



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0085457

(43) 공개일자 2007년08월27일

(21) 출원번호 10-2007-7011878

(22) 출원일자 2007년05월25일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년05월25일

(87) 국제공개번호 WO 2006/059247

(86) 국제출원번호 PCT/IB2005/004126

국제출원일자 2005년10월25일

국제공개일자 2006년06월08일

(30) 우선권주장 60/621,921 2004년10월25일 미국(US)

(71) 출원인 더 유니버시티 오브 웨스턴 온타리오

캐나다 온타리오 엔6에이 5비8 론돈 스티븐슨-로손 빌딩 319호 리치몬드 스트리트 노쓰
1151, 인더스트리라이어슨

(72) 발명자 헤인리치스, 데이비드, 이.

캐나다 엔5와이 2엑스2 온타리오 런던 메잇랜드 스트리트 923

버메이伦, 크리스티

캐나다 엔0엠 2에스0 온타리오 왓포드 워윅 빌리지 로드 6308

(74) 대리인 남상선

전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 스타필로코쿠스 아우레우스의 철에 의해 조절되는 표면결정인자 I s d A, I s d B, 및 I s d C
기재 백신,조성을 및 방법

(57) 요약

본 발명에서 스타필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)로부터의 철에 의해 조절되는 표면 결정인자 단백질 IsdA, IsdB 및 IsdC, 뿐만 아니라 IsdA, IsdB 또는 IsdC에 특이적인 항체, 안티센스 핵산 및 siRNA이 백신으로 사용되고, 이는 스타필로코쿠스 아우레우스 감염과 관련된 질병 또는 질환을 치료하거나 예방하기 위한 방법에서 사용된다. IsdA, IsdB 또는 IsdC의 발현 및/또는 기능을 억제하거나 간섭하는 작용제를 확인하기 위한 스크리닝 검정이 또한 기술된다.

특허청구의 범위

청구항 1.

IsdA (SEQ ID NO:3) 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 주사용 제형 내에 존재함을 특징으로 하는 백신.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 애쥬번트를 추가로 포함함을 특징으로 하는 백신.

청구항 4.

IsdB (SEQ ID NO:6) 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 주사용 제형 내에 존재함을 특징으로 하는 백신.

청구항 6.

제 4항에 있어서, 애쥬번트를 추가로 포함함을 특징으로 하는 백신.

청구항 7.

IsdC (SEQ ID NO:9) 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 주사용 제형 내에 존재함을 특징으로 하는 백신.

청구항 9.

제 7항에 있어서, 애쥬번트를 추가로 포함함을 특징으로 하는 백신.

청구항 10.

항-박테리아 유효량의 IsdA (SEQ ID NO:3)에 결합하는 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 조성물.

청구항 11.

항-박테리아 유효량의 IsdB (SEQ ID NO:6)에 결합하는 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 조성물.

청구항 12.

항-박테리아 유효량의 IsdC (SEQ ID NO:9)에 결합하는 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 조성물.

청구항 13.

SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4 또는 SEQ ID NO:7에 대해 안티센스(antisense)인 핵산 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 조성물.

청구항 14.

SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4 또는 SEQ ID NO:7의 핵산을 포함하는 siRNA 분자 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 조성물.

청구항 15.

제 1항 또는 제 4항 또는 제 7항중 어느 한 항의 백신의 유효량을 피검체에게 투여하는 것을 포함하여, 피검체의 스태필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)의 감염에 의해 야기되거나 이에 기인된 질병 또는 질환을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 16.

제 10항의 약제 조성물의 유효량을 피검체에 투여하는 것을 포함하여, 피검체의 스태필로코쿠스 아우레우스의 감염에 의해 야기되거나 이에 기인된 질병 또는 질환을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 17.

제 11항의 약제 조성물의 유효량을 피검체에 투여하는 것을 포함하여, 피검체의 스태필로코쿠스 아우레우스의 감염에 의해 야기되거나 이에 기인된 질병 또는 질환을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 18.

제 12항의 약제 조성물의 유효량을 피검체에 투여하는 것을 포함하여, 피검체의 스태필로코쿠스 아우레우스의 감염에 의해 야기되거나 이에 기인된 질병 또는 질환을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 19.

제 13항의 약제 조성물의 유효량을 피검체에 투여하는 것을 포함하여, 피검체의 스태필로코쿠스 아우레우스의 감염에 의해 야기되거나 이에 기인된 질병 또는 질환을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 20.

제 14항의 약제 조성물의 유효량을 피검체에 투여하는 것을 포함하여, 피검체의 스태필로코쿠스 아우레우스의 감염에 의해 야기되거나 이에 기인된 질병 또는 질환을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 21.

(i) 작용제의 부재시 Isd 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용을 허용하는 조건하에서 작용제의 존재하에 Isd 폴리펩티드와 적절한 상호작용 분자를 접촉시키는 단계; 및

(ii) Isd 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용의 수준을 결정하는 단계를 포함하여, Isd 폴리펩티드에 결합하고 철흡수를 억제하는 작용제를 확인하는 방법으로서,

작용제의 부재시에 대한 작용제의 존재시의 Isd 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용의 상이한 수준이 상기 작용제가 Isd 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용을 억제하는 것을 나타내는 방법.

청구항 22.

제 21항에 있어서, Isd 폴리펩티드가 스태필로코쿠스 아우레우스 IsdA, IsdB 및 IsdC로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

(i) 작용제의 존재 또는 부재하에서 야생형 스태필로코쿠스 아우레우스 군주를 배양하는 단계; 및 (ii) Isd 폴리펩티드의 발현을 비교하는 단계를 포함하여, 스태필로코쿠스 아우레우스의 IsdA, IsdB 및 IsdC 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드의 발현을 억제하는 작용제를 확인하는 방법으로서, 상기 작용제로 처리된 세포에서의 Isd 폴리펩티드의 발현의 보다 큰 감소가 상기 작용제가 스태필로코쿠스 아우레우스의 Isd 폴리펩티드의 발현을 억제함을 나타내는 것인 방법.

청구항 24.

(i) 작용제의 존재 또는 부재하에서 야생형 스태필로코쿠스 아우레우스를 배양하는 단계; 및 (ii) *isd* 핵산의 발현을 비교하는 단계를 포함하여, 스태필로코쿠스 아우레우스의 *isdA*, *isdB* 및 *isdc* 핵산으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산의 발현을 억제하는 작용제를 확인하는 방법으로서, 상기 작용제로 처리된 세포에서의 *isd* 핵산의 발현의 보다 큰 감소가 상기 작용제가 스태필로코쿠스 아우레우스의 *isd* 핵산의 발현을 억제함을 나타내는 것인 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

배경기술

락토바실러스 (Archibald (1983) FEMS Microbiol. Lett. 19:29-32) 및 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*) (Posey and Gherardini (2000) Science 288: 1651-1653)를 제외하고는 대부분의 미생물의 성장에 철은 절대적으로 필요하다. 각각에서 네번째로 풍부한 원소임에도 불구하고, 철은 종종 성장 제한 영양소이다. 호기성 환경 및 생리적 pH에서, 철은 삼가철 (Fe^{3+}) 상태로 존재하고, 불용성 히드록시드 및 옥시히드록시드 침전물을 형성한다. 포유동물은 철을 용해시켜 숙주 세포에 전달하는 트랜스페린 및 락토페린과 같은 고친화성 철 결합 당단백질을 함유함으로써 철에 의한 제한을 극복한다 (Weinberg (1999) Emerg. Infect. Dis. 5:346-352). 이러한 결과는 자유 세포외 철을 추가로 제한하고, 이에 따라 인체에서의 자유 철의 농도는 생산적 박테리아 감염을 지지하는데 요구되는 것 보다 여러 단계 낮은 농

도인 10^{-18} M로 측정된다 (Braun et al., (1998) *Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation*, p. 67-145. In A. Sigel and H. Sigel (ed.), *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 35. *Iron transport and storage in microorganisms, plants, and animals*. Marcel Dekker, Inc., New York). 철의 격리는 박테리아 감염에 대한 중요한 선천적 방어이다 (Skaar and Schneewind (2004) *Microbes and Infect.* 6:390-397).

철에 의한 제한을 극복하기 위해, 박테리아는 이러한 필수 영양소를 획득하기 위한 여러 메카니즘으로 진화하였다. 예를 들어, 파스튜렐라시에 (*Pasteurellaceae*) 일원은 철 적재된 형태의 트랜스페린 및 락토페린의 인지를 위한 수용체를 발현할 수 있다 (Gray-Owen and Schryvers, (1996) *Trends Microbiol.* 4:185-91). 가장 일반적인 철 획득 메카니즘 중 하나는 철포획체로 불리는 낮은 분자량의 고친화성 철 칼레이트제, 및 제2철-포획체 착물을 활발하게 내화시키는 동족 세포 외피 수용체를 통한 것이다. 많은 철포획체는 숙주 철에 대해 트랜스페린 및 락토페린과 성공적으로 경쟁할 수 있다. 또한, 제2 철-철포획체 흡수 시스템의 발현은 패혈성 대장균 (*E. coli*) (Williams (1979) *Infect. Immun.* 26:925-932), 비브리오 양길라룸 (*Vibrio anguillarum*) (Crossa et al., (1980) *Infect. Immun.* 27:897-902), 어위니아 크리сан테마이 (*Erwinia chrysanthemi*) (Enard et al., (1988) *J. Bacteriol.* 170:2419-2426) 및 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) (Meyer et al., (1996) *Infect. Immun.* 64:518-523)와 같은 박테리아에서 중요한 독성 요인이다.

스테필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)는 *sstABCD* (Morrissey et al., (2000) *Infect. Immun.* 68:6281-6288), *sirABC* (Heinrichs et al., (1999) *J. Bacteriol.* 181:1436-1443; Dale et al., (2004) *J. Bacteriol.*, In press), *fhuCBG* (Sebulsky et al., (2000) *J. Bacteriol.* 182:4394-4400), 및 *sbn* (Dale et al., (2004) *Infect. Immun.* 72:29-37) 오페론에 의해 엔코딩되는 것을 포함하는 상이한 여러 철에 의해 조절되는 ABC 운반체를 지닌다. 운반되는 기질은 *sst* 및 *sir* 시스템에 대해 공지되어 있지 않지만, *fhuD1* 및 *fhuD2* (Sebulsky and Heinrichs (2001) *J. Bacteriol.* 183:4994-5000)와 관련된 *fhuCBG* 유전자가 철(III)-히드록사메이트 착물의 획득과 관련된다. 다수의 혈장응고효소-네거티브 스테필로코쿠스 (CoNS) 및 스테필로코쿠스 아우레우스의 균주를 포함하는 스테필로코쿠스의 여러 일원이 철포획체를 생성한다. 이들 철포획체들 중 두개인 스태필로페린 (staphyloferrin) A (Konetschny-Rapp et al., (1990) *Eur. J. Biochem.* 191:65-74; Meiwes et al., (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 67:201-206) 및 스태필로페린 B (Dreschel et al., (1993) *BioMetals*. 6:185-192; Haag et al., (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* 115:125-130)은 폴리카르복실레이트 부류이나, 세번째의 아우레오케린 (aureochelin) (Courcol et al., (1997) *Infect. Immun.* 65:1944-1948)은 화학적으로 특성 규명되지 않았다. 추가로, *sbn* 오페론에 의해 엔코딩되는 추가의 철포획체는 스태필로코쿠스 아우레우스에 대해 특이적인 것으로 보이고, 기타 CoNS 균주와 비교하여 스태필로코쿠스 아우레우스의 독성에 중요 결정인자일 수 있다 (Dale et al., (2004) *Infect. Immun.* 72:29-37).

그러나, 인체에서 가장 풍부한 철 공급원은 햄 함유 단백질 (햄단백질)에 격리되어 있다. 햄은 포르피린의 4개의 고리 질소 원자에 결합된 단일 철 원자를 함유하는 고리 분자이다. 햄단백질은 다수의 세포 기능을 책임지고, 혜모글로빈 및 미오글로빈이 포유동물에서 가장 풍부한 햄 함유 단백질이다. 철은 박테리아 병원체의 생존에 필수적이고, 박테리아는 자유 햄 및 햄단백질로부터 철을 이용하기 위한 여러 메카니즘을 획득하였다. 특히, 스태필로코쿠스 아우레우스는 철에 의해 조절되는 표면 결정인자 (Isd) 시스템을 통해 햄 또는 햄단백질로부터 철을 획득할 수 있다. Isd 시스템은 박테리아 세포벽을 가로질러 햄에 결합하고 운반할 수 있는 세포 표면 단백질 뿐만 아니라 햄으로부터 철을 추출할 수 있는 하나 이상의 세포질 단백질을 포함한다 (Mazmanian et al., (2003) *Science* 299:906-909; Clarke et al., (2004) *Mol. Microbiol.* 51:1509-1519). 추가로, Isd 단백질, 특히 IsdA는 피브리노겐 및 피브로넥틴 (Clarke et al., (2004) *Mol. Microbiol.* 51:1509-1519) 뿐만 아니라 트랜스페린 (Taylor and Heinrichs (2002) *Mol. Microbiol.* 43:1603-1614) 및 혜민 (Mazmanian et al., (2003) *Science* 299:906-909)을 포함하나 이에 제한되지 않는 광범위한 세포외 기질 단백질에 결합하는 것으로 보인다.

스테필로코쿠스 아우레우스는 가벼운 피부 및 창상 감염으로부터 보다 중증의 후유증, 예를 들어 심장내막염, 골수염 및 패혈증의 광범위한 감염을 야기하는 우세한 인간 병원체이다 (Archer (1998) *Clin. Infect. Dis.* 26:1179-1181). 다수의 조직에 침투하여 콜로니를 형성하는 스태필로코쿠스 아우레우스의 능력은 여러 독성 인자, 예를 들어 조직 부착을 원조하는 피브로넥틴 결합 단백질, 엘라스틴 결합 단백질 및 콜라겐 결합 단백질, 및 조직 파괴 및 박테리아 전염을 야기시키는 다중 외독소 및 프로테아제를 발현시키는 이의 능력에 기인될 수 있다. 생체내 성장 동안 철을 획득하는 이러한 박테리아의 능력은 또한 이의 발병기전에 대해 중요한 듯 하고, 여러 연구 그룹이 숙주 철 화합물의 결합 및/또는 운반과 관련된 생성물의 여러 상이한 유전자를 특성 규명하였다 (Mazmanian et al., (2003) *Science* 299:906-9; Modun et al., (1998) *Infect. Immun.* 66:3591-3596; Taylor and Heinrichs (2002) *Mol. Microbiol.* 43:1603-1614).

최초로, 페니실린이 최악의 스태필로코쿠스 아우레우스 감염을 치료하기 위해 사용되었다. 그러나, 스태필로코쿠스 아우레우스의 페니실린 내성 균주의 출현은 스태필로코쿠스 감염의 치료에서 페니실린의 효능을 감소시켰고, 오늘날 원내 감

염에서 조우되는 스태필로코쿠스 아우레우스의 대부분의 균주는 페니실린에 반응하지 않는다. 스태필로코쿠스 아우레우스의 페니실린 내성 균주는 페니실린을 페니실린산 (pencillinoic acid)으로 전환시켜 항생제 활성을 파괴하는 베타-락타마아제를 생성한다. 더욱이, 베타-락타마아제 엔코딩 유전자는 통상적으로 플라스미드에 대해 종종 에피솜적으로 증식되고, 이는 종종 에피솜 성분에 대해 다중약물 내성을 함께 수여하는 여러 유전자중 하나이다.

1960년대에 도입된 메티실린은 스태필로코쿠스 아우레우스의 페니실린 내성의 문제점을 대부분 극복하였다. 이를 화합물은 항생제 활성을 책임지는 페니실린의 부분을 보존하고, 페니실린을 락타마아제를 불활성화시키기 위한 우수한 기질로 만드는 기타 부분을 변형시키거나 전환시킨다. 그러나, 스태필로코쿠스 아우레우스에서 메티실린 내성이 출현하였고, 이와 함께 스태필로코쿠스 아우레우스에 대한 아미노글리코시드, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 마크로라이드 및 린코사미드를 포함하는 다수의 기타 항생제 효과에 대한 내성이 출현하였다. 사실, 스태필로코쿠스 아우레우스의 메티실린 내성 균주는 일반적으로 약물 내성이 증가된다. 메티실린 내성 스태필로코쿠스 아우레우스 (MRSA)는 세계에서 가장 중요한 원내 병원체중 하나가 되었고, 심각한 감염 조절 문제가 되었다. 오늘날, 다수의 균주가 반코마이신 유형 당단백질 항생제를 제외하고는 사실상 모든 항생제에 대해 다중내성이다. 스태필로코쿠스 아우레우스 감염의 약물 내성은 신규한 치료제가 개발되지 않는 경우 보다 악화되는 현저한 치료 난점을 지닌다. 따라서, 스태필로코쿠스 아우레우스 감염을 치료하기 위한 신규하고 효과적인 치료제에 대한 충족되지 않은 절박한 의료적 필요성이 존재한다.

발명의 개요

본 발명은, 적어도 부분적으로, Isd (철에 의해 조절되는 표면 결정인자) 단백질인 IsdA, IsdB 및 IsdC의 확인 및 특성화를 기재로 하고, 이는 스태필로코쿠스 아우레우스의 헴 및 헴단백질로부터의 철의 내재화와 관련된 Isd 시스템의 일부이다. IsdA, IsdB 및 IsdC는 스태필로코쿠스 아우레우스의 세포 표면에서 발현되고, 이는 생체내에서의 철에 의해 제한된 성장 및 생존에 중요하다. 결과적으로, IsdA, IsdB 및 IsdC 단백질은 이의 억제가 생체내에서의 손상된 박테리아 성장을 일으킬 수 있는 매력적인 백신 표적이다. 추가로, IsdA, IsdB 및 IsdC 단백질은 스태필로코쿠스 아우레우스 특이적 항생제를 확인하기 위한 스크리닝 검정에 사용될 수 있는 매력적인 약물 표적이다.

한 양태에서, 본 발명은 Isd 단백질 기재 백신을 특징으로 한다. 한 예시적 구체예에서, Isd 기재 백신은 IsdA 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 한 구체예에서, IsdA 폴리펩티드는 SEQ ID NO:3의 전장 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, IsdA 폴리펩티드는 SEQ ID NO:3의 최소한 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산의 펩티드이다. 또 다른 구체예에서, Isd 백신은 IsdB 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 특정 구체예에서, IsdB 폴리펩티드는 SEQ ID NO:6의 전장 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, IsdB 폴리펩티드는 SEQ ID NO:6의 최소한 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산의 펩티드이다. 또 다른 구체예에서, Isd 백신은 IsdC 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 특정 구체예에서, IsdC 폴리펩티드는 SEQ ID NO:9의 전장 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, IsdC 폴리펩티드는 SEQ ID NO:9의 최소한 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산의 펩티드이다. 백신 조성물은 주사용 제형으로 제형화될 수 있고, 애쥬번트를 추가로 포함할 수 있다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 스태필로코쿠스 아우레우스에서 철 흡수를 억제하는 항체, 안티센스 (antisense) 핵산 및 siRNA를 포함하는 신규한 항생제를 특징으로 한다. 본 발명은 IsdA, IsdB 및/또는 IsdC에 대한 항체를 특징으로 한다. 특정 구체예에서, IsdA 폴리펩티드에 대한 항체는 SEQ ID NO:3의 전장 재조합 아미노산 서열에 대해 생성될 수 있거나, SEQ ID NO:3의 최소한 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산의 펩티드에 대해 생성될 수 있다. IsdB 폴리펩티드에 대한 항체가 SEQ ID NO:6의 전장 재조합 아미노산 서열에 대해 생성될 수 있거나, SEQ ID NO:6의 최소한 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산의 펩티드에 대해 생성될 수 있다. IsdC 폴리펩티드에 대한 항체가 SEQ ID NO:9의 전장 재조합 아미노산 서열에 대해 생성될 수 있거나, SEQ ID NO:9의 최소한 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산의 펩티드에 대해 생성될 수 있다. Isd 폴리펩티드에 대한 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. Isd 폴리펩티드에 대한 항체는 주사용 제형으로 제형화될 수 있고, 항-박테리아 치료제로서 투여될 수 있다.

한 추가 양태에서, 본 발명은 임의의 Isd 단백질의 발현 수준 및/또는 기능을 억제하거나 달리 간섭하는 작용제를 확인하기 위한 스크리닝 검정을 특징으로 한다. 한 예시적 구체예에서, 본 발명은 IsdA의 발현 및/또는 기능을 억제하는 작용제에 대한 스크리닝 검정을 특징으로 한다. 한 구체예에서, 검정은 결합 검정이고, Isd 유전자 생성물에 결합하여 이의 생화학적 기능을 간섭하는 작용제가 후보 스태필로코쿠스 아우레우스 특이적 항생제이다. 또 다른 구체예에서, 검정은 발현 검정이고, Isd 폴리펩티드의 발현 수준을 감소시키는 작용제가 후보 스태필로코쿠스 아우레우스 특이적 항생제이다.

한 추가 양태에서, Isd 단백질은 스태필로코쿠스 아우레우스, 코리네박테리움 디프테리아 (*Corynebacterium diphtheriae*), 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 및 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*)를

포함하나 이에 제한되지 않는 그람-포지티브 박테리아에서 발현될 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 *Isd* 단백질을 표적으로 하는 백신 및 억제제가 포유동물에서 질병을 야기시키는 다수의 독성 그람-포지티브 박테리아 균주를 치료하는데 사용될 수 있다.

본원 발명의 추가 특징 및 이점은 하기의 상세한 설명 및 청구의 범위와 관련하여 논의될 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 (A) *IsdA*를 엔코딩하는 핵산 서열 (SEQ ID NO:1), (B) SEQ ID NO:1의 상보적 서열 (SEQ ID NO:2), 및 (C) *IsdA*에 대해 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:3)을 도시한다.

도 2는 (A) *IsdB*를 엔코딩하는 핵산 서열 (SEQ ID NO:4), (B) SEQ ID NO:4의 상보적 서열 (SEQ ID NO:5), 및 (C) *IsdB*에 대해 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:6)을 도시한다.

도 3은 (A) *IsdC*를 엔코딩하는 핵산 서열 (SEQ ID NO:7), (B) SEQ ID NO:7의 상보적 서열 (SEQ ID NO:8), 및 (C) *IsdC*에 대해 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:9)을 도시한다.

도 4는 철-풍부 배지 및 철-고갈 배지에서의 스태필로코쿠스 배양물로부터의 전체 세포 용해물을 나타내는 SDS-PAGE 젤이다.

도 5는 마우스의 꼬리 정맥으로의 10^7 개의 박테리아의 주사 6일 후의 마우스 신장으로부터 회수된 스태필로코쿠스 수를 나타내는 그래프이다.

도 6은 햄에 결합된 야생형 스태필로코쿠스 아우레우스 *Isd* 단백질이 *isdA*, *isdB* 및 *isdC*가 녹아웃 (knocked-out)된 스태필로코쿠스 아우레우스에 비해 증가된 과산화수소 (H_2O_2)의 조건하에서 생존할 수 있음을 나타내는 표이다 (✓: 90%를 초과하는 박테리아 생존을 나타냄).

도 7A 및 7B는 (A) 쿠마시 (전체 단백질에 대해서임)로 염색되고, (B) TMBZ (테트라메틸벤자린)로 염색된 야생형 및 *isdA* 녹아웃 스태필로코쿠스 아우레우스로부터의 단백질을 나타내는 SDS-PAGE 젤이다.

발명의 상세한 설명

1. 개요

본원에 기술된 바와 같이, 햄의 흡수를 통한 철의 내재화는 *isd* 유전자, 예를 들어 *isdA*, *isdB* 및 *isdC*가 녹아웃되는 경우 약독화될 수 있는 독성 특성이다. 추가로, 본원에 기술된 바와 같이, 햄 결합된 *Isd* 단백질은 숙주에서 스태필로코쿠스 생존을 촉진시키는 추가의 역할을 수행할 수 있다. 세포를 보호하는 산화 완충용액으로 작용하는 것으로 보이는 햄 결합된 *Isd* 단백질은 자유 라디칼의 유해한 효과를 형성한다. 따라서, *Isd* 단백질의 발현이 결핍된 돌연변이가 과산화수소 투여에 보다 민감한 반면, 야생형 스태필로코쿠스 아우레우스는 보다 높은 농도의 과산화수소에서 생존할 수 있다.

본원에 기술된 *Isd* 단백질은 생체내 스태필로코쿠스 아우레우스 감염에 필수적이며, 스태필로코쿠스 아우레우스 감염 동안 고도로 발현된다. 스태필로코쿠스 아우레우스가 숙주로 진입한 후, 이는 철이 제한된 환경과 조우하고, 이후 *Isd* 단백질 발현이 상향 조절된다. 철에 의한 제한 숙주에서, *Isd* 발현은 스태필로코쿠스 아우레우스가 철을 이용함에 따라 상향 조절된 상태로 유지되는 듯 하다. 특히 본원에 기술된 *IsdA*는 면역우세한데, 이는 회복기 환자 (즉, 스태필로코쿠스 아우레우스 감염된 환자)로부터의 혈청의 1:4000 희석액이 웨스턴 면역블롯에서 4 마이크로그램의 정제된 *IsdA* 단백질과 양성으로 반응하기 때문이다. 따라서, *Isd* 단백질은 백신 개발에서 매력적인 표적이다. *Isd* 단백질의 항원 펩티드는 스태필로코쿠스 아우레우스에 대한 효과적인 면역 반응을 생성시키기 위한 백신 표적으로 사용될 수 있다. 추가로, *Isd* 특이적 항체, 안티 센스 RNA, siRNA 또는 소분자 억제제를 이용하여 *Isd* 단백질의 기능을 억제시키는 것은 스태필로코쿠스 아우레우스의 독성을 약독화시키는 효과적인 수단이 될 것이다.

본원에 기술된 *Isd* 단백질은 스태필로코쿠스 아우레우스에서 발현된다. 추가 구체예에서, *Isd* 단백질은 기타 그람-포지티브 박테리아에서 발현될 수 있다. *Isd* 단백질을 발현하는 그람-포지티브 병원체의 비제한적 예로는 스태필로코쿠스 아우

레우스, 코리네박테리움 디프테리에, 리스테리아 모노사이토제네스 및 바실러스 아트라시스가 있다. 따라서, 본원에 기술된 Isd 단백질을 표적으로 하는 백신 및 억제제는 포유동물에서 질병을 야기시키는 기타 독성 그람-포지티브 박테리아균 주를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

2. 정의

편의상, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용된 특정 용어 및 표현의 의미를 하기에 제공한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 지닌다.

관사 "a" 및 "an"은 이러한 관사의 하나 또는 하나 이상(즉, 최소한 하나)의 문법적 대상을 의미하는 것으로 사용된다. 예를 들어, "요소"는 하나 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

본원에서 사용되는 용어 "애쥬번트"는 특정한 항원과 함께 사용되는 경우 항상된 면역 반응을 유도하는 물질을 의미한다.

"작용제"라는 용어는 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자(예컨대, 혼산, 항체, 단백질 또는 이들의 일부, 예컨대 웨პ티드), 또는 세균, 식물, 균사체 또는 동물(특히 포유동물) 세포 또는 조직과 같은 생물학적 재료로부터 제조된 추출물을 나타내기 위해 사용된다. 본원에 기술된 스크리닝 검정은 작용제를 확인할 수 있다. 상기 작용제는 스태필로코쿠스 아우레우스의 Isd 매개 철 흡수의 억제제 또는 길항제일 수 있다. 상기 작용제의 활성은 이것을 피검체에서 국소적으로 또는 전신적으로 작용하는 생물학적, 생리학적 또는 약리학적으로 활성인 물질(또는 물질들)인 "치료제"로서 적합하게 할 수 있다.

"길항제" 또는 "억제제"라는 용어는 단백질의 하나 이상의 생체활성을 하향 조절(예를 들어, 억제 또는 감소)시키는 작용제를 의미한다. 길항제는 단백질과 또 다른 분자, 예컨대 표적 웨პ티드 또는 효소 기질간의 상호작용을 억제하거나 감소시키는 화합물일 수 있다. 길항제는 또한 유전자의 발현을 하향 조절하거나 존재하는 발현된 단백질의 양을 감소시키는 화합물일 수 있다.

본원에서 사용된 "항체"라는 용어는 면역글로불린 및 면역글로불린의 임의의 항원-결합 부분(예컨대, IgG, IgD, IgA, IgM 및 IgE), 즉 특이적으로 항원과 결합하는 ("항원과 면역반응하는") 항원 결합 부위를 함유하는 폴리웨პ티드를 의미한다. 항체는 하나 이상의 이황화 결합에 의해 상호연결된 하나 이상의 중쇄(H) 및 하나 이상의 경쇄(L)를 포함할 수 있다. "V_H"라는 용어는 항체의 중쇄 가변 영역을 의미한다. "V_L"라는 용어는 항체의 경쇄 가변 영역을 의미한다. 예시적인 구체예에서, "항체"라는 용어는 특히 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 포함한다. "폴리클로날 항체"는 항원 또는 항원들로 면역화된 동물의 혈청으로부터 유래된 항체를 의미한다. "모노클로날 항체"는 하이브리도마 세포의 단일 클론에 의해 생성된 항체를 의미한다. 모노클로날 항체를 생성하는 기술은 하이브리도마 기술(참조 Kohler & Milstein (1975) *Nature* 256:495-497); 트리오마 기술; 인간 B-세포 하이브리도마 기술(참조 Kohler 등 (1983) *Immunol. Today* 4:72), EBV 하이브리도마 기술(참조 Cole 등, 1985 In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 및 과지 디스플레이를 포함하나 이로 제한되지 않는다.

폴리클로날 또는 모노클로날 항체는 추가로 조작되거나 변형되어 키메라 또는 인간화된 항체를 생성할 수 있다. "키메라 항체"는 유전자공학에 의해 생성된 면역글로불린 유전자에 의해 엔코딩되며, 경쇄 및 중쇄 유전자는 상이한 종에 속하는 면역글로불린 유전자 세그먼트로 구성된다. 예를 들어, 본원에 기술된 대로 수득된 것과 같은 마우스 모노클로날 항체로부터의 유전자의 가변(V) 세그먼트의 실질적인 부분을 인간 불변(C) 세그먼트의 실질적인 부분에 결합시킬 수 있다. 이러한 키메라 항체는 마우스 모노클로날 항체 보다 인간에 대해 덜 항원성일 것이다.

본원에서 사용된 "인간화된 항체"(HuAb)라는 용어는 비-인간 항체로부터의 CDR을 지니는, 인간 프레임워크와 실질적으로 동일한(즉, 85% 이상) 프레임워크 영역을 지니는 키메라 항체를 의미하며, 여기에서 임의의 불변 영역은 인간 면역글로불린 불변 영역에 대해 적어도 약 85-90%, 바람직하게는 약 95%의 폴리웨პ티드 서열 동일성을 지닌다. 참조, 예를 들어 PCT 공개 WO 90/07861호 및 유럽 특허 제 0451216호. 아마도 CDR을 제외한 상기 HuAb의 모든 부분이 하나 이상의 천연 인간 면역글로불린 서열의 상응하는 부분과 실질적으로 동일하다. 본원에서 사용된 "프레임워크 영역"이라는 용어는 문헌[KaBAT 등 (1987) *Sequences of Proteins of Immunologic Interest*, 4th Ed., US Dept. Heath and Human Services]에 정의된 대로, 단일 종의 상이한 면역글로불린 중에서 비교적 보존된(즉, CDR이 아닌) 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 부분들을 의미한다. 인간 불변 영역 DNA 서열은 널리 공지된 절차에 따라 다양한 인간 세포로부터 단리

될 수 있으나, 바람직하게는 무한증식하는 B 세포로부터 단리된다. 인간화된 항체를 생성하기 위한 가변 영역 또는 CDR은 항원과 결합할 수 있는 모노클로날 항체로부터 유래될 수 있으며, 마우스, 래트, 토끼 또는 다른 척추동물을 포함하는 임의의 편리한 포유동물 공급원에서 생성될 것이다.

"항체"라는 용어는 또한 항체 단편을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 및 Fv 단편; 비제한적으로 단쇄 Fv (scFv) 분자, 단 하나의 경쇄 가변 도메인을 함유하는 단쇄 폴리펩티드, 또는 결합된 중쇄 분자 없이 경쇄 가변 도메인의 세 CDR을 함유하는 이의 단편 및 (3) 단 하나의 중쇄 가변 영역을 함유하는 단쇄 폴리펩티드, 또는 결합된 경쇄 분자 없이 중쇄 가변 영역의 세 CDR을 함유하는 이의 단편을 포함하는, 연속하는 아미노산 잔기 중 하나의 중단되지 않은 서열로 구성된 일차 구조를 지니는 디아보디(diabodies) 및 임의의 항체 단편; 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 또는 다가 구조가 있다. 하나 이상의 중쇄를 포함하는 항체 단편에서, 중쇄(들)는 완전한 항체의 비-Fc 영역에서 발견되는 임의의 불변 도메인 서열 (예컨대, IgG 이소형의 CH1)을 함유할 수 있고/거나 완전한 항체에서 발견되는 임의의 헌지 영역 서열을 함유할 수 있고/거나 헌지 영역 서열 또는 중쇄(들)의 불변 도메인 서열에 융합되거나 정위된 루신 지퍼 서열을 함유할 수 있다. 적합한 루신 지퍼 서열로는 문헌 [Kostelney 등, (1992) *J. Immunol.*, 148: 1547-1553]에 교시된 jun 및 fos 루신 지퍼 및 미국특허 제 6,468,5323호에 개시된 GCN4 루신 지퍼가 있다. Fab 및 F(ab')₂ 단편에는 완전한 항체의 Fc 단편이 결여되어 있으며, 통상적으로 파파인 (Fab 단편을 생성하기 위해) 또는 펩신 (F(ab')₂ 단편을 생성하기 위해)과 같은 효소를 이용하여 단백질분해 절단에 의해 생성된다.

항체가 대부분의 다른 항원 보다 하나의 항원에 바람직하게 결합한다면, 항체는 그 항원 또는 항원의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것이다. 예를 들어, 항체는 하나 이상의 다른 에피토프에 대하여 약 50%, 20%, 10%, 5%, 1% 또는 0.1% 보다 적은 교차-반응성을 지닐 수 있다.

"보존성 치환"이라는 용어는 대체로 유사한 분자 특성의 아미노산 사이의 변화를 의미한다. 예를 들어, 지방족 그룹인 알라닌, 발린, 루신 및 이소루신 내의 상호교환이 보존성으로 간주될 수 있다. 때때로, 이들 중 하나에 대한 글리신의 치환이 또한 보존성으로 간주될 수 있다. 기타 보존성 상호교환은 지방족 그룹인 아스파테이트 및 글루타메이트 내; 아미드 그룹인 아스파라긴 및 글루타민 내; 히드록실기인 세린 및 트레오닌 내; 방향족 그룹인 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판 내; 염기성 그룹인 리신, 아르기닌 및 히스티딘 내; 및 황 함유 그룹인 메티오닌 및 시스테인 내에서의 상호교환을 의미한다. 때때로, 메티오닌 및 루신 내에서의 치환이 또한 보존성으로 간주될 수 있다. 바람직한 보존성 치환기는 아스파테이트-글루타메이트; 아라파라긴-글루타민; 발린-루신-이소루신; 알라닌-발린; 발린-루신-이소루신-메티오닌; 페닐알라닌-티로신; 페닐알라닌-티로신-트립토판; 리신-아르기닌; 및 히스티딘-리신-아르기닌이다.

"유효량"은 치료시 유익하거나 요망되는 임상적 결과를 제공하기에 충분한 양이다. 유효량은 하나 이상의 용량으로 환자에게 투여될 수 있다. 치료와 관련하여, 유효량은 환자의 감염을 감소시키기에 충분한 양이다. 유효량을 달성하는 적합한 투약량을 결정할 때 수개의 인자가 통상적으로 고려된다. 상기 인자로는 환자의 연령, 성별 및 체중, 치료되는 질병, 질병의 중증도 및 투여되는 작용제의 형태 및 유효 농도가 있다.

용어 "에피토프"는 항체가 우선적이고 특이적으로 결합하는 항원의 영역을 의미한다. 모노클로날 항체는 분자로 정의될 수 있는 분자의 단일 특이적 에피토프에 우선적으로 결합한다. 특정 단백질의 에피토프는 단백질에서 선형 또는 비선형인 제한된 수의 아미노산 잔기, 예를 들어 5-15개의 잔기로 구성될 수 있다.

핵산 또는 누클레오티드 서열을 기술할 때 사용되는 "동등물"이란 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 의미한다. 동등한 누클레오티드 서열은 대립유전자 변이와 같은 하나 이상의 누클레오티드 치환, 첨가 또는 결실에 의해 상이한 서열을 포함할 것이고; 따라서 유전자 코드의 퇴화로 인해 상이해진 서열을 포함할 것이다. 예를 들어, 핵산 변이는 누클레오티드 치환, 결실 또는 첨가에 의해 생성된 것들을 포함할 수 있다. 치환, 결실 또는 첨가는 하나 이상의 누클레오티드를 수반할 수 있다. 변이는 코딩 영역, 비코딩 영역 또는 둘 모두에서 변경될 수 있다. 코딩 영역에서의 변경은 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 생성할 수 있다.

"상동성" 또는 대안적으로 "동일성"은 두 펩티드 또는 두 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 의미한다. 상동성은 비교를 위해 정렬될 수 있는 각 서열의 위치를 비교함으로서 결정될 수 있다. 비교된 서열의 위치를 동일한 염기 또는 아미노산이 차지하고 있는 경우, 분자는 그 위치에서 상동이다. 서열간 상동성의 정도는 매칭 또는 서열에 의해 공유된 상동 위치의 수의 함수이다. "동일성 %"라는 용어는 두 아미노산 서열 또는 두 누클레오티드 서열 사이의 서열 동일성을 의미한다. 동일성은 비교를 위해 정렬될 수 있는 각 서열의 위치를 비교함에 의해 결정될 수 있다. 비교된 서열의 동등한 위치를 동일한 염기 또는 아미노산이 차지하고 있는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하고; 동등한 부위가 동일하거나 유사한 아미노산 잔기 (예컨대 입체 및/또는 전자 특성이 유사한)에 의해 점유된 경우, 분자는 그 위치에서 상동(유사)인 것으로 언급될 수 있다. 상

동성, 유사성 또는 동일성의 백분율로서의 표시는 비교된 서열에 의해 공유된 위치에서 동일하거나 유사한 아미노산 수의 함수로서 언급된다. 다양한 정렬 알고리즘 및/또는 프로그램을 이용할 수 있고, FASTA, BLAST 또는 ENTREZ를 포함한다. FASTA 및 BLAST는 GCG 서열 분석 패키지 (University of Wisconsin, Madison, Wis.)의 일부로서 이용가능하며, 예컨대 디폴트 세팅(default settings)으로 이용될 수 있다. ENTREZ는 내셔널 센터 포 바이오테크놀로지 인포메이션, 내셔널 라이브러리 오브 메디슨, 내셔널 인스티튜트 오브 헬쓰(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md)를 통해 이용할 수 있다. 한 구체예에서, 두 서열의 동일성 %는 간격 질량(gap weight)이 1인 GCG 프로그램에 의해 결정될 수 있고, 예컨대 각 아미노산 간격은 이것이 단일 아미노산이거나 두 서열간에 누클레오티드 미스매치인 것처럼 칭량된다. 다른 정렬 기술이 문헌[Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequences Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USA]에 기술되어 있다. 바람직하게는, 서열에 간격을 허용하는 정렬 프로그램을 서열을 정렬하는데 이용한다. 스미쓰-워터맨(Smith-Waterman)은 서열 정렬에서 간격을 허용하는 알고리즘의 한 유형이다. 참조 문헌[Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997)]. 니들맨 앤 원치(Needleman and Wunsch) 정렬 방법을 이용한 GAP 프로그램도 서열을 정렬하는데 이용될 수 있다. 대안적인 탐색 방법은 MPSRCH 소프트웨어를 이용하며, 이것은 MASPAR 컴퓨터상에서 진행된다. MPSRCH는 대량의 병렬 컴퓨터상에서 서열의 점수를 매기기 위해 스미쓰-워터맨 알고리즘을 이용한다. 이러한 접근법은 떨어져 있는 관련된 매치를 포착하는 능력을 개선시키며, 특히 소형 간격 및 누클레오티드 서열 오류를 확인한다. 핵산-엔코딩된 아미노산 서열을 사용하여 단백질 및 DNA 데이터베이스 둘 모두를 탐색할 수 있다. 개별적인 서열의 데이터베이스는 문헌[Methods in Enzymology, ed. Doolittle, 상술함]에 개시되어 있다. 데이터베이스는 Genbank, EMBL, 및 일본의 DNA 데이터베이스 (DDBJ)를 포함한다.

본원에서 사용된 "감염"이라는 용어는 체조직에서 스태필로코쿠스 아우레우스와 같은 미생물의 침입 및 증식을 의미하며, 이것은 임상적으로 명백하지 않거나 경쟁적인 물질대사, 독소, 세포내 복제 또는 항원 항체 반응으로 인해 국소적인 세포 손상을 초래할 수 있다. 감염은 신체의 방어 메커니즘이 유효한 경우 국소적이고, 무증상이며, 일시적일 수 있다. 국소적 감염은 존속하고 확장에 의해 만연되어 급성, 아급성 또는 만성 임상적 감염 또는 질병 상태가 될 수 있다. 국소적 감염은 미생물이 림프관 또는 혈관 시스템에 접근할 경우 전신적인 것이 될 수도 있다.

본원에서 사용되는 용어 "철에 의해 조절되는 표면 결정인자 시스템" 또는 "Isd 시스템"은 추축상 헴 흡수 시스템을 함께 엔코딩하는 다섯개의 상이한 전사 단위에 의해 엔코딩된 다수의 유전자를 포함하는 스태필로코쿠스 아우레우스 Isd 유전자좌를 의미한다. 다섯개의 전사 단위는 *isdA*, *isdB*, *isdCDEFsrtBisdG*, *isdH* 및 *isdI*이다. *isd* 유전자의 전사는 Fur 프로모터의 조절 시에 주위 철에 의해 조절된다. Isd 유전자좌에 의해 엔코딩된 단백질 중 4개인 IsdA, IsdB, IsdC 및 IsdH는 폴리펩티드 사슬 및 펩티도글리칸의 C-말단 사이의 아미드 결합에 의해 세포벽에 공유적으로 부착된다. IsdA, IsdB 및 IsdH는 LPXTG 모티프(즉, 소르타아제 A에 의해 인지되는 모티프)로 언급되는 C-말단의 분류 신호를 지니는 것으로 특성규명되었다. IsdC는 NPQTН 모티프(즉, 스태필로코쿠스 아우레우스의 소르타아제 B에 의해 인지되는 모티프)로 언급되는 C-말단의 분류 신호를 지니는 것으로 특성규명되었다. IsdA, IsdB 및 IsdH는 LPXTG 모티프에서 세포 표면 단백질을 분해시키고 폴리펩티드와 펩티도글리칸 사이의 아미드 결합의 형성을 촉매하는 막 부착된 트랜스펩티다아제인 소르타아제 A (srtA)에 의해 세포벽에 고착된다. IsdC는 소르타아제 A와 유사한 트랜스펩티다아제인 소르타아제 B (srtB)에 의해 세포벽에 고착된다. 헴으로부터 철을 추출하는데 관련될 수 있는 Isd 유전자좌에 의해 엔코딩된 기타 단백질은 추정상 막 전위 인자인 IsdD, IsdE 및 IsdF, 및 세포질 헴-철 결합 단백질인 IsdG 및 IsdI를 포함한다.

본원에서 사용되는 "IsdA 폴리펩티드"는 철에 의해 조절되는 표면 결정인자 A를 의미한다. IsdA 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO:3에 기술되어 있고, SEQ ID NO:1에 의해 엔코딩된다. 상기 용어는 또한 IsdA 폴리펩티드의 임의의 단편, 변이체, 유사체, 효능제, 화학적 유도체, 기능적 유도체 또는 기능적 단편을 포함한다. "IsdA 면역원"은 피검체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 IsdA 폴리펩티드이다.

본원에서 사용되는 "IsdB 폴리펩티드"는 철에 의해 조절되는 표면 결정인자 B를 의미한다. IsdB 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO:6에 기술되어 있고, SEQ ID NO:4에 의해 엔코딩된다. 상기 용어는 또한 IsdB 폴리펩티드의 임의의 단편, 변이체, 유사체, 효능제, 화학적 유도체, 기능적 유도체 또는 기능적 단편을 포함한다. "IsdB 면역원"은 피검체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 IsdB 폴리펩티드이다.

본원에서 사용되는 "IsdC 폴리펩티드"는 철에 의해 조절되는 표면 결정인자 C를 의미한다. IsdC 폴리펩티드의 서열은 SEQ ID NO:9에 기술되어 있고, SEQ ID NO:7에 의해 엔코딩된다. 상기 용어는 또한 IsdC 폴리펩티드의 임의의 단편, 변이체, 유사체, 효능제, 화학적 유도체, 기능적 유도체 또는 기능적 단편을 포함한다. "IsdC 면역원"은 피검체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 IsdC 폴리펩티드이다.

"표지" 및 "검출가능한 표지"는 방사성 동위원소, 플루오로포어, 화학발광 분자, 효소, 효소 기질, 효소 보조인자, 효소 억제제, 염료, 금속 이온, 리간드(예컨대, 바이오텐 또는 합텐) 등을 포함하나 이로 제한되지 않는 검출가능한 분자를 의미한다. "플루오로포어 (fluorophore)"는 검출가능한 범위로 형광성을 나타낼 수 있는 물질 또는 이의 일부를 의미한다. 적절한 표지의 특정 예로는 플루오레세인, 로다민, 단실, 염밸리페론, 텍사스 레드, 루미놀, NADPH, 알파-갈اكت오시다아제 또는 베타-갈락토시다아제 및 호스라디쉬 퍼옥시다제가 있다.

유전자와 관련하여 본원에서 사용된 "돌연변이"라는 용어는 돌연변이 단백질을 엔코딩하는 유전자를 의미한다. 단백질과 관련하여 본원에서 사용된 "돌연변이"라는 용어는 이의 통상적이거나 정상적인 생리학적 기능을 수행하지 않는 단백질을 의미한다. 스태필로코쿠스 아우레우스 폴리펩티드 돌연변이는 아미노산 치환, 결실 또는 첨가에 의해 생성될 수 있다. 치환, 결실 또는 첨가는 하나 이상의 잔기를 수반할 수 있다. 이들 중에서 특히 바람직한 것이 본 발명의 스태필로코쿠스 아우레우스 단백질의 특성 및 활성을 변경시키는 치환, 첨가 및 결실이다.

"폴리누클레오티드" 및 "핵산"이란 용어는 상호교환적으로 사용된다. 이들은 임의의 길이의 누클레오티드의 중합체 형태, 테옥시리보누클레오티드 또는 리보누클레오티드, 또는 이들의 유사체를 의미한다. 하기는 폴리누클레오티드의 비제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비코딩 영역, 결합 분석으로부터 정의된 유전자좌, 엑손, 인트론, 메신져 RNA (mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 안티센스 핵산, 재조합 폴리누클레오티드. 분지된 폴리누클레오티드, 폴라스미드, 벡터, 임의 서열의 단리된 DNA, 임의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머. 폴리누클레오티드는 메틸화된 누클레오티드 및 누클레오티드 유사체와 같은 변형 누클레오티드를 포함할 수 있다. 누클레오티드 구조에 대한 변형이 존재하는 경우, 이것은 중합체의 어셈블리 이전 또는 이후에 제공될 수 있다. 폴리누클레오티드는 예컨대 표지 성분과의 컨쥬게이션에 의해, 중합체화 이후에 추가로 변형될 수 있다. "재조합" 폴리누클레오티드라는 용어는 자연적으로 일어나지 않거나 비자연적인 정렬의 또 다른 폴리누클레오티드에 결합된 게놈, cDNA, 반합성 또는 합성 기원의 폴리누클레오티드를 의미한다. "올리고누클레오티드"는 약 100개 미만의 누클레오티드, 예컨대 75개, 50개, 25개 또는 10개 미만의 누클레오티드를 지니는 단일 표준 폴리누클레오티드를 의미한다.

"폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질" (단체인 경우)이라는 용어는 아미노산의 중합체를 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비아미노산에 의해 중단될 수 있다. 상기 용어는 예를 들어 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 표지 성분과의 컨쥬게이션과 같은 임의의 다른 조작으로 변형된 아미노산 중합체도 포함한다. 본원에서 사용된 "아미노산"이라는 용어는 글리신 및 D 또는 L 광학 이성질체 둘 모두를 포함하는 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산, 및 아미노산 유사체 및 펩티도미메틱 (peptidomimetic)을 의미한다.

"소분자"라는 용어는 분자량이 약 5 kD 미만, 약 2.5 kD 미만, 약 1.5 kD 미만, 또는 약 0.9 kD 미만인 화합물을 의미한다. 소분자는, 예를 들어 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드 핵산, 펩티도미메틱, 탄수화물, 지질 또는 다른 유기(탄소 함유) 또는 무기 분자일 수 있다. 많은 제약 회사가 화학적 및/또는 생물학적 혼합물, 종종 본 발명의 임의의 검정으로 스크리닝될 수 있는 균사체, 세균 또는 해조류 추출물의 광대한 라이브러리를 갖는다. "소 유기 분자"라는 용어는 유기 또는 약용 화합물로 종종 동정되는 소분자를 의미하며, 핵산, 펩티드 또는 폴리펩티드인 문자만을 포함하는 것은 아니다.

용어 "특이적 하이브리드화"는 검출가능한 특이적인 핵산 결합을 의미한다. 본 발명의 폴리누클레오티드, 올리고누클레오티드 및 핵산은 비특이적 핵산에 대해 감지할 수 있는 양의 검출가능한 결합을 최소화시키는 하이브리드화 및 세척 조건 하에서 핵산 가닥에 선택적으로 하이브리드된다. 선택적 하이브리드화 조건을 달성하기 위해 당 분야에 공지되어 있고 본원에서 논의되는 엄격한 조건이 사용될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 폴리누클레오티드, 올리고누클레오티드 및 핵산과 관심 핵산 서열 사이의 핵산 서열 상동성을 최소한 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 이 이상일 것이다. 특정 예에서, 하이브리드화 및 세척 조건은 통상적인 하이브리드화 과정 및 본원에서 추가로 기술되는 하이브리드화 과정에 따라 엄격한 조건하에서 수행된다.

용어 "엄격한 조건" 또는 "엄격한 하이브리드화 조건"은 두개의 상보적 폴리누클레오티드 사이의 특정 하이브리드화를 촉진시켜 이중가닥을 형성시키는 조건을 의미한다. 엄격한 조건은 규정된 이온 강도 및 pH에서 주어진 폴리누클레오티드 이중가닥에 대한 열 용융점 (T_m) 보다 약 5°C 낮게 선택될 수 있다. 상보적 폴리누클레오티드 가닥의 길이 및 이들의 GC 함량이 이중가닥의 T_m , 및 이에 따른 하이브리드화의 요망되는 특이성을 수득하는데 필요한 하이브리드화 조건을 결정할 것이다. T_m 은 폴리누클레오티드 서열의 50%가 상보적 가닥에 하이브리드되어 완전하게 매칭되는 온도이다 (규정된 이온 강도 및 pH 하에서임). 특정한 경우, 특정 이중가닥에 대한 T_m 에 대략 동일한 하이브리드화 조건의 엄격성을 증가시키는 것이 바람직할 수 있다.

Tm을 측정하기 위해 다양한 기술이 이용가능하다. 통상적으로, 이중가닥 내에서 G-C 염기쌍이 Tm에 약 3°C 기여하는 것으로 평가되는데 반해, A-T 염기쌍은 약 2°C 기여하는 것으로 평가되고, Tm은 약 80-100°C의 이론적 최대치 이하이다. 그러나, G-C 스태킹 (stacking) 상호작용, 용매 효과, 요망되는 검정 온도 등을 고려하는 보다 정교한 모델의 Tm이 이용가능하다. 예를들어, 프로브는 식 $Td = (((3x\#GC) + (2x\#AT)) \times 37) - 562) / \#bp - 5$ (여기서, #GC, #AT 및 #bp는 각각 이중가닥의 형성과 관련된 구아닌-시토신 염기쌍의 수, 아데닌-티민 염기쌍의 수 및 전체 염기쌍의 수임)을 이용하여 약 60°C의 해리 온도 (Td)를 지니도록 고안될 수 있다.

하이브리드화는 최소한 약 1시간, 2시간, 5시간, 12시간 또는 24시간 동안 5xSSC, 4xSSC, 3xSSC, 2xSSC, 1xSSC 또는 0.2xSSC에서 수행될 수 있다. 하이브리드화의 온도는 반응의 염격함을 조절하기 위해, 예를들어 약 25°C (실온)에서 약 45°C, 50°C, 55°C, 60°C 또는 65°C로 증가될 수 있다. 하이브리드화 반응은 또한 염격함에 영향을 주는 또 다른 작용제를 포함할 수 있고, 예를들어 50% 포름아미드의 존재하에서 수행된 하이브리드화는 규정된 온도에서 하이브리드화의 염격함을 증가시킨다.

하이브리드화 반응 후, 동일하거나 상이한 염도 및 온도에서 수행되는 단일한 세척 단계 또는 두개 이상의 세척 단계가 후속될 수 있다. 예를들어, 세척의 온도는 염격함을 조절하기 위해 약 25°C (실온)에서 약 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C 또는 이 이상의 온도로 증가될 수 있다. 세척 단계는 세제, 예를들어 0.1 또는 0.2% SDS의 존재하에서 수행될 수 있다. 예를들어, 하이브리드화 후, 2xSSC, 0.1% SDS 중에서 약 20분 동안 각각 65°C에서 2회의 세척 단계, 및 임의로 0.2xSSC, 0.1% SDS 중에서 약 20분 동안 각각 65°C에서 2회의 추가 세척 단계가 후속될 수 있다.

예시적인 염격한 하이브리드화 조건은 50% 포름아미드, 10 x 덴하르트 (Denhardt) (0.2% 피콜, 0.2% 폴리비닐피롤리돈, 0.2% 우혈청 알부민) 및 200 µg/ml의 변성된 담체 DNA, 예를들어 전단된 연어 정자 DNA를 함유하거나, 이로 구성된 용액에서 65°C에서 밤새의 하이브리드화 후, 2xSSC, 0.1% SDS에서 약 20분 동안 65°C에서의 각각 2회의 세척 단계, 및 0.2xSSC, 0.1% SDS에서 약 20분 동안 65°C에서의 각각 2회의 세척 단계를 포함한다.

하이브리드화는 고형 지지대, 예를들어 필터에 부착된 핵산에 대해 용액 중의 2개의 핵산, 또는 용액 중의 1개의 핵산을 하이브리드화시키는 것으로 구성될 수 있다. 하나의 핵산이 고형 지지대에 존재하는 경우, 하이브리드화에 앞서 예비 하이브리드화 단계가 수행될 수 있다. 예비 하이브리드화는 하이브리드화 용액과 동일한 용액 및 동일한 온도에서 최소한 약 1시간, 3시간 또는 10시간 동안 (상보적 폴리누클레오티드 가닥 없이) 수행될 수 있다.

적절히 염격한 조건은 당업자에게 공지되어 있거나, 숙련자에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 예를들어 문헌 [Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-12.3.6; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y; S. Agrawal (ed.) Methods in Molecular Biology, volume 20; Tijssen (1993) Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology-hybridization with nucleic acid probes, e.g., part I chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, New York; and Tibanyenda, N. et al., Eur. J. Biochem. 139:19 (1984) and Ebel, S. et al., Biochem. 31:12083 (1992)]의 최신 프로토콜을 참조하라.

핵산 또는 아미노산 서열과 관련하여 사용되는 경우 용어 "실질적으로 상동성임"은 형태의 동일성을 발생시킴으로써 하나 이상의 생물학적 (면역학적 포함) 활성의 보유를 유용한 정도로 발생시키는, 서로 서열이 실질적으로 동일하거나 유사한 서열을 의미한다. 상기 용어는 서열의 일반적인 진화를 의미하지는 않는다.

"피검체"는 인간을 포함하는 수컷 또는 암컷 포유동물을 의미한다.

Isd 폴리펩티드의 "변이체"는 IsdA, IsdB 또는 IsdC와 실질적으로 유사한 분자를 의미한다. 변이체 펩티드는 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 변이체 펩티드의 직접적인 화학적 합성에 의해 공유적으로 제조될 수 있다. Isd 폴리펩티드의 변이체는, 예를들어 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 추가로 포함할 수 있다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 또한 요망되는 활성을 지니는 최종 작제물이 발생되도록 제조될 수 있다. 이들 변이체는 변이체를 엔코딩하는 DNA를 생성시킨 후 재조합 세포 배양물에서 DNA를 발현시킴으로써, 펩티드 분자를 엔코딩하는 DNA 내의 누클레오티드의 부위 특이적 돌연변이유발 (문헌 [Adelman et al., DNA 2: 183 (1983)]에 예시됨)에 의해 제조될 수 있다. 통상적으로, 변이체는 야생형 Isd 폴리펩티드와 동일한 정성적 생물학적 활성을 나타낸다. 공지된 폴리펩티드의 모든 가능한 단일 아미노산 치환을 또한 합성할 수 있음이 당 분야에 공지되어 있다 (Geysen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 18:3998-4002 (1984)). 다양한 치환의 효과가 항상 첨가되는 것은 아니지만, Isd 폴리펩티드 내의 상이한 잔기 위치에서의 두개의 유리한 치환 또는 중립의 단일한 치환이 임의의 Isd 단백질 활성을 손실함이 없이 안전하게 조합될 수 있다. 퇴화된 폴리펩

티드의 제조 방법이 문헌[Rutter, U.S. Pat. No. 5,010,175; Haugter et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 82:5131-5135 (1985); Geysen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 81:3998-4002 (1984); WO86/06487; and WO86/00991]에 기술되어 있다. 치환 방법의 고안에서, 당업자는 어떠한 잔기를 변화시키고, 어떠한 아미노산 또는 아미노산 부류가 적절한 대체인지 결정할 것이다. 당업자는 또한 패밀리 또는 자연 발생 상동 단백질에서의 서열 변이성의 연구를 참고할 것이다. 특정 아미노산 치환은 기타 아미노산 치환보다 빈번히 용인되고, 이들은 본래의 아미노산과 이의 대체물 사이의 크기 및 전하 등의 유사성과 종종 관련된다. 아미노산의 삽입 또는 결실이 또한 상기 기술된 바와 같이 이루어질 수 있다. 치환은 바람직하게는 보존성으로, 이는 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된 문헌[Schulz et al., Principle of Protein Structure (Springer-Verlag, New York (1978)); and Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties (W. H. Freeman & Co., San Francisco (1983))]을 참조하라.

Isd 폴리펩티드의 "화학적 유도체"는 보통 IsdA, IsdB 또는 IsdC 아미노산 서열의 일부가 아닌 추가의 화학적 부분을 함유할 수 있다. 이러한 화학적 변형은 폴리펩티드의 표적 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도화제로 반응시킴으로써 Isd 폴리펩티드로 도입될 수 있다. 아미노 말단 잔기는 숙신산 무수물 또는 기타 카르복실산 무수물과 반응될 수 있다. 알파-아미노 함유 잔기를 유도하기 위한 기타 적절한 시약은 아미도-에스테르, 예를 들어 메틸 피콜린이미데이트; 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로히드라이드; 트리니트로벤젠슬론산; O-메틸이소우레아; 2,4-펜탄디온; 및 글리옥실레이트와 반응된 트랜스아미나아제-카탈라아제를 포함한다. 특히 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과의 반응에 의해 티로실 잔기로 분광 표지를 도입시키는 것에 관한 티로실 잔기 그 자체의 특이적 변형이 광범위하게 연구되었다. 가장 흔히, N-아세틸이미다졸 및 테트라니트로메탄이 O-아세틸 티로실 종 및 3-니트로 유도체를 각각 형성시키기 위해 사용된다. 아스파르틸 또는 글루타밀과 같은 카르복실 측기는 1-시클로헥실-3-[2-모르폴리닐-(4-에틸)]카르보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸)카르보디이미드와 같은 카르보디이미드 (R'N-C-N-R')와의 반응에 의해 선택적으로 변형될 수 있다. 더욱이, 아르파르틸 및 글루타밀 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아르파라기닐 및 글루나미닐 잔기로 전환될 수 있다.

"벡터"는 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포 및/또는 숙주 세포간에 전달하는 자기-복제성 핵산 분자이다. 상기 용어는 핵산 분자를 세포에 삽입시키기 위해 주로 기능하는 벡터, 핵산의 복제를 위해 주로 기능하는 복제 벡터 및 DNA 또는 RNA의 전사 및/또는 번역을 위해 기능하는 발현 벡터를 포함한다. 상기 기능 중 하나 이상을 제공하는 벡터가 또한 포함된다. 본원에서 사용된 "발현 벡터"는 적합한 숙주 세포에 도입될 때 폴리펩티드(들)로 전사되고 번역될 수 있는 폴리누클레오티드로서 정의된다. "발현 시스템"은 일반적으로 요망되는 발현 생성물을 제공하도록 기능할 수 있는 발현 벡터로 구성된 적합한 숙주 세포를 포함한다.

3. *Isd* 유전자

Isd 유전자좌의 세개의 유전자 *isdA*, *isdB* 및 *isdC*는 스태필로코쿠스 세포벽에 공유적으로 부착되는 세포 표면 단백질을 엔코딩한다. 도 1-3은 *isdA* (SEQ ID NO:1), *isdB* (SEQ ID NO:4) 및 *isdC* (SEQ ID NO:7)의 핵산 서열을 제공한다.

본 발명의 핵산은 본원에 기술된 임의의 *isd* 누클레오티드 서열로 구성되거나 필수적으로 구성될 수도 있다. 또한 다른 핵산은 *isd* 유전자와 적어도 약 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일하거나 상동인 누클레오티드 서열을 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 실질적으로 상동인 서열은 엄격한 하이브리드화 조건을 이용하여 동정될 수 있다.

유전자 코드에서의 퇴화로 인해 본 발명의 핵산과 상이한 단리된 핵산이 또한 본 발명의 범위내에 있다. 예를 들어, 다수의 핵산이 하나 이상의 삼중자 (triplet)에 의해 고안된다. 동일한 아미노산, 또는 동의어(예를 들어, CAU 및 CAC는 히스티딘에 대한 동의어임)를 특정하는 코돈은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 "침묵" 돌연변이를 초래할 수 있다. 그러나, 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화를 초래하는 DNA 서열 다형태가 존재할 것으로 예상된다. 당업자는 본 발명의 특정 단백질을 엔코딩하는 핵산의 하나 이상의 누클레오티드(1% 미만에서 약 3 또는 5% 또는 아마도 그 이상의 누클레오티드)에서의 상기 변경들이 천연의 대립유전자 변이로 인하여 주어진 종에서 존재할 수 있음을 이해할 것이다. 임의의 모든 상기 누클레오티드 변이 및 결과적인 아미노산 다형태가 본 발명의 범위내에 있다.

본원에 개시된 폴리펩티드와 진화적으로 관련된 아미노산 서열을 지니는 단백질을 엔코딩하는 핵산이 제공되며, 여기서 "진화적으로 관련된"이란 자연적으로 (예컨대, 대립유전자 변이 또는 차별적인 스플라이싱에 의해) 발생한 상이한 아미노산 서열을 지니는 단백질 뿐만 아니라, 예를 들어 조합 돌연변이 유발에 의해 유래된 본 발명의 단백질의 돌연변이 변이체를 의미한다.

또한 피검체 폴리펩티드의 생물학적으로 활성인 부분을 엔코딩하는 본 발명의 폴리누클레오티드의 단편이 제공된다. 본원에서 사용된, 본원에 개시된 폴리펩티드의 활성 단편을 엔코딩하는 핵산의 단편이란 본 발명의 폴리펩티드의 전장 아미노산 서열을 엔코딩하는 누클레오티드 서열 보다 적은 수의 누클레오티드를 갖는 누클레오티드 서열로서, 본원에 개시된 전장 Isd 단백질의 생물학적 활성의 적어도 일부를 보유하는 소정의 폴리펩티드를 엔코딩하거나, 대안적으로 전장 단백질의 생물학적 활성의 조절제로서 기능하는 누클레오티드 서열을 의미한다. 예를 들어, 상기 단편은 단백질과 또 다른 분자(예컨대, 폴리펩티드, DNA, RNA 등)와의 상호작용을 매개하는 폴리펩티드가 유래되는 전장 단백질의 도메인을 함유하는 폴리펩티드를 포함한다.

본원에서 제공된 핵산은 또한 링커 서열, 변형된 제한 엔도누클레아제 부위 및 이러한 재조합 폴리펩티드의 분자 클로닝, 발현 또는 정제에 유용한 다른 서열을 함유할 수 있다.

본원에서 제공된 Isd 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열은 본원에 개시된 프로토콜 및 당업자에게 일반적인 공지된 프로토콜에 따라 임의의 유기체로부터의 mRNA 또는 게놈 DNA로부터 수득될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 cDNA는, 예를 들어 세균, 바이러스, 포유동물 등의 유기체로부터 전체 mRNA를 단리시킴에 의해 수득될 수 있다. 이중 가닥 cDNA를 이후 전체 mRNA로부터 제조하고, 후속하여 다수의 공지된 기술 중 어느 하나를 이용하여 적합한 플라스미드 또는 박테리오파지 벡터로 삽입시킬 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 유전자를 본 발명에서 제공된 누클레오티드 서열 정보에 따라 확립된 중합효소 연쇄반응 기술을 이용하여 클로닝시킬 수도 있다. 한 양태에서, 본 발명의 핵산 또는 이의 단편을 증폭시키는 방법은 (a) 각각이 8개 이상의 누클레오티드 길이이고 본 발명의 핵산 서열에 상보적인 한 쌍의 단일 표준 올리누클레오티드를 제공하는 단계로서, 이 때 올리고누클레오티드와 상보적인 서열은 10개 이상의 누클레오티드 만큼 떨어져 있는 것을 특징으로 하는 단계; (b) 올리고누클레오티드를 한 쌍의 올리누클레오티드 사이에 정위된 영역의 증폭을 허용하여 핵산을 증폭시키는 조건하에 본 발명의 핵산을 포함하는 샘플과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다.

Isd 단백질은 재조합 벡터, 재조합 벡터를 함유하는 숙주 세포 및 엔코딩된 스태필로코쿠스 아우레우스 폴리펩티드를 생성하는 방법으로부터 발현될 수 있다. 적합한 벡터를 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 트랜스벡션, 일렉트로포레이션 및 형질전환과 같은 널리 공지된 기술을 이용하여 숙주 세포에 도입시킬 수 있다. 벡터는 예를 들어 파지, 플라스미드, 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 복제 수행능력이 있거나 복제 결손일 수 있다. 후자의 경우에서, 바이러스 증식은 일반적으로 숙주 세포를 보체화함에 의해서만 발생할 것이다.

벡터는 숙주에서의 증식을 위해 선택적인 마커를 함유할 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터를 인산칼슘 침전물과 같은 침전물, 또는 하전된 지질과의 복합체에 도입한다. 벡터가 바이러스인 경우, 적합한 패키징 세포주를 이용하여 시험관내 패키징한 다음 숙주 세포로 형질도입될 수 있다.

바람직한 벡터는 관심 있는 폴리누클레오티드에 대한 시스-작용성 조절 영역을 포함한다. 적합한 트랜스-작용성 인자가 숙주에 의해 공급되거나, 보체화 벡터에 의해 공급되거나, 숙주에 도입시 벡터 자체에 의해 공급될 수 있다.

특정 구체예에서, 벡터는 유도성 및/또는 세포-유형 특이적일 수 있는 특정 발현을 제공한다. 이러한 벡터 중에서 특히 바람직한 것이 온도 및 영양 부가물과 같은 조작이 용이한 환경 인자에 의해 유도될 수 있는 것들이다.

본 발명에 유용한 발현 벡터로는 크로모좀-, 에피솜- 및 바이러스-유래된 벡터, 예컨대 세균 플라스미드, 박테리오파지, 효모 에피솜, 효모 염색체 엘리먼트, 바콜로바이러스, 파포바 바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 포울 폭스 바이러스, 거짓미친개병 바이러스 및 레트로바이러스와 같은 바이러스로부터 유래된 벡터, 및 코스미드 및 파지미드와 같은 이의 조합물로부터 유래된 벡터가 있다.

DNA 삽입은 적합한 프로모터, 소수를 언급하자면, 파지 람다 PL 프로모터, 대장균(*E.coli*) lac, trp 및 tac 프로모터, SV40 조기 및 후기 프로모터 및 레트로바이러스 LTR의 프로모터에 작동가능하게 결합되어야 한다. 다른 적합한 프로모터가 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 발현 구성물은 전사 개시, 종료를 위한 부위 및 전사된 영역에서 번역을 위한 리보좀 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 구성물에 의해 발현된 성숙한 전사체의 코딩 부분은 번역되는 폴리펩티드의 말단에 적합하게 정위된 개시 및 종료 코돈(UAA, UGA 또는 UAG)에 번역 개시 부위를 포함하는 것이 바람직할 것이다.

기술된 대로, 발현 벡터는 바람직하게 하나 이상의 선택적인 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 디하이드로폴레이트 환원효소 또는 진핵 세포 배양을 위한 네오마이신 내성 및 대장균(*E.coli*) 및 다른 세균에서의 배양을 위한 테트라사이클린, 카나마이신 또는 암피실린 내성 유전자를 포함한다. 적합한 숙주의 대표적인 예로는 대장균(*E.coli*), 스트렙토마이세스

(*Streptomyces*) 및 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) 세포와 같은 세균 세포; 효모 세포와 같은 균사체 세포; 드로소필라(*Drosophila*) S2 및 Sf9 세포와 같은 곤충 세포; CHO, COS 및 Bowes 흑색종 세포와 같은 동물 세포; 및 식물 세포가 있으나 이로 제한되지 않는다. 적합한 배양 배지 및 상기 기술된 숙주 세포에 대한 조건은 당 분야에 공지되어 있다.

세균에 사용하기에 바람직한 벡터로는 Qiagen에서 시판되는 pQE70, pQE60 및 pQE9, pQE10; Stratagene에서 시판되는 pBS 벡터, 파지스크립트 벡터, 블루스크립트 벡터, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A; Novagen에서 시판되는 pET 시리즈의 벡터; 및 Pharmacia에서 시판되는 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5가 있다. 바람직한 진핵 벡터로는 Stratagene에서 시판되는 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG; 및 Pharmacia에서 시판되는 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL이 있다. 다른 적합한 벡터가 당업자에게 용이하게 자명할 것이다.

본 발명에 사용하기 적합한 공지된 세균 프로모터로는 대장균(*E.coli*) lacI 및 lacZ 프로모터, T3, T5 및 T7 프로모터, gpt 프로모터, 람다 PR 및 PL 프로모터, trp 프로모터 및 xyI/tet 키메라 프로모터가 있다. 적합한 진핵 프로모터로는 CMV 즉시 조기 프로모터, HSV 티미딘 키나제 프로모터, 조기 및 후기 SV40 프로모터, 로우스 육종 바이러스(RSV)의 프로모터와 같은 레트로바이러스 LTR의 프로모터, 및 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터와 같은 메탈로티오네인 프로모터가 있다.

구성물을 숙주 세포에 도입하는 것은 인산칼슘 트랜스펙션, DEAE-덱스트란 매개된 트랜스펙션, 양이온성 지질-매개된 트랜스펙션, 일렉트로포레이션, 형질도입, 감염 또는 다른 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 방법들이 많은 실험실 기준 매뉴얼에 개시되어 있다 (예를 들어, Davis 등, *Basic Methods In Molecular Biology* (1986)).

고등 진핵생물에 의한 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터에 삽입함에 의해 증가될 수 있다. 인핸서는 소정의 숙주 세포-유형에서 프로모터의 전사 활성을 증가시키도록 작용하는 일반적으로 10개 내지 300개 누클레오티드의 DNA의 시스-작용성 엘리먼트이다. 인핸서의 예로는 100개 내지 270개의 누클레오티드에서 복제 기원의 후기 측상에 정위된 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 조기 프로모터 인핸서, 복제 기원의 후기 측상의 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서가 있다.

소포체의 루멘, 원형질막 주위공간 또는 세포외 환경으로 번역된 폴리펩티드를 분비하기 위해, 발현된 폴리펩티드, 예를 들어 아미노산 서열 KDEL (서열번호 33)에 적합한 분비 신호가 포함될 수 있다. 신호는 폴리펩티드에 대해 내인성일 수 있거나, 이종성 신호일 수 있다.

관심있는 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 상이한 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 포함하는 융합 유전자의 일부로서 혼입시킬 수 있다. 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 단리된 핵산 및 본 발명의 핵산의 누클레오티드 서열에 대한 프레임에 결합된 이종성 웨프티드를 엔코딩하는 하나 이상의 이종성 서열을 고찰하여 이종성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 엔코딩한다. 이종성 폴리펩티드는 (a) 본 발명의 핵산에 의해 엔코딩된 폴리펩티드의 C-말단, (b) 폴리펩티드의 N-말단, 또는 (c) 폴리펩티드의 C-말단 및 N-말단에 융합될 수 있다. 특정 예에서, 이종성 서열은 여기에 융합되는 폴리펩티드의 검출, 단리, 가용화 및/또는 안정화를 허용하는 폴리펩티드를 엔코딩한다. 여전히 다른 구체예에서, 이종성 서열은 폴리-His tag, myc, HA, GST, 단백질 A, 단백질 G, 칼모돌린-결합 웨프티드, 티오레독신, 말토스-결합 단백질, 폴리 아르기닌, 폴리 His-Asp, FLAG, 면역글로불린 단백질의 일부, 및 트랜스시토시스 웨프티드로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 엔코딩한다.

융합 발현 시스템은 본 발명의 폴리펩티드의 면역원성 단편을 생성하는 것이 바람직한 경우 유용할 수 있다. 예를 들어, 로타바이러스의 VP6 캡시드 단백질을 단량체 형체 또는 바이러스 입자의 형태로 폴리펩티드의 일부에 대한 면역적 담체 단백질로서 사용할 수 있다. 항체가 생성되는 본 발명의 폴리펩티드의 일부에 상응하는 핵산 서열은 비리온의 일부로서 단백질의 일부를 포함하는 융합 단백질을 발현시키는 일련의 재조합 바이러스를 생성하기 위해 후기 백시니아 바이러스 구조 단백질에 대한 코딩 서열을 포함하는 융합 유전자 구성물에 혼입될 수 있다. B형 간염 표면 항원을 또한 이러한 역할을 위해 사용할 수 있다. 유사하게, 본 발명의 폴리펩티드의 일부를 함유하는 융합 단백질 및 폴리오바이러스 캡시드 단백질을 엔코딩하는 키메라 구성을 생성시켜 면역원성을 향상시킬 수 있다 (참조, 예를 들어, EP Publication NO: 0259149; 및 Evans 등 (1989) *Nature* 339:385; Huang 등 (1988) *J. Virol.* 62:3855; 및 Schlienger 등 (1992) *J. Virol.* 66:2).

융합 단백질은 단백질의 발현 및/또는 정제를 촉진할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 글루타치온-S-트랜스 폴라아제 (GST) 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 이러한 GST 융합 단백질은 글루타치온-유도체화된 매트릭스의 사용에 의한 것과 같이, 본 발명의 폴리펩티드의 정제를 단순화하는데 사용될 수 있다 (참조, 예를 들어 *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel 등 (N.Y.: John Wiley & Sons, 1991)). 또 다른 구체예에서, 재조합 단백질의 요망되는 부분의 N-말단에서의 폴리-(His)/엔테로키나제 절단 부위 서열과 같이, 정제 리더 서열을 코딩하는 융합 유전자가

Ni^{2+} 금속 수지를 이용한 친화력 크로마토그래피에 의해 발현된 융합 단백질의 정제를 허가할 수 있다. 이후 정제 리더 서열을 엔테로키나제로 후속적으로 제거하여 정제된 단백질을 제공할 수 있다 (예컨대, 참조 Hochuli 등 (1987) *J. Chromatography* 411:177; 및 Janknecht 등, *PNAS USA* 88:8972).

융합 유전자를 제조하는 기술은 널리 공지되어 있다. 본질적으로 라이게이션, 적합한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 소화, 적합한 부착성 말단의 채움, 요망되지 않는 결합을 피하기 위한 알칼리 포스파타제 처리 및 효소적 라이게이션을 위해 블런트-엔딩되거나 엉갈림-엔딩된 말단을 적용시켜 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편의 결합을 통상적인 기술에 따라 수행한다. 대안적으로, 키메라 유전자 서열을 생성하기 위해 후속적으로 어닐링될 수 있는 두 연속하는 유전자 단편 간에 상보적인 오버행을 일으키는 앵커 프라이머를 이용하여 유전자 단편의 PCR 증폭을 수행할 수 있다 (참조, 예를 들어 *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel 등, John Wiley & Sons: 1992).

다른 구체예에서, 본 발명의 핵산은 플레이트, 미세역가 플레이트, 슬라이드, 비드, 입자, 구체, 필름, 스트랜드, 침전물, 겔, 시트, 튜빙, 컨테이너, 모세관, 패드, 슬라이스 등을 포함하는 고체 표면위에 고정될 수 있다. 본 발명의 핵산은 어레이의 일부로서 칩에 고정될 수 있다. 어레이는 본원에 기술된 하나 이상의 본 발명의 폴리누클레오티드를 포함할 수 있다. 한 구체 예에서, 칩은 누클레오티드 서열의 어레이의 일부로서 하나 이상의 본 발명의 폴리누클레오티드를 포함한다.

또 다른 양태는 "안티센스 치료법"에서 본 발명의 핵산의 용도에 관한 것이다. 본원에서 사용된 안티센스 치료법이란 본 발명의 폴리펩티드 중 하나를 엔코딩하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 하이브리드화되거나 세포 조건하에 달리 결합되는 올리고누클레오티드 프로브 또는 이들의 유도체를 투여하거나 동일반응계내 생성시켜 예컨대 전사 및/또는 번역을 억제함에 의해 상기 폴리펩티드의 발현을 억제하는 것을 의미한다. 결합은 통상적인 염기쌍 상보성에 의해 이루어지거나, 예를 들어 DNA 이중가닥에 결합하는 경우, 이중 헬릭스의 주요 그루브에서의 특이적 상호작용을 통해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 안티센스 치료법은 당 분야에서 일반적으로 적용되는 범위의 기술을 언급하며, 올리고누클레오티드 서열에 대한 특정 결합에 의존하는 임의의 치료법을 포함한다.

올리고누클레오티드는 웨이트, 하이브리드화 촉발된 가교제 운반체, 하이브리드화 촉발된 절단제 등과 같은 또 다른 분자에 컨쥬게이션될 수 있다. 안티센스 분자는 "펩티드 핵산"(PNA)일 수 있다. PNA는 라이신으로 끝나는 아미노산 잔기의 웨이트 백분에 결합된 길이가 약 5개 이상의 누클레오티드인 올리고누클레오티드를 포함하는 안티센스 분자 또는 항-유전자 작용제를 의미한다. 말단 라이신은 조성물에 가용성을 부여한다. PNA는 우선적으로 상보적인 단일 표준 DNA 또는 RNA 및 스톱 전사체 신장에 결합하며, 폐길화되어 세포에서 이들의 수명을 연장시킬 수 있다.

본 발명의 안티센스 구성물은 세포에 전사될 때 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 mRNA의 적어도 유일한 부분에 상보적인 RNA를 생성하는 발현 플라스미드로서 전달될 수 있다. 대안적으로, 안티센스 구성물은 생체외에서 생성되며 세포에 도입될 때 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 mRNA 및/또는 게놈 서열과 하이브리드화됨에 의해 발현의 억제를 야기하는 올리고누클레오티드 프로브일 수 있다. 상기 올리고누클레오티드 프로브는 내인성 누클레아제, 예컨대 엑소누클레아제 및/또는 엔도누클레아제에 내성이고, 따라서 생체내에서 안정한 변형된 올리고누클레오티드일 수 있다. 안티센스 올리고누클레오티드로서 사용되는 예시적인 핵산 분자로는 DNA의 포스포르아미데이트, 포스포티오에이트 및 메틸포스포네이트 유사체가 있다 (참조, US 특허 5,176,996; 5,264,564; 및 5,256,775). 추가로, 안티센스 치료법에 유용한 올리고머를 구성하기 위한 일반적인 접근법이 예를 들어 문헌 [van der Krol 등 (1998) *Biotechniques* 6: 958-976; 및 Stein 등 (1998) *Cancer Res* 48: 2659-2668]에서 검토되었다.

추가의 양태에서, 이중 가닥 소형 간섭 RNA (siRNA), 및 이를 투여하는 방법이 제공된다. siRNA는 유전자 발현을 감소시키거나 차단한다. 이론에 구속되길 바라지 않으며, 일반적으로 siRNA는 서열 특이적 mRNA 분해를 매개함에 의해 유전자 발현을 억제하는 것으로 고려된다. RNA 간섭(RNAi)은 특히 동물 및 식물에서 침묵하는 유전자에 대한 서열에 상동인 이중 가닥 RNA (dsRNA)에 의해 개시되는 서열 특이적인, 전사 후 유전자 침묵의 과정이다 (Elbashir 등 *Nature* 2001; 411 (6836): 494-8). 따라서, 본 발명의 폴리누클레오티드의 전부 또는 일부와 실질적인 서열 동일성을 갖는 siRNA 및 긴 dsRNA를 본 발명의 핵산의 발현을 억제하는데 이용할 수 있을 것으로 이해된다.

대안적으로, 본원에 개시된 1sd 폴리펩티드의 발현을 감소시키거나 차단하는 siRNA가 표적 유전자에 대한 다수의 siRNA 구성물을 시험함에 의해 결정될 수 있다. 표적 유전자에 대한 이러한 siRNA는 화학적으로 합성될 수 있다. 억제되는 표적 유전자에 대해 가닥이 상보성 영역을 지니도록 개별적인 RNA 가닥의 누클레오티드 서열을 선택한다 (즉, 상보적인 RNA 가닥은 표적 유전자의 발현 동안 형성된 mRNA 전사체의 영역에 상보적인 누클레오티드 서열, 또는 이의 가공 생성물, 또

는 (+)가닥 바이러스의 영역을 포함한다). RNA 가닥을 합성하는 단계는 고체-상 합성을 포함할 수 있고, 여기서 개별적인 누클레오티드의 말단과 말단을 연속적인 합성 싸이클에서 누클레오티드간 3'-5' 포스포다이에스테르 결합의 형성을 통해 연결한다.

본원에 개시된 *isd* 핵산 서열로 본질적으로 구성된 누클레오티드 서열을 포함하는 siRNA 분자가 본원에 제공된다. siRNA 분자는 두 가닥을 포함할 수 있으며, 각 가닥은 적어도 본질적으로 서로에 상보적인 누클레오티드 서열을 포함하고, 둘 중 하나는 표적 유전자의 서열에 본질적으로 일치한다. 표적 유전자의 서열에 본질적으로 일치하는 서열을 "센스 표적 서열"로서 언급하며 여기에 본질적으로 상보적인 서열을 siRNA의 "안티센스 표적 서열"로서 언급한다. 센스 및 안티센스 표적 서열은 약 15개 내지 약 30개의 연속적인 누클레오티드; 약 19개 내지 약 25개의 연속적인 누클레오티드; 약 19개 내지 약 23개의 연속적인 누클레오티드 또는 약 19, 20, 21, 22 또는 23개의 누클레오티드 길이일 수 있다. 센스 및 안티센스 서열의 길이는, 이러한 길이의 센스 및 안티센스 표적 서열을 지니는 siRNA가 바람직하게는 숙주 인터페론 반응을 현저히 유도하지 않으며 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있도록 결정된다.

siRNA 표적 서열은 확장자 web.mit.edu/mmcmanus/www/home1.2files/siRNAs를 지니는 mmcmanus의 월드 와이드 웹상에 제공된 임의의 알고리즘을 이용하여 예측될 수 있다.

센스 표적 서열은 표적 핵산의 코딩 또는 비코딩 부분, 또는 이의 조합과 본질적으로 또는 실질적으로 동일할 수 있다. 예를 들어, 센스 표적 서열은 표적 핵산 또는 이의 보체의 5' 또는 3' 비번역된 영역, 프로모터, 인트론 또는 엑손에 본질적으로 상보적일 수 있다. 이것은 또한 상기 두 유전자 영역간에 경계를 포함하는 영역과 본질적으로 상보적일 수 있다.

센스 표적 서열의 누클레오티드 염기 조성은 약 50%의 아데닌(As) 및 티미딘(Ts) 및 50%의 시티딘(Cs) 및 구아노신(Gs)일 수 있다. 대안적으로, 염기 조성은 50% 이상의 Cs/Gs, 예컨대 약 60%, 70% 또는 80%의 Cs/Gs일 수 있다. 따라서, 센스 표적 서열의 선택은 누클레오티드 염기 조성에 근거할 수 있다. siRNA에 의한 표적 핵산의 접근성과 관련하여, 이것은 예컨대 문헌 [Lee 등 (2002) *Nature Biotech.* 19:500]에 기술된 대로 결정될 수 있다. 상기 접근법은 예컨대 세포 추출물에서 기질 접근성을 결정하기 위해 표적 핵산에 상보적인 올리고누클레오티드의 프로브로서의 이용을 수반한다. 올리고누클레오티드 프로브와 이중가닥을 형성한 후, 기질은 RNase H에 민감해진다. 따라서, 예컨대 PCR에 의해 결정된 소정의 프로브에 대한 RNase H의 민감성의 정도는 선택된 부위의 접근성을 반영하며, 상응하는 siRNA가 상기 표적 유전자로부터의 전사를 억제함에 있어서 얼마나 잘 임무를 수행할지에 대한 예상치가 될 수 있다. 중합효소 연쇄반응(PCR) 검정을 위한 프라이머를 동정하거나 제1 표적 서열을 동정하기 위해 안티센스 올리고누클레오티드를 동정하는 알고리즘을 이용할 수도 있다.

센스 및 안티센스 표적 서열은 바람직하게 충분히 상보적이어서, 두 서열 모두를 포함하는 siRNA가 표적 유전자의 발현을 억제하고, 즉 RNA 간섭을 매개할 수 있다. 예를 들어, 서열은 예컨대 세포에서 요망되는 조건하에 하이브리드화될 수 있도록 충분히 상보적일 수 있다. 따라서, 센스 및 안티센스 표적 서열은 적어도 약 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하고, 예컨대 많아야 5, 4, 3, 2, 1 또는 0개의 누클레오티드 만큼 상이할 수 있다.

또한 센스 및 안티센스 표적 서열은 표적 핵산 또는 이의 보체 이외의 서열과 현저하게 상호작용하지 않을 서열인 것이 바람직하다. 이것은 표적 세포의 계층에서 예컨대 선택된 서열을 다른 서열과 비교함에 의해 확인될 수 있다. 서열 비교는 당분야에 공지된 방법에 따라, 예컨대 본원에 추가로 기술된 BLAST 알고리즘을 이용하여 수행될 수 있다. 물론, 특정 제1 표적 서열이 표적 핵산의 발현을 특이적으로 억제하고 다른 유전자의 발현을 본질적으로 억제하지 않음을 확인하기 위해 소규모 실험을 수행할 수도 있다.

siRNA는 또한 센스 및 안티센스 서열에 더하여 서열들을 포함할 수 있다. 예를 들어, siRNA는 두 가닥의 RNA로 구성된 RNA 이중가닥일 수 있고, 여기서 하나 이상의 가닥이 3' 오버행을 지닌다. 다른 가닥은 블런트-엔딩이거나 오버행을 지닐 수 있다. RNA 분자가 이중 가닥이고 두 가닥 모두가 오버행을 포함하는 구체예에서, 오버행의 길이는 각 가닥에 대해 동일하거나 상이할 수 있다. 특정 구체예에서, siRNA는 센스 및 안티센스 서열을 포함하고, 이들 각각은 하나의 RNA 가닥위에 존재하며, 쌍을 이루고 RNA의 양 3' 말단에 약 1 내지 약 3개, 특히 약 2개의 누클레오티드로 된 오버행을 지니는 약 19-25개의 누클레오티드로 구성된다. 본 발명의 RNA의 안정성을 추가로 향상시키기 위하여, 3' 오버행을 분해에 대해 안정화 시킬 수 있다. 한 구체예에서, RNA는 아데노신 또는 구아노신 누클레오티드와 같은 푸린 누클레오티드를 포함함에 의해 안정화된다. 대안적으로, 변형된 유사체에 의한 피리미딘 누클레오티드의 치환, 예컨대 2'-데옥시티미딘에 의한 우리딘 2 누클레오티드 3' 오버행의 치환이 허용되며 이것은 RNAi의 효능에 영향을 미치지 않는다. 2' 허드록실의 부재는 적어도 조직 배양 배지에서 오버행의 누클레아제 내성을 현저하게 개선시킬 수 있다. siRNA의 RNA 가닥은 5' 포스페이트 및 3' 허드록실기를 지닐 수 있다.

한 구체예에서, siRNA 분자는 이중가닥을 형성하는 두 가닥의 RNA를 포함한다. 또 다른 구체예에서, siRNA 분자는 헤어핀 루프를 형성하는 하나의 RNA 가닥으로 구성되며, 여기서 센스 및 안티센스 표적 서열은 하이브리드화되고 두 표적 서열 사이의 서열은 본질적으로 헤어핀 구조의 루프를 형성하는 스페이서 서열이다. 스페이서 서열은 누클레오티드의 임의의 조합물일 수 있고 두 상보적인 올리고누클레오티드가 이러한 서열을 지니는 스페이서에 의해 결합되는 경우 임의의 길이의 헤어핀 구조를 형성할 수 있으며, 이 때 스페이서의 적어도 일부가 헤어핀의 닫힌 말단에서 루프를 형성한다. 예를 들어, 스페이서 서열은 약 3 내지 약 30개의 누클레오티드; 약 3 내지 약 20개의 누클레오티드; 약 5 내지 약 15개의 누클레오티드; 약 5 내지 약 10개의 누클레오티드; 또는 약 3 내지 약 9개의 누클레오티드로 이루어질 수 있다. 서열은, 이것이 헤어핀 구조의 형성을 방해하지 않는 한 임의의 서열일 수 있다. 특히, 스페이서 서열은 제1 또는 제2 표적 서열에 임의의 상당한 상동성을 지니는 서열이 아닌 것이 바람직한데, 이는 헤어핀 구조의 형성을 방해할 수 있기 때문이다. 스페이서 서열은 또한 핵산 서열이 도입될 세포의 계놈 서열과 같은 다른 서열과 유사하지 않은 것이 바람직하며, 이는 세포에서 바람직하지 않은 결과를 초래할 수 있기 때문이다.

당업자는 핵산, 예컨대 RNA를 언급할 때, RNA가 천연 발생 누클레오티드 또는 예컨대 핵산에 더 큰 안정성을 제공하는 누클레오티드 유도체를 포함하거나 이들로 구성될 수 있음을 이해할 것이다. 핵산이 요망되는 형식으로 작용할 수 있다면 임의의 유도체가 허용된다. 예를 들어, siRNA는 siRNA가 여전히 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있다면 누클레오티드 유도체를 포함할 수 있다.

예를 들어, siRNA는 하나 이상의 변형된 염기 및/또는 안정성 또는 다른 이유로 변형된 백본을 포함할 수 있다. 예를 들어, 천연 RNA의 포스포다이에스테르 결합을 변형시켜 질소 또는 황 헤테로원자 중 하나 이상을 포함시킬 수 있다. 더욱이, 두 가지 예를 들자면, 이노신과 같은 색다른 염기 또는 트리틸화된 염기와 같은 변형된 염기를 포함하는 siRNA를 본 발명에 이용할 수 있다. 매우 다양한 변형이 당업자에게 공지된 많은 유용한 목적을 달성하도록 RNA에 수행될 수 있음을 이해할 것이다. 본원에서 사용된 siRNA라는 용어는 이것이 내인성 주형으로부터 유래된 경우, siRNA의 화학적, 효소적 또는 대사적으로 변형된 형태를 포함한다.

siRNA를 합성할 수 있는 방식에는 제한이 없다. 따라서, 이것은 수동 및/또는 자동화 공정을 이용하여 시험관내 또는 생체내에서 합성될 수 있다. 시험관내 합성은 예를 들어 DNA (또는 cDNA) 주형의 전사를 위한 클로닝된 RNA 중합효소 (예컨대, T3, T7, SP6)를 이용하여 화학적 또는 효소적일 수 있거나, 둘 모두의 혼합일 수 있다. siRNA는 또한 두 가닥 각각을 예컨대 화학적으로 합성하고 두 가닥을 하이브리드화시켜 이중가닥을 형성함에 의해 제조될 수 있다. 생체내에서, siRNA는 당 분야에 널리 공지된 재조합 기술을 이용하여 합성될 수 있다 (참조, 예컨대 Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning: Volumes I and II (D.N. Clover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed, 1984); Nucleic Acid Hybridisation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney ed. 1986); Immobilised Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the series, Methods in Enzymology (Academic Press, INC.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (Wu and Grossman, and Wu, eds., 각각), Mayer and Walker, eds. (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London), Scopes (1987), Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition (Springer-Verlag, N.Y.) and Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds 1986). 예를 들어, siRNA가 유래되는 DNA 주형을 포함하는 발현 벡터로 세균 세포를 형질변화시킬 수 있다.

세포 외부에서 합성되는 경우, siRNA를 세포에 도입하기 전에 정제시킬 수 있다. 정제는 용매 (예컨대 수지/클로로포름) 또는 수지를 이용한 추출, 침전 (예를 들어 에탄올 중), 전기영동, 크로마토그래피 또는 이들의 조합에 의해 이루어질 수 있다. 그러나, 정제는 siRNA의 손실을 초래할 수 있으므로 최소화하거나 전혀 수행하지 않을 수 있다. siRNA를 저장을 위해 전조시키거나, 완충액 또는 RNA 가닥의 어닐링 및/또는 안정화를 촉진시키는 염을 포함할 수 있는 수용액에 용해시킬 수 있다.

이중 가닥 구조는 단일의 자기-상보적인 RNA 가닥 또는 분리된 두 상보적인 RNA 가닥에 의해 형성될 수 있다.

포유동물 세포가 세포외 siRNA에 반응할 수 있어서 dsRNA에 대한 운반 메커니즘을 지닐 수 있음이 공지되어 있다 (Asher 등 (1969) *Nature* 223 715-717). 따라서, siRNA를 공동, 간질 공간 (interstitial space)으로 포유동물의 순환에 세포외적으로 투여하거나, 경구 도입할 수 있다. 경구 도입 방법은 RNA와 포유동물의 영양물과의 직접 혼합 뿐만 아니라 영양물로서 사용되는 종이 RNA를 발현하도록 이를 공학처리한 다음, 병에 걸린 포유동물에게 공급하는 공학처리된 접근

법이 있다. 예를 들어, 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)와 같은 식품 세균을 형질변환시켜 dsRNA를 생성할 수 있다 (참조 WO93/17117, WO97/14806). 혈관 또는 혈관외 순환, 혈액 또는 림프 시스템 및 뇌척수액이 RNA가 주입될 수 있는 부위이다.

RNA는 세포에 세포내적으로 도입될 수 있다. 핵산을 도입하는 물리적 방법을 이와 관련하여 사용할 수도 있다. siRNA는 문헌 [Zernicka-Goetz 등 (1997) Development 124, 1133-1137 and Wianny 등 (1998) Chromosoma 107, 430-439]에 개시된 미세주입 기술을 이용하여 투여될 수 있다.

세포내적으로 핵산을 도입하는 다른 물리적 방법으로는 siRNA에 의해 덜한 입자에 의한 충격, 예를 들어 siRNA를 금 입자 상에 고정하고 와운딩(wounding) 부위에서 직접 발사시키는 유전자 총 기술이 있다. 따라서, 본 발명은 표적 유전자의 발현을 억제하기 위해 유전자 총에서의 siRNA의 사용을 제공한다. 추가로, siRNA 및 금 입자를 포함하는 유전자 총 치료법에 적합한 조성물을 제공한다. 대안적인 물리적 방법으로는 siRNA의 존재하에 세포막의 일렉트로포레이션이다. 이 방법은 대규모의 RNAi를 허가한다. 세포에 핵산을 도입하는 당분야에 공지된 다른 방법이 이용될 수 있으며, 예컨대 지질-매개된 담체 운반, 인산칼슘과 같은 화학제-매개된 운반 등이 있다. siRNA는 하기 활성 중 하나 이상을 수행하는 성분과 함께 도입될 수 있다: 세포에 의한 RNA 흡수 개선, 이중가닥의 어닐링 촉진, 어닐링된 가닥의 안정화 또는 표적 유전자의 억제 증가.

RNA를 투여하는데 임의의 공지된 유전자 치료법을 이용할 수 있다. 바이러스 입자에 패키징된 바이러스 구성물은 세포로의 발현 구성물의 효과적인 도입 및 발현 구성물에 의해 엔코딩되는 siRNA의 전사 둘 모두를 달성할 것이다. 따라서, siRNA는 세포 내부에 제공될 수도 있다. 하나 또는 두 가닥의 siRNA 분자를 엔코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 예컨대 발현 벡터를 상기 목적을 위해 사용할 수 있다. 핵산은 센스 표적 서열에 본질적으로 상보적인 안티센스 서열을 추가로 포함할 수 있다. 핵산은 센스 및 안티센스 표적 서열 사이에 스페이서 서열을 추가로 포함할 수 있다. 핵산은 세포에서 센스 및 안티센스 서열의 발현을 유도하는 프로모터, 예컨대 RNA 중합효소 II 또는 III 프로모터 및 전사 종료 신호를 추가로 포함할 수 있다. 서열은 작동가능하게 연결될 수 있다.

한 구체예에서, 핵산은 RNA 중합효소 III 프로모터에 작동가능하게 연결된 RNA 코딩 영역 (예컨대, 센스 또는 안티센스 표적 서열)을 포함한다. RNA 코딩 영역 바로 뒤에는 pol III에 의한 RNA 합성의 종료를 지시하는 pol III 종결인자 서열이 올 수 있다. pol III 종결인자 서열은 일반적으로 4개 이상의 연속적인 티미딘 ("T") 잔기를 지닌다. 바람직한 구체예에서, 5개의 연속적인 T 잔기의 클러스터를 종결인자로서 사용하여 pol III 전사를 DNA 주형의 제2 또는 제3 T에서 중단시킴으로써 2 내지 3개의 우리딘 ("U") 잔기만이 코딩 서열의 3' 말단에 첨가된다. 다양한 pol III 프로모터가 본 발명에 이용될 수 있고, 예를 들어 인간 또는 마우스 기원 또는 임의의 다른 종으로부터의 H1 RNA 유전자 또는 U6 snRNA 유전자로부터 유래된 프로모터 단편을 포함한다. 또한 pol III 프로모터를 변형/공학처리하여 소형 화학 분자에 의해 도입되는 능력과 같은 다른 바람직한 특성을 편재하도록 또는 조직-특이적 방식으로 훈입시킬 수 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 프로모터를 테트라사이클린에 의해 활성화시킬 수 있다. 또 다른 구체예에서, 프로모터를 IPTG (lacI 시스템)에 의해 활성화시킬 수 있다.

siRNA는 세포를 두 핵산, 예컨대 벡터로 형질변환시킴에 의해 세포에 제공될 수 있고, 각 핵산은 발현 카세트를 포함하며, 각 발현 카세트는 프로모터, RNA 코딩 서열 (하나는 센스 표적 서열이고 다른 하나는 안티센스 표적 서열임) 및 종료 신호를 포함한다. 대안적으로, 단일 핵산은 두 개의 상기 발현 카세트를 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 핵산은 안티센스 표적 서열에 결합된 스페이서에 결합된 센스 표적 서열을 포함하는 단일 가닥 RNA를 엔코딩한다. 핵산은 세포에 도입된 세포내 센스 및 안티센스 표적 서열의 발현을 가능하게 하는 벡터, 예컨대 발현 벡터, 예컨대 진핵 발현 벡터에 존재할 수 있다.

siRNA를 생성하기 위한 벡터는 문헌 [Paul 등 (2002) *Nature Biotechnology* 29:505; Xia 등 (2002) *Nature Biotechnology* 20:1006; Zeng 등 (2002) *Mol. Cell* 9:1327; Thijn 등 (2002) *Science* 296:550; BMC Biotechnol. 2002 Aug 28;2(1):15; Lee 등 (2002) *Nature Biotechnology* 19: 500; McManus 등 (2002) *RNA* 8:842; Miyagishi 등 (2002) *Nature Biotechnology* 19:497; Sui 등 (2002) *PNAS* 99:5515; Yu 등 (2002) *PNAS* 99:6047; Shi 등 (2003) *Trends Genet.* 19(1):9; Gaudilliere 등 (2002) *J. Biol. Chem.* 277(48):46442; US2002/0182223; US 2003/0027783; WO 01/36646 및 WO 03/006477]에 개시되어 있다. 벡터는 또한 시판된다. 예를 들어 pSilencer는 Gene Therapy Systems, Inc.로부터 시판되며 pSUPER RNAi 시스템은 Oligoengine으로부터 시판된다.

또한 하나 이상의 siRNA 또는 siRNA의 RNA 코딩 영역을 엔코딩하는 핵산을 포함하는 조성물이 본원에서 제공된다. 조성물은 약제 조성물이며 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 조성물은 또한 세포 또는 피검체에서 조성물을 투여하기 위한 장치로 제공될 수도 있다. 예를 들어, 조성물은 주사기 또는 스텐트로 존재할 수 있다. 조성물은 또한 siRNA 또는 핵산의 세포로의 진입을 촉진하는 작용제를 포함할 수 있다.

일반적으로, 올리고누클레오티드는 당 분야에 공지된 프로토콜을 이용하여 합성될 수 있으며, 예를 들어 문헌[Caruthers 등, *Methods in Enzymology* (1992) 211:3-19; Thompson 등, International PCT Publication No. WO 99/54459; Wincott 등, *Nucl. Acids Res.* (1995) 23:2677-2684; Wincott 등, *Methods Mol Bio.* (1997) 74:59; Brennan emd, *Biotechnol. Bioeng.* (1998) 61:33-45; 및 Brennan, U.S. Pat. No. 6,001,311; 각각은 본원에서 그 전체가 참조로서 포함된다]에 개시되어 있다. 일반적으로 올리고누클레오티드의 합성은 5' 말단에 디메톡시트리틸 및 3' 말단에 포스포르아미다이트와 같은 통상적인 핵산 보호기 및 커플링기를 포함한다. 비제한적인 실시예에서, 소규모 합성은 Applied Biosystems, Inc. (Weiterstadt, Germany)에서 판매되는 Expedite 8909 RNA 합성기 상에서 ChemGenes Corporation (Ashland Technology Center, 200 Homer Avenue, Ashland, MA 01721, USA)에 의해 판매되는 리보누클레오시드 포스포르아미다이트를 이용하여 수행된다. 대안적으로 합성은 Protogene (Palo Alto, Calif., USA)에 의해 생성된 장치와 같은 96-웰 플레이트 합성기 상에서, 또는 문헌[Usman 등, *J. Am. Chem. Soc.* (1987) 109:7845; Scaringe 등, *Nucl. Acids Res.* (1990) 18:5433; Wincott 등, *Nucl. Acids Res.* (1990) 23:2677-2684; 및 Wincott 등, *Methods Mol. Bio.* (1997) 74:59, 각각은 본원에서 그 전체가 참조로서 포함된다]에 개시된 것들과 같은 방법에 의해 수행될 수 있다.

본 발명의 핵산 분자는 따로따로 합성될 수 있고 합성한 후에 dsRNA를, 예를 들어 라이케이션 (Moore 등, *Science* (1992) 256:9923; Draper 등, International PCT publication No. WO 93/23569; Shabarova 등, *Nucl Acids Res.* (1991) 19:4247; Bellon 등, *Nucleosides & Nucleotides* (1997) 16:951; 및 Bellon 등, *Bioconjugate Chem.* (1997) 8:204) 또는 합성 및/또는 탈보호에 이어 하이브리드화에 의해 합성할 수 있다. 핵산 분자는 통상적인 방법을 이용하여 젤 전기영동에 의해 정제될 수 있거나, 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC; 참조 Wincott 등, 상술함, 이의 전체 내용이 본원에 참조로서 포함됨)에 의해 정제되고 물에 재현탁될 수 있다.

또 다른 구체예에서, 세포의 특정 mRNA 또는 폴리펩티드의 수준이 리보자임을 세포 또는 이를 엔코딩하는 핵산에 도입함에 의해 감소된다. 또한 mRNA 전사체를 촉매적으로 절단하도록 고안된 리보자임 분자를 세포에 도입하거나 세포에서 발현시켜 유전자 Y의 발현을 억제할 수 있다 (참조, 예컨대 Sarver 등, 1990, *Science* 247:1222-1225 및 U.S. Patent No. 5,093,246). 일반적으로 사용되는 한 리보자임 모티프는 해머헤드이며, 이에 대한 기질 서열 요구는 극미하다. 해머헤드 리보자임의 설계는 문헌[Usman 등, *Current Opin. Struct. Biol.* (1996) 6:527-533]에 개시되어 있다. Usman은 또한 리보자임의 치료적 용도를 논의하였다. 리보자임은 문헌[Long 등, *FASEB J.* (1993) 7:25; Symons, *Ann. Rev. Biochem.* (1992) 61:641; Perrotta 등, *Biochem.* (1992) 31:16-17; Ojwang 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1992) 89: 10802-10806; 및 U.S. Patent No. 5,254,678]에 개시된 대로 제조되거나 사용될 수도 있다. HIV-1 RNA의 리보자임 절단은 미국특허 제 5,144,019호에 개시되어 있고; 리보자임을 이용하여 RNA를 절단하는 방법은 미국특허 제 5,116,742호에 개시되어 있으며; 리보자임의 특이성을 증가시키는 방법은 미국특허 제 5,225,337호 및 문헌[Koizumi 등, *Nucleic Acid Res.* (1989) 17:7059-7071]에 개시되어 있다. 해머헤드 구조에서 리보자임 단편의 제조 및 이용이 또한 문헌[Koizumi 등, *Nucleic Acids Res.* (1989) 17:7059-7071]에 기술되어 있다. 헤어핀 구조에서 리보자임 단편의 제조 및 이용은 문헌[Chowrira and Burke, *Nucleic Acids Res.* (1992) 20:2835]에 기술되어 있다. 또한 리보자임은 문헌[Daubendiek and Kool, *Nat. Biotechnol.* (1997) 15(3):273-277]에 기술된 전사를 진행함에 의해 제조될 수 있다.

유전자 발현은 표적 유전자의 조절 영역에 상보적인 데옥시리보누클레오티드 서열을 표적화하여 (즉, 유전자 프로모터 및/또는 인핸서) 신체의 표적 세포에서 유전자의 전사를 억제하는 삼중 나선 구조를 형성함에 의해 감소될 수 있다 (참조, 일반적으로, Helene (1991) *Anticancer Drug Des.*, 6(6):569-84; Helene 등 (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:27-36; 및 Maher (1992) *Bioassays* 14(12):807-15).

추가의 구체예에서, RNA 앱타머(aptamer)를 세포에 도입하거나 세포에서 발현시킬 수 있다. RNA 앱타머는 Tat 및 Rev RNA와 같은 단백질에 특이적인 RNA 리간드이며 (Good 등 (1997) *Gene Therapy* 4: 45-54) 이들의 번역을 특이적으로 억제시킬 수 있다.

4. *Isd* 폴리펩티드

본원에 기술된 IsdA (SEQ ID NO:3), IsdB (SEQ ID NO:6) 및 IsdC (SEQ ID NO:9) (도 1-3)을 포함하는 스태필로코쿠스 아우레우스 폴리펩티드는 천연 정제 생성물, 화학적 합성 공정의 생성물, 및 예를 들어 세균, 효소, 고등 식물, 곤충 및 포유 동물 세포를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포로부터 재조합 기술에 의해 생성된 생성물을 포함한다. 특정 구체예에서, 본원에 기술된 폴리펩티드는 Isd 폴리펩티드의 기능을 억제한다.

폴리펩티드는 본원에 기술된 임의의 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 구성될 수 있다. 또한 다른 폴리펩티드는 Isd 폴리펩티드와 적어도 약 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일하거나 상동인 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 구성되거나 본질적으로 구성될 수 있다. 예를 들어, 천연 발생 Isd 단백질에서의 서열과 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 아미노산에서 상이한 폴리펩티드가 고려될 수도 있다. 상기 차이는 치환, 예컨대 보존 치환, 결실 또는 첨가일 수 있다. 이러한 차이는 상이한 종간에 현저하게 보존되지 않는 영역에 있는 것이 바람직하다. 상기 영역은 다양한 종으로부터의 아미노산 서열을 정렬시킴에 의해 동정될 수 있다. 상기 아미노산은 예컨대 또 다른 종에서 발견되는 것들로 치환될 수 있다. 이러한 위치 또는 다른 위치에서 치환, 삽입 또는 결실될 수 있는 다른 아미노산은 생물학적 검정과 커플링된 돌연변이 유발 연구에 의해 동정될 수 있다.

단백질은 또한 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비전형적인 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체는 치환 또는 첨가로서 단백질에 도입될 수 있다. 비전형적인 아미노산은 통상적인 아미노산의 D-이성질체, 2,4-디아미노부티르산, 알파-아미노 이소부티르산, 4-아미노부티르산, Abu, 2-아미노 부티르산, 감마-Abu, 엠실론-Ahx, 6-아미노 헥산산, Aib, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르루신, 노르발린, 히드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 호모시트룰린, 시스트산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 시클로헥실알라닌, 베타-알라닌, 플루오로-아미노산, 베타-메틸 아미노산과 같은 디자이너 아미노산, 칼파-메틸(Calpha-methyl) 아미노산, 날파-메틸(Nalpha-methyl) 아미노산, 및 아미노산 유사체를 일반적으로 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱이, 아미노산은 D(우선성) 또는 L(좌선성)일 수 있다.

본원에 포함되는 다른 단백질은 변형된 아미노산을 포함하는 단백질이 있다. 대표적인 단백질은 글리코실화, 폐길화, 인산화 또는 이를 유도체화하는 것으로부터 단백질의 하나 이상의 생물학적 기능을 지니는 임의의 유사한 공정에 의해 변형될 수 있는 유도체 단백질이다.

단백질은 예를 들어 제조물 내의 약 90% 이상의 단백질이 요망되는 단백질인 경우 실질적으로 순수한 제조물로 사용될 수 있다.

스태필로코쿠스 아우레우스 폴리펩티드는 공지된 방법, 예를 들어 암모늄 술페이트 또는 에탄올 침전에 의해 재조합 세포 배양으로부터 회수되고 정제될 수 있으며, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 수산화인회석 크로마토그래피, 렉틴 크로마토그래피 및 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC")를 정제를 위해 사용할 수 있다. 단백질은 실질적으로 순수한 제조물로서 사용될 수 있으며, 예를 들어 단백질 중 적어도 약 90% 이상의 단백질은 요망되는 단백질이다. 요망되는 단백질을 적어도 약 50%, 60%, 70%, 또는 80% 이상 포함하는 조성물이 또한 사용될 수 있다.

단백질은 변성되거나 변성되지 않을 수 있고, 이의 결과로 응집되거나 응집되지 않을 수 있다. 단백질은 당 분야에 공지된 방법에 따라 변성될 수 있다.

특정 구체예에서, 본원에 기술된 Isd 폴리펩티드는 이의 가용성을 증가시키고/거나 이의 정제, 동정, 검출, 및/또는 구조 특징화를 촉진시키는 도메인을 함유하는 융합 단백질일 수 있다. 대표적인 도메인은 예를 들어 글루타치온 S-트랜스퍼라아제(GST), 단백질 A, 단백질 G, 칼모듈린-결합 웨პ티드, 티오레독신, 말토스 결합 단백질, HA, myc, 폴리 아르기닌, 폴리 His, 폴리 His-Asp 또는 FLAG 융합 단백질 및 태그(tag)를 포함한다. 추가적으로 대표적인 도메인은 생체내에서 단백질 위치를 변경하는 도메인, 예를 들어 신호 웨პ티드, 타입 III 분비 시스템-표적 웨პ티드, 트랜스시토시스 도메인, 핵 위치 신호 등을 포함한다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 하나 이상의 이종 융합을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 동일한 융합 도메인의 다중 복사체를 함유하거나 두개 이상의 상이한 도메인에 대한 융합물을 함유할 수 있다. 융합물은 폴리 웨პ티드의 N-말단, 폴리 웨პ티드의 C-말단, 또는 폴리 웨პ티드의 N- 및 C-말단 모두에서 생성될 수 있다. 이는 또한 본 발명의 범위내에서 융합 단백질의 구조화를 촉진시키거나 융합 단백질의 단백질 발현 또는 구조적 제한을 최적화하기 위해 본 발명의 폴리 웨პ티드와 융합 도메인 간의 링커 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 폴리 웨პ티드는 단백질 발현 후 또는 이에 따라 태그를 제거하기 위해 융합 폴리 웨პ티드와 본 발명의 폴리 웨პ티드 간의 프로테아제 절단 부위를 함유하도록 구조화될

수 있다. 적합한 엔도프로타아제의 예로는 예를 들어 인자 Xa 및 TEV 프로테아제를 포함한다. 단백질은 또한 신호 서열에 융합될 수 있다. 예를 들어, 재조합적으로 제조되는 경우, 펩티드를 엔코딩하는 핵산은 신호 서열에 대해 이의 5' 말단에 연결되어, 상기 단백질은 세포로부터 분비된다.

특정 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 화학적으로, 무-세포 시스템에서 리보솜에 의해, 또는 세포내에서 리보솜에 의해 합성될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 화학적 합성은 여러 개의 당해 분야에서 인식된 방법, 예를 들어 단계별 고체상 합성, 펩티드 단편의 형태학적으로 보조된 재-라이게이션을 통한 반합성, 클로닝된 세그먼트 또는 합성 펩티드 세그먼트의 효소적 라이게이션, 및 화학적 라이게이션을 사용하여 수행될 수 있다. 천연 화학적 라이게이션은 두개의 비보호된 펩티드 세그먼트의 화학선택적 반응을 이용하여 일시적인 티오에스테르-연결 중간체를 생산한다. 일시적인 티오에스테르-연결 중간체는 이후 자발적으로 재배열을 수행하여 라이게이션 부위에서 천연 펩티드 결합을 갖는 전장 라이게이션 생성물을 제공한다. 전장 라이게이션 생성물은 무-세포 합성에 의해 생산되는 단백질과 화학적으로 동일하다. 전장 라이게이션 생성물은 허용되는 대로 다시 풀딩(refold)되고/되거나 산화되어 천연 이황화물-함유 단백질 분자를 형성시킬 수 있다 [참조: 미국특번호 제6,184,344호 및 제6,174,530호; 및 Muir 등, *Curr. Opin. Biotech.* (1993): vol. 4, p 420; Miller 등, *Science* (1989): vol. 246, p 1149; Wlodawer 등, *Science* (1989): vol. 245, p 616; Huang 등, *Biochemistry* (1991): vol. 30, p 7402; Schnolzer, 등, *Int. J. Pept. Prot. Res.* (1992): vol. 40, p 180-193; Rajarathnam 등, *Science* (1994): vol. 264, p 90; R. E. Offord, "Chemical Approaches to Protein Engineering", in *Protein Design and the Development of New therapeutics and Vaccines*, J. B. Hook, G. Poste, Eds., (Plenum Press, New York, 1990) pp. 253-282; Wallace 등, *J. Biol. Chem.* (1992): vol. 267, p 3852; Abrahmsen 등, *Biochemistry* (1991): vol. 30, p 4151; Chang, 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 12544-12548; Schnlzer 등, *Science* (1992): vol., 3256, p 221; and Akaji 등, *Chen. Phalan. Bull. (Tokyo)* (1985) 33: 184].

특정 구체예에서, 본 발명의 천연 발생 또는 실험적으로 유도되는 폴리펩티드의 동족체를 제공하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 동족체는 조절제로서 제한된 용량으로 작용하여 천연 발생 폴리펩티드의 형태의 생물학적 활성의 서브세트 (subset)를 증진시키거나 억제할 수 있다. 따라서, 특이적 생물학적 효과는 제한된 기능의 동족체로 처리하므로써 유도될 수 있으며, 본 발명의 폴리펩티드의 모든 생물학적 활성과 관련된 효능제 또는 길항제로의 처리와 비교하여 보다 적은 부작용을 갖는다. 예를 들어, 길항 동족체는 본 발명의 야생형 폴리펩티드의 능력을 방해하여 특정 단백질과 결합하지만 천연 폴리펩티드와 다른 세포 단백질 간의 복합체의 형성을 실질적으로 방해하지 않도록 생성될 수 있다.

폴리펩티드는 본 발명의 전장 폴리펩티드로부터 유도될 수 있다. 이러한 폴리펩티드 중 단리된 펩티딜 부분은 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산의 상응하는 단편으로부터 재조합에 의해 생산되는 폴리펩티드를 스크리닝하므로써 수득될 수 있다. 또한, 단편은 통상적인 메리필드(Merrifield) 고체상 f-Moc 또는 t-Boc 화학과 같은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 단편의 겹침없이 요망되는 길이의 단편으로 임의적으로 분할될 수 있거나, 요망되는 길이의 단편을 겹치도록 분할될 수 있다. 이러한 단편은 (재조합적 또는 화학적 합성에 의해) 생산될 수 있으며, 요망되는 성질 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드의 조절제로서 작용하는 용량을 갖는 이의 펩티딜 단편을 동정하기 위해 시험될 수 있다. 기술된 구체예에서, 본 발명의 단백질 중 펩티딜 부분은 티오래독신 융합 단백질로서의 발현에 의해, 예를 들어 결합 활성, 및 억제 활성에 대해 시험될 수 있으며, 각각은 본 발명의 단백질의 분리된 단편을 함유한다[참조, 예를 들어 미국특허 제5,270,181호 및 제5,292,646호; 및 PCT 공개 WO94/02502호].

다른 구체예에서, 절단된 폴리펩티드가 제조될 수 있다. 절단된 폴리펩티드는 N- 및 C-말단 각각 또는 둘 모두로부터 제거된 1개 내지 20개 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 절단된 폴리펩티드는 전장 폴리펩티드 보다 더욱 수정가능하게 발현, 정제 또는 특성화를 증명할 수 있다. 예를 들어, 절단된 폴리펩티드는 고성능 회절 결정을 수득하거나 고감도 피크 및 최소 겹침 피크를 갖는 HSQC 스펙트럼을 수득하도록 전장 폴리펩티드 보다 결정화에 더욱 수정가능함을 입증할 수 있다. 또한, 절단된 폴리펩티드의 사용은 특성화에 보다 더 수정가능하게 될 수 있는 전장 폴리펩티드의 안정적이고 활성인 도메인을 동정할 수 있다.

또한, 본 발명은 치료학적 또는 예방학적 효능, 또는 안정성(예를 들어, 생체외 보관기간, 생체내 단백질 가수분해 퇴화에 대한 내성 등)을 개선시키기 위한 목적으로서 본 발명의 폴리펩티드의 구조를 변형시킬 수 있다. 단백질의 천연발생 형태의 하나 이상의 활성을 갖도록 고안되는 경우 이러한 변형된 폴리펩티드는 본원에서 더욱 상세하게 기술된 폴리펩티드의 "기능적 등가물"로서 간주된다. 이러한 변형된 폴리펩티드는 예를 들어, 아미노산 치환, 결실, 또는 첨가에 의해 생산될 수 있으며, 치환은 보존적 아미노산 치환에 의해 전체적으로 또는 부분적으로 구성될 수 있다.

예를 들어, 루신의 이소루신 또는 발린으로의 교체, 아스파르테이트의 글루타메이트로의 교체, 트레오닌의 세린으로의 교체와 같은 분리된 보존적 아미노산 치환은 생성된 분자의 생물학적 활성에 주요한 영향을 미치지 않을 것으로 예상하는 것

이 합당하다. 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화가 기능적 동족체를 초래하는지의 여부는 야생형 단백질과 유사한 반응을 생산하는 변이 폴리펩티드의 능력을 평가하므로써 용이하게 결정될 수 있다. 하나 이상의 교체가 수행되는 폴리펩티드는 동일한 방식으로 용이하게 시험될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드의 조합적 돌연변이 및 절단 돌연변이의 세트를 발생시키는 방법이 제공되고, 이는 특히 잠재적인 변이 서열(예를 들어, 동족체)을 동정하는데 유용하다. 이러한 조합적 라이브러리를 스크리닝하는 목적은 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드의 활성을 조절할 수 있거나, 대안적으로는 전체적으로 신규한 활성을 갖는 동족체를 생성하기 위한 것이다. 조합적으로 유도된 동족체는 천연 발생 단백질과 비교하여 선택적 효능을 갖도록 생성될 수 있다. 이러한 동족체가 치료제의 개발에 이용될 수 있다.

마찬가지로, 돌연변이유발은 상응하는 야생형 단백질에 비해 매우 상이한 세포내 반감기를 갖는 동족체를 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 변형된 단백질은 단백질분해 퇴화에 대해 더욱 안정하거나 덜 안정할 수 있거나 다른 세포 공정은 단백질의 파괴 또는 그밖의 비활성을 초래한다. 이러한 동족체, 및 이들을 엔코딩하는 유전자는 단백질의 반감기를 조절하므로써 단백질 발현을 변경하기 위해 사용될 수 있다. 상기와 같이, 이러한 단백질은 치료제 또는 치료법의 개발을 위해 사용될 수 있다.

유사한 방식에서, 단백질 동족체는 본 조합적 방법에 의해 발생되어 길항제로서 작용할 수 있으며, 이는 상응하는 야생형 단백질의 활성을 방해할 수 있다.

본 방법의 대표적인 구체예에서, 단백질 동족체의 개체군에 대한 아미노산 서열은 바람직하게는 가장 높은 상동성을 증진시키도록 배열된다. 이러한 변이의 개체군은 예를 들어, 하나 이상의 종으로부터의 동족체, 또는 동일한 종이지만 돌연변이로 인해 상이해진 종으로부터의 동족체를 포함할 수 있다. 정렬된 서열의 각 위치에서 나타나는 아미노산은 조합적 서열의 퇴화 세트를 생성시킬 수 있도록 선택된다. 특정 구체예에서, 조합 라이브러리는 폴리펩티드의 라이브러리를 엔코딩하는 유전자의 퇴화 라이브러리의 방식으로 제조되며, 각각은 잠재적 단백질 서열의 적어도 일부를 포함한다. 예를 들어, 합성 올리고누클레오티드의 혼합물은 유전자 서열에 효소적으로 라이게이션되어 잠재적 누클레오티드 서열의 퇴화 세트가 개개 폴리펩티드로서, 또는 대안적으로는 보다 큰 융합 단백질의 세트(예를 들어 파지 디스플레이)로서 발현될 수 있도록 한다.

잠재적인 동족체의 라이브러리를 퇴화 올리고누클레오티드 서열로부터 발생시킬 수 있는 많은 방법이 존재한다. 퇴화 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기에서 수행될 수 있으며, 합성 유전자는 이후 발현을 위해 적절한 벡터에 라이게이션될 수 있다. 유전자의 퇴화 세트의 한 목적은 한 혼합물에서 잠재적 단백질 서열의 요망되는 세트를 엔코딩하는 모든 서열을 제공하기 위한 것이다. 퇴화 올리고누클레오티드의 합성은 당업계에서 널리 공지되어 있다[예를 들어, Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura 등 (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp. 273-289; Itakura 등 (1984) *Annu Rev. Biochem.* 53:323; Itakura 등 (1984) *Science* 198:1056; Ike 등, (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477]. 이러한 기술은 지시된 다른 단백질의 진화에서 사용될 수 있다[예를 들어, Scott 등 (1990) *Science* 249:386-390; Roberts 등 (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin 등 (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla 등 (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; 미국특허번호 제5,223,409호, 제5,198,346호, 및 제5,096,815호].

대안적으로는, 돌연변이유발의 다른 형태는 조합 라이브러리를 발생시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 단백질 동족체(효능제 및 길항제 형태 모두)가 발생되고 예를 들어 알라닌 스크리닝 돌연변이유발(Ruf 등 (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang 등. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint 등 (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg 등 (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima 등 (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman 등 (1991) *Biochemistry* 30:10832-10833; and Cunningham 등, (1989) *Science* 244:1081-1085), 링커 스크리닝 돌연변이유발(Gustin 등 (1993) *Virology* 193:653-660; Brown 등 (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight 등 (1982) *Science* 232:316), 포화 돌연변이유발(Meyers 등 (1986) *Science* 232:613), PCR 돌연변이유발(Leung 등 (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19), 또는 랜덤 돌연변이유발(Miller 등 (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; and Greener 등 (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34) 등을 사용하여 스크리닝하므로써 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 구체적으로 조합적 셋팅에서의 링커 스캐닝 돌연변이유발은 생체활성인 단백질의 절단된 형태를 동정하기 위한 가장 바람직한 방법이다.

포인트 돌연변이 및 절단에 의해 제조된 조합적 라이브러리의 유전자 생성물을 스크리닝하고 특정 성질을 갖는 유전자 생성물의 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 광범위한 기술은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 기술은 일반적으로 단백질 동족체의 조합적 돌연변이유발에 의해 발생된 유전자 라이브러리의 빠른 스크리닝을 위해 변형될 수 있을 것이다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위해 가장 널리 사용되는 기술은 통상적으로 유전자 라이브러리를 교체가능한 발현 벡

터로 클로닝하는 기술, 적당한 세포를 얻어진 벡터의 라이브러리로 형질전환시키는 기술, 및 요망되는 활성의 검출이 생성물이 검출되는 유전자를 엔코딩하는 벡터의 상대적으로 용이한 분리를 촉진시키는 조건하에서, 조합적 유전자를 발현시키는 기술을 포함한다.

스크리닝 검정의 기술된 구체예에서, 후보 조합적 유전자 생성물은 세포의 표면 상에 나타나며, 조합적 유전자 생성물에 결합하는 특정 세포 또는 바이러스 입자의 능력은 "페닝 검정(panning assay)"으로 검출된다. 예를 들어, 유전자 라이브러리는 세균 세포의 표면막 단백질에 대한 유전자로 클로닝될 수 있으며 [Ladner 등, WO 88106630; Fuchs 등, (1991) Bio/Technology 9:1370-1371; 및 Goward 등, (1992) TIBS 18:136-140], 얻어진 융합 단백질을 페닝에 의해, 예를 들어 세포 표면 단백질, 예를 들어 FITC-기질에 결합하는 형광적으로 표지된 분자를 사용하여 검출하여 잠재적인 기능성 동족체를 계산한다. 세포는 시각적으로 검사될 수 있으며, 형광현미경하에서 분리되거나, 세포의 형태가 허가하는 경우에, 형광-활성 세포 분류기에 의해 분리될 수 있다. 이러한 방법은 본 발명의 폴리펩티드와 상호작용할 수 있는 기질 또는 다른 폴리펩티드를 동정하는데 사용될 수 있다.

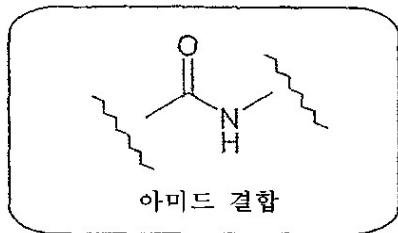
유사한 방식으로, 유전자 라이브러리는 바이러스 입자의 표면 상에 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 예를 들어, 사상 파지 시스템에서, 외부 펩티드 서열은 감염성 파지의 표면 상에 발현되어 두 가지의 이점을 제공할 수 있다. 첫째로, 이러한 파지가 매우 높은 농도에서 친화성 매트릭스에 적용될 수 있기 때문에, 많은 파지가 한번에 스크리닝될 수 있다. 두번째로, 각각의 감염성 파지가 이의 표면 상에 조합적 유전자 생성물을 나타내기 때문에, 특정 파지가 낮은 수율로 친화성 매트릭스로부터 회수되는 경우 파지는 감염의 다른 라운드(round)에 의해 증폭될 수 있다. 대체로 동일한 대장균(*E. coli*) 사상 파지 M13, fd, 및 f1의 군은 파지 디스플레이 라이브러리에서 거의 대부분 사용되며, 파지 gIII 또는 gVIII 코트 단백질 중 하나는 바이러스 입자의 최대 폐키징을 분열시킴 없이 융합 단백질을 발생시키는데 사용될 수 있다 [Ladner 등, PCT 특허 공개 WO 90/02909호; Garrard 등, PCT 특허공개 WO 92/09690호; Marks 등, (1992) J. Biol. Chem. 267:16007-16010; Griffiths 등, (1993) EMBO J. 12:725-734; Clackson 등, (1991) Nature 352:624-628; 및 Barbas 등, (1992) PNAS USA 89:4457-4461]. 다른 파지 코트 단백질이 적절한 경우 사용될 수 있다.

본원에 기술된 폴리펩티드는 환원되어 미메틱(mimetic), 예를 들어 펩티드 또는 비-펩티드 작용제를 발생시킬 수 있으며, 이는 다른 세포 파트너에 본래 단백질을 유사 결합시킬 수 있다. 상술된 바와 같은 이러한 돌연변이 발생 기술 및 티오레독신 시스템은 또한 구체적으로 다른 단백질과 함께 단백질-단백질 상호작용에 관여하는 단백질의 결정인자를 지도화하는데 유용하다. 설명을 위하여, 기질 단백질의 분자 인식에 수반되는 단백질의 중요한 잔기는 기질 단백질에 결합할 수 있는 펩티도미메틱(peptidomimetic)을 발생시키기 위해 결정되고 사용될 수 있다. 이후 펩티도미메틱은 기질에 결합되고 야생형 단백질과 상호작용하는데 필요한 중요한 잔기를 포함함으로써 야생형 단백질의 억제제로서 사용될 수 있고, 이에 따라 단백질과 기질의 상호작용을 방해할 수 있다. 예를 들어, 기질 폴리펩티드를 결합시키는데 포함되는 단백질의 아미노산 잔기를 지도화하기 위한 스캐닝 돌연변이유발을 적용시켜, 기질에 결합함에 있어서 이러한 잔기를 흡내내는 펩티도미메틱 화합물을 생성할 수 있다.

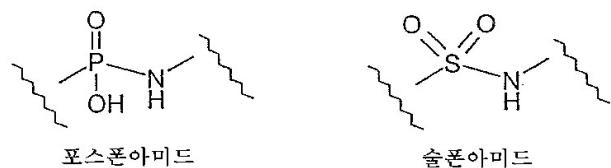
예를 들어, 본원에 기술된 Isd 단백질의 유도체는 화학적으로 변형된 펩티드 및 펩티도미메틱일 수 있다. 펩티도미메틱은 펩티드 및 단백질을 기초로 하거나 이로부터 유래된 화합물이다. 펩티도미메틱은 비천연의 아미노산, 형태 억제, 등배 대체 등을 사용하여 공지된 펩티드 서열의 구조적 변형에 의해 수득될 수 있다. 당해 펩티도미메틱은 펩티드와 비-펩티드 합성 구조 간의 구조적 공간의 연속체를 구성하며; 따라서 펩티도미메틱은 약물작용발색단을 나타내고, 모 펩티드의 활성을 갖는 비펩티드 화합물로 펩티드를 번역하기 위해 기여하는데 유용할 수 있다.

더욱이, 당해 펩티드의 미메토프(mimotope)가 제공될 수 있다. 이러한 펩티도미메틱은 가수분해 가능하지 않고(예를 들어, 프로테아제 또는 상응하는 펩티드를 퇴화시키는 다른 생리학적 조건에 대한 증가된 안정성), 세포 분화를 자극하기 위한 증가된 특이성 및/또는 효능으로서 이러한 특징을 갖을 수 있다. 설명할 목적으로, 이러한 잔기의 비가수분해성 펩티드 유사체는 벤조디아제핀 [Freidinger 등, in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988], 아제핀 [Huffman 등, in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988], 치환된 감마 락탐 고리 [Garvey 등, in Peptides.. Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988], 케토-메틸렌 슈도펩티드 [Ewenson 등, (1986) J. Med. Chem. 29:295; and Ewenson 등, in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985], β -턴(turn) 디펩티드 코어 [Nagai 등, (1985) Tetrahedron Lett 26:647; and Sato 등, (1986) J Chem Soc Perkin Trans 1:1231], 및 β -아미노알코올 [Gordon 등, (1985) Biochem Biophys Res Common 126:419; and Dann 등, (1986) Biochem Biophys Res Commun 134:71]을 사용하여 생성될 수 있다.

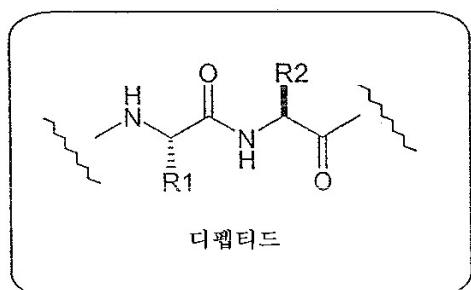
펩티도미메틱을 발생시키기 위해 수행될 수 있는 다양한 측쇄 교체 이외에, 본 기술은 상세하게는 펩티드 2차 구조의 형태 학적으로 억제된 모방체의 사용을 고려한다. 많은 대용품이 펩티드의 아미드 결합을 위해 개발되었다. 종종 개발되는 아미노 결합을 위한 대용품은 하기 (i) 트랜스-올레핀, (ii) 플루오로알켄, (iii) 메틸렌아미노, (iv) 포스폰아미드, 및 (v) 술폰아미드를 포함한다.



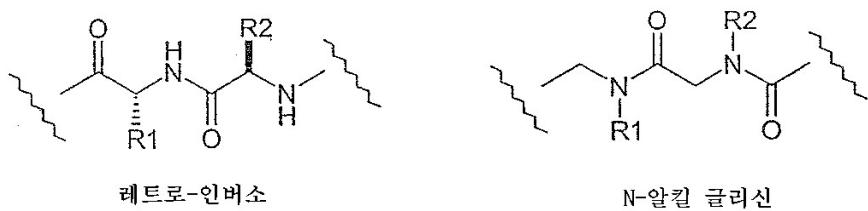
대용품의 예로는:



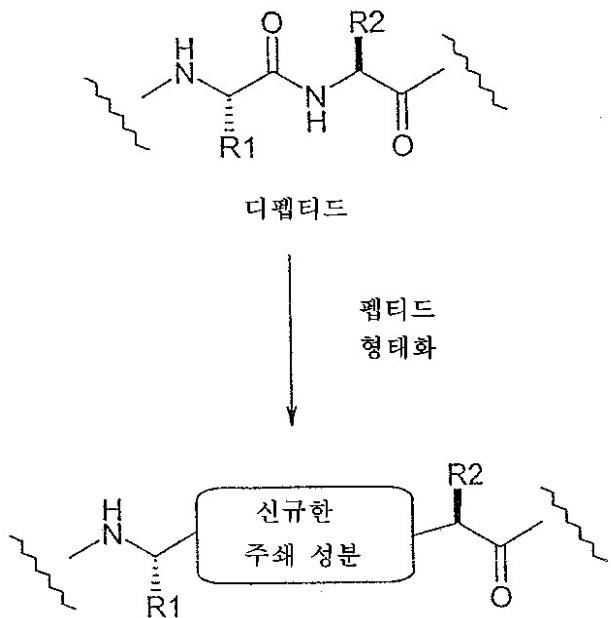
추가적으로, 펩티드 백본의 보다 실질적인 변형을 기초로 한 펩티도미메틱이 사용될 수 있다. 본 부류에 속하는 펩티도미메틱은 (i) 레트로-인버소(retro-inverso) 유사체, 및 (ii) N-알킬 글리신 유사체(소위 웹토이드)를 포함한다.



유사체의 예로는:



더욱이, 조합 화합의 방법은 신규한 펩티도미메틱을 개발하는데 적합하다. 예를 들어, 소위 "펩티드 형태화(peptide morphing)" 방법의 한 구체예는 광범위한 펩티드 결합 치환을 포함하는 펩티드 유사체의 라이브러리의 랜덤 발생에 초점을 맞춘다.



예시적인 구체예에서, 펩티도미메틱은 펩티드의 레트로-인버소 유사체로서 유래될 수 있다. 이러한 레트로-인버소 유사체는 문헌[Sisto 등. 미국특허번호 제4,522,752호]에 기술된 바와 같이, 당업계에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 레트로-인버소 유사체는 예를 들어, WO 00/01720호에 기술된 바와 같이 발생될 수 있다. 예를 들어, 일부 정상 펩티드 결합을 포함하는 혼합된 펩티드가 발생될 수 있음이 이해될 것이다. 일반적인 기술로서, 단백질분해에 가장 영향을 받기 쉬운 부위는 통상적으로 미메티 스위칭에 대해 선택적인 덜 영향을 받기 쉬운 아미드 결합으로 변경된다. 최종 생성물, 또는 이의 중간체는 HPLC로 정제될 수 있다.

펩티드는 하나 이상의 아미노산 또는 D 입체이성질체인 모든 아미노산을 포함할 수 있다. 다른 펩티드는 역전되는 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 역전되는 아미노산은 D 입체이성질체일 수 있다. 펩티드의 모든 아미노산은 역전될 수 있고/거나 모든 아미노산은 D 입체이성질체일 수 있다.

다른 기술되는 구체예에서, 펩티도미메틱은 펩티드의 레트로-에난티오 유사체로서 유래될 수 있다. 이와 같은 레트로-에난티오 유사체는 시판되는 D-아미노산(또는 이의 유사체) 및 예를 들어 WO 00/01720호에 기술된 표준 고체- 또는 용액-상 펩티드-합성 기술로 합성될 수 있다. 최종 생성물은 HPLC로 정제되어 순수한 레트로-에난티오 유사체를 수득할 수 있다.

또 다른 예시적 구체예에서, 트랜스-올레핀 유도체가 목적하는 펩티드를 위해서 제조될 수 있다. 트랜스-올레핀 유사체는 문헌[Y.K. Shue 등 (1987) Tetrahedron Letters 28:3225]의 방법 및 WO 00/01720호에 기재된 바와 같은 방법에 따라서 합성될 수 있다. 상기된 방법에 의해서 합성된 유사디펩티드를 다른 유사디펩티드에 결합시켜서 아미드 작용성 대신 몇 가지 올레핀 작용성을 지니는 펩티드 유사체를 제조하는 것도 추가로 가능하다.

펩티도미메틱 유도체의 또 다른 부류는 포스포네이트 유사체를 포함한다. 그러한 포스포네이트 유사체의 합성은 공지된 합성 도식으로부터 유도될 수 있다. 문헌예[Loots 등 in Peptides: Chemistry and Biology, (Escom Science Publishers, Leiden, 1988, p. 118); Petrillo 등 in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium, Pierce Chem Co. Rockland, IL, 1985)].

많은 그 밖의 펩티도미메틱 구조가 본 기술분야에 공지되어 있으며, 목적하는 펩티도미메틱에의 사용을 위해서 용이하게 조절될 수 있다. 예시하자면, 펩티도미메틱은 1-아자바이사이클로[4.3.0]노난 서로게이트[문헌: Kim 등 (1997) J. Org. Chem. 62:2847], 또는 N-아실 피페라진산[문헌: Xi 등 (1998) J. Am. Chem. Soc. 120:80], 또는 강제된(constrained) 아미노산 유사체로서 2-치환된 피페라진 잔기[문헌: Williams 등 (1996) J. Med. Chem. 39:1345-1348]를 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 특정의 아미노산 잔기가 아릴 및 바이-아릴 잔기, 예를 들어, 모노시클릭 또는 바이시클릭 방향족 또는 헤테로방향족 핵, 또는 바이-방향족, 방향족-헤테로방향족, 또는 바이헤테로방향족 핵으로 치환될 수 있다.

목적 펩티도미메틱은 고출력 스크리닝과 결부된 조합적 합성기술에 의해서 최적화될 수 있다.

또한, 미메토프의 그 밖의 예는, 이로 한정되는 것은 아니지만, 단백질 기재 화합물, 탄수화물 기재 화합물, 지질-기재 화합물, 핵산-기재 화합물, 천연 유기 화합물, 합성 유기 화합물, 항-이디오타입 항체 및/또는 촉매 항체, 또는 이의 단편을 포함한다. 미메토프는, 예를 들어, 세포 생존 및/또는 종양 성장을 억제할 수 있는 화합물에 대한 천연 및 합성 화합물의 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻을 수 있다. 미메토프는 또한, 예를 들어, 천연 및 합성 화합물의 라이브러리, 특히 화학적 또는 조합성 라이브러리(즉, 동일한 빌딩 블록을 지니지만 서열 또는 크기에서 상이한 화합물의 라이브러리)로부터 얻을 수 있다. 미메토프는 또한, 예를 들어, 합리적인 약물 디자인에 의해서 얻을 수 있다. 합리적인 약물 디자인 과정에서, 본 발명의 화합물의 3-차원 구조는, 예를 들어, 핵 자기 공명(NMR) 또는 x-레이 크리스탈로그라피(x-ray crystallography)에 의해서 분석될 수 있다. 3-차원 구조는, 예를 들어, 컴퓨터 모델링에 의한 효능적 미메토프의 구조를 예측하는데 이용될 수 있다. 예측된 미메토프 구조는, 예를 들어, 화학적 합성, 재조합 DNA 기술에 의해서 생산되거나, 천연 공급원(예, 식물, 동물, 및 균사체)으로부터 미메토프를 분리함으로써 얻을 수 있다.

"펩티드, 이의 변이체 및 유사체" 또는 "펩티드 및 이의 유사체"는 "펩티드 치료제"에 포함되며, 본원에 기재된 어떠한 펩티드 또는 이의 변형된 형태, 예컨대 펩티도미메틱을 포함하는 것으로 의도된다. 바람직한 펩티드 치료제는, 예를 들어, 본원에서 기재된 검정에서 측정되는 바와 같이 약 2배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 30배 이상 또는 100배 이상으로 세포 생존을 저하시키거나 아폽토시스(apoptosis)를 증가시킨다.

Isd 단백질, 이의 단편 또는 변이체의 활성은 이하 기재된 바와 같이 적절한 기질 또는 결합 파트너, 또는 의심되는 활성을 시험하기에 적합한 그 밖의 시약을 사용함으로써 검정될 수 있다.

또 다른 구체예에서, 폴리펩티드의 활성은 RNA 및/또는 단백질 분자의 발현 수준을 검정함으로써 측정될 수 있다. 전사수준은, 예를 들어, 노던 블롯(Northern blots), 올리고누클레오티드 어레이에 대한 하이브리드화를 이용하거나, 생성되는 단백질 생성물의 수준을 검정함으로써 측정될 수 있다. 번역수준은, 예를 들어, 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 이용하거나, 단백질 생성물에 의해서 생성된 검출 가능한 신호(예, 형광, 발광, 효소 활성 등)를 동정함으로써 측정될 수 있다. 특정의 상황에 따라서, 단일 유전자 또는 다중 유전자의 전사 및/또는 번역의 수준을 검사하는 것이 바람직할 수 있다.

대안적으로는, 세포에서의 전체 DNA 복제율, 전사율 및/또는 번역율을 측정하는 것이 바람직 할 수 있다. 일반적으로, 이러한 측정은 생성되는 DNA, RNA, 또는 단백질 생성물내로 혼입되는 검출 가능한 대사물의 존재하에 세포를 성장시킴으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, DNA 합성율은 새롭게 합성된 DNA내로 혼입되는 BrdU의 존재하에 세포를 성장시킴으로써 측정될 수 있다. BrdU의 양은 항-BrdU 항체를 사용함으로써 조직화학적으로 측정될 수 있다.

또 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 미세역가 플레이트, 슬라이드, 비드, 필름 등을 포함하는 고형 표면상에 고정될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 어레이의 일부로서 "칩(chip)"상에 고정될 수 있다. 다수의 어드레스를 지니는 어레이는 하나 이상의 어드레스에 하나 이상의 본 발명의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 칩은 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드를 폴리펩티드 서열의 어레이의 일부로서 포함한다.

또 다른 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 플레이트, 미세역가 플레이트, 슬라이드, 비드, 입자, 구체, 필름, 스트랜드(strand), 침전물, 젤, 시트,튜빙(tubing), 컨테이너, 모세관, 패드, 슬라이스 등을 포함한 고체 표면상에 고정될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 어레이의 일부로서 "칩"상에 고정될 수 있다. 다수의 어드레스를 지니는 어레이는 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드를 하나 이상의 어드레스에 포함한다. 한 구체예에서, 칩은 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드를 어레이의 일부로서 포함한다.

5. Isd 백신

IsdA, IsdB 및 IsdC 폴리펩티드는 스태필로코쿠스 아우레우스에 의해 발현되는 세포 표면 단백질로, 생체내에서의 완전한 독성에 필수적이다(신장 간염의 마우스 모델을 이용하여 나타냄). 추가로, IsdA는 회복기 인간 혈청에서 검출되는 항-IsdA 항체와 같이 면역우세적이다. 따라서, IsdA, IsdB 및/또는 IsdC 폴리펩티드는 스태필로코쿠스 아우레우스 감염을 치료하기 위한 백신 요법으로 사용될 수 있다.

IsdA, IsdB 및/또는 IsdC 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드는 백신으로 제형화될 수 있고, 피검체에 투여되어 피검체에서 IsdA, IsdB 및/또는 IsdC에 대한 면역 반응(예를 들어, 세포성 또는 체액성)을 유도할 수 있다.

백신 내에 포함시키기 위한 예시적 IsdA 단백질은 전장의 IsdA 폴리펩티드 또는 IsdA 웨პ티드이다. 특정 구체예에서, 재조합 IsdA 단백질이 백신에 사용될 것이다. 대안적 구체예에서, 백신으로 사용되는 IsdB 또는 IsdC 단백질은 전장의 IsdB 또는 IsdC, IsdB 또는 IsdC의 웨პ티드 단편, 또는 재조합 IsdB 또는 IsdC 단백질일 수 있다.

항원성이고 백신으로 사용되는 Isd 단백질은 다양한 방법을 이용하여 확인될 수 있다. 한 방법에서, 항원성 서열을 함유하는 웹티드는 일반적으로 수용되는 기준의 잠재적 항원성 및/또는 노출을 기초로 하여 선택될 수 있다. 이러한 기준은 친수성 및 단백질의 표면 노출 분석에 의해 결정되는 상대 항원성 지수를 포함한다. 적절한 기준의 결정은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Hopp et al., Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 3824-8; Kyte et al., J Mol Biol 1982; 157: 105-32; Emini, J Virol 1985; 55: 836-9; Jameson et al., CA BIOS 1988; 4: 181-6; and Karplus et al., Naturwissenschaften 1985; 72: 212-3]에 기술되어 있다. 표면 노출되는 상기 기준에 의해 예측된 아미노산 도메인은 우선적으로 보다 소수성인 것으로 예측되는 도메인에 걸쳐 선택될 수 있다.

항원성인 것으로 결정된 IsdA, IsdB 및/또는 IsdC의 부분은 개별적 아미노산으로부터 당 분야에 공지된 방법에 의해 화학적으로 합성될 수 있다. 단백질 단편을 합성하기 위한 적절한 방법은 문헌 [Stuart and Young in "Solid Phase Peptide Synthesis," Second Edition, Pierce Chemical Company (1984)]에 기술되어 있다.

대안적으로, IsdA, IsdB 또는 IsdC의 항원성 선형 에피토프(들)은 상응하는 Isd 항체를 이용한 미메토프 검정에 의해 확인될 수 있다. 간단히, 미메토프 검정에서, 폴리펩티드는 중첩되는 단편으로 세분될 것이다. 예를 들어, 중첩하는 15개의 아미노산 웹티드는 전장의 폴리펩티드의 전체 길이를 포함하도록 합성될 것이다. 각각의 15개의 아미노산 웹티드는 3개의 아미노산에 의해 중첩될 것이다. 대안적으로, 15개의 아미노산 웹티드 단편은 전체 아미노산 서열을 포함하기 위해 탄뎀(tandem)으로 고안될 것이다. 이후, 각각의 웹티드는 비오티닐화되고, 96-웰 플레이트 내의 스트렙타비딘 코팅된 웰에 결합할 수 있다. 다양한 혈청의 반응성이 효소면역측정법 (ELISA)에 의해 검출될 수 있다. 비특이적 결합을 블로킹시킨 후, 항-Isd 항체가 각각에 웰에 첨가된 후, 페옥시다아제가 컨쥬게이션된 제 2 항체 및 페옥시다아제 기질이 연속적으로 첨가될 수 있다. 항-Isd 항체는 친화성 정제된 항-전장-재조합 IsdA 또는 친화성 정제된 항-IsdA 웹티드일 수 있다. 대안적으로, 항-Isd 항체는 IsdB 또는 IsdC에 대한 것일 수 있다. 각각의 웰의 광학 밀도는 450 nm에서 판독될 수 있고, 이중 또는 삼중 웰로 평균을 구할 수 있다. 대조 혈청 (즉, 면역전 항체)을 이용한 유사한 ELISA로부터 수득된 평균 값은 시험 면역글로불린 값으로부터 감해질 수 있고, 생성된 값은 어떠한 선형 에피토프가 면역글로불린(들)에 의해 인지되는지 결정하기 위해 작도될 수 있다.

추가로, 선형 에피토프를 나타내는 합성 펩티드를 이용한 경쟁적 결합 분석이 항원 단편을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 항원성 단편은 표지된 철의 흡수를 억제할 수 있다.

IsdA, IsdB 및/또는 IsdC 웨프티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 포함하는 DNA 백신이 또한 본원에 제공된다. 예시적 DNA 백신이 두개 이상의 IsdA 웨프티드를 엔코딩한다. 대안적 DNA 백신은 두개 이상의 IsdB 또는 IsdC 웨프티드 또는 두개 이상의 IsdA, IsdB 또는 IsdC 웨프티드의 임의의 조합물을 엔코딩 할 수 있다. 후보 백신 (웨프티드 또는 DNA)의 효능이 적절한 동물 모델, 예를들어 래트, 마우스, 기니아 피그, 원숭이 및 비비에서 시험될 수 있다. 백신의 보호적 또는 긍정적 효과는 시험 동물에서 감소된 번식력으로 반영된다.

IsdA, IsdB 또는 IsdC 면역원을 엔코딩하는 핵산이 유전체 DNA, cDNA, RNA (예를 들어, RT-PCR에 의해), 또는 클로닝된 서열로부터의 유전자 단편의 증폭인 중합효소 연쇄반응 (PCR)에 의해 수득될 수 있다. 유전자 또는 cDNA의 공지된 서열에 기초하여 PCR 프라이머가 선택되며, 이들은 비교적 독특한 단편의 증폭을 발생시킨다. 요망되는 특이성 및 최적 증폭 목적으로 프라이머를 고안하기 위해 컴퓨터 프로그램이 사용될 수 있다. 참조: 올리고 버전 (Oligo version) 5.0 (National Biosciences). 증폭을 위한 프라이머를 고안하고 선택하는데 적용되는 인자는 예를 들어 문헌 [Rylchik, W. (1993) "Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction." In Methods in Molecular Biology, vol. 15, White B. ed., Humana Press, Totowa, NJ]에 기술되어 있다. 서열은 유전자은행 (GenBank) 또는 기타 공공원으로부터 수득될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 핵산은 또한 예를 들어 자동화된 DNA 합성기 (예를 들어, 합성기는 바이오서치 (Biosearch) 사, 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems)사에서 시판됨)의 사용과 같은 당 업계에 공지된 표준 방법에 의해 합성될 수 있다. 숙주 또는 세포에서 Isd 폴리펩티드를 발현시키기 위한 적절한 클로닝 벡터가 상기 기술된 표준 기술에 따라 작제될 수 있다.

대안적으로, Isd 면역원은 무손상 Isd 폴리펩티드의 효소적 분열로부터 제조될 수 있다. 단백질 분해 효소의 예는 트립신, 키모트립신, 펩신, 파파인, V8 프로테아제, 셉틸리신, 플라스민 및 트롬빈을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 무손상 폴

리펩티드는 하나 이상의 단백질 분해효소와 동시에 또는 순차적으로 인큐베이션될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 무손상 Isd 폴리펩티드는 이황화 환원제로 처리될 수 있다. 이후, 웨프티드는 젤 여과 크로마토그래피, 젤 전기영동, 및 역상 HPLC를 포함하나 이에 제한되지 않는 당 분야에 공지된 기술에 의해 서로로부터 분리될 수 있다.

6. Isd 항체 및 이의 용도

IsdA, IsdB 및/또는 IsdC에 대한 항체를 생성시키기 위해서, 숙주 동물에게 전장의 Isd 폴리펩티드 또는 Isd 웨프티드를 주사할 수 있다. 숙주에게는 목적하는 표적 서열을 내포하는 상이한 길이의 웨프티드가 주사될 수 있다. 예를 들어, 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 또는 150개 아미노산인 웨프티드 항원이 사용될 수 있다. 대안적으로는, 단백질의 일부가 에피토프를 규정하지만 항원성이기에 너무 짧은 경우, 이러한 단백질의 일부는 항체를 생성하도록 담체 분자에 컨주게이션될 수 있다. 일부 적합한 담체 분자는 키홀 림펫 해모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), Ig 서열, TrpE, 및 인간 또는 우혈청 알부민을 포함한다. 컨주게이션은 본 기술분야에 공지된 방법으로 수행될 수 있다. 그러한 방법은 단편의 시스테인 잔기를 담체 분자상의 시스테인 잔기와 조합해야 한다.

또한, 3차원 에피토프, 즉, 비선형 에피토프에 대한 항체가 또한 단백질의 결정학적 데이터를 근거로 하여 제조될 수 있다. 그러한 에피토프의 주사에 의해서 얻은 항체는 IsdA, IsdB 및 IsdC의 단쇄 항원에 대해서 선별될 수 있다. Isd 웨프티드에 대해서 제조된 항체는 전장 Isd 단백질 뿐만 아니라 그 웨프티드에 대한 활성에 대해서 시험될 수 있다. 항체는 Isd 웨프티드 및/또는 전장 Isd 단백질에 대해서 적어도 약 $10^{-6}M$, $10^{-7}M$, $10^{-8}M$, $10^{-9}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$ 또는 $10^{-12}M$ 이상의 친화성을 지닐 수 있다.

DNA 서열에 적합한 세포 및 항체 발현 및 분비를 위한 숙주 세포는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection)("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas" 5th edition (1985) Rockville, Md., U.S.A.)을 포함한 다양한 공급원으로부터 얻을 수 있다.

폴리클로날 및 모노클로날 항체가 본 기술분야에 공지된 방법에 의해서 생성될 수 있다. 모노클로날 항체는 문헌[Kohler and Milstein, Nature 1975; 256: 495-7; and Campbell in "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" in Burdon 등, Eds. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985)]에 기재된 면역학적 방법을 포함한 공지된 과정을 사용함으로써 제조되는 하이브리도마에 의해서 생산될 수 있을 뿐만 아니라; 문헌[Huse 등, Science (1989) 246: 1275-81]에 기재된 재조합 DNA 방법에 의해서 생산될 수 있다.

항체 정제방법은 본 기술분야에 공지되어 있다. 참조예[Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.]. 정제 방법은 염 침전법(예를 들어, 황산암모늄과 함께), 이온 교환 크로마토그래피(예를 들어, 중성 pH에서 작동되며 이온 강도를 증가시키는 단계 구배로 용리시키는 양이온 또는 음이온 교환 컬럼상에서), 젤 여과 크로마토그래피(젤 여과 HPLC를 포함), 및 친화성 수지, 예컨대, 단백질 A, 단백질 G, 수산화인회석 및 항-항체상의 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 항체는 또한 본 기술분야에 공지된 방법에 따라서 친화성 컬럼상에서 정제될 수 있다.

그 밖의 구체예는 기능적 등가의 항체를 포함하며, 예를 들어, 키메라화된, 인간화된, 및 단쇄 항체, 및 이의 단편을 포함한다. 기능적 등가물을 생성시키는 방법은 PCT 출원 WO 93/21319호; 유럽특허출원 제239,400호; PCT 출원 WO 89/09622호; 유럽특허출원 제388,745호; 및 유럽특허출원 EP 332,424호에 기재되어 있다.

기능적 등가물은 본 발명의 항체의 가변 또는 과변 영역의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 지닌 폴리펩티드를 포함한다. "실질적으로 동일한" 아미노산 서열은 문헌[Pearson and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85: 2444-8]에 따른 FASTA 조사 방법에 의해서 측정되는 경우 다른 아미노산 서열에 대해서 70% 이상, 바람직하게는 약 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 지니는 서열로서 정의된다.

키메라화된 항체는 인간 항체 불변 영역으로부터 실질적으로 또는 전적으로 유도된 불변 영역 및 인간이 아닌 포유동물로부터의 가변 영역의 서열로부터 실질적으로 또는 전적으로 유도된 가변 영역을 지닐 수 있다. 인간화된 항체는 상응하는 인간 항체 영역으로부터 실질적으로 또는 전적으로 유도된 보체 결정 영역(CDR) 및 인간이 아닌 포유동물로부터 실질적으로 또는 전적으로 유도된 CDR이 아닌 불변 영역 및 가변 영역을 지닐 수 있다.

인간이 아닌 적합한 포유동물에는 모노클로날 항체가 생성될 수 있는 어떠한 포유동물도 포함될 수 있다. 인간이 아닌 포유동물의 적합한 예에는, 예를 들어, 토끼, 래트, 마우스, 말, 염소, 또는 영장류가 포함될 수 있다.

항감염제로 사용되는 IsdA, IsdB 또는 IsdC에 대한 항체가 상기 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 기타 구체예에서, 기능성 Isd 단편을 인지하는 항체가 또한 무작위 웨이브 패턴과 전시 기술(Eidne et al., Biol Reprod. 63(5): 1396-402 (2000))에서 사용될 수 있다. 간단히, 15합체 또는 20합체의 무작위 웨이브 패턴과 전시 라이브러리가 Isd 항체의 Fab 단편의 경쟁적 대체에 의해 기능성 Isd 웨이브 패턴과 상호작용할 수 있는 웨이브 패턴을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 이를 위해, 고정된 스태필로코쿠스 아우레우스 세포가 다중웰 플레이트 내의 웰에 부착되고, IsdA, IsdB 또는 IsdC에 대한 면역염색이 이후 패지 전시에 의해 발현된 독특하고 무작위한 웨이브 패턴의 존재 및 부재하에서 평가될 수 있다. 일단, 경쟁적 웨이브 패턴이 아미노산 서열 분석에 의해 확인되면, 증가된 양의 웨이브 패턴이 합성될 수 있고, 기능성 단편에 대해 특이적인 항체에 대한 대안적 분자 길항제로 사용될 수 있다. 또 다른 대안은 Fab 단편을 기능성 IsdA, IsdB 또는 IsdC 단편으로 경쟁적으로 대체하는 능력에 대한 소분자 라이브러리를 스크리닝하는 것이다. 이러한 방식으로 확인된 분자 길항제가 Isd 폴리웨이브 또는 폴리누클레오티드 백신에 대한 면역 반응에 의해 생성된 항체의 효과를 중화시키기 위해 사용될 수 있다.

한 추가 구체예에서, IsdA, IsdB 또는 IsdC에 대한 항체 (전체 항체 또는 항체 단편)가 항체의 반감기를 증가시키기 위해 당업자에게 널리 공지된 방법에 따른 생체적합 물질, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 분자 (PEG)에 컨주게이션될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 6,468,532호를 참조하라. 예를 들어, 넥타르 테라퓨틱스사 (Nektar Therapeutics)로부터의 기능적 PEG 중합체가 이용가능하다. 시판되는 PEG 유도체는 아미노-PEG, PEG 아미노산 에스테르, PEG-히드라지드, PEG-티울, PEG-숙시네이트, 카르복시메틸화된 PEG, PEG-프로파온산, PEG 아미노산, PEG 숙신이미딜 숙시네이트, PEG 숙신이미딜 프로파온네이트, 카르복시메틸화된 PEG의 숙신이미딜 에스테르, PEG의 숙신이미딜 카르보네이트, 아미노산 PEG의 숙신이미딜 에스테르, PEG-옥시카르보닐이미다졸, PEG-니트로페닐 카르보네이트, PEG 트레실레이트, PEG-글리시딜 에테르, PEG-알데히드, PEG 비닐술폰, PEG-말레이미드, PEG-오르토페리딜-디술피드, 이종기능성 PEG, PEG 비닐 유도체, PEG 실란 및 PEG 포스포리드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 PEG 유도체를 커플링시키기 위한 반응 조건은 폴리웨이브, 요망되는 정도의 폐길화 (PEGylation), 및 사용되는 PEG 유도체에 따라 다양할 것이다. PEG 유도체화의 선택과 관련된 몇몇 인자는 요망되는 결합점 (예를 들어, 리신 또는 시스테인 R-기), 유도체의 가수분해 안정성 및 반응성, 안정성, 결합의 독성 및 항원성, 분석 적합성 등을 포함한다.

7. 약제 조성물

제조된 IsdA, IsdB 또는 IsdC 폴리웨이브 및 핵산이 제형화되어, 경구, 피내, 근내, 복막내, 정맥내, 피하, 비내, 질내 및 난절법 (즉, 예를 들어 두갈래진 바늘을 이용하는 피부의 상층을 통한 스크래칭) 또는 임의의 기타 면역화 표준 경로를 통해 도입될 수 있다. Isd 폴리웨이브는 추가로 장에서 용해되어 파이어판 (Peyer's patch) 내의 항원 제시 세포에 의해 흡수되는 장용성 코팅 캡슐에 의해 백신으로서 경구 전달될 수 있다. Isd 폴리웨이브의 경구 전달은 Isd 폴리웨이브의 주사에 의해 보충될 수 있다.

추가로, 본원에 기술된 스태필로코쿠스 아우레우스 항-Isd 항체, *isd* 앤티센스 핵산 및 siRNA가 당 분야에 널리 공지된 바와 같이 이들의 사용 용도에 따라 다양한 수단으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 스태필로코쿠스 아우레우스 길항제 조성물이 경구 투여되는 경우, 이들은 정제, 캡슐, 과립, 분말 또는 시럽으로 제형화될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 제형은 주사 (정맥내, 근내 또는 피하), 점적 주입 제조물 또는 쥐약으로 비경구적으로 투여될 수 있다. 안구 점막 경로에 의한 적용을 위해, 본 발명의 조성물은 점안제 또는 안구 연고로 제형화될 수 있다. 이러한 제형은 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있고, 요망시, 조성물은 임의의 통상적인 첨가제, 예를 들어 부형제, 결합제, 봉해제, 윤활제, 교정제, 용해제, 혼탁 보조제, 어멀젼화제 또는 코팅제와 함께 혼합될 수 있다.

본 발명의 제형에서, 습윤제, 유화제 및 윤활제, 예컨대 나트륨 라우릴 설페이트 및 스테아린산마그네슘 뿐만 아니라, 착색제, 방출제, 코팅제, 감미제, 향미제, 및 방향제, 보존제, 및 항산화제가 제형화된 제제에 존재할 수 있다.

본 조성물은 경구, 비내, 국소(구강 및 설하를 포함), 직장내, 질내, 에어로졸 및/또는 비경구 투여에 적합할 수 있다. 제형은 통상적으로 단위 용량형으로 존재하며, 제약 분야에서 공지된 어떠한 방법으로 제조될 수 있다. 담체 물질과 조합되어 단일 용량을 생성시킬 수 있는 조성물의 양은 처리되는 대상 및 특정의 투여 방식에 따라 좌우될 수 있다.

이들 제형을 제조하는 방법은 본 발명의 조성물을 담체 및 임의로 하나 이상의 보조 성분과 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로 제형은 제제를 액체 담체 또는 미분된 고형 담체, 또는 이들 둘 모두와 균일하고 치밀하게 회합시키고, 필요한 경우, 생성물을 성형시킴으로써 제조된다.

경구 투여에 적합한 제형은 캡슐, 카세(cachet), 환제, 정제, 로젠파(향미제, 일반적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트를 사용함), 분제, 과립의 형태일 수 있거나, 수성 또는 비수성 액체 중의 용액 또는 혼탁액으로서, 또는 수중유 또는 유중수 액체에 멀션으로서, 또는 엘릭시르 또는 시럽으로서, 또는 파스텔(pastille)(불활성 염기, 예컨대, 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아를 사용함)로서 존재할 수 있으며, 각각은 활성 성분으로서 소정량의 목적 조성물을 함유한다. 본 발명의 조성물은 또한 거환약(bolus), 연질약(electuary), 또는 페이스트로서 투여될 수 있다.

경구 투여(캡슐, 정제, 환제, 드라제(dragee), 분제 및 과립 등)를 위한 고형 용량형에서, 목적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 예컨대, 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘, 및/또는 하기 성분중 어느 성분과 혼합된다: (1) 충전제 또는 중량제, 예컨대, 전분, 락토오스, 수크로오스, 글루코스, 만니톨, 및/또는 규산; (2) 결합제, 예컨대, 카르복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로오스 및/또는 아카시아; (3) 습윤제, 예컨대, 글리세롤; (4) 봉해제, 예컨대, 한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알진산, 특정의 규산염 및 탄산나트륨; (5) 용해 저지제, 예컨대, 파라핀; (6) 흡수 촉진제, 예컨대, 4차 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 예컨대, 아세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡착제, 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대, 탈크, 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 고형 폴리에틸렌글리콜, 나트륨 라우릴 세레이트, 및 이의 혼합물; 및 (10) 착색제. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 형태의 고형 조성물은 락토오스 또는 유당, 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용함으로써 충전제로서 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐에 사용될 수 있다.

정제는 임의로 하나 이상의 보조 성분과 함께 타정 또는 몰딩함으로써 제조될 수 있다. 타정된 정제는 결합제(예를 들어, 젤라틴 또는 히드록시프로필메틸셀룰로오스), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 봉해제(예를 들어, 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 가교된 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스), 표면활성제 또는 분산제를 사용함으로써 제조될 수 있다. 성형된 정제는 적합한 기계에서 불활성 액체 희석제로 습화된 목적 조성물의 혼합물을 성형함으로써 제조될 수 있다. 정제 및 그 밖의 고형 용량형, 예컨대, 드라제, 캡슐, 환제 및 과립은 임의적으로는 코팅 및 쉘(shell), 예컨대, 약제학적 제형분야에서 공지된 장용피 및 그 밖의 코팅으로 스코어링되거나 제조될 수 있다.

경구 투여에 적합한 액체 용량형은 약제학적으로 허용되는 멀션, 마이크로멀션, 용액, 혼탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 목적 조성물에 추가로, 액체 용량형은 본 기술 분야에 일반적으로 사용되는 불활성 희석제, 예컨대, 물 또는 그 밖의 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 면화씨 오일, 땅콩유, 옥수수 오일, 검, 올리브, 카스터 오일 및 참기름), 글리세롤, 테트라히드로푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

현탁제는 목적 조성물에 추가로 현탁제, 예컨대, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 및 소르비탄 에스테르, 미결정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천 및 트라가칸트 및 이의 혼합물을 함유할 수 있다.

직장내 또는 질내 투여를 위한 제형은 목적 조성물을 예를 들어, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실산염을 포함하는 하나 이상의 적합한 자극성 부형제 또는 담체와 혼합함으로써 제조될 수 있으며, 실온에서는 고형물이지만, 체온에서는 액체이어서 체강에서 용융되어 활성제를 방출시키는 좌제로서 존재할 수 있다. 질내 투여에 적합한 제형은 또한 본 기술분야에 적절한 것으로 공지되어 있는 담체를 함유하는 폐서리(pessary), 탬폰(tampon), 크림, 젤, 페이스트, 포움 또는 스프레이 제형을 포함한다.

목적 조성물의 경피 투여를 위한 용량형은 분제, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 폐치, 및 흡입제를 포함한다. 활성 성분은 무균 조건하에서 약제학적으로 허용되는 담체, 및 어떠한 보존제, 완충제, 또는 요구될 수 있는 추진제와 혼합될 수 있다.

연고, 페이스트, 크림 및 젤은, 목적 조성물에 추가로, 부형제, 예컨대, 동물 및 식물 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 이의 혼합물을 함유할 수 있다.

분제 및 스프레이에는, 목적 조성물에 추가로, 부형제, 예컨대, 락토오스, 탈크, 규산, 수산화알루미늄, 규산칼슘 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이에는 추가로 통상의 추진제, 예컨대, 클로로플루오로히드로카본 및 휘발성 비치환된 탄화수소, 예컨대, 부탄 및 프로판을 함유할 수 있다.

본 발명의 조성물은 대안적으로 에어로졸에 의해서 투여될 수 있다. 이러한 에어로졸은 화합물을 함유하는 수성 에어로졸, 리포좀 제제 또는 고형 입자를 제조함으로써 수행될 수 있다. 비수성(예, 플루오로카본 추진제) 혼탁액이 사용될 수 있다. 음파 분무기가 사용될 수 있는데, 그 이유는 이러한 음파 분무기는 목적 조성물에 함유된 화합물을 분해시킬 수 있는 전단력에 제제를 최소로 노출시키기 때문이다.

일반적으로, 수성 에어로졸은 통상의 약제학적으로 허용되는 담체 및 안정화제와 함께 목적 조성물의 수성 용액 또는 혼탁액을 제형함으로써 제조된다. 담체 및 안정화제는 특정의 목적 조성물의 요건에 좌우되지만 전형적으로는 비이온성 계면활성제(트윈(Tween), 플루로닉(Pluronic), 또는 폴리에틸렌 글리콜), 혈청 알부민과 같은 무독성 단백질, 소르비탄 에스테르, 올레산, 레시틴, 아미노산, 예컨대, 글리신, 완충제, 염, 당, 또는 당 알코올을 포함한다. 에어로졸은 일반적으로 등장성 용액으로부터 제조된다.

또한, Isd 기재 백신은 주사(정맥내, 근내 또는 피하)로서 비경구 투여될 수 있다. 본 발명의 백신 조성물은 임의로 하나 이상의 애쥬번트를 함유할 수 있다. 수산화 알루미늄, 인산 알루미늄, 식물 및 동물 오일 등과 같은 임의의 적절한 애쥬번트가 사용되는 특정 애쥬번트의 특성에 따른 애쥬번트 양으로 사용될 수 있다. 또한, 항-감염 백신 조성물이 또한 하나 이상의 안정화제, 예를 들어 탄수화물, 예를 들어 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로오스, 렉스트린 및 글루코오스 뿐만 아니라 단백질, 예를 들어 알부민 또는 카세인, 완충제, 예를 들어 알칼리 금속 포스페이트 등을 함유할 수 있다. 바람직한 애쥬번트는 시너백스(SynerVaxTM) 애쥬번트를 포함한다.

비경구 투여에 적합한 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 무균의 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 혼탁액 또는 에멀션, 또는 사용 직전에 무균의 주사 가능한 용액 또는 분산액으로서 항산화제, 완충제, 항생제, 의도된 수용자의 혈액과 등장성인 제형이 되게 하는 용질, 혼탁제 또는 증점제를 포함할 수 있는 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 무균의 문제와 함께 목적 조성물을 포함한다.

본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예에는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대, 올리브 오일, 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트가 포함된다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅 물질, 예컨대, 레시틴의 사용에 의해서, 분산액의 경우 요구된 입자 크기를 유지시킴으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

추가로, 본 발명의 Isd 면역원 또는 Isd 항체는 리포솜에 캡슐화될 수 있고, 주사를 통해 투여될 수 있다. 시판되는 리포솜 전달 시스템은 노바백스, 인크 (Novavax, Inc., Rockville, Md.)로부터 노바솜 (NovasomesTM)의 명칭으로 시판된다. 이들 리포솜은 면역원 또는 항체 전달에 대해 특이적으로 제형화된다. 본 발명의 구체예에서, 상기 비-인지질에 양성으로 하전된 리포솜의 표면에 결합된 Isd 웨პ티드 또는 항체 분자를 함유하는 노바솜 (NovasomesTM)이 사용될 수 있다.

본원에 기재된 약제학적 조성물은, 이로 한정되는 것은 아니지만, 종기증(furunculosis), 만성 종기증, 고름딱지증, 급성 골수염, 폐렴, 심장내막염, 화상피부증후군, 독소 충격증후군, 및 식중독을 포함한 스태필로코쿠스 아우레우스 감염증으로부터 유발되는 병태 또는 질환을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

8. Isd 억제제에 대한 예시적 스크리닝 검정

일반적으로, 철에 의해 조절되는 표면 결정인자 (Isd)를 간접시킴으로써 병원성 발병력을 감소시킬 수 있는 제제 또는 화합물은 천연 생성물 또는 합성(또는 반-합성) 추출물 둘 모두의 큰 라이브러리 또는 화학적 라이브러리로부터 확인될 수 있다. 약물 발견 및 개발 분야의 전문가라면 작용제(예, 시험 추출물 또는 화합물)의 정밀한 공급원이 본 발명의 스크리닝 과정(들)에 중요하지 않다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 따라서, 실질적으로, 어떠한 수의 화학적 추출물 또는 화합물이 본원에 기재된 방법을 이용함으로써 스크리닝될 수 있다. 그러한 작용제, 추출물 또는 화합물의 예는, 이로 한정되는 것은 아니지만, 식물-, 균사체-, 원핵- 또는 동물-기재 추출물, 발효 육즙, 및 합성 화합물, 및 기준 화합물의 변형물을 포함한다. 다양한 방법이 또한, 이로 한정되는 것은 아니지만, 사카라이드-, 지질-, 웨პ티드-, 및 핵산-기재 화합물을 포함하는 어떠한 수의 화학적 화합물의 랜덤 또는 직접적인 합성(예, 반-합성 또는 전체 합성)을 유도하는데 이용될 수 있다. 합성 화합물 라이브러리는 브랜든 어소시에이트(Brandon Associates: Merrimack, NH) 및 알드리치 케미칼(Aldrich Chemical: Milwaukee, Wis.)로부터 구입할 수 있다. 또한, 세균, 균류, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리는 바이오틱스(Biotics: Sussex, UK), 제노바(Xenova: Slough, UK), 하버 브랜치 오슨그라픽스 인스티튜트(Harbor Branch Oceangraphics Institute: Ft. Pierce, Fla.), 및 팜나마르, 유.에스.에이.(PharmnaMar, U.S.A.: Cambridge, Mass.)를 포

함한 많은 공급원으로부터 구입할 수 있다. 또한, 천연 및 합성된 라이브러리는, 요구되는 경우, 본 기술분야에 공지된 방법에 따라서, 예를 들어, 표준 추출 및 발효 방법에 의해서 생성된다. 또한, 요구되는 경우, 어떠한 라이브러리 또는 화합물은 표준 화학, 물리, 또는 생화학 방법을 이용함으로써 용이하게 변경된다.

또한, 약물 발견 및 개발 분야의 전문가라면 항-병원성 활성이 이미 공지된 물질의 복제물 또는 반복단위의 탈복제(예, 분류학적 탈복제, 생물학적 탈복제, 및 화학적 탈복제, 또는 이의 어떠한 조합) 또는 제거를 위한 방법이 가능한 경우에는 이용되어야 한다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

미정제 추출물이 항-병원성 또는 항-발병성 활성, 또는 결합 활성을 지니는 것으로 밝혀지는 경우, 관찰된 효과의 원인이 되는 화학적 구성물을 분리하기 위해서 양성 선도 추출물의 분별이 필요하다. 따라서, 추출, 분별, 및 정제 과정의 목적은 항-병원성 활성을 지니는 미정제 추출물 내의 화학적 실체에 대한 조심스런 특성화 및 확인이다. 그러한 불균질 추출물의 분별 및 정제 방법이 본 기술 분야에 공지되어 있다. 요구되는 경우, 병원성의 치료에 유용한 제제인 것으로 밝혀지는 화합물이 본 기술분야에서 공지된 방법에 따라서 화학적으로 변형된다.

Isd 엔코딩된 폴리펩티드의 잠재적 억제제는 본 발명의 핵산 서열 또는 폴리펩티드에 결합하여 이의 활성을 억제하거나 소멸시키는 유기 분자, 펩티드, 펩티드 미메틱, 폴리펩티드 및 항체를 포함할 수 있다. 효능적인 길항제에는 또한 폴리펩티드의 결합부위에 결합하여 그 부위를 채워서 세포 결합 분자에 결합되는 것을 방지하여 정상적인 생물학적 활성이 억제되게 하는 소분자(small molecule)가 포함된다. 그 밖의 잠재적인 길항제에는 안티센스 분자가 포함된다.

추가로, 본원에 기술된 스크리닝 검정에 의해 확인된 S. 아우-레우스 항-Isd 길항제는 상기 기술된 바와 같이 이의 용도에 따라 다양한 방법으로 투여될 수 있다.

8.1 상호작용 검정

정제된 및 재조합 IsdA, IsdB 및 IsdC 폴리펩티드는 Isd 유전자 생성물에 결합하고, 단백질-단백질 상호작용을 분열시키는 작용제를 스크리닝하기 위한 검정의 개발에 사용될 수 있다. IsdA, IsdB 또는 IsdC의 잠재적 억제제 또는 길항제는 IsdA, IsdB 또는 IsdC에 결합하여 이의 활성을 감소시키거나 소멸시키는 유기 소분자, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드 미메틱, 및 항체가 포함될 수 있다.

특정 구체예에서, (i) 작용제의 부재시 Isd 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용을 허용하는 조건하에서 작용제의 존재하에 Isd 폴리펩티드와 적절한 상호작용 분자를 접촉시키는 단계; 및 (ii) Isd 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용의 수준을 결정하는 단계를 포함하여, Isd 폴리펩티드에 결합하고 철 흡수를 억제하는 작용제를 확인할 수 있고, 여기서 작용제의 부재시에 대한 작용제의 존재시의 Isd 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용의 상이한 수준은 상기 작용제가 Isd 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용을 억제하는 것을 나타낸다.

또 다른 구체예에서, Isd 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용을 분열시키는 작용제가 확인될 수 있다. 한 예시적 결합 검정에서, 반응 혼합물은 IsdA, IsdB 또는 IsdC의 하나 이상의 생물학적 활성 부분, 관심 작용제(들), 및 적절한 상호작용 분자를 포함하도록 생성될 수 있다. 한 예시적 상호작용 분자는 헴단백질, 헤민, 트랜스페린, 피브리노겐 또는 피브로네틴일 수 있다. 한 예시적 구체예에서, 관심 작용제는 특정 Isd 폴리펩티드에 대한 항체이다. Isd 폴리펩티드에 대한 항체의 결합은 결합하는 헴 또는 헴단백질에서 Isd 폴리펩티드의 기능을 억제할 수 있다. 특정 Isd 폴리펩티드와 적절한 상호작용 분자의 상호작용의 검출 및 정량화는 상호작용을 억제하는 작용제의 효능을 결정하기 위한 방법을 제공한다. 작용제의 효능은 다양한 농도의 시험 작용제를 이용하여 수득된 데이터로부터 용량 반응 곡선을 생성시킴으로써 측정될 수 있다. 더욱이, 대조 검정은 또한 비교를 위한 기준치를 제공하도록 수행될 수 있다. 대조 검정에서, 특정 Isd 폴리펩티드와 적절한 상호작용 분자의 상호작용은 시험 작용제의 부재하에서 정량화될 수 있다.

특정 Isd 폴리펩티드와 적절한 상호작용 분자 사이의 상호작용은 다양한 기술에 의해서 검출될 수 있다. 복합체 형성의 조절은, 예를 들어, 검출 가능하게 표지된 단백질, 예컨대, 방사성 표지된, 형광 표지된, 또는 효소적으로 표지된 폴리펩티드를 사용함으로써, 면역검정법에 의해서 또는 크로마토그래피 검출법에 의해서 정량화될 수 있다.

특정의 Isd 단백질과 적절한 상호작용 분자와의 상호작용의 측정은 광 바이오센서 장치(optical biosensor device)에서 표면 플라스몬 공명 기술(surface plasmon resonance technology)을 이용함으로써 직접 관찰될 수 있다. 이러한 방법은 보다 큰(>5kDa) 폴리펩티드와의 상호작용을 측정하는데 특히 유용하며, 단백질-단백질 상호작용의 억제제를 스크리닝하도록 조정될 수 있다.

대안적으로는, 특정 *Isd* 폴리펩티드 또는 적절한 상호작용 분자를 고정시켜 단백질 중 하나 또는 둘 모두의 비복합된 형태로부터의 복합체의 분리를 용이하게 하고, 검정의 자동화를 가능하게 하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 후보 작용제의 존재 및 부재하에 상호작용분자에 대한 특정 *Isd* 단백질의 결합은 반응물을 함유하기에 적합한 어떠한 용기 내에서 수행될 수 있다. 그러한 예에는 미세역가 플레이트, 시험 튜브, 및 마이크로-원심분리 튜브가 포함된다. 한 구체예에서, 단백질이 매트릭스에 결합되게 하는 도메인을 지니는 융합 단백질이 제공될 수 있다. 예를 들어, 글루타치온-S-트랜스퍼라아제/*IsdA*(GST/*IsdA*) 융합 단백질이 글루타치온 세파로오스 비드(glutathione sepharose beads: Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) 또는 글루타치온 유도체화된 미세역가 플레이트상으로 흡착될 수 있으며, 이들은 이어서, 예를 들어, ^{35}S -표지된 상호작용 분자, 및 시험 작용제, 및 약간 더 엄격한 조건이 요구될 수도 있지만, 복합체 형성을 유도하는 조건하에, 예를 들어, 염 및 pH에 대해서 생리학적인 조건에서 인큐베이션된 혼합물과 조합된다. 인큐베이션 후에, 비드를 세척하여 어떠한 비결합된 표지를 제거하고, 매트릭스를 고정하고 방사성표지를 직접 측정하거나(비드를 신틸런트(scintillant)에 넣는다), 복합체를 후속하여 해리시킨 후에 상청액에서 측정한다. 대안적으로는, 복합체를 매트릭스로부터 해리시키고, SDS-PAGE에 의해서 분리하고, 비드 분획에서 발견된 상호작용 분자의 수준을 표준 전기 영동 기술을 사용함으로써 젤로부터 정량화한다.

매트릭스상에 단백질 및 다른 분자를 고정시키는 그 밖의 기술이 또한 본 검정에서 이용될 수 있다. 예를 들어, 특정 *Isd* 단백질 또는 적절한 상호작용 분자중 하나가 비오틴 및 스트렙타비딘의 컨주케이션을 이용함으로써 고정될 수 있다. 예를 들어, 비오틴화된 *IsdA*, *IsdB* 또는 *IsdC*가 본 기술분야에 공지된 기술을 사용함으로써 비오틴-NHS(N-히드록시-숙신이미드)로부터 제조될 수 있으며(예, 비오틴화 키트, 미국 일리노이즈 락필드소재의 피어스 케미칼스(Pierce Chemicals)), 스트렙타비딘-코팅된 96 웰 플레이트(Pierce Chemical)의 웰에 고정될 수 있다. 대안적으로는, *IsdA*, *IsdB* 또는 *IsdC*와 반응성이지만 폴리펩티드와 상호작용 분자 사이의 상호작용을 방해하지 않는 항체가 플레이트의 웰에 유도체화될 수 있으며, *IsdA*, *IsdB* 또는 *IsdC*가 항체 컨주케이션에 의해서 웰에 포집될 수 있다. 상기된 바와 같이, 상호작용 분자와 시험 화합물의 제조물은 플레이트의 폴리펩티드-존재 웰에서 인큐베이션될 수 있으며, 웰에 포집된 복합체의 양은 시험 작용제의 존재 또는 부재하에 정량화될 수 있다. GST-고정된 복합체에 대한 상기된 방법에 추가하여, 상기 복합체를 검출하는 예시적인 방법에는 상호작용 분자와 반응성인 항체를 사용하는 복합체의 면역검출법 또는 상호작용 분자와 관련된 효소적 활성을 검출하는 효소-연관된 검정이 포함된다.

예를 들어, 효소는 화학적으로 컨주케이션되거나 상호작용 분자와의 융합 단백질로서 제공될 수 있다. 예를 들면, 상호작용 분자는 화학적으로 가교되거나 호스래디시 퍼옥시다제(horseradish peroxidase)와 유전적으로 융합될 수 있으며, 복합체에 포집된 폴리펩티드의 양은 효소, 예를 들어, 3,3'-디아미노-벤즈아딘 테트라히드로클로라이드 또는 4-클로로-1-나프톨의 발색성 기질로 검정될 수 있다. 유사하게, 폴리펩티드 및 글루타치온-S-트랜스퍼라아제를 포함하는 융합 단백질이 제공될 수 있으며 복합체 형성은 1-클로로-2,4-디니트로벤젠을 사용한 GST 활성을 검출함으로써 정량화될 수 있다[문헌: Habig 등(1974) J. Biol. Chem. 249:7130].

8.2 발현 검정

추가의 구체예에서, 철 흡수의 길항제는 *isdA*, *isdB* 및 *isdC* 핵산 또는 단백질의 발현에 영향을 줄 수 있다. 이러한 스크린에서, 스태필로코쿠스 아우레우스 세포는 관심 화합물(들)로 처리되고, 이어서, *isdA*, *isdB* 및 *isdC* 핵산 또는 단백질 발현에 대한 화합물(들)의 효과에 대해서 검정될 수 있다.

특정 구체예에서, (i) 작용제의 존재 또는 부재하에서 야생형 스태필로코쿠스 아우레우스 균주를 배양하는 단계; 및 (ii) *Isd* 폴리펩티드의 발현을 비교하는 단계를 포함하여, 스태필로코쿠스 아우레우스의 *Isd* 폴리펩티드의 발현을 억제하는 작용제를 확인할 수 있고, 여기서 상기 작용제로 처리된 세포에서의 *Isd* 폴리펩티드의 발현의 보다 큰 감소가 상기 작용제가 스태필로코쿠스 아우레우스의 *Isd* 폴리펩티드의 발현을 억제함을 나타낸다.

한 대안적 구체예에서, (i) 작용제의 존재 또는 부재하에서 야생형 스태필로코쿠스 아우레우스를 배양하는 단계; 및 (ii) *isd* 핵산의 발현을 비교하는 단계를 포함하여, 스태필로코쿠스 아우레우스의 *isd* 핵산의 발현을 억제하는 작용제를 확인할 수 있고, 여기서 상기 작용제로 처리된 세포에서의 *isd* 핵산의 발현의 보다 큰 감소가 상기 작용제가 스태필로코쿠스 아우레우스의 *isd* 핵산의 발현을 억제함을 나타낸다.

예를 들어, 전체 RNA는 문헌[Chomczynski 등 (1987) *Anal. Biochem.* 162:156-159]에 기재된 단일-단계 구아니디늄-티오시아네이트-페놀-클로로포름 방법과 같은 어떠한 적합한 기술을 사용함으로써 시험 작용제의 존재 또는 부재하에 배

양된 스태필로코쿠스 아우레우스 세포로부터 분리될 수 있다. *isdA*, *isdB* 또는 *isdC*의 발현은 어떠한 적절한 방법, 예컨대, 노던 블롯 분석(Northern blot analysis), 중합효소 연쇄반응(PCR), 중합효소 연쇄반응과 조합된 역전사(RT-PCR), 및 리가아제 연쇄반응과 조합된 역전사(RT-LCR)에 의해서 검정될 수 있다.

노던 블롯 분석은 문헌[Harada 등 (1990) Cell 63:303-312]에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 간략하게는, 전체 RNA는 시험 작용제의 존재하에 배양된 스태필로코쿠스 아우레우스 세포로부터 제조된다. 노던 블롯의 경우, RNA를 적절한 완충액(예컨대, 글리وك실/디메틸 셀록시드/나트륨 포스페이트 완충액)에서 변성시키고, 한천 겔 전기영동에 가하고, 니트로셀룰로오스 필터상으로 옮긴다. RNA가 UV 링커(linker)에 의해서 필터에 결합된 후에, 포름아미드, SSC, 덴하르트 용액(Denhardt's solution), 변성된 연어 정액, SDS, 및 나트륨 포스페이트 완충액을 함유하는 용액에서 예비 하이브리드화시킨다. 스태필로코쿠스 아우레우스 *isdA*, *isdB* 또는 *isdC*의 DNA 서열을 어떠한 적절한 방법(예컨대, 32P-멀티프라임드(multiprimed) DNA 표지화 시스템(Amersham))에 따라서 표지시키고 프로브로서 사용한다. 밤새 하이브리드화시킨 후에, 필터를 세척하고 x-레이 필름에 노출시킨다. 또한, 비교를 위한 기준선을 제공하도록 대조 시험을 수행할 수 있다. 대조시험에서, 스태필로코쿠스 아우레우스 중의 *isdA*, *isdB* 또는 *isdC*의 발현이 시험 작용제의 부재하에 정량화될 수 있다.

대안적으로는, *IsdA*, *IsdB* 또는 *IsdC* 폴리펩티드를 엔코딩하는 mRNA의 수준이, 예를 들어, 문헌[Makino 등 (1990) Technique 2:295-301]에 기재된 RT-PCR 방법을 이용함으로써, 검정될 수 있다. 요약하면, 이러한 방법은 RT 프라이머 및 적절한 완충액을 함유하는 반응 혼합물 중에 시험 작용제의 존재하에 배양된 스태필로코쿠스 아우레우스 세포로부터 분리된 전체 RNA를 첨가함을 포함한다. 프라이머 어닐링(annealing)을 위한 인큐베이션 후에, 혼합물에 RT 완충액, dNTP, DTT, RNase 억제제 및 역전사효소를 보완할 수 있다. RNA의 역전사를 달성하기 위한 인큐베이션 후에, RT 생성물을 표지된 프라이머를 사용하는 PCR에 가한다. 대안적으로는 프라이머를 표지하기 보다는, 표지된 dNTP가 PCR 반응 혼합물에 포함될 수 있다. PCR 증폭이 통상의 기술에 따라서 DNA 열 사이클러(DNA thermal cycler)에서 수행될 수 있다. 증폭을 달성하기 적합한 횟수의 라운드 후에, PCR 반응 혼합물은 폴리아크릴아미드 겔상에서 전기영동된다. 겔을 건조시킨 후에, 적절한 밴드의 방사성 활성을 영상 분석기를 사용하여 정량화할 수 있다. RT 및 PCR 반응 성분 및 조건, 시약 및 겔 농도, 및 표지화 방법은 본 기술 분야에 공지되어 있다. RT-PCR 방법에 대한 변형은 당업자에게는 자명할 것이다. 본 발명의 핵산을 검출할 수 있는 그 밖의 PCR 방법은 문헌[PCR Primer: A Laboratory Manual(Dieffenbach 등 eds., Cold Spring Harbor Lab Press, 1995)]을 참조할 수 있다. 비교를 위한 기준선을 제공하도록 대조시험이 수행될 수 있다. 대조시험에서, 스태필로코쿠스 아우레우스 중의 *isdA*, *isdB* 또는 *isdC*의 발현이 시험 작용제의 부재하에 정량화될 수 있다.

대안적으로는, *IsdA*, *IsdB* 및 *IsdC* 폴리펩티드의 발현이 스태필로코쿠스 아우레우스 세포를 시험 작용제로 처리한 후에 면역검정과 같은 항체 기재 방법을 이용함으로써 정량화될 수 있다. 이로 제한되는 것은 아니지만, 웨스턴 블롯과 같은 기술을 이용한 경쟁 및 비경쟁 검정 시스템, 방사성면역검정, ELISA(효소 결합된 면역흡착 검정), "샌드위치(sandwich)" 면역검정, 면역침전 검정, 침강 반응(precipitin reaction), 겔 확산 침강 반응, 면역확산 검정, 응집 검정(agglutination assay), 보체 결합 검정, 면역방사계측 검정(immunoradiometric assay), 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정을 포함한 어떠한 적합한 면역검정이 이용될 수 있다.

예를 들어, *IsdA*, *IsdB* 또는 *IsdC* 폴리펩티드는 2-단계 샌드위치 검정 수단에 의해서 시험 작용제로 처리된 스태필로코쿠스 아우레우스 세포로부터 얻은 샘플에서 검출될 수 있다. 첫 번째 단계에서, 포획 시약(예, *IsdA*, *IsdB* 또는 *IsdC* 항체 중 한 항체)을 사용하여 특정의 폴리펩티드를 포획한다. 포획 시약은 임의로 고형상에 고정될 수 있다. 두 번째 단계에서, 직접 또는 간접적으로 표지된 검출 시약을 사용하여 포획된 마커를 검출한다. 한 구체예에서, 검출 시약은 항체이다. 시험 시약으로 처리된 스태필로코쿠스 아우레우스 세포에 존재하는 *IsdA*, *IsdB* 또는 *IsdC* 폴리펩티드의 양은 비처리된 스태필로코쿠스 아우레우스 세포에 존재하는 양을 참고하여 계산될 수 있다.

적합한 효소 표지에는, 예를 들어, 기질과 반응함으로써 과산화수소의 생산을 촉매화하는 옥시다제 그룹로부터의 표지가 포함된다. 글루코스 옥시다제가 양호한 안정성을 지니며 그의 기질이 용이하게 입수될 수 있으므로, 특히 바람직하다. 옥시다제 표지의 활성은 효소-표지된 항체/기질 반응에 의해서 형성된 과산화수소의 농도를 측정함으로써 검정될 수 있다. 효소 이외에, 다른 적합한 표지에는 방사성 동위원소, 예컨대, 요오드(^{125}I , ^{121}I), 탄소(^{14}C), 황(^{35}S), 3중수소(^3H)가 포함된다.

적합한 형광 표지의 예에는 플루오레세인 표지, 이소티오시아네이트 표지, 로다민 표지, 피코에리트린 표지, 피코시아닌 표지, 알로피코시아닌 표지, o-프트알데히드 표지, 및 플루오레사민(fluorescamine) 표지가 포함된다.

적합한 효소 표지의 예에는 말레이트 데히드로게나아제, 스타필로코콜 누클레아제(staphylococcal nuclease), 엘타-5-스테로이드 이소머라아제, 효모-알코올 데히드로게나아제, 알파-글리세롤 포스페이트 데히드로게나아제, 트리오스 포스페이트 이소머라아제, 페옥시다아제, 알칼리성 포스파타아제, 아스파라기나아제, 글루코스 옥시다아제, 베타-갈락토시다아제, 리보누클레아제, 우레아제, 카탈라아제, 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제, 글루코아밀라아제, 및 아세틸콜린 에스테라아제가 포함한다. 화학발광 표지의 예에는 루미놀 표지(luminol label), 이소루미놀 표지, 방향족 아크리디늄 에스테르 표지, 이미다졸 표지, 아크리디늄 염 표지, 옥살레이트 에스테르 표지, 루시페린 표지, 루시페라제 표지 및 에퀴린 표지(aequorin label)가 포함된다.

예시

일반적으로 기재된 본 발명은 하기 실시예를 참조함으로써 보다 용이하게 이해될 수 있는데, 이러한 실시예는 본 발명의 특정 관점 및 구체예를 단지 설명하고자 하는 것이며, 이로써 본 발명을 한정하고자 하는 것은 아니다.

실시예 1: IsdA, IsdB 및 IsdC 단백질의 발현

IsdA, IsdB 및 IsdC 단백질 또는 이들의 단편은 도 4 (스태필로코쿠스 아우레우스 - Fe)에 나타낸 바와 같이 철에 의해 제한된 환경하에서 발현된다. 도 4에 나타낸 SDS-PAGE 겔은 IsdA, IsdB 및 IsdC 단백질이 스태필로코쿠스 아우레우스에 의해 발현되는 가장 우세한 철에 의해 조절되는 단백질중 3개임을 나타낸다. 이들 단백질은 스태필로코쿠스 아우레우스 세포가 철 풍부 배지 (스태필로코쿠스 아우레우스 + Fe)에서 배양되는 경우 발현되지 않고, 따라서 추정적으로 생체내에서 모두 고도로 발현되는 듯 하다.

대장균으로의 융합에 따른 IsdA, IsdB 및 IsdC 뿐만 아니라 IsdE의 과발현은 매우 착색된 용해물을 생성시킨다. 이러한 착색이 대장균 세포질 내로부터의 프로토포르피린 및 헴의 상이한 형태를 이용하는 단백질의 능력에 기인하는 것을 확증하기 위해 흡수 및 자성 원편광 이색성 분광법이 사용되고, 이는 헴 결합에서의 프로토포르피린 및 헴의 역할을 확증한다.

실시예 2: *isd* 유전자 녹아웃 돌연변이의 생성

추가로, *isdA*, *isdB* 및 *isdC* 또는 이의 부분의 코딩 영역은 *isd* 유전자의 각각에서 단일 돌연변이를 함유하는 균주를 개별적으로 생성시키는 것이 차단될 수 있다. *isdA* 코딩 영역을 테트라사이클린에 대한 내성을 엔코딩하는 카세트를 삽입함으로써 차단시켰다. *isdB* 코딩 영역을 에리트로마이신에 대한 내성을 엔코딩하는 카세트를 삽입함으로써 차단시켰다. *isdC* 코딩 영역을 카나마이신에 대한 내성을 엔코딩하는 카세트를 삽입함으로써 차단시켰다. 이후, 각각의 돌연변이를 문헌 [Sebulsky et al., (2001) J. Bacteriol. 183:4994-5000]에 기술된 바와 같이 파지 형질도입 과정을 이용하고 적절한 내성을 이용하여 선택된 동일한 유전적 백그라운드로 이동시켰다. 추가로, 두개 이상의 *isd* 유전자가 노킹 아웃된 돌연변이를 함유하는 균주(예를 들어, *isdA*, *isdB* 및 *isdC*에서 돌연변이된 균주)가 또한 생성될 수 있다.

실시예 3: 신장 감염의 마우스 모델의 생존 연구

25 g의 암컷 스위스-웹스터 (Swiss-Webster) 마우스를 찰스 리버 래버리토리스 캐나다, 인크 (Charles River Laboratories Canada, Inc.)사로부터 구입하고, 마이크로분리계 우리에서 사육하였다. 박테리아를 트리프릭 소이 브로쓰 (Trypric Soy Broth, TSB)에서 밤새 성장시키고, 수거하고, 멸균 염수로 3회 세척하였다. 예비 실험은 스태필로코쿠스 아우레우스 뉴먼 (Newman)이 RN6390 보다 상기 모델에서 마우스를 더욱 콜로니화시키고, 급성이지만 치사성이 아닌 신장 감염을 수득하기 위해 꼬리 정맥으로 주사된 스태필로코쿠스 아우레우스 뉴먼의 최적량은 1×10^7 CFU임을 입증하였다. 멸균 염수에 혼탁된 박테리아를 꼬리 정맥을 통해 정맥 투여하였다. 주사된 생존 박테리아의 수는 TSB 상에 접종물의 연속적 희석액을 플레이팅시킴으로써 확인하였다. 주사후 6일째에, 마우스를 희생시키고, 신장을 무균적으로 분리시켰다. 파워젠 (PowerGen) 700 균질화기를 이용하여, 신장을 0.1% 트리톤 X-100을 함유하는 멸균 PBS에서 45초 동안 균질화시키고, 균질화된 희석액을 TSB-아가에 플레이팅시켜 생존 박테리아를 계수하였다. 제시되는 데이터는 마우스당 회수된 log CFU이다.

스태필로코쿠스 아우레우스 감염의 뮤린 신장 종기 모델을 이용하는 결과는 IsdA 단독에서의 돌연변이 또는 IsdA, IsdB 및 IsdC 모두에서 돌연변이를 지니는 균주가 스태필로코쿠스 아우레우스 독성을 약독화시킴을 나타낸다. 흥미롭게도, 주사 6일후, 회수된 돌연변이 박테리아는 야생형으로부터 회수된 수에 비해 90% 감소하였고, 이는 이들 단백질이 박테리아

세포 표면에서 발현시 감염 동안의 박테리아의 적합성에서 필수적인 역할을 한다는 것을 나타낸다. 이는 또한 생체내에서의 이들 단백질의 억제가 Isd를 발현하는 박테리아에 의한 감염을 예방 (즉, Isd 기재 백신의 경우)하거나, 일단 감염이 개시된 후 Isd를 발현하는 박테리아의 제거를 일으킬 수 있음을 나타낸다.

실시예 4: 증가하는 과산화수소 농도 하에서의 스태필로코쿠스 아우레우스의 생존

햄에 결합된 Isd 단백질은 자유 라디칼의 유해한 효과로부터 스태필로코쿠스 아우레우스 세포를 보호하는 산화 완충제로 작용하는 듯하다. 햄의 존재하에서 인큐베이션된 IsdA, IsdB 및 IsdC가 제거된 뉴먼 균주에 대한 햄의 존재하에서 인큐베이션된 뉴먼 균주의 직접적 비교는 돌연변이 세포가 증가된 농도의 과산화수소에서 생존할 수 없음을 나타낸다 (도 6). 따라서, 여러 Isd 단백질의 발현이 결핍된 돌연변이가 과산화수소 공격에 보다 민감하다.

도 7은 (A) 쿠마시 및 (B) TMBZ (테트라메틸벤자린)으로 염색된 SDS-PAGE 겔에서 수행된 야생형 스태필로코쿠스 아우레우스 및 스태필로코쿠스 아우레우스 *isdA::km^c* 둘 모두에서의 IsdA 플러스 및 마이너스의 발현을 도시한다. IsdA의 햄 결합된 형태와 관련된 카탈라아제 활성은 TMBZ 화합물을 분해시켜 착색된 반응 생성물을 생성시킨다. 따라서, 햄 결합된 IsdA는 대식세포에 의한 산화적 사멸에 대한 내성을 원조할 수 있다.

실시예 5: Isd 백신

재조합 IsdA 폴리펩티드를 포함하는 백신은 마우스에서 전신적 및 국소적 스태필로코쿠스 아우레우스 감염에 대해 보호적 면역성을 확립할 수 있다. 재조합 IsdA 단백질은 표준 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 12 내지 15 마리의 스위스-웹 스터 마우스 (25 g) 그룹이 모든 면역화 실험에 대해 사용될 수 있고, 복막내 (IP) 주사될 수 있다. 마우스는 다양한 상이한 시점에서 차후의 주사로 부스팅될 수 있다. 혈청은 항-IsdA 항체 역가에 대한 실험의 과정에 걸쳐 모니터될 수 있다. 약 30 일째에, 마우스는 1×10^7 개의 스태필로코쿠스 아우레우스로 정맥내 투여될 수 있고, 추가의 7일 동안 모니터될 수 있다. 본 발명자들은 이러한 수의 생(生) 유기체를 이용한 주사가 비-치명적 신장 감염을 야기함을 이전에 보여주었다. 마우스는 신장 조직을 감염시키는 유기체의 수를 모니터하기 위해 감염후 다양한 시점에 희생될 수 있다. 피동 면역화 실험이 또한 이전에 면역화된 마우스로부터 수득한 혈청을 이용하여 수행되어 기타 그룹의 마우스에서의 감염 예방의 유효성을 시험될 수 있다. 유사한 면역화 실험이 IsdB 및 IsdC 폴리펩티드로 수행될 수 있다.

실시예 6: IsdA, IsdB 및 IsdC 항체

A. 전장 Isd 단백질에 대한 모노클로날 항체의 제조

BALB/c 마우스는 전장의 재조합 IsdA, IsdB 또는 IsdC로 복막내 주사를 통해 최초로 면역화된 후, 약 6주 후에 천연 IsdA, IsdB 또는 IsdC로 유사하게 부스팅될 수 있다. 마우스는 적절한 애쥬번트로 면역화될 수 있다. 마우스 혈청은 2차 주사후 약 10일 후에 수득될 수 있고, ELISA를 통해 nti-HRP 활성에 대해 시험될 수 있다. 혈청이 높은 수준의 항-HRP 활성을 나타내는 마우스가 세포 융합체에 대해 선택될 수 있다. 상기 마우스로부터 비장이 수거될 수 있고, 둘째코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)를 이용한 관류에 의해 세포 혼탁액이 제조될 수 있다.

B-림프구 및 대식세포를 함유하는 비장 세포 혼탁액이 비장의 관류에 의해 제조될 수 있다. 세포 혼탁액이 원심분리에 의해 세척되고 수거될 수 있고; 골수종 세포가 또한 이러한 방식으로 세척될 수 있다. 생(生) 세포가 계수될 수 있고, 37°C 수조로 배치될 수 있다. 1 mL의 50% 폴리에틸렌 글리콜(PEG)가 DMEM에 첨가될 수 있다. Balb/c 비장 세포가 PEG에 의해 SP 2/0-Ag 14 마우스 골수종 세포와 융합될 수 있고, 생성된 하이브리도마가 20% 우태아혈청을 함유하는 하이포크산틴 (H), 아미놉테린(A) 및 티미딘(T) (HAT) 선택 조직 배양 배지에서 성장될 수 있다. 생존 세포가 컨플루언스 (confluence)로 성장될 수 있다. 소비된 배양 배지를 항체 역가, 특이성 및 친화성에 대해 확인될 수 있다. PEG에 DMEM 배지를 서서히 첨가함으로써 희석시킨 후, 세포가 37°C에서 1 내지 1.5분 동안 PEG에서 인큐베이션될 수 있다. 세포는 펠레트화될 수 있고, 10% 우태아혈청을 함유하는 35 내지 40 mL의 DMEM이 첨가될 수 있다. 이후, 세포는 조직 배양 플레이트로 분배될 수 있고, 37°C의 5% CO₂의 가습화된 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션될 수 있다.

다음날, 하이포크산틴(H), 아미놉테린(A) 및 티미딘(T) 배지 (HAT 배지)를 함유하는 DMEM-FCS가 각각의 웰에 첨가될 수 있다. 첨가되는 배지 내의 HAT의 농도는 요구되는 최종 농도의 2배, 즉 $H_{최종} = 1 \text{ 배 } 10^{-4} \text{M}$; $A_{최종} = 4 \text{ 배 } 10^{-7} \text{M}$; 및 $T_{최종} = 1.6 \text{ 배 } 10^{-5} \text{M}$ 이 될 수 있다.

이후, 플레이트는 2주에 걸쳐 매 3 내지 4일 동안 HAT 배지로 인큐베이션될 수 있다. 융합된 세포는 이후 HAT 배지를 함유하는 DMEM-FCS에서 배양될 수 있다. 융합된 세포는 웰의 바닥 상에 1/2 내지 3/4 컨플루언스가 되고, 상층의 조직 배양 용액이 수거되어 ELISA에 의해 IsdA, IsdB 또는 IsdC 특이적 항체에 대해 시험될 수 있다. 포지티브 웰이 대식세포 또는 흉선세포 공급자 플레이트 상에서 제한 희석에 의해 클로닝될 수 있고, DMEM-FCS에서 배양될 수 있다. 클로닝된 웰이 시험될 수 있고, 통계적으로 유의한 모노클로날 항체가 수득되기 전에 3회 재클로닝될 수 있다. 소모된 배양 배지가 항체 생성 클론으로부터 시험될 수 있다.

B. 전장 Isd 단백질에 대한 폴리클로날 항체의 제조

컨쥬게이션되지 않은 정제된 재조합 IsdA, IsdB 및/또는 IsdC가 2마리의 래빗을 면역화시키기 위한 항원으로 사용될 수 있다. 간단히, 1 mg의 재조합 IsdA, IsdB 또는 IsdC가 1 ml의 인산염 완충 식염수에 재현탁될 수 있고, 동등한 부피의 완전 프로인트 애쥬번트 (Complete Freund's Adjuvant)로 에멀젼화될 수 있고, 약 1 ml (전체 부피의 절반)가 각각의 래빗에 복막내로 주사될 수 있다. 2번째 및 3번째 면역화가 2주 및 3주 후에 불완전 프로인트 애쥬번트를 이용하여 후속될 수 있다. 재조합 IsdA, IsdB 또는 IsdC 특이적 항체 역가를 결정하기 위해 효소면역측정법 (ELISA)을 이용하여 혈청이 시험될 수 있다. ELISA 결과에 기초하여 높은 역가를 나타내는 항-재조합 IsdA, IsdB 및/또는 IsdC 함유 혈청이 상응하는 Isd 폴리펩티드와 컨쥬게이션된 세파로오스 컬럼 상의 친화성 크로마토그래피로 정제될 수 있다. 항-재조합 IsdA, IsdB 및 IsdC 면역글로불린이 스태필로코쿠스 아우레우스 감염의 독성을 약독화시키는 능력에 대해 시험될 수 있다.

실시예 7: 발현 검정

스태필로코쿠스 아우레우스에서의 IsdA의 발현을 저지하는 작용제에 대한 스크리닝 검정이 다음과 같이 수행될 것이다. 야생형 스태필로코쿠스 아우레우스 세포는 시험 작용제의 존재 또는 부재하에 트립틱 소이 액체배지(TSB)(Difco)에서 밤새 배양될 것이다. 배양 24 시간 후에, 세포는 1X PBS(포스페이트 완충된 염수)에서 세척되고, 이어서 STE(0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0])중의 10 μ g의 라이소스타핀(lysostaphin)을 사용함으로써 37°C에서 용해될 것이다. 세포 용해물은 이어서 항-IsdA 항체 예비 코팅된 플레이트로 옮겨지고 45 내지 60분 동안 실온에서 인큐베이션될 것이다. 대조군으로서, 비처리된 스태필로코쿠스 아우레우스 세포로부터의 세포 용해물이 사용될 것이다. 물로 3회 세척한 후에, 알칼리 포스파타제(AP) 또는 호스래디시 페옥시다제(HRP)중 하나에 컨쥬게이션된 2차 항체가 첨가되고 1 시간 동안 인큐베이션될 것이다. 플레이트는 이어서 세척되어 유리 항체 복합체로부터 결합물이 분리될 것이다. 화학발광 기질(호스래디시 페옥시다제에 대한 피어스(Pierce)로부터의 알칼리 포스파타제 또는 수퍼 시그널 이뮤놀 용액(Super Signal luminol solution))이 사용되어 결합된 항체를 검출할 것이다. 마이크로플레이트 발광계(microplate luminometer)가 사용되어 화학발광 신호를 검출할 것이다. 시험 작용제로 처리된 세포로부터 얻은 세포 용해물 샘플에서의 신호의 부재는 시험 작용제가 IsdA의 발현을 억제함을 나타낼 것이다. 유사한 발현 검정이 또한 IsdB 및 IsdC에 대해서 수행될 수 있다.

달리 언급되지 않는 한 당분야의 기술내에 있는 통상적인 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 유전자이식 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학 기술을 본 발명의 실시에 적용할 것이다. 참조, 예를 들어 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D.N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed., 1984); Mullis 등 U.S. Patent No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu 등 eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986); Antibodies: A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1987)), Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986).

참조문헌의 포함

본원에 언급된 모든 공개문헌 및 특허는, 각각의 개별적인 공개문헌 또는 특허가 참조로서 포함된다고 구체적으로 및 개별적으로 나타낸 대로, 그 전체가 본원에 참조로서 포함된다. 불일치의 경우에는 임의의 정의를 포함하고 있는 본 출원이 우선일 것이다.

등가물

당업자는 통상적인 실험만을 이용하여 본원에 기술된 본 발명의 특정 구체예에 대한 수많은 등가물을 인식하거나, 확인 할 수 있을 것이다. 그러한 등가물이 첨부된 청구범위에 의해 포함될 것이 의도된다.

도면

도면1

(A)

(B)

(C)

```

1 MTKHYLNSKY QSEQRSSAMK KITMGTASII LGSLVYIGAD SQVQNAATEA
51 TNATNNQSTQ VSQATSQPIN FVQVKDGSSSE KSHMDDYMQH PGKVIKQNNK
101 YYFQTVLNNNA SFWKKEYKFYN ANNQELATTV VNDNKKNDT TINVAVEPGY
151 KSLTITKVVIV VPQINYNHRY TTHLEFEKAI PTLADAAKPN NVKVPQPKPA
201 QPKPTTEQTK PVQPKVKEVKV PTVTTTISKVE DHNSTKVVST DTTKDQTKTQ
251 TAHTVKTAQT AQEQNQKVQTP VKDVATAKSE SNNQAVSNDK SQQTNKVTKH
301 NETPKQASKA KELPKTGLTS VDNFISTVAF ATLALLGSLs LLLFKRKESK
(SEQ ID NO: 3)

```

도면2a

(A)

1	atgaacaacaac	agccaaaaga	atttaaatca	tttttattca	tttagaaagtc	atctactaggc
61	gttgcacatcg	tagcgttag	tacactttt	tttttaatgt	caaatggcg	agcacaaagc
121	gcagctgaa	aaacaggctg	tacaatatac	aaagocaaac	caaaaactgt	agcgttgc
181	agtccaaacaa	caacatcg	aaaagctca	aaaactaaac	cagttagct	tgcgttttt
241	gtatctata	aagaaggttg	ggcccttact	tctgaaacaa	aagaaggtaa	agaaggtaaa
301	gaaggtaaag	ccccctaaag	aaacaaaacg	gtttaaccacg	cggaaacaaacg	cactaaacaaat
361	acatctcta	tttttgcata	ggaaacttga	ggacggatca	aaaaccctgc	ataaaaagat
421	aaagatcata	ggccacaaaa	ctctcgltc	atgttatttg	aaatggaaaa	agaaaatgtt
481	gagaaacat	ttttatcc	tgccagctt	gtttaacccgt	cttaggttt	tttcaactgt
541	tccaaacacg	aaatgttgaat	aggattttac	tttaggttcaat	tttggagaaa	atttggaaat
601	ttatggatgt	tttttttttttt	ggccaaattda	tttagttatcat	agctatgtat	taaaggatcc
661	gctttatccat	gtttctctgt	tccaaatgt	aaaaacccgg	ttttttttttt	aaatgttact
721	cacttcaata	acaaagaaga	aaaataatcgat	tacacatata	tggatttcg	acaaccaatt
781	tataacatcg	cgatataat	aaaaacttgg	aaaggattata	aaatgttggaa	attttatggc
841	ccatataaaa	aaacggaaaaac	acttggaaa	caatgttttg	attttataaa	atttcaatgt
901	aaacttctcg	aaaaattttaa	ggctggtat	aaagaaat	ttagggatcc	aaacaaaggat
961	tttagatgac	aaatgttgc	agctatattac	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1021	aaaaatgtact	attttacaaga	tacaaaaat	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1081	tctatgtt	atcttttttt	taaacccctt	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1141	taatgttgc	tggaaactac	taatgttgc	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1201	cgttgttga	ctataaagca	agatgttcaaa	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1261	gttgttga	aaaaacttca	ttgtgttcatc	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1321	gtatggatcat	accatgttgc	attgttgcat	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1381	aaatcttaca	aaaaaaagaa	acaagatatac	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1441	ctggcaaca	caacccatcc	acatgttgc	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1501	gtatggatata	aaaaatattcc	aaatgttgc	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1561	aaagacaaaa	ccccgtctcg	aaaaacccat	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1621	cccaactaagg	ttgtatctac	gactttttat	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1681	acacaacaaag	atgttgc	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1741	tttacaaaaaa	caaaatttaa	aaacacaaaat	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1801	ataacacaaag	aaaaaaatgg	aaaattttca	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1861	atgtatccat	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt
1921	aaaaaaatgt	aaaaatctgt	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt	ttttttttttt

(SEQ ID NO: 4)

도면 2b

(C)

1	MNKQQKEFKS	FYSIRKSSLG	VASVAISTILL	LLMSNGEAQA	AAEBETGGTNT
51	EAOPKTEAVA	SPTTTSEKAP	ETKPVANAVS	VSNKEVEAPT	SETKEAKEVIR
101	EVKAPKETKA	VKPAAKATNN	TYTIPNLNQLR	EAIKNPAIKD	KDHAPSNSRE
151	IDFEMKKENG	EQOFYHYASS	VKPARVIFTD	SKPEIELGLQ	SGQFWRKFRE
201	YEGDKKLPIK	LVSYDVTVDY	AYIRFSVNG	TKAVKIVSST	HFPNKEEKYD
251	YTLMFQAQPI	YNSADKFKE	EDYKAEKLLA	PYKKAKTLER	QVYELNKIQD
301	KLPEKKLQA	KKKLDETTKA	LDEQVKSATI	EFQNVQPTNE	KMTDQLDQTKV
351	VVYESVENNE	SMMDTFLVHP	IKTGMLNGKK	YVMETNTDD	WYKDFMVWEGC
401	RVRITSKDAN	NTRRTIIPVE	VEGKTLYD	VKHHVKTID	DQYHVRVIE
451	KEAFKTANTD	CSNKKEQODN	SAKKEATPAT	PSKTPSPVIE	KESQKODDSQK
501	DDNKQLPSVE	KENDASSESG	KDKTPATKPT	KGEVESSSTT	PTKVVSTTQN
551	VAKPTTASSK	TTKDVVQTS	GSSEAKDSAP	LQKANIKNTN	DGHTQSQNNK
601	NTQENKAQSL	PQTGEESNKD	MTLPLMALLA	LSSIVAFVLP	RKRKN

(SEQ ID NO: 6)

도면3

(A)

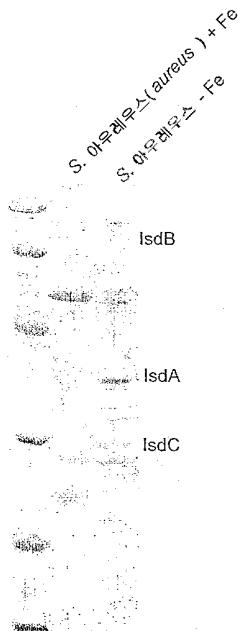
atggaaaatatt ttaaaagttt ttaataacaac gattttagcg ttaattatca tcatecgocac
attcgtatca ttgcgaaatcg ccgcagatcg cggtaatcttg aattatggg tttacaataa
caataccaat gacaatcg tttcaatgtatcg ctatggatataaa acggccaa agtacattaa
aaaaatggt aaattgtatcg tttcaataatcg tttcaacccac agtccatgg tttcaatggat
gagtatcgaa ggacataaag aaaattatattat tagtaaaaac actgcacaaag atgaacgcac
ttctgtatctt ggaaatgtatcg tttcaatgtatcg gggaaatggt agtctttat
cgatggaaatcg tttcaatgtatcg ggccattccaa atatggatcat cattacaaca ttatcatataa
atttatggc ccaactatcg tagccatggc taatgcacca ggtaaagatg ataaaaatcg
ttgttcgtatcg agtgcacaaag gatctgtatcg aacgactact ggtcaagtg aatctaatag
ttcgatataa gggaaatggt aaaaatccaa aacaatgtatcg ggtacacccgt cattatata
ttcaatccca gttgcacccatcg tttcaatgtatcg acatggatccaa acatggatccaa
atctaaaggc aatgtggat aa (SEQ ID NO: 7)

(B)

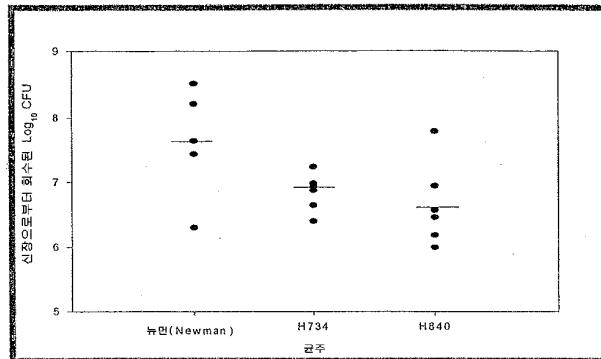
(C)

1 MKNLKVFNT TILALIIIA TFSNSANAAD SGTLNYEVK YNTNDTSIAN
51 DYFNPKAYI KKNGKLYVQI TVNHSHWITG MSIEGHKENI ISKNTAKDER
101 TSEFEVSKLN GKIDGKIDVY IDEKVNGKPF KYDHHYNITY KPNGPDTVAG
151 ANAPGKDDKN SASGSDKGSD GTTTGQSESN SSNKDKVNP QTNAGTPAYI
201 YAIPVASLAL LIAITLFWVRK KSKGNVIE (SEQ ID NO: 9)

도면4



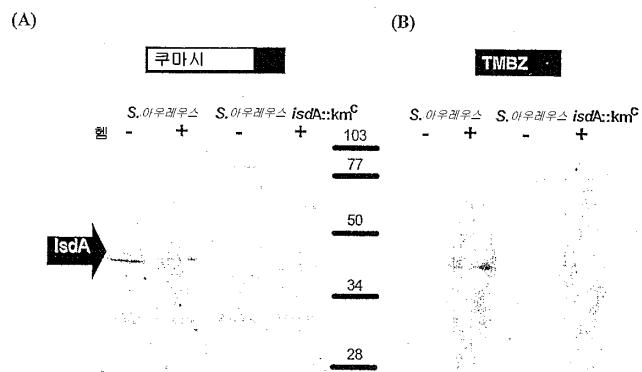
도면5



도면6

H_2O_2 (μM)	뉴먼		뉴먼		
	+ 헬	$\Delta isdA$	$\Delta isdB$	$\Delta isdC$	+ 헬
1000					
500	✓				
250	✓				
125	✓				
62.5	✓				
31.2	✓		✓		
15.6	✓		✓		
7.6	✓		✓		
3.8	✓		✓		
0	✓		✓		

도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO

<120> STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISD PROTEIN-BASED ANTI-INFECTIVES

<130> UWA-013.25

<140> PCT/IB05/004126

<141> 2005-10-25

<150> 60/621,921

<151> 2004-10-25

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 1053

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

atgacaaaac attattnaaa cagtaagtat caatcagaac aacgttcatc agctatgaaa 60
 aagattacaa tgggtacagc atctatcatt ttaggttccc ttgtatacat aggccgagac 120
 agccaacaag tcaatgcggc aacagaagct acgaacgcaa ctaataatca aagcacacaa 180
 gtttctcaag caacatcaca accaattaat ttccaaagtgc aaaaagatgg ctcttcagag 240
 aagtccacaca tggatgacta tatgcaacac cctggtaaag taattaaaca aaataataaa 300
 tattattncc aaaccgtgtt aaacaatgca tcattctgga aagaatacaa attttacaat 360
 gcaaaacaatc aagaatttagc aacaactgtt gtttaacgata ataaaaaagc ggatactaga 420
 acaatcaatg ttgcagttga acctggatat aagagcttaa ctactaaagt acatattgtc 480
 gtgccacaaa ttaattacaa tcatagatat actacgcatt tggaaattgtt aaaaagcaatt 540
 cctacattag ctgacgcgcgcaaaaac aatgttaaac cggttcaacc aaaaccagct 600
 caacctaaaa cacctactga gcaaaactaaa ccagttcaac ctaaagtgtt aaaaagttaaa 660
 cctactgtaa ctacaacaag caaagttgaa gacaatcact ctactaaagt tgtaagtact 720
 gacacaacaaa aagatcaaac taaaacacaa actgctcata cagttaaaac agcacaact 780
 gctcaagaac aaaataaaagt tcaaacacct gttaaagatg ttgcaacagc gaaatctgaa 840
 agcaacaatc aagctgttaag tgataataaa tcacaacaaa ctaacaaagt tacaaaacat 900
 aacgaaacgc ctaaaacaagc atctaaagt aaagaattac caaaaactgg tttaacttca 960
 gttgataact ttattagcac agttgccttc gcaacacttg cccttttagg ttcattatct 1020
 ttattactt tcaaaagaaaa agaatctaaa taa 1053

<210> 2

<211> 1053

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

ttattnagat tcttttcttt tgaaaagtaa taaagataat gaacctaaaa gggcaagtgt 60
 tgcaaggca actgtgctaa taaagttatc aactgaagtt aaaccagttt ttgttaattc 120
 tttagcttta gatgcttgcgtt taggcgttgc gttatgttt gtaactttgt tagtttgcgtt 180
 tgatttatta tcacttacag cttgattgtt gcttcagat ttgcgttgc caacatcttt 240
 aacagggttt tgaactttat ttgttgcgtt agcagttgt gctgtttaa ctgtatgagc 300
 agtttgcgtt ttagttgtat cttttgcgtt gtcagttactt acaacttttag tagagtgtt 360
 gtcttcaact ttgcgttgcgtt tagttacagt aggttaact ttgttcaactt taggttgaac 420
 tggtttagtt tgctcagtag gtttttttagg ttgagctgtt tttgggttgcgtt cccgtttaac 480

attgttttgtt tttgctgcgt cagctaattgtt aggaattgtt ttttcaaattt ccaaattgcgt 540
 agtataatcta tgattgttaat taatttggg cacgacaata tgtacttttag tagttaaatgtt 600
 cttatatcca ggttcaactg caacattgtat tggcttagt tccgctttt tattatcggtt 660
 aacaacagtt gttgctaattt cttgattgtt tgcattgtaa aatttggattt ctttccagaa 720
 tggatgcattt ttaaacacgg tttggaaata atatttattt ttttggattttaa ttactttacc 780
 agggtgttgc atatagtcat ccatgtgtga cttctctgaa gagccatctt tttgcacttg 840
 gaaattaattt ggttggatgtt tggcttgaga aacttggatgtt ctttgattat tagttgcgtt 900
 cgtagcttctt gttgccgcat tgacttggatgtt gctgtctgat cctatgtata caaggaaacc 960
 taaaatgata gatgctgtac ccattgtaaat ctttttcata gctgatgaac gttgttctga 1020
 ttgataactta ctgtttaat aatgttttgtt cat 1053

<210> 3

<211> 350

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 3

Met Thr Lys His Tyr Leu Asn Ser Lys Tyr Gln Ser Glu Gln Arg Ser
 1 5 10 15

Ser Ala Met Lys Lys Ile Thr Met Gly Thr Ala Ser Ile Ile Leu Gly
 20 25 30

Ser Leu Val Tyr Ile Gly Ala Asp Ser Gln Gln Val Asn Ala Ala Thr
 35 40 45

Glu Ala Thr Asn Ala Thr Asn Asn Gln Ser Thr Gln Val Ser Gln Ala
 50 55 60

Thr Ser Gln Pro Ile Asn Phe Gln Val Gln Lys Asp Gly Ser Ser Glu
 65 70 75 80

Lys Ser His Met Asp Asp Tyr Met Gln His Pro Gly Lys Val Ile Lys
 85 90 95

Gln Asn Asn Lys Tyr Tyr Phe Gln Thr Val Leu Asn Asn Ala Ser Phe
 100 105 110

Trp Lys Glu Tyr Lys Phe Tyr Asn Ala Asn Gln Glu Leu Ala Thr
 115 120 125

Thr Val Val Asn Asp Asn Lys Lys Ala Asp Thr Arg Thr Ile Asn Val
 130 135 140

Ala Val Glu Pro Gly Tyr Lys Ser Leu Thr Thr Lys Val His Ile Val
 145 150 155 160

Val Pro Gln Ile Asn Tyr Asn His Arg Tyr Thr Thr His Leu Glu Phe
 165 170 175

Glu Lys Ala Ile Pro Thr Leu Ala Asp Ala Ala Lys Pro Asn Asn Val

180	185	190
Lys Pro Val Gln Pro Lys Pro Ala Gln Pro Lys Thr Pro Thr Glu Gln		
195	200	205
Thr Lys Pro Val Gln Pro Lys Val Glu Lys Val Lys Pro Thr Val Thr		
210	215	220
Thr Thr Ser Lys Val Glu Asp Asn His Ser Thr Lys Val Val Ser Thr		
225	230	235
Asp Thr Thr Lys Asp Gln Thr Lys Thr Gln Thr Ala His Thr Val Lys		
245	250	255
Thr Ala Gln Thr Ala Gln Glu Gln Asn Lys Val Gln Thr Pro Val Lys		
260	265	270
Asp Val Ala Thr Ala Lys Ser Glu Ser Asn Asn Gln Ala Val Ser Asp		
275	280	285
Asn Lys Ser Gln Gln Thr Asn Lys Val Thr Lys His Asn Glu Thr Pro		
290	295	300
Lys Gln Ala Ser Lys Ala Lys Glu Leu Pro Lys Thr Gly Leu Thr Ser		
305	310	315
Val Asp Asn Phe Ile Ser Thr Val Ala Phe Ala Thr Leu Ala Leu Leu		
325	330	335
Gly Ser Leu Ser Leu Leu Leu Phe Lys Arg Lys Glu Ser Lys		
340	345	350

<210> 4
 <211> 1938
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 4
 atgaacaaac agcaaaaaga atttaaatca ttttattcaa ttagaaagtc atcactaggc 60
 gttgcattctg tagcgattag tacacttta ttattatgt caaatggcga agcacaagca 120
 gcagctgaag aaacagggtgg tacaaataca gaagcacaac caaaaactga agcagttgca 180
 agtccaacaa caacatctga aaaagctcca gaaactaac cagtagctaa tgctgtctca 240
 gtatctaata aagaagtta ggccttact tctgaaacaa aagaagctaa agaagttaaa 300
 gaagttaaag cccctaagga aacaaaagca gttaaaccag cagcaaaagc cactaacaat 360
 acatatccta ttttgaatca ggaacttaga gaagcgattt aaaaacctgc aataaaagat 420
 aaagatcata ggcacccaaa ctctcgatca attgattttg aatgaaaaa agaaaaatgg 480
 gagcaacaat ttatcatta tgccagctt gttaaacctg ctagagttat ttctactgat 540
 tcaaaaccag aaattgaatt aggattaca tcaggtcaat tttggagaaa atttgaagtt 600
 tatgaaggtg acaaaaagtt gccaattaaa ttagtatcat acgatactgt taaagattac 660
 gtttacattc gtttctctgt ttcaaatgga acaaaaagccg tttaaaattgt aagttcaact 720

cacttcaata acaaagaaga aaaatacgt tacacattaa tggaattcgc acaaccaatt 780
tataacagt cagataaatt caaaaactgaa gaagattata aagctgaaaa attattagcg 840
ccatataaaa aagcgaaaac actagaaaaga caagtttatg aattaaataa aattcaagat 900
aaacttcctg aaaaattaaa ggctgagttac aagaagaaaat tagaggatac aaagaaaagct 960
ttagatgagc aagtggaaatc agctattact gaattccaaa atgtacaacc aacaaatgaa 1020
aaaatgactg atttacaaga tacaaaatat gttgtttatg aaagtgttga gaataacgaa 1080
tctatgtatgg atactttgt taaacaccct attaaaaacag gtatgcttaa cggcaaaaaaa 1140
tatatggtca tggaaactac taatgacgt tactggaaag atttcatggt tgaaggtcaa 1200
cgtgttagaa ctataagcaa agatgctaaa aataatacta gaacaattat tttcccatat 1260
gttgaaggta aaactctata tgatgctatc gttaaagttc acgtaaaaac gattgattat 1320
gatggacaat accatgtcag aatcggtat aaaaagcat ttacaaaagc caataccgt 1380
aaatctaaca aaaaagaaca acaagataac tcagctaaga aggaagctac tccagctacg 1440
cctagcaaac caacaccatc acctgtgaa aaagaatcaca aaaaacaaga cagccaaaaaa 1500
gatgacaata aacaattacc aagtgttga aaaaagaaatg acgcattctag tgagtcagg 1560
aaagacaaaaa cgcctgctac aaaaaccaact aaaggtgaag tagaatcaag tagtacaact 1620
ccaactaagg tagtatctac gactcaaaaat gttgcaaaaac caacaactgc ttcattaaaa 1680
acaacaaaaag atgttgttca aacttcagca gttctagcg aagcaaaaaga tagtgctcca 1740
ttacaaaaag caaacattaa aaacacaaaat gatggacaca ctcaaaagcca aaacaataaa 1800
aatacacaag aaaataaaagc aaaatcatta ccacaaaactg gtgaagaatc aaataaaagat 1860
atgacattac cattaatggc attactagct ttaagtagca tcgttgcatt cgtattacct 1920
aaaaaacgta aaaactaa 1938

<210> 5
<211> 1938
<212> DNA
<213> *Staphylococcus aureus*

cttttgtca cttcataaaa cttcaaattt tctccaaaat tgacctgatt gtaatcctaa 1380
 ttcaatttctt ggtttgaat cagtgaaaat aactctagca ggtttaacag agctggcata 1440
 atgataaaat tggcgctac cattttctt tttcatttca aaatcaattt gacgagagtt 1500
 tggcgctca tgatctttat cttttattgc agggtttta atcgcttctc taagttcctg 1560
 attcaaaata ggatatgtat tggtagtggc ttttgcgt ggtttaactg cttttgttcc 1620
 cttaggggct ttaacttctt taacttctt agcttctttt gtttcaag taggggcctc 1680
 aacttcttta ttagatactg agacagcatt agctactggt ttagttctg gagcttttc 1740
 agatgttggtt gttggacttg caactgcttc agttttgggt tggcttctg tatttgcacc 1800
 acctgtttct tcagctgctg cttgtgctc gccatttgac attaataata aaagtgtact 1860
 aatcgctaca gatgcaacgc ctatgtatga ctttctaattt gaataaaatg atttaaattc 1920
 ttttgctgt ttgttcat 1938

<210> 6
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 6

Met	Asn	Lys	Gln	Gln	Lys	Glu	Phe	Lys	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ile	Arg	Lys
1									10					15	

Ser	Ser	Leu	Gly	Val	Ala	Ser	Val	Ala	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Leu	
									25					30	

Met	Ser	Asn	Gly	Glu	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Glu	Glu	Thr	Gly	Gly	Thr
												35		40	45

Asn	Thr	Glu	Ala	Gln	Pro	Lys	Thr	Glu	Ala	Val	Ala	Ser	Pro	Thr	Thr
												50		55	60

Thr	Ser	Glu	Lys	Ala	Pro	Glu	Thr	Lys	Pro	Val	Ala	Asn	Ala	Val	Ser
												65		70	75

Val	Ser	Asn	Lys	Glu	Val	Glu	Ala	Pro	Thr	Ser	Glu	Thr	Lys	Glu	Ala
												85		90	95

Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Lys	Ala	Pro	Lys	Glu	Thr	Lys	Ala	Val	Lys
												100		105	110

Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Tyr	Pro	Ile	Leu	Asn	Gln	Glu
												115		120	125

Leu	Arg	Glu	Ala	Ile	Lys	Asn	Pro	Ala	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	His	Ser
												130		135	140

Ala	Pro	Asn	Ser	Arg	Pro	Ile	Asp	Phe	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly
												145		150	155

Glu	Gln	Gln	Phe	Tyr	His	Tyr	Ala	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Ala	Arg	Val
												165		170	175

Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

180	185	190
Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro		
195	200	205
Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg		
210	215	220
Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Ala Val Lys Ile Val Ser Ser Thr		
225	230	235
His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe		
245	250	255
Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp		
260	265	270
Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu		
275	280	285
Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu		
290	295	300
Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala		
305	310	315
Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln		
325	330	335
Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val		
340	345	350
Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys		
355	360	365
His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met		
370	375	380
Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln		
385	390	395
Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile		
405	410	415
Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys		
420	425	430
Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile		
435	440	445
Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys		
450	455	460

Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
 465 470 475 480
 Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
 485 490 495
 Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
 500 505 510
 Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
 515 520 525
 Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540
 Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

<210> 7
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 7
 atgaaaata ttttaataca acgatttag cgttaattat catcatcg 60
 acattcagta attctgc当地 tgccgc当地 agcggtaactt tgaattatga ggtttacaaa 120
 tacaatacca atgacacgta aattgctaat gactattta ataaaccggc aaagtacatt 180
 aagaaaaatg gtaaattgta tggtaataa actgtcaacc acagtcatgg gattactgga 240
 atgagtatcg aaggacataa agaaaaatatt attagtaaaa acactgcca agatgaacgc 300
 acttctgaat ttgaagtaag taagttgaac ggtaaaatag atggaaaaat tgacgtttat 360
 atcgatgaaa aagtaaatgg aaagccattc aaatatgacc atcattacaa cattacatat 420
 aaatttaatg gaccaactga tgttagcagg gctaattgcac caggttaaga tgataaaaat 480

tctgcttcag gtagtgacaa aggatctgat ggaacgacta ctggtaaag tgaatcta 540
 agttcgaata aagacaaagt agaaaaatcca caaacaaatg ctggtacacc tgcataatata 600
 tatgaatac cagttgcattc ctttagcat ttaatcgcaa tcacattgtt tgttagaaaa 660
 aaatctaaag gcaatgtgga ataa 684

<210> 8
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 8
 ttattccaca ttgccttag attttttct aacaaacaat gtgattgcga ttaataatgc 60
 taaggatgca actggatttgc catatatata tgcagggtgtt ccagcatgg tttgtggatt 120
 ttctacttttgc tctttattcg aactatttgc ttcactttgc ccagtagtgc ttccatcaga 180
 tcctttgtca ctacatgttgc cagaattttt atcatcttgc cctgggtgc tagcacctgc 240
 tacatcgatt ggtccattaa atttataatgtt aatgttgcattt tgatgggtcat atttgaatgg 300
 ctttccattt acttttgcattt cgtatataaac gtcaattttt ccattttt taccgttcaa 360
 cttacttact tcaaatttgc aagtgcgttc atcttggca gtgttttac taataatattt 420
 ttctttatgtt ctttcgatac tcattccattt aatccatgc ctgtgggttgc cagttatttgc 480
 aacatataat ttaccattttt tcttaatgtt ctttgcgggt ttattttttt agtcatttgc 540
 aattgacgttgc tcattggat tttttttttt aacctcataa ttcaaagtttgc cgctatctgc 600
 ggcatttgcga gaattacttgc atgtgcgttgc gatgataattt aacgctaaaa tcgttgcattt 660
 aaaaactttt aaaaatattttt tcattt 684

<210> 9
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 9
 Met Lys Asn Ile Leu Lys Val Phe Asn Thr Thr Ile Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Ile Ile Ile Ala Thr Phe Ser Asn Ser Ala Asn Ala Asp Ser Gly
 20 25 30
 Thr Leu Asn Tyr Glu Val Tyr Lys Tyr Asn Thr Asn Asp Thr Ser Ile
 35 40 45
 Ala Asn Asp Tyr Phe Asn Lys Pro Ala Lys Tyr Ile Lys Lys Asn Gly
 50 55 60
 Lys Leu Tyr Val Gln Ile Thr Val Asn His Ser His Trp Ile Thr Gly
 65 70 75 80
 Met Ser Ile Glu Gly His Lys Glu Asn Ile Ile Ser Lys Asn Thr Ala
 85 90 95
 Lys Asp Glu Arg Thr Ser Glu Phe Val Ser Lys Leu Asn Gly Lys

100	105	110
Ile Asp Gly Lys Ile Asp Val Tyr Ile Asp Glu Lys Val Asn Gly Lys		
115	120	125
Pro Phe Lys Tyr Asp His His Tyr Asn Ile Thr Tyr Lys Phe Asn Gly		
130	135	140
Pro Thr Asp Val Ala Gly Ala Asn Ala Pro Gly Lys Asp Asp Lys Asn		
145	150	155
Ser Ala Ser Gly Ser Asp Lys Gly Ser Asp Gly Thr Thr Gly Gln		
165	170	175
Ser Glu Ser Asn Ser Asn Lys Asp Lys Val Glu Asn Pro Gln Thr		
180	185	190
Asn Ala Gly Thr Pro Ala Tyr Ile Tyr Ala Ile Pro Val Ala Ser Leu		
195	200	205
Ala Leu Leu Ile Ala Ile Thr Leu Phe Val Arg Lys Lys Ser Lys Gly		
210	215	220
Asn Val Glu		
225		

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide motif

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> variable amino acid residue

<400> 10
Leu Pro Xaa Thr Gly

1	5
---	---

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide motif

<400> 11

Asn Pro Gln Thr Asn

1 5

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 12

Lys Asp Glu Leu

1