

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-500697

(P2007-500697A)

(43) 公表日 平成19年1月18日(2007.1.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7084 (2006.01)	A 6 1 K 31/7084	4 C O 5 7
C O 7 H 21/00 (2006.01)	C O 7 H 21/00	4 C O 8 6
C O 7 H 21/02 (2006.01)	C O 7 H 21/02	
C O 7 H 21/04 (2006.01)	C O 7 H 21/04	Z
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-521912 (P2006-521912)
 (86) (22) 出願日 平成16年7月22日 (2004. 7. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年3月30日 (2006. 3. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/023498
 (87) 国際公開番号 W02005/030186
 (87) 国際公開日 平成17年4月7日 (2005. 4. 7)
 (31) 優先権主張番号 60/490, 029
 (32) 優先日 平成15年7月28日 (2003. 7. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

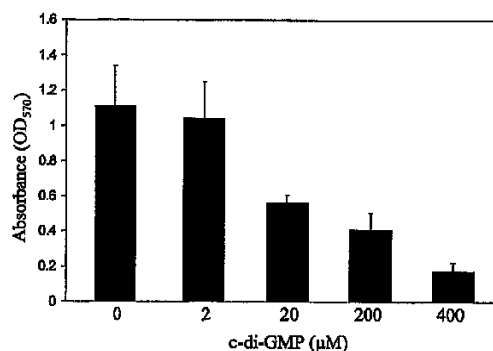
(71) 出願人 506032107
 デイビッド・ケイ・アール・カラオリス
 D a v i d K. R. K A R A O L I S
 アメリカ合衆国21210-2227メリー
 ランド州ボルティモア、クラブ・ロード
 4番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物病原体の毒性を減弱させる方法、および微生物のバイオフィルム形成を阻害する方法

(57) 【要約】

本発明は、微生物病原体の毒性を減弱させる方法、または微生物病原体によるコロニー形成を阻害または低減させる方法における環状ジヌクレオチドである c - ジ - G M P およびその環状ジヌクレオチドアナログの使用に関する。本発明の方法はさらに、微生物のバイオフィルム形成を阻害し、細菌感染症を処置することができる。阻害または低減される微生物のコロニー形成またはバイオフィルム形成は、皮膚、または鼻または粘膜表面上であってもよい。阻害される微生物のコロニー形成またはバイオフィルム形成はまた、医療器具、特に、患者と密接に接触しているものの表面、および微生物のコロニー形成およびバイオフィルム形成が関心事である産業および建設資材の表面上のものであり得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

必要とする患者において微生物病原体の毒性を減弱させる方法または微生物病原体によるコロニー形成を阻害または低減させる方法であって、必要とする患者に有効量の c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログを投与し、微生物病原体の毒性を減弱させるか、または微生物病原体によるコロニー形成を阻害または低減させる、方法。

【請求項 2】

微生物病原体の毒性の減弱が細菌感染症を処置することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

細菌感染症がスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) 感染症である、請求項 2 記載の方法。 10

【請求項 4】

細菌感染症が乳腺のスタフィロコッカス・アウレウス感染症である乳房炎である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

微生物のバイオフィルム形成を阻害することにより、または既に形成された微生物のバイオフィルムを低減させることにより細菌感染症が処置される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログが、c - ジ - G M P アゴニストとして作用する c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログを含む、請求項 5 記載の方法。 20

【請求項 7】

微生物のバイオフィルムがスタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィルムである、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログが、c - ジ - G M P アンタゴニストとして作用する c - ジ - G M P の環状ジヌクレオチドアナログを含む、請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

微生物のバイオフィルムがビブリオ・コレラ (Vibrio cholerae) のバイオフィルムまたはサルモネラ・エンテリティデス (Salmonella enteritidis) のバイオフィルムである、請求項 8 記載の方法。 30

【請求項 10】

微生物のバイオフィルムが皮膚、または鼻または粘膜表面上にある、請求項 5 記載の方法。

【請求項 11】

細菌感染症を処置する際に有効な抗生物質を投与することをさらに含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 12】

c - ジ - G M P の環状ジヌクレオチドアナログが環状ジヌクレオチド化合物 (I) ~ (XIX) からなる群から選択されるものである、請求項 1 記載の方法。 40

【請求項 13】

微生物病原体のコロニー形成の阻害または低減が、微生物病原体によりコロニー形成されるリスクのある患者または微生物病原体により既にコロニー形成された患者を処置することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

阻害または低減される微生物病原体のコロニー形成が、皮膚、または鼻または粘膜表面上にある、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

微生物病原体がスタフィロコッカス・アウレウスである、請求項 13 記載の方法。 50

【請求項 16】

患者がスタフィロコッカス・アウレウスのキャリアである、請求項 13 記載の方法。

【請求項 17】

固体表面上での微生物のコロニー形成およびバイオフィルム形成を阻害する方法またはコロニー形成および既に形成された微生物のバイオフィルムを低減させる方法であって、固体表面を有効量の c - ジ - GMP またはその環状ジヌクレオチドアナログに曝露し、固体表面上での微生物のコロニー形成およびバイオフィルム形成を阻害するか、または微生物のコロニー形成および既に形成されたバイオフィルムを低減させる、方法。

【請求項 18】

固体表面が医療器具の固体表面である、請求項 17 記載の方法。

10

【請求項 19】

医療器具が患者に移植可能なものであるか、あるいは患者と接触可能なものである、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

医療器具が患者に移植されているか、そうでなければ患者と接触しているものである、請求項 18 記載の方法。

【請求項 21】

微生物のコロニー形成およびバイオフィルムがスタフィロコッカス・アウレウスのコロニー形成およびバイオフィルムであり、c - ジ - GMP またはその環状ジヌクレオチドアナログが c - ジ - GMP またはその環状ジヌクレオチドアゴニストである、請求項 17 記載の方法。

20

【請求項 22】

有効成分としての c - ジ - GMP またはその環状ジヌクレオチドアナログおよび医薬的に許容される担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 23】

c - ジ - GMP の環状ジヌクレオチドアナログが環状ジヌクレオチド化合物 (I) ~ (XIX) からなる群から選択されるものである、請求項 22 記載の医薬組成物。

【請求項 24】

c - ジ - GMP アゴニストとして作用する環状ジヌクレオチドアナログを含む、請求項 22 記載の医薬組成物。

30

【請求項 25】

c - ジ - GMP アンタゴニストとして作用する環状ジヌクレオチドアナログを含む、請求項 22 記載の医薬組成物。

【請求項 26】

細菌感染症を処置するための医薬の製造における c - ジ - GMP またはその環状ジヌクレオチドアナログの使用。

【請求項 27】

コロニー形成および微生物のバイオフィルム形成を阻害するため、あるいはコロニー形成および既に形成された微生物のバイオフィルムを低減させるための医薬の製造における c - ジ - GMP またはその環状ジヌクレオチドアナログの使用。

40

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

発明の分野

本発明は、微生物病原体の毒性を減弱させるため、およびバイオフィルム形成を阻害するための環状ジヌクレオチドの使用に関し、これにより、微生物のコロニー形成または多種多様な微生物種により引き起こされる感染症が制御される。

【0002】

関連技術の記載

50

コレラは、深刻な罹患率および死亡率となるヒトの重大な下痢性疾患である (Pollitzer, 1959; および Kaper et al., 1995)。コレラは 75 ヶ国より多くの国、そして全ての大陸を襲う (Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, who. org)。小腸にコロニーを形成し、大量の分泌性下痢、そして処置しないと死を導くコレラ毒素 (CT) を放出し得る病原性ビブリオ・コレラ (*Vibrio cholerae*) を含有する糞便で汚染された食物または水を飲むことにより、コレラに罹患 (acquired) する (Kaper et al., 1995)。症例に対するその高い死亡率、飲料水中での存続、および爆発的流行型で生じるその能力のため、コレラは公衆衛生上の関心事である。さらに、食物および飲料水に対する兵器化されたビブリオ・コレラ (*V. cholerae*) の脅威の可能性があるため、それは生物テロ防衛の研究において優先される生物である。ビブリオ・コレラは国際的に輸送される可能性を有し、新たな地域に船舶のバラスト水を介して侵入することが分かると、経済、環境、および人類の健康への脅威も高まりつつある (McCarthy et al., 1994)。ビブリオ・コレラは環境で存続することが知られているが、ビブリオ・コレラの環境での存続を促進する因子についてはあまり分かっていない。

10

20

30

40

50

【0003】

ビブリオ・コレラは、その表現型を変化させ、EPS off (滑らかなコロニー形態) から EPS on (しわ状コロニー形態) (細胞は、細胞外多糖またはしわ状エキソ多糖類 (rEPS) に包埋され、しわの寄った「しわ状」コロニー形態 (図 1 A および 1 B) および関連するバイオフィルムを呈する) へ可逆的に切りかわることができる (White, 1940 および Rice et al., 1993)。EPS on およびしわ状表現型への切りかわりにより、バイオフィルム形成が促進される (Rice et al., 1993; Morris et al., 1996; および Watnick et al., 1999)。重要なことに、EPS はビブリオ・コレラのバイオフィルム形成に必須である。しわ状変異体は、高度に塩素耐性であり、かつ酸、紫外線、および補体介在性血清殺菌活性 (complement-mediated serum bactericidal activity) による殺傷に対して増大した抵抗性を示す (Rice et al., 1993; Morris et al., 1996; および Yildiz et al., 1999)。それゆえ、EPS on およびしわ状表現型への切りかわりは、ニッチの特殊化および特定環境での生存および適応の促進に重要であり得る。しわ状株は毒性であり、ウサギの回腸ループにおいて体液貯留を引き起こし、ヒトボランティアにおいて下痢を生じ、そして補体介在性血清殺菌活性に対して高度に耐性である (Rice et al., 1993; Morris et al., 1996; および Yildiz et al., 1999)。凝集した細胞からなるしわ状またはしわの寄ったコロニー表現型は、サルモネラ・エンテリカ・エンテリティデス (*S. enterica* Enteritidis) (Petter, 1993)、サルモネラ・エンテリカ・チフィムリウム (*S. enterica* Typhimurium) (Anriany et al., 2001)、ビブリオ・パラハエモリチクス (*V. parahaemolyticus*) (Gauvener et al., 2003)、シュードモナス・アエルギノーサ (*P. aeruginosa*) (Parsek, 2003)、およびエンテロバクター・サカザキ (*Enterobacter sakazakii*) (Farmer et al., 1980) で報告されている。本発明者和其他の者からなる研究室による研究により、ビブリオ・コレラの EPS 産生は、重要な毒性因子の分泌にも関与する II 型通常細胞外タンパク質分泌経路と結びつくことも示された (Ali et al., 2000; Davis et al., 2000)。

【0004】

ビブリオ・コレラの vps (ビブリオ多糖) 遺伝子クラスターは、rEPS の生合成に関する構造遺伝子を有する (Yildiz et al., 1999)。vps 遺伝子クラスターは、2 つの、近接して位置するが離れたオペロン (vps A および vps L は、それぞれのオペロンの第 1 遺伝子を表す) を含むと考えられている (Yildiz et al., 1999 および 2001)。vps A および vps L の転写は、あまりよく分かっていない機序で Vps R (54 転写活性化因子の相同体) により調節される (Yildiz et al., 2001)。Vps R は、関連するセンサーキナーゼタンパク質によるそのレシーバードメインのリン酸化の後に転写を活性化する NtrC、AlgB、および HydG 細菌エンハンサー結合タンパク質に対する高い相同性を有する (Kern et al., 1999)。従前の研究により、あるビブリオ・コレラ株の HapR がある未知の機序によりしわ状表現型と結びつくこと (Jobling et al.,

1997)、およびCytRがvps遺伝子の転写および関連するバイオフィーム形成を抑制し得ること(Haugo et al., 2002)が見出された。本発明者はまた、ビブリオ・コレラのしわ状表現型への切りかわりはToxT、LuxS、およびRpoSに依存しないことを見出した(Ali et al., 2002)。しかしながら、ビブリオ・コレラの滑らかな表現型からしわ状表現型への切りかわりの基礎をなす分子基盤は、依然としてあまりよく分かっていない。

【0005】

ビブリオ・コレラのしわ状表現型についての初期の研究は、試験した条件下でのEPSおよびしわ状表現型への切りかわりが非常に低い頻度であることによって妨げられた(Morris et al., 1996; Yildiz et al., 1999; およびWai et al., 1998)。本発明者の研究室は、最近、高頻度しわ状産出(production)(HFRP)と呼ばれる過程においてしわ状表現型への急激なシフトを促進する(〜80%)条件を同定した(Ali et al., 2002)。流行株間での表現型の発現および安定性に違いがあること、および高頻度で切りかわる能力が非病原性株におけるものより流行ビブリオ・コレラ株において共通することが見出された(Ali et al., 2002)。これは、しわ状表現型へ切りかわる能力がビブリオ・コレラにおいて重要であり、特定条件下で適応できるという強みをもたらし得ることを示唆している。

10

【0006】

バイオフィームは、多くの細菌種の存在の主な様式であり、それらの生存、存続、そしてしばしば毒性の中枢である(Costerton et al., 1995; Davey et al., 2000; Donlan, 2002およびWatnick et al., 2000)。バイオフィームは、バイオフィームなしで生存している細胞より上手く環境ストレスおよび不利な条件に抵抗し、増大した栄養素利用性を有し、そして免疫応答をうまく回避することができる(Anwar et al., 1992)。バイオフィームに共通する特徴は、微生物がEPSを多く含む細胞外基質に包埋されることである(Costerton et al., 1981およびWingender et al., 1999)。EPSは、バイオフィームの構造上および機能上の完全性に重要であり、その物理化学的および生物学的特性を決定し、接着、防御において役割を担い、そしてコミュニティの相互作用を促進する(Wimpenny, 2000)。EPSは、UV照射、pHシフト、浸透圧ショック、および乾燥のような様々な環境ストレスからの防御をもたらす。

20

【0007】

ある種の病原体の環境での存続および伝播におけるバイオフィームの役割もよく認識されている。ビブリオ・コレラ(Ali et al., 2002; Morris et al., 1996およびYildiz et al., 1999)同様、サルモネラ・エンテリカ・チフィムリウム(*Salmonella enterica* Typhimurium)は、増大したバイオフィーム形成能を有し、かつ環境での増大した存続において役割を担うと提案されるしわ状EPS産生表現型を形成する能力を有する(Anriany et al., 2001)。洗浄液耐性のサルモネラ・エンテリティデス(*Salmonella enteritidis*)のバイオフィームは、サルモネラ症の発症後少なくとも4週間、家庭用トイレで存続することが示された(Barker et al., 2000)。エスケリキア・コリ(*E. coli*)およびサルモネラのバイオフィームが発芽の際観察され得るという知見は抗菌化合物でのそれらの根絶を困難なものとし、それゆえ、それらの存続が増大し、摂取および感染に結びつく(Fett, 2000)。DNA交換が、バイオフィームなしで浮遊している浮遊細胞間よりむしろ、表面に接着している細菌およびバイオフィーム内にいる細菌において増大され得ることを示唆する結果が存在することから、バイオフィームの重要性はまた水平方向の遺伝子移動の過程において際立つ(Ehlers, 2000)。これは、抗生物質抵抗性または毒性、および総体的な存続のような機能をコードする遺伝子の移動に関与する。

30

40

【0008】

臨床上、バイオフィーム形成は、感染症の処置におけるいくつかの困難性の確立および存続における鍵となる因子であることが知られている。嚢胞性線維症は、多量のEPSを発現し、肺でバイオフィームを形成するある種のシュードモナス・アエルギノーサ株により引き起こされる(Davies et al., 1995; Geesey et al., 1993およびGovan et al., 19

50

96)。これらのシュードモナス・アエルギノーサ株のEPSにより、それらは抗菌処置に不応となる。興味深いことに、ビブリオ・コレラのEPS (Ali et al., 2002およびMorris et al., 1996) 同様、シュードモナス・アエルギノーサによるアルギン酸EPS産生は、これらの株を塩素から守り、そして塩素処理された水道でのこれらの株の生存に寄与し得る (Grobe et al., 2001)。バイオフィルムにより介在される感染症の別の例は、慢性耳感染症 (中耳炎) である (Dingman et al., 1998)。歯周病もバイオフィルムにより介在される疾患の別の例であり、これは歯茎を支える組織の慢性炎症に起因し、歯の喪失を導き得る。この疾患を引き起こす主な微生物はポルフィロモナス・ジンジバリス (Porphyromonas gingivalis) である (Lamont et al., 1998)。

【0009】

バイオフィルムのEPS基質は、イオン交換体として作用し、それにより、化合物の外部環境からバイオフィルムへの分散を制限することにより、ある種の抗菌剤のバイオフィルムへのアクセスを物理的に妨げる可能性を有する (Goodell et al., 1985; Nichols et al., 1988およびNickel et al., 1985)。ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori) は、宿主の防御因子および抗生物質に対する抵抗性を増強させる際、およびインビボ低pH条件下での成長を促進する際に重要であると思われるバイオフィルムを産生する (Stark et al., 1999)。バイオフィルム細菌は、浮遊状態で成長した同じ生物より、抗生物質処置に $\sim 1,000$ 倍耐性であり得る (Gilbert et al., 1997)。臨床的なバイオフィルムによる感染症は、典型的には、抗生物質での度重なる処置の後でさえ再発する症状により特徴付けられる。さらに、バイオフィルムによる感染症は、まれに、宿主の免疫系により解決される (Costerton et al., 1999)。人工弁上の細菌のバイオフィルムは、心臓弁置換術を受けた患者で心内膜炎を生じる原因である。これらの感染症を発症する患者において、死亡率は70%もの高さである (Hyde et al., 1998)。何百万ものカテーテル (例えば、中心カテーテル、静脈カテーテル、および尿カテーテル) が毎年患者に挿入され、これらの挿入物がバイオフィルムのための可能性ある表面として働く。全体として、全院内感染症の60%より多くがバイオフィルムによるものであると考えられる。これらのバイオフィルムによる感染症は、2～3日間入院を長引かせ、1年当たり10億ドルより高い追加コストとなり得る (Archibald et al., 1997)。

【0010】

スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) は、重要なヒトおよび動物の病原体として長く認識されてきた別のバイオフィルム形成細菌である (Archer, 1998; Hermans et al., 2003; Kluytmans et al., 1997およびSutra et al., 1994)。スタフィロコッカス・アウレウス (S. aureus) は、ヒトの皮膚および粘膜表面、特に、鼻孔前部で見出され得る。時間がたつと、ヒト集団の $\sim 20\%$ は持続キャリア; $\sim 60\%$ は断続キャリアとなる一方で集団の $\sim 20\%$ はコロニー形成されない (Peacock et al., 2001)。スタフィロコッカス・アウレウスは、コミュニティで罹患する感染症および病院で罹患する感染症の両方に共通する原因である。カナダの最近の集団ベースの積極的 (active) サーベイランスにおいて、侵襲性スタフィロコッカス・アウレウス感染症の1年当たりの発生率は100,000人の集団当たり28.4であった (Laupland et al., 2003)。血管カテーテルの様な留置医療器具を装着した患者、血液透析を受けている患者、経静脈薬を使用している患者、皮膚病および糖尿病を有する患者を含むある種の集団は、一般的な集団より高いコロニー形成率を有する (Kirmani et al., 1978; Tuazon et al., 1975および1974)。キャリアはコロニー形成株に感染するリスクがあるので、スタフィロコッカス・アウレウスキャリアの状態は临床上重要である。透析を受けている患者、HIV感染症の患者、および血流感染症の患者における研究は、株を分子タイピングにより調べると、感染症の原因となるスタフィロコッカス・アウレウスの単離物は元々内在性であるという仮説を支持するものとなる (Ena et al., 1994; Luzar et al., 1990; Nguyen et al., 1999; von Eiff et al., 2001およびYu et al., 1986)。ゆえに、スタフィロコッカス・アウレウスの保因およびコロニー形成を阻害または低減させる方法が必要である。

【0011】

Disease Control and Prevention's National Nosocomial Infection Surveillance systemによると、スタフィロコッカス・アウレウスは、院内感染症の特に共通する原因であり、手術部位感染症の最も共通する原因であり、そして院内菌血症の2番目に共通する原因である(National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) Report, 1998)。集中治療室でのスタフィロコッカス・アウレウス感染症総数は、1987年から1997年に増大し、このうち大部分の増大がメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス単離物によるものであった(Lowry, 1998)。スタフィロコッカス・アウレウスは、しばしば複数の抗生物質に耐性である。メチシリンおよび複数の抗生物質に耐性のスタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)により引き起こされる感染症は処置するのが特に難しく、MRSA感染症はしばしば高い死亡率と関連し、メチシリン感受性株より医療費を増大させる(Cosgrove et al., 2003)。

10

【0012】

スタフィロコッカス・アウレウスはまた授乳中のメスの乳腺内感染(IMI)に共通する原因であり、しばしば慢性乳腺炎を生じ、これはアメリカ合衆国中での乳牛の潜在性乳房炎と関連する乳業における毎年の損失(推定約10億ドル)を伴う(Ott, 1999)。メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)に起因する感染症に選択される薬物はバンコマイシンであるが、この抗生物質は処置の最後の要である。

【0013】

他の細菌種同様、バイオフィルム形成は、スタフィロコッカス感染症の確立および存続において鍵となる因子であることが知られている。バイオフィルム中の細菌細胞は、浮遊状態で成長した同じ細胞より抗生物質処置に対して最大1,000倍耐性であり得る。この知見と一致して、組織または医療器具上でのバイオフィルム形成は、ヒトおよび動物のスタフィロコッカス・アウレウス感染症の発病の重要な第1工程である(Bradley et al., 1991; Cole et al., 2001; Cucarella et al., 2001, 2002および2004; Goetz, 2002; Huang et al., 2003; Kluytmans et al., 1997; Mest et al., 1994; Muder et al., 1991; Peacock et al., 2001; Pujol et al., 1996; およびRoghmann et al., 2001)。全体として、全院内感染症の60%より多くがバイオフィルムに関与する。これらのバイオフィルムベースの感染症は、2~3日間入院を長引かせ、1年当たり10億ドルより高い追加コストとなり得る。感染のリスクは、スタフィロコッカス・アウレウスによるコロニー形成のあるヒトで高いが、コロニー形成およびバイオフィルム形成を予防する別の切実な理由がある。それは、スタフィロコッカス・アウレウスの他への伝播を予防することである(Muto et al., 2003)。MRSAは、既存のメチシリン感受性スタフィロコッカス・アウレウスから自然発生的には出現しない。MRSAのコロニー形成を有する人々の大部分が、MRSAで一過性にコロニー形成された(MRSA感染患者またはコロニー形成患者との先に接触したことに由来する)医療従事者の手に曝されることにより、MRSAに罹患する(Muto et al., 2003)。隔離および手指洗浄のような感染症の制御手段はこの伝播を低減するが、消去せず、従ってこれらの方針の順守はしばしば低いものとなる(Richet et al., 2003)。MRSAの根絶は一般的に一時的なものでしかないので、他への伝播を制御するためのアプローチとしての除菌法は一般的には不成功であった。それゆえ、コロニー形成およびバイオフィルム形成を予防または阻害する新規介入ステージの開発が必要とされている。

20

30

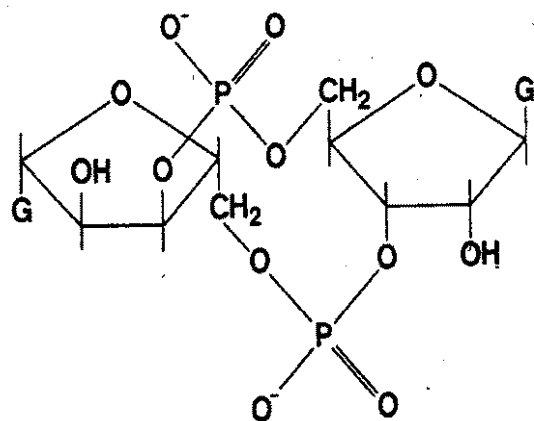
40

【0014】

cAMPまたはcGMPの様な環状ヌクレオチドは、真核生物の重要な小分子シグナル伝達分子としてよく認識されている。細菌において、cAMPはグルコース異化代謝産物抑制の緩和において役割を担う(Jackson et al., 2002; Notley-McRobb et al., 1997)が、一方cGMPがシグナル伝達分子として作用することは示されていない。しかしながら、別のグアノシンヌクレオチドである環状ジヌクレオチドc-ジ-GMP(3', 5'-環状ジグアニル酸、環状ジグアニル酸塩、環状ジグアノシンモノリン酸塩、環状ピス(3', 5')ジグアニル酸、環状ジグアニル酸、cGpGp、およびc-GpGpとしても知られている)

50

【化 1】



10

(上記構造式中の G はグアニンである) は、細胞内の細菌シグナル伝達分子であると数種において報告されており、その構造は既知であり、頭部と尾部が結合した 2 個の c G M P 分子からなる (Jenal, 2004 および Ross et al., 1991)。c - ジ - G M P は、アセトバクター・キシリナム (*Acetobacter xylinum*) (グルコンアセトバクター・キシリナム (*Gluconacetobacter xylinum*) に改名) において最初に同定され、この種でセルロースの産生を調節することが示された (Amikam et al., 1989; Mayer et al., 1991; Ross et al., 1990 および 1991)。正確な分子機序は不明なままであるが、グルコンアセトバクター・キシリナム (*G. xylinum*) における調節は、c - ジ - G M P が遺伝子発現を活性化する膜タンパク質と結合することを含むようである。セルロースの産生は、G G D E F ドメインを有する 2 つのタンパク質、ジグアニル酸シクラーゼ (D g c) および c - ジ - G M P ホスホジエステラーゼ (P d e A) (それぞれ、細胞の c - ジ - G M P レベルを制御する) の効果を妨害することにより、調節されるようである。従って、c - ジ - G M P はシグナル伝達分子であると考えられる。

20

【 0 0 1 5 】

本発明者の研究室および他の研究室による研究に基づき、現時点で、ビブリオ・コレラ、エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*)、サルモネラ・エンテリティデス・チフィムリウムおよびシュドモナス・アエルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*) を含む多くの病原体でのバイオフィルムの形成が、G G D E F タンパク質と関連することが数多く報告されつつある (Bomchil et al., 2003; D'Argenio et al., 2002; Jones et al., 1999 および Roumling et al., 2000)。

30

【 0 0 1 6 】

細菌病原体における抗生物質耐性の出現の増大、および感染過程におけるコロニー形成およびバイオフィルムの重要性は、代替する抗菌戦略の開発を必要とする。本発明までに、バイオフィルムおよび可能性のある感染症の制御における抗菌アプローチとして使用する c - ジ - G M P のような環状ジヌクレオチドの適用は述べられていない。

40

【 0 0 1 7 】

本明細書における任意の文書の引用は、かかる文書が直接関係のある先行技術であるか、または本願の任意の請求項の特許性を阻止する資料であることを認めることを意図するものではない。任意の文書の内容または日付についてのいずれの記述も、出願時に出版人が利用可能であった情報に基づき、かかる記述の正確さについての承認を構成するものではない。

【 0 0 1 8 】

発明の要約

本発明は、微生物病原体の毒性を低減させる方法、または微生物病原体によるコロニー形成を阻害または低減させる方法を提供し、該方法は、微生物病原体がバイオフィルム形

50

成細菌であるか否かに関わらず、*c*-ジ-GMPまたは*c*-ジ-GMPの環状ジヌクレオチドアナログをそれらを必要とする患者に投与することによるものである。この方法は、細菌感染症を処置することができる。

【0019】

バイオフィーム形成細菌に関して、本発明の方法はまた、バイオフィーム形成を阻害するか、あるいはその存在、すなわち、既に形成されたバイオフィームの量を低減させる。従って、本発明は、バイオフィーム形成を阻害し、あるいは既に形成されたバイオフィームの量を低減し、さらなるバイオフィーム発生を阻害し、それにより、バイオフィーム形成細菌病原体により引き起こされる感染症を処置する方法を提供する。

【0020】

本発明はまた、固体表面、特に、患者と密接に接触しているか、あるいは接触状態になる医療器具の固体表面上での、微生物のコロニー形成およびバイオフィーム形成を阻害する方法およびコロニー形成を低減させ、バイオフィームの分解を促進する（既に存在するコロニー形成および既に形成されたかあるいは蓄積したバイオフィームを低減させる）方法に関し、該方法は、該固体表面を*c*-ジ-GMPまたはその環状ジヌクレオチドアナログと接触させることによるものである。

【0021】

本発明のさらなる態様は、*c*-ジ-GMPまたはその環状ジヌクレオチドを有効成分として含有する医薬組成物に関するものである。

【0022】

図面の簡単な説明

図1Aおよび1Bは、ビブリオ・コレラ株N16961の滑らかな変異体（図1A）およびしわ状変異体（図1B）のコロニー形態を示す。示したコロニーは、LB寒天プレート上48時間後のものである。

【0023】

図2は、ビブリオ・コレラの滑らかなコロニー変異体およびしわ状コロニー変異体によるバイオフィーム形成を示すグラフである。

【0024】

図3は、ビブリオ・コレラ株N16961（野生型）、AmiB変異体（DK630）、およびRocS変異体（DS567）の運動性を示す遊走プレートアッセイ（Swarm plate assay）である。プレートは、0.3% 寒天を添加したLB培地を含有し、37で4時間インキュベーションした。

【0025】

図4Aおよび4Bは、ビブリオ・コレラ株N16961（野生型の細胞を図4Aに示し、AmiB変異細胞を図4Bに示す）の細胞形態に対するAmiB変異の効果を示す。AmiB細胞は形態に差があり、全部の細胞の大きさが増大し、多数の連鎖した細胞が存在することを示すことに注意されたい。倍率は×1000である。

【0026】

図5Aおよび図5Bは*c*-ジ-GMPのHPLC特性を示す。生成物の純度を、*c*-ジ-GMPの合成直後の分析により示す（図5A）。0.9% NaCl中、4で3ヶ月間保存後の*c*-ジ-GMPの純度を、分析により示す（図5B）。

【0027】

図6A～6Fは、スタフィロコッカス・アウレウス細胞と細胞の凝集に対する*c*-ジ-GMPの効果を示す。200μM *c*-ジ-GMPで処理したDK825の24時間培養物（図6A）および無処理対照（図6B）。*c*-ジ-GMPで処理した細胞（図6C）および無処理の細胞（図6D）のグラム染色。bap変異体M556の*c*-ジ-GMPで処理した培養物（図6E）および無処理対照（図6F）。図6Cおよび図6Dの倍率は×630である。

【0028】

図7A～7Cは、スタフィロコッカス・アウレウスのヒト臨床単離物のポリスチレン表

10

20

30

40

50

面（マイクロタイタープレートを用いた）上でのバイオフィルム形成能に対する c - ジ - G M P の効果を示す。マイクロタイタープレートのウェルでのバイオフィルム形成の阻害は、T S B および 0 . 2 5 % グルコース中のスタフィロコッカス・アウレウス株 D K 8 2 5 を種々の濃度の c - ジ - G M P で 2 4 時間処理し、クリスタルバイオレットで染色して示す。ウェルの外観および OD_{570} 値を示す（図 7 A）。c - ジ - G M P で処理したスタフィロコッカス・アウレウス株 D K 8 2 5 でのバイオフィルム形成の阻害の用量応答性についての定量的分析（図 7 B）。c - ジ - G M P で処理した高バイオフィルムスタフィロコッカス・アウレウス株 1 5 9 8 1 でのバイオフィルム形成の阻害についての定量分析（図 7 C）。

【 0 0 2 9 】

図 8 A ~ 8 D は、スタフィロコッカス・アウレウスウシ乳房炎単離物 V 3 2 9（図 8 A）、M 5 5 6（図 8 B）、V 2 9 9（図 8 C）および V 3 1 5（図 8 D）のポリスチレン表面上でのバイオフィルム形成能に対する c - ジ - G M P の効果についての定量的分析を示すグラフである。

【 0 0 3 0 】

図 9 A および 9 B は、ポリスチレン表面上でのスタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィルム形成の阻害に対するグアノシンヌクレオチドアナログの効果を示す。マイクロタイタープレートのウェルでのバイオフィルム形成の阻害は、T S B および 0 . 2 5 % グルコース中のスタフィロコッカス・アウレウス D K 8 2 5 をヌクレオチド c - ジ - G M P、c G M P、および 5' - G M P で処理したことによるものである。ウェルの外観および OD_{570} 値を図 9 A に示す。バイオフィルムの形成に対する 5' - G M P、c G M P、および c - ジ - G M P の処理の効果についての定量的バイオフィルム分析を図 9 B に示す。

【 0 0 3 1 】

図 1 0 は、2 4 時間既にバイオフィルムを形成したスタフィロコッカス・アウレウスに対する c - ジ - G M P の効果についての定量的バイオフィルム分析を示すグラフである。

【 0 0 3 2 】

図 1 1 A および 1 1 B は、H e L a 上皮細胞と接着したスタフィロコッカス・アウレウス D K 8 2 5 に対する c - ジ - G M P 処置の効果を示す。図 1 1 A は無処理対照培養物；図 1 1 B は c - ジ - G M P 処理培養物である。

【 0 0 3 3 】

図 1 2 は、ビブリオ・コレラ株 N 1 6 9 6 1 および R o c S 変異体におけるバイオフィルム形成に対する c - ジ - G M P の効果を示すグラフである。結果は、少なくとも 3 つの独立したコロニーに基づく平均である。

【 0 0 3 4 】

図 1 3 は、バイオフィルム成長の反応システムの略図であり、これは 3 7 °C のインキュベーター内に完全に入れられたワンスルーシステムである。10⁷ C F U を反応チューブに注入し、3 0 分間接着させ、各時点でフローをシステムに戻すことが可能である。フローセルを除去し、シリコンチューブを開き、腔の内側を擦過することで、バイオフィルムを回収できる。

【 0 0 3 5 】

図 1 4 は、図 1 3 に示したバイオフィルム成長反応システムに挿入したインラインであり、P B B A およびステンレススチールを含む種々の表面に接触したバイオフィルム試料を得るために用いられる、シールドフローセル（Protofab, Inc., Bozeman, MT）を示す。バイオフィルムの回収のため、挿入物は容易に取り出すことができる。

【 0 0 3 6 】

図 1 5 は、マウス乳房炎モデルにおけるスタフィロコッカス・アウレウス N e w b o u l d 3 0 5 株の C F U 数に対する c - ジ - G M P の効果を示すグラフである。

【 0 0 3 7 】

発明の詳細な説明

10

20

30

40

50

本発明者は、環状ジヌクレオチドである c -ジ-GMP ($3'$, $5'$ -環状ジグアニル酸、 c -GpGp) が、微生物のバイオフィルム形成に影響し、病原性細菌のコロニー形成、運動性および毒性において顕著な役割を担う、天然に存在するシグナル(エフェクター)分子であることを見出した。純粋に化学合成された c -ジ-GMP は、溶解性かつ安定であり、 c -ジ-GMP でのスタフィロコッカス・アウレウスの処理は、劇的に低減したバイオフィルム形成およびスタフィロコッカス・アウレウスの細胞と表面との相互作用、およびスタフィロコッカス・アウレウス細胞に対する印象的な抗凝集効果(細胞と細胞の細菌相互作用を阻害する)を示す。本発明者が得た結果により、 c -ジ-GMP がスタフィロコッカス・アウレウスのヒト上皮細胞への接着を高度に阻害し、いくつかの細胞株において有意な毒性を示さず、かつ生物学的に適切な用量でマウスにおいて致命的ではなかったことがさらに示される。従って、 c -ジ-GMP は、スタフィロコッカス・アウレウスでのバイオフィルム形成を阻害し、その毒性およびコロニー形成能を低減または減弱させる。

10

【0038】

さらなる実験により、 c -ジ-GMP はスタフィロコッカス・アウレウスにおける多数の遺伝子の発現に影響することが見出された。例えば、クオラムセンシング(quorum sensing)遺伝子はアップレギュレーションされ、毒素産生、毒性、接着、およびコロニー形成と関連する遺伝子はダウンレギュレーションされた。これらの結果は、毒性、毒素、コロニー形成における既知の役割を有する調節因子としてのクオラムセンシング遺伝子およびバイオフィルム関連遺伝子の役割と一致し、 c -ジ-GMP がバイオフィルム形成、コロニー形成、細胞凝集、毒素活性、および毒性を減弱させるという知見をさらに支持するものとなる。

20

【0039】

細菌細胞は、クオラムセンシングと呼ばれる過程の成長フェーズと関連する低分子量のシグナル伝達分子を分泌することにより、特定の遺伝子の発現を制御する能力を有する。クオラムセンシングにより制御される生理的過程は多様な種の細菌で生じ、生物発光、抗生物質合成、病原性または毒性、タンパク質分泌、莢膜エキソ多糖類合成、バイオフィルム形成、および運動性を含む(Miller et al., 2001; Schander et al., 2001; Whitehead et al., 2001)。ピブリオ・コレラにおいて、毒性に重要なバイオフィルム形成およびいくつかの他の表現型は、クオラムセンシングにおける小シグナル伝達分子により調節されることが知られている(Hammer et al., 2003; Miller et al., 2002; Zhu et al., 2002)。しかしながら、 c -ジ-GMP は、かかるクオラムセンシングのシグナル伝達分子として同定されていなかった。細胞密度および毒性の制御はクオラムセンシングの顕著な特性の1つであり、クオラムセンシングに欠失を生じる化合物は抗菌活性を有するだろう。従って、本発明の1つの態様は、病原性細菌におけるクオラムセンシングのコミュニケーション調節システムを破壊または阻害するために c -ジ-GMP またはその環状ジヌクレオチドアナログを用いる方法を提供するものである。

30

【0040】

スタフィロコッカス・アウレウスを用いた結果から、 c -ジ-GMP は細菌(細菌がバイオフィルム形成細菌であるか否かに関わらない)における普遍的なシグナル伝達分子であり、それゆえまた、病原性細菌におけるバイオフィルム形成、毒素産生、コロニー形成、および毒性のような生理的過程に参与する。本発明は、微生物病原体の毒性を減弱させる方法、または微生物病原体によるコロニー形成を阻害または低減させる方法を提供し、該方法は、それを必要とする患者、すなわち、微生物病原体に曝露された患者、コロニー形成された患者、または感染した患者に有効量の c -ジ-GMP または c -ジ-GMP の環状ジヌクレオチドアナログを投与することを含む。従って、本発明の方法は、微生物病原体の毒性を減弱させることにより、細菌感染症を処置することができ、それは、 c -ジ-GMP (またはその環状ジヌクレオチド)を単独で、あるいは別の抗生物質/抗菌剤と組合せて相乗的に用いることによる。例えば、バイオフィルム形成の阻害は、確実に病原性細菌を病原体特異的な感染症を処置するために通常用いられるような別の抗生物質/抗

40

50

菌剤の作用に非常に影響を受けやすいものとするだろう。用語「処置」、「処置する」、および「処置すること」は、活性または確立した細菌感染症を指示するだけでなく、感染症を導く発症の初期ステージの阻害を指示することも意図されている。

【 0 0 4 1 】

好ましい実施態様として、本発明の方法は、バイオフィルムの形成がその病原性、すなわち、その毒性およびそのコロニー形成能に必須である微生物病原体におけるバイオフィルム形成を阻害する。スタフィロコッカス・アウレウスに関して、c - ジ - G M P がそれを必要とする患者に投与され、スタフィロコッカス・アウレウスのコロニー形成およびバイオフィルム形成が阻害され（またはコロニー形成および既に形成されたバイオフィルムが低減される）、スタフィロコッカス・アウレウス感染症が処置される。スタフィロコッカス・アウレウスは、多種多様なヒトおよび動物の感染症を生じることが知られており、これは、膿瘍、乳腺炎、食中毒、敗血症、骨髓炎、関節炎、心内膜炎、および肺炎を含むが、これらに限らない。感染症（乳房炎）の動物モデルの予備データは、c - ジ - G M P が乳腺のスタフィロコッカス・アウレウス感染症である乳房炎を阻害することを示している。乳牛の乳房炎（ウシ乳房炎）は、酪農業において特に関心事であり、経済上重要である。

10

【 0 0 4 2 】

スタフィロコッカス・アウレウスを例として用いると、病院環境下でのスタフィロコッカス・アウレウスの存在は、入院患者および職員でのコロニー形成および感染のリスクを有する。従って、c - ジ - G M P は、入院患者および職員、ならびに新たに来院した患者に投与され得る（すなわち、皮膚、鼻腔および粘膜表面にスプレーすることで、患者でのスタフィロコッカス・アウレウスのコロニー形成およびバイオフィルム形成を阻害し、スタフィロコッカス・アウレウスのキャリアである個体のコロニー形成およびバイオフィルム形成を低減させる）。

20

【 0 0 4 3 】

c - ジ - G M P の他に、c - ジ - G M P アゴニストとして作用する（すなわち、c - ジ - G M P と同じ効果を有する）その環状ジヌクレオチドアナログを用いて、スタフィロコッカス・アウレウスのコロニー形成およびバイオフィルム形成が阻害され（または、既に存在するコロニー形成および既に形成されたバイオフィルムが低減され）、スタフィロコッカス・アウレウス感染症が処置され得る。

30

【 0 0 4 4 】

意外なことに、本発明者はさらに、細菌に依存して、c - ジ - G M P がバイオフィルム形成を阻害する効果を有し得るか、あるいはバイオフィルム形成を誘導するか、または増強する反対の効果を有し得ることを見出した。例えば、ビブリオ・コレラおよびサルモネラ・エンテリティデス（共にグラム陰性である）において、c - ジ - G M P はバイオフィルム形成を誘導するか、または増強し、グラム陽性細菌であるスタフィロコッカス・アウレウスにおいては反対の効果であることを見出した。従って、c - ジ - G M P の効果は、細菌特異的である。c - ジ - G M P がバイオフィルム形成を阻害するか、あるいは増強するかに関わらず、c - ジ - G M P はやはり、細菌におけるバイオフィルム形成を調節するシグナル伝達エフェクター分子として機能する。

40

【 0 0 4 5 】

異なる細菌におけるc - ジ - G M P の反対効果の現象は、細菌がグラム陽性であるか、グラム陰性であるかに起因し得る可能性がある一方、これは単なる思索であり、容易に試験され得る。本明細書において以下で開示されるマイクロタイタープレートまたは試験管およびフラスコでのバイオフィルム形成 / 阻害アッセイは、特定の細菌に対するc - ジ - G M P の効果を決定する迅速かつ容易なアッセイである。さらに、これらのアッセイは、c - ジ - G M P の効果についての多くの異なる種類の細菌（すなわち多くの異なる株、種、および / または属）の試験をハイスループットで同時にできる。従って、いずれかのバイオフィルム形成細菌に関して、そのバイオフィルム形成に対するc - ジ - G M P の効果について容易かつ迅速に試験され得る。c - ジ - G M P がバイオフィルム形成を阻害する

50

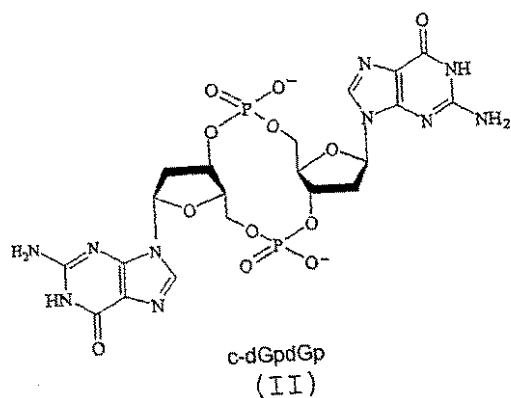
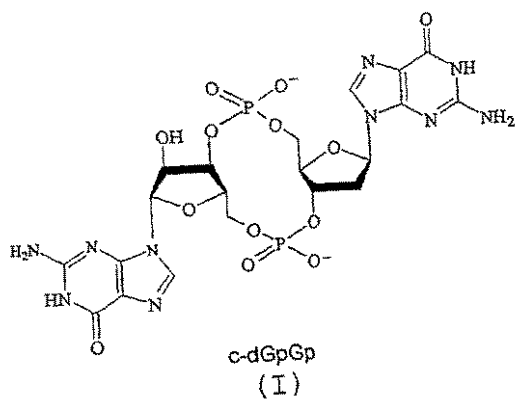
ことが見出されると、次に、c - ジ - G M P または c - ジ - G M P 活性を有する環状ジヌクレオチドアナログ (c - ジ - G M P アゴニストとして作用する) を用いて、バイオフィルム形成が阻害されるか、あるいは既に形成されたバイオフィルムが低減され得る (並びに、毒性が減弱され、コロニー形成が阻害および低減される)。同様に、c - ジ - G M P が代わりにバイオフィルム形成を増強するか、あるいは誘発すると、次に、c - ジ - G M P アンタゴニスト活性を有する c - ジ - G M P の環状ジヌクレオチドアナログ (c - ジ - G M P の効果と反対に作用する) を用いて、バイオフィルム形成が阻害されるか、あるいは既に形成されたバイオフィルムが低減される (並びに、毒性が減弱され、コロニー形成が阻害および低減される)。ピブリオ・コレラおよびサルモネラ・エンテリティデス (*S. enteritidis*) は、c - ジ - G M P アンタゴニストとして作用する添加された c - ジ - G M P の環状ジヌクレオチドアナログがバイオフィルム形成を阻害する、細菌の非限定的な例である。

10

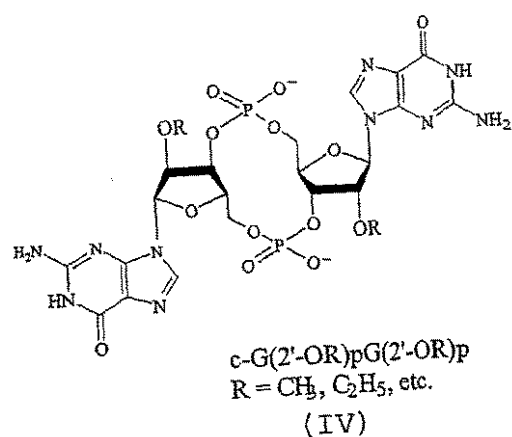
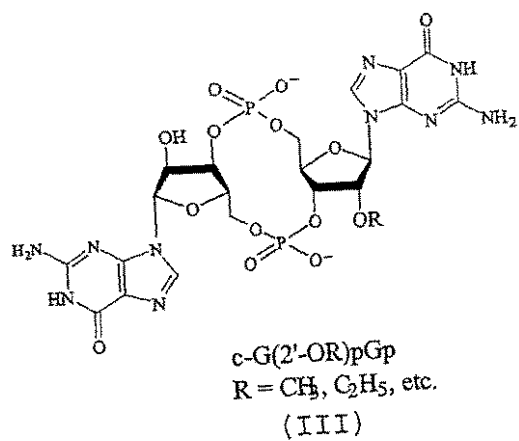
【 0 0 4 6 】

迅速かつ容易なバイオフィルム形成 / 阻害アッセイを用いて、試験した細菌に対する c - ジ - G M P の効果を迅速に決定できるだけでなく、該アッセイを用いて、c - ジ - G M P の環状ジヌクレオチドアナログが c - ジ - G M P のアゴニストであるか、あるいはアンタゴニストであるかを単に日常的な実験で決定できることを当業者は理解するだろう。c - ジ - G M P の環状ジヌクレオチドアナログの非限定的な例は、化合物 (I) ~ (X I X) として以下に示される。

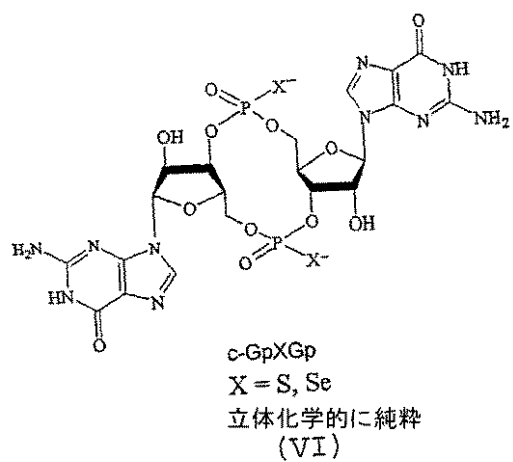
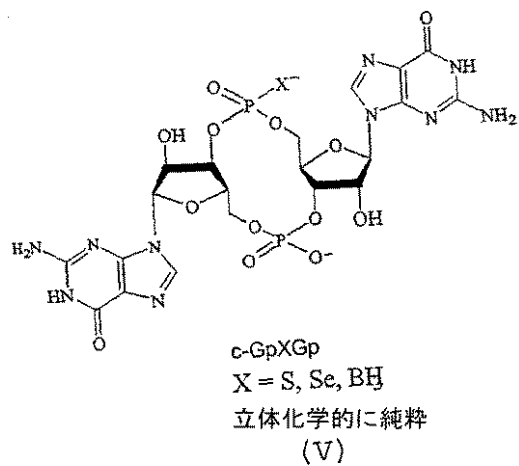
【化 2】



10



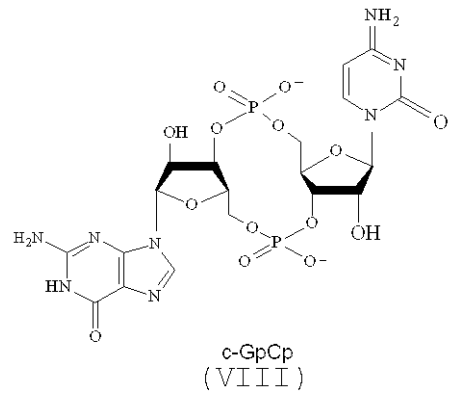
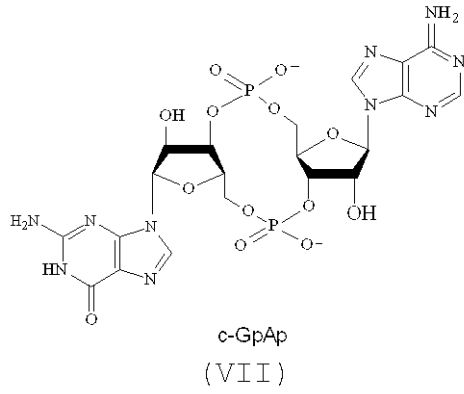
20



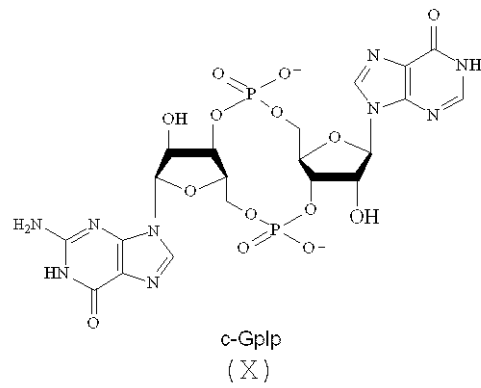
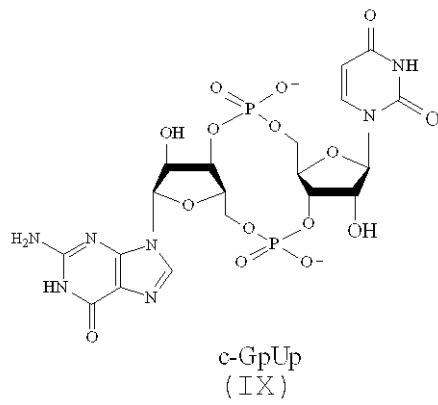
30

40

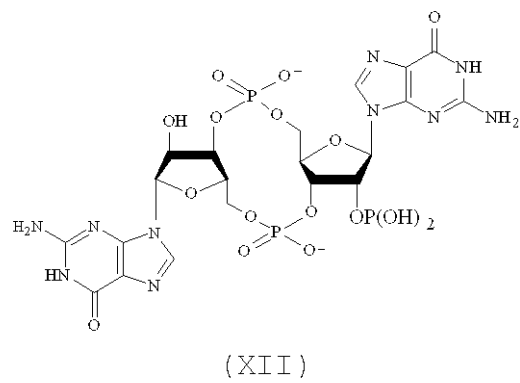
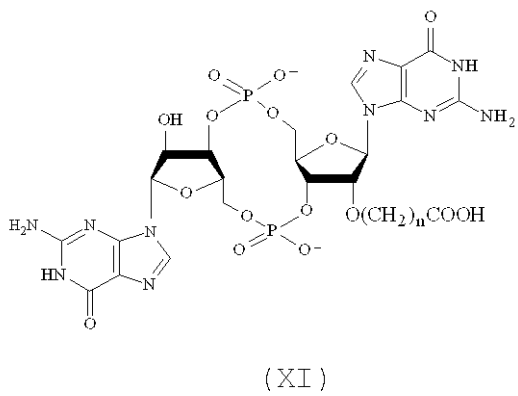
【化 3】



10

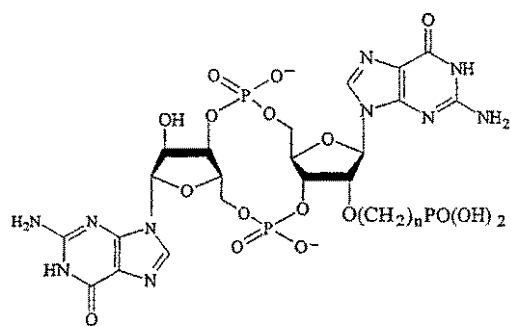


20

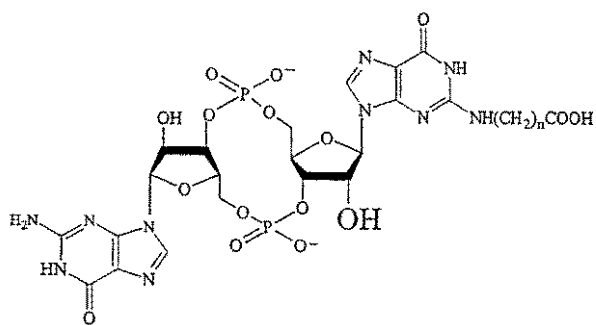


30

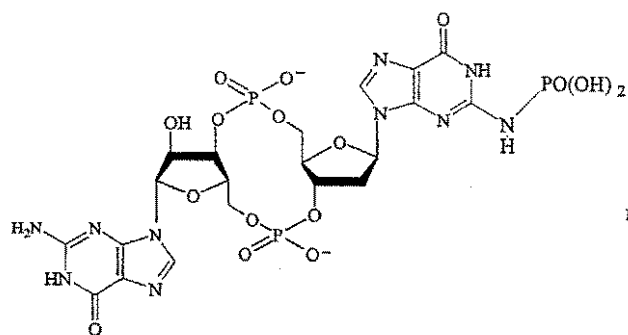
【化 4】



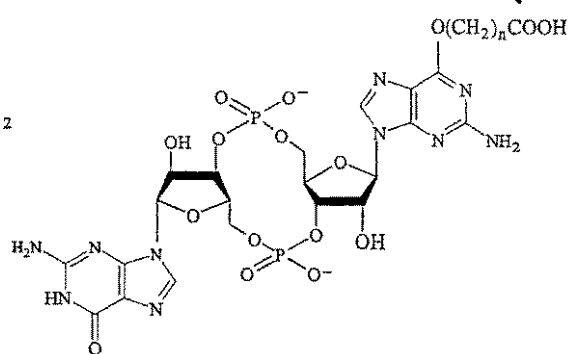
(XIII)



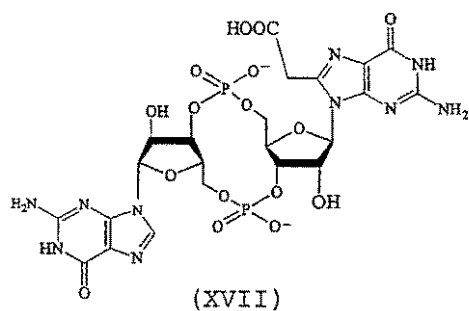
(XIV)



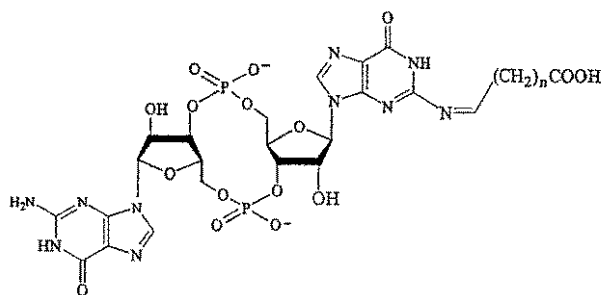
(XV)



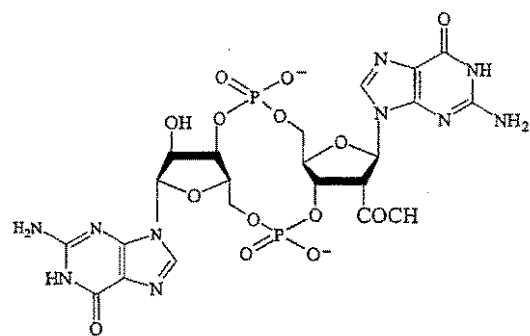
(XVI)



(XVII)



(XVIII)



(XIX)

上記の環状ジヌクレオチドは、c - ジ - G M P の環状ジヌクレオチドアナログの好ましい

10

20

30

40

50

実施態様のみであって、制限することを意図されていない。例えば、グアニン塩基は、他の基で置換されてもよい。

【0047】

本発明はまた、固体表面上での微生物のコロニー形成およびバイオフィーム形成を阻害する方法を提供し、該方法は、固体表面を有効量の c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログに曝露し、医療器具、より好ましくは患者に移植可能であるか、移植される医療器具（すなわち、人工関節、ステントなど）、またはそうでなければ患者に接着しているか、密接に接触している医療器具（すなわち、カテーテル、留置器具、静脈管系、インスリンポンプなど）の表面上での微生物のコロニー形成およびバイオフィーム形成を阻害するか、またはその存在を低減させることによるものである。固体表面は、バイオフィーム形成細菌の存在が改善を必要とする問題を生じ得る産業パイプライン、および建築または建設資材のような非医薬向けの器具上であり得ることも意図されるであろう。医療器具の固体表面上でスタフィロコッカス・アウレウスにより形成された微生物バイオフィームが特に関心事であるので、本発明のこの態様の好ましい実施態様は、表面を有効量の c - ジ - G M P アゴニストに曝露することによる、医療器具の固体表面上でのスタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィーム形成を阻害するか、あるいはその存在を低減させることである。上述の微生物病原体の毒性を減弱させる方法およびコロニー形成およびバイオフィーム形成を阻害する方法と同様、この方法において、c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログ（アゴニストまたはアンタゴニストのいずれか）が、特定の表面についての関心事であるバイオフィーム形成細菌の種類に基づき選択され得る。例えば、スタフィロコッカス・アウレウスまたはバイオフィーム形成が c - ジ - G M P により阻害される細菌が主な関心事である場合、c - ジ - G M P が用いられ得る。他の例では、関心事である細菌のバイオフィーム形成が c - ジ - G M P により増強 / 誘発されるが、c - ジ - G M P のアンタゴニストにより阻害される場合、c - ジ - G M P アンタゴニストとして作用する c - ジ - G M P の環状ジヌクレオチドアナログが用いられ得る。

【0048】

当業者は、当業者に既知のあらゆる方法で固体表面が c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログに曝露され得ることを理解するだろう。ある方法としては、c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログを固体表面に接着または固定することであるか、または表面に c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログを取り込むことである。別の方法としては、固体表面を c - ジ - G M P またはその環状ジヌクレオチドアナログを含有する溶液で流すことである。

【0049】

本発明の方法に適当な病原性および非病原性の両方の種々の細菌種の非限定的な例は、ビブリオ・ハーベイ (*Vibrio harveyi*)、ビブリオ・コレラ、ビブリオ・パラヘモリティカス (*Vibrio parahaemolyticus*)、ビブリオ・アルギノリティカス (*Vibrio alginolyticus*)、シュードモナス・フルオレッセン (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・アエルギノーサ、シュードモナス・アシドボランス (*Pseudomonas acidovorans*)、シュードモナス・アルカリゲネス (*Pseudomonas alcaligenes*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*)、シュードモナス・オーレオファシエンス (*Pseudomonas aureofaciens*)、シュードモナス・フラギ (*Pseudomonas fragi*)、フソバクテリウム ナクレタム (*Fusobacterium nucleatum*)、トレボネーマ・デンティコラ (*Treponema denticola*)、シトロバクター・フロインディ (*Citrobacter freundii*)、ポルフィロモナス・ジンジバーリス、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*)、ステノトロホモナス・マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*)、パーコホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*)、エロモナス・ハイドロフィラ (*Aeromonas hydrophilia*)、サルモネラ・チフィ (*Salmonella typhi*)、サルモネラ・パラチフス (*Salmonella paratyphi*)、サルモネラ・エンテリティデス、シゲラ・ディゼンテリエ (*Shigella dysenteriae*)、シゲラ・フレックスネリ (*Shigella flexneri*)、シゲラ・ソンネイ (*Shigella sonnei*)、エンテロバクター・クロア

カ (*Enterobacter cloacae*)、エンテロバクター・エーロジェネス (*Enterobacter aerogenes*)、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、エルシニア・ペスチス、エルシニア・シュ・ドツベルクロ・シス (*Yersinia pseudotuberculosis*)、エルシニア・インテン・ネジア (*Yersinia inten-nedia*)、ボルデテラ・ペルツーシス (*Bordetella pertussis*)、ボルデテラ・パラペルツーシス (*Bordetella parapertussis*)、ボルデテラ・ブロンキセプチカ (*Bordetella bronchiseptica*)、エスケリキア・コリ、サルモネラ・チフィムリウム、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*)、ヘモフィルス・パラインフルエンゼ (*Haemophilus parainfluenzae*)、ヘモフィルス・ヘモリチクス (*Haemophilus haemolyticus*)、ヘモフィルス・パラヘモリチクス (*Haemophilus parahaemolyticus*)、パスツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、パスツレラ・ヘモリチカ (*Pasteurella haemolytica*)、ガードネレラ・バジナリス (*Gardnerella vaginalis*)、バクテロイデス種 (*Bacteroides spp.*)、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*)、マイコバクテリウム・アビウム (*Mycobacterium avium*)、マイコバクテリウム・イントラセルラー (*Mycobacterium intracellulare*)、マイコバクテリウム・レブラ (*Mycobacterium leprae*)、コリネバクテリア・ジブリテリア (*Corynebacterium diplitheriae*)、コリネバクテリア・ウルセランス (*Corynebacterium ulcerans*)、レジオネラ・ニューロノフィラ (*Legionella pneumophila*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、ヘリコバクター・ピロリ、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・アントラシス (*Bacillus anthracis*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)、ナイセリア・ゴノレーエー (*Neisseria gonorrhoeae*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、カンピロバクター・フェトゥス (*Campylobacter fetus*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、カンピロバクター・コリ (*Campylobacter coli*)、デイノコッカス・ラジオデュランス (*Deinococcus radiodurans*)、マイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、デスルフビブリオ種 (*Desulfvibrio spp.*)、アクチノミセス種 (*Actinomyces spp.*)、エルビニア種 (*Erwinia spp.*)、キサントモナス種 (*Xanthomonas spp.*)、キシレラ種 (*Xylella spp.*)、クラビバクテル種 (*Clavibacter spp.*)、デスルフホモナス種 (*Desulfomonas spp.*)、デスルフォヴィブリオ種 (*Desulfovibrio spp.*)、デスルフコッカス種 (*Desulfococcus spp.*)、デスルフォバクター種 (*Desulfobacter spp.*)、デスルフブルブス種 (*Desulfobulbus spp.*)、デスルフサルシナ種 (*Desulfosarcina spp.*)、デスルフロモナス種 (*Desulfuromonas spp.*)、アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*)、アシネトバクター・ハエモリチクス (*Acinetobacter haemolyticus*)、エンテロコックス・ファエカルス (*Enterococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、ストレプトコッカス・パイオジェネス (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・アガラクティイ (*Streptococcus agalactiae*)、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・エピデルミデス (*Staphylococcus epidermidis*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*)、セラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*)、フランシセラ・ツラレンシス (*Francisella tularensis*)、モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*)、プロビデンシア・アルカリファシエンス (*Providencia alcalifaciens*)、プロビデンシア・レットゲリ (*Providencia rettgeri*)、プロビデンシア・スチュアルティイ (*Providencia stuartii*)、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*)、プロテウス・ブルガルス (*Proteus vulgaris*)、ストレプトマイセス種 (*Streptomyces spp.*)、クロストリジウム種 (*Clostridium spp.*)、ロドコッカス種 (*Rhodococcus spp.*)、テルマトガ種 (*Thermatoga spp.*)、スフィンゴモナス種 (*Sphingomonas spp.*)、ザイモモナス種 (*Zymomonas spp.*)、ミクロコッカス種 (*Micrococcus spp.*)、アゾトバクター種 (*Azotobacter spp.*)、ノルカルジア種 (*Norcardia spp.*)、ブレビバクテリウム種 (*Brevibacterium spp.*)、アルカリゲネス種 (*Alcaligenes spp.*)、ミクロビスポラ種 (*Microbispora spp.*)、ミクロモ

10

20

30

40

50

ノスポラ種 (*Micromonospora* spp.)、メチロバクテリウム・オルガノフィルム (*Methylobacterium organophilum*)、シュードモナス・レプチリボラ (*Pseudomonas reptilivora*)、シュードモナス・カラギエノボラ (*Pseudomonas carragienovora*)、シュードモナス・デンチフィカンス (*Pseudomonas dentificans*)、コリネバクテリウム種 (*Corynebacterium* spp.)、プロピオニバクテリウム種 (*Propionibacterium* spp.)、キサノトモナス種 (*Xanthomonas* spp.)、メチロバクテリウム種 (*Methylobacterium* spp.)、クロモバクテリウム種 (*Chromobacterium* spp.)、サッカロポリスポラ種 (*Saccharopolyspora* spp.)、アクチノパチルス種 (*Actinobacillus* spp.)、アルテロモナス種 (*Alteromonas* spp.)、アエロモナス種 (*Aeromonas* spp.)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・エピデニジス (*Staphylococcus epidermidis*)、スタフィロコッカス・オミニス (*Staphylococcus hominis*)、スタフィロコッカス・ヘモリチカス (*Staphylococcus haemolyticus*)、スタフィロコッカス・ワルネイ (*Staphylococcus warneri*)、スタフィロコッカス・コーニイ (*Staphylococcus cohnii*)、スタフィロコッカス・サブロフィティックス (*Staphylococcus saprophyticus*)、スタフィロコッカス・カピチス (*Staphylococcus capitis*)、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス (*Staphylococcus lugdunensis*)、スタフィロコッカス・インテムジウス (*Staphylococcus intermedius*)、スタフィロコッカス・ハイカス (*Staphylococcus hyicus*)、スタフィロコッカス・サッカロリチクス (*Staphylococcus saccharolyticus*)、およびリゾビウム種 (*Rhizobium* spp.)、およびそれらの変異体を含む。

10

20

【0050】

本発明の微生物病原体の毒性を減弱させる方法または微生物病原体によるコロニー形成を阻害または低減させる方法、好ましくは哺乳類において、最も好ましくはヒトにおいて用いられることが意図されている（トリのような他の動物においても用いられ得る）。

【0051】

本発明の微生物病原体の毒性を減弱させる方法または微生物病原体によるコロニー形成を阻害または低減させる方法をふまえて使用する c - ジ - GMP またはその環状ジヌクレオチドアナログを含有する医薬組成物は、1 種以上の生理学的に許容される担体または賦形剤を用いた通常の方法で製剤され得る。担体は、組成物の他の成分と影響し合わないという意味で「許容され」なければならない、かつその受け手に有害であってはならない。

30

【0052】

担体、投与経路、投薬形態の以下の例は既知の可能性を有するので挙げられ、それらの中から担体、投与経路、投薬形態などが本発明で用いられるために選択され得る。しかしながら、当業者は、任意の指定の剤形および選択された投与経路が最初に試され、それが所望の結果を達成するか否かが決定されるべきであることを理解するだろう。c - ジ - GMP またはその環状ジヌクレオチドが有効成分として単独で、あるいは細菌感染症を処置するために通常用いられるような別の抗生物質または抗菌剤と組み合わせて用いられてもよいことも理解するだろう。

【0053】

用語「担体」は、c - ジ - GMP またはその環状ジヌクレオチドと一緒に投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビークルを意味する。医薬組成物における担体は、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン（ポリビドンまたはポビドン）、トラガカントゴム、ゼラチン、スターチ、ラクトースまたはラクトース水和物（monohydrate）のような結合剤；アルギン酸、メイズスターチなどのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはラウリル硫酸ナトリウムのような滑沢剤または界面活性剤；コロイド状二酸化ケイ素のような潤滑剤；スクロースまたはサッカリンのような甘味料；および／またはペパーミント、メチルサリチル酸塩、またはオレンジ香味料のような香味料を含んでいてもよい。

40

【0054】

投与方法は、非経腸、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、経粘膜（例えば、経口

50

、経鼻、口腔、膣、直腸、眼内)、くも膜下、局所および皮内経路を含むが、これらに限らない。投与は全身または局所のいずれでもあってもよい。

【0055】

経口投与用の医薬製剤は液体形態(例えば、液剤、シロップ剤または懸濁剤)であってもよいし、あるいは使用前に水または他の適当なビークルでの再調製用薬剤製品として提供されてもよい。かかる液体製剤は、懸濁化剤(例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または水素化食用脂);乳化剤(例えば、レシチンまたはアラビアゴム);非水性ビークル(例えば、アーモンドオイル、油性エステル、または植物油);および保存剤(例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシ安息香酸塩、またはソルビン酸)のような医薬的に許容される添加剤を用いた通常の方法で製剤されてもよい。医薬組成物は、例えば、結合剤(例えば、あらかじめゼラチン化したメイズスターチ、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース);充填剤(例えば、ラクトース、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム);滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ);崩壊剤(例えば、ジャガイモでんぷんまたはナトリウムスターチグリコール酸塩)、または湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)のような医薬的に許容される賦形剤を用いた通常の方法で例えば錠剤またはカプセル剤の形態で製剤されてもよい。錠剤は、当該技術分野でよく知られた方法でコーティング(すなわち、腸溶性コーティング)されていてもよい。

10

【0056】

経口投与用製剤は、活性化合物の制御した放出を生じるように適当に製剤されてもよい。

20

【0057】

局所投与のため、c-GMPまたはその環状ジヌクレオチドアナログは、膏薬または軟膏のような局所に適応したビークルに取り込まれる。

【0058】

口腔内投与のため、組成物は通常の方法で製剤された錠剤またはトローチ剤の形態をとってもよい。

【0059】

組成物は、注射(例えば、ボーラス注射または持続注射)により非経腸投与用に製剤されてもよい。注射用製剤は、単位投薬形(例えば、アンプル剤)または保存剤を添加した多用量容器にて提供されてもよい。組成物は油性または水性ビークル中の懸濁剤、液剤、または乳剤のような形態をとってもよく、懸濁化剤、安定化剤および/または分散剤のような製剤化用の剤を含有していてもよい。あるいは、有効成分は、使用前に適当なビークル(例えば、清潔なパイロジェンフリー水)で調製する粉剤形態であってもよい。

30

【0060】

組成物はまた、座剤または停留浣腸剤(例えば、カカオ脂または他のグリセリドのような通常の座剤基剤を含有する)のような直腸用組成物の形で製剤されてもよい。

【0061】

吸入による投与のため、本発明により用いられる組成物は、適当な高压ガス(例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、炭酸ガス、または他の適当なガス)を使用して、加圧パックまたは噴霧器からのエアゾールスプレーの形で通常もたらされる。吸入スプレーとして加圧パックまたは噴霧器を必要としない鼻用スプレーが、鼻腔内投与のために代わりに用いられてもよい。加圧エアゾールの場合、定量を運ぶバルブを用意することで投薬単位が決定されてもよい。吸入器または吸入器(insufflator)において用いるために例えばゼラチンからなるカプセル剤およびカートリッジが製剤されてもよく、これは化合物の粉剤混合物およびラクトースまたはスターチのような適当な粉剤基剤を含有する。

40

【0062】

典型的な処置計画は、数日間ないし1週間から約6ヶ月間を含む期間までにわたる有効量の投与を含む。

50

【 0 0 6 3 】

コロニー形成、バイオフィルム形成、または感染部位での有効用量は、約 $1 \mu\text{M}$ から $90 \mu\text{M}$ 、好ましくは約 $20 \mu\text{M}$ から $500 \mu\text{M}$ 、より好ましくは約 $100 \mu\text{M}$ から $300 \mu\text{M}$ の間のような μM の範囲内にあるようである。当業者は、何用量の c -ジ-GMP またはその環状ジヌクレオチドアナログが、投与経路に依存してかかる有効量をバイオフィルム形成または感染部位に運ぶのに必要であるかを日常の実験で決定する。

【 0 0 6 4 】

インビボで投与される c -ジ-GMP またはその環状ジヌクレオチドアナログの投薬量は、受け手の年齢、性別、健康状態、および体重、併存処置の種類、必要に応じて処置の頻度、および所望の医薬効果の性質に依存し得ることは理解される。本明細書に記載の有効用量範囲は、限定的なものではなく、好ましい用量範囲を表すものである。しかしながら、最も好ましい投薬量は個々の対象に合わせられ、このことを当業者は理解し、決定できる。例えば、Berkow et al., eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and co., Rahway, N. J., 1992; Goodman et al., eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th edition, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y. (1990); Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, Appleton and Lange, Norwalk, Conn., (1992); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1987), Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, (1985) (引用は、引用により本明細書に完全に取り込まれる)を参照されたい。

10

20

【 0 0 6 5 】

これまで本発明を一般的に説明したが、それらが以下の実施例（説明の目的で提供されるものであって、本発明を制限することを意図するものではない）を通じてより簡単に理解されるだろう。

【 0 0 6 6 】

実施例 1

ビブリオ・コレラ（および他種）のしわ状表現型を研究している研究者は、インビトロでの滑らかな細胞（EPSoFF）としわ状細胞（EPSoN）との切りかわりの頻度が非常に低い（ $< 1\%$ ）ことにより邪魔されてきた（Morris et al., 1996; Wai et al., 1998; White, 1940および1938; Yildiz et al., 1999）。本発明者の研究室は、滑らかな細胞（EPSoFF）からしわ状表現型（EPSoN）への高頻度のシフトを生じる培地および条件であるAPW#3（ 1% プロテオースペプトン#3、 1% NaCl、 $\text{pH } 8.5$ ）を同定した。この過程は高頻度しわ状産出（HFRP）と呼ばれる（表1）（Ali et al., 2002）。

30

【 0 0 6 7 】

表 1 ビブリオ・コレラ株によるしわ状EPSoN産出（HFRP）への切りかわり頻度

【表 1】

株 ^a	血清型／ バイオタイプ	供給源 ^b	% しわ状コロニー			
			フラスコ		チューブ	
			30℃	37℃	30℃	37℃
N16961	O1/E1 Tor	C(1971)	24-38	42-51	68-74	60-80
C6709	O1/E1 Tor	C(1991)	1	23	15	70
NCTC 6585	O1/古典的	C(1943)	33-48	44-45	0	0
AMS20A73	O1/古典的	C(1945)	3	4	0	0
Aldova	O37	C(1965)	0	1	71-72	23-50
1803	非O1	C(1992)	0	0	16	87
1837	O139	C(1991)	0	0.2	0	0-2
P44	非O1	E(2000)	12	0	0	2
1085-93	O37	E(1993)	0	0	0.1	0
141-94	O70	E(1994)	0	0	0.3	0
928-93	O6	E(1993)	0	0.2	0.4	0

10

^a HFRPまたは自然発生したしわ状コロニーを示す株のみを挙げる

20

^b C、臨床；E、環境；括弧内は単離した年である

【0068】

高頻度でのしわ状表現型への切りかわりは、非病原性株においてより流行株において共通するものであることを見出した。時間上および地理上無関連の6/19の毒素産生単離物(32%)および無関連の1/16のみの非毒素産生株(6%)が、しわ状表現型(E P S o n)へシフトでき、HFRPを示すことを見出した(T検定; $p < 0.05$)(表1)。試験した全ての株のうち、E1 Tor株N16961が最も高い切りかわり率(80%まで)であった。より低い頻度であるがしわ状表現型から滑らかな表現型への逆のものも見出され、これは表現型の切りかわりが条件付きで一過性であることを示している。これらの特徴は、切りかわり過程がフェーズバリエーション(phase variation)様機序と関連し得ることを示唆している。流行株が全て高頻度で切りかわることができるわけではないが、高頻度での切りかわりが毒素産生株とより相関することを示す結果は、それがビブリオ・コレラにおいて重要であることを示唆し、そしてまたこの過程と毒性との間の結びつきを示唆している。従前の研究(Morris et al., 1996)と一致して、しわ状表現型への低頻度($< 0.5\%$)のシフトをいくつかの株で見出した。非病原性株は、E P S o nしわ状表現型への切りかわりを刺激するための異なる条件下で成長させられなければならない可能性がある一方、このことは、それにも関わらず臨床上の株と非病原性株との間に差があることを依然として示すものである。本発明者の研究室は、6番目の世界的流行(古典的バイオタイプ)株NCTC 6585が高頻度(48%まで)でしわ状表現型に切りかわったことを見出した。HFRPは、滑らかな表現型からしわ状表現型へのシフトが $> 3\%$ であると定義した(Ali et al., 2002)。NCTC 6585のしわ状変異体がrEPSを発現することを確認するために、ルテニウムレッド染色した薄片について透過電子顕微鏡法(TEM)を行った。TEMのため、LB培地上2日目の滑らかなコロニーおよびしわ状コロニーを $0.5 - cm^2$ のブロックとして取り出し、次に、固定し、 $0.1 M$ カコジル酸緩衝液($pH 7.2$)中の2% グルタルアルデヒド、 0.075% ルテニウムレッド、 $50 mM$ リジン塩酸塩溶液中で1時間、室温、次に、18時間、4 にて染色した。試料を $0.1 M$ カコジル酸緩衝液($pH 7.2$)中で2回洗浄し、2% 溶解Noble寒天にて包埋し、 $0.1 M$ カコジル酸緩衝液($pH 7.2$)中の1% 四酸化オスミウムで一晩、4 にて後固定した。次に、試料を30%、50%、70%、および90% EtOHにてそれぞれ10分間、100% EtOHにてそれぞ

30

40

50

れ10分間を2回、脱水した。次に、それぞれプロピレンオキシドで15分間2回処理の後、プロピレンオキシドとエポンの1:1溶液を用いて2時間室温にて、次に3:1 エポン/プロピレンオキシドにて一晚浸透させた。次に、試料を純粋なエポン中に1時間置き、エポンで包埋し、60のオーブンに2日間入れ、次に薄切した(厚さ50~80nm)。切片を酢酸ウラニルで20分間染色し、くえん酸塩を20分間導入した。試料を、J E O L 1200 EX II透過顕微鏡下80kVで調べた。しわ状NCTC 6585のTEMは、細胞間の細胞外多糖の存在、および滑らかな細胞にはこの物質が存在しないことを示した。ビブリオ・コレラの全ての主要な流行コロニー(古典、E1 Torおよび0139)はしわ状表現型にシフトできると思われる。

【0069】

rEPSの産生は、塩素、UV照射、過酸化水素のような種々の環境ストレスおよび補体介在性細菌活性に対するE1 Tor株の耐性を促進することが知られている(Morris et al., 1996; Rice et al., 1993; Watnick et al., 1999およびYildiz et al., 1999)。6番目に世界的流行の古典的バイオタイプ株NCTC 6585のしわ状細胞が環境ストレスに対する耐性を促進するか否かを決定するために、滑らかな変異体およびしわ状変異体を塩素に曝露した。塩素耐性を新鮮なLB(Miller)培地3ml中でのNCTC 6585一晚培養物の1:50希釈物を用いてアッセイした(4回の独立実験)。次に、培養物を37にて3時間、 $\sim 2 \times 10^8$ CFU/mlまで静的にインキュベーションし、細胞を遠心により回収し、3mg/L遊離塩素(次亜塩素酸ナトリウム, Sigma)含有リン酸緩衝食塩水(PBS)(pH7.2)に再懸濁した。3mg/L塩素に5分間曝露した後、培養物を連続希釈し、LB寒天上に播種した生存細胞数を決定した。E1 Tor株92A1552と一致して(Yildiz et al., 1999)、しわ状NCTC 6585細胞は滑らかな細胞より10,000倍塩素(5分間、3mg/Lに曝露)耐性であった。これらの知見は、古典的なバイオタイプ株によりしわ状表現型を報告する最初のものであり、rEPSはまた古典的なバイオタイプ株の生存を促進することを示している。

【0070】

EPSonおよびしわ状表現型への切りかわりはバイオフィーム形成を促進する

しわ状表現型はE1 Torおよび0139株におけるバイオフィーム形成を促進できるので、N16961(E1 Tor)、NCTC 6585(古典的)、およびAldova(非01/非0139)株の滑らかな変異体およびしわ状変異体のバイオフィーム形成能を、上記方法を用いて試験した(Watnick et al., 2001)。LB培地500μlを含有するガラス試験管に、各変異体の一晚培養物の1:100希釈物を植え付けた。

【0071】

次に、これらの培養物を室温にて24時間静的にインキュベーションした。次に、培養上清を破棄し、蒸留水で激しく洗浄して未接着の細胞を除去し、0.1%クリスタルバイオレット(Sigma)600μlで満たし、30分間室温でインキュベーションし、次に水で再び洗浄した。定量的バイオフィーム形成を、細胞関連ダイをDMSO(Sigma)600μlで抽出して生成した溶液の570nmでの吸高度を測定することによりアッセイした。他の研究(Yildiz et al., 1999)と一致して、結果は、試験した全ての株のしわ状変異体が、滑らかな細胞より有意に高い(~ 7 倍)バイオフィーム形成能を有すること(図2)、およびEPSがビブリオ・コレラのバイオフィーム形成に必須であることを示している。

【0072】

ビブリオ・コレラは環境下でしわ状表現型(EPSon)へ切りかわることができる

EPSonおよびしわ状表現型への切りかわりが環境下でのビブリオ・コレラの生存を促進するという仮説は、EPSonへの切りかわりが環境下で起こるという前提に基づくものである。しかしながら、しわ状ビブリオ・コレラを環境(または臨床上)供給源から検出したという報告はない。不運なことに、しわ状株を環境から単離する現行の濃縮方法はない。TCBSはビブリオ・コレラの選択および鑑別培地であるが、本発明者の研究室は、TCBSがしわ状表現型を阻害(遮断)することを見出した(Ali et al., 2002)。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

滑らかな細胞が天然環境の水試料中でしわ状表現型に切りかわるか否かを試験するために、Columbia, Howard County, Marylandの市の端に位置するKittamaqundi湖の天然の湖水を用いた。Kittamaqundi湖は、およそ長さ1マイル、幅1/8マイル、最深7フィートの27エーカーの人工湖である。およそ数マイルのみ離れたチェサピーク湾は、ビブリオ・コレラの天然の保有所であると知られている。新鮮な水試料を2002年の3月から9月の暖かい間に湖から集めた。集める際、湖水は、pH 7.6、そしてNa⁺濃度およびCl⁻濃度はそれぞれ6 mMおよび2 mMであった。湖水を使用に先立ち1時間オーロクレーブにかけた。この研究において、ビブリオ・コレラ株N16961をLB培地中で一晩、37℃にて成長させ、遠心して、0.85% NaClで2回洗浄し、PBSに再懸濁し、適当に希釈し、湖水100 mlに植え付け、最終濃度10⁴ ~ 10⁵ cfu/mlをプレートカウントで確かめた。微生物を室温、暗所にて静的にインキュベーションし、適当な時間間隔で一定分量をLB寒天上に播種し、プレートカウントおよびコロニー形態を決定した。約6ヶ月間試料採取した後の予備的な結果は、ビブリオ・コレラN16961がこれらの条件下で存続でき、生存力は1 logのみ低減してことを示唆している。重大なことに、N16961は、これらの条件下で50日まで高頻度(16%まで)で滑らかな(EPS off)表現型からしわ状(EPS on)表現型へ切りかわることができた。これらの研究の利点は、それが本来の環境シナリオおよびN16961の野生型株の切りかわりをしっかりと模倣しているということである。これらの研究を拡大することができる一方、これらの結果は、ビブリオ・コレラが天然環境下でしわ状表現型にシフトできることを示唆している。

【 0 0 7 4 】

ビブリオ・コレラでのrEPSの組成分析

本発明者の研究室の上記知見は、ビブリオ・コレラの古典的(6番目の世界的流行)バイオタイプ株でのしわ状表現型を報告する最初のものであった。古典的なバイオタイプ株NCTC 6585のしわ状変異体の構造組成を決定し、それを他の種の多糖と比較するために、古典的なバイオタイプ株NCTC 6585のしわ状コロニーをAPW#3に植え付け、EPS産生およびバイオフィーム形成を促進する静的条件下37℃にて3日間インキュベーションした。EPSを回収するために、培養物を大きな(10 μm)孔サイズフィルター(VWR)を用いて濾過した。バイオフィームを1回PBSで軽く洗浄し、浮遊細胞を除去し、新しいチューブに移し、3 mmのガラスビーズを加え、バイオフィームを崩壊した。次に、試料を20,000 rpm(50,000 × g)で16時間4℃にて遠心し、細胞片および他の混合物を除去した。上清をDetoxi-Gel Affinitypakカラム(アガロースカラムにポリミキシンBを固定したもの)(Pierce)に通し、試料由来のLPSの痕跡を全て除去し、DNaseおよびRNase(最終濃度100 μg/ml)を添加し、次に、37℃で4時間インキュベーションした。プロテイナーゼK(最終濃度100 μg/ml)を添加し、37℃で一晩、次に、60℃にて15分間インキュベーションした。95%エタノール3容量を添加後、混合物を一晩4℃で沈殿させ、次に、12,000 rpmで20分間遠心した。遠心したEPSを2回洗浄し、まず80%エタノールで、次に95%のエタノールで洗浄した。EPS沈殿物を、MQ 0.5 mlに再懸濁し、-80℃で2時間インキュベーションし、4時間凍結乾燥させ、次に、複合ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)(Atlanta, GeorgiaにあるComplex Carbohydrate Research Centerにより行った)により分析した。

【 0 0 7 5 】

以下の表2の分析は、6番目の世界的流行株NCTC 6585のしわ状EPS(rEPS)が、主要な糖としてグルコースを有する7番目の世界的流行株92A1552(Yildiz et al., 1999)および主要な糖としてマンノースを有する株TSI-4(Wai et al., 1998)のEPSと顕著に異なることを示している。組成分析結果はまた、本明細書に記載の細胞外炭水化物が、典型的には多量のペロサミン(perosamine)およびクイノボサミン(quinovosamine)を含有するO1 LPSと非常に異なることを示唆している(Raz

iuddin, 1980)。E1 Tor株92A1552の結果(4結合ガラクトースおよび4結合グルコースが主要な結合である)(Yildiz et al., 1999)とは対照的に、古典的バイオタイプ株について行ったガスクロマトグラフィー-質量分析(GC-MS)を用いたグリコシル結合分析は、主要な結合が4結合ガラクトシル残基であり、糖骨格を表し得ることを示している。

【0076】

表2 株NCTC 6585由来のrEPSのグリコシル組成および結合分析

【表2】

糖	グリコシル組成	グリコシル結合	
	%	グリコシル残基 ^a	%
ラムノース	8.92	末端結合-フコース残基	9.8
フコース	10.46	末端結合-グリコシル残基	7.9
マンノース	4.68	3結合-グリコシル残基	8.8
ガラクトース	18.71	2結合-グリコシル残基	15.0
グルコース	9.29	4結合-マンノシル残基	14.2
GlcNAc	16.86	4結合-ガラクトシル残基	24.8
GlcNAc	27.65	2, 3, 4結合-フコース残基	7.7
		2, 3結合-マンノシル残基	11.8

10

20

^a 全ての残基はピラノース(p)型である。

【0077】

実施例2

ビブリオ・コレラは、エキソ多糖類(EPS)基質、しわの寄ったコロニー形態、増加したバイオフィーム形成および特定の条件下での増大した生存により特徴付けられる「しわ状」表現型に切りかわることができる。しわ状EPS(rEPS)の生合成に関与するvps遺伝子クラスターは、VpsRにより正に制御される。EPS産生およびしわ状表現型を促進する培地(APW#3)を同定し、流行株が非病原性株より高頻度で切りかわることを見出し、このことは、この切りかわりおよび細胞外多糖がコレラの疫学に重要であることを示唆している。この実施例の実験において、滑らかなビブリオ・コレラ株上のトランスポゾン変異誘発を用いて、切りかわりの分子基盤をより理解するために誘導条件下でしわ状表現型にシフトできない変異体を同定した。本発明者は、しわ状表現型とす

に関連するとされているvpsR、galE、およびvpsを同定し、LPS合成において役割を担うrfbDおよびrfbE、および芳香族アミノ酸合成において役割を担うaroBおよびaroKを含む、これまでに関連するとはされていない遺伝子も同定した。さらに、N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼをコードするamiBにおける変異は、切りかわり、運動性、および細胞形態における欠失を引き起こした。GGDEFおよびEALドメインを含有するRocSと呼ばれる新規調節タンパク質(細胞シグナル伝達の調節)をコードし、c-ジ-GMPと関連する遺伝子が、しわ状表現型、EPS、バイオフィーム形成、および運動性に重要であることも見出した。

30

40

【0078】

材料および方法

しわ状表現型への切りかわりにおいて役割を担う遺伝子の変異誘発およびスクリーニング
本発明者の研究室は高頻度でしわ状表現型への切りかわりを促進する培養条件(HFRP)を既に同定し(Ali et al., 2002)、これを滑らかな表現型からしわ状表現型への分子切りかわりに関与する遺伝子を同定するアッセイの開発において利用した。従前の研究において、本発明者の研究室は、APW#3と呼ばれる培地中での細胞のインキュベーションが、ビブリオ・コレラの滑らかなN16961細胞のしわ状表現型への高頻度(80%まで)の切りかわりを生じることを報告した(All et al., 2002)。N16961は、バングラデシュで単離された野生型で7番目に流行型(E1 Tor株)である(Levine

50

et al., 1981)。滑らかな (E P S o f f) 表現型からしわ状 (E P S o n) 表現型への分子切りかわりに関与する遺伝子を同定するために、mini-Tn5 Km2 変異誘発を用いた (de Lorenzo et al., 1990 および Herrero et al., 1990)。Tn5 は、自殺ベクター pG704 に由来する R6K ベースのプラスミド pUT/mini-Tn5 Km (または pUT Km) 上に含有され (Miller et al., 1988)、R6K およびそれに由来するプラスミドに必須の複製タンパク質である R6K 特異的 pir タンパク質を産生する宿主株 (例えば、エスケリキア・コリの pir 溶原) においてただ維持され得る。それはまた、有効な接合伝達を可能とするプラスミド RP4 の伝達供給源である oriT を有する。宿主プラスミド pUT Km のレシピエント細胞への送達は、トランスポゾンの外側の部位にあるプラスミド上にコードされる同族トランスポサターゼにより仲介される。この変異誘発システムの利点は、同族トランスポサターゼが転位中のトランスポゾンに付随しないので、Tn5 挿入が安定なことである。従って、それぞれの変異体はスクリーニングするために 1 つの Tn5 のみを有する。

10

【0079】

エスケリキア・コリ S17 pir (pUT/mini-Tn5 Km) を、滑らかな N16961 (E P S o f f) 細胞とかけ合わせ、30 種の独立した同族体から 14, 500 種の mini-Tn5 変異体を得、続いてマイクロタイタープレートのウェル中で保存した。トランスポゾン変異体をマイクロタイタープレートのウェル中 APW #3 培地 200 μ l に植え付け、48 時間インキュベーションし、LB 寒天に植えかえ、24 ~ 48 時間インキュベーションすると、コロニー形態を視覚的に観察できる、ハイスループットスクリーニングを HFRP 変異体について行った。このアプローチを用いて、しわ状コロニーを全く産出しない HFRP 陰性と操作上定義された 43 種の変異体を同定した。これらの変異体は、ガラス試験管中 APW #3 3 ml にコロニーを植え付け、48 時間 37 ° で静的にインキュベーションすることによる、HFRP 誘発条件下でのしわ状表現型への切りかわりににおいて安定かつ欠失であることをさらに確かめた。次に、清潔なガラスビーズ (直径 4 mm) を加え、培養物をしわ状細胞の凝集を破壊しないようボルテックスした。それぞれの培養物の適当な希釈物を LB 寒天に播種し、コロニーを標準的プレートカウントによりカウントし、しわ状細胞のトータルの CFU/ml および頻度を決定した。これらのスクリーニング方法により同定し、試験した 43 種の変異体は、しわ状誘発 (HFRP) 条件下で検出可能なしわ状コロニーを産出せず、これらをさらに研究した。

20

30

【0080】

トランスポゾン挿入部位の配列決定、および破壊された遺伝子の同定

これらの変異体におけるトランスポゾン挿入部位を同定するために、困難ではない任意の 1 次 PCR 法、次に、既に記載のもの (Bahrani-Mougeot et al., 2002) に類似した DNA 配列決定を用いた。簡単にいうと、任意の PCR を 2 工程で行った。第 1 の反応において、変異体の染色体 DNA を、トランスポゾンの両サイドを読み取るプライマー、および 2 つの任意のプライマーを用いた PCR の鋳型として用いた。これらの 1 次反応により、トランスポゾン挿入体の接合部に由来するいくつかを含む多数の単位複製配列が生じた。1 回目の PCR 産物を GeneAmp 2.1 試薬で精製し、第 1 ペアの外側にある外方向トランスポゾンプライマーの第 2 ペア、およびオリジナルの任意のプライマーの一定領域に対応する任意のプライマーを用いて増幅した。この第 2 の PCR 反応は、トランスポゾン接合部を含む第 1 の PCR 産物を増幅するために特異的に作用する。増幅したフラグメントは 100 ~ 800 bp の範囲であった。最も強力な結合を生じる産物をアガロースゲルから回収し、第 2 の PCR で用いたのと同じトランスポゾンプライマーおよび任意のプライマーを用いて配列決定した。配列決定を自動 DNA シークエンサー (373A モデル, Applied Biosystems) にて Prism ready reaction dye deoxy termination キット (Applied Biosystems) を用いて製造元の指示に従った。

40

【0081】

vpsR のクローニング

50

PCRプライマーKAR486(5'-CGGGATCCCCGCTAAGTCAGAGTTTATTCGC-3';配列番号:3)およびKAR487(5'-TCCCCGCGGGTTCGGTGGTTTGTATCGTGT-3';配列番号:4)を用いて、2.61kbのPCRフラグメント上にN16961のvpSR遺伝子を得た。PCRフラグメントをBamHIおよびSacIIでそれぞれ切断し、低コピーベクターpWSK29に適当にクローニン化し(Wang et al., 1999)、プラスミドpDK104を得た。

【0082】

運動性アッセイ

等量のビブリオ・コレラ細胞(LBプロスで成長させたもの)を0.3%寒天含有LB培地に突き刺し、37℃で4時間インキュベーションした後のそれぞれの区域の群直径を測定することで、群プレートアッセイにて運動性を決定した。 10

【0083】

amiB変異体株の顕微鏡分析

野生型N16961およびamiB変異体株DK630由来のLBプレート上シングル18時間コロニーを、PBS 1mlに再懸濁し、アリコート50μlをガラススライド上に塗抹し、熱固定し、次に、0.1%クリスタルバイオレットで30秒間染色した。次に、スライドをdH₂Oで洗浄し、乾燥させ、Zeiss Axioskopエピ蛍光顕微鏡(Carl Zeiss, Inc. NY)を用いて細胞形態を観察した。画像をAxioCam Mrmカメラ(Carl Zeiss, Inc. NY)を用いて取り込んだ。 20

【0084】

結果および考察

本発明者の研究室は、滑らかな表現型からしわ状表現型へ切りかわることができない43種のビブリオ・コレラ変異体のトランスポゾン挿入部位の配列決定および同定に成功した。破壊された遺伝子を同定するための公開ビブリオ・コレラN16961ゲノムに対するBLAST検索(Heidelberg et al., 2000)の概略を表3に示す。

【0085】

表3 ビブリオ・コレラN16961の代表的なHFRP変異体

【表 3】

変異体 ^a	遺伝子座 ^b	推定タンパク質	推定機能
DK568 (2)	VC0243	R f b D	L P S 生合成、 G D P - マンノース 4, 6 脱水酵素
DK623 (1)	VC0244	R f b E	L P S 生合成、ペロサミン合成酵素
DK578 (2)	VCA0744	G a l E	L P S 生合成、 U D P - グルコース 4 - エピメラーゼ
DK589 (1)	VC0920	V p s (E p s F)	E P S 生合成、グリコシル転移酵素
DK576 (2)	VC0921	V p s (W z x)	E P S、多糖輸送、フリッパーゼ
DK588 (7)	VC0922	V p s	E P S、仮想タンパク質
DK562 (13)	VC0665	V p s R	E P S 生合成、 δ^{54} 転写活性化因子
DK614 (10)	VC2628	A r o B	芳香族アミノ酸生合成、 3 - デヒドロキナ酸合成酵素
DK625 (1)	VC2629	A r o K	芳香族アミノ酸合成、 シキミ酸キナーゼ
DK630 (1)	VC0344	A m i B	N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ
DK567 (3)	VC0653	R o c S	調節因子、 G G D E F および E A L ドメイン含有

10

20

^a 括弧内の数は同じ遺伝子座に挿入物を有する mini - T n 5 変異体の数を示す

^b 遺伝子座および推定タンパク質はビブリオ・コレラ N 1 6 9 6 1 T I G R 配列決定プロジェクトからもたらされたものである

【 0 0 8 6 】

従前のトランスポゾン変異誘発研究により、安定なしわ状から滑らかな変異体を生じる遺伝子変異が同定されている (Watnick et al., 1999; Yildiz et al., 1999; および Ali et al., 2000)。対照的に、本発明者の研究室が開発したしわ状表現型への切りかわりを促進する条件を利用して、N 1 6 9 6 1 の滑らかな株上でのトランスポゾン変異誘発を行い、しわ状誘発条件下でのしわ状表現型へ切りかわることができない安定な変異体をスクリーニングした。該知見により、いくつかの生合成のようなしわ状表現型において役割を担うと既に同定されている遺伝子 (v p s オペロン)、および調節遺伝子 (v p s R) および L P S 遺伝子 (g a l E) における欠損を有する変異体が明らかとなる一方、このスクリーニングにより、まだ同定されていない遺伝子の挿入物を支持する変異体も同定した。これらの新たに同定した変異体を、L P S をコードするいくつかの機能群 (r f b D および r f b E) (ある種の糖結合の付加の触媒において役割を担い、それにより L P S 構造物における置換がまたしわ状 (E P S o n) 表現型の活動停止と結びつく遺伝子; 芳香族アミノ酸生合成に関与し、それにより芳香族アミノ酸生合成遺伝子がしわ状表現型と直接的または間接的に関連し得る遺伝子 (a r o B および a r o K); 細胞壁加水分解に関与する遺伝子 (a m i B)、および N 1 6 9 6 1 ゲノムデータベースにおいて「p d e A 様」と指定した新規遺伝子座 V C 0 6 5 3 (本発明者は、ここで、G G D E F および E A L ドメインを含有する仮想タンパク質 (配列番号: 2) をコードする R o c S (細胞シグナル伝達の調節用; 配列番号: 1) と呼ぶ)) にクラスター形成させることができた。G G D E F および E A L ドメインの正確な機能はあまりよく分かっていないが、シグナル伝達においていくつかの役割を担うと考えられ、これらのドメインを含有するタンパク質が原核生物種に広く行きわたり、多くの種の調節および生物学において鍵となる機能を担うと思われる。

50

【 0 0 8 7 】

V p s Rはしわ状表現型への切りかわりにおいて重要な役割を担う

ビブリオ・コレラにおいてv p s 生合成遺伝子を調節する際の重要性から、本発明者はD K 5 6 2およびD K 5 8 1と呼ばれるいくつかのv p s Rトランスポゾン変異体をさらに研究した。遺伝子座V C 0 6 6 5によりコードされるV p s Rは、N t r C、A l g B、およびH y d Gのような 5 4 応答制御因子ファミリーに高度に類似する仮想の4 4 4個のアミノ酸タンパク質である(Yildiz et al., 2001およびAli et al., 2000)。本発明者の研究室は、プラスミドp D K 1 0 4上でのv p s R供給が、これらのv p s R変異体両方においてしわ状表現型への切りかわりを保持できることを見出した。これらの知見により、これらの変異体におけるしわ状表現型への切りかわりの欠失はv p s Rの変異が原因であることが確かめられた。V p s Rは転写活性化因子であると予測されるので、本発明者は、それがビブリオ・コレラの運動性を制御するか否かを思索した。V p s R変異体(D K 5 6 2およびD K 5 8 1)について行った運動性試験は、変異体が親N 1 6 9 6 1と比較してその運動性を常に~ 5 0 %低減していることを示した(データは示していない)。ビブリオ・コレラ細胞は典型的には運動性であり、運動性は毒性に重要である(Yancey et al., 1978およびRichardson, 1991)ので、V p s Rがまたビブリオ・コレラの毒性において役割を担い得るかを思索することを試みた。V p s RはE P S (v p s) 生合成遺伝子および可能性のある他の表現型を調節する際に重要であるが、V p s R発現を促進する条件およびv p s 遺伝子を調節するその機序はあまりよく分かっていない。

10

20

【 0 0 8 8 】

A m i Bアミダーゼはしわ状表現型への切りかわりにおいて役割を担う

A m i B (N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ) タンパク質は、a m i B 遺伝子 (V C 0 3 4 4) によりコードされる。ビブリオ・コレラのしわ状株は運動性が影響されていることが既に見出されている (Ali et al., 2002) ので、a m i B 変異体を試験し、その運動性が影響されているかを確かめた。運動性アッセイは、A m i B 変異体 (株 D K 6 3 0) がその親 N 1 6 9 6 1 (領域 2 6 mm) と比較してその運動性を常に ~ 5 0 % 低減されている (領域 1 0 mm) ことを示した (図 3) 。これらの結果は、A m i B がビブリオ・コレラの運動性およびしわ状表現型に影響することを示唆している。

【 0 0 8 9 】

細菌細胞壁は、典型的には、ムレインまたはペプチドグリカンとして知られているヘテロポリマーからなる。多くのグラム陰性細菌は、1世代当たりそのムレインの50%までを退化させ、それを繰り返して新たなムレインを形成する (Goodell, 1985 ; Park, 1993) 。 N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼは、しばしば、自己溶解または微生物の細胞壁加水分解と関連する。意外なことに、A m i B のような中隔を開裂するグラム陰性細菌の酵素は、最近でも数種で研究されているのみであり、エスケリキア・コリにおいて、A m i B 変異体は分離していない細胞からなる長い鎖として成長することが見出された (Heidrich et al., 2001 および Holtje et al., 2001) 。アゾトバクター・ビネランジー (Azotobacter vinelandii) において、N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼは、アゾトバクター・ビネランジーのその細胞壁を再利用する能力によりアルギン酸産生と結びつく (Nunez et al., 2000) 。

30

40

【 0 0 9 0 】

B L A S T 検索により、ビブリオ・コレラのA m i B 配列が、シュードモナス・アエルギノーサ ($7 \times 10^{-7.8}$) 、サルモネラ・エンテリカ・チフィウム (Salmonella enterica Typhi) ($7 \times 10^{-6.9}$) 、エスケリキア・コリ O 1 5 7 : H 7 ($6 \times 10^{-5.7}$) 、およびエルシニア・ペスチス ($6 \times 10^{-5.0}$) を含む多種多様な種において見出されるN - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼに高度に類似することが示された。ビブリオ・コレラ株N 1 6 9 6 1のA m i Bは、セリン (9 . 5 %) 、プロリン (6 %) 、およびスレオニン (6 %) が異常に濃縮した59 k D aのタンパク質であると推定される。かかる組成は、グラム陽性細菌の細胞壁と関連するタンパク質ドメインに共通し (Fischetti et al., 1991) 、ラクトコッカス・ラクチス (Lactococcus lactis) の推定ペプチドグリカ

50

ン加水分解酵素 (a c m B) に類似する (Huard et al., 2003)。エスケリキア・コリおよびエルシニア・ペスチスにおいてと同様ビブリオ・コレラにおいて、a m i B は、D N A ミスマッチ修復において役割を担う m u t L の直ぐ上流に位置する (Tsui et al., 2003 および Parkhill et al., 2001)。P S O R T を用いたコンピューター分析により、ビブリオ・コレラの A m i B は切断可能な N 末端シグナル配列を有すると予測され、T M p r e d を用いた分析により、A m i B が 2 つの膜貫通型ドメイン (スコア 2 3 6 3) (一方は N 末端 (アミノ酸 1 0 ~ 2 9) に位置し、これは N 末端シグナルアンカー配列も表し得、もう一方の膜貫通型ドメインは C 末端 (アミノ酸 4 4 6 ~ 4 6 5) に位置する) を有することが強く予想される。s e c 依存性シグナル配列がまた予測されると、T m p r e d は N 末端にある膜貫通型領域を推測すると予測される。ビブリオ・コレラの A m i B はまた、その C 末端にある L y s M (リジンモチーフ) ドメインを含有すると予測され、そしてこれは細胞壁分解に関与する酵素において見出されたものである (Bateman et al., 2000)。興味深いことに、ビブリオ・コレラの A m i B は、種々の哺乳類接着タンパク質の表面結合ドメインとしばしば関連する A r g - G l y - A s p (R G D) モチーフを含有する。

10

【0091】

A m i B は、エスケリキア・コリのような他種において中隔と関連する (Heidrich et al., 2001 および 2002) ので、ビブリオ・コレラの A m i B 変異体は、その細胞形態ならびにしわ状表現型が影響されているかどうかを決定した。細胞を調べると、細胞の形態および配列において A m i B 変異体 (図 4 B) と野生型株 (図 4 A) との間に明らかな違いが示された。A m i B 変異体の多くの細胞は形が変化し、いくつかは細胞の大きさ (長さおよび幅) が劇的に増大していた。A m i B 変異体は、鎖状の細胞の割合が高いようであった。この知見により、細胞分裂または中隔が影響され得ることが示唆される。野生型と A m i B 変異体 D K 6 3 0 との間で成長速度の差は観察されず (データは示していない)、このことは細胞構造の差が成長速度の差に関与しないことを示唆している。L B プレート上で成長させた細胞の知見は継代培養において形質を維持するものである一方、L B ブロスで成長させた株の間で明らかに劇的な差は観察されなかった (データは示していない)。例えば、電子顕微鏡を用いて A m i B 変異体の細胞構造および形態をより詳細に分析するためにさらなる研究が必要であるが、この実施例に示す研究結果は、ビブリオ・コレラの細胞分裂、構造または中隔としわ状表現型との間に結び付きがあることを示唆している。これらの知見は、原核生物のアミダーゼの新たな機能、すなわちしわ状表現型への切りかわりおよびバイオフィーム形成に重要であることの証拠をもたらすものである。

20

30

【0092】

ビブリオ・コレラの R o c S : G G D E F および E A L ドメインを有する保存された調節タンパク質はしわ状表現型を調節する

本発明者の研究室が特に興味を持った別の種類の変異体は、R o c S (前述のデータベースにおける「P d e A 様」タンパク質) と呼ばれ、G G D E F および E A L ドメイン含有推定タンパク質をコードする遺伝子座 V C 0 6 5 3 における欠失を有するものであった。3 種の独立した接合体から r o c S において変異を含有する 3 種の独立した変異体が単離されたことに注意することが重要である。この結果は、ビブリオ・コレラの R o c S が、r E P S 産生、しわ状表現型、バイオフィーム形成、およびおそらく他の表現型において重要な役割を担うことを示唆している。この変異体におけるしわ状表現型の欠失は、野生型 N 1 6 9 6 1 と R o c S (D K 5 6 7) 細胞間の成長速度の差によっては説明されない (データは示していない)。ビブリオ・コレラの R o c S 変異体はしわ状表現型への切りかわりが欠失しているようであるという知見は、上記の運動性の試験を促すものであった。運動性アッセイにより、R o c S 変異体 (D K 5 6 7) が、その親である N 1 6 9 6 1 (領域 2 6 m m) と比較して常にその運動性が > 5 0 % 低減していることが示され、このことは、この遺伝子座がまたビブリオ・コレラの運動性に影響することを示唆している (図 3)。これらの結果に基づき、本発明者は、ビブリオ・コレラの R o c S (および c - ジ - G M P) が、種の毒性、バイオフィームおよび存続において役割を有するものを含

40

50

むいくつかの表現型を調節すると考える。

【0093】

興味深いことに、GGDEFドメインは、セルロース（ α -1,4-グルカン）合成の調節に関与することが知られているタンパク質において示された（Ausmees et al., 2001）。アセトバクター・キシリナム、リゾビウム・レグミノサルム生物型トリフォリー（*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*）およびアグロバクテリウム・ツメファシエンスにおけるセルロース産生は、2つの酵素、ジグアニル酸シクラーゼ（Dgc）およびc-ジ-GMPジエステラーゼ（PdeA）（それぞれ、細胞において新規シグナル伝達分子であるc-ジ-GMPのレベルを調節する）の逆効果により調節される（Amikam et al., 1989およびRoss et al., 1990および1991）。ジグアニル酸シクラーゼは、セルロース産生を特異的に活性化するc-ジ-GMPの形成を触媒することにより正の調節因子として作用し、一方ホスホジエステラーゼはc-ジ-GMPを消化し、セルロースを負に調節する。c-ジ-GMP分子は、セルロース生合成の可逆アロステリック活性化因子（エフェクター）であると予測される（Ross et al., 1991）。さらに、共通する唯一のエLEMENTとしてGGDEFドメインを有するタンパク質をコードする異なる種由来の遺伝子を用いた遺伝的相補性研究により、GGDEFドメインがジグアニル酸シクラーゼ活性において役割を担い、c-ジ-GMPレベルの調節において重要であることが示唆される（Ausmees et al., 2001）。本発明者の研究室は、ビブリオ・コレラのRocSタンパク質が、EPS様物質の産生および増大したバイオフィーム形成と関連するしわ状表現型への切りかわりにおいて鍵となる役割を担うことを見出した。

10

20

【0094】

ビブリオ・コレラのRocSのBLAST検索により、それが高度に保存され、シュードモナス・アエルギノーサ（PA0575；42% id； $5e^{-9.2}$ ）、パチルス・アントラシス（BA5593；37% id； $6e^{-9.0}$ ）、ラルストニア・ソラナセアルム（*Ralstonia solanacearum*）（RSC0588；36% id； $4e^{-8.8}$ ）、およびアセトバクター・キシリナム（*A. xylinum*）（c-ジ-GMPジグアニル酸シクラーゼDgc；40%， $9e^{-8.2}$ ）を含む多種多様な他の種において見出された推定タンパク質と有意な相同性を有することが示された。dgcおよびpdeA遺伝子はいくらかの相同性を有し、類似のドメイン構築物を有するが、rocS変異体はEPS様物質を産生できないという本明細書での知見は、セルロースを産生できないジグアニル酸シクラーゼ（dgc）変異体と一致する。ビブリオ・コレラのRocSは、PdeAよりアセトバクター・キシリナムのDgcと有意に高度な類似性を有する（データは示していない）。最近の報告によると、「RocS」相同体をシュードモナス・アエルギノーサ（これはバイオフィーム形成に必須なようである）（Connolly et al., 2003）およびビブリオ・パラハエモリチクスにおいて（これは莢膜多糖産生を調節する）（Gauvener et al., 2003）同定された。加えて、疫病細菌であるエルシニア・ペスチス（*Y. pestis*）の自己凝集表現型（しわ状表現型の典型である）は、GGDEF含有タンパク質HmsTを必要とする（Jones et al., 1999）。相同な調節（GGDEF含有）タンパク質がいくつかの種で見出され、しわの寄ったコロニー、EPS産生、およびバイオフィーム形成と関連付けられたが、この過程を調節する際のそれらの役割はあまり研究されていない（一部は、利用可能な試薬がないことに起因する）。GGDEF含有タンパク質はヌクレオチドシクラーゼ活性を有し（Ausmees et al., 2001；Ross et al., 1987；Pei et al., 2001およびTal et al., 1998）、細菌において広がっている（Croft et al., 2000およびGalperin et al., 2001）ことを示唆する証拠は増えている。原核生物におけるこのタンパク質の相同体およびc-ジ-GMPの可能性のある広範囲の出現は、共通する調節系、およびそれらが、ビブリオ・コレラにおけるEPS産生、しわ状表現型、およびバイオフィーム形成を含む表現型および多種の表現型を調節する際に重要な機能を有し得ることを示唆している。

30

40

【0095】

しわ状様表現型は、サルモネラ・エンテリカ・エンテリティデス（Petter, 1993）、サルモネラ・エンテリカ（Anriany et al., 2001）、ビブリオ・パラハエモリチクス（Gauv

50

ener et al., 2003)、シュードモナス・アエルギノーサ (D'Argenio et al., 2002) およびエンテロバクター・サカザキ (Farmer et al., 1980) を含むいくつかの種で報告されている。現在、しわ状表現型はビブリオ・コレラおよびいくつかの他の種で重要な役割を有し得ることが次第に認められつつある。このことは、これらの「変異体」が「氷山の一角」を表し得ることを示唆している。しわ状変異体がバイオフィルム形成、特にニッチまたは特に環境下で特異的な役割を満たすことを示唆するデータが増えている。ビブリオ・コレラの場合、rEPS 産生、しわ状表現型、および HFRP は、特に環境下での細胞亜種に対するいくつかの進化的または適応した利点をもたらし得る。

【0096】

この実施例において示す研究において、本発明者の研究室は、ビブリオ・コレラの滑らかな表現型からしわ状表現型への高頻度での切りかわりを促進する条件を同定し、これを利用して、滑らかな表現型としわ状表現型との間の分子切りかわりに関与する遺伝子を同定し、研究した。ビブリオ・コレラ株のいくつかは、特定の条件下での EPS 産生、増大したバイオフィルム形成、および増大した細胞生存と関連するしわ状表現型への高頻度シフトの有効な機序を引き出したようである。増大したバイオフィルム形成を導くことができる切りかわる能力は、特に、株が同じ生態学的ニッチについて競い合い、耐性、増大したコロニー形成、または細胞凝集を促進する表現型の若干のバリエーションが適応および生存に重要である環境下で適応する利点をもたらし得る。

【0097】

実施例 3

スタフィロコッカス・アウレウスはヒトおよび動物の重要な病原体であり、その抗生物質耐性は公衆衛生の関心事である。バイオフィルム形成は発病に必須であり、バイオフィルムを形成し、伝統的な抗生物質処置に抵抗する能力により、しばしば処置は困難なものとなり、感染が持続する。従って、新規抗菌アプローチは科学、医療、および農業コミュニティにとって非常に興味を引くものである。本発明者は、実施例 1 において環状ジヌクレオチドシグナル伝達分子である c - ジ - GMP (3'5' - 環状ジグアニル酸) のレベルを調節することが原核生物の表現型を調節する際に適用できると提案した。この実施例の以下に記載する実験において、細胞外 c - ジ - GMP は、メチシリン耐性 (MRSA) 株を含むスタフィロコッカス・アウレウスのヒト臨床およびウシ乳房炎に対する活性を示す。本実施例により、化学的に合成した c - ジ - GMP は生理食塩水に溶解性かつ安定であり、沸騰、および酸およびアルカリに曝露した後も安定であることが示される。細胞外 c - ジ - GMP でのスタフィロコッカス・アウレウスの処置は、無処置対照と比較して、液体培地における細胞と細胞 (細胞間) の接着相互作用を阻害し、ヒトおよびウシ単離物における細胞と表面の相互作用およびバイオフィルム形成を低減 (> 50%) した。c - ジ - GMP は、スタフィロコッカス・アウレウスのヒト上皮 HeLa 細胞との接着を阻害し、そして c - ジ - GMP は HeLa 細胞への明らかな毒性を示さず、マウスにおいて致命的ではなかった。グアノシンヌクレオチドアナログ GMP は、バイオフィルムに対する効果は劣っており、一方 5' - GMP は効果を有していなかった。本明細書におけるデータは、スタフィロコッカス・アウレウスが細胞外 c - ジ - GMP シグナルに感受性であり、応答し得ることを示唆している。単独、あるいは他の抗菌剤と組み合わせて用いられる場合、c - ジ - GMP のような環状ジヌクレオチドは、バイオフィルムの阻害および制御、ならびに感染症の制御および処置における新規かつ魅力的なアプローチとなる。

【0098】

材料および方法

用いた c - ジ - GMP、cGMP および 5' - GMP ヌクレオチド c - ジ - GMP ジアンモニウム塩を純粋かつ高収率で製造する最近記載された新規合成方法を用いて、本実施例の研究において用いる c - ジ - GMP を純粋な形で生化学的に合成した (図 5A) (Hayakawa et al., 2003)。使用前に、まず分子を 0.9% NaCl 中に再懸濁し、2 mM 溶液を調製して、凍結乾燥させた c - ジ - GMP の純度および安定性を決定し、次に HPLC 分析および ESI-TOF MS 分光計により確認した。cGMP (グアノシ

10

20

30

40

50

ン 3' , 5' - 環状モノリン酸塩, Sigma #G7504) および 5' - GMP (グアノシン 5' - モノリン酸塩, TCI, Tokyo Kasei Kogyo Co.) ヌクレオチドも用いた。別段述べてない限り、それぞれのヌクレオチドの 0.9% NaCl 中の 4mM ストック溶液を調製し、必要になるまで 4℃ で保存した。

【0099】

用いた細菌株および成長培地 スタフィロコッカス・アウレウスのヒト臨床単離物を本研究において用い、-70℃、50% グリセロール中で保存した。スタフィロコッカス・アウレウス株 DK825 は、Veterans Affairs Medical Center (Baltimore, MD、緊急処置ベット数およそ 200 床) の患者の血液培養物から 2003 年に単離されたものである。DK825 は VAMC の診断的微生物学研究室により単離され、標準的なプレーティング技術、コアグラゼ検出用 BactiStaph Latex 150 試験キット (Remel) を用いたラテックス凝集、および抗生物質感受性試験により、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (MRSA) であると確認された (Sensititre plates, Microbiology Systems)。スタフィロコッカス・アウレウス株 15981 は、Universitaria de Navarra, Spain (Inigo Lasa、パーソナルコミュニケーション) の臨床研究室によって耳炎患者から 1999 年に単離された高接着性高バイオフィルムヒト臨床株である (Valle et al., 2003)。スタフィロコッカス・アウレウス 15981 は、天然の agr 変異体であり、MET、AMX、CLI、ERY、DOX、FOF、VAN、CIP に感受性であり、GEN に耐性である。本研究で用いた野生型ウシ潜在性乳房炎株は、V329 (高バイオフィルム株) (Cucarella et al., 2001)、V299 (bap 陰性 icA DBC 陽性) (Cucarella et al., 2004) および V315 (bap 陰性および icA DBC 陰性) (Cucarella et al., 2004) であった。スタフィロコッカス・アウレウス株 M556 (V329 のアイソジェニックなトランスポゾン挿入 bap 変異体) (Cucarella et al., 2001) も用いた。別段示していない限り、スタフィロコッカス・アウレウス株は、37℃、ヒツジ血液寒天プレート上、または 0.25% グルコース添加トリプティックソイブロス (TSB, Difco) 中で成長させた。

【0100】

c-ジ-GMP 安定性試験 用語 c-ジ-GMP を本明細書で用いるが、c-ジ-GMP ジアンモニウム塩 (遊離ニリン酸ではない) をこれらの安定性試験のために用いた。(i) 沸騰水中: 2mM c-ジ-GMP 水中溶液を、c-ジ-GMP 2.42mg (3.3μmol) をイオン交換ノイオンを含まない水 (蒸留水をイオン交換樹脂を通して調製した) 1.65mL に溶解して調製した。この溶液を 100℃ で 10 分間加熱し、次に減圧下で濃縮した。生じた残渣を、以下に示す条件下で HPLC 分析の対象とした。(ii) pH3 の溶液中: 上記の 2mM c-ジ-GMP 水溶液 500μl (1μM c-ジ-GMP を含有) を 1mM HCl 20mL 中に溶解し、pH3 (pHメーターで確かめた) を得た。得られた溶液を室温にて 1 時間攪拌し、次に、0.1mM NaOH 200mL を添加して中和した。水を減圧下で蒸発させ、得られた残渣を HPLC 分析の対象とした。(iii) pH10 の溶液中: 上記 2mM c-ジ-GMP 水溶液 500μl (1μM c-ジ-GMP を含有) を、0.1mM NaOH 水溶液 200mL 中に溶解し、pH10 (pHメーターで確かめた) の溶液を得た。得られた溶液を室温にて 1 時間攪拌した。反応物を 1mM HCl 20mL を添加してクエンチした。得られた中和溶液を減圧下で濃縮し、残渣物質を HPLC 分析の対象とした。HPLC 分析を、Waters 2996 Photodiode Array Detector を備えた Waters 2695 Separation Module 上で次の条件下で行った。カラム: Nacalai Tesque COSMOSIL 5C18-AR-II カラム (4.6mm (直径) × 250mm (長さ)); 検出: 254nm の紫外線; 温度: 40℃; 溶出: A = 0.9% NaCl (水溶液)、B = 水: アセトニトリル 20: 80 混合物; 流速: 1mL / 分; 0 ~ 10 分: A 100%; 10 ~ 60 分: A 100% / B 0% から A 40% から B 60% への直線的勾配。

【0101】

抗生物質感受性試験 感受性試験を、Sensititre マイクロタイタープレートにて製造元

10

20

30

40

50

(Microbiology Systems) の指示に従い行った。

【 0 1 0 2 】

スタフィロコッカス・アウレウスの成長速度に対する効果 スタフィロコッカス・アウレウス D K 8 2 5 を、グリセロールストックから血液寒天プレート上に継代培養し、37 で18時間インキュベーションした。次に、シングルコロニーを T S B ブロス (0 . 2 5 % グルコース添加) 5 m l に植え付け、37 で4時間250 r p m で振盪しながらインキュベーションした。一晚培養物の 10^{-3} 希釈物 1 0 0 μ l アリコート、T S B ブロス 5 m l 含有試験管に開始細胞カウント 10^5 c f u / m l (プレーティングにより確かめた) で植え付けた。「処置」試料のため、c - ジ - G M P の適当なアリコートを添加し、200 μ M c - ジ - G M P (最終濃度) とした。負の「無処置」対照として、T S B 含有試験管および等量の 0 . 9 % N a C l を研究に含めた。時間 0 で、それぞれの試料 5 0 μ l を血液寒天プレートに播種し、開始 c f u / m l を測定した。次に、試験管を 37 で8時間、振盪条件下でインキュベーションし、全試験管由来のアリコートを 3 0 分毎に播種した。

10

【 0 1 0 3 】

試験管凝集アッセイおよび光学顕微鏡

18時間後の血液寒天プレート由来コロニーを P B S 1 m l に植え付け、 $\sim 5 \times 10^8$ c f u / m l (プレートカウントで確かめた) 含有 0 . 5 McFarland 標準とした。次に、0 . 5 McFarland 標準由来のアリコート 5 μ l を、T S B 1 m l 含有 5 m l ポリスチレンチューブに植え付け、 $\sim 10^5$ c f u / m l (プレートカウントで確かめた) とした。これらのチューブを、c - ジ - G M P 5 0 μ l と共に植え付けて、最終濃度 200 μ M c - ジ - G M P を得るか (「処置」試料を表す) 、または対照として 0 . 9 % N a C l 5 0 μ l と共に植え付けた (「無処理」対照を表す) 。培養物を 37 で24時間静的にインキュベーションした。インキュベーション後、これらの培養物を肉眼的および顕微鏡 (Zeiss Axioskop) で調べ、視覚可能な細胞と細胞の凝集の存在または不存在を調べた。

20

【 0 1 0 4 】

スタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィーム形成に対する c - ジ - G M P の作用
スタフィロコッカス・アウレウス株を、グリセロールストックから血液寒天プレートに継代培養し、37 で18時間インキュベーションした。シングルコロニーを、T S B ブロス 5 m l に清潔なループで植え付け、37 で18時間250 r p m で攪拌しながら、分光光度計 (SpectraMAX 250, Molecular Devices) を用いて分光学的に測定して O . D . $_{660}$ 値が 3 . 0 に達するまでインキュベーションした。インキュベーション後、培養物を新しい T S B で 1 : 250 希釈し、希釈した培養物 200 μ l を平底ポリスチレンマイクロタイタープレート (Evergreen Scientific) のウェルに移した。バイオフィーム形成に対する c - ジ - G M P 処置の効果を試験するために、c - ジ - G M P の 10 倍希釈物を含有する「処置」試料の連続希釈物を T S B 中にセットアップした。これは次の最終濃度 (0、2、20、および 200 μ M) の c - ジ - G M P を含有するものであった。これらのバイオフィーム実験において、0 . 9 % N a C l を等量、異なるウェルセットに加え、これは「無処置」対照試料を表すものとした。次に、マイクロタイタープレートを 37 で24時間または48時間静的にインキュベーションした。インキュベーション後、上清を注意して捨て、ウェルを P B S 260 μ l で2回洗浄した。次に、プレートを、ペーパータオル上で30分間乾燥させ、その後 0 . 1 % クリスタルバイオレット 260 μ l を各ウェルに添加し、プレートを室温にて30分間インキュベーションした。クリスタルバイオレットを捨て、プレートを水で簡単に洗浄し、ウェルを30分間乾燥せ、次に、D M S O 260 μ l を各ウェルに添加し、1時間軽く振盪し、O . D . $_{570}$ 値を分光光度計 (SpectraMAX 250, Molecular Devices) を用いて測定した。これらのバイオフィームアッセイの結果は、デュプリケートで試験した少なくとも3種の独立したコロニーから得られたデータに基づくものであった。

30

40

【 0 1 0 5 】

50

スタフィロコッカス・アウレウスの既に形成されたバイオフィルムに対する c - ジ - G M P の作用 スタフィロコッカス・アウレウス D K 8 2 5 を、グリセロールストックから血液寒天プレートに継代培養し、37 で静的にインキュベーションした。シングルコロニーを T S B ブロス (0 . 2 5 % グリコース含有) 5 m l に植え付け、37 で一晩、250 r p m で振盪しながら、培養物が O . D . ₆₆₀ 値 ~ 3 . 0 に達するまでインキュベーションした。インキュベーション後、培養物を、新たな T S B ブロスで 1 : 2 5 0 希釈し、希釈した培養物 2 0 0 μ l をマイクロタイタープレートの各ウェルに移し、スタフィロコッカス・アウレウス培養物を有するウェルを含有するプレートを 37 で 2 4 時間静的にインキュベーションした。2 4 時間後、c - ジ - G M P を適当量添加し、最終濃度 2 0 0 μ M とし、これを「処置」試料を表すものとした。「無処置」の対照として、0 . 9 % N a C l 同量を独立したウェルに加えた。次に、プレートを 37 でさらに 2 4 時間静的にインキュベーションした。インキュベーション後、培養物を捨て、マイクロタイタープレートを 1 × P B S で 2 回洗浄した。等量 (2 6 0 μ l) の 1 × P B S を洗浄のため各ウェルに加えた。次に、プレートをペーパータオル上で ~ 3 0 分間乾燥させた。0 . 1 % クリスタルバイオレット 2 6 0 μ l を各ウェルに添加し、バイオフィルム中の細胞を染色し、プレートを室温にて 3 0 分間インキュベーションした。クリスタルバイオレットを捨て、プレートを t a p 水で軽く洗浄し、ペーパータオル上で 3 0 分間乾燥させた。D M S O 2 6 0 μ l を各ウェルに添加し、1 時間軽く振盪した。バイオフィルムの量を定量的にアッセイするため、O . D . ₅₇₀ を分光光度計 (SpectraMAX 250, Molecular Devices) により測定した。結果は、デュプリケートで試験した少なくとも 3 種の独立したコロニーに基づくものであった。

【 0 1 0 6 】

上皮細胞アッセイ H e L a 細胞 (A T C C C C L 2) を完全培地 (グルタミン (In vitrogen) および 5 0 p g / m l ゲンタマイシンを含む 1 0 % F B S (Sigma) D M E M / F 1 2) 中コンフレントになるまで成長させ、0 . 1 % トリプシン - E D T A でトリプシン処理した。H e L a 細胞約 1×10^5 をチャンバースライドの各ウェルに播種し、次に、H e L a 細胞を 37 、5 % C O ₂ 中で少なくとも 1 8 時間、8 5 % コンフレントとなるまでインキュベーションした。感染に先立ち、H e L a 細胞を温 P B S で 2 回洗浄し、次に、温 F M E M / F 1 2 5 0 0 μ l を各ウェルに添加した。細菌接着アッセイのため、スタフィロコッカス・アウレウス株 D K 8 2 5 の一晩培養物を L B ブロス中、37 、250 r p m で振盪しながら一晩成長させた。インキュベーション後、一晩培養物 1 m l をペレット化し、P B S で 2 回洗浄し、P B S 1 m l に再懸濁した。ウェル中の H e L a 細胞を H B S S 5 0 0 μ l で 2 回洗浄し、所望の濃度 (0 、2 、2 0 、および 2 0 0 μ M) の c - ジ - G M P を含む D M E M アリコート調製した。各濃度の c - ジ - G M P を含有する D M E M (5 0 0 μ l) を H e L a 細胞含有ウェルに植え付け、次にスタフィロコッカス・アウレウス 1 0 μ l (~ 10^7) (M O I H e L a : 細菌 ~ 1 : 1 0 0) を添加した。上皮細胞アッセイを C O ₂ 中で 4 5 分間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を P B S 5 0 0 μ l で 2 回洗浄し、2 % ホルマリンで 2 0 分間固定した。細胞を再び P B S で 2 回洗浄し、1 0 秒間ギムザ染色し、P B S で 3 回洗浄し、次に細胞を水中の 9 0 % グリセロール 4 0 μ l で覆い、カバースライドを置いた。スライドを光学顕微鏡 (Zeiss Axioskop) 下、6 3 0 × m a g で観察した。1 0 0 個の個々の H e L a 細胞との細菌の接着レベルを、それぞれデュプリケートの処理について計測し、平均を決定した。

【 0 1 0 7 】

安全性および毒性アッセイ H e L a 細胞の毒性研究のため、種々の濃度 (0 、2 5 、5 0 、1 0 0 、2 0 0 、および 4 0 0 μ M) の c - ジ - G M P を、完全培地 (細菌を含まない) 中上記のように調製した H e L a 細胞含有チャンバースライドの別々のウェルにて試験した。H e L a 細胞形態を 1 2 、2 4 、および 4 8 時間インキュベーションした後、顕微鏡で調べた。マウスに投与した c - ジ - G M P の可能性のある致死性も調べた。これらの研究において、成体メス C D - 1 マウスおよび生後 5 日間のマウスに、2 0 0 μ M

c - ジ - G M P 5 0 μ L を経口で植え付け、c - ジ - G M P 処置の 2 4 時間後に調べた。

【 0 1 0 8 】

結果および考察

医療器具のような種々の表面上または組織上でバイオフィルムを形成するスタフィロコッカス・アウレウスの能力は、疾患の発病において重要かつ必須の第 1 工程である。コミュニティおよび病院内のスタフィロコッカス・アウレウスの総合的普及率、バイオフィルムを形成するその能力、およびスタフィロコッカス・アウレウスが複数の抗生物質にしばしば耐性であるという事実により、スタフィロコッカス・アウレウスは主要な公衆衛生の課題となる。従って、ヒトおよび動物におけるバイオフィルム形成を低減させる新規介入および抗菌方法は、対応する抗生物質感受性の増大、およびより有効な予防および処置戦略となり得る。この研究は、細胞外 c - ジ - G M P がスタフィロコッカス・アウレウスのヒトおよび動物単離物における細胞と細胞との相互作用およびバイオフィルム形成を阻害することを示している。

10

【 0 1 0 9 】

スタフィロコッカス・アウレウスにおける G G D E F ドメインの同定は c - ジ - G M P との結びつきを示唆する。c - ジ - G M P は G G D E F アミノ酸ドメインを含有するタンパク質と関連する。G G D E F ドメインは、アデニル酸シクラーゼ様折りたたみを有し、環状ジグアニル酸合成酵素として作用する ~ 1 8 0 個のアミノ酸タンパク質フラグメントである。これらのドメインは、保存された G G (D / E) E F モチーフ (配列番号 : 5) を有するが、また多くの他の保存された残基も有する (Galperin, 2001 および 2004)。G G D E F タンパク質は、細菌のエキソ多糖類、バイオフィルム形成、コロニー形成、および接着の調節において重要であるという知見が増大している (Bomchil et al., 2003 ; D' Argenio et al., 2002 ; Jones et al., 1999 および Roumping et al., 2000)。これらの種類のタンパク質は細菌に広く行きわたっており、これは、広範囲の種が標的としての可能性を有し、c - ジ - G M P レベルを調節することで調節される表現型および多くの種が G G D E F ドメインを含む多数のタンパク質を有することを示唆している (Galperin, 2001 および 2004)。興味深いことに、C O G データベースの検索により、スタフィロコッカス・アウレウスが、C 末端に G G D E F ドメインを含むただ 1 つのタンパク質 (S A 0 7 0 1、C O G 2 1 9 9)、および修飾 G G D E F ドメインを含む別のタンパク質 (S A 0 0 1 3、C O G 3 8 8 7) を有することが示される (Tatusov et al., 2001)。P f a m 分析 (pfam. wustl. edu) によると、S A 0 7 0 1 の N 末フラグメントは、5 T M - 5 T M R _ _ L Y T タイプ (5 個の推定膜貫通型セグメント、P f a m エントリー P F 0 7 6 9 4) の不可欠な膜感覚ドメインであると予測され、それゆえ、ジグアニル酸シクラーゼアウトプットドメインを含む膜受容体であると予測される。不運なことに、スタフィロコッカス・アウレウス中のこれらの推定シグナル伝達タンパク質の役割、およびそれらが c - ジ - G M P と結びつく可能性があるか否か、c - ジ - G M P がスタフィロコッカス・アウレウスにより作られるか否か、および c - ジ - G M P の調節効果が全ての種で類似するか否かはまだ分かっていない。

20

30

【 0 1 1 0 】

c - ジ - G M P の安定性 種々の物理的条件下および処置下での c - ジ - G M P の安定性はあまりわかっていない。しかしながら、c - ジ - G M P が抗菌戦略の一部または抗菌剤として用いられるべきものであると、その安定性はより研究されることを必要とする。本発明者の研究室は、数種の保存条件下での保存後、次に熱、酸 (p H 3) およびアルカリ (p H 1 0) 処理を含む種々の曝露後に c - ジ - G M P の安定性を決定した。

40

【 0 1 1 1 】

イオンを含まない蒸留水 (蒸留水をイオン交換樹脂カラムを通して調製される) に H P L C 分析の直前に再懸濁され、2 m M ストックとなる、c - ジ - G M P のきちんとした (凍結乾燥粉末由来物) 形の H P L C 分析は、数日間 - 7 8 での c - ジ - G M P のきちんとした形の保存は凝集分子 (構造は現時点ではわかっていないが、決定されつつある)

50

データは示していない))を形成することを示した。さらに、希釈剤として水を含む2 mM ストック溶液の任意の温度(10~20)での幾日間かの保存は、凝集産物の形成を生じる。しかしながら、興味深いことに、溶液を0.9% NaCl濃度に調節すると、凝集分子はモノマー型に戻ることを見出した(HPLCおよびESI-TOF MS分光分析により決定)(データは示していない)。c-ジ-GMPは、100 mM リン酸バッファー中で少なくとも1ヶ月間-78、4、および25で安定であり、構造も変化しなかった(データは示していない)。0.9% NaCl溶液中で、HPLC分析により、モノマー構造のc-ジ-GMPは、-78、4、および25で少なくとも3ヶ月間保存後非常に安定であった(図5B)。c-ジ-GMPはまた、100 mM 酢酸アンモニウムバッファー中、少なくとも1ヶ月間、-78、4、および25で安定であり、構造も変化を受けないことを見出した。これらの結果は、c-ジ-GMPのストック溶液が、c-ジ-GMPが安定であり、少なくとも数ヶ月間モノマー型で残るように、0.9% NaCl中に調製されるべきであることを示唆している。

10

20

30

40

50

【0112】

セルロース産生を活性化する際のc-ジ-GMPの役割を調べたグルコンアセトバクター・キシリナムにおけるRoss等の(Ross et al., 1991)従前の研究と一致して、この研究のHPLC分析は、化学的に合成されたc-ジ-GMPは100に10分間曝露した後安定であることを示した。Rossは、「活性化因子」(セルロース活性化活性により測定)が比較的強いアルカリ(0.2N NaOH、pH~13.5、37で24時間)での処置の後も不安定であることを見出したが、本研究で行ったHPLC分析は、c-ジ-GMPが中程度のアルカリ(0.0001N NaOH、pH10、20~25で1時間)での処置後安定であることを示唆するものであった。Ross等(Ross et al., 1991)による従前の研究における知見と一致して、本発明者の研究室のデータは、化学的に合成されたc-ジ-GMPが酸処理(0.001N HCl、pH3、20~25で1時間)後安定であることを示した。これらの研究に基づき、c-ジ-GMPは安定であり、溶解性の低分子量の分子である。

【0113】

スタフィロコッカス・アウレウス株DK825の抗生物質感受性

スタフィロコッカス・アウレウスDK825をさらに特徴付けるために、抗生物質感受性試験を通常用いられる抗生物質に対して行った。DK825についての抗生物質感受性試験を次のMICプロファイル($\mu\text{g}/\text{ml}$)で行った: ペニシリン, PEN > 8; アンピシリン, AMP 4; オキサシリン, OXA > 2; テトラサイクリン, TET > 32; リファンピン, RIF > 2; クラリスロマイシン, CLR > 4; レボフロキサシン, LVX 2; シプロフロキサシン, CIP > 2; モキシフロキサシン, MXF 2; クリンダマイシン CLI > 2; エリスロマイシン, ERY > 4; バンコマイシン, VAN < 0.5。これらの知見はさらに、スタフィロコッカス・アウレウスDK825が通常用いられる多数の抗生物質に耐性であるが、バンコマイシン感受性であることを示した。

【0114】

c-ジ-GMP処置は、スタフィロコッカス・アウレウス細胞と細胞の相互作用を予防する。スタフィロコッカス・アウレウスに対するc-ジ-GMPの効果についての1次実験により、c-ジ-GMPがスタフィロコッカス・アウレウスの成長速度に対する効果を有するか否かを調べた。8時間までの成長速度を1時間毎に調べ、200 μM c-ジ-GMPが成長速度に対して明らかな効果を有さないことを示した。次に、本発明者の研究室は、c-ジ-GMP処置が、液体培地中での24時間静的インキュベーション後にスタフィロコッカス・アウレウス細胞の肉眼的成長および出現に影響を及ぼすか否かを試験した。インキュベーション後、処理した培養物および無処理培養物を、視認できる細胞と細胞の凝集(clumping)および凝集について視覚的に調べた。スタフィロコッカス・アウレウスDK825の結果は、200 μM c-ジ-GMPで処理した培養物は、明らかに視認可能な細胞凝集または管底部でのベレットを現さなかった(図6A)が、無処理培養

物は明らかな細胞凝集およびペレットを示した(図6B)。c-ジ-GMPで処理した培養物および無処理培養物を播種すると、培養物間での最終細胞カウント(6×10^8 CFU/ml)に差はなかった。このことは、細胞と細胞の相互作用の障害が成長速度または最終細胞数の主要な差に寄与しないことをさらに示唆している。c-ジ-GMPに応答した管底部での細胞凝集に対する同様の効果を、いくつかの独立した野生型スタフィロコッカス・アウレウスウシ乳房炎株(V329、V299、V315)で観察した(データは示していない)。Cucarella等(Cucarella et al., 2001)による最近の研究により、管底部での細胞凝集の蓄積を、野生型V329について肉眼でのみ観察し、アイソジェニックなbap変異体M556では観察しなかった。株M556でのそれほど多くない視認可能な凝集を観察する一方で、本明細書での結果はc-ジ-GMP処理は、無処理培養物と比較して管底部でのM556細胞の細胞凝集を阻害することを明らかに示唆していた(図6Eおよび6F)。bap変異体であるM556株がica陽性であることに気づくことも重要である(Cucarella et al., 2001)。これらの2つの研究における知見を説明し得る2点の可能性は、Cucarella等の結果が振盪培養物に基づくものであること、または異なる供給源から得られたTSBが細胞成長および細胞相互作用に影響し得ることである。細胞凝集の障害は一貫し、同様のc-ジ-GMP処理(用いたc-ジ-GMPは独立して合成されたものである)後観察された。この肉眼的分析結果は、スタフィロコッカス・アウレウスが細胞外c-ジ-GMPに応答すること、およびc-ジ-GMP処理がヒトおよび動物単離物においてスタフィロコッカス・アウレウス細胞凝集を阻害することを示している。

10

20

【0115】

上記の処理培養物および無処理培養物間で観察される肉眼的な違いに横たわる基盤をさらに研究するために、これらの培養物における細胞をボルテックス処理し、グラム染色し、光学顕微鏡により視覚化した。スタフィロコッカスという名前は、「ブドウの房」を意味するギリシア語に由来する。しかしながら、DK825 c-ジ-GMP処理培養物のグラム染色試験は、典型的なブドウ様クラスターを示す無処理細胞(図6D)より液体培地中での細胞と細胞の相互作用および凝集(図6C)を劇的に減少したことを示した。図6における知見と同様に、そして肉眼的分析と一致して、少ない細胞間相互作用および凝集を野生型ウシ乳房炎株(V329、V299、V315)のグラム染色および光学顕微鏡像により観察した(データは示していない)。野生型株V329はbap陽性icaADBC陽性であり、一方野生型株V299およびV315は、それぞれbap陰性icaADBC陽性、bap陰性icaADBC陰性であることに気づくことが重要である(Cucarella et al., 2004)。bap遺伝子はウシ乳房炎単離物において少ない率でのみ存在すると思われるので、大抵のウシ乳房炎単離物はbap陰性であると思われる、bapはヒト単離物にも存在しないようである(Cucarella et al., 2001)。この実施例の実験において、アイソジェニックなbap変異体株M556における細胞凝集はその親V329よりずっと少ないが、データは、c-ジ-GMP処理がM556における細胞凝集を阻害することを示唆している(図6Eおよび6F)。野生型および変異体株の分析のこのデータは、細胞相互作用の障害がbapおよびicaADBC遺伝子クラスター独立であることを含意しているようである。重要なことに、肉眼的分析結果は顕微鏡観察と相関し、c-ジ-GMP処理が、ヒトおよびウシ単離物においてスタフィロコッカス・アウレウス細胞と細胞(細胞間)接着性相互作用を阻害できることをさらに示唆する。

30

40

【0116】

c-ジ-GMPは、ヒトおよびウシスタフィロコッカス・アウレウスにおけるバイオフィルム形成を阻害する。c-ジ-GMP処理がスタフィロコッカス・アウレウス細胞と細胞の相互作用を阻害すると考え、本発明者はc-ジ-GMPがバイオフィルム形成を阻害すると予測する。定量的バイオフィルムの結果は、c-ジ-GMP処理が、無生物ポリスチレン表面上でのスタフィロコッカス・アウレウスDK825バイオフィルム形成を用量に依存して阻害することを示した(図7Aおよび7B)。細胞外c-ジ-GMPの阻害効果を、 $20 \mu\text{M}$ (~50%低減)、 $200 \mu\text{M}$ (~65%低減)、および $400 \mu\text{M}$ (~

50

85%低減)で観察した。処理培養物と無処理培養間のバイオフィルム形成の同様の違いを、48時間の測定後観察した。これは、処理耐性の選択が生じなかったことを示唆している(データは示していない)。結果は、試験した濃度で高度に接着性の高バイオフィルムスタフィロコッカス・アウレウス株15981において24時間の時点で同様のバイオフィルム形成のc-ジ-GMPによる阻害も示した(図7C)。コアグラゼは、宿主組織に対するスタフィロコッカス・アウレウスのコロニー形成に重要であると示されてきたが、DK825における処理細胞と無処理細胞間のコアグラゼ産生の違いは見出されなかった(データは示していない)。定量的バイオフィルムの結果は、肉眼的データおよび肉眼的な細胞と細胞の凝集データと関連し、このことは、細胞外c-ジ-GMPがヒト単離物において細胞相互作用およびバイオフィルム形成を阻害することを示唆している。

10

【0117】

定量的バイオフィルム分析はまた、c-ジ-GMPがウシ潜在性乳房炎株のバイオフィルム形成を阻害することも示した(図8A~8D)。野生型ウシV329株は、ポリスチレン表面での強力なバイオフィルム産生体であることが既に示されているが、アイソジェニックなbap変異体M556はこのバイオフィルム能が減弱していた(Cucarella et al., 2001)。本明細書における分析は、この知見を支持するが、重要なことに、ヒト単離物と同様c-ジ-GMPは、これらの野生型および変異体ウシ株、ならびに野生型bap陰性株V299および野生型bap陰性icaADBC陰性株V315(非常に低レベルでバイオフィルムを形成する)においてバイオフィルム形成を劇的に阻害することを示している(図8Cおよび8D)。同様に、これらの結果は、c-ジ-GMP処理がバイオフィルム形成に関与するスタフィロコッカス・アウレウスの細胞と細胞の相互作用および細胞と表面の相互作用を阻害することを示すためのさらなる説得力のある証拠を提供する。これらの知見は、c-ジ-GMPのような環状ジヌクレオチドが、医療器具のような臨床関連する表面上でのバイオフィルムを防止するのに有用であり、ヒトおよび動物の感染症の制御において可能性を有することも示唆している。

20

【0118】

スタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィルム形成に関与する調節機序は、完全には分かっていない。しかしながら、スタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィルム形成は、icaADBC遺伝子により合成され、細胞凝集においても役割を担う細胞外多糖細胞間接着(PIA/PNAG/PSA)の産生により仲介されることが知られている(Cramton et al., 1999; Maira-Litran et al., 2002およびMcKenney et al., 1999)。SarA調節因子は、Bapタンパク質を有している(Cucarella et al., 2001および2002)ので、バイオフィルム形成に重要であると示された(Beenken et al., 2003; Blevins et al., 2002およびValle et al., 2003)。作用の正確な機序が依然として決定されるべきであるが、株15981の結果は機序がagr独立であり得ることを示唆し、ウシ単離物での初期研究は機序がbapおよびicaADBC独立であり得ることを示唆している。

30

【0119】

バイオフィルム形成に対するcGMPおよび5'-GMPの効果

c-ジ-GMPで観察された効果に基づき、本発明者の研究室は、次に同じ濃度(200μM)のcGMP(グアノシン3',5'-環状モノリン酸塩)および5'-GMP(グアノシン5'-モノリン酸塩)のような細胞外グアノシンヌクレオチドアナログで処理した培養物が、スタフィロコッカス・アウレウスDK825のバイオフィルム形成も阻害できるか否かを試験した。これらの実験を行い、この実施例の研究において観察されたバイオフィルムに対する効果が、一般的な細胞外グアノシンヌクレオチドまたは環状グアノシン(モノヌクレオチド)アナログの存在に単に起因する可能性を除外した。c-ジ-GMPの構造が頭部と尾部(3'-5')で結合している2つのcGMPに幾分類似し、5'-GMPはc-ジ-GMPの既知の崩壊産物であるので、これらの2つの特定のヌクレオチドも選択された(Ross et al., 1991)。cGMPの成長培地への添加により、バイオフィルム形成は阻害(~40%)されたが、c-ジ-GMPよりずっと狭く、一方5'

40

50

- GMPはc - ジ - GMPと比較してバイオフィルム形成に対する効果を有していなかった(図9Aおよび9B)。これらの知見は、c GMPと比較してc - ジ - GMPで観察された阻害効果は、事実ただ単にグアノシン塩基を有するか、またはただ単に環状である分子に寄与するものではないが、その環状ジヌクレオチド構造がどういうわけか独特であることを示している。c - ジ - GMPと比較してスタフィロコッカス・アウレウスでのバイオフィルム形成を阻害するその能力におけるc GMPおよび5' - GMPの可能性の総合的な欠如は、細胞に対する作用および効果のその機序におけるc - ジ - GMPの重要性、新規かつおそらく特異性および親和性をさらに高める。分子の一般的でない形および構造を考慮すると、それは特定の細胞(または細胞壁)標的または受容体に対するある種特異性を伴って結合することが可能である。

10

【0120】

スタフィロコッカス・アウレウスの事前に形成されたバイオフィルムに対するc - ジ - GMP処理の効果 本実施例で示すデータは、c - ジ - GMP処理がスタフィロコッカス・アウレウス株DK825および15981におけるバイオフィルム形成を阻害するので、細胞外c - ジ - GMPが事前に形成され、確立したバイオフィルムに対する効果を有するという仮説を試験した。得られた結果は、24時間前に形成されたバイオフィルムのc - ジ - GMP処理(200 μ M)が無処理対照と比較してさらなるバイオフィルム展開をブロック(～75%低減)することを示した(図10)。これらのデータに基づくと、c - ジ - GMPがバイオフィルムの初期形成および既に形成されたバイオフィルムのさらなる展開の両方を阻害するようである。

20

【0121】

c - ジ - GMP処置はスタフィロコッカス・アウレウスのヒト上皮細胞への接着を阻害する。スタフィロコッカス・アウレウスの上皮細胞単層への接着および接着を阻害する可能性のある治療剤の効果を調べる研究を行った(Balaban et al., 2003; Cucarella et al., 2002; Matsuura et al., 1996; Miyake et al., 1989および1991; Roche et al., 2003; およびWyatt et al., 1990)。本明細書の研究のデータは、2および20 μ M c - ジ - GMPでの処理が接着に対する明らかな効果を全く示さなかったことを示している。しかしながら、無処理対照(図11A)と比較して、200 μ M c - ジ - GMPでの処理は、HeLa細胞に接着しているスタフィロコッカス・アウレウスの細胞数を低減させた(図11B)。データは、c - ジ - GMP処理が接着を平均12細菌/細胞から4細菌/細胞低減させた(～66%低減)ことを示した。完全培地(細菌不存下)にて上記のように調製したHeLa細胞に対する種々の濃度(0、25、50、100、200、および400 μ M)のc - ジ - GMPの効果は、12、24および48時間インキュベーション時点で顕微鏡で調べたHeLa細胞の形態に対して明らかな目に見える効果を示さなかった。c - ジ - GMPがスタフィロコッカス・アウレウスと上皮細胞との接着を阻害する分子機序はまだ分かっていないが、これらのインビトロのデータは、ポリスチレン(抗菌)表面を用いた従前のバイオフィルム結果と非常に一致し、c - ジ - GMPを用いて、上皮細胞(細菌)表面のバイオフィルム形成が阻害され得ることを示唆している。

30

【0122】

安全性および毒性試験 HeLa細胞の分析により、400 μ Mまでの濃度でのc - ジ - GMP処理が24時間曝露後、細胞形態に明らかな変化を全く引き起こさなかったことが示された。しかしながら、400 μ M c - ジ - GMPで処理されたHeLa細胞は、48時間曝露後形態学的変化を受けたようであった。これらの知見は、濃度<400 μ Mでc - ジ - GMPが試験した条件下でこれらの上皮細胞に対して比較的毒性が低いようであることを示唆している。

40

【0123】

c - ジ - GMPの安全性および可能性のある致死率を、CD-1マウスにてさらに調べた。これらの研究において、c - ジ - GMP処置(200 μ M、50 μ L、経口)の24時間後にマウスを調べたところ、全てのマウスが生存しており、致命的な効果は観察されなかった。屠殺後、種々の組織、組織液を後の組織学的分析および生化学的分析のために

50

回収した。c - ジ - G M P 処置後の組織分布レベルおよび可能性のある組織毒性はまだ分かっていないが、現在研究中であり、インビボの研究により、この濃度でのc - ジ - G M P の処置がマウスにおいて致命的でなく、c - ジ - G M P が比較的安全であり毒性が低いことを示す本発明者の研究室のデータを支持することが示されている。

【0124】

スタフィロコッカス・アウレウスに対するc - ジ - G M P の作用の可能性のある機序
グラム陰性細菌種であるアセトバクター・キシリナムでの研究は、c - ジ - G M P が細胞内シグナル伝達分子であり、これらの細菌細胞に侵入できないようであることを示した。グラム陽性種であるスタフィロコッカス・アウレウスにおける本明細書記載の知見に基づき、スタフィロコッカス・アウレウスは細胞外c - ジ - G M P に感受性であり、応答できると考えられる。これらの知見は、細胞外c - ジ - G M P 処置および生じた細胞と細胞の相互作用およびバイオフィルム形成の阻害が、c - ジ - G M P の受容体（おそらく、細胞表面に提示されている）への結合に関与し、これがシグナル伝達現象調節遺伝子およびタンパク質発現の引き金を引くことを示唆している。c - ジ - G M P は真核細胞に侵入できると報告されてきたので（Steinberger et al., 1999）、別の可能性は、c - ジ - G M P がスタフィロコッカス・アウレウスに侵入し、タンパク質発現の変化の引き金を引くことができることである。関与する分子機序にもかかわらず、この実施例での知見は、c - ジ - G M P 処理が、スタフィロコッカス・アウレウスにおける細胞と細胞の相互作用およびバイオフィルム形成を阻害することを明らかに示している。細菌標的部位の抗生物質に対する感受性を増大させるので、この能力は抗菌処置に対する有用な補助特性である。

10

20

【0125】

実施例 4

細胞外c - ジ - G M P はビブリオ・コレラのバイオフィルム形成を阻害する。異なるバッファーおよび温度下での分子の安定性を調べる試験により、それは生理食塩水中、4 にて少なくとも数ヶ月間安定であり、10 分間沸騰させた後も安定であり、そして酸（pH 3）およびアルカリ（pH 10）中で1時間処理した後も安定であることが示された。種々の濃度のc - ジ - G M P を添加したLBブロス含有ガラス試験管にて24時間静的にインキュベーションした後、標準的なクリスタルバイオレットを用いて定量的バイオフィルムアッセイを行い、細胞外c - ジ - G M P が無処理対照と比較してビブリオ・コレラN 16961においてバイオフィルム形成を用量に依存して増大させることを見出した（図12）。これらの知見は、増大したc - ジ - G M P レベルがセルロース産生を増大させるグルコンアセトバクター・キシリナムにおける知見と一致する。得られた結果は、処理培養物と無処理培養物との間の成長の差に関与しないようであった。興味深いことに、RocS変異体は、野生型株と比較して低いバイオフィルム形成能を示し、c - ジ - G M P に応答して増大したバイオフィルム形成活性を示した。RocSはc - ジ - G M P と結びつくと、細胞外c - ジ - G M P は変異体において野生型バイオフィルムレベルを保持することができず、これはRocS変異体がc - ジ - G M P 調節ばかりでなく、バイオフィルム形成に関連する他の特性における欠失であることを意味する。

30

【0126】

実施例 5

カテーテルの表面のような生理的環境下で、スタフィロコッカス・アウレウスは、コロニー形成し、バイオフィルム形成すると予測され、これにより細胞のフロー条件下での持続を可能にする。インビトロでこれらの条件を模倣し、新規抗バイオフィルム剤としてのc - ジ - G M P の可能性のある使用をさらに探るために、連続培養フローセルバイオフィルムモデルを用いて、シリコン表面およびステンレス・スチール表面上でのスタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィルム形成に対するc - ジ - G M P 処置を研究する。c - ジ - G M P 単独、および通常用いられる抗生物質オキサシリンと組み合わせたc - ジ - G M P での処置の感受性を増大させ、シリコンおよびステンレス・スチール上でのバイオフィルム形成を低減させる効果も試験する。

40

【0127】

50

スタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィルム形成に対する c - ジ - G M P の効果を試験するためのフローセルバイオフィルムモデル

i . 成長条件

バイオフィルム形成のため、ダイナミックフロー下のシリコン表面上で培養物を成長させ、シリコンチューブのセクション 1 m の内部表面 (サイズ 1 6 、容量 7 m l を生じる、Masterflex) を接触表面として用いる (反応器の図については図 1 3 を参照) 。バイオフィルムがフローセル内で成長させられるべきである実験において、Protofab Sealed Flowcell を用いた (図 1 4) 。このフローセルは反応系のシリコンチューブのセクション 1 m の中程に取り込まれることができ、接着性のバイオフィルムのため取り外し可能かつ回収可能なインサート (P M M A またはステンレス・スチールのいずれか) を有する。 c - ジ - G M P 処置は、 a) シリコンおよびスチール上でのバイオフィルム形成を阻害し、 b) シリコンおよびスチール上の事前に形成されたバイオフィルムを低減するという仮説を試験する。 10

【 0 1 2 8 】

i i . バイオフィルム形成に対する効果

スタフィロコッカス・アウレウス D K 8 2 5 培養物を一晩 3 7 T S B 中で振盪しながら成長させる。次に、一晩培養物を新鮮な T S B で 1 : 1 0 0 0 希釈し、対数成長フェーズに達するまで試料を振盪しながら 3 7 で成長させる。この対数フェーズ培養物 (~ 1 0 ⁷ C F U) (2 0 0 μ M c - ジ - G M P (処理) 含有) のアリコート、および 0 . 9 % N a C l の同じアリコートで植え付けた試料 (無処理) をチューブに注入し、T S B フロー (c - ジ - G M P ありおよび c - ジ - G M P なし) (0 . 7 m l / 分) を開始する 3 0 分前に接着させる。残り時間 7 . 5 分 (バッチ成長条件下での細菌の倍加時間は 3 0 ~ 4 0 分未満) 以降は、接着した生物のみが表面に保持される。全てのバイオフィルム実験を 3 7 のインキュベーター内で行い、かつ全ての試料をトリプリケートで行う。シリコンおよびスチール表面を擦過し、それによりバイオフィルムを剥離させてバイオフィルム試料を植え付けた 2 4 時間後に回収する。それぞれの試料を P B S 2 m l に懸濁し、ボルテックスして任意の凝集細胞を解離させる。処理試料および無処理試料の c f u / m l を数えるためにボルテックスした試料の連続希釈物を血液寒天プレートに播種し、それによりシリコンおよびスチールのモデルバイオフィルムシステムにおけるスタフィロコッカス・アウレウスの生存力に対する c - ジ - G M P の効果を試験する。 20 30

【 0 1 2 9 】

i i i . 事前に形成されたバイオフィルムに対する効果

スタフィロコッカス・アウレウス D K 8 2 5 を一晩 3 7 で T S B 中にて振盪しながら成長させる。次に、一晩培養物を新鮮な T S B で 1 : 1 0 0 0 希釈し、対数成長フェーズに達するまで 3 7 で振盪しながら成長させる。 c - ジ - G M P を含まないこの対数フェーズの培養物 (~ 1 0 ⁷ C F U) のアリコートをチューブに注入し、 c - ジ - G M P (処理) を含む T S B または 0 . 9 % N a C l (無処理) 同じアリコートを含有する T S B フロー (0 . 7 m l / 分) を開始する 3 0 分前に接着させる。残り時間 7 . 5 分 (バッチ成長条件下での細菌倍加時間は 3 0 ~ 4 0 分未満) 以降、接着した生物のみが表面に保持される。全てのバイオフィルム実験を 3 7 のインキュベーター内で行い、かつ全ての試料をトリプリケートで行う。次に、シリコンおよびスチール表面を擦過し、それによりバイオフィルムを剥離させて、バイオフィルム試料を植え付けた 2 4 時間後に回収する。それぞれの試料を P B S 2 m l に懸濁し、ボルテックスして任意の凝集細胞を解離させる。処理試料および無処理試料の c f u / m l を数えるためにボルテックスした試料の連続希釈物を血液寒天プレートに播種し、それによりシリコンおよびスチールのモデルバイオフィルムシステムにおけるスタフィロコッカス・アウレウスの生存に対する c - ジ - G M P の効果を試験する。実施例 3 の結果は、 c - ジ - G M P 処理が、細胞と細胞の相互作用、細胞と表面の相互作用 (プラスチックと上皮細胞との接着) を低減し、スタフィロコッカス・アウレウス細胞の生存力を低減させることを示唆している。本発明者は、 c - ジ - G M P がシリコンおよびスチール表面上でのバイオフィルム形成を阻害し、既 40 50

に形成されたバイオフィルムのレベルも低減することを見出すと予測する。

【0130】

感受性およびバイオフィルム形成に対する c - ジ - G M P および抗生物質の効果を試験するためのフローセルバイオフィルムモデル

本発明者の研究室の予備データに基づき、c - ジ - G M P 処理がスタフィロコッカス・アウレウスの抗生物質感受性を増大させると予測される。それゆえ、「抗バイオフィルム」剤として c - ジ - G M P を用いる可能性があるかをさらに調べるために、c - ジ - G M P 処理が抗生物質感受性を増大させるという仮説を試験する。まず、c - ジ - G M P 単独、および通常用いられる抗生物質であるオキサシリンと組み合わせた c - ジ - G M P のバイオフィルム関連スタフィロコッカス・アウレウスの感受性を増大させる効果を試験する。これらの研究は、上記の連続培養フローセルバイオフィルムモデルを用い、単独または組み合わせた c - ジ - G M P の存在下でのスタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィルム形成を分析する。

10

【0131】

スタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィルムに対する c - ジ - G M P およびオキサシリンからなる任意の組合せ抗菌活性（相乗作用）の可能性を研究するため、上記のフローセルバイオフィルムモデルの変形版を用いる。まず、National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) を用いて濃度 $1 - 1, 024 \mu\text{g/ml}$ を試験することにより、標準的チューブアッセイを用いてオキサシリンの MIC を決定する。200 μM c - ジ - G M P 存在下でのオキサシリンの MIC を定量し、感受性および相乗作用における低減がないかどうかを決定する。

20

【0132】

バイオフィルムモデルにおける研究のため、スタフィロコッカス・アウレウス DK 825 を一晚 37℃、TSB 中にて振盪しながら成長させる。次に、一晚培養物を新鮮な TSB で 1 : 1000 希釈し、対数成長フェーズに達するまで、試料を 37℃ で振盪しながら成長させる。この対数フェーズの培養物 ($\sim 10^7$ CFU) アリコート (5 ml) (i) 200 μM c - ジ - G M P のみ、ii) c - ジ - G M P + オキサシリン (上で決定した濃度)、iii) オキサシリンのみ、および iv) 0.9% NaCl のみを含有) をチューブに注入し、TSB フロー (上記と同様の条件) (0.7 ml/分) を開始する前 30 分間接着させる。残り時間 7.5 分 (バッチ成長条件下での細菌の倍加時間は 30 ~ 40 分未満) 以降、接着している生物のみが表面に保持される。全てのバイオフィルム実験を 37℃ のインキュベーター内で行い、かつ全ての試料をトリプリケートで行う。シリコン表面を擦過し、それによりバイオフィルムを剥離させ、バイオフィルム試料を植え付けた 24 時間後に回収する。それぞれの試料を PBS 2 ml 中に懸濁し、ボルテックスして任意の凝集細胞を解離させる。処理試料および無処理試料の cfu/ml を数えるために、ボルテックスした試料の連続希釈物を血液寒天プレートに播種し、それにより、抗生物質感受性およびスタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィルム形成の阻害に対する c - ジ - G M P の効果を試験する。Domaracki 等 (Domaracki et al., 2000) の方法に類似の時間 - 殺菌曲線も行い、上記のバイオフィルムモデルにおける 12 時間のインキュベーションを通じて MRS A 株 DK 825 の成長に対する c - ジ - G M P およびオキサシリンの組合せの効果を研究する。TSB + 2% NaCl 中、半 MIC 濃度のオキサシリン単独 (用いられるべき濃度は上で決定) または c - ジ - G M P (200 μM) との組合せにより株を試験する。これらの研究において、フローセルシステム由来の試料を血液寒天に播種して、生存力のカウントを 0、3、6 および 12 時間に行う。

30

40

【0133】

この実施例に使用したバイオフィルムモデルシステムは臨床上的セッティング (例えば、医療器具) を模倣しており、一定濃度の「薬物」がフローシステムにより投与されると、その後のインターバルでの薬物再投与を回避する。上の実施例 3 のデータは、c - ジ - G M P が細胞の生存力をおよそ 1 - 1 log 阻害し、既に試験した条件下で細胞と細胞の相互作用およびバイオフィルムを阻害することを示唆するので、このモデルバイオフィルム

50

システムにおける c - ジ - G M P 処理で低減されると予測される。一方、オキサシリン感受性に対する拮抗作用はないと予測可能である。また、疑わしいことに、細胞と細胞の相互作用を阻害すると、抗菌標的へのアクセスがより良好になり、c - ジ - G M P が相乗的にならず、D K 8 2 5 の抗菌感受性を増大させない。しかしながら、本発明者は、組合せ c - ジ - G M P 処置は相乗効果を生じ、オキサシリンまたは c - ジ - G M P 処置単独と比較してスタフィロコッカス・アウレウスにおける抗菌感受性の測定可能な増大を引き起こすことを見出すと予測する。かかる相乗効果は、抗菌活性を増大させるために c - ジ - G M P を他の薬物と組合せて用いられることを示す。感受性の差をこのシステムにおいて見出した場合、これらの知見は c - ジ - G M P が有用な抗菌活性を有することを支持し、異なる抗生物質を用いてさらなる感受性研究を行う。時間 - 殺菌曲線は、c - ジ - G M P とオキサシリンの組合せの存在下での殺菌の増強を示すと予測される。例えば、2 - l o g の殺菌をスタフィロコッカス・アウレウスの摂取開始と比較して観察した場合、これは相乗作用を示す。本研究は半 M I C のオキサシリンが c - ジ - G M P と一体となって、殺菌において有効であるか、または M R S A の感受性を少なくとも増大させる際に有効であることを示し得る。相乗作用を観察した場合、動物モデルを用いたさらなる調査を行い、c - ジ - G M P ・オキサシリンの組合せがインビボにおいて相乗的であるかどうかを観察する。さらなる試験も行い、異なる種のスタフィロコッカスおよび臨床上のスタフィロコッカス集団において相乗効果の普及を決定することができる。

10

【 0 1 3 4 】

実施例 6

20

ビブリオ・コレラ株 N 1 6 9 6 1 の配列決定 (Heidelberg et al., 2000) は、この病原体を研究する新たなアプローチを可能にする。3 8 8 4 のオリゴ (1 オリゴ / ゲノム 遺伝子) により表される N 1 6 9 6 1 ゲノムのマイクロアレイを、ポリスチレンコートガラスマイクロアレイスライド (Corning) 上にマイクロアレイマーカー P S 5 2 0 0 (Cartesian Technologies) を用いてプリントした。オリゴヌクレオチドプローブを 2 0 m M T r i s、5 0 m M K C l、p H 6 . 5、5 0 % D M S O (プリントバッファー) に懸濁し、次に、9 6 ウェルプレートにアレイし、適当な条件の温度および湿度の下スポットした。プリント後、スライドを乾燥させ、次に、スポットした D N A を Stratalink (Stratagene) を用いて 6 0 m J にて U V 架橋結合によりスライドに結合させ、8 0 で 2 時間焼いた。標的核酸を C y 3 または C y 5 蛍光ダイのいずれかで標識する。

30

【 0 1 3 5 】

G G D E F ドメインを有するタンパク質は調節する役割を有し、c - ジ - G M P と関連すると考えられる。ビブリオ・コレラは、約 4 1 種の G G D E F タンパク質を含有する (Galperin et al., 2001) ので、本発明者は c - ジ - G M P が毒性を含む多くの遺伝子およびビブリオ・コレラ (および他の病原体) の重要な過程を調節すると予測する。この仮説を、転写プロファイルアプローチを用いて試験し、ビブリオ・コレラ株 N 1 6 9 6 1 のトランスクリプトームを研究する。

【 0 1 3 6 】

これらの最初の研究において、c - ジ - G M P の存在下および不存下で成長させた野生型細胞を比較して、発現が c - ジ - G M P により影響される遺伝子を同定する。L B ブロス中、3 7 にて振盪させて成長させた対数フェーズの細胞由来の R N A を、O D₆₀₀ 0 . 3 ~ 0 . 4 に調節した後 RNA Easy kit (Qiagen) を用いて抽出し、標識前に DNase I (Qiagen) で処理する。標識反応のため、m R N A を C y 3 または C y 5 ダイのいずれかで標識する。両方の標識反応を全ての試料で行い、標識反応およびダイの特徴に基づくシステム上の変動を評価する。アミノアシル標識ヌクレオチドでの逆転写酵素を含む標準的方法を用いて蛍光標識を取り込む。未取り込みの d N T P およびオリゴ d T プライマーをエタノール沈殿により除去する。第 2 の工程にて標識を取り込む。アミノアシル標識は対照試料において試料から試料への一様な産物をもたらすことが分かる。シグナルを最大にし、バックグラウンドを最小とするために、1 M N a C l、5 0 m M T r i s、p H 7 . 0、5 0 % ホルムアミド、1 0 % 硫酸デキストラン、1 % S D S、および 1 %

40

50

ウシ血清アルブミン中、1時間42℃にてマイクロアレイをプレハイブリダイゼーションする。標識標的核酸を95℃で5分間変性し、4℃に冷却し、次に、スライドを含有するハイブリダイゼーションチャンバーに加えた。ハイブリダイゼーション反応を42℃で一晩インキュベーションして行う。スライドをチャンバーから取り出し、0.1M NaClおよび0.1% SDSで5分間室温にて洗浄する。次に、スライドを空気乾燥させる。ハイブリダイゼーションさせたマイクロアレイをScan Array 3000 (GSI Lumonics) スキャナーにてスキャンする。スキャナーでは、Cy3およびCy5をそれぞれ位置決定するために633nmおよび543nmでレーザー操作する。光分解に対する感受性が高いので、Cy5を最初にスキャンする。それぞれの蛍光チャンネルのデータをTIFFファイルとして別々に保存する。Image (Biodiscovery) ソフトウェアを用いて、それぞれのスポットの位置を同定し、スポット識別子をつけ、各スポットの周りのバックグラウンド密度を測定し、蛍光強度を単純なフラットファイルに記録する。複製スポットおよび同じ値 (taxa) を示すスポットのデータを比較し、異常値を除去し、その他をソフトウェア GeneSight (Biodiscovery) を用いて平均する。

10

20

30

40

50

【0137】

マイクロアレイデータ分析の実験設計 c - ジ - GMPあり、およびなしで成長させた細胞の発現特性を比較するために、ラテン方格法を用いる。それぞれのペアの試料 (c - ジ - GMPあり、およびなし) の2つのアリコート (すなわち、c - ジ - GMPなしの試料由来の2つ (A1およびA2) およびc - ジ - GMPありの試料由来の2つ (B1およびB2)) を調製する。第1のアレイは、レッドで標識し、グリーンで標識した第2の処理試料 (B1) でハイブリダイゼーションさせた第1の未処理試料 (A1) からなる。第2のアレイは、レッドで標識し、グリーンで標識した未処理の試料 (A2) でハイブリダイゼーションさせた第2の処理試料 (B2) からなる。ラテン方格法のレイアウトを以下の表4に示す。

【0138】

表4

【表4】

ダイ	チップ1	チップ2
レッド	A1	A2
グリーン	B1	B2

【0139】

この設計は、c - ジ - GMPあり、およびなしそれぞれの比較のためダイバイアスを除去する際に非常に効果的である。ラテン方格法はそれぞれトリプリケートのペアの試料に適用するので、6個のチップを用いた。

【0140】

データ処理 典型的には、マイクロアレイイメージのバックグラウンドはアレイ全体にわたって均一ではない。局所性バックグラウンド強度の抽出方法を使用する。それぞれのアレイからの2つのチャンネル由来の (バックグラウンドを引いた) 強度を互いにプロットし、データ (すなわち、転写レベルが本質的に変化していない全ての遺伝子のデータ) のクオリティをチェックする (直線となるべきである)。値の範囲は、全てのチャンネルについてほぼ同じとなるべきであり、いずれのチャンネルも満たされなければならない。Log 転換により、データがそれぞれの遺伝子においておよそ正常な分布であることを確かめ、そしてそれは分散分析の統計的実施を改良する。方法は正常から逸脱したものに対して公平なものである。転換後のそれぞれの単位が2倍差に対応するので、底2のlogスケールを分析において用いる。

【0141】

校正 個々の遺伝子のデータにバイアス影響を生じる実験幅系統的效果を説明するため

、そのままの蛍光強度値をダイおよびアレイの機能と合わせるANOVAを用いて校正を行う (Wolfinger et al., 2001)。遺伝子 g 、幅 i ($i = 1, 2$)、ダイ j ($j = 1, 2$) およびアレイ k ($k = 1, *, 6$) 由来のバックグラウンドで補正した強度値の底 2 の対数を $y_{g i j k}$ とする。校正モデルは：

【数 1】

$$y_{g i j k} = \mu + D_j + A_k + (DK)_{i k} + \varepsilon_{g i j k} \quad (1)$$

(式中、 μ は全体の平均、 D はダイの主な効果、 A はアレイの主な効果、 DA はアレイとダイの相互作用効果、 ε はランダムなエラーである) である。モデル (1) において、主な相互作用効果をランダム効果として処理してもよい。効果について適合した値を $y_{g i j k}$ 値から引いて計算したこのモデルの残りを、試料平均に対するそれぞれの遺伝子の相対的蛍光強度と見なすことができる。校正モデルの基本的考え方は、ダイ間およびアレイ間の全体的な差を除去することである。

10

【0142】

遺伝子特異的な有意モデル 処理細胞と無処理細胞との間で異なって発現した遺伝子を同定するために、遺伝子特異的ANOVA (Wolfinger et al., 2001) を行う。 $r_{g i j k}$ はモデル (1) の残り (すなわち、遺伝子 g の相対的蛍光強度) を示すものとする。遺伝子モデルは：

【数 2】

$$r_{g i j k} = V_{g i} + D_{g j} + (VK)_{g i j} + \varepsilon_{g i j k} \quad (2)$$

20

である。

【0143】

全ての効果を g により指標化し、モデル (1) でのものと同じ役割をなすと思われるが、遺伝子レベルにおいて、 V はバリエーションの主要な効果である。 V 以外の他の効果は、ランダムな効果として扱われ得る。第 1 の対象の概算は、 $V_{g i}$ 効果のものであり、それはそれぞれの遺伝子についての様々な効果を測定したものである。これらの効果の差を、遺伝子内 PROC MIXED のような SAS 手順を用いて試験する。この統計的アプローチに基づき、カットオフ値を確立する。最終的に、異なって発現した遺伝子のリストをそれぞれの比較のために選択する。

30

【0144】

代替分析 マイクロアレイの有意な分析 (SAM) (Tusher et al., 2001) は、ANOVA アプローチの代わりとなる。Rob Tibshirani, Stanford University により開発された SAM はマイクロアレイに特に適合した統計的方法である。SAM は、それぞれの遺伝子を、遺伝子について示された測定値の標準偏差に対する遺伝子発現の変化に基づくスコアで指定する。閾値より高いスコアを有する遺伝子は、有意である可能性があると考えられる。この手順により、過誤発見率 (false discovery rate) (FDR) が提供され、かかる遺伝子の割合は偶然同定された。正確な FDR (0.05 のような) を制御することで、異なって発現した遺伝子のセットをそれぞれの比較について同定する。ANOVA の結果との比較において、両方の方法で同定された遺伝子に注意が向けられる。

40

【0145】

予測結果と解釈 これらの転写プロファイル研究により、 c -ジ-GMP により調節される遺伝子が同定される。 c -ジ-GMP により有意に活性化され、抑制される興味ある特定の遺伝子 (例えば、調節および毒性) を、RT-PCR により確認し、さらなる研究に用いる。たとえ c -ジ-GMP が既知の毒性遺伝子を調節するとしても、これは毒性を制御する新規シグナル伝達カスケードを表すだろう。同様のアプローチを用いて、他の病原体の低減での c -ジ-GMP およびアナログの効果を研究することができる。

【0146】

実施例 7

スタフィロコッカス・アウレウス単位複製配列に基づくマイクロアレイを TIGR (Th

50

e Institute for Genomic Research, Rockville, MD) により構築し、これは、スタフィロコッカス・アウレウス株 C O L (参考株)、スタフィロコッカス・アウレウス株 M U 5 0、スタフィロコッカス・アウレウス株 M W 2、およびスタフィロコッカス・アウレウス株 N 3 1 5 由来の 2 4 8 0 個の O R F のセグメントを表す単位複製配列を含有する。マイクロアレイも対照転写スポットでプリントする。

【 0 1 4 7 】

以下の表 5 は、スタフィロコッカス・アウレウス株 D K 8 2 5 での c - ジ - G M P (2 0 0 μ M) の効果について得られたマイクロアレイのデータのサブセットを示す。発現 (転写レベル) が c - ジ - G M P に応答して異なって調節される (アップレギュレートされるか、またはダウンレギュレートされる) 既知の調節、毒性、およびバイオフィーム関連遺伝子のいくつかのみをこの表に示す。スタフィロコッカス・アウレウスの無処理対照から単離された R N A に対するハイブリダイゼーション強度と比較して、2 0 0 μ M c - ジ - G M P で処理したスタフィロコッカス・アウレウスから単離された R N A に対するマイクロアレイ上での単位複製配列スポットのハイブリダイゼーション強度により決定される、それぞれの遺伝子の発現の倍増または減少を提示する。

10

【 0 1 4 8 】

表 5

【 表 5 】

アップレギュレーション

a g r A (クオラムセンシング)	5. 4
a g r B (クオラムセンシング)	5. 8
a g r C (クオラムセンシング)	2. 0
a g r D (クオラムセンシング)	2. 2
s a e R (応答調節因子)	2. 5
s a e S (ヒスチジンキナーゼ)	1. 5
r s b W (抗シグマ B)	4. 5
P B P - 2	2. 0
P B P - 4	1. 7

20

ダウンレギュレーション

f n b B (フィブロネクチン結合)	0. 4 7
f b n A (フィブロネクチン結合)	0. 6 6
c l f A (クランピング因子)	0. 5 4
c l f A (クランピング因子)	0. 4 3
i c a R (細胞間接着)	0. 6 2
コラーゲン接着	0. 5 5
細胞空胞化毒素	0. 5 6
エンテロトキシン A	0. 5 4
エンテロトキシン 1	0. 3 5
表皮剥脱毒素	0. 5 2
毒素性ショック症候群毒素	0. 4 5

30

40

【 0 1 4 9 】

データは、c - ジ - G M P がスタフィロコッカス・アウレウスの多数の遺伝子の発現に影響することを示す。特に、c - ジ - G M P 分子はクオラムセンシング (a g r) 遺伝子、毒性における既知の役割を担う調節因子、毒素遺伝子およびコロニー形成およびバイオフィーム関連遺伝子の発現に影響する。データは、バイオフィーム形成、コロニー形成、細胞凝集、毒素活性、および全体的 (調節) 毒性について減弱されているスタフィロコッカス・アウレウスのものと一致する。r s b W 遺伝子は、完全な毒性に重要であるシグマ

50

Bの発現を表す抗シグマB因子をコードする。それゆえ、rsbWの増大した発現は減少した毒性と一致する。

【0150】

実施例 8

スタフィロコッカス・アウレウス Newbould 305 株を用いたスタフィロコッカス・アウレウス感染症のマウス乳房炎モデル (Brouillette et al., 2003, 2004aおよび2004b) を用いて、c-ジ-GMPでの処置の有効性を示した。1群当たり3匹のマウスおよび1マウス当たり2つの乳腺を用い、1処置当たりトータル6試料とした。スタフィロコッカス・アウレウス Newbould 305 株 100 CFU (コロニー形成単位) をそれぞれの乳腺に植え付けた。c-ジ-GMP 5 または 50 nmol を、時間 0 (容量 100 μ l、すなわち、50 または 500 μ M 濃度のスタフィロコッカス・アウレウス接種材料とあらかじめ混合したもの) および感染の4時間後 (50 μ l 中、すなわち、100 または 1000 μ M) でそれぞれ2回乳腺に注射して投与した。ミルクを含んだ乳腺の容量は約 250 μ l であると考えられるため、各注射時の乳腺中の c-ジ-GMP の最終濃度は 20 μ M または 200 μ M であると推定された。c-ジ-GMPでの処置は、スタフィロコッカス・アウレウスの乳腺における増殖またはコロニー形成する能力に対する c-ジ-GMP の有意な用量依存性抑制効果 (CFU カウントの低減) をはっきりと示している (図 15)。結果は、乳腺に注射された c-ジ-GMP 50 nmol がインビボにおいて乳腺のスタフィロコッカス・アウレウス感染症を少なくとも 10 倍 (T 検定: $p = 0.004$; マンホイットニー U 検定: $p = 0.009$) 有意に阻害することを示す。

【0151】

十分に本発明を説明したが、それは本発明の精神および範囲から逸脱することなく、かつ適切な実験なしで、均等なパラメーター、濃度、および条件の広い範囲内で行われ得ることを当業者は理解するだろう。

【0152】

本発明は特定の実施態様と関連して記載されているが、さらなる修飾が可能であることは理解されるだろう。本願は、一般的な本発明の原理に従い、かつ当該技術分野内で既知または慣習的な実施内に入る本発明の開示から本発明が関連するものへの逸脱および添付の請求の範囲内となる上述の必須の特徴に適合し得る逸脱を含む、本発明の任意のバリエーション、使用、または適用をカバーすることが意図されている。

【0153】

文献、抄録、公開または対応する米国または外国の特許出願、公開米国または外国特許、または任意の他の引用文献を含む本明細書において引用される全ての引用文献は、本明細書において引用により完全に取り込まれ、これは、引用文献において提示された全てのデータ、表、図、およびテキストを含む。さらに、本明細書において引用される引用文献において引用された引用文献の全ての内容も引用により完全に取り込まれる。

【0154】

既知の方法工程、通常の方法工程、既知の方法、または通常の方法への言及は、本発明の任意の態様、記載または実施態様が従来技術において開示され、教示され、あるいは示唆されていることを決して許可するものではない。

【0155】

特定の実施態様の上述の記載は、第三者が、当業者の知識 (本明細書において引用される引用文献の内容を含む) を適用して、適切な実験を行うことなく、本発明の一般的な概念から逸脱することなく、かかる本発明の実施態様を容易に修飾し、および/または種々の応用を適合させ得ることができる、本発明の一般的な性質を十分に明らかにするであろう。それゆえ、かかる適合および修飾は、本明細書において提示された教示および指針に基づき、開示の実際態様と均等な意味および範囲内にあることが意図される。本明細書における用語または専門用語は、説明の目的のためのものであって、制限するためのものではなく、本明細書の専門用語または用語は、本明細書に提示の教示および指標に照らして、当業者の知識と組み合わせて、当業者によって解釈されるべきことは理解されるべ

きである。

【 0 1 5 6 】

引用文献

- Ali, A., Johnson, J.A., Franco, A.A., Metzger, D.J., Connell, T.D., Morris, J. G.J. and Sozhamannan, S. (2000) *Infection and Immunity* 68,1967-1974.
- Ali, A., M.H. Rashid, and D. K. R. Karaolis. 2002. High-frequency rugose exopolysaccharide production in *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol.* 68: 5773-5778.
- Ali, A., Mahmud, Z.H., Morris, J.G., Jr., Sozhamannan, S. and Johnson, J.A. (2000) *Infection and Immunity* 68, 6857-6864. 10
- Ali, A., Rashid, M.H. and Karaolis, D. K. R. (2002) *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5773-5778.
- Altschul, A.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Amikam, D., and M. Benziman. 1989. Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 171: 6649-55.
- Anriany, Y. A., R. M. Weiner, J. A. Johnson, C. E. De Rezende, and S. W. Joseph. 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype. *Appl Environ Microbiol.* 67: 4048-4056.
- Anriany, Y.A., Weiner, R.M., Johnson, J.A., De Rezende, C.E. and Joseph, S.W. (2001) *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4048-4056. 20
- Anwar, H., J.L. Strap, and J. W. Costerton. 1992. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 1347-1351.
- Archer, G.L. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis.* 26: 1179-81.
- Archibald, L., L. Phillips, D. Monnet, J. E. J. McGowan, F. Tenover, and R. Gagnes. 1997. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 24: 211-5. 30
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. and Lindberg, M. (2001) *FEMS Microbiol Lett* 204, 163-7.
- Bahrani-Mougeot, F.K., Buckles, E.L., Lockatell, C.V., Hebel, J.R., Johnson, D.E., Tang, C.M. and Donnenberg, M.S. (2002) *Mol Microbiol* 45, 1079-93.
- Balaban, N., Y. Gov, A. Bitler, and J. R. Boelaert. 2003. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. *Kidney Int.* 63: 340-5.
- Barker, J., and S. F. Bloomfield. 2000. Survival of *Salmonella* in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis. *Journal of Applied Microbiology.* 89: 137-144. 40
- Bateman, A. and Bycroft, M. (2000) *J Mol Biol* 299,1113-9.
- Beenken, K. E., J. S. Blevins, and M. S. Smeltzer. 2003. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect. Immun.* 71: 4206-11.
- Blevins, J. S., K. E. Beenken, M. O. Elasri, B. K. Hurlburt, and M. S. Smeltzer. 2002. Strain-dependent differences in the regulatory roles of *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70: 470-80.
- Bomchil, N., P. Watnick, and R. Kolter. 2003. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 185 :1384-90.
- Bradley, S. F., M. S. Terpenning, M. A. Ramsey, L. T. Zarins, K. A. Jorgensen, 50

- W. S. Sottile, D. R. Schaberg, and C. A. Kauffman. 1991. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med.* 115: 417-22.
- Brouillette E., Talbot B.G., Malouin F. 2003. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infect Immun.* 71 (4): 2292-2295.
- Brouillette E, Martinez A, Boyl BJ, Allen NE, Malouin F. 2004a. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 41(1) :35-41.
- Brouillette E, Grondin G, Lefebvre C, Talbot BG, Malouin F. 2004b. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* 101 (4): 253-62. 10
- Cole, A. M., S. Tahk, A. Oren, D. Yoshioka, Y. H. Kim, A. Park, and T. Ganz. 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8: 1064-9.
- Connolly, J. P., Kuchma, S.L. and O'Toole, G.A. (2003) in: 103rd General meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Cosgrove, S. E., G. Sakoulas, E. N. Perencevich, M. J. Schwaber, A. W. Karchmer, and Y. Carmeli. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 36: 53-9. 20
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318-1322.
- Costerton, J. W., R. T. Irvin, and K. J. Cheng. 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 35:299-324.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49: 711-745.
- Cramton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, and F. Gotz. 1999. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67: 5427-33. 30
- Croft, L., Beatson, S. A., Whitchurch, C.B., Huang, B., Blakeley, R.L. and Matlick, J.S. (2000) *Microbiology* 146 (Pt 10), 2351-64.
- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, and J. R. Penades. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183: 2888-2896.
- Cucarella, C., M. A. Tormo, C. Ubeda, M. P. Trotonda, M. Monzon, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa, and J. R. Penades. 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72: 2177-85. 40
- Cucarella, C., M. A. Tormo, E. Knecht, B. Amorena, I. Lasa, T. J. Foster, and J. R. Penades. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect. Immun.* 70: 3180-6.
- D'Argenio, D. A., M. W. Calfee, P. B. Rainey, and E. C. Pesci. 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J. Bacteriol.* 184: 6481-9.
- Davey, M. E., and G. A. O'toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64: 847-867.
- Davies, D. G., and G. G. Geesey. 1995. Regulation of the alginate biosynthesis 50

gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol.* 61:860-867.

Davis, B. M., Lawson, E. H., Sandkvist, M., Ali, A., Sozhamannan, S. and Waldo, M. K. (2000) *Science* 288,333-5.

de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6568-72.

Dills, W. L., C. D. Goodwin, T. M. Lincoln, J. A. Beavo, P. J. Bechtel, J. D. Corbin, and E. G. Krebs. 1979. Purification of cyclic nucleotide receptor proteins by cyclic nucleotide affinity chromatography. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 10: 199- 217. 10

Dingman, J. R., M. G. Rayner, S. Mishra, Y. Zhang, M. D. Ehrlich, J. C. Post, and G. D. Ehrlich. 1998. Correlation between presence of viable bacteria and presence of endotoxin in middle-ear effusions. *J Clin Microbiol.* 36: 3417-3419.

Domaracki, B. E., A. M. Evans, and R. A. Venezia. 2000. Vancomycin and oxacillin in synergy for methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1394-6.

Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases.* 8: 881-890.

Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 59: 4310-4317. 20

Ehlers, L. J. 2000. Gene transfer in biofilms, p. 215-256. In D. G. Allison, P. J. Gilbert, H. M. Lappin-Scott, and M. Wilson (eds), *Community structure and cooperation in biofilms*. General Society for Microbiology, Cambridge.

Ena, J., J. R. Boelaert, L. D. Boyken, H. W. Van Landuyt, C. A. Godard, and L. A. Herwaldt. 1994. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in patients on hemodialysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 15: 78-81.

Fang, L., Z. Gan, and R. R. Marquardt. 2000. Isolation, affinity purification, and identification of piglet small intestine mucosa receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* k88ac+fimbriae. *Infect. Immun.* 68: 564-9. 30

Farmer, J.J., 3rd, Asbury, M.A., Hickman, F.W., Brenner, D.J. and Group, E.S. (1980) *International Journal of Systematic Bacteriology* 30, 569-584.

Fett, W. F. 2000. Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *J. Food Protection.* 63: 625-32.

Fischetti, V.A., Pancholi, V. and Schneewind, O. (1991) in: *Genetics and molecular biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci*, pp. 290-294 (Dunny, G.M., Cleary, P.P. and McKay, L.L., Eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Galperin, M. Y. 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol.* 6: 552-67. 40

Galperin, M. Y., A. N. Nikolskaya, and E. V. Koonin. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* 203: 11-21.

Geesey, D. G., A. M. Chakrabarty, and G. G. Geesey. 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 59: 1181-1186.

Gilbert, P., J. Das, and I. Foley. 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res.* 11: 160-7.

Goodell, E. W. 1985. Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 163: 50

305-10.

Goodell, E.W. and Schwarz, U. (1985) *J Bacteriol* 162, 391-7.

Goutz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43: 1367-1378.

Govan, J. R. W., and V. Deretic. 1996. Microbial Pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60: 539-574.

Grobe, S., J. Wingender, and H. C. Flemming. 2001. Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *Int J Hyg Environ Health.* 204: 139-142.

Guvener, Z.T. and McCarter, L.L. (2003) in: 103rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D.C. 10

Hammer, B. K., and B. L. Bassler. 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 50: 101-4.

Harlow, E., and D. Lane 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor.

Haugo, A.J. and Watnick, P.I. (2002) *Molecular Microbiology* 45, 471-483.

Hayakawa, Y., R. Nagata, A. Hirata, M. Hyodo, and R. Kawai. 2003. A facile synthesis of cyclic bis(3'-5')diguanilylic acid. *Tetrahedron.* 59: 6465-6471.

Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleischmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, and F. C. M. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* 406: 477-483. 20

Heidrich, C., Templin, M.F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., de Pedro, M.A. and Holtje, J.V. (2001) *Molecular Microbiology* 41, 167-78.

Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H. and Holtje, J.V. (2002) *Journal of Bacteriology* 184, 6093-6099.

Hermans, K., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck. 2003. Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Vet. Microbiol.* 91: 57-64. 30

Herrero, M., de Lorenzo, V. and Timmis, K.N. (1990) *Journal of Bacteriology* 172, 6557-6567.

Holtje, J.V. and Heidrich, C. (2001) *Biochimie* 83, 103-108.

Huang, S. S., and R. Platt. 2003. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clin Infect Dis.* 36: 281-5.

Huard, C., Miranda, G., Wessner, F., Bolotin, A., Hansen, J., Foster, S.J. and Chapot-Chartier, M.P. (2003) *Microbiology* 149, 695-705.

Hyde, J. A., R. O. Darouiche, and J. W. Costerton. 1998. Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. *J Heart Valve Dis.* 7: 316-326. 40

Jackson, D. W., J. W. Simecka, and T. Romeo. 2002. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 184: 3406-10.

Jenal, U. 2004. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr Opin Microbiol.* 7: 185-91.

Jobling, M.G. and Holmes, R.K. (1997) *Molecular Microbiology* 26, 1023-1034.

Jones, H. A., J. W. Lillard, Jr., and R. D. Perry. 1999. HmsT, a protein essential for expression of the haemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis*. *M* 50

icrobiology. 145 (Pt 8): 2117-28.

Jones, H.A., Lillard, J.W., Jr. and Perry, R.D. (1999) Microbiology 145 (Pt 8), 2117-28.

Kaper, J.B., Morris Jr., J.G. and Levine, M.M. (1995) Clinical Microbiology Reviews 8, 48-86.

Kern, D., Volkman, B.F., Luginbuhl, P., Nohaile, M.J., Kustu, S. and Wemmer, D.E. (1999) Nature 402, 894-8.

Kirmani, N., C. U. Tuazon, H. W. Murray, A. E. Parrish, and J. N. Sheagren. 1978. Staphylococcus aureus carriage rate of patients receiving long-term hemodialysis. Arch Intern Med. 138: 1657-9.

Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh. 1997. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin. Microbiol. Rev. 10: 505-20.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Lamont, R. J., and H. F. Jenkinson. 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis. Microbiol Mol Biol Rev. 62: 1244-1263.

Laupland, K. B., D. L. Church, M. Mucenski, L. R. Sutherland, and H. D. Davies. 2003. Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive Staphylococcus aureus infections. J. Infect. Dis. 187: 1452-9.

Levine, M.M., Black, R.E., Clements, M.L., Nalin, D.R., Cisneros, L. and Finkelestein, R.A. (1981) in: Acute enteric infections in children. New prospects for treatment and prevention (Holme, T., Holmgren, J., Merson, M.H. and Mollby, R., Eds.) /Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Lincoln, T. M., W. L. Dills, Jr., and J. D. Corbin. 1977. Purification and subunit composition of guanosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine lung. J. Biol. Chem. 252: 4269-75.

Lowy, F. D. 1998. Staphylococcus aureus infections. N. Engl. J. Med. 339:520-32.

Luzar, M. A., G. A. Coles, B. Faller, A. Slingeneyer, G. D. Dah, C. Briat, C. Wone, Y. Knefati, M. Kessler, and F. Peluso. 1990. Staphylococcus aureus nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. N. Engl. J. Med. 322: 505-9.

Maira-Litran, T., A. Kropec, C. Abeygunawardana, J. Joyce, G. Mark, 3rd, D. A. Goldmann, and G. B. Pier. 2002. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. Infect. Immun. 70: 4433-40.

Matsuura, T., Y. Miyake, S. Nakashima, H. Komatsuzawa, Y. Akagawa, and H. Sugina. 1996. Isolation and characterization of teichoic acid-lake substance as an adhesin of Staphylococcus aureus to HeLa cells. Microbiol. Immunol. 40: 247-54.

Mayer, R., P. Ross, H. Weinhouse, D. Amikam, G. Volman, P. Ohana, R. D. Calhoun, H. C. Wong, A. W. Emerick, and M. Benziman. 1991. Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants. Proc Natl Acad Sci U S A. 88: 5472-6.

McCarthy, S. A., and F. M. Khambaty. 1994. International dissemination of epidemic Vibrio cholerae by cargo ship ballast and other nonpotable waters. Appl Environ Microbiol. 60: 2597-2601.

McKenney, D., K. L. Pouliot, Y. Wang, V. Murthy, M. Ulrich, G. Doring, J. C. Lee, D. A. Goldmann, and G. B. Pier. 1999. Broadly protective vaccine for Staphylococcus aureus based on an in vivo-expressed antigen. Science. 284: 1523-7.

10

20

30

40

50

- Menard, R., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1993. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines *IpaB*, *IpaC*, and *IpaD* as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175: 5899-5906.
- Mest, D. R., D. H. Wong, K. J. Shimoda, M. E. Mulligan, and S. E. Wilson. 1994. Nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on admission to the surgical intensive care unit increases the risk of infection. *Anesth Analg.* 78: 644-50.
- Miller, V.L. and Mekalanos, J.J. (1988) *Journal of Bacteriology* 170, 2575-2583.
- Miller, M.B., and B.L. Bassler (2001) Quorum sensing in bacteria, *Annu Rev Microbiol* 55: 165-99. 10
- Miller, M. B., K. Skorupski, D. H. Lenz, R. K. Taylor, and B. L. Bassler. 2002. Parallel Quorum Sensing Systems Converge to Regulate Virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell.* 110: 303-314.
- Miyake, Y., A. Kohada, I. Fujii, M. Sugai, and H. Suginaka. 1989. Aminoglycosides enhance the adherence of *Staphylococcus aureus* to HeLa cells. *J Antimicrob Chemother.* 23: 79-86.
- Miyake, Y., A. Kohada, M. Sugai, and H. Suginaka. 1991. Mechanism of aminoglycoside enhancement of *Staphylococcus aureus* adherence to HeLa cells. *J Antimicrob Chemother.* 28: 811-7. 20
- Morris Jr., J. G., M. B. Sztein, E. W. Rice, J. P. Nataro, G. A. Losonsky, P. Panigrahi, C.O. Tacket, and J. A. Johnson. 1996. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. *J Infect Dis.* 174: 1364-1368.
- Muder, R. R., C. Brennen, M. M. Wagener, R. M. Vickers, J. D. Rihs, G. A. Hancock, Y. C. Yee, J. M. Miller, and V. L. Yu. 1991. Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med.* 114: 107-12.
- Muto, C. A., J. A. Jernigan, B. E. Ostrowsky, H. M. Richet, W. R. Jarvis, J. M. Boyce, and B. M. Farr. 2003. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 24: 362-86. 30
- Nakajima, H., Y. U. Katagiri, N. Kiyokawa, T. Taguchi, T. Suzuki, T. Sekino, K. Mimori, M. Saito, H. Nakao, T. Takeda, and J. Fujimoto. 2001. Single-step method for purification of Shiga toxin-1 B subunit using receptor-mediated affinity chromatography by globotriaosylceramide-conjugated octyl sepharose CL-4B. *Protein Expr Purif.* 22: 267-75.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) Report. 1998. Data summary from October 1986-April 1998, issued June 1998. *Am J Infect Control.* 26: 522-33. 40
- Nguyen, M. H., C. A. Kauffman, R. P. Goodman, C. Squier, R. D. Arbeit, N. Singh, M. M. Wagener, and V. L. Yu. 1999. Nasal carriage of and infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. *Ann Intern Med.* 130: 221-5.
- Nichols, W. W., S. M. Dorrington, M. P. Slack, and H. L. Walmsley. 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother.* 32: 518-523.
- Nickel, J. C., I. Ruseska, J. B. Wright, and J. W. Costerton. 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother.* 27: 619-624.
- Notley-McRobb, L., A. Death, and T. Ferenci. 1997. The relationship between external glucose concentration and cAMP levels inside *Escherichia coli*: implications 50

ns for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase. *Microbiology*. 143 (Pt 6): 1909-18.

Nunez, C., Moreno, S., Cardenas, L., Soberon-Chavez, G. and Espin, G. (2000) *Journal of Bacteriology* 182, 4829-4835.

Ott, S. L. 1999. Costs of herd-level production losses associated with subclinical mastitis in U.S.dairy cows. National Mastitis Council 38th Annual Meeting.

Park, J.T. (1993) *J Bacteriol* 175, 7-11.

Parkhill, J. et al. (2001) *Nature* 413, 523-7.

Parsek, M. R. 2003. The role of EPS in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. 103rd General meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D.C. 10

Peacock, S. J., I. de Silva, and F. D. Lowy. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol.* 9: 605-10.

Pei, J. and Grishin, N.V. (2001) *Proteins* 42, 210-6.

Petter, J.G. (1993) *Appl Environ Microbiol* 59, 2884-90.

Pollitzer, R. (1959) Monograph Series 43. Geneva: World Health Organization.

Pujol, M., C. Pena, R. Pallares, J. Ariza, J. Ayats, M. A. Dominguez, and F. Gudiol. 1996. Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am J Med.*190: 509-16 20

Rajanna, C., J. Wang, D. Zhang, Z. Xu, A. Ali, Y.-M. Hou, and D. K. R. Karaolis. 2003. The *Vibrio* pathogenicity island of epidemic *Vibrio cholerae* forms precise extrachromosomal circular excision products. *J. Bacteriol.* 185: 6893-6901.

Rashid, M. H., C. Rajanna, A. Ali, and D. K. R. Karaolis. 2003. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Letts.* 227: 113-119.

Raziuddin, S. 1980. Immunochemical studies of the lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*: constitution of O specific side chain and core polysaccharide. *Infect Immun.* 27: 211-215.

Rice, E.W. et al. (1993) *International Journal of Environmental Health Research* 30
h 3, 89-98.

Richardson, K. (1991) *Infection and Immunity* 59, 2727-2736.

Richet, H. M., M. Benbachir, D. E. Brown, H. Giamarellou, I. Gould, M. Gubina, P. Heczko, S. Kalenic, M. Pana, D. Pittet, S. B. Redjeb, J. Schindler, C. Starling, M. J. Struelens, W. Witte, and W. R. Jarvis. 2003. Are there regional variations in the diagnosis, surveillance, and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 24: 334-41.

Roche, F. M., M. Meehan, and T. J. Foster. 2003. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology.* 149: 2759-67. 40

Roghmann, M. C., A. Siddiqui, K. Plaisance, and H. Standiford. 2001. MRSA colonization and the risk of MRSA bacteraemia in hospitalized patients with chronic ulcers. *J Hosp Infect.* 47: 98-103.

Roumping, U., M. Rohde, A. Olsen, S. Normark, and J. Reinkoster. 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* 36: 10-23.

Ross, P. et al. (1987) *Nature* 325, 279-281.

Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* 55: 35-58.

Ross, P., R. Mayer, H. Weinhouse, D. Amikam, Y. Huggirat, M. Benziman, E. de V 50

room, A. Fidder, P. de Paus, L. A. Sliedregt, and et al. 1990. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *J. Biol. Chem.* 265: 18933-43.

Ross, P., Y. Aloni, C. Weinhouse, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Meyer, and M. Benziman. 1991. An unusual guanyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett.* 186: 191-196.

Schauder, S., and B.L. Bassler (2001) The languages of bacteria, *Genes Dev* 15: 1468-80.

Stark, R. M., G. J. Gerwig, R. S. Pitman, L. F. Potts, N. A. Williams, J. Greenman, I. P. Weinzwieg, T. R. Hirst, and M. R. Millar. 1999. Biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 121-126.

Steinberger, O., Z. Lapidot, Z. Ben-Ishai, and D. Amikam. 1999. Elevated expression of the CD4 receptor and cell cycle arrest are induced in Jurkat cells by treatment with the novel cyclic dinucleotide 3',5'-cyclic diguanylic acid. *FEBS Lett.* 444: 125-9.

Sutra, L., and B. Poutrel. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40: 79-89.

Tal, R. et al. (1998) *Journal of Bacteriology* 180, 4416-4425.

Tatusov, R. L., D. A. Natale, I. V. Garkavtsev, T. A. Tatusova, U. T. Shankararam, B. S. Rao, B. Kiryutin, M. Y. Galperin, N. D. Fedorova, and E. V. Koonin. 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucl. Acids Res.* 29: 22-8.

Tsui, H.C., Zhao, G., Feng, G., Leung, H.C. and Winkler, M.E. (1994) *Mol Microbiol* 11, 189-202.

Tuazon, C. U., A. Perez, T. Kishaba, and J. N. Sheagren. 1975. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. *Jama*. 231: 1272.

Tuazon, C. U., and J. N. Sheagren. 1974. Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. *J. Infect. Dis.* 129: 725-7.

Tusher, V. G., R. Tibshirani, and G. Chu. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 5116-21.

Valle, J., A. Toledo-Arana, C. Berasain, J. M. Ghigo, B. Amorena, J. R. Penades, and I. Lasa. 2003. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 48: 1075-87.

von Eiff, C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, and G. Peters. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N. Engl. J. Med.* 344: 11-6.

Wai, S. N., Y. Mizunoe, A. Takade, S. I. Kawabata, and S. I. Yoshida. 1998. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 64: 3648-3655.

Wang, R. F., and S. R. Kushner. 1999. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene*. 100: 195-199.

Watnick, P. I., and R. Kolter. 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* E1 Tor biofilm. *Mol Microbiol.* 34: 586-595.

Watnick, P. I., and R. Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 182, 5055-5062.

82: 2675-2679.

Watnick, P. I., C. M. Lauriano, K. E. Klose, L. Croal, and R. Kolter. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* 0139. *Mol Microbiol.* 39: 223-235.

White, P.B. 1938. The rugose variant of vibrios. *Journal of Pathol. Bacteriol.* 46: 1-6.

White, P. B. 1940. The characteristic hapten and antigen of rugose races of cholera and E1 Tor vibrios. *Journal of Pathol. Bacteriol.* 50: 160-164.

Whitehead, N.A., A.M. Barnard, H. Slater, N.J. Simpson, and G.P. Salmond (2001) Quorum sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol Rev* 25: 365-404. 10

Wimpenny, J. 2000. An overview of biofilms as functional communities, p. 1-24. In D. G. Allison, P. Gilbert, H. M. Lappin-Scott, and M. Wilson (eds), *Community structure and co-operation in biofilms*. Society for General Microbiology, Great Britain.

Wingender, J., T. R. Neu, and H.-C. Flemming 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? In J. Wingender, T. R. Neu, and H.-C. Flemming (eds), *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, Berlin.

Wolfinger, R. D., G. Gibson, E. D. Wolfinger, L. Ennett, H. Hamadeh, P. Bushel, C. Afshari, and R. S. Paules. 2001. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J. Computational Biol.* 6: 625-637. 20

Wyatt, J. E., S. M. Poston, and W. C. Noble. 1990. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cell monolayers. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 834-44.

Yancey, R.J., Willis, D.L. and Berry, L.J. (1978) *Infection and Immunity* 22, 387-392.

Yildiz, F. H., and G. K. Schoolnik. 1999. *Vibrio cholerae* 01 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 4028-4033.

Yildiz, F. H., and G. K. Schoolnik. 1999. *Vibrio cholerae* 01 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 4028-4033. 30

Yildiz, F.H., Dolganov, N.A. and Schoolnik, G.K. (2001) *Journal of Bacteriology* 183, 1716-1726.

Yu, V. L., A. Goetz, M. Wagener, P. B. Smith, J. D. Rihs, J. Hanchett, and J. J. Zuravleff. 1986. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis. *N. Engl. J. Med.* 315: 91-6.

Zhang, D., Z. Xu, W. Sun, and D. K. Karalolis. 2003. The *Vibrio* Pathogenicity Island-Encoded Mop Protein Modulates the Pathogenesis and Reactogenicity of Epidemic *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 71: 510-515. 40

Zhu, J., M. B. Miller, R. E. Vance, M. Dziejman, B. L. Bassler, and J. J. Mekalanos. 2002. Quorum sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 3129-3134.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 7 】

【図 1】図 1 A および 1 B は、ピブリオ・コレラ株 N 1 6 9 6 1 の滑らかな変異体（図 1 A）およびしわ状変異体（図 1 B）のコロニー形態を示す。

【図 2】図 2 は、ピブリオ・コレラの滑らかなコロニー変異体およびしわ状コロニー変異体によるバイオフィルム形成を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、ピブリオ・コレラ株 N 1 6 9 6 1 (野生型)、A m i B 変異体 (D K 6 3 0)、および R o c S 変異体 (D S 5 6 7) の運動性を示す遊走プレートアッセイ (Sw arm plate assay) である。

【図 4】図 4 A および 4 B は、ピブリオ・コレラ株 N 1 6 9 6 1 (野生型の細胞を図 4 A に示し、A m i B 変異細胞を図 4 B に示す) の細胞形態に対する A m i B 変異の効果を示す。

【図 5】図 5 A および図 5 B は c - ジ - G M P の H P L C 特性を示す。

【図 6】図 6 A ~ 6 F は、スタフィロコッカス・アウレウス細胞と細胞の凝集に対する c - ジ - G M P の効果を示す。

【図 7】図 7 A ~ 7 C は、スタフィロコッカス・アウレウスのヒト臨床単離物のポリスチレン表面 (マイクロタイタープレートを用いた) 上でのバイオフィーム形成能に対する c - ジ - G M P の効果を示す。 10

【図 8】図 8 A ~ 8 D は、スタフィロコッカス・アウレウスウシ乳房炎単離物 V 3 2 9 (図 8 A)、M 5 5 6 (図 8 B)、V 2 9 9 (図 8 C) および V 3 1 5 (図 8 D) のポリスチレン表面上でのバイオフィーム形成能に対する c - ジ - G M P の効果についての定量的分析を示すグラフである。

【図 9】図 9 A および 9 B は、ポリスチレン表面上でのスタフィロコッカス・アウレウスのバイオフィーム形成の阻害に対するグアノシンクレオチドアナログの効果を示す。

【図 10】図 10 は、24 時間既にバイオフィームを形成したスタフィロコッカス・アウレウスに対する c - ジ - G M P の効果についての定量的バイオフィーム分析を示すグラフ 20 である。

【図 11】図 11 A および 11 B は、H e L a 上皮細胞と接着したスタフィロコッカス・アウレウス D K 8 2 5 に対する c - ジ - G M P 処置の効果を示す。

【図 12】図 12 は、ピブリオ・コレラ株 N 1 6 9 6 1 および R o c S 変異体におけるバイオフィーム形成に対する c - ジ - G M P の効果を示すグラフである。

【図 13】図 13 は、バイオフィーム成長の反応システムの略図であり、これは 37 のインキュベーター内に完全に入れられたワンスルーシステムである。

【図 14】図 14 は、図 13 に示したバイオフィーム成長反応システムに挿入したインラインであり、P B B A およびステンレススチールを含む種々の表面に接触したバイオフィーム試料を得るために用いられる、シールドフローセル (Protofab, Inc., Bozeman, M 30 T) を示す。

【図 15】図 15 は、マウス乳房炎モデルにおけるスタフィロコッカス・アウレウス N e w b o u l d 3 0 5 株の C F U 数に対する c - ジ - G M P の効果を示すグラフである。

【図 1】

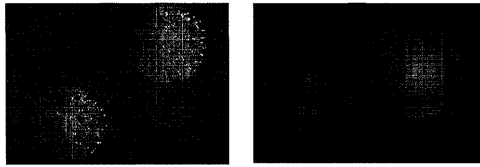


FIG. 1A

FIG. 1B

【図 2】

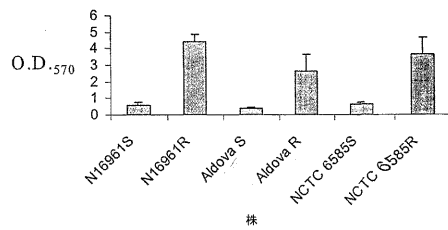


FIG. 2

【図 3】

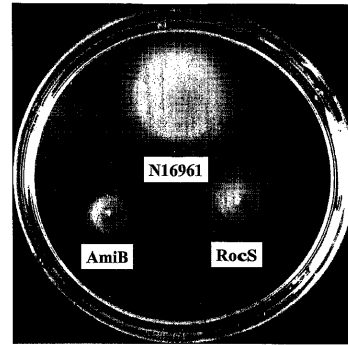


FIG. 3

【図 4】

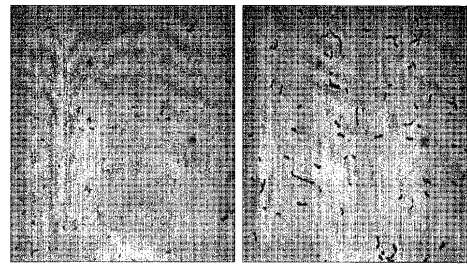


FIG. 4A

FIG. 4B

【図 5】

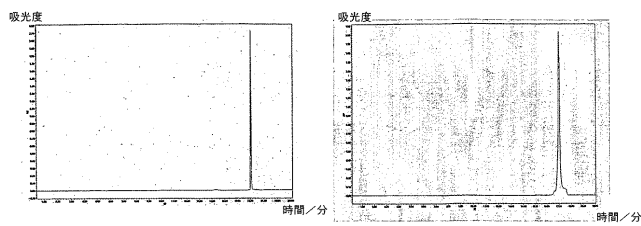


FIG. 5A

FIG. 5B

【図 7】

FIG. 7A

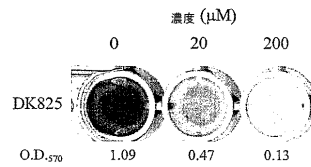


FIG. 7B

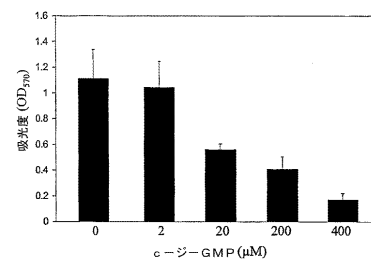
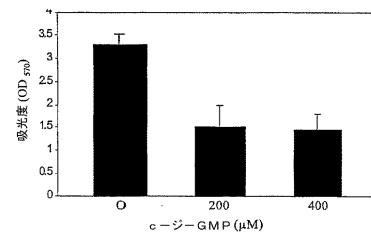


FIG. 7C



【図 6】

FIG. 6A



FIG. 6B

FIG. 6C

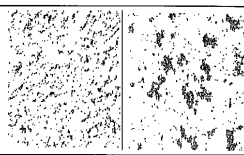


FIG. 6D

FIG. 6E

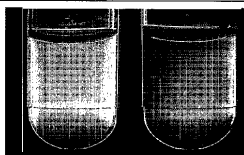


FIG. 6F

【 図 8 】

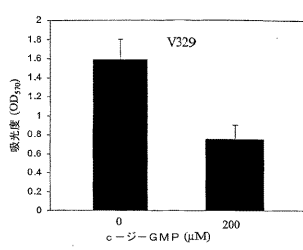


FIG. 8A

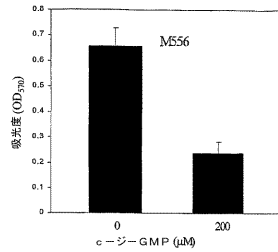


FIG. 8B

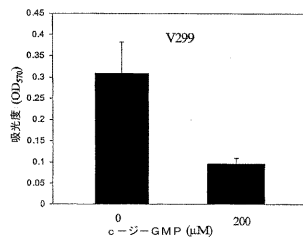


FIG. 8C

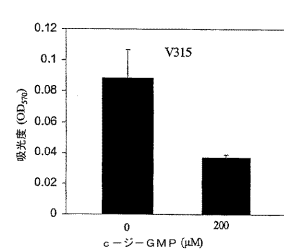


FIG. 8D

【 図 9 】

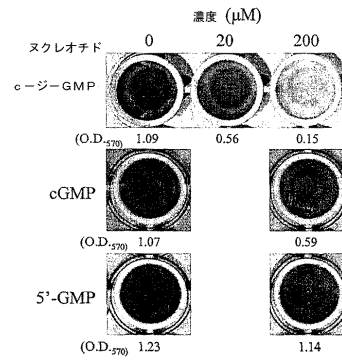


FIG. 9A

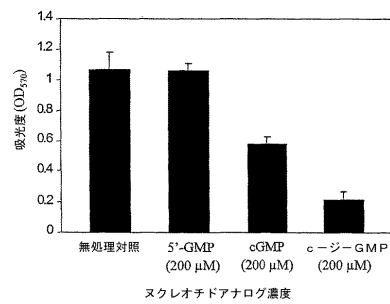


FIG. 9B

【 図 10 】

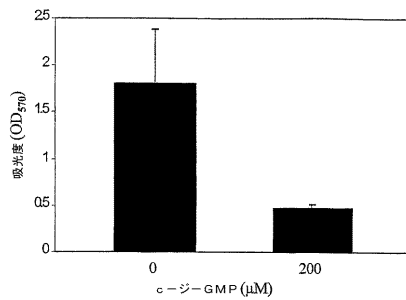


FIG. 10

【 図 12 】

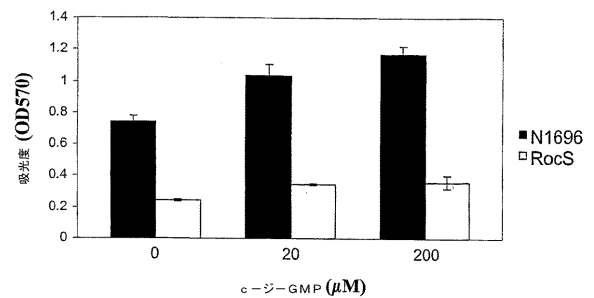


FIG. 12

【 図 11 】



FIG. 11A

FIG. 11B

【 図 13 】

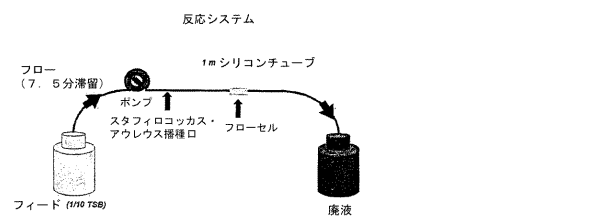


FIG. 13

【図 14】

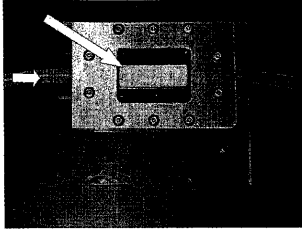


FIG. 14

【図 15】

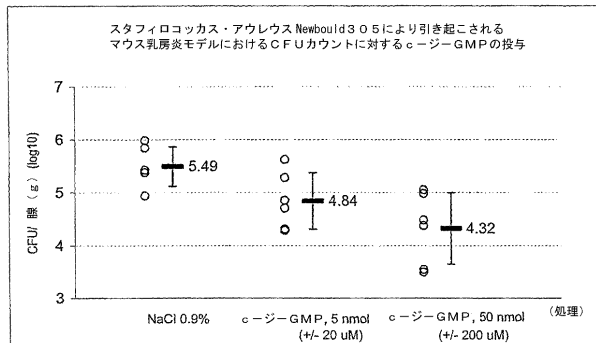


FIG. 15

【配列表】

[20075006970000001.xml](#)

【手続補正書】

【提出日】平成18年3月30日(2006.3.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

[20075006970000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2004/023498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 A61K31/7084 A61P1/12 A61P31/04 A61P31/02		
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)		
IPC 7 A61K		
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, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	RASHID MOHAMMED H ET AL: "Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of <i>Vibrio cholerae</i> ." FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 227, no. 1, 6 September 2003 (2003-09-06), pages 113-119, XP002322846 ISSN: 0378-1097 abstract page 113, right-hand column, paragraph 2 page 118, left-hand column, paragraph 2 page 118, right-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 April 2005		11/04/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-8016		Authorized officer Hars, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/023498

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the International application as filed
- ☒ filed together with the International application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2004/023498

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	<p>JENAL URS: "Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria?" CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, vol. 7, no. 2, 2 March 2004 (2004-03-02), pages 185-191, XP002322847 ISSN: 1369-5274 cited in the application abstract page 189, right-hand column, last paragraph</p>	1-27
A	<p>----- GALPERIN MICHAEL Y ET AL: "Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 203, no. 1, 11 September 2001 (2001-09-11), pages 11-21, XP002322854 ISSN: 0378-1097 cited in the application abstract table 1 -----</p>	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/023498**Box 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:

Although claims 1-16,20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

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

(72) 発明者 デイビッド・ケイ・アール・カラオリス
アメリカ合衆国 2 1 2 1 0 - 2 2 2 7 メリーランド州ボルティモア、クラブ・ロード 4 番
F ターム (参考) 4C057 BB02 DD01 MM02 MM04 MM10
4C086 AA01 AA02 EA17 EA18 MA01 MA04 NA14 ZB35 ZC41