

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-60898

(P2009-60898A)

(43) 公開日 平成21年3月26日(2009.3.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/315 (2006.01)	C O 7 K 14/315	4 B O 2 9
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 3
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12	4 B O 6 4
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 6 5
審査請求 有 請求項の数 105 O L (全 118 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-209785 (P2008-209785)	(71) 出願人	591000791
(22) 出願日	平成20年8月18日 (2008. 8. 18)		ワイス・ホールディングズ・コーポレイション
(62) 分割の表示	特願2002-582194 (P2002-582194)の分割		Wyeth Holdings Corporation
原出願日	平成14年4月12日 (2002. 4. 12)		アメリカ合衆国ニュージャージー州07940-0874 マディソン・ファイブジラルダファームス (番地なし)
(31) 優先権主張番号	60/283, 948	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成13年4月16日 (2001. 4. 16)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	60/284, 443		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成13年4月18日 (2001. 4. 18)	(74) 代理人	100116311
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 元山 忠行
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ポリペプチド抗原をコードしている新規ストレプトコッカスニューモニアエオープンリーディングフレームおよびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ストレプトコッカスニューモニアレプトコッカス肺炎の有効な治療法の提供。

【解決手段】 特定の配列の1つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含む、ストレプトコッカスニューモニアエゲノム配列の単離ポリヌクレオチドを用いることで、ストレプトコッカスニューモニアレプトコッカス肺炎を効果的に治療することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリヌクレオチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含む、ストレプトコッカス ニューモニアエゲノム配列の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

ポリヌクレオチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントに対する相補物である、請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 3】

ポリヌクレオチドが、DNA、染色体 DNA、cDNA、および RNA から成る群から選択される、請求項 2 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

ポリヌクレオチドが異種構造ヌクレオチドをさらに含む、請求項 3 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列、その相補物、その縮重変種、またはそのフラグメントに、高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズする、単離ポリヌクレオチド。

20

【請求項 6】

ポリヌクレオチドが中ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズする、請求項 5 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

ポリヌクレオチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含み、以下の (a) ~ (m) から成る群から選択されるポリペプチド、その生物学的同等物、またはそのフラグメントをコードする、ストレプトコッカス ニューモニアエゲノム配列の単離ポリヌクレオチド；

30

(a) 0、1、または 2 個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(b) 3 個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(c) 外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(d) 内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(e) Blastp 分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(f) Pfam 分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(g) ストレプトコッカス ニューモニアエリボタンパク質；

40

(h) LPXTG モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合している；

(i) ペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合している；

(j) シグナル配列および C 末端チロシンまたは C 末端フェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(k) トリペプチド RGD アミノ酸配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(l) プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；および、

50

(m) プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド。

【請求項 8】

ポリヌクレオチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントに対する相補物である、請求項 7 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

ポリヌクレオチドが、DNA、染色体 DNA、cDNA、および RNA から成る群から選択される、請求項 8 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

ポリヌクレオチドが異種構造ヌクレオチドをさらに含む、請求項 9 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

ポリヌクレオチドが融合ポリペプチドをコードする、請求項 10 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

0、1、または 2 個の膜貫通ドメインを有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号39、配列番号41、配列番号42、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号58、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号78、配列番号79、配列番号81、配列番号83、配列番号85、配列番号86、配列番号89、配列番号91、配列番号92、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号100、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号113、配列番号116、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号131、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号141、配列番号142、配列番号143、配列番号144、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150、配列番号155、配列番号156、配列番号158、配列番号161、配列番号162、配列番号165、配列番号170、配列番号171、配列番号172、配列番号174、配列番号176、配列番号179、配列番号183、配列番号185、配列番号187、配列番号192、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号204、配列番号205、配列番号207、配列番号209、および配列番号210の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 7 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

3 個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号2、配列番号5、配列番号6、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号15、配列番号20、配列番号21、配列番号26、配列番号27、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号38、配列番号40、配列番号43、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号52、配列番号54、配列番号56、配列番号59、配列番号65、配列番号71、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号87、配列番号88、配列番号90、配列番号93、配列番号94、配列番号98、配列番号99、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号107、配列番号108、配列番号112、配列番号114、配列番号115、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号124、配列番号129、配列番号130、配列番号133、配列番号135、配列番号139、配列番号140、配列番号145、配列番号146、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号154、配列番号157、配列番号159、配列番号160、配列番号16

10

20

30

40

50

3、配列番号164、配列番号166、配列番号167、配列番号168、配列番号169、配列番号173、配列番号175、配列番号177、配列番号178、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号184、配列番号186、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号193、配列番号194、配列番号198、配列番号203、配列番号206、配列番号208、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214、および配列番号215

の1つから選択されるヌクレオチドは配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項14】

外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号3、配列番号8、配列番号9、配列番号23、配列番号39、配列番号50、配列番号62、配列番号67、配列番号78、配列番号85、配列番号125、配列番号134、配列番号147、配列番号165、配列番号172および配列番号179の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項15】

内膜ドメインを有しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号2、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号40、配列番号43、配列番号44、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号56、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号65、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号86配列番号87、配列番号88、配列番号90、配列番号91、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号135、配列番号136、配列番号139、配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号154、配列番号156、配列番号157、配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号166、配列番号167、配列番号168、配列番号169、配列番号170、配列番号173、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号184、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号192、配列番号193、配列番号194、配列番号195、配列番号198、配列番号200、配列番号203、配列番号206、配列番号208、配列番号209、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214および配列番号215の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。 20 30 40

【請求項16】

Blastp分析により同定されるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号7、配列番号10、配列番号12、配列番号16、配列番号20、配列番号24、配列番号27、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号48、配列番号51、配列番号53、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号65、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列 50

番号80、配列番号87、配列番号88、配列番号90、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号112、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号118、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号138、配列番号139、配列番号141、配列番号144、配列番号146、配列番号147、配列番号151、配列番号152、配列番号154、配列番号155、配列番号157、配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号161、配列番号162、配列番号163、配列番号165、配列番号166、配列番号167、配列番号169、配列番号172、配列番号173、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号188、配列番号189、配列番号191、配列番号193、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号210、配列番号212、配列番号213 および配列番号214の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項17】

Pfam分析により同定されるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号4、配列番号18、配列番号19、配列番号41、配列番号45、配列番号55、配列番号57、配列番号58、配列番号63、配列番号64、配列番号66、配列番号72、配列番号74、配列番号89、配列番号92、配列番号104、配列番号111、配列番号116、配列番号119、配列番号128、配列番号137、配列番号142、配列番号143、配列番号149、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号157、配列番号159、配列番号160、配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号165、配列番号166、配列番号169、配列番号171、配列番号174、配列番号176、配列番号180、配列番号182、配列番号183、配列番号184、配列番号186、配列番号188、配列番号189、配列番号195、配列番号198、配列番号199、配列番号205、配列番号212 および、配列番号213の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項18】

リポタンパク質をコードしているポリヌクレオチドが、配列番号3、配列番号8、配列番号9、配列番号13、配列番号21、配列番号26、配列番号34、配列番号62、配列番号67、配列番号85、配列番号134、配列番号147、配列番号150、配列番号168、配列番号170 および配列番号173の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項19】

L P X T Gモチーフを有しており、そしてペプチドグリカン層に共有結合しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号13、配列番号21、配列番号34 および配列番号170の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項20】

ペプチドグリカン結合モチーフを有しており、そしてペプチドグリカン層に結合しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号25、配列番号49、および配列番号110の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項21】

シグナル配列およびC末端チロシンまたはC末端フェニルアラニンアミノ酸を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号11、配列番号39、配列番号73、配列番号97、配列番号106、配列番号125 および配列番号187の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項22】

10

20

30

40

50

トリペプチド R G D アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号1、配列番号21、配列番号66 および配列番号67の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項23】

プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号46、配列番号64、配列番号66、配列番号67、配列番号69、配列番号71、配列番号74、配列番号91、配列番号103、配列番号116、配列番号128、配列番号131、配列番号136、配列番号151、配列番号156、配列番号159、配列番号162、配列番号164、配列番号172、配列番号176、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号182 および配列番号205の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項24】

プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、配列番号431～配列番号591の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項25】

ポリヌクレオチドが、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含む、ストレプトコッカス ニューモニアエゲノム配列のポリヌクレオチドによりコードされる単離ポリペプチド。

20

【請求項26】

ポリペプチドが融合ポリペプチドである、請求項25記載のポリペプチド。

【請求項27】

ストレプトコッカス ニューモニアエで感染した個人の血清ポジティブな血清と免疫反応する、請求項25記載のポリペプチド。

【請求項28】

さらに以下の(a)～(m)のように定義される、請求項25記載のポリペプチド：

(a) 0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

30

(b) 3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(c) 外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(d) 内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(e) Blastp分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(f) Pfam分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(g) ストレプトコッカス ニューモニアエリボタンパク質；

(h) L P X T Gモチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合している；

40

(i) ペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合している；

(j) シグナル配列およびC末端チロシンまたはC末端フェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(k) トリペプチド R G D アミノ酸配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(l) プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；および、

(m) プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド。

50

【請求項 29】

0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するポリペプチドが、配列番号 216、配列番号 218、配列番号 219、配列番号 222、配列番号 223、配列番号 224、配列番号 226、配列番号 228、配列番号 231、配列番号 232、配列番号 233、配列番号 234、配列番号 237、配列番号 238、配列番号 239、配列番号 240、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 247、配列番号 249、配列番号 251、配列番号 254、配列番号 256、配列番号 257、配列番号 260、配列番号 262、配列番号 264、配列番号 265、配列番号 266、配列番号 268、配列番号 270、配列番号 272、配列番号 273、配列番号 275、配列番号 276、配列番号 277、配列番号 278、配列番号 279、配列番号 281、配列番号 282、配列番号 283、配列番号 284、配列番号 285、配列番号 286、配列番号 287、配列番号 289、配列番号 293、配列番号 294、配列番号 296、配列番号 298、配列番号 300、配列番号 301、配列番号 304、配列番号 306、配列番号 307、配列番号 310、配列番号 311、配列番号 312、配列番号 315、配列番号 319、配列番号 320、配列番号 321、配列番号 324、配列番号 325、配列番号 326、配列番号 328、配列番号 331、配列番号 336、配列番号 337、配列番号 338、配列番号 340、配列番号 341、配列番号 342、配列番号 343、配列番号 346、配列番号 347、配列番号 349、配列番号 351、配列番号 352、配列番号 353、配列番号 356、配列番号 357、配列番号 358、配列番号 359、配列番号 362、配列番号 363、配列番号 364、配列番号 365、配列番号 370、配列番号 371、配列番号 373、配列番号 376、配列番号 377、配列番号 380、配列番号 385、配列番号 386、配列番号 387、配列番号 389、配列番号 391、配列番号 394、配列番号 398、配列番号 400、配列番号 402、配列番号 407、配列番号 410、配列番号 411、配列番号 412、配列番号 414、配列番号 415、配列番号 416、配列番号 417、配列番号 419、配列番号 420、配列番号 422、配列番号 424、配列番号 425の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

【請求項 30】

3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するポリペプチドが、配列番号 217、配列番号 220、配列番号 221、配列番号 225、配列番号 227、配列番号 229、配列番号 230、配列番号 235、配列番号 236、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 248、配列番号 250、配列番号 252、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 258、配列番号 259、配列番号 261、配列番号 263、配列番号 267、配列番号 269、配列番号 271、配列番号 274、配列番号 280、配列番号 286、配列番号 290、配列番号 291、配列番号 292、配列番号 295、配列番号 297、配列番号 299、配列番号 302、配列番号 303、配列番号 305、配列番号 308、配列番号 309、配列番号 313、配列番号 314、配列番号 316、配列番号 317、配列番号 318、配列番号 322、配列番号 323、配列番号 327、配列番号 329、配列番号 330、配列番号 332、配列番号 333、配列番号 334、配列番号 335、配列番号 339、配列番号 344、配列番号 345、配列番号 348、配列番号 350、配列番号 354、配列番号 355、配列番号 360、配列番号 361、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 368、配列番号 369、配列番号 372、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 378、配列番号 379、配列番号 381、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 388、配列番号 390、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 399、配列番号 401、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 405、配列番号 406、配列番号 408、配列番号 409、配列番号 413、配列番号 418、配列番号 421、配列番号 423、配列番号 426、配列番号 427、配列番号 428、配列番号 429、配列番号 430の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

【請求項 31】

外膜または周辺細胞ドメインを有するポリペプチドが、配列番号 218、配列番号 223、配列番号 224、配列番号 238、配列番号 254、配列番号 265、配列番号 277、配

列番号 282、配列番号 293、配列番号 300、配列番号 340、配列番号 349、配列番号 362、配列番号 380、配列番号 387、配列番号 394の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項28記載のポリペプチド。

【請求項32】

内膜ドメインを有するポリペプチドが、配列番号 217、配列番号 220、配列番号 221、配列番号 222、配列番号 225、配列番号 226、配列番号 227、配列番号 228、配列番号 229、配列番号 230、配列番号 231、配列番号 232、配列番号 234、配列番号 235、配列番号 236、配列番号 237、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、配列番号 252、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 258、配列番号 259、配列番号 261、配列番号 262、配列番号 263、配列番号 266、配列番号 267、配列番号 268、配列番号 269、配列番号 271、配列番号 274、配列番号 275、配列番号 276、配列番号 280、配列番号 283、配列番号 284、配列番号 285、配列番号 286、配列番号 288、配列番号 290、配列番号 291、配列番号 292、配列番号 294、配列番号 295、配列番号 296、配列番号 297、配列番号 298、配列番号 299、配列番号 301 配列番号 302、配列番号 303、配列番号 305、配列番号 306、配列番号 308、配列番号 309、配列番号 310、配列番号 311、配列番号 312、配列番号 313、配列番号 314、配列番号 315、配列番号 316、配列番号 317、配列番号 318、配列番号 320、配列番号 321、配列番号 322、配列番号 323、配列番号 324、配列番号 327、配列番号 328、配列番号 329、配列番号 330、配列番号 332、配列番号 333、配列番号 334、配列番号 335、配列番号 336、配列番号 337、配列番号 338、配列番号 339、配列番号 341、配列番号 342、配列番号 343、配列番号 344、配列番号 345、配列番号 346、配列番号 347、配列番号 348、配列番号 350、配列番号 351、配列番号 354、配列番号 355、配列番号 356、配列番号 357、配列番号 359、配列番号 360、配列番号 361、配列番号 362、配列番号 365、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 368、配列番号 369、配列番号 371、配列番号 372、配列番号 373、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 377、配列番号 378、配列番号 379、配列番号 381、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 385、配列番号 388、配列番号 390、配列番号 391、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 399、配列番号 401、配列番号 402、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 405、配列番号 406、配列番号 407、配列番号 408、配列番号 409、配列番号 410、配列番号 413、配列番号 415、配列番号 418、配列番号 421、配列番号 423、配列番号 424、配列番号 426、配列番号 427、配列番号 428、配列番号 429、配列番号 430の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項28記載のポリペプチド。

【請求項33】

Blastp分析により同定されるポリペプチドが、配列番号 216、配列番号 217、配列番号 222、配列番号 225、配列番号 227、配列番号 231、配列番号 235、配列番号 239、配列番号 242、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 257、配列番号 258、配列番号 259、配列番号 263、配列番号 266、配列番号 268、配列番号 269、配列番号 275、配列番号 276、配列番号 280、配列番号 282、配列番号 283、配列番号 284、配列番号 285、配列番号 286、配列番号 290、配列番号 291、配列番号 292、配列番号 293、配列番号 294、配列番号 295、配列番号 302、配列番号 303、配列番号 305、配列番号 309、配列番号 310、配列番号 311、配列番号 313、配列番号 315、配列番号 318、配列番号 320、配列番号 322、配列番号 323、配列番号 324、配列番号 327、配列番号 328、配列番号 330、配列番号 332、配列番号 333、配列番号 337、配列番号 338、配列番号 339、配列番号 342、配列番号 344、配列番号 346、配列番号 347、配列番号 348、配列番号 349、配列番号 350、配列

番号 351、配列番号 353、配列番号 354、配列番号 356、配列番号 359、配列番号 361、配列番号 362、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 369、配列番号 370、配列番号 372、配列番号 373、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 376、配列番号 377、配列番号 378、配列番号 380、配列番号 381、配列番号 382、配列番号 384、配列番号 387、配列番号 388、配列番号 391、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 399、配列番号 400、配列番号 401、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 406、配列番号 408、配列番号 411、配列番号 412、配列番号 413、配列番号 414、配列番号 415、配列番号 416、配列番号 417、配列番号 419、配列番号 420、配列番号 421、配列番号 422、配列番号 423、配列番号 425、配列番号 427、配列番号 428、配列番号 429の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

10

【請求項 34】

Pfam分析により同定されるポリペプチドが、配列番号 219、配列番号 233、配列番号 234、配列番号 255、配列番号 260、配列番号 270、配列番号 272、配列番号 273、配列番号 278、配列番号 279、配列番号 281、配列番号 287、配列番号 289、配列番号 304、配列番号 307、配列番号 319、配列番号 326、配列番号 331、配列番号 334、配列番号 343、配列番号 352、配列番号 357、配列番号 358、配列番号 364、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 368、配列番号 372、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 377、配列番号 378、配列番号 379、配列番号 380、配列番号 381、配列番号 384、配列番号 386、配列番号 389、配列番号 391、配列番号 395、配列番号 397、配列番号 398、配列番号 399、配列番号 401、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 410、配列番号 413、配列番号 414、配列番号 420、配列番号 427、配列番号 428の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

20

【請求項 35】

ポリペプチドがリポタンパク質であり、配列番号 218、配列番号 223、配列番号 224、配列番号 228、配列番号 236、配列番号 241、配列番号 249、配列番号 277、配列番号 282、配列番号 300、配列番号 349、配列番号 362、配列番号 365、配列番号 383、配列番号 385、配列番号 388の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

30

【請求項 36】

LPATGモチーフを有し、ペプチドグリカン層に共有結合しているポリペプチドが、配列番号 228、配列番号 236、配列番号 249、SEQ、配列番号 385の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

【請求項 37】

ペプチドグリカン結合モチーフを有し、ペプチドグリカン層に結合しているポリペプチドが、配列番号 240、配列番号 264、配列番号 325の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

40

【請求項 38】

シグナル配列およびC-末端チロシンまたはフェニルアラニンアミノ酸を有するポリペプチドが、配列番号226、配列番号254、配列番号289、配列番号312、配列番号321、配列番号 340、配列番号402の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

【請求項 39】

細胞接着に潜在的に関与するトリペプチドRGD配列を有するポリペプチドが、配列番号216、配列番号236、配列番号281、配列番号282の1つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

【請求項 40】

50

プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるポリペプチドが、配列番号 29、配列番号 231、配列番号 232、配列番号 261、配列番号 279、配列番号 281、配列番号 282、配列番号 284、配列番号 286、配列番号 289、配列番号 306、配列番号 318、配列番号 331、配列番号 343、配列番号 346、配列番号 351、配列番号 366、配列番号 371、配列番号 374、配列番号 377、配列番号 379、配列番号 387、配列番号 391、配列番号 393、配列番号 394、395、配列番号 397、配列番号 420 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

【請求項 4 1】

プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるポリペプチドが、配列番号 592 ~ 配列番号 752 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含む、請求項 28 記載のポリペプチド。

【請求項 4 2】

配列番号 216 ~ 配列番号 430 または配列番号 592 ~ 配列番号 752 の 1 つから選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 4 3】

ポリペプチドが融合ポリペプチドである、請求項 4 2 記載のポリペプチド。

【請求項 4 4】

ストレプトコッカス ニューモニアエで感染した個人の血清ポジティブな血清と免疫反応する、請求項 4 2 記載のポリペプチド。

【請求項 4 5】

さらに (a) ~ (m) として定義される、請求項 4 2 記載のポリペプチド：

(a) 0、1、または 2 個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(b) 3 個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(c) 外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(d) 内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(e) Blastp 分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(f) Pfam 分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(g) ストレプトコッカス ニューモニアエリボタンパク質；

(h) LPXTG モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合している；

(i) ペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合している；

(j) シグナル配列および C 末端チロシンまたは C 末端フェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(k) トリペプチド RGD アミノ酸配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(l) プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；および、

(m) プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド。

【請求項 4 6】

0、1、または 2 個の膜貫通ドメインを有するポリペプチドが、配列番号 216、配列番号 218、配列番号 219、配列番号 222、配列番号 223、配列番号 224、配列番号 226、配列番号 228、配列番号 231、配列番号 232、配列番号 233、配列番号 234、配列番号 237、配列番号 238、配列番号 239、配列番号 240、配列番号 243、配列

10

20

30

40

50

番号 244、配列番号 247、配列番号 249、配列番号 251、配列番号 254、配列番号 256、配列番号 257、配列番号 260、配列番号 262、配列番号 264、配列番号 265、配列番号 266、配列番号 268、配列番号 270、配列番号 272、配列番号 273、配列番号 275、配列番号 276、配列番号 277、配列番号 278、配列番号 279、配列番号 281、配列番号 282、配列番号 283、配列番号 284、配列番号 285、配列番号 286、配列番号 287、配列番号 289、配列番号 293、配列番号 294、配列番号 296、配列番号 298、配列番号 300、配列番号 301、配列番号 304、配列番号 306、配列番号 307、配列番号 310、配列番号 311、配列番号 312、配列番号 315、配列番号 319、配列番号 320、配列番号 321、配列番号 324、配列番号 325、配列番号 326、配列番号 328、配列番号 331、配列番号 336、配列番号 337、配列番号 338、配列番号 340、配列番号 341、配列番号 342、配列番号 343、配列番号 346、配列番号 347、配列番号 349、配列番号 351、配列番号 352、配列番号 353、配列番号 356、配列番号 357、配列番号 358、配列番号 359、配列番号 362、配列番号 363、配列番号 364、配列番号 365、配列番号 370、配列番号 371、配列番号 373、配列番号 376、配列番号 377、配列番号 380、配列番号 385、配列番号 386、配列番号 387、配列番号 389、配列番号 391、配列番号 394、配列番号 398、配列番号 400、配列番号 402、配列番号 407、配列番号 410、配列番号 411、配列番号 412、配列番号 414、配列番号 415、配列番号 416、配列番号 417、配列番号 419、配列番号 420、配列番号 422、配列番号 424、配列番号 425の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

10

20

【請求項 4 7】

3 個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するポリペプチドが、配列番号 217、配列番号 220、配列番号 221、配列番号 225、配列番号 227、配列番号 229、配列番号 230、配列番号 235、配列番号 236、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 248、配列番号 250、配列番号 252、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 258、配列番号 259、配列番号 261、配列番号 263、配列番号 267、配列番号 269、配列番号 271、配列番号 274、配列番号 280、配列番号 286、配列番号 290、配列番号 291、配列番号 292、配列番号 295、配列番号 297、配列番号 299、配列番号 302、配列番号 303、配列番号 305、配列番号 308、配列番号 309、配列番号 313、配列番号 314、配列番号 316、配列番号 317、配列番号 318、配列番号 322、配列番号 323、配列番号 327、配列番号 329、配列番号 330、配列番号 332、配列番号 333、配列番号 334、配列番号 335、配列番号 339、配列番号 344、配列番号 345、配列番号 348、配列番号 350、配列番号 354、配列番号 355、配列番号 360、配列番号 361、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 368、配列番号 369、配列番号 372、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 378、配列番号 379、配列番号 381、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 388、配列番号 390、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 399、配列番号 401、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 405、配列番号 406、配列番号 408、配列番号 409、配列番号 413、配列番号 418、配列番号 421、配列番号 423、配列番号 426、配列番号 427、配列番号 428、配列番号 429、配列番号 430の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

30

40

【請求項 4 8】

外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するポリペプチドが、配列番号 218、配列番号 223、配列番号 224、配列番号 238、配列番号 254、配列番号 265、配列番号 277、配列番号 282、配列番号 293、配列番号 300、配列番号 340、配列番号 349、配列番号 362、配列番号 380、配列番号 387、配列番号 394の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 4 9】

50

内膜ドメインを有するポリペプチドが、配列番号 217、配列番号 220、配列番号 221、配列番号 222、配列番号 225、配列番号 226、配列番号 227、配列番号 228、配列番号 229、配列番号 230、配列番号 231、配列番号 232、配列番号 234、配列番号 235、配列番号 236、配列番号 237、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、配列番号 252、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 258、配列番号 259、配列番号 261、配列番号 262、配列番号 263、配列番号 266、配列番号 267、配列番号 268、配列番号 269、配列番号 271、配列番号 274、配列番号 275、配列番号 276、配列番号 280、配列番号 283、配列番号 284、配列番号 285、配列番号 286、配列番号 288、配列番号 290、配列番号 291、配列番号 292、配列番号 294、配列番号 295、配列番号 296、配列番号 297、配列番号 298、配列番号 299、配列番号 301、配列番号 302、配列番号 303、配列番号 305、配列番号 306、配列番号 308、配列番号 309、配列番号 310、配列番号 311、配列番号 312、配列番号 313、配列番号 314、配列番号 315、配列番号 316、配列番号 317、配列番号 318、配列番号 320、配列番号 321、配列番号 322、配列番号 323、配列番号 324、配列番号 327、配列番号 328、配列番号 329、配列番号 330、配列番号 332、配列番号 333、配列番号 334、配列番号 335、配列番号 336、配列番号 337、配列番号 338、配列番号 339、配列番号 341、配列番号 342、配列番号 343、配列番号 344、配列番号 345、配列番号 346、配列番号 347、配列番号 348、配列番号 350、配列番号 351、配列番号 354、配列番号 355、配列番号 356、配列番号 357、配列番号 359、配列番号 360、配列番号 361、配列番号 362、配列番号 365、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 368、配列番号 369、配列番号 371、配列番号 372、配列番号 373、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 377、配列番号 378、配列番号 379、配列番号 381、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 385、配列番号 388、配列番号 390、配列番号 391、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 399、配列番号 401、配列番号 402、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 405、配列番号 406、配列番号 407、配列番号 408、配列番号 409、配列番号 410、配列番号 413、配列番号 415、配列番号 418、配列番号 421、配列番号 423、配列番号 424、配列番号 426、配列番号 427、配列番号 428、配列番号 429、配列番号 430 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 5 0】

Blastp 分析により同定されるポリペプチドが、配列番号 216、配列番号 217、配列番号 222、配列番号 225、配列番号 227、配列番号 231、配列番号 235、配列番号 239、配列番号 242、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 257、配列番号 258、配列番号 259、配列番号 263、配列番号 266、配列番号 268、配列番号 269、配列番号 275、配列番号 276、配列番号 280、配列番号 282、配列番号 283、配列番号 284、配列番号 285、配列番号 286、配列番号 290、配列番号 291、配列番号 292、配列番号 293、配列番号 294、配列番号 295、配列番号 302、配列番号 303、配列番号 305、配列番号 309、配列番号 310、配列番号 311、配列番号 313、配列番号 315、配列番号 318、配列番号 320、配列番号 322、配列番号 323、配列番号 324、配列番号 327、配列番号 328、配列番号 330、配列番号 332、配列番号 333、配列番号 337、配列番号 338、配列番号 339、配列番号 342、配列番号 344、配列番号 346、配列番号 347、配列番号 348、配列番号 349、配列番号 350、配列番号 351、配列番号 353、配列番号 354、配列番号 356、配列番号 359、配列番号 361、配列番号 362、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 369、配列番号 370、配列番号 372、配列番号 373、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 376、配列番号 377、配列番号 378、配列番号 380、配列番号 381、配列番号 382、配列番号

号 384、配列番号 387、配列番号 388、配列番号 391、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 399、配列番号 400、配列番号 401、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 406、配列番号 408、配列番号 411、配列番号 412、配列番号 413、配列番号 414、配列番号 415、配列番号 416、配列番号 417、配列番号 419、配列番号 420、配列番号 421、配列番号 422、配列番号 423、配列番号 425、配列番号 427、配列番号 428、配列番号 429の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 5 1】

Pfamにより同定されるポリペプチドが、配列番号 219、配列番号 233、配列番号 234、配列番号 255、配列番号 260、配列番号 270、配列番号 272、配列番号 273、配列番号 278、配列番号 279、配列番号 281、配列番号 287、配列番号 289、配列番号 304、配列番号 307、配列番号 319、配列番号 326、配列番号 331、配列番号 334、配列番号 343、配列番号 352、配列番号 357、配列番号 358、配列番号 364、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 368、配列番号 372、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 377、配列番号 378、配列番号 379、配列番号 380、配列番号 381、配列番号 384、配列番号 386、配列番号 389、配列番号 391、配列番号 395、配列番号 397、配列番号 398、配列番号 399、配列番号 401、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 410、配列番号 413、配列番号 414、配列番号 420、配列番号 427、配列番号 428の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 5 2】

ポリペプチドがリポタンパク質であり、ポリペプチドが、配列番号 218、配列番号 223、配列番号 224、配列番号 228、配列番号 236、配列番号 241、配列番号 249、配列番号 277、配列番号 282、配列番号 300、配列番号 349、配列番号 362、配列番号 365、配列番号 383、配列番号 385、配列番号 388の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 5 3】

L P X T Gモチーフを有し、そしてペプチドグリカン層に共有結合しているポリペプチドが、配列番号 228、配列番号 236、配列番号 249、配列番号 385の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 5 4】

ペプチドグリカン結合モチーフを有し、そしてペプチドグリカン層に結合しているポリペプチドが、配列番号 240、配列番号 264、配列番号 325の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 5 5】

シグナル配列およびC - 末端チロシンまたはフェニルアラニンアミノ酸を有するポリペプチドが、配列番号226、配列番号254、配列番号289、配列番号312、配列番号321、配列番号 340、配列番号402の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 5 6】

細胞結合に潜在的に関与するトリペプチド R G D 配列を有するポリペプチドが、配列番号216、配列番号236、配列番号281、配列番号282の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 5 7】

プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるポリペプチドが、配列番号 2

29、 配列番号 231、 配列番号 232、 配列番号 261、 配列番号 279、 配列番号 281、 配列番号 282、 配列番号 284、 配列番号 286、 配列番号 289、 配列番号 306、 配列番号 318、 配列番号 331、 配列番号 343、 配列番号 346、 配列番号 351、 配列番号 366、 配列番号 371、 配列番号 374、 配列番号 377、 配列番号 379、 配列番号 387、 配列番号 391、 配列番号 393、 配列番号 394、 395、 配列番号 397、 配列番号 420 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。

【請求項 5 8】

プロテオミックスにより表面に露出していると同定されると同定されるポリペプチドが、配列番号 5 92 ~ 配列番号 752 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、請求項 4 5 記載のポリペプチド。 10

【請求項 5 9】

配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含む、組換え発現ベクター。

【請求項 6 0】

ポリヌクレオチドが、DNA、染色体 DNA、cDNA、RNA、およびアンチセンス RNA から成る群から選択される、請求項 5 9 記載のベクター。

【請求項 6 1】

ポリヌクレオチドが、異種構造ヌクレオチド配列を含む、請求項 6 0 記載のベクター。 20

【請求項 6 2】

ポリヌクレオチドが、1 個またはそれ以上の遺伝子発現調節エレメントに作用的に結合している、請求項 6 1 記載のベクター。

【請求項 6 3】

ポリヌクレオチドが、配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の 1 つから選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含むポリペプチドをコードする、請求項 6 2 記載のベクター。

【請求項 6 4】

ベクターがプラスミドである、請求項 5 9 記載のベクター。 30

【請求項 6 5】

請求項 5 9 記載のベクターでトランスフェクトされた、形質転換された、または感染した、遺伝子操作された宿主細胞。

【請求項 6 6】

宿主細胞が細菌細胞である、請求項 6 5 記載の宿主細胞。

【請求項 6 7】

ポリヌクレオチドが発現されて、コードされたポリペプチド、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを生じる、請求項 6 6 記載の宿主細胞。

【請求項 6 8】

配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるストレプトコッカス ニューモニアエポリヌクレオチド、そのフラグメント、その縮重変種、または配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の 1 つから選択されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、その生物学的同等物、またはそのフラグメントに特異的な抗体。 40

【請求項 6 9】

抗体が、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、ヒト化、および一本鎖から成る群から選択される、請求項 6 8 記載の抗体。

【請求項 7 0】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 6 9 記載の抗体。

【請求項 7 1】

抗体がヒト化抗体である、請求項 7 0 記載の抗体。

【請求項 7 2】

配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の 1 つまたはそれ以上から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む免疫原性組成物。

【請求項 7 3】

医薬上許容されるキャリアをさらに含む、請求項 7 2 記載の免疫原性組成物。

【請求項 7 4】

1 個またはそれ以上のアジュバントをさらに含む、請求項 7 2 記載の免疫原性組成物。

【請求項 7 5】

さらに以下の (a) ~ (m) のごとく定義される、請求項 7 2 記載の免疫原性組成物：

(a) 0、1、または 2 個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(b) 3 個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(c) 外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(d) 内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(e) Blastp 分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(f) Pfam 分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(g) ストレプトコッカス ニューモニアエリポタンパク質；

(h) L P X T G モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合している；

(i) ペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合している；

(j) シグナル配列および C 末端チロシンまたは C 末端フェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(k) トリペプチド R G D アミノ酸配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(l) プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；および、

(m) プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド。

【請求項 7 6】

ポリペプチドが、異種構造アミノ酸をさらに含む、請求項 7 5 記載の免疫原性組成物。

【請求項 7 7】

ポリペプチドが融合ポリペプチドである、請求項 7 5 記載の免疫原性組成物。

【請求項 7 8】

ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 7 5 記載の免疫原性組成物。

【請求項 7 9】

ポリヌクレオチドが異種構造ヌクレオチドをさらに含む、請求項 7 8 記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 0】

配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを有し、そして発現ベクターに含まれているポリヌクレオチドを含む免疫原性組成物。

【請求項 8 1】

10

20

30

40

50

ベクターがプラスミドDNAである、請求項 8 0 記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 2】

ポリヌクレオチドが異種構造ヌクレオチドを含む、請求項 8 1 記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 3】

ポリヌクレオチドが、1 個またはそれ以上の遺伝子発現調節エレメントに作用的に結合している、請求項 8 2 記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 4】

ポリヌクレオチドがストレプトコッカス ニューモニアエの中和エピトープの発現を指向する、請求項 8 3 記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 5】

1 個またはそれ以上のアジュバントをさらに含む、請求項 8 4 記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 6】

ポリペプチドおよび医薬上許容されるキャリアを含む医薬組成物であって、ポリペプチドが、配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の 1 つから選択されるアミノ酸、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、医薬組成物。

【請求項 8 7】

ポリペプチドが以下の (a) ~ (m) のごとくさらに定義される、請求項 8 6 記載の医薬組成物：

(a) 0、1、または 2 個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(b) 3 個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(c) 外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(d) 内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(e) Blastp 分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(f) Pfam 分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(g) ストレプトコッカス ニューモニアエリボタンパク質；

(h) L P X T G モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合している；

(i) ペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ここで、該ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合している；

(j) シグナル配列および C 末端チロシンまたは C 末端フェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(k) トリペプチド R G D アミノ酸配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；

(l) プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド；および、

(m) プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド。

【請求項 8 8】

ポリペプチドが異種構造アミノ酸をさらに含む、請求項 8 7 記載の医薬組成物。

【請求項 8 9】

ポリペプチドが融合ポリペプチドである、請求項 8 7 記載の医薬組成物。

【請求項 9 0】

ポリヌクレオチドの少なくとも 1 つが、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列、その相補物、その縮重変種、またはそのフラグメントを含む、ポリヌクレオチドのアレイを含む DNA チップ。

【請求項 9 1】

10

20

30

40

50

ポリペプチドの少なくとも１つが、配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の１つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、ポリペプチドのアレイを含むタンパク質チップ。

【請求項 9 2】

ストレプトコッカス ニューモニアエに対する免疫化の方法であって、宿主に、免疫化量のポリペプチドおよび医薬上許容されるキャリア含有免疫原性組成物を投与することを含み、ポリペプチドが配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の１つまたはそれ以上から選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む方法。

【請求項 9 3】

ポリペプチドが融合ポリペプチドである、請求項 9 2 記載の方法。

【請求項 9 4】

アジュバントをさらに含む、請求項 9 2 記載の方法。

【請求項 9 5】

生物学的サンプルにおけるストレプトコッカス ニューモニアエの検出および／または同定のための方法であって、以下の (a) および (b) を含む方法：

(a) 配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の１つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含んでいるポリヌクレオチドのオリゴヌクレオチドプローブとサンプルを、ハイブリダイゼーションを許容する条件下で接触させること；および、

(b) サンプル中のハイブリダイゼーションコンプレックスの存在を検出すること、ここでハイブリダイゼーションコンプレックスはサンプル中のストレプトコッカス ニューモニアエの存在を示す。

【請求項 9 6】

生物学的サンプルにおけるストレプトコッカス ニューモニアエの検出および／または同定のための方法であって、以下の (a) および (b) を含む方法：

(a) 配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の１つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含んでいるポリヌクレオチドのオリゴヌクレオチドプローブとサンプルを、ヌクレオチドおよびポリメラーゼ酵素の存在下、プライマーの拡張を許容する条件下で接触させること；および、

(b) サンプル中のプライマー拡張産物の存在を検出すること、ここで拡張産物はサンプル中のストレプトコッカス ニューモニアエの存在を示す。

【請求項 9 7】

生物学的サンプルにおけるストレプトコッカス ニューモニアエの検出および／または同定のための方法であって、以下の (a) および (b) を含む方法：

(a) 配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の１つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含んでいるポリペプチドに特異的な抗体とサンプルを、免疫複合体の形成を許容する条件下で接触させること；および、

(b) サンプル中の免疫複合体の存在を検出すること、ここで免疫複合体はサンプル中のストレプトコッカス ニューモニアエの存在を示す。

【請求項 9 8】

生物学的サンプルにおけるストレプトコッカス ニューモニアエに対する抗体の検出および／または同定のための方法であって、以下の (a) および (b) を含む方法：

(a) 配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の１つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含んでいるポリペプチドとサンプルを、免疫複合体の形成を許容する条件下で接触させること；および、

(b) サンプル中の免疫複合体の存在を検出すること、ここで免疫複合体はサンプル中のストレプトコッカス ニューモニアエの存在を示す。

10

20

30

40

50

【請求項 99】

配列番号 1 ~ 配列番号 215 または配列番号 431 ~ 配列番号 591 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含んでいる単離ポリヌクレオチドを含んでいるコンテナを含むキット。

【請求項 100】

ポリヌクレオチドがプライマーまたはプローブである、請求項 99 記載のキット。

【請求項 101】

ポリヌクレオチドがプライマーであり、キットがポリメラーゼを含んでいるコンテナをさらに含む、請求項 100 記載のキット。

【請求項 102】

キットが、dNTP を含んでいるコンテナをさらに含む、請求項 99 記載のキット。

【請求項 103】

配列番号 216 ~ 配列番号 430 または配列番号 592 ~ 配列番号 752 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含むポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体を含んでいるコンテナを含むキット。

【請求項 104】

配列番号 216 ~ 配列番号 430 または配列番号 592 ~ 配列番号 752 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを少なくとも含む融合ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体を含んでいるコンテナを含むキット。

【請求項 105】

請求項 66 記載の遺伝子操作された宿主細胞を、ポリペプチドを作製するのに適当な条件下に培養すること、および培養物からポリペプチドを回収することを含む、ポリペプチドを作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、本明細書中出典明示によりその全開示を組み込む、2001年4月16日に
出願された、同時係属の仮出願出願番号第60/283,948号、および本明細書中に
出典明示によりその全開示を組み込む、2001年4月18日に
出願された、仮出願出願番号第60/284,443号からの優先権を主張する。

【0002】

本発明は、ストレプトコッカス ニューモニアエ(*Streptococcus pneumoniae*)ゲノム配
列およびストレプトコッカス ニューモニアエのポリペプチドをコードしているポリヌク
レオチド配列に関する。より詳細には、本発明は、ストレプトコッカス ニューモニアエ
のゲノムヌクレオチド配列内に含まれる新たに同定されたポリヌクレオチドオープンリー
ディングフレームであって、オープンリーディングフレームがストレプトコッカス ニュー
モニアエポリペプチド、好ましくはストレプトコッカス ニューモニアレプトコッカス
における、表面局在性、分泌性、膜結合性、または露出性ポリペプチドをコードするもの
に関する。

【背景技術】

【0003】

ストレプトコッカス ニューモニアエの感染は、世界中の、中耳炎、菌血症、髄膜炎、
敗血症性関節炎、および死に至る肺炎などのヒトの疾患の主要原因である(Butler et al.,
1999; James and Thomas, 2000)。過去10 - 20年に渡り、ストレプトコッカス ニュー
モニアエは、その治療に用いられるほとんどの抗生物質に対して耐性を発達させてきた
。実際、例えば、β - ラクタム、マクロリド、リンコサミド、トリメトプリム - スルファ
メトキサゾール、テトラサイクリンなどの1クラス以上の抗生物質に対して耐性であるこ
とが一般的になり(Tauber, 2000)、これは、ストレプトコッカス ニューモニアレプトコ
ッカス肺炎治療がより困難になっていることを意味する。

【0004】

つまり、世界中での多薬耐性肺炎双球菌株の早期の出現により、免疫化による肺炎双球菌感染予防の重要性が増した(Goldstein and Garau, 1997)。現在入手可能な23 - 価の肺炎双球菌莢膜多糖類ワクチンは、肺炎双球菌感染のリスクのある2つの主な個体群、2歳未満の子供または免疫抑制患者において有効ではない(Douglas et al., 1983)。アメリカ合衆国で近年認可された7価の肺炎双球菌多糖類タンパク質コンジュゲートワクチンは、ワクチン血清型により引き起こされる全身性肺炎双球菌疾患および交差反応性莢膜血清型に対して、幼児および子供に非常に有効であることが示された(Shinefield and Black, 2000)。7つの莢膜型は、合衆国の子供の侵入性疾患隔離集団の80%以上を防御するが、世界の他の領域の疾患隔離集団の57 - 60%のみを防御する(Hausdorff et al., 2000)。それゆえ、肺炎双球菌の血清型に原因のある疾患のほとんどまたは全てを防御するコストレプトコッカス ニューモニア的に有効なワクチンが、差し迫って必要とされている。これは、更なる血清型を防御しているコンジュゲートを追加することにより達成することができるが、全肺炎双球菌血清型に保存されており、そして肺炎双球菌疾患に対して有効な非莢膜ワクチン抗原を見出す努力がなされ続けている。

10

20

30

40

50

【0005】

ストレプトコッカス ニューモニアエのタンパク質抗原は、肺炎双球菌感染の動物モデルにおける強い効能が評価されている。最も一般的に研究されている候補抗原のいくつかには、PspAタンパク質、PsaAリポタンパク質、およびCbpAタンパク質が含まれる。多くの研究により、PspAタンパク質が毒性因子であることが示されているが(Crain et al., 1990; McDaniel et al., 1984)、それは、肺炎双球菌株間で抗原性が変化する。近年の研究により、組換えPspA変種のいくつかの抗原保存領域がヒトの成人において交差反応抗体を誘導し得ることが示されている(Nabors et al., 2000)。他のグラム陽性アドヘジンと類似する37kDのリポタンパク質であるPsaAは、肺炎双球菌におけるMn⁺輸送に関与し(Sampson et al., 1994; Dintilhac et al., 1997)、全身性疾患のマウスモデルにおいて防御作用があることが示されている(Talkington et al., 1996)。表面露出コリン結合タンパク質CbpAは、肺炎双球菌のマウスモデルにおいて抗原的に保存されており、そして防御作用がある(Rosenow et al., 1997)。鼻咽腔のコロニー化が耳の疾患の必要条件であり、肺炎双球菌タンパク質および適当な粘膜アジュバントでのマウスの鼻腔内免疫化を用いて、粘膜抗体反応、従って、候補抗原の有効性が高められている(Yamamoto et al., 1998; Briles et al., 2000)。

【0006】

PspAタンパク質、PsaAリポタンパク質、およびCbpAタンパク質抗原が見込みがあると考えられるが、全てのストレプトコッカス ニューモニアエ血清型に有効なタンパク質抗原は一つもないと考えられる。それゆえ、研究機関は、抗原的に保存されており、コロニー化を減じる(中耳炎に対して重要である)、全身性疾患に対して防御作用のある、またはその両方の作用のある抗体を誘発する更なる候補を探し続けている。従って、ストレプトコッカス ニューモニアエの疾患を引き起こす血清型のほとんどまたは全てを防御するコストレプトコッカス ニューモニア的に有効なワクチンおよびストレプトコッカス ニューモニアエ感染の診断法が、差し迫って必要とされている。ストレプトコッカス ニューモニアエ感染の遺伝子および分子レベルの更なる理解により、ストレプトコッカス ニューモニアエに特異的な予防的処置、治療的処置、新規診断およびワクチン戦略の更なる開発のための基礎が提供される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、広く、ストレプトコッカス ニューモニアエゲノム配列に関する。より詳細には、本発明は、ストレプトコッカス ニューモニアエのゲノムヌクレオチド配列内に含まれる新規に同定されたポリヌクレオチドオープンリーディングフレームであって、オープンリーディングフレームが、ストレプトコッカス ニューモニアエにおいて、表面に局在する、膜に結合する、分泌される、または露出するポリペプチドをコードするものに関

する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

つまり、所定の態様において、本発明は、ストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードするストレプトコッカス ニューモニアエオープンリーディングフレームに関する。好ましい具体例において、これらのストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドは、抗原ポリペプチドである。以下、定義するように、ストレプトコッカス ニューモニアエ抗原ポリペプチド、抗原、または免疫原は、抗体と免疫反応性があるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドであり、または免疫反応を誘発するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドである。他の具体例では、本発明は、抗原ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに関する。他の態様において、本発明は、オープンリーディングフレーム配列を含むベクター、およびこれらのベクターで形質転換、トランスフェクト、または感染した細胞または動物に関する。本発明はまた、これらの核酸またはポリペプチドを検出する方法、およびストレプトコッカス ニューモニアエ感染を診断するためのキットに関する。本発明はさらに、細菌感染、特にストレプトコッカス ニューモニアエでの感染の予防および/または治療のための医薬組成物、特に、免疫原性組成物にさらに関する。好ましい具体例において、免疫原性組成物は、ストレプトコッカス ニューモニアエにより誘発もしくは悪化される全身性疾患の治療または予防に用いられる。他の好ましい具体例において、免疫原性組成物は、ストレプトコッカス ニューモニアエにより誘発または悪化される非全身性疾患、特に中耳炎の治療または予防に用いられる。

10

20

【0009】

特定の具体例において、本発明の単離ポリヌクレオチドは、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の一つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチドに関する。以下に定義するように、「縮重変種」は、配列番号1～配列番号215、および配列番号431～配列番号591に示すヌクレオチド配列（およびそのフラグメント）と遺伝子コードの縮重により異なるが、配列番号1～配列番号215および配列番号431から配列番号591に示すヌクレオチド配列によりコードされるものと同じストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（すなわち、配列番号216～配列番号430、および配列番号592～配列番号752）として定義される。

30

【0010】

他の具体例において、ポリヌクレオチドは、配列番号1～配列番号215、または配列番号431から配列番号591の一つから選択されるヌクレオチド配列の相補物、その縮重変種、またはそのフラグメントである。さらに他の具体例において、ポリヌクレオチドは、DNA、染色体DNA、cDNAおよびRNAから成る群から選択され、およびさらに異種ヌクレオチドから成ってよい。

【0011】

他の具体例において、本発明は、配列番号1～配列番号215、または配列番号431～配列番号591の一つから選択されるヌクレオチド配列、その相補物、その縮重変種、またはそのフラグメントに、高ストレプトコッカス ニューモニアリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする単離ポリヌクレオチドを含む。さらに他の具体例において、ポリヌクレオチドは中間のストレプトコッカス ニューモニアリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズする。

40

【0012】

好ましい具体例において、ストレプトコッカス ニューモニアエゲノム配列の単離ポリヌクレオチドは、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の一つから選択されるヌクレオチド配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含み、0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリ

50

ペプチド、3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Blastp分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Pfam分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ストレプトコッカス ニューモニアレプトコッカス ニューモニアリボタンパク質、LPXTGモチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド（ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合している）、ポペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド（ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合している）、シグナル配列およびC-末端チロシンまたはフェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、トリペプチドRGD配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより膜に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、およびプロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドから選択されるポリペプチド、その生物学的同等物、またはそのフラグメントをコードする。

【0013】

他の具体例において、単離ポリヌクレオチドは、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の一つから選択されるヌクレオチド配列、そのフラグメント、またはその縮重変種を含み、0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Blastp分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Pfam分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ストレプトコッカス ニューモニアレプトコッカス ニューモニアリボタンパク質、LPXTGモチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド（ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合している）、ポペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド（ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合している）、シグナル配列およびC-末端チロシンまたはフェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、トリペプチドRGD配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより膜に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、およびプロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドから選択されるポリペプチド、その生物学的同等物、またはそのフラグメントをコードするストレプトコッカス ニューモニアエゲノム配列に対する相補物である。所定の具体例において、ポリヌクレオチドはDNA、染色体DNA、cDNA、およびRNAから成る群から選択され、さらに、異種構造ヌクレオチドを含んでよい。さらに他の具体例で、ポリヌクレオチドは融合ポリペプチドをコードする。

【0014】

好ましい具体例において、0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号39、配列番号41、配列番号42、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号58、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号72、配列

10

20

30

40

50

番号 73、配列番号 74、配列番号 78、配列番号 79、配列番号 81、配列番号 83、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 89、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 95、配列番号 96、配列番号 97、配列番号 100、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 106、配列番号 109、配列番号 110、配列番号 111、配列番号 113、配列番号 116、配列番号 121、配列番号 122、配列番号 123、配列番号 125、配列番号 126、配列番号 127、配列番号 128、配列番号 131、配列番号 132、配列番号 134、配列番号 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 141、配列番号 142、配列番号 143、配列番号 144、配列番号 147、配列番号 148、配列番号 149、配列番号 150、配列番号 155、配列番号 156、配列番号 158、配列番号 161、配列番号 162、配列番号 165、配列番号 170、配列番号 171、配列番号 172、配列番号 174、配列番号 176、配列番号 179、配列番号 183、配列番号 185、配列番号 187、配列番号 192、配列番号 195、配列番号 196、配列番号 197、配列番号 199、配列番号 200、配列番号 201、配列番号 202、配列番号 204、配列番号 205、配列番号 207、配列番号 209、および配列番号 210 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

10

【0015】

他の好ましい具体例において、3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 52、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 59、配列番号 65、配列番号 71、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 80、配列番号 82、配列番号 84、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 90、配列番号 93、配列番号 94、配列番号 98、配列番号 99、配列番号 101、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 107、配列番号 108、配列番号 112、配列番号 114、配列番号 115、配列番号 117、配列番号 118、配列番号 119、配列番号 120、配列番号 124、配列番号 129、配列番号 130、配列番号 133、配列番号 135、配列番号 139、配列番号 140、配列番号 145、配列番号 146、配列番号 151、配列番号 152、配列番号 153、配列番号 154、配列番号 157、配列番号 159、配列番号 160、配列番号 163、配列番号 164、配列番号 166、配列番号 167、配列番号 168、配列番号 169、配列番号 173、配列番号 175、配列番号 177、配列番号 178、配列番号 180、配列番号 181、配列番号 182、配列番号 184、配列番号 186、配列番号 188、配列番号 189、配列番号 190、配列番号 191、配列番号 193、配列番号 194、配列番号 198、配列番号 203、配列番号 206、配列番号 208、配列番号 211、配列番号 212、配列番号 213、配列番号 214、および配列番号 215 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

20

30

【0016】

他の好ましい具体例において、外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 3、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 23、配列番号 39、配列番号 50、配列番号 62、配列番号 67、配列番号 78、配列番号 85、配列番号 125、配列番号 134、配列番号 147、配列番号 165、配列番号 172、および配列番号 179 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

40

【0017】

他の好ましい具体例において、内膜ドメインを有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配

50

列番号38、配列番号40、配列番号43、配列番号44、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号56、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号65、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号90、配列番号91、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号135、配列番号136、配列番号139、配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号154、配列番号156、配列番号157、配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号166、配列番号167、配列番号168、配列番号169、配列番号170、配列番号173、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号184、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号192、配列番号193、配列番号194、配列番号195、配列番号198、配列番号200、配列番号203、配列番号206、配列番号208、配列番号209、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214、および配列番号215の1つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

10

20

30

40

50

【0018】

さらに他の好ましい具体例において、Blastp分析により同定されるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号7、配列番号10、配列番号12、配列番号16、配列番号20、配列番号24、配列番号27、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号48、配列番号51、配列番号53、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号65、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号87、配列番号88、配列番号90、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号112、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号118、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号138、配列番号139、配列番号141、配列番号144、配列番号146、配列番号147、配列番号151、配列番号152、配列番号154、配列番号155、配列番号157、配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号161、配列番号162、配列番号163、配列番号165、配列番号166、配列番号167、配列番号169、配列番号172、配列番号173、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号188、配列番号189、配列番号191、配列番号193、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号

号 2 0 8、配列番号 2 1 0、配列番号 2 1 2、配列番号 2 1 3、および配列番号 2 1 4 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 9 】

いっそうさらに好ましい具体例において、Pfam分析により同定されるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 4、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 4 1、配列番号 4 5、配列番号 5 5、配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 6、配列番号 7 2、配列番号 7 4、配列番号 8 9、配列番号 9 2、配列番号 1 0 4、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 8、配列番号 1 3 7、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 9、配列番号 1 5 1、配列番号 1 5 2、配列番号 1 5 3、配列番号 1 5 7、配列番号 1 5 9、配列番号 1 6 0、配列番号 1 6 2、配列番号 1 6 3、配列番号 1 6 4、配列番号 1 6 5、配列番号 1 6 6、配列番号 1 6 9、配列番号 1 7 1、配列番号 1 7 4、配列番号 1 7 6、配列番号 1 8 0、配列番号 1 8 2、配列番号 1 8 3、配列番号 1 8 4、配列番号 1 8 6、配列番号 1 8 8、配列番号 1 8 9、配列番号 1 9 5、配列番号 1 9 8、配列番号 1 9 9、配列番号 2 0 5、配列番号 2 1 2、および配列番号 2 1 3 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 2 0 】

他の好ましい具体例において、リボタンパク質をコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 3、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 3、配列番号 2 1、配列番号 2 6、配列番号 3 4、配列番号 6 2、配列番号 6 7、配列番号 8 5、配列番号 1 3 4、配列番号 1 4 7、配列番号 1 5 0、配列番号 1 6 8、配列番号 1 7 0、および配列番号 1 7 3 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

20

【 0 0 2 1 】

他の好ましい具体例において、LPXTGモチーフを有し、ペプチドグリカン層に共有結合しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 1 3、配列番号 2 1、配列番号 3 4、および配列番号 1 7 0 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含み；または、ペプチドグリカン結合モチーフを有し、ペプチドグリカン層に結合しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 2 5、配列番号 4 9、および配列番号 1 1 0 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 2 2 】

他の好ましい具体例において、シグナル配列および C - 末端チロシンまたはフェニルアラミンアミノ酸を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 1 1、配列番号 3 9、配列番号 7 3、配列番号 9 7、配列番号 1 0 6、配列番号 1 2 5、および配列番号 1 8 7 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

30

【 0 0 2 3 】

さらに他の好ましい具体例において、細胞結合に潜在的に関与するトリペプチド R G D 配列を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 1、配列番号 2 1、配列番号 6 6、および配列番号 6 7 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 2 4 】

他の好ましい具体例において、プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 4 6、配列番号 6 4、配列番号 6 6、配列番号 6 7、配列番号 6 9、配列番号 7 1、配列番号 7 4、配列番号 9 1、配列番号 1 0 3、配列番号 1 1 6、配列番号 1 2 8、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 6、配列番号 1 5 1、配列番号 1 5 6、配列番号 1 5 9、配列番号 1 6 2、配列番号 1 6 4、配列番号 1 7 2、配列番号 1 7 6、配列番号 1 7 8、配列番号 1 7 9、配列番号 1 8 0、配列番号 1 8 2、および配列番号 2 0 5 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

40

【 0 0 2 5 】

さらに他の具体例において、プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1

50

つから選択されるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 2 6 】

所定の態様において、本発明はストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドに関する。より詳細には、本発明は、ストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、より好ましくはストレプトコッカス ニューモニアエポリヌクレオチドオープンリーディングフレームによりコードされる抗原性ポリペプチドに関する。つまり、所定の具体例において、単離ポリペプチドは、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチドによりコードされる。好ましい具体例において、前記ポリヌクレオチドの 1 つによりコードされる単離ポリペプチドは、配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の 1 つから選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。他の具体例において、ポリペプチドは融合ポリペプチドである。好ましい具体例において、ポリペプチドは、ストレプトコッカス ニューモニアエで感染した個人の血清反応陽性の血清と免疫反応する。

10

【 0 0 2 7 】

好ましい具体例において、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチドによりコードされる単離ポリペプチドは、さらに、0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Blastp分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Pfam分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ストレプトコッカス ニューモニアエリポタンパク質、LPXTGモチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド(ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合する)、ペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド(ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合する)、シグナル配列およびC末端チロシンまたはフェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、トリペプチド R G D 配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドとさらに定義され、ここで、これらの群のそれぞれは、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 内に前記の O R F のセットを有する。

20

30

【 0 0 2 8 】

特に好ましい具体例において、単離ポリペプチドは、配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の 1 つから選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。他の具体例において、ポリペプチドは融合ポリペプチドである。特に好ましい具体では、ポリペプチドはストレプトコッカス ニューモニアエで感染した個人の血清反応陽性の血清と免疫反応する。さらに他の好ましい具体では、ポリペプチドは、0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Blastp分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Pfam分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ストレ

40

50

プトコッカス ニューモニアエリポタンパク質、LPXTGモチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド(ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合する)、ペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド(ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合する)、シグナル配列およびC末端チロシンまたはフェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、トリペプチドRGD配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドとさらに定義され、ここで、これらの群のそれぞれは、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591内に前記のORFのセットを有する。

【0029】

好ましい具体例では、0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するポリペプチドは、配列番号216、配列番号218、配列番号219、配列番号222、配列番号223、配列番号224、配列番号226、配列番号228、配列番号231、配列番号232、配列番号233、配列番号234、配列番号237、配列番号238、配列番号239、配列番号240、配列番号243、配列番号244、配列番号247、配列番号249、配列番号251、配列番号254、配列番号256、配列番号257、配列番号260、配列番号262、配列番号264、配列番号265、配列番号266、配列番号268、配列番号270、配列番号272、配列番号273、配列番号275、配列番号276、配列番号277、配列番号278、配列番号279、配列番号281、配列番号282、配列番号283、配列番号284、配列番号285、配列番号286、配列番号287、配列番号289、配列番号293、配列番号294、配列番号296、配列番号298、配列番号300、配列番号301、配列番号304、配列番号306、配列番号307、配列番号310、配列番号311、配列番号312、配列番号315、配列番号319、配列番号320、配列番号321、配列番号324、配列番号325、配列番号326、配列番号328、配列番号331、配列番号336、配列番号337、配列番号338、配列番号340、配列番号341、配列番号342、配列番号343、配列番号346、配列番号347、配列番号349、配列番号351、配列番号352、配列番号353、配列番号356、配列番号357、配列番号358、配列番号359、配列番号362、配列番号363、配列番号364、配列番号365、配列番号370、配列番号371、配列番号373、配列番号376、配列番号377、配列番号380、配列番号385、配列番号386、配列番号387、配列番号389、配列番号391、配列番号394、配列番号398、配列番号400、配列番号402、配列番号407、配列番号410、配列番号411、配列番号412、配列番号414、配列番号415、配列番号416、配列番号417、配列番号419、配列番号420、配列番号422、配列番号424、配列番号425の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

【0030】

他の好ましい具体例において、3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するポリペプチドは、配列番号217、配列番号220、配列番号221、配列番号225、配列番号227、配列番号229、配列番号230、配列番号235、配列番号236、配列番号241、配列番号242、配列番号245、配列番号246、配列番号248、配列番号250、配列番号252、配列番号253、配列番号255、配列番号258、配列番号259、配列番号261、配列番号263、配列番号267、配列番号269、配列番号271、配列番号274、配列番号280、配列番号286、配列番号290、配列番号291、配列番号292、配列番号295、配列番号297、配列番号299、配列番号302、配列番号303、配列番号305、配列番号308、配列番号309、配列番号313、配列番号314、配列番号316、配列番号317、配列番号318、配列番号322、配列番号323、配列番号327、配列番号329、配列番号330、配列番号332、配列番号333、配列番号334、配列番号

10

20

30

40

50

335、配列番号 339、配列番号 344、配列番号 345、配列番号 348、配列番号 350、配列番号 354、配列番号 355、配列番号 360、配列番号 361、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 368、配列番号 369、配列番号 372、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 378、配列番号 379、配列番号 381、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 388、配列番号 390、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 399、配列番号 401、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 405、配列番号 406、配列番号 408、配列番号 409、配列番号 413、配列番号 418、配列番号 421、配列番号 423、配列番号 426、配列番号 427、配列番号 428、配列番号 429、配列番号 430の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

10

【0031】

さらに他の好ましい具体例において、外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するポリペプチドは、配列番号 218、配列番号 223、配列番号 224、配列番号 238、配列番号 254、配列番号 265、配列番号 277、配列番号 282、配列番号 293、配列番号 300、配列番号 340、配列番号 349、配列番号 362、配列番号 380、配列番号 387、配列番号 394の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

【0032】

さらに他の好ましい具体例において、内膜ドメインを有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、配列番号 217、配列番号 220、配列番号 221、配列番号 222、配列番号 225、配列番号 226、配列番号 227、配列番号 228、配列番号 229、配列番号 230、配列番号 231、配列番号 232、配列番号 234、配列番号 235、配列番号 236、配列番号 237、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、配列番号 252、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 258、配列番号 259、配列番号 261、配列番号 262、配列番号 263、配列番号 266、配列番号 267、配列番号 268、配列番号 269、配列番号 271、配列番号 274、配列番号 275、配列番号 276、配列番号 280、配列番号 283、配列番号 284、配列番号 285、配列番号 286、配列番号 288、配列番号 290、配列番号 291、配列番号 292、配列番号 294、配列番号 295、配列番号 296、配列番号 297、配列番号 298、配列番号 299、配列番号 301、配列番号 302、配列番号 303、配列番号 305、配列番号 306、配列番号 308、配列番号 309、配列番号 310、配列番号 311、配列番号 312、配列番号 313、配列番号 314、配列番号 315、配列番号 316、配列番号 317、配列番号 318、配列番号 320、配列番号 321、配列番号 322、配列番号 323、配列番号 324、配列番号 327、配列番号 328、配列番号 329、配列番号 330、配列番号 332、配列番号 333、配列番号 334、配列番号 335、配列番号 336、配列番号 337、配列番号 338、配列番号 339、配列番号 341、配列番号 342、配列番号 343、配列番号 344、配列番号 345、配列番号 346、配列番号 347、配列番号 348、配列番号 350、配列番号 351、配列番号 354、配列番号 355、配列番号 356、配列番号 357、配列番号 359、配列番号 360、配列番号 361、配列番号 362、配列番号 365、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 368、配列番号 369、配列番号 371、配列番号 372、配列番号 373、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 377、配列番号 378、配列番号 379、配列番号 381、配列番号 382、配列番号 383、配列番号 384、配列番号 385、配列番号 388、配列番号 390、配列番号 391、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 399、配列番号 401、配列番号 402、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 405、配列番号 406、配列番号 407、配列番号 408、配列番号 409、配列番号 410、配列番号 413、配列番号 415、配列番号 418、配列番号 421、配列番号 423、配列番号 424、配列番号 426、配列番号 427、配列番号 428、配列番号 429、配列番号 430の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

さらに他の好ましい具体例において、Blastp分析により同定されるポリペプチドは、配列番号 216、配列番号 217、配列番号 222、配列番号 225、配列番号 227、配列番号 231、配列番号 235、配列番号 239、配列番号 242、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 257、配列番号 258、配列番号 259、配列番号 263、配列番号 266、配列番号 268、配列番号 269、配列番号 275、配列番号 276、配列番号 280、配列番号 282、配列番号 283、配列番号 284、配列番号 285、配列番号 286、配列番号 290、配列番号 291、配列番号 292、配列番号 293、配列番号 294、配列番号 295、配列番号 302、配列番号 303、配列番号 305、配列番号 309、配列番号 310、配列番号 311、配列番号 313、配列番号 315、配列番号 318、配列番号 320、配列番号 322、配列番号 323、配列番号 324、配列番号 327、配列番号 328、配列番号 330、配列番号 332、配列番号 333、配列番号 337、配列番号 338、配列番号 339、配列番号 342、配列番号 344、配列番号 346、配列番号 347、配列番号 348、配列番号 349、配列番号 350、配列番号 351、配列番号 353、配列番号 354、配列番号 356、配列番号 359、配列番号 361、配列番号 362、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 369、配列番号 370、配列番号 372、配列番号 373、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 376、配列番号 377、配列番号 378、配列番号 380、配列番号 381、配列番号 382、配列番号 384、配列番号 387、配列番号 388、配列番号 391、配列番号 392、配列番号 393、配列番号 395、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 399、配列番号 400、配列番号 401、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 406、配列番号 408、配列番号 411、配列番号 412、配列番号 413、配列番号 414、配列番号 415、配列番号 416、配列番号 417、配列番号 419、配列番号 420、配列番号 421、配列番号 422、配列番号 423、配列番号 425、配列番号 427、配列番号 428、配列番号 429の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

【 0 0 3 4 】

他の好ましい具体例において、Pfam分析により同定されるポリペプチドは、配列番号 219、配列番号 233、配列番号 234、配列番号 255、配列番号 260、配列番号 270、配列番号 272、配列番号 273、配列番号 278、配列番号 279、配列番号 281、配列番号 287、配列番号 289、配列番号 304、配列番号 307、配列番号 319、配列番号 326、配列番号 331、配列番号 334、配列番号 343、配列番号 352、配列番号 357、配列番号 358、配列番号 364、配列番号 366、配列番号 367、配列番号 368、配列番号 372、配列番号 374、配列番号 375、配列番号 377、配列番号 378、配列番号 379、配列番号 380、配列番号 381、配列番号 384、配列番号 386、配列番号 389、配列番号 391、配列番号 395、配列番号 397、配列番号 398、配列番号 399、配列番号 401、配列番号 403、配列番号 404、配列番号 410、配列番号 413、配列番号 414、配列番号 420、配列番号 427、配列番号 428の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

【 0 0 3 5 】

1 の好ましい具体例において、ポリペプチドはリボタンパク質であり、配列番号 218、配列番号 223、配列番号 224、配列番号 228、配列番号 236、配列番号 241、配列番号 249、配列番号 277、配列番号 282、配列番号 300、配列番号 349、配列番号 362、配列番号 365、配列番号 383、配列番号 385、配列番号 388の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

所定の他の好ましい具体例において、LPXTGモチーフを有し、ペプチドグリカン層に共有結合するポリペプチドは、配列番号 228、配列番号 236、配列番号 249、SEQ、配列番号 385の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含み；または、ペプチドグリカン結合モチーフを有し、ペプチドグリカン層に結合しているポリペプチドは、配列番号 240、配列番号 264、配列番号 325の 1 つから選

択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

【0036】

他の好ましい具体例において、シグナル配列およびC末端チロシンまたはフェニルアラニンアミノ酸を有するポリペプチドは、配列番号226、配列番号254、配列番号289、配列番号312、配列番号321、配列番号340、配列番号402の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

【0037】

さらの他の好ましい具体例において、細胞結合に潜在的に関与するトリペプチドRGD配列を有するポリペプチドは、配列番号216、配列番号236、配列番号281、配列番号282の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

10

さらに他の具体例において、プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるポリペプチドは、配列番号229、配列番号231、配列番号232、配列番号261、配列番号279、配列番号281、配列番号282、配列番号284、配列番号286、配列番号289、配列番号306、配列番号318、配列番号331、配列番号343、配列番号346、配列番号351、配列番号366、配列番号371、配列番号374、配列番号377、配列番号379、配列番号387、配列番号391、配列番号393、配列番号394、配列番号395、配列番号397、配列番号420の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

【0038】

さらに他の具体例において、プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるポリペプチドは、配列番号592～配列番号752の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む。

20

【0039】

本発明の他の態様において、ポリペプチドは組換え発現システムにて発現および精製される。つまり、所定の具体例において、本発明により、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種またはそのフラグメントを含む組換え発現ベクターが提供される。所定の他の具体例において、ポリヌクレオチドは、DNA、染色体DNA、cDNA、RNA、およびアンチセンスRNAから成る群から選択される。他の具体例において、ベクター内に含まれるポリヌクレオチドは異種構造ヌクレオチド配列を含む。他の具体例において、ポリヌクレオチドは、1またはそれ以上の遺伝子発現調節エレメントと作用的に結合している。さらに他の具体例において、ポリヌクレオチドは、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つから選択されるアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含むポリペプチドをコードする。好ましい具体例において、ベクターはプラスミドである。

30

【0040】

本発明の他の態様において、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種またはそのフラグメントを含む組換え発現ベクターでトランスフェクトした、形質転換したまたは感染した、遺伝子操作された宿主細胞が提供される。好ましい具体例において、宿主細胞は細菌細胞である。さらなる具体例では、ポリヌクレオチドはコードされたポリペプチド、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを製造するのに適した条件下に発現され、次いで回収される。

40

【0041】

他の具体例において、本発明により、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つから選択されるストレプトコッカスニューモニアエポリヌクレオチド、そのフラグメント、その縮重変種に特異的な抗体、または、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つから選択されるストレプト

50

コッカス ニューモニアエポリペプチド、その生物学的同等物、またはそのフラグメントに特異的な抗体が提供される。所定の具体例において、抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、ヒト化、および一本鎖から成る群から選択される。好ましい具体例では、抗体はモノクローナルである。他の好ましい具体例では、抗体はヒト化されている。

【0042】

本発明によりさらに、細菌感染の予防および/または治療のための医薬組成物、特に免疫原性組成物が提供される。つまり、1つの具体例において、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つまたはそれ以上から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む免疫原性組成物が提供される。所定の具体例において、組成物は、医薬上許容されるキャリアをさらに含む。さらに他の具体例において、免疫原性組成物は1またはそれ以上のアジュバントをさらに含む。好ましい具体例において、免疫原性組成物のポリペプチドは、0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Blastp分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Pfam分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ストレプトコッカス ニューモニアエリボタンパク質、LPXTGモチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド(ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合する)、ペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド(ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合する)、シグナル配列およびC末端チロシンまたはフェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、トリペプチドRGD配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドとさらに定義される。所定の他の具体例において、免疫原性組成物は、異種構造アミノ酸をさらに含む。特定の具体例において、ポリペプチドは融合ポリペプチドである。

【0043】

さらなる具体例において、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つまたはそれ以上から選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを有し、発現ベクター中に含まれるポリヌクレオチドを含む免疫原性組成物が提供される。好ましい具体例において、ベクターはプラスミドDNAである。他の具体例において、ポリヌクレオチドは異種構造ヌクレオチドを含む。さらに他の具体例において、ポリヌクレオチドは1またはそれ以上の調節エレメントと作用的に結合している。さらに他の具体例では、ポリヌクレオチドはストレプトコッカス ニューモニアエの中和エピトープの発現を指向する。好ましい具体例において、免疫原性組成物は、1またはそれ以上のアジュバントをさらに含む。

【0044】

ポリペプチドおよび医薬上許容されるキャリア、ここでポリペプチドは配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つから選択されるアミノ酸、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、を含む医薬組成物も提供される。好ましい具体例において、ポリペプチドは、0、1、または2個の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、3個またはそれ以上の膜貫通ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、外膜ドメインまたは細胞周辺ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、内膜ドメインを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Blastp分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、Pfam分析により同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、ストレプトコッカス ニューモニアエリ

ボタンパク質、LPXTGモチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド(ポリペプチドはペプチドグリカン層に共有結合する)、ペプチドグリカン結合モチーフを有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド(ポリペプチドはペプチドグリカン層に結合する)、シグナル配列およびC末端チロシンまたはフェニルアラニンアミノ酸を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、トリペプチドRGD配列を有するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより表面に露出していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド、プロテオミックスにより膜に結合していると同定されるストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドとさらに定義される。所定の具体例において、ポリペプチドは異種構造アミノ酸をさらに含む。さらに他の具体例では、ポリペプチドは融合ポリペプチドである。

10

【0045】

他の具体例において、1またはそれ以上のポリペプチドおよび医薬上許容されるキャリア、ここでポリペプチドは配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1またはそれ以上から選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含む、を含む免疫原性組成物の免疫化量を宿主に投与することを含む、ストレプトコッカス ニューモニアエに対する免疫化法が提供される。所定の具体例において、ポリペプチドは融合ポリペプチドである。他の具体例において、方法は、アジュバントを投与することをさらに含む。

【0046】

本発明の他の具体例により、ポリヌクレオチドのアレイを含むDNAチップであって、ポリヌクレオチドの少なくとも1つが配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つから選択されるヌクレオチド配列、その相補物、その縮重変種、またはそのフラグメントを含むものが提供される。

20

ポリヌクレオチドのアレイを含むタンパク質チップであって、ポリペプチドの少なくとも1つが配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含むものが提供される。

【0047】

本発明により、ストレプトコッカス ニューモニアエポリヌクレオチドおよびポリペプチドを検出する方法ならびにストレプトコッカス ニューモニアエの感染を診断するためのキットがさらに提供される。

30

他の具体例により、生物サンプルにおけるストレプトコッカス ニューモニアエの検出および/または同定のための方法であって、サンプルを、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチドのオリゴヌクレオチドプローブと、ハイブリダイゼーションを許容する条件下に接触させること、次いでサンプル中のハイブリダイゼーション複合体の存在を検出することを含み、ハイブリダイゼーション複合体がストレプトコッカス ニューモニアエのサンプル中での存在を示す方法が提供される。

【0048】

さらに他の具体例により、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含む生物サンプルにおける、ヌクレオチドおよびポリメラーゼ酵素の存在下、プライマー拡張を許容する条件下でのストレプトコッカス ニューモニアエの検出および/または同定のための方法であって、サンプル中のプライマー拡張産物の存在を検出することを含み、拡張産物がサンプル中でのストレプトコッカス ニューモニアエの存在を示す方法が提供される。

40

【0049】

さらなる具体例により、生物サンプルにおけるストレプトコッカス ニューモニアエの検出および/または同定のための方法であって、サンプルを、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つから選択されるアミノ酸配列、その

50

生物学的同等物、またはそのフラグメントを含むポリペプチドに特異的な抗体と、免疫複合体の形成を許容する条件下に接触させ、次いでサンプル中の免疫複合体の存在を検出することを含み、免疫複合体がストレプトコッカス ニューモニアエのサンプル中での存在を示す方法が提供される。

【 0 0 5 0 】

所定の具体例により、生物サンプルにおけるストレプトコッカス ニューモニアエの抗体の検出および / または同定のための方法であって、サンプルを、配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含むポリペプチドと、免疫複合体の形成を許容する条件下に接触させ、次いでサンプル中の免疫複合体の存在を検出することを含み、免疫複合体がストレプトコッカス ニューモニアエのサンプル中での存在を示す方法が提供される。

10

【 0 0 5 1 】

本発明の他の具体例により、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含む単離ポリヌクレオチドを含む容器を含むキットが提供される。好ましい具体例において、ポリヌクレオチドはプライマーまたはプローブであり、ポリヌクレオチドがプライマーである場合、キットはポリメラーゼを含む容器をさらに含む。他の具体例において、キットはさらに d N T P を含む容器を含む。

20

【 0 0 5 2 】

配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを含むポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体を含む容器を含むキットがさらに提供される。

配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを少なくとも含む融合ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体を含む容器を含むキットがさらに提供される。

【 0 0 5 3 】

本発明の好ましい具体例において、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはそのフラグメントを含む組換え発現ベクターで、配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 のポリペプチドの 1 つを製造し、そして該ポリペプチドを回収するのに適当な条件下で、トランスフェクトし、形質転換し、または感染した遺伝子操作された宿主細胞が提供される。

30

本発明の他の態様および利点は、以下の詳細な説明から、その好ましい具体例から、および請求の範囲から明らかであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 5 4 】

以下に記載する本発明は、ストレプトコッカス ニューモニアエの血清型により引き起こされる疾患のほとんどまたは全てを効果的に予防または治療するストレプトコッカス ニューモニアエ免疫原性組成物の必要性に対するものである。本発明はさらに、ストレプトコッカス ニューモニアエ感染を診断する方法の必要性に対するものである。本発明により、抗原性ポリペプチドをコードする、新規なストレプトコッカス ニューモニアエオープンリーディングフレーム（以下 O R F とよぶ）が同定された。より詳細には、新規に同定された O R F は、ストレプトコッカス ニューモニアエ上にて分泌され、露出し、膜結合し、または表面に位置し、こうして免疫原性組成物において潜在的な抗原性ポリペプチドとして役立つポリペプチドをコードする。つまり、所定の具体例において、本発明は、表面に位置し、露出し、分泌され、または膜結合するポリペプチド抗原をコードしているストレプトコッカス ニューモニアエポリヌクレオチド O R F を包含する。本発明はそれゆえ、他の具体例において、ストレプトコッカス ニューモ

40

50

ニアエORFによりコードされるこれらのポリペプチド、好ましくは抗原性ポリペプチドを包含する。

【0055】

他の具体例において、本発明は、ORF配列を含むベクター、およびこれらのベクターで形質転換した、トランスフェクトした、または感染した宿主細胞または動物を包含する。本発明はさらに、ストレプトコッカス ニューモニアエORFの転写遺伝子産物、例えば、mRNA、アンチセンスRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびリボザイム分子など、微生物の増殖を阻害または調整するのに用いることができるものを包含する。本発明はさらに、これらの核酸またはポリペプチドを検出する方法、およびストレプトコッカス ニューモニアエ感染を診断するためのキットに関する。本発明はさらに、細菌感染、特に、ストレプトコッカス ニューモニアエにより引き起こされるもしくはそれにより悪化される感染の予防および/または治療のための、医薬組成物、特に免疫原性組成物に関する。特定の具体例において、免疫原性組成物は、ストレプトコッカス ニューモニアエにより誘導されるもしくはそれにより悪化される全身性疾患の治療または予防のために用いられる。他の具体例において、免疫原性組成物は、ストレプトコッカス ニューモニアエにより誘導されるもしくはそれにより悪化される非全身性疾患、特に中耳炎の治療または予防のために用いられる。

10

【0056】

A. ストレプトコッカス ニューモニアエのゲノム配列内のORFの同定

本発明は、特定の具体例において、ストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、より詳細にはORFの同定に対して指向される。生物情報科学の情報加工能と共に、完全な細菌ゲノム配列の入手可能性が、ゲノム、転写特性、およびプロテオミックスによる候補抗原の同定において重要な役割を果たし始めている (McAttee et al., 1998a; McAttee et al., 1998b; Pizza et al., 2000; Sonnenberg and Belisle, 1997; Weldingh et al., 1998; McAttee et al., 1998c)。現在、細菌ゲノム内の全ORFの約60%だけが、機能が決定されているポリペプチドといくつかの適合する。ゲノムORFの約40%は、未だ特定されないままである。そこで、本願発明者らは、ストレプトコッカス ニューモニアエゲノムを分析し、生物情報手段を利用して、本発明のポリペプチドをコードしている新規ORFを同定した。ゲノム分析に加えて、発明者らは、ストレプトコッカス ニューモニアエ膜タンパク質成分を分析し、新規性を同定し、および/または本発明のペプチドをコードしているORFを確認した。以下に記載するように、ORFは種々の特性に関して分析した。

20

30

【0057】

詳細には、ゲノム研究機関 (The Institute for Genomic Research) (TIGR) からのストレプトコッカス ニューモニアエタイプ4ゲノムの広範囲のゲノム分析を、指定のアルゴリズムを用いてコンピューターにて行い、他の微生物における公知の関心物のポリペプチドに対して推定上の類似性を有する新規表面局在ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする遺伝子を同定した。つまり、2つのORF探索アルゴリズムのユニークなセット (即ち、GLIMMER, Salzberg et al., 1998、および発明者ら指定代理人自身のプログラム) を用いるストレプトコッカス ニューモニアエゲノムの併合分析により、3,799個のORFを得た。最もストリンジェントなORFファインダー; Glimmerは、2,022個のORFを得、一方、代理人のORFファインダーは最高の3,798個のORFを得た。2つのアルゴリズムにより同定された2,021個のORFが存在する。個々のORFファインダー間の結果の差は、各プログラムにより用いられる特定の開始コドンに主によるものであるが、Glimmerは、Shine-Dalgarnoボックスおよび内挿されたMarkovモデルのいくつかの評価も組み込む。ここでの目的に関して、共通のストレプトコッカス ニューモニアアップコドンを持つ全ORFは同じORF指定を与え、それらは同じORFであるごとく扱う。以下に用いるように、ORFは3つの潜在的な開始部位コドン、ATG、GTG、またはTTGの1つ、および3つの潜在的な終結コドン、TAA、TAG、またはTGAの1つを有すると定義される。カットオフとして選択されるアミノ酸長さの限界が

40

50

低い（例えば、～74アミノ酸）ことも、アルゴリズムがいくつかのリーディングフレームを見落とす原因たり得る。しかし、これらの「真の」リーディングフレームは、ORFが短くなるにつれてますます稀なこととなる。

【0058】

ストレプトコッカス ニューモニアのORFの最初の注解は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; バージョン2.0)ギャップ検索アルゴリズム、Blastpを用いて行い、相同配列が同定された(Altschul et al., 1997)。e^{-10}の全てのカットオフ値を有意と見なした。相同性検索のために用いられる非重複タンパク質配列データベースは、GenBank, SWISS-PROT(Bairoch and Apweiler, 2000)、PIR(Barker et al., 2001)、およびTREMBL(Bairoch and Apweiler, 2000)から成り、これらのデータベース配列は、毎日更新されている。本発明において、Blastp「e」以外の別の量的発現値、例えばパーセント同一性を用いて、本発明のストレプトコッカス ニューモニアORFとデータベース配列を比較してもよい。

10

完全なBLASTの結果のキーワード検索は、免疫原性組成物に関して公知のまたは疑わしい標的遺伝子ならびにタンパク質の位置または機能を同定する言語を用いて行った。

【0059】

いくつかのパラメーターを用いて、本発明の推定ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの分類を行った。例えば、細胞質膜を横切る移動のために運命づけられるポリペプチドは、ポジティブに荷電した残着がN末端に隣接する中心の疎水性領域から成るリーダーシグナル（シグナル配列とも呼ばれる）をコードする(Pugsley, 1993)。SignalPと呼ばれるソフトウェアプログラム、これはニューラルネットワークに基いて、シグナルペプチドおよびその切断部位を同定する、を本発明において用いて、そのようなシグナルペプチドに関するORFのアミノ酸配列を分析した。各ORFの最初の60個のN-末端アミノ酸は、グラム-ポジティブなソフトウェアデータベースを用いてSignalPにより分析した。アウトプットは、4つの別個の値、最大C、最大S、最大S、および平均Sを生じた。S-スコア、またはシグナル領域はシグナルペプチドに属する位置の確率である。C-スコア、または切断部位は、成熟タンパク質における第一番目のものである位置の確率である。Y-スコアは、Cスコアと、平坦化したSスコア誘導値の相乗平均である。イエスまたはノーのいずれかの結論は、各スコアの次になす。全4つの結論がイエスの場合、「YES」をそのORFに関して記載し、結論の3つがイエスの場合、「yes」をそのORFに関して記載し、結論の2つがイエスの場合、「maybe」をそのORFに関して記載し、全他の場合には、「no」をそのORFに関して記載する。

20

30

【0060】

細菌におけるポリペプチドの局在性を予測するために、ソフトウェアプログラムPSORTを用いた(Nakai, 1991)。PSORTは、グラム陽性細菌に関しては「細胞質」、「原型質膜」、および/または「細胞膜」に対して、グラム陰性細菌に関しては「外膜」に対して、ポリペプチドの局在性を予測する。ポリペプチドの膜貫通(TM)ドメインは、ソフトウェアプログラムTopPred IIを用いた(Cserzo et al., 1997)。

【0061】

隠れマルコフモデル(HMM) Pfamデータベース (Bateman, 2000)を用いて、現存のタンパク質ファミリーに属する可能性のあるストレプトコッカス ニューモニアタンパク質を同定した。このアウトプットのキーワード検索をさらに用いて、BLAST検索基準により見落とされた更なる候補抗原を同定するのに役立てた。

40

HMM Lipopと呼ばれるコンピューターアルゴリズムが、発明者の譲受人により、リボタンパク質を予測するために、約131個の生物学的に検証されている細菌リボタンパク質を用いて開発された。タンパク質の開始からシステインアミノ酸までのタンパク質配列、および次なる2つの更なるさらなるアミノ酸を用いて、HMMを作製した(Eddy and Markov, 1996)。

【0062】

発明者らの譲受人はさらに、LPXTG細胞壁ソーティングシグナルを含む約70個の公知

50

の原核生物のタンパク質を用いてHMMを開発し、ペプチドグリカン層に停泊する細胞壁タンパク質を予測した(Mazmanian et al., 1999; Navarre and Schneewind, 1999)。モデルはLPXTGを用いただけでなく、2つの形態の下流配列、第1の疎水性膜貫通ドメインおよび第2のポジティブに荷電したカルボキシ末端をも含んだ。ペプチドグリカン層と非共有結合的に相互作用する多くのタンパク質も存在するが、前記のLPXTGタンパク質のクラスからは異なる。これらのタンパク質は、そのカルボキシ末端にコンセンサス配列を有するようである(Koebnik, 1995)。発明者らはそれゆえ、本領域のHMMを開発し、およびそれを用いて、このクラスのタンパク質に含まれ得るあらゆるストレプトコッカス ニューモニア(Streptococcus pneumoniae)を同定した。

【0063】

表面に位置する、露出する、または膜に結合するポリペプチドをコードしているストレプトコッカス ニューモニアORFは、プロテオミックスによっても同定された(実施例3を参照されたい)。このプロテオミックス分析により、前記ゲノム分析により同定された多くのストレプトコッカス ニューモニアORFを検証し、さらに、膜結合ポリペプチドをコードしている新規なストレプトコッカス ニューモニアORFを同定した。

【0064】

以下の表(即ち、表1-12)は、本発明の前記特徴に従い同定されたORFを分類した12群を示す。つまり、以下に記載する群の全ては、ストレプトコッカス ニューモニアゲノム内に含まれ、推定の、表面に位置する、露出する、膜に結合する、または分泌されるポリペプチドをコードしていると同定されるORFである。これらの群は、さらなるORF特性の分析が予定されているように、本発明の範囲を制限することを意図しない。これらのさらなる特性、例えば、RGD配列は、ORFのグループ分けのトータルの数をさらに拡張するのに、または、現時点で同定されたORFをより規定された群、より広い群、より狭い群、または群のサブセットへと分析するのに役立ち得る。加えて、いくつかのORFは1つ以上のカテゴリーの基準に合致し、それゆえ、以下の群の1つ以上に含まれると考えられる。

【0065】

表1に掲載するものは、TopPred IIプログラムにより規定されるように、細胞膜シグナル配列(即ち、「YES」のSignalP値)を含み、および1個または小数の膜埋没ドメイン(MSD)を有するORFである。13個のORFがこれらの基準に適合していることが見出され、表面に露出していると見なされる。

【0066】

【表1】

表1. 表面露出ポリペプチドをコードしているORF、SignalP 値
=「YES」および≤MSD

配列番号	ORF
11	190
17	403
23	469
39	790
50	935
70	1143
83	1475
91	1568
97	1724
128	2271
148	2621
179	3212
209	3600

【0067】

表 2 に示すものは、プログラム Psorg により分析した場合に、細胞膜シグナル配列を（即ち、「YES」のSignalP値）、および外膜（OM）または細胞周辺（Peri）の予測値を含むORFである。5つのORFがこれらの基準に適合することが見出され、表面に露出していると見なされる。

【0068】

【表 2】

表 2. 表面露出ポリペプチドをコードしているORF、SignalP 値
=「YES」および「OMまたはPeri」のPsort 値

配列番号	ORF
23	469
39	790
50	935
125	2228
179	3212

10

【0069】

表 3 に示すものは、TopPred IIプログラムにより規定されるように、細胞膜シグナル配列（即ち、「YES」のSignalP値）を含み、2個またはそれ以上の膜埋没ドメイン（MSD）を有するORFである。22個のORFがこれらの基準に適合することが見出され、表面に露出していると見なされる。

20

【0070】

【表 3】

表 3. 表面露出ポリペプチドをコードしているORF、SignalP
=「YES」および $\leq$ MSD

配列番号	ORF
11	190
13	339
17	403
23	469
34	640
39	790
50	935
70	1143
73	1207
83	1475
91	1568
97	1724
106	1947
121	2196
125	2228
126	2234
128	2271
148	2621
179	3212
187	3361
192	3384
209	3600

30

40

【0071】

表 4 に示すものは、TopPred IIプログラムにより規定されるように、4つのSignalP値の少なくとも3つ（即ち、「yes」のSignalP値）を含み、2個またはそれ以上の膜埋没ドメイン（MSD）を有するORFである。49個のORFがこれらの基準に適合することが見出され、表面に露出しているとみなされる。

50

【 0 0 7 2 】

【 表 4 】

表 4. 表面露出ポリペプチドをコードしているORF、SignalP
=「yes」および ≥ 2 MSD

配列番号	ORF	配列番号	ORF
2	72	129	2304
6	94	133	2350
10	141	140	2470
14	356	145	2594
22	462	146	2613
28	597	152	2676
29	598	156	2838
36	715	168	3072
37	716	175	3141
40	823	180	3256
46	885	184	3340
47	904	188	3369
48	916	190	3373
56	989	194	3386
59	998	203	3558
71	1178	211	3631
77	1339	213	3770
80	1412	215	3799
81	1437		
86	1493		
87	1528		
88	1530		
93	1623		
99	1816		
101	1849		
102	1863		
105	1904		
112	2026		
114	2061		
115	2112		
120	2195		

10

20

30

【 0 0 7 3 】

推定の表面露出タンパク質に関するBlastpデータのキーワード検索により、119個のORFを得、表5に示す。

【 0 0 7 4 】

【表 5】

表 5. Blastp データのキーワード検索により同定される、表面露出ポリペプチドをコードしている ORF

配列番号	ORF	配列番号	ORF	配列番号	ORF	配列番号	ORF
1	51	88	1530	158	2847	213	3770
2	72	90	1560	159	2894	214	3789
7	113	94	1630	160	2969		
10	141	95	1632	161	2975		
12	304	96	1710	162	2979		
16	378	98	1765	163	2980		
20	410	100	1835	165	3039		
24	493	103	1864	166	3040		
27	580	105	1904	167	3060		
30	607	107	1966	169	3079		
31	612	108	1999	172	3107		
32	624	109	2001	173	3115		
33	639	112	2026	176	3167		
34	640	113	2027	177	3198		
35	703	115	2112	178	3209		
38	772	117	2132	180	3256		
40	823	118	2191	181	3262		
42	838	122	2198	182	3298		
43	854	123	2201	184	3340		
44	855	124	2215	185	3346		
48	916	127	2239	186	3349		
51	945	129	2304	188	3369		
53	979	131	2329	189	3372		
59	998	132	2348	191	3378		
60	1013	133	2350	193	3385		
61	1048	134	2352	196	3457		
65	1072	135	2354	197	3473		
67	1104	136	2385	198	3479		
68	1117	138	2431	199	3480		
69	1141	139	2452	200	3487		
70	1143	141	2488	201	3493		
71	1178	144	2591	202	3494		
75	1244	146	2613	204	3568		
76	1267	147	2615	205	3576		
77	1339	151	2661	206	3578		
78	1350	152	2676	207	3584		
79	1410	154	2734	208	3585		
80	1412	155	2814	210	3627		
87	1528	157	2845	212	3669		

【0075】

HMM Pfam分析は、現存のタンパク質ファミリーに属するタンパク質に類似するドメインまたはアミノ酸パターンを有するタンパク質をコードしているORFを同定するのに役立つ。潜在的な表面露出タンパク質に関するPfamファミリー分類のキーワード検索により、52個のORFを得、表6に示す。

【0076】

10

20

30

40

【表 6】

表 6. HMM Pfam 分析により同定される、表面露出ポリペプチドをコードしている ORF

配列番号	ORF	配列番号	ORF
4	79	160	2969
18	404	162	2979
19	406	163	2980
41	828	164	2983
45	869	165	3039
55	983	166	3040
57	992	169	3079
58	996	171	3083
63	1064	174	3140
64	1070	176	3167
66	1097	180	3256
72	1179	182	3298
74	1220	183	3327
89	1559	184	3340
92	1572	186	3349
104	1868	188	3369
111	2025	189	3372
116	2129	195	3413
119	2193	198	3479
128	2271	199	3480
137	2400	205	3576
142	2499	212	3669
143	2543	213	3770
149	2642		
151	2661		
152	2676		
153	2678		
157	2845		
159	2894		

10

20

30

【0077】

HMM Lipoと呼ばれるアルゴリズムを、本発明における使用のために開発した。HMM Lipoプログラムは、約131個の生物学的に検証された細菌リポタンパク質を用いてリポタンパク質を予測する。HMM Lipoにより、推定のリポタンパク質である16個のORFが同定され、表7に示す。

【0078】

【表 7】

表 7. 表面露出リボタンパク質をコードしている ORF

配列番号	ORF
3	75
8	132
9	140
13	339
21	423
26	502
34	640
62	1059
67	1104
85	1479
134	2352
147	2615
150	2655
168	3072
170	3081
173	3115

10

【0079】

発明者らは、LPXTG細胞壁ソーティングシグナルを含んでいる約70個の公知の原核生物のポリペプチドを用いてHMMを開発した。つまり、このHMMを用いて、ペプチドグリカン層に停留する細胞壁ポリペプチドを予測した。表8に記載するのは、LPXTGモチーフを有することが予測される4個のORFであり、ソーターゼにより標的される可能性のあるタンパク質として分類される。

20

【0080】

【表 8】

表 8. ペプチドグリカン層に結合した表面露出ポリペプチドをコードしている ORF

配列番号	ORF
13	339
21	423
34	640
170	3081

30

【0081】

加えて、表9に示すのは、HMM PGB分析により、ソーターゼとは無関係の様式でペプチドグリカン層に潜在的に結合するポリペプチドをコードすることが予測される3個のORFである。

【0082】

【表 9】

40

表 9. ペプチドグリカン層に非共有結合した表面露出ポリペプチドをコードしている ORF

配列番号	ORF
25	494
49	927
110	2012

【0083】

「YES」のSignalP値を示し、そしてそのカルボキシ末端アミノ酸がフェニルアラニ

50

ンまたはチロシンのいずれかであるORFを、表面に露出しているとみなす。表10に示すのは、これらの基準に適合している7個のORFである。

【0084】

【表10】

表10. 表面露出ポリペプチド、細胞質膜シグナル配列（即ち、SignalP =「YES」）

および C-末端 Phe または Tyr アミノ酸をコードしているORF

配列番号	ORF
11	190
39	790
73	1207
97	1724
106	1947
125	2228
187	3361

10

【0085】

28個のストレプトコッカス ニューモニアORFを、プロテオミックスにより膜結合ポリペプチドをコードしているとさらに同定し、表11に示す。表11に示すORFは、前記のゲノムマイニングアルゴリズムにより同定されるストレプトコッカス ニューモニアORF（即ち、表面に位置する、分泌される、または露出するポリペプチドをコードしているORF；表1-10）をさらにサポートする。

20

【0086】

【表 1 1】

表 11. プロテオミックスにより表面に露出していると確認された
 ストレプトコッカス ニューモニアエ ORF

配列番号	ORF
14	356
16	378
17	403
46	885
64	1070
66	1097
67	1104
69	1141
71	1178
74	1220
91	1568
103	1864
116	2129
128	2271
131	2329
136	2385
151	2661
156	2838
159	2894
162	2979
164	2983
172	3107
176	3167
178	3209
179	3212
180	3256
182	3298
205	3576

10

20

30

【0087】

最終的に、161個の新規なストレプトコッカス ニューモニアORFを、プロテオミックスにより膜結合ポリペプチドをコードしていると同定し、表12に示す。

【0088】

【表 1 2】

表 12. プロテオミックスにより膜に結合していると同定された
ストレプトコッカス ニューモニアエ ORF

配列番号	ORF	配列番号	ORF	配列番号	ORF	配列番号	ORF
431	64	463	357	495	1344	527	2284
432	120	464	390	496	1347	528	2315
433	121	465	431	497	1356	529	2317
434	152	466	434	498	1417	530	2318
435	153	467	436	499	1465	531	2319
436	156	468	439	500	1477	532	2320
437	159	469	513	501	1515	533	2372
438	160	470	515	502	1527	534	2374
439	163	471	583	503	1565	535	2376
440	164	472	633	504	1601	536	2387
441	166	473	683	505	1606	537	2394
442	172	474	686	506	1641	538	2410
443	174	475	720	507	1770	539	2425
444	175	476	726	508	1773	540	2443
445	178	477	818	509	1774	541	2451
446	180	478	861	510	1785	542	2454
447	181	479	863	511	1803	543	2508
448	183	480	960	512	1817	544	2513
449	186	481	1004	513	1823	545	2542
450	188	482	1037	514	1847	546	2558
451	189	483	1049	515	1917	547	2568
452	192	484	1054	516	1923	548	2575
453	194	485	1061	517	1964	549	2587
454	199	486	1082	518	1970	550	2754
455	268	487	1105	519	2039	551	2800
456	269	488	1111	520	2041	552	2839
457	294	489	1175	521	2047	553	2892
458	296	490	1248	522	2058	554	2906
459	298	491	1262	523	2068	555	2958
460	301	492	1266	524	2130	556	2963
461	316	493	1312	525	2251	557	3021
462	320	494	1314	526	2282	558	3048

【 0 0 8 9 】

10

20

30

【表 13】

表 12. プロテオミックスにより膜に結合していると同定された
ストレプトコッカス ニューモニアエ ORF

配列番号	ORF	配列番号	ORF	配列番号	ORF	配列番号	ORF
559	3065	569	3248	579	3552	589	3739
560	3095	570	3303	580	3555	590	3766
561	3111	571	3331	581	3560	591	3778
562	3125	572	3367	582	3564		
563	3151	573	3410	583	3566		
564	3153	574	3446	584	3632		
565	3161	575	3454	585	3653		
566	3178	576	3525	586	3714		
567	3180	577	3538	587	3732		
568	3234	578	3540	588	3735		

10

【0090】

本発明においてさらに意図されるように、ストレプトコッカス ニューモニア ORF を他の重要な特性に関して検索および評価する。例えば、Arg-Gly-Asp(RGD) 連結モチーフを含むタンパク質は、そのレセプターとして役立つインテグリンと共に、細胞接着の主要な認識システムを構成し、従って、推定ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチド抗原である。4 個のストレプトコッカス ニューモニア ORF、即ち、ORF 51、ORF 423、ORF 1097、および ORF 1104 が、細胞接着に潜在的に関与するトリペプチド RGD 配列を有すると同定された。

20

【0091】

ORF RGD の認識は、微生物により、真核生物組織へのエントリーを得るのに用いられる 1 つのメカニズムである (Stockbauer et al., 1999; Isberg and Nhieu, 1994)。しかし、全ての RGD - 含有タンパク質が細胞接着を媒介するのではない。プロリンをカルボキシ末端に有する RGD - 含有ペプチド (RGDP) が細胞接着アッセイにおいて不活性であることが示されており (Pierschbacher and Rouslahti, 1987)、除外される。タンデムナリピートファインダー (Benson, 1999) も、MSCRAMM にて見出されるものなどの ORF 含有繰り返し DNA 配列を同定し (Foster and Hook, 1998)、ナイセリア メニンギティディス (Neisseria meningitidis) の種々の表面タンパク質と一致させるのに (Parkhill et al., 2000) 用いられているゆえ、用いられてよい。

30

【0092】

本願発明者らは、さらに、Geanfammer ソフトウェアを用いてタンパク質を相同ファミリーにクラスター化した (Park and Teichmann, 1998)。ファミリークラスの予備的分析により、新規な ORF はワクチン候補のクラスター内に提供され、潜在的なタンパク質機能が規定される。

40

【0093】

表 13 に示す ORF は、ストレプトコッカス ニューモニアゲノムの分析により同定したものである。215 個の ORF のトータルを、前記の分析基準に基いて同定し、表 1 - 10 に示した。同定された 215 個の ORF を、表 13 に縦に示す (カラム 1)。配列番号 1 ~ 配列番号 215 のヌクレオチド (カラム 2) および配列番号 216 ~ 配列番号 430 のコードされるポリペプチド (カラム 3) を、その個々の ORF に対して水平に示す。例えば、表 13 において、ORF 51 は配列番号 1 のヌクレオチド配列を有し、コードされるポリペプチドは配列番号 216 のアミノ酸配列を有し、ORF 72 は配列番号 2 のヌクレオチドを有し、配列番号 217 のポリペプチドをコードするなどである。

【0094】

プロテオミックス分析により、表 13 におけるすでに示した 28 個の ORF (表 11 を

50

参照されたい)を同定した(例えば、配列番号14、配列番号16、配列番号27など)。プロテオミックス分析により、膜結合タンパク質をコードしている161個の新規なORFをさらに同定した(表12を参照されたい)。膜に結合しているとプロテオミックスにより同定されたこれら161個の新規なORFを表14に縦に示す(カラム1)。ヌクレオチド配列番号431~配列番号591(カラム2)およびコードされるポリペプチド配列番号592~752(カラム3)をその個々のORFに対して水平に記載する。

【0095】

【表14】

表13. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム(ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
51	1	216
72	2	217
75	3	218
79	4	219
86	5	220
94	6	221
113	7	222
132	8	223
140	9	224
141	10	225
190	11	226
304	12	227
339	13	228
356	14	229
370	15	230
378	16	231
403	17	232
404	18	233
406	19	234
410	20	235
423	21	236
462	22	237
469	23	238
493	24	239
494	25	240
502	26	241
580	27	242
597	28	243
598	29	244
607	30	245
612	31	246
624	32	247
639	33	248
640	34	249
703	35	250
715	36	251
716	37	252
772	38	253
790	39	254
823	40	255

【0096】

10

20

30

40

【表 15】

表13. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム(ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
823	40	255
828	41	256
838	42	257
854	43	258
855	44	259
869	45	260
885	46	261
904	47	262
916	48	263
927	49	264
935	50	265
945	51	266
965	52	267
979	53	268
980	54	269
983	55	270
989	56	271
992	57	272
996	58	273
998	59	274
1013	60	275
1048	61	276
1059	62	277
1064	63	278
1070	64	279
1072	65	280
1097	66	281
1104	67	282
1117	68	283
1141	69	284
1143	70	285
1178	71	286
1179	72	287
1207	73	288
1220	74	289
1244	75	290
1267	76	291
1339	77	292
1350	78	293
1410	79	294

10

20

30

【0097】

【表 16】

表 13. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム(ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
1412	80	295
1437	81	296
1459	82	297
1475	83	298
1476	84	299
1479	85	300
1493	86	301
1528	87	302
1530	88	303
1559	89	304
1560	90	305
1568	91	306
1572	92	307
1623	93	308
1630	94	309
1632	95	310
1710	96	311
1724	97	312
1765	98	313
1816	99	314
1835	100	315
1849	101	316
1863	102	317
1864	103	318
1868	104	319
1904	105	320
1947	106	321
1966	107	322
1999	108	323
2001	109	324
2012	110	325
2025	111	326
2026	112	327
2027	113	328
2061	114	329
2112	115	330
2129	116	331
2132	117	332
2191	118	333
2193	119	334

10

20

30

【0098】

【表 17】

表13. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム(ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
2195	120	335
2196	121	336
2198	122	337
2201	123	338
2215	124	339
2228	125	340
2234	126	341
2239	127	342
2271	128	343
2304	129	344
2322	130	345
2329	131	346
2348	132	347
2350	133	348
2352	134	349
2354	135	350
2385	136	351
2400	137	352
2431	138	353
2452	139	354
2470	140	355
2488	141	356
2499	142	357
2543	143	358
2591	144	359
2594	145	360
2613	146	361
2615	147	362
2621	148	363
2642	149	364
2655	150	365
2661	151	366
2676	152	367
2678	153	368
2734	154	369
2814	155	370
2838	156	371
2845	157	372
2847	158	373
2894	159	374

10

20

30

【 0 0 9 9 】

【表 18】

表13. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム(ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
2969	160	375
2975	161	376
2979	162	377
2980	163	378
2983	164	379
3039	165	380
3040	166	381
3060	167	382
3072	168	383
3079	169	384
3081	170	385
3083	171	386
3107	172	387
3115	173	388
3140	174	389
3141	175	390
3167	176	391
3198	177	392
3209	178	393
3212	179	394
3256	180	395
3262	181	396
3298	182	397
3327	183	398
3340	184	399
3346	185	400
3349	186	401
3361	187	402
3369	188	403
3372	189	404
3373	190	405
3378	191	406
3384	192	407
3385	193	408
3386	194	409
3413	195	410
3457	196	411
3473	197	412
3479	198	413
3480	199	414

10

20

30

【0100】

【表 19】

表 13. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム (ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
3487	200	415
3493	201	416
3494	202	417
3558	203	418
3568	204	419
3576	205	420
3578	206	421
3584	207	422
3585	208	423
3600	209	424
3627	210	425
3631	211	426
3669	212	427
3770	213	428
3789	214	429
3799	215	430

10

【0101】

【表 2 0】

表 14. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム (ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
64	431	592
120	432	593
121	433	594
152	434	595
153	435	596
156	436	597
159	437	598
160	438	599
163	439	600
164	440	601
166	441	602
172	442	603
174	443	604
175	444	605
178	445	606
180	446	607
181	447	608
183	448	609
186	449	610
188	450	611
189	451	612
192	452	613
194	453	614
199	454	615
268	455	616
269	456	617
294	457	618
296	458	619
298	459	620
301	460	621
316	461	622
320	462	623
357	463	624
390	464	625
431	465	626
434	466	627
436	467	628

10

20

30

40

【 0 1 0 2 】

【表 2 1】

表 14. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム (ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
439	468	629
513	469	630
515	470	631
583	471	632
633	472	633
683	473	634
686	474	635
720	475	636
726	476	637
818	477	638
861	478	639
863	479	640
960	480	641
1004	481	642
1037	482	643
1049	483	644
1054	484	645
1061	485	646
1082	486	647
1105	487	648
1111	488	649
1175	489	650
1248	490	651
1262	491	652
1266	492	653
1312	493	654
1314	494	655
1344	495	656
1347	496	657
1356	497	658
1417	498	659
1465	499	660
1477	500	661
1515	501	662
1527	502	663
1565	503	664
1601	504	665

10

20

30

40

【 0 1 0 3 】

【表 2 2】

表 14. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム (ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
1606	505	666
1641	506	667
1770	507	668
1773	508	669
1774	509	670
1785	510	671
1803	511	672
1817	512	673
1823	513	674
1847	514	675
1917	515	676
1923	516	677
1964	517	678
1970	518	679
2039	519	680
2041	520	681
2047	521	682
2058	522	683
2068	523	684
2130	524	685
2251	525	686
2282	526	687
2284	527	688
2315	528	689
2317	529	690
2318	530	691
2319	531	692
2320	532	693
2372	533	694
2374	534	695
2376	535	696
2387	536	697
2394	537	698
2410	538	699
2425	539	700
2443	540	701
2451	541	702

10

20

30

40

【 0 1 0 4 】

【表 2 3】

表 14. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム(ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
2454	542	703
2508	543	704
2513	544	705
2542	545	706
2558	546	707
2568	547	708
2575	548	709
2587	549	710
2754	550	711
2800	551	712
2839	552	713
2892	553	714
2906	554	715
2958	555	716
2963	556	717
3021	557	718
3048	558	719
3065	559	720
3095	560	721
3111	561	722
3125	562	723
3151	563	724
3153	564	725
3161	565	726
3178	566	727
3180	567	728
3234	568	729
3248	569	730
3303	570	731
3331	571	732
3367	572	733
3410	573	734
3446	574	735
3454	575	736
3525	576	737
3538	577	738
3540	578	739

10

20

30

40

【表 2 4】

表 14. ストレプトコッカス ニューモニアエ オープン リーディング フレーム (ORF)

ORF	ヌクレオチド 配列番号	ポリペプチド 配列番号
3552	579	740
3555	580	741
3560	581	742
3564	582	743
3566	583	744
3632	584	745
3653	585	746
3714	586	747
3732	587	748
3735	588	749
3739	589	750
3766	590	751
3778	591	752

10

【0106】

B. 表面に露出するポリペプチドをコードしているストレプトコッカス ニューモニア O R F ポリヌクレオチド

20

本発明の単離および精製ストレプトコッカス ニューモニア O R F ポリヌクレオチドは、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの製造において使用することが考えられる。より詳細には、所定の具体例において、O R F は、ストレプトコッカス ニューモニアの、表面に位置する、露出する、膜に結合する、または分泌されるポリペプチド、特に抗原性ポリペプチドをコードする。つまり、1つの態様において、本発明により、ストレプトコッカス ニューモニアの表面に位置する、露出する、膜に結合する、または分泌されるポリペプチドをコードする単離および精製ポリヌクレオチド (O R F) が提供される。特定の具体例において、本発明のポリヌクレオチドはDNA分子、ここでDNA分子はゲノムDNA、染色体DNA、プラスミドDNAまたはcDNAであってよい、である。好ましい具体例において、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つのアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列またはそのフラグメントを含むストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドである。他の具体例において、単離および精製されたO R F ポリヌクレオチドは、配列番号1～配列番号251または配列番号431～配列番号591のO R F ヌクレオチド配列の1つと少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列、その縮重変種、またはその相補物を含む。好ましい具体例において、配列番号1～配列番号251または配列番号431～配列番号591の1つのO R F ポリヌクレオチドはプラスミドベクター中に含まれ、原核生物宿主細胞において発現される。

30

40

【0107】

以下に用いられるように、「ポリヌクレオチド」なる用語は、ホスホジエステル結合により連結するヌクレオチドの配列を意味する。ポリヌクレオチドは以下、5'から3'の方向で示す。本発明のポリヌクレオチドは、約10～数十万個の塩基対からなり得る。好ましくは、ポリヌクレオチドは約10～約3,000個の塩基対からなる。特定のポリヌクレオチドの好ましい長さは以下に示す。

【0108】

本発明のポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸 (DNA) 分子、リボ核酸 (RNA) 分子、またはヌクレオチド類似体を用いて作製されたDNAもしくはRNAの類似体であり得る。核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得るが、二本鎖のDNAが好ましい。ポリ

50

ヌクレオチドがDNA分子である場合、その分子は、遺伝子、cDNA分子またはゲノムDNA分子であり得る。ヌクレオチド塩基は以下、一文字表記のコード：アデニン（A）、グアニン（G）、チミン（T）、シトシン（C）、イノシン（I）およびウラシル（U）により示す。

【0109】

「単離された」なる用語は、天然の状態から「人の手により」変更されたことを意味する。「単離された」組成物または物質が天然に生じる場合、それは、その始めの環境から変化されているかまたは取り出されているか、またはその両方である。例えば、生きている動物において天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離されて」いないが、その天然状態の同時に存在する物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、該用語を以下に用いるごとく、「単離されて」いる。

10

【0110】

好ましくは、「単離された」ポリヌクレオチドは、核酸が由来する生物体のゲノムDNAにおける核酸に本来隣接する配列（即ち、核酸の5'および3'末端に位置する配列）から遊離している。例えば、種々の具体例において、単離ストレプトコッカス ニューモニア核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNAにおいて、核酸分子に本来隣接する約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、または0.1 kb未満のヌクレオチド配列を含み得る。しかし、ストレプトコッカス ニューモニア核酸分子は他のタンパク質をコードしているまたは調節配列に融合され得、そしてその場合も単離と見なされる。

20

【0111】

本発明のORFポリヌクレオチドは、通常のクローニングおよびスクリーニング法を用いて、mRNA由来のcDNAライブラリーから得てよい。本発明のポリヌクレオチドは、ゲノムDNAライブラリー（例えば、ストレプトコッカス ニューモニアライブラリー）などの天然の源から得ることもでき、または周知のおよび市場入手可能な方法を用いて合成することができる。本発明において意図されるORFポリヌクレオチドは、ストレプトコッカス ニューモニアエタイプ3、タイプ14またはタイプ19F染色体DNAを鋳型として用いて得られる。

【0112】

本発明は、さらに、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591に示すヌクレオチド配列と遺伝子コードの縮重のために異なり、そして配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591に示す核酸分子によりコードされるものと同じストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードする核酸分子（およびそのフラグメント）を包含する。

30

【0113】

ストレプトコッカス ニューモニアエポリヌクレオチドのオーソログスおよび対立変種は、当該分野で周知の方法を用いて容易に同定することができる。ポリヌクレオチドの対立変種およびオーソログは、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591に示すヌクレオチド配列と典型的には少なくとも約70～75%、より典型的には少なくとも約80～85%、および最も典型的には少なくとも約90～95%またはそれ以上相同であるヌクレオチド配列またはこれらのヌクレオチド配列のフラグメントから成る。そのような核酸分子は、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591に示すヌクレオチド配列またはこれらのヌクレオチド配列のフラグメントと、好ましくはストリンジェント条件下でハイブリダイズすることができるので、容易に同定することができる。

40

【0114】

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つのフラグメントなどの、ストレプトコッカス ニューモニアエポリヌクレオチドまたは遺伝子のコーディング領域のフラグメントのみを含むことができる。好ましくは、そのようなフラグメントは免疫原性フラグメントである。

50

【 0 1 1 5 】

本発明の O R F ポリヌクレオチドを本発明のストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドの組換え産生に用いる場合、ポリヌクレオチドは成熟ポリペプチドのコーディング配列そのもの、またはリーディングフレーム中の成熟ポリペプチドのコーディング配列とリーダーもしくはは分泌配列、プレ - もしくはプロ - もしくはブレプロ - タンパク質配列、または他の融合ペプチド部分などをコードしているものなどの他のコーディング配列を含んでよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコーディング配列に結合することができる（その全容を以下に出典明示により組み込むGentz et al., 1989を参照されたい）。つまり、発現産物の H i s - タグの精製を許容する融合ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの精製が、本発明中に意図される。ポリヌクレオチドは、非 - コーディング 5 ' および 3 ' 配列、転写される、非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどを含んでもよい。

10

【 0 1 1 6 】

つまり、ストレプトコッカス ニューモニアエ以外の種からのホモログおよびオースログを含んでいる本発明のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、適当なライブラリーをストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つの配列、そのフラグメントを有する標識されたプローブで適当なライブラリーをスクリーニングするステップ、およびポリヌクレオチド配列を含んでいる全長 c D N A およびゲノムクローンを単離するステップを含むプロセスにより得てよい。そのようなハイブリダイゼーション法は、当該分野の専門家に周知である。当業者は、多くの場合に、単離された c D N A 配列が、ポリペプチドをコードしている領域が c D N A の 5 ' 末端で切断されている点で不完全であることを認識するであろう。これは、第一鎖 c D N A 合成中に m R N A 鋳型の d D N A コピーを完成し損じる、固有の低い「加工性」（ポリメライゼーション反応中に酵素が鋳型に対する結合を維持する能力に関する基準）を有する酵素、逆転写酵素の結果である。

20

【 0 1 1 7 】

つまり、所定の具体例において、本発明により提供されるポリヌクレオチド配列情報により、以下に開示する選り抜きのポリヌクレオチドの遺伝子配列に特異的にハイブリダイズし得る、比較的短い D N A （または R N A ）オリゴヌクレオチド配列の調製が可能となる。以下に用いられる「オリゴヌクレオチド」なる用語は、通常 3 個（ 3 ）以上の、および典型的には 1 0 個（ 1 0 ）以上の、および 1 0 0 個（ 1 0 0 ）もしくはそれ以上までの（ 2 0 ~ 3 0 個が好ましいが）、 2 またはそれ以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドから成る分子として定義される。正確なサイズは、多くの要因に依存し、最終的な機能またはオリゴヌクレオチドの使用に依存する。つまり、本発明の特定の態様において、適当な長さの核酸プローブを、選択されるヌクレオチド配列、例えば配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 に示すもののような配列を考慮して調製する。そのような核酸プローブがストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする能力により、種々の具体例におけるそれらの特定の有用性が付与される。最も重要なのは、プローブは所定のサンプルにおける相補配列の存在を検出するための種々のアッセイに用いることができる。

30

40

【 0 1 1 8 】

所定の具体例において、オリゴヌクレオチドプライマーを用いることが好都合である。これらのプライマーは、化学合成、D N A 複製、逆転写、またはその組み合わせを含むいずれかの方法で作製されてよい。そのようなプライマー配列は、原核生物細胞からのストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードする O R F ポリヌクレオチドの規定のセグメントを、ポリメラーゼ鎖反応（ P C R ）法を用いて検出、増幅または変異させるのに使用するために、本発明のポリヌクレオチドを用いて設計される。

【 0 1 1 9 】

所定の具体例において、本発明のポリヌクレオチドを、ハイブリッド形成を検出するた

50

めの適当なラベルと組み合わせて用いることが好都合である。放射能活性、酵素、またはアビジン/ビオチンなどの他のリガンドを含む、検出可能なシグナルを付与することができる広範囲の適当なラベルが、当該分野で公知である。

【0120】

配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つに含まれるヌクレオチド配列またはそのフラグメントと同一もしくは十分に同一なポリヌクレオチドを、cDNAおよびゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして、および核酸増幅(PCR)反応のためのプライマーとして用いて、本発明のポリペプチドをコードしている全長のcDNAおよびゲノミッククローンを単離し、および、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591に示すポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントと高い配列同一性を有する他の遺伝子(ストレプトコッカス ニューモニア以外の種からのホモログおよびオーソログをコードしている遺伝子を含む)のcDNAおよびゲノミッククローンを単離してよい。典型的には、これらのヌクレオチド配列は、引用ポリヌクレオチド配列のものと少なくとも約70%から少なくとも約95%同一である。プローブまたはプライマーは、一般に、少なくとも15個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも30個のヌクレオチドを含み、少なくとも50個のヌクレオチドを有してよい。特に好ましいプローブは、約30～50個のヌクレオチドを有する。

10

【0121】

全長のcDNAを得るための、または短いcDNAを延長するための、当該分野の専門家に利用可能なもしくは周知のいくつかの方法、例えばcDNA末端高速増幅法(RACE)(Frohman et al., 1988を参照されたい)に基くものなどがある。近年の、Marathon(登録商標)法(Clontech Laboratories Inc.)により例示される、該方法の変法は、例えば、より長いcDNAの検索をかなり単純化する。Marathon(登録商標)法では、cDNAは選択された組織から抽出されたmRNA、および核末端にライゲートした「アダプター」配列から調製されている。核酸増幅(PCR)を次いで行い、cDNAの「ミッシング」5'末端を、遺伝子特異的およびアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いて増幅する。PCR反応を次いで、「ネステッド」プライマー、つまり、増幅産物内でアニールするべく設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列の3'にさらにアニールするアダプター特異的プライマー、および公知の遺伝子配列の5'にさらにアニールする遺伝子特異的プライマー)を用いて繰り返す。この反応の産物を次いでDNA配列決定により分析し、そして、産物を既存のcDNAに直接連結して完全な配列を得ること、または、5'プライマーの設計のための新しい配列情報を用いて別の全長PCRを行うことのいずれかにより、全長のcDNAを構築することができる。

20

30

【0122】

本発明による所定の利点を得るための、ハイブリダイゼーション試験またはアッセイのために用いられる好ましい核酸配列には、ストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つに示すものなどの少なくとも10～約70個のヌクレオチド長のポリヌクレオチドに相補的なプローブ分子が含まれる。少なくとも10個のヌクレオチド長のサイズにより、フラグメントが安定かつ選択的な二本鎖分子を形成するのに十分な長さであることが保証される。ハイブリッドの安定性および選択性を増し、それにより、得られる特異的ハイブリッド分子の量および程度を改良するためにではあるが、10塩基以上の長さの伸長におよぶ相補的配列を有する分子が一般に好ましい。25～40個のヌクレオチドの、55～70個のヌクレオチドの、または所望の場合には、それ以上長い遺伝子の相補的伸長を有する核酸分子を設計することが一般に好ましい。そのようなフラグメントは、例えば、化学的手段により、核酸複製技術、例えばPCR法など(本明細書中に典拠明示により組み込むU.S.特許第4,683,202号)の適用により、または適当なインサートおよび適当な制限酵素部位を含んでいる組換えプラスミドから選択されるDNAフラグメントを切り出すことにより、フラグメントを直接合成することにより容易に調製することができる。

40

50

【 0 1 2 3 】

他の態様において、本発明は、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つの少なくとも 1 0 個の連続塩基のセグメントと同一または相補的なヌクレオチド配列を含む単離および精製ポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドがストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするものが企図される。好ましくは、単離および精製ポリヌクレオチドには、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つの少なくとも 2 5 ~ 約 7 0 個の連結塩基のセグメントと同一または相補的な塩基配列が含まれる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、開示されるヌクレオチド配列の 4 0 または 5 5 個の連結塩基と同一または相補的な塩基のセグメントを含む。

10

【 0 1 2 4 】

従って、本発明のポリヌクレオチドプローブ分子を、遺伝子の相補的な伸長と二本鎖分子を選択的に形成するその能力のために、用いることができる。構想される適用に依存して、種々の条件のハイブリダイゼーションを用いて、標的配列に対するプローブの種々の程度の選択性を達成することが望まれる（以下の表 1 5 を参照されたい）。高程度の選択性を要する適用のためには、比較的ストリンジェントな条件を用いてハイブリッドを形成することが典型的に望まれる。もちろん、いくつかの適用に関して、例えば、基本の鋳型に対してハイブリダイズした変異プライマー鎖を用いて変異体を調製することが望まれる場合、または他の細胞からストレプトコッカス ニューモニアエ相同ポリペプチドコーディング配列、機能的同等物などを単離することが望まれる場合、ヘテロ二本鎖の形成を許容するために、低ストリンジェントハイブリダイゼーション条件が典型的に必要とされる（表 1 5 を参照されたい）。交差ハイブリダイズ種をそれにより、対照のハイブリダイゼーションに対してポジティブにハイブリダイズしているシグナルとして容易に同定することができる。つまり、ハイブリダイゼーション条件は用意に操作され、ゆえに、一般的に、望まれる結果に依存する選択法である。

20

【 0 1 2 5 】

もちろん、いくつかの適用に関して、例えば、基本の鋳型にハイブリダイズした変異プライマー鎖を用いて変異体を調製することが望まれる場合、または、他の細胞からの相同ポリペプチドコーディング配列、機能的相同物などを単離することが求められる場合、ヘテロ二本鎖の形成を可能とするためには、低ストリンジェントハイブリダイゼーション条件が典型的には必要とされる。交差ハイブリダイズする種は、それにより、対照ハイブリダイゼーションに対してポジティブにハイブリダイズしているシグナルとして容易に同定される。いずれの場合にも、条件は、上昇温度と同じ様式でハイブリッド二本鎖を脱安定化させるのに作用するホルムアミドの量を増しながら添加することにより、よりストリンジェントとすることができることが一般に認識される。つまり、ハイブリダイゼーション条件は容易に操作され、それゆえ、一般的に、所望される結果に応じる選択法である。

30

【 0 1 2 6 】

本発明はさらに、以下に記載するポリヌクレオチドに対して、減じたストリンジェンシー条件、より好ましくはストリンジェント条件、および最も好ましくは高ストリンジェント条件下でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドも含む。ストリンジェンシー条件の例を以下の表に示す：高ストリンジェント条件は、例えば条件 A - F と少なくとも同程度にストリンジェントであるもの；ストリンジェント条件は、例えば、条件 G - L と少なくとも同程度にストリンジェントである；および減じたストリンジェント条件は、例えば、条件 M - R と少なくとも同程度にストリンジェントである。

40

【 0 1 2 7 】

【表 2 5】

表 15
ストリンジェンシー条件

ストリンジェンシー 条件	ポリヌクレオチド ハイブリッド	ハイブリッド の長さ (bp) ¹	ハイブリダイゼーション 温度およびバッファー ^H	洗浄温度 および バッファー ^H
A	DNA:DNA	> 50	65°C; 1xSSC -or- 42°C; 1xSSC, 50% ホルムアミド	65°C; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	< 50	T _B ; 1xSSC	T _B ; 1xSSC
C	DNA:RNA	> 50	67°C; 1xSSC -or- 45°C; 1xSSC, 50% ホルムアミド	67°C; 0.3xSSC
D	DNA:RNA	< 50	T _D ; 1xSSC	T _D ; 1xSSC
E	RNA:RNA	> 50	70°C; 1xSSC -or- 50°C; 1xSSC, 50% ホルムアミド	70°C; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	< 50	T _F ; 1xSSC	T _F ; 1xSSC
G	DNA:DNA	> 50	65°C; 4xSSC -or- 42°C; 4xSSC, 50% ホルムアミド	65°C; 1xSSC
H	DNA:DNA	< 50	T _H ; 4xSSC	T _H ; 4xSSC
I	DNA:RNA	> 50	67°C; 4xSSC -or- 45°C; 4xSSC, 50% ホルムアミド	67°C; 1xSSC
J	DNA:RNA	< 50	T _J ; 4xSSC	T _J ; 4xSSC
K	RNA:RNA	> 50	70°C; 4xSSC -or- 50°C; 4xSSC, 50% ホルムアミド	67°C; 1xSSC
L	RNA:RNA	< 50	T _L ; 2xSSC	T _L ; 2xSSC
M	DNA:DNA	> 50	50°C; 4xSSC -or- 40°C; 6xSSC, 50% ホルムアミド	50°C; 2xSSC
N	DNA:DNA	< 50	T _N ; 6xSSC	T _N ; 6xSSC
O	DNA:RNA	> 50	55°C; 4xSSC -or- 42°C; 6xSSC, 50% ホルムアミド	55°C; 2xSSC
P	DNA:RNA	< 50	T _P ; 6xSSC	T _P ; 6xSSC
Q	RNA:RNA	> 50	60°C; 4xSSC -or- 45°C; 6xSSC, 50% ホルムアミド	60°C; 2xSSC
R	RNA:RNA	< 50	T _R ; 4xSSC	T _R ; 4xSSC

【 0 1 2 8 】

(bp)' : ハイブリッドの長さは、ハイブリダイズしているポリヌクレオチドのハイブリダイズ領域に対して予想されたものである。未知の配列の標的ポリヌクレオチドに対してポリヌクレオチドをハイブリダイズする場合、ハイブリッドの長さは、ハイブリダイズしているポリヌクレオチドの長さで仮定される。公知の配列のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる場合、ハイブリッドの長さは、ポリヌクレオチドの配列を並べ、ついで最適の配列相補性の領域（複数も）を同定することにより決定することができる。

バッファ^H : ハイブリダイゼーションおよび洗浄バッファ^Hにおいて、SSPE (1 × SSPEは、0.15 M NaCl、10 mM NaH₂PO₄、および1.25 mM EDTA、pH 7.4)をSSC (1 × SSCは、0.15 M NaClおよび15 mM クエン酸ナトリウム)に置きかえることができる。洗浄はハイブリダイゼーション完了後15分間行う。

T_B ~ T_R : 50塩基対長未満であると予想されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融点(T_m)より5 - 10℃低く、ここで、T_mは以下の等式に従い決定される。18塩基対長未満のハイブリッドに関しては、T_m(°C) = 2(#A + T塩基) + 4(#G + C塩基)。18 ~ 49塩基対長のハイブリッドに関しては、T_m(°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G + C) - (600/N)、ここでNはハイブリッド中の塩基の数であり、および[Na⁺]は、ハイブリダイゼーションバッファ^H (1 × SSCに対する[Na⁺] = 0.165 M)中のナトリウムイオン濃度である。

【0129】

ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションのためのストリンジェンシー条件のさらなる例は、出典明示により以下に組み込むSambrook et al. モレキュラークローニング(Molecular Cloning): 研究室マニュアル(A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, チャプター 9 および 11、およびAusubel et al., 1995, Current Protocols in Molecular Biology, eds., John Wiley & Sons, Inc., セクション 2.10 および 6.3-6.4に提供される。

【0130】

前記のストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードしている核酸分子に加えて、本発明の他の側面は、それに対してアンチセンスである単離核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードしている「センス」核酸に相補的な、例えば二本鎖cDNAのコーディング鎖に相補的な、またはmRNA配列に相補的なヌクレオチド配列が含まれる。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合することができる。アンチセンス核酸は、全ストレプトコッカス ニューモニアエコーディング鎖に、またはそのフラグメントのみに相補的であり得る。1つの具体例において、アンチセンス核酸分子ストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列のコーディング鎖の「コーディング領域」に対してアンチセンスである。

【0131】

「コーディング領域」なる用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含んでいるヌクレオチド配列の領域、例えば、配列番号1 ~ 配列番号215または配列番号431 ~ 配列番号591の1つの全コーディング領域を意味する。他の具体例において、アンチセンス核酸分子は、ストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列のコーディング鎖の「非コーディング領域」に対してアンチセンスである。「非コーディング領域」なる用語は、アミノ酸に翻訳されないコーディング領域に隣接する5'および3'配列を意味する(即ち、5'および3'非翻訳領域とも呼ばれる)。

【0132】

以下に開示するストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチドをコードしているコーディング鎖配列(例えば、配列番号1 ~ 配列番号215または配列番号431 ~ 配列番号571の1つ)を用いて、本発明のアンチセンス核酸を、ワトソンおよびクリックの塩基対形成の規則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、ストレプトコッカス ニューモニアエmRNAの全コーディング領域に相補的であり得るが、より好ま

しくは、ストレプトコッカス ニューモニアエ mRNA のコーディングまたは非コーディング領域のフラグメントのみにアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ストレプトコッカス ニューモニアエ mRNA の翻訳開始部位を囲む領域に相補的であり得る。

【0133】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50 個のヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、化学合成および酵素ライゲーション反応を用いて、当該分野で公知の方法を用いて構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に生じるヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増すために、またはアンチセンスストレプトコッカス ニューモニアエ核酸の間で形成された二本鎖の物理的安定性を増すために設計された種々の変更ヌクレオチド、例えばホスホロチオエート誘導体を用いて化学合成することができ、アクリジン置換ヌクレオチドを用いることができる。アンチセンス核酸を作製するために用いることができる変更されたヌクレオチドの例には、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルクエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、イブトキソシン、擬似ウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸 メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および 2、6-ジアミノプリンが含まれる。

10

20

【0134】

別法として、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス配置でサブクローンされている発現ベクターを用いて生物学的に製造することができる（即ち、挿入された核酸から転写された RNA は、以下のサブセクションにさらに記載する目的の標的核酸に対してアンチセンス配向である）。

30

【0135】

本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的には、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードしている細胞内 mRNA および / またはゲノム DNA とハイブリダイズまたは結合して、それにより、例えば、転写および / または翻訳を阻害することによりポリペプチドの発現を阻害するように、対象に投与されるか、またはインサイチュで作製される。ハイブリダイゼーションは、安定な二本鎖を形成するための、または例えば、二本鎖ヘリックスの主溝における特異的相互作用により DNA 二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合の、おきまりのヌクレオチド相補性によるものであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例には、組織部位における直接注入が含まれる。別法として、アンチセンス核酸分子は、選択される細胞を標的し、次いで全身に投与されるように変更することができる。例えば、全身投与のためには、アンチセンス分子は、例えばアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に結合させることにより、選択される細胞の表面上に発現されるレセプターまたは抗原にそれが特異的に結合するように、変更されることができる。アンチセンス核酸分子は、以下に記載するベクターを用いて細胞へ送達することもできる。

40

【0136】

さらに他の具体例において、本発明のアンチセンス核酸分子は、 α -アノマー核酸分子

50

である。 α - アノマー核酸分子は、通常の γ - ユニットと違って鎖が互いに平行に走っている、相補的 RNA との特異的二本鎖ハイブリッドを形成する(Gaultier et al., 1987)。アンチセンス核酸分子は、さらに、2' - o - メチルリボヌクレオチド (Inoue et al., 1987 (a)) またはキメラ RNA - DNA 類似体 (Inoue et al., 1987(b)) を含み得る。

【0137】

さらに他の具体例では、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それらが相補性領域を有する mRNA などの一本鎖核酸を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒 RNA 分子である。つまり、リボザイム (例えば、ハンマーヘッドリボザイム (Haselhoff および Gerlach, 1988 に記載されている)) は、ストレプトコッカス ニューモニア mRNA 転写産物を触媒切断し、それによりストレプトコッカス ニューモニア mRNA の翻訳を阻害することができる。ストレプトコッカス ニューモニアエンコーディング核酸に対して特異性を有するリボザイムを、以下に開示するストレプトコッカス ニューモニア cDNA のヌクレオチド配列 (即ち、配列番号 1 ~ 配列番号 215 または配列番号 431 ~ 配列番号 591) に基き指定することができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列がストレプトコッカス ニューモニアエンコーディング mRNA において切断されるヌクレオチド配列と相補的であるテトラヒメナ L - 19 I V S RNA の誘導体を構築することができる。共に出典明示により組み込む Cech et al. U.S. 特許第 4,987,071 号および Cech et al. U.S. 特許第 5,116,742 号を参照されたい。別法として、ストレプトコッカス ニューモニア mRNA を用いて、RNA 分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒 RNA を選択することができる。例えば、Bartel and Szostak, 1993 を参照されたい。

【0138】

別法として、ストレプトコッカス ニューモニア遺伝子発現は、ストレプトコッカス ニューモニア遺伝子の調節領域 (例えば、ストレプトコッカス ニューモニア遺伝子プロモーターおよび / またはエンハンサー) に相補的なヌクレオチド配列を標的にして、標的細胞におけるストレプトコッカス ニューモニア遺伝子の転写を妨げる三重螺旋構造を形成することにより、阻害することができる。一般に、Helene, 1991; Helene et al., 1992; and Maher, 1992 を参照されたい。

【0139】

ストレプトコッカス ニューモニア遺伝子発現は、RNA インターフィアランス (RNAi) を用いて阻害することもできる。これは、同種の本鎖 RNA (dsRNA) で標的遺伝子の活性を特異的に破壊する転写後遺伝子サイレンシング法である。RNAi は多くの側面において、植物における PTGS に類似し、トリパノゾーマ、ヒドラ、プラナリア、線虫、およびミバエ (ドロソフィラ メランゲノスター (Drosophila melanogaster)) を含む多くの非脊椎動物において検出されている。それは、転写因子の移動および抗ウイルス状態の形成の調節に関与する可能性がある。哺乳動物のシステムにおける RNAi は、その全容を以下に出典明示により組み込む国際出願第 WO00/63364 号に開示されている。基本的に、標的に対して相同な、少なくとも約 600 個のヌクレオチドの dsRNA を細胞に導入し、配列特異的な遺伝子の活性の低下が認められる。

【0140】

C. ストレプトコッカス ニューモニアエポリペプチド

特定の具体例において、本発明により、単離および精製ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドが提供される。好ましくは、本発明のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは組換えポリペプチドである。所定の具体例において、本発明のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは配列番号 216 ~ 配列番号 430 または配列番号 592 ~ 配列番号 752 の一つのアミノ酸配列と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントが含まれる。

【0141】

本発明によるストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは、1) 配列番号 216

10

20

30

40

50

～配列番号430または配列番号592～配列番号752の一つに示すアミノ酸配列；2）配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの、機能性および非機能性の天然に生じる変種または生物学的同等物；3）配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの組換え産生された変種または生物学的同等物；および4）ストレプトコッカス ニューモニア以外の生物体から単離されたポリペプチド（ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドのオルトログ）を含むポリペプチドを包含する。

【0142】

本発明によるストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの生物学的同等物または変種は、1）ストレプトコッカス ニューモニアから単離されたポリペプチド；および2）ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドに対して実質上ホモロジーを含むポリペプチドを包含する。

10

【0143】

ストレプトコッカス ニューモニアの生物学的同等物または変種は、機能性および非機能性のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの両方を含む。機能性の生物学的同等物または変種は、対象において免疫学的または抗原反応を誘発することができる能力を保持するストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの天然に生じるアミノ酸配列変種である。機能性変種は、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つの1個またはそれ以上のアミノ酸の保存的置換のみを、またはポリペプチドの非必須領域に（例えば、抗原決定基または防御エピトープを含んでいる領域ではなく）、非必須残基の置換、欠失、または挿入を典型的に含む。

20

【0144】

本発明によりさらに、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの非ストレプトコッカス ニューモニアソログが提供される。ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドのオーソログは、ストレプトコッカス ニューモニアでない生物体から単離され、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの抗原性能力を有するポリペプチドである。ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドのオーソログは、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つに実質上相同なアミノ酸配列を含むとして容易に同定することができる。

30

【0145】

変更および変化を本発明のポリペプチドの構造においてなすことができ、そして、ストレプトコッカス ニューモニア抗原性を有する分子を得ることもできる。例えば、所定のアミノ酸を、抗原性について明らかな損失を伴うことなく、配列中の他のアミノ酸と置換することができる。ポリペプチドの生物学的な機能活性を規定するのは、ポリペプチドの相互作用能力および性質であるので、所定のアミノ酸配列の置換をポリペプチド配列（またはもちろん、そのもとのDNAコーディング配列）になすことができ、しかも同様の特性を有するポリペプチドを得ることができる。

【0146】

そのような変化をなすにつき、アミノ酸の疎水性指標を考慮することができる。ポリペプチドに相互作用性の生物学的機能を付与するにあたっての疎水性アミノ酸指標の重要性は、当該分野で一般に理解されている(Kyte & Doolittle, 1982)。所定のアミノ酸を同様の疎水性指標もしくはスコアを有する他のアミノ酸に置換することができ、しかも同様の生物学的活性を有するポリペプチドを生じ得ることが公知である。各アミノ酸はその疎水性および荷電特性に基き疎水性指標を与られている。これらの指標は以下のようである。イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；トレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラ

40

50

ギン酸 (- 3 . 5) ; アスパラギン (- 3 . 5) ; リジン (- 3 . 9) ; およびアルギニン (- 4 . 5) 。

【 0 1 4 7 】

アミノ酸残基の相対的な疎水性特性により、生じるポリペプチドの二次および三次構造 (これがさらに、酵素、基質、レセプター、抗体、抗原などの他の分子とのポリペプチドの相互作用を規定する) が決定されると考えられている。アミノ酸は、同様の疎水性指標を有する他のアミノ酸で置換することができるが、なお、機能的に同等のポリペプチドを得ることができる。そのような変化に関して、疎水性指標が + / - 2 の範囲内であるアミノ酸の置換が好ましく、+ / - 1 の範囲内にあるものが特に好ましく、および + / - 0 . 5 の範囲内のものがよりいっそう特に好ましい。

10

【 0 1 4 8 】

親水性に基いて同様のアミノ酸の置換を、特にそのようにして作製された生物学的に機能的に同等なポリペプチドまたはペプチドを免疫学的態様に用いることが意図される場合になすこともできる。以下に出版明示により組み込む米国特許第4,554,101号は、その隣接するアミノ酸の親水性により決定されるような、ポリペプチドの最大の局所的な平均親水性は、その免疫原性および抗原性、即ち、ポリペプチドの生物学的特性に関連していると記載している。

【 0 1 4 9 】

U.S. 特許第4,554,101号に詳述されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に対して指定されている。アルギニン (+ 3 . 0) ; リジン (+ 3 . 0) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0 ± 1) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0 ± 1) ; セリン (+ 0 . 3) ; アスパラギン (+ 0 . 2) ; グルタミン (+ 0 . 2) ; グリシン (0) ; プロリン (- 0 . 5 ± 1) ; トレオニン (- 0 . 4) ; アラニン (- 0 . 5) ; ヒスチジン (- 0 . 5) ; システイン (- 1 . 0) ; メチオニン (- 1 . 3) ; バリン (- 1 . 5) ; ロイシン (- 1 . 8) ; イソロイシン (- 1 . 8) ; チロシン (- 2 . 3) ; フェニルアラニン (- 2 . 5) ; トリプトファン (- 3 . 4) 。アミノ酸は同様の親水性値を有する他のものと置換することができるが、なお、生物学的に等価な、および特に免疫学的に等価なポリペプチドを得ることができることが理解される。そのような変化において、親水性値が ± 2 の範囲内であるアミノ酸の置換が好ましく、± 1 の範囲内にあるものが特に好ましく、および ± 0 . 5 の範囲内にあるものがよりいっそう特に好ましい。

20

30

【 0 1 5 0 】

前記のように、アミノ酸置換はそれゆえ、アミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、その疎水性、親水性、電荷、サイズなどに一般に基く。種々の前記特性を考慮する典型的な置換は当該分野の専門家に周知であり、アルギニンとリジン ; グルタミン酸とアスパラギン酸 ; セリンとトレオニン ; グルタミンとアスパラギン ; およびバリン、ロイシンとイソロイシン (以下の表 1 6 を参照されたい) が含まれる。本発明は従って、前記のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの機能性または生物学的同等物を企図する。

【 0 1 5 1 】

【表 2 6】

表 16
アミノ酸置換

もとの 残基	例示的な 残基置換
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg
Met	Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

10

20

【0152】

ポリペプチドの生物学的または機能的同等物は、部位特異的突然変異を用いて調製することもできる。部位特異的突然変異は、その配列に由来する第2世代のポリペプチドまたは生物学的機能的に等価なポリペプチドもしくはペプチドの、基本のDNAの特異的突然変異による調製に有用な方法である。前記のように、そのような変化は、アミノ酸置換が望まれる場合に望ましい。該方法により、DNAに1個またはそれ以上のヌクレオチドの配列変化を導入することにより、例えば、考慮された前期特性の1またはそれ以上を組み込んでいる配列変種を容易に調製および試験することができる。部位特異的突然変異により、所望の変異のDNA配列ならびに、妨害されるデリーションジャンクションの両サイドにおいて安定な二本鎖を形成するのに十分なサイズおよび配列コンプレキシティのプライマー配列を提供するのに十分な数の隣接ヌクレオチドをコードする特定のオリゴヌクレオチド配列の使用により、変異体の製造が可能となる。典型的には、配列のジャンクションの両サイドの約5～10残基が変更された約17～25ヌクレオチド長のプライマーが好ましい。

30

【0153】

該して、部位特異的突然変異法は当該分野で周知である。認められるように、該方法は、一本鎖および二本鎖両形態にて存在し得るファージベクターを典型的に用いる。典型的には、本明細書による部位特異的突然変異は、選択されるストレプトコッカス ニューモニアペプチド配列の全部または部分をコードするDNA配列をその配列内に含む一本鎖ベクターをまず得ることにより行う。所望の変異配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを（例えば合成にて）調製する。このプライマーを次いで一本鎖ベクターにアニールし、次いで、変異を有する鎖の合成を完了するためのイー・コリポリメラーゼエクレンウフラグメントなどの酵素の使用により拡張する。こうして、一本鎖がオリジナルな非変異配列をコードし、二本目の鎖が所望の変異を有するヘテロ二本鎖を形成する。Thisヘテロ二本鎖ベクターを次いで用いて、イー・コリ細胞などの適当な細胞を形質転換し、次いで変異を有している組換えベクターを含むクローンを選択する。市場入手可能なキットが、オリゴヌクレオチドプライマーを除き、必要とされる全試薬と共に入手可能である。

40

【0154】

本発明のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドまたはポリペプチド抗原は、

50

配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の一つのアミノ酸配列を含んでいるストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドと実質的な配列類似性、構造類似性および / または機能類似性を有するあらゆるストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドであることが理解される。加えて、本発明のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドまたはポリペプチド抗原は、特定の源には制限されない。つまり、本発明により種々の源からのポリペプチドの一般的な検出および単離法が提供される。

【 0 1 5 5 】

本発明において、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは更なる構造または機能分析におけるまたはストレプトコッカス ニューモニア関連ポリペプチドおよびストレプトコッカス ニューモニア特異的抗体などの物質の作製における使用のために、フラグメントへと都合よく切断されてよいことが企図される。これは、精製されたもしくは精製されていないストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを、エンドプロテイナーゼ g l u - C (Boehringer, Indianapolis, IN) などのペプチダーゼで処理することにより行うことができる。C N B r での処置は、ペプチドフラグメントを天然のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドから作製し得る他の方法である。組換え法を用いてストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの特異的フラグメントを製造することもできる。

10

【 0 1 5 6 】

加えて、発明者らはさらに、特定のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチド抗原を作製して、ペプチド構造の重要な部分を擬似してよい (これはペプチドミメティクスストレプトコッカス ニューモニアと呼ばれる) ことをも意図する。ミメティクスは、タンパク質の二次構造のエLEMENTを擬似するペプチドを含む分子である (例えば、Johnson et al., 1993 を参照されたい)。ペプチドミメティクスの使用の背後にある基本的理論は、タンパク質のペプチド骨格が、レセプターとリガンドの相互作用などの分子の相互作用を促進するようにアミノ酸側鎖を方向づけるべく、専ら存在しているということである。

20

【 0 1 5 7 】

ペプチドミメティクス概念がうまく当てはまることで、タンパク質内の β - ターンのミメティクスに焦点があてられた。同様に、ストレプトコッカス ニューモニア内の β - ターン構造を、前記のコンピューターに基くアルゴリズムにより予測することができる。ターンの成分のアミノ酸が一度決定されたら、ミメティクスを構築して、Johnson et al., 1993 に記載されているものと同様のアミノ酸側鎖の必須のエLEMENTの空間的配向を達成することができる。

30

【 0 1 5 8 】

ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドのフラグメントも本発明に含まれる。フラグメントは、アミノ酸配列の全部ではないが部分と完全に同じであるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。フラグメントは例えば、配列番号 2 1 6 ~ 配列番号 4 3 0 または配列番号 5 9 2 ~ 配列番号 7 5 2 の一つのアミノ酸配列の少なくとも 7 個またはそれ以上 (例えば、8、10、12、14、16、18、20 個、またはそれ以上) の連続アミノ酸を含み得る。フラグメントは「フリースタンディング」であってよく、または、最も好ましくは単一、連続領域としてそれらが部分または領域を形成するところのもっと大きなポリペプチドの中に含まれてよい。1つの具体例において、フラグメントは成熟ポリペプチド配列の少なくとも 1 つのエピトープを含む。

40

【 0 1 5 9 】

「融合タンパク質」は、関連していないことが多い 2 つの融合遺伝子またはそのフラグメントによりコードされるタンパク質またはポリペプチドを意味する。例えば、他のヒトタンパク質またはその部分と共に免疫グロブリン分子の不変領域の種々の部分を含んでいる融合タンパク質またはポリペプチドが開示されている。多くの場合、免疫グロブリン Fc 領域を融合タンパク質またはポリペプチドの部分として用いることが、例えば治療および診断に用いるのに好都合であり、改良された薬物動態特性が得られる (例えば、国際出願 EP-A 0232 2621 を参照されたい)。他方、いくつかの使用のために、融合タンパク質ま

50

たはポリペプチドが発現、検出および精製された後に F c 部分を削除し得ることが望ましい。

【0160】

D. ストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチドおよびポリペプチド変種

以下に用いられる「変種」なる用語は、対照のポリヌクレオチドまたはポリペプチドそれぞれから異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変種は、他の対照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なる。変種のヌクレオチド配列における変化は、対照のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化してもしなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、以下に記載するように、対照の配列によりコードされるポリペプチドにアミノ酸置換、付加、欠失、融合および切断を生じてよい。ポリペプチドの典型的な変種は、他の対照ポリペプチドからアミノ酸配列が異なる。一般に、違いは制限され、その結果、対照ポリペプチドと変種の配列は全体的に非常に類似し、および多くの領域において同一である。変種および対照ポリペプチドは、いずれかの組み合わせでの 1 またはそれ以上の置換、付加、欠失によりアミノ酸配列が異なっていてよい。置換もしくは挿入されるアミノ酸残基は、遺伝子コードによりコードされるものであってもなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は、対立変種などの天然に生じるものであってよく、または天然に生じることは知られていない変種であってよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然にない変種は、突然変異法または直接合成により作製されてよい。

【0161】

当該分野で公知の「同一性」は、配列を比較することにより決定されるような、2 個またはそれ以上のポリペプチド配列または 2 個またはそれ以上のポリヌクレオチド配列の間の関連性をいう。当該分野において、「同一性」はさらに、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の間の、場合によりそのような一連の配列間の適合により決定されるような、配列関連性の程度を意味する。「同一性」および「類似性」は、制限されるものではないが、(コンピューター使用の分子生物学(Computational Molecular Biology), Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; バイオコンピューティング(Bio computing): 情報科学およびゲノムプロジェクト(Informatics and Genome Projects), Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; 配列データのコンピュータ分析(Computer Analysis of Sequence Data), Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; 分子生物学の配列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology), von Heinje, G., Academic Press, 1987; および配列分析プライマー(Sequence Analysis Primer), Gribskov, M. および Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; および Carillo, H., および Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988).)に記載されているものなどを含む公知の方法により容易に算定することができる。同一性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間で最大の適合を得るべく設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータープログラムに体系化されている。配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータープログラム法には、制限されるものではないが、GCC プログラムパッケージ(Devereux, J., et al 1984)、BLASTP、BLASTN、TBLASTN、およびFASTA(Altschul, S. F., et al., 1990)が含まれる。BLASTX プログラムはNCBI および他の源から入手可能である(BLAST マニュアル, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., 1990)。周知のSmith-Watermanアルゴリズムを用いて同一性を決定してよい。

【0162】

例として、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 ~ 配列番号 215 または配列番号 431 ~ 配列番号 591 の 1 つの対照配列と同一であり、つまり、100% 同一であり、または、対照配列と比べて所定の完全数までのヌクレオチド変化を含んでよい。そのような変化は、移動および横断を含む少なくとも 1 つのヌクレオチドの欠失、置換、または挿入から成る群から選択され、ここで、変化は対照ヌクレオチド配列の 5' または 3'

末端に、または対照配列のヌクレオチド中に個々に、または対照配列内で１個またはそれ以上の連続群で散在した状態で、これらの末端位の間のどこかに生じてよい。ヌクレオチド変化の数は、配列番号１～配列番号２１５または配列番号４３１～配列番号５９１の一つにおけるヌクレオチドのトータルの数に個々のパーセント同一性（１００で割る）の数値パーセントを乗じ、次いで配列番号１～配列番号２１５または配列番号４３１～配列番号５９１の一つにおけるヌクレオチドの当該トータル数からその値を差し引くことにより、決定される。

【０１６３】

例えば、配列番号１～配列番号２１５または配列番号４３１～配列番号５９１の一つの核酸配列と少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド、その縮重変種またはそのフラグメントを含んでいる単離ストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチド、ここで、該ポリヌクレオチド配列は、配列番号１～配列番号２１５または配列番号４３１～配列番号５９１の一つの核酸配列の全ポリヌクレオチド領域に対して n_n 個まで核酸変化を含んでよい[n_n は変化の最大数であり、以下の式：

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y)$$

（式中、 x_n は配列番号１～配列番号２１５または配列番号４３１～配列番号５９１の一つの核酸のトータル数であり、 y は０．７０の値を有し、 x_n および y の全非整数積は、当該積を x_n から差し引く前に最も近似する整数へと切り捨てる）により算出される]。

もちろん、 y は８０％に関しては０．８、８５％に関しては０．８５、９０％に関しては０．９０、９５％に関しては０．９５の値を有してもよい。配列番号２１６～配列番号４３０または配列番号５９２～配列番号７５２のポリペプチドの一つをコードしているポリヌクレオチド配列の変化は、このコーディング配列における非センス、誤センス、またはフレームシフト変異であってよく、それにより、そのような変更後、該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが変化する。

【０１６４】

同様に、本発明のポリペプチド配列は、配列番号２１６～配列番号４３０または配列番号５９２～配列番号７５２の対照配列と同一であって、即ち、１００％同一であってよく、または対照配列と比較して所定の完全数までのアミノ酸変化を含んでいてよく、その結果、％同一性は１００％未満となる。そのような変化は、アミノ酸欠失、保存的および非保存的置換を含む置換または挿入から成る群から選択され、ここで、該変化は対照ポリペプチド配列のアミノ-またはカルボキシ末端位、または対照配列中のアミノ酸において個々に、または対照配列内の１個またはそれ以上の連続群にて散在した状態で、これらの末端位の間のどこかに生じてよい。所定の％同一性に関するアミノ酸変化の数は、配列番号２１６～配列番号４３０または配列番号５９２～配列番号７５２の一つにおけるアミノ酸のトータル数に、個々のパーセント同一性の数値パーセント（１００で割る）を乗じ、次いで配列番号２１６～配列番号４３０または配列番号５９２～配列番号７５２の一つにおけるアミノ酸の当該トータル数からその積を差し引くことにより、または、

$$n_a < x_a - (x_a \cdot y)$$

（式中、 n_a は、アミノ酸変化の数であり、 x_a は、配列番号２１６～配列番号４３０または配列番号５９２～配列番号７５２の一つにおけるアミノ酸のトータル数であり、および y は、例えば、７０％に対しては０．７０、８０％に対しては０．８０、８５％に対しては０．８５などであり、および x_a と y のあらゆる非整数積は、 x_a からそれを差し引く前に最も近似する整数へと切り捨てる）により決定する。

【０１６５】

E．ベクター、宿主細胞、および組換えストレプトコッカス ニューモニアポリペプチド
好ましい具体例において、本発明によりストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードするORFポリヌクレオチドを含む発現ベクターが提供される。好ましくは、本発明の発現ベクターは、配列番号２１６～配列番号４３０または配列番号５９２～配列番号７５２の一つのアミノ酸残基配列を含むストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードするORFポリヌクレオチドを含む。より好ましくは、本発明の発現ベクタ

10

20

30

40

50

ーは、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つのヌクレオチド塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む。よりいっそう好ましくは、本発明の発現ベクターは、エンハンサープロモーターに作用的に結合したポリヌクレオチドを含む。よりいっそう好ましくは、本発明の発現ベクターは、原核生物のプロモーターに作用的に結合したポリヌクレオチドを含む。別法として、本発明の発現ベクターは、真核生物のプロモーターであるエンハンサープロモーターに作用的に結合したポリヌクレオチドを含み、および発現ベクターは、さらに、カルボキシ末端のアミノ酸の 3' に位置し、コードされるポリペプチドの転写ユニット内にあるポリアデニル化シグナルをさらに含む。

【0166】

原核生物中でのタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向している構造的もしくは誘導性プロモーターを含んでいるベクターを用いて、イー・コリにて行われることが最も多い。融合ベクターは、多数のアミノ酸をコードされるタンパク質、通常組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。そのような融合ベクターは、典型的には 3 つの目的： 1) 組換えタンパク質の発現を増すために； 2) 組換えタンパク質の溶解性を増すために； 3) アフィニティ精製におけるリガンドとして作用させることにより、組換えタンパク質の精製に役立てるために、役立つ。しばしば、融合発現ベクターにおいて、融合タンパク質の精製の後で、融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能とするために、タンパク質分解部位が、融合部分と組換えタンパク質のジャンクションに導入される。そのような酵素およびそのコグネイト認識配列には、ファクター X_a、トロンプイン、およびエンテロキナーゼが含まれる。

【0167】

典型的な融合発現ベクターには、p G E X (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988)、p M A L (New England Biolabs, Beverly; MA)、および p R I T 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ)、これらは、グルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T)、マルトース E 結合タンパク質、またはタンパク質 A をそれぞれ標的組換えタンパク質に融合する、が含まれる。

【0168】

1 つの具体例において、ストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチドのコーディング配列を p G E X 発現ベクターにクローニングして、N 末端から C 末端に G S T トロンピン切断部位 - ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを含む融合タンパク質をコードしているベクターを作製する。融合タンパク質は、グルタチオン - アガロース樹脂を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。G S T に融合していない組換えストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは、融合タンパク質のトロンピンでの切断により回収することができる。

【0169】

適当な誘導性非融合イー・コリ発現ベクターの例には、p T r c (Amann et al., 1988)、p E T I I d (Studier et al., 1990)、p B A D および p C R T 7 が含まれる。p T r c ベクターからの標的遺伝子の発現は、ハイブリッド t r p - l a c 融合プロモーターからの宿主 R N A ポリメラーゼの転写に依存する。p E T I I d ベクターからの標的遺伝子の発現は、同時発現されるウイルス R N A ポリメラーゼ J 7 g n l により媒介される T 7 g n l 0 - l a c 融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、T 7 g n l 遺伝子を有している固有のプロファージからの宿主株 B L 2 1 (D E 3) または H M S I 7 4 (D E 3) により、l a c U V 5 プロモーターの転写調節下で供給される。

【0170】

イー・コリにおける組換えタンパク質の発現を最大にする一つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解により切断する能力が損なわれた宿主細菌においてタンパク質を発現させることである。他の戦略は、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を、核アミノ酸に関する個々のコドンがイー・コリにて選択的に利用されるものとなるように、変更することである。本発明の核酸配列のそのような変更は、常套の D N A 突然変異生成また

は合成法により行うことができる。

【0171】

他の具体例において、ストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチド発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母エス・セレビジエ(*S. cerevisiae*)における発現のためのベクターの例には、pYepSec I (Baldari, et al., 1987), pMFA (Kurjan and Herskowitz, 1982)、pJRY88 (Schultz et al., 1987)、およびpYES32 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)が含まれる。

【0172】

別法として、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは、例えばバキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞にて発現させることができる。培養昆虫細胞(例えば、Sf9細胞)中でのタンパク質の発現に利用できるバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ(Smith et al., 1983)、およびpVLシリーズ(Lucklow and Summers, 1989)が含まれる。

【0173】

さらに他の具体例において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8 (Seed, 1987)およびpMT2PC (Kaufman et al., 1987)が含まれる。哺乳動物細胞において用いられる場合、発現ベクターの調節機能は、ウイルス調節エレメントにより提供されることが多い。

【0174】

以後用いるように、プロモーターは、典型的には転写開始点(即ち転写開始部位)の前(上流)の約100ヌクレオチド対内にあるDNA分子の領域である。そのような領域は、典型的には、種々の遺伝子において同様の相対的位置に位置するいくつかのタイプのDNA配列エレメントを含む。以下に用いるように、「プロモーター」なる用語には、当該分野において、未分化の真核生物RNAポリメラーゼII転写ユニットの上流プロモーター領域、プロモーター領域またはプロモーターとして言及されるものが含まれる。

【0175】

別個の転写調節配列エレメントの他のタイプは、エンハンサーである。エンハンサーにより、特定のコーディング領域(例えば、遺伝子)の時間、位置、および発現レベルの特異性が提供される。エンハンサーの主要機能は、エンハンサーに結合する1個またはそれ以上の転写ファクターを含む細胞において、コーディング配列の転写のレベルを増すことである。プロモーターと異なり、エンハンサーは、プロモーターが存在する限り、転写開始部位から種々の距離に位置する場合にも機能し得る。

【0176】

以下に用いるように、「エンハンサー - プロモーター」なる用語は、エンハンサーとプロモーターエレメントの両方を含む複合ユニットを意味する。エンハンサー - プロモーターは、少なくとも1つの遺伝子産物をコードするコーディング配列に作用的に結合する。以下に用いるように、「作用的に結合する」なる用語は、エンハンサー - プロモーターが、そのコーディング配列の転写がそのエンハンサー - プロモーターにより制御および調節されるような方法でコーディング配列に結合していることを意味する。エンハンサー - プロモーターをコーディング配列に作用的に結合する方法は、当該分野で周知である。当該分野で周知のように、転写が制御されるコーディング配列に対する正確な向きおよび位置は、エンハンサー - プロモーターの特定の性格に特に依存する。つまり、TATAボックス最小プロモーターは、転写開始部位の約25 ~ 約30塩基対上流に典型的には位置し、上流プロモーターエレメントは、転写開始部位の約100 ~ 約200塩基対上流に典型的には位置する。これに対して、エンハンサーは開始部位から下流に位置し得、その部位からかなりの距離にあってよい。

【0177】

本発明のベクター構築物に用いられるエンハンサー - プロモーターは、トランスフェクトされる細胞において発現を駆動するあらゆるエンハンサー - プロモーターであり得る。周知の特性を有するエンハンサー - プロモーターを用いることにより、遺伝子産物の発現

のレベルおよびパターンを最適化することができる。

【0178】

例えば、一般に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス40から誘導される。原核生物および真核生物両細胞のための他の適当な発現系に関しては、本明細書中に出典明示により組み込むSambrook et al., “分子クローニング(Molecular Cloning): 研究室マニュアル(A Laboratory Manual)” 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の第16および17章を参照されたい。

【0179】

他の具体例において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞タイプにおいて選択的に核酸の発現を指向することができる(例えば、組織特異的調節エレメントが核酸を発現するために用いられる)。組織特異的調節エレメントは当該分野で公知である。適当な組織特異的プロモーターの無制限の例には、アルブミンプロモーター(肝臓特異的; Pinkert et al., 1987)、リンパ球特異的プロモーター(Calame and Eaton, 1988)、特にT細胞レセプターのプロモーター(Winoto and Baltimore, 1989)、および免疫グロブリン(Banerji et al., 1983)、Queen and Baltimore (1983)、ニューロン特異的プロモーター(例えば、神経繊維プロモーター、Byrne and Ruddle, 1989)、膵臓特異的プロモーター(Edlund et al., 1985)、および乳腺特異的プロモーター(例えばミルクホエイプロモーター; U.S. 特許第 4,873,316号および国際出願EP 264,166号)が含まれる。発生調節プロモーターも包含され、例えば、ネズミのホックスプロモーター(Kessel and Gruss, 1990)および α -フェトタンパク質プロモーター(Campes and Tilghman, 1989)が含まれる。

【0180】

本発明により、さらに、アンチセンス配向で発現ベクターにクローン化されたストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードしているDNA分子を含む組換え発現ベクターが提供される。つまり、DNA分子はストレプトコッカス ニューモニアmRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現(DNA分子の転写による)を可能とする方法で調節配列に作用的に結合する。種々の細胞タイプ中でアンチセンスRNA分子の継続発現を指向するアンチセンス配向でクローン化された核酸に作用的に結合した調節配列を選択することができる。例えば、アンチセンスRNAの構造的、組織特異的、または細胞タイプ特異的発現を指向するウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサー、または調節配列を選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、アンチセンス核酸が高効率の調節領域、その活性はベクターが導入される細胞タイプにより決定される、の制御下に産生される組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化ウイルスの形態であり得る。

【0181】

本発明の他の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞を包含する。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」なる用語は、以下、互いに交換して用いられる。そのような用語は、特定の対象細胞のみならず、そのような細胞の子孫または潜在的子孫を意味することが理解される。所定の変更が変異または環境の影響のために継代世代に起こり得るので、そのような子孫は、実際、親細胞と同一でない可能性があるが、以下に用いる用語の範囲内にある。宿主細胞はあらゆる原核生物または真核生物細胞であり得る。例えば、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは、イー・コリ、昆虫細胞(Sf9、Sf21など)、酵母または哺乳動物細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、VERO、ニワトリ胎児繊維芽細胞、BHK細胞またはCOS細胞など)などの細菌細胞において発現され得る。他の適当な宿主細胞は、当該分野の専門家に公知である。

【0182】

ベクターDNAは、常套の形質転換、感染、またはトランスフェクション法により原核細胞または真核細胞に導入される。以下に用いるように、「形質転換」および「トランスフェクション」なる用語は、外来の核酸(例えば、DNA)を宿主細胞に導入するための

、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム同時沈降、D E A E - デキストレプトコッカス ニューモニアラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、超音波、またはエレクトロポレーションを含む当該分野で認められる種々の方法を意味するものとする。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適当な方法は、Sambrook, et al. (" Molecular Cloning: A Laboratory Manual " 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)および他の研究室マニュアルに見出すことができる。

【 0 1 8 3 】

培養原核または真核宿主細胞などの本発明の宿主細胞を用いて、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを産生（例えば発現させる）ことができる。従って、本発明により、本発明の宿主細胞を用いてストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを産生するための方法がさらに提供される。1つの具体例において、該方法は、本発明の宿主細胞（ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードしている組換え発現ベクターが導入されている）を、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドが産生されるまで、適当な培地中で培養することを含む。他の具体例において、該方法は、培地または宿主細胞からストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを単離することをさらに含む。

10

【 0 1 8 4 】

発現ベクターのコーディング配列は、転写終結領域に作用的に結合している。RNAポリメラーゼは、ポリアデニル化が起こる部位からコーディングDNA配列を転写する。典型的には、DNA配列は、転写を終結するのに作用するポリアデニル化部位の数百塩基対下流に位置している。これらのDNA配列を、以下、転写終結領域と呼ぶ。これらの領域は、転写されたメッセンジャーRNA（mRNA）の有効なポリアデニル化に必要である。転写終結領域は、当該分野で周知である。本発明のアデノウイルスベクター構築物に用いられる好ましい転写終結領域は、SV40またはプロタミン遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む。

20

【 0 1 8 5 】

発現ベクターは、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。そのようなポリペプチドは、非 - ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドセグメントからセグメントを分かつの十分な長さのストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードしているヌクレオチド塩基配列を含むものとする。本発明のポリペプチドは、交換されるアミノ酸の相対疎水性スコアなどの指標に基いて特定の変化を有する、変種アミノ酸配列を有する生物学的機能性ポリペプチドまたはペプチドをさらにコードし得る。これらの変種配列は、天然ソースから単離されるもの、または以下に開示する配列内に、部位指向性突然変異などの突然変異法を用いて誘導されるものである。

30

【 0 1 8 6 】

好ましくは、本発明の発現ベクターは、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つのアミノ酸残基配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。発現ベクターは、前記のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドのいずれかのストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドコーディング領域自体を含み得、またはそのようなストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの基本的なコーディング領域に特定の変化または変更を有しているコーディング領域を含み得る。別法として、そのようなベクターまたはフラグメントは、基本的なコーディング領域を含むもっと大きなポリペプチド、またはやはり基本的なコーディング領域を含むポリペプチドをコードすることができる。いずれの場合にも、コドン縮重性ならびに生物学的機能等価性のために、本発明のこの態様は、前記のポリペプチド配列に対応している特定のDNA分子には制限されない。

40

【 0 1 8 7 】

典型的なベクターには、pCMV6bおよびpCMV6c(Chiron Corp., Emeryville

50

CA.)を含んでいる p C M V ファミリーの哺乳動物発現ベクターが含まれる。所定の場合および特にこれらの個々の哺乳動物発現ベクターの場合、生じる構築物は、p S V 2 n e o などの選択可能なマーカーを含んでいるベクターとの同時トランスフェクションを要し得る。ジヒドロ葉酸塩レダクターゼ欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞系統、D G 4 4 などへの同時トランスフェクションにより、そのような発現ベクターに導入された D N A により、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを発現しているクローンを検出することができる。

【 0 1 8 8 】

本発明の D N A 分子は、当該分野で周知の多くの方法によりベクターに導入することができる。例えば、ベクター p U C 1 8 は、遺伝子のクローニングおよび発現に特に重要であることが立証されている。同様に、関連するベクター、M 1 3 m p 1 8 および M 1 3 m p 1 9 を、本発明の所定の態様、特にジデオキシシークエンシングを行うのに用いることができる。

10

【 0 1 8 9 】

本発明の発現ベクターは、大量のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードしている D N A 自を調製するための手段として、およびコードされるポリペプチドおよびペプチドを調製するための手段としての両方に有用である。本発明のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを組換え手段により作製する場合、シャトルシステムなどの原核または真核生物発現ベクターいずれかをを用いることができることが意図される。

20

【 0 1 9 0 】

他の側面において、本発明の組換え宿主細胞は、原核生物宿主細胞である。好ましくは、本発明の組換え宿主細胞は、エシェリキア コリの D H 5 α 株の細菌細胞である。一般に、原核生物は、D N A 配列の初期クローニングおよび本発明に有用なベクターの構築に好ましい。例えば、イー・コリ K 1 2 株が特に有用であり得る。用いることができる他の細菌株には、イー・コリ B、およびイー・コリ $\times$ 1 9 7 6 (ATCC No. 31537)が含まれる。これらの例は、もちろん、例示であって制限するものではないものとする。

【 0 1 9 1 】

前記株ならびにイー・コリ W 3 1 1 0 (ATCC No. 273325)、イー・コリ B L 2 1 (D E 3)、イー・コリ T o p 1 0、パチルス サブチリス (*Bacillus subtilis*) などのパチルス、またはサルモネラ チフィムリアム (*Salmonella typhimurium*) などの他の腸細菌 (または U.S. 特許第 4,837,151 号に開示されているような他の弱毒化されたサルモネラ株)、またはセラチア菌 (*Serratia marcesans*) および種々のシュードモナス種などを用いることができる。

30

【 0 1 9 2 】

一般に、宿主細胞と和合性の種から誘導されるレプリコンおよびコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターをこれらの宿主に関連して用いる。ベクターは通常複製部位、ならびに、形質転換された細胞において表現型選択を提供することができるマーキング配列を有する。例えば、イー・コリは、イー・コリ種から誘導されるプラスミド (Bolivar, et al. 1977) である p B R 3 2 2 を用いて形質転換することができる。p B R 3 2 2 は、アンピシリンおよびテトラサイクリン抵抗性の遺伝子を含み、これにより、形質転換細胞を同定するための容易な手段が提供される。p B R プラスミドまたは他の微生物プラスミドまたはファージは、微生物生物体によりそれ自身のポリペプチドの発現のために用いられ得るプロモーターをさらに含まねばならず、または含むように変更されなければならない。

40

【 0 1 9 3 】

組換え D N A の構築に最も一般的に用いられるこれらのプロモーターには、 β -ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) およびラクトースプロモーターシステム (Chang, et al. 1978; Itakura, et al. 1977, Goeddel, et al. 1979; Goeddel, et al. 1980) およびトリプトファン (T R P) プロモーターシステム (EP 0036776; Siebwenlist et al. 1980) が含まれる。これらが最も一般的に用いられるが、他の微生物プロモーターが開発および利用

50

されており、そのヌクレオチド配列に関する詳細が公開されており、当業者はプラスミドベクターに機能性プロモーターを誘導することが可能である(Siebewenlist, et al. 1980)。

【0194】

原核生物に加えて、酵母などの真核生物微生物も用いることができる。多くの他の株を一般的に用いることができるが、サッカロマイセス セレビジアエまたは一般的なパン酵母が、真核生物微生物において最も一般的に用いられる。サッカロマイセスにおける発現に関して、例えばプラスミド Y R p 7 が一般的に用いられる(Stinchcomb, et al. 1979; Kingsman, et al. 1979; Tschemper, et al. 1980)。このプラスミドは、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母変異株、例えば A T C C N o . 4 4 0 7 6 または P E P 4 - 1 のための選択マーカーを提供する t r p 1 遺伝子を既に含んでいる(Jones, 1977)。酵母宿主細胞ゲノムの特徴としての t r p 1 損傷の存在により、トリプトファンの不在下での増殖により形質転換を検出するのに有効な環境が提供される。

10

【0195】

酵母ベクターにおける適当なプロモーター配列には、3 - ホスホグリセレートキナーゼ(Hitzeman., et al. 1980)、または他の糖分解酵素(Hess, et al. 1968; Holland, et al. 1978)、例えばエノラーゼ、グリセロアルデヒド - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース - 6 - ホスフェートイソメラーゼ、3 - ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼが含まれる。適当な発現プラスミドを構築するのに、これらの遺伝子に結合した終結配列を、発現されるべき配列から下流に発現ベクターにさらに導入して、m R N A のポリアデニル化および終結を提供する。増殖条件により制御される転写のさらなる利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソシトローム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する崩壊酵素、前記グリセロアルデヒド - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトース利用の基礎となる酵素のためのプロモーター領域である。酵母和合性プロモーター、起点または複製および終結配列を含むあらゆるプラスミドベクターが適当である。

20

【0196】

微生物に加えて、多細胞生物由来の培養細胞を宿主として用いることもできる。原則として、脊椎動物培養細胞であろうと無脊椎動物培養細胞であろうと、あらゆるそのような培養細胞を用いることができる。しかし、脊椎動物細胞が最も関心を持たれており、脊椎動物培養細胞の増殖(組織培養)が、近年の常套法となっている。このような有用な宿主細胞系統の例は、A t T - 2 0、V E R O、ヒーラー、N S O、P E R C 6、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞系統、および W 1 3 8、B H K、C O S M 6、C O S - 7、2 9 3 および M D C K 細胞系統である。このような細胞のための発現ベクターには、常套的に、複製起源(必要な場合)、あらゆる必要とされるリボソーム結合部位と共に、発現されるべき遺伝子上流に位置するプロモーター、R N A スプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列が含まれる。

30

【0197】

組換えストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの発現が所望される場合、真核宿主が意図され、真核生物複製起源を組み込むプラスミドなどのベクターを用いることが最も望ましい。加えて、真核生物系における発現のためには、チャイニーズハムスター卵巣細胞と合わせて用いられるプロモーターなどの有効な真核生物プロモーターに隣接して、およびその制御下にストレプトコッカス ニューモニアをコードしている配列を位置づけることが望まれる。真核生物であろう原核生物であろうと、プロモーターの制御下にコーディング配列を位置付けるためには、ポリペプチドの適当な翻訳リーディングフレームの転写開始領域の 5' 末端は、選択されるプロモーターの約 1 ~ 約 5 0 ヌクレオチド 3' 間に、またはそれに対して下流に位置していなければならない。さらに、真核生物発現が期待される場合、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを含む転写ユニットに

40

50

挿入することが典型的には望まれる。

【0198】

DNA分子などの外来ポリヌクレオチドで細胞を形質転換するまたはトランスフェクトする手段は当該分野で周知であり、リン酸カルシウムまたはDEAE-デキストレプトコッカスニューモニアラン-媒介性トランスフェクション、プロトプラストレプトコッカスニューモニア融合、エレクトロポレーション、リボソーム媒介性トランスフェクション、直接マイクロインジェクション、およびアデノウイルスインフェクション（例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989を参照されたい）が含まれる。

【0199】

最も広く用いられている方法は、リン酸カルシウムまたはDEAE-デキストレプトコッカスニューモニアランいずれかにより媒介されるトランスフェクションである。そのメカニズムは未だ解明されていないが、トランスフェクトされたDNAがエンドサイトーシスにより細胞の細胞質に入り、核へと輸送されると考えられる。細胞タイプにより、培養細胞集団の約90%までがいかなる時点でもトランスフェクトされ得る。その高効率のために、リン酸カルシウムまたはDEAE-デキストレプトコッカスニューモニアランにより媒介されるトランスフェクションは、多数の細胞における外来DNAの一過性の発現を必要とする実験のための選り抜きの方法である。リン酸カルシウム媒介性トランスフェクションは、ヘッド-ツウ-テイルのタンデムなアレイにて宿主細胞ゲノムに通常配置される外来DNAのコピーを統合する細胞系統を確立するのにも用いられる。

10

【0200】

プロトプラストレプトコッカスニューモニア融合法では、目的のプラスミドの多数のコピーを有している細菌から誘導されたプロトプラストレプトコッカスニューモニアを直接、哺乳動物培養細胞と混合する。細胞膜の（通常ポリエチレングリコールでの）融合後、細菌の内容物が哺乳動物細胞の細胞質へと送達され、プラスミドDNAが核へ輸送される。プロトプラストレプトコッカスニューモニアの融合は、一貫性の発現アッセイに一般的に用いられる細胞系統の多くのためのトランスフェクションとしては有効でないが、DNAのエンドサイトーシスが起る効率の悪い細胞系統に関しては有用である。プロトプラストレプトコッカスニューモニアの融合はしばしば、宿主染色体にタンデムに統合されたプラスミドDNAの多数のコピーを生じる。

20

【0201】

短時間の、高電圧の電気パルスの、種々の哺乳動物および植物細胞への適用により、原形質膜にナノメートルサイズの穴を形成する。DNAは、これらの穴を経由して、または穴の閉鎖を伴う膜成分の再分配の結果としてのいずれかにて細胞の細胞質へと直接取りこまれる。エレクトロポレーションは非常に有効であり得、クローン遺伝子の一過性の発現および目的の遺伝子の完全コピーを有する細胞系統の確立の両方のために用いることができる。リン酸カルシウム媒介性トランスフェクションおよびプロトプラスト融合に比べて、エレクトロポレーションにより、外来DNAの1つまたは多くとも少数の完全コピーを有する細胞系統を生じることが多い。

30

【0202】

リボソームトランスフェクションには、細胞膜とのリボソームの融合が後になされる、リボソームでのDNAおよびRNAのエンキャプシュレーションが関与する。どのようにDNAが細胞へと送達されるかは明らかでないが、トランスフェクション効率は90%もの高さであり得る。

40

【0203】

DNA分子の核への直接マイクロインジェクションは、DNAを低pHのエンドソームなどの細胞区画へ曝さないという利点を有する。マイクロインジェクションはそれゆえ、統合される目的のDNAのコピーを有する細胞系統を確立するための方法として主に用いられる。

細胞トランスフェクションのためのベクターとしてのアデノウイルスの使用は、当該分野で周知である。アデノウイルスベクター媒介性の細胞トランスフェクションが、種々の

50

細胞に関して報告されている(Stratford-Perricaudet, et al. 1992)。

【0204】

トランスフェクトされる細胞は、原核生物または真核生物であり得る。好ましくは、本発明の宿主細胞は原核生物宿主細胞である。ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを産生することが目的である場合、培養原核生物宿主細胞はが特に興味深い。

【0205】

さらに他の具体例において、本発明は、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを調製するためのプロセスまたは方法であって、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで細胞を形質転換、トランスフェクト、または感染させて、形質転換した宿主細胞を産生すること；および、形質転換した宿主細胞を、ポリペプチドの発現に十分な生物学的条件下に維持することを含む方法が企図される。好ましくは、形質転換した宿主細胞は、原核生物細胞である。別法として、宿主細胞は、真核生物細胞である。より好ましくは、原核生物細胞は、エシェリキア コリのDH5- α 株の細菌細胞である。よりいっそう好ましくは、形質転換細胞にトランスフェクトされるポリヌクレオチドは、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つの核酸配列を含む。別法として、トランスフェクションは、前記の発現ベクターを用いて行う。プロセスに用いられる宿主細胞は、機能性、組換えストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを発現することができる。

10

【0206】

トランスフェクション後、細胞をストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの発現のために十分な時間、培養条件下に維持する。培養条件は当該分野で周知であり、イオン組成および濃度、温度、pHなどが含まれる。典型的には、トランスフェクトされた細胞は、培養培地中培養条件下に維持する。種々の細胞タイプに適した培地は、当該分野で周知である。好ましい具体例において、温度は約20～約50、より好ましくは約30～約40、およびいっそうより好ましくは約37である。

20

【0207】

pHは、好ましくは約6.0の値から約8.0の値、より好ましくは約6.8の値から約7.8の値、および最も好ましくは約7.4である。浸透圧は、好ましくはリットル当たり約200ミリオスモル(mosm/L)～約400mosm/Lであり、より好ましくは約290mosm/L～約310mosm/Lである。コードされるタンパク質のトランスフェクションおよび発現に必要とされる他の生物学的条件は、当該分野で周知である。

30

【0208】

トランスフェクトされた細胞を、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの発現に十分な時間維持する。適当な時間は、特に、用いられる細胞タイプに依存し、当業者により容易に決定される。典型的には、維持時間は、約2～約14日である。

組換えストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは、トランスフェクトされた細胞またはこれらの細胞が培養された培地のいずれかから回収または収集される。回収は、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを単離および精製することを含む。ポリペプチドの単離および精製は、当該分野の専門家に周知であり、沈降、濾過、クロマトグラフィー、電気泳動などの方法を含む。

40

【0209】

F. ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドと免疫反応性の抗体

さらに他の具体例では、本発明により、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドと免疫反応する抗体が提供される。好ましくは、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。さらに、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つのアミノ酸残基配列を含む。抗体を調製および特定する手段は、当該分野で周知である(例えば、抗体「研究室マニュアル」、E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照されたい)。

50

【0210】

簡単には、ポリクローナル抗体は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む免疫原で動物を免疫化し、免疫化された動物から抗血清を収集することにより調製される。広範な動物種を、抗血清の産生のために用いることができる。典型的には、抗 - 抗血清の産生のために用いられる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスターまたはモルモットである。ウサギが相対的に血液量が多いことから、ウサギがポリクローナル抗体の産生のために好ましく選択される。

【0211】

当該分野で周知のように、所定のポリペプチドまたはポリヌクレオチドはその免疫原性が変化してよい。それゆえ、本発明の免疫原（例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）をキャリアと組み合わせることがしばしば必要となる。典型的かつ好ましいキャリアは、CRM₁₉₇、スカシガイヘモシアニン（KLH）および牛血清アルブミン（BSA）である。卵白アルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミンなどの他のアルブミンもキャリアとして用いることができる。

10

【0212】

ポリペプチドまたはポリヌクレオチドをキャリアタンパク質と結合させるための方法は当該分野で周知であり、グルタルアルデヒド、m - マレイミドベンコイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミドおよびビス - ピアゾ化ベンジジンが含まれる。

20

【0213】

ポリクローナル抗体の産生のために用いられる免疫原の量は、免疫原の性質ならびに免疫化のために用いられる動物により特に変化する。種々の経路を用いて、免疫原を投与することができる（皮下、筋肉内、経皮、静脈内、および腹腔内）。ポリクローナル抗体の産生は、免疫化の後の種々の時点で免疫化した動物の血液をサンプリングすることにより測定される。所望のレベルの免疫原性が得られたら、免疫化された動物から採血し、血清を単離および貯蔵することができる。

【0214】

他の態様において、本発明は、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドと免疫反応性の抗体を製造するプロセスであって、（a）組換え宿主細胞を、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトする；（b）宿主細胞を、ポリペプチドの発現に十分な条件下で培養する；（c）ポリペプチドを回収する；および、（d）；ポリペプチドに対する抗体を調製するステップを含むプロセスが企図される。好ましくは、宿主細胞は、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つのポリヌクレオチドでトランスフェクトする。よりいっそう好ましくは、本発明により、前記のプロセスに従い調製される抗体が提供される。

30

【0215】

本発明のモノクローナル抗体は、以下に出典明示により組み込む米国特許第4,196,265号に例示されているもののような周知の方法の使用により、容易に調製することができる。典型的には、方法は、適当な動物を特定の抗原（例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド）で、免疫反応を得るのに十分な方法でまず免疫化することが含まれる。免疫化された動物からの脾臓細胞を次いで、不死化骨髓腫細胞の細胞と融合する。免疫化された動物がマウスである場合、好ましい骨髓腫細胞は、ネズミNS-1骨髓腫細胞である。

40

【0216】

融合された脾臓 / 骨髓腫細胞を選択培地中で培養し、親細胞から融合脾臓 / 骨髓腫細胞を選択する。融合細胞を非融親細胞混合物から、例えば、組織培養培地におけるヌクレオチドのデノボ合成をブロックする試薬の添加により分離する。典型的かつ好ましい試薬は、アミノプテリン、メトトレキサート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキサートは、プリンおよびピリミジン両方のデノボ合成をブロックし、一方、アザセリンは、プリン合成のみをブロックする。アミノプテリンまたはメトトレキサートを

50

用いる場合、培地にヒポキサンチンおよびチミジンを、ヌクレオチドソースストレプトコッカス ニューモニアとして補充する。アザセリンを用いる場合、培地にヒポキサンチンを補充する。

【0217】

この培養により、ハイブリドーマ集団が提供され、これから特定のハイブリドーマを選択する。典型的には、ハイブリドーマの選択は、細胞をシングル・クローン希釈にてマイクロタイタープレート中で培養し、その後、個々のクローナル上清を抗原・ポリペプチドとの反応性に関して試験することにより行う。選択されたクローンを次いで無制限に増殖させて、モノクローナル抗体を得ることができる。

【0218】

特定の具体例として、本発明の抗体を製造するために、マウスに本発明のポリペプチドを含んでいる約1 - 200 μ gの抗原を腹腔内注射する。完全フロイントアジュバント（結核死菌体を含んでいる免疫反応の非特異的刺激因子）などのアジュバントと組合わせて抗原を注入することにより、リンパ球細胞を刺激して増殖させる。第一の注入後数時点（例えば、少なくとも2週間）で、マウスを不完全フロイントアジュバントと混合した抗原の第2投与での注入により、ブースター注射する。

【0219】

第2注入の数週後、マウスの尾から採血し、血清を放射能標識した抗原に対する免疫沈降により力価測定(titer)する。好ましくは、ブースティングと力価測定のプロセスは、適当な力価が達成されるまで繰り返す。最も高い力価を有するマウスの脾臓を取り出し、脾臓のリンパ球を、脾臓をシリンゲでホモジェナイズすることにより得る。典型的には、免疫化されたマウスからの脾臓は、約 5×10^7 ~ 約 2×10^8 個のリンパ球を含む。

【0220】

骨髓腫細胞として知られる変異リンパ球細胞を、そのような細胞が種々の周知の方法により増殖するように誘導された実験動物から得る。骨髓腫細胞は、ヌクレオチド生合成の再利用経路を欠く。骨髓腫細胞は腫瘍細胞であるので、それらは組織培養において無限に増殖することができ、それゆえ、不死と呼ばれる。マウスおよびラットからの骨髓腫細胞の多くの培養細胞系統、例えば、NS - 1 骨髓腫細胞などが確立されている。

【0221】

骨髓腫細胞を、本発明の抗原/ポリペプチドを注射したマウスまたはラットの脾臓からの正常の抗体産生細胞との融合を促進するのに適した条件下で合わせる。融合条件には、例えば、ポリエチレングリコールの存在が含まれる。生じた融合細胞がハイブリドーマ細胞である。骨髓腫細胞と同様、ハイブリドーマ細胞は培地中で無限に増殖する。

【0222】

ハイブリドーマ細胞は、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）などの選択培地中で培養することにより、非融合骨髓腫細胞から分離される。非融合骨髓腫細胞は、それらはアミノプテリン、メトトレキサート、またはアザセリンの存在下で死滅されるので、再利用経路からのヌクレオチドを合成するのに必要な酵素を欠く。非融合リンパ球は、組織培養中に増殖し続けない。つまり、うまく融合した細胞（ハイブリドーマ細胞）のみが選択培地中で増殖することができる。

【0223】

生き残っているハイブリドーマ細胞のそれぞれは、単一の抗体を産生する。これらの細胞を次いで、本発明の抗原/ポリペプチドと免疫反応性のある特異的抗体の産生に関してスクリーニングする。単一細胞のハイブリドーマをハイブリドーマの基質を制限することにより単離する。ハイブリドーマを数回連続希釈し、希釈後、増殖させ、上清をモノクローナル抗体の存在に関して試験する。当該抗体を産生しているクローンを次いで大量に培養し、適切な量の本発明の抗体を得る。

【0224】

本発明のモノクローナル抗体の使用により、本発明の特異的ポリペプチドおよびポリヌクレオチドが抗原として同定される。一度同定されたら、これらのポリペプチドおよびポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドを抗体アフィニティクロマトグラフィーなどの方法により、単離および精製する。抗体アフィニティクロマトグラフィーでは、モノクローナル抗体を固体支持層に結合させ、所望の抗原を含んでいる溶液に曝す。抗原を結合抗体との免疫反応により溶液から回収する。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを次いで、支持層から取りだし、精製する。

【0225】

加えて、抗体ディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするのに特に用いることができる方法および試薬の例は、例えば、米国特許第5,223,409号、国際出願WO92/18619号、国際出願WO91/17271号、国際出願WO92/20791号、国際出願WO92/15679号、国際出願WO93/01288号、国際出願WO92/01047号、国際出願WO92/09690号、国際出願WO90/02809号に見出すことができる。

10

【0226】

加えて、常套の組換えDNA技術を用いて作製することができる、ヒトおよび非ヒトフラグメントの両方を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体などの組換え抗-スト렙トコッカス ニューモニア抗体は、本発明の範囲内である。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術により、例えば、国際出願PCT/US86/02269号；国際出願EP184,187号；国際出願EP171,496号；国際出願EP173,494号；国際出願WO86/01533号；米国特許第4,816,567号；および国際出願EP125,023号に開示されている方法を用いて製造することができる。

20

【0227】

抗-スト렙トコッカス ニューモニア抗体（例えば、モノクローナル抗体）を用いて、アフィニティクロマトグラフィーまたは免疫沈降などの常套法によりスト렙トコッカス ニューモニアポリペプチドを単離する。抗スト렙トコッカス ニューモニア抗体により、細胞からのスト렙トコッカス ニューモニアポリペプチド、および宿主細胞で発現される組換え産生されるスト렙トコッカス ニューモニアポリペプチドの精製が促進される。さらに、抗-スト렙トコッカス ニューモニア抗体を用いて、スト렙トコッカス ニューモニアポリペプチドの発生量を評価するために、（例えば、細胞溶解物または細胞上清中の）スト렙トコッカス ニューモニアポリペプチドを検出する。スト렙トコッカス ニューモニアポリペプチドの循環しているフラグメントの検出を用いて、対象におけるスト렙トコッカス ニューモニアポリペプチドのターンオーバーを同定する。抗-スト렙トコッカス ニューモニア抗体を診断上用いて、臨床試験法の部分として、例えば、所定の治療法の有効性を決定するために組織中でのタンパク質レベルを測定する。検出は、抗体を検出可能な物質へ結合すること（即ち、物理的に結合すること）により促進される。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射能活性物質が含まれる。適当な酵素の例には、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、P-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ；適当な補欠分子団複合体の例には、スト렙トコッカス ニューモニアレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる；適当な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアルニフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフィコエリトリンが含まれ；発光物質の例には、ルミノールが含まれ；生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびアクオリンが含まれ、および適当な放射能活性物質の例には、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵S、または³Hが含まれる。

30

40

【0228】

G. 医薬および免疫原性組成物

所定の具体例において、本発明により、スト렙トコッカス ニューモニアポリペプチドおよび薬理的に許容されるキャリアを含む医薬および免疫原性組成物が提供される。より好ましくは、医薬組成物は、配列番号216～配列番号430または配列番号592

50

～配列番号752の1個またはそれ以上のアミノ酸残基配列を含む1個またはそれ以上のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを含む。他の具体例において、本発明の医薬組成物は、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび薬理学上許容されるキャリアを含む。好ましくは、本発明の医薬および免疫原性組成物は、配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つのアミノ酸配列を含むストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを含む。別法として、医薬および免疫原性組成物は、配列番号1～配列番号215または配列番号431～配列番号591の1つのヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む。

【0229】

種々の試験を用いて、本発明のポリペプチドのインビトロでの免疫原性を評価する。例えば、インビトロオプソニックアッセイを、ストレプトコッカス ニューモニア細胞、問題のポリペプチドに対して特異的な抗体を含む熱不活性化ヒト血清および外来補体源の混合物と共にインキュベートすることにより行う。オプソノファゴサイトーシスが、新たに単離したヒト多形核細胞(PMN)および抗体/補体/肺炎双球菌細胞混合物のインキュベーション中に進行する。抗体および補体で覆われる細菌細胞は、オプソノファゴサイトーシスにて死ぬ。オプソノファゴサイトーシスを逃れる生きている細菌のコロニー形成ユニット(cfu)を、アッセイ混合物をプレーティングすることにより決定する。力価を、アッセイ対照との比較により決定される $\geq 50\%$ の細菌殺滅を生じる最高の基積の逆数として示す。試験した最低の血清希釈(1:8)で50%未満の殺滅しか示さない標本を、4のOPAタイターを有するとして示す。試験した最高の希釈は1:2560である。最高希釈で $\geq 50\%$ の殺滅を有するサンプルを、より高い初期希釈から始めて繰り返す。前記方法は、グレイ法(Gray, 1990)の変更である。

【0230】

試験血清+細菌細胞および熱不活性化補体を含む試験血清対照物が、核個々の血清に含まれる。この対照を用いて、抗体または他の血清成分の存在が細菌株を直接(即ち、補体またはPMNの不在下で)殺し得るかどうかを評価することができる。公知のオスソニック力価を有するヒト血清をポジティブなヒト血清対照として用いる。各未公知の血清のオスソニック抗体力価は、血清を含まない対照と比較して50%のcfuの低下を生じる血清の初期希釈の逆数として算定することができる。

【0231】

全細胞ELISAアッセイを用いてさらに、ポリペプチド抗原のインビトロ免疫原性および表面露出性を評価するが、ここで、目的の細菌株(エス・ニューモニアエ)を、96穴プレートなどのプレートにのせ、免疫化した動物からの試験血清を細菌細胞と反応させる。試験ポリペプチド抗原に特異的ないずれかの抗体がポリペプチド抗原の表面露出エピトープと反応する場合、当業者に公知の常套法により検出することができる。

【0232】

所望のインビトロ活性を示しているあらゆるポリペプチドをついで、インビボ動物攻撃モデルにて試験する。所定の具体例において、免疫原性組成物を次いで、当業者に公知の免疫化の方法および経路(例えば、鼻腔内、非経口、経口、直腸、膣、経皮、腹腔内、静脈内、皮下など)により、動物(例えば、マウス)の免疫化に用いる。特定のストレプトコッカス ニューモニア免疫原性組成物で動物を免疫化した後、動物をストレプトコッカス ニューモニアで攻撃し、ストレプトコッカス ニューモニア感染に対する抵抗性に関して評価する。

【0233】

1つの具体例において、6週齢の、病原体フリーのBalb/cマウスを免疫化し、ストレプトコッカス ニューモニアで攻撃する。例えば、グループ当たり10匹のBALB/Cマウスを、(各マウスの鼻孔への徐々の点鼻により)所望のポリペプチドの1または2投与で、免疫原性組成物にて免疫化する。ストレプトコッカス ニューモニアはBalb/cマウスの鼻咽腔でコロニー形成するが、病気または死を引き起こさない。次いで、Balb/cマウスを、ストレプトコッカス ニューモニアレブトマイシン抵抗性ストレ

プトコッカス ニューモニアで攻撃する。B a l b / c マウスを攻撃後に屠殺し、鼻を取り、無菌塩水中でホモジェナイズする。ホモジェネートを塩水に希釈し、ストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシン含有 T S A プレートに蒔く。プレートを一晩 37 にてインキュベートし、次いでコロニーをカウントする。鼻咽腔でのコロニー形成の統計学的に有意な低下は、ポリペプチドがヒトの臨床試験における使用に適していることを示す。

【 0 2 3 4 】

他の具体例において、6 週齢の病原体フリーのオスの C B A / C a H N x i d / J (C B A / N) マウスを鼻腔内または非経口にて、ストレプトコッカス ニューモニア攻撃前に免疫化する。グループ当たり 10 匹の C B A / N マウスを適量の所望のポリペプチドで免疫原性組成物にて免疫化し、試験する。C B A / N マウスは、免疫欠損 (X I D) であり、適当なストレプトコッカス ニューモニアで攻撃した場合、鼻咽腔でのコロニー形成、菌血症および死を進行させる。

10

【 0 2 3 5 】

C B A / N マウスを所望の免疫原性組成物の 1 またはそれ以上の投与にて鼻腔内または皮下にて免疫化する。その後、C B A / N マウスをストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシン - 抵抗性ストレプトコッカス ニューモニアで攻撃する。鼻腔内でのコロニー形成における免疫化の効果を決定するために、C B A / N マウスを攻撃後に屠殺し、鼻を取り、滅菌塩水中にホモジェナイズする。ホモジェネートを塩水にて連続希釈し、ストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシン含有 T S A プレートに蒔く。加えて、各マウスから攻撃後に収集した血液もストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシンを含んでいる T S A プレートに蒔き、細菌のレベルを決定する。プレートを一晩 37 にてインキュベートし、次いでコロニーをカウントする。他の具体例では、C B A / N マウスを前記のように免疫化し、鼻腔内攻撃する。攻撃後に毎日 C B A / N マウスを観察し、死亡率を 14 日間モニターする。鼻咽腔でのコロニー形成および / または死亡の統計学的に有意な低下は、ポリペプチドがヒト臨床法試験に用いるのに適当であることを示す。

20

【 0 2 3 6 】

本発明のストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチド、ポリペプチド、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドのモジュレーター、および抗 - ストレプトコッカス ニューモニア抗体 (以下、「活性化化合物」とも呼ぶ) を、対象、例えばヒトへの投与に適した医薬および免疫原性組成物に組み込む。そのような組成物は、典型的には、核酸分子、タンパク質、モジュレーター、または抗体および医薬上許容されるキャリアを含む。以下用いる「医薬上許容されるキャリア」なる用語は、医薬投与に適合するいずれかおよび全ての溶媒、分散媒質、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むものとする。医薬活性物質のためのそのような媒質および剤の使用は、当該分野で周知である。いずれかの常套の媒質または剤が活性化化合物と適合しない場合を除き、そのような媒質を本発明の組成物に用いることができる。補助的活性化化合物も、組成物に組み込むことができる。

30

【 0 2 3 7 】

発明の医薬または免疫原性組成物は、その意図される投与経路と適合するように処方される。投与経路の例には、非経口 (例えば、静脈内、経皮、皮下、腹腔内)、粘膜経由 (例えば、経口、直腸、鼻腔内、膣、呼吸器)、および経皮 (局所) が含まれる。非経口、経皮、または皮下適用のために用いられる溶液または懸濁液には、以下の成分：注射用の水、塩水溶液、固定オイル、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒などの無菌希釈液；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または二亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミンテトラ酢酸などのキレート剤；アセテート、シトレート、またはホスフェートなどのバッファー、および塩化ナトリウムまたはデキストレプトコッカス ニューモニアロースなどの緊張調整剤などを含むことができる。p H は、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる。非経口調製物は、アンプル、使い捨て注射器またはガ

40

50

ラスまたはプラスチック製の多投与バイアルに封入することができる。

【0238】

注射可能使用に適した医薬組成物には、無菌の注射可能溶液または分散液の即席調製のための無菌水溶液（水溶性の場合）または散剤、および無菌粉末が含まれる。静脈内投与に関して、適当なキャリアには、生理的塩水、静菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, NJ)、またはリン酸緩衝塩水（PBS）が含まれる。全ての場合において、組成物は無菌でなければならず、容易な注射可能性が存在する程度まで流動的でなければならない。製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染活性に対して保護されなければならない。キャリアは例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、ポリエチレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）およびその適当な混合物を含んでいる溶媒または分散媒質であり得る。適当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には所望の粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。微生物の活性の予防は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、砂糖、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどを組成物中に含めることが好ましい。注射可能組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどを組成物中に含めることによりなすことができる。

10

【0239】

無菌注射可能溶液は、活性化化合物（例えば、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドまたは抗ストレプトコッカス ニューモニア抗体）を所望の量で適当な溶媒中に、所望のように、前に列挙した成分の1つまたは組み合わせとともに組み込み、次いで濾過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散液は、活性化化合物を、塩基性の分散媒質および前に列挙したものからの所望の他の成分を含む無菌ビヒクルに組み込むことにより調製される。無菌注射可能溶液の調製のための無菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより既に滅菌濾過した溶液からの活性成分+いずれかの追加の所望の成分の粉末を得る。

20

【0240】

経口組成物は、一般に、不活性成分または食用キャリアを含む。それらは、ゼラチンカプセルに封入され、または錠剤へと圧縮され得る。経口治療投与のためには、活性化化合物は、賦形剤と共に組み込むことができ、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で用いることができる。経口組成物は、うがい（液体キャリア中の化合物を口に入れ、口のなかでグチュグチュし、そして吐き出すかまたは飲み込む）としての使用のための液体キャリアを用いて調製することもできる。医薬上適合できる結合剤および/またはアジュバント物質を組成物の部分として含めることができる。錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは、以下の活性成分または同様の性質の化合物のいずれかを含むことができる：ミクロクリスタリンセルロール、トラガカントゴム、またはゼラチンなどの結合剤；スターチまたはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、Primogel、コーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはSterotesなどの潤滑剤；コロイド状二酸化シリコンなどの滑剤；スクロースまたはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ風味などの風味剤。

30

40

【0241】

吸入による投与のためには、組成物は、適当な推進剤、例えば二酸化炭素などのガスまたはネブライザーを含む加圧したコンテナまたはディスペンサーからエアソールスプレーの形態で送達される。全身投与は、粘膜経由または経皮手段によることもできる。粘膜経由または経皮投与のためには、浸透されるべきバリアに適した浸透剤を処方用いる。そのような浸透剤は、一般に当該分野で公知であり、例えば、粘膜経由投与のためには、洗浄剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体を含む。粘膜経由投与は、鼻スプレーまたは坐薬の使用により達成することができる。経皮投与のためには、活性化化合物は当該分野で一般

50

的に知られているような軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームへと処方される。

【0242】

組成物は、直腸送達のための坐薬（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドなどの常套の坐薬基剤を用いて）または停留浣腸の形態で調製することもできる。

1つの具体例では、活性化合物は体からの迅速な排出に対して化合物を保護するキャリア、例えば、インプラントおよびマイクロ封入送達システムを含む制御放出製剤などを用いて調製する。

【0243】

生物分解可能な、生物適合性ポリマー、エチレンビニルアセテート、ポリアンヒドライド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ酢酸などを用いることができる。そのような製剤の調製法は、当該分野の専門家に明らかであろう。物質は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Incから市場入手可能でもある。リボソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染した細胞にターゲットされるリボソームを含む）も、医薬上許容されるキャリアとして用いることができる。これらは、例えば出典明示により本明細書中に組み込まれるU.S.特許第4,522,811号に記載されているような、当業者に公知の方法に従い調製することができる。

【0244】

投与の簡便および投与の単一性のために、投与ユニット製剤に、経口または非経口組成物を処方することが特に好都合である。以下に用いられる単位投与製剤は、治療されるべき対象に対する単位投与として適した物理的に別個のユニット；各ユニットは、所望の医薬キャリアと組み合わせて所望の治療効果を生じるべく算定された、予め決定された量の活性化合物を含んでいる、を意味する。本発明の投与ユニット製剤の詳細は、活性化合物および達成されるべき特定の治療効果、および個人の治療のためにそのような活性化合物を配合することに関する当該分野に本来的に存在する制限により決定され、それに直接依存する。

【0245】

組み合わせ免疫原性組成物は、本発明のポリペプチドの2つまたはそれ以上を含め、そして本発明のポリペプチドの1つまたはそれ以上を、制限されるものではないが、C5aペプチダーゼ、Mタンパク質、アドヘジンなどを含む1つまたはそれ以上の公知のエス・ピヨギン(*S. pyogenes*)ポリペプチドと組み合わせることにより提供される。

【0246】

他の具体例において、組み合わせ免疫原性組成物は、発明のポリペプチドの1つまたはそれ以上を、制限されるものではないが、現在入手可能な23-価の肺炎双球菌被膜多糖類ワクチンおよび7-価の肺炎双球菌多糖類-タンパク質結合ワクチンを含む1つまたはそれ以上の公知のエス・ニューモニアエ多糖類または多糖類-タンパク結合物と組み合わせることにより提供される。

【0247】

本発明の核酸分子は、種々のベクターおよび発現システムに挿入する。非常に多くの発現システムが用いられる。そのようなシステムには、特に、染色体、エピソーム、およびウイルス由来のシステム、例えば細菌プラスミド、サルモネラなどの弱毒化細菌（米国特許第4,837,151号）、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ワクシニアおよび他のボックスウイルス、シンドビス、アデノウイルス、バキュロウイルス、パポバウイルス、SV40など、鶏痘ウイルス、偽狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスなどのアルファウイルス（米国特許第5,643,576号）、水疱性口内炎ウイルスなどの非セグメント化ネガティブ鎖RNAウイルス（米国特許第6,168,943号）などのウイルス由来のベクター、およびその組み合わせ由来のベクター、プラスミドおよびバクテリオファージ遺伝子エレメント、コスミドおよびファージミドなど由来のものなどが含まれる。発現システムは、発現を調節ならびに発生する制御領域、プロモーターおよび他の調節エレメントなど（ポリアデニル化シグナルなど）を含む。一般に、宿主中でポリペプ

10

20

30

40

50

チドを生じるためのポリヌクレオチドを維持、増殖、または発現するのに適したあらゆるシステムまたはベクターを用いてよい。適当なヌクレオチド配列を、種々の周知および常套の方法、例えば、Sambrook et al., “分子クローニング：研究室マニュアル” 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されているものなどのいずれかにより、発現システムに挿入してよい。

【0248】

医薬上許容されるビヒクルは、副作用を引き起こさず、かつ例えば活性化合物の投与を容易にすること、体内でのその寿命および/または効率を増すこと、溶液中でのその溶解性を増すこと、またはこれとは別に、その保存性を高めることを可能とする医薬または免疫原性組成物に入っている化合物または化合物の組み合わせを示すことが理解される。これらの医薬上許容されるビヒクルは周知であり、選択される活性化合物の性質および投与様式に従い、当該分野の専門家により適合される。

【0249】

以下に定義される、「アジュバント」は、「抗原」または配列番号216～配列番号430または配列番号592～配列番号752の1つから選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド抗原を含んでいる免疫原性組成物の免疫原性を高めるのに役立つ物質である。つまり、アジュバントは免疫反応をブーストレプトコッカス ニューモニアするべく与えられることが多く、当業者に周知である。本発明に意図されるアジュバントの例には、制限されるものではないが、リン酸アルミニウムおよび水酸化アルミニウムなどのアルミニウム塩 (alum)、マイコバクテリウム結核 (*Mycobacterium tuberculosis*)、ボルデテラ百日咳 (*Bordetella pertussis*)、細菌リボ多糖類、アミノアルキルリン酸グルコサミン化合物 (AGP)、またはその誘導体または類似体 (これらはCorixa(Hamilton, MT)から入手可能であり、米国特許第6,113,918号に開示されている)；1つのそのようなAGPは、2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]エチル-2-デオキシ-4-O-ホスホノ-3-O-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル]-2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-b-D-グルコピラノシドであり、これは水性形態または安定なエマルジョンとして処方される529としても知られる (正式にはRC529としても知られる)；U.S. 特許第4,912,094号に開示されているMPLTM (3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A) (Corixa)、CpGモチーフを含んでいるオリゴヌクレオチドなどの合成ポリヌクレオチド (米国特許第6,207,646号)、ポリペプチド、米国特許第5,057,540号に開示されているQuil AまたはSTIMULONTM QS-21 (Antigenics, Framingham, Massachusetts)などのサポニン、百日咳毒 (PT)、またはイー・コリ熱不安定性毒 (LT)、特にLT-K63、LT-R72、CT-S109、PT-K9/G129；例えば、国際特許公開第WO93/13302号およびWO92/19265号を参照されたい；コレラ毒 (野生型または変異形態、例えばアミノ酸第29位置のグルタミン酸が他のアミノ酸、好ましくはヒスチジンなどで、公開国際特許出願第WO00/18434号に従い置き換えられているものいずれか)が含まれる。種々のサイトカインおよびリンフォカインがアジュバントとしての使用に適當である。1つのそのようなアジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) であり、これは米国特許第5,078,996号に記載されているヌクレオチド配列を有する。GM-CSF cDNAを含んでいるプラスミドがイー・コリに形質転換され、アメリカタイプカルチャーコレクション (ATCC)、1081 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に受託番号39900下に寄託されている。サイトカインインターロイキン-12 (IL-12) は、米国特許第5,723,127号に記載されているもう一つのアジュバントである。インターロイキン1-アルファ、1-ベータ、2、4、5、6、7、8、10、13、14、15、16、17、および18、インターフェロン-アルファ、ベータ、およびガンマ、顆粒球コロニー刺激因子、および腫瘍壊死因子アルファおよびベータを含む他のサイトカインまたはリンフォカインが免疫調節活性を有することが

10

20

30

40

50

示されており、アジュバントとしての使用に適している。

【0250】

本発明の組成物は、典型的には、常套の、周知の無毒の生理学的に許容されるキャリア、アジュバントおよびビヒクルを所望のように含んでいる投与単位製剤にて非経口投与される。以下に用いる非経口なる用語は、静脈内、筋肉内、動脈内注射、または注入法が含まれる。

【0251】

注射可能製剤、例えば無菌の注射可能水性または油性懸濁液は、適当な散剤、または湿剤、および懸濁剤を用いて当該分野で公知の方法に従い処方される。無菌注射可能製剤は、無毒の非経口許容希釈液または溶媒、例えば、1, 3 - ブタンジオール中の溶液などの無菌の注射可能溶液または懸濁液であり得る。

10

【0252】

用いてよい許容されるビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンガー溶液、および等張の塩化ナトリウム溶液である。加えて、無菌の固定オイルが溶媒または懸濁媒質として簡便に用いられる。この目的のために、合成モノ - またはジ - グリセリドを含むあらゆるブランドの固定オイルを用いることができる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸が、注射可能製剤の調製に用いられる。

【0253】

好ましいキャリアには、リン酸、乳酸、トリスなどで緩衝処理された中性塩水溶液が含まれる。もちろん、ウイルスベクターを投与する場合、不完全な干渉アデノウイルス粒子またはエンドトキシンおよび他の病原体などの望ましくない汚染物質を本質的に含まないようにするのに十分な程度にベクターを精製して、ベクター構築物を受けている個人にいかなる望ましくない反応も起こらないようにする。ベクターを精製するのに好ましい手段には、上昇密度勾配、塩化セシウム勾配遠心分離などの使用が含まれる。

20

【0254】

キャリアはリボソームであってもよい。送達ビヒクルとしてリボソームを用いる手段は、当該分野で周知である（例えば、Gabizon et al., 1990; Ferruti et al., 1986; and Ranade, 1989を参照されたい）。

【0255】

本発明の免疫原性組成物は、遺伝子発現を制御する調節配列と作用的に組み合わせて本発明のポリヌクレオチド配列を含む。目的のポリヌクレオチド配列は、発現ベクター、プラスミドなどに、DNAの発現を促進する調節エレメント、つまり、プロモーターおよび/またはエンハンサーエレメントの制御下に操作される。好ましい具体例において、ヒトのサイトメガロウイルス前初期プロモーター/エンハンサーを用いる（米国特許第 5, 168, 062号）。プロモーターは細胞特異的であってよく、予め決定された細胞においてのみポリヌクレオチドの実質的な転写を許容する。

30

【0256】

ポリヌクレオチドは、「ネイキッドな」DNAとして宿主中に直接導入されるか（米国特許第 5, 580, 859号）、またはプピバカインおよび他の局所麻酔薬（米国特許第 5, 593, 972号）および陽イオン性ポリアミン（米国特許第 6, 127, 170号）などの免疫化を促進する剤と共に組成物中に処方されるかのいずれかである。

40

【0257】

このポリヌクレオチド免疫化法において、本発明のポリペプチドはトランジェントな基準にてインビボで発現され、遺伝子物質は宿主の染色体に全く挿入されず、または統合されない。この方法は、目的が、目的の遺伝物質を染色体へ挿入または統合することである遺伝子治療と区別されなければならない。アッセイを用いて、免疫化により投与されたポリヌクレオチドが、宿主において形質転換された表現型を生じないことを確認する（米国特許第 6, 168, 918号）。

【0258】

H. 本発明の使用および方法

50

本発明に開示されるストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリペプチド相同物、モジュレーター、アジュバント、および抗体を、治療、特に疾患の同定における診断アッセイ、薬物スクリーニングアッセイ、および臨床試験中の効果を測定することに使用することができる。本発明の単離ポリヌクレオチドを用いて、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを（例えば、宿主細胞またはポリヌクレオチド免疫化を適用したものにおいて、組換え発現ベクターにより）発現すること、およびストレプトコッカス ニューモニア mRNA を（例えば生物学的サンプル中で）検出することができる。さらに、本発明の抗ストレプトコッカス ニューモニア抗体を用いて、生物サンプル中に存在するストレプトコッカス ニューモニアポリペプチド、特にストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドのフラグメントを検出および単離すること、およびストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの活性を調節することができる。

10

【0259】

本発明により、配列番号 216 ~ 配列番号 430 または配列番号 592 ~ 配列番号 752 の 1 つから選択されるアミノ酸配列、その生物学的同等物、またはそのフラグメントを有するポリペプチドを含んでいる免疫原性組成物が提供される。免疫原性組成物は、セクション G に概説したように、医薬上許容されるキャリアをさらに含んでよい。所定の好ましい具体例において、免疫原性組成物は 1 つまたはそれ以上のアジュバントを含む。

【0260】

他の具体例において、本発明により、配列番号 1 ~ 配列番号 215 または配列番号 431 ~ 配列番号 591 の 1 つから選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む免疫原性組成物であって、ポリヌクレオチドが組換え発現ベクターに含まれるものが提供される。好ましくは、ベクターはプラスミド DNA である。もちろん、ポリヌクレオチドは、異種構造ヌクレオチドをさらに含んでよく、例えば、ポリヌクレオチドは 1 つまたはそれ以上の発現調節エレメントに作用的に結合しており、および 1 つまたはそれ以上のアジュバントをさらに含む。好ましい具体例において、免疫原性ポリヌクレオチド組成物は、ストレプトコッカス ニューモニアの中和エпитープの発現を指向する。

20

【0261】

ストレプトコッカス ニューモニア感染に対して宿主を免疫化するための方法が提供される。好ましい具体例において、宿主はヒトである。つまり、宿主または対象に、配列番号 216 ~ 配列番号 430 または配列番号 592 ~ 配列番号 752 の 1 つから選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、その生物学的同等物またはそのフラグメントおよび医薬上許容されるキャリアを含む免疫原性組成物の免疫化量を投与する。免疫原性組成物の免疫化量は、対象を、免疫原性組成物を段階的に量を増して用いて免疫化し、免疫反応を分析して、最適の投与量を決定する投与反応試験を行うことにより決定することができる。試験の開始時点は、動物モデルでの免疫化データから推断することができる。投与量は、個人の特定の条件に基き変化し得る。量は、当業者に公知の方法により常套の試験で決定することができる。

30

【0262】

免疫原性組成物の免疫学的有効量を、適当な投与数で対象に投与して、免疫反応を誘発する。本明細書中に用いられる免疫学的有効量は、処置した個人の免疫系に細菌感染の臨床影響を減じる反応を少なくとも引き起こすのに十分な量の、単一投与にて、または一連の投与の部分としてのいずれかでの、哺乳動物宿主（好ましくはヒト）への投与を意味する。保護は、免疫原性組成物またはワクチンの単一投与により付与されてよく、または、保護を維持するための後の時点でのブースター投与に加えて数回投与の投与を要してよい。これは、細菌による悩みの最も少ない低下 ~ 感染の予防までの範囲であってよい。理論上は、処置された個人は、ストレプトコッカス ニューモニア感染に関してより重篤な臨床徴候を示さない。投与量は、個人の特定の条件、年齢および体重などにより変化することができる。この量は、当該分野の専門家に公知の方法により、常套の試験で決定することができる。

40

【0263】

50

1. 診断アッセイ

本発明により、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドまたはストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチド、またはそのフラグメントの生物サンプルにおける存在を検出するための方法が提供される。方法は、生物学的サンプルを、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドまたはmRNAを検出することができる化合物または試薬と接触させて、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチド/コードしている核酸分子の存在を生物サンプル中で検出することを含む。ストレプトコッカス ニューモニア mRNA または DNA を検出するのに好ましい試薬は、ストレプトコッカス ニューモニア mRNA または DNA にハイブリダイズすることができる標識されたまたは標識可能なオリゴヌクレオチドプローブである。核酸プローブは、例えば、配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つの全長ストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチド、その相補物、またはそのフラグメント、例えば少なくとも 1 5、3 0、5 0、1 0 0、2 5 0、または 5 0 0 ヌクレオチド長の、およびストレプトコッカス ニューモニア mRNA または DNA に対してストリンジェント条件下で特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドなどであり得る。別法として、サンプルを配列番号 1 ~ 配列番号 2 1 5 または配列番号 4 3 1 ~ 配列番号 5 9 1 の 1 つのストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチド、その相補物、またはそのフラグメントのオリゴヌクレオチドプライマーと、ヌクレオチドおよびポリメラーゼの存在下、プライマーの拡張を許容する条件下で接触させることができる。

【0264】

ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドを検出するために好ましい試薬は、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドに結合することができる標識されたまたは標識可能な抗体である。抗体は、ポリクローナル、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。完全な抗体またはそのフラグメント（例えば、Fab または F(ab')₂）を用いることができる。「常識されたまたは標識可能な」なる用語は、プローブまたは抗体に関して、プローブまたは抗体へ検出可能な物質を結合させること（即ち、物理的に結合させること）によるプローブまたは抗体の直接的な標識、ならびに直接標識された他の試薬との反応によるプローブまたは抗体の間接的な標識を包含するものとする。間接的な標識の例には、蛍光標識された二次抗体を用いる一次抗体の検出および蛍光標識されたストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドで検出することができるようにビオチンで DNA プローブを末端標識することが含まれる。「生物学的サンプル」なる用語は、対象から単離された組織、細胞、および生物体液ならびに対象中に存在する組織、細胞、および液体が含まれるものとする。つまり、発明の検出法を用いて、生物サンプル中のストレプトコッカス ニューモニア mRNA、DNA、またはタンパク質を、インビトロならびにインビボで検出することができる。例えば、ストレプトコッカス ニューモニア mRNA の検出のためのインビトロ法には、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの検出のためのインビトロ法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降法および免疫蛍光法が含まれる。別法として、ストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドは、対象に標識された抗 - ストレプトコッカス ニューモニア抗体を導入することにより、対象において検出することができる。例えば、抗体は、対象におけるその存在および位置を常套の画像処理法により検出することができる放射性マーカーで標識することができる。

【0265】

本発明によるポリヌクレオチドは、配列決定、遺伝子の変異および発現試験を可能とし、遺伝子の非常に小さいサイズおよび分析数に関するその高い能力が与えられた場合に現在重要な分析 DNA チップにも用いてもよい。

【0266】

これらのチップの操作の原則は、一般的に数平方センチメートルのオーダーの小型化された表面に結合された分子プローブ、最も頻繁には、オリゴヌクレオチドに基づく。分析中

、分析されるべき標的核酸のフラグメントを含んでいるサンプル、例えば、標識されたDNAまたはRNAを例えば増幅後に、支持体をプローブで予め覆ったDNAチップ上にのせる。標識された標的配列をプローブと接触させることにより、J.D.ワトソンおよびF.クリックにより定義された対形成の原則による二本鎖の、ハイブリダイゼーションによる形成が導かれる。洗浄ステップ後、チップの表面の分析により、標的をタグしている標的により放出されるシグナルを用いて有効なハイブリダイゼーションを位置づけることが可能となる。適当なコンピューター処理によりサンプル中の特異的フラグメントの存在、配列の決定および変異の存在などの情報を決定することを可能とするこの分析により、ハイブリダイゼーションフィンガープリントが得られる。

【0267】

チップは多数の分子プローブ、詳細には、その表面が小型化された固体支持体上に組織化または整列化された多数の分子プローブから成る。それは他のエレメント（画像処理システム、マイクロコンピューター）がハイブリダイゼーションの獲得および解釈を可能とするシステムの中核である。

【0268】

ハイブリダイゼーション支持体は、種々の物質から成る平坦または（ウェルで貫通された）多孔の表面の形態にて提供される。支持体の選択は、後者、およびプローブの合成または結合中またはチップの使用中に支持体が置かれる条件の間の関係により決定される。それゆえ、特定の支持体を用いることを考慮する前に、pHに対するその安定性、その物理的強度、その反応性およびその化学的安定性、ならびに核酸に非特異的に結合するその能力などの特性を考慮することが必要である。ガラス、シリコン、およびポリマーなどの物質も一般に用いられる。それらの表面は、「機能分化」と呼ばれる第一段階で、その上に結合させることが所望される群に対して反応性となるようにされる。機能分化後、いわゆるスパーサー分子を活性化された表面に融合させる。表面とプローブの間の中間物質として用いて、様々なサイズのこれらの分子により、プローブの合成または結合およびハイブリダイゼーションに関して問題であることがよくわかっている支持体の表面特性が取るにたらないものとなる。

【0269】

ハイブリダイゼーション支持体の中には、例えばAffymetrixカンパニー(E.L. Sheldon, 1993)により開発された光化学アドレッシングによるオリゴヌクレオチドのインサイチュ合成法にて用いられるガラスが挙げられ得、ガラスの表面はシランで活性化される。Geno sensor Consortium (P. Merel, 1994)は、3 mm間隔のウェルを有するガラススライドを用い、この支持体はエポキシシランで活性化されている。

【0270】

本発明によるプローブは、DNAチップの支持体上にインサイチュ直接合成されてよい。このインサイチュ合成は、(Affymaxカンパニーにより開発された(Amsterdam, Holland)およびその子会社Affymetrix (United States)により工業的に開発された)光化学アドレッシングにより、またはVLSIPS（巨大スケールの固定化されたポリマー合成）法(S.P.A. Fodor et al., 1991)、これは光化学ディレクティッドコンビナトリー合成法に基づく、に基いて行われてよい。その原理は、固相化学、光標識可能基および光リトグラフィー使用を組み合わせる。

【0271】

発明によるプローブは、電気化学的アドレッシング、自動化アドレッシング、またはプローブプライマーの使用などの種々の方法でDNAチップに結合してよい(T. Livache et al., 1994; G. Yershov et al., 1996; J. Derisi et al., 1996, and S. Borman, 1996)。

DNAチップの支持体上にインサイチュでのせられたまたは合成された発明のプローブと分析されるべきサンプルの間のハイブリダイゼーションの検出は、例えば、蛍光シグナルの測定により、放射能活性測定によりまたは電氣的検出により測定されてよい。

【0272】

10

20

30

40

50

フルオレセインなどの蛍光分子の使用は、サンプルを標識化する最も一般的な方法である。それにより、ハイブリダイゼーションの直接的または間接的な検出が可能となり、および種々の蛍光色素の使用が可能となる。

【0273】

Affymetrixは、現在、Gene ChipTMチップを読むべく設計された装置またはスキャナーを提供する。それにより、焦点顕微鏡にてチップの表面をスキャンすることによりハイブリダイゼーションを検出することが可能となる(R.J. Lipshutz et al., 1995)。

【0274】

発明によるヌクレオチド配列をDNAチップに用いて、ストレプトコッカス ニューモニア遺伝子の発現の分析を行ってよい。ストレプトコッカス ニューモニア遺伝子の発現の分析は、所定の遺伝子の特徴付けるその選択性のために選択された発明のプロープが存在するチップの使用に基く(D.J. Lockhart et al., 1996; D.D. Shoemaker et al., 1996)。DNAチップを用いる遺伝子発現の分析法に関しては、プロープのインサイチュ合成、または既に合成されたプロープのアドレッシングおよび結合に関するD.J. Lockhart et al. (1996) および Sosnowsky et al. (1997)に記載の方法を参照してよい。分析されるべき標的配列は標識し、そして一般に、チップにハイブリダイズされる前に約50～100ヌクレオチドの配列に断片化される。すでに、例えばD.J. Lockhart et al. (1996)および別の電気分野の出願(Sosnowsky et al., 1997)により記載されているように洗浄し、標識された化合物を検出および定量し、ハイブリダイゼーションは少なくとも2回行う。別のサンプルに関して同一プロープについておよび/または異なるプロープに関して同じサンプルを用いて得られたシグナル強度の比較分析により、サンプルから誘導されるRNAの差別的発現またはDNAのコピー数を測定する。

【0275】

本発明によるヌクレオチド配列は、さらに、他の微生物に特異的な他のヌクレオチドプロープも存在するDNAチップに用いてよく、そして、サンプル中の微生物の存在の迅速な同定を可能とする一連の試験を行うことを許容し得る。

従って、発明の目的はさらに、DNAチップの支持体に固定されることに特徴づけられる発明によるヌクレオチド配列である。

【0276】

発明による少なくとも1つのヌクレオチド配列を含むことに特徴づけられる、チップの支持体上に固定されたDNAチップも本発明の部分を形成する。

チップは、大きな確実性で、標的配列の特異性または分析されるべきサンプルにおける所望の変異が同定するべく、種々の長さの、および/または別個の遺伝子に対応している発明のいくつかのプロープまたはヌクレオチド配列を好ましくは含む。

【0277】

従って、DNAチップなどの支持体上に固定された発明によるプライマーおよび/またはプロープを用いて行う分析により、例えば、同一種内での変化などの変化に関連する変異を同定することが可能となる。これらの変化は、同定される変異に特異的な病状に関連し、またはそれと関係があり、適当な治療を選択することを可能とする。

本発明は、さらに、該チップの支持体上に固定された、ストレプトコッカス ニューモニアとは別個の微生物；好ましくは、別個の微生物は、関連する微生物、ストレプトコッカス ニューモニアファミリーの細菌、およびストレプトコッカス ニューモニア種の変種から選択される、の少なくとも1つのヌクレオチド配列を含むことに特徴づけられる本発明によるDNAチップを含む。

【0278】

前記DNAチップの原理を用いて、支持体が、DNAの代わりに本発明によるポリペプチドまたは抗体またはそのアレイで覆われたタンパク質「チップ」を製造してもよい。これらのタンパク質「チップ」により、例えば、タンパク質で覆われた支持体上への標的分析物の表面プラズマ共鳴(SPR)によるアフィニティ補足により誘導される生物分子相互作用(BIA)を分析することが可能となる。例えば、国際出願EP 5 2 4 8 0 0号に記

載されている固体支持体上へタンパク質を結合させることに関する方法、またはB I A コア - タイプ法などのバイオセンサー - タイプのタンパク質チップの使用を記載している方法(Pharmacia) (Arlinghaus et al., 1997, Krone et al., 1997, Chatelier et al., 1995)を参照してよい。分析されるべきサンプル由来の抗体またはポリペプチドを特異的に結合することができる本発明によるこれらのポリペプチドまたは抗体を次いでサンプルにおけるタンパク質の検出および/または同定のためのタンパク質チップに用いてよい。該タンパク質チップは特に、感染の診断に用いてよく、およびチップあたり異なる特異性の発明のいくつかのポリペプチドおよび/または抗体、および/またはストレプトコッカス ニューモニアとは異なる微生物を認識することができるポリペプチドおよび/または抗体を好ましくは含んでよい。

10

【0279】

従って、本発明の対象は、さらに、支持体に固定されることに特徴づけられる、特にタンパク質チップの、本発明によるポリペプチドおよび抗体である。

該チップの支持体に固定された本発明による少なくとも1つのポリペプチドまたは1つの抗体を含むことに特徴づけられるタンパク質チップも、発明の部分を形成する。

本発明はさらに、ストレプトコッカス ニューモニアとは別の微生物の少なくとも1つのポリペプチドまたはストレプトコッカス ニューモニアとは別の微生物の化合物に対して指向される少なくとも1つの抗体を含むことに特徴付けられる、チップの支持体上に固定された本発明によるタンパク質チップを含む。

20

【0280】

本発明は、さらに、ストレプトコッカス ニューモニア種または関連する微生物に属する細菌の検出および/または同定のための、または微生物の検出および/または同定のための、本発明によるタンパク質チップを含むことに特徴づけられるキットまたはセットに関する。

本発明によりさらに、ストレプトコッカス ニューモニアまたは関連する微生物に属する細菌の生物サンプル中での検出および/または同定のための、本発明によるヌクレオチド配列を使用することに特徴づけられる方法が提供される。

【0281】

本発明はさらに、生物サンプル中のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、キットは、生物サンプル中のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドまたはmRNAを検出することができる、標識されたまたは標識可能な化合物または試薬などの試薬；サンプル中のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの量を測定するための手段；およびサンプル中のストレプトコッカス ニューモニアポリペプチドの量を基準と比較するための手段を含む。化合物または試薬は適当なコンテナにパッケージされる。キットはさらに、キットを用いてストレプトコッカス ニューモニアmRNAまたはタンパク質を検出するための説明を含む。

30

【0282】

所定の具体例において、検出は、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)(例えば、米国特許第4,683,195号および米国特許第4,683,202号を参照されたい)、アンカーPCRまたはRACE PCRなど、または別法として、ライゲーション鎖反応(LCR)におけるプローブ/プライマーの使用を含む。この方法は、患者から細胞サンプルを回収すること、サンプルの細胞から核酸(例えば、ゲノム、mRNA、またはその両方)を単離すること、核酸サンプルを、ストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチド(存在する場合)のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で、ストレプトコッカス ニューモニアポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする1つまたはそれ以上のプライマーと接触させること、および増幅産物の存在または不在を検出すること、または増幅産物のサイズを検出すること、および対照サンプルと長さを比較することのステップを含む。

40

本明細書中に引用する全特許および公開文献は、出典明示により本明細書中に組み込む。

50

【0283】

実施例

以下の実施例を、他が詳細に記載される場合を除いて、当該分野の専門家にとって周知の、および通常の常套法を用いて行う。以下の実施例は例としての目的のために示し、いずれにせよ、本発明の範囲を制限するものと解釈されるべきではない。

【0284】

実施例 1

ストレプトコッカス ニューモニアの生物情報および遺伝子マイニング

ストレプトコッカス ニューモニアの遺伝子配列は、ゲノム研究機関 (TIGR) ウェブサイトからダウンロードし、新規なオープンリーディングフレーム (ORF) を以下の方法で決定した。ORF は、3つのポテンシャルな開始部位コドン、ATG、GTG、またはTTGの1つ、および3つのポテンシャルな停止コドン、TAA、TAG、またはTGAの1つを有するとして同定された。発明者らは、2つのORFファインダーアルゴリズム; GLIMMER (Salzberg et al., 1998) および発明者の承継人のプログラムのユニークなセットを用いて、「全ての」ORFを見出す効率を高めた。決定されるORFの精度を評価するために、発明者らの承継人により開発されたDictionと呼ばれる、各ORFに関するスコアを指定する別個の数数学的コサイン係数を用いるプログラムを用いた。 > 1.5 のDictionスコアを有するORFを、タンパク質産物をオードすることに関して高い確率を有するとみなす。2つのORFファインディングアルゴリズムにより予測されるORFの最少の長さを、74個のアミノ酸のタンパク質をコードする (ストレプトコッカス ニューモニアアップコドンを含む) 225ヌクレオチドと設定した。ORFの残りの最終的な調査として、 > 75 ヌクレオチドの全非コーディング領域をtBLASTnを用いて公のタンパク質データベース (以下に記載する) に対して調査した。これは、抗原性の変化を引き起こす役割を有する可能性のあるフレームシフト (Mejlhede et al., 1999) または遺伝子フラグメントを含む遺伝子の領域を同定するのに役立つ。発明者らの承継人により開発されたグラフィカル分析プログラムによっても、発明者らが全6つのリーディングフレームおよび更なる検査のためのゲノム配列に関して予測されるORFの位置を確認することが可能となる。これは、他のORF内に完全に組み込まれているORFの公知のケースが存在するが、他のORFと大きなオーバーラップを有するORFを除外するのに役立つ (Loessner et al., 1999; Hernandez-Sanchez et al., 1998)。

【0285】

ストレプトコッカス ニューモニアのORFの最初の注解は、BLAST (バージョン2.0) ギャップ検索アルゴリズム、Blastpを用いて行い、相同配列が同定された (Altschul et al., 1997)。 $< e^{-10}$ の全てのカットオフ値を有意と見なした。FASTAまたはPSI-BLASTなどの他の検索アルゴリズムを必要に応じて用いた。相同性検索のために用いられる非重複タンパク質配列データベースは、毎日更新されるGenBank、SWISS-PROT (Bairoch and Apweiler, 2000)、PIR (Barker et al., 2001)、およびTREMBL (Bairoch and Apweiler, 2000) データベース配列から成る。 $> e^{-10}$ のBlastp結果を有するORFを、ストレプトコッカス ニューモニアに対してユニークであると見なした。

完全なBLASTの結果のキーワード検索は、免疫原性組成物に関して公知のまたは疑わしい標的遺伝子ならびにタンパク質の位置または機能を同定する言語を用いて行った。

【0286】

いくつかのパラメーターを用いて、予測されるタンパク質の分類を決定した。細胞質膜を横切る移動のために運命づけられるタンパク質は、ポジティブに荷電した残着がN末端に隣接する中心の疎水性領域から成るリーダーシグナル (シグナル配列とも呼ばれる) をコードする (Pugsley, 1993)。SignalPと呼ばれるプログラムは、シグナルペプチドおよびその切断部位を同定する (Nielsen et al., 1997)。細菌におけるタンパク質の位置を予測するために、ソフトウェアPSORTを用いた (Nakai and Kanehisa, 1991)。このプログラムはニューラルネットアルゴリズムを用いて、グラム陽性細菌の「細胞質」、「原形質膜」および「細胞質膜」およびグラム陰性細菌の「外膜」へのタンパク質の局在性を予測する

。タンパク質の膜貫通 (T M) ドメインを、ソフトウェアプログラムTopPred II (Cserzo et al., 1997)を用いて分析した。

【 0 2 8 7 】

タンパク質ドメインまたは保存されたタンパク質領域の複数のアライメントの隠れマルコフニコフモデル(HMM)Pfamデータベースを用いて、現存のタンパク質ファミリーに属する可能性のあるストレプトコッカス ニューモニアタンパク質を同定した。このアウトプットのキーワード検索を用いて、B L A S T 検索基準により見逃された可能性のある追加の候補 O R F を同定するのに役立てた。H M M Lipoと呼ばれるコンピューターアルゴリズムが、約 1 3 1 個の生物学的に検証された細菌リポタンパク質を用いてリポタンパク質を予測するために、発明者らの承継人により開発された。この試験セットは、実験的に確認されている原核生物のリポタンパク質から作成された。タンパク質の開始からシステムアミノ酸までのタンパク質配列 + 次の 2 つのさらなるアミノ酸を用いて H M M を作製した。LPXTG細胞壁ソーティングシグナルを含む約 7 0 個の公知の原核生物のタンパク質を用いて H M M を開発し(Eddy, 1996)、ペプチドグリカン層に停泊する細胞壁タンパク質を予測した(Mazmanian et al., 1999; Navarre and Schneewind, 1999)。モデルはLPXTGを用いだけでなく、2つの形態の下流配列、第1の疎水性膜貫通ドメインおよび第2のポジティブに荷電したカルボキシ末端をも含んだ。ペプチドグリカン層と非共有結合的に相互作用する多くのタンパク質も存在するが、前記のLPXTGタンパク質のクラスからは異なる。これらのタンパク質は、そのカルボキシ末端にコンセンサス配列を有するようである(Koebnik, 1995)。発明者らの承継人はそれゆえ、本領域の H M M を開発し、およびそれを用いて、このクラスのタンパク質に含まれ得るあらゆるストレプトコッカス ニューモニアを同定した。

【 0 2 8 8 】

ストレプトコッカス ニューモニアの同定された O R F によりコードされるタンパク質を、他の有用な特徴に関してさらに評価した。タンデムな繰り返しファインダー(Benson, 1999)は、MSCRAMM(Foster and Hook, 1998)およびナイセリア メニンギティディス(Neisseria meningitidis)の相変異表面タンパク質において見出されているもののような繰り返し D N A 配列を含んでいる O R F を同定した。Arg-Gly-Asp(RGD)結合モチーフを、そのレセプターとして役立つインテグリンと共に含むタンパク質が、細胞接着の腫瘍な認識システムを構成する。R G D 認識は、真核生物組織へエントリーするために微生物により用いられている1つのメカニズムである(Stockbauer et al., 1999; Isberg and Tran Van Nhieu, 1994)。しかし、全ての R G D を含んでいるタンパク質が細胞接着を媒介するわけではない。カルボキシ末端にプロリンと共に R G D を含んでいるペプチド (R G D P) は、細胞接着アッセイにおいて不活性であり(Pierschbacher and Ruoslahti, 1987)、それゆえ除外される。Geanfammarソフトウェアを用いて、タンパク質を相同ファミリー(Park and Teichmann, 1998)へとクラスター化した。ファミリークラスの予備的分析により、候補クラスター内に新規な O R F が提供されており、潜在的なタンパク質の機能が規定されている。

【 0 2 8 9 】

実施例 2

予測 O R F タンパク質のクローニング、発現、および分析

材料および方法

ストレプトコッカス ニューモニアの増殖 . ストレプトコッカス ニューモニアを 0 . 5 % の酵母抽出物を追加したTodd Hewittブロス(Difco)中で増殖させた。細菌を 3 5 にて 5 % C O ₂ 中で振とうせずにインキュベートした。中 - log相培養物 (O D _{5 5 0} 約 0 . 3) をインキュベーションの約 4 時間後に回収し、細胞を遠心分離 (5 , 0 0 0 × g) により 4 にてペレット化した。

【 0 2 9 0 】

予測 O R F のクローニングおよび発現 . 予測された O R F を、イー . コリTop10またはBLR (DE3)にクローン化し、発現させた。各 O R F の発現を、pBAD/チオ-TOPO(アラビノース誘

10

20

30

40

50

導性プロモーターを含む)およびpCR T7/NT-TOP0発現システム(Invitrogen, Carlsbad, CA)の両方で試験した。遺伝子特異的プライマーを設計し、WizardゲノムDNA精製キット(Promega, Madison, WI)を用いて精製したストレプトコッカス ニューモニアC P 1 2 0 0 (Morrison et al., 1983)ゲノムDNAからそれぞれ選択されたORFを、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)により増幅するべく設計した。5'プライマーを、予測されるシグナル配列(SignalPにより予測される)を除外するべく設計し、3'プライマーをストレプトコッカス ニューモニアアップコドン(pCR-T7)を含むかまたはストレプトコッカス ニューモニアアップコドン(pBAD)を除外するかするように設計した。ORFを常套のポリメラーゼ鎖反応(50 μ Lのトータル容積中200 μ M各dNTP(Invitrogen)、200 μ Mの各5'および3'遺伝子特異的プライマー、染色体DNAの1 μ Lのストレプトコッカス ニューモニアック、2.5 UのPfu Turboポリメラーゼ(Stratagene, LaJolla, CA)および1 $\times$ pFu Turbo反応バッファー)にて増幅した。突出しているAを、10分間72 にて1 UのTaq DNAポリメラーゼ(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)でのインキュベーションによりPCR産物に添加した。PCR産物を発現ベクターにクローン化し、製造業者のTOPO-TAクローニングプロトコル(Invitrogen)に従い、イー・コリTOP10へと形質転換した。ポジティブクローンを、1つの遺伝子特異的プライマーおよび1つのベクター特異的プライマーを用いてPCRにより同定し、正確な方向を確認した。

10

【0291】

pCR-T7にクローン化したORFを、T7プロモーターを用いてタンパク質発現のためにイー・コリBL21(DE3)へと形質転換し、pBADにクローン化したものをTOP10に維持した。タンパク質発現を、100 μ g/mLのアンプシリンを追加した2 mLのHySoyブロス(DMV International Nutritional, Fraser, NY)中でポジティブクローンの培養物を一晚増殖させることにより決定した。これらの培養物を次いで新鮮な培地へと1:100希釈し、次いでOD₆₀₀ = 1.0まで増殖させた。タンパク質の発現を2%のアラビノース(pBAD)または0.1 mMのIPTG(pCRT7)を用いて誘導した。誘導3時間後、細胞を回収し、タンパク質の発現を、抗-発現エピトープ(pCRT7)または抗-チオ(pBAD)抗体いずれかを用いて、全細胞溶解物のウェスタンブロット分析により決定した。最もよい発現クローン(pBADまたはpCRT7)を、タンパク質の産生および精製のために用いた。

20

【0292】

pCRT7またはpBADいずれかにて、発現されなかった14個のORFをpET27b(+)(Novagen, Madison, WI)にクローン化した。ORFを再びPCRにより増幅し、常套の分子生物学的方法を用いてpET27b(+)(NcoIおよびXhoI部位にクローン化した。クローンをPCRにより再びスクリーンし、正しいインサートを有するプラスミドをBL21(DE3)へと形質転換し、pCR-T7に関して記載されているように発現を試験した。タンパク質の発現をウェスタンブロット分析により、抗-HSVエピトープ抗体を用いて測定した。

30

【0293】

溶解性His-tag ORFタンパク質の精製。

タンパク質を前記の4 $\times$ 1 Lの培地中でポジティブクローンから発現させた。細胞を、遠心分離により回収し、100 mLのNiバッファーA(20 mMのトリス、pH 7.5、150 mM NaCl)中に再懸濁し、French圧力セルに16,000 psiにて(SLM Instruments, Inc., Rochester, NY)2回通過させることにより溶解した。

40

【0294】

溶解性のタンパク質に関して、細胞の破片を~9,000 $\times$ gの遠心分離によりペレットとし、上清をNi²⁺で荷電したイミノジ酢酸セファロース6B(Sigma Chemical, St. Louis, MO)カラムに載せた。非結合タンパク質をカラムから、300 mMのイミダゾール(Sigma Chemical)を含むNiバッファーAで溶離した。純度は、SDS-PAGEにより推定した。

【0295】

50

さらなる精製を要するサンプルは濃縮し、バッファーを、バッファー A (20 mM トリス、pH 8.0) で平衡化した PD-10 カラム (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) と交換した。溶離液を Q-セファロー ス高性能 (Amersham-Pharmacia Biotech) カラムにのせ、0-35% のバッファー B (20 mM トリス、pH 8.0、1 M NaCl) 勾配で溶離した。タンパク質を含んでいるフラクションを SDS-PAGE により決定した。全タンパク質の精製は、AKTA Explorer (Amersham-Pharmacia Biotech) を用いて行った。

【0296】

His-tag 融合タンパク質の単離および溶解。

細菌細胞ペレットを EDTA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含んでいる完全プロテアーゼインヒビターカクテルを含む 10 mM の NaPO_4 / 150 mM NaCl / pH 7.0 中に 5:1 (バッファー容積: ペレット湿重量) で懸濁した。細胞をマイクロfluidiザー (Microfluidics Corp., Newton, MA) を用いて粉碎し、21,900 × g にて 30 分間 4 にて遠心分離した。不溶性の His-tag タンパク質を含んでいるペレットを、一連の界面活性剤抽出に供し、最終的に 6 M 尿素を用いる溶解を行った。ペレットを、完全プロテアーゼインヒビターカクテルおよび 1.0% のトライトン X-100 (TX-100) を含んでいる 10 mM の NaPO_4 / 150 mM NaCl / pH 7.0 に、前記と同じ 5:1 比を用いて再懸濁した。懸濁液を 4 にて 30 分間攪拌し、21,900 × g に 20 分間 4 にて遠心分離した。上清を取り、さらなる分析のために 4 にて貯蔵した。ペレットを 2 回目の TX-100 抽出に前記のように供し、上清を取り、4 にてさらなる分析のために貯蔵した。TX-100 ペレットを次いで完全プロテアーゼインヒビターカクテルおよび 1.0% の Zwittergent3-14 (Z3-14) を含んでいる 10 mM の NaPO_4 / 150 mM NaCl / pH 7.0 に再懸濁し、4 にて最低 1 時間貯蔵した。懸濁液を 21,900 × g にて 20 分間 4 にて遠心分離した。上清を取り、4 にてさらなる分析のために貯蔵した。Z3-14 ペレットを 100 mM の トリス-HCl / 6 M 尿素 / pH 8.0 に再懸濁し、最低 4 時間室温にて貯蔵した。懸濁液を 21,900 × g にて 20 時間 4 にて遠心分離し、上清を 4 にてさらなる分析のために貯蔵した。

【0297】

溶解させた His-tag 融合タンパク質の精製。

His-tag 融合タンパク質を含んでいる単離抽出物を SDS-PAGE および / またはウェスタンブロット分析により記載のごとく同定した。クロマトグラフィーを、製業者により調製された POROS MC20 ミクロン金属キレート-Ni²⁺ 媒質 (Perseptive Biosystems, Framingham, MA) を用いて行った。タンパク質抽出物をカラム媒質 mL 当たり約 5-10 mg のトータルのタンパク質にてのせた。

【0298】

His-tag タンパク質がサイトソルフракクションまたは TX-100 または Z3-14 による界面活性剤抽出物中のいずれかの中に溶解された調製物に関しては、材料をサイトソルタンパク質に関しては最低 3 カラム容量の 10 mM の NaPO_4 / 150 mM NaCl / pH 7.0 で、または TX-100 および Z3-14 抽出それぞれにおいて単離されたタンパク質に関しては 1.0% TX-100 または 1.0% Z3-14 いずれかを含んでいる同じバッファーで平衡化した MC20 カラムに直接適用した。サイトソル材料に関しては、非結合タンパク質を最低 5 カラム容積の平衡バッファーでカラムを通じて洗浄した。TX-100 または Z3-14 含有抽出物に関しては、非結合タンパク質を、特定のタンパク質の溶解特性により 0.05% TX-100 または Z3-14 いずれかを含んでいる平衡化バッファーでカラムを通じて洗浄した。His-tag 融合タンパク質は、0.05% の TX-100 または 0.05% の Z3-14 のいずれかを含んでいる 10 mM の NaPO_4 / 150 mM NaCl / pH 7.0 中それぞれ 25 mM、50 mM、125 mM、および 250 mM のイミダゾールの 2 カラム容量の段階勾配を用いて溶離した。His-tag タンパク質を含んでいるフラクションを SDS-PAGE により同

定し、プールした。イミダゾールを透析により適当なバッファーへと除去した。。タンパク質濃度を B C A アッセイ (Pierce) により決定し、所望により、調製物を、Centriprep Y M-10 膜 (Millipore, Bedford, MA) を用いる限外濾過か、材料をより小さな M C 2 0 カラムに前記の条件下に適用し、次いで 2 5 0 m M のイミダゾールで溶離した後透析を行うかのいずれかにより濃縮した。タンパク質純度は、S D S - P A G E およびスキャニングデンスシトメトリーにより見積もった。

【 0 2 9 9 】

尿素を用いてタンパク質を変性および溶解した調製物に関しては、材料を 1 0 0 m M のトリス - H C l / 0 . 0 5 % T X - 1 0 0 / p H 7 . 5 にて 3 倍希釈し、2 M の最終尿素濃度を得た。材料を最低 3 カラム容積の 1 0 0 m M の T r i s - H C l / 0 . 0 5 % T X - 1 0 0 / 2 M 尿素 / p H 7 . 5 で平衡化した M C 2 0 カラムに適用し、非結合タンパク質を最低 5 カラム容積の平衡バッファーでカラムを通じて洗浄した。H i s - t a g 融合タンパク質は、1 0 0 m M のトリス - H C l / 0 . 0 5 % T X - 1 0 0 / 2 M 尿素 p H 7 . 5 中それぞれ 2 5 m M 、 5 0 m M 、 1 2 5 m M 、および 2 5 0 m M のイミダゾールの 2 カラム容量の段階勾配を用いて溶離した。H i s - t a g タンパク質を含んでいるフラクションを S D S - P A G E により同定し、プールした。イミダゾールおよび尿素を除去し、タンパク質を透析により 0 . 0 5 % の T X - 1 0 0 を含んでいる適当なバッファーにリホールドした。所望により、調製物を、Centriprep Y M-10 膜 (Millipore, Bedford, MA) を用いる限外濾過か、材料をより小さな M C 2 0 カラムに前記の条件下に適用し、次いで 2 5 0 m M のイミダゾールで溶離した後透析を行うかのいずれかにより濃縮した。タンパク質純度は、S D S - P A G E およびスキャニングデンスシトメトリーにより見積もった。

10

20

【 0 3 0 0 】

S D S - P A G E & ウェスタン分析 .

S D S - P A G E を、Laemmli (Laemmli, 1970) により開示されているように、1 0 - 2 0 % (w t / v o l) 勾配アクリルアミドゲル (Zaxis, Hudson, OH) を用いて行った。タンパク質をゲルをシンプリーブルーセーフステイン (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) で染色することにより視覚化した。ゲルをパーソナルデンシメーター S I (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA) でスキャンし、純度をイメージクウォントソフトウェア (Image Quant software) (Molecular Dynamics Inc.) を用いて見積もった。

30

【 0 3 0 1 】

タンパク質のポリビニリデンジフルオライド (P V D F) 膜への移動を半乾燥エレクトロブロッターおよびエレクトロブロットバッファー (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH) で行った。移動したタンパク質を含んでいる P V D F 膜を、P B S (Blotto) 中で 3 0 分間調製された 5 % の脂肪分を含まない乾燥ミルクでブロックした。膜を次いで個々のタンパク質発現システムに特異的な指定の希釈での以下の一次抗体調製物の 1 つでプローブした : Invitrogen 抗 - X プレス (1 : 5 0 0 0) 、 Invitrogen 抗 - チオレドキシン (1 : 2 0 0 0) 、 Novagen 抗 - H S V エピトープ (1 : 5 0 0 0) 、 Qiagen 抗 - 4 × H i s (1 : 5 0 0 0) 。膜を次いで、Blottoで洗浄した後、二次抗体としてのヤギ抗 - マウスアルカリホスファターゼコンジュゲート (1 : 1 5 0 0) (Biosource International, C amarillo, CA) により洗浄した。ウェスタンブロットを 5 - プロモ - 4 - クロロ - インドリルホスフェート - ニトロブルーテトラゾリアム (B C I P / N B T) ホスファターゼ基質システム (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) で展開した。

40

【 0 3 0 2 】

タンパク質の定量 .

タンパク質の濃度を、ウシ血清アルブミンを基準として用いてビシンコニンアッセイ (Pierce, Rockford, IL) により見積もった。

【 0 3 0 3 】

マウスにおける抗 - O R F 血清の製造

6 ~ 8 週齢の雌のスイスウェブスターマウス (Taconic Farms, Germantown, NY) を、精

50

製した H i s - t a g タンパク質にて、0、4、および6週にて首に皮下免疫化した。2つの別個の免疫原性組成物を各 H i s - t a g タンパク質を用いて調製した。1つの免疫原性組成物は S T I M U L O N ^{T M} Q S - 2 1 で調製したタンパク質を用いて調製し、2つめのものは、M P L ^{T M} で処方したタンパク質を用いて調製した。マウスの1群の各投与量は、10 μ g の精製タンパク質および20 μ g の S T I M U L O N ^{T M} Q S - 2 1 を含み、第2の群のマウスの各投与量は、10 μ g の同じタンパク質および50 μ g の M P L ^{T M} を含んだ。血清サンプルを0、4、6、および8週で回収した。マウスを特定の病原体フリーの設備で飼育し、水と食餌を自由に摂取できるようにした。

【0304】

肺炎双球菌全細胞 E L I S A .

10

タイプ3またはタイプ14いずれかのストレプトコッカス ニューモニア株を、100 μ g / m l のストレプトコッカス ニューモニアを含んでいる T o d d H e w i t t プロス(Difco)中で35 にて振とうせずに増殖させた。細菌を中 l o g 相 (O D ₅₅₀ < 1 . 0) へと増殖させ、1時間60 にて熱不活性化した。細菌を10,000 $\times$ g にてペレットし、P B S 中に O D ₅₅₀ = 0 . 1 まで再懸濁した。懸濁液の55 μ l を次いで96ウェルの N u n c プレートの各ウェルへと添加し、室温にて空気乾燥した。プレートを4 にて使用まで貯蔵した。

【0305】

ウェルを5% (w t / v o l) の乾燥ミルク (ブロッキングバッファー) を含んでいる150 μ l / ウェルの P B S で1時間ブロックした。ウェルを5回 P B S にて S k a n t r o n 洗浄器にて洗浄し、マウスの血清を追加したブロッキングバッファー (100 μ l / ウェル) に希釈した。プレートを室温にて2時間インキュベートし、非結合抗体を5回 P B S で S k a n t r o n 洗浄器中で洗浄することにより除去した。結合抗体を100 μ l / ウェルのペルオキシダーゼ - 標識ヤギ抗 - マウス I g G (P B S 中 1 m g / m l の 1 : 1000 希釈 ; K P L) にて室温で2時間検出した。プレートを前記のように P B S で洗浄し、100 μ l / ウェルの A B T S (K P L) にて25分間室温にて展開した。反応を100 μ l / ウェルの1% S D S で停止し、各ウェルの O D ₄₀₅ を V E R S A マックスマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, Calif.) にて読んだ。各試験血清のエンドポイント力価を O D ₄₀₅ = 0 . 1 を生じる最高平均希釈の逆数として算定した。

20

30

【0306】

ストレプトコッカス ニューモニアの F A C S 分析

株タイプ3および19Fを、T o d d - H e w i t t プロス + O D ₆₀₀ ~ 1 . 0 細胞の凍結ストレプトコッカス ニューモニアックからの0 . 5 % 酵母抽出物中で増殖させた。2 - 3 $\times$ 10⁷ 細胞、タイプ3に関して O D ₆₀₀ = 0 . 5 の100 μ l、および19Fに関して50 μ l を96ウェルのマイクロタイタープレートにピペットし、4000 r p m にてエッテンドルフテーブル状遠心機に5分間かけた。上清を吸引し、細胞を95 μ l の P B S - 0 . 5 % B S A - 0 . 1 % ゼラチンに再懸濁した。5 μ l の一次抗体を添加し、混合し、氷上にて1時間インキュベートした。細胞を前記のようにペレットし、2回100 μ l のバッファーで洗浄し、99 μ l のバッファーに再懸濁した。Alexa Flour 488に結合させた1 μ l のヤギ抗マウス二次抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR) をサンプルに添加し、混合し、氷上にて30分間インキュベートした。細胞を前記のように洗浄し、100 μ l のバッファーに再懸濁した。FACSVantageSEユニット上で分析する前に、サンプルを1 m l へとバッファーで希釈した。サンプルをBecton Dickinson FACSVantageユニットにて、Enterprise IIレーザーを用いて呼んだ。励起は488 n m であり、放出は530 / 30 フィルターを用いて光電子増倍管で検出した。0週の抗血清を8週の抗血清に対するバックグラウンド対照とした。

40

【0307】

インビボおよびインビトロで増殖させた細胞からのメッセージの比較

特定の転写産物に関するメッセンジャー R N A (m R N A) レベルは、逆転写酵素を用

50

いてmRNAから二本鎖cDNAを作製することにより試験することができる。このcDNAを次いで常套のPCR条件を用いて増幅する。生じた増幅産物がつまり、作製されるメッセージを示すものである。この方法は、例えば培養フラスコ中の増殖対インビボでの増殖のように、特定の転写産物の発現を種々の環境条件下に比較するのに有用である。

【0308】

インビトロで増殖させた細胞からのRNAの調製

インビトロで増殖させたストレプトコッカス ニューモニア血清型を10g相へと、60mlのTHB-0.5%YE中にて37℃で5%CO₂にて増殖させた。細菌細胞を1000×gにて15分間4℃での遠心分離により回収した。上清を吸引し、細胞を1mlのRNA l a t e r (Ambion, Austin, TX)に再懸濁し、>1時間4℃にて貯蔵した。細胞を次いでマイクロフュージにて5分間8000×gにて遠心分離した。上清を吸引し、細胞を100μlの10%デオキシコレート(DOC)中に再懸濁した。1100μlのRNA Z O L B (Tel-Test, Inc)を次いで添加し、懸濁液を手短に転置により混合した。120μlのCHCl₃を次いで添加し、サンプルを転置により混合し、次いでマイクロフュージにて完全スピードで10分間4℃にて遠心分離した。水層を除去し、RNAを等容積の2-プロパノールの添加により沈殿させた。RNAを4℃にて>1時間インキュベートし、次いでマイクロフュージにて完全スピードで10分間室温で遠心分離した。上清を吸引し、RNAを75%のETOHで洗浄し、5分間再遠心分離した。上清を吸引し、RNAを50-100μlのヌクレアーゼフリーの水に再懸濁した。DNAを、サンプルをRNA se - フリーDNA se (DNAフリー1、Ambion)で20分間37℃にて処理した後、DNAフリーのキレーターの添加による酵素の不活性化を行うことによりRNAから除去した。RNAの純度および収率を、260nmおよび280nmでの吸収を測定することにより評価した。吸光比は典型的には1.9-2.0であった。RNAは-70℃にて保存した。

【0309】

インビボで増殖させた細胞からのRNAの調製

インビボで増殖させたストレプトコッカス ニューモニア血清型を、Orihuela et al. (2000)により記載されているように、スプラーク-ダウレイラットの腹腔洞にてインキュベートした密封透析管から回収した。Log相のストレプトコッカス ニューモニア細胞を前記のように調製し、10⁶cfu/mlへと、0.4%グルコースを補充したRPMI培地(Celltech)に再懸濁した。1mlの細胞懸濁液を80,000M_wのカットオフ(SpectraPore)を有するPVDF透析膜に密封した。2つのそのようなバッグを400gのスプラーク-ダウレイラット(Tacnic)に腹腔内にインプラントした。バッグをラットに22時間維持し、その後、ラットを殺し、バッグを回収した。RNAを前記のように腹腔内増殖させた細胞から調製した。

【0310】

メッセージレベルを測定するためのRT-PCR

各候補遺伝子に対する特定のメッセージを、RT-PCRを用いてインビトロおよびインビボ両方の増殖細胞から調製した。各反応に関して、0.5μgのRNAを0.25μMの逆マイニングプライマーと共に3分間75℃にてインキュベートし、次いで氷上で冷却し、44℃に移した。メッセージをRETROスクリプト(Ambion)キットを製造業者の指示に従い用いて逆転写した。Reddy Mix(ABgene)を製造業者の指示に従い用いて、0.25μMの前記リバープライマーおよびフォワードマイニングプライマーを用いて2-5μlのサンプルからのそれぞれのメッセージを増幅した。増幅後、10μlの増幅生成物を1%のアガロースゲル上で電気泳動した。

【0311】

結果

発現ベクターへのORFのクローニング

59個のORFを、前記のようなゲノム分析から表面露出の予測に基きクローニングおよび発現のために選択した。これらのORFをPCRにより増幅し、材料および方法に記

載のごとくの発現ベクターにクローン化した。ORFをpBAD/チオ-TOPOおよびpCR-T7/NT-TOPOにクローン化した。両ベクターはヘキサヒスチジntagおよびユニークなエピトープを融合し、精製およびウェスタンブロットによる同定をそれぞれ促進する。pBADベクターはクローン化されるタンパク質に対してチオレドキシン部分を融合して、溶解性をさらに高める。

【0312】

イー・コリにおけるORFの発現

全59個のORFをコードしている遺伝子を適当な宿主イー・コリ株に導入し、SDS-PAGEによる発現および全細胞抽出物のウェスタンブロット分析に関して試験した。59個のORFの中で、トータル24個の(41%)が検出可能なレベルで発現された。いずれの発現ベクターでも発現されなかった15個のORFを、ヒスチジntagをC末端に、PelBリーダー配列をタンパク質のN末端に融合するpET27b(+)にクローン化した。

【0313】

発現されたORFタンパク質の精製

発現されたORFの全ては、精製に役立つ6×Hisモチーフを含んだ。全てのタンパク質の最初の精製を、Ni含有樹脂を製造業者の指示に従い行いに行った。12個の発現されたORFタンパク質をアフィニティ精製を用いて、免疫化試験のために許容されるレベルの同質性まで精製した(表17)。用いた特定の精製条件は、材料および方法および表17に詳述する。20個のORFタンパク質の13個を用いてマウスを免疫化し、発現タンパク質に特異的な抗血清を得た。

【0314】

【表27】

表 17

発現されたエス・ニューモニアエORFタンパク質の精製

ORF #	[タンパク質] mg/ml	トータル タンパク質 mg	純度 %	最終バッファー	「PSORT」 予測位置	イー・コリに おける位置
75	0.52	6.8	94%	PBS/1mM EDTA pH 7.4	外膜	細胞質
2615	0.42	16.8	80%	PBS/1mM EDTA pH 7.4	外膜	細胞質
3039	0.53 (0.14)	2.91	82%	0.1Mトリス/150mM NaCl/ 0.05%Zw3-14/1mM EDTA pH 8.0	外膜	封入体
1143	1.4	196	92%	PBS/0.05%tx-100/ 1mM EDTA pH 7.4	内膜	封入体
1835	0.5 (0.2)	10.5	91.3%	PBS/0.05%tx-100/ 1mM EDTA pH 7.4	内膜	封入体
1568	1.0	5.0	>85%	PBS/0.05%tx-100/ 1mM EDTA pH 7.4	内膜	封入体
2271	4.9	122.5	>90%	PBS, pH 7.4	内膜	細胞質
2621	1.5	4.5	>90%	PBS, pH 7.4	内膜	細胞質
1104	2.0	-	85- 90%	PBS, pH 7.4	外膜	細胞質
935	0.1	.5	85%	50mM グリシン- NaOH/ 150mM NaCl/ 0.05%Z3-14 pH 10.0	外膜	封入体

【 0 3 1 5 】

【 表 2 8 】

3361	1.67	3.34	98%	PBS/1mM EDTA pH 7.4	内膜	細胞質
339	0.91 (0.91)	127.4 (27.3)	93.2% (80.8%)	PBS/0.05%tx-100/ 1mM EDTA pH 7.4	内膜	封入体
2322	0.55 (0.23)	2.5 (0.92)	90%	BS/0.05%tx-100/ 1mM EDTA pH 7.4	内膜	封入体
1476	1.2 (0.6)	9.6	>80%	PBS/0.05%tx-100/ 1mM EDTA pH 7.4	内膜	封入体
3115	0.2 (0.5)	2.8	>85%	PBS/0.05%tx-100/ 1mM EDTA pH 7.4	内膜	封入体
132	4.6	460	95%	PBS pH 7.4	-	細胞質
3386	3.1	27	85%	PBS pH 7.4	内膜	細胞質
2112	0.6	1.8	85%	PBS pH 7.4	内膜	細胞質
916	0.26	1.3	>85%	PBS 0.05% Tx-100 pH 7.4	-	封入体
3373	0.97	1.9	84%	PBS 0.05% Z3-14 pH 7.4	内膜	封入体

10

20

30

【 0 3 1 6 】

ストレプトコッカス ニューモニア全細胞溶解物におけるORFタンパク質の発現

ORFがストレプトコッカス ニューモニアにおいて発現されるかどうかを決定するために、インビトロ増殖細胞の全細胞溶解物をウェスタンブロット分析において抗血清でプローブした。各抗血清をポジティブ対照としての精製組換えタンパク質と反応させた（データは示していない）。ストレプトコッカス ニューモニア株タイプ3、タイプ14、およびタイプ19Fからの全細胞溶解物をウェスタンブロットにて試験し、結果を表18にまとめる。3つのORFからのタンパク質は、試験した株の全てにおいて検出されなかったか、またはほとんど検出されなかった。8個のORFからのタンパク質は、少なくとも2つの株で発現されたが、2つのORFからのタンパク質は試験した3つの株の1つにおいてのみ検出された。これらの結果は、これらのORFからのタンパク質の大部分が後期log、初期静止相のストレプトコッカス ニューモニアにて発現されたこと、および、いくつかの株は試験した時点で検出可能な量の各ORFを発現し得ないことを示す。

【 0 3 1 7 】

【表 29】

表 18

エス・ニューモニアエ ORF に関する全細胞 ELISA およびウエスタンブロット発現データ

		全細胞 ELISA		インビトロウエスタンブロット 発現			FACS 分析	
ワクチン (10 µg)	アジュバント (20 µg)	タイプ 3	タイプ 14	タイプ 3	タイプ 14	タイプ 19F	タイプ 3	タイプ 19F
2615	QS21	<200	<200	-	-	-	-	-
3039	QS21	<200	<200	+	++	++	-	-
75	QS21	256	<200	+++	+++	+++	+	-
1568	QS21	4,018	<200	++	+++	+++	-	-
1143	QS21	779	<200	+	++	+	+	-
1835	QS21	202	<200	-	+/-	-	+	-
2271	QS21	442	<200	+++	+++	+++	+	-
2621	QS21	739	<200	++	+	-	++	-
1104	QS21	409	<200	+++	+++	+++	+	-
339	QS21	<200	<200	-	+/-	-	-	ND
2322	QS21	<200	<200	-	-	+/-	-	ND
3361	QS21	<200	<200	-	+	+	+	ND
935	QS21	<200	<200	-	-	-	-	ND
スタンダード		~45,000	~10,000	ND	ND	ND		

【0318】

ORF タンパク質の表面露出：全細胞 ELISA

組換え ORF タンパク質に対する 13 個の抗血清をストレプトコッカス ニューモニア タイプ 3 およびタイプ 14 の 2 つの株に対する全細胞 ELISA により表面反応性に関して試験した。結果を表 18 に示す。13 個の抗血清のうち 7 つはタイプ 3 ストレプトコッカス ニューモニアに対して検出可能な全細胞力価を示したが、それらのいずれもタイプ 14 株に対しては検出可能な力価を示さなかった。抗英膜血清を相同英膜血清型に対して試験した時、タイプ 14 株に対する力価はタイプ 3 株に対するものよりも低かった（表 18 における横列に分類した「スタンダード」を参照されたい）。この結果は、ウエスタンブロットデータは、タイプ 14 ストレプトコッカス ニューモニアが ORF のタンパク質の大部分を発現することを明らかに示すので、タイプ 14 全細胞 ELISA にて反応性の現象である可能性があることを示した。ORF 75（配列番号 218）、ORF 1104（配列番号 282）、ORF 2621（配列番号 363）、ORF 1568（配列番号 306）、ORF 1143（配列番号 285）、ORF 2271（配列番号 343）、および ORF 1835（配列番号 315）のタンパク質に対する抗血清の全細胞 ELISA 力価は、バックグラウンドをわずかに上回るものからバックグラウンドを 20 倍超える範囲にあった。これらの結果は、これらの抗血清がこれらの ORF に関する少なくともいくつかの表面露出エピトープを検出することを示す。

【0319】

ORF タンパク質の表面露出：FACS 分析

ORF 2615、3039、75、1568、1143、1835、2271、2621、1104、339、2322、3361、および 935 からのタンパク質に対するポリクローナル抗血清を、前記のごとく FACS 分析により全ストレプトコッカス ニューモニア細胞を用いて表面反応性に関して分析した。分析結果を表 18 に示す。ストレプトコッカス ニューモニアタイプ 3 細胞は、ORF 2621（配列番号 363）の抗血清で標識した場合、相乗平均蛍光強度に関して 9 倍の増加を示した。ORF 1835（配列番号 315）、ORF 2271（配列番号 343）、ORF 75（配列番号 218）、ORF 1143（配列番号 285）、および ORF 1104（配列番号 282）のタンパク質

に対して指向された抗血清では、もっと低強度の蛍光強度が検出された。試験した抗血清の9つは、ストレプトコッカス ニューモニアタイプ19F株と検出可能な表面反応性を示さなかった。これは、技術の感受性のレベルまたは試験した条件下でより完全に表面露出タンパク質を覆っている19Fの莢膜によるものであり得る。

【0320】

インビトロ対インビボにおけるORF mRNAの分析

フォワードおよびリバースマイニングプライマーを用いて、インビトロおよびインビボ条件下で増殖させたタイプ3およびタイプ14細胞から、マイニングアルゴリズムにより潜在的なワクチン抗原として同定された(実施例1)いくつかのORFに関する全長のメッセージを増幅した。試験した4つのORFの3つにおいて、インビトロおよびインビボ増殖細胞の両方においてメッセージが検出された。ORF1104(配列番号282)および1568(配列番号306)に関しては、メッセージの検出は、同じ血清型に関する全細胞溶解物のウェスタンブロットにおける免疫反応性のバンドの存在と関連した。しかし、ORF2322(配列番号345)に関しては、メッセージは両血清型3および14で検出されたが、これらの血清型に関して免疫反応性のバンドは存在せず、両タンパク質が分泌されたこと、または組換えタンパク質により作製された抗体がネイティブのタンパク質を認識しなかったを示す。いずれの増殖条件においても、ORF935(配列番号265)に関してメッセージは検出されず、これはウェスタンブロットにおける免疫反応性のバンドの不在と関連する。別の実験において、期待されるサイズのメッセージが、ORF1143(配列番号285)、1475(配列番号298)、3039(配列番号380)、2271(配列番号343)、3115(配列番号388)および3361(配列番号402)に関してインビトロにて増殖させた血清型14から作製されたRNAから検出された(データは示していない)。

【0321】

考察

表面露出の予測は、候補抗原を同定するための遺伝子マイニングの試みの重要なステップである。本明細書で用いられるアルゴリズムは、試験する候補ORFを選択するための予測的な値を有することが過去に示されている。ここに示す結果は、ストレプトコッカス ニューモニアに対するアルゴリズムの有用性、およびそれらがすでに利用されているアルゴリズムに対して進歩を示すことを立証する。ここで、試験したORFからの13個のタンパク質のうち7個は用いた技術の少なくとも2つにより表面露出性であることが示される。全ストレプトコッカス ニューモニア細胞の全細胞ELISAおよびFACS分析を含むこれらの技術は、タンパク質の表面露出エピトープの検出に関して異なる強度を有する。全細胞ELISAは固相支持体に結合させた固定細胞を利用するが、FACS分析は液体懸濁液中の生きているストレプトコッカス ニューモニアを用いる。しかし、全細胞ELISAはFACS分析よりもより感受性があり、従って低レベルの抗体結合で表面露出エピトープのより優れた定量測定を生じることができる。なぜ、ORF2621のタンパク質がFACS分析においてそのように強度にポジティブであるにも関わらず、比較的低い全細胞ELISA力価を有したのかは分からない(表18)。これは、アッセイのそれぞれにおいて用いた異なる増殖条件または異なる検出条件の結果かもしれない。しかし、データは、表面露出エピトープを有するとして注目される6つのORFからのタンパク質が全て、用いた両アッセイにおいてポジティブである点で一致する。

【0322】

FACSによる19F株における表面露出の検出の欠如は不明である。ORFのいずれも用いたFACS法において19F株の表面において検出可能なエピトープを有しなかったが、それらの大部分はこの株からの全細胞溶解物においてよく発現された(表18)。これは、表面露出タンパク質を覆っている19Fのユニークな莢膜物質、またはFACS法がタイプ19F細胞に対して感受性が低いことによる可能性がある。試験したタンパク質のいずれもがタイプ19Fにおいて表面露出エピトープを有しない可能性もあるが、表面露出性である他の公知の候補物(P hp Aタンパク質)(Zhang et al., 2001)に対する

抗血清すら、タイプ 3 細胞と比較して F A C S 分析において低い検出可能な表面抗体結合しか生じなかったので（データは示していない）、ほとんどありえないであろう。

【 0 3 2 3 】

タイプ 1 4 全細胞 E L I S A における表面反応抗体を検出できなかったことは（表 1 8）、用いた基準の血清は通常観察されるものよりもっと低い力価しか生じなかったので、細胞増殖またはアッセイ条件によるものであることが最もよく考えられる。

R T - P C R データは、これらの O R F のものからの候補タンパク質のポテンシャルを増強するのに役立つ。インビトロまたはインビボの両方で増殖させたストレプトコッカス ニューモニアは、試験した O R F に特異的な m R N A を生じることを示す。O R F はインビトロで発現されることが公知であるので、それらはインビボでも同様に発現されると考えられる。インビボ増殖細胞からの全細胞溶解物を用いて、これを確認する実験が進行中である。

【 0 3 2 4 】

分析した全 O R F がストレプトコッカス ニューモニアにおいて発現されることが示されたわけではない。例えば、O R F 9 3 5 からのタンパク質は、ウェスタンブロット分析、全細胞 E L I S A（表 1 8）、または R T - P C R（データは示していない）により検出されなかった。O R F 9 3 5 は「リアルな」インビボ条件下でのみ発現されるが、領域の配列は不正確であり、発現されるタンパク質はストレプトコッカス ニューモニアにより作製される真のタンパク質とは構造が異なる。

【 0 3 2 5 】

実施例 3

ストレプトコッカス ニューモニアプロテオーム分析

材料および方法

細菌および培地

エス・ニューモニアエ タイプ I I I（A T C C # 6 3 0 3）は、アメリカタイプカルチャーコレクション、Manassas, VAから入手した。エス・ニューモニアエタイプ 1 9 F は、Dr. Gerald Schiffman, State University of New York, Brooklyn, NYから得た。Tryptic Soy Agar II (TSA II) 上グリセロールストレプトコッカス ニューモニアックプレート / 5.0% ヒツジ血液プレート (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD) を調製し、一晚 3 7 °C にて 5 . 0 % C O ₂ の存在下にインキュベートした。各プレートからの細胞を 2 0 m l の Todd-Hewitt ブロス / 0 . 5 % 酵母抽出物 (T H Y) に移し、一晚 3 7 °C で、穏やかに振とう (1 0 r p m) しながら 5 . 0 % C O ₂ の存在下にインキュベートした。タイプ 3 に関しては、培養物を 1 0 倍に 1 0 0 m l の T H Y で希釈した。タイプ 1 9 F に関しては、培養物を次いで 4 0 倍に 2 0 0 m l の T H Y で希釈した。これらの希釈培養物の両方を次いで上記条件下でインキュベートした。タイプ 1 9 F は 1 × 1 0 ⁹ 細胞 / m l の濃度に達するのに 9 時間のインキュベーションを要した。タイプ 3 を一晚インキュベートし、その濃度は測定しなかった。

【 0 3 2 6 】

膜フラクションの単離

細菌培養物をスパンダウンし、P B S / M g S O ₄ (3 0 m M リン酸ナトリウム / 1 5 0 m M N a C l / 1 m M M g S O ₄、p H 6 . 8) で洗浄した。ペレットを 5 μ g のリソザイム (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) および 4 0 0 μ g のムタノリシン (Sigma) を含む 4 m l の P B S / M g S O ₄ に再懸濁した。サンプルを 3 7 °C にて 1 時間振とうしながらインキュベートした。インキュベーション後、~ 3 0 0 ユニットの R N A s e カクテル^{T M} (Ambion Inc., Austin, TX) を各サンプルに添加した。サンプルをテーブルトップの遠心分離器 (2 . 5 k r p m、1 0 分、4 °C) を用いて低速で遠心分離した。上清を次いで高速でスパンし、Beckman (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA) モデル L 8 - 7 0 M 予備超遠心分離器 (6 0 T i ローター、4 0 k r p m にて、4 °C、1 時間) を用いて膜フラクションをペレットした。上清を除去し、膜ペレットを P B S / M g S O ₄ にて洗浄した。

【 0 3 2 7 】

切り出された S D S - P A G E ゲルバンドのトリブシン消化

ミニ S D S - P A G E ゲル (1 0 c m × 1 0 c m) を予め成形した 1 0 - 2 0 % (w/v、アクリルアミド) 勾配ゲル (Zaxis, Hudson, OH) を用いて 2 0 0 V にて流した。用いたシーブルーの分子量基準は、Invitrogen, Carlsbad, CA から得た。ゲルをシンブリーブルーのセーフステイン (Simply Blue Safestain)、コロイド状クマシーブルー G 2 5 0 ステイン (Inbitrogen) を製造業者の指示に従い用いて染色した。各サンプルレーンは、その全体において、15 個の異なるバンドに分かれた。各サンプルに関して、3 つのサンプルレーンからゲルの同一の分子量領域を示している、互いに隣に走るバンドを、更なるプロセシングのためにともに集めた。ゲルスライスを 2 回 0 . 5 m l の 5 0 % (v/v) 水性 HPLC グレードのアセトニトリル (Burdick & Jackson, Muskegon, MI) で 5 分間穏やかに振とうしながら洗浄し、洗浄液を除去した後に、- 2 0 にて凍結保存した。凍結したゲルバンドを溶解し、1 m m の立方体に切断し、DigestPro ロボット (ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld, Germany) を用いてイン - ゲルトリブシン消化に供した。用いた遠心分離器において、3 0 サンプルまでを同時に処理することができた。自動化プロトコルは、順に以下のステップからなった；ゲルバンド中のタンパク質の、ジチオトレイトールでの還元、ヨードアセトアミドでのアルキル化、トリブシンでの消化、およびペプチドの溶離。Promega Corporation から入手した配列決定グレードの変更されたトリブシン、Madison, WI を用いた。このトリブシンは、リシンおよびアルギニン残基のカルボキシル側鎖でのペプチド結合の加水分解に高度に特異性がある。自己分解に非常に耐性とするために、それは還元メチル化により変更し、キモトリブシン様の特異性を有する擬似トリブシンを作製することができる。特異性は、L - 1 - クロロ - 3 - トシルアミド - 4 - フェニルブタン - 2 - オン (T P C K) での処置によりさらに改良し、その後アフィニティ精製を行う。ペプチド消化物を回収し、SpeedVac (Thermo Savant, Holbrook, NY) を用いて ~ 1 0 μ l へと乾燥し、次いで 0 . 1 M の酢酸で 5 0 μ l へと希釈した。サンプルをプラスチック性のオートサンプラーバイアルに移し、密封し、5 μ l のサンプルループを用いて注入した。

10

20

【 0 3 2 8 】

マイクロキャピラリー LC - マススペクトロメトリー

マススペクトルデータを、マイクロキャピラリー逆相 H P L C / マイクロ - エレクトロスプレーインターフェースを備えた Thermo Finnigan LCQ DECA 四極子イオントラップマススペクトロメーター (Thermo Finnigan, San Jose, CA) にて獲得した。ペプチド抽出物を自動化マイクロエレクトロスプレー逆相 H P L C にて分析した。マイクロエレクトロスプレーインターフェースは、1 0 c m の長さまで 1 0 μ m の C₁₈ 逆相ビーズ (YMC, Wilmington, North Carolina) と共にパックされた、7 5 μ m I D により 1 0 c m 長、1 5 μ m のオリフィス直径の、Picofrit 融合シリカスプレーニードルから成った。Picofrit ニードルを、マススペクトロメーター検出器の前面に位置する基材に取りつけたファイバーオプティックホルダー (Melles Griot, Irvine, California) に取りつけた。カラムの尻をチャタユニオンを通して配管し、エレクトロスプレーインターフェースのための電気連絡を供給した。ユニオンを、一定の長さの融合シリカキャピラリー (F S C) 管を用いて、H P L C 溶媒ポンプ (ABI 140C, Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut) へと連結した F A M O S オートサンプラー (LC-Packings, San Francisco, California) へと結合した。H P L C 溶媒ポンプは、5 0 μ l / 分の流速で輸送し、これは 2 5 0 n l / 分へと、P E E K マイクロタイトスプリッティングティー (Upchurch Scientific, Oak Harbor, Washington) を用いて減じ、次いで F S C 輸送ラインを用いてオートサンプラーへと送達した。H P L C ポンプおよびオートサンプラーはそれぞれ、その内在するユーザープログラムを用いて制御した。

30

40

【 0 3 2 9 】

5 マイクロリットルのトリブシン消化物を、マススペクトロメーターのオリフィスに直接溶離する C₁₈ マイクロキャピラリー H P L C カラムを用いて分離した。ペプチドは、

50

0.1 M 酢酸中 4 - 65 % (v/v) アセトニトリルの 50 分の勾配を用いて 250 nl / 分の流速で分離した。ペプチド分析を、1.5 kV のスプレーボルト数にて操作し、140 の加熱キャピラリー温度を用いる LCQ - DECA イオントラップマスマススペクトロメーターにて行った。データを装置を用いて提供されるデータ獲得ソフトウェアを用いて自動化 MS / MS モードにて獲得した。ペプチドがマスマススペクトロメーターへ HPLC から分離するにつれ、それらは検出され、「ダイナミック イクスクルージョン」を用いてデータ依存様式でフラグメント化される。この方法では、イオントラップが、全スキャンおよび衝突誘起解離 (CID) モードの間を循環し、まず候補イオンを検出し、次いでそれらをフラグメント化のために収集する。どのイオンがフラグメント化されつつあるかについての決定は、装置「オンザフライ (on the fly)」により行われる。イオンは、一度収集されると、イクスクルージョンリストレプトコッカス ニューモニアに追加され、2 分のウィンドウに関してリジェクトされる。この方法により、非常に高いコンプレキシティの分析物を用いて提示される場合、装置がその時間を有効に分散することが可能となる。操作は、一回の操作で 1000 ~ 2000 ものフラグメント化 (CID) スペクトルの収集を生じ得る。獲得法は、MS スキャンにおけるトップ 2 つの最も豊富な MS / MS スキャンを後に行う 1 MS スキャン (375 - 600 m/z) を含む。装置は次いで第 2 のスキャン (600 - 1000 m/z) を行った後、そのスキャンにおけるトップ 2 つの最も豊富なイオンの MS / MS スキャンを行う。ダイナミックイクスクルージョンおよびアイソトープイクスクルージョン機能を用いて、分析されるペプチドイオンの数を増した (セッティング: 3 amu = イクスクルージョン幅、3 分 = イクスクルージョンの持続、30 秒 = 前イクスクルージョンの持続、3 amu = アイソトープイクスクルージョン幅)。30 サンプルを含んでいる現実験に関して、データを 48 時間自動サンプラーを用いて完全に自動化様式にて収集した。

10

20

30

40

50

【0330】

CID スペクトルからのタンパク質の同定のための配列データベース検索

MS / MS データの自動分析を、Finnigan Bioworks データ分析パッケージ (ThermoFinnigan, San Jose, California) に組み込まれている SEQUEST コンピューターアルゴリズム (Eng, McCormack and Yates, 1994) を用いて、以下に記載するタンパク質配列データベースを用いて行った。SEQUEST は、高度にコンピューター集約型であり、試験に関する検索は、専用の 12 × 600 MHz PC クラスタにて行った。2.0 より大きい Xcorr 値を有するペプチドの適合をさらなるコンピューター分析のためにデータベースにロードし、その後、必要な場合、データのマニュアル検査を (以下に記載するように) 行った。

【0331】

結果および考察

プロテオミックスに基づくアプローチ

「プロテオーム」なる用語は、器官または組織のゲノムにより発現される プロテイン として定義されている。プロテオームまたはプロテオミックスの分析の第一の目的の一つは、巨大規模高処理量のフォーマットでのタンパク質の同定を含む。細菌膜調製物は、候補抗原である可能性のある表面局在タンパク質の非常に重要なソースを構成する。プロテオミックスに基づくアプローチを用いてストレプトコッカス ニューモニアの膜フラクションに含まれるタンパク質のコンプレックス混合物のタンパク質成分を同定した。膜結合タンパク質の研究により、非常に特異的かつ重要なプロテオミックスに対する課題が提供される。水溶液中にこれらのタンパク質を維持するのに必要な界面活性剤は、分析法と通常抵触する。溶解性タンパク質の分析において広く用いられている 2 次元 (2 - D) ゲル電気泳動中、膜タンパク質の大量の喪失がしばしば認められる。問題は、固定された pH 勾配を 1 次元で用いる場合にもっと重篤である。いくつかの他の細菌からの膜調製物に伴うそのような溶解性の問題を最小にするために、いくつかのサンプル調製物ならびにいくつかの新規な双性イオン界面活性剤を試験したが、その全ては 2 - D ゲル電気泳動による膜タンパク質の分析を改善しないことが示された。しかし、出願人らは、外膜タンパク質の主

なセットを同定することにおけるその成功が非常に制限されたものであったと考える。この観点から、ストレプトコッカス ニューモニアの膜プロテオーム成分の同定のための、非常に単純な、および非常に複雑な方法の新規な組み合わせを以下に記載するように適用する。

【0332】

このアプローチにおいては、膜調製物をまず、ミニゲルフォーマットを用いてドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、次いでコロイド状クマシーブルー染色でのゲルの染色により分離した。全サンプルレーンを含んでいる15個のゲルのバンドを切り出し、バンドをトリプシンでそれぞれ消化した。トリプシン処理したペプチドを、Finnigan LCQ デカ四極子イオントラップマスマススペクトロメーター上マイクロキャピラリー逆相液体クロマトグラフィー・マイクロ・エレクトロスプレータンドマスマススペクトロメトリー (LC-MS/MS) を用いて分析した。タンデムマスマススペクトロメトリー (MS/MS) は、タンパク質を分析するための強力なアプローチであることが示されている (Eng, McCormack and Yates, 1994)。第一ステップにおいて、MS/MS はマッサナライザーを用いてイオン混合物からペプチドイオンを分離し、次いで第2ステップまたはマッサナライザーを用いて目的のイオンを活性化および解離する。衝突誘起解離 (CID) として知られるこのプロセスは、アミノ酸間のペプチド結合にてペプチドをフラグメント化し、ペプチドのフラグメント化パターンを用いてそのアミノ酸配列を決定する。SEQUEST コンピューターアルゴリズム (Eng, McCormack and Yates, 1994) を用いて、タンパク質または翻訳されるヌクレオチド配列データベースに対して解釈されていない実験フラグメント化スペクトルを検索し、各ゲルバンドに存在するタンパク質を同定した。SEQUEST は、データベース中のタンパク質配列をトリプシン処理したペプチドへと完全に消化し、次いでペプチドフラグメント化の公知の法則を用いて刺激CIDスペクトルへとそれらをモデル化する。SEQUEST は次いでこれらの刺激性CIDスペクトルを実験スペクトルと比較し、適合の忠実性を示している種々のパラメータに加えて未処理のデータを適合していると考えられるペプチド配列適合のリストレプトコッカス ニューモニアを選出する。およそ800 - 900 ダルトン以上のサイズのペプチドに関しては、単一スペクトルがタンパク質をユニークに同定し得る。

【0333】

SDS-PAGE ゲルバンドのトリプシン消化により生じたコンプレックス混合物からの多数のペプチドに関する配列情報を得るために、逆相クロマトグラフィーシステムをエレクトロスプレーイオントラップマスマススペクトロメーターと組み合わせた。このシステムにおいて、高い感受性 (サブフェムトモルを下る) を、流速とカラム直径の両方を最少にすることにより達成することができ、溶離容積を濃縮し、できるだけ多くのカラム流出物をマスマススペクトロメーターのオリフィスへ向けることができる。サンプル中に存在するタンパク質の適用範囲を最大にするために、データ依存性のイオントラップ獲得態様を用いた。スペクトルが特定の m/z 値に関して獲得されたら、ダイナミックエクスクルージョンを用いて、イオンのタンデムなマスマススペクトルの再獲得を防いだ。これらのデータ依存性の態様により、CID 分析のために選択されるペプチドイオンの数が劇的に増した。

【0334】

前記の LC-MS/MS データ獲得条件は典型的には、それぞれの操作に関して2000を超すペプチドイオンに関するフラグメント化データを生じた。SEQUEST アルゴリズムを用いて、2つのタンパク質配列データベースに対してこのデータを関連づけた。第一の1つ、SnA6F6 は、全6つのリーディングフレーム中のストレプトコッカス ニューモニアタイプ4ゲノム配列 (TIGR4) の翻訳から得られたオープンリーディングフレームを6つのアミノ酸残基を含んでいる最小のペプチドと共に含んだ。第2の1つ、nr は、非重複 GenBank タンパク質配列データベースである。SEQUEST 検索条件は、両検索に対するトリプシン選択性を用いた。SnA6F6 検索により、メチオニン残基に関する +16 ダルトンのディファレンシャル検索によりメチオニンの酸化を示しているペプチドが説明される。

【0335】

SEQUESTにより同定された候補マッチを以下の方法を用いて確認した。各ペプチドに関して、SEQUESTは、配列データベース中の候補ペプチドと実験MS/MSスペクトルの交差関係からXcorr値を推定する。Xcorrは配列データベースから生じたものに対する実験MS/MSデータの同一性の基準である。2.0を超えるXcorr値を有するペプチドマッチを更なる分析のために選択し、市場入手可能なOracle(登録商標)関連データベースシステムを用いるSEQUESTデータの分析のための社内開発されたシステムにロードした。SEQUESTアウトプットは非常に複雑なので、出願人はOracle(登録商標)に新規なスコアリングアルゴリズムを組みこんで、以下のごとく同定される各タンパク質に関するマッチスコアを算定した：

タンパク質スコア = $n \sum (Xcorr / rank)$ (式中、rankはデータベース中の特定のタンパク質配列から同定される各ペプチド配列に関してSEQUESTにより指定されるものであり、nはそのタンパク質に関して同定されるユニークなペプチドの数であるが、これは同じペプチドがLC-MS/MS実験において複数回同定される可能性があるからである。) 。用いたソフトウェアによる全ての中程度または弱い指定に対するフラグメント化スペクトルを妥当なシグマ/ノイズ比に関するCIDスペクトルの直接実験によりマニュアル通りに調査し、マッチしたイオンのリストレプトコッカス ニューモニアをさらに妥当なコンティニュイティに関して試験した。一般に、単一データベースエントリー上に妥当なタンパク質スコア(通常>25)またはXcorr値(通常>2.5)を有する3つまたはそれ以上のスペクトル収束が説得性のある同定を組成する。

【0336】

ストレプトコッカス ニューモニアの膜結合タンパク質の特定のための実験的プロテオミックスアプローチの背後にある理論は、単一のSDS-PAGEステップが2-Dゲル電気泳動における等電点電気泳動法に伴う溶解性の問題を回避することであった。LC-MS/MS分析に供したサンプルの複雑性を減らす、分子量による膜調製物の簡単な分別化も提供される。これらの分析法の組み合わせにより、高濃度範囲を超える高い感受性で複数のペプチドの配列情報を分類し、そして得、およびデータベースにおける配列との関連により対応するタンパク質を同定することが可能となる。本試験の部分として、ストレプトコッカス ニューモニアから膜タンパク質を単離するための方法も開発された。これは、遠心分離を後に行う、ムタノリシンおよびリソザイムでの低張バッファー中でのストレプトコッカス ニューモニア細胞壁の酵素消化を含む。表面露出タンパク質を示している28個のORFも、プロテオミックスアプローチで同定し、表11に示す。膜結合タンパク質を示しており、プロテオミックスアプローチにより同定されるORFを表12に示す。表14は、TIGR4ゲノム配列を示しているSnA6F6データベースから同定された全オープンリーディングフレームを含む。表14は、TIGR4ゲノムから生じないnrデータベース検索から同定されたタンパク質も含む。

【0337】

ゲノミックスおよびプロテオミックスアプローチの組み合わせ

プロテオミックスにより同定されるORFは、ストレプトコッカス ニューモニアの表面局在、表面露出または膜結合タンパク質を示す。ゲノミックスアプローチにより同定された推定の表面露出ORFをサポートするこれら28個のORF(即ち、表1-10)を表11に示し、これらの候補物質の表面局在性の更なる証拠を示す。プロテオミックスにより膜に結合していると同定される161個の新規なORFを表12に示す。

【0338】

実施例4

ストレプトコッカス ニューモニアの免疫金標識および低電圧走査電子顕微鏡

ストレプトコッカス ニューモニア上のタンパク質の表面露出は、全細菌の免疫金標識および電子顕微鏡により評価してもよい。細菌細胞をすでに記載されているように標識する(Olmsted et al., 1993)。簡単には、後期log相の細菌培養物を2回洗浄し、10 mMのリン酸緩衝塩水(PBS)(pH7.4)中に 1×10^8 細胞/mlの濃度へと再懸

10

20

30

40

50

濁し、ポリ-L-リジンコートカバーガラスにのせる。過剰の細菌をカバーガラスから穏やかに洗浄し、非標識サンプルを固定剤（7.5%スクロースを含んでいる0.1Mのナトリウムカコジレート中2.0%グルタルアルデヒド）に30分間入れた。コロイド状の金で標識されたであろう細菌を、0.5%のウシ血清アルブミンを含んでいるPBSで洗浄し、前記のように調製した前もって免疫化した、または過剰免疫化したマウスのポリクローナル抗体を1時間室温にて適用する。細菌を次いで穏やかに洗浄し、18nmのコロイド状金粒子に結合させたヤギ抗-マウスの1:6希釈(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)を10分間室温にて適用した。最後に全サンプルを穏やかにPBSで洗浄し、前記固定剤にいた。固定剤をサンプルから2回、10分間0.1Mのナトリウムカコジレートバッファーにて洗浄し、30分間、1%のオスミウムテトロキシドを含んでいる0.1Mナトリウムカコジレートに二次固定した。サンプルを次いで0.1Mのナトリウムカコジレートで2回洗浄し、連続濃度のエタノールで脱水し、Anderson(Anderson, 1951)のCO₂法により、Samdri-780A(Tousimis, Rockville, MD)を用いて臨界点乾燥し、ペトロレウムの1-2nmの不連続層(discontinuous layer)でコートした。ストレプトコッカス ニューモニア細胞を、低加速電圧(1-4.5keV)にて、常套の形態画像処理および高分解能ロビンソン後方散乱検出器のための二次電気検出器を用いて操作するLEO1550フィールド放出走査電子顕微鏡で視覚化し、原子数コントラストストレプトコッカス ニューモニアによりコロイド状の金の視覚化を高めた。

【0339】

実施例5

インビトロオプソンファゴサイトーシス分析

インビボ反応を擬似し得るインビトロオプソン反応を、ストレプトコッカス ニューモニア細胞、肺炎双球菌株に対する特異的抗体を含んでいる熱不活性化ヒト血清、および外来補体源の混合物と共にインキュベートすることにより行う。新たに単離したヒト多形核細胞(PMN)および抗体/補体/肺炎双球菌細胞混合物のインキュベーション中にオプソノファゴサイトーシスが進行する。抗体および補体でコートされる細菌細胞は、オプソノファゴサイトーシスに際して死ぬ。オプソノファゴサイトーシスを逃れる生きている細菌のコロニー形成ユニット(cfu)を、アッセイ混合物をプレーティングすることにより決定する。力価を、アッセイ対照との比較により決定される $\geq 50\%$ の細菌殺滅を生じる最高の基積の逆数として示す。試験した最低の血清希釈(1:8)で50%未満の殺滅しか示さない標本を、4のOPAタイターを有するとして示す。試験した最高の希釈は1:2560である。最高希釈で $\geq 50\%$ の殺滅を有するサンプルを、より高い初期希釈から始めて繰り返す。

【0340】

本方法は、Grayの方法(Gray, B.M. 1990)の変更である。アッセイ混合物を96ウェルのマイクロタイター組織培養プレートに室温で集める。アッセイ混合物は、試験前30分間56℃へと加熱した10 μ lの試験血清(2倍希釈のシリーズ)、細菌試験株に関してオプソニン活性を有しない10 μ lのpreclostraウシ血清(補体源)、および2000個の生存能力のあるストレプトコッカス ニューモニア生物体を含む20 μ Lのバッファーから成る。この混合液を37℃にてCO₂を用いずに30分間振とうしながらインキュベートする。次に、デキストレプトコッカス ニューモニアラン沈降およびPercoll密度遠心分離によりヘパリン化された末梢血から新たに調製し、 1×10^6 /mL濃度にてバッファーに懸濁した40 μ lのヒトPMNを添加する。アッセイプレートを次いで37℃にてさらに90分間激しく振とうしながらインキュベートする。各ウェルからの部分を15 $\times$ 100mmの血液アガープレートの上部1/4に載せる。血液アガープレートをピペットしながら突き、液体懸濁液をプレートの下に「流す」。プレートを一晚5%CO₂にて37℃にてインキュベートする。生存能力のあるcfuを翌朝カウントする。細菌細胞を欠くネガティブ対照ウェル、試験血清、補体、および/または食細胞を適当な組み合わせで各アッセイに含める。試験血清+細菌細胞および熱不活性化補体を含む試験血清対照を各個々の血清に関して含める。この対照を用いて、抗生物質または他の結成成分の存在

が細菌株を直接死滅させることができるかどうか(すなわち、補体またはPMSの不在下で)を評価することができる。公知のオプソニック力価を有するヒト血清をポジティブなヒト血清対照として用いる。各非公知の血清のオプソニック抗体力価を、血清を含まない対照と比較して50%のcfuの低下を生じる血清の初期希釈の逆数として算定する。

【0341】

実施例6

攻撃前のCBA/CaHnマウスの鼻腔内または非経口免疫化

6週齢の病原体フリーの、オスのCBA/CaHn x id/J (CBA/N)マウスをJackson研究所(Bar Harbor, Maine)から購入し、標準的な温度、湿度、および光条件下で籠の中で飼育する。CBA/Nマウスを1群当たり10匹で、適当な量の試験すべきタンパク質で免疫化する。非経口免疫化のためには、投与当たり100 μ gのMPLTMと混合して、塩水中200 μ lの最終容積とし、次いでマウスに皮下(SC)注射する。全群に、同じ投与量で同じ経路で、一次免疫化の3および5週間後にブースターを施す。対照マウスにはMPLTMのみを注射する。全マウスを最後のブースティングの2週間後に採血する。血清を次いで単離し、-20℃にて貯蔵する。鼻腔内(IN)免疫化のために、マウスに1週間おいて3回免疫化を施す。各場合に、適当な投与量の試験されるべきタンパク質は、酵素活性および毒性が低下している遺伝子変更されたコレラ毒である0.1 μ gのCT-E29Hを用いて処方し(Tebbey et al., 2000)、10 μ lの容積で各マウスの鼻孔に徐々にたらす。CT-E29Hのみで免疫化したマウスを対照として用いる。血清サンプルを最後の免疫化の1週間後に回収する。

【0342】

実施例7

LD₅₀の決定

6または12週齢のCBA/Nマウス(群当たり10匹)をPBS中に 5×10^9 CFU/mlへと希釈したストレプトコッカス ニューモニア耐性タイプ3ストレプトコッカス ニューモニアの10 μ lの懸濁液で鼻腔内攻撃する。この懸濁液の2倍の連続希釈をさらに試験する。投与される細菌の実際の投与量は、ストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシン含有トリプシンダイズアガープレートに接種原の希釈物をプレーティングすることにより決定する。LD₅₀は、Lennette (Lennette, 1995)により論じられているように、Reed-Muenh法により算定する。タイプ3株を用いた13週齢のCBA/NマウスのLD₅₀は 1×10^5 CFUであることが予め示されたが、6週齢のCBA/NマウスのLD₅₀は 1×10^4 CFUであった。

【0343】

実施例8

CBA/CaHn XIDマウス鼻腔内攻撃モデル

マウスを血清型3または血清型14ストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシン耐性ストレプトコッカス ニューモニアのいずれかで攻撃する。肺炎双球菌を100 μ g/mgのストレプトコッカス ニューモニアを含んでいる3mlのTodd-Hewittブロスに播種する。培養物を37℃にて中-log相まで増殖させ、次いでTodd-Hewittブロスで所望の濃度へと希釈し、氷上に使用まで貯蔵する。各マウスを1.2mgのケタミンHCl (Fort Dodge Laboratory, Ft. Dodge, Iowa)で腹腔内(IP)注射により麻酔する。細菌懸濁液を麻酔したマウスの鼻孔へと接種する(マウス当たり10 μ l)。投与される細菌の実際の投与量をプレートカウントにより確認する。攻撃2日または3日後、マウスを屠殺し、鼻を取り、組織ホモジェナイザー(Ultra-Turax T25, Janke & Kunkel Ika-Labortechnik, Staufen, Germany)で3mlの無菌塩水中にホモジェナイズする。ホモジェネートを塩水中に10倍連続希釈し、ストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシン含有TSAプレートにプレートする。各マウスから攻撃2日後に回収した50 μ lの血液をさらに同種のプレートにプレートする。プレートを一晚37℃にてインキュベートし、次いでコロニーをカウントする。CBA/Nマウスを攻撃後毎日観察し、死亡率を14日間モニターする。

10

20

30

40

50

【 0 3 4 4 】

実施例 9

攻撃前の B A L B / C マウスの鼻腔内免疫化

6 週齢の、病原体フリーの B a l b / c マウスを、Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) から購入し、通常の温度、湿度、および光条件下に籠の中に住ませる。群あたり 10 匹の B A L B / C マウスを適当な量の試験されるべきタンパク質で、0、2、および 4 週に免疫化する。各場合に、試験されるべきタンパク質を 0.1 μ g の C T - E 2 9 H を用いて処方し、10 μ l 容積で各マウスの鼻に徐々にたらす。スカシガイヘモシアニン (K L H) - C T - E 2 9 H で免疫化したマウスを対照として用いる。血清サンプルを最後の免疫化の 4 日後に回収する。

10

【 0 3 4 5 】

実施例 10

マウス鼻腔内攻撃モデル

B a l b / c マウスを 4 週の 6 日目に (即ち、約 27 日にて)、 1×10^5 C F U の血清型 3 ストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシン耐性ストレプトコッカス ニューモニアで攻撃する。肺炎双球菌を 100 μ g / ml のストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシンを含んでいる 3 ml の Todd-Hewitt ブロスに接種する。培養物を 37 にて中 log 相まで増殖し、次いで所望の濃度へと Todd-Hewitt ブロスで希釈し、氷上に使用まで貯蔵する。各マウスを 1.2 mg の ケタミン H C l (Fort Dodge Laboratory, Ft. Dodge, Iowa) で i . p . 注入により麻酔する。細菌懸濁液を麻酔したマウスの鼻孔へと接種する (マウス当たり 10 μ l)。投与される細菌の実際の投与量をプレートカウントにより確認する。攻撃の 4 日後、マウスを屠殺し、鼻を取り、3 ml の無菌塩水に組織ホモジェナイザー (Ultra-Turax T25, Janke & Kunkel Ika-Labortechnik, Staufen, Germany) にてホモジェナイズする。ホモジェネートを塩水中に 10 倍希釈し、ストレプトコッカス ニューモニアレプトマイシン含有 T S A プレートに蒔く。各マウスから攻撃 2 日後に回収した 50 μ l の血液を同種のプレートに蒔く。プレートを一晩 37 にてインキュベートし、次いでコロニーをカウントする。

20

【 0 3 4 6 】

引用例

国際出願第 EP A02323621

30

国際出願第 EP 0036776

国際出願第 EP 0859055

国際出願第 EP 125,023

国際出願第 EP 171,496

国際出願第 EP 171,496

国際出願第 EP 184,187

【 0 3 4 7 】

国際出願第 EP 264166

国際出願第 PCT/US86/02269

米国特許第 4,196,265

40

米国特許第 4,522,811

米国特許第 4,554,101

米国特許第 4,683,195

米国特許第 4,683,202

【 0 3 4 8 】

米国特許第 4,736,866

米国特許第 4,816,567

米国特許第 4,870,009

米国特許第 4,873,191

米国特許第 4,873,316

50

米国特許第4,987,071	
米国特許第5,116,742	
【 0 3 4 9 】	
米国特許第5,223,409	
米国特許第5,272,057	
米国特許第5,283,317	
米国特許第5,328,470	
米国特許第5,498,531	
米国特許第5,766,844	
米国特許第5,789,654	10
【 0 3 5 0 】	
米国特許第5,798,209	
米国特許第6,201,103	
米国出願第H1,892	
国際出願第 WO 86/01533	
国際出願第 WO 90/02809	
国際出願第 WO 90/11354	
国際出願第 WO 91/01140	
【 0 3 5 1 】	
国際出願第 WO 91/17271	20
国際出願第 WO 92/01047	
国際出願第 WO 92/0968	
国際出願第 WO 92/09690	
国際出願第 WO 92/15679	
国際出願第 WO 92/18619	
国際出願第 WO 92/20791	
【 0 3 5 2 】	
国際出願第 WO 93/01288	
国際出願第 WO 93/04169	
国際出願第 WO94/10300	30
国際出願第 WO 94/16101	
国際出願第 WO 97/07668	
国際出願第 WO 97/07669	
国際出願第 WO 00/63364	
【 0 3 5 3 】	
Abravaya et al., Nucleic Acids Res., 23:675-682, 1995.	
Adams et al., Nature 355:632-634, 1992.	
Adams et al., Nature 377 Supp:3-174, 1995.	
Adams et al., Science 252:1651-1656, 1991.	
Altschul et al, " Gapped BLAST および PSI-BLAST: 「タンパク質データベース検索プログラムの新世代」 (a new generation of protein database search programs) " Nuc. Acids Res. 25(17):3389-402, 1997.	40
【 0 3 5 4 】	
Altschul et al., J. Molec. Biol. 215:403-410, 1990.	
Amann et al., Gene 69:301-315, 1988.	
Anderson, " 「電子顕微鏡のための標本の調製における3次元構造の保存法」 (Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope) " Trans. N. Y. Acad. Sci. 13(130):130-134, 1951.	
Bairoch and Apweiler, Nucleic Acids Research, 28:45-48, 2000.	
Baldari et al., Embo J. 6:229-234, 1987.	50

【 0 3 5 5 】

Banerji et al., Cell, 33:729-740; 1983.

Barker et al., Nucleic Acids Research, 29:29-32, 2001.

Bartel and Szostak, Science 261:1411-1418, 1993.

Bartel et al. Biotechniques 14:920-924, 1993(b).

Bartel, “ 「細胞相互作用および発生」 (Cellular Interactions and Development: A Practical Approach) ”, pp. 153-179, 1993(a).

Bateman et al., “ P f a m タンパク質ファミリーデータベース (The Pfam protein families database), ” Nucleic Acid Res., 28(1), 263-266, 2000.

【 0 3 5 6 】

Benson, “ タンデムリピートファインダー (Tandem repeats finder): 「 D N A 配列を分析するためのプログラム」 (a program to analyze DNA sequences), ” Nucleic Acids Res. 27(2):573-80, 1999.

Bradley, Current Opinion in Biotechnology 2:823-829, 1991.

Bradley, in “ および胎児幹細胞 (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells): A Practical Approach, ” E.J. Robertson, ed., IRL, Oxford, pp. 113-152, 1987.

【 0 3 5 7 】

Briles et al., “ 「 P s a A および P s a p A の混合物での鼻腔内免疫化は、ストレプトコッカス ニューモニアの鼻咽腔キャリアッジを高度に保護する」 (Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae,) ” Infect. Immun. 68(2):796-800, 2000.

Bunzow et al., Nature, 336:783-787, 1988.

【 0 3 5 8 】

Burge and Karlin, “ 「ヒトのゲノム D N A における完全遺伝子構造の予測」 (Prediction of complete gene structures in human genomic DNA). ” J. Mol. Biol. 268:78-94, 1997.

Butler et al., “ 肺炎双球菌ワクチン (Pneumococcal vaccines): ヒストレプトコッカス ニューモニアリー、現状、および将来の方向, ” Am. J. Med. 107(1A):69S-76S, 1999.

【 0 3 5 9 】

Byrne and Ruddle, PNAS 86:5473- 5477, 1989.

Calame and Eaton, Adv. Immunol. 43:235-275, 1988.

Campes and Tilghman, Genes Dev. 3:537-546, 1989.

Chen et al., PNAS 91:3054-3057, 1994.

Cohen et al., Adv. Chromatogr. 36:127-162, 1996.

Cotton et al., PNAS 85:4397, 1988.

【 0 3 6 0 】

Cotton, Mutat. Res. 285:125-144, 1993.

Cowan et al., “ 「 R G S タンパク質」 (RGS Proteins): R G S 9 サブファミリーからのレッスン (Lessons from the RGS9 subfamily), ” 核酸研究および分子生物学における進展 65:341-359, 2001.

Crain et al., “ ストレプトコッカス ニューモニア表面タンパク質 A (P s p A) は、血清学的に高度に変異し、全ての臨床上重要なストレプトコッカス ニューモニアの莢膜血清型により発現される (Streptococcus pneumoniaecoccal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of Streptococcus pneumoniae), ” Infect. Immun. 58(10):3293-9, 1990.

【 0 3 6 1 】

Cserzo et al., “ 「原核細胞膜タンパク質における膜貫通アルファ - ヘリックスの予測」 (Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins): 高

10

20

30

40

50

密アライメント表面法(the dense alignment surface method), "「タンパク質操作」(Protein Engineering) 10(6):673-6, 1997.

D'Eustachio et al., Science 220:919-924, 1983.

Devereux et al., Nucleic Acids Research 12(1):387, 1984.

【 0 3 6 2 】

Dintilhac, et al., " ストレプトコッカス ニューモニアのコンピテンスおよび毒性(Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*): Adc およびPsaA変異体は、推定 A B C 金属透過酵素の不活性化から生じる Z n と M n の要求を示す。" Mol. Microbiol. 25(4):727-739, 1997.

Doestschman et al., J. Embryol. Exp. Morphol. 87:27-45, 1985.

Douglas et al., " 5 歳未満の子供における肺炎双球菌ワクチン化に対する抗体反応 " J. Infect. Dis. 148:131-137, 1983.

【 0 3 6 3 】

Eddy, " 隠れマルコフモデル " 構造生物学における現在の見解(Current Opinion in Structural Biology 6(3)):361-5, 1996.

Edlund et al., Science 230:912-916, 1985.

Eichelbaum, Clin. Exp. Pharmacol Physiol, 23(10-11):983-985, 1996.

Elledge et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:1731-1735, 1991.

【 0 3 6 4 】

Eng, McCormack and Yates, " ペプチドのタンデムなマスペクトルデータをタンパク質データベース中のアミノ酸配列と関連づけるためのアプローチ " Journal of the American Society for Mass Spectrometry, " 5:976-989, 1994.

Fan, Y. et al., PNAS, 87:6223-27, 1990.

Finely et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:12980-12984, 1994.

Foster and Hook, " スタフィロコッカスアウレウス(*Staphylococcus aureus*)の表面タンパク質アドヘジン " Trends Microbiol. 6(12):484-8, 1998.

【 0 3 6 5 】

Fraser et al., " ライム病スピロヘータのゲノム配列, ボレリア バークドロフェリ(*Borrelia burgdorferi*) " Nature 390(6660):580-6, 1997.

Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988.

Gaultier et al., Nucleic Acids Res. 15:6625-6641, 1987.

Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, 1989.

Goldstein and Garau, " ペニシリン耐性エス . ニューモニアエの 3 0 年: 神話か真実か ? " Lancet 350(9073):233-4.

【 0 3 6 6 】

Gray, コンジュゲートワクチンサプリメント p694-697, 1990.

Griffin et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159, 1993.

Gunnar von Heijne, " 膜タンパク質構造予測, 疎水性分析およびポジティブ - インサイド ルール(Positive-inside Rule) " J. Mol. Biol., 225:487-494, 1992.

Harlow and Lane, " 抗体: A Laboratory Manual, " Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988

Harper et al., Cell, 75:805-816, 1993.

【 0 3 6 7 】

Haselhoff and Gerlach, Nature 334:585-591, 1988.

Hausdorff et al., " どの肺炎双球菌血清群が最も侵襲性疾患をひき起こすか: コンジュゲートワクチン製剤および使用のための含意、パート I " 臨床感染疾患30(1):100-21, 1997.

Hayashi, Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79, 1992.

Helene et al., Ann. N. Y Acad Sci. 660:27- 36, 1992.

【 0 3 6 8 】

10

20

30

40

50

Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84, 1991.

Hepler, “細胞シグナリングにおける R G S タンパク質の新たな役割” *薬理化学における傾向* 20:376-382, 1999.

Hernandez-Sanchez et al., “タンパク質合成のラムダバーミニ遺伝子 - 媒介阻害には、ペプチジル - tRNA の蓄積および tRNA の欠乏が関与する (lambda bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA)” *EMBO Jour.* 17(13):3758-65, 1998.

【 0 3 6 9 】

Hogan, “マウス胎児の操作” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986.

10

Inoue et al., *FEBS Lett.* 215:327-330, 1987(a).

Inoue et al., *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148, 1987(b).

Isberg and Tran Van Nhieu, “インテグリンレセプターによる微生物の結合および内在化” *微生物学における傾向* 2(1):10-4, 1994.

Iwabuchi et al., *Oncogene* 8:1693-1696, 1993.

【 0 3 7 0 】

Johnson et al., *Endoc. Rev.*, 10:317-331, 1989.

Kaufman et al., *EMBO J* 6:187-195, 1987.

Kessel and Gruss, *Science* 249:374-379, 1990.

20

Klein et al., *Curr. Genet.*, 16:145-152, 1989(b).

Klein et al., *Curr. Genet.* 13:29-35, 1989(a).

Koebnik, “いくつかの細菌細胞 - 表面タンパク質の C 末端領域におけるペプチドグリカン結合アルファヘリックスモチーフに関する提案” *Mol. Microbiol.* 16(6):1269-70, 1995.

【 0 3 7 1 】

Krappa et al., “Evectins: プレクストレプトコッカス ニューモニアリン相同ドメインを有し、ポストレプトコッカス ニューモニアゴルジ膜に局在する小胞タンパク質” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:4633-4368, 1999.

Kurjan and Herskowitz, *Cell* 933-943, 1982.

Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132, 1982.

30

Lakso et al., *PJVAS* 89:6232-6236, 1992.

【 0 3 7 2 】

Laemmli, “バクテリオファージ T4 の頭部のアッセンブリ - 中の構造タンパク質の切断 (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4)” *Nature (London)* 227:680-685, 1970.

Lefkowitz, *Nature*, 351:353-354, 1991.

Lennette, “ウイルス、リケッチア属、およびクラミジア感染の研究室診断のための一般的原则,” p. 17-18, ウイルス、リケッチア属、およびクラミジア感染の診断法, vol. 7th edition, 1995.

【 0 3 7 3 】

Lewis, “細菌におけるプログラムされた死” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(3):503-14, 2000.

40

Li et al., *Cell* 69:915, 1992.

Linder, *Clin. Chem.* 43(2):254-266, 1997.

Loessner et al., “スタフィロコッカス アウレウス バクテリオファージ 187 のエンドリシン遺伝子におけるフレーム外に完全に包埋されたホーリン様タンパク質に関する証拠 (Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187),” *J. Bacteriol.* 181(15):4452-60, 1999.

【 0 3 7 4 】

Lowry et al., “フォーリン - フェノール試薬でのタンパク質測定” *J. Biol. Chem.* 193:

50

265-275, 1951.

Lucklow and Summers, *Virology* 170:31-39, 1989.

Lukashin and Borodovsky, "GeneMark.hmm: 遺伝子発見に関する新規な解決法(new solutions for gene finding)," *Nuc. Acids Res.* 26(4):1107-15, 1998.

Madura et al., *J. Biol. Chem.* 268:12046-1205, 1993

Maher, *Bioassays* 14(12):807-15, 1992.

【 0 3 7 5 】

Mansour et al., *Nature* 336:348, 1988

Maxim and Gilbert, *PNAS* 74:560, 1977.

Mazmanian et al., "スタフィロコッカス アウレウス ソーターゼ、細胞壁へと表面タンパク質を結合する酵素," *Science* 285(5428):760-3, 1999. 10

McAtee et al., "プロテオーム法によるヘリコバクターピロリワクチン候補の特定" *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 714(2):325-33, 1998(c).

McAtee et al., "「プロテオーム」法によるヘリコバクターピロリの潜在的診断およびワクチン候補の同定" *ヘリコバクター(Helicobacter)* 3(3):163-9, 1998(a).

【 0 3 7 6 】

McAtee et al., "2次元ゲル電気泳動、配列分析、および血清プロファイリングによるヘリコバクターピロリの潜在的診断およびワクチン候補の同定" *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5(4):537-42, 1998(b).

McDaniel et al., "プロテアーゼ - 感受性肺炎双球菌抗原に対するモノクローナル抗体は、マウスをストレプトコッカス ニューモニアでの致命的な感染から保護することができる。" *J. Exp. Med.* 160(2):386-97, 1984. 20

【 0 3 7 7 】

Mejlhede et al., "パチラス サブチリスcddのデコーディング中のリボソーム -1 フレームシフティングは、配列CGA AAGにて起こる。" *J. Bacteriol.* 181(9):2930-7, 1999.

Morrison et al., "DNA輸送および遺伝子組換えが欠損しているストレプトコッカス ニューモニアの形質転換不完全変異体の3つの新規なクラスの単離および特定," *Journal of Bacteriology*, 156:281-290, 1983.

Morin et al., *Nucleic Acids Res.*, 21:2157-2163, 1993.

【 0 3 7 8 】

Myers et al., *Nature* 313:495, 1985(a).

Myers et al., *Science* 230:1242, 1985(b).

Nabors et al., "組換え肺炎双球菌表面タンパク質A (PspA) 変種での健康な成人の免疫化により、異種構造PspA分子に対して広汎な交差反応抗体が刺激される。" *ワクチン* 18:1743-1754, 2000.

Nakai and Kanehisa, "グラム陰性細菌におけるタンパク質局在部位を予測するための巧妙なシステム" *タンパク質* 11(2):95-110, 1991.

【 0 3 7 9 】

Navarre and Schneewind, "グラム陽性細菌の表面タンパク質および細胞壁エンベロープへのその標的のメカニズム" *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(1):174-229, 1999. 40

Nielsen et al., "原核細胞および真核細胞シグナルペプチドの同定およびその切断部位の予測" *タンパク質エンジニアリング(Protein Engineering)* 10(1):1-6, 1997.

O'Gon-nan et al., *Science* 251:1351-1355, 1991.

【 0 3 8 0 】

Olmsted et al., "フェロモン誘導性のコンジュゲートプラスミドpCF10によりコードされるエンテロコッカス フェアカリス(Enterococcus faecalis)表面タンパク質のフィールド放出走査顕微鏡による高分解能の視覚化" *J. Bacteriol.* 175(19):6229-37, 1993.

Orita et al., *PNAS* 86:2766, 1989.

Orihuela et al., "腹腔内培養により、ストレプトコッカス ニューモニアタンパク質のプロフィールおよび毒性が変化する" *Infect. Immun.* 68:6082-6086, 2000. 50

【 0 3 8 1 】

Park and Teichmann, "DIVCLUS: 単一 - および複数 - ドメインタンパク質において相同ドメインを見出す G E A N F A M M E R パッケージにおけるオートマチック法," *Bioinformatics* 14(2):144-50, 1998.

Parkhill et al., "ナイセリア メニンギティディス Z 2 4 9 1 の血清群 A 株の完全 D N A 配列" *Nature* 404(6777):502-6, 2000.

Pierschbacher and Ruoslahti, "細胞接着における結合特異性における配列 Arg-Gly-Asp-Xaa の立体化学の影響" *J. Biol. Chem.* 262(36):17294-8, 1987.

Pinkert et al. *Genes Dev.* 1:268-277, 1987.

【 0 3 8 2 】

Pizza et al., "全ゲノム配列決定による血清群 B 髄膜炎菌に対するワクチン候補の同定" *Science* 287(5459):1816-20, 2000.

Pugsley, "グラム陰性細菌における完全一般的分泌経路" *Microbiol. Rev.* 57(1):50-108, 1993.

Queen and Baltimore, *Cell* 33:741-748, 1983.

Rahman et al., *Journal of Neuroscience* 19:2016-2026, 1999.

【 0 3 8 3 】

Rose et al., "酵母発生学における方法: 研究室コースマニュアル" Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Rosenow et al., "ストレプトコッカス ニューモニアの接着、コロニー化、および免疫原性に対する新規コリン結合タンパク質の寄与" *Mol. Microbiol.* 25(5):819-29, 1997.

Ross and Wilkie, "ヘテロ三量体 G タンパク質のための G T P アーゼ活性化タンパク質: G T P アーゼ - 活性化タンパク質 G タンパク質のシグナリングのレギュレーター (R G S) および R G S - 様タンパク質" *Annual Review of Biochemistry* 69:795-827, 2000.

【 0 3 8 4 】

Saleeba et al., *Meth. Enzymol.* 217:286-295, 1992.

Salzberg et al., "挿入マルコフモデルを用いる微生物遺伝子同定" *Nuc. Acids Res.* 26(2):544-8, 1998.

Sambrook et al., "分子クローニング: 研究室マニュアル" 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

【 0 3 8 5 】

Sampson et al., "すでに報告されているストレプトコッカス ニューモニアレプトコッカス エスピー アドヒージョンに相同な 3 7 キロダルトンのタンパク質をコードしているストレプトコッカス ニューモニア遺伝子である、p s a S のクローニングおよびヌクレオチド配列分析" *Infect. Immun.* 62(1):319-24, 1994.

Sanger, *PNAS* 74:5463, 1977.

Schultz et al., *Gene* 54:113-123, 1987.

【 0 3 8 6 】

Seed, *Nature* 329:840, 1987.

Shinefield and Black, "巨大規模のフィールド試験における肺炎双球菌コンジュゲートワクチンの有効性 (In Process Citation)," *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19(4):394-7, 2000.

Simon et al., *Science*, 252:802-8, 1991.

Smith and Johnson, *Gene* 67:31-40, 1988.

Smith et al., *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165, 1983.

【 0 3 8 7 】

Songyang, et al., *Cell* 72:767-778, 1993.

Sonnenberg and Belisle, "二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動、N - 末端アミノ酸配列決定、およびエレクトロスプレーマススペクトロメトリーによるマイコバクテリウム結核培養濾過タンパク質の限定" *Infect. Immun.* 65(11):4515-24, 1997.

10

20

30

40

50

Sonnhammer et al., “タンパク質配列における膜貫通ヘリックスを予測するための隠れマルコフモデル” *Ismb* 6:175-82, 1998.

【0388】

Stockbauer et al., “アルギニン - グリシン - アスパラギン酸 (RGD) モチーフを有する群 A のストレプトコッカス ニューモニアレプトコッカスのシステインプロテアーゼ毒性因子の天然変種は、インテグリンアルファベータ 3 およびアルファベータ 3 に選択的に結合する。 (In Process Citation),” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96(1):242-7, 1999.

Studier et al. “遺伝子発現テクノロジー” 酵素学における方法185, 60-89, 1990.

【0389】

Talkington et al., “肺炎双球菌表面アドヘジン A (PsaA) による、致命的な肺炎双球菌攻撃に対するマウスの保護(Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesin A (PsaA)),” *Microb. Pathog.* 21(1):17-22, 1996.

Tebbey et al., “遺伝的に解毒したコレラホロトキシン、CT-E29Hを用いる呼吸器シンシチウイルスに対する効果的な粘膜免疫化” *ワクチン* 18(24):2723-34, 2000.

【0390】

Thomas and Capecchi, *Cell* 51:503, 1987.

Weldingh et al., “マイコバクテリウム結核培養濾過物の分析のための二次元電気泳動および6つの新規なタンパク質の精製および特定” *Infect. Immun.* 66(8):3492-500, 1998.

Wilmot et al., *Nature* 385:810-813, 1997.

Wilson et al., *Cell* 37:767, 1984.

【0391】

Winoto and Baltimore. *EMBO J* 8:729-733, 1989.

Xu et al., “PHR1は、光レセプター外部セグメントにおける豊富なブレックストレプトコッカス ニューモニアリン相同ドメイン含有完全膜タンパク質をコードする。” *Journal of Biological Chemistry* 274:35676-35685, 1999.

Yamamoto et al., “肺炎双球菌表面タンパク質に対する粘膜免疫化のための無毒のアジュバント” *A. J. Immunol.* 161(8):4115-21, 1998.

【0392】

Zervos et al., *Cell* 72:223-232, 1993.

Zhang et al., 2001, “組換えPhpAタンパク質、ストレプトコッカス ニューモニアからのユニークなヒスチジンモチーフ含有タンパク質は、腹腔内肺炎双球菌攻撃に対してマウスを保護する。” *Infect. Immun.* 69:3827-3836, 2001.

10

20

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	F 4 C 0 8 4
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 8 5
C 0 7 K	17/00	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	C 0 7 K 17/00	
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K	39/09	(2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/09	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
			G 0 1 N 33/569	F

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 ロバート・ジョン・ザガースキー

アメリカ合衆国 1 4 5 6 4 ニューヨーク州ビクター、フォックス・ハント・ドライブ 5 6 9 番

(72)発明者 エイミー・ワダムズ・マシ

アメリカ合衆国 1 4 4 2 3 ニューヨーク州カレドニア、グランド・サークル 3 2 6 番

(72)発明者 ブルース・アーサー・グリーン

アメリカ合衆国 1 4 5 3 4 ニューヨーク州ピッツフォード、ノースフィールド・ゲイト 4 9 番

(72)発明者 デブ・ナラヤン・チャクラバルティ

アメリカ合衆国 1 4 5 3 4 ニューヨーク州ピッツフォード、フェアウェイ・クロッシング 2 番

(72)発明者 デイビッド・パリッシュ・ラッセル

アメリカ合衆国 1 4 4 2 4 ニューヨーク州カナンダグワ、ノース・プレザント・ストリート 2 4 0 番

(72)発明者 ジョゼフ・ローレンス・ウーターズ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 5 マサチューセッツ州ブライトン、グレンリー・テラス 9 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA50 CA04 CA09 CA20 DA06 EA04 GA11

HA14

4B029 AA07 AA23 BB20

4B063 QA01 QQ06 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS33 QS34

4B064 AG27 AG31 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA26X AA49Y AB01 AC14 BA02 CA44 CA46

4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 DA42 NA14 ZB351

ZB352

4C085 AA03 BA14 CC07 EE06 FF24

4H045 AA11 BA10 CA11 DA76 DA86 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	新型肺炎链球菌开放阅读框编码多肽抗原及其用途		
公开(公告)号	JP2009060898A	公开(公告)日	2009-03-26
申请号	JP2008209785	申请日	2008-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏控股		
申请(专利权)人(译)	惠氏控股公司		
[标]发明人	ロバートジョンザガースキー エイミーワダムズマシ ブルースアーサーグリーン デブナラヤンチャクラバルティ デイビッドパリッシュラッセル ジョゼフローレンスウーターズ		
发明人	ロバート・ジョン・ザガースキー エイミー・ワダムズ・マシ ブルース・アーサー・グリーン デブ・ナラヤン・チャクラバルティ デイビッド・パリッシュ・ラッセル ジョゼフ・ローレンス・ウーターズ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/315 C12N1/21 C07K16/12 C12M1/00 C12Q1/68 C12P21/02 C07K17/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K39/09 A61K48/00 A61K38/00 A61P31/04 G01N33/53 G01N33/569 A61P37/04 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12P21/08 G01N37/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K2039/53 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/3156 C07K2319/00 C12N9/88 C12Q1/689 C12Y305/01011		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/315 C12N1/21 C07K16/12 C12M1/00.A C12N15/00.F C12Q1/68.A C12P21/02.C C07K17/00 A61K39/00.H A61K39/39 A61K39/09 A61K48/00 A61K37/02 A61P31/04 G01N33/53.M G01N33/569.F A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.200 C12Q1/689.C C12Q1/689.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B063/QA01 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA49Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DA42 4C084/NA14 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/BA14 4C085/CC07 4C085/EE06 4C085/FF24 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	60/283948 2001-04-16 US 60/284443 2001-04-18 US		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

解决的问题：为肺炎链球菌提供有效的治疗方法。肺炎链球菌基因组序列的分离的多核苷酸，其包含与选自指定序列之一，其简并变体或其片段的核苷酸序列具有至少约95%同一性的核苷酸序列。可以有效地治疗肺炎链球菌。[选择图]无

配列番号	ORF
11	190
17	403
23	469
39	790
50	935
70	1143
83	1475
91	1568
97	1724
128	2271
148	2621
179	3212
209	3600