187-193,195-201,211-224, 230-236,247-269,278-290	B: 1, M: 8	75-92	118, 296
HP1460	DNA ポリメラーゼ III アルファ-サブユ ニット (dnaE)	7-21,25-33,37-43,87-94,103-120,131-147,168-174,1 97-203,207-212,227-237,247-257,263-271,279-287,2 98-306,320-325,332-340,363-374,379-384,390-401,4 03-414,428-433,448-457,462-475,483-490,513-519,5 25-535,543-554,559-566,571-620,625-631,636-642,6 59-670,688-706,708-723,770-779,787-793,796-807,8 20-840,848-854,863-874,895-905,912-919,934-942,9 68-975,983-1000,1012-1019,1026-1036,1050-1060,1 064-1070,1081-1091,1094-1108,1112-1118,1140-11 52,1164-1169,1172-1180,1187-1192	E: 3, G: 2, I: 732-748	732-748	119, 297
HP1497	ペプチジル-tRNA ヒ ドローラーゼ (pth)	23-40,42-59,66-73,78-97,111-128,130-141,157-166, 178-183	E: 6, F: 1, H: 2	53-71	120, 298
HP1527	仮想 タンパク質	4-27,38-44,47-57,59-85,99-106,114-121,154-166,18 1-186,193-198,238-244,253-262,272-278,287-299,31 4-320,338-350,358-368,382-388,407-416,433-446,45 6-461,463-473	B: 3, C: 1, I: 7	86-195	121, 299
HP1564	外膜 タンパク質	5-24,38-59,64-80,87-99,105-126,134-142,149-163,1 65-179,181-202,205-220,227-233,243-250,257-263	A: 2, B: 1, C: 3, F: 1, H: 1	87-245	122, 300

10

20

30

40

【表 1 - 1 6】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローン の数	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)
HP1565	ペニシリン結合性 タンパク質 2 (pbp2)	5-32,47-53,66-79,81-97,115-151,155-174,183-188,196-210,215-226,230-238,253-258,263-270,276-282,295-301,304-325,334-344,360-390,397-412,425-432,434-462,478-494,508-526,539-564,571-579	A: 1, F: 2, H: 1, L: 5	347-371, 375-386	123, 301
HP1574	リボフラビンシ ターゼ アルファ サ ブユニット (ribC)	4-15,36-44,49-56,60-66,68-82,84-103,109-115,118-141,147-154,160-168,176-185	H: 1, M: 5	26-39	124, 302
ARF0044	仮想タンパク質	7-13,23-33	H: 1, I: 2	13-21	125, 303
ARF0048	仮想タンパク質	無し	F: 1, G: 1, I: 4, L: 8	2-10	126, 304
ARF0143	仮想タンパク質	4-9,12-18,35-42,49-62	F: 1	6-18	127, 305
ARF0184	仮想タンパク質	19-25	A: 1, I: 6	1-13	128, 306
ARF0219	仮想タンパク質	15-21,27-45	E: 7	12-25	129, 307
ARF0308	仮想タンパク質	14-20	E: 41	1-14	130, 308
ARF0349	仮想タンパク質	4-18	G: 11	13-26	131, 309
ARF0387	仮想タンパク質	8-21	G: 12, H: 2, K: 1	2-20	132, 310
ARF0402	仮想タンパク質	4-14	F: 2, G: 10, H: 1, M: 2	4-16	133, 311
ARF0501	仮想タンパク質	無し	M: 2	3-12	134, 312
ARF0509	仮想タンパク質	6-14,6-25,35-57	G: 5, H: 1, M: 3	2-14	135, 313
ARF0522	仮想タンパク質	6-25,35-57	F: 1, I: 3, K: 2	17-31	136, 314
ARF0578	仮想タンパク質	14-25,32-46	E: 12, G: 1	5-19	137, 315
ARF0629	仮想タンパク質	18-31	G: 1, I: 7	5-16	138, 316
ARF0665	仮想タンパク質	19-24	L: 2, M: 5	4-26	139, 317
ARF0693	仮想タンパク質	13-21,29-34,47-58,61-73	G: 1, I: 6	36-47	140, 318
ARF0752	仮想タンパク質	4-15	D: 3	5-24	141, 319
ARF0788	仮想タンパク質	無し	B: 1, H: 1	6-18	142, 320
ARF0819	仮想タンパク質	13-20	F: 14	4-13	143, 321
ARF0839	仮想タンパク質	無し	A: 2, C: 1, I: 1, K: 3	15-23	144, 322
ARF0868	仮想タンパク質	4-9	F: 2, G: 1	7-21	145, 323
ARF0948	仮想タンパク質	無し	F: 1	1-10	146, 324

10

20

30

40

【表 1 - 17】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクロー ンの数	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)
ARF0969	仮想タンパク質	無し	B: 1, G: 1, M: 2	4-14	147, 325
ARF1100	仮想タンパク質	4-17,35-41,46-89,93-98	A: 1, B: 1, H: 1, I: 2, M: 5	70-88	148, 326
ARF1164	仮想タンパク質	無し	G: 1, H: 3, J: 1, M: 2	11-13	149, 327
ARF1470	仮想タンパク質	4-16,26-32	G: 1, I: 1, M: 2	25-38	150, 328
ARF1553	仮想タンパク質	8-15,23-28	B: 2, F: 6, G: 2, H: 1, I: 1, K: 1	4-17	151, 329
CRF0017	仮想タンパク質	4-12	H: 1, I: 1, M: 5	1-15	152, 330
CRF0025	仮想タンパク質	4-29,31-42,52-58	E: 1, G: 1, L: 3, M: 1	6-16	153, 331
CRF0090	仮想タンパク質	4-9,24-32	F: 13, G: 1, H: 1, L: 1	9-19	154, 332
CRF0127	仮想タンパク質	4-12,18-27	L: 3, M: 10	5-18	155, 333
CRF0169	仮想タンパク質	4-11,37-56,58-92	D: 3	18-29	156, 334
CRF0190	仮想タンパク質	8-28	M: 14	20-35	157, 335
CRF0251	仮想タンパク質	無し	D: 16, E: 2, G: 3	4-15	158, 336
CRF0258	仮想タンパク質	4-23,27-39,55-63	A: 1, B: 1, C: 1, F: 1, L: 5	35-58	159, 337
CRF0354	仮想タンパク質	6-26,28-54	F: 8, H: 1	28-47	160, 338
CRF0388	仮想タンパク質	4-10,38-52,58-82	H: 1, L: 3	30-49	161, 339
CRF0409	仮想タンパク質	4-22,29-35,44-50,53-68,70-80	G: 2, H: 1, M: 10	20-33	162, 340
CRF0421	仮想タンパク質	22-28,30-36	F: 4	18-33	163, 341
CRF0480	仮想タンパク質	4-11,13-21,25-30	E: 1, L: 8	20-30	164, 342
CRF0552	仮想タンパク質	10-22	G: 1, M: 5	10-23	165, 343
CRF0563	仮想タンパク質	4-11	G: 1, L: 1, M: 6	9-20	166, 344

10

20

30

40

【表 1 - 18】

ピロリ菌 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 スクリーニングあたり の選択されたクローン の数	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)
CRF0578	仮想タンパク質	14-25,32-46	G: 1, L: 7, M: 12	6-19	167, 345
CRF0626	仮想タンパク質	5-30	L: 43	14-33	168, 346
CRF0870	仮想タンパク質	4-15,28-35,46-55,59-65,76-84	H: 6, I: 1, L: 8	9-24	169, 347
CRF0894	仮想タンパク質	27-33	L: 5	5-19	170, 348
CRF0922	仮想タンパク質	5-13	E: 11, F: 3, G: 1, H: 7, I: 1, L: 4	8-18	171, 349
CRF1012	仮想タンパク質	9-22,24-34	L: 3	21-40	172, 350
CRF1100	仮想タンパク質	4-17,35-41,46-89,93-98	E: 1, H: 5, I: 2, L: 4	71-89	173, 351
CRF1301	仮想タンパク質	4-12,14-24	H: 9, I: 2	2-17	174, 352
CRF1354	仮想タンパク質	9-17	I: 2, M: 16	5-16	175, 353
CRF1422	仮想タンパク質	7-41,48-58,63-75,80-89	G: 2, H: 1, L: 62	43-53	176, 354
CRF1489	仮想タンパク質	4-22,25-30	E: 1, F: 1, H: 5, L: 10	4-14	177, 355
CRF1549	仮想タンパク質	4-55	G: 1, M: 7	18-33	178, 356

10

20

30

【0252】

表 2:ピロリ菌株における遺伝子分布

【表 2 - 1】

ピロリ菌 抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	遺伝子分布 (28 株における 存在)	アミノ酸置換 (患者分離株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
HP0009	外膜タンパク質 (omp1)	n.d.	n.d.	1, 179
HP0010	シャペロンおよび熱ショックタンパク質 (groEL)	n.d.	n.d.	2, 180
HP0043	マンノース-6-ホスフェートイソメラーゼ (pmi)	28/28	11/247	3, 181
HP0063	仮想タンパク質	n.d.	n.d.	4, 182
HP0067	ウレアーゼアクセサリータンパク質 (ureH)	13/28	9/230	5, 183
HP0072	ウレアーゼベータサブユニット (尿素アミドヒドロラーゼ) (ureB)	n.d.	n.d.	6, 184
HP0086	保存仮想タンパク質	28/28	1/221	7, 185
HP0087	仮想タンパク質	28/28	15/241	8, 186
HP0088	RNAポリメラーゼシグマ-70因子 (rpoD)	28/28	4/226	9, 187
HP0089	pfsタンパク質 (pfs)	28/28	5/199	10, 188
HP0115	フラグリン B (flaB)	28/28	2/249	11, 189
HP0175	細胞結合性因子 2	n.d.	n.d.	12, 190
HP0121	ホスホエノールピルビン酸シンターゼ (ppsA)	28/28	0/240	13, 191
HP0123	スレオニル-tRNAシンゼターゼ (thrS)	28/28	7/238	14, 192
HP0130	仮想タンパク質	28/28	8/241	15, 193
HP0150	仮想タンパク質	28/28	5/111	16, 194
HP0183	セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (glyA)	28/28	2/227	17, 195
HP0192	フマル酸レダクターゼ、フラボタンパク質サブユニット (frdA)	28/28	3/219	18, 196
HP0197	S-アデノシルメチオニンシンゼターゼ 2 (metX)	28/28	1/243	19, 197
HP0201	脂肪酸/リン脂質合成タンパク質 (plsX)	28/28	0/176	20, 198
HP0202	ペーテクトアシル-アシルキャリアタンパク質シンターゼ III	28/28	7/232	21, 199
HP0210	シャペロンおよび熱ショックタンパク質 C62.5 (htpG)	n.d.	n.d.	22, 200
HP0211	保存仮想分泌タンパク質	28/28	3/201	23, 201
HP0228	保存仮想内在性膜タンパク質	28/28	3/248	24, 202

10

20

30

40

【表 2 - 2】

ピロリ菌 抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	遺伝子分布 (28株における 存在)	アミノ酸置換 (癌患者分離株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
HP0229	外膜タンパク質 (omp6)	n.d.	n.d.	25, 203
HP0235	保存 仮想分泌タンパク質	n.d.	n.d.	26, 204
HP0239	グルタミル-tRNA レダクターゼ (hemA)	7/28	4/257*	27, 205
HP0258	保存 仮想 内在性膜タンパク質	28/28	14/254	28, 206
HP0266	ジヒドロオロターゼ (pyrC)	15/28	14/253	29, 207
HP0279	リボ多糖 ヘプトシルトランスフェラーゼ-1 (rfaC)	28/28	15/246	30, 208
HP0289	毒素様 外膜タンパク質	28/28	12/241	31, 209
HP0292	仮想タンパク質	28/28	9/245	32, 210
HP0295	フラグリンB ホモログ (fla)	14/28	9/224*	33, 211
HP0349	CTP シンゼターゼ (pyrG)	28/28	2/249	34, 212
HP0351	鞭毛 基底小体 M-環タンパク質 (fliF)	28/28	2/249	35, 213
HP0380	グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ (gdhA)	28/28	9/253	36, 214
HP0392	ヒスチジンキナーゼ (cheA)	27/28	4/259; 5 aa 挿入, 4 aa 欠失	37, 215
HP0401	β-ホスホシキミ酸 1-カルボキシ ビニルトランスフェラーゼ (aroA)	28/28	14/248	38, 216
HP0406	仮想タンパク質	28/28	2/146	39, 217
HP0409	GMP シンターゼ (guaA)	28/28	9/252	40, 218
HP0413	トランスボサーゼ-様タンパク 質, PS3IS	10/28	0/268*	41, 219
HP0459	virB4 ホモログ (virB4)	9/28	6/248*	42, 220
HP0480	GTP結合性タンパク質, fusA-ホ モログ (yihK)	n.d.	n.d.	43, 221
HP0485	カタラーゼ-様タンパク質	28/28	7/252	44, 222
HP0508	仮想タンパク質	28/28	3/260	45, 223
HP0519	保存 仮想タンパク質	28/28	6/224; 1 aa 挿入, 1 aa 欠失	46, 224
HP0525	virB11 ホモログ	24/28	0/257	47, 225
HP0527	cag 病原性 島タンパク質 (cag7-cagY)	22/28	4/214	48, 226
HP0540	cag 病原性 島タンパク質 (cag19)	25/28	5/251	49, 227
HP0541	cag 病原性 島タンパク質 (cag20)	26/28	3/251	50, 228
HP0542	cag 病原性 島タンパク質 (cag21-cagG)	23/28	0/115	51, 229

10

20

30

40

【表 2 - 3】

ピロリ菌 抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	遺伝子分布 (28 株における 存在)	アミノ酸置換 (癌患者分離株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
HP0544	cag 病原性 島 タンパク質 (cag23-cagE)	11/28	n.d.	52, 230
HP0545	cag 病原性 島 タンパク質 (cag24)	25/28	1/153	53, 231
HP547	cag 病原性 島 タンパク質 (cag26-cagA)	24/28	20/256; 1 aa 挿入*	54, 232
HP0563	仮想 タンパク質	28/28	9/192	55, 233
HP0604	ウロポルフィリノーゲン デカル ボキシラーゼ (hemE)	28/28	5/260	56, 234
HP0607	アクリフラビン 抵抗性 タンパク 質 (acrB)	28/28	0/254	57, 235
HP0630	薬剤活性モジュレーター (mda66)	28/28	2/112*	58, 236
HP0635	仮想 タンパク質	24/28	13/135	59, 237
HP0655	保護表面抗原 D15	28/28	n.d.	60, 238
HP0659	仮想 タンパク質	6/28	14/187	61, 239
HP0683	UDP-N-アセチルグルコサミン ピロホスホリラーゼ (glmU)	28/28	8/193	62, 240
HP0687	鉄(II) 輸送 タンパク質 (feoB)	28/28	2/203	63, 241
HP0696	N-メチルヒダントイナーゼ	28/28	2/206	64, 242
HP0701	DNA ジャイレース, サブ A (gytA)	28/28	5/224	65, 243
HP0706	外膜 タンパク質 (omp15)	28/28	2/167	66, 244
HP0714	RNA ポリメラーゼ シグマ-54 因 子 (rpoN)	28/28	8/200	67, 245
HP0717	DNA ポリメラーゼ III ガンマ お よびタウサブユニット (dnaX)	28/28	15/137; 2 aa 挿入*	68, 246
HP0723	L-アスパラギナーゼ II (ansB)	28/28	12/220	69, 247
HP0727	転写制御因子, 推定	28/28	4/207	70, 248
HP0752	鞭毛 フック結合 タンパク質 2 (fliD)	28/28	2/191	71, 249
HP0760	保存 仮想 タンパク質	28/28	2/211	72, 250
HP0836	仮想 タンパク質	28/28	1/82	73, 251
HP0850	I型制限酵素 M タンパク質 (hsdM)	28/28	10/181	74, 252
HP0853	ABC トランスポーター, ATP結合 性 タンパク質 (yheS)	19/28	2/198*	75, 253
HP0863	仮想 タンパク質	27/28	2/161	76, 254
HP0874	仮想 タンパク質	28/28	3/243	77, 255

10

20

30

40

【表 2 - 4】

ピロリ菌 抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	遺伝子分布 (28 株における 存在)	アミノ酸置換 (癌患者分離株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
HP0875	カタラーゼ	n.d.	n.d.	78, 256
HP0876	鉄-制御外膜タンパク質 (frpB)	28/28	4/193	79, 257
HP0887	細胞空胞化毒素	28/28	9/228*	80, 258
HP0891	保存 仮想タンパク質	18/28	2/149*	81, 259
HP0910	アデニン特異的 DNA メチルト ランスフェラーゼ (HINDIIM)	27/28	3/205	82, 260
HP0913	外膜タンパク質 (omp21)	28/28	12/172; 1 aa 欠失	83, 261
HP0922	毒素様外膜タンパク質	28/28	27/198	84, 262
HP0925	組換え DNA 修復タンパク質 (recR)	28/28	1/159	85, 263
HP0953	仮想タンパク質	28/28	2/164	86, 264
HP0973	仮想タンパク質	19/28	6/248; 1 aa 欠失	87, 265
HP0977	保存 仮想分泌タンパク質	28/28	9/238	88, 266
HP1019	セリンプロテアーゼ (htrA)	n.d.	n.d.	89, 267
HP1024	コ-シャペロン-彎曲 DNA 結合性 タンパク質 A (CbpA)	25/28	5/167	90, 268
HP1052	UDP-3-0-アシル N-アセチルグル コサミンデアセチラーゼ (envA)	28/28	5/186	91, 269
HP1090	細胞分裂タンパク質 (ftsK)	28/28	2/223	92, 270
HP1098	保存 仮想分泌タンパク質	n.d.	n.d.	93, 271
HP1116	仮想タンパク質	28/28	192/283	94, 272
HP1117	保存 仮想分泌タンパク質	n.d.	n.d.	95, 273
HP1119	鞭毛 フック結合タンパク質 1 (HAP1) (flgK)	28/28	7/213	96, 274
HP1126	コリシン耐性様タンパク質 (tolB)	28/28	4/241	97, 275
HP1152	シグナル認識粒子タンパク質 (ffh)	n.d.	n.d.	98, 276
HP1153	バリンル-tRNA シンゼターゼ (valS)	28/28	14/243	99, 277
HP1186	脱炭酸酵素			100, 278
HP1198	DNA-指向 RNA ポリメラーゼ, ベータサブユニット (rpoB)	28/28	7/232	101, 279
HP1205	翻訳伸長因子 EF-Tu (tufB)	n.d.	n.d.	102, 280
HP1229	アスパルトキナーゼ (lysC)	27/28	4/245*	103, 281
HP1243	外膜タンパク質 (omp28)	n.d.	n.d.	104, 282
HP1254	ビオチン合成タンパク質 (bioC)	28/28	9/169	105, 283
HP1265	仮想タンパク質	28/28	19/216	106, 284

10

20

30

40

【表 2 - 5】

ピロリ菌 抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	遺伝子分布 (28 株における 存在)	アミノ酸置換 (病患者分離株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
HP1282	アントラニル酸 シンターゼ コン ポーネント I (trpE)	28/28	12/193	107, 285
HP1329	カチオン流出システム タンパク 質 (czcA)	28/28	3/196	108, 286
HP1339	バイオポリマー 輸送 タンパク質 (exbB)	27/28	1/109*	109, 287
HP1341	シデロホア-媒介鉄 輸送 タンパ ク質	28/28	12/179*	110, 288
HP1342	外膜 タンパク質 (omp29)	n.d.	n.d.	111, 289
HP1345	ホスホグリセリン酸 キナーゼ	28/28	3/220	112, 290
HP1350	プロテアーゼ	n.d.	n.d.	113, 291
HP1374	ATP-依存性 プロテアーゼ ATPase サブユニット (clpX)	28/28	0/211	114, 292
HP1393	DNA 修復 タンパク質 (recN)	28/28	4/209	115, 293
HP1448	リボヌクレアーゼ P, タンパク質 コンポーネント (rnpA)	19/28	5/124*	116, 294
HP1453	保存 仮想 タンパク質	28/28	8/200	117, 295
HP1454	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	118, 296
HP1460	DNA ポリメラーゼ III アルファ- サブユニット (dnaE)	28/28	2/225	119, 297
HP1497	ペプチジル-tRNA ヒドロラーゼ (pth)	28/28	4/155	120, 298
HP1527	仮想 タンパク質	28/28	14/202	121, 299
HP1564	外膜 タンパク質	n.d.	n.d.	122, 300
HP1565	ペニシリン結合性 タンパク質 2 (pbp2)	28/28	3/178	123, 301
HP1574	リボフラビン シンターゼ アルフ ァ サブユニット (ribC)	23/28	4/153*	124, 302
ARF0044	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	125, 303
ARF0048	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	126, 304
ARF0143	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	127, 305
ARF0184	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	128, 306
ARF0219	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	129, 307
ARF0308	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	130, 308
ARF0349	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	131, 309
ARF0387	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	132, 310
ARF0402	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	133, 311

10

20

30

40

【表 2 - 6】

ピロリ菌 抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	遺伝子分布 (28 株における 存在)	アミノ酸置換 (癌患者分離株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
ARF0501	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	134, 312
ARF0509	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	135, 313
ARF0522	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	136, 314
ARF0578	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	137, 315
ARF0629	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	138, 316
ARF0665	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	139, 317
ARF0693	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	140, 318
ARF0752	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	141, 319
ARF0788	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	142, 320
ARF0819	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	143, 321
ARF0839	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	144, 322
ARF0868	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	145, 323
ARF0948	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	146, 324
ARF0969	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	147, 325
ARF1100	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	148, 326
ARF1164	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	149, 327
ARF1470	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	150, 328
ARF1553	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	151, 329
CRF0017	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	152, 330
CRF0025	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	153, 331
CRF0090	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	154, 332
CRF0127	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	155, 333
CRF0169	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	156, 334
CRF0190	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	157, 335
CRF0251	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	158, 336
CRF0258	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	159, 337
CRF0354	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	160, 338
CRF0388	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	161, 339
CRF0409	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	162, 340
CRF0421	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	163, 341
CRF0480	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	164, 342
CRF0552	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	165, 343
CRF0563	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	166, 344
CRF0578	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	167, 345
CRF0626	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	168, 346
CRF0870	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	169, 347
CRF0894	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	170, 348
CRF0922	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	171, 349

10

20

30

40

【表 2 - 7】

ピロリ菌 抗原性タンパク質	推定機能 (相同性による)	遺伝子分布 (28 株における 存在)	アミノ酸置換 (癌患者分離株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
CRF1012	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	172, 350
CRF1100	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	173, 351
CRF1301	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	174, 352
CRF1354	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	175, 353
CRF1422	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	176, 354
CRF1489	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	177, 355
CRF1549	仮想 タンパク質	n.d.	n.d.	178, 356

10

【 0 2 5 3 】

表 3

【表 3 - 1】

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	N1	N2	N3	N4	from	to	S	配列 番号
HPO0009.1		■											■										262	280	16	179
HPO0087.1	■					■							■										131	146	16	186
HPO0089.1	■																						207	224	6	188
HPO0115.1																							27	50	4	189
HPO0115.2																							203	217	2	189
HPO0115.3	■																						313	325	8	189
HPO0123.1	■	■											■										110	129	12	192
HPO0175.1																							156	179	3	190
HPO0175.2																							174	197	15	190
HPO0175.3																							192	215	6	190
HPO0175.4																							210	233	7	190
HPO0175.5																							228	251	13	190
HPO0175.6																							246	267	12	190
HPO0192.1	■					■		■					■										377	400	32	196
HPO0229.1																							34	43	3	203
HPO0229.2																							234	257	9	203
HPO0229.3							■																350	367	9	203
HPO0266.1																							304	327	8	207
HPO0485.1	■					■		■					■										25	48	20	222
HPO0485.2																							43	66	1	222
HPO0485.3	■																						61	82	10	222
HPO0527.1																							398	421	6	226
HPO0527.2																							416	439	6	226
HPO0527.3						■																	434	457	6	226
HPO0527.4																							452	475	6	226
HPO0527.5			■			■			■			■											470	493	24	226
HPO0527.6																							488	511	5	226
HPO0527.7			■			■			■			■											506	529	21	226
HPO0527.8																							524	547	4	226
HPO0527.9			■						■														621	644	13	226
HPO0527.10	■																						639	664	7	226
HPO0527.11		■																					707	730	8	226
HPO0527.12			■						■														725	748	16	226
HPO0527.13																							743	766	13	226
HPO0527.14			■						■														761	784	10	226
HPO0527.15																							779	802	9	226
HPO0527.16			■						■														797	820	20	226
HPO0527.17																							984	1007	9	226
HPO0527.18			■						■														1002	1025	14	226
HPO0527.19			■						■					■									1020	1043	24	226
HPO0527.20			■						■					■									1038	1061	21	226
HPO0527.21			■						■														1056	1079	26	226
HPO0527.22																							1074	1097	7	226
HPO0527.23			■						■					■									1092	1115	25	226
HPO0527.24																							1286	1309	2	226
HPO0527.25																							1304	1327	6	226
HPO0527.26																							1322	1345	7	226
HPO0527.27																							1340	1363	5	226
HPO0527.28				■																			1358	1381	7	226
HPO0527.29																							1376	1399	4	226
HPO0527.30																							1394	1417	4	226
HPO0527.31																							1412	1435	5	226
HPO0527.32																							1430	1453	5	226

10

20

30

40

【 図 1 】

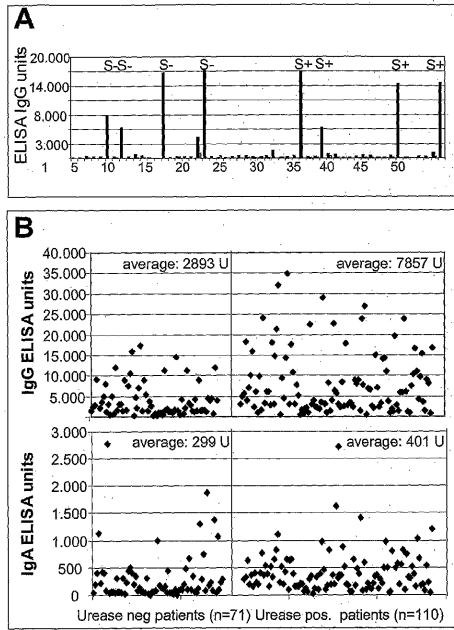


Fig. 1

Figure 1

【 図 1 】

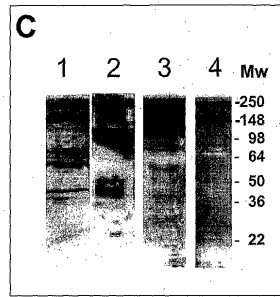


Fig. 1

【 図 2 】

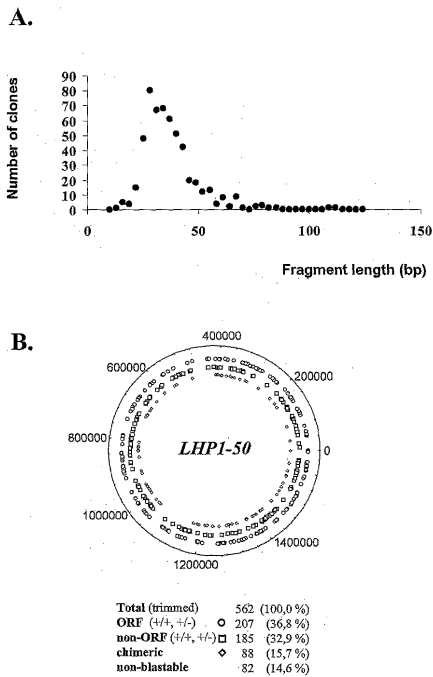


Figure 2

【 図 3 】

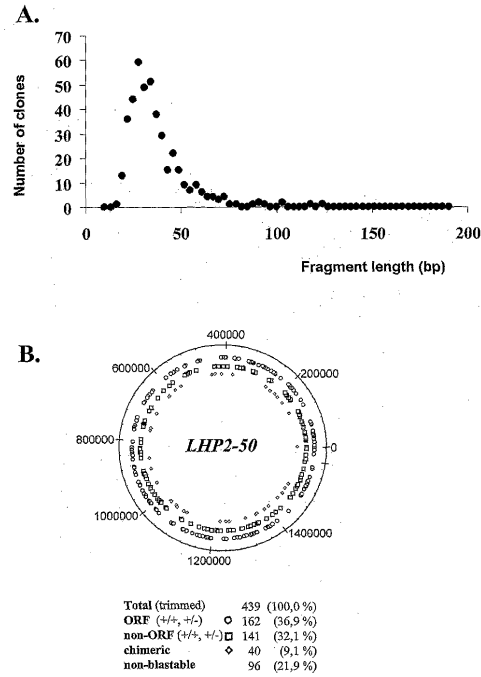


Figure 3

【 図 4 】

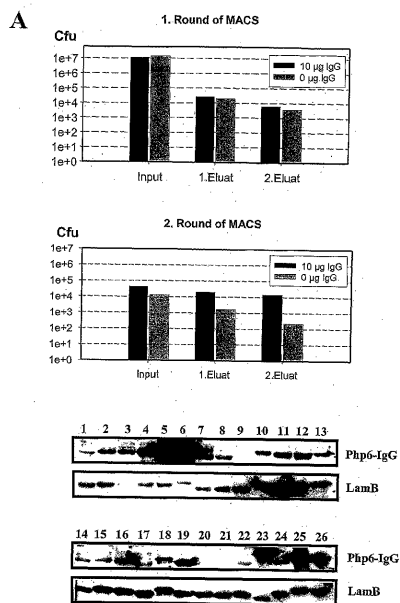


Figure 4

【 配列表 】

[2007524366000001.xml](#)

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成18年2月16日 (2006.2.16)

【 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 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2007524366000001.app](#)

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 6
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
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/106 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/106	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/569	F

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, 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 ドック・ミン・ブイ

オーストリア、アー - 1 2 3 0 ヴィエナ、ルドルフ・ツェラー・ガッセ 7 0 / 6 / 9 番

(72) 発明者 エステル・ナデュ

オーストリア、アー - 1 0 2 0 ヴィエナ、タポアシュトラッセ 9 番

(72) 発明者 タマシュ・ヘニツチュ

オーストリア、アー - 1 0 2 0 ヴィエナ、タポアシュトラッセ 9 / 4 / 1 5 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA50 BA61 CA04 DA06 EA04 GA14 HA14
 HA15
 4B063 QA01 QA19 QQ42 QR32 QS34
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AB01 AB04 BA02 BA03 CA25 CA44
 CA46
 4C085 AA03 AA14 AA38 BB11 BB23 CC02 CC21 CC23 EE01 EE06
 FF02 FF03 FF13 FF20
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14 ZB35
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA76 DA86 EA20 EA50
 FA34

专利名称(译)	幽门螺杆菌抗原		
公开(公告)号	JP2007524366A	公开(公告)日	2007-08-30
申请号	JP2006505226	申请日	2004-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	英特塞尔股份公司		
申请(专利权)人(译)	国米泽尔股份公司		
[标]发明人	アンドレアスマインケ ドゥクミンブイ エステルナデュ タマシユヘニツチュ		
发明人	アンドレアス・マインケ ドゥク・ミン・ブイ エステル・ナデュ タマシユ・ヘニツチュ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 C07K14/195 C07K16/12 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12Q1/68 A61K39/106 A61P31/04 A61K39/39 A61K31/7088 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/569 A61K38/00 A61K39/00		
CPC分类号	C07K16/121 A61K38/00 A61K39/00 C07K14/195		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C07K14/195 C07K16/12 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/08 C12Q1/68.A A61K39/106 A61P31/04 A61K39/39 A61K31/7088 A61K39/395.N G01N33/53.D G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024 /EA04 4B024/GA14 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065 /AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA02 4B065 /BA03 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085 /FF03 4C085/FF13 4C085/FF20 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB35 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA34		
代理人(译)	田中，三夫 小島 一晃 櫻井洋子		
优先权	2003450097 2003-04-22 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了编码源自幽门螺杆菌和超免疫血清反应性抗原或其片段的超免疫血清反应性抗原或其片段的分离的核酸分子，分离这些抗原的方法及其特定用途。

ヒトリ菌 抗原性多 シグマ因子	種元機能 (相同性による)	予測免疫原性アミノ酸**	ORFおよび シグマ因子 の位置 (aa)	決定された 抗原性領域の 位置 (aa)	配列番号 (DNA, タンパク 質)
HP0009	免疫タンパク質 (comp1)	63,91,95,101,110,116,134,148,150,156,158,164,188 193,197,209,226,241,247,254,291,297,311,319,336 346,351,358,366,378,404,410,420,438,448,454,465 473,482,488,490,498,503,510,512,519,531,543,547 559,568,575,580,594,616,631	C: 1, 14, 2, K: 2, M: 38	239-308	1, 179
HP0010	シヤペロンおよび 熱ショックタンパ ク質 (proH)	16,29,38,47,50,68,70,72,91,101,143,149,158,163,3 85,191,196,206,215,224,230,237,244,251,258,278,2 90,311,319,325,338,351,365,365,396,429,445,454,4 58,466,491,499,503,521	K: 1	17-76, 218-233	2, 180
HP0043	リンノースホスファ テートインシワゼ (ppm)	4,10,16,41,46,66,77,84,91,97,102,118,125,144,147, 200,202,214,245,253,258,261,286,295,300,330,339, 342,350,361,363,381,385,392,396,416,435,450	G: 1	460-470	3, 183
HP0063	免疫タンパク質	11,19,27,46,52,59,77,82,84,107,118,125,127,154, 178,183,192,209,215,221,286,295,302,313,350,357,4 62,415,417,431,433,463,465,493	G: 4, H: 1, I: 2	313-331	4, 182
HP0067	クレアゼアダプテ ドタンパク質 (cse1)	19,26,30,43,47,55,63,68,72,80,92,104,107,119,129, 186,160,175,194,216,251,251,254,260	F: 1	26-43	5, 183
HP0072	クレアゼベータ サブユニット (HSE ファミリードメイン) (cseB)	7,13,29,37,65,81,110,120,123,131,135,152,230,249, 254,260,284,290,292,299,317,326,329,336,403,444 452,458,466,477,490,498,510,519,541,556,557,566	E: 2, G: 3, H: 1, M: 2	533-567	6, 184
HP0086	保存免疫タンパク 質	6,47,71,77,79,86,89,95,120,126,137,144,176,181,1 84,186,202,208,211,232,236,282,301,313,317,329,3 41,347,353,388,394,400,412,433,436,443	N: 3, C: 1, 1	99-79	7, 185
HP0087	免疫タンパク質	4,18,22,38,39,69,106,112,116,130,138,149,156,170, 175,197,200,214,216,223,233,244,255,261,266,276, 279,296,325,333,342,346,366,399,402,420,439,441, 451,1,2,2	A: 2, B: 2, E, L: F: 1, G: 2, I: 1, I: 2	1104, 130-147	8, 186
HP0088	RNAポリマラーゼ シグマ70因子 (psf)	50,58,69,95,97,113,131,136,157,163,170,175,188,2 12,220,226,254,259,265,277,283,289,297,308,311,3 18,347,359,360,369,378,403,416,421,440,480,484,4 82,470,476,493,502,506,514,536,567,585,590,598,6 97,613,616,653,659	A: 2, B: 9, D: 2, F: 3, I: 4	35-46	9, 187
HP0089	Meタンパク質 (pH)	16,29,32,60,65,87,89,123,128,134,137,158,162,173, 178,196,210,216,218,228	H: 11, C: 2	206-225	10, 188