

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-101642

(P2011-101642A)

(43) 公開日 平成23年5月26日(2011.5.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 3
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 130 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-250135 (P2010-250135)	(71) 出願人	502270718
(22) 出願日	平成22年11月8日 (2010.11.8)		インターツェル・アクチエンゲゼルシャフト
(62) 分割の表示	特願2006-505392 (P2006-505392)の分割		I N T E R C E L L A G
原出願日	平成16年5月6日 (2004.5.6)		オーストリア、アーナー1030ウィエナ、
(31) 優先権主張番号	03450112.2		キャンパス・ウィエナ・バイオセンター6番
(32) 優先日	平成15年5月7日 (2003.5.7)	(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
(31) 優先権主張番号	03450266.6	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成15年11月28日 (2003.11.28)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100127638
			弁理士 志賀 美苗
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原 I + I I

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ストレプトコッカス・アガラクティエは、高齢者(the extremities of age)および基礎となる疾患を有する者のヒト疾患の重要な病原体である。グループB連鎖球菌は新生児における全身性および局所性感染症の主な原因である。GBSは1970年代から米国の新生児における主な病原である。細菌感染症は生命を脅かす疾患、例えば、敗血症、肺炎および髄膜炎を導きうる。ストレプトコッカス・アガラクティエに対する、医薬組成物、特にワクチンを提供する。

【解決手段】 ストレプトコッカス・アガラクティエから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。

【選択図】 なし

【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 14、90、157-216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)の核酸分子に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)の核酸分子にハイブリダイズしうる核酸分子。

10

【請求項 2】

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

【請求項 3】

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

- a) 配列番号 1、3、5-13、15、18-25、27-31、33-36、39-68、70-85、92-100、103-126、128-145、147、149-156、217、435-448および463-474から選択される核酸分子に対して96% または96%を超える、好ましくは少なくとも 98 %、特に100 %の配列同一性を有する核酸分子、
- b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、
- c) a)または b)の核酸分子の少なくとも15の連続する塩基を含む核酸分子、
- d) a)、b)、またはc)の核酸分子に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)の核酸にハイブリダイズしうる核酸分子。

20

【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 32、86、91、101、127から選択される核酸分子に対して98 %または98%を超える、特に100 %の配列同一性を有する核酸分子、
- 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)の核酸にハイブリダイズしうる核酸分子。

30

【請求項 5】

核酸がDNAである請求項 1、2、3または4のいずれかの核酸分子。

【請求項 6】

核酸がRNAである請求項 1、2、3、4、または5のいずれかの核酸分子。

40

【請求項 7】

核酸分子がゲノム DNA、特にストレプトコッカス・アガラクティエゲノム DNAから単離されたものである請求項 1 ~ 5のいずれかの単離核酸分子。

【請求項 8】

請求項 1~ 7のいずれかの核酸分子を含むベクター。

【請求項 9】

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

【請求項 10】

請求項 8または 9のベクターを含む宿主細胞。

50

【請求項 1 1】

請求項 1、2、5、6 または7のいずれかの核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含む過免疫血清反応性抗原およびその断片、ここで好ましくはアミノ酸配列は配列番号 231、307、374-433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、ここで好ましくはアミノ酸配列は配列番号 218、220、222-230、232、235-242、244-248、250-253、256-285、287-302、309-317、320-343、345-362、364、366-373、434、449-462および475-486からなる群から選択される。

【請求項 1 3】

請求項 4、5、6、または7のいずれかの核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を含む過免疫血清反応性抗原およびその断片、ここで好ましくはアミノ酸配列は配列番号 249、303、308、318、344からなる群から選択される。

【請求項 1 4】

以下からなる群から選択される過免疫血清反応性抗原の断片：表1A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、特に以下のアミノ酸を含むペプチド： 4-20、35-44、65-70、73-87、92-98、112-137、152-161、177-186、193-200、206-213、229-255、282-294、308-313、320-326、349-355、373-384、388-406、420-425 および 115-199（配列番号 218）； 5-24、35-41、44-70、73-89、103-109、127-143、155-161、185-190、192-207、212-219、246-262、304-336、372-382、384-393、398-407、412-418、438-444、1-75、76-161 および 164-239（配列番号 219）； 4-10、16-58、60-71、77-92、100-126、132-146、149-164、166-172、190-209、214-220、223-229、241-256、297-312、314-319、337-343、351-359、378-387、398-418、421-428、430-437、440-448、462-471、510-519、525-536、552-559、561-568、573-582、596-602、608-630、637-649、651-665、681-702、714-732、739-745、757-778、790-805、807-815、821-829、836-842、846-873、880-903、908-914、916-923、931-940、943-948、956-970、975-986、996-1015、1031-1040、1051-1069、1072-1095、1114-1119、1130-1148、1150-1157、1169-1176、1229-1238 および 802-812（配列番号 220）； 5-12、14-26、35-47、52-67、72-78、83-98、121-141、152-159、163-183、186-207、209-257、264-277、282-299、301-309、312-318、324-339、358-368、372-378、387-397、425-431 および 46-291（配列番号 221）； 29-38、44-64、70-76、78-87、94-100、102-112、119-134、140-149、163-173、178-186、188-194、207-234、247-262、269-290 および 73-92（配列番号 222）； 10-28、36-63、77-87、103-119、127-136、141-169、171-183、195-200、207-232、236-246、251-265、268-283、287-297、314-322、335-343、354-363、384-390、405-411、419-436、443-455、467-473、480-513、518-529、550-557、565-585、602-608、616-625、632-660、665-677、685-701、726-736、738-747、752-761、785-796、801-813、838-853、866-871 および 757-774（配列番号 223）； 31-38、61-66、74-81、90-115、123-145、154-167、169-179、182-193、200-206、238-244、267-272 および 235-251（配列番号 224）； 19-25、38-54、56-64、66-72、74-92、94-100、116-129、143-149、156-183、204-232、253-266、269-275、294-307 および 241-313（配列番号 225）； 5-34、50-56、60-65、74-85、89-97、108-119、159-165、181-199、209-225、230-240、245-251、257-262、274-282、300-305 および 64-75（配列番号 226）； 5-13、16-21、27-42、45-52、58-66、74-87、108-114、119-131 および 39-51（配列番号 227）； 6-23、46-54、59-65、78-84、100-120、128-133、140-146、159-165、171-183、190-204、224-232、240-248、250-259、274-280、288-296、306-315 および 267-274（配列番号 228）； 5-12、15-24、26-36、42-65、68-80、82-104、111-116、125-144、159-167、184-189、209-218、235-243、254-265、269-283、287-300、306-316、318-336、338-352、374-392 および 162-174（配列番号 229）； 30-42、45-54 および 25-37（配列番号 230）； 10-30、53-59、86-95、116-130、132-147、169-189、195-201、212-221、247-256、258-265、278-283、291-298、310-316、329-339、341-352、360-367、388-396、398-411、416-43

10

20

30

40

50

2、443-452、460-466、506-512、515-521、542-548 および 419-431 (配列番号 231) ;
4-27、30-53、60-67、70-90、92-151、159-185、189-195、198-210、215-239 および 173
-189 (配列番号 232) ; 4-26、41-54、71-78、116-127、140-149、151-158、161-175、1
90-196、201-208、220-226、240-252、266-281、298-305、308-318、321-329、344-353、
372-378、384-405、418-426、429-442、457-463、494-505、514-522 および 174-188 (10
配列番号 233) ; 17-25、27-39、61-67、81-89、99-110、120-131、133-139、147-161、1
67-172、179-185、192-198、203-213、226-238、243-258、261-267、284-290、296-307、
311-328、340-352、356-371 および 239-256 (配列番号 234) ; 8-30、40-49、67-80、1
14-123、126-142、152-162、188-194 および 57-70 (配列番号 235) ; 4-23、28-34、36
-47、50-61、76-81、89-94、96-104、112-119、126-146、155-181、195-200、208-214、2 10
20-229、244-260、263-276、282-288、292-300、317-323、336-351、353-359、363-375、
382-399、415-432、444-455、458-471、476-481、484-492、499-517、522-529、535-541
、543-568、572-584、586-600、607-617、626-637、656-675 および 282-297 (配列番号
236) ; 6-24、30-35、38-45、63-91、134-140、146-160、167-188、214-220、226-234、
244-250、260-270、286-301、316-329、340-371、429-446、448-459、474-481、485-491
、512-526、537-544、550-565、573-583、596-613、621-630、652-658 および 87-97 (20
配列番号 237) ; 8-20、26-48、56-67、76-86、94-109、115-121、123-129、143-160、17
8-186、191-198、201-208、221-236、238-244、260-268 および 237-247 (配列番号 238
) ; 4-40、42-57、73-87、98-117、126-135、150-156、166-174、196-217、231-236、248
-258、276-284、293-301、307-313、339-347、359-365、375-387、395-402、428-440、44 20
5-456、485-490、497-505、535-541、547-555、610-625、648-656、665-671 および 448-
528 (配列番号 239) ; 10-18、39-45、51-61、80-96、98-106、110-115、158-172、174-
183、191-200、220-237、249-255、274-289、308-324、331-341、372-381、384-397、405
-414 および 322-338 (配列番号 240) ; 30-36、38-56、85-108、134-147、149-160、16
3-183、188-201、206-211、219-238、247-254 および 5-13 (配列番号 241) ; 11-40、9
8-103、110-115、133-145、151-159、172-179、192-201、204-212、222-228、235-245、2
58-268、283-296、298-309、322-329、342-351、354-362、372-378、385-393、407-418、
495-516 および 1-148 (配列番号 242) ; 5-19、21-36、73-94、112-119、122-137、139
-145、152-167、184-190、198-204、208-224、249-265、267-281、299-304、309-317、32 30
6-333、356-364、368-374、381-389、391-414、419-425、430-435 および 113-140 (配
列番号 243) ; 45-54、59-67、78-91 および 15-23 (配列番号 244) ; 11-22、33-47、5
2-80、88-112、124-129 および 6-25 (配列番号 245) ; 26-41、51-63、80-89、93-115
、150-163、187-193、220-237、240-249、286-294、296-306、316-329、345-353、361-37
0、407-425、428-437、474-482、484-494、504-517、533-541、549-558、595-613、616-6
25、660-668、673-685、711-726、736-744、749-761、787-802、812-820、825-837、863-
878、888-896、901-913、939-954、964-972、977-989、1003-1008、1016-1022、1028-103
4、1041-1053、1059-1074、1101-1122、420-511 および 581-704 (配列番号 246) ; 18-
25、27-55、71-83、89-95、102-113、120-146、150-156、174-185 および 159-175 (配
列番号 247) ; 24-30、38-56、63-68、87-93、136-142、153-164、183-199、213-219、22 40
6-234、244-261、269-278、283-289、291-297、320-328、330-336、340-346、348-356、3
58-366、382-387、401-408、414-419、449-455、468-491、504-512、531-537、554-560、
597-608、621-627、632-643、650-662、667-692、703-716、724-737、743-758、783-794
、800-818、846-856 および 806-884 (配列番号 248) ; 4-14、21-39、86-92、99-107、
121-131、136-144、147-154、158-166、176-185、193-199、207-222、224-230 および 11
7-136 (配列番号 249) ; 65-76、85-97、103-109、115-121、125-146、163-169、196-20
5、212-219、228-237、241-247、254-262、269-288、294-303、305-313、328-367、395-4
01、405-412、418-429、437-447、481-488、506-513、519-524、530-541、546-557 およ
び 266-284 (配列番号 250) ; 5-14、37-42、49-71、78-92、97-112、127-136、147-154
、156-163、186-198、216-225、233-243、248-253、295-307、323-332、359-366、368-37
4、380-398 および 194-223 (配列番号 251) ; 4-11、33-39、45-72、100-113、119-129 50

、136-144、169-175、177-185、200-208、210-219、262-276、278-297、320-326、336-344、347-362、381-394、443-453 および 438-454 (配列番号 252) ; 4-29、31-52、55-61、95-110、138-158、162-171、179-187、202-229、239-248、251-256、262-267、269-285、304-310、351-360、362-368、381-388、415-428、435-440、448-458 および 161-178 (配列番号 253) ; 4-17、19-28、32-43、47-59、89-110、112-126、128-134、140-148、152-161、169-184、191-204、230-235、255-264、328-338、341-347、401-409、413-419、433-441、449-458、463-468、476-482、486-492、500-506、529-545 および 305-381 (配列番号 254) ; 10-29、38-45、53-61、134-145、152-160、163-170、202-208、219-229、248-258、266-275、282-288、315-320、328-334、377-385、392-402、418-424、447-453、460-471、479-487、491-497、500-507、531-537、581-594、615-623、629-635、644-652、659-666、668-678、710-717、719-728、736-741、747-760、766-773、784-789、794-800、805-817、855-861、866-887 および 698-715 (配列番号 255) ; 16-26、29-37、44-58、62-68、74-80、88-95、97-120、125-144、165-196 および 58-72 (配列番号 256) ; 14-21、23-46、49-60、63-74、78-92、96-103、117-129、134-161、169-211、217-231、239-248、252-281、292-299、313-343 および 243-257 (配列番号 257) ; 11-27、46-52、67-72、76-84、91-112、116-153、160-175、187-196、202-211、213-220 および 43-76 (配列番号 258) ; 5-29、37-56、78-86、108-118、152-161 および 120-130 (配列番号 259) ; 8-14、19-41、52-66、75-82、87-92、106-121、127-133、136-143、158-175、180-187、196-204、221-228、239-245、259-265、291-306、318-323、328-340、352-358、361-368、375-381、391-399、411-418、431-442、446-455、484-496、498-510、527-533、541-549、558-565、575-585、587-594、644-655、661-668、671-677 および 184-196 (配列番号 260) ; 4-22、29-38、55-62、75-81、102-107、110-134、143-150、161-167、172-179、191-215、223-233、241-247、251-264、266-272、288-309、340-352、354-366、394-402、414-438 および 198-218 (配列番号 261) ; 24-44、49-70、80-91、105-118、128-136、140-154 および 77-92 (配列番号 262) ; 5-22、31-36、41-47、67-74、83-90、105-122、135-143、160-167 および 118-129 (配列番号 263) ; 4-25、33-73、81-93、96-106、114-120、122-128、130-172、179-208、210-241、251-283、296-301 および 92-100 (配列番号 264) ; 14-24、29-38、43-50、52-72、86-97、101-107、110-125、127-141、145-157、168-175、177-184、186-195、205-226、238-250、255-261、284-290、293-304、307-314、316-323、325-356、363-371、383-390、405-415、423-432、442-454、466-485、502-511、519-527、535-556、558-565、569-574、612-634、641-655、672-686、698-709、715-722、724-732、743-753、760-769、783-792、818-825、830-839、842-849、884-896、905-918、926-940、957-969、979-1007、1015-1021、1049-1057 および 336-349 (配列番号 265) ; 6-16、26-31、33-39、62-73、75-85、87-100、113-123、127-152、157-164、168-181、191-198、208-214、219-226、233-254、259-266、286-329 および 181-195 (配列番号 266) ; 4-13、32-39、53-76、99-108、110-116、124-135、137-146、149-157、162-174、182-190、207-231、242-253、255-264、274-283、291-323、334-345、351-360、375-388、418-425、456-474、486-492、508-517、520-536、547-560、562-577、31-45 および 419-443 (配列番号 267) ; 15-26、30-37、42-49、58-90、93-99、128-134、147-154、174-179、190-197、199-205、221-230、262-274、277-287、300-314、327-333、343-351、359-377、388-396、408-413、416-425、431-446 および 246-256 (配列番号 268) ; 5-26、34-42、47-54、61-67、71-104、107-115、131-138、144-153、157-189、196-202、204-210、228-245、288-309、316-329、332-341、379-386、393-399、404-412、414-421、457-468、483-489、500-506、508-517、523-534、543-557、565-580、587-605、609-617、619-627、631-636、640-646、662-668、675-682、705-710、716-723、727-732、750-758、784-789、795-809、869-874、14-138、166-286、372-503、674-696 および 754-859 (配列番号 269) ; 5-17、32-38、40-47、80-89、113-119、125-137、140-154、157-163、170-177、185-199、213-225、228-236、242-248、277-290、292-305、323-333、347-353、364-370、385-394、399-406、423-433、441-451、462-474、477-487 および 116-124 (配

列番号 270) ; 7-16、18-30、32-49、53-61、63-85、95-101、105-115、119-134、143-150、159-178、185-202、212-229、236-250、254-265、268-294 および 63-72 (配列番号 271) ; 4-12、19-47、73-81、97-103、153-169、188-198、207-213、217-223、236-242、255-265、270-278、298-305、309-317、335-347、354-363、373-394、419-424、442-465、486-492、500-507、542-549、551-558、560-572、580-589、607-614、617-623、647-653、666-676、694-704、706-714、748-754、765-772、786-792、795-806 および 358-370 (配列番号 272) ; 18-28、30-38、40-46、49-55、69-78、82-98、104-134、147-153、180-190、196-202、218-236、244-261、266-273、275-286、290-295、301-314、378-387、390-395、427-434 および 290-305 (配列番号 273) ; 4-13、20-31、39-51、54-61、69-84、87-105、117-124 および 108-125 (配列番号 274) ; 24-34、43-54、56-66、68-79 および 50-69 (配列番号 275) ; 5-43、71-77、102-131、141-148、150-156、159-186、191-207、209-234、255-268、280-286、293-299、317-323、350-357、363-372、391-397、406-418、428-435、455-465、484-497、499-505、525-531、575-582、593-607、621-633、638-649、655-673、684-698、711-725、736-741、743-752、759-769、781-793、813-831、843-853、894-905、908-916、929-946、953-963、970-978、1001-1007、1011-1033、165-178 および 818-974 (配列番号 276) ; 16-44、63-86、98-108、185-191、222-237、261-274、282-294、335-345、349-362、374-384、409-420、424-430、440-447、453-460、465-473、475-504、522-534、538-551、554-560、567-582、598-607、611-619、627-640、643-653、655-661、669-680、684-690、701-707、715-731、744-750、756-763、768-804、829-837、845-853、855-879、884-890、910-928、77-90、144-212、279-355、434-536、782-810 および 875-902 (配列番号 277) ; 4-22、29-41、45-51、53-66、70-77、86-95、98-104、106-124、129-135、142-151、153-161、169-176、228-251、284-299、331-337、339-370、380-387、393-398、406-411、423-433、440-452、461-469、488-498、501-516、523-530、532-559、562-567、570-602、612-628、630-645、649-659、666-672、677-696、714-723、727-747 および 212-227 (配列番号 278) ; 4-9、17-31、35-41、56-61、66-75、81-87、90-124、133-138、149-163、173-192、213-219、221-262、265-275、277-282、292-298、301-307、333-346、353-363、371-378、419-430、435-448、456-469、551-570、583-599、603-612 および 275-291 (配列番号 279) ; 28-34、53-58、72-81、100-128、145-154、159-168、172-189、217-225、227-249、256-263、299-309、322-330、361-379、381-388、392-401、404-417、425-436、440-446、451-464、469-487、502-511、543-551、559-564、595-601、606-612、615-626、633-642、644-650、664-670、674-684、692-701、715-723、726-734、749-756、763-771、781-787、810-843、860-869、882-889、907-917、931-936、941-948、951-958、964-971、976-993、1039-1049、1051-1065、1092-1121、1126-1132、1145-1151、1158-1173、1181-1192、1194-1208、1218-1223、1229-1243、1249-1254、1265-1279、1287-1297、1303-1320、1334-1341、1343-1358、1372-1382、1406-1417、1419-1425、1428-1434、1441-1448、1460-1473、1494-1504、1509-1514、1529-1550、654-669 および 1400-1483 (配列番号 280) ; 10-16、20-25、58-65、97-109、118-132、134-146、148-155、186-195、226-233、244-262、275-284、295-310、317-322、330-339、345-351、366-375、392-403、408-415、423-430、435-444、446-457、467-479、486-499、503-510、525-537、540-585、602-612、614-623、625-634、639-645、650-669、700-707、717-724、727-739、205-230 および 733-754 (配列番号 281) ; 5-22、37-43、72-81、105-113、128-133、148-160、188-194、204-230、238-245、251-257 および 194-213 (配列番号 282) ; 16-21、35-41、56-72、74-92、103-109 および 62-68 (配列番号 283) ; 4-15、17-82、90-104、107-159、163-170、188-221、234-245、252-265 および 220-235 (配列番号 284) ; 16-22、36-46、61-75、92-107、113-121、139-145、148-160 および 30-42 (配列番号 285) ; 4-12、20-26、43-49、55-62、66-78、121-127、135-141、146-161、164-170、178-189、196-205、233-238、269-279、288-318、325-332、381-386、400-407 および 328-346 (配列番号 286) ; 5-12、31-49、57-63、69-79、89-97、99-114、116-127、134-142、147-154、160-173、185-193、199-204、211-222、229-236、243-249、256-274 および 58-68 (配列番号 287) ; 10-20、28-34、39-53

、68-79、84-90、99-106 および 73-79 (配列番号 288) ; 14-37、45-50、61-66、77-82
、93-98、109-114、125-130、141-146、157-162、173-178、189-194、205-210、221-226
、237-242、253-258、269-274、285-290、301-306、316-332、349-359、371-378、385-40
6、34-307 および 312-385 (配列番号 289) ; 4-10、17-38、50-85、93-99、109-116、1
28-185、189-197、199-210、223-256、263-287、289-312、327-337、371-386、389-394、
406-419、424-432、438-450、458-463、475-502、507-513、519-526、535-542、550-567
および 361-376 (配列番号 290) ; 10-39、42-93、100-144、155-176、178-224、230-24
4、246-255、273-282、292-301、308-325、332-351、356-361、368-379、386-393、400-4
21 および 138-155 (配列番号 291) ; 5-11、17-34、40-45、50-55、72-80、101-123、1
45-151、164-172、182-187、189-195、208-218、220-241、243-252、255-270、325-331、 10
365-371、391-398、402-418、422-428、430-435、443-452、463-469、476-484、486-494
、503-509、529-553、560-565、570-590、608-614、619-627、654-661、744-750、772-78
0、784-790、806-816、836-853、876-885、912-918、926-933、961-975、980-987、996-1
006、1016-1028、1043-1053、1057-1062、994-1003 および 1033-1056 (配列番号 292)
; 17-45、64-71、73-81、99-109、186-192、223-238、262-275、283-295、336-346、350-
363、375-385、410-421、425-431、441-448、454-463、468-474、476-512、523-537、539
-552、568-583、599-608、612-620、628-641、644-654、656-662、670-681、685-695、70
2-708、716-723、725-735、757-764、769-798、800-806、808-816、826-840、846-854、8
56-862、874-881、885-902、907-928、274-350 および 443-513 (配列番号 293) ; 4-22
、29-41、45-51、53-61、70-76、85-92、99-104、111-122、134-140、142-154、163-174 20
、224-232、255-265、273-279、283-297、330-335、337-348、356-367、373-385、391-39
6、421-431、442-455、475-485、493-505、526-538、544-561、587-599、605-620、622-6
51、662-670、675-681、687-692、697-712、714-735 および 252-262 (配列番号 294) ;
4-12、15-35、40-46、50-59、67-94、110-128、143-169、182-188、207-215、218-228、
238-250 および 74-90 (配列番号 295) ; 9-18、42-58、78-85、88-95、97-106、115-12
2、128-134、140-145、154-181、186-202、204-223、261-267、269-278、284-293、300-3
36、358-368 および 12-29 (配列番号 296) ; 7-34、46-53、62-72、82-88、100-105、1
11-117、132-137、144-160、166-180、183-189、209-221、231-236、246-253、268-282、
286-293、323-336、364-372、378-392、422-433 および 388-405 (配列番号 297) ; 21- 30
27、34-50、72-77、80-95、164-177、192-198、202-220、226-236、239-247、270-279、2
85-292、315-320、327-334、348-355、364-371、388-397、453-476、488-497、534-545、
556-576、582-588、601-607、609-616、642-662、674-681、687-697、709-715、721-727
、741-755 および 621-739 (配列番号 298) ; 4-14、16-77、79-109 および 25-99 (配
列番号 299) ; 4-9、17-23、30-37、44-55、65-72、77-93、102-121、123-132、146-153
および 17-29 (配列番号 300) ; 4-18、25-41、52-60、83-92、104-112、117-123、149-
155、159-167、170-192、201-210、220-227、245-250 および 124-137 (配列番号 301)
; 8-25、50-55、89-95、138-143、148-153、159-169、173-179、223-238、262-268、288-
295、297-308、325-335、403-409、411-417、432-446、463-475、492-501、524-530、542
-548、561-574、576-593、604-609、612-622、637-654、665-672、678-685、720-725、73
1-739、762-767、777-783、820-838、851-865、901-908、913-920、958-970、1000-1006 40
、1009-1015、1020-1026、1043-1052、1055-1061、1-128、252-341、771-793 および 104
3-1058 (配列番号 302) ; 16-26、33-46 および 64-76 (配列番号 303) ; 4-27、69-77
、79-101、117-123、126-142、155-161、171-186、200-206、213-231、233-244、267-273
、313-329、335-344、347-370、374-379、399-408、422-443、445-453、461-468、476-48
2、518-534、544-553、556-567、578-595、601-620、626-636、646-658、666-681、715-7
21、762-768、778-785、789-803、809-819、22-108、153-318、391-527 および 638-757
(配列番号 304) ; 6-21、32-43、62-92、104-123、135-141、145-152、199-216、218-22
6、237-247、260-269、274-283、297-303、1-72 および 127-211 (配列番号 305) ; 6-2
6、50-56、83-89、108-114、123-131、172-181、194-200、221-238、241-247、251-259、
263-271、284-292、304-319、321-335、353-358、384-391、408-417、424-430、442-448 50

、459-466、487-500、514-528、541-556、572-578、595-601、605-613、620-631、635-648、660-670、673-679、686-693、702-708、716-725、730-735、749-755、770-777、805-811、831-837、843-851、854-860、863-869、895-901、904-914、922-929、933-938、947-952、956-963、1000-1005、1008-1014、1021-1030、1097-1103、1120-1130、1132-1140、1-213、269-592 および 992-1120 (配列番号 306) ; 9-16、33-39、47-59、65-79、81-95、103-108、115-123、138-148、163-171、176-185、191-196、205-211、213-221、224-256、261-276、294-302、357-363、384-390、95-111 および 161-189 (配列番号 307) ; 21-27、35-45、70-76、92-105、129-143、145-155、161-166、170-191、204-211、214-231、234-246、249-255、259-275 および 1-18 (配列番号 308) ; 21-35、45-53、56-64、69-97 および 1-16 (配列番号 309) ; 25-33、41-47、61-68、86-101、106-114、116-129、134-142、144-156、163-176、181-190、228-251、255-261、276-292、295-305、334-357、368-380、395-410、424-429、454-460、469-482、510-516、518-527、531-546、558-570、579-606、628-636、638-645、651-656、668-674、691-698、717-734、742-754、765-770、792-797、827-835、847-859、874-881、903-909、926-933、942-961、964-977、989-1004、1010-1028、1031-1047、1057-1075、1081-1095、1108-1117、1138-1144、1182-1189、1193-1206、1220-1229、1239-1246、1257-1267、1271-1279、1284-1301、1312-1320、1329-1335、1341-1347、1358-1371、1399-1404、1417-1426、1458-1463、1468-1476、1478-1485、1493-1506、1535-1541、1559-1574、1583-1590、1595-1601、1603-1611、1622-1628、1634-1644、1671-1685、1689-1696、1715-1720、1734-1746、1766-1775、1801-1806、1838-1844、1858-1871、1910-1917、1948-1955、1960-1974、2000-2015、2019-2036、2041-2063、748-847 および 1381-1391 (配列番号 310) ; 5-12、18-24、27-53、56-63、96-113、119-124、131-136、157-163、203-209、215-223、233-246、264-273、311-316、380-389、393-399、425-433、445-450、457-462、464-470、475-482、507-513、527-535、542-548、550-565、591-602、607-613、627-642、644-664、673-712、714-732、739-764、769-782、812-818、826-838、848-854、860-871、892-906、930-938、940-954、957-973、990-998、1002-1021、1024-1033、1037-1042、1050-1060、1077-1083、1085-1092、1100-1129、1144-1161、1169-1175、1178-1189、1192-1198、1201-1207、1211-1221、1229-1239、1250-1270、1278-1292、1294-1300、1314-1335、1344-1352、1360-1374、1394-1405、1407-1414、1416-1424、1432-1452、1456-1462、1474-1497、1500-1510、1516-1522、1534-1542、1550-1559、1584-1603、1608-1627、187-273 および 306-441 (配列番号 311) ; 70-80、90-97、118-125、128-140、142-148、154-162、189-202、214-222、224-232、254-260、275-313、317-332、355-360、392-398、425-432、448-456、464-470、476-482、491-505、521-528、533-546、560-567、592-597、605-614、618-626、637-644、646-653、660-666、677-691 および 207-227 (配列番号 312) ; 5-19、26-34、37-55、57-66、69-83、86-102、115-134、138-143、154-172、178-195、209-246、251-257、290-302、306-311 および 256-266 (配列番号 313) ; 10-20、22-28、35-57、72-79、87-103、108-128、130-144、158-171、190-198、225-242、274-291、301-315、317-324、374-385 および 353-365 (配列番号 314) ; 4-9、17-30、34-54、59-66、73-94、118-130、135-150、158-171、189-198、219-239、269-275、283-301、89-106 および 176-193 (配列番号 315) ; 14-20、22-74、77-86、89-99、104-109、126-135、154-165、181-195、197-212、216-224、264-275 および 107-118 (配列番号 316) ; 4-18、21-38、63-72、101-109、156-162、165-179、183-192、195-210、212-218、230-239、241-256、278-290、299-311、313-322、332-341、348-366、386-401、420-426、435-450、455-460、468-479、491-498、510-518、532-538、545-552、557-563、567-573、586-595、599-609、620-626、628-636、652-657、665-681 および 1-198 (配列番号 317) ; 4-10、16-38、51-68、73-79、94-115、120-125、132-178、201-208、216-223、238-266、269-295、297-304、337-342、347-356、374-401、403-422、440-447、478-504、510-516、519-530、537-544 および 191-206 (配列番号 318) ; 12-40、42-48、66-71、77-86、95-102、113-120、129-137、141-148、155-174、208-214、218-225、234-240、256-267、275-283、300-306、313-321、343-350、359-36

7、370-383、398-405、432-439、443-461、492-508、516-526、528-535 および 370-478
(配列番号 319) ; 6-14、20-37、56-62、90-95、97-113、118-125、140-145、161-170、
183-202、237-244、275-284、286-305、309-316、333-359、373-401、405-412 および 17
6-187 (配列番号 320) ; 33-44、50-55、59-80、86-101、129-139、147-153、157-163、
171-176、189-201、203-224、239-245、257-262、281-287、290-297、304-320、322-331
、334-350、372-390、396-401、71-88 および 353-372 (配列番号 321) ; 5-11、15-24
、26-33、40-47、75-88、95-103、105-112 および 17-30 (配列番号 322) ; 5-11、16-3
9、46-54、62-82、100-107、111-124、126-150、154-165、167-183、204-238、245-295、
301-313、316-335 および 8-16 (配列番号 323) ; 4-19、34-48、69-74、79-107、115-1
27、129-135、143-153、160-169、171-182 および 142-153 (配列番号 324) ; 4-30、65 10
-74、82-106、110-120、124-132、135-140、146-175、179-184、190-196、217-223、228-
233、250-267、275-292、303-315、322-332 および 174-186 (配列番号 325) ; 9-16、2
9-41、47-57、68-84、87-109、113-119、162-180、186-193、195-201、203-208、218-230
、234-243、265-271、281-292、305-312、323-332、341-347、349-363、368-374、383-39
0、396-410、434-440、446-452、455-464、466-473、515-522、529-542、565-570、589-6
00、602-613、618-623、637-644、1019-1027、1238-1244、1258-1264、1268-1276、1281-
1292、1296-1302 および 883-936 (配列番号 326) ; 10-17、23-32、39-44、54-72、75-
81、88-111、138-154、160-167、178-185、201-210、236-252、327-334、336-342、366-3
76、388-400、410-430、472-482、493-526、552-558、586-592、598-603、612-621、630-
635、641-660 および 384-393 (配列番号 327) ; 4-22、24-39、50-59、73-84、100-105 20
、111-117、130-138、155-161、173-178、182-189、205-215、266-284、308-313、321-32
8、330-337、346-363、368-374、388-395、397-405、426-434、453-459、482-492、501-5
07、509-515、518-523、527-544、559-590、598-612、614-629、646-659、663-684、686-
694、698-721 および 445-461 (配列番号 328) ; 14-22、27-33 および 3-17 (配列番
号 329) ; 29-41、66-73、81-87、90-108、140-146、150-159、165-184、186-196、216-2
26、230-238、247-253、261-269 および 126-140 (配列番号 330) ; 5-12、16-25、27-3
3、36-45、60-68、83-88、103-126 および 86-101 (配列番号 331) ; 14-23、36-47、56
-66、84-89、94-105、111-127、140-153、160-174、176-183、189-203、219-225、231-23
7、250-257 および 194-227 (配列番号 332) ; 4-25、54-60、64-71、73-82、89-106、1 30
17-124、157-169、183-188、199-210、221-232、236-244、255-264 および 58-98 (配列
番号 333) ; 13-19、26-36、41-53、55-71、77-84、86-108、114-135、157-172、177-183
、187-194、208-213、218-226、110-125 および 156-170 (配列番号 334) ; 5-24、63-6
9、77-85、94-112、120-137、140-146、152-159、166-172、179-187、193-199、206-212
、222-228、234-240、244-252、257-264、270-289、298-309、316-328、337-348、363-37
5、1-56 および 340-352 (配列番号 335) ; 18-39、42-71、78-120、124-144、152-173
、179-189、199-209、213-222、228-258、269-304、329-361、364-372、374-389、396-44
1 および 313-327 (配列番号 336) ; 19-25、91-98、108-120、156-162、168-174、191-
204、211-216、232-266、272-278、286-308、316-321、327-333、344-355、358-364、384
-391、395-428、464-476、487-495、497-511、544-561、563-573、575-582、588-594、10
-25 および 322-338 (配列番号 337) ; 14-26、32-49、51-57、59-72、80-91、102-112 40
、119-125、147-161、164-173、175-183、188-213、217-222、246-254、260-276、282-30
3、308-318、321-328、333-350、352-359、371-378、392-401、407-414、416-443、448-4
63、471-484、490-497、501-514、519-527、539-551、557-570、578-590、592-598、600-
610、618-629、633-647、654-667、676-689、702-709、718-726、728-737、741-760、764
-780、786-795、808-826、836-842、845-852、865-874、881-887、931-945、949-957、96
8-974、979-986、1003-1009、1023-1029 および 90-103 (配列番号 338) ; 11-16、37-5
6、60-66、69-77、80-88、93-106、117-139、166-171 および 72-90 (配列番号 339) ;
59-84、123-133、145-150、161-167、178-189 および 115-128 (配列番号 340) ; 15-33
、39-46、52-64、74-87、108-124、127-144、150-156、173-179、184-194、201-208、219
-236、243-269、272-295、302-309、343-349、356-361、370-379、405-411、414-423、43 50

0-451、457-464、466-475、477-483、496-502、507-522、541-548、557-563、571-577、579-585、590-605、626-642、650-662、671-691、704-710、751-769、775-781、786-791、794-829、851-858、868-878、884-904、913-919、931-939 および 132-142 (配列番号 341) ; 33-58、64-71、74-80、83-88、96-120、122-139、146-157、167-177、207-213、220-225、236-242、264-279、300-305、326-336、340-347、350-360、97-115 および 199-211 (配列番号 342) ; 4-26、43-57、70-99、102-117、121-133、142-148、151-168、170-183、192-220、235-249、258-279 および 30-41 (配列番号 343) ; 34-42、48-58、70-94、110-130、154-160、164-172、178-183、195-203、211-222、229-250、256-261、274-284、286-292、312-323 および 222-233 (配列番号 344) ; 4-9、15-36、38-45、49-74、78-88、100-112、136-191、211-220、226-233、239-246、254-274、287-307、316-322、342-353、356-366、373-378、384-393、405-431、449-457、459-468、487-511、515-524、529-541、544-552、562-568、571-576 および 208-280 (配列番号 345) ; 10-27、31-37、39-54、71-108、124-143 および 2-107 (配列番号 346) ; 16-27、38-57、64-70、90-102、104-113、116-137、160-166 および 1-80 (配列番号 347) ; 13-21、31-36、56-67、127-136、153-171、173-180、184-200、214-222、225-231、239-263、267-273 および 135-159 (配列番号 348) ; 12-27、31-51、68-74、77-87、94-101、108-114、117-123、127-134、138-168、173-196、201-207、212-217、227-237、247-257、264-280 および 205-223 (配列番号 349) ; 17-22、25-54、70-76、92-100 および 98-110 (配列番号 350) ; 7-29、40-50、60-67、87-96、105-111、119-164、172-199、206-212、220-227、237-259、272-279、282-293、295-309、313-319、321-328、345-363、376-386 および 159-176 (配列番号 351) ; 4-19、24-30、36-43、50-68、71-89、93-106、141-152、154-172、179-197、199-215、229-239、246-252、255-263、281-298、319-325、329-356、358-368、374-390、397-409、420-429、432-444、450-456、459-475、483-494、496-502、520-528、532-556 および 362-377 (配列番号 352) ; 18-25、40-62、77-85、91-97、105-116、123-133、139-184、189-197 および 122-140 (配列番号 353) ; 4-49、52-58、62-70、79-105、109-133、142-150、163-168、206-214、220-228、233-240、243-254、274-281、303-311、327-338、357-373、378-396、403-413、420-436、441-453、461-467、475-481、484-498、506-512、514-521、523-529、562-579、589-595、598-603、615-648、714-722、728-742、749-758、777-792、795-807 および 643-658 (配列番号 354) ; 8-27、37-48、51-56、72-79、87-106、120-138、140-147、167-176、187-197、205-216、222-229、234-239、243-249、277-288、292-315、334-343、347-353、363-391、398-404、430-447、461-467、478-492、498-507 および 456-470 (配列番号 355) ; 5-12、18-24、59-69、80-93、95-109、119-125、130-137、139-147、158-163、168-176、182-202、206-215、222-239、241-249、267-277、291-298、311-318、321-327、338-344、348-355、373-386、393-406、411-417、434-443、446-465、473-484、514-521、532-553、584-594 および 221-237 (配列番号 356) ; 4-14、27-34、50-58、63-72、79-106、109-114、121-142、146-154、161-167、169-175、178-201、223-238、249-254、259-264、278-292、294-312、319-330 および 167-191 (配列番号 357) ; 7-28、36-42、50-61、63-80、122-152、161-174、176-191 および 140-190 (配列番号 358) ; 20-57、59-65、70-78、86-102、119-133、142-161、163-173、177-188、192-202、204-220、222-236、240-253、279-319、326-331、337-383、390-399、406-412、420-427、431-438 および 381-395 (配列番号 359) ; 13-18、28-34、37-43、50-59、75-81、83-97、105-121、139-147、200-206、209-227、231-247、260-271、318-327、366-381、388-394、399-406 および 182-201 (配列番号 360) ; 6-29、37-43、51-56、70-77、82-102、110-119、127-143、178-190、201-209、216-243、261-269、281-292、305-313、327-339、341-354、356-373、391-397、423-429、438-445、450-478 および 21-314 (配列番号 361) ; 4-12、15-21、32-41、59-76、80-89、96-104 および 90-103 (配列番号 362) ; 9-28、30-41、44-54、69-74、77-82、90-97、104-123、125-135、149-155、164-173、177-184、217-226、230-235、238-244、258-272、282-297、300-305、309-315、317-322、327-336、348-362、368-374、380-387、400-411、414-424、451-458、460-466、483-494、497-503、506-511、521-528、540-553、569

-587、598-606、

628-642、661-681、688-700、718-733、740-749、752-764、769-783、823-834、848-854
、862-872、878-884、886-898、915-920、938-951、954-961、963-972、982-989、996-10
03、1010-1016、1021-1032、1038-1044、1047-1057、1060-1070、1079-1088、1094-1102
、1117-1127、1129-1135、1142-1153、1158-1204、1212-1229、1234-1263、1269-1277、1
308-1313、1327-1338、1344-1376、1400-1415、1436-1443、1448-1458、1497-1504、1511
-1522、1544-1566、3-82 および 509-576 (配列番号 363) ; 8-36、40-64、71-79、88-9
4、102-109、118-127、138-148、151-159、163-174、192-198、200-206、220-233、268-2
73、290-301、304-309、316-323、331-349、378-391、414-420、427-437、455-475、494-
510、541-547、549-555、616-640、1-60、55-139、212-308、386-458 および 458-624 (10
配列番号 364) ; 16-31、35-42、70-77、91-101、120-130、132-140、143-153、185-190
、195-202、215-222、228-238、241-251、257-264、268-277、288-302、312-324、326-33
3、341-348、364-382、415-429、438-454、458-466、491-499、501-521 および 273-281
(配列番号 365) ; 8-14、32-57、74-149、155-177、179-212、221-266、271-296、304-3
24、329-346、349-359、368-401、413-419、426-454、465-478、493-510 および 466-490
(配列番号 366) ; 22-28、33-51、64-89、96-119、126-132、138-146、152-159、161-1
69、172-179、193-198、205-211、221-231、235-254、273-280、297-303、312-320、328-
346、351-373、378-384、391-398、448-454、460-468、470-481、516-558、574-593、597
-602、613-623、626-646、649-656、668-673、675-683、696-708、715-722、724-739、74
5-751、759-777、780-804、816-822 および 102-113 (配列番号 367) ; 12-28、41-91、 20
98-107、112-120、125-131、151-193、215-221、240-250、263-280 および 128-138 (配
列番号 368) ; 16-24、32-38、46-62、68-81、90-105、127-133、144-150、160-166、178
-184、186-202、210-219、232-240、252-258、264-273、293-324、337-344、349-357、36
0-369、385-398、410-416、419-427、441-449、458-476、508-515、523-539、544-549、5
62-569、571-579、96-109 および 127-139 (配列番号 369) ; 19-25、28-34、56-61、85
-97、110-116 および 39-53 (配列番号 370) ; 4-37、41-50、62-72、91-97、99-109、1
14-125、136-141、149-158、160-166、201-215 および 27-225 (配列番号 371) ; 15-31
、44-51、96-105、122-130、149-157、162-168、178-183、185-192、198-204、206-213、
221-234、239-245、248-255、257-266、289-335、349-357、415-422、425-441、448-454
、462-468 および 463-481 (配列番号 372) ; 5-31、39-55、63-72、76-99、106-155、1 30
60-177、179-199、207-217、223-240、245-255、261-267、294-316、321-343、354-378、
382-452、477-488、529-536、555-569、584-591、593-612、620-627、632-640、647-654
、671-680、698-704、723-730、732-750、769-775、781-788、822-852 および 505-525
(配列番号 373) ; 3-18 (配列番号 374) ; 4-14 および 12-24 (配列番号 375) ; 4-1
1、22-30 および 12-25 (配列番号 376) ; 5-12 および 4-18 (配列番号 377) ; 4-28
および 7-14 (配列番号 378) ; 6-16 および 8-16 (配列番号 379) ; 4-15、18-33 お
よび 24-36 (配列番号 380) ; 4-10、16-21 および 20-31 (配列番号 381) ; 6-19 (30
配列番号 382) ; 11-18 および 3-10 (配列番号 383) ; 13-24 および 3-15 (配列番号
384) ; 15-27 および 7-16 (配列番号 385) ; 11-16 および 1-15 (配列番号 386) ;
4-16 および 9-21 (配列番号 387) ; 4-24、40-48、54-67 および 22-39 (配列番号 38 40
8) ; 6-30、34-55、62-68、78-106 および 68-74 (配列番号 389) ; 3-14 (配列番号 3
90) ; 9-19 および 6-21 (配列番号 391) ; 4-17 および 1-9 (配列番号 392) ; 5-30
および 1-8 (配列番号 393) ; 4-16、23-46、51-56 および 45-55 (配列番号 394) ; 7
-16 (配列番号 395) ; 2-14 (配列番号 396) ; 4-36、43-65 および 50-62 (配列番号
397) ; 10-30 および 14-21 (配列番号 398) ; 9-17 および 1-10 (配列番号 399) ;
4-12 および 3-16 (配列番号 400) ; 4-15 および 5-23 (配列番号 401) ; 10-21 (配
列番号 402) ; 6-16 (配列番号 403) ; 4-29、31-38 および 2-14 (配列番号 404) ; 4
-35 および 33-42 (配列番号 405) ; 2-17 (配列番号 406) ; 9-18、30-35 および 15-
33 (配列番号 407) ; 4-9 および 6-12 (配列番号 408) ; 3-17 (配列番号 409) ; 12
-21、37-44、52-61、72-80 および 38-48 (配列番号 410) ; 4-10、29-44、54-61、69-7 50

8 および 13-27 (配列番号 411); 13-23、36-53 および 2-15 (配列番号 412); 4-25、28-46、56-72、81-99、120-132、134-142、154-160 および 129-141 (配列番号 413); 4-15、24-33、35-41、64-86 および 21-33 (配列番号 414); 9-15 および 4-13 (配列番号 415); 4-11、13-19、34-48 および 15-32 (配列番号 416); 4-21 および 11-31 (配列番号 417); 23-57 および 38-50 (配列番号 418); 4-32 および 3-13 (配列番号 419); 4-10、13-25、32-42、56-68、72-84 および 26-38 (配列番号 420); 4-20、31-48、52-58、65-71、80-93、99-108、114-123 および 37-49 (配列番号 421); 6-12、14-20 および 3-25 (配列番号 422); 14-25、27-38 および 5-14 (配列番号 423); 4-41、57-105、109-118、123-136、144-152 および 86-99 (配列番号 424); 6-19 (配列番号 425); 2-19 (配列番号 426); 14-47 および 1-14 (配列番号 427); 4-21、29-44 および 2-18 (配列番号 428); 23-29 および 10-28 (配列番号 429); 6-16、22-36 および 11-22 (配列番号 430); 4-19、30-44 および 18-27 (配列番号 431); 5-15、37-45、58-65 および 38-47 (配列番号 432); 4-15、23-34 および 4-15 (配列番号 433); 30-36、44-54、79-85、101-114、138-152、154-164、170-175、179-200、213-220、223-240、243-255、258-264、268-284 および 10-28 (配列番号 434); 表1Bの「同一領域」の列のアミノ酸配列を含むペプチド、特に以下のアミノ酸を含むペプチド: 210-226 および 738-753 (配列番号 449); 326-344、326-348、338-354、371-392、801-809 および 877-901 (配列番号 450); 893-906 (配列番号 451); 51-69 (配列番号 452); 110-125 (配列番号 453); 291-305 (配列番号 454); 210-226 および 738-753 (配列番号 455); 326-344、326-348、338-354、371-392、801-809 および 877-901 (配列番号 456); 893-906 (配列番号 457); 51-69 (配列番号 458); 110-125 (配列番号 459); 291-305 (配列番号 460); 32-44 (配列番号 461); 399-410 (配列番号 462); 表2の「aa from」から「aa to」の列に特定した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: 120-143、138-161 および 156-179 (配列番号 218); 110-129 および 168-184 (配列番号 219); 74-90 (配列番号 222); 759-773 (配列番号 223); 237-260 (配列番号 224); 265-284 (配列番号 225); 65-74 (配列番号 226); 41-50 (配列番号 227); 163-174 (配列番号 229); 26-37 (配列番号 230); 174-189 (配列番号 232); 240-256 (配列番号 234); 285-297 (配列番号 236); 238-247 (配列番号 238); 491-519 (配列番号 239); 114-140 (配列番号 243); 267-284 (配列番号 250); 439-453 (配列番号 252); 162-178 (配列番号 253); 347-364 (配列番号 254); 699-715 (配列番号 255); 60-71 (配列番号 256); 244-257 (配列番号 257); 44-63 および 57-76 (配列番号 258); 185-196 (配列番号 260); 119-129 (配列番号 263); 182-195 (配列番号 266); 32-44 および 424-442 (配列番号 267); 247-256 (配列番号 268); 678-694、785-805、55-77 および 72-94 (配列番号 269); 210-226 (配列番号 281); 37-59 (配列番号 289); 13-29 (配列番号 296); 136-159 (配列番号 348); 205-222 (配列番号 349); 99-110 (配列番号 350); 160-176 (配列番号 351); 457-470 (配列番号 355); 221-237 (配列番号 356); 167-190 (配列番号 357); 96-120 (配列番号 361); 399-417、503-519 および 544-563 (配列番号 364); 46-68、159-183 および 184-198 (配列番号 371); 463-481 (配列番号 372); 表4の「aa from」から「aa to」の列に特定した免疫原性エピトープ、特に以下のアミノ酸を含むペプチド: 110-129 および 168-184 (配列番号 219); 877-901、333-354、326-344 および 801-809 (配列番号 277); 1-54 (配列番号 347); 544-563、31-51、107-119、399-417 および 503-519 (配列番号 364); 120-198 (配列番号 218); 20-35 (配列番号 219); 118-201 (配列番号 221); 48-132 (配列番号 242); 118-136 (配列番号 249); 162-178 (配列番号 253); 347-364 (配列番号 254); 699-715 (配列番号 255); 50-76 (配列番号 258); 785-819 および 44-128 (配列番号 269); 90-128 (配列番号 274); 314-384 (配列番号 289); 327-349 (配列番号 293); 242-314、405-478 および 23-100 (配列番号 304); 129-210 (配列番号 305); 162-188 (配列番号 307); 750-772 (配列番号 310); 1-56 (配列番号 335); 322-337 (配列番号 337); 72-90 (配列番号 339); 374-395 (配列番号 3

45) ; 136-159 (配列番号 348) ; 141-164 (配列番号 358) ; 96-157 (配列番号 361) ; 1-82 (配列番号 363) ; 489-556 (配列番号 364) ; 159-183 および 49-133 (配列番号 371) ; 表5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(aa)」の列のアミノ酸配列を含むペプチド、特に以下のアミノ酸を含むペプチド : 4-26、35-41、53-61、73-84、103-108、114-120、140-146、156-162、192-208、214-219、227-233、239-252、260-268、284-297、1-48 および 113-133 (配列番号 475) ; 4-27、38-44、50-56、59-64、72-79、83-89、92-97、108-116、123-148、152-167、183-196、200-220、232-244、255-261、265-274、282-302、309-317、1-79 および 231-302 (配列番号 476) ; 6-28、66-72、85-105、115-121、144-151、160-170、176-185、223-230、252-288、296-310、319-333、367-374、458-464、471-480、483-488、520-528、530-549、559-564、593-601、606-616、636-643、655-662、676-682、684-699、719-726、735-750、757-764、777-785、799-810、812-843、846-853、868-873、880-889、891-899、909-929、934-940、963-969、998-1004、1007-1014、1016-1022、1030-1046、1-80 および 808-821 (配列番号 477) ; 7-24、35-41、75-81、91-114、122-132、137-144、148-156、183-192、194-200、212-228、233-238、251-258、275-295、326-332、337-346、1-79 および 305-321 (配列番号 478) ; 31-38、42-52、66-72、86-92、98-104、115-122、127-146、154-164、169-187、198-212、225-237、255-269、13-92 および 135-142 (配列番号 479) ; 4-36、39-49、63-69、71-77、81-88、123-131、133-139、160-169、174-180、188-194、210-217、273-278、289-300、317-334、336-341、383-401、425-438、1-68、212-270 および 402-446 (配列番号 480) ; 21-29、31-42、49-63、72-79、81-93、112-132、159-165、188-195、197-232、262-267、279-286、294-301、318-326、348-366、381-405、409-426、436-465、471-480、484-492、497-505、521-544、554-561、567-577、581-589、601-609、611-622、636-651、653-667、669-685、700-708、716-722、729-744、749-766、780-786、789-811、814-864、1-57 および 84-106 (配列番号 481) ; 6-24、35-48、57-63、72-78、87-92、113-119、123-137、147-153、173-181、212-233 および 1-124 (配列番号 482) ; 13-34、62-69、78-83、86-91、98-104、107-115、146-159、179-188、195-205、209-221、226-233、239-253、276-282、284-294、297-308、331-354、375-382、388-399、421-433、449-458、464-469、472-491、508-513、525-531、534-550、575-593、601-618、629-635、654-661、666-680、706-721、723-740、771-805、810-830、845-851 および 1-84 (配列番号 483) ; 4-32、45-64、73-83、86-92、100-111、125-147、157-163、170-175、177-188、226-232、245-252、258-274、320-335、348-359 および 1-71 (配列番号 484) ; 13-40、43-71、76-83、87-101、109-119、125-156、162-175、182-219、226-232、240-262、270-287、306-318、326-342、344-408、414-444、449-456 および 1-51 (配列番号 485) ; 4-16、18-34、45-54、99-108、134-140、203-212、241-257、266-274、279-291、308-315、330-336、355-370、374-382、402-410、428-455、466-472、474-480、531-554、560-566、572-580、597-618、632-660、664-674、676-685、691-705、708-735、750-768、1-87 および 342-480 (配列番号 486) ; 表6の「aa from」から「aa to」の列に特定した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 : 115-132 および 1-26 (配列番号 475) ; 33-55 (配列番号 476) ; 1-25 (配列番号 478) ; 37-61 (配列番号 479) ; 1-24 (配列番号 480) ; 1-23 (配列番号 481) ; 46-60 (配列番号 482) ; 1-28、23-50 および 45-71 (配列番号 483) ; 1-22 および 17-38 (配列番号 484) ; 1-22 および 17-38 (配列番号 485) ; 1-27、22-47 および 422-447 (配列番号 486) ; 表7の「aa from」から「aa to」の列に特定した免疫原性エピトープ、特に以下のアミノ酸を含むペプチド : 115-132 および 1-47 (配列番号 475) ; 1-55 (配列番号 476) ; 22-85 (配列番号 477) ; 307-320 および 1-44 (配列番号 478) ; 15-76 および 40-92 (配列番号 479) ; 1-59、213-269 および 403-445 (配列番号 480) ; 1-56 および 85-105 (配列番号 481) ; 37-121 (配列番号 482) ; 1-71 (配列番号 483) ; 1-38 (配列番号 484) ; 1-38 (配列番号 485) ; 1-47 (配列番号 486) 。

【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のいずれかのストレプトコッカス・アガラクティエ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】

好適な宿主細胞を請求項 8 または請求項 9のベクターで形質転換または形質移入することを含む請求項 11～14のいずれかのストレプトコッカス・アガラクティエ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。

10

【請求項 18】

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性物質を含むことを特徴とする請求項 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】

請求項 1～7のいずれかの核酸分子または請求項 11～14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその断片の、医薬品の製造、特にストレプトコッカス・アガラクティエ感染に対するワクチンの製造のための使用。

20

【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な部分。

【請求項 21】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 20の抗体。

【請求項 22】

該有効な部分がFab断片を含む請求項 20または 21の抗体。

【請求項 23】

抗体がキメラ抗体である請求項 20～22のいずれかの抗体。

30

【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り、非-ヒト動物において免疫応答を開始させる工程、
該動物から抗体を含む体液を取り出す工程、および、
該抗体を含む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。

40

【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、
該クローン化し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産生する工程。

【請求項 28】

50

ストレプトコッカス・アガラクティエ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断片への結合を可能とする条件下で、候補アンタゴニストの該過免疫血清反応性抗原またはその断片に対する結合に応答して検出可能なシグナルを提供することが出来る成分の存在下で、接触させる工程；および、
- b) アンタゴニストの過免疫血清反応性抗原またはその断片に対する結合に応答して生じるシグナルの存在または不在を検出する工程。

10

【請求項 31】

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

- a) 請求項 11-14のいずれかの過免疫血清反応性抗原またはその過免疫断片を提供する工程、
- b) 該過免疫血清反応性抗原またはその断片に対する相互作用パートナー、特に請求項 20～24のいずれかの抗体を提供する工程、
- c) 該 過免疫血清反応性抗原またはその断片の該相互作用パートナーとの相互作用を可能にし、相互作用複合体を形成させる工程、
- d) 候補アンタゴニストを提供する工程、
- e) 候補アンタゴニストと相互作用複合体の間で競合反応を起こさせる工程、
- f) 候補アンタゴニストが過免疫血清反応性抗原またはその断片と相互作用パートナーとの相互作用活性を阻害または低減するかを判定する工程。

20

【請求項 32】

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、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/または同定のための使用。

30

【請求項 33】

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での診断方法。

【請求項 34】

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、特にストレプトコッカス・アガラクティエ感染をインビトロで診断する方法。

40

【請求項 35】

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、該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使用、ここで、該ペプチドはアンチカリンを含む群から選択される。

【請求項 36】

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

50

択される。

【請求項 37】

請求項 11~14のいずれかの核酸分子の機能的リボ核酸の製造のための使用、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、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) によって起こる細菌感染症の予防および治療用の医薬の調製における使用に好適なストレプトコッカス・アガラクティエの抗原をコードする単離核酸分子に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ストレプトコッカス・アガラクティエはグラム陽性細菌であり、血液寒天培地におけるその溶血パターンに基づくグループB連鎖球菌(GBS)に属する。この生物は被包性であり、莢膜は病原性の重要な要素である。莢膜は抗原性であり、GBSを血清型によって分類するための基礎をなす。9種類のGBS血清型が同定されている: Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VIIおよびVIII。ほとんどのストレプトコッカス・アガラクティエ血清型は重篤な疾患を引き起こすことが示されており、2つのもっとも一般的な血清型- 型IIIおよびV - は世界中の侵入型疾患の大部分を占めると評価されている。この順位および血清型有病率は年齢群および地理的領域によって異なる。米国では、GBS 型 IIIが幼児疾患の50%以上を、型 Vが非妊娠成人の疾患の約40%、そして型 Ia があらゆる患者集団の疾患の約3分の1を引き起こす。

20

【0003】

ストレプトコッカス・アガラクティエは、高齢者(the extremities of age)および基礎となる疾患を有する者のヒト疾患の重要な病原体である。グループB連鎖球菌は新生児における全身性および局所性感染症の主な原因である。GBSは1970年代から米国の新生児における主な病原である。細菌感染症は生命を脅かす疾患、例えば、敗血症、肺炎および髄膜炎を導きうる。生存者は聴覚、学習および視覚能力障害において永久に障害者となりうる。新生児は通常、GBSが定着した母親からの分娩時または出産されるときにこの生物を得る。さらに、GBSはまた、妊婦および慢性的に体調がすぐれないものおよび高齢の糖尿病、悪性腫瘍、免疫不全などの患者における感染症の頻度の高い原因である(Balter、S. et al. in Gram positive pathogens ed. by Fischetti V.A. et al. ASM Press 2000、p p 154-160に概説)。

30

【0004】

妊婦の10-35%にGBSが定着するが、無症候性である。しかし、GBS 定着は垂直感染のリスクのために重要である。50-70%の新生児が定着した母親から産まれる-即ち、すべての新生児の5-15%に出生時にGBSが定着するようになる。定着は感染および疾患に必須である。ほとんどの早産児は、抗体の母親からの移動が少なく、免疫系が未成熟であるため侵入型疾患のリスクが非常に高い。妊娠時のGBS 保因は慢性、間欠性、または一過性であり得る。妊婦は三半期の後期から出生前診の際に一度スクリーニングされるから、保因の持続時間を評価するのは困難である。いくつかの研究は3番目の三半期と分娩時の定着状態の間に相関(~90%)があることを示唆している。分離株の血清型決定は、同じ型の持続がもっとも一般的であることを示す (Balter、S. et al. in Gram positive pathogens ed. by Fischetti V.A. et al. ASM Press 2000、pp 154-160に概説)。

40

【0005】

予防処置をしなければ、すべての新生児の1~2%および重度に定着した母親から産まれた新生児の15%に侵入型疾患が発症する(敗血症、肺炎および/または髄膜炎)。米国では、GBS 感染症は1-5 新生児/1000 出生に影響を与える。約 17,000例の侵入型 GBS 疾患が毎年米国で起こっており、予防前の新生児には7,500例起こっている。GBSは細菌性髄膜炎

50

の一番の原因であり、この年齢群に報告されているすべての症例の～40 %を占める。侵入型 GBS 疾患の全発生率は米国において0.2-0.7/100,000である。欧州ではそれより幾分低い。予防処置をしない場合の侵入型疾患による死亡率は6%であり、16人の感染した新生児のうち1人が死亡し、生存者の20%は永久に障害をもつようになる。

【0006】

重篤なグループB連鎖球菌感染の率はどの年齢群よりも新生児においてかなり高い。にもかかわらず、重篤なグループB連鎖球菌感染は男女に拘わらずその他の年齢群においても起こる。非妊娠成人のなかで、重篤な疾患の率は、4.1～7.2例/100,000人の範囲である。侵入型感染症(通常は細菌に曝されない体の部分に細菌が侵入した感染症)の平均死亡率は、18-64歳の成人で8-10%であり、65歳以上の成人で15-25%である。死亡率は若い成人や、その他の医学的症状のない成人では低い。重篤なグループB連鎖球菌疾患の割合は年齢とともに増える。非妊娠成人における症例の平均年齢は約60歳である。ほとんどの成人のグループB連鎖球菌疾患は重篤な医学的症状を有する成人において起こる。これらには以下が含まれる: 真性糖尿病; 肝臓疾患; 脳卒中歴; 癌歴; または褥瘡。老人の中では、重篤なグループB連鎖球菌疾患の割合は看護施設の居住者、寝たきりの入院患者の間で高い。非妊娠成人でのグループB連鎖球菌疾患には最近の外傷後、手術などの特定の侵入型医療行為の後によくかかる({Farley、M.、2001}; {Jackson、L. et al.、1995}; www.cdc.gov/groupbstrep/)。 10

【0007】

予防前の新生児疾患の直接の医療費は毎年2億9400万ドルであり、GBSはかなりの経済的 20
負荷を与え続けている。

【0008】

ストレプトコッカス・アガラクティエによる感染の決定的な診断は一般に、子宮頸部スワブ、血液またはその他の通常は無菌の身体部位からの該生物の単離に依存してなされる。試験は体液中の莢膜多糖類抗原の検出にも利用できる。

【0009】

ペニシリン G はGBSの確立した症状の最適な治療法である。菌血症、肺炎および軟組織感染症のためには10日の治療が推奨されているが、髄膜炎には2-3週間、骨髄炎には3-4週間が推奨されている。

【0010】

予防は、北米において1994年から確立しており、GBSの保因について妊婦を、妊娠35-37週目の膣および肛門直腸スワブを採取してスクリーニングすることによって行われるか、培養無しに分娩のための入院時に危険因子を同定することによって行われる。予防の候補である妊婦は、早期発症の新生児疾患を予防するために出産中に分娩時抗生物質治療を受ける。この予防方法は米国において1993～1999年の間のGBS 疾患の発症を1.7/1000 出生から 0.4/1000 出生に減少させた。ほとんどの新生児 GBS 疾患は分娩時予防 (ペニシリン Gまたはアンピシリン)により阻止できるが、現在使える戦略は、特に遅発性 (>7 日齢) 感染症および早生児の疾患の予防には理想的ではない。いくつかの理由により保因についてのスクリーニングを避ける人が常におり、理由としては例えば、32-35週目に陰性であると試験されたが出産中に陽性となる間欠性の保因、非看護(unattendance)、過失またはスクリーニング日前の出産(32-35週目)などがある。 30 40

【0011】

長い目で見れば、抗生物質の広範な使用は通常一定期間後にあらわれる抵抗性株を誘導する。ペニシリン (妊婦は3-5週に1回高用量で処置される)およびその他の抗生物質の多用は、抗生物質耐性臨床分離株の率を確実に上昇させることが示されている(参考文献)。さらに、抗生物質に基づく予防の効力は遅発性疾患や早期発症(出産後48時間以内)には有効ではない。さらに注意されるのは、感染しやすい成人集団における予防に対する処置がなされていないことである。

【0012】

ワクチン開発はGBS 保因および疾患に対する防御免疫の要素に関する十分な知識が無い 50

ために進んでいない。保因と自然免疫の発達との関連はあまり理解されていない。さらに、保因者において疾患を起こさせる免疫原性機構が明らかではない。しかし、病原-特異的抗体の母親の血清でのレベルが新生児 GBS 疾患と相関していることが示唆されている。出産時の母親の抗-莢膜多糖類抗体レベルと侵入型新生児疾患の頻度の間に逆相関があることが確実に確認されている{Campbell、J. et al.、2000}。

【0013】

グループB 炭水化物抗原はすべてのGBS株に共通であるが、残念なことに、それは免疫原性が強くなく、抗体は実験モデルにおいて致死性の攻撃から保護を示さない。多糖から出来ているGBS 莢膜自体は免疫原性であり、防御抗体を誘導することが出来る。しかしこの保護は型特異的である。莢膜特異的抗体は高度な保護を示すことがわかっているが、どの程度の濃度のこれら血清型-特異的抗体が疾患から保護できるかは明らかではなく、より最近にはこれら抗体のオプソニン活性および結合力が濃度よりも重要な保護の決定因子であることが明らかになってきている。

10

【0014】

ストレプトコッカス・アガラクティエに対するヒト免疫における表面タンパク質の重要性はすでに理解されている。すべての血清型が宿主免疫防御に関連する活性を有する表面タンパク質を発現していることは明らかである。アルファ C タンパク質、ベータ C タンパク質、Ribおよび Sip タンパク質は生化学的および遺伝学的によく特徴づけられており、動物モデルにおいて免疫原性であり保護を示すことが知られている({Michel、J. et al.、1991}; {Brodeur、B. et al.、2000}; {Larsson、C. et al.、1999}; {Cheng、Q. et al.、2002})。ワクチン候補としてのこれらのタンパク質の主な問題点は、GBSの異なる臨床分離株の間での有病率における可変性であろう。Rib タンパク質は例えば血清型 III GBSには存在するが、世界中の疾患のかなりの部分の原因である型 Vには存在しない。いくつかのその他の表面タンパク質が免疫原性であるとして特徴づけられているが、GBSの免疫原性タンパク質の大部分を同定するためになされてきた系統的研究には限りがある。

20

【0015】

したがって、GBS 感染症を予防または寛解させるための有効な処置が望まれている。ワクチンはGBSによる感染症を予防できるだけでなく、宿主組織の定着をより特異的に予防または寛解させ(特に産道において)、それによって母親から胎児へ感染することを低減できる。この生物の急性感染の発生および保因を減らすことにより、新生児における侵入型疾患、-肺炎、菌血症、髄膜炎、および敗血症-の予防が導かれる。ヒト感染症をもたらすストレプトコッカス・アガラクティエ株の大部分に対する交差保護を示すことができるワクチンはその他のすべての連鎖球菌種、特にグループA、CおよびGによる感染症の予防または寛解にも有用であろう。

30

【0016】

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、完全に死滅または弱毒化した生物体、これら生物/組織の細画分、タンパク質、またはそのもっとも単純な形態において、ペプチドが挙げられる。抗原はグリコシル化タンパク質またはペプチドの形態で免疫系によって認識され得、多糖または脂質で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識するからである。B-細胞は4-5アミノ酸といった短い直鎖状エピトープおよび三次元構造(高次構造エピトープ)を認識することが出来る。持続性の、抗原-特異的免疫応答を得るためには、アジュバントが、免疫系のすべての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、

40

50

あるいは免疫系の刺激剤として局所のおよび/または全身的に作用しうる。

【0017】

1970年代の後半からワクチン開発は莢膜多糖類に注目しているが、安全かつ有効な製品はまだ得られていない。しかし、ストレプトコッカス・アガラクティエに対するワクチンは開発および幼児およびリスクの高い成人への投与のためにもっとも重要なものの一つであると格付けされている。現在のこの感染に対するワクチンは開発の調査段階にあるにすぎない。タンパク質と結合しているかしていない莢膜多糖類(CPS)を免疫原として用いることに努力がなされている{Paoletti, L. et al., 2002}。しかし、多糖に基づくワクチンの使用に対する議論がいくらかある。多糖はIgG2 抗体を誘導するが、これはIgG1またはIgG3 抗体と比べて胎盤を横切る効率が低い。それはもっとも罹患しやすい新生児、死産児にとって特に問題である。というのは胎盤の抗体の移動は32-34週目より前は低いからである。出産の~10%は妊娠34週目より前に起こると見積もられている。

10

【0018】

タンパク質結合ワクチンは、GBS 疾患との戦いにおいてアマルマトリウム(amarmatorium)を強力に補強する新規なものであることには疑いはないが、ワクチンは制限された数のGBS 血清型しか含みえず、適当な環境負荷をうけると、疾患の負荷が非常に高い領域では特に、非ワクチン血清型による交代疾患が現に脅威として残る。さらに能動免疫化のために用いる多糖抗原は、ヒトに免疫記憶を起こさせない。CPSの非-GBS関連免疫原性タンパク質担体(例えば、破傷風トキソイド、コレラ毒素 B サブユニット等)との結合が、ワクチン中の抗体濃度を高めるのに有用であることが示されているが、それは非常に有効な宿主応答を支持するために実際の感染の際に記憶BおよびT 細胞を増強しうるであろう病原-特異的 B 細胞およびT 細胞 エピトープをもたらさない。これらの基準を満たすタンパク質によるCPS ワクチンの補強を可能にするには、保存された免疫原性 GBS-特異的表面タンパク質の同定が必須である。

20

【0019】

これらの問題点のすべてからヒトにおいてオブソニン化 および/または 中和抗体を誘導することが出来、インビボ条件下ですべての株によって発現されるタンパク質またはその誘導体からなる新世代ワクチンの開発が必要であることが示唆される。

【0020】

受動的な抗体に基づく治療法には大きな能力がある。予防のためにヒト静脈内免疫グロブリン(IVIG)調製物を使用する試みがすでになされている。モノクローナル抗体産生の技術における最近の進歩により、血清療法に伴う毒性をさけつつ、ヒト抗体医薬を作る手段および抗体を再導入する治療法が提供されている。免疫グロブリンは非常に多用途の一群の抗菌タンパク質であり、増えつつある感染性疾患の予防と治療に用いることが出来る。抗体療法は非常に多様な微生物に対して有効であった({Burnie, J. et al., 1998}に概説)。抗-GBS mAbは治療的に侵入型疾患を起こす新生児全てに与えることが出来、また予防的に未熟児および早産児に与えることが出来るであろう。

30

【0021】

ここ10年間で、いくつかのGBS タンパク質の免疫原性および保護能力が動物モデルにおいて記載されてきており、今では種に共通のタンパク質に基づくワクチンの開発が探索されている。かかるタンパク質は、GBS 表面タンパク質 Sip {Brodeur, B. et al., 2000}、rib、o-タンパク質{Michel, J. et al., 1991}である。

40

【0022】

グラム陽性生物の表面に表示される特定のタンパク質または酵素は病原性に重要な役割を果たし、これらの病原によって起こされる疾患プロセスに関与している。しばしば、これらタンパク質は宿主組織との直接相互作用または細菌表面を宿主防御機構から隠すことに関与している {Navarre, W. et al., 1999}。ストレプトコッカス・アガラクティエはこの点で例外ではない。いくつかの表面タンパク質が毒性因子として特徴づけられており、GBS 病原性に重要である((Paoletti L.C. et al. in Gram positive pathogens, ed. by Fischetti V.A et al., ASM Press 2000, pp 137-153); {Paoletti, L. et al., 2

50

002}に概説)。これらタンパク質に対する抗体がヒトに多糖よりもよい保護を与えるとすると、新規なタンパク質-に基づくGBS ワクチンのソースを提供することが出来、従来の莢膜多糖ワクチンと組み合わせて使うことが出来るし、それにとって代わることも出来る。上記タンパク質および多数のさらなる候補の、潜在的ワクチンのための抗原としての使用は、主に同定の容易さまたは入手可能性に基づいた選択から得られたものである。より網羅的な様式でストレプトコッカス・アガラクティエに対する関連抗原を同定する必要がある。

【0023】

本発明者らは、特定の病原、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(WO 02/059148)。しかし、生物学的特性、病原性機能および遺伝的背景の相違により、ストレプトコッカス・アガラクティエとブドウ球菌株とは全く異なる。重要なことに、ストレプトコッカス・アガラクティエ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。ヒト抗体源の4つの主な型をこの目的のために収集した。第一は、子宮頸部および肛門直腸のGBS保因について陰性であると試験された健康妊婦である。このドナー群はもっとも重要な抗体源である。その血清サンプルに加えて子宮頸部芯から回収した分泌IgA (sIgA)を含むヒト子宮頸部分泌物も抗原同定および確証に用いた。この収集物の主な価値は、sIgAは粘膜表面の主な免疫エフェクター分子であると考えられることである。第二は、GBSが定着した健康妊婦であって、その子供がGBS-無含有(抗生物質予防によってであるが)のものである。第三は、臨床疾患を有さない45歳未満の成人である。第四は、未処置個体であって、5~10ヶ月の子供であり、母親の抗体を既に失っており、GBS 疾患ではないために GBS-特異的抗体を獲得していないものである。

【0024】

適切な血清源を選択するために、抗-ストレプトコッカス・アガラクティエIgGおよび IgA 抗体レベルを測定する一連のELISAおよびイムノブロットング実験を、細菌溶解液および培養上清タンパク質を用いて行った。保因者および非保因者からの高力価の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、保因または非保因状態が抗体レベルと関係がない黄色ブドウ球菌について用いたアプローチとは基本的に非常に異なる。

【0025】

本発明はハイスルーブットゲノム方法を用いて、感染と定着の過程でヒトにおいて抗体を誘導する能力を有するインビボで発現する病原-特異的タンパク質を同定する。

【0026】

2つの細菌種、ストレプトコッカス・アガラクティエおよび黄色ブドウ球菌のゲノムはそれ自体多数の重要な相違を示す。ストレプトコッカス・アガラクティエのゲノムはおおよそ 2.2 Mbであり、黄色ブドウ球菌は 2.85 Mbである。平均GC含量はそれぞれ35.7および33%であり、コードされる遺伝子のおおよそ30~45%は2つの病原体に共有されていない。さらに2つの細菌種は増殖のために異なる培養条件と培地を要求する。2つの病原によってもたらされるもっとも重要な疾患を以下に例示する。黄色ブドウ球菌は主に院内、日和見性感染症をもたらす：膿痂疹、毛囊炎、膿瘍、腫れ、感染裂傷、心内膜炎、髄膜炎、敗血症性関節炎、肺炎、骨髓炎、熱傷様皮膚症候群 (SSS)、毒素ショック症候群。ストレプトコッカス・アガラクティエは主に新生児感染症および老人の疾患をもたらす。例えば、菌血症、敗血症、創傷感染、骨髓炎および髄膜炎。

【0027】

NEM316 (ATCC 12403)と称されるストレプトコッカス・アガラクティエの莢膜血清型 11I 分離株の完全ゲノム配列を、ランダムショットガンシーケンシングステラテジー (GenBank accession number AL732656; see www.tigr.org/tigrscripts/CMR2/CMRHomePage.spl)により決定した{Glaser, P. et al., 2002}。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 2 8 】

【特許文献 1】国際公開第 0 2 / 0 5 9 1 4 8 号

【非特許文献】

【 0 0 2 9 】

【非特許文献 1】Balter, S. et al. in Gram positive pathogens ed. by Fischetti V. A. et al. ASM Press 2000、pp 154-160

【非特許文献 2】Farley, M. (2001). Clin Infect Dis 33: 556-61.

【非特許文献 3】Jackson, L., et al. (1995). Ann Intern Med 123: 415-20.

【非特許文献 4】Campbell, J., et al. (2000). Obstet Gynecol 96: 498-503.

【非特許文献 5】Michel, J., et al. (1991). Infect Immun 59: 2023-8.

10

【非特許文献 6】Brodeur, B., et al. (2000). Infect Immun 68: 5610-8.

【非特許文献 7】Larsson, C., et al. (1999). Vaccine 17: 454-8.

【非特許文献 8】Cheng, Q., et al. (2002). Infect Immun 70: 6409-15.

【非特許文献 9】Paoletti, L., et al. (2002). Semin Neonatol 7: 315-23.

【非特許文献 1 0】Burnie, J., et al. (1998). J Antimicrob Chemother 41: 319-22.

【非特許文献 1 1】Navarre, W., et al. (1999). Microbiol Mol Biol Rev 63: 174-229

【非特許文献 1 2】Paoletti, L., et al. In Gram positive pathogens ed. by Fischetti V.A. et al. ASM Press 2000, pp 137-153.

【非特許文献 1 3】Glaser, P., et al. (2002). Mol Microbiol 45: 1499-513.

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 3 0 】

本発明の根底となる問題は、ストレプトコッカス・アガラクティエ感染症に対するワクチン等の医薬を開発する手段を提供することであった。より具体的には、問題は、該医薬の製造に有用であり得る、有効かつ関連する網羅的セットのストレプトコッカス・アガラクティエ由来の核酸分子または過免疫血清反応性抗原を提供することであった。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 3 1 】

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：

30

a) 配列番号 14、90、157-216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)の核酸分子に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)の核酸分子にハイブリダイズしうる核酸分子。

【 0 0 3 2 】

40

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。

【 0 0 3 3 】

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

a) 配列番号 1、3、5-13、15、18-25、27-31、33-36、39-68、70-85、92-100、103-126、128-145、147、149-156、217、435-448および463-474から選択される核酸分子に対して96%または 96 %を超える、好ましくは 少なくとも 98 %、特に100 % 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、

50

- 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) の核酸分子に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) の核酸分子にハイブリダイズしうる核酸分子。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、ストレプトコッカス・アガラクティエに対するヒト抗体源の特徴付けを示す。

【図2】図2は、ストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403からの小断片ゲノムライブラリー、LSAg-70の特徴付けを示す。

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

【図4】図4は、用いた株の血清型と、同定された抗原の1つを用いた遺伝子分布分析の一例を示す。

【図5】図5は、大腸菌溶解液での免疫化によるマウスにおける、エピトープ-特異的抗体の誘導の例を示す。

【図6】図6は、フローサイトメトリーによるエピトープ-特異的抗血清での細胞表面染色の例を示す。

【図7】図7は、インビトロアッセイにおける選択されたエピトープによって誘導された抗体の殺菌活性の測定を示す。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明の別の態様によると、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 32、86、91、101、127から選択される核酸分子に対して98 %または98 %を超える、特に100 %の配列同一性を有する核酸分子、
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) の核酸にハイブリダイズしうる核酸分子。

【0036】

好ましくは、核酸分子はDNAまたはRNAである。

【0037】

本発明の好ましい態様によると、核酸分子はゲノムDNA、特にストレプトコッカス・アガラクティエゲノムDNAから単離される。

【0038】

本発明によると、本発明のいずれかによる核酸分子を含むベクターが提供される。

【0039】

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。

【0040】

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。

【0041】

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。

【0042】

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 231、307、374-433からなる群から選択される。

【0043】

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 218、220、222-230、232、235-242、244-248、250-253、256-285、287-302、309-317、320-343、345-362

10

20

30

40

50

、364、366-373、434、449-462および475-486からなる群から選択される。

【 0 0 4 4 】

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 249、303、308、318、344からなる群から選択される。

【 0 0 4 5 】

さらなる態様によると、本発明は、以下からなる群から選択される過免疫血清反応性抗原の断片、表1Aの「予測免疫原性アミノ」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、特に以下のアミノ酸を含むペプチド：4-20、35-44、65-70、73-87、92-98、112-137、152-161、177-186、193-200、206-213、229-255、282-294、308-313、320-326、349-355、373-384、388-406、420-425 および 115-199（配列番号 218）；5-24、35-41、44-70、73-89、103-109、127-143、155-161、185-190、192-207、212-219、246-262、304-336、372-382、384-393、398-407、412-418、438-444、1-75、76-161 および 164-239（配列番号 219）；4-10、16-58、60-71、77-92、100-126、132-146、149-164、166-172、190-209、214-220、223-229、241-256、297-312、314-319、337-343、351-359、378-387、398-418、421-428、430-437、440-448、462-471、510-519、525-536、552-559、561-568、573-582、596-602、608-630、637-649、651-665、681-702、714-732、739-745、757-778、790-805、807-815、821-829、836-842、846-873、880-903、908-914、916-923、931-940、943-948、956-970、975-986、996-1015、1031-1040、1051-1069、1072-1095、1114-1119、1130-1148、1150-1157、1169-1176、1229-1238 および 802-812（配列番号 220）；5-12、14-26、35-47、52-67、72-78、83-98、121-141、152-159、163-183、186-207、209-257、264-277、282-299、301-309、312-318、324-339、358-368、372-378、387-397、425-431 および 46-291（配列番号 221）；29-38、44-64、70-76、78-87、94-100、102-112、119-134、140-149、163-173、178-186、188-194、207-234、247-262、269-290 および 73-92（配列番号 222）；10-28、36-63、77-87、103-119、127-136、141-169、171-183、195-200、207-232、236-246、251-265、268-283、287-297、314-322、335-343、354-363、384-390、405-411、419-436、443-455、467-473、480-513、518-529、550-557、565-585、602-608、616-625、632-660、665-677、685-701、726-736、738-747、752-761、785-796、801-813、838-853、866-871 および 757-774（配列番号 223）；31-38、61-66、74-81、90-115、123-145、154-167、169-179、182-193、200-206、238-244、267-272 および 235-251（配列番号 224）；19-25、38-54、56-64、66-72、74-92、94-100、116-129、143-149、156-183、204-232、253-266、269-275、294-307 および 241-313（配列番号 225）；5-34、50-56、60-65、74-85、89-97、108-119、159-165、181-199、209-225、230-240、245-251、257-262、274-282、300-305 および 64-75（配列番号 226）；5-13、16-21、27-42、45-52、58-66、74-87、108-114、119-131 および 39-51（配列番号 227）；6-23、46-54、59-65、78-84、100-120、128-133、140-146、159-165、171-183、190-204、224-232、240-248、250-259、274-280、288-296、306-315 および 267-274（配列番号 228）；5-12、15-24、26-36、42-65、68-80、82-104、111-116、125-144、159-167、184-189、209-218、235-243、254-265、269-283、287-300、306-316、318-336、338-352、374-392 および 162-174（配列番号 229）；30-42、45-54 および 25-37（配列番号 230）；10-30、53-59、86-95、116-130、132-147、169-189、195-201、212-221、247-256、258-265、278-283、291-298、310-316、329-339、341-352、360-367、388-396、398-411、416-432、443-452、460-466、506-512、515-521、542-548 および 419-431（配列番号 231）；4-27、30-53、60-67、70-90、92-151、159-185、189-195、198-210、215-239 および 173-189（配列番号 232）；4-26、41-54、71-78、116-127、140-149、151-158、161-175、190-196、201-208、220-226、240-252、266-281、298-305、308-318、321-329、344-353、372-378、384-405、418-426、429-442、457-463、494-505、514-522 および 174-188（配列番号 233）；17-25、27-39、61-67、81-89、99-110、120-131、133-139、147-161、167-172、179-185、192-198、203-213、226-238、243-258、261-267、284-290、296-307、311-328、340-352、356-371 および 239-256（配列番号 234）；8-30、40-49、67-80、114-123、126-142、152-162、188-194 および 57-70（

配列番号 235) ; 4-23、28-34、36-47、50-61、76-81、89-94、96-104、112-119、126-146、155-181、195-200、208-214、220-229、244-260、263-276、282-288、292-300、317-323、336-351、353-359、363-375、382-399、415-432、444-455、458-471、476-481、484-492、499-517、522-529、535-541、543-568、572-584、586-600、607-617、626-637、656-675 および 282-297 (配列番号 236) ; 6-24、30-35、38-45、63-91、134-140、146-160、167-188、214-220、226-234、244-250、260-270、286-301、316-329、340-371、429-446、448-459、474-481、485-491、512-526、537-544、550-565、573-583、596-613、621-630、652-658 および 87-97 (配列番号 237) ; 8-20、26-48、56-67、76-86、94-109、115-121、123-129、143-160、178-186、191-198、201-208、221-236、238-244、260-268 および 237-247 (配列番号 238) ; 4-40、42-57、73-87、98-117、126-135、150-156、166-174、196-217、231-236、248-258、276-284、293-301、307-313、339-347、359-365、375-387、395-402、428-440、445-456、485-490、497-505、535-541、547-555、610-625、648-656、665-671 および 448-528 (配列番号 239) ; 10-18、39-45、51-61、80-96、98-106、110-115、158-172、174-183、191-200、220-237、249-255、274-289、308-324、331-341、372-381、384-397、405-414 および 322-338 (配列番号 240) ; 30-36、38-56、85-108、134-147、149-160、163-183、188-201、206-211、219-238、247-254 および 5-13 (配列番号 241) ; 11-40、98-103、110-115、133-145、151-159、172-179、192-201、204-212、222-228、235-245、258-268、283-296、298-309、322-329、342-351、354-362、372-378、385-393、407-418、495-516 および 1-148 (配列番号 242) ; 5-19、21-36、73-94、112-119、122-137、139-145、152-167、184-190、198-204、208-224、249-265、267-281、299-304、309-317、326-333、356-364、368-374、381-389、391-414、419-425、430-435 および 113-140 (配列番号 243) ; 45-54、59-67、78-91 および 15-23 (配列番号 244) ; 11-22、33-47、52-80、88-112、124-129 および 6-25 (配列番号 245) ; 26-41、51-63、80-89、93-115、150-163、187-193、220-237、240-249、286-294、296-306、316-329、345-353、361-370、407-425、428-437、474-482、484-494、504-517、533-541、549-558、595-613、616-625、660-668、673-685、711-726、736-744、749-761、787-802、812-820、825-837、863-878、888-896、901-913、939-954、964-972、977-989、1003-1008、1016-1022、1028-1034、1041-1053、1059-1074、1101-1122、420-511 および 581-704 (配列番号 246) ; 18-25、27-55、71-83、89-95、102-113、120-146、150-156、174-185 および 159-175 (配列番号 247) ; 24-30、38-56、63-68、87-93、136-142、153-164、183-199、213-219、226-234、244-261、269-278、283-289、291-297、320-328、330-336、340-346、348-356、358-366、382-387、401-408、414-419、449-455、468-491、504-512、531-537、554-560、597-608、621-627、632-643、650-662、667-692、703-716、724-737、743-758、783-794、800-818、846-856 および 806-884 (配列番号 248) ; 4-14、21-39、86-92、99-107、121-131、136-144、147-154、158-166、176-185、193-199、207-222、224-230 および 117-136 (配列番号 249) ; 65-76、85-97、103-109、115-121、125-146、163-169、196-205、212-219、228-237、241-247、254-262、269-288、294-303、305-313、328-367、395-401、405-412、418-429、437-447、481-488、506-513、519-524、530-541、546-557 および 266-284 (配列番号 250) ; 5-14、37-42、49-71、78-92、97-112、127-136、147-154、156-163、186-198、216-225、233-243、248-253、295-307、323-332、359-366、368-374、380-398 および 194-223 (配列番号 251) ; 4-11、33-39、45-72、100-113、119-129、136-144、169-175、177-185、200-208、210-219、262-276、278-297、320-326、336-344、347-362、381-394、443-453 および 438-454 (配列番号 252) ; 4-29、31-52、55-61、95-110、138-158、162-171、179-187、202-229、239-248、251-256、262-267、269-285、304-310、351-360、362-368、381-388、415-428、435-440、448-458 および 161-178 (配列番号 253) ; 4-17、19-28、32-43、47-59、89-110、112-126、128-134、140-148、152-161、169-184、191-204、230-235、255-264、328-338、341-347、401-409、413-419、433-441、449-458、463-468、476-482、486-492、500-506、529-545 および 305-381 (配列番号 254) ; 10-29、38-45、53-61、134-145、152-160、163-170、202-208、219-229、248-258、266-275、282-288、315-320、328-334、377-

385、392-402、418-424、447-453、460-471、479-487、491-497、500-507、531-537、581-594、615-623、629-635、644-652、659-666、668-678、710-717、719-728、736-741、747-760、766-773、784-789、794-800、805-817、855-861、866-887 および 698-715 (配列番号 255) ; 16-26、29-37、44-58、62-68、74-80、88-95、97-120、125-144、165-196 および 58-72 (配列番号 256) ; 14-21、23-46、49-60、63-74、78-92、96-103、117-129、134-161、169-211、217-231、239-248、252-281、292-299、313-343 および 243-257 (配列番号 257) ; 11-27、46-52、67-72、76-84、91-112、116-153、160-175、187-196、202-211、213-220 および 43-76 (配列番号 258) ; 5-29、37-56、78-86、108-118、152-161 および 120-130 (配列番号 259) ; 8-14、19-41、52-66、75-82、87-92、106-121、127-133、136-143、158-175、180-187、196-204、221-228、239-245、259-265、291-306、318-323、328-340、352-358、361-368、375-381、391-399、411-418、431-442、446-455、484-496、498-510、527-533、541-549、558-565、575-585、587-594、644-655、661-668、671-677 および 184-196 (配列番号 260) ; 4-22、29-38、55-62、75-81、102-107、110-134、143-150、161-167、172-179、191-215、223-233、241-247、251-264、266-272、288-309、340-352、354-366、394-402、414-438 および 198-218 (配列番号 261) ; 24-44、49-70、80-91、105-118、128-136、140-154 および 77-92 (配列番号 262) ; 5-22、31-36、41-47、67-74、83-90、105-122、135-143、160-167 および 118-129 (配列番号 263) ; 4-25、33-73、81-93、96-106、114-120、122-128、130-172、179-208、210-241、251-283、296-301 および 92-100 (配列番号 264) ; 14-24、29-38、43-50、52-72、86-97、101-107、110-125、127-141、145-157、168-175、177-184、186-195、205-226、238-250、255-261、284-290、293-304、307-314、316-323、325-356、363-371、383-390、405-415、423-432、442-454、466-485、502-511、519-527、535-556、558-565、569-574、612-634、641-655、672-686、698-709、715-722、724-732、743-753、760-769、783-792、818-825、830-839、842-849、884-896、905-918、926-940、957-969、979-1007、1015-1021、1049-1057 および 336-349 (配列番号 265) ; 6-16、26-31、33-39、62-73、75-85、87-100、113-123、127-152、157-164、168-181、191-198、208-214、219-226、233-254、259-266、286-329 および 181-195 (配列番号 266) ; 4-13、32-39、53-76、99-108、110-116、124-135、137-146、149-157、162-174、182-190、207-231、242-253、255-264、274-283、291-323、334-345、351-360、375-388、418-425、456-474、486-492、508-517、520-536、547-560、562-577、31-45 および 419-443 (配列番号 267) ; 15-26、30-37、42-49、58-90、93-99、128-134、147-154、174-179、190-197、199-205、221-230、262-274、277-287、300-314、327-333、343-351、359-377、388-396、408-413、416-425、431-446 および 246-256 (配列番号 268) ; 5-26、34-42、47-54、61-67、71-104、107-115、131-138、144-153、157-189、196-202、204-210、228-245、288-309、316-329、332-341、379-386、393-399、404-412、414-421、457-468、483-489、500-506、508-517、523-534、543-557、565-580、587-605、609-617、619-627、631-636、640-646、662-668、675-682、705-710、716-723、727-732、750-758、784-789、795-809、869-874、14-138、166-286、372-503、674-696 および 754-859 (配列番号 269) ; 5-17、32-38、40-47、80-89、113-119、125-137、140-154、157-163、170-177、185-199、213-225、228-236、242-248、277-290、292-305、323-333、347-353、364-370、385-394、399-406、423-433、441-451、462-474、477-487 および 116-124 (配列番号 270) ; 7-16、18-30、32-49、53-61、63-85、95-101、105-115、119-134、143-150、159-178、185-202、212-229、236-250、254-265、268-294 および 63-72 (配列番号 271) ; 4-12、19-47、73-81、97-103、153-169、188-198、207-213、217-223、236-242、255-265、270-278、298-305、309-317、335-347、354-363、373-394、419-424、442-465、486-492、500-507、542-549、551-558、560-572、580-589、607-614、617-623、647-653、666-676、694-704、706-714、748-754、765-772、786-792、795-806 および 358-370 (配列番号 272) ; 18-28、30-38、40-46、49-55、69-78、82-98、104-134、147-153、180-190、196-202、218-236、244-261、266-273、275-286、290-295、301-314、378-387、390-395、427-434 および 290-305 (配列番号 273) ; 4

-13、20-31、39-51、54-61、69-84、87-105、117-124 および 108-125 (配列番号 274) ; 24-34、43-54、56-66、68-79 および 50-69 (配列番号 275) ; 5-43、71-77、102-131、141-148、150-156、159-186、191-207、209-234、255-268、280-286、293-299、317-323、350-357、363-372、391-397、406-418、428-435、455-465、484-497、499-505、525-531、575-582、593-607、621-633、638-649、655-673、684-698、711-725、736-741、743-752、759-769、781-793、813-831、843-853、894-905、908-916、929-946、953-963、970-978、1001-1007、1011-1033、165-178 および 818-974 (配列番号 276) ; 16-44、63-86、98-108、185-191、222-237、261-274、282-294、335-345、349-362、374-384、409-420、424-430、440-447、453-460、465-473、475-504、522-534、538-551、554-560、567-582、598-607、611-619、627-640、643-653、655-661、669-680、684-690、701-707、715-731、744-750、756-763、768-804、829-837、845-853、855-879、884-890、910-928、77-90、144-212、279-355、434-536、782-810 および 875-902 (配列番号 277) ; 4-22、29-41、45-51、53-66、70-77、86-95、98-104、106-124、129-135、142-151、153-161、169-176、228-251、284-299、331-337、339-370、380-387、393-398、406-411、423-433、440-452、461-469、488-498、501-516、523-530、532-559、562-567、570-602、612-628、630-645、649-659、666-672、677-696、714-723、727-747 および 212-227 (配列番号 278) ; 4-9、17-31、35-41、56-61、66-75、81-87、90-124、133-138、149-163、173-192、213-219、221-262、265-275、277-282、292-298、301-307、333-346、353-363、371-378、419-430、435-448、456-469、551-570、583-599、603-612 および 275-291 (配列番号 279) ; 28-34、53-58、72-81、100-128、145-154、159-168、172-189、217-225、227-249、256-263、299-309、322-330、361-379、381-388、392-401、404-417、425-436、440-446、451-464、469-487、502-511、543-551、559-564、595-601、606-612、615-626、633-642、644-650、664-670、674-684、692-701、715-723、726-734、749-756、763-771、781-787、810-843、860-869、882-889、907-917、931-936、941-948、951-958、964-971、976-993、1039-1049、1051-1065、1092-1121、1126-1132、1145-1151、1158-1173、1181-1192、1194-1208、1218-1223、1229-1243、1249-1254、1265-1279、1287-1297、1303-1320、1334-1341、1343-1358、1372-1382、1406-1417、1419-1425、1428-1434、1441-1448、1460-1473、1494-1504、1509-1514、1529-1550、654-669 および 1400-1483 (配列番号 280) ; 10-16、20-25、58-65、97-109、118-132、134-146、148-155、186-195、226-233、244-262、275-284、295-310、317-322、330-339、345-351、366-375、392-403、408-415、423-430、435-444、446-457、467-479、486-499、503-510、525-537、540-585、602-612、614-623、625-634、639-645、650-669、700-707、717-724、727-739、205-230 および 733-754 (配列番号 281) ; 5-22、37-43、72-81、105-113、128-133、148-160、188-194、204-230、238-245、251-257 および 194-213 (配列番号 282) ; 16-21、35-41、56-72、74-92、103-109 および 62-68 (配列番号 283) ; 4-15、17-82、90-104、107-159、163-170、188-221、234-245、252-265 および 220-235 (配列番号 284) ; 16-22、36-46、61-75、92-107、113-121、139-145、148-160 および 30-42 (配列番号 285) ; 4-12、20-26、43-49、55-62、66-78、121-127、135-141、146-161、164-170、178-189、196-205、233-238、269-279、288-318、325-332、381-386、400-407 および 328-346 (配列番号 286) ; 5-12、31-49、57-63、69-79、89-97、99-114、116-127、134-142、147-154、160-173、185-193、199-204、211-222、229-236、243-249、256-274 および 58-68 (配列番号 287) ; 10-20、28-34、39-53、68-79、84-90、99-106 および 73-79 (配列番号 288) ; 14-37、45-50、61-66、77-82、93-98、109-114、125-130、141-146、157-162、173-178、189-194、205-210、221-226、237-242、253-258、269-274、285-290、301-306、316-332、349-359、371-378、385-406、34-307 および 312-385 (配列番号 289) ; 4-10、17-38、50-85、93-99、109-116、128-185、189-197、199-210、223-256、263-287、289-312、327-337、371-386、389-394、406-419、424-432、438-450、458-463、475-502、507-513、519-526、535-542、550-567 および 361-376 (配列番号 290) ; 10-39、42-93、100-144、155-176、178-224、230-244、246-255、273-282、292-301、308-325、332-351、356-361、368-379、386-393、400-421 および 138-155 (配列番号 291) ; 5-11、17-34、40

-45、50-55、72-80、101-123、145-151、164-172、182-187、189-195、208-218、220-241、243-252、255-270、325-331、365-371、391-398、402-418、422-428、430-435、443-452、463-469、476-484、486-494、503-509、529-553、560-565、570-590、608-614、619-627、654-661、744-750、772-780、784-790、806-816、836-853、876-885、912-918、926-933、961-975、980-987、996-1006、1016-1028、1043-1053、1057-1062、994-1003 および 1033-1056 (配列番号 292) ; 17-45、64-71、73-81、99-109、186-192、223-238、262-275、283-295、336-346、350-363、375-385、410-421、425-431、441-448、454-463、468-474、476-512、523-537、539-552、568-583、599-608、612-620、628-641、644-654、656-662、670-681、685-695、702-708、716-723、725-735、757-764、769-798、800-806、808-816、826-840、846-854、856-862、874-881、885-902、907-928、274-350 および 443-513 (配列番号 293) ; 4-22、29-41、45-51、53-61、70-76、85-92、99-104、111-122、134-140、142-154、163-174、224-232、255-265、273-279、283-297、330-335、337-348、356-367、373-385、391-396、421-431、442-455、475-485、493-505、526-538、544-561、587-599、605-620、622-651、662-670、675-681、687-692、697-712、714-735 および 252-262 (配列番号 294) ; 4-12、15-35、40-46、50-59、67-94、110-128、143-169、182-188、207-215、218-228、238-250 および 74-90 (配列番号 295) ; 9-18、42-58、78-85、88-95、97-106、115-122、128-134、140-145、154-181、186-202、204-223、261-267、269-278、284-293、300-336、358-368 および 12-29 (配列番号 296) ; 7-34、46-53、62-72、82-88、100-105、111-117、132-137、144-160、166-180、183-189、209-221、231-236、246-253、268-282、286-293、323-336、364-372、378-392、422-433 および 388-405 (配列番号 297) ; 21-27、34-50、72-77、80-95、164-177、192-198、202-220、226-236、239-247、270-279、285-292、315-320、327-334、348-355、364-371、388-397、453-476、488-497、534-545、556-576、582-588、601-607、609-616、642-662、674-681、687-697、709-715、721-727、741-755 および 621-739 (配列番号 298) ; 4-14、16-77、79-109 および 25-99 (配列番号 299) ; 4-9、17-23、30-37、44-55、65-72、77-93、102-121、123-132、146-153 および 17-29 (配列番号 300) ; 4-18、25-41、52-60、83-92、104-112、117-123、149-155、159-167、170-192、201-210、220-227、245-250 および 124-137 (配列番号 301) ; 8-25、50-55、89-95、138-143、148-153、159-169、173-179、223-238、262-268、288-295、297-308、325-335、403-409、411-417、432-446、463-475、492-501、524-530、542-548、561-574、576-593、604-609、612-622、637-654、665-672、678-685、720-725、731-739、762-767、777-783、820-838、851-865、901-908、913-920、958-970、1000-1006、1009-1015、1020-1026、1043-1052、1055-1061、1-128、252-341、771-793 および 1043-1058 (配列番号 302) ; 16-26、33-46 および 64-76 (配列番号 303) ; 4-27、69-77、79-101、117-123、126-142、155-161、171-186、200-206、213-231、233-244、267-273、313-329、335-344、347-370、374-379、399-408、422-443、445-453、461-468、476-482、518-534、544-553、556-567、578-595、601-620、626-636、646-658、666-681、715-721、762-768、778-785、789-803、809-819、22-108、153-318、391-527 および 638-757 (配列番号 304) ; 6-21、32-43、62-92、104-123、135-141、145-152、199-216、218-226、237-247、260-269、274-283、297-303、1-72 および 127-211 (配列番号 305) ; 6-26、50-56、83-89、108-114、123-131、172-181、194-200、221-238、241-247、251-259、263-271、284-292、304-319、321-335、353-358、384-391、408-417、424-430、442-448、459-466、487-500、514-528、541-556、572-578、595-601、605-613、620-631、635-648、660-670、673-679、686-693、702-708、716-725、730-735、749-755、770-777、805-811、831-837、843-851、854-860、863-869、895-901、904-914、922-929、933-938、947-952、956-963、1000-1005、1008-1014、1021-1030、1097-1103、1120-1130、1132-1140、1-213、269-592 および 992-1120 (配列番号 306) ; 9-16、33-39、47-59、65-79、81-95、103-108、115-123、138-148、163-171、176-185、191-196、205-211、213-221、224-256、261-276、294-302、357-363、384-390、95-111 および 161-189 (配列番号 307) ; 21-27、35-45、70-76、92-105、129-143、145-155、161-166、170-191、204-211、214-231、234-246、249-255、259-275 および 1-18 (配列番号 308)

308) ; 21-35、45-53、56-64、69-97 および 1-16 (配列番号 309) ; 25-33、41-47、6
1-68、86-101、106-114、116-129、134-142、144-156、163-176、181-190、228-251、255
-261、276-292、295-305、334-357、368-380、395-410、424-429、454-460、469-482、51
0-516、518-527、531-546、558-570、579-606、628-636、638-645、651-656、668-674、6
91-698、717-734、742-754、765-770、792-797、827-835、847-859、874-881、903-909、
926-933、942-961、964-977、989-1004、1010-1028、1031-1047、1057-1075、1081-1095
、1108-1117、1138-1144、1182-1189、1193-1206、1220-1229、1239-1246、1257-1267、1
271-1279、1284-1301、1312-1320、1329-1335、1341-1347、1358-1371、1399-1404、1417
-1426、1458-1463、1468-1476、1478-1485、1493-1506、1535-1541、1559-1574、1583-15
90、1595-1601、1603-1611、1622-1628、1634-1644、1671-1685、1689-1696、1715-1720 10
、1734-1746、1766-1775、1801-1806、1838-1844、1858-1871、1910-1917、1948-1955、1
960-1974、2000-2015、2019-2036、2041-2063、748-847 および 1381-1391 (配列番号 3
10) ; 5-12、18-2
4、27-53、56-63、96-113、119-124、131-136、157-163、203-209、215-223、233-246、2
64-273、311-316、380-389、393-399、425-433、445-450、457-462、464-470、475-482、
507-513、527-535、542-548、550-565、591-602、607-613、627-642、644-664、673-712
、714-732、739-764、769-782、812-818、826-838、848-854、860-871、892-906、930-93
8、940-954、957-973、990-998、1002-1021、1024-1033、1037-1042、1050-1060、1077-1
083、1085-1092、1100-1129、1144-1161、1169-1175、1178-1189、1192-1198、1201-1207
、1211-1221、1229-1239、1250-1270、1278-1292、1294-1300、1314-1335、1344-1352、1 20
360-1374、1394-1405、1407-1414、1416-1424、1432-1452、1456-1462、1474-1497、1500
-1510、1516-1522、1534-1542、1550-1559、1584-1603、1608-1627、187-273 および 306
-441 (配列番号 311) ; 70-80、90-97、118-125、128-140、142-148、154-162、189-202
、214-222、224-232、254-260、275-313、317-332、355-360、392-398、425-432、448-45
6、464-470、476-482、491-505、521-528、533-546、560-567、592-597、605-614、618-6
26、637-644、646-653、660-666、677-691 および 207-227 (配列番号 312) ; 5-19、26
-34、37-55、57-66、69-83、86-102、115-134、138-143、154-172、178-195、209-246、2
51-257、290-302、306-311 および 256-266 (配列番号 313) ; 10-20、22-28、35-57、7
2-79、87-103、108-128、130-144、158-171、190-198、225-242、274-291、301-315、317
-324、374-385 および 353-365 (配列番号 314) ; 4-9、17-30、34-54、59-66、73-94、 30
118-130、135-150、158-171、189-198、219-239、269-275、283-301、89-106 および 176
-193 (配列番号 315) ; 14-20、22-74、77-86、89-99、104-109、126-135、154-165、18
1-195、197-212、216-224、264-275 および 107-118 (配列番号 316) ; 4-18、21-38、6
3-72、101-109、156-162、165-179、183-192、195-210、212-218、230-239、241-256、27
8-290、299-311、313-322、332-341、348-366、386-401、420-426、435-450、455-460、4
68-479、491-498、510-518、532-538、545-552、557-563、567-573、586-595、599-609、
620-626、628-636、652-657、665-681 および 1-198 (配列番号 317) ; 4-10、16-38、5
1-68、73-79、94-115、120-125、132-178、201-208、216-223、238-266、269-295、297-3
04、337-342、347-356、374-401、403-422、440-447、478-504、510-516、519-530、537-
544 および 191-206 (配列番号 318) ; 12-40、42-48、66-71、77-86、95-102、113-120 40
、129-137、141-148、155-174、208-214、218-225、234-240、256-267、275-283、300-30
6、313-321、343-350、359-367、370-383、398-405、432-439、443-461、492-508、516-5
26、528-535 および 370-478 (配列番号 319) ; 6-14、20-37、56-62、90-95、97-113、
118-125、140-145、161-170、183-202、237-244、275-284、286-305、309-316、333-359
、373-401、405-412 および 176-187 (配列番号 320) ; 33-44、50-55、59-80、86-101
、129-139、147-153、157-163、171-176、189-201、203-224、239-245、257-262、281-28
7、290-297、304-320、322-331、334-350、372-390、396-401、71-88 および 353-372 (配
列番号 321) ; 5-11、15-24、26-33、40-47、75-88、95-103、105-112 および 17-30
(配列番号 322) ; 5-11、16-39、46-54、62-82、100-107、111-124、126-150、154-165
、167-183、204-238、245-295、301-313、316-335 および 8-16 (配列番号 323) ; 4-19 50

、34-48、69-74、79-107、115-127、129-135、143-153、160-169、171-182 および 142-153 (配列番号 324) ; 4-30、65-74、82-106、110-120、124-132、135-140、146-175、179-184、190-196、217-223、228-233、250-267、275-292、303-315、322-332 および 174-186 (配列番号 325) ; 9-16、29-41、47-57、68-84、87-109、113-119、162-180、186-193、195-201、203-208、218-230、234-243、265-271、281-292、305-312、323-332、341-347、349-363、368-374、383-390、396-410、434-440、446-452、455-464、466-473、515-522、529-542、565-570、589-600、602-613、618-623、637-644、1019-1027、1238-1244、1258-1264、1268-1276、1281-1292、1296-1302 および 883-936 (配列番号 326) ; 10-17、23-32、39-44、54-72、75-81、88-111、138-154、160-167、178-185、201-210、236-252、327-334、336-342、366-376、388-400、410-430、472-482、493-526、552-558、586-592、598-603、612-621、630-635、641-660 および 384-393 (配列番号 327) ; 4-22、24-39、50-59、73-84、100-105、111-117、130-138、155-161、173-178、182-189、205-215、266-284、308-313、321-328、330-337、346-363、368-374、388-395、397-405、426-434、453-459、482-492、501-507、509-515、518-523、527-544、559-590、598-612、614-629、646-659、663-684、686-694、698-721 および 445-461 (配列番号 328) ; 14-22、27-33 および 3-17 (配列番号 329) ; 29-41、66-73、81-87、90-108、140-146、150-159、165-184、186-196、216-226、230-238、247-253、261-269 および 126-140 (配列番号 330) ; 5-12、16-25、27-33、36-45、60-68、83-88、103-126 および 86-101 (配列番号 331) ; 14-23、36-47、56-66、84-89、94-105、111-127、140-153、160-174、176-183、189-203、219-225、231-237、250-257 および 194-227 (配列番号 332) ; 4-25、54-60、64-71、73-82、89-106、117-124、157-169、183-188、199-210、221-232、236-244、255-264 および 58-98 (配列番号 333) ; 13-19、26-36、41-53、55-71、77-84、86-108、114-135、157-172、177-183、187-194、208-213、218-226、110-125 および 156-170 (配列番号 334) ; 5-24、63-69、77-85、94-112、120-137、140-146、152-159、166-172、179-187、193-199、206-212、222-228、234-240、244-252、257-264、270-289、298-309、316-328、337-348、363-375、1-56 および 340-352 (配列番号 335) ; 18-39、42-71、78-120、124-144、152-173、179-189、199-209、213-222、228-258、269-304、329-361、364-372、374-389、396-441 および 313-327 (配列番号 336) ; 19-25、91-98、108-120、156-162、168-174、191-204、211-216、232-266、272-278、286-308、316-321、327-333、344-355、358-364、384-391、395-428、464-476、487-495、497-511、544-561、563-573、575-582、588-594、10-25 および 322-338 (配列番号 337) ; 14-26、32-49、51-57、59-72、80-91、102-112、119-125、147-161、164-173、175-183、188-213、217-222、246-254、260-276、282-303、308-318、321-328、333-350、352-359、371-378、392-401、407-414、416-443、448-463、471-484、490-497、501-514、519-527、539-551、557-570、578-590、592-598、600-610、618-629、633-647、654-667、676-689、702-709、718-726、728-737、741-760、764-780、786-795、808-826、836-842、845-852、865-874、881-887、931-945、949-957、968-974、979-986、1003-1009、1023-1029 および 90-103 (配列番号 338) ; 11-16、37-56、60-66、69-77、80-88、93-106、117-139、166-171 および 72-90 (配列番号 339) ; 59-84、123-133、145-150、161-167、178-189 および 115-128 (配列番号 340) ; 15-33、39-46、52-64、74-87、108-124、127-144、150-156、173-179、184-194、201-208、219-236、243-269、272-295、302-309、343-349、356-361、370-379、405-411、414-423、430-451、457-464、466-475、477-483、496-502、507-522、541-548、557-563、571-577、579-585、590-605、626-642、650-662、671-691、704-710、751-769、775-781、786-791、794-829、851-858、868-878、884-904、913-919、931-939 および 132-142 (配列番号 341) ; 33-58、64-71、74-80、83-88、96-120、122-139、146-157、167-177、207-213、220-225、236-242、264-279、300-305、326-336、340-347、350-360、97-115 および 199-211 (配列番号 342) ; 4-26、43-57、70-99、102-117、121-133、142-148、151-168、170-183、192-220、235-249、258-279 および 30-41 (配列番号 343) ; 34-42、48-58、70-94、110-130、154-160、164-172、178-183、195-203、211-222、229-250、256-261、274-284、286-292、312-323 および 222-233 (配列番号 344)

; 4-9、15-36、38-45、49-74、78-88、100-112、136-191、211-220、226-233、239-246、
254-274、287-307、316-322、342-353、356-366、373-378、384-393、405-431、449-457
、459-468、487-511、515-524、529-541、544-552、562-568、571-576 および 208-280
(配列番号 345) ; 10-27、31-37、39-54、71-108、124-143 および 2-107 (配列番号 3
46) ; 16-27、38-57、64-70、90-102、104-113、116-137、160-166 および 1-80 (配列
番号 347) ; 13-21、31-36、56-67、127-136、153-171、173-180、184-200、214-222、22
5-231、239-263、267-273 および 135-159 (配列番号 348) ; 12-27、31-51、68-74、77
-87、94-101、108-114、117-123、127-134、138-168、173-196、201-207、212-217、227-
237、247-257、264-280 および 205-223 (配列番号 349) ; 17-22、25-54、70-76、92-1
00 および 98-110 (配列番号 350) ; 7-29、40-50、60-67、87-96、105-111、119-164、 10
172-199、206-212、220-227、237-259、272-279、282-293、295-309、313-319、321-328
、345-363、376-386 および 159-176 (配列番号 351) ; 4-19、24-30、36-43、50-68、7
1-89、93-106、141-152、154-172、179-197、199-215、229-239、246-252、255-263、281
-298、319-325、329-356、358-368、374-390、397-409、420-429、432-444、450-456、45
9-475、483-494、496-502、520-528、532-556 および 362-377 (配列番号 352) ; 18-25
、40-62、77-85、91-97、105-116、123-133、139-184、189-197 および 122-140 (配列
番号 353) ; 4-49、52-58、62-70、79-105、109-133、142-150、163-168、206-214、220-
228、233-240、243-254、274-281、303-311、327-338、357-373、378-396、403-413、420
-436、441-453、461-467、475-481、484-498、506-512、514-521、523-529、562-579、58
9-595、598-603、615-648、714-722、728-742、749-758、777-792、795-807 および 643- 20
658 (配列番号 354) ; 8-27、37-48、51-56、72-79、87-106、120-138、140-147、167-1
76、187-197、205-216、222-229、234-239、243-249、277-288、292-315、334-343、347-
353、363-391、398-404、430-447、461-467、478-492、498-507 および 456-470 (配列
番号 355) ; 5-12、18-24、59-69、80-93、95-109、119-125、130-137、139-147、158-16
3、168-176、182-202、206-215、222-239、241-249、267-277、291-298、311-318、321-3
27、338-344、348-355、373-386、393-406、411-417、434-443、446-465、473-484、514-
521、532-553、584-594 および 221-237 (配列番号 356) ; 4-14、27-34、50-58、63-72
、79-106、109-114、121-142、146-154、161-167、169-175、178-201、223-238、249-254
、259-264、278-292、294-312、319-330 および 167-191 (配列番号 357) ; 7-28、36-4
2、50-61、63-80、122-152、161-174、176-191 および 140-190 (配列番号 358) ; 20-5 30
7、59-65、70-78、86-102、119-133、142-161、163-173、177-188、192-202、204-220、2
22-236、240-253、279-319、326-331、337-383、390-399、406-412、420-427、431-438
および 381-395 (配列番号 359) ; 13-18、28-34、37-43、50-59、75-81、83-97、105-1
21、139-147、200-206、209-227、231-247、260-271、318-327、366-381、388-394、399-
406 および 182-201 (配列番号 360) ; 6-29、37-43、51-56、70-77、82-102、110-119
、127-143、178-190、201-209、216-243、261-269、281-292、305-313、327-339、341-35
4、356-373、391-397、423-429、438-445、450-478 および 21-314 (配列番号 361) ; 4
-12、15-21、32-41、59-76、80-89、96-104 および 90-103 (配列番号 362) ; 9-28、30
-41、44-54、69-74、77-82、90-97、104-123、125-135、149-155、164-173、177-184、21
7-226、230-235、238-244、258-272、282-297、300-305、309-315、317-322、327-336、3 40
48-362、368-374、380-387、400-411、414-424、451-458、460-466、483-494、497-503、
506-511、521-528
、540-553、569-587、598-606、628-642、661-681、688-700、718-733、740-749、752-76
4、769-783、823-834、848-854、862-872、878-884、886-898、915-920、938-951、954-9
61、963-972、982-989、996-1003、1010-1016、1021-1032、1038-1044、1047-1057、1060
-1070、1079-1088、1094-1102、1117-1127、1129-1135、1142-1153、1158-1204、1212-12
29、1234-1263、1269-1277、1308-1313、1327-1338、1344-1376、1400-1415、1436-1443
、1448-1458、1497-1504、1511-1522、1544-1566、3-82 および 509-576 (配列番号 363
) ; 8-36、40-64、71-79、88-94、102-109、118-127、138-148、151-159、163-174、192-
198、200-206、220-233、268-273、290-301、304-309、316-323、331-349、378-391、414 50

-420、427-437、455-475、494-510、541-547、549-555、616-640、1-60、55-139、212-308、386-458 および 458-624 (配列番号 364); 16-31、35-42、70-77、91-101、120-130、132-140、143-153、185-190、195-202、215-222、228-238、241-251、257-264、268-277、288-302、312-324、326-333、341-348、364-382、415-429、438-454、458-466、491-499、501-521 および 273-281 (配列番号 365); 8-14、32-57、74-149、155-177、179-212、221-266、271-296、304-324、329-346、349-359、368-401、413-419、426-454、465-478、493-510 および 466-490 (配列番号 366); 22-28、33-51、64-89、96-119、126-132、138-146、152-159、161-169、172-179、193-198、205-211、221-231、235-254、273-280、297-303、312-320、328-346、351-373、378-384、391-398、448-454、460-468、470-481、516-558、574-593、597-602、613-623、626-646、649-656、668-673、675-683、696-708、715-722、724-739、745-751、759-777、780-804、816-822 および 102-113 (配列番号 367); 12-28、41-91、98-107、112-120、125-131、151-193、215-221、240-250、263-280 および 128-138 (配列番号 368); 16-24、32-38、46-62、68-81、90-105、127-133、144-150、160-166、178-184、186-202、210-219、232-240、252-258、264-273、293-324、337-344、349-357、360-369、385-398、410-416、419-427、441-449、458-476、508-515、523-539、544-549、562-569、571-579、96-109 および 127-139 (配列番号 369); 19-25、28-34、56-61、85-97、110-116 および 39-53 (配列番号 370); 4-37、41-50、62-72、91-97、99-109、114-125、136-141、149-158、160-166、201-215 および 27-225 (配列番号 371); 15-31、44-51、96-105、122-130、149-157、162-168、178-183、185-192、198-204、206-213、221-234、239-245、248-255、257-266、289-335、349-357、415-422、425-441、448-454、462-468 および 463-481 (配列番号 372); 5-31、39-55、63-72、76-99、106-155、160-177、179-199、207-217、223-240、245-255、261-267、294-316、321-343、354-378、382-452、477-488、529-536、555-569、584-591、593-612、620-627、632-640、647-654、671-680、698-704、723-730、732-750、769-775、781-788、822-852 および 505-525 (配列番号 373); 3-18 (配列番号 374); 4-14 および 12-24 (配列番号 375); 4-11、22-30 および 12-25 (配列番号 376); 5-12 および 4-18 (配列番号 377); 4-28 および 7-14 (配列番号 378); 6-16 および 8-16 (配列番号 379); 4-15、18-33 および 24-36 (配列番号 380); 4-10、16-21 および 20-31 (配列番号 381); 6-19 (配列番号 382); 11-18 および 3-10 (配列番号 383); 13-24 および 3-15 (配列番号 384); 15-27 および 7-16 (配列番号 385); 11-16 および 1-15 (配列番号 386); 4-16 および 9-21 (配列番号 387); 4-24、40-48、54-67 および 22-39 (配列番号 388); 6-30、34-55、62-68、78-106 および 68-74 (配列番号 389); 3-14 (配列番号 390); 9-19 および 6-21 (配列番号 391); 4-17 および 1-9 (配列番号 392); 5-30 および 1-8 (配列番号 393); 4-16、23-46、51-56 および 45-55 (配列番号 394); 7-16 (配列番号 395); 2-14 (配列番号 396); 4-36、43-65 および 50-62 (配列番号 397); 10-30 および 14-21 (配列番号 398); 9-17 および 1-10 (配列番号 399); 4-12 および 3-16 (配列番号 400); 4-15 および 5-23 (配列番号 401); 10-21 (配列番号 402); 6-16 (配列番号 403); 4-29、31-38 および 2-14 (配列番号 404); 4-35 および 33-42 (配列番号 405); 2-17 (配列番号 406); 9-18、30-35 および 15-33 (配列番号 407); 4-9 および 6-12 (配列番号 408); 3-17 (配列番号 409); 12-21、37-44、52-61、72-80 および 38-48 (配列番号 410); 4-10、29-44、54-61、69-78 および 13-27 (配列番号 411); 13-23、36-53 および 2-15 (配列番号 412); 4-25、28-46、56-72、81-99、120-132、134-142、154-160 および 129-141 (配列番号 413); 4-15、24-33、35-41、64-86 および 21-33 (配列番号 414); 9-15 および 4-13 (配列番号 415); 4-11、13-19、34-48 および 15-32 (配列番号 416); 4-21 および 11-31 (配列番号 417); 23-57 および 38-50 (配列番号 418); 4-32 および 3-13 (配列番号 419); 4-10、13-25、32-42、56-68、72-84 および 26-38 (配列番号 420); 4-20、31-48、52-58、65-71、80-93、99-108、114-123 および 37-49 (配列番号 421); 6-12、14-20 および 3-25 (配列番号 422); 14-25、27-38 および 5-14 (配列番号 423); 4-41、57-105、109-118、123-136、144-152 およ

び 86-99 (配列番号 424); 6-19 (配列番号 425); 2-19 (配列番号 426); 14-47
および 1-14 (配列番号 427); 4-21、29-44 および 2-18 (配列番号 428); 23-29 お
よび 10-28 (配列番号 429); 6-16、22-36 および 11-22 (配列番号 430); 4-19、30
-44 および 18-27 (配列番号 431); 5-15、37-45、58-65 および 38-47 (配列番号 43
2); 4-15、23-34 および 4-15 (配列番号 433); 30-36、44-54、79-85、101-114、138
-152、154-164、170-175、179-200、213-220、223-240、243-255、258-264、268-284 お
よび 10-28 (配列番号 434); 表1Bの「同一領域」の列のアミノ酸配列を含むペプチド、
特に以下のアミノ酸を含むペプチド: 210-226 および 738-753 (配列番号 449); 326-3
44、326-348、338-354、371-392、801-809 および 877-901 (配列番号 450); 893-906
(配列番号 451); 51-69 (配列番号 452); 110-125 (配列番号 453); 291-305 (配
列番号 454); 210-226 および 738-753 (配列番号 455); 326-344、326-348、338-354
、371-392、801-809 および 877-901 (配列番号 456); 893-906 (配列番号 457); 51
-69 (配列番号 458); 110-125 (配列番号 459); 291-305 (配列番号 460); 32-44
(配列番号 461); 399-410 (配列番号 462); 表2の「aa from」から「aa to」の列に特
定した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: 120-143、138-161
および 156-179 (配列番号 218); 110-129 および 168-184 (配列番号 219); 74-90
(配列番号 222); 759-773 (配列番号 223); 237-260 (配列番号 224); 265-284 (配
列番号 225); 65-74 (配列番号 226); 41-50 (配列番号 227); 163-174 (配列番
号 229); 26-37 (配列番号 230); 174-189 (配列番号 232); 240-256 (配列番号 2
34); 285-297 (配列番号 236); 238-247 (配列番号 238); 491-519 (配列番号 239
) ; 114-140 (配列番号 243); 267-284 (配列番号 250); 439-453 (配列番号 252)
; 162-178 (配列番号 253); 347-364 (配列番号 254); 699-715 (配列番号 255);
60-71 (配列番号 256); 244-257 (配列番号 257); 44-63 および 57-76 (配列番号
258); 185-196 (配列番号 260); 119-129 (配列番号 263); 182-195 (配列番号 26
6); 32-44 および 424-442 (配列番号 267); 247-256 (配列番号 268); 678-694、7
85-805、55-77 および 72-94 (配列番号 269); 210-226 (配列番号 281); 37-59 (配
列番号 289); 13-29 (配列番号 296); 136-159 (配列番号 348); 205-222 (配列
番号 349); 99-110 (配列番号 350); 160-176 (配列番号 351); 457-470 (配列番
号 355); 221-237 (配列番号 356); 167-190 (配列番号 357); 96-120 (配列番号
361); 399-417、503-519 および 544-563 (配列番号 364); 46-68、159-183 および 1
84-198 (配列番号 371); 463-481 (配列番号 372); 表4の「aa from」から「aa to」
の列に特定した免疫原性エピトープ; 特に以下のアミノ酸を含むペプチド: 110-129 およ
び 168-184 (配列番号 219); 877-901、333-354、326-344 および 801-809 (配列番号
277); 1-54 (配列番号 347); 544-563、31-51、107-119、399-417 および 503-519
(配列番号 364); 120-198 (配列番号 218); 20-35 (配列番号 219); 118-201 (配
列番号 221); 48-132 (配列番号 242); 118-136 (配列番号 249); 162-178 (配列
番号 253); 347-364 (配列番号 254); 699-715 (配列番号 255); 50-76 (配列番号
258); 785-819 および 44-128 (配列番号 269); 90-128 (配列番号 274); 314-384
(配列番号 289); 327-349 (配列番号 293); 242-314、405-478 および 23-100 (配
列番号 304); 129-210 (配列番号 305); 162-188 (配列番号 307); 750-772 (配列
番号 310); 1-56 (配列番号 335); 322-337 (配列番号 337); 72-90 (配列番号 33
9); 374-395 (配列番号 345); 136-159 (配列番号 348); 141-164 (配列番号 358
) ; 96-157 (配列番号 361); 1-82 (配列番号 363); 489-556 (配列番号 364); 15
9-183 および 49-133 (配列番号 371); 表5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 (aa)」の列のアミノ酸配列を含むペプチド、特に以下のアミ
ノ酸を含むペプチド: 4-26、35-41、53-61、73-84、103-108、114-120、140-146、156-16
2、192-208、214-219、227-233、239-252、260-268、284-297、1-48 および 113-133 (配
列番号 475); 4-27、38-44、50-56、59-64、72-79、83-89、92-97、108-116、123-148
、152-167、183-196、200-220、232-244、255-261、265-274、282-302、309-317、1-79
および 231-302 (配列番号 476); 6-28、66-72、85-105、115-121、144-151、160-170

、176-185、223-230、252-288、296-310、319-333、367-374、458-464、471-480、483-488、520-528、530-549、559-564、593-601、606-616、636-643、655-662、676-682、684-699、719-726、735-750、757-764、777-785、799-810、812-843、846-853、868-873、880-889、891-899、909-929、934-940、963-969、998-1004、1007-1014、1016-1022、1030-1046、1-80 および 808-821 (配列番号 477) ; 7-24、35-41、75-81、91-114、122-132、137-144、148-156、183-192、194-200、212-228、233-238、251-258、275-295、326-332、337-346、1-79 および 305-321 (配列番号 478) ; 31-38、42-52、66-72、86-92、98-104、115-122、127-146、154-164、169-187、198-212、225-237、255-269、13-92 および 135-142 (配列番号 479) ; 4-36、39-49、63-69、71-77、81-88、123-131、133-139、160-169、174-180、188-194、210-217、273-278、289-300、317-334、336-341、383-401、425-438、1-68、212-270 および 402-446 (配列番号 480) ; 21-29、31-42、49-63、72-79、81-93、112-132、159-165、188-195、197-232、262-267、279-286、294-301、318-326、348-366、381-405、409-426、436-465、471-480、484-492、497-505、521-544、554-561、567-577、581-589、601-609、611-622、636-651、653-667、669-685、700-708、716-722、729-744、749-766、780-786、789-811、814-864、1-57 および 84-106 (配列番号 481) ; 6-24、35-48、57-63、72-78、87-92、113-119、123-137、147-153、173-181、212-233 および 1-124 (配列番号 482) ; 13-34、62-69、78-83、86-91、98-104、107-115、146-159、179-188、195-205、209-221、226-233、239-253、276-282、284-294、297-308、331-354、375-382、388-399、421-433、449-458、464-469、472-491、508-513、525-531、534-550、575-593、601-618、629-635、654-661、666-680、706-721、723-740、771-805、810-830、845-851 および 1-84 (配列番号 483) ; 4-32、45-64、73-83、86-92、100-111、125-147、157-163、170-175、177-188、226-232、245-252、258-274、320-335、348-359 および 1-71 (配列番号 484) ; 13-40、43-71、76-83、87-101、109-119、125-156、162-175、182-219、226-232、240-262、270-287、306-318、326-342、344-408、414-444、449-456 および 1-51 (配列番号 485) ; 4-16、18-34、45-54、99-108、134-140、203-212、241-257、266-274、279-291、308-315、330-336、355-370、374-382、402-410、428-455、466-472、474-480、531-554、560-566、572-580、597-618、632-660、664-674、676-685、691-705、708-735、750-768、1-87 および 342-480 (配列番号 486) ; 表6の「aa from」から「aa to」の列に特定した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 : 115-132 および 1-26 (配列番号 475) ; 33-55 (配列番号 476) ; 1-25 (配列番号 478) ; 37-61 (配列番号 479) ; 1-24 (配列番号 480) ; 1-23 (配列番号 481) ; 46-60 (配列番号 482) ; 1-28、23-50 および 45-71 (配列番号 483) ; 1-22 および 17-38 (配列番号 484) ; 1-22 および 17-38 (配列番号 485) ; 1-27、22-47 および 422-447 (配列番号 486) ; 表7の「aa from」から「aa to」の列に特定した免疫原性エピトープ、特に以下のアミノ酸を含むペプチド : 115-132 および 1-47 (配列番号 475) ; 1-55 (配列番号 476) ; 22-85 (配列番号 477) ; 307-320 および 1-44 (配列番号 478) ; 15-76 および 40-92 (配列番号 479) ; 1-59、213-269 および 403-445 (配列番号 480) ; 1-56 および 85-105 (配列番号 481) ; 37-121 (配列番号 482) ; 1-71 (配列番号 483) ; 1-38 (配列番号 484) ; 1-38 (配列番号 485) ; 1-47 (配列番号 486)、を提供する。

【0046】

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ストレプトコッカス・アガラクティエ過免疫血清反応性抗原またはその断片の産生方法も提供する。

【0047】

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、本発明によるストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0048】

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

10

20

30

40

50

たは本発明の核酸分子を含むワクチンが提供される。

【0049】

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KLKL5KLK、向神経活性化化合物、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。

【0050】

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

10

【0051】

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。

【0052】

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、特にストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0053】

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

20

【0054】

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。

【0055】

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。

【0056】

さらに好ましい態様において、抗体はキメラ抗体である。

【0057】

より好ましい態様において、抗体はヒト化抗体である。

【0058】

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。

30

【0059】

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

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

【0060】

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：

40

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

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

【0061】

50

上記方法によって提供または生産された抗体はストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【 0 0 6 2 】

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。

【 0 0 6 3 】

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

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

10

【 0 0 6 4 】

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。

20

【 0 0 6 5 】

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。

30

【 0 0 6 6 】

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。

【 0 0 6 7 】

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、特にストレプトコッカス・アガラクティエ感染症をインビトロで診断する方法も提供する。

40

【 0 0 6 8 】

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。

【 0 0 6 9 】

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。

【 0 0 7 0 】

50

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。

【0071】

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ストレプトコッカス・アガラクティエのゲノム由来の表面発現ライブラリーを用いてストレプトコッカス・アガラクティエ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、本発明はストレプトコッカス・アガラクティエ抗原、ワクチン、診断および抗体の調製およびストレプトコッカス・アガラクティエ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。

10

【0072】

有効なワクチンは、すべての株によって発現され、ストレプトコッカス・アガラクティエの細胞表面成分に対する高親和性の豊富な抗体を誘導することが出来るタンパク質またはポリペプチドから構成されるべきである。抗体はオプソニン作用のためにはIgG1 および/または IgG3であるべきであり、付着および毒素作用の中和のためにはいずれかのIgG サブタイプおよびIgAであるべきである。化学的に規定されたワクチンは、全細胞ワクチン(弱毒化または死滅化)と比較して明確に優れていなければならない。というのはヒト組織と交差反応するかオプソニン作用を阻害するストレプトコッカス・アガラクティエの成分が排除でき、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。

20

【0073】

本発明に用いられたアプローチは、GBS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ストレプトコッカス・アガラクティエに対して産生され、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処理される。したがって本発明は、医薬組成物、特にストレプトコッカス・アガラクティエによる感染症の予防用ワクチンとしての有効かつ関連する網羅的セットのGBS 抗原を供給する。

30

【0074】

本発明による網羅的セットの抗原を同定するための抗原同定プログラムにおいて、少なくとも2種類の細菌表面発現ライブラリーを、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。抗体プールはストレプトコッカス・アガラクティエの抗原性化合物、例えば全細胞抽出物および培養上清タンパク質に対して試験された血清収集物由来である。好ましくは、以下から得られる3種類の血清収集物を用いる：1. 子宮頸部および肛門直腸のGBS保因について陰性であると試験された健康妊婦、2. その子供がGBS-無含有(抗生物質予防によるが)であり、子宮頸部 および/または 肛門直腸のGBS保因について陽性であると試験された健康妊婦、3. 臨床疾患のない45歳未満の成人。血清は過免疫であるとみなされ、本発明のスクリーニング方法に適切であるためには、複数のGBS-特異的抗原と反応しなくてはならない。

40

【0075】

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、例えばストレプトコッカス・アガラクティエのすべての分泌および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2つの選択された外膜タンパク質(LamBおよびFhuA)上にストレプトコッカス・アガラクティエの(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

50

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產生できることである。

【0076】

本発明による上記のプログラムによって同定された包括的なセットの抗原をさらに1以上のさらなるラウンドのスクリーニングによって分析する。それゆえ、免疫原性であると同定された選択されたペプチドに対して作られた個体の抗体調製物または抗体が用いられる。好ましい態様によると第二ラウンドのスクリーニングのための個体の抗体調製物は、一定の最低レベルを超える抗体力価を示す妊婦および非妊娠成人、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ものに由来する。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、ストレプトコッカス・アガラクティエ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

【0077】

網羅的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(最小~150健康および患者血清)を用いてその免疫原性を評価する。

【0078】

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

20

30

【0079】

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。

【0080】

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、ストレプトコッカス・アガラクティエ(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300Uを超え、特に500Uを超え、および/またはIgG力価5,000Uを超え、特に10,000Uを超える(U=ユニット、一定の希釈度でのOD_{405nm}の読みから計算)ものが選択される。

40

【0081】

ヒト免疫系によって連鎖球菌に対して產生され、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。血清抗体により認識される直線状エピトープの認識は4-5アミノ酸程度の短い配列に基づきうる。もちろん、かかる短いペプチドが所与の抗体をインビボで誘導できるということを必ずしも意味しない。そのため、

50

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。

【0082】

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多くの目的に役立つと考えられる: 付着の阻害、栄養獲得の阻害、免疫回避の阻害そして食作用の促進である{Hornef, M. et al., 2002}。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、連鎖球菌種間または種内の成長を促進するクロストークを妨害する。生物情報分析(シグナル配列、細胞壁局在化シグナル、膜貫通ドメイン)は、細胞表面局在または分泌の評価に非常に有用であることが判明している。実験アプローチは、対応するエピトープ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ストレプトコッカス・アガラクティエの細胞表面染色(FACS、または顕微鏡観察)、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。

10

【0083】

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。

20

【0084】

ストレプトコッカス・アガラクティエに対する宿主防御は主にオプソニン食作用(opsonophagocytic)殺傷機構に依存する。オプソニンおよび中和タイプの高親和性抗体をワクチン接種により誘導することにより、自然免疫系が細菌および毒素を排除することが助けられる。これによって本発明による方法はGBS抗原性タンパク質の同定の最適手段となる。

【0085】

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

30

40

【0086】

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、ストレプトコッカス・アガラクティエの網羅的セットの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

50

表の配列番号1-217、435-448および463-474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218-434、449-462および475-486に示される)に関する。

【0087】

本発明の好ましい態様において、配列番号 14、90、157-216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 14、90、157-216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 14、90、157-216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。

【0088】

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。

【0089】

本発明の別の態様によると、配列番号 1、3、5-13、15、18-25、27-31、33-36、39-68、70-85、92-100、103-126、128-145、147、149-156、217、435-448 および463-474に示す核酸配列に対して96% または96%を超える、特に100%の配列同一性を示す核酸分子が提供される。

【0090】

本発明のさらなる態様によると、配列番号 32、86、91、101、127に示す核酸配列と同一な核酸分子に対して98%または98%を超える、特に100%の配列同一性を示す核酸分子が提供される。

【0091】

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 Protocol

s 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 °Cで行うハイブリダイゼーション

0.2xSSC、0.1% SDS中、42 °C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 °Cでの高いストリンジェンシーの洗浄。

【0092】

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

【0093】

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。

【0094】

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

【0095】

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

【0096】

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、公表されたストレプトコッカス・アガラクティエ株 NEM316 (ATCC 12403) ゲノム ({Glaser, P. et al., 2002}; GenBank accession AL732656) および/またはその他の公表されたストレプトコッカス・アガラクティエゲノム配列 またはその部分、特に血清型 V 2603 V/R (A909) 株 {Tettelin, H. et al., 2002}); GenBank accession AE009948)の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ストレプトコッカス・アガラクティエ対応物と比較して少なくとも 1、好ましくは 少なくとも 2、好ましくは少なくとも3の異なるアミノ酸残基を有するポリペプチドをコードする。また本明細書で言及する、例えば配列表に挙げるタンパク質の断片である(または全タンパク質)かかる単離ポリペプチドであって少なくとも 6、7、または8 アミノ酸残基を有し、かかる核酸によってコードされるものも好ましい。

【0097】

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。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 8 】

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、ストレプトコッカス・アガラクティエ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なわれる。

10

【 0 0 9 9 】

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

20

30

【 0 1 0 0 】

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、それらにはストレプトコッカス・アガラクティエ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する必要があり、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ストレプトコッカス・アガラクティエ断片を比較することによって簡単に決定される。

40

【 0 1 0 1 】

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

【 0 1 0 2 】

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、これはストレプトコッカス・アガラクティエ調節配列または異種調節配列、異種リーダー配列、異種マーカー配列または融合タンパク質

50

を作る異種コード配列であってよい。

【0103】

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。

【0104】

本発明はさらに、配列表に示す推定ストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0105】

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。配列表に示すストレプトコッカス・アガラクティエ配列を有する、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ストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0106】

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

【0107】

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ストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0108】

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。

【0109】

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ャンニング(positional scanning)である。かかるアプローチは、例えば{Hemmer, B. et al., 1999}およ

10

20

30

40

50

びそのなかの引用文献に詳細に記載されている。

【0110】

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。

【0111】

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。

【0112】

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、f1t3-リガンドその他とともに製剤することである。

【0113】

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。

【0114】

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

【0115】

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

【0116】

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ストレプトコッカス・アガラクティエ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の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。

【0117】

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、より好ましくはストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0118】

ストレプトコッカス・アガラクティエ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。ストレプトコッカス・アガラクティエ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

10

20

30

40

50

。

【0119】

本発明はストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0120】

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

【0121】

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ストレプトコッカス・アガラクティエから単離してもよい。

【0122】

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 231、307、374-433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 218、220、222-230、232、235-242、244-248、250-253、256-285、287-302、309-317、320-343、345-362、364、366-373、434、449-462および475-486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 249、303、308、318、344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。

【0123】

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。

【0124】

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。

【0125】

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。

【0126】

本発明はまた、様々なストレプトコッカス・アガラクティエ分離株の抗原に関する。かかるホモログは本明細書に開示の核酸およびアミノ酸配列に基づいて容易に単離することができる。現在識別可能な9つの血清型があり、血清型の決定は血清型特異的抗血清に基づく。したがっていずれかの抗原の存在をそれぞれの血清型について判定すればよい。さらに化膿性連鎖球菌 sic 遺伝子について記載されているように様々な血清型における特定の抗原の可変性を判定することも可能である{Hoe, N. et al., 2001}。様々な血清型の異なるGBS感染症に対する寄与は、異なる年齢群および地理的領域においては変動する。もっとも価値のある保護抗原は様々な臨床株間で保存されていると予測されるということが重要な側面である。

【0127】

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

【0128】

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。

【0129】

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。

【0130】

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。

【0131】

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

【0132】

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

10

20

【0133】

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。

30

【0134】

過免疫血清反応性抗原のかかる断片の好ましい例は、以下からなる群から選択される：表1A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特に以下のアミノ酸を含むペプチド： 4-20、35-44、65-70、73-87、92-98、112-137、152-161、177-186、193-200、206-213、229-255、282-294、308-313、320-326、349-355、373-384、388-406、420-425 および 115-199 (配列番号 218)； 5-24、35-41、44-70、73-89、103-109、127-143、155-161、185-190、192-207、212-219、246-262、304-336、372-382、384-393、398-407、412-418、438-444、1-75、76-161 および 164-239 (配列番号 219)； 4-10、16-58、60-71、77-92、100-126、132-146、149-164、166-172、190-209、214-220、223-229、241-256、297-312、314-319、337-343、351-359、378-387、398-418、421-428、430-437、440-448、462-471、510-519、525-536、552-559、561-568、573-582、596-602、608-630、637-649、651-665、681-702、714-732、739-745、757-778、790-805、807-815、821-829、836-842、846-873、880-903、908-914、916-923、931-940、943-948、956-970、975-986、996-1015、1031-1040、1051-1069、1072-1095、1114-1119、1130-1148、1150-1157、1169-1176、1229-1238 および 802-812 (配

40

50

列番号 220) ; 5-12、14-26、35-47、52-67、72-78、83-98、121-141、152-159、163-183、186-207、209-257、264-277、282-299、301-309、312-318、324-339、358-368、372-378、387-397、425-431 および 46-291 (配列番号 221) ; 29-38、44-64、70-76、78-87、94-100、102-112、119-134、140-149、163-173、178-186、188-194、207-234、247-262、269-290 および 73-92 (配列番号 222) ; 10-28、36-63、77-87、103-119、127-136、141-169、171-183、195-200、207-232、236-246、251-265、268-283、287-297、314-322、335-343、354-363、384-390、405-411、419-436、443-455、467-473、480-513、518-529、550-557、565-585、602-608、616-625、632-660、665-677、685-701、726-736、738-747、752-761、785-796、801-813、838-853、866-871 および 757-774 (配列番号 223) ; 31-38、61-66、74-81、90-115、123-145、154-167、169-179、182-193、200-206、238-244、267-272 および 235-251 (配列番号 224) ; 19-25、38-54、56-64、66-72、74-92、94-100、116-129、143-149、156-183、204-232、253-266、269-275、294-307 および 241-313 (配列番号 225) ; 5-34、50-56、60-65、74-85、89-97、108-119、159-165、181-199、209-225、230-240、245-251、257-262、274-282、300-305 および 64-75 (配列番号 226) ; 5-13、16-21、27-42、45-52、58-66、74-87、108-114、119-131 および 39-51 (配列番号 227) ; 6-23、46-54、59-65、78-84、100-120、128-133、140-146、159-165、171-183、190-204、224-232、240-248、250-259、274-280、288-296、306-315 および 267-274 (配列番号 228) ; 5-12、15-24、26-36、42-65、68-80、82-104、111-116、125-144、159-167、184-189、209-218、235-243、254-265、269-283、287-300、306-316、318-336、338-352、374-392 および 162-174 (配列番号 229) ; 30-42、45-54 および 25-37 (配列番号 230) ; 10-30、53-59、86-95、116-130、132-147、169-189、195-201、212-221、247-256、258-265、278-283、291-298、310-316、329-339、341-352、360-367、388-396、398-411、416-432、443-452、460-466、506-512、515-521、542-548 および 419-431 (配列番号 231) ; 4-27、30-53、60-67、70-90、92-151、159-185、189-195、198-210、215-239 および 173-189 (配列番号 232) ; 4-26、41-54、71-78、116-127、140-149、151-158、161-175、190-196、201-208、220-226、240-252、266-281、298-305、308-318、321-329、344-353、372-378、384-405、418-426、429-442、457-463、494-505、514-522 および 174-188 (配列番号 233) ; 17-25、27-39、61-67、81-89、99-110、120-131、133-139、147-161、167-172、179-185、192-198、203-213、226-238、243-258、261-267、284-290、296-307、311-328、340-352、356-371 および 239-256 (配列番号 234) ; 8-30、40-49、67-80、114-123、126-142、152-162、188-194 および 57-70 (配列番号 235) ; 4-23、28-34、36-47、50-61、76-81、89-94、96-104、112-119、126-146、155-181、195-200、208-214、220-229、244-260、263-276、282-288、292-300、317-323、336-351、353-359、363-375、382-399、415-432、444-455、458-471、476-481、484-492、499-517、522-529、535-541、543-568、572-584、586-600、607-617、626-637、656-675 および 282-297 (配列番号 236) ; 6-24、30-35、38-45、63-91、134-140、146-160、167-188、214-220、226-234、244-250、260-270、286-301、316-329、340-371、429-446、448-459、474-481、485-491、512-526、537-544、550-565、573-583、596-613、621-630、652-658 および 87-97 (配列番号 237) ; 8-20、26-48、56-67、76-86、94-109、115-121、123-129、143-160、178-186、191-198、201-208、221-236、238-244、260-268 および 237-247 (配列番号 238) ; 4-40、42-57、73-87、98-117、126-135、150-156、166-174、196-217、231-236、248-258、276-284、293-301、307-313、339-347、359-365、375-387、395-402、428-440、445-456、485-490、497-505、535-541、547-555、610-625、648-656、665-671 および 448-528 (配列番号 239) ; 10-18、39-45、51-61、80-96、98-106、110-115、158-172、174-183、191-200、220-237、249-255、274-289、308-324、331-341、372-381、384-397、405-414 および 322-338 (配列番号 240) ; 30-36、38-56、85-108、134-147、149-160、163-183、188-201、206-211、219-238、247-254 および 5-13 (配列番号 241) ; 11-40、98-103、110-115、133-145、151-159、172-179、192-201、204-212、222-228、235-245、258-268、283-296、298-309、322-329、342-351、354-362、372-378、385-393、407-418、495-516 および 1-148 (配列番号 242) ; 5-19、21-36、73-94、

112-119、122-137、139-145、152-167、184-190、198-204、208-224、249-265、267-281
、299-304、309-317、326-333、356-364、368-374、381-389、391-414、419-425、430-43
5 および 113-140 (配列番号 243) ; 45-54、59-67、78-91 および 15-23 (配列番号 2
44) ; 11-22、33-47、52-80、88-112、124-129 および 6-25 (配列番号 245) ; 26-41、
51-63、80-89、93-115、150-163、187-193、220-237、240-249、286-294、296-306、316-
329、345-353、361-370、407-425、428-437、474-482、484-494、504-517、533-541、549
-558、595-613、616-625、660-668、673-685、711-726、736-744、749-761、787-802、81
2-820、825-837、863-878、888-896、901-913、939-954、964-972、977-989、1003-1008
、1016-1022、1028-1034、1041-1053、1059-1074、1101-1122、420-511 および 581-704
(配列番号 246) ; 18-25、27-55、71-83、89-95、102-113、120-146、150-156、174-185 10
および 159-175 (配列番号 247) ; 24-30、38-56、63-68、87-93、136-142、153-164、
183-199、213-219、226-234、244-261、269-278、283-289、291-297、320-328、330-336
、340-346、348-356、358-366、382-387、401-408、414-419、449-455、468-491、504-51
2、531-537、554-560、597-608、621-627、632-643、650-662、667-692、703-716、724-7
37、743-758、783-794、800-818、846-856 および 806-884 (配列番号 248) ; 4-14、21
-39、86-92、99-107、121-131、136-144、147-154、158-166、176-185、193-199、207-22
2、224-230 および 117-136 (配列番号 249) ; 65-76、85-97、103-109、115-121、125-
146、163-169、196-205、212-219、228-237、241-247、254-262、269-288、294-303、305
-313、328-367、395-401、405-412、418-429、437-447、481-488、506-513、519-524、53
0-541、546-557 および 266-284 (配列番号 250) ; 5-14、37-42、49-71、78-92、97-11 20
2、127-136、147-154、156-163、186-198、216-225、233-243、248-253、295-307、323-3
32、359-366、368-374、380-398 および 194-223 (配列番号 251) ; 4-11、33-39、45-7
2、100-113、119-129、136-144、169-175、177-185、200-208、210-219、262-276、278-2
97、320-326、336-344、347-362、381-394、443-453 および 438-454 (配列番号 252) ;
4-29、31-52、55-61、95-110、138-158、162-171、179-187、202-229、239-248、251-25
6、262-267、269-285、304-310、351-360、362-368、381-388、415-428、435-440、448-4
58 および 161-178 (配列番号 253) ; 4-17、19-28、32-43、47-59、89-110、112-126、
128-134、140-148、152-161、169-184、191-204、230-235、255-264、328-338、341-347
、401-409、413-419、433-441、449-458、463-468、476-482、486-492、500-506、529-54
5 および 305-381 (配列番号 254) ; 10-29、38-45、53-61、134-145、152-160、163-17 30
0、202-208、219-229、248-258、266-275、282-288、315-320、328-334、377-385、392-4
02、418-424、447-453、460-471、479-487、491-497、500-507、531-537、581-594、615-
623、629-635、644-652、659-666、668-678、710-717、719-728、736-741、747-760、766
-773、784-789、794-800、805-817、855-861、866-887 および 698-715 (配列番号 255
) ; 16-26、29-37、44-58、62-68、74-80、88-95、97-120、125-144、165-196 および 58
-72 (配列番号 256) ; 14-21、23-46、49-60、63-74、78-92、96-103、117-129、134-16
1、169-211、217-231、239-248、252-281、292-299、313-343 および 243-257 (配列番
号 257) ; 11-27、46-52、67-72、76-84、91-112、116-153、160-175、187-196、202-211
、213-220 および 43-76 (配列番号 258) ; 5-29、37-56、78-86、108-118、152-161 お
よび 120-130 (配列番号 259) ; 8-14、19-41、52-66、75-82、87-92、106-121、127-13 40
3、136-143、158-175、180-187、196-204、221-228、239-245、259-265、291-306、318-3
23、328-340、352-358、361-368、375-381、391-399、411-418、431-442、446-455、484-
496、498-510、527-533、541-549、558-565、575-585、587-594、644-655、661-668、671
-677 および 184-196 (配列番号 260) ; 4-22、29-38、55-62、75-81、102-107、110-13
4、143-150、161-167、172-179、191-215、223-233、241-247、251-264、266-272、288-3
09、340-352、354-366、394-402、414-438 および 198-218 (配列番号 261) ; 24-44、4
9-70、80-91、105-118、128-136、140-154 および 77-92 (配列番号 262) ; 5-22、31-3
6、41-47、67-74、83-90、105-122、135-143、160-167 および 118-129 (配列番号 263
) ; 4-25、33-73、81-93、96-106、114-120、122-128、130-172、179-208、210-241、251
-283、296-301 および 92-100 (配列番号 264) ; 14-24、29-38、43-50、52-72、86-97 50

、101-107、110-125、127-141、145-157、168-175、177-184、186-195、205-226、238-250、255-261、284-290、293-304、307-314、316-323、325-356、363-371、383-390、405-415、423-432、442-454、466-485、502-511、519-527、535-556、558-565、569-574、612-634、641-655、672-686、698-709、715-722、724-732、743-753、760-769、783-792、818-825、830-839、842-849、884-896、905-918、926-940、957-969、979-1007、1015-1021、1049-1057 および 336-349 (配列番号 265) ; 6-16、26-31、33-39、62-73、75-85、87-100、113-123、127-152、157-164、168-181、191-198、208-214、219-226、233-254、259-266、286-329 および 181-195 (配列番号 266) ; 4-13、32-39、53-76、99-108、110-116、124-135、137-146、149-157、162-174、182-190、207-231、242-253、255-264、274-283、291-323、334-345、351-360、375-388、418-425、456-474、486-492、508-517、520-536、547-560、562-577、31-45 および 419-443 (配列番号 267) ; 15-26、30-37、42-49、58-90、93-99、128-134、147-154、174-179、190-197、199-205、221-230、262-274、277-287、300-314、327-333、343-351、359-377、388-396、408-413、416-425、431-446 および 246-256 (配列番号 268) ; 5-26、34-42、47-54、61-67、71-104、107-115、131-138、144-153、157-189、196-202、204-210、228-245、288-309、316-329、332-341、379-386、393-399、404-412、414-421、457-468、483-489、500-506、508-517、523-534、543-557、565-580、587-605、609-617、619-627、631-636、640-646、662-668、675-682、705-710、716-723、727-732、750-758、784-789、795-809、869-874、14-138、166-286、372-503、674-696 および 754-859 (配列番号 269) ; 5-17、32-38、40-47、80-89、113-119、125-137、140-154、157-163、170-177、185-199、213-225、228-236、242-248、277-290、292-305、323-333、347-353、364-370、385-394、399-406、423-433、441-451、462-474、477-487 および 116-124 (配列番号 270) ; 7-16、18-30、32-49、53-61、63-85、95-101、105-115、119-134、143-150、159-178、185-202、212-229、236-250、254-265、268-294 および 63-72 (配列番号 271) ; 4-12、19-47、73-81、97-103、153-169、188-198、207-213、217-223、236-242、255-265、270-278、298-305、309-317、335-347、354-363、373-394、419-424、442-465、486-492、500-507、542-549、551-558、560-572、580-589、607-614、617-623、647-653、666-676、694-704、706-714、748-754、765-772、786-792、795-806 および 358-370 (配列番号 272) ; 18-28、30-38、40-46、49-55、69-78、82-98、104-134、147-153、180-190、196-202、218-236、244-261、266-273、275-286、290-295、301-314、378-387、390-395、427-434 および 290-305 (配列番号 273) ; 4-13、20-31、39-51、54-61、69-84、87-105、117-124 および 108-125 (配列番号 274) ; 24-34、43-54、56-66、68-79 および 50-69 (配列番号 275) ; 5-43、71-77、102-131、141-148、150-156、159-186、191-207、209-234、255-268、280-286、293-299、317-323、350-357、363-372、391-397、406-418、428-435、455-465、484-497、499-505、525-531、575-582、593-607、621-633、638-649、655-673、684-698、711-725、736-741、743-752、759-769、781-793、813-831、843-853、894-905、908-916、929-946、953-963、970-978、1001-1007、1011-1033、165-178 および 818-974 (配列番号 276) ; 16-44、63-86、98-108、185-191、222-237、261-274、282-294、335-345、349-362、374-384、409-420、424-430、440-447、453-460、465-473、475-504、522-534、538-551、554-560、567-582、598-607、611-619、627-640、643-653、655-661、669-680、684-690、701-707、715-731、744-750、756-763、768-804、829-837、845-853、855-879、884-890、910-928、77-90、144-212、279-355、434-536、782-810 および 875-902 (配列番号 277) ; 4-22、29-41、45-51、53-66、70-77、86-95、98-104、106-124、129-135、142-151、153-161、169-176、228-251、284-299、331-337、339-370、380-387、393-398、406-411、423-433、440-452、461-469、488-498、501-516、523-530、532-559、562-567、570-602、612-628、630-645、649-659、666-672、677-696、714-723、727-747 および 212-227 (配列番号 278) ; 4-9、17-31、35-41、56-61、66-75、81-87、90-124、133-138、149-163、173-192、213-219、221-262、265-275、277-282、292-298、301-307、333-346、353-363、371-378、419-430、435-448、456-469、551-570、583-599、603-612 および 275-291 (配列番号 279) ;

28-34、53-58、72-81、100-128、145-154、159-168、172-189、217-225、227-249、256-263、299-309、322-330、361-379、381-388、392-401、404-417、425-436、440-446、451-464、469-487、502-511、543-551、559-564、595-601、606-612、615-626、633-642、644-650、664-670、674-684、692-701、715-723、726-734、749-756、763-771、781-787、810-843、860-869、882-889、907-917、931-936、941-948、951-958、964-971、976-993、1039-1049、1051-1065、1092-1121、1126-1132、1145-1151、1158-1173、1181-1192、1194-1208、1218-1223、1229-1243、1249-1254、1265-1279、1287-1297、1303-1320、1334-1341、1343-1358、1372-1382、1406-1417、1419-1425、1428-1434、1441-1448、1460-1473、1494-1504、1509-1514、1529-1550、654-669 および 1400-1483 (配列番号 280); 101-16、20-25、58-65、97-109、118-132、134-146、148-155、186-195、226-233、244-262、275-284、295-310、317-322、330-339、345-351、366-375、392-403、408-415、423-430、435-444、446-457、467-479、486-499、503-510、525-537、540-585、602-612、614-623、625-634、639-645、650-669、700-707、717-724、727-739、205-230 および 733-754 (配列番号 281); 5-22、37-43、72-81、105-113、128-133、148-160、188-194、204-230、238-245、251-257 および 194-213 (配列番号 282); 16-21、35-41、56-72、74-92、103-109 および 62-68 (配列番号 283); 4-15、17-82、90-104、107-159、163-170、188-221、234-245、252-265 および 220-235 (配列番号 284); 16-22、36-46、61-75、92-107、113-121、139-145、148-160 および 30-42 (配列番号 285); 4-12、20-26、43-49、55-62、66-78、121-127、135-141、146-161、164-170、178-189、196-205、233-238、269-279、288-318、325-332、381-386、400-407 および 328-346 (配列番号 286); 5-12、31-49、57-63、69-79、89-97、99-114、116-127、134-142、147-154、160-173、185-193、199-204、211-222、229-236、243-249、256-274 および 58-68 (配列番号 287); 10-20、28-34、39-53、68-79、84-90、99-106 および 73-79 (配列番号 288); 14-37、45-50、61-66、77-82、93-98、109-114、125-130、141-146、157-162、173-178、189-194、205-210、221-226、237-242、253-258、269-274、285-290、301-306、316-332、349-359、371-378、385-406、34-307 および 312-385 (配列番号 289); 4-10、17-38、50-85、93-99、109-116、128-185、189-197、199-210、223-256、263-287、289-312、327-337、371-386、389-394、406-419、424-432、438-450、458-463、475-502、507-513、519-526、535-542、550-567 および 361-376 (配列番号 290); 10-39、42-93、100-144、155-176、178-224、230-244、246-255、273-282、292-301、308-325、332-351、356-361、368-379、386-393、400-421 および 138-155 (配列番号 291); 5-11、17-34、40-45、50-55、72-80、101-123、145-151、164-172、182-187、189-195、208-218、220-241、243-252、255-270、325-331、365-371、391-398、402-418、422-428、430-435、443-452、463-469、476-484、486-494、503-509、529-553、560-565、570-590、608-614、619-627、654-661、744-750、772-780、784-790、806-816、836-853、876-885、912-918、926-933、961-975、980-987、996-1006、1016-1028、1043-1053、1057-1062、994-1003 および 1033-1056 (配列番号 292); 17-45、64-71、73-81、99-109、186-192、223-238、262-275、283-295、336-346、350-363、375-385、410-421、425-431、441-448、454-463、468-474、476-512、523-537、539-552、568-583、599-608、612-620、628-641、644-654、656-662、670-681、685-695、702-708、716-723、725-735、757-764、769-798、800-806、808-816、826-840、846-854、856-862、874-881、885-902、907-928、274-350 および 443-513 (配列番号 293); 4-22、29-41、45-51、53-61、70-76、85-92、99-104、111-122、134-140、142-154、163-174、224-232、255-265、273-279、283-297、330-335、337-348、356-367、373-385、391-396、421-431、442-455、475-485、493-505、526-538、544-561、587-599、605-620、622-651、662-670、675-681、687-692、697-712、714-735 および 252-262 (配列番号 294); 4-12、15-35、40-46、50-59、67-94、110-128、143-169、182-188、207-215、218-228、238-250 および 74-90 (配列番号 295); 9-18、42-58、78-85、88-95、97-106、115-122、128-134、140-145、154-181、186-202、204-223、261-267、269-278、284-293、300-336、358-368 および 12-29 (配列番号 296); 7-34、46-53、62-72、82-88、100-105、111-117、132-137、144-160、166-180、183-189、209-221、231-236

、246-253、268-282、286-293、323-336、364-372、378-392、422-433 および 388-405
(配列番号 297) ; 21-27、34-50、72-77、80-95、164-177、192-198、202-220、226-236
、239-247、270-279、285-292、315-320、327-334、348-355、364-371、388-397、453-47
6、488-497、534-545、556-576、582-588、601-607、609-616、642-662、674-681、687-6
97、709-715、721-727、741-755 および 621-739 (配列番号 298) ; 4-14、16-77、79-1
09 および 25-99 (配列番号 299) ; 4-9、17-23、30-37、44-55、65-72、77-93、102-12
1、123-132、146-153 および 17-29 (配列番号 300) ; 4-18、25-41、52-60、83-92、10
4-112、117-123、149-155、159-167、170-192、201-210、220-227、245-250 および 124-
137 (配列番号 301) ; 8-25、50-55、89-95、138-143、148-153、159-169、173-179、22
3-238、262-268、288-295、297-308、325-335、403-409、411-417、432-446、463-475、4
92-501、524-530、542-548、561-574、576-593、604-609、612-622、637-654、665-672、
678-685、720-725、731-739、762-767、777-783、820-838、851-865、901-908、913-920
、958-970、1000-1006、1009-1015、1020-1026、1043-1052、1055-1061、1-128、252-341
、771-793 および 1043-1058 (配列番号 302) ; 16-26、33-46 および 64-76 (配列番
号 303) ; 4-27、69-77、79-101、117-123、126-142、155-161、171-186、200-206、213-
231、233-244、267-273、313-329、335-344、347-370、374-379、399-408、422-443、445
-453、461-468、476-482、518-534、544-553、556-567、578-595、601-620、626-636、64
6-658、666-681、715-721、762-768、778-785、789-803、809-819、22-108、153-318、39
1-527 および 638-757 (配列番号 304) ; 6-21、32-43、62-92、104-123、135-141、145
-152、199-216、218-226、237-247、260-269、274-283、297-303、1-72 および 127-211
(配列番号 305) ; 6-26、50-56、83-89、108-114、123-131、172-181、194-200、221-23
8、241-247、251-259、263-271、284-292、304-319、321-335、353-358、384-391、408-4
17、424-430、442-448、459-466、487-500、514-528、541-556、572-578、595-601、605-
613、620-631、635-648、660-670、673-679、686-693、702-708、716-725、730-735、749
-755、770-777、805-811、831-837、843-851、854-860、863-869、895-901、904-914、92
2-929、933-938、947-952、956-963、1000-1005、1008-1014、1021-1030、1097-1103、11
20-1130、1132-1140、1-213、269-592 および 992-1120 (配列番号 306) ; 9-16、33-39
、47-59、65-79、81-95、103-108、115-123、138-148、163-171、176-185、191-196、205
-211、213-221、224-256、261-276、294-302、357-363、384-390、95-111 および 161-18
9 (配列番号 307) ; 21-27、35-45、70-76、92-105、129-143、145-155、161-166、170-
191、204-211、214-231、234-246、249-255、259-275 および 1-18 (配列番号 308) ; 2
1-35、45-53、56-64、69-97 および 1-16 (配列番号 309) ; 25-33、41-47、61-68、86-
101、106-114、116-129、134-142、144-156、163-176、181-190、228-251、255-261、276
-292、295-305、334-357、368-380、395-410、424-429、454-460、469-482、510-516、51
8-527、531-546、558-570、579-606、628-636、638-645、651-656、668-674、691-698、7
17-734、742-754、765-770、792-797、827-835、847-859、874-881、903-909、926-933、
942-961、964-977、989-1004、1010-1028、1031-1047、1057-1075、1081-1095、1108-111
7、1138-1144、1182-1189、1193-1206、1220-1229、1239-1246、1257-1267、1271-1279、
1284-1301、1312-1320、1329-1335、1341-1347、1358-1371、1399-1404、1417-1426、145
8-1463、1468-1476、1478-1485、1493-1506、1535-1541、1559-1574、1583-1590、1595-1
601、1603-1611、1622-1628、1634-1644、1671-1685、1689-1696、1715-1720、1734-1746
、1766-1775、1801-1806、1838-1844、1858-1871、1910-1917、1948-1955、1960-1974、2
000-2015、2019-2036、2041-2063、748-847 および 1381-1391 (配列番号 310) ; 5-12
、18-24、27-53、
56-63、96-113、119-124、131-136、157-163、203-209、215-223、233-246、264-273、31
1-316、380-389、393-399、425-433、445-450、457-462、464-470、475-482、507-513、5
27-535、542-548、550-565、591-602、607-613、627-642、644-664、673-712、714-732、
739-764、769-782、812-818、826-838、848-854、860-871、892-906、930-938、940-954
、957-973、990-998、1002-1021、1024-1033、1037-1042、1050-1060、1077-1083、1085-
1092、1100-1129、1144-1161、1169-1175、1178-1189、1192-1198、1201-1207、1211-122

1、1229-1239、1250-1270、1278-1292、1294-1300、1314-1335、1344-1352、1360-1374、1394-1405、1407-1414、1416-1424、1432-1452、1456-1462、1474-1497、1500-1510、1516-1522、1534-1542、1550-1559、1584-1603、1608-1627、187-273 および 306-441 (配列番号 311) ; 70-80、90-97、118-125、128-140、142-148、154-162、189-202、214-222、224-232、254-260、275-313、317-332、355-360、392-398、425-432、448-456、464-470、476-482、491-505、521-528、533-546、560-567、592-597、605-614、618-626、637-644、646-653、660-666、677-691 および 207-227 (配列番号 312) ; 5-19、26-34、37-55、57-66、69-83、86-102、115-134、138-143、154-172、178-195、209-246、251-257、290-302、306-311 および 256-266 (配列番号 313) ; 10-20、22-28、35-57、72-79、87-103、108-128、130-144、158-171、190-198、225-242、274-291、301-315、317-324、374-385 および 353-365 (配列番号 314) ; 4-9、17-30、34-54、59-66、73-94、118-130、135-150、158-171、189-198、219-239、269-275、283-301、89-106 および 176-193 (配列番号 315) ; 14-20、22-74、77-86、89-99、104-109、126-135、154-165、181-195、197-212、216-224、264-275 および 107-118 (配列番号 316) ; 4-18、21-38、63-72、101-109、156-162、165-179、183-192、195-210、212-218、230-239、241-256、278-290、299-311、313-322、332-341、348-366、386-401、420-426、435-450、455-460、468-479、491-498、510-518、532-538、545-552、557-563、567-573、586-595、599-609、620-626、628-636、652-657、665-681 および 1-198 (配列番号 317) ; 4-10、16-38、51-68、73-79、94-115、120-125、132-178、201-208、216-223、238-266、269-295、297-304、337-342、347-356、374-401、403-422、440-447、478-504、510-516、519-530、537-544 および 191-206 (配列番号 318) ; 12-40、42-48、66-71、77-86、95-102、113-120、129-137、141-148、155-174、208-214、218-225、234-240、256-267、275-283、300-306、313-321、343-350、359-367、370-383、398-405、432-439、443-461、492-508、516-526、528-535 および 370-478 (配列番号 319) ; 6-14、20-37、56-62、90-95、97-113、118-125、140-145、161-170、183-202、237-244、275-284、286-305、309-316、333-359、373-401、405-412 および 176-187 (配列番号 320) ; 33-44、50-55、59-80、86-101、129-139、147-153、157-163、171-176、189-201、203-224、239-245、257-262、281-287、290-297、304-320、322-331、334-350、372-390、396-401、71-88 および 353-372 (配列番号 321) ; 5-11、15-24、26-33、40-47、75-88、95-103、105-112 および 17-30 (配列番号 322) ; 5-11、16-39、46-54、62-82、100-107、111-124、126-150、154-165、167-183、204-238、245-295、301-313、316-335 および 8-16 (配列番号 323) ; 4-19、34-48、69-74、79-107、115-127、129-135、143-153、160-169、171-182 および 142-153 (配列番号 324) ; 4-30、65-74、82-106、110-120、124-132、135-140、146-175、179-184、190-196、217-223、228-233、250-267、275-292、303-315、322-332 および 174-186 (配列番号 325) ; 9-16、29-41、47-57、68-84、87-109、113-119、162-180、186-193、195-201、203-208、218-230、234-243、265-271、281-292、305-312、323-332、341-347、349-363、368-374、383-390、396-410、434-440、446-452、455-464、466-473、515-522、529-542、565-570、589-600、602-613、618-623、637-644、1019-1027、1238-1244、1258-1264、1268-1276、1281-1292、1296-1302 および 883-936 (配列番号 326) ; 10-17、23-32、39-44、54-72、75-81、88-111、138-154、160-167、178-185、201-210、236-252、327-334、336-342、366-376、388-400、410-430、472-482、493-526、552-558、586-592、598-603、612-621、630-635、641-660 および 384-393 (配列番号 327) ; 4-22、24-39、50-59、73-84、100-105、111-117、130-138、155-161、173-178、182-189、205-215、266-284、308-313、321-328、330-337、346-363、368-374、388-395、397-405、426-434、453-459、482-492、501-507、509-515、518-523、527-544、559-590、598-612、614-629、646-659、663-684、686-694、698-721 および 445-461 (配列番号 328) ; 14-22、27-33 および 3-17 (配列番号 329) ; 29-41、66-73、81-87、90-108、140-146、150-159、165-184、186-196、216-226、230-238、247-253、261-269 および 126-140 (配列番号 330) ; 5-12、16-25、27-33、36-45、60-68、83-88、103-126 および 86-101 (配列番号 331) ; 14-23、36-47、56-66、84-89、94-105、111-127、140-153、160-174、176-183、189-20

3、219-225、231-237、250-257 および 194-227 (配列番号 332) ; 4-25、54-60、64-71、73-82、89-106、117-124、157-169、183-188、199-210、221-232、236-244、255-264 および 58-98 (配列番号 333) ; 13-19、26-36、41-53、55-71、77-84、86-108、114-135、157-172、177-183、187-194、208-213、218-226、110-125 および 156-170 (配列番号 334) ; 5-24、63-69、77-85、94-112、120-137、140-146、152-159、166-172、179-187、193-199、206-212、222-228、234-240、244-252、257-264、270-289、298-309、316-328、337-348、363-375、1-56 および 340-352 (配列番号 335) ; 18-39、42-71、78-120、124-144、152-173、179-189、199-209、213-222、228-258、269-304、329-361、364-372、374-389、396-441 および 313-327 (配列番号 336) ; 19-25、91-98、108-120、156-162、168-174、191-204、211-216、232-266、272-278、286-308、316-321、327-333、344-355、358-364、384-391、395-428、464-476、487-495、497-511、544-561、563-573、575-582、588-594、10-25 および 322-338 (配列番号 337) ; 14-26、32-49、51-57、59-72、80-91、102-112、119-125、147-161、164-173、175-183、188-213、217-222、246-254、260-276、282-303、308-318、321-328、333-350、352-359、371-378、392-401、407-414、416-443、448-463、471-484、490-497、501-514、519-527、539-551、557-570、578-590、592-598、600-610、618-629、633-647、654-667、676-689、702-709、718-726、728-737、741-760、764-780、786-795、808-826、836-842、845-852、865-874、881-887、931-945、949-957、968-974、979-986、1003-1009、1023-1029 および 90-103 (配列番号 338) ; 11-16、37-56、60-66、69-77、80-88、93-106、117-139、166-171 および 72-90 (配列番号 339) ; 59-84、123-133、145-150、161-167、178-189 および 115-128 (配列番号 340) ; 15-33、39-46、52-64、74-87、108-124、127-144、150-156、173-179、184-194、201-208、219-236、243-269、272-295、302-309、343-349、356-361、370-379、405-411、414-423、430-451、457-464、466-475、477-483、496-502、507-522、541-548、557-563、571-577、579-585、590-605、626-642、650-662、671-691、704-710、751-769、775-781、786-791、794-829、851-858、868-878、884-904、913-919、931-939 および 132-142 (配列番号 341) ; 33-58、64-71、74-80、83-88、96-120、122-139、146-157、167-177、207-213、220-225、236-242、264-279、300-305、326-336、340-347、350-360、97-115 および 199-211 (配列番号 342) ; 4-26、43-57、70-99、102-117、121-133、142-148、151-168、170-183、192-220、235-249、258-279 および 30-41 (配列番号 343) ; 34-42、48-58、70-94、110-130、154-160、164-172、178-183、195-203、211-222、229-250、256-261、274-284、286-292、312-323 および 222-233 (配列番号 344) ; 4-9、15-36、38-45、49-74、78-88、100-112、136-191、211-220、226-233、239-246、254-274、287-307、316-322、342-353、356-366、373-378、384-393、405-431、449-457、459-468、487-511、515-524、529-541、544-552、562-568、571-576 および 208-280 (配列番号 345) ; 10-27、31-37、39-54、71-108、124-143 および 2-107 (配列番号 346) ; 16-27、38-57、64-70、90-102、104-113、116-137、160-166 および 1-80 (配列番号 347) ; 13-21、31-36、56-67、127-136、153-171、173-180、184-200、214-222、225-231、239-263、267-273 および 135-159 (配列番号 348) ; 12-27、31-51、68-74、77-87、94-101、108-114、117-123、127-134、138-168、173-196、201-207、212-217、227-237、247-257、264-280 および 205-223 (配列番号 349) ; 17-22、25-54、70-76、92-100 および 98-110 (配列番号 350) ; 7-29、40-50、60-67、87-96、105-111、119-164、172-199、206-212、220-227、237-259、272-279、282-293、295-309、313-319、321-328、345-363、376-386 および 159-176 (配列番号 351) ; 4-19、24-30、36-43、50-68、71-89、93-106、141-152、154-172、179-197、199-215、229-239、246-252、255-263、281-298、319-325、329-356、358-368、374-390、397-409、420-429、432-444、450-456、459-475、483-494、496-502、520-528、532-556 および 362-377 (配列番号 352) ; 18-25、40-62、77-85、91-97、105-116、123-133、139-184、189-197 および 122-140 (配列番号 353) ; 4-49、52-58、62-70、79-105、109-133、142-150、163-168、206-214、220-228、233-240、243-254、274-281、303-311、327-338、357-373、378-396、403-413、420-436、441-453、461-467、475-481、484-498、506-512、514-521、523-529、562-579、589-595、5

98-603、615-648、714-722、728-742、749-758、777-792、795-807 および 643-658 (配列番号 354) ; 8-27、37-48、51-56、72-79、87-106、120-138、140-147、167-176、187-197、205-216、222-229、234-239、243-249、277-288、292-315、334-343、347-353、363-391、398-404、430-447、461-467、478-492、498-507 および 456-470 (配列番号 355) ; 5-12、18-24、59-69、80-93、95-109、119-125、130-137、139-147、158-163、168-176、182-202、206-215、222-239、241-249、267-277、291-298、311-318、321-327、338-344、348-355、373-386、393-406、411-417、434-443、446-465、473-484、514-521、532-553、584-594 および 221-237 (配列番号 356) ; 4-14、27-34、50-58、63-72、79-106、109-114、121-142、146-154、161-167、169-175、178-201、223-238、249-254、259-264、278-292、294-312、319-330 および 167-191 (配列番号 357) ; 7-28、36-42、50-61、63-80、122-152、161-174、176-191 および 140-190 (配列番号 358) ; 20-57、59-65、70-78、86-102、119-133、142-161、163-173、177-188、192-202、204-220、222-236、240-253、279-319、326-331、337-383、390-399、406-412、420-427、431-438 および 381-395 (配列番号 359) ; 13-18、28-34、37-43、50-59、75-81、83-97、105-121、139-147、200-206、209-227、231-247、260-271、318-327、366-381、388-394、399-406 および 182-201 (配列番号 360) ; 6-29、37-43、51-56、70-77、82-102、110-119、127-143、178-190、201-209、216-243、261-269、281-292、305-313、327-339、341-354、356-373、391-397、423-429、438-445、450-478 および 21-314 (配列番号 361) ; 4-12、15-21、32-41、59-76、80-89、96-104 および 90-103 (配列番号 362) ; 9-28、30-41、44-54、69-74、77-82、90-97、104-123、125-135、149-155、164-173、177-184、217-226、230-235、238-244、258-272、282-297、300-305、309-315、317-322、327-336、348-362、368-374、380-387、400-411、414-424、451-458、460-466、483-494、497-503、506-511、521-528、540-553、569-587、598-606、628-642、661-681、688-700、718-733、740-749、752-764、769-783、823-834、848-854、862-872、878-884、886-898、915-920、938-951、954-961、963-972、982-989、996-1003、1010-1016、1021-1032、1038-1044、1047-1057、1060-1070、1079-1088、1094-1102、1117-1127、1129-1135、1142-1153、1158-1204、1212-1229、1234-1263、1269-1277、1308-1313、1327-1338、1344-1376、1400-1415、1436-1443、1448-1458、1497-1504、1511-1522、1544-1566、3-82 および 509-576 (配列番号 363) ; 8-36、40-64、71-79、88-94、102-109、118-127、138-148、151-159、163-174、192-198、200-206、220-233、268-273、290-301、304-309、316-323、331-349、378-391、414-420、427-437、455-475、494-510、541-547、549-555、616-640、1-60、55-139、212-308、386-458 および 458-624 (配列番号 364) ; 16-31、35-42、70-77、91-101、120-130、132-140、143-153、185-190、195-202、215-222、228-238、241-251、257-264、268-277、288-302、312-324、326-333、341-348、364-382、415-429、438-454、458-466、491-499、501-521 および 273-281 (配列番号 365) ; 8-14、32-57、74-149、155-177、179-212、221-266、271-296、304-324、329-346、349-359、368-401、413-419、426-454、465-478、493-510 および 466-490 (配列番号 366) ; 22-28、33-51、64-89、96-119、126-132、138-146、152-159、161-169、172-179、193-198、205-211、221-231、235-254、273-280、297-303、312-320、328-346、351-373、378-384、391-398、448-454、460-468、470-481、516-558、574-593、597-602、613-623、626-646、649-656、668-673、675-683、696-708、715-722、724-739、745-751、759-777、780-804、816-822 および 102-113 (配列番号 367) ; 12-28、41-91、98-107、112-120、125-131、151-193、215-221、240-250、263-280 および 128-138 (配列番号 368) ; 16-24、32-38、46-62、68-81、90-105、127-133、144-150、160-166、178-184、186-202、210-219、232-240、252-258、264-273、293-324、337-344、349-357、360-369、385-398、410-416、419-427、441-449、458-476、508-515、523-539、544-549、562-569、571-579、96-109 および 127-139 (配列番号 369) ; 19-25、28-34、56-61、85-97、110-116 および 39-53 (配列番号 370) ; 4-37、41-50、62-72、91-97、99-109、114-125、136-141、149-158、160-166、201-215 および 27-225 (配列番号 371) ; 15-31、44-51、96-105、122-130、149-157、162-168、178-183、185-192

、198-204、206-213、221-234、239-245、248-255、257-266、289-335、349-357、415-422、425-441、448-454、462-468 および 463-481 (配列番号 372) ; 5-31、39-55、63-72、76-99、106-155、160-177、179-199、207-217、223-240、245-255、261-267、294-316、321-343、354-378、382-452、477-488、529-536、555-569、584-591、593-612、620-627、632-640、647-654、671-680、698-704、723-730、732-750、769-775、781-788、822-852 および 505-525 (配列番号 373) ; 3-18 (配列番号 374) ; 4-14 および 12-24 (配列番号 375) ; 4-11、22-30 および 12-25 (配列番号 376) ; 5-12 および 4-18 (配列番号 377) ; 4-28 および 7-14 (配列番号 378) ; 6-16 および 8-16 (配列番号 379) ; 4-15、18-33 および 24-36 (配列番号 380) ; 4-10、16-21 および 20-31 (配列番号 381) ; 6-19 (配列番号 382) ; 11-18 および 3-10 (配列番号 383) ; 13-24 および 3-15 (配列番号 384) ; 15-27 および 7-16 (配列番号 385) ; 11-16 および 1-15 (配列番号 386) ; 4-16 および 9-21 (配列番号 387) ; 4-24、40-48、54-67 および 22-39 (配列番号 388) ; 6-30、34-55、62-68、78-106 および 68-74 (配列番号 389) ; 3-14 (配列番号 390) ; 9-19 および 6-21 (配列番号 391) ; 4-17 および 1-9 (配列番号 392) ; 5-30 および 1-8 (配列番号 393) ; 4-16、23-46、51-56 および 45-55 (配列番号 394) ; 7-16 (配列番号 395) ; 2-14 (配列番号 396) ; 4-36、43-65 および 50-62 (配列番号 397) ; 10-30 および 14-21 (配列番号 398) ; 9-17 および 1-10 (配列番号 399) ; 4-12 および 3-16 (配列番号 400) ; 4-15 および 5-23 (配列番号 401) ; 10-21 (配列番号 402) ; 6-16 (配列番号 403) ; 4-29、31-38 および 2-14 (配列番号 404) ; 4-35 および 33-42 (配列番号 405) ; 2-17 (配列番号 406) ; 9-18、30-35 および 15-33 (配列番号 407) ; 4-9 および 6-12 (配列番号 408) ; 3-17 (配列番号 409) ; 12-21、37-44、52-61、72-80 および 38-48 (配列番号 410) ; 4-10、29-44、54-61、69-78 および 13-27 (配列番号 411) ; 13-23、36-53 および 2-15 (配列番号 412) ; 4-25、28-46、56-72、81-99、120-132、134-142、154-160 および 129-141 (配列番号 413) ; 4-15、24-33、35-41、64-86 および 21-33 (配列番号 414) ; 9-15 および 4-13 (配列番号 415) ; 4-11、13-19、34-48 および 15-32 (配列番号 416) ; 4-21 および 11-31 (配列番号 417) ; 23-57 および 38-50 (配列番号 418) ; 4-32 および 3-13 (配列番号 419) ; 4-10、13-25、32-42、56-68、72-84 および 26-38 (配列番号 420) ; 4-20、31-48、52-58、65-71、80-93、99-108、114-123 および 37-49 (配列番号 421) ; 6-12、14-20 および 3-25 (配列番号 422) ; 14-25、27-38 および 5-14 (配列番号 423) ; 4-41、57-105、109-118、123-136、144-152 および 86-99 (配列番号 424) ; 6-19 (配列番号 425) ; 2-19 (配列番号 426) ; 14-47 および 1-14 (配列番号 427) ; 4-21、29-44 および 2-18 (配列番号 428) ; 23-29 および 10-28 (配列番号 429) ; 6-16、22-36 および 11-22 (配列番号 430) ; 4-19、30-44 および 18-27 (配列番号 431) ; 5-15、37-45、58-65 および 38-47 (配列番号 432) ; 4-15、23-34 および 4-15 (配列番号 433) ; 30-36、44-54、79-85、101-114、138-152、154-164、170-175、179-200、213-220、223-240、243-255、258-264、268-284 および 10-28 (配列番号 434) ; 表1Bの「同一領域」の列のアミノ酸配列を含むペプチド、特に以下のアミノ酸を含むペプチド : 210-226 および 738-753 (配列番号 449) ; 326-344、326-348、338-354、371-392、801-809 および 877-901 (配列番号 450) ; 893-906 (配列番号 451) ; 51-69 (配列番号 452) ; 110-125 (配列番号 453) ; 291-305 (配列番号 454) ; 210-226 および 738-753 (配列番号 455) ; 326-344、326-348、338-354、371-392、801-809 および 877-901 (配列番号 456) ; 893-906 (配列番号 457) ; 51-69 (配列番号 458) ; 110-125 (配列番号 459) ; 291-305 (配列番号 460) ; 32-44 (配列番号 461) ; 399-410 (配列番号 462) ; 表2の「aa from」から「aa to」の列に特定した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 : 120-143、138-161 および 156-179 (配列番号 218) ; 110-129 および 168-184 (配列番号 219) ; 74-90 (配列番号 222) ; 759-773 (配列番号 223) ; 237-260 (配列番号 224) ; 265-284 (配列番号 225) ; 65-74 (配列番号 226) ; 41-50 (配列番号 227) ; 163-174 (配列番号 229) ; 26-37 (配列番号 230) ; 174-189 (配列番号 232) ; 240-256 (配列番号 234) ;

285-297 (配列番号 236); 238-247 (配列番号 238); 491-519 (配列番号 239); 11
 4-140 (配列番号 243); 267-284 (配列番号 250); 439-453 (配列番号 252); 162-
 178 (配列番号 253); 347-364 (配列番号 254); 699-715 (配列番号 255); 60-71
 (配列番号 256); 244-257 (配列番号 257); 44-63 および 57-76 (配列番号 258);
 185-196 (配列番号 260); 119-129 (配列番号 263); 182-195 (配列番号 266); 3
 2-44 および 424-442 (配列番号 267); 247-256 (配列番号 268); 678-694、785-805
 、55-77 および 72-94 (配列番号 269); 210-226 (配列番号 281); 37-59 (配列番
 号 289); 13-29 (配列番号 296); 136-159 (配列番号 348); 205-222 (配列番号 3
 49); 99-110 (配列番号 350); 160-176 (配列番号 351); 457-470 (配列番号 355
); 221-237 (配列番号 356); 167-190 (配列番号 357); 96-120 (配列番号 361); 10
 399-417、503-519 および 544-563 (配列番号 364); 46-68、159-183 および 184-198
 (配列番号 371); 463-481 (配列番号 372); 表4の「aa from」から「aa to」の列に
 特定した免疫原性エピトープ; 特に以下のアミノ酸を含むペプチド: 110-129 および 16
 8-184 (配列番号 219); 877-901、333-354、326-344 および 801-809 (配列番号 277
); 1-54 (配列番号 347); 544-563、31-51、107-119、399-417 および 503-519 (配
 列番号 364); 120-198 (配列番号 218); 20-35 (配列番号 219); 118-201 (配列番
 号 221); 48-132 (配列番号 242); 118-136 (配列番号 249); 162-178 (配列番号
 253); 347-364 (配列番号 254); 699-715 (配列番号 255); 50-76 (配列番号 258
); 785-819 および 44-128 (配列番号 269); 90-128 (配列番号 274); 314-384 (配
 列番号 289); 327-349 (配列番号 293); 242-314、405-478 および 23-100 (配列
 番号 304); 129-210 (配列番号 305); 162-188 (配列番号 307); 750-772 (配列番
 号 310); 1-56 (配列番号 335); 322-337 (配列番号 337); 72-90 (配列番号 339
); 374-395 (配列番号 345); 136-159 (配列番号 348); 141-164 (配列番号 358)
 ; 96-157 (配列番号 361); 1-82 (配列番号 363); 489-556 (配列番号 364); 159-
 183 および 49-133 (配列番号 371); 表5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 (aa)」の列のアミノ酸配列を含むペプチド、特に以下のアミ
 ノ酸を含むペプチド: 4-26、35-41、53-61、73-84、103-108、114-120、140-146、156-162
 、192-208、214-219、227-233、239-252、260-268、284-297、1-48 および 113-133 (配
 列番号 475); 4-27、38-44、50-56、59-64、72-79、83-89、92-97、108-116、123-148、
 152-167、183-196、200-220、232-244、255-261、265-274、282-302、309-317、1-79 お
 よび 231-302 (配列番号 476); 6-28、66-72、85-105、115-121、144-151、160-170、1
 76-185、223-230、252-288、296-310、319-333、367-374、458-464、471-480、483-488、
 520-528、530-549、559-564、593-601、606-616、636-643、655-662、676-682、684-699
 、719-726、735-750、757-764、777-785、799-810、812-843、846-853、868-873、880-88
 9、891-899、909-929、934-940、963-969、998-1004、1007-1014、1016-1022、1030-1046
 、1-80 および 808-821 (配列番号 477); 7-24、35-41、75-81、91-114、122-132、137
 -144、148-156、183-192、194-200、212-228、233-238、251-258、275-295、326-332、33
 7-346、1-79 および 305-321 (配列番号 478); 31-38、42-52、66-72、86-92、98-104
 、115-122、127-146、154-164、169-187、198-212、225-237、255-269、13-92 および 13
 5-142 (配列番号 479); 4-36、39-49、63-69、71-77、81-88、123-131、133-139、160-
 169、174-180、188-194、210-217、273-278、289-300、317-334、336-341、383-401、425
 -438、1-68、212-270 および 402-446 (配列番号 480); 21-29、31-42、49-63、72-79
 、81-93、112-132、159-165、188-195、197-232、262-267、279-286、294-301、318-326
 、348-366、381-405、409-426、436-465、471-480、484-492、497-505、521-544、554-56
 1、567-577、581-589、601-609、611-622、636-651、653-667、669-685、700-708、716-7
 22、729-744、749-766、780-786、789-811、814-864、1-57 および 84-106 (配列番号 4
 81); 6-24、35-48、57-63、72-78、87-92、113-119、123-137、147-153、173-181、212-
 233 および 1-124 (配列番号 482); 13-34、62-69、78-83、86-91、98-104、107-115、
 146-159、179-188、195-205、209-221、226-233、239-253、276-282、284-294、297-308
 、331-354、375-382、388-399、421-433、449-458、464-469、472-491、508-513、525-53 50

1、534-550、575-593、601-618、629-635、654-661、666-680、706-721、723-740、771-805、810-830、845-851 および 1-84 (配列番号 483) ; 4-32、45-64、73-83、86-92、100-111、125-147、157-163、170-175、177-188、226-232、245-252、258-274、320-335、348-359 および 1-71 (配列番号 484) ; 13-40、43-71、76-83、87-101、109-119、125-156、162-175、182-219、226-232、240-262、270-287、306-318、326-342、344-408、414-444、449-456 および 1-51 (配列番号 485) ; 4-16、18-34、45-54、99-108、134-140、203-212、241-257、266-274、279-291、308-315、330-336、355-370、374-382、402-410、428-455、466-472、474-480、531-554、560-566、572-580、597-618、632-660、664-674、676-685、691-705、708-735、750-768、1-87 および 342-480 (配列番号 486) ; 表6の「aa from」から「aa to」の列に特定した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 : 115-132 および 1-26 (配列番号 475) ; 33-55 (配列番号 476) ; 1-25 (配列番号 478) ; 37-61 (配列番号 479) ; 1-24 (配列番号 480) ; 1-23 (配列番号 481) ; 46-60 (配列番号 482) ; 1-28、23-50 および 45-71 (配列番号 483) ; 1-22 および 17-38 (配列番号 484) ; 1-22 および 17-38 (配列番号 485) ; 1-27、22-47 および 422-447 (配列番号 486) ; 表7の「aa from」から「aa to」の列に特定した免疫原性エピトープ、特に以下のアミノ酸を含むペプチド 115-132 および 1-47 (配列番号 475) ; 1-55 (配列番号 476) ; 22-85 (配列番号 477) ; 307-320 および 1-44 (配列番号 478) ; 15-76 および 40-92 (配列番号 479) ; 1-59、213-269 および 403-445 (配列番号 480) ; 1-56 および 85-105 (配列番号 481) ; 37-121 (配列番号 482) ; 1-71 (配列番号 483) ; 1-38 (配列番号 484) ; 1-38 (配列番号 485) ; 1-47 (配列番号 486) 、および該配列の少なくとも 6、好ましくは 8を超える、特に10を超えるアミノ酸、好ましくは70以下、50、40、20、15または 11アミノ酸を含む断片。かかる断片は全て個々にそしてそれぞれ独立して本発明の好ましい選択された態様を形成する。

10

20

30

40

50

【0135】

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、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。

【0136】

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。

【0137】

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。

【0138】

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適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せしめる。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。

10

【0139】

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 スポドブレタ 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。

【0140】

本発明はまた、ストレプトコッカス・アガラクティエ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。本発明はさらにストレプトコッカス・アガラクティエ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

【0141】

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

40

【0142】

ストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0143】

本発明による過免疫血清反応性抗原およびその断片は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

50

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、ペクターは本発明によるペクターである。

【0144】

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

10

【0145】

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。

20

【0146】

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

30

【0147】

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。

40

【0148】

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

50

、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。

【0149】

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

【0150】

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)。

【0151】

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

【0152】

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}。

30

【0153】

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。

【0154】

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。

40

【0155】

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、特にストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0156】

過免疫血清反応性抗原およびその断片は、抗原的に、エピトープ的に (epitopically) または免疫学的に同等な誘導体を含み、これらは本発明の特定の態様を形成する。本明細書において用いる「抗原的に同等な誘導体」の語は、本発明によるタンパク質または過免疫血清反応性抗原およびその断片に対して生じた場合、病原菌と哺乳類宿主との相互作用に干渉する特定の抗体によって特異的に認識される過免疫血清反応性抗原およびその断片

50

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。

【0157】

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。

10

【0158】

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。

【0159】

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、様々な形態のリボソーム中への 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}。

20

【0160】

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。

30

【0161】

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で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、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。

40

【0162】

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。

【0163】

50

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

【0164】

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

【0165】

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-核酸をのぞく。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。

【0166】

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。

【0167】

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

10

【0168】

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

【0169】

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

40

【0170】

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

50

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。

【0171】

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

10

【0172】

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。

【0173】

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ストレプトコッカス・アガラクティエ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、特に連鎖球菌感染、そしてもっとも具体的にはストレプトコッカス・アガラクティエ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。

20

【0174】

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。

30

【0175】

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。

【0176】

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

【0177】

また、本発明によって、ストレプトコッカス・アガラクティエによる感染の動物モデル

50

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、特にヒトにおけるストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0178】

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、ウイルス感染（特に呼吸器、例えばインフルエンザ）、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および粘膜組織の創傷、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。

10

【0179】

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。

20

【0180】

本発明は別の態様によると、ストレプトコッカス・アガラクティエ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ストレプトコッカス・アガラクティエに対する1つ、好ましくは少なくとも2以上の過免疫血清反応性抗原またはその断片を含んでいてもよい。所望により、かかるストレプトコッカス・アガラクティエ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、ストレプトコッカス・アガラクティエおよび/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。

30

【0181】

さらなる態様によると、本発明はストレプトコッカス・アガラクティエ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以上のストレプトコッカス・アガラクティエ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ストレプトコッカス・アガラクティエ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、ストレプトコッカス・アガラクティエおよび/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。

40

【0182】

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。

【0183】

50

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、免疫賦活性核酸分子、好ましくは免疫賦活性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、向神経活性化合物、特にヒト成長ホルモン、またはそれらの組み合わせ。

【0184】

本発明による過免疫血清反応性抗原、その断片および/またはそれをコードする核酸分子以外に、生物学的または医薬上活性なその他の化合物を含む医薬組成物、特にワクチンも本発明に含まれる。好ましくは、ワクチン組成物は少なくとも1つのポリカチオン性ペプチドを含む。本発明によって用いられるポリカチオン性化合物はWO 97/30721 に記載の特徴的な効果を示すいずれのポリカチオン性化合物でもよい。好ましいポリカチオン性化合物は塩基性ポリペプチド (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(WO 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WO 97/30721 (例えば、ポリエチレンイミン)および WO 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

20

【0185】

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。

【0186】

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(WO 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(WO 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、Antimicrobial Sequence Databaseにおいてみられる:<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag2.html>。

30

【0187】

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。

【0188】

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 WO 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。

40

【0189】

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-RLAGLLRKGGKIGKLLKKIGOKIKNFFQKLPQPPE-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

50

を含む。誘導には20の標準アミノ酸以外のアミノ酸による天然のアミノ酸の置換または修飾が含まれる。さらに、さらなるカチオン性残基をかかるとカテリン分子に導入してもよい。これらカテリン分子は抗原との混合に好ましい。これらカテリン分子は驚くべきことに、さらなるアジュバントを添加しなくても抗原のためのアジュバントとして有効であることが判明した。それゆえ、さらなる免疫賦活性物質とともに、またはそれをとみなわずに、ワクチン製剤中に有効なアジュバントとしてかかるカテリン分子を用いることが出来る。

【0190】

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

10

【0191】

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

20

【0192】

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。

【0193】

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

30

【0194】

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。

40

【0195】

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。

【0196】

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

50

水性分散液として個体に投与すればよい。

【0197】

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。

【0198】

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。

【0199】

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。

【0200】

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。

【0201】

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

【0202】

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、特に連鎖球菌、より好ましくは、化膿連鎖球菌および肺炎連鎖球菌によってもたらされるか、それに関連する疾患または疾患状態である。それに関して、ストレプトコッカス・アガラクティエは本明細書に開示するものを含む複数の株を含むことに注意されたい。本発明によって予防および/または治療すべき細菌感染症によって引き起こされるか、それに関する疾患としては、ヒトにおける細菌性咽頭炎、中耳炎、肺炎、菌血症、髄膜炎、腹膜炎、創傷感染および敗血症が含まれる。

【0203】

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

【0204】

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。

【0205】

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

10

20

30

40

50

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

【0206】

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

【0207】

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

【0208】

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。

【0209】

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。

【0210】

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)。

【0211】

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。

【0212】

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。

【0213】

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

10

20

30

40

50

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) 粘膜表面および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創傷における細胞外マトリックスタンパク質へのストレプトコッカス・アガラクティエの付着の予防； ii) 組織損傷または侵入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 iii) または免疫防御の回避の誘導の阻害；{Rosenshine、I. et al .、1992}； iv) 留置装置の移植またはその他の外科技術、例えば栄養獲得の阻害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。

【0214】

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

【0215】

アンタゴニストおよびアゴニストは、例えば、連鎖球菌、特にストレプトコッカス・アガラクティエによる感染に起因する疾患、例えば敗血症を阻害するために用いることが出来る。

【0216】

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

【0217】

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。

【0218】

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

【0219】

本発明に関して、

図1は、ストレプトコッカス・アガラクティエに対するヒト抗体源の特徴付けを示す。

【0220】

図2は、ストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403からの小断片ゲノムライブラリー、LSAg-70の特徴付けを示す。

【0221】

図3は、ビオチン化ヒトIgGを用いるMACSによる細菌細胞の選択を示す。

【0222】

図4は、用いた株の血清型と、同定された抗原の1つを用いた遺伝子分布分析の一例を示す。

【0223】

図5は、大腸菌溶解液での免疫化によるマウスにおける、エピトープ-特異的抗体の誘導の例を示す。

【0224】

図6は、フローサイトメトリーによるエピトープ-特異的抗血清での細胞表面染色の例

10

20

30

40

50

を示す。

【0225】

図7は、インビトロアッセイにおける選択されたエピトープによって誘導された抗体の殺菌活性の測定を示す。

【0226】

表1Aは、ゲノムストレプトコッカス・アガラクティエライブラリーとヒト血清とを用いて行ったすべてのスクリーニングの要約を示す。表1Bは、表1Aに挙げたタンパク質の抗原性領域内の配列同一性によって同定した抗原性タンパク質を示す。

【0227】

表2は、ヒト血清によるエピトープ血清学分析の要約を示す。

10

【0228】

表3は、46のストレプトコッカス・アガラクティエ株において同定された抗原についての遺伝子分布分析の要約を示す。

【0229】

表4は、マウス免疫原性実験の要約を示す。

【0230】

表5は、ゲノムストレプトコッカス・アガラクティエ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。

【0231】

表6は、ヒト血清によるエピトープ血清学分析の要約を示す。

20

【0232】

表7は、マウス免疫原性実験の要約を示す。

【0233】

明細書において言及する図について以下により詳細に説明する。

【0234】

図1は、免疫アッセイによって測定した抗-ストレプトコッカス・アガラクティエ抗体についてのヒト血清および子宮頸部分泌物の特徴付けを示す。全抗-ストレプトコッカス・アガラクティエIgGおよびIgA抗体レベルをストレプトコッカス・アガラクティエ血清型III株ATCC 12403から調製した全細菌溶解液または培養上清画分を被覆抗原として用いた標準的ELISAによって測定した。(A)健康成人血清と全細菌溶解液タンパク質を用いた代表的実験の結果を示す。データは血清希釈度が検出の線形範囲での(IgAについて2.000X、IgGについて10,000)、405nmの吸光度から計算したELISAユニットとして表す。健康成人非妊娠血清プール(NSag8-IgG、-IgA)に含まれていた(52の中から)選択された血清を太字の数で示す。(B)イムノプロット分析をELISAによって選択された高力価血清について行って、タンパク質抗原による多重免疫反応性を確認した。ストレプトコッカス・アガラクティエ血清型III ATCC 12403株から調製した全細菌溶解液と5.000X希釈の選択された患者の血清を用いて行った代表的実験の結果を示す。プロットは抗-ヒトIgG二次抗体試薬を用いて現像した。低力価血清を陰性対照として含めた。Mw:分子量マーカー。(C)はイムノプロット分析による、定着していない妊婦からの子宮頸部分泌物の選択を示す。子宮頸部の芯(wicks)から抽出した抗体のIgA含量を定量した。各調製物からの2 μg IgAを、複数ウェルプロッティング装置において全細菌溶解液を用いて免疫反応性について試験した。プロットは抗-ヒトIgA二次抗体で現像した。GBSタンパク質と反応性を示すIgA調製物(→で示す)を選択してプールした。

30

40

【0235】

図2(A)は、ストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403小断片ゲノムライブラリー、LSAg-70の断片サイズ分布を示す。576のランダムに選択されたクローンの配列決定の後、配列を切って(464)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数をプロットした。(B)は、ストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403染色体上のLSAg-70の同じセットのランダムに配列決定したクローンの分布を模式的に示す。四角は注釈をつけた(nnotated)ORFと一致する配列を示し、菱形は+/+または+/-方向において

50

非コード染色体配列に対して完全に一致したクローンを示す。丸はキメラ配列を有するすべてのクローンを位置づける。塩基対における数値距離は環状ゲノムにわたって一方向に示す。様々なクローンセットのライブラリーにおける分配は、図の下の数とパーセンテージにおいて示す。

【0236】

図3(A)は、ビオチン化 ヒト IgGによるMACS 選択を示す。pMAL9.1中のLSAg-70 ライブラリーを15-20 μ gのビオチン化 IgG (PSag11-IgG、ヒト血清から精製)でスクリーニングした。陰性対照では、スクリーニングのためのライブラリー細胞に血清を添加しなかった。第一、第二および第三の溶出の後に選択された細胞の数を各選択ラウンドについて示す(それぞれ上、中および下のパネル)。(B)は、1:3,000希釈でMACSによる選択に用いたヒト血清 IgG プール (PSag11-IgG、4 μ g/ μ l)を用いるイムノプ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選択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、同じプロットを過免疫ウサギ血清の1:5,000希釈でブラットフォームタンパク質LamBに対する抗体によって分析した。M、分子量マーカー; L、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。

10

【0237】

図4(A)は、遺伝子分布研究のために分析したストレプトコッカス・アガラクティエ臨床分離株の様々な血清型を表示する。多くの株は血清型が決定できず、さらなる血清型である可能性がある。(B)は、それぞれのオリゴヌクレオチドおよび46のストレプトコッカス・アガラクティエ株を用いたgbs0061の遺伝子分布のためのPCR 分析を示す。PCR 断片の予測サイズは814 bpである。1-46、ストレプトコッカス・アガラクティエ株、Aに示される臨床分離株; -, ゲノム DNA無添加; +、ライブラリー構築のためのテンプレートとして用いた、ストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403からのゲノム DNA。

20

【0238】

図5は、ストレプトコッカス・アガラクティエ -由来エピトープとともにLamBまたはFhuAを発現する大腸菌クローンの全細菌溶解液によって誘導されたエピトープ-特異的マウス血清 IgG 抗体レベルの測定を示す。(A)は、gbs 0428、gbs 0628およびgbs 632 エピトープからそれぞれ作られた、3セットのマウス血清(各群につきマウス5匹、1-5)を用いた代表的ペプチド ELISA 実験を示す。血清は2種類の希釈度で用いた: 黒バー: 100X; 灰色バー: 1000X。それぞれのエピトープに対応するビオチン-標識化合成ペプチドをペプチド ELISAに用いた。ストレプトコッカス・アガラクティエ由来エピトープを有さない大腸菌溶解液によって誘導された血清をFhuA またはLamBとして示す。(B)は、マウス注射のために選択された個々の大腸菌クローンから調製した溶解液を用いた典型的なイムノプロット実験を示す。血清をエピトープを有さない大腸菌溶解液によって枯渇させ、大腸菌タンパク質に対する抗体を除去した。gbs 0918、gbs 0428、gbs 0628 およびgbs 632 エピトープについての例を示す。陰性対照(-)は空のブラットフォームタンパク質を有する大腸菌クローンである。ブラットフォームタンパク質 LamBおよびFhuAの位置は矢印で示す。

30

【0239】

図6は、フローサイトメトリーによるストレプトコッカス・アガラクティエの細胞表面に結合する特異的抗体の検出を示す。図6Aにおいて、免疫前マウス血清およびストレプトコッカス・アガラクティエ血清型 III 溶解液に対するポリクローナル 血清をストレプトコッカス・アガラクティエ株血清型 IIIとインキュベートし、フローサイトメトリーにより分析した。対照はストレプトコッカス・アガラクティエ細胞の表面への二次抗体の非特異的結合レベルを示す。図6Bのヒストグラムは「空の」ブラットフォームタンパク質FhuAのみを含む大腸菌溶解液に対する対照血清と比較しての、抗-gbs 0031、抗-gbs 1925および抗-gbs 0012 抗体の特異的結合による蛍光の上昇を示す。

40

【0240】

図7は、インビトロ殺傷アッセイにて測定したエピトープ特異的抗体の殺菌活性を示す。免疫血清の殺傷活性は適当な対照血清と並行して測定し、それと比較して計算した。デ

50

ータは殺傷パーセントとして表し、それは特異的抗体の存在の結果としての細菌のcfu数の減少である。ストレプトコッカス・アガラクティエ溶解液によって作った過免疫ポリクローナルマウス血清および非免疫化マウスからの血清を陽性および陰性対照としてアッセイにそれぞれ用いた。(A) gbs0012、gbs0016、gbs0031、gbs0428、gbs1306 および gbs2018 エピトープによって作られた免疫血清および(B) gbs0233、gbs0419、gbs0942、gbs0975、gbs1038、gbs1144 およびgbs2093 エピトープによって作られた免疫血清を殺菌活性について試験し、データを適当な対照と比較して示した。対照は例えば、ストレプトコッカス・アガラクティエ -由来エピトープを含まないLambまたはFhuA発現大腸菌クローンによって誘導された血清である。ストレプトコッカス・アガラクティエ血清型 III 細胞をマウス 食細胞と60分間インキュベートし、生存細菌を血液寒天培地に播いた後のcfuを測定することにより定量した。

10

【0241】

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) 列A、fhuA中のストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403の300bp ライブラリーとNSag8-IgA (826)、B、fhuA中の300bp ライブラリーとPSag10-IgA (768)、C、fhuA中の300bp ライブラリーと PSag10-IgG (711)、D、fhuA中の300bp ライブラリーとPSag11-IgG (640)、E、IamB中の70bp ライブラリーとNSag8-IgA (1057)、F、IamB中の70bp ライブラリーとNSag8-IgG (869)、G、IamB中の70bp ライブラリー と PSag10-IgA (904)、H、IamB中の70bp ライブラリーとPSag10-IgA-吸収 (493)、I、IamB中の70bp ライブラリーとPSag10-IgG (910)、J、IamB中の70bp ライブラリーとPSag11-IgA (631)、K、IamB中の70bp ライブラリー とPSag11-IgG (926)、L、IamB中の70bp ライブラリー とPSag18-IgA (691)、M、IamB中の70bp ライブラリー とPSag-sIgA (628); *、5 アミノ酸より長い抗原性配列の予測をプログラム ANTIGENIC (Kolaskar and Tongaonkar、1990)を用いて行った。表1Bは、細菌表面ディスプレイによって同定されたペプチドとのアミノ酸配列同一性によって同定された免疫原性タンパク質を挙げる。細菌表面ディスプレイによって同定された抗原性ペプチドは、ストレプトコッカス・アガラクティエからの列挙されたタンパク質において同一の対応物を有する。ペプチドは複数のヒト血清と反応することが示された (表2参照)。これらペプチドに対する血清はそれゆえ複数のタンパク質を認識しうる。

20

【0242】

表2: ヒト血清によるエピトープ血清学

30

選択されたエピトープを表す個々の合成ペプチドとヒト血清との免疫反応性を示す。反応性の程度を+、++ または+++として表し、個々の血清とのペプチドの個々の反応性の和をとった(13人の患者と9人の健康成人、全部で22人)。各ペプチドの全スコアをすべての反応性の和としてELISAユニットに基づいて計算した。スコアは、+は2-8、++ は9-16、そして+++は17-26。ELISAユニットは、バックグラウンドについて較正した後 OD_{405nm} の読みと血清希釈度から計算した。ATCC 12403株のゲノムアノテーションによる抗原性 ORF内の合成ペプチドの位置は、列「aa from」および「aa to」に示し、これらはそれぞれ最初と最後のアミノ酸残基を示す。ペプチド名: G gbs 0012.1は、アノテーションされたORF: gbs 0012に存在する。

【0243】

40

表3: ストレプトコッカス・アガラクティエ株における遺伝子分布

図 4A に示す46のストレプトコッカス・アガラクティエ株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るPCRによって試験した。1つの選択された PCR 反応の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。*、ストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403と比較した、配列決定から得られた血清型 I A 株におけるアミノ酸置換の数。#、血清型 I A 株に遺伝子が存在しないために、配列決定に別の株を用いた。

【0244】

表4: 抗原性エピトープの免疫原性

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原をストレプトコッカス・アガラクティエのペ

50

ブチドと融合したプラットフォームタンパク質LambまたはFhuAをコードするプラスミドを有する大腸菌クローンによる免疫化によって免疫原性について試験した。エピトープ-特異的抗体の存在を、免疫原として対応する大腸菌クローン溶解液を用いたペプチド ELISA および/または イムノプロットティングによって検出および測定した。結果を+ から ++++ +で示し、ペプチド ELISAについてはELISAユニットに基づいた個々のマウス血清の反応性の和として(図5Aに示す)、イムノプロットティング (IB)についてはプールされた(5個体の) マウス血清とエピトープを含有するプラットフォームタンパク質との反応性の強度として(図5Bに示す)計算した。ATCC 12403 株のゲノムアノテーションによる抗原性 ORF 内の合成ペプチドの位置は列「aa from」と「aa to」で示し、これらはそれぞれ最初と最後のアミノ酸残基を示す。

10

【0245】

表5: 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中のストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403の300bp ライブラリーと、IC8-IgA (826)、B、fhuA中の300bp ライブラリーと、P10-IgA (768)、C、fhuA中の300bp ライブラリーと、P10-IgG (711)、D、fhuA中の300bp ライブラリーと、P11-IgG (640)、E、lamB中の70bp ライブラリーと、IC8-IgA (1057)、F、lamB中の70bp ライブラリーと、IC8-IgG (869)、G、lamB中の70bp ライブラリーと、P10-IgA (904)、H、lamB中の70bp ライブラリーと、P10-IgA-吸収 (493)、I、lamB中の70bp ライブラリーと、P10-IgG (910)、J、lamB中の70bp ライブラリーと、P11-IgA (631)、K、lamB中の70bp ライブラリーと、P11-IgG (926)、*、5 アミノ酸より長い抗原性配列の予測はプログラム ANTIGENIC (Kölsch and Tongaonkar, 1990)を用いて行った。

20

【0246】

表6: 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ヒト血清との免疫反応性を示す。反応性の程度は+、++ または +++として示し、個々の血清とのペプチドの個々の反応性から和を得た(13人の患者および9人の健康成人、全部で22人)。各ペプチドの全スコアはELISAユニットに基づいて全反応性の和として計算した。スコアは、+は2-8、++は9-16および+++は17-30。ELISAユニットはバックグラウンドの較正の後、OD_{405nm}の読みと血清希釈度から計算した。ATCC 12403 株のゲノムアノテーションによる抗原性 ORF内の合成ペプチドの位置は列「aa from」と「aa to」に示し、これらはそれぞれ最初と最後のアミノ酸残基を示す。ペプチド名: gbs 0233.1はアノテーションされたORF: gbs 0233に存在する。

30

【0247】

表7: マウスにおける抗原性エピトープの免疫原性

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原を、ストレプトコッカス・アガラクティエペプチドに融合したプラットフォームタンパク質、LambまたはFhuA をコードするプラスミドを有する大腸菌クローンによる免疫化によって免疫原性について試験した。エピトープ-特異的抗体の存在はペプチド ELISAによって検出および測定した。結果は+ から+++++として示し、ペプチド ELISAについてはELISAユニットに基づいた個々のマウス血清の反応性の和として(図5に示すように)計算した。ATCC 12403 株のゲノムアノテーションによる抗原性 ORF内のエピトープの位置は列「aa from」と「aa to」に示し、これらはそれぞれ最初と最後のアミノ酸残基を示す。

40

【実施例】

【0248】

実施例1: 抗-ストレプトコッカス・アガラクティエ抗体に基づくヒト血清源の特徴付けおよび選択、抗体スクリーニング試薬の調製

実験手順

酵素結合免疫測定法(ELISA)

ELISA プレート (Maxisorb、Millipore)を被覆バッファー (0.1M 炭酸ナトリウム pH 9.2)に希釈した5-10 μg/ml 全タンパク質で被覆した。3種の血清希釈(2,000X、10,000X

50

、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。

【0249】

細菌抗原抽出物の調製

全細菌溶解液: 細菌を一晚THB (Todd-Hewitt Broth)中で培養し、凍結乾燥サイクルの繰り返しによって溶解した:ドライアイス/エタノール-混合物上で凍結するまでインキュベーションし(1分間)、37℃で解凍した(5分間):これを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分間、4℃)により収集した。

培養上清: 遠心分離により細菌を除いた後、一晚培養した細菌培養物の上清を、1部の上清と3部の無水エタノールとを混合し、一晚-20℃でインキュベートすることによって、氷冷エタノールで沈殿させた。沈殿を遠心分離 (2,600 g、15分間)で回収した。乾燥ペレットを、ELISAのためにPBSに溶解するか、またはSDS-PAGE およびイムノブロットイングのために尿素およびSDS-サンプルバッファーに溶解した。サンプルのタンパク質濃度はBradford アッセイにより測定した。

【0250】

イムノブロットイング

全細菌溶解液および培養上清サンプルをインビトロで培養したストレプトコッカス・アガラクティエ血清型 III株から調製した。10 ~ 25 µg 全タンパク質/レーンをBioRad Mini-Protean Cell電気泳動システムを用いて SDS-PAGEで分離し、タンパク質をニトロセルロースメンブレン(ECL、Amersham Pharmacia)にトランスファーした。5%ミルク中での一晚のブロッキングの後、ヒト血清を2,000x 希釈で添加し、HRPO標識抗-ヒト IgGを用いて検出した。

【0251】

子宮頸部芯(wicks)からの抗体の抽出

子宮頸部分泌物を膣鏡診の際に子宮頸部管に導入した吸着性円柱状芯 (Polyfiltronics)によって収集し、その後の抽出まで凍結した。抽出はHordnes et al、1998 (サンプル供給者)にしたがって行った。簡単に説明すると、芯をプロテアーゼ阻害剤を含むPBSと混合し、ボルテックスにかけ、芯を含むチューブから液体を取り出した。IgAおよびIgG 抗体の抽出物中の全濃度を測定した。

【0252】

ゲノムスクリーニングのための抗体の精製

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または子宮頸部分泌物プールの総抗-GBS力価に基づいて選択した。大腸菌タンパク質に対する抗体を熱不活性化血清と全細胞大腸菌細胞(pHIE11で形質転換し、細菌表面ディスプレイと同じ条件下で培養したDH5アルファ)とをインキュベートすることによって除いた。プールされた、枯渇血清からの高度に濃縮されたIgG調製物を、タンパク質 G 親和性クロマトグラフィーによって、製造業者の指示に従って作った (UltraLink Immobilized Protein G、Pierce)。IgA 抗体を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)を用いる親和性クロマトグラフィーによって精製した。枯渇と精製の有効性を、SDS-PAGE、ウェスタンブロットイング、ELISA およびタンパク質濃度測定によって確認した。

【0253】

結果

ヒト免疫系によってストレプトコッカス・アガラクティエに対して産生され、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での発現とその免疫原性を示す。これら分子は、特異的抗-GBS 抗体と対応するストレプトコッカス・アガラクティエペプチドまたはタンパク質の相互作用に基づく本発明に記載のアプローチにおける個々の抗原の同定

に必須である。関連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. 子宮頸部 および肛門直腸のGBS保因について陰性であると試験された健康妊婦
- II. 子宮頸部 および/または 肛門直腸のGBS保因について陽性であると試験された健康妊婦であって、その子供がGBS-無含有(抗生物質予防によるが)であるもの
- III. 臨床疾患を有さない45歳未満の成人
- IV. 未処置個体、5～10月齢の子供であって、母親の抗体を既に失っており、GBS 疾患が無いためにGBS-特異的抗体を獲得していないもの。

【0254】

さらに、子宮頸部分泌物も最初の2群のドナーから収集した。これら抗体源の究極の価値は主に分泌IgA 成分であり、これは粘膜表面において保護エフェクター分子として直接関与する。

10

【0255】

少なくとも2種類の集団、妊婦および非妊娠成人からの抗体を用いてスクリーニングするのが重要である、というのはGBS 疾患は老人および免疫無防備状態の成人にも影響を与えるからである。妊婦研究群の中でも、2種類の患者のカテゴリーがあり、GBSが定着した女性と定着していない女性を、抗原スクリーニングに含めるべきである。

【0256】

病原に曝された個体において誘導された、血清およびその他の体液、例えば、粘膜分泌液における抗体が抗原の同定に必須である。GBSに曝す結果、無症候性定着、現在または過去の急性あるいは慢性感染が起こる。ストレプトコッカス・アガラクティエの定着と感染症は一般的であり、抗体は以前の攻撃による自然免疫の結果として存在する。高力価の定着していない個体からの血清は機能的抗体を含んでおり、保因を排除することが出来るようである。同時に特定の抗体は抗原が持続している場合のみGBS 成分に対して誘導される。このため定着した個体からの血清も含めた。定着は莢膜多糖 (CPS)-特異的抗体応答に関連することが示されている。しかし、定着した女性には抗-CPS 抗体レベルが高いものも低いものもあり、定着していない妊婦についても同様であるため、CPSに対する十分なレベルの抗体がGBS 定着を予防するのかどうかは明らかではない。

20

【0257】

しかし、妊娠中に産生された抗体のエフェクター機能と結合力は変化するという報告がある。ほとんどの健康成人は侵入型 GBS 疾患から保護され、新生児や老人と比べて感染しにくいことを認識するのが重要である。かかる個体からの抗体は対応する抗原の同定に特に有用であると考えられる。抗-GBS 抗体レベルは年齢と共に上昇することが知られている。

30

【0258】

GBSは粘膜病原であり、IgA 応答を誘導するはずである；そのため、IgAに基づくスクリーニングおよび IgGに基づくスクリーニングを行うことが重要であった。ストレプトコッカス・アガラクティエ株のなかには高親和性IgA-結合受容体を発現するものもあるという事実も、宿主応答におけるIgAの重要性を示す。最近、IgGだけでなく、IgA 血清抗体もPMN のFcRIII 受容体によって認識され、オプソニン化を促進することが出来ることが報告された{Phillips-Quagliata, J. et al., 2000}; {Shibuya, A. et al., 2000}。IgA 抗体の主な役割は、主に粘膜表面での中和である。血清 IgAレベルは二量体分泌IgAの質、量および特異性を反映する。そのため、血清収集物を、抗-連鎖球菌 IgGについてだけでなく、IgA レベルについても分析した。ELISA アッセイにおいて高度に特異的な二次試験を用いて、高親和性型、例えば、IgGおよび IgAからの抗体を検出し、IgMからの検出は避けた。IgM 抗体の生産は一次適応体液性応答の際に起こり、その結果低親和性抗体が生じ、一方IgGおよび IgA 抗体はすでに親和性成熟を経ており、疾患に対する戦いまたは予防においてより有用である。

40

【0259】

妊婦からの127の血清サンプルと97の子宮頸部分泌物、および健康成人からの50の血清を一連の免疫アッセイによって抗-ストレプトコッカス・アガラクティエ抗体について特

50

徴づけた。一次特徴付けは、2種類の抗原調製物、例えばストレプトコッカス・アガラクティエ血清型 III ATCC 12403 株から調製した全細菌抽出物および培養上清タンパク質を用いてELISAによって行った。健康成人集団からの血清を用いた代表的実験を図1Aに示す。抗体力価を応答が線形である所与の希釈度において比較した。血清を2つの複雑な抗原性混合物(血清型特異的型 III 莢膜を含む)に対するIgGおよび IgA 反応性に基づいてランク付けし、最も高い血清をさらなるイムノブロットティングによる試験のために選択した。この分析により、特に選択されなかった低力価血清と比較した場合、あらかじめ選択された血清の複数のGBS タンパク質に対する高い抗体反応性が確認された(図1B)。しかし、血清のELISAによるランク付けはイムノブロットシグナルと常に相関しているわけではなく、これによって抗-莢膜抗体が豊富であり、全細菌抽出物に対するELISA反応性の中心となることが示唆される。したがって抗体プールに含めるべき血清の最終選択はイムノブロットティング実験における複数の免疫原性バンドに主に基づいて行った。この大規模な抗体特徴付けアプローチにより、抗-GBS 過免疫血清が明らかに同定された。

10

【0260】

97の子宮頸部分泌物のIgA含量を測定し、同じ量(2 μ g)をイムノブロットティングにより抗-GBS 反応性について試験した。陽性であると選択された血清(図1Cに示す)を定着および非定着IgA プールに分け、細菌表面ディスプレイ実験において別々に用いた。

【0261】

両方のドナー群からの5つの血清を細菌表面ディスプレイによる抗原同定のために選択し、プールした。選択された血清は4つの妊婦 プール(PSAg10-IgG, -IgA, PSAg11-IgG, P SAg18-IgG およびPSAg-sIgA)および1つの健康成人(非妊娠)プール(NSAg8-IgG, -IgA)に含まれていた。IgGおよび IgA 抗体をプールされた血清から親和性クロマトグラフィーによって精製し、大腸菌-反応性抗体を枯渇させて細菌表面ディスプレイスクリーニングにおけるバックグラウンドを避けた。

20

【0262】

実施例2: ストレプトコッカス・アガラクティエの高度にランダムなフレーム選択された小断片ゲノム DNA ライブラリーの作成

実験手順

連鎖球菌 ゲノム DNAの調製

50 mlのTodd-Hewitt Broth 培地に、凍結スタブからストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403 細菌を播き、通気および攪拌しながら18時間37 $^{\circ}$ で培養した。培養物を収集し、1,600x g で15分間遠心分離し、上清を除いた。細菌ペレットを3回PBSで洗浄し、注意深く0.5 mlのリゾチーム溶液(100 mg/ml)に再懸濁した。0.1 mlの10 mg/ml熱不活性化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 $^{\circ}$ でインキュベートした。0.2 mlの20 % SDS 溶液および0.1 mlのプロテイナーゼK(10 mg/ml)を添加した後、チューブを一晩55 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ でインキュベートした。抽出物を微小遠心管(13,000 rpm)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を室温で0.6x 容積のイソプロパノールを添加することにより沈殿させ、無菌パスツールピペットを用いて溶液から取り出し、80%氷冷エタノールを含むチューブに移した。DNAを沈殿を10-12,000x gで遠心分離することにより回収し、風乾し、ddH₂Oに溶解した。

30

40

【0263】

小ゲノム DNA 断片の調製

ゲノム DNA 断片をcup-horn 超音波処理器(Bandelin Sonoplus UV 2200 BB5 cup horn)を備えた超音波処理器 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、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破壊した際に断片サイズ分布がよりタイトになることが観察された。しかし、DNAを超音波-誘導機械的剪断力に広範に曝したにも拘わらず、結果としての断片サイズの低下は十分ではなく、再現性

50

もなかった。それゆえ、50~70 bpサイズの断片をNovagenのショットガン切断キットを用いて穏やかなDNase I処理によって得た。キットに備えられているDNase Iの1:20 希釈を調製し、消化はMnCl₂ の存在下、60 µl 容積、20 で5分間行って、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によって停止させ、断片化効率を2% TAE-アガロースゲルで評価した。この処理の結果、約50-70 bp断片にゲノム DNAが完全に断片化された。断片をついでT4 DNA ポリメラーゼを2回用いて100 µMの各dNTPの存在下で平滑末端化し、末端の有効なフラッシングを確実にした。断片を直接ライゲーション反応に用いるか、または次に使うまで-20 で冷凍した。

【0264】

ベクターの説明

ベクター pMAL4.31をベータ-ラクタマーゼ (bla)遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子と交換したpASK-IBA バックボーン {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 アミノ酸をコードする配列(スパーサー配列)をompA リーダーペプチド配列の後に配置し、リーダーペプチダーゼ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によって細胞膜を横切る転位が減少または無くなるからである{Kajava, A. et al., 2000}。SmaI 制限部位がライブラリー挿入に役立った。選択された断片の回収に用いる、上流のFseI 部位と下流のNotI 部位は、SmaI部位に隣接していた。3つの制限部位は12 アミノ酸スパーサー配列をコードする配列の後に、bla遺伝子が -1読み枠から転写され、NotI 部位の15 bp後に停止コドンが生じるように挿入された。+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るようになり、その結果再びアンピシリン耐性を獲得する。

【0265】

ベクター pMAL9.1を、IamB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り構築した{Hashemzadeh-Bonehi, L. et al., 1998}。次いで、IamB中のアミノ酸 154の後に、制限部位、FseI、SmaI および NotIを含む配列を挿入した。この挿入のための読み枠は、プラスミド pMAL4.31からFseI 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IamB と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。

【0266】

ベクター pHIE11を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、fhuA 中のアミノ酸 405の後に制限部位 FseI、XbaI および NotIを含む配列を挿入した。この挿入のための読み枠は、プラスミド pMAL4.31からFseIと NotIでの消化によって切り出されたフレーム選択されたDNA 断片の移動の結果、fhuA と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選択した。

【0267】

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

ゲノム ストレプトコッカス・アガラクティエDNA 断片をベクター pMAL4.31のSmaI 部位にライゲーションした。組換え DNAをDH10B エレクトロコンピテント大腸菌細胞(GIBCO BRL)にエレクトロポレーションし、形質転換体をカナマイシン (50 µg/ml)およびアンピシリン (50 µg/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、コロニーをラージスケール DNA 抽出のために回収した。代表的プレートをコロニー 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回収用に保存した。簡便なコロニー PCR アッセイを用いてまずだいたいの断片サイズ分布と挿入効率を調べた。配列決定データから、正確な断片サイズ、挿入部位における結合の完全性およびフレーム選択の正確さ(3n+1規則)を評価した。

【0268】

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 断片をストレプトコッカス・アガラクティエ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 と NotI で消化しておいたプラスミド pMAL9.1 (LamB) または pHIE11 (FhuA) に移した。8 bp GC リッチ配列を認識するこれら 2 つの制限酵素を用いることにより、pMAL4.31 ベクターにおいて選択された読み枠がプラットフォームベクターのそれぞれにおいて維持される。プラスミドライブラリーを次いでエレクトロポレーションにより大腸菌 DH5 アルファ 細胞に形質転換した。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 $^{\circ}\text{C}$ でシングルコロニーが明らかに目視できるような密度で培養した。細胞をこれらプレートの表面から掻き取り、新しい LB 培地で洗浄し、アリコート中でライブラリースクリーニングまで -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

10

【0269】

結果

フレーム選択のためのライブラリー

サイズがそれぞれおよそ 70 および 300 bp の 2 つのライブラリー (LSAg-70 および LSAg-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、次いでおよそ 1 μg の pMAL4.31 プラスミド DNA と 50 ng の断片化ゲノムストレプトコッカス・アガラクティエ DNA での形質転換により、フレーム選択後の $4 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ クローンが得られた。ライブラリーのランダムさを評価するために、LSAg-70 のおよそ 576 のランダムに選択したクローンを配列決定した。生物情報分析により、これらクローンのなかには 2 回以上存在するものはほとんどないことが示された。さらに、およそ 80% のクローンが 25 ~ 100 bp のサイズ範囲であり、平均サイズがおよそ 40 bp であることが示された (図 2)。ほとんどすべての配列は 3n+1 規則に従っており、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。

20

【0270】

細菌表面ディスプレイライブラリー

大腸菌表面へのペプチドのディスプレイには、フレーム選択ベクター pMAL4.31 からディスプレイ プラスミド pMAL9.1 (LamB) または pHIE11 (FhuA) へと、LSAg-70 および LSAg-300 ライブラリー由来のインサートを移す必要がある。ゲノム DNA 断片を FseI および NotI 制限酵素で消化し、5 ng のインサートと 0.1 μg のプラスミド DNA をライゲーションし、次いで DH5 アルファ 細胞に形質転換した結果、 $2 \sim 5 \times 10^6$ クローンが得られた。クローンを LB プレートから掻き取り、更に増幅せずに凍結した。

30

【0271】

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ストレプトコッカス・アガラクティエ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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μl LB 培地に再懸濁し、エッペンドルフチューブに移した。

40

【0272】

血清から精製した 10 ~ 20 μg のビオチン化ヒト IgG を細胞に添加し、懸濁液を一晩 4 $^{\circ}\text{C}$ で穏やかに振盪しながらインキュベートした。900 μl の LB 培地を添加し、懸濁液を混合し、次いで 10 分間 6,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離した (IgA スクリーニングには、10 μg の精製 IgA を用い、それらはビオチン化 抗-ヒト-IgG 二次抗体で捕捉した)。細胞を 1 ml LB で 1 回洗浄し、次いで 100 μl LB 培地に再懸濁した。ストレプトアビジン (Miltenyi Biotec, Germany) に結合させた 10 μl の MACS マイクロビーズを添加し、インキュベーションを 20 分間 4 $^{\circ}\text{C}$ で続けた。その後、900 μl の LB 培地を添加し、MACS マイクロビーズ 細胞懸濁液を磁石に固定化した平衡化 MS カラム (Miltenyi Biotec, 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り平

50

衡化した)。

【0273】

カラムを次いで3 ml LB 培地で3回洗浄した。磁石を除いた後、細胞を2 ml LB 培地での洗浄により溶出した。3 ml LB 培地でカラムを洗浄した後、2 ml 溶出液を同じカラムに2回目にローディングし、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の3回目を行った結果、最終溶出液 2 ml が得られた。

【0274】

第二および第三ラウンドのスクリーニングは以下のように行った。最終溶出液からの細胞を遠心分離によって回収し、50 μ 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 $^{\circ}$ Cで90分間インキュベートし、1 mM IPTGで30分間誘導した。次いで細胞を回収し、1 ml LB 培地で1回洗浄し、10 μ l LB 培地に懸濁した。10~20 μ g のヒトビオチン化 IgGを再び添加し、懸濁液を一晩4 $^{\circ}$ Cで穏やかに攪拌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ように行った。2ラウンドの選択後に選択された細胞を50 μ g/ml カナマイシンを追加したLB-ア寒天プレートに播き、一晩37 $^{\circ}$ Cで培養した。

10

【0275】

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 $^{\circ}$ Cで50 μ g/ml カナマイシンを追加した3 ml LB 培地で培養して、標準的手順を用いてプラスミド DNAを調製した。配列決定をMWG (Germany)またはTIGR (U.S.A.)とともに行った。

20

【0276】

ウェスタンブロット分析のために、およそ 10~20 μ 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 1:3,000 ~ 1:5,000希釈、そしてHRPと結合した抗-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 またはウサギ抗-LamB ポリクローナル免疫血清を一次抗体として、HRPに結合したそれぞれの二次抗体と組み合わせて用いて融合タンパク質を検出した。

30

【0277】

結果

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

pMAL9.1中のライブラリー LSag-70およびpHIE11中の ライブラリーLSag-300を健康成人の血清から調製したビオチン化ヒト IgGおよびIgA のプール(NSag8-IgG, -IgA) または P10,11,18 (実施例1: ヒト血清からの抗体の調製を参照)によってスクリーニングした。選択手順は実験手順に記載のように行った。図 3AはLSag-70 ライブラリーと PSag11-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選択サイクルの後のコロニー数から理解されるように、最後に回収された細胞の総数は、 2×10^7 細胞からおよそ 2×10^4 細胞へと劇的に減少したが、抗体を添加しなかった選択では細胞数が同様に減少を示した(図 3A)。それゆえ第二および第三ラウンドの選択を行った。第三ラウンドの最後には、およそ 10^4 細胞が PSag11-IgGによって回収され、ヒト血清からのIgGを添加しなかった場合には 2×10^3 細胞のみが回収された。これによって明らかに選択がストレプトコッカス・アガラクティエ特異的抗体に依存することが示された。スクリーニングの性能を評価するために、26の選択されたクローンをランダムに取り上げ、スクリーニング IgG プールによるイムノブロット 分析に供した(図 3B)。この分析により、80%を超える選択されたクローンが関連する血清において存在する抗体との反応性を示す一方、ストレプトコッカス・アガラクティエ特異的インサートを含まないLamB発現対照株は同じ血清と反応しないということが明らかになった。一般に、反応性の率は35 ~ 90%の範囲であることが観察された。コロニー PCR 分析によりすべての選択されたクローンが予測

40

50

されたサイズ範囲にインサートを含むことが示された。

【0278】

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、遺伝子および、スクリーニングに用いたヒト血清抗体によって特異的に認識される対応するペプチドまたはタンパク質配列が同定された。特異的クローンが選択される頻度は少なくとも部分的には選択に用いた血清中にあ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/または親和性を反映する。この点で、いくつかのORF (例えば、gbs 1087、gbs 1306、gbs 2018) 由来のクローンが100回以上取り出されたのは驚くべきであり、それらの高い免疫原性の性質が示される。表1および表5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および表5に示すすべてのクローンは、単一のクローンからの全細胞抽出物を用いるイムノプロット分析によって、それぞれのスクリーニングに用いたヒト血清のプールと反応性を示すことが確認された。表1および表5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によって表面にディスプレイされるために、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。

10

【0279】

細菌表面ディスプレイスクリーニングによって同定された遺伝子のほとんどが、ストレプトコッカス・アガラクティエの表面結合タンパク質および/または分泌タンパク質をコードするという事は注目に値する。これはストレプトコッカス・アガラクティエの病原性における表面結合または分泌タンパク質の予測される役割と一致する。

20

【0280】

実施例4: 高度に免疫原性のペプチド配列と個体のヒト血清との反応性の評価

実験手順

ペプチド合成

ペプチドはSyro II 合成機 (MultisynTech, Witten, Germany) を用いて、Rink アミド樹脂 (PepChem, Tubingen, Germany) 上の標準的 F-moc化学を使用し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) 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) を用いて伸長させた。ペプチドを1時間、93% TFA、5% トリエチルシランおよび2% 水を用いて樹脂から切断した。ペプチドを減圧下で乾燥させ、アセトニトリル/水(1:1) から3回凍結乾燥させた。正確な質量の存在をReflex III MALDI-TOF (Bruker, Bremen Germany) で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

【0281】

酵素結合免疫測定法, (ELISA)

ビオチン-標識化ペプチド(N-末端)を10 µg/mlの濃度で製造業者の指示に従ってストレプトアビジン ELISA プレート (EXICON) に被覆した。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ELISA リーダー (GENIOS、TECAN) を備えた Gemini 160 ELISA ロボット (TECAN) で加工および分析した。

40

【0282】

結果

選択されたクローンの生物情報分析の後、対応するペプチドを設計し、合成した。26 アミノ酸残基を超えるエピトープの場合、オーバーラップするペプチドを作った。すべてのペプチドをN-末端 ビオチン-タグを有するよう合成し、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。

【0283】

分析は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に用いた血清プールに含まれていた個体の血清との反応性に基づいて選択したペプチドについて

50

行った。抗原同定に用いた22人のヒト血清 (13人の患者および9人の健康な曝された高力価個体)を用いて分析したゲノムスクリーニングからの55種類のストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質を表す74のペプチドの血清反応性の要約を表2および表6に示す。ペプチドは、陽性血清の数と反応性の程度に基づいて各ペプチドについて計算したスコアによって比較した。ペプチドは高度に広範に反応性のものから、弱く反応性のものまで様々であった。

【0284】

実施例5: ストレプトコッカス・アガラクティエから同定された高度に免疫原性のタンパク質の遺伝子分布研究

実験手順

PCRによるGBS 抗原の遺伝子分布

理想的なワクチン抗原とは、ワクチンが与えられる標的生物のすべてまたは大多数の株に存在する抗原であろう。同定されたストレプトコッカス・アガラクティエ抗原をコードする遺伝子がストレプトコッカス・アガラクティエ株に普遍的に存在するかを調べるために、目的遺伝子に特異的なプライマーを用いて、PCRを一連の独立のストレプトコッカス・アガラクティエ分離株に対して行った。図 4Aに示すように患者にもっともよく存在する血清型を包含するストレプトコッカス・アガラクティエ分離株を得た。プライマーとしてのオリゴヌクレオチド配列をすべての同定されたORFについて設計し、およそ 1,000 bpの産物を得、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カバーすることができるようにした。すべてのストレプトコッカス・アガラクティエ株のゲノム 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で、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製造業者の指示に従ってキットを用いて行った (Invitrogen、The Netherlands)。個々のプライマー対について条件を合わせる必要がない限り、標準として、30 サイクル(1x: 5分、95 $^{\circ}$ C、30x: 30秒、95 $^{\circ}$ C、30秒、56 $^{\circ}$ C、30秒、72 $^{\circ}$ C、1x 4分、72 $^{\circ}$ C)を行った。

【0285】

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、46種類のストレプトコッカス・アガラクティエ株におけるその存在についてPCRで試験した (図 4A)。一例として、図 4Bは GBS0061とすべての示した46 株とのPCR 反応を示す。明らかに目視できるように、遺伝子はすべての分析した株に存在する。型 IA 株 からのPCR 断片を配列決定し、すべての657 bpがストレプトコッカス・アガラクティエATCC 12403 株と比較して同一であることが示され、これは2つの分離株の間の高レベルの保存を示す。

【0286】

全部で117の分析した遺伝子のなかで100を超える遺伝子が試験したすべてまたはほとんどすべての株に存在しており、5つの遺伝子は試験した46 株の10%以上で存在しなかった (表3)。さらに、わずかな遺伝子(例えば、GBS0016、GBS1087、GBS1528 および GBS2018)がサイズにおける変動を示したが、すべてまたはほとんどの株分離株に存在していた。1つの株から作成したPCR 断片の配列決定および型 III 株 ATCC 12403との比較により、正しいDNA 断片の増幅が確認され、表3に示すような有る程度の配列の相違が明らかになった。重要なことに、同定された抗原の多くは配列とサイズにおいてすべての株に保存されており、しががってそれらはGBSによる感染症の予防の新規なワクチン候補である。

【0287】

実施例6: 大腸菌表面にディスプレイされたストレプトコッカス・アガラクティエ由来の高度に免疫原性のタンパク質/ペプチドで免疫したマウスから得た免疫血清の特徴付け

実験手順

マウスからの免疫血清の作成

ストレプトコッカス・アガラクティエペプチドに融合したブラットフォームタンパク質をコードするプラスミドを有する大腸菌クローンを50 μ g/ml カナマイシンを追加したLB培地で37 $^{\circ}$ Cで培養した。一晚培養物を1:10に希釈し、OD₆₀₀ が0.5となるまで培養し、0.2

10

20

30

40

50

mM IPTGで2時間誘導した。ペレットとなった細菌細胞を PBS バッファーに懸濁し、氷上での超音波処理によって破壊し、粗細胞抽出物を得た。OD₆₀₀の測定によって、 5×10^7 細胞に対応するアリコートにNMRI マウスの静脈内に注射し、2週間後に追加免疫した。血清を2回目の注射の1週間後に採取した。エピトープ特異的抗体レベルをペプチド ELISAにより測定した。

【0288】

抗原のインビトロ発現

インビトロで培養したストレプトコッカス・アガラクティエ血清型 III による抗原の発現をイムノブロットイングによって試験した。様々な培地と培養条件を試験して、全溶解液および細菌培養上清における抗原の存在を検出した。予測される分子量および電気泳動度に対応する特異的バンドが検出された場合に発現が確認されたとみなした。

10

【0289】

細胞表面染色

フローサイトメトリー分析を以下のように行った。細菌を、イムノブロット分析によって示されたように抗原の発現が導かれる培養条件下で培養した。細胞をハックス緩衝塩類溶液 (HBSS) で2回洗浄し、細胞密度を100 μ l HBSS、0.5% BSA中およそ 1×10^6 CFUに調整した。30~60 分間4 での50~100倍希釈したマウス抗血清とのインキュベーションの後、未結合の抗体を過剰のHBSS、0.5% BSA中の遠心分離によって洗浄した。フルオレセイン (FITC) 標識した二次ヤギ抗-マウス 抗体 (F(ab')₂ 断片特異的)を細胞と4 30 ~60 分間インキュベートした。洗浄後、細胞を2% パラホルムアルデヒドで固定した。結合抗体をBecton Dickinson FACScan フローサイトメーターを用いて検出し、データをさらにコンピュータプログラム CellQuestで分析した。陰性対照血清には、マウス免疫前血清および、ストレプトコッカス・アガラクティエゲノムインサートを含まないLambまたはFhuA遺伝子をコードするプラスミドで形質転換したIPTG誘導後の大腸菌細胞から調製した溶解液によって作成したマウス ポリクローナル血清を含めた。

20

【0290】

殺菌(殺傷)アッセイ

マウスマクロファージ細胞(RAW246.7または P388.D1)と細菌をインキュベートし、60分後の生細菌の減少をコロニーの計数によって測定した。簡単に説明すると、細菌をハックス緩衝塩類溶液 (HBSS)で2回洗浄し、細胞密度を50 μ l HBSS中およそ 1×10^5 CFUに調整した。細菌をマウス血清 (25%まで)とモルモット補体(5%まで)とともに全容積100 μ lで60分間4 30 でインキュベートした。オプソニン化前の細菌をマクロファージ(マウス細胞株 RAW264.7 またはP388.D1; 2×10^6 細胞/100 μ l)と1:20の比で混合し、500 rpmの回転振盪機で37 30 でインキュベートした。各サンプルのアリコートを滅菌水で希釈し、5分間室温でインキュベートしてマクロファージを溶解した。段階希釈をTodd-Hewitt Broth 寒天プレートに播いた。プレートを一晚37 40 でインキュベートし、コロニーをCountermat flash コロニーカウンター(IUL Instruments)で計数した。対照血清には、マウス免疫前血清およびストレプトコッカス・アガラクティエゲノムインサートを含まない遺伝子LambまたはFhuAを有するプラスミドで形質転換されたIPTG誘導後の大腸菌から調製した溶解液を用いて作製したマウスポリクローナル血清を含めた。

30

40

【0291】

結果

マウスにおける免疫原性

特異的抗体の存在を、それぞれ図5AおよびBに例証し、表4および表7に要約するように、LambまたはFhuA プラットフォームタンパク質に含まれた所与のエピトープを発現する大腸菌クローンをを用いたペプチド ELISA および/または イムノブロットイングによって判定した。61種類のエピトープ領域によって表される43の新規GBS 抗原がマウスにおいて免疫原性であることが示された。陽性血清を次いでストレプトコッカス・アガラクティエ血清型 III 株から調製した全細菌溶解液と培養上清を用いるイムノブロットイングにより分析した(データ示さず)。この分析は、FACS 分析によってポリペプチドの表面発現を

50

評価するために、抗原性タンパク質が発現しているか、発現しているとすればどのような培養条件で発現しているかを判定する第一段階である。それはすべてのタンパク質がインビトロ条件下で発現するわけではないという文献データに基づいて予測した。

【0292】

ストレプトコッカス・アガラクティエの細胞表面染色

いくつかの抗原性タンパク質の細胞表面への接近可能性を、フローサイトメトリーに基づくアッセイによって調べた。GBS細胞を免疫前血清およびストレプトコッカス・アガラクティエ溶解液またはストレプトコッカス・アガラクティエペプチドに融合したブラッドフォームタンパク質をコードするプラスミドを有する大腸菌クローンに対して作ったポリクローナルマウス血清とインキュベートし、次いで蛍光タグを付加した二次抗体によって検出した。図6Aに示すように、ストレプトコッカス・アガラクティエ溶解液に対して作った抗血清は表面成分に対する抗体を含んでおり、これはストレプトコッカス・アガラクティエ血清型 III 細胞集団における蛍光の有意なシフトによって示される。ストレプトコッカス・アガラクティエ血清型 III 細胞の同様の細胞表面染色が多くの同定されたGBS抗原のペプチドに対して作られたポリクローナル血清によっても観察された(図6B)。ある場合には、細菌の亜集団は染色されず、これはヒストグラムにおける2つのピークの検出によって示される(図6B)。この現象は、細菌の成長過程での遺伝子産物の異なる発現、不十分な抗体レベルまたは、その他の表面分子または血漿タンパク質による抗体結合の部分的阻害の結果であろう。重要なことに、周知の保護GBS抗原、Sip/ gbs 0031はこのアッセイにおいても陽性であることが明らかとなった。

10

20

【0293】

インビトロ 殺菌活性

オプソニン食細胞(Opsonophagocytic)の殺傷は細胞外細菌、例えば、ストレプトコッカス・アガラクティエに対する宿主の防御の基礎をなす。細菌抗原に対する抗体の細胞表面結合はオプソニン作用性であり、特定の抗原により誘導された抗体が活性化補体成分(C3bi)に結合できる場合は食細胞(マクロファージおよび好中球顆粒球)による殺傷(殺菌)が誘導される。図7において、対応するエピトープによってマウスにおいて作られた抗原-特異的抗体による、測定された殺菌活性に対するデータを示す。これらのデータによると、いくつかの新規なGBS抗原、例えば gbs 0012、gbs 0016、gbs 0428、gbs 1306およびG gbs 2018は機能的な抗体を誘導する。重要なことに、周知の保護GBS抗原、Sip/ gbs 0031は全く同じアッセイにおいて強度に陽性であることが判明した。

30

【0294】

これらの実験により、多くのタンパク質がそのシグナルペプチド配列によって輸送されるという生物情報的予測が確認され、さらにストレプトコッカス・アガラクティエ血清型 IIIの細胞表面へのタンパク質の提示が示された。これらタンパク質は機能的特性を有するヒト抗体による認識に利用され、GBS疾患に対するワクチンの開発の有用な候補となることが確認された。

【0295】

表1A: 細菌表面ディスプレイによって同定された免疫原性タンパク質

【表 1 - A】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs0012	ベータ・ラクタマーゼと弱い類似	4-20,35-44,65-70,73-87,92-98,112-137,152-161,177-186,193-200,206-213,229-255,282-294,308-313,320-326,349-355,373-384,388-406,420-425	B:13, C:6	115-199	1, 218
gbs0016	グルカン結合タンパク質 B	5-24,35-41,44-70,73-89,103-109,127-143,155-161,185-190,192-207,212-219,246-262,304-336,372-382,384-393,398-407,412-418,438-444	B:12, C:4, D:3, E:5, H:4, I:12, M:2	1-75, 76-161, 164-239	2, 219
gbs0024	ホスホリボシルホルミルグリシンアミジンシンターゼ	4-10,16-58,60-71,77-92,100-126,132-146,149-164,166-172,190-209,214-220,223-229,241-256,297-312,314-319,337-343,351-359,378-387,398-418,421-428,430-437,440-448,462-471,510-519,525-536,552-559,561-568,573-582,596-602,608-630,637-649,651-665,681-702,714-732,739-745,757-778,790-805,807-815,821-829,836-842,846-873,880-903,908-914,916-923,931-940,943-948,956-970,975-986,996-1015,1031-1040,1051-1069,1072-1095,1114-1119,1130-1148,1150-1157,1169-1176,1229-1238	F:4	802-812	3, 220
gbs0031	表面免疫原性タンパク質	5-12,14-26,35-47,52-67,72-78,83-98,121-141,152-159,163-183,186-207,209-257,264-277,282-299,301-309,312-318,324-339,358-368,372-378,387-397,425-431	A:17, B:53, C:36, D:4	46-291	4, 221
gbs0048	仮想タンパク質	29-38,44-64,70-76,78-87,94-100,102-112,119-134,140-149,163-173,178-186,188-194,207-234,247-262,269-290	K:13	73-92	5, 222
gbs0053	アルデヒドアルコールデヒドロゲナーゼ (adhE)	10-28,36-63,77-87,103-119,127-136,141-169,171-183,195-200,207-232,236-246,251-265,268-283,287-297,314-322,335-343,354-363,384-390,405-411,419-436,443-455,467-473,480-513,518-529,550-557,565-585,602-608,616-625,632-660,665-677,685-701,726-736,738-747,752-761,785-796,801-813,838-853,866-871	E:4	757-774	6, 223
gbs0061	rpIB リボソームタンパク質 L2	31-38,61-66,74-81,90-115,123-145,154-167,169-179,182-193,200-206,238-244,267-272	F:2, I:12	235-251	7, 224
gbs0084	DNA-指向 RNA ポリメラーゼ, アルファサブユニット (rpoA)	19-25,38-54,56-64,66-72,74-92,94-100,116-129,143-149,156-183,204-232,253-266,269-275,294-307	C:4, D:6	241-313	8, 225
gbs0107	保存仮想タンパク質	5-34,50-56,60-65,74-85,89-97,108-119,159-165,181-199,209-225,230-240,245-251,257-262,274-282,300-305	K:2	64-75	9, 226

10

20

30

40

【表 1 - B】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs0108	デオキシウリジン 5'-トリホスフェートスクレオチドヒドrolase	5-13,16-21,27-42,45-52,58-66,74-87,108-114,119-131	I:5	39-51	10, 227
gbs0113	リボース ABC トランスポーター	6-23,46-54,59-65,78-84,100-120,128-133,140-146,159-165,171-183,190-204,224-232,240-248,250-259,274-280,288-296,306-315	F:4	267-274	11, 228
gbs0123	アルギニノコハク酸シンターゼと類似	5-12,15-24,26-36,42-65,68-80,82-104,111-116,125-144,159-167,184-189,209-218,235-243,254-265,269-283,287-300,306-316,318-336,338-352,374-392	K:17	162-174	12, 229
gbs0127	rpmV 50S リボソームタンパク質 L28	30-42,45-54	F:11	25-37	13, 230
gbs0144	オリゴペプチド ABC トランスポーター, 基質結合性	10-30,53-59,86-95,116-130,132-147,169-189,195-201,212-221,247-256,258-265,278-283,291-298,310-316,329-339,341-352,360-367,388-396,398-411,416-432,443-452,460-466,506-512,515-521,542-548	E:7	419-431	14, 231
gbs0183	膜タンパク質, 推定	4-27,30-53,60-67,70-90,92-151,159-185,189-195,198-210,215-239	F:9	173-189	15, 232
gbs0184	オリゴペプチド ABC トランスポーター, オリゴペプチド-結合性	4-26,41-54,71-78,116-127,140-149,151-158,161-175,190-196,201-208,220-226,240-252,266-281,298-305,308-318,321-329,344-353,372-378,384-405,418-426,429-442,457-463,494-505,514-522	E:6	174-188	16, 233
gbs0235	グリシン ベタイン/カルニチン/コリン ABC トランスポーター	17-25,27-39,61-67,81-89,99-110,120-131,133-139,147-161,167-172,179-185,192-198,203-213,226-238,243-258,261-267,284-290,296-307,311-328,340-352,356-371	G:8, H:15	239-256	17, 234
gbs0255	保存 仮想タンパク質	8-30,40-49,67-80,114-123,126-142,152-162,188-194	E:2	57-70	18, 235
gbs0260	グリシル-tRNA シンターゼ (ベータサブユニット)	4-23,28-34,36-47,50-61,76-81,89-94,96-104,112-119,126-146,155-181,195-200,208-214,220-229,244-260,263-276,282-288,292-300,317-323,336-351,353-359,363-375,382-399,415-432,444-455,458-471,476-481,484-492,499-517,522-529,535-541,543-568,572-584,586-600,607-617,626-637,656-675	F:3	282-297	19, 236
gbs0268	トランスケトラゼ (lkt)	6-24,30-35,38-45,63-91,134-140,146-160,167-188,214-220,226-234,244-250,260-270,286-301,316-329,340-371,429-446,448-459,474-481,485-491,512-526,537-544,550-565,573-583,596-613,621-630,652-658	E:7	87-97	20, 237

10

20

30

40

【表 1 - C】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs0286	NH3-依存性 NAD ⁺ シンゼターゼ	8-20,26-48,56-67,76-86,94-109,115-121,123-129,143-160,178-186,191-198,201-208,221-236,238-244,260-268	E:12, G:7, H:8	237-247	21, 238
gbs0288	ペニシリン結合性タンパク質 1Aと類似	4-40,42-57,73-87,98-117,126-135,150-156,166-174,196-217,231-236,248-258,276-284,293-301,307-313,339-347,359-365,375-387,395-402,428-440,445-456,485-490,497-505,535-541,547-555,610-625,648-656,665-671	D:5, K:3	448-528	22, 239
gbs0343	セリル-tRNA シンゼターゼ (serS)	10-18,39-45,51-61,80-96,98-106,110-115,158-172,174-183,191-200,220-237,249-255,274-289,308-324,331-341,372-381,384-397,405-414	L:3	322-338	23, 240
gbs0411	仮想タンパク質	30-36,38-56,85-108,134-147,149-160,163-183,188-201,206-211,219-238,247-254	I:11	5-13	24, 241
gbs0428	フィブリノーゲン結合性タンパク質と類似, 推定 ペプチドグリカン結合タンパク質 (LPXTG モチーフ)	11-40,98-103,110-115,133-145,151-159,172-179,192-201,204-212,222-228,235-245,258-268,283-296,298-309,322-329,342-351,354-362,372-378,385-393,407-418,495-516	A:7, B:2, C:31	1-148	25, 242
gbs0437	グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ (pgi)	5-19,21-36,73-94,112-119,122-137,139-145,152-167,184-190,198-204,208-224,249-265,267-281,299-304,309-317,326-333,356-364,368-374,381-389,391-414,419-425,430-435	L:26	113-140	26, 243
gbs0460	デカルボキシラーゼ	45-54,59-67,78-91	L:7, K:11	15-23	27, 244
gbs0465	オキシドレダクターゼ	11-22,33-47,52-80,88-112,124-129	F:4	6-25	28, 245
gbs0470	アルファタンパク質と類似, 推定 ペプチドグリカン結合タンパク質 (LPXTG モチーフ)	26-41,51-63,80-89,93-115,150-163,187-193,220-237,240-249,286-294,296-306,316-329,345-353,361-370,407-425,428-437,474-482,484-494,504-517,533-541,549-558,595-613,616-625,660-668,673-685,711-726,736-744,749-761,787-802,812-820,825-837,863-878,888-896,901-913,939-954,964-972,977-989,1003-1008,1016-1022,1028-1034,1041-1053,1059-1074,1101-1122	B:4, C:2, D:8	420-511, 581-704	29, 246
gbs0489	アセチルトランスフェラーゼ, GNAT ファミリー	18-25,27-55,71-83,89-95,102-113,120-146,150-156,174-185	E:32	159-175	30, 247
gbs0492	gbs0492 バリル-tRNA シンゼターゼ	24-30,38-56,63-68,87-93,136-142,153-164,183-199,213-219,226-234,244-261,269-278,283-289,291-297,320-328,330-336,340-346,348-356,358-366,382-387,401-408,414-419,449-455,468-491,504-512,531-537,554-560,597-608,621-627,632-643,650-662,667-692,703-716,724-737,743-758,783-794,800-818,846-856	A:3	806-884	31, 248

10

20

30

40

【表 1 - D】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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 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)
gbs0538	アミノ酸 ABC トラン スポーター (ATP-結 合性 タンパク質)	4-14,21-39,86-92,99-107,121-131,136-144,147-154,158-16 6,176-185,193-199,207-222,224-230	G:1	117-136	32, 249
gbs0539	ホスホマンノムター ゼと類似	65-76,85-97,103-109,115-121,125-146,163-169,196-205,21 2-219,228-237,241-247,254-262,269-288,294-303,305-313, 328-367,395-401,405-412,418-429,437-447,481-488,506-5 13,519-524,530-541,546-557	K:4	266-284	33, 250
gbs0555	ベータ-ラクタム 抵抗 性因子 (fibA)	5-14,37-42,49-71,78-92,97-112,127-136,147-154,156-163,1 86-198,216-225,233-243,248-253,295-307,323-332,359-36 6,368-374,380-398	E:3	194-223	34, 251
gbs0579	ジペプチダーゼ	4-11,33-39,45-72,100-113,119-129,136-144,169-175,177-1 85,200-208,210-219,262-276,278-297,320-326,336-344,347 -362,381-394,443-453	L:4	438-454	35, 252
gbs0580	亜鉛 ABC トランスポ ーター, 亜鉛-結合性 接着, リボタンパク質	4-29,31-52,55-61,95-110,138-158,162-171,179-187,202-22 9,239-248,251-256,262-267,269-285,304-310,351-360,362- 368,381-388,415-428,435-440,448-458	L:11	161-178	36, 253
gbs0628	細胞壁 表面 アンカー ファミリー タンパク 質 (IPxTG)	4-17,19-28,32-43,47-59,89-110,112-126,128-134,140-148,1 52-161,169-184,191-204,230-235,255-264,328-338,341-34 7,401-409,413-419,433-441,449-458,463-468,476-482,486- 492,500-506,529-545	L:9, H:1	305-381	37, 254
gbs0632	細胞壁 表面 アンカー ファミリー タンパク 質, 推定 (FPKGTG モチ ーフ)	10-29,38-45,53-61,134-145,152-160,163-170,202-208,219- 229,248-258,266-275,282-288,315-320,328-334,377-385,39 2-402,418-424,447-453,460-471,479-487,491-497,500-507, 531-537,581-594,615-623,629-635,644-652,659-666,668-6 78,710-717,719-728,736-741,747-760,766-773,784-789,794 -800,805-817,855-861,866-887	H:3	698-715	38, 255
gbs0634	推定 表面 タンパク質	16-26,29-37,44-58,62-68,74-80,88-95,97-120,125-144,165- 196	H:1	58-72	39, 256
gbs0667	調節 タンパク質, 推 定, 切形	14-21,23-46,49-60,63-74,78-92,96-103,117-129,134-161,16 9-211,217-231,239-248,252-281,292-299,313-343	L:2	243-257	40, 257
gbs0672	転写制御因子 (GntR ファミリー)	11-27,46-52,67-72,76-84,91-112,116-153,160-175,187-196, 202-211,213-220	G:11	43-76	41, 258
gbs0687	仮想 タンパク質	5-29,37-56,78-86,108-118,152-161	L:4	120-130	42, 259

10

20

30

40

【表 1 - E】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs0785	ペニシリン結合性タンパク質 2B と類似	8-14,19-41,52-66,75-82,87-92,106-121,127-133,136-143,158-175,180-187,196-204,221-228,239-245,259-265,291-306,318-323,328-340,352-358,361-368,375-381,391-399,411-418,431-442,446-455,484-496,498-510,527-533,541-549,558-565,575-585,587-594,644-655,661-668,671-677	K:3	184-196	43, 260
gbs0811	ベータ-グルコシダーゼ	4-22,29-38,55-62,75-81,102-107,110-134,143-150,161-167,172-179,191-215,223-233,241-247,251-264,266-272,288-309,340-352,354-366,394-402,414-438	L:13	198-218	44, 261
gbs0828	仮想タンパク質	24-44,49-70,80-91,105-118,128-136,140-154	L:3	77-92	45, 262
gbs0851	仮想タンパク質	5-22,31-36,41-47,67-74,83-90,105-122,135-143,160-167	E:2	118-129	46, 263
gbs0865	仮想タンパク質	4-25,33-73,81-93,96-106,114-120,122-128,130-172,179-208,210-241,251-283,296-301	K:4	92-100	47, 264
gbs0890	エキソヌクレアーゼ RexB (rexB)	14-24,29-38,43-50,52-72,86-97,101-107,110-125,127-141,145-157,168-175,177-184,186-195,205-226,238-250,255-261,284-290,293-304,307-314,316-323,325-356,363-371,383-390,405-415,423-432,442-454,466-485,502-511,519-527,535-556,558-565,569-574,612-634,641-655,672-686,698-709,715-722,724-732,743-753,760-769,783-792,818-825,830-839,842-849,884-896,905-918,926-940,957-969,979-1007,1015-1021,1049-1057	E:5	336-349	48, 265
gbs0896	アセトインデヒドデヒドロゲナーゼと類似	6-16,26-31,33-39,62-73,75-85,87-100,113-123,127-152,157-164,168-181,191-198,208-214,219-226,233-254,259-266,286-329	K:2	181-195	49, 266
gbs0898	アセトインデヒドデヒドロゲナーゼ, チミン PPI 依存性	4-13,32-39,53-76,99-108,110-116,124-135,137-146,149-157,162-174,182-190,207-231,242-253,255-264,274-283,291-323,334-345,351-360,375-388,418-425,456-474,486-492,508-517,520-536,547-560,562-577	E:13, F:2, I:2, J:2	31-45, 419-443	50, 267
gbs0904	ホスホグルコムターゼ/ホスホマンノムターゼファミリータンパク質	15-26,30-37,42-49,58-90,93-99,128-134,147-154,174-179,190-197,199-205,221-230,262-274,277-287,300-314,327-333,343-351,359-377,388-396,408-413,416-425,431-446	L:3	246-256	51, 268
gbs0918	ヒスチジン三連構造タンパク質と弱く類似, 推定リポタンパク質	5-26,34-42,47-54,61-67,71-104,107-115,131-138,144-153,157-189,196-202,204-210,228-245,288-309,316-329,332-341,379-386,393-399,404-412,414-421,457-468,483-489,500-506,508-517,523-534,543-557,565-580,587-605,609-617,619-627,631-636,640-646,662-668,675-682,705-710,716-723,727-732,750-758,784-789,795-809,869-874	B:5, C:11, D:36, E:3, K:3	14-138, 166-286, 372-503, 674-696, 754-859	52, 269

10

20

30

40

【表 1 - F】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs0931	ピルビン酸 キナーゼ	5-17,32-38,40-47,80-89,113-119,125-137,140-154,157-163,170-177,185-199,213-225,228-236,242-248,277-290,292-305,323-333,347-353,364-370,385-394,399-406,423-433,441-451,462-474,477-487	E:78	116-124	53, 270
gbs0947	L-乳酸 デヒドロゲナーゼと類似	7-16,18-30,32-49,53-61,63-85,95-101,105-115,119-134,143-150,159-178,185-202,212-229,236-250,254-265,268-294	K:28	63-72	54, 271
gbs0948	DNA ジャイレース, A サブユニット (gyrA)	4-12,19-47,73-81,97-103,153-169,188-198,207-213,217-223,236-242,255-265,270-278,298-305,309-317,335-347,354-363,373-394,419-424,442-465,486-492,500-507,542-549,551-558,560-572,580-589,607-614,617-623,647-653,666-676,694-704,706-714,748-754,765-772,786-792,795-806	L:4	358-370	55, 272
gbs0969	未知プラスミドタンパク質と類似	18-28,30-38,40-46,49-55,69-78,82-98,104-134,147-153,180-190,196-202,218-236,244-261,266-273,275-286,290-295,301-314,378-387,390-395,427-434	E:3	290-305	56, 273
gbs0971	推定プラスミド複製タンパク質と類似	4-13,20-31,39-51,54-61,69-84,87-105,117-124	K:17	108-125	57, 274
gbs0972	仮想タンパク質	24-34,43-54,56-66,68-79	E:3	50-69	58, 275
gbs0983	プラスミドタンパク質と類似	5-43,71-77,102-131,141-148,150-156,159-186,191-207,209-234,255-268,280-286,293-299,317-323,350-357,363-372,391-397,406-418,428-435,455-465,484-497,499-505,525-531,575-582,593-607,621-633,638-649,655-673,684-698,711-725,736-741,743-752,759-769,781-793,813-831,843-853,894-905,908-916,929-946,953-963,970-978,1001-1007,1011-1033	D:11, E:2, F:2, J:10, K:10, L:46, M:3	165-178, 818-974	59, 276
gbs0986	表面抗原タンパク質, 推定ペプチドグリカン結合型	16-44,63-86,98-108,185-191,222-237,261-274,282-294,335-345,349-362,374-384,409-420,424-430,440-447,453-460,465-473,475-504,522-534,538-551,554-560,567-582,598-607,611-619,627-640,643-653,655-661,669-680,684-690,701-707,715-731,744-750,756-763,768-804,829-837,845-853,855-879,884-890,910-928	B:3, C:12, D:2, E:3, F:20, H:3, I:3, J:5, M:2	77-90, 144-212, 279-355, 434-536, 782-810, 875-902	60, 277
gbs0988	プラスミド表面排除タンパク質と類似, 推定ペプチドグリカン結合型タンパク質 (LPXTG モチーフ)	4-22,29-41,45-51,53-66,70-77,86-95,98-104,106-124,129-135,142-151,153-161,169-176,228-251,284-299,331-337,339-370,380-387,393-398,406-411,423-433,440-452,461-469,488-498,501-516,523-530,532-559,562-567,570-602,612-628,630-645,649-659,666-672,677-696,714-723,727-747	J:2	212-227	61, 278

10

20

30

40

【表 1 - G】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs0991	ATP-依存性 Clp プロテアーゼ, ATP-結合性 サブユニット ClpA	4-9,17-31,35-41,56-61,66-75,81-87,90-124,133-138,149-163,173-192,213-219,221-262,265-275,277-282,292-298,301-307,333-346,353-363,371-378,419-430,435-448,456-469,551-570,583-599,603-612	F:15	275-291	62, 279
gbs0993	プラスミドタンパク質と類似	28-34,53-58,72-81,100-128,145-154,159-168,172-189,217-225,227-249,256-263,299-309,322-330,361-379,381-388,392-401,404-417,425-436,440-446,451-464,469-487,502-511,543-551,559-564,595-601,606-612,615-626,633-642,644-650,664-670,674-684,692-701,715-723,726-734,749-756,763-771,781-787,810-843,860-869,882-889,907-917,931-936,941-948,951-958,964-971,976-993,1039-1049,1051-1065,1092-1121,1126-1132,1145-1151,1158-1173,1181-1192,1194-1208,1218-1223,1229-1243,1249-1254,1265-1279,1287-1297,1303-1320,1334-1341,1343-1358,1372-1382,1406-1417,1419-1425,1428-1434,1441-1448,1460-1473,1494-1504,1509-1514,1529-1550	B:2, F:2, J:4, K:2, M:7	654-669, 1400-1483	63, 280
gbs0995	仮想 タンパク質	10-16,20-25,58-65,97-109,118-132,134-146,148-155,186-195,226-233,244-262,275-284,295-310,317-322,330-339,345-351,366-375,392-403,408-415,423-430,435-444,446-457,467-479,486-499,503-510,525-537,540-585,602-612,614-623,625-634,639-645,650-669,700-707,717-724,727-739	H:3, I:39, J:3, M:3	205-230, 733-754	64, 281
gbs0997	仮想 タンパク質	5-22,37-43,72-81,105-113,128-133,148-160,188-194,204-230,238-245,251-257	D:2, F:52	194-213	65, 282
gbs0998	仮想 タンパク質	16-21,35-41,56-72,74-92,103-109	I:2	62-68	66, 283
gbs1001	仮想 タンパク質	4-15,17-82,90-104,107-159,163-170,188-221,234-245,252-265	G:8	220-235	67, 284
gbs1015	仮想 タンパク質	16-22,36-46,61-75,92-107,113-121,139-145,148-160	K:17	30-42	68, 285
gbs1035	保存 仮想 タンパク質	4-12,20-26,43-49,55-62,66-78,121-127,135-141,146-161,164-170,178-189,196-205,233-238,269-279,288-318,325-332,381-386,400-407	E:3	328-346	69, 286
gbs1041	仮想 タンパク質	5-12,31-49,57-63,69-79,89-97,99-114,116-127,134-142,147-154,160-173,185-193,199-204,211-222,229-236,243-249,256-274	L:2	58-68	70, 287
gbs1066	仮想 タンパク質	10-20,28-34,39-53,68-79,84-90,99-106	K:2	73-79	71, 288

10

20

30

40

【表 1 - H】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs1087	FbsA	14-37,45-50,61-66,77-82,93-98,109-114,125-130,141-146,157-162,173-178,189-194,205-210,221-226,237-242,253-258,269-274,285-290,301-306,316-332,349-359,371-378,385-406	A:7, B:2, C:4, E:277, G:523, J:25	34-307, 312-385	72, 289
gbs1103	ABC トランスポーター (ATP-結合性 タンパク質)	4-10,17-38,50-85,93-99,109-116,128-185,189-197,199-210,223-256,263-287,289-312,327-337,371-386,389-394,406-419,424-432,438-450,458-463,475-502,507-513,519-526,535-542,550-567	L:5	361-376	73, 290
gbs1116	キサンチンパーミターゼ (pbuX)	10-39,42-93,100-144,155-176,178-224,230-244,246-255,273-282,292-301,308-325,332-351,356-361,368-379,386-393,400-421	I:48	138-155	74, 291
gbs1126	プラスミド未知 タンパク質と類似	5-11,17-34,40-45,50-55,72-80,101-123,145-151,164-172,182-187,189-195,208-218,220-241,243-252,255-270,325-331,365-371,391-398,402-418,422-428,430-435,443-452,463-469,476-484,486-494,503-509,529-553,560-565,570-590,608-614,619-627,654-661,744-750,772-780,784-790,806-816,836-853,876-885,912-918,926-933,961-975,980-987,996-1006,1016-1028,1043-1053,1057-1062	E:2, K:3	994-1003, 1033-1056	75, 292
gbs1143	推定 ペプチドグリカン 結合 タンパク質 (LPXTG)	17-45,64-71,73-81,99-109,186-192,223-238,262-275,283-295,336-346,350-363,375-385,410-421,425-431,441-448,454-463,468-474,476-512,523-537,539-552,568-583,599-608,612-620,628-641,644-654,656-662,670-681,685-695,702-708,716-723,725-735,757-764,769-798,800-806,808-816,826-840,846-854,856-862,874-881,885-902,907-928	C:3, D:2, F:15, J:3	274-350, 443-513	76, 293
gbs1145	表面 排除 タンパク質 Sec10	4-22,29-41,45-51,53-61,70-76,85-92,99-104,111-122,134-140,142-154,163-174,224-232,255-265,273-279,283-297,330-335,337-348,356-367,373-385,391-396,421-431,442-455,475-485,493-505,526-538,544-561,587-599,605-620,622-651,662-670,675-681,687-692,697-712,714-735	C:2	252-262	77, 294
gbs1158	オキシドレダクターゼと類似	4-12,15-35,40-46,50-59,67-94,110-128,143-169,182-188,207-215,218-228,238-250	K:2	74-90	78, 295
gbs1165	システインデスルフラゼ (iscS-1)	9-18,42-58,78-85,88-95,97-106,115-122,128-134,140-145,154-181,186-202,204-223,261-267,269-278,284-293,300-336,358-368	F:5	12-29	79, 296
gbs1195	スタフィロキナーゼおよびストレプトキナーゼ	7-34,46-53,62-72,82-88,100-105,111-117,132-137,144-160,166-180,183-189,209-221,231-236,246-253,268-282,286-293,323-336,364-372,378-392,422-433	B:3, C:2, D:2, G:3, H:8	388-405	80, 297

10

20

30

40

【表 1 - I】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs1209	ATP-依存性 DNA ヘ リカーゼ PcrA	21-27,34-50,72-77,80-95,164-177,192-198,202-220,226-23 6,239-247,270-279,285-292,315-320,327-334,348-355,364- 371,388-397,453-476,488-497,534-545,556-576,582-588,60 1-607,609-616,642-662,674-681,687-697,709-715,721-727, 741-755	C:3, I:5	621-739	81, 298
gbs1214	保存 仮想 タンパク質	4-14,16-77,79-109	B:2	25-99	82, 299
gbs1242	CpsG, ベータ-1,4-ガ ラクトシルトランス フェラーゼ	4-9,17-23,30-37,44-55,65-72,77-93,102-121,123-132,146-1 53	L:24	17-29	83, 300
gbs1260	ABC トランスポート ー, ATP-結合性 タン パク質	4-18,25-41,52-60,83-92,104-112,117-123,149-155,159-167, 170-192,201-210,220-227,245-250	I:17	124-137	84, 301
gbs1270	gbs1270 ヒアルロン 酸リアーゼ	8-25,50-55,89-95,138-143,148-153,159-169,173-179,223-2 38,262-268,288-295,297-308,325-335,403-409,411-417,432- 446,463-475,492-501,524-530,542-548,561-574,576-593,6 04-609,612-622,637-654,665-672,678-685,720-725,731-73 9,762-767,777-783,820-838,851-865,901-908,913-920,958- 970,1000-1006,1009-1015,1020-1026,1043-1052,1055-106 1	C:19, D:5, L:19	1-128, 252-341, 771-793, 1043-1058	85, 302
gbs1305	仮想 タンパク質	16-26,33-46	I:2	64-76	86, 303
gbs1306	ラミニン 結合性 タン パク質	4-27,69-77,79-101,117-123,126-142,155-161,171-186,200- 206,213-231,233-244,267-273,313-329,335-344,347-370,37 4-379,399-408,422-443,445-453,461-468,476-482,518-534, 544-553,556-567,578-595,601-620,626-636,646-658,666-6 81,715-721,762-768,778-785,789-803,809-819	A:6, B:7, C:17, D:72, E:8, F:91, G:2, H:4, I:26, J:3, K:14	22-108, 153-318, 391-527, 638-757	87, 304
gbs1307	Lmb, ラミニン-結合 性 表面 タンパク質	6-21,32-43,62-92,104-123,135-141,145-152,199-216,218-2 26,237-247,260-269,274-283,297-303	A:2, D:3	1-72, 127-211	88, 305
gbs1308	C5a ペプチダーゼ, 真 正 フレームシフト	6-26,50-56,83-89,108-114,123-131,172-181,194-200,221-2 38,241-247,251-259,263-271,284-292,304-319,321-335,353- 358,384-391,408-417,424-430,442-448,459-466,487-500,5 14-528,541-556,572-578,595-601,605-613,620-631,635-64 8,660-670,673-679,686-693,702-708,716-725,730-735,749- 755,770-777,805-811,831-837,843-851,854-860,863-869,89 5-901,904-914,922-929,933-938,947-952,956-963,1000-10 05,1008-1014,1021-1030,1097-1103,1120-1130,1132-1140	B:4, C:15, D:70, E:18, F:26, G:5, H:4, J:2, K:40	1-213, 269-592, 992-1120	89, 306
gbs1309	仮想 タンパク質	9-16,33-39,47-59,65-79,81-95,103-108,115-123,138-148,16 3-171,176-185,191-196,205-211,213-221,224-256,261-276, 294-302,357-363,384-390	E:2, F:4, H:2, J:2	95-111, 161-189	90, 307

10

20

30

40

【表 1 - J】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs1311	トランスボザゼ, C-末端部分	21-27,35-45,70-76,92-105,129-143,145-155,161-166,170-191,204-211,214-231,234-246,249-255,259-275	F:3	1-18	91, 308
gbs1321	仮想 タンパク質	21-35,45-53,56-64,69-97	F:7	1-16	92, 309
gbs1352	推定 ヘリカーゼ およびメチラーゼ	25-33,41-47,61-68,86-101,106-114,116-129,134-142,144-156,163-176,181-190,228-251,255-261,276-292,295-305,334-357,368-380,395-410,424-429,454-460,469-482,510-516,518-527,531-546,558-570,579-606,628-636,638-645,651-656,668-674,691-698,717-734,742-754,765-770,792-797,827-835,847-859,874-881,903-909,926-933,942-961,964-977,989-1004,1010-1028,1031-1047,1057-1075,1081-1095,1108-1117,1138-1144,1182-1189,1193-1206,1220-1229,1239-1246,1257-1267,1271-1279,1284-1301,1312-1320,1329-1335,1341-1347,1358-1371,1399-1404,1417-1426,1458-1463,1468-1476,1478-1485,1493-1506,1535-1541,1559-1574,1583-1590,1595-1601,1603-1611,1622-1628,1634-1644,1671-1685,1689-1696,1715-1720,1734-1746,1766-1775,1801-1806,1838-1844,1858-1871,1910-1917,1948-1955,1960-1974,2000-2015,2019-2036,2041-2063	E:3, H:2, M:4	748-847, 1381-1391	93, 310
gbs1356	推定 ペプチドグリカン 結合 タンパク質 (LPXTG モチーフ) - アグルチニン受容体	5-12,18-24,27-53,56-63,96-113,119-124,131-136,157-163,203-209,215-223,233-246,264-273,311-316,380-389,393-399,425-433,445-450,457-462,464-470,475-482,507-513,527-535,542-548,550-565,591-602,607-613,627-642,644-664,673-712,714-732,739-764,769-782,812-818,826-838,848-854,860-871,892-906,930-938,940-954,957-973,990-998,1002-1021,1024-1033,1037-1042,1050-1060,1077-1083,1085-1092,1100-1129,1144-1161,1169-1175,1178-1189,1192-1198,1201-1207,1211-1221,1229-1239,1250-1270,1278-1292,1294-1300,1314-1335,1344-1352,1360-1374,1394-1405,1407-1414,1416-1424,1432-1452,1456-1462,1474-1497,1500-1510,1516-1522,1534-1542,1550-1559,1584-1603,1608-1627	C:5, D:62, I:22	187-273, 306-441	94, 311
gbs1376	ATP-依存性 Clp プロテイナーゼと類似 (ATP-結合性 サブユニット), ClpL	70-80,90-97,118-125,128-140,142-148,154-162,189-202,214-222,224-232,254-260,275-313,317-332,355-360,392-398,425-432,448-456,464-470,476-482,491-505,521-528,533-546,560-567,592-597,605-614,618-626,637-644,646-653,660-666,677-691	K:4	207-227	95, 312
gbs1377	ホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼと類似	5-19,26-34,37-55,57-66,69-83,86-102,115-134,138-143,154-172,178-195,209-246,251-257,290-302,306-311	M:2	256-266	96, 313

10

20

30

40

【表 1 - K】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs1386	ヒドロキシ-3-メチル グルタリル-コエンザ イム A シンターゼ	10-20,22-28,35-57,72-79,87-103,108-128,130-144,158-171,190-198,225-242,274-291,301-315,317-324,374-385	G:2	353-365	97, 314
gbs1390	仮想 タンパク質	4-9,17-30,34-54,59-66,73-94,118-130,135-150,158-171,189-198,219-239,269-275,283-301	E:3, K:4	89-106, 176-193	98, 315
gbs1391	仮想 タンパク質	14-20,22-74,77-86,89-99,104-109,126-135,154-165,181-195,197-212,216-224,264-275	E:3	107-118	99, 316
gbs1403	5'-スクレオチダーゼ と類似, 推定 ペプチ ドグリカン 結合型 タ ンパク質 (LPXTN)	4-18,21-38,63-72,101-109,156-162,165-179,183-192,195-210,212-218,230-239,241-256,278-290,299-311,313-322,332-341,348-366,386-401,420-426,435-450,455-460,468-479,491-498,510-518,532-538,545-552,557-563,567-573,586-595,599-609,620-626,628-636,652-657,665-681	A:3, C:12, D:4, J:2	1-198	100, 317
gbs1408	ABC トランスポー ターと類似 (ATP-結合 性 タンパク質)	4-10,16-38,51-68,73-79,94-115,120-125,132-178,201-208,216-223,238-266,269-295,297-304,337-342,347-356,374-401,403-422,440-447,478-504,510-516,519-530,537-544	D:2, K:4	191-206	101, 318
gbs1420	細胞壁 タンパク質と 類似, 推定 ペプチド グリカン 結合 タン パク質 (LPXTG モチー フ)	12-40,42-48,66-71,77-86,95-102,113-120,129-137,141-148,155-174,208-214,218-225,234-240,256-267,275-283,300-306,313-321,343-350,359-367,370-383,398-405,432-439,443-461,492-508,516-526,528-535	C:3, D:4	370-478	102, 319
gbs1429	仮想 タンパク質	6-14,20-37,56-62,90-95,97-113,118-125,140-145,161-170,183-202,237-244,275-284,286-305,309-316,333-359,373-401,405-412	B:2, C:2	176-187	103, 320
gbs1442	仮想 チアミン生合成 タンパク質, ThiI	33-44,50-55,59-80,86-101,129-139,147-153,157-163,171-176,189-201,203-224,239-245,257-262,281-287,290-297,304-320,322-331,334-350,372-390,396-401	L:28	71-88, 353-372	104, 321
gbs1452	rpIT 50S リボソーム タンパク質 L20	5-11,15-24,26-33,40-47,75-88,95-103,105-112	E:2	17-30	105, 322
gbs1464	フェリクローム ABC トランスポーター (パ ーミナーゼ)	5-11,16-39,46-54,62-82,100-107,111-124,126-150,154-165,167-183,204-238,245-295,301-313,316-335	F:4	8-16	106, 323
gbs1470	保存 仮想 タンパク質	4-19,34-48,69-74,79-107,115-127,129-135,143-153,160-169,171-182	I:4	142-153	107, 324
gbs1528	保存 仮想 タンパク質	4-30,65-74,82-106,110-120,124-132,135-140,146-175,179-184,190-196,217-223,228-233,250-267,275-292,303-315,322-332	I:7	174-186	108, 325

10

20

30

40

【表 1 - L】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs1529	推定 ペプチドグリカン 結合型 タンパク質 (LPXTG モチーフ)	9-16,29-41,47-57,68-84,87-109,113-119,162-180,186-193,195-201,203-208,218-230,234-243,265-271,281-292,305-312,323-332,341-347,349-363,368-374,383-390,396-410,434-440,446-452,455-464,466-473,515-522,529-542,565-570,589-600,602-613,618-623,637-644,1019-1027,1238-1244,1258-1264,1268-1276,1281-1292,1296-1302	C:2	883-936	109, 326
gbs1531	UvrB エキシヌクレアーゼ ABC 鎖 B	10-17,23-32,39-44,54-72,75-81,88-111,138-154,160-167,178-185,201-210,236-252,327-334,336-342,366-376,388-400,410-430,472-482,493-526,552-558,586-592,598-603,612-621,630-635,641-660	M:2	384-393	110, 327
gbs1533	グルタミン ABC トランスポーター, グルタミン-結合性 タンパク質	4-22,24-39,50-59,73-84,100-105,111-117,130-138,155-161,173-178,182-189,205-215,266-284,308-313,321-328,330-337,346-363,368-374,388-395,397-405,426-434,453-459,482-492,501-507,509-515,518-523,527-544,559-590,598-612,614-629,646-659,663-684,686-694,698-721	E:4	445-461	111, 328
gbs1536	仮想 タンパク質	14-22,27-33	E:10	3-17	112, 329
gbs1542	オキシドレダクターゼ, アルド/ケトレダクターゼ ファミリー	29-41,66-73,81-87,90-108,140-146,150-159,165-184,186-196,216-226,230-238,247-253,261-269	E:13	126-140	113, 330
gbs1547	小 タンパク質, SmpB	5-12,16-25,27-33,36-45,60-68,83-88,103-126	L:11	86-101	114, 331
gbs1565	仮想 タンパク質	14-23,36-47,56-66,84-89,94-105,111-127,140-153,160-174,176-183,189-203,219-225,231-237,250-257	F:2, J:2, K:8, L:21	194-227	115, 332
gbs1586	ペプチジル-プロリルシス・トランスイソメラーゼ, シクロフィリン型	4-25,54-60,64-71,73-82,89-106,117-124,157-169,183-188,199-210,221-232,236-244,255-264	E:3	58-98	116, 333
gbs1591	5-メチルチオアデノシンヌクレオシダーゼ/S-アデノシルホモシステインヌクレオシダーゼ (pfs)	13-19,26-36,41-53,55-71,77-84,86-108,114-135,157-172,177-183,187-194,208-213,218-226	I:18, L:2	110-125, 156-170	117, 334
gbs1632	分枝鎖 アミノ酸 ABC トランスポーターと類似, アミノ酸-結合性 タンパク質	5-24,63-69,77-85,94-112,120-137,140-146,152-159,166-172,179-187,193-199,206-212,222-228,234-240,244-252,257-264,270-289,298-309,316-328,337-348,363-375	B:2, E:4, I:3	1-56, 340-352	118, 335
gbs1638	アミノ酸 パーマターゼ	18-39,42-71,78-120,124-144,152-173,179-189,199-209,213-222,228-258,269-304,329-361,364-372,374-389,396-441	E:8, G:9, H:9	313-327	119, 336

10

20

30

40

【表 1 - M】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs1662	保存 仮想 タンパク質	19-25,91-98,108-120,156-162,168-174,191-204,211-216,232-266,272-278,286-308,316-321,327-333,344-355,358-364,384-391,395-428,464-476,487-495,497-511,544-561,563-573,575-582,588-594	E:3, H:2	10-25, 322-338	120, 337
gbs1666	SWI/SNF ファミリー ヘリカーゼ	14-26,32-49,51-57,59-72,80-91,102-112,119-125,147-161,164-173,175-183,188-213,217-222,246-254,260-276,282-303,308-318,321-328,333-350,352-359,371-378,392-401,407-414,416-443,448-463,471-484,490-497,501-514,519-527,539-551,557-570,578-590,592-598,600-610,618-629,633-647,654-667,676-689,702-709,718-726,728-737,741-760,764-780,786-795,808-826,836-842,845-852,865-874,881-887,931-945,949-957,968-974,979-986,1003-1009,1023-1029	F:4	90-103	121, 338
gbs1673	保存 仮想 タンパク質	11-16,37-56,60-66,69-77,80-88,93-106,117-139,166-171	E:2	72-90	122, 339
gbs1695	ジヒドロキシアセトン キナーゼ ファミリー タンパク質	59-84,123-133,145-150,161-167,178-189	I:8	115-128	123, 340
gbs1754	エキシヌクレアーゼ ABC, A サブユニット (uvrA)	15-33,39-46,52-64,74-87,108-124,127-144,150-156,173-179,184-194,201-208,219-236,243-269,272-295,302-309,343-349,356-361,370-379,405-411,414-423,430-451,457-464,466-475,477-483,496-502,507-522,541-548,557-563,571-577,579-585,590-605,626-642,650-662,671-691,704-710,751-769,775-781,786-791,794-829,851-858,868-878,884-904,913-919,931-939	I:2	132-142	124, 341
gbs1760	A/G-特異的アデニン グリコシラーゼと類似	33-58,64-71,74-80,83-88,96-120,122-139,146-157,167-177,207-213,220-225,236-242,264-279,300-305,326-336,340-347,350-360	K:8	97-115, 199-211	125, 342
gbs1777	グリセロール取り込み 促進因子 タンパク質, 推定	4-26,43-57,70-99,102-117,121-133,142-148,151-168,170-183,192-220,235-249,258-279	E:4	30-41	126, 343
gbs1783	ポリプレニル シンセターゼ ファミリー タンパク質	34-42,48-58,70-94,110-130,154-160,164-172,178-183,195-203,211-222,229-250,256-261,274-284,286-292,312-323	I:3	222-233	127, 344
gbs1784	ABC トランスポーター, ATP-結合性 タンパク質 CydC	4-9,15-36,38-45,49-74,78-88,100-112,136-191,211-220,226-233,239-246,254-274,287-307,316-322,342-353,356-366,373-378,384-393,405-431,449-457,459-468,487-511,515-524,529-541,544-552,562-568,571-576	C:2, D:2	208-280	128, 345
gbs1790	仮想 タンパク質	10-27,31-37,39-54,71-108,124-143	A:23, C:6	2-107	129, 346

10

20

30

40

【表 1 - N】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs1805	分泌未知タンパク質と類似	16-27,38-57,64-70,90-102,104-113,116-137,160-166	A:197, C:2	1-80	130, 347
gbs1816	HD ドメインタンパク質	13-21,31-36,56-67,127-136,153-171,173-180,184-200,214-222,225-231,239-263,267-273	F:8	135-159	131, 348
gbs1821	23S リボソーム RNA メチルトランスフェラーゼと類似	12-27,31-51,68-74,77-87,94-101,108-114,117-123,127-134,138-168,173-196,201-207,212-217,227-237,247-257,264-280	K:5	205-223	132, 349
gbs1823	三連構造ファミリータンパク質	17-22,25-54,70-76,92-100	G:6, H:3	98-110	133, 350
gbs1834	二成分センサーヒスチジンキナーゼ	7-29,40-50,60-67,87-96,105-111,119-164,172-199,206-212,220-227,237-259,272-279,282-293,295-309,313-319,321-328,345-363,376-386	E:3, F:6	159-176	134, 351
gbs1842	転写抗ターミネーター, BglG ファミリー	4-19,24-30,36-43,50-68,71-89,93-106,141-152,154-172,179-197,199-215,229-239,246-252,255-263,281-298,319-325,329-356,358-368,374-390,397-409,420-429,432-444,450-456,459-475,483-494,496-502,520-528,532-556	I:19	362-377	135, 352
gbs1850	仮想トランスアルドラーゼ	18-25,40-62,77-85,91-97,105-116,123-133,139-184,189-197	G:2	122-140	136, 353
gbs1869	ホスホグリセリン酸キナーゼ	4-49,52-58,62-70,79-105,109-133,142-150,163-168,206-214,220-228,233-240,243-254,274-281,303-311,327-338,357-373,378-396,403-413,420-436,441-453,461-467,475-481,484-498,506-512,514-521,523-529,562-579,589-595,598-603,615-648,714-722,728-742,749-758,777-792,795-807	L:9	643-658	137, 354
gbs1875	アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ (大サブユニット) および NADH デヒドロゲナーゼ	8-27,37-48,51-56,72-79,87-106,120-138,140-147,167-176,187-197,205-216,222-229,234-239,243-249,277-288,292-315,334-343,347-353,363-391,398-404,430-447,461-467,478-492,498-507	F:3	456-470	138, 355
gbs1879	エンドペプチダーゼ O (pepO)	5-12,18-24,59-69,80-93,95-109,119-125,130-137,139-147,158-163,168-176,182-202,206-215,222-239,241-249,267-277,291-298,311-318,321-327,338-344,348-355,373-386,393-406,411-417,434-443,446-465,473-484,514-521,532-553,584-594	I:26	221-237	139, 356
gbs1893	2-ケト-3-デオキシグルコン酸キナーゼ	4-14,27-34,50-58,63-72,79-106,109-114,121-142,146-154,161-167,169-175,178-201,223-238,249-254,259-264,278-292,294-312,319-330	F:8, K:9	167-191	140, 357

10

20

30

40

【表 1 - O】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs1899	N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ, ファミリー 4 タンパク質	7-28,36-42,50-61,63-80,122-152,161-174,176-191	B:2, C:2, E:3	140-190	141, 358
gbs1907	クエン酸 キヤリアタンパク質, CCS ファミリー	20-57,59-65,70-78,86-102,119-133,142-161,163-173,177-188,192-202,204-220,222-236,240-253,279-319,326-331,337-383,390-399,406-412,420-427,431-438	I:2	381-395	142, 359
gbs1924	肺炎球菌 ヒスチジン三連構造 タンパク質 B 前駆体 (C-末端部分)と類似	13-18,28-34,37-43,50-59,75-81,83-97,105-121,139-147,200-206,209-227,231-247,260-271,318-327,366-381,388-394,399-406	K:3	182-201	143, 360
gbs1925	肺炎球菌 ヒスチジン三連構造 タンパク質 B 前駆体 (N-末端部分)と類似	6-29,37-43,51-56,70-77,82-102,110-119,127-143,178-190,201-209,216-243,261-269,281-292,305-313,327-339,341-354,356-373,391-397,423-429,438-445,450-478	A:2, B:5, C:12, D:57	21-314	144, 361
gbs1962	保存 仮想 タンパク質	4-12,15-21,32-41,59-76,80-89,96-104	E:3	90-103	145, 362
gbs2008	C5A ペプチダーゼと類似, 推定 ペプチドグリカン 結合 タンパク質 (LPXTG モチーフ)	9-28,30-41,44-54,69-74,77-82,90-97,104-123,125-135,149-155,164-173,177-184,217-226,230-235,238-244,258-272,282-297,300-305,309-315,317-322,327-336,348-362,368-374,380-387,400-411,414-424,451-458,460-466,483-494,497-503,506-511,521-528,540-553,569-587,598-606,628-642,661-681,688-700,718-733,740-749,752-764,769-783,823-834,848-854,862-872,878-884,886-898,915-920,938-951,954-961,963-972,982-989,996-1003,1010-1016,1021-1032,1038-1044,1047-1057,1060-1070,1079-1088,1094-1102,1117-1127,1129-1135,1142-1153,1158-1204,1212-1229,1234-1263,1269-1277,1308-1313,1327-1338,1344-1376,1400-1415,1436-1443,1448-1458,1497-1504,1511-1522,1544-1566	A:253, B:2, C:3, D:6, H:2	3-82, 509-576	146, 363
gbs2018	推定 ペプチドグリカン 結合 タンパク質 (LPXTG モチーフ)	8-36,40-64,71-79,88-94,102-109,118-127,138-148,151-159,163-174,192-198,200-206,220-233,268-273,290-301,304-309,316-323,331-349,378-391,414-420,427-437,455-475,494-510,541-547,549-555,616-640	A:132, B:6, C:13, D:63, E:15, H:2, J:9, K:13	1-60, 55-139, 212-308, 386-458, 458-624	147, 364
gbs2029	仮想 タンパク質	16-31,35-42,70-77,91-101,120-130,132-140,143-153,185-190,195-202,215-222,228-238,241-251,257-264,268-277,288-302,312-324,326-333,341-348,364-382,415-429,438-454,458-466,491-499,501-521	G:8	273-281	148, 365

10

20

30

40

【表 1 - P】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs2042	仮想 タンパク質	8-14,32-57,74-149,155-177,179-212,221-266,271-296,304-324,329-346,349-359,368-401,413-419,426-454,465-478,493-510	L:11	466-490	149, 366
gbs2054	DNA ミスマッチ修復タンパク質 HexA	22-28,33-51,64-89,96-119,126-132,138-146,152-159,161-169,172-179,193-198,205-211,221-231,235-254,273-280,297-303,312-320,328-346,351-373,378-384,391-398,448-454,460-468,470-481,516-558,574-593,597-602,613-623,626-646,649-656,668-673,675-683,696-708,715-722,724-739,745-751,759-777,780-804,816-822	E:8	102-113	150, 367
gbs2058	仮想 タンパク質	12-28,41-91,98-107,112-120,125-131,151-193,215-221,240-250,263-280	L:3	128-138	151, 368
gbs2060	アスパルチル-tRNA シンゼターゼ (aspS)	16-24,32-38,46-62,68-81,90-105,127-133,144-150,160-166,178-184,186-202,210-219,232-240,252-258,264-273,293-324,337-344,349-357,360-369,385-398,410-416,419-427,441-449,458-476,508-515,523-539,544-549,562-569,571-579	L:3, L:12	96-109, 127-139	152, 369
gbs2075	仮想 タンパク質	19-25,28-34,56-61,85-97,110-116	M:2	39-53	153, 370
gbs2106	未知機能のタンパク質/リポタンパク質, 推定	4-37,41-50,62-72,91-97,99-109,114-125,136-141,149-158,160-166,201-215	A:5, B:6, C:4, D:14, E:11, F:8, K:23	27-225	154, 371
gbs2118	イノシンモノホスフェート デヒドロゲナーゼと類似	15-31,44-51,96-105,122-130,149-157,162-168,178-183,185-192,198-204,206-213,221-234,239-245,248-255,257-266,289-335,349-357,415-422,425-441,448-454,462-468	K:17	463-481	155, 372
gbs2131	ABC トランスポーター, パーミターゼ タンパク質, 推定	5-31,39-55,63-72,76-99,106-155,160-177,179-199,207-217,223-240,245-255,261-267,294-316,321-343,354-378,382-452,477-488,529-536,555-569,584-591,593-612,620-627,632-640,647-654,671-680,698-704,723-730,732-750,769-775,781-788,822-852	L:2	505-525	156, 373
ARF0112	仮想 タンパク質	無し	F:6	3-18	157, 374
ARF0147	仮想 タンパク質	4-14	E:3, I:3	12-24	158, 375
ARF0532	仮想 タンパク質	4-11,22-30	F:10	12-25	159, 376
ARF0534	仮想 タンパク質	5-12	E:2, G:2	4-18	160, 377
ARF0557	仮想 タンパク質	4-28	E:2, G:6, H:4	7-14	161, 378
ARF0862	仮想 タンパク質	6-16	G:7, H:4	8-16	162, 379
ARF0891	仮想 タンパク質	4-15,18-33	K:6	24-36	163, 380
ARF0895	仮想 タンパク質	4-10,16-21	I:21	20-31	164, 381
ARF0943	仮想 タンパク質	無し	C:2, K:9	6-19	165, 382

10

20

30

40

【表 1 - Q】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
ARF0973	仮想 タンパク質	11-18	D:2, G:3, H:8, I:2, K:2	3-10	166, 383
ARF0999	仮想 タンパク質	13-24	B:4, K:3	3-15	167, 384
ARF1010	仮想 タンパク質	15-27	K:2	7-16	168, 385
ARF1230	仮想 タンパク質	11-16	K:11	1-15	169, 386
ARF1503	仮想 タンパク質	4-16	E:13	9-21	170, 387
ARF1556	仮想 タンパク質	4-24,40-48,54-67	F:2	22-39	171, 388
ARF1585	仮想 タンパク質	6-30,34-55,62-68,78-106	I:5, J:4	68-74	172, 389
ARF1588	仮想 タンパク質	無し	I:2	3-14	173, 390
ARF1735	仮想 タンパク質	9-19	I:13	6-21	174, 391
ARF1809	仮想 タンパク質	4-17	H:2, L:17	1-9	175, 392
ARF1826	仮想 タンパク質	5-30	I:6	1-8	176, 393
ARF1882	仮想 タンパク質	4-16,23-46,51-56	K:23	45-55	177, 394
ARF1996	仮想 タンパク質	無し	F:3	7-16	178, 395
CRF0123	仮想 タンパク質	無し	F:32	2-14	179, 396
CRF0180	仮想 タンパク質	4-36,43-65	E:6, G:6, H:12	50-62	180, 397
CRF0208	仮想 タンパク質	10-30	I:2	14-21	181, 398
CRF0258	仮想 タンパク質	9-17	I:2	1-10	182, 399
CRF0285	仮想 タンパク質	4-12	F:2	3-16	183, 400
CRF0311	仮想 タンパク質	4-15	H:4	5-23	184, 401
CRF0446	仮想 タンパク質	無し	L:20	10-21	185, 402
CRF0455	仮想 タンパク質	無し	F:5	6-16	186, 403
CRF0491	仮想 タンパク質	4-29,31-38	G:4	2-14	187, 404
CRF0520	仮想 タンパク質	4-35	H:4	33-42	188, 405
CRF0530	仮想 タンパク質	無し	G:13, H:8, K:3	32-17	189, 406
CRF0570	仮想 タンパク質	9-18,30-35	I:2	15-33	190, 407
CRF0649	仮想 タンパク質	4-9	G:8, H:6	6-12	191, 408
CRF0853	仮想 タンパク質	無し	I:6	3-17	192, 409
CRF0955	仮想 タンパク質	12-21,37-44,52-61,72-80	E:7, L:44	38-48	193, 410
CRF0983.1	仮想 タンパク質	4-10,29-44,54-61,69-78	K:59	13-27	194, 411
CRF0983.2	仮想 タンパク質	13-23,36-53	L:33	2-15	195, 412
CRF1083	仮想 タンパク質	4-25,28-46,56-72,81-99,120-132,134-142,154-160	F:18	129-141	196, 413
CRF1095	仮想 タンパク質	4-15,24-33,35-41,64-86	L:15	21-33	197, 414
CRF1212.1	仮想 タンパク質	9-15	I:5	4-13	198, 415
CRF1212.2	仮想 タンパク質	4-11,13-19,34-48	L:30	15-32	199, 416
CRF1290	仮想 タンパク質	4-21	I:7	11-31	200, 417

10

20

30

40

【表 1 - R】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
CRF1383	仮想 タンパク質	23-57	K:13	38-50	201, 418
CRF1416	仮想 タンパク質	4-32	E:16, J:7	3-13	202, 419
CRF1500	仮想 タンパク質	4-10,13-25,32-42,56-68,72-84	E:16	26-38	203, 420
CRF1513	仮想 タンパク質	4-20,31-48,52-58,65-71,80-93,99-108,114-123	I:2	37-49	204, 421
CRF1518	仮想 タンパク質	6-12,14-20	F:28	3-25	205, 422
CRF1663	仮想 タンパク質	14-25,27-38	F:10	5-14	206, 423
CRF1667	仮想 タンパク質	4-41,57-105,109-118,123-136,144-152	G:4	86-99	207, 424
CRF1832	仮想 タンパク質	無し	E:5, L:8	6-19	208, 425
CRF1866	仮想 タンパク質	無し	G:3, H: 18	2-19	209, 426
CRF1892	仮想 タンパク質	14-47	L:11	1-14	210, 427
CRF1942	仮想 タンパク質	4-21,29-44	F:14	2-18	211, 428
CRF1992	仮想 タンパク質	23-29	K:10	10-28	212, 429
CRF2047	仮想 タンパク質	6-16,22-36	K:9	11-22	213, 430
CRF2050	仮想 タンパク質	4-19,30-44	I:2	18-27	214, 431
CRF2096	仮想 タンパク質	5-15,37-45,58-65	G:2	38-47	215, 432
CRF2113	仮想 タンパク質	4-15,23-34	I:5	4-15	216, 433
NRF1311	トランスボザーゼ, C-末端部分	30-36,44-54,79-85,101-114,138-152,154-164,170-175,179-200,213-220,223-240,243-255,258-264,268-284	F:3	10-28	217, 434

【 0 2 9 6 】

表1B: 細菌表面ディスプレイによって同定されたペプチドとのアミノ酸配列同一性によって同定された免疫原性タンパク質

10

20

30

【表 1 - S】

ストレプト コッカス・ アガラクテ イエ抗原性 タンパク質 (新規)	同一領域	ペプチド配列	ペプチド名	BSDによっ て同定された タンパク質	免疫原性領域 (aa)	配列番号 (DNA, タ ンパク 質)
gbs0384	210 - 226 738 - 753	MEYKGNFSQKTINRFKS QTQRSGKINTDFMRQL	gbs0995.1 gbs0995.2	gbs0995 gbs0995	210 - 226 738 - 753	435, 449
gbs0393	326 - 344 326 - 348 338 - 354 371 - 392 801 - 809 877 - 901	VKTIGYGKLTGKVNHHYVA VKTIGYGKLTGKVNHHYVANKDG VNHHYVANKDGSVTAFV AAVNQNIVFRVLTkdGRPIFEK TVIKKGTNL VTHHTEKSKPVEPQKATPKAPAKGL	gbs0986.2 gbs1143.1 gbs0986.3 gbs1143.2 gbs0986.4 gbs0986.5	gbs0986 gbs1143 gbs0986 gbs1143 gbs0986 gbs0986	326 - 344 327 - 349 338 - 354 372 - 393 801 - 809 877 - 901	436, 450
gbs0396	893 - 906	RQELLPTQLSKLQ	gbs0983.1	gbs0983	893 - 906	437, 451
gbs0407	51 - 69	VRYDKLEALVAYHGAKSAS	gbs0972.1	gbs0972	51 - 69	438, 452
gbs0408	110 - 125	HQPNRIYLTdKLVPYI	gbs0971.1	gbs0971	110 - 125	439, 453
gbs0410	291 - 305	QSIKQHDKEKLRTVL	gbs0969.1	gbs0969	291 - 305	440, 454
gbs0714	210 - 226 738 - 753	MEYKGNFSQKTINRFKS QTQRSGKINTDFMRQL	gbs0995.1 gbs0995.2	gbs0995 gbs0995	210 - 226 738 - 753	441, 455
gbs0723	326 - 344 326 - 348 338 - 354 371 - 392 801 - 809 877 - 901	VKTIGYGKLTGKVNHHYVA VKTIGYGKLTGKVNHHYVANKDG VNHHYVANKDGSVTAFV AAVNQNIVFRVLTkdGRPIFEK TVIKKGTNL VTHHTEKSKPVEPQKATPKAPAKGL	gbs0986.2 gbs1143.1 gbs0986.3 gbs1143.2 gbs0986.4 gbs0986.5	gbs0986 gbs1143 gbs0986 gbs1143 gbs0986 gbs0986	326 - 344 327 - 349 338 - 354 372 - 393 801 - 809 877 - 901	442, 456
gbs0726	893 - 906	RQELLPTQLSKLQ	gbs0983.1	gbs0983	893 - 906	443, 457
gbs0737	51 - 69	VRYDKLEALVAYHGAKSAS	gbs0972.1	gbs0972	51 - 69	444, 458
gbs0738	110 - 125	HQPNRIYLTdKLVPYI	gbs0971.1	gbs0971	110 - 125	445, 459
gbs0740	291 - 305	QSIKQHDKEKLRTVL	gbs0969.1	gbs0969	291 - 305	446, 460
gbs0897	32 - 44	EGDVLLEIMSDKT	gbs0898.1	gbs0898	32 - 44	447, 461
gbs0966	399 - 410	PGLTVEEKFTVF	gbs0144.1	gbs0144	420 - 431	448, 462

10

20

【 0 2 9 7 】

表2. ヒト血清によるエピトープ血清学

【表 2】

ペプチド	陽性	aa from	aa to	配列番号
gbs0012.1	++	120	143	218
gbs0012.2	+	138	161	218
gbs0012.3	+	156	179	218
gbs0016.2	+++	110	129	219
gbs0016.3	+	168	184	219
gbs0048.1	+	74	90	222
gbs0053.1	+++	759	773	223
gbs0061.1	+++	237	260	224
gbs0084.1	+	265	284	225
gbs0107.1	++	65	74	226
gbs0108.1	++	41	50	227
gbs0123.1	+	163	174	229
gbs0127.1	++	26	37	230
gbs0183.1	+	174	189	232
gbs0235.1	++	240	256	234
gbs0260.1	+	285	297	236
gbs0286.1	+	238	247	238
gbs0288.1	+	491	519	239
gbs0437.1	++	114	140	243
gbs0539.1	+	267	284	250
gbs0579.1	+	439	453	252
gbs0580.1	++	162	178	253
gbs0628.1	++	347	364	254
gbs0632.1	+++	699	715	255
gbs0634.1	+	60	71	256
gbs0667.1	++	244	257	257
gbs0672.1	+	44	63	258
gbs0672.2	+	57	76	258
gbs0785.1	+	185	196	260
gbs0851.1	+	119	129	263
gbs0896.1	++	182	195	266
gbs0898.1	++	32	44	267
gbs0898.2	+	424	442	267
gbs0904.1	+	247	256	268
gbs0918.1	++	678	694	269
gbs0918.2	+	785	805	269
gbs0918.4	+	55	77	269
gbs0918.5	+++	72	94	269
gbs0995.1	+	210	226	281
gbs1087.3	+	37	59	289
gbs1165.1	+	13	29	296
gbs1816.1	+	136	159	348
gbs1821.1	+	205	222	349
gbs1823.1	+	99	110	350
gbs1834.1	+	160	176	351
gbs1875.1	+	457	470	355
gbs1879.1	+	221	237	356
gbs1893.1	+	167	190	357
gbs1925.1	+	96	120	361
gbs2018.3	+++	399	417	364
gbs2018.4	+++	503	519	364
gbs2018.5	+++	544	563	364
gbs2106.2	+	46	68	371
gbs2106.7	+	159	183	371
gbs2106.8	+	184	198	371
gbs2118.1	++	463	481	372

10

20

30

40

【 0 2 9 8 】

表3: ストレプトコッカス・アガラクティエ株における遺伝子分布

50

【表 3 - 1】

ORF	一般名	遺伝子分布 (50存在)	アミノ酸置換 (血清型 IA株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
gbs0012	ベータ・ラクタマーゼと弱い類似	44/44	n.d.	1, 218
gbs0016	グルカン結合 タンパク質 B (S.突然変異体)	40/44	0/224	2, 219
gbs0024	ホスホリボシルホルミルグリシンアミジン	46/46	10/228	3, 220
gbs0031	表面免疫原性 タンパク質	46/46	1/225	4, 221
gbs0048	未知	30/46	0/61	5, 222
gbs0053	アルデヒド-アルコール デヒドロゲナーゼ (adhE)	45/45	0/224	6, 223
gbs0061	rpIB リボソーム タンパク質 L2	46/46	0/218	7, 224
gbs0084	DNA-指向 RNA ポリメラーゼ, アルファ サブユニット (rpoA)	45/45	0/207	8, 225
gbs0107	保存 仮想 タンパク質	46/46	0/235	9, 226
gbs0108	デオキシウリジン 5'-トリホスフェートヌクレオチドヒドロラーゼ	44/44	0/125	10, 227
gbs0113	リボース ABC トランスポーター	44/45	0/227	11, 228
gbs0123	アルギニノコハク酸 シンターゼと類似	44/44	0/184	12, 229
gbs0127	rpmV 50S リボソーム タンパク質 L28	46/46	0/40	13, 230
gbs0144	オリゴペプチド ABC トランスポーター, 基質結合性	45/45	0/282	14, 231
gbs0183	膜 タンパク質, 推定	44/44	0/223	15, 232
gbs0184	オリゴペプチド ABC トランスポーター, オリゴペプチド-結合性	46/46	1/203	16, 233
gbs0235	グリシン ベタイン/カルニチン/コリン ABC トランスポーター	46/46	0/219	17, 234
gbs0255	保存 仮想 タンパク質	46/46	0/180	18, 235
gbs0260	グリシル-tRNA シンセターゼ (ベータ サブユニット)	46/46	0/209	19, 236
gbs0268	トランスケトララーゼ (tkt)	46/46	0/208	20, 237
gbs0286	NH3-依存性 NAD+ シンセターゼ	45/45	0/191	21, 238
gbs0288	ペニシリン-結合性 タンパク質 1Aと類似	45/45	0/212	22, 239
gbs0343	セリル-tRNA シンセターゼ (serS)	46/46	0/228	23, 240
gbs0428	フィブリノーゲン 結合性 タンパク質と類似, 推定 ペプチドグリカン 結合 タンパク質 (LPXTG モチーフ)	45/46	1/126	25, 242

10

20

30

40

【表 3 - 2】

ORF	一般名	遺伝子分布 (50存在)	アミノ酸置換 (血清型 IA株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
gbs0437	グルコース-6-ホスフェート イソメラーゼ (pgi)	45/45	0/232	26, 243
gbs0460	デカルボキシラーゼ	46/46	1/81	27, 244
gbs0465	オキシドレダクターゼ	46/46	0/126	28, 245
gbs0489	アセチルトランスフェラーゼ, GNAT ファミリー	45/45	3/144	30, 247
gbs0492	gbs0492 バリル-tRNA シンゼターゼ	44/44	3/125	31, 248
gbs0538	アミノ酸 ABC トランスポーター (ATP-結合性 タンパク質)	46/46	0/214	32, 249
gbs0539	ホスホマンノムターゼと類似	46/46	0/244	33, 250
gbs0555	ペーテ-ラクタム 抵抗性因子 (fibA)	46/46	0/218	34, 251
gbs0579	ジペプチダーゼ	46/46	0/218	35, 252
gbs0580	亜鉛 ABC トランスポーター, 亜鉛-結合性 接着リボタンパク質	45/45	2/235	36, 253
gbs0628	細胞壁 表面 アンカー ファミリー タンパク質 - (IPxTG)	42/44	0/219	37, 254
gbs0632	細胞壁 表面 アンカー ファミリー タンパク質, 推定 (FPK1G モチーフ)	44/45	0/238	38, 255
gbs0667	調節 タンパク質, 推定, 切形	44/44	0/229	40, 257
gbs0672	転写制御因子 (GntR ファミリー)	43/43	0/203	41, 258
gbs0687	未知 タンパク質	45/45	0/149	42, 259
gbs0785	ペニシリン 結合性 タンパク質 2Bと類似	45/45	0/218	43, 260
gbs0828	未知 タンパク質	46/46	1/120	45, 262
gbs0851	仮想 タンパク質	46/46	0/140	46, 263
gbs0865	gbs0865 未知	44/44	0/241	47, 264
gbs0890	エキソヌクレアーゼ RxB (rxB)	46/46	0/232	48, 265
gbs0896	アセトインデヒドロゲナーゼと類似	46/46	0/239	49, 266
gbs0898	アセトインデヒドロゲナーゼ, チミン PPI 依存性	45/45	0/180	50, 267
gbs0904	ホスホグルコムターゼ/ホスホマンノムターゼ ファミリー タンパク質	46/46	0/169	51, 268
gbs0918	ヒスチジン三連構造 タンパク質と弱く類似, 推定 リボタンパク質	45/45	1/209	52, 269
gbs0931	ビルビン酸 キナーゼ	46/46	0/185	53, 270
gbs0947	L-乳酸 デヒドロゲナーゼと類似	46/46	0/233	54, 271
gbs0948	DNA ジャイレース, A サブユニット (gyrA)	44/44	0/172	55, 272
gbs1035	保存 仮想 タンパク質	46/46	0/210	69, 286

10

20

30

40

【表 3 - 3】

ORF	一般名	遺伝子分布 (50存在)	アミノ酸置換 (血清型 1A株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
gbs1066	gbs1066 未知	17/46	2/92	71, 288
gbs1087	高度に反復性のペプチドグリカン 結合型タンパク質 (LPXTG モチーフ)	42/45	n.d.	72, 289
gbs1103	ABC トランスポーター (ATP-結合性 タンパク質)	46/46	1/165	73, 290
gbs1116	キサンチンパーミターゼ (pbuX)	45/45	1/170	74, 291
gbs1158	オキシドレダクターゼと類似	44/44	1/170	78, 295
gbs1165	システインデスルフラゼ (iscS-1)	43/43	0/148#	79, 296
gbs1195	スタフィロキナーゼ およびストレプトキナーゼ	45/45	60/142	80, 297
gbs1209	ATP-依存性 DNA ヘリカーゼ PcrA	43/44	1/94#	81, 298
gbs1214	保存 仮想 タンパク質	43/46	0/97	82, 299
gbs1260	ABC トランスポーター, ATP-結合性 タンパク質	44/46	1/198	84, 301
gbs1306	ラミニン 結合性 タンパク質 (Spellerberg, B et al 1999)	45/46	0/215	87, 304
gbs1307	lmb ラミニン-結合性 表面 タンパク質	45/45	n.d.	88, 305
gbs1308	C5a ペプチダーゼ, 真正フレームシフト	46/46	0/205	89, 306
gbs1309	仮想 タンパク質	44/46	0/214	90, 307
gbs1356	推定 ペプチドグリカン 結合 タンパク質 (LPXTG モチーフ) - アグルチニン受容体	20/46	50/211#	94, 311
gbs1376	ATP-依存性 Clp プロテイナーゼと類似 (ATP-結合性 サブユニット), ClpL	45/45	0/197	95, 312
gbs1377	ホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼと類似	45/45	0/55	96, 313
gbs1386	-ヒドロキシ-3-メチルグルタルル-コエンザイム A シンターゼ	44/44	0/219	97, 314
gbs1390	gbs1390 未知	43/43	0/198	98, 315
gbs1391	gbs1391 未知	44/44	0/214	99, 316
gbs1403	5'-ヌクレオチダーゼと類似, 推定 ペプチドグリカン 結合型 タンパク質 (LPXTN)	45/45	3/189	100, 317
gbs1408	ABC トランスポーターと類似 (ATP-結合性タンパク質)	45/45	0/205	101, 318
gbs1429	未知 タンパク質	46/46	1/193	103, 320
gbs1452	rplT 50S リボソーム タンパク質 I.20	46/46	0/101	105, 322

10

20

30

40

【表 3 - 4】

ORF	一般名	遺伝子分布 (50存在)	アミノ酸置換 (血清型 IA株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
gbs1464	フェリクローム ABC トランスポーター (パーミアーゼ)	44/44	2/232	106, 323
gbs1470	保存 仮想 タンパク質	46/46	2/164	107, 324
gbs1528	保存 仮想 タンパク質	45/45	0/213	108, 325
gbs1531	UvrB エキシヌクレアーゼ ABC 鎖 B	45/45	0/108	110, 327
gbs1533	グルタミン ABC トランスポーター, グルタミン-結合性 タンパク質	44/44	0/166	111, 328
gbs1542	オキシドレダクターゼ, アルド/ケトレダクターゼ ファミリー	45/45	1/219	113, 330
gbs1565	仮想 タンパク質	43/43	1/218	115, 332
gbs1586	ペプチジル-プロリル シス・トランスイソメラーゼ, シクロフィリン-型	45/45	1/227	116, 333
gbs1591	5-メチルチオアデノシン ヌクレオシダーゼ /S-アデノシルホモシステイン ヌクレオシダーゼ	45/45	0/203	117, 334
gbs1632	分枝鎖 アミノ酸 ABC トランスポーターと類似, アミノ酸-結合性 タンパク質	45/45	0/223	118, 335
gbs1638	アミノ酸 パーミアーゼ	45/45	0/100	119, 336
gbs1662	保存 仮想 タンパク質	45/45	0/213	120, 337
gbs1666	SWI/SNF ファミリー ヘリカーゼ	45/45	0/200	121, 338
gbs1673	保存 仮想 タンパク質	45/45	0/147	122, 339
gbs1695	ジヒドロキシアセトン キナーゼ ファミリー タンパク質	43/43	1/165	123, 340
gbs1754	エキシヌクレアーゼ ABC, A サブユニット (uvrA)	43/43	0/224	124, 341
gbs1760	A/G-特異的アデニングリコシラーゼと類似	46/46	0/181	125, 342
gbs1777	グリセロール取り込み促進因子 タンパク質, 推定	43/43	0/199	126, 343
gbs1783	ポリプレニル シンゼターゼ ファミリー タンパク質	45/45	0/217	127, 344
gbs1784	ABC トランスポーター, ATP-結合性 タンパク質 CydC	45/45	1/220	128, 345
gbs1790	未知 タンパク質	41/43	3/75#	129, 346
gbs1805	分泌未知タンパク質と類似	45/45	0/66	130, 347
gbs1816	HD ドメイン タンパク質	43/43	1/176	131, 348
gbs1821	23S リボソーム RNA メチルトランスフェラーゼと類似	43/43	2/155#	132, 349
gbs1834	二成分 センサーヒスチジン キナーゼ	44/44	0/213	134, 351

10

20

30

40

【表 3 - 5】

ORF	一般名	遺伝子分布 (50存在)	アミノ酸置換 (血清型IA株)*	配列番号 (DNA, タンパク質)
gbs1842	転写抗ターミネーター, BglG ファミリー	43/43	0/208	135, 352
gbs1850	仮想 トランスアルドラーゼ	44/44	0/194	136, 353
gbs1875	アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ (大 サブユニット) および NADH デヒドロゲナーゼ	46/46	0/192	138, 355
gbs1879	エンドペプチダーゼ O (pepO)	43/43	0/135	139, 356
gbs1893	2-ケト-3-デオキシグルコン酸 キナーゼ	36/46	0/228	140, 357
gbs1899	N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ, ファミリー 4 タンパク質	43/43	0/149	141, 358
gbs1907	クエン酸 キャリア タンパク質, CCS ファミリー	43/43	0/219	142, 359
gbs1925	肺炎球菌 ヒスチジン三連構造 タンパク質 B 前駆体 (N-末端部分) と類似	43/43	0/103	144, 361
gbs1962	保存 仮想 タンパク質	28/46	0/136	145, 362
gbs2008	C5A ペプチダーゼと類似, 推定 ペプチドグリカン 結合 タンパク質 (LPXTG モチーフ)	43/43	n.d.	146, 363
gbs2018	推定 ペプチドグリカン 結合 タンパク質 (LPXTG モチーフ)	43/45	0/104	147, 364
gbs2029	未知 タンパク質	44/44	1/238	148, 365
gbs2054	DNA ミスマッチ修復 タンパク質 HexA	46/46	0/206	150, 367
gbs2060	アスパルチル-tRNA シンゼターゼ (aspS)	46/46	2/211	152, 369
gbs2106	未知機能のタンパク質/リボタンパク質, 推定	44/44	0/160	154, 371
gbs2118	イノシンモノホスフェート デヒドロゲナーゼと類似	43/43	0/113	155, 372
gbs2131	ABC トランスポーター, バーミアーゼ タンパク質, 推定	45/45	0/237	156, 373

10

20

30

【 0 2 9 9 】

表4. マウスにおけるエピトープの免疫原性

40

【表 4】

ORF	aa from	aa to	IB	ペプチド ELISA	配列番号
gbs0016	110	129	+		219
	168	184	+		
gbs0986	877	901	+		277
	333	354	+		
	326	344	+		
	801	809	+		
gbs1805	1	54		+++++	347
gbs2018	544	563	++	+++++	364
	31	51	+	+++	
	107	119	+		
	399	417	++	++++	
	503	519	+	++++	
gbs0012	120	198	++	+	218
gbs0016	20	35	+	++	219
gbs0031	118	201		++++	221
gbs0428	48	132	+	+++++	242
gbs0538	118	136	+	++++	249
gbs0580	162	178	+	+	253
gbs0628	347	364	+	+++++	254
gbs0632	699	715	+	+++++	255
gbs0672	50	76		+	258
gbs0918	785	819	+	+++++	269
	44	128	++		
gbs0971	90	128		+++++	274
gbs1087	314	384	+		289
gbs1143	327	349		+++	293
gbs1306	242	314	++	++++	304
	405	478	++		
	23	100	+		
gbs1307	129	210	++		305
gbs1309	162	188		++	307
gbs1352	750	772	++	+++++	310
gbs1632	1	56		++	335
gbs1662	322	337	+	+++++	337
gbs1673	72	90	+	+++++	339
gbs1784	374	395		+	345
gbs1816	136	159	+	++++	348
gbs1899	141	164	+		358
gbs1925	96	157	++	+	361
gbs2008	1	82		+	363
gbs2018	489	556	+	+++++	364
gbs2106	159	183		++	371
	49	133	+	+++++	

10

20

30

40

【 0 3 0 0 】

表5: 細菌表面ディスプレイによって同定された免疫原性タンパク質

50

【表 5 - 1】

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs0233	グリシン ペタイン/カルニチン/コリン ABC トランスポーターと類似 (オスモプロテクタント-結合性 タンパク質)	4-26, 35-41, 53-61, 73-84, 103-108, 114-120, 140-146, 156-162, 192-208, 214-219, 227-233, 239-252, 260-268, 284-297	A:5, B:9, H:3	1-48, 113-133	463, 475
gbs0419	未知機能のタンパク質 / リボタンパク質	4-27, 38-44, 50-56, 59-64, 72-79, 83-89, 92-97, 108-116, 123-148, 152-167, 183-196, 200-220, 232-244, 255-261, 265-274, 282-302, 309-317	C:3, D:4, J:2, K:4	1-79, 231-302	464, 476
gbs0456	細胞壁 表面 アンカー ファミリー タンパク質	6-28, 66-72, 85-105, 115-121, 144-151, 160-170, 176-185, 223-230, 252-288, 296-310, 319-333, 367-374, 458-464, 471-480, 483-488, 520-528, 530-549, 559-564, 593-601, 606-616, 636-643, 655-662, 676-682, 684-699, 719-726, 735-750, 757-764, 777-785, 799-810, 812-843, 846-853, 868-873, 880-889, 891-899, 909-929, 934-940, 963-969, 998-1004, 1007-1014, 1016-1022, 1030-1046	A:9, B:125, F:9	1-80, 808-821	465, 477
gbs0942	未知機能のタンパク質 / リボタンパク質	7-24, 35-41, 75-81, 91-114, 122-132, 137-144, 148-156, 183-192, 194-200, 212-228, 233-238, 251-258, 275-295, 326-332, 337-346	A:3, B:9, C:2, J:3	1-79, 305-321	466, 478
gbs0973	gid タンパク質 (gid)	31-38, 42-52, 66-72, 86-92, 98-104, 115-122, 127-146, 154-164, 169-187, 198-212, 225-237, 255-269	D:2, G:3, H:8, I:2, K:2	13-92, 135-142	467, 479
gbs0975	未知 タンパク質	4-36, 39-49, 63-69, 71-77, 81-88, 123-131, 133-139, 160-169, 174-180, 188-194, 210-217, 273-278, 289-300, 317-334, 336-341, 383-401, 425-438	A:3, B:5, C:5, D:2, J:2	1-68, 212-270, 402-446	468, 480
gbs1038	パーミアーゼ, 推定	21-29, 31-42, 49-63, 72-79, 81-93, 112-132, 159-165, 188-195, 197-232, 262-267, 279-286, 294-301, 318-326, 348-366, 381-405, 409-426, 436-465, 471-480, 484-492, 497-505, 521-544, 554-561, 567-577, 581-589, 601-609, 611-622, 636-651, 653-667, 669-685, 700-708, 716-722, 729-744, 749-766, 780-786, 789-811, 814-864	B:2, C:3, E:3, J:2	1-57, 84-106	469, 481
gbs1144	未知 タンパク質	6-24, 35-48, 57-63, 72-78, 87-92, 113-119, 123-137, 147-153, 173-181, 212-233	C:30	1-124	470, 482

10

20

30

40

【表 5 - 2】

--

ストレプトコッカス・アガラクティエ抗原性タンパク質	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)
gbs1279	保存ドメインタンパク質	13-34, 62-69, 78-83, 86-91, 98-104, 107-115, 146-159, 179-188, 195-205, 209-221, 226-233, 239-253, 276-282, 284-294, 297-308, 331-354, 375-382, 388-399, 421-433, 449-458, 464-469, 472-491, 508-513, 525-531, 534-550, 575-593, 601-618, 629-635, 654-661, 666-680, 706-721, 723-740, 771-805, 810-830, 845-851	A:44, B:2, C:4	1-84	471, 483
gbs1441	保存 仮想 タンパク質	4-32, 45-64, 73-83, 86-92, 100-111, 125-147, 157-163, 170-175, 177-188, 226-232, 245-252, 258-274, 320-335, 348-359	A:2, B:8, C:2	1-71	472, 484
gbs1677	ナトリウム輸送ファミリー タンパク質	13-40, 43-71, 76-83, 87-101, 109-119, 125-156, 162-175, 182-219, 226-232, 240-262, 270-287, 306-318, 326-342, 344-408, 414-444, 449-456	B:3, C:2, K:5	1-51	473, 485
gbs2093	膜タンパク質, 推定	4-16, 18-34, 45-54, 99-108, 134-140, 203-212, 241-257, 266-274, 279-291, 308-315, 330-336, 355-370, 374-382, 402-410, 428-455, 466-472, 474-480, 531-554, 560-566, 572-580, 597-618, 632-660, 664-674, 676-685, 691-705, 708-735, 750-768	B:5, C:8, D:2	1-87, 342-480	474, 486

10

20

【0301】

表6. ヒト血清によって同定された抗原内のエピトープの免疫反応性

30

【表 6】

ペプチド	陽性	aa from	aa to	配列番号
gbs0233.1	+	115	132	475
gbs0233.2	+	1	26	475
gbs0419.1	++	33	55	476
gbs0942.2	+++	1	25	478
gbs0973.1	+	37	61	479
gbs0975.1	+	1	24	480
gbs1038.1	+	1	23	481
gbs1144.3	++	46	60	482
gbs1279.1	+++	1	28	483
gbs1279.2	+	23	50	483
gbs1279.3	++	45	71	483
gbs1441.1	+	1	22	484
gbs1441.2	++	17	38	484
gbs1677.1	+	1	22	485
gbs1677.2	+	17	38	485
gbs2093.1	+	1	27	486
gbs2093.2	++	22	47	486
gbs2093.4	+	422	447	486

10

20

【0302】

表7. マウスにおけるエピトープの免疫原性

【表 7】

ORF	aa from	aa to	ペプチド ELISA	配列番号
gbs0233	115	132	++++	475
	1	47	++	
gbs0419	1	55	++++	476
gbs0456	22	85	++	477
gbs0942	307	320	+	478
	1	44	++	
gbs0973	15	76	++	479
	40	92	+++	
gbs0975	1	59	++	480
	213	269	+	
	403	445	+	
gbs1038	1	56	++++	481
	85	105	+	
gbs1144	37	121	+++++	482
gbs1279	1	71	+++++	483
gbs1441	1	38	+++	484
gbs1677	1	38	+++	485
gbs2093	1	47	+++	486

30

40

【0303】

参考文献

- Altschul, S., et al. (1990). Journal of Molecular Biology 215: 403-10.
 Balter, S. et al. In Gram positive pathogens ed. by Fischetti V.A. et al. AMS Press 2000, 154-160.
 Bennett, D., et al. (1995). J Mol Recognit 8: 52-8.
 Brodeur, B., et al. (2000). Infect Immun 68: 5610-8.
 Burnie, J., et al. (1998). J Antimicrob Chemother 41: 319-22.

50

- Campbell, J., et al. (2000). *Obstet Gynecol* 96: 498-503.
- Cheng, Q., et al. (2002). *Infect Immun* 70: 6409-15.
- Clackson, T., et al. (1991). *Nature* 352: 624-8.
- Devereux, J., et al. (1984). *Nucleic acids research* 12: 387-95.
- Doherty, E., et al. (2001). *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 457-475.
- Eisenbraun, M., et al. (1993). *DNA Cell Biol* 12: 791-7.
- Etz, H., et al. (2001). *J Bacteriol* 183: 6924-35.
- Farley, M. (2001). *Clin Infect Dis* 33: 556-61.
- Ganz, T. (1999). *Science* 286: 420-421.
- Georgiou, G. (1997). *Nature Biotechnology* 15: 29-34. 10
- Glaser, P., et al. (2002). *Mol Microbiol* 45: 1499-513.
- 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.
- Hoe, N., et al. (2001). *J Infect Dis* 183: 633-9.
- Hornef, M., et al. (2002). *Nat Immunol* 3: 1033-40.
- Jackson, L., et al. (1995). *Ann Intern Med* 123: 415-20.
- Johanson, K., et al. (1995). *J Biol Chem* 270: 9459-71.
- Jones, P., et al. (1986). *Nature* 321: 522-5. 20
- Kajava, A., et al. (2000). *J Bacteriol* 182: 2163-9.
- Kohler, G., et al. (1975). *Nature* 256: 495-7.
- Larsson, C., et al. (1999). *Vaccine* 17: 454-8.
- Lewin, A., et al. (2001). *Trends Mol Med* 7: 221-8.
- Marks, J., et al. (1992). *Biotechnology (N Y)* 10: 779-83.
- McCafferty, J., et al. (1990). *Nature* 348: 552-4.
- Michel, J., et al. (1991). *Infect Immun* 59: 2023-8.
- Navarre, W., et al. (1999). *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 174-229.
- Nizet, V. & Rubens, C.E. in *Gram positive pathogens* ed. by Fischetti V.A. et al. ASM Press 2000, pp 125-136. 30
- Okano, H., et al. (1991). *J Neurochem* 56: 560-7.
- Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression; CRC Press, Boca Ration, FL (1988).
- Paoletti, L., et al. (2002). *Semin Neonatol* 7: 315-23.
- Paoletti, L., et al. In *Gram positive pathogens* ed. by Fischetti V.A. et al. ASM Press 2000, pp 137-153.
- Phillips-Quagliata, J., et al. (2000). *J Immunol* 165: 2544-55.
- Rammensee, H., et al. (1999). *Immunogenetics* 50: 213-9.
- Seeger, C., et al. (1984). *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5849-52. 40
- Shibuya, A., et al. (2000). *Nature Immunology* 1: 441-6.
- Skerra, A. (1994). *Gene* 151: 131-5.
- Tang, D., et al. (1992). *Nature* 356: 152-4.
- Tempest, P., et al. (1991). *Biotechnology (N Y)* 9: 266-71.
- Tettelin, H., et al. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12391-6.
- Tourdot, S., et al. (2000). *Eur J Immunol* 30: 3411-21.
- Wiley, J., et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*.

【図 1 - 1】

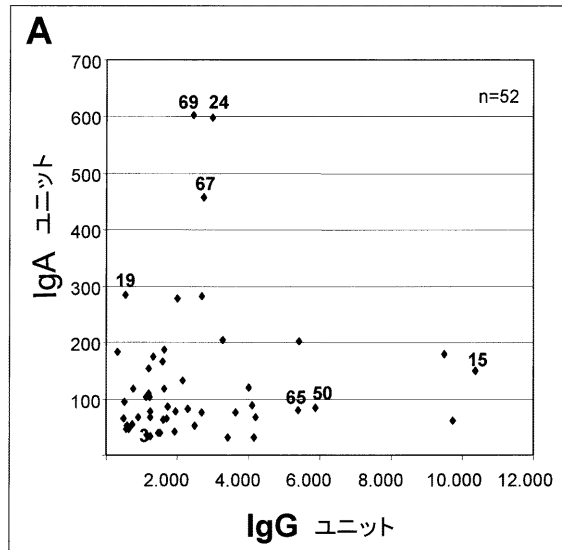


Fig. 1

【図 1 - 2】

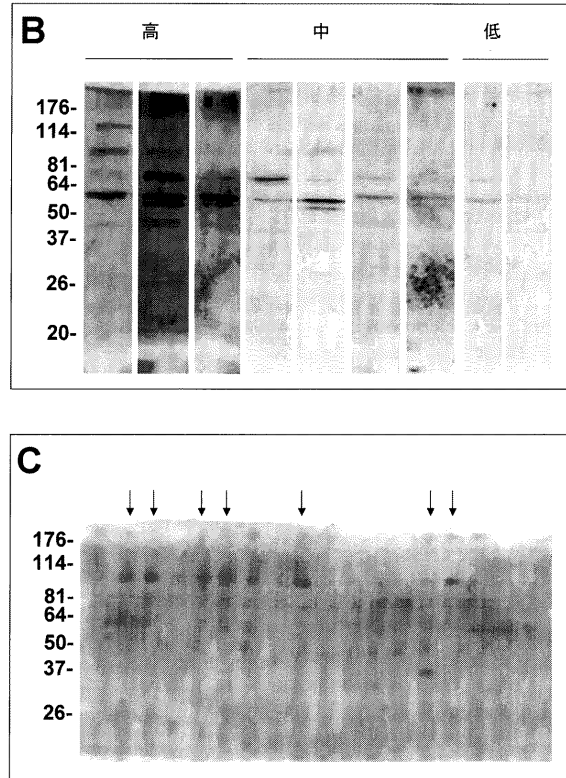


Fig. 1

【図 2】

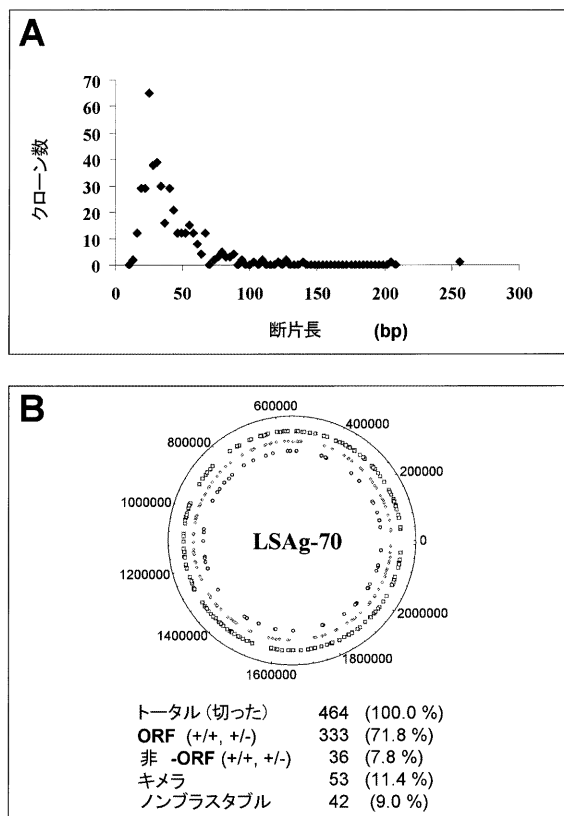


Fig. 2

【図 3】

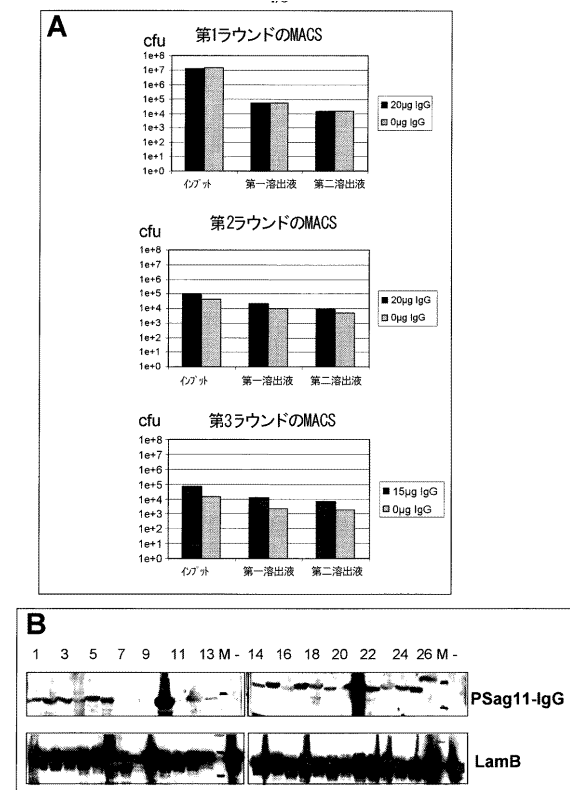


Fig. 3

【 図 4 】

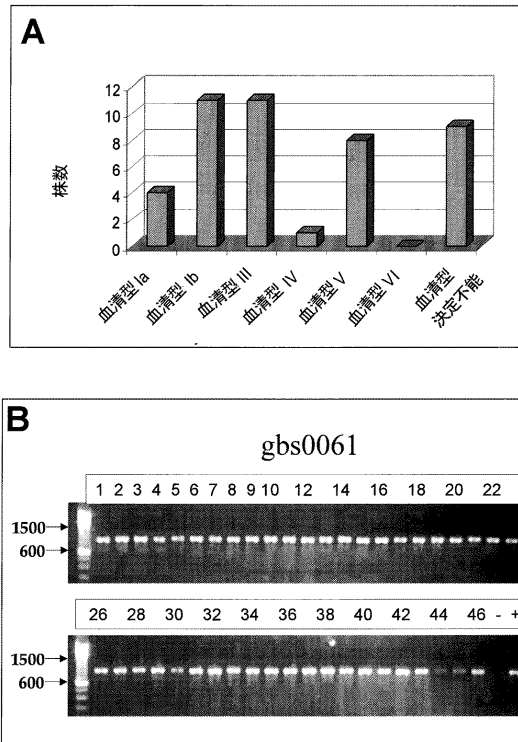


Fig. 4

【 図 5 】

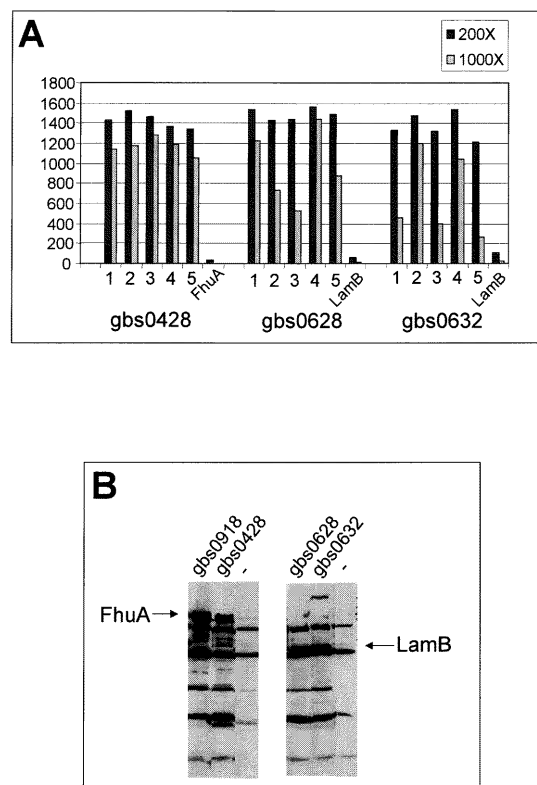


Fig. 5

【 図 6 】

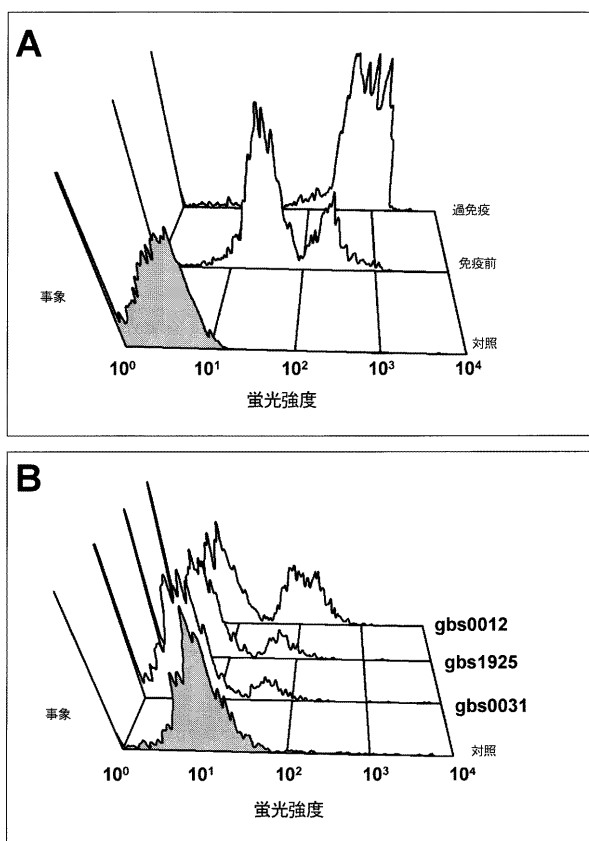


Fig. 6

【 図 7 】

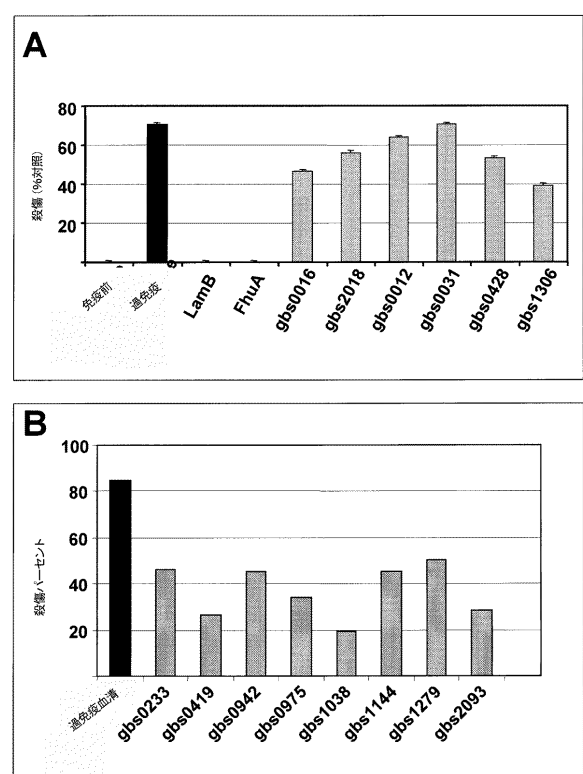


Fig. 7

【配列表】

2011101642000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年12月7日(2010.12.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

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 14、90、157-216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)の核酸分子に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)の核酸分子にハイブリダイズしうる核酸分子。

【請求項2】

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

- a) 配列番号 1、3、5-13、15、18-25、27-31、33-36、39-68、70-85、92-100、103-126、128-145、147、149-156、217、435-448および463-474から選択される核酸分子に対して96% または96%を超える、好ましくは少なくとも 98 %、特に100 %の配列同一性を有する核酸分子、
- b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、
- c) a)または b)の核酸分子の少なくとも15の連続する塩基を含む核酸分子、
- d) a)、b)、またはc)の核酸分子に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)の核酸にハイブリダイズしうる核酸分子。

【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 32、86、91、101、127から選択される核酸分子に対して98 %または98%を超える、特に100 %の配列同一性を有する核酸分子、
- 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)の核酸に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過免疫血清反応性抗原の断片：表1A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、特に以下のアミノ酸を含むペプチド： 4-20、35-44、65-70、73-87、92-98、112-137、152-161、177-186、193-200、206-213、229-255、282-294、308-313、320-326、349-355、373-384、388-406、420-425 および 115-199 (配列番号 218)； 5-24、35-41、44-70、73-89、103-109、127-143、155-161、185-190、192-207、212-219、246-262、304-336、372-382、384-393、398-407、412-418、438-444、1-75、76-161 および 164-239 (配列番号

219) ; 4-10、16-58、60-71、77-92、100-126、132-146、149-164、166-172、190-209、214-220、223-229、241-256、297-312、314-319、337-343、351-359、378-387、398-418、421-428、430-437、440-448、462-471、510-519、525-536、552-559、561-568、573-582、596-602、608-630、637-649、651-665、681-702、714-732、739-745、757-778、790-805、807-815、821-829、836-842、846-873、880-903、908-914、916-923、931-940、943-948、956-970、975-986、996-1015、1031-1040、1051-1069、1072-1095、1114-1119、1130-1148、1150-1157、1169-1176、1229-1238 および 802-812 (配列番号 220) ; 5-12、14-26、35-47、52-67、72-78、83-98、121-141、152-159、163-183、186-207、209-257、264-277、282-299、301-309、312-318、324-339、358-368、372-378、387-397、425-431 および 46-291 (配列番号 221) ; 29-38、44-64、70-76、78-87、94-100、102-112、119-134、140-149、163-173、178-186、188-194、207-234、247-262、269-290 および 73-92 (配列番号 222) ; 10-28、36-63、77-87、103-119、127-136、141-169、171-183、195-200、207-232、236-246、251-265、268-283、287-297、314-322、335-343、354-363、384-390、405-411、419-436、443-455、467-473、480-513、518-529、550-557、565-585、602-608、616-625、632-660、665-677、685-701、726-736、738-747、752-761、785-796、801-813、838-853、866-871 および 757-774 (配列番号 223) ; 31-38、61-66、74-81、90-115、123-145、154-167、169-179、182-193、200-206、238-244、267-272 および 235-251 (配列番号 224) ; 19-25、38-54、56-64、66-72、74-92、94-100、116-129、143-149、156-183、204-232、253-266、269-275、294-307 および 241-313 (配列番号 225) ; 5-34、50-56、60-65、74-85、89-97、108-119、159-165、181-199、209-225、230-240、245-251、257-262、274-282、300-305 および 64-75 (配列番号 226) ; 5-13、16-21、27-42、45-52、58-66、74-87、108-114、119-131 および 39-51 (配列番号 227) ; 6-23、46-54、59-65、78-84、100-120、128-133、140-146、159-165、171-183、190-204、224-232、240-248、250-259、274-280、288-296、306-315 および 267-274 (配列番号 228) ; 5-12、15-24、26-36、42-65、68-80、82-104、111-116、125-144、159-167、184-189、209-218、235-243、254-265、269-283、287-300、306-316、318-336、338-352、374-392 および 162-174 (配列番号 229) ; 30-42、45-54 および 25-37 (配列番号 230) ; 10-30、53-59、86-95、116-130、132-147、169-189、195-201、212-221、247-256、258-265、278-283、291-298、310-316、329-339、341-352、360-367、388-396、398-411、416-432、443-452、460-466、506-512、515-521、542-548 および 419-431 (配列番号 231) ; 4-27、30-53、60-67、70-90、92-151、159-185、189-195、198-210、215-239 および 173-189 (配列番号 232) ; 4-26、41-54、71-78、116-127、140-149、151-158、161-175、190-196、201-208、220-226、240-252、266-281、298-305、308-318、321-329、344-353、372-378、384-405、418-426、429-442、457-463、494-505、514-522 および 174-188 (配列番号 233) ; 17-25、27-39、61-67、81-89、99-110、120-131、133-139、147-161、167-172、179-185、192-198、203-213、226-238、243-258、261-267、284-290、296-307、311-328、340-352、356-371 および 239-256 (配列番号 234) ; 8-30、40-49、67-80、114-123、126-142、152-162、188-194 および 57-70 (配列番号 235) ; 4-23、28-34、36-47、50-61、76-81、89-94、96-104、112-119、126-146、155-181、195-200、208-214、220-229、244-260、263-276、282-288、292-300、317-323、336-351、353-359、363-375、382-399、415-432、444-455、458-471、476-481、484-492、499-517、522-529、535-541、543-568、572-584、586-600、607-617、626-637、656-675 および 282-297 (配列番号 236) ; 6-24、30-35、38-45、63-91、134-140、146-160、167-188、214-220、226-234、244-250、260-270、286-301、316-329、340-371、429-446、448-459、474-481、485-491、512-526、537-544、550-565、573-583、596-613、621-630、652-658 および 87-97 (配列番号 237) ; 8-20、26-48、56-67、76-86、94-109、115-121、123-129、143-160、178-186、191-198、201-208、221-236、238-244、260-268 および 237-247 (配列番号 238) ; 4-40、42-57、73-87、98-117、126-135、150-156、166-174、196-217、231-236、248-258、276-284、293-301、307-313、339-347、359-365、375-387、395-402、428-440、445-456、485-490、497-505、535-541、547-555、610-625、648-656、665-671 および 448-

528 (配列番号 239); 10-18、39-45、51-61、80-96、98-106、110-115、158-172、174-183、191-200、220-237、249-255、274-289、308-324、331-341、372-381、384-397、405-414 および 322-338 (配列番号 240); 30-36、38-56、85-108、134-147、149-160、163-183、188-201、206-211、219-238、247-254 および 5-13 (配列番号 241); 11-40、98-103、110-115、133-145、151-159、172-179、192-201、204-212、222-228、235-245、258-268、283-296、298-309、322-329、342-351、354-362、372-378、385-393、407-418、495-516 および 1-148 (配列番号 242); 5-19、21-36、73-94、112-119、122-137、139-145、152-167、184-190、198-204、208-224、249-265、267-281、299-304、309-317、326-333、356-364、368-374、381-389、391-414、419-425、430-435 および 113-140 (配列番号 243); 45-54、59-67、78-91 および 15-23 (配列番号 244); 11-22、33-47、52-80、88-112、124-129 および 6-25 (配列番号 245); 26-41、51-63、80-89、93-115、150-163、187-193、220-237、240-249、286-294、296-306、316-329、345-353、361-370、407-425、428-437、474-482、484-494、504-517、533-541、549-558、595-613、616-625、660-668、673-685、711-726、736-744、749-761、787-802、812-820、825-837、863-878、888-896、901-913、939-954、964-972、977-989、1003-1008、1016-1022、1028-1034、1041-1053、1059-1074、1101-1122、420-511 および 581-704 (配列番号 246); 18-25、27-55、71-83、89-95、102-113、120-146、150-156、174-185 および 159-175 (配列番号 247); 24-30、38-56、63-68、87-93、136-142、153-164、183-199、213-219、226-234、244-261、269-278、283-289、291-297、320-328、330-336、340-346、348-356、358-366、382-387、401-408、414-419、449-455、468-491、504-512、531-537、554-560、597-608、621-627、632-643、650-662、667-692、703-716、724-737、743-758、783-794、800-818、846-856 および 806-884 (配列番号 248); 4-14、21-39、86-92、99-107、121-131、136-144、147-154、158-166、176-185、193-199、207-222、224-230 および 117-136 (配列番号 249); 65-76、85-97、103-109、115-121、125-146、163-169、196-205、212-219、228-237、241-247、254-262、269-288、294-303、305-313、328-367、395-401、405-412、418-429、437-447、481-488、506-513、519-524、530-541、546-557 および 266-284 (配列番号 250); 5-14、37-42、49-71、78-92、97-112、127-136、147-154、156-163、186-198、216-225、233-243、248-253、295-307、323-332、359-366、368-374、380-398 および 194-223 (配列番号 251); 4-11、33-39、45-72、100-113、119-129、136-144、169-175、177-185、200-208、210-219、262-276、278-297、320-326、336-344、347-362、381-394、443-453 および 438-454 (配列番号 252); 4-29、31-52、55-61、95-110、138-158、162-171、179-187、202-229、239-248、251-256、262-267、269-285、304-310、351-360、362-368、381-388、415-428、435-440、448-458 および 161-178 (配列番号 253); 4-17、19-28、32-43、47-59、89-110、112-126、128-134、140-148、152-161、169-184、191-204、230-235、255-264、328-338、341-347、401-409、413-419、433-441、449-458、463-468、476-482、486-492、500-506、529-545 および 305-381 (配列番号 254); 10-29、38-45、53-61、134-145、152-160、163-170、202-208、219-229、248-258、266-275、282-288、315-320、328-334、377-385、392-402、418-424、447-453、460-471、479-487、491-497、500-507、531-537、581-594、615-623、629-635、644-652、659-666、668-678、710-717、719-728、736-741、747-760、766-773、784-789、794-800、805-817、855-861、866-887 および 698-715 (配列番号 255); 16-26、29-37、44-58、62-68、74-80、88-95、97-120、125-144、165-196 および 58-72 (配列番号 256); 14-21、23-46、49-60、63-74、78-92、96-103、117-129、134-161、169-211、217-231、239-248、252-281、292-299、313-343 および 243-257 (配列番号 257); 11-27、46-52、67-72、76-84、91-112、116-153、160-175、187-196、202-211、213-220 および 43-76 (配列番号 258); 5-29、37-56、78-86、108-118、152-161 および 120-130 (配列番号 259); 8-14、19-41、52-66、75-82、87-92、106-121、127-133、136-143、158-175、180-187、196-204、221-228、239-245、259-265、291-306、318-323、328-340、352-358、361-368、375-381、391-399、411-418、431-442、446-455、484-496、498-510、527-533、541-549、558-565、575-585、587-594、644-655、661-668、671-677 および 184-196

(配列番号 260) ; 4-22、29-38、55-62、75-81、102-107、110-134、143-150、161-167、172-179、191-215、223-233、241-247、251-264、266-272、288-309、340-352、354-366、394-402、414-438 および 198-218 (配列番号 261) ; 24-44、49-70、80-91、105-118、128-136、140-154 および 77-92 (配列番号 262) ; 5-22、31-36、41-47、67-74、83-90、105-122、135-143、160-167 および 118-129 (配列番号 263) ; 4-25、33-73、81-93、96-106、114-120、122-128、130-172、179-208、210-241、251-283、296-301 および 92-100 (配列番号 264) ; 14-24、29-38、43-50、52-72、86-97、101-107、110-125、127-141、145-157、168-175、177-184、186-195、205-226、238-250、255-261、284-290、293-304、307-314、316-323、325-356、363-371、383-390、405-415、423-432、442-454、466-485、502-511、519-527、535-556、558-565、569-574、612-634、641-655、672-686、698-709、715-722、724-732、743-753、760-769、783-792、818-825、830-839、842-849、884-896、905-918、926-940、957-969、979-1007、1015-1021、1049-1057 および 336-349 (配列番号 265) ; 6-16、26-31、33-39、62-73、75-85、87-100、113-123、127-152、157-164、168-181、191-198、208-214、219-226、233-254、259-266、286-329 および 181-195 (配列番号 266) ; 4-13、32-39、53-76、99-108、110-116、124-135、137-146、149-157、162-174、182-190、207-231、242-253、255-264、274-283、291-323、334-345、351-360、375-388、418-425、456-474、486-492、508-517、520-536、547-560、562-577、31-45 および 419-443 (配列番号 267) ; 15-26、30-37、42-49、58-90、93-99、128-134、147-154、174-179、190-197、199-205、221-230、262-274、277-287、300-314、327-333、343-351、359-377、388-396、408-413、416-425、431-446 および 246-256 (配列番号 268) ; 5-26、34-42、47-54、61-67、71-104、107-115、131-138、144-153、157-189、196-202、204-210、228-245、288-309、316-329、332-341、379-386、393-399、404-412、414-421、457-468、483-489、500-506、508-517、523-534、543-557、565-580、587-605、609-617、619-627、631-636、640-646、662-668、675-682、705-710、716-723、727-732、750-758、784-789、795-809、869-874、14-138、166-286、372-503、674-696 および 754-859 (配列番号 269) ; 5-17、32-38、40-47、80-89、113-119、125-137、140-154、157-163、170-177、185-199、213-225、228-236、242-248、277-290、292-305、323-333、347-353、364-370、385-394、399-406、423-433、441-451、462-474、477-487 および 116-124 (配列番号 270) ; 7-16、18-30、32-49、53-61、63-85、95-101、105-115、119-134、143-150、159-178、185-202、212-229、236-250、254-265、268-294 および 63-72 (配列番号 271) ; 4-12、19-47、73-81、97-103、153-169、188-198、207-213、217-223、236-242、255-265、270-278、298-305、309-317、335-347、354-363、373-394、419-424、442-465、486-492、500-507、542-549、551-558、560-572、580-589、607-614、617-623、647-653、666-676、694-704、706-714、748-754、765-772、786-792、795-806 および 358-370 (配列番号 272) ; 18-28、30-38、40-46、49-55、69-78、82-98、104-134、147-153、180-190、196-202、218-236、244-261、266-273、275-286、290-295、301-314、378-387、390-395、427-434 および 290-305 (配列番号 273) ; 4-13、20-31、39-51、54-61、69-84、87-105、117-124 および 108-125 (配列番号 274) ; 24-34、43-54、56-66、68-79 および 50-69 (配列番号 275) ; 5-43、71-77、102-131、141-148、150-156、159-186、191-207、209-234、255-268、280-286、293-299、317-323、350-357、363-372、391-397、406-418、428-435、455-465、484-497、499-505、525-531、575-582、593-607、621-633、638-649、655-673、684-698、711-725、736-741、743-752、759-769、781-793、813-831、843-853、894-905、908-916、929-946、953-963、970-978、1001-1007、1011-1033、165-178 および 818-974 (配列番号 276) ; 16-44、63-86、98-108、185-191、222-237、261-274、282-294、335-345、349-362、374-384、409-420、424-430、440-447、453-460、465-473、475-504、522-534、538-551、554-560、567-582、598-607、611-619、627-640、643-653、655-661、669-680、684-690、701-707、715-731、744-750、756-763、768-804、829-837、845-853、855-879、884-890、910-928、77-90、144-212、279-355、434-536、782-810 および 875-902 (配列番号 277) ; 4-22、29-41、45-51、53-66、70-77、8

6-95、98-104、106-124、129-135、142-151、153-161、169-176、228-251、284-299、331-337、339-370、380-387、393-398、406-411、423-433、440-452、461-469、488-498、501-516、523-530、532-559、562-567、570-602、612-628、630-645、649-659、666-672、677-696、714-723、727-747 および 212-227 (配列番号 278) ; 4-9、17-31、35-41、56-61、66-75、81-87、90-124、133-138、149-163、173-192、213-219、221-262、265-275、277-282、292-298、301-307、333-346、353-363、371-378、419-430、435-448、456-469、551-570、583-599、603-612 および 275-291 (配列番号 279) ; 28-34、53-58、72-81、100-128、145-154、159-168、172-189、217-225、227-249、256-263、299-309、322-330、361-379、381-388、392-401、404-417、425-436、440-446、451-464、469-487、502-511、543-551、559-564、595-601、606-612、615-626、633-642、644-650、664-670、674-684、692-701、715-723、726-734、749-756、763-771、781-787、810-843、860-869、882-889、907-917、931-936、941-948、951-958、964-971、976-993、1039-1049、1051-1065、1092-1121、1126-1132、1145-1151、1158-1173、1181-1192、1194-1208、1218-1223、1229-1243、1249-1254、1265-1279、1287-1297、1303-1320、1334-1341、1343-1358、1372-1382、1406-1417、1419-1425、1428-1434、1441-1448、1460-1473、1494-1504、1509-1514、1529-1550、654-669 および 1400-1483 (配列番号 280) ; 10-16、20-25、58-65、97-109、118-132、134-146、148-155、186-195、226-233、244-262、275-284、295-310、317-322、330-339、345-351、366-375、392-403、408-415、423-430、435-444、446-457、467-479、486-499、503-510、525-537、540-585、602-612、614-623、625-634、639-645、650-669、700-707、717-724、727-739、205-230 および 733-754 (配列番号 281) ; 5-22、37-43、72-81、105-113、128-133、148-160、188-194、204-230、238-245、251-257 および 194-213 (配列番号 282) ; 16-21、35-41、56-72、74-92、103-109 および 62-68 (配列番号 283) ; 4-15、17-82、90-104、107-159、163-170、188-221、234-245、252-265 および 220-235 (配列番号 284) ; 16-22、36-46、61-75、92-107、113-121、139-145、148-160 および 30-42 (配列番号 285) ; 4-12、20-26、43-49、55-62、66-78、121-127、135-141、146-161、164-170、178-189、196-205、233-238、269-279、288-318、325-332、381-386、400-407 および 328-346 (配列番号 286) ; 5-12、31-49、57-63、69-79、89-97、99-114、116-127、134-142、147-154、160-173、185-193、199-204、211-222、229-236、243-249、256-274 および 58-68 (配列番号 287) ; 10-20、28-34、39-53、68-79、84-90、99-106 および 73-79 (配列番号 288) ; 14-37、45-50、61-66、77-82、93-98、109-114、125-130、141-146、157-162、173-178、189-194、205-210、221-226、237-242、253-258、269-274、285-290、301-306、316-332、349-359、371-378、385-406、34-307 および 312-385 (配列番号 289) ; 4-10、17-38、50-85、93-99、109-116、128-185、189-197、199-210、223-256、263-287、289-312、327-337、371-386、389-394、406-419、424-432、438-450、458-463、475-502、507-513、519-526、535-542、550-567 および 361-376 (配列番号 290) ; 10-39、42-93、100-144、155-176、178-224、230-244、246-255、273-282、292-301、308-325、332-351、356-361、368-379、386-393、400-421 および 138-155 (配列番号 291) ; 5-11、17-34、40-45、50-55、72-80、101-123、145-151、164-172、182-187、189-195、208-218、220-241、243-252、255-270、325-331、365-371、391-398、402-418、422-428、430-435、443-452、463-469、476-484、486-494、503-509、529-553、560-565、570-590、608-614、619-627、654-661、744-750、772-780、784-790、806-816、836-853、876-885、912-918、926-933、961-975、980-987、996-1006、1016-1028、1043-1053、1057-1062、994-1003 および 1033-1056 (配列番号 292) ; 17-45、64-71、73-81、99-109、186-192、223-238、262-275、283-295、336-346、350-363、375-385、410-421、425-431、441-448、454-463、468-474、476-512、523-537、539-552、568-583、599-608、612-620、628-641、644-654、656-662、670-681、685-695、702-708、716-723、725-735、757-764、769-798、800-806、808-816、826-840、846-854、856-862、874-881、885-902、907-928、274-350 および 443-513 (配列番号 293) ; 4-22、29-41、45-51、53-61、70-76、85-92、99-104、111-122、134-140、142-154、163-174、224-232、255-265、273-279、283-297、330-335、337-348、356-367、373-385、391-39

6、421-431、442-455、475-485、493-505、526-538、544-561、587-599、605-620、622-651、662-670、675-681、687-692、697-712、714-735 および 252-262 (配列番号 294) ; 4-12、15-35、40-46、50-59、67-94、110-128、143-169、182-188、207-215、218-228、238-250 および 74-90 (配列番号 295) ; 9-18、42-58、78-85、88-95、97-106、115-122、128-134、140-145、154-181、186-202、204-223、261-267、269-278、284-293、300-336、358-368 および 12-29 (配列番号 296) ; 7-34、46-53、62-72、82-88、100-105、111-117、132-137、144-160、166-180、183-189、209-221、231-236、246-253、268-282、286-293、323-336、364-372、378-392、422-433 および 388-405 (配列番号 297) ; 21-27、34-50、72-77、80-95、164-177、192-198、202-220、226-236、239-247、270-279、285-292、315-320、327-334、348-355、364-371、388-397、453-476、488-497、534-545、556-576、582-588、601-607、609-616、642-662、674-681、687-697、709-715、721-727、741-755 および 621-739 (配列番号 298) ; 4-14、16-77、79-109 および 25-99 (配列番号 299) ; 4-9、17-23、30-37、44-55、65-72、77-93、102-121、123-132、146-153 および 17-29 (配列番号 300) ; 4-18、25-41、52-60、83-92、104-112、117-123、149-155、159-167、170-192、201-210、220-227、245-250 および 124-137 (配列番号 301) ; 8-25、50-55、89-95、138-143、148-153、159-169、173-179、223-238、262-268、288-295、297-308、325-335、403-409、411-417、432-446、463-475、492-501、524-530、542-548、561-574、576-593、604-609、612-622、637-654、665-672、678-685、720-725、731-739、762-767、777-783、820-838、851-865、901-908、913-920、958-970、1000-1006、1009-1015、1020-1026、1043-1052、1055-1061、1-128、252-341、771-793 および 1043-1058 (配列番号 302) ; 16-26、33-46 および 64-76 (配列番号 303) ; 4-27、69-77、79-101、117-123、126-142、155-161、171-186、200-206、213-231、233-244、267-273、313-329、335-344、347-370、374-379、399-408、422-443、445-453、461-468、476-482、518-534、544-553、556-567、578-595、601-620、626-636、646-658、666-681、715-721、762-768、778-785、789-803、809-819、22-108、153-318、391-527 および 638-757 (配列番号 304) ; 6-21、32-43、62-92、104-123、135-141、145-152、199-216、218-226、237-247、260-269、274-283、297-303、1-72 および 127-211 (配列番号 305) ; 6-26、50-56、83-89、108-114、123-131、172-181、194-200、221-238、241-247、251-259、263-271、284-292、304-319、321-335、353-358、384-391、408-417、424-430、442-448、459-466、487-500、514-528、541-556、572-578、595-601、605-613、620-631、635-648、660-670、673-679、686-693、702-708、716-725、730-735、749-755、770-777、805-811、831-837、843-851、854-860、863-869、895-901、904-914、922-929、933-938、947-952、956-963、1000-1005、1008-1014、1021-1030、1097-1103、1120-1130、1132-1140、1-213、269-592 および 992-1120 (配列番号 306) ; 9-16、33-39、47-59、65-79、81-95、103-108、115-123、138-148、163-171、176-185、191-196、205-211、213-221、224-256、261-276、294-302、357-363、384-390、95-111 および 161-189 (配列番号 307) ; 21-27、35-45、70-76、92-105、129-143、145-155、161-166、170-191、204-211、214-231、234-246、249-255、259-275 および 1-18 (配列番号 308) ; 21-35、45-53、56-64、69-97 および 1-16 (配列番号 309) ; 25-33、41-47、61-68、86-101、106-114、116-129、134-142、144-156、163-176、181-190、228-251、255-261、276-292、295-305、334-357、368-380、395-410、424-429、454-460、469-482、510-516、518-527、531-546、558-570、579-606、628-636、638-645、651-656、668-674、691-698、717-734、742-754、765-770、792-797、827-835、847-859、874-881、903-909、926-933、942-961、964-977、989-1004、1010-1028、1031-1047、1057-1075、1081-1095、1108-1117、1138-1144、1182-1189、1193-1206、1220-1229、1239-1246、1257-1267、1271-1279、1284-1301、1312-1320、1329-1335、1341-1347、1358-1371、1399-1404、1417-1426、1458-1463、1468-1476、1478-1485、1493-1506、1535-1541、1559-1574、1583-1590、1595-1601、1603-1611、1622-1628、1634-1644、1671-1685、1689-1696、1715-1720、1734-1746、1766-1775、1801-1806、1838-1844、1858-1871、1910-1917、1948-1955、1960-1974、2000-2015、2019-2036、2041-2063、748-847 および 1381-1391 (配列番号 310) ; 5-12、18-24、27-53、56-6

3、96-113、119-

124、131-136、157-163、203-209、215-223、233-246、264-273、311-316、380-389、393-399、425-433、445-450、457-462、464-470、475-482、507-513、527-535、542-548、550-565、591-602、607-613、627-642、644-664、673-712、714-732、739-764、769-782、812-818、826-838、848-854、860-871、892-906、930-938、940-954、957-973、990-998、1002-1021、1024-1033、1037-1042、1050-1060、1077-1083、1085-1092、1100-1129、1144-1161、1169-1175、1178-1189、1192-1198、1201-1207、1211-1221、1229-1239、1250-1270、1278-1292、1294-1300、1314-1335、1344-1352、1360-1374、1394-1405、1407-1414、1416-1424、1432-1452、1456-1462、1474-1497、1500-1510、1516-1522、1534-1542、1550-1559、1584-1603、1608-1627、187-273 および 306-441 (配列番号 311) ; 70-80、90-97、118-125、128-140、142-148、154-162、189-202、214-222、224-232、254-260、275-313、317-332、355-360、392-398、425-432、448-456、464-470、476-482、491-505、521-528、533-546、560-567、592-597、605-614、618-626、637-644、646-653、660-666、677-691 および 207-227 (配列番号 312) ; 5-19、26-34、37-55、57-66、69-83、86-102、115-134、138-143、154-172、178-195、209-246、251-257、290-302、306-311 および 256-266 (配列番号 313) ; 10-20、22-28、35-57、72-79、87-103、108-128、130-144、158-171、190-198、225-242、274-291、301-315、317-324、374-385 および 353-365 (配列番号 314) ; 4-9、17-30、34-54、59-66、73-94、118-130、135-150、158-171、189-198、219-239、269-275、283-301、89-106 および 176-193 (配列番号 315) ; 14-20、22-74、77-86、89-99、104-109、126-135、154-165、181-195、197-212、216-224、264-275 および 107-118 (配列番号 316) ; 4-18、21-38、63-72、101-109、156-162、165-179、183-192、195-210、212-218、230-239、241-256、278-290、299-311、313-322、332-341、348-366、386-401、420-426、435-450、455-460、468-479、491-498、510-518、532-538、545-552、557-563、567-573、586-595、599-609、620-626、628-636、652-657、665-681 および 1-198 (配列番号 317) ; 4-10、16-38、51-68、73-79、94-115、120-125、132-178、201-208、216-223、238-266、269-295、297-304、337-342、347-356、374-401、403-422、440-447、478-504、510-516、519-530、537-544 および 191-206 (配列番号 318) ; 12-40、42-48、66-71、77-86、95-102、113-120、129-137、141-148、155-174、208-214、218-225、234-240、256-267、275-283、300-306、313-321、343-350、359-367、370-383、398-405、432-439、443-461、492-508、516-526、528-535 および 370-478 (配列番号 319) ; 6-14、20-37、56-62、90-95、97-113、118-125、140-145、161-170、183-202、237-244、275-284、286-305、309-316、333-359、373-401、405-412 および 176-187 (配列番号 320) ; 33-44、50-55、59-80、86-101、129-139、147-153、157-163、171-176、189-201、203-224、239-245、257-262、281-287、290-297、304-320、322-331、334-350、372-390、396-401、71-88 および 353-372 (配列番号 321) ; 5-11、15-24、26-33、40-47、75-88、95-103、105-112 および 17-30 (配列番号 322) ; 5-11、16-39、46-54、62-82、100-107、111-124、126-150、154-165、167-183、204-238、245-295、301-313、316-335 および 8-16 (配列番号 323) ; 4-19、34-48、69-74、79-107、115-127、129-135、143-153、160-169、171-182 および 142-153 (配列番号 324) ; 4-30、65-74、82-106、110-120、124-132、135-140、146-175、179-184、190-196、217-223、228-233、250-267、275-292、303-315、322-332 および 174-186 (配列番号 325) ; 9-16、29-41、47-57、68-84、87-109、113-119、162-180、186-193、195-201、203-208、218-230、234-243、265-271、281-292、305-312、323-332、341-347、349-363、368-374、383-390、396-410、434-440、446-452、455-464、466-473、515-522、529-542、565-570、589-600、602-613、618-623、637-644、1019-1027、1238-1244、1258-1264、1268-1276、1281-1292、1296-1302 および 883-936 (配列番号 326) ; 10-17、23-32、39-44、54-72、75-81、88-111、138-154、160-167、178-185、201-210、236-252、327-334、336-342、366-376、388-400、410-430、472-482、493-526、552-558、586-592、598-603、612-621、630-635、641-660 および 384-393 (配列番号 327) ; 4-22、24-39、50-59、73-84、100-105、111-117、130-138、155-161、173-178、182-189、205-215、266-284、308-313、321-32

8、330-337、346-363、368-374、388-395、397-405、426-434、453-459、482-492、501-507、509-515、518-523、527-544、559-590、598-612、614-629、646-659、663-684、686-694、698-721 および 445-461 (配列番号 328) ; 14-22、27-33 および 3-17 (配列番号 329) ; 29-41、66-73、81-87、90-108、140-146、150-159、165-184、186-196、216-226、230-238、247-253、261-269 および 126-140 (配列番号 330) ; 5-12、16-25、27-33、36-45、60-68、83-88、103-126 および 86-101 (配列番号 331) ; 14-23、36-47、56-66、84-89、94-105、111-127、140-153、160-174、176-183、189-203、219-225、231-237、250-257 および 194-227 (配列番号 332) ; 4-25、54-60、64-71、73-82、89-106、117-124、157-169、183-188、199-210、221-232、236-244、255-264 および 58-98 (配列番号 333) ; 13-19、26-36、41-53、55-71、77-84、86-108、114-135、157-172、177-183、187-194、208-213、218-226、110-125 および 156-170 (配列番号 334) ; 5-24、63-69、77-85、94-112、120-137、140-146、152-159、166-172、179-187、193-199、206-212、222-228、234-240、244-252、257-264、270-289、298-309、316-328、337-348、363-375、1-56 および 340-352 (配列番号 335) ; 18-39、42-71、78-120、124-144、152-173、179-189、199-209、213-222、228-258、269-304、329-361、364-372、374-389、396-441 および 313-327 (配列番号 336) ; 19-25、91-98、108-120、156-162、168-174、191-204、211-216、232-266、272-278、286-308、316-321、327-333、344-355、358-364、384-391、395-428、464-476、487-495、497-511、544-561、563-573、575-582、588-594、10-25 および 322-338 (配列番号 337) ; 14-26、32-49、51-57、59-72、80-91、102-112、119-125、147-161、164-173、175-183、188-213、217-222、246-254、260-276、282-303、308-318、321-328、333-350、352-359、371-378、392-401、407-414、416-443、448-463、471-484、490-497、501-514、519-527、539-551、557-570、578-590、592-598、600-610、618-629、633-647、654-667、676-689、702-709、718-726、728-737、741-760、764-780、786-795、808-826、836-842、845-852、865-874、881-887、931-945、949-957、968-974、979-986、1003-1009、1023-1029 および 90-103 (配列番号 338) ; 11-16、37-56、60-66、69-77、80-88、93-106、117-139、166-171 および 72-90 (配列番号 339) ; 59-84、123-133、145-150、161-167、178-189 および 115-128 (配列番号 340) ; 15-33、39-46、52-64、74-87、108-124、127-144、150-156、173-179、184-194、201-208、219-236、243-269、272-295、302-309、343-349、356-361、370-379、405-411、414-423、430-451、457-464、466-475、477-483、496-502、507-522、541-548、557-563、571-577、579-585、590-605、626-642、650-662、671-691、704-710、751-769、775-781、786-791、794-829、851-858、868-878、884-904、913-919、931-939 および 132-142 (配列番号 341) ; 33-58、64-71、74-80、83-88、96-120、122-139、146-157、167-177、207-213、220-225、236-242、264-279、300-305、326-336、340-347、350-360、97-115 および 199-211 (配列番号 342) ; 4-26、43-57、70-99、102-117、121-133、142-148、151-168、170-183、192-220、235-249、258-279 および 30-41 (配列番号 343) ; 34-42、48-58、70-94、110-130、154-160、164-172、178-183、195-203、211-222、229-250、256-261、274-284、286-292、312-323 および 222-233 (配列番号 344) ; 4-9、15-36、38-45、49-74、78-88、100-112、136-191、211-220、226-233、239-246、254-274、287-307、316-322、342-353、356-366、373-378、384-393、405-431、449-457、459-468、487-511、515-524、529-541、544-552、562-568、571-576 および 208-280 (配列番号 345) ; 10-27、31-37、39-54、71-108、124-143 および 2-107 (配列番号 346) ; 16-27、38-57、64-70、90-102、104-113、116-137、160-166 および 1-80 (配列番号 347) ; 13-21、31-36、56-67、127-136、153-171、173-180、184-200、214-222、225-231、239-263、267-273 および 135-159 (配列番号 348) ; 12-27、31-51、68-74、77-87、94-101、108-114、117-123、127-134、138-168、173-196、201-207、212-217、227-237、247-257、264-280 および 205-223 (配列番号 349) ; 17-22、25-54、70-76、92-100 および 98-110 (配列番号 350) ; 7-29、40-50、60-67、87-96、105-111、119-164、172-199、206-212、220-227、237-259、272-279、282-293、295-309、313-319、321-328、345-363、376-386 および 159-176 (配列番号 351) ; 4-19、24-30、36-43、50-68、71-89、93-106、141-152、154-17

2、179-197、199-215、229-239、246-252、255-263、281-298、319-325、329-356、358-368、374-390、397-409、420-429、432-444、450-456、459-475、483-494、496-502、520-528、532-556 および 362-377 (配列番号 352) ; 18-25、40-62、77-85、91-97、105-116、123-133、139-184、189-197 および 122-140 (配列番号 353) ; 4-49、52-58、62-70、79-105、109-133、142-150、163-168、206-214、220-228、233-240、243-254、274-281、303-311、327-338、357-373、378-396、403-413、420-436、441-453、461-467、475-481、484-498、506-512、514-521、523-529、562-579、589-595、598-603、615-648、714-722、728-742、749-758、777-792、795-807 および 643-658 (配列番号 354) ; 8-27、37-48、51-56、72-79、87-106、120-138、140-147、167-176、187-197、205-216、222-229、234-239、243-249、277-288、292-315、334-343、347-353、363-391、398-404、430-447、461-467、478-492、498-507 および 456-470 (配列番号 355) ; 5-12、18-24、59-69、80-93、95-109、119-125、130-137、139-147、158-163、168-176、182-202、206-215、222-239、241-249、267-277、291-298、311-318、321-327、338-344、348-355、373-386、393-406、411-417、434-443、446-465、473-484、514-521、532-553、584-594 および 221-237 (配列番号 356) ; 4-14、27-34、50-58、63-72、79-106、109-114、121-142、146-154、161-167、169-175、178-201、223-238、249-254、259-264、278-292、294-312、319-330 および 167-191 (配列番号 357) ; 7-28、36-42、50-61、63-80、122-152、161-174、176-191 および 140-190 (配列番号 358) ; 20-57、59-65、70-78、86-102、119-133、142-161、163-173、177-188、192-202、204-220、222-236、240-253、279-319、326-331、337-383、390-399、406-412、420-427、431-438 および 381-395 (配列番号 359) ; 13-18、28-34、37-43、50-59、75-81、83-97、105-121、139-147、200-206、209-227、231-247、260-271、318-327、366-381、388-394、399-406 および 182-201 (配列番号 360) ; 6-29、37-43、51-56、70-77、82-102、110-119、127-143、178-190、201-209、216-243、261-269、281-292、305-313、327-339、341-354、356-373、391-397、423-429、438-445、450-478 および 21-314 (配列番号 361) ; 4-12、15-21、32-41、59-76、80-89、96-104 および 90-103 (配列番号 362) ; 9-28、30-41、44-54、69-74、77-82、90-97、104-123、125-135、149-155、164-173、177-184、217-226、230-235、238-244、258-272、282-297、300-305、309-315、317-322、327-336、348-362、368-374、380-387、400-411、414-424、451-458、460-466、483-494、497-503、506-511、521-528、540-553、569-587、598-606、628-642、661-681、688-700、718-733、740-749、752-764、769-783、823-834、848-854、862-872、878-884、886-898、915-920、938-951、954-961、963-972、982-989、996-1003、1010-1016、1021-1032、1038-1044、1047-1057、1060-1070、1079-1088、1094-1102、1117-1127、1129-1135、1142-1153、1158-1204、1212-1229、1234-1263、1269-1277、1308-1313、1327-1338、1344-1376、1400-1415、1436-1443、1448-1458、1497-1504、1511-1522、1544-1566、3-82 および 509-576 (配列番号 363) ; 8-36、40-64、71-79、88-94、102-109、118-127、138-148、151-159、163-174、192-198、200-206、220-233、268-273、290-301、304-309、316-323、331-349、378-391、414-420、427-437、455-475、494-510、541-547、549-555、616-640、1-60、55-139、212-308、386-458 および 458-624 (配列番号 364) ; 16-31、35-42、70-77、91-101、120-130、132-140、143-153、185-190、195-202、215-222、228-238、241-251、257-264、268-277、288-302、312-324、326-333、341-348、364-382、415-429、438-454、458-466、491-499、501-521 および 273-281 (配列番号 365) ; 8-14、32-57、74-149、155-177、179-212、221-266、271-296、304-324、329-346、349-359、368-401、413-419、426-454、465-478、493-510 および 466-490 (配列番号 366) ; 22-28、33-51、64-89、96-119、126-132、138-146、152-159、161-169、172-179、193-198、205-211、221-231、235-254、273-280、297-303、312-320、328-346、351-373、378-384、391-398、448-454、460-468、470-481、516-558、574-593、597-602、613-623、626-646、649-656、668-673、675-683、696-708、715-722、724-739、745-751、759-777、780-804、816-822 および 102-113 (配列番号 367) ; 12-28、41-91、98-107、112-120、125-131、151-193、215-221、240-250、263-280 および 128-138 (配

列番号 368) ; 16-24、32-38、46-62、68-81、90-105、127-133、144-150、160-166、178-184、186-202、210-219、232-240、252-258、264-273、293-324、337-344、349-357、360-369、385-398、410-416、419-427、441-449、458-476、508-515、523-539、544-549、562-569、571-579、96-109 および 127-139 (配列番号 369) ; 19-25、28-34、56-61、85-97、110-116 および 39-53 (配列番号 370) ; 4-37、41-50、62-72、91-97、99-109、114-125、136-141、149-158、160-166、201-215 および 27-225 (配列番号 371) ; 15-31、44-51、96-105、122-130、149-157、162-168、178-183、185-192、198-204、206-213、221-234、239-245、248-255、257-266、289-335、349-357、415-422、425-441、448-454、462-468 および 463-481 (配列番号 372) ; 5-31、39-55、63-72、76-99、106-155、160-177、179-199、207-217、223-240、245-255、261-267、294-316、321-343、354-378、382-452、477-488、529-536、555-569、584-591、593-612、620-627、632-640、647-654、671-680、698-704、723-730、732-750、769-775、781-788、822-852 および 505-525 (配列番号 373) ; 3-18 (配列番号 374) ; 4-14 および 12-24 (配列番号 375) ; 4-11、22-30 および 12-25 (配列番号 376) ; 5-12 および 4-18 (配列番号 377) ; 4-28 および 7-14 (配列番号 378) ; 6-16 および 8-16 (配列番号 379) ; 4-15、18-33 および 24-36 (配列番号 380) ; 4-10、16-21 および 20-31 (配列番号 381) ; 6-19 (配列番号 382) ; 11-18 および 3-10 (配列番号 383) ; 13-24 および 3-15 (配列番号 384) ; 15-27 および 7-16 (配列番号 385) ; 11-16 および 1-15 (配列番号 386) ; 4-16 および 9-21 (配列番号 387) ; 4-24、40-48、54-67 および 22-39 (配列番号 388) ; 6-30、34-55、62-68、78-106 および 68-74 (配列番号 389) ; 3-14 (配列番号 390) ; 9-19 および 6-21 (配列番号 391) ; 4-17 および 1-9 (配列番号 392) ; 5-30 および 1-8 (配列番号 393) ; 4-16、23-46、51-56 および 45-55 (配列番号 394) ; 7-16 (配列番号 395) ; 2-14 (配列番号 396) ; 4-36、43-65 および 50-62 (配列番号 397) ; 10-30 および 14-21 (配列番号 398) ; 9-17 および 1-10 (配列番号 399) ; 4-12 および 3-16 (配列番号 400) ; 4-15 および 5-23 (配列番号 401) ; 10-21 (配列番号 402) ; 6-16 (配列番号 403) ; 4-29、31-38 および 2-14 (配列番号 404) ; 4-35 および 33-42 (配列番号 405) ; 2-17 (配列番号 406) ; 9-18、30-35 および 15-33 (配列番号 407) ; 4-9 および 6-12 (配列番号 408) ; 3-17 (配列番号 409) ; 12-21、37-44、52-61、72-80 および 38-48 (配列番号 410) ; 4-10、29-44、54-61、69-78 および 13-27 (配列番号 411) ; 13-23、36-53 および 2-15 (配列番号 412) ; 4-25、28-46、56-72、81-99、120-132、134-142、154-160 および 129-141 (配列番号 413) ; 4-15、24-33、35-41、64-86 および 21-33 (配列番号 414) ; 9-15 および 4-13 (配列番号 415) ; 4-11、13-19、34-48 および 15-32 (配列番号 416) ; 4-21 および 11-31 (配列番号 417) ; 23-57 および 38-50 (配列番号 418) ; 4-32 および 3-13 (配列番号 419) ; 4-10、13-25、32-42、56-68、72-84 および 26-38 (配列番号 420) ; 4-20、31-48、52-58、65-71、80-93、99-108、114-123 および 37-49 (配列番号 421) ; 6-12、14-20 および 3-25 (配列番号 422) ; 14-25、27-38 および 5-14 (配列番号 423) ; 4-41、57-105、109-118、123-136、144-152 および 86-99 (配列番号 424) ; 6-19 (配列番号 425) ; 2-19 (配列番号 426) ; 14-47 および 1-14 (配列番号 427) ; 4-21、29-44 および 2-18 (配列番号 428) ; 23-29 および 10-28 (配列番号 429) ; 6-16、22-36 および 11-22 (配列番号 430) ; 4-19、30-44 および 18-27 (配列番号 431) ; 5-15、37-45、58-65 および 38-47 (配列番号 432) ; 4-15、23-34 および 4-15 (配列番号 433) ; 30-36、44-54、79-85、101-114、138-152、154-164、170-175、179-200、213-220、223-240、243-255、258-264、268-284 および 10-28 (配列番号 434) ; 表1Bの「同一領域」の列のアミノ酸配列を含むペプチド、特に以下のアミノ酸を含むペプチド : 210-226 および 738-753 (配列番号 449) ; 326-344、326-348、338-354、371-392、801-809 および 877-901 (配列番号 450) ; 893-906 (配列番号 451) ; 51-69 (配列番号 452) ; 110-125 (配列番号 453) ; 291-305 (配列番号 454) ; 210-226 および 738-753 (配列番号 455) ; 326-344、326-348、338-354、371-392、801-809 および 877-901 (配列番号 456) ; 893-906 (配列番号 457) ; 51-69 (配列番号 458) ; 110-125

(配列番号 459); 291-305 (配列番号 460); 32-44 (配列番号 461); 399-410 (配列番号 462); 表2の「aa from」から「aa to」の列に特定した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 : 120-143、138-161 および 156-179 (配列番号 218); 110-129 および 168-184 (配列番号 219); 74-90 (配列番号 222); 759-773 (配列番号 223); 237-260 (配列番号 224); 265-284 (配列番号 225); 65-74 (配列番号 226); 41-50 (配列番号 227); 163-174 (配列番号 229); 26-37 (配列番号 230); 174-189 (配列番号 232); 240-256 (配列番号 234); 285-297 (配列番号 236); 238-247 (配列番号 238); 491-519 (配列番号 239); 114-140 (配列番号 243); 267-284 (配列番号 250); 439-453 (配列番号 252); 162-178 (配列番号 253); 347-364 (配列番号 254); 699-715 (配列番号 255); 60-71 (配列番号 256); 244-257 (配列番号 257); 44-63 および 57-76 (配列番号 258); 185-196 (配列番号 260); 119-129 (配列番号 263); 182-195 (配列番号 266); 32-44 および 424-442 (配列番号 267); 247-256 (配列番号 268); 678-694、785-805、55-77 および 72-94 (配列番号 269); 210-226 (配列番号 281); 37-59 (配列番号 289); 13-29 (配列番号 296); 136-159 (配列番号 348); 205-222 (配列番号 349); 99-110 (配列番号 350); 160-176 (配列番号 351); 457-470 (配列番号 355); 221-237 (配列番号 356); 167-190 (配列番号 357); 96-120 (配列番号 361); 399-417、503-519 および 544-563 (配列番号 364); 46-68、159-183 および 184-198 (配列番号 371); 463-481 (配列番号 372); 表4の「aa from」から「aa to」の列に特定した免疫原性エピトープ、特に以下のアミノ酸を含むペプチド : 110-129 および 168-184 (配列番号 219); 877-901、333-354、326-344 および 801-809 (配列番号 277); 1-54 (配列番号 347); 544-563、31-51、107-119、399-417 および 503-519 (配列番号 364); 120-198 (配列番号 218); 20-35 (配列番号 219); 118-201 (配列番号 221); 48-132 (配列番号 242); 118-136 (配列番号 249); 162-178 (配列番号 253); 347-364 (配列番号 254); 699-715 (配列番号 255); 50-76 (配列番号 258); 785-819 および 44-128 (配列番号 269); 90-128 (配列番号 274); 314-384 (配列番号 289); 327-349 (配列番号 293); 242-314、405-478 および 23-100 (配列番号 304); 129-210 (配列番号 305); 162-188 (配列番号 307); 750-772 (配列番号 310); 1-56 (配列番号 335); 322-337 (配列番号 337); 72-90 (配列番号 339); 374-395 (配列番号 345); 136-159 (配列番号 348); 141-164 (配列番号 358); 96-157 (配列番号 361); 1-82 (配列番号 363); 489-556 (配列番号 364); 159-183 および 49-133 (配列番号 371); 表5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(aa)」の列のアミノ酸配列を含むペプチド、特に以下のアミノ酸を含むペプチド : 4-26、35-41、53-61、73-84、103-108、114-120、140-146、156-162、192-208、214-219、227-233、239-252、260-268、284-297、1-48 および 113-133 (配列番号 475); 4-27、38-44、50-56、59-64、72-79、83-89、92-97、108-116、123-148、152-167、183-196、200-220、232-244、255-261、265-274、282-302、309-317、1-79 および 231-302 (配列番号 476); 6-28、66-72、85-105、115-121、144-151、160-170、176-185、223-230、252-288、296-310、319-333、367-374、458-464、471-480、483-488、520-528、530-549、559-564、593-601、606-616、636-643、655-662、676-682、684-699、719-726、735-750、757-764、777-785、799-810、812-843、846-853、868-873、880-889、891-899、909-929、934-940、963-969、998-1004、1007-1014、1016-1022、1030-1046、1-80 および 808-821 (配列番号 477); 7-24、35-41、75-81、91-114、122-132、137-144、148-156、183-192、194-200、212-228、233-238、251-258、275-295、326-332、337-346、1-79 および 305-321 (配列番号 478); 31-38、42-52、66-72、86-92、98-104、115-122、127-146、154-164、169-187、198-212、225-237、255-269、13-92 および 135-142 (配列番号 479); 4-36、39-49、63-69、71-77、81-88、123-131、133-139、160-169、174-180、188-194、210-217、273-278、289-300、317-334、336-341、383-401、425-438、1-68、212-270 および 402-446 (配列番号 480); 21-29、31-42、49-63、72-79、81-93、112-132、159-165、188-195、197-232、262-267、279-286、294-301、318-326、348-366、381-405、409-42

6、436-465、471-480、484-492、497-505、521-544、554-561、567-577、581-589、601-609、611-622、636-651、653-667、669-685、700-708、716-722、729-744、749-766、780-786、789-811、814-864、1-57 および 84-106 (配列番号 481) ; 6-24、35-48、57-63、72-78、87-92、113-119、123-137、147-153、173-181、212-233 および 1-124 (配列番号 482) ; 13-34、62-69、78-83、86-91、98-104、107-115、146-159、179-188、195-205、209-221、226-233、239-253、276-282、284-294、297-308、331-354、375-382、388-399、421-433、449-458、464-469、472-491、508-513、525-531、534-550、575-593、601-618、629-635、654-661、666-680、706-721、723-740、771-805、810-830、845-851 および 1-84 (配列番号 483) ; 4-32、45-64、73-83、86-92、100-111、125-147、157-163、170-175、177-188、226-232、245-252、258-274、320-335、348-359 および 1-71 (配列番号 484) ; 13-40、43-71、76-83、87-101、109-119、125-156、162-175、182-219、226-232、240-262、270-287、306-318、326-342、344-408、414-444、449-456 および 1-51 (配列番号 485) ; 4-16、18-34、45-54、99-108、134-140、203-212、241-257、266-274、279-291、308-315、330-336、355-370、374-382、402-410、428-455、466-472、474-480、531-554、560-566、572-580、597-618、632-660、664-674、676-685、691-705、708-735、750-768、1-87 および 342-480 (配列番号 486) ; 表6の「aa from」から「aa to」の列に特定した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 : 115-132 および 1-26 (配列番号 475) ; 33-55 (配列番号 476) ; 1-25 (配列番号 478) ; 37-61 (配列番号 479) ; 1-24 (配列番号 480) ; 1-23 (配列番号 481) ; 46-60 (配列番号 482) ; 1-28、23-50 および 45-71 (配列番号 483) ; 1-22 および 17-38 (配列番号 484) ; 1-22 および 17-38 (配列番号 485) ; 1-27、22-47 および 422-447 (配列番号 486) ; 表7の「aa from」から「aa to」の列に特定した免疫原性エピトープ、特に以下のアミノ酸を含むペプチド : 115-132 および 1-47 (配列番号 475) ; 1-55 (配列番号 476) ; 22-85 (配列番号 477) ; 307-320 および 1-44 (配列番号 478) ; 15-76 および 40-92 (配列番号 479) ; 1-59、213-269 および 403-445 (配列番号 480) ; 1-56 および 85-105 (配列番号 481) ; 37-121 (配列番号 482) ; 1-71 (配列番号 483) ; 1-38 (配列番号 484) ; 1-38 (配列番号 485) ; 1-47 (配列番号 486) 。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/315 (2006.01)	C 0 7 K 14/315	4 C 0 8 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 1/14 (2006.01)	C 0 7 K 1/14	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 38/27 (2006.01)	A 6 1 K 37/36	
A 6 1 K 33/00 (2006.01)	A 6 1 K 33/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 R	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
	G 0 1 N 33/569 C	
	C 1 2 N 5/00 1 0 2	

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(72)発明者 アンドレアス・マインケ

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

(72)発明者 エステル・ナデュ

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

(72)発明者 マルクス・ハンナー

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

(72)発明者 マルクス・ホルキー

オーストリア、アー - 1 2 0 0 ヴィエナ、ヴェーリシュトラッセ 5 1 / 2 アー / 2 0 番

(72)発明者 ザビーネ・カレンダ

オーストリア、アー - 1 1 6 0 ヴィーン、ヴァットガッセ 3 0 - 3 2 / 1 8 番

(72)発明者 ソーニャ・プルストメルスキー

オーストリア、アー - 1 1 0 0 ヴィーン、ザーウルカシュトラッセ 9 番、パルツェレ 3

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CA26 CB21 DA13 DA36 FB02 FB03

4B024 AA01 AA13 BA31 BA50 BA61 CA01 CA11 DA06 EA04 GA01

GA14 HA01 HA14 HA15 HA17

4B063 QA19 QQ03 QQ06 QQ42 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR55 QR73

QR75 QS33 QS34 QX01

4B064 AG26 AG31 CA19 CA20 DA01 DA15

4B065 AA26X AA49Y AB01 AC14 BA03 CA24 CA25 CA45 CA46

4C084	AA02	DB22	MA02	NA14	ZB352	ZC752				
4C085	AA03	AA14	AA38	BA14	CC07	CC23	DD63	EE03	EE06	FF01
		FF03								
4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA02	MA04	NA14	ZB09	ZB35	ZC75
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA11	CA40	DA75	DA86	EA29
		EA52	FA72	FA74						

专利名称(译)	无乳链球菌抗原I + II		
公开(公告)号	JP2011101642A	公开(公告)日	2011-05-26
申请号	JP2010250135	申请日	2010-11-08
[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 エステルナデュ マルクスハンナー マルクスホルキー ザビーネカレンダ ソーニャプルストメルスキー		
发明人	アンドレアス・マインケ エステル・ナデュ マルクス・ハンナー マルクス・ホルキー ザビーネ・カレンダ ソーニャ・プルストメルスキー		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12N1/21 C07K14/315 C12P21/02 C07K16/12 C07K16/46 C12N15/02 C12P21/08 C07K1/14 C12Q1/68 C07K19/00 A61K39/09 A61P31/04 A61P37/04 A61K38 /00 A61K31/711 A61K39/39 A61K38/27 A61K33/00 A61P43/00 A61K39/395 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61P11/00 A61P17/00 A61P19/08 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/315 C07K2317/00 C07K16/1275		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N5/00.101 C12N1/21 C07K14/315 C12P21/02.C C07K16 /12 C07K16/46 C12N15/00.C C12P21/08 C07K1/14 C12Q1/68.A C07K19/00 A61K39/09 A61P31/04 A61P37/04 A61K37/02 A61K31/711 A61K39/39 A61K37/36 A61K33/00 A61P43/00.121 A61K39/395.R G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/569.C C12N5/00.102 A61K38/00 A61K38/27 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CA26 2G045/CB21 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045 /FB03 4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA14 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024 /HA17 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR73 4B063/QR75 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064 /AG26 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA26X 4B065/AA49Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084 /AA02 4C084/DB22 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB352 4C084/ZC752 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/AA38 4C085/BA14 4C085/CC07 4C085/CC23 4C085/DD63 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085 /FF01 4C085/FF03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB09 4C086/ZB35 4C086/ZC75 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二 中川正幸		

优先权

2003450112 2003-05-07 EP

2003450266 2003-11-28 EP

外部链接

Espacenet

摘要(译)

无乳链球菌是人类四肢和基础疾病患者的重要病原体。B组链球菌是新生儿全身和局部感染的主要原因。自1970年代以来,GBS一直是美国新生儿的主要病原体。细菌感染可导致危及生命的疾病,如败血症,肺炎和脑膜炎。提供了抗无乳链球菌的药物组合物,特别是疫苗。分离的编码无乳链球菌超免疫血清反应性抗原或其片段和超免疫血清反应性抗原或其片段的核酸分子,分离这种抗原的方法及其特定用途。[选择图]无

ストレプトモナス 属、"アカ シア"属、 "カサネ"属 菌	検定機能 (同源性による)	予測菌種名と遺伝子座**	ORFおよび ストリーニ ン遺伝子領域 の位置 (aa)	同定された 配列番号 の数の	配列番号 IDNA、 GenBank 番号	
gsh00012	ペプター、カタラーゼ と類似	20,30,35-46,70,72,87,92,98,112,137,152,161,177,186,193 3,200,206,205-213,215,282,294,308,313,320-326,349-355, 374,384,398-406,423,435	10,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,950,951,952,953,954,955,956,957,958,959,960,961,962,963,964,965,966,967,968,969,970,971,972,973,974,975,976,977,978,979,980,981,982,983,984,985,986,987,988,989,990	115-199	1,248	
gsh00016	ペプター、カタラーゼ と類似	25,230,41-44,70,72,99,103,109,127,143,155,163,180,197 197-202,214-216,262,304,336,372,382,384,393,398,404 97,412-418,434-444	10,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,950,951,952,953,954,955,956,957,958,959,960,961,962,963,964,965,966,967,968,969,970,971,972,973,974,975,976,977,978,979,980,981,982,983,984,985,986,987,988,989,990	102-124	5,220	
gsh00031	ペプター、カタラーゼ と類似	11,12,16-25,35-47,52-67,72-78,83,99,131,141,152,159,163,186,207,219,227,244,277,283,295,301,303,313,318,322,36,124 39,358,358-362,378,387,397,425,431	10,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,950,951,952,953,954,955,956,957,958,959,960,961,962,963,964,965,966,967,968,969,970,971,972,973,974,975,976,977,978,979,980,981,982,983,984,985,986,987,988,989,990	46-291	4,221	
gsh00048	ペプター、カタラーゼ と類似	38,43,44,64,70,76,78,84,94,100,102,113,119,134,140,149 163,174,178,188,194,207,242,267,262,269,290	10,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87			