

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-538718

(P2005-538718A)

(43) 公表日 平成17年12月22日(2005.12.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A 6 1 K 9/12</b>	A 6 1 K 9/12	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 35/16</b>	A 6 1 K 35/16	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/00</b>	A 6 1 K 39/00	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/00	H
	A 6 1 K 39/395	D
		4 C O 7 6
		4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-536258 (P2004-536258)  
 (86) (22) 出願日 平成15年9月15日 (2003. 9. 15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成17年5月9日 (2005. 5. 9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/028789  
 (87) 国際公開番号 W02004/025416  
 (87) 国際公開日 平成16年3月25日 (2004. 3. 25)  
 (31) 優先権主張番号 60/410, 303  
 (32) 優先日 平成14年9月13日 (2002. 9. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505092474  
 ザ テキサス エイ アンド エム ユニ  
 バースティ システム  
 アメリカ合衆国 テキサス 77843-  
 3369, カレッヂ ステーション, タム  
 3369  
 (71) 出願人 505092485  
 インビビテックス, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 ジョージア 30004  
 , アルファレッタ, スウィート 400,  
 サンクチャーリー パークウェイ 1165

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グラム陽性菌由来の表面固定化タンパク質を同定するためのバイオインフォマティクス法及びそれによって得られるタンパク質

## (57) 【要約】

グラム陽性菌、例えばエンテロコッカス属、ブドウ球菌属、連鎖球菌属及びバシラス属細菌由来のMSCRAMM (登録商標) 様の特徴を有するタンパク質を同定し且つ単離するバイオインフォマティクス法であって、グラム陽性菌によって引き起こされる感染症を予防及び治療する方法に利用できるバイオインフォマティクス法が提供される。この方法は、配列情報から、C末端領域に推定上のLPXTG (配列番号: 1) 細胞壁選別シグナルを有し且つ前記タンパク質及び該LPXTG固定化細胞壁タンパク質を有するMSCRAMM (登録商標) タンパク質と別の構造類似性を有するタンパク質を同定することを含む。本発明を使用して同定し且つ単離されるMSCRAMM (登録商標) タンパク質及びその免疫原性領域は、グラム陽性菌感染症の診断、予防及び治療に有用な抗体を産生させるのに使用し得る。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞外マトリックス分子に結合するグラム陽性菌由来のLPXTG含有細胞壁固定化表面タンパク質の同定方法であって、配列情報のデータベースを検索してC末端領域にLPXTGモチーフを有するグラム陽性菌由来の推定上のタンパク質配列を同定し、同定された配列を分析して1個又はそれ以上のIg様折りたたみ領域の存在を調べ、次いで前記の推定上のタンパク質配列を、この配列が細胞外マトリックス分子に結合するLPXTG含有細胞壁固定化表面タンパク質の1個又はそれ以上のIg様折りたたみ領域を有する場合に、細胞外マトリックス分子に結合するLPXTG含有細胞壁固定化表面タンパク質として明確に同定することからなる、細胞外マトリックス分子に結合するグラム陽性菌由来のLPXTG含有細胞壁固定化表面タンパク質の同定方法。

10

## 【請求項 2】

グラム陽性菌がエンテロコッカス属、連鎖球菌属、ブドウ球菌属及びバシラス属からなる群の中から選択される属由来のものである請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

グラム陽性菌がエンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム(*Enterococcus faecium*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、ストレプトコッカス・ミュータンズ(*Streptococcus mutans*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermis*)及び炭疽菌(*Bacillus anthracis*)からなる群の中から選択される種

20

## 【請求項 4】

推定上のLPXTG含有タンパク質配列のIg様折りたたみが、該タンパク質の配列を、細胞外マトリックス分子に結合する公知のLPXTG含有細胞壁固定化表面タンパク質のIg様折りたたみの配列と比較することによって調べられるものである請求項1に記載の方法。

## 【請求項 5】

推定上のLPXTG含有タンパク質が、配列の比較に基づいた確率値を使用して公知のLPXTG含有タンパク質と比較されるものであり且つ推定上のLPXTG含有タンパク質が、確率値が<0.25である場合に、細胞外マトリックス分子に結合するLPXTG含有細胞壁固定化表面タンパク質として同定されるものである請求項1に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

請求項1に記載の方法により同定される単離タンパク質。

## 【請求項 7】

タンパク質が、SP0368、SP0462、SP0463、SP0464；EF2224、EF1091、EF1092、EF1093、EF3023、EF1269、EF0089、EF1824、EF1075、EF1074、EF1651、SMU.610、SMU.987、SMU.63c、SA2447、SA2290、SA2291、SA2423、SA0742、SA0519、SA0520、SA0521、BA0871、BA5258、SERP\_GSE\_14\_6.AA、SERP\_GRE\_2\_50.AA、SERP\_GSE\_9\_28.AA、SEPN\_5\_124.AA及びSEPN\_8\_63.AAとして同定されるグラム陽性菌タンパク質からなる群の中から選択されるものである請求項6に記載の単離タンパク質。

## 【請求項 8】

請求項6に記載のタンパク質の単離Aドメイン。

40

## 【請求項 9】

請求項6に記載のタンパク質に結合することができる単離抗体。

## 【請求項 10】

請求項6に記載のタンパク質をコードする単離核酸配列。

## 【請求項 11】

細胞外マトリックス分子に結合するグラム陽性菌由来のLPXTG含有細胞壁固定化表面タンパク質の同定方法であって、配列情報のデータベースを検索してC末端領域にLPXTGモチーフを有するグラム陽性菌由来の推定上のタンパク質配列を同定し、同定された配列を分析して、該配列がN末端にシグナルペプチドを有し、疎水性貫膜セグメントを伴うC末

50

端の近くにLPXTGモチーフを有し且つC末端に数個の正帯電残基を有するか否かを調べ、次いで前記の推定上のタンパク質配列を、該配列がN末端にシグナルペプチドを有し、疎水性貫膜セグメントを伴うC末端の近くにLPXTGモチーフを有し且つC末端に数個の正帯電残基を有する場合に、細胞外マトリックス分子に結合するLPXTG含有の細胞壁固定化表面タンパク質として明確に同定することからなる、細胞外マトリックス分子に結合するグラム陽性菌由来のLPXTG含有細胞壁固定化表面タンパク質の同定方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 の方法により同定された単離タンパク質。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載のタンパク質の単離 A ドメイン。

10

【請求項 1 4】

請求項 1 2 に記載のタンパク質に結合することができる単離抗体。

【請求項 1 5】

請求項 1 1 に記載のタンパク質をコードする単離核酸配列。

【請求項 1 6】

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：19、配列番号：20～24 からなる群の中から選択されるアミノ酸配列及び前記配列の A ドメインを有するグラム陽性菌由来の単離 LPXTG 含有細胞壁固定化表面タンパク質又は前記タンパク質由来の A ドメイン。

20

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載のタンパク質をコードする単離核酸配列。

【請求項 1 8】

配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16 及び配列番号：18 からなる群の中から選択される核酸配列又はその縮重を有するグラム陽性菌由来の LPXTG 含有細胞壁固定化表面タンパク質又は該タンパク質由来の A ドメインをコードする単離核酸。

【請求項 1 9】

請求項 1 6 に記載のタンパク質に結合することができる単離抗体。

【請求項 2 0】

抗体がモノクロナール抗体である請求項 1 9 に記載の抗体。

30

【請求項 2 1】

一本鎖抗体、キメラ抗体、ネズミ抗体、ヒト化抗体及びヒトモノクロナール抗体からなる群の中から選択される請求項 1 9 に記載の抗体。

【請求項 2 2】

前記抗体がヒト又は動物においてグラム陽性菌感染症を治療又は予防するものである請求項 1 9 に記載の抗体。

【請求項 2 3】

前記抗体がヒト又は動物において非経口投与、経口投与、鼻腔内投与、皮下投与、エアゾール投与又は静脈内投与に適したものである請求項 1 9 に記載の抗体。

40

【請求項 2 4】

請求項 1 9 に記載の抗体を含有する単離抗血清。

【請求項 2 5】

請求項 1 9 に記載の抗体と、該抗体による結合を検出するための手段とからなる診断キット。

【請求項 2 6】

前記の結合の検出手段が前記抗体に連結される検出可能標識からなるものである請求項 2 5 に記載の診断キット。

【請求項 2 7】

ヒト又は動物患者に有効量の請求項 1 9 に記載の抗体を投与することからなるグラム陽

50

性菌の感染症の治療又は予防方法。

【請求項 28】

有効量の請求項 19 に記載の抗体と、製薬学的に許容し得るビヒクル、担体又は賦形剤とを含有してなる医薬組成物。

【請求項 29】

免疫原有効量の請求項 8 に記載のタンパク質又はペプチドと、製薬学的に許容し得るビヒクル、担体又は賦形剤とを含有してなる医薬組成物。

【請求項 30】

免疫原有効量の請求項 16 に記載のタンパク質又はペプチドと、製薬学的に許容し得るビヒクル、担体又は賦形剤とを含有してなる医薬組成物。

10

【請求項 31】

ヒト又は動物患者に有効量の請求項 19 に記載の抗体を投与することからなるグラム陽性菌の感染症の治療又は予防方法。

【請求項 32】

グラム陽性菌によって引き起こされる感染症の診断方法であって、かかる感染症を有すると疑われる生物材料の試料に請求項 19 に記載の抗体を導入し、次いで前記抗体が前記試料中の抗原に結合するか否かを調べることからなるグラム陽性菌によって引き起こされる感染症の診断方法。

【請求項 33】

ヒト又は動物に免疫有効量の請求項 8 に記載のタンパク質を投与することからなるヒト又は動物における免疫原性反応の誘発方法。

20

【請求項 34】

免疫原有効量の請求項 8 に記載のタンパク質と、製薬学的に許容し得るビヒクル、担体又は賦形剤とを含有してなるワクチン。

【請求項 35】

グラム陽性菌由来の抗原を含有すると疑われる生物試料中のグラム陽性菌由来の抗原の存在のアッセイ方法であって、(a) 前記試料を、固相免疫吸着剤に結合された固相固定化抗体か又は可溶性標識抗体の形の請求項 19 に記載の抗体のいずれかと同時に含有する混合物を形成し；(b) 工程(a)で形成された混合物を、試料中の抗原を前記の固定化抗体又は前記の標識抗体に結合させるのに十分な時間及び条件下でインキュベートし；次いで(c) 固相免疫吸着剤に結合された標識抗体を検出するか又は標識可溶性抗体を検出することからなるグラム陽性菌由来の抗原を含有すると疑われる生物試料中のグラム陽性菌由来の抗原の存在のアッセイ方法。

30

【請求項 36】

さらに洗浄、攪拌、振盪又は濾過工程を含む請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

グラム陽性菌抗原を有すると疑われるヒト又は動物患者におけるグラム陽性菌抗原の量の監視方法であって、(a) 前記のヒト又は動物患者から生物試料を採取し；(b) 前記の試料に測定可能量の請求項 19 に記載の抗体を導入し；(c) 該試料を、抗体と組み合わせた際に前記の抗原と抗体とを結合させるのに十分な時間及び条件下でインキュベートし；次いで(d) 該試料中に存在するグラム陽性菌抗原の量を示す抗原-抗体結合の量を測定することによって試料中の抗原の量を監視することからなるグラム陽性菌抗原を有すると疑われるヒト又は動物患者にグラム陽性菌抗原の量の監視方法。

40

【請求項 38】

免疫原有効量の請求項 16 に記載のタンパク質と、製薬学的に許容し得るビヒクル、担体又は賦形剤とを含有してなる医薬組成物。

【請求項 39】

グラム陽性菌によって引き起こされる感染症の診断方法であって、請求項 16 に記載のタンパク質をかかかる感染症を有すると疑われる生物材料の試料に導入し且つ前記抗体が前記試料中の抗体に結合するか否かを調べることからなるグラム陽性菌によって引き起こさ

50

れる感染症の診断方法。

【請求項 40】

ヒト又は動物に免疫有効量の請求項 16 に記載のタンパク質を投与することからなるヒト又は動物における免疫原性反応の誘発方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2002年9月13日付けで出願された米国仮出願第60/410,303号の優先権を主張する。 10

【0002】

発明の分野

本発明は、微生物学、分子生物学及び免疫学の分野に関し、さらに詳しくはMSCRAMM (登録商標)として知られている表面固定化タンパク質(surface-anchored protein)に関し、また免疫グロブリン(Ig)様折りたたみ領域を含む潜在的(potential)タンパク質由来の構造的特徴を検出することにより認識可能な細胞壁選別シグナルを有するグラム陽性菌由来の推定上のMSCRAMM (登録商標)タンパク質、すなわち細胞外マトリックス分子に結合できるタンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子を同定するバイオインフォマティクス法に関する。さらにまた、本発明は、かかるタンパク質を認識する抗体、例えばポリクロナール抗体及びモノクロナール抗体、並びにモノクロナール抗体をコードする核酸を用いて形質転換された宿主細胞に関し、またヒト及び動物のグラム陽性菌感染症の診断、治療又は予防におけるかかる抗体の使用に関する。 20

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ヒト及び動物において無数の感染症を引き起こす可能性があることから、医薬及び疫学の分野で重要になっている多数のグラム陽性菌が存在する。一つのこのようなグラム陽性菌、エンテロコッカス・フェカーリス (*Enterococcus faecalis*) は、哺乳動物の腸内の共生菌叢に属する。グラム陽性菌はまた、細菌性心内膜炎の病原物質として長い間知られている (Murray、1990年)。この10年間で、エンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) は、典型的に抗生物質療法を受けている入院患者において感染症を引き起こす日和見性院内病原体としてますます出現している。この細菌の臨床株は、最も一般的に使用されている抗生物質に対して多数の後天的及び内因的に進化させた耐性メカニズムを宿主場合が多く、腸内球菌感染症の治療を困難にしている (Murray、1990年、1999年) (Tailor、1993年) (Huycke、1998年)。多くの抗生物質耐性遺伝子は、可動遺伝要素、例えば小プラスミド及びトランスポゾンにある (Paulsen、2003年)。これは、この生物から他の細菌種への耐性決定因子の遺伝的伝達、例えば、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に対するバンコマイシン耐性について最近文書化された伝達について懸念を生じている (CDC、2002年)。抑制することが難しい感染症を一般に引き起こすさらに別のグラム陽性菌、例えばエンテロコッカス属の中の別の細菌、例えばエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、並びにストレプトコッカス属の細菌、例えばストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) 及び肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属の細菌、例えば黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 及び表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermis*)、並びにバシラス属の細菌、例えば炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) が知られている。 40

【0004】

哺乳動物組織に接着することができるものが、微生物感染の定着及び開始の重要なステップである。しかし、微生物接着に関する多数の未知の因子に照らして、グラム陽性菌の比較的知られていない接着メカニズムについて研究し、得られた情報を利用して代替抗菌 50

療法を開発するための手段を提供する挑戦が相変わらずある。このような療法の開発への1つの侵入 (inroad)は、上皮細胞及び内皮細胞の下部の、主としてコラーゲンやその他の糖タンパク質からなる複雑で、動的で且つ多機能な構造であるヒト細胞外マトリックスの存在である。外部環境に対する最も外側の層として、それは病原性細菌のための主要な接着標的及び入り口である (Foster及びHook、1998年) (Westerlund及びKorhonen、1993年)。ECM成分に特異的に結合する多数の細菌性付着因子が分子レベルで特定されている。まとめてMSCRAMM (登録商標) タンパク質 (微生物表面成分認識接着性マトリックス分子) と呼ばれるグラム陽性菌由来の一群の関連細胞表面タンパク質は、ECMの主要な成分、例えばコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、フィブリノーゲン、ケラチン、ピトロネクチン及び骨シアロタンパク質に結合する (Patti、1994年) (Foster及びHook、1998年) (Tung、2000年) (O'Brien、2002年)。MSCRAMM (登録商標) タンパク質は、典型的には細胞質膜を横切るSec-依存性輸送用のN末端シグナル配列と、その後続くほとんどの場合に結合活性を示すN末端Aドメインと、MSCRAMM (登録商標) タンパク質を結合する一群のフィブロネクチンにおいてフィブロネクチン結合を付与する反復Bドメインとからなるモザイクタンパク質である (Johら、1994年)。細菌細胞壁に対する共有結合は、細胞壁橋架け (spanning) ドメインが前にあり且つ後ろに疎水性貫膜領域があり、そして最後に正に帯電したアミノ酸残基の短い配列からなる細胞質ゾル尾部があるC末端に配置されたLPxTGモチーフによって媒介される (Schneewindら、1995年) (Mazmanianら、2001年)。

#### 【0005】

いずれにしても、抗生物質耐性細菌株の発生を増やす可能性なしに効率的且つ効果的な方法で種々様々な細菌感染症に対応する新規な手段を開発するためには、感染症の分野において未だ個々の問題がある。さらにまた、特に入院患者において細菌株一般及び抗生物質耐性株一般によって引き起こされる潜在的な問題に照らして、抗生物質を使用せず且つ抗生物質耐性菌株が発生する可能性を増大させることなく、このような感染症を抑える方法を開発することがますます重要である。従って、グラム陽性菌によって引き起こされる感染症を特定し、治療し且つ予防するための新規な手段を開発し且つこのような細菌由来の新規なMSCRAMM (登録商標) タンパク質であってグラム陽性菌による感染症の伝播を治療及び予防するための新規な方法をもたらす抗体を生じさせるであろう新規なMSCRAMM (登録商標) タンパク質を開発することが極めて望ましい。

#### 【発明の開示】

#### 【0006】

##### 発明の概要

従って、本発明の目的は、グラム陽性菌により生じる感染症を治療又は予防する方法に利用できるグラム陽性菌由来のMSCRAMM (登録商標) タンパク質を同定し且つ単離するバイオインフォマティクス方法を提供することにある。

#### 【0007】

本発明の別の目的は、本発明のバイオインフォマティクス法を使用して得られるタンパク質を同定し且つ単離すること、及びその中の有効な抗原性ドメイン、例えばAドメインを同定すること、並びにグラム陽性菌により生じる感染症を治療又は予防する方法においてこれらのドメインを利用することにある。

#### 【0008】

また、本発明の目的は、本発明のバイオインフォマティクス法を使用して単離され且つ同定されるタンパク質及び抗原性ドメインを利用して、これらのタンパク質及び抗原性領域を認識できる抗体であって、従ってグラム陽性菌によって引き起こされる病気及び感染症を診断、治療又は予防するのに有用であり得る抗体を生じさせることにある。

#### 【0009】

さらにまた、本発明の目的は、慣用の抗生物質療法の代替法として使用でき、従ってグラム陽性菌によって引き起こされる感染症を治療又は予防する安全且つ有効な方法を提供することができる本発明のバイオインフォマティクス法を使用して同定及び単離されるタンパク質及び抗原性ドメインを利用するワクチン、キット及び別の治療法を提供すること

にある。

【0010】

これらの目的及びその他の目的は、グラム陽性菌、例えばエンテロコッカス属、ブドウ球菌属、ストレプトコッカス属及びバシラス属の細菌の中から、多数のその他の細菌の中から、グラム陽性菌によって引き起こされる感染症を予防及び治療する方法に利用することができるMSCRAMM（登録商標）様の特徴を有するタンパク質を同定するバイオインフォマティクスアプローチを利用する本発明によって提供される。特に、この方法は、推定上のC末端LPXTG（配列番号：1）細胞壁選別シグナルと、LPXTG固定化細胞壁タンパク質を有するMSCRAMM（登録商標）タンパク質の構造類似性とを有するタンパク質を探索することを伴う。特に、本発明は、例えば免疫グロブリン様折りたたみを採用する(adopt)領域の位置を確認することによって、MSCRAMM（登録商標）タンパク質、すなわち細胞外マトリックス分子に結合することができるタンパク質を同定し且つ単離する方法を提供し、且つこれらのタンパク質をコードする本方法で同定される核酸由来のこれらのタンパク質の組換え製造を包含する。これらのIg折りたたみ含有領域は、同じサイズ及びIg型折りたたみの1～4個のドメインからなる免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）の解明された（solved）結晶構造（～50 - 500 aa）に対する幾つかの連続し且つ重複する一致（match）からなる。相同性Ig折りたたみ領域は、フィブロネクチン及びその他のIgSFタンパク質に認められるような“糸に通したビーズ（beads-in-a-string）”配置の連続モジュールを示す(Leahy, 1996年)(Sharma, 1999年)(Hamburger, 1999年)(Luo, 2000年)。例えば、Ig折りたたみサブドメイン(N2及びN3)の縦列反復は、ClfAのフィブリノーゲン結合ドメインの結晶構造に認められる。ClfA及び同様の構造のClfBの全長Aドメインは、追加のN末端サブドメインN1からなる(Deivanayagam, 2002年)(Perkins, 2001年)。配列及び二次構造類似性に基づいて、類似のサブドメイン組織はまた、別のMSCRAMM（登録商標）タンパク質、例えばFnbpA、FnbpB、Ace及びSdrタンパク質中にも期待される。CNA最小コラーゲン結合性ドメインの解明された結晶構造は、単一のIg型サブドメイン(N2)からなり(Symersky, 1997年)且つC末端反復ドメインB1及びB2それぞれはIg折りたたみサブドメインの縦列反復からなる(Deivanayagam, 2000年)。同様のモジュール構造が、B3及びB4反復中に期待される。

10

20

【0011】

本発明に従って、主要な細胞外マトリックスタンパク質に結合することができる新規なMSCRAMM（登録商標）様タンパク質表面固定化タンパク質は、グラム陽性菌、例えばエンテロコッカス属、ストレプトコッカス属、ブドウ球菌属及びバシラス属のグラム陽性菌から得られ、このようなタンパク質は、(i)ClfA及びCNAの解明されたIg折りたたみ結晶構造並びに別のMSCRAMM（登録商標）タンパク質の予測された三次構造に構造的に相同性であり、(ii)Ig折りたたみタンパク質に認められるような類似のβ-シートに富む二次構造を共有し且つ(iii)分泌シグナル、反復を後ろに伴う非反復ドメイン、及びC末端細胞壁固定ドメインと同様の構成を有することを特徴とする。また、本発明の方法によって同定されるタンパク質の結合は、これらが種々の細胞外マトリックス(ECM)分子、例えばタンパク質及びその他の成分を標的とし且つ結合することを確認した。例えば、3種類の単離タンパク質の3個はECMタンパク質に結合し；2個はフィブリノーゲンに結合し且つ少なくとも1個はコラーゲン及びラミニンに結合する。また、本発明のタンパク質は、ほとんどの分離株に存在することが明らかにされており、感染中に生体内で発現される。

30

40

【0012】

従って、本発明に従って、MSCRAMM（登録商標）タンパク質ファミリーの一般的な特徴であると思われる多数のIg折りたたみ単位のもジュール構造を同定し且つ単離する方法が提供される。MSCRAMM（登録商標）タンパク質のN-サブドメインの長さは、典型的には～150 aaであり、また本発明によって同定されるタンパク質、例えば以下に挙げたタンパク質は、そのAドメインに4個以上のIg折りたたみサブドメインを収容している。

【0013】

これらの態様並びに開示された発明の精神及び範囲に入る別法及び改変は、本明細書及

50

び / 又は本明細書で引用した参考文献から当業者には容易に明らかになるであろう。これらの参考文献の全部が、参考として組み込まれる。

【 0 0 1 4 】

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明に従って同定された種々の MSCRAMM (登録商標) タンパク質を表す図であり、該タンパク質の種々の領域及びこれらの免疫グロブリン様領域を例示する図である。

【 0 0 1 5 】

図 2 は、本発明の LPXTG 含有タンパク質の大腸菌発現及び精製 A ドメインのクーマシー染色 SDS-PAGE を例示する。

10

【 0 0 1 6 】

好ましい態様の詳細な説明

本発明に従って、グラム陽性菌、例えばエンテロコッカス属、ブドウ球菌属、ストレプトコッカス属及びバシラス属のような属からの細菌由来のタンパク質、特に MSCRAMM (登録商標) 様の特徴を有するタンパク質を同定し且つ単離し、同定され且つ分離されたタンパク質を利用して抗体を生じさせ且つグラム陽性菌によって引き起こされる感染症を診断、治療又は予防するバイオインフォマティクス法が提供される。一般的に、この方法は、推定上の C 末端 LPXTG (配列番号: 1) 細胞壁選別シグナル及び / 又は LPXTG 含有細胞壁固定化タンパク質を有する MSCRAMM (登録商標) タンパク質 (微生物表面成分認識接着性マトリックス分子) に対する別の構造類似物を用いてタンパク質を探索することを伴う。好ましい態様において、本発明は、MSCRAMM (登録商標) タンパク質、すなわち宿主細胞の細胞外マトリックス分子、例えばタンパク質、炭水化物及びその他の成分に結合する表面タンパク質 [但し、これらの配置されたタンパク質は免疫グロブリン様折りたたみを採用する (adopt) 領域を含有する] を同定し且つ単離する方法を提供する。これらの Ig 折りたたみ含有領域は、同じサイズ及び Ig 型折りたたみの 1 ~ 4 個のドメインからなる免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) の解明された結晶構造 (~ 50 - 500 aa) に対する幾つかの連続し且つ重複する一致 (match) からなる。相同性 Ig 折りたたみ領域は、フィブロネクチン及びその他の IgSF タンパク質に認められるような “糸に通したビーズ (beads-in-a-string)” 配置の連続モジュールを示す (Leahy, 1996年) (Sharma, 1999年) (Hamburger, 1999年) (Luo, 2000年)。例えば、Ig 折りたたみサブドメイン (N 2 及び N 3) の縦列反復は、ClfA のフィブリノーゲン結合ドメインの結晶構造に認められる。ClfA 及び同様の構造の ClfB の全長 A ドメインは、追加の N 末端サブドメイン、N 1 からなる (Deivanayagam, 2002年) (Perkins, 2001年)。配列及び二次構造類似性に基づいて、類似のサブドメイン組織はまた、別の MSCRAMM (登録商標) タンパク質、例えば FnbpA、FnbpB、Ace 及び Sdr タンパク質中に期待される。CNA 最小コラーゲン結合性ドメインの解明された結晶構造は、単一の Ig 型サブドメイン (N 2) からなり (Symersky, 1997年) 且つ C 末端反復ドメイン B 1 及び B 2 それぞれは、Ig 折りたたみサブドメインの縦列反復からなる (Deivanayagam, 2000年)。同様のモジュール構造は、B 3 及び B 4 反復中に期待される。

20

30

【 0 0 1 7 】

本発明に従って、新規な MSCRAMM (登録商標) 様タンパク質表面固定化タンパク質は、グラム陽性菌、例えばエンテロコッカス属、ストレプトコッカス属、ブドウ球菌属及びバシラス属のグラム陽性菌から得られ、このようなタンパク質は、(i) ClfA 及び CNA の解明された Ig 折りたたみ結晶構造並びに別の MSCRAMM (登録商標) タンパク質の予測された三次構造に構造的に相同性であり、(ii) Ig 折りたたみタンパク質に認められるような同様のシートに富む二次構造を共有し且つ (iii) 分泌シグナル、後ろに反復を伴う非反復ドメイン、及び C 末端細胞壁固定ドメインと同様の構成を有することを特徴とする。また、本発明の方法によって同定されるタンパク質の結合は、これらが種々の細胞外マトリックス分子を標的とし且つ結合することを確認した。例えば、単離タンパク質の 3 個は ECM タンパク質に結合し; 2 個はフィブリノーゲンに結合し且つ少なくとも 1 個はコラーゲン及びラミニンに結合する。また、本発明のタンパク質は、ほとんどの分離株に存在するこ

40

50

とが明らかにされており、感染中に生体内で発現される。

【0018】

本発明に従って、MSCRAMM（登録商標）タンパク質ファミリーの一般的な特徴を有する多数のIg折りたたみ単位のリモジュール構造を同定し且つ単離する方法が提供される。MSCRAMM（登録商標）タンパク質のN-サブドメインの長さは、典型的には～150 aaであり、また本発明によって同定されるタンパク質、例えば以下に挙げたタンパク質は、そのAドメインに4個以上のIg折りたたみサブドメインを収容している。本発明のMSCRAMM（登録商標）タンパク質及びこれらのAドメインの分離及びこれらに結合することができる抗体の産生又は病気を診断、治療又は予防する方法における使用は、米国特許第6,288,214号；第6,177,084号；第6,008,241号；第6,086,895号；第5,980,908号；第5,866,541号；第5,851,794号；第5,840,846号；第5,789,549号；第5,770,702号；第5,652,217号；第5,648,240号；第5,571,514号；第5,440,014号；第5,416,021号及び第5,320,951号公報；並びに国際公開第W0 00/68242号明細書に記載されているような別のMSCRAMM（登録商標）タンパク質を用いて記載されているものと同様である。前記の参考文献の全部は、本明細書に参考文献として組み込まれる。

【0019】

本発明に従って、グラム陽性菌の1個又はそれ以上の表面固定化MSCRAMM（登録商標）タンパク質ファミリーの特徴的なリモジュール構造を同定し且つ分離するために、推定上のLPXTG含有タンパク質中に免疫グロブリン様（すなわちIg様）折りたたみの位置を確認する工程を含む一連の工程が採用される。この方法は、グラム陽性菌種由来の配列情報、例えばアミノ酸配列及び/又は核酸配列を含む現在知られているデータベースと共に使用でき且つLPXTG（配列番号：1）モチーフ有するタンパク質の位置を確認し、次いで配列情報を再調査し、分析して以下に記載のMSCRAMM（登録商標）と個々の構造類似性を有するタンパク質を選別する工程を含む。

【0020】

本発明の一般的な方法において、該方法の最初の部分は、1種又はそれ以上のグラム陽性菌に関する配列情報を含むデータベースを検索して、グラム陽性菌の注釈付きゲノム中の細胞壁固定化タンパク質に含まれるLPXTG（配列番号：1）モチーフを含有するこれらのタンパク質の位置を確認すべきである。これは、最初に、例えば配列決定センター、例えばTIGR、NCBIなどの多数のウェブサイトから関心事の1種又はそれ以上のグラム陽性菌由来のアミノ酸配列の全ゲノムを得ることによって行われる。好ましい方法において、これらの配列は、ダウンロードして、電子メモリーに保存した後に、ローカルシリコングラフィックスマシン(SGI)又はその他の適当なコンピューター装置で同定工程を実施することができる。好ましい方法において、この保存情報は、例えばNCBIから得られるプログラムフォーム“atdb”を使用することによってローカル検索可能データベースを作成するのに使用され、またこのような検索可能データベースは、SGIにローカルインストールされる。

【0021】

LPXTGモチーフは、保存配列情報から多数の適当なプログラムにより同定される。例えば、これらのLPXTGモチーフ含有タンパク質は、PHI-blastを使用して同定することができる。PHI-blastはNCBIから得られ、再度SGI又はその他の適当なコンピューター装置にローカルインストール及び保存できる。PHI-blastサーチは、縮重LPXTGパターン L-P-X-[TSA]-[GANS]（Xは任意のアミノ酸である）を使用する。PHI-blastの正確な鋳型(テンプレート)は、個々の生物に応じて変化させることができるが、いずれの場合にも、この装置はLPXTGモチーフを同定する方法を含む。それぞれの生物については、配列相同性を有していないブドウ球菌の少なくとも2個の公知の細胞壁固定化タンパク質及び利用できる場合には標的生物由来の公知の細胞壁固定化タンパク質を使用することが好ましい。

【0022】

LPXTG含有タンパク質はPHI-blastのような適当なシステムを使用して同定され、得られ、これらのタンパク質はMSCRAMM（登録商標）の特性を有するLPXTGモチーフ含有細胞壁固

定化タンパク質の典型的な特徴を有するタンパク質を選択するためにさらに分析される。好ましい方法において、これらの特徴は、一般にN末端にシグナルペプチド、C末端の近くにあるLPXTGモチーフ、その後続く疎水性貫膜セグメント、及びC末端に数個の正帯電残基を含むであろう。これらは下記のようにして行われる：

シグナルペプチドは、任意の適当な同定方法、例えば“Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites” Henrik Nielsen、Jacob Engelbrecht、Soren Brunak及びGunnar von Heijne、Protein Engineering 10, 1-6 (1997)、(参考文献として本明細書に組み込まれる)に記載の方法を使用して同定し得る。本方法において、本発明者らにとって好ましいシステムは <http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal/> のシグナルP予測サーバーであるが、別の類似のシグナルペプチド同定方法も使用し得る。LPXTGモチーフの位置及びC末端の正帯電アミノ酸残基の決定は配列の目視検査を使用して達成されるが、データベースを使用してこれらの特徴の存在を調べてもよい。

10

20

30

40

50

#### 【0023】

好ましい態様において、LPXTGモチーフの後の疎水性貫膜セグメントはまた、このような領域を予測できる慣用のプログラムを使用して位置を確認してもよい。一つのこのようなシステムの例は、貫膜セグメントの予測に使用できる<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>でインターネットで利用できるTMHMMサーバーである。しかし、多数の別の適当な予測サーバーが、インターネットで又は保存したコンピュータプログラムで、例えば[http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)で利用できるT-Mpred、<http://www.sbc.su.se/miklos/DAS/>で利用できるDASシステム及び<http://www.enzim.hu/hmmtop/>で利用できるHMMTOPで利用できる。

#### 【0024】

前記の操作に従うことによって、前記の特徴を含む推定上のLPXTG含有配列を、MSCRAMM (登録商標)タンパク質、すなわち細胞外マトリックス成分を結合できる能力を有する可能性が高いものとして選択することができる。これらの最初の工程に従って、このようにして同定されるLPXTG含有タンパク質は、結局、推定上のタンパク質又はそのAドメインを発現し且つこのタンパク質又はそのドメインが細胞外マトリックス成分に結合するか否かを決定することによって確認されるように、少なくとも約90%の時間でMSCRAMM (登録商標)タンパク質であることが分かることが意図される。これは、当該技術で常用され且つ十分に当業者の能力の範囲にあるであろう簡単な結合アッセイによって行われる。さらに、最初に位置が確認される又は前記のシグナルペプチド/C末端/貫膜同定特徴を使用してさらに選択されるLPXTG含有配列は、グラム陽性菌由来のMSCRAMM (登録商標)タンパク質の免疫グロブリン様折りたたみ特徴の存在を確認するために、以下に示すようにしてさらに分析することができる。

#### 【0025】

同様に、このような方法において、LPXTG含有細胞壁タンパク質はまた、注釈付きゲノムヌクレオチドデータベース、例えば <http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/CMRHomePage.sp1> のTIGRウェブサイト(総合微生物資源)に置かれている注釈付きゲノムヌクレオチドデータベースを使用しても位置を確認し得る。これらのデータベースについて、用語“LPXTG”又は“細胞壁”を使用して、関心事のゲノム中の細胞壁固定化タンパク質として注釈付けられているようなタンパク質を検索するのに使用し得る。

#### 【0026】

最後に、LPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質はまた、グラム陽性菌の注釈が付かないヌクレオチドゲノムにおいて同定し得る。この場合に、ゲノム配列は、配列決定センターのウェブサイトから得られ、また該配列は、適当ならば、ローカルシリコングラフィックスマシン(SGI)などのコンピューターメモリーに保存してもよい。遺伝子予測は、TIGR製のGlimmer 2.0のようなプログラムを使用して実施し得、これは個々の生物又は特徴に適合させるために所望するように部分変更し得るUNIX Cシェルスクリプトにより促進す

ることができる。好ましい方法において、予測された遺伝子は、適当な翻訳プログラム、好ましくは大量の配列を翻訳できる翻訳プログラムを使用してアミノ酸配列に翻訳される。最後に、翻訳されたアミノ酸配列は、前記のような検索可能なデータベースにローカルにフォーマットされ、以下に記載のようにして別の分析に供される。

#### 【0027】

本発明の好ましい方法において、諸工程を実施し、それによって推定上のLPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質中の免疫グロブリン様(Ig様)折りたたみを予測し、同定することができる。本発明に従って、推定上のLPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質のアミノ酸配列は、次いでMSCRAMM(登録商標)タンパク質の特徴を示すIg様折りたたみの存在を調べるために分析される。これは、多数の方法で、例えば(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dpssm/>)で利用できるウェブサーバー3D-PSSMを使用して入手し得るような折りたたみ認識ソフトウェアを使用して推定上のMSCRAMM(登録商標)を処理することにより行われる。折りたたみ予測の別の方法は、本明細書に参考として組み込まれる Kelley LA, MacCallum RM & Sternberg MJE. Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Progam 3D-PSSM. J Mol Biol. 2000 Jun 2; 299(2): 499-520で論じられている。この方法を使用すると、3D-PSSMのアウトプットは、公知且つ公表されたMSCRAMM(登録商標)として類似の3D構造を採用する供試配列の可能性を示す確率E値を与える。本発明に従って、公表されたIg様折りたたみ構造に対してE値<0.25を有するタンパク質は、予測されたIg様折りたたみを含有すると考えられ、このようなタンパク質は、本発明に従って有用なMSCRAMM(登録商標)タンパク質、すなわち宿主細胞の細胞外マトリックス上の付着因子分子を認識するタンパク質として同定される。

10

20

#### 【0028】

本発明はこのようにして実施され、それによりこのようなグラム陽性菌、例えばエンテロコッカス属、ストレプトコッカス属、ブドウ球菌属及びバシラス属のグラム陽性菌由来のMSCRAMM(登録商標)様の特徴を有するタンパク質及びAドメインを同定し且つ生成する。好ましい方法において、前記のようにして同定されたタンパク質又はその抗原性Aドメインは、本明細書に記載のようにして発現させ、精製し且つ特定し得る。

#### 【0029】

従って、本発明に従って、バイオインフォマティクスアプローチは、グラム陽性菌の中からMSCRAMM(登録商標)様特徴をもつタンパク質を同定するのに使用され、これらの予測されたタンパク質がMSCRAMM様特徴をもつことが明らかにされた。エンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus faecalis*)を使用する一つのこのような場合において、推定上のC末端LPXTG細胞壁選別シグナルを有する42個のタンパク質がエンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)ゲノムにおいて同定された。本方法に従って、これらのタンパク質は前記の方法でIg様折りたたみの存在を調べるために分析された。本方法に基づいて、9個のタンパク質が免疫グロブリン様折りたたみを採用する(adopt)領域を含むことが認められた。これらの9個のタンパク質についてのIg折りたたみ含有領域は、図1に示され、これは免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)の解明された結晶構造(~150-500 aa)に対する幾つかの連続し且つ重複した一致(match)からなり、同じサイズ及びIg型の折りたたみの1~4個のドメインからなる。相同性のIg折りたたみ領域は、腸球菌タンパク質の大部分をカバーし得、しかもフィブロネクチンやその他のIgSFタンパク質に認められる同様の“糸に通したビーズ(beads-in-a-string)”配置の連続モジュールを示し得る。

30

40

#### 【0030】

これらのタンパク質のAドメインのさらなる発現、精製及び分析を行った。図2に示すように、8個のタンパク質のA領域は、SDS-PAGEゲルで予期されたように移動したN末端His<sub>6</sub>標識融合タンパク質として発現し、これに対してEF1091はサイズで約160 kDaのバンドを示した；予測された113 kDaよりも大きいサイズの分子であった。おそらくは比較的大きなサイズに起因すると思われるある種の分解がタンパク質EF1091、EF1824、EF0089及びEF3023で認められた。それにもかかわらず、これらのタンパク質は>95%の純度である

50

と評価された。EF1824の推定上のグルコシルヒドロラーゼドメイン(アミノ酸42-819)(これは、前記タンパク質の残部から別々にクローン化され、発現された)(図1)は大腸菌細胞質の不溶性画分に認められた。従って、別の発現されたタンパク質について採用された在来の(native)、非変性条件下で金属アフィニティークロマトグラフィーによる精製は、実行できなかった。精製されたタンパク質は、さらにMaldi-TOF質量分析により特定された。SDS-PAGEで異常な移動を伴うEF1091を含めて9個のタンパク質全部が、アミノ酸配列から算出される分子量(表1)とよく一致したピークを示し、従ってフルサイズのタンパク質が後翻訳処理を伴わずに生成していたことが示される。

#### 【0031】

二次構造予測及びCD測定(表2)は、腸球菌タンパク質におけるIg折りたたみモジュール構造の発見を支持する。両方の方法は、類似した高い割合の $\beta$ -シート(~50%)とコイル、並びに少量の $\alpha$ らせん、MSCRAMM(登録商標)タンパク質及びIgSF全般に認められるような同じ状態を示す。EF1824及びEF3023における多量の $\alpha$ らせんはおそらくは、Ig折りたたみを有するその比較的短い予測された領域を反映し、且つ残りのタンパク質がMSCRAMM(登録商標)タンパク質と構造的により離れていることを示唆していると思われる。

10

#### 【0032】

表1. 分子サイズ分析

タンパク質	分子量(Da)	
	配列予測	質量分析
EF1091	113,021	113,025
EF1824	111,893	111,901
EF0089	122,853	122,857
EF3023	113,338	113,323
EF1092	47,291	47,295
EF2224	82,194	82,199
EF1269	64,776	64,776
EF1099	39,281	39,293
EF1093	62,363	62,366

20

30

#### 【0033】

表2. 二次構造要素の概要

配列予測			
タンパク質	$\alpha$ らせん	$\beta$ シート	その他
EF1091	0.10±0.05	0.33±0.08	0.53±0.06
EF1824	0.45±0.04	0.16±0.04	0.39±0.08
EF0089	0.07±0.07	0.44±0.14	0.49±0.08
EF3023	0.24±0.09	0.29±0.10	0.47±0.12
EF1092	0.15±0.05	0.36±0.06	0.49±0.10
EF2224	0.15±0.10	0.32±0.05	0.54±0.10
EF1269	0.09±0.10	0.42±0.12	0.49±0.10
EF1099	0.04±0.07	0.47±0.07	0.49±0.07
EF1093	0.09±0.06	0.41±0.11	0.51±0.11

CD測定			
タンパク質	$\alpha$ らせん	$\beta$ シート	その他
EF1091	0.14±0.05	0.41±0.11	0.45±0.10
EF1824	0.29±0.04	0.29±0.17	0.44±0.17
EF0089	0.08±0.04	0.49±0.13	0.43±0.12
EF3023	0.33±0.05	0.16±0.05	0.51±0.03
EF1092	0.05±0.04	0.50±0.12	0.45±0.14
EF2224	0.16±0.03	0.36±0.10	0.48±0.09
EF1269	0.03±0.04	0.55±0.14	0.42±0.12
EF1099	0.07±0.03	0.49±0.13	0.44±0.14
EF1093	0.06±0.05	0.57±0.18	0.37±0.17

10

## 【0034】

20

EF1099 (Ace) の他に、EF1269の一次配列は、明らかにMSCRAMM (登録商標) タンパク質ファミリーと関連している。Aceと同様に、それは2つのサブドメインの間に保存TYTDYVDモチーフと連結性チロシン残基を含む相同性N2及びN3サブドメインを有する。また、N1の欠如はAceに似ている。しかし、これらの配列の残りはほとんど相同性を共有しない。EF1269のAドメインは、フィブリノーゲン結合C1fA、C1fB、SdrG、及びそれほどではないにせよFnbpA及びFnbpBのように類似のN2及びN3サブドメインから作られているが、フィブリノーゲンを結合することができない。この点において、EF1269は、N2及びN3サブドメインを含有するSdrD及びSdrEに似ているが、それについてのリガンドはまだ見出されない。これは、EF1269 N2及びN3サブドメインの最も高い類似性はSdrE (同一性26%) の対応領域にあるという本発明者らの知見によって増強される。さらに、C末端EF1269配列の残部を作り上げる低い保存 (同一性20%) を有する2つの推定上の反復 (95及び109 aa) は、SdrE (EF1269の375~531 aaにわたって25%の同一性) のB反復との関連を示す。タンパク質EF1091、EF0089、EF1092、EF2224及びEF1093は、腸球菌及びブドウ球菌付着因子に対する高い配列同一性を欠くことから、前記のMSCRAMM (登録商標) タンパク質の単なる相同分子種ではない。しかし、これらのタンパク質は、類似の構造構成及びMSCRAMM (登録商標) タンパク質のような類似の予測された折りたたみを有する多数の $\beta$ -シートに富む二次構造を共有する。2つの残りのタンパク質EF1824及びEF3023は、公知の酵素、グルコシルヒドロラーゼ及びヒアルロナンリアーゼそれぞれに関連した大きな領域を有し、これらの領域をMSCRAMM (登録商標) タンパク質と区別する。ヒアルロニダーゼ活性は、感染中のヒアルロナン含有組織における細菌侵入及び伝播について重要であり及び/又はヒトの腸内での共生寿命 (commensal life) 中の細菌栄養におそらくは寄与するであろう。EF1824及びEF3023の大きな推定上の触媒ドメインは、MSCRAMM (登録商標) タンパク質に対するこれらの領域の前記の構造無関係性とよく一致する。

30

40

## 【0035】

主要ECMタンパク質に対する結合をスクリーニングすると、本発明者らはMSCRAMM (登録商標) タンパク質EF0089、EF1091、EF1092、EF1093及びEF2224の4つについてリガンドを認めた。エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) における2個以上のフィブリノーゲン結合MSCRAMM (登録商標) タンパク質の存在は、4種類のフィブリノーゲン結合MSCRAMM (登録商標) タンパク質C1fA、C1fB、FnbpA及びFnbpBが記載されている関連ブドウ球菌における知見と一致する (McDevittら、1994年) (Ni Eidhinら、1998年) (Wannら、2000

50

年)(Davisら、2001年；Hartfordら、2001年)。EF0089及びEF2224は、その長さ全体にわたってMSCRAMM(登録商標)タンパク質との強い構造類似性：モジュールIg折りたたみサブドメインを形成することが予測される類似の一次組織及び相同性 -シートに富む二次構造を有する。公知のフィブリノーゲン結合付着因子との比較的低い配列同一性は、リガンド結合についての新規な適合を意味し得る。本発明者らの初期の結果は、EF2224がフィブリノーゲンの鎖及び鎖に結合し、従ってClfBに類似していることを示唆する(Ni Eidhinら、1998年)。哺乳動物の組織表面は、細菌接着について多数の可能なリガンドを発現する。ここで、本発明者らはI型、III型及びIV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン及びピトロネクチンに対する結合を評価した。

#### 【0036】

本発明に従って、PCR法を使用して、本発明を使用して同定し、分離したタンパク質からAドメインを増幅し得る。PCRオリゴヌクレオチド、例えば下記の表3のオリゴヌクレオチドを使用して、EF0089、EF1091、EF1092、EF1093、EF1099、EF1269、EF1824、EF2224及びEF3023由来のAドメインをエンテロコッカス・フェカーリス(*E. faecalis*) V583又はエンテロコッカス・フェカーリス(*E. faecalis*) EF1(EF1099)ゲノムDNAから増幅し、大腸菌発現ベクターpQE-30(Qiagen製)にサブクローニングした。適当なpQE-30系組立て体を含む(haroboring)大腸菌M15(pREP4)培養液の1リットル培養液を、一夜培養液から初期2%接種物を用いて $OD_{600} = 0.6$ まで増殖させた。0.4mMイソプロピル-β-D-チアラクトシド(IPTG)を用いて2~3時間誘導した後に、細胞を遠心分離により回収し、10 mM Tris-Cl、100 mM NaCl (pH7.9)に再懸濁し、次いで-80 で保存した。

#### 【0037】

前記細胞を溶解し、発現タンパク質を放出させるために、細胞をフレンチプレスに1200 PSIの設定したゲージ圧を用いて2回通して、20,000 PSIの推定内部細胞圧を与えた。細胞溶解液を165,000×gの $RCF_{max}$ で遠心分離し、上清を0.45 μmフィルターを通して濾過した。容量を10 mM Tris-Cl、100 mM NaCl (pH7.9)で15mlに調節し、これと同じ緩衝液に溶解した0.2Mイミダゾールを加えて、非特異結合を最小限にするためにイミダゾール濃度を6.5mMまで増大させた。FPLC装置(Pharmacia製)に連結し且つ予め10mM Tris-Cl、100mM NaCl (pH7.9)で平衡化しておいたニッケルアフィニティークロマトグラフィーカラム(HiTrap chelating、Pharmacia製)に試料を充填した。結合タンパク質を、10 mM Tris-Cl、100mM NaCl (pH7.9)に溶解した0~100mMイミダゾールの直線勾配を用いて100~200 mlにわたって溶出した。タンパク質含有画分をSDS-PAGEで分析し(図2)、25mM Tris-Cl、1 mM EDTA (pH6.5~9)に対して透析し(精製したタンパク質のpIに応じて)、その後得られた試料をさらに精製するためにイオン交換カラム(HiTrap Q、Pharmacia製)に加えた。結合タンパク質を、25mM Tris-Cl、1 mM EDTA (pH6.5~9)に溶解した0~0.5M NaClの直線勾配を用いて100mlにわたって溶出した。最後に、タンパク質試料をPBSに対して広範囲にわたって透析し、そして+4 で保存した。

#### 【0038】

別法として、EF1091、EF1092及びEF1093を振盪フラスコ又はバイオリアクター中で発現させ、細胞を遠心分離により回収し、得られた細胞ペーストを-80 で凍結した。細胞を、1×PBS(10mLの緩衝液/1g細胞ペースト)中に10,000 psiでマイクロフルイダイザーに2回通すことによって溶解した。溶解細胞を17,000rpmで30分間遠心分離して細胞碎片を除去した。上清を、0.1M  $NiCl_2$ を充填した5-mL HiTrap Chelating(Pharmacia製)カラムに通した。充填後に、カラムをカラムの5倍容の10mM Tris(pH8.0)、100mM NaCl(緩衝液A)で洗浄した。タンパク質を、10mM Tris(pH8.0)、100mM NaCl、500mMイミダゾール(緩衝液B)を0~100%の濃度勾配で使用して溶出した。タンパク質含有画分を1×PBS中に透析した。

#### 【0039】

MSCRAMM(登録商標)をコードする9種類の腸球菌遺伝子が、表3に要約したようにエンテロコッカス・フェカーリス(*E. faecalis*)株の中に偏在する。9種類の遺伝子のうちの2種類は、全ての菌株に100%保存された。予測されたコード化タンパク質触媒ドメ

10

20

30

40

50

イン及び比較的低い割合のMSCRAMM (登録商標) 様タンパク質の特徴を有する2個の遺伝子EF1824及びEF3023が、それぞれ16/30株及び23/30株に存在した。そのそれぞれの遺伝子によってコードされた9種類の腸球菌は感染個体中で高められた力価を示し、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) 感染中に生体内での発現を示唆した。これらのタンパク質は菌株中で高分布を有するが、誘導された抗原応答には明らかに差があった；タンパク質EF1091、EF1092、EF1093及びEF2224は、最も高い力価を示した。これは、生理学的条件における異なる発現レベルによるか又は高免疫原性表面エピトープ、従って強い免疫応答によるものであり得る。興味深いことには、最も高い力価を有する3種類のタンパク質 (EF1091、EF1092及びEF1093) は、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) ゲノム中の推定上のオペロンとしてまとめられる。前記オペロンは、2つのプロモーター共通領域及び1つのリボソーム結合部位が前にあり、従ってこれらのタンパク質は同時翻訳されると思われる。次の遺伝子下流のEF1094は、推定上のLPxTGトランスペプチダーゼソルターゼをコードし、またEF1099 (Ace) は緊密に連結される。MSCRAMM (登録商標) 様タンパク質のこのクラスター及び推定上のソルターゼが感染プロセスにおいてどんな役割を有し得るかは、今の段階では未だわからない。

【0040】

表3. この研究で使用した合成オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド	位置 (aa)	クローニング部位	オリゴヌクレオチド
EF1091A	Fw 102	<i>SphI</i>	5'-CCGCATGCCAAGAGCAAACAGCAAAAAGAAG-3'
	Rev 1107	<i>SalI</i>	5'-CCGTCGACTTAAAGTACCAGAAGTGGTGGTTTC-3'
EF1824AI	Fw 42	<i>SphI</i>	5'-CCGCATGCCAAGAGCAAACAGCAAAAAGAAG-3'
	Rev 819	<i>SalI</i>	5'-GGGTCGACTTATTGTTTCAAGTTACTTCTGTC
EF1824AII	Fw 819	<i>BamHI</i>	5'-CCGGATCCGCAGCTAATAAAGAAGAATTTTITAG
	Rev 1829	<i>SalI</i>	5'-CCGTCGACTTAAAGTACCAGAAGTGGTGGTTTC-3'
EF0089A	Fw 35	<i>SacI</i>	5'-CCGAGCTCGAAGAGGTTAACAGCGATGG-3'
	Rev 1143	<i>PstI</i>	5'-CCCTGCAGTTACCCACCAAATGTGATAACCC-3'
EF3023A	Fw 25	<i>BamHI</i>	5'-CCGGATCCGAAGAAATAACTGATTTTATTTTAC-3'
	Rev 1024	<i>SacI</i>	5'-CCGAGCTCTTATTGTTCTGTAATTAATTTTCTAAC-3'
EF1092A	Fw 27	<i>SphI</i>	5'-CCGCATGCTCGCAAGCAAGCGTTCAAG-3'
	Rev 438	<i>PstI</i>	5'-CCCTGCAGTTAGAAGCCTGACTCTTTTACTTTT-3'
EF2224A	Fw 30	<i>BamHI</i>	5'-CCGGATCCCAAGAAGTAACAAGTGATGCTG-3'
	Rev 771	<i>SacI</i>	5'-CCGAGCTCTTAAAGTACTTGTTCGTCGCCAAT-3'
EF1269A	Fw 26	<i>BamHI</i>	5'-CCGGATCCGAAACAGGATATGCGCAAAC-3'
	Rev 596	<i>SacI</i>	5'-CCGAGCTCTTATTCCTTATTACGAATCGCCTG-3'
EF1093A	Fw 32	<i>BamHI</i>	5'-GCGGGATCCGAAGAAAATGGGGAGAGCGC-3'
	Rev 590	<i>SacI</i>	5'-GCGGAGCTCTTAGGTACCTTTGTGTTTGTGG-3'

それぞれのオリゴヌクレオチド配列の5'末端が突出したクローニング部位はボールド体で示し、停止コドンはイタリック体で示し、Fwは前進方向のオリゴヌクレオチドプライマーを示し、Revは逆進方向のオリゴヌクレオチドプライマーを示す。

【0041】

エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) における幾つかのMSCRAMM (登録商標) 様タンパク質、例えばフィブリノーゲンを結合する2種類並びに前記のコラーゲン及びラミニン結合Aceの存在は、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) が、ECM付着因子の武器庫 (armory) を有することによってブドウ球菌及びその他のグラム陽性球菌と似ていることを示唆する。抗生物質療法の導入以来、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) は、宿主組織を侵し且つ感染症を引き起こすことができる有害共生生物から細線を交差させることができる日和見病原体として出現する傾向が増大しつつあることを明らかにしている。付着因子のレパートリーは、感染しやすいヒト宿主の種々のヒト組織型に定着し、伝播するための適合性を高め得る。

【0042】

従って、本発明は、グラム陽性菌由来の新規なMSCRAMM (登録商標) 様タンパク質表面固定化タンパク質であって、(i) C1fA及びCNAの解明されたIg折りたたみ結晶構造及びそ

の他のMSCRAMM(登録商標)タンパク質の予測された三次構造に構造的に相同性であり、(ii)Ig折りたたみタンパク質に認められるような類似のβ-シートに富む二次構造を共有することができ且つ(iii)分泌シグナル、後に反復を伴う非反復ドメイン及びC末端細胞壁固定ドメインを有する類似構成を有するグラム陽性菌由来の新規なMSCRAMM(登録商標)様タンパク質表面固定化タンパク質の同定及び最終的生成を可能にする。また、これらのタンパク質は、主要なECMタンパク質、例えばフィブリノーゲン、コラーゲン及びラミニニンに結合し得、また種々のグラム陽性菌種由来のタンパク質における類似性により、これらのタンパク質は、交差反応性である抗体であって且つ種々のグラム陽性菌種に認められる類似タンパク質に結合することができる抗体を提供し得る。従って、さらに以下に記載するように、このような抗体は、種々様々な感染症を同時に診断又は抑制するのに有用であり得る。

10

#### 【0043】

本発明の方法を使用して同定し且つ単離されるタンパク質のほかに、特に、本発明は、本発明の方法を使用して得られるMSCRAMM(登録商標)様タンパク質から又はこれらのタンパク質由来のAドメインのような抗原領域から抗体の産生を意図する。“抗体”とは、抗原〔例えば、Fab又はF(ab')<sub>2</sub>断片〕を認識し且つポリクロナール又はモノクロナール型であることができる完全な抗体分子又はその断片を意味し、また本発明の抗体は、本発明のMSCRAMM(登録商標)タンパク質及び/又は前記タンパク質、例えばこれらのAドメイン由来の特異抗原エピトープを認識できるであろう。従って、これらの抗体は、グラム陽性菌由来の感染症を診断、監視、治療又は予防する方法に有効であろう。“エピトープ”とは、抗体分子との免疫化学結合に関与する抗原決定基を意味する。エピトープは、通常はタンパク質分子の化学的に活性な表面群(例えば、アミノ酸類及び場合によっては糖側鎖)の中に存在し且つ特異的三次元構造特性及び特異的帯電特性を有する。本発明のタンパク質、又は本明細書に記載のエピトープ及びペプチドに関して、このような用語はまた1個又はそれ以上のアミノ酸の置換、欠失及び/又は付加により天然産タンパク質又は組換えタンパク質と異なるが、全タンパク質に対して生じた抗原によって認識される能力を保持するタンパク質及びペプチドを包含すると理解される。その例は、完全抗原又はその免疫活性断片の担体/抗原融合ポリペプチドであり、その場合に前記抗原又は断片は、担体ポリペプチド内に埋め込まれることができるし又は担体ポリペプチドにいずれかの端部に連結されることができる。

20

30

#### 【0044】

従って、本発明に従って、単離及び/又は精製された抗体は、本発明のグラム陽性MSCRAMM(登録商標)タンパク質から又は本明細書に記載のタンパク質由来のAドメイン由来のエピトープペプチド配列のような特定のエピトープから産生させることができる。これらの抗体は、モノクロナール又はポリクロナールであってもよいし、また当該技術で周知であるようにかかる抗体を生じさせるのに適した方法を使用して産生させてもよい。発明による抗体は、宿主細胞の細胞外マトリックス成分に対するグラム陽性菌の結合を阻害するのに特に有用であり、またグラム陽性菌の感染症を診断、治療又は予防するのに特に有用である。

#### 【0045】

例えば、ポリクロナール抗体に関して、これらの抗体は、この場合に宿主から回収できるポリクロナール抗体を産生させることを目的として、一般的に単離及び/又は精製又は組換え生成タンパク質(又はこれらの免疫原活性ペプチド又はエピトープ)を適当な宿主に注射することを含む多数の方法を使用して産生させ得る。例えば、本発明に従って、単離及び精製されたMSCRAMM(登録商標)タンパク質又はそのAドメインは、ウサギに注射してこのタンパク質を認識するポリクロナール抗血清を生成させ得る。

40

#### 【0046】

また、本発明に従うモノクロナール抗体は、当業者によって容易に理解されるように、適当なハイブリドーマを使用して生成させ得る。好ましい方法において、本発明のタンパク質は、前記のバイオインフォマティクス法を使用して初めて同定され、単離される。次

50

に、該タンパク質は、当該技術において普通に知られている多数の適当な方法で単離及び/又は精製されるか、又は該タンパク質は配列決定した後に、モノクローナル法で使用されるタンパク質は、当該技術において普通に使用されるような組換え手段で生成され、次いで使用のために精製される。一つの適当な精製方法において、本発明の細胞壁タンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)法及びウエスタンブロット法、並びに本明細書で論じた方法を含む慣用の方法を使用して単離され、検査される。一つの適当な方法において、モノクローナル抗体は、前記のようにして単離され、精製されたタンパク質から、該タンパク質をアジュバントと混合し、得られた混合物をBALB/cマウスに注射することによって産生される。

#### 【0047】

免疫化方法は、最初の注射(完全フロイントアジュバントを使用して)、その後の3週間の間隔での2回の追加免疫注射(不完全フロイントアジュバントを用いて)、及び融合の3日前のアジュバントなしでの1回の最終追加免疫注射(注射は全て皮下注射であった)からなっていた。ハイブリドーマ産生については、マウスを犠牲にし、その脾臓を脾臓を無菌で取り出した。抗体分泌細胞を、分離し、ポリエチレングリコールの滴加を使用して骨髓腫細胞(NS1)と混合した。融合後に、細胞を選択培地(ビタミン追加DMEM/HAT)に希釈し、低い濃度でマルチウエル組織培養皿に塗布した。得られた融合から組織上清を、ELISA法(マイクロタイタープレートのウエルを被覆するために全2-ME抽出物を使用して)及び免疫ブロット法の両方で選別した。これらの陽性ウエルからの細胞を増殖させ、1個の細胞を限界希釈によりクローン化し、上清をELISA法及び免疫ブロット法の両方による1回又はそれ以上の選別に供した。陽性クローンを同定し、モノクローナル抗体をハイブリドーマ上清として回収した。

#### 【0048】

本発明に従って、本発明のバイオインフォマティクス法を使用して得られるタンパク質及び/又はそのエピトープ及び活性領域、例えばAドメインを認識し、結合することができる抗体を生成させ、このような抗体を以下に詳細に記載するような多数の診断及び治療用途で利用できる。

#### 【0049】

##### ワクチン、ヒト化抗体及びアジュバント

本発明の分離抗体、又は前記の分離タンパク質又はエピトープは、以下にさらに記載するように、細菌感染症に対する能動及び受動免疫用ワクチンの開発に利用し得る。能動ワクチンの場合、該ワクチンは、免疫原量の本発明のタンパク質又はその活性領域あるいは前記のエピトープを提供することによって調製され、従って本発明による活性ワクチンは免疫原量のタンパク質又はペプチドを含有し、このようなワクチンを必要とするヒト又は動物に投与されるであろう。該ワクチンはまた、ワクチン技術で知られ且つ常用されている適当な製薬学的に許容し得るビヒクル、賦形剤又は担体を含有し得る。前記のように、本発明に従って使用すべき抗原の“免疫原量”とは、毒性がないが、所望の予防又は治療効果が生じるように免疫原応答が宿主中で引き起こされるような薬剤の十分な量を意味することを意図する。従って、必要とされる抗原の正確な量は、患者の種、年齢、及び全身状態、治療される病気の重症度、使用される具体的な担体又はアジュバント並びにその投与方法などに依りて患者から患者に変化するであろう。同様に、このような抗原ワクチン組成物の“免疫原量”は、具体的な状況に基づいて変化し、適当な免疫原量は、常用の実験だけを使用して当業者によってそれぞれの用途で決定される。その用量は、前記組成物が投与される個人に合わせて調節されるべきであり且つ個人の年齢、体重及び代謝と共に変化するであろう。

#### 【0050】

また、医薬組成物として患者に投与されるか又は医療器具又は重合体バイオマテリアルを生体外及び生体内で被覆するのに使用される場合には、本発明の抗体はまた、これらの抗体が宿主細胞に付着するグラム陽性菌の能力を妨害し且つ感染の伝播を制限することができ得ることから、有用であり得る。

10

20

30

40

50

## 【0051】

また、抗体は、ある場合には、投与される患者においてあまり免疫原性でないように、必要に応じて変性させ得る。例えば、患者がヒトである場合には、抗体は、例えば Jones et al., Nature 321:522-525 (1986) 又は Tempest et al., Biotechnology 9:266-273 (1991) に記載のように、ハイブリドーマ由来の抗体の相補性決定領域をヒトモノクロナール抗体に移植すること“ヒト化”させてもよいし、又は例えば、Padlan, Molecular Imm. 28:489-498 (1991) に記載のようにして、相同性のヒトフレームワーク対応物を模倣するために免疫グロブリン可変部の表面暴露ネズミフレームワーク残基を変化させることによって“上張り(veneer)”してもよい。これらの参考文献は、本明細書に参考として組み込まれる。さらにまた、ある状況下では、この組成物の感染症を抑制又は防止する能力をさらに高めるように投与される場合には、本発明のモノクロナール抗体を適当な抗生物質と組み合わせることが望ましいものであり得る。

10

## 【0052】

好ましい態様において、前記抗体はまたグラム陽性菌感染症を治療又は予防するのに適した抗体を提供するのに有用である受動ワクチンとして使用し得る。当業者によって認められるように、ワクチンは、多数の適当な方法で、例えば非経口(すなわち、筋肉内、皮内又は皮下)投与又は鼻咽頭(すなわち、鼻内)投与により投与するために包装し得る。一つのこのような方法は、前記ワクチンを筋肉内に、例えば三角筋に注射する場合であるが、具体的な投与方法は、扱う細菌感染症の性質及び患者の状態に左右されるであろう。前記ワクチンは、投与を促進させるために製薬学的に許容し得るビヒクル、担体又は賦形剤と組み合わせることが好ましく、前記担体は通常は、防腐剤を含有するか又は含有しない水又は緩衝生理食塩水である。前記ワクチンは投与時に再懸濁させるために凍結乾燥させてもよいし又は溶液状であってもよい。

20

## 【0053】

本発明による抗体組成物の投与に好ましい用量は、用量が細菌感染症を予防又は治療するのに有効である量であり、この量が感染症の性質及び患者の状態に応じて大きく変化することは容易に認められるであろう。本発明に従って使用されるべき抗体又は医薬の“有効量”は、所望の予防又は治療効果が生じるような前記薬剤の無毒性であるが十分な量を意味する。従って、必要とされる抗体又は個々の薬剤の正確な量は、患者の種、年齢及び全身状態、治療される病気の重症度、使用される具体的な担体又はアジュバント並びにその投与方法などに応じて患者から患者まで変化するであろう。従って、具体的な抗体組成物の“有効量”は、個々の状況に基づいて変化し、適切な有効量は、常用の実験だけを使用して当業者によって施用のそれぞれの場合で決定し得る。用量は、組成物が投与される個人に合わせて調節されるべきであり且つ個人の年齢、体重及び代謝と共に変化するであろう。組成物は、追加成分として安定剤又は製薬学的に許容し得る防腐剤、例えばチメロサル〔エチル(2-メルカプトベンゾエート-S)水銀ナトリウム塩〕(Sigma Chemical Company製、ミズリー州センロルイス所在)を含有し得る。

30

## 【0054】

また、本発明の抗体組成物及び前記のワクチンはまた、適当なアジュバントと共に前記複合体に対する免疫原応答を高めるのに有効な量で投与し得る。例えば、適当なアジュバントとしては、ヒトに広く使用されるミョウバン(リン酸アルミニウム又は水酸化アルミニウム)、及びその他のアジュバント、例えばサポニン及びその精製成分 Quil A、フロイント完全アジュバント、並びに獣医用途に使用されるその他のアジュバントを挙げ得る。さらに別の化学的に定義される調剤、例えばムラミルジペプチド、モノホスホリル脂質 A、リン脂質複合体、例えば Goodman-Snitkoff et al., J. Immunol. 147:410-415 (1991) に記載され且つ本明細書に参考として組み込まれるもの、並びに Miller et al., J. Exp. Med. 176:1739-1744 (1992) に記載され且つ本明細書に参考として組み込まれるプロ手尾リポソーム内の複合体のカプセル化物、Novasome(商標)脂質小胞(Micro Vesicular Systems Inc.製、ニューハンプシャー州ナッシュア所在)のような脂質小胞への前記タンパク質のカプセル化物も有用であり得る。

40

50

## 【 0 0 5 5 】

医薬組成物

当業者によって認められるように、本発明の同定され且つ単離されたタンパク質及びこれに対する抗体であって該タンパク質を認識し、結合できる抗体は、グラム陽性菌感染症、例えばエンテロコッカス属、ストレプトコッカス属、ブドウ球菌属などによって引き起こされるグラム陽性菌感染症を治療又は予防することを目的としてヒト又は動物患者に投与するのに適した医薬組成物に形成し得る。前記に定義し且つ記載したような本発明のタンパク質又は抗体を含有する医薬組成物は、この技術で常用される適当な製薬ビヒクル、賦形剤又は担体、例えば食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、その他の医薬化合物及びこれらの組合せと組み合わせで製剤化し得る。当業者が認めるように、使用する具体的なビヒクル、賦形剤又は担体は、患者及び患者の状態に応じて変化するのであろうし、また種々の投与方法が当業者によって認められるように本発明の組成物に適するであろう。本明細書に開示される医薬組成物の適当な投与方法は、局所、経口、肛門、膣、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内及び皮内投与が挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【 0 0 5 6 】

局所投与については、組成物は、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、点滴剤(例えば点眼薬及び点耳薬)、又は溶液(例えばうがい薬)の形に製剤化し得る。創傷包帯、縫合剤及びエアロゾルには、前記組成物を含浸させ得る。前記組成物は、慣用の添加剤、防腐剤、浸透を促進させるための溶媒、及び皮膚軟化剤を含有し得る。また、局所製剤は、慣用の担体、例えばクリーム又は軟膏基剤、エタノール、あるいはオレイルアルコールを含有し得る。

20

## 【 0 0 5 7 】

組成物の別の形、並びに本発明の別の細菌表面タンパク質及びペプチド並びにこれらに対する抗体に関する組成物、方法及び施用に関するその他の情報は、MSCRAMM(登録商標)に関するその他の特許文献、例えば米国特許第6,288,214号公報(Hookら)(本明細書に参考として組み込まれる)に認められるであろう。

## 【 0 0 5 8 】

また、本発明に従って生成される組成物は、適当なアジュバントと共に患者の免疫応答を高めるのに有効な量で投与し得る。例えば、適当なアジュバントとしては、ヒトに広く使用されるミョウバン(リン酸アルミニウム又は水酸化アルミニウム)及びその他のアジュバント、例えばサポニン及びその精製成分Quil A、フロイント完全アジュバント、RIBIアジュバント、並びに研究及び獣医学用途で使用されるその他のアジュバントを挙げ得る、また、さらに別の化学的に定義される調剤、例えばムラミルジペプチド、モノホスホリル脂質A、リン脂質複合体、例えばGoodman-Snitkoff et al., *J. Immunol.*, 147:410-415 (1991)によって記載され且つ本明細書に参考として組み込まれるリン脂質複合体、Miller et al., *J. Exp. Med.*, 176:1739-1744 (1992)によって記載され且つ本明細書に参考として組み込まれるプロテオリポソーム内の複合体のカプセル化物、及びNovasome(商標)脂質小胞(Micro Vesicular Systems Inc.製、ニューハンプシャー州ナッシュア所在)のような脂質小胞中の前記タンパク質のカプセル化物も有用であり得る。

30

40

## 【 0 0 5 9 】

いずれにしても、本発明の組成物は、このように、グラム陽性菌による結合相互作用を妨害、調節又は阻害するのに有用であろう。従って、本発明は、グラム陽性菌感染症予防又は治療する組成物及び方法の開発において、並びに宿主細胞に対する細菌の結合及び伝播の阻害において具体的な利用可能性を有するであろう。

## 【 0 0 6 0 】

方法：感染症の発見及び診断

本発明に従って、前記のような本発明のバイオインフォマティクス法によって得られるタンパク質、エピトープ及びペプチド並びにこのようなタンパク質、エピトープ及びノ又

50

はペプチドを認識する抗体を使用することによってグラム陽性菌による感染症を同定し且つ診断する方法が提供される。本発明に従って、前記の発明の抗体はこのような感染症を診断するキットに使用し得、またこのようなキットは当該技術で一般的に知られており且つ本発明の抗体に結合する関心事の抗原又は微生物を検出するのに常用される種類のものであり得る。

#### 【0061】

これらの診断キットは、一般に本発明の抗体を、当業者に容易に理解されるような該抗体による結合を検出するのに適した手段と共に含有する。例えば、抗体の結合を検出するための手段は、前記抗体に連結される検出可能な標識を含有し得る。この場合に、これらのキットは、1種又はそれ以上のグラム陽性菌に感染していると疑われる試料、例えば個体から、例えば血液、唾液、尿、脳脊髄液、尿生殖器路、組織、骨、筋肉、軟骨又は皮膚から採取される試料を得、且つ該試料に本明細書に記載の抗体の1種又はそれ以上を導入するグラム陽性菌感染症の存在を検出するための診断方法に使用できる。この場合に、抗体の導入後に、試料中の抗原又は微生物による結合があったか否かを、慣用の手段によって、例えば適当な標識によって又は前記抗体が固体支持体に結合され且つこの結合が試料中の標識抗原又は微生物の存在を反映するアッセイによって調べられる。

10

#### 【0062】

##### 抗体又は抗原の量を監視する方法

本発明に従って、本発明の別の使用はグラム陽性菌抗原、又は該抗原を認識する抗体の量を、前記の抗原又は抗体を含有すると疑われるヒト又は動物患者において監視することになり得ることも意図される。好ましい方法において、これは、ヒト又は動物患者から生物学的試料を最初に得ることによって実施し得、また生物学的試料としては、例えばヒト又は動物患者の血液、血清、唾液、組織、骨、筋肉、軟骨又は皮膚から得られる、感染症について日常的に監視される適当な試料が挙げられる。次に、試料には、(1)グラム陽性菌に対するヒト又は動物患者の抗体の量を監視する場合には、このような抗体を結合するであろうタンパク質又はそのAドメインの決定可能な量を導入するか；又は(2)細菌感染のレベルを監視することが望まれる場合には、前記試料に、前記のようなタンパク質に対する抗体の測定可能な量を導入する。この方法における次の工程は、試料中の抗原及び抗体が、十分な時間及び条件の後に、結合を達成でき、試料中に見出されるグラム陽性菌の量又は濃度を反映するであろう抗原-抗体結合又はこれに対する抗体の量を調べることができるようなものである。所望の方法においては、量は入院又は治療期間中のようなグラム陽性菌感染症の進行/寛解を追跡するように規則正しい時間(例えば、時間毎、日毎など)で監視し得る。

20

30

#### 【0063】

##### 感染症を検出及び診断するためのアッセイ

本発明に従って、体液(例えば、血液、血清、血漿、唾液、尿、脳脊髄液、生殖器路)又はその他の生物学的物質(例えば、組織、骨、筋肉、軟骨又は皮膚)に存在するグラム陽性菌の検出は、グラム陽性菌によって引き起こされる急性又は慢性の感染症の診断方法を構成することができる。前記の抗体は数種のグラム陽性菌に認められるエピトープを認識することができることから、これらの抗体は、種々様々なグラム陽性菌及び病状の診断を可能にするアッセイに使用できる。モノクロナール抗体又はポリクロナール抗体は、アッセイで使用でき、且つ前記に挙げたようなモノクロナール抗体の場合に使用できる。このアッセイを使用することにより同定される検出抗原は、多数の慣用の手段、例えばウェスタンブロット試験及びその他の同様の試験により検出することができる。

40

#### 【0064】

本発明のアッセイに関して、これらのアッセイは、本発明の抗体を標識された形で使用し得るし、また標識抗体の周知の方法の全てが、例えば限定されることなく酵素複合体、色素、放射性アイソトープ、蛍光又は粒状標識、例えばリポソーム、ラテックス、ポリスチレン及びコロイド金属又は非金属を用いた直接標識が意図される。多数の抗体アッセイシステム、例えば抗原捕捉サンドイッチアッセイもまた、本発明の範囲に入る。また、標

50

識されたタンパク質を必要とする競合免疫アッセイ又は血清抗体を検出するために標識されたタンパク質を使用するアッセイもまた、本発明の診断アッセイの意図される形である。溶液中で生じる診断アッセイの他に、固定化抗体又はタンパク質を伴うアッセイも本発明の範囲内にあるとみなされる（例えば、Miles et al., Lancet 2: 492, 1968; Berry et al., J. Virol. Met., 34: 91-100, 1991; Engvall et al., G. Immunochemistry, 8: 871, 1971, Tom, Liposomes and Immunology, Elsevier/North Holland, New York, N. Y., 1980; Gribnau et al., J. of Chromatogr., 376: 175-89, 1986 及び本明細書で引用される全ての参考文献参照）。本発明で使用することができる標識の種類例としては、酵素、放射性アイソトープ、蛍光化合物、化学発光化合物、生物発光化合物、微粒子及び金属キレートが挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、モノクロナール又はポリクロナール抗体（あるいは抗原）に結合するその他の適当な標識を知っているであろうし、又は常用の実験を使用することによって上記のものを確認することができるであろう。また、モノクロナール又はポリクロナール抗体（あるいは抗原）に対するこれらの標識の結合は、当業者により普通に知られている標準的な方法を使用して達成することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0065】

本発明のアッセイ試薬（一般に、モノクロナール抗体、ポリクロナール抗体又は抗原）を検出可能に標識できる方法の一つは、モノクロナール抗体、ポリクロナール抗体又は抗原を酵素に連結することによる。この酵素は、後でその基質に暴露されると、例えば分光分析手段又は蛍光分析手段により検出することができる化学的部分を生成するような方法で基質と次々に反応するであろう。本発明の試薬を検出可能に標識するのに使用できる酵素の例としては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 $\alpha$ -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。

#### 【0066】

本発明の検出可能に標識された試薬の存在はまた、該試薬をガンマカウンター又はシンチレーションカウンターの使用のような手段で調べることができる放射線アイソトープで前記試薬を標識することによって検出することができる。本発明の目的に特に有用なアイソトープは、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 及び $^{75}\text{Se}$ である。モノクロナール又はポリクロナール抗体を蛍光化合物で標識することによって、本発明の検出可能に標識された試薬の結合を検出することも可能である。蛍光標識された試薬を適当な波長の光に暴露すると、その存在は色素の蛍光により検出することができる。最も普通に使用される蛍光標識化合物の中に、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド及びフルオレスカミンがある。また、本発明の試薬は、それを化学発光化合物にカップリングさせることによって検出可能に標識することができる。この場合に、化学発光標識試薬の存在は、化学反応の経過中に生じる発光の存在を検出することによって調べられる。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、theromatic アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びシュウ酸エステルである。同様に、生物発光化合物を、本発明の試薬を標識するのに使用し得る。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を大きくする生物学的系において認められる化学発光の種類である。生物発光試薬の存在は、発光の存在を検出することによって調べられる。標識の目的に重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンである。

#### 【0067】

本発明と同時に使用するとより大きな感度をもたらす別の方法は、本発明のモノクロナール抗体又はポリクロナール抗体を低分子量ハプテンに連結することからなる。この

場合には、ハプテンが第二の反応によって特異的に検出される。例えば、このようにピオチン（アビジンと反応する）又はジニトロフェノール、ピリドキサル及びフルオレスカミン（特異的抗ハプテン抗体と反応する）のようなハプテンを使用することが一般的である。検出可能な未だ知られていない量のグラム陽性抗原を含有する生物学的試料をアッセイで使用することができる。標準的には、該試料は、液体、例えば尿、唾液、脳脊髄液、血液、血清などであるか、あるいは固体又は半固体、例えば組織、糞便などであることが好ましい。

#### 【0068】

本発明の診断アッセイとしては、かかるアッセイのキット形態が挙げられる。このキットは、場合によって固定化できる前記の抗体（全タンパク質又はAドメインのような活性化免疫反応性断片又はその免疫原性類縁体に対して生じる）、及び生物学的試料を調製し、分析を行うのに必要な試薬及び装置、例えば防腐剤、無毒性緩衝液のような反応媒体、マイクロタイプレート、マイクロピペットなどを含む。前記試薬（Ab類及び/又は抗原）は凍結乾燥又は凍結保存することができる。前記のように、アッセイフォーマットに応じて、抗体を標識できるし又はキットはさらに体液及び組織中のグラム陽性菌に対する抗体の検出を可能にするように関連エピトープを含有する標識されたタンパク質、断片又はその類縁体を含有することができる。類縁体とは、1個又はそれ以上のアミノ酸の置換、欠失及び/又は付加によりその天然に産するもの又は組換え対応物と異なってもよいが、全タンパク質に対して生じる抗体によって認識される能力を保持するタンパク質又はペプチドを意味する。その例は、全抗原又はその免疫反応性断片の担体/抗原融合ポリペプチドであり、この場合に抗原又は断片は担体ポリペプチド内に埋め込むことができるし又は担体ポリペプチドのいずれかの端部に連結することができる。従って、本発明による抗体はかかる類縁体も認識し得る。キットフォームに組み込むことができる免疫アッセイの種類は多い。発明の抗体を利用できる免疫アッセイの幾つかの典型的な例は、ラジオイムノアッセイ（RIA）及びイムノメトリックアッセイ（immunometric assay）、又はサンドイッチイムノアッセイである。

#### 【0069】

“イムノメトリックアッセイ”又は“サンドイッチイムノアッセイ”とは、同時サンドイッチ、フォワード（forward）サンドイッチ及びリバーズ（reverse）サンドイッチイムノアッセイを包含することを意味する。これらの用語は、当業者によりよく理解される。当業者には、本発明のモノクロナール抗体、ポリクロナール抗体及び/又は抗原が現在知られているか又は将来開発されるかもしれないイムノアッセイの別の変法及び形に有用であろうということが認められるであろう。これらは、本発明の範囲に含まれることが意図される。フォワードサンドイッチイムノアッセイでは、試料を最初に抗原に対するモノクロナール又はポリクロナール抗体（1種又は複数）を含有する固相免疫吸着剤と共にインキュベートする。インキュベーションは、試料中の抗原を固相中の固定化抗体に結合させるのに十分な時間続けられる。最初のインキュベーション後に、固相免疫吸着剤をインキュベーション混合物から分離し、洗浄して過剰の抗原と、試料中に存在し得るその他の妨害物質、例えば非特異的結合性タンパク質とを除去する。その後、固定化抗体に結合された抗原を含有する固相免疫吸着剤を、可溶性の標識抗体（1種又は複数）と共に第二の時間インキュベートする。第二のインキュベーションの後に、別の洗浄を行って、結合されなかった標識抗体を固相免疫吸着剤から除去し且つ非特異的に結合された標識抗体（1種又は複数）を除去する。次いで、固相免疫吸着剤に結合された標識抗体（1種又は複数）を検出し且つ検出された標識抗体の量を元の試料中に存在する抗原の量の直接尺度として役立てる。

#### 【0070】

別法として、免疫吸着剤複合体と会合しない標識抗体も検出することができ、この場合にその尺度は試料中の抗原の量に反比例する。フォワードサンドイッチアッセイは、例えば米国特許第3,867,517号；第4,012,294号及び第4,376,110号公報（これらは本明細書に参考として組み込まれる）に記載されている。フォワードイムノメトリックアッセイの実

10

20

30

40

50

施において、この方法は、さらに詳しくは：(a) 先ず、試料と、固相結合抗体（1種又は複数）との混合物を形成し、該混合物を、試料中の抗原を固相結合抗体（1種又は複数）に結合させるのに十分な時間及び条件下でインキュベートし、(b)工程(a)のインキュベーションの後に、前記混合物に検出可能に標識した抗体（1種又は複数）を加え、新たに得られた混合物を、標識抗体を固相免疫吸着剤上の抗原-抗体複合体に結合させるのに十分な時間及び条件下でインキュベートし；(c)工程(b)のインキュベーションの後に、混合物から固相免疫吸着剤を分離し；そして(d)固相免疫吸着剤上の抗原-抗体複合体に結合された1種又は複数の標識抗体を検出するか、又は前記抗原-抗体複合体と会合しなかった抗体を検出することからなり得る。

**【0071】**

リバースサンドイッチアッセイでは、試料を最初に標識抗体（1種又は複数）と共にインキュベートし、その後にこれに多数の固定化抗体を含有する固相免疫吸着剤を加え、第二のインキュベーションを行う。フォワードサンドイッチアッセイの最初の洗浄工程は必要でないが、洗浄は第二のインキュベーションの後に行われる。リバースサンドイッチアッセイは、例えば、米国特許第4,098,876号及び第4,376,110号公報に記載されている。リバースイムノメトリックアッセイの実施において、この方法は、さらに詳しくは：(a) 先ず、試料と可溶性の検出可能標識抗体との混合物を、試料中の抗原を標識抗体に結合させるのに十分な時間及び条件下で形成し、(b)工程(a)のインキュベーションの後の、前記混合物に固相結合抗体を加え、新たに得られた混合物を、標識抗体に結合された抗原を固相抗体に結合させるのに十分な時間及び条件下でインキュベートし；(c)工程(b)のインキュベーションの後に、インキュベーション混合物から固相免疫吸着剤を分離し；そして(d)固相免疫吸着剤に結合された標識抗体を検出するか、又は固相免疫吸着剤と会合しなかった標識抗体を検出することからなり得る。

**【0072】**

同時サンドイッチアッセイでは、試料、表面に多数の固定化抗体を有する免疫吸着剤及び標識された可溶性抗体（1種又は複数）を、一度のインキュベーション工程で同時にインキュベートする。同時アッセイは、一回のインキュベーションを必要とするだけであり、洗浄工程を含まない。同時アッセイの使用が非常に好ましい。この種のアッセイは、取り扱い易さ、等質性、再現性、並びにアッセイの直線性及び高精度をもたらす。抗原、固定化抗体を有する固相免疫吸着剤及び標識可溶性抗体（1種又は複数）を含有する試料を、抗原を固定化抗体及び可溶性抗体（1種及び複数）に結合させるのに十分な条件及び時間でインキュベートする。一般的に、できる限り多くの抗原を結合するのに十分なインキュベーション条件を提供することが望ましい。その理由は、これにより標識抗体の固相に対する結合が最大になり、それによってシグナルが増大するからである。時間及び温度の典型的な条件は、45 で2時間又は37 で12時間である。抗原は、典型的には固定化抗体に結合するよりも迅速に標識抗体に結合する。その理由は、標識抗体が溶液状であるのに対して、固定化抗体は固相支持体に結合されているからである。このために、標識抗体は固定化抗体よりも低い濃度で使用し得且つ標識抗体について高特異活性を用いることも好ましい。例えば、標識抗体はアッセイ当たり約1~50ngの濃度で使用し得、これに対して固定化抗体は抗体当たりのアッセイ当たり10~500ngの濃度を有し得る。標識抗体は、例えば抗体の分子当たり1個の放射性ヨウ素、又は抗体の分子当たり2個以上の多い放射性ヨウ素を有する特異活性を有し得る。

**【0073】**

もちろん、標識抗体及び固定化抗体の特異濃度、インキュベーションの温度及び時間並びにその他のアッセイ条件は、種々の因子、例えば試料中の抗原の濃度、試料の性質などに応じて変化させ得る。当業者は、常用実験を用いることによりそれぞれの測定について操作及び最適アッセイ条件を決定することができるであろう。

**【0074】**

多価抗原を含有する試料に関する同時イムノメトリックアッセイの実施において、この方法は、さらに詳しくは：(a)試料を、固相結合抗体及び可溶性の標識抗体（1種又は複

10

20

30

40

50

数)と一緒に含有する混合物を同時に形成し; (b)工程(a)で形成された混合物を、試料中の抗原を固定化抗体及び標識抗体の両方と結合させるのに十分な時間及び条件下でインキュベートし; (c)インキュベーション後にインキュベーション混合物から固相免疫吸着剤を分離し; 且つ(d)固相免疫吸着剤に結合された標識抗体を検出するか又は固相免疫吸着剤に会合されなかった標識抗体を検出することからなり得る。洗浄、攪拌、振盪濾過などのその他の工程を、勿論、個々の状況に慣用又は不可欠であるようにアッセイに付加し得る。

#### 【0075】

用いられている多数の固相免疫吸着剤及び本発明に使用できる多数の固相免疫吸着剤が存在する、周知の免疫吸着剤としては、ニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、デキストラン、ナイロン及びその他の物質; かかる物質から形成されるか又はかかる物質で被覆されたチューブ、ビーズ及びマイクロタイタープレートなどが挙げられる。固定化抗体は、アミド又はエステル連鎖による共有結合のような方法によって又は吸収によって固相免疫吸着剤に共有結合的に又は物理的に結合することができる。当業者は、多数のその他の適当な固相免疫吸着剤及びその表面に抗体を固定化する方法を知っているであろうし、又は常用実験だけを使用してそれ自体確認することができるであろう。

10

#### 【0076】

##### キット

前記のように、本発明に従って、前記の本発明の抗体は、キットに使用してグラム陽性菌感染症を診断し得る。このような診断キットは当該技術では周知であり、一般的には本発明の抗体に結合するであろうエピトープ又はタンパク質の存在を調べるのに適するように調製されるであろう。これらの診断キットは、一般に本発明の抗体を、当業者に容易に理解されるような抗体による結合を検出するのに適した手段と一緒に含むであろう。例えば、抗体の結合を検出するための手段は、前記の抗体に結合される検出可能な標識からなり得る。この場合に、これらのキットは、診断方法に使用して、細菌感染症の存在を検出することができる。この場合に、このような感染症を有すると疑われる生物学的試料、例えば個体から、例えば血液、唾液、尿、脳脊髄液、生殖器路、組織、骨、筋肉、軟骨又は皮膚から採取される試料を得、該試料に、本明細書に挙げたような1種又はそれ以上の抗体を導入し、次いで試料中のかかる微生物の存在を示すであろう抗体が試料に結合するか否かを調べる。

20

30

#### 【0077】

また、前記のように、これらのキットはまた、ヒト又は動物患者の血清中の抗体又は細菌性抗原の量を監視する方法に有用であり得る。抗原の量を監視することが望まれる場合には、キットは、前記のような本発明による抗体を、該抗体に対する結合の量を調べる手段と共に含有するであろう。試料中のグラム陽性菌に対する抗体の量を測定することが望まれる場合には、キットは前記のような単離されたタンパク質又はエピトープ(例えば、Aドメイン)を、試料中に存在する抗体に対するこれらの抗原の結合を検出する手段と共に含有することが好ましい。

#### 【0078】

##### 感染症の治療及び感染症からの保護

本発明に従って、グラム陽性菌によって引き起こされる感染症を予防又は治療する方法であって、かかる治療を必要とするヒト又は動物患者に有効量の前記の抗体を該感染症を治療又は予防するのに有効な量で投与することからなるグラム陽性菌によって引き起こされる感染症を予防又は治療する方法が提供される。従って、本発明に従って、前記の慣用の方法(例えば、局所、非経口、筋肉内など)での有効量の本発明の抗体の投与は、このようにしてヒト又は動物患者の細菌感染症を治療又は予防する極めて有効な方法を提供する。前記のように、有効量とは、細菌の接着を防止するか又はかかる生物が宿主細胞に結合及び定着するのを阻害するのに十分な量であり、従ってかかる感染症の治療又は予防に有用である使用量、例えば抗体力価を意味する。また、これらの抗体はまた、多数のその他のメカニズム、例えば伝染性微生物の直接殺滅、オプソニン作用の増大、形態学的変遷

40

50

の阻害などによる保護効果を示し、従って有効量の抗体は保護効果を達成する手段が得られる量を包含するであろう。当業者により認められるように、感染症を治療又は予防するのに有効であるのに必要な抗体力価のレベルは、患者の性質及び状態及び/又は事前に存在する感染症の重症度に応じて変化するであろう。

#### 【0079】

##### 免疫応答の誘発

本発明に従って、ヒト又は動物に前記のバイオインフォマティクス法を使用して分離されたタンパク質、又はこのようなタンパク質の組換え生成体、又は前記の免疫原性断片、領域又はエピトープの免疫有効量を投与して免疫原応答を誘発することからなるヒト又は動物において免疫原反応を誘発する方法が提供される。前記のように、免疫原反応を得るために本発明に従って使用される抗原の“免疫原量”とは、免疫原応答が宿主で誘発され所望の予防又は治療効果が生じるような薬剤の無毒であるが十分な量を意味することを意図する。従って、かかる応答を誘発させるのに必要な単離タンパク質の正確な量は、患者の種、年齢、全身状態、治療される病気の重症度、使用される個々の担体又はアジュバント及びその投与の様式などに応じて変化するであろう。本発明はまた、前記のタンパク質及びエピトープを認識する抗体を産生する方法を意図し、またモノクローナル及びポリクローナル抗体を産生するのに適した方法は上記に詳しく説明される。

10

#### 【0080】

##### 被覆デバイス

本発明に従って、前記の抗体及び組成物はまた、ある種の医療機器及び補綴器具などのその他の移植材料に関する細菌感染症を治療するか又は該感染症の発生から保護するのに利用し得る。本明細書に記載の抗体及び/又は組成物を用いて都合よく被覆し得る医療機器又は高分子生体材料としては、針、縫合糸、代替心臓弁、心臓補助装置、ハード及びソフトコンタクトレンズ、眼内レンズ(前眼房又は後眼房)、その他のインプラント、例えば角膜インレー、人工角膜、血管ステント、エピケラトファリア・デバイス(epikeratophalia device)、緑内障シャント、網膜ステープル、強膜バックル、歯科補綴材、甲状腺形成デバイス(thyroplastic device)、咽頭形成デバイス(laryngoplastic devices)、血管移植片、軟及び硬組織補綴材、例えば(以下に限定されないが)ポンプ、電気装置、例えば刺激装置及び記録装置、聴覚プロテーゼ、ペースメーカー、人工喉頭、歯科インプラント、乳房インプラント、ペニスインプラント、脳顔面頭蓋腱、人工関節、腱、靭帯、半月及び円板、人工骨、人工臓器、例えば人工脾臓、人工心臓、義肢、及び心臓弁;ステント、ワイヤー、ガイドワイヤー、静脈内及び中心静脈カテーテル、レーザー及びバルーン血管形成装置、血管及び心臓機器(チューブ、カテーテル、バルーン)、心室補助装置、血液透析要素、血液酸素付加装置、尿道/尿管/尿機器(フォーリーカテーテル、ステント、チューブ及びバルーン)、気道カテーテル(気管内及び気管開口チューブ及びカフ)、経腸栄養チューブ(例えば経鼻胃チューブ、胃内チューブ及び空腸チューブ)、創傷ドレナージチューブ、胸膜腔、腹膜腔、頭蓋腔及び心膜腔などの体腔のドレン排出を行うのに使用されるチューブ、血液バッグ、試験管、血液採取管、バキュテイナー、注射器、針、ピペット、ピペットチップ、及び血液チューブが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

#### 【0081】

本明細書で使用する“被覆された”又は“被覆する”という用語は、前記の抗体又は組成物を、前記の装置、機器又はデバイスの表面、好ましくは感染症、例えばグラム陽性菌によって引き起こされる感染症に暴露される外面に塗布することを意味することが当業者には理解されるであろう。前記の装置、機器又はデバイスの表面は、タンパク質、抗体又は活性断片で完全に被覆される必要はない。

#### 【0082】

前記のように、本発明の抗体あるいはその活性部分又は断片はまた、感染症の原因である細菌と哺乳動物宿主との間の物理的相互作用を妨害するのに有用であり得、しかもまた細胞外マトリックスタンパク質、フィブリノーゲン、コラーゲン、ラミニンなどに接着

50

する細菌の能力を妨害するのにも有用であり得る。従って、本発明の抗体は、患者の治療及び細菌感染症の防止又は減少の両方に有用であり得るし、あるいは住居内医療装置及び人工装具においてこれらを使用するのに安全にするためにこのような生物の感染及び伝播を減らす又は撲滅するために有用であり得る。

#### 【0083】

要約すれば、前記の本発明の抗体は、ヒト及び動物患者においてグラム陽性菌による感染症を検出、治療又は予防するのに、あるいはかかる生物によって引き起こされ得る医療機器及び補綴材の感染症を防止又は減らすのに極めて有用であり得る。特に、本発明は、早産新生児、AIDS及び衰弱癌患者のような高感受性群において且つ骨髄移植後に特に頻繁に起こり且つ重い高感受性群においてこのような感染症を治療又は防止するのに重要である。

10

#### 【実施例】

#### 【0084】

以下の実施例を、本発明の好ましい態様を例証するために提供する。以下の実施例に記載された技法は、本発明の実施において十分に機能することが本発明者らによって知見された技法を表し、従って本発明を実施するための好ましい形式をなしているとみなし得ることは、当業者によって認められるべきである。しかし、当業者には、本発明に照らして、記載されている特定の態様において多数の改変を行うことができ、さらに本発明の精神から乖離することなく同様又は類似の結果を得ることができることが認められる。

#### 【0085】

20

#### 実施例

実施例1： グラム陽性菌由来のMSCRAMM（登録商標）タンパク質の同定方法並びに該タンパク質のAドメインの発現及び精製

A. グラム陽性菌の注釈付きゲノム中のLPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質の検索

1. 配列決定センターのウェブサイトから、関心事の完全ゲノム配列の複数のアミノ酸配列を得る。これらの配列をローカルシリコングラフィックスマシン（SGI）に保存する。

#### 【0086】

2. ローカルサーチ可能データベースを、NCBIから得られるプログラムフォーマットdbを使用して構築し、SGIにローカルインストールする。

30

3. LPXTGモチーフ含有タンパク質を、NCBIから得られ且つSGIにローカルインストールされるPHI-blastを使用して同定する。PHI-blast検索は、縮重LPXTGパターンL-P-X-[TSA]-[GANS]（Xは任意のアミノ酸である）を使用する。PHI-blastのテンプレートは個々の生物に応じて変化する。それぞれの生物について、配列相同性をもたないブドウ球菌の2つの公知の細胞壁固定化タンパク質を使用し、また入手できない場合には個々の生物から公知の細胞壁固定化タンパク質を使用した。

4. PHI-blastから得られたLPXTG含有タンパク質を分析して、LPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質の典型的な特徴：N末端にシグナルペプチド、後に疎水性貫膜セグメントが続くC末端の近くにあるLPXTGモチーフ、及びC末端の数個の正帯電残基を含むタンパク質を選択する。これらは以下に記載のように行う：

40

シグナルペプチド： 本発明者らは<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>のシグナルP予測サーバーを使用する。この方法は、“Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites”. Henrik Nielsen, Jacob Engelbrecht Soren Brunak and Gunnar von Heijne, *Protein Engineering*, 10, 1-6 (1997) に記載されている。

LPXTGモチーフの位置： 配列の目視検査

LPXTGモチーフの後の疎水性貫膜セグメント： 本発明者らは貫膜セグメントの予測に<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>のTMHMMサーバーを使用する。幾つかの別の予測ウェブサーバーも使用でき、その中に<http://www.ch.embnet.org/software/TMPR>

50

ED form.htmlのTMpred、<http://www.sbc.su.se/miklos/DAS/>のDAS及び<http://www.enzim.hu/hmmtop/>のHMMTOPがある。

C末端の正帯電残基：目視検査

5. 前記の特徴を含有する配列は、推定上のLPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質である。

6. 用語“LPXTG”又は“細胞壁”を使用して、ウェブサイトTIGR(総合微生物資源、<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/CMRHomePage.spl>)で関心事のゲノム配列に細胞壁固定化タンパク質として注釈されているタンパク質を検索した。

【0087】

B. グラム陽性菌の注釈なしゲノム内のLPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質の検索

1. 配列決定センターのウェブサイトから、複数のゲノム配列を得る。これらの配列をローカルシリコングラフィックスマシン(SGI)に保存する。

2. TIGRから得られるプログラム Glimmer 2.0を使用して遺伝子予測する。これは社内で書かれたUNIX Cシェルスクリプトで促進される。

3. 予測遺伝子を、社内で書かれた翻訳プログラムを使用してアミノ酸配列に翻訳する。このプログラムは大量の配列を翻訳することができる。

4. 翻訳されたアミノ酸配列を、Section A.2におけるように検索可能データベースにローカルフォーマットする。その後の分析はSection A.3-5に記載の通りである。

【0088】

C. 推定上のLPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質中の免疫グロブリン様(Ig様)折りたたみの予測

推定上のLPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質のアミノ酸配列を、折りたたみ認識ウェブサーバー3D-PSSM(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dpssm/>)に供する。予測の方法は、Kelley LA, MacCallum RM & Sternberg MJE. Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Programm 3D-PSSM. J Mol Biol. 2000 Jun 2; 299(2): 499-520に記載されている。

【0089】

3D-PSSMのアウトプットは、公表された構造として類似の3D構造を採用する提供配列の確度を示す確率E値を与える。

【0090】

公表されたIg様折りたたみ構造に対して<0.25のE値を有するタンパク質は、予測されたIg様折りたたみを含有するとみなされる。これらはタンパク質MSCRAMM(登録商標)タンパク質とみなされるべきである。

【0091】

従って、本発明に従って、パイオインフォマティクアプローチを使用して、グラム陽性菌の中から、特にエンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus faecalis*)の中からMSCRAMM(登録商標)様の特徴を有するタンパク質を同定した。推定上のC末端LPxTG細胞壁選別シグナルを有する42個のタンパク質が、エンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)ゲノム配列において同定された。次いで、本発明者らは、LPxTG-固定化腸球菌タンパク質の中からMSCRAMM(登録商標)タンパク質に対する構造類似性を探した。9個のタンパク質が、免疫グロブリン様折りたたみを採用する領域を含有すると予測された。図1のIg折りたたみ含有領域は、免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)の解明された結晶構造(~150-500 aa)に対する幾つかの連続し且つ重複する一致(match)からなり、同じサイズ及びIg型折りたたみの1~4ドメインからなる。相同性のIg折りたたみ領域は、前記腸球菌タンパク質の大部分をカバーし且つフィブロネクチン及びその他のIgSFタンパク質に認められる類似の“糸に通したビーズ(beads-in-a-string)”配置の連続モジュールを示し得る(Leahy, 1996年)(Sharma, 1999年)(Hamburger, 1999年)(Luo, 2000年)。Ig折りたたみサブドメイン(N2及びN3)の縦列反復は、CIfAのフィブリノーゲン結合ドメインの結晶構造に認められる。CIfA及び類似構造CIfBの全長Aドメインは、付加N

10

20

30

40

50

末端サブドメイン、N 1 からなる (Deivanayagam、2002年) (Perkins、2001年)。配列及び二次構造の類似性に基づいて、類似サブドメイン組織が別のMSCRAMM (登録商標) タンパク質、例えばFnbpA、FnbpB、Ace及びSdrタンパク質中に期待される。CNA最小コラーゲン結合性メインの解明された結晶構造は単一のIg型サブドメイン (N 2) からなり (Symersky、1997年)、またC末端反復ドメインB 1及びB 2それぞれはIg折りたたみサブドメインの縦列反復からなる (Deivanayagam、2000年)。同様のモジュール構造がB 3及びB 4反復中に期待される。従って、多数のIg折りたたみ単位のモジュール構造は、MSCRAMM (登録商標) タンパク質ファミリーの一般的特徴と思われる。MSCRAMM (登録商標) タンパク質のN - サブドメインの長さは、典型的には、EF1091及びEF0089の大きなサイズのAドメインがこれらのAドメインの3個以上のIg折りたたみサブドメインを収容できることを示唆する ~ 150 aaである。

10

## 【 0 0 9 2 】

実施例 3 . 組換え腸球菌MSCRAMM (登録商標) タンパク質断片の発現及び精製

本発明の有用性をさらに特徴付けるために、エンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) 由来のEF1091、EF1092及びEF1093タンパク質のAドメイン並びにエンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*) 由来のEfae 2926、Efae 2925及びEfae 2924タンパク質Aドメインをクローン化し、発現させ且つ精製した。また、EF1824を大きなサイズのタンパク質であるという理由から2つのセグメント、EF1824AI (aa 43-819) 及びEF1824AII (aa 820-1829) にクローン化した。EF1824AIは大腸菌細胞質に不溶性であり、アッセイから除外された。結合され且つ下線を付された配列は、クローン化された推定上のAドメインを表す。

20

## 【 0 0 9 3 】

EF1824AI : アミノ酸残基 43 - 819 (配列番号 : 2 )

QEQTAKEDVADSATSVGAIVSIEKAEKNFVITYASGKKAQISILNDHLFRYHLDLP  
TGKFEEYPTPNPKHVAKITAKTMADYGTQAFEQTNVTDSGNQFILENGLKI  
MFEKESALMKVLDKKNQVILEETAPLSFKNDKATQTLKQSSQENYFGGGTQ  
NGRFTHKGTAIQIVNTNNWVDGGVASPFPYWSTAGYGVVRRNTWKPGNYDF  
GSHDPQKTTTTHEGTFDAFYFFNDSSAGILKDYYELTGKPALMPEYGFYEAH  
LNAYNRDYVVKVAEGTAGAVKFDGNFYKEYQPGDLGNLNGTLESLNGEKE  
NYQFSARAVIDRYKKNMPLGWFLPNDGYGAGYGQTDSDLGDVQNLKEFTEY  
AQANGVEVGLWTQSNLHPADPKPKKGERDIAKEVSVAGVKALKKTDVAWVG  
YGYSFGLNGVEDAANVFKETDGAVRPMIVSLDGWAGTQRHAGIWTGDQGTG  
GQWEYIRFHIPTYIGTSLSGQPNVGSMDMGIFGGKNKEINIRDFQWKFTFPVQL  
NMDGWGSNPKTPFAFDQEATDLNRAYLKLKSMMPYNYSIAKESVDGLPMV  
RAMALEFPNEGTAAYTKDSQYQYMWGPNLLVAPIYNGNQDEAGNSIRDGIYLPD  
EKQVWVDLFTGEKYQGGVRLNGVKTPLWKVPVFKDGSIIPTNPNPNPKEI  
QRDQRSFLIYPNGTTSFNMYEDDGISTSYEAGQSATTKINSQGPKSNEKGDLT  
VTIEPTKGSYKDFVDERSTTLDLLASEAPESVTAMVGGTEVTLKQ

30

## 【 0 0 9 4 】

EF1824AII : アミノ酸残基 820 - 1829 (配列番号 : 3 )

AANKKEFLAGTNLYYFDKEFQVQNQYLSEASGEKLNQSALSVKLAQSVTAKDVQITVK  
GFINKGTVDDGNTTVDDQLTIPANVAINEEKTTPSSLTLQWDQVTEATSYEVERDGTVF  
GNIQNTNTATFDGFSFLSEHTFRVRAVGKNGVSEWSEPIKGTQDDPYKETINQVKATS  
NLPEQPGAELKKLTDKDLSTGWHTNWSTGIANPSDGNFSLKFDLGAEYQMDKIEYL  
PRDNAGNGNILQLQYRTSKDGANWTEFSEPINWKQDALTKTETKDQAYRFVEMKVL  
KSVGNFGSGREMLFYKQPGTEGILHGDITNDGTIDENDAMSYRNYTGLESDSDDFNGY  
VEKGDNLKNGVIDAYDISYVLRQLDGGIEIPDVEEIAAGLSLAVVNENGGKDTYLPDGLT  
FILKGQDLKNINALSTKMSFDSSKFEVVGQPATNNTQOMENYSKYRKHSDNVDENLYL  
VLNQGKQLLNGSMDLVTFKVKVETTRVKRATTVEQPLQFDMSQGLLVGGGFGQ  
ATLSDFSVTVKPTLVKELLQALITLNQARVEKEYTPETWAIFKPILDEAVAVLANEQA  
TQTDVSAAAENLEKAASQLEKMPDVANKADLEKAIQEGLAKKPSDGGQEFTEETKKVL  
EESLAAAQKVFAQEKVTQEEIDQATKTLREAIAQLKEQPVAVDKETLKEQIAQVGRK  
PEEGYQFTKETEKQLQEAIAQAAEIVAKETATKEEVSEALNALETAMAQLKEVPLVNK  
DQLQEVVKRAQQVTPSEGHQFTASSLQELQKALLAAKNTLNKPAANQKMIDEAVLAE  
TSIDGLQEEVLVTDKKALEAMIAKAKAIKPSAGKEFTSESKARLTEAIDQAEGLADKN  
ARQEQIDIAEKNVKTALDSLEEQVLQTDKTKLKELLQKAETLKPKAGKQFTKASQEA  
AEAIAKQAKALVEDPNATQEAVDKCLSILSQAIEAMAEFPISSNSTGNNGNHSTVSGTGG  
VTSQGGKGTATGGTTTKTTTSGT

10

【 0 0 9 5 】

EF0089A : アミノ酸残基 36 - 1143 ( 配列番号 : 4 )

EEVNSDGQLTLGEVKQTSQQEMTLALQGGKAQPVTOEWWWHSANVSIKAAHWAAPN  
NTRKIQVDDQKKQIQIELNQQALADTLVLTNPTATEDVTFSYGQQQRALTLKTGTDPT  
ESTAITSSPAASANEGSTEEASTNSSVPRSSEETVASTTKAIESKTTESTTVKPRVAGPT  
DISDYFTGDETTIIDNFEDPIYLNPDGTPATPPYKEDVTIHWNFNWSIPEDVREQMKAGD  
YFEFQLPGNLKPNKPGSGDLVDAEGNVYGYTISEDGTVRFTFNERITSESDIHGDFSL  
DTHLNDSDGRGPGDWVIDIPTQEDLPPVVIPIVPDTEQQIDKQGHFDRTPNPSAITWTV  
DINQAMIKDQTNPTVTETWPTGNTFKSVKYVELVMNLDGTIKEVGRELSPDEYTVDKNG  
NVTIKGDTNKAYRLEYQTTIDEAVIPDGGGDVFPKNHATLTSNPNGLDAEATVTATY  
GKMLDKRNIDYDEANQEFWEINYNYGEQITPKDQAVITDIMGDNLTFEPDSLHLYSVT  
FDDKGNVVGAEVVEGKDYKVVINGDGSFAIDFLHDVTGAVKIDYKTKVDGIVEGDVAV  
NNRVDVGTGQHSDDGTASQQNIKNTGAVDYQNSTIGWTLAVNQNNYLMENAVITDT  
YEPVPGLTMPVNSLVVKDTTGAQLTLGKDFMVEITRNADGETGFKVFIGAYAKTSD  
AFHITYTFFDVTELDANNPALDHYRNTAAIDWTEAGNNHHSSEDSKPFKPLPAFDLNA  
QKSGVYNAVTKETWTIAVNLNNRLVDAFLTDPILTNTQTYLAGSLKVEGNTKPDGSV  
EKVKPTQPLTDITMEEPSEKNQNTWRVDFPNDSRTYVIEFKTSVDEKVIEGSASYDNA  
SYTNQGSRRDVTGKVSQHGGSVKKGGGEYHKDDPDHVVHVMINGAQSVDLDDVVIT  
DTPSPNQVLDPESLVIYGTNVTEDGTITPKSVILEEGKDYTLEVTTDNETGQQKIVVKM  
AHIEAPYYMEYRSLVTSSAAGSTDTVSNQVSITGNGSEVHGGDNGDVVDIDHSGGH  
ATGTKGKIQLKKTAMDETTILAGAHFIWDQAKTQVLRREGTVDATGVITFGG

20

30

【 0 0 9 6 】

EF3023A : アミノ酸残基 26 - 1024 ( 配列番号 : 5 )

EEITDLFLQKEVTYSGVEGGKIGENWKYPQFVGEKAVDGDDETRWSADKQDEQWLIV  
DLGEVKNIGELVLQLHAESPVYEILVSTDGESYQSIFKEENGKGGQPTKKYIDGNNVQA  
RFVKYQQMKMMWQHNTNKQFYSSSISFEAYEKKRLPEAIKLLTENLTISEKRRKQLAFEV  
SPAGVDITEDQIEWSSSDPTIVTVDQTNLTAVKSGEAKVTVKIKGTEISDTIPVTVVAEN  
KQYAEEMRAKWKMRLLGTTQYDNDADVQQYRAQIATESLALWQTLNQAADREYLWER  
KPSDTVSADYTTQFTNIKKLALGYEPSSSELFKPEVYDAIVKGIEMIDTKKYNGTYTT  
GNWWWDWQIGSAQPLTDTLILLHDDLNTDAEKLNKFTAPLMLYAKDPNIQWPIYRATG  
ANLTDISITVLGTGLLLEDNQRLVQVQEAVPSVLKSVSSGDGLYPDGLIQHGYPYNG  
SYGNELLKGFGRIGTILQGSWEMNDPNISNLFNVVDKGYLQLMVNGKMPMSMVSGRS  
ISRAPENTNPFTEFESGKETIANLTLIAKFAPENLRNDIYTSIQTWLQQSGSYHHFFKKP  
RDFEALIDLKNVNSASPAQATPMQSLNVYGSMDRVLQKNNEYAVGISMYSQRVGNV  
EFGNTENKKGWHTADGMLYLYNQDFAQFDEGYWATIDPYRPLPGTTVDTRELANGAYT  
GKRSPQSWVGGSSNGQVASIGMFLDKSNEGMMNLVAKKSWFLLDGQIINLGSGITGTT  
DASIEITLDNRMIHPQEVKLNQGSDDKNSWISLSAANPLNNIGYVFPNSMNTLDVQIEE  
RSGRYGDINEYFVNDKTYTNTFAKISKNYGKTVENGTYEYLVVVGKTNEEIAALSKNKG  
YTVLENTANLQAEAGNYVMNNTWNNDQEIAGLYAYDPMVSEKIDNGVYRLTLANPL  
QNNASVSIIEFDKGILEVVAADPEISVDQNIITLNSAGLNGSSRSIIVKTTPEVTKEALEKLI  
QEQ

40

【 0 0 9 7 】

50

EF2224A : アミノ酸残基31 - 771 ( 配列番号 : 6 )

QEVTSDAEKTVEKDGLKVIKIEDTSSQEDIKTVTYEVTNTRDVPKDLILKQKNTNDSPI  
KFVLDTLSEERGPTSLLEQAKVETNEKDQTTDIKLLNLQPNSTRKTINGQITTKASNKL  
LVSVLIEDNEKGTVIDLPSKDILADKESVSKEKQETSETKVENQANETASSTNEMTATT  
SNETKPEAGKAIESIQETALTQATESPEQPPLKAQPTGPLVPPTPGRGFNTPYQSVHK  
GELFSTGNTNLKIANENTAAAQTFLNTRGASSGYAINNFLEFADVDNDPNTYNSRRAY  
IDLNGAKEIAWAGLFWASASRYKGPAYGTNLSDEEISAPVQFTTPNGTVQRVSPQRYHR  
IDQDATNPGQRFGYNNTGFSNYADVTSILQGDKSATGSYTLADIPMTSSLNGQYQYYN  
FSGWSLFWVTKDQASKSRAFSIYYGARGNAAGTNNFTMSNFLTAKQGNLDPIVWFT  
VQGDKYWTGDNAQIKNSAGTWVVISNNTLNPVNNAMNATVTDNDEHMDVKYPGKFAP  
DHPNFLDIDIRMAIPEGVLNAGQNIQNFRTTSSGDDYSTNAIGFAVNAETPEFEIKKEIV  
EPKETYKVGETITYRVSLKNTKADSEAINSVSKDALDGRNLNYPGSLKIISGPNSEKTD  
ASGDDQAEYDETNKQIIVRVGNATATQGGSYKADTAETIYEFKARINERAKANELVPN  
SATVEAVDILTSAKVNETSNIWEAKIADEQVT

10

【 0 0 9 8 】

EF1269A : アミノ酸残基27 - 596 ( 配列番号 : 7 )

ETGYAQTEPTSTSETNQISATPNVPRKQVGNIVTAIQLTDKEGNPLGTINQYTDIYLRIE  
FNLPDNTVNSGDTSVITLPEELRLEKNMTFNVVDDGTVAIAQTDVANKTVLTYTDY  
VENHANISGSLYFTSLIDFENVENESKIPIYVTVGEKIFAGDLDYQEGDDVNEKFSKY  
SWFIEDDPTEIYNVLRINPTGQTYTDLEVEDVLKTESLSYMKDTMKIERGQWTLDGNAI  
WQFTPEEDITDQLAVQYGPDDRNFSVHFGNIGTNEYRITYKTKIDHLEPKGETFTNYAK  
LTENQTVVEEVEVSRVSTGGGEANGEQYVVEIHKEDEAGQRLAGAEFELIRNSTNQT  
VAKITTDQNGTAIVKGLLKDNYTLVETKAPTGYQLSQNKIPITPEDFGKNLVALKTVVNH  
KISYQPVAAASFLAGKVLGKPLKDAEFQFELLDEKGTVLETVSNDTLGKIQFSPLTFET  
PGNYQYTIREVNTQQTGVSYDTHNLQVQVTVEALLGNLVATTQYDGGQVFTNHYTPE  
KPIESTTPPTSGTTDTTNSTTETTSITIEKQAIRNKE

20

【 0 0 9 9 】

EF1091 : ヌクレオチド配列 ( 配列番号 : 8 )

0 ATGATAACAG ATGAGAATGA TAAACGAAT ATTAATATCG AGTTAAATCT  
 50 TCTCAACCAA ACAGAGCAGC CATTACAACG AGAAATTCAA TTGAAAAATG  
 100 CACAGTTCAT GGATACTGCT GTAATTGAAA AAGACGGATA TTCTTACCAA  
 150 GTGACTAATG GTACGCTTTA TCTGACTTTG GACGCACAAG TAAAAAGCC  
200 GGTACAGCTT TCGTTAGCTG TTGAGCAAAG TTCGCTTCAA ACAGCTCAGC  
250 CACCTAAGTT ATTGTATGAA AACAACGAAT ATGATGTTTC AGTTACTTCT  
300 GAAAAAATAA CAGTAGAGGA TTCTGCTAAA GAATCAACTG AACCAGAAAA  
350 AATAACTGTA CCAGAAAAA CGAAAGAAAC TAACAAAAAT GATTCGGCTC  
400 CAGAAAAAAC AGAACAGCCG ACCGCAACAG AAGAGGTAAC CAATCCATT  
450 GCAGAAGCAA GAATGGCGCC AGCTACTTTG AGAGCGAATC TGGCACTGCC  
500 TTAATTGCA CCACAATACA CGACGGATAA TTCTGGGACT TATCCGACAG  
550 CTAATTGGCA GCCACAGGC AATCAAAAATG TGTTAAACCA TCAAGGGAAT  
600 AAAGACGGTA GTGCACAATG GGACGGCCAA ACGAGTTGGA  
ATGGGGACCC  
650 TACTAATCGC ACAAATCTT ATATTGAGTA TGGCGGTACA GGAGACCAAG  
700 CCGATTATGC CATCCGAAAA TATGCTAGAG AAACAACAAC ACCAGGGCTT  
750 TTTGATGTAT ATCTTAATGT GCGTGGGAAT GTTCAGAAAG AAATCACGCC  
800 ATTGGATTG GTCTTAGTGG TTGACTGGTC CGGTAGTATG AATGAAAACA  
850 ATCGGATTGG TGAAGTTCAA AAAGGAGTGA ACCGTTTTGT TGATACATTG  
900 GCAGATAGCG GTATTACCAA TAACATCAAC ATGGGCTATG TTGGCTACTC  
950 AAGTGACGGT TATAATAACA ACGCCATTCA AATGGGGCCG TTTGATACAG  
1000 TCAAAAATCC AATTAATAAT ATTACGCCAA GTAGCACTAG AGGAGGAACT  
1050 TTAAGTCAAA AAGCATTAG AGATGCTGGT GATATGTTAG CAACGCCAAA  
1100 TGGACATAAG AAAGTCATTG TACTTTAAG GGATGGCGTC CCAACCTTCT  
1150 CTTATAAAGT GAGTCGAGTT CAAACAGAGG CGGATGGTGG CTTTACGGG  
1200 ACACAATTTA CGAATCGACA AGATCAACCA GGTAGCACTT CTTATATCTC

30

40

【 0 1 0 0 】

EF1091 : アミノ酸残基63 - 1067 ( 配列番号 : 9 )

1250 TGGTAGCTAT AATGCGCCAG ATCAAAACAA TATCAATAAA CGGATTAACA  
 1300 GTACGTTTTAT CGCCACGATA GGTGAGGCAA TGGTCTTAAA ACAACGTGGG  
 1350 ATTGAAATAC ATGGATTGGG CATTCAATTG CAAAGCGATC CACGAGCTAA  
 1400 TTTATCTAAA CAACAAGTTG AAGATAAAAT GCGTGAGATG GTGTCAGCCG  
 1450 ATGAAAATGG AGACCTTTAT TATGAATCCG CGGATTATGC ACCAGACATT  
 1500 TCTGATTATT TAGCGAAAAA AGCCGTTGAG ATTTGAGGAA CGGTTGTAAA  
 1550 CGGAAAAGTA GTTGATCCAA TTGCTGAACC TTTAAATAC GAGCCAAATA  
 1600 CATTATCAAT GAAAAGTGTG GGTCTGTTT AGGTTCAAAC ATTACCAGAA  
 1650 GTGTCGCTAA CAGGCGCTAC AATTAATAGT AATGAGATTT ATTTGGGTAA  
 1700 AGGGCAAGAA ATTCAAATTC ATTATCAAGT ACGTATTCAA ACAGAGTCAG  
 1750 AAAACTTCAA ACCTGATTTT TGGTATCAAA TGAATGGTCC GACAACGTTT  
 1800 CAGCCATTAG CCACGGCCCC TGAAAAAGTT GATTTTGGGG TTCCTTCGGG  
 1850 AAAAGCACCT GCGTGAAGT TAAACGTGAA AAAAATCTGG GAAGAGTATG  
 1900 ATCAAGACCC GACAAGTCGG CCAGATAATG TGATTTATGA AATTAGTAGA  
 1950 AAGCAAGTAA CTGACACAGC CAACTGGCAA ACTGGGTATA TTAATTATC  
 2000 AAAACAGAA AATGATACCA GCAATAGTTG GGAGCGCAA AATGTAACCC  
 2050 AACTTTCCAA AACCGCGGAT GAAAGCTATC AAGAAGTTCT TGGGCTTCCC  
 2100 CAATACAACA ATCAAGGACA AGCTTTCAAT TATCAAACAA CCCGTGAATT  
 2150 AGCAGTTTCT GTTACAGTC AAGAAAAAAT CGACGATACT ACTTGGAAAA  
 2200 ACACGAAGCA GTTCAAGCCA TTAGATTTAA AAGTAATCAA AAATCTTCC  
 2250 TCAGGTGAGA AAAACTTAGT GGGAGCCGTC TTTGAATTGA GTGGTAAAAA  
 2300 TGTTCAAACA ACATTAGTGG ACAATAAAGA TGGTAGCTAT TCCTTGCCAA  
 2350 AAGATGTGCG CCTACAAAAA GGGGAACGCT ATACATTAAC TGAAGTAAAA  
 2400 GCACCTGCAG GACATGAGTT AGGCAAGAAA ACGACTTGGC AAATTGAGGT  
 2450 GAGTGAGCAA GGCAAAGTAA GCATCGATGG ACAAGAAGTG  
 ACCACCACAA  
 2500 ATCAAGTTAT TCCATTGGAA ATTGAAAATA AATTTCTTC TTTGCCAATC  
 2550 AGAATTAGAA AATACACCAT GCAAAATGGC AAACAAGTGA ACTTAGCAGA  
 2600 GGCGACTTTT GCGTTGCAA GAAAAAATGC TCAAGGAAGT TACCAAAGT  
 2650 TGGCAACTCA AAAACAGAT ACTACAGGAT TGAGCTATTT TAAAATTAGT  
 2700 GAACCTGGTG AGTATCGAAT GGTGGAACAA TCAGGACCAT TAGGCTACGA  
 2750 CACTCTTGCT GGAAATTATG AATTTACTGT TGATAAATAT GGGAAAATTC  
 2800 ACTATGCAGG CAAAAATATT GAAGAAAATG CGCCAGAATG GACACTGACA  
 2850 CATCAAATA ATTTGAAACC TTTGACTTA ACAGTTAATA AAAAAGCCGA  
 2900 TAATCAGACG CCACTTAAAG GAGCGAAATT CCGTTTAAAC GGACCAGATA  
 2950 CGGATATTGA ATTACCAAAA GATGGCAAAG AAACGGATAC TTTTGTITTT  
 3000 GAAAACCTAA AACCGGGAA ATATGTTCTA ACAGAAACCT TTAGCCAGA  
 3050 AGGATATCAG GGGTTAAAAG AACCAATCGA ATTAATAATT CGTGAAGATG  
 3100 GTTCAGTCAC GATAGATGGG GAAAAAGTAG CAGATGTTTT AATTTCTGGA  
 3150 GAGAAGAATA ATCAAATTAC TTTAGACGTT ACGAACCAAG CAAAGTTCC  
 3200 TTTACCTGAA ACTGGTGGCA TAGGACGCTT GTGGTTTTAC TTGATAGCGA  
 3250 TTAGTACATT CGTGATAGCG GGTGTTTATC TCTTTATTAG ACGACCAGAA  
 3300 GGGAGTGTG

10

20

30

【 0 1 0 1 】

EF1091 : 核酸配列 ( 配列番号 : 1 0 )

0 MITDENDKTN INIELNLLNQ TEQPLQREIQ LKNAQFMDTA VIEKDGYSYQ  
 50 VTNGTLYLTL DAQVKKPVQL SLAVEQSSLQ TAQPPKLLYE NNEYDVSVTS  
 100 EKITVEDSAK ESTEPEKITV PENTKETNKN DSAPEKTEQP TATEEVTNPF  
 150 AEARMAPATL RANLALPLIA PQYTTDNSGT YPTANWQPTG NQNVLNHQGN  
 200 KDGSAQWDGQ TSWNGDPTNR TNSYIEYGGT GDOADYAIRK YARETTTTPGL  
 250 FDVYLNVRGN VQKEITPLDL VLVVDWVSGSM NENNRIGEVO KGVNRFVDL  
 300 ADSGITNNIN MGYVGYSSDG YNNNAIQMGP FDTVKNPIKN ITPSSTRGGT  
 350 FTQKALRDAG DMLATPNGHK KVIVLLTDGV PTFSYKVSRY QTEADGRFYG  
 400 TQFTNRQDQP GSTSYISGSY NAPDQNNINK RINSTFIATI GEAMVLKQRG  
 450 IEIHGLGIQL QSDPRANLSK QQVEDKMREM VSADENGDLY YESADYAPDI  
 500 SDYLAKKAVQ ISGTVVNGKV VDPIAEPFKY EPNTLSMKSV GPVQVQTLPE  
 550 VSLTGATINS NEIYLKGGQE IQIHYQVRIQ TESENFKPDF WYQMNGRTTF  
 600 QPLATAPEKV DFGVPSGKAP GVKLVKKIW EYDQDPTSR PDNVIYEISR  
 650 KQVTDANWQ TGYIKLSKPE NDTSNWERK NVTQLSKTAD ESYQEVGLPL  
 700 QYNNQGGAFN YQTTRELAVP GYSQEKIDDT TWKNTKQFKP LDLKVIKNS  
 750 SGEKNLVGAV FELSGKNVQT TLVDNKDGSY SLPKDVRLQK GERYTLTEVK  
 800 APAGHELKPK TTWQIEVSEQ GKVSIDGQEV TTNQVIPLE IENKFSSLP  
 850 RIRKYTMQNG KQVNLAEATF ALQRKNAQGS YQTVATQKTD TTGLSYFKIS  
 900 EPGYRMVEQ SGPLGYDTLA GNYEFTVDKY GKIHYAGKNI EENAPEWTLT  
 950 HQNNLKPFDL TVNKKADNQT PLKGAKFRLT GPDTDIELPK DGKETDTFVF  
 1000 ENLKPGKYVL TETFTPEGYQ GLKEPIELI REDGSVTIDG EKVADVLISG  
 1050 EKNNQITLDV TNQAKVPLPE TGGIGRLWFY LIAISTFVIA GVYLFIRPE  
 1100 GSV

10

【 0 1 0 2 】

EF1092 : アミノ酸残基28 - 438 ( 配列番号 : 1 1 )

20

0 ATGAAAAACG CACGTTGGTT AAGTATTTGC GTCATGCTAC TCGCTCTTTT  
 50 CGGGTTTTCA CAGCAAGCAT TAGCAGAGGC ATCGCAAGCA AGCGTTCAAG  
 100 TTACGTTGCA CAAATTATTG TTCCTGATG GTCAATTACC AGAACAGCAG  
 150 CAAAACACAG GGGAAAGAGGG AACCGTGCTT CAAAATTATC GGGGCTTAAA  
 200 TGACGTCACT TATCAAGTCT ATGATGTGAC GGATCCGTTT TATCAGCTTC  
 250 GTTCTGAAGG AAAAACGGTC CAAGAGGCAC AGCGTCAATT AGCAGAAACC  
 300 GGTGCAACAA ATAGAAAACC GATCGCAGAA GATAAACAC AGACAATAAA  
 350 TGGAGAAGAT GGAGTGGTTT CTTTTTATT AGCTAGCAAA GATTGCGCAG  
 400 AACGAGATAA AGCCTATTTA TTTGTTGAAG CGGAAGCACC AGAAGTGGTA  
 450 AAGGAAAAAG CTAGCAACCT AGTAGTGATT TTCCCTGTTT AAGATCCACA  
 500 AGGGCAATCG TTAACGCATA TTCATTTATA TCCAAAAAAT GAAGAAAATG  
 550 CCTATGACTT ACCACCACTT GAAAAAACGG TACTCGATAA GCAACAAGGC  
 600 TTTAATCAAG GAGAGCACAT TAACTATCAG TTAACGACTC AGATTCCAGC  
 650 GAATATTTTA GGATATCAGG AATTCCGTTT GTCAGATAAG GCGGATACAA  
 700 CGTTGACACT TTTACCAGAA TCAATTGAGG TAAAAGTGGC TGGAAAAACA  
 750 GTTACTACAG GTTACACACT GACGACGCAA AAGCATGGAT TTACGCTTGA  
 800 TTTTCAATT AAAGACTTAC AAAACTTTGC AAATCAAACA ATGACTGTGT  
 850 CGTATCAAAT GCGTTTAGAA AAGACCGCTG AACCTGACAC TCGGATTAAC  
 900 AACGAAGGAC AATTAGTCAC GGACAAACAT ACCTTGACTA AAAGAGCCAC  
 950 AGTTCGTACA GCGGCAAGT CTTTTGTCAA AGTTGATAGT GAAAATGCGA  
 1000 AAATCACCTT GCCAGAGGCT GTTTTTATCG TCAAAAATCA AGCGGGGGAA  
 1050 TACCTCAATG AAACAGCAAA CGGGTATCGT TGGCAAAAAG AAAAAGCATT  
 1100 AGCTAAAAAA TTCACGTCTA ATCAAGCCGG TGAATTTTCA GTTAAAGGCT  
 1150 TAAAAGATGG CCAGTACTTC TTGGAAGAAA TCTCTGCACC AAAAGGTTAT  
 1200 CTCTGAATC AAACAGAAAT TCCTTTTACG GTGGGAAAAA ATTCTTATGC  
 1250 AACGAACGGA CAACGAACAG CACCGTTACA TGTAAATCAAT AAAAAAGTAA  
 1300 AAGAGTCAGG CTTCTTACCA AAAACAAATG AAGAACGTTT TATTTGGTTG  
 1350 ACGATTGCAG GCCTGCTAAT CATTGGGATG GTAGTCATTT GGCTATTTTA  
 1400 TCAAAAAACA AAAAGAGGAG AGAGAAAA

30

40

【 0 1 0 3 】

EF1093 ( V583 ) : ヌクレオチド配列 ( 配列番号 : 1 2 )

0 MKNARWLSIC VMLLALFGFS QQALAEASQA SVQVTLHKLL FPDGQLPEQQ  
 50 QNTGEEGTL QNYRGLNDVT YQVYDVTDPF YQLRSEGKTV QEAQRQLAET  
 100 GATNRKPIAE DKTQTINGED GVVSFSLASK DSQQRDKAYL FVEAEAPEVV  
 150 KEKASNLVVI LPVQDPQGS LTHIHLYPKN EENAYDLPL EKTVLDKQGG  
 200 FNQGEHINYQ LTTQIPANIL GYQEFRLSDK ADTTLTLLPE SIEVKVAGKT  
 250 VTTGYTLTQ KHGFTLDFSI KDLQNFANQT MTSYQMRLE KTAEPDTAIN  
 300 NEGQLVTDKH TLTKRATVRT GGKSFVKVDS ENAKITLPEA VFIVKNQAGE  
 350 YLNETANGYR WQKEKALAKK FTSNQAGEFS VKGLKDGQYF LEEISAPKGY  
 400 LLNQTEIPFT VGKNSYATNG QRTAPLHVIN KKVKESGFLP KTNEERSIWL  
 450 TIAGLLIIGM VVIWLFYQKQ KRGERK

【 0 1 0 4 】

10

EF1093 : アミノ酸残基33 - 590 ( 配列番号 : 1 3 )

0 ATGAAGCAAT TAAAAAAGT TTGGTACACC GTTAGTACCT TGTTACTAAT  
 50 TTTGCCACTT TTCACAAGTG TATTAGGGAC AACAACTGCA TTTGCAGAAG  
 100 AAAATGGGGA GAGCGCACAG CTCGTGATTC AAAAAAGAA AATGACGGAT  
 150 TTACCAGATC CGCTTATTCA AAATAGCGGG AAAGAAATGA GCGAGTTTGA  
 200 TAAATATCAA GGACTIONCAG ATGTGACGTT TAGTATTAT AACGTGACGA  
 250 ACGAATTTTA CGAGCAACGA GCGGCAGGCG CAAGCGTTGA TGCAGCTAAA  
 300 CAAGCTGTCC AAAGTTTAACT CCTGCGGAAA CCTGTTGCTC AAGGAACCCAC  
 350 CGATGCAAAT GGAATGTCA CTGTTGAGTT ACCTAAAAA CAAAATGGTA  
 400 AAGATGCAGT GTATACCATT AAAGAAGAAC CAAAAGAGGG TGTAGTTGCT  
 450 GCTACGAATA TGGTGGTGGC GTTCCAGTT TACGAAATGA TCAAGCAAAAC  
 500 AGATGGTTCC TATAAATATG GAACAGAAGA ATTAGCGGTT GTTCATATTI  
 550 ATCTAAAAA TGTGGTAGCC AATGATGGTA GTTTACATGT GAAAAACAGT  
 600 GGAAGTCTG AAAATGAAGG ATTAATGGC GCAGAATTTG TTATTCTAA  
 650 AAGCGAAGGC TCACCAGGCA CAGTAAATA TATCCAAGGA GTCAAAGATG  
 700 GATTATATAC ATGGACAACG GATAAAGAAC AAGCAAAACG CTTTATTACT  
 750 GGGAAAAGTT ATGAAATTGG CGAAAATGAT TTCACAGAAG CAGAGAATGG  
 800 AACGGGAGAA TTAACAGTTA AAAATCTTGA GGTTGGTTCC TATATTTAG  
 850 AAGAAGTAAA AGCTCCAAAT AATGCAGAAT TAATTGAAA TCAAACAAAA  
 900 ACACCATTTA CAATTGAAGC AAACAATCAA ACACCTGTTG AAAAAACAGT  
 950 CAAAATGAT ACCTCTAAAG TTGATAAAAC AACACCAAGC TTAGATGGTA  
 1000 AAGATGTGGC AATTGGCGAA AAAATTAAT ATCAAATTC TGTAATATT  
 1050 CCATTGGGGA TTGCAGACAA AGAAGGCGAC GCTAATAAAT ACGTCAAATT  
 1100 CAATTTAGTT GATAAACATG ATGCAGCCTT AACTTTTGAT AACGTGACTT  
 1150 CTGGAGAGTA TGCTTATGCG TTATATGATG GGGATACAGT GATTGCTCCT  
 1200 GAAAATTATC AAGTGACTGA ACAAGCAAAT GGCTTCACTG TCGCCGTTAA  
 1250 TCCAGCGTAT ATTCCTACGC TAACACCAGG CGGCACACTA AAATTCGTTT  
 1300 ACTTTATGCA TTTAAATGAA AAAGCAGATC CTACGAAAGG CTTTAAAAAT  
 1350 GAGGCGAATG TTGATAACGG TCATACCGAC GACCAAACAC CACCAACTGT  
 1400 TGAAGTTGTG ACAGGTGGGA AACGTTTCAT TAAAGTCGAT GGCGATGTGA  
 1450 CAGCGACACA AGCCTTGGCG GGAGCTTCTT TTGTCGTCCG TGATCAAAC  
 1500 AGCGACACAG CAAATTATTT GAAAATCGAT GAAACAACGA AAGCAGCAAC  
 1550 TTGGGTGAAA ACAAAGCTG AAGCAACTAC TTTTACAACA ACGGCTGATG  
 1600 GATTAGTTGA TATCACAGGG CTAAATACG GTACCTATTA TTAGAAGAA  
 1650 ACTGTAGCTC CTGATGATTA TGTCTTGTIA ACAAATCGGA TGAATTTGT  
 1700 GGTCAATGAA CAATCATATG GCACAACAGA AAACCTAGTT TCACCAGAAA  
 1750 AAGTACCAAA CAAACACAAA GGTACCTTAC CTTCAACAGG TGGCAAAGGA  
 1800 ATCTACGTTT ACTTAGGAAG TGGCGCAGTC TTGCTACTTA TTGCAGGAGT  
 1850 CTACTTTGCT AGACGTAGAA AAAAAATGC T

20

30

40

【 0 1 0 5 】

Efae2926 : ヌクレオチド配列 ( 配列番号 : 1 4 )

0 MKQLKKWYVT VSTLLLPL FTSVLGTTTA FAENGESAQ LVIHKKKMTD  
 50 LPDPLIQNSG KEMSEFDKYQ GLADVTFISIY NVTNEFYEQR AAGASVDAAK  
 100 QAVQSLTPGK PVAQGTDDAN GNVTVQLPKK QNGKDAVYTI KEEPKEGVVA  
 150 ATNMVVAFPV YEMIKQTDGS YKYGTEELAV VHIYPKNVVA NDGSLHVKKV  
 200 GTAENEGLNG AEFVISKSEG SPGTVKYIQG VKDGLYTWTT DKEQAKRFT  
 250 GKSYEIGEND FTEAENGTE LTVKNLEVGS YILEEVKAPN NAELIENQTK  
 300 TPFTIEANNO TPVEKTVKND TSKVDKTPS LDGKDVAIGE KIKYQISVNI  
 350 PLGIADKEGD ANKYVKFNLV DKHDAALTFD NVTSGEYAYA LYDGDVIAF  
 400 ENYQVTEQAN GFTVAVNPAY IPTLTPGGTL KFYVFMHLNE KADPTKGFKN  
 450 EAVDNGHTD DQTPPTVEVV TGGKRFKVD GDVTATQALA GASFVVRDQN  
 500 SDTANYLKID ETTKAATWVK TKAETTFIT TADGLVDITG LKYGTYYLEE  
 550 TVAPDDYVLL TNRIEFVNE QSYGTTENLV SPEKVPNKHK GTLPSTGGKG  
 600 IYVYLGSGAV LLLIAGVYFA RRRKENA

10

0 ATGACGACCA CAGGGAAGAA ACTGAAAGTT ATTTTCATGC TGATAATATT  
 50 GAGTTTATCA AACTTTGTGC CATTATCTGC AATAGCAGAC ACTACAGATG  
 100 ATCCAACAGT TTTAGAAACA ATTTGAGCTG AAGTCATTTT GGATCAGTCT  
 150 GGAAAAAAG CACTGAACAT CAAGCTAAAT GCGAATAACA CCAGTGCTGA  
 200 AAAGATAGAA AAAGAAATTG GTCTAGTCGA AAATTACTTA AGTGATGTGG  
 250 AAAGAAAAGA AGGAGATGGC TATGCTTATC AGGTAAATAG CGGGAAAATT  
 300 ACGTTGGAAA TCTCATCAA CACTAAACAA ACTATCGATC TGAGTTTTCC  
 350 AATCGATCCA GCACTTTACC ACAGCCAGGC AAACAAGCTG ATCGTCGATA  
 400 ATAAAGAATA TGACATTATT GATGAGACAG AAAATAAGAA AGATACAGAT  
 450 GTGTCAGTAC CAAAGCCAGA CGAAATAGAA GAAGAATCAT CAAAAGAAAA  
 500 CGAAAATTCT GTCAGCCCAT TTACATTGCC TACATTATCC TTGCCAGCTG  
 550 TGAGTGTGCC ATCTAATCAA ACGATTCTTA CAGAATATAC AACAGATGAT  
 600 CAGGGCACTT ATCCTAAAGC CAGTTGGCAA CCTACAGGAA ATACAAATGT  
 650 TCTTGATCAT CAAGGCAATA AAAACGGAAC AAATCAATGG GATGGTATAA  
 700 ATTCTTGGAA TGGAGATCCT AATGATCGGA CCCATTGTA TATCGAATAT  
 750 GGAGGAACCG GTAATCAAGC AACTATGCG ATACGAAAGT ATGCAAAGGA  
 800 AACAAAGTACA CCCGGATTGT TTGATGTTA TTTGAATGCT CGTGGAAATG  
 850 TACAAAAGA TATCAGCCCT CTTGATCTCG TATTGGTCGT AGACTGGTCA

20

900 GGAAGTATGA ACGACAATAA TCGGATCGGT GAAGTAAAGA TTGGTGTCGA  
 950 TCGTTTTGTC GATACTTTAG CAGATAGCGG TATCACAGAC AAAATCAATA  
 1000 TGGGATATGT CGGCTACTCA AGCGAAGGAT ATAGCTACAG TAACGGTGCA  
 1050 GTACAGATGG GTTCATTTGA TTCAGTGAAA AATCAAGTAA AATCCATTAC  
 1100 ACCTTCACGG ACAAATGGTG GTACTTTTAC AAAAAAGCA CTAAGAGATG  
 1150 CAGGAAGCAT GCTATCCGTT CCAAATGGAC ATAAAAAGT GATCGTTTTG  
 1200 CTGACGGATG GTGTACCAAC ATTTTCCTAT AAAGTACAGC GGGTACACGC  
 1250 ACAATCAAGC AGCAATTATT ACGGAACTCA GTTTTCTAAT ACGCAAGATC  
 1300 GGCCGGGAAA TACTTCTCTA ATCTCAAGAA TCTATGATGC ACCTGACCAA  
 1350 AACAATCTAT CCAGAAGAAT CGACAGTACG TTTATCGCAA CCATCGGAGA  
 1400 AGCGATGGCA CTCAAAGAAC GAGGAATCGA AATACATGGT CTTGGCATCC  
 1450 AACTTCAAAG CGATCCGGCA GCTGGTCTCT CAAAAGCAGA AGTAGAGTCT  
 1500 CGTATGCGAC AAATGGTTTC ATCAGATGAA AAAGGCGATC TTTACTATGA  
 1550 ATCAGCTGAT CATGCAACAG ATATCTCTGA ATACCTAGCC AAAAAAGCTG  
 1600 TACAGATCTC AGCAACTGTA AGCAATGGAC AAATAAATGA TCCAATCGCA  
 1650 GAACCATTCA TTTATCAGCC TGGTACACTT TCAGTCAAGA GTGTGGGGAC  
 1700 AAGTCCTACA ACGGTCACCTC CATCTATTTT CATAGAAGGA AATACCATCA  
 1750 AGAGCAATCA GATCTATTTA GGAAAAGACC AAGAAATCCA AATCCATTAC  
 1800 CAAGTGAGAA TCCAAACAGA AAATGAGGAC TTCCATCCAA ATTTCTGGTA  
 1850 TCAAATGAAC GGCAGGACAA CTTTCCAGCC AAACATTGAT ACCAATGAAT  
 1900 TAGTGAATT CGGTATACCA TCTGCTAAAG CTCCCGGAGT CAGTCTTAC  
 1950 ATCAAAAAGT TATGGGAAGA ATTTGACAAC AATCTAGCTG ATCGCCAGA  
 2000 TCAAGTTACT TTTGAGATTC AACGGGAACA TACGACAAAT GCTGCAGCTT  
 2050 GGAAAAACGG ATATATTCGA ATCATTAAAC CAGCTAAAGA TACAACAAAT  
 2100 ACGTGGGAAC GTGCAGACAT TGACAAATTA TCTGCAAATA GCGGAGAAAG  
 2150 TTATCAAGAG ATATTATCAC TACCTCAATA CAATAATCAA GGTCGAAGCAT  
 2200 TCAGTTACCA AACAATCAAA GAATTACCTG TACCAGGATA CGATTCTCAA  
 2250 CAAATAGATG CAATGACATG GAAAAATACT AAACAATTCA CACCGTTAAA  
 2300 CTTGAAAATA ACGAAAAATT CCTCTACAGG TGAAAAGGAT CTTATTGGCG  
 2350 CTGTTTTCAA ATTAACAGGA GATTCTATTG ATACTTTACT AACAGATCAT  
 2400 GGCGACGGAA CCTATTCTCT TCCAGAAAAT GTCAAATTGC AAAAAGAAAT  
 2450 GACCTATACG CTGACAGAAA CAAAAGCTCC AGAAGGGCAT GGATTAAGCA  
 2500 AAAAGACTAC TTGGGAAATC AAGATCGCTT CTGATGGTAC GGTAACCATT  
 2550 GATGGAAAAA CAGTCACTAC TTCCGATGAT ACGATCCAGT TGACTIONGA  
 2600 AAATCCTTTT GTTGAAGTTC CTGTAGCAGT ACGTAAGTAT GCGATGCAAG  
 2650 GGACGGACAA AGAGATAAAT CTAAAGGAG CAGCATTTTC CCTACAGAAA  
 2700 AAAGAAGCAA ATGGTACTTA TCAGCCAATT GACAGCCAAA CAACGAATGA  
 2750 AAAAGGTCTT GCCAGTTTTG ATTCACTCAC ACCTGGTAAA TATCGAGTCG  
 2800 TTGAAACAGC TGGTCCTGCC GGATATGATA CTTGCGCCGG AAATTATGAA  
 2850 TTCCAAATCG ATAAATATGG AAAAATCATT TACACGGGAA AAAATACCGA  
 2900 GATGACAAAT AATGTATGGA CGCTCACTCA TCAAAATCGA CTAAAAGCGT  
 2950 TTGATCTAAC GGTACACAAA AAAGAAGACA ACGGACAGAC ATTAAGGA  
 3000 GCAAAATTC AACTGACAGG ACCAGAAATG GACTTAGAAT CGCCAAAAGA  
 3050 TGGACAAGAA ACAGATACCT TTCTATTGGA AAATTTAAAA CCTGGAACCT  
 3100 ATACGCTGAC CGAAACTTTT ACACCAGAAG GATACCAAGG TCTAAAAGAG  
 3150 CCAGTTACTA TAGTTATACA CGAAGATGGG TCAATTCAAG TGGATGGACA  
 3200 AGATCATGAA TCTGTTCTGT CACCAGGAGC CAAAAACAAC CAGATTTCTT  
 3250 TAGACATCAC GAATCAGGCA AAAGTACCAT TACCTGAAAC GGGAGGAATT

10

20

30

## 【 0 1 0 6 】

Efae2926 : アミノ酸残基 57 - 734 ( 配列番号 : 1 5 )

3300 GGCCGTTTAG GAATCTATCT AGTAGGGATG ATTGGTTGTG CGTTTTCTAT  
 3350 TTGGTATCTT TTTTTGAAAA AAGAAAGAGG GGGCAGC

## 【 0 1 0 7 】

Efae2925 : ヌクレオチド配列 ( 配列番号 : 1 6 )

40

0 MTTTGKCLKV IFMLIILSLS NFPVLSAIAD TTDDPTVLET ISAEVSDQS  
 50 GKALNIKLN ANNTSAEKIE KEIGLVENYL SDVERKEGDG YAYQVNSGKI  
 100 TLEISSNTKQ TIDLSPIDP ALYHSQANKL IVDNKEYDII DETENKKTDD  
 150 VSVPKPDEIE EESSKENENS VSPFTLPTLS LPAVSVPSNQ TIPTEYTTDD  
 200 QGTYPKASWQ PTGNTNVLDH QGNKNGTNQW DGINSWNGDP NDRTHSYIEY  
 250 GGTGNQADYA IRKYAKETST PGLFDVYVNA RGNVQKDITP LDLVLVDWS  
 300 GSMNDNNRIG EVKIGVDRFV DTLADSGITD KINMGYVGYG SEGYSYSNGA  
 350 VQMGSFDSVK NQVKSITPSR TNGGTFTQKA LRDAGSMLSV PNGHKKVIVL  
 400 LTDGVPTFSY KVQRVHAQSS SNYYGTQFSN TQDRPGNTSL ISRIYDAPDQ  
 450 NNLRRIDST FIATIGEAMA LKERGIEIHG LGIQLQSDPA AGLSKAEVES  
 500 RMRQMVSSDE KGDLYESAD HATDISEYLA KKAVQISATV SNGQINDPIA  
 550 EPFIYQPGTL SVKSVGTSPT TVTPSISIEG NTKSNQIYL GKDQEIQIHY  
 600 QVRIQTENED FHPNFWYQMN GRITTFQPNID TNELAEFGIP SAKAPGVSLH  
 650 IKKLWEEFDN NLADRPDQVT FEIQREHTTN AAAWKNGYIR IIPAKDTTN  
 700 TWERADIDKL SANSGESYQE ILSLPQYNNQ GQAFSYQTIK ELPVPGYDSQ  
 750 QIDAMTWKNT KQFTPLNLKI TKNSSTGEKD LIGAVFKLTG DSIDLTLTDH  
 800 GDGTYSLPEN VKLQKEMTYT LTETKAPEGH GLSKKTTWEI KIASDGTVTI  
 850 DGKTVTTSDD TIQLTIENPF VEVPAVVRKY AMQGTDKAIN LKGAASFSLQK  
 900 KEANGTYQPI DSQTTNEKGL ASFDSLTPGK YRVVETAGPA GYDTPSPNYE  
 950 FQIDKYGKII YTGKNTMTN NWWTLTHQNR LKAFDLTVHK KEDNGQTLKG  
 1000 AKFRLQGPEN DLESPKDGQE TDTFLFENLK PGTYTLTETF TPEGYQLKE  
 1050 PVTIVIHEDG SIQVDGQDHE SVLSPGAKNN QISLDITNQA KVPLPETGGI  
 1100 GRLGIYLVGM IGCAFSIWYL FLKKERGGG

10

【 0 1 0 8 】

Efae2925 : アミノ酸残基30 - 429 ( 配列番号 : 1 7 )

0 ATGAAAAAAC TTGGTTGGCT TAGTATGTGT CTCTTCTTGT TACTATTTAA  
 50 ACCAGCTTTT ACTCAGGTAG CAACAGAAAC AGAAACAGAA ATGGTTCCAG  
 100 TTACTTTACA CAAATTGCTT TTCCCAAACG GGCAACTGCC GAAAAATCAT  
 150 CCAATGACG GACAAGAAA AGCTTTATTA CAAACGTATC GAGGATTA  
 200 TGGTGTACACA TTCCAAGTTT ATGATGTCAC AGATTCTTTT TACCATCTAC  
 250 GGGAAAAGGG CAAAACGGTA GAAGAAGCAC AAGCAGAGAT  
 CGCAAAAAAC  
 300 GGTGCGTCTT CCGGTATGTT TACCGCAGAA GCAACAACCTA CAACTCTTAA  
 350 CAACGAAGAT GGTATCGCTT CTTTTCTCT GGCCGCTAAA GATCAAGAAA  
 400 AAAGAGATAA AGCGTATCTT TTCATTGAAT CCAAAGTACC AGAAGTCGTC  
 450 AAAGAAAAGG CAGAGAATAT GGTAGTTGTT CTTCCTGTAC ATGGACAAAA  
 500 CAATCAAAAA CTTTCAACTA TCCATTTGTA TCCTAAAAAT GAAGAAAACG  
 650 ACTACCCTGA TCCACCTTTT GAGAAGGTAT TAGAAGAGCC TAGAAATGAT  
 600 TTTACGATTG GTGAAAAAAT CACTTATTCC TTGCATACGA CAATTCTGT  
 650 AAATATCCTT GACTATCAAA AGTTCGAATT GTCAGATAGT GCGGATGAAG  
 700 CATTAACGTT TTTACCTAAT AGTTTAAACGA TTTATCGAA TGGAGAAAAG  
 750 CTGACAGAAG GCTTTGTCAT ACACAAGAAA CCTCACGGAT TTGATGTTTT  
 800 ATTTTCGATC CCTTCGTTGG AAAAATATGC TGGAAAAAAA CTGACCATTI  
 850 CTTATCAGAT GCAGCTAAGC AGTACAGCAC AGGCGAACAA GGAAATCAAC  
 900 AACAAACGGAA CACTGGATTT TGGTTTTGGT GTCAGTACAA AGAAAGTCTC  
 950 TGTATATACA GGGAGTAAGC AATTTGTCAA AATCGAGACA AATAAACCAG  
 1000 ATAAACGATT AGCTGGCGCA GTATTCTTA TAAAAACAA AGCAGGAAAT  
 1050 TACCTCCAGC AAACAGCCAA CGGATACAAG TGGACAAAAGA ACGAATCAGA  
 1100 TCGCGTTCAC CTGATTTCCG ATAAAAATGG CGCTTTTTC AATTCGCGGT  
 1150 TGAAAACAGG AAGTTATCGA TAAAAGAGA TCGAAGCACC TTCTGTTAT  
 1200 ATTTAAGTG AAACAGAAAT TCCGTTTACC ATTTCAACTT TTCTTCTGA  
 1250 GGATAAAGAG GCGGACAGTA TATTGAAAGT AGTCAATAAA AAAGAAAATA  
 1300 GCCGTCCATT TCTTCAAAA ACAACGAAA CGAAAAATAC ACTTTTAGGC  
 1350 GTTGTGGTA TGGTATTGCG AAGCTTTGCA ATCTGGTTGT TTATCAAAAA  
 1400 AAGAACAGGA GTGAAAAAAT GA

20

30

40

【 0 1 0 9 】

Efae2924 : ヌクレオチド配列 ( 配列番号 : 1 8 )

0 MKKLGWLSMC LLLLLFKPAF TQVATETETE MVQITLHKLL FPNGQLPKNH  
 50 PNDGQEKALL QTYRGLNGVT FQVYDVTDSF YHLREKGTKV EEAQAEIAKN  
 100 GASSGMFTAE ATTTLLNED GIASFSLAAK DQEKRDKAYL FIESKVPEVV  
 150 KEKAENMWWW LPVHGQNNQK LSTIHLYPKN EENDYPDPFF EKVLEEPRND  
 200 FTIGEKITYS LHTTIPVNIL DYQKFELSDS ADEALTFLPN SLTISSNGEK  
 250 LTEGFVIHKK PHGFDVLSI PSLEKYAGKK LTISYQMQLS STAQANKEIN  
 300 NNGTLDFFGG VSTKKVSVYT GSKQFVKIET NKPKDKRLAGA VFLIKNKAGN  
 350 YLQQTANGYK WTKNESDALH LISDKNGAFS ISGLKTGSYR LKEIEAPSGY  
 400 ILSETEIPFT ISTFLSEDKE ADSILKVVNK KENSRRPFLPK TNETKNTLLG  
 450 VVGMVFASFA IWLFIKKRTG VKK

## 【 0 1 1 0 】

Efae2924 : アミノ酸残基55 - 588 ( 配列番号 : 1 9 )

10

0 ATGAAAAATC ATAAAAAAT AAACGTTATG TTAGGAGTCC TTTTCCTTAT  
 50 TTTACCATTA CTCACAAACA GCTTCGGCGC AAAAAAGTG TTTGCAGAGG  
 100 AGACAGCAGC TCAAGTCATC CTTCATAAAA AGAAAATGAC TGATTTACCC  
 150 GATCCTTTAA TCCAAAACAG CGGGAAAGAA ATGAGCGAAT TCGATCAATA  
 200 CCAAGGATTA GCCGATATTT CATTTCAGT TTATAACGTC ACTCAAGAAT  
 250 TTTATGCGCA ACGAGATAAA GGAGCGTCCG TGGATGCAGC AAAACAAGCA  
 300 GTCCAGTCTT TGACTCCTGG TACACCAGTT GCTTCAGGAA CGACAGATGC  
 350 TGATGGAAAT GTCACCTTAT CTTTACCTAA AAAACAAAAT GGGAAAGATG  
 400 CAGTCTACAC GATCAAAGAA GAACCAAAG ACGGAGTGTG AGCTGCCGCA  
 450 AACATGGTTT TAGCTTTCCC TGTATATGAG ATGATCAAAC AAGCAGGATA  
 500 CTCTTATAAA TACGGGACAG AAGAAGTAGA TACTATCCAT CTCTACCCTA  
 550 AAAATACAGT CGGTAATGAT GGAACGTTGA AAGTTACAAA AATCGGTAAT  
 600 GCCGAAAACG AAGCACTAAA TGGAGCAGAA TTTATTATTT CTAAGAAGA  
 650 AGGAACACCA AGCGTCAAAA AATACATCCA AAGTGTGACA GATGGATTGT  
 700 ACACITGGAC AACTGATCAA ACCAAAAGCCA AACATTTTAT TACTGGTCA  
 750 TCTTATGACA TCGGCAACAA TGACTTTGCC GAGGCATCTA TTGAAAAGG  
 800 CCAGTTGATC GTTAATCATT TAGAAGTTGG AAAATATAAT TTAGAAGAAG  
 850 TAAAAGCTCC TGATAATGCG GAAATGATTG AAAAGCAAAC AATCACGCT  
 900 TTTGAGATCC TGGCAAATAG CCAAACACCA GTAGAAAAGA CGATCAAAAA  
 950 TGATACGCTT AAAGTTGATA AAACAACACC TCAATTGAAT GGAAAAGATG  
 1000 TCGCAATCGG TGAAAAAATT CAATATGAGA TTTCTGTCAA TATCCCATTA  
 1050 GGTATCGCTG ATAAAGAAGG AACGCAAAAC AAGTACACAA CATTCAAAT  
 1100 TATCGATACT CATGACGCTG CTTTAAACATT TGATAATGAT TCTTCAGGAA  
 1150 CGTATGCTTA TGCCTTATAT GATGGAAATA AAGAAATCGA CCCAGTAAAT  
 1200 TATTCTGTCA CTGAGCAAAC AGACGGATTC ACGGTTTCAG TTGATCCGAA  
 1250 TTATATTCCT TCATTAACCTC CTGGCGGTAC ATTGAAATTC GTTTACTATA  
 1300 TGCATTTGAA CGAAAAAGCA GATCCAACCA AAGGATTTTC TAACCAAGCA  
 1350 AATGTCGATA ACGGGCATAC AAATGATCAA ACACCACCGT CAGTCCGATG  
 1400 CGTTACTGGG GGCAAACGAT TTGTTAAAGT AGATGGTGAC GTTACATGAC  
 1450 ACCAAACACT TGCTGGAGCA GAATTCGTCG TTCGTGATCA AGATAGTGAC  
 1500 ACAGCGAAAT ATTTATCGAT CGACCCATCC ACAAAGCCG TCAGCTGGGT  
 1550 ATCGGGCGAAA GAATCAGCAA CGGTTTTTAC AACCACAAGT AACGGTTTAA  
 1600 TCGATGTGAC AGGTCTAAAA TATGGCACGT ACTATCTGGA AGAAACGAAA  
 1650 GCGCCAGAAA AATATGTTCC ATTAACAAAC CGTGTAGCAT TTAGTATCGA  
 1700 TGAACAATCT TATGTAACAG CAGGACAGTT GATTTCTCCT GAAAAATAC  
 1750 CAAATAAACA CAAAGGTACA CTTCTTCAA CAGGCGGTAA GGGAAATCTAT  
 1800 GTGTATATCG GTGCAGGAGT AGTCCTTCTA CTGATTGCTG GACTGTACTT  
 1850 TGCTAGACGC AAGCACAGTC AGATTTAG

20

30

40

## 【 0 1 1 1 】

タンパク質の発現及び精製

PCR ( PCR反応に使用したオリゴヌクレオチドを表3に示す ) を使用して、EF0089、EF1091、EF1092、EF1093、EF1099、EF1269、EF1824、EF2224及びEF3023由来のAドメインをエンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) V583又はエンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) EF1 ( EF1099 ) ゲノムDNAから増幅し、大腸菌発現ベクターPQE-30 ( Qiagen製 ) にサブクローン化した。

## 【 0 1 1 2 】

適当なpQE-30ベースの組立て体を含む大腸菌M15 ( pREP4 ) 培養物の1リットル培養物を、一夜培養物由来の初期2%接種物を用いてOD<sub>600</sub> = 0.6まで増殖させた。0.4mMイソプロピル-β-D-チオガラクトシド ( IPTG ) を用いて2~3時間誘導した後に、細胞を遠心分離により回収し、10mM Tris-Cl、100mM NaCl、pH 7.9に再懸濁し、そして-80℃で保存

50

した。

【0113】

細胞を溶解し、発現されたタンパク質を放出させるために、細胞を1200 PSIに設定したゲージ圧でフレンチプレスに2回通して、20,000 PSの推定内部細胞圧を得た。得られた溶菌液を、165,000 × gのRCFmaxで遠心分離し、上清を0.45 μmフィルターに通して濾過した。容量を10mM Tris-Cl、100mM NaCl、pH7.9を用いて15mlに調節し、同じ緩衝液に溶解した0.2Mイミダゾールを加えて、非特異結合を最小にするためにイミダゾール濃度を6.5mMに上げた。試料を、FPLC装置(Pharmacia製)に連結し且つ予め10mM Tris-Cl、100mM NaCl、pH 7.9で平衡化したニッケルアフィニティークロマトグラフィーカラム(HiTrap chelating、Pharmacia製)に装填した。結合されたタンパク質を、100~200mlにわたって10mM Tris-Cl、100mM NaCl、pH7.9に溶解した0~100mMイミダゾールの直線濃度勾配で溶出した。タンパク質含有画分をSDS-PAGEで分析し(図2)、25mM Tris-Cl、1mM EDTA、pH6.5-9(精製されたタンパク質のpiに応じて)に対して透析し、その後さらに精製するために、得られた試料をイオン交換カラム(HiTrap Q、Pharmacia製)に加えた。結合されたタンパク質を、100mlにわたって25mM Tris-Cl、1mM EDTA、pH6.5-9に溶解した0-0.5M NaClの直線濃度勾配で溶出した。最後に、タンパク質試料をPBSに対して広範囲にわたって透析し、そして+4で保存した。

【0114】

また、EF1091、EF1092及びEF1093を振盪フラスコ又はバイオリアクターで発現させ、細胞を遠心分離により収集し、得られた細胞ペースト-80で凍結させた。細胞を、ミクロフルイダイザーに10,000 psiで2回通して1 × PBS(10mLの緩衝液/1gの細胞ペースト)に溶解した。溶解した細胞を17,000rpmで30分間遠沈して細胞碎片を除去した。上清を、0.1M NiCl<sub>2</sub>を装填した5mL HiTrap Chelating(Pharmacia製)カラムに通した。装填後に、カラムを、カラム容量の5倍容の10mM Tris、pH8.0、100mM NaCl(緩衝液A)で洗浄した。タンパク質を、10mM Tris、pH8.0、100mM NaCl、500mMイミダゾール(緩衝液B)を0~100%の濃度勾配で使用して溶出した。タンパク質含有画分を1 × PBSに透析した。

【0115】

実施例3. エンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)及びエンテロコッカス・フェシウム(*E. faecium*) PCR分析に共通のMSCRAMM(登録商標)遺伝子

前記の配列のランキング領域用のプライマーを使用して、エンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)株由来のゲノムDNA 1 μgを増幅した。表1の5種類のエンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)株からのPCR生成物を配列決定し、TIGRデータベース配列と比較した。腸球菌MSCRAMM(登録商標)Aドメイン遺伝子生成物を増幅するのに使用したプライマーを以下に示す。

【0116】

```

0 MKNHKKINVM LGVLFILPL LTNSFGAKKV FAEETAAQVI LHKKKMTDLP
50 DPLIQNSGKE MSEFDQYQGL ADISFSVYNV TQEFYAQRDK GASVDAKQA
100 VQSLTPGTPV ASGTTDADGN VTLSPKKQN GKDAVYTIKE EPKDGVSAAA
150 NMVLAFPVYE MIKQADGSYK YGTEELDTIH LYPKNTVGND GTLKVTKIGT
200 AENEALNGAE FISKKEGTP SVKKYIQSVT DGLYTWTTDQ TKAKHFITGH
250 SYDIGNNDFA EASIEKGQLI VNHLEVGKYN LEEVKAPDNA EMIEKQTITP
300 FEILANSQTP VEKTIKNDTS KVDKTTPLN GKDVAIKEKI QYEISVNIPL
350 GIADKEGTQN KYTTFKLIDT HDAALTFDND SSGTYAYALY DGNKEIDPVN
400 YSVTEQTDGF TVSVDPNYIP SLTPGGTLKF VYMHLENEKA DPTKGFNSQA
450 NVDNGHTNDQ TPPSYDVVTG GKRFVKVDGD VTSQTLAGA EFVVRDQDSD
500 TAKYLSIDPS TKAVSWWSAK ESATVFTTTS NGLIDVTGLK YGTYYLEETK
600 APEKYVPLTN RVAFTIDEQS YVTAGQLISP EKIPNKHKGT LPSTGGKGIY
600 VYIGAGVLL LIAGLYFARR KHSQI

```

【0117】

腸球菌MSCRAMM(登録商標)タンパク質同士の相同性

NCBI検索エンジンを用いて上記のAA配列を使用してblastp検索を行った。見いだされたそれぞれの推定上の相同体について、得られたアクセッション番号を示す。%同一性及び

類似性の両方は、照会配列に厳密に一致するAAの%を示し、これに対して類似性はマッチング計算における同類AA変化を含む。

## 【 0 1 1 8 】

表 4 . エンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) MSCRAMM (登録商標) タンパク質のエンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) 相同体の比較

タンパク質	5'プライマー	3'プライマー
ACE40	GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG	GTCTGTCTTTTCACTTGTCTTCTGT TG
EF1091	CAAGTAAAAAAGCCGGTACAGC	AAAGGAACCTTTGCTTGGTTC
EF1092	TCGCAAGCAAGCGTTCAAG	AAGCCTGACTCTTTTACTTTTTTA TTG
EF1093	GAGAGCGCACAGCTCGTG	GGTACCTTTGTGTTTGTGGTA C
Efae29 24	CGGGATCCCAAACAGCGGGAA AGAAATGAGCGA	CCCAAGCTTTCATGTACCTTTGT GTTTATTGG
Efae29 25	CGGGATCCGAAATGGTTCAGAT TACTTTACAC	TCTGCAGTTCAATTGACTACTTTC AATATACTGTC
Efae29 26	CGGGATCCAAAGCACTGAACAT CAAGCTAAATGCG	CCCAAGCTTTCAGAATGCTTGAC CTTGATTATTGTA

10

## 【 0 1 1 9 】

それぞれのエンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) MSCRAMM (登録商標) タンパク質由来の“A”ドメインアミノ酸配列を、blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 検索のクエリーとして使用した。示した結果は、NCBIコンピュータで記録した。同一性は、対象配列とクエリー配列との間の厳密な一致(match)として算出され、これに対して類似性はまた同じ位置の配列に同類変化を含む。

20

## 【 0 1 2 0 】

実施例 4 . MSCRAMM (登録商標) タンパク質であると予測された追加のグラム陽性アミノ酸配列

予測された免疫グロブリン様折りたたみを含むLPXTGモチーフ含有細胞壁固定化タンパク質のリスト。それぞれのゲノム配列についての配列決定センターを、括弧内に示す。ブドウ球菌及び表皮ブドウ球菌由来のCNAの配列を除く全ての配列は、TIGRウェブサイト ([www.tigr.org](http://www.tigr.org))、総合微生物資源セクションから得ることができる。表皮ブドウ球菌 RP64Aゲノム配列は注釈が付かない。しかし、前記に挙げた表皮ブドウ球菌タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチドのコーディネート(coordinate)はTIGRウェブサイトにより得ることができる。

30

## 【 0 1 2 1 】

肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) TIGR4 (TIGR)

SP0462

SP0463

SP0464

40

エンテロコッカス・フェカーリス (*Enterococcus faecalis*) V583 (TIGR)

EF2224

EF1099

EF1092

EF3023

EF1269

EF0089

EF1824

EF1091

50

EF1093  
 EF1075  
 EF1074  
 EF1651

学) ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans) UA159 (オクラホマ大

SMU.610  
 SMU.987  
 SMU.63c

10

黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) N315 (順天堂大学)

SA2447  
 SA2290  
 SA2291  
 SA2423  
 SA0742  
 SA0519  
 SA0520  
 SA0521

20

炭疽菌 (Bacillus anthracis) Ames (TIGR)

BA0871  
 BA5258

【 0 1 2 2 】

表皮ブドウ球菌 (Staphylococcus epidermis) 株 PR62A (TIGR) (配列番号: 20)

<i>E. faecalis</i> タンパク質 類似体	<i>E. faecium</i> タンパク質 相同体名	アクセッション 番号	% 同一性	%
EF1091	Efae2926	00038011	60	75
EF1092	Efae2925	00038010	48	63
EF1093	Efae2924	00038009	74	83

30

【 0 1 2 3 】

>SERP\_GSE\_14\_6.AA 2402 残基

mknkqgflpnllnkygirklisagtaslligatlvfgingqvkaaednivsngndnktndsessdkelykseddcks  
ststdnlesefdqnnnpssieestnrndedtinqrstetektthvksadtqtnnetnknddnattnthtesisdes  
tyqsddskttqhdnsntnqdtqstlnpstkessnkdeatsptpkestsiektnlsndanhqttdevnhdsdsdnmt  
nspndteneldttqtshtdespspqsdnftgftnlmatplnlnrndnprinlaatedtkpktykkpnnseysyllndl  
gydattvkensdirhagisqsqdnstgsviklnltkwslsqsdvnggkvnlsfaqsdfytqiesitlndvkmtdttnng  
qnwsapingstvrsgligsvtnhdivitlknstlsslgysnnpvylthtwttndgaiaeesiqvasitptidskapnt  
iqksdftagrmtnkikydsqsiksivhtfkpnenflqtdyrvlyikeqvnelipyidpnsvklyvsdpdgnpisd  
dryvngsidndgldsskineisiknntsgqisnartsldrnvffglgqrsytsiyklkdgytiesvaskvsaretf  
swmevdylidsydgapnkrllgsyassyidmidrippvapkansittedtsikgtaevdtnitfndgrtllngkvd  
sngnfsaiapsyvytgeketsidkgnvspaitisvidktpavkaisnktqkvnteiepikeatdnggavtnk  
veglpamtfdeatntisgtpsevgsyditvttidengnsetttfidvedttkptvesvadqtqevnteiepikeatd  
nsgavtnkvdgldpvgvfdeatntisgtpsevgsyditvttidengnsetttfidvedttkptvesiadqteve  
epikieakdngsgqvtnkvdgldpvgvfdeatntisgtpsevgsyditvttidengnsetttfidvedttkptves  
dqtqevnteiepikeardnsgqavtnkvdgldpvgvfdeatntisgtpsevgsyditvttidengnsetttfidved  
tkptvenvadqtqevnteipitiesednsgqvtnkvdgldpvgvfdeatntisgtpsevgsyditvttidengnatet  
ttidvedttkptvenvadqtqevnteiepikeatdnggavtnkveglpamtfdeatntisgtpsevgsyvtvtt  
mdesgnatettfidvedttkptvesvadqtqevnteipitiesednsgqavtnkvdgldpvgvfdeatntisgtp  
evgsyvtvttidengnatettfidvedttkptvksvdqtqevnteiepikeatdngqvtnkvdgldpvgvfdeat  
ntisgtpsevgsyditvttidengnatettfidvedttkptvediadqtqevnteiepikeatdnggavtnkvdgld  
dvgvfdeatntisgtpsevgsyditvttidengnsetttfidvedttkptvesvadqtqevnteiepikeatdng  
vankvdgldpvgvfdeatntisgtpsevgsyditvttidengnsetttfidvedttkptvesiadqteve  
atdnggavtnkvdgldpvgvfdeatntisgtpsevgsyvtvttidengnatettfidvedttkptvesvadqtqev  
nteipitiesednsgqavtnkveglpamtfdeatntisgtpsevgsyvtvttidengnatettfidvedttkptves  
ianqtqevnteiepikeatdnggavtnkvdgldpvgvfdeatntisgtpsevgsyditvttidengnatettfidve  
dttkptvesvadqtqevnteiepikeardnsgqavtnkvdgldpvgvfdeatntisgtpsevgsyditvttideng  
atettfidvedttkptvediadqtqevnteiepikeatdnggavtnkveglpamtfdeatntisgtpsevgsydit  
tidkdgnatattitinvittpaqptinkvtenstevngrepgtvevtfpdgnkvegkvsdgnhiqipsettikg  
gqplqvaidkagnkseattinvittpaqptinkvtenstevsgrgepgtvevtfpdgnkvegkvsdgnhi  
qipsderfkvgqqlivkvdeegnsepsitmvqkedknsklsvtgtvtknnsklskhkaseqqsyhknski  
knvnkptkivekdmstydysryskdisnknksatfeqqnvsdinngysrnkvnpvksrknkinkdipqtg  
eenfnkstlfgtlvaslgaillfkrkkdendeke

10

20

【 0 1 2 4 】

>SERP\_GSE\_2\_50.AA 892 残基 (配列番号 : 2 1)

lfglghneakeentvqdvkdsnmddelsdsndqssneekndvinnsqsintdddnqikkeetnsndaienr  
skditqstnvdeneatflqktpqdnqtkveevkpsvessnssmdtaqqpshtinseasiqtsdneensrv  
sdfanskiesnteskeentieqpnkvredsitsqpssyknideklsnqdelnlpineyenkvrplsttsaqps  
krvtvnqlaaeqgsnvnhlikvtdqsitesygdsgjiikahdaenliydvtfvddkvksgdtmtvntidkntvpsd  
tdsfaipkikdngseiatgtydntnkqitytftdydkyenikahikltsyidskvpnnntkldveyktalssvntitv  
eyqkpnentranlqsmftnidtknhtveqtiyinprysaketnvnisngdegstiidstiiikvykvgdnqnlpds  
nriydyseyedvntdyaqignndvnnifgnidspyiikviskydpnkddyttiqtvtmqttineygefrtasyd  
ntiafstssggqgdllppekykigdywedvdkdgiqntndnekplsnvltitypdgtsksvrtdeegkyqfdgi  
kngltykifetpegypthkhsngtpaldsegnsvwvtingqddmtidsgyfqtqkyslgnvwydtnkdgiaggd  
dekgisgvkvtlkdengniisttdengkyqfdnlngnyivhfdkpsgmtqttdsgdddeqdadgeevhvtit  
dhdfsidngyyddds  
sdsgldnssdkntkdklpdtganedhdskgtlgaifagigalllgrkrknkn

30

40

【 0 1 2 5 】

>SERP\_GSE\_9\_28.AA 1973 残基 (配列番号 : 2 2)

mkenkrknndkntrfsirkyqgygatsvaiigfiiiscfseakadsdkheikshqqsmtnhtltpsdnqentsn  
nfnrnrdhishlslnksiqmdelkklikqykainindkteesiklfqsdlvqaeslinnpqsqqhvdafyhkflnsa  
gkirkketvsikhersesntyrigdevrsqtfshirhknnavsfrmadsqnsistdpikaneinpei qngnfsqvsggp  
lptsskrlvtvndvnwhsystdpnpeypmftyttavnyprfmsngnapygvilgrttgdwnrvnidskvagiyy  
didvvpgselvnvfnstspvfdgaagakkisnveqnrvfdsrfrngmgpyptgklsamvni pndinrvrisflpvs  
stgrsvqrsrehgfgdnssyyhggsvsdvrinsgsyvsvkvtqreyttrpnssndtfaratinlsvenkghnqs  
kdyvevilpqnsrlistrggsgnynnatnksirlndlnpugdrrdisyvd fessspklinnahlyktnatfrngdgqr  
tgdnivdlqsi allmnkdvletelneidkfrldneadftidswsalqekmteggnilneqqnqvalenqasqetinn  
vtqsleilknnlkyktpsqpiiksnqipnitispadkadkltityqntdnesasiignkinnqwslnnnipgieidmq  
glvtidykavypesvvgandktgnsdasaesritmprkeatplspiveaneervnvviapngeatqiaikyrtpd  
gqeativaskngsswtlnkqidyvnieensgkvitigyqavqpeseviatetkngsdasaesrvtmprkeatphs  
piveaneehvntviapngeatqiaikyrtpdgqettliaskngsswtlnkqidyvnieensgkvitigyqavqlesev  
iatetkngsdasaesritmrlrkeatphspiveaneehvntviapngeatqiaikyrtpdgqeativasknesswtl  
nkqidhvnidensgkvitigyqavqpeseiatetkngsdasaesritmprkeatpipptleasvqeasvtvtpne  
natkfvikylidin deistliaskinqwtnkdnfgikinplgtkviisyvavqpesdvialesqgnsdlseesriimptk  
eeppepplesdsieakvnifpndeativimyslegqeativasknesswtlnkqidhvnidensgkvitigyqa  
vqpeseviatetkngsdasaesrvtmprkeatphspivetneervnvviapngeatqiaikyrtpdgqettliask  
ngsswtlnkqidhvnidensgkvitigyqavqpeseiatetkngsdasaesritmprkeaihpiveaneehv  
nvtiapggettqiaivkyrtpdgqeatiasknesswtlnkqidhvnidensgkvitigyqavqpeseviatetkngs  
dasaesritmpvkektappisiinesnasveii pqvntqslqyidakggqqnliatinqngwtlnknvshitvd  
kntgkviinyqavypeseviare skngsdssnsvmvmprktatpkppiikvdemnaslaiipyknntainihyi  
dkkgiksmvtaiknndqwqldekikyvkidaktgtviinyqivqenseiataingnsdkseevkvimpikleftpla  
pilletnykkatvsilpqsnatkldfkyrdkkgdskiiivkrfknwkaneqisgvitnpefgqvinyqavypesdila  
aqyvngsdasewakvkmppkelaphsplydnmknkiliapnsnatemelsyvdknqslkvkalkinnrkwk  
fdssvsnisinpntgkivlqpqfltnskiiivfakkngsdasisvslrvpavkkielepmfnvplvlslnkkriqfddcs  
gvknclnkqisktqlpdtgysdkasksnlsvllgfgfisyrsrkrkekq

10

20

>|cl|SEPN\_5\_124.AA 10203 残基 (配列番号 : 2 3)

MKSKPKLNGRNICSFLLSKCMSYSLSKLSTLKTYNFQITSNNKEKTSRIGVAIALN  
NRDKLQKFSIRKYAIGTFSTVIAT  
LVFMGINTNHASADELNQKLIKQLNQTDDDDSNTHSQEIENNKQNSSGKTE  
SLRSSTSQNQANARLSDQFKDTNETSQ  
QLPTNVSDDSINQSHSEANMNEPLKVDNSTMQAHSKIVSDSDGNASENKHHK  
LTENVLAESRASKNDKEKENLQEKDKS  
QQVHPPLDKNALQAFFDASYHNYRMIDRDRADATEYQKVKSTFDYVNDLLGNN  
QNIPSEQLV SAYQQLKALELARTLPQ  
QSTTEKRGRRSTRSVVENRSSRSYLDARTEYVSKDDDDSGFPPGTFPHAS  
NRRWPYNLPRSRNILRASDVQGNAYITT  
KRLKDG YQWDILFNSNHKGHEMYWYFGLPSDQTPTGPVTFIINRDGSSTST  
GGVGFSGGAPLPQFWRSAGAINSSVAN  
DFKHGSATNYAFYDGVNNSDFARGGELYFDREGATQTNKYGDENFALLNSE  
KPDQIRGLDTIYSFKGSGDVSYRISFK  
TQGAPTARLYYAAGARSGEYKQATNYNQLYVEPYKNYRNRVQSNVQVKNRTL  
HLKRTIRQFDPTLQRTTDVPILDSDGSG  
SIDSVDPLSYVKNVTGTVLGIYPSYLPYNQERWQGANAMNAYQIEELFSQENL  
QNAARSGRPIQFLVGFDFVEDSHHNPE  
TLLPVNLYVKPELKHTIELYHDNEKQNRKEFSVSKRAGHG VFQIMSGTLHNTVG  
SGILPYQQEIRIKLTSNEPIKDSEWS  
ITGYPNTLTLQNAVGRTNNA TEKNLALVGHIDPGNYFITVKFGDKVEQFEIRSKP  
TPPRIITTANELRGNSNHKPEIRVT

30

40

DIPNDTTAKIKLVMGGTDGDHDPEINPYTPPENYTVVAEAYHDNDPSKNGVLT  
 RSSDYLDLPLSGELKAIVYYNQYVQ  
 SNFNSVFPSSDTPPTINEPAGLVHKYYRGDHVEITLPVTDNTGGSGLRDVNV  
 NLPQGWTKTFTINPNNTEGTLKLG  
 NIPSNEAYNTTYHFNITATDMSGNTTNPAKTFILNVGKLADDLNPVGLSRDQLQL  
 VTDPSLSNSEREEVKRKISEANAN  
 IRSYLLQNNPILAGVNGDVTFYFRDGSVDVIDAENVITYEPERKSIFSENGNTNK  
 KEAVITIARGQNYTIGPNLRKYFSL  
 SNGSDLPNRDFTSISAIGSLPSSSEISRLNVGNYNRYVNAKNAYHKTQQELNLKL  
 KIVEVNAPTGNRRVYRVSTYLNLTND  
 EINKIKQAFKAANSGLNLDNDITVSNNFDRNVSSVTVTIRKGDLIKEFSSNLNN  
 MNFLRWVNIRDDYTIISWTSSKIQQ  
 RNTDGGLEWSPDHKSLIYKYDATLGRQINTNDVLTLLQATAKNSNLRSNINSNE  
 KQLAERGSNGYSKSIIRDDGEKSYLL  
 NSNPIQVLDLVEPDNGYGGRRQVSHSNVIYNEKNSSIVNGQVPEANGASAFNIDK  
 VVKANAANNGIMGVYKAQLYLAPYS  
 PKGYIEKLGQNLSTNNVINVYFVPSDKVNPSITVGNYDHHTVYSGETFKNTINV  
 NDNYGLNTVASTSDSAITMTRNNNE  
 LVGQAPNVTNSTNKIVKVKATDKSGNESIVSFTVNIKPLNEKYRITSSSNQTPV  
 RISNIQNNANLSIEDQNRVKSSLSM  
 TKILGTRNYVNESNNDVRSQVSVKVNRSNGNATVNVTTTFSDGTTNTITVPVKH  
 VLLEVPTRTRTTVRGQQFPTGKGTSP  
 NDFSLRTGGPVDARIVWVNNQGPDINSNQIGRDLTLHAEIFFDGETTPIRKDTT  
 YKLSQSIPKQIYETTINGRFNSSGD  
 AYPGNFVQAVNQYWPEHMDFRWAQSGTSSRNAGSFTKTVTVVYQNGQTE  
 NVNVLFKVKPNKPVDSNSVISKGQLNGQ  
 QILVRNVPQNAQVTLYQSNGTVIPNTNTTIDSNGIATVTIQGTLPTGNITAKTSMT  
 NNVTYTKQNSSGASNTTEDISVF  
 SENSDQVNVTAGMQAKNDGIKIKGTNYNFNDFNSFISNIPAHSTLTWNEEPNS  
 WKNNIGTTTKTVTVTLPNHQGTRTV  
 IPITYPTVTAKNPVRDQKGRNLTNGTDVYNYIIFENNNRLGGTASWKDNRQPK  
 NIAGVQNLIALVNYPGISTPLEVPV  
 KVVVYNFDFTPQPIYKIQVGDTFPKGTWAGYYKHLENGEGLPIDGWKFYWNQQ  
 STGTTSDQWQSLAYTRTPFVKTGTVDV  
 NPSNWGWVQTSQSAKFIVTNAKPNQPTITQSKTGDVTVTPGAVRNILISGTNDY  
 IQASADKIVINKNGNKLTTFVKNNDG  
 RWTVETGSPDINGIGPTNNGTAISLRLAVRPGDSIEAIAATEGSGETISTSATSEI  
 YIVKAPQPEQVATHTYDNGTFDIL  
 PDNSRNSLNPTERVEINYTEKLNNGNETQKSFTITKNNNGKWTINNKPNYVEFNQ  
 DNGKVVFSANTIKPNSQITITPKAGQ  
 GNTENTNPTVIQAPAQHTLTINEIVKEQGQNVTDNDINNAVQVPNKNRVAIKQG  
 NALPTNLAGGSTSHIPVVIYSDGSS  
 EEATETVRTKVNKTELINARRRLDEEISKENKTPSSIRNFDQAMNRAQSQINTAK  
 SDADQVIGTEFATPQQVNSALSQVQ  
 AAQNKINEAKALLQNKADNSQLVRAKEQLQSQIPAASTDGMTQDSTRNYKNK  
 RQAAEQAIQHANSVINNGDATSQQIND

10

20

30

AKNTVEQAQRDYVEAKSNLRADKSQLQSAYDTLNRDVLTDNDKKPASVRRYNEA  
 ISNIRKELDTAKADASSTLRNTNPSVE  
 QVRDALNKINTVQPKVNQAIALLQPKENNELVQAKKRLQDAVNDIPQTQGMTQ  
 QTINNYNDKQREARALSAQRVIDN  
 GDATTQEITSEKSKVEQAMQALNAKSNLRADKNEQTAYNKLIENVSTNGKPP  
 ASIRQYETAKARIQINQINDAKNEAER  
 ILGNDNPQVSQVTQALNKIKAIQPKLTEAINMLQNKENNELVNAKNRLENVND  
 TDPTHGMTQETINNYNAKKREAQNE  
 IQKANMIINNGDATAQDISSEKSKVEQVLQALQNAKNDLRADKRELQAYNKLIQ  
 NVNTNGKPKPSSIQNYKSARRNIENQ  
 YNTAKNEAHNVLENTNPTVNAVEDALRKINAIQPEVTKAINILQDKEDNSELVRA  
 KEKLDQAINSQPSLNGMTQESINNY  
 TTKRREAQNIASSADTIINNGDASIEQITENKIRVEEATNALNEAKQHILTADTTSL  
 KTEVRKLSRRGDTNKKPSSVSAY  
 NNTIHSLSQSEITQENRANTIINKPIRSVEEVNNAHEVNQLNQRLTDTINLLQPL  
 ANKESLKEARNRLESKINETVQTD  
 GMTQQSVENYKQAKIKAQNESSIAQTLINNGDASDQEVSTEIEKLNQKLSLNTN  
 SINHLTVNKEPLETAKNQLQANIDQK  
 PSTDGMTQQSVQSYERKLQEAQDKINSINNVLANNPDVNAIRTNKVETEIQINNE  
 LTQAKQGLTVDKQPLINAKTALQQSL  
 DNQPSTTGMTQATIQNYNAKRQKAEQVIQNAKIIENAQPSVQQVSDKSKVEQ  
 ALSELNNAKSALRADKQELQQAYNQL  
 IQPTDLNKKPASITAYNQRYQQFSNELNSTKTNTDRILKEQNPSVADVNNALN  
 KVREVQQKLNARALLQNKEDNSALV  
 RAKEQLQQAQVDPSTEGMTQQTKDDYNSKQQAQQEISKAQQVIDNGDATT  
 QQISNAKTNVERALEALNNAKTGLRADK  
 EELQNAYNQLTQNIQDTSGKTPASIRKYNEAKSRIQTQIDSAKNEANSILTNDNPQ  
 VSQVTAALNKIKAVQPELDAIAML  
 KNKENNNALVQAKQQLQIVNEVDPTQGMTTDTANNYKSKKREADEIQKAQQ  
 IINNGDATEQQITNETNRVNQAINAIN  
 KAKNDLRADKSQLENAYNQLIQNVDTNGKPKASIQQYQAARQAIETQYNNAKS  
 EAHQILENSNPSVNEVAQALQKVEAVQ  
 LKVNDAIHILQNKENNSALVTAKNQLQQSVNDQPLTTGMTQDSINNYEAKRNEA  
 QSAIRNAEAVINNGDATAKQISDEKS  
 KVEQALAHLNDKQQLTADTTELQTAVQQLNRRGDTNKKPSSINAYNKAIQSL  
 ETQITSAKDNANAVIQKPIRTVQEVN  
 NALQQVNQLNQQLTEAINQLQPLSNNDALKAARLNLENKINQTVQTDGMTQQSI  
 EAYQNAKRVAQNESNTALALINNGDA  
 DEQQITTETDRVNQQTTNLTQAINGLTVNKEPLETAKTALQNNIDQVPSTDGMT  
 QQSVANYNQKLQIAKNEINTINNVLA  
 NNPDVNAIKTNKAEAEERISNDLTQAKNNLQVDTQPLEKIKRQLQDEIDQGTNTD  
 GMTQDSVDNYNDSLSAAIIEKGVNK  
 LLKRNPVEQVKESVANAAQQVIQDLQARTSLVDPDKTQLQEAKNRENSINQQT  
 DTDGMTQDSLNNYNDKLAQARQNKLEK  
 ISKVLGGQPTVAEIRQNTDEANAHKQALDTARSQTLNREPYINHINNESHLNNA  
 QKDNFKAQVNSAPNHNTLETIKNKA

10

20

30

DTLNQSMTALSESIADYENQKQQENYLDASNNKRQDYDNAVNAAKGILNQTQS  
PTMSADVIDQKAEDVKRTKTALDGNQR  
LEVAKQQALNHLNLTNLDLNDAAQRQTLTDTINHSPNINSVNOAKEKANTVNTAMT  
QLKQTIANYDDELHDGNYINADKDKK  
DAYNNAVNNAKQLINQSDANQAQLDPAEINKVTQRVNTTKNDLNGNDKLAEAK  
RDANTTIDGLTYLNEAQRNKAKENVGK  
ASTKTNITSQLQDYNQLNIAMQALRNSVNDVNNVKANSNYINEDNGPKEAYNQA  
VTHAQTLINEAQSNEPMSRDVVNQKTQ  
AVNTAHQNLHGQQKLEQAQSSANTEIGNLPNLTNTQKAKEKELVNSKQTRTEV  
QEQLNQAKSLDSSMGTLSLVAKQPTV  
QKTSVYINEDQPEQSAYNDSITMGQTIINKTADPVLDKTLVDNAISNISTKENALH  
GEQKLTAKTEAINALNTLADLNT  
PQKEAIKTAINTAHTRTDVTAEQSKANQINSAMHTLRQNI SDNESVTNESNYINA  
EPEKQHAFTEALNNAKEIVNEQQAT  
LDANSINQKAQAILTTKNALDGEEQLRRAKENADQEINTLNQLTDAQRNSEKGL  
VNSSQTRTEVASQLAKAKELNKVMEQ  
LNHLINGKNQMINSSKFINEDANQQQAYSNAIASAEALKNKSQNPEDKVTIEQA  
INNINSAINNLNGEAKLTKAKEDAV  
ASINNL SGLTNEQKPKENQAVNGAQRTRDQVANKLRDAEALDQSMQTLRDLVNN  
QNAIHSTSNYFNEDSTQKNTYDNAIDN  
GSTYITGQHNPENLKNSTIDQTSRINTAKNDLHGVEKLRDKGTANQEIGQLGYL  
NDPQKSGEESLVNGSNTRSEVEEHL  
NEAKSLNNAMKQLRDKVAEKTNVKQSSDYINDSTEHQRGYDQALQEAENIINEI  
GNPTLNKSEIEQKQLQQLTDAQNALQG  
SHLLEEAKNNAITGINKLTALNDAQRKAIENVQAQQTIPAVNQQLTLDREINTA  
MQALRDKVGOQNNVHQQS NYFNEDE  
QPKHNYDNSVQAGQTIIDKLQDPIMNKNEIEQAINQINTTQTALSGENKLHTDQE  
STNRQIEGLSSLNTAQINA EKDLVN  
QAKTRTDVAQKLAAAKEINSAMSNLRDGIQNKEDIKRSSAYINADPTKVTAYDQ  
ALQNAENIINATPNVELNKATIEQAL  
SRVQQAQQDL DGVQQLANAKQQATQTVNGLNSLNDGQKRELNLLINSANTRT  
KVQEELNKATELNHAMEALRNSVQNV DQ  
VKQSSNYVNEDQPEQHNYDNAVNEAQATINNNAQPVL DKLAIERLTQTVNTTK  
DALHGAQKLTQDQQAETGIRGLTSLN  
EPQKNAEVAKVTAATTRDEVRNIRQEATTLDTAMLGLRKS IKDKNDTKNSSKYI  
NEDHDQQQAYDNAVNNAAQQVIDETQA  
TLSSDTINQLANAVTQAKSNLHGDTKLQHDKDSAKQTIAQLQNLNSAQKHMED  
SLIDNESTRTQVQHDLTEAQA LDGLMG  
ALKESIKDYTNIVSNGNYINAEP SKKQAYDAAVQNAQNIINGTNQPTINKGNVTT  
ATQTVKNTKDALDGDHRLEEAKNNA  
NQ TIRNLSNLNNAQKDAEKNLVNSASTLEQVQQNLQTAQQLDNAMGELRQSIA  
KKDQVKADSKYLNEDPQIKQNYDDAVQ  
RVETIINETQNPPELLKANIDQATQSVQNAEQALHGAEKLNQDKQTSSTELDGLT  
DLTDAQREKLREQINTSNSRDDIKQK  
IEQAKALNDAMKKLKEQVAQKDG V HANSDYTNEDSAQKDAYNNALKQAEDIIN  
NSSNPNLNAQDITNALNNIKQAQDN LH

10

20

30

GAQKLQQDKNTTNQAIGNLNHLNQPQKDALIQAINGATSRDQVAEKLKEAEALD  
EAMKQLEDQVNQDDQISNSSPFINED  
SDKQKTYNDKIQAAKEIINQTSNPTLDKQKIADTLQNIKDAVNNLHGDQKLAQSK  
QDANNQLNHLDDLTEEQKNHFKPLI  
NNADTRDEVNKQLEIAKQLNGDMSTLHKVINDKDQIQHLSNYINADNDKKQNYD  
NAIKEAEDLIHNHPDTLDHKALQDLL  
NKIDQAHNELNGESRFKQALDNALNDIDSLNSLNVPQRQTVKDNINHVTTLES  
AQELQKAKELNDAMKAMRDSIMNQE  
IRKNSNYTNEDLAQQNAYNHAVDKINNIIGEDNATMDPQIIKQATQDINTAINGLN  
GDQKLQDAKTDKQKITNFTGLTE  
PQKQALENIINQQTSRANVAKQLSHAKFLNGKMEELKVAVAKASLVRQNSNYIN  
EDVSEKEAYEQAIKQGEIINSENNP  
TISSTDINRTIQEINDAEQNLHGDNKLROAQEIAKNEIQNL DGLNSAQITKLIQDIG  
RTTTKPAVTQKLEEKAINQAMQ  
QLKQSIADKDATLNSSNYLNEDSEKKLAYDNAVSQAEQLINQLNDPTMDISNIQA  
ITQKVIQAKDSLHGANKLAQNQADS  
NLIINQSTNLNDKQKQALNDLINHAQTKQQVAEIIAQANKLNNEMGTLKTLVEEQ  
SNVHQSKYINEDPQVQNIYNSIQ  
KGREILNGTTDDVLNNKIADAIQNIHLTKNDLHGDQKLQKAQQDATNELNYLTN  
LNNSQRQSEHDEINSAPSRTEVSND  
LNHAKALNEAMRQLENEVALENSVKKLSDFINEDEAAQNEYSNALQKAKDIING  
VPSSTLDKATIEDALLELQNAESLH  
GEQKLQEAKNQAVAEIDNLQALNPGQVLAEKTLVNQASTKPEVQEALQKAKEL  
NEAMKALKTEINKKEQIKADSRVYNAD  
SGLQANYNSALNYGSQIATTQPPELNKDVINRATQTIKTAENNLNGQSKLAEAK  
SDGNQSIHLQGLTQSQKDKQHDLI  
NQAQTKQVDDIVNNSKQLDNSMNLQQLQIVNNDNTVKQNSDFINEDSSQQDA  
YNHAIQAAKDLITAHPTIMDKNQIDQAI  
ENIKQALNDLHGSNKLSEDKKEASEQLQNLNSLTNGQKDTILNHIFSAPTRSQV  
GEKIASAKQLNNTMKALRDSIADNNE  
ILQSSKYFNEDSEQNAYNQAVNKAKNIINDQPTPVMANDEIQSVLNEVKQTKD  
NLHGDQKLANDKTDAAQATLNALNYLN  
QAQRGNLETKVQNSNSRPEVQKVQLANQLNDAMKKLDDALTGNDAIKQTSN  
YINEDTSQQVNFDEYTDGRGKNIVAEQTN  
PNMSPTNINTIADKITEAKNDLHGQKQKQAQQQSINTINQMTGLNQAQKEQLN  
QEIQQTQTRSEVHVINKAALNDSM  
NLRQSITDEHEVKQTSNYINETVGNQATAYNNAVDRVKQIINQTSNPTMNP  
ERATSNVKISKDALHGERELNDNKN  
KTFAVNHLNLDNLQAQKEALTHEIEQATIVSQVNNIYNKAKALNNDMKKLDIVAQ  
QDNVRQSNYINEDSTPQNMYNDTI  
NHAQSIIDQVANPTMSHDEIENAINNIKHAINALDGEHKLQQAKENANLLINSLND  
LNAPQRDAINRLVNEAQTREKVAE  
QLQSAQALNDAMKHLRNSIQNSVSRQESKYINASDAKKEQYNHAVREVENIIN  
EQHPTLDKEIKQLTDGVNQANNDLN  
GVELLADAKQNAHQSIPTLMHLNQAQQNALNEKINNAVTRTEVAAIGQAKLLDH  
AMENLEESIKDKEQVKQSSNYINED

10

20

30

SDVQETYDNAVDHVTEILNQTVNPTLSIEDIEHAINEVNQAKKQLRGKQKLYQTI  
DLADKELSKLDDLTSSQSSSISNQI  
YTAKTRTEVAQAIEKAKSLNHAMKALNKVYKNADKVLDSRRFINEDQPEKKAYQ  
QAINHVDSIIHRQTNPEMDPTVINSI  
THELETAQNNLHGDQQLAHAQQDAANVINGLIHLNVAQREVMINTNTNATTREK  
VAKNLDNAQALDKAMETLQQVVAHKN  
NILNDSKYLNEDSKYQQQYDRVIADAEQLLNQTTNPTLEPYKVDIVKDNVLANEK  
ILFGAEKLSYDKSNANDEIKHMNYL  
NNAQKQSIKDMISHAALRTEVKQLLQQAQILDEAMKSLEDKTQVVITDITLPNYT  
EASEDKKEKVDQTVSHAQAIIDKIN  
GSNVSLDQVRQALEQLTQASENLGDQRVVEAKVHANQTIDQLTHLNSLQQQT  
AKESVKNATKLEEIATVSNNAAQALNKV  
MGKLEQFINHADSVENSNDYRQADDDKIIAYDEALEHGQDIQKTNATQNETKQA  
LQQLIYAETSLNGFERLNHARPRALE  
YIKSLEKINNAQKSALEDKVTQSHDLLELEHIVNEGTNLNDIMGELANAIVNNYAP  
TKASINYINADNLRKDNFTQAINN  
ARDALNKTQGGQNLDFNAIDTFKDDIFKTKDALNGIERLTAASKAEEKLIDSLKFIN  
KAQFTHANDEIINTNSIAQLSRIV  
NQAFDLNDAMKSLRDELNNQAFPVQASSNYINSDEDLKQQFDHALSNARKVLA  
KENGKNLDEKQIQGLKQVIEDTKDALN  
GIQRLSKAKAKAIQYVQSLSYINDAQRHIAENNIHNSDDLSSLANTLSKASDLDN  
AMKDLRDTIESNSTSVPSNVNYINA  
DKNLQIEFDEALQQASATSSKTSENPATIEEVLGLSQAIYDTKNALNGEQRLATE  
KSKDLKLIKGLKDLNKAQLEDVTNK  
VNSANTLTELSQLTQSTLELNDKMKLLRDKLKTLPVVKASLNRYRNADYNLKRQ  
FNKALKEAKGVLNKNSTNVNINDIQ  
HLLTQIDNAKDQLNGERRLKEHQKSEVFIKELDILNNAQKAAIINQIRASKDIKII  
NQIVDNAIELNDAMQGLKEHVA  
QLTATTKDNIEYLNADHDHKLQYDYAINLANNVLDKENGTKDANIIIGMIQNMD  
DARALLNGIERLKDAQTKAHNDIKD  
TLKRQLDEIEHANATSNSKAQAKQMVNEEARKALSININDATSNDLVNQAQDEG  
QSAIEHHADELPAKALDANQMIDQKV  
EDINHLSQNPNSNEEKKNLISQINKLVNGIKNEIQQAINKQQIENATTKLDEVIET  
TKKLIIAKAEAKQMIKELSQKK  
RDAINNNTDLTPSQKAHALADIDKTEKDALQHIENSNSIDDINNNKEHAFNTLAHII  
IWDTDQQPLVFELPELSLQNALV  
TSEVVVHRDETISLESIGAMTLDELKVNIVSLPNTDKVADHLTAKVKVILADGS  
YVTVNVPVKVVEKELQIAKKDAIK  
TIDVLVKQKIKDIDSNNELTSTQREDAKAEIERLKKQAIKVNHSKSIKDIETVKRT  
DFEEDQFDPKRFTLNKAKKDII  
TDVNTQIQNGFKEIETIKGLTSNEKTQFDKQLTALQKEFLEKVEHAHNLVELNQL  
QQEFNNRYKHILNQAHLGKXIAE  
HKLGYVVNKTQQILNNSQASYFIKQWALDRIKQIQLETMNSIRGAHTVQDVHK  
ALLQGIEQILKVNVSIIINQSFNDSLH  
NFNYLHSHKFDARLREKDVANHIVQTETTFKEVLKGTGVEPGKINKETQQPKLHKN  
DNDSLFKHLVDNFGKTVGVITLTGLL

10

20

30

【 0 1 2 6 】

SSFVLVLAKRRKKEEEEKQSIKNHHKDIRLSDTDKIDPIVITKRKIDKEEQIQNDD  
KHSIPVAKHKKSKKQQLSEEDIHS  
IPVVKRKQNSDNKDTKQKQKVTSKKKKTPQSTKKVWTKKRSKK

40

>|c|SEP8\_63.AA 1973 残基 (配列番号 : 24)  
 MKENKRKNNLDKNNTRFSIRKYQGYGATSVAIIGFIIISCFSEAKADSDKHEIKSH  
 QQSMTNHLTTLPSDNQENTSNNEF  
 NNRNHDISHLSLNKSIQMDLKKLIKQYKAINLNDKTEESIKLFQSDLVQAESLIN  
 NPQSQQHVDVAFYHKFLNSAGKLRK  
 KETVSIKHERSESNTYRLGDEVRSQTFSHIRHKRNAVSFRNADQSNLSTDPDKA  
 NEINPEIQNGNFSQVSGGPLPTSSKR  
 LTVVTNVDNWHYSYSDPNPEYPMFYTTTAVNYPNFMSNGNAPYGVILGRITTDG  
 WNRNVIDSKVAGIYQDIDVVPGESENV  
 NFISTSPVFSDDGAGAKLKISNVEQNRVLFDSRLNGMGPYPTGKLSAMVNIPNDI  
 NRVRSIFLPSSTGRVSVQRSSREH  
 GFGDNSSYYHGGSVSDVRINSGSYVSVKVTQREYTRPNSSNDTFARATINLS  
 VENKGNHNSKDTYYEVILPQNSRLIST  
 RGGSGNYNNATNKLISRLDNLNPGDRRDISYTVDFESSPKLINLNAHLLYKTNA  
 TFRGNDGQRTGDNIVDLQSIALLMN  
 KDVLETELNEIDKFIRDLNEADFTIDSWALQEKMTTEGGNINLEQQNQVALENQ  
 ASQETINNVTSLEILKNNLKYKTPS  
 QPIIKSNNQIPNITISPADKADKLTITYQNTDNESASIIIGNKLNNQWLSLNNNIPGIEI  
 DMQTGLVTIDYKAVYVESVGA  
 NDKTGNSDASAESRITMPRKEATPLSPIVEANEERVNVVIAPNGEATQIAIKYRT  
 PDGQEATLVASKNGSSWTLNKQIDY  
 VNIENSGKVTIGYQAVQPESEVIATETKGNSESAESRVTMPRKEATPHSPIVE  
 ANEEHVNVVIAPNGEATQIAIKYRT  
 PDGQETTLIASKNGSSWTLNKQIDYVNIENSGKVTIGYQAVQLESEVIATETKG  
 NSDASAESRITMLRKEATPHSPIVE  
 ANEEHVNVVIAPNGEATQIAIKYRTPDGQEATLVASKNESSWTLNKQIDHVNIDE  
 NSGKVTIGYQAVQPESEIATETKG  
 NSDASAESRITMPRKEATPIPTLEASVQEASVTVTPNENATKVFICYLDINDEIS  
 TIIASKINQQWTLNKDNFNGIKINP  
 LTGKVIISYVAVQPESDVIAIESQGNLSEESRIIMPTKEEPPEPPILESDSIEAK  
 VNIFPNDEATRIVIMYTSLEGQE  
 ATLVASKNESSWTLNKQIDHVNIDENSGKVTIGYQAVQPESEVIATETKGNSDA  
 SAESRVTMPRKEATPHSPIVETNEER  
 VNVVIAPNGEATQIAIKYRTPDGQETTLIASKNGSSWTLNKQIDHVNIDENSGKV  
 TIGYQAVQPESEIATETKGNSDAS  
 AESRITMPRKEAIPHSPIVEANEEHVNVVIAPNGETTQIAVKYRTPDGQEATLIAS  
 KNESSWTLNKQIDHVNIDENSGKV  
 TIGYQAVQPESEVIATETKGNSDASAESRITMPVKEKTPAPPISIIINESNASVEIIP  
 QVNVTLQSLQYIDAKGQQQLIA  
 TLNQNQWTLNKNVSHITVDKNTGKVLINYQAVYPESEVIARESKGNSDSSNVSM  
 VIMPRKTATPKPPIIKVDEMNASLAI

10

20

30

## 【 0 1 2 7 】

実施例 5 . 3 種類の代表的な腸球菌 MSCRAMM (登録商標) タンパク質を使用した抗体産生のための免疫化方法

精製 EF1091、EF1092 及び EF1093 タンパク質を使用して 1 パネルのネズミ抗体を産生させた。手短かに言えば、一群の Balb/C マウスを、溶液状であるか又は表 5 に以下に記載のようにアジュバントと混合したタンパク質 1 ~ 10mg の一連の皮下免疫処置を施した :

40

表 5 . 免疫処置スキーム

慣用の注射	日	量 (µg)	経路	アジュバント
一次	0	5	皮下	FCA
追加 # 1	14	1	腹腔内	RIBI
追加 # 2	28	1	腹腔内	RIBI
追加 # 3	42	1	腹腔内	RIBI

犠牲時に、血清を採取し、MSCRAMM (登録商標) タンパク質 ACE、EF1091、EF1092 及び EF1093 に対して ELISA アッセイで力価測定した (表 6)。

## 【 0 1 2 8 】

50

## 血清ELISA

Immulon 2-HB高タンパク質結合96ウエルプレートを用いて、EF1091、EF1092又はEF1093の精製Aドメイン100ng/ウエルで被覆し、2～8℃で一晩インキュベートした。プレートを、Skantron Skanwasherプレートウォシャーを使用してPBS/0.5% Tween 20で4回洗浄し(350µl/ウエル)、次いで及び1%ウシ血清アルブミン(BSA)溶液200µl/ウエルを用いて室温で1～2時間ブロックした。インキュベーションの後に、プレートを上記のようにして洗浄し、96ウエルのプレートのB～H列のそれぞれのウエルに100µlの1×PBS、0.05% Tween 20、0.1% BSA緩衝液を加えた。次いで、陰性対照血清(免疫前Balb/C血清)及び超免疫試料を1×PBS、0.05% Tween 20、0.1% BSA緩衝液に1:100希釈した。200µlの陰性対照血清を、96ウエルのプレートのウエルA1及びA2に二重反復試験として加え、またそれぞれの希釈超免疫試験血清200µlをウエルA3～A12に二重反復試験として加えた。2倍連続希釈をH列を最後とするプレートで行い、残りの100µlを廃棄した。プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを前記のようにして再度洗浄し、次いで二次抗体溶液、ヤギ抗マウスIgG(全分子)-AP複合体(Sigma Cat. A-5153)の1:5000希釈液をそれぞれのウエルに加え(100µl/ウエル)、そして1時間インキュベートした。インキュベーション後に、プレートをPBS/0.5% Tween 20(350µl/ウエル)を用いて4回洗浄した。発色溶液、すなわち1Mジエタノールアミン、pH9.8、0.5mM MgCl<sub>2</sub>に溶解した1mg/mlの4-ニトロフェニルリン酸(pNPP)を、それぞれのウエルに加え(100µl/ウエル)、プレートを37℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後に、それぞれのウエルの吸光度(A<sub>405nm</sub>)を、Spectra MAX 190プレート読み取り装置(Molecular Devices Corp.製、カリフォルニア州サニバール所在)を使用して測定した。データをソフトウェアSOFTmax Pro v.3.1.2.(Molecular Devices Corp.製、カリフォルニア州サニバール所在)を使用して分析した。陰性対照血清の吸光度の2倍であった超免疫血清の希釈液を、超免疫血清試料の力価として使用した。

10

20

## 【0129】

表6. 犠牲時の抗体力価

IPYKNNAINIHIDKKGKIKSMVTAIKNNDQWQLDEKIKYVKIDAKTGTVIINYQIVQ  
 ENSEIATAINGNSDKSEEVKV  
 LMPIKEFTPLAPLLETNYKKATVSILPQSNATKLDKFKYRDKKGDSKIIVKRFKNIW  
 KANEQISGVTINPEFGQWVINYQ  
 AVYPESDILAAQYVGNSDASEWAKVKMPKELAPHSPSLIYDNRNKKILIAPNSN  
 ATEMELSYVDKNNQSLKVKALKINN  
 RWKFDSSVSNISINPNTGKIVLQPQFLLTNSKIIVFAKKGNSDASISVSLRVPVK  
 KIELEPMFNVPLVSLNKKRIQFD  
 DCSGVKNCLNKQISKTLQPDGTGYSKASKSNILSVLLLGFGFLSYSRKRKEKQ

30

## 【0130】

実施例6. エンテロコッカス・フェカーリス(*E. faecalis*)MSCRAMM(登録商標)タンパク質に対する抗体反応性

Balb/cマウスから誘導した(実施例3に記載のようにして)抗血清を使用して、エンテロコッカス・フェカーリス(*E. faecalis*)株の表面で自然に(natively)発現したEF1091、EF1092又はEF1093を同定した。

40

## 【0131】

フローサイトメトリー(流動細胞計測法)分析 - 全細胞染色

細菌試料(表7)を採取し、洗浄し、次いでウサギIgG(50mg/ml)でブロックした後にポリクロナール抗血清又は免疫前血清(対照)と共に1:2000に希釈でインキュベートした。血清と共にインキュベートした後に、細菌細胞を、検出抗体として働くヤギ-F<sub>(ab)</sub>-2-抗-マウス-F<sub>(ab)</sub>-2-FITCと共にインキュベートした。抗体を標識した後に、細菌細胞をFACScaliberフローサイトメーターにより吸引して、蛍光発光を分析した(励起:488、発光:570)。それぞれの菌株について、10,000個のイベント(event)を集め、測定した。

## 【0132】

50

表 7 . エンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) 及びエンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*) の全細胞染色

抗原	ポリクロナール抗体力価
EF1091	>12,800
EF1092	>12,800
EF1093	>12,800

10

## 【 0 1 3 3 】

EF1091、EF1092及びEF1093に対してマウスで生じさせたポリクロナール抗血清が、エンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) 株及びエンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*) の表面で発現された天然タンパク質を認識することがフローサイトメトリー (流動細胞計測法) 研究で明らかにされた (表 7)。

## 【 0 1 3 4 】

## 実施例 7 . モノクロナール抗体産生についての免疫処置方法

モノクロナール抗体 (mAb) を産生させ、特定することを目的に、方法を策定して高親和性であり、細胞外マトリックスタンパク質 (ECM) の結合を中断し且つ制限することができ且つ生体内で治療効果を実証する mAb を EF1091、EF 1092 及び EF 1093 に対して産生させた。大腸菌で発現させ且つ精製した EF1091、EF1092 及び EF1093 タンパク質を使用して、1 パネルのネズミモノクロナール抗体を産生させた。手短に言えば、一群の Balb/C 又は SJL マウスを、溶液状の又は表 8 に以下に記載のようにアジュバントと混合したタンパク質 1 ~ 10 g の一連の皮下免疫処置を施した：

20

表 8 . 免疫処置スキーム

RIMMS注射	日	量 (µg)	経路	アジュバント
# 1	0	5	皮下	FCA/RIBI
# 2	2	1	皮下	FCA/RIBI
# 3	4	1	皮下	FCA/RIBI
# 4	7	1	皮下	FCA/RIBI
# 5	9	1	皮下	FCA/RIBI
慣用の注射	日	量 (µg)	経路	アジュバント
一次	0	5	皮下	FCA
追加 # 1	14	1	腹腔内	RIBI
追加 # 2	28	1	腹腔内	RIBI
追加 # 3	42	1	腹腔内	RIBI

30

犠牲時 (RIMMS) に又は追加免疫後 7 日目に (慣用)、血清を採取し、MSCRAMM 又は全細胞 [エンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) 及び / 又はエンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*)] の免疫処置に対して ELISA アッセイで力価測定した。

40

## 【 0 1 3 5 】

最終追加免疫 3 日後に、脾臓又はリンパ節を取り出し、単一細胞懸濁物にほぐし、リンパ球を収集した。次いで、リンパ球を P3X63Ag8.653 骨髄腫細胞株 (ATCC #CRL-1580) に融合した。細胞融合、その後の平板培養及び栄養補給を、*Current Protocols in Immunology* (Chapter 2, Unit 2.) の「Production of Monoclonal Antibodies protocol」に従って行った。

## 【 0 1 3 6 】

## 実施例 8 . 抗 EF1091 モノクロナール抗体のスクリーニング及び選別

EF1091 融合から生じたクローンを、特異的抗 EF1091 抗体産生について標準 ELISA アッセ

50

イを使用して選別した。陽性クローンを拡大し、さらにフローサイトメトリーによる全細菌細胞結合アッセイ及びBiacore分析によるEF1091結合における活性について試験した(表9)。

【0137】

ELISA分析

Immulon 2-HB高タンパク質結合96ウェルプレート(Dynex製)を、 $1\ \mu\text{g}$ /ウェルの $1\times\text{PBS}$ 、 $\text{pH}7.4$ 溶解rEF1091で被覆し、室温で2時間インキュベートした。複数のELISAにおいて洗浄工程は全て、 $1\times\text{PBS}$ 、 $0.05\%$  Tween-20洗浄緩衝液を用いて3回行った。プレートを洗浄し、 $1\%$  BSA溶液を用いて室温で1時間ブロックし、その後にハイブリドーマ上清試料をウェルに加えた。プレートを試料及び関連がある対照、例えば媒体単独と共に室温で1時間インキュベートし、洗浄し、次いで $1\times\text{PBS}$ 、 $0.05\%$  Tween-20、 $0.1\%$  BSAに $1:5000$ 希釈したヤギ抗-マウスIgG-AP(Sigma製)を二次試薬として使用した。プレートを、4-ニトロフェニルリン酸(pNPP)(Sigma製)の $1\ \text{mg/ml}$ 溶液を加え、次いで37°Cで30分間インキュベートすることによって発色させた。吸光度を、 $405\ \text{nm}$ でSpectraMax 190 Plate Reader(Molecular Devices Corp.製)を使用して読み取った。 $\text{OD}_{405}$ バックグラウンドよりも3倍(媒体単独、 $\sim 0.1\ \text{OD}$ )を有していた抗体上清を陽性とみなした。

10

【0138】

Biacore分析

分析全体を通じて、流量を $10\ \text{ml/min}$ で一定のままであった。EF1091注入の前に、試験抗体をチップにRAM-Fc結合によって吸着させた。時間0で、EF1091を $30\ \text{mg/ml}$ の濃度で、チップ上に3分間注入し、次いで2分間解離させた。分析のこの相は、mAb/EF1091相互作用の相対結合及び解離速度を測定した。

20

【0139】

フローサイトメトリー分析

細菌試料を収集し、洗浄し、次いで $2\ \text{mg/ml}$ 濃度のmAb又はPBS単独(対照)と共にインキュベートし、その後にウサギIgG( $50\ \text{mg/ml}$ )を用いてブロックした。抗体と共にインキュベートした後に、細菌細胞を、検出抗体として働くヤギ- $\text{F}_{(\text{ab}')_2}$ -抗-マウス- $\text{F}_{(\text{ab}')_2}$ -FITCと共にインキュベートした。抗体を標識した後に、細菌細胞をFACScaliberフローサイトメーターにより吸引して、蛍光発光を分析した(励起： $488$ 、発光： $570$ )。それぞれの細菌株について、 $10,000$ 個のイベント(event)を集め、測定した。

30

【0140】

表9. ハイブリドーマ上清の代表例

<i>E. faecalis</i>	EF1091	EF1092	EF1093
ATCC70080	--	--	Not done
2	--	--	(NA)
687097	--	--	ND
V583	--	--	ND
CG110	--	--	ND
OG1RF	+	+	+
TX2708	--	--	ND
TX0020	ND	ND	ND
TX0045	--	--	ND
TX0002	--	--	ND
TX0039	--	--	ND
TX0052	ND	ND	ND
TX0012	--	--	ND
TX0017	ND	ND	ND
TX0008	ND	ND	ND
TX0024	ND	ND	ND

<i>E. faecium</i>	EF1091	EF1092	EF1093
935/01	--	--	ND
TX0016	ND	ND	ND
TX0054	+/-	+/-	ND
TX0074	+	+	ND
TX0078	--	--	ND
TX0080	+/-	+/-	ND
TX0081	+/-	+/-	ND
TX2535	ND	ND	ND
TX2555	+/-	+	+
TX0110	--	--	--
TX0111	ND	ND	ND

## 【 0 1 4 1 】

実施例 9 . 細胞外マトリックス (ECM) タンパク質に対する腸球菌MSCRAIIVI (登録商標) タンパク質の結合

エンテロコッカス属細菌から発現されるこれらのMSCRAMMが結合する潜在的 (potential) 細胞外マトリックスタンパク質を理解することは、治療への示唆と共に極めて生物学的に重要である。

## 【 0 1 4 2 】

ELISAに基づく細胞外マトリックスリガンドのスクリーニング

組換えタンパク質EF1091、EF1092及びEF1093 (表10) の細胞外マトリックス分子との結合活性を調べるために、96ウエルCostarマイクロタイタープレート (Corning製) の二重のウエルを、100 $\mu$ Lの1 $\times$  PBS、pH7.4 (Gibco製) に溶解したヒトコラーゲン I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型又はVI 型 (Rockland Immunochemicals製)、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、プラスミノゲン、ピトロネクチン (Sigma製) あるいはエラスチン (CalBiochem) の2 $\mu$ gを用いて4 $\times$  で一夜被覆した。ウエルを、0.05% Tween 20を含有する1 $\times$  PBS、pH7.4 (1 $\times$  PBST) で4回洗浄した。次いで、ウエルをBSA in 1 $\times$  PBS、pH7.4に溶解したBSAの1% (w/v) 溶液で1時間ブロックし、次いで1 $\times$  PBSTで4回洗浄した。次に、0.1% BSAを含有する1 $\times$  PBST (1 $\times$  PBST-BSA) 100 $\mu$ Lに溶解した組換えタンパク質5 $\mu$ gを、それぞれのウエルに加えた。前記タンパク質と共に室温で1時間インキュベートした後に、ウエルを1 $\times$  PBSTで4回洗浄し、次いでそれぞれの組換えタンパク質に対して生じたマウス ポリクロナール 抗血清100 $\mu$ Lをそれぞれのウエルに1 $\times$  PBST-BSAに1:2000の希釈率で加えた。抗血清と共に室温で1時間インキュベートした後に、ウエルを1 $\times$  PBSTで4回洗浄した。最後に、ヤギ抗マウス IgG - アルカリ性ホスファターゼ複合体 (Sigma製) を1 $\times$  PBST-BSAで1:2000希釈し、次いで100 $\mu$ Lをそれぞれのウエルに加えた。このイ

10

20

30

40

50

ンキュベーションを室温で1時間行い、次いでウエルを1×PBSTで4回洗浄した。それぞれのウエルに100 $\mu$ Lの1mg/mL pNP溶液 (Sigma 104錠剤)を加え、室温で30分間インキュベートすることによって、アルカリ性ホスファターゼを発色させた。発色は、それぞれのウエルに50 $\mu$ Lの2M NaOHを加えることによって停止させた。405nm (A405)での吸光度を、SpectraMax 190 (Molecular Devices製)を使用して測定した。得られたシグナルがバックグラウンドよりも2.5倍を越えて大きい場合には、反応性を陽性として記録した。

## 【0143】

また、ECMの諸成分に結合するEF0089及びEF2224(表10)を、100 $\mu$ L PBSに又はコラーゲンの場合には3%酢酸に溶解したそれぞれのECMタンパク質(ヒトラミン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン、I型、III型及びIV型コラーゲン)1 $\mu$ gをマイクロプレートウエル(96ウエル、4HBX、Thermo Labsystems製、マサチューセッツマサチューセッツ州フランクリン所在)に4 $\mu$ Lで一夜固体化することによって試験した。プレートを1回PBSで洗浄し、次いでPBSに溶解した1%BSAで1時間ブロックした。ブロッキング緩衝液に溶解した5及び10 $\mu$ M濃度の精製His-標識タンパク質50 $\mu$ Lを加え、次いで周囲温度で2時間インキュベートした。プレートをPBSに溶解した0.05%Tween 20で3回洗浄し、次いでブロッキング緩衝液に溶解したHis-標識モノクローナル抗体(Amersham Biosciences Corp.製、ニュージャージー州ピスカタウエイ所在)の1:3000希釈液と共に2時間インキュベートした。3回洗浄後に、各ウエルに、ブロッキング緩衝液に溶解したアルカリ性ホスファターゼ複合抗マウス抗体の1:3000希釈液を加え、2時間インキュベートした。最後に、0.1M NaHCO<sub>3</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>、pH9.8に溶解したニトロブルーテトラゾリウム(NBT)及び5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸(BCIP)シグナルを用いてシグナルを検出した。405nmで吸光度を、ELISA読取装置で測定した。

## 【0144】

表10. ECMタンパク質を認識するMSCRAMM(登録商標)タンパク質

融合クローン	免疫化抗原	ELISAデータ (EF1091)	Biacore分析	フローサイトメ トリー E. faecalis染色
85-8	EF 1091	0.70	+	+
85-25	EF 1091	0.75	+	+
85-58	EF 1091	0.76	+	--
85-78	EF 1091	0.83	+	+
85-81	EF 1091	0.84	+	+
85-162	EF 1091	0.78	+	+
85-310	EF 1091	0.30	--	--
85-341	EF 1091	0.31	--	--
85-359	EF 1091	0.48	--	--
85-374	EF 1091	0.39	--	--
85-380	EF 1091	0.32	--	--
85-399	EF 1091	0.98	+	--
85-473	EF 1091	0.55	+	--
85-511	EF 1091	0.85	+	--
85-581	EF 1091	0.88	+	+
85-586	EF 1091	0.88	+	+
85-641	EF 1091	0.45	+	+
85-661	EF 1091	0.32	--	--
85-712	EF 1091	0.30	--	--

## 【0145】

実施例10. エンテロコッカス・フェカリス(E. faecalis)に感染した患者からの血清はMSCRAMM(登録商標)タンパク質に対する抗体を高められた濃度で含有する

10

20

30

40

50

前記のエンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)に感染したいるか又は感染していない入院患者から採取した腸球菌タンパク質に対する抗体の存在を、若干の変更を加えた(Arduino et al., 1994)(Nallapareddy et al., 2000b)に記載のELISA アッセイで試験した(表11)。手短に言えば、100 $\mu$ lのPBSに溶解したそれぞれの精製腸球菌タンパク質20ngをマイクロプレート(96ウエル、4HBX、Thermo Labsystems製、マサチューセッツマサチューセッツ州フランクリン所在)に4 $\mu$ lで一夜塗布した。プレートを、1%BSA、0.01%Tween20を用いて周囲温度で1時間ブロックし、次いでブロッキング緩衝液に溶解した血清1 $\mu$ lを加えた。それぞれの血清を、1:100から1:6400までの連続希釈液を用いて三重反復して試験した。プレートを周囲温度で2時間インキュベートし、次いでPBSに溶解した0.01%Tween 20で3回洗浄した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ複合抗ヒトIgGの1:3000希釈液100 $\mu$ lを加え、2時間インキュベートした。3回洗浄した後に、0.1Mクエン酸塩-酢酸塩緩衝液、pH6.0中でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の存在下で3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を用いて周囲温度で15分間シグナルを検出した。2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いて反応を停止させ、次いで450nmで吸光度を記録した。適当な対照からA<sub>450nm</sub>値を差し引くことによって力価を測定した。血清力価についてカットオフレベルを調べるために、前のエンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)に感染していない健常者から得た4種の追加の対照血清をアッセイした。それぞれの対照血清について平均A<sub>450nm</sub>値の合計及び2回の標準偏差を陽性力価についてカットオフとして挙げた。

10

【0146】

ECM タンパク質	EF0089	EF2224	EF 1091	EF 1092	EF 1093
フィブリノーゲン	+	+	~	--	+
フィブリネクチン	--	--	--	--	--
コラーゲンI	--	--	--	--	--
コラーゲンIII	--	--	--	--	--
コラーゲンIV	--	--	--	--	--
コラーゲンV	検査しなかった (ND)	ND	--	--	--
コラーゲンVI	--	--	--	+	--
ビトロネクチン	--	--	--	--	--
エラスチン	ND	ND	--	--	--
プラスミノゲン	ND	ND	+	+	+

20

30

【0147】

前記の説明で挙げた以下の参考文献は、その全体が本明細書で説明されたものとして組み込まれる：

CDC.2002. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* - Pennsylvania, 2002. Morb. Mortal. Wkly. 51:902.

Deivanayagam, C.C., R.L. Rich, M. Carson, R.T. Owens, S. Danthuluri, T. Bice, M. Hook, and S.V. Narayana. 2000. Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. Structure Fold Des 8:67-78.

40

Deivanayagam, C.C., E.R. Wann, W. Chen, M. Carson, K.R. RaJashankar, M. Hook, and S. V. Narayana. 2002. A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. Embo J 21:6660-72.

Hamburger, Z.A., M.S. Brown, R.R. Isberg, and P.J. Bjorkman. 1999. Crystal str

50

structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. Science 286:291-5.

Huycke, M.M., D.F. Sahn, and M.S. Gilmore. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis 4:239-49.

Leahy, D.J., I. Aukhil, and H.P. Erickson. 1996. 2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. Cell 84:155-64.

Luo, Y., E.A. Prey, R.A. Pfuetzner, A.L. Creagh, D.G. Knoechel, C.A. Haynes, B.B. Finlay, and N.C. Strynadka. 2000. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. Nature 405:1073-7.

O'Brien, L.M., E.J. Walsh, R.C. Massey, S.J. Peacock, and T.J. Foster. 2002. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. Cell Microbiol 4:759-70.

Patti, J.M., and M. Hook. 1994. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. Curr. Biol. 6:752-758.

Paulsen, I.T., L. Banerjee, G.S. Myers, K.E. Nelson, R. Seshadri, T.D. Read, D.E. Fouts, J.A. Eisen, S.R. Gill, J.F. Heidelberg, H. Tettelin, R.J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R.T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K.A. Ketchum, B.A. Dougherty, and C.M. Fraser. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science 299:2071-4.

Perkins, S., E.J. Waish, C.C. Deivanayagam, S.V. Narayana, T.J. Foster, and M. Hook. 2001. Structural organization of the fibrinogen-binding region of the clumping factor B MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 276:44721-8.

Sharma, A., J.A. Askari, M.J. Humphries, E.Y. Jones, and D.I. Stuart. 1999. Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fibronectin. Embo J 18:1468-79.

Symersky, J., J.M. Patti, M. Carson, K. House-Pompeo, M. Teale, D. Moore, L. Jin, A. Schneider, L.J. DeLucas, M. Hook, and S.V. Narayana. 1997. Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. Nat Struct Biol 4:833-8.

Taylor, S.A., E.M. Bailey, and M.J. Rybak. 1993. *Enterococcus*, an emerging pathogen. Ann Pharmacother 27:1231-42.

Tung, H., B. Guss, U. Hellman, L. Persson, K. Rubin, and C. Ryden. 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. Biochem J 345 Pt 3:611-9.

Arduino, R.C., Murray, B.E., and Rakita, R.M. (1994) Roles of antibodies and c

10

20

30

40

50

plement in phagocytic killing of enterococci. Infection and Immunity 62: 987-993.

Davis, S.L., Qurusiddappa, S., McCrea, K.W., Perkins, S., and Hook, M. (2001) SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the Bbeta chain. J Biol Chem 276: 27799-27805.

Deivanayagam, C.C., Perkins, S., Danthuluri, S., Owens, R.T., Bice, T., Nanavathy, T., Foster, T.J., Hook, M., and Narayana, S.V. (1999) Crystallization of ClfA and ClfB fragments: the fibrinogen-binding surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 55 ( Pt 2): 554-556. 10

Deivanayagam, C.C., Wann, E.R., Chen, W., Carson, M., Rajashankar, K.R., Hook, M., and Narayana, S.V. (2002) A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. Embo J 21: 6660-6672.

Foster, T.J., and Hook, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 6:484-488. 20

Hartford, O., O'Brien, L., Schofield, K., Wells, J., and Foster, T.J. (2001) The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. Microbiology 147: 2545-2552.

Joh, H.J., House-Pompeo, K., Patti, J.M., Gurusiddappa, S., and Hook, M. (1994) Fibronectin receptors from Gram-positive bacteria: comparison of active sites. Biochemistry 33: 6086-6092. 30

Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A., and Liddington, R. (1995) Crystal structure of the A-domain from the  $\alpha$  subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). Cell 80: 631-638.

Mazmanian, S.K., Ton-That, H., and Schneewind, O. (2001) Sortase-catalyzed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology 40:1049-1057.

McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P., and Foster, T.J. (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 11:237-248. 40

Murray, B.E. (1990) The life and times of the enterococcus. Clin. Microbiol. Rev 3: 46-65. 50

Murray, B.E., and Weinstock, G.M. (1999) Enterococci: new aspects of an old organism. Proc. Assoc. Am. Physicians 111: 328-334.

Nallapareddy, S.R., Qin, X., Weinstock, G.M., Hook, M., and Murray, B.E. (2000) Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix 50

ix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. Infect Immun 68: 5218-5224.

Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Duh, R.W., Weinstock, G.M., and Murray, B.E. (2000b) Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ace during human infections. Infect Immun 68: 5210-5217.

Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M., and Foster, T.J. (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 30: 245-257. 10

Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Science 4: 2411-2423.

Perkins, S., Walsh, E.J., Deivanayagam, C.C., Narayana, S.V., Foster, T.J., and Hook, M. (2001) Structural organization of the fibrinogen-binding region of the clumping factor B MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 276:44721-44728. 20

Ponnuraj, K., Xu, Y., Moore, D., Deivanayagam, C.C., Boque, L., Hook, M., and Narayana, S.V. (2002) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Ace: a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. Biochim Biophys Acta 1596:173-176.

Rich, R.L., Kreikemeyer, B., Owens, R.T., LaBrenz, S., Narayana, S.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., and Hook, M. (1999) Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. J Biol Chem 274: 26939-26945. 30

Sahm, D.F., Kissinger, J., Gilmore, M.S., Murray, P.R., Mulder, R., Solliday, J., and Clarke, B. (1989) In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 33:1588-1591.

Schneewind, O., Fowler, A., and Faull, K.F. (1995) Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. Science 268: 103-106.

Symersky, J., Patti, J.M., Carson, M., House-Pompeo, K., Teale, M., Moore, D., Jin, L., Schneider, A., DeLucas, L.J., Hook, M., and Narayana, S.V. (1997) Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. Nature Structural Biology 4:833-838. 40

Wann, E.R., Gurusiddappa, S., and Hook, M. (2000) The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. J Biol Chem 275:13863-13871.

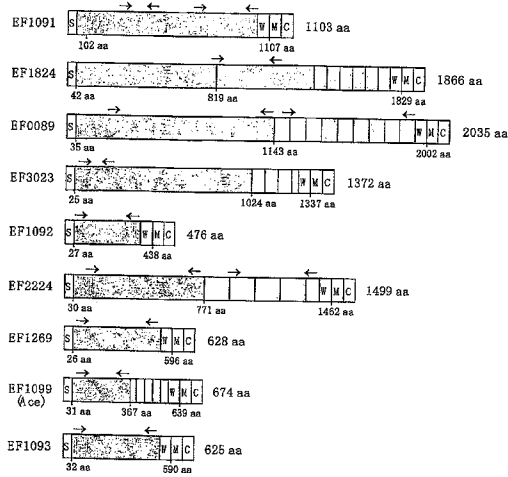
Westerlund, B., and Korhonen, T.K. (1993) Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. Mol. Microbiol. 9: 687-694.

【 0 1 4 8 】

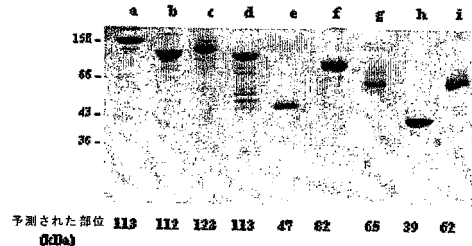
【 図 1 】 本発明に従って同定された種々のMSCRAMM（登録商標）タンパク質を示し、これらのタンパク質の種々の領域及びこれらの免疫グロブリン様領域を示す。

【 図 2 】 本発明のLPXTG含有タンパク質の大腸菌発現及び精製Aドメインのクーマシー染色SDS-PAGEを示す。

【 図 1 】



【 図 2 】



*E. faecalis* LPxTGタンパク質の大腸菌で発現させ、精製したAドメインのクーマシー染色SDS-PAGE  
a, EF1091; b, EF1824; c, EF0089; d, EF3023; e, EF1092; f, EF2224; g, EF1269; h, Ace; i, EF1093.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/28789
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : G06F 19/00 US CL : 702/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 702/20		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,448,043 B1 (CHOI et al.) 10 September 2002 (10.01.2002), see especially Detailed Description.	1-24, 27
Y	US 6,426,074 B1 (MICHEL et al.) 30 July 2002 (30.07.2002), see especially Detailed Description of the Preferred Embodiments.	1-24, 27
Y	US 2002/0061545 A1 (CHOI et al.) 23 May 2002 (23.05.2002), see especially Detailed Description.	1-24, 27
Y	US 6,008,341 A (FOSTER et al.) 28 December 1999 (28.12.1999), see especially Summary of the Invention.	1-24, 27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"Y"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"X"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"X"
Date of actual completion of the international search 20 April 2004 (20.04.2004)		Date of mailing of the international search report 22 APR 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Carolyn Smith</i> Telephone No. 703-308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/28789

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

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

1.  Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claim Nos.: 31  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claim 31 was not searched because it is a duplicate of claim 27.
3.  Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-5 (6-10, 12-24, 27 with SEQ ID NO: 13) 10, 15, 17-18 with SEQ ID NO: 12)
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest


The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US03/28789

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group 1, claims 1-5, drawn to a method of identifying LPXTG-containing cell wall-anchored surface proteins from Gram positive bacteria that bind to an extracellular matrix molecule via sequence analysis involving one or more IG-like fold regions.

Groups 2-50, claims 6-8, 12-13, and 16, drawn to proteins. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 49 amino acid sequences (as seen in claims 7 and 16) that is to be searched. For example, Group 2 is directed to the first sequence listed in claim 7 (SP0368) and Group 34 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

Groups 51-99, claims 9, 14, and 19-24, drawn to antibodies and antisera. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 49 amino acid sequences (as seen in claims 7 and 16) that is to be searched. For example, Group 51 is directed to the first sequence listed in claim 7 (SP0368) and Group 83 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

Groups 100-154, claims 10, 15, 17-18, drawn to nucleic acids. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of the 6 nucleic acid sequences (claim 18) or one of 49 amino acid sequences (as seen in claims 7 and 16) that is to be searched. For example, Group 100 is directed to the first sequence listed in claim 18 (SEQ ID NO: 8), Group 106 is the first sequence listed in claim 7 (SP0368) and Group 138 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

Group 155, claim 11, drawn to a method of identifying LPXTG-containing cell wall-anchored surface proteins from Gram positive bacteria that bind to an extracellular matrix molecule via sequence analysis involving a signal peptide at the N-terminus, the C-terminus followed by a hydrophobic transmembrane segment, and several positively charged residues at the C-terminus.

Groups 156-172, claims 25-26, drawn to a kit. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 17 amino acid sequences (as seen in claim 16) that is to be searched. For example, Group 156 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

Groups 173-189, claim 27, drawn to a method of treating or preventing an infection of a Gram positive bacteria via antibody administration. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 17 amino acid sequences (as seen in claim 16) that is to be searched. For example, Group 173 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

Groups 190-238, claims 28-30 and 38, drawn to pharmaceutical compositions. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 49 amino acid sequences (as seen in claims 7 and 16) that is to be searched. For example, Group 190 is directed to the first sequence listed in claim 7 (SP0368) and Group 222 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

Groups 239-255, claims 32 and 39, drawn to a method of diagnosing an infection caused by Gram positive bacteria. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 17 amino acid sequences (as seen in claim 16) that is to be searched. For example, Group 239 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

Groups 256-304, claims 33 and 40, drawn to a method of eliciting an immunogenic reaction. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 49 amino acid sequences (as seen in claims 7 and 16) that is to be searched. For example, Group 256 is directed to the first sequence listed in claim 7 (SP0368) and Group 288 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

Groups 305-336, claim 34, drawn to a vaccine. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 32 amino acid sequences (as seen in claim 7) that is to be searched. For example, Group 305 is directed to the first sequence listed in claim 7 (SP0368).

Groups 337-353, claims 35-36, drawn to a method of assaying for the presence of antigens from Gram positive bacteria via detection of labeled antibody. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 17 amino acid sequences (as seen in claim 16) that is to be searched. For example, Group 337 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

Groups 354-370, claim 37, drawn to a method of monitoring the level of Gram positive bacterial antigens via determination of antigen-antibody binding levels. Each Group contains a unique sequence, so if this Grouping is elected, then please select the Group corresponding to the one of 17 amino acid sequences (as seen in claim 16) that is to be searched. For example, Group 354 is directed to the first sequence listed in claim 16 (SEQ ID NO:2).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/28789

The inventions listed as Groups 1-370 do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Group 1 is directed toward identifying LPXTG-containing cell wall-anchored surface proteins from Gram positive bacteria that bind to an extracellular matrix molecule via sequence analysis involving one or more IG-like fold regions. Groupings [2-50], [51-99], and [100-154] are directed to different chemical entities (proteins, antibodies/antisera, and nucleic acids) which are structurally and functionally different from each other. Group 155 is directed to identifying LPXTG-containing cell wall-anchored surface proteins from Gram positive bacteria that bind to an extracellular matrix molecule via sequence analysis involving a signal peptide at the N-terminus, the C-terminus followed by a hydrophobic transmembrane segment, and several positively charged residues at the C-terminus. Groups 156-172 are directed to kits not found in any other Group. Groups 173-189 are directed to treating and preventing infections via antibody administration. Groups 190-238 are directed to pharmaceutical compositions not found in other Groups. Groups 239-255 are directed to diagnosing infections which differs from the other Groups. Groups 256-304 are directed to eliciting an immunogenic reactions. Group 305-336 are directed to vaccines. Groups 337-353 are directed to assaying for the presence of antigens from Gram positive bacteria via detection of labeled antibodies. Groups 354-370 are directed to monitoring the level of Gram positive bacterial antigens via determination of antigen-antibody binding levels.

Groups 2-154 and 155-370 contain patentably distinct sequences. There appear to be 32 (claim 7) plus 17 (claim 16) sequences which equals 49 amino acid sequences. There appear to be 6 (claim 18) nucleic acid sequences. These sequences each contain special technical features in that they contain unique sequences with different structures and functions.

Clearly, these 370 Groups with their respective technical features are distinct from each other. Thus, in summary, each of Groups 1-370 are directed to different special technical features and thus support this lack of unity.

Claim 31 was not included in this lack of unity analysis, because this claim is a duplicate of claim 27.

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

WEST, PUBMED, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH searching the following terms: method, identify, LPXTG, cell wall, Gram positive, bacteria, database, sequence, motif, C-terminal, IG, Enterococcus, Streptococcus, staphylococcus, Bacillus, protein, domain, antibody, nucleic acid, hydrophobic transmembrane, treat, prevent, infection

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/04	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 7
C 0 7 K 14/195	A 6 1 P 31/04	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/12	C 0 7 K 14/195	
G 0 1 N 33/53	C 0 7 K 16/12	
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/68	G 0 1 N 33/569	F
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/68	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, M X, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

U N I X

(71) 出願人 505092496

ザ ユーイービー リサーチ ファンデーション

アメリカ合衆国 アラバマ 35294, バーミンガム, サウス トウェンティス ストリート  
701, アドミニストレーション ビルディング 1120 - ザー

(74) 代理人 100064388

弁理士 浜野 孝雄

(74) 代理人 100067965

弁理士 森田 哲二

(74) 代理人 100088236

弁理士 平井 輝一

(72) 発明者 フック, マグナス

アメリカ合衆国 テキサス 77005, ハウストン, オーバーリン 4235

(72) 発明者 クー, イ

アメリカ合衆国 テキサス 77843 - 3369, カレッヂ スティション, タム 3369,  
ザ テキサス エイ アンド エム ユニバースティ システム内

(72) 発明者 シランパ, ジュコ ヴイ

アメリカ合衆国 テキサス 77843 - 3369, カレッヂ スティション, タム 3369,  
ザ テキサス エイ アンド エム ユニバースティ システム内

(72) 発明者 シュタナム, ナラヤナ

アメリカ合衆国 アラバマ 35294, バーミンガム, トウェンティス ストリート サウス  
720, 1120 - ザー アドミニストレーション ビルディング, ザ ユーイービー リサーチ  
ファンデーション内

(72) 発明者 ポヌライ, カルテ

アメリカ合衆国 アラバマ 35294, バーミンガム, トウェンティス ストリート サウス  
720, 1120 - ザー アドミニストレーション ビルディング, ザ ユーイービー リサーチ  
ファンデーション内

(72) 発明者 パティ, ヨセフ エム

アメリカ合衆国 ジョージア 30040, カミングス, ストラドフォード プレイス 6680

(72) 発明者 ハトキンス, ジェフ テイ

アメリカ合衆国 ジョージア 30004, アルファレッタ, ウェストサイド パークウェイ 8  
995, インヒビテックス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ホール, アンドレア

アメリカ合衆国 ジョージア 30004, アルファレッタ, スウィート 400, ウェストサイ  
ド パークウェイ 8995, インヒビテックス, インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 2G045 AA28 CB21 DA36 DA37 FB03 FB07

4B024 AA01 AA13 BA31 CA02 DA06

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA15

4C076 AA24 BB01 BB13 BB16 BB25 CC03

4C085 AA13 AA14 BA15 BB31 CC21 DD88 EE01 GG02 GG04 GG08

4C087 BB35 MA13 MA52 MA55 MA59 MA66 NA14 ZB35

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA76 DA86 EA29 EA31 EA52

FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005538718A5</a>	公开(公告)日	2010-02-18
申请号	JP2004536258	申请日	2003-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	得克萨斯州A & M宇宙三通系统 英希比泰克斯公司 郁AB研究风扇状态		
申请(专利权)人(译)	得克萨斯州A & M宇宙三通系统 特克斯抑制剂公司 该Yuebi研究风扇状态		
[标]发明人	フックマグナス クーイ シランパジユコヴィ シュタナムナラヤナ ポヌライカルテ パティヨセフエム ハトキンスジエフテイ ホールアンドレア		
发明人	フック,マグナス クー,イ シランパ,ジユコ ヴイ シュタナム,ナラヤナ ポヌライ,カルテ パティ,ヨセフ エム ハトキンス,ジエフ テイ ホール,アンドレア		
IPC分类号	C12N15/09 A61K9/12 A61K35/16 A61K39/00 A61K39/395 A61P31/04 C07K14/195 C07K16/12 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/68 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/315 C07K16/1267 G01N33/56911 G01N33/56916 G16B15 /00 G16B30/00 Y02A90/26 Y10S435/975		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K9/12 A61K35/16 A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61P31/04 C07K14/195 C07K16/12 G01N33/53.D G01N33/569.F G01N33/68 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/CB21 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024 /AA13 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/DA06 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4C076/AA24 4C076/BB01 4C076/BB13 4C076/BB16 4C076/BB25 4C076 /CC03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA15 4C085/BB31 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG08 4C087/BB35 4C087/MA13 4C087/MA52 4C087/MA55 4C087 /MA59 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74		
优先权	60/410303 2002-09-13 US		
其他公开文献	JP2005538718A JP4686188B2		

#### 摘要(译)

革兰氏阳性菌，例如肠球菌，葡萄球菌，链球菌属和芽孢杆菌属细菌来源的MSCRAMM ( TM ) 样生物信息学方法来识别和并分离具有的特性的蛋白质，由革兰氏阳性菌提供的生物信息学方法，其可用于预防和治疗引起的感染的方法中使用。该方法中，序列信

息，C-末端，推定的LPXTG的区域 ( SEQ ID NO : 1 ) MSCRAMM并具有细胞壁与蛋白质和LPXTG分选信号固定化细胞壁蛋白 ( TM ) 蛋白和另一种结构并鉴定具有相似性的蛋白质MSCRAMM ( R ) 蛋白质及其免疫原性区域确定和使用本发明，革兰氏阳性菌感染的诊断孤立的，它可用于生产用于预防和治疗有用的抗体。