(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-532612
(P2004-532612A)
(43)公表日　平成16年10月28日(2004.10.28)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A61K 38/00	A61K 45/00		4B024
A61K 45/00	A61K 48/00		4B063
A61K 48/00	A61P 31/04		4B065
A61P 31/04	C07K 14/31		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 194 頁）　最終頁に続く

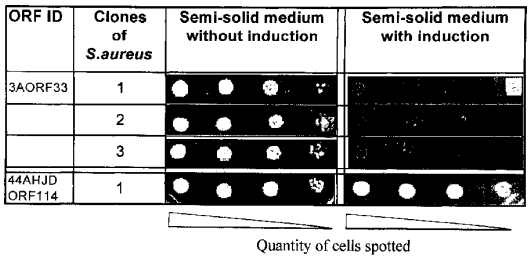
(21)出願番号　特願2002-551999(P2002-551999)
(86)(22)出願日　平成13年12月19日(2001.12.19)
(85)翻訳文提出日　平成15年6月20日(2003.6.20)
(86)国際出願番号　PCT/CA2001/001847
(87)国際公開番号　WO2002/050106
(87)国際公開日　平成14年6月27日(2002.6.27)
(31)優先権主張番号　60/256,489
(32)優先日　平成12年12月20日(2000.12.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　503223854
フェージテック・インコーポレーテッド
カナダ国　エイチ　４　エス　２　エー　１　ケベック州　セント　ローレント，フレデリック　バンティング７１７０
(74)代理人　230104019
弁護士　大野　聖二
(74)代理人　100106840
弁理士　森田　耕司
(74)代理人　100105991
弁理士　田中　玲子
(72)発明者　ペレティア，ジェリー
カナダ国　エイチ　９　エックス　３　ビー　１　ケベック州　バイエ　ダルフェ，レイクビュー　８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】本質的な黄色ブドウ球菌遺伝子およびそのエンコードされるタンパク質ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４を伴う組成物および方法。

(57)【要約】
本発明は、脂肪酸／リン脂質生合成の工程に関与する細菌遺伝子およびタンパク質に、並びに、脂肪酸／リン脂質生合成に関与する細菌タンパク質と相互作用するバクテリオファージ遺伝子およびそれらのタンパク質産物にも、関連する。より具体的には、本発明は、本質的な黄色ブドウ球菌遺伝子およびそのエンコードされるタンパク質ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４を伴う組成物および方法に関連する。さらに、本発明は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のレベルおよび／または活性を調節する化合物を同定するスクリーニングアッセイ、およびそのような化合物に関連する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２のアミノ酸配列からなる、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリペプチド。
【請求項２】
請求項１のアミノ酸配列と少なくとも５５％の同一性を有する、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリペプチド。
【請求項３】
請求項１のアミノ酸配列と少なくとも６０％の同一性を有する、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリペプチド。
【請求項４】
請求項１のアミノ酸配列と少なくとも７５％の同一性を有する、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリペプチド。
【請求項５】
配列番号２のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体。
【請求項６】
請求項５のアミノ酸配列と少なくとも５５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリペプチド。
【請求項７】
請求項５のアミノ酸配列と少なくとも６０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリペプチド。
【請求項８】
配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも５５％の同一性を有する、単離され、精製され、若しくは濃縮された、少なくとも５０アミノ酸長のポリペプチド。
【請求項９】
配列番号１で表されるヌクレオチド配列からなる、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリヌクレオチド、または前記ポリヌクレオチド配列の相補鎖。
【請求項１０】
請求項５のポリペプチドをエンコードする、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリヌクレオチド配列、または前記ポリヌクレオチド配列の相補鎖。
【請求項１１】
配列番号１を含む、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリヌクレオチド、またはそれらの相補鎖。
【請求項１２】
配列番号１で表される配列と少なくとも６５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリヌクレオチド、または前記ポリヌクレオチドの相補鎖。
【請求項１３】
請求項１ないし８のポリペプチドのいずれか１つをエンコードするヌクレオチド配列を含む、単離され、精製され、若しくは濃縮されたポリヌクレオチド。
【請求項１４】
配列番号２のアミノ酸配列を含む生物学的に活性なＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性な化合物、およびそれらの生物学的に活性な変異体を同定する方法であって、前記方法は、
前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドを候補化合物と接触させること、および
前記化合物の前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドへの結合；およびそれらの生物学的活性；の１つを検出することを含み、
ここで、化合物の前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドへの前記結合、または前記候補物質が存在しない場合に比べた存在する場合の前記それらの生物学的活性の減少が、前記候補

化合物がＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性のある化合物であることを示す、
方法。
【請求項１５】
前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドが前記バクテリオファージポリペプチド配列に同時に接触する、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記結合、または生物学的活性の前記減少、が前記候補化合物の存在および不存在下で実行される、請求項１４または１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記バクテリオファージポリペプチド配列が以下からなる群より選ばれる、請求項１４ないし１６のいずれかに記載の方法：
ａ）配列番号４；および
ｂ）配列番号２に特異的に結合するａ）のフラグメントまたは変異体。
【請求項１８】
前記検出が、候補化合物の前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドへの結合を測定することを含み、その化合物が直接的にまたは間接的に検出可能にラベル化されている、請求項１４ないし１７のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
同じものと特異的に相互作用するＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドおよびバクテリオファージポリペプチドのうちの１つに対して活性のある化合物を同定する以下を含む方法：
配列番号２のアミノ酸配列を含む前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはそれらの変異体を、候補化合物に接触させること；ここで、前記バクテリオファージポリペプチドが、
ａ）配列番号４；および
ｂ）ａ）のフラグメントまたは変異体がその生物学的活性を維持する、ａ）のフラグメントまたは変異体、
からなる群より選ばれ；そして
前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドおよび／または前記バクテリオファージポリペプチドの生物学的活性を検出すること；ここで、候補化合物の存在下におけるそれらの生物学的活性の減少が、前記候補化合物が前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および／またはバクテリオファージポリペプチドのうちの１つに対して活性のある化合物であることを示す、
方法。
【請求項２０】
ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に対して活性のある化合物を同定する、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記検出が、前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの前記バクテリオファージポリペプチドへの結合を測定する動作を含み、ここで前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたは前記バクテリオファージポリペプチドが直接的にまたは間接的に検出可能にラベル化されている、請求項１９または２０に記載の方法。
【請求項２２】
生物学的に活性なＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性のある化合物を同定する方法であって、前記方法は、
候補化合物を配列番号２のアミノ酸を含む前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、または生物学的に活性なフラグメント、を発現している細胞に接触させること、および
前記細胞中でＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性を測定すること、を含み、
ここで、前記候補化合物の存在下における前記細胞中の前記活性の減少が、前記化合物によるＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性の阻害を示す、
方法。
【請求項２３】
請求項１４ないし２２の方法のいずれか１つにより同定される、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド若しくはそれらのフラグメント、または前記ポリペプチド若しくはそれらのフラグ

メントをエンコードする核酸、の活性のアゴニスト若しくはアンタゴニスト。
【請求項２４】
前記検出が、時間分解蛍光共鳴エネルギー転移（ＴＲ－ＦＲＥＴ）による測定を含む、請求項１４ないし２１のいずれかに記載の方法。
【請求項２５】
前記検出が、蛍光偏光変化の測定を含む、請求項１４ないし２１のいずれかに記載の方法。
【請求項２６】
前記検出が、表面プラスモン共鳴による測定を含む、請求項１４ないし２１のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
前記検出が、シンチレーション近接アッセイを含む、請求項１４ないし２１のいずれかに記載の方法。
【請求項２８】
前記検出が、バイオセンサーアッセイを含む、請求項１４ないし２１のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
前記検出が、ファージディスプレイによる測定を含む、請求項１４ないし２１のいずれかに記載の方法。
【請求項３０】
ａ）配列番号２、
ｂ）生物学的に活性なａ）のフラグメントまたは変異体、
ｃ）ａ）およびｂ）の前記ポリペプチドのいずれかをエンコードする核酸、
から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して活性のある化合物を同定すること、
前記ポリペプチドまたは同じものをエンコードする核酸を自然に産生する細菌により感染された、または感染の危険のある生物に投与したときに、治療効果を提供するのに充分な量の前記活性化合物を合成または精製すること、
を含む、抗菌化合物の製造方法。
【請求項３１】
細菌を、ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含む黄色ブドウ球菌ポリペプチドまたはそれらのフラグメント若しくは変異体、ｂ）ａ）のポリペプチドをエンコードする核酸、のうちの１つに対して活性のある化合物に接触させることを含む、細菌を阻害する方法。
【請求項３２】
感染を患っているまたはそれらを患う危険性のある動物において細菌感染を処置または予防する方法であって、ａ）配列番号２またはそれらのフラグメント若しくは変異体、ｂ）ａ）の前記アミノ酸配列をエンコードする核酸、のうちの１つのアミノ酸配列を含む黄色ブドウ球菌ポリペプチドに対して活性のある、治療的に有効量のまたは予防的に有効量の化合物を前記動物に投与することを含む、方法。
【請求項３３】
哺乳動物への移植前に、内在装置を配列番号２のアミノ酸配列を含む黄色ブドウ球菌ポリペプチドに対して活性のある化合物と接触させることを含む、細菌感染を予防するための予防処置方法であって、このような接触が移植部位における黄色ブドウ球菌の感染を予防するのに充分である方法。
【請求項３４】
配列番号２のアミノ酸配列、それらのフラグメント若しくは変異体、または前記ポリペプチドをエンコードする遺伝子、の１つを含む黄色ブドウ球菌ポリペプチドに対して活性のある化合物を、哺乳動物組織の組織表面への細菌の吸着を低下させるのに充分な量を、動物に投与することを含む、細菌による動物の感染を予防するための予防処置方法。
【請求項３５】

前記活性化合物が、小分子、ペプチド疑似化合物、およびバクテリオファージ阻害タンパク質のフラグメント若しくは誘導体から成る群より選ばれる、請求項１４ないし２２、または２４ないし３４のいずれかに記載の方法。
【請求項３６】
前記活性化合物が、発現系により合成され精製されたペプチド、または人工的に合成されたものである、請求項１４ないし２２、または２４ないし３４のいずれかに記載の方法。
【請求項３７】
前記化合物が、
ａ）配列番号４、および
ｂ）ａ）のフラグメントまたは変異体であって、前記それらのフラグメントまたは変異体が、配列番号２、それらのフラグメント若しくは変異体、の１つと相互作用する特異的結合能力を維持するフラグメントまたは変異体、
からなる群より選ばれる、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記接触が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる、請求項３１、３３、３５、３６または３７のいずれかに記載の方法。
【請求項３９】
前記接触が、動物のｉｎ　ｖｉｖｏで行われる、請求項３１、３２、３４ないし３６、または３７のいずれかに記載の方法。
【請求項４０】
前記接触が、既存の抗菌剤と組み合わせて行われる、請求項３１ないし３８のいずれかに記載の方法。
【請求項４１】
前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドが、配列番号２で示されるアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体を含む、請求項１４ないし２２、２３、２４ないし２９、または３５ないし３７のいずれかに記載の方法。
【請求項４２】
単離され、精製され、または濃縮された、バクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３にエンコードされるポリペプチド；および配列番号２で示されるアミノ酸配列またはそれらのフラグメント若しくは変異体を含む黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、を含む組成物。
【請求項４３】
特異的に相互作用するドメインのペアを含む組成物であって、前記ペアが、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、および前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドと特異的に相互作用するバクテリオファージＯＲＦによってエンコードされたポリペプチド、を含む組成物。
【請求項４４】
前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドが配列番号２で示されるアミノ酸配列を含み、前記バクテリオファージＯＲＦが配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４５】
前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドが、配列番号２で示されるアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体を含む、請求項４３または４４に記載の組成物。
【請求項４６】
ａ）配列番号２のアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体を含むポリペプチドに対して活性な化合物についてのスクリーニングアッセイを実行することにより、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性な化合物を同定すること、および
ｂ）ａ）で同定された化合物を適当な医薬キャリアと混合すること、
を含む、医薬組成物の製造方法。

【請求項４７】
前記バクテリオファージＯＲＦが、配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む、請求項４６に記載の製造方法。
【請求項４８】
前記ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドが、配列番号２で示されるアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体を含む、請求項４６または４７に記載の製造方法。
【請求項４９】
ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性のある化合物の同定のための、
ａ）配列番号２のアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体を含むＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド；
ｂ）ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくはそれらの変異体、およびＳＴＡＡＵ＿Ｒ４と特異的に相互作用するバクテリオファージＯＲＦによってエンコードされるポリペプチド、を含む特異的に相互作用するドメインのペアを含む組成物；
ｃ）ｉ）配列番号２のアミノ酸配列、またはｉｉ）ｉ）の生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体、のうちの１つを含む第１のポリペプチド、およびｉ）またはｉｉ）のうちの１つと特異的に相互作用するバクテリオファージＯＲＦによってエンコードされる第２のポリペプチド、を含むアッセイ混合物；
のうちの１つの使用。
【請求項５０】
個体における黄色ブドウ球菌による感染を診断する方法であって、
前記個体における黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの存在を測定すること、
を含む方法。
【請求項５１】
前記測定する工程が、前記個体の生物学的サンプルを黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに存在するエピトープに対して特異的な抗体と接触させることを含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
個体における黄色ブドウ球菌による感染を診断する方法であって、
前記個体における黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドをエンコードする核酸配列の存在を測定すること、
を含む方法。
【請求項５３】
前記測定する工程が、前記個体の核酸サンプルを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号１の配列、またはプローブの相補鎖、にハイブリダイズする少なくとも１５ヌクレオチド長のプローブと接触させることを含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
単離され、精製され、または濃縮された、配列番号２由来のポリペプチドに対して特異的な抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、脂肪酸／リン脂質生合成の工程に関与する細菌遺伝子およびタンパク質に、並びに、脂肪酸／リン脂質生合成に関与する細菌タンパク質と相互作用するバクテリオファージ遺伝子およびそれらのタンパク質産物にも、関連する。より具体的には、本発明は、本質的な黄色ブドウ球菌遺伝子およびそのエンコードされるタンパク質ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４を伴う組成物および方法に関連する。さらに、本発明は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のレベルおよび／または活性を調節する化合物を同定するスクリーニングアッセイ、およびそのような

化合物に関連する。
【背景技術】
【０００２】
ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ）は、ヒトにおいていくつかの型の疾患の原因として知られる細菌の医学的に重要な属を構成する。黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓまたはＳ．ａｕｒｅｕｓ）は、健康なヒト宿主の皮膚に見出されるグラム陽性生物であり、多くの菌血症の原因となる。
【０００３】
黄色ブドウ球菌は、過去においてはペニシリン誘導のメチシリンによりうまく処置されてきたが、現在この抗生物質に対して次第に耐性となってきた（ＭＲＳＡ－メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）［Ｈａｒｂａｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ａｒｃｈ．Ｉｎｔｅｒｎ．Ｍｅｄ．１５８：１８２－１８９］。例えば、黄色ブドウ球菌心内膜炎の死亡率は２６－４５％を占め、β－ラクタム／アミノグリコシドの組み合わせ治療は疾患の根絶において次第に効果がなくなってきたことが明らかとなっている［Ｒｏｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ａｒｃｈ．Ｉｎｔｅｒｎ．Ｍｅｄ．１５９：４６２－４６９］。
【０００４】
ほとんどの標準的な抗菌剤に耐性である黄色ブドウ球菌株を単離することは、もはやまれなことではなく、したがってこの生物に対する新規な抗菌剤、ワクチン、薬のスクリーニング方法、および診断試験に対する、未解決の医学的必要性および要望がある。抗生物質は、細胞内の非常に少ない標的に対する活性により、広い分類に分けられる。一般的に、標的分子は、本質的な機能を提供する細胞タンパク質である。本質的なタンパク質の活性の阻害は、細菌細胞の死、またはその増殖不能のいずれかをもたらす。抗生物質がこれに対して現在用いる決定的な細胞機能には、細胞壁の合成、葉酸および脂肪酸の代謝、タンパク質の合成、および核酸の合成がある。本発明において特に関連するのは、脂肪酸／リン脂質の生合成である。
【０００５】
新薬発見のための確立した手法には、細胞に基づく薬の発見から区別するために、標的に基づく薬の発見と呼ばれる、標的タンパク質を入手すること、およびタンパク質の生物学的機能を妨害するｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイを開発すること、がある。
【０００６】
新規の細菌の標的および新規の標的ドメイン、並びに、抗菌剤、より具体的には抗黄色ブドウ球菌剤をスクリーニングし、同定するために用いることができる黄色ブドウ球菌細菌標的、を同定することに対する必要性がある。新規の抗菌剤、ワクチン、薬のスクリーニング方法、診断および治療方法を同定することに対する必要性もある。
【０００７】
本発明は、これらおよび他の必要性を解決することを追求する。
【０００８】
本記載は、多数の文献を参照し、それらの内容は、引用することによりそれらの全体を本明細書に取り込むものとする。
【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【０００９】
（発明の概要）
本発明は、新規の抗菌剤、ワクチン、薬のスクリーニング方法、診断および治療方法に関連する。
【００１０】
より具体的には、本発明は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４と相互作用する化合物、特に黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドと相互作用する細菌成長阻害性（または阻害因子）バクテリオファージ遺伝子産物に関連する。
【００１１】

本発明はまた、相互作用するタンパク質、およびそれらの部分若しくはフラグメントのペアに関連する。より具体的には、本発明は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質の相互作用するドメインに、および同じものに相互作用し、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の生物学的活性を遮断若しくは阻害するタンパク質に、関連する。特定の態様として、本発明は、黄色ブドウ球菌バクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３のような、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４およびそれらと特異的に相互作用するバクテリオファージＯＲＦによってエンコードされたポリペプチドを含む、相互作用するドメインのペアに関連する。本発明の１つの特に好ましい態様として、これらのドメインの相互作用およびそれらの調節は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の生物学的機能の調節因子を、より具体的には抗菌剤を、同定するためのスクリーニングアッセイの基礎を形成する。

【００１２】

本発明はまた、サブユニットとしてＳＴＡＡＵ＿Ｒ４およびそれらの変異体および部分を含む、脂肪酸／リン脂質の生合成複製に関与すると信じられている多重タンパク質複合体のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに関連する。

【００１３】

他の見地として、本発明は、中でも細菌による疾患の処置および診断を含む、このようなポリペプチド、ポリヌクレオチド、ペプチド疑似物等を使用する方法に関連する。

【００１４】

さらなる見地として、本発明は、本発明により提供される物質を用いるアゴニストおよびアンタゴニストを同定する方法に関連する。関連する見地として、本発明は、細菌感染およびこのような感染に関係した症状を、同定されたアゴニストまたはアンタゴニストにより処置する方法に関連する。

【００１５】

またさらなる見地として、本発明は、細菌感染およびこのような感染に関係した症状に関係した疾患を検出するための診断アッセイに関連する。１つの態様として、診断アッセイは、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の発現および／または活性を検出する。

【００１６】

本発明の１つの特定の態様として、配列番号２のアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体を含むポリペプチドに対して活性のある化合物を同定する方法を提供し、ここで配列番号２またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体は、配列番号４、それらの生物学に活性なフラグメント、およびそれらの変異体から選ばれる配列を含むポリペプチドと特異的に結合でき、フラグメントまたは変異体は、配列番号２、それらのフラグメント若しくは変異体に結合する能力を保持している。

【００１７】

本発明の１つの好ましい態様として、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性な化合物の同定は、以下を含む方法により提供される：

候補化合物の存在または不存在下で第１および第２のポリペプチドを接触させること、ここで第１のポリペプチドは、配列番号２、それらのフラグメントまたは変異体のうちの１つと特異的に結合できるバクテリオファージＯＲＦ由来の第２のポリペプチドに特異的に結合する配列番号２のアミノ酸配列、それらのフラグメント若しくは変異体を含み、１つの特定の態様として、第２のポリペプチドは、ファージＯＲＦ、それらのフラグメント若しくはそれらの変異体であり、ここでこの第２のポリペプチドは、その生物学的活性を維持している；

第１および／または第２のポリペプチドの生物学的活性を検出すること、ここで候補化合物の不存在下での生物学的活性に比べたそれらの存在下での生物学的活性の減少は、候補化合物が配列番号２のアミノ酸配列、それらのフラグメントまたは変異体を含むポリペプチドに対して活性のある化合物であると同定するものである。

【００１８】

１つの特定の態様として、生物学的活性は第１および第２のポリペプチドがお互いに結合

することであり、その方法は以下を含む：
ａ）配列番号２のアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは変異体を含む第１のポリペプチド、およびｂ）配列番号４、それらのフラグメント、およびそれらの変異体からなる群より選ばれる第２のポリペプチド、を含むアッセイ混合物を接触させること； 候補化合物の不存在下での結合に比べたそれらの存在下での第１および第２のポリペプチドの結合を測定すること；ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、それらのフラグメントまたは変異体、と相互作用する候補化合物の能力を測定すること、ここで第１のポリペプチドと相互作用する候補化合物の不存在下での結合と比べた、それらの存在下での第１および第２のポリペプチドの結合の減少は、候補化合物がＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、それらのフラグメントまたは変異体に対して活性のある化合物であると同定するものである。一方好ましい態様として、この方法は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に対して活性な化合物を同定し、この方法は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に特異的に相互作用するバクテリオファージＯＲＦに対して活性な化合物も同定できる。

【００１９】
１つの態様として、検出する工程が、第１および第２のタンパク質の結合を測定する工程を含み、ここで第１または第２のタンパク質は直接的にまたは間接的に検出可能にラベル化されている。

【００２０】
本発明はまた、試験化合物が黄色ブドウ球菌ポリペプチド、主として配列番号２で示されるＳＴＡＡＵ＿Ｒ４またはそれらの部分に対して活性があるかどうかを測定することを含む、抗菌剤を同定する方法を範囲に含む。

【００２１】
さらなる態様として、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性のある化合物を同定することは、以下を含む方法により提供される：候補化合物を、配列番号２のアミノ酸配列、それらのフラグメントまたはそれらの変異体であって、フラグメントまたは変異体はその生物学的活性を保持しているもの、を含むポリペプチドに接触させること；それらに対する候補化合物の結合を検出すること、ここで結合の検出はその化合物がポリペプチドに対して活性があることを示すものである。

【００２２】
異なる態様として、検出工程は候補化合物のポリペプチドへの結合を測定することを含み、ここで候補化合物は、限定されないが、時間分解蛍光共鳴エネルギー変換（ＴＲ－ＦＲＥＴ）、蛍光偏光変化、表面プラスモン共鳴による測定、シンチレーション近接アッセイ、バイオセンサーアッセイ、およびファージディスプレイを含む方法により、直接的にまたは間接的に検出可能なようにラベル化される。

【００２３】
１つの態様として、化合物ライブラリーが用いられる。候補化合物の非限定の例には、小分子、ペプチド疑似化合物、ペプチド、およびバクテリオファージ阻害因子タンパク質のフラグメントまたは誘導体が含まれる。

【００２４】
１つの態様として、候補化合物は、発現系により合成され、精製され、または人工的に合成されたペプチドである。

【００２５】
本発明は、候補化合物（またはそれらのライブラリー）を配列番号２で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを発現している細胞と接触させること；細胞のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性を検出すること、ここで候補化合物と接触していない細胞のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性と比べた活性の減少が、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性阻害の指標となる；の工程を含む、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、それらのフラグメントまたは変異体に対して活性のある化合物を同定する方法を、さらに範囲に含む。本発明はまた、配列番号２のフラグメントまたは変異体を用いない、このような方法も範囲に含む。

【００２６】

もちろん、本発明は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法をさらに範囲に含み、ここで候補化合物と接触しない細胞のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性に比べた活性を増加させる化合物は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性の刺激因子である化合物として選択される。

【００２７】

本発明は、候補化合物（またはそれらのライブラリー）を細胞を必要としないアッセイにおいて、起源として自然発生したものおよび組み換えによるものいずれかのＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分と接触させる工程；ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性を検出する工程、ここで候補化合物と接触しない細胞を必要としないアッセイにおけるＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性と比べた活性の減少が、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性阻害の指標となる；を含む、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、それらのフラグメントまたは変異体に対して活性のある化合物を同定する方法を、さらに範囲に含む。

【００２８】

本発明は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはそのポリペプチドをエンコードする核酸若しくは遺伝子、の活性のアゴニストまたはアンタゴニストを、さらに範囲に含む。

【００２９】

ここで記載されるアッセイは、さらなる開発のための有望なリード化合物を検出するための初期のまたは第１のスクリーニングとして使用してもよい。同じアッセイは、候補化合物のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対する活性を測定する第２のスクリーニングアッセイにも用いてもよい。しばしば、リード化合物は、追加の異なるスクリーニングによりさらに評価されることとなる。この発明は、黄色ブドウ球菌株または他の適当な細菌を利用する生物学的アッセイを伴う第２のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４スクリーニングをも含む。

【００３０】

第３のスクリーニングは、動物における薬剤の効果の研究を伴うであろう。したがって、適切な動物モデルとしてここに記載されたように同定された薬剤をさらに使用することは、この発明の範囲に含まれる。例えば、ここで記載されたように同定された試験化合物（例えば、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４阻害剤、アンチセンスＳＴＡＡＵ＿Ｒ４核酸分子、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４特異的抗体、またはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４結合パートナー）を動物モデルで使用して、このような薬剤による処置の効果、毒性、または副作用を測定することができる。あるいは、ここで記載されたように同定された薬剤を動物モデルで使用して、このような薬剤の作用機序を決定することができる。さらに、この発明は、ここに記載されたように、（例えば細菌感染の）処置のための上述のスクリーニングアッセイにより同定された新規の薬剤の使用に関連する。

【００３１】

本発明は、以下の工程を含む抗菌化合物の製造方法をさらに範囲に含む：ａ）候補化合物が配列番号２のアミノ酸配列、それらのフラグメント若しくは変異体、を含むポリペプチド、またはそれらのポリペプチドをエンコードする遺伝子、に対して活性であるかどうかを測定すること、およびｂ）配列番号２のアミノ酸配列、それらのフラグメント若しくは変異体を含むポリペプチドを自然に産生する細菌に感染した生物に投与されたときに、治療効果を提供するのに充分な量の候補化合物を合成または精製すること。

【００３２】

本発明は、配列番号２のアミノ酸配列、それらのフラグメント若しくは変異体、を含むポリペプチド、またはそれらのポリペプチドをエンコードする核酸、に対して活性のある化合物を、細菌に接触させることを含む、細菌を阻害する方法をさらに範囲に含む。

【００３３】

１つの態様として、接触させる工程は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。

【００３４】

他の態様として、接触させる工程は、動物のｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。

【００３５】

他の態様として、細菌は、既存の抗菌剤との併用で活性化合物と接触させられる。したが

って、本発明は、既存の抗菌剤と併用して本発明の化合物を含む抗菌組成物にも関連する。もちろん、１以上の本発明の活性化合物を既存の抗菌剤と組み合わせても、または組み合わせなくてもよい。

【００３６】

本発明は、配列番号２のアミノ酸配列、それらの変異体若しくはフラグメントを含むポリペプチド、またはそれらをエンコードする核酸配列、に対して活性のある化合物の治療的または予防的に有効量を投与することを含む、感染を患うまたは患いやすい動物における細菌感染を処置または予防する方法を、さらに範囲に含む。動物は、好ましくは、必須ではないが哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。１つの態様として、活性化合物は、既存の抗菌剤と併用して動物に投与される。したがって、本発明は、既存の抗菌剤と併用して本発明の化合物を含む抗菌組成物にも関連する。

【００３７】

本発明は、哺乳動物に移植する前に、内在装置を配列番号２のアミノ酸配列、それらの変異体若しくはフラグメントを含むポリペプチドに対して活性のある化合物と接触させることを含む細菌感染を予防するための予防的処置方法をさらに範囲に含み、そのような接触は移植部位において黄色ブドウ球菌の感染を予防するのに充分なようになされる。

【００３８】

本発明は、配列番号２のアミノ酸配列、それらの変異体若しくはフラグメントを含むポリペプチド、またはそれらのポリペプチドをエンコードする遺伝子、に対して活性のある化合物の予防的に有効量で、動物の感染を予防するのに充分な量を動物に投与することを含む、細菌による動物の感染を予防するための予防的処置方法をさらに範囲に含む。特定の態様として、予防的に有効量は、細菌の哺乳動物の組織表面への吸着を低下させる。

【００３９】

本発明は、配列番号２のアミノ酸配列、それらの部分、それらの変異体、それらのフラグメント、それらのエピトープを含むポリペプチド、またはこれらをエンコードする核酸の動物中における存在を測定すること、を含む黄色ブドウ球菌に感染した動物の診断方法をさらに範囲に含む。好ましくはポリペプチドは、３Ａ　ＯＲＦ　３３と特異的に相互作用できるものである。好ましくは、動物はヒトである。

【００４０】

１つの態様として、測定する工程は、動物または個体の生物学的サンプルを、配列番号２のアミノ酸配列、それらの変異体若しくはフラグメントを含むポリペプチドに存在するエピトープに対して特異的な抗体と接触させることを含む。

【００４１】

本発明は、配列番号２のアミノ酸配列、それらの変異体若しくはフラグメントを含むポリペプチドをエンコードする核酸の動物または個体中における存在を測定することを含む、黄色ブドウ球菌に感染した動物または個体の診断方法をさらに範囲に含み、ここでポリペプチドは、３Ａ　ＯＲＦ　３３と特異的に相互作用できるものである。

【００４２】

１つの態様として、測定する工程は、動物または個体の核酸サンプルを、配列番号１の配列またはそれらの相補鎖とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも１５ヌクレオチド長の、単離され、精製され、または濃縮された核酸プローブと接触させることを含む。

【００４３】

本発明は、ポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列を含む、単離され、精製され、または濃縮されたポリヌクレオチドをさらに範囲に含み、そのポリペプチドは細菌の成長阻害性（または阻害因子）バクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３遺伝子産物またはそれらの部分と相互作用できる。

【００４４】

１つの特定の態様として、単離され、精製され、または濃縮されたポリヌクレオチドは、配列番号２に対応するポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列またはその相補鎖

を含む。

【００４５】

本発明の他の特定の態様として、単離され、精製され、または濃縮されたポリヌクレオチドは、配列番号１の配列またはその相補鎖と、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、そしてより好ましくは少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００４６】

本発明は、配列番号２のアミノ酸配列、それらの変異体若しくはフラグメントを含む、単離され、精製され、または濃縮されたポリペプチドをさらに範囲に含む。

【００４７】

本発明は、配列番号２のアミノ酸配列、それらの変異体若しくはフラグメントを含むかまたはこれらに存在する、単離され、精製され、または濃縮されたポリペプチドをさらに範囲に含む。

【００４８】

１つの特定の態様として、単離され、精製され、または濃縮されたポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列と、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、そしてより好ましくは少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはこれらから構成される。

【００４９】

１つの特定の態様として、単離され、精製され、または濃縮された本発明のポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列と、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも９０％、そしてより好ましくは少なくとも９５％または少なくとも９９％の類似性を有するアミノ酸配列を含むかまたはこれらから構成される。

【００５０】

１つの特定の態様として、配列番号２の配列、またはそれらのフラグメント若しくは変異体は、キメラタンパク質の部分である。

【００５１】

本発明は、配列番号２で示されるアミノ酸配列によりエンコードされるエピトープに特異的な、単離され、精製され、または濃縮された抗体をさらに範囲に含む。

【００５２】

本発明は、配列番号２またはその変異体若しくはフラグメントに対応するバクテリオファージによりエンコードされるポリペプチドおよび黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの、２つのポリペプチドを含む組成物をさらに範囲に含む。他の態様として、本発明は、バクテリオファージによりエンコードされるポリペプチドおよび黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド由来の２つの相互作用するポリペプチドを含む組成物をさらに範囲に含む。したがって、本発明は、これらの直接的に相互作用するポリペプチドをエンコードする２つの核酸配列を含む組成物を範囲に含む。

【００５３】

他の態様として、本発明は、特異的に相互作用するドメインのペアを含む組成物を範囲に含み、そのペアは、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドおよびＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドと特異的に相互作用するバクテリオファージＯＲＦによりエンコードされるポリペプチドを含む。

【００５４】

さらに、本発明は、ａ）配列番号２のアミノ酸配列、生物学的に活性なそれらのフラグメント、またはそれらの変異体を含むＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性のある化合物を同定することを目的とした本発明のスクリーニングアッセイを行うこと；およびｂ）ａ）で同定された化合物を適当な医薬キャリアと混合すること；を含む医薬組成物の製造方法を範囲に含む。

【００５５】
特定の態様として、医薬組成物を製造する方法は、ａ）バクテリオファージＯＲＦ由来の第２のポリペプチドに特異的に結合する配列番号２のアミノ酸配列、生物学的に活性なそれらのフラグメント、またはそれらの変異体を含む、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性のある化合物を同定すること；およびｂ）ａ）で同定された化合物を適当な医薬キャリアと混合すること；を含む。
【００５６】
医薬組成物を製造するこの方法のさらなる態様として、この方法は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対して活性のある同定された化合物を単離するための調製のスケールアップをさらに含む。医薬組成物を製造する方法のさらに他の態様として、調製された医薬組成物は、ａ）で同定された化合物の誘導体またはホモログを含む。
【００５７】
また、本発明は、配列番号２のアミノ酸配列、生物学的に活性なそれらのフラグメントまたはそれらの変異体を含むポリペプチドに対して活性のある化合物を同定するための；ａ）配列番号２のアミノ酸配列、生物学的に活性なそれらのフラグメントまたはそれらの変異体を含むＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド；ｂ）ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のポリペプチド、生物学的に活性なそれらのフラグメントまたはそれらの変異体と、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に特異的に相互作用するバクテリオファージＯＲＦによりエンコードされるポリペプチドとを含む、特異的に相互作用するドメインのペアを含む組成物；またはｃ）配列番号２のアミノ酸配列、生物学的に活性なそれらのフラグメントまたはそれらの変異体を含む第１のポリペプチド、およびお互いに特異的に相互作用するバクテリオファージＯＲＦによりエンコードされる第２のポリペプチド、を含むアッセイ混合物、のうちの１つの使用を範囲に含む。
【００５８】
本発明のさらに他の態様として、エンコードされたバクテリオファージＯＲＦ相互作用ドメインのバクテリオファージＯＲＦへの特異的結合を可能にするバクテリオファージＯＲＦ相互作用ドメイン、を含む単離されたポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列が提供され、その配列は非バクテリオファージＯＲＦ相互作用ドメインに突然変異させたものである。
【００５９】
本発明のさらなる特徴および有利な点は、態様に関する以下の記載、それらの図面、および特許請求の範囲からより完全に明らかとなるであろう。
【００６０】
本発明の他の目的、有利な点および特徴は、例示であり本発明の範囲を制限するように解釈してはならない添付の図面を参照しながら、以下の好ましい態様の非限定の記載を読むことにより、より明らかとなるであろう。
【００６１】
（好ましい態様の記載）
本発明は、例えば、スクリーニング、診断、および治療に有用な、黄色ブドウ球菌およびそれらの部分の本質的な遺伝子およびそのエンコードされたポリペプチドの発見に関連する。より具体的には、本発明は、以下により詳しく記載するように黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドおよびポリヌクレオチドにも関連し、また相互作用するポリペプチドのペアをエンコードするポリヌクレオチドのペア、ポリペプチドのペアそのもの、またはそれらの相互作用するドメインにも関連する。特定の態様として、そのペアは、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド若しくはそれらの相互作用するドメインおよび３Ａ　ＯＲＦ　３３若しくはそれらの相互作用するドメインを含む。１つの態様として、本発明は、配列番号１または配列番号２でそれぞれ示されるヌクレオチドまたはアミノ酸配列を有するＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に関連する。当業者は、このような配列が一般的にリボポリヌクレオチド等のポリヌクレオチドにも有用に適用できることを認識するので、配列番号１および２で示される配列は、本発明の例を示すものである。

【００６２】
２つの以前の発明の方法論（１９９８年１２月３日に出願された米国仮特許出願６０／１１０，９９２、および１９９９年１２月３日に出願されたＰＣＴ国際出願ＷＯ１９９９／ＩＢ９９／０２０４０）を用いて、黄色ブドウ球菌からの本質的なポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列を同定し特徴づけた。
【００６３】
したがって、本発明の特定の態様として、抗菌活性を有する化合物を同定するための薬のスクリーニングアッセイに用いることのできる、黄色ブドウ球菌から単離されたポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列が提供される。ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、ここに記載されたものと同様の方法、または他の方法を用いて単離することができる。さらに、このようなポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、化学的に合成できる。バクテリオファージに対する標的としての黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４配列の同定は、細菌の標的を同定するための本発明の手法を検証し、抗菌薬開発およびそれらに基づく診断および処置方法に対する鍵となる標的としてのＳＴＡＡＵ＿Ｒ４をも検証することとなる。
【００６４】
（定義）
本記載に用いられる用語の明確且つ一致した理解を提供するために、多くの定義を以下に提供する。
【００６５】
「活性のある」の用語は、特定の遺伝子の産物のような特定の細胞標的に関連して用いられる場合、標的が、その標的および細胞経路で作用する薬剤または化合物を含むその経路の重要な部分であることを意味する。したがって、いくつかの場合では、薬剤または化合物は、その経路の調節因子またはその経路の成分等の、定まった標的の上流または下流の成分に（即ち標的に間接的に）作用してもよい。一般的に、抗菌剤は、本質的な細胞機能、しばしば本質的な遺伝子産物に対し（即ち標的に直接的に）活性がある。
【００６６】
「活性のある」の用語は、（化合物の不存在下での標的の活性と比較した場合に）活性のある標的への測定可能な化合物の効果をも指す。それらに対して示される活性は、本発明のポリペプチドの１つの生物学的活性のいずれでもよい。
【００６７】
ここで用いられる場合、「阻害する」、「阻害」、「阻害性」、および「阻害因子」の語はすべて、生物学的活性または機能を低下させる機能を指す。活性または機能のこのような低下は、例えば、細胞成分（例えば酵素）と関係し、細胞工程（例えば特定のタンパク質の合成）と関係し、または細胞の全体の工程（例えば細胞の成長）と関係しうる。細胞の成長と関連して、阻害性効果は、殺菌性（細菌細胞を殺す）または静菌性（即ち細菌細胞の成長を止めるか少なくとも遅くさせる）でもよい。後者は、所定の時間にわたり阻害されない細胞と比べて株のより少ない細胞しか産生しないようにして細胞の成長を遅くさせるかまたは妨げる。分子の観点からは、このような阻害は、転写および／または翻訳および／または特異的細菌標的の安定性、のレベルを低下させることまたは削除すること、および／または特定の標的生体分子の活性の低下もしくは削除、に等しい。
【００６８】
ここで用いられる場合、「ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド」、「ｐｌｓＸポリペプチド」等の用語は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４（配列番号２）、それらの変異体若しくは黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の活性ドメインを含むポリペプチドを指す。ここで用いられる場合、「黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の活性ドメイン」、「ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の生物学的に活性なポリペプチド」等の語は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の活性を保持する黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のポリペプチドのフラグメント若しくは部分を指す。「ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド」の語は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４または他の非ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド配列に融合する黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４

の活性ドメインを含むことを意味する。

【００６９】

本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４または他のポリペプチドの「ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性」、「配列番号２のアミノ酸配列を含むポリペプチドの活性」、「ｐｌｓＸポリペプチド活性」、または「生物学的に活性」は、本発明の遺伝子、核酸配列、タンパク質またはポリペプチドの検出可能な生物学的活性として定義される。これには、本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４、またはファージＯＲＦの特異的な生物学的活性に起因するいずれの生理的機能も含まれる。生物学的活性の非限定の例は、直接的または間接的になされる。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の生物学的活性には、例えば、限定されないが、脂肪酸／リン脂質生合成の機能がある。生物学的活性には、化合物、基質、およびもちろん相互作用するタンパク質等の他の因子（ポリペプチドまたはその他）への単純な結合を含んでもよい。したがって、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４について、生物学的活性には、この分野で知られた技術により測定できるコンホメーション変化、リン酸化状態またはタンパク質の他の特徴のようなＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の標準的ないずれの生化学的測定値が含まれる。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４生物学的活性にはまた、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４遺伝子転写若しくは翻訳、またはこのような転写若しくは翻訳産物のいずれもの生物学的活性にも関連する活性が含まれる。本発明は、本発明の阻害性ポリペプチドとのＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の相互作用にも関連し、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４およびそれらのフラグメントの生物学的活性には、結合をモニターするアッセイおよびこれらのポリペプチドの他の生化学的測定値も含まれる。さらに、「生物学的活性」の用語は、確かに、本発明の相互作用タンパク質のドメインの相互作用に基づく測定値も含まれる（例えばＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のファージＯＲＦ相互作用ドメイン、またはそれらのファージＯＲＦドメインのＳＴＡＡＵ＿Ｒ４相互作用ドメイン）。「生物学的活性」の非限定の例には、以下の１またはそれ以上が含まれる：

【００７０】

ｉ）３Ａ　ＯＲＦ　３３ポリペプチドまたはそれらの部分を含むバクテリオファージ由来の細菌成長阻害性ＯＲＦへの結合。

本発明のポリペプチド間の結合の測定は、以下の記載または直接結合を測定するためのこの分野に知られた方法の１つにより行うことができる。本発明のある態様として、自動で、より具体的にはハイスループットで分析できる結合アッセイを提供することは有益であろうが、本発明はそのように限定されない。ここで提供される配列番号２のアミノ酸配列、若しくはそれらのフラグメントを含むポリペプチド、およびバクテリオファージタンパク質３Ａ　ＯＲＦ　３３若しくはそれらの部分の間の結合若しくは物理的相互作用は、結合に必要な配列から本質的に構成された単離されたポリペプチド間でおこり、または、その代わりに、それぞれのポリペプチド配列が大きなポリペプチド内に含まれうる。

【００７１】

配列番号２のアミノ酸配列若しくはそれらのフラグメントを含むポリペプチドへのバクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３の結合を測定するための、本発明に有用な多数の非限定の方法を以下に示す。結合は、１つの分子を、膜、ミクロタイタープレートウェル、またはミクロアレイチップのような表面若しくは担体に結合させ、限定されないが光学分光計、蛍光計、および放射性ラベル検出等の種々の手段により第２の分子の結合をモニターすることにより、測定できる。

【００７２】

例えば、時間分解蛍光共鳴エネルギー転移（ＴＲ－ＦＲＥＴ）は、２つのフルオロフォアに極接近するものであり、トリプトファンのような天然に蛍光のアミノ酸残基の場合のように固有のものであるか、または別個の分子に共有結合的若しくは非共有結合的に結合したいずれかの場合であるかによって、１つのフルオロフォアのスペクトルが第２のものの励起スペクトルに重なるような放射が起こり、そしてたった１つのフルオロフォアの励起に続く２つの蛍光は、結合の指標となる。本発明に有用なさらなるアッセイとしては蛍光偏光があり、これは所定の蛍光タグ化分子の定量可能な偏光値が第２の分子への結合により変化するものである。表面プラスモン共鳴アッセイは、水相からセンサーに固定化され

た第２のものへの１つのタンパク質の結合により生じた固定化されたセンサー近くの質量変化により、２つの分子間の結合を測定する定量的方法として用いることができる。シンチレーション近接アッセイを用いて、シンチラント近接でのそれらの結合が放射性粒子をシンチレーションカウンタや他の検出器により検出される光子シグナルに変換する、配列番号２のアミノ酸配列、およびそれらのフラグメント、並びにバクテリオファージＯＲＦ若しくはそれらのフラグメントを含むポリペプチドの結合を測定することもできる。さらに、結合は、バイオセンサーアッセイによって評価でき、これは結合に続くイオンチャネルの調節により引き起こされるアドミッタンスの変化を記録するセンサーの能力に基づいている。ファージディスプレイも、色測定ＥＬＩＳＡ（酵素結合イムノソルベントアッセイ）を用いるタンパク質：タンパク質相互作用を測定するための強力な定量的アッセイである。

【００７３】

ｉｉ）グリセロール－３－リン酸要求性の補完

本発明に有用な方法は、ｐｌｓＢ２６およびｐｌｓＸ５０変異を有するＥ．ｃｏｌｉ株のグリセロール－３－リン酸要求性を取り除くＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの能力を測定するものである。２つの異なる座、ｐｌｓＢおよびｐｌｓＸに変異を有するＥ．ｃｏｌｉの株は、その成長のために培地中のグリセロール－３－リン酸の存在に依存する。野生型ＰｌｓＸをエンコードするポリヌクレオチド配列のこの株への導入は、グリセロール－３－リン酸成長要求を回避する。株は、グリセロール－３－リン酸を含む最小培地と含まないもので同時に培養ことにより、それらの要求性を取り除くことについて評価される。グリセロール－３－リン酸を欠いたプレート上での成長は、要求性表現型の補完を示す。

【００７４】

このアッセイは、グラム陰性菌Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ並びにグラム陽性菌Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｕｔｙｒｉｃｕｍおよびＢａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉ等の、他の細菌種からのＥ．ｃｏｌｉ ｐｌｓＸのホモログが、Ｅ．ｃｏｌｉ中のＰｌｓＸに機能的に置き換わることができるかどうかを評価するのに有用であることがわかった。同様のアッセイが、黄色ブドウ球菌からのＰｌｓＸの活性を試験するため、およびこのような活性の阻害因子をスクリーニングするために開発できる。

【００７５】

ここで用いられる場合、「ポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド」の語またはそれと等価な言葉は、本発明のポリペプチド、特に細菌のポリペプチド、より具体的には図１に示す配列番号２のアミノ酸配列を有する黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質のポリペプチドをエンコードする配列を含むポリヌクレオチドを範囲に含む。この語は、コードおよび／または非コード配列も含みうるさらなる領域とともに、ポリペプチドをエンコードする単一の連続領域若しくは不連続領域（例えば、統合されたファージ、統合された挿入配列、統合されたベクター配列、統合されたトランスポゾン配列、またはＲＮＡ編集若しくはゲノムＤＮＡの組み換えにより変化した他のものにより割り込まれたポリヌクレオチド）を含む、ポリヌクレオチドも範囲に含む。

【００７６】

ここで用いられる場合、「ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４遺伝子」「ＰｌｓＸ遺伝子」の語は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドを範囲に含むことを意味する。黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドをエンコードするＲＮＡの直接の転写に必要なさらなるヌクレオチド配列は、細胞中またはｉｎ ｖｉｔｒｏのいずれかにおいて、「調節配列」と呼ばれ、これは、限定されないが転写プロモーターおよびエンハンサー、並びに転写ターミネーターを含む。

【００７７】

ここで用いられる場合、「ＯＲＦ ３３」、「ファージ３Ａ ＯＲＦ ３３」または「３Ａ ＯＲＦ ３３」の語は、図２（配列番号３）に提供される配列を含むかまたかこれからなるポリヌクレオチドを範囲に含み、これは３Ａ ＯＲＦ ３３遺伝子産物として知られる遺伝子産物をエンコードする。

【００７８】
ここで用いられる場合、「ポリヌクレオチド」の語は、一般的にいずれものポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指し、これは未修飾のＲＮＡ若しくはＤＮＡまたは修飾されたＲＮＡもしくはＤＮＡでもよい。「ポリヌクレオチド」には、限定されないが、１本鎖および２本鎖ＤＮＡ；１本鎖および２本鎖領域、または１本鎖、２本鎖、および３本鎖領域の混合物であるＤＮＡ；１本鎖および２本鎖ＲＮＡ；１本鎖および２本鎖領域の混合物であるＲＮＡ；１本鎖またはより典型的には２本鎖若しくは３本鎖領域または１本鎖および２本鎖領域の混合物でもよいＤＮＡおよびＲＮＡを含むハイブリッド分子、が含まれる。さらに、ここで用いられる場合、「ポリヌクレオチド」は、ＲＮＡもしくはＤＮＡ、またはＲＮＡとＤＮＡの両方を含む３本鎖領域を指す。このような領域の鎖は、同じ分子からでも、または異なる分子からでもよい。この領域は、その分子の１またはそれ以上のすべてを含んでもよいが、より典型的にはいくつかのその分子の領域のみを伴う。３重らせん領域の分子の１つは、しばしばオリゴヌクレオチドである。ここで用いられる場合、「ポリヌクレオチド」の語には、１またはそれ以上の修飾された塩基を含む上述したＤＮＡまたはＲＮＡも含まれる。したがって、安定性や他の理由により修飾された骨格を有するＤＮＡまたはＲＮＡは、その語がここで意図されるような「ポリヌクレオチド」である。さらに、イノシンのような一般的でない塩基やトリチル化塩基のような修飾された塩基を含むＤＮＡまたはＲＮＡは、ちょうど２つの例として指名するが、ここでその語が用いられるようにポリヌクレオチドである。当業者に知られた多くの有用な目的を提供するＤＮＡまたはＲＮＡに対してなされる多数の修飾が、認識されるであろう。ここで利用される「ポリヌクレオチド」の語は、ポリヌクレオチドのこのような化学的、酵素的、または代謝的に修飾された形態を、また同様に例えば単純および複合細胞等のウイルスおよび細胞のＤＮＡおよびＲＮＡの特徴の化学的形態を、包含する。「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる短いポリヌクレオチドも包含する。ポリヌクレオチドは、ＤＮＡおよびＲＮＡのキメラであってもよい。

【００７９】
ここで用いられる場合、「ポリペプチド」の語は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合によりお互い結合した２またはそれ以上のアミノ酸を含むいずれものペプチドまたはタンパク質を指す。「ポリペプチド」は、一般的にペプチド、オリゴペプチド、およびオリゴマーと呼ばれる短鎖のもの、並びに一般的にタンパク質と呼ばれる長鎖のものの両方を指す。ポリペプチドは、２０の、遺伝子によりエンコードされたアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。「ポリペプチド」は、プロセシングや他の翻訳後修飾のような自然の工程だけでなく、化学的修飾技術によって修飾されたものも含む。このような修飾は、基本的な教科書およびより詳細な論文、さらに多数の研究論文によく記載されており、これらは当業者によく知られている。修飾のいくつかの型が所定のポリペプチドのいくつかの部位で同様にまたは異なる度合いで存在しうることが認識されることとなる。また、所定のポリペプチドは、多くの型の修飾を含んでもよい。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノまたはカルボキシル末端等のポリペプチドのいずれの場所でも起こりうる。修飾には、例えば、アセチル化、アシル化、ＡＤＰリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部位の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、ＧＰＩアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解工程、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマカルボキシル化、ヒドロキシル化、セレノイル化、アルギニル化のような硫酸化およびトランスファーＲＮＡ媒介のタンパク質へのアミノ酸の付加、およびユビキチン化が含まれる。例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ－Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，第２版，Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）；Ｗｏｌｄ，Ｆ．，Ｐｏｓｔｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ

al Protein Modifications：Perspectives and Prospects, pgs. 1－12 in Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York（1983）；Seifter et al., Meth. Enzymol. 182：626－646（1990）；およびRattan et al., Protein Synthesis：Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663：48－62（1992）を参照のこと。ポリペプチドは、枝分かれしていても環状でもよく、側鎖を有していてもいなくてもよい。環状、枝分かれした、および枝分かれして環状のポリペプチドは、翻訳後の自然の工程の結果であっても、同様に、全合成方法によって作成されてもよい。

【００８０】

ここで用いられる場合、「変異体」の語は、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるそれぞれポリヌクレオチドまたはポリペプチドであるが、本発明の最初の（例えば非変異体の）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド（例えば、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４）の１またはそれ以上の生物学的活性を保持しているもの、を指す。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、一方の参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列において異なる。変異体のヌクレオチド配列の変化は、参照ポリヌクレオチドによりエンコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変えても変えなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、参照配列によりエンコードされるポリペプチドまたは後述する融合タンパク質の形態におけるアミノ酸の置換、付加、欠失、およびトランケーションをもたらしうる。ポリペプチドの典型的な変異体は、一方の参照ポリペプチドとアミノ酸配列において異なる。一般的に、その相違は、参照ポリペプチドと変異体の配列が全体として極似ており、多くの領域において同一であるように限定される。変異体と参照ポリペプチドは、１またはそれ以上の置換、付加、欠失のいずれもの組み合わせでアミノ酸配列において異なっていてもよい。置換されたまたは挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子コードによりエンコードされた１つであってもそうでなくてもよい。本発明はまた、本発明のポリペプチドのそれぞれの変異体を含み、それは残基が同様の特徴を有する他のものに置き換わる保存的アミノ酸置換により参照体から変化するポリペプチドである。典型的には、このような置換は、ＶａｌとＬｅｕおよびＩｌｅの間；ＳｅｒおよびＴｈｒの間；酸性残基のＡｓｐおよびＧｌｕの間；塩基性残基のＬｙｓおよびＡｒｇの間；芳香族残基のＰｈｅおよびＴｙｒの間で起こる。特に好ましくは、１～１０、１～５、１～３、２～３、または１つのアミノ酸について置換、欠失、または付加が、いずれもの組み合わせでも起こる変異体である。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子変異体のように自然発生するものでもよく、または自然発生すると知られていない変異体でもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの自然発生しない変異体は、変異誘発技術、直接合成、および当業者に知られた他の組み換え方法を用いて作成できる。ここで用いられる場合、「フラグメント」の語は、ポリペプチドと関連して用いられるときは、それが「由来する」本発明によるポリペプチドのアミノ酸配列と部分的には完全に同じであるが、全部は同じでないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドのように、フラグメントは、「自立している」（「それから構成されている」）、または最も好ましくは単一の長いポリペプチドの単一の連続領域として、部分または領域、を形成する大きなポリペプチドに含まれてもよい。

【００８１】

「単離された」の語は、核酸と関連して用いられるときは、自然発生する配列が、その通常細胞の（例えば染色体の）環境から取り出されたこと、または自然でない環境で合成された（例えば人工的に合成された）ことを意味する。したがって、配列は、細胞を含まない溶液中にあるか、または異なる細胞の環境に置かれてもよい。この語は、配列にヌクレオチド鎖のみが存在することを意味するのではなく、それに自然に関係する非ヌクレオチド物質を本質的に含まないことであり（少なくとも約９０～９５％純粋）、したがって単

離された染色体からは区別される。

【００８２】

「濃縮された」の語は、ポリヌクレオチドと関連して用いられるときは、特定のＤＮＡまたはＲＮＡ配列が、正常若しくは疾患細胞中またはその配列をもともと採取した細胞中と比べ、目的とする細胞または溶液中に存在する全ＤＮＡまたはＲＮＡの顕著に高い画分（２～５倍）を構成することを意味する。これは、人為的に、存在する他のＤＮＡまたはＲＮＡの量を優先的に低下させることにより、または特定のＤＮＡまたはＲＮＡ配列の量を優先的に増やすことにより、またはその２つの組み合わせにより、起こされてもよい。しかし、濃縮されたということが他のＤＮＡまたはＲＮＡ配列が存在しないことを意味せず、目的とする配列の相対量が顕著に増加したということに注意すべきである。

【００８３】

ここで用いられる場合、「顕著に高い画分」の語は、濃縮物のレベルがこのような濃縮物を作成する人に有用であることを示し、他の核酸に比べて少なくとも約２倍、若しくは５から１０倍またはそれ以上に濃縮物が増加することを示す。この語はまた、他の供給源からのＤＮＡまたはＲＮＡがないことを意味するものではない。ＤＮＡの他の供給源には、例えば、酵母若しくは細菌のゲノム、またはｐＵＣ１９のようなクローニングベクターが含まれる。この語は、ウイルス感染、または腫瘍型の成長のような自然発生するものから区別され、ここでは１つのｍＲＮＡのレベルは、他の種のｍＲＮＡと比べて自然に増加しうる。つまり、この語は、所望の核酸の比率を上昇させようと人が介在した状況のみを包含することを意味する。

【００８４】

ここで用いられる場合、核酸と関連して用いられる「精製された」の語は、（均一な調製物のような）絶対的な純粋性を必要としない。その代わり、これは、配列が自然環境にあるものよりも（自然のレベルと比べ、このレベルは、例えば、ｍｇ／ｍＬの意味で、少なくとも２～５倍大きい必要があり）、相対的により純粋であることの指標であることを示す。ゲノムまたはｃＤＮＡライブラリーから単離された個々のクローンは、電気泳動的均質性にまで精製されうる。これらのクローンから得られた要求されたＤＮＡ分子は、全ＤＮＡまたは全ＲＮＡから直接得ることができる。ｃＤＮＡクローンは自然発生せず、好ましくは部分的に精製された自然発生した物質（メッセンジャーＲＮＡ）の操作を介して得られる。ｍＲＮＡからのｃＤＮＡライブラリーの構築は、合成物質（ｃＤＮＡ）の作成を伴い、純粋な個々のｃＤＮＡクローンは、ｃＤＮＡライブラリーを有する細胞のクローン選択により合成ライブラリーから単離できる。したがって、ｍＲＮＡからのｃＤＮＡライブラリーの構築および別個のｃＤＮＡクローンの単離を含む工程により、自然発生する細胞における比率に対して自然のメッセージの約10^6倍の精製を生じることとなる。したがって、少なくとも１桁の大きさ、好ましくは２若しくは３桁の、そしてより好ましくは４若しくは５桁の大きさの精製を、明らかに企図する。ゲノムライブラリーは、同じやり方で用いることができ、同じおおよその精製レベルを生ずる。

【００８５】

上記の核酸に関係して用いられる「単離された」、「濃縮された」、および「精製された」の語は、ポリペプチドの相対純度およびアバンダンスを示すのにも同様に用いられる。これらは、また、この分野でよく知られた生化学技術を用いて、保存され、成長させられ、スクリーニングされ、およびライブラリーから選択されてもよい。このようなポリペプチドは、天然、合成またはキメラでもよく、また抗体免疫沈降、他の「タグ化」技術、通常のクロマトグラフィーおよび／または電気泳動方法のような種々の方法のいずれかを用いて抽出してもよい。

【００８６】

ここで用いられる場合、「相補鎖」の語は、所定のポリヌクレオチド配列と関連して用いられるとき、ヌクレオチドの配列中のすべてのヌクレオチドが、所定のポリヌクレオチド配列を有するヘテロ２本鎖においてこれに対向するヌクレオチドと水素結合により塩基対を形成する２本鎖のヘテロ２本鎖を形成できるヌクレオチドの配列を指す。この語は、も

う一方のＲＮＡまたはＤＮＡ配列の相補鎖であるＤＮＡまたはＲＮＡ配列を指してもよい。ここで用いられる場合、「ハイブリダイズ」の語は、２つの核酸分子間で水素結合したヘテロ２本鎖の形成を指す。一般的に、所定の核酸分子はその相補鎖とハイブリダイズし、または２つの分子間で水素結合したヘテロ２本鎖の形成を許容するように所定の分子に対して充分に相補的である分子とハイブリダイズすることとなる。

【００８７】

ここで用いられる場合、「プローブ」の語は、少なくとも長さが１５ヌクレオチド（ｎｔ）、２０ｎｔ、３０ｎｔ、４０ｎｔ、５０ｎｔ、７５ｎｔ、１００ｎｔ、２００ｎｔ、５００ｎｔ、１０００ｎｔおよび５０００から１０，０００ｎｔのポリヌクレオチドを指す。

【００８８】

ここで用いられまたこの分野で知られた「同一性」および「類似性」は、２若しくはそれ以上のポリペプチド配列間の、または２若しくはそれ以上のポリヌクレオチド配列間の関係であり、配列同士を比較することにより決定される場合でもよい。

【００８９】

アミノ酸または核酸配列の「同一性」および「類似性」は、比較される２つの配列間の最適全体アライメントから決定される。最適全体アライメントの非限定の例は、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈのアルゴリズムを用いて実行できる［ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３］。「同一性」は、第１のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの特定の位置におけるアミノ酸またはヌクレオチドが、第１のポリペプチドまたはポリヌクレオチドと最適全体アライメントにある第２のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの対応するアミノ酸またはヌクレオチドと同一であることを意味する。同一性とは対照的に、「類似性」は、保存的置換であるアミノ酸を範囲に含む。

【００９０】

「保存的」置換の語は、この分野でよく知られており、置換されたアミノ酸の化学物理的性質が大きくは変わらない置換を広く指す。例えば、「保存的」置換は、ｂｌｏｓｕｍ６２置換マトリックスにおいて正のスコアを有するいずれかの置換である［ＨｅｎｔｉｋｏｆｆおよびＨｅｎｔｉｋｏｆｆ，１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：１０９１５－１０９１９］。「配列Ａは、配列Ｂにｎ％類似する」の言い方は、配列ＡおよびＢの間の最適全体アライメントの位置のｎ％が保存的置換からなることを意味する。「配列Ａは、配列Ｂとｎ％同一である」の言い方は、配列ＡおよびＢの間の最適全体アライメントの位置のｎ％が同一の残基またはヌクレオチドからなることを意味する。この開示における最適全体アライメントは、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアライメントアルゴリズムにおいて以下のパラメータを用いた：

ポリペプチドには：

置換マトリックス：ｂｌｏｓｕｍ６２

ギャップスコアリング関数：－Ａ－Ｂ*ＬＧ、ここでＡ＝１１（ギャップペナルティー）、Ｂ＝１（ギャップ長さペナルティー）およびＬＧはギャップの長さである。

ヌクレオチド配列には：

置換マトリックス：適合に１０、不適合に０

ギャップスコアリング関数：－Ａ－Ｂ*ＬＧ、ここでＡ＝５０（ギャップペナルティー）、Ｂ＝３（ギャップ長さペナルティー）およびＬＧはギャップの長さである。

【００９１】

配列間の「同一性」および「類似性」の語は、それらのフラグメントに拡張できる。配列ＡおよびＢの最適局所アライメントは、ＡおよびＢのフラグメントの最高のスコアリングアライメントである。「配列ＡはＢに局所的にｎ％類似する」の言い方は、配列ＡおよびＢの間の最適局所アライメントの位置のｎ％が保存的置換からなることを意味する。「配列Ａは、Ｂと局所的にｎ％同一である」の言い方は、配列ＡおよびＢの間の最適局所アライメントの位置のｎ％が同一の残基またはヌクレオチドからなることを意味する。最適局

所アライメントの非限定の例は、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎのアルゴリズムを用いて実行できる［Ｓｍｉｔｈ，Ｔ．ＦおよびＷａｔｅｒｍａｎ，Ｍ．Ｓ．１９８１．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｏｍｍｏｎ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｓｕｂｓｅｑｕｅｎｃｅｓ． Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１４７：１９５－１９７］。

【００９２】

もちろん、上記のパラメータは、アライメントアルゴリズムパラメータの１つの特定の例にすぎない。多数のアルゴリズムおよびパラメータが利用可能であり、当業者に知られている。

【００９３】

典型的な保存的置換は、Ｍｅｔ、Ｖａｌ、ＬｅｕおよびＩｌｅ間；ＳｅｒおよびＴｈｒ間；Ａｓｐ、ＧｌｕおよびＡｓｎ残基間；Ｇｌｎ、ＬｙｓおよびＡｒｇ残基間；またはＰｈｅおよびＴｙｒ芳香族残基間で起こる。２つのポリペプチド配列間の類似性の度合い（最もしばしば割合として）を計算する場合、同一性または類似性が２つのポリペプチド配列の対応するアミノ酸残基間で観察される位置の数を、比較される２つの分子の全長との関係で考慮する。

【００９４】

ここで用いられる場合、「抗体」の語は、抗体のような結合（可変）領域を用いる構造体、および他の抗体の修飾を範囲に含むことを意味する。したがって、本発明に有用な抗体は、抗体全体、抗体フラグメント、多機能抗体集合体、または一般的に抗体からの１またはそれ以上の特異的結合部位を含む物質を含んでもよい。抗体フラグメントは、Ｆｖ、Ｆａｂ若しくはＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントまたはそれらの誘導体のようなフラグメント、単鎖Ｆｖフラグメントのようなフラグメントでもよい。抗体または抗体フラグメントは、非組み換え、組み換え、またはヒト化されたものでもよい。抗体は、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ等の免疫グロブリンアイソタイプのものでもよい。さらに、免疫グロブリン若しくはそれらのフラグメントの集合体、高分子、誘導体およびコンジュゲートも適宜用いることができる。中和抗体は、本発明による診断、治療および薬のスクリーニングおよび薬の設計方法に特に有用である。

【００９５】

ここで用いられる場合、「黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに存在するエピトープに特異的」の語は、抗体と関連して用いられるとき、抗体が本発明による黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはそれらのフラグメントに存在する抗原決定基を認識して結合することを意味する。

【００９６】

ここで用いられる場合、「抗原的に等価な誘導体」の語は、本発明によるタンパク質、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドについて用いられるときに、病原体と哺乳動物宿主との即座の物理的相互作用を妨害する特定の抗体により特異的に認識されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはそれらの等価物を範囲に含む。

【００９７】

ここで用いられる場合、「本質的な」の語は、遺伝子または遺伝子産物との関連で用いられるとき、宿主がそれなしでは生き残れず、または機能的産物の不存在若しくは涸渇により、顕著に欠陥を生じた成長となることを意味する。「本質的な遺伝子」は、したがって、問題となっている特定の遺伝子に対応する野生型対立遺伝子を有する株の成長に適した培地中でのｉｎ ｖｉｔｒｏの細胞の成長のために有益な、または好ましくは必要な産物をエンコードするものである。したがって、本質的な遺伝子が不活性化若しくは阻害されると、その細胞は野生型株に比べ顕著に遅く成長するか、または全く成長しないこととなりうる。好ましくは、このような遺伝子が不活性化された株の成長は、増殖培地中で、野生型の成長速度の２０％以下、より好ましくは１０％以下、最も好ましくは５％以下となり、またはその速度は、０となりうる。好ましくは、遺伝子産物により提供される活性の不存在下では、少なくとも正常のｉｎ ｖｉｖｏの成長条件に似た培地条件下では、細胞は全く成長しないか、または生育不能となりうる。例えば、細菌の細胞壁合成に関与する

ある酵素の生物学的活性の不存在は、たとえプロトプロストが制御された浸透圧条件下で維持可能であっても、正常浸透圧条件下で細胞の溶解をもたらすこととなる。好ましくは、しかし必要ではないが、例えば、抗菌剤やファージ産物によりこのような遺伝子が阻害されると、阻害された細菌の成長速度は、阻害されていない細菌の成長速度の５０％以下、より好ましくは３０％以下、さらにより好ましくは２０％以下、最も好ましくは１０％以下となりうる。当業者に認識されるように、成長阻害の度合いは、一般的に阻害剤の濃度に依存する。本発明との関係において、本質的な遺伝子は、一般的に抗菌剤の好ましい標的となる。本質的な遺伝子は、「標的」分子を直接エンコードできるか、または標的分子の産生、修飾、若しくは維持に関与する産物をエンコードできる。

【００９８】

ここで用いられる場合、「標的」は、外因性の薬剤若しくは化合物により作用されることができ、それにより細菌細胞の成長若しくは生存力を調節し、好ましくは阻害する、生体分子若しくは生体分子の複合体を指す。標的は、核酸配列若しくは核酸分子、またはポリペプチド若しくはポリペプチドの一領域でもよい。

【００９９】

ここで用いられる場合、「配列番号２のアミノ酸配列若しくはそれらのフラグメントを含む黄色ブドウ球菌ポリペプチドの、３Ａ　ＯＲＦ　３３若しくはそれらのフラグメントとの相互作用により発生するシグナル」等の語は、結合アッセイによるポリペプチドの相互作用の測定可能な指標を指し、ここで相互作用するポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列それらのフラグメント若しくはそれらの変異体、および３Ａ　ＯＲＦ　３３それらのフラグメント若しくはそれらの変異体を含む。ここで用いられる場合、「配列番号２のアミノ酸配列若しくはそれらのフラグメントを含む黄色ブドウ球菌ポリペプチドの活性化若しくは阻害により発生するシグナル」の語は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性のアッセイによる、配列番号２のアミノ酸配列それらのフラグメント若しくは変異体を含むポリペプチドの測定可能な指標を指す。例えば、そのシグナルには、限定されないが、（ｉ）蛍光シグナル（時間分解蛍光共鳴エネルギー変換アッセイ；蛍光偏光アッセイ）、色測定シグナルの分光光度計吸収測定（ファージディスプレイＥＬＩＳＡ）、質量変化測定（表面プラスモン共鳴分析）、または選択培地による生存可能性測定（酵母２－ハイブリッド分析）等の、３Ａ　ＯＲＦ　３３のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドへの結合からもたらされるシグナルが含まれうる。

【０１００】

ここで用いられる場合、「標準」の語は、ポリペプチド活性と関連して用いられ、候補化合物の不存在下で行われる所定のアッセイで（直接的にまたは間接的に）観察または検出される活性の量を意味する。「標準」は、候補化合物のポリペプチド活性に対する正または負の効果を測定するための参照として機能する。

【０１０１】

ここで用いられる場合、「活性の増加」の語は、候補化合物の不存在下の測定可能な活性レベルと比べた、候補化合物の存在下の所定のアッセイにおけるポリペプチドの測定可能な活性の増強されたレベルを指す。活性は、候補化合物の不存在下より少なくとも１０％大きく、２０％大きく、５０％大きく、７５％大きく、１００％またはそれ以上大きく、２倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍、１００倍またはそれ以上までの場合、本発明により増加したと見なされる。

【０１０２】

ここで用いられる場合、「活性の減少」の語は、候補化合物の不存在下の測定可能な活性レベルと比べた、候補化合物の存在下の所定のアッセイにおけるポリペプチドの測定可能な活性の低下したレベルを指す。活性は、候補化合物の不存在下で観察されるより少なくとも１０％少なく、好ましくは１５％少なく、２０％少なく、５０％少なく、７５％少なく、または１００％少ない（即ち活性がない）場合、本発明により減少したと見なされる。

【０１０３】

ここで用いられる場合、「それらの相互作用ができる条件」の語は、配列番号２のアミノ酸配列若しくはそれらのフラグメントを含む黄色ブドウ球菌ポリペプチド、および候補化合物に関連して用いられるとき、２つの独立物がともに溶液中にあるか、または一方が何らかの方法で固定化若しくは制限されており他方が溶液中にあるかのいずれかにより、一緒に置かれていることを意味し、ここで溶液のパラメータ（例えば、塩、界面活性剤、タンパク質または候補化合物濃度、温度、および酸化還元電位、その他）は、配列番号２のアミノ酸配列若しくはそれらのフラグメントを含む黄色ブドウ球菌ポリペプチド、および候補化合物が物理的に結合できるようなものである。タンパク質：候補化合物相互作用ができる条件には、例えば、ＴＲ－ＦＲＥＴ、蛍光偏光、表面プラスモン共鳴およびファージディスプレイアッセイについてここで記載した条件が含まれる。

【０１０４】

ここで用いられる場合、「ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の測定可能なパラメータの検出可能な変化」の語は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの定量可能な特徴の変化を指す。

【０１０５】

ここで用いられる場合、「アゴニスト」の語は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を増強または増加させる薬剤または化合物を指す。アゴニストは、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに直接的に活性があっても、または黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの増強したまたは増加した活性を導く経路の１またはそれ以上の構成要素に対して活性があってもよい。

【０１０６】

ここで用いられる場合、「アンタゴニスト」の語は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を低下または減少させる薬剤または化合物を指す。アンタゴニストは、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに直接的に活性があっても、または黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの低下したまたは減少した活性を導く経路の１またはそれ以上の構成要素に対して活性があってもよい。

【０１０７】

ここで用いられる場合、「抗菌剤」または「抗菌化合物」の語は、１またはそれ以上の細菌株に殺菌または静菌効果を有する薬剤または化合物を指し、好ましくはこのような薬剤または化合物は、少なくとも黄色ブドウ球菌に対し殺菌性または静菌性である。

【０１０８】

ここで用いられる場合、「合成の」の語は、化合物を化学的に合成する工程を指す。

【０１０９】

細菌感染を処置することの文脈で用いられる場合、「治療的に有効量」、「医薬的に有効量」または「治療的効果を提供するのに充分な量」は、治療的効果を有する抗菌剤の量を示す。これは一般的に、持続した細菌感染に必要な細菌細胞の正常な細胞機能をある程度まで阻害することを指す。さらに、ここで用いられる場合、治療的に有効量は、例えば臨床試験結果および／または動物モデルにより判定されるような望ましい治療効果をもたらす抗菌剤の量を意味する。この量は、当業者が普通に決定でき、関与する特定の細菌株および用いる特定の抗菌剤のような、いくつかの要因に依存して変化しうる。同じ文脈において、組織または組織表面への細菌の「吸着を低下させるのに充分な量」は、所定の組織または組織表面の細菌感染の程度を予防的に妨げることまたは低下させることに対して効果的な抗菌剤の量を示す。同じ原理が、「予防的に有効量」の用語に適用できる。

【０１１０】

細菌感染を処置することの文脈で用いられる場合、「既存の抗菌剤との組み合わせで」抗菌剤を接触させることまたは投与することは、活性化合物または抗生物質の個々の殺菌効果または成長阻害効果を超えて、殺菌効果または成長阻害効果を提供するために、活性化合物を抗生物質とともに同時に接触させることまたは投与することを指す。既存の抗生物質は、例えば、ペニシリン、セファロスポリン、イミペネム、モノバクタム、アミノグリ

コシド、テトラサイクリン、スルホンアミド、トリメトプリム／スルホンアミド、フルオロキノロン、マクロライド、バンコマイシン、ポリミキシン、クロラムフェニコールおよびリンコサミドからなる群を指す。

【０１１１】

ここで用いられる場合、「組織」は、生物において１またはそれ以上の特定の機能を一緒になって実行する１またはそれ以上の細胞型の細胞集合体を指す。ここで用いられる場合、「組織表面」は、所定の組織と他の組織または組織の周囲との境界を形成する組織の部分を指す。組織表面は、例えば皮膚や角膜などの動物外表面を指してもよく、または、その代わりに、この語は、例えば腸の内面などの内側である表面を指してもよく、または傷害や手術工程の結果としてのみ動物の外側周囲に暴露される表面を指してもよい。

【０１１２】

ここで用いられる場合、「候補化合物の結合を測定すること」の語は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、それらのフラグメントまたは変異体と物理的に関係する候補化合物量の定量が好ましくできるアッセイの使用を指す。

【０１１３】

ここで用いられる場合の「候補化合物」は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの発現または活性を調節する能力を有するいずれもの化合物をさす。

【０１１４】

ここで用いられる場合、「直接的にまたは間接的に検出可能にラベル化された」の語は、候補化合物を、直接的に検出可能（例えば、放射性同位体またはフルオロフォア）または間接的に検出可能（例えば、適切な基質の存在下で検出できる酵素活性、または特異的な抗原若しくは抗体や他の特異的な指標の添加により検出可能となる他のマーカー）のいずれかにする部分の、候補化合物への結合を指す。

【０１１５】

「スクリーニング方法」は、１つや２、３の化合物だけではなく、多数の化合物の関連する活性や性質を評価するための方法を指す。例えば、スクリーニング方法を用いて、便利に、少なくとも１００、より好ましくは少なくとも１０００、さらにより好ましくは少なくとも１０，０００、そして最も好ましくは１００，０００、またはさらに多くの異なる化合物を試験することができる。特定の態様として、この方法は、自動化しやすく、リード物質開発のための化合物ライブラリーの費用効果のあるハイスループットスクリーニングである。

【０１１６】

関連する見地としてまたは好ましい態様として、本発明は、複数の化合物の、好ましくは複数の小分子のいずれのものがＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に対して活性があるのかを測定することにより可能性のある抗菌剤のスクリーニング方法を提供する。好ましい態様には、１またはそれ以上の試験化合物が細菌標的に結合するかまたはその活性レベルを低下させるかどうかを測定することを伴う態様、および上述した複数の異なる標的を利用する態様等の、上述した見地について記載したものを含む。

【０１１７】

ここで用いられる場合、「同時に」の語は、本発明のアッセイに関係して用いられるとき、特定された成分または作用が少なくとも１時期重複することを指し、したがって開始および終了時点が同一であるということに限定されない。確かに、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの候補化合物およびバクテリオファージポリペプチドへの同時接触は、例えば、接触期間の重複があり、これはそうすることができるが、しかし後者２つがまさに同時にアッセイ混合物に導入されることを表す必要はない。

【０１１８】

「化合物」の語には、好ましくは、限定されないが、例えば阻害性ＯＲＦ遺伝子産物やそれらの標的であり、それによりその活性若しくは発現を阻害し、消滅させまたは増強するような、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドに結合する、小有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。可能性のある化合物は、バクテリオフ

ァージ遺伝子産物であり、それによりバクテリオファージ遺伝子産物がＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに結合することを妨げるような、結合する分子と同じ部位に結合する非常に関連するタンパク質や抗体のような、小分子、ペプチド、ポリペプチドでもよい。

【０１１９】

「化合物」の語はまた、ポリペプチドの結合部位に結合しこれを占拠し、それにより細胞結合分子への結合を妨げ、正常な生物学的活性が妨げられるようになる小分子を含むことを意味する。小分子の例としては、限定されないが、小有機分子、ペプチドまたはペプチド様分子が含まれる。好ましい可能性のある化合物には、バクテリオファージによりエンコードされる阻害性ＯＲＦ、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４、およびそれらのいずれかのホモログおよび／またはペプチド疑似物および／またはフラグメント、に関連する化合物およびそれらの変異体が含まれる。可能性のあるポリペプチドアンタゴニストの他の例には、リガンド、基質、レセプター、酵素等に非常に関連する抗体、またはある場合には、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質が含まれ、例えばリガンド、基質、レセプター、酵素等のフラグメントなどのポリペプチドの場合があり、または反応を顕在化させていないが本発明のポリペプチドに結合する小分子の場合があり、ポリペプチドの活性が妨げられるようになる。他の可能性のある化合物には、アンチセンス分子が含まれる（これらの分子の記載については、Ｏｋａｎｏ，１９９１　Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６，５６０を参照のこと；また“Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ　ａｓ　Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ　ｏｆ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ”，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８）を参照のこと）。

【０１２０】

ここで用いられる場合、「ライブラリー」の語は、１００化合物の、好ましくは１０００の、さらに好ましくは５０００、さらにより好ましくは１０，０００またはそれ以上、そして最も好ましくは５０，０００またはそれ以上の化合物の収集を指す。

【０１２１】

ここで用いられる場合、「小分子」の語は、３０００ドルトン以下の、好ましくは２０００または１５００以下の、さらにより好ましくは１０００以下の、そして最も好ましくは６００ドルトン以下の分子量を有する化合物を指す。好ましくは、しかし必須ではないが、小分子は、オリゴペプチドではない。

【０１２２】

ここで用いられる場合、「疑似物」の語は、天然の、合成の、またはキメラのものでよく、参照化合物に構造的および機能的に関連する化合物を指す。本発明の観点から、「ペプチド疑似物」は、例えば、ペプチド若しくはポリペプチドの３次元構造の活性に関連した見地を真似た非ペプチド化合物、例えば、ファージや細菌ＯＲＦがエンコードするポリペプチドのペプチドや活性部分の構造を真似た化合物である。

【０１２３】

ここで用いられる場合、「バクテリオファージ阻害因子タンパク質」の語は、バクテリオファージ核酸配列によりエンコードされるタンパク質を指し、これは宿主細菌中で細菌の機能を阻害する。したがって、これは、細菌阻害ファージ産物である。「バクテリオファージ阻害因子タンパク質」の語は、バクテリオファージ阻害因子タンパク質のフラグメント、誘導体、または活性部位を範囲に含む。

【０１２４】

本発明の上記アッセイ方法の１以上の態様として、タンパク質若しくはポリペプチドの一方若しくは両方の複合化されていない形態から複合化されたものの分離を容易にし、またアッセイの自動化をなすために、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４、またはその標的分子若しくはリガンドのいずれかを固定化することが望ましい。候補化合物の存在下および不存在下での、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質（またはそれらのフラグメント若しくは変異体）への試験化合物の結合、またはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質の標的分子若しくはリガンドとの相互作用は、反応物質を含むのに適したいずれの容器内においても達成できる。

【０１２５】

このような容器の例には、ミクロタイタープレート、試験管およびミクロ遠心管が含まれる。

【０１２６】

１つの態様として、タンパク質の一方または両方がマトリックスに結合できるドメインを付加する融合タンパク質を提供できる。例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）／ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４融合タンパク質またはＧＳＴ／標的融合タンパク質（例えば、ＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３）は、グルタチオンセファロースビーズ（シグマケミカル社、セントルイス、ミズーリ州）またはグルタチオン誘導化ミクロタイタープレートに吸着でき、そしてこれは、試験化合物、または試験化合物および非吸着標的タンパク質若しくはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質のいずれかと組み合わされ、そしてその混合物は複合体形成を誘導する条件下で（例えば、塩およびｐＨについて生理的条件で）インキュベートされる。インキュベーションの後、ビーズまたはミクロタイタープレートウェルを洗浄して結合していないすべての成分を除去し、ビーズの入れ物に固定化されたマトリックス、複合体が例えば上述したように、直接的にまたは間接的に測定される。あるいは、複合体は、マトリックスから分離され、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４結合のレベルまたは活性が標準的な技術を用いて測定される。

【０１２７】

マトリックスにタンパク質を固定化する他の技術（およびこの分野でよく知られたもの）を本発明のスクリーニングアッセイに用いることもできる。例えば、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質またはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４標的分子若しくはリガンドのいずれも、ビオチンおよびストレプトアビジンのコンジュゲーションを利用することにより固定化できる。ビオチン化ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質または標的分子若しくはリガンドは、この分野で知られた技術（例えば、ビオチン化キット、ピアスケミカルズ社、ロックフォード、イリノイ州）を用いてビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシ－サクシンイミド）から調製でき、そしてストレプトアビジンで被覆した９６ウェルプレートのウェルに固定化できる（ピアスケミカルズ社）。あるいは、標的分子若しくはリガンドと反応するがＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質（若しくはそれらの部分）のその標的分子若しくはリガンドへの結合を妨害しない抗体を、プレートのウェルに誘導し、抗体コンジュゲーションによりウェルにトラップされた標的またはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質をはずすことができる。ＧＳＴ－固定化複合体についての上述のものに加えて、そのような複合体を検出する方法には、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質または標的分子に反応する抗体を用いた複合体の免疫検出、およびＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質に関係した酵素活性を検出することによる酵素結合アッセイが含まれる。

【０１２８】

ここで用いられる場合、「活性部位」の語は、バクテリオファージ由来配列に関連するとき、細菌の標的阻害をもたらし、またはその重要な要因となるバクテリオファージ阻害因子タンパク質のエピトープ、触媒若しくは制御ドメイン、またはフラグメントに関連する。活性部位は好ましくは、その連続する配列から取り除かれ、単離されても、未だ阻害効果を有しうる。

【０１２９】

ここで用いられる場合、「細菌感染を処置すること」の語は、それにより、宿主、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおける細菌の成長および／または代謝活性または細菌の数が、阻害されまたは除去される工程を指す。同様に、「細菌感染を予防すること」の語は、それにより、宿主、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおける細菌の成長および／または代謝活性または細菌の数が、感染する危険性において阻害されまたは除去される工程を指す。

【０１３０】

ここで用いられる場合、「細菌」の語は、単一の細菌株を指し、明確に反対のことを示さない限り単一の細胞およびその株の複数または集団を含む。細菌またはバクテリオファージと関連して、「株」の語は、特定の遺伝子内容を有する細菌またはファージを指す。遺

伝子内容には、ゲノム内容および組み換えベクターを含む。したがって、例えば、２つの他の同一の細菌細胞は、それぞれベクター、例えばプラスミド、を異なる挿入物に含む場合は、異なる株を示すこととなる。

【０１３１】

ここで用いられる場合、「診断すること」の語は、細菌感染をもたらす生物または生物の株の同定を指す。

【０１３２】

ここで用いられる場合、「黄色ブドウ球菌による感染」の語は、哺乳動物、好ましくはヒトのような動物内、またはその表面で黄色ブドウ球菌株細胞の存在、成長、または増殖を指す。

【０１３３】

ここで用いられる場合、「バクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３がエンコードするポリペプチド」の語は、配列番号３によりエンコードされるポリペプチド、または配列番号４に開示される配列のバクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３がエンコードするポリペプチドの活性部分を範囲に含むそれらのフラグメント若しくは誘導体を指す。

【０１３４】

ここで用いられる場合、「ポリペプチド複合体」の語は、お互いに物理的に関係する２またはそれ以上のポリペプチドの組み合わせを指す。このような物理的関係が、このようなポリペプチド複合体において１またはそれ以上のポリペプチドの活性のいくつかの見地に対して必要とされるのは、好ましい。

【０１３５】

ここで用いられる場合、「物理的関係」の語は、２つの部位の接触を伴う２つの部位の相互作用を指す。

【０１３６】

ここで用いられる場合、「身体物質」の語は、限定されないが、骨、血液、血清、脳脊髄液、精液、唾液、筋肉、軟骨、器官組織、皮膚、尿、便または解剖物質のような細胞、組織および排泄物等の、個体由来のまたは個体に感染し、はびこり、または宿る生物由来のすべての物質を意味する。

【０１３７】

ここで用いられる場合、「疾患」の語は、例えば、中耳炎、結膜炎、肺炎、菌血症、髄膜炎、副鼻腔炎、胸膜膿症および心内膜炎、そして最も具体的には、例えば脳脊髄液の感染のような髄膜炎等の、細菌による感染により引き起こされるまたは関連するすべての疾患を意味する。

【０１３８】

ここで用いられる場合、「融合タンパク質」の語は、タンパク質が別個のタンパク質からの融合したアミノ酸配列を含むようにフレーム単位で融合した２またはそれ以上の別個のタンパク質からのアミノ酸コード配列を含む遺伝子によりエンコードされたタンパク質を指す。

【０１３９】

ここで用いられる場合、「宿主細胞」の語は、形質転換された若しくは形質導入された細胞であり、または外因性ポリヌクレオチド配列により形質転換もしくは形質導入できるものである。

【０１４０】

ここで用いられる場合、「免疫学的に等価な誘導体」の語は、脊椎動物で抗体を発生させるために適当な形態で用いられたときに、病原体と哺乳動物宿主との即座の物理的相互作用を妨害するように作用する抗体をもたらす、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはいずれかの等価物をも範囲に含む。

【０１４１】

ここで用いられる場合、「免疫特異的」の語は、抗体の特徴を意味し、ここでその抗体は、他の関連するポリペプチドまたはポリヌクレオチド、特に先行技術のポリペプチドまた

はポリヌクレオチド、に対するアフィニティーよりも、それぞれ本発明のポリペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドに対して、実質的に大きなアフィニティーを有する。

【０１４２】

ここで用いられる場合、「個体」の語は、限定されないが、後生動物、哺乳動物、ヒツジ（ｏｖｉｄ）、ウシ、サル、霊長類、およびヒト等の多細胞真核生物を意味する。

【０１４３】

ここで用いられる場合、「生物」の語は、（ｉ）限定されないが、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ，Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ，Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ，Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ，Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ，Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ，Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ，Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｓ，Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｔｅｓ，Ｎｏｃａｒｄｉａ，Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ，Ｙｅｒｓｉｎｉａ，Ｆａｎｃｉｓｅｌｌａ，Ｐａｓｔｕｒｅｌｌａ，Ｍｏｒａｘｅｌｌａ，Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ，Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ，Ｂｒａｎｈａｍｅｌｌａ，Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ，Ｓｔｒｅｐｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ，Ｌｉｓｔｅｒｉａ，Ｃａｌｙｍｍａｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ，Ｂｒｕｃｅｌｌａ，Ｂａｃｉｌｌｕｓ，Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ，Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ，Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ，Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ，Ｋｌｅｉｂｓｉｅｌｌａ，Ｖｉｂｒｉｏ，Ｐｒｏｔｅｕｓ，Ｅｒｗｉｎｉａ，Ｂｏｒｒｅｌｉａ，Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ，Ｓｐｉｒｉｌｌｕｍ，Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ，Ｓｈｉｇｅｌｌａ，Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ，Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ，Ａｅｒｏｍｏｎａｓ，Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ，Ｃｈｌａｍｙｄｉａ，ＢｏｒｒｅｌｉａおよびＭｙｃｏｐｌａｓｍａ属の一員等、さらに限定されないが、Ｇｒｏｕｐ Ａ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ，Ｇｒｏｕｐ Ｂ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ，Ｇｒｏｕｐ Ｃ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ，Ｇｒｏｕｐ Ｄ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ，Ｇｒｏｕｐ Ｇ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ，Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ，Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ，Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ，Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ，Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃｉｕｍ，Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｄｕｒａｎｓ，Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｅａｅ，Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ，Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ，Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ，Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｔｈｅｒｉａｅ，Ｇａｒｄｎｅｒｅｌｌａ ｖａｇｉｎａｌｉｓ，Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ，Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｂｏｖｉｓ，Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｕｌｃｅｒａｎｓ，Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ，Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｔｅｓ ｉｓｒａｅｌｉｉ，Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ，Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐｅｒｔｕｓｉｓ，Ｂｏｒｄａｔｅｌｌａ ｐａｒａｐｅｒｔｕｓｉｓ，Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｂｒｏｎｃｈｉｓｅｐｔｉｃａ，Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ，Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ，Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ，Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ａｅｇｙｐｔｉｕｓ，Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｐａｒａｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ，Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｄｕｃｒｅｙｉ，Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ，Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ，Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ ｆｒｅｕｎｄｉｉ，Ｐｒｏｔｅｕｓ ｍｉｒａｂｉｌｉｓ，Ｐｒｏｔｅｕｓ ｖｕｌｇａｒｉｓ，Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｅｓｔｉｓ，Ｋｌｅｉｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ，Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｓｅｎｓ，Ｓｅｒｒａｔｉａ ｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ，Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａ，Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉｉ，Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｆｌｅｘｎｅｒｉ，Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ，Ｆｒａｎｓｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ，Ｂｒｕｃｅｌｌａ ａｂｏｒｔｉｓ，Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｈｒａｃｉｓ，Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ，Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ，Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ，Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ，Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ，Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｉおよびＣｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍｉｔｉｓの種または族の一員等の、原核生物を、（ｉｉ）限定されな

いが、Ａｒｃｈａｅｂａｃｔｅｒ等の原始生物を、（ｉｉｉ）限定されないが、原生動物、真菌、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ，Ｋｌｕｖｅｒｏｍｙｃｅｓ，またはＣａｎｄｉｄａ属の一員、およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｉｖｉｓｅａｅ，Ｋｌｕｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ，またはＣａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ種の一員等の、単細胞または線状真核生物、を意味する。

【０１４４】

ここで用いられる場合、「組み換え発現系」の語は、本発明のポリペプチド若しくはそれらの部分をエンコードする配列または本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生のために宿主細胞または宿主細胞溶解物に導入されまたは形質転換される系を指す。

【０１４５】

ここで用いられる場合、「人工的に合成された」の語は、ペプチド、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと関連して用いられるとき、アミノ酸またはヌクレオチドサブユニットがｉｎ ｖｉｔｒｏで細胞や重合化酵素を用いることなく化学的に結合されたことを意味する。ポリヌクレオチドおよびペプチド合成の化学的作用は、この分野でよく知られている。

【０１４６】

アミノ酸を表す標準的な１文字および３文字表記に加え、「Ｘ」または「Ｘａａ」の語も、本発明の特定のポリペプチドを記述するのに用いられる。「Ｘ」および「Ｘａａ」は、２０の自然に発生するアミノ酸のいずれもが、ポリペプチド配列のそのような指定された位置に存在してもよいことを意味する。

【０１４７】

ここで用いられる場合、２つのポリペプチドの相互作用の文脈において「特異的に結合する」の語は、２つのポリペプチドがポリペプチドの別個の領域またはドメインを介して物理的に相互作用することを意味し、ここでその相互作用は、相互作用するドメインのアミノ酸配列に依存する。一般的に、他のものに特異的に結合するポリペプチドの平衡結合濃度は、約１ｍＭまたはそれ以下か、より好ましくは１μＭまたはそれ以下か、好ましくは１００ｎＭまたはそれ以下か、１０ｎＭまたはそれ以下か、１ｎＭまたはそれ以下か、１００ｐＭまたはそれ以下か、さらに１０ｐＭまたはそれ以下の範囲である。

【０１４８】

ここで用いられる場合、「結合の減少」の語は、他の組の参照条件下でのシグナルと比べて、１つの組の条件下での２つのポリペプチドの物理的関係により発生するシグナルの低下を指す。参照条件下のレベルよりも少なくとも１０％低い場合、好ましくは２０％、４０％、５０％、７５％、９０％、９５％、さらに１００％低い（即ち、検出可能な相互作用がない）場合、シグナルは減少することとなる。

【０１４９】

ここで用いられる場合、「検出可能なマーカー」の語は、酵母２－ハイブリッドアッセイの文脈で用いられるとき、その発現したポリペプチドの存在または量についてシグナルを発生するそのポリペプチドを発現している細胞の形質を付与するポリペプチドを指す。検出可能なマーカーは、エピソームに存在できまたは宿主細胞のゲノムに統合されうるプラスミド上にエンコードされる。検出可能なマーカーには、限定されないが、色測定または蛍光検出を可能にする酵素をエンコードするポリペプチド（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ ＬａｃＺであり、これは基質アナログＸ－ｇａｌを変換し、青色を発生する）、抗生物質耐性を付与する酵素をエンコードするポリペプチド、および所定の成分を欠いた培地中で成長する酵母株の能力を付与する酵素をエンコードするポリペプチド（即ち、栄養要求性の除去に不可欠なもの）が含まれる。

【０１５０】

ここで用いられる場合、「検出可能なマーカーの発現をもたらす」の語は、検出可能なマーカー（例えば、２－ハイブリッド転写促進ドメインおよびＤＮＡ結合ドメイン融合タンパク質）の発現をするのに必要な因子の相互作用が、検出可能なマーカーの検出可能なレ

ベルの転写促進および翻訳を引き起こすことを意味する。「検出可能なレベル」は、マーカー発現に必要な１またはそれ以上の因子または条件が実質的に不存在の場合に起こるバックグラウンドの発現から識別できる発現レベルである。検出可能なレベルは、検出可能なマーカーの性質に依存して変化しうるが、一般的に所定のマーカーのバックグラウンドレベルより、少なくとも約１０％またはそれ以上の大きいレベルからなるであろう。

【０１５１】

ここで用いられる場合、「発現の減少」の語は、他の組の参照条件下での発現と比べて、１つの組条件下での検出可能なマーカーの発現の低下を指す。参照条件下のレベルよりも少なくとも１０％低い場合、好ましくは２０％、４０％、５０％、７５％、９０％、９５％、さらに１００％低い（即ち、発現しない）場合、検出可能なマーカーの発現は減少することとなる。

【０１５２】

黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４配列の同定

ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドを同定するために用いられる方法論は、１９９８年１２月３日出願された米国仮特許出願６０／１１０、９９２、および１９９９年１２月３日に出願されたＰＣＴ国際出願ＷＯ１９９９／ＩＢ９９／０２０４０に詳細に記載されている。要約すると、このＰＣＴ出願は、選択された細菌に感染できるバクテリオファージに関する。ファージの遺伝子情報の配列決定および特徴付けにより、それらの宿主を阻害するのに本質的または助けになるもの等の、ファージによりエンコードされるすべてのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の同定ができる。各々のＯＲＦは、コンピュータソフトウエアを用いて同定され、宿主中で個々に発現される。そして、宿主の生存力に対するこの発現の効果が測定される。宿主細菌を阻害するファージゲノムからのＯＲＦの同定は、それ自体細菌阻害因子化合物として使用できる化合物（またはさらなる阻害因子を得るために誘導体化または修飾される）、およびファージがエンコードする阻害因子により影響される細菌標的の同定のための道具として使用できる化合物、の両方を提供する。

【０１５３】

実施例１および２に詳細に記載された方法論を用いて、細菌成長阻害性３Ａファージ ＯＲＦ３３タンパク質に特異的に結合する黄色ブドウ球菌ポリペプチドが単離された。要約すると、３Ａ ＯＲＦ ３３タンパク質は、黄色ブドウ球菌タンパク質抽出物によるアフィニティークロマトグラフィー結合工程のリガンドとして用いられた。選択された黄色ブドウ球菌相互作用ポリペプチドは精製され、トリプシン消化およびＭＡＬＤＩ－ＴｏＦ技術を用いた質量分析計によりさらに分析された［Ｑｉｎ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．（１９９７） Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６９：３９９５－４００１］。得られた質量スペクトルのコンピュータ解析により（ｈｔｔｐ：／／ｐｒｏｗｌ．ｒｏｃｋｆｅｌｌｅｒ．ｅｄｕ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＰｒｏＦｏｕｎｄ）、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏｍｅ．ｏｕ．ｅｄｕ／ｓｔａｐｈ．ｈｔｍｌにおけるオクラホマ大学黄色ブドウ球菌ゲノムデータベース中の黄色ブドウ球菌ヌクレオチド配列の相当するＯＲＦを同定した。３Ａ ＯＲＦ ３３と候補標的タンパク質、ここではＳＴＡＡＵ＿Ｒ４と呼ぶ、との相互作用も、アフィニティーブロッティングアッセイにより確認した。黄色ブドウ球菌ファージ３Ａ ＯＲＦ ３３結合研究において同定されたものと同様のトリプシン消化性ペプチドをエンコードする黄色ブドウ球菌コンティーグのＯＲＦと、公衆データベースのすべての他の配列との比較により、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４は、脂肪酸／リン脂質合成に関与するタンパク質、ＰｌｓＸと関連することがわかった（図８）。図９Ａに示すように、同定されたＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ ＯＲＦのＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質に対する関連度は、全配列にわたるアミノ酸レベルで５３％の同一性、７３％の類似性である。

【０１５４】

ＰｌｓＸ（ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４）の機能

脂肪酸生合成は、多くの種類の脂質分子を生じ、そのいくつかは膜の重要な構造成分であり、他のものはシグナル伝達およびエネルギー保存に重要な役割を有しているので、すべての細胞の生存に本質的なものである。リン脂質の重要性は、例えばヒトにおけるこれら

の脂質代謝の遺伝的欠損により強調される。細菌において、脂質代謝は、細胞に対する不可欠な重要性と同様である。Ｅ．ｃｏｌｉでは、８つの酵素により触媒された反応により、アセチル－補酵素Ａが脂肪酸に変換する。３つのこれに続く反応がグリセロール－３－リン酸にアシル鎖を付加してＣＤＰジアシルグリセロールを生じさせ、これはフォスファチジルセリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルグリセロール、およびカルジオリピン等の重要な細胞リン脂質の生合成の重要な分岐点分子となる。

【０１５５】

Ｅ．ｃｏｌｉにおけるリン脂質生合成の最初の反応は、ｐｌｓＢ遺伝子産物である、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼにより触媒される。この酵素は、グリセロール－３－リン酸の最初のアシル化に、飽和脂肪酸アシル誘導体（パルミトイル補酵素Ａまたはパルミトイル－アシルキャリアタンパク質）を優先的に利用する。興味深いことに、もともとＢｅｌｌにより記載されたＥ．ｃｏｌｉのグリセロール－３－リン酸要求性変異体［Ｂｅｌｌ，Ｒ．Ｍ．（１９７４）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１１７：１０６５－１０７６］は、２つの座において変異を含み、成長のためのグリセロール－３－リン酸への株の依存を観察するために両方の変異が必要であることが、わかった［Ｌａｒｓｏｎ，Ｔ．Ｊ．，Ｌｕｄｔｋｅ，Ｄ．Ｎ．，およびＢｅｌｌ，Ｒ．Ｍ．（１９８４）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１６０：７１１－７１７］。ファージＰ１の同時形質導入により媒介される、野生型細胞からの独立したトランスポゾンの挿入が、変異株の栄養要求性の修正のために探索された。予期されたように、トランスポゾン挿入部分は、ｐｌｓＢ領域のマーカーを同時形質導入できた。しかし、残りのものは、染色体の別個の領域のｐｌｓＸと称する座に、マッピングされた。実際、ｐｌｓＢ２６とｐｌｓＸ５０変異体は、グリセロール－３－リン酸要求性の付与に必要且つ充分である。

【０１５６】

野生型ＰｌｓＸは、その基質に対して変異体ＰｌｓＢが機能できるように、グリセロール－３－リン酸の細胞内レベルを上昇させるか、またはＰｌｓＢ２６によりエンコードされる、欠損したグリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼのアフィニティーを増加させるか、のいずれかに機能できる［Ｌａｒｓｏｎ，Ｔ．Ｊ．，Ｌｕｄｔｋｅ，Ｄ．Ｎ．，およびＢｅｌｌ，Ｒ．Ｍ．（１９８４）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１６０：７１１－７１７］。V_{max}とｐｌｓＢ２６変異体によりもたらされる明らかなK_mの欠損が野生型ＰｌｓＸの存在に独立なので、ＰｌｓＸはｉｎ ｖｉｔｒｏにおけるグリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼの活性に明らかに影響を与えない。しかし、ｐｌｓＢ２６ ｐｌｓＸ５０変異を有するＥ．ｃｏｌｉ株へのＰｌｓＸの野生型コピーの回復、および１－アシルグリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼをエンコードする、ＰｌｓＣの温度感受変異は、非許容性温度におけるｉｎ ｖｉｖｏでのリゾホスファチジン酸合成を回復させるのには充分でなかった［Ｈｅａｔｈ，Ｒ．Ｊ．，Ｇｏｌｄｆｉｎｅ，Ｈ．，およびＲｏｃｋ，Ｃ．Ｏ．（１９９７）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７９：７２５７－７２６３］。したがって、ＰｌｓＸは、ｉｎ ｖｉｖｏにおいてグリセロール－３－リン酸活性を回復できない。

【０１５７】

Ｅ．ｃｏｌｉ ｐｌｓＸに対する機能的ホモログが、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ［Ｚｈａｎｇ，Ｙ．，およびＣｒｏｎａｎ Ｊｒ．，Ｊ．Ｅ．（１９９８）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８０：３２９５－３３０３］およびグラム陽性菌Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｕｔｙｒｉｃｕｍ［Ｈｅａｔｈ，Ｒ．Ｊ．，Ｇｏｌｄｆｉｎｅ，Ｈ．，および Ｒｏｃｋ，Ｃ．Ｏ．（１９９７） Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７９：７２５７－７２６３］およびＢａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ［Ｍｏｒｂｉｄｏｎｉ，Ｈ．，ｄｅ Ｍｅｎｄｏｚａ，Ｄ．，およびＣｒｏｎａｎ，Ｊｒ．，Ｊ．Ｅ．（１９９６）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７８：４７９４－４８００］等の、いくつかの細菌種において存在する。現在まで、黄色ブドウ球菌ＰｌｓＸのホモログは、記載されまたは単離されていない。グラム陽性菌において、ＰｌｓＸの機能を決定することが残されているが、ｐｌｓＸは、その遺伝子を破壊するための度重なる試みが不成功であったという表れに基づいて

、本質的な遺伝子でありそうである［Ｍｏｒｂｉｄｏｎｉ，Ｈ．，ｄｅ Ｍｅｎｄｏｚａ，Ｄ．，およびＣｒｏｎａｎ，Ｊｒ．，Ｊ．Ｅ．（１９９６）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７８：４７９４－４８００］。

【０１５８】

バクテリオファージが特定の細胞成分または標的に作用することにより宿主細菌を阻害することに適応したという確証は、その成分が、例えば治療処置における抗菌剤の開発および使用のための適切な標的であることの強い指標を提供する。本発明は、細菌の本質的な遺伝子の単なる同定に加えさらなる方向性を提供するものであり、本発明はまた、標的の阻害因子への接近可能性の指標、およびその標的に作用するファージが発育し持続できる時間にわたりその標的が充分に安定である（例えば、速い速度の変異とはならない）という指標、を提供するものである。したがって、本発明は、特に抗菌剤開発のための適切な標的を当てそうなＳＴＡＡＵ＿Ｒ４を同定する。

【０１５９】

ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の相互作用表面の同定

この発明は、部分的には、黄色ブドウ球菌バクテリオファージゲノムによりエンコードされる成長阻害性タンパク質と本質的な黄色ブドウ球菌タンパク質との特異的相互作用に関連する。１つの態様として、この相互作用は、薬のスクリーニングアッセイの基礎を形成する。より具体的には、本発明は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４によりエンコードされるタンパク質および黄色ブドウ球菌バクテリオファージ３Ａ ＯＲＦ ３３タンパク質の相互作用ドメインと関連し、スクリーニングアッセイの基礎を形成する。本発明は、３Ａ ＯＲＦ ３３の同定方法、より好ましくは、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４と３Ａ ＯＲＦ ３３との相互作用に関与するＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドフラグメントの同定方法を提供する。

【０１６０】

当業者に知られたいくつかの手法および技術を用いて、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および３Ａ ＯＲＦ ３３の相互作用フラグメントを同定し、特徴づけることができる。これらのフラグメントは、例えば、アミノ末端－および／またはカルボキシル末端のアミノ酸配列を含む連続した一連の残基のような、２つのタンパク質若しくはそれらの変異体のいずれものアミノ酸配列の部分を有するトランケーションポリペプチドを含んでもよい。

【０１６１】

ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および３Ａ ＯＲＦ ３３のフラグメントは、遺伝子組み換え技術によりクローニングでき、以下で例証するように酵母２－ハイブリッドアッセイを用いて相互作用について試験できる。

【０１６２】

溶液中でのタンパク質の部分的な分解は、多重ドメインタンパク質におけるドメイン境界を線引きするための１つの方法である。タンパク質を限定して消化することにより、最も接近可能な切断部位が優先的に加水分解される。これらの切断部位は、高次構造ドメイン間の結合アミノ酸に典型的なループや高移行可能範囲を含む構造化が少ない領域に優先的に存在する。精製されたＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および３Ａ ＯＲＦ ３３タンパク質は、部分的なタンパク質分解を行うことができる。タンパク質分解は、溶液中で低い濃度のプロテアーゼ（トリプシン、キモトリプシン、エンドプロテイナーゼＧｌｕ－Ｃ、およびＡｓｐ－Ｎ）によりＳＴＡＡＵ＿Ｒ４または３Ａ ＯＲＦ ３３について実行され、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより観察されるように規定されたタンパク質分解産物の生成をもたらすことができる。許容可能な濃度および反応時間は、完全長タンパク質の安定なタンパク質分解産物へのほぼ完全な転換により規定される。タンパク質分解産物は、適切な相互作用のパートナー（３Ａ ＯＲＦ ３３またはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４精製タンパク質）を含むアフィニティークロマトグラフィーにかけられ、相互作用できるタンパク質サブ領域が決定される。相互作用ドメインは、無傷のフラグメントの質量とトリプシンにより（インゲル消化により）完全に消化されたものの両方を測定するために質量分析計により同定され、部分的にタンパク質分解されたフラグメントに含まれるアミノ酸残基がよりよく測定される。両方の

組のデータを用いて、部分的にタンパク質分解されたフラグメントのアミノ酸配列が、正確に決定できる。

【０１６３】

他の手法は、３Ａ　ＯＲＦ　３３またはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の異なる部分を用いたペプチドスクリーニングに基づいており、２つタンパク質間の相互作用を妨害できる各々のポリペプチドからの最小ペプチドを同定するものである。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４と３Ａ　ＯＲＦ　３３との相互作用を妨げることができるフラグメントは２つの相互作用タンパク質いずれかに位置する相互作用ドメインに相当すると仮定される。異なるペプチドフラグメントは、以下に記載されるようなタンパク質：タンパク質結合アッセイの相互作用の競争因子としてスクリーニングできる。タンパク質内の相互作用部位の正確なマッピングは、タンパク質の全アミノ酸配列にわたる小さい重複するフラグメント若しくはペプチドの広範囲なスクリーニングにより実行できる。

【０１６４】

両タンパク質の完全配列についての、適当なＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および３Ａ　ＯＲＦ　３３誘導アミノ酸フラグメントの代表例は、化学合成物である。例えば、複数ピン手法において、ペプチドは、グリコール酸と４－（ヒロドキシメチル）安息香酸に基づくエステルリンカーにより誘導体化されたプラスチックピン上の少量のペプチド（約５０ｎｍｏｌ）の組立により同時に合成される［Ｍａｅｊｉ　１９９１　ＰｅｐｔＲｅｓ，４：１４２－６］。

【０１６５】

黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド

本発明の１つの見地として、ここで「ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４」および「ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド」と呼ばれる黄色ブドウ球菌のポリペプチド、並びに生物学的に、診断に、予防に、臨床にまたは治療に有用なそれらの変異体、およびそれらを含む組成物が提供される。

【０１６６】

本発明の特に好ましい態様には、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４遺伝子の自然発生する対立遺伝子によりエンコードされる黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの変異体がある。本発明は、（ａ）配列番号２の全長について、少なくとも５０％の同一性、好ましくは少なくとも５５％の同一性、好ましくは少なくとも６０％の同一性、好ましくは少なくとも７０％の同一性、好ましくは少なくとも８０％の同一性、より好ましくは少なくとも９０％、さらにより好ましくは少なくとも９５％、最も好ましくは少なくとも９７～９９％、または完全な同一性を有するアミノ酸配列、または（ｂ）配列番号２の全長について、少なくとも７０％の類似性、少なくとも７５％の類似性、少なくもと８０％の類似性、少なくとも９０％の類似性、少なくとも９５％の類似性、少なくもと９７～９９％の類似性、若しくはさらに１００％の類似性を有するアミノ酸配列、を含むまたはこれらからなる単離されたポリペプチドを提供する。

【０１６７】

本発明のポリペプチドには、図１（配列番号２）（特に成熟ポリペプチド）のポリペプチド、また特にＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の生物学的活性を有するポリペプチドおよびフラグメント、また配列番号２のポリペプチド若しくは関連する部分に対して５０またはそれ以上のアミノ酸の少なくとも５０％の同一性を有するもの、好ましくは配列番号２のポリペプチドに対して５０またはそれ以上のアミノ酸の少なくとも５５％、６０％、７０％、または８０％の同一性を、より好ましくは配列番号２のポリペプチドに対して５０またはそれ以上のアミノ酸の少なくとも９０％の同一性、さらにより好ましくは配列番号２のポリペプチドに対して５０またはそれ以上のアミノ酸の少なくとも９５％の同一性、またさらにより好ましくは配列番号２のポリペプチドに対して５０またはそれ以上のアミノ酸の少なくとも９９％の同一性若しくは完全な同一性を有するものが含まれる。

【０１６８】

本発明のポリペプチドはまた、配列番号２のポリペプチドに対して５０またはそれ以上の

アミノ酸の少なくとも７０％、７５％、８０％または９０％の類似性、９５％の類似性若しくはさらに９７～９９％の類似性を有するポリペプチド若しくはタンパク質フラグメントを含む。

【０１６９】

本発明のポリペプチドが黄色ブドウ球菌由来であることが最も好ましいが、同じ分類属の他の生物から得てもよい。本発明のポリペプチドはまた、例えば、同じ分類科または目の生物から得てもよい。

【０１７０】

ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のフラグメントも、本発明に含まれる。これらのフラグメントは、例えば、アミノ末端および／またはカルボキシル末端のアミノ酸配列を含む連続する一連の残基のような、図１（配列番号２）のアミノ酸配列それらのフラグメント若しくは変異体の部分を有するトランケーションポリペプチドを含んでもよい。宿主細胞、特に黄色ブドウ球菌、によりまたはその中で産生された本発明のポリペプチドの分解した形態のものも、また好ましい。さらに好ましくは、アルファ－ヘリックスおよびアルファ－ヘリックス形成領域、ベーター－シートおよびベーター－シート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、可変領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原性指標領域を含むフラグメントのような、構造的もしくは機能的帰属により特徴づけられるフラグメントである。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のフラグメントは、他のタンパク質若しくはタンパク質フラグメントとの融合タンパク質として発現してもよい。

【０１７１】

好ましいフラグメントにはまた、配列番号２のアミノ酸配列からの少なくとも１０、１５、２０、３０、３９、５０、１００、２００、２５０、３００またはそれ以上の連続するアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが含まれる。

【０１７２】

また好ましくは、類似の活性、改善した活性、または減少した望ましくない活性を有するもの等の、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の活性を媒介するフラグメントである生物学的に「活性のある」フラグメントである。また、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性であるフラグメントが含まれる。特に好ましくは、黄色ブドウ球菌の生存力に本質的な機能を付与するドメインを含むフラグメントである。

【０１７３】

本発明のポリペプチドのフラグメントは、ペプチド合成により対応する完全長ポリペプチドを製造するために利用してもよく、したがって、これらの変異体は、本発明の完全長ポリペプチドを製造するための中間体として利用してもよい。

【０１７４】

黄色ブドウ球菌ポリヌクレオチド

ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド、特にここで指定される黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドを提供することは、本発明の１つの目的である。

【０１７５】

本発明の１つの見地として、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドをエンコードする領域を含むポリヌクレオチドを提供し、そのポリヌクレオチドは、配列番号１で表される配列を含む。このようなポリヌクレオチドは、完全長ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４遺伝子、それらのフラグメント若しくは変異体をエンコードする。この完全長遺伝子が、黄色ブドウ球菌のように、これを有する生物の成長および／または生存に本質的であることが予期される。

【０１７６】

本発明のさらなる見地として、完全長ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、特に黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド、それらのフラグメント若しくは変異体をエンコードおよび／または発現する単離された核酸分子が提供される。本発明のさらなる態様には、生

物学的に、診断に、予防に、臨床および治療に有用なポリヌクレオチド、ポリペプチド、それらの変異体、およびそれらを含む組成物が含まれる。

【０１７７】

本発明のポリヌクレオチドは、出発物質として黄色ブドウ球菌細胞、配列番号１に開示されたヌクレオチド情報、および細菌から染色体ＤＮＡフラグメントのクローニングおよび配列決定するような、標準的なクローニングおよびスクリーニング方法を用いて得られる。例えば、配列番号１に開示されたポリヌクレオチド配列のような、本発明のポリヌクレオチド配列を得るためには、Ｅ．ｃｏｌｉ中または他の適当な宿主中の黄色ブドウ球菌の染色体ＤＮＡのクローンライブラリーを、放射線ラベル化オリゴヌクレオチド、好ましくは１７量体またはそれ以上長いものであり、部分的配列由来のものにより、プローブされる。プローブのＤＮＡと同一のものを有するクローンは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を用いて区別できる。ここで用いられる場合、「ストリンジェントな条件」および「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」の語は、配列間で少なくとも９５％および好ましくは少なくとも９７％の同一性がある場合にのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の特定の例は、1×10^{6}ｃｐｍ／ｍｌのラベル化プローブ、５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハーズ溶液、１０％硫酸デキストラン、および２０マイクログラム／ｍｌの変性され剪断されたサケ精液ＤＮＡ、を含む溶液中で４２℃でハイブリダイゼーション担体（例えば、ナイロンまたはニトロセルロースメンブレン）の一晩のインキュベーションに続き、６５℃で０．１×ＳＳＣ中でハイブリダイゼーション担体を洗浄することである。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、当業者によく知られており、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，（１９８９）の特に１１章に例示されている。溶液ハイブリダイゼーションも、本発明により提供されるポリヌクレオチド配列に用いることができる。ハイブリダイゼーションにより同定された個々のクローンを配列決定することにより、クローンの同一性を確認することができる。

【０１７８】

あるいは、ポリヌクレオチドを単離するために、増幅工程を利用できる。この手法では、配列番号１として開示された配列は、２つのオリゴヌクレオチドにより標的とされ、一方はＡＴＧ開始コドン若しくはその上流のコードＤＮＡ鎖の配列と同一であり、他方は終止コドン若しくはその下流の対向する鎖にアニールする。ポリメラーゼ連鎖反応におけるこれらのオリゴヌクレオチドからのプライミングにより、完全長遺伝子コード配列が生じる。このような適当な技術は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）に記載されている。

【０１７９】

さらなる見地として、本発明は、（ａ）配列番号１のポリヌクレオチド配列に対して、少なくもと６０％の同一性、好ましくは少なくとも７０％の同一性、より好ましくは少なくとも８０％の同一性、より好ましくは少なくとも９０％の同一性、さらにより好ましくは少なくとも９５％、最も好ましくは少なくとも９７～９９％若しくは完全な同一性を有するポリヌクレオチド配列；（ｂ）配列番号２の全長に対して、配列番号２と少なくとも５０％の同一性、好ましくは少なくとも５５％の同一性、好ましくは少なくとも６０％の同一性、より好ましくは少なくとも７０％の同一性、より好ましくは少なくとも８０％の同一性、より好ましくは少なくとも９０％、さらにより好ましくは少なくとも９５％、最も好ましくは少なくとも９７～９９％若しくは完全な同一性を有するポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド配列；または上記（ａ）若しくは（ｂ）の配列の相補鎖、を含むまたはこれらからなる単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【０１８０】
本発明は、配列番号１のコード配列に対してその全長にわたり同一なポリヌクレオチド配列を提供する。また、本発明は、それ自身成熟したポリペプチドまたはそれらのフラグメントについてのコード配列、およびリーダー配列もしくは分泌配列、プレ－、プロ－、またはプレプロ－タンパク質配列をエンコードする配列のような、他のコード配列を有するリーディングフレームの成熟ポリペプチド若しくはフラグメントについてのコード配列を提供する。本発明のポリヌクレオチドはまた、例えば、限定されないが、転写されたが翻訳されていない配列、（ロー依存およびロー独立ターミネーションシグナルのような）ターミネーションシグナル、リボソーム結合部位、コザック配列、ｍＲＮＡを安定化するかまたは不安定化する配列、イントロン、およびポリアデニル化シグナルのような、少なくとも１つの非コード５’および３’配列等の、少なくとも１つの非コード配列を含んでもよい。ポリヌクレオチド配列はまた、さらなるアミノ酸をエンコードするさらなるコード配列を含んでもよい。例えば、融合したポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をエンコードすることができる。本発明の特定の態様として、マーカー配列は、ｐＱＥベクターとして提供され（キアゲン社）、Ｇｅｎｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８６：８２１－８２４（１９８９）に記載されたヘキサヒスチジンペプチド、またはＨＡペプチドタグ［Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ３７：７６７（１９８４）］であり、その両方がそれらに融合したポリペプチド配列を精製するのに有用である。本発明のポリヌクレオチドはまた、限定されないが、構造遺伝子および遺伝子発現を制御するそれに自然に関係する配列を含むポリヌクレオチドを含んでもよい。

【０１８１】
本発明のポリヌクレオチドが黄色ブドウ球菌由来であることが最も好ましいが、同じ分類の属の他の生物から得てもよい。本発明のポリヌクレオチドは、例えば、同じ分類の科または目の生物から得てもよい。

【０１８２】
さらに好ましい態様は、配列番号２の黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドのアミノ酸配列を有する黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４変異体をエンコードするポリヌクレオチドであり、この配列のいくつかの、少しの、１０～５０、５～１０、１～５、１～３、２、１または０のアミノ酸残基がいずれもの組み合わせにより置換され、修飾され、削除および／または付加されている。これらのポリヌクレオチドで特に好ましくは、それらがエンコードする黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドのコード配列や活性を変化させないサイレントなヌクレオチド変異をエンコードするものである。

【０１８３】
好ましい態様は、配列番号１のＤＮＡによりエンコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能若しくは活性を保持したポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドである。

【０１８４】
この発明の特定の好ましい態様に従い、図１のポリヌクレオチドのような、特にストリンジェント条件で、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドが提供される。

【０１８５】
本発明のポリヌクレオチドは、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４遺伝子と高い度合いで配列同一性を有する遺伝子をエンコードする完全長ｃＤＮＡおよびゲノムクローンを単離するための、ＲＮＡ、ｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡに対するハイブリダイゼーションプローブとして有用である。このようなプローブは、一般的に少なくとも１５から約１００残基または塩基対を含むが、このようなプローブは、好ましくは約２０から５０のヌクレオチド残基または塩基対を有する。特に好ましいプローブは、長さ約２０から約３０のヌクレオチド残基または塩基対である。

【０１８６】
黄色ブドウ球菌以外の細菌種からの関連するＳＴＡＡＵ＿Ｒ４遺伝子のコード領域を、配

列番号１に提供されるＤＮＡ配列を用いたライブラリーのスクリーニングにより、オリゴヌクレオチドプローブを合成するために単離してもよい。本発明の遺伝子と相補的な配列を有するラベル化されたオリゴヌクレオチドを用いてｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡまたはｍＲＮＡのライブラリーがスクリーニングされ、ライブラリーのどの構成員にプローブがハイブリダイズするかが測定される。

【０１８７】

例えば、ｃＤＮＡ末端の迅速増幅法（ＲＡＣＥ）に基づくもの［例えば、Ｆｒｏｈｍａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：８９９８－９００２，１９８８を参照のこと］等、完全長ＤＮＡを得るため、または短いＤＮＡを伸ばすための利用可能で当業者によく知られたいくつかの方法がある。この技術の最近の改良では、例えばＭＡＲＡＴＨＯＮ技術（クロンテックラボラトリーズ社）により例示されるように、長いｃＤＮＡついての顕著に単純化された探索がある。ＭＡＲＡＴＨＯＮ技術では、ｃＤＮＡは、選択された細胞から抽出されたｍＲＮＡから調製され、「アダプター」配列がそれぞれの末端にリゲートされる。そして、遺伝子特異的およびアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いてＤＮＡの「失われた」５’末端を増幅するために、ＰＣＲによる核酸の増幅が行われる。「巣に入った」プライマーを用いて、これは増幅産物内でアニールするように設計されたプライマーであり（典型的には、アダプター配列中のさらなる３’にアニールするアダプター特異的プライマーおよび選択された遺伝子配列中のさらなる５’にアニールする遺伝子特異的プライマーである）、ＰＣＲ反応が繰り返される。この反応生成物は、ＤＮＡ配列決定により分析でき、完全配列を得るために生成物を既存のＤＮＡに直接結合すること、または５’プライマーの設計のために新たな配列情報を用いて別個の完全長ＰＣＲを実行すること、のいずれかにより完全長ＤＮＡを構築できる。

【０１８８】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、例えば、ポリヌクレオチドアッセイに関連して本明細書でさらに議論するように、疾患、特にヒトの疾患の処置および診断の発見のための研究試薬および物質として、利用してもよい。

【０１８９】

配列番号１の配列由来のオリゴヌクレオチドである本発明のポリヌクレオチドは、ここで全体もしくは部分的に同定されたポリヌクレオチドが感染した組織の細菌中で転写されるかどうかを測定するための反応におけるＰＣＲプライマーの設計に有用である。即ち、本発明のポリヌクレオチドは、これらの配列を有する細菌株による感染の診断に有用である。このような配列は病原体が成した感染の段階および感染の型の診断にも有用であることが認識される。

【０１９０】

本発明はまた、成熟タンパク質に加えさらなるアミノ若しくはカルボキシル末端アミノ酸、または成熟ポリペプチド内にあるアミノ酸であるポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドを提供する。このような配列は、とりわけ、前駆体から成熟形態へのタンパク質のプロセシングに役割を果たし、タンパク質を輸送できるようにし、タンパク質の半減期を長くし若しくは短くし、またはアッセイや作製のためのタンパク質の操作を容易にしうる。ｉｎ　ｖｉｖｏの場合は一般的に、さらなるアミノ酸は、細胞酵素により成熟タンパク質からプロセッシングにより除かれうる。

【０１９１】

前駆体タンパク質は、１またはそれ以上のプロ配列に融合したポリペプチドの成熟形態を有しており、ポリペプチドの不活性形態でもよい。プロ配列が除去されると、そのような不活性前駆体は、一般的に活性化される。プロ配列のいくつか若しくは全部は、活性化の前に除去されてもよい。一般的に、このような前駆体は、プロタンパク質と呼ばれる。

【０１９２】

したがって、本発明のポリヌクレオチドは、成熟タンパク質、成熟タンパク質に加えてリーダー配列（プレタンパク質と呼ばれうる）、プレタンパク質のリーダー配列ではない１

またはそれ以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、またはプレプロタンパク質をエンコードし、ここでプレプロタンパク質は、プロタンパク質の前駆体であり、リーダー配列および１またはそれ以上のプロ配列を有し、一般的にポリペプチドの活性かつ成熟形態を生じるプロセシング工程の間に除去される。

【０１９３】

ヌクレオチドの標準的なＡ、Ｇ、Ｃ、Ｔ／Ｕの表示に加え、「Ｎ」の語は、本発明の特定のポリヌクレオチドを記載するのにも用いられる。「Ｎ」は、４つのＤＮＡまたはＲＮＡのいずれもがＤＮＡまたはＲＮＡ配列のそのように指定された位置にあってもよいが、Ｎは、正しいリーディングフレームで読まれる隣接するヌクレオチド位置との組み合わせをとったときに、このようなリーディングフレームで時期尚早の終止コドンを発生する効果を有することとなるヌクレオチドでないことが好ましい。

【０１９４】

本発明の各々のおよびすべてのポリヌクレオチドについて、これに相補的なポリヌクレオチドも提供される。

【０１９５】

ベクター、宿主および発現系

本発明は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターにより遺伝子工学により作られた宿主細胞、および組み換え技術による本発明のポリペプチドの産生にも関連する。細胞を含まない翻訳系を利用して、本発明のＤＮＡ構築物由来のＲＮＡを用いてこのようなタンパク質を製造することもできる。

【０１９６】

本発明の組み換えＳＴＡＡＵ＿Ｒ４およびバクテリオファージポリペプチドは、当業者によく知られた工程により、発現系を含む遺伝子工学により作られた宿主細胞から調製してもよい。よって、さらなる見地として、本発明は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４若しくはバクテリオファージポリヌクレオチド若しくは本発明のポリヌクレオチドを含む発現系に、このような発現系により遺伝子工学により作られた宿主細胞に、および組み換え技術による本発明のポリペプチドの製造に、関連する。

【０１９７】

本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの組み換え産生について、宿主細胞は、遺伝子工学により作って、発現系若しくはそれらの部分または本発明のポリヌクレオチドを取り込むことができる。適切な宿主の代表的な例には、細菌細胞（グラム陽性およびグラム陰性）、真菌細胞、昆虫細胞、動物細胞および植物細胞が含まれる。ポリヌクレオチドは、塩化カルシウム処理によるＤＮＡを取り込む能力の誘発のような（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，前掲）、標準的な化学的処理プロトコルにより細菌に導入される。真菌（例えば酵母）へのポリヌクレオチドの導入は、所望により、酢酸リチウム媒介形質転換のような標準的な化学的方法により、行われる。

【０１９８】

多数の発現系が、本発明のポリペプチドを製造するために有用である。このようなベクターには、なかでも染色体誘導の、エピソーム誘導のおよびウイルス誘導のベクターが含まれる。例えば、細菌プラスミド由来の、バクテリオファージ由来の、トランスポゾン由来の、酵母エピソーム由来の、挿入因子由来の、酵母染色体因子由来の、ウイルス由来の、およびそれらの組み合わせ由来の、ベクターが、本発明に有用である。

【０１９９】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウム若しくはエタノール沈殿、酸若しくは尿素抽出、アニオン若しくはカチオン交換クロマトグラフィー、リン酸セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィー等のよく知られた方法により組み換え細胞培地から回収および精製される。ポリペプチドが単離および／または精製の間で変性された場合、活性コンホメーションを回復するために再折りたたみのよく知られた技術が利用される。

【０２００】
診断の、予後の、抗原型決定の、および変異のアッセイ
この発明はまた、診断試薬として用いるための本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用に関連する。真核生物、特に哺乳動物、とりわけヒトにおける黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの検出は、疾患の診断、疾患の段階付け、または感染生物の薬への反応の診断方法を提供することとなる。真核生物、特に哺乳動物、とりわけヒトで、特に黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４遺伝子若しくはタンパク質を含む生物に感染した若しくは感染の疑いのあるものは、種々のよく知られた技術およびここで提供される技術により核酸若しくはアミノ酸レベルで検出してもよい。

【０２０１】
予後、診断または他の分析のためのポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、推定的に感染したおよび／または感染した個体の身体物質から得てもよい。これらの供給源、特にＤＮＡまたはＲＮＡからのポリヌクレオチドは、検出に直接用いられるか、または分析に先立ち、ＰＣＲや他のいずれかの増幅技術を用いて酵素的に増幅してもよい。ＲＮＡ、特にｍＲＮＡ、ｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡを、同様に用いてもよい。増幅を用いて、個体に存在する感染性若しくは抵抗性生物の種および株の特徴付けを、生物の選択されたポリヌクレオチドの遺伝子型の分析により行ってもよい。欠失および挿入は、関連する生物、好ましくは同じ属の異なる種若しくは同じ種の異なる株から選択された参照配列の遺伝子型と比較した、増幅された産物の大きさの変化により検出することができる。

【０２０２】
点突然変異は、増幅したＤＮＡをラベル化したＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズさせることにより同定できる。完全に若しくは顕著にマッチした配列は、ＤＮＡ若しくはＲＮＡに対してそれぞれＤＮａｓｅ若しくはＲＮａｓｅの消化により、または融解温度若しくは再生動態の違いを検出することにより、不完全に若しくはより顕著にミスマッチした２本鎖から識別できる。ポリヌクレオチド配列の相違は、参照配列と比較したゲル中でのポリヌクレオチドフラグメントの電気泳動の移動度の変化によっても検出できる。これは、変成剤の使用または使用なしに行ってもよい。ポリヌクレオチドの相違は、ＤＮＡまたはＲＮＡの直接の配列決定により検出してもよい。例えば、Ｍｙｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ，（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３０，１２４２を参照のこと。特定の位置での配列の変化は、ＲＮａｓｅ、Ｖ１およびＳ１保護アッセイまたは化学的切断方法のようなヌクレアーゼ保護アッセイにより明らかにしてもよい。例えば、Ｃｏｔｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ８５，４３９７－４４０１を参照のこと。

【０２０３】
他の態様として、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ヌクレオチド配列若しくはそれらのフラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイが、例えば、遺伝的変異、抗原型、分類学的分類または同定などの効果的なスクリーニングを行うために構築できる。アレイ技術の方法はよく知られており、一般的な実用性があり、遺伝子発現、遺伝的結合、および遺伝的変異性等の分子遺伝学における種々の疑問に対峙するために用いることができる（例えば、Ｃｈｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７４，６１０を参照のこと）。

【０２０４】
したがって、他の見地として、本発明は、（ａ）本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号１のヌクレオチド配列若しくはそれらのフラグメント；（ｂ）（ａ）のものに相補的なヌクレオチド配列；（ｃ）本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号２のポリペプチド若しくはそれらのフラグメント；または（ｄ）本発明のポリペプチドに、好ましくは配列番号２のポリペプチド若しくはそれらのフラグメントに対する抗体、を含む診断キットに関連する。

【０２０５】
このようないずれものキットにおいて、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）または（ｄ）は、実質的

な成分を含んでもよいことが認識できる。このようなキットは、特に疾患または疾患の罹病性の診断に用いられる。

【０２０６】

この発明はまた、診断試薬としての本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチドの使用に関連する。本発明のポリヌクレオチドの、好ましくは配列番号１の変異形態の検出は、疾患または病原性に関連するものであり、疾患の診断、疾患の経過の予後、疾患の段階の決定、または疾患の罹病性の診断の一助となるかまたこれらを定義する診断ツールを提供することとなり、これらはポリヌクレオチドの発現不足、発現過剰または変化した発現によりもたらされるものである。このようなポリヌクレオチド中に変異を有する生物、特に感染性の生物は、本明細書の他の部分に記載されているような、種々の技術によりポリヌクレオチドレベルで検出してもよい。

【０２０７】

本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチド配列はまた、生物染色体の同定にも有用である。この配列は、生物の染色体、特に黄色ブドウ球菌染色体の特定の位置を特異的に標的とし、結合することができる。本発明による染色体に関連する配列のマッピングは、これらの配列を病原性の潜在性および／または生物の生態学的地位および／または生物の薬への耐性、およびその生物に対する遺伝子の本質性と関連づける重要な工程となりうる。配列が正確な染色体の位置についてマッピングされると、染色体上での配列の物理的位置が、遺伝的マップデータと関連づけることができる。このようなデータは、配列データベースにおいてオンラインで見つけてもよい。同じ染色体領域でマッピングされた遺伝子と疾患との関連性は、例えば、コンジュゲーションによるような、リンケージ分析（物理的に隣接する遺伝子の共同遺伝）若しくは交配実験等の、知られた遺伝子的方法を通じて同定される。

【０２０８】

第１の表現型を有する生物と、異なった第２の表現型を有する生物とのポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド配列の違いも、測定することができる。第１の表現型を有するいくつかのまたはすべての生物において変異が観察されるが、第２の表現型を有するいずれの生物においても変異が観察されない場合、変異は第１の表現型の原因物質によりそうである。

【０２０９】

予後、診断または他の分析のためのポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、推定的に感染したおよび／または感染した個体の身体物質から得てもよい。これらの供給源のいずれかからの、特にＤＮＡまたはポリヌクレオチドは、検出に直接用いてもよく、または黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチド増幅プライマーによるＰＣＲや他の増幅技術を用いて酵素的に増幅してもよい。ＲＮＡ、特にｍＲＮＡ、またはｃＤＮＡに逆転写したＲＮＡは、診断にも有用である。サンプルからの黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４関連ポリヌクレオチドの増幅に続き、感染性若しくは耐性生物の種および株の特徴付けが、１またはそれ以上の参照ポリヌクレオチドと比べた増幅されたポリヌクレオチド、または関連する生物（即ち黄色ブドウ球菌の知られた株）からの標準と比べた配列の分析により、行われる。

【０２１０】

本発明は、黄色ブドウ球菌により引き起こされるような細菌感染を診断する工程をさらに提供し、その工程は、身体物質のような個体由来のサンプルから、疾患を有しない個体から得られたサンプルと比べた配列番号１に開示された配列を有するポリヌクレオチドの増加した発現レベルを測定することを含む。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチドの増加したまたは減少した発現は、例えば、ＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、ＲＮａｓｅ保護、ノーザンブロッティングおよび他のハイブリダイゼーション方法、並びに分光光度計のような、ポリヌクレオチドの定量としてこの分野でよく知られた方法のいずれをも用いて測定することができる。

【０２１１】

さらに、正常な対照組織サンプルと比較したＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの過剰発現を検出するための本発明にしたがった診断アッセイは、例えば感染の存在を検出するために用いてもよい。身体物質のような宿主由来のサンプル中の黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドのレベルを測定するために用いることができるアッセイ技術は、当業者によく知られている。このようなアッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウエスタンブロット分析、抗体サンドウィッチ分析、抗体検出およびＥＬＩＳＡアッセイが含まれる。

【０２１２】

黄色ブドウ球菌ゲノム配列のグリッディングおよびポリヌクレオチド除去

本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドアレイ、好ましくは高密度アレイ若しくはグリッドの成分として用いてもよい。これらの高密度アレイは、診断および予後目的に特に有用である。例えば、異なる遺伝子をそれぞれ含み、本発明のポリペプチド若しくはポリヌクレオチドをそれぞれさらに含む１組のスポットは、身体サンプルから得た若しくはそれ由来のプローブを用いて、個体中の特定のポリヌクレオチド配列若しくは関連する配列の存在を測定するために、ハイブリダイゼーションや核酸増幅のように、プローブするために用いてもよい。

【０２１３】

黄色ブドウ球菌ペプチドまたはポリペプチドに特異的な抗体

本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドおよびポリヌクレオチド若しくはそれらの変異体、またはそれらを発現する細胞は、このようなポリペプチド若しくはポリヌクレオチドそれぞれに免疫特異的な抗体を製造するための免疫原として有用である。

【０２１４】

本発明のある好ましい態様として、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはそれらをエンコードするポリヌクレオチドに対する抗体が提供される。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドまたはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチドに対する抗体は、感染、特に細菌感染の処置に有用である。

【０２１５】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して生産された抗体は、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド、それらのいずれかまたは両方のエピトープ保持フラグメント、それらのいずれかまたは両方のアナログ、それらのいずれかまたは両方を発現する細胞、を通常のプロトコルを用いて動物、好ましくは非ヒトに投与することにより得られる。モノクローナル抗体の調製には、連続細胞系培地により産生される抗体を提供するこの分野で知られたいずれの技術も有用である。例としては、Ｋｏｈｌｅｒ，Ｇ．およびＭｉｌｓｔｅｉｎ，Ｃ．，Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７（１９７５）；Ｋｏｚｂｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ ４：７２（１９８３）；およびＣｏｌｅ ｅｔ ａｌ．，ｐｇ．９６－９６、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｂｉｔｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．（１９８５）にあるような、種々の技術が含まれる。

【０２１６】

単鎖抗体製造のための技術（米国特許番号：４，９４６，９６８）は、この発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する単鎖抗体を製造するために適用できる。また、トランスジェニックマウス、または他の哺乳動物も、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに免疫特異的なヒト化抗体を発現させるのに有用である。

【０２１７】

抗体が治療的に投与されると、抗体若しくはそれらの変異体は、個体中で免疫原性が少なくなるように好ましくは修飾される。例えば、個体がヒトの場合、抗体は最も好ましくは「ヒト化」されており、ここでは相補鎖決定領域またはハイブリドーマ誘導抗体の領域は、ヒトモノクローナル抗体に移植される。これは、例えばＪｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６），Ｎａｔｕｒｅ ３２１，５２２－５２５またはＴｅｍｐｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９，２６６－２７３に記載されいる。

【０２１８】
あるいは、ファージディスプレイ技術は、本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対する結合活性により抗体遺伝子を選択するために有用である。１つの可能性のあるスキームとして、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に特異的な抗体フラグメントは、線状ファージのコートタンパク質との融合体として発現した抗体遺伝子の免疫ライブラリーから選択される。あるいは、ナイーブライブラリーが、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に特化された抗体またはナイーブライブラリーからの抗体をエンコードする遺伝子を同定するためにファージディスプレイ技術により、スクリーニングされる［ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ，ｅｔ ａｌ．，（１９９０），Ｎａｔｕｒｅ ３４８，５５２－５５４；Ｍａｒｋｓ，ｅｔ ａｌ．，（１９９２）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０，９６９－７８３；最近の参考文献は、ｄｅ Ｈａａｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７４：１８２１８－１８２３０］。種々の標的について、ナノモル以下でのアフィニティーによる抗体を回収する能力は、免疫性を与える必要をなくす。これらの抗体のアフィニティーはまた、例えば、チェーンシャッフリング［Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２８］により改善できる。

【０２１９】
上述の抗体は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを発現するクローンを単離するまたは同定するために用いてもよく、例えば、イムノアフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドまたはポリヌクレオチドを精製してもよい。

【０２２０】
ポリペプチドの抗原的に若しくは免疫学的に等価な誘導体または融合タンパク質のような、本発明の変異体ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドはまた、マウス、またはラット若しくはニワトリのような他の動物を免疫するための免疫原として有用である。融合タンパク質は、キャリアとして作用するポリペプチドに対して安定性を提供し、若しくはアジュバントして、またはその両方として作用する。あるいは、抗原は、例えばコンジュゲーションにより、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシニアンまたは破傷風類毒素のような、免疫原性キャリアタンパク質に関係する。あるいは、抗体が治療的に投与されるとき、あるいはポリペプチドまたはそれらの抗原的に若しくは免疫学的に等価なポリペプチドの多重コピーを含む多重抗原性ポリペプチドは、キャリアの使用を不用にするように免疫原性を改善するのに充分に抗原性でもよい。

【０２２１】
本発明の見地にしたがって、治療的若しくは予防的目的、特に遺伝的免疫化のために本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチドの使用が提供される。遺伝的免疫化における本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチドの使用は、筋肉へのプラスミドＤＮＡの直接注入のような適当な運搬方法［Ｗｏｌｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ（１９９２）１：３６３，Ｍａｎｔｈｏｒｐｅ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．（１９８３）４：４１９］、特異的タンパク質キャリアによるＤＮＡ複合体の運搬［Ｗｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．（１９８９）２６４：１６９８５］、リン酸カルシウムによるＤＮＡの共沈［ＢｅｎｖｅｎｉｓｔｙおよびＲｅｓｈｅｆ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，（１９８６）８３：９５５１］、種々の形態のリポソームへのＤＮＡの包含［Ｋａｎｅｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８９）２４３：３７５］、パーティクル砲撃［Ｔａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９２）３５６：１５２，Ｅｉｓｅｎｂｒａｕｎ ｅｔ ａｌ．，ＤＮＡ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ（１９９３）１２：７９１］、またはクローニングしたレトロウイルスベクターを用いたｉｎ ｖｉｖｏ感染［Ｓｅｅｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ，Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８４）８１：５８４９］、が好ましくは利用される。

【０２２２】
アンタゴニストおよびアゴニスト：アッセイおよび分子
本発明は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４がバクテリオファージ３Ａ ＯＲＦ ３３阻害性因子の標的であるという発見に一部基づいている。出願人は、抗菌剤開発におけるその相互作用の利

用を認識した。特に、本発明者らは、１）ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４が、細菌の阻害の決定的な標的となること；２）３Ａ　ＯＲＦ　３３またはそれらの誘導体若しくは機能的疑似物が、細菌の成長を阻害するのに有用であること；および３）黄色ブドウ球菌のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４若しくはそれらのフラグメントと３Ａ　ＯＲＦ　３３との相互作用が、薬若しくは抗菌剤のスクリーニングおよび合理的な設計の標的として有用であること、を認識した。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性を直接阻害する方法に加えて、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の発現を阻害する方法も、抗菌活性にとって興味深い。

【０２２３】

本発明のいくつかの態様として、結合しまたは相互作用して、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドの活性若しくは発現を阻害若しくは活性化する化合物を同定する方法を提供し、その方法は、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを、結合するかまたは化合物と他の相互作用を評価するために、結合できるかまたは化合物とポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドとの他の相互作用ができる条件下で、スクリーニングされる化合物に接触させること、ここでこのような結合または相互作用は好ましくは結合またはポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドとの化合物の相互作用に応じた検出可能なシグナルを提供できる第２の成分に関連しており；および化合物が結合しまたは相互作用して、ポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドの活性若しくは発現を活性化若しくは阻害するかどうかを、結合またはポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドとの化合物の相互作用から生じるシグナルの存在または不存在を検出することにより、測定すること、を含む。

【０２２４】

可能性のあるアンタゴニストには、とりわけ、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドに結合し、それによりその活性または発現を阻害しまたは無力化する小有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。可能性のあるアンタゴニストはまた、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に誘導される活性を誘導せず、それにより黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを結合から排除して黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドの作用若しくは発現を妨げる結合分子のような結合分子の同じ部位に結合する非常に関連したタンパク質若しくは抗体のような、小有機分子、ペプチド、ポリペプチドでもよい。

【０２２５】

可能性のあるアンタゴニストにはまた、ポリペプチドの結合部位に結合して占拠し、それにより細胞結合分子への結合を妨げ、正常な生物学的活性が妨げされるようにする、小分子が含まれる。小分子の例には、限定されないが、小有機分子、ペプチドまたはペプチド様分子が含まれる。他の可能性のあるアンタゴニストには、アンチセンス分子が含まれる［Ｏｋａｎｏ，（１９９１）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６，５６０を参照のこと；またこれらの分子の説明は、Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ　Ａｓ　Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ　ｏｆ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８）を参照のこと］。好ましい可能性のあるアンタゴニストには、３Ａ　ＯＲＦ　３３およびＳＴＡＡＵ＿Ｒ４に関連する化合物およびそれらの変異体が含まれる。可能性のあるポリペプチドアンタゴニストの他の例には、抗体またはいくつかの場合には、場合によってはポリペプチドのリガンド、基質、レセプター、酵素等に非常に関連するオリゴヌクレオチド若しくはタンパク質が含まれ、例えば、リガンド、基質、レセプター、酵素等のフラグメント、または本発明のポリペプチドに結合するが反応を誘発せず、ポリペプチドの活性が妨げられる小分子が含まれる。

【０２２６】

化合物は、例えば、細胞、細胞を含まない調製物、化学ライブラリー、および天然物混合物などの種々の供給源から同定してもよい。これらの基質およびリガンドは、天然の基質およびリガンドであっても、または構造的若しくは機能的疑似物であってもよい。例えば、Ｃｏｌｉｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１（２）：第５章（１９９１）を参照のこと。ペプチド調節因子はまた

、特定の長さのすべての可能なペプチドの大規模ランダムライブラリーをスクリーニングすることより選択できる。

【０２２７】

３Ａ　ＯＲＦ　３３のポリペプチド配列由来の化合物は、これらのＯＲＦの全アミノ酸配列にわたり小さい重複ペプチドを示すフラグメントを示しうる。３Ａ　ＯＲＦ　３３のフラグメントは、上述したように製造できる。

【０２２８】

本発明の特定のポリペプチドは、天然黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの生体疑似物、機能的疑似物である。これらの機能的疑似物は、とりわけ、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの活性に拮抗するために、または上述した方法による抗原若しくは免疫原として有用である。本発明のポリペプチドの機能的疑似物には、限定されないが、トランケートされたポリペプチドが含まれる。これらの機能性疑似物の各々をエンコードするポリヌクレオチドは、各々の疑似ポリペプチドを発現するための発現カセットとして用いてもよい。これらのカセットは、所望によりカセット同士をリゲートする便利な手段として５’および３’制限部位を含むことが好ましい。これらのカセットがこの分野で知られたまたは本明細書のいずれかに記載された遺伝子発現シグナルを含むことがさらに好ましい。

【０２２９】

本発明によるスクリーニングアッセイ

本発明のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド若しくはポリヌクレオチドの機能を刺激するまたは阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法を考案するのは、望ましいことである。したがって、本発明は、本発明のポリペプチド若しくはポリヌクレオチドの機能を調節する化合物を同定するための化合物のスクリーニング方法を提供する。一般的に、アンタゴニストを、治療および予防目的で利用してもよい。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のアゴニストが、例えば診断若しくは他の目的のために培養されたサンプル中の細菌の成長速度を増加するために、有用であることが企図される。

【０２３０】

ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４がバクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３産物の標的であり、これが阻害性因子として作用することが確定された。出願人は、抗菌剤の開発においてその相互作用の利用を認識した。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のようなポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド標的は、細菌阻害のための決定的な標的である。例えば、黄色ブドウ球菌のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および３Ａ　ＯＲＦ　３３が薬若しくは抗菌剤のスクリーニングおよび合理的な設計に用いられるように、黄色ブドウ球菌バクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３またはそれらの誘導体若しくは機能的疑似物は、細菌成長の阻害、並びにポリペプチド間で起こる相互作用、結合、阻害および／または活性化に有用である。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性のような標的を直接阻害する方法に加えて、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４発現のような標的を阻害する方法も、抗菌活性にとって興味深い。

【０２３１】

好ましい態様として、この方法は、阻害性ＯＲＦ産物若しくはそれらのフラグメントの、ＯＲＦ産物若しくはフラグメントとの相互作用を維持する対応する細菌の標的若しくはそれらのフラグメントとの相互作用を伴う。成分間の相互作用による妨害はモニターでき、そしてそのような妨害は、標的分子の活性を阻害し、活性化し、または増強する化合物でありうることの表示である。

【０２３２】

ａ．結合アッセイ

ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および配列番号２のアミノ酸配列若しくはそれらのフラグメントを含むポリペプチドのようなタンパク質標的への候補化合物の結合を検査する多数の方法がある。候補化合物の、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド若しくはポリヌクレオチドへの、またはポリペプチドを有する細胞若しくは担体またはポリペプチドを含む融合タンパク質への結合を、候補化合物に直接若しくは間接に関係するラベルを用いて測定するスクリーニング

方法は、本発明に有用である。

【０２３３】

スクリーニング方法は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４若しくはそれらのフラグメントに結合するための成分である３Ａ　ＯＲＦ　３３若しくはフラグメントのようなラベル化された競争因子の結合の競争を伴ってもよい。

【０２３４】

本発明にしたがったスクリーニングアッセイの非限定の例には、以下のものが含まれる［また、Ｓｉｔｔａｍｐａｌａｍ　ｅｔ　ａｌ．１９９７　Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．３：３８４－９１にも総説されている。］。

【０２３５】

ｉ）時間分解蛍光共鳴エネルギー転移（ＴＲ－ＦＲＥＴ）

蛍光共鳴エネルギー転移を用いた２つのタンパク質の結合阻害を測定する方法［ＦＲＥＴ；ｄｅ　Ａｎｇｅｌｉｓ，１９９９，Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ］であるＦＲＥＴは、蛍光ドナー（Ｄ）の放射スペクトルが蛍光アクセプター（Ａ）の励起スペクトルに重なるときの、極近接した（通常＜１００Ａの隔たり）ＤとＡとの間で起こる量子力学現象である。クラゲのＡｅｑｕｏｒｅａ　ｖｉｃｔｏｒｉａからのグリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の変異体は、ポリペプチドまたはタンパク質に融合し、タンパク質－タンパク質相互作用を測定するためのＦＲＥＴ理論におけるＤ－Ａ対として機能する。シアン（ＣＦＰ：Ｄ）およびイエロー（ＹＦＰ：Ａ）蛍光タンパク質は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド若しくはそれらのフラグメント、および３Ａ　ＯＲＦ　３３ポリペプチドにそれぞれ結合する。最適の近接において、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドと３Ａ　ＯＲＦ　３３ポリペプチドとの相互作用は、ＹＦＰ蛍光の増加を伴うＣＦＰ蛍光強度減少の原因となる。

【０２３６】

適切にラベル化されたＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および３Ａ　ＯＲＦ　３３ポリペプチドの混合物への候補調整因子の添加は、例えば、候補阻害因子を用いないサンプルと比べた３Ａ　ＯＲＦ　３３の所定濃度におけるＹＦＰ蛍光の減少により明示される、エネルギー変換の阻害をもたらすこととなる。

【０２３７】

時間分解ＦＲＥＴ（ＴＲ－ＦＲＥＴまたはＨＴＲＦ［均一時間分解エネルギー転移］）と称するＦＲＥＴ技術の拡張は、ハイスループットスクリーニングとの関連で、タンパク質－タンパク質相互作用の同定をそれ自身特によく付与する。要約すると、ＴＲ－ＦＲＥＴは、ユーロピウム（Ｅｕ）のような稀土クリプタートの長命の蛍光およびアロフィコシアニン（ＡＰＣ）のような適当なアクセプターへの非放射性エネルギー転移による増幅に基づいた均一アッセイ方法を構成する。ＴＲ－ＦＲＥＴの原理は、時間的および空間的選択性を通じた放出されたシグナルの２重識別を可能にする。ＡＰＣ（アクセプター）からの蛍光放射の寿命には、非放射性エネルギー転移の存在におけるＥｕ（ドナー）の寿命に等しい寄与が含まれるので、長命のＡＰＣアクセプターシグナルは、エネルギー転移の不存在においてその自然の即座の蛍光から分解できる。ＥｕおよびＡＰＣは、ポリペプチドのような相互作用分子のペアを介して近接に至る。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド若しくはそれらのフラグメントと３Ａ　ＯＲＦ　３３ポリペプチドとの相互作用を証明するために、それ自身ＥｕもしくはＡＰＣのいずれかにコンジュゲートする結合分子により認識されるＮ末端若しくはＣ末端タグを含むように、組み換えＤＮＡ手法を用いてそれぞれのポリペプチドがラベル化される。（エピトープに対して誘導された）抗体または（ビオチンに対して誘導された）ストレプトアビジン等の、種々の結合分子が利用できる。あるいは、相互作用するタンパク質の一方または両方が、ＥｕまたはＡＰＣのいずれかに直接コンジュゲートする。

【０２３８】

いくつかの可能なアッセイ形態の１つとして、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４若しくはそれらのフラグメントは、ポリヒスチジンタグとの融合体として発現し、抗ポリヒスチジンＥｕ抗体コン

ジュゲートにより認識され；３Ａ　ＯＲＦ　３３は、ＧＳＴとの融合体として発現し、抗ＧＳＴ　ＡＰＣ抗体コンジュゲートにより検出される。最良の近接下並びに抗ポリヒスチジンおよび抗ＧＳＴ抗体コンジュゲートの存在下において、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４若しくはそれらのフラグメントと３Ａ　ＯＲＦ　３３ポリペプチドとの相互作用は、最適には６６５ｎｍで検出される、ＥｕからＡＰＣへの非放射性の時間分解エネルギー変換を誘導する。

【０２３９】

適切にラベル化されたＳＴＡＡＵ＿Ｒ４と３Ａ　ＯＲＦ　３３ポリペプチドとの混合物への候補調節因子の添加は、例えば、候補阻害因子を用いないサンプルと比べた３Ａ　ＯＲＦ　３３の所定濃度におけるＡＰＣ蛍光の減少により明示される、エネルギー変換の阻害をもたらすこととなる。

【０２４０】

ｉｉ）蛍光偏光

蛍光偏光測定は、タンパク質－タンパク質結合を定量するための他の有用な方法である。蛍光的にタグ化した分子の蛍光偏光値は、回転相関時間または回転速度に依存する。蛍光的にラベル化されたポリペプチド（例えば、３Ａ　ＯＲＦ　３３またはそれらの結合フラグメント）に関係する黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド若しくはそれらのフラグメントにより形成されるようなタンパク質複合体は、蛍光的にラベル化されたポリペプチドよりも高い偏光値を有する。候補阻害因子がＳＴＡＡＵ＿Ｒ４とそのポリペプチド結合パートナーとの相互作用を妨害または阻害する場合、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４相互作用の候補阻害因子の包含は、候補阻害因子を有しない混合物に比べた蛍光偏光の減少をもたらす。この方法は、ポリペプチドまたはタンパク質複合体の形成を妨害する小分子を特徴づけるために用いることが好ましい。

【０２４１】

ｉｉｉ）表面プラスモン共鳴

タンパク質：タンパク質相互作用の阻害因子をスクリーニングするための他の強力なアッセイは、表面プラスモン共鳴である。表面プラスモン共鳴は、水溶液相（検体）からセンサー（リガンド）上に固定化された第２のタンパク質若しくは生体分子への１つのタンパク質若しくは他の生体分子の結合により引き起こされるセンサー表面近くの質量の変化により２つ（またはそれ以上）の分子間の結合を測定する、定量的な方法である。この質量の変化は、第２のタンパク質若しくは生体分子（検体）の注入若しくは除去後の時間に対する共鳴単位として測定され、およびビアコアバイオセンサー（ビアコア社）若しくは同様の装置を用いて測定される。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４若しくはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のフラグメントを含むポリペプチドは、共有結合方法を用いて（例えば、１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ４．５）中でのアミンカップリング）、センサーチップ（例えば、研究グレードＣＭ５、ビアコア社）上にリガンドとして固定化できる。空の表面は、タンパク質の固定化をせずにセンサーチップを活性化および不活性化することにより調製される。あるいは、リガンド表面は、ペプチドアフィニティータグ、抗体、若しくはビオチン化によるセンサーチップ表面上のリガンドの非共有結合の捕捉により調製できる。３Ａ　ＯＲＦ　３３のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４若しくはそれらのフラグメントへの結合は、リガンドチップ表面上の精製した３Ａ　ＯＲＦ　３３を注入することにより測定される。測定は、４℃と３７℃の間のいずれの所望の温度でも実行できる。アッセイ（即ち、結合をおこなうもの）に用いられる条件は、以下のとおりである：２５ｍＭのヘペス－ＫＯＨ（ｐＨ７．６）、１５０ｍＭの塩化ナトリウム、１５％のグリセリン、１ｍＭのジチオトレイトール、および０．００１％のＴｗｅｅｎ２０、１０μｌ／ｍｉｎの流速。候補阻害因子によるセンサーチップのプレインキュベーションは、予想どおり３Ａ　ＯＲＦ　３３とＳＴＡＡＵ＿Ｒ４との相互作用を減少させることとなる。３Ａ　ＯＲＦ　３３結合の減少は、センサーグラム上の低下した反応として検出され、また共鳴単位で測定され、候補化合物による競争結合の表示となる。

【０２４２】

ｉＶ）シンチレーション近接アッセイ

シンチレーション近接アッセイ（ＳＰＡ）は、例えば配列番号２のアミノ酸配列を含む黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチド若しくはそれらのフラグメントと、他のポリペプチドとの相互作用を特徴づけるために用いてもよい。ＳＰＡは、ビーズやミクロタイタープレートのプラスチックのような固相基質に頼っており、ここでシンチラントが取り込まれる。アッセイのために、例えば黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドなどの標的タンパク質が、ビーズやプレート表面に結合しており、活性化した表面化学物質を通じて共有結合的に、またはペプチドアフィニティータグ、抗体、若しくはビオチン化を通じて非共有結合的のいずれかで結合している。例えば、［^{32}Ｐ］－放射線ラベル化３Ａ　ＯＲＦ　３３などの放射線ラベル化された結合ポリペプチドの添加は、放射性供給分子のシンチラントへの近い近接をもたらす。結果として、放射性の崩壊がビーズ内またはプレートのプラスチック内に含まれるシンチラントを励起し、検出可能な光を放射する。固定化された黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドと放射線ラベル化された３Ａ　ＯＲＦ　３３との関連を妨げる化合物は、シンチレーションシグナルを減少させることとなる。したがって、ＳＰＡはハイスループットの自動化形態に容易に適用するので、またマイクロモルからナノモルの範囲においてK_D値によりタンパク質－タンパク質相互作用の検出のためのその感度の良さにより、ＳＰＡは、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４－３Ａ　ＯＲＦ　３３相互作用の阻害因子のスクリーニングのための理想的な技術の例を示す。

【０２４３】

ｖ）バイオセンサーアッセイ

ＩＣＳバイオセンサーは、ＡＭＢＲＩ（オーストラリアメンブレンバイオテクノロジー研究所；ｈｔｔｐ／／ｗｗｗ．ａｍｂｒｉ．ｃｏｍ．ａｕ／）により記載されている。この技術において、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４若しくはそれらのフラグメント、およびバクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３若しくはそれらのフラグメントのような、巨大分子の自己会合は、分散した膜２分子相中のグラマシジン－促進イオンチャネルを閉じること、およびそれによりバイオセンサーのアドミッタンス（インピーダンスに似たもの）の測定可能な変化を結びつける。この手法は、アドミッタンス変化の大きさの６桁以上で直線性があり、小分子コンビナトリアルライブラリーの大規模ハイスループットスクリーニングに理想的に適合する。

【０２４４】

ｖｉ）ファージディスプレイ

ファージディスプレイは、タンパク質：タンパク質相互作用を測定するための強力なアッセイである。このスキームにおいて、タンパク質またはペプチドは、線状バクテリオファージのコートタンパク質またはテールタンパク質との融合体として発現する。この主題についての包括的な論文は、Ｋａｙ　ｅｔ　ａｌ．により編集された、Ｐｈａｇｅ　Ｄｉｓｐｌａｙ　ｏｆ　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ．　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（１９９６）Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓである。Ｍ１３およびｆｄを含むＦｆファミリーのファージとして、遺伝子ＩＩＩタンパク質および遺伝子ＶＩＩＩタンパク質は、外来のタンパク質またはペプチドとの融合のための最も一般的に用いられるパートナーである。ファージミドは、プラスミドおよびバクテリオファージの両方の複製起点を含むベクターである。遺伝子ＩＩＩまたは遺伝子ＶＩＩＩに対する融合体をエンコードするファージミドは、ヘルパーファージによりそれらの細菌宿主から回収でき、組み換えファージの被覆または先端で外来配列のディスプレイをもたらす。

【０２４５】

単純なアッセイの１つの例として、精製された組み換えＳＴＡＡＵ＿Ｒ４若しくはそれらのフラグメントは、ミクロタイタープレートのウェル中に固定化でき、遺伝子ＩＩＩタンパク質との融合体の３Ａ　ＯＲＦ　３３配列をディスプレイするファージによりインキュベートできる。結合していないファージを除去するために洗浄工程を行い、結合したファージは、ファージコートタンパク質（遺伝子ＶＩＩＩタンパク質）に対して誘導されたモノクローナル抗体により検出される。酵素結合第２抗体により、蛍光、化学発光、または色測定変換により結合した融合タンパク質の定量的検出ができる。阻害因子のスクリーニ

ングは、ファージの添加前に固定化された標的による化合物のインキュベーションにより実行される。阻害因子の存在は、阻害因子を含まない対照と比べて容量依存型でシグナルを特異的に低下させることとなる。

【０２４６】

タンパク質－タンパク質相互作用のアッセイにおいて、相互作用の調節因子は物理的に相互作用するタンパク質のドメインと直接相互作用する必要が必ずしもないことに注意をすることが重要である。調節因子は、タンパク質－タンパク質相互作用の部位から除去された位置で相互作用して、例えば、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドのコンホメーションの変化を引き起こすことも可能である。この様式で作用する調節因子（阻害因子またはアゴニスト）は、アロステリックエフェクターと称し、それらが誘導する変化がＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの活性を修飾しうるので、興味深い。

【０２４７】

阻害因子の試験は、反応混合物による化合物のインキュベーションにより実行される。阻害因子の存在は、阻害因子を含まない対照と比べて容量依存型によりシグナルを特異的に低下させることとなる。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４－３Ａ　ＯＲＦ　３３間の相互作用を阻害するそれらの能力により選択された化合物は、第２のスクリーニングアッセイによりさらに試験される。

【０２４８】

ｂ．細菌の成長阻害

ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドと３Ａ　ＯＲＦ　３３との相互作用を阻害するか、またはＳＴＡＡＵ＿Ｒ４活性を阻害する能力について選択された化合物は、細菌成長の機能的アッセイにおいてさらに試験されうる。黄色ブドウ球菌の培地は、直接培地に添加するか、細胞中に化合物を運ぶのに適した媒体を用いて添加された変化させた濃度の候補化合物の存在下で成長する。ポリペプチドに対応する化合物については、前記ポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列は、誘導性プロモーターを含む黄色ブドウ球菌発現ベクター中にクローニングできる。ポリペプチドの発現は、細胞のトランスフェクションに続いて誘導できる。例えば、ポリペプチドには、限定されないが、異なる３Ａ　ＯＲＦ　３３誘導フラグメントが含まれる。

【０２４９】

発現の誘導または化合物の添加に続いて、培地は、さらに３７℃で４時間インキュベートされる。その時間の間、細菌細胞成長に対する阻害因子の効果は、例えば、OD_{565}および培地中のコロニー形成単位（ＣＦＵ）の数を測定することにより、４０分間隔でモニターしてもよい。ＣＦＵの数は、以下のようにして評価される：培地は連続的に希釈され、異なる培地からの部分標本が寒天板上で培養される。３７℃での一晩のインキュベーションに続いて、コロニーに数が数えられる。黄色ブドウ球菌の処理していない培地が陰性対照として含められる。

【０２５０】

他の見地として、本発明は、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドに対するアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、基質、酵素等；またはこのようなポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドの産生を減少若しくは増強させる化合物、を同定するためのスクリーニングキットに関連し、これは、（ａ）本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド；（ｂ）本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを発現する組み換え細胞；（ｃ）本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドに関係する細胞膜；または（ｄ）本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドに対する抗体を含み、そのポリペプチドは、好ましくは配列番号２のものであり、そのポリヌクレオチドは、好ましくは配列番号１のものである。

【０２５１】

このようないずれかのキットにおいて、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）または（ｄ）は、実質的な成分を含んでもよいことが、認識されることとなる。

【０２５２】

（ａ）第１段階としてポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド若しくはそれらの複合体の３次元構造を測定すること；（ｂ）アゴニスト、アンタゴニストまたは阻害因子の可能性のある反応部位、結合部位またはモチーフについての３次元構造を推定すること；（ｃ）推定した結合部位、反応部位、および／またはモチーフに結合しまたはこれと反応すると予測される候補化合物を合成すること；および（ｄ）候補化合物が実際にアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害因子であるかどうか試験すること、により、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを、ポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害因子の構造に基づく設計のための方法に用いてもよいことは、当業者に容易に認識されることとなる。これが通常は反復工程となること、そしてこの反復工程が自動化およびコンピュータ制御の手段を用いて実行できることを、さらに認識することとなる。

【０２５３】

ここで提供されるポリヌクレオチド配列の各々は、抗菌化合物の発見および開発に用いてもよい。発現により、エンコードされたタンパク質は、抗菌薬のスクリーニングのための標的として使用できる。さらに、それぞれのｍＲＮＡの翻訳を促進する、エンコードされたタンパク質のアミノ末端領域をエンコードするポリヌクレオチド配列またはシャイン－ダルガーノ若しくは他の配列は、目的とするコード配列の発現を制御するためのアンチセンス配列を構築するのに用いることができる。

【０２５４】

本発明はまた、感染の後遺症の原因となる、病原体と真核生物、好ましくは哺乳動物の宿主との最初の物理的な相互作用を妨害するために、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストの使用を提供する。特に、本発明の分子は、細菌、特にグラム陽性および／またはグラム陰性菌の、真核生物、好ましくは哺乳動物の細胞外マトリックスタンパク質への内在装置上での吸着、または傷における細胞外マトリックスタンパク質への吸着を妨げることに；真核生物、好ましくは哺乳動物の細胞外マトリックスタンパク質と組織損傷を媒介する細菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質との細菌の吸着を遮蔽すること；および／または、内在装置の移植若しくは他の外科技術による以外で開始した感染における病原の正常な進行を遮蔽すること；に用いてもよい。本発明のさらに他の見地によれば、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４アンタゴニスト、好ましくは静菌性もしくは殺菌性アンタゴニストが提供される。

【０２５５】

本発明のアンタゴニストは、例えば、疾患を予防し、阻害し、および／または処置することに利用してもよい。

【０２５６】

組成物、キットおよび投与

本発明のさらなる見地として、細胞若しくは多細胞生物に投与するためのＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリヌクレオチドおよび／または黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドを含む組成物が提供される。

【０２５７】

本発明は、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドの溶解形態のような、治療的に有効量のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド、アンタゴニストペプチド若しくは小分子化合物を、医薬的に許容可能なキャリア若しくは賦形剤と組み合わせて含む、医薬組成物を提供する。このようなキャリアには、限定されないが、塩水、緩衝塩水、ブドウ糖、水、グリセリン、エタノール、およびそれらの組み合わせが含まれる。医薬組成物は、例えば、局所、経口、肛門、膣、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内または皮内の経路その他による投与等の、効果的で便利ないずれの方法で投与してもよい。

【０２５８】

治療または予防として、活性剤は、例えば無菌水溶性懸濁液、好ましくは等張液等の、注射可能な組成物として個体に投与してもよい。

【０２５９】

あるいは、組成物は、例えば、軟膏、クリーム、ローション、眼軟膏、点眼剤、点耳剤、口腔洗浄剤、含浸包帯剤、縫合剤、およびエアロゾルの形態で局所適用のために処方されてもよく、また例えば、防腐剤、薬の浸透を助ける溶媒、軟膏およびクリームの軟化薬等の適切な通常の添加剤を含んでもよい。このような局所処方はまた、例えば、クリーム若しくは軟膏基剤、およびローションのエタノール若しくはオレイルアルコール等の相溶性の通常のキャリアを含んでもよい。このようなキャリアは、処方重量の約１％から約９８％から構成されていてもよく、通常は処方重量の約８０％まで構成されうる。全身投与の代替手段には、胆汁酸塩、フシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いた経粘膜または経皮投与が含まれる。さらに、本発明のポリペプチドまたは他の化合物が腸溶性またはカプセル化された形態で処方できる場合は、経口投与も可能である。これらの化合物の投与は、軟膏、ペースト、ゲル等の形態で、局所的および／または局在的にされてもよい。

【０２６０】

哺乳動物、特にヒトへの投与としては、活性剤の毎日の投与レベルは、０．０１ｍｇ／ｋｇから１０ｍｇ／ｋｇ、典型的には約１ｍｇ／ｋｇとなることが予期される。いずれの場合でも医師が、個体に最も適した、年齢、体重、および特定の個体の反応に応じて変化する実際の投与量を決定することとなる。上記の投与量は、平均的な場合の例示である。もちろん、高い若しくは低い投与量範囲が有利な個体の例もあり、このようなものも、この発明の範囲に含まれる。

【０２６１】

ここで用いられる場合、「内在装置」の語は、外科的移植物、人工器官装置およびカテーテル、即ち個体の身体に導入され、長い時間所定の位置にとどまる装置を指す。このような装置には、限定されないが、人工関節、心臓弁、ペースメーカー、血管移植片、脳脊髄液シャント、尿カテーテル、連続携行式腹膜灌流（ＣＡＰＤ）カテーテルが含まれる。

【０２６２】

本発明の組成物は、内在装置の挿入の直前に、関連する細菌に対して全身的な効果を達成するために注射により投与してもよい。処置は、手術後装置が体内にある時間続けてもよい。さらに、この組成物はまた、細菌創傷感染、特に黄色ブドウ球菌創傷感染を予防するためのいずれもの外科技術に対する手術時の保護を広げるために用いることもできる。

【０２６３】

多くの整形外科医は、人工関節を有する人は、菌血症を起こしうる歯科処置の前に抗生物質による予防を考慮すべきであるということを、考慮する。深層での感染は、重篤な合併症であり、時には人工関節の喪失をもたらし、相当な罹患率と死亡率を伴う。したがって、この状況において、予防的抗生物質の代わりとしてこの活性剤の使用を広げることができる。

【０２６４】

上述した治療に加え、この発明の組成物は、創傷組織において露出したマトリックスタンパク質への細菌の付着を予防するための創傷処置剤として一般的に用いてもよく、また抗生物質による予防の代わりに、若しくはそれとともに歯科処置における予防に用いてもよい。

【０２６５】

あるいは、本発明の組成物は、挿入直前に内在装置を浸すために用いてもよい。活性剤は、創傷若しくは内在装置を浸すためには、１ｍｇ／ｍｌから１０ｍｇ／ｍｌの濃度であることが好ましい。

【０２６６】

ワクチン組成物は、注射可能な形態として便利である。通常のアジュバントを、免疫反応を増強するために用いてもよい。ワクチン接種のための適当な単位投与量は、０．５～５マイクログラムの抗原／ｋｇであり、このような投与量が、好ましくは１～３回、１～３週間の間隔をおいて投与される。示された投与量範囲では、適当な個体へのそれらの投与を排除するような本発明の化合物による不利な毒性作用は、観察されないであろう。

【０２６７】
配列データベース、有形の媒体中の配列、およびアルゴリズム
ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、その２次元および３次元構造を測定し、またさらなる相同性の配列を同定するための有用な情報源をなす。これらの手法は、配列をコンピュータ読みとり可能媒体に保存し、その保存されたデータを既知の巨大分子構造プログラムで使用することにより、またはＧＣＣのようなよく知られた検索ツールを用いて配列データベースを検索することを、最も容易に促進する。
【０２６８】
本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、検索分析のために有用なデータベースの要素として、および配列分析アルゴリズムの要素として特に有用である。「配列データベース、有形の媒体中の配列、およびアルゴリズム」と題するこの節で用いられる場合、「本発明のポリヌクレオチド」および「本発明のポリヌクレオチド配列」の語は、有形の媒体、好ましくはコンピュータ読みとり可能形態、に圧縮若しくは保存されるもしくはできる、本発明のポリヌクレオチドのすべての検出可能な化学的若しくは物理的特徴を意味する。例えば、クロマトグラフィーの走査データ若しくはピークデータ、写真のデータ若しくはそれらからの走査データ、基線と呼ばれるもの、および質量分析データがある。データベースおよびアルゴリズムと題するこの節で用いられる場合、「本発明のポリペプチド」および「本発明のポリペプチド配列」の語は、有形の媒体、好ましくはコンピュータ読みとり可能形態、に圧縮若しくは保存されるもしくはできる、本発明のポリペプチドのすべての検出可能な化学的若しくは物理的特徴を意味する。例えば、クロマトグラフィーの走査データ若しくはピークデータ、写真のデータ若しくはそれらからの走査データ、および質量分析データがある。
【０２６９】
本発明は、本発明のポリペプチド配列および／または本発明のポリヌクレオチド配列をそれらに保存して有するコンピュータ読みとり可能媒体を提供する。コンピュータ読みとり可能媒体は、例えば、市販のフロッピーディスク、テープ、チップ、ハードドライブ、コンパクトディスク、およびビデオディスク等の情報若しくはデータを保存するために用いられるすべての組成物を用いることができる。
【０２７０】
本発明の好ましい態様として、配列番号１の配列を含むポリヌクレオチド；配列番号２の配列を含むポリペプチド；少なくとも１つの配列が配列番号１の配列を含む１組のポリヌクレオチド配列；少なくとも１つの配列が配列番号２のポリペプチドを含む１組のポリペプチド配列；配列番号１の配列を含むポリヌクレオチド配列を示すデータセット；配列番号２の配列を含むポリペプチド配列をエンコードするポリヌクレオチド配列を示すデータセット；配列番号１の配列を含むポリヌクレオチド；配列番号２の配列を含むポリペプチド；少なくとも１つの配列が配列番号１の配列を含む１組のポリヌクレオチド配列；少なくとも１つの配列が配列番号２の配列を含む１組のポリペプチド配列；配列番号１の配列を含むポリヌクレオチド配列を示すデータセット；配列番号２の配列を含むポリペプチド配列をエンコードするポリヌクレオチド配列を示すデータセット；からなる群より選ばれる構成員をそれらに保存して有するコンピュータ読みとり可能媒体を提供する。
【０２７１】
限定されないが、特許および特許出願、この明細書で引用したもの等のすべての刊行物および参考文献は、各々の個々の刊行物若しくは参考文献が参照することにより、そこで完全に述べられているままに本明細書に取り込まれると明確かつ個別に示されているかのように、参照することによりそれらのすべてを本明細書に取り込むものとする。この出願が優先権を主張するすべての特許出願もまた、刊行物および参考文献について上述した様式により、参照することによりそのすべてを本明細書に取り込むものとする。
【０２７２】
本発明は、以下の非限定の実施例によりさらに詳細に例示される。
【実施例１】

【０２７３】
黄色ブドウ球菌バクテリオファージ３Ａからの阻害性ＯＲＦの同定
黄色ブドウ球菌増殖株３Ａ（オンタリオ州オタワのカナダ疾患制御健康研究センター（ＣＤＣ）から得たＰＳ３Ａ）を、ファージ３Ａ（同様にＣＤＣから得た）を増殖するための宿主として用いた。ファージは、ＳｗａｎｓｔｏｒｍおよびＡｄａｍｓにより記載された寒天層方法を用いて増殖した［Ｓｗａｎｓｔｒｏｍ ｅｔ ａｌ．（１９５１）Ｐｒｏｃ．Ｓｏｃ．Ｅｘｐｔｌ．Ｂｉｏｌ．＆ Ｍｅｄ．７８：３７２－３７５］。ファージＤＮＡは、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第2版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹに記載されたように精製したファージから調製した。

【０２７４】
３Ａ ＯＲＦ ３３（図２；配列番号４）を、それらのそれぞれのファージゲノムＤＮＡからポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により増幅した。ＰＣＲ産物は、ゲル精製しＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄＩＩＩにより消化した。消化したＰＣＲ産物を、カナマイシン耐性選択マーカーを含む黄色ブドウ球菌ベクター（図３Ａ）である、ＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ－消化ｐＴＭベクターにリゲートし、黄色ブドウ球菌株ＲＮ４２２０［Ｋｒｅｉｓｗｉｒｔｈ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｎａｔｕｒｅ ３０５：７０９－７１２］を形質転換するために用いた。得られたベクター、ｐＴＭ３ＡＯＲＦ３３（図３Ａ）において、ファージＯＲＦの発現は、亜砒酸塩誘導性プロモーターの制御下にある。組み換えクローンの選択は、カナマイシン３０μｇ／ｍｌを含むＬｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ（ＬＢ）寒天板上で実行した。

【０２７５】
亜砒酸ナトリウム（$NaAsO_2$）を用いて、ａｒｓプロモーター／オペレオーターからの遺伝子発現を誘導した。細菌の細胞成長に対するファージＯＲＦ発現の影響を、固体培地および液体培地における機能性アッセイにより評価した。図３Ｂに示すように、５μＭの亜砒酸ナトリウムを含む半固体培地へ3つの独立した形質転換株（クローン１から３）を培養することによる、ファージ３Ａ ＯＲＦ ３３の発現の誘導は、誘導剤の不存在での培養または対照の非阻害性ＯＲＦ（ファージ４４ＡＨＪＤＯＲＦ１１４）形質転換株の培養と比較して固体培地上での細菌成長の阻害をもたらす。図３ＣおよびＤに示すように、コロニー形成単位（ＣＦＵ）により評価される、３Ａ ＯＲＦ ３３を含む黄色ブドウ球菌クローンについての液体培地の密度は、非誘導条件下では時間の経過により増加した。同様の成長速度が、誘導および非誘導の両方の条件下で、（グラフ上で「非キラー」を付した）非阻害性ＯＲＦを含む形質転換株によっても観察された。両方のグラフの各々の時点は、黄色ブドウ球菌の３つの独立した形質転換株から得た平均を示す。

【０２７６】
３Ａ ＯＲＦ ３３の発現は、誘導された培地に対して時間に伴うＣＦＵの低下により観察されるように、細菌の成長を阻害する。誘導後４時間で、３Ａ ＯＲＦ ３３の発現は、同じ培地に最初に存在したＣＦＵ数と比較したＣＦＵ数の２．５対数の阻害低下をもたらす細胞殺傷性となる（図３Ｃ）。コロニー培養が、３Ａ ＯＲＦ ３３をエンコードするプラスミドについての選択圧を維持するのに必要な抗生物質であるカナマイシンの不存在下で行われた場合、成長阻害の程度が低下し、１対数の細胞殺傷効果をもたらす（図３Ｄ）。

【実施例２】
【０２７７】
バクテリオファージ３Ａ ＯＲＦ ３３により標的化された黄色ブドウ球菌タンパク質の同定
黄色ブドウ球菌バクテリオファージ３Ａの阻害性ＯＲＦと相互作用する黄色ブドウ球菌タンパク質を同定するために、３Ａ ＯＲＦ ３３のＧＳＴ融合体またはポリヒスチジン融合体を作製した。組み換えタンパク質を精製して利用し、ＧＳＴ／３Ａ ＯＲＦ ３３ア

フィニティーカラムを作製した。黄色ブドウ球菌細胞から調製した細胞抽出物をアフィニティーマトリックスによりインキュベートし、マトリックスを増加する濃度の塩および異なる界面活性剤を含むバッファーで洗浄した。タンパク質の溶出プロフィールを、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により評価した。ＰＴ４０として同定された分子量～４０ｋＤａのタンパク質を、アフィニティーマトリックスから特異的に溶出したが（図４および５）、ＧＳＴ陰性対照カラムからの溶出物中には検出されなかった（図６）。溶出したタンパク質をさらに特徴付けし、以下の詳述するように、相互作用タンパク質の同一性を測定し、タンパク質と３Ａ　ＯＲＦ　３３との相互作用を確認した。

【０２７８】

Ａ．融合３Ａ　ＯＲＦ　３３組み換えタンパク質の製造

バクテリオファージ３ＡからのＯＲＦ３３を、ＧＳＴとのフレーム単位での翻訳による融合のための発現ベクターであるｐＧＥＸ４Ｔ－１（ファルマシア）中に、およびポリヒスチジン（ヒスタグ）とのフレーム単位での発現ベクターであるｐＥＴ１５ｂＭＣＳ２中にサブクローニングした。プラスミドｐＴＭ３ＡＯＲＦ３３（図３Ａ）をキアゲンカラムで精製し、ＨｉｎｄＩＩＩで消化し、Ｅ．ｃｏｌｉＤＮＡポリメラーゼのクレノウフラグメントで処理し、そしてＢａｍＨＩで消化した。３Ａ　ＯＲＦ　３３を含むＤＮＡ制限産物を、キアクイックスピンカラム（キアゲン）でゲル精製し、（ＳａｌＩでの消化、Ｅ．ｃｏｌｉＤＮＡポリメラーゼのクレノウフラグメントでの処理、そしてＢａｍＨＩでの消化、その後のキアクイックスピンカラムによるゲル精製により調製した）ｐＧＸＴ４Ｔ－１およびｐＥＴ１５ｂＭＣＤ２発現ベクターにリゲートした。組み換え発現ベクターを、プラスミドミニプレップの制限酵素分析により同定した。大規模ＤＮＡ調製をキアゲンカラムにより実行し、得られたプラスミドを配列決定した。発現プラスミドを含むＥ．ｃｏｌｉ細胞（ＢＬ２１（ＤＥ３）Ｇｏｌｄ）中での試験発現を行い、最適なタンパク質発現条件を確認した。発現構築物を含むＥ．ｃｏｌｉ細胞を、２ＬのＬｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ培養液中３７℃で$ＯＤ_{600}$が０．４から０．６（１ｃｍ経路長）となるまで成長させ、１ｍＭのＩＰＴＧで最適時間および最適温度（３０℃で３時間）で誘導した。

【０２７９】

Ｂ．ＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３およびＭＣＳ２／３Ａ　ＯＲＦ　３３融合体のタンパク質精製

ＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３融合タンパク質を含む細胞を、１０ｍｌＧＳＴ溶解バッファー／リットルの細胞培地（ＧＳＴ溶解バッファー：２０ｍＭのヘペス　ｐＨ７．２、５００ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセリン、１ｍＭのＤＴＴ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのベンズアミジン、および１ＰＭＳＦ）に懸濁させ、フレンチプレッシャーにより細胞を溶解した後、４℃での超音波による２０秒間の３回バーストした。溶解物をソーヴァルＳＳ３４ローターにより１００００ｒｐｍで４℃で３０分間遠心分離した。上清を溶解バッファーによりあらかじめ平衡化した４ｍｌのグルタチオンセファロースカラムに投入し、重力により流した。カラムを１０カラム容積の溶解バッファーで洗浄し、ＧＳＴ溶出バッファー（２０ｍＭのヘペス　ｐＨ８．０、５００ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセリン、１ｍＭのＤＴＴ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ、および２５ｍＭの還元型グルタチオン）により４ｍｌの画分として溶出させた。画分を１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ラーミリ）により分析し、クマシーブリリアントブルーＲ－２５０染料により染色することにより視覚化し、溶出したＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３タンパク質の量を評価した。

【０２８０】

ＭＣＳ２／３Ａ　ＯＲＦ　３３（ヒスタグ）融合タンパク質を含む細胞を、ヒスタグ溶解バッファー（２０ｍＭのヘペス　ｐＨ７．５、５００ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセリン、１ｍＭのベンズアミジン、および１ｍＭのＰＭＳＦ）とともに、１０ｍｌ溶解バッファー／リットルの細胞培地に懸濁させ、フレンチプレッシャーを通すことにより細胞を溶解した後、４℃での超音波による２０秒間の３回バーストした。溶解物をソーヴァルＳＳ３４ローターにより１００００ｒｐｍで４℃で３０分間遠心分離した。上清を$Ｎｉ^{2+}$によ

りあらかじめ平衡化した４ｍｌの金属キレートセファロースカラムに投入し、ヒスタグ溶解バッファーにより洗浄し、重力により流した。カラムを５ｍＭのイミダゾールを含む１０カラム容積のヒスタグ溶解バッファー、５０ｍＭのイミダゾールを含む６カラム容積のヒスタグ溶解バッファーで洗浄し、ヒスタグ溶出バッファー（２０ｍＭのヘペス　ｐＨ７．５、５００ｍＭのＮａＣｌ、５００ｍＭのイミダゾール、１０％のグリセリン）により４ｍｌの画分として溶出させた。画分を１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ラーミリ）により分析し、クマシーブリリアントブルーＲ－２５０染料により染色することにより視覚化した。

【０２８１】

Ｃ．黄色ブドウ球菌抽出物の調製

黄色ブドウ球菌抽出物を、超音波照射およびヌクレアーゼ消化に続くリソスタフィン消化を用いて細胞ペレットから調製した。細胞ペレット（２．９ｇ）を、２０ｍＭのヘペスｐＨ７．５、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセリン、１０ｍＭの$MgSO_4$、１０ｍＭの$CaCl_2$、１ｍＭのＤＴＴ、１ｍＭのＰＭＳＦ、１ｍＭのベンズアミジン、１０００単位のリソスタフィン、０．５ｍｇのＲＮａｓｅＡ、７５０単位のミクロコッカルヌクレアーゼ、３７５単位のＤＮａｓｅ１の、８ｍｌに懸濁させた。細胞懸濁液を、３７℃で３０分間インキュベートし、４℃に冷却し、１ｍＭのＥＤＴＡおよび５００ｍＭのＮａＣｌの最終濃度とした。溶解物を、それぞれ２０秒間の３回のバーストを用いて氷上で超音波照射した。溶解物を、Ｔｉ７０固定角度ベックマンローターにより２００００ｒｐｍで１時間遠心分離した。上清を採取し、１００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのベンズアミジン、および１ｍＭのＰＭＳＦを含むアフィニティークロマトグラフィーバッファー（ＡＣＢ：２０ｍＭのヘペスｐＨ７．５、１０％のグリセリン、１ｍＭのＤＴＴ、および１ｍＭのＥＤＴＡ）に対して、１００００Ｍｒ透析膜により一晩透析した。透析されたタンパク質抽出物を透析管から採取し、１ｍｌの部分標本として－７０℃で凍結させた。

【０２８２】

Ｄ．アフィニティーカラムの調製

ＧＳＴ、ＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３、およびＭＣＳ２／３Ａ　ＯＲＦ　３３を、１ＭのＮａＣｌを含むＡＣＢに対して一晩透析した。タンパク質濃度をバイオラッドタンパク質アッセイにより測定し、タンパク質を０、０．１、０．５、１．０、および２．０ｍｇ／ｍｌのタンパク質／樹脂濃度でアフィゲル１０樹脂（バイオラッド）に架橋させた。架橋した樹脂を、カラム充填および１００ｍＭのＮａＣｌを含むＡＣＢにより平衡化する前に、エタノールアミンおよびウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）の存在下で連続的にインキュベートした。黄色ブドウ球菌抽出物を、４℃でマイクロ遠心分離により１５分間遠心分離し、１００ｍＭのＮａＣｌを含むＡＣＢで５ｍｇ／ｍｌに希釈した。４００μｌの抽出物を、０、０．１、０．５、１．０、および２．０ｍｇ／ｍｌのリガンドを含む４０μｌのカラムに投入し、そして１００ｍＭのＮａＣｌを含むＡＣＢ（４００μｌ）を２．０ｍｇ／ｍｌのリガンドを含むさらなるカラムに投入した。カラムを１００ｍＭのＮａＣｌを含むＡＣＢ（４００μｌ）により洗浄し、０．１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００および１００ｍＭのＮａＣｌを含むＡＣＢ（１００μｌ）、１ＭのＮａＣｌを含むＡＣＢ（１６０μｌ）、および１％のＳＤＳ（１６０μｌ）により連続的に溶出させた。各々の溶出物８０μｌを１６ｃｍ１４％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分解し［Ｌａｅｍｍｌｉ，Ｕ．Ｋ．（１９７０）Ｎａｔｕｒｅ　２２７：６８０－６８５］、タンパク質を銀染色により視覚化した。

【０２８３】

Ｅ．アフィニティークロマトグラフィー

４０ｋＤａの相互作用タンパク質の１つの候補（ＰＴ４０）は、ＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３クロマトグラフィー実験の１ＭのＮａＣｌ溶出物中で観察された（図４）。ＰＴ４０タンパク質はまた、ＭＣＳ２／３Ａ　ＯＲＦ　３３実験の１ＭのＮａＣｌ溶出物中でも観察された（図５）。この候補タンパク質は、ＧＳＴ対照アフィニティークロマトグラフィー実験では観察されなかった。黄色ブドウ球菌抽出物中のＰＴ４０タンパク質の相対アバンダンスの見積もりは、候補相互作用タンパク質のほぼ定量的回収がアフィニティークロマトグラフィーの間に起こるとの仮定に頼っている。リガンドＭＣＳ２／３Ａ　ＯＲＦ

３３およびＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３を用いた５ｍｇ／ｍｌの抽出物によるアフィニティークロマトグラフィー実験では、２．０ｍｇ／ｍｌカラムの１ＭのＮａＣｌ溶出物において約２５ｎｇのＰＴ４０というＰＴ４０の同様の量が得られた。リガンドＭＣＳ２／３Ａ　ＯＲＦ　３３およびＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３を用いた１０ｍｇ／ｍｌの抽出物によるアフィニティークロマトグラフィー実験では、２．０ｍｇ／ｍｌカラムの１ＭのＮａＣｌ溶出物において約７０ｎｇのＰＴ４０というＰＴ４０の同様の量が得られた。銀染色のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルからのタンパク質定量は近似にすぎないが、見積もられた抽出物中のＰＴ４０のアバンダンスは、約０．００５％である。

【０２８４】

Ｆ．３Ａ　ＯＲＦ　３３相互作用タンパク質としての黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の同定

候補タンパク質ＰＴ４０を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルから切除し、ＭＡＬＤＩ－ＴｏＦ質量分析計によるトリプシン消化ペプチド質量分析のために調製した［Ｑｉｎ，Ｊ．，ｅｔａｌ．（１９９７）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６９，３９９５－４００１］。図７に例示されるように、高品位のマススペクトルが得られた。２つのアフィニティークロマトグラフィー実験で観察されたＰＴ４０タンパク質（図４および５に示された溶出物）は、トリプシン消化ペプチドの質量により測定されるように、同一であった。ＰＴ４０のバンドは、オクラホマ大学ゲノム配列決定プロジェクトデータベース（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏｍｅ．ｏｕ．ｅｄｕ／ｓｔａｐｈ．ｈｔｍｌ）のＣｏｎｔｉｇ７８２に見出されたオープンリーディングフレームと同一であった（ここでは「ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４」と呼ぶ）。

【０２８５】

Ｇ．ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のバイオインフォマティック分析

配列相同性（ＢＬＡＳＴ）および隠れマルコフモデル（ＨＭＭ）解析を、両プログラムの実行により行った。配列分析に用いたダウンロードした公開データベースは、以下の通りである。

ｉ）ｎｏｎ－ｒｅｄｕｎｄａｎｔ　ＧｅｎＢａｎｋ　（ｎｒ）（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）

ｉｉ）ｐｄｂａａ　ｄａｔａｂａｓｅ（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）

ｉｉｉ）ＰＲＯＤＯＭ　（ｈｔｔｐ：／／ｐｒｏｔｅｉｎ．ｔｏｕｌｏｕｓｅ．ｉｎｒａ．ｆｒ／ｐｒｏｔｅｉｎ．ｈｔｍｌ）

ｉｖ）Ｓｗｉｓｓｐｒｏｔ　ａｎｄ　ＴＲＥＭＢＬ（ｗｗｗ．ｅｘｐａｓｙ．ｃｈ）

ｖ）Ｂｌｏｃｋ　ｐｌｕｓ　ａｎｄ　Ｂｌｏｃｋ　ｐｒｉｎｔｓ（ｈｔｔｐ：／／ｂｌｏｃｋｓ．ｆｈｃｒｃ．ｏｒｇ）

ｖｉ）Ｐｆａｍ　（ｈｔｔｐ：／／ｐｆａｍ．ｗｕｓｔｌ．ｅｄｕ）

ｖｉｉ）Ｐｒｏｓｉｔｅ　（ｗｗｗ．ｅｘｐａｓｙ．ｃｈ）

【０２８６】

図８に示すように、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４について行ったＢＬＡＳＴ解析の結果から、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ等の種々の細菌からの脂肪酸／リン脂質合成ＰｌｓＸタンパク質に似ていることが明らかとなった。特に、図９Ａに示される、全体最適アライメントの結果から、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のアミノ酸配列とＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　ＰｌｓＸ（ｇｉ｜６６８６３２５｜ｓｐ｜Ｐ７１０１８｜ＰＬＳＸ＿ＢＡＣＳＵ：ＦＡＴＴＹ　ＡＣＩＤ／ＰＨＯＳＰＨＯＬＩＰＩＤ　ＳＹＮＴＨＥＳＩＳ　ＰＲＯＴＥＩＮ　ＰＬＳＸ）との間に、５３％の同一性、７１％の類似性があることが明らかとなった。

【０２８７】

ソフトウエアプログラムを開発して黄色ブドウ球菌配列に用いて、候補ＯＲＦの開始コドンを同定した。ソフトウエアは、適切な開始コドンのための最初のヌクレオチド配列を走査した。開始コドンの性質を規定する２つの可能性のある選択、ａ）ＡＴＧの選択、またはｂ）ＡＴＧ若しくはＧＴＧの選択、がなされる。この分析は、開始コドンの上流に位置する２５ヌクレオチド長のシャイン－ダルガーノ配列「ａａａｇｇａｇｇｔ」の最適のギ

ャップのないアライメントの発見と一致する、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）配列の同定をも伴う。位置依存スコアは、以下の通りである。

【０２８８】

ａ ａ ａ ｇ ｇ ａ ｇ ｇ ｔ
２ ３ ３ ６ ６ ４ ６ ５ ２

【０２８９】

図９Ｂに示すように、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４を含む黄色ブドウ球菌の終止コドンから終止コドンまでのＤＮＡ領域の分析により、７０％の完全一致のスコアを有する予測されるＲＢＳ配列に関係する２つの可能性のあるＡＴＧ開始コドンの存在が明らかとなった。他のＰｌｓＸポリペプチドとのＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の配列アライメントに基づき、図９ＡのＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ ＰｌｓＸに例示されるように、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の開始コドンは、図９Ｂの太字で示されるＲＢＳ配列の下流の最初のメチオニンに対応すると予測される。

【実施例３】

【０２９０】

ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４と３Ａ ＯＲＦ ３３との相互作用のアフィニティーブロッティング

細菌のＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および３Ａ ＯＲＦ ３３の相互作用も、アフィニティーブロッティングアッセイにより確認した。プローブを、心筋キナーゼ（ＨＭＫ）－タグ化ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ ＧＳＴ－融合体の［^{32}Ｐ］－ＡＴＰおよびＨＭＫによるインキュベーションにより、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４タンパク質から作製した。ラベル化したプローブを、固定化阻害性ファージＯＲＦを有する遮蔽された膜によりインキュベートし、完全な洗浄の後に残ったシグナルを、Ｘ線フィルムに暴露することにより検出する。

【０２９１】

Ａ．アフィニティーブロッティングアッセイのためのＧＳＴ／３Ａ ＯＲＦ ３３およびＧＳＴ／ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４組み換えポリペプチドの作製

プレシジョンプロテアーゼ切断部位を融合したＧＳＴを含むｐＧＥＸ－６Ｐ１を、ファルマシアアマシャムバイテックから購入した。心筋キナーゼ（ＨＭＫ）リン酸化部位（配列番号５：５’－ＧＡＴＣＴＣＧＴＣＧＴＧＣＡＴＣＴＧＴＴＧＧＡＴＣＣＣＣＧＧＡＡＴＴＣＣＣＧＧＧ－３’および配列番号６：５’－ＴＣＧＡＣＣＣＧＧＧＡＡＴＴＣＣＧＧＧＧＡＴＣＣＡＡＣＡＧＡＴ－ＧＣＡＣＧＡＣＧＡ－３’）に対応する合成によりアニールしたオリゴヌクレオチドを、固有のＢａｍＨＩ－ＳａｌＩにクローニングすることにより、ｐＧＥＸ－６ＰＫを得た［Ｋａｅｌｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ ７０：３５１－３６４］。結果として、ＨＭＫ部位は、ＧＳＴと融合してクローニングされ、固有のＢａｍＨＩ、ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩクローニング部位に続く。２本鎖の挿入を、ＤＮＡ配列分析により確認し、そのプラスミドをｐＧＥＸ－６ＰＫと呼ぶ（図１０Ｃ）。

【０２９２】

図１０Ｂに示すように、バクテリオファージ３Ａ ＯＲＦ ３３を、３Ａ ＯＲＦ ３３配列を含むｐＧＡＤＴ７ベクター（クロンテックラボラトリーズ）のＥｃｏＲＩおよびＸｈｏＩ消化によりｐＧＥＸ－６ＰＫ中にサブクローニングした。３Ａ ＯＲＦ ３３を含むＤＮＡフラグメントを、キアゲンカラムによりゲル精製し、ＨＭＫラベル化部位の３’末端でフレーム単位で（事前にＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩで消化しておいた）ｐＧＥＸ－６ＰＫにリゲートし、ｐＧＥＸ－６ＰＫ３Ａ ＯＲＦ ３３を作製した。組み換え発現ベクターを、プラスミドミニプレップの制限酵素分析により同定し、大規模ＤＮＡ調製を、キアゲンカラムにより行った。

【０２９３】

図１０Ａに示すように、完全長ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４を、ＢａｍＨＩ制限部位に先行する開始コドンを標的とするセンス鎖プライマー（５’－ｃｇｇｇａｔｃｃＡＴＧＧＴＴＡＡＡＴＴＡＧＣＡＡＴＴＧＡＴ－３’）（配列番号７）およびＸｈｏＩ制限部位に先行する終止コドンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド（５’－ｃｃｇｃｔｃｇａｇＴＴＡＣＴＣＡＴＴＴＧＡＴＴＣＡＣＣＴＡＣ－３’）（配列番号８）を用いたＰＣＲにより、

黄色ブドウ球菌ゲノムＤＮＡから増幅した。増幅したＳＴＡＡＵ＿Ｒ４（配列番号１）に用いた開始コドンは、図９ＡのＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　ＰｌｓＸに例示されるように、他のＰｌｓＸポリペプチドとのＳＴＡＡＵ＿Ｒ４の配列アライメントに基づいた予測された開始コドン（図９Ｂ）に対応する。消化されたＰＣＴ産物を、キアゲンＰＣＲ精製キットを用いて精製し、ＨＭＫラベル化部位の３’末端でフレーム単位で、ＢａｍＨＩおよびＳａｌＩで消化されたｐＧＥＸ－６ＰＫベクターにリゲートし、Ｅ．ｃｏｌｉ株ＢＬ２１（アマシャム－ファルマシア）を形質転換するために用いた。ＧＳＴに融合したＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドの配列の完全性を、ＤＮＡ配列決定により直接確認した。

【０２９４】

Ｂ．ＧＳＴ融合タンパク質の精製と放射線ラベル化

プラスミドｐＧＥＸ－６ＰからのＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３およびＧＳＴ／ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４組み換えタンパク質の発現を、OD_{600}～０．５において培地に１ｍＭのイソプロピル－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトシダーゼ（ＩＰＴＧ）の添加により誘導した。タンパク質を３７℃で３時間発現させ、細胞をＪＡ－１０ローター（ベックマン）により４℃で１５分間５０００ｒｐｍで遠心分離することにより採取した。細菌ペレットを、１００ｍｌの氷冷リン酸バッファー塩水（ＰＢＳ）中に再懸濁させ、４つの部分標本に分けて上記のように遠心分離した。各々の部分標本を、７ｍｌのＳＴＥ（１０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ８．０、１ｍＭのＥＤＴＡ、１５０ｍＭのＮａＣｌおよび０．１ｍｇ／ｍｌのリゾチーム）に再懸濁した。１５分間のインキュベーションの後、１０ｍＭのジチオトレイトール（ギブコＢＲＬ）および１．４％のサルコシル（シグマ）を加え、溶解した細胞に氷上で２０秒間の超音波のバーストを３回行った。

【０２９５】

細胞溶解物をＪＡ－２０ローター（ベックマン）により４℃で２０分間１６，０００ｒｐｍで遠心分離し、上清を全容積２０ｍｌの２％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（シグマ）により、室温で３０分間、倒置回転させて処理した。溶解物をＪＡ－２０ローターにより４℃で２０分間１６，０００ｒｐｍで遠心分離し、上清を１ｍｌのグルタチオンセファロース－４Ｂビーズ（アマシャム－ファルマシア）により４℃で６０分間インキュベートした。ビーズをＰＢＳで完全に洗浄し、エッペンドルフチューブに移し、純粋なタンパク質を、５０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ７．０、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡおよび１ｍＭのＤＴＴの５００μｌ中の４０単位のプレシジョンプロテアーゼ（ファルマシア－アマシャム）による消化により、ＧＳＴ部分から切断した。倒置回転による４℃での５時間のインキュベーションの後、サンプルをミクロ遠心で５分間１３，０００ｇで遠心分離し、上清を採取した。タンパク質濃度を、使用説明書（バイオラッド）にしたがってバイオラッド試薬を用いて測定し、タンパク質を使用するまで－８０℃で保存した。タンパク質を、１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いて分析し、クマシーブリリアントブルーＲ－２５０染色により視覚化した。

【０２９６】

［^{32}Ｐ］－ＡＴＰによる放射性ラベル化のため、４μｇのＧＳＴ切断ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドを、ｃＡＭＰ依存タンパク質キナーゼ「心筋キナーゼ」（シグマ）の５０単位の触媒サブユニットにより、２００ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ７．５、１ＭのＮａＣｌ、１２０ｍＭの$MgCl_2$、１０ｍＭのＤＴＴおよび５０μＣｉの［γ^{32}Ｐ］－ＡＴＰ（３０００ｃｉ／ｍｍｏｌ）（ＮＥＮ／マンデル）を含む全容積１００μｌ中で、室温で３０分間インキュベートした。結合していないヌクレオチドを除去するために、タンパク質をセファデックスＧ５０ＮＩＣＫカラム（アマシャム－ファルマシア）に投入し、Ｚ－バッファー（２５ｍＭのヘペス　ｐＨ７．７、１２．５ｍＭの$MgCl_2$、２０％のグリセリン、１００ｍＭのＫＣｌおよび１ｍＭのＤＴＴ）により溶出させ、γ^{32}Ｐ－ＡＴＰの取り込みを、液体シンチレーションカウンターでカウントすることにより測定した。

【０２９７】

Ｃ．アフィニティーブロッティングアッセイ

増加する量（０．１２５、０．２５０、０．５および１．０μｇ、それぞれ図１０Ｄのレ

ーン１、２、３および４）のＧＳＴ切断３Ａ　ＯＲＦ　３３を、ドデシル硫酸ナトリウム－１０％ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）ゲルで分解し、ニトロセルロース膜（ミリポア）上にブロッティングした。膜をＨＢＢバッファー（２５ｍＭのヘペス－ＫＯＨ　ｐＨ７．７、２５ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭの$MgCl_2$、１ｍＭのＤＴＴ）中の６Ｍの尿素で４℃で２０分間インキュベートすることにより、固定化タンパク質を変性させた。タンパク質を、ＨＢＢバッファー中の尿素の連続的希釈によりその位置で再生した。膜を少なくとも１時間４℃で０．０５％のＮＰ－４０を補給したＨＢＢ中５％の乳で遮蔽し、また少なくとも４５分間０．０５％のＮＰ－４０を補給したＨＢＢ中１％の乳で遮蔽した。プローブとして２５０，０００ｃｐｍ／ｍｌの［^{32}P］－ＡＴＰラベル化ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドを含むハイブリダイゼーションバッファー（２０ｍＭのヘペス－ＫＯＨ　ｐＨ７．７、７５ｍＭのＫＣｌ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ、２．５ｍＭの$MgCl_2$、０．０５％のＮｐ－４０、および１％の乳）中で、ハイブリダイゼーションを４℃で一晩行った。膜をハイブリダイゼーションバッファーで１０分間３回洗浄し、ｘ線フィルムに暴露した（図１０Ｄ）。［^{32}P］－ＡＴＰラベル化ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドに対応するバンドを、３Ａ　ＯＲＦ　３３（１８ｋＤａ）に対応するブロット上の位置で検出した。

【０２９８】

結論

阻害性バクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３とＳＴＡＡＵ＿Ｒ４との相互作用によって、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４遺伝子およびその遺伝子産物は、抗菌剤の、より具体的には抗黄色ブドウ球菌剤のスクリーニングおよび同定のための、新規な細菌標的として同定された。本発明はまた、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４および／またはバクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３および／または本発明により同定される化合物に基づいた新規な診断、予後、および治療方法を提供する。

【０２９９】

本発明は、それらの好ましい態様の方式により上記に記載されたが、添付の特許請求の範囲に規定された主題の発明の精神および性質から離れることなく修飾することができる。

【図面の簡単な説明】

【０３００】

一般的に記載された発明として、それらの好ましい態様を例示する目的で示される、以下の図面が参照されることとなる。

【図１】図１は、黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のヌクレオチド（配列番号１）およびアミノ酸（配列番号２）配列を示す。

【図２】図２は、黄色ブドウ球菌バクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３のヌクレオチド（配列番号３）およびアミノ酸（配列番号４）配列を示す。

【図３】図３は、バクテリオファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３の細菌阻害性ポテンシャルおよび黄色ブドウ球菌中でその発現を誘導するのに使用される発現ベクターを示す。Ａ）黄色ブドウ球菌細胞中の発現を誘導するのに使用される発現ベクターｐＴＭ／ＯＲＦの模式図；Ｂ）半固体担体培地上で成長した黄色ブドウ球菌中で発現させたときの３Ａ　ＯＲＦ　３３の阻害性ポテンシャルを評価するためのスクリーニングの結果；Ｃ）、Ｄ）プラスミドに対する選択圧を維持するのに必要な抗生物質を含む（Ｃ）または含まない（Ｄ）いずれかの半固体培地上で培養した後に液体培地中で成長させた黄色ブドウ球菌中で発現させたときの、３Ａ　ＯＲＦ　３３の阻害性ポテンシャルのアッセイ結果。

【図４】図４は、ＧＳＴ／３Ａ　ＯＲＦ　３３リガンドを用いた、１０．０ｍｇ／ｍｌの黄色ブドウ球菌抽出物についてのアフィニティークロマトグラフィーを示す。樹脂中に０、０．１、０．５、１．０、および２．０ｍｇ／ｍｌでリガンドを含むアフィニティーカラムからの溶出液を１４％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて分解し、ゲルを硝酸銀で染色した。０．１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（ＳＤＳ－ＰＡＧＥは示していない）、１ＭのＮａＣｌ　ＡＣＢ、および１％のＳＤＳを含む１００ｍＭのＡＣＢにより、ミクロカラムを連続的に溶出した。それぞれの分子量マーカーは、約２００ｎｇである。ＡＣＢが付されたレー

ンは、１００ｍＭのＮａＣｌを含むＡＣＢバッファーのみを流した２．０ｍｇ／ｍｌのリガンドのカラムからの溶出液を示す。ＰＴ４０で示された矢印は、タンパク質同定のために切断されたバンド位置を示す。

【図５】図５は、リガンドとしてポリヒスチジン配列（ＭＳＣ２／３Ａ　ＯＲＦ　３３）に融合した３Ａ　ＯＲＦ　３３を用いた、１０．０ｍｇ／ｍｌの黄色ブドウ球菌抽出物についてのアフィニティークロマトグラフィーを示す。樹脂中に０、０．１、０．５、１．０、および２．０ｍｇ／ｍｌでリガンドを含むアフィニティーカラムからの溶出液を１４％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて分解し、ゲルを硝酸銀で染色した。０．１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（ＳＤＳ－ＰＡＧＥは示していない）、１ＭのＮａＣｌ　ＡＣＢ、および１％のＳＤＳを含む１００ｍＭのＡＣＢにより、ミクロカラムを連続的に溶出した。それぞれの分子量マーカーは、約２００ｎｇである。ＡＣＢが付されたレーンは、１００ｍＭのＮａＣｌを含むＡＣＢバッファーのみを流した２．０ｍｇ／ｍｌのリガンドのカラムからの溶出液を示す。ＰＴ４０で示された矢印は、タンパク質同定のために切断されたバンド位置を示す。

【図６】図６は、リガンドとして対照ＧＳＴを用いた、１０．０ｍｇ／ｍｌの黄色ブドウ球菌抽出物についてのアフィニティークロマトグラフィーを示す。樹脂中に０、０．１、０．５、１．０、および２．０ｍｇ／ｍｌでリガンドを含むアフィニティーカラムからの溶出液を１４％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて分解し、ゲルを硝酸銀で染色した。０．１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（ＳＤＳ－ＰＡＧＥは示していない）、１ＭのＮａＣｌ　ＡＣＢ、および１％のＳＤＳを含む１００ｍＭのＡＣＢにより、ミクロカラムを連続的に溶出した。それぞれの分子量マーカーは、約２００ｎｇである。ＡＣＢが付されたレーンは、１００ｍＭのＮａＣｌを含むＡＣＢバッファーのみを流した２．０ｍｇ／ｍｌのリガンドのカラムからの溶出液を示す。

【図７】図７は、アフィニティークロマトグラフィーにおいて３Ａ　ＯＲＦ　３３と相互作用するＰＴ４０タンパク質のトリプシン消化によるペプチドの質量分析を示す。ＰＴ４０のバンドは、オープンリーディングフレームとして同定され、ここではＳＴＡＡＵ＿Ｒ４と呼ばれ、オクラホマ大学のゲノム配列決定プロジェクトデータベース（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏｍｅ．ｏｕ．ｅｄｕ／ｓｔａｐｈ．ｈｔｍｌ）のＣｏｎｔｉｇ７８２中に見出された。

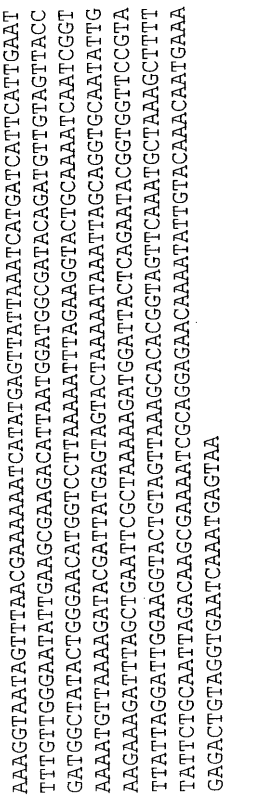
【図８】図８は、ＮＣＢＩ（ｎｒ）を含む公衆に利用可能なＢＬＡＳＴ検索解析の結果を示す。ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４は、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　（ｇｉ｜６６８６３２５｜ｓｐ｜Ｐ７１０１８｜ＰＬＳＸ＿ＢＡＣＳＵ：ＦＡＴＴＹ　ＡＣＩＤ／ＰＨＯＳＰＨＯＬＩＰＩＤ　ＳＹＮＴＨＥＳＩＳ　ＰＲＯＴＥＩＮ（脂肪酸／リン脂質合成タンパク質）　ＰＬＳＸ）を含む、種々の細菌からのＰｌｓＸタンパク質に極めて似ている。

【図９】図９は、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４およびＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　ＰｌｓＸのアミノ酸配列の全体最適アライメント、並びに黄色ブドウ球菌遺伝子の開始コドンの同定を示す。Ａ）全体最適アライメントの結果から、ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４とＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓのＰｌｓＸとの間に５３％の同一性があることがわかる。Ｂ）ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４を含む黄色ブドウ球菌の終止コドンから終止コドンまでのＤＮＡ領域の解析結果から、予測されたリボソーム結合部位（ＲＢＳ）配列（ヌクレオチド配列の強調文字）に関係したＡＴＧ開始コドンの存在が明らかとなる。

【図１０】図１０は、Ａ）黄色ブドウ球菌ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４のクローニングの概略；Ｂ）ｐＧＥＸ－６ＰＫベクター中でのファージ３Ａ　ＯＲＦ　３３のクローニングの概略；Ｃ）ＢａｍＨＩ、ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩクローニング部位の後に、プレシジョンプロテアーゼ切断部位および心筋キナーゼ（ＨＭＫ）リン酸化部位に融合したＧＳＴを含むベクターｐＧＥＸ－６ＰＫ；およびＤ）精製した３Ａ　ＯＲＦ　３３と［^{32}Ｐ］－ＡＴＰ－放射性ラベル化ＳＴＡＡＵ＿Ｒ４ポリペプチドとの相互作用を試験するために設計されたファーウエスタンアフィニティーブロッティング分析の結果；を示す。レーン１から４は、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分解し、ニトロセルロース膜にブロットした増加させた量の（０．１２５、０．２５０、０．５および１．０μｇ）の３Ａ　ＯＲ

F　３３を示す。

【図１－１】



【図１－２】

【図２】

配列番号3

>3AORF033 ヌクレオチド配列

ATGGCAATATTAGAAGGTATTTTTGAAGAATTAAAACTATTAAATAAGAATTTACGTGTG
CTAAATACTGAACTATCAACTCTGTAGATTCATCAATTGTACAAGAGAAAGTTAAAGAAGCA
CCAATGCCAAAAGATGAAACAGCTCAACTGGAATCAGTTGAAGAAGTTAAGGAAACTTCT
GCTGATTTAACTAAAGATTATCTTTTATCAGTAGGAAAAGAGTTCCTTAAAAAAGCAGAT
ACTTCTGATAAGAAAGAATTTAGAAATAAACTTAACGAACTTGGTGCCGATAAGCTATCT
ACTATCAAAGAAGAGCATTATGAAAAAATTGTTGATTTTATGAATGCCAGAATAAATGCA
TGA

配列番号4

>3AORF033 アミノ酸配列

MAILEGIFEELKLLNKNLRVLNTELSTVDSSIVQEKVKEAPMPKDETAQLESVEEVKETS
ADLTKDYVLSVGKEFLKKADTSDKKEFRNKLNELGADKLSTIKEEHYEKIVDFMNARINA

【図３－１】

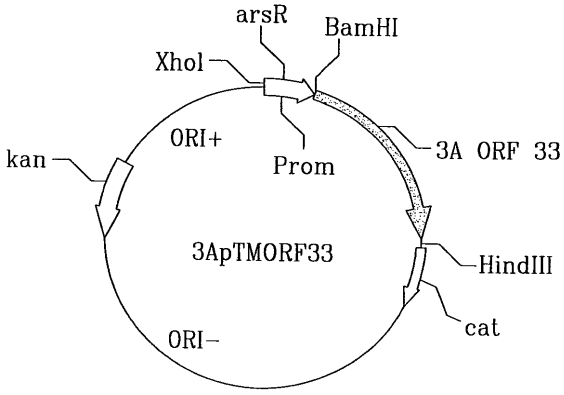


図3A

【図３－２】

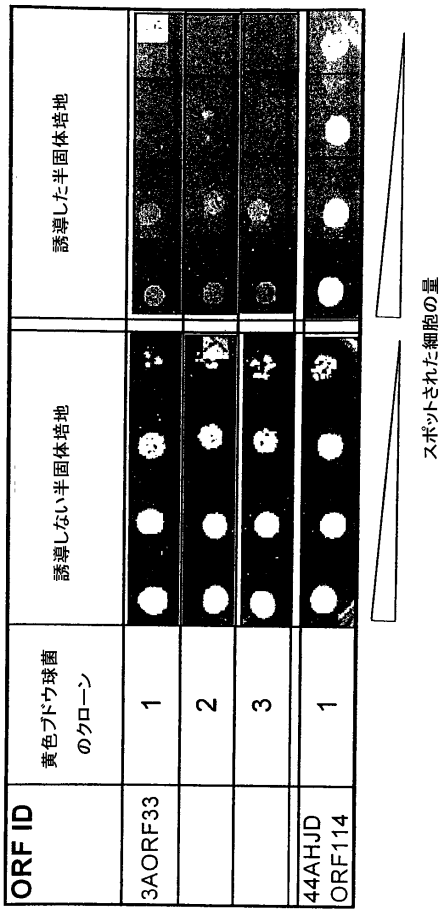


図3B

【図３－３】

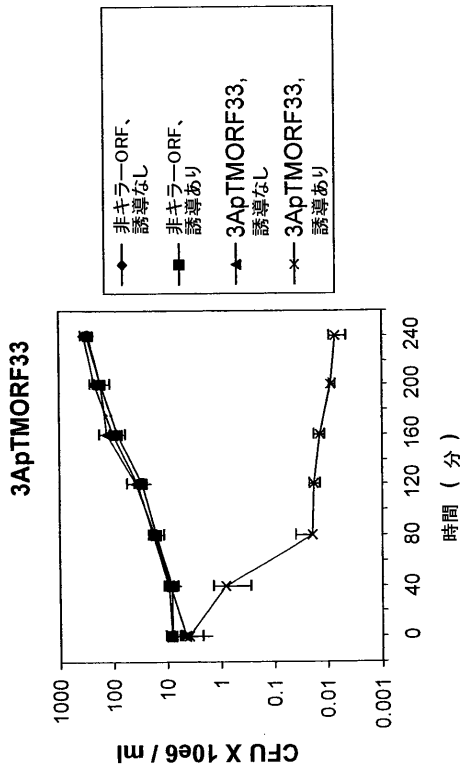


図3C

【図３－４】

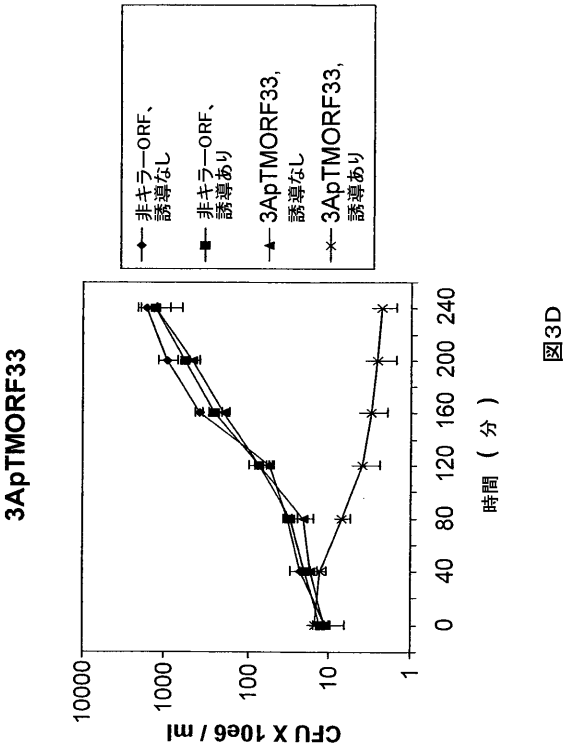
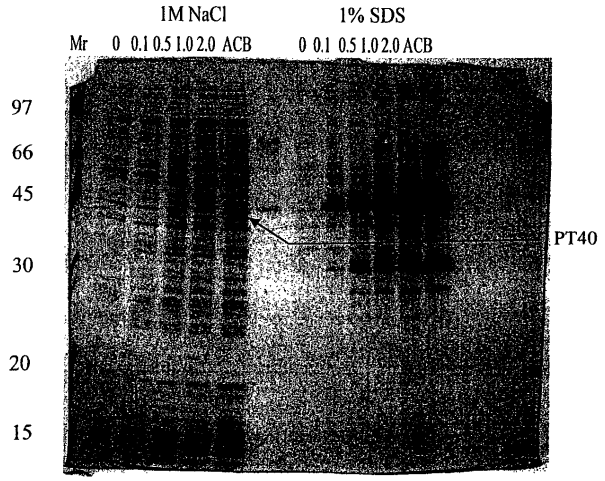
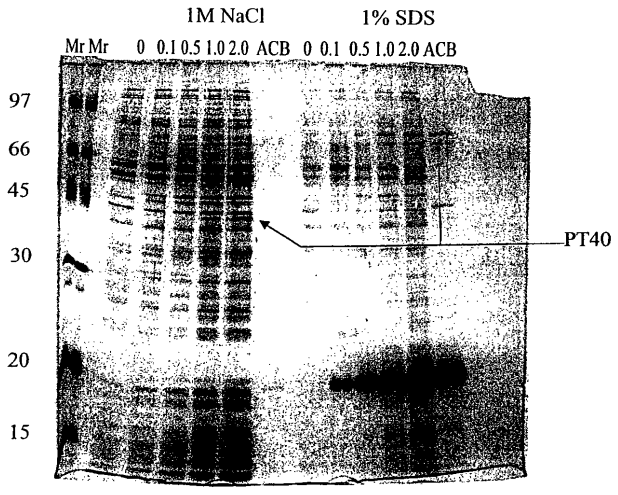


図3D

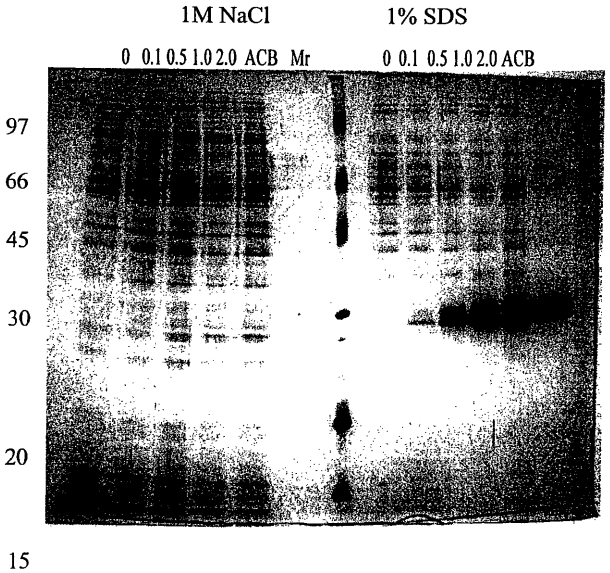
【図４】



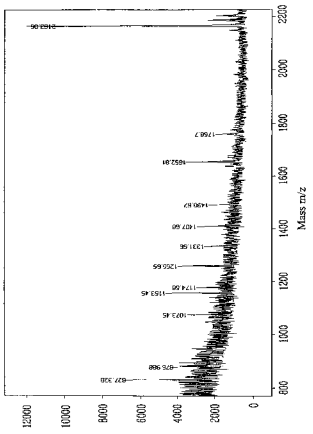
【図５】



【図６】



【図７】



【図８－１】

Sequence analysis of STAAU_R004

Blast Analysis

Database: nr

582,290 sequences; 183,345,511 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|6686325|sp|P71018|PLSX_BACSU FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	339	3e-92
gi|10175113|dbj|BAB06212.1| (AP001515) involved in fatty acid/p...	293	1e-78
gi|1502419|gb|AAC44305.1| (U59433) PlsX [Bacillus subtilis]	279	3e-74
gi|6685740|sp|O65984|PLSX_CLOTS FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	266	2e-70
gi|3006127|emb|CAA06178.1| (AJ004870) hypothetical protein [The...	259	2e-68
gi|6685741|sp|O67186|PLSX_AQUAE FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	221	9e-57
gi|6685761|sp|Q9WXZ6|PLSX_THEMA FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	211	8e-54
gi|7428758|pir||A64545 fatty acid/phospholipid synthesis protei...	210	1e-53
gi|6685765|sp|Q9ZMN1|PLSX_HELPJ FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	209	3e-53
gi|6685733|sp|O24993|PLSX_HELPY FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	208	5e-53
gi|2498794|sp|P73950|PLSX_SYNY3 FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	206	3e-52
gi|7441729|pir||C72412 fatty acid/phospholipid synthesis protei...	202	4e-51
gi|6967803|emb|CAB72796.1| (AL139074) putative fatty acid\phosp...	196	3e-49
gi|7379281|emb|CAB83835.1| (AL162753) putative fatty acid/phosp...	193	2e-48
gi|7227170|gb|AAF42243.1| (AE002540) fatty acid/phospholipid sy...	190	2e-47
gi|9656568|gb|AAF95172.1| (AE004276) fatty acid/phospholipid sy...	183	2e-45
gi|401571|sp|P30789|PLSX_RHOCA FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESI...	180	1e-44
gi|6685745|sp|O85138|PLSX_SALTY FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	178	7e-44
gi|6686317|sp|P27247|PLSX_ECOLI FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	178	9e-44
gi|9949068|gb|AAG06357.1|AE004723_1 (AE004723) fatty acid biosy...	176	3e-43
gi|2498793|sp|P75232|PLSX_MYCPN FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	175	6e-43
gi|2498791|sp|Q49427|PLSX_MYCGE FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	173	2e-42

【図８－２】

Database: pdbaa

8891 sequences; 1,886,625 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|4699699|pdb|1A40| Phosphate-Binding Protein With Ala 197 ...	26	5.2
gi|3892022|pdb|1A55|A Chain A, Phosphate-Binding Protein Mutant...	26	5.2
gi|2624641|pdb|1IXI| Phosphate-Binding Protein Mutant With A...	26	5.2
gi|2914192|pdb|1IXH| Phosphate-Binding Protein (Pbp) Complex...	26	5.2
gi|1633135|pdb|1QUI| Phosphate-Binding Protein Mutant With A...	26	5.2
gi|1633133|pdb|1QUK| Phosphate-Binding Protein Mutant With A...	26	5.2
gi|1633132|pdb|1QUL| Phosphate-Binding Protein Mutant With A...	26	5.2
gi|2914191|pdb|1IXG| Phosphate-Binding Protein Mutant With T...	26	5.2

Database: prodom

157,167 sequences; 18,560,502 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
pd|PD006974 p99.2 (12) PLSX(6) // PROTEIN PLSX SYNTHESIS FATTY...	266	2e-71
pd|PD017557 p99.2 (4) O34561(1) O65984(1) O67186(1) // PROTEIN...	52	5e-07
pd|PD136714 p99.2 (1) Q47878_EUBAC // GLYCINE REDUCTASE	44	1e-04
pd|PD123945 p99.2 (1) PLSX_RHOCA // FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYN...	37	0.018
pd|PD039564 p99.2 (2) PLSX(2) // FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTH...	35	0.093
pd|PD123943 p99.2 (1) O24993_HELPY // FATTY ACID/PHOSPHOLIPID S...	34	0.12
pd|PD131367 p99.2 (1) O61845_CAEEL // T04D1.4 PROTEIN	30	3.1
pd|PD131278 p99.2 (2) O17665(1) UN13(1) // UNC13 PROTEIN PHORB...	30	3.1
pd|PD181530 p99.2 (1) O84817_CHLTR // FA/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS...	29	4.1
pd|PD014373 p99.2 (5) ACLY(3) P90731(1) Q13037(1) // LYASE ATP...	29	4.1
pd|PD141343 p99.2 (1) O60158_SCHPO // HYPOTHETICAL 49.4 KD PROT...	29	5.3

【図８－３】

Database: swissprot

88,166 sequences; 32,012,037 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
sp|P71018 PLSX_BACSU FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	339	5e-93
sp|O65984 PLSX_CLOTS FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	266	4e-71
sp|O67186 PLSX_AQUAE FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	221	2e-57
sp|Q9WXZ6 PLSX_THEMA FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	211	1e-54
sp|Q9ZMN1 PLSX_HELPJ FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	209	6e-54
sp|O24993 PLSX_HELPY FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	208	9e-54
sp|P73950 PLSX_SYNY3 FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	206	5e-53
sp|P30789 PLSX_RHOCA FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	180	3e-45
sp|O85138 PLSX_SALTY FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	178	1e-44
sp|P27247 PLSX_ECOLI FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	178	2e-44
sp|P75232 PLSX_MYCPN FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	175	1e-43
sp|Q49427 PLSX_MYCGE FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	173	3e-43
sp|O84817 PLSX_CHLTR FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	145	9e-35
sp|Q92GU6 PLSX_CHLPN FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	142	1e-33
sp|Q46578 PLSX_DEIRA FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	138	2e-32

【図８－４】

Database: trembl
372,572 sequences; 116,471,635 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
tr|Q9KA01|Q9KA01 INVOLVED IN FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS.	293	9e-79
tr|Q9PIH0|Q9PIH0 PUTATIVE FATTY ACID\PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PR...	196	2e-49
tr|Q9JW54|Q9JW54 PUTATIVE FATTY ACID/PHOSPHOLIPID BIOSYNTHESIS...	193	1e-48
tr|Q9JXR8|Q9JXR8 FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN.	190	1e-47
tr|Q9KQH4|Q9KQH4 FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN PLSX.	183	1e-45
tr|Q9RA35|Q9RA35 FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN PLS...	168	4e-41
tr|Q9PQT7|Q9PQT7 FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN.	153	1e-36
tr|Q9PLB1|Q9PLB1 FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN.	144	7e-34
tr|Q9JQ90|Q9JQ90 FA/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN (FATTY ACID...	142	4e-33
tr|Q53843|Q53843 ORFA AND ORFF GENES, PARTIAL CDS, ORFB, ORFC,...	100	2e-20

【図８－５】

Database: staph_aureus
160 sequences; 5,603,166 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
st|8091 Staphylococcus aureus, TIGR database	647	0.0
st|Contig248 Staphylococcus aureus, Univ. of Oklahama database	647	0.0
st|8083 Staphylococcus aureus, TIGR database	28	1.9
st|Contig276 Staphylococcus aureus, Univ. of Oklahama database	28	1.9
st|8084 Staphylococcus aureus, TIGR database	28	2.5
st|Contig264 Staphylococcus aureus, Univ. of Oklahama database	28	2.5
st|8104 Staphylococcus aureus, TIGR database	28	2.5
st|8096 Staphylococcus aureus, TIGR database	27	4.3
st|Contig280 Staphylococcus aureus, Univ. of Oklahama database	27	4.3
st|8085 Staphylococcus aureus, TIGR database	26	9.6

【図９－１】

Optimal global alignment between STAAU_R004 and gene PlsX from *Bacillus subtilis*

Sequence 1
>pt|125098 STAAU_R004 STAAU_R004_NT|1-987|
(328 letters)

Sequence 2
>sp|P71018 PLSX_BACSU FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN PLSX.
(333 letters)

Substitution matrix: blosum62
Gap penalty: - (11 + 1 * (gap length))

Score: 908
Identical: 179/334 (53%), **Similar:** 240/334 (71%), **Gap:** 7/334 (2%)

```
seq1     1 MVKLAIDMMGGDNAPDIVLEAVQKAVEDFKDLEIILFGD----EKKYNLNHERIEFRHCS   56
           | ::|:| ||||:||  |:: | | :| | || | | ||    |       :||  |
seq2     1 M-RIAVDAMGGDHAPKAVIDGVIKGIEAFDDLHITLVGDKTTIESHLTTTSDRITVLHAD   59

seq1    57 EKIEMEDEPVRAIKRKKDSSMVKMAEAVKSGEADGCVSAGNTGALMSAGLFIVGRIKGVA   116
           | ||  ||||||::|||:|||| ||: |    || |:|||||||||:||||||||||:
seq2    60 EVIEPTDEPVRAVRRKKNSSMVLMAQEVAENRADACISAGNTGALMTAGLFIVGRIKGID   119
```

図9A－1

【図９－２】

```
seq1   117 RPALVVTLPTIDGKGFVFLDVGANADAKPEHLLQYAQLGDIYAQKIRGIDNPKISLLNIG   176
           ||||  ||||: | ||: ||||||  |||||||:||| :| :|:|::||: :|:: |||:|
seq2   120 RPALAPTLPTVSGDGFLLLDVGANVDAKPEHLVQYAIMGSVYSQQVRGVTSPRVGLLNVG   179

seq1   177 TEPAKGNSLTKKSYELLNHDHSLNFVGNIEAKTLMDGDTDVVVTDGYTGNMVLKNLEGTA   236
           ||  ||| |||:::::|    ::||:||:||: |:|   |||||||:|||: || |||:|
seq2   180 TEDKKGNELTKQTFQILKETANINFIGNVEARDLLDDVADVVVTDGFTGNVTLKTLEGSA   239

seq1   237 KSIGKMLKDTIMSSTKNKLAGAILKKDLAEFAKKMDYSEYGGSVLLGLEGTVVKAHGSSN   296
            || ||::| : |:  :||| |:||  | |   ||:|| |||: | ||:  |:||||||:
seq2   240 LSIFKMMRDVMTSTLTSKLAAAVLKPKLKEMKMKMEYSNYGGASLFGLKAPVIKAHGSSD   299

seq1   297 AKAFYSAIRQAKIAGEQNIVQTMKETVGE--SNE   328
           : | : |||||:    ||:   ::| | |  ::|
seq2   300 SNAVFHAIRQAREMVSQNVAALIQEEVKEEKTDE   333
```

図9A－2

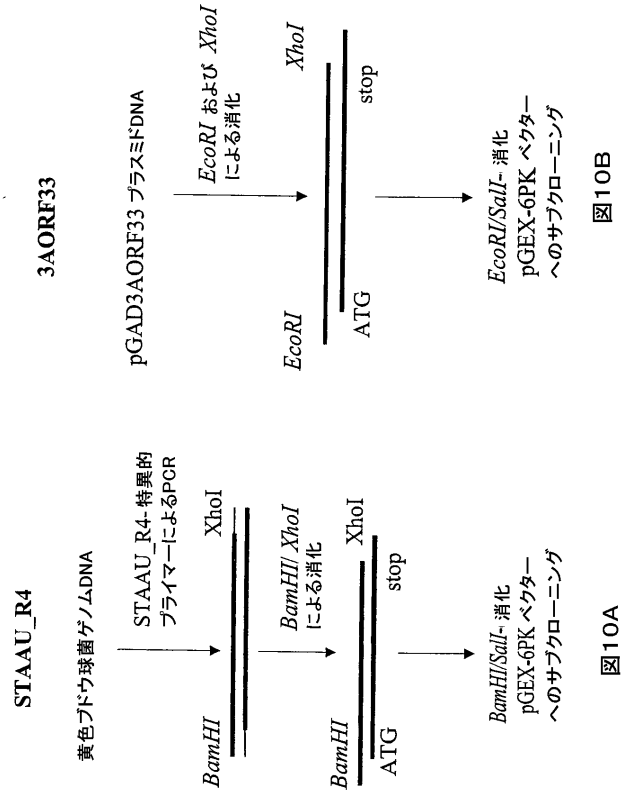
【図９－３】

STAAU_R004 stop codon-to-stop codon region

```
50574  tagttttcaaaggaaattttaaaatgttttatgataagcgaggataaaattatggttaaattagcaatt
1      * F S K E I L K C F M I S E D K I M V K L A I
50643  gatatgatgggtggcgacaatgcgcctgatatcgtattagaagccgtacaaaaggctgttgaagacttt
24     D M M G G D N A P D I V L E A V Q K A V E D F
50712  aaagatctagaaattatacttttcggtgacgaaaaaaagtataatctgaaccatgaacgaatcgaattt
47     K D L E I I L F G D E K K Y N L N H E R I E F
50781  agacattgttctgaaaagattgaaatggaagatgagcctgttagagcgattaaacgtaaaaaagatagc
70     R H C S E K I E M E D E P V R A I K R K K D S
50850  tcaatggtaaaaatggctgaagctgtgaaatctggtgaagcagatggatgtgtgtcagcaggtaatact
93     S M V K M A E A V K S G E A D G C V S A G N T
50919  ggtgctttaatgtcagctggtttattcattgttggacgtattaaaggtgtagctagaccggctttagta
116    G A L M S A G L F I V G R I K G V A R P A L V
50988  gtaacattgccaacgattgatggaaaaggttttgtctttttagacgttggtgcaaatgctgatgctaaa
139    V T L P T I D G K G F V F L D V G A N A D A K
51057  cctgaacacttattacagtatgcgcaactaggggatatttatgctcaaaaaattagaggtattgataat
162    P E H L L Q Y A Q L G D I Y A Q K I R G I D N
51126  ccgaaaatctcattattaaatataggaaccgagccagctaaaggtaatagtttaacgaaaaaatcatat
185    P K I S L L N I G T E P A K G N S L T K K S Y
51195  gagttattaaatcatgatcattcattgaattttgttgggaatattgaagcgaagacattaatggatggc
208    E L L N H D H S L N F V G N I E A K T L M D G
51264  gatacagatgttgtagttaccgatggctatactgggaacatggtccttaaaaatttagaaggtactgca
231    D T D V V V T D G Y T G N M V L K N L E G T A
51333  aaatcaatcggtaaaatgttaaaagatacgattatgagtagtactaaaaataaattagcaggtgcaata
254    K S I G K M L K D T I M S S T K N K L A G A I
51402  ttgaagaaagatttagctgaattcgctaaaaagatggattactcagaatacggtggttccgtattatta
277    L K K D L A E F A K K M D Y S E Y G G S V L L
51471  ggattggaaggtactgtagttaaagcacacggtagttcaaatgctaaagcttttattctgcaattaga
300    G L E G T V V K A H G S S N A K A F Y S A I R
51540  caagcgaaaatcgcaggagaacaaaatattgtacaaacaatgaaagagactgtaggtgaatcaaatgag
323    Q A K I A G E Q N I V Q T M K E T V G E S N E
51609  taa 51611
346    *
```

図9B

【図１０－１】



【図１０－２】

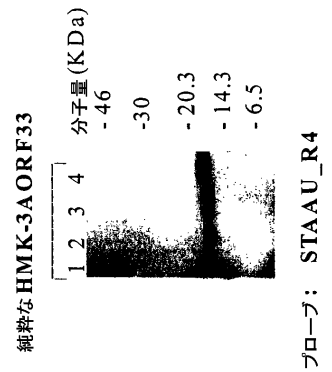


図10D

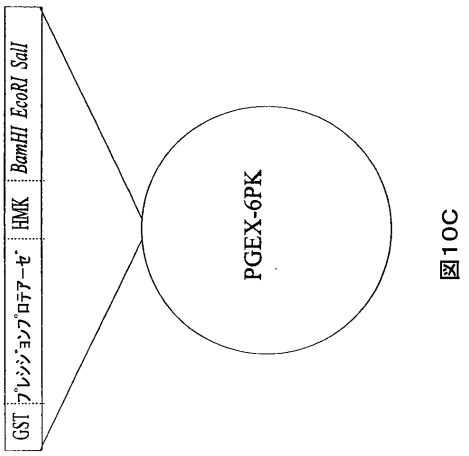


図10C

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
27 June 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/50106 A2

(51) International Patent Classification[7]: C07K 14/195

(21) International Application Number: PCT/CA01/01847

(22) International Filing Date:
19 December 2001 (19.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/256,489 20 December 2000 (20.12.2000) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **PHAGETECH INC.** [CA/CA]; C.P. 387, Place du Parc, Montréal, Québec H2W 2N9 (CA).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **PELLETIER, Jerry** [CA/CA]; 8 Lakeview, Baie D'Urfe, Quebec H9X 3B1 (CA). **GROS, Philippe** [CA/CA]; 107 Montrose, St. Lambert, Quebec J4R 1X4 (CA). **DUBOW, Michael** [CA/CA]; 4901 Coolbrook, Montreal, Quebec H3X 2K8 (CA).

(74) Agents: **DUBUC, J.** et al.; Goudreau Gage Dubuc, Stock Exchange Tower, Suite 3400, 800 Place Victoria, P.O. Box 242, Montréal, Québec H4Z 1E9 (CA).

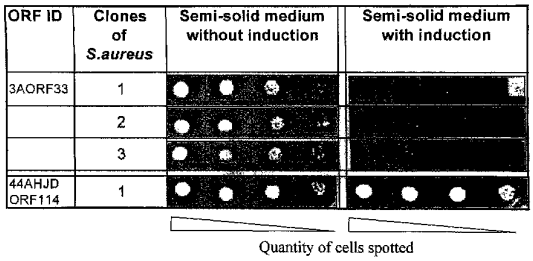
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) **Title:** COMPOSITIONS AND METHODS INVOLVING AN ESSENTIAL STAPHYLOCOCCUS AUREUS GENE AND ITS ENCODED PROTEIN STAAU_R4



(57) **Abstract:** The invention relates to bacterial genes and proteins that are implicated in the process of fatty acid/phospholipid biosynthesis and also to bacteriophage genes and their protein products that interact with bacterial proteins implicated in fatty acid/phospholipid biosynthesis. More particularly, the invention relates to compositions and methods involving essential *Staphylococcus aureus* genes and its encoded proteins STAAU_R4. In addition, the invention relates to screening assays to identify compounds which modulate the level and/or activity of STAAU_R4 and to such compounds.

WO 02/50106 A2

TITLE OF THE INVENTION

COMPOSITIONS AND METHODS INVOLVING AN ESSENTIAL STAPHYLOCOCCUS AUREUS GENE AND ITS ENCODED PROTEIN STAAU_R4

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to bacterial genes and proteins that are implicated in the process of fatty acid/phospholipid biosynthesis and also to bacteriophage genes and their protein products that interact with bacterial proteins implicated in fatty acid/phospholipid biosynthesis. More particularly, the invention relates to compositions and methods involving essential *Staphylococcus aureus* genes and its encoded proteins STAAU_R4. In addition, the invention relates to screening assays to identify compounds which modulate the level and/or activity of STAAU_R4 and to such compounds.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The Staphylococci make up a medically important genera of microbes known to cause several types of diseases in humans. *S. aureus* is a Gram positive organism which can be found on the skin of healthy human hosts and it is responsible for a large number of bacteremias.

S. aureus has been successfully treated with the penicillin derivative Methicillin in the past, but is now becoming increasingly resistant (MRSA - Methicillin Resistant *S. aureus*) to this antibiotic [Harbath *et al.*, (1998) Arch. Intern. Med. 158:182-189]. For example, *S. aureus* endocarditis mortality can range from 26-45%, and combined ß-lactam/aminoglycoside therapy is proving increasingly ineffective in disease eradication [Røder *et al.*, (1999) Arch. Intern. Med. 159:462-469].

It is no longer uncommon to isolate *S. aureus* strains which are resistant to most of the standard antibiotics, and thus there is an unmet medical need and demand for new anti-microbial agents, vaccines, drug screening

methods, and diagnostic tests for this organism. Antibiotics can be grouped into broad classes of activities against surprisingly few targets within the cell. Generally, the target molecule is a cellular protein that provides an essential function. The inhibition of activity of the essential protein leads either to death of the bacterial cell or to its inability to proliferate. Critical cellular functions against which antibiotics are currently in use include cell wall synthesis, folate and fatty acid metabolism, protein synthesis, and nucleic acid synthesis. Of particular relevance for the current invention is fatty acid/phospholipid biosynthesis.

A proven approach in the discovery of a new drug, referred to as target-based drug discovery to distinguish it from cell-based drug discovery, is to obtain a target protein and to develop *in vitro* assays to interfere with the biological function of the protein.

There remains a need to identify new bacterial targets and new target domains, and more particularly *S. aureus* bacterial targets which could be used to screen for and identify antibacterial and more particularly anti-*S. aureus* agents. There also remains a need to identify new antimicrobial agents, vaccines, drug screening methods and diagnosis and therapeutic methods.

The present invention seeks to meet these and other needs.

The present description refers to a number of documents, the content of which is herein incorporated by reference in their entirety.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to new antimicrobial agents, vaccines, drug screening methods and diagnosis and therapeutic methods.

More particularly, the invention relates to compounds which interact with STAAU_R4 and in particular to bacterial growth-inhibitory (or inhibitor) bacteriophage gene products that interacts with the *S. aureus* STAAU_R4 polypeptides.

The invention also relates to a pair of interaction proteins and parts or fragments thereof. More specifically, the invention relates to the

interacting domains of the *S. aureus* STAAU_R4 protein and to proteins which interact with same and block or inhibit a STAAU_R4 biological activity. In a particular embodiment, the invention relates to a pair of interacting domains comprised of that of STAAU_R4 and a polypeptide encoded by a bacteriophage ORF which specifically interacts therewith, such as the *S. aureus* bacteriophage 3A ORF 33. In one particularly preferred embodiment of the present invention, the interaction of these domains and a modulation thereof forms the basis for screening assays to identify modulators of STAAU_R4 biological function and more particularly of antimicrobials.

The present invention also relates to polynucleotides and polypeptides of a multiprotein complex believed to be involved in fatty acid/phospholipid biosynthesis replication containing STAAU_R4 as a subunit, as well as variants and portions thereof.

In another aspect, the invention relates to methods for using such polypeptides, polynucleotides, peptidomimetics and the like, including treatment and diagnosis of microbial diseases, amongst others.

In a further aspect, the invention relates to methods for identifying agonists and antagonists using the materials provided by the invention. In a related aspect, the invention relates to methods for treating microbial infections and conditions associated with such infections with the identified agonist or antagonist.

In a still further aspect, the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with microbial infections and conditions associated with such infections. In one embodiment, the diagnostic assay detects STAAU_R4 expression and/or activity.

In one particular embodiment of the invention, there is provided a method of identifying a compound that is active on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or a biologically active fragment, or variant thereof, wherein SEQ ID NO: 2 or a biologically active fragment or variant thereof is capable of binding specifically with a polypeptide

comprising the sequence selected from SEQ ID NO: 4, a biologically active fragment thereof, and variant thereof, wherein the fragment or variant retains its capability of binding to SEQ ID NO:2, fragment, or variant thereof.

In one preferred embodiment of the invention, the identification of a compound active on a STAAU_R4 polypeptide is provided by a method comprising: contacting a first and a second polypeptide in the presence or absence of a candidate compound, wherein the first polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, a fragment or variant thereof which specifically binds to a second polypeptide derived from a bacteriophage ORF which is capable of binding specifically with one of SEQ ID NO: 2, a fragment, or variant thereof. In one particular embodiment, the second polypeptide is a phage ORF, a fragment thereof or variant thereof, wherein this second polypeptide maintains its biological activity; and detecting a biological activity of the first and/or second polypeptide, wherein a decrease in the biological activity in the presence thereof relative to the biological activity in the absence of the candidate compound identifies the candidate compound as a compound that is active on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, fragment or variant thereof.

In one particular embodiment, the biological activity is the binding of the first and second polypeptides to each other, the method comprising: contacting an assay mixture comprising a) a first polypeptide which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a biologically active fragment, or variant thereof, and b) a second polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 4, a fragment thereof, and a variant thereof; with a test compound; measuring the binding of the first and the second polypeptides in the presence of the candidate compound relative to the binding in the absence thereof and; determining the ability of the candidate compound to interact with a STAAU_R4 polypeptide, fragment or variant thereof, wherein a decrease in the binding of the first and the second polypeptides in the presence of a candidate compound that interacts with the first polypeptide, relative to the binding in the absence thereof,

identifies the candidate compound as a compound that is active on a STAAU_R4 polypeptide, fragment or variant thereof. While in a preferred embodiment, the method identifies a compound active on STAAU_R4, the method can also identify compounds active on a bacteriophage ORF which specifically interacts with STAAU_R4.

In one embodiment, the step of detecting comprises the step of measuring the binding of the first and second proteins, wherein the first or the second protein is directly or indirectly detectably labeled.

The invention also encompasses a method of identifying an antimicrobial agent comprising determining whether a test compound is active on a *S. aureus* polypeptide, namely STAAU_R4 as set forth in SEQ ID NO: 2, or parts thereof.

In a further embodiment, identifying a compound active on a STAAU_R4 polypeptide is provided by a method which comprises: contacting a candidate compound with a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; a fragment thereof, or a variant thereof, the fragment or variant retaining its biological activity, and detecting binding of the candidate compound thereto, wherein detection of binding is indicative that the compound is active on the polypeptide.

In different embodiments, the step of detecting includes measuring the binding of a candidate compound to the polypeptide, wherein the compound is directly or indirectly detectably labeled, by a method comprising, but not limited to, time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET), fluorescence polarization changes, measurement by surface plasmon resonance, scintillation proximity assay, biosensor assay, and phage display.

In one embodiment, a library of compounds is used. Non-limiting examples of candidate compound include a small molecule, a peptidomimetic compound, a peptide, and a fragment or derivative of a bacteriophage inhibitor protein.

In one embodiment, the candidate compound is a peptide synthesized by expression systems and purified, or artificially synthesized.

The invention further encompasses a method of identifying a compound that is active on a STAAU_R4 polypeptide, a fragment or a variant thereof, comprising the steps of contacting a candidate compound (or library thereof) with cells expressing a polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2; and detecting STAAU_R4 activity in the cells, wherein a decrease in activity relative to STAAU_R4 activity in cells not contacted with a candidate compound is indicative of inhibition of STAAU_R4 activity. The invention also encompasses such a method but using a fragment or variant of SEQ ID NO:2.

Of course, the invention further encompasses methods of identifying a compound that modulates the activity of a STAAU_R4 polypeptide, wherein a compound increasing the activity relative to STAAU_R4 activity in cells not contacted with the candidate compound, is selected as a compound which is a stimulator of STAAU_R4 activity.

The invention further encompasses a method of identifying a compound that is active on a STAAU_R4 polypeptide, a fragment or a variant thereof, comprising the steps of contacting a candidate compound (or library thereof) in a cell-free assay, with a STAAU_R4 protein or biologically active portion thereof, either naturally occurring or recombinant in origin; and detecting STAAU_R4 activity, wherein a decrease in activity relative to STAAU_R4 activity in cell-free assay not contacted with a candidate compound is indicative of inhibition of STAAU_R4 activity.

The invention further encompasses an agonist or an antagonist of the activity of a STAAU_R4 polypeptide or a nucleic acid or gene encoding the polypeptide.

The assays described herein may be used as initial or primary screens to detect promising lead compounds for further development. The same assays may also be used in a secondary screening assay to measure the activity

of candidate compounds on a STAAU_R4 polypeptide. Often, lead compounds will be further assessed in additional, different screens. This invention also includes secondary STAAU_R4 screens which may involve biological assays utilizing *S. aureus* strains or other suitable bacteria.

Tertiary screens may involve the study of the effect of the agent in an animal. Accordingly, it is within the scope of this invention to further use an agent identified as described herein in an appropriate animal model. For example, a test compound identified as described herein (e.g., a STAAU_R4 inhibiting agent, an antisense STAAU_R4 nucleic acid molecule, a STAAU_R4-specific antibody, or a STAAU_R4-binding partner) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent. Alternatively, an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such an agent. Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents identified by the above-described screening assays for treatment (e.g. bacterial infections), as described herein.

The invention further encompasses a method of making an antibacterial compound, comprising the steps of: a) determining whether a candidate compound is active on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, fragment or variant thereof, or a gene encoding the polypeptide; and b) synthesizing or purifying the candidate compound in an amount sufficient to provide a therapeutic effect when administered to an organism infected by a bacterium naturally producing a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, fragment or variant thereof.

The invention further encompasses a method for inhibiting a bacterium, comprising contacting the bacterium with a compound active on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, fragment or variant thereof, or a nucleic acid encoding the polypeptide.

In one embodiment, the step of contacting is performed *in vitro*.

In another embodiment, the step of contacting is performed *in vivo* in an animal.

In another embodiment, bacterium is contacted with the active compound in combination with existing antimicrobial agents. Thus, the invention also relates to antimicrobial compositions comprising a compound of the present invention in combination with an existing antimicrobial agent. Of course, more than one active compound of the present invention could be combined with or without existing antimicrobial agent(s).

The invention further encompasses a method for treating or preventing a bacterial infection in an animal suffering from an infection or susceptible of suffering from same, comprising administering thereto a therapeutically or prophylactically effective amount of a compound active on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, variant or fragment thereof, or nucleic acid sequence encoding same. The animal is preferably, but not necessarily a mammal, and more preferably a human. In one embodiment, the active compound is administred to the animal in combination with existing antimicrobial agents. Thus, the invention also relates to antimicrobial compositions comprising a compound of the present invention in combination with an existing antimicrobial agent.

The invention further encompasses a method of prophylactic treatment to prevent bacterial infection comprising contacting an indwelling device with a compound active on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, variant or fragment thereof before its implantation into a mammal, such contacting being sufficient to prevent *S. aureus* infection at the site of implantation.

The invention further encompasses a method of prophylactic treatment to prevent infection of an animal by a bacterium comprising administering to the animal a prophylactically effective amount of a compound that is active on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, variant or fragment thereof or a gene encoding the polypeptide in an amount

sufficient to prevent infection of the animal. In a particular embodiment, the prophylactically effective amount reduces adhesion of the bacterium to a tissue surface of the mammal.

The invention further encompasses a method of diagnosing in an animal an infection with *S. aureus*, comprising: determining the presence in the animal of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, part thereof, variant thereof, fragment thereof, epitope thereof or nucleic acid encoding same. Preferably the polypeptide is capable of specifically interacting with 3A ORF 33 . Preferably, the animal is a human.

In one embodiment, the determining step comprises contacting a biological sample of the animal or individual with an antibody specific for an epitope present on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, variant or fragment thereof.

The invention further encompasses a method of diagnosing in an animal or individual an infection with *S. aureus*, comprising determining the presence in the animal or individual of a nucleic acid sequence encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, variant or fragment thereof, wherein the polypeptide is capable of specifically interacting with 3A ORF 33 .

In one embodiment, the determining step comprises contacting a nucleic acid sample of the animal or individual with an isolated, purified or enriched nucleic acid probe of at least 15 nucleotides in length that hybridizes under stringent hybridization conditions with the sequence of SEQ ID NO: 1, or the complement thereof.

The invention further encompasses an isolated, purified or enriched polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide, which can interact with a bacterial growth-inhibitory (or inhibitor) bacteriophage 3A ORF 33 gene product or part thereof.

In one particular embodiment, the isolated, purified or enriched polynucleotide comprises a nucleotide sequence encoding a polypeptide corresponding to SEQ ID NO: 2, or complement thereof.

In another particular embodiment of the present invention, the isolated, purified or enriched polynucleotide comprises a nucleotide sequence having at least 60 %, at least 70 %, at least 80 %, and more preferably at least 90% identity to the sequence of SEQ ID NO: 1, or to the complement thereof.

The invention further encompasses an isolated, purified or enriched polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, a variant or fragment thereof.

The invention further encompasses an isolated, purified or enriched polypeptide comprising or consisting in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or a fragment or variant thereof.

In one particular embodiment, the isolated, purified or enriched polypeptide comprises or consists of an amino acid sequence having at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 70%, and more preferably at least 80%, at least 90%, at least 95% or at least 99% identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

In one particular embodiment, the isolated, purified or enriched polypeptide of the present invention comprises or consists of an amino acid sequence having least 60%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, more preferably at least 90%, and more preferably at least 95% or at least 99% similarity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

In one particular embodiment, the sequence of SEQ ID NO:2 or fragment or variant thereof is part of a chimeric protein.

The invention further encompasses an isolated, purified or enriched antibody specific for an epitope encoded by the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2.

The invention further encompasses a composition comprising two polypeptides, a bacteriophage-encoded polypeptide and a *S. aureus*

STAAU_R4 polypeptide corresponding to SEQ ID NO: 2, or variant or fragment thereof. In another embodiment, the invention encompasses a composition comprising two interacting polypeptides derived from a bacteriophage encoded polypeptide and a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide. As such, the invention encompasses a composition comprising two nucleic acid sequences encoding these directly interacting polypeptides.

In another embodiment, the invention encompasses a composition comprising a pair of specifically interacting domains, the pair comprising: a STAAU_R4 polypeptide and a polypeptide encoded by a bacteriophage ORF which specifically interacts with the STAAU_R4 polypeptide.

Further, the invention encompasses a process for producing a pharmaceutical composition comprising: a) carrying out a screening assay of the present invention aimed at identifying a compound that is active on a STAAU_R4 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, biologically active fragment thereof, or variant thereof; and b) mixing the compound identified in a) with a suitable pharmaceutical carrier.

In a particular embodiment, the process for producing a pharmaceutical composition comprises a) identifying a compound that is active on a STAAU_R4 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, biologically active fragment thereof, or variant thereof that binds specifically with a second polypeptide derived from a bacteriophage ORF; and b) mixing the compound identified in a) with a suitable pharmaceutical carrier.

In a further embodiment of this process of producing a pharmaceutical composition, the process further includes a scaling-up of the preparation for isolating of the identified compound active on the STAAU_R4 polypeptide. In yet another embodiment of this process of producing a pharmaceutical composition, the pharmaceutical composition prepared comprises a derivative or homolog of the compound identified in a).

Also, the invention encompasses the use of one of: a) a STAAU_R4 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2,

a biologically active fragment thereof or variant thereof, b) a composition comprising a pair of specifically interacting domains comprised of a polypeptide of STAAU_R4, biologically active fragment thereof or variant thereof and a polypeptide encoded by a bacteriophage ORF which specifically interacts with STAAU_R4; or c) an assay mixture comprising a first polypeptide which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, biologically active fragment thereof or variant thereof and a second polypeptide encoded by a bacteriophage ORF which specifically interact with each other; for the identification of a compound that is active on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, biologically active fragment thereof or variant thereof.

In yet another embodiment of the present invention, there is provided an isolated polypeptide or polynucleotide sequence which comprises a bacteriophage ORF interacting domain which enables specific binding of the encoded bacteriophage ORF interacting domain to a bacteriophage ORF, the sequence being mutagenized in the non-bacteriophage ORF interacting domain.

Further features and advantages of the invention will become more fully apparent in the following description of the embodiments and drawings thereof, and from the claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Having thus generally described the invention, reference will now be made to the accompanying drawings, showing by way of illustration a preferred embodiment thereof, and in which:

Fig. 1 shows the nucleotide (SEQ ID NO: 1) and amino acid (SEQ ID NO: 2) sequences of *S. aureus* STAAU_R4.

Fig. 2 shows the nucleotide (SEQ ID NO: 3) and the amino acid (SEQ ID NO: 4) sequences of *S. aureus* bacteriophage 3A ORF 33.

Fig. 3 shows the bacterial inhibitory potential of bacteriophage 3A ORF 33 and the expression vector used to induce its expression in *S. aureus*. A) Schematic diagram of expression vector pTM/ORF used to induce expression

of 3A ORF 33 in *S. aureus* cells; B) Results of a screen to assess the inhibitory potential of 3A ORF 33 when expressed in *S. aureus* grown on semi-solid support media; and C), D) Results of assays for inhibitory potential of 3A ORF 33 when expressed in *S. aureus* grown in liquid medium followed by plating on semi-solid medium either containing (C) or not containing (D) the antibiotic necessary to maintain the selective pressure for the plasmid.

Fig. 4 shows affinity chromatography using GST/3A ORF 33 ligands with a 10.0 mg/ml *S. aureus* extract. Eluates from affinity columns containing the ligands at 0, 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml resin were resolved by 14% SDS-PAGE and the gel was stained with silver nitrate. Micro-columns were sequentially eluted with 100 mM ACB containing 0.1% Triton X-100 (SDS-PAGE not shown), 1 M NaCl ACB, and 1% SDS. Each molecular weight marker is approximately 200 ng. The lanes labeled ACB indicate eluates from a 2.0 mg/ml ligand column loaded only with ACB buffer containing 100 mM NaCl. The arrow designated PT40 indicates the position of the band that was excised for protein identification.

Fig. 5 shows affinity chromatography using 3A ORF 33 fused to a polyhistidine sequence (MSC2/3A ORF 33) as ligand with a 10.0 mg/ml *S. aureus* extract. Eluates from affinity columns containing the ligands at 0, 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml resin were resolved by 14% SDS-PAGE and the gel was stained with silver nitrate. Micro-columns were sequentially eluted with 100 mM ACB containing 0.1% Triton X-100 (SDS-PAGE not shown), 1 M NaCl ACB, and 1% SDS. Each molecular weight marker is approximately 200 ng. The lanes labeled ACB indicate eluates from a 2.0 mg/ml ligand column loaded only with ACB buffer containing 100 mM NaCl. The arrow designated PT40 indicates the position of the band that was excised for protein identification.

Fig. 6 shows affinity chromatography using control GST as ligand with a 10.0 mg/ml *S. aureus* extract. Eluates from affinity columns containing the ligands at 0, 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml resin were resolved by 14% SDS-PAGE and the gel was stained with silver nitrate. Micro-columns were

sequentially eluted with 100 mM ACB containing 0.1% Triton X-100 (SDS-PAGE not shown), 1 M NaCl ACB, and 1% SDS. Each molecular weight marker is approximately 200 ng. The lanes labeled ACB indicate eluates from a 2.0 mg/ml ligand column loaded only with ACB buffer containing 100 mM NaCl.

Fig. 7 shows the tryptic peptide mass spectrum analysis of the PT40 protein that interacted with 3A ORF 33 in affintity chromatography. The PT40 band was identified as an open reading frame, herein referred as STAAU_R4, found in Contig782 of the University of Oklahoma genome sequencing project database (http://www.genome.ou.edu/staph.html).

Fig. 8 shows the results of the BLAST searching analysis of publically available databases including NCBI (nr). STAAU_R4 is significantly similar to PlsX protein from a variety of bacteria, including *B. subtilis* (gi|6686325|sp|P71018|PLSX_BACSU: FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN *PLSX*).

Fig. 9 shows the global optimal alignment of the amino acid sequences of STAAU_R4 and *B. subtilis* PlsX and the identification of the start codon of the *S. aureus* gene. A) Result of the global optimal alignment reveals a 53% identity between STAAU_R4 and PlsX of *B. subtilis*; B) Results of the analysis of the *S. aureus* stop codon-to-stop codon DNA region containing STAAU_R4 revealing the presence of an ATG start codon associated with a predicted ribosomal binding site (RBS) sequence (in bold on the nucleotide sequence).

Fig. 10 shows A) an overview of the cloning of *S. aureus* STAAU_R4 and B) an overview of the cloning of phage 3A ORF 33 in the pGEX-6PK vector; C) the vector pGEX-6PK containing GST in fusion with PreScission protease cleavage site and the heart muscle kinase (HMK) phosphorylation site, followed by *Bam*HI,*Eco*RI and SalI cloning sites; and D) the results of the Far western affinity blotting analysis that was designed to test the interaction between purified 3A ORF 33 and [^{32}P]-ATP-radiolabelled STAAU_R4 polypeptides. Lanes 1 to 4 represent increasing amount (0.125, 0.250, 0.5 and 1.0 ug) of 3A ORF 33

resolved on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose membrane.

Other objects, advantages and features of the present invention will become more apparent upon reading of the following non-restrictive description of preferred embodiments with reference to the accompanying drawing which is exemplary and should not be interpreted as limiting the scope of the present invention.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

The invention relates to the discovery of an essential gene and its encoded polypeptide in *S. aureus* and portions thereof useful for example in screening, diagnostics, and therapeutics. More specifically, the invention also relates to *S. aureus* STAAU_R4 polypeptides and polynucleotides as described in greater detail below, and to a pair of polynucleotides encoding a pair of interacting polypeptides, to the pair of polypeptides themselves, or interacting domains thereof. In a particular embodiment, the pair includes a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide or interacting domain thereof and a 3A ORF 33 or interacting domain thereof. In one embodiment, the invention relates to STAAU_R4 having the nucleotide or amino acid sequence disclosed as SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, respectively. The sequences presented as SEQ ID NOs: 1 and 2 represent an exemplification of the invention, since those of ordinary skill will recognize that such sequences can be usefully employed in polynucleotides in general, including ribopolynucleotides.

The methodology of two previous inventions (U.S. Provisional Patent Application 60/110,992, filed December 3, 1998, and PCT International Application WO1999/IB99/02040, filed December 3, 1999) has been used to identify and characterize essential polynucleotide and polypeptide sequences from *S. aureus*.

Thus, in a particular embodiment of the present invention, there is provided polynucleotide and polypeptide sequences isolated from *S.*

aureus that can be used in a drug screening assay to identify compounds with anti-microbial activity. The polynucleotide and polypeptide sequences can be isolated using a method similar to those described herein, or using another method. In addition, such polynucleotide and polypeptide sequences can be chemically synthesized. The identification of the *S. aureus* STAAU_R4 sequence as a target for a bacteriophage validates the approach of the present invention to identify bacterial targets and also validates STAAU_R4 as a key target for antibacterial drug development as well as diagnosis and treatment methods based thereon.

DEFINITIONS

In order to provide a clear and consistent understanding of terms used in the present description, a number of definitions are provided hereinbelow.

The terminology "active on", with reference to a particular cellular target, such as the product of a particular gene, means that the target is an important part of a cellular pathway which includes that target and that an agent or compound acts on that pathway. Thus, in some cases the agent or compound may act on a component upstream or downstream of the stated target (i.e. indirectly on the target), including a regulator of that pathway or a component of that pathway. In general, an antibacterial agent is active on an essential cellular function, often on a product of an essential gene (i.e. directly on the target).

The terminology "active on" also refers to a measurable effect of the compound on the target it is active on (as compared to the activity of the target in the absence of the compound). The activity referred thereto is any one of a biological activity of one of the polypeptides of the present invention.

As used herein, the terms "inhibit", "inhibition", "inhibitory", and "inhibitor" all refer to a function of reducing a biological activity or function. Such reduction in activity or function can, for example, be in connection with a cellular component (e.g., an enzyme), or in connection with a cellular process (e.g.,

synthesis of a particular protein), or in connection with an overall process of a cell (e.g., cell growth). In reference to cell growth, the inhibitory effects may be bacteriocidal (killing of bacterial cells) or bacteriostatic (i.e. - stopping or at least slowing bacterial cell growth). The latter slows or prevents cell growth such that fewer cells of the strain are produced relative to uninhibited cells over a given time period. From a molecular standpoint, such inhibition may equate with a reduction in the level of, or elimination of, the transcription and/or translation and/or stability of a specific bacterial target(s), and/or reduction or elimination of activity of a particular target biomolecule.

As used herein, the terminologies "STAAU_R4 polypeptide", "plsX polypeptide" or the like refer to a polypeptide encompassing *S. aureus* STAAU_R4 (SEQ ID NO: 2), variant thereof or an active domain of *S. aureus* STAAU_R4. As used herein, the term "active domain of *S. aureus* STAAU_R4", "biologically active polypeptide of STAAU_R4" or the like refers to a polypeptide fragment or portion of *S. aureus* STAAU_R4 that retains an activity of *S. aureus* STAAU_R4. The term "STAAU_R4 polypeptide" is meant to encompass *S. aureus* STAAU_R4 or an active domain of *S. aureus* STAAU_R4 that is fused to another, non-STAAU_R4 polypeptide sequence.

"STAAU_R4 activity" "polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 2 activity" "plsX polypeptide activity" or "biological activity" of STAAU_R4 or other polypeptides of the present invention is defined as a detectable biological activity of a gene, nucleic acid sequence, protein or polypeptide of the present invention. This includes any physiological function attributable to the specific biological activity of STAAU_R4, or phage ORF of the present invention. Non-limiting examples of the biological activities may be made directly or indirectly. STAAU_R4 biological activity, for example, is not limited, however, to its function in fatty acid/phospholipid biosynthesis. Biological activities may also include simple binding to other factors (polypeptides or otherwise), including compounds, substrates, and of course interacting proteins. Thus, for STAAU_R4, biological activity includes any standard biochemical measurement

of STAAU_R4 such as conformational changes, phosphorylation status or any other feature of the protein that can be measured with techniques known in the art. STAAU_R4 biological activity also includes activities related to STAAU_R4 gene transcription or translation, or any biological activities of such transcripts or translation products. The instant invention is also concerned with STAAU_R4 interaction with an inhibitory polypeptide of the present invention, biological activity of STAAU_R4 and fragment thereof also includes assays which monitor binding and other biochemical measurements of these polypeptides. Furthermore, for certainty, the terminology "biological activity" also includes measurements based on the interaction of domains of interacting proteins of the present invention (e.g. the phage ORF interacting domain of STAAU_R4, or STAAU_R4 interacting domain of a phage ORF domains thereof). Non-limiting examples of "biological activity" include one or more of the following:

i) Binding to a bacterial growth inhibitory ORF derived from a bacteriophage including a 3A ORF 33 polypeptide or part thereof.

Determining the binding between polypeptides of the present invention can be accomplished by one of the methods described below or known in the art for determining direct binding. While it might be advantageous in certain embodiments of the present invention to provide a binding assay which is amenable to automation and more particularly to high-throughput, the present invention is not so limited. The binding or physical interaction between a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, provided herein, or fragment thereof and a bacteriophage protein 3A ORF 33 or portion thereof may be between isolated polypeptides consisting essentially of the sequence necessary for binding, or, alternatively, the respective polypeptide sequence may be comprised within a larger polypeptide.

A number of non-limiting methods, useful in the invention, to measure the binding of bacteriophage 3A ORF 33 to a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or fragment thereof are described below. Binding can be measured by coupling one molecule to a surface or support such

as a membrane, a microtiter plate well, or a microarray chip, and monitoring binding of a second molecule by any number of means including but not limited to optical spectroscopy, fluorometry, and radioactive label detection.

For example, Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET), in which the close proximity of two fluorophores, whether intrinsic to, as in the case of a naturally-fluorescent amino acid residue such as tryptophan, or either covalently or non-covalently bound to a separate molecule, causes the emission spectrum of one fluorophore to overlap with the excitation spectrum of the second, and thus dual fluorescence following excitation of only one fluorophore is indicative of binding. An additional assay useful in the present invention is fluorescence polarization, in which the quantifiable polarization value for a given fluorescently-tagged molecule is altered upon binding to a second molecule. Surface plasmon resonance assays can be used as a quantitative method to measure binding between two molecules by the change in mass near an immobilized sensor caused by the binding of one protein from the aqueous phase to a second immobilized on the sensor. A scintillation proximity assay can also be used to measure binding of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and fragment thereof and a bacteriophage ORF or fragment thereof in which binding in the proximity to a scintillant converts radioactive particles into a photon signal that is detected by a scintillation counter or other detector. Additionally, binding can be evaluated by a Bio Sensor assay, which is based on the ability of the sensor to register changes in admittance induced by ion-channel modulation following binding. Phage display is also a powerful quantitative assay to measure protein:protein interaction using colourimetric ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

ii) The complementation of glycerol-3-phosphate auxotrophy

A method, useful in the invention, is to measure the ability of a STAAU_R4 polypeptide to relieve glycerol-3-phosphate auxotrophy of an *E. coli* strain that possesses the *plsB26* and *plsX50* mutations. A strain of *E. coli* bearing mutations in two distinct loci, *plsB* and *plsX*, depends upon the presence of

glycerol-3-phosphate in the medium for its growth. Introduction, into this strain, of a polynucleotide sequence encoding wild-type PlsX circumvents the glycerol-3-phosphate growth requirement. Strains are assessed for the relief of their auxotrophic requirement by plating, in parallel, onto minimal medium containing or not containing glycerol-3-phosphate. Growth on the plates lacking glycerol-3-phosphate indicates complementation of the auxotrophic phenotype.

This assay has proven useful to assess whether homologues of *E. coli plsX* from other bacterial species, including the Gram-negative bacterium *Salmonella typhimurium* and the Gram-positive bacteria *Clostridium butyricum* and *Bacillus subtilis* can functionally replace PlsX in *E. coli*. Similar assays can be developed to test the activity of PlsX from *S. aureus* and to screen for inhibitors of such activity.

As used herein, the term "polynucleotide encoding a polypeptide" or equivalent language encompasses polynucleotides that include a sequence encoding a polypeptide of the invention, particularly a bacterial polypeptide and more particularly a polypeptide of *S. aureus* STAAU_R4 protein having an amino acid sequence set out in Fig. 1, SEQ ID NO: 2. The term also encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, polynucleotides interrupted by integrated phage, an integrated insertion sequence, an integrated vector sequence, an integrated transposon sequence, or otherwise altered due to RNA editing or genomic DNA reorganization) together with additional regions that also may contain coding and/or non-coding sequences.

As used herein, the term "STAAU_R4 gene" "PlsX gene" is meant to encompass a polynucleotide encoding a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide. Any additional nucleotide sequences necessary to direct transcription of RNA encoding a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide, either in a cell or *in vitro*, will be termed "regulatory sequences", which include but are not limited to transcriptional promoters and enhancers, and transcription terminators.

As used herein, the term "ORF 33" or "phage 3A ORF 33" or "3A ORF 33" encompasses a polynucleotide comprising or consisting of the sequence provided in Fig. 2 (SEQ ID NO: 3), which encodes a gene product known as the 3A ORF 33 gene product.

As used herein, the term "polynucleotide(s)" generally refers to any polyribonucleotide or poly-deoxyribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. "Polynucleotide(s)" include, without limitation, single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions or single-, double- and triple-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded, or triple-stranded regions, or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, "polynucleotide" as used herein refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The strands in such regions may be from the same molecule or from different molecules. The regions may include all of one or more of the molecules, but more typically involve only a region of some of the molecules. One of the molecules of a triple-helical region often is an oligonucleotide. As used herein, the term "polynucleotide(s)"also includes DNAs or RNAs as described above that contain one or more modified bases. Thus, DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons are "polynucleotide(s)" as that term is intended herein. Moreover, DNAs or RNAs comprising unusual bases, such as inosine, or modified bases, such as tritylated bases, to name just two examples, are polynucleotides as the term is used herein. It will be appreciated that a great variety of modifications have been made to DNA and RNA that serve many useful purposes known to those of skill in the art. The term "polynucleotide(s)" as it is employed herein embraces such chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells, including, for example, simple and complex

cells. "Polynucleotide(s)" also embraces short polynucleotides often referred to as oligonucleotide(s). Polynucleotides can also be DNA and RNA chimeras.

As used herein, the term "polypeptide(s)" refers to any peptide or protein comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds. "Polypeptide(s)" refers to both short chains, commonly referred to as peptides, oligopeptides and oligomers and to longer chains generally referred to as proteins. Polypeptides may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. "Polypeptide(s)" include those modified either by natural processes, such as processing and other post-translational modifications, but also by chemical modification techniques. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature, and they are well known to those of skill in the art. It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degree at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains, and the amino or carboxyl termini. Modifications include, for example, acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphotidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of cysteine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, glycosylation, lipid attachment, sulfation, gamma-carboxylation of glutamic acid residues, hydroxylation, selenoylation, sulfation and transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins, such as arginylation, and ubiquitination. See, for instance: Proteins – Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); Wold, F., Posttranslational

Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); and Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62(1992). Polypeptides may be branched or cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched circular polypeptides may result from post-translational natural processes and may be made by entirely synthetic methods, as well.

As used herein, the term "variant(s)" refers to a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide, respectively, but retains one or more of the biological activities of the initial (e.g. non-variant) polynucleotide or polypeptide of the present invention (e.g. STAAU_R4). A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from another reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, or in the formation of fusion proteins, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from another reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. The present invention also includes variants of each of the polypeptides of the invention, that is polypeptides that vary from the referents by conservative amino acid substitutions whereby a residue is substituted by another with like characteristics. Typically, such substitutions are among Val, Leu and Ile; among Ser and Thr; among the acidic residues Asp and Glu; and among the basic residues Lys and Arg; or aromatic residues Phe and

Tyr. Particularly preferred are variants in which 1-10, 1-5, 1-3, 2-3, or 1 amino acid or amino acids are substituted, deleted, or added in any combination. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be a naturally occurring such as an allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques, by direct synthesis, and by other recombinant methods known to skilled artisans. As used herein, the term "fragment", when used in reference to a polypeptide, is a polypeptide having an amino acid sequence that is entirely the same as part but not all of the amino acid sequence of the polypeptide according to the invention from which it "derives". As with *S. aureus* STAAU_R4 polypeptides, fragments may be "free-standing" ("consisting of"), or comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region, most preferably as a single continuous region in a single larger polypeptide.

The term "isolated", when used in reference to a nucleic acid means that a naturally occurring sequence has been removed from its normal cellular (*e.g.*, chromosomal) environment or is synthesized in a non-natural environment (*e.g.*, artificially synthesized). Thus, the sequence may be in a cell-free solution or placed in a different cellular environment. The term does not imply that the sequence is the only nucleotide chain present, but that it is essentially free (about 90-95% pure at least) of non-nucleotide material naturally associated with it, and thus is distinguished from isolated chromosomes.

The term "enriched", when used in reference to a polynucleotide means that the specific DNA or RNA sequence constitutes a significantly higher fraction (2-5 fold) of the total DNA or RNA present in the cells or solution of interest than in normal or diseased cells or in cells from which the sequence was originally taken. This could be caused by a person, by preferential reduction in the amount of other DNA or RNA present, or by a preferential increase in the amount of the specific DNA or RNA sequence, or by a combination of the two. However, it should be noted that enriched does not imply

that there are no other DNA or RNA sequences present, just that the relative amount of the sequence of interest has been significantly increased.

As used herein, the term "significantly higher fraction" indicates that the level of enrichment is useful to the person making such an enrichment and indicates an increase in enrichment relative to other nucleic acids of at least about 2-fold, or 5- to 10-fold or even more. The term also does not imply that there is no DNA or RNA from other sources. The other source of DNA may, for example, comprise DNA from a yeast or bacterial genome, or a cloning vector such as pUC19. This term distinguishes from naturally occurring events, such as viral infection, or tumor type growths, in which the level of one mRNA may be naturally increased relative to other species of mRNA. That is, the term is meant to cover only those situations in which a person has intervened to elevate the proportion of the desired nucleic acid.

As used herein, the term "purified" in reference to nucleic acid does not require absolute purity (such as a homogeneous preparation). Instead, it represents an indication that the sequence is relatively more pure than in the natural environment (compared to the natural level, this level should be at least 2-5 fold greater, *e.g.*, in terms of mg/mL). Individual clones isolated from a genomic or cDNA library may be purified to electrophoretic homogeneity. The claimed DNA molecules obtained from these clones could be obtained directly from total DNA or from total RNA. cDNA clones are not naturally occurring, but rather are preferably obtained via manipulation of a partially purified naturally occurring substance (messenger RNA). The construction of a cDNA library from mRNA involves the creation of a synthetic substance (cDNA) and pure individual cDNA clones can be isolated from the synthetic library by clonal selection of the cells carrying the cDNA library. Thus, the process which includes the construction of a cDNA library from mRNA and isolation of distinct cDNA clones yields an approximately 10^6-fold purification of the native message over its proportion in naturally occurring cells. Thus, purification of at least one order of magnitude, preferably two or three orders, and more preferably four or five orders of

magnitude is expressly contemplated. A genomic library can be used in the same way and yields the same approximate levels of purification.

The terms "isolated", "enriched", and "purified" used with respect to nucleic acids, above, may similarly be used to denote the relative purity and abundance of polypeptides. These, too, may be stored in, grown in, screened in, and selected from libraries using biochemical techniques familiar in the art. Such polypeptides may be natural, synthetic or chimeric and may be extracted using any of a variety of methods, such as antibody immunoprecipitation, other "tagging" techniques, conventional chromatography and/or electrophoretic methods. Some of the above utilize the corresponding nucleic acid sequence.

As used herein, the term "complement" when used in reference to a given polynucleotide sequence refers to a sequence of nucleotides which can form a double-stranded heteroduplex in which every nucleotide in the sequence of nucleotides is base-paired by hydrogen bonding to a nucleotide opposite it in the heteroduplex with the given polynucleotide sequence. The term may refer to a DNA or an RNA sequence that is the complement of another RNA or DNA sequence. As used herein, the term "hybridizes" refers to the formation of a hydrogen-bonded heteroduplex between two nucleic acid molecules. Generally, a given nucleic acid molecule will hybridize with its complement, or with a molecule that is sufficiently complementary to the given molecule to permit formation of a hydrogen-bonded heteroduplex between the two molecules.

As used herein, the term "probe" refers to a polynucleotide of at least 15 nucleotides (nt), 20 nt, 30 nt, 40 nt, 50 nt, 75 nt, 100 nt, 200 nt, 500 nt, 1000 nt, and even up to 5000 to 10,000 nt in length.

"Identity" and "similarity," as used herein and as known in the art, are relationships between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by comparing the sequences.

Amino acid or nucleotide sequence "identity" and "similarity" are determined from an optimal global alignment between the two sequences

being compared. A non-limiting example of optimal global alignment can be carried-out using the Needleman - Wunsch algorithm [Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453]. "Identity" means that an amino acid or nucleotide at a particular position in a first polypeptide or polynucleotide is identical to a corresponding amino acid or nucleotide in a second polypeptide or polynucleotide that is in an optimal global alignment with the first polypeptide or polynucleotide. In contrast to identity, "similarity" encompasses amino acids that are conservative substitutions.

The term "conservative" substitution is well-known in the art and broadly refers to a substitution which does not significantly change the chemico-physical properties of the substituted amino acid. For example, a "conservative" substitution is any substitution that has a positive score in the blosum62 substitution matrix [Hentikoff and Hentikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919]. By the statement "sequence A is n% similar to sequence B" is meant that n% of the positions of an optimal global alignment between sequences A and B consists of conservative substitutions. By the statement "sequence A is n% identical to sequence B" is meant that n% of the positions of an optimal global alignment between sequences A and B consists of identical residues or nucleotides. Optimal global alignments in this disclosure used the following parameters in the Needleman-Wunsch alignment algorithm:

For polypeptides:

Substitution matrix: blosum62.

Gap scoring function: -A -B*LG, where A=11 (the gap penalty), B=1 (the gap length penalty) and LG is the length of the gap.

For nucleotide sequences:

Substitution matrix: 10 for matches, 0 for mismatches.

Gap scoring function: -A -B*LG where A=50 (the gap penalty), B=3 (the gap length penalty) and LG is the length of the gap.

The term ' identity' and 'similarity' between sequences can be extended to their fragments. An optimal local alignment between sequences A

and B is the highest scoring alignment of fragments of A and B. By the statement "sequence A is n% similar locally to B" is meant that n% of the positions of an optimal local alignment between sequences A and B consists of conservative substitutions. By the statement "sequence A is n% identical locally to B" is meant that n% of the position of an optimal local alignment between sequences A and B consists of identical residues or nucleotides. A non-limiting example of optimal local alignment can be carried-out using the Smith-Waterman algorithm [Smith, T.F and Waterman, M.S. 1981. Identification of common molecular subsequences. J. Mol. Biol. 147:195-197].

Of course, the above-listed parameters are but one specific example of alignment algorithm parameters. Numerous algorithms and parameters are available and known to the person of ordinary skill.

Typical conservative substitutions are among Met, Val, Leu and Ile; among Ser and Thr; among the residues Asp, Glu and Asn; among the residues Gln, Lys and Arg; or aromatic residues Phe and Tyr. In calculating the degree (most often as a percentage) of similarity between two polypeptide sequences, one considers the number of positions at which identity or similarity is observed between corresponding amino acid residues in the two polypeptide sequences in relation to the entire lengths of the two molecules being compared.

As used herein, the term "antibody" is meant to encompass constructions using the binding (variable) region of such an antibody, and other antibody modifications. Thus, an antibody useful in the invention may comprise a whole antibody, an antibody fragment, a polyfunctional antibody aggregate, or in general a substance comprising one or more specific binding sites from an antibody. The antibody fragment may be a fragment such as an Fv, Fab or $F(ab')_2$ fragment or a derivative thereof, such as a single chain Fv fragment. The antibody or antibody fragment may be non-recombinant, recombinant or humanized. The antibody may be of an immunoglobulin isotype, e.g., IgG, IgM, and so forth. In addition, an aggregate, polymer, derivative and conjugate of an immunoglobulin or a fragment thereof can be used where appropriate. Neutralizing antibodies are

especially useful according to the invention for diagnostics, therapeutics and methods of drug screening and drug design.

As used herein, the term "specific for an epitope present on a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide", when used in reference to an antibody, means that the antibody recognizes and binds an antigenic determinant present on a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide or fragment thereof according to the invention.

As used herein, the term "antigenically equivalent derivative(s)" encompasses a polypeptide, polynucleotide, or the equivalent of either which will be specifically recognized by certain antibodies which, when raised to the protein, polypeptide or polynucleotide according to the invention, interferes with the immediate physical interaction between pathogen and mammalian host.

As used herein, the term "essential", when used in connection with a gene or gene product, means that the host cannot survive without, or is significantly growth compromised, in the absence or depletion of functional product. An "essential gene" is thus one that encodes a product that is beneficial, or preferably necessary, for cellular growth *in vitro* in a medium appropriate for growth of a strain having a wild-type allele corresponding to the particular gene in question. Therefore, if an essential gene is inactivated or inhibited, that cell will grow significantly more slowly than a wild-type strain or even not at all. Preferably, growth of a strain in which such a gene has been inactivated will be less than 20%, more preferably less than 10%, most preferably less than 5% of the growth rate of the wild-type, or the rate will be zero, in the growth medium. Preferably, in the absence of activity provided by a product of the gene, the cell will not grow at all or will be non-viable, at least under culture conditions similar to normal *in vivo* growth conditions. For example, absence of the biological activity of certain enzymes involved in bacterial cell wall synthesis can result in the lysis of cells under normal osmotic conditions, even though protoplasts can be maintained under controlled osmotic conditions. Preferably, but not necessarily, if such a

gene is inhibited, e.g., with an antibacterial agent or a phage product, the growth rate of the inhibited bacteria will be less than 50%, more preferably less than 30%, still more preferably less than 20%, and most preferably less than 10% of the growth rate of the uninhibited bacteria. As recognized by those skilled in the art, the degree of growth inhibition will generally depend upon the concentration of the inhibitory agent. In the context of the invention, essential genes are generally the preferred targets of antimicrobial agents. Essential genes can encode "target" molecules directly or can encode a product involved in the production, modification, or maintenance of a target molecule.

As used herein, "target" refers to a biomolecule or complex of biomolecules that can be acted on by an exogenous agent or compound, thereby modulating, preferably inhibiting, growth or viability of a bacterial cell. A target may be a nucleic acid sequence or molecule, or a polypeptide or a region of a polypeptide.

As used herein, the term "signal that is generated by interaction of a *S. aureus* polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or fragments thereof to a 3A ORF 33 or fragment thereof" or the like refers to the measurable indicator of polypeptide interaction in a binding assay, wherein the interacting polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, fragment thereof or variant thereof and 3A ORF 33, fragment thereof or variant thereof. As used herein, the term "signal that is generated by activation or inhibition of a *S. aureus* polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or fragments thereof" refers to the measurable indicator of polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, fragment or variant thereof, activity in an assay of STAAU_R4 activity. For example, the signal may include, but is not limited to (i) a signal resulting from binding of 3A ORF 33 to a STAAU_R4 polypeptide, including a fluorescence signal (time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay; fluorescence polarization assay), spectrophotometer absorbance measurement of a colourimetric signal (phage display ELISA), mass change measurement (surface

plasmon resonance analysis), or a viability measurement on selective medium (yeast two-hybrid analysis)

As used herein, the term "standard", used in reference to polypeptide activity, means the amount of activity observed or detected (directly or indirectly) in a given assay performed in the absence of a candidate compound. A "standard" serves as a reference to determine the effect, positive or negative, of a candidate compound on polypeptide activity.

As used herein, the term "increase in activity" refers to an enhanced level of measurable activity of a polypeptide in a given assay in the presence of a candidate compound relative to the measurable level of activity in the absence of a candidate compound. Activity is considered increased according to the invention if it is at least 10% greater, 20% greater, 50% greater, 75% greater, 100% greater or more, up to 2-fold, 5-fold, 10-fold, 20-fold, 50-fold, 100-fold or more than in the absence of a candidate compound.

As used herein, the term "decrease in activity" refers to a reduced level of measurable activity of a polypeptide in a given assay in the presence of a candidate compound relative to the measurable level of activity in the absence of a candidate compound. Activity is considered decreased according to the invention if it is at least 10% less, preferably 15% less, 20% less, 50% less, 75% less, or even 100% less (i.e., no activity) than that observed in the absence of a candidate compound.

As used herein, the term "conditions that permit their interaction", when used in reference to a *S. aureus* polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or fragments thereof, and a candidate compound means that the two entities are placed together, whether both in solution or with one immobilized or restricted in some way and the other in solution, wherein the parameters (e.g., salt, detergent, protein or candidate compound concentration, temperature, and redox potential, among others) of the solution are such that the *S. aureus* polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or fragments thereof, and the candidate compound

may physically associate. Conditions that permit protein:candidate interaction include, for example, the conditions described herein for TR-FRET, fluorescent polarization, Surface Plasmon Resonance and Phage display assays.

As used herein, the term "detectable change in a measurable parameter of STAAU_R4" refers to an alteration in a quantifiable characteristic of a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide.

As used herein, the term "agonist" refers to an agent or compound that enhances or increases the activity of a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide or polynucleotide. An agonist may be directly active on a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide or polynucleotide, or it may be active on one or more constituents in a pathway that leads to enhanced or increased activity of a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide or polynucleotide.

As used herein, the term "antagonist" refers to an agent or compound that reduces or decreases the activity of a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide or polynucleotide. An antagonist may be directly active on a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide or polynucleotide, or it may be active on one or more constituents in a pathway that leads to reduced or decreased activity of a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide or polynucleotide.

As used herein, the term "antibacterial agent" or "antibacterial compound" refers to an agent or compound that has a bacteriocidal or bacteriostatic effect on one or more bacterial strains, preferably such an agent or compound is bacteriocidal or bacteriostatic on at least *S. aureus*.

As used herein, the term "synthesizing" refers to a process of chemically synthesizing a compound.

As used in the context of treating a bacterial infection a "therapeutically effective amount", "pharmaceutically effective amount" or "amount sufficient to provide a therapeutic effect" indicates an amount of an antibacterial agent which has a therapeutic effect. This generally refers to the inhibition, to some extent, of the normal cellular functioning of bacterial cells required for continued bacterial infection. Further, as used herein, a therapeutically effective

amount means an amount of an antibacterial agent that produces the desired therapeutic effect as judged for example by clinical trial results and/or animal models. This amount can be routinely determined by one skilled in the art and will vary depending on several factors, such as the particular bacterial strain involved and the particular antibacterial agent used. In the same context, an "amount sufficient to reduce adhesion" of a bacterium to a tissue or tissue surface indicates an amount of an antibacterial agent that is effective for prophylactically preventing or reducing the extent of bacterial infection of the given tissue or tissue surface. The same principle applies to the terminology "prophylactically effective amount".

As used in the context of treating a bacterial infection, contacting or administering the antimicrobial agent 'in combination with existing antimicrobial agents' refer to a concurrent contacting or administration of the active compound with antibiotics to provide a bactericidal or growth inhibitory effects beyond the individual bactericidal or growth inhibitory effects of the active compound or the antibiotic. Existing antibiotic refers for example to the group consisting of penicillins, cephalosporins, imipenem, monobactams, aminoglycosides, tetracyclines, sulfonamides, trimethoprim/sulfonamide, fluoroquinolones, macrolides, vancomycin, polymyxins, chloramphenicol and lincosamides.

As used herein, a "tissue" refers to an aggregation of cells of one or more cell types which together perform one or more specific functions in an organism. As used herein, a "tissue surface" refers to that portion of a tissue that forms a boundary between a given tissue and other tissues or the surroundings of the tissue. A tissue surface may refer to an external surface of an animal, for example the skin or cornea, or, alternatively, the term may refer to a surface that is either internal, for example, the lining of the gut, or to a surface that is exposed to the outside surroundings of the animal only as the result of an injury or a surgical procedure.

As used herein, the term "measuring the binding of a candidate compound" refers to the use of an assay preferably permitting the quantitation of the amount of a candidate compound physically associated with a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide, fragment or variant thereof.

A "candidate compound" as used herein, is any compound with a potential to modulate the expression or activity of a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide.

As used herein, the term "directly or indirectly detectably labeled" refers to the attachment of a moiety to a candidate compound that renders the candidate compound either directly detectable (e.g., an isotope or a fluorophore) or indirectly detectable (e.g., an enzyme activity, allowing detection in the presence of an appropriate substrate, or a specific antigen or other marker allowing detection by addition of an antibody or other specific indicator).

A "method of screening" refers to a method for evaluating a relevant activity or property of a large plurality of compounds, rather than just one or a few compounds. For example, a method of screening can be used to conveniently test at least 100, more preferably at least 1000, still more preferably at least 10,000, and most preferably at least 100,000 different compounds, or even more. In a particular embodiment, the method is amenable to automated, cost-effective high throughput screening on libraries of compounds for lead development.

In a related aspect or in preferred embodiments, the invention provides a method of screening for potential antibacterial agents by determining whether any of a plurality of compounds, preferably a plurality of small molecules, is active on STAAU_R4. Preferred embodiments include those described for the above aspect, including embodiments which involve determining whether one or more test compounds bind to or reduce the level of activity of a bacterial target, and embodiments which utilize a plurality of different targets as described above.

As used herein, the term "simultaneously" when used in connection with the assays of the present invention, refers to the fact that the

specified components or actions at least overlap in time, and is thus not restricted to the fact that the initiation and termination points are identical. For certainty, a simultaneous contact of a STAAU_R4 polypeptide with a candidate compound and a bacteriophage polypeptide, for example, is an overlap in contact periods, which can, but does not necessarily reflect the fact that the latter two are introduced into an assay mixture at the exact same time.

The term "compounds" preferably includes, but is not limited to, small organic molecules, peptides, polypeptides and antibodies that bind to a polynucleotide and/or polypeptide of the invention, such as for example inhibitory ORF gene product or target thereof, and thereby inhibit, extinguish or enhance its activity or expression. Potential compounds may be small organic molecules, a peptide, a polypeptide such as a closely related protein or antibody that binds the same site(s) on a binding molecule, such as a bacteriophage gene product, thereby preventing bacteriophage gene product from binding to STAAU_R4 polypeptides.

The term "compounds" is also meant to include small molecules that bind to and occupy the binding site of a polypeptide, thereby preventing binding to cellular binding molecules, such that normal biological activity is prevented. Examples of small molecules include but are not limited to small organic molecules, peptides or peptide-like molecules. Preferred potential compounds include compounds related to and variants of inhibitory ORF encoded by a bacteriophage and of STAAU_R4 and any homologues and/or peptido-mimetics and/or fragments thereof. Other examples of potential polypeptide antagonists include antibodies or, in some cases, oligonucleotides or proteins which are closely related to the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide, e.g., a fragment of the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc.; or small molecules which bind to the polypeptide of the present invention but do not elicit a response, so that the activity of the polypeptide is prevented. Other potential compounds include antisense molecules (see Okano, 1991 J. Neurochem. 56, 560; see also "Oligodeoxynucleotides as

Antisense Inhibitors of Gene Expression", CRC Press, Boca Raton, FL (1988), for a description of these molecules).

As used herein, the term "library" refers to a collection of 100 compounds, preferably of 1000, still more preferably 5000, still more preferably 10,000 or more, and most preferably of 50,000 or more compounds.

As used herein, the term "small molecule" refers to compounds having molecular mass of less than 3000 Daltons, preferably less than 2000 or 1500, still more preferably less than 1000, and most preferably less than 600 Daltons. Preferably but not necessarily, a small molecule is not an oligopeptide.

As used herein, the term "mimetic" refers to a compound that can be natural, synthetic, or chimeric and is structurally and functionally related to a reference compound. In terms of the present invention, a "peptidomimetic," for example, is a non-peptide compound that mimics the activity-related aspects of the 3-dimensional structure of a peptide or polypeptide, for example a compound that mimics the structure of a peptide or active portion of a phage- or bacterial ORF-encoded polypeptide.

As used herein, the term "bacteriophage inhibitor protein" refers to a protein encoded by a bacteriophage nucleic acid sequence, which inhibits bacterial function in a host bacterium. Thus, it is a bacteria-inhibiting phage product. The term "bacteriophage inhibitor protein" encompasses a fragment, derivative, or active portion of a bacteriophage inhibitor protein.

In more than one embodiment of the above assay methods of the present invention, it may be desirable to immobilize either STAAU_R4 or its target molecule or ligand to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins or polypeptides, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to a STAAU_R4 protein (or fragment, or variant thereof) or interaction of a STAAU_R4 protein with a target molecule or ligand in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants.

Examples of such vessels include microtitre plates, test tubes and micro-centrifuge tubes.

In one embodiment a fusion protein can be provided which adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, glutathione-S-transferase (GST)/STAAU_R4 fusion proteins or GST/target fusion proteins (e.g. GST/3A ORF 33) can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtitre plates, which are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or STAAU_R4 protein and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation (e.g. at physiological conditions for salt and pH). Following incubation the beads or microtitre plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of STAAU_R4 binding or activity determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices (and well-known in the art) can also be used in the screening assays of the invention. For example, either a STAAU_R4 protein or a STAAU_R4 target molecule or ligand can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated STAAU_R4 protein or target molecules or ligand can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies reactive with target molecules or ligand but which do not interfere with binding of the STAAU_R4 protein (or part thereof) to its target molecule or ligand can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or STAAU_R4 protein trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with

the STAAU_R4 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with the STAAU_R4 protein.

As used herein, the term "active portion", when refering to a bacteriophage-derived sequence, relates to an epitope, a catalytic or regulatory domain, or a fragment of a bacteriophage inhibitor protein that is responsible for, or a significant factor in, bacterial target inhibition. The active portion preferably may be removed from its contiguous sequences and, in isolation, still effect inhibition.

As used herein, the term "treating a bacterial infection" refers to a process whereby the growth and/or metabolic activity of a bacterium or bacterial population in a host, preferably a mammal, more preferably a human, is inhibited or ablated. Similarly, the term "preventing a bacterial infection" refers to a process whereby the growth and/or metabolic activity of a bacterium or bacterial population in a host, preferably a mammal, more preferably a human, at risk of being infected is inhibited or ablated.

As used herein, the term "bacterium" refers to a single bacterial strain and includes a single cell and a plurality or population of cells of that strain unless clearly indicated to the contrary. In reference to bacteria or bacteriophage, the term "strain" refers to bacteria or phage having a particular genetic content. The genetic content includes genomic content as well as recombinant vectors. Thus, for example, two otherwise identical bacterial cells would represent different strains if each contained a vector, *e.g.*, a plasmid, with different inserts.

As used herein, the term "diagnosing" refers to the identification of an organism or strain of an organism responsible for a bacterial infection.

As used herein, the term "infection with *Staphylococcus aureus*" refers to the presence, growth or proliferation of cells of a *S. aureus* strain within, or on a surface of, an animal, such as a mammal, preferably a human.

As used herein, the term "bacteriophage 3A ORF 33 -encoded polypeptide" refers to a polypeptide encoded by SEQ ID NO: 3 or to a fragment or derivative thereof encompassing an active portion of a bacteriophage 3A ORF 33 -encoded polypeptide of sequence disclosed in SEQ ID NO: 4.

As used herein, the term "polypeptide complex" refers to a combination of two or more polypeptides in a physical association with each other. It is preferred that such a physical association be required for some aspect of the activity of one or more of the polypeptides in such a polypeptide complex.

As used herein, the term "physical association" refers to an interaction between two moieties involving contact between the two moieties.

As used herein, the term "bodily material(s)" means any material derived from an individual or from an organism infecting, infesting or inhabiting an individual, including but not limited to, cells, tissues and waste, such as, bone, blood, serum, cerebrospinal fluid, semen, saliva, muscle, cartilage, organ tissue, skin, urine, stool or autopsy materials.

As used herein, the term "disease(s)" means any disease caused by or related to infection by a bacterium, including, for example, otitis media, conjunctivitis, pneumonia, bacteremia, meningitis, sinusitis, pleural empyema and endocarditis, and most particularly meningitis, such as for example infection of cerebrospinal fluid.

As used herein, the term "fusion protein(s)" refers to a protein encoded by a gene comprising amino acid coding sequences from two or more separate proteins fused in frame such that the protein comprises fused amino acid sequences from the separate proteins.

As used herein, the term "host cell(s)" is a cell which has been transformed or transfected, or is capable of transformation or transfection by an exogenous polynucleotide sequence.

As used herein, the term "immunologically equivalent derivative(s)" encompasses a polypeptide, polynucleotide, or the equivalent of either which when used in a suitable formulation to raise antibodies in a

vertebrate, results in antibodies that act to interfere with the immediate physical interaction between pathogen and mammalian host.

As used herein, the term "immunospecific" means that characteristic of an antibody whereby it possesses substantially greater affinity for the polypeptides of the invention or the polynucleotides of the invention than its affinity for other related polypeptides or polynucleotides respectively, particularly those polypeptides and polynucleotides in the prior art.

As used herein, the term "individual(s)" means a multicellular eukaryote, including, but not limited to a metazoan, a mammal, an ovid, a bovid, a simian, a primate, and a human.

As used herein, the term "Organism(s)" means a (i) prokaryote, including but not limited to, a member of the genus *Streptococcus, Staphylococcus, Bordetella, Corynebacterium, Mycobacterium, Neisseria, Haemophilus, Actinomycetes, Streptomycetes, Nocardia, Enterobacter, Yersinia, Fancisella, Pasturella, Moraxella, Acinetobacter, Erysipelothrix, Branhamella, Actinobacillus, Streptobacillus, Listeria, Calymmatobacterium, Brucella, Bacillus, Clostridium, Treponema, Escherichia, Salmonella, Kleibsiella, Vibrio, Proteus, Erwinia, Borrelia, Leptospira, Spirillum, Campylobacter, Shigella, Legionella, Pseudomonas, Aeromonas, Rickettsia, Chlamydia, Borrelia and Mycoplasma, and further including, but not limited to, a member of the species or group, Group A Streptococcus, Group B Streptococcus, Group C Streptococcus, Group D Streptococcus, Group G Streptococcus, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium, Streptococcus durans, Neisseria gonorrheae, Neisseria meningitidis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Corynebacterium diptheriae, Gardnerella vaginalis, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium leprae, Actinomyctes israelii, Listeria monocytogenes, Bordetella pertusis, Bordatella parapertusis, Bordetella bronchiseptica, Escherichia coli, Shigella dysenteriae, Haemophilus influenzae, Haemophilus aegyptius, Haemophilus parainfluenzae,*

Haemophilus ducreyi, Bordetella, Salmonella typhi, Citrobacter freundii, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Yersinia pestis, Kleibsiella pneumoniae, Serratia marcessens, Serratia liquefaciens, Vibrio cholera, Shigella dysenterii, Shigella flexneri, Pseudomonas aeruginosa, Franscisella tularensis, Brucella abortis, Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Clostridium botulinum, Treponema pallidum, Rickettsia rickettsii and *Chlamydia trachomitis*, (ii) an archaeon, including but not limited to *Archaebacter*, and (iii) a unicellular or filamenous eukaryote, including but not limited to, a protozoan, a fungus, a member of the genus Saccharomyces, *Kluveromyces*, or *Candida*, and a member of the species *Saccharomyces ceriviseae, Kluveromyces lactis*, or *Candida albicans*.

As used herein, the term "recombinant expression system(s)" refers to a system in which vectors comprising sequences encoding polypeptides of the invention or portions thereof, or polynucleotides of the invention are introduced or transformed into a host cell or host cell lysate for the production of the polynucleotides and polypeptides of the invention.

As used herein, the term "artificially synthesized" when used in reference to a peptide, polypeptide or polynucleotide means that the amino acid or nucleotide subunits were chemically joined *in vitro* without the use of cells or polymerizing enzymes. The chemistry of polynucleotide and peptide synthesis is well known in the art.

In addition to the standard single and triple letter representations for amino acids, the term "X" or "Xaa" may also be used in describing certain polypeptides of the invention. "X" and "Xaa" mean that any of the twenty naturally occurring amino acids may appear at such a designated position in the polypeptide sequence.

As used herein, the term "specifically binding" in the context of the interaction of two polypeptides means that the two polypeptides physically interact via discrete regions or domains on the polypeptides, wherein the interaction is dependent upon the amino acid sequences of the interacting

domains. Generally, the equilibrium binding concentration of a polypeptide that specifically binds another is in the range of about 1 mM or lower, more preferably 1 uM or lower, preferably 100 nM or lower, 10 nM or lower, 1 nM or lower, 100 pM or lower, and even 10 pM or lower.

As used herein, the term "decrease in the binding" refers to a drop in the signal that is generated by the physical association between two polypeptides under one set of conditions relative to the signal under another set of reference conditions. The signal is decreased if it is at least 10% lower than the level under reference conditions, and preferably 20%, 40%, 50%, 75%, 90%, 95% or even as much as 100% lower (i.e., no detectable interaction).

As used herein, the term "detectable marker", when used in the context of a yeast two-hybrid assay, refers to a polypeptide that confers a trait upon a cell expressing that polypeptide that signals the presence or amount of that polypeptide expressed. Detectable markers are encoded on plasmids that may exist episomally or may be integrated into the genome of a host cell. Detectable markers include, but are not limited to, polypeptides encoding enzymes allowing colorimetric or fluorescent detection (e.g., *E. coli LacZ*, which catalyzes the conversion of the substrate analog X-gal to generate a blue color), polypeptides encoding enzymes conferring antibiotic resistance, and polypeptides encoding enzymes conferring the ability of a yeast strain to grow on medium lacking a given component (i.e., critical for the relief of auxotrophy).

As used herein, the term "results in the expression of a detectable marker" means that the interaction of factors necessary to permit the expression of a detectable marker (e.g., two-hybrid transactivation domain and DNA binding domain fusion proteins) causes the transactivation and translation of detectable levels of a detectable marker. A "detectable level" is that level of expression that can be differentiated from background expression occurring in the substantial absence of one or more factors or conditions necessary for marker expression. Detectable levels will vary depending upon the nature of the

detectable marker, but will generally consist of levels at least about 10% or more greater than the background level of a given marker.

As used herein, the term "decrease in the expression" refers to a drop in the expression of a detectable marker under one set of conditions relative to the expression under another set of reference conditions. The expression of a detectable marker is decreased if it is at least 10% lower than the level under reference conditions, and preferably 20%, 40%, 50%, 75%, 90%, 95% or even as much as 100% lower (i.e., not expressed).

Identification of the *S. aureus* STAAU_R4 sequence

The methodology used to identify the STAAU_R4 polypeptide is described in detail in U.S. Provisional Patent Application 60/110,992, filed December 3, 1998, and PCT International Application WO1999/IB99/02040, filed December 3, 1999. Briefly, this PCT application concerns bacteriophages that can infect a selected bacterium. The sequencing and characterization of the phage genetic information allow the identification of all open reading frames (ORFs) encoded by the phage, including those that are essential or instrumental in inhibiting their host. Each ORF is identified using computer softwares and individually expressed in the host. The effect of this expression on host viability is then measured. Identification of ORFs from the phage genome which inhibit the host bacterium both provides a compound that could be used as a bacterial inhibitor compound *per se* (or derivatized or modified to obtain further inhibitors) and as a tool for the identification of the bacterial target affected by the phage-encoded inhibitor.

Using methodology described in detail in Example 1 and 2, a *S. aureus* polypeptide that specifically bound the bacterial growth inhibitory 3A phage ORF 33 protein was isolated. Briefly, the 3A ORF 33 protein was used as a ligand in an affinity chromatography binding step with *S. aureus* protein extract. The selected *S. aureus* interacting polypeptide was purified and further analyzed by tryptic digestion and mass spectrometry using MALDI-ToF technology [Qin, J., *et al.* (1997) *Anal. Chem.* 69:3995-4001]. Computational analysis

(http://prowl.rockfeller.edu/cgi-bin/ProFound) of the mass spectrum obtained identifies the corresponding ORF in the *S. aureus* nucleotide sequence in the University of Oklahoma *S. aureus* genomic database at http://www.genome.ou.edu/staph.html. The interaction between 3A ORF 33 and the candidate target protein, herein referred as STAAU_R4, was also confirmed in affinity blotting assays. Comparison of the ORF of the *S. aureus* contig that encodes a tryptic peptide similar to that identified in the *S. aureus* phage 3A ORF 33 binding studies with all other sequences in the public domain databases revealed that STAAU_R4 is related to PlsX, a protein implicated in fatty acid/phospholipid synthesis (Fig. 8). As shown in Fig. 9A, the degree of relatedness of the identified *B. subtilis* ORF to the STAAU_R4 protein is 53% identity and 71% similarity at the amino acid level across the entire sequence.

Function of PlsX (STAAU_R4)

Fatty acid biosynthesis is essential to the viability of all cells because it yields a wide variety of lipid molecules some of which are key structural components of membranes and others which have important roles in signalling and in energy storage. The importance of phospholipids, for example, is underscored by the lack of genetic defects in the metabolism of these lipids in humans. In bacteria, lipid metabolism is similarly of critical importance to the cell. In *E. coli*, eight enzyme-catalyzed reactions convert acetyl-coenzyme A into fatty acids. Three subsequent reactions append acyl chains onto glycerol-3-phosphate to yield CDP diacylglycerol, a key branchpoint molecule for the biosynthesis of important cellular phospholipids including phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, and cardiolipin.

The initial reaction of phospholipid biosynthesis in *E. coli* is catalyzed by the product of the *plsB* gene, glycerol-3-phosphate acyltransferase. This enzyme preferentially utilizes saturated fatty acyl derivatives (palmitoyl-coenzymeA or palmitoyl-acyl carrier protein) for the initial acylation of glycerol-3-phosphate. Interestingly, the glycerol-3-phosphate auxotrophic mutant of *E. coli* that was originally described by Bell [Bell, R.M. (1974) J. Bacteriol. 117: 1065-

1076] was found to contain mutations at two loci; both mutations were necessary to observe the dependence of the strain on glycerol-3-phosphate for growth [Larson, T.J., Ludtke, D.N., and Bell, R.M. (1984) J. Bacteriol. 160: 711-717]. Independent transposon insertions from wild-type cells, mediated by phage P1 cotransduction, were sought which could correct the auxotrophy of the mutant strain. As expected, a portion of the transposon insertions were cotransducible with markers in the *plsB* region. However, the remainder mapped to a locus termed *plsX* in a distinct region of the chromosome. Indeed, both *plsB26* and *plsX50* mutations are necessary and sufficient for conferral of glycerol-3-phosphate auxotrophy.

Wild-type PlsX may function either to elevate the intracellular levels of glycerol-3-phosphate or to increase the affinity of the defective glycerol-3-phosphate acyltransferase, encoded by *plsB26*, for its substrate, allowing the mutant PlsB to function [Larson, T.J., Ludtke, D.N., and Bell, R.M. (1984) J. Bacteriol. 160: 711-717]. PlsX apparently does not influence glycerol-3-phosphate acyltransferase activity *in vitro* since the V_{max} and the apparent K_m defects resulting from the *plsB26* mutation were independent of the presence of wild type PlsX. However, restoration of a wild-type copy of PlsX to a strain of *E. coli* bearing the *plsB26 plsX50* mutations and a temperature-sensitive mutation in PlsC, encoding the 1-acyl glycerol-3-phosphate acyltransferase, was not sufficient to restore lysophosphatidic acid synthesis *in vivo* at the nonpermissive temperature [Heath, R.J., Goldfine, H., and Rock, C.O. (1997) J. Bacteriol. 179: 7257-7263]. Thus, PlsX cannot restore glycerol-3-phosphate activity *in vivo*.

Functional homologues to *E. coli plsX* exist in several bacterial species, including *Salmonella typhimurium* [Zhang, Y., and Cronan Jr., J.E. (1998) J. Bacteriol. 180: 3295-3303] and the Gram-positive bacteria *Clostridium butyricum* [Heath, R.J., Goldfine, H., and Rock, C.O. (1997) J. Bacteriol. 179: 7257-7263] and *Bacillus subtilis* [Morbidoni, H., de Mendoza, D., and Cronan, Jr., J.E. (1996) J. Bacteriol. 178: 4794-4800]. To date, no homologue of the *S. aureus* PlsX has been described or isolated. In Gram-positive bacteria, while the function

of PlsX remains to be determined, *plsX* is likely to be an essential gene based on indications that repeated attempts to disrupt the gene were unsuccessful [Morbidoni, H., de Mendoza, D., and Cronan, Jr., J.E. (1996) J. Bacteriol. 178: 4794-4800].

The demonstration that bacteriophage have adapted to inhibiting a host bacterium by acting on a particular cellular component or target provides a strong indication that that component is an appropriate target for developing and using antibacterial agents, e.g. in therapeutic treatments. The present invention provides additional guidance over mere identification of bacterial essential genes, as the present invention also provides an indication of accessibility of the target to an inhibitor, and an indication that the target is sufficiently stable over time (e.g., not subject to high rates of mutation) as phage acting on that target were able to develop and persist. Thus the present invention identifies STAAU_R4 as particularly likely to bean appropriate target for development of antibacterial agents.

Identification of the surface of interaction on STAAU_R4

This invention relates, in part, to a specific interaction between a growth-inhibitory protein encoded by the *S. aureus* bacteriophage genome and an essential *S. aureus* protein. In one embodiment, this interaction forms the basis for drug screening assays. More specifically, the invention relates to the interacting domains of the protein encoded by the *S. aureus* STAAU_R4 and the *S. aureus* bacteriophage 3A ORF 33 proteins, forming the basis for screening assays. The invention provides a method for the identification of 3A ORF 33 and, more preferably, STAAU_R4 polypeptide fragments which are involved in the interaction between STAAU_R4 and 3A ORF 33.

Several approaches and techniques known to those skilled in the art can be used to identify and to characterize interacting fragments of STAAU_R4 and 3A ORF 33. These fragments may include, for example, truncation polypeptides having a portion of an amino acid sequence of any of the

two proteins, or variants thereof, such as a continuous series of residues that includes an amino- and/or carboxyl-terminal amino acid sequence.

Fragments of STAAU_R4 and 3A ORF 33 can be cloned by genetic recombinant technology and tested for interaction using a yeast two-hybrid assay as exemplified below.

Partial proteolysis of proteins in solution is one method to delineate the domain boundaries in multi-domain proteins. By subjecting proteins to limited digestion, the most accessible cleavage sites are preferentially hydrolyzed. These cleavage sites preferentially reside in less structured regions which include loops and highly mobile areas typical of the joining amino acids between highly structures domains. Purified STAAU_R4 and 3A ORF 33 proteins can be subjected to partial proteolysis. The proteolysis can be performed with low concentrations of proteases (trypsin, chymotrypsin, endoproteinase Glu-C, and Asp-N) with STAAU_R4 or 3A ORF 33 in solution, resulting in the generation of defined proteolytic products as observed by SDS-PAGE. An acceptable concentration and reaction time is defined by the near complete conversion of the full-length protein to stable proteolytic products. The proteolytic products are then subjected to affinity chromatography containing the appropriated partner of interaction (3A ORF 33 or STAAU_R4 purified proteins) to determine a protein sub-region able to interact. Interacting domains are identified by mass spectrometry to determine both the intact fragment mass and the completely digested with trypsin (by in-gel digestion) to better determine the amino acid residues contained within the partial proteolytic fragment. Using both sets of data, the amino acid sequence of the partial proteolytic fragment can be precisely determined.

Another approach is based on peptide screening using different portions of 3A ORF 33 or STAAU_R4 to identify minimal peptides from each polypeptide that are able to disrupt the interaction between the two proteins. It is assumed that fragments able to prevent interaction between STAAU_R4 and 3A ORF 33 correspond to domains of interaction located on either of the two

interacting proteins. The different peptide fragments can be screened as competitors of interaction in protein: protein binding assays such as the ones described below. Fine mapping of interaction site(s) within a protein can be performed by an extensive screen of small overlapping fragments or peptides spanning the entire amino acid sequence of the protein.

Suitable STAAU_R4 and 3A ORF 33 -derived amino acid fragments representative of the complete sequence of both proteins can be chemical synthesis. For instance, in the multipin approach, peptides are simultaneously synthesis by the assembly of small quantities of peptides (ca. 50 nmol) on plastic pins derivatized with an ester linker based on glycolate and 4-(hydroxymethyl) benzoate [Maeji 1991 Pept Res, 4:142-6].

S. aureus STAAU_R4 polypeptides

In one aspect of the invention there are provided polypeptides of *S. aureus* referred to herein as "STAAU_R4" and "STAAU_R4 polypeptides" as well as biologically, diagnostically, prophylactically, clinically or therapeutically useful variants thereof, and compositions comprising the same.

Among the particularly preferred embodiments of the invention are variants of *S. aureus* STAAU_R4 polypeptides encoded by naturally occurring alleles of the STAAU_R4 gene. The present invention provides for an isolated polypeptide which comprises or consists of: (a) an amino acid sequence which has at least 50% identity, preferably at least 55% identity, preferably at least 60% identity, preferably at least 70% identity, preferably at least 80% identity, more preferably at least 90%, yet more preferably at least 95%, most preferably at least 97-99%, or exact identity, over the entire length of SEQ ID NO: 2; or b) an amino acid sequence that has at least 70% similarity, at least 75% similarity, at least 80% similarity, at least 90% similarity, at least 95% similarity, at least 97-99% similarity or even 100% similarity over the entire length of SEQ ID NO: 2.

The polypeptides of the invention include a polypeptide of Fig. 1 (SEQ ID NO: 2) (in particular the mature polypeptide) as well as polypeptides and fragments, particularly those which have a biological activity of STAAU_R4,

and also those which have at least 50% identity over 50 or more amino acids to a polypeptide of SEQ ID NO: 2 or the relevant portion, preferably at least 55%, 60%, 70%, or 80% identity over 50 or more amino acids to a polypeptide of SEQ ID NO: 2, more preferably at least 90% identity over 50 or more amino acids to a polypeptide of SEQ ID NO: 2 and still more preferably at least 95% identity over 50 or more amino acids to a polypeptide of SEQ ID NO: 2 and yet still more preferably at least 99% identity or exact identity over 50 or more amino acids to a polypeptide of SEQ ID NO: 2.

The polypeptides of the invention also include a polypeptide or protein fragment that has at least 70%, 75%, 80% or 90% similarity, 95% similarity or even 97-99% similarity over 50 or more amino acids to a polypeptide of SEQ ID NO: 2.

It is most preferred that a polypeptide of the invention is derived from *S. aureus*, however, it may be obtained from other organisms of the same taxonomic genus. A polypeptide of the invention may also be obtained, for example, from organisms of the same taxonomic family or order.

Fragments of STAAU_R4 also are included in the invention. These fragments may include, for example, truncation polypeptides having a portion of an amino acid sequence of Fig. 1 (SEQ ID NO: 2), a fragment or a variant thereof, such as a continuous series of residues that includes an amino- and/or carboxyl-terminal amino acid sequence. Degradation forms of the polypeptides of the invention produced by or in a host cell, particularly *S. aureus*, are also preferred. Further preferred are fragments characterized by structural or functional attributes such as fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix-forming regions, beta-sheet and beta-sheet-forming regions, turn and turn-forming regions, coil and coil-forming regions, hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphipathic regions, beta amphipathic regions, flexible regions, surface-forming regions, substrate binding region, and high antigenic index regions. Fragments of STAAU_R4 may be expressed as fusion proteins with other proteins or protein fragments.

Preferred fragments also include an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 10, 15, 20, 30, 39, 50, 100, 200, 250, 300 or or more contiguous amino acids from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

Also preferred are biologically "active" fragments which are those fragments that mediate activities of *S. aureus* STAAU_R4, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Also included are those fragments that are antigenic or immunogenic in an animal, especially in a human. Particularly preferred are fragments comprising domains that confer a function essential for viability of *S. aureus*.

Fragments of the polypeptides of the invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, these variants may be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides of the invention.

S. aureus Polynucleotides

It is an object of the invention to provide polynucleotides that encode STAAU_R4 polypeptides, particularly polynucleotides that encode the polypeptide herein designated *S. aureus* STAAU_R4.

In one aspect of the invention, a polynucleotide is provided that comprises a region encoding a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide, the polynucleotide comprising a sequence set out in SEQ ID NO: 1. Such a polynucleotide encodes a full length STAAU_R4 gene, a fragment or a variant thereof. It is contemplated that this full-length gene is essential to the growth and/or survival of an organism which possesses it, such as *S. aureus*.

As a further aspect of the invention there are provided isolated nucleic acid molecules encoding and/or expressing a fragment of a full-length STAAU_R4 polypeptide, particularly a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide, a fragment or a variant thereof. Further embodiments of the invention include biologically, diagnostically, prophylactically, clinically or therapeutically useful

polynucleotides, polypeptides, variants thereof, and compositions comprising same.

A polynucleotide of the invention is obtained using *S. aureus* cells as starting material, the nucleotide sequence information disclosed in SEQ ID NO:1, and standard cloning and screening methods, such as those for cloning and sequencing chromosomal DNA fragments from bacteria. For example, to obtain a polynucleotide sequence of the invention, such as the polynucleotide sequence disclosed as in SEQ ID NO: 1, a library of clones of chromosomal DNA of *S. aureus* in *E. coli* or another suitable host is probed with a radiolabeled oligonucleotide, preferably a 17-mer or longer, derived from a partial sequence. Clones carrying DNA identical to that of the probe can be distinguished using stringent hybridization conditions. As herein used, the terms "stringent conditions" and "stringent hybridization conditions" mean hybridization occurring only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences. A specific example of stringent hybridization conditions is of an overnight incubation of a hybridization support (e.g., a nylon or nitrocellulose membrane) at 42°C in a solution comprising: 1 X 10^6 cpm/ml labeled probe, 50% formamide, 5x SSC (150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 micrograms/ml of denatured, sheared salmon sperm DNA, followed by washing the hybridization support in 0.1x SSC at 65°C. Hybridization and wash conditions are well known to those skilled in the art and are exemplified in Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularly Chapter 11 therein. Solution hybridization may also be used with the polynucleotide sequences provided by the invention. By sequencing the individual clones thus identified by hybridization, it is possible to confirm the identity of the clone.

Alternatively, an amplification process can be utilized to isolate the polynucleotide. In this approach, the sequence disclosed as SEQ ID NO:1 is targeted by two oligonucleotides, one identical to a sequence on the coding DNA

strand at or upstream of the ATG initiation codon and the other which anneals to the opposite strand at or downstream of the stop codon. Priming from these oligonucleotides in a polymerase chain reaction yields a full-length gene coding sequence. Such suitable techniques are described by Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

In a further aspect, the present invention provides for an isolated polynucleotide comprising or consisting of: (a) a polynucleotide sequence which has at least 60% identity, preferably at least 70% identity, more preferably at least 80% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95%, most preferably at least 97-99% or exact identity, to that of SEQ ID NO: 1; (b) a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 50% identity, preferably at least 55% identity, preferably at least 60% identity, more preferably at least 70% identity, more preferably at least 80% identity, more preferably at least 90%, yet more preferably at least 95%, most preferably at least 97-99% or exact identity to SEQ ID NO: 2 over the entire length of SEQ ID NO: 2; or the complement of a sequence of (a) or (b) above.

The invention provides a polynucleotide sequence identical over its entire length to the coding sequence of SEQ ID NO:1. Also provided by the invention is a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment thereof by itself as well as a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment in reading frame with another coding sequence, such as a sequence encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro-, or prepro-protein sequence. The polynucleotide of the invention may also contain at least one non-coding sequence, including for example, but not limited to at least one non-coding 5' and 3' sequence, such as the transcribed but non-translated sequences, termination signals (such as rho-dependent and rho-independent termination signals), ribosome binding sites, Kozak sequences, sequences that stabilize or destabilize mRNAs, introns, and polyadenylation signals. The polynucleotide sequence may also comprise additional coding sequence encoding additional amino acids. For

example, a marker sequence that facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain embodiments of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 821-824 (1989), or an HA peptide tag [Wilson *et al.*, Cell 37: 767 (1984)], both of which may be useful in purifying polypeptide sequences fused to them. Polynucleotides of the invention also include, but are not limited to, polynucleotides comprising a structural gene and its naturally associated sequences that control gene expression.

While it is most preferred that a polynucleotide of the invention be derived from *S. aureus*, it may also be obtained from other organisms of the same taxonomic genus. A polynucleotide of the invention may also be obtained, for example, from organisms of the same taxonomic family or order.

Further preferred embodiments are polynucleotides encoding *S. aureus* STAAU_R4 variants that have the amino acid sequence of *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide of SEQ ID NO: 2 in which several, a few, 10 to 50, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, modified, deleted and/or added, in any combination. Especially preferred among these polynucleotides are those encoding silent nucleotide alterations that do not alter the coding sequence or activities of *S. aureus* STAAU_R4 polypeptides they encode.

Preferred embodiments are polynucleotides encoding polypeptides that retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by a DNA of SEQ ID NO: 1.

In accordance with certain preferred embodiments of this invention there are provided polynucleotides that hybridize, particularly under stringent conditions, to *S. aureus* STAAU_R4 polynucleotide sequences, such as those polynucleotides in Fig. 1.

The polynucleotides of the invention are useful as hybridization probes for RNA, cDNA and genomic DNA to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding genes that have a high degree of sequence

identity to the STAAU_R4 gene. Such probes generally will comprise at least 15 to about 100 residues or base pairs, although such probes will preferably have about 20 to 50 nucleotide residues or base pairs. Particularly preferred probes are about 20 to about 30 nucleotide residues or base pairs in length.

A coding region of a related STAAU_R4 gene from a bacterial species other than *S. aureus* may be isolated by screening a library using a DNA sequence provided in SEQ ID NO: 1 to synthesize an oligonucleotide probe. A labeled oligonucleotide having a sequence complementary to that of a gene of the invention is then used to screen a library of cDNA, genomic DNA or mRNA to determine to which member(s) of the library the probe hybridizes.

There are several methods available and well known to those skilled in the art to obtain full-length DNAs, or extend short DNAs, for example those based on the method of Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) [see, for example, Frohman, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8998-9002, 1988]. Recent modifications of the technique, exemplified by the MARATHON™ technology (Clontech Laboratories Inc.) for example, have significantly simplified the search for longer cDNAs. In the MARATHON technology, cDNAs are prepared from mRNA extracted from a chosen cell and an 'adaptor' sequence is ligated onto each end. Nucleic acid amplification by PCR is then carried out to amplify the "missing" 5' end of the DNA using a combination of gene specific and adaptor specific oligonucleotide primers. The PCR reaction is then repeated using "nested" primers, that is, primers designed to anneal within the amplified product (typically an adaptor-specific primer that anneals further 3' in the adaptor sequence and a gene-specific primer that anneals further 5' in the selected gene sequence). The products of this reaction can then be analyzed by DNA sequencing and a full-length DNA constructed either by joining the product directly to the existing DNA to give a complete sequence, or by carrying out a separate full-length PCR using the new sequence information for the design of the 5' primer.

The polynucleotides and polypeptides of the invention may be employed, for example, as research reagents and materials for discovery of treatments of and diagnostics for diseases, particularly human diseases, as further discussed herein relating to polynucleotide assays.

The polynucleotides of the invention that are oligonucleotides derived from a sequence of SEQ ID NO:1 are useful for the design of PCR primers in reactions to determine whether or not the polynucleotides identified herein in whole or in part are transcribed in bacteria in infected tissue. That is, the polynucleotides of the invention are useful for diagnosis of infection with a bacterial strain carrying those sequences. It is recognized that such sequences also have utility in diagnosis of the stage of infection and type of infection the pathogen has attained.

The invention also provides polynucleotides that encode a polypeptide that is the mature protein plus additional amino or carboxyl-terminal amino acids, or amino acids interior to the mature polypeptide. Such sequences may play a role in processing of a protein from precursor to a mature form, may allow protein transport, may lengthen or shorten protein half-life or may facilitate manipulation of a protein for assay or production, among other things. As generally is the case *in vivo*, the additional amino acids may be processed away from the mature protein by cellular enzymes.

A precursor protein, having a mature form of the polypeptide fused to one or more prosequences may be an inactive form of the polypeptide. When prosequences are removed such inactive precursors generally are activated. Some or all of the prosequences may be removed before activation. Generally, such precursors are called proproteins.

A polynucleotide of the invention thus may encode a mature protein, a mature protein plus a leader sequence (which may be referred to as a preprotein), a precursor of a mature protein having one or more prosequences that are not the leader sequences of a preprotein, or a preproprotein, which is a precursor to a proprotein, having a leader sequence and one or more

prosequences, which generally are removed during processing steps that produce active and mature forms of the polypeptide.

In addition to the standard A, G, C, T/U representations for nucleotides, the term "N" may also be used in describing certain polynucleotides of the invention. "N" means that any of the four DNA or RNA nucleotides may appear at such a designated position in the DNA or RNA sequence, except it is preferred that N is not a nucleotide that when taken in combination with adjacent nucleotide positions, read in the correct reading frame, would have the effect of generating a premature termination codon in such reading frame.

For each and every polynucleotide of the invention there is also provided a polynucleotide complementary to it.

Vectors, Host Cells, and Expression Systems

The invention also relates to vectors that comprise a polynucleotide or polynucleotides of the invention, host cells that are genetically engineered with vectors of the invention and the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the invention

Recombinant STAAU_R4 and bacteriophage polypeptides of the present invention may be prepared by processes well known to those skilled in the art from genetically engineered host cells comprising expression systems. Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to expression systems that comprise a STAAU_R4 or bacteriophage polynucleotide or polynucleotides of the present invention, to host cells which are genetically engineered with such expression systems, and to the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques.

For recombinant production of a STAAU_R4 polypeptide of the invention, host cells can be genetically engineered to incorporate expression systems or portions thereof or polynucleotides of the invention. Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells (Gram positive and Gram

negative), fungal cells, insect cells, animal cells and plant cells. Polynucleotides are introduced to bacteria by standard chemical treatment protocols, such as the induction of competence to take up DNA by treatment with calcium chloride (Sambrook et al., supra). Introduction of polynucleotides into fungal (e.g., yeast) host cells is effected, if desired, by standard chemical methods, such as lithium acetate-mediated transformation.

A great variety of expression systems are useful to produce polypeptides of the invention. Such vectors include among others, chromosomal-, episomal- and virus-derived vectors. For example, vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophages, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses, and from vectors derived from combinations thereof, are useful in the invention.

Polypeptides of the invention are recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid or urea extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography, and lectin chromatography. Well known techniques for refolding may be employed to regenerate an active conformation when the polypeptide is denatured during isolation and/or purification.

Diagnostic, Prognostic, Serotyping, and Mutation Assays

This invention is also related to the use of STAAU_R4 polynucleotides and polypeptides of the invention for use as diagnostic reagents. Detection of *S. aureus* STAAU_R4 polynucleotides and/or polypeptides in a eukaryote, particularly a mammal, and especially a human, will provide a diagnostic method for diagnosis of disease, staging of disease or response of an infectious organism to drugs. Eukaryotes, particularly mammals, and especially humans, particularly those infected or suspected to be infected with an organism comprising the *S. aureus* STAAU_R4 gene or protein, may be detected at the

nucleic acid or amino acid level by a variety of well known techniques as well as by methods provided herein.

Polypeptides and polynucleotides for prognosis, diagnosis or other analysis may be obtained from a putatively infected and/or infected individual's bodily materials. Polynucleotides from any of these sources, particularly DNA or RNA, may be used directly for detection or may be amplified enzymatically by using PCR or any other amplification technique prior to analysis. RNA, particularly mRNA, cDNA and genomic DNA may also be used in the same ways. Using amplification, characterization of the species and strain of infectious or resident organism present in an individual, may be made by an analysis of the genotype of a selected polynucleotide of the organism. Deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to a genotype of a reference sequence selected from a related organism, preferably a different species of the same genus or a different strain of the same species.

Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to labeled STAAU_R4 polynucleotide sequences. Perfectly or significantly matched sequences can be distinguished from imperfectly or more significantly mismatched duplexes by DNase or RNase digestion, for DNA or RNA respectively, or by detecting differences in melting temperatures or renaturation kinetics. Polynucleotide sequence differences may also be detected by alterations in the electrophoretic mobility of polynucleotide fragments in gels as compared to a reference sequence. This may be carried out with or without denaturing agents. Polynucleotide differences may also be detected by direct DNA or RNA sequencing. See, for example, Myers *et al*, (1985) Science 230, 1242. Sequence changes at specific locations also may be revealed by nuclease protection assays, such as RNase, V1 and S1 protection assay or a chemical cleavage method. See, for example, Cotton *et al.*, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85, 4397-4401.

In another embodiment, an array of oligonucleotide probes comprising STAAU_R4 nucleotide sequence or fragments thereof can be

constructed to conduct efficient screening of, for example, genetic mutations, serotype, taxonomic classification or identification. Array technology methods are well known and have general applicability and can be used to address a variety of questions in molecular genetics including gene expression, genetic linkage, and genetic variability [see, for example, Chee et al., (1996) Science 274, 610].

Thus in another aspect, the present invention relates to a diagnostic kit which comprises: (a) a polynucleotide of the present invention, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, or a fragment thereof; (b) a nucleotide sequence complementary to that of (a); (c) a polypeptide of the present invention, preferably the polypeptide of SEQ ID NO: 2 or a fragment thereof; or (d) an antibody to a polypeptide of the present invention, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO: 2 or fragment thereof.

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component. Such a kit will be of use in diagnosing a disease or susceptibility to a disease, among others.

This invention also relates to the use of STAAU_R4 polynucleotides of the present invention as diagnostic reagents. Detection of a mutated form of a polynucleotide of the invention, preferably, SEQ ID NO: 1, which is associated with a disease or pathogenicity will provide a diagnostic tool that can add to, or define, a diagnosis of a disease, a prognosis of a course of disease, a determination of a stage of disease, or a susceptibility to a disease, which results from under-expression, over-expression or altered expression of the polynucleotide. Organisms, particularly infectious organisms, carrying mutations in such polynucleotide may be detected at the polynucleotide level by a variety of techniques, such as those described elsewhere herein.

The STAAU_R4 nucleotide sequences of the present invention are also valuable for organism chromosome identification. The sequence is specifically targeted to, and can hybridize with, a particular location on an organism's chromosome, particularly to a *S. aureus* chromosome. The mapping of relevant sequences to chromosomes according to the present

invention may be an important step in correlating those sequences with pathogenic potential and/or an ecological niche of an organism and/or drug resistance of an organism, as well as the essentiality of the gene to the organism. Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data. Such data may be found on-line in a sequence database. The relationship between genes and diseases that have been mapped to the same chromosomal region are then identified through known genetic methods, for example, through linkage analysis (coinheritance of physically adjacent genes) or mating studies, such as by conjugation.

The differences in a polynucleotide and/or polypeptide sequence between organisms possessing a first phenotype and organisms possessing a different, second different phenotype can also be determined. If a mutation is observed in some or all organisms possessing the first phenotype but not in any organisms possessing the second phenotype, then the mutation is likely to be the causative agent of the first phenotype.

Polypeptides and polynucleotides for prognosis, diagnosis or other analysis may be obtained from a putatively infected and/or infected individual's bodily materials. Particularly DNA or polynucleotides, from any of these sources may be used directly for detection or may be amplified enzymatically using PCR or other amplification technique with oligonucleotide amplification primers derived from the polynucleotide sequence of *S. aureus* STAAU_R4. RNA, particularly mRNA, or RNA reverse transcribed to cDNA, is also useful for diagnostics. Following amplification of a *S. aureus* STAAU_R4-related polynucleotide from a sample, characterization of the species and strain of infecting or resident organism is made by an analysis of the amplified polynucleotide relative to one or more reference polynucleotides or sequences relative to a standard from a related organism (i.e. a known strain of *S. aureus*).

The invention further provides a process for diagnosing bacterial infections such as those caused by *S. aureus*, the process comprising

determining from a sample derived from an individual, such as a bodily material, an increased level of expression of a polynucleotide having a sequence disclosed in SEQ ID NO: 1 relative to a sample taken from a non-diseased individual. Increased or decreased expression of a STAAU_R4 polynucleotide can be measured using any one of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting and other hybridization methods, and spectrometry.

In addition, a diagnostic assay in accordance with the invention for detecting over-expression of STAAU_R4 polypeptide compared to normal control tissue samples may be used to detect the presence of an infection, for example. Assay techniques that can be used to determine levels of a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide, in a sample derived from a host, such as a bodily material, are well-known to those of skill in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis, antibody sandwich assays, antibody detection and ELISA assays.

Gridding and Polynucleotide Subtraction of *S. aureus* Genomic Sequences

The STAAU_R4 polynucleotides of the invention may be used as components of polynucleotide arrays, preferably high density arrays or grids. These high density arrays are particularly useful for diagnostic and prognostic purposes. For example, a set of spots each comprising a different gene, and further comprising a polynucleotide or polynucleotides of the invention, may be used for probing, such as hybridization or nucleic acid amplification, using a probe obtained or derived from a bodily sample, to determine the presence a particular polynucleotide sequence or related sequence in an individual.

Antibodies Specific for *S. aureus* Peptides or Polypeptides

The STAAU_R4 polypeptides and polynucleotides of the invention or variants thereof, or cells expressing them are useful as immunogens to produce antibodies immunospecific for such polypeptides or polynucleotides, respectively.

In certain preferred embodiments of the invention there are provided antibodies against *S. aureus* STAAU_R4 polypeptides or polynucleotides encoding them. Antibodies against STAAU_R4-polypeptide or STAAU_R4-polynucleotide are useful for treatment of infections, particularly bacterial infections.

Antibodies generated against the polypeptides or polynucleotides of the invention are obtained by administering the polypeptides and/or polynucleotides of the invention or epitope-bearing fragments of either or both, analogues of either or both, or cells expressing either or both, to an animal, preferably a nonhuman, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique known in the art that provides antibodies produced by continuous cell line cultures is useful. Examples include various techniques, such as those in Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor *et al.*, Immunology Today 4: 72 (1983); and Cole *et al.*, pg. 96-96 in Monoclonal Anbitodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Techniques for the production of single chain antibodies (US Patent No: 4,946,968) can be adapted to produce single chain antibodies to polypeptides or polynucleotides of this invention. Also, transgenic mice, or other mammals, are useful to express humanized antibodies immunospecific to the polypeptides or polynucleotides of the invention.

When antibodies are administered therapeutically, the antibody or variant thereof is preferably modified to make it less immunogenic in the individual. For example, if the individual is human the antibody is most preferably "humanized," where the complementarity determining region or regions of the hybridoma-derived antibody has been transplanted into a human monoclonal antibody, for example as described in Jones *et al.* (1986), Nature 321, 522-525 or Tempest *et al.*, (1991) Biotechnology 9, 266-273.

Alternatively, phage display technology is useful to select antibody genes with binding activities towards a STAAU_R4 polypeptide of the invention. In one possible scheme, antibody fragments specific for *S. aureus*

STAAU_R4 are selected from an immune library of antibody genes expressed as fusions with coat protein of filamentous phage. Alternatively, naive libraries are screened by phage display techniques to identify genes encoding antibodies specified for STAAU_R4 or from naive libraries [McCafferty, *et al.*, (1990), Nature 348, 552-554; Marks, *et al.*, (1992) Biotechnology 10, 969-783; a recent reference is de Haard *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274: 18218-18230]. The ability to recover, for various targets, antibodies with subnanomolar affinities obviates the need for immunization. The affinity of these antibodies can also be improved by, for example, chain shuffling [Clackson *et al.*, (1991) Nature 352: 628].

The above-described antibodies may be employed to isolate or to identify clones expressing the polypeptides or polynucleotides of the invention, for example to purify the polypeptides or polynucleotides by immunoaffinity chromatography.

A variant polypeptide or polynucleotide of the invention, such as an antigenically or immunologically equivalent derivative or a fusion protein of the polypeptide is also useful as an antigen to immunize a mouse or other animal such as a rat or chicken. A fused protein provides stability to the polypeptide acting as a carrier, or acts as an adjuvant or both. Alternatively, the antigen is associated, for example by conjugation, with an immunogenic carrier protein, such as bovine serum albumin, keyhole limpet haemocyanin or tetanus toxoid. Alternatively, when antibodies are to be administered therapeutically, alternatively a multiple antigenic polypeptide comprising multiple copies of the polypeptide, or an antigenically or immunologically equivalent polypeptide thereof may be sufficiently antigenic to improve immunogenicity so as to obviate the use of a carrier.

In accordance with an aspect of the invention, there is provided the use of a STAAU_R4 polynucleotide of the invention for therapeutic or prophylactic purposes, in particular genetic immunization. The use of a STAAU_R4 polynucleotide of the invention in genetic immunization preferably employs a suitable delivery method such as direct injection of plasmid DNA into

muscles [Wolff *et al.*, Hum Mol Genet (1992) 1: 363, Manthorpe *et al.*, Hum. Gene Ther. (1983) 4: 419], delivery of DNA complexed with specific protein carriers [Wu *et al.*, JBiol Chem. (1989) 264: 16985], coprecipitation of DNA with calcium phosphate [Benvenisty and Reshef, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1986) 83: 9551], encapsulation of DNA in various forms of liposomes [Kaneda *et al.*, Science (1989) 243: 375], particle bombardment [Tang *et al.*, Nature (1992) 356:152, Eisenbraun *et al.*, DNA Cell Biol (1993) 12: 791] or *in vivo* infection using cloned retroviral vectors [Seeger *et al.*, Proc. Natl, Acad. Sci. USA (1984) 81: 5849].

Antagonists and Agonists: Assays and Molecules

The invention is based in part on the discovery that STAAU_R4 is a target for the bacteriophage 3A ORF 33 inhibitory factor. Applicants have recognized the utility of the interaction in the development of antibacterial agents. Specifically, the inventors have recognized that 1) STAAU_R4 is a critical target for bacterial inhibition; 2) 3A ORF 33 or derivatives or functional mimetics thereof are useful for inhibiting bacterial growth; and 3) the interaction between STAAU_R4 or fragment thereof of *S. aureus* and 3A ORF 33 may be used as a target for the screening and rational design of drugs or antibacterial agents. In addition to methods of directly inhibiting STAAU_R4 activity, methods of inhibiting STAAU_R4 expression are also attractive for antibacterial activity.

In several embodiments of the invention, there are provided methods for identifying compounds which bind to or otherwise interact with and inhibit or activate an activity or expression of a polypeptide and/or polynucleotide of the invention comprising: contacting a polypeptide and/or polynucleotide of the invention with a compound to be screened under conditions to permit binding to or other interaction between the compound and the polypeptide and/or polynucleotide to assess the binding to or other interaction with the compound, such binding or interaction preferably being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the binding or interaction of the polypeptide and/or polynucleotide with the compound; and determining

whether the compound binds to or otherwise interacts with and activates or inhibits an activity or expression of the polypeptide and/or polynucleotide by detecting the presence or absence of a signal generated from the binding or interaction of the compound with the polypeptide and/or polynucleotide.

Potential antagonists include, among others, small organic molecules, peptides, polypeptides and antibodies that bind to a polynucleotide and/or polypeptide of the invention and thereby inhibit or extinguish its activity or expression. Potential antagonists also may be small organic molecules, a peptide, a polypeptide such as a closely related protein or antibody that binds the same sites on a binding molecule, such as a binding molecule, without inducing STAAU_R4-induced activities, thereby preventing the action or expression of *S. aureus* STAAU_R4 polypeptides and/or polynucleotides by excluding *S. aureus* STAAU_R4 polypeptides and/or polynucleotides from binding.

Potential antagonists also include a small molecule that binds to and occupies the binding site of the polypeptide thereby preventing binding to cellular binding molecules, such that normal biological activity is prevented. Examples of small molecules include but are not limited to small organic molecules, peptides or peptide-like molecules. Other potential antagonists include antisense molecules [see Okano, (1991) J. Neurochem. 56, 560; see also Oligodeoxynucleotides As Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), for a description of these molecules]. Preferred potential antagonists include compounds related to and variants of 3A ORF 33 and of STAAU_R4. Other examples of potential polypeptide antagonists include antibodies or, in some cases, oligonucleotides or proteins which are closely related to the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide, e.g., a fragment of the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc.; or small molecules which bind to the polypeptide of the present invention but do not elicit a response, so that the activity of the polypeptide is prevented.

Compounds may be identified from a variety of sources, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, and natural product mixtures. These substrates and ligands may be natural substrates and ligands or may be structural or functional mimetics. See, e.g., Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5 (1991). Peptide modulators can also be selected by screening large random libraries of all possible peptides of a certain length.

Compounds derived from the polypeptide sequence of 3A ORF 33 could represent fragments representing small overlapping peptides spanning the entire amino acid sequence of these ORFs. Fragments of 3A ORF 33 can be produced as described above.

Certain of the polypeptides of the invention are biomimetics, functional mimetics of the natural *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide. These functional mimetics are useful for, among other things, antagonizing the activity of *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide or as an antigen or immunogen in a manner described above. Functional mimetics of the polypeptides of the invention include but are not limited to truncated polypeptides. Polynucleotides encoding each of these functional mimetics may be used as expression cassettes to express each mimetic polypeptide. It is preferred that these cassettes comprise 5' and 3' restriction sites to allow for a convenient means to ligate the cassettes together when desired. It is further preferred that these cassettes comprise gene expression signals known in the art or described elsewhere herein.

Screening Assays According to the Invention

It is desirable to devise screening methods to identify compounds which stimulate or which inhibit the function of the STAAU_R4 polypeptide or polynucleotide of the invention. Accordingly, the present invention provides for a method of screening compounds to identify those that modulate the function of a polypeptide or polynucleotide of the invention. In general, antagonists may be employed for therapeutic and prophylactic purposes. It is contemplated that an agonist of STAAU_R4 may be useful, for example, to

enhance the growth rate of bacteria in a sample being cultured for diagnostic or other purposes.

It has been determined that STAAU_R4 is a target for bacteriophage 3A ORF 33 product, which acts as an inhibitory factor. Applicants have recognized the utility of the interaction in the development of antibacterial agents. Polypeptide and/or polynucleotide targets such as STAAU_R4 are critical targets for bacterial inhibition. *S. aureus* bacteriophage 3A ORF 33 or derivatives or functional mimetics thereof are useful for inhibiting bacterial growth and the interaction, binding, inhibition and/or activation which occurs between polypeptides, such as for example STAAU_R4 of *S. aureus* and 3A ORF 33 may be used for the screening and rational design of drugs or antibacterial agents. In addition to methods for directly inhibiting a target such as STAAU_R4 activity, methods of inhibiting a target such as STAAU_R4 expression are also attractive for antibacterial activity.

In preferred embodiments, the method involves the interaction of an inhibitory ORF product or fragment thereof with the corresponding bacterial target or fragment thereof that maintains the interaction with the ORF product or fragment. Interference with the interaction between the components can be monitored, and such interference is indicative of compounds that may inhibit, activate, or enhance the activity of the target molecule.

a. Binding Assays

There are a number of methods of examining binding of a candidate compound to a protein target such as STAAU_R4 and a polypeptide comprising amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or fragment thereof. Screening methods that measure the binding of a candidate compound to a STAAU_R4 polypeptide or polynucleotide, or to cells or supports bearing the polypeptide or a fusion protein comprising the polypeptide, by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound, are useful in the invention.

The screening method may involve competition for binding of a labeled competitor such as 3A ORF 33 or a fragment that is competent to bind STAAU_R4 or fragment thereof.

Non-limiting examples of screening assays in accordance with the present invention include the following [Also reviewed in Sittampalam *et al.* 1997 Curr. Opin. Chem. Biol. 3:384-91]:

i.) Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET)

A method of measuring inhibition of binding of two proteins using fluorescence resonance energy transfer [FRET; de Angelis, 1999, Physiological Genomics]. FRET is a quantum mechanical phenomenon that occurs between a fluorescence donor (D) and a fluorescence acceptor (A) in close proximity (usually < 100 A of separation.) if the emission spectrum of D overlaps with the excitation spectrum of A. Variants of the green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* are fused to a polypeptide or protein and serve as D-A pairs in a FRET scheme to measure protein-protein interaction. Cyan (CFP: D) and yellow (YFP: A) fluorescence proteins are linked with STAAU_R4 polypeptide, or a fragment thereof and a 3A ORF 33 polypeptide respectively. Under optimal proximity, interaction between the STAAU_R4 polypeptide and a 3A ORF 33 polypeptide causes a decrease in intensity of CFP fluorescence concomitant with an increase in YFP fluorescence.

The addition of a candidate modulator to the mixture of appropriately labeled STAAU_R4 and 3A ORF 33 polypeptide, will result in an inhibition of energy transfer evidenced by, for example, a decease in YFP fluorescence at a given concentration of 3A ORF 33 relative to a sample without the candidate inhibitor.

An extension of the FRET technology, termed time-resolved FRET (TR-FRET or HTRF [homogeneous time-resolved energy transfer]) lends itself particularly well to identification of protein-protein interactions in the context of high-throughput screening. In brief, TR-FRET constitutes a homogeneous assay method based on the long-lived fluorescence of rare earth cryptates such

as Europium (Eu) and amplification by nonradiative energy transfer to a suitable acceptor such as allophycocyanin (APC). The TR-FRET principle allows double discrimination of the emitted signal through temporal and spectral selectivity. Since the lifetime of fluorescence emission from APC (acceptor) contains a contribution equal to the Eu (donor) lifetime in the presence of nonradiative energy transfer, a long-lived APC acceptor signal can be resolved from its natural prompt fluorescence in the absence of energy transfer. Eu and APC are brought into proximity via a pair of interacting molecules such as polypeptides. To demonstrate interaction between the STAAU_R4 polypeptide, or a fragment thereof, and a 3A ORF 33 polypeptide, the respective polypeptide is labeled by recombinant DNA methodology to contain an N- or C-terminal tag that is recognized by a binding molecule which itself is conjugated to either Eu or APC. A variety of binding molecules may be employed, including an antibody (directed against an epitope) or streptavidin (directed against biotin). Alternatively, one or both of the interacting proteins is conjugated directly to either Eu or APC.

In one of several possible assay formats, STAAU_R4, or a fragment thereof is expressed as a fusion with a polyhistidine tag and is recognized by an anti-polyhistidine Eu antibody conjugate; 3A ORF 33 is expressed as a fusion with GST and is detected by an anti-GST APC antibody conjugate. Under optimal proximity and in the presence of the anti-polyhistidine and anti-GST antibody conjugates, interaction between STAAU_R4, or a fragment thereof, and 3A ORF 33 induces nonradiative, time-resolved energy transfer from Eu to APC, detected optimally at 665 nm.

The addition of a candidate modulator to the mixture of appropriately labeled STAAU_R4 and 3A ORF 33 polypeptide, will result in an inhibition of energy transfer evidenced by, for example, a decease in APC fluorescence at a given concentration of 3A ORF 33 relative to a sample without the candidate inhibitor.

ii.) Fluorescence polarization

Fluorescence polarization measurement is another useful method to quantitate protein-protein binding. The fluorescence polarization value for a fluorescently-tagged molecule depends on the rotational correlation time or tumbling rate. Protein complexes, such as those formed by a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide, or a fragment thereof associating with a fluorescently labeled polypeptide (e.g., 3A ORF 33 or a binding fragment thereof), have higher polarization values than does the fluorescently labeled polypeptide. Inclusion of a candidate inhibitor of the STAAU_R4 interaction results in a decrease in fluorescence polarization relative to a mixture without the candidate inhibitor if the candidate inhibitor disrupts or inhibits the interaction of STAAU_R4 with its polypeptide binding partner. It is preferred that this method be used to characterize small molecules that disrupt the formation of polypeptide or protein complexes.

iii.) Surface plasmon resonance

Another powerful assay to screen for inhibitors of a protein: protein interaction is surface plasmon resonance. Surface plasmon resonance is a quantitative method that measures binding between two (or more) molecules by the change in mass near a sensor surface caused by the binding of one protein or other biomolecule from the aqueous phase (analyte) to a second protein or biomolecule immobilized on the sensor(ligand). This change in mass is measured as resonance units versus time after injection or removal of the second protein or biomolecule (analyte) and is measured using a Biacore Biosensor (Biacore AB) or similar device. STAAU_R4, or a polypeptide comprising a fragment of STAAU_R4 , could be immobilized as a ligand on a sensor chip (for example, research grade CM5 chip; Biacore AB) using a covalent linkage method (e.g. amine coupling in 10 mM sodium acetate [pH 4.5]). A blank surface is prepared by activating and inactivating a sensor chip without protein immobilization. Alternatively, a ligand surface can be prepared by noncovalent capture of ligand on the surface of the sensor chip by means of a peptide affinity

tag, an antibody, or biotinylation. The binding of 3A ORF 33 to STAAU_R4, or a fragment thereof, is measured by injecting purified 3A ORF 33 over the ligand chip surface. Measurements are performed at any desired temperature between 4°C and 37°C. Conditions used for the assay (i.e., those permitting binding) are as follows: 25 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 150 mM sodium chloride, 15% glycerol, 1 mM dithiothreitol, and 0.001% Tween 20 with a flow rate of 10 ul/min. Preincubation of the sensor chip with candidate inhibitors will predictably decrease the interaction between 3A ORF 33 and STAAU_R4. A decrease in 3A ORF 33 binding, detected as a reduced response on sensorgrams and measured in resonance units, is indicative of competitive binding by the candidate compound.

iv.) Scintillation Proximity Assay

A scintillation proximity assay (SPA) may be used to characterize the interaction between a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide, or a fragment thereof, for example comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 and another polypeptide. The SPA relies in a solid-phase substrate, such as beads or the plastic of a microtitre plate, into which a scintillant has been incorporated. For the assay, the target protein, for example a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide, is coupled to the beads or to the surface of the plate, either covalently through activated surface chemistries or non-covalently through a peptide affinity tag, an antibody, or biotinylation. Addition of a radiolabeled binding polypeptide, for example [^{32}P]-radiolabeled 3A ORF 33 , results in close proximity of the radioactive source molecule to the scintillant. As a consequence, the radioactive decay excites the scintillant contained within the bead or within the plastic of the plate and detectable light is emitted. Compounds that prevent the association between immobilized *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide and radiolabeled 3A ORF 33 will diminish the scintillation signal. The SPA thus represents an example of an ideal technology with which to screen for inhibitors of the STAAU_R4-3A ORF 33 interactions because it is readily adapted to high-

throughput, automated format and because of its sensitivity for detection of protein-protein interactions with K_D values in the micromolar to nanomolar ranges.

v.) Bio Sensor Assay

ICS biosensors have been described by AMBRI (Australian Membrane Biotechnology Research Institute; http//www.ambri.com.au/). In this technology, the self-association of macromolecules such as STAAU_R4, or fragment thereof, and bacteriophage 3A ORF 33 or fragment thereof, is coupled to the closing of gramacidin-facilitated ion channels in suspended membrane bilayers and hence to a measurable change in the admittance (similar to impedence) of the biosensor. This approach is linear over six order of magnitude of admittance change and is ideally suited for large scale, high through-put screening of small molecule combinatorial libraries.

vi.) Phage display

Phage display is a powerful assay to measure protein:protein interaction. In this scheme, proteins or peptides are expressed as fusions with coat proteins or tail proteins of filamentous bacteriophage. A comprehensive monograph on this subject is *Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual* edited by Kay *et al.* (1996) Academic Press. For phages in the Ff family that include M13 and fd, gene III protein and gene VIII protein are the most commonly-used partners for fusion with foreign protein or peptides. Phagemids are vectors containing origins of replication both for plasmids and for bacteriophage. Phagemids encoding fusions to the gene III or gene VIII can be rescued from their bacterial hosts with helper phage, resulting in the display of the foreign sequences on the coat or at the tip of the recombinant phage.

In one example of a simple assay, purified recombinant STAAU_R4 protein, or fragment thereof, could be immobilized in the wells of a microtitre plate and incubated with phages displaying a 3A ORF 33 sequence in fusion with the gene III protein. Washing steps are performed to remove unbound phages and bound phages are detected with monoclonal antibodies directed against phage coat protein (gene VIII protein). An enzyme-linked secondary

antibody allows quantitative detection of bound fusion protein by fluorescence, chemiluminescence, or colourimetric conversion. Screening for inhibitors is performed by the incubation of the compound with the immobilized target before the addition of phages. The presence of an inhibitor will specifically reduce the signal in a dose-dependent manner relative to controls without inhibitor.

It is important to note that in assays of protein-protein interaction, it is possible that a modulator of the interaction need not necessarily interact directly with the domain(s) of the proteins that physically interact. It is also possible that a modulator will interact at a location removed from the site of protein-protein interaction and cause, for example, a conformational change in the STAAU_R4 polypeptide. Modulators (inhibitors or agonists) that act in this manner can be termed allosteric effectors and are of interest since the change they induce may modify the activity of the STAAU_R4 polypeptide.

Testing for inhibitors is performed by the incubation of the compound with the reaction mixtures. The presence of an inhibitor will specifically reduce the signal in a dose-dependent manner relative to controls without inhibitor. Compounds selected for their ability to inhibit interactions between STAAU_R4-3A ORF 33 are further tested in secondary screening assays.

b. Bacterial growth inhibition

Compounds selected for their ability to inhibit interactions between a STAAU_R4 polypeptide and 3A ORF 33 polypeptide or to inhibit the STAAU_R4 activity can be further tested in functional assays of bacterial growth. Cultures of *S. aureus* are grown in the presence of varying concentrations of a candidate compound added directly to the medium or using a vehicle which is appropriate for the delivery of the compound into the cell. For compounds that correspond to polypeptides, the nucleotide sequence encoding said polypeptides can be cloned into a *S. aureus* expression vector containing an inducible promotor. The expression of the polypeptide could be induced following transfection of cells. For example, the polypeptide may include, but is not limited to different 3A ORF 33 -derived fragments.

Following the induction of expression or the addition of compound, the cultures are then incubated for an additional 4 h at 37°C. During that period of time, the effect of inhibitors on bacterial cell growth may be monitored at 40 min intervals, by measuring, for example, the OD_{565} and the number of colony forming units (CFU) in the cultures. The number of CFU is evaluated as follows: cultures are serially diluted and aliquots from the different cultures are plated out on agar plates.Following incubation overnight at 37°C, the number of colonies is counted. Non-treated cultures of *S. aureus* are included as negative control.

In another aspect, the present invention relates to a screening kit for identifying agonists, antagonists, ligands, receptors, substrates, enzymes, etc. for a polypeptide and/or polynucleotide of the present invention; or compounds which decrease or enhance the production of such polypeptides and/or polynucleotides, which comprises: (a) a polypeptide and/or a polynucleotide of the present invention; (b) a recombinant cell expressing a polypeptide and/or polynucleotide of the present invention; (c) a cell membrane associated with a polypeptide and/or polynucleotide of the present invention; or (d) an antibody to a polypeptide and/or polynucleotide of the present invention; which polypeptide is preferably that of SEQ ID NO: 2, and for which the polynucleotide is preferably that of SEQ ID NO: 1.

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component.

It will be readily appreciated by the skilled artisan that a polypeptide and/or polynucleotide of the present invention may also be used in a method for the structure-based design of an agonist, antagonist or inhibitor of the polypeptide and/or polynucleotide, by: (a) determining in the first instance the three-dimensional structure of the polypeptide and/or polynucleotide, or complexes thereof; (b) deducing the three-dimensional structure for the likely reactive site(s), binding site(s) or motif(s) of an agonist, antagonist or inhibitor; (c) synthesizing candidate compounds that are predicted to bind to or react with the

deduced binding site(s), reactive site(s), and/or motif(s); and (d) testing whether the candidate compounds are indeed agonists, antagonists or inhibitors. It will be further appreciated that this will normally be an iterative process, and this iterative process may be performed using automated and computer-controlled steps.

Each of the polynucleotide sequences provided herein may be used in the discovery and development of antibacterial compounds. The encoded protein, upon expression, can be used as a target for the screening of antibacterial drugs. Additionally, the polynucleotide sequences encoding the amino terminal regions of the encoded protein or Shine-Dalgarno or other sequence that facilitate translation of the respective mRNA can be used to construct antisense sequences to control the expression of the coding sequence of interest.

The invention also provides the use of the polypeptide, polynucleotide, agonist or antagonist of the invention to interfere with the initial physical interaction between a pathogen or pathogens and a eukaryotic, preferably mammalian, host that is responsible for sequelae of infection. In particular, the molecules of the invention may be used: in the prevention of adhesion of bacteria, in particular Gram positive and/or Gram negative bacteria, to eukaryotic, preferably mammalian, extracellular matrix proteins on in-dwelling devices or to extracellular matrix proteins in wounds; to block bacterial adhesion between eukaryotic, preferably mammalian, extracellular matrix proteins and bacterial STAAU_R4 proteins that mediate tissue damage and/or; to block the normal progression of pathogenesis in infections initiated other than by the implantation of in-dwelling devices or by other surgical techniques. In accordance with yet another aspect of the invention, there are provided STAAU_R4 antagonists, preferably bacteriostatic or bacteriocidal antagonists.

The antagonists of the invention may be employed, for instance, to prevent, inhibit and/or treat diseases.

Compositions, kits and administration

In a further aspect of the invention there are provided compositions comprising a STAAU_R4 polynucleotide and/or a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide for administration to a cell or to a multicellular organism.

The present invention provides for pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of a polypeptide and/or polynucleotide, such as the soluble form of a polypeptide and/or polynucleotide of the present invention, antagonist peptide or small molecule compound, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Such carriers include, but are not limited to, saline, buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol, and combinations thereof. The pharmaceutical compositions may be administered in any effective, convenient manner including, for instance, administration by topical, oral, anal, vaginal, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal or intradermal routes among others.

In therapy or as a prophylactic, the active agent may be administered to an individual as an injectable composition, for example as a sterile aqueous dispersion, preferably isotonic.

Alternatively the composition may be formulated for topical application for example in the form of ointments, creams, lotions, eye ointments, eye drops, ear drops, mouthwash, impregnated dressings and sutures and aerosols, and may contain appropriate conventional additives, including, for example, preservatives, solvents to assist drug penetration, and emollients in ointments and creams. Such topical formulations may also contain compatible conventional carriers, for example cream or ointment bases, and ethanol or oleyl alcohol for lotions. Such carriers may constitute from about 1% to about 98% by weight of the formulation; more usually they will constitute up to about 80% by weight of the formulation. Alternative means for systemic administration include transmucosal and transdermal administration using penetrants such as bile salts or fusidic acids or other detergents. In addition, if a polypeptide or other

compounds of the present invention can be formulated in an enteric or an encapsulated formulation, oral administration may also be possible. Administration of these compounds may also be topical and/or localized, in the form of salves, pastes, gels, and the like.

For administration to mammals, and particularly humans, it is expected that the daily dosage level of the active agent will be from 0.01 mg/kg to 10 mg/kg, typically around 1 mg/kg. The physician in any event will determine the actual dosage that will be most suitable for an individual and will vary with the age, weight and response of the particular individual. The above dosages are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited, and such are within the scope of this invention.

As used herein, the term "in-dwelling device" refers to surgical implants, prosthetic devices and catheters, i.e., devices that are introduced to the body of an individual and remain in position for an extended time. Such devices include, but are not limited to, artificial joints, heart valves, pacemakers, vascular grafts, vascular catheters, cerebrospinal fluid shunts, urinary catheters, continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) catheters.

The composition of the invention may be administered by injection to achieve a systemic effect against relevant bacteria shortly before insertion of an in-dwelling device. Treatment may be continued after surgery during the in-body time of the device. In addition, the composition could also be used to broaden perioperative cover for any surgical technique to prevent bacterial wound infections, especially *S. aureus* wound infections.

Many orthopedic surgeons consider that humans with prosthetic joints should be considered for antibiotic prophylaxis before dental treatment that could produce a bacteremia. Deep infection is a serious complication sometimes leading to loss of the prosthetic joint and is accompanied by significant morbidity and mortality. It may therefore be possible to extend the

use of the active agent as a replacement for prophylactic antibiotics in this situation.

In addition to the therapy described above, the compositions of this invention may be used generally as a wound treatment agent to prevent adhesion of bacteria to matrix proteins exposed in wound tissue and for prophylactic use in dental treatment as an alternative to, or in conjunction with, antibiotic prophylaxis.

Alternatively, the composition of the invention may be used to bathe an indwelling device immediately before insertion. The active agent will preferably be present at a concentration of 1 mg/ml to 10mg/ml for bathing of wounds or indwelling devices.

A vaccine composition is conveniently in injectable form. Conventional adjuvants may be employed to enhance the immune response. A suitable unit dose for vaccination is 0.5-5 microgram of antigen /kg, and such dose is preferably administered 1-3 times and with an interval of 1-3 weeks. With the indicated dose range, no adverse toxicological effects will be observed with the compounds of the invention that would preclude their administration to suitable individuals.

Sequence Databases, Sequences in a Tangible Medium, and Algorithms

Polynucleotide and polypeptide sequences form a valuable information resource with which to determine their 2- and 3-dimensional structures as well as to identify further sequences of homology. These approaches are most easily facilitated by storing the sequence in a computer readable medium and then using the stored data in a known macromolecular structure program or to search a sequence database using well-known searching tools, such as GCC.

The polynucleotide and polypeptide sequences of the invention are particularly useful as components in databases useful for search analyses as well as in sequence analysis algorithms. As used in this section entitled "Sequence Databases, Sequences in a Tangible Medium, and Algorithms," the terms "polynucleotide of the invention" and "polynucleotide

sequence of the invention" mean any detectable chemical or physical characteristic of a polynucleotide of the invention that is or may be reduced to or stored in a tangible medium, preferably a computer readable form. For example, chromatographic scan data or peak data, photographic data or scan data therefrom, called bases, and mass spectrographic data. As used in this section entitled Databases and Algorithms, the terms "polypeptide of the invention" and "polypeptide sequence of the invention" mean any detectable chemical or physical characteristic of a polypeptide of the invention that is or may be reduced to or stored in a tangible medium, preferably a computer readable form. For example, chromatographic scan data or peak data, photographic data or scan data therefrom, and mass spectrographic data.

The invention provides a computer readable medium having stored thereon polypeptide sequences of the invention and/or polynucleotide sequences of the invention. The computer readable medium can be any composition of matter used to store information or data, including, for example, commercially available floppy disks, tapes, chips, hard drives, compact disks, and video disks.

In a preferred embodiment of the invention there is provided a computer readable medium having stored thereon a member selected from the group consisting of: a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:1; a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO:2; a set of polynucleotide sequences wherein at least one of said sequences comprises the sequence of SEQ ID NO:1: a set of polypeptide sequences wherein at least one of said sequences comprises the sequence of SEQ ID NO:2; a data set representing a polynucleotide sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:1; a data set representing a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:2; a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:1; a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO:2; a set of polynucleotide sequences wherein at least one of said sequences comprises the sequence of SEQ ID NO: 1; a set of polypeptide sequences

wherein at least one of said sequences comprises the sequence of SEQ ID NO: 2; a data set representing a polynucleotide sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 1; a data set representing a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 2.

All publications and references, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference in their entirety as if each individual publication or reference were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as being fully set forth. Any patent application to which this application claims priority is also incorporated by reference herein in its entirety in the manner described above for publications and references.

The present invention is illustrated in further detail by the following non-limiting examples.

EXAMPLE 1

Identification of the inhibitory ORF from Staphylococcus aureus bacteriophage 3A

The *S. aureus* propagating strain 3A (PS 3A obtained from the Laboratory Center for Disease Control (CDC) Health Canada, Ottawa, Ontario) was used as a host to propagate phages 3A (also obtained from CDC). The phage was propagated using the agar layer method described by Swanström and Adams [Swanström et al. (1951) Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med. 78: 372-375]. Phage DNA was prepared from the purified phages as described in Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

3A ORF 33 (Fig. 2; SEQ ID NO: 4) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from their respective phage genomic DNA. The PCR products were gel purified and digested with BamHI-HindIII. Digested PCR products was then ligated into BamHI-HindIII- digested pTM vector, a *S. aureus* vector containing a kanamycin resistance selective marker (Fig. 3A), and used to

transform *S. aureus* strain RN4220 [Kreiswirth *et al.* (1983) Nature 305: 709-712]. In the resulting vectors, pTM 3AORF33 (Fig.3A), expression of the phage ORF is under the control of an arsenite-inducible promoter. Selection of recombinant clones was performed on Luria-Bertani (LB) agar plates containing 30 μg/ml of kanamycin.

Sodium arsenite ($NaAsO_2$) was used to induce gene expression from the *ars* promoter/operator. The effect of expression of phage ORF on bacterial cell growth was then evaluated in functional assays on solid medium and in liquid medium. As shown in Fig. 3B, the induction of expression of phage 3A ORF 33, by plating three independent transformants (clones 1 to 3) on semi-solid medium containing 5 uM sodium arsenite, results in the inhibition of bacterial growth on solid medium compared to plating in the absence of inducer or plating of a control non-inhibitory ORF (phage 44AHJD ORF 114) transformant. As shown in Fig. 3C and D, the density of the liquid culture, as assessed by colony forming units (CFU), for *S. aureus* clones harboring the 3A ORF 33 increased over time under non-induced conditions. Similar growth rates were also observed with transformants harboring a non-inhibitory ORF (labeled as 'non killer' on the graphs) under both induced and non-induced conditions. Each timepoint in both graphs represents the average obtained from three independent transformants of *S. aureus*.

The expression of 3A ORF 33 inhibits the bacterial growth as observed by the reduction in CFU with time for induced cultures. At 4 h following induction, the expression of 3A ORF 33 is cytocidal resulting in a 2.5 log inhibition reduction in the number of CFU compared to the number of CFU initially present in the same culture (Fig. 3C). When colony plating was done in the absence of kanamycin, the antibiotic necessary to maintain the selective pressure for the plasmid encoding 3A ORF 33 (Fig. 3D), the extent of growth inhibition was reduced, resulting in a 1 log cytocidal effect.

EXAMPLE 2

Identification of a *S. aureus* protein targeted by bacteriophage 3A ORF 33

To identify the *S. aureus* protein(s) that interacts with inhibitory ORF 33 of *S. aureus* bacteriophage 3A, GST-fusion or polyhistidine-fusion of 3A ORF 33 were generated. The recombinant protein was purified and utilized to make a GST/3A ORF 33 affinity column. Cellular extracts prepared from *S. aureus* cells were incubated with the affinity matrix and the matrix was washed with buffers containing increasing concentrations of salt and different detergents. The protein elution profile was assessed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). A protein of molecular mass ~ 40 kDa, identified as PT40, was specifically eluted from the affinity matrix (Fig. 4 and 5) and was not detected in eluates from the GST negative control column (Fig. 6). Eluted proteins were further characterized to determine the identity of the interacting protein and to validate the interaction of the protein with 3A ORF 33 as described in detail below.

A. Generation of fusion 3A ORF 33 recombinant protein.

ORF 33 from bacteriophage 3A was sub-cloned into pGEX 4T-1 (Pharmacia), an expression vector for in-frame translational fusions with GST and into pET15b MCS2, an expression vector in frame with a polyhistidine (histag). Plasmid pTM 3AORF33 (Fig 3A) was purified on a Qiagen column and digested with *Hin*dIII, treated with Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase, and digested with *Bam*HI. The DNA restriction product containing 3A ORF 33 was gel purified by QiAquick spin column (Qiagen) and ligated into pGEX 4T-1 and pET15b MCS2 expression vectors (prepared by digestion with *Sal*I, treatment with Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase, and digestion with *Bam*HI, followed by gel purification by QiAquick spin columns). Recombinant expression vectors were identified by restriction enzyme analysis of plasmid minipreps. Large-scale DNA preparations were performed with Qiagen columns, and the resulting plasmid was sequenced. Test expressions in *E. coli* cells (BL21(DE3) Gold)

containing the expression plasmids were performed to identify optimal protein expression conditions. *E. coli* cells containing the expression constructs were grown in 2 L Luria-Bertani broth at 37°C to an OD_{600} of 0.4 to 0.6 (1 cm pathlength) and induced with 1 mM IPTG for the optimized time and at the optimized temperature (30°C for 3hrs).

B. Fusion of GST/3A ORF 33 and MCS2/3A ORF 33 protein purifications.

Cells containing GST/3A ORF 33 fusion protein were suspended in 10 ml GST lysis buffer/liter of cell culture (GST lysis buffer: 20 mM Hepes pH 7.2, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 mM DTT, 1mM EDTA, 1mM benzamidine, and 1 PMSF) and lysed by French Pressure cell followed by three bursts of twenty seconds with an ultra-sonicator at 4°C. The lysate was centrifuged at 4°C for 30 minutes at 10 000 rpm in a Sorval SS34 rotor. The supernatant was applied to a 4 ml glutathione sepharose column pre-equilibrated with lysis buffer and allowed to flow by gravity. The column was washed with 10 column volumes of lysis buffer and eluted in 4 ml fractions with GST elution buffer (20 mM Hepes pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 mM DTT, 0.1mM EDTA, and 25 mM reduced glutathione). The fractions were analyzed by 15% SDS-PAGE (Laemmli) and visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R250 stain to assess the amount of eluted GST/3A ORF 33 protein.

Cells containing MCS2/3A ORF 33 (histag) fusion proteins were suspended in 10 ml lysis buffer/liter of cell culture with histag lysis buffer (20 mM Hepes pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1mM benzamidine, and 1 mM PMSF) and lysed by passage through a French Pressure cell followed by three bursts of twenty seconds with an ultra-sonicator at 4°C. The lysate was centrifuged at 4°C for 30 minutes at 10 000 rpm in a Sorval SS34 rotor. The supernatant was applied to a 4 ml metal chelate sepharose column pre-equilibrated with Ni^{2+}, and washed with histag lysis buffer and allowed to flow by gravity. The column was washed with 10 column volumes of histag lysis buffer containing 5 mM imidazole, 6 column volumes of histag lysis buffer containing 50 mM imidazole and eluted in 4 ml fractions with histag elution buffer (20 mM Hepes

pH 7.5, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, and 10% glycerol). The fractions were analyzed by 15% SDS-PAGE (Laemmli) and visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R250 stain.

C. *S. aureus* extract preparation.

A *Staphylococcus aureus* extract was prepared from the cell pellets using lysostaphin digestion followed by sonication and nuclease digestion. The cell pellet (2.9g) was suspended in 8 ml of 20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $CaCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1000 units of lysostaphin, 0.5 mg RNase A, 750 units micrococcal nuclease, and 375 units DNase 1. The cell suspension was incubated at 37°C for 30 minutes, cooled to 4°C, and made up to a final concentration of 1 mM EDTA and 500 mM NaCl. The lysate was sonicated on ice using three bursts of 20 seconds each. The lysate was centrifuged at 20 000 rpm for 1 hr in a Ti70 fixed angle Beckman rotor. The supernatant was removed and dialyzed overnight in a 10 000 Mr dialysis membrane against Affinity Chromatography Buffer (ACB; 20 mM Hepes pH 7.5, 10 % glycerol, 1 mM DTT, and 1 mM EDTA) containing 100 mM NaCl, 1mM benzamidine, and 1 mM PMSF. The dialyzed protein extract was removed from the dialysis tubing and frozen in one ml aliquots at –70 °C.

D. Affinity column preparation.

GST, GST/3A ORF 33, and MCS2/3A ORF 33 were dialyzed overnight against ACB containing 1 M NaCl. Protein concentrations were determined by Bio-Rad Protein Assay and proteins were crosslinked to Affigel 10 resin (Bio-Rad) at protein/resin concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml. The crosslinked resin was sequentially incubated in the presence of ethanolamine and bovine serum albumin (BSA) prior to column packing and equilibration with ACB containing 100 mM NaCl. *S. aureus* extracts were centrifuged at 4°C in a micro-centrifuge for 15 minutes and diluted to 5 mg/ml with ACB containing 100 mM NaCl. 400 ul of extract was applied to 40 ul columns containing 0, 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml ligand and ACB containing 100 mM NaCl (400 ul) was applied

to an additional column containing 2.0 mg/ml ligand. The columns were washed with ACB containing 100 mM NaCl (400 ul) and sequentially eluted with ACB containing 0.1% Triton X-100 and 100 mM NaCl (100 ul), ACB containing 1 M NaCl (160 ul), and 1% SDS (160 ul). 80 ul of each eluate was resolved by 16 cm 14 % SDS-PAGE [Laemmli, U.K. (1970) Nature 227: 680-685] and the protein was visualized by silver stain.

E. Affinity chromatography

One candidate interacting protein of 40 kDa (PT40) was observed in the 1M NaCl eluates of the GST/3A ORF 33 chromatography experiment (Fig. 4). The PT40 protein was also observed in the 1M NaCl eluates of the MCS2/3A ORF 33 experiment (Fig. 5). This candidate protein was not observed in the GST control affinity chromatography experiment. An estimation of the relative abundance of PT40 protein in the *Staphylococcus aureus* extract relies upon the assumption that nearly quantitative recovery of the candidate interacting protein has occurred during the affinity chromatography. Affinity chromatography experiments with the 5 mg/ml extract using ligands MCS2/3A ORF 33 and GST/3A ORF 33 yielded similar quantities of PT40 with approximately 25 ng of PT40 in the 1M NaCl eluate of the 2.0 mg/ml column. Affinity chromatography experiments with the 10 mg/ml extract using ligands MCS2/3A ORF33 and GST/3A ORF 33 yielded similar quantities of PT40 with approximately 70 ng of PT40 in the 1M NaCl eluate of the 2.0 mg/ml column. Although protein quantitation from silver stained SDS-PAGE gels is only approximate, the estimated abundance of PT40 in the extracts is approximately 0.005%.

F. Identification of *S. aureus* STAAU_R4 as an 3A ORF 33 interacting protein

The candidate protein PT40 was excised from the SDS-PAGE gels and prepared for tryptic peptide mass determination by MALDI-ToF mass spectrometry. [Qin, J., *et al.* (1997) *Anal. Chem.* 69, 3995-4001]. As exemplified in Fig. 7, high quality mass spectra were obtained. The PT40 proteins observed in the two affinity chromatography experiments (eluates presented in Figs. 4 and

5) were identical as determined by the masses of the tryptic peptides. The PT40 band was identified as an open reading frame found in Contig782 of the University of Oklahoma genome sequencing project database (http://www.genome.ou.edu/staph.html) (herein referred as 'STAAU_R4'). G. Bioinformatic analysis of STAAU_R4

Sequence homology (BLAST) and Hidden Markov Model (HMM) searches were then carried out using an implementation of both programs. Downloaded public databases used for sequence analysis include:

i) non-redundant GenBank (nr) (www.ncbi.nlm.nih.gov)
ii) pdbaa database (www.ncbi.nlm.nih.gov)
iii) PRODOM (http://protein.toulouse.inra.fr/protein.html)
iv) Swissprot and TREMBL (www.expasy.ch)
v) Block plus and Block prints (http://blocks.fhcrc.org)
vi) Pfam (http://pfam.wustl.edu)
vii) Prosite (www.expasy.ch)

As shown in Fig.8, the results of the BLAST searches performed on STAAU_R4 revealed similarity to fatty acid/phospholipid synthesis PlsX protein from a variety of bacteria, including *B. subtilis*. In particular, the result of the global optimal alignment, presented in Fig. 9A, reveals a 53% identity and a 71% similarity between the amino acid sequences of STAAU_R4 and *B. subtilis* PlsX (gi|6686325|sp|P71018|PLSX_BACSU: FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN PLSX).

A software program was developed and used on the *S. aureus* sequence to identify the start codon of the candidate ORF. The software scans the primary nucleotide sequence for an appropriate start codon. Two possible selections can be made for defining the nature of the start codon; a) selection of ATG or b) selection of ATG or GTG. The analysis also involved the identification of a ribosomal binding site (RBS) sequence that consists on finding the best ungapped alignment of the Shine-dalgarno sequence '***aaaggaggt***' within the 25

nucleotides long sequence located upstream of the start codon. Position dependent scores are as followed:

a a a g g a g g t

2 3 3 6 6 4 6 5 2

As shown in Fig. 9B, the analysis of the *S. aureus* stop codon-to-stop codon DNA region containing the STAAU_R4 revealed the presence of two possible ATG start codons associated with a predicted RBS sequence with a score of 70 % of the perfect match. Based on the sequence alignment of STAAU_R4 with other PlsX polypeptides, exemplified for *B. subtilis* PlsX in Fig. 9A, the start codon of STAAU_R4 is predicted to correspond to the first methionine downstream of the RBS sequence identified in bold on Fig 9B.

EXAMPLE 3

Affinity blotting interaction between STAAU_R4 and 3A ORF 33.

The bacterial STAAU_R4 and 3A ORF 33 interaction was also confirmed by an affinity blotting assay. The probe was made of the STAAU_R4 protein by incubation of the heart muscle kinase (HMK)-tagged STAAU_R4 GST-fusion with [^{32}P]-ATP and HMK. The labeled probe was incubated with the blocked membrane bearing the immobilized inhibitory phage ORF, and the remaining signal after extensive washing is detected by exposure to X-ray film.

A. Generation of GST/3A ORF 33 and GST/STAAU R4recombinant polypeptides for affinity blotting analysis.

The pGEX-6P1 harboring GST in fusion with PreScission protease cleavage site was purchased from Pharmacia Amersham Biotech. The pGEX-6PK was obtained by cloning synthetic annealed oligonucleotides corresponding to the heart muscle kinase (HMK) phosphorylation site (SEQ ID NO: 5: 5'- GATCTCGTCGTGCATCTGTTGGATCCCCGGAATTCCCGGG-3' And SEQ ID NO: 6: 5'-TCGACCCGGGAATTCCGGGGATCCAACAGAT-GCACGACGA-3') into the unique *Bam*HI-*Sal*I [Kaelin *et al.* (1992) Cell 70: 351-

364]. As a consequence, the HMK site is cloned in fusion with GST and is followed by unique *Bam*HI, *Eco*RI and *Sal*I cloning sites. Insertion of the duplex was confirmed by DNA sequence analysis and the plasmid is referred to as pGEX-6PK (Fig.10C).

As shown in Fig 10B, bacteriophage 3A ORF 33 was sub-cloned into pGEX-6PK by *EcoRI* and *XhoI* digestion from a pGADT7 vector (Clontech Laboratories) harboring the 3A ORF 33 sequence. The DNA fragment containing 3A ORF 33 was gel purified by Qiagen column and ligated in frame at the 3'-end of the HMK labeling site into pGEX–6PK (which had been previously digested with *EcoRI* and *SalI*) to generate pGEX–6PK3A ORF 33. Recombinant expression vectors were identified by restriction enzyme analysis of plasmid minipreps, large-scale DNA preparations were performed with Qiagen columns.

As shown in Fig 10A, full-length STAAU_R4 was amplified from *S. aureus* genomic DNA by PCR using the sense strand primer targeting the initiation codon preceded by a *Bam*HI restriction site (5'-cgggatccATGGTTAAATTAGCAATTGAT-3') (SEQ ID NO: 7) and the antisense oligonucleotide targeting the stop codon preceded by a *XhoI* restriction site (5'-ccgctcgagTTACTCATTTGATTCACCTAC-3') (SEQ ID NO: 8). The initiation codon used to amplified STAAU_R4 (SEQ ID NO: 1) corresponds to the predicted start codon (Fig. 9B) based on the sequence alignment of STAAU_R4 with other PlsX polypeptides, exemplified for *B. subtilis* PlsX in Fig. 9A. The digested PCR product was purified using the Qiagen PCR purification kit, ligated in frame at the 3'-end of the HMK labeling site into *BamHI* and *SalI* digested pGEX-6PK vector and used to transform *E. coli* strain BL21 (Amersham-Pharmacia). The sequence integrity of STAAU_R4 polypeptides fused to GST was verified directly by DNA sequencing.

B. Purification and radiolabeling of GST-fusion proteins

Expression of the GST/3A ORF 33 and GST/STAAU_R4 recombinant proteins from the plasmid pGEX-6P was induced by the addition of 1 mM of isopropyl-1-thio-β-D-galactosidase (IPTG) to a culture at OD_{600} ~0.5. The

protein was expressed at 37°C for 3h and the cells were harvested by centrifugation at 5,000 rpm in a JA-10 rotor (Beckman) for 15 min at 4°C. The bacterial pellet was resuspended in 100 ml of ice-cold phosphate buffer saline (PBS), divided into 4 aliquots and centrifuged as above. Each aliquot was resuspended in 7 ml of STE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl and 0.1 mg/ml lysozyme). After incubation for 15 min, 10 mM dithiothreithol (Gibco BRL) and 1.4% Sarkosyl (Sigma) were added and the lysed cells were submitted to three bursts of sonication of 20 seconds on ice.

The cell lysate was centrifuged at 16,000 rpm in a JA-20 rotor (Beckman) for 20 min at 4°C and the supernatant was treated with 2% Triton X-100 (Sigma) in a total volume of 20 ml for 30 min at room temperature with end-over-end rotation. The lysate was centrifuged at 16,000 rpm in an JA-20 rotor for 20 min at 4C° and the supernatant was incubated with 1 ml of glutathione Sepharose-4B beads (Amersham-Pharmacia) for 60 min at 4C°. Beads were washed extensively with PBS, transferred to an eppendorf tube and the pure proteins were cleaved from the GST portion by digestion with 40 Units of PreScission protease (Pharmacia –Amersham) in 500 µl of 50 mM Tris pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1 mM DTT. After 5 hrs incubation at 4C° with end-over-end rotation, samples were centrifuged for 5 min at 13,000 g in a microfuge and the supernatant was collected. Protein concentrations were determined using the Biorad reagent according to the manufacturer's instructions (Biorad) and the proteins were stored at –80°C until use. Proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE and visualized by Coommassie Brilliant Blue R-250 staining.

For radiolabeling with [^{32}P]-ATP, 4 µg of GST-cleaved STAAU_R4 polypeptide were incubated with 50 Units of catalytic sub-unit of cAMP dependent protein kinase "Heart Muscle Kinase" (Sigma) in a total volume of 100 µl containing 200 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 120 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT and 50 µCi of [γ^{32}P]-ATP (3000 ci/mmol) (NEN/Mandel) for 30 min at room temperature. To remove free nucleotides, the proteins were applied to Sephadex-G50 NICK columns (Amersham-Pharmacia) and eluted with Z-buffer (25 mM

Hepes pH 7.7, 12.5 mM $MgCl_2$, 20% Glycerol, 100 mM KCl & 1 mM DTT and the incorporation of γ^{32}P-ATP was determined by counting on a liquid scintillation counter.

C. Affinity blotting assay:

Increasing amounts (0.125, 0.250, 0.5 and 1.0 µg respectively lanes 1, 2, 3 and 4 in Fig 10D) of GST-cleaved 3A ORF 33 were resolved on a sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels and blotted onto nitrocellulose membrane (Millipore). Immobilized proteins were denatured by incubating the membrane with 6M urea in HBB buffer (25 mM Hepes-KOH pH 7.7, 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1mM DTT) for 20 min at 4°C. The proteins were renatured *in situ* by a progressive dilution of urea in HBB buffer. The membrane was blocked for at least 1 hr at 4°C with 5% milk in HBB supplemented with 0.05% NP-40 and for 45 min in 1% milk in HBB supplemented with 0.05% NP-40. The hybridization was performed for overnight at 4°C in hybridization buffer (20 mM Hepes-KOH pH 7.7, 75 mK KCl, 0.1 mM EDTA 2.5 mM $MgCl_2$, 0.05% NP-40 and 1% milk) containing 250,000 cpm/ml of [^{32}P]-ATP labelled STAAU_R4 polypeptide as a probe. The membrane was washed 3 times for 10 min with hybridization buffer and exposed to x-ray film (Fig 10D). A band corresponding to the [^{32}P]-ATP labelled STAAU_R4 polypeptide was detected at a position on the blot that corresponds to 3A ORF 33 (18 kDa).

CONCLUSION

By virtue of the interaction between the inhibitory bacteriophage 3A ORF 33 and the STAAU_R4, the STAAU_R4 gene and its gene product have thus been identified as novel bacterial targets for the screening and identification of anti-bacterial agents and more particularly for anti *S. aureus* agents. The present invention also provides novel diagnosis, prognosis and therapeutic methods based on STAAU_R4, and/or bacteriophage 3A ORF 33 and/or a compound identified in accordance with the present invention.

Although the present invention has been described hereinabove by way of preferred embodiments thereof, it can be modified without departing from the spirit and nature of the subject invention as defined in the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated, purified or enriched polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

2. An isolated, purified or enriched polypeptide having at least 55% identity to the amino acid sequence of claim 1.

3. An isolated, purified or enriched polypeptide having at least 60% identity to the amino acid sequence of claim 1.

4. An isolated, purified or enriched polypeptide having at least 75% similarity to the amino acid sequence of claim 1.

5. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or biologically active fragment or variant thereof.

6. An isolated, purified or enriched polypeptide comprising the amino acid sequence having at least 55% identity to the amino acid sequence of claim 5.

7. An isolated, purified or enriched polypeptide comprising the amino acid sequence having at least 60% identity to the amino acid sequence of claim 5.

8. An isolated, purified or enriched polypeptide of at least 50 amino acids in length having at least 55 % identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

9. An isolated, purified or enriched polynucleotide consisting of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1, or the complement of said polynucleotide sequence.

10. An isolated, purified or enriched polynucleotide sequence encoding the polypeptide of claim 5 or the complement of said polynucleotide sequence.

11. An isolated, purified or enriched polynucleotide comprising SEQ ID NO: 1 or the complement thereof.

12. An isolated, purified or enriched polynucleotide comprising a nucleotide sequence having at least 65% identity to the sequence as set forth in SEQ ID NO: 1; or the complement of said polynucleotide.

13. An isolated, purified or enriched polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding any one of the polypeptides from claim 1 to 8.

14. A method for identifying a compound active on a biologically active STAAU_R4 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or a biologically active variant thereof, said method comprising:

contacting said STAAU_R4 polypeptide with a candidate compound, and

detecting one of: a binding of said compound to said STAAU_R4 polypeptide; and a biological activity thereof,

wherein said binding of the compound to said STAAU_R4 polypeptide or a decrease in said biological activity thereof in the presence of said candidate compound relative to same in the absence thereof, is indicative that said candidate compound is a compound that is active on the STAAU_R4 polypeptide.

15. The method of claim 14, wherein said STAAU_R4 polypeptide is contacted simultaneously with said bacteriophage polypeptide sequence.

16. The method of claim 14 or 15, wherein said binding or said decrease in biological activity is performed in the presence and absence of said candidate compound.

17. The method of one of claims 14 to 16, wherein said bacteriophage polypeptide sequence is selected from the group consisting of:

a) SEQ ID NO:4; and

b) a fragment or variant of a) that specifically binds with SEQ ID NO:2.

18. The method of one of claims 14 to 17, wherein said detecting comprises measuring the binding of a candidate compound to said STAAU_R4 polypeptide, wherein the compound is directly or indirectly detectably labeled.

19. A method for identifying a compound active on one of a STAAU_R4 polypeptide and a bacteriophage polypeptide which specifically interacts with same comprising:

contacting said STAAU_R4 polypeptide which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or variant thereof, and said bacteriophage polypeptide which is selected from the group consisting of:

a) SEQ ID NO:4; and

b) a fragment or variant of a), wherein said fragment or variant of a) maintains its biological activity;

with a candidate compound; and

detecting a biological activity of said STAAU_R4 polypeptide and/or said bacteriophage polypeptide, wherein a decrease in the biological activity thereof in the presence of the candidate compound is indicative that said candidate compound is a compound that is active on one of said STAAU_R4 and/or bacteriophage polypeptide.

20. The method of claim 19, which identifies a compound active on STAAU_R4.

21. The method of claim 19 or 20, wherein said detecting comprises the act of measuring the binding of said STAAU_R4 polypeptide to said bacteriophage polypeptide wherein said STAAU_R4 polypeptide or said bacteriophage polypeptide is directly or indirectly detectably labeled.

22. A method of identifying a compound that is active on a biologically active STAAU_R4 polypeptide, said method comprising:

contacting a candidate compound with cells expressing said STAAU_R4 polypeptide comprising the amino acids of SEQ ID NO: 2, or a biologically active fragment, and

detecting a STAAU_R4 activity in said cells,

wherein a decrease in said activity in said cells in the presence of said candidate compound is indicative of an inhibition of STAAU_R4 activity by said compound.

23. An agonist or an antagonist of the activity of a STAAU_R4 polypeptide or fragment thereof, or a nucleic acid encoding said polypeptide or fragment thereof, identified with any one of the methods of claims 14 to 22.

24. The method of any one of claims 14-21, wherein said detecting comprises measurement by time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET).

25. The method of any one of claims 14-21, wherein said detecting comprises measurement of fluorescence polarization changes.

26. The method of any one of claims 14-21, wherein said detecting comprises measurement by surface plasmon resonance.

27. The method of any one of claims 14-21, wherein said detecting comprises a scintillation proximity assay.

28. The method of any one of claims 14-21, wherein said detecting comprises a biosensor assay.

29. The method of any one of claims 14-21, wherein said detecting comprises measurement by phage display.

30. A method of making an antibacterial compound, comprising:

identifying a compound active on a polypeptide comprising the amino acid sequence selected from:

a) SEQ ID NO:2;

b) a biologically active fragment or variant of a)

c) a nucleic acid encoding any of said polypeptide of a) – b); and

synthesizing or purifying said active compound in an amount sufficient to provide a therapeutic effect when administered to an organism infected or at risk of being infected by a bacterium naturally producing said polypeptide, or nucleic acid encoding same.

31. A method for inhibiting a bacterium, comprising contacting the bacterium with a compound active on one of a) a *S. aureus* polypeptide

comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, fragment or variant thereof; and b) a nucleic acid encoding the polypeptide of a).

32. A method for treating or preventing a bacterial infection in an animal suffering from an infection or at risk of suffering therefrom, comprising administering to said animal a therapeutically effective or prophylactically effective amount of a compound active on a *S. aureus* polypeptide comprising the amino acid sequence of one of a) SEQ ID NO: 2, fragment or variant thereof; b) a nucleic acid encoding said amino acid sequence of a).

33. A method of prophylactic treatment to prevent bacterial infection comprising contacting an indwelling device with a compound active on a *S. aureus* polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, before its implantation into a mammal, such contacting being sufficient to prevent *S. aureus* infection at the site of implantation.

34. A method of prophylactic treatment to prevent infection of an animal by a bacterium comprising administering to the animal a compound that is active on a *S. aureus* polypeptide comprising one of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, fragment or variant thereof; or a gene encoding said polypeptide, in an amount sufficient to reduce adhesion of the bacterium to a tissue surface of a tissue of the mammal.

35. The method of any one of claims 14-22, or 24-34, wherein said active compound is selected from the group consisting of a small molecule, a peptidomimetic compound, and a fragment or derivative of a bacteriophage inhibitor protein.

36. The method of any one of claims 14-22, or 24-34, wherein said active compound is a peptide synthesized by an expression system and purified, or is artificially synthesized.

37. The method of claim 36, wherein said compound is selected from the group consisting of:

a) SEQ ID NO:4; and

b) a fragment or variant of a), wherein said fragment or variant thereof maintains its specific binding capability of interacting with one of SEQ ID NO:2, fragment or variant thereof.

38. The method of any one of claims 31, 33, 35, 36 or 37, wherein said contacting is performed *in vitro*.

39. The method of any one of claims 31, 32, 34-36 or 37, wherein said contacting is performed *in vivo* in an animal.

40. The method of any one of claims 31-38, wherein said contacting is performed in combination with existing antimicrobial agents.

41. The method of any one of claims 14-22, 23, 24-29, or 35-37, wherein said STAAU_R4 polypeptide comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, or biologically active fragment or variant thereof.

42. A composition comprising an isolated, purified or enriched bacteriophage 3A ORF 33-encoded polypeptide; and a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide comprising the amino acid sequence seth forth in SEQ ID NO: 2, fragment or variant thereof.

43. A composition comprising a pair of specifically interacting domains, said pair comprising: a STAAU_R4 polypeptide and a polypeptide encoded by a bacteriophage ORF which specifically interacts with said STAAU_R4 polypeptide.

44. The composition of claim 43, wherein said STAAU_R4 polypeptide comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, and wherein said bacteriophage ORF comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:4.

45. The composition of claim 43 or 44, wherein said STAAU_R4 polypeptide comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2 or biologically active fragment or variant thereof.

46. A process for producing a pharmaceutical composition comprising: a) identifying a compound that is active on a STAAU_R4 polypeptide by performing a screening assay for compounds active on a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or biologically active fragment or variant thereof; and b) mixing the compound identified in a) with a suitable pharmaceutical carrier.

47. The process of claim 46, wherein said bacteriophage ORF comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:4.

48. The process of claim 46 or 47, wherein said STAAU_R4 polypeptide comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or biologically active fragment or variant thereof.

49. Use of one of: a) a STAAU_R4 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, a biologically active fragment or variant

thereof; b) a composition comprising a pair of specifically interacting domains comprised of a polypeptide of STAAU_R4, biologically active fragment thereof or variant thereof and a polypeptide encoded by a bacteriophage ORF which specifically interacts with STAAU_R4; or c) an assay mixture comprising a first polypeptide which comprises one of i) the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or ii) a biologically active fragment or variant of i); and a second polypeptide encoded by a bacteriophage ORF which specifically interacts with one of i)-ii); for the identification of a compound that is active on a STAAU_R4 polypeptide.

50. A method of diagnosing in an individual an infection with *S. aureus*, comprising:

determining the presence in said individual of a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide.

51. The method of claim 50 wherein said determining step comprises contacting a biological sample of said individual with an antibody specific for an epitope present on a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide.

52. A method of diagnosing in an individual an infection with *Staphylococcus aureus*, comprising:

determining the presence in said individual of a nucleic acid sequence encoding a *S. aureus* STAAU_R4 polypeptide.

53. The method of claim 52 wherein said determining step comprises contacting a nucleic acid sample of said individual with a probe of at least 15 nucleotides in length that hybridizes under stringent hybridization conditions with the sequence of SEQ ID NO:1, or the complement of said probe.

54. An isolated, purified or enriched antibody specific for a polypeptide derived from SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 1

>STAAU_R004 DNA sequence 987 nuceotides
ATGGTTAAATTAGCAATTGATATGATGGGTGGCGACAATGCGCCTGATATCGTATTAGAA
GCCGTACAAAAGGCTGTTGAAGACTTTAAAGATCTAGAAATTATACTTTCGGTGACGAA
AAAAAGTATAATCTGAACCATGAACGAATCGAATTTAGACATTGTTCTGAAAAGATTGAA
ATGGAAGATGAGCCTGTTAGAGCGATTAAACGTAAAAAAGATAGCTCAATGGTAAAAATG
GCTGAAGCTGTGAAATCTGGTGAAGCAGATGGATGTGTGTCAGCAGGTAATACTGGTGCT
TTAATGTCAGCTGGTTTATTCATTGTTGGACGTATTAAAGGTGTAGCTAGACCGGCTTTA
GTAGTAACATTGCCAACGATTGATGGAAAAGGTTTTGTCTTTTTAGACGTTGGTGCAAAT
GCTGATGCTAAACCTGAACACTTATTACAGTATGCGCAACTAGGGATATTTATGCTCAA
AAAATTAGAGGTATTGATAATCCGAAAATCTCATTATTAAATATAGGAACCGAGCCAGCT
AAAGGTAATAGTTTAACGAAAAAATCATATGAGTTATTAAATCATGATCATTCATTGAAT
TTTGTTGGGAATATTGAAGCGAAGACATTAATGGATGGCGATACAGATGTTGTAGTTACC
GATGGCTATACTGGGAACATGGTCCTTAAAAATTTAGAAGGTACTGCAAAATCAATCGGT
AAAATGTTAAAAGATACGATTATGAGTAGTACTAAAAATAAATTAGCAGGTGCAATATTG
AAGAAAGATTTAGCTGAATTCGCTAAAAAGATGGATTACTCAGAATACGGTGGTTCCGTA
TTATTAGGATTGGAAGGTACTGTAGTTAAAGCACACGGTAGTTCAAATGCTAAAGCTTTT
TATTCTGCAATTAGACAAGCGAAAATCGGCAGGAGAACAAAATATTGTACAAACAATGAAA
GAGACTGTAGGTGAATCAAATGAGTAA

FIG. 1

SEQ ID NO: 2

>STAAU_R004 amino acids sequence
MVKLAIDMMGGDNAPDIVLEAVQKAVEDFKDLEIILFGDEKKYNLNHERIEFRHCSEKIE
MEDEPVRAIKRKKDSSMVKMAEAVKSGEADGCVSAGNTGALMSAGLFIVGRIKGVARPAL
VVTLPTIDGKGFVFLDVGANADAKPEHLLQYAQLGDIYAQKIRGIDNPKISLLNIGTEPA
KGNSLTKKSYELLNHDHSLNFVGNIEAKTLMDGDTDVVVTDGYTGNMVLKNLEGTAKSIG
KMLKDTIMSSTKNKLAGAILKKDLAEFAKKMDYSEYGGSVLLGLEGTVVKAHGSSNAKAF
YSAIRQAKIAGEQNIVQTMKETVGESNE

Fig. 1 (cont.)

SEQ ID NO: 3

>3AORF033 nucleotide sequence
ATGGCAATATTAGAAGGTATTTTTGAAGAATTAAAACTATTAAATAAGAATTTACGTGTG
CTAAATACTGAACTATCAACTGTAGATTCATCAATTGTACAAGAGAAAGTTAAAGAAGCA
CCAATGCCAAAAGATGAAACAGCTCAACTGGAATCAGTTGAAGAAGTTAAGGAAACTTCT
GCTGATTTAACTAAAGATTATATGTTTTTATCAGTAGGAAAAAGAGTTCCTTAAAAAAGCAGAT
ACTTCTGATAAGAAAGAATTTAGAAATAAACTTAACGAACTTGGTGCGGATAAGCTATCT
ACTATCAAAGAAGAGCATTATGAAAAAATTGTTGATTTTATGAATGCGAGAATAAATGCA
TGA

SEQ ID NO: 4

>3AORF033 amino acid sequence
MAILEGIFEELKLLNKNLRVLNTELSTVDSSIVQEKVKEAPMPKDETAQLESVEEVKETS
ADLTKDYVLSVGKEFLKKADTSDKKEFRNKLNELGADKLSTIKEEHYEKIVDFMNARINA

Fig. 2

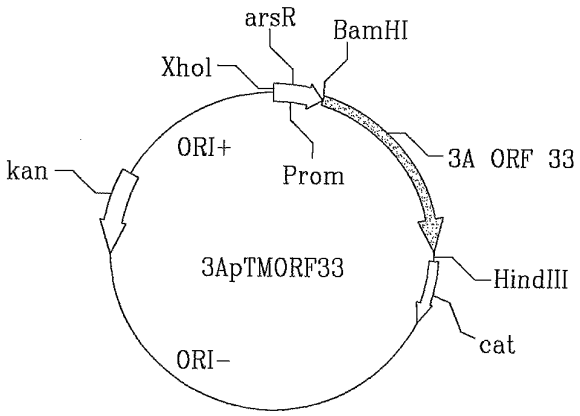

arsR
BamHI
XhoI
ORI+
Prom
3A ORF 33
kan
3ApTMORF33
HindIII
cat
ORI-

Fig. 3A

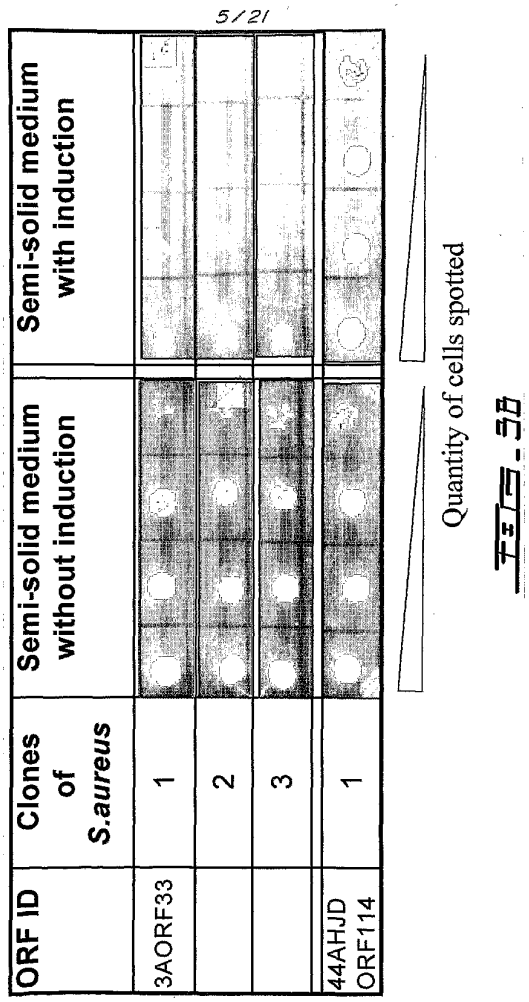

ORF ID
Clones of S.aureus
Semi-solid medium without induction
Semi-solid medium with induction
3AORF33
1
2
3
44AHJD ORF114
1
Quantity of cells spotted

図 3B

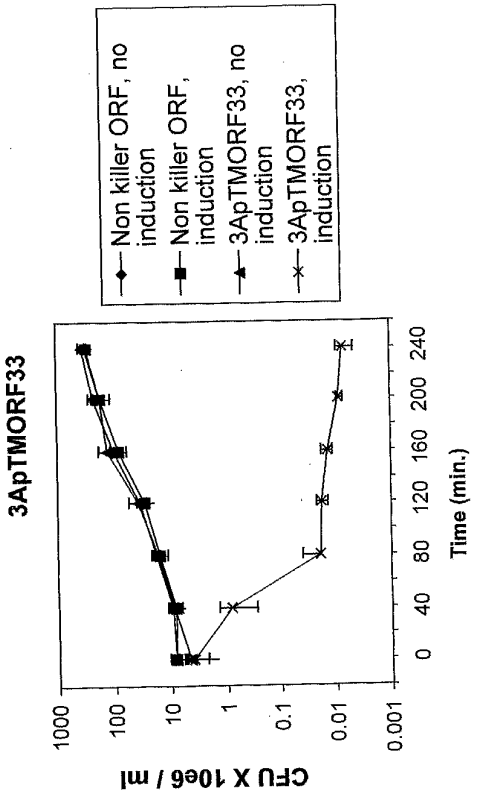

Non killer ORF, no induction
Non killer ORF, induction
3ApTMORF33, no induction
3ApTMORF33, induction
3ApTMORF33
CFU X 10e6 / ml
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
40
80
120
160
200
240
Time (min.)

FIG. 3C

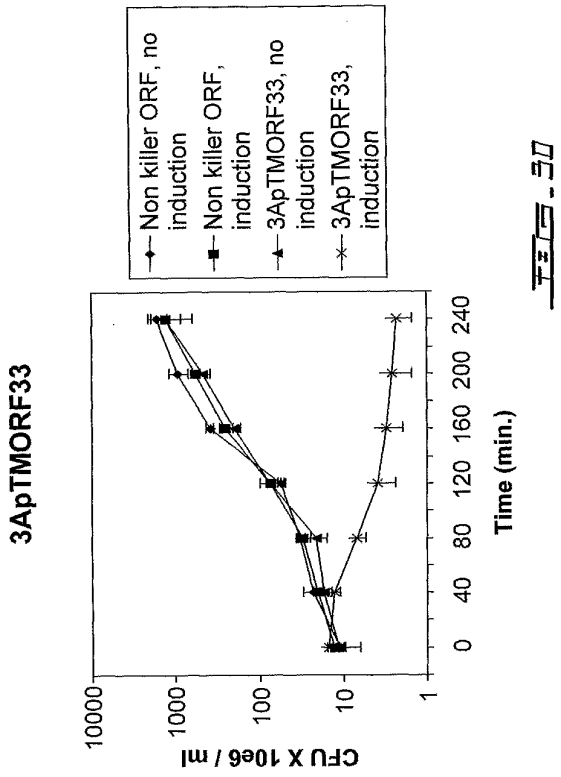

3ApTMORF33
Non killer ORF, no induction
Non killer ORF, induction
3ApTMORF33, no induction
3ApTMORF33, induction
CFU X 10e6 / ml
10000
1000
100
10
1
0
40
80
120
160
200
240
Time (min.)

FIG. 3D

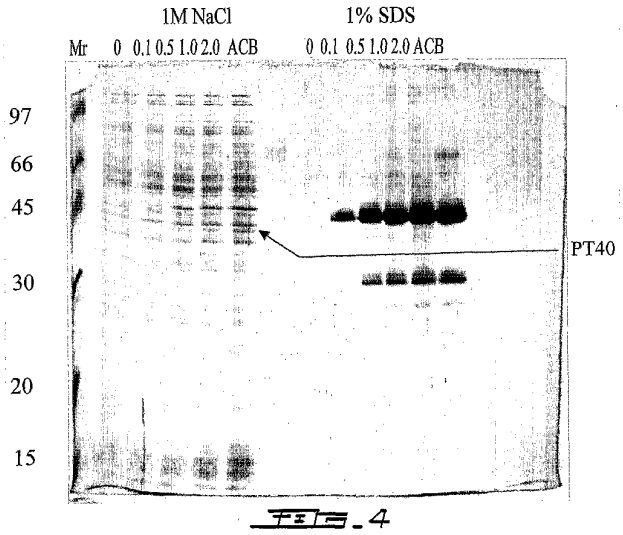

1M NaCl
1% SDS
Mr 0 0.1 0.5 1.0 2.0 ACB 0 0.1 0.5 1.0 2.0 ACB
97
66
45
30
20
15
PT40

FIG. 4

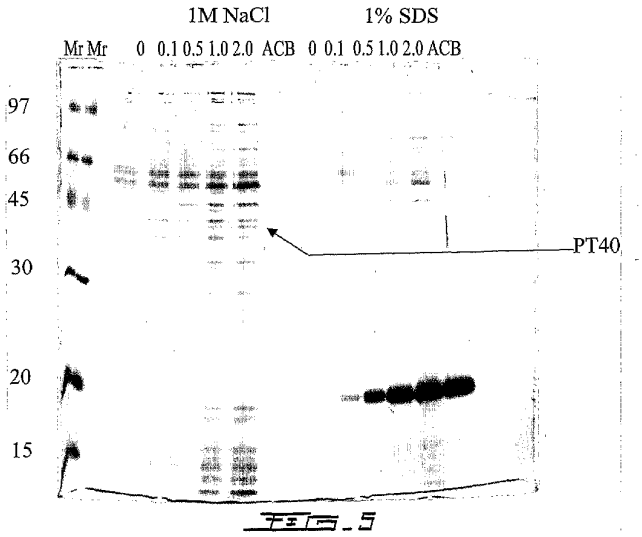

1M NaCl
1% SDS
Mr Mr 0 0.1 0.5 1.0 2.0 ACB 0 0.1 0.5 1.0 2.0 ACB
97
66
45
30
20
15
PT40

Fig. 5

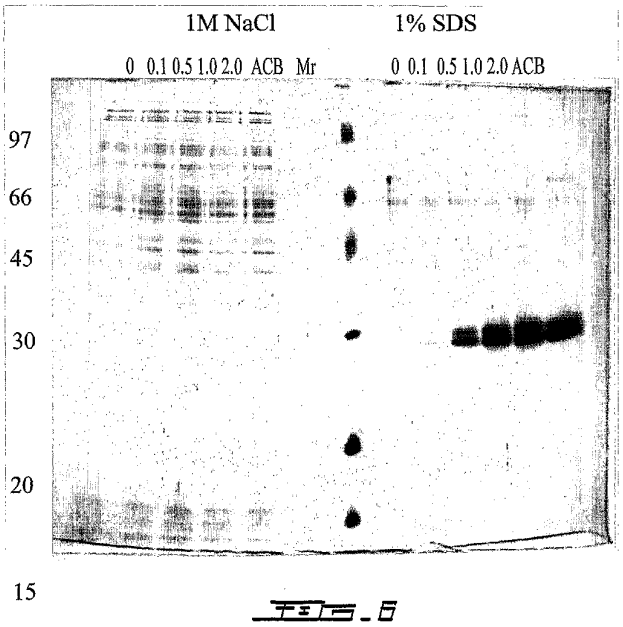


Fig. 6

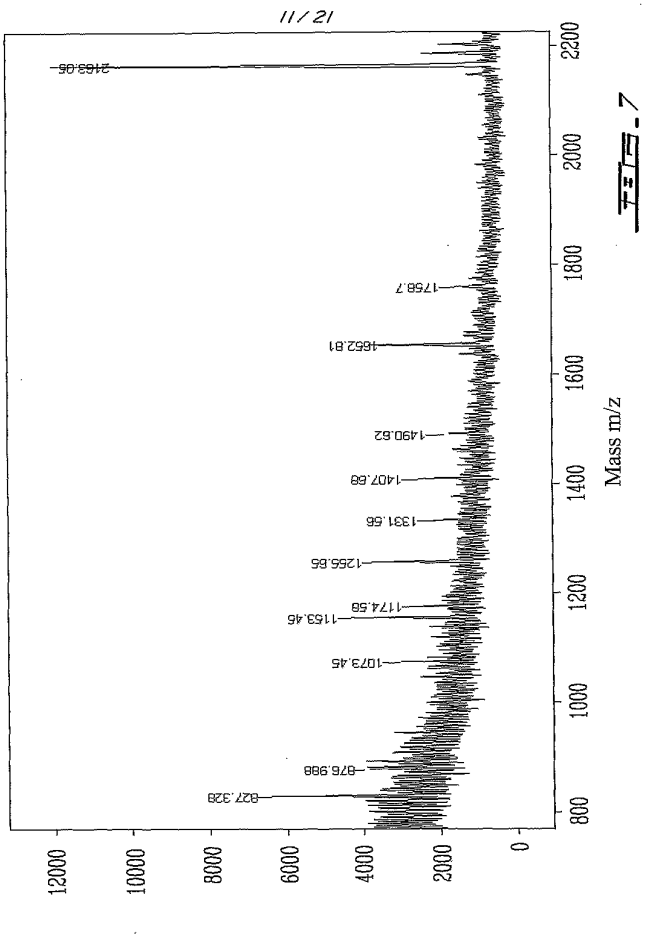

2183.05
1758.7
1652.81
1490.62
1407.68
1331.56
1255.55
1174.58
1153.45
1073.45
876.988
827.328
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200
Mass m/z

FIG. 7

Sequence analysis of STAAU_R004

Blast Analysis

Database: nr
582,290 sequences; 183,345,511 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|6686325|sp|P71018|PLSX_BACSU FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	339	3e-92
gi|10175113|dbj|BAB06212.1| (AP001515) involved in fatty acid/p...	293	1e-78
gi|1502419|gb|AAC44305.1| (U59433) PlsX [Bacillus subtilis]	279	3e-74
gi|6685740|sp|O65984|PLSX_CLOTS FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	266	2e-70
gi|3006127|emb|CAA06178.1| (AJ004870) hypothetical protein [The...	259	2e-68
gi|6685741|sp|O67186|PLSX_AQUAE FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	221	9e-57
gi|6685761|sp|Q9WXZ6|PLSX_THEMA FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	211	8e-54
gi|7428758|pir||A64545 fatty acid/phospholipid synthesis protei...	210	1e-53
gi|6685765|sp|Q9ZMN1|PLSX_HELPJ FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	209	3e-53
gi|6685733|sp|O24993|PLSX_HELPY FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	208	5e-53
gi|2498794|sp|P73950|PLSX_SYNY3 FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	206	3e-52
gi|7441729|pir||C72412 fatty acid/phospholipid synthesis protei...	202	4e-51
gi|6967803|emb|CAB72796.1| (AL139074) putative fatty acid\phosp...	196	3e-49
gi|7379281|emb|CAB83835.1| (AL162753) putative fatty acid/phosp...	193	2e-48
gi|7227170|gb|AAF42243.1| (AE002540) fatty acid/phospholipid sy...	190	2e-47
gi|9656568|gb|AAF95172.1| (AE004276) fatty acid/phospholipid sy...	183	2e-45
gi|401571|sp|P30789|PLSX_RHOCA FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESI...	180	1e-44
gi|6685745|sp|O85138|PLSX_SALTY FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	178	7e-44
gi|6686317|sp|P27247|PLSX_ECOLI FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	178	9e-44
gi|9949068|gb|AAG06357.1|AE004723_1 (AE004723) fatty acid biosy...	176	3e-43
gi|2498793|sp|P75232|PLSX_MYCPN FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	175	6e-43
gi|2498791|sp|Q49427|PLSX_MYCGE FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHES...	173	2e-42

Database: pdbaa

8891 sequences; 1,886,625 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|4699699|pdb|1A40| Phosphate-Binding Protein With Ala 197 ...	26	5.2
gi|3892022|pdb|1A55|A Chain A, Phosphate-Binding Protein Mutant...	26	5.2
gi|2624641|pdb|1IXI| Phosphate-Binding Protein Mutant With A...	26	5.2
gi|2914192|pdb|1IXH| Phosphate-Binding Protein (Pbp) Complex...	26	5.2
gi|1633135|pdb|1QUI| Phosphate-Binding Protein Mutant With A...	26	5.2
gi|1633133|pdb|1QUK| Phosphate-Binding Protein Mutant With A...	26	5.2
gi|1633132|pdb|1QUL| Phosphate-Binding Protein Mutant With A...	26	5.2
gi|2914191|pdb|1IXG| Phosphate-Binding Protein Mutant With T...	26	5.2

Database: prodom

157,167 sequences; 18,560,502 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
pd|PD006974 p99.2 (12) PLSX(6) // PROTEIN PLSX SYNTHESIS FATTY...	266	2e-71
pd|PD017557 p99.2 (4) O34561(1) O65984(1) O67186(1) // PROTEIN...	52	5e-07
pd|PD136714 p99.2 (1) Q47878_EUBAC // GLYCINE REDUCTASE	44	1e-04
pd|PD123945 p99.2 (1) PLSX_RHOCA // FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYN...	37	0.018
pd|PD039564 p99.2 (2) PLSX(2) // FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTH...	35	0.093
pd|PD123943 p99.2 (1) O24993_HELPY // FATTY ACID/PHOSPHOLIPID S...	34	0.12
pd|PD131367 p99.2 (1) O61845_CAEEL // T04D1.4 PROTEIN	30	3.1
pd|PD131278 p99.2 (2) O17665(1) UN13(1) // UNC13 PROTEIN PHORB...	30	3.1
pd|PD181530 p99.2 (1) O84817_CHLTR // FA/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS...	29	4.1
pd|PD014373 p99.2 (5) ACLY(3) P90731(1) Q13037(1) // LYASE ATP...	29	4.1
pd|PD141343 p99.2 (1) O60158_SCHPO // HYPOTHETICAL 49.4 KD PROT...	29	5.3

Fig. 8 (cont.)

Database: swissprot
88,166 sequences; 32,012,037 total letters

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
sp|P71018 PLSX_BACSU	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	339	5e-93
sp|O65984 PLSX_CLOTS	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	266	4e-71
sp|O67186 PLSX_AQUAE	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	221	2e-57
sp|Q9WXZ6 PLSX_THEMA	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	211	1e-54
sp|Q9ZMN1 PLSX_HELPJ	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	209	6e-54
sp|O24993 PLSX_HELPY	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	208	9e-54
sp|P73950 PLSX_SYNY3	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	206	5e-53
sp|P30789 PLSX_RHOCA	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	180	3e-45
sp|O85138 PLSX_SALTY	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	178	1e-44
sp|P27247 PLSX_ECOLI	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	178	2e-44
sp|P75232 PLSX_MYCPN	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	175	1e-43
sp|Q49427 PLSX_MYCGE	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	173	3e-43
sp|O84817 PLSX_CHLTR	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	145	9e-35
sp|Q926U6 PLSX_CHLPN	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	142	1e-33
sp|Q46578 PLSX_DEIRA	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN...	138	2e-32

第1図－B (cont.)

Database: trembl
372,572 sequences; 116,471,635 total letters

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
tr|Q9KA01|Q9KA01	INVOLVED IN FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS.	293	9e-79
tr|Q9PIH0|Q9PIH0	PUTATIVE FATTY ACID\PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PR...	196	2e-49
tr|Q9JW54|Q9JW54	PUTATIVE FATTY ACID/PHOSPHOLIPID BIOSYNTHESIS...	193	1e-48
tr|Q9JXR8|Q9JXR8	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN.	190	1e-47
tr|Q9KQH4|Q9KQH4	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN PLSX.	183	1e-45
tr|Q9RA35|Q9RA35	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN PLS...	168	4e-41
tr|Q9PQT7|Q9PQT7	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN.	153	1e-36
tr|Q9PLB1|Q9PLB1	FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN.	144	7e-34
tr|Q9JQ90|Q9JQ90	FA/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN (FATTY ACID...	142	4e-33
tr|Q53843|Q53843	ORFA AND ORFF GENES, PARTIAL CDS, ORFB, ORFC,...	100	2e-20

第5図 (cont.)

Database: staph_aureus
160 sequences; 5,603,166 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
st|8091 Staphylococcus aureus, TIGR database	647	0.0
st|Contig248 Staphylococcus aureus, Univ. of Oklahama database	647	0.0
st|8083 Staphylococcus aureus, TIGR database	28	1.9
st|Contig276 Staphylococcus aureus, Univ. of Oklahama database	28	1.9
st|8084 Staphylococcus aureus, TIGR database	28	2.5
st|Contig264 Staphylococcus aureus, Univ. of Oklahama database	28	2.5
st|8104 Staphylococcus aureus, TIGR database	28	2.5
st|8096 Staphylococcus aureus, TIGR database	27	4.3
st|Contig280 Staphylococcus aureus, Univ. of Oklahama database	27	4.3
st|8085 Staphylococcus aureus, TIGR database	26	9.6

Fig. 8 (cont.)

Optimal global alignment between STAAU_R004 and gene PlsX from *Bacillus subtilis*

Sequence 1
>pt|125098 STAAU_R004 STAAU_R004_NT|1-987|
(328 letters)

Sequence 2
>sp|P71018 PLSX_BACSU FATTY ACID/PHOSPHOLIPID SYNTHESIS PROTEIN PLSX.
(333 letters)

Substitution matrix: blosum62
Gap penalty: - (11 + 1 * (gap length))

Score: 908
Identical: 179/334 (53%), **Similar:** 240/334 (71%), **Gap:** 7/334 (2%)

```
seq1     1 MVKLAIDMMGGDNAPDIVLEAVQKAVEDFKDLEIILFGD----EKKYNLNHERIEFRHCS   56
           | ::|:| ||||:|| |:: | | :| | || | | ||    |      :||   |
seq2     1 M-RIAVDAMGGDHAPKAVIDGVIKGIEAFDDLHITLVGDKTTIESHLTTTSDRITVLHAD   59

seq1    57 EKIEMEDEPVRAIKRKKDSSMVKMAEAVKSGEADGCVSAGNTGALMSAGLFIVGRIKGVA   116
           | ||  ||||||::|||:|||| ||: |    || |:||||||||:||||||||||:
seq2    60 EVIEPTDEPVRAVRRKKNSSMVLMAQEVAENRADACISAGNTGALMTAGLFIVGRIKGID   119
```

FIG. 9A

```
seq1   117 RPALVVTLPTIDGKGFVFLDVGANADAKPEHLLQYAQLGDIYAQKIRGIDNPKISLLNIG  176
seq2   120 RPALAPTLPTVSGDGFLLLDVGANVDAKPEHLVQYAIMGSVYSQQVRGVTSPRVGLLNVG  179

seq1   177 TEPAKGNSLTKKSYELLNHDHSLNFVGNIEAKTLMDGDTDVVVTDGYTGNMVLKNLEGTA  236
seq2   180 TEDKKGNELTKQTFQILKETANINFIGNVEARDLLDDVADVVVTDGFTGNVTLKTLEGSA  239

seq1   237 KSIGKMLKDTIMSSTKNKLAGAILKKDLAEFAKKMDYSEYGGSVLLGLEGTVVKAHGSSN  296
seq2   240 LSIFKMMRDVMTSTLTSKLAAAVLKPKLKEMKMKMEYSNYGGASLFGLKAPVIKAHGSSD  299

seq1   297 AKAFYSAIRQAKIAGEQNIVQTMKETVGE--SNE  328
seq2   300 SNAVFHAIRQAREMVSQNVAALIQEEVKEEKTDE  333
```

FIG. 9A (cont.)

STAAU_R004 stop codon-to-stop codon region

```
50574  tagttttcaaaggaaaattttaaaatgttttatgataagcgaggataaaattatggttaaattagcaatt
1      *  F  S  K  E  I  L  K  C  F  M  I  S  E  D  K  I  M  V  K  L  A  I
50643  gatatgatgggtggcgacaatgcgcctgatatcgtattagaagccgtacaaaaggctgttgaagacttt
24     D  M  M  G  G  D  N  A  P  D  I  V  L  E  A  V  Q  K  A  V  E  D  F
50712  aaagatctagaaattatacttttcggtgacgaaaaaaagtataatctgaaccatgaacgaatcgaattt
47     K  D  L  E  I  I  L  F  G  D  E  K  K  Y  N  L  N  H  E  R  I  E  F
50781  agacattgttctgaaaagattgaaatggaagatgagcctgttagagcgattaaacgtaaaaaagatagc
70     R  H  C  S  E  K  I  E  M  E  D  E  P  V  R  A  I  K  R  K  K  D  S
50850  tcaatggtaaaaatggctgaagctgtgaaatctggtgaagcagatggatgtgtgtcagcaggtaatact
93     S  M  V  K  M  A  E  A  V  K  S  G  E  A  D  G  C  V  S  A  G  N  T
50919  ggtgctttaatgtcagctggtttattcattgttggacgtattaaaggtgtagctagaccggctttagta
116    G  A  L  M  S  A  G  L  F  I  V  G  R  I  K  G  V  A  R  P  A  L  V
50988  gtaacattgccaacgattgatggaaaaggttttgtctttttagacgttggtgcaaatgctgatgctaaa
139    V  T  L  P  T  I  D  G  K  G  F  V  F  L  D  V  G  A  N  A  D  A  K
51057  cctgaacacttattacagtatgcgcaactaggggatatttatgctcaaaaaattagaggtattgataat
162    P  E  H  L  L  Q  Y  A  Q  L  G  D  I  Y  A  Q  K  I  R  G  I  D  N
51126  ccgaaaatctcattattaaatataggaaccgagccagctaaaggtaatagtttaacgaaaaaatcatat
185    P  K  I  S  L  L  N  I  G  T  E  P  A  K  G  N  S  L  T  K  K  S  Y
51195  gagttattaaatcatgatcattcattgaattttgttgggaatattgaagcgaagacattaatggatggc
208    E  L  L  N  H  D  H  S  L  N  F  V  G  N  I  E  A  K  T  L  M  D  G
51264  gatacagatgttgtagttaccgatggctatactgggaacatggtccttaaaaatttagaaggtactgca
231    D  T  D  V  V  V  T  D  G  Y  T  G  N  M  V  L  K  N  L  E  G  T  A
51333  aaatcaatcggtaaaatgttaaaagatacgattatgagtagtactaaaaataaattagcaggtgcaata
254    K  S  I  G  K  M  L  K  D  T  I  M  S  S  T  K  N  K  L  A  G  A  I
51402  ttgaagaaagatttagctgaattcgctaaaaagatggattactcagaatacggtggttccgtattatta
277    L  K  K  D  L  A  E  F  A  K  K  M  D  Y  S  E  Y  G  G  S  V  L  L
51471  ggattggaaggtactgtagttaaagcacacggtagttcaaatgctaaagctttttattctgcaattaga
300    G  L  E  G  T  V  V  K  A  H  G  S  S  N  A  K  A  F  Y  S  A  I  R
51540  caagcgaaaatcgcaggagaacaaaatattgtacaaacaatgaaagagactgtaggtgaatcaaatgag
323    Q  A  K  I  A  G  E  Q  N  I  V  Q  T  M  K  E  T  V  G  E  S  N  E
51609  taa 51611
346    *
```

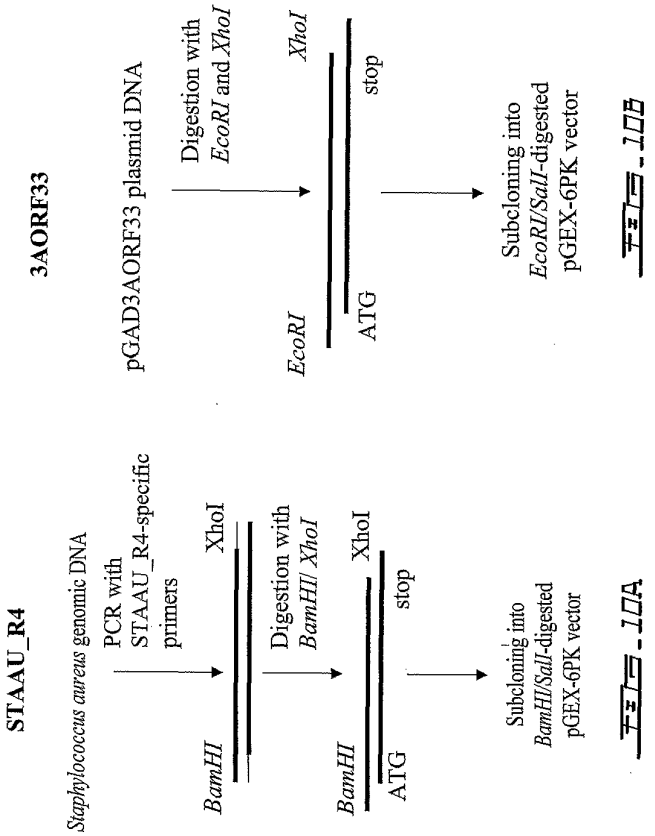
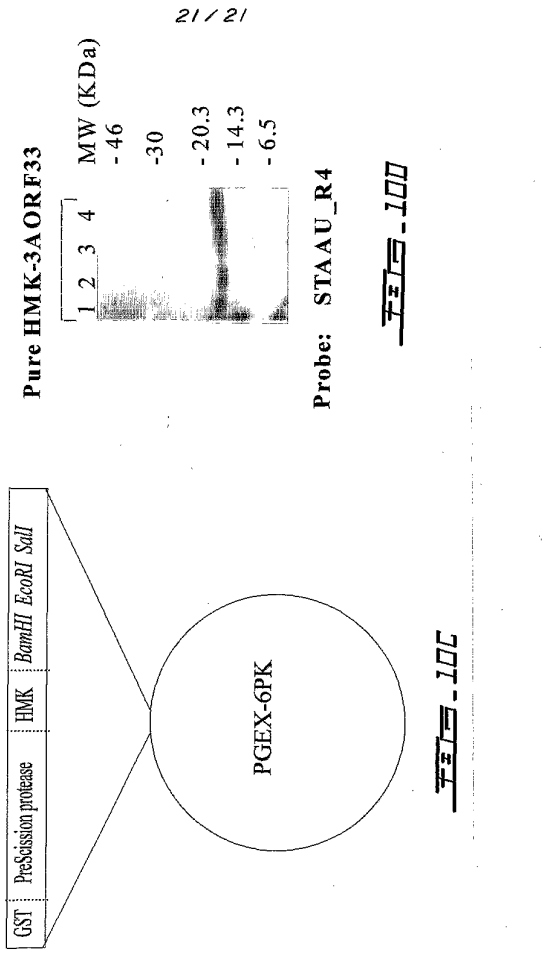


FIG. 10B

FIG. 10A


Pure HMK-3AORF33
MW (KDa)
- 46
-30
- 20.3
- 14.3
- 6.5
1 2 3 4
Probe: STAAU_R4
FIG. 10D
GST
PreScission protease
HMK
BamHI EcoRI SalI
PGEX-6PK
FIG. 10C

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
27 June 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/050106 A3

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/31, C12N 15/31, G01N 33/68, A61K 38/00, A61P 31/00, C12Q 1/68, C07K 16/12

(21) International Application Number: PCT/CA01/01847

(22) International Filing Date: 19 December 2001 (19.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/256,489 20 December 2000 (20.12.2000) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **PHAGETECH INC.** [CA/CA]; C.P. 387, Place du Parc, Montréal, Québec H2W 2N9 (CA).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **PELLETIER, Jerry** [CA/CA]; 8 Lakeview, Baie D'Urfe, Quebec H9X 3B1 (CA). **GROS, Philippe** [CA/CA]; 107 Montrose, St. Lambert, Quebec J4R 1X4 (CA). **DUBOW, Michael** [CA/CA]; 4901 Coolbrook, Montreal, Quebec H3X 2K8 (CA).

(74) Agents: **DUBUC, J.** et al.; Goudreau Gage Dubuc, Stock Exchange Tower, Suite 3400, 800 Place Victoria, P.O. Box 242, Montréal, Québec H4Z 1E9 (CA).

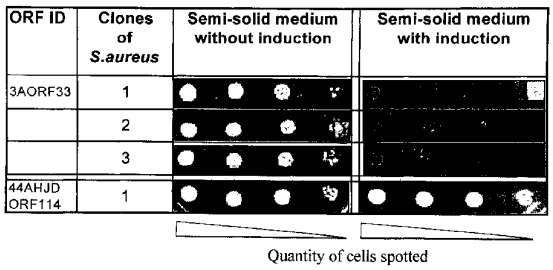
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

[Continued on next page]

(54) **Title:** COMPOSITIONS AND METHODS INVOLVING AN ESSENTIAL STAPHYLOCOCCUS AUREUS GENE AND ITS ENCODED PROTEIN STAAU_R4



(57) **Abstract:** The invention relates to bacterial genes and proteins that are implicated in the process of fatty acid/phospholipid biosynthesis and also to bacteriophage genes and their protein products that interact with bacterial proteins implicated in fatty acid/phospholipid biosynthesis. More particularly, the invention relates to compositions and methods involving essential *Staphylococcus aureus* genes and its encoded proteins STAAU_R4. In addition, the invention relates to screening assays to identify compounds which modulate the level and/or activity of STAAU_R4 and to such compounds.

WO 02/050106 A3

WO 02/050106 A3

(88) Date of publication of the international search report:
12 December 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 01/01847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/31 C12N15/31 G01N33/68 A61K38/00 A61P31/00
C12Q1/68 C07K16/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C12N G01N A61K A61P C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EMBL, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORBIDONI H R ET AL: "Bacillus subtilis acyl carrier protein is encoded in a cluster of lipid biosynthesis genes" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 178, no. 16, August 1996 (1996-08), pages 4794-4800, XP002119514 ISSN: 0021-9193 abstract page 4794, right-hand column, last paragraph page 4795, right-hand column, paragraph 2 -page 4796, left-hand column, paragraph 1; figures 1,2 page 4799, left-hand column, paragraph 3 --- -/--	2,5-8, 10,13

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [ ] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
'E' earlier document but published on or after the international filing date
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 October 2002	29/10/2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Montero Lopez, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 01/01847

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MAKOTO KURODA ET AL.: "Whole genome sequencing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus" LANCET, vol. 357, April 2001 (2001-04), pages 1225-1240, XP004246103 the whole document	1-13
P,X	-& DATABASE EMBL 'Online! 24 April 2001 (2001-04-24) KURODA, M. ET AL.: "Staphylococcus aureus subsp. aureus genomic DNA, complete genome, section 5/10" Database accession no. AP003133 XP002215850 nucleotides 16851-17837	1-13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 01/01847

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

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

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [X] Claims Nos.: 23
because they relate to parts of the international Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/CA 01/01847

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 31, 35-37, 40 and 41 as far as concerning an in vivo method, and claims 32, 34, and 39 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound. Although claims 50 and 52 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 23

Present claim 23 relates to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely acting as agonist or antagonist of the activity of a STAAU_R4 polypeptide. The claim covers all compounds having this characteristic or property, whereas the application does not provide support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any specific example of such compounds. In the present case, the claim so lacks support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, no search has been carried out for claim 23.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ 14/31	Ｃ０７Ｋ 16/12		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ 16/12	Ｃ１２Ｎ 1/20	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ 1/20	Ｃ１２Ｑ 1/02		
Ｃ１２Ｑ 1/02	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
// Ｃ０７Ｋ 14/005	Ａ６１Ｋ 37/02		
	Ｃ０７Ｋ 14/005		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
フロッピー

(72)発明者 グロス，フィリップ
カナダ国 ジェー ４ アール １ エックス ４ ケベック州 セント ランバート，モントローズ １０７
(72)発明者 ドゥボウ，ミカエル
カナダ国 エイチ ３ エックス ２ ケイ ８ ケベック州 モントリオール，クールブロック ４９０１

Ｆターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 BA80 CA03 CA07 CA09 CA12 CA20 DA05 DA06 EA04 GA11 HA03 HA11 HA13 HA14
4B063 QA01 QA05 QA06 QA18 QA19 QQ06 QQ21 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61 QQ89 QQ91 QR32 QR35 QR39 QR48 QR56 QR74 QR75 QR80 QS33 QS34 QX02
4B065 AA53X BA30 CA43 CA44
4C084 AA13 AA17 BA02 BA35 DA41 NA14 ZB35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA75 EA29 EA52 FA71 FA74