

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第6部門第1区分
 【発行日】平成17年7月7日(2005.7.7)

【公表番号】特表2004-522945(P2004-522945A)
 【公表日】平成16年7月29日(2004.7.29)
 【年通号数】公開・登録公報2004-029
 【出願番号】特願2002-546211(P2002-546211)
 【国際特許分類第7版】

G 0 1 N 33/566
 A 6 1 K 38/00
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 31/04
 C 1 2 P 21/02
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 21/27
 G 0 1 N 21/64
 G 0 1 N 21/78
 G 0 1 N 33/15
 G 0 1 N 33/483
 G 0 1 N 33/50
 G 0 1 N 33/53
 // C 0 7 K 14/005

【F I】

G 0 1 N 33/566
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 31/04
 C 1 2 P 21/02 C
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 21/27 C
 G 0 1 N 21/64 A
 G 0 1 N 21/64 F
 G 0 1 N 21/78 C
 G 0 1 N 33/15 Z
 G 0 1 N 33/483 C
 G 0 1 N 33/50 Z N A Z
 G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 33/53 M
 A 6 1 K 37/02
 C 0 7 K 14/005

【手続補正書】
 【提出日】平成15年10月1日(2003.10.1)
 【手続補正1】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】特許請求の範囲
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【特許請求の範囲】
 【請求項1】

スタフィロコッカス・アウレウスに対する殺菌又は静菌効果を有する、配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドに結合する抗菌剤。

【請求項2】

前記剤が、小有機分子、ペプチド類似物質、ペプチド及びポリペプチドから成る群から選択される請求項1記載の抗菌剤。

【請求項3】

前記ポリペプチドが、バクテリオファージタンパク質から成る請求項2記載の抗菌剤。

【請求項4】

前記バクテリオファージタンパク質が、44AHJD - ORF25 (配列番号4)、TwortORF168 (配列番号6)、G1 - ORF240 (配列番号10) 及びそれらのフラグメントから成る群から選択される請求項3記載の抗菌剤。

【請求項5】

前記結合が特異的である請求項1～4のいずれか1項記載の抗菌剤。

【請求項6】

前記剤が、配列番号2を含んで成るスタフィロコッカス・アウレウスポリペプチドの活性を減じるか又は低める請求項1～5のいずれか1項記載の抗菌剤。

【請求項7】

請求項1～6のいずれか1項記載の抗菌剤、及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る抗菌組成物。

【請求項8】

細菌の阻害方法であって、前記細菌と、請求項1～6のいずれか1項記載の抗菌剤、及び/又は請求項7記載の抗菌組成物とを接触せしめることを含んで成る方法。

【請求項9】

前記接触がインピトロで行われる請求項8記載の方法。

【請求項10】

前記接触が、非ヒト動物においてインピボで行われる請求項8記載の方法。

【請求項11】

配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るSTAAU_R2ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法であって、

- 前記STAAU_R2ポリペプチド、その生物学的活性フラグメント又は変異体と、候補体化合物とを、前記STAAU_R2ポリペプチド、その生物学的活性フラグメント又は変異体に対して特異的に結合するバクテリオファージポリペプチドの存在下で、接触せしめ；
- 前記候補体化合物が前記結合を減じるかどうかを決定し；そして
- 前記結合を減じる候補体化合物を選択する段階を含んで成る方法。

【請求項12】

前記バクテリオファージタンパク質が、44AHJD - ORF25 (配列番号4)、TwortORF168 (配列番号6)、G1 - ORF240 (配列番号10) 及びそれらのフラグメント又は変異体から成る群から選択される請求項11記載の方法。

【請求項13】

前記バクテリオファージポリペプチド、フラグメント又は変異体が、前記STAAU_R2ポリペプチド、その生物学的活性フラグメント又は変異体に対して特異的に結合することができる請求項12記載の方法。

【請求項14】

前記バクテリオファージポリペプチド、フラグメント又は変異体が、検出できるよう直接的に又は間接的にラベルされる請求項11～13のいずれか1項記載の方法。

【請求項15】

前記決定が、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET)、蛍光偏光変化、表層プラスモン共鳴、シンチレーション・プロキシミティ・アッセイ、バイオセンサー・アッセイ及びファージ・ディスプレイから成る群から選択された技法による測定を含んで成る請求項11～13のいずれか1項記載の方法。

【請求項 16】

前記候補体化合物が、小分子、ペプチド類似物質、ペプチド及びポリペプチドから成る群から選択される請求項11～15のいずれか1項記載の方法。

【請求項 17】

S. アウレウスDNA - 意図されたDNAポリメラーゼIII サブユニットタンパク質に対して活性的である化合物についてのスクリーニング方法であって、

- i) 配列番号4, 6, 8及び10から成る群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチド; ii) S. アウレウスDNA - 指図されたDNAポリメラーゼIII - サブユニットタンパク質; 及び iii) 少なくとも1つの候補体化合物を接触せしめ;

- 前記少なくとも1つの候補体の化合物が、前記DNAポリメラーゼIII サブユニットタンパク質と前記ポリペプチドとの間の結合相互作用を減じるかどうかを決定し;そして

- 前記結合を減じる候補体化合物を選択することを含んで成る方法。

【請求項 18】

抗菌化合物の製造方法であって、

- 請求項11～17のいずれか1項記載の方法を実施することによって、STAAU_R2ポリペプチドと相互作用する化合物を同定し;そして

- 前記STAAU_R2ポリペプチドを天然において生成する細菌により感染された生物に投与される場合、治療効果を提供するのに十分な量の前記化合物を合成し又は精製する段階を含んで成る方法。

【請求項 19】

STAAU_R2ポリペプチド、又は前記STAAU_R2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由来のポリペプチドの1つに対して活性的な化合物の同定方法であって、

- 候補体化合物の存在又は不在で第1及び第2ポリペプチドを接触せしめ、ここで前記第1ポリペプチドは、i) 配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るSTAAU_R2ポリペプチド、ii) i) のフラグメント、又はi) の変異体から成り;そして前記第2ポリペプチドは、前記STAAU_R2ポリペプチド又は前記生成物学的活性のフラグメント又は変異体に対して特異的に結合するバクテリオファージポリペプチドから成り;そして

- 前記第1及び/又は第2ポリペプチドの生物学的活性を測定することを含んで成り;ここで前記候補体化合物の不在下での生物学的活性に比較される場合、前記候補体化合物の存在下での前記生物学的活性の低下又は上昇が、前記候補体化合物が少なくとも1つの前記第1及び第2ポリペプチドに対して活性的であることを表示することを特徴とする方法。

【請求項 20】

前記候補体化合物が検出できるよう直接的に又は間接的にラベルされ、そして前記第1及び/又は第2ポリペプチドへの前記候補体化合物の結合を測定する段階をさらに含んで成る請求項19記載の方法。

【請求項 21】

前記測定が、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)、蛍光偏光変化、表層プラスモン共鳴、シンチレーション・プロキシミティ・アッセイ、バイオセンサー・アッセイ及びファージ・ディスプレイから成る群から選択された技法による測定を含んで成る請求項19又は20記載の方法。

【請求項 22】

前記候補体化合物が、小分子、ペプチド類似物質、ペプチド及びポリペプチドから成る群から選択される請求項19～21のいずれか1項記載の方法。

【請求項 23】

配列番号2を含んで成るSTAAU_R2ポリペプチドの活性、又は前記STAAU_R2ポリペプチドの生物学的活性フラグメント又は変異体の活性の拮抗物質。

【請求項 24】

配列番号4, 6, 8及び10から成る群から選択された、バクテリオファージタンパク質

の少なくとも10個の長さのアミノ酸残基のフラグメントを含んで成る、単離され、精製され、又は富化されたポリペプチド。

【請求項25】

配列番号4, 6, 8及び10から成る群から選択されたアミノ酸と少なくとも50%の同一性を有する、単離され、精製された、又は富化されたポリペプチド。

【請求項26】

前記同一性が少なくとも75%である請求項25記載のポリペプチド。

【請求項27】

前記同一性が少なくとも95%である請求項26記載のポリペプチド。

【請求項28】

第1ポリペプチドドメイン、及びお互いと特異的に相互作用する第2ポリペプチドドメインを含んで成り、ここで前記第1ドメインが配列番号2を含んで成るSTAAU_R2ポリペプチドに由来し、そして前記第2ドメインが前記STAAU_R2ポリペプチドに結合するバクテリオファージポリペプチドに由来することを特徴とする組成物。

【請求項29】

哺乳類における細菌感染を処理するか又は予防するための方法であって、治療的に有効な又は予防的に有効な量の請求項1～6のいずれか1項記載の抗菌剤、及び/又は請求項7記載の抗菌組成物を、前記哺乳類に投与することを含んで成る方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

スタフィロコッカス・アウレウス (*S. aureus*) 由来の必須ポリヌクレオチドとポリペプチド配列を分離、特徴づけるために、2つのこれまでの発明 (合衆国特許6,376,652号、国際PCT出願W000/32825号) の方法論を使用した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0138

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0138】

S. アウレウスSTAAU_R2配列の同定:

STAAU_R2ポリペプチドを同定するために使用される方法は、アメリカ特許6,376,652号及び国際PCT出願W000/32825号に詳細に記載されている。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0169

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0169】

このポリヌクレオチド配列は、付加的なアミノ酸をコードする付加的な翻訳配列を含むことがある。例えば、融合タンパク質の精製を容易にする標識配列がコードされることもある。本発明の一部の具体例においてこの標識配列は、pQE (商標) ベクター (Qiagen, Inc.) によって提供され、Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 821-824 (1989) に述べられているような6ヒスチジンペプチド、及びHAペプチド・タグ (Wilson et al., Cell 37: 767 (1984)) であり、両方ともこ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、構造遺伝子及び遺伝子の発現を調節するそれに天然に関連する配列をも含むが、これに限るわけではない。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0188
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0189
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0190
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0191
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0192
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0193
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0194
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 12】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0195
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 9 6
【補正方法】 削除
【補正の内容】

【手続補正 1 4】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0 1 9 7
【補正方法】 削除
【補正の内容】

【手続補正 1 5】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0 1 9 8
【補正方法】 削除
【補正の内容】

【手続補正 1 6】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0 1 9 9
【補正方法】 削除
【補正の内容】

【手続補正 1 7】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0 2 0 0
【補正方法】 削除
【補正の内容】

【手続補正 1 8】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0 2 0 1
【補正方法】 削除
【補正の内容】

【手続補正 1 9】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0 2 0 2
【補正方法】 削除
【補正の内容】

【手続補正 2 0】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0 2 0 3
【補正方法】 削除
【補正の内容】

【手続補正 2 1】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0 2 0 4
【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0 2 0 5
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0 2 0 6
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0 2 0 7
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 2 5】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0 2 0 8
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 2 6】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0 2 0 9
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 2 7】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0 2 1 0
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 2 8】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0 2 2 9
【補正方法】変更
【補正の内容】

【0 2 2 9】

iii) 表面プラズモン共鳴：

タンパク質：タンパク質の相互作用に対する阻害剤をスクリーニングする他の強力なアッセイは、表面プラズモン共鳴である。表面プラズモン共鳴は、水相（分析物）から第一のタンパク質又は他の生体分子が、センサー（リガンド）上に固相化した第二のタンパク質又は生体分子に結合することによって生じるセンサー表面付近の質量の変化によって、二つの（又はそれ以上の）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、第二のタンパク質又は生体分子（分析物）の注入又は除去後の時間あたりの共鳴単位として測定され、Biacore（商標）Biosensor（Biacore AB）又は類似する装置を使用して測定される。

【手続補正29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0230

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0230】

共有結合法（例えば、10mM 酢酸ナトリウム[pH 4.5]中アミン・カップリング）を用いて、センサー・チップ（例えば、研究用CM5（商標）チップ；Biacore AB）上にSTAAU_R2、又はSTAAU_R2のフラグメントを含んで成るポリペプチドを固相化することも可能である。盲検は、タンパク質固相化をしない状態で、センサーを活性化及び不活性化することによって準備する。他方では、リガンド表面は、ペプチド親和性標識、抗体又はビオチニル化により、センサーチップの表面上のリガンドの共有捕獲により調製され得る。STAAU_R2又はSTAAU_R2フラグメントに対する44AHJD ORF25、Twort ORF168及びG1 ORF240の結合は、チップ表面に精製44AHJD ORF25、Twort ORF168及びG1 ORF240を注入することによって測定する。

【手続補正30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0231

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0231】

測定は4 ~ 37 のいずれかの所望する温度で行なう。アッセイの条件（例えばそれらが結合する条件）は以下の通りである：25 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、150 mM 塩化ナトリウム、15% グリセロール、1 mM ジチオスレイトール、0.001% Tween（商標）20、流速度 10 μ l/min。候補体阻害剤とセンサー・チップのプレインキュベーションにより、44AHJD ORF25、Twort ORF168及びG1 ORF240とSTAAU_R2との間の相互作用の減少が予想される。センサーグラム上での低められた応答として検出されそして共鳴単位で測定される、44 AHJD ORF25、Twort ORF168及びG1 ORF240の結合低下は、候補体化合物による競合的な結合を示唆する。

【手続補正31】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0244

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0244】

STAAU_R2活性についてアッセイするためのもう1つの例は、感作された環状ssDNA基質を用いて、再構成されたインビトロアッセイにおいてのDNA中に組み込まれる放射性ラベルされたヌクレオチドのレベルを測定することである（Bruck and O'Donnell 2000, J. Biol. Chem. 275: 28971-28983）。複製反応は典型的には、トリス-HCl (pH7.5)、MgCl₂、BSA、DTT、ATP、dCTP、dGTP及びdATP、(³²P)dTTP、EDTA、グリセロール、感作された環状M13ssDNA、S. アウレウスSSB、PolC、⁺、⁻、及び⁺、及び上昇する量のSTAAU_R2ポリペプチドを含んだ。反応は37 で5分間インキュベートされ、そしてSDS及びEDTAの添加に基づいて急冷された。急冷された反応の半分が、DE81フィルター紙を用いて、全DNA合成について分析される。ほかの半分がアガロースゲル上での電気泳動により分析される。ゲルが乾燥され、そして放射性生成物が、DNA合成の割合及び加工性の評価のためにホスホリメジャー（PhosphorImager（商標））スクリーンへの照射に続いて可視化された。

【手続補正 3 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 4 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 4 7】

複製反応は、トリス - HCl (pH7.5)、MgCl₂、BSA、DTT、ATP、dNTP、EDTA、グリセロール、感作された環状M13ssDNA、S. アウレウスSSB、PoIC、及び'、及び上昇する量のSTAAU_R2ポリペプチドを含むことができる。反応は37 で種々の時間インキュベートされ、次に急冷される。急冷された反応は、PicoGreen(商標)色素(Molecular Probes, Eugene, OR)を添加し、室温で5分間インキュベートし、そしてPicoGreen(商標)(λ_{EX} , 485nm; λ_{EM} , 525nm)の蛍光の強度を読み取ることによって、全DNA合成について分析される。色素の感度及びPicoGreen(商標)アッセイの均質性質は、非放射性定量アッセイ型においての急速なスクリーニングを可能にすべきである。

【手続補正 3 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 5 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 5 7】

組成物、キットと投与管理:

【手続補正 3 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 6 3

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 3 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 6 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 6 5】

多くの整形外科医は、人工関節を持つヒトは菌血症を引き起こすおそれのある歯科治療を行う前に、抗菌物質による予防が考慮されるべきだと考えている。重度の感染は深刻な合併症であり、時には人工関節を失うことになったり、著しい疾病率及び死亡率を伴う。従ってこのような状況の際、予防的抗菌物質の代わりにこの活性物質の使用にまで適用範囲を広げることができる。

【手続補正 3 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 6 6

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 3 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 6 7

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 38】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0268
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 39】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0269
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 40】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0270
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 41】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0271
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 42】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0272
【補正方法】削除
【補正の内容】

【手続補正 43】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0275
【補正方法】変更
【補正の内容】
【0275】

例 1 . バクテリオファージゲノムからの阻害性ORFのクローニング

本発明者は、バクテリオファージ44AHJD及びTwortから阻害性ORFを同定するために、これまでの発明の方法論（国際PCT出願W000/32825号）を使用した。スタフィロコッカス・アウレウス増殖株（PS44A）（Felix d' Herelle Reference Centre #HER1101, Ottawa, Canada）を、そのそれぞれのファージ44AHJD（Felix d' Herelle Reference Centre #HER101）を増殖するために宿主として使用した。Dr. H.-W. Ackermann（Quebec, Canada）（#HER1048）により維持されるFelix d' Herelle Reference Centre から得られたスタフィロコッカス増殖株（PS Twort）を、Felix d' Herelle Reference Centre（#HER48）からまた得られたファージTwortを増殖するための宿主として使用した。

【手続補正 44】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0279
【補正方法】変更
【補正の内容】

【 0 2 7 9 】

例 2. バクテリオファージ44HJD ORF25の標的となるスタフィロコッカス・アウレウス (S.aureus) タンパク質の同定

A. GST/ORF25組換えタンパク質の産生：

バクテリオファージ44HJD ORF25を、GST部分を含む発現ベクターpGEX (商標) 4T-1 (Pharmacia) にサブクローン化した。ORF25を、BamHI及びSalIによるT/44HJD ORF25の消化により得た。ORF25を含むDNAフラグメントをQiaQuick (商標) スピン・カラム (Qiagen) によってゲル精製し、pGEX (商標) 4T GST/ORF25を作成するために (事前にBamHIとSalIによって消化された) pGEX (商標) 4T-1に連結した。

【 手 続 補 正 4 5 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 2 8 0

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 2 8 0 】

組換え発現ベクターをミニプレップ法プラスミドの制限酵素解析によって同定した。大規模DNA調製を行い、そして得られる挿入体を配列決定した。発現プラスミドを含むE. コリBL21 (DE3) Gold細胞における試験発現を行い、最適なタンパク質発現条件を同定した。発現構造体を含むE. コリ細胞を、Luria - Bertaniブイオンにおいて25℃で0.4~0.6のOD₆₀₀まで増殖し、そして最適な時間及び最適な温度で、1mMのIPIGにより誘発した (典型的には、25℃で3時間、増殖されたBL21 (DE3) Gold (pGEX (商標) 4T/ORF25) の2Lの培養物)。

【 手 続 補 正 4 6 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 2 8 1

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 2 8 1 】

B. 融合タンパク質の精製：

GST/ORF25融合タンパク質を含む細胞を、1リットルの培養細胞に対して20 mlのGST溶解緩衝液 (20 mM Hepes pH 7.2、500 mM 塩化ナトリウム、10 % グリセロール、1 mM DTT、1mM EDTA、1mM benzamidin及び1 mM PMSF) の割合で懸濁し、フレンチプレスセルを用いてホモジナイズ後、4℃にて20秒3回超音波破砕機を用いてホモジナイズした。最終濃度0.1%になるようにTriton (商標) X-100を溶解液に加え、30分4℃で混合した。溶解液をSorval (商標) SS34ローターを用いて4℃、10,000回転、30分間遠心した。

【 手 続 補 正 4 7 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 2 8 2

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 2 8 2 】

上清液を、あらかじめ溶解緩衝液で平衡化した4 mlグルタチオン・セファロース・カラムに適用し、重力によって流出させた。カラムをカラム容量の10倍の溶解緩衝液で洗浄後、GST溶出緩衝液 (20 mM Hepes pH 8.0、500 mM 塩化ナトリウム、10 % グリセロール、1 mM DTT、0.1mM EDTA及び25 mM 還元グルタチオン) を用いて1.5 mlの分画に溶出した。この分画を12.5% SDS-PAGE (Laemmli) によって解析し、そしてタンパク質を、溶出せられたGST/ORF25タンパク質の量を評価するために、クマシー・ブリリアント・ブルー (商標) R250染色により可視化した。

【 手 続 補 正 4 8 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【補正対象項目名】 0 2 8 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 2 8 3 】

C. 親和性カラムの調製：

GST及びGST/ORF25融合タンパク質を、1 M 塩化ナトリウムを含むアフィニティ・クロマトグラフィ緩衝液 (ACB; 20 mM Hepes pH 7.5、10 % グリセロール、1 mM DTT、及び1 mM EDTA) にて一晚透析した。タンパク質濃度をBio-Rad (商標) タンパク質アッセイによって決定し、Affigel 10 resin (Bio-Rad) にタンパク質/レジン濃度0、0.1、0.5、1.0及び2.0 mg/mlで架橋結合させた。続けて、架橋結合させたレジンをカラムに充填する前にエタノールアミン、及びウシ血清アルブミン (BSA) と共にインキュベートし、100 mM 塩化ナトリウムを含むACBで平衡化した。

【手続補正 4 9】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 8 5

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 2 8 5 】

懸濁細胞をフレンチプレスセルに3回通過させ、続いて20秒間3回超音波破碎し、0.1% Triton (商標) X-100に調製して30分間攪拌後、Ti70 (商標) 角度固定Beckman (商標) ローターを用いて50,000回転で3時間遠心した。細胞の溶解効率は低く、結果として得られた溶解液 (7 ml) は2.4 mg/mlのタンパク質を含んでいた。フレンチプレスセル溶解後の細胞ペレットは、同じ緩衝液を用いモーターやベッスルと共に液体窒素中で極低温粉碎した。溶解液を0.1% Triton (商標) X-100になるように調整して30分間攪拌後、Ti70 (商標) 角度固定Beckman (商標) ローターを用いて50,000回転で3時間遠心し、2.0 mg/mlのタンパク質を含む溶解液 (10 ml) を得た。

【手続補正 5 0】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 8 6

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 2 8 6 】

細胞溶解液をプールし、8 mlに濃縮し、3000 Mr透析膜を用いて1 mM PMSF、1 mM benzamide 及び 75 mM 塩化ナトリウムを含むアフィニティ・クロマトグラフィ緩衝液中で一晚透析した。透析したタンパク質抽出液を透析チューブから取り出し、Sorval (商標) S S34 ローターを用いて10,000回転で1時間遠心し、タンパク質濃度 (Bio-Rad (商標) Protein Assayを用いた) 及び塩濃度 (導電率計を用いた) を調べた。

【手続補正 5 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 8 7

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 2 8 7 】

E. 親和性クロマトグラフィ：

親和性クロマトグラフィ処理を、0、0.1、0.5、1.0及び2.0 mg/mlのタンパク質/樹脂濃度で、Affigel (商標) 10にカップリングされたリガンドとしてGST及びGST ORF25を用いて行った。スタフィロコッカス・アウレウス抽出液を、4 で15分間、マイクロ遠心分離機により遠心分離し、そして0、0.1、0.5、1.0及び2.0 mg/mlのリガンドを含む20 µlカラムに適用した。100mMのNaCl (200 µl) を含むABCを、2.0mg/mlを含む対照カラムに適用した。カラムを100 mM 塩化ナトリウムを含むACB10カラム体積によりで洗浄し、続けて1% T

riton (商標) X-100及び100mM 塩化ナトリウム (800 μ l)を含むACB、1 M 塩化ナトリウム (800 μ l)を含むACB、及び1% SDS (160 μ l)により溶出した。各々の溶出液40 μ lを、12.5% SDS-PAGE (Laemmli)で分離し、銀染色によって溶出タンパク質を可視化した。

【手続補正52】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0288

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0288】

F. 44AHJD ORF25相互作用タンパク質としてのS. アウレウスDnaNの同定:

2種のS. アウレウス抽出物を、個々のリガンドを用いて親和性クロマトグラフィーのために使用した。別々に調製された、親和性クロマトグラフィーのために使用される2種の抽出物は、4.0及び9.0mg/mlのタンパク質を含んだ。48kDaの1つの候補体相互作用タンパク質 (PT48) を、初期クロマトグラフィー実験において1% SDS溶出液において観察した (図4)。その候補体タンパク質PT48を、SDS-PAGEゲルから切除し、そしてMALDI-ToF (商標) 質量分光計によるトリプシンペプチド質量決定のために調製した (Qin, J., Fenyó, d., Zhao, Y., Hall, W. W., Chao, D. M., Wilson, C. J., Young, R.A. and Chait, B. T. (1997) Anal. Chem. 69, 3995-4001)。

【手続補正53】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0289

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0289】

2種の親和性クロマトグラフィー実験において観察されるPT48タンパク質は、トリプシンペプチドの質量により決定される場合、同一であった。得られる質量スペクトルのコンピュータ分析 (<http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>) は、University of Oklahoma のS. アウレウスゲノムデータベース (<http://www.genome.ou.edu/staph.html>) におけるS. アウレウスヌクレオチド配列におけるその対応するORFを同定する。GST ORF25に対して特異的に結合するそのタンパク質の本体は、DNA-指図されたDNAポリメラーゼIII サブユニット (Genbank (商標) 受託番号1084187号) (図6) である。

【手続補正54】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0290

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0290】

バクテリオファージ44ADJH ORF25の相互作用パートナーとしてのS. アウレウスSTAAU_R2の同定は、精製された組換えポリペプチドを用いて、表面プラスモン共鳴 (Biacore 2000 (商標) Biosensor) により確認された。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GS) - 標識されたSTAAU_R2を、CM5センサーチップの表面に共有結合されている抗-GST抗体によりリガンドとして捕獲し; 抗-GST抗体を有し、そして捕獲されたりガンドを有さないブランク表面を負の対照として使用した。2種の表面上への精製された44ADJH ORF25タンパク質の注入は、固定されたSTAAU_R2による44ADJH ORFの特異的捕獲を示した。

【手続補正55】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0291

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0291】

例3 . バクテリオファージTwort ORF168により標的化されたS . アウレウスタンパク質の同定

A . GST/Twort ORF168組換えタンパク質の生成 :

バクテリオファージTwort ORF168を、pGEX (商標) 4T-1中にサブクローン化した。Twort ORF168を含むプラスミド (pTM) を、Qiagenカラム上で精製し、そしてHindIIIにより消化し、E . コリDNAポリメラーゼのクレノウフラグメントにより処理し、そしてBamHIにより消化した。前記ORFを含むDNA制限生成物を、QiAquick (商標) 回転カラム (Quagen) によりゲル精製し、そしてpGEX (商標) 4T-1発現ベクター (SalIにより消化、E . コリDNAポリメラーゼのクレノウフラグメントによる処理、及びBamHIによる消化、続いて、QiAquick (商標) 回転カラムによるゲノム精製により調製された) 中に連結した。

【手続補正56】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0292

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0292】

組換え発現ベクターを、プラスミドminiprepsの制限酵素分析により同定し、そして大規模DNA調製を、Qiagen (商標) DNA精製カラムにより行った。発現プラスミドを含むE . コリ細胞における試験発現を行い、最適なタンパク質発現条件 (BL21 (DE3) Gold細胞において発現される) を同定した。発現構造体を含むE . コリ細胞を、Luria - Bertaniブイヨンにおいて25℃で0.4~0.6のOD₆₀₀まで増殖し、そして最適な時間及び最適な温度で、1 mMのIPIGにより誘発した (15℃で16時間、2 LのGST ORF168) 。

【手続補正57】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0293

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0293】

B . 融合タンパク質の精製 :

GST ORF168融合タンパク質を含む細胞を、1 リットルの培養細胞に対して10 mlの溶解緩衝液の割合で懸濁し、そして4℃にて20秒3回超音波破碎機を用いて溶解した。溶解液をBeckman (商標) JA25.50ローターを用いて4、10,000回転、30分間遠心した。上清液を、あらかじめ溶解緩衝液で平衡化した4 mlグルタチオン・セファロース・カラムに適用し、重力によって流出させた。カラムをカラム容量の10倍の溶解緩衝液で洗浄し、そしてGST溶出緩衝液を用いて4 mlの分画に溶出した。この分画を15% SDS-PAGE (Laemmli) によって解析し、そしてタンパク質を、クマシー・ブリリアント・ブルー R250染色により可視化した。

【手続補正58】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0294

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0294】

C . 親和性カラムの調製 :

GST及びGST ORF168を、1 M 塩化ナトリウムを含むACBにてpH7 . 9で一晩透析した。タンパク質濃度をBio-Rad (商標) タンパク質アッセイによって決定し、Affigel (商標) 10 resin (Bio-Rad) にタンパク質/レジン濃度0、0.1、0.5、1.0及び2.0 mg/mlで架橋結合させた。架橋結合されたタンパク質を含むACBにより洗浄し、そして100 mM 塩化ナトリウムを含むACBで平衡化した。

【手続補正59】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0296

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0296】

ビーズを、Biorad Econo (商標) カラム (2.5 × 40cm) により溶解物から分離し、そしてビーズを1カラム体積の溶解緩衝液により洗浄した。流動物及び洗浄物をプールし、そしてBeckman (商標) JA25.50ローターにより20,000rpmで1時間、遠心分離した。上清液を除去し、そして100mMのNaCl, 1mMのベンズアミジン、10mMのMgSO₄、10mMのCaCl₂及び1mMのPMSFを含むABC (20mMのHepes, pH7.5, 10%のグリセロール、1mMのDTT、及び1mMのEDTA) に対して10.000Mr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、透析管から除去し、そして-70℃で、1mlのアリコートにより凍結した。

【手続補正60】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0297

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0297】

E. 親和性クロマトグラフィー:

親和性クロマトグラフィーを、0, 0.1, 0.5, 1.0及び2.0mg/mlのタンパク質/樹脂濃度で、Affigel (商標) 10にカップリングされるリガンドとして、GST及びGST ORF168を用いて行った。S. アウレウス抽出物を、マイクロ遠心分離機において4℃で15分間、遠心分離し、そして100mMのNaClを含むACBにより5mg/mlに希釈した。200µlの抽出物を、0, 0.1, 0.5, 1.0及び2.0mg/mlのリガンドを含む40µlのカラムに適用し、そして100mMのNaClを含むACB (200µl) を、2.0mg/mlのリガンドを含む追加のカラムに適用した。カラムを、100mMのNaClを含むACB (2 × 100µl)、0.1%のTriton (商標) X-100を含むACB及び100mMのNaCl (200µl) により2度洗浄し、そして1MのNaCl (100µl) 及び1% SDS (100µl) を含むACBにより連続的に希釈した。それぞれ65µlの溶出液を、16cmの14% SDS - PAGE (Laemmli) により分解し、そしてタンパク質を銀染色により可視化した。

【手続補正61】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0299

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0299】

高品質の質量スペクトルが得られた (図8)。親和性クロマトグラフィー実験において観察されるPT50タンパク質は、トリプシンペプチドの質量により決定される場合、同一であった。GST ORF168に対して得意的に結合するそのタンパク質の本体は、DNA - 指図されたDNAポリメラーゼIII サブユニット (Genbank (商標) 受託番号1084187号) (図9) である。

【手続補正62】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0301

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0301】

A. イースト・ツー・ハイブリッド分析のためのTwort ORF168及びSTAAU_R2組換えポリペプチドの生成:

バクテリオファージTwort ORF168を、酵母Gal4 DNA結合ドメイン (Clontech LaboratoriesからのpGBKT7 (商標) ベクターにコードされる) のカルボキシル末端、又は酵母Gal4

活性化ドメイン (Clontech LaboratoriesからのpGADT7 (商標) ベクターにコードされる) のいずれかに融合した。図10Bに示されるように、センス鎖プライマー (配列番号11; 5' - ccggaattcATGTTATTTTTTAAAGAAAAG - 3') の先にEcoRI制限部位が存在し; アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号12; 5' - cgcgatcccTCATCGAACTATATCCTTAAT - 3') は停止コドンを標的化し、そしてその先に、BamHI制限部位が存在する。

【手続補正63】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0302

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0302】

PCR生成物を、Qiagen (商標) PCR精製キットを用いて精製し、そしてEcoRI及びBamHIにより消化した。消化されたPCR生成物を、EcoRI - 及びBamHI - 消化された、pGBKT7ベクターに連結し、pGBKSTAAU_R2を生成した。類似する手段が、pGADT7ベクター中にSTAAU_R2をクローニングし、pGADSTAAU_R2を生成するために使用された。

【手続補正64】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0304

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0304】

図10Aに示されるように、センス鎖プライマー (配列番号15; 5' - GGGAATTCATATGATGATGATGGAATTCACTATTTAAA - 3') は、開始コドンを標的化し、そしてこの先に、NdeI制限部位が存在し; アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号16; 5' - CGCGGATCCTTAGTAAGTTCTGATTGG - 3') は、停止コドンを標的化し、そしてこの先に、BamHI制限部位が存在する。PCR生成物を、Qiagen (商標) PCR生成キットを用いて精製し、そしてNdeI及びBamHIにより消化した。消化されたPCR生成物を、NdeI - 及びBamHI - 消化されたpGADT7 (商標) ベクター (Clontech Laboratories) に連結し、pGADSTAAU_R2を生成した。類似する手段を用いて、pGBKT7 (商標) ベクター (Clontech Laboratories) 中にSTAAU_R2をクローニングし、pGBKSTAAU_R2を生成した。

【手続補正65】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0309

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0309】

G1 ORF240をpGEX4T-1中にクローニングし、そしてそのポリペプチドを上記のようにして精製した。親和性クロマトグラフィー処理を、0, 0.1, 0.5, 1.0及び2.0mg/mlのタンパク質/樹脂濃度でAffigel (商標) 10にカップリングされるリガンドとしてGST及びGST ORF240を用いて行った。S. アウレウス抽出物をカラムに適用し、そして100mMのNaClを含むACBを、20mg/mlのリガンドを含む追加のカラムに適用した。カラムを洗浄し、そして1MのNaCl及び1% SDSを含むACBにより連続的に溶出した。個々の溶出物画分を、14% SDS - PAGEにより分解し、そしてタンパク質を銀染色により可視化した。

1つの候補体相互作用タンパク質が、ORF240と特異的に相互作用することが観察され、そしてSTAAU_R2に対応することが示された (結果は示されていない)。

【手続補正66】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、S. アウレウス STAAU_R2 のヌクレオチド（配列番号 1）及びアミノ酸（配列番号 2）配列を示す。

【図 2】

図 2 は、S. アウレウス バクテリオファージ 44AHJD ORF25、Twort ORF168、Twort ORF168 に由来する 36 個のアミノ酸フラグメント、及び G1 ORF240 のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。

【図 3】

図 3 は、バクテリオファージ 44AHJD ORF25、又は Twort ORF168 の細菌阻害能力、及び S. アウレウス におけるそれらの発現を誘発するために使用される発現ベクターを示す。A) S. アウレウス 細胞における 44AHJD ORF25、又は Twort ORF168 の発現を誘発するために使用される亜硫酸塩 - 誘発性発現ベクター（例えば、pT/ORF 及び pTM/ORF のための）の図；B) 液体培地において増殖され、続いてプラスミドに対する選択的圧力を維持するために必要な抗生物質（30 µg/ml のカナマイシン）を含むか又は含まない半固体培地上にプレートすることにより増殖された S. アウレウス において発現される場合、44AHJD ORF25 又は Twort ORF168 の阻害能力についてのアッセイの結果。

【図 4】

図 4 は、French 圧力細胞溶解及び音波処理により調製された S. アウレウス 抽出物と共にリガンドとして GST 及び GST/44AHJD ORF25 を用いての親和性クロマトグラフィーからの結果を示す。1ml 樹脂当たり 0, 0.1, 0.5, 1.0 及び 2.0mg の GST 及び GST/ORF25 リガンドを含む親和性カラムの溶出液を、SDS - 12.5% PAGE により分解した。タンパク質を銀染色により可視化した。マイクロカラムを、0.1% の Triton（商標）X-100 を含む 100mM の ACB、1M の NaCl を含む ACB、及び 1% SDS（SDS - PAGE は単に 1% SDS を示す）により連続的に溶出した。個々の分子量マーカーは約 100ng である。ACB にラベルされたレーンは、75mM の NaCl を含む ACB 緩衝液によってのみ充填された 2.0mg/ml リガンドカラムからの溶出液を示す。PT48 を示す矢印は、44AHJD ORF25 と特異的に相互作用するタンパク質を示す。PT48 に対応するバンドが、タンパク質同定のために切除された。

【図 5】

図 5 は、44AHJD ORF25 と相互作用し、そして 1% SDS により溶出された PT48 タンパク質のトリプシンペプチド質量スペクトルの結果を示す。48kDa の領域から切除された対照バンド（図 4 において PT48C と命名された）は、PT48 を含まなかった。

【図 6】

図 6 は、Genbank（商標）データベースからの S. アウレウス DNA - 指図された DNA ポリメラーゼ III サブユニットタンパク質（受託番号：G1: 15922992）としての PT48（本明細書においては、STAAU_R2）の同定を示す。

【図 7】

図 7 は、5.0mg/ml の S. アウレウス 抽出物と共に、リガンドとしての GST/Twort ORF168 (A) 又は GST (B) を用いての親和性クロマトグラフィーを示す。1ml の樹脂あたり 0, 0.1, 0.5, 1.0 及び 2.0mg のリガンドを含む親和性カラムからの溶出液を、14% SDS - PAGE により分解し、そしてゲルを硝酸銀により染色した。マイクロカラムを、0.1% Triton（商標）X-100 を含む 100mM の ACB（SDS - PAGE は示されていない）、1M の NaCl を含む ACB 及び 1% SDS により連続的に溶出した。個々の分子量マーカーは約 200ng である。ACB にラベルされたレーンは、100mM の NaCl を含む ACB 緩衝液によってのみ充填された 2.0mg/ml リガンドカラムからの溶出液を示す。PT50 を示す矢印は、Twort ORF168 と特異的に相互作用するタンパク質を示す。PT50 に対応するバンドが、タンパク質同定のために切除された。

【図 8】

図 8 は、Twort ORF168 と相互作用する PT50 タンパク質のトリプシンペプチド質量スペクトル分析を示す。PT50 を含むゲルスライスには 1 種のタンパク質を含んだ。

【図 9】

図9は、Genbank(商標)データベースからの*S. アウレウス* DNA - 指図されたDNAポリメラーゼIII サブユニットタンパク質(受託番号: G1: 15922992)としてのPT50(本明細書においては、STAAU_R2)の同定を示す。

【図10】

図10は、A) 酵素発現ベクター-pGADT7(商標)における*S. アウレウス* STAAU_R2のクローニング方法(pGADSTAAU_R2); B) 酵母発現ベクター-pGBKT7(商標)におけるファージTwort ORF168のクローニング方法(pGBK Twort ORF168); 及びC) GADSTAAU_R2(上部パネル)、Twort ORF168(中間パネル)又はGADSTAAU_R2及びTwort ORF168(下部パネル)の両者のいずれかを発現する3種の様式化された細胞におけるイースト・ツー・ハイブリッド・システムの代表図を示す。

【図11】

図11は、配列番号2のアミノ酸を含んで成る*S. アウレウス* STAAU_R2及びTwort ORF168の相互作用を試験するために企画されたイースト・ツー・ハイブリッド分析の結果を示す。A) 及びB) 酵母を、ペトリ皿の個々の対の写真上に示されるように1対のベクターにより同時形質転換した。同時形質転換体を、トリプトファン及びロイシンを欠くアミノ酸(THALマイナス)により補充された酵母合成培地(SD)上に、及びトリプトファン、ヒスチジン、アデニン及びロイシンを欠いているアミノ酸(THALマイナス)により補充されたSD上に同時にプレートした。Twort ORF168ポリペプチドを有する同時形質転換体は、STAAU_R2の存在下で、選択的THALマイナス培地上で増殖した(ペトリ皿の上部対)。非相互作用タンパク質を有する対照ベクター(pGBKLaminC又はpGADT7-T(商標))によるそれらのポリペプチドの同時形質転換は、THALマイナス培地上での増殖をもたらさない。C) 示される同時形質転換からのタンパク質抽出物による発光 - ガラクトシダーゼ酵素アッセイの結果。

【図12】

図12は、Twort ORF168(配列番号6)、及びTwort ORF168(配列番号8)とG1 ORF240(配列番号10)とのSTAAU_R2相互作用ドメインの最適な全体的及び局部アラインメントを示す。