

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 510025

(P2003 - 510025A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	H 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		45/00	4 B 0 2 4
39/00		A 6 1 P 31/00	4 B 0 5 0
45/00		C 0 7 K 16/40	4 B 0 6 3
A 6 1 P 31/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 60数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 515711(P2001 - 515711)

(86)(22)出願日 平成12年8月3日(2000.8.3)

(85)翻訳文提出日 平成13年4月4日(2001.4.4)

(86)国際出願番号 PCT/US00/21165

(87)国際公開番号 W001/010904

(87)国際公開日 平成13年2月15日(2001.2.15)

(31)優先権主張番号 09/370,397

(32)優先日 平成11年8月6日(1999.8.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , J P

(71)出願人 スミスクライン・ビーチャム・コーポレイション

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406 - 0939、キング・オブ・プルシア、スウェードランド・ロード709番

(72)発明者 レスリー・エム・パーマー

アメリカ合衆国19403ペンシルベニア州オーデュボン、イーグルビル・ロード2820番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 M A P

(57)【要約】

本発明は、m a pポリペプチドおよびm a pポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびに組換え技法によりかかるポリペプチドを産生する方法を提供する。さらに、抗菌化合物をスクリーニングするのにm a pポリペプチドを利用する方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド；

(ii) 配列番号2のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド；

(iii) 配列番号2のアミノ酸配列である単離ポリペプチド；および

(iv) 配列番号1のポリヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド

からなる群より選択される単離ポリペプチド。

【請求項2】

(i) 配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(ii) 配列番号2のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(iii) 配列番号1の全長にわたって配列番号1のヌクレオチド配列に対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(iv) 配列番号2のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(v) 配列番号1のポリヌクレオチドである単離ポリヌクレオチド；

(vi) 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の配列または長さが少なくとも30のヌクレオチドのそのフラグメントの配列を有する標識プローブを用いて適当なライブラリーをスクリーニングすることにより得ることのできる長さが少なくとも30のヌクレオチドの単離ポリヌクレオチド；

(vii) スタフィロコッカス・アウレウス中に含まれるmap遺伝子により発現される成熟ポリペプチドをコードしている単離ポリヌクレオチド；および

(viii) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)ま

たは(v i i)の該単離ポリヌクレオチドに対して相捕的なポリヌクレオチド配列

からなる群より選択される単離ポリヌクレオチド。

【請求項3】 個体の治療方法であって、

(i) 請求項1のポリペプチドに対する治療上有効量のアゴニストを個体に投与することを含む、請求項1のポリペプチドの活性または発現あるいはその免疫学的応答の促進を必要とする個体の治療方法；あるいは

(i i) (a) 請求項1のポリペプチドに対する治療上有効量のアンタゴニストを個体に投与すること；

(b) 請求項1のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列の発現を阻害する核酸分子を個体に投与すること；

(c) リガンド、基質、または受容体を求めて請求項1のポリペプチドと競争する治療上有効量のポリペプチドを個体に投与すること；または

(d) 個体中にて請求項1のポリペプチドに対する免疫学的応答を誘発する量のポリペプチドを個体に投与することを含む、請求項1のポリペプチドの活性または発現の阻害を必要とする個体の治療方法。

【請求項4】 個体における請求項1のポリペプチドの発現または活性に関連した、個体における疾病または疾病に対する感受性の診断または予後の方法であって、下記工程：

(a) 該個体の生物中の該ポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列における変異の存在または不存在を決定すること；または

(b) 該個体由来の試料中の該ポリペプチドの発現の存在または量を分析することを含む方法。

【請求項5】

(i) 配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド；

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、または
 (i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列である単離ポリペプチド；および
 (i v) 配列番号 1 のポリヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチドに
 よりコードされるポリペプチド
 からなる群より選択されるポリペプチドの製造方法であって、ポリペプチドの生
 成に十分な条件下で宿主細胞を培養することを含む方法。

【請求項 6】

(i) 配列番号 2 の全長にわたって配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なく
 とも 95% の同一性を有する群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプ
 チド；

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド；

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列である単離ポリペプチド；および

(i v) 配列番号 1 のポリヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチドに
 よりコードされるポリペプチド
 からなる群より選択されるポリペプチドを発現する発現系を含む宿主細胞または
 その膜の製造方法であって、適合宿主中に存在する場合に上記ポリペプチド (i
)、(i i)、(i i i) または (i v) を生成可能なポリヌクレオチドを含む
 発現系で細胞を形質転換またはトランスフェクションして、適当な培養条件下で
 宿主細胞が上記ポリペプチド (i)、(i i)、(i i i) または (i v) を生
 成するようにすることを含む方法。

【請求項 7】

(i) 配列番号 2 の全長にわたって配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なく
 とも 95% の同一性を有する群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプ
 チド；

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、または

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列である単離ポリペプチド；および

(i v) 配列番号 1 のポリヌクレオチド配列を含む組み換えポリヌクレオチド
 によりコードされるポリペプチド
 からなる群より選択されるポリペプチドを発現する、宿主細胞またはその膜。

【請求項8】 請求項1のポリペプチドに対して免疫特異的な抗体。

【請求項9】 請求項1のポリペプチドの機能を活性化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であって、

(a) 候補化合物に直接または間接的に結合した標識を用い、候補化合物の、ポリペプチド(またはポリペプチドを有する細胞もしくは膜)またはその融合蛋白への結合を測定すること；

(b) 標識競争物質の存在下で、候補化合物の、ポリペプチド(またはポリペプチドを有する細胞もしくは膜)またはその融合蛋白への結合を測定すること；

(c) ポリペプチドを有する細胞もしくは細胞膜に適する検出系を用いて、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害により発生するシグナルを生じさせるかどうかを試験すること；

(d) 候補化合物と、請求項1のポリペプチドを含む溶液とを混合して混合物を作成し、混合物中のポリペプチドの活性を測定し、次いで、混合物の活性を標準と比較すること；

(e) 例えば、ELISAアッセイを用いて細胞中で該ポリペプチドをコードしているmRNAおよび該ポリペプチドの生成に対する候補化合物の影響を検出すること、

からなる群から選択される方法を含む方法。

【請求項10】 請求項1のポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニスト。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、新規に同定されたポリヌクレオチドおよびポリペプチド、その製造および使用、ならびにその変種、アゴニストおよびアンタゴニスト、ならびにその使用に関する。特に、本発明は、メチオニンアミノペプチダーゼファミリーのポリヌクレオチドおよびポリペプチドならびにそれらの変種（本明細書中、「map」、「mapポリヌクレオチド」、および場合により「mapポリペプチド」という）に関する。

【0002】**(背景技術)**

抗生物質の開発に用いる標的としてスタフィロコッカス属の遺伝子および遺伝子生成物を使用することが好ましい。スタフィロコッカス属は医学的に重要な微生物属を形成している。それらは、2つの型の疾患、侵入性および毒素生産性の疾患を引き起こすことが知られている。侵入感染は、一般に、皮膚表面および深部組織に影響する膿瘍形成により特徴付けられている。癌患者において、エス・アウレウスは、菌血症の2番目に主要な病因である。骨髄炎、敗血性関節炎、敗血性静脈炎および急性細菌性心内膜炎もまた比較的一般的である。スタフィロコッカス属の毒素生産の特性による臨床的症狀は、少なくとも3つの症狀がある。かかる疾患は、組織感染性および菌血症に対抗する外毒素の作用に発現する。かかる症狀は、スタフィロコッカス属による食中毒、熱傷様皮膚症候群および毒素ショック症候群を包含する。

【0003】

スタフィロコッカス・アウレウス感染の頻度は過去20～30年間に劇的に上昇している。これは多重抗生物質耐性株の出現、および免疫系が低下した人口の増加に起因している。いくつかのまたはすべての標準的な抗生物質に対して耐性を有するスタフィロコッカス・アウレウス株を単離することはもはやめずらしいことではない。この現象により、この生物に対する新しい抗菌剤、ワクチン、薬物スクリーニング方法および診断試験に関して不適當な医薬上の要求があり、か

つ需要を形成している。

【0004】

そのうえ、薬剤の発見方法は、現在のところ、「機能的遺伝学」、すなわち、ハイスループットゲノムまたは遺伝子に基づく生物学を包含するため抜本的な改革を受けている。この方法は、「位置的クローニング」に基づく初期のアプローチおよび他の方法に取って代わりつつある。機能的遺伝学は、現在利用可能な多くの分子生物学的データベースならびに他のソースから問題となる可能性のある遺伝子配列を同定するための種々の生物学的情報的手段に大きく依存している。未だ、薬剤の発見の標的としての、さらなる遺伝子および他のポリヌクレオチド配列ならびにそれらの関連ポリペプチドの同定および特徴づけをする必要がある。

【0005】

とりわけ、化合物を抗微生物活性についてスクリーニングするのに有用であるという利点を有する、本発明のmap具体例のごときポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対する要望があることは明白である。かかる因子はまた、感染、機能不全および疾患の発生病理における役割を決定するのに有用である。感染、機能不全および疾患を予防、改善または治癒するための方法を見出すために、かかる因子ならびにそのアンタゴニストおよびアゴニストを同定および特徴づけする必要もある。

【0006】

(発明の開示)

本発明は、map、詳細にはmapポリペプチドおよびmapポリヌクレオチド、組み換え物質ならびにそれらの製造方法に関する。もう1つの態様において、本発明は、かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用方法に関し、とりわけ、微生物による疾病の治療を包含する。さらなる態様において、本発明は、本発明により提供される材料を用いるアゴニストおよびアンタゴニストの同定方法、ならびに同定されたアゴニストまたはアンタゴニスト化合物を用いる微生物による感染およびかかる感染に関連した症状の治療方法に関する。さらなる態様において、本発明は、微生物による感染およびかかる感染に関連した症状の検

出のための診断アッセイ、例えば、map発現または活性の検出のためのアッセイに関する。

開示された本発明の精神および範囲内での種々の変更および修飾は、以下の説明を読み、本開示の他の部分を読めば、当業者に容易に明らかになるであろう。

【0007】

(発明を実施するための最良の形態)

以下により詳細に説明するように、本発明は、mapポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。詳細には、本発明は、mapポリペプチドに対するアミノ酸配列相同性により関連づけられる、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) のmapのポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。特に、本発明は、それぞれ配列番号1および配列番号2として表1に示されるヌクレオチドおよびアミノ酸配列を有するmapに関する。「DNA」として以下の配列表に示す配列は、当業者であればかかる配列を、リボヌクレオチドを含む、一般のポリヌクレオチドに有効に用いることができると認識されるため、それを例示として示す。

【0008】

表1

mapポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列

(A) スタフィロコッカス・アウレウスのmapポリヌクレオチド配列 [配列番号1]

```
5'-ATGATTGTAAAAACAGAAGAATTACAAGCGTTAAAGAAATTGGATACATATGCGCTAAAGTGCGC
AATACAATGCA
AGCTGCAACCAAACCAGGTATCACTACGAAAGAGCTTGATAATATTGCGAAAGAGTTATTTGAAGAATACGG
TGCTATTT
CTGCGCCAATTCATGATGAAAATTTTCTGGTCAAACGTGTATTAGTGTCAATGAAGAGGTGGCACATGGGA
TTCCAAGT
AAGCGTGCATTCGTGAAGGAGATTTAGTAAATATTGATGTATCGGCTTTGAAGAATGGCTATTATGCAGAT
ACAGGCAT
TTCATTTGTCGTTGGAGAATCAGATGATCCAATGAAACAAAAAGTATGTGACGTAGCAACGATGGCATTGGA
```

GAATGCAA
 TTGCAAAAGTAAAACCGGGTACTAAGTTAAGTAACATTGGTAAAGCGGTGCATAATACAGCTAGACAAAATG
 ATTTGAAA
 GTCATTA AAAACTTAACAGGTCATGGTGTGGTTTATCATTACATGAAGCACCAGCACATGTACTTAATTAC
 TTTGATCC
 AAAAGACAAAACATTATTA ACTGAAGGTATGGTATTAGCTATTGAACCGTTTATCTCATCAAATGCATCATT
 TGTTACAG
 AAGGTAAAAATGAATGGGCTTTTGA AACGAGCGATAAAAGTTTTGTTGCTCAAATTGAGCATACGGTTATCG
 TGAATAAG
 GATGGTCCGATTTTAACGACAAAAATTGAAGAAGAATAG-3'

【0009】

(B) この表のポリヌクレオチド配列より推定されるスタフィロコッカス・アウ
 レウスのm a p ポリペプチド配列 [配列番号 2]

NH₂-MIVKTEEELQALKEIGYICAKVRNTMQAATKPGITTKELDNI AKELFEEYGAISAPI HDENFPGQTCI
 SVNEEVAHGIPS
 KRVIREGLVNI DVSA LKNGYYADTGISFVVGESDDPMKQKVC DVATMAFENAI AKVKPGTKLSNIGKAVHN
 TARQNDLK
 VIKNLTGHGVGLSLHEAPAVLNYFDPKDKTLLTEGMVLAIEPFI SSNASFVTEGKNEWAFETSDKSFVAQI
 EHTVIVTK
 DGPILTTKIEEE-COOH

【0010】

寄託材料

スタフィロコッカス・アウレウスWCUH29株を含む寄託株を、1995年
 9月11日に、スコットランド、AB21RY、アバディーン、マチャードラ
 イブ23St.のナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・
 マリーン・バクテリア・リミテッド(本明細書にて「NCIMB」という)に、
 NCIMB受託番号40771の下で寄託し、スタフィロコッカス・アウレウス
 WCUH29と命名された。スタフィロコッカス・アウレウス寄託株を、本明細
 書では「寄託株」または「寄託株のDNA」と称する。

【0011】

寄託株は全長のm a p遺伝子を含んでいる。寄託株に含まれるポリヌクレオチドの配列ならびにそれによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書における配列の記載とのいずれの不一致においても支配的である。

寄託株の寄託は、特許手続き上の微生物寄託の国際承認に関するブタペスト条約の条件下で行われている。特許が発行されると何ら制限または条件もなく、最終的に寄託株は分譲される。寄託株は当業者の便宜のためにのみ提供され、35 U.S.C. 112条の下に要求されるような、寄託が実施可能要件であることを承認するものではない。寄託株、それに由来の化合物を製造、使用または販売するには、ライセンスが必要であるが、そのようなライセンスはここで付与されるものではない。

【0012】

本発明の一の態様は、寄託株に含まれるスタフィロコッカス・アウレウスW C U H 2 9株により発現可能な成熟ポリペプチドをコードする単離核酸分子を提供することである。さらには、本発明は寄託株中のDNAおよびRNAのm a pポリヌクレオチド配列およびそれによりコードされるアミノ酸配列を提供する。また、本発明は寄託株より単離されたm a pポリペプチド配列およびそれに由来のポリヌクレオチド配列を提供する。

【0013】

ポリペプチド

実質的に本発明のm a pポリペプチドは系統発生論的に他のメチオニンアミノペプチドファミリーの蛋白に関連している。

本発明の一の態様において、スタフィロコッカス・アウレウスのポリペプチド（本明細書ではm a pおよびm a pポリペプチドという）、ならびに生物学的、診断上、予防上、臨床的または治療上有用なその変種、ならびにそれを含む組成物が提供される。

本発明のとりわけ好ましい具体例は、m a p遺伝子の自然発生対立遺伝子によりコードされるm a pポリペプチドの変種である。

【0014】

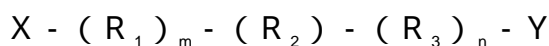
さらに本発明は：(a) 配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかまたは全く同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれよりなるポリペプチド；(b) 配列番号1の全長にわたって配列番号1に対して少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかまたは全く同一であるポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれよりなる単離ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド；(c) 配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかまたは全く同一であるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれよりなる単離ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、である単離ポリペプチドを提供する。

【0015】

本発明のポリペプチドは、表1 [配列番号2] のポリペプチド（とりわけ成熟ポリペプチド）ならびにポリペプチドおよびフラグメント、詳細には、mapの生物活性を有し、表1 [配列番号2] のポリペプチドと少なくとも95%の同一性を有するものを包含し、さらにかかるポリペプチドの部分も包含し、一般に、ポリペプチドのかかる部分は少なくとも30個のアミノ酸、より好ましくは、少なくとも50個のアミノ酸を含む。

【0016】

本発明はまた、



[式中、アミノ末端のXは水素または金属、または本明細書において修飾ポリペプチドについて説明された他の残基であり、カルボキシル末端のYは水素または金属、または本明細書において修飾ポリペプチドについて説明された他の残基であり、 R_1 および R_3 はいずれかのアミノ酸残基または修飾アミノ酸残基であり、 m は1~1000の整数または0であり、 n は1~1000の整数または0であり、 R_2 は本発明のアミノ酸配列、特に表1のアミノ酸配列またはそれらの修飾形態を意味する]

で示されるポリペプチドを包含する。上記の式中、 R_2 はアミノ末端残基がその左側で R_1 に結合し、そのカルボキシ末端残基がその右側で R_3 に結合するように方向づけられる。 m および/または n が1より大きい場合、 R_1 または R_3 のいずれかで表されるアミノ酸残基の鎖は、ヘテロポリマーまたはホモポリマーのいずれであってもよく、ヘテロポリマーが好ましい。本発明の他の好ましい具体例は、 m が1ないし50、100または500の間の整数であり、 n が1ないし50、100または500の間の整数のものである。

本発明のポリペプチドがスタフィロコッカス・アウレウス由来のものであるのが最も好ましいが、同じ分類学上の属の他の生物由来のものであっても好ましい。また本発明のポリペプチドは、例えば、同じ科または目から得られるものであってもよい。

【0017】

フラグメントは、その全体が上記したポリペプチドのアミノ酸配列の全部ではないが、一部と同じであるアミノ酸配列を有する変種ポリペプチドである。 m a p ポリペプチドと同様、フラグメントは「独立している (free-standing)」であるか、またはそれらが一部の部分または領域、最も好ましくは単一の連続した領域、単一のより大きなポリペプチドを形成するより大きなポリペプチドの中に含まれていてもよい。

好ましいフラグメントは、例えば、表1 [配列番号2] のアミノ酸配列または、アミノ - および/またはカルボキシル - 末端アミノ酸配列を含む連続した一連の残基のような、その変種の一部を有する末端切断ポリペプチドを包含する。宿主細胞、特に、スタフィロコッカス・アウレウスにより、またはそこにおいて産生される本発明のポリペプチドの分解型も好ましい。さらに、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、ベータシートおよびベータシート形成領域、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、親水領域、疎水領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、フレキシブル領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含むフラグメントのような、構造的または機能的属性によって特徴づけられるフラグメントもまた好ましいフラグメントである。

【0018】

さらに好ましいフラグメントは、配列番号2のアミノ酸配列由来の少なくとも15、20、30、40、50または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、あるいは配列番号2のアミノ酸配列由来の末端切断または欠失された少なくとも15、20、30、40、50または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを包含する。

本発明のポリペプチドのフラグメントである変種は、ペプチド合成法により対応する全長のポリペプチドの製造に使用することができる。したがって、これらの変種は、本発明の全長ポリペプチドを製造するための中間体として使用できる。

【0019】

ポリヌクレオチド

m a pポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、詳細には、本明細書でm a pと命名されるポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを提供することが本発明の一の目的である。

本発明の特に好ましい具体例において、ポリヌクレオチドは、全長の遺伝子を含む、表1[配列番号1]に示す配列を含むm a pポリペプチド、またはその変種をコードしている領域を含む。本発明は、この全長の遺伝子は当該ポリペプチドを有する生物（例えば、スタフィロコッカス・アウレウス）の増殖および/または生存に必須であることを提供する。

【0020】

本発明のさらなる態様として、m a pポリペプチドおよびポリヌクレオチド、詳細には、スタフィロコッカス・アウレウスのm a pポリペプチドおよびポリヌクレオチドをコードおよび/または発現する単離核酸分子が提供され、核酸分子としては、例えば、未プロセッシングRNA、リボザイムRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、B-およびZ-DNAが挙げられる。本発明のさらなる具体例は、生物学的、診断上、予防上、臨床的または治療上有用なポリヌクレオチドおよびポリペプチド、ならびにその変種、ならびにそれらを含む組成物を包

含する。

本発明のもう一つの態様は、表1 [配列番号2] の推定アミノ酸配列を有するmapポリペプチドをコードする、少なくとも1つの全長遺伝子を含む、単離ポリヌクレオチド、それに密接に関連するポリヌクレオチドおよびそれらの変種に関する。

もう一つの特に好ましい本発明具体例において、表1 [配列番号2] のアミノ酸配列を含むかまたはそれよりなる、スタフィロコッカス・アウレウス由来のmapポリペプチドまたはその変種が提供される。

【0021】

表1 [配列番号1] に示すポリヌクレオチド配列のような本明細書の情報を使用し、出発材料としてスタフィロコッカス・アウレウスWCUH29細胞を使用し、細菌からの染色体DNAフラグメントをクローニングし、配列決定し、つづいて全長クローンを得る標準的クローニングおよびスクリーニング法を使用して、mapポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。例えば、表1 [配列番号1] に示す配列のような本発明のポリヌクレオチド配列を得るには、典型的には、エシェリシア・コリまたは他の適当な宿主中のスタフィロコッカス・アウレウスWCUH29の染色体DNAのクローンのライブラリーを、部分配列から由来する放射標識したオリゴヌクレオチド、好ましくは17量体またはそれより長いオリゴヌクレオチドでプローブする。ついで、該プローブと同じDNAを有するクローンをストリンジентなハイブリダイゼーション条件を使用して区別できる。該オリジナルポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列から設計された配列決定プライマーとハイブリダイゼーションすることで同定された個々のクローンを配列決定することにより、そのポリヌクレオチド配列を両方の方向に伸長し、全長遺伝子配列を決定することが可能である。都合よくは、プラスミド・クローンから調製された変性二本鎖DNAを用いてかかる配列決定を行う。適当な技法は、Maniatis, T., Fritsch, E.F. および Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) (特に、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング1.90および変性二本鎖DNA鋳型の配

列決定13.70を参照のこと)により記載されている。直接ゲノムDNA配列決定を行って全長の遺伝子配列を得てもよい。例えば、表1[配列番号1]に示すポリヌクレオチドは、スタフィロコッカス・アウレウスWCUH29から由来するDNAライブラリー中に見いだされたものである。

【0022】

そのうえ、表1[配列番号1]のDNA配列は、表1[配列番号2]に示すのとはほぼ同数のアミノ酸残基を有し、当業者に周知のアミノ酸残基の分子量から計算できる推定分子量を有する蛋白をコードするオープンリーディングフレームを有する。配列番号1のヌクレオチド番号1と、ヌクレオチド番号757で始まる停止コドンとの間の配列番号1のポリヌクレオチドが、配列番号2のポリペプチドをコードする。

【0023】

さらなる態様において、本発明は、下記のポリヌクレオチドを含むかまたはそれらよりなる単離ポリヌクレオチドを提供する：(a)配列番号1の全長または配列番号2をコードする配列番号1の蛋白の全長にわたって配列番号1に対して少なくとも95%の同一性、より好ましくは少なくとも97-99%の同一性を有するかまたは全く同一であるポリヌクレオチド配列(b)配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも97-99%またはちょうど100%の同一性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列。

【0024】

本発明のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド(スタフィロコッカス・アウレウス以外の種由来のホモログおよびオーソログを包含)を、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件において、配列番号1の配列またはそれらのフラグメントを含むかまたはそれらよりなる標識または検出可能プローブを用いて適当なライブラリーをスクリーニングし、次いで、該ポリヌクレオチド配列を含む全長遺伝子および/またはゲノムクローンを単離する工程を含む方法により得てもよい。

【0025】

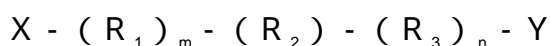
本発明は、表1 [配列番号1] のコーディング配列 (オープンリーディングフレーム) と、その全長にわたって同一であるポリヌクレオチド配列を提供する。また、本発明は、成熟ポリペプチドまたはそのフラグメント用のコーディング配列自体ならびにリーダーまたは分泌配列、プレ、プロまたはプレプロ蛋白配列をコードするコーディング配列のような他のコーディング配列を有するリーディング・フレーム中の成熟ポリペプチドまたはフラグメントのコーディング配列を提供する。ポリヌクレオチドはまた、例えば、転写されるが翻訳されない配列、終止シグナル (例えば、*r h o* - 依存のおよび *r h o* - 非依存終止シグナル)、リボソーム結合部位、Kozak配列、mRNAを安定化する配列、イントロン、ポリアデニル化シグナルのごとき少なくとも1つの非コーディング5' および3' 配列を包含する非コーディング配列を含むが、これらに限定するものではない。また、ポリヌクレオチド配列はさらなるアミノ酸をコードしているさらなるコーディング配列を含んでいてもよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を促進するマーカー配列をコードすることができる。本発明のある種の具体例において、マーカー配列は、pQEベクター (Qiagen, Inc.) において提供され、Gentzら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86 : 821 - 824に記載されるような、ヘキサ - ヒスチジンペプチドであるか、またはHAペプチドタグ (Wilsonら、*Cell*, 37 : 767 (1984)) であり、ともにそれらに融合したポリペプチド配列の精製において有用である。本発明のポリヌクレオチドは、限定するものではないが、構造遺伝子および遺伝子の発現を調節する、本来的に結合している配列からなるポリヌクレオチドを包含する。

【 0 0 2 6 】

本発明の好ましい具体例は、表1の配列番号1に示されるヌクレオチド1からヌクレオチド757のすぐ上流にあるヌクレオチドまたはそのヌクレオチドを含むヌクレオチドまでを有するポリヌクレオチドであり、それは共にmapポリペプチドをコードする。

【 0 0 2 7 】

本発明はまた、式：



[式中、分子の5'末端のXは水素または金属、または修飾ヌクレオチド残基であるか、あるいはYと一緒に共有結合を形成し、分子の3'末端のYは水素または金属、または修飾ヌクレオチド残基であるか、あるいはXと一緒に共有結合を形成し、 R_1 および R_3 は、各々、独立していずれかの核酸残基または修飾核酸残基であり、 m は1~3000の整数または0であり、 n は1~3000の整数または0であり、 R_2 は本発明の核酸配列または修飾核酸配列、特に表1より選択される核酸配列またはその修飾核酸配列を意味する]

で示されるポリヌクレオチドからなるかまたは含むポリヌクレオチドを包含する。上記した式のポリヌクレオチド中、 R_2 は5'末端核酸残基がその左側で R_1 に結合し、その3'末端核酸残基がその右側で R_3 に結合するように方向付けられる。 m および/または n が1より大きい場合、 R_1 および/または R_2 のいずれかで表される核酸残基の鎖は、ヘテロポリマーまたはホモポリマーのいずれであってもよく、ヘテロポリマーが好ましい。好ましい具体例において、XおよびYと一緒に共有結合を形成する場合、前記した式のポリヌクレオチドは閉じた環状ポリヌクレオチドであり、それはその式が第2の鎖が相補性を有する第1の鎖を示す二本鎖ポリヌクレオチドであり得る。もう一つ別の具体例において、 m および/または n は1と1000の間の整数である。他の好ましい本発明の具体例は、 m が1ないし50、100または500の間の整数であり、 n が1ないし50、100または500の間の整数である。

【0028】

本発明のポリヌクレオチドはスタフィロコッカス・アウレウス由来であるのが最も好ましいが、分類学上同じ属の他の生物より得ることも好ましい。また、例えば、本発明のポリヌクレオチドは、分類学上同じ科または目の生物から得てもよい。

本明細書で使用する「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」なる用語は、本発明のポリペプチド、特に、細菌性ポリペプチド、より詳細には、表1 [配列番号2] に示すアミノ酸配列を有するスタフィロコッカス・アウレウス・mapのポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドを包含する。この用語はコードおよび/非コーディング配列を含んでもよいさらなる領域と共に、

該ポリペプチドをコードする単一の連続または非連続領域（例えば、組み込まれたファージ、組み込まれた挿入配列、組み込まれたベクター配列、組み込まれたトランスポゾン配列、またはRNAエディティング（editing）もしくはゲノムDNA再組織化により中断されている）を含むポリヌクレオチドを包含する。

本発明はさらに、表1 [配列番号2] の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの変種をコードする、本明細書に記載したポリヌクレオチドの変種に関する。本発明のポリヌクレオチドのフラグメントである変種は本発明の全長ポリヌクレオチドの合成に使用できる。

【0029】

さらに好ましい具体例は、数個、わずかな、5～10、1～5、1～3、2または1個あるいは0個のアミノ酸残基が、いずれかの組み合わせで置換、修飾、欠失または付加された表1 [配列番号2] のmapポリペプチドのアミノ酸配列を有する、map変種をコードするポリヌクレオチドである。特に好ましくは、mapポリペプチドの特性、活性を変化させないサイレント置換、付加および欠失である。

また、好ましい単離されたポリヌクレオチドの具体例として、配列番号1のポリヌクレオチド配列からの、少なくとも15、20、30、40、50または100個の連続した核酸を有する核酸配列を含むポリヌクレオチド、あるいは配列番号1のポリヌクレオチド配列の5'および/または3'末端から少なくとも15、20、30、40、50または100個の連続した核酸が末端切断または欠失されている核酸配列を含むポリヌクレオチドなどの、ポリヌクレオチド配列が挙げられる。

【0030】

本発明のさらに好ましい具体例は、表1 [配列番号2] に示すアミノ酸配列を有するmapポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの全長にわたって少なくとも95%または97%の同一性を有するポリヌクレオチドおよびそのようなポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである。少なくとも95%の同一性を有する領域を含むポリペプチドが最も好ましい。さらには、少なくとも95%の同一性を有するものの中で少なくとも97%の同一性を有するものがより好

ましく、中でも少なくとも98%および少なくとも99%の同一性を有するものが特に好ましい。少なくとも99.5%の同一性を有するものがより好ましい。

【0031】

好ましい具体例は、表1 [配列番号1] のDNAによってコードされている成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

本発明のある好ましい具体例によれば、特にストリンジентな条件下で、例えば表1のポリヌクレオチドのごときmap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。

【0032】

さらに本発明は、本明細書にて上記した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に関する。この点において、本発明は特に、本明細書にて上記したポリヌクレオチドにストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件の一例として、50%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハート(Denhardt's)溶液、10%硫酸デキストランおよび20 μ g/ml変性切断サケ精子DNAを含む溶液中、42 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし、ついでハイブリダイゼーション支持体を0.1xSSC(約65 $^{\circ}$ C)で洗浄することが挙げられる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は公知であり、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)、特に、第11章に例示されている。本発明により提供されるポリヌクレオチド配列に関して溶液ハイブリダイゼーションを用いてもよい。

【0033】

本発明は、配列番号1に示したポリヌクレオチド配列の完全遺伝子を含む適当なライブラリーを、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下、配列番号1に示す該ポリヌクレオチド配列の配列を有するプローブまたはそのフラグメントでスクリーニングし、該ポリヌクレオチド配列を単離することにより得ることができるポリヌクレオチド配列を含むかまたはそれよりなるポリヌクレオチド

を提供する。そのようなポリヌクレオチドを得るのに有用なフラグメントには、例えば、本明細書のいずれかの場所で十分に説明するプローブおよびプライマーが包含される。

【0034】

本明細書において本発明のポリヌクレオチドの分析についてさらに説明するように、例えば、上記したような本発明のポリヌクレオチドを、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使用し、mapをコードする全長cDNAおよびゲノムクローンを単離し、map遺伝子に対して高い同一性、特に高い配列類似性を有する他の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンを単離することができる。そのようなプローブは、一般に、少なくとも15ヌクレオチド残基または塩基対を含むであろう。好ましくは、そのようなプローブは少なくとも30塩基からなり、少なくとも50ヌクレオチド残基または塩基対を有してもよい。特に好ましいプローブは、少なくとも20ヌクレオチド残基または塩基対を有し、30以下のヌクレオチド残基または塩基対を有する。

map遺伝子のコード領域は、表1（配列番号1）のDNA配列を使用してスクリーニングしてオリゴヌクレオチド・プローブを合成することにより単離できる。ついで、本発明の遺伝子の配列と相補性の配列を有する標識したオリゴヌクレオチドを用いてcDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーをスクリーニングし、ライブラリーのどのメンバーがプローブとハイブリダイゼーションするか決定する。

【0035】

全長のDNAを得るための、あるいは短いDNAを伸長させる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り、例えば、cDNA末端の迅速増幅(RACE)（例えば、Frohmanら、PNAS USA 85、8998-9002(1988)を参照のこと）に基づく方法がある。Marathon™法(Clontech Laboratories Inc.)に例示される当該方法の最近の変法は、例えば、より長いcDNAの検索を有意に簡単にしている。Marathon™法において、cDNAは選択組織から抽出されたmRNAから調製され、各末端に「アダプター」配列が連結され

る。次いで、遺伝子特異的かつアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いて核酸増幅（PCR）を行ってDNAの「失われた」5'末端を増幅する。次いで、「ネステッド」プライマー、すなわち、増幅生成物の範囲にアニールするように設計されたプライマー（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ならびに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）を用いてPCR反応を繰り返す。次いで、この反応の生成物をDNA配列決定により分析し、次いで、存在しているDNAに生成物を直接結合して完全配列を得ること、あるいは5'プライマーの設計に関する新たな配列の情報を用いて別個の全長PCRを行うことにより、全長のDNAを構築する。

【0036】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、本明細書においてポリヌクレオチド分析に関してさらに説明するように、例えば、疾患、特にヒトの疾患に対する治療および診断の発見のための研究試薬および研究材料として用いることができる。

表1 [配列番号1または2]の配列に由来する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、本明細書に記載の方法に使用できるが、好ましくはPCRに使用し、本明細書で同定したポリヌクレオチドが全体として、または部分的に感染組織において細菌中で転写されるか否か測定する。そのような配列はまた、病原体が達した感染の段階およびタイプの診断においても有用性がある。

また、本発明は、成熟蛋白に、さらなるアミノまたはカルボキシ末端アミノ酸が加わるか、成熟ポリペプチドの内部にアミノ酸が加わった（例えば、成熟形態が一つ以上のポリペプチド鎖を有する場合）ポリペプチドを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蛋白のプロセッシングにおいて役割を果たし、蛋白を運び、蛋白の半減期を長くしたり、短くしたり、あるいは分析または生産のための蛋白の取り扱いを容易にすることができる。インビボで一般的なように、該付加アミノ酸は細胞酵素により成熟蛋白からプロセッシングにより除かれる。

【0037】

本発明の各ポリヌクレオチドおよび全ポリヌクレオチドについて、それに相捕的なポリヌクレオチドが提供される。これらの相捕的ポリヌクレオチドが、相捕的である各ポリヌクレオチドに対して十分に相捕的であることが好ましい。

一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する前駆体蛋白は該ポリペプチドの不活性形でもよい。プロ配列がそのような不活性前駆体から除かれると、一般に活性化される。プロ配列のいくらかまたは全体を、活性化の前に除去できる。一般に、そのような前駆体はプロ蛋白と称される。

理解されているように、読み枠によりコードされるポリペプチド全体が活性に必要でないことも多い。したがって、分子生物学においては、N - 末端およびC - 末端欠失実験で活性に必要な一次構造の境界の地図作成を行うことが慣用的操作となる。これらの実験は、コーディング核酸配列を切断するのに、エキソヌクレアーゼ消化または都合のよい制限部位を利用する。例えば、Promega (マジソン、WI) は欠失産物が容易に分析されるように設計されたエキソヌクレアーゼ III (www.comで利用しうるプロトコル) を使用する。その消化された末端は、読み枠を保存するのに必要な程度にまで (例えば、合成リンカーにライゲートすることで) 修復することができる。このように、配列番号1の核酸は、酵素、結合または抗体誘発活性などの活性を得るのに十分な配列番号2の連続的フラグメントを容易に提供する。配列番号2のかかるフラグメントをコード化する核酸配列および本明細書に記載されているようなその変種は、本発明の範囲内にあり、本発明に従ってコードされるポリペプチドである。

【0038】

当該分野において公知のように、蛋白のN - 末端および/またはC - 末端配列部分は、一般に、蛋白の機能に対して大きく影響することなく取り除くことができる。取り除くことのできる配列の量は、しばしば非常に重要である。かかる欠失変種の形成に用いる核酸の切断および除去方法は、現在は完全に慣例的な操作である。したがって、配列番号2の遺伝子によりコードされたポリペプチドの活性を少なくとも20%、好ましくは少なくとも50%有する配列番号2の連続的ないずれのフラグメントも本発明の範囲内にあり、かかる連続的フラグメントに70%、80%、90%、95%、97%、98%または99%の同一性を有す

る対応するフラグメントも同様である。ある一の実例において、連続的フラグメントは、少なくとも70%の配列番号2のアミノ酸残基を含有し、好ましくは80%、90%または95%の残基を含有する。

【0039】

要するに、本発明のポリヌクレオチドは成熟蛋白、リーダー配列の加わった成熟蛋白（プレ蛋白とも称される）、プレ蛋白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蛋白の前駆体、またはリーダー配列と、一般に、ポリペプチドの活性な成熟形態を生成するプロセッシング工程の間に除去される1またはそれ以上のプロ配列を有するプロ蛋白の前駆体であるプレプロ蛋白をコードする。

【0040】

ベクター、宿主細胞、発現系

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作される宿主細胞および組換え技術による本発明のポリペプチドの製造に関する。さらに無細胞翻訳系を用い、本発明のDNA構築物由来のRNAを使用してかかる蛋白を製造することができる。

本発明の組み換えポリペプチドを、発現系を含む遺伝子操作された宿主細胞から、当業者によく知られた方法により製造してもよい。したがって、さらなる態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む発現系、かかる発現系で遺伝子操作された宿主細胞、ならびに組み換え法による本発明のポリペプチドの製造に関する。

【0041】

組換え体産生のために、宿主細胞を遺伝子操作し、発現系もしくはそれらの一部、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。ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレープ・ローディング、弾道導入および感染のような、Davisら、BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986) および Sambroo

から、MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL , 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) のごとき複数の標準的研究室マニュアルに記載されている方法によって行うことができる。

【0042】

適当な宿主の代表例は、レンサ球菌 (streptococcus)、ブドウ球菌 (staphylococcus)、腸球菌 (enterococcus)、大腸菌 (E.coli)、ストレプトマイセス (streptomyces)、シアノバクテリア (cyanobacteria)、枯草菌 (Bacillus subtilis) およびスタフィロコッカス・アウレウス (Streptococcus pneumoniae) のごとき細菌細胞；酵母、クルベロミセス (Kluveromyces)、サッカロミセス (Saccharomyces) の細胞のごとき真菌細胞、担子菌、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans) およびアスペルギルス (Aspergillus)；ドロソフィラ (Drosophila) S2 およびスポドプテラ (Spodoptera) Sf9細胞のごとき昆虫細胞；CH0、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293、CV-1 およびボーウェス (Bowes) メラノーマ細胞のごとき動物細胞；および裸子植物または被子植物のごとき植物細胞を包含する。

【0043】

本発明のポリペプチドを製造するために非常に多様な発現系を使用することができる。かかるベクターは、とりわけ、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、バキュロウイルス、SV40のごときパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、ニワトリポックスウイルス、偽狂犬病ウイルス、ピコルナウイルスおよびレトロウイルスのようなウイルス由来のベクター、およびコスミドおよびファージミドなどのプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝因子由来のベクターのごとき、それらの組み合わせに由来するベクターを包含する。発現系構築物は、発現を制御ならびに引き起こす調節領域を有していてもよい。一般に、宿主においてポリヌクレオチドを維持、増幅または発現し、および/またはポリペプチドを発現するのに適した系またはベクターを、この点にて発現に使用してもよい。適当なDNA配列を、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING

, A LABORATORY MANUAL (前掲) に示されている技術のごとき、種々のよく知られた慣用的技術のいずれかによって、発現系に挿入してもよい。

【0044】

真核細胞の組み換え発現系において、翻訳された蛋白を小胞体内腔、周辺腔または細胞外環境に分泌するために、適当な分泌シグナルを発現されるポリペプチドに挿入してもよい。これらのシグナルは、ポリペプチドに固有のものであってもよく、または異種のシグナルであってもよい。

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水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を包含する、よく知られた方法によって組換え細胞培養物から回収および精製できる。最も好ましくは、高品質液体クロマトグラフィーが精製に使用される。ポリペプチドが単離および/または精製の間に変性する場合、蛋白を再生するための周知方法を用いて、再び活性な立体配座とすることができる。

【0045】

診断、予後、セロタイピングおよび変異アッセイ

また本発明は、診断試薬として使用するための本発明のm a pポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用にも関する。真核生物、とりわけ哺乳動物、特にヒトにおけるm a p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、疾病の段階の決定、または薬剤に対する感染生物の応答に関する診断方法を提供するであろう。m a p遺伝子または蛋白を含む生物に感染、または感染の可能性のある真核生物、とりわけ哺乳動物、特にヒトを、種々のよく知られた方法ならびに本明細書記載の方法により核酸レベルまたはアミノ酸レベルで検出できる。

【0046】

予後、診断または他の分析に供するポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、感染していると思われる個体および/または感染した個体の身体材料から得られる。これらの源由来のポリヌクレオチド、特にDNAまたはRNAを検出に直接

用いてもよく、あるいは分析に付す前にPCRもしくはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅できる。RNA（詳細にはmRNA）、cDNAおよびゲノムDNAも同じようして使用できる。増幅を用いると、個体に存在する感染または定住生物の種および株を、該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特徴付けることができる。関連する生物、好ましくは同じ属の異なる種または同じ種の異なる系統より選択された対照配列の遺伝子型と比較した増幅生成物の大きさの変化により、欠失および挿入を検出できる。点突然変異は、増幅DNAを標識したmap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。完全にまたは有意に対合した配列は、DNAまたはRNAについての、各々、DNaseまたはRNase消化により、または融解温度または再生速度の差により、不完全にまたはより有意に誤対合した二重らせんと区別できる。ポリヌクレオチド配列の差はまた、対照配列と比較した場合の、ゲル中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り、または直接的なDNAの配列決定により検出できる。これは変性剤と共にまたは無しで行うことができる。ポリヌクレオチドの差異はまた、直接的DNAまたはRNA配列決定により検出することもできる。例えば、Myersら、Science, 230:1242 (1985)を参照のこと。特異的な位置での配列の変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えば、RNase、V1およびS1保護または化学的切断法によっても明らかにすることができる。例えば、Cottonら、Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 85:4397-4401 (1985)を参照のこと。

【0047】

もう1つの具体例において、mapヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブの一群を構築して、例えば遺伝学的変異、セロタイプ、分類学的分類または同定のための効果的なスクリーニングを行うことができる。アレイ法は周知であり、適応範囲が広く、遺伝子発現、遺伝学的連関、および遺伝学的変化を包含する分子遺伝学における種々の問題を解決するために用いられる（例えば、Cheeら、Science 274:610 (1996)を参照のこと）。

【0048】

よって、もう1つの態様において、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、またはそのフラグメント；(b)(a)のヌクレオチド配列に対して相捕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、またはそのフラグメント；あるいは(d)本発明のポリペプチドに対する抗体、好ましくは配列番号2のポリペプチドに対する抗体を含む診断キットに関する。かかるキットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)が重要な成分を含んでいてもよいことが理解されよう。かかるキットは、とりわけ疾病または疾病に対する感受性についての診断において有用である。

【0049】

また本発明は、診断試薬としての本発明のポリヌクレオチドの使用にも関する。疾病または発病に関連した本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1のポリヌクレオチドの変異形態の検出は、ポリヌクレオチドの発現低下、発現過剰または発現の変化により生じる疾病の診断、疾病経過の予後、疾病段階の決定、または疾病に対する感受性の決定に加えて用いる診断用道具、またはかかる診断等の決定のための道具を提供するであろう。かかるポリヌクレオチドにおける変異を有する生物、特に感染生物を、本明細書記載のいずれかの場所で説明するような種々の方法によりポリヌクレオチドレベルで検出してもよい。

【0050】

第1の表現型を有する生物と、異なる第2の表現型を有する生物との間のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド配列の相違を調べることもできる。第1の表現型を有する生物のいくつかまたは全部に変異が観察されるが、第2の表現型を有する生物には変異が観察されない場合、変異は第1の表現型の発生原因である可能性がある。

本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド中に変異または多型性(対立遺伝子変異)を担持する生物由来の細胞を、例えばセロタイピングを可能にするような種々の技術によりポリヌクレオチドまたはポリペプチドレベルで検出できる。例えば、RT-PCRを用いてRNAにおける変異を検出することができる。RT-PCRを自動検出系、例えばGeneScan等と組み合わせて用いる

のが特に好ましい。RNA、cDNAまたはゲノムDNAもまた同じ目的でPCRに用いることができる。一例として、mapポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに相補的なPCRプライマーを用いて変異を同定および分析することができる。さらに本発明は、5'および/または3'末端から1、2、3または4個のヌクレオチドが除去されたプライマーを提供する。特に、これらのプライマーを、個体由来の試料、例えば身体材料から単離されたmapDNAおよび/またはRNAの増幅に用いることができる。プライマーを用いて感染個体から単離されたポリヌクレオチドを増幅して、そのポリヌクレオチドをポリヌクレオチド配列研究のための種々の方法に供してもよい。このようにして、ポリヌクレオチド配列中の変異を検出し、変異を用いて感染または感染段階もしくは経路を診断および/または予後を行い、あるいは感染物のセロタイプおよび/または分類を行ってもよい。

【0051】

本発明はさらに、疾患、好ましくは細菌感染、さらに好ましくはスタフィロコッカス・アウレウスによる感染の診断方法であって、表1 [配列番号1]の配列を有するポリヌクレオチドの発現レベルの上昇を、個体由来のサンプル、例えば、肉體物質から決定することを特徴とする方法を提供する。mapポリヌクレオチドの発現の増加または低下は、ポリヌクレオチドの定量法として当該分野で周知の方法である任意の方法、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザンブロットティング、スペクトロメトリーおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いて測定できる。

【0052】

加えて、正常対照組織サンプルと比較してmapポリペプチドの過剰発現を検出するための本発明による診断アッセイを用いて、例えば感染の存在を検出することができる。宿主由来のサンプル中のmapポリペプチドのレベルを決定するために用いることができるアッセイ技法は、当業者に周知である。このようなアッセイ法は、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析、抗体サンドイッチアッセイ、抗体検出およびELISAアッセイを包含する。

【0053】

アンタゴニストおよびアゴニスト - アッセイおよび分子

さらに、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いて、例えば、細胞、無細胞調製物、化学的ライブラリー、および天然産物の混合物中の、小型分子基質とリガンドとの結合を評価することもできる。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よく、または構造上もしくは機能上の模倣物でもよい。例えば、Coliganら、Current Protocols in Immunology 1 (2) : 第5章 (1991) を参照のこと。

【0054】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは多くの生物学的機能に關与しており、該機能には多くの疾病状態、詳細には上記疾病が包含される。それゆえ、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの機能を作動 (例えば、刺激) または拮抗 (例えば、阻害) する化合物を同定するためのスクリーニング法を工夫することが望ましい。したがって、さらなる態様において、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ならびに関連ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの機能を作動または拮抗する化合物を同定するためのスクリーニング方法を提供する。一般的には、アゴニストまたはアンタゴニスト (例えば、阻害剤) を上記疾病の治療および予防のために用いてもよい。種々の源、例えば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリーおよび天然産物の混合物から化合物を同定できる。そのようにして同定されたかかるアゴニストおよびアンタゴニストは、天然または修飾基質、リガンド、受容体、酵素等であってもよく、場合によってはmapポリペプチドおよびポリヌクレオチド、あるいはそれらの構造上または機能上の模倣物であってもよい (Coliganら、Current Protocols in Immunology 1 (2) : 第5章 (1991) を参照のこと)。

【0055】

スクリーニング法は、単に候補化合物のポリペプチドまたはポリヌクレオチドへの、あるいはポリペプチドまたはポリヌクレオチドを有する細胞もしくは膜への、あるいはポリペプチド含む融合蛋白への結合を、直接的または間接的に候補化合物に結合した標識により測定するものであってもよい。別法として、スクリ

ーニング法は標識競争物質との競争を用いるものであってもよい。さらに、これらのスクリーニング法は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む細胞に適した検出系を用いて、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性化または阻害により生じるシグナルを候補化合物が発生させるかどうかを試験するものであってもよい。一般的には、既知アゴニスト存在下で活性化の阻害剤をアッセイし、次いで、候補化合物存在下でのアゴニストによる活性化の効果を観察する。構成的に活性のあるポリペプチドおよび/または構成的に発現されるポリペプチドおよびポリヌクレオチドを、アゴニストまたはアンタゴニストの不存在下、アゴニストの効果を逆転させる物質を探すスクリーニング法に用いてもよく、候補化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性化を阻害するかどうかを試験することによる。さらに、スクリーニング法は、単に、候補化合物を本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含有する溶液と混合して混合物を作成し、混合物中のm a pポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド活性を測定し、次いで、混合物中のm a pポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド活性を標準に対して比較することを特徴とする。F c部分および上記m a pポリペプチドから作成されるような融合蛋白を用いて高処理量アッセイを行って本発明のポリペプチドのアンタゴニストならびに系統分類的および/または機能的に関連したポリペプチドを同定することもできる(D.Bennettら、J. Mol. Recognition, 8 : 52 - 58 (1995) ; およびK.Johansonら、J. Biol. Chem. 270 (16) : 9459 - 9471 (1995) を参照のこと)。

【0056】

本発明のポリペプチドと結合および/または相互作用するポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体を用いて、細胞中のmRNAおよび/またはポリペプチドの精製に対する添加化合物の影響を検出するためのスクリーニング方法を組み立ててもよい。例えば、ELISAアッセイを構築して、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いてポリペプチドの分泌または細胞結合レベルを、当該分野において標準的な方法により測定してもよい。これにより、適当に操作された細胞または組織からのポリペプチドの生成を阻害または促進しうる作用剤(それぞれ、アンタゴニストまたはアゴニストという)を見いだすことができる。

【0057】

本発明はまた、mapポリペプチドまたはポリヌクレオチドの作用、特に静菌および/または殺菌性である化合物の作用を亢進（アゴニスト）または遮断（アンタゴニスト）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。スクリーニング方法にはハイスループット技術が含まれる。例えば、アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするために、mapポリペプチドおよびかかるポリペプチドの標識基質またはリガンドを含む合成反応混合物、膜、細胞エンベロープもしくは細胞壁のごとき細胞コンパートメント、またはそれらのいずれかの調製物を、mapアゴニストまたはアンタゴニストであるかもしれない候補分子の存在下または不在下でインキュベートする。候補分子がmapポリペプチドに作動または拮抗する能力は、標識リガンドの結合の低下またはかかる基質からの生成物の生成低下に反映される。結合しても影響を及ぼさない分子、すなわちmapポリペプチドの効果を誘起しない分子は、ほとんどの場合、良好なアンタゴニストであろう。よく結合し、基質からの生成物の生成速度を高め、シグナルトランスダクションを増大させ、あるいは化学チャンネル活性を増大させる分子はアゴニストである。基質からの生成物の生成速度、シグナルトランスダクション、あるいは化学チャンネル活性のレベルの検出はリポーターシステムを用いることにより強調できる。この点に関して有用なリポーターシステムは、生成物に転換される比色標識基質、mapポリヌクレオチドまたはポリペプチド活性の変化に応答するリポーター遺伝子、および当該分野で公知の結合アッセイを包含するが、これらに限定するものではない。

【0058】

本発明のポリペプチドを用いて膜結合または可溶性受容体を同定してもよく、かかるポリペプチドは当該分野において標準的な受容体結合法により同定される。これらの方法は、リガンド結合およびクロスリンクングアッセイを包含するが、これらに限らない。これらの方法において、ポリペプチドを放射性標識（例えば¹²⁵I）、化学修飾（例えばビオチン化）または検出および精製に適したペプチド配列に融合され、推定上の受容体（例えば細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、身体材料）の源とともにインキュベーションする。他の方法は表面プラス

モン共鳴および分光学的法法を包含する。これらのスクリーニング方法を用いて、ポリペプチドのその受容体への結合と競争するポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定してもよい。かかるアッセイを行うための標準的方法は当該分野においてよく知られている。

【0059】

蛍光タグを付した分子に関する蛍光分極値は回転相関時間 (rotational correlation time) または回転速度 (tumbling rate) に依存する。別のmapポリペプチドもしくは他のポリペプチドと結合したmapポリペプチドのごとき蛋白複合体であって蛍光標識分子を含むように標識されているものは、蛍光標識されたモノマー蛋白よりも高い分極値を有するであろう。この方法を用いて、ポリペプチド複合体を分裂させる小型分子を特徴づけるのが好ましい。

蛍光エネルギー転移を用いて、mapポリペプチドダイマー、トリマー、テトラマー、または高次構造、あるいは別のポリペプチドに結合したmapポリペプチドにより形成される構造の形成を妨害する小型分子を特徴づけてもよい。mapポリペプチドをドナーおよびアクセプター両方の蛍光発色団で標識することができる。2種の標識種を混合し、ドナー蛍光発色団を励起したならば、アクセプターの蛍光を観察することにより蛍光エネルギー転移を検出することができる。ダイマー化をブロックする化合物は蛍光エネルギー転移を阻害するであろう。

【0060】

表面プラスモン共鳴を用いて、mapポリペプチドの自己結合ならびにmapポリペプチドと別のポリペプチドもしくは小型分子との結合に対する小型分子の影響をモニターすることができる。低いサイト密度 (site density) においてmapポリペプチドをセンサーチップにカップリングさせて、共有結合分子がモノマー性となるようにすることができる。次いで、溶液蛋白をmapポリペプチド被覆表面上に通し、局所屈折率の変化により生じる共鳴角の変化をモニターすることにより特異的結合をリアルタイムで検出することができる。この方法を用いて、mapポリペプチドの自己結合ならびにmapポリペプチドと別のポリペプチドもしくは小型分子との結合に関する反応速度および平衡結合定数に対する小型分子の影響を特徴づけることができる。

【0061】

シンチレーション近接アッセイを用いて、m a pポリペプチドと別のm a pポリペプチドもしくは別のポリペプチドとの結合の間の相互作用を特徴づけることができる。m a pポリペプチドをシンチレーション充填ビーズにカップリングさせることができる。放射性標識m a pポリペプチドの添加は結合を生じ、放射性源分子はシンチレーション液に極めて近接した状態となる。よって、m a pポリペプチドの結合によりシグナルが放出され、m a pポリペプチドの自己結合またはm a pポリペプチドと別のポリペプチドもしくは小型分子との結合を妨害する化合物はシグナルを減少させるであろう。

【0062】

本発明の他の具体例において、本発明のポリペプチドおよびまたはポリヌクレオチドと結合あるいは相互作用して、その活性または発現を阻害または活性化する化合物を同定する方法であって、ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドへの結合、あるいはポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと化合物との他の相互作用を可能にする条件下で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スクリーニングすべき化合物と接触させて、化合物との結合あるいは他の相互作用を評価し（該方法において、好ましくは、かかる結合または相互作用はポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと化合物との結合あるいは相互作用に応答した検出可能シグナルを提供しうる第2の化合物に関連したものである）、次いで、ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと化合物との結合あるいは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、化合物がポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと結合あるいは相互作用し、その活性または発現を活性化または阻害するかどうかを決定する方法が提供される。

【0063】

m a pアゴニストのアッセイのもう1つの例は、競争阻害アッセイに適した条件下で、m a pおよび潜在的なアゴニストを、m a p結合分子、組換えm a p結合分子、天然基質もしくはリガンド、または基質もしくはリガンド模倣物と混合する、競合アッセイである。m a p分子を例えば放射活性または比色化合物によ

り標識し、結合分子に結合した、あるいは生成物に変換したmap分子の数を正確に決定して、潜在的なアンタゴニストの効果を評価できる。

【0064】

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剤の構造に基づく設計方法に用いてもよいことが、当業者に容易に理解されよう。該方法は：(a)最初にポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、またはそれらの複合体の3次元構造を決定し、(b)アゴニストまたはアンタゴニストの反応部位、結合部位またはモチーフである可能性のある部位の3次元構造を推定し、(c)推定された反応部位、結合部位および/またはモチーフと結合または反応すると予想される候補化合物を合成し、次いで(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剤であるかどうかを試験する、ことを含む。

これが繰り返しプロセスであり、自動およびコンピューター制御工程を用いてこの繰り返しプロセスを行ってもよいことが、さらに理解されよう。

【0065】

さらなる態様において、本発明は、例えばmapポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの過剰発現、発現不足、上昇した活性、または低下した活性に関連した疾病のごとき異常な状態の治療方法を提供する。

ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの発現および/または活性が過剰な場合、いくつかの方法を用いることができる。1の方法は、ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの機能および/または発現を阻害(例えば、リガンド、基質、受容体、酵素等の結合をブロックすることにより、あるいは2次的シグナルを阻害することにより)するに有効な量の上記阻害化合物(アンタゴニスト)を医薬上許容される担体とともに対象に投与し、そのことにより異常な症状を改善することを含む。もう1つの方法において、やはり内在性ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと競争してリガンド、基質、受容体、酵素等に結合することができる可溶性形態のポリペプチドを投与してもよい。かかる競争物質の典型例はmapポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドのフラグメントを包含する。

【0066】

さらにもう1つのアプローチにおいて、発現ブロッキング法を用いて内在性m a pポリペプチドをコードしている遺伝子の発現を阻害することができる。このブロッキングは遺伝子発現のいずれの工程を標的としてもよいが、好ましくは、転写および/または翻訳を標的とする。この種の既知方法の例は、体内で生じるかまたは別個に投与されるアンチセンス配列の使用を包含する(例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)中O'Connor, J. Neurochem (1991) 56: 560を参照のこと)。別法として、遺伝子とともに三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを提供してもよい。例えば、Leeら、Nucleic Acids Res (1979) 6: 3073; Cooneyら、Science (1988) 241: 45; Dervanら、Science (1991) 251: 1360を参照のこと。これらのオリゴヌクレオチドはそれ自体投与することができ、あるいは重要部分のオリゴマーをインビボで発現させることもできる。

【0067】

本明細書で得られるポリヌクレオチド配列は、各々、抗菌化合物の発見および開発に用いることができる。発現でコードされた蛋白は、抗菌薬物をスクリーニングするための標的として用いることができる。加えて、コードされた蛋白のアミノ末端領域をコードするポリヌクレオチド配列あるいはシャイン・ダルガノまたは他の個々のmRNAの翻訳容易化配列を用いて、目的とするコーディング配列の発現を調節するアンチセンス配列を構築することができる。

【0068】

本発明はまた、感染の続発症に関与する、病原体および哺乳動物宿主間の最初の物理的相互作用を妨害するための、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、特にグラム陽性菌が内在装置上の哺乳動物細胞外マトリックス蛋白、または創傷部の細胞外マトリックス蛋白に付着することを防御するために; 真核生物、好ましくは哺乳動物細胞外マトリックス蛋白と組織損傷を媒介する細菌性m a p蛋白との間の細菌付着を遮断するために; 内在装置の埋め込みまたは他の外科

的手技以外により開始した感染における病因の通常の進行を遮断するために使用することができる。

本発明のさらに別の態様によれば、m a pのアゴニストおよびアンタゴニスト、好ましくは静菌性または殺菌性アゴニストおよびアンタゴニストが提供される。

本発明のアンタゴニストおよびアゴニストを用いて、例えば、疾患を阻害し、治療することができる。

【0069】

本発明のアンタゴニストは、特に、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または消失させる小型有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体を包含する。アンタゴニストはまた、m a p誘導活性を誘導することなく、結合分子の同じ部位に結合し、それによりm a p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することにより、m a pポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの作用または発現を妨げる、小型有機分子、ペプチド、ポリペプチド、例えば密接に関係した蛋白または抗体あってもよい。

また、本発明のアンタゴニストはポリペプチドの結合部位に結合して占拠し、それによって細胞性結合分子への防止し、通常の生物学的活性妨げる小型分子を包含する。小型分子の例として、限定するわけではないが、小型有機分子、ペプチドまたはペプチド様分子を包含する。他のアンタゴニストはアンチセンス分子を包含する (Okano, J. Neurochem, 56: 560(1991); OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIVITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL(1988), for a description of these moleculesを参照)。好ましいアンタゴニストはm a pに関連する化合物およびm a pの変種を包含する。

【0070】

他のポリペプチドアンタゴニストは、抗体または、ある場合には、リガンド、基質、受容体、酵素などに深く関連のあるオリゴヌクレオチドまたは蛋白、ポリペプチドの場合には、例えばリガンド、基質、受容体、酵素などのフラグメントであってもよく；または本発明のポリペプチドに結合するが応答を惹起せず、そ

の結果ポリペプチドの活性を阻害する小型分子を包含する。

好ましくは、本発明の小型分子は、分子量が2000ダルトン以下であり、より好ましくは300と1000ダルトンの間であり、最も好ましくは400と700ダルトンの間である。かかる小型分子は有機分子であることが好ましい。

【0071】

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) (本明細書中、エッチ・ピロリともいう) 菌は、胃癌、潰瘍、胃炎を発病している世界中の人々の3分の1以上の胃に感染している (国際癌研究機関 (International Agency for Research on Cancer) (1994) Schistomoses , Liver Flukes and Helicobacter Pylori (International Agency for Research on Cancer , Lyon , France ; <http://www.uicc.ch/ecp/ecp2904.htm>)) 。さらに、この国際癌研究機関は、最近になって、ヘリコバクター・ピロリと胃腺癌の間の因果関係を認識し、その細菌をグループI (限定的) 発癌物質と分類した。本発明により提供されるまたは当該分野にて知られているスクリーニング法を用いて見出される本発明の好ましい抗菌化合物 (map 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およびアンタゴニスト) 、特に狭スペクトルの抗生物質は、ヘリコバクター・ピロリ感染の治療に有用である。このような治療はヘリコバクター・ピロリ誘発性癌、例えば胃腸癌の出現を減少させる。かかる治療はまた胃潰瘍および胃炎も予防、阻害および / または治癒する。

【0072】

本明細書において引用したすべての刊行物および引用文献 (特許および特許出願に限らない) は、たとえ、個々の刊行物または引用文献が具体的および個別的に完全に記載されている場合に出典明示により本明細書の一部とするとされていても、出典明示によりその内容を本明細書の一部とする。本願が優先権を主張するいずれの特許出願もまた出典明示により本明細書の一部とする。

【0073】

用語

本明細書中で頻繁に使用される特定の用語を、その理解を容易にするために以下に定義する。

「肉体材料（複数でも可）」とは、個体または生物由来の材料を意味し、骨、血液、血清、脳脊髄液、精液、唾液、筋肉、軟骨、器官組織、皮膚、尿、糞便または生検材料のごとき細胞、組織および排泄物等を包含するが、これらに限定されるものではない。

「疾病（複数でも可）」は、例えば、例えば上気道疾患（例えば、中耳炎、細菌性気管炎、急性咽頭蓋炎、甲状腺炎）、下気道疾患（例えば、蓄膿症、肺膿瘍）、心臓疾患（例えば、感染性心内膜炎）、胃腸疾患（例えば、分泌性下痢、脾臓膿瘍、腹膜後膿瘍）、CNS疾患（例えば、大脳膿瘍）、眼疾患（例えば、眼瞼炎、結膜炎、角膜炎、眼内炎、前中隔および眼窩蜂巣炎、涙囊炎）、腎および尿管疾患（例えば、副睾丸炎、腎内および腎周囲膿瘍、トキシックショック症候群）、皮膚疾患（例えば、膿痂疹、毛囊炎、皮膚膿瘍、蜂巣炎、創傷感染、細菌性筋炎）、ならびに骨および関節疾患（例えば、敗血症性関節炎、骨髄炎）含む、細菌による感染により引き起こされる疾病、またはかかる細菌による感染に関連した疾病を意味する。

「宿主細胞（複数でも可）」は外来性ポリヌクレオチド配列によって導入（例えば、形質転換またはトランスフェクト）された、あるいは導入能（形質転換またはトランスフェクション能）を有する細胞である。

【0074】

「同一性」は、当該分野で公知であり、配列の比較で決定されるような、2またはそれ以上のポリペプチド配列あるいは2またはそれ以上のポリヌクレオチド配列の関係である。また、当該分野では、「同一性」は、場合によっては、配列の鎖間の対合によって決定されるような、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列の関連性の度合を意味する。「同一性」は、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M.編, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W.編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M.およびGriffin, H.G.編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, Von Heinje, G. Academic Press, 1987; およびSequence Analysis Primer, Gribskov, M.およびDevereux, J.

編, M Stockton Press, New York, 1991; およびCarllio, HおよびLipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)に記載されている方法(これらに限らない)を含め、公知方法により容易に決定することができる。同一性を決定する好ましい方法は、テストする配列間に最大の対合を与えるように設計されている。そのうえ、同一性を測定する方法は公に入手できるコンピュータ・プログラムに集成されている。2つの配列の間の同一性を測定する好ましいコンピュータ・プログラム方法は、例えば、GCGプログラムパッケージ(Deveraux, J.ら, Nucleic Acids Research (1984) 12(1): 387)、BLASTP、BLASTNおよびFASTA(Atschul, S. F.ら, J. Molec. Biol. (1990) 215: 403-410)を包含するが、これに限らない。BLAST XプログラムはNCBIおよび他の源(BLAST Manual, Altschul, S.ら, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S.ら, J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990))から公に入手できる。また、周知のスミス・ウォーターマン(Smith Waterman)アルゴリズムを用いて同一性を決定することもできる。

【0075】

ポリペプチド配列の比較のためのパラメーターは以下のものを包含する:

1) アルゴリズム: NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス: HentikoffおよびHentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 10915-10919 (1992)からのBLOSSUM62

ギャップペナルティー: 12

ギャップ長ペナルティー: 4

これらのパラメーターに関して有用なプログラムは、Genetics Computer Group, Madison WI.から「ギャップ」プログラムとして公に利用できる。上記パラメーターはペプチド比較のための省略時パラメーターである(エンドギャップについてペナルティーを伴わない)。

ポリヌクレオチド比較のためのパラメーターは下記のものを包含する:

1) アルゴリズム: NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス：マッチ = + 1 0、ミスマッチ = 0

ギャップペナルティ：5 0

ギャップ長ペナルティ：3

これらのパラメーターに関して有用なプログラムは、Genetics Computer Group, Madison WI. から「ギャップ」プログラムとして公に利用できる。上記パラメーターは核酸比較のための省略時パラメーターである。

【0076】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドについての「同一性」に関する好ましい意味は、下記(1)および(2)に示される。

(1) さらにポリヌクレオチドの具体例は、配列番号1の対照配列に対して少なくとも95、97または100%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド配列を包含し、そのポリヌクレオチド配列は配列番号1の対照配列と同一であってもよく、あるいは対照配列と比較してある程度の数までのヌクレオチドの変化を有していてもよい。かかる変化は、少なくとも1個のヌクレオチドの欠失、置換(トランジションおよびトランスバージョンを包含)または挿入からなる群より選択され、該変化は対照ヌクレオチド配列の5'または3'末端の位置あるいはそれらの末端位置の間の位置において、対照配列中のヌクレオチドにおいて個々にまたは散在して、あるいは対照配列中の1またはそれ以上の連続した群として生じてもよい。配列番号1中の全ヌクレオチド数と個々の同一性パーセント値(100で割ったもの)とをかけて、その積を配列番号1中の全ヌクレオチド数から差し引くことによりヌクレオチド変化の数を決定する。これを下式により説明する：

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

式中、 n_n はヌクレオチド変化の数であり、 x_n は配列番号1中の全ヌクレオチド数であり、 y は、例えば95%ならば0.95であり、97%ならば0.97であり、100%ならば1.00であり、 \cdot は積の演算子であり、 x_n と y との整数でない積は切り捨てにより最も近い整数とした後、 x_n から差し引く。配列番号2のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列の変化は、好ましくはコーディング配列中のナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異を引き起

こす可能性があり、それゆえ、かかる変化に随伴してポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドが変化する。

【0077】

(2) さらにポリペプチドの具体例は、配列番号2のポリペプチド対照配列に対して少なくとも95、97または100%の同一性を有するポリペプチドを含む単離ポリペプチドを包含し、該ポリペプチド配列は配列番号2の対照配列と同一であってもよく、あるいは対照配列と比較してある程度の数までのアミノ酸の変化を有していてもよい。かかる変化は、少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換(保存的および非保存的置換を包含)または挿入からなる群より選択され、該変化は対照ポリペプチド配列のアミノまたはカルボキシ末端の位置あるいはそれらの末端位置の間の位置において、対照配列中のアミノ酸において個々にまたは散在して、あるいは対照配列中の1またはそれ以上の連続した群として生じてもよい。配列番号2中の全アミノ酸数と同一性を示す整数を100で割った値とをかけて、その積を配列番号2中の全アミノ酸数から差し引くことによりアミノ酸変化の数を決定する。これを下式により説明する：

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

式中、 n_a はアミノ酸変化数であり、 x_a は配列番号2中の全アミノ酸数であり、 y は、例えば95%ならば0.95であり、97%ならば0.97であり、100%ならば1.00であり、 \cdot は積の演算子であり、 x_a と y との整数でない積は切り捨てにより最も近い整数とした後、 x_a から差し引く。

【0078】

「個体(複数でも可)」とは多細胞真核生物を意味し、後生動物類、哺乳動物、ヤギ類、ウシ類、類人猿、霊長類およびヒトを包含するが、これらに限らない。

「単離された」とは、「ヒトの手により」、その天然の状態から変えられること、すなわち、天然物の場合、その本来的な環境から変化または除去あるいは両方されたことを意味する。例えば、生体に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものではないが、その天然状態で共存する物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書で用いる

用語としての「単離された」ものである。さらには、形質転換、遺伝的操作により、または他のいずれかの方法により生物に導入されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、まだ生物内にあり、その生物が活着しているまたは死んでいるとしても、「単離された」ものである。

【0079】

「生物（複数でも可）」は、(i) Streptococcus、Staphylococcus、Bordetella、Corynebacterium、Mycobacterium、Neisseria、Haemophilus、Actinomyces、Streptomyces、Nocardia、Enterobacter、Yersinia、Francisella、Pasteurella、Moraxella、Acinetobacter、Erysipelothrix、Branhamella、Actinobacillus、Streptobacillus、Listeria、Calymmatobacterium、Brucella、Bacillus、Clostridium、Treponema、Escherichia、Salmonella、Klebsiella、Vibrio、Proteus、Erwinia、Borrelia、Leptospira、Spirillum、Campylobacter、Shigella、Legionella、Pseudomonas、Aeromonas、Rickettsia、Chlamydia、BorreliaおよびMycoplasmaである属（これらに限らない）のメンバー、ならびにグループAのStreptococcus、グループBのStreptococcus、グループCのStreptococcus、グループDのStreptococcus、グループGのStreptococcus、Staphylococcus aureus、Streptococcus pyogenes、Streptococcus agalactiae、Streptococcus faecalis、Streptococcus faecium、Streptococcus durans、Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermidis、Corynebacterium diphtheriae、Gardnerella vaginalis、Mycobacterium tuberculosis、Mycobacterium bovis、Mycobacterium ulcerans、Mycobacterium leprae、Actinomyces israelii、Listeria monocytogenes、Bordetella pertussis、Bordetella parapertussis、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、Klebsiella pneumoniae、Serratia marcescens、Serratia liquefaciens、Vibrio cholerae、Shigella dysenteriae、Shigella flexneri、Pseudomonas aeruginosa、Francisella tularensis、Brucella abortus、Bacillus anthracis、Baci

Illus cereus, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium butulinum*, *Treponema pallidum*, *Rickettsia rickettsii* および *Chlamydia trachomatis* である種またはグループ（これらに限らない）のメンバーを包含する原核生物、(ii) *Archaeobacter*（これに限らない）を包含する古細菌、および (iii) 原生動物、真菌類、*Saccharomyces*, *Kluveromyces* または *Candida* 属（これらに限らない）のメンバー、および *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis* または *Candida albicans* 種のメンバー（これらに限らない）を包含する単細胞または糸状真核生物を意味する。

【0080】

「ポリヌクレオチド（複数でも可）」は、一般に、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のいずれをもいい、それらは非修飾RNAまたはDNA、あるいは修飾RNAまたはDNAであってもよい。「ポリヌクレオチド」は、単鎖および二本鎖DNA、単鎖および二本鎖領域または単鎖、二本鎖および三本鎖領域の混合物であるDNA、単鎖および二本鎖RNA、単鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、および単鎖またはより典型的には二本鎖または三本鎖領域または一本鎖および二本鎖領域の混合物であってもよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を包含するが、これに限定されない。さらに、本明細書において用いる「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNA、あるいはRNAおよびDNAの両方からなる三本鎖領域をいう。これらの領域の鎖は同じ分子からのものでも、異なる分子からのものでもよい。該領域は、これら分子の一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、分子のいくつかの領域のみを含む。三本螺旋領域の分子の一つは、しばしば、オリゴヌクレオチドである。本明細書において用いる場合、「ポリヌクレオチド（複数でも可）」なる用語はまた、一つまたはそれ以上の修飾された塩基を含有する上記DNAまたはRNAを包含する。すなわち、安定性または他の理由で修飾された骨格を有するDNAまたはRNAも、該用語が本明細書で意図するところの「ポリヌクレオチド（複数でも可）」である。さらに、イノシンなどの通常でない塩基、またはトリチル化された塩基などの修飾塩基を含むDNAまたはRNA（2つの例だけを示す）も、その用語を本明細書で用いる場合のポリヌクレオチドである。多

種の修飾がDNAおよびRNAになされており、当業者に公知のように多くの有用な目的に使用されていることが理解されよう。本明細書で用いる「ポリヌクレオチド」なる語は、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、ならびにウイルスおよび、例えば、単純型細胞および複雑型細胞などの細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド(複数でも可)」はまた、しばしばオリゴヌクレオチド(複数でも可)と称される比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

【0081】

「ポリペプチド(複数でも可)」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合で互いに結合した2つまたはそれ以上のアミノ酸を含むいずれのペプチドまたは蛋白質をもいう。「ポリペプチド(複数でも可)」は、通常、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと称される短い鎖、および一般に蛋白質と称される長い鎖の両方をいう。ポリペプチドは、遺伝子によりコードされている20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含有してもよい。「ポリペプチド(複数でも可)」は、プロセッシングおよび他の翻訳後の修飾のごとき自然の工程、または化学修飾技法のいずれかによって修飾されたものを有する。かかる修飾は、基本テキストにて、およびより詳細な研究論文にて、ならびに膨大な研究文献にて詳しく記載されており、それらは当業者に周知である。同じ型の修飾が、所定のポリペプチド中、いくつかの部位で、同じまたは異なる程度にて存在してもよいことは明らかであろう。また、所定のペプチドは多くの型の修飾を有していてもよい。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、アミノまたはカルボキシル末端を含め、ポリペプチドのどこでも起こりうる。修飾は、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、ヘム部分の共有結合、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、交差結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有交差結合の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、蛋白分解的プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、糖鎖形成、脂質付加、硫酸化、グルタミン酸残基の

ガンマーカルボキシル化、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のごとき転移RNAにより媒介される蛋白へのアミノ酸付加、およびユビキチネーションを包含する。例えば、PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 第2版, T.E.Creighton, W.H.Freeman and Company, New York (1993) およびWold, F., POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12頁, B.C.Johnson編, Academic Press, New York (1983); Seifterら, Meth Enzymol. (1990) 182: 626-646、およびRattanら, Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann N.Y. Acad Sci (1992) 663: 48-62を参照のこと。ポリペプチドは、分枝してもよく、分枝を伴ったまたは伴わない環状であってもよい。環状、分枝および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後の天然のプロセッシングの結果であり、同様に全く合成的な方法で合成できる。

【0082】

「組換え発現系（複数でも可）」は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの製造のために宿主細胞または宿主細胞溶解物中に導入または形質転換された発現系またはその部分または本発明のポリヌクレオチドをいう。

【0083】

本明細書中で使用される「変種（複数でも可）」なる語は、各々、対照標準のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるが、本質的な特性を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変種は、別の対照標準のポリヌクレオチドとヌクレオチド配列において異なっている。変種のヌクレオチド配列における変化は、対照標準のポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドのアミノ酸配列と変わっていてもよいし、または変わっていてもよい。ヌクレオチドの変化は、後述するように、対照標準の配列によってコードされたポリペプチドにおいて、アミノ酸置換、付加、欠失、融合および切断をもたらす。ポリペプチドの典型的な変種は、別の対照標準のポリペプチドとはアミノ酸配列において異なっている。一般に、差異は、対照標準のポリペプチドとその変種の配列が全体的に非常に類似しており、多くの領域

においては同一であるように限定される。変種および対照標準のポリペプチドは、一またはそれ以上の置換、付加、欠失のいずれかの組み合わせによって、アミノ酸配列において異なってもよい。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされたものであってもなくてもよい。また本発明は、本発明の各ポリペプチドの変種、すなわち保存的アミノ酸置換により対照標準とは異なっており、そのことにより残基が同様の特性を有する別の残基に置換されているものを包含する。典型的なかかる置換は、Ala、Val、LeuおよびIle間；SerおよびThr間；酸性残基AspおよびGlu間；AsnおよびGln間；塩基性残基LysおよびArg間；あるいは芳香族残基PheおよびTyr間のものである。数個、5～10個、1～5個、1～3個、1～2個または1個のアミノ酸がいずれかの組み合わせで置換、欠失、または付加されている変種が特に好ましい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は、対立遺伝子変種のような天然に存在するものであってもよく、または天然に存在することが知られていない変種であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しない変種は、変異誘発法または直接合成あるいは当業者に公知の他の組換え法によって作られてもよい。

【0084】

(実施例)

以下の実施例は、別に詳細に記載したこと以外は、当業者に周知で慣用的な標準的な技法を用いて実施する。実施例は例示であって、本発明を限定するものではない。

実施例1 株の選択、ライブラリーの製造および配列決定

表1(配列番号1)に示すDNA配列を有するポリヌクレオチドは、エシェリシア・コリ中のスタフィロコッカス・アウレウスの染色体DNAのクローンライブラリーより得た。重複するスタフィロコッカス・アウレウスDNAを含有する2個またはそれ以上のクローンからの配列データを用いて、配列番号1の連続したDNA配列を構築した。ライブラリーは常套手段、例えば以下の方法1および2により製造してもよい。

全細胞DNAをスタフィロコッカス・アウレウスWCUH29より、標準法に

従って単離し、以下に示す二つの方法のいずれかによりサイズ分画する。

【0085】

方法1

標準的方法に従ってサイズ分画するために、全細胞DNAをニードル (needle) に通して機械的に剪断する。11 kbpまでの大きさのDNAフラグメントをエキソヌクレアーゼおよびDNAポリメラーゼで処理することによって末端切断し、EcoRIリンカーを付加する。フラグメントを、EcoRIで切断したベクター、ラムダZapIIに連結し、標準的方法によりライブラリーをパッケージングし、次いでパッケージングしたライブラリーでエシェリシア・コリを感染させる。ライブラリーを標準方法により増幅する。

【0086】

方法2

全細胞DNAをライブラリーベクターにクローニングするための一連のフラグメントを得るのに適当な1つの制限酵素(例えば、RsaI、PaiI、AluI、Bsh1235I)またはその組み合わせで部分的に加水分解し、かかるフラグメントを標準的方法に従ってサイズ分画する。EcoRIリンカーをDNAに連結し、次いでそのフラグメントをEcoRIで切断したベクター、ラムダZapIIに連結し、標準的方法によりライブラリーをパッケージングし、パッケージングしたライブラリーでエシェリシア・コリを感染させる。ライブラリーを標準方法により増幅する。

【0087】

実施例2 mapの特徴付け

感染中のスタフィロコッカス・アウレウスからの遺伝子の発現の決定

スタフィロコッカス・アウレウスWCUH29が鼠蹊部に感染した4日経過後のマウスの懐死脂肪細胞をカオトロピック剤およびRNA阻害剤の存在下で効果的に粉碎し、処理して動物および細菌RNAの混合物を得る。安定した調製物および高収量の細菌RNAを得るための粉碎および処理の最適条件は、ノーザンブロットにおけるスタフィロコッカス・アウレウス16S RNAに特異的な放射性標識したオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにも使用される。得ら

れたRNAについてのRNAase不含、DNAase不含、DNAおよび蛋白不含の調合物は、スタフィロコッカス・アウレウスWCUH29の各遺伝子の配列から設計された独特なプライマー対を用いる逆転写PCR(RT-PCR)に適している。この操作を用いると、mapが感染の間に転写されることを説明することが可能であった。

【0088】

a) マウスの感染動物実験からのスタフィロコッカス・アウレウスWCUH29に感染した組織(肺)の単離

体積10mlの滅菌栄養培地(No.2 Oxoid)に、寒天培養プレートから単離した個々のスタフィロコッカス・アウレウスWCUH29を撒く。スタフィロコッカス・アウレウスWCUH29のプロス培養物(プロス中で約 10^8 cfu/mlとなるよう希釈)0.5mlを、右前足の大腿部(鼠蹊部)に皮下注射することにより4週齢のマウス(雌、18g-22g、MF1株)をそれぞれ感染させた。感染後24時間は、マウスを定期的にモニターすべきであり、その後、実験終了まで毎日モニターする。全身感染の徴候、すなわち昏睡状態、逆立った毛、群からの離脱を示す動物を詳細にモニターすべきであり、徴候が瀕死状態に至る場合には、その哺乳動物をすぐに除去すべきである。

傷害進展を示す外部から目で見えてわかる徴候は、感染後24~48時間現れるであろう。哺乳動物の腹部の実験により、皮膚下の膿瘍の盛り上がった輪郭が示されるであろう。局所的な障害は、右下大腿部にとどまるはずであるが、場合によっては左下大腿部および上にひろがって胸部に至るかもしれない。場合によっては膿瘍が皮膚層から破裂してくるかもしれない。このような場合、感染動物を即座に除去し、可能であればその組織をサンプリングする。動物を除去しないと、膿瘍を覆っている壊死皮膚組織が脱落し、腹部筋肉壁が露出するかもしれない。

感染の約96時間後、哺乳動物を二酸化炭素にを用いて窒息死させた。マウスの死亡から組織処理/保存までの時間を最小限にするために、マウスを群単位ではなく個別に殺すこととする。殺した哺乳動物を仰向けにし、毛皮に70%アルコールを横向けに拭く。最初の切開は、はさみを用いて左下大腿部から上へ移動

し、胸部を横断する。腹部より右下の大腿部への切開により切開を完了する。腹壁を貫通しないように注意すべきである。鉗子で皮膚を固定し、腹部から皮膚を静かに引っ張る。腹膜を覆っているが通常には筋肉シートを完全には貫通していない、露出した膿瘍を切除するが、内臓を傷つけないように注意する。

膿瘍 / 筋肉シートおよび他の感染組織をスライスし、その後、液体窒素中で急速冷凍することで、プラスチック製収集バイアル中での保存が容易になる。

【0089】

b) 感染組織試料からのスタフィロコッカス・アウレウス WC U H 2 9 R N A の単離

2 ml のねじふた付きチューブ中の 4 ~ 6 個の感染組織の試料 (各々約 0 . 5 ~ 0 . 7 g) を - 8 0 °C の保存庫からドライアイスエタノール浴中に取り出す。微生物安全キャビネット中で、試料をそれぞれ粉碎し、一方で残った試料をドライアイスエタノール浴中で冷却し続けた。細胞試料中の細菌を粉碎するために、1 ml の TRIzol 試薬 (Gibco BRL , Life Technologies) を加え、0 . 1 mm のジルコニア / シリカビーズをチューブがほとんどいっぱいになる十分な量を加え、ねじ溝にビーズが残らないように注意しながらゆっくりとフタをして、良好な密閉状態を保ち、エアロゾルの発生をなくす。次いで、試料を Mini - Bead Beater Type BX - 4 (Biospec Products) 中でホモジナイズする。壊死脂肪細胞を、5 0 0 0 rpm で 1 0 0 秒間処理して、細菌溶解物を得る。インビトロ培養した細菌は、インビトロ培養したスタフィロコッカスアウレウス (3 0 秒間ビーズ処理により粉碎される) より長く処理を必要とする。

粉碎中に発生した熱により TRIzol が分解され、シアニドが遊離する可能性があるため、ビーズ処理後、氷でチューブを冷却して、その後、フーム - フード (fume-hood) 中で開栓する。

次いで、2 0 0 マイクロリットルのクロロホルムを加え、チューブを手で 1 5 秒間振盪して完全に混合する。室温で 2 ~ 3 分置き、チューブを 1 5 分間 1 2 0 0 0 x g、4 °C で遠心分離し、次いで TRIzol 試薬の製造者による方法、すなわち ; 約 0 . 6 ml の水相を滅菌エッペンドルフチューブに移し、0 . 5 ml

のイソプロパノールを加える方法によりRNAの抽出を続ける。室温で10分置いた後、試料を12000×g、4℃で10分間遠心分離する。上清を除去し、次いでRNAペレットを1mlの75%エタノールで洗浄する。短時間ボルテックス攪拌をして試料を混合し、その後7500×g、4℃で5分間遠心分離に付した。エタノールを除去し、RNAペレットを5分以上減圧乾燥する。次いで、試料を100マイクロリットルのDEPC処理水中に繰り返しピペティングすることにより再懸濁し、つづいて55℃に5～10分間置く。最後に、氷上に少なくとも1分間置いた後、200単位のRnasin(Promega)を加える。

【0090】

RNA調製物を-80℃で一ヶ月までの間貯蔵する。長期貯蔵には、プロトコルの洗浄工程にあるRNA沈降物は75%エタノール中に少なくとも1年間、-20℃で貯蔵することができる。

試料を1%アガロースゲルに泳動させることで単離したRNAの特性を評価する。臭化エチジウムで染色した1×TBEゲルを用いてRNAの全収量を可視化する。感染組織からの細菌RNAの単離を示すために、1×MOPS、2.2Mホルムアルデヒドゲルで泳動を行い、Hybond-N(Amersham)に減圧プロットングする。ついで、プロットを、スタフィロコッカス・アウレウスの16S rRNAに特異的な、³²P標識オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせる(K. Greisen, M. Loeffelholz, A. Purohit and D. Leong. J. Clin. (1994) Microbiol. 32 335-351)。ハイブリダイズしているバンドの大きさをインビトロ増殖したスタフィロコッカス・アウレウスWCUH29から単離された対照RNAの大きさとノーザンプロットにおいて比較する。全RNA試料中において正しい大きさの細菌16S rRNAバンドが検出でき、TBEゲル上で可視化した場合、哺乳動物RNAの分解が示される。

【0091】

c)スタフィロコッカス・アウレウス由来のRNAからのDNAの除去

最終容量が90マイクロリットルのバッファー(200単位のRnasin(Promega)を添加補足)中で、3単位のDNAase I(増幅グレード)

(Gibco BRL, Life Technologies)を氷上で15分間処理することにより、73マイクロリットルのRNA試料からDNAを除去した。

製造者のプロトコルに従ってTRIzol LS試薬(Gibco BRL, Life Technologies)によりDNAaseを不活化し除去した。DNAase処理したRNAを、上記したようにRnasinを添加したDPEC処理水100マイクロリットル中に再び懸濁させた。

【0092】

d) 感染組織由来のRNA試料からのcDNAの調製

製造者の指示に従って、DNAase処理したRNAの試料10マイクロリットルを、First Strand cDNA合成キット用のSuperScript Preamplification System(Gibco BRL, Life Technologies)を用いて逆転写する。150ナノグラムのランダムヘキサマーを用いて各反応を開始する。SuperScript II逆転写酵素を添加しない対照も反応させる。+/-両方のRT試料をRNase Hで処理し、次いで、PCR反応に供する。

【0093】

e) 細菌cDNA種の存在を測定するためのPCRの使用

下記成分を添加することにより氷上で0.2mlの試験管においてPCR反応物をセットアップする：43マイクロリットルのPCR SUPERMIX(Gibco BRL, Life Technologies)；1マイクロリットル50mM MgCl₂(最終濃度を2.5mMとする)；1マイクロリットルのPCRプライマー(最適には、長さが18~25塩基対で、類似のアニーリング温度を有するように設計されたもの)(各プライマーは初濃度10mM)；および2マイクロリットルのcDNA。

【0094】

Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600においてPCR反応を以下のように行った：95℃で5分、次いでそれぞれ94℃、42℃そして72℃で30秒を50サイクル、その後72℃で3分、次いで、

保持温度4 とする（最適には、PCR産物の出現または欠乏を決定するためのサイクル数は30～50回であり、RT反応からの出発cDNA量の評価を行う場合には、最適には8～30サイクルである）。次いで、10マイクロリットルのアリコートをして1%1×TBEゲルで泳動し、臭化エチジウム染色する。PCR生成物については、存在するならば、100bpのDNAラダー（Gibco BRL, Life Technologies）との比較により大きさを評価する。別法として、都合よくは、標識PCRプライマー（例えば、染料で5'末端を標識したもの）を用いてPCR産物を標識し、PCR産物の適当なアリコートをポリアクリルアミドゲルで泳動し、適当なゲルスキャンニングシステム（例えば、Perkin Elmerにより提供されるGeneScan™ソフトウェアを用いたABI Prism™377 Sequencer）を用いてその存在および量を検出する。

【0095】

RT/PCR対照は+/-逆転写酵素反応物、非転写スタフィロコッカス・アウレウスWCUH29ゲノム配列からPCR産物を生じるように設計された16SrRNAプライマーもしくはDNA特異的プライマー対を含んでいてもよい。

プライマー対の効率を試験するために、それらをスタフィロコッカス・アウレウスWCUH29全DNAを用いるDNA PCRに使用する。PCR反応をセットアップし、cDNAの代わりに約1マイクログラムのDNAおよび35サイクルのPCRを用いて上記のごとく反応を行う。

DNA PCRまたはRT/PCRのいずれにおいても予想された大きさの産物を生じないプライマー対はPCR反応できず、そのようなものとしては不均一である。DNA PCRで正しい大きさの産物を生じるものは、RT/PCRで2つのクラスに分類される：1. インビボで転写されない遺伝子であって、RT/PCRにおいて産物を生じる再現性がないもの；および2. インビボで転写される遺伝子であって、RT/PCRにおいて正しい大きさの産物を再現性をもって生じ、+RT試料において-RT対照におけるシグナル（生じた場合には）よりも強力なシグナルを生じるもの。

【0096】

かかる実験に基づき、エス・アウレウスmap遺伝子は感染中に転写されると結論する。

実施例3**メチオニンアミノペプチダーゼの必要性**

メチオニンアミノペプチダーゼ遺伝子生成物の必要性は、エス・ニューモニエで決定された。エス・アウレウスおよびエス・ニューモニエ間の関係における我々の理解に基づくと、この遺伝子生成物はエス・アウレウスにおいて不可欠であると確信する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SmithKline Beecham Corporation
SmithKline Beecham, plc.

<120> map

<130> GM10232

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 759

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

atgattgtaa aaacagaaga agaattacaa gcgttaaaag aaattggata catatgcgct	60
aaagtgcgca atacaatgca agctgcaacc aaaccaggta tcaactacgaa agagcttgat	120
aatattgcga aagagttatt tgaagaatac ggtgctatct ctgcgccaat tcatgatgaa	180
aattttcctg gtcaaactg tattagtgtc aatgaagagg tggcacatgg gattccaagt	240
aagcgtgtca ttcgtgaagg agatttagta aatattgatg tatcggcttt gaagaatggc	300
tattatgcag atacaggcat ttcatttgtc gttggagaat cagatgatcc aatgaaacaa	360
aaagtatgtg acgtagcaac gatggcattt gagaatgcaa ttgcaaaagt aaaaccgggt	420
actaagttaa gtaacattgg taaagcgtg cataatacag ctagacaaaa tgatttgaaa	480
gtcattaata acttaacagg tcatggtgtt ggtttatcat tacatgaagc accagcacat	540
gtacttaatt actttgatcc aaaagacaaa acattattaa ctgaaggat ggtattagct	600
attgaaccgt ttatctcacc aaatgcatca tttgttacag aaggtaaaaa tgaatgggct	660
tttgaacgca gcgataaaag tttgttgct caaattgagc atacggttat cgtgactaag	720
gatggtccga ttttaacgac aaaattgaa gaagaatag	759

<210> 2

<211> 252

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

Met	Ile	Val	Lys	Thr	Glu	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Leu	Lys	Glu	Ile	Gly
1				5				10						15	

Tyr Ile Cys Ala Lys Val Arg Asn Thr Met Gln Ala Ala Thr Lys Pro
 20 25 30
 Gly Ile Thr Thr Lys Glu Leu Asp Asn Ile Ala Lys Glu Leu Phe Glu
 35 40 45
 Glu Tyr Gly Ala Ile Ser Ala Pro Ile His Asp Glu Asn Phe Pro Gly
 50 55 60
 Gln Thr Cys Ile Ser Val Asn Glu Glu Val Ala His Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Lys Arg Val Ile Arg Glu Gly Asp Leu Val Asn Ile Asp Val Ser Ala
 85 90 95
 Leu Lys Asn Gly Tyr Tyr Ala Asp Thr Gly Ile Ser Phe Val Val Gly
 100 105 110
 Glu Ser Asp Asp Pro Met Lys Gln Lys Val Cys Asp Val Ala Thr Met
 115 120 125
 Ala Phe Glu Asn Ala Ile Ala Lys Val Lys Pro Gly Thr Lys Leu Ser
 130 135 140
 Asn Ile Gly Lys Ala Val His Asn Thr Ala Arg Gln Asn Asp Leu Lys
 145 150 155 160
 Val Ile Lys Asn Leu Thr Gly His Gly Val Gly Leu Ser Leu His Glu
 165 170 175
 Ala Pro Ala His Val Leu Asn Tyr Phe Asp Pro Lys Asp Lys Thr Leu
 180 185 190
 Leu Thr Glu Gly Met Val Leu Ala Ile Glu Pro Phe Ile Ser Ser Asn
 195 200 205
 Ala Ser Phe Val Thr Glu Gly Lys Asn Glu Trp Ala Phe Glu Thr Ser
 210 215 220
 Asp Lys Ser Phe Val Ala Gln Ile Glu His Thr Val Ile Val Thr Lys
 225 230 235 240
 Asp Gly Pro Ile Leu Thr Thr Lys Ile Glu Glu Glu
 245 250

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/21165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 14/31, C12N 9/48, 9/52 US CL : 530/350; 435/212, 220 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) U.S. : 530/350; 435/212, 220 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 practicable, search terms used) DIALOG (files 5 and 155) and EAST (files U.S. Patents, European abstracts, Japanese abstracts, and Derwent) search terms: Staphylococcus aureus, map, aminopeptidase		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP O 786,519 A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 30 July 1997 (30-07-97), see abstract, SEQ ID NO: 227, and claims.	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand it: principle or theory underlying the invention
E earlier document published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*G* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 02 NOVEMBER 2000	Date of mailing of the international search report 03 JAN 2001	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer MARIAMNE P. ALLEN Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/21165**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

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

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

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

Box 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:

Please See Extra Sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.:

1

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/21165**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING**
This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

- Group I, claim 1, drawn to an isolated polypeptide.
- Group II, claims 2 and 5-7, drawn to an isolated polynucleotide.
- Group III, claim 3, drawn to a method for treatment.
- Group IV, claim 4, drawn to a method for diagnosis.
- Group V, claim 8, drawn to an antibody.
- Group VI, claim 9, drawn to a method for screening agonists and antagonists.
- Group VII, claim 10, drawn to an agonist or antagonist.

The inventions listed as Groups I-VII do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Group I forms a single inventive concept and contains a claim directed to a first appearing polypeptide product. This first appearing product possesses no special technical feature as prior art can be applied against the claim of Group I and a special technical feature must define a contribution over the prior art. (See reference to Human Genome Sciences, Inc. on attached search report.) Groups II, V, and VII are drawn to structurally different products which do not share the same or a corresponding special technical feature. Groups III-IV and VI are drawn to methods having different goals, method steps, and/or starting materials which do not share the same or a corresponding special technical feature. Note that PCT Rule 13 does not provide for multiple products or methods within a single application.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
C 0 7 K	16/40	C 1 2 N	1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15		1/21	4 C 0 8 5
	1/19		9/52	4 H 0 4 5
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10		1/37	
	9/52		1/68	A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
	1/37		33/50	Z
	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15			M
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A
		A 6 1 K	37/02	
(71)出願人	スミスクライン ビーチャム パブリック リミテッド カンパニー SmithKline Beecham p.l.c. イギリス国 ティダブリュ8 9ジーエ ス, ミドルセックス, プレントフォード, グレート ウェスト ロード 980			
(72)発明者	レスリー・エム・パーマー アメリカ合衆国19403ペンシルベニア州オ ーデュボン、イーグルビル・ロード2820番			
(72)発明者	クリストファー・エム・トレイニ アメリカ合衆国19063ペンシルベニア州メ ディア、ポッター・コート50番			
(72)発明者	マーティン・ケイ・アール・バーナム アメリカ合衆国19504ペンシルベニア州バ ート、フォージデイル・ロード565番			
(72)発明者	ジュディス・エム・ウォード イギリス、サリー、ドーキング、カーメ ル・コッテイジ、コトマンディーン19番			

Fターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB10 BB46
BB48 CB17 CB25 DA13 DA14
DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA14 CA03 CA07
CA09 CA12 CA20 DA01 DA02
DA05 DA12 EA03 GA11 HA11
HA13 HA14
4B050 CC01 CC03 CC05 DD02 LL01
LL03 LL05
4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19
QQ02 QQ21 QQ36 QQ41 QQ43
QQ53 QQ61 QQ89 QQ95 QR08
QR16 QR23 QR32 QR35 QR39
QR42 QR56 QR57 QR62 QR77
QR80 QS16 QS25 QS34 QS36
QX01 QX02 QX10
4B065 AA01X AA53Y AA58X AA72X
AA87X AB01 AC14 BA02
CA33 CA44 CA46
4C084 AA01 AA06 AA07 AA16 BA23
NA14 ZB31
4C085 AA03 BA13 CC07 CC21
4H045 AA11 AA30 CA11 DA75 EA20
EA50 FA71

专利名称(译)	地图		
公开(公告)号	JP2003510025A	公开(公告)日	2003-03-18
申请号	JP2001515711	申请日	2000-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	史密斯克莱恩比彻姆公司		
申请(专利权)人(译)	史克必成公司 史克必成公共有限公司		
[标]发明人	レスリーエムパーマー クリストファーエムトレイニ マーティンケイアールバーナム ジュディスエムウォード		
发明人	レスリー・エム・パーマー クリストファー・エム・トレイニ マーティン・ケイ・アール・バーナム ジュディス・エム・ウォード		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K45/00 A61P31/00 C07K14/31 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/52 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61P31/00 C07K14/31 Y02A90/24 Y02A90/26		
FI分类号	A61K39/00.H A61K45/00 A61P31/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/52 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB46 2G045/BB48 2G045/CB17 2G045/CB25 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA03 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA03 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD02 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ21 4B063/QQ36 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ95 4B063/QR08 4B063/QR16 4B063/QR23 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX10 4B065/AA01X 4B065/AA53Y 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA16 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZB31 4C085/AA03 4C085/BA13 4C085/CC07 4C085/CC21 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71		
优先权	09/370397 1999-08-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了图谱多肽和编码图谱多肽的多核苷酸，以及通过重组技术生产这种多肽的方法。还提供了利用图谱多肽筛选抗微生物化合物的方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/21163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC CL. 3A2; C12N 01/08, 9/52 US CL. 380/350, 435/212, 220 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) I.P.C.: 380/350, 435/212, 220 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 practicable, search terms used) DIALOAD (DBS 3 and 153) and EAST (DBS 11.5, Damsis, European abstracts, Japanese abstracts, and Dowload search terms: Staphylococcus aureus, map, autotranspirate)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 786 519 A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 30 July 1997 (30-07-97); see abstract, SEQ. ID NO. 227, and claims.	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* prior document published on or after the international filing date *C* document which may prove decisive of patentability of the claimed invention (see also the International Search Report) *D* document referred to in the International Search Report but not searched *E* document published prior to the international filing date but later than the priority date		**1* document published after the international filing date or priority date and not searched, but appearing to be of relevance to the invention **2* document of apparent relevance, the abstract of which may be consulted (partial or complete) in order to decide whether to search the document in order to decide whether to invite an applicant to amend his or her claims **3* document of technical relevance, the abstract of which may be consulted in order to decide whether to invite an applicant to amend his or her claims in order to decide whether to invite an applicant to amend his or her claims **4* document of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 02 NOVEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 03 JAN 2001
Name and mailing address of the ISA/US International Patent Center Washington, D.C. 20540		Author and address MARYANNE ALLEN Telephone No. (703) 308-0196
Facsimile No. (703) 305-3236		Telephone No. (703) 308-0196