

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-532657

(P2010-532657A)

(43) 公表日 平成22年10月14日(2010.10.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 167 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-504730 (P2010-504730)
 (86) (22) 出願日 平成20年4月29日 (2008.4.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年12月24日 (2009.12.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/055214
 (87) 国際公開番号 W02008/135446
 (87) 国際公開日 平成20年11月13日 (2008.11.13)
 (31) 優先権主張番号 07107344.9
 (32) 優先日 平成19年5月2日 (2007.5.2)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 505141657
 インターセル アーゲー
 オーストリア国 ウイーン キャンパス
 ウイーン バイオセンター 3
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クレブシエラ属の抗原

(57) 【要約】

本発明は、抗原をコードする単離された核酸分子、このような核酸分子を含むベクター、およびこのようなベクターを含む宿主細胞に関する。さらに、本発明は、クレブシエラ属 (Klebsiella) の種に由来する抗原、ならびにその断片および変種、このような抗原を作製する方法、ならびにこのような抗原を発現する細胞を作製する方法を提供する。さらに、本発明は、このような抗原に結合する抗体、このような抗体を産生するハイブリドーマ細胞、このような抗体を作製する方法、このような核酸分子、抗原、ベクターまたは抗体を含む薬学的組成物、薬学的組成物を調製するための、このような核酸分子、抗原、ベクターまたは抗体の使用、このような抗原に結合することができるか、またはこのような抗原の相互作用活性を低下もしくは阻害することができるアンタゴニストを特定する方法、感染症を診断する方法、および感染症を治療または予防する方法を提供する。さらに具体的には、このような抗原は、院内感染を引き起こす細菌病原体によって産生されるか、もしくは院内感染を引き起こす細菌病原体と関連するか、または肺炎桿菌によって引き起こされる細菌感染症と関連する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原またはその断片をコードする単離された核酸分子であって、
以下からなる群より選択される、核酸配列を含む単離された核酸分子：

- a) SEQ ID NO:1~187およびSEQ ID NO:375を含む群より選択されるヌクレオチド配列を有する核酸分子と少なくとも70%の配列同一性を有する核酸分子、
- b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、
- c) a)またはb)の核酸分子の少なくとも15個の連続した塩基を含む核酸分子、
- d) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、a)、b)、またはc)の核酸分子にアニーリングする核酸分子、
- e) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c)またはd)において定義された核酸分子にハイブリダイズする核酸分子。

10

【請求項 2】

SEQ ID NO:1~187またはSEQ ID NO:375との配列同一性が、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%、または最も好ましくは100%である、請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

DNAである、請求項1または2のいずれか一項記載の核酸分子。

【請求項 4】

RNAである、請求項1または2のいずれか一項記載の核酸分子。

20

【請求項 5】

ゲノムDNA、好ましくはクレブシエラ (*Klebsiella*) 属の種に由来する、より好ましくは3つの亜種ニューモニエ (*pneumoniae*)、オゼネ (*ozaenae*)、およびリノスクレロマチス (*rhinoscleromatis*) を含む肺炎桿菌 (*K. pneumoniae*)、*K. オキシトカ* (*K. oxytoca*)、*K. プランチコラ* (*K. planticola*)、*K. テリゲナ* (*K. terrigena*)、ならびに *K. オルニチノリティカ* (*K. ornithinolytica*) を含む群より選択される種に由来する、より好ましくは肺炎桿菌または *K. オキシトカ* に由来するゲノムDNAから単離された、請求項1~3のいずれか一項記載の単離された核酸分子。

【請求項 6】

断片が、その活性断片または活性変種である、請求項1~5のいずれか一項記載の核酸。

30

【請求項 7】

抗原またはその断片が、クレブシエラ属に由来する、好ましくは3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、*K. オキシトカ*、*K. プランチコラ*、*K. テリゲナ*、ならびに *K. オルニチノリティカ*、より好ましくは肺炎桿菌または *K. オキシトカ* に由来するポリペプチドもしくはペプチド断片を含むか、またはこのようなポリペプチドもしくはペプチド断片からなる、請求項1~6のいずれか一項記載の核酸。

【請求項 8】

請求項1~7のいずれか一項記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 9】

請求項1~7のいずれか一項において定義された核酸分子によってコードされる抗原またはその断片を組換え発現するように適合された、請求項8記載のベクター。

40

【請求項 10】

請求項8または9において定義されたベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

クレブシエラ属に感染しているヒトに由来するまたはクレブシエラ属に以前に感染したことがある非感染健常ヒトに由来する血清と免疫学的に反応する抗原であって、

クレブシエラ属に由来する、好ましくは3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、*K. オキシトカ*、*K. プランチコラ*、*K. テリゲナ*、ならびに *K. オルニチノリティカ* に由来する、より好ましくは肺炎桿菌または *K. オキシトカ* に由来する単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種を含む、抗原。

50

【請求項 1 2】

SEQ ID NO:188～374、SEQ ID NO:376からなる群より選択される単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種を含むか、あるいはこのような単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種からなる、抗原。

【請求項 1 3】

ポリペプチドが、請求項1～7のいずれか一項において定義された核酸分子によってコードされる、請求項11または12記載の抗原。

【請求項 1 4】

抗原の活性断片が、前記ポリペプチドの、特に、SEQ ID NO:188～374またはSEQ ID NO:376のいずれかによって定義されるポリペプチドの、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%からなる、請求項11～13のいずれか一項記載の抗原。

10

【請求項 1 5】

抗原の活性変種が、前記ポリペプチドと、特に、SEQ ID NO:188～374またはSEQ ID NO:376のいずれかによって定義されるポリペプチドと、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%の配列同一性を有する、請求項11～14のいずれか一項記載の抗原。

【請求項 1 6】

抗原の活性断片が、SEQ ID NO:205のアミノ酸2-130;SEQ ID NO:216のアミノ酸26-356;SEQ ID NO:223のアミノ酸2-180;SEQ ID NO:224のアミノ酸1-168;SEQ ID NO:235のアミノ酸23-397;SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420および414-847;SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099;SEQ ID NO:242のアミノ酸1-245;SEQ ID NO:247のアミノ酸24-703;SEQ ID NO:252のアミノ酸23-328;SEQ ID NO:263のアミノ酸23-248;SEQ ID NO:267のアミノ酸2-335;SEQ ID NO:268のアミノ酸38-633;SEQ ID NO:269のアミノ酸26-742;SEQ ID NO:281のアミノ酸26-429;またはSEQ ID NO:285のアミノ酸1-632を含むか、またはこのようなアミノ酸からなる、請求項14記載の抗原。

20

【請求項 1 7】

抗原の活性変種が、SEQ ID NO:205のアミノ酸2-130;SEQ ID NO:216のアミノ酸26-356;SEQ ID NO:223のアミノ酸2-180;SEQ ID NO:224のアミノ酸1-168;SEQ ID NO:235のアミノ酸23-397;SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420および414-847;SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099;SEQ ID NO:242のアミノ酸1-245;SEQ ID NO:247のアミノ酸24-703;SEQ ID NO:252のアミノ酸23-328;SEQ ID NO:263のアミノ酸23-248;SEQ ID NO:267のアミノ酸2-335;SEQ ID NO:268のアミノ酸38-633;SEQ ID NO:269のアミノ酸26-742;SEQ ID NO:281のアミノ酸26-429;またはSEQ ID NO:285のアミノ酸1-632と、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%の配列同一性を有する、請求項15記載の抗原。

30

【請求項 1 8】

抗原の活性変種が、肺炎桿菌の異なる血清型の相同配列に由来し、特に、該血清型が、K1、K2、K3、K10、K21、K22、K30、K55、K64、O1、O2a、O3、O4、O5、もしくはO12、または該Kの血清型と該Oの血清型との任意の組み合わせである、請求項11～17のいずれか一項記載の抗原。

40

【請求項 1 9】

活性変種がSEQ ID NO:413～765からなる群より選択される、請求項11～18のいずれか一項記載の抗原。

【請求項 2 0】

a) SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847を含む抗原の活性断片またはSEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847からなる抗原の活性断片に対する、あるいはSEQ

50

ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847に由来する抗原の活性変種に対する、1~400個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは、1~350個、1~300個、1~250個、または1~200個、より好ましくは、1~150個、さらにより好ましくは、多くとも1~100個、さらにより好ましくは、多くとも1~50個、最も好ましくは、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、30個、または40個のさらなるアミノ酸残基、あるいは

b)SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099を含む抗原の活性断片もしくはSEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099からなる抗原の活性断片に対する、またはSEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099に由来する抗原の活性断片に対する、1~1100個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは、1~1000個、1~900個、1~800個、1~700個、1~600個、1~500個、1~400個、もしくは1~300個、より好ましくは、1~200個、さらにより好ましくは、多くとも1~100個、さらにより好ましくは、多くとも1~50個、最も好ましくは、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、30個、または40個のさらなるアミノ酸残基によってさらに定義される、請求項16~19のいずれか一項記載の抗原。

【請求項 2 1】

抗原と非相同の少なくとも1個のアミノ酸残基、好ましくはマーカートンパク質をさらに含むか、またはこのような少なくとも1個のアミノ酸残基からさらになる、請求項11~20のいずれか一項記載の抗原。

【請求項 2 2】

さらなるアミノ酸残基が、抗原のN末端に隣接するか、抗原のC末端に隣接するか、または抗原のN末端とC末端とに隣接する、請求項20または21記載の抗原。

【請求項 2 3】

さらなるアミノ酸残基が、

a)SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくはそのC末端に由来する変種、

b)SEQ ID NO:240のアミノ酸414-847もしくはそのN末端に由来する変種、または

c)SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099もしくはそのN末端およびC末端に由来する変種

によって定義される抗原に隣接する、請求項20~22のいずれか一項記載の抗原。

【請求項 2 4】

リーダー配列もしくは分泌配列、精製に用いられる配列、またはプロタンパク質配列のいずれかの配列をさらに含むか、あるいはこのようないずれかの配列からさらになる、請求項11~23のいずれか一項記載の抗原。

【請求項 2 5】

少なくとも1つのコアアミノ酸配列が、表1の「推定された免疫原性アミノ酸」もしくは「特定された免疫原領域の位置」の列において示されるか、または表4の「aaから」および「aaまで」の列によって定義されるか、または表5の「タンパク質内の位置(aa)」の列において示され、

より好ましくは、該コアアミノ酸配列が、以下:SEQ ID NO:204のアミノ酸11-27、35-47、68-107、113-122、124-136、140-146、152-164、168-174、183-201、211-218、228-243、246-253、および180-226;SEQ ID NO:205のアミノ酸13-31、48-59、69-91、109-115、121-127、および46-105;SEQ ID NO:206のアミノ酸12-44、49-95、102-145、148-178、184-229、233-244、249-273、292-299、304-329、334-348、354-365、367-385、394-426、428-440、444-487、503-527、531-539、546-554、556-584、および273-286;SEQ ID NO:207のアミノ酸7-17、22-32、34-41、55-77、79-86、93-111、118-126、131-148、152-162、165-177、183-197、213-220、234-250、253-262、267-294、および211-269;SEQ ID NO:208のアミノ酸22-29、41-56、58-66、79-88、94-121、124-131、134-157、162-171、173-180、189-197、201-214、216-224、242-254、257-270、282-287、290-302、309-315、320-325、341-355、362-368、372-378、および1-48;SEQ ID NO:209のアミノ酸5-15、18-35、48-61、65-71、112-119、138-154、157-169、179-208、214-223、226-232、243-250、256-262、277-286、289-296、338-348、352-363、370-376、385-408、420-436、443-454、462-483、498-561、563-592、600-642、661-671、673-709、714-733、748-754、771-776、798-806、808-821、823-839、および31-83;SEQ ID NO:210のアミノ酸5-14、21-26、31-41、59-

10

20

30

40

50

77、101-115、132-145、147-156、180-185、188-197、および97-158;SEQ ID NO:211のアミノ酸6-18、23-43、45-56、69-80、87-97、112-123、135-151、164-171、178-193、200-227、249-258、262-274、279-291、302-308、322-327、329-336、351-363、366-373、384-399、403-411、415-434、440-446、461-482、488-506、510-516、518-551、574-589、607-629、634-665、667-687、694-712、725-739、743-751、753-768、および521-583;SEQ ID NO:212のアミノ酸4-13、19-44、55-63、71-82、89-110、120-130、132-138、145-161、168-182、189-258、261-272、278-288、290-301、および11-76;SEQ ID NO:213のアミノ酸4-22、43-56、63-68、81-90、93-99、139-148、155-160、170-176、189-195、207-218、227-232、241-249、251-258、260-266、277-295、300-327、329-336、340-356、384-390、418-423、427-433、438-444、および383-428;SEQ ID NO:214のアミノ酸10-18、32-37、45-55、60-69、77-83、89-95、120-125、133-170、172-185、193-211、214-223、232-249、255-275、277-303、305-310、320-328、334-341、347-353、355-369、380-386、389-395、および71-85;SEQ ID NO:215のアミノ酸4-23、27-35、67-73、80-103、117-126、132-138、140-159、162-171、180-194、198-208、211-218、228-234、239-253、262-270、272-291、296-305、および39-110;SEQ ID NO:216のアミノ酸13-24、27-34、37-66、69-88、99-104、149-155、164-175、184-193、199-209、227-235、264-273、276-285、288-315、323-335、346-353、56-111、および199-261;SEQ ID NO:217のアミノ酸11-22、25-48、51-60、64-72、80-96、108-122、132-137、142-150、152-167、175-199、214-229、237-244、252-258、260-266、279-287、301-340、345-350、および109-153;SEQ ID NO:218のアミノ酸37-43、50-57、65-82、87-109、123-129、141-150、152-157、166-172、179-203、209-241、249-284、290-300、308-326、329-335、345-357、359-368、379-386、390-417、420-425、438-444、461-466、473-490、497-505、524-534、541-550、586-597、608-614、622-632、660-666、679-694、696-706、708-722、725-731、737-763、784-789、810-825、837-854、857-880、882-895、901-907、911-928、14-76、および176-220;SEQ ID NO:219のアミノ酸9-16、38-52、61-86、93-100、110-117、123-132、138-145、151-169、172-181、186-202、208-225、227-253、264-275、289-295、320-329、335-342、および113-193;SEQ ID NO:220のアミノ酸11-18、24-30、42-49、53-63、69-80、87-93、95-103、144-171、173-185、193-200、202-208、215-221、242-261、266-273、277-286、290-299、322-328、338-351、354-377、391-409、441-451、461-466、499-515、521-527、562-569、621-629、647-663、676-682、694-701、703-713、725-731、735-744、755-764、793-800、および490-547;SEQ ID NO:221のアミノ酸4-11、14-22、38-70、81-90、97-114、118-132、147-171、173-181、187-202、244-250、252-298、301-311、313-331、342-368、410-418、446-451、456-462、468-474、476-492、499-507、519-528、552-565、568-575、584-613、618-624、626-649、および417-489;SEQ ID NO:222のアミノ酸4-9、32-53、66-72、74-90、97-104、110-130、133-139、144-152、166-177、203-213、215-241、256-275、291-304、307-316、321-326、334-345、352-367、および201-255;SEQ ID NO:223のアミノ酸13-19、26-43、66-72、80-85、95-101、109-125、131-137、および25-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸13-24、35-43、50-56、58-68、77-83、104-110、117-125、132-138、140-153、および19-66;SEQ ID NO:225のアミノ酸15-31、37-42、47-54、68-87、89-96、107-117、121-127、131-137、145-151、176-182、220-226、232-246、250-257、291-300、317-325、328-333、337-359、368-393、403-428、460-478、480-493、500-506、511-516、519-526、528-559、565-572、584-595、597-605、608-613、626-648、679-684、687-693、703-714、718-735、742-750、757-765、768-788、793-799、813-819、823-829、839-850、および576-623;SEQ ID NO:226のアミノ酸10-35、37-60、63-76、79-86、88-97、108-113、118-126、128-134、138-145、153-159、168-188、194-208、211-243、255-260、270-276、285-301、307-346、348-367、および275-339;SEQ ID NO:227のアミノ酸4-17、21-33、35-42、47-64、72-80、85-92、98-103、125-147、151-161、165-177、183-230、232-246、256-262、284-306、310-328、331-367、369-383、392-399、および32-85;SEQ ID NO:228のアミノ酸5-11、18-27、42-52、60-65、75-84、90-102、107-116、125-178、184-206、221-233、235-242、249-257、264-277、288-317、および267-313;SEQ ID NO:229のアミノ酸5-11、14-

42、50-75、79-86、89-98、120-125、152-160、166-181、185-193、200-207、および85-14;SEQ ID NO:230のアミノ酸4-30、36-43、46-55、63-111、144-152、159-168、179-189、191-200、205-213、および37-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸20-45、57-77、80-100、119-126、131-137、143-169、179-185、195-203、207-231、235-264、282-302、320-329、341-347、353-359、361-373、および266-296;SEQ ID NO:232のアミノ酸5-22、24-37、41-55、57-65、72-78、90-103、105-116、119-130、164-170、190-202、209-231、244-254、260-276、300-339、344-350、355-376、389-397、399-406、408-421、429-437、および103-152;SEQ ID NO:233のアミノ酸8-16、18-25、31-47、71-82、87-102、104-114、126-156、176-183、190-200、205-212、218-228、231-243、256-279、287-301、303-312、324-332、335-348、351-357、365-380、395-412、422-451、456-464、467-483、501-507、および405-468;SEQ ID NO:234のアミノ酸4-18、21-39、46-56、63-69、72-86、116-130、132-160、162-190、196-201、209-231、233-241、251-265、269-282、292-298、309-324、333-369、391-415、417-427、436-454、471-480、482-499、510-518、521-533、537-543、545-561、571-581、585-597、599-607、609-635、638-643、650-665、671-685、687-695、701-707、710-720、724-736、747-757、764-769、772-784、791-796、808-820、および317-401;SEQ ID NO:235のアミノ酸4-12、15-33、58-77、82-89、98-106、108-118、120-135、141-147、152-160、168-215、225-233、235-247、250-264、284-312、314-321、336-343、359-374、386-394、および159-218;SEQ ID NO:236のアミノ酸4-16、24-36、40-47、49-56、61-81、84-143、148-156、158-164、170-175、194-206、208-214、および126-203;SEQ ID NO:237のアミノ酸28-45、50-61、94-111、113-124、137-142、147-173、180-188、190-196、202-223、229-235、239-249、262-270、280-288、290-321、325-332、347-355、359-368、389-407、415-427、429-453、458-465、477-485、499-505、516-527、531-549、569-592、594-602、605-615、628-635、647-659、662-683、727-735、760-765、771-780、788-809、811-818、および549-630;SEQ ID NO:238のアミノ酸21-28、33-40、48-100、104-111、113-134、および1-46;SEQ ID NO:239のアミノ酸12-24、31-41、53-61、73-87、112-128、133-140、151-156、および26-98;SEQ ID NO:240のアミノ酸4-9、19-26、32-56、58-67、71-81、90-95、97-105、112-118、124-132、138-144、147-167、169-177、199-207、212-217、231-241、250-260、266-272、274-282、289-296、299-310、316-331、344-350、352-363、368-377、381-394、399-406、412-450、459-473、486-503、508-514、518-548、564-570、579-587、602-608、616-623、628-635、638-654、678-688、691-696、703-709、716-723、761-772、784-793、819-826、835-844、および790-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸4-10、18-36、43-50、63-71、75-105、109-117、134-140、145-157、176-182、184-201、203-211、215-225、240-250、262-284、294-309、313-319、327-337、350-356、361-367、372-393、411-421、428-451、453-466、487-492、501-528、535-553、564-574、592-605、612-629、631-640、646-653、658-666、673-681、713-718、720-730、739-749、784-792、821-826、833-844、853-863、871-876、885-894、900-918、937-950、952-957、972-990、995-1001、1024-1036、1039-1044、1049-1055、1062-1089、1091-1103、1110-1121、1123-1129、1131-1151、1157-1179、1181-1201、1204-1223、1233-1244、1269-1276、1279-1286、1294-1301、1303-1309、1315-1338、1350-1362、1373-1381、1398-1406、1412-1423、1440-1446、1458-1466、1481-1487、1492-1508、1511-1518、1528-1534、1536-1547、1553-1565、1606-1617、1619-1644、および761-781;SEQ ID NO:242のアミノ酸6-13、31-38、47-60、71-102、107-123、128-155、173-179、185-194、210-220、および161-232;SEQ ID NO:243のアミノ酸11-34、36-43、49-67、74-79、84-92、94-100、103-112、120-129、134-155、162-173、177-185、189-202、206-211、および130-185;SEQ ID NO:244のアミノ酸4-10、20-35、37-46、48-55、60-66、75-82、87-98、133-150、166-172、178-189、208-214、230-235、245-251、271-308、319-333、335-355、373-380、および117-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸4-30、54-65、91-105、107-131、135-154、163-192、199-208、210-224、229-239、248-257、263-279、281-294、328-354、373-379、382-405、426-453、462-487、および249-323;SEQ ID NO:246のアミノ酸4-10、12-24、45-55、75-88、および24-40;SEQ ID NO:247のアミノ酸4-14、20-37、47-53、55-61、75-81、97-103

、107-124、129-135、139-147、160-166、169-175、181-190、202-221、247-255、272-285、300-310、318-332、351-361、384-397、406-427、442-449、458-482、494-503、512-524、531-539、552-562、577-588、590-596、600-608、613-624、637-668、692-700、および232-278;SEQ ID NO:248のアミノ酸33-39、49-55、68-84、90-96、104-120、126-143、150-159、168-191、197-208、219-225、227-233、241-247、63-115、および200-250;SEQ ID NO:249のアミノ酸4-22、24-34、36-55、57-76、83-97、99-117、135-143、145-157、163-174、178-198、200-207、209-270、276-290、321-335、338-347、367-374、393-402、404-411、416-422、443-460、467-473、および117-183;SEQ ID NO:250のアミノ酸26-37、44-52、57-96、104-111、118-124、155-177、179-197、201-214、223-233、243-250、257-262、291-297、303-314、319-363、および47-105;SEQ ID NO:251のアミノ酸36-43、45-60、76-97、107-125、131-156、158-164、および118-163;SEQ ID NO:252のアミノ酸5-32、40-50、52-60、70-88、92-101、106-126、138-150、152-161、175-193、201-234、237-248、270-285、297-303、312-318、および209-255;SEQ ID NO:253のアミノ酸4-12、23-34、49-55、59-65、70-81、83-130、および62-113;SEQ ID NO:254のアミノ酸4-26、38-49、69-76、82-96、103-119、126-140、143-190、194-209、212-218、および100-167;SEQ ID NO:255のアミノ酸7-29、35-47、56-66、80-94、97-123、125-148、150-160、166-173、175-191、193-200、207-225、および75-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸14-36、39-45、51-59、66-71、76-88、106-117、121-126、140-157、164-187、198-206、210-252、および202-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸4-19、27-35、90-107、120-134、144-150、166-175、192-198、221-243、249-255、263-278、283-288、305-321、324-334、342-349、355-366、377-390、413-425、442-448、および130-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸17-26、41-51、54-61、64-72、78-105、117-125、127-137、147-155、175-213、230-236、238-261、271-277、282-297、309-318、329-347、355-372、377-390、および69-126;SEQ ID NO:259のアミノ酸4-48、54-60、62-69、73-81、88-115、124-137、139-154、156-169、171-190、194-231、240-273、288-303、336-363、367-395、405-411、434-442、449-454、466-483、491-507、および226-282;SEQ ID NO:260のアミノ酸26-34、39-47、50-80、82-88、97-105、108-127、131-137、162-180、185-191、198-203、209-214、226-247、256-288、296-305、および149-239;SEQ ID NO:261のアミノ酸5-28、30-54、73-84、89-98、109-116、122-128、137-142、163-189、207-236、245-280、288-390、404-423、426-433、450-474、487-504、506-513、524-530、532-595、605-614、620-626、631-638、644-657、667-683、686-693、695-702、707-733、739-747、および6-62;SEQ ID NO:262のアミノ酸23-31、39-50、55-67、76-100、117-130、149-171、173-185、218-238、242-288、291-298、334-346、355-369、382-399、413-420、431-438、442-449、455-466、486-493、498-508、524-531、540-546、551-558、562-570、575-582、585-596、598-604、621-630、632-650、670-677、682-701、736-749、755-761、および612-626;SEQ ID NO:263のアミノ酸4-21、24-39、44-68、74-81、85-91、109-116、129-138、142-148、173-188、195-201、207-212、223-228、および126-148;SEQ ID NO:264のアミノ酸4-17、24-42、61-67、84-93、96-102、116-121、135-143、155-165、177-186、210-224、253-259、272-297、299-331、337-351、359-367、369-385、および1-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸4-25、28-54、67-81、85-136、138-143、157-170、180-190、197-203、205-214、219-243、246-270、277-283、290-299、305-311、および127-182;SEQ ID NO:266のアミノ酸11-20、25-33、75-80、85-91、113-124、143-155、161-170、172-184、および128-176;SEQ ID NO:267のアミノ酸4-9、16-26、28-34、55-80、120-143、150-156、158-164、167-178、185-190、192-213、221-237、242-255、257-272、281-290、325-332、および48-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸13-48、59-70、78-88、95-112、129-151、153-161、163-182、214-221、235-245、248-277、281-291、293-301、303-311、315-320、323-346、377-383、390-398、447-454、474-487、491-512、531-544、547-553、582-590、597-603、605-611、623-629、および410-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸6-26、39-46、48-58、69-75、109-121、139-144、148-155、166-172、215-221、261-267、313-319、363-386、423-433、447-458、465-471、483-494、497-517、558-565、578-586、589-597、619-626、636-645、659-665、671-680、682-693、733-739、および152-2

10

20

30

40

50

06;SEQ ID NO:270のアミノ酸4-19、23-35、40-50、52-58、65-73、78-103、112-125、146-160、163-192、194-200、および29-90;SEQ ID NO:271のアミノ酸4-13、17-32、40-50、57-67、76-81、88-95、107-119、131-142、144-157、171-178、185-193、197-207、212-227、231-238、248-253、263-310、および90-170;SEQ ID NO:272のアミノ酸9-28、57-82、84-93、126-135、143-166、173-194、196-201、212-220、228-254、269-277、289-298、305-316、320-327、330-337、350-359、373-378、386-392、403-411、421-428、435-441、443-458、465-470、および80-141;SEQ ID NO:273のアミノ酸11-48、54-67、69-75、89-95、101-122、124-131、134-157、159-175、202-208、214-228、258-270、272-280、287-295、298-310、331-338、340-417、427-500、502-509、534-552、556-561、564-577、585-592、594-608、621-627、632-641、643-652、671-681、683-709、712-743、758-764、776-783、789-820、835-851、864-883、885-910、913-940、948-953、967-976、994-1020、および775-825;SEQ ID NO:274のアミノ酸14-24、32-54、58-63、70-80、93-100、108-125、127-135、142-153、155-160、180-191、201-208、210-216、222-235、242-264、267-273、276-282、284-308、および10-59;SEQ ID NO:275のアミノ酸16-28、44-68、70-77、83-90、99-129、131-137、145-154、161-175、183-190、196-203、205-220、238-245、321-328、330-338、366-379、383-397、399-405、412-418、442-458、471-483、486-505、536-544、562-568、583-602、610-618、629-635、641-655、672-682、697-705、714-729、744-751、755-762、766-771、783-807、および555-621;SEQ ID NO:276のアミノ酸4-9、20-34、45-54、60-77、79-89、91-100、102-149、162-170、177-189、193-208、210-222、238-244、252-264、267-276、302-307、および100-140;SEQ ID NO:277のアミノ酸11-27、30-49、56-62、69-74、76-85、94-108、116-125、129-147、153-161、165-171、177-208、217-223、225-231、237-255、260-284、293-300、および73-137;SEQ ID NO:278のアミノ酸4-38、40-51、84-97、99-106、109-115、119-129、131-145、148-160、180-186、188-202、230-243、246-267、274-288、290-299、302-312、317-327、332-344、353-377、381-388、407-419、423-437、447-470、474-482、486-494、501-523、531-546、551-556、および727-740;SEQ ID NO:279のアミノ酸23-52、62-76、87-104、109-115、117-123、129-139、143-149、152-170、172-191、199-205、212-218、220-240、249-256、263-275、297-303、308-342、349-380、382-394、414-420、430-441、446-452、460-475、488-505、514-531、533-539、546-568、570-577、579-588、613-625、632-670、672-716、718-745、759-769、785-798、801-807、および272-324;SEQ ID NO:280のアミノ酸4-34、36-43、56-73、80-87、101-134、148-159、161-170、178-185、195-206、211-221、223-248、259-271、276-295、297-308、および241-296;SEQ ID NO:281のアミノ酸5-31、44-50、64-74、86-94、132-147、154-167、196-203、209-219、253-260、284-289、300-312、319-327、335-340、358-364、376-383、および166-202;SEQ ID NO:282のアミノ酸4-9、12-27、29-71、77-84、90-108、114-142、147-164、180-213、217-227、229-282、291-309、322-329、336-353、365-370、および317-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸36-41、52-66、71-83、89-95、116-127、154-174、176-184、200-206、230-237、248-259、269-284、307-316、376-383、399-418、424-442、445-451、454-462、および1-50;SEQ ID NO:284のアミノ酸9-14、33-49、64-72、87-92、103-109、123-128、130-141、143-154、160-166、182-214、237-247、251-260、292-300、327-332、337-350、357-365、388-398、405-411、422-428、451-459、478-488、520-531、534-540、558-564、580-586、591-600、605-615、629-635、641-653、658-672、212-244、および533-611;SEQ ID NO:285のアミノ酸4-10、17-27、30-37、44-62、80-85、94-114、118-131、134-141、148-161、171-212、218-241、248-261、274-313、325-336、342-348、359-373、391-397、424-431、454-474、489-495、497-503、505-515、548-553、560-580、591-610、および277-324;SEQ ID NO:286のアミノ酸7-16、18-24、30-47、49-70、83-99、103-117、126-141、146-153、159-165、177-194、198-221、236-246、255-262、273-279、283-296、301-332、338-411、422-428、434-440、452-458、463-469、494-509、511-517、524-531、548-554、564-572、および335-389;SEQ ID NO:287のアミノ酸9-15、33-54、56-80、102-108、および1-42;SEQ ID NO:288のアミノ酸15-36、42-55、58-68、および54-77;SEQ ID NO:289のアミノ酸55-75、89-96、98-110、および14-36

;SEQ ID NO:290のアミノ酸8-14、29-51、73-101、110-117、および70-114;SEQ ID NO:291
のアミノ酸20-25、29-34、41-52、60-67、69-85、90-100、114-122、136-142、160-170、
174-181、および21-58;SEQ ID NO:292のアミノ酸14-22、および4-13;SEQ ID NO:293のア
ミノ酸22-40、54-66、88-105、109-118、および31-74;SEQ ID NO:294のアミノ酸5-11、18
-32、47-60、66-73、83-92、113-120、126-141、151-164、167-174、201-211、および118
-129;SEQ ID NO:295のアミノ酸5-11、18-24、32-40、47-53、および25-54;SEQ ID NO:296
のアミノ酸18-24、31-48、および5-55;SEQ ID NO:297のアミノ酸10-16、26-32、47-56、8
5-95、および10-62;SEQ ID NO:298のアミノ酸4-12、16-26、および25-34;SEQ ID NO:299
のアミノ酸19-29、45-51、63-68、76-92、103-110、114-120、123-133、135-141、および
14-78;SEQ ID NO:300のアミノ酸4-18、47-61、および57-93;SEQ ID NO:301のアミノ酸17-
29、44-50、および26-38;SEQ ID NO:302のアミノ酸5-19、55-64、78-85、95-101、104-11
2、および24-33;SEQ ID NO:303のアミノ酸4-10、および12-31;SEQ ID NO:304のアミノ酸4
-12、27-41、43-58、60-67、76-86、および13-65;SEQ ID NO:305のアミノ酸30-38、57-67
、および5-32;SEQ ID NO:306のアミノ酸30-43、および2-21;SEQ ID NO:307のアミノ酸14-
20、23-36、41-48、および1-52;SEQ ID NO:308のアミノ酸18-33、51-58、76-82、および3
2-46;SEQ ID NO:309のアミノ酸25-31、および2-16;SEQ ID NO:310のアミノ酸14-23、50-5
8、および9-49;SEQ ID NO:311のアミノ酸4-10、22-31、35-45、48-68、71-80、および17-
66;SEQ ID NO:312のアミノ酸4-24、28-42、46-56、63-69、87-94、112-131、および2-46;
SEQ ID NO:313のアミノ酸4-15、19-28、34-41、52-62、78-86、および2-20;SEQ ID NO:31
4のアミノ酸4-11、16-30、32-42、および7-38;SEQ ID NO:315のアミノ酸4-20、22-31、お
よび22-38;SEQ ID NO:316のアミノ酸4-19、および17-32;SEQ ID NO:317のアミノ酸7-13、
17-22、27-33、80-100、および26-40;SEQ ID NO:318のアミノ酸10-18、22-48、および32-
44;SEQ ID NO:319のアミノ酸15-24、43-49、73-83、および45-93;SEQ ID NO:320のアミノ
酸22-29、46-55、57-63、および5-17;SEQ ID NO:321のアミノ酸10-33、および21-35;SEQ
ID NO:322のアミノ酸16-24、および22-49;SEQ ID NO:323のアミノ酸4-16、37-73、76-110
、117-125、127-132、および2-30;SEQ ID NO:324のアミノ酸4-12、23-35、44-56、59-88
、および22-76;SEQ ID NO:325のアミノ酸15-26、および23-35;SEQ ID NO:326のアミノ酸1
2-22、31-40、および17-44;SEQ ID NO:327のアミノ酸4-9、13-18、29-35、および57-64;S
EQ ID NO:328のアミノ酸31-55、67-81、および25-70;SEQ ID NO:329のアミノ酸13-24、51
-58、および13-26;SEQ ID NO:330のアミノ酸6-20、29-40、57-79、および46-88;SEQ ID N
O:331のアミノ酸8-14、41-54、68-76、83-93、106-126、130-139、および12-72;SEQ ID N
O:332のアミノ酸5-13、17-24、41-55、64-69、80-85、94-107、109-115、および53-88;SE
Q ID NO:333のアミノ酸5-12、32-54、57-64、および20-33;SEQ ID NO:334のアミノ酸4-16
、40-48、50-58、62-68、75-85、92-104、108-116、124-134、および68-128;SEQ ID NO:3
35のアミノ酸7-13、19-29、34-40、54-71、76-81、91-144、147-155、157-188、および11
-83;SEQ ID NO:336のアミノ酸17-24、32-41、および6-43;SEQ ID NO:337のアミノ酸14-31
、38-59、69-87、95-102、126-146、157-162、177-193、201-227、238-251、および63-78
;SEQ ID NO:338のアミノ酸10-16、18-25、27-41、43-52、59-86、94-101、134-140、およ
び38-100;SEQ ID NO:339のアミノ酸4-19、23-35、43-72、78-92、および37-93;SEQ ID NO
:340のアミノ酸15-20、27-32、41-65、69-82、93-105、107-115、120-147、170-178、184
-201、214-257、272-281、293-314、332-339、358-364、374-381、390-397、399-414、
428-460、および317-375;SEQ ID NO:341のアミノ酸11-28、47-55、59-68、76-105、108-1
16、120-144、146-160、167-175、180-187、209-233、および144-158;SEQ ID NO:342のア
ミノ酸4-13、58-78、および14-77;SEQ ID NO:343のアミノ酸26-31、44-49、57-64、67-74
、107-112、116-152、154-181、202-212、241-255、および57-101;SEQ ID NO:344のアミ
ノ酸10-41、53-70、81-93、100-111、137-147、164-169、183-190、199-210、216-221、2
26-240、および84-95;SEQ ID NO:345のアミノ酸12-45、48-56、73-79、91-103、106-112
、117-125、132-143、154-160、178-201、208-214、216-225、260-266、276-283、および
98-115;SEQ ID NO:346のアミノ酸4-15、30-42、および29-39;SEQ ID NO:347のアミノ酸22
-53、55-73、80-88、および33-66;SEQ ID NO:348のアミノ酸6-23、44-54、および56-67;S

10

20

30

40

50

EQ ID NO:349のアミノ酸8-21、35-44、66-75、82-87、94-101、および32-94;SEQ ID NO:350のアミノ酸8-20、23-32、36-50、53-69、および15-69;SEQ ID NO:351のアミノ酸8-22;SEQ ID NO:352のアミノ酸31-37、および2-31;SEQ ID NO:353のアミノ酸4-20、23-39、58-63、71-78、97-102、および22-82;SEQ ID NO:354のアミノ酸23-44、135-152、168-184、および57-116;SEQ ID NO:355のアミノ酸24-31、42-50、52-62、93-117、および43-94;SEQ ID NO:356のアミノ酸20-29、および24-43;SEQ ID NO:357のアミノ酸12-57、59-74、および22-40;SEQ ID NO:358のアミノ酸7-16、18-26、39-45、68-78、86-92、および65-82;SEQ ID NO:359のアミノ酸5-17、19-34、42-48、56-71、102-113、118-129、および67-111;SEQ ID NO:360のアミノ酸4-33、50-71、および13-55;SEQ ID NO:361のアミノ酸9-17、23-30、37-54、69-88、96-102、114-123、130-140、143-163、および5-70;SEQ ID NO:362のアミノ酸4-23、27-52、71-80、および9-94;SEQ ID NO:363のアミノ酸13-19、および2-21;SEQ ID NO:364のアミノ酸18-26、28-52、63-74、94-107、123-134、および18-84;SEQ ID NO:365のアミノ酸19-33、57-68、および26-48;SEQ ID NO:366のアミノ酸4-26、31-37、42-59、および12-65;SEQ ID NO:367のアミノ酸4-25、および20-39;SEQ ID NO:368のアミノ酸40-51、54-62、67-75、83-89、126-146、148-156、および31-42;SEQ ID NO:369のアミノ酸4-15、23-33、38-49、82-98、および7-91;SEQ ID NO:370のアミノ酸6-26、36-57、および40-64;SEQ ID NO:371のアミノ酸6-15、21-28、32-38、57-65、78-103、114-134、138-144、154-163、および41-95;SEQ ID NO:372のアミノ酸13-30、47-57、71-76、および25-71;SEQ ID NO:373のアミノ酸4-31、43-51、55-63、67-72、76-83、88-95、99-118、125-132、134-159、および82-118;SEQ ID NO:374のアミノ酸4-17、26-32、34-40、45-61、67-92、および41-97;SEQ ID NO:204のアミノ酸179-208、および198-227;SEQ ID NO:205のアミノ酸45-69、65-89、および83-106;SEQ ID NO:206のアミノ酸269-290;SEQ ID NO:207のアミノ酸209-230、226-249、および245-269;SEQ ID NO:208のアミノ酸-9-15、10-33、および28-52;SEQ ID NO:209のアミノ酸29-50、45-67、および62-85;SEQ ID NO:210のアミノ酸96-120、115-139、および134-158;SEQ ID NO:211のアミノ酸519-543、539-563、および559-584;SEQ ID NO:212のアミノ酸10-35、31-56、および52-77;SEQ ID NO:213のアミノ酸382-407、および403-428;SEQ ID NO:214のアミノ酸66-90;SEQ ID NO:215のアミノ酸38-65、および61-88;SEQ ID NO:216のアミノ酸56-85、198-221、217-240、および236-261;SEQ ID NO:217のアミノ酸108-132、および128-153;SEQ ID NO:218のアミノ酸13-37、33-56、52-76、175-200、および196-220;SEQ ID NO:219のアミノ酸132-156、152-176、および172-195;SEQ ID NO:220のアミノ酸489-512、508-531、および526-549;SEQ ID NO:221のアミノ酸416-442、438-465、および461-489;SEQ ID NO:222のアミノ酸199-222、217-240、および235-257;SEQ ID NO:223のアミノ酸25-55、51-81、および77-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸18-46、および42-66;SEQ ID NO:225のアミノ酸575-601、および597-623;SEQ ID NO:226のアミノ酸274-299、295-320、および316-339;SEQ ID NO:227のアミノ酸32-61、および57-85;SEQ ID NO:228のアミノ酸266-291、および287-313;SEQ ID NO:229のアミノ酸85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸36-64、および83-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸264-285、および280-300;SEQ ID NO:232のアミノ酸102-128、および124-152;SEQ ID NO:233のアミノ酸404-429、および445-468;SEQ ID NO:234のアミノ酸343-374、および370-401;SEQ ID NO:235のアミノ酸158-182、および178-202;SEQ ID NO:236のアミノ酸151-180;SEQ ID NO:237のアミノ酸549-579、575-605、および601-630;SEQ ID NO:238のアミノ酸-7-23、および19-46;SEQ ID NO:239のアミノ酸48-75、および71-98;SEQ ID NO:240のアミノ酸789-813、および809-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸759-783;SEQ ID NO:242のアミノ酸160-188、184-211、および207-232;SEQ ID NO:243のアミノ酸130-159;SEQ ID NO:244のアミノ酸117-147、143-173、および169-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸248-276、272-300、および296-323;SEQ ID NO:246のアミノ酸21-43;SEQ ID NO:247のアミノ酸231-256、および252-278;SEQ ID NO:248のアミノ酸62-91、87-115、および199-227;SEQ ID NO:249のアミノ酸116-141、137-162、および158-183;SEQ ID NO:250のアミノ酸46-69、65-87、および82-105;SEQ ID NO:251のアミノ酸117-142、および138-163;SEQ ID NO:252のアミノ酸208-233、および229-255;SEQ ID NO:253のアミノ酸61-88;SEQ ID NO:254のアミノ酸99-124、120-145、および141-16

7;SEQ ID NO:255のアミノ酸74-103、99-128、124-152、および148-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸202-231、および227-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸129-154、および150-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸95-126;SEQ ID NO:259のアミノ酸226-256、および252-282;SEQ ID NO:260のアミノ酸171-198、194-221、および217-240;SEQ ID NO:261のアミノ酸35-65、および61-91;SEQ ID NO:262のアミノ酸608-631;SEQ ID NO:263のアミノ酸124-149;SEQ ID NO:264のアミノ酸-14-21、および17-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸127-157、および153-182;SEQ ID NO:266のアミノ酸150-176;SEQ ID NO:267のアミノ酸48-79、および75-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸435-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸151-180、および176-206;SEQ ID NO:270のアミノ酸126-151、および167-190;SEQ ID NO:271のアミノ酸89-118、114-144、および140-170;SEQ ID NO:272のアミノ酸80-112;SEQ ID NO:274のアミノ酸9-36;SEQ ID NO:276のアミノ酸117-140;SEQ ID NO:277のアミノ酸72-97、93-117、および113-137;SEQ ID NO:278のアミノ酸723-746;SEQ ID NO:279のアミノ酸271-300;SEQ ID NO:280のアミノ酸240-271、および267-296;SEQ ID NO:281のアミノ酸165-188、および183-206;SEQ ID NO:282のアミノ酸316-344、および340-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸-3-27、および23-50;SEQ ID NO:284のアミノ酸212-244、532-561、557-586、および582-611;SEQ ID NO:285のアミノ酸276-302、および298-324;SEQ ID NO:286のアミノ酸335-364、および360-389;SEQ ID NO:287のアミノ酸41-64、および59-82;SEQ ID NO:288のアミノ酸53-77;SEQ ID NO:289のアミノ酸13-37;SEQ ID NO:290のアミノ酸69-94、および90-114;SEQ ID NO:291のアミノ酸19-42、および37-60;SEQ ID NO:292のアミノ酸1-25;SEQ ID NO:293のアミノ酸30-54、および50-75;SEQ ID NO:294のアミノ酸111-135;SEQ ID NO:295のアミノ酸25-54;SEQ ID NO:334のアミノ酸67-98、および94-126;SEQ ID NO:335のアミノ酸9-32、27-51、46-70、および65-86;SEQ ID NO:336のアミノ酸1-24、および20-44;SEQ ID NO:337のアミノ酸58-82;SEQ ID NO:338のアミノ酸37-62、58-82、および77-101;SEQ ID NO:339のアミノ酸37-68、および64-93;SEQ ID NO:340のアミノ酸317-347、および343-375;SEQ ID NO:341のアミノ酸140-164;SEQ ID NO:342のアミノ酸13-40、36-60、および55-79;SEQ ID NO:343のアミノ酸56-79、および75-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸77-101;SEQ ID NO:345のアミノ酸94-118;SEQ ID NO:205のアミノ酸46-105;SEQ ID NO:216のアミノ酸56-111;SEQ ID NO:223のアミノ酸25-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸19-66;SEQ ID NO:229のアミノ酸85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸37-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸266-296;SEQ ID NO:232のアミノ酸103-152;SEQ ID NO:235のアミノ酸167-218;SEQ ID NO:240のアミノ酸790-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸761-781;SEQ ID NO:242のアミノ酸176-232;SEQ ID NO:244のアミノ酸117-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸249-323;SEQ ID NO:247のアミノ酸232-278;SEQ ID NO:252のアミノ酸209-255;SEQ ID NO:255のアミノ酸75-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸202-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸130-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸69-126;SEQ ID NO:263のアミノ酸126-148;SEQ ID NO:264のアミノ酸1-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸127-182;SEQ ID NO:267のアミノ酸48-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸410-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸152-206;SEQ ID NO:275のアミノ酸555-621;SEQ ID NO:281のアミノ酸166-202;SEQ ID NO:282のアミノ酸317-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸1-50;SEQ ID NO:285のアミノ酸277-324;SEQ ID NO:289のアミノ酸14-36;SEQ ID NO:336のアミノ酸6-43;SEQ ID NO:343のアミノ酸57-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸84-95;またはSEQ ID NO:345のアミノ酸98-115からなる群より選択される、少なくとも1つのコアアミノ酸配列を含む抗原。

【請求項 26】

a) 1～50個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは1～40個、より好ましくは1～30個、さらにより好ましくは多くとも1～25個、さらにより好ましくは多くとも1～10個、最も好ましくは1個、2個、3個、4個、もしくは5個のさらなるアミノ酸残基;および/または

b) コアアミノ酸配列と非相同の少なくとも1個のさらなるアミノ酸残基からさらになる、請求項25記載の抗原。

【請求項 27】

さらなるアミノ酸残基が、コアアミノ酸配列のN末端に隣接するか、C末端に隣接するか、またはN末端とC末端とに隣接する、請求項26記載の抗原。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

請求項25において定義された、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、または少なくとも6個のコアアミノ酸配列を含む、請求項25～27のいずれか一項記載の抗原。

【請求項 29】

請求項1～7のいずれか一項において定義された核酸分子を発現させる工程を含む、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を作製する方法。

【請求項 30】

適した宿主細胞を、請求項8または9において定義されたベクターで形質転換またはトランスフェクトする工程を含む、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を発現する細胞を作製する方法。

10

【請求項 31】

抗原またはその活性断片もしくは活性変種が、クレブシエラ属から、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカから、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカから単離される、請求項29または30のいずれか一項記載の方法。

【請求項 32】

ワクチンであることが好ましく、

20

請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項1～7のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項8～9のいずれか一項において定義されたベクターを含む、薬学的組成物。

【請求項 33】

ワクチンであることが好ましく、

クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項1～7のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項8～9のいずれか一項において定義されたベクターを含む、薬学的組成物。

30

【請求項 34】

免疫賦活物質、好ましくは、ポリカチオンポリマー、特にポリカチオンペプチド、免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、特にオリゴ(dIdC)₁₃、少なくとも2個のLysLeuLysモチーフを含有するペプチド、特に、ペプチド

KLKLLLLLKLK

、神経刺激性化合物、特に、ヒト成長ホルモン、ミョウバン、フロイント完全アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバント、またはその組み合わせを含む群より選択される免疫賦活物質をさらに含むことを特徴とする、請求項32または33記載の薬学的組成物。

40

【請求項 35】

免疫賦活物質が、ポリカチオンポリマーと免疫賦活性デオキシヌクレオチドとの組み合わせ、または少なくとも2個のLysLeuLysモチーフを含有するペプチドと免疫賦活性デオキシヌクレオチドとの組み合わせ、好ましくは、

KLKLLLLLKLK

とオリゴ(dIdC)₁₃との組み合わせのどちらかである、請求項34記載の薬学的組成物。

【請求項 36】

ポリカチオンペプチドがポリアルギニンである、請求項34または35記載の薬学的組成物。

50

【請求項 37】

クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、請求項11~28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項1~7のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項8~9のいずれか一項において定義されたベクター。

【請求項 38】

クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の薬学的組成物を調製するための、特にワクチンを調製するための、請求項1~7のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項11~28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種の使用。

10

【請求項 39】

請求項11~28のいずれか一項において定義された、抗原またはその断片、好ましくは、その活性断片、もしくはその変種、好ましくは、その活性変種の少なくとも選択部分に結合する、抗体または少なくともその有効部分。

【請求項 40】

モノクローナル抗体である、請求項39記載の抗体。

20

【請求項 41】

有効部分が、Fabフラグメント、F(ab)フラグメント、F(ab)Nフラグメント、F(ab)₂フラグメント、またはFvフラグメントを含む、請求項39または40記載の抗体。

【請求項 42】

キメラ抗体である、請求項39~41のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 43】

ヒト化抗体である、請求項39~42のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 44】

請求項39~43のいずれか一項において定義された抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞株。

30

【請求項 45】

以下の工程を特徴とする、請求項39~43のいずれか一項において定義された抗体を作製する方法：

- a) 請求項11~28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を非ヒト動物に投与することによって、該動物において免疫応答を惹起する工程、
- b) 該動物から、抗体含有体液を取り出す工程、および
- c) 該抗体含有体液をさらなる精製工程に供することによって、該抗体を作製する工程。

【請求項 46】

以下の工程を特徴とする、請求項39~43のいずれか一項において定義された抗体を作製する方法：

40

- a) 請求項11~28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を非ヒト動物に投与することによって、該動物において免疫応答を惹起する工程、
- b) 該動物から、脾臓または脾臓細胞を取り出す工程、
- c) 該脾臓または脾臓細胞のハイブリドーマ細胞を作製する工程、
- d) 該抗原またはその活性断片もしくは活性変種に特異的なハイブリドーマ細胞を選択およびクローニングする工程、
- e) クローニングされた該ハイブリドーマ細胞を培養することによって該抗体を作製する工程、ならびに
- f) 任意で、さらなる精製工程を行う工程。

【請求項 47】

50

請求項39～43のいずれか一項記載の抗体を含む、薬学的組成物。

【請求項48】

クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、請求項39～43いずれか一項記載の抗体、または請求項39～43いずれか一項記載の抗体を含む薬学的組成物。

【請求項49】

クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の薬学的組成物の調製のための、請求項39～43のいずれか一項において定義された抗体の使用。

10

【請求項50】

以下の工程を含む、請求項11～28のいずれか一項において定義された、抗原またはその活性断片もしくは活性変種に結合することができるアンタゴニストを特定する方法：

a) 候補アンタゴニストと請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種との結合を可能にする条件下、該候補アンタゴニストと該抗原またはその活性断片もしくは活性変種との結合に応答して検出可能なシグナルを発することができる成分の存在下で、単離もしくは固定化された該抗原またはその活性断片もしくは活性変種と、該候補アンタゴニストを接触させる工程、および

20

b) 該アンタゴニストと該抗原またはその活性断片もしくは活性変種との結合に応答して生じたシグナルの有無を検出する工程。

【請求項51】

以下の工程を含む、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種とその相互作用パートナーとの相互作用活性を低下または阻害することができるアンタゴニストを特定する方法：

a) 請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を準備する工程、

b) 該抗原またはその活性断片もしくは活性変種に対する相互作用パートナー、特に、請求項39～43のいずれか一項記載の抗体を準備する工程、

30

c) 該抗原またはその活性断片もしくは活性変種と該相互作用パートナーを相互作用させて、相互作用複合体を形成する工程、

d) 候補アンタゴニストを準備する工程、

e) 該候補アンタゴニストと相互作用複合体との間で競合反応を起こす工程、

f) 該候補アンタゴニストが、該抗原またはその活性断片もしくは活性変種と該相互作用パートナーとの相互作用活性を阻害または低下するかどうか決定する工程。

【請求項52】

請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種の相互作用パートナーを単離および/または精製および/または特定するための、該抗原またはその活性断片もしくは活性変種のいずれかの使用。

40

【請求項53】

以下の工程を含む、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法：

a) 被験体から得られた試料と、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を接触させる工程；および

b) 試料中の、該クレブシエラ属生物に対する抗体の存在を検出する工程。

【請求項54】

以下の工程を含む、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法：

a) 被験体から得られた試料と、請求項39～43のいずれか一項記載の抗体を接触させる工程；および

50

b) 試料中の、該クレブシエラ属生物の抗原の存在を検出する工程。

【請求項 5 5】

クレブシエラ属生物の抗原が、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種である、請求項54記載の方法。

【請求項 5 6】

以下の工程を含む、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法：

a) 被験体から得られた試料と、請求項1～7のいずれか一項において定義された核酸分子またはその断片に特異的なプライマーまたはプローブを接触させる工程、および

b) 試料中の、このような核酸分子またはその断片の存在を検出する工程。

【請求項 5 7】

クレブシエラ属生物が、病原性クレブシエラ属生物であり、より好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカを含む群より選択されるクレブシエラ属生物、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカより選択されるクレブシエラ属生物である、請求項53～56のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 8】

アダマーおよびスピーゲルマーを含む群より選択される機能的核酸を調製するための、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種の使用。

【請求項 5 9】

リボザイム、アンチセンス核酸、およびsiRNAを含む群より選択される機能的リボ核酸を調製するための、請求項1～7のいずれか一項において定義された核酸分子の使用。

【請求項 6 0】

以下の工程を含む、動物またはヒトにおいて、好ましくは、クレブシエラ属による感染症の治療を必要とする動物またはヒトにおいて、クレブシエラ属感染症を治療する方法：

治療的有効量の、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項1～7のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項8～9のいずれか一項において定義されたベクター、あるいは請求項39～43のいずれか一項において定義された抗体、あるいは請求項32～36、47、または48のいずれか一項において定義された薬学的組成物を、該動物またはヒトに投与する工程。

【請求項 6 1】

以下の工程を含む、クレブシエラ属生物による感染症に対して動物またはヒトを免疫化する方法：

該動物またはヒトにおいて免疫応答を誘発するのに適した有効量の、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項1～7のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項8～9のいずれか一項において定義されたベクター、あるいは請求項39～43のいずれか一項において定義された抗体、あるいは請求項32～36、47、または48のいずれか一項において定義された薬学的組成物を、該動物またはヒトに投与する工程。

【請求項 6 2】

以下の工程を含む、動物またはヒトにおいてクレブシエラ属生物に対する免疫応答を刺激する方法：

該動物またはヒトにおいて免疫応答を刺激するのに適した有効量の、請求項11～28のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項1～7のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項8～9のいずれか一項において定義されたベクター、あるいは請求項39～43のいずれか一項において定義された抗体、あるいは請求項32～36、47、または48のいずれか一項において定義された薬学的組成物を、該動物またはヒトに投与する工程。

【請求項 6 3】

クレブシエラ属生物が、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチス

10

20

30

40

50

を含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリ
ティカを含む群より選択され、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカより選択さ
れる、請求項60～62のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原をコードする単離された核酸分子、このような核酸分子を含むベクター
、およびこのようなベクターを含む宿主細胞に関する。さらに、本発明は、クレブシエラ
属(*Klebsiella*)の種に由来する抗原、ならびにその断片および変種、このような抗原を作
製する方法、ならびにこのような抗原を発現する細胞を作製する方法を提供する。さらに
、本発明は、このような抗原に結合する抗体、このような抗体を産生するハイブリドーマ
細胞、このような抗体を作製する方法、このような核酸分子、抗原、ベクターまたは抗体
を含む薬学的組成物、薬学的組成物を調製するための、このような核酸分子、抗原、ベク
ターまたは抗体の使用、このような抗原に結合することができる、またはこのような抗原
の相互作用活性を低下もしくは阻害することができるアンタゴニストを特定する方法、感
染症を診断する方法、および感染症を治療または予防する方法を提供する。さらに具体的
には、このような抗原は、院内感染を引き起こす細菌病原体によって産生されるか、もし
くは院内感染を引き起こす細菌病原体と関連するか、または肺炎桿菌(*Klebsiella pneumo*
niae)によって引き起こされる細菌感染症と関連する。

10

【背景技術】

20

【0002】

肺炎桿菌(*K.pneumoniae*)は、グラム陰性通性嫌気性細菌である。肺炎桿菌の株は、莢膜
多糖の存在によって区別され、このうち77種類の抗原型がある。この莢膜は細胞表面全体
を包んでおり、グラム染色すると生物の大きな外観を占め、多くの宿主防御機構に対する
耐性をもたらす。コロニーは大きく、粘性が高い。肺炎桿菌は、窒素を固定する能力、
すなわち、大気窒素ガスをアンモニウムに変換する能力を有する。

【0003】

クレブシエラ属には2つの一般的な生息地がある。一方は自然環境であり、クレブシエ
ラ属は地表水、下水、および土に見られ、他方は、クレブシエラ属がコロニー形成する哺乳
動物、例えば、ヒト、ウマ、またはブタの粘膜表面である。ヒトでは、肺炎桿菌は、気
道、腸管、および泌尿生殖路の中で腐生菌として存在する。しかしながら、クレブシエラ
属細菌が消化管外に出ると、重篤な感染症が起こる場合がある。

30

【0004】

肺炎桿菌は、尿路感染症、院内肺炎、腹腔内感染症、手術創感染症、および血液感染症
の原因となる、一般的な院内感染性病原体である。これらの感染症は全て、積極的に早期
に治療されなければショックおよび死亡に進行する場合がある。肺炎桿菌はまた潜在的な
市中感染性病原体でもある。クレブシエラ属の種は地方病性院内感染症の8%、大流行の3
%を占めると見積もられている(Stamm E. et al., 1981)。

【0005】

クレブシエラ属の病原性は、熱安定性エンテロトキシンの産生に起因する場合がある。
今までに特定された肺炎桿菌の病原因子には、莢膜多糖(CPS)、リポ多糖、アドヘシン(1
型および3型線毛、KPF-28フィンブリア、CF29K、および集合性アドヘシン(*aggregative a*
dhesin))、ならびに鉄獲得系(Podschun R et al., 1998)が含まれる。

40

【0006】

肺炎桿菌による感染症は、病院内でよく見られ、肺炎(血痰の出現を特徴とする)および
カテーテル挿入された患者では尿路感染症の原因となる。実際には、肺炎桿菌は、尿路病
原体としては大腸菌に次ぐ2番目の細菌である。肺炎桿菌は、全ての院内尿路感染症(UTI)
の6～17パーセントを占める。現在、クレブシエラ属による感染症は以前より増して見ら
れる。これは、おそらく、細菌の抗生物質耐性によるものである。クレブシエラ属の種は
、アンピシリンおよびカルベニシリンなどの抗生物質に対する耐性を付与する耐性プラス

50

ミド(R-プラスミド)を含有する場合がある(Wu et al., 2005)。さらに悪いことには、R-プラスミドは他の腸内細菌に移ることがあり、この腸内細菌は同じ種の細菌とは限らない。多剤耐性クレブシエラ属種の院内大流行は、多くの場合、新型株であるESBL産生株(基質特異性拡張型ラクタマーゼ)によって引き起こされる。クレブシエラ属の臨床分離株の中からのESBL産生株の発生率は過去数年にわたって着実に増加している。ある地域では、40%までの頻度が報告されている。肺炎桿菌感染症を治療するためには、セフェピム、ポリミキシンB(Parchuri et al., 2005)、カルバペネム(メロペネムおよびイミペネム)(Ueda Y. et al., 2005)のように利用可能な抗生物質がわずかしかない。

【0007】

クレブシエラ属に対するワクチンの開発が試みられている。様々な細菌構成物のうち、抗クレブシエラ属ワクチン候補として、2つの表面成分であるLPSおよびCPSが主に議論されている(Yadav et al., 2005)。LPS含有ワクチンによる能動免疫の大きな欠点は有害な毒性反応を誘導することであり、これはエンドトキシン内容物によって引き起こされる。CPSは免疫原性が高く、かつ無毒であることが分かっている。しかしながら、クレブシエラ属CPSワクチンの重大な欠点は、異なるK抗原(現在、77種類)が多数あることである。後に、安全性および免疫原性があることが判明した(Cryz et al., 1986)、6価クレブシエラ属CPSワクチンがあるが、クレブシエラ属血液分離株の30%しかカバーしないのに対して、25価ワクチンは最高75%までカバーする。さらに、このような多価ワクチンの作製は難しく、高価である。この状況を克服するために、タンパク質に基づくクレブシエラ属ワクチンを開発しなければならない。Kurupati et al. (2006)は、肺炎桿菌から多数の免疫原性抗原を同定しており、候補遺伝子の2つ、すなわち、OmpAおよびFepAがインビボマウスモデルにおいてさらに特徴付けられている。しかしながら、現在、予防用のクレブシエラ属ワクチンは市販されておらず、公的な情報によれば、積極的に前臨床開発も臨床開発もなされていない。Berna Biotechのクレブシエラ属ワクチン開発プログラム(Klebgen Berna(登録商標))は中断されている。

【0008】

ワクチンは多種多様な抗原を含有してもよい。抗原の例は、全滅生物もしくは弱毒化生物、これらの生物/組織の垂分画、タンパク質、または最も単純な形ではペプチドである。抗原はまた、グリコシル化されたタンパク質またはペプチドの形でも免疫系によって認識されることがあり、多糖または脂質でもよく、多糖または脂質を含有してもよい。例えば、細胞傷害性T細胞(CTL)は、主要組織適合複合体(MHC)と共に、短い、通常、8~11アミノ酸長のペプチドの形を取る抗原を認識するので、短いペプチドを使用することができる。B細胞は、4~5アミノ酸と短い線状エピトープならびに三次元構造(高次構造エピトープ)を認識することができる。持続的な抗原特異的免疫応答を得るために、アジュバントが、免疫系の全ての細胞に関与する免疫カスケードを誘発する必要がある。主に、アジュバントは、いわゆる、抗原提示細胞(APC)に作用するが、アジュバントの作用様式は制限されない。これらの細胞が、通常、最初に抗原に遭遇した後に、プロセッシングされた抗原または改変されていない抗原が免疫エフェクター細胞に提示される。中間の細胞タイプも関与することがある。生産的免疫応答では、適切な特異性を有するエフェクター細胞しか活性化されない。アジュバントはまた、抗原および共に注射された因子を局所に保つこともできる。さらに、アジュバントは、他の免疫細胞の化学誘引物質として作用してもよく、免疫系の刺激剤として局所および/または全身に作用してもよい。

【0009】

ヒト抗原に対する交差反応性抗体を誘導する可能性があるという潜在的なリスクのために、ヒト用の不活化全細胞ワクチンの開発には懸念がある。従って、サブユニットワクチンは、肺炎桿菌による感染症の予防において最大の可能性があるものとみなされている。

【発明の概要】

【0010】

本発明の根底にある問題は、クレブシエラ属によって引き起こされる院内感染に対する薬学的組成物、例えば、ワクチンを開発するための手段を提供することであった。より具

10

20

30

40

50

体的には、この問題は、薬学的組成物の調製に使用することができる、クレブシエラ属に由来する核酸分子あるいは抗原またはその断片もしくは変種の効率的な、関連する、かつ包括的なセットを提供することであった。なおさらなる問題は、抗原、その断片または変種を作製する方法および手段を提供することであった。さらに別の問題は、核酸または抗原を含む薬学的組成物を提供することであった。本発明のなおさらなる問題は、抗体、抗体を含む薬学的組成物、抗体を作製する方法、および薬学的調整物の調製のための抗体の使用を提供することであった。さらに、本発明の目的は、抗原またはその断片もしくは変種に結合することができるアンタゴニストを特定する方法を提供すること、ならびにこのような抗原とその相互作用パートナーとの相互作用活性を低下または阻害することができるアンタゴニストを特定する方法を提供することであった。本発明のさらなる問題は、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法を提供することであった。本発明の根底にあるさらに別の問題は、クレブシエラ属感染症を治療する方法を提供すること、および動物またはヒトを免疫化する方法を提供することであった。

10

【0011】

本発明の根底にある問題は、1つの局面では、抗原またはその断片をコードする単離された核酸分子であって、以下：

- a) SEQ ID NO:1~187およびSEQ ID NO:375を含む群より選択されるヌクレオチド配列を有する核酸分子と少なくとも70%の配列同一性を有する核酸分子、
- b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、
- c) a)またはb)の核酸分子の少なくとも15個の連続した塩基を含む核酸分子、
- d) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、a)、b)、またはc)の核酸分子にアニーリングする核酸分子、
- e) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c)またはd)において定義された核酸分子にハイブリダイズする核酸分子

20

からなる群より選択される、核酸配列を含む単離された核酸分子によって、解決される。

【0012】

本発明による1つの態様では、SEQ ID NO:1~187またはSEQ ID NO:375との配列同一性は、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%、または最も好ましくは100%である。

【0013】

別の態様では、核酸はDNAである。

30

【0014】

代わりの態様では、核酸はRNAである。

【0015】

さらに別の態様では、核酸分子は、ゲノムDNA、好ましくは、クレブシエラ属に由来する、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ(pneumoniae)、オゼネ(ozaenae)、およびリノスクレロマチス(rhinoscleromatis)を含む肺炎桿菌、K.オキシトカ(K. oxytoca)、K.プランチコラ(K. planticola)、K.テリゲナ(K. terrigena)、ならびにK.オルニチノリティカ(K. ornithinolytica)を含む群より選択される種に由来する、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカに由来するゲノムDNAから単離される。Orskov, I.(1984)によるクレブシエラ属の命名法または分類法が本明細書において用いられる。

40

【0016】

本発明の1つの態様では、断片は、その活性断片もしくは活性変種である。

【0017】

1つの態様では、核酸は、クレブシエラ属に由来する、好ましくは3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカに由来するポリペプチドもしくはペプチド断片、より好ましくは肺炎桿菌またはK.オキシトカに由来するポリペプチドもしくはペプチド断片を含むか、またはこのようなポリペプチドもしくはペプチド断片からなる、抗原またはその断片をコードする。

50

【0018】

さらに、本発明の根底にある問題は、前記の核酸分子を含むベクターによって解決される。

【0019】

1つの態様では、ベクターは、前記で定義した核酸分子によってコードされる抗原またはその断片を組換え発現するように適合される。

【0020】

本発明はまた、前記で定義したベクターを含む宿主細胞に関する。

【0021】

本発明の根底にある問題は、さらなる局面では、クレブシエラ属に感染しているヒトに由来するまたはクレブシエラ属に以前に感染したことがある非感染健常ヒトに由来する血清と免疫学的に反応する抗原であって、クレブシエラ属、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカに由来する単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種を含む抗原によって解決される。

10

【0022】

本明細書で使用する「非感染健常ヒト」という用語は、病原体と複数回遭遇している、または複数回遭遇したことがあり、その結果、集落形成があり得るが、症状が全くないか、疾患が軽度である、個体を含む。この用語、および抗原を特定するために非感染健常ヒトの血清を選択した理由は、Nagy, E. et al. (2003)においてさらに定義されている。

20

【0023】

本発明の別の局面は、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376からなる群より選択される単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種を含む、あるいは前記の単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種からなる、抗原に関する。

【0024】

本発明による1つの態様では、前記ポリペプチドは、前記で定義した核酸分子によってコードされる。

【0025】

別の態様では、抗原の活性断片は、前記ポリペプチドの、特に、SEQ ID NO:188~374またはSEQ ID NO:376のいずれかによって定義されるポリペプチドの、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%からなる。

30

【0026】

別の態様では、抗原の活性変種は、前記ポリペプチドと、特に、SEQ ID NO: 188~374またはSEQ ID NO:376のいずれかによって定義されるポリペプチドと、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%の配列同一性を有する。

40

【0027】

本発明の1つの態様では、抗原の活性断片は、SEQ ID NO:205のアミノ酸2-130;SEQ ID NO:216のアミノ酸26-356;SEQ ID NO:223のアミノ酸2-180;SEQ ID NO:224のアミノ酸1-168;SEQ ID NO:235のアミノ酸23-397;SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420および414-847;SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099;SEQ ID NO:242のアミノ酸1-245;SEQ ID NO:247のアミノ酸24-703;SEQ ID NO:252のアミノ酸23-328;SEQ ID NO:263のアミノ酸23-248;SEQ ID NO:267のアミノ酸2-335;SEQ ID NO:268のアミノ酸38-633;SEQ ID NO:269のアミノ酸26-742;SEQ ID NO:281のアミノ酸26-429;またはSEQ ID NO:285のアミノ酸1-632を含むか、このようなアミノ酸からなる。前記で列挙された断片は、SEQ ID NO:188~203および376においてさら

50

に定義される(表16も参照されたい)。

【0028】

別の態様では、抗原の活性変種は、SEQ ID NO:205のアミノ酸2-130;SEQ ID NO:216のアミノ酸26-356;SEQ ID NO:223のアミノ酸2-180;SEQ ID NO:224のアミノ酸1-168;SEQ ID NO:235のアミノ酸23-397;SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420および414-847;SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099;SEQ ID NO:242のアミノ酸1-245;SEQ ID NO:247のアミノ酸24-703;SEQ ID NO:252のアミノ酸23-328;SEQ ID NO:263のアミノ酸23-248;SEQ ID NO:267のアミノ酸2-335;SEQ ID NO:268のアミノ酸38-633;SEQ ID NO:269のアミノ酸26-742;SEQ ID NO:281のアミノ酸26-429;またはSEQ ID NO:285のアミノ酸1-632と少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%の配列同一性を有する。

10

【0029】

さらに別の態様では、前記で定義した抗原の活性変種は、異なる株および/または血清型の肺炎桿菌、特に、血清型が、K1、K2、K3、K10、K21、K22、K30、K55、K64、O1、O2a、O3、O4、O5、もしくはO12、または該Kの血清型と該Oの血清型との任意の組み合わせである肺炎桿菌の相同配列に由来する。

【0030】

KPORF-13(SEQ ID NO:216)の変種の例を、表8およびSEQ ID NO:413-451に示した。KPORF-21(SEQ ID NO:224)の変種の例を、表9およびSEQ ID NO:452-500に示した。KPORF-32(SEQ ID NO:235)の変種の例を、表10およびSEQ ID NO:501-540に示した。KPORF-37(SEQ ID NO:240)の変種の例を、表11およびSEQ ID NO:541-579に示した。KPORF-38(SEQ ID NO:241)の変種の例を、表12およびSEQ ID NO:580-617に示した。KPORF-39(SEQ ID NO:242)の変種の例を、表13およびSEQ ID NO:618-667に示した。KPORF-60(SEQ ID NO:263)の変種の例を、表14およびSEQ ID NO:668-717に示した。KPORF-65(SEQ ID NO:268)の変種の例を、表15およびSEQ ID NO:718-765に示した。

20

【0031】

従って、本発明のさらに別の態様では、前記で定義した抗原の活性変種は、SEQ ID NO:413-765からなる群より選択される。

【0032】

さらに別の態様では、抗原は、

a)SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847を含む抗原の活性断片またはSEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847からなる抗原の活性断片に対する、あるいはSEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847に由来する抗原の活性変種に対する、1~400個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは、1~350個、1~300個、1~250個、または1~200個、より好ましくは、1~150個、さらにより好ましくは、多くとも1~100個、さらにより好ましくは、多くとも1~50個、最も好ましくは、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、30個、または40個のさらなるアミノ酸残基、あるいは

30

b)SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099を含む抗原の活性断片もしくはSEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099からなる抗原の活性断片に対する、またはSEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099に由来する抗原の活性変種に対する、1~1100個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは、1~1000個、1~900個、1~800個、1~700個、1~600個、1~500個、1~400個、もしくは1~300個、より好ましくは、1~200個、さらにより好ましくは、多くとも1~100個、さらにより好ましくは、多くとも1~50個、最も好ましくは、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、30個、または40個のさらなるアミノ酸残基によって、さらに定義される。

40

【0033】

さらなるアミノ酸残基は、前記で定義した抗原と相同でもよい。相同とは、断片を得たクレブシエラ属抗原のアミノ酸配列と同一の任意のアミノ酸残基を指す。

【0034】

50

その代わりとして、またはさらに、ポリペプチドは、抗原、任意で、前記で定義したさらなる配列、および抗原と非相同の少なくとも1個のアミノ酸残基を含んでもよく、これらからなってもよい。

【0035】

本発明の1つの態様では、抗原は、抗原と非相同の少なくとも1個のアミノ酸残基、好ましくは、マーカータンパク質のアミノ酸配列をさらに含み、これからさらになる。

【0036】

前記で定義したさらなる配列またはアミノ酸残基は、任意のアミノ酸でよく、L-アミノ酸および/またはD-アミノ酸、天然アミノ酸、および別のアミノ酸でもよい、アミノ酸残基からなる。好ましくは、アミノ酸は、任意の天然アミノ酸、例えば、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオニン、バリン、トリプトファンまたはチロシンである。

10

【0037】

しかしながら、アミノ酸はまた、修飾アミノ酸または希なアミノ酸でもよい。これらの例は、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、 β -アラニン、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、2,4-ジアミノ酪酸、デスマシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ヒドロキシリジン、 α -ヒドロキシリジン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスマシン、 α -イソロイシン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、6-N-メチルリジン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシンまたはオルニチンである。さらに、アミノ酸は、翻訳後修飾などの修飾に供されてもよい。修飾の例には、アセチル化、アミド化、ブロッキング、ホルミル化、 β -カルボキシグルタミン酸ヒドロキシル化、グリコシル化、メチル化、リン酸化、および硫酸化が含まれる。複数のさらなるアミノ酸残基または非相同アミノ酸残基がペプチドに存在する場合、これらのアミノ酸残基は同じでもよく、互いに異なってもよい。

20

【0038】

1つの態様では、本発明のペプチドは、抗原と非相同の少なくとも1個のアミノ酸残基をさらに含む。「非相同アミノ酸」または「抗原と非相同のアミノ酸」という特徴は、クレブシエラ属、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカの任意の天然タンパク質の中で、抗原に隣接して位置するアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸を指す。従って、少なくとも1個の非相同アミノ酸を含む本発明のタンパク質は、クレブシエラ属、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカの任意の天然タンパク質またはその断片とは異なるタンパク質を指す。

30

【0039】

1つの態様では、さらなるアミノ酸残基は、抗原のN末端に隣接するか、C末端に隣接するか、またはN末端とC末端とに隣接する。

40

【0040】

別の態様では、本発明は、前記のさらなるアミノ酸残基が

- a) SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくはそのC末端に由来する変種、
 - b) SEQ ID NO:240のアミノ酸414-847もしくはそのN末端に由来する変種、または
 - c) SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099もしくはそのN末端およびC末端に由来する変種
- によって定義される抗原に隣接する、前記の抗原に関する。

【0041】

別の態様では、抗原は、リーダー配列もしくは分泌配列、精製に用いられる配列、また

50

はプロタンパク質配列のいずれかの配列をさらに含むか、あるいはこのようないずれかの配列からさらになる。

【 0 0 4 2 】

本発明の別の局面は、表1の「推定された免疫原性アミノ酸」もしくは「特定された免疫原領域の位置」の列において示された、または表4の「aaから」および「aaまで」の列によって定義された、または表5の「タンパク質内の位置(aa)」の列において示された少なくとも1つのコアアミノ酸配列を含む抗原に関する。より好ましくは、コアアミノ酸配列は、SEQ ID NO:204のアミノ酸11-27、35-47、68-107、113-122、124-136、140-146、152-164、168-174、183-201、211-218、228-243、246-253、および180-226;SEQ ID NO:205のアミノ酸13-31、48-59、69-91、109-115、121-127、および46-105;SEQ ID NO:206のアミノ酸12-44、49-95、102-145、148-178、184-229、233-244、249-273、292-299、304-329、334-348、354-365、367-385、394-426、428-440、444-487、503-527、531-539、546-554、556-584、および273-286;SEQ ID NO:207のアミノ酸7-17、22-32、34-41、55-77、79-86、93-111、118-126、131-148、152-162、165-177、183-197、213-220、234-250、253-262、267-294、および211-269;SEQ ID NO:208のアミノ酸22-29、41-56、58-66、79-88、94-121、124-131、134-157、162-171、173-180、189-197、201-214、216-224、242-254、257-270、282-287、290-302、309-315、320-325、341-355、362-368、372-378、および1-48;SEQ ID NO:209のアミノ酸5-15、18-35、48-61、65-71、112-119、138-154、157-169、179-208、214-223、226-232、243-250、256-262、277-286、289-296、338-348、352-363、370-376、385-408、420-436、443-454、462-483、498-561、563-592、600-642、661-671、673-709、714-733、748-754、771-776、798-806、808-821、823-839、および31-83;SEQ ID NO:210のアミノ酸5-14、21-26、31-41、59-77、101-115、132-145、147-156、180-185、188-197、および97-158;SEQ ID NO:211のアミノ酸6-18、23-43、45-56、69-80、87-97、112-123、135-151、164-171、178-193、200-227、249-258、262-274、279-291、302-308、322-327、329-336、351-363、366-373、384-399、403-411、415-434、440-446、461-482、488-506、510-516、518-551、574-589、607-629、634-665、667-687、694-712、725-739、743-751、753-768、および521-583;SEQ ID NO:212のアミノ酸4-13、19-44、55-63、71-82、89-110、120-130、132-138、145-161、168-182、189-258、261-272、278-288、290-301、および11-76;SEQ ID NO:213のアミノ酸4-22、43-56、63-68、81-90、93-99、139-148、155-160、170-176、189-195、207-218、227-232、241-249、251-258、260-266、277-295、300-327、329-336、340-356、384-390、418-423、427-433、438-444、および383-428;SEQ ID NO:214のアミノ酸10-18、32-37、45-55、60-69、77-83、89-95、120-125、133-170、172-185、193-211、214-223、232-249、255-275、277-303、305-310、320-328、334-341、347-353、355-369、380-386、389-395、および71-85;SEQ ID NO:215のアミノ酸4-23、27-35、67-73、80-103、117-126、132-138、140-159、162-171、180-194、198-208、211-218、228-234、239-253、262-270、272-291、296-305、および39-110;SEQ ID NO:216のアミノ酸13-24、27-34、37-66、69-88、99-104、149-155、164-175、184-193、199-209、227-235、264-273、276-285、288-315、323-335、346-353、56-111、および199-261;SEQ ID NO:217のアミノ酸11-22、25-48、51-60、64-72、80-96、108-122、132-137、142-150、152-167、175-199、214-229、237-244、252-258、260-266、279-287、301-340、345-350、および109-153;SEQ ID NO:218のアミノ酸37-43、50-57、65-82、87-109、123-129、141-150、152-157、166-172、179-203、209-241、249-284、290-300、308-326、329-335、345-357、359-368、379-386、390-417、420-425、438-444、461-466、473-490、497-505、524-534、541-550、586-597、608-614、622-632、660-666、679-694、696-706、708-722、725-731、737-763、784-789、810-825、837-854、857-880、882-895、901-907、911-928、14-76、および176-220;SEQ ID NO:219のアミノ酸9-16、38-52、61-86、93-100、110-117、123-132、138-145、151-169、172-181、186-202、208-225、227-253、264-275、289-295、320-329、335-342、および113-193;SEQ ID NO:220のアミノ酸11-18、24-30、42-49、53-63、69-80、87-93、95-103、144-171、173-185、193-200、202-208、215-221、242-261、266-273、277-286、290-299、322-328、338-351、354-377、391-409、441-451、461

-466、499-515、521-527、562-569、621-629、647-663、676-682、694-701、703-713、725-731、735-744、755-764、793-800、および490-547;SEQ ID NO:221のアミノ酸4-11、14-22、38-70、81-90、97-114、118-132、147-171、173-181、187-202、244-250、252-298、301-311、313-331、342-368、410-418、446-451、456-462、468-474、476-492、499-507、519-528、552-565、568-575、584-613、618-624、626-649、および417-489;SEQ ID NO:222のアミノ酸4-9、32-53、66-72、74-90、97-104、110-130、133-139、144-152、166-177、203-213、215-241、256-275、291-304、307-316、321-326、334-345、352-367、および201-255;SEQ ID NO:223のアミノ酸13-19、26-43、66-72、80-85、95-101、109-125、131-137、および25-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸13-24、35-43、50-56、58-68、77-83、104-110、117-125、132-138、140-153、および19-66;SEQ ID NO:225のアミノ酸15-31、37-42、47-54、68-87、89-96、107-117、121-127、131-137、145-151、176-182、220-226、232-246、250-257、291-300、317-325、328-333、337-359、368-393、403-428、460-478、480-493、500-506、511-516、519-526、528-559、565-572、584-595、597-605、608-613、626-648、679-684、687-693、703-714、718-735、742-750、757-765、768-788、793-799、813-819、823-829、839-850、および576-623;SEQ ID NO:226のアミノ酸10-35、37-60、63-76、79-86、88-97、108-113、118-126、128-134、138-145、153-159、168-188、194-208、211-243、255-260、270-276、285-301、307-346、348-367、および275-339;SEQ ID NO:227のアミノ酸4-17、21-33、35-42、47-64、72-80、85-92、98-103、125-147、151-161、165-177、183-230、232-246、256-262、284-306、310-328、331-367、369-383、392-399、および32-85;SEQ ID NO:228のアミノ酸5-11、18-27、42-52、60-65、75-84、90-102、107-116、125-178、184-206、221-233、235-242、249-257、264-277、288-317、および267-313;SEQ ID NO:229のアミノ酸5-11、14-42、50-75、79-86、89-98、120-125、152-160、166-181、185-193、200-207、および85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸4-30、36-43、46-55、63-111、144-152、159-168、179-189、191-200、205-213、および37-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸20-45、57-77、80-100、119-126、131-137、143-169、179-185、195-203、207-231、235-264、282-302、320-329、341-347、353-359、361-373、および266-296;SEQ ID NO:232のアミノ酸5-22、24-37、41-55、57-65、72-78、90-103、105-116、119-130、164-170、190-202、209-231、244-254、260-276、300-339、344-350、355-376、389-397、399-406、408-421、429-437、および103-152;SEQ ID NO:233のアミノ酸8-16、18-25、31-47、71-82、87-102、104-114、126-156、176-183、190-200、205-212、218-228、231-243、256-279、287-301、303-312、324-332、335-348、351-357、365-380、395-412、422-451、456-464、467-483、501-507、および405-468;SEQ ID NO:234のアミノ酸4-18、21-39、46-56、63-69、72-86、116-130、132-160、162-190、196-201、209-231、233-241、251-265、269-282、292-298、309-324、333-369、391-415、417-427、436-454、471-480、482-499、510-518、521-533、537-543、545-561、571-581、585-597、599-607、609-635、638-643、650-665、671-685、687-695、701-707、710-720、724-736、747-757、764-769、772-784、791-796、808-820、および317-401;SEQ ID NO:235のアミノ酸4-12、15-33、58-77、82-89、98-106、108-118、120-135、141-147、152-160、168-215、225-233、235-247、250-264、284-312、314-321、336-343、359-374、386-394、および159-218;SEQ ID NO:236のアミノ酸4-16、24-36、40-47、49-56、61-81、84-143、148-156、158-164、170-175、194-206、208-214、および126-203;SEQ ID NO:237のアミノ酸28-45、50-61、94-111、113-124、137-142、147-173、180-188、190-196、202-223、229-235、239-249、262-270、280-288、290-321、325-332、347-355、359-368、389-407、415-427、429-453、458-465、477-485、499-505、516-527、531-549、569-592、594-602、605-615、628-635、647-659、662-683、727-735、760-765、771-780、788-809、811-818、および549-630;SEQ ID NO:238のアミノ酸21-28、33-40、48-100、104-111、113-134、および1-46;SEQ ID NO:239のアミノ酸12-24、31-41、53-61、73-87、112-128、133-140、151-156、および26-98;SEQ ID NO:240のアミノ酸4-9、19-26、32-56、58-67、71-81、90-95、97-105、112-118、124-132、138-144、147-167、169-177、199-207、212-217、231-241、250-260、266-272、274-282、289-296、299-310、316-331、344-350、352-363、368-377、381-394、399-406、4

12-450、459-473、486-503、508-514、518-548、564-570、579-587、602-608、616-623、628-635、638-654、678-688、691-696、703-709、716-723、761-772、784-793、819-826、835-844、および790-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸4-10、18-36、43-50、63-71、75-105、109-117、134-140、145-157、176-182、184-201、203-211、215-225、240-250、262-284、294-309、313-319、327-337、350-356、361-367、372-393、411-421、428-451、453-466、487-492、501-528、535-553、564-574、592-605、612-629、631-640、646-653、658-666、673-681、713-718、720-730、739-749、784-792、821-826、833-844、853-863、871-876、885-894、900-918、937-950、952-957、972-990、995-1001、1024-1036、1039-1044、1049-1055、1062-1089、1091-1103、1110-1121、1123-1129、1131-1151、1157-1179、1181-1201、1204-1223、1233-1244、1269-1276、1279-1286、1294-1301、1303-1309、1315-1338、1350-1362、1373-1381、1398-1406、1412-1423、1440-1446、1458-1466、1481-1487、1492-1508、1511-1518、1528-1534、1536-1547、1553-1565、1606-1617、1619-1644、および761-781;SEQ ID NO:242のアミノ酸6-13、31-38、47-60、71-102、107-123、128-155、173-179、185-194、210-220、および161-232;SEQ ID NO:243のアミノ酸11-34、36-43、49-67、74-79、84-92、94-100、103-112、120-129、134-155、162-173、177-185、189-202、206-211、および130-185;SEQ ID NO:244のアミノ酸4-10、20-35、37-46、48-55、60-66、75-82、87-98、133-150、166-172、178-189、208-214、230-235、245-251、271-308、319-333、335-355、373-380、および117-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸4-30、54-65、91-105、107-131、135-154、163-192、199-208、210-224、229-239、248-257、263-279、281-294、328-354、373-379、382-405、426-453、462-487、および249-323;SEQ ID NO:246のアミノ酸4-10、12-24、45-55、75-88、および24-40;SEQ ID NO:247のアミノ酸4-14、20-37、47-53、55-61、75-81、97-103、107-124、129-135、139-147、160-166、169-175、181-190、202-221、247-255、272-285、300-310、318-332、351-361、384-397、406-427、442-449、458-482、494-503、512-524、531-539、552-562、577-588、590-596、600-608、613-624、637-668、692-700、および232-278;SEQ ID NO:248のアミノ酸33-39、49-55、68-84、90-96、104-120、126-143、150-159、168-191、197-208、219-225、227-233、241-247、63-115、および200-250;SEQ ID NO:249のアミノ酸4-22、24-34、36-55、57-76、83-97、99-117、135-143、145-157、163-174、178-198、200-207、209-270、276-290、321-335、338-347、367-374、393-402、404-411、416-422、443-460、467-473、および117-183;SEQ ID NO:250のアミノ酸26-37、44-52、57-96、104-111、118-124、155-177、179-197、201-214、223-233、243-250、257-262、291-297、303-314、319-363、および47-105;SEQ ID NO:251のアミノ酸36-43、45-60、76-97、107-125、131-156、158-164、および118-163;SEQ ID NO:252のアミノ酸5-32、40-50、52-60、70-88、92-101、106-126、138-150、152-161、175-193、201-234、237-248、270-285、297-303、312-318、および209-255;SEQ ID NO:253のアミノ酸4-12、23-34、49-55、59-65、70-81、83-130、および62-113;SEQ ID NO:254のアミノ酸4-26、38-49、69-76、82-96、103-119、126-140、143-190、194-209、212-218、および100-167;SEQ ID NO:255のアミノ酸7-29、35-47、56-66、80-94、97-123、125-148、150-160、166-173、175-191、193-200、207-225、および75-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸14-36、39-45、51-59、66-71、76-88、106-117、121-126、140-157、164-187、198-206、210-252、および202-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸4-19、27-35、90-107、120-134、144-150、166-175、192-198、221-243、249-255、263-278、283-288、305-321、324-334、342-349、355-366、377-390、413-425、442-448、および130-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸17-26、41-51、54-61、64-72、78-105、117-125、127-137、147-155、175-213、230-236、238-261、271-277、282-297、309-318、329-347、355-372、377-390、および69-126;SEQ ID NO:259のアミノ酸4-48、54-60、62-69、73-81、88-115、124-137、139-154、156-169、171-190、194-231、240-273、288-303、336-363、367-395、405-411、434-442、449-454、466-483、491-507、および226-282;SEQ ID NO:260のアミノ酸26-34、39-47、50-80、82-88、97-105、108-127、131-137、162-180、185-191、198-203、209-214、226-247、256-288、296-305、および149-239;SEQ ID NO:261のアミノ酸5-28、30-54、73-84、89-98、109-116、122-128、137-142、163-189、207-236、245-280、288-390

、404-423、426-433、450-474、487-504、506-513、524-530、532-595、605-614、620-626、631-638、644-657、667-683、686-693、695-702、707-733、739-747、および6-62;SEQ ID NO:262のアミノ酸23-31、39-50、55-67、76-100、117-130、149-171、173-185、218-238、242-288、291-298、334-346、355-369、382-399、413-420、431-438、442-449、455-466、486-493、498-508、524-531、540-546、551-558、562-570、575-582、585-596、598-604、621-630、632-650、670-677、682-701、736-749、755-761、および612-626;SEQ ID NO:263のアミノ酸4-21、24-39、44-68、74-81、85-91、109-116、129-138、142-148、173-188、195-201、207-212、223-228、および126-148;SEQ ID NO:264のアミノ酸4-17、24-42、61-67、84-93、96-102、116-121、135-143、155-165、177-186、210-224、253-259、272-297、299-331、337-351、359-367、369-385、および1-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸4-25、28-54、67-81、85-136、138-143、157-170、180-190、197-203、205-214、219-243、246-270、277-283、290-299、305-311、および127-182;SEQ ID NO:266のアミノ酸11-20、25-33、75-80、85-91、113-124、143-155、161-170、172-184、および128-176;SEQ ID NO:267のアミノ酸4-9、16-26、28-34、55-80、120-143、150-156、158-164、167-178、185-190、192-213、221-237、242-255、257-272、281-290、325-332、および48-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸13-48、59-70、78-88、95-112、129-151、153-161、163-182、214-221、235-245、248-277、281-291、293-301、303-311、315-320、323-346、377-383、390-398、447-454、474-487、491-512、531-544、547-553、582-590、597-603、605-611、623-629、および410-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸6-26、39-46、48-58、69-75、109-121、139-144、148-155、166-172、215-221、261-267、313-319、363-386、423-433、447-458、465-471、483-494、497-517、558-565、578-586、589-597、619-626、636-645、659-665、671-680、682-693、733-739、および152-206;SEQ ID NO:270のアミノ酸4-19、23-35、40-50、52-58、65-73、78-103、112-125、146-160、163-192、194-200、および29-90;SEQ ID NO:271のアミノ酸4-13、17-32、40-50、57-67、76-81、88-95、107-119、131-142、144-157、171-178、185-193、197-207、212-227、231-238、248-253、263-310、および90-170;SEQ ID NO:272のアミノ酸9-28、57-82、84-93、126-135、143-166、173-194、196-201、212-220、228-254、269-277、289-298、305-316、320-327、330-337、350-359、373-378、386-392、403-411、421-428、435-441、443-458、465-470、および80-141;SEQ ID NO:273のアミノ酸11-48、54-67、69-75、89-95、101-122、124-131、134-157、159-175、202-208、214-228、258-270、272-280、287-295、298-310、331-338、340-417、427-500、502-509、534-552、556-561、564-577、585-592、594-608、621-627、632-641、643-652、671-681、683-709、712-743、758-764、776-783、789-820、835-851、864-883、885-910、913-940、948-953、967-976、994-1020、および775-825;SEQ ID NO:274のアミノ酸14-24、32-54、58-63、70-80、93-100、108-125、127-135、142-153、155-160、180-191、201-208、210-216、222-235、242-264、267-273、276-282、284-308、および10-59;SEQ ID NO:275のアミノ酸16-28、44-68、70-77、83-90、99-129、131-137、145-154、161-175、183-190、196-203、205-220、238-245、321-328、330-338、366-379、383-397、399-405、412-418、442-458、471-483、486-505、536-544、562-568、583-602、610-618、629-635、641-655、672-682、697-705、714-729、744-751、755-762、766-771、783-807、および555-621;SEQ ID NO:276のアミノ酸4-9、20-34、45-54、60-77、79-89、91-100、102-149、162-170、177-189、193-208、210-222、238-244、252-264、267-276、302-307、および100-140;SEQ ID NO:277のアミノ酸11-27、30-49、56-62、69-74、76-85、94-108、116-125、129-147、153-161、165-171、177-208、217-223、225-231、237-255、260-284、293-300、および73-137;SEQ ID NO:278のアミノ酸4-38、40-51、84-97、99-106、109-115、119-129、131-145、148-160、180-186、188-202、230-243、246-267、274-288、290-299、302-312、317-327、332-344、353-377、381-388、407-419、423-437、447-470、474-482、486-494、501-523、531-546、551-556、および727-740;SEQ ID NO:279のアミノ酸23-52、62-76、87-104、109-115、117-123、129-139、143-149、152-170、172-191、199-205、212-218、220-240、249-256、263-275、297-303、308-342、349-380、382-394、414-420、430-441、446-452、460-475、488-505、514-531、533-539、546-568、570-577、579-588、613-6

25、632-670、672-716、718-745、759-769、785-798、801-807、および272-324;SEQ ID NO:280のアミノ酸4-34、36-43、56-73、80-87、101-134、148-159、161-170、178-185、195-206、211-221、223-248、259-271、276-295、297-308、および241-296;SEQ ID NO:281のアミノ酸5-31、44-50、64-74、86-94、132-147、154-167、196-203、209-219、253-260、284-289、300-312、319-327、335-340、358-364、376-383、および166-202;SEQ ID NO:282のアミノ酸4-9、12-27、29-71、77-84、90-108、114-142、147-164、180-213、217-227、229-282、291-309、322-329、336-353、365-370、および317-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸36-41、52-66、71-83、89-95、116-127、154-174、176-184、200-206、230-237、248-259、269-284、307-316、376-383、399-418、424-442、445-451、454-462、および1-50;SEQ ID NO:284のアミノ酸9-14、33-49、64-72、87-92、103-109、123-128、130-141、143-154、160-166、182-214、237-247、251-260、292-300、327-332、337-350、357-365、388-398、405-411、422-428、451-459、478-488、520-531、534-540、558-564、580-586、591-600、605-615、629-635、641-653、658-672、212-244、および533-611;SEQ ID NO:285のアミノ酸4-10、17-27、30-37、44-62、80-85、94-114、118-131、134-141、148-161、171-212、218-241、248-261、274-313、325-336、342-348、359-373、391-397、424-431、454-474、489-495、497-503、505-515、548-553、560-580、591-610、および277-324;SEQ ID NO:286のアミノ酸7-16、18-24、30-47、49-70、83-99、103-117、126-141、146-153、159-165、177-194、198-221、236-246、255-262、273-279、283-296、301-332、338-411、422-428、434-440、452-458、463-469、494-509、511-517、524-531、548-554、564-572、および335-389;SEQ ID NO:287のアミノ酸9-15、33-54、56-80、102-108、および1-42;SEQ ID NO:288のアミノ酸15-36、42-55、58-68、および54-77;SEQ ID NO:289のアミノ酸55-75、89-96、98-110、および14-36;SEQ ID NO:290のアミノ酸8-14、29-51、73-101、110-117、および70-114;SEQ ID NO:291のアミノ酸20-25、29-34、41-52、60-67、69-85、90-100、114-122、136-142、160-170、174-181、および21-58;SEQ ID NO:292のアミノ酸14-22、および4-13;SEQ ID NO:293のアミノ酸22-40、54-66、88-105、109-118、および31-74;SEQ ID NO:294のアミノ酸5-11、18-32、47-60、66-73、83-92、113-120、126-141、151-164、167-174、201-211、および118-129;SEQ ID NO:295のアミノ酸5-11、18-24、32-40、47-53、および25-54;SEQ ID NO:296のアミノ酸18-24、31-48、および5-55;SEQ ID NO:297のアミノ酸10-16、26-32、47-56、85-95、および10-62;SEQ ID NO:298のアミノ酸4-12、16-26、および25-34;SEQ ID NO:299のアミノ酸19-29、45-51、63-68、76-92、103-110、114-120、123-133、135-141、および14-78;SEQ ID NO:300のアミノ酸4-18、47-61、および57-93;SEQ ID NO:301のアミノ酸17-29、44-50、および26-38;SEQ ID NO:302のアミノ酸5-19、55-64、78-85、95-101、104-112、および24-33;SEQ ID NO:303のアミノ酸4-10、および12-31;SEQ ID NO:304のアミノ酸4-12、27-41、43-58、60-67、76-86、および13-65;SEQ ID NO:305のアミノ酸30-38、57-67、および5-32;SEQ ID NO:306のアミノ酸30-43、および2-21;SEQ ID NO:307のアミノ酸14-20、23-36、41-48、および1-52;SEQ ID NO:308のアミノ酸18-33、51-58、76-82、および32-46;SEQ ID NO:309のアミノ酸25-31、および2-16;SEQ ID NO:310のアミノ酸14-23、50-58、および9-49;SEQ ID NO:311のアミノ酸4-10、22-31、35-45、48-68、71-80、および17-66;SEQ ID NO:312のアミノ酸4-24、28-42、46-56、63-69、87-94、112-131、および2-46;SEQ ID NO:313のアミノ酸4-15、19-28、34-41、52-62、78-86、および2-20;SEQ ID NO:314のアミノ酸4-11、16-30、32-42、および7-38;SEQ ID NO:315のアミノ酸4-20、22-31、および22-38;SEQ ID NO:316のアミノ酸4-19、および17-32;SEQ ID NO:317のアミノ酸7-13、17-22、27-33、80-100、および26-40;SEQ ID NO:318のアミノ酸10-18、22-48、および32-44;SEQ ID NO:319のアミノ酸15-24、43-49、73-83、および45-93;SEQ ID NO:320のアミノ酸22-29、46-55、57-63、および5-17;SEQ ID NO:321のアミノ酸10-33、および21-35;SEQ ID NO:322のアミノ酸16-24、および22-49;SEQ ID NO:323のアミノ酸4-16、37-73、76-110、117-125、127-132、および2-30;SEQ ID NO:324のアミノ酸4-12、23-35、44-56、59-88、および22-76;SEQ ID NO:325のアミノ酸15-26、および23-35;SEQ ID NO:326のアミノ酸12-22、31-40、および17-44;SEQ ID NO:327のアミノ酸4-9、13-18、29-35、および57-64;SEQ ID NO:328のアミノ酸31-55、67-81、および

25-70;SEQ ID NO:329のアミノ酸13-24、51-58、および13-26;SEQ ID NO:330のアミノ酸6-20、29-40、57-79、および46-88;SEQ ID NO:331のアミノ酸8-14、41-54、68-76、83-93、106-126、130-139、および12-72;SEQ ID NO:332のアミノ酸5-13、17-24、41-55、64-69、80-85、94-107、109-115、および53-88;SEQ ID NO:333のアミノ酸5-12、32-54、57-64、および20-33;SEQ ID NO:334のアミノ酸4-16、40-48、50-58、62-68、75-85、92-104、108-116、124-134、および68-128;SEQ ID NO:335のアミノ酸7-13、19-29、34-40、54-71、76-81、91-144、147-155、157-188、および11-83;SEQ ID NO:336のアミノ酸17-24、32-41、および6-43;SEQ ID NO:337のアミノ酸14-31、38-59、69-87、95-102、126-146、157-162、177-193、201-227、238-251、および63-78;SEQ ID NO:338のアミノ酸10-16、18-25、27-41、43-52、59-86、94-101、134-140、および38-100;SEQ ID NO:339のアミノ酸4-19、23-35、43-72、78-92、および37-93;SEQ ID NO:340のアミノ酸15-20、27-32、41-65、69-82、93-105、107-115、120-147、170-178、184-201、214-257、272-281、293-314、332-339、358-364、374-381、390-397、399-414、428-460、および317-375;SEQ ID NO:341のアミノ酸11-28、47-55、59-68、76-105、108-116、120-144、146-160、167-175、180-187、209-233、および144-158;SEQ ID NO:342のアミノ酸4-13、58-78、および14-77;SEQ ID NO:343のアミノ酸26-31、44-49、57-64、67-74、107-112、116-152、154-181、202-212、241-255、および57-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸10-41、53-70、81-93、100-111、137-147、164-169、183-190、199-210、216-221、226-240、および84-95;SEQ ID NO:345のアミノ酸12-45、48-56、73-79、91-103、106-112、117-125、132-143、154-160、178-201、208-214、216-225、260-266、276-283、および98-115;SEQ ID NO:346のアミノ酸4-15、30-42、および29-39;SEQ ID NO:347のアミノ酸22-53、55-73、80-88、および33-66;SEQ ID NO:348のアミノ酸6-23、44-54、および56-67;SEQ ID NO:349のアミノ酸8-21、35-44、66-75、82-87、94-101、および32-94;SEQ ID NO:350のアミノ酸8-20、23-32、36-50、53-69、および15-69;SEQ ID NO:351のアミノ酸8-22;SEQ ID NO:352のアミノ酸31-37、および2-31;SEQ ID NO:353のアミノ酸4-20、23-39、58-63、71-78、97-102、および22-82;SEQ ID NO:354のアミノ酸23-44、135-152、168-184、および57-116;SEQ ID NO:355のアミノ酸24-31、42-50、52-62、93-117、および43-94;SEQ ID NO:356のアミノ酸20-29、および24-43;SEQ ID NO:357のアミノ酸12-57、59-74、および22-40;SEQ ID NO:358のアミノ酸7-16、18-26、39-45、68-78、86-92、および65-82;SEQ ID NO:359のアミノ酸5-17、19-34、42-48、56-71、102-113、118-129、および67-111;SEQ ID NO:360のアミノ酸4-33、50-71、および13-55;SEQ ID NO:361のアミノ酸9-17、23-30、37-54、69-88、96-102、114-123、130-140、143-163、および5-70;SEQ ID NO:362のアミノ酸4-23、27-52、71-80、および9-94;SEQ ID NO:363のアミノ酸13-19、および2-21;SEQ ID NO:364のアミノ酸18-26、28-52、63-74、94-107、123-134、および18-84;SEQ ID NO:365のアミノ酸19-33、57-68、および26-48;SEQ ID NO:366のアミノ酸4-26、31-37、42-59、および12-65;SEQ ID NO:367のアミノ酸4-25、および20-39;SEQ ID NO:368のアミノ酸40-51、54-62、67-75、83-89、126-146、148-156、および31-42;SEQ ID NO:369のアミノ酸4-15、23-33、38-49、82-98、および7-91;SEQ ID NO:370のアミノ酸6-26、36-57、および40-64;SEQ ID NO:371のアミノ酸6-15、21-28、32-38、57-65、78-103、114-134、138-144、154-163、および41-95;SEQ ID NO:372のアミノ酸13-30、47-57、71-76、および25-71;SEQ ID NO:373のアミノ酸4-31、43-51、55-63、67-72、76-83、88-95、99-118、125-132、134-159、および82-118;SEQ ID NO:374のアミノ酸4-17、26-32、34-40、45-61、67-92、および41-97;SEQ ID NO:204のアミノ酸179-208、および198-227;SEQ ID NO:205のアミノ酸45-69、65-89、および83-106;SEQ ID NO:206のアミノ酸269-290;SEQ ID NO:207のアミノ酸209-230、226-249、および245-269;SEQ ID NO:208のアミノ酸-9-15、10-33、および28-52;SEQ ID NO:209のアミノ酸29-50、45-67、および62-85;SEQ ID NO:210のアミノ酸96-120、115-139、および134-158;SEQ ID NO:211のアミノ酸519-543、539-563、および559-584;SEQ ID NO:212のアミノ酸10-35、31-56、および52-77;SEQ ID NO:213のアミノ酸382-407、および403-428;SEQ ID NO:214のアミノ酸66-90;SEQ ID NO:215のアミノ酸38-65、および61-88;SEQ ID NO:216のアミノ酸56-85、198-221、217-240、および236-261;SEQ ID NO:217のアミノ酸108-132、および128-153;SE

Q ID NO:218のアミノ酸13-37、33-56、52-76、175-200、および196-220;SEQ ID NO:219のアミノ酸132-156、152-176、および172-195;SEQ ID NO:220のアミノ酸489-512、508-531、および526-549;SEQ ID NO:221のアミノ酸416-442、438-465、および461-489;SEQ ID NO:222のアミノ酸199-222、217-240、および235-257;SEQ ID NO:223のアミノ酸25-55、51-81、および77-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸18-46、および42-66;SEQ ID NO:225のアミノ酸575-601、および597-623;SEQ ID NO:226のアミノ酸274-299、295-320、および316-339;SEQ ID NO:227のアミノ酸32-61、および57-85;SEQ ID NO:228のアミノ酸266-291、および287-313;SEQ ID NO:229のアミノ酸85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸36-64、および83-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸264-285、および280-300;SEQ ID NO:232のアミノ酸102-128、および124-152;SEQ ID NO:233のアミノ酸404-429、および445-468;SEQ ID NO:234のアミノ酸343-374、および370-401;SEQ ID NO:235のアミノ酸158-182、および178-202;SEQ ID NO:236のアミノ酸151-180;SEQ ID NO:237のアミノ酸549-579、575-605、および601-630;SEQ ID NO:238のアミノ酸-7-23、および19-46;SEQ ID NO:239のアミノ酸48-75、および71-98;SEQ ID NO:240のアミノ酸789-813、および809-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸759-783;SEQ ID NO:242のアミノ酸160-188、184-211、および207-232;SEQ ID NO:243のアミノ酸130-159;SEQ ID NO:244のアミノ酸117-147、143-173、および169-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸248-276、272-300、および296-323;SEQ ID NO:246のアミノ酸21-43;SEQ ID NO:247のアミノ酸231-256、および252-278;SEQ ID NO:248のアミノ酸62-91、87-115、および199-227;SEQ ID NO:249のアミノ酸116-141、137-162、および158-183;SEQ ID NO:250のアミノ酸46-69、65-87、および82-105;SEQ ID NO:251のアミノ酸117-142、および138-163;SEQ ID NO:252のアミノ酸208-233、および229-255;SEQ ID NO:253のアミノ酸61-88;SEQ ID NO:254のアミノ酸99-124、120-145、および141-167;SEQ ID NO:255のアミノ酸74-103、99-128、124-152、および148-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸202-231、および227-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸129-154、および150-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸95-126;SEQ ID NO:259のアミノ酸226-256、および252-282;SEQ ID NO:260のアミノ酸171-198、194-221、および217-240;SEQ ID NO:261のアミノ酸35-65、および61-91;SEQ ID NO:262のアミノ酸608-631;SEQ ID NO:263のアミノ酸124-149;SEQ ID NO:264のアミノ酸-14-21、および17-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸127-157、および153-182;SEQ ID NO:266のアミノ酸150-176;SEQ ID NO:267のアミノ酸48-79、および75-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸435-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸151-180、および176-206;SEQ ID NO:270のアミノ酸126-151、および167-190;SEQ ID NO:271のアミノ酸89-118、114-144、および140-170;SEQ ID NO:272のアミノ酸80-112;SEQ ID NO:274のアミノ酸9-36;SEQ ID NO:276のアミノ酸117-140;SEQ ID NO:277のアミノ酸72-97、93-117、および113-137;SEQ ID NO:278のアミノ酸723-746;SEQ ID NO:279のアミノ酸271-300;SEQ ID NO:280のアミノ酸240-271、および267-296;SEQ ID NO:281のアミノ酸165-188、および183-206;SEQ ID NO:282のアミノ酸316-344、および340-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸-3-27、および23-50;SEQ ID NO:284のアミノ酸212-244、532-561、557-586、および582-611;SEQ ID NO:285のアミノ酸276-302、および298-324;SEQ ID NO:286のアミノ酸335-364、および360-389;SEQ ID NO:287のアミノ酸41-64、および59-82;SEQ ID NO:288のアミノ酸53-77;SEQ ID NO:289のアミノ酸13-37;SEQ ID NO:290のアミノ酸69-94、および90-114;SEQ ID NO:291のアミノ酸19-42、および37-60;SEQ ID NO:292のアミノ酸1-25;SEQ ID NO:293のアミノ酸30-54、および50-75;SEQ ID NO:294のアミノ酸111-135;SEQ ID NO:295のアミノ酸25-54;SEQ ID NO:334のアミノ酸67-98、および94-126;SEQ ID NO:335のアミノ酸9-32、27-51、46-70、および65-86;SEQ ID NO:336のアミノ酸1-24、および20-44;SEQ ID NO:337のアミノ酸58-82;SEQ ID NO:338のアミノ酸37-62、58-82、および77-101;SEQ ID NO:339のアミノ酸37-68、および64-93;SEQ ID NO:340のアミノ酸317-347、および343-375;SEQ ID NO:341のアミノ酸140-164;SEQ ID NO:342のアミノ酸13-40、36-60、および55-79;SEQ ID NO:343のアミノ酸56-79、および75-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸77-101;SEQ ID NO:345のアミノ酸94-118;SEQ ID NO:205のアミノ酸46-105;SEQ ID NO:216のアミノ酸56-111;SEQ ID NO:223のアミノ酸25-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸19-66;SEQ ID NO:229のアミノ酸85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸37-109;SEQ ID NO:231のアミノ

ノ酸266-296;SEQ ID NO:232のアミノ酸103-152;SEQ ID NO:235のアミノ酸167-218;SEQ ID NO:240のアミノ酸790-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸761-781;SEQ ID NO:242のアミノ酸176-232;SEQ ID NO:244のアミノ酸117-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸249-323;SEQ ID NO:247のアミノ酸232-278;SEQ ID NO:252のアミノ酸209-255;SEQ ID NO:255のアミノ酸75-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸202-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸130-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸69-126;SEQ ID NO:263のアミノ酸126-148;SEQ ID NO:264のアミノ酸1-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸127-182;SEQ ID NO:267のアミノ酸48-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸410-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸152-206;SEQ ID NO:275のアミノ酸555-621;SEQ ID NO:281のアミノ酸166-202;SEQ ID NO:282のアミノ酸317-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸1-50;SEQ ID NO:285のアミノ酸277-324;SEQ ID NO:289のアミノ酸14-36;SEQ ID NO:336のアミノ酸6-43;SEQ ID NO:343のアミノ酸57-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸84-95;またはSEQ ID NO:345のアミノ酸98-115からなる群より選択される。

10

【0043】

1つの態様では、さらに、抗原は、

a)1~50個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは1~40個、より好ましくは1~30個、さらにより好ましくは多くとも1~25個、さらにより好ましくは多くとも1~10個、最も好ましくは、1個、2個、3個、4個、もしくは5個のさらなるアミノ酸残基;および/または

b)コアアミノ酸配列と非相同の少なくとも1個のアミノ酸残基からなる。

【0044】

前記のさらなるアミノ酸残基は、前記でさらに定義されている。

20

【0045】

別の態様では、前記のアミノ酸残基は、コアアミノ酸配列のN末端に隣接するか、C末端に隣接するか、またはN末端とC末端とに隣接する。

【0046】

本発明の1つの態様では、抗原は、前記で定義した、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、または少なくとも6個のコアアミノ酸配列を含む。

【0047】

本発明の根底にある問題は、別の局面では、前記で定義した核酸分子を発現させる工程を含む、本発明において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を作製する方法によって解決される。

30

【0048】

さらに、本発明は、適した宿主細胞を前記で定義したベクターで形質転換またはトランスフェクトする工程を含む、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種を発現する細胞を作製する方法に関する。

【0049】

1つの態様では、抗原またはその活性断片もしくは活性変種は、クレブシエラ属から、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカから、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカから単離される。

40

【0050】

本発明の根底にある問題は、別の局面では、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは前記で定義した核酸分子、あるいは前記で定義したベクターを含む、薬学的組成物、好ましくは、ワクチンによって解決される。

【0051】

本発明の別の局面は、クレブシエラ属、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは前記で定義した核酸分子、あるいは前記で定義したベクターを含む、薬学

50

的組成物、好ましくは、ワクチンを提供する。

【0052】

好ましい態様では、本発明の薬学的組成物は、免疫賦活物質、好ましくは、ポリカチオンポリマー、特に、ポリカチオンペプチド、免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、特に、オリゴ(dIdC)₁₃、少なくとも2個のLysLeuLysモチーフを含有するペプチド、特に、

KLKLLLLLKLK

、神経刺激性化合物、特に、ヒト成長ホルモン、ミョウバン、フロイント完全アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバント、またはその組み合わせを含む群より選択される免疫賦活物質をさらに含む。

【0053】

本発明の薬学的組成物のより好ましい態様では、免疫賦活物質は、ポリカチオンポリマーと免疫賦活性デオキシヌクレオチドとの組み合わせ、または少なくとも2個のLysLeuLysモチーフを含有するペプチドと免疫賦活性デオキシヌクレオチドとの組み合わせ、好ましくは、

KLKLLLLLKLK

およびオリゴ(dIdC)₁₃の組み合わせのどちらかである。

【0054】

本発明の薬学的組成物のさらにより好ましい態様では、ポリカチオンポリマーは、ポリカチオンペプチド、特に、ポリアルギニンである。

【0055】

本発明のさらに別の局面は、クレブシエラ属、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは前記で定義した核酸分子、あるいは前記で定義したベクターを提供する。

【0056】

本発明の別の好ましい態様は、クレブシエラ属、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の薬学的組成物を調製するための、特にワクチンを調製するための、前記で定義した核酸分子、または前記で定義した抗原、その活性断片もしくは活性変種の使用に関する。

【0057】

本発明の根底にある問題は、さらなる局面では、前記で定義した抗原またはその断片、好ましくは、抗原の活性断片または変種、好ましくは、抗原の活性変種の少なくとも選択部分に結合する、抗体または少なくともその有効部分によって解決される。

【0058】

好ましい態様では、抗体はモノクローナル抗体である。

【0059】

別の好ましい態様では、前記有効部分は、Fabフラグメント、F(ab)フラグメント、F(ab)₂フラグメント、F(ab)₂Nフラグメント、F(ab)₂フラグメント、またはFvフラグメントである。

【0060】

本発明のさらに別の態様では、抗体はキメラ抗体である。

【0061】

さらに別の態様では、抗体はヒト化抗体である。

【0062】

本発明の別の局面は、前記で定義した抗体を産生するハイブリドーマ細胞株に関する。

【0063】

10

20

30

40

50

さらに、本発明の根底にある問題は、前記で定義した抗体を作製する方法によって解決される。前記方法は、以下の工程を特徴とする。

- a) 前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種を非ヒト動物に投与することによって、該動物において免疫応答を惹起する工程、
- b) 該動物から、抗体含有体液を取り出す工程、および
- c) 該抗体含有体液をさらなる精製工程に供することによって、該抗体を作製する工程。

【0064】

さらに、本発明は、以下の工程を特徴とする、前記で定義した抗体を作製する方法に関する。

- a) 前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種を非ヒト動物に投与することによって、該動物において免疫応答を惹起する工程、
- b) 該動物から、脾臓または脾臓細胞を取り出す工程、
- c) 該脾臓または脾臓細胞のハイブリドーマ細胞を作製する工程、
- d) 該抗原またはその活性断片もしくは活性変種に特異的なハイブリドーマ細胞を選択およびクローニングする工程、
- e) クローニングされた該ハイブリドーマ細胞を培養することによって該抗体を作製する工程、ならびに
- f) 任意で、さらなる精製工程を行う工程。

10

【0065】

本発明の別の局面は、前記で特定された抗体を含む薬学的組成物に関する。

20

【0066】

なおさらなる局面は、クレブシエラ属、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. プランチコラ、K. テリゲナ、ならびにK. オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK. オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、前記で定義した抗体または前記で定義した抗体を含む薬学的組成物に関する。

【0067】

本発明の根底にある問題は、別の局面では、クレブシエラ属、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. プランチコラ、K. テリゲナ、ならびにK. オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK. オキシトカによる感染症の治療用または予防用の薬学的組成物の調製のための、前記で定義した抗体の使用によって解決される。

30

【0068】

別の局面によれば、本発明は、本発明に開示される抗原またはその活性断片もしくは活性変種に結合する、またはこれらに結合することができる、アンタゴニストを提供する。なおさらなる局面によれば、本発明によるアンタゴニストは、本発明による抗原またはその活性断片もしくは活性変種とその相互作用パートナーとの相互作用活性を低下または阻害することができるアンタゴニストである。このような相互作用パートナーは、好ましい態様では、前記抗原またはその活性断片もしくはその活性変種の抗体もしくは受容体、好ましくは、生理学的受容体である。

40

【0069】

別の局面によれば、本発明は、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種に結合することができるアンタゴニストを特定する方法を提供する。前記方法は、以下の工程を含む。

- a) 候補アンタゴニストと前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種との結合を可能にする条件下、該候補アンタゴニストと該抗原またはその活性断片もしくは活性変種との結合に反応して検出可能なシグナルを発することができる成分の存在下で、単離されたもしくは固定化された該抗原またはその活性断片もしくは活性変種と、該候補アンタゴニストを接触させる工程、および
- b) 該アンタゴニストと該抗原またはその活性断片もしくは活性変種との結合に反応して

50

生じたシグナルの有無を検出する工程。

【0070】

本発明の根底にある問題は、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種と、その相互作用パートナーとの相互作用活性を低下または阻害することができるアンタゴニストを特定する方法によってさらに解決される。前記方法は、以下の工程を含む。

- a) 前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種を準備する工程、
- b) 該抗原またはその活性断片もしくは活性変種に対する相互作用パートナー、特に、前記で定義した抗体を準備する工程、
- c) 該抗原またはその活性断片もしくは活性変種と該相互作用パートナーを相互作用させて、相互作用複合体を形成する工程、
- d) 候補アンタゴニストを準備する工程、
- e) 該候補アンタゴニストと相互作用複合体との間で競合反応を起こす工程、
- f) 該候補アンタゴニストが、該抗原またはその活性断片もしくは活性変種と該相互作用パートナーとの相互作用活性を阻害または低下するかどうか判断する工程。

10

【0071】

さらに、本発明は、前記の抗原またはその活性断片もしくは活性変種の相互作用パートナーを単離および/または精製および/または特定するための、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種のいずれかの使用に関する。

【0072】

本発明の別の局面は、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法に関する。前記方法は、以下の工程を含む。

- a) 被験体から得られた試料と、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種を接触させる工程;および
- b) 試料中の、前記クレブシエラ属生物に対する抗体の存在を検出する工程。

20

【0073】

さらに別の局面では、本発明は、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法に関する。前記方法は、以下の工程を含む。

- a) 被験体から得られた試料と、前記で定義した抗体を接触させる工程;および
- b) 試料中の、前記クレブシエラ属生物の抗原の存在を検出する工程。

30

【0074】

前記方法の1つの態様では、前記クレブシエラ属生物の抗原は、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種である。

【0075】

さらに別の局面は、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法に関する。前記方法は、以下の工程を含む。

- a) 被験体から得られた試料と、前記で定義した核酸分子またはその断片に特異的なプライマーまたはプローブを接触させる工程、および
- b) 試料中の、このような核酸分子またはその断片の存在を検出する工程。

【0076】

本発明はまた、本発明による抗原またはその断片の発現に関連する疾患をインビトロで診断する方法も提供する。この方法は、本発明による前記の抗原もしくはその断片をコードする核酸配列の存在を確認する工程、または本発明による抗原もしくはその断片の存在を確認する工程を含む。

40

【0077】

クレブシエラ属生物による感染症を診断する前記の方法のいずれかの態様では、クレブシエラ属生物は、病原性クレブシエラ属生物、より好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカを含む群より選択されるクレブシエラ属生物であり、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカより選択されるクレブシエラ属生物である。

50

【0078】

さらに、本発明は、本発明において定義された抗原またはその断片もしくは変種に結合するペプチドであるアンチカリン(anticaline)を作製するための、本発明において定義された抗原またはその断片もしくは変種の使用を提供する。

【0079】

さらに、本発明は、アプタマーおよびスピーゲルマー(spiegelmer)を含む群より選択される機能的核酸を調製するための、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種の使用を提供する。

【0080】

別の局面では、本発明は、リボザイム、アンチセンス核酸およびsiRNAを含む群より選択される機能的リボ核酸を調製するための、前記で定義した核酸分子の使用を提供する。

10

【0081】

さらに、本発明の根底にある問題は、動物またはヒトにおいて、好ましくは、クレブシエラ属による感染症の治療を必要とする動物またはヒトにおいて、クレブシエラ属による感染症を治療する方法によって解決される。前記方法は、治療的有効量の、前記局面のいずれかにおいて定義された、抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは核酸分子、あるいはベクター、あるいは抗体、あるいは薬学的組成物を前記動物またはヒトに投与する工程を含む。

【0082】

1つの態様では、クレブシエラ属による感染症は、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症である。

20

【0083】

本発明の根底にある問題は、別の局面では、クレブシエラ属生物による感染症に対して動物またはヒトを免疫化する方法によって解決される。前記方法は、前記動物またはヒトにおいて免疫応答を誘発するのに適した有効量の、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは前記で定義した核酸分子、あるいは前記で定義したベクター、あるいは前記で定義した抗体、あるいは前記で定義した薬学的組成物を、前記動物またはヒトに投与する工程を含む。

30

【0084】

クレブシエラ属生物による感染症に対して動物またはヒトを免疫化する前記方法の1つの態様では、クレブシエラ属生物は、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカを含む群より選択され、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカより選択される。

【0085】

本発明の根底にある問題は、さらに別の局面では、動物またはヒトにおいて、クレブシエラ属生物に対する免疫応答を刺激する方法によって解決される。前記方法は、前記動物またはヒトにおける免疫応答を刺激するのに適した有効量の、前記で定義した抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは前記で定義した核酸分子、あるいは前記で定義したベクター、あるいは前記で定義した抗体、あるいは前記で定義した薬学的組成物を、前記動物またはヒトに投与する工程を含む。

40

【0086】

動物またはヒトにおいて、クレブシエラ属生物に対する免疫応答を刺激する前記方法の1つの態様では、クレブシエラ属生物は、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカを含む群より選択され、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカより選択される。

【0087】

50

本発明において定義された抗原が用いられる様々な方法および使用はまた、このような抗原の断片、好ましくは、このような抗原の活性断片、またはこのような抗原の変種、好ましくは、このような抗原の活性変種、好ましくは、本明細書に記載のものをを用いて実行または実施できることは本発明の範囲内である。さらにまたはその代わりに、本発明による抗原と相互作用する、または本発明による抗原を標的とすると本明細書において開示された様々な種類の化合物が、前記抗原の活性断片もしくは活性変種と相互作用するか、または前記抗原の活性断片または活性変種を標的とすることも本発明の範囲内である。

【0088】

抗体が用いられる実施における、それぞれのおよび任意の方法はまた、抗体の代わりに、本明細書において定義されるアンチカリンまたは機能的核酸が用いられる時にも原則として実施可能なことも、本発明の範囲内である。このような機能的核酸はアプタマーおよびスピーゲルマーを含む群より選択されることが好ましい。これは本願の様々な使用に等しく適用される。

10

【0089】

好ましい態様では、本明細書において開示される抗原の断片は、このような抗原の少なくとも1つの特徴を示す、このような抗原の一部である。好ましくは、このような特徴は、感染症治療のための適性、ヒトを含む動物の免疫化、および/またはヒトを含む動物における免疫応答の刺激を含む群より選択される特徴である。

【0090】

クレブシエラ属、より具体的には肺炎桿菌に関して本明細書においてなされた任意の開示が、どのクレブシエラ属またはクレブシエラ属の種にも等しく当てはまることも、本発明の範囲内である。クレブシエラ属の種は、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカを含む群より選択され、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカより選択される。

20

【0091】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」、または「抗原」という用語は本明細書全体を通じて同義に用いられ、本発明による抗原のそれぞれのおよび任意の変種、断片、類似体または誘導体、特に、本明細書に記載のものも含めて、本発明による抗原を包括的に指している。ポリペプチド、ペプチド、タンパク質、または抗原という用語が本明細書において用いられる時はいつでも、かつ特に明記されていなければ、それぞれの開示は、本発明による抗原のそれぞれのおよび任意の変種、断片、類似体または誘導体、特に、本明細書に記載のものも含めて、本発明による任意の抗原についても、または本発明による任意の抗原に関してもなされる。本発明によるポリペプチド、ペプチド、タンパク質、または抗原という用語によってカバーされる任意の前述の化合物に関して述べられたどの使用または局面も、本発明によるポリペプチド、ペプチド、タンパク質、または抗原という用語によってカバーされる、それぞれのおよび他の任意の前述の化合物にも適用されるものとするとも理解されるはずである。

30

【0092】

本発明は、複数のヒト血漿プールからの抗体調製物および肺炎桿菌ゲノムに由来する表面発現ライブラリーを用いて、単離された核酸分子、ならびに単離された核酸分子によってコードされる抗原、その活性断片および活性変種の効率的な、関連する、かつ包括的なセットを有利に提供する。従って、本発明は、病原性クレブシエラ属、より好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、最も好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによって引き起こされる感染症に対して有効な抗体の調製および化合物の特定のための手順において有用な、肺炎桿菌抗原、ワクチン、診断薬、および製品の幅広く感じられている要望を満たす。

40

【0093】

有効なワクチンは、全ての株で発現され、かつ前記の病原性クレブシエラ属、特に、3

50

つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカの細胞表面成分に対する高親和性の豊富な抗体を誘導することができるタンパク質またはポリペプチドからならなければならない。抗体は、オプソニン化の場合にはIgG1および/またはIgG3、付着中和および毒素作用の場合には任意のIgGサブタイプでなければならない。化学的に規定されたワクチンは、前記の病原性クレブシエラ属のヒト組織交差反応成分またはオプソニン化阻害成分、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカのヒト組織交差反応成分またはオプソニン化阻害成分を排除することができ、防御抗体および/または防御免疫応答を誘導する個々のポリペプチドを選択することができるので、全細胞ワクチン(弱毒化または死菌)と比較して明らかに優れているはずである。

10

【0094】

本発明の好ましい態様では、核酸分子は、SEQ ID NO:1~187およびSEQ ID NO:375に示したヌクレオチド配列に対して全長にわたって70%の同一性を示す。SEQ ID NO:1~187およびSEQ ID NO:375に示した核酸分子に対して全長にわたって少なくとも80%または少なくとも85%同一の領域を含む核酸がより好ましい。これに関して、SEQ ID NO:1~187およびSEQ ID NO:375に示した核酸分子に対して全長にわたって少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、または96%同一の核酸分子が特に好ましい。さらに、少なくとも97%の同一性を有する核酸分子が極めて好ましく、少なくとも98%および少なくとも99%の同一性を有する核酸分子が特に極めて好ましく、少なくとも99%または99.5%の同一性を有する核酸分子がさらに好ましく、100%の同一性を有する核酸分子が特に好ましい。さらに、これに関して、好ましい態様は、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376に示した成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持する抗原またはその断片(ポリペプチド)をコードする核酸である。本発明による核酸分子は、タンパク質、好ましくは、抗原をコードすることもまた本発明の範囲内である。なおさらに、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376によって定義される分子がタンパク質、好ましくは、抗原であることもまた本発明の範囲内である。

20

【0095】

当技術分野において公知の、および本明細書において用いられる同一性は、配列比較によって求められる2つまたはそれ以上のポリペプチド配列間または2つまたはそれ以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。当技術分野において、同一性はまた、ポリペプチド配列間またはポリヌクレオチド配列間の配列関連性の程度を意味し、場合によっては、このような配列間のマッチによって求められることがある。同一性は容易に計算することができる。2つのポリヌクレオチド配列間または2つのポリペプチド配列間の同一性を測定する多くの方法が存在するが、この用語は当業者に周知である(例えば、Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987)。同一性を求める好ましい方法は、試験配列間の最大マッチを与えるように設計されたものである。同一性を求める方法はコンピュータプログラムにおいて体系化されている。2つの配列間の同一性を求める好ましいコンピュータプログラム方法には、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J. et al., 1984)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschul, S. et al., 1990)が含まれるが、これに限定されない。

30

40

【0096】

SEQ ID NO:1-187およびSEQ ID NO:375を参照して本明細書において説明された核酸分子は本明細書において第1の選択肢として言及されたが、この核酸分子の第2の選択肢として、本発明による核酸分子は、本明細書において第1の選択肢に従って説明された核酸に少なくとも本質的に相補的な核酸分子でもよい。個々の核酸分子は、別の個々の核酸分子に少なくとも本質的に相補的であることが当業者により認められるであろう。本明細書で使用する、相補的とは、核酸鎖がワトソン・クリック塩基対形成を介して第2の核酸鎖と塩基対形成することを意味する。本明細書で使用する、本質的に相補的とは、それぞれの鎖

50

の全ての塩基について塩基対形成が起こっておらず、ある特定の数またはパーセントの塩基が対形成していないか誤って対形成していることを意味する。正しく対形成している塩基のパーセントは、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは80%、さらに好ましくは90%、最も好ましくは90%超の任意のパーセントである。このようなさらに高いパーセントには、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および100%が含まれ、このような定義は、この種の用語が用いられる本願のそれぞれの局面に適用することができる。マッチ塩基のパーセントが70%であるときは相同とみなされ、この程度のマッチ塩基対を有するハイブリダイゼーションはストリンジェントであるとみなされることに留意しなければならない。この種のストリンジェントなハイブリダイゼーションのハイブリダイゼーション条件は、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., 1987)から選択することができる。より具体的には、ハイブリダイゼーション条件は以下でもよい。

-ハイブリダイゼーションを、例えば、5xSSPE、5xデンハルト試薬、0.1%SDS、100g/mLの切断(sheared)DNA中で68℃で行う。

-0.2xSSC、0.1%SDS中、42℃で中程度のストリンジェンシー洗浄を行う。

-0.1xSSC、0.1%SDS中、68℃で高ストリンジェンシー洗浄を行う。

【0097】

GC含量50%のゲノムDNAの T_M は約96℃である。1%のミスマッチがあると、 T_M は約1℃下がる。

【0098】

さらに、原則的に、本明細書に記載のさらなる任意のハイブリダイゼーション条件も適用することができる。

【0099】

もちろん、ある特定のコード配列の開示によって、本発明によって同定されたものと同じポリペプチド分子をコードする全ての核酸配列分子が包含される。なぜなら、ある特定のポリペプチド分子をコードする全ての可能性のある核酸分子を明確に決めるために、遺伝暗号の縮重を、このような縮重核酸分子の数が多い場合があっても、直接適用できるからである。完全長抗原を使用した場合と同じ効果を得ることができるように、ある特定の抗原の活性断片または活性変種が使用に適した抗原をコードしている限り、このことは活性断片または活性変種にも適用することができる。好ましくは、このような抗原またはその活性断片もしくは活性変種は、ワクチン接種用途において、例えば、能動ワクチンまたは受動ワクチンとして使用することができる。

【0100】

本発明による核酸分子はまた、第3の選択肢として、上記の本発明による核酸分子の第1および第2の選択肢による核酸分子の少なくとも15塩基の配列を含む核酸でもよい。好ましくは、塩基は連続した塩基配列を形成する。しかしながら、配列が、多数の塩基によって分離された2つまたはそれ以上の部分からなることも本発明の範囲内である。

【0101】

本発明による核酸分子は、本明細書において開示した配列に由来する、好ましくは少なくとも20、さらにより好ましくは少なくとも30、特に少なくとも50の連続した塩基からなってもよい。適切な長さは目的の使用分野によって容易に最適化することができる(例えば、(PCR)プライマー、プローブ、捕捉分子(例えば、(DNA)チップ上のもの)など)。好ましい核酸分子は、少なくとも、表1および表4に列挙した1つまたは複数の免疫原性アミノ酸配列の連続した15塩基部分を含有する。具体的には、(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>または<http://pedant.gsf.de/>および<http://cmr.tigr.org/>)で入手可能な肺炎桿菌MGH78578およびKp342の未完成ゲノム配列と比較して、ならびに以下のアクセッション番号肺炎桿菌プラスミドpJHCMW1、NC_003486、肺炎桿菌プラスミドpIP843、NC_005015、肺炎桿菌プラスミドpK2044、NC_006625、肺炎桿菌プラスミドpK1ebB-k17-80、NC_002610、肺炎桿菌プラスミドpKPN2、NC_005018、肺炎桿菌プラスミドpLVPK、NC_005249、クレブシエラ属の種KCL-2プラスミドpMGD2、NC_003789によって特定されるプラスミド

10

20

30

40

50

と比較して、1個または複数の、好ましくは2個を超える、特に5個を超える非同一核酸残基を示す、本願の配列プロトコールに含まれる任意の配列のDNA配列の連続した部分を含有する核酸が好ましい。しかしながら、前記の未完成ゲノム配列は、一連の再配列決定、訂正、修正、および追加に供される。例えば、2007年4月現在、<http://cmr.tigr.org/>で入手可能な配列は9つのステータスコードのうちステータス7にあり、このことは、ギャップ閉鎖(gap closure)のために作製された追加配列が構築され、データリリース(<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>)に追加されたことを意味している。特に好ましい非同一核酸残基は、非同一アミノ酸残基につながる残基である。好ましくは、核酸配列は、前記の公表または列挙された肺炎桿菌対応物と比較して少なくとも1個、好ましくは少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個の異なるアミノ酸残基を有する、ポリペプチド、タンパク質、または抗原をコードする。好ましくは、この種のポリペプチド、タンパク質、または抗原は依然として、同一のアミノ酸残基を有すると本明細書において開示した分子の特徴の少なくとも1つを有する。少なくとも6個、7個、または8個のアミノ酸残基を有し、本明細書に記載の核酸によりコードされる、本明細書において開示した、例えば、配列表に開示したタンパク質の断片または抗原の断片である、このような単離されたポリペプチドも好ましい。

10

【0102】

本発明による核酸分子はまた、第4の選択肢として、本明細書において開示される第1、第2および第3の選択肢による本発明の核酸のいずれかとストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でアニーリングする核酸分子でもよい。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、典型的には、本明細書に記載のものである。

20

【0103】

最後に、本発明による核酸分子は、第5の選択肢として、遺伝暗号の縮重がなければ、本明細書において概説される第1、第2、第3および第4の選択肢による本発明の核酸分子のいずれかとハイブリダイズする核酸分子でもよい。この種の核酸分子は、好ましくは、本発明による核酸が本発明による抗原またはその断片もしくは変種をコードすることを指す。この種の核酸分子は、本発明による核酸分子の検出において特に有用であり、従って、それぞれの微生物、例えば、肺炎桿菌または任意の病原性クレブシエラ属、特に、本明細書において開示された病原性クレブシエラ属の種、およびこれらの種の微生物が関与する任意の疾患または疾患状態の診断において有用である。好ましくは、このような微生物、特に、日和見性微生物は、このような疾患の直接的または間接的な原因となっている。好ましくは、ハイブリダイゼーションは、本明細書に記載の第4の選択肢に関して記載したストリンジентな条件下で起こってもよく、行われてもよい。

30

【0104】

本明細書で使用する核酸分子は、一般的に、任意のリボ核酸分子またはデオキシリボ核酸分子を指し、非改変RNAまたは非改変DNAでもよく、改変RNAまたは改変DNAでもよい。従って、例えば、本明細書で使用する核酸分子は、特に、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNAの混合物であるDNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、またはより典型的には二本鎖、または三本鎖、または一本鎖領域および二本鎖領域の混合物でもよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子である。さらに、本明細書で使用する核酸分子は、RNA、またはDNA、またはRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域も指す。このような領域にある鎖は同じ分子に由来してもよく、異なる分子に由来してもよい。領域は、1つまたは複数の分子に由来してもよいが、より典型的には、いくつかの分子の一領域のみを含む。多くの場合、三重らせん領域の分子の1つはオリゴヌクレオチドである。本明細書で使用する、核酸分子という用語は、1つまたは複数の修飾塩基を含有する前記のDNAまたはRNAを含む。従って、安定性またはその他の理由のために改変された骨格を有するDNAまたはRNAは、この用語が本明細書において意図されるように「核酸分子」である。さらに、二例しか挙げないが、珍しい塩基、例えば、イノシン、または修飾塩基、例えば、トリチル化塩基を含むDNAまたはRNAは、この用語が本明細書において用いられるように、核酸分子である。当業者に公知の多くの有用な目的にかなう様々な改変を

40

50

DNAおよびRNAに加えることができることが理解されるだろう。核酸分子という用語が本明細書で用いられる時、特に、このような化学的に改変された形態の核酸分子、酵素的に改変された形態の核酸分子、または代謝的に改変された形態の核酸分子、ならびにウイルスならびに単細胞および複合細胞を含む細胞に特徴的な化学形態のDNAおよびRNAを含む。核酸分子という用語はまた、オリゴヌクレオチドと呼ばれることが多い短い核酸分子も含む。「ポリヌクレオチド」および「核酸」または「核酸分子」は本明細書において同義に用いられることが多い。

【0105】

本発明において提供される核酸分子はまたは、本願の配列表に示した核酸分子配列、より具体的には、肺炎桿菌コード領域の核酸分子配列より長いまたは短い、非常に多くの独特の断片も含み、これらは標準的なクローニング法によって作製することができる。独特であるためには、断片は、他の公知の核酸配列と区別できるほど十分な大きさでなければならず、任意の選択された肺炎桿菌断片と、生物配列(biosequence)データベース、例えば、GenBankのヌクレオチド配列を比較することによって最も容易に決定される。肺炎桿菌に関する任意の局面において本明細書において言われたものは、本明細書に記載の他のクレブシエラ属の種、より好ましくは、本明細書に記載の任意の病原性クレブシエラ属の種のいずれにも等しく適用されると当業者に理解されるだろう。

10

【0106】

さらに、本発明に包含される核酸分子およびポリペプチドに対して改変を加えることができる。例えば、核酸は、遺伝暗号の縮重の結果である配列も含む。20種類の天然アミノ酸があり、これらのほとんどは複数のコドンによって特定される。従って、核酸によってコードされるポリペプチドに影響を及ぼさないヌクレオチド置換を行うことができる。従って、抗原またはその断片をコードする全ての核酸分子が本発明に包含される。

20

【0107】

さらに、融合タンパク質を作り出すために、本発明により提供される抗原またはその断片をコードする任意の核酸分子は、標準的な技法、例えば、標準的なクローニング法を用いて、肺炎桿菌の調節配列でも異種の調節配列でも任意の望ましい調節配列に、異種のリーダー配列に、異種マーカ配列に、異種コード配列でも機能的に連結することができる。

30

【0108】

本発明の核酸分子は、クローニングによって得られた、または化学合成法によって作製された、またはその組み合わせによって作製された、RNA、例えば、mRNAまたはcRNAの形態でもよく、例えば、cDNAおよびゲノムDNAを含むDNAの形態でもよい。DNAは三本鎖でもよく、二本鎖でもよく、一本鎖でもよい。一本鎖DNAは、センス鎖とも知られるコード鎖でもよく、アンチセンス鎖とも呼ばれる非コード鎖でもよい。

【0109】

さらに、本発明は、配列表に示した肺炎桿菌の推定アミノ酸配列を有する、断片、抗原およびその断片の類似体および誘導体をコードする本明細書に記載の核酸分子の変種に関する。核酸分子の変種は、天然の変種、例えば、天然の対立遺伝子変種でもよく、天然に生じることが知られていない変種でもよい。このような非天然の核酸分子変種は、核酸分子、細胞または生物に適用される変異誘発法を含む変異誘発法によって作ることができる。

40

【0110】

これに関する変種の中には、ヌクレオチド置換、欠失、または付加によって上述の核酸分子と異なる変種がある。置換、欠失、または付加は1つまたは複数のヌクレオチドを伴ってもよい。変種は、コード領域または非コード領域が変化したものでもよく、その両方が変化したものでもよい。コード領域の変化は、保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換、欠失または付加を生じてもよい。配列表に示した肺炎桿菌配列を有し、いくつかの、数個の、5~10個、1~5個、1~3個、2個、1個のアミノ酸が置換、欠失、もしくは付加が任意の組み合わせでなされている、または置換、欠失、もしくは付加がなされてい

50

ない、変種、類似体、誘導体もしくは断片、または断片の変種、類似体もしくは誘導体をコードする核酸分子が好ましい。これらの中で特に好ましいのは、配列表に示した肺炎桿菌ポリペプチドの性質および活性を変えない、サイレントな置換、付加、および欠失である。これに関して、保存的置換も特に好ましい。

【0111】

本発明の核酸分子はまた、本発明のポリペプチドをコードする完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離するための、ならびに本発明の核酸分子と高い配列類似性を有する他の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンを単離するための、ハイブリダイゼーションプローブ、例えば、RNA用、cDNA用、およびゲノムDNA用のハイブリダイゼーションプローブとしても使用することができる。このようなプローブは、一般的に、少なくとも15塩基を含む。好ましくは、このようなプローブは、少なくとも20塩基、少なくとも25塩基、または少なくとも30塩基を有し、少なくとも50塩基を有することもある。特に好ましいプローブは少なくとも30塩基を有し、50塩基またはそれ以下、例えば、30塩基、35塩基、40塩基、45塩基、または50塩基を有する。

10

【0112】

例えば、本発明の核酸分子のコード領域は、オリゴヌクレオチドプローブ合成用の公知のDNA配列を用いて関連ライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。次いで、本発明の遺伝子に相補的な配列を有する標識オリゴヌクレオチドを用いて、cDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングして、プローブがどのライブラリーメンバーにハイブリダイズするか決定する。

20

【0113】

本発明の核酸分子およびポリペプチドは、本明細書においてさらに議論するように、薬学的組成物の開発もしくは調製および/または疾患、特に、ヒト疾患の診断薬のための試薬および材料として使用することができる。

【0114】

オリゴヌクレオチドである本発明の核酸分子は、本明細書において全体または一部が同定された肺炎桿菌遺伝子が感染組織、例えば、皮膚、滑液、もしくは血液の中で存在するかどうか、および/または転写されているかどうか決定するために本明細書に記載の方法、好ましくは、PCRについて述べられた方法において使用することができる。このような配列はまた、病原体が獲得した感染段階または感染型の診断においても有用であると認められる。この目的および他の目的のために、本明細書に記載の本発明による核酸またはポリペプチドの少なくとも1つを含む当技術分野において公知のアレイを使用することができる。

30

【0115】

本発明による核酸分子は、核酸分子およびこれらの核酸を含有する生物または試料の検出に使用することができる。好ましくは、このような検出は、診断、より好ましくは、クレブシエラ属またはクレブシエラ属の他の任意の病原体種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカの有無に関連または関係する疾患の診断のための検出である。

40

【0116】

クレブシエラ属、またはクレブシエラ属の他の任意の病原体種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカに感染した真核生物(本明細書において「個体」ともいう)、特に、哺乳類、特に、ヒトは、様々な技法によってDNAレベルで検出される本発明による任意の核酸分子を検出することによって特定することができる。クレブシエラ属または前記の他の病原性クレブシエラ属と他の生物と区別するのに好ましい核酸分子候補を得ることができる。

【0117】

本発明は、クレブシエラ属またはクレブシエラ属の他の任意の病原体種、特に、3つの

50

亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症から生じた疾患を診断する方法を提供する。この方法は、本明細書において開示した、より好ましくは、配列表に示した核酸分子の配列を有する核酸分子の発現レベルの上昇を、個体から単離された試料または個体に由来する試料から決定する工程を含む。核酸分子の発現は、核酸分子の定量のための当技術分野において周知の方法のいずれか1つ、例えば、PCR、RT-PCR、RNase保護、ノザンプロットティング、他のハイブリダイゼーション法、および本明細書に記載のアレイを用いて測定することができる。

【0118】

本明細書で使用する単離とは、その天然の状態から「人の手によって」分離されていることを意味する。すなわち、それが天然に存在する場合、その元の環境から変化もしくは取り出されているか、またはその両方である。例えば、天然状態において生物に天然に存在する天然の核酸分子またはポリペプチドは「単離」されていないが、同じ核酸分子またはポリペプチドがその天然状態の共存する材料から分離されていると、この用語が本明細書において用いられるように「単離」されている。単離の一部としてまたは単離の後に、このような核酸分子は、例えば、変異誘発、融合タンパク質の形成、ならびに宿主内での増殖または発現のために、他の核酸分子、例えば、DNAに接続することができる。単離された核酸分子は単独で、または他の核酸分子、例えば、ベクターと接続させて、培養宿主細胞または生物内の宿主細胞に導入することができる。培養宿主細胞または生物内の宿主細胞に導入されても、このようなDNAは、この用語が本明細書において用いられるように単離されている。なぜなら、このようなDNAは、天然の形態または環境にはないからである。同様に、核酸分子およびポリペプチドは、組成物、例えば、培地配合物、核酸分子またはポリペプチドを、例えば、細胞に導入するための溶液、化学反応または酵素反応のための組成物または溶液、例えば、天然組成物でない組成物または溶液の中にあってもよく、これらの中では、この用語が本明細書において用いられるように、この用語の意味の範囲内で、単離された核酸分子またはポリペプチドのままである。

【0119】

本発明の核酸分子は、最初に、インビトロで、例えば、化学合成によって、または細胞培養で形成され、その後、単離または精製されてもよい。一般的に、核酸は、エンドヌクレアーゼおよび/またはエキソヌクレアーゼおよび/またはポリメラーゼおよび/またはリガーゼおよび/またはリコンビナーゼによって核酸を操作することによって得られてもよく、当業者に公知の他の核酸作製法によって得られてもよい。

【0120】

SEQ ID NO:1~187およびSEQ ID NO:375によって定義される核酸配列は、ベクターに挿入された断片に含まれ、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376により定義される最初のアミノ酸をコードする最初の完全コドンから始まる。しかしながら、組換えによる作製の場合、クローニングおよび発現を容易にするために、さらなる核酸が有用または必要な場合がある。

【0121】

好ましくは、核酸は、当業者に公知の方法によって、クレブシエラ属またはクレブシエラ属の他の任意の病原体種から、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカから、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカから単離することができる。同じことが本発明によるポリペプチドに当てはまる。

【0122】

本発明はまた、本発明の核酸分子を含むベクターに関する。さらに、ベクターは、宿主細胞内での複製を可能にする核酸配列、例えば、複製起点、1つもしくは複数の治療用遺伝子および/または選択マーカー遺伝子、ならびに当技術分野において公知の他の遺伝因子、例えば、コードタンパク質の転写、翻訳、および/または分泌を指向する調節エレ

10

20

30

40

50

ントを含んでもよい。ベクターは、細胞に形質導入、細胞を形質転換、または細胞に感染して、細胞に天然にあるもの以外の核酸および/またはタンパク質を細胞が発現するように使用することができる。ベクターは、任意で、核酸を細胞に入れるのを助ける材料、例えば、ウイルス粒子、リポソーム、タンパク質コーティングなどを含む。

【0123】

本発明はまた、本発明のベクターを用いて遺伝子操作された宿主細胞、および組換え法による本発明によるポリペプチドの作製に関する。

【0124】

本発明によるポリペプチドを発現するために様々な発現ベクターを使用することができる。一般的に、この点に関する発現のために、宿主内でポリペプチドを発現するように核酸を維持、増殖、または発現するのに適した任意のベクターを使用することができる。本発明のこの局面によれば、ベクターは、例えば、プラスミドベクター、一本鎖または二本鎖ファージベクター、一本鎖または二本鎖RNAもしくはDNAウイルスベクターでもよい。本明細書において開示した出発プラスミドは市販されているか、公的に入手可能であるか、周知の公表された手順を日常的に適用することによって、入手可能なベクターから構築することができる。ある点では、ベクターの中で、本発明による核酸分子およびポリペプチドを発現するためのベクターが好ましい。宿主細胞内の核酸構築物は従来どおり用いて、組換え配列によってコードされる遺伝子産物を産生することができる。または、本発明によるポリペプチドは、従来のペプチド合成機によって合成により作製することができる。成熟タンパク質を、適切なプロモーターの制御下で哺乳動物細胞、酵母、細菌、または他の細胞の中で発現させることができる。無細胞翻訳系も使用して、本発明のDNA構築物に由来するRNAを用いて、このようなタンパク質を産生することができる。

【0125】

宿主細胞は、本発明の核酸分子を組み込み、本発明の核酸分子を発現するように遺伝子操作することができる。適した宿主の代表例には、細菌細胞、例えば、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌、ストレプトマイセス属(*Streptomyces*)および枯草菌(*Bacillus subtilis*)細胞;真菌細胞、例えば、酵母細胞およびアスペルギルス属(*Aspergillus*)細胞;昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエ(*Drosophila*)S2およびスポドプテラ属(*Spodoptera*)Sf9細胞;動物細胞、例えば、CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293およびBowes黒色腫細胞;および植物細胞が含まれる。

【0126】

宿主細胞は、例えば、従来の手段、例えば、エレクトロポレーションによって、転写調節配列の制御下にある本発明の核酸を含有する少なくとも1つの発現ベクターを用いてトランスフェクトすることができる。

【0127】

本発明の別の局面によれば、新規のポリペプチドの包括的なセットが提供される。このようなポリペプチドは、本明細書において既に述べたように、本明細書において開示した抗原およびその断片、好ましくは、その活性断片およびその変種、好ましくは、その活性変種である。好ましくは、本発明によるポリペプチドは抗原およびその断片である。本発明の好ましい態様では、アミノ酸配列、好ましくは、本明細書に記載の核酸分子およびその断片のいずれか1つによりコードされるアミノ酸配列を含む抗原が提供される。本発明の別の好ましい態様では、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376を含む群より選択されるアミノ酸配列を含む、タンパク質および抗原ならびにその活性断片および活性変種の新規のセットが提供される。

【0128】

本発明によるポリペプチド、すなわち、本発明によって提供される抗原は、好ましくは、配列表に示した任意のポリペプチドまたは分子、ならびにこのような本発明によるポリペプチドと少なくとも70%の同一性、好ましくは、このような本発明によるポリペプチドと少なくとも80%または85%の同一性、より好ましくは、このような本発明によるポリペプチド、より好ましくは、配列表に示したポリペプチドと少なくとも90%の類似性(より

10

20

30

40

50

好ましくは、少なくとも90%の同一性)、さらにより好ましくは、このような本発明によるポリペプチドと少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%の類似性(さらにより好ましくは、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%の同一性)を有するポリペプチドを含み、また、このようなポリペプチドの部分も含み、このようなポリペプチドの部分は、一般的に少なくとも4個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも8個の、さらにより好ましくは少なくとも30個の、さらにより好ましくは多くとも50個のアミノ酸、例えば、4個、8個、10個、20個、30個、35個、40個、45個、または50個のアミノ酸を含有する。好ましい態様では、このような部分は本発明によるポリペプチドの活性断片である。

【0129】

本発明はまた、本発明によるポリペプチドの断片、類似体、および誘導体に関する。「断片」、「誘導体」、および「類似体」という用語は、このようなポリペプチド、好ましくは、配列表に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドについて言及しているときは、このようなポリペプチドと本質的に同じ、または類似の生物学的活性を保持しているポリペプチドを意味する。本明細書で使用する「類似の生物学的活性」という用語の意味は、好ましくは、検討されているポリペプチドに左右される、より具体的には、その機能に左右されると当業者に認められるだろう。本明細書で使用する「生物学的活性」という用語は、以下でさらに定義される。より好ましくは、類似の生物学的機能または生物学的活性は、活性、親和性、免疫原性、安定性、および/または特異性の程度の点で、非断片または非誘導体の機能とは異なる。好ましい態様では、この差は、50%未満、75%未満、または90%未満である。

【0130】

1つの態様では、本発明によるポリペプチドの断片、誘導体、変種または類似体は、1)アミノ酸残基の1つまたは複数、保存的アミノ酸残基または非保存的アミノ酸残基(好ましくは、保存的アミノ酸残基)で置換されたものであり、このような置換アミノ酸残基は遺伝暗号によってコードされるものでもよく、コードされないものでもよい、あるいは2)アミノ酸残基の1つまたは複数、置換基を含むもの、あるいは3)本発明によるポリペプチドまたはその断片が、別の化合物、例えば、本発明によるポリペプチドのまたはその断片の半減期を延ばす化合物、例えば、ポリエチレングリコールと融合したもの、あるいは4)さらなるアミノ酸、例えば、リーダー配列もしくは分泌配列、または本発明によるポリペプチドもしくはその断片の精製に用いられる配列、またはプロタンパク質配列が、本発明によるポリペプチドまたはその断片と融合したものである。このような断片、誘導体、変種および類似体は、本明細書の開示から当業者の範囲内とみなされる。

【0131】

本発明はまた、異なるクレブシエラ属の種、好ましくは、病原性クレブシエラ属の種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカのタンパク質および抗原、好ましくは、ホモログであるタンパク質および抗原に関する。このようなホモログは、本明細書において開示した核酸配列およびアミノ酸配列に基づいて簡単に単離することができる。各病原体について現在まで区別されている複数の血清型または臨床株があり、タイピングは、血清型に特異的な抗血清または分子アプローチに基づいている。従って、あらゆる血清型について、すべての抗原の存在を確認することができる。異なるクレブシエラ属感染症への様々な血清型の寄与は、異なる年齢群、特に、地域によって異なる。特に、クレブシエラ属の関連する血清型は、例えば、K1、K2、K3、K10、K21、K22、K30、K55、K64、O1、O2a、O3、O4、O5、もしくはO12、または該Kの血清型と該Oの血清型との任意の組み合わせである。最も価値のある防御抗原が様々な臨床株の中で保存されている必要があることは重要な局面である。

【0132】

さらに、このような抗原、変種、類似体、誘導体、およびその断片、ならびに断片の変

10

20

30

40

50

種、類似体、および誘導体を含む融合ポリペプチドも本発明に包含される。このような融合ポリペプチドおよびタンパク質、ならびにこれらをコードする核酸分子は、融合タンパク質をコードする組換えポリ核酸の作製および発現のための標準的な組換え法を含む標準的な技法を用いて容易に作ることができる。

【0133】

好ましい変種の中には、保存的アミノ酸置換だけ基準と異なるものがある。このような置換は、本発明によるポリペプチドの所定のアミノ酸を、類似の特徴を有する別のアミノ酸で置換したものである。保存的置換として典型的にみられるのは、脂肪族アミノ酸、Ala、Val、LeuおよびIleの間で、あるアミノ酸と別のアミノ酸の置換；ヒドロキシル残基SerおよびThrの交換、酸性残基AspおよびGluの交換、アミド残基AsnおよびGlnの間での置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、ならびに芳香族残基PheおよびTyrの間での交換である。

10

【0134】

本発明の別の態様では、前記で定義したペプチドは、改変ペプチドと本質的に同じ活性(断片および変種について前記で定義した)を有し、任意で、他の望ましい特性を有する誘導体を作製するように様々な化学的技法によって改変することができる。例えば、タンパク質のカルボン酸基はC末端にあっても側鎖にあっても、薬学的に許容されるカチオンの塩の形で提供されてもよく、エステルを形成するようにエステル化されてもよく、アミドに変換されてもよい。ペプチドのアミノ基はアミノ末端にあっても側鎖にあっても、薬学的に許容される酸添加塩、例えば、HCl塩、HBr塩、酢酸塩、安息香酸塩、トルエンスルホン酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、および他の有機塩の形をとってもよく、アミドに変換されてもよい。ペプチド側鎖のヒドロキシル基は、よく認識された技法を用いて、アルコキシまたはエステルに変換することができる。ペプチド側鎖のフェニルおよびフェノール環は、1つまたは複数のハロゲン原子、例えば、フッ素、塩素、臭素もしくはヨウ素、またはそのアルキル、アルコキシ、カルボン酸およびそのエステル、またはこのようなカルボン酸のアミドで置換することができる。チオールは、よく認識されている多数の保護基のいずれか1つ、例えば、アセトアミド基を用いて保護することができる。

20

【0135】

これに関してさらに特に好ましいのは、本明細書において開示した、好ましくは、配列表に示した本発明による任意のポリペプチドのアミノ酸配列を有し、いくつかの、数個の、5~10個、1~5個、1~3個、2個、1個のアミノ酸残基が任意の組み合わせで置換、欠失、または付加されている、または置換、欠失、もしくは付加がなされていない、変種、類似体、誘導体および断片、ならびに断片の変種、類似体および誘導体である。これらの中で特に好ましいのは、本発明のペプチドの性質および活性を変えない、サイレントな置換、付加、および欠失である。これに関して、保存的置換も特に好ましい。配列表に示したアミノ酸配列を有し、置換のないペプチドが最も極めて好ましい。

30

【0136】

本明細書において開示した様々な態様における任意の抗原の変種、特に、本明細書においてSEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376と特定した抗原およびペプチドは、典型的には、バイオインフォマティクスによって特徴付けることもできる。配列分析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと併用するために、NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., 1990)などの各ツールが、米国国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)(NCBI, Bethesda, MD)を含むいくつかの情報源から、およびインターネット上で入手可能である。NCBI Blast 2.0を使用する時には、gapped blastpはデフォルトパラメータに設定されている。少なくとも35個のアミノ酸のアミノ酸配列を比較するために、デフォルトパラメータ(gap existence cost 11、およびper residue gap cost 1)に設定されたデフォルトBLOSUM62マトリックスを用いて、Blast 2配列機能が用いられる。(約35アミノ酸より少ない)短いペプチドをアラインメントする時には、アラインメントは、Blast 2配列機能を使用し、デフォルトパラメータ(open gap 9、extension gap 1ペナルティ)に設定されたPAM30マ

40

50

トリックスを用いて行われる。このような短いウィンドウ、例えば、15アミノ酸またはそれ以下にわたる配列同一性を求める方法は、Bethesda, Marylandにある米国立バイオテクノロジー情報センターによって管理されているウェブサイトおよび(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)において説明されている。

【0137】

抗原の活性変種は、相反することが明記されていなければ、抗原のそれぞれのおよび任意の変種、断片、類似体または誘導体も含む、抗原の配列変化によって得られる。ここで、配列変化を有する本発明によるポリペプチドは、免疫化を誘導する能力、ならびに/またはクレブシエラ属生物に対する防御を示す能力、例えば、敗血症モデルおよび/もしくは致死モデル(lethality model)においてクレブシエラ属に対する防御を示す能力を含む、本発明による変化していないポリペプチドの機能を保持する、例えば、完全抗原により表される生物学的活性と類似の生物学的活性を有する。本発明による変化していないポリペプチドの機能を保持するさらなる例は、変化していない形の本発明によるポリペプチドが結合するポリペプチド特異的抗体に、抗原の活性変種が特異的に結合することである。「生物学的機能」または「生物学的活性」とは、好ましくは、ポリペプチドの機能が細胞および生物の成長または生存にそれぞれ必要でなくても、ポリペプチドが天然に生じる細胞または生物でのポリペプチドの機能を意味する。例えば、ポーリンの生物学的機能は、細胞外培地に存在する化合物が細胞に流入するのを可能にする機能である。生物学的機能は抗原機能とは異なる。本発明によるポリペプチドは複数の生物学的機能を有してもよい。

10

20

【0138】

このような変種の配列変化には、保存的置換、欠失、変異、および挿入が含まれ得るが、これに限定されない。好ましくは、活性変種は敗血症患者のヒト血清と反応性を示し、より好ましくは、セロコンバージョンを媒介し、最も好ましくは、殺菌活性を示す。活性変種のこれらの特徴は、例えば、実施例に詳述したように評価することができる。本発明の文脈において、特異的抗体(好ましくは、動物、例えば、マウス、ウサギにおいて組換えタンパク質に対して産生されたポリクローナル抗体、またはマウスにおいて作製されたまたはモノクローナル抗体)に特異的に結合する変種は、変種の活性が、配列変化のない抗原の活性の少なくとも10%、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%に達すれば、敗血症患者からのヒト血清との反応性を示すか、セロコンバージョンを媒介するか、または殺菌活性を示す。

30

【0139】

前記の活性変種には、天然の対立遺伝子変種、ならびに変異体または他の任意の非天然変種が含まれる。当技術分野において公知のように、対立遺伝子変種は、前記のようにポリペプチド生物学的機能を本質的に変えない1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、または付加を有することを特徴とする別の形態の(ポリ)ペプチドである。

【0140】

生物界のどんな種の中でも、対立遺伝子変異は普通のことである。例えば、どんな細菌種でも、例えば、肺炎桿菌でも、通常、マイナー対立遺伝子変異だけ互いに異なる様々な株(クローン生殖を特徴とする)によって表される。実際に、異なる株において同じ生物学的機能を果たすポリペプチドは、それぞれの株において同一でないアミノ酸配列を有することがある。このような対立遺伝子変異はポリヌクレオチドレベルで等しく反映される。

40

【0141】

クラスA ラクタマーゼK2について述べられたように(Haeggman, S. et al., 1997)、対立遺伝子変異はクレブシエラ属の種の中で非常によく見られる。

【0142】

好ましい態様では、アミノ酸の交換、欠失または挿入によって、本発明によるポリペプチドから得られた活性変種または活性断片は、活性(本明細書において定義した、反応性

50

、セロコンバージョンおよび/または殺菌活性)を保存することがあり、より好ましくは、活性(本明細書において定義した、反応性、セロコンバージョンおよび/または殺菌活性)を改善することがある。さらに、これらのポリペプチドは、同じT細胞応答または好ましくは改善したT細胞応答を誘発するエピトープをカバーしてもよい。これらエピトープは、本明細書においてさらに定義される「ヘテロクリティック」と呼ばれる。これらエピトープは、MHC/HLA分子に対して同様のまたは好ましくはより高い親和性を有し、元のエピトープに対するT細胞受容体(TCR)を同様にまたは好ましくはより強く刺激する能力を有する。ヘテロクリティックエピトープは、合理的な設計によって、すなわち、例えば、Rammensee et al. (1999)に記載のようにMHC/HLAへの結合への個々の残基の寄与を考慮に入れることと、TCRと潜在的に相互作用する残基を系統的に交換し、結果として生じた配列を元のエピトープに対するT細胞を用いて試験することを組み合わせ得ることができる。このような設計は、過度の実験なく当業者に可能である。

10

【0143】

本発明のさらにより好ましい態様では、本発明によるポリペプチドの活性変種は、本明細書において開示した任意のポリペプチドであり、より具体的には、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376のいずれかのポリペプチドと少なくとも50%の配列同一性を有する、特に、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376のいずれかのポリペプチドと少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、最も好ましくは99%の配列同一性を有する、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376によって定義される任意のポリペプチドであり、および/または保存的置換によって、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376の任意の配列のポリペプチドから得られるものである。保存的置換は、側鎖および化学的特性に関連性があるアミノ酸ファミリーの中で起こる置換である。このようなファミリーの例は、塩基性側鎖を有するアミノ酸、酸性側鎖を有するアミノ酸、非極性脂肪族側鎖を有するアミノ酸、非極性芳香族側鎖を有するアミノ酸、無電荷極性側鎖を有するアミノ酸、小さな側鎖を有するアミノ酸、大きな側鎖を有するアミノ酸などである。1つの態様では、1つの保存的置換がペプチドに含まれる。別の態様では、2つまたはそれ以下の保存的置換がペプチドに含まれる。さらなる態様では、3つまたはそれ以下の保存的置換がペプチドに含まれる。

20

【0144】

保存的アミノ酸置換の例には、以下に列挙した保存的アミノ酸置換が含まれるが、これに限定されない。

30

<u>元の残基</u>	<u>保存的置換</u>	
Ala	Ser	
Arg	Lys	
Asn	Gln; His	
Asp	Glu	
Cys	Ser	
Gln	Asn	10
Glu	Asp	
His	Asn; Gln	
Ile	Leu; Val	
Leu	Ile; Val	
Lys	Arg; Gln; Asn	
Met	Leu; Ile	
Phe	Met; Leu; Tyr	20
Ser	Thr	
Thr	Ser	
Trp	Tyr	
Tyr	Trp; Phe	
Val	Ile; Leu	

【 0 1 4 5 】

本発明によるポリペプチドならびにその断片および変種はまた、改変エピトープを含むか、または改変エピトープからなる。改変エピトープでは、好ましくは、所定のエピトープの1個または2個のアミノ酸が、例えば、Tourdot, S. et al., 2000に開示される規則に従って改変または置換されており、このような改変エピトープをコードする核酸配列も同様である。本発明によるポリペプチドによって示されるエピトープは、本明細書において本発明のエピトープとも呼ばれる。

【 0 1 4 6 】

エピトープのT細胞活性化能を改善する、保存する、または少なくとも有意に妨げないアミノ酸交換によって本発明のエピトープから得られるエピトープも本発明によるエピトープに含まれることは明らかである。従って、本発明のエピトープは、肺炎桿菌由来の元の配列を含有しないが、同じT細胞応答または好ましくは改善したT細胞応答を誘発するエピトープも含む。これらエピトープは「ヘテロクリティック」と呼ばれ、MHC/HLA分子に対して同様のまたは好ましくはより高い親和性を有する必要がある、元のエピトープに対するT細胞受容体(TCR)を同様にまたは好ましくはより強く刺激する能力を有する必要がある。

【 0 1 4 7 】

エピトープ、より具体的にはヘテロクリティックエピトープを特定する別の可能性があるものには、本発明のエピトープの1つまたはいくつかに対するT細胞を用いたペプチドライブラリーのスクリーニングが含まれる。好ましい手法の1つが合成ペプチドライブラリーの位置スキヤニング(positional scanning)である。このようなアプローチは、例えば、Hemmer, B. et al., (1999)およびその参考文献に詳述されている。

【 0 1 4 8 】

本明細書において開示される、本発明から得られるアミノ酸配列によって表されるエピトープまたはヘテロクリティックエピトープの代わりとして、本明細書において「ペプチドミメチカ(peptidemimetica)」または「レトロインバースペプチド(retro-inverse-peptide)」とも呼ばれる、これらのエピトープを模倣する物質または化合物も適用することができ、従って、本発明の範囲内である。

【0149】

改善されたエピトープの設計の別の局面は、T細胞を刺激する能力を高める物質を用いた製剤または改変である。これらには、Tヘルパー細胞エピトープ、脂質もしくはリポソーム、またはWO01/78767に記載の好ましい改変が含まれる。

【0150】

エピトープのT細胞刺激能を高める別の手法は、免疫刺激物質、例えば、サイトカインまたはケモカイン、例えば、インターロイキン-2、-7、-12、-18、クラスIおよびIIインターフェロン(IFN)、特に、IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 、flt3-リガンド、およびその他を用いた製剤である。

【0151】

本発明によるポリペプチドは、好ましくは、単離された形で提供され、好ましくは、均一になるまで精製されている。

【0152】

本発明の別の態様では、変種は断片である。断片は、前記で定義した抗原から1つまたは複数のアミノ酸欠失によって得られていることを特徴とする。欠失は、C末端にあってもよく、N末端にあってもよく、および/または内部にあってもよい。好ましくは、断片は、多くとも10、20、30、40、50、60、80、100、150、または200、より好ましくは、多くとも10、20、30、40、または50、さらにより好ましくは、多くとも5、10、または15、さらにより好ましくは、多くとも5または10、最も好ましくは、1、2、3、4、または5の欠失によって得られる。本発明の活性断片は、免疫化を誘導する能力、ならびに/またはクレブシエラ属に対する防御を示す能力、例えば、敗血症モデルおよび/もしくは致死モデルにおいてクレブシエラ属に対する防御を示す能力を含む、完全抗原により表される生物学的活性と類似の生物学的活性を有することを特徴とする。断片の活性が、配列変化のない抗原の活性の少なくとも10%、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%、特に少なくとも90%、特に少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%に達すれば、抗原の断片は本発明の文脈では活性がある。これらの断片は、約50~80アミノ酸長と短い長さを含めて任意の望ましい長さで設計または入手することができる。

【0153】

さらなる態様では、断片、より好ましくは、本発明によるポリペプチドの断片は、本発明によるポリペプチドならびにこのような断片の組み合わせの構造的性質または機能的性質、すなわち、 α ヘリックスおよび β ヘリックス形成領域、シートおよびシート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、可動性領域、表面形成領域、基質結合領域、ならびに高抗原性指数領域を含む断片を特徴とする。好ましい領域は、本発明によるポリペプチドの抗原性および抗体結合活性を媒介する領域である。これに関して、本発明の抗原およびその断片の化学的活性、生物学的活性、または他の活性を有する断片が、類似の活性もしくは改善した活性を有する断片または望ましくない活性が低下した断片も含めて最も極めて好ましい。このような改善した活性は免疫原性および安定性であり、このような低下する望ましくない活性は、酵素機能および毒性機能ならびにヒト交差反応性抗体の産生である。特に好ましいのは、クレブシエラ属または他の任意の病原性クレブシエラ属の種の生存に必須の機能あるいはヒトにおいて疾患を引き起こす能力を付与する、受容体または酵素ドメインを含む断片である。本発明によるポリペプチドのさらに好ましい断片は、動物、特に、ヒトにおける抗原決定基または免疫原決定基を含む、または含有する断片である。このような断片は抗原性断片とも呼ばれる。

10

20

30

40

50

【0154】

抗原性断片は、好ましくは、それ自体で抗原性のある断片、またはハプテンとして提供される時に抗原性となり得る断片と定義される。従って、1つのアミノ酸交換を示す抗原または抗原性断片、特に、長い断片の場合では、いくつかのアミノ酸交換しか示さない抗原または抗原性断片もまた、アミノ酸が交換されたこのような断片の抗原性または抗原能が交換によりひどく損なわれていなければ、すなわち、抗原が接種された個体における適切な免疫応答の誘発に適しており、個体の血清に由来する個体抗体調製物によって特定されれば、本発明により可能である。

【0155】

本発明によるポリペプチドのこのような断片の好ましい例は、表16に列挙した断片(SED ID NO 188-203および376)である。

10

【0156】

本発明によるポリペプチドのこのような断片のさらに好ましい例は、表1の「推定された免疫原性アミノ酸」もしくは「特定された免疫原領域の位置」の列において示された、または表4の「aaから」および「aaまで」の列によって定義された、または表5の「タンパク質内の位置(aa)」の列において示されたコアアミノ酸配列である。

【0157】

表1、表4、および表5に列挙した、これらの全ての断片は個々に、およびそれぞれ独立して、本発明の好ましい選択された局面を形成する。

【0158】

本発明はまた、特に、上述の断片、変種、活性変種、および活性断片をコードする核酸分子、断片、変種、活性変種、および活性断片をコードする核酸分子にハイブリダイズする核酸分子、特に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子、ならびに断片をコードする核酸分子を増幅するための核酸分子、例えば、PCRプライマーに関することが認められるだろう。これらに関して、好ましい核酸分子は、前記のように好ましい断片に対応する核酸分子である。

20

【0159】

本発明によるポリペプチドは、改変された形態、例えば、融合タンパク質として発現してもよく、分泌シグナルだけでなく、さらなる異種機能領域を含んでもよい。従って、例えば、精製の間または後の操作および保存の間の宿主細胞内での安定性および持続性を改善するさらなるアミノ酸、特に、荷電アミノ酸領域を、ポリペプチドのN末端またはC末端に付加することができる。また、精製を容易にする領域または発現を強化する領域をポリペプチドに付加してもよい。このような領域はポリペプチドの最終調製の前に除去することができる。特に、分泌もしくは排出を生じさせるため、安定性を改善するため、発現を強化するため、または精製を促進するために、ペプチド部分をポリペプチドに付加することはよく知られており、当技術分野において日常的な技法である。好ましい融合タンパク質は、ポリペプチドの可溶化または精製に有用な免疫グロブリンからの異種領域を含む。例えば、EP0464533は、イムノグロビン(immunoglobulin)分子の定常部の様々な部分と別のタンパク質またはその部分を含む融合タンパク質を開示している。創薬では、例えば、アンタゴニストを特定するハイスループットスクリーニングアッセイのために、タンパク質と抗体Fc部分が融合されている。例えば、(Bennett, D. et al., 1995)および(Johanson, K. et al., 1995)を参照されたい。融合はまた、脂質および炭水化物を含むアミノ酸以外の部分と融合または結合した本発明によるポリペプチドを含んでもよい。さらに、本発明の抗原は、先行技術に述べられている他の接種用薬剤、ならびに他の微生物に由来する他の種の接種用薬剤と併用されてもよい。このようなタンパク質は、広域クレブシエラ属分離株によって引き起こされる疾患の予防、治療、および診断において有用である。

30

40

【0160】

さらなる態様では、本発明のペプチドは、抗タグ物質が選択的に結合することができるエピトープをもたらすエピトープタグに融合される。エピトープタグは、一般的に、ペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に配置されるが、生物学的活性が許す限り内部

50

の挿入または置換として組み込まれてもよい。このようなエピトープタグがつけられた形のペプチドの存在は、タグ化ペプチドに対する抗体などの物質を用いて検出することができる。また、エピトープタグを設けると、ペプチドを、抗タグ抗体またはエピトープタグに結合する別のタイプのアフィニティマトリックスを用いたアフィニティ精製によって容易に精製することができる。様々なタグポリペプチドおよびその抗体が当技術分野において周知である。例には、ポリヒスチジン(poly-his)、ポリヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ、HAタグポリペプチド、c-mycタグ、Strepタグ、およびFLAGタグが含まれる。

【0161】

本発明のポリペプチドは、多くの任意の従来技法によって調製することができる。例えば、本発明のポリペプチドは、化学合成ならびにバイオテクノロジー手段によって生成することができる。後者は、本発明による核酸を含有するベクターによる宿主細胞のトランスフェクションまたは形質転換を含む。好ましい態様では、ベクターは、本発明によるベクターである。本発明によるポリペプチドのバイオテクノロジーによる生成は、トランスフェクションまたは形質転換された宿主細胞を、タンパク質発現が可能であり、かつ当業者に公知の条件下で培養することを含む。発現タンパク質は、当業者に公知の適切な手段によって、細胞(または細胞外に発現された場合には培地)から、単離された形、任意で精製された形で回収される。例えば、タンパク質は、細胞溶解後に可溶性の形で単離されるか、公知の技法を用いて、例えば、塩化グアニジン(guanidine chloride)中に抽出される。本発明のポリペプチドおよび抗原を含む分子は、様々な任意の従来方法を用いてさらに精製することができる。従来方法には、硫酸沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、液体クロマトグラフィー、例えば、HPLC、FPLCなどを用いた順相または逆相液体クロマトグラフィー;アフィニティクロマトグラフィー(例えば、無機リガンドまたはモノクローナル抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィー)、サイズ排除クロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、固定化金属キレートクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などが含まれるが、これに限定されない。当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく、最も適切な単離法および精製法を選択することができる。このような精製を用いると、微生物の他のタンパク質性材料および非タンパク質性材料を実質的に含まない形で抗原が得られる。

10

20

30

【0162】

本発明によるポリペプチドを調製する代わりにアプローチは、酵素消化によって、例えば、タンパク質の特定のアミノ酸残基によって定義される部位を切断することが知られている酵素を用いてタンパク質を処理することによって、または適切な制限酵素でDNAを消化し、消化されたDNAを発現させ、望ましい断片を単離することによって、公知のペプチドの断片を作製することを伴う。さらに別の適切な技法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、望ましいペプチド断片をコードするDNA断片を単離および増幅することを伴う。DNA断片の望ましい末端を規定するオリゴヌクレオチドは、PCRにおいて5'プライマーおよび3'プライマーとして用いられる。公知の配列を有するDNA、従って、タンパク質の予め決められた部位に、変異、例えば、欠失、挿入および置換を作る技法は周知である。従来技法、例えば、PCRを用いる当業者であれば、本明細書において提供される抗原およびペプチドを容易に使用して、他の類似のタンパク質を同定および単離することができる。このような方法は日常的なものであり、本明細書において提供される情報があれば過度の実験を必要とするとはみなされない。例えば、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的変異誘発(Carter, P. et al., 1986; Zoller, M.J. et al., 1987)、カセット変異誘発(Wells, J.A. et al., 1985)、制限選択変異誘発(Wells et al., 1986)、PCR変異誘発を用いて、変異を加えることができる。または、本発明のペプチドを生成するために、クローニングされたDNAに対して他の公知の技法を実施することができる。

40

【0163】

本発明によるポリペプチドは、これらの生物またはタンパク質または抗原を、その断片

50

を含めて含有する試料において生物を検出するのに使用することができる。好ましくは、このような検出は、診断のための検出であり、より好ましくは、疾患の診断、最も好ましくは、グラム陰性細菌、特に、病原性クレブシエラ属の種、特に、3つの亜種ニューモニア、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカを含む群より選択される細菌、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカより選択される細菌の存在または存在量に関連または関係する疾患の診断のための検出である。

【0164】

本発明による核酸はまた、試料中の生物の診断または検出にも使用することもできる。生物は、好ましくは、本発明によるポリペプチドおよび本発明による抗体の使用に関してそれぞれ開示されたものと同じ生物である。基本的に、本開示を考慮すれば、このような診断および検出のためのアッセイおよび方法をそれぞれ設計および実施することは当業者の技術の範囲内である。より好ましくは、このような診断または検出では、本発明による核酸分子と特異的に相互作用するプライマーまたはプローブが用いられる。このようなプライマーおよびプローブの長さおよび設計は、それぞれ、実施される特定の手法または診断に応じて異なる。好ましい態様では、例えば、PCRに基づく検出システムまたは診断システム、すなわち、手法またはアッセイのためにプライマーが用いられる場合、プライマーの長さは、約10ヌクレオチド～約30ヌクレオチド、より好ましくは、約16～25ヌクレオチドである。プローブに基づく検出システムまたは診断システムの場合、プローブの長さは、好ましくは、プライマーに基づくシステムについて特定されたものとほぼ同じである。さらに、プローブに基づくシステムの場合、プローブは、プローブの検出を直接的または間接的に可能にする部分を含む。直接検出のためのこのような部分は、当業者に公知の放射性標識でもよく、蛍光標識でもよい。間接検出のためのこのような部分はビオチンでもよく、さらなる化合物との相互作用を媒介する他の任意の部分でもよく、化合物は相互作用後に検出可能となるように標識される。

10

20

【0165】

本発明はまた、診断アッセイ、例えば、細胞および組織における本発明によるポリペプチド、より好ましくは、本発明の抗原およびその断片のレベルを、正常レベルおよび異常レベルの決定も含めて検出するための定量アッセイおよび診断アッセイに関する。従って、例えば、正常対照組織試料と比較して本発明によるポリペプチドの過剰発現を検出するための本発明による診断アッセイは、感染の存在を検出するのに、例えば、感染生物を特定するのに使用することができる。宿主に由来する試料におけるこのようなポリペプチドのレベルの決定に用いることができるアッセイ技法は当業者に周知である。このようなアッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。これらの中で、ELISAおよびウェスタンブロット分析が好ましいことが多い。ELISAアッセイは、最初に、本発明によるポリペプチドの1つに特異的な抗体、好ましくは、モノクローナル抗体を調製することを含む。さらに、一般的に、モノクローナル抗体に結合するレポーター抗体が調製される。レポーター抗体は、検出試薬、例えば、放射性試薬、蛍光試薬、または酵素試薬、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素に取り付けられる。本発明によるポリペプチド、より好ましくは、本発明による抗原およびその断片の1つまたはいくつかが、試験しようとする患者または被験体の血清中の反応性抗体を検出するためにELISAプレートに固定化することができる。

30

40

【0166】

ウェスタンブロットアッセイでは、最初に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、本発明によるポリペプチドが個々にまたは組み合わされて分離され、その後、固体支持体マトリックス、例えば、ニトロセルロース、ナイロンまたはその組み合わせに転写および固定化される。レポーター抗体と共に反応性抗体を検出することができる。レポーター抗体は、検出試薬、例えば、放射性試薬、蛍光試薬、または酵素試薬、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素に取り付けられる。

【0167】

50

本発明によるポリペプチド、または本発明による核酸分子、または本明細書に記載のように本発明による核酸分子に対して作られたプライマーもしくはプローブはまた、アレイの目的で、またはアレイと共に使用することができる。本発明による核酸分子ならびに本発明による核酸分子に対して作られたプライマーおよびプローブの場合、プローブおよびプライマーの長さは、好ましくは、約25～約75ヌクレオチド、より好ましくは、約35～約50ヌクレオチドの範囲内でもよい。より具体的には、本発明によるポリペプチドの少なくとも1つを支持体上に固定化することができる。支持体は、典型的には、様々な本発明によるポリペプチドならびに/または抗原およびその断片を含む。ここで、多様性は、本発明による抗原およびその断片ならびに/または異なる抗原およびその断片の1つもしくはいくつかを用いることによって作り出すことができる。このようなアレイならびに任意のアレイの特徴は、一般的に、支持体上またはその表面上の別個のまたは予め定義された領域または位置に、別個のポリペプチドが固定化されることである。このために、アレイの別個の位置または領域にあるあらゆる活性を、特定のポリペプチドと相関付けることができる。支持体上に固定化された、異なるポリペプチド、より好ましくは、異なる抗原およびその断片の数は、それぞれ、10種類と少数から数千種類のポリペプチドならびに抗原およびその断片でもよい。1cm²当たりの前記分子の密度は、好ましい態様では、1cm²当たり10種類という少数のこのようなペプチド～1cm²当たり少なくとも400種類のこのようなポリペプチドであり、より具体的には、1cm²当たり少なくとも1000種類のこのようなポリペプチドであり、より好ましくは、1cm²当たり種類の抗原およびその断片である。本発明によるポリペプチドの固定化および本発明によるポリペプチドの使用について本明細書において言われたものは、当業者に認められるように、核酸分子ならびに核酸分子に対して作られたプライマーおよびプローブにもそれぞれ当てはまる。

10

20

30

40

50

【0168】

このようなアレイの製造は当業者に公知であり、例えば、米国特許第5,744,309号に記載されている。アレイは、好ましくは、少なくとも第1の表面を有する平面状、多孔性、または非孔性の固体支持体を含む。本発明によるポリペプチドは前記表面上に固定化される。好ましい支持体材料は、特に、ガラスまたはセルロースである。アレイが本明細書に記載の診断用途のいずれかに用いられることもまた本発明の範囲内である。本発明によるポリペプチドの他に本発明による核酸分子も前記のアレイの作製に使用することができる。このことは、抗体、好ましくは、モノクローナル抗体、特に、本明細書に記載のモノクローナル抗体から作られたアレイにも当てはまる。

【0169】

さらなる局面では、本発明は、本発明による任意のポリペプチドに対する抗体、本発明によるその誘導體、断片、変種、活性断片および活性変種に関する。本発明は、例えば、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、およびヒト化抗体、ならびにFabフラグメントまたはFab発現ライブラリーの産物を含む。抗体がキメラでもよい、すなわち、その異なる部分が異なる種に由来するか、または少なくともそれぞれの配列が異なる種から得られることは本発明の範囲内である。

【0170】

このような抗体は、一般的に、特に、本発明の配列に対応する抗原およびその断片に対して作られ、本発明によるポリペプチドを動物に直接注射することによって、または前記ポリペプチドを動物、好ましくは、非ヒトに投与することによって得ることができる。次いで、このように得られた抗体は、前記ポリペプチドそれ自体に結合する。このようにして、前記ポリペプチドの断片しかコードしない配列でも、本発明による天然のポリペプチド全体に結合する抗体を作製するのに使用することができる。次いで、このような抗体は、抗原およびその断片を発現する組織から本発明によるポリペプチドを単離するのに使用することができる。この手順は、前記ポリペプチドの断片、変種、活性断片および活性変種にも当てはまるのが当業者に理解されるだろう。

【0171】

モノクローナル抗体の調製のために、((Kohler, G. et al., 1975)において最初に述べられた)連続継代性細胞系培養によって産生される抗体を提供する当技術分野において公知の任意の技術を使用することができる。

【0172】

単鎖抗体の産生について記載されている技術(米国特許第4,946,778号)は、本発明による多様な態様において、免疫原性抗原およびその断片に対する単鎖抗体を産生するように適合することができる。また、トランスジェニックマウス、または他の生物、例えば、他の哺乳動物を用いて、本発明によるポリペプチドに対するヒト化抗体を発現させることができる。

【0173】

本発明のさらなる別の局面は、本発明の抗体を産生するハイブリドーマ細胞株に関する。

【0174】

望ましいモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞株は、周知の従来技法によって作製される。ハイブリドーマ細胞は、正常な活性化抗体産生B細胞と骨髄腫細胞を融合することによって作製することができる。本発明の文脈において、ハイブリドーマ細胞は、本発明の抗原に特異的に結合する抗体を産生することができる。

【0175】

同様に、これらの抗原に対して作られたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に公知の組換え技法を適用することによって、望ましい高力価抗体が作られる(例えば、PCT特許出願番号PCT/GB85/00392; 英国特許出願公開番号GB2188638A; Amit, A.G. et al., 1986; Queen, C. et al., 1989; PCT 特許出願番号WO90/07861; Riechmann, L. et al., 1988; Huse, W.D. et al., 1988を参照されたい)。

【0176】

または、ファージディスプレイ技術またはリボソームディスプレイを利用して、それぞれの標的抗原を有するようにスクリーニングされたヒト由来リンパ球のPCR増幅v-遺伝子レパトリーから、またはナイーブライブラリーから、本発明によるポリペプチドに対して結合活性を有する抗体遺伝子を選択することができる(McCafferty, J. et al., 1990); (Marks, J. et al., 1992)。これらの抗体の親和性は、鎖シャuffling(chain shuffling)によっても改善することができる(Clackson, T. et al., 1991)。

【0177】

2つの抗原結合ドメインが存在する場合、各ドメインは異なるエピトープに対するものでもよい。これは「二重特異性」抗体と呼ばれる。

【0178】

上記の抗体は、アフィニティークロマトグラフィーにより単離および/または精製するために抗体を固体支持体を取り付けることによって、本発明によるポリペプチドを発現するクローンを単離または同定するのに使用することができる。

【0179】

従って、特に、本発明によるポリペプチドに対する抗体は、感染症、特に、細菌感染症、特に、病原性クレブシエラ属の種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカから生じる感染症を阻害および/または治療するのに使用することができる。

【0180】

本発明によるポリペプチド、より具体的には抗原およびその断片は、多様な態様において、本発明のある特定の局面を形成する、抗原的に、エピトープ的に、または免疫学的に等価な誘導体を含む。本明細書で使用する「抗原的に等価な誘導体」という用語は、前記ポリペプチドに対して特定の抗体が産生された時に、病原体と哺乳動物宿主の相互作用を妨害する特定の抗体によって特異的に認識される、このような本発明によるポリペプチドまたはその等価物を包含する。本明細書で使用する「免疫学的に等価な誘導体」という用

10

20

30

40

50

語は、適切な製剤の中に用いられた時に、病原体と哺乳動物宿主の相互作用を妨害するように作用する抗体を脊椎動物において産生する、ペプチドまたはその等価物を包含する。

【0181】

本発明によるポリペプチド、より具体的には、抗原およびその断片、多様な態様では、例えば、抗原的もしくは免疫学的に等価な誘導体、またはその融合タンパク質は、マウスまたは他の動物、例えば、ラットもしくはニワトリを免疫化する抗原として使用することができる。融合タンパク質は、本発明によるポリペプチドに安定性をもたらし得る。このようなポリペプチドは、例えば、免疫原性の担体タンパク質、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)またはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)と接合することによって結合することができる。または、多コピーの本発明によるポリペプチドを含む抗原性ペプチド、より好ましくは、抗原およびその断片、または抗原的もしくは免疫学的に等価な抗原およびその断片は、免疫原性が改善して担体が不要となるほど十分に抗原性がある場合がある。

10

【0182】

好ましくは、抗体またはその誘導体は、個体において免疫原性が低くなるよう改変される。例えば、個体がヒトの場合、抗体は最も好ましくは「ヒト化」することができる。ヒト化抗体では、例えば、(Jones, P. et al., 1986)または(Tempest, P. et al., 1991)に記載のように、ハイブリドーマ由来抗体の相補性決定領域がヒトモノクローナル抗体に移植されている。

【0183】

遺伝子による免疫化における本発明による核酸分子の使用では、好ましくは、適切な送達法、例えば、プラスミドDNAの筋肉への直接注射、特定のタンパク質担体と複合化したDNAの送達、DNAとリン酸カルシウムとの共沈、様々な形態のリボソームへのDNAのカプセル封入、パーティクルボンパードメント(Tang, D. et al., 1992)、(Eisenbraun, M. et al., 1993)、およびクローニングされたレトロウイルスベクターを用いたインビボ感染(Seeger, C. et al., 1984)が用いられる。

20

【0184】

さらなる局面では、本発明は、本発明による任意のポリペプチドへのペプチド結合、およびこのようなペプチドを調製する方法に関する。前記の方法は前記ポリペプチドの使用を特徴とし、基本工程は当業者に公知である。

【0185】

このようなペプチドは、最新技術による方法、例えば、ファージディスプレイまたはリボソームディスプレイを用いて作製することができる。ファージディスプレイの場合、基本的に、ペプチドライブラリーをファージの形で作製し、この種のライブラリーを、標的分子、本件では、本発明によるポリペプチドと接触させる。その後、標的分子に結合しているペプチドを、それぞれの反応から、好ましくは、標的分子との複合体として取り出す。結合特性は、少なくともある程度まで、特に、実現した実験状況、例えば、塩濃度などに左右されることが当業者に公知である。より高い親和性またはより大きな力を用いて、標的分子に結合していないペプチドをライブラリーの非結合メンバーから分離した後、任意で、標的分子およびペプチドの複合体から標的分子も除去した後に、続いて、それぞれのペプチドを特徴付けることができる。特徴付けの前に、任意で、例えば、ペプチドコードファージを増殖させることによって、増幅工程が行われる。特徴付けは、好ましくは、標的結合ペプチドの配列決定を含む。基本的に、ペプチドの長さには制限はない。しかしながら、好ましくは、長さが約8~20アミノ酸のペプチドが、それぞれの方法で得られる。ライブラリーのサイズは、約 10^2 ~ 10^{18} 、好ましくは、 10^8 ~ 10^{15} 種類のペプチドでもよいが、これに限定されない。好ましい態様では、このようなペプチドは高親和性結合ペプチドである。さらにより好ましい態様では、ペプチドはペプチドアプタマーである。

30

40

【0186】

前記のような特定の形の標的結合ペプチドは、いわゆる「アンチカリン」であり、特に、独国特許出願DE19742706に記載されている。本発明はまた、本発明によるポリペプチドに特異的に結合するペプチド、ならびに本明細書に記載の任意の治療用途および診断用途

50

のための、好ましくは、抗体のための、その使用に関する。

【0187】

さらなる局面において、本発明は、本発明による任意のポリペプチドと相互作用する機能的核酸、およびこのような機能的核酸を調製する方法に関する。前記方法は本発明によるポリペプチドの使用を特徴とし、基本工程は当業者に公知である。機能的核酸は、好ましくは、アプタマーおよびスピーゲルマーである。本発明はまた、本発明によるポリペプチドに特異的に結合するアプタマーおよびスピーゲルマー、ならびに本明細書に記載の任意の治療用途および診断用途のための、好ましくは、抗体のための、その使用に関する。

【0188】

アプタマーは、標的分子と特異的に相互作用する、一本鎖または二本鎖のD-核酸である。アプタマーの調製または選択は、例えば、欧州特許EP0533838に記載されている。基本的には以下の工程が行われる。第1に、核酸、すなわち、潜在的アプタマーの混合物を準備する。ここで、それぞれの核酸は、典型的には、数個、好ましくは少なくとも8個のそれに続くランダムヌクレオチドのセグメントを含む。その後、この混合物と標的分子を接触させる。これによって、例えば、候補混合物と比較して標的に対する高い親和性またはより強い力に基づいて、核酸は標的分子に結合する。その後、結合した核酸を混合物の残りから分離する。任意で、このように得られた核酸を、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅する。これらの工程を数回繰り返して、最終的に標的に特異的に結合する核酸の比が増した混合物が得られる。次いで、これから最終的な結合核酸が任意で選択される。これらの特異的に結合する核酸はアプタマーと呼ばれる。アプタマーを作製または同定する方法のいずれの段階においても、個々の核酸の混合物の試料を採取して、標準的な技法を用いてその配列を決定できることは明らかである。例えば、アプタマーの作製の当業者に公知の特定の化学基を導入することによって、アプタマーを安定化できることは本発明の範囲内である。このような改変は、例えば、ヌクレオチドの糖部分の2'位へのアミノ基の導入でもよい。アプタマーは現在、治療剤として用いられている。しかしながら、このように選択または作製されたアプタマーを、標的バリデーションのために、および/または、薬学的組成物、好ましくは低分子に基づく薬学的組成物の開発のためのリード物質として使用できることもまた本発明の範囲内である。これは、実際には、競合アッセイにより行われる。競合アッセイでは、標的分子とアプタマーとの特異的相互作用が候補薬剤によって阻害され、これによって、それぞれの薬剤候補が標的およびアプタマーの複合体からアプタマーを置換すると、標的とアプタマーの間の相互作用を特異的に阻害することができ、相互作用が特異的であれば、候補薬剤は少なくとも原則的には標的のブロックに適しており、従って、このような標的を含むそれぞれの系における生物学的利用能または生物学的活性を減少させると考えることができる。次いで、このように得られた低分子は、その物理的、化学的、生物学的、および/または医学的な特徴、例えば、毒性、特異性、生分解性およびバイオアベイラビリティを最適化するために、さらなる誘導体化および改変に供することができる。

【0189】

スピーゲルマーおよびその作製または調製は同様の原理に基づいている。スピーゲルマーの調製は国際特許出願WO98/08856に記載されている。スピーゲルマーはL-核酸であり、これは、スピーゲルマーがアプタマーのようにD-ヌクレオチドではなくL-ヌクレオチドから構成されることを意味する。スピーゲルマーは生物系において非常に高い安定性を有することを特徴とし、アプタマーと同様に、スピーゲルマーの標的分子と特異的に相互作用する。スピーゲルマーを作製する方法では、D-核酸の不均一な集団を作り出し、この集団を標的分子の鏡像異性体、本件では、例えば、本発明による抗原およびその断片の天然のL-鏡像異性体のD-鏡像異性体と接触させる。その後、標的分子の鏡像異性体と相互作用しないD-核酸を分離する。しかし、標的分子の鏡像異性体と相互作用するD-核酸を分離し、任意で、同定および/または配列決定し、その後、D-核酸から得られた核酸配列情報に基づいて、対応するL-核酸を合成する。これらのL-核酸は、標的分子の鏡像異性体と相互作用する前述のD-核酸と配列の点では同じであり、その鏡像異性体ではなく、天然の標

10

20

30

40

50

的分子と特異的に相互作用する。アプタマーの作製方法と同様に、様々な工程を数回繰り返して、標的分子の鏡像異性体に特異的に相互作用する核酸を濃縮することも可能である。

【0190】

さらなる局面において、本発明は、本発明による任意の核酸分子と相互作用する機能的核酸、およびこのような機能的核酸の調製方法に関する。前記方法は、本発明による核酸分子およびそのそれぞれの配列を使用することを特徴とし、基本工程は当業者に公知である。機能的核酸は、好ましくは、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNAである。本発明はまた、本発明によるポリペプチドに特異的に結合する、この種の機能的核酸、ならびに本明細書に記載の治療用途および診断用途のいずれか、好ましくは、抗体のための、その使用に関する。

10

【0191】

リボザイムは触媒活性のある核酸であり、好ましくは、RNAからなり、基本的には2つの部分を含む。第1の部分は触媒活性を示すのに対して、第2の部分は、標的核酸、本件では本発明によるポリペプチドをコードする核酸との特異的相互作用を担う。標的核酸とリボザイムの第2の部分が相互作用すると、典型的には、2本のハイブリダイズ鎖にある本質的に相補的な塩基配列がハイブリダイゼーションおよびワトソン・クリック塩基対形成することにより相互作用すると、触媒活性部分が活性となり得る。このことは、リボザイムの触媒活性がホスホジエステラーゼ活性である場合、リボザイムが分子内または分子間で標的核酸を触媒することを意味する。その後、さらに標的核酸が分解され、最終的に、標的核酸ならびに標的核酸に由来するタンパク質が分解され得る。リボザイム、その使用および設計原理は当業者に公知であり、例えば、(Doherty, E. et al., 2001)および(Lewin, A. et al., 2001)に記載されている。

20

【0192】

薬学的組成物調製用のおよび診断剤としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性および設計は、それぞれ、同様の作用機序に基づいている。基本的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、塩基相補性に基づいて、標的RNA、好ましくはmRNAにハイブリダイズし、それによってRNaseHが活性化される。RNaseHは、ホスホジエステル結合DNAおよびホスホロチオエート結合DNAの両方によって活性化される。しかしながら、ホスホロチオエート結合DNAを除き、ホスホジエステル結合DNAは細胞ヌクレアーゼによって急速に分解される。これらの耐性のある非天然DNA誘導体はRNAとハイブリダイゼーションしてもRNaseHを阻害しない。言い換えると、アンチセンスポリヌクレオチドはDNA RNAハイブリッド複合体としてのみ有効である。この種のアンチセンスオリゴヌクレオチドの例は、特に、米国特許第5,849,902号および同第5,989,912号に記載されている。言い換えると、適切なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的分子の核酸配列、本件では、本発明による抗原およびその断片の核酸分子の核酸配列に基づいて、原則的に、それぞれの核酸配列を推定することができる標的タンパク質から、または、核酸配列、特に、mRNAを知ることによって塩基相補性の原理に基づいて設計することができる。

30

【0193】

短いホスホロチオエートDNA配列(3~9塩基)を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドが特に好ましい。細菌RNaseHの活性化には最低3個のDNA塩基が必要であり、哺乳動物RNaseH活性化には最低5個の塩基が必要である。これらキメラオリゴヌクレオチドでは、RNaseH基質を形成する中心領域と、RNaseH基質を形成しない改変ヌクレオチドからなるハイブリダイズ「アーム」が隣接している。キメラオリゴヌクレオチドのハイブリダイズアームは、例えば、2'-O-メチルまたは2'-フルオロによって改変されていてもよい。代替のアプローチでは、アームにメチルホスホネート結合またはホスホルアミダート結合が用いられた。本発明の実施に有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドのさらなる態様は、P-メトキシオリゴヌクレオチド、部分P-メトキシオリゴデオキシリボヌクレオチド、またはP-メトキシオリゴデオキシリボヌクレオチドである。

40

【0194】

50

本発明に特に関連し、かつ有用なものは、前述の2つの米国特許においてさらに具体的に説明されるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは天然の5'=>3'連結ヌクレオチドを含有しない。もっと正確に言うと、これらのオリゴヌクレオチドは、2タイプのヌクレオチド:RNaseHを活性化する2'-デオキシホスホロチオエート、およびRNaseHを活性化しない2'改変ヌクレオチドを有する。2'改変ヌクレオチド間の連結は、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、またはP-エトキシホスホジエステルでもよい。RNaseHの活性化は、連続したRNaseH活性化領域によって達成される。RNaseH活性化領域は、細菌RNaseHの活性化には3~5個の2'-デオキシホスホロチオエートヌクレオチドを含み、真核生物、特に、哺乳動物RNaseHの活性化には5~10個の2'-デオキシホスホロチオエートヌクレオチドを含む。分解からの保護は、5'末端塩基および3'末端塩基を高度にヌクレアーゼ耐性にし、任意で、3'末端ブロック基を配置することによって達成される。

【0195】

より具体的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'末端および3'末端;ならびに2'改変ホスホジエステルヌクレオチドおよび2'改変P-アルキルオキシホスホトリエステルヌクレオチドからなる群より独立して選択される、位置11~59の5'=>3'連結ヌクレオチドを含む。ここで、5'末端ヌクレオチドは、3~10個の連続したホスホロチオエート連結デオキシリボヌクレオチドのRNaseH活性化領域に取り付けられ、前記オリゴヌクレオチドの3'末端は、逆位デオキシリボヌクレオチド、1~3個のホスホロチオエート2'改変リボヌクレオチドの連続した配列、ピオチン基、およびP-アルキルオキシホスホトリエステルヌクレオチドからなる群より選択される。

【0196】

5'末端ヌクレオチドがRNaseH活性化領域に取り付けられていないが、3'末端ヌクレオチドが上記の通りであるアンチセンスオリゴヌクレオチドも使用することができる。また、前記オリゴヌクレオチドの3'末端ではなく5'末端が特定の基から選択される。

【0197】

本発明による核酸ならびにポリペプチドは、多様な態様において、薬学的組成物、特に、ワクチンとして、または薬学的組成物、特に、ワクチンの調製に使用することができる。好ましくは、このような薬学的組成物、好ましくは、ワクチンは、クレブシエラ属の種、好ましくは、病原性クレブシエラ属、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによって引き起こされる、またはこれらに関する、またはこれらと関連する疾患の予防用または治療用の薬学的組成物である。本発明の別の局面は、個体、特に、哺乳動物における免疫応答を誘導する方法に関する。前記方法は、抗体を産生して、前記微生物による感染症から個体を守るのに十分な、多様な態様における本発明によるポリペプチドまたはその断片もしくは変種を個体に接種する工程を含む。

【0198】

本発明のさらに別の局面は、個体における免疫応答の誘導方法に関する。前記方法は、疾患が既に個体において確立しているかどうかに関係なく、免疫応答を誘導して、抗体を産生するか、またはサイトカイン産生T細胞もしくは細胞傷害性T細胞いずれかの細胞性T細胞応答を生じさせて、疾患から個体を守るために本発明によるポリペプチドをインビボで発現するための、本発明による核酸分子、好ましくは、多様な態様における抗原およびその断片を機能的にコードする核酸分子を、遺伝子療法または他の方法を介して送達する工程を含む。遺伝子を投与方法の1つは、粒子上のコーティングとして、または他の方法により、遺伝子を加速して望ましい細胞の中に入れる方法である。

【0199】

本発明のさらなる局面は、免疫応答を誘導することができる宿主または免疫応答を誘導したことがある宿主に導入されると、このような宿主において免疫応答を誘導する免疫学的組成物に関する。ここで、前記組成物は、多様な態様における本発明によるポリペプチドの少なくとも1つをコードおよび発現する組換えDNAを含む。免疫応答は治療または予防

10

20

30

40

50

に用いられてもよく、抗体免疫、または細胞性免疫、例えば、CTLもしくはCD4+T細胞を生じる細胞性免疫の形をとってもよい。

【0200】

本発明によるポリペプチドは、多様な態様では、それ自体では抗体を産生できないが、第1のタンパク質を安定化し、免疫原性および防御特性を有する融合タンパク質を産生することができる共タンパク質と融合することができる。この融合組換えタンパク質は、好ましくは、抗原性のある共タンパク質、例えば、タンパク質を可溶化し、その産生および精製を容易にする比較的大きな共タンパク質であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)またはガラクトシダーゼをさらに含む。さらに、共タンパク質は、免疫系を全身刺激するという意味ではアジュバントとしても作用することができる。共タンパク質は、第1のタンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれに取り付けられてもよい。

10

【0201】

本明細書に記載のクレブシエラ属の任意の種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の動物モデルでの、このような遺伝子による免疫化実験において、多様な態様における本発明による核酸分子を使用する方法も本発明により提供される。このような分子は、特に、予防的免疫応答または治療的免疫応答を引き起こすことができるタンパク質エピトープを同定するのに有用である。このアプローチを用いると、哺乳動物、特に、ヒトにおける、本明細書に記載のクレブシエラ属の種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカの予防剤または治療法を開発するために、感染症に抵抗または感染症を排除することに成功した動物の必須の臓器から、特に価値のあるモノクローナル抗体を後で調製することが可能になる。

20

【0202】

多様な態様における本発明によるポリペプチドは、例えば、損傷した組織への細菌の付着をブロックすることによって細菌の侵入を防ぐ特異的抗体を産生するために宿主へのワクチン接種用の抗原として使用することができる。組織損傷およびこのように損傷した組織の例には、皮膚または結合組織および粘膜組織での創傷、例えば、ウイルス感染(特に、呼吸器感染、例えば、インフルエンザ)、機械的損傷、化学的損傷もしくは熱による損傷、または留置装置の埋め込みによって引き起こされる創傷、あるいは粘膜、例えば、口、乳腺、尿道、もしくは膣での創傷が含まれる。

30

【0203】

本発明はまた、多様な態様における本発明によるポリペプチドの1つまたはいくつかと、1つもしくは複数の適切な担体および/または賦形剤を含むワクチン製剤も含む。本発明において有用な薬学的に許容される担体および/または賦形剤は従来のものであり、緩衝剤、安定剤、希釈剤、防腐剤、および可溶化剤を含んでもよい。Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)は、本明細書において開示した(ポリ)ペプチドの薬学的送達に適した組成物および製剤について述べている。一般的に、担体または賦形剤がどういったものであるかは、使用されている特定の投与方法に左右される。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとして薬学および生理学的に許容される液体、例えば、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどを含む注射液を含む。固体組成物(例えば、散剤、丸剤、錠剤、またはカプセルの形)の場合、従来の無毒の固体担体は、例えば、薬品用のマンニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムを含んでもよい。生物学的に中性の担体に加えて、投与しようとする薬学的組成物は、微量の無毒の補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、防腐剤、およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートを含むしてもよい。

40

【0204】

50

本発明によるポリペプチドは胃の中で分解されることがあるので、好ましくは、非経口投与される。非経口投与には、例えば、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、皮内投与、鼻腔内投与、または経皮投与が含まれる。非経口投与に適した製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を個体の体液、好ましくは、血液と等張にする溶質を含有してもよい、水性または非水性の滅菌注射溶液；ならびに懸濁剤または増粘剤を含んでもよい、水性および非水性の滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量または複数用量の容器、例えば、密封アンプルおよびバイアルに入れて提供されてもよく、使用の直前に滅菌液体担体の添加のみ必要とする凍結乾燥状態で保存されてもよい。ワクチン製剤は、製剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系、例えば、当技術分野において公知の水中油型系および他の系を含んでもよい。投与量はワクチンの比活性に左右され、日常的な実験によって容易に決定することができる。

10

【0205】

別の局面によれば、本発明は、本明細書に記載の様々なクレブシエラ属の種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカの、多様な態様における本発明によるポリペプチドの1つまたはいくつかを含む薬学的組成物に関する。このような薬学的組成物は、前記クレブシエラ属の種に対する前記ポリペプチドの1つ、好ましくは、少なくとも2つまたはそれ以上を含んでもよい。任意で、組み合わせ薬学的組成物では、このようなポリペプチドはまた、なおさらなる病原体に対する抗原と組み合わせられてもよい。好ましくは、前記の薬学的組成物は、クレブシエラ属の種、より好ましくは、病原性クレブシエラ属の種、例えば、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカ、ならびに/またはワクチンに含まれたことのある抗原を有する他の病原体によって引き起こされる感染症を予防または治療するためのワクチンである。

20

【0206】

さらなる局面によれば、本発明は、本発明による核酸分子を含む薬学的組成物に関する。このような薬学的組成物は、本発明によるポリペプチドをコードする本発明による核酸分子の1つまたは複数を含んでもよい。任意で、本発明によるポリペプチドをコードするこのような核酸分子は、組み合わせ薬学的組成物では、他の病原体に対する抗原をコードする核酸分子と組み合わせられる。好ましくは、前記の薬学的組成物は、クレブシエラ属の種、より好ましくは、本明細書において開示される病原性クレブシエラ属の種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌もしくはK.オキシトカ、ならびに/またはワクチンに含まれたことのある抗原を有する他の病原体によって引き起こされる感染症を予防または治療するためのワクチンである。

30

【0207】

薬学的組成物は、任意の適切な補助物質、例えば、緩衝剤物質、安定剤、またはさらなる活性成分、特に、薬学的組成物および/もしくはワクチンの製造と関連することが知られている成分を含有してもよい。

40

【0208】

好ましい態様では、薬学的組成物は、免疫賦活物質、例えば、アジュバントをさらに含む。アジュバントは投与方法に基づいて選択することができ、ポリカチオン物質、特に、ポリカチオンペプチド、免疫賦活性核酸分子、好ましくは、免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、特に、オリゴ(dIdC)₁₃、少なくとも2個のLysLeuLysモチーフを含有するペプチド、特に、ペプチド

KLKLLLLLKLK

、ミョウバン、鉱油をベースとするアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバント、神経刺激性化合物、特に、ヒト成長ホルモン、ま

50

たは前述のアジュバントの1つもしくは複数の任意の組み合わせを含んでもよい。他の適切なアジュバントは、Montanide Seppic不完全アジュバント、例えば、ISA、水中油型エマルジョンアジュバント、例えば、Ribiアジュバント系、syntaxムラミルジペプチド含有アジュバント製剤、もしくはアルミニウム塩アジュバント、またはその組み合わせからなる群より選択されてもよい。好ましくは、アジュバントは、IC31(登録商標)(InterCell;W002/32451に記載のペプチドモチーフKLKを含む合成アジュバント、およびW001/93905に記載のオリゴヌクレオチド)である。

【0209】

本発明において使用する「オリゴ(dIdC)₁₃」という用語は、ホスホジエステルで置換された、13個のデオキシ(イノシン-シトシン)モチーフを含有する一本鎖ODNを意味し、[オリゴ-d(IC)₁₃]という用語によっても定義される。正確な配列は、
5'-dIdCdIdCdIdCdIdCdIdCdIdCdIdCdIdCdIdCdIdCdIdCdIdC-3'

である。オリゴ(dIdC)₁₃は、例えば、W001/93903およびW001/93905に記載のように、(オリゴ-dIC₂₆);オリゴ-dIC_{26-mer};オリゴ-デオキシIC_{26-mer};またはオリゴ-dIC_{26-mer}という用語によっても定義することができる。

【0210】

薬学的組成物、特に、ワクチンは、多様な態様における本発明によるポリペプチドの1つもしくはいくつか、および/または本発明によるそのコードする核酸分子に加えて、生物学的または薬学的に活性のある他の化合物を含むことも本発明の範囲内である。好ましくは、ワクチン組成物は、少なくとも1種類のポリカチオンペプチドを含む。本発明に従って用いられるポリカチオン化合物は、W097/30721に従って特徴的な効果を示す任意のポリカチオン化合物でもよい。好ましいポリカチオン化合物は、塩基性ポリペプチド、有機ポリカチオン、塩基性ポリアミノ酸、またはその混合物より選択される。これらのポリアミノ酸は、少なくとも4個のアミノ酸残基(W097/30721)の鎖長を有しなければならない。特に好ましいのは、ポリリジン、ポリアルギニン、および8個超、特に、20個超の範囲のアミノ酸残基において20%超、特に、50%超の塩基性アミノ酸を含有するポリペプチドのような物質、またはその混合物である。好ましい他のポリカチオンおよびその薬学的組成物はW097/30721(例えば、ポリエチレンジイミン)およびW099/38528に記載されている。好ましくは、これらのポリペプチドは、20~500個のアミノ酸残基、特に、30~200個の残基を含む。

【0211】

これらのポリカチオン化合物は化学的にまたは組換えによって作製されてもよく、天然供給源に由来してもよい。

【0212】

カチオン(ポリ)ペプチドは、(Ganz, T., 1999)に概説されている性質を有する抗菌剤でもよい。これらの(ポリ)ペプチドは原核生物または動物または植物に由来してもよく、化学的にまたは組換えによって作製されてもよい(W002/13857)。ペプチドはまたデフェンシンのクラスに属するものでもよい(W002/13857)。このようなペプチドの配列は、例えば、以下のインターネットアドレス:<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag2.html>のAntimicrobial Sequence Databaseにおいて見られる。

【0213】

このような宿主防御ペプチドまたは防御物質(defensives)もまた本発明によるポリカチオンポリマーの好ましい形である。一般的に、最終産物として、適応免疫系、好ましくは、APC(樹状細胞を含む)によって媒介される適応免疫系の活性化(またはダウンレギュレーション)を可能とする化合物がポリカチオンポリマーとして用いられる。

【0214】

本発明におけるポリカチオン物質として使用するのに特に好ましいのは、カテリシジンに由来する抗菌ペプチドまたはその誘導体(参照により本明細書に組み入れられる、国際特許出願W002/13857)、特に哺乳動物カテリシジン由来の抗菌ペプチド、好ましくはヒト

10

20

30

40

50

、ウシまたはマウス由来の抗菌ペプチドである。

【0215】

天然供給源由来のポリカチオン化合物には、HIV-REVまたはHIV-TAT(HIV-REVまたはHIV-TATに由来するカチオンペプチド、アンテナペディアペプチド、キトサンまたは他のキチン誘導体)、あるいはこれらのペプチドまたはタンパク質に由来する、生化学的にまたは組換えによって作製された他のペプチドが含まれる。他の好ましいポリカチオン化合物は、カテリン(cathelin)またはカテリンに関連または由来する物質である。例えば、マウスカテリンはアミノ酸配列

NH₂-RLAGLLRKGGEKIGEKLLKKIGOKIKNFFQKLVPQPE-COOH

10

を有するペプチドである。関連するまたは由来するカテリン物質は、少なくとも15~20個のアミノ酸残基を有するカテリン配列の全部または一部を含む。誘導には、20種類の標準アミノ酸以外のアミノ酸による天然アミノ酸の置換または改変が含まれ得る。さらに、さらなるカチオン性残基を、このようなカテリン分子に導入することができる。これらのカテリン分子は、抗原と組み合わせることが好ましい。これらのカテリン分子は、驚くべきことに、さらなるアジュバントを添加しなくても抗原のアジュバントとして有効であることも判明している。従って、さらなる免疫活性化物質とともに、またはそれをとまわずに、ワクチン製剤中に有効なアジュバントとしてこのようなカテリン分子を使用することができる。

【0216】

20

本発明に従って用いられる別の好ましいポリカチオン物質は、3~7個の疎水性アミノ酸のリンカーによって分けられた少なくとも2個のKLKモチーフを含有する合成ペプチドである(参照により本明細書に組み入れられる、国際特許出願WO02/32451)。

【0217】

本発明の薬学的組成物は免疫賦活性核酸をさらに含んでもよい。免疫賦活性核酸は、例えば、中性または人工のCpG含有核酸、非脊椎動物に由来する短い核酸配列、または非メチル化シトシン-グアニンジ-ヌクレオチド(CpG)をある特定の塩基の状況で含有する短いオリゴヌクレオチド(ODN)の形である(例えば、WO96/02555に記載)。または、例えば、WO01/93903に記載のイノシンおよびシチジンに基づく核酸、またはデオキシ-イノシンおよび/またはデオキシウリジン残基を含有するデオキシ核酸(参照により本明細書に組み入れられる、WO01/93905およびWO02/095027に記載)もまた、好ましくは、本発明に関連する免疫賦活性核酸として使用することができる。好ましくは、異なる免疫賦活性核酸の混合物を本発明に従って使用することができる。

30

【0218】

前述の任意のポリカチオン化合物が前述の任意の免疫賦活性核酸と組み合わせられることもまた、本発明の範囲内である。好ましくは、このような組み合わせは、参照により本明細書に組み入れられるWO01/93905、WO02/32451、WO01/54720、WO01/93903、WO02/13857、WO02/095027、およびWO03/047602に記載のものに従う。

【0219】

さらに、またはその代わりとして、このようなワクチン組成物は、本発明によるポリペプチド、および本発明による核酸分子、好ましくは、本発明によるコード核酸分子に加えて、神経刺激性化合物を含んでもよい。好ましくは、神経刺激性化合物は、例えば、WO01/24822に記載のヒト成長因子である。また好ましくは、神経刺激性化合物は、前述の任意のポリカチオン化合物および/または免疫賦活性核酸と組み合わせられる。

40

【0220】

また、本発明による薬学的組成物は、以下の化合物:本発明による核酸分子、多様な態様における本発明によるポリペプチド、本発明によるベクター、本発明による細胞、本発明による抗体、本発明による機能的核酸、および本発明による結合ペプチド、例えば、アンチカリンおよび高親和性結合ペプチドおよびペプチドアダプター、本発明による任意のアゴニストおよびアンタゴニスト、好ましくは、本明細書に記載のようにスクリーニング

50

されたアゴニストおよびアンタゴニストの少なくともいずれか、またはその組み合わせを含む薬学的組成物である。これに関連して、これらの化合物はいずれも、細胞、組織または生物と使用するために非滅菌担体または滅菌担体、例えば、被験体への投与に適した薬学的担体と組み合わせて使用することができる。このような組成物は、例えば、培地添加物または治療的有効量の本発明の抗原およびその断片、ならびに薬学的に許容される担体または賦形剤を含む。このような担体には、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびその組み合わせが含まれ得るが、これに限定されない。製剤は投与方法に適合しなければならない。

【0221】

組成物は、例えば、被験体を免疫化または治療するのに使用することができる。薬学的組成物は、本発明のペプチドの少なくとも1つを含む。しかしながら、薬学的組成物はまた、本発明の様々なペプチド(断片および他の変種を含む)を含有し、任意で、他の病原体の様々な抗原性のタンパク質またはペプチドと混合したカクテル(すなわち、単一混合物)も含有してよい。これらのペプチド、ポリペプチド、タンパク質またはその断片もしくは変種のこのような混合物は、例えば、広域クレブシエラ属分離株に対する望ましい抗体の作製において有用である。本発明のペプチドはまた、薬学的に許容される塩の形で使用することができる。本発明のペプチドと塩を形成することができる適切な酸および塩基は当業者に周知であり、無機および有機の酸および塩基を含む。

10

【0222】

本発明のさらに別の局面は、以下:

20

- (i) 本発明の核酸および/またはそれに相補的な核酸からなる群より選択される核酸、ならびに
- (ii) 任意で、薬学的に許容される担体または賦形剤を含有する薬学的組成物である。

【0223】

核酸配列は単独で、あるいは他の病原性微生物の抗原または他の病原性微生物に対する抗体をコードする他の核酸配列と組み合わせて、薬学的組成物の成分としてさらに使用することができる。組成物は、クレブシエラ属による感染症、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによって引き起こされる疾患を有するヒトおよび/または動物を免疫化または治療するのに使用することができる。薬学的に許容される担体または賦形剤は前記で定義したものでよい。

30

【0224】

別の態様では、本発明の核酸配列は単独で、または他の病原性微生物に由来する他の抗原または抗体をコードする核酸配列と共に、被験体内で病原体に対する防御免疫応答を能動的に誘導するよう向けられた組成物において、さらに使用することができる。本発明のこれらの成分は、ヒトおよび/または動物において、クレブシエラ属、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症に対する防御免疫応答を誘導する方法において有用である。

40

【0225】

治療用組成物またはワクチン組成物の調製において使用する場合、核酸送達のための組成物および方法が有用であり、当業者に公知である。本発明の核酸は、本発明の方法または本明細書に記載の組成物において、裸のDNAとして投与されるDNA配列として、または薬学的に許容される担体と結合したDNA配列として用いられてもよく、抗原、ペプチド、またはポリペプチドのインビボ発現をもたらす。いわゆる「裸のDNA」は、患者においてインビボで本発明の抗原、ペプチド、またはポリペプチドを発現させるために使用することができる(「裸のDNA」の類似の使用について述べている、例えば、Cohen, J., 1993を参

50

照されたい)。例えば、調節配列と結合した「裸のDNA」を、例えば、注射によって、治療のために、またはワクチン組成物の一部として投与することができる。

【0226】

または、本発明の抗原もしくはペプチドをコードする核酸またはそれに相補的な核酸は、本発明の抗原またはペプチドまたはポリペプチドをインビボで発現させるために、例えば、抗体を誘導するために、薬学的組成物と共に使用することができる。

【0227】

本発明の好ましい態様は、本発明による核酸がベクターおよび/または細胞の中に含まれる薬学的組成物に関する。本発明の文脈において適切なベクターおよび細胞は前述されている。ベクターは、特に、DNAワクチンに用いられる。送達に適したベクターは当業者により容易に選択することができる。インビボ遺伝子送達用の例示的なベクターは様々な学術的および商業的な供給元から容易に入手可能であり、例えば、アデノ随伴ウイルス(国際特許出願番号PCT/US91/03440)、アデノウイルスベクター(Kay, M. et al., 1994; Ishibashi, S. et al., 1993)、または別のウイルスベクター、例えば、様々なポックスウイルス、ワクシニアなどを含む。細胞染色体に外因性DNAを組み込むには、組換えウイルスベクター、例えば、レトロウイルスまたはアデノウイルスが好ましい。

10

【0228】

本発明の薬学的組成物は、例えば、特に、局所経路、経口経路、肛門経路、腔経路、静脈内経路、腹腔内経路、筋肉内経路、皮下経路、鼻腔内経路、気管内経路または皮内経路による投与を含む、任意の有効な従来やり方で投与することができる。

20

【0229】

療法において、または予防薬として、本発明の薬学的組成物の活性薬剤は、注射用組成物として、例えば、滅菌水性分散液、好ましくは、等張性の滅菌水性分散液として個体に投与することができる。

【0230】

または、組成物、好ましくは、薬学的組成物は、局所塗布用に、例えば、軟膏、クリーム、ローション剤、眼軟膏、点眼薬、点耳剤、口内洗浄剤、含浸処理した包帯および縫合糸、ならびにエアゾール剤の形で処方されてもよく、例えば、防腐剤、薬物浸透を助ける溶媒、ならびに軟膏およびクリームに含まれる軟化薬を含む適切な従来添加物を含んでもよい。このような局所製剤はまた、適合性の従来担体、例えば、クリームまたは軟膏の基剤、ローション剤の場合はエタノールまたはオレイルアルコールを含んでもよい。このような担体は、製剤の約1%~約98重量%を構成してもよく、より通常は、製剤の約80重量%までを構成する。

30

【0231】

上記の療法に加えて、本発明の組成物は、一般的に、創傷組織内の曝露したマトリックスタンパク質に細菌が付着するのを防ぐ創傷治療剤として、および歯科治療における予防的使用のために抗生物質予防法の代替としてまたは抗生物質予防法と共に使用することができる。

【0232】

好ましい態様では、薬学的組成物はワクチン組成物である。好ましくは、このようなワクチン組成物は、都合よく、注射液の形をとっている。免疫応答を高めるために、従来アジュバントを使用することができる。タンパク質抗原をワクチン接種するのに適した単位用量は、成人の場合、0.02~3 μ g抗原/kg体重、小児の場合、0.2~10 μ g抗原/kg体重であり、このような用量は、好ましくは、1~3回、2~24週間の間隔をあけて投与される。

40

【0233】

本発明の抗原、核酸、ベクター、抗体、または薬学的組成物の「有効量」または「治療的有效量」は、インビボで効果を示すことができる量、例えば、クレブシエラ属、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の徴候または症状を予防または寛解することが

50

できる量として計算することができる。このような量は当業者によって決定することができる。

【0234】

指示された用量の範囲であれば、適切な個体への投与を妨げる毒性有害作用は本発明の化合物で予想されない。

【0235】

さらなる態様では、本発明は、上述の本発明の組成物の成分の1つまたは複数が充填された1つまたは複数の容器を備える診断用および薬品用のパックおよびキットに関する。前記の成分は、有用な量、投与量、処方、または組み合わせで存在してもよい。このような容器には、薬品または生物学的製品の調製、使用、または販売を規制する政府機関によって定められた形式で、ヒト投与のための製品の調製、使用または販売が政府機関によって許可されたことを示す貼り紙が添付されてもよい。

10

【0236】

本発明に関して、本明細書において開示される使用、例えば、薬学的組成物またはワクチンの使用に関連する疾患は、クレブシエラ属、より好ましくは、病原性クレブシエラ属の任意の種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによって引き起こされる、またはこれらに関する、またはこれらと関連する疾患または疾患状態である。本発明に従って予防および/または治療しようとする、細菌感染に関する、または細菌感染によって引き起こされる、または細菌感染に関連する疾患には、院内感染が含まれる。よく見られる部位には、尿路、下気道、胆道、および手術創部位が含まれる。この範囲の臨床的症候群には、肺炎、菌血症、血栓静脈炎、尿路感染症(UTI)、胆嚢炎、下痢、上気道感染症、創傷感染症、骨髄炎、および髄膜炎が含まれる。

20

【0237】

生物、例えば、任意の動物またはヒトと、クレブシエラ属の種、より好ましくは、病原性クレブシエラ属の種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカとの接触に直接的または間接的に関連または起因する、本明細書に記載の症状、疾患、障害、または症候群がそれぞれ、またはいずれも、別々におよび独立して、本発明の意味での適応症、疾患、または障害であることは本発明の範囲内である。従って、および単なる例示として、本願の意味での疾患は、敗血症ならびに髄膜炎および骨髄炎である。

30

【0238】

本明細書に記載の様々な化合物を使用することができる疾患はまた、本発明によるポリペプチドが発現している疾患、または本明細書に記載の化合物、例えば、本発明によるポリペプチド、ワクチン、抗体、ならびに任意のアプタマーおよびスピーゲルマーがそれぞれ治療および/またはその診断に適している任意の疾患であることは本発明の範囲内である。このような潜在的な使用は、交差反応性および相同性からそれぞれ生じてもよい。本発明による薬学的組成物に関して述べられたいずれの疾患も本明細書に記載の薬学的組成物を使用することができ、逆もまた同じであることが当業者に理解される。

40

【0239】

本発明の文脈における治療とは、治療と、予防的処置または防止的処置の両方を指す。ここで、目的は、標的とする病的状態または障害を予防または減速(緩和)することである。治療を必要とする人には、すでに障害がある人、ならびに障害を起こしやすい人、または障害を予防しようとする人が含まれる。

【0240】

なおさらなる態様では、本発明は、本発明による任意のポリペプチドまたは本発明による任意の核酸を用いたスクリーニング方法に関する。このようなスクリーニング方法は当業者に公知であり、アゴニストまたはアンタゴニストがスクリーニングされるように設計

50

することができる。このようなスクリーニング方法に関して、好ましくは、本件では、本発明による任意の抗原およびその断片と相互作用パートナーとの結合を阻害または阻止するアンタゴニストがスクリーニングされる。このような相互作用パートナーは天然の相互作用パートナーでもよく、非天然の相互作用パートナーでもよい。

【0241】

本発明はまた、本発明によるポリペプチドまたは本発明の核酸分子の機能、例えば、結合分子との相互作用を増強するもの(アゴニスト)または阻害するもの(アンタゴニスト)を同定するための化合物スクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法はハイスループットを伴ってもよい。

【0242】

例えば、アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするために、本発明による核酸分子および核酸の相互作用パートナーは、合成反応混合物、細胞区画、例えば、膜、細胞エンベロープもしくは細胞壁、または、そのいずれかの調製物でもよく、本発明によるポリペプチドに結合する分子を発現する細胞から調製されてもよい。調製物を、アゴニストまたはアンタゴニストでもよい候補分子の非存在下または存在下で、標識された形のこのようなポリペプチドと共にインキュベートする。候補分子が結合分子に結合する能力は、標識リガンドの結合の減少に反映される。無報酬で結合する分子、すなわち、前記ポリペプチドの機能効果を誘導することなく結合する分子は、良好なアンタゴニストである可能性が最も高い。良好に結合し、本発明によるポリペプチドと同じまたは密接に関連する機能効果を誘発する分子は、良好なアゴニストである。

【0243】

潜在的なアゴニストおよびアンタゴニストの機能効果は、例えば、候補分子と細胞または適切な細胞調製物が相互作用した後にレポーター系の活性を求め、その効果と、本発明によるポリペプチドまたは前記ポリペプチドと同じ効果を誘発する分子の効果を比較することによって測定できる。これに関して有用であり得るレポーター系には、生成物に変換される比色用標識基質、本発明によるポリペプチドの機能活性の変化に应答するレポーター遺伝子、および当技術分野において公知の結合アッセイが含まれるが、これに限定されない。

【0244】

アンタゴニストのアッセイの別の例は競合アッセイである。競合アッセイは、本発明によるポリペプチドおよび潜在的なアンタゴニストと、膜結合型結合分子、組換え結合分子、天然の基質もしくはリガンド、または基質模倣物もしくはリガンド模倣物とを、競合阻害アッセイに適した条件下で組み合わせるものである。潜在的なアンタゴニストの有効性を評価するために、本発明によるポリペプチドが結合分子に結合した分子数または生成物に変換した分子数を正確に求めることができるように、本発明によるポリペプチドは、例えば、放射能または比色化合物によって標識することができる。

【0245】

潜在的なアンタゴニストには、本発明によるポリペプチドに結合し、それによって、その活性を阻害または消失させる、有機低分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。潜在的なアンタゴニストはまた、本発明によるポリペプチドの機能的活性を誘導することなく結合分子の同じ部位に結合する、有機低分子、ペプチド、ポリペプチド、例えば、密接に関連するタンパク質または抗体でもよい。

【0246】

潜在的なアンタゴニストには、本発明によるポリペプチドの結合部位に結合し、結合部位を占有して、正常な生物学的活性が阻止されるように細胞結合分子との結合を妨げる低分子が含まれる。低分子の例には、有機低分子、ペプチドまたはペプチド様分子が含まれるが、これに限定されない。

【0247】

他の潜在的なアンタゴニストにはアンチセンス分子が含まれる(これらの分子の説明については、(Okano, H. et al., 1991); OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITOR

10

20

30

40

50

S OF GENE EXPRESSION; CRC Press, Boca Raton, FL (1988)を参照されたい)。

【0248】

好ましい潜在的なアンタゴニストには、本発明の抗原およびその断片の誘導体が含まれる。

【0249】

本明細書で使用する、本発明によるポリペプチドの活性は、その任意の相互作用パートナーと結合する能力、またはそのもしくはは任意の相互作用パートナーに結合する、このような能力の程度である。

【0250】

特定の局面において、本発明は、i)哺乳動物細胞外マトリックスタンパク質への、本明細書において開示されるクレブシエラ属の種、より好ましくは、その病原性種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカの付着の阻止;ii)哺乳動物細胞外マトリックスタンパク質と、組織反応を媒介する細菌タンパク質との細菌付着のブロック;iii)免疫防御の回避;iv)留置装置移植または他の外科法以外の方法によって、例えば、栄養分の獲得を阻害することによって惹起される感染症における発病の通常進行のブロックにおいて使用することができる。

10

【0251】

本明細書において提供されるDNAコード配列はそれぞれ、抗菌化合物の発見、開発、および/または調製において使用することができる。コードされているタンパク質は発現すると、抗細菌薬スクリーニングの標的として使用することができる。さらに、コードされているタンパク質のアミノ末端領域をコードするDNA配列、またはそれぞれのmRNAのShine-Delgarno配列もしくは他の翻訳促進配列を用いて、関心対象のコード配列の発現を制御するアンチセンス配列を構築することができる。

20

【0252】

アンタゴニストおよびアゴニストは、例えば、クレブシエラ属の種、特に、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカから生じた疾患を阻害するのに用いられてもよい。

30

【0253】

なおさらなる局面では、本発明は親和性装置に関する。このような親和性装置は、少なくとも、支持体材料および支持体材料に取り付けられた本発明による任意のポリペプチドを含む。前記ポリペプチドには、その標的細胞または標的分子またはその相互作用パートナーに対して特異性があるので、前記ポリペプチドを用いると、結合条件が合えば、支持体材料に適用された任意の種類を試料から相互作用パートナーを選択的に取り出すことができる。試料は生物学的試料または医学的試料でよい。試料には、発酵プロス、細胞細片、細胞調製物、組織調製物、臓器調製物、血液、尿、リンパ液、羊水などが含まれるが、これに限定されない。

【0254】

本発明によるポリペプチドは、共有結合によりマトリックスに取り付けられてもよく、非共有結合によりマトリックスに取り付けられてもよい。適切な支持体材料は当業者に公知であり、セルロース、ケイ素、ガラス、アルミニウム、常磁性ビーズ、デンブロン、およびデキストランを含む群より選択することができる。

40

【0255】

本発明は、以下の図面、表、実施例および配列表によってさらに説明され、これらからさらなる特徴、態様、および利点を理解することができる。本実施例は例示に過ぎず、開示を限定するものではないことが理解されるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0256】

50

【図1】病原体特異的抗体の特異性としてのヒト血清の特徴付けを示す。

【図2】ライブラリーの特徴付けを示す。

【図3】ビオチン化ヒトIgGを用いたMACSによる細菌細胞の選択を示す。

【図4】それぞれの細菌病原体の臨床分離株における選択された抗原の遺伝子分布を求めるPCR分析を示す。

【図5】マウスにおいて作製されたエピトープ血清を用いた表面染色の例を示す。

【図6A】アジュバントとしてCFA/IFAを使用した時に、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いた能動免疫によって付与された防御を示す。

【図6B】アジュバントとしてCFA/IFAを使用した時に、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いた能動免疫によって付与された防御を示す。

【図6C】アジュバントとしてCFA/IFAを使用した時に、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いた能動免疫によって付与された防御を示す。

【図6D】アジュバントとしてCFA/IFAを使用した時に、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いた能動免疫によって付与された防御を示す。

【図6E】アジュバントとしてCFA/IFAを使用した時に、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いた能動免疫によって付与された防御を示す。

【図7】アジュバントとしてミョウバンを使用した時に、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いた能動免疫によって付与された防御を示す。

【図8】アジュバントとしてIC31(登録商標)を使用した時に、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いた能動免疫によって付与された防御を示す。

【図9】マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原に対して産生されたポリクローナルウサギ血清を用いた受動免疫によって付与された防御を示す。

【発明を実施するための形態】

【0257】

本明細書において言及され得る図面および表を以下でさらに詳細に説明する。

【0258】

図1は、免疫アッセイによって肺炎桿菌特異的抗体を測定することによるヒト血清の特徴付けを示す。IgG抗体の総レベルを標準ELISAによって測定した。(A)肺炎桿菌Mich61株およびその莢膜陰性変異体から調製した総細菌溶解産物。(B)肺炎桿菌708株およびその莢膜陰性変異体から調製した総細菌溶解産物。健康個体および敗血症患者からの血清試料を、2種類の血清希釈(1:1,000および1:5,000)で分析した。P3536.2、P3495.2、およびP3533.2は、病気から回復した後に患者から得た回復期血清であった。1:1,000に血清希釈した4種類のプールの選択された血清の結果を示した。

【0259】

図2(A)は、pMAL4.31の中に入れた肺炎桿菌小断片ゲノムライブラリー-KPL50の断片サイズ分布を示す。ランダムに選択したクローンを配列決定した後、ベクター残基を無くすために配列を刈り込み(476)、様々なゲノム断片サイズを有するクローンの数をプロットした。(B)は、pMAL4.31の中に入れた肺炎桿菌大断片ゲノムライブラリー-KPF300の断片サイズ分布を示す。ランダムに選択したクローンの配列を刈り込み(425)、様々なゲノム断片サイズを有するクローンの数をプロットした。

【0260】

図3(A)は、敗血症患者からの血清を用いたビオチン化ヒトIgGプールによるMACS選択を示す。pMAL9.1の中に入れたKPL50ライブラリーを、10~20 μ gのビオチン化IgGを用いてスクリーニングした。負の対照として、スクリーニング用のライブラリー細胞に血清を添加しなかった。溶出後に選択された細胞の数を示した。(B)は、イムノプロット分析によって分析された時の、細菌表面ディスプレイによって選択された特異的クローン(1-20)およびWt(インサートのないpMAL9.1)と、1:3,000に希釈した、MACSによる選択に使用したヒト血清IgGプール(PKp34-IgG)との反応性を示す。星印は、クローンが陽性として検出されたことを示している。ローディング対照として、同じプロットを、1:5,000に希釈したプラットフォームタンパク質LamBに対する抗体でも分析した(データ示さず)。(C)は、敗血症

患者からの血清によるビオチン化ヒトIgGプール(PKp35-IgG)およびpHIE11の中に入れたKP F300ライブラリーを用いたMACS選択を示す。(D)は、イムノプロット分析によって分析された時の、細菌表面ディスプレイによって選択された特異的クローン(1-20)およびWt(インサートのないpHIE11)と、1:3,000に希釈した、MACSによる選択に使用したヒト血清IgGプール(PKp35-IgG)との反応性を示す。星印は、クローンが陽性として検出されたことを示している。

【0261】

図4は、1遺伝子の遺伝子分布分析のために、それぞれのオリゴヌクレオチドおよび46個の肺炎桿菌株を用いたPCR分析の一例を示す。肺炎桿菌からの抗原KPORF-54に由来するPCR断片の推定サイズは1040bpである。1-46:表2に示した株または臨床分離株;-:ゲノムDNAなし;+:肺炎桿菌MGH78578株のゲノムDNA。

10

【0262】

図5は、マウスにおいて作製されたエピトープ血清を用いた表面染色の例を示す。3種類の抗原が肺炎桿菌A5054上に効率的に表面ディスプレイされたことを示す。KPORF-28、KPORF-82、およびKPORF-02は例であり、カテゴリーは「+」,0~9%;「++」,10~35%、および「+++」,>36%である。パーセントは、免疫血清とインキュベートしなかった細胞と比較してFACS分析において変化を示した細胞の数を示す。

【0263】

図6(A)、(B)、(C)、(D)および(E)は、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いた能動免疫によって達成された防御を示す。CD-1マウス(10マウス/群)を、肺炎桿菌MGH78578株からクローニングした組換え抗原を用いて皮下免疫し、肺炎桿菌(O1:K2)B5055株を用いて抗原暴露した。抗原暴露後14日間、生存率をモニタリングした。組換えタンパク質50 μ gとアジュバントとしてCFA/IFAまたはIFAを用いて、マウスを皮下免疫した。PBSとCFA/IFAまたはIFAを用いて免疫化したマウスは負の対照として用いたのに対して、肺炎桿菌B5055溶解産物(5 μ g)を用いて免疫化したマウスは正の対照として役立った。10³CFU肺炎桿菌B5055を用いて、マウスの腹腔内に抗原暴露した。生存しているマウスの数をマウス総数のパーセントとしてプロットした。

20

【0264】

図7(A)および(B)は、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いて能動免疫によって付与された防御を示す。CD-1マウス(10マウス/群)を、肺炎桿菌MGH78578株からクローニングした組換え抗原を用いて皮下免疫し、肺炎桿菌(O1:K2)B5055株を用いて抗原暴露した。抗原暴露後14日間、生存率をモニタリングした。組換えタンパク質50 μ gとアジュバントとしてミョウバンを用いて、マウスを皮下免疫した。PBSとミョウバンを用いて免疫化したマウスは負の対照として用いたのに対して、肺炎桿菌B5055溶解産物(5 μ g)とミョウバンを用いて免疫化したマウスは正の対照として役立った。10³CFU肺炎桿菌B5055を用いて、マウスの腹腔内に抗原暴露した。生存しているマウスの数をマウス総数のパーセントとしてプロットした。

30

【0265】

図8(A)および(B)は、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原を用いた能動免疫によって付与された防御を示す。CD-1マウス(10マウス/群)を、肺炎桿菌MGH78578株からクローニングした組換え抗原を用いて皮下免疫し、肺炎桿菌(O1:K2)B5055株を用いて抗原暴露した。抗原暴露後14日間、生存率をモニタリングした。組換えタンパク質50 μ gとアジュバントとしてIC31(登録商標)を用いて、マウスを皮下免疫した。PBSとIC31(登録商標)を用いて免疫化したマウスは負の対照として用いたのに対して、肺炎桿菌B5055溶解産物(5 μ g)とIC31(登録商標)を用いて免疫化したマウスは正の対照として役立った。10³CFU肺炎桿菌B5055を用いて、マウスの腹腔内に抗原暴露した。生存しているマウスの数をマウス総数のパーセントとしてプロットした。

40

【0266】

図9(A)および(B)は、マウス致死モデルにおける、選択された肺炎桿菌抗原に対して産生されたポリクローナルウサギ血清を用いて受動免疫によって付与された防御を示す。CD

50

-1マウス(10マウス/群)を、肺炎桿菌MHG78578株からクローニングした組換え抗原に対して産生された血清を用いて腹腔内免疫し、肺炎桿菌(O1:K2)B5055株を用いて抗原暴露した。抗原暴露後14日間、生存率をモニタリングした。PBS血清を用いて免疫化したマウスは負の対照として用いたのに対して、肺炎桿菌B5055溶解産物血清(5 µg)を用いて免疫化したマウスは正の対照として役立った。10³CFU肺炎桿菌B5055を用いて、マウスの腹腔内に抗原暴露した。生存しているマウスの数をマウス総数のパーセントとしてプロットした。

【0267】

表1は、ゲノム肺炎桿菌ライブラリーおよびヒト血清を用いて行った全てのスクリーニングをまとめたものを示す。

表2は、遺伝子分布分析に使用した株を示す。

10

表3は、それぞれの細菌種の様々な株における選択された数の抗原についての遺伝子分布分析をまとめたものを示す。

表4は、ヒト血清を用いたペプチドELISAをまとめたものを示す。

表5は、マウスにおいて作製されたエピトープ血清を用いた表面染色を示す。

表6は、関心対象の遺伝子を増幅するのに使用したクレブシエラ属の種の独立した分離株を示す。

表7は、関心対象の遺伝子を増幅するのに使用したオリゴヌクレオチドの配列を示す。

表8は、KPORF-13の遺伝子保存を示す。

表9は、KPORF-21の遺伝子保存を示す。

表10は、KPORF-32の遺伝子保存を示す。

20

表11は、KPORF-37の遺伝子保存を示す。

表12は、KPORF-38の遺伝子保存を示す。

表13は、KPORF-39の遺伝子保存を示す。

表14は、KPORF-60の遺伝子保存を示す。

表15は、KPORF-65の遺伝子保存を示す。

表16は、防御実験に使用した抗原断片を示す。

【0268】

(表1)肺炎桿菌から細菌表面ディスプレイによって同定された免疫原性タンパク質

ORF	推定機能 (相同性による)	予測された 免疫原性アミノ酸*	選択 された クローン の数	スクリー ニングに おいて同定	特定された 免疫原性 領域の 位置(aa)	SeqID (DNA, タンパク 質)
KPORF-01	NADH ピロホスファターゼ	11-27, 35-47, 68-107, 113-122, 124-136, 140-146, 152-164, 168-174, 183-201, 211-218, 228-243, 246-253	2	H	180-226	17, 204
KPORF-02	乳酸グルタチオン リアーゼおよび 関連リアーゼ	13-31, 48-59, 69-91, 109-115, 121-127	2	D	46-105	18, 205
KPORF-03	ABC型 Fe ³⁺ 輸送系、 パーミアーゼ成分	12-44, 49-95, 102-145, 148-178, 184-229, 233-244, 249-273, 292-299, 304-329, 334-348, 354-365, 367-385, 394-426, 428-440, 444-487, 503-527, 531-539, 546-554, 556-584	3	A	273-286	19, 206
KPORF-04	仮説上の 転写活性化因子	7-17, 22-32, 34-41, 55-77, 79-86, 93-111, 118-126, 131-148, 152-162, 165-177, 183-197, 213-220, 234-250, 253-262, 267-294	2	G	211-269	20, 207

10

20

KPORF-05	23S rRNA ブソイドウリジル酸 シンターゼ	22-29, 41-56, 58-66, 79-88, 94-121, 124-131, 134-157, 162-171, 173-180, 189-197, 201-214, 216-224, 242-254, 257-270, 282-287, 290-302, 309-315, 320-325, 341-355, 362-368, 372-378	3	H	1-48	21, 208
KPORF-06	グルコシル トランスフェラーゼ MdoH	5-15, 18-35, 48-61, 65-71, 112-119, 138-154, 157-169, 179-208, 214-223, 226-232, 243-250, 256-262, 277-286, 289-296, 338-348, 352-363, 370-376, 385-408, 420-436, 443-454, 462-483, 498-561, 563-592, 600-642, 661-671, 673-709, 714-733, 748-754, 771-776, 798-806, 808-821, 823-839	2	C	31-83	22, 209
KPORF-07	trpリプレッサー 結合タンパク質	5-14, 21-26, 31-41, 59-77, 101-115, 132-145, 147-156, 180-185, 188-197	3	H	97-158	23, 210
KPORF-08	推定転写調節因子	6-18, 23-43, 45-56, 69-80, 87-97, 112-123, 135-151, 164-171, 178-193, 200-227, 249-258, 262-274, 279-291, 302-308, 322-327, 329-336, 351-363, 366-373, 384-399, 403-411, 415-434, 440-446, 461-482, 488-506, 510-516, 518-551, 574-589, 607-629, 634-665, 667-687, 694-712, 725-739, 743-751, 753-768	2	G	521-583	24, 211
KPORF-09	亜鉛含有 アルコール デヒドロゲナーゼ	4-13, 19-44, 55-63, 71-82, 89-110, 120-130, 132-138, 145-161, 168-182, 189-258, 261-272, 278-288, 290-301	3	G	11-76	25, 212

10

20

30

40

KPORF-10	推定内膜タンパク質	4-22, 43-56, 63-68, 81-90, 93-99, 139-148, 155-160, 170-176, 189-195, 207-218, 227-232, 241-249, 251-258, 260-266, 277-295, 300-327, 329-336, 340-356, 384-390, 418-423, 427-433, 438-444	2	D	383-428	26, 213
KPORF-11	モリブドプテリン生合成に関連する推定ヌクレオチド利用酵素	10-18, 32-37, 45-55, 60-69, 77-83, 89-95, 120-125, 133-170, 172-185, 193-211, 214-223, 232-249, 255-275, 277-303, 305-310, 320-328, 334-341, 347-353, 355-369, 380-386, 389-395	8	E	71-85	27, 214
KPORF-12	ABC 輸送体 ATP 結合タンパク質	4-23, 27-35, 67-73, 80-103, 117-126, 132-138, 140-159, 162-171, 180-194, 198-208, 211-218, 228-234, 239-253, 262-270, 272-291, 296-305	2	D	39-110	28, 215
KPORF-13	周辺質グリセロホスホジエステル ホスホジエステラーゼ	13-24, 27-34, 37-66, 69-88, 99-104, 149-155, 164-175, 184-193, 199-209, 227-235, 264-273, 276-285, 288-315, 323-335, 346-353	4	D	56-111, 199-261	29, 216
KPORF-14	グルコサミン-フルクトース-6-リン酸 アミノトランスフェラーゼ	11-22, 25-48, 51-60, 64-72, 80-96, 108-122, 132-137, 142-150, 152-167, 175-199, 214-229, 237-244, 252-258, 260-266, 279-287, 301-340, 345-350	2	G	109-153	30, 217

10

20

30

40

KPORF-15	イソロイシン tRNA 合成酵素	37-43, 50-57, 65-82, 87-109, 123-129, 141-150, 152-157, 166-172, 179-203, 209-241, 249-284, 290-300, 308-326, 329-335, 345-357, 359-368, 379-386, 390-417, 420-425, 438-444, 461-466, 473-490, 497-505, 524-534, 541-550, 586-597, 608-614, 622-632, 660-666, 679-694, 696-706, 708-722, 725-731, 737-763, 784-789, 810-825, 837-854, 857-880, 882-895, 901-907, 911-928	3	G	14-76, 176-220	31, 218
KPORF-16	推定酸化還元酵素	9-16, 38-52, 61-86, 93-100, 110-117, 123-132, 138-145, 151-169, 172-181, 186-202, 208-225, 227-253, 264-275, 289-295, 320-329, 335-342	5	H	113-193	32, 219
KPORF-17	推定モリブドプテリン 酸化還元酵素	11-18, 24-30, 42-49, 53-63, 69-80, 87-93, 95-103, 144-171, 173-185, 193-200, 202-208, 215-221, 242-261, 266-273, 277-286, 290-299, 322-328, 338-351, 354-377, 391-409, 441-451, 461-466, 499-515, 521-527, 562-569, 621-629, 647-663, 676-682, 694-701, 703-713, 725-731, 735-744, 755-764, 793-800	2	H	490-547	33, 220

10

20

30

40

KPORF-18	推定ペニシリン結合タンパク質	4-11, 14-22, 38-70, 81-90, 97-114, 118-132, 147-171, 173-181, 187-202, 244-250, 252-298, 301-311, 313-331, 342-368, 410-418, 446-451, 456-462, 468-474, 476-492, 499-507, 519-528, 552-565, 568-575, 584-613, 618-624, 626-649	4	C	417-489	34, 221	10
KPORF-19	推定分泌タンパク質 (多剤耐性排出ポンプ)	4-9, 32-53, 66-72, 74-90, 97-104, 110-130, 133-139, 144-152, 166-177, 203-213, 215-241, 256-275, 291-304, 307-316, 321-326, 334-345, 352-367	2	G	201-255	35, 222	20
KPORF-20	仮説上のタンパク質、相同性なし	13-19, 26-43, 66-72, 80-85, 95-101, 109-125, 131-137	7	C	25-107	36, 223	
KPORF-21	制御因子、OraAタンパク質	13-24, 35-43, 50-56, 58-68, 77-83, 104-110, 117-125, 132-138, 140-153	4	D	19-66	37, 224	
KPORF-22	DNA ミスマッチ修復タンパク質 mutS	15-31, 37-42, 47-54, 68-87, 89-96, 107-117, 121-127, 131-137, 145-151, 176-182, 220-226, 232-246, 250-257, 291-300, 317-325, 328-333, 337-359, 368-393, 403-428, 460-478, 480-493, 500-506, 511-516, 519-526, 528-559, 565-572, 584-595, 597-605, 608-613, 626-648, 679-684, 687-693, 703-714, 718-735, 742-750, 757-765, 768-788, 793-799, 813-819, 823-829, 839-850	2	G	576-623	38, 225	30 40

KPORF-23	ヒドロゲナーゼ アイソザイム HypD	10-35, 37-60, 63-76, 79-86, 88-97, 108-113, 118-126, 128-134, 138-145, 153-159, 168-188, 194-208, 211-243, 255-260, 270-276, 285-301, 307-346, 348-367	2	C	275-339	39, 226
KPORF-24	セレノシステイン リアーゼ	4-17, 21-33, 35-42, 47-64, 72-80, 85-92, 98-103, 125-147, 151-161, 165-177, 183-230, 232-246, 256-262, 284-306, 310-328, 331-367, 369-383, 392-399	2	H	32-85	40, 227
KPORF-25	リボースリン酸 ピロホスホキナーゼ	5-11, 18-27, 42-52, 60-65, 75-84, 90-102, 107-116, 125-178, 184-206, 221-233, 235-242, 249-257, 264-277, 288-317	2	H	267-313	41, 228
KPORF-26	TonB	5-11, 14-42, 50-75, 79-86, 89-98, 120-125, 152-160, 166-181, 185-193, 200-207	8	F	85-114	42, 229
KPORF-27	推定ホスファターゼ	4-30, 36-43, 46-55, 63-111, 144-152, 159-168, 179-189, 191-200, 205-213	2	D	37-109	43, 230
KPORF-28	フラボタンパク質と 類似	20-45, 57-77, 80-100, 119-126, 131-137, 143-169, 179-185, 195-203, 207-231, 235-264, 282-302, 320-329, 341-347, 353-359, 361-373	7	A	266-296	44, 231
KPORF-29	外膜チャンネル タンパク質	5-22, 24-37, 41-55, 57-65, 72-78, 90-103, 105-116, 119-130, 164-170, 190-202, 209-231, 244-254, 260-276, 300-339, 344-350, 355-376, 389-397, 399-406, 408-421, 429-437	2	H	103-152	45, 232

10

20

30

40

KPORF-30	膜結合性 ATP 合成酵素、F1 セクター、 α-サブユニット	8-16, 18-25, 31-47, 71-82, 87-102, 104- 114, 126-156, 176- 183, 190-200, 205- 212, 218-228, 231- 243, 256-279, 287- 301, 303-312, 324- 332, 335-348, 351- 357, 365-380, 395- 412, 422-451, 456- 464, 467-483, 501- 507	3	H	405-468	46, 233	10
KPORF-31	仮説上のタンパク質	4-18, 21-39, 46-56, 63-69, 72-86, 116- 130, 132-160, 162- 190, 196-201, 209- 231, 233-241, 251- 265, 269-282, 292- 298, 309-324, 333- 369, 391-415, 417- 427, 436-454, 471- 480, 482-499, 510- 518, 521-533, 537- 543, 545-561, 571- 581, 585-597, 599- 607, 609-635, 638- 643, 650-665, 671- 685, 687-695, 701- 707, 710-720, 724- 736, 747-757, 764- 769, 772-784, 791- 796, 808-820	2	C	317-401	47, 234	20
KPORF-32	推定周辺質タンパク質	4-12, 15-33, 58-77, 82-89, 98-106, 108- 118, 120-135, 141- 147, 152-160, 168- 215, 225-233, 235- 247, 250-264, 284- 312, 314-321, 336- 343, 359-374, 386- 394	2	D	159-218	48, 235	30
KPORF-33	D-リブローズ-5- リン酸 3-エピメラーゼ	4-16, 24-36, 40-47, 49-56, 61-81, 84- 143, 148-156, 158- 164, 170-175, 194- 206, 208-214	5	H	126-203	49, 236	40

KPORF-34	仮説上のタンパク質	28-45, 50-61, 94-111, 113-124, 137-142, 147-173, 180-188, 190-196, 202-223, 229-235, 239-249, 262-270, 280-288, 290-321, 325-332, 347-355, 359-368, 389-407, 415-427, 429-453, 458-465, 477-485, 499-505, 516-527, 531-549, 569-592, 594-602, 605-615, 628-635, 647-659, 662-683, 727-735, 760-765, 771-780, 788-809, 811-818	2	D	549-630	50, 237	10
KPORF-35	仮説上のタンパク質	21-28, 33-40, 48-100, 104-111, 113-134	2	H	1-46	51, 238	20
KPORF-36	30Sリボソームサブユニットタンパク質 S5	12-24, 31-41, 53-61, 73-87, 112-128, 133-140, 151-156	2	H	26-98	52, 239	20
KPORF-37	亜硝酸還元酵素大サブユニット	4-9, 19-26, 32-56, 58-67, 71-81, 90-95, 97-105, 112-118, 124-132, 138-144, 147-167, 169-177, 199-207, 212-217, 231-241, 250-260, 266-272, 274-282, 289-296, 299-310, 316-331, 344-350, 352-363, 368-377, 381-394, 399-406, 412-450, 459-473, 486-503, 508-514, 518-548, 564-570, 579-587, 602-608, 616-623, 628-635, 638-654, 678-688, 691-696, 703-709, 716-723, 761-772, 784-793, 819-826, 835-844	2	D	790-834	53, 240	30
							40

KPORF-38	推定内膜 リポタンパク質	4-10, 18-36, 43-50, 63-71, 75-105, 109-117, 134-140, 145-157, 176-182, 184-201, 203-211, 215-225, 240-250, 262-284, 294-309, 313-319, 327-337, 350-356, 361-367, 372-393, 411-421, 428-451, 453-466, 487-492, 501-528, 535-553, 564-574, 592-605, 612-629, 631-640, 646-653, 658-666, 673-681, 713-718, 720-730, 739-749, 784-792, 821-826, 833-844, 853-863, 871-876, 885-894, 900-918, 937-950, 952-957, 972-990, 995-1001, 1024-1036, 1039-1044, 1049-1055, 1062-1089, 1091-1103, 1110-1121, 1123-1129, 1131-1151, 1157-1179, 1181-1201, 1204-1223, 1233-1244, 1269-1276, 1279-1286, 1294-1301, 1303-1309, 1315-1338, 1350-1362, 1373-1381, 1398-1406, 1412-1423, 1440-1446, 1458-1466, 1481-1487, 1492-1508, 1511-1518, 1528-1534, 1536-1547, 1553-1565, 1606-1617, 1619-1644	2	A	761-781	54, 241	10
KPORF-39	組換え DNA 修復タンパク質	6-13, 31-38, 47-60, 71-102, 107-123, 128-155, 173-179, 185-194, 210-220	2	H	161-232	55, 242	20
KPORF-40	推定調節タンパク質	11-34, 36-43, 49-67, 74-79, 84-92, 94-100, 103-112, 120-129, 134-155, 162-173, 177-185, 189-202, 206-211	2	G	130-185	56, 243	30
							40

KPORF-41	S-アデノシルメチオニン合成酵素	4-10, 20-35, 37-46, 48-55, 60-66, 75-82, 87-98, 133-150, 166-172, 178-189, 208-214, 230-235, 245-251, 271-308, 319-333, 335-355, 373-380	4	H	117-201	57, 244
KPORF-42	A/G特異的DNAグリコシラーゼ	4-30, 54-65, 91-105, 107-131, 135-154, 163-192, 199-208, 210-224, 229-239, 248-257, 263-279, 281-294, 328-354, 373-379, 382-405, 426-453, 462-487	1	G	249-323	58, 245
KPORF-43	仮説上のタンパク質	4-10, 12-24, 45-55, 75-88	6	E	24-40	59, 246
KPORF-44	トランスケトラーゼ	4-14, 20-37, 47-53, 55-61, 75-81, 97-103, 107-124, 129-135, 139-147, 160-166, 169-175, 181-190, 202-221, 247-255, 272-285, 300-310, 318-332, 351-361, 384-397, 406-427, 442-449, 458-482, 494-503, 512-524, 531-539, 552-562, 577-588, 590-596, 600-608, 613-624, 637-668, 692-700	2	D	232-278	60, 247
KPORF-45	推定S-アデノシルメチオニン依存性メチルトランスフェラーゼ	33-39, 49-55, 68-84, 90-96, 104-120, 126-143, 150-159, 168-191, 197-208, 219-225, 227-233, 241-247	4	G, H	63-115, 200-250	61, 248
KPORF-46	ヌクレオシドニリン酸糖エピメラーゼ	4-22, 24-34, 36-55, 57-76, 83-97, 99-117, 135-143, 145-157, 163-174, 178-198, 200-207, 209-270, 276-290, 321-335, 338-347, 367-374, 393-402, 404-411, 416-422, 443-460, 467-473	5	G, H	117-183	62, 249

10

20

30

40

KPORF-47	コエンザイム F420 依存性 N5,N10- メチレンテトラヒドロ メタノプテリン還元酵素 および関連する フラビン依存性 酸化還元酵素	26-37, 44-52, 57- 96, 104-111, 118- 124, 155-177, 179- 197, 201-214, 223- 233, 243-250, 257- 262, 291-297, 303- 314, 319-363	6	G	47-105	63, 250
KPORF-48	ATP/GTP 結合タンパク質	36-43, 45-60, 76- 97, 107-125, 131- 156, 158-164	2	G	118-163	64, 251
KPORF-49	ABC 輸送体、 基質結合タンパク質	5-32, 40-50, 52-60, 70-88, 92-101, 106- 126, 138-150, 152- 161, 175-193, 201- 234, 237-248, 270- 285, 297-303, 312- 318	3	D	209-255	65, 252
KPORF-50	推定 PTS 系 IIA 成分	4-12, 23-34, 49-55, 59-65, 70-81, 83- 130	2	D	62-113	66, 253
KPORF-51	推定ホスファターゼ	4-26, 38-49, 69-76, 82-96, 103-119, 126-140, 143-190, 194-209, 212-218	3	D	100-167	67, 254
KPORF-52	推定リポタンパク質	7-29, 35-47, 56-66, 80-94, 97-123, 125- 148, 150-160, 166- 173, 175-191, 193- 200, 207-225	18	C	75-176	68, 255
KPORF-53	保存された 仮説上のタンパク質	14-36, 39-45, 51- 59, 66-71, 76-88, 106-117, 121-126, 140-157, 164-187, 198-206, 210-252	9	G	202-256	69, 256
KPORF-54	膜結合性溶菌性 ムレイン トランスグリコシラーゼ d 前駆体	4-19, 27-35, 90- 107, 120-134, 144- 150, 166-175, 192- 198, 221-243, 249- 255, 263-278, 283- 288, 305-321, 324- 334, 342-349, 355- 366, 377-390, 413- 425, 442-448	2	D	130-178	70, 257

10

20

30

40

KPORF-55	rRNA メチラーゼと類似	17-26, 41-51, 54-61, 64-72, 78-105, 117-125, 127-137, 147-155, 175-213, 230-236, 238-261, 271-277, 282-297, 309-318, 329-347, 355-372, 377-390	4	D	69-126	71, 258
KPORF-56	アポリポタンパク質 N-アシル トランスフェラーゼ	4-48, 54-60, 62-69, 73-81, 88-115, 124-137, 139-154, 156-169, 171-190, 194-231, 240-273, 288-303, 336-363, 367-395, 405-411, 434-442, 449-454, 466-483, 491-507	2	G	226-282	72, 259
KPORF-57	推定 カルボキシラーゼ	26-34, 39-47, 50-80, 82-88, 97-105, 108-127, 131-137, 162-180, 185-191, 198-203, 209-214, 226-247, 256-288, 296-305	2	D	149-239	73, 260
KPORF-58	推定輸送タンパク質	5-28, 30-54, 73-84, 89-98, 109-116, 122-128, 137-142, 163-189, 207-236, 245-280, 288-390, 404-423, 426-433, 450-474, 487-504, 506-513, 524-530, 532-595, 605-614, 620-626, 631-638, 644-657, 667-683, 686-693, 695-702, 707-733, 739-747	2	D	6-62	74, 261
KPORF-59	嫌気性 デヒドロゲナーゼと 類似	23-31, 39-50, 55-67, 76-100, 117-130, 149-171, 173-185, 218-238, 242-288, 291-298, 334-346, 355-369, 382-399, 413-420, 431-438, 442-449, 455-466, 486-493, 498-508, 524-531, 540-546, 551-558, 562-570, 575-582, 585-596, 598-604, 621-630, 632-650, 670-677, 682-701, 736-749, 755-761	4	A	612-626	75, 262

10

20

30

40

KPORF-60	グルタミン結合 周辺質タンパク質 前駆体と類似	4-21, 24-39, 44-68, 74-81, 85-91, 109- 116, 129-138, 142- 148, 173-188, 195- 201, 207-212, 223- 228	2	A	126-148	76, 263
KPORF-61	推定細胞質タンパク質	4-17, 24-42, 61-67, 84-93, 96-102, 116- 121, 135-143, 155- 165, 177-186, 210- 224, 253-259, 272- 297, 299-331, 337- 351, 359-367, 369- 385	7	G, H	1-49	77, 264
KPORF-62	高可能性 転写調節因子	4-25, 28-54, 67-81, 85-136, 138-143, 157-170, 180-190, 197-203, 205-214, 219-243, 246-270, 277-283, 290-299, 305-311	4	G	127-182	78, 265
KPORF-63	仮説上のタンパク質	11-20, 25-33, 75- 80, 85-91, 113-124, 143-155, 161-170, 172-184	2	D	128-176	79, 266
KPORF-64	細胞外 溶質結合タンパク質、 ファミリー3	4-9, 16-26, 28-34, 55-80, 120-143, 150-156, 158-164, 167-178, 185-190, 192-213, 221-237, 242-255, 257-272, 281-290, 325-332	26	G	48-106	80, 267
KPORF-65	ペニシリン結合 タンパク質	13-48, 59-70, 78- 88, 95-112, 129- 151, 153-161, 163- 182, 214-221, 235- 245, 248-277, 281- 291, 293-301, 303- 311, 315-320, 323- 346, 377-383, 390- 398, 447-454, 474- 487, 491-512, 531- 544, 547-553, 582- 590, 597-603, 605- 611, 623-629	4	C	410-466	81, 268

10

20

30

40

KPORF-66	外膜ポーリン、 三価鉄エンテロバクチン (エンテロケリン) ならびにコリシンB およびDの受容体	6-26, 39-46, 48-58, 69-75, 109-121, 139-144, 148-155, 166-172, 215-221, 261-267, 313-319, 363-386, 423-433, 447-458, 465-471, 483-494, 497-517, 558-565, 578-586, 589-597, 619-626, 636-645, 659-665, 671-680, 682-693, 733-739	2	D	152-206	82, 269
KPORF-67	仮説上のタンパク質	4-19, 23-35, 40-50, 52-58, 65-73, 78- 103, 112-125, 146- 160, 163-192, 194- 200	2	H	29-90	83, 270
KPORF-68	仮説上のタンパク質	4-13, 17-32, 40-50, 57-67, 76-81, 88- 95, 107-119, 131- 142, 144-157, 171- 178, 185-193, 197- 207, 212-227, 231- 238, 248-253, 263- 310	2	D	90-170	84, 271
KPORF-69	3-フィターゼ前駆体	9-28, 57-82, 84-93, 126-135, 143-166, 173-194, 196-201, 212-220, 228-254, 269-277, 289-298, 305-316, 320-327, 330-337, 350-359, 373-378, 386-392, 403-411, 421-428, 435-441, 443-458, 465-470	2	D	80-141	85, 272

10

20

30

KPORF-70	カチオン/多剤 排出ポンプ	11-48, 54-67, 69-75, 89-95, 101-122, 124-131, 134-157, 159-175, 202-208, 214-228, 258-270, 272-280, 287-295, 298-310, 331-338, 340-417, 427-500, 502-509, 534-552, 556-561, 564-577, 585-592, 594-608, 621-627, 632-641, 643-652, 671-681, 683-709, 712-743, 758-764, 776-783, 789-820, 835-851, 864-883, 885-910, 913-940, 948-953, 967-976, 994-1020	1	H	775-825	86, 273	10
KPORF-71	三価鉄エンテロバクチン 輸送 ATP 結合タンパク質	14-24, 32-54, 58-63, 70-80, 93-100, 108-125, 127-135, 142-153, 155-160, 180-191, 201-208, 210-216, 222-235, 242-264, 267-273, 276-282, 284-308	5	H	10-59	87, 274	20
KPORF-72	ATP 依存性 プロテアーゼ La	16-28, 44-68, 70-77, 83-90, 99-129, 131-137, 145-154, 161-175, 183-190, 196-203, 205-220, 238-245, 321-328, 330-338, 366-379, 383-397, 399-405, 412-418, 442-458, 471-483, 486-505, 536-544, 562-568, 583-602, 610-618, 629-635, 641-655, 672-682, 697-705, 714-729, 744-751, 755-762, 766-771, 783-807	2	D	555-621	88, 275	30
KPORF-73	予測された Fe-S 酸化還元酵素	4-9, 20-34, 45-54, 60-77, 79-89, 91-100, 102-149, 162-170, 177-189, 193-208, 210-222, 238-244, 252-264, 267-276, 302-307	2	D	100-140	89, 276	40

KPORF-74	高可能性 転写調節因子、 LysR ファミリー	11-27, 30-49, 56-62, 69-74, 76-85, 94-108, 116-125, 129-147, 153-161, 165-171, 177-208, 217-223, 225-231, 237-255, 260-284, 293-300	10	G, H	73-137	90, 277
KPORF-75	仮説上のタンパク質	4-38, 40-51, 84-97, 99-106, 109-115, 119-129, 131-145, 148-160, 180-186, 188-202, 230-243, 246-267, 274-288, 290-299, 302-312, 317-327, 332-344, 353-377, 381-388, 407-419, 423-437, 447-470, 474-482, 486-494, 501-523, 531-546, 551-556	2	E	727-740	91, 278
KPORF-76	仮説上のタンパク質	23-52, 62-76, 87-104, 109-115, 117-123, 129-139, 143-149, 152-170, 172-191, 199-205, 212-218, 220-240, 249-256, 263-275, 297-303, 308-342, 349-380, 382-394, 414-420, 430-441, 446-452, 460-475, 488-505, 514-531, 533-539, 546-568, 570-577, 579-588, 613-625, 632-670, 672-716, 718-745, 759-769, 785-798, 801-807	3	C	272-324	92, 279
KPORF-77	仮説上のタンパク質、 (ABC 輸送体基質 結合タンパク質内の CRFとして位置する)	4-34, 36-43, 56-73, 80-87, 101-134, 148-159, 161-170, 178-185, 195-206, 211-221, 223-248, 259-271, 276-295, 297-308	2	C	241-296	93, 280
KPORF-78	マルトポリン	5-31, 44-50, 64-74, 86-94, 132-147, 154-167, 196-203, 209-219, 253-260, 284-289, 300-312, 319-327, 335-340, 358-364, 376-383	4	E	166-202	94, 281

10

20

30

40

KPORF-79	仮説上のタンパク質	4-9, 12-27, 29-71, 77-84, 90-108, 114-142, 147-164, 180-213, 217-227, 229-282, 291-309, 322-329, 336-353, 365-370	3	G	317-364	95, 282
KPORF-80	メチル基受容 走化性タンパク質	36-41, 52-66, 71-83, 89-95, 116-127, 154-174, 176-184, 200-206, 230-237, 248-259, 269-284, 307-316, 376-383, 399-418, 424-442, 445-451, 454-462	2	H	1-50	96, 283
KPORF-81	I型制限修飾系 DNA メチラーゼ	9-14, 33-49, 64-72, 87-92, 103-109, 123-128, 130-141, 143-154, 160-166, 182-214, 237-247, 251-260, 292-300, 327-332, 337-350, 357-365, 388-398, 405-411, 422-428, 451-459, 478-488, 520-531, 534-540, 558-564, 580-586, 591-600, 605-615, 629-635, 641-653, 658-672	4	C	212-244, 533-611	97, 284
KPORF-82	ピルビン酸 デヒドロゲナーゼ E2 成分	4-10, 17-27, 30-37, 44-62, 80-85, 94-114, 118-131, 134-141, 148-161, 171-212, 218-241, 248-261, 274-313, 325-336, 342-348, 359-373, 391-397, 424-431, 454-474, 489-495, 497-503, 505-515, 548-553, 560-580, 591-610	2	C	277-324	98, 285

10

20

30

40

KPORF-83	亜硫酸還元酵素 [NADPH] フラボタンパク質 α成分	7-16, 18-24, 30-47, 49-70, 83-99, 103- 117, 126-141, 146- 153, 159-165, 177- 194, 198-221, 236- 246, 255-262, 273- 279, 283-296, 301- 332, 338-411, 422- 428, 434-440, 452- 458, 463-469, 494- 509, 511-517, 524- 531, 548-554, 564- 572	23	H	335-389	99, 286
KPARF-01	仮説上のタンパク質	9-15, 33-54, 56-80, 102-108	10	G	1-42	100, 287
KPARF-02	仮説上のタンパク質	15-36, 42-55, 58-68	83	E, F	54-77	101, 288
KPARF-03	仮説上のタンパク質	55-75, 89-96, 98- 110	51	E, F	14-36	102, 289
KPARF-04	仮説上のタンパク質	8-14, 29-51, 73- 101, 110-117	31	E, H	70-114	103, 290
KPARF-05	仮説上のタンパク質	20-25, 29-34, 41- 52, 60-67, 69-85, 90-100, 114-122, 136-142, 160-170, 174-181	5	H	21-58	104, 291
KPARF-06	仮説上のタンパク質	14-22	33	E, F	4-13	105, 292
KPARF-07	仮説上のタンパク質	22-40, 54-66, 88- 105, 109-118	4	G	31-74	106, 293
KPARF-08	仮説上のタンパク質	5-11, 18-32, 47-60, 66-73, 83-92, 113- 120, 126-141, 151- 164, 167-174, 201- 211	14	F	118-129	107, 294
KPARF-09	仮説上のタンパク質	5-11, 18-24, 32-40, 47-53	38	E	25-54	108, 295
KPARF-10	仮説上のタンパク質	18-24, 31-48	22	H	5-55	109, 296
KPARF-11	仮説上のタンパク質	10-16, 26-32, 47- 56, 85-95	9	G	10-62	110, 297
KPARF-12	仮説上のタンパク質	4-12, 16-26	9	F	25-34	111, 298
KPARF-13	仮説上のタンパク質	19-29, 45-51, 63- 68, 76-92, 103-110, 114-120, 123-133, 135-141	3	H	14-78	112, 299
KPARF-14	仮説上のタンパク質	4-18, 47-61	3	E	57-93	113, 300
KPARF-15	仮説上のタンパク質	17-29, 44-50	5	F	26-38	114, 301

10

20

30

40

KPARF-16	仮説上のタンパク質	5-19, 55-64, 78-85, 95-101, 104-112	2	A	24-33	115, 302
KPARF-17	仮説上のタンパク質	4-10	3	A	12-31	116, 303
KPARF-18	仮説上のタンパク質	4-12, 27-41, 43-58, 60-67, 76-86	3	G	13-65	117, 304
KPARF-19	仮説上のタンパク質	30-38, 57-67	2	F	5-32	118, 305
KPARF-20	仮説上のタンパク質	30-43	4	A	2-21	119, 306
KPARF-21	仮説上のタンパク質	14-20, 23-36, 41-48	3	C	1-52	120, 307
KPARF-22	仮説上のタンパク質	18-33, 51-58, 76-82	3	B	32-46	121, 308
KPARF-23	仮説上のタンパク質	25-31	2	E	2-16	122, 309
KPARF-24	仮説上のタンパク質	14-23, 50-58	3	G	9-49	123, 310
KPARF-25	仮説上のタンパク質	4-10, 22-31, 35-45, 48-68, 71-80	2	G	17-66	124, 311
KPARF-26	仮説上のタンパク質	4-24, 28-42, 46-56, 63-69, 87-94, 112-131	3	H	2-46	125, 312
KPARF-27	仮説上のタンパク質	4-15, 19-28, 34-41, 52-62, 78-86	3	E	2-20	126, 313
KPARF-28	仮説上のタンパク質	4-11, 16-30, 32-42	5	H	7-38	127, 314
KPARF-29	仮説上のタンパク質	4-20, 22-31	7	A	22-38	128, 315
KPARF-30	仮説上のタンパク質	4-19	3	F	17-32	129, 316
KPARF-31	仮説上のタンパク質	7-13, 17-22, 27-33, 80-100	2	F	26-40	130, 317
KPARF-32	仮説上のタンパク質	10-18, 22-48	2	E	32-44	131, 318
KPARF-33	仮説上のタンパク質	15-24, 43-49, 73-83	2	G	45-93	132, 319
KPARF-34	仮説上のタンパク質	22-29, 46-55, 57-63	3	A	5-17	133, 320
KPARF-35	仮説上のタンパク質	10-33	2	F	21-35	134, 321
KPARF-36	仮説上のタンパク質	16-24	2	A	22-49	135, 322
KPARF-37	仮説上のタンパク質	4-16, 37-73, 76-110, 117-125, 127-132	2	A	2-30	136, 323
KPARF-38	仮説上のタンパク質	4-12, 23-35, 44-56, 59-88	2	H	22-76	137, 324
KPARF-39	仮説上のタンパク質	15-26	2	F	23-35	138, 325
KPARF-40	仮説上のタンパク質	12-22, 31-40	2	F	17-44	139, 326

10

20

30

40

KPARF-41	仮説上のタンパク質	4-9, 13-18, 29-35	2	B	57-64	140, 327
KPARF-42	仮説上のタンパク質	31-55, 67-81	2	H	25-70	141, 328
KPARF-43	仮説上のタンパク質	13-24, 51-58	2	E	13-26	142, 329
KPARF-44	仮説上のタンパク質	6-20, 29-40, 57-79	3	H	46-88	143, 330
KPARF-45	仮説上のタンパク質	8-14, 41-54, 68-76, 83-93, 106-126, 130-139	3	G	12-72	144, 331
KPARF-46	仮説上のタンパク質	5-13, 17-24, 41-55, 64-69, 80-85, 94-107, 109-115	5	G	53-88	145, 332
KPARF-47	仮説上のタンパク質	5-12, 32-54, 57-64	2	A	20-33	146, 333
KPCRF-01	仮説上のタンパク質	4-16, 40-48, 50-58, 62-68, 75-85, 92-104, 108-116, 124-134	5	C	68-128	147, 334
KPCRF-02	仮説上のタンパク質	7-13, 19-29, 34-40, 54-71, 76-81, 91-144, 147-155, 157-188	19	D, F	11-83	148, 335
KPCRF-03	仮説上のタンパク質	17-24, 32-41	79	A, E, F	6-43	149, 336
KPCRF-04	仮説上のタンパク質	14-31, 38-59, 69-87, 95-102, 126-146, 157-162, 177-193, 201-227, 238-251	11	E	63-78	150, 337
KPCRF-05	仮説上のタンパク質	10-16, 18-25, 27-41, 43-52, 59-86, 94-101, 134-140	5	H	38-100	151, 338
KPCRF-06	仮説上のタンパク質	4-19, 23-35, 43-72, 78-92	3	H	37-93	152, 339
KPCRF-07	仮説上のタンパク質	15-20, 27-32, 41-65, 69-82, 93-105, 107-115, 120-147, 170-178, 184-201, 214-257, 272-281, 293-314, 332-339, 358-364, 374-381, 390-397, 399-414, 428-460	2	C	317-375	153, 340
KPCRF-08	仮説上のタンパク質	11-28, 47-55, 59-68, 76-105, 108-116, 120-144, 146-160, 167-175, 180-187, 209-233	2	A	144-158	154, 341

10

20

30

40

KPCRf-09	仮説上のタンパク質	4-13, 58-78	31	H	14-77	155, 342
KPCRf-10	仮説上のタンパク質	26-31, 44-49, 57-64, 67-74, 107-112, 116-152, 154-181, 202-212, 241-255	30	A, E, F, G	57-101	156, 343
KPCRf-11	仮説上のタンパク質	10-41, 53-70, 81-93, 100-111, 137-147, 164-169, 183-190, 199-210, 216-221, 226-240	21	E, F	84-95	157, 344
KPCRf-12	仮説上のタンパク質	12-45, 48-56, 73-79, 91-103, 106-112, 117-125, 132-143, 154-160, 178-201, 208-214, 216-225, 260-266, 276-283	3	F	98-115	158, 345
KPCRf-13	仮説上のタンパク質	4-15, 30-42	2	B	29-39	159, 346
KPCRf-14	仮説上のタンパク質	22-53, 55-73, 80-88	3	A	33-66	160, 347
KPCRf-15	仮説上のタンパク質	6-23, 44-54	7	F	56-67	161, 348
KPCRf-16	仮説上のタンパク質	8-21, 35-44, 66-75, 82-87, 94-101	3	C	32-94	162, 349
KPCRf-17	仮説上のタンパク質	8-20, 23-32, 36-50, 53-69	4	H	15-69	163, 350
KPCRf-18	仮説上のタンパク質		5	F	8-22	164, 351
KPCRf-19	仮説上のタンパク質	31-37	5	A	2-31	165, 352
KPCRf-20	仮説上のタンパク質	4-20, 23-39, 58-63, 71-78, 97-102	2	D	22-82	166, 353
KPCRf-21	仮説上のタンパク質	23-44, 135-152, 168-184	2	C	57-116	167, 354
KPCRf-22	仮説上のタンパク質	24-31, 42-50, 52-62, 93-117	2	D	43-94	168, 355
KPCRf-23	仮説上のタンパク質	20-29	10	E	24-43	169, 356
KPCRf-24	仮説上のタンパク質	12-57, 59-74	2	A	22-40	170, 357
KPCRf-25	仮説上のタンパク質	7-16, 18-26, 39-45, 68-78, 86-92	2	A	65-82	171, 358
KPCRf-26	仮説上のタンパク質	5-17, 19-34, 42-48, 56-71, 102-113, 118-129	6	H	67-111	172, 359
KPCRf-27	仮説上のタンパク質	4-33, 50-71	3	D	13-55	173, 360
KPCRf-28	仮説上のタンパク質	9-17, 23-30, 37-54, 69-88, 96-102, 114-123, 130-140, 143-163	2	D	5-70	174, 361

10

20

30

40

KPCRF-29	仮説上のタンパク質	4-23, 27-52, 71-80	11	C, H	9-94	175, 362
KPCRF-30	仮説上のタンパク質	13-19	5	A	2-21	176, 363
KPCRF-31	仮説上のタンパク質	18-26, 28-52, 63-74, 94-107, 123-134	2	D	18-84	177, 364
KPCRF-32	仮説上のタンパク質	19-33, 57-68	3	A	26-48	178, 365
KPCRF-33	仮説上のタンパク質	4-26, 31-37, 42-59	7	H	12-65	179, 366
KPCRF-34	仮説上のタンパク質	4-25	1	A	20-39	180, 367
KPCRF-35	仮説上のタンパク質	40-51, 54-62, 67-75, 83-89, 126-146, 148-156	3	A	31-42	181, 368
KPCRF-36	仮説上のタンパク質	4-15, 23-33, 38-49, 82-98	2	H	7-91	182, 369
KPCRF-37	仮説上のタンパク質	6-26, 36-57	2	F	40-64	183, 370
KPCRF-38	仮説上のタンパク質	6-15, 21-28, 32-38, 57-65, 78-103, 114-134, 138-144, 154-163	13	H	41-95	184, 371
KPCRF-39	仮説上のタンパク質	13-30, 47-57, 71-76	2	C	25-71	185, 372
KPCRF-40	仮説上のタンパク質	4-31, 43-51, 55-63, 67-72, 76-83, 88-95, 99-118, 125-132, 134-159	2	F	82-118	186, 373
KPCRF-41	仮説上のタンパク質	4-17, 26-32, 34-40, 45-61, 67-92	2	H	41-97	187, 374

A, lamBの中にある50 bp 肺炎桿菌ライブラリーと、IC38、IC40、IC76およびIC86を含有するICKp18-IgG プール (562の刈り込まれたクローン)、B, lamBの中にある50 bp 肺炎桿菌ライブラリーと、IC88、IC89、IC92およびIC93 血清を含有するICKp19-IgG プール (444の刈り込まれたクローン)、C, fhuAの中にある300 bp 肺炎桿菌ライブラリーと、IC38、IC40、IC76およびIC86 血清を含有するICKp18-IgG プール (455の刈り込まれたクローン)、D, fhuAの中にある300 bp 肺炎桿菌ライブラリーと IC88、IC89、IC92、およびIC93 血清を含有するICKp19-IgG プール (591の刈り込まれたクローン)、E, lamBの中にある50 bp 肺炎桿菌ライブラリーとPKp34 プール (P3536.2、P3548、P3560、P3582およびP3583 血清) (618の刈り込まれたクローン)、F, lamBの中にある50 bp 肺炎桿菌ライブラリーとPKp35 プール (P3495.2、P3533.2、P3567およびP3576 血清) (562の刈り込まれたクローン)、G, fhuAの中にある300 bp 肺炎桿菌ライブラリーとPKp34 プール (P3536.2、P3548、P3560、P3582およびP3583 血清) (562の刈り込まれたクローン)、H, fhuAの中にある300 bp 肺炎桿菌ライブラリーとPKp35 プール (P3495.2、P3533.2、P3567およびP3576 血清) (593の刈り込まれたクローン); P3536.2、P3495.2、およびP3533.2は、病気から回復した後に患者から得た回復期血清であった。*、5 アミノ酸より長い抗原性配列の推定は、プログラムANTIGENIC (Kolaskar, A. et al., 1990)を用いて行った。肺炎桿菌 MGH78578のゲノム配列に対する、決定されたエピトープ配列のBLASTによって同定された肺炎桿菌由来遺伝子を列挙した(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>、<http://pendant.gsf.de/>)。ORFの番号付けは恣意的なものである。アノテーション/推定機能は、主

10

20

30

40

50

に、他の細菌の種、優先的に、グラム陰性細菌からのオープンリーディングフレームとの
相同性によって得た。

【 0 2 6 9 】

(表 2) 遺伝子分布分析に使用した株のリスト

番号	株の識別番号	種	K型	O型
1	A 5054	肺炎桿菌	1	1
2	i252/94	肺炎桿菌	1	3
3	B 5055	肺炎桿菌	2	1
4	i225/94	肺炎桿菌	3	1
5	C 5046	肺炎桿菌	3	2
6	D 5050	<i>K. オゼネ (K. ozaenae)</i>	← 4	2ac
7	E 5051	<i>K. オゼネ</i>	5	2ac
8	エロゲネス (Aerogenes) 4140	肺炎桿菌	7	1
9	1015	<i>K. プランチコラ</i>	← 8	1
10	i272/94	肺炎桿菌	8	3
11	919	肺炎桿菌	10	1
12	313	肺炎桿菌	12	1
13	1470	肺炎桿菌	13	O-
14	1193	<i>K. プランチコラ</i>	14	5
15	Mich61	肺炎桿菌	15	4
16	2069/49	肺炎桿菌	16	1
17	i243/94	肺炎桿菌	16	3
18	1702/49	肺炎桿菌	21	1
19	i202/94	肺炎桿菌	21	3
20	1680/49	肺炎桿菌	24	1
21	i257/94	肺炎桿菌	24	9
22	2002/49	肺炎桿菌	25	3
23	6613	肺炎桿菌	27	2
24	i192/94	肺炎桿菌	27	9
25	5758	肺炎桿菌	28	2
26	5725y	<i>K. オキシトカ</i>	29	1
27	i219/94	肺炎桿菌	29	3
28	6258	肺炎桿菌	31	3
29	6168	肺炎桿菌	33	3
30	i256/94	肺炎桿菌	38	3
31	8414	肺炎桿菌	38	O-
32	7749	<i>K. プランチコラ</i>	39	1
33	5281	肺炎桿菌	46	1
34	i224/94	肺炎桿菌	52	3
35	5759/50	肺炎桿菌	52	O-
36	スタンリー (Stanley)	<i>K. プランチコラ</i>	54	3
37	i221/94	肺炎桿菌	57	3
38	4425/51	<i>K. プランチコラ</i>	57	5
39	264-1	肺炎桿菌	67	7
40	265-1	肺炎桿菌	68	2
41	i203/94	肺炎桿菌	68	3
42	889	肺炎桿菌	69	8
43	708	肺炎桿菌	80	12
44	370	肺炎桿菌	81	O+
45	フライドランダー (Friedländer) 204	肺炎桿菌	K-	1
46	5053	<i>K. オゼネ</i>	K-	2a, 2c
47	MGH78578	肺炎桿菌	nd	nd

10

20

30

40

表2は、遺伝子分布研究のために分析した肺炎桿菌分離株の異なる株を示す。種ならびに関連するK型およびO型を示す。MGH78578はゲノムライブラリーの作製に使用した。nd、

50

未決定。

【 0 2 7 0 】

(表3) 様々なクレブシエラ属の種および肺炎桿菌株における選択された数の抗原についての遺伝子分布分析

ORF	SEQ ID NO (DNA)	遺伝子分布
KPORF-01	17	46/46
KPORF-02	18	36/46
KPORF-03	19	12/46
KPORF-04	20	42/46
KPORF-05	21	46/46
KPORF-06	22	17/46
KPORF-07	23	41/46
KPORF-08	24	5/46
KPORF-09	25	41/46
KPORF-10	26	43/46
KPORF-11	27	46/46
KPORF-12	28	22/46
KPORF-13	29	43/46
KPORF-14	30	45/46
KPORF-15	31	40/46
KPORF-16	32	32/46
KPORF-17	33	34/46
KPORF-18	34	39/46
KPORF-19	35	24/46
KPORF-20	36	39/46
KPORF-21	37	43/46
KPORF-22	38	27/46
KPORF-23	39	4/46
KPORF-24	40	28/46
KPORF-25	41	46/46
KPORF-26	42	35/46
KPORF-27	43	43/46
KPORF-28	44	41/46
KPORF-29	45	40/46
KPORF-30	46	46/46
KPORF-31	47	46/46
KPORF-32	48	46/46
KPORF-33	49	46/46
KPORF-34	50	38/46
KPORF-35	51	39/46
KPORF-36	52	46/46

10

20

30

40

KPORF-37	53	46/46
KPORF-38	54	41/46
KPORF-39	55	39/46
KPORF-40	56	38/46
KPORF-41	57	39/46
KPORF-42	58	46/46
KPORF-43	59	37/46
KPORF-44	60	45/46
KPORF-45	61	46/46
KPORF-46	62	39/46
KPORF-47	63	1/46
KPORF-48	64	39/46
KPORF-49	65	46/46
KPORF-50	66	46/46
KPORF-51	67	7/46
KPORF-52	68	7/46
KPORF-53	69	46/46
KPORF-54	70	46/46
KPORF-55	71	46/46
KPORF-56	72	44/46
KPORF-57	73	40/46
KPORF-58	74	42/46
KPORF-59	75	17/46
KPORF-60	76	46/46
KPORF-61	77	44/46
KPORF-62	78	43/46
KPORF-63	79	35/46
KPORF-64	80	40/46
KPORF-65	81	46/46
KPORF-66	82	42/46
KPORF-67	83	18/46
KPORF-68	84	37/46
KPORF-69	85	5/46
KPORF-70	86	42/46
KPORF-71	87	39/46
KPORF-72	88	43/46
KPORF-73	89	41/46
KPORF-74	90	36/46
KPORF-75	91	31/46
KPORF-76	92	38/46
KPORF-77	93	37/46
KPORF-78	94	40/46
KPORF-79	95	4/46
KPORF-80	96	4/46

10

20

30

40

KPORF-81	97	2/46
KPORF-82	98	46/46
KPARF-01	100	37/46
KPARF-04	103	40/46
KPARF-05	104	46/46
KPARF-07	106	43/46
KPARF-08	107	40/46
KPCRF-01	147	39/46
KPCRF-02	148	1/46
KPCRF-05	151	10/46
KPCRF-06	152	45/46
KPCRF-07	153	44/46
KPCRF-08	154	36/46
KPCRF-10	156	32/46
KPCRF-12	158	34/46

10

表3に示したように46種類のクレブシエラ属株とPCRの正の対照であるMGH78578を、関連する抗原をコードする遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドを用いてPCRによって試験した。この遺伝子分布表は、各遺伝子についての46種類の株からのPCR陽性結果の数を列挙し、クレブシエラ属の種の多様な分離株において遺伝子が存在し、保存されていることを示す。

20

【 0 2 7 1 】

(表4) 肺炎桿菌抗原に由来するペプチドを用いたペプチドELISA

ペプチド	ORF	Seq ID	合計	aa から	aa まで	P3494.2	P3495.2	P3518.2	P3533.2	P3536.2	P3545	P3548	P3560	P3567	P3571	P3576	P3581	P3582	P3583	IC38	IC40	IC76	IC86	IC88	IC89	IC92	IC93	スコア
CRF-2.04	KPCRF-02	335	22	65	86	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	61
ORF-26.01	KPORF-26	229	22	85	114	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	48
ORF-81.01	KPORF-81	284	22	212	244	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	27
ARF-3.01	KPARF-03	289	21	13	37	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	49
ORF-58.01	KPORF-58	261	21	35	65	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	22
CRF-4.01	KPCRF-04	337	20	58	82	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	41
ORF-27.03	KPORF-27	230	20	83	109	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	20
ORF-42.01	KPORF-42	245	20	248	276	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	23

30

ORF	Seq ID NO (タンパク質)	タンパク質 内の 位置 (aa)	A5054	フライドランダー 204
KPORF-02	205	46-105	+++	++
KPORF-13	216	56-111	++	+++
KPORF-20	223	25-107	+	+++
KPORF-21	224	19-66	++	++
KPORF-26	229	85-114	+	++
KPORF-27	230	37-109	+	++
KPORF-28	231	266-296	+	++
KPORF-29	232	103-152	+	+++
KPORF-32	235	167-218	+	+++
KPORF-37	240	790-834	+	+++
KPORF-38	241	761-781	++	+++
KPORF-39	242	176-232	++	+++
KPORF-41	244	117-201	+	++
KPORF-42	245	249-323	+	++
KPORF-44	247	232-278	+	++
KPORF-49	252	209-255	+	+++
KPORF-52	255	75-176	+	++
KPORF-53	256	202-256	+	++
KPORF-54	257	130-178	+	++
KPORF-55	258	69-126	++	+++
KPORF-60	263	126-148	+	++
KPORF-61	264	1-49	+	++
KPORF-62	265	127-182	+	++
KPORF-64	267	48-106	+	++
KPORF-65	268	410-466	+	+++
KPORF-66	269	152-206	++	+++
KPORF-72	275	555-621	+	++
KPORF-78	281	166-202	++	+++
KPORF-79	282	317-364	+	++
KPORF-80	283	1-50	+	++
KPORF-82	285	277-324	++	+++
KPARF-03	289	14-36	++	+++
KPCRF-03	336	6-43	++	+++
KPCRF-10	343	57-101	++	++
KPCRF-11	344	84-95	+++	+++
KPCRF-12	345	98-115	+	+++

10

20

30

40

肺炎桿菌A5054株およびフライドランダー204株の細胞の表面に結合するかどうか、マウスにおいて作製されたエピトープ特異的抗体をFACS分析において試験した。FACS分析において有意な変化を示した血清を列挙した。変化の程度は、「+」の数によって示した。+, 0~9%; ++, 10~35%; +++, >36%パーセントは、免疫血清とインキュベートしなかった細胞と比較してFACS分析において変化を示した細胞の数を示す。

50

【 0 2 7 3 】

(表6) 肺炎桿菌抗原の遺伝子保存分析に利用したクレブシエラ属の種の株

番号	株の名前	種	K型	O型
1	A 5054	肺炎桿菌	1	1
2	i252/94	肺炎桿菌	1	3
3	B 5055	肺炎桿菌	2	1
4	i225/94	肺炎桿菌	3	1
5	D 5050	K. オゼネ	4	2ac
6	E 5051	K. オゼネ	5	2ac
7	エロゲネス4140	肺炎桿菌	7	1
8	1015	K. プランチコラ	8	1
9	i262/94	肺炎桿菌	9	3
10	919	肺炎桿菌	10	1
11	313	肺炎桿菌	12	1
12	1470	肺炎桿菌	13	O-
13	1193	K. プランチコラ	14	5
14	Mich61	肺炎桿菌	15	4
15	2069/49	肺炎桿菌	16	1
16	i243/94	肺炎桿菌	16	3
17	2005/49	肺炎桿菌	17	O-
18	1754/49	肺炎桿菌	18	1
19	1702/49	肺炎桿菌	21	1

10

20

20	i202/94	肺炎桿菌	21	3
21	1996/49	肺炎桿菌	22	1
22	1680/49	肺炎桿菌	24	1
23	2002/49	肺炎桿菌	25	3
24	6613	肺炎桿菌	27	2
25	5758	肺炎桿菌	28	2
26	5725y	K. オキシトカ	29	1
27	7824	肺炎桿菌	30	1
28	6258	肺炎桿菌	31	3
29	6168	肺炎桿菌	33	3
30	i256/94	肺炎桿菌	38	3
31	7749	K. プランチコラ	39	1
32	2482	肺炎桿菌	43	2
33	5281	肺炎桿菌	46	1
34	i224/94	肺炎桿菌	52	3
35	1756/51	K. プランチコラ	53	3
36	スタンリー	K. プランチコラ	54	3
37	3985/51	肺炎桿菌	55	3
38	i221/94	肺炎桿菌	57	3
39	4463/52	肺炎桿菌	60	5
40	5710/52	肺炎桿菌	61	5
41	5711/52	肺炎桿菌	62	1
42	5845/52	肺炎桿菌	63	1
43	NCTC8172	肺炎桿菌	64	1
44	264-1	肺炎桿菌	67	7
45	265-1	肺炎桿菌	68	2
46	889	肺炎桿菌	69	8
47	708	肺炎桿菌	80	12
48	370	肺炎桿菌	81	O+
49	フライトランダー204	肺炎桿菌	K-	1
50	5053	K. オゼネ	K-	2a, 2c
51	MGH78578	肺炎桿菌	未決定	未決定

10

20

30

【 0 2 7 4 】

(表7) 配列保存分析に使用したオリゴヌクレオチド

40

ORF	プライマー名	方向	配列	遺伝子開始に対する位置
KPORF-13	210-5901 (SEQ ID NO 377)	センス	GTGCTGGCGGTTATCCTG	-83 ~ -66
	210-5902 (SEQ ID NO 378)	アンチセンス	GTTATTCCCGGGTCGAAATC	+1145 ~ 1164
KPORF-21	210-5903 (SEQ ID NO 379)	センス	ACGCAGAAGAAACCGAACAG	-89 ~ -70
	210-5904 (SEQ ID NO 380)	アンチセンス	CGACGGAATAAAGTGGGAAT	+549 ~ +568
KPORF-32	210-6097 (SEQ ID NO 381)	センス	GACCAGAGTGAAATATTTACAAAA	-52 ~ -29
	210-6563 (SEQ ID NO 382)	アンチセンス	GTTTATCGCCACGCTGAT	+1295 ~ +1312
KPORF-37	210-5905 (SEQ ID NO 383)	センス	GCCTGATGGCTGAATCGTTA	-54 ~ -35
	210-5906 (SEQ ID NO 384)	アンチセンス	GAGCAGCGTTTTTGTGTCG	+1089 ~ +1107
	210-6345 (SEQ ID NO 385)	センス	CAAGCTGAAGCTGTTGGGTGTGGAC	+963 ~ 987
	210-6346 (SEQ ID NO 386)	アンチセンス	GGCGGTGCGGATGTAGAACATC	+2211 ~ 2232
	210-5909 (SEQ ID NO 387)	センス	GGCTGGAACCTGTACGTTTG	+2101 ~ 2120
	210-5910 (SEQ ID NO 388)	アンチセンス	TCGTCGATGCTGCAGATATT	+2556 ~ 2575
KPORF-38	210-5911 (SEQ ID NO 389)	センス	CCGCTTCGTCACTGTTGAG	-44 ~ -26
	210-5912 (SEQ ID NO 390)	アンチセンス	TGACTGACAAAGGCGGAGAG	+652 ~ +671
	210-5913 (SEQ ID NO 391)	センス	CGCTGAACGTCGATAATGTC	+599 ~ +618
	210-5914 (SEQ ID NO 392)	アンチセンス	GAACCACCTCGAGTTTCACC	+1296 ~ +1315
	210-5915 (SEQ ID NO 393)	センス	CGCGCATCTCTATCGTC	+1211 ~ +1228
	210-5916 (SEQ ID NO 394)	アンチセンス	GAGACCGGAGATCGCTTTTT	+2009 ~ +2028
	210-5917 (SEQ ID NO 395)	センス	GCCGCGTTTGATATCGTCTA	+1969 ~ +1988
	210-5918 (SEQ ID NO 396)	アンチセンス	CGTTTTAACTCGTCGCCATC	+2881 ~ +2900
	210-5919 (SEQ ID NO 397)	センス	GTGGATAGCGGGTACTGAA	+2728 ~ +2747
	210-2920 (SEQ ID NO 398)	アンチセンス	GCCCCTCTCTATCCCATAGC	+3756 ~ +3775
	210-5921 (SEQ ID NO 399)	センス	TAAAGGCGCTGGGCATTAG	+3650 ~ +3668
	210-5922 (SEQ ID NO 400)	アンチセンス	GGCTGACTGCCGGTATTACT	+4459 ~ +4478
210-5923 (SEQ ID NO 401)	センス	AACCAACGCCTTGTTCCCTT	+4311 ~ +4329	
210-5924 (SEQ ID NO 402)	アンチセンス	GTGACCGGATAACGCCAGAC	+5176 ~ +5195	

10

20

30

40

KPORF-39	210-5925 (SEQ ID NO 403)	センス	GTAAGGACATGCAGGAGATG	-132 ~ -113
	210-5926 (SEQ ID NO 404)	アンチセンス	GTAATATGGCGACGGTCTT	+892 ~ +910
KPORF-60	210-5927 (SEQ ID NO 405)	センス	CATTAGGCTAGTCGTTCTCG	-54 ~ -35
	210-5928 (SEQ ID NO 406)	アンチセンス	TACGTTCCCTGTTACCGTGTC	+851 ~ +870
KPORF-65	210-6564 (SEQ ID NO 407)	センス	GACGTCAGTTTACTGGTAGGC	-206 ~ -186
	210-6565 (SEQ ID NO 408)	アンチセンス	TCTTTCAGCTGACGAATGAC	+703 ~ +722
	210-6566 (SEQ ID NO 409)	センス	CTCGTAATAACGCTCTATACCC	+624 ~ +645
	210-6567 (SEQ ID NO 410)	アンチセンス	CAATAGCCGGAATGGATA	+1518 ~ +1535
	210-6568 (SEQ ID NO 411)	センス	CTGATGATCCTGATTAACGAC	+1405 ~ +1425
	210-6569 (SEQ ID NO 412)	アンチセンス	CGATTTTACGCTCCATCAT	+2034 ~ +2052

10

KPORFおよびプライマー名、SEQ ID NO:、遺伝子に対するプライマーの方向、配列、および遺伝子に対する位置を示した。遺伝子または遺伝子断片のPCR増幅とその後の配列分析にオリゴヌクレオチドを使用した。

20

【 0 2 7 5 】

(表 8) KPORF-13の遺伝子保存

基準位置	アラインメント位置	基準におけるアミノ酸	アミノ酸変化 ¹	アミノ酸変化 ²	アミノ酸変化 ³	アミノ酸変化 ⁴	それぞれの変化を有する株 ¹	それぞれの変化を有する株 ²	それぞれの変化を有する株 ³	それぞれの変化を有する株 ⁴
2	2	K	N	R	S	T	313, i202/94, 6613, 5758, 4463/52	1680/49	1470	i221/94
3	3	M	L	V			D5050	1470		
4	4	K	I	N			D5050	1470, i221/94		
5	5	L	F				1470, i221/94			
6	6	T	P				1470, i221/94			
7	7	A	T				i202/94			
10	10	S	I				1470, i221/94			
11	11	G	V				1470, 1680/49, i221/94			
12	12	M	I				A5054, 919, Mich61, 2069/49, i224/94, 5710/52, 708, 370, 5053			
13	13	I	M				i202/94, 4463/52			
14	14	L	P				i221/94			
15	15	S	A				i202/94, 6613, 5758, 4463/52			
17	17	S	L				919			
18	18	A	P				919, 5281			
24	24	T	V				6613, 5758			
27	27	D	E				6613, 5758			
29	29	M	L				4463/52			
30	30	V	D				6613, 4463/52			
56	56	A	T				エロゲネス4140, 1470, 1996/49, 5711/52			
84	84	D	N				1754/49			
88	88	R	H				1680/49, 5281			
95	95	K	Q				919, 1754/49, i202/94, 1680/49, 5281, i224/94, 4463/52			
107	107	D	A				D5050, E5051, エロゲネス4140, 1470, Mich61, 1754/49, i202/94, 1996/49, 6613, 5758, 7749, i224/94, 4463/52, 5711/52, 5053			
122	122	N	D				i202/94, 4463/52			
125	125	N	Y				2005/49, フライドランダー 204			
183	183	A	T				2005/49, フライドランダー 204			
249	249	K	Q				i202/94, 4463/52			

10

20

30

260	260	K	Q				6613, 5758			
261	261	P	S				4463/52			
330	330	V	I	L			NCTC8172	i202/94, 6613, 5758, 4463/52		
331	331	L	V				1680/49			
333	333	N	H				6613, 5758			
337	337	V	A				1680/49			
338	338	D	I				1680/49			
340	340	L	V				1680/49			
341	341	F	V				1680/49			
344	344	F	L				6613			
346	346	D	A				1470, 1680/49, 6613			
351	351	F	L				1680/49			
352	352	L	G	R			1680/49, i221/94	6613		
353	353	D	H	N			5281	1680/49		
355	355	K	I	N			1680/49	5281		
356	356	R	H	L	Q		A5054, D5050, E5051, 919, 1754/49, 6168, 7749	1470, 1680/49, i221/94	i225/94, エロゲネス4140, 2005/49, 1702/49, 1996/49, 2002/49, 6613, 5758, 7824, 6258, 3985/51, 5711/52, 708, 370, フライドランダー 204	

10

20

1、2、3、4、肺炎桿菌MGH78578を基準とした、クレブシエラ属の種のそれぞれの株の配列決定された遺伝子における各位置で観察されたアミノ酸。

【 0 2 7 6 】

(表 9) KPORF-21の遺伝子保存

基準位置	アラインメント位置	基準におけるアミノ酸	アミノ酸変化 ¹	アミノ酸変化 ²	アミノ酸変化 ³	アミノ酸変化 ⁴	それぞれの変化を有する株 ¹	それぞれの変化を有する株 ²	それぞれの変化を有する株 ³	それぞれの変化を有する株 ⁴
1	1	V	L				5725y, 264-1			
2	2	P	T				264-1			
5	5	E	D				B5055, 2005/49, 1702/49, 7824, i224/94			
6	6	P	A	S	T		7824	265-1, 889	5725y, 264-1	
7	7	S	T				889			
12	12	G	D				5725y, 264-1			
36	36	R	G				i262/94			
39	39	V	A	D			i262/94, i202/94, 5725y, スタンリー, 4463/52, 264-1, 265-1, 889	5710/52		
43	43	M	I				2005/49			
44	44	S	G				265-1, 889			
52	52	D	N				5725y			
53	53	V	A				919, 313, 6613, 5758, 6258, 6168, 3985/51, i221/94, 5845/52			
54	54	T	I				4463/52			
56	56	D	E				i262/94, i202/94, 5725y, 1756/51, スタンリー, 4463/52, 264-1, 265-1, 889			
58	58	L	V				5725y, 264-1, 265-1, 889			
59	59	E	D				5725y, 264-1, 265-1, 889			
60	60	Q	K	N	R		264-1	5725y	265-1, 889	
63	63	A	E				5725y, 264-1			
68	68	N	K				2005/49			
74	74	N	E	H	Q		5725y, 264-1	1756/51, スタンリー	265-1, 889	
78	78	G	R				5725y, 264-1, 265-1, 889			
85	85	S	G				i262/94			
94	94	I	V				5725y, 264-1			
99	99	S	K	N			5725y, 264-1	265-1, 889		
104	104	A	S				5725y, 264-1			
106	106	Q	E				5725y, 264-1, 265-1, 889			
107	107	V	A	D	E	T	i202/94, 2482, 4463/52	1756/51, スタンリー	265-1, 889	5725y, 264-1
108	108	V	G	I	T		265-1, 889	5725y	264-1	
109	109	D	E				i202/94, 5725y, 2482, スタンリー, 4463/52, 264-1, 265-1, 889			
110	110	Q	A	R			5725y, 264-1	265-1, 889		
114	114	E	K				A5054, Mich61, 6613, 5758, 5845/52, 708, 370, 5053			
116	116	D	E				5725y, 264-1, 265-1, 889			
118	118	D	Y				5710/52			
120	120	V	A				5725y, 264-1, 265-1, 889			
121	121	S	L	Q	R		265-1, 889	5725y	264-1	
122	122	L	F				B5055			
124	124	R	K				5725y, 264-1, 265-1, 889			
125	125	E	A				i202/94, 4463/52			
133	133	E	D				265-1, 889			
137	137	S	T				5725y, 265-1, 889			
138	138	A	V				5725y, 264-1, 265-1, 889			
140	140	T	A				i202/94, 5725y, 4463/52, 264-1, 265-1, 889			
145	145	V	I				i202/94, 5725y, 4463/52, 264-1, 265-1, 889			

1、2、3、4、肺炎桿菌MGH78578を基準とした、クレブシエラ属の種のそれぞれの株の配

列決定された遺伝子における各位置で観察されたアミノ酸。

【 0 2 7 7 】

(表 1 0) KPORF-32の遺伝子保存

基準位置	アラインメント位置	基準におけるアミノ酸	アミノ酸変化 ¹	アミノ酸変化 ²	アミノ酸変化 ³	それぞれの変化を有する株 ¹	それぞれの変化を有する株 ²	それぞれの変化を有する株 ³
2	2	E	V			A5054, 6613		
4	4	F	I			6613		
7	7	I	V			A5054, B5055, 6613, 5281		
9	9	V	I			4463/52		
11	11	A	D			i243/94		
12	12	G	R			i243/94		
19	19	A	T			i243/94		
20	20	A	P			i243/94		
21	21	Q	D	H		i243/94	i221/94, 5053	
24	24	Q	P			i243/94		
28	28	R	H			5845/52		
32	32	L	V			i243/94		
34	34	N	K			i243/94		

10

20

36	36	K	I	R		i243/94	6613	
38	38	P	M			i243/94		
45	45	S	A			i243/94		
60	60	T	A			A5054, B5055, i225/94, D5050, E5051, エロゲネス 4140, 1015, Mich61, 2069/49, i243/94, 2005/49, 1754/49, 1702/49, i202/94, 1996/49, 1680/49, 2002/49, 6613, 5725y, 7824, 6258, 6168, i256/94, 7749, 2482, 5281, i224/94, 1756/51, スタンリー, 3985/51, i221/94, 4463/52, 5710/52, 5711/52, 5845/52, NCTC8172, 708, 370, 5053		
75	75	A	G			5725y		
79	79	Q	H			5725y		
92	92	A	P			5725y		
93	93	W	R			5725y		
99	99	G	R			5725y		
112	112	N	T			i202/94, 4463/52		
119	119	E	G			A5054		
122	122	G	D			D5050, E5051, i243/94, 1756/51, スタンリー		
124	124	Q	E			2482		
133	133	S	L			5725y		
136	136	R	H	S		i224/94, 3985/51, NCTC8172	2069/49	
151	151	M	A	T	V	i202/94, 4463/52	i225/94, 2005/49	A5054, エロゲネス 4140, 1015, Mich61, 1754/49, 1702/49, 1996/49, 1680/49, 2002/49, 6613, 7824, 6258, 6168, i256/94, 7749, 2482, i221/94, 5710/52, 5845/52, 708, 370, 5053
152	152	T	A			i225/94, 2005/49		
176	176	V	I			i202/94, 4463/52		
211	211	S	T			5725y		
229	229	L	M			5725y		
238	238	P	T			5725y		
240	240	V	G			5725y		
259	259	P	T			5725y		
262	262	D	N			i243/94, i202/94, 1756/51, スタンリー, 4463/52		
264	264	D	E			i243/94, i202/94, 1756/51, スタンリー, 4463/52		
265	265	D	E			i202/94, 4463/52		
268	268	N	Y			5725y		
272	272	S	G			i202/94, 4463/52		
276	276	N	H			5725y		
281	281	N	K			5725y		
286	286	Q	P			5725y		
294	294	C	R			5725y		
312	312	R	P			5725y		
315	315	Q	L			1754/49		
316	316	T	A			i202/94, 4463/52		
320	320	T	K			5725y		
354	354	M	T			i243/94		
359	359	A	G			5725y		
360	360	P	S			i243/94, 1756/51, スタンリー		
363	363	Y	F	S		4463/52	5725y	
367	367	E	D			6613		
368	368	V	L	M		2069/49	1015, i243/94, 6613, 5053	
371	371	V	L			5725y		
374	374	W	R			i243/94		

10

20

30

40

377	377	G	R			i243/94	
379	379	N	K			i243/94	
380	380	F	T			i243/94	
382	382	W	S			i243/94	
383	383	A	P			6613	
387	387	A	L			i243/94	
388	388	W	H			i243/94	
390	390	C	S			i243/94	
391	391	A	V	Y		D5050	i243/94
394	394	L	H			i243/94	
395	395	V	M	Q		A5054	i243/94
397	397	G	E			エロゲネス4140, 7824	

10

1、2、3、肺炎桿菌MGH78578を基準とした、クレブシエラ属の種のそれぞれの株の配列決定された遺伝子における各位置で観察されたアミノ酸。

【0278】

(表11) KPORF-37の遺伝子保存

基準位置	アライメント位置	基準におけるアミノ酸	アミノ酸変化 ¹	アミノ酸変化 ²	それぞれの変化を有する株 ¹	それぞれの変化を有する株 ²
213	213	I	V		2005/49	
218	218	T	I		i202/94, 4463/52	
225	225	H	R		i202/94, 4463/52	
254	254	G	E		D5050, E5051	
299	299	M	T		1193	
364	364	D	H	T	1470	NCTC8172
509	509	D	G		1680/49	
513	513	E	A		i202/94, 4463/52	
523	523	V	I		i243/94, 1756/51	
551	551	S	T		i243/94, i202/94, 1756/51, 4463/52	
615	615	E	K		D5050, E5051	
618	618	R	Q		1680/49	
727	727	E	D		A5054, B5055, D5050, E5051, 1015, 919, 313, 1470, Mich61, 2069/49, 2005/49, 1754/49, 1996/49, 1680/49, 2002/49, 6613, 5758, 6258, 6168, i256/94, i224/94, i221/94, 5710/52, 5711/52, 370, フライドランダー 204, 5053	
731	731	K	T		i202/94, 4463/52	
792	792	C	W		1680/49	
803	803	A	T		A5054	
827	827	D	N		7749	
845	845	E	K		エロゲネス4140	
846	846	K	N		i243/94, 1756/51	
847	847	A	V		i243/94, 1756/51	

20

30

1、2、肺炎桿菌MGH78578を基準とした、クレブシエラ属の種のそれぞれの株の配列決定された遺伝子における各位置で観察されたアミノ酸。

40

【0279】

(表12) 選択されたクレブシエラ属の種および株からのクレブシエラ属遺伝子KPORF-38の配列決定によって得られた配列長(アミノ酸)

株の名前	得られた配列 (aa)	SEQ ID NO
MGH78578	1663	580
A5054	1254	581
i252/94	951	582
B5055	1403	583
i225/94	1454	584
D5050	1492	585
E5051	1463	586
エロゲネス 4140	1492	587
1015	1457	588
i262/94	1489	589
919	1476	590
313	1490	591
1470	1490	592
1193	1492	593
Mich61	1490	594
2069/49	1491	595
2005/49	1489	596
1702/49	1419	597
1996/49	1489	598
1680/49	1484	599
2002/49	1489	600
6613	1482	601
5758	1240	602
7824	1492	603
6258	1423	604
6168	1491	605
i256/94	1489	606
7749	1492	607
2482	1492	608
5281	1492	609
i224/94	1492	610
i221/94	1487	611
5710/52	1489	612
5711/52	1490	613
NCTC8172	1252	614
708	949	615
フライドランダー 204	1244	616
5053	1474	617

10

20

30

全ての配列を、最初のコドン(開始)から、示した位置まで決定した。

40

【 0 2 8 0 】

(表 1 3) KPORF-39の遺伝子保存

基準位置	アラインメント位置	基準におけるアミノ酸	アミノ酸変化 ¹	アミノ酸変化 ²	それぞれの変化を有する株 ¹	それぞれの変化を有する株 ²
1	1	V	M		264-1	
2	2	D	E		264-1, 265-1, 889	
45	45	N	S		265-1, 889	
50	50	L	F		265-1	
52	52	P	S		i256/94	
58	58	V	L		264-1, 265-1, 889	
82	82	S	N		6258, 3985/51	
96	96	I	L		264-1, 265-1, 889	
117	117	I	L		265-1, 889	
119	119	A	S		264-1	
123	123	A	T		i252/94, i262/94, i243/94, 1756/51, スタンリー, 4463/52	
126	126	S	T		265-1, 889	
157	157	P	A		264-1, 265-1, 889	
159	159	D	S		265-1, 889	
161	161	T	A		264-1	
176	176	L	V		264-1	
182	182	T	S		265-1, 889	
193	193	S	N		265-1, 889	
199	199	V	S		264-1, 265-1, 889	
201	201	T	A		264-1, 265-1, 889	
213	213	L	M		6613, 5758, 5710/52	
232	232	M	I		265-1, 889	
234	234	A	S		i262/94, i243/94, 1756/51, スタンリー	
236	236	K	A		264-1, 265-1, 889	
237	237	A	P	T	1756/51	1470
241	241	N	K		264-1, 265-1, 889	
243	243	N	K		i202/94, 4463/52	
245	245	D	E		265-1, 889	
245	246	-	Q		889	

10

20

30

¹、²、肺炎桿菌MGH78578を基準とした、クレブシエラ属の種のそれぞれの株の配列決定された遺伝子における各位置で観察されたアミノ酸。

【 0 2 8 1 】

(表 1 4) KPORF-60の遺伝子保存

基準位置	アライメント位置	基準におけるアミノ酸	アミノ酸変化 ¹	アミノ酸変化 ²	アミノ酸変化 ³	それぞれの変化を有する株 ¹	それぞれの変化を有する株 ²	それぞれの変化を有する株 ³
5	5	F	L			265-1, 889		
21	21	H	Q			265-1, 889		
24	24	N	D	E	T	D5050, 264-1	265-1, 889	スタンリー
26	26	T	Q			265-1, 889		
28	28	V	I			265-1, 889		
66	66	T	A	I		265-1, 889	6613	
95	95	D	E			265-1, 889		
117	117	N	K			265-1, 889		
138	138	S	G			D5050, 264-1, 265-1, 889		
192	192	N	H			265-1, 889		
194	194	K	Q			265-1, 889		
200	200	E	D			D5050, 264-1, 265-1, 889		
206	206	N	S			265-1, 889		
231	231	D	E			i252/94, D5050, i262/94, i243/94, i202/94, 1996/49, 1756/51, スタンリー, 4463/52, 264-1, 265-1, 889		

10

1、2、3、肺炎桿菌MGH78578を基準とした、クレブシエラ属の種のそれぞれの株の配列決定された遺伝子における各位置で観察されたアミノ酸。

20

【 0 2 8 2 】

(表 1 5) KPORF-65の遺伝子保存

基準位置	アラニンメント位置	基準におけるアミノ酸	アミノ酸変化 ¹	それぞれの变化を有する株 ¹
36	36	I	V	i252/94, i262/94, i243/94, 1756/51, スタンリー
48	48	D	N	i252/94, i262/94, i243/94, 1756/51, スタンリー
61	61	L	P	E5051
100	100	Q	H	i202/94
115	115	D	E	i202/94
125	125	R	P	i202/94
128	128	R	A	i202/94
144	144	A	V	i202/94
186	186	D	H	i202/94
215	215	E	D	i202/94
283	283	I	V	i252/94, i262/94, i243/94, 1756/51, スタンリー
303	303	S	R	スタンリー
308	308	A	G	i252/94, i262/94, i243/94, i202/94, 1756/51, スタンリー, 4463/52
364	364	E	D	i252/94, i262/94, i243/94, 1756/51, スタンリー
376	376	G	D	E5051
389	389	D	G	フライドランダー 204
405	405	S	A	i202/94, 4463/52
422	422	S	A	i202/94, 4463/52
471	471	I	L	A5054
481	481	P	S	5725y
497	497	V	I	NCTC8172
511	511	Y	F	5725y
516	516	K	Q	エロゲネス4140
520	520	Y	F	i252/94, D5050, i262/94, i243/94, i202/94, 5725y, 1756/51, スタンリー, 4463/52
565	565	S	A	D5050, 5725y
589	589	M	I	D5050, 5725y
619	619	T	N	D5050, 5725y

10

20

30

¹、肺炎桿菌MGH78578を基準とした、クレブシエラ属の種のそれぞれの株の配列決定された遺伝子における各位置で観察されたアミノ酸。

【 0 2 8 3 】

(表 1 6) 防御実験に使用した抗原断片の概要(実施例8)

断片の名前	断片のSEQ ID DNA/タンパク質	完全長のSEQ ID DNA/タンパク質	完全長の位置 aaからaaまで
KPORF-02.1	1 / 188	18 / 205	2-130
KPORF-13.1	2 / 189	29 / 216	26-356
KPORF-20.1	3 / 190	36 / 223	2-180
KPORF-21.1	4 / 191	37 / 224	1-168
KPORF-32.1	375 / 376	48 / 235	23-397
KPORF-37.1	5 / 192	53 / 240	2-420
KPORF-37.2	6 / 193	53 / 240	414-847
KPORF-38.2	7 / 194	54 / 241	582-1099
KPORF-39.1	8 / 195	55 / 242	1-245
KPORF-44.1	9 / 196	60 / 247	24-703
KPORF-49.1	10 / 197	65 / 252	23-328
KPORF-60.1	11 / 198	76 / 263	23-248
KPORF-64.1	12 / 199	80 / 267	2-335
KPORF-65.1	13 / 200	81 / 268	38-633
KPORF-66.1	14 / 201	82 / 269	26-742
KPORF-78.1	15 / 202	94 / 281	26-429
KPORF-82.1	16 / 203	98 / 285	1-632

10

20

【0284】

実施例

実施例1: 本発明によるペプチドを同定するための一般的なスクリーニング手順

本発明に用いられたアプローチは、肺炎桿菌によってコードされるタンパク質またはペプチドと、ヒト血清中に存在する抗体との相互作用に基づいている。ヒト免疫系によって産生され、ヒト血清中に存在する、肺炎桿菌に対する抗体は、抗原タンパク質がインビボで発現され、抗原タンパク質に免疫性があることを示している。さらに、予め選択された血清のプールを用いて、細菌表面ディスプレイ発現ライブラリーによって同定された抗原タンパク質を、選択または作製された個々の血清による2回目および3回目のスクリーニングにおいて処理する。従って、本発明は、薬学的組成物、特に、肺炎桿菌によって引き起こされる感染症を予防するワクチンとしての抗原の効率的な、関連する、包括的なセットを供給する。

30

【0285】

本発明による抗原の包括的なセットを同定するための抗原同定プログラムでは、肺炎桿菌に由来する少なくとも2種類の細菌表面発現ライブラリーが、いくつかの血清プールまたは血漿画分(抗体プール)を用いてスクリーニングされる。抗体プールは、肺炎桿菌の抗原化合物、例えば、全細胞、総抽出物に対して試験されている血清収集物に由来する。好ましくは、(17の試料を用いた)4種類の血清プールを使用する。高いELISA価を有することが確認された血清は、本発明に適用されるスクリーニング方法において、過免疫、従って、関連性があると見なされるためには、イムノプロットングにおいて複数のタンパク質と反応しなければならない。

40

【0286】

本発明で使用する発現ライブラリーは、可能性のある全ての抗原、例えば、肺炎桿菌の全ての分泌型タンパク質および表面タンパク質に由来する抗原を発現しなければならない。細菌表面ディスプレイライブラリーは、肺炎桿菌の発現ペプチド配列のセット(全てのセット)を、細菌宿主膜にある2種類の外膜タンパク質(LamBおよびFhuA)上にディスプレイする細菌宿主の組換えライブラリーによって表される(Georgiou, G., 1997);(Etz, H. et

50

al., 2001)。組換え発現ライブラリーを用いる利点の一つは、同定された抗原の産生が、さらなる組換えDNA技術またはクローニング工程を必要とせずに、スクリーニングおよび選択された抗原発現クローンのコード配列を発現することによって直ちに可能となることである。

【0287】

説明された本発明によるプログラムによって同定された抗原の包括的なセットを、もう1回またはそれ以上のスクリーニングによってさらに分析する。従って、免疫原性があると特定された選択ペプチドに対して作製した個体抗体調製物または抗体が用いられる。好ましい態様によれば、2回目のスクリーニング用の個体抗体調製物は、健常成人、および/またはある特定の最低値を上回る抗体価を示す、抗原暴露された成人に由来する。例えば、抗体価は、試験したヒト(患者または健常個体)の血清の80パーセントイルを超える、好ましくは、90パーセントイルを超える、特に、95パーセントイルを超える。このような高力価の個体抗体調製物を、2回目のスクリーニングで用いることにより、肺炎桿菌に由来する抗原およびその断片を非常に選択的に同定することが可能になる。

10

【0288】

包括的スクリーニング手順の後に、組換えタンパク質として発現させた、もしくは原核生物発現系において発現できなければインビトロ翻訳産物として発現させた、選択された抗原タンパク質、または、(合成により生成された)同定された抗原ペプチドを、2回目のスクリーニングにおいて免疫原性を評価するために、大きなヒト血清収集物(最低約20個の健常人血清および患者血清)を用いた一連のELISAおよびウェスタンブロットティングアッセイによって試験する。

20

【0289】

個体抗体調製物(選択された血清でもよい)を用いて、1回目からの見込みのある全ての候補から、全ての抗原の中で最も見込みのある候補を選択的に同定できることが重要である。従って、好ましくは、2回目のスクリーニングにおけるこれらの抗原の同定では、少なくとも10個の個体抗体調製物(すなわち、選択された病原体に暴露された少なくとも10人の個体に由来する抗体調製物(例えば、血清))を使用しなければならない。もちろん、10個未満の個体調製物を使用することも可能であるが、この工程の選択性が少数の個体抗体調製物では最適でない場合がある。他方で、所定の抗原(またはその抗原断片)が少なくとも10個の個体抗体調製物、好ましくは少なくとも30個、特に少なくとも50個の個体抗体調製物によって認識されるのであれば、この抗原の同定は適切な同定に十分な選択性もある。もちろん、血清反応性は、可能な限り多くの(例えば、100個超、さらには1,000個超)個体調製物を用いて試験することができる。

30

【0290】

従って、血清に反応する、本発明による抗体調製物の関連部分は、好ましくは、少なくとも10個の、より好ましくは、少なくとも30個の、特に、少なくとも50個の個体抗体調製物でなければならない。その代わりとして(または組み合わせで)、抗原はまた、2回目のスクリーニングにおいて使用した全ての個体抗体調製物の好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、特に少なくとも40%を用いて同定することもできる。

【0291】

本発明の好ましい態様によれば、2回目のスクリーニング用の個体抗体調製物を調製するのに用いられる(または抗体調製物として用いられる)血清は、肺炎桿菌(例えば、この病原体の調製物、例えば、溶解産物、細胞壁成分、および組換えタンパク質)に対する力価によって選択される。好ましくは、生物全体(総溶解産物または全細胞)がELISAの抗原として用いられる場合、一部は1,000Uを上回る、特に、5,000Uを上回るIgG価(U=単位、所定の希釈でのOD_{405nm}測定値から計算する)によって選択される。

40

【0292】

ヒト免疫系によって産生され、ヒト血清中に存在する、肺炎桿菌に対する抗体は、抗原タンパク質がインビボで発現され、抗原タンパク質に免疫性があることを示している。血清抗体によって認識される線状エピトープの認識は、4~5と短いアミノ酸の配列に基づい

50

てもよい。もちろん、このことは、これらの短いペプチドが所定の抗体をインビボで誘導できることを必ずしも意味しているわけではない。このような理由で、規定されたエピトープ、ポリペプチド、およびタンパク質は、選択されたタンパク質に対する抗体をインビボで誘導する能力について、動物(主にマウス)においてさらに試験しなければならない。

【0293】

好ましい抗原は細胞表面上に位置するか、または分泌されたものであり、従って、細胞外で接近可能なものである。細胞壁タンパク質に対する抗体は、複数の目的、すなわち、付着の阻害、栄養分の獲得の妨害、免疫回避の阻害、および食作用の促進にかなうと期待されている(Hornef, M. et al., 2002)。分泌タンパク質に対する抗体は、毒素または病原性成分としての分泌タンパク質の機能の中和において有益である。細菌は分泌タンパク質を介して互いに情報交換していることも知られている。これらのタンパク質に対する中和抗体は、感染症を引き起こす病原体種間または種内での、成長を促進するクロストークを妨害する。生物情報分析(シグナル配列、細胞壁局在化シグナル、膜貫通ドメイン)が細胞表面局在または分泌の評価に非常に有用であることが判明した。この実験アプローチには、対応するエピトープおよびタンパク質を有する抗体のヒト血清からの単離、ならびに細菌表面ディスプレイスクリーニングにより選択された(ポリ)ペプチドに対するマウスにおける免疫血清の作製が含まれる。次いで、これらの血清を、3回目のスクリーニングにおいて、以下のアッセイ:様々な条件下で増殖させた肺炎桿菌の細胞表面染色(FACSまたは顕微鏡観察)、中和能(毒素、付着)の測定、ならびにオプソニン化および食作用の促進(インビトロ食作用アッセイ)の少なくとも1つの試薬として使用する。

10

20

【0294】

このような目的で、細菌大腸菌クローンをマウスに直接注射し、免疫血清を採取し、関連するインビトロアッセイにおいて試験する。または、ペプチドまたはタンパク質を基質として用いて、特異的抗体をヒトまたはマウスの血清から精製することができる。

【0295】

本明細書において使用した抗原同定方法によれば、本発明は、驚くべきことに、特に、本明細書に記載のような、肺炎桿菌の包括的な新規の核酸および新規の抗原、その変種および断片のセットを提供することができる。本発明による、抗原をコードするヌクレオチド配列は、好ましくは、SEQ ID NO:1~187およびSEQ ID NO:375に個々に示したヌクレオチド配列を有し、コードされる対応するアミノ酸配列は、好ましくは、SEQ ID NO:188~374およびSEQ ID NO:376に示したアミノ酸配列を有する。

30

【0296】

ある特定の抗原の全ての線状断片は、少なくとも10アミノ酸の長さを有し、1アミノ酸だけ重複するペプチドのセットによって、タンパク質抗原の配列全体を分析することによって同定することができる。その後、完全長の発現タンパク質またはそのドメインポリペプチドと過免疫血清を用いてタンパク質抗原を分析することによって、非線状エピトープを同定することができる。タンパク質の別個のドメインが、ネイティブタンパク質とは無関係に3D構造を形成するのに十分だとすると、それぞれの組換えドメインポリペプチドまたは合成により生成されたドメインポリペプチドを過免疫血清によって分析すれば、マルチドメインタンパク質の個々のドメイン内の高次構造エピトープが同定できるだろう。ドメインが線状エピトープおよび高次構造エピトープを有する抗原の場合、線状エピトープに対応するペプチドによる競合実験を用いて、高次構造エピトープの存在を確かめることができる。

40

【0297】

実施例2:抗クレブシエラ属抗体に基づくヒト血清試料の特徴付けおよび選択、ならびに抗体スクリーニング試薬の調製

実験手順

酵素結合免疫測定法(ELISA)

ELISAプレート(Maxisorb, Millipore)を、コーティング緩衝液(0.1M炭酸ナトリウムpH9.2)で希釈した5~10 µg/ml総タンパク質でコーティングした。2種類の血清希釈液(1,000x

50

および5,000x)をPBS-BSAに溶解して作製した。高度に特異的な西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合抗ヒトIgG二次抗体(Southern Biotech)を、製造業者の推奨(希釈:1,000x)に従って使用した。抗原-抗体複合体は、自動ELISAリーダー(TECAN SUNRISE)によるOD_{405nm}測定値に基づいて、基質(ABTS)から着色生成物への変換を測定することによって定量した。

【0298】

総細菌抽出物の調製

肺炎桿菌Mich61株(K型15; O型4)および708株(K型 80; O型12)ならびにこれらの莢膜陰性変種を、Nutrient Broth(Difco 234000)中で37℃で一晩増殖させた。ドライアイス/エタノール混合物上で凍結するまで1分間インキュベーションした後に、37℃で5分間融解する凍結融解サイクルを繰り返すことによって、細胞を溶解した。この溶解手順を3回繰り返した後、超音波処理を行った。4,000rpm、4℃で15分間、遠心分離した後、上清は全細胞抽出物を含含有しており、上清を収集した。ペレットを捨て、タンパク質濃度を、タンパク質アッセイ色素試薬濃縮物(Bio-Rad Laboratories, Austria)を用いたBradfordアッセイによって測定した。

【0299】

ゲノムスクリーニング用抗体の精製

ELISAでの莢膜陰性株に対する血清の反応が莢膜のある株に対する反応より強いことに基づいて、抗体プール1つにつき4~5個の血清を選択した。熱失活血清と全細胞大腸菌DH5細胞(pHIE11で形質転換し、細菌表面ディスプレイに使用したものと同一条件下で増殖させた)をインキュベートすることによって、大腸菌DH5タンパク質に対する抗体を除去した。プールされ、枯渇された血清から高度に濃縮されたIgG調製物を、プロテインGアフィニティクロマトグラフィー(UltraLink Immobilized Protein G, Pierce)によって、製造業者の説明書に従って作製した。枯渇および精製の効率はELISA測定によってチェックした。

【0300】

結果

ヒト免疫系によって産生され、ヒト血清中に存在する、肺炎桿菌に対する抗体は、抗原タンパク質がインビボで発現され、抗原タンパク質に免疫性があることを示している。これらの分子は、抗菌性特異的抗体と対応する肺炎桿菌ペプチドまたはタンパク質の相互作用に基づく本発明に記載のアプローチにおいて、個々の抗原を同定するのに不可欠である。関連する抗体レパートリーを利用するために、敗血症患者および暴露された健康人からヒト血清を収集した。

【0301】

100人のドナーから50個の急性期血清試料および100個の回復期血清試料を収集し、健康個体から採取した49の血清と共に一連の免疫アッセイによって抗肺炎桿菌抗体について特徴付けた。最初の特徴付けは、肺炎桿菌Mich61株および708株ならびにこれらの莢膜陰性変種の総細菌溶解産物を用いてELISAによって行った。抗体価を測定し、ELISA単位を、直線的な応答の範囲にある血清希釈から計算した。ELISAでの、莢膜を有する株および莢膜を有さない株から調製した溶解産物に対する反応の差に基づいて血清をランク付けし、抗体プールに含める血清を選択するのに使用した。プールの作製に使用した血清と、肺炎桿菌からの細菌溶解産物との反応性を図1Aおよび1Bに示した。

【0302】

細菌表面ディスプレイによる抗原同定のために、選択した血清を、4種類のIgGプールに含めた(各プールにおいて4~5個の血清)。アフィニティクロマトグラフィーによって血清プールからIgG抗体を精製し、細菌表面ディスプレイスクリーニングでのバックグラウンドを避けるために大腸菌DH5反応性抗体を枯渇させた。健康個体を表す血清プールは、ICKp18(IC38、IC40、IC76およびIC86)ならびにICKp19(IC88、IC89、IC92およびIC93)であり、敗血症患者からの血清プールは、PKp34(P3536.2、P3548、P3560、P3582、およびP3583)ならびにPKp35(P3495.2、P3533.2、P3567、およびP3576)である。

【0303】

実施例3:肺炎桿菌の非常にランダムな、フレーム選択した、小断片のゲノムDNAライブラリーの作製

実験手順

肺炎桿菌MGH78578株(ATCC700721)からのゲノムDNAの調製

400ml細菌培養物から細胞を採取し(5,000rpm、20分、室温)、80mlの50mM Tris pH7.4で洗浄し、10mlの50mM Tris pH 7.4/25%スクロース/50mM EDTAに再懸濁した。懸濁液を新しいガラス管に移し、リゾチーム(最終濃度:1.5mg/ml)およびSDS(最終濃度:2%)を添加した。細胞溶解のためにガラス管を氷上でインキュベートした。プロテイナーゼK(最終濃度:0.1mg/ml)を添加し、37℃で10分間インキュベートし、その後に、フェノール/クロロホルム(1:1)抽出を数回行った。最終抽出工程は、フェノールの痕跡を除去するためにクロロホルム/イソアミルアルコール(1:24)を用いて行った。試料を、RNaseA(最終濃度:10µg/ml)で室温で1時間処理し、フェノール/クロロホルムおよびクロロホルム/イソアミルアルコール抽出を前記のように行った。出発体積の1/10の3M NaAc(pH5.3)およびこの体積の2.5倍の99.5%エタノールを添加することによって、残った上清中のDNAを沈殿させた。-20℃で1時間インキュベーションした後、混合物を遠心分離し(20,000rpm、15分)、ペレットを70%エタノールで洗浄した。最後に、ペレットをTE緩衝液に溶解した。

10

【0304】

ゲノムDNA小断片の調製

ゲノムDNA断片を、カップホーン(cup-horn)超音波処理器(BB5カップホーンを備えたBandelin Sonoplus UV 2200超音波処理器、100%出力で10秒のパルス)を用いて機械的に剪断して150~300bpのサイズの断片にするか、または、穏やかなDNaseI(Novagen)処理によって50~70bpのサイズの断片にした。超音波処理によって、非常に密な断片サイズ分布が得られ、この時、DNAが150~300bpサイズ範囲の断片に分解されることが観察された。しかしながら、超音波により誘導された流体力学的剪断力にDNAを大規模に暴露したにもかかわらず、それに続く断片サイズの減少は効率的かつ再現可能に達成できなかった。従って、50~70bpのサイズの断片は、Novagenのショットガン切断キットを用いた穏やかなDNaseI処理によって得た。キットに付いているDNaseIの1:20希釈を調製し、酵素による二本鎖の切断を確実にするために、MnCl₂の存在下、60µl体積で、消化を20℃で5分間行った。反応を2µlの0.5M EDTAで止め、断片化効率を2%TAE-アガロースゲルで評価した。この処理の結果、ゲノムDNAが全て約50~70bpの断片へと断片化された。末端の効率的なフラッシング(flushing)を確実にするために、T4 DNAポリメラーゼを用いて100µMの各dNTPの存在下で、断片を2回平滑末端化した。断片を連結反応にすぐに使用したか、または後で使用するために-20℃で凍結した。

20

30

【0305】

ベクターの説明

ベクター-pMAL4.31は、ラクタマーゼ(bla)遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子で置換したpASK-IBAバックボーン(Skerra, A., 1994)上に構築した。さらに、bla遺伝子をマルチクローニングサイトにクローニングした。細胞膜を横切る効率的な分泌を可能にするために、成熟ラクタマーゼをコードする配列の前にompAリーダーペプチド配列を配置した。リーダーペプチダーゼ切断部位のすぐ後ろの配列の融合を避けるために、ompAリーダーペプチド配列の後に、成熟ラクタマーゼの最初の12アミノ酸(スペーサー配列)をコードする配列をさらに配置した。なぜなら、例えば、この領域にある正に荷電したアミノ酸のクラスターが、細胞膜を横切る転移を減少または無くすからである(Kajava, A. et al., 2000)。SmaI制限部位はライブラリー挿入に役立つ。選択された断片の回収に用いた上流FseI部位および下流NotI部位がSmaI部位に隣接する。bla遺伝子が-1のリーディングフレームにて転写されると、NotI部位の15bp後に終止コドンが生じるように、3つの制限部位は12アミノ酸スペーサー配列をコードする配列の後に挿入される。+1bpが挿入されるとblaのORFが回復し、その結果、ラクタマーゼタンパク質が生じ、結果としてアンピシリン耐性が獲得される。

40

50

【0306】

ベクター-pMAL9.1は、IamB遺伝子をpEH1(Hashemzadeh-Bonehi, L. et al., 1998)のマルチクローニングサイトにクローニングすることによって構築した。その後、制限部位FseI、SmaIおよびNotIを含有する配列を、IamBのアミノ酸154の後に挿入した。この挿入のためのリーディングフレームは、プラスミドpMAL4.31からのFseIおよびNotIによる消化により切り出された、フレーム選択したDNA断片の導入によって、IamBおよびそれぞれのインサートの連続的なリーディングフレームが生じるように構築した。

【0307】

ベクター-pHIE11は、pEH1のマルチクローニングサイトにfhuA遺伝子をクローニングすることによって構築した。その後、制限部位FseI、XbaIおよびNotIを含有する配列を、fhuAのアミノ酸405の後に挿入した。この挿入のためのリーディングフレームは、プラスミドpMAL4.31からのFseIおよびNotIによる消化により切り出され、フレーム選択したDNA断片の導入によって、fhuAおよびそれぞれのインサートの連続的なリーディングフレームが生じるように選択した。

【0308】

クローニングおよびフレーム選択用のライブラリーの評価

肺炎桿菌(MGH78578株)ゲノムDNA断片をベクター-pMAL4.31のSmaI部位に連結した。組換えDNAをDH10Bエレクトロコンピテント大腸菌細胞(GIBCO BRL)にエレクトロポレーションし、形質変換体をカナマイシン(50 µg/ml)およびアンピシリン(50 µg/ml)を添加したLB寒天に播いた。プレートを37 °Cで一晩インキュベートし、コロニーをラージスケールDNA抽出のために収集した。代表的なプレートを、コロニーPCR分析用およびラージスケール配列決定用のコロニーを収集するために保管および保存した。簡単なコロニーPCRアッセイを用いて、最初に、大まかな断片サイズ分布および挿入効率を決定した。配列決定データから、正確な断片サイズを評価し、挿入部位における接合部の完全性およびフレーム選択の正確さ(3n+1規則)を評価した。

【0309】

クローニングおよび細菌表面ディスプレイ用ライブラリーの評価

ゲノムDNA断片を、肺炎桿菌ライブラリーを含有するpMAL4.31ベクターから、制限酵素FseIおよびNotIによって切り出した。次いで、断片の全集団を、FseIおよびNotIで消化したプラスミドpMAL9.1(LamB)またはpHIE11(FhuA)に移した。8bp GCリッチ配列を認識する、これら2つの制限酵素を用いることにより、pMAL4.31ベクターにおいて選択されたリーディングフレームが、プラットフォームベクターのそれぞれにおいて維持される。次いで、プラスミドライブラリーを用いたエレクトロポレーションによって、大腸菌DH5 細胞を形質転換した。細胞を、50 µg/mlカナマイシンを添加したラージLB-寒天プレートに播き、37 °Cで一晩、明らかに目に見えるシングルコロニーが得られる密度で増殖させた。次いで、細胞を、これらのプレートの表面から掻き取り、新しいLB培地で洗浄し、ライブラリースクリーニングのためにアリコートに分けて-80 °Cで保存した。

【0310】

結果

フレーム選択用ライブラリー

肺炎桿菌MGH78578株について、2つのライブラリーをpMAL4.31ベクター中に作成し、サイズはそれぞれ約70bpおよび約300bpであった。各ライブラリーについて、約1 µgのpMAL4.31プラスミドDNAおよび50ngの断片化ゲノム肺炎桿菌DNAの連結と、その後の形質転換により、フレーム選択後に $3 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ のクローンが得られた。ライブラリーのランダム性を評価するために、各ライブラリーの約500~600個のランダムに選択したクローンを配列決定した。2つのライブラリー(KPL50およびKPF300)の代表的な生物情報分析により、これらのライブラリーに対応するクローンのうち、2回以上存在するクローンはごくわずかしかないことが示された。さらに、KPL50ライブラリーについては、平均インサートサイズが77bpであり、予想されたインサートサイズに非常に近いことが示された(図2A)。KPF300ライブラリーについては、平均インサートサイズは187bpであり、予想されたインサート

サイズよりわずかに短かった(図2B)。

【0311】

細菌表面ディスプレイライブラリー

ペプチドを大腸菌表面上にディスプレイするには、フレーム選択ベクター-pMAL4.31からのKPL50およびKPF300ライブラリーからのインサートを、ディスプレイプラスミドpMAL9.1(LamB)またはpHIE11(FhuA)に導入することが必要であった。ゲノムDNA断片をFseIおよびNotI制限によって切り出し、5ngのインサートと0.1µgのプラスミドDNAを連結し、次いで、DH5⁺細胞を形質転換して、 $3 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ クローンを得た。クローンをLBプレートから掻き取り、さらに増幅させずに凍結した。

【0312】

実施例4:細菌表面ディスプレイゲノムライブラリーおよびヒト血清を用いた、肺炎桿菌からの免疫原性の高いペプチド配列の同定

実験手順

MACSスクリーニング

所定のライブラリーから約 2.5×10^8 細胞を、50µg/mlカナマイシンを添加したLB培地5ml中で37℃で2時間培養した。発現は、1mM IPTGの添加により30分間誘導した。細胞を新鮮なLB培地で2回洗浄し、約 2×10^7 細胞をLB培地100µlに再懸濁し、エッペンドルフチューブに移した。

【0313】

血清から精製され、ビオチン化したヒトIgG 10~20µgを細胞に添加し、懸濁液をおだやかに振盪しながら4℃で一晩インキュベートした。LB培地900µlを添加し、懸濁液を混合し、その後に、6,000rpm、4℃で10分間、遠心分離した。細胞をLB 1mlで1回洗浄し、次いで、LB培地100µlに再懸濁した。ストレプトアビジン(Miltenyi Biotech, Germany)に結合したMACSマイクロビーズ10µlを添加し、インキュベーションを4℃で20分間続けた。その後、LB培地900µlを添加し、MACSマイクロビーズ細胞懸濁液を、磁石に固定した平衡化MSカラム(Miltenyi Biotech, Germany)にロードした。MSカラムは、70%EtOH 1mlで1回、LB培地2mlで2回洗浄することによって平衡化した。

【0314】

次いで、カラムをLB培地3mlで3回洗浄した。磁石を取り除いた後、細胞をLB培地2mlで洗浄することにより溶出した。LB培地3mlでカラムを洗浄した後、2mlの溶出液を再び同じカラムにロードし、洗浄および溶出のプロセスを繰り返した。3回目のローディング、洗浄および溶出のプロセスを行い、その結果、最終溶出液は2mlとなった。2回目の選択の後に選択された細胞を、50µg/mlカナマイシンを添加したLB-寒天プレートに播き、37℃で一晩増殖させた。

【0315】

配列決定およびウェスタンブロット分析による、選択されたクローンの評価

ランダムに選択されたクローンを、50µg/mlカナマイシンを添加したLB培地3ml中で37℃で一晩増殖させて、標準的手順を用いてプラスミドDNAを調製した。配列決定はMWG(Germany)またはAgowa(Germany)で行った。

【0316】

ウェスタンブロット分析のために、約10~20µgの総細胞タンパク質を10%SDS-PAGEによって分離し、HybondCメンブレン(Amersham Pharmacia Biotech, England)にブロットティングした。LamB融合タンパク質またはFhuA融合タンパク質を、ヒト血清を一次抗体として約1:3,000~1:5,000の希釈で用い、HRP結合抗ヒトIgG抗体を二次抗体として1:5,000の希釈で用いて検出した。検出はECL検出キット(Amersham Pharmacia Biotech, England)を用いて行った。または、融合タンパク質を検出するために、一次抗体としてウサギ抗FhuA抗体またはウサギ抗LamBポリクローナル免疫血清と、それぞれのHRP結合二次抗体を組み合わせ使用した。

【0317】

結果

10

20

30

40

50

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

pMAL9.1中のライブラリーKPL50およびpHIE11中のKPF300を、非感染健常成人の血清から調製したビオチン化ヒトIgGプール(IC38、IC40、IC76、IC86、IC88、IC89、IC92、およびIC93)、ならびに急性肺炎桿菌感染症(敗血症)患者の血清から調製したビオチン化ヒトIgGプール(P3536.2、P3548、P3560、P3582、P3583、P3495.2、P3533.2、P3567およびP3576)を用いてスクリーニングした(実施例1:ヒト血清からの抗体の調製を参照されたい)。この選択手順は実験手順に記載のように行った。図3Aは、KPL50ライブラリーおよびPKp34-IgGを用いたスクリーニングの代表例を示す。MACSスクリーニングからの1回目の選択サイクル後のコロニー数から分かるように、最終的に回収された細胞の総数は、 2.2×10^7 細胞から約 1.2×10^4 細胞へと劇的に減少し、抗体を用いなかった選択では細胞数はさらに著しく減少した。このことは、選択が肺炎桿菌特異的抗体に依存したことを示している(図3A)。スクリーニングの性能を評価するために、20個の選択されたクローンをランダムに選び、スクリーニングPKp34-IgGプールを用いてイムノプロット分析に供した(図3B)。この分析により、選択されたクローンの大半は、関連する血清に存在する抗体と反応性を示すのに対して、肺炎桿菌特異的インサートを含まないFhuAを発現する対照株は同じ血清と反応しないことが明らかになった。一般的に、反応性の割合は15~85%の範囲内にあることが観察された。コロニーPCR分析により、選択された全てのクローンは、予想されたサイズ範囲内のインサート含有することが示された(データ示さず)。他の血清プールからのライブラリーを用いたスクリーニングにおいて、同様の結果が見られた。第2の例として、図3Cおよび3Dは、大きなインサートKPF300およびPKp35-IgG抗体プールを用いて得られたデータを示している。1回目のMACS選択によって、特異的IgGの存在下でのみ細胞は濃縮し、特異的IgGの非存在下では濃縮しなかった(図3C)。このことは、選択は、適用された抗体に特異的であったことを示している。次いで、この特異的選択は、同じPKp35-IgG抗体プールを用いた、個々の細菌クローンのウェスタンブロット分析において確かめられた(図3D)。

10

20

30

40

50

【0318】

この後に、それぞれのスクリーニングから、ランダムに選ばれた多数のクローン(600~800個)を配列決定することによって、スクリーニングに使用したヒト血清抗体により特異的に認識される遺伝子および対応するペプチド配列またはタンパク質配列が同定された。特異的クローンが選択される頻度は、このクローンによって提示されるエピトープを認識する、選択に用いられた血清中の特異的抗体の存在量および/または親和性を少なくとも部分的に反映している。表1は、実施された8回全てのスクリーニングについて得られたデータをまとめたものである。表1に示した全てのクローンは、シングルクローンからの全細胞抽出液を用いたイムノプロット分析によって、それぞれのスクリーニングにおいて使用したヒト血清プールと示された反応性を示すことが確認された。表1から分かるように、様々なサイズのタンパク質断片がプラットフォームタンパク質によって表面にディスプレイされるので、同定されたORFの別個の領域に免疫原性があると特定された。

【0319】

さらに、細菌表面ディスプレイスクリーニングによって同定された遺伝子の多くが、細菌表面に取り付けられるタンパク質をコードすることは注目に値する。これは、表面に取り付けられるタンパク質が肺炎桿菌の毒性において役割を果たすと予想されることと一致する。

【0320】

実施例5:肺炎桿菌から同定された免疫原性の高いタンパク質を用いた遺伝子分布研究
実験手順

PCRによる抗原の遺伝子分布

理想的なワクチン抗原とは、ワクチンの対象となる標的生物の全てまたは大多数の株に存在する抗原であろう。同定された肺炎桿菌抗原をコードする遺伝子が関連する株に遍在するかどうかを証明するために、一連の独立した細菌分離株に対して、関心対象の遺伝子

に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。プライマーとしてのオリゴヌクレオチド配列を、全ての同定されたORFについて、約1,000bpの産物を生じるように、可能であれば、全ての同定された免疫原性エピトープをカバーするように設計した。全ての肺炎桿菌株のゲノムDNAを実施例2に記載のように調製した。PCRはTaqポリメラーゼ(1U)、200nM dNTP、10pMolの各オリゴヌクレオチド、およびキットを製造業者の説明書に従って用いて(Invitrogen, The Netherlands)、反応体積25 μ lで行った。個々のプライマー対に条件を合わせなければならなかった場合を除いて、標準として、30サイクル(1x:5分95 $^{\circ}$ C、30x:30秒95 $^{\circ}$ C、30秒56 $^{\circ}$ C、30秒72 $^{\circ}$ C、1x4分72 $^{\circ}$ C)を行った。

【0321】

結果

免疫原性タンパク質をコードする同定された遺伝子を、46種類の肺炎桿菌株に存在するかどうかPCRによって試験した(表3)。95個の遺伝子を全て一緒に分析した。40%(38/95)が>90%の株(>41/46)において検出されたのに対して、25%(24/95)が>75%の株(<35/46)において見られず、従って、十分に保存されていないと分類された。一例として、図4は、示された46種類全ての株を用いた肺炎桿菌KPORF-54抗原に対するPCR反応を示している。はっきりと目に見えるように、この遺伝子は、分析した全ての株に存在している。選択された抗原に関する全ての結果を表3にまとめた。重要なことに、同定された抗原の80%が、分析した肺炎桿菌株の中で、少なくとも、遺伝子特異的PCR産物の存在およびサイズの点で良好に保存されており、従って、ワクチン候補の可能性を評価するさらなる研究のために選択された。

【0322】

実施例6: ペプチドELISAによる肺炎桿菌由来ペプチドのバリデーション 酵素結合免疫測定法(ELISA)

ELISAプレート(Maxisorb, Millipore)を、コーティング緩衝液(0.1M炭酸ナトリウムpH9.2)で希釈した5~10 μ g/ml総タンパク質でコーティングした。2種類の血清希釈液(400xおよび2,000x)をPBS-BSAに溶解して作製した。高度に特異的な西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合抗ヒトIgG二次抗体(Southern Biotech)を、製造業者の推奨(希釈:1,000x)に従って使用した。抗原-抗体複合体は、自動ELISAリーダー(TECAN SUNRISE)によるOD_{405nm}測定値に基づいて、基質(ABTS)から着色生成物への変換を測定することによって定量した。400x希釈での測定値は、表4に示した結果の計算に使用した。

【0323】

結果

ヒトにおける免疫原性

表4にまとめたように、ヒト血清中に特異的抗体が存在するかどうかをペプチドELISAによって決定された。この分析に使用したヒト血清は、細菌表面ディスプレイスクリーニングによる抗原の同定に適用した様々な血清プールに含めた血清に対応する。肺炎桿菌MGH78578からの個々の抗原からの1つまたは複数のペプチドを分析し、これらの多くがヒトにおいて免疫原性があることが示された。選択されたペプチドの中には、調べられたヒト血清の多くまたは全てと高度に反応するものもあれば(例えば、ORF-26.01またはORF-81.01)、中間のまたは低い反応性を示すものもあったことは明らかである。選択されたエピトープが30個を上回るアミノ酸を含む抗原の場合、5~6個のアミノ酸が重複する複数のペプチドを設計した。抗原の一部について、同じ抗原に由来する、これらの複数のペプチドが異なる反応性を示すことが観察された。このことは、それぞれの抗原(例えば、KPORF-27またはKPORF-42)の免疫原領域をさらに示している。これらの実験によって、同定されたエピトープ/タンパク質の多くがヒトにおいて高い免疫原性をもつことが確かめられ、これらが、感染中に病原体によって発現され、強力な免疫応答を誘導できることを示している。

【0324】

実施例7: 大腸菌表面上にディスプレイされた、肺炎桿菌に由来する免疫原性の高いタンパク質/ペプチドで免疫化されたマウスから得られた免疫血清の、肺炎桿菌の表面への結合

実験手順

FACS分析

肺炎桿菌A5054株およびフライドランダー-204株を、グリセロールストックからTHB培地5mlに接種し、37℃で一晩インキュベートした。200μlを新鮮なTHB培地10mlに添加することによって、一晩培養したものを再接種し、OD₆₀₀が約0.6(約5×10⁸細胞/ml)に達するまでインキュベートした。細菌を、4,000rpm、5分間の遠心分離によってペレット化し、HBSS 2mlで2回洗浄した。細胞密度が5×10⁶細胞/mlとなるように、最後のペレットを、0.5%BSAを含むHBSSに再懸濁した。細菌100μlに、免疫血清5μlを添加し、氷上で45分間インキュベートした。細菌を、1,000gで4分間の遠心分離によってペレット化し、0.5%BSAを含むHBSS 1mlで1回洗浄し、0.5%BSAを含むHBSS 100μlに再懸濁した。オプソニン化細菌には、結合型抗マウス抗体を、製造業者の推奨に従う希釈(100μlに希釈)で添加した。二次染色を氷上で45分間、暗所で行った。インキュベーションの終わりに、試料を5,000rpmで3分間遠心分離し、HBSS 1mlで洗浄し、HBSS-2%パラホルムアルデヒド1mlに再懸濁した。試料をボルテックスし、一晩固定し、フローサイトメトリーで分析した。

10

【0325】

結果

肺炎桿菌細胞の表面への結合

肺炎桿菌A5054上およびフライドランダー-204上にある表面タンパク質を認識する抗体が存在するかどうかをFACS分析において試験した。表5にまとめたように、異なる血清によって表される103個の抗原のうち、36個がFACS分析において緩衝液対照と比較して有意な変化を示した。これらのインビトロ実験から、インビトロで培養した肺炎桿菌細胞において、これらの36個の抗原は表面上に発現されたことが分かる。一例として、図5は、肺炎桿菌KPORF-28、KPORF-82およびKPORF-02抗原のFACS染色を示す。これらは、それぞれ、カテゴリ「+」、「++」および「+++」を代表する。

20

【0326】

実施例8: 抗原は、肺炎桿菌により誘導される致死性敗血症に対する防御免疫応答を誘導する

実験手順

組換え肺炎桿菌タンパク質の発現および精製

遺伝子/DNA断片のクローニング:

関心対象の遺伝子/DNA断片を、肺炎桿菌MGH78578のゲノムDNAから遺伝子特異的プライマーを用いてPCR増幅した。遺伝子特異的部分に加えて、プライマーには、増幅されたPCR産物のディレクショナルクローニングを助ける制限部位があった。プライマーの遺伝子アニーリング(特異的)部分は15~30塩基長であった。得られたPCR産物を適切な制限酵素で消化し、Hisタグ化タンパク質用のpET28b(+)_{ベクター}(Novagen)にクローニングした。組換えプラスミドが関心対象の遺伝子含有すると確かめられたら、発現宿主として役立つ大腸菌BL21-CodonPlus(登録商標)細胞(Stratagene)を形質転換した。インサートを配列決定した。遺伝子特異的断片のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、それぞれの配列識別番号(SEQ ID NO:DNA、タンパク質):KPORF-02.1:1、188;KPORF-13.1:2、189;KPORF-20.1:3、190;KPORF-21.1:4、191;KPORF-32.1:375、376;KPORF-37.1:5、192;KPORF-37.2:6、193;KPORF-38.2:7、194;KPORF-39.1:8、195;KPORF-44.1:9、196;KPORF-49.1:10、197;KPORF-60.1:11、198;KPORF-64.1:12、199;KPORF-65.1:13、200;KPORF-66.1:14、201;KPORF-78.1:15、202;KPORF-82.1:16、203(表16も参照されたい)を付けて列挙した。

30

40

【0327】

タンパク質の発現および精製

えり抜きの組換えプラスミドを有する大腸菌BL21-CodonPlus(登録商標)細胞を、必要とされる培養体積中で対数期まで増殖させた。OD_{600nm}が0.6になったら、培養物を0.5mM IPTGと共に37℃で3時間インキュベートした。細胞を遠心分離により採取し、凍結融解法とそれに続く「Bug-buster(登録商標)(Novagen)を用いた細胞破壊の組み合わせによって溶解した。溶解産物を、遠心分離によって可溶性画分(上清)および不溶性画分(ペレット)に

50

分離した。タンパク質の位置に応じて、異なる精製戦略を適用した。A) Hisタグ化タンパク質が可溶性画分であれば、タンパク質精製は、上清をNi-Sepharoseビーズ(Ni-Sepharose(商標)6 Fast Flow, GE Healthcare)に結合させることによって行った。発現タンパク質のC末端にヘキサヒスチジン(6xHIS)が存在するために、発現タンパク質はNi-Sepharoseに結合するが、他の汚染タンパク質は洗浄緩衝液によってカラムから洗浄される。20mM NaH₂PO₄、0.5mM NaClに溶解した500mMイミダゾール緩衝液pH7.4によって、タンパク質を溶出した。溶出液を濃縮し、タンパク質濃度についてBradfordによってアッセイし、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットによってチェックした。B) タンパク質が不溶性画分に存在すれば、8M尿素を含有する適切な緩衝液中でペレットを可溶化し、前記と同じ材料および手順を用いて変性条件下で(8M尿素含有緩衝液中で)Ni-NTAカラムにアプライした。尿素を含まない洗浄緩衝液によって汚染タンパク質をカラムから洗浄した。タンパク質をNi-NTAマトリックス上に固定化したままで、Hisタグ化タンパク質のリフォールディングを行った。再生後、500mMイミダゾールを添加することによってタンパク質を溶出した。微量の尿素を除去するために溶出液を透析し、体積が多ければ濃縮し、SDS-PAGEによってチェックし、Bradford法によって測定した。

10

【0328】

動物防御研究

動物:

CD-1雌マウス(6~8週)を使用した。

20

【0329】

能動免疫(皮下経路):

表16に列挙した組換えタンパク質50 µgと、アジュバントとしてフロイント完全アジュバント(CFA)、ミョウバン、またはIC31(登録商標)を用いて、CD-1マウスに皮下注射した。14日目および28日目に、(CFAでなくフロイント不完全アジュバント(IFA)を使用した以外は)同量のタンパク質およびアジュバントを用いて、マウスを追加免疫した。肺炎桿菌B5055溶解産物で免疫化したマウスは正の対照として役立ったのに対して、PBSとアジュバントのみで免疫化したマウスは負の対照として役立った。それぞれの組換えタンパク質を用いたELISAによって35日目に抗体価を測定した。

【0330】

受動免疫(腹腔内経路):

30

IP細菌抗原暴露の1~3時間前に、表16に列挙した個々の肺炎桿菌組換えタンパク質抗原に対して産生された過免疫ウサギ血清150 µlをCD-1マウスに腹腔内(IP)注射した。免疫化に使用した血清の抗体価を、それぞれの組換えタンパク質を用いて測定した。

【0331】

細菌抗原暴露:

直前に増殖させた肺炎桿菌B5055株を使用した。細菌接種材料に存在する生細胞数を求めるために、接種材料の希釈液を血液寒天プレート上にプレートすることによって、CFUを求めた。10³CFUを腹腔内に適用した。免疫化により付与される防御は、抗原暴露後2週間、生存率を追跡する菌血症/敗血症モデルを用いて測定した。生存率は、動物の総数(10マウス/群)のパーセントとして表した。

40

【0332】

結果

能動免疫実験

ヒトにおける予防的ワクチンの主な標的適応症の1つは敗血症であるので、候補抗原を評価するために腹腔内抗原暴露モデルを使用し、このマウス敗血症/致死モデルにおいて防御を示すかどうかについて、前もって選択した肺炎桿菌抗原を試験した。これまでに、腹腔内抗原暴露モデルにおいて、2つの別個のタンパク質について防御が観察されている。肺炎桿菌抗原暴露に対する防御は抗体により媒介されるので、最高レベルの抗体を得るために、アジュバントとしてCFA/IFAを用いて、免疫化を行った。図6Aおよび図6B/Cに図示した2つの独立した実験において分かるように、タンパク質KPORF-21.1およびKPORF-60.

50

1は100%の防御を示し、KPORF-38.2およびKPORF-39.1は、それぞれ、90%および60%の防御を示した。これらの抗原は、肺炎桿菌感染症を防ぐことが以前に示されていない。

【0333】

9個のORFについて部分的な防御が観察された。KPORF-02.1(30%)、KPORF-13.1(40%)、KPORF-20.1(40%)、KPORF-37.1(20%)、KPORF-37.2(20%)、KPORF-44.1(30%)、KPORF-64.1(40%)、KPORF-65.1(50%)、およびKPORF-66.1(40%)(図6A、B、およびC)。

【0334】

組換えタンパク質KPORF-13.1およびKPORF-37.1を同じモデルにおいて再試験した。1つの実験では、肺炎桿菌IP抗原暴露に対して、KPORF-13.1による免疫化は70%の防御を示し、KPORF-37.1による免疫化は50%の防御を示した(図6D)。

10

【0335】

さらに、もう2つの組換えタンパク質、KPORF-32.1およびKPORF-39.1-1B(タンパク質はKPORF-39.1と同じであるが、封入体(inclusion body)として免疫化した)を同じモデルにおいて試験した。これらは、それぞれ、50%および40%の防御レベルを示した(図6E)。正の対照である肺炎桿菌B5055溶解産物による免疫化は、全ての実験において一貫して100%の防御を示した。

【0336】

前記の実験セットにおいて、CFA/IFAをアジュバントとして用いた時に防御を証明した8つの組換え肺炎桿菌タンパク質を、アジュバントとしてミョウバンまたはIC31(商標登録)を用いた能動免疫実験において再試験した。アジュバントとしてミョウバンを用いた3つの独立した実験では、KPORF-13.1およびKPORF-21.1は、それぞれ、60%(図7A)、50%、および40%の防御を示した。KPORF-32.1は、それぞれ、80%(図7A)、75%、および70%の防御を示した。3つの独立した実験において、KPORF-39.1-1Bは100%の防御を示した(図7B、1回の実験を示した)。3つの独立した実験において一貫して、KPORF-37.1は40%の防御(図7A)、KPORF-38.2は60%(図7B)、KPORF-65.1は50%(図7B)の防御を示した(1回の実験を示した)。3つの独立した実験において、KPORF-60.1は、67%(図7B)、58%、および50%の防御を示した。

20

【0337】

アジュバントとしてIC31(登録商標)を用いた3つの独立した実験において、タンパク質KPORF-13.1は、それぞれ、40%(図8A)、35%、および30%の防御を示した。KPORF-21.1は、60%(図8B)、55%、および50%の防御を示した。KPORF-32.1による免疫化は、22%(図8B)、16%、および10%の生存しかもたらさなかった。KPORF-37.1は、3つの独立した実験において、30%の防御(図8B、1回の実験を示した)を示した。KPORF-38.2は、3つの独立した実験において、60%(図8A)、55%、および50%の防御を示した。KPORF-39.1-1Bは、それぞれ、50%(図8A)、40%、および30%の防御を示した。KPORF-60.1は、それぞれ、63%(図8A)、59%、および56%の防御を示した。KPORF-65.1による免疫化は、それぞれ、50%(図8B)、35%、および20%の生存をもたらした。

30

【0338】

受動免疫実験

肺炎桿菌B5055溶解産物、PBS、および能動免疫実験において防御を証明した8つの個々の組換え肺炎桿菌タンパク質;KPORF-13.1、KPORF-21.1、KPORF-32.1、KPORF-37.1、KPORF-38.2、KPORF-39.1、KPORF-60.1、およびKPORF-65.1に対して個々に、過免疫ウサギ血清を産生した。1回の実験において、肺炎桿菌抗原暴露に対して、KPORF-60.1血清によるマウスの受動免疫は60%の防御を示し(図9A)、KPORF-37.1血清による免疫化は40%の防御を示した(図9B)。肺炎桿菌B5055溶解産物血清で免疫化した全てのマウスにおいて100%の防御が観察された。PBS血清で免疫化したマウスでは生存は観察されなかった(図9Aおよび9B)。KPORF-32.1血清で免疫化したマウスでは20%の生存が観察された(図9B)。他の5つのタンパク質KPORF-13.1、KPORF-21.1、KPORF-38.2、KPORF-60.1(図9A)、KPORF-65.1(図9B)に対して産生された血清で免疫化したマウスでは、防御は観察されなかった。

40

【0339】

50

これらの抗原は、肺炎桿菌感染症を防ぐことが以前に示されていない。

【0340】

実施例9: クレブシエラ属抗原の遺伝子保存

クレブシエラ属の種のゲノムDNAの調製

DIFCO0001 培地7mlを、凍結穿針培養からのクレブシエラ属の種のそれぞれの株に接種し、振盪することなく37℃一晩増殖させた。次いで、培養物2mlを、Biofuge fresco(Heraeus)の中で13,000rpmで5分間遠心分離することによって採取し、上清を除去した。Wizard(登録商標)ゲノムDNA精製キット(Promega)のプロトコールに従って、DNAを細菌細胞ペレットから単離した。最後に、DNAペレットを風乾し、ddH₂O 70 μlに溶解した。

【0341】

クレブシエラ属の種の抗原のPCR増幅

関心対象の遺伝子に特異的なプライマーを用いて、一連の独立したクレブシエラ属の種の分離株に対してPCRを行った(表6)。8個の抗原候補について、プライマーとしてのオリゴヌクレオチド配列を、公的なプログラムであるPrimer3(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi)を用いて設計したか、または手作業で選択した。遺伝子全体を増幅できるようにするために、PCRプライマーとしてのオリゴヌクレオチド配列を、選択した抗原について設計した。クレブシエラ属の種の全ての株のゲノムDNAを前記のように調製した。PCRは、Taqポリメラーゼ(1U)、200nM dNTP、10pMolの各オリゴヌクレオチド、約10~20ngのDNA、およびキットを製造業者の説明書(Invitrogen, The Netherlands)に従って用いて、30 μlの反応体積で行った。個々のプライマー対に条件を合わせなければならなかった場合を除いて、標準として、30サイクル(1x:5分95℃、30x:30秒95℃、30秒52℃、90秒72℃、1x:4分72℃)を行った。PCR増幅はBiometra T3 Thermocyclerで行った。1回目の増幅におけるネガティブなPCR反応は全て、最適化条件を適用することによって繰り返した。その後、DNA断片を1%アガロースゲル上での電気泳動によって視覚化し、EtBr染色した。

【0342】

クレブシエラ属の種の遺伝子の配列分析

クレブシエラ属の種の多様な株からの抗原の配列を決定するために、前記のように、関心対象の遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。これらの分析に使用したクレブシエラ属の種の株を表6に示した。配列決定は、専用のプライマーと、テンプレートとしてPCR産物を用いて行った。オリゴヌクレオチドの配列を表7に列挙した。クレブシエラ属の種の全ての株のゲノムDNAを前記のように調製した。個々のプライマー対に条件を合わせなければならなかった場合を除いて、PCRは、前記のように30 μlの反応体積で行った。PCR試料を、表7に列挙したオリゴヌクレオチドを用いて配列決定した。配列決定はAgowa(Berlin, Germany)で行った。

【0343】

結果

選択された肺炎桿菌抗原は高度に保存されている

8個の選択された遺伝子のPCRおよび配列決定を方法に記載のように行った。表6は、配列決定に使用した株を示しているのに対して、表7は、PCRおよび配列決定分析に使用したオリゴヌクレオチドを列挙している。KPORF-21を除く、8個の遺伝子のうち7個は分析された全ての株において約93%より大きなレベルの配列同一性を示している。KPORF-21は、少なくとも、83%のレベルの同一性である。個々の遺伝子の詳細な分析を以下で別個に説明する。

【0344】

KPORF-13の配列分析

39の株から配列を得た。アミノ酸配列同一性のレベルは、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-13の参照配列と比較して95.8%~100%であった。表8は、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-13と比較して別個のアミノ酸を示した43個全てのアミノ酸位置を列挙している。

【0345】

10

20

30

40

50

KPORF-21の配列分析

49の株から配列を得た。アミノ酸配列同一性のレベルは、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-21の配列と比較して83.3%～100%であった。表9は、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-21と比較して別個のアミノ酸を示した43個全てのアミノ酸位置を列挙している。

【0346】

KPORF-32の配列分析

40の株から配列を得た。アミノ酸配列同一性のレベルは、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-32の配列と比較して92.7%～99.5%であった。表10は、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-32と比較して別個のアミノ酸を示した69個全てのアミノ酸位置を列挙している。

【0347】

KPORF-37の配列分析

39の株から配列を得た。アミノ酸配列同一性のレベルは、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-37の配列と比較して99.4%～100%であった。表11は、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-37と比較して別個のアミノ酸を示した20個全てのアミノ酸位置を列挙している。

【0348】

KPORF-38の配列分析

C末端に極めて近い部分をコードするヌクレオチド配列は今までに首尾よく増幅されていないので、38の株から部分配列を得た(表12)。アミノ酸配列同一性のレベルは、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-38の配列と比較して98.2%～99.9%であった。クレブシエラ属の種のi252/94株およびクレブシエラ属の種の708株から得られたKPORF-38部分配列を除き、分析した全ての配列は、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-38のKPORF-38.2(アミノ酸範囲582-1099)断片を含む対応アミノ酸配列を含んでいる。

【0349】

KPORF-39の配列分析

50の株から配列を得た。アミノ酸配列同一性のレベルは、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-39の配列と比較して93.1%～100%であった。表13は、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-39と比較して別個のアミノ酸を示した29個全てのアミノ酸位置を列挙している。

【0350】

KPORF-60の配列分析

50の株から配列を得た。アミノ酸配列同一性のレベルは、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-60の配列と比較して94.4%～100%であった。表14は、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-60と比較して別個のアミノ酸を示した14個全てのアミノ酸位置を列挙している。

【0351】

KPORF-65の配列分析

48の株から配列を得た。アミノ酸配列同一性のレベルは、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-65の配列と比較して98.3%～100%であった。表15は、肺炎桿菌MGH78578からのKPORF-65と比較して別個のアミノ酸を示した27個全てのアミノ酸位置を列挙している。

【0352】

参考文献

本明細書において省略されたバージョンで列挙された以下の参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

20

30

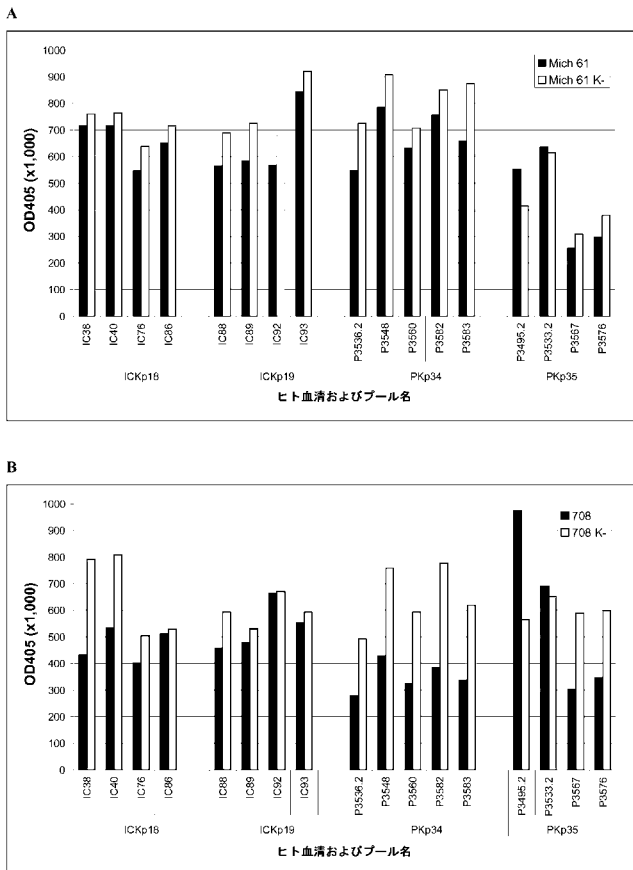
40

- Altschul, S., et al. (1990). Journal of Molecular Biology **215**: 403-410.
- Amit, A.G., et al. (1986). Science **233**: 747-753.
- Bennett, D., et al. (1995). J Mol Recognit **8**: 52-58.
- Carter, P., et al. (1985). Nucl. Acids Res. **13**: 4431-4443.
- Clackson, T., et al. (1991). Nature **352**: 624-628.
- Cohen, J. (1993). Science **259**: 1691-1692.
- Cryz, S.J., et al. (1986). Vaccine **4**: 15-20. 10
- Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1987).
- Devereux, J., et al. (1984). Nucleic acids research **12**: 387-395.
- Doherty, E., et al. (2001). Annu Rev Biophys Biomol Struct **30**: 457-475.
- Eisenbraun, M., et al. (1993). DNA Cell Biol **12**: 791-797.
- Etz, H., et al. (2001). J Bacteriol **183**: 6924-6935.
- Ganz, T. (1999). Science **286**: 420-421.
- Georgiou, G. (1997). Nature Biotechnology **15**: 29-34. 20
- Haeggman, S., et al. (1997). Antimicrob Agents Chemother. **41**: 2705-2709.
- Hashemzadeh-Bonchi, L., et al. (1998). Mol Microbiol **30**: 676-678.
- Heinje, von G. (1987). Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press.
- Hemmer, B., et al. (1999). Nat Med **5**: 1375-1382.
- Hornef, M., et al. (2002). Nat Immunol **3**: 1033-1040.
- Huse, W.D., et al. (1988). Science **246**: 1275-1281.
- Ishibashi, S., et al. (1993). J. Clin. Invest. **92**: 883-893. 30
- Johanson, K., et al. (1995). J Biol Chem **270**: 9459-9471.

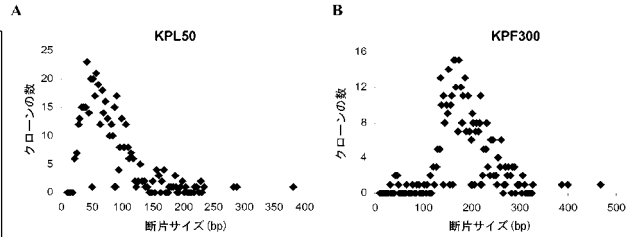
- Jones, P., et al. (1986). Nature **321**: 522-525.
- Kajava, A., et al. (2000). J Bacteriol **182**: 2163-2169.
- Kay, M., et al. (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 2353-2357.
- Kohler, G., et al. (1975). Nature **256**: 495-497.
- Kolaskar, A., et al. (1990). FEBS Lett **276**: 172-174.
- Kurupati, P., et al. (2006). Proteomics **6**: 836-844.
- Lewin, A., et al. (2001). Trends Mol Med **7**: 221-228. 10
- Marks, J., et al. (1992). Biotechnology (N Y) **10**: 779-783.
- McCafferty, J., et al. (1990). Nature **348**: 552-554.
- Nagy, E., et al. (2003). Identification of the “antigenome” - a novel tool for design and development of subunit vaccines against bacterial pathogens. In *Genomics, Proteomics and Vaccines* (G. Grandi, ed), John Wiley & Sons Ltd., UK.
- Okano, H., et al. (1991). J Neurochem **56**: 560-567.
- Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression; CRC Press, Boca Raton, FL (1988). 20
- Ørskov, I. (1984). Genus *Klebsiella*, p461-465. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Parchuri, S., et al. (2005). Heart Lung. **34**:360-363.
- Podschun, R., et al. (1998). Clinical microbiology review. vol. 11:4:589-603.
- Queen, C., et al. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 10029-10033.
- Rammensee, H., et al. (1999). Immunogenetics **50**: 213-219.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975). 30
- Riechmann, L., et al. (1988). Nature **332**: 323-327.
- Seeger, C., et al. (1984). Proc Natl Acad Sci U S A **81**: 5849-5852.
- Skerra, A. (1994). Gene **151**: 131-135.
- Stamm, W.E, et al. (1981). Comparison of endemic and epidemic nonsocomial infection. *Nosocomial infection*. Yorke Medical Books, Atlanta. Ga. p.9-13.
- Tang, D., et al. (1992). Nature **356**: 152-154.
- Tempest, P., et al. (1991). Biotechnology (N Y) **9**: 266-271.
- Tourdot, S., et al. (2000). Eur J Immunol **30**: 3411-3421. 40
- Ueda, Y., et al. (2005). Antimicrob Agents Chemother. **49**: 4185-4196.
- Wells et al. (1986). Philos. Trans. R. Soc. London Ser.A **317**: 415.
- Wells, J.A., et al. (1985). Gene **34**: 315-323.
- Wu, L.T., et al. (2005). Clin Microbiol Infect. **11**: 893-897.
- Yadav, V., et al. (2005). Folia Microbiol (Praha) **50**: 83-86.
- Zoller, M.J., et al. (1987). Nucl. Acids Res. **10**: 6487-6500.

明細書、特許請求の範囲、および/または図面に開示される本発明の特徴は別々に、かつその任意の組み合わせで、本発明を様々な形で実現するのに重要であり得る。

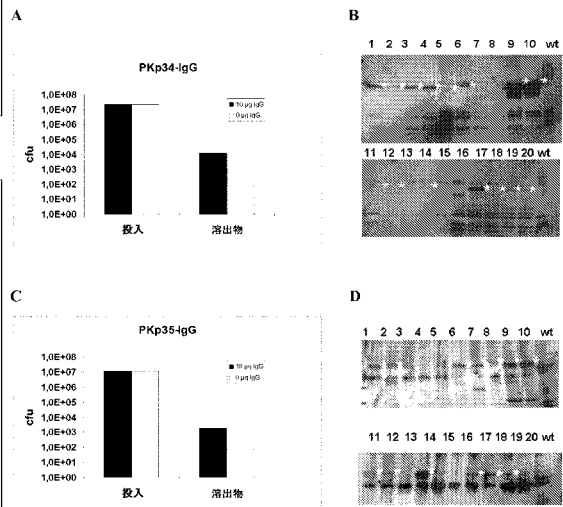
【図1】



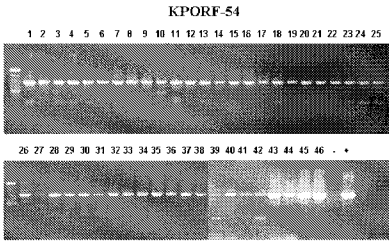
【図2】



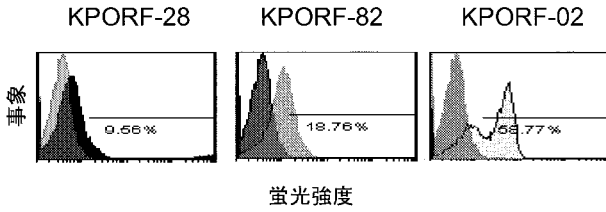
【図3】



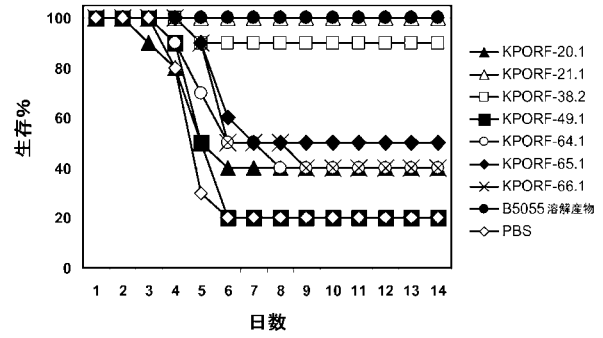
【 図 4 】



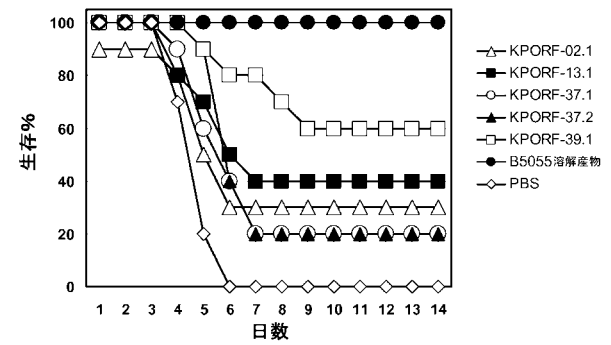
【 図 5 】



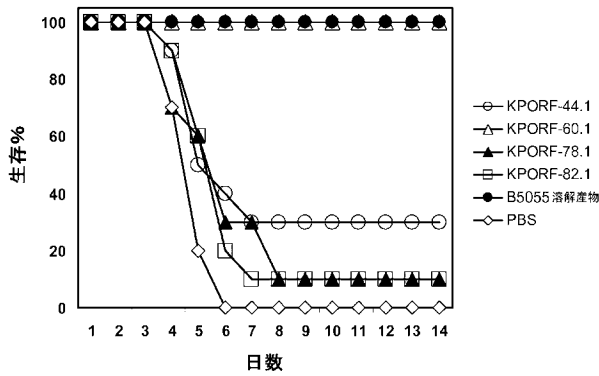
【 図 6 A 】



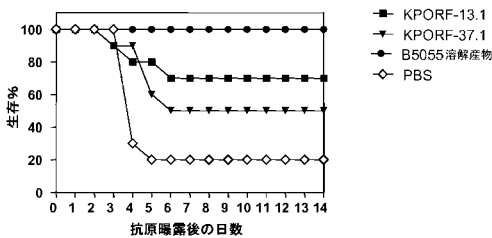
【 図 6 B 】



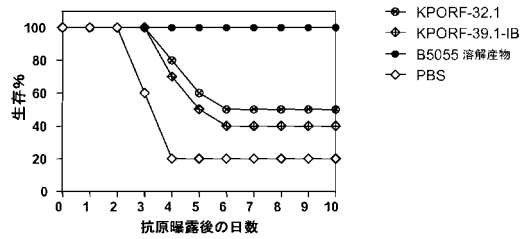
【 図 6 C 】



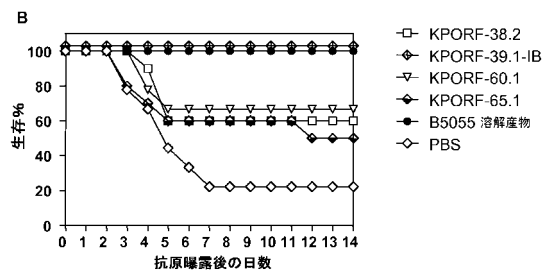
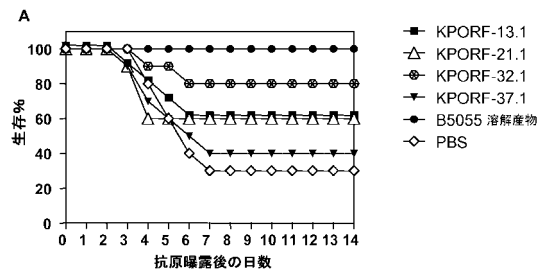
【 図 6 D 】



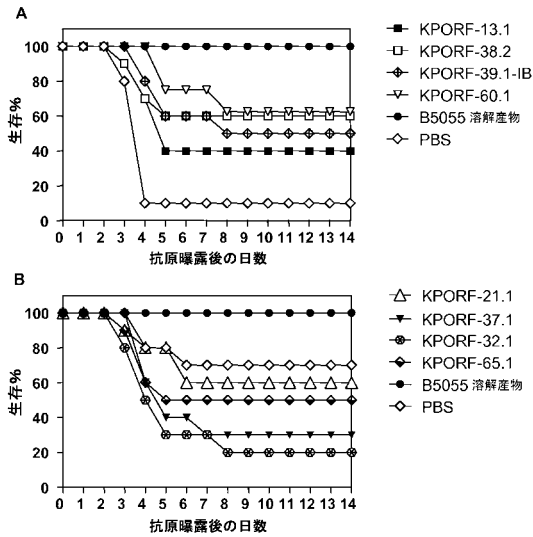
【 図 6 E 】



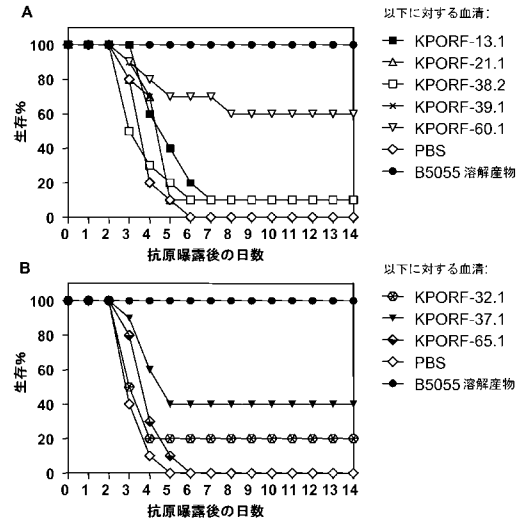
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

2010532657000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成22年2月24日(2010.2.24)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

抗原またはその断片をコードする単離された核酸分子であって、

以下からなる群より選択される、核酸配列を含む単離された核酸分子：

a) SEQ ID NO:1 ~ 187およびSEQ ID NO:375を含む群より選択されるヌクレオチド配列を有する核酸分子と少なくとも70%の配列同一性を有する核酸分子、

b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、

c) a)またはb)の核酸分子の少なくとも15個の連続した塩基を含む核酸分子、

d) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、a)、b)、またはc)の核酸分子にアニーリングする核酸分子、

e) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c)またはd)において定義された核酸分子にハイブリダイズする核酸分子。

【 請求項 2 】

a) SEQ ID NO:1 ~ 187またはSEQ ID NO:375との配列同一性が、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%、または最も好ましくは100%であり、

b) 核酸がDNAまたはRNAであり、

c) 核酸分子が、ゲノムDNA、好ましくはクレブシエラ (Klebsiella) 属の種に由来する、より好ましくは3つの亜種ニューモニエ (pneumoniae)、オゼネ (ozaenae)、およびリノスクレロマチス (rhinoscleromatis) を含む肺炎桿菌 (K. pneumoniae)、K. オキシトカ (K. oxytoca)、K. プランチコラ (K. planticola)、K. テリゲナ (K. terrigena)、ならびにK. オルニチノリティカ (K. ornithinolytica) を含む群より選択される種に由来する、より好ましくは肺炎桿菌またはK. オキシトカに由来するゲノムDNAから単離され、

d) 断片が、その活性断片または活性変種であり、かつ/あるいは

e) 抗原またはその断片が、クレブシエラ属に由来する、好ましくは3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. プランチコラ、K. テリゲナ、ならびにK. オルニチノリティカ、より好ましくは肺炎桿菌またはK. オキシトカに由来するポリペプチドもしくはペプチド断片を含むか、またはこのようなポリペプチドもしくはペプチド断片からなる、

請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項3】

特に、請求項1または2において定義された核酸分子によってコードされる抗原またはその断片を組換え発現するように適合され、かつ/あるいは

特に、宿主細胞内にある、

請求項1または2記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項4】

クレブシエラ属に感染しているヒトに由来するまたはクレブシエラ属に以前に感染したことがある非感染健常ヒトに由来する血清と免疫学的に反応する抗原であって、

クレブシエラ属に由来する、好ましくは3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. プランチコラ、K. テリゲナ、ならびにK. オルニチノリティカに由来する、より好ましくは肺炎桿菌またはK. オキシトカに由来する単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種を含む、抗原。

【請求項5】

SEQ ID NO:188~374、SEQ ID NO:376からなる群より選択される単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種を含むか、あるいはこのような単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種からなる、抗原。

【請求項6】

a) 前記ポリペプチドが、請求項1または2において定義された核酸分子によってコードされ、

b) 抗原の活性断片が、該ポリペプチドの、特に、SEQ ID NO:188~374またはSEQ ID NO:376のいずれかによって定義されるポリペプチドの、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%からなり、

特に、抗原の活性断片が、SEQ ID NO:205のアミノ酸2-130;SEQ ID NO:216のアミノ酸26-356;SEQ ID NO:223のアミノ酸2-180;SEQ ID NO:224のアミノ酸1-168;SEQ ID NO:235のアミノ酸23-397;SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420および414-847;SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099;SEQ ID NO:242のアミノ酸1-245;SEQ ID NO:247のアミノ酸24-703;SEQ ID NO:252のアミノ酸23-328;SEQ ID NO:263のアミノ酸23-248;SEQ ID NO:267のアミノ酸2-335;SEQ ID NO:268のアミノ酸38-633;SEQ ID NO:269のアミノ酸26-742;SEQ ID NO:281のアミノ酸26-429;またはSEQ ID NO:285のアミノ酸1-632を含むか、またはこのようなアミノ酸からなり、

c) 抗原の活性変種が、該ポリペプチドと、特に、SEQ ID NO:188~374またはSEQ ID NO:376のいずれかによって定義されるポリペプチドと、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も

好ましくは99%の配列同一性を有し、

特に、抗原の活性変種が、SEQ ID NO:205のアミノ酸2-130;SEQ ID NO:216のアミノ酸26-356;SEQ ID NO:223のアミノ酸2-180;SEQ ID NO:224のアミノ酸1-168;SEQ ID NO:235のアミノ酸23-397;SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420および414-847;SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099;SEQ ID NO:242のアミノ酸1-245;SEQ ID NO:247のアミノ酸24-703;SEQ ID NO:252のアミノ酸23-328;SEQ ID NO:263のアミノ酸23-248;SEQ ID NO:267のアミノ酸2-335;SEQ ID NO:268のアミノ酸38-633;SEQ ID NO:269のアミノ酸26-742;SEQ ID NO:281のアミノ酸26-429;またはSEQ ID NO:285のアミノ酸1-632と、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%の配列同一性を有し、

d) 抗原の活性変種が、肺炎桿菌の異なる血清型の相同配列に由来し、

特に、該血清型が、K1、K2、K3、K10、K21、K22、K30、K55、K64、O1、O2a、O3、O4、O5、もしくはO12、または該Kの血清型と該Oの血清型との任意の組み合わせであり、かつ/あるいは

e) 活性変種がSEQ ID NO:413~765からなる群より選択され、

f) 抗原が、

i) SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847を含む抗原の活性断片またはSEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847からなる抗原の活性断片に対する、あるいはSEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847に由来する抗原の活性変種に対する、1~400個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは、1~350個、1~300個、1~250個、または1~200個、より好ましくは、1~150個、さらにより好ましくは、多くとも1~100個、さらにより好ましくは、多くとも1~50個、最も好ましくは、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、30個、または40個のさらなるアミノ酸残基、あるいは

ii) SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099を含む抗原の活性断片もしくはSEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099からなる抗原の活性断片に対する、またはSEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099に由来する抗原の活性断片に対する、1~1100個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは、1~1000個、1~900個、1~800個、1~700個、1~600個、1~500個、1~400個、もしくは1~300個、より好ましくは、1~200個、さらにより好ましくは、多くとも1~100個、さらにより好ましくは、多くとも1~50個、最も好ましくは、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、30個、または40個のさらなるアミノ酸残基によってさらに定義され、

特に、該さらなるアミノ酸残基が、抗原のN末端に隣接するか、抗原のC末端に隣接するか、または抗原のN末端とC末端とに隣接し、かつ/あるいは

特に、該さらなるアミノ酸残基が、(I)SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくはそのC末端に由来する変種、(II)SEQ ID NO:240のアミノ酸414-847もしくはそのN末端に由来する変種、または(III)SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099もしくはそのN末端およびC末端に由来する変種によって定義される抗原に隣接し、

g) 抗原が、抗原と非相同の少なくとも1個のアミノ酸残基、好ましくはマーカートンパク質をさらに含むか、またはこのような少なくとも1個のアミノ酸残基からさらになり、

特に、該さらなるアミノ酸残基が、抗原のN末端に隣接するか、抗原のC末端に隣接するか、または抗原のN末端とC末端とに隣接し、かつ/あるいは

特に、該さらなるアミノ酸残基が、(I)SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくはそのC末端に由来する変種、(II)SEQ ID NO:240のアミノ酸414-847もしくはそのN末端に由来する変種、または(III)SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099もしくはそのN末端およびC末端に由来する変種によって定義される抗原に隣接し、かつ/あるいは

h) 抗原が、リーダー配列もしくは分泌配列、精製に用いられる配列、またはプロタンパク質配列のいずれかの配列をさらに含むか、あるいはこのようないずれかの配列からさらになる、

請求項4または5記載の抗原。

【請求項7】

少なくとも1つのコアアミノ酸配列が、表1の「推定された免疫原性アミノ酸」もしくは「特定された免疫原領域の位置」の列において示されるか、または表4の「aaから」および「aaまで」の列によって定義されるか、または表5の「タンパク質内の位置(aa)」の列において示され、

より好ましくは、該コアアミノ酸配列が、以下：

SEQ ID NO:204のアミノ酸11-27、35-47、68-107、113-122、124-136、140-146、152-164、168-174、183-201、211-218、228-243、246-253、および180-226;SEQ ID NO:205のアミノ酸13-31、48-59、69-91、109-115、121-127、および46-105;SEQ ID NO:206のアミノ酸12-44、49-95、102-145、148-178、184-229、233-244、249-273、292-299、304-329、334-348、354-365、367-385、394-426、428-440、444-487、503-527、531-539、546-554、556-584、および273-286;SEQ ID NO:207のアミノ酸7-17、22-32、34-41、55-77、79-86、93-111、118-126、131-148、152-162、165-177、183-197、213-220、234-250、253-262、267-294、および211-269;SEQ ID NO:208のアミノ酸22-29、41-56、58-66、79-88、94-121、124-131、134-157、162-171、173-180、189-197、201-214、216-224、242-254、257-270、282-287、290-302、309-315、320-325、341-355、362-368、372-378、および1-48;SEQ ID NO:209のアミノ酸5-15、18-35、48-61、65-71、112-119、138-154、157-169、179-208、214-223、226-232、243-250、256-262、277-286、289-296、338-348、352-363、370-376、385-408、420-436、443-454、462-483、498-561、563-592、600-642、661-671、673-709、714-733、748-754、771-776、798-806、808-821、823-839、および31-83;SEQ ID NO:210のアミノ酸5-14、21-26、31-41、59-77、101-115、132-145、147-156、180-185、188-197、および97-158;SEQ ID NO:211のアミノ酸6-18、23-43、45-56、69-80、87-97、112-123、135-151、164-171、178-193、200-227、249-258、262-274、279-291、302-308、322-327、329-336、351-363、366-373、384-399、403-411、415-434、440-446、461-482、488-506、510-516、518-551、574-589、607-629、634-665、667-687、694-712、725-739、743-751、753-768、および521-583;SEQ ID NO:212のアミノ酸4-13、19-44、55-63、71-82、89-110、120-130、132-138、145-161、168-182、189-258、261-272、278-288、290-301、および11-76;SEQ ID NO:213のアミノ酸4-22、43-56、63-68、81-90、93-99、139-148、155-160、170-176、189-195、207-218、227-232、241-249、251-258、260-266、277-295、300-327、329-336、340-356、384-390、418-423、427-433、438-444、および383-428;SEQ ID NO:214のアミノ酸10-18、32-37、45-55、60-69、77-83、89-95、120-125、133-170、172-185、193-211、214-223、232-249、255-275、277-303、305-310、320-328、334-341、347-353、355-369、380-386、389-395、および71-85;SEQ ID NO:215のアミノ酸4-23、27-35、67-73、80-103、117-126、132-138、140-159、162-171、180-194、198-208、211-218、228-234、239-253、262-270、272-291、296-305、および39-110;SEQ ID NO:216のアミノ酸13-24、27-34、37-66、69-88、99-104、149-155、164-175、184-193、199-209、227-235、264-273、276-285、288-315、323-335、346-353、56-111、および199-261;SEQ ID NO:217のアミノ酸11-22、25-48、51-60、64-72、80-96、108-122、132-137、142-150、152-167、175-199、214-229、237-244、252-258、260-266、279-287、301-340、345-350、および109-153;SEQ ID NO:218のアミノ酸37-43、50-57、65-82、87-109、123-129、141-150、152-157、166-172、179-203、209-241、249-284、290-300、308-326、329-335、345-357、359-368、379-386、390-417、420-425、438-444、461-466、473-490、497-505、524-534、541-550、586-597、608-614、622-632、660-666、679-694、696-706、708-722、725-731、737-763、784-789、810-825、837-854、857-880、882-895、901-907、911-928、14-76、および176-220;SEQ ID NO:219のアミノ酸9-16、38-52、61-86、93-100、110-117、123-132、138-145、151-169、172-181、186-202、208-225、227-253、264-275、289-295、320-329、335-342、および113-193;SEQ ID NO:220のアミノ酸11-18、24-30、42-49、53-63、69-80、87-93、95-103、144-171、173-185、193-200、202-208、215-221、242-261、266-273、277-286、290-299、322-328、338-351、354-377、391-409、441-451、461-466、499-515、521-527、562-569、621-629、647-663、676-682、694-701、703-713、725-731、

735-744、755-764、793-800、および490-547;SEQ ID NO:221のアミノ酸4-11、14-22、38-70、81-90、97-114、118-132、147-171、173-181、187-202、244-250、252-298、301-311、313-331、342-368、410-418、446-451、456-462、468-474、476-492、499-507、519-528、552-565、568-575、584-613、618-624、626-649、および417-489;SEQ ID NO:222のアミノ酸4-9、32-53、66-72、74-90、97-104、110-130、133-139、144-152、166-177、203-213、215-241、256-275、291-304、307-316、321-326、334-345、352-367、および201-255;SEQ ID NO:223のアミノ酸13-19、26-43、66-72、80-85、95-101、109-125、131-137、および25-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸13-24、35-43、50-56、58-68、77-83、104-110、117-125、132-138、140-153、および19-66;SEQ ID NO:225のアミノ酸15-31、37-42、47-54、68-87、89-96、107-117、121-127、131-137、145-151、176-182、220-226、232-246、250-257、291-300、317-325、328-333、337-359、368-393、403-428、460-478、480-493、500-506、511-516、519-526、528-559、565-572、584-595、597-605、608-613、626-648、679-684、687-693、703-714、718-735、742-750、757-765、768-788、793-799、813-819、823-829、839-850、および576-623;SEQ ID NO:226のアミノ酸10-35、37-60、63-76、79-86、88-97、108-113、118-126、128-134、138-145、153-159、168-188、194-208、211-243、255-260、270-276、285-301、307-346、348-367、および275-339;SEQ ID NO:227のアミノ酸4-17、21-33、35-42、47-64、72-80、85-92、98-103、125-147、151-161、165-177、183-230、232-246、256-262、284-306、310-328、331-367、369-383、392-399、および32-85;SEQ ID NO:228のアミノ酸5-11、18-27、42-52、60-65、75-84、90-102、107-116、125-178、184-206、221-233、235-242、249-257、264-277、288-317、および267-313;SEQ ID NO:229のアミノ酸5-11、14-42、50-75、79-86、89-98、120-125、152-160、166-181、185-193、200-207、および85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸4-30、36-43、46-55、63-111、144-152、159-168、179-189、191-200、205-213、および37-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸20-45、57-77、80-100、119-126、131-137、143-169、179-185、195-203、207-231、235-264、282-302、320-329、341-347、353-359、361-373、および266-296;SEQ ID NO:232のアミノ酸5-22、24-37、41-55、57-65、72-78、90-103、105-116、119-130、164-170、190-202、209-231、244-254、260-276、300-339、344-350、355-376、389-397、399-406、408-421、429-437、および103-152;SEQ ID NO:233のアミノ酸8-16、18-25、31-47、71-82、87-102、104-114、126-156、176-183、190-200、205-212、218-228、231-243、256-279、287-301、303-312、324-332、335-348、351-357、365-380、395-412、422-451、456-464、467-483、501-507、および405-468;SEQ ID NO:234のアミノ酸4-18、21-39、46-56、63-69、72-86、116-130、132-160、162-190、196-201、209-231、233-241、251-265、269-282、292-298、309-324、333-369、391-415、417-427、436-454、471-480、482-499、510-518、521-533、537-543、545-561、571-581、585-597、599-607、609-635、638-643、650-665、671-685、687-695、701-707、710-720、724-736、747-757、764-769、772-784、791-796、808-820、および317-401;SEQ ID NO:235のアミノ酸4-12、15-33、58-77、82-89、98-106、108-118、120-135、141-147、152-160、168-215、225-233、235-247、250-264、284-312、314-321、336-343、359-374、386-394、および159-218;SEQ ID NO:236のアミノ酸4-16、24-36、40-47、49-56、61-81、84-143、148-156、158-164、170-175、194-206、208-214、および126-203;SEQ ID NO:237のアミノ酸28-45、50-61、94-111、113-124、137-142、147-173、180-188、190-196、202-223、229-235、239-249、262-270、280-288、290-321、325-332、347-355、359-368、389-407、415-427、429-453、458-465、477-485、499-505、516-527、531-549、569-592、594-602、605-615、628-635、647-659、662-683、727-735、760-765、771-780、788-809、811-818、および549-630;SEQ ID NO:238のアミノ酸21-28、33-40、48-100、104-111、113-134、および1-46;SEQ ID NO:239のアミノ酸12-24、31-41、53-61、73-87、112-128、133-140、151-156、および26-98;SEQ ID NO:240のアミノ酸4-9、19-26、32-56、58-67、71-81、90-95、97-105、112-118、124-132、138-144、147-167、169-177、199-207、212-217、231-241、250-260、266-272、274-282、289-296、299-310、316-331、344-350、352-363、368-377、381-394、399-406、412-450、459-473、486-503、508-514、518-548、564-570、579-587、602-608、616-623、628-635

、638-654、678-688、691-696、703-709、716-723、761-772、784-793、819-826、835-844、および790-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸4-10、18-36、43-50、63-71、75-105、109-117、134-140、145-157、176-182、184-201、203-211、215-225、240-250、262-284、294-309、313-319、327-337、350-356、361-367、372-393、411-421、428-451、453-466、487-492、501-528、535-553、564-574、592-605、612-629、631-640、646-653、658-666、673-681、713-718、720-730、739-749、784-792、821-826、833-844、853-863、871-876、885-894、900-918、937-950、952-957、972-990、995-1001、1024-1036、1039-1044、1049-1055、1062-1089、1091-1103、1110-1121、1123-1129、1131-1151、1157-1179、1181-1201、1204-1223、1233-1244、1269-1276、1279-1286、1294-1301、1303-1309、1315-1338、1350-1362、1373-1381、1398-1406、1412-1423、1440-1446、1458-1466、1481-1487、1492-1508、1511-1518、1528-1534、1536-1547、1553-1565、1606-1617、1619-1644、および761-781;SEQ ID NO:242のアミノ酸6-13、31-38、47-60、71-102、107-123、128-155、173-179、185-194、210-220、および161-232;SEQ ID NO:243のアミノ酸11-34、36-43、49-67、74-79、84-92、94-100、103-112、120-129、134-155、162-173、177-185、189-202、206-211、および130-185;SEQ ID NO:244のアミノ酸4-10、20-35、37-46、48-55、60-66、75-82、87-98、133-150、166-172、178-189、208-214、230-235、245-251、271-308、319-333、335-355、373-380、および117-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸4-30、54-65、91-105、107-131、135-154、163-192、199-208、210-224、229-239、248-257、263-279、281-294、328-354、373-379、382-405、426-453、462-487、および249-323;SEQ ID NO:246のアミノ酸4-10、12-24、45-55、75-88、および24-40;SEQ ID NO:247のアミノ酸4-14、20-37、47-53、55-61、75-81、97-103、107-124、129-135、139-147、160-166、169-175、181-190、202-221、247-255、272-285、300-310、318-332、351-361、384-397、406-427、442-449、458-482、494-503、512-524、531-539、552-562、577-588、590-596、600-608、613-624、637-668、692-700、および232-278;SEQ ID NO:248のアミノ酸33-39、49-55、68-84、90-96、104-120、126-143、150-159、168-191、197-208、219-225、227-233、241-247、63-115、および200-250;SEQ ID NO:249のアミノ酸4-22、24-34、36-55、57-76、83-97、99-117、135-143、145-157、163-174、178-198、200-207、209-270、276-290、321-335、338-347、367-374、393-402、404-411、416-422、443-460、467-473、および117-183;SEQ ID NO:250のアミノ酸26-37、44-52、57-96、104-111、118-124、155-177、179-197、201-214、223-233、243-250、257-262、291-297、303-314、319-363、および47-105;SEQ ID NO:251のアミノ酸36-43、45-60、76-97、107-125、131-156、158-164、および118-163;SEQ ID NO:252のアミノ酸5-32、40-50、52-60、70-88、92-101、106-126、138-150、152-161、175-193、201-234、237-248、270-285、297-303、312-318、および209-255;SEQ ID NO:253のアミノ酸4-12、23-34、49-55、59-65、70-81、83-130、および62-113;SEQ ID NO:254のアミノ酸4-26、38-49、69-76、82-96、103-119、126-140、143-190、194-209、212-218、および100-167;SEQ ID NO:255のアミノ酸7-29、35-47、56-66、80-94、97-123、125-148、150-160、166-173、175-191、193-200、207-225、および75-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸14-36、39-45、51-59、66-71、76-88、106-117、121-126、140-157、164-187、198-206、210-252、および202-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸4-19、27-35、90-107、120-134、144-150、166-175、192-198、221-243、249-255、263-278、283-288、305-321、324-334、342-349、355-366、377-390、413-425、442-448、および130-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸17-26、41-51、54-61、64-72、78-105、117-125、127-137、147-155、175-213、230-236、238-261、271-277、282-297、309-318、329-347、355-372、377-390、および69-126;SEQ ID NO:259のアミノ酸4-48、54-60、62-69、73-81、88-115、124-137、139-154、156-169、171-190、194-231、240-273、288-303、336-363、367-395、405-411、434-442、449-454、466-483、491-507、および226-282;SEQ ID NO:260のアミノ酸26-34、39-47、50-80、82-88、97-105、108-127、131-137、162-180、185-191、198-203、209-214、226-247、256-288、296-305、および149-239;SEQ ID NO:261のアミノ酸5-28、30-54、73-84、89-98、109-116、122-128、137-142、163-189、207-236、245-280、288-390、404-423、426-433、450-474、487-504、506-513、524-530、532-595、605-614、620-626、631-63

8、644-657、667-683、686-693、695-702、707-733、739-747、および6-62;SEQ ID NO:262のアミノ酸23-31、39-50、55-67、76-100、117-130、149-171、173-185、218-238、242-288、291-298、334-346、355-369、382-399、413-420、431-438、442-449、455-466、486-493、498-508、524-531、540-546、551-558、562-570、575-582、585-596、598-604、621-630、632-650、670-677、682-701、736-749、755-761、および612-626;SEQ ID NO:263のアミノ酸4-21、24-39、44-68、74-81、85-91、109-116、129-138、142-148、173-188、195-201、207-212、223-228、および126-148;SEQ ID NO:264のアミノ酸4-17、24-42、61-67、84-93、96-102、116-121、135-143、155-165、177-186、210-224、253-259、272-297、299-331、337-351、359-367、369-385、および1-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸4-25、28-54、67-81、85-136、138-143、157-170、180-190、197-203、205-214、219-243、246-270、277-283、290-299、305-311、および127-182;SEQ ID NO:266のアミノ酸11-20、25-33、75-80、85-91、113-124、143-155、161-170、172-184、および128-176;SEQ ID NO:267のアミノ酸4-9、16-26、28-34、55-80、120-143、150-156、158-164、167-178、185-190、192-213、221-237、242-255、257-272、281-290、325-332、および48-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸13-48、59-70、78-88、95-112、129-151、153-161、163-182、214-221、235-245、248-277、281-291、293-301、303-311、315-320、323-346、377-383、390-398、447-454、474-487、491-512、531-544、547-553、582-590、597-603、605-611、623-629、および410-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸6-26、39-46、48-58、69-75、109-121、139-144、148-155、166-172、215-221、261-267、313-319、363-386、423-433、447-458、465-471、483-494、497-517、558-565、578-586、589-597、619-626、636-645、659-665、671-680、682-693、733-739、および152-206;SEQ ID NO:270のアミノ酸4-19、23-35、40-50、52-58、65-73、78-103、112-125、146-160、163-192、194-200、および29-90;SEQ ID NO:271のアミノ酸4-13、17-32、40-50、57-67、76-81、88-95、107-119、131-142、144-157、171-178、185-193、197-207、212-227、231-238、248-253、263-310、および90-170;SEQ ID NO:272のアミノ酸9-28、57-82、84-93、126-135、143-166、173-194、196-201、212-220、228-254、269-277、289-298、305-316、320-327、330-337、350-359、373-378、386-392、403-411、421-428、435-441、443-458、465-470、および80-141;SEQ ID NO:273のアミノ酸11-48、54-67、69-75、89-95、101-122、124-131、134-157、159-175、202-208、214-228、258-270、272-280、287-295、298-310、331-338、340-417、427-500、502-509、534-552、556-561、564-577、585-592、594-608、621-627、632-641、643-652、671-681、683-709、712-743、758-764、776-783、789-820、835-851、864-883、885-910、913-940、948-953、967-976、994-1020、および775-825;SEQ ID NO:274のアミノ酸14-24、32-54、58-63、70-80、93-100、108-125、127-135、142-153、155-160、180-191、201-208、210-216、222-235、242-264、267-273、276-282、284-308、および10-59;SEQ ID NO:275のアミノ酸16-28、44-68、70-77、83-90、99-129、131-137、145-154、161-175、183-190、196-203、205-220、238-245、321-328、330-338、366-379、383-397、399-405、412-418、442-458、471-483、486-505、536-544、562-568、583-602、610-618、629-635、641-655、672-682、697-705、714-729、744-751、755-762、766-771、783-807、および555-621;SEQ ID NO:276のアミノ酸4-9、20-34、45-54、60-77、79-89、91-100、102-149、162-170、177-189、193-208、210-222、238-244、252-264、267-276、302-307、および100-140;SEQ ID NO:277のアミノ酸11-27、30-49、56-62、69-74、76-85、94-108、116-125、129-147、153-161、165-171、177-208、217-223、225-231、237-255、260-284、293-300、および73-137;SEQ ID NO:278のアミノ酸4-38、40-51、84-97、99-106、109-115、119-129、131-145、148-160、180-186、188-202、230-243、246-267、274-288、290-299、302-312、317-327、332-344、353-377、381-388、407-419、423-437、447-470、474-482、486-494、501-523、531-546、551-556、および727-740;SEQ ID NO:279のアミノ酸23-52、62-76、87-104、109-115、117-123、129-139、143-149、152-170、172-191、199-205、212-218、220-240、249-256、263-275、297-303、308-342、349-380、382-394、414-420、430-441、446-452、460-475、488-505、514-531、533-539、546-568、570-577、579-588、613-625、632-670、672-716、718-745、759-769、785-798、801-807、および272-324;SEQ ID NO:28

0のアミノ酸4-34、36-43、56-73、80-87、101-134、148-159、161-170、178-185、195-206、211-221、223-248、259-271、276-295、297-308、および241-296;SEQ ID NO:281のアミノ酸5-31、44-50、64-74、86-94、132-147、154-167、196-203、209-219、253-260、284-289、300-312、319-327、335-340、358-364、376-383、および166-202;SEQ ID NO:282のアミノ酸4-9、12-27、29-71、77-84、90-108、114-142、147-164、180-213、217-227、229-282、291-309、322-329、336-353、365-370、および317-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸36-41、52-66、71-83、89-95、116-127、154-174、176-184、200-206、230-237、248-259、269-284、307-316、376-383、399-418、424-442、445-451、454-462、および1-50;SEQ ID NO:284のアミノ酸9-14、33-49、64-72、87-92、103-109、123-128、130-141、143-154、160-166、182-214、237-247、251-260、292-300、327-332、337-350、357-365、388-398、405-411、422-428、451-459、478-488、520-531、534-540、558-564、580-586、591-600、605-615、629-635、641-653、658-672、212-244、および533-611;SEQ ID NO:285のアミノ酸4-10、17-27、30-37、44-62、80-85、94-114、118-131、134-141、148-161、171-212、218-241、248-261、274-313、325-336、342-348、359-373、391-397、424-431、454-474、489-495、497-503、505-515、548-553、560-580、591-610、および277-324;SEQ ID NO:286のアミノ酸7-16、18-24、30-47、49-70、83-99、103-117、126-141、146-153、159-165、177-194、198-221、236-246、255-262、273-279、283-296、301-332、338-411、422-428、434-440、452-458、463-469、494-509、511-517、524-531、548-554、564-572、および335-389;SEQ ID NO:287のアミノ酸9-15、33-54、56-80、102-108、および1-42;SEQ ID NO:288のアミノ酸15-36、42-55、58-68、および54-77;SEQ ID NO:289のアミノ酸55-75、89-96、98-110、および14-36;SEQ ID NO:290のアミノ酸8-14、29-51、73-101、110-117、および70-114;SEQ ID NO:291のアミノ酸20-25、29-34、41-52、60-67、69-85、90-100、114-122、136-142、160-170、174-181、および21-58;SEQ ID NO:292のアミノ酸14-22、および4-13;SEQ ID NO:293のアミノ酸22-40、54-66、88-105、109-118、および31-74;SEQ ID NO:294のアミノ酸5-11、18-32、47-60、66-73、83-92、113-120、126-141、151-164、167-174、201-211、および118-129;SEQ ID NO:295のアミノ酸5-11、18-24、32-40、47-53、および25-54;SEQ ID NO:296のアミノ酸18-24、31-48、および5-55;SEQ ID NO:297のアミノ酸10-16、26-32、47-56、85-95、および10-62;SEQ ID NO:298のアミノ酸4-12、16-26、および25-34;SEQ ID NO:299のアミノ酸19-29、45-51、63-68、76-92、103-110、114-120、123-133、135-141、および14-78;SEQ ID NO:300のアミノ酸4-18、47-61、および57-93;SEQ ID NO:301のアミノ酸17-29、44-50、および26-38;SEQ ID NO:302のアミノ酸5-19、55-64、78-85、95-101、104-112、および24-33;SEQ ID NO:303のアミノ酸4-10、および12-31;SEQ ID NO:304のアミノ酸4-12、27-41、43-58、60-67、76-86、および13-65;SEQ ID NO:305のアミノ酸30-38、57-67、および5-32;SEQ ID NO:306のアミノ酸30-43、および2-21;SEQ ID NO:307のアミノ酸14-20、23-36、41-48、および1-52;SEQ ID NO:308のアミノ酸18-33、51-58、76-82、および32-46;SEQ ID NO:309のアミノ酸25-31、および2-16;SEQ ID NO:310のアミノ酸14-23、50-58、および9-49;SEQ ID NO:311のアミノ酸4-10、22-31、35-45、48-68、71-80、および17-66;SEQ ID NO:312のアミノ酸4-24、28-42、46-56、63-69、87-94、112-131、および2-46;SEQ ID NO:313のアミノ酸4-15、19-28、34-41、52-62、78-86、および2-20;SEQ ID NO:314のアミノ酸4-11、16-30、32-42、および7-38;SEQ ID NO:315のアミノ酸4-20、22-31、および22-38;SEQ ID NO:316のアミノ酸4-19、および17-32;SEQ ID NO:317のアミノ酸7-13、17-22、27-33、80-100、および26-40;SEQ ID NO:318のアミノ酸10-18、22-48、および32-44;SEQ ID NO:319のアミノ酸15-24、43-49、73-83、および45-93;SEQ ID NO:320のアミノ酸22-29、46-55、57-63、および5-17;SEQ ID NO:321のアミノ酸10-33、および21-35;SEQ ID NO:322のアミノ酸16-24、および22-49;SEQ ID NO:323のアミノ酸4-16、37-73、76-110、117-125、127-132、および2-30;SEQ ID NO:324のアミノ酸4-12、23-35、44-56、59-88、および22-76;SEQ ID NO:325のアミノ酸15-26、および23-35;SEQ ID NO:326のアミノ酸12-22、31-40、および17-44;SEQ ID NO:327のアミノ酸4-9、13-18、29-35、および57-64;SEQ ID NO:328のアミノ酸31-55、67-81、および25-70;SEQ ID NO:329のアミノ酸13-24、51-58、および13-26;SEQ ID NO:330のアミノ酸6-20、29

-40、57-79、および46-88;SEQ ID NO:331のアミノ酸8-14、41-54、68-76、83-93、106-126、130-139、および12-72;SEQ ID NO:332のアミノ酸5-13、17-24、41-55、64-69、80-85、94-107、109-115、および53-88;SEQ ID NO:333のアミノ酸5-12、32-54、57-64、および20-33;SEQ ID NO:334のアミノ酸4-16、40-48、50-58、62-68、75-85、92-104、108-116、124-134、および68-128;SEQ ID NO:335のアミノ酸7-13、19-29、34-40、54-71、76-81、91-144、147-155、157-188、および11-83;SEQ ID NO:336のアミノ酸17-24、32-41、および6-43;SEQ ID NO:337のアミノ酸14-31、38-59、69-87、95-102、126-146、157-162、177-193、201-227、238-251、および63-78;SEQ ID NO:338のアミノ酸10-16、18-25、27-41、43-52、59-86、94-101、134-140、および38-100;SEQ ID NO:339のアミノ酸4-19、23-35、43-72、78-92、および37-93;SEQ ID NO:340のアミノ酸15-20、27-32、41-65、69-82、93-105、107-115、120-147、170-178、184-201、214-257、272-281、293-314、332-339、358-364、374-381、390-397、399-414、428-460、および317-375;SEQ ID NO:341のアミノ酸11-28、47-55、59-68、76-105、108-116、120-144、146-160、167-175、180-187、209-233、および144-158;SEQ ID NO:342のアミノ酸4-13、58-78、および14-77;SEQ ID NO:343のアミノ酸26-31、44-49、57-64、67-74、107-112、116-152、154-181、202-212、241-255、および57-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸10-41、53-70、81-93、100-111、137-147、164-169、183-190、199-210、216-221、226-240、および84-95;SEQ ID NO:345のアミノ酸12-45、48-56、73-79、91-103、106-112、117-125、132-143、154-160、178-201、208-214、216-225、260-266、276-283、および98-115;SEQ ID NO:346のアミノ酸4-15、30-42、および29-39;SEQ ID NO:347のアミノ酸22-53、55-73、80-88、および33-66;SEQ ID NO:348のアミノ酸6-23、44-54、および56-67;SEQ ID NO:349のアミノ酸8-21、35-44、66-75、82-87、94-101、および32-94;SEQ ID NO:350のアミノ酸8-20、23-32、36-50、53-69、および15-69;SEQ ID NO:351のアミノ酸8-22;SEQ ID NO:352のアミノ酸31-37、および2-31;SEQ ID NO:353のアミノ酸4-20、23-39、58-63、71-78、97-102、および22-82;SEQ ID NO:354のアミノ酸23-44、135-152、168-184、および57-116;SEQ ID NO:355のアミノ酸24-31、42-50、52-62、93-117、および43-94;SEQ ID NO:356のアミノ酸20-29、および24-43;SEQ ID NO:357のアミノ酸12-57、59-74、および22-40;SEQ ID NO:358のアミノ酸7-16、18-26、39-45、68-78、86-92、および65-82;SEQ ID NO:359のアミノ酸5-17、19-34、42-48、56-71、102-113、118-129、および67-111;SEQ ID NO:360のアミノ酸4-33、50-71、および13-55;SEQ ID NO:361のアミノ酸9-17、23-30、37-54、69-88、96-102、114-123、130-140、143-163、および5-70;SEQ ID NO:362のアミノ酸4-23、27-52、71-80、および9-94;SEQ ID NO:363のアミノ酸13-19、および2-21;SEQ ID NO:364のアミノ酸18-26、28-52、63-74、94-107、123-134、および18-84;SEQ ID NO:365のアミノ酸19-33、57-68、および26-48;SEQ ID NO:366のアミノ酸4-26、31-37、42-59、および12-65;SEQ ID NO:367のアミノ酸4-25、および20-39;SEQ ID NO:368のアミノ酸40-51、54-62、67-75、83-89、126-146、148-156、および31-42;SEQ ID NO:369のアミノ酸4-15、23-33、38-49、82-98、および7-91;SEQ ID NO:370のアミノ酸6-26、36-57、および40-64;SEQ ID NO:371のアミノ酸6-15、21-28、32-38、57-65、78-103、114-134、138-144、154-163、および41-95;SEQ ID NO:372のアミノ酸13-30、47-57、71-76、および25-71;SEQ ID NO:373のアミノ酸4-31、43-51、55-63、67-72、76-83、88-95、99-118、125-132、134-159、および82-118;SEQ ID NO:374のアミノ酸4-17、26-32、34-40、45-61、67-92、および41-97;SEQ ID NO:204のアミノ酸179-208、および198-227;SEQ ID NO:205のアミノ酸45-69、65-89、および83-106;SEQ ID NO:206のアミノ酸269-290;SEQ ID NO:207のアミノ酸209-230、226-249、および245-269;SEQ ID NO:208のアミノ酸-9-15、10-33、および28-52;SEQ ID NO:209のアミノ酸29-50、45-67、および62-85;SEQ ID NO:210のアミノ酸96-120、115-139、および134-158;SEQ ID NO:211のアミノ酸519-543、539-563、および559-584;SEQ ID NO:212のアミノ酸10-35、31-56、および52-77;SEQ ID NO:213のアミノ酸382-407、および403-428;SEQ ID NO:214のアミノ酸66-90;SEQ ID NO:215のアミノ酸38-65、および61-88;SEQ ID NO:216のアミノ酸56-85、198-221、217-240、および236-261;SEQ ID NO:217のアミノ酸108-132、および128-153;SEQ ID NO:218のアミノ酸13-37、33-56、52-76、175-200、および196-220;SEQ ID NO:219のアミノ酸13

2-156、152-176、および172-195;SEQ ID NO:220のアミノ酸489-512、508-531、および526-549;SEQ ID NO:221のアミノ酸416-442、438-465、および461-489;SEQ ID NO:222のアミノ酸199-222、217-240、および235-257;SEQ ID NO:223のアミノ酸25-55、51-81、および77-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸18-46、および42-66;SEQ ID NO:225のアミノ酸575-601、および597-623;SEQ ID NO:226のアミノ酸274-299、295-320、および316-339;SEQ ID NO:227のアミノ酸32-61、および57-85;SEQ ID NO:228のアミノ酸266-291、および287-313;SEQ ID NO:229のアミノ酸85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸36-64、および83-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸264-285、および280-300;SEQ ID NO:232のアミノ酸102-128、および124-152;SEQ ID NO:233のアミノ酸404-429、および445-468;SEQ ID NO:234のアミノ酸343-374、および370-401;SEQ ID NO:235のアミノ酸158-182、および178-202;SEQ ID NO:236のアミノ酸151-180;SEQ ID NO:237のアミノ酸549-579、575-605、および601-630;SEQ ID NO:238のアミノ酸-7-23、および19-46;SEQ ID NO:239のアミノ酸48-75、および71-98;SEQ ID NO:240のアミノ酸789-813、および809-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸759-783;SEQ ID NO:242のアミノ酸160-188、184-211、および207-232;SEQ ID NO:243のアミノ酸130-159;SEQ ID NO:244のアミノ酸117-147、143-173、および169-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸248-276、272-300、および296-323;SEQ ID NO:246のアミノ酸21-43;SEQ ID NO:247のアミノ酸231-256、および252-278;SEQ ID NO:248のアミノ酸62-91、87-115、および199-227;SEQ ID NO:249のアミノ酸116-141、137-162、および158-183;SEQ ID NO:250のアミノ酸46-69、65-87、および82-105;SEQ ID NO:251のアミノ酸117-142、および138-163;SEQ ID NO:252のアミノ酸208-233、および229-255;SEQ ID NO:253のアミノ酸61-88;SEQ ID NO:254のアミノ酸99-124、120-145、および141-167;SEQ ID NO:255のアミノ酸74-103、99-128、124-152、および148-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸202-231、および227-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸129-154、および150-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸95-126;SEQ ID NO:259のアミノ酸226-256、および252-282;SEQ ID NO:260のアミノ酸171-198、194-221、および217-240;SEQ ID NO:261のアミノ酸35-65、および61-91;SEQ ID NO:262のアミノ酸608-631;SEQ ID NO:263のアミノ酸124-149;SEQ ID NO:264のアミノ酸-14-21、および17-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸127-157、および153-182;SEQ ID NO:266のアミノ酸150-176;SEQ ID NO:267のアミノ酸48-79、および75-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸435-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸151-180、および176-206;SEQ ID NO:270のアミノ酸126-151、および167-190;SEQ ID NO:271のアミノ酸89-118、114-144、および140-170;SEQ ID NO:272のアミノ酸80-112;SEQ ID NO:274のアミノ酸9-36;SEQ ID NO:276のアミノ酸117-140;SEQ ID NO:277のアミノ酸72-97、93-117、および113-137;SEQ ID NO:278のアミノ酸723-746;SEQ ID NO:279のアミノ酸271-300;SEQ ID NO:280のアミノ酸240-271、および267-296;SEQ ID NO:281のアミノ酸165-188、および183-206;SEQ ID NO:282のアミノ酸316-344、および340-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸-3-27、および23-50;SEQ ID NO:284のアミノ酸212-244、532-561、557-586、および582-611;SEQ ID NO:285のアミノ酸276-302、および298-324;SEQ ID NO:286のアミノ酸335-364、および360-389;SEQ ID NO:287のアミノ酸41-64、および59-82;SEQ ID NO:288のアミノ酸53-77;SEQ ID NO:289のアミノ酸13-37;SEQ ID NO:290のアミノ酸69-94、および90-114;SEQ ID NO:291のアミノ酸19-42、および37-60;SEQ ID NO:292のアミノ酸1-25;SEQ ID NO:293のアミノ酸30-54、および50-75;SEQ ID NO:294のアミノ酸111-135;SEQ ID NO:295のアミノ酸25-54;SEQ ID NO:334のアミノ酸67-98、および94-126;SEQ ID NO:335のアミノ酸9-32、27-51、46-70、および65-86;SEQ ID NO:336のアミノ酸1-24、および20-44;SEQ ID NO:337のアミノ酸58-82;SEQ ID NO:338のアミノ酸37-62、58-82、および77-101;SEQ ID NO:339のアミノ酸37-68、および64-93;SEQ ID NO:340のアミノ酸317-347、および343-375;SEQ ID NO:341のアミノ酸140-164;SEQ ID NO:342のアミノ酸13-40、36-60、および55-79;SEQ ID NO:343のアミノ酸56-79、および75-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸77-101;SEQ ID NO:345のアミノ酸94-118;SEQ ID NO:205のアミノ酸46-105;SEQ ID NO:216のアミノ酸56-111;SEQ ID NO:223のアミノ酸25-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸19-66;SEQ ID NO:229のアミノ酸85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸37-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸266-296;SEQ ID NO:232のアミノ酸103-152;SEQ ID NO:235のアミノ酸167-218;SEQ ID NO:240の

アミノ酸790-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸761-781;SEQ ID NO:242のアミノ酸176-232;SEQ ID NO:244のアミノ酸117-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸249-323;SEQ ID NO:247のアミノ酸232-278;SEQ ID NO:252のアミノ酸209-255;SEQ ID NO:255のアミノ酸75-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸202-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸130-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸69-126;SEQ ID NO:263のアミノ酸126-148;SEQ ID NO:264のアミノ酸1-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸127-182;SEQ ID NO:267のアミノ酸48-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸410-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸152-206;SEQ ID NO:275のアミノ酸555-621;SEQ ID NO:281のアミノ酸166-202;SEQ ID NO:282のアミノ酸317-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸1-50;SEQ ID NO:285のアミノ酸277-324;SEQ ID NO:289のアミノ酸14-36;SEQ ID NO:336のアミノ酸6-43;SEQ ID NO:343のアミノ酸57-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸84-95;およびSEQ ID NO:345のアミノ酸98-115

からなる群より選択される、

少なくとも1つのコアアミノ酸配列を含む抗原。

【請求項8】

抗原が、以下:

a)1~50個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは1~40個、より好ましくは1~30個、さらにより好ましくは多くとも1~25個、さらにより好ましくは多くとも1~10個、最も好ましくは1個、2個、3個、4個、もしくは5個のさらなるアミノ酸残基;および/または

b)コアアミノ酸配列と非相同の少なくとも1個のさらなるアミノ酸残基からさらになり、

特に、さらなるアミノ酸残基が、コアアミノ酸配列のN末端に隣接するか、C末端に隣接するか、またはN末端とC末端とに隣接し、かつ/あるいは

特に、該抗原が、請求項7において定義された、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、または少なくとも6個のコアアミノ酸配列を含む、

請求項7記載の抗原。

【請求項9】

ワクチンであることが好ましく、

請求項4~8のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項1または2において定義された核酸分子、あるいは請求項3において定義されたベクターを含む、

薬学的組成物。

【請求項10】

a)ワクチンであることが好ましく、医用薬剤として使用するための、

b)クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、

c)特に、免疫賦活物質が、ポリカチオンポリマーと免疫賦活性デオキシヌクレオチドとの組み合わせ、または少なくとも2個のLysLeuLysモチーフを含有するペプチドと免疫賦活性デオキシヌクレオチドとの組み合わせ、好ましくは、KLKLLLLLKLKとオリゴ(dIdC)₁₃との組み合わせのどちらかであり、かつ/または

特に該ポリカチオンペプチドがポリアルギニンである、

免疫賦活物質、好ましくは、ポリカチオンポリマー、特にポリカチオンペプチド、免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、特にオリゴ(dIdC)₁₃、少なくとも2個のLysLeuLysモチーフを含有するペプチド、特に、ペプチドKLKLLLLLKLK、神経刺激性化合物、特に、ヒト成長ホルモン、ミョウバン、フロイント完全アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバント、またはその組み合わせを含む群より選択される免疫賦活物質をさらに含むことを特徴とし、かつ/あるいは

d)クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびに

K. オルニチノリティカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK. オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項11】

特に、

- a) 抗体がモノクローナル抗体である、
- b) 有効部分が、Fabフラグメント、F(ab)フラグメント、F(ab)Nフラグメント、F(ab)₂フラグメント、またはFvフラグメントを含み、
- c) 抗体がキメラ抗体であり、
- d) 抗体がヒト化抗体である、
- e) 医用薬剤としての使用のための、かつ/あるいは
- f) クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. プランチコラ、K. テリゲナ、ならびに
K. オルニチノリティカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK. オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、

請求項4~8のいずれか一項において定義された、抗原またはその断片、好ましくは、その活性断片、もしくはその変種、好ましくは、その活性変種の少なくとも選択部分に結合する、抗体または少なくともその有効部分。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0255

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0255】

本発明は、以下の図面、表、実施例および配列表によってさらに説明され、これらからさらなる特徴、態様、および利点を理解することができる。本実施例は例示に過ぎず、開示を限定するものではないことが理解されるだろう。

[請求項101]

抗原またはその断片をコードする単離された核酸分子であって、

以下からなる群より選択される、核酸配列を含む単離された核酸分子：

- a) SEQ ID NO:1~187およびSEQ ID NO:375を含む群より選択されるヌクレオチド配列を有する核酸分子と少なくとも70%の配列同一性を有する核酸分子、
- b) a)の核酸分子に相補的な核酸分子、
- c) a)またはb)の核酸分子の少なくとも15個の連続した塩基を含む核酸分子、
- d) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、a)、b)、またはc)の核酸分子にアニーリングする核酸分子、
- e) 遺伝暗号の縮重がなければ、a)、b)、c)またはd)において定義された核酸分子にハイブリダイズする核酸分子。

[請求項102]

SEQ ID NO:1~187またはSEQ ID NO:375との配列同一性が、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%、または最も好ましくは100%である、請求項101記載の単離された核酸分子。

[請求項103]

DNAである、請求項101または102のいずれか一項記載の核酸分子。

[請求項104]

RNAである、請求項101または102のいずれか一項記載の核酸分子。

[請求項105]

ゲノムDNA、好ましくはクレブシエラ(Klebsiella)属の種に由来する、より好ましくは3つの亜種ニューモニエ(pneumoniae)、オゼネ(ozaenae)、およびリノスクレロマチス(rhin oscleromatis)を含む肺炎桿菌(K. pneumoniae)、K. オキシトカ(K. oxytoca)、K. プランチ

コラ(K.planticola)、K.テリゲナ(K.terrigena)、ならびにK.オルニチノリティカ(K.ornithinolytica)を含む群より選択される種に由来する、より好ましくは肺炎桿菌またはK.オキシトカに由来するゲノムDNAから単離された、請求項101～103のいずれか一項記載の単離された核酸分子。

[請求項106]

断片が、その活性断片または活性変種である、請求項101～105のいずれか一項記載の核酸。

[請求項107]

抗原またはその断片が、クレブシエラ属に由来する、好ましくは3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカ、より好ましくは肺炎桿菌またはK.オキシトカに由来するポリペプチドもしくはペプチド断片を含むか、またはこのようなポリペプチドもしくはペプチド断片からなる、請求項101～106のいずれか一項記載の核酸。

[請求項108]

請求項101～107のいずれか一項記載の核酸分子を含む、ベクター。

[請求項109]

請求項101～107のいずれか一項において定義された核酸分子によってコードされる抗原またはその断片を組換え発現するように適合された、請求項108記載のベクター。

[請求項110]

請求項108または109において定義されたベクターを含む、宿主細胞。

[請求項111]

クレブシエラ属に感染しているヒトに由来するまたはクレブシエラ属に以前に感染したことの非感染健常ヒトに由来する血清と免疫学的に反応する抗原であって、

クレブシエラ属に由来する、好ましくは3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカに由来する、より好ましくは肺炎桿菌またはK.オキシトカに由来する単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種を含む、抗原。

[請求項112]

SEQ ID NO:188～374、SEQ ID NO:376からなる群より選択される単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種を含むか、あるいはこのような単離されたポリペプチドまたはその活性断片もしくは活性変種からなる、抗原。

[請求項113]

ポリペプチドが、請求項101～107のいずれか一項において定義された核酸分子によってコードされる、請求項111または112記載の抗原。

[請求項114]

抗原の活性断片が、前記ポリペプチドの、特に、SEQ ID NO:188～374またはSEQ ID NO:376のいずれかによって定義されるポリペプチドの、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%からなる、請求項111～113のいずれか一項記載の抗原。

[請求項115]

抗原の活性変種が、前記ポリペプチドと、特に、SEQ ID NO:188～374またはSEQ ID NO:376のいずれかによって定義されるポリペプチドと、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%の配列同一性を有する、請求項111～114のいずれか一項記載の抗原。

[請求項116]

抗原の活性断片が、SEQ ID NO:205のアミノ酸2-130;SEQ ID NO:216のアミノ酸26-356;SEQ ID NO:223のアミノ酸2-180;SEQ ID NO:224のアミノ酸1-168;SEQ ID NO:235のアミノ酸23-397;SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420および414-847;SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099;

SEQ ID NO:242のアミノ酸1-245;SEQ ID NO:247のアミノ酸24-703;SEQ ID NO:252のアミノ酸23-328;SEQ ID NO:263のアミノ酸23-248;SEQ ID NO:267のアミノ酸2-335;SEQ ID NO:268のアミノ酸38-633;SEQ ID NO:269のアミノ酸26-742;SEQ ID NO:281のアミノ酸26-429;またはSEQ ID NO:285のアミノ酸1-632を含むか、またはこのようなアミノ酸からなる、請求項114記載の抗原。

[請求項117]

抗原の活性変種が、SEQ ID NO:205のアミノ酸2-130;SEQ ID NO:216のアミノ酸26-356;SEQ ID NO:223のアミノ酸2-180;SEQ ID NO:224のアミノ酸1-168;SEQ ID NO:235のアミノ酸3-397;SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420および414-847;SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099;SEQ ID NO:242のアミノ酸1-245;SEQ ID NO:247のアミノ酸24-703;SEQ ID NO:252のアミノ酸23-328;SEQ ID NO:263のアミノ酸23-248;SEQ ID NO:267のアミノ酸2-335;SEQ ID NO:268のアミノ酸38-633;SEQ ID NO:269のアミノ酸26-742;SEQ ID NO:281のアミノ酸26-429;またはSEQ ID NO:285のアミノ酸1-632と、少なくとも50%、特に少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%、最も好ましくは99%の配列同一性を有する、請求項115記載の抗原。

[請求項118]

抗原の活性変種が、肺炎桿菌の異なる血清型の相同配列に由来し、特に、該血清型が、K1、K2、K3、K10、K21、K22、K30、K55、K64、O1、O2a、O3、O4、O5、もしくはO12、または該Kの血清型と該Oの血清型との任意の組み合わせである、請求項111～117のいずれか一項記載の抗原。

[請求項119]

活性変種がSEQ ID NO:413～765からなる群より選択される、請求項111～118のいずれか一項記載の抗原。

[請求項120]

a) SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847を含む抗原の活性断片またはSEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847からなる抗原の活性断片に対する、あるいはSEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくは414-847に由来する抗原の活性変種に対する、1～400個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは、1～350個、1～300個、1～250個、または1～200個、より好ましくは、1～150個、さらにより好ましくは、多くとも1～100個、さらにより好ましくは、多くとも1～50個、最も好ましくは、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、30個、または40個のさらなるアミノ酸残基、あるいは

b)SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099を含む抗原の活性断片もしくはSEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099からなる抗原の活性断片に対する、またはSEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099に由来する抗原の活性断片に対する、1～1100個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは、1～1000個、1～900個、1～800個、1～700個、1～600個、1～500個、1～400個、もしくは1～300個、より好ましくは、1～200個、さらにより好ましくは、多くとも1～100個、さらにより好ましくは、多くとも1～50個、最も好ましくは、1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、30個、または40個のさらなるアミノ酸残基
によってさらに定義される、請求項116～119のいずれか一項記載の抗原。

[請求項121]

抗原と非相同の少なくとも1個のアミノ酸残基、好ましくはマーカートンパク質をさらに含むか、またはこのような少なくとも1個のアミノ酸残基からさらになる、請求項111～120のいずれか一項記載の抗原。

[請求項122]

さらなるアミノ酸残基が、抗原のN末端に隣接するか、抗原のC末端に隣接するか、または抗原のN末端とC末端とに隣接する、請求項120または121記載の抗原。

[請求項123]

さらなるアミノ酸残基が、

a)SEQ ID NO:240のアミノ酸2-420もしくはそのC末端に由来する変種、

b)SEQ ID NO:240のアミノ酸414-847もしくはそのN末端に由来する変種、または
 c)SEQ ID NO:241のアミノ酸582-1099もしくはそのN末端およびC末端に由来する変種
 によって定義される抗原に隣接する、請求項120～122のいずれか一項記載の抗原。

[請求項124]

リーダー配列もしくは分泌配列、精製に用いられる配列、またはプロタンパク質配列の
 いずれかの配列をさらに含むか、あるいはこのようないずれかの配列からさらになる、請
 求項111～123のいずれか一項記載の抗原。

[請求項125]

少なくとも1つのコアアミノ酸配列が、表1の「推定された免疫原性アミノ酸」もしくは
 「特定された免疫原領域の位置」の列において示されるか、または表4の「aaから」およ
 び「aaまで」の列によって定義されるか、または表5の「タンパク質内の位置(aa)」の列
 において示され、

より好ましくは、該コアアミノ酸配列が、以下:SEQ ID NO:204のアミノ酸11-27、35-47
 、68-107、113-122、124-136、140-146、152-164、168-174、183-201、211-218、228-243
 、246-253、および180-226;SEQ ID NO:205のアミノ酸13-31、48-59、69-91、109-115、12
 1-127、および46-105;SEQ ID NO:206のアミノ酸12-44、49-95、102-145、148-178、184-2
 29、233-244、249-273、292-299、304-329、334-348、354-365、367-385、394-426、428-
 440、444-487、503-527、531-539、546-554、556-584、および273-286;SEQ ID NO:207の
 アミノ酸7-17、22-32、34-41、55-77、79-86、93-111、118-126、131-148、152-162、165
 -177、183-197、213-220、234-250、253-262、267-294、および211-269;SEQ ID NO:208の
 アミノ酸22-29、41-56、58-66、79-88、94-121、124-131、134-157、162-171、173-180、
 189-197、201-214、216-224、242-254、257-270、282-287、290-302、309-315、320-325
 、341-355、362-368、372-378、および1-48;SEQ ID NO:209のアミノ酸5-15、18-35、48-6
 1、65-71、112-119、138-154、157-169、179-208、214-223、226-232、243-250、256-262
 、277-286、289-296、338-348、352-363、370-376、385-408、420-436、443-454、462-48
 3、498-561、563-592、600-642、661-671、673-709、714-733、748-754、771-776、798-8
 06、808-821、823-839、および31-83;SEQ ID NO:210のアミノ酸5-14、21-26、31-41、59-
 77、101-115、132-145、147-156、180-185、188-197、および97-158;SEQ ID NO:211のア
 ミノ酸6-18、23-43、45-56、69-80、87-97、112-123、135-151、164-171、178-193、200-
 227、249-258、262-274、279-291、302-308、322-327、329-336、351-363、366-373、384
 -399、403-411、415-434、440-446、461-482、488-506、510-516、518-551、574-589、60
 7-629、634-665、667-687、694-712、725-739、743-751、753-768、および521-583;SEQ I
 D NO:212のアミノ酸4-13、19-44、55-63、71-82、89-110、120-130、132-138、145-161、
 168-182、189-258、261-272、278-288、290-301、および11-76;SEQ ID NO:213のアミノ酸
 4-22、43-56、63-68、81-90、93-99、139-148、155-160、170-176、189-195、207-218、2
 27-232、241-249、251-258、260-266、277-295、300-327、329-336、340-356、384-390、
 418-423、427-433、438-444、および383-428;SEQ ID NO:214のアミノ酸10-18、32-37、45
 -55、60-69、77-83、89-95、120-125、133-170、172-185、193-211、214-223、232-249、
 255-275、277-303、305-310、320-328、334-341、347-353、355-369、380-386、389-395
 、および71-85;SEQ ID NO:215のアミノ酸4-23、27-35、67-73、80-103、117-126、132-13
 8、140-159、162-171、180-194、198-208、211-218、228-234、239-253、262-270、272-2
 91、296-305、および39-110;SEQ ID NO:216のアミノ酸13-24、27-34、37-66、69-88、99-
 104、149-155、164-175、184-193、199-209、227-235、264-273、276-285、288-315、323
 -335、346-353、56-111、および199-261;SEQ ID NO:217のアミノ酸11-22、25-48、51-60
 、64-72、80-96、108-122、132-137、142-150、152-167、175-199、214-229、237-244、2
 52-258、260-266、279-287、301-340、345-350、および109-153;SEQ ID NO:218のアミノ
 酸37-43、50-57、65-82、87-109、123-129、141-150、152-157、166-172、179-203、209-
 241、249-284、290-300、308-326、329-335、345-357、359-368、379-386、390-417、420
 -425、438-444、461-466、473-490、497-505、524-534、541-550、586-597、608-614、62
 2-632、660-666、679-694、696-706、708-722、725-731、737-763、784-789、810-825、8

37-854、857-880、882-895、901-907、911-928、14-76、および176-220;SEQ ID NO:219の
アミノ酸9-16、38-52、61-86、93-100、110-117、123-132、138-145、151-169、172-181
、186-202、208-225、227-253、264-275、289-295、320-329、335-342、および113-193;S
EQ ID NO:220のアミノ酸11-18、24-30、42-49、53-63、69-80、87-93、95-103、144-171
、173-185、193-200、202-208、215-221、242-261、266-273、277-286、290-299、322-32
8、338-351、354-377、391-409、441-451、461-466、499-515、521-527、562-569、621-6
29、647-663、676-682、694-701、703-713、725-731、735-744、755-764、793-800、およ
び490-547;SEQ ID NO:221のアミノ酸4-11、14-22、38-70、81-90、97-114、118-132、147
-171、173-181、187-202、244-250、252-298、301-311、313-331、342-368、410-418、44
6-451、456-462、468-474、476-492、499-507、519-528、552-565、568-575、584-613、6
18-624、626-649、および417-489;SEQ ID NO:222のアミノ酸4-9、32-53、66-72、74-90、
97-104、110-130、133-139、144-152、166-177、203-213、215-241、256-275、291-304、
307-316、321-326、334-345、352-367、および201-255;SEQ ID NO:223のアミノ酸13-19、
26-43、66-72、80-85、95-101、109-125、131-137、および25-107;SEQ ID NO:224のアミ
ノ酸13-24、35-43、50-56、58-68、77-83、104-110、117-125、132-138、140-153、およ
び19-66;SEQ ID NO:225のアミノ酸15-31、37-42、47-54、68-87、89-96、107-117、121-1
27、131-137、145-151、176-182、220-226、232-246、250-257、291-300、317-325、328-
333、337-359、368-393、403-428、460-478、480-493、500-506、511-516、519-526、528
-559、565-572、584-595、597-605、608-613、626-648、679-684、687-693、703-714、71
8-735、742-750、757-765、768-788、793-799、813-819、823-829、839-850、および576-
623;SEQ ID NO:226のアミノ酸10-35、37-60、63-76、79-86、88-97、108-113、118-126、
128-134、138-145、153-159、168-188、194-208、211-243、255-260、270-276、285-301
、307-346、348-367、および275-339;SEQ ID NO:227のアミノ酸4-17、21-33、35-42、47-
64、72-80、85-92、98-103、125-147、151-161、165-177、183-230、232-246、256-262、
284-306、310-328、331-367、369-383、392-399、および32-85;SEQ ID NO:228のアミノ酸
5-11、18-27、42-52、60-65、75-84、90-102、107-116、125-178、184-206、221-233、23
5-242、249-257、264-277、288-317、および267-313;SEQ ID NO:229のアミノ酸5-11、14-
42、50-75、79-86、89-98、120-125、152-160、166-181、185-193、200-207、および85-1
14;SEQ ID NO:230のアミノ酸4-30、36-43、46-55、63-111、144-152、159-168、179-189
、191-200、205-213、および37-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸20-45、57-77、80-100、11
9-126、131-137、143-169、179-185、195-203、207-231、235-264、282-302、320-329、3
41-347、353-359、361-373、および266-296;SEQ ID NO:232のアミノ酸5-22、24-37、41-5
5、57-65、72-78、90-103、105-116、119-130、164-170、190-202、209-231、244-254、2
60-276、300-339、344-350、355-376、389-397、399-406、408-421、429-437、および103
-152;SEQ ID NO:233のアミノ酸8-16、18-25、31-47、71-82、87-102、104-114、126-156
、176-183、190-200、205-212、218-228、231-243、256-279、287-301、303-312、324-33
2、335-348、351-357、365-380、395-412、422-451、456-464、467-483、501-507、およ
び405-468;SEQ ID NO:234のアミノ酸4-18、21-39、46-56、63-69、72-86、116-130、132-
160、162-190、196-201、209-231、233-241、251-265、269-282、292-298、309-324、333
-369、391-415、417-427、436-454、471-480、482-499、510-518、521-533、537-543、54
5-561、571-581、585-597、599-607、609-635、638-643、650-665、671-685、687-695、7
01-707、710-720、724-736、747-757、764-769、772-784、791-796、808-820、および317
-401;SEQ ID NO:235のアミノ酸4-12、15-33、58-77、82-89、98-106、108-118、120-135
、141-147、152-160、168-215、225-233、235-247、250-264、284-312、314-321、336-34
3、359-374、386-394、および159-218;SEQ ID NO:236のアミノ酸4-16、24-36、40-47、49
-56、61-81、84-143、148-156、158-164、170-175、194-206、208-214、および126-203;S
EQ ID NO:237のアミノ酸28-45、50-61、94-111、113-124、137-142、147-173、180-188、
190-196、202-223、229-235、239-249、262-270、280-288、290-321、325-332、347-355
、359-368、389-407、415-427、429-453、458-465、477-485、499-505、516-527、531-54
9、569-592、594-602、605-615、628-635、647-659、662-683、727-735、760-765、771-7

80、788-809、811-818、および549-630;SEQ ID NO:238のアミノ酸21-28、33-40、48-100
、104-111、113-134、および1-46;SEQ ID NO:239のアミノ酸12-24、31-41、53-61、73-87
、112-128、133-140、151-156、および26-98;SEQ ID NO:240のアミノ酸4-9、19-26、32-5
6、58-67、71-81、90-95、97-105、112-118、124-132、138-144、147-167、169-177、199
-207、212-217、231-241、250-260、266-272、274-282、289-296、299-310、316-331、34
4-350、352-363、368-377、381-394、399-406、412-450、459-473、486-503、508-514、5
18-548、564-570、579-587、602-608、616-623、628-635、638-654、678-688、691-696、
703-709、716-723、761-772、784-793、819-826、835-844、および790-834;SEQ ID NO:24
1のアミノ酸4-10、18-36、43-50、63-71、75-105、109-117、134-140、145-157、176-182
、184-201、203-211、215-225、240-250、262-284、294-309、313-319、327-337、350-35
6、361-367、372-393、411-421、428-451、453-466、487-492、501-528、535-553、564-5
74、592-605、612-629、631-640、646-653、658-666、673-681、713-718、720-730、739-
749、784-792、821-826、833-844、853-863、871-876、885-894、900-918、937-950、952
-957、972-990、995-1001、1024-1036、1039-1044、1049-1055、1062-1089、1091-1103、
1110-1121、1123-1129、1131-1151、1157-1179、1181-1201、1204-1223、1233-1244、126
9-1276、1279-1286、1294-1301、1303-1309、1315-1338、1350-1362、1373-1381、1398-1
406、1412-1423、1440-1446、1458-1466、1481-1487、1492-1508、1511-1518、1528-1534
、1536-1547、1553-1565、1606-1617、1619-1644、および761-781;SEQ ID NO:242のアミ
ノ酸6-13、31-38、47-60、71-102、107-123、128-155、173-179、185-194、210-220、お
よび161-232;SEQ ID NO:243のアミノ酸11-34、36-43、49-67、74-79、84-92、94-100、10
3-112、120-129、134-155、162-173、177-185、189-202、206-211、および130-185;SEQ I
D NO:244のアミノ酸4-10、20-35、37-46、48-55、60-66、75-82、87-98、133-150、166-1
72、178-189、208-214、230-235、245-251、271-308、319-333、335-355、373-380、およ
び117-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸4-30、54-65、91-105、107-131、135-154、163-192
、199-208、210-224、229-239、248-257、263-279、281-294、328-354、373-379、382-40
5、426-453、462-487、および249-323;SEQ ID NO:246のアミノ酸4-10、12-24、45-55、75
-88、および24-40;SEQ ID NO:247のアミノ酸4-14、20-37、47-53、55-61、75-81、97-103
、107-124、129-135、139-147、160-166、169-175、181-190、202-221、247-255、272-28
5、300-310、318-332、351-361、384-397、406-427、442-449、458-482、494-503、512-5
24、531-539、552-562、577-588、590-596、600-608、613-624、637-668、692-700、およ
び232-278;SEQ ID NO:248のアミノ酸33-39、49-55、68-84、90-96、104-120、126-143、1
50-159、168-191、197-208、219-225、227-233、241-247、63-115、および200-250;SEQ I
D NO:249のアミノ酸4-22、24-34、36-55、57-76、83-97、99-117、135-143、145-157、16
3-174、178-198、200-207、209-270、276-290、321-335、338-347、367-374、393-402、4
04-411、416-422、443-460、467-473、および117-183;SEQ ID NO:250のアミノ酸26-37、4
4-52、57-96、104-111、118-124、155-177、179-197、201-214、223-233、243-250、257-
262、291-297、303-314、319-363、および47-105;SEQ ID NO:251のアミノ酸36-43、45-60
、76-97、107-125、131-156、158-164、および118-163;SEQ ID NO:252のアミノ酸5-32、4
0-50、52-60、70-88、92-101、106-126、138-150、152-161、175-193、201-234、237-248
、270-285、297-303、312-318、および209-255;SEQ ID NO:253のアミノ酸4-12、23-34、
49-55、59-65、70-81、83-130、および62-113;SEQ ID NO:254のアミノ酸4-26、38-49、69
-76、82-96、103-119、126-140、143-190、194-209、212-218、および100-167;SEQ ID NO
:255のアミノ酸7-29、35-47、56-66、80-94、97-123、125-148、150-160、166-173、175-
191、193-200、207-225、および75-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸14-36、39-45、51-59、
66-71、76-88、106-117、121-126、140-157、164-187、198-206、210-252、および202-25
6;SEQ ID NO:257のアミノ酸4-19、27-35、90-107、120-134、144-150、166-175、192-198
、221-243、249-255、263-278、283-288、305-321、324-334、342-349、355-366、377-39
0、413-425、442-448、および130-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸17-26、41-51、54-61、6
4-72、78-105、117-125、127-137、147-155、175-213、230-236、238-261、271-277、282
-297、309-318、329-347、355-372、377-390、および69-126;SEQ ID NO:259のアミノ酸4-

48、54-60、62-69、73-81、88-115、124-137、139-154、156-169、171-190、194-231、240-273、288-303、336-363、367-395、405-411、434-442、449-454、466-483、491-507、および226-282;SEQ ID NO:260のアミノ酸26-34、39-47、50-80、82-88、97-105、108-127、131-137、162-180、185-191、198-203、209-214、226-247、256-288、296-305、および149-239;SEQ ID NO:261のアミノ酸5-28、30-54、73-84、89-98、109-116、122-128、137-142、163-189、207-236、245-280、288-390、404-423、426-433、450-474、487-504、506-513、524-530、532-595、605-614、620-626、631-638、644-657、667-683、686-693、695-702、707-733、739-747、および6-62;SEQ ID NO:262のアミノ酸23-31、39-50、55-67、76-100、117-130、149-171、173-185、218-238、242-288、291-298、334-346、355-369、382-399、413-420、431-438、442-449、455-466、486-493、498-508、524-531、540-546、551-558、562-570、575-582、585-596、598-604、621-630、632-650、670-677、682-701、736-749、755-761、および612-626;SEQ ID NO:263のアミノ酸4-21、24-39、44-68、74-81、85-91、109-116、129-138、142-148、173-188、195-201、207-212、223-228、および126-148;SEQ ID NO:264のアミノ酸4-17、24-42、61-67、84-93、96-102、116-121、135-143、155-165、177-186、210-224、253-259、272-297、299-331、337-351、359-367、369-385、および1-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸4-25、28-54、67-81、85-136、138-143、157-170、180-190、197-203、205-214、219-243、246-270、277-283、290-299、305-311、および127-182;SEQ ID NO:266のアミノ酸11-20、25-33、75-80、85-91、113-124、143-155、161-170、172-184、および128-176;SEQ ID NO:267のアミノ酸4-9、16-26、28-34、55-80、120-143、150-156、158-164、167-178、185-190、192-213、221-237、242-255、257-272、281-290、325-332、および48-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸13-48、59-70、78-88、95-112、129-151、153-161、163-182、214-221、235-245、248-277、281-291、293-301、303-311、315-320、323-346、377-383、390-398、447-454、474-487、491-512、531-544、547-553、582-590、597-603、605-611、623-629、および410-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸6-26、39-46、48-58、69-75、109-121、139-144、148-155、166-172、215-221、261-267、313-319、363-386、423-433、447-458、465-471、483-494、497-517、558-565、578-586、589-597、619-626、636-645、659-665、671-680、682-693、733-739、および152-206;SEQ ID NO:270のアミノ酸4-19、23-35、40-50、52-58、65-73、78-103、112-125、146-160、163-192、194-200、および29-90;SEQ ID NO:271のアミノ酸4-13、17-32、40-50、57-67、76-81、88-95、107-119、131-142、144-157、171-178、185-193、197-207、212-227、231-238、248-253、263-310、および90-170;SEQ ID NO:272のアミノ酸9-28、57-82、84-93、126-135、143-166、173-194、196-201、212-220、228-254、269-277、289-298、305-316、320-327、330-337、350-359、373-378、386-392、403-411、421-428、435-441、443-458、465-470、および80-141;SEQ ID NO:273のアミノ酸11-48、54-67、69-75、89-95、101-122、124-131、134-157、159-175、202-208、214-228、258-270、272-280、287-295、298-310、331-338、340-417、427-500、502-509、534-552、556-561、564-577、585-592、594-608、621-627、632-641、643-652、671-681、683-709、712-743、758-764、776-783、789-820、835-851、864-883、885-910、913-940、948-953、967-976、994-1020、および775-825;SEQ ID NO:274のアミノ酸14-24、32-54、58-63、70-80、93-100、108-125、127-135、142-153、155-160、180-191、201-208、210-216、222-235、242-264、267-273、276-282、284-308、および10-59;SEQ ID NO:275のアミノ酸16-28、44-68、70-77、83-90、99-129、131-137、145-154、161-175、183-190、196-203、205-220、238-245、321-328、330-338、366-379、383-397、399-405、412-418、442-458、471-483、486-505、536-544、562-568、583-602、610-618、629-635、641-655、672-682、697-705、714-729、744-751、755-762、766-771、783-807、および555-621;SEQ ID NO:276のアミノ酸4-9、20-34、45-54、60-77、79-89、91-100、102-149、162-170、177-189、193-208、210-222、238-244、252-264、267-276、302-307、および100-140;SEQ ID NO:277のアミノ酸11-27、30-49、56-62、69-74、76-85、94-108、116-125、129-147、153-161、165-171、177-208、217-223、225-231、237-255、260-284、293-300、および73-137;SEQ ID NO:278のアミノ酸4-38、40-51、84-97、99-106、109-115、119-129、131-145、148-160、180-186、188-202、

230-243、246-267、274-288、290-299、302-312、317-327、332-344、353-377、381-388
、407-419、423-437、447-470、474-482、486-494、501-523、531-546、551-556、および
727-740;SEQ ID NO:279のアミノ酸23-52、62-76、87-104、109-115、117-123、129-139、
143-149、152-170、172-191、199-205、212-218、220-240、249-256、263-275、297-303
、308-342、349-380、382-394、414-420、430-441、446-452、460-475、488-505、514-53
1、533-539、546-568、570-577、579-588、613-625、632-670、672-716、718-745、759-7
69、785-798、801-807、および272-324;SEQ ID NO:280のアミノ酸4-34、36-43、56-73、8
0-87、101-134、148-159、161-170、178-185、195-206、211-221、223-248、259-271、27
6-295、297-308、および241-296;SEQ ID NO:281のアミノ酸5-31、44-50、64-74、86-94、
132-147、154-167、196-203、209-219、253-260、284-289、300-312、319-327、335-340
、358-364、376-383、および166-202;SEQ ID NO:282のアミノ酸4-9、12-27、29-71、77-8
4、90-108、114-142、147-164、180-213、217-227、229-282、291-309、322-329、336-35
3、365-370、および317-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸36-41、52-66、71-83、89-95、116
-127、154-174、176-184、200-206、230-237、248-259、269-284、307-316、376-383、39
9-418、424-442、445-451、454-462、および1-50;SEQ ID NO:284のアミノ酸9-14、33-49
、64-72、87-92、103-109、123-128、130-141、143-154、160-166、182-214、237-247、2
51-260、292-300、327-332、337-350、357-365、388-398、405-411、422-428、451-459、
478-488、520-531、534-540、558-564、580-586、591-600、605-615、629-635、641-653
、658-672、212-244、および533-611;SEQ ID NO:285のアミノ酸4-10、17-27、30-37、44-
62、80-85、94-114、118-131、134-141、148-161、171-212、218-241、248-261、274-313
、325-336、342-348、359-373、391-397、424-431、454-474、489-495、497-503、505-51
5、548-553、560-580、591-610、および277-324;SEQ ID NO:286のアミノ酸7-16、18-24、
30-47、49-70、83-99、103-117、126-141、146-153、159-165、177-194、198-221、236-2
46、255-262、273-279、283-296、301-332、338-411、422-428、434-440、452-458、463-
469、494-509、511-517、524-531、548-554、564-572、および335-389;SEQ ID NO:287の
アミノ酸9-15、33-54、56-80、102-108、および1-42;SEQ ID NO:288のアミノ酸15-36、42
-55、58-68、および54-77;SEQ ID NO:289のアミノ酸55-75、89-96、98-110、および14-36
;SEQ ID NO:290のアミノ酸8-14、29-51、73-101、110-117、および70-114;SEQ ID NO:291
のアミノ酸20-25、29-34、41-52、60-67、69-85、90-100、114-122、136-142、160-170、
174-181、および21-58;SEQ ID NO:292のアミノ酸14-22、および4-13;SEQ ID NO:293のア
ミノ酸22-40、54-66、88-105、109-118、および31-74;SEQ ID NO:294のアミノ酸5-11、18
-32、47-60、66-73、83-92、113-120、126-141、151-164、167-174、201-211、および118
-129;SEQ ID NO:295のアミノ酸5-11、18-24、32-40、47-53、および25-54;SEQ ID NO:296
のアミノ酸18-24、31-48、および5-55;SEQ ID NO:297のアミノ酸10-16、26-32、47-56、8
5-95、および10-62;SEQ ID NO:298のアミノ酸4-12、16-26、および25-34;SEQ ID NO:299
のアミノ酸19-29、45-51、63-68、76-92、103-110、114-120、123-133、135-141、および
14-78;SEQ ID NO:300のアミノ酸4-18、47-61、および57-93;SEQ ID NO:301のアミノ酸17-
29、44-50、および26-38;SEQ ID NO:302のアミノ酸5-19、55-64、78-85、95-101、104-11
2、および24-33;SEQ ID NO:303のアミノ酸4-10、および12-31;SEQ ID NO:304のアミノ酸4
-12、27-41、43-58、60-67、76-86、および13-65;SEQ ID NO:305のアミノ酸30-38、57-67
、および5-32;SEQ ID NO:306のアミノ酸30-43、および2-21;SEQ ID NO:307のアミノ酸14-
20、23-36、41-48、および1-52;SEQ ID NO:308のアミノ酸18-33、51-58、76-82、および3
2-46;SEQ ID NO:309のアミノ酸25-31、および2-16;SEQ ID NO:310のアミノ酸14-23、50-5
8、および9-49;SEQ ID NO:311のアミノ酸4-10、22-31、35-45、48-68、71-80、および17-
66;SEQ ID NO:312のアミノ酸4-24、28-42、46-56、63-69、87-94、112-131、および2-46;
SEQ ID NO:313のアミノ酸4-15、19-28、34-41、52-62、78-86、および2-20;SEQ ID NO:31
4のアミノ酸4-11、16-30、32-42、および7-38;SEQ ID NO:315のアミノ酸4-20、22-31、お
よび22-38;SEQ ID NO:316のアミノ酸4-19、および17-32;SEQ ID NO:317のアミノ酸7-13、
17-22、27-33、80-100、および26-40;SEQ ID NO:318のアミノ酸10-18、22-48、および32-
44;SEQ ID NO:319のアミノ酸15-24、43-49、73-83、および45-93;SEQ ID NO:320のアミノ

酸22-29、46-55、57-63、および5-17;SEQ ID NO:321のアミノ酸10-33、および21-35;SEQ ID NO:322のアミノ酸16-24、および22-49;SEQ ID NO:323のアミノ酸4-16、37-73、76-110、117-125、127-132、および2-30;SEQ ID NO:324のアミノ酸4-12、23-35、44-56、59-88、および22-76;SEQ ID NO:325のアミノ酸15-26、および23-35;SEQ ID NO:326のアミノ酸12-22、31-40、および17-44;SEQ ID NO:327のアミノ酸4-9、13-18、29-35、および57-64;SEQ ID NO:328のアミノ酸31-55、67-81、および25-70;SEQ ID NO:329のアミノ酸13-24、51-58、および13-26;SEQ ID NO:330のアミノ酸6-20、29-40、57-79、および46-88;SEQ ID NO:331のアミノ酸8-14、41-54、68-76、83-93、106-126、130-139、および12-72;SEQ ID NO:332のアミノ酸5-13、17-24、41-55、64-69、80-85、94-107、109-115、および53-88;SEQ ID NO:333のアミノ酸5-12、32-54、57-64、および20-33;SEQ ID NO:334のアミノ酸4-16、40-48、50-58、62-68、75-85、92-104、108-116、124-134、および68-128;SEQ ID NO:335のアミノ酸7-13、19-29、34-40、54-71、76-81、91-144、147-155、157-188、および11-83;SEQ ID NO:336のアミノ酸17-24、32-41、および6-43;SEQ ID NO:337のアミノ酸14-31、38-59、69-87、95-102、126-146、157-162、177-193、201-227、238-251、および63-78;SEQ ID NO:338のアミノ酸10-16、18-25、27-41、43-52、59-86、94-101、134-140、および38-100;SEQ ID NO:339のアミノ酸4-19、23-35、43-72、78-92、および37-93;SEQ ID NO:340のアミノ酸15-20、27-32、41-65、69-82、93-105、107-115、120-147、170-178、184-201、214-257、272-281、293-314、332-339、358-364、374-381、390-397、399-414、428-460、および317-375;SEQ ID NO:341のアミノ酸11-28、47-55、59-68、76-105、108-116、120-144、146-160、167-175、180-187、209-233、および144-158;SEQ ID NO:342のアミノ酸4-13、58-78、および14-77;SEQ ID NO:343のアミノ酸26-31、44-49、57-64、67-74、107-112、116-152、154-181、202-212、241-255、および57-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸10-41、53-70、81-93、100-111、137-147、164-169、183-190、199-210、216-221、226-240、および84-95;SEQ ID NO:345のアミノ酸12-45、48-56、73-79、91-103、106-112、117-125、132-143、154-160、178-201、208-214、216-225、260-266、276-283、および98-115;SEQ ID NO:346のアミノ酸4-15、30-42、および29-39;SEQ ID NO:347のアミノ酸22-53、55-73、80-88、および33-66;SEQ ID NO:348のアミノ酸6-23、44-54、および56-67;SEQ ID NO:349のアミノ酸8-21、35-44、66-75、82-87、94-101、および32-94;SEQ ID NO:350のアミノ酸8-20、23-32、36-50、53-69、および15-69;SEQ ID NO:351のアミノ酸8-22;SEQ ID NO:352のアミノ酸31-37、および2-31;SEQ ID NO:353のアミノ酸4-20、23-39、58-63、71-78、97-102、および22-82;SEQ ID NO:354のアミノ酸23-44、135-152、168-184、および57-116;SEQ ID NO:355のアミノ酸24-31、42-50、52-62、93-117、および43-94;SEQ ID NO:356のアミノ酸20-29、および24-43;SEQ ID NO:357のアミノ酸12-57、59-74、および22-40;SEQ ID NO:358のアミノ酸7-16、18-26、39-45、68-78、86-92、および65-82;SEQ ID NO:359のアミノ酸5-17、19-34、42-48、56-71、102-113、118-129、および67-111;SEQ ID NO:360のアミノ酸4-33、50-71、および13-55;SEQ ID NO:361のアミノ酸9-17、23-30、37-54、69-88、96-102、114-123、130-140、143-163、および5-70;SEQ ID NO:362のアミノ酸4-23、27-52、71-80、および9-94;SEQ ID NO:363のアミノ酸13-19、および2-21;SEQ ID NO:364のアミノ酸18-26、28-52、63-74、94-107、123-134、および18-84;SEQ ID NO:365のアミノ酸19-33、57-68、および26-48;SEQ ID NO:366のアミノ酸4-26、31-37、42-59、および12-65;SEQ ID NO:367のアミノ酸4-25、および20-39;SEQ ID NO:368のアミノ酸40-51、54-62、67-75、83-89、126-146、148-156、および31-42;SEQ ID NO:369のアミノ酸4-15、23-33、38-49、82-98、および7-91;SEQ ID NO:370のアミノ酸6-26、36-57、および40-64;SEQ ID NO:371のアミノ酸6-15、21-28、32-38、57-65、78-103、114-134、138-144、154-163、および41-95;SEQ ID NO:372のアミノ酸13-30、47-57、71-76、および25-71;SEQ ID NO:373のアミノ酸4-31、43-51、55-63、67-72、76-83、88-95、99-118、125-132、134-159、および82-118;SEQ ID NO:374のアミノ酸4-17、26-32、34-40、45-61、67-92、および41-97;SEQ ID NO:204のアミノ酸179-208、および198-227;SEQ ID NO:205のアミノ酸45-69、65-89、および83-106;SEQ ID NO:206のアミノ酸269-290;SEQ ID NO:207のアミノ酸209-230、226-249、および245-269;SEQ ID NO:208のアミノ酸-9-15、10-33、および2

8-52;SEQ ID NO:209のアミノ酸29-50、45-67、および62-85;SEQ ID NO:210のアミノ酸96-120、115-139、および134-158;SEQ ID NO:211のアミノ酸519-543、539-563、および559-584;SEQ ID NO:212のアミノ酸10-35、31-56、および52-77;SEQ ID NO:213のアミノ酸382-407、および403-428;SEQ ID NO:214のアミノ酸66-90;SEQ ID NO:215のアミノ酸38-65、および61-88;SEQ ID NO:216のアミノ酸56-85、198-221、217-240、および236-261;SEQ ID NO:217のアミノ酸108-132、および128-153;SEQ ID NO:218のアミノ酸13-37、33-56、52-76、175-200、および196-220;SEQ ID NO:219のアミノ酸132-156、152-176、および172-195;SEQ ID NO:220のアミノ酸489-512、508-531、および526-549;SEQ ID NO:221のアミノ酸416-442、438-465、および461-489;SEQ ID NO:222のアミノ酸199-222、217-240、および235-257;SEQ ID NO:223のアミノ酸25-55、51-81、および77-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸18-46、および42-66;SEQ ID NO:225のアミノ酸575-601、および597-623;SEQ ID NO:226のアミノ酸274-299、295-320、および316-339;SEQ ID NO:227のアミノ酸32-61、および57-85;SEQ ID NO:228のアミノ酸266-291、および287-313;SEQ ID NO:229のアミノ酸85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸36-64、および83-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸264-285、および280-300;SEQ ID NO:232のアミノ酸102-128、および124-152;SEQ ID NO:233のアミノ酸404-429、および445-468;SEQ ID NO:234のアミノ酸343-374、および370-401;SEQ ID NO:235のアミノ酸158-182、および178-202;SEQ ID NO:236のアミノ酸151-180;SEQ ID NO:237のアミノ酸549-579、575-605、および601-630;SEQ ID NO:238のアミノ酸-7-23、および19-46;SEQ ID NO:239のアミノ酸48-75、および71-98;SEQ ID NO:240のアミノ酸789-813、および809-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸759-783;SEQ ID NO:242のアミノ酸160-188、184-211、および207-232;SEQ ID NO:243のアミノ酸130-159;SEQ ID NO:244のアミノ酸117-147、143-173、および169-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸248-276、272-300、および296-323;SEQ ID NO:246のアミノ酸21-43;SEQ ID NO:247のアミノ酸231-256、および252-278;SEQ ID NO:248のアミノ酸62-91、87-115、および199-227;SEQ ID NO:249のアミノ酸116-141、137-162、および158-183;SEQ ID NO:250のアミノ酸46-69、65-87、および82-105;SEQ ID NO:251のアミノ酸117-142、および138-163;SEQ ID NO:252のアミノ酸208-233、および229-255;SEQ ID NO:253のアミノ酸61-88;SEQ ID NO:254のアミノ酸99-124、120-145、および141-167;SEQ ID NO:255のアミノ酸74-103、99-128、124-152、および148-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸202-231、および227-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸129-154、および150-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸95-126;SEQ ID NO:259のアミノ酸226-256、および252-282;SEQ ID NO:260のアミノ酸171-198、194-221、および217-240;SEQ ID NO:261のアミノ酸35-65、および61-91;SEQ ID NO:262のアミノ酸608-631;SEQ ID NO:263のアミノ酸124-149;SEQ ID NO:264のアミノ酸-14-21、および17-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸127-157、および153-182;SEQ ID NO:266のアミノ酸150-176;SEQ ID NO:267のアミノ酸48-79、および75-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸435-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸151-180、および176-206;SEQ ID NO:270のアミノ酸126-151、および167-190;SEQ ID NO:271のアミノ酸89-118、114-144、および140-170;SEQ ID NO:272のアミノ酸80-112;SEQ ID NO:274のアミノ酸9-36;SEQ ID NO:276のアミノ酸117-140;SEQ ID NO:277のアミノ酸72-97、93-117、および113-137;SEQ ID NO:278のアミノ酸723-746;SEQ ID NO:279のアミノ酸271-300;SEQ ID NO:280のアミノ酸240-271、および267-296;SEQ ID NO:281のアミノ酸165-188、および183-206;SEQ ID NO:282のアミノ酸316-344、および340-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸-3-27、および23-50;SEQ ID NO:284のアミノ酸212-244、532-561、557-586、および582-611;SEQ ID NO:285のアミノ酸276-302、および298-324;SEQ ID NO:286のアミノ酸335-364、および360-389;SEQ ID NO:287のアミノ酸41-64、および59-82;SEQ ID NO:288のアミノ酸53-77;SEQ ID NO:289のアミノ酸13-37;SEQ ID NO:290のアミノ酸69-94、および90-114;SEQ ID NO:291のアミノ酸19-42、および37-60;SEQ ID NO:292のアミノ酸1-25;SEQ ID NO:293のアミノ酸30-54、および50-75;SEQ ID NO:294のアミノ酸111-135;SEQ ID NO:295のアミノ酸25-54;SEQ ID NO:334のアミノ酸67-98、および94-126;SEQ ID NO:335のアミノ酸9-32、27-51、46-70、および65-86;SEQ ID NO:336のアミノ酸1-24、および20-44;SEQ ID NO:337のアミノ酸58-82;SEQ ID NO:338のアミノ酸37-62、58-82、および77-101;SEQ ID NO:339のアミノ酸37-68、およ

び64-93;SEQ ID NO:340のアミノ酸317-347、および343-375;SEQ ID NO:341のアミノ酸140-164;SEQ ID NO:342のアミノ酸13-40、36-60、および55-79;SEQ ID NO:343のアミノ酸56-79、および75-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸77-101;SEQ ID NO:345のアミノ酸94-118;SEQ ID NO:205のアミノ酸46-105;SEQ ID NO:216のアミノ酸56-111;SEQ ID NO:223のアミノ酸25-107;SEQ ID NO:224のアミノ酸19-66;SEQ ID NO:229のアミノ酸85-114;SEQ ID NO:230のアミノ酸37-109;SEQ ID NO:231のアミノ酸266-296;SEQ ID NO:232のアミノ酸103-152;SEQ ID NO:235のアミノ酸167-218;SEQ ID NO:240のアミノ酸790-834;SEQ ID NO:241のアミノ酸761-781;SEQ ID NO:242のアミノ酸176-232;SEQ ID NO:244のアミノ酸117-201;SEQ ID NO:245のアミノ酸249-323;SEQ ID NO:247のアミノ酸232-278;SEQ ID NO:252のアミノ酸209-255;SEQ ID NO:255のアミノ酸75-176;SEQ ID NO:256のアミノ酸202-256;SEQ ID NO:257のアミノ酸130-178;SEQ ID NO:258のアミノ酸69-126;SEQ ID NO:263のアミノ酸126-148;SEQ ID NO:264のアミノ酸1-49;SEQ ID NO:265のアミノ酸127-182;SEQ ID NO:267のアミノ酸48-106;SEQ ID NO:268のアミノ酸410-466;SEQ ID NO:269のアミノ酸152-206;SEQ ID NO:275のアミノ酸555-621;SEQ ID NO:281のアミノ酸166-202;SEQ ID NO:282のアミノ酸317-364;SEQ ID NO:283のアミノ酸1-50;SEQ ID NO:285のアミノ酸277-324;SEQ ID NO:289のアミノ酸14-36;SEQ ID NO:336のアミノ酸6-43;SEQ ID NO:343のアミノ酸57-101;SEQ ID NO:344のアミノ酸84-95;またはSEQ ID NO:345のアミノ酸98-115からなる群より選択される、少なくとも1つのコアアミノ酸配列を含む抗原。

[請求項126]

a)1~50個のさらなるアミノ酸残基、好ましくは1~40個、より好ましくは1~30個、さらにより好ましくは多くとも1~25個、さらにより好ましくは多くとも1~10個、最も好ましくは1個、2個、3個、4個、もしくは5個のさらなるアミノ酸残基;および/または

b)コアアミノ酸配列と非相同の少なくとも1個のさらなるアミノ酸残基からさらになる、請求項125記載の抗原。

[請求項127]

さらなるアミノ酸残基が、コアアミノ酸配列のN末端に隣接するか、C末端に隣接するか、またはN末端とC末端とに隣接する、請求項126記載の抗原。

[請求項128]

請求項125において定義された、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、または少なくとも6個のコアアミノ酸配列を含む、請求項125~127のいずれか一項記載の抗原。

[請求項129]

請求項101~107のいずれか一項において定義された核酸分子を発現させる工程を含む、請求項111~128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を作製する方法。

[請求項130]

適した宿主細胞を、請求項108または109において定義されたベクターで形質転換またはトランスフェクトする工程を含む、請求項111~128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を発現する細胞を作製する方法。

[請求項131]

抗原またはその活性断片もしくは活性変種が、クレブシエラ属から、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカから、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカから単離される、請求項129または130のいずれか一項記載の方法。

[請求項132]

ワクチンであることが好ましく、

請求項111~128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項101~107のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項108~109のいずれか一項において定義されたベクターを含む、

薬学的組成物。

[請求項133]

ワクチンであることが好ましく、
クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスク
レロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オル
ニチノリティカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の
治療用または予防用の、請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはそ
の活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項101～107のいずれか一項において定義され
た核酸分子、あるいは請求項108～109のいずれか一項において定義されたベクターを含む

薬学的組成物。

[請求項134]

免疫賦活物質、好ましくは、ポリカチオンポリマー、特にポリカチオンペプチド、免疫
賦活性オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、特にオリゴ(dIdC)₁₃、少なくとも2個のLysLeu
Lysモチーフを含有するペプチド、特に、ペプチド

KLKLLLLLKLK

、神経刺激性化合物、特に、ヒト成長ホルモン、ミョウバン、フロイント完全アジュバント
もしくはフロイント不完全アジュバント、またはその組み合わせを含む群より選択され
る免疫賦活物質をさらに含むことを特徴とする、請求項132または133記載の薬学的組成物

[請求項135]

免疫賦活物質が、ポリカチオンポリマーと免疫賦活性デオキシヌクレオチドとの組み合
わせ、または少なくとも2個のLysLeuLysモチーフを含有するペプチドと免疫賦活性デオキ
シヌクレオチドとの組み合わせ、好ましくは、

KLKLLLLLKLK

とオリゴ(dIdC)₁₃との組み合わせのどちらかである、請求項134記載の薬学的組成物。

[請求項136]

ポリカチオンペプチドがポリアルギニンである、請求項134または135記載の薬学的組成
物。

[請求項137]

クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスク
レロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オル
ニチノリティカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の
治療用または予防用の、請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはそ
の活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項101～107のいずれか一項において定義され
た核酸分子、あるいは請求項108～109のいずれか一項において定義されたベクター。

[請求項138]

クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスク
レロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オル
ニチノリティカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の
治療用または予防用の薬学的組成物を調製するための、特にワクチンを調製するための、
請求項101～107のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項111～128の
いずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種の使用。

[請求項139]

請求項111～128のいずれか一項において定義された、抗原またはその断片、好ましくは
、その活性断片、もしくはその変種、好ましくは、その活性変種の少なくとも選択部分に
結合する、抗体または少なくともその有効部分。

[請求項140]

モノクローナル抗体である、請求項139記載の抗体。

[請求項141]

有効部分が、Fabフラグメント、F(ab)フラグメント、F(ab)Nフラグメント、F(ab)₂フラグメント、またはFvフラグメントを含む、請求項139または140記載の抗体。

[請求項142]

キメラ抗体である、請求項139～141のいずれか一項記載の抗体。

[請求項143]

ヒト化抗体である、請求項139～142のいずれか一項記載の抗体。

[請求項144]

請求項139～143のいずれか一項において定義された抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞株。

[請求項145]

以下の工程を特徴とする、請求項139～143のいずれか一項において定義された抗体を作製する方法：

a) 請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を非ヒト動物に投与することによって、該動物において免疫応答を惹起する工程

、

b) 該動物から、抗体含有体液を取り出す工程、および

c) 該抗体含有体液をさらなる精製工程に供することによって、該抗体を作製する工程。

[請求項146]

以下の工程を特徴とする、請求項139～143のいずれか一項において定義された抗体を作製する方法：

a) 請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を非ヒト動物に投与することによって、該動物において免疫応答を惹起する工程

、

b) 該動物から、脾臓または脾臓細胞を取り出す工程、

c) 該脾臓または脾臓細胞のハイブリドーマ細胞を作製する工程、

d) 該抗原またはその活性断片もしくは活性変種に特異的なハイブリドーマ細胞を選択およびクローニングする工程、

e) クローニングされた該ハイブリドーマ細胞を培養することによって該抗体を作製する工程、ならびに

f) 任意で、さらなる精製工程を行う工程。

[請求項147]

請求項139～143のいずれか一項記載の抗体を含む、薬学的組成物。

[請求項148]

クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の、請求項139～143のいずれか一項記載の抗体、または請求項139～143のいずれか一項記載の抗体を含む薬学的組成物。

[請求項149]

クレブシエラ属による、好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.プランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリティカによる、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカによる感染症の治療用または予防用の薬学的組成物の調製のための、請求項139～143のいずれか一項において定義された抗体の使用。

[請求項150]

以下の工程を含む、請求項111～128のいずれか一項において定義された、抗原またはその活性断片もしくは活性変種に結合することができるアンタゴニストを特定する方法：

a) 候補アンタゴニストと請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種との結合を可能にする条件下、該候補アンタゴニストと該抗原またはその活性断片もしくは活性変種との結合に反応して検出可能なシグナルを発す

ることができる成分の存在下で、単離もしくは固定化された該抗原またはその活性断片もしくは活性変種と、該候補アンタゴニストを接触させる工程、および

b) 該アンタゴニストと該抗原またはその活性断片もしくは活性変種との結合に応答して生じたシグナルの有無を検出する工程。

[請求項151]

以下の工程を含む、請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種とその相互作用パートナーとの相互作用活性を低下または阻害することができるアンタゴニストを特定する方法：

a) 請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を準備する工程、

b) 該抗原またはその活性断片もしくは活性変種に対する相互作用パートナー、特に、請求項139～143のいずれか一項記載の抗体を準備する工程、

c) 該抗原またはその活性断片もしくは活性変種と該相互作用パートナーを相互作用させて、相互作用複合体を形成する工程、

d) 候補アンタゴニストを準備する工程、

e) 該候補アンタゴニストと相互作用複合体との間で競合反応を起こす工程、

f) 該候補アンタゴニストが、該抗原またはその活性断片もしくは活性変種と該相互作用パートナーとの相互作用活性を阻害または低下するかどうか決定する工程。

[請求項152]

請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種の相互作用パートナーを単離および/または精製および/または特定するための、該抗原またはその活性断片もしくは活性変種のいずれかの使用。

[請求項153]

以下の工程を含む、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法：

a) 被験体から得られた試料と、請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種を接触させる工程；および

b) 試料中の、該クレブシエラ属生物に対する抗体の存在を検出する工程。

[請求項154]

以下の工程を含む、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法：

a) 被験体から得られた試料と、請求項139～143のいずれか一項記載の抗体を接触させる工程；および

b) 試料中の、該クレブシエラ属生物の抗原の存在を検出する工程。

[請求項155]

クレブシエラ属生物の抗原が、請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種である、請求項154記載の方法。

[請求項156]

以下の工程を含む、クレブシエラ属生物による感染症を診断する方法：

a) 被験体から得られた試料と、請求項101～107のいずれか一項において定義された核酸分子またはその断片に特異的なプライマーまたはプローブを接触させる工程、および

b) 試料中の、このような核酸分子またはその断片の存在を検出する工程。

[請求項157]

クレブシエラ属生物が、病原性クレブシエラ属生物であり、より好ましくは、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリチカを含む群より選択されるクレブシエラ属生物、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカより選択されるクレブシエラ属生物である、請求項153～156のいずれか一項記載の方法。

[請求項158]

アプタマーおよびスピーゲルマーを含む群より選択される機能的核酸を調製するための、請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種の使用。

[請求項159]

リボザイム、アンチセンス核酸、およびsiRNAを含む群より選択される機能的リボ核酸を調製するための、請求項101～107のいずれか一項において定義された核酸分子の使用。

[請求項160]

以下の工程を含む、動物またはヒトにおいて、好ましくは、クレブシエラ属による感染症の治療を必要とする動物またはヒトにおいて、クレブシエラ属感染症を治療する方法：治療的有効量の、請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項101～107のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項108～109のいずれか一項において定義されたベクター、あるいは請求項139～143のいずれか一項において定義された抗体、あるいは請求項132～136、147、または148のいずれか一項において定義された薬学的組成物を、該動物またはヒトに投与する工程。

[請求項161]

以下の工程を含む、クレブシエラ属生物による感染症に対して動物またはヒトを免疫化する方法：

該動物またはヒトにおいて免疫応答を誘発するのに適した有効量の、請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項101～107のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項108～109のいずれか一項において定義されたベクター、あるいは請求項139～143のいずれか一項において定義された抗体、あるいは請求項132～136、147、または148のいずれか一項において定義された薬学的組成物を、該動物またはヒトに投与する工程。

[請求項162]

以下の工程を含む、動物またはヒトにおいてクレブシエラ属生物に対する免疫応答を刺激する方法：

該動物またはヒトにおいて免疫応答を刺激するのに適した有効量の、請求項111～128のいずれか一項において定義された抗原またはその活性断片もしくは活性変種、あるいは請求項101～107のいずれか一項において定義された核酸分子、あるいは請求項108～109のいずれか一項において定義されたベクター、あるいは請求項139～143のいずれか一項において定義された抗体、あるいは請求項132～136、147、または148のいずれか一項において定義された薬学的組成物を、該動物またはヒトに投与する工程。

[請求項163]

クレブシエラ属生物が、3つの亜種ニューモニエ、オゼネ、およびリノスクレロマチスを含む肺炎桿菌、K.オキシトカ、K.ブランチコラ、K.テリゲナ、ならびにK.オルニチノリテュカを含む群より選択され、より好ましくは、肺炎桿菌またはK.オキシトカより選択される、請求項160～162のいずれか一項記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2008/055214
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/26 C07K16/12 A61K39/395 A61P31/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 610 836 B1 (BRETON GARY L [US] ET AL) 26 August 2003 (2003-08-26)	1-19, 21, 22, 24-33, 37-43, 47-57, 59-63
Y	columns 2, 7, 11, 28-29, 41-42, 48-52; sequences 62, 7233, 8635 ----- -/-	34-36, 58
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 23 September 2008		Date of mailing of the international search report 26/01/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bernhardt, Wiebke

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2008/055214

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TRAUTMANN M ET AL: "O antigen seroepidemiology of Klebsiella clinical isolates and implications for immunoprophylaxis of Klebsiella infections" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 22, no. 7, 17 February 2004 (2004-02-17), pages 818-821, XP004487434 ISSN: 0264-410X abstract; tables 1,3	11,39, 40,44-49
X	ALCÁNTAR-CURIEL M D ET AL: "Klebsiella pneumoniae 35 and 36 kDa porins are common antigens in different serotypes and induce opsonizing antibodies." ARCHIVES OF MEDICAL RESEARCH 2000 JAN-FEB, vol. 31, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 28-36, XP009104944 ISSN: 0188-4409 abstract; figures 4-6; table 1	11,39, 40,44-47
X	KURUPATI PRATHIBA ET AL: "Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing Klebsiella pneumoniae clinical strain by immunoproteome analysis" PROTEOMICS, vol. 6, no. 3, February 2006 (2006-02), pages 836-844, XP009104802 ISSN: 1615-9853 abstract	11
Y	WO 01/93903 A (CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH [AT]; EGYED ALENA [AT]; LINGNAU KAREN [AT]) 13 December 2001 (2001-12-13) examples	34-36
Y	WO 01/93905 A (CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH [AT]; SCHMIDT WALTER [AT]; LINGNAU KAREN [AT]) 13 December 2001 (2001-12-13) examples	34-36
Y	US 6 605 713 B1 (FURSTE JENS PETER [DE] ET AL) 12 August 2003 (2003-08-12) examples	58
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/055214

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ETZ HILDEGARD ET AL: "Bacterial phage receptors, versatile tools for display of polypeptides on the cell surface" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 183, no. 23, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 6924-6935, XP002356338 ISSN: 0021-9193 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-19, 21, 22, 24-63</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/055214

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-19, 21, 22, 24-63 (all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the Invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2008/055214

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: Claims 1-19, 21, 22, 24-63 (all partially)

An isolated nucleic acid molecule according to claim 1, insofar as referring to Seq ID No. 1; a vector comprising said nucleic acid molecule; a host cell comprising said vector; an antigen that is immunologically reactive with sera from a human having a Klebsiella infection; an antigen comprising or consisting of an isolated polypeptide with Seq ID No. 188 or an active variant thereof; a process for producing said antigen; a process for producing a cell which expresses said antigen; a pharmaceutical composition comprising said antigen or said nucleic acid molecule; a pharmaceutical composition comprising said antigen or said nucleic acid or said antigen or said nucleic acid for the treatment of an infection or prevention with Klebsiella; use of said nucleic acid or said antigen for the treatment or prevention of Klebsiella infections; an antibody which binds to said antigen; a hybridoma cell line which produces said antibody; methods for producing said antibody; a pharmaceutical composition comprising said antibody; said antibody for the treatment or prevention of an infection with Klebsiella; use of said antibody for treating or prevention infections with Klebsiella; a method for identifying an antagonist capable of binding to an antigen; a method for identifying an antagonist capable of reducing or inhibiting the interaction activity of said antigen; use of said antigens for the isolation and/or purification and/or identification of an interaction partner of said antigen; methods for diagnosing an infection with Klebsiella; use of said antigen for the preparation of a functional nucleic acid; use of said nucleic acid molecule for the preparation of a functional ribonucleic acid; a method for the treatment of a Klebsiella infection; a method for immunizing against infection with a Klebsiella organism; a method for stimulating an immune response against a Klebsiella organism

Inventions 2-4, 7-15 and 171: Claims 1-19, 21, 22, 24-63 (all partially)

Idem as in invention 1, insofar as referring to nucleic acid Seq ID No. 2-4 or Seq ID No. 29, 36, 37 for inventions 2-4, Seq ID No. 8-16 or 53-55, 60, 65, 76, 80-82, 94 or 98 for inventions 7-15, respectively, or Seq ID No 375 or 48 for invention 171; and corresponding amino acid Seq ID No. 189-191 or 216, 223 or 224 for inventions 2-4, respectively, or amino acid Seq ID No. 195-203 or 242, 247, 252, 263, 267-269, 281 or 285 for invention 7-15, respectively, or Seq ID No 376 or 235 for invention 171

International Application No. PCT/EP2008/055214

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**Inventions 5 and 6: Claims 1-63 (all partially)**

Idem as invention 1, insofar as referring to nucleic acid sequences Seq ID No. 5, 6, and 53 for invention 5 and Seq ID No. 7 or 54 for invention 6; and corresponding amino acid Seq ID No. 192, 193 or 240 for invention 5 or Seq ID Nos 194 or 241 for invention 6; in addition, said antigen according to claims 20 and 23 referring to Seq ID No. 240 or 241, respectively

Inventions 16-170: Claims 1-15, 18, 19, 21, 22, 24-63 (all partially)

Idem as invention 1, insofar as referring to nucleic acid Seq ID No. 17, 19-28, 30-35, 38-47, 49-52, 56-59, 61-64, 66-75, 77-79, 83-93, 95-97 or 99-187, respectively, and corresponding amino acid Seq ID No. 204, 206-215, 217-222, 225-234, 236-239, 243-246, 248-251, 253-262, 264-266, 270-280, 282-284 or 286-374, respectively

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/055214

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6610836	B1	26-08-2003	NONE
WO 0193903	A	13-12-2001	AT 290880 T 15-04-2005 AT 410173 B 25-02-2003 AU 6234501 A 17-12-2001 DE 60109443 D1 21-04-2005 DE 60109443 T2 13-04-2006 EP 1286695 A1 05-03-2003 US 2003162738 A1 28-08-2003 US 2007218073 A1 20-09-2007 ZA 200209479 A 21-11-2003
WO 0193905	A	13-12-2001	AT 249839 T 15-10-2003 AU 8181201 A 17-12-2001 AU 2001281812 B2 07-04-2005 BR 0111639 A 25-03-2003 CA 2411575 A1 13-12-2001 CN 1434723 A 06-08-2003 CZ 20024168 A3 17-09-2003 DE 60100814 D1 23-10-2003 DE 60100814 T2 01-07-2004 DK 1296713 T3 26-01-2004 EP 1296713 A1 02-04-2003 ES 2206424 T3 16-05-2004 HK 1056678 A1 21-09-2007 HU 0301229 A2 28-08-2003 IS 6627 A 18-11-2002 JP 2003535146 T 25-11-2003 MX PA02012010 A 22-04-2005 NO 20025835 A 04-12-2002 PL 358982 A1 23-08-2004 PT 1296713 T 27-02-2004 RU 2293573 C2 20-02-2007 SI 1296713 T1 29-02-2004 SK 18152002 A3 05-08-2003 TR 200302015 T4 21-01-2004 US 2003171321 A1 11-09-2003
US 6605713	B1	12-08-2003	AT 228529 T 15-12-2002 AU 743469 B2 24-01-2002 AU 4456897 A 19-03-1998 DE 59708838 D1 09-01-2003 WO 9808856 A2 05-03-1998 ES 2188985 T3 01-07-2003 JP 2001504448 T 03-04-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/26 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 14/26	4 C 0 8 7
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
A 6 1 K 39/07 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/07	
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 A	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
	G 0 1 N 33/53 N	
	G 0 1 N 33/569 B	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 バクシ シャーミラ

オーストリア国 ウイーン エスラルンガッセ 2 トップ 2 1

(72)発明者 シップス トマス

オーストリア国 ウイーン ヒュターガッセ 2 / 5

(72)発明者 ハナー マルクス

オーストリア国 プレスバウム テーラッセンガッセ 1 2

(72)発明者 ピカロ ジュッタ

オーストリア国 シュトラウ ヴィツェルスドルフ 1 1 2

(72)発明者 サッケ クリスティーナ

オーストリア国 メードリング カール ツヴィリングガッセ 3 9 / 2

(72)発明者 ナージ エスター

オーストリア国 ウィーン ヴェストバーンシュトラッセ 32 / 34
 (72)発明者 ランドバーク アーバン
 ドイツ連邦共和国 ドレスデン シュペナーシュトラッセ 8
 (72)発明者 ツィーレル ダグマー
 オーストリア国 ウィーン ハルプガッセ 9 / 19
 (72)発明者 メインケ アンドリアス
 オーストリア国 プレスバウム ピエッテガッセ 26 / 1
 (72)発明者 ノイジス ビルギット
 オーストリア国 ウィーン シェーンブルナー シュトラッセ 100 / 20
 (72)発明者 シュティーアシュナイダー ウルリケ
 オーストリア国 ウィーン カイザーシュトラッセ 66 / 2 / 14
 (72)発明者 ボン ガバイン アレクサンダー
 オーストリア国 ウィーン ホッケガッセ 77
 F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA41 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA01
 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04 GA11 HA01 HA11 HA14
 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35
 QR48 QR55 QR59 QR62 QS25 QS32 QX01
 4B064 AG26 AG27 AG31 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA26X AA29Y AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AB02 AC14
 BA01 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA13 CA04 NA14 ZB052 ZB352
 4C085 AA03 AA13 AA14 BA21 BB31 EE06 FF02 FF03 FF12 FF13
 FF20
 4C087 BC36 CA09 NA14 ZB35
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	克雷伯氏菌的抗体		
公开(公告)号	JP2010532657A	公开(公告)日	2010-10-14
申请号	JP2010504730	申请日	2008-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	英特塞尔股份公司		
申请(专利权)人(译)	小区间AG		
[标]发明人	バクシシャーミラ シップストマス ハナーマルクス ピカロジュッタ サッケクリスティーナ ナージエスター ランドバーグアーバン ツーレルダグマー メインケアンドリアス ノイジスビルギット シュティーアシュナイダーウルリケ ボンガバインアレクサンダー		
发明人	バクシ シャーミラ シップ ストマス ハナー マルクス ピカロ ジュッタ サッケ クリスティーナ ナージ エスター ランドバーグ アーバン ツーレル ダグマー メインケ アンドリアス ノイジス ビルギット シュティーアシュナイダー ウルリケ ボン ガバイン アレクサンダー		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/26 C07K16/12 C07K16/46 C07K16/18 C12Q1/68 C12P21/08 A61K39/07 A61K48/00 A61K35/74 A61K39/39 A61K39/395 A61P31/04 G01N33/ /53 G01N33/569 A61K39/00		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/0266 A61K2039/505 A61K2039/55505 A61K2039/55566 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/26 C07K16/1228 C07K2317/21 A61K45/06		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 C07K14/26 C07K16/ /12 C07K16/46 C07K16/18 C12Q1/68.A C12P21/08 A61K39/07 A61K48/00 A61K35/74.A A61K39/39 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P31/04 G01N33/53.N G01N33/569.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/ /CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/ /QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4B064/AG26 4B064/ /AG27 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA29Y 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/ /AA13 4C084/CA04 4C084/NA14 4C084/ZB052 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14		

4C085/BA21 4C085/BB31 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085/FF12 4C085/FF13 4C085/FF20 4C087/BC36 4C087/CA09 4C087/NA14 4C087/ZB35 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74

代理人(译) 清水初衷
井上隆一
佐藤俊光
小林智彦
渡边真一
正人大关

優先権 2007107344 2007-05-02 EP

其他公开文献 JP2010532657A5

外部链接 Espacenet

摘要(译)

本发明涉及编码抗原的分离的核酸分子，包含这种核酸分子的载体，和包含这种载体的宿主细胞。此外，本发明提供了来自克雷伯氏菌属物种的抗原，以及其片段和变体，产生这种抗原的方法，以及产生表达这种抗原的细胞的方法。此外，本发明提供了与这种抗原结合的抗体，产生这种抗体的杂交瘤细胞，产生这种抗体的方法，包含这种核酸分子，抗原，载体或抗体的药物组合物，这种核酸分子，抗原的用途，用于制备药物组合物的载体或抗体，用于鉴定能够结合这种抗原或降低或抑制这种抗原的相互作用活性的拮抗剂的方法，用于诊断感染的方法和用于治疗或预防感染的方法。更具体地，这些抗原由细菌病原体产生或与细菌病原体相关，引起由肺炎克雷伯氏菌引起的医院感染或细菌感染。

ORF	推定機能（相同性による）	予測された免疫原性アミノ酸*	選択されたクローンの数	スクリーニングにおいて同定	特定された免疫原性領域の位置(aa)	SeqID (DNA, タンパク質)
KPORF-01	NADH ピロホスファターゼ	11-27, 35-47, 68-107, 113-122, 124-136, 140-146, 152-164, 168-174, 183-201, 211-218, 228-243, 246-253	2	H	180-226	17, 204
KPORF-02	乳酸グルタチオン リアーゼおよび 関連リアーゼ	13-31, 48-59, 69-91, 109-115, 121-127	2	D	46-105	18, 205
KPORF-03	ABC型 Fe3+ 輸送系、 パーミアーゼ成分	12-44, 49-95, 102-145, 148-178, 184-229, 233-244, 249-273, 292-299, 304-329, 334-348, 354-365, 367-385, 394-426, 428-440, 444-487, 503-527, 531-539, 546-554, 556-584	3	A	273-286	19, 206
KPORF-04	仮説上の 転写活性化因子	7-17, 22-32, 34-41, 55-77, 79-86, 93-111, 118-126, 131-148, 152-162, 165-177, 183-197, 213-220, 234-250, 253-262, 267-294	2	G	211-269	20, 207