

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-546925

(P2023-546925A)

(43)公表日 令和5年11月8日(2023.11.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	A Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04		4 C 0 8 4
A 6 1 K	35/74 (2015.01)	A 6 1 K	35/74	A	4 C 0 8 7
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17		
A 6 1 K	38/55 (2006.01)	A 6 1 K	38/55		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全36頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-524354(P2023-524354)				
(86)(22)出願日	令和3年10月20日(2021.10.20)				
(85)翻訳文提出日	令和5年6月19日(2023.6.19)				
(86)国際出願番号	PCT/US2021/055744				
(87)国際公開番号	WO2022/087065				
(87)国際公開日	令和4年4月28日(2022.4.28)				
(31)優先権主張番号	63/094,858				
(32)優先日	令和2年10月21日(2020.10.21)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				
(71)出願人	398066918 ザ ジャクソン ラボラトリー THE JACKSON LABORAT ORY アメリカ合衆国 メイン州 バー ハーバー メイン ストリート 6 0 0				
(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策				
(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹				
(74)代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏				
(74)代理人	100181641 弁理士 石川 大輔				
(74)代理人	230113332 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 抗菌バイオセンサー

(57)【要約】

Staphylococcus aureus I型、II型、III型、および／またはIV型 感染を処置するための皮膚用抗菌バイオセンサーが、本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、上記抗菌バイオセンサーは、*Staphylococcus epidermidis* 細胞において発現される。本開示は、いくつかの局面において、抗菌剤曝露の空間的かつ時間的制御を提供する皮膚用の微生物治療バイオセンサーを提供する。本明細書で記載されるように、抗菌剤を制御された様式で送達するための操作された微生物設計の使用は、天然に存在する抗菌剤を分泌するプロバイオティク株の使用を超える重要な利益を提供する。



FIG. 1C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

操作された *Staphylococcus (S.) epidermidis* 細胞であって、*S. aureus* クオラムセンシングレセプターを含む、操作された細胞。

【請求項 2】

前記 *S. aureus* クオラムセンシングレセプターは、*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムの構成要素である、請求項 1 に記載の操作された細胞。

【請求項 3】

前記細胞は、*agr* 欠損変異体 *S. epidermidis* 細胞である、請求項 1 または 2 に記載の操作された細胞。

【請求項 4】

前記クオラムセンシングシグナル応答システムは、治療用ペプチドコード配列に作動可能に連結された第 1 のプロモーター配列を含む、請求項 2 または 3 に記載の操作された細胞。

【請求項 5】

前記プロモーター配列は、前記クオラムセンシングシグナル応答システムのシグナル伝達によって活性化される、請求項 4 に記載の操作された細胞。

【請求項 6】

前記治療用ペプチドコード配列は、抗菌ペプチドコード配列である、請求項 4 または 5 に記載の操作された細胞。

【請求項 7】

前記クオラムセンシングシグナル応答システムは、(a) *AgrA* をコードする *S. aureus agrA* コード配列および (b) *S. aureus AgrC* をコードする *S. aureus agrC* コード配列を含む、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 8】

前記第 1 のプロモーター配列は、*S. aureus AgrA* によって活性化される、請求項 7 に記載の操作された細胞。

【請求項 9】

前記 *S. aureus agrA* コード配列は、第 2 のプロモーター配列に作動可能に連結される、請求項 7 または 8 に記載の操作された細胞。

【請求項 10】

前記 *S. aureus agrC* コード配列は、第 2 のプロモーター配列に作動可能に連結される、請求項 7 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 11】

前記 *S. aureus agrA* コード配列および前記 *S. aureus agrC* コード配列は、第 2 のプロモーター配列に作動可能に連結される、請求項 7 に記載の操作された細胞。

【請求項 12】

前記第 2 のプロモーター配列は、構成的プロモーター配列である、請求項 9 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 13】

前記第 1 のプロモーター配列および第 2 のプロモーター配列は、互いに対して反対の方向に配向される、請求項 9 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 14】

前記第 1 のプロモーター配列および前記第 2 のプロモーター配列は、双方向プロモーターの構成要素である、請求項 13 に記載の操作された細胞。

【請求項 15】

双方向プロモーターを含む核酸を含む操作された *agr* 欠損変異体 *Staphylococcus (S.) epidermidis* 細胞であって、ここで前記双方向プロモーター

10

20

30

40

50

は、(a) *S. aureus agrA*コード配列および*S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(b) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結され、ここで前記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、操作された細胞。

【請求項16】

前記抗菌ペプチドのサイズは、5 kD～100 kD、または5 kD～50 kDである、請求項6～15のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項17】

前記抗菌ペプチドは、LL-37である、請求項6～16のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項18】

前記抗菌ペプチドは、エラフィンである、請求項6～16のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項19】

前記抗菌ペプチドは、ヒラシンである、請求項6～16のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項20】

双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む操作された*agr*欠損変異体*Staphylococcus (S.) epidermidis*細胞であって、ここで前記双方向プロモーターは、(a) *S. aureus agrA*コード配列および*S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(b) 抗菌LL-37ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結され、ここで前記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、操作された細胞。

【請求項21】

双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む操作された*agr*欠損変異体*Staphylococcus (S.) epidermidis*細胞であって、ここで前記双方向プロモーターは、(a) *S. aureus agrA*コード配列および*S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(b) 抗菌エラフィンペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結され、ここで前記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、操作された細胞。

【請求項22】

双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む操作された*agr*欠損変異体*Staphylococcus (S.) epidermidis*細胞であって、ここで前記双方向プロモーターは、(a) *S. aureus agrA*コード配列および*S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(b) 抗菌ヒラシンペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結され、ここで前記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、操作された細胞。

【請求項23】

前記双方向プロモーターは、構成的プロモーター配列、必要に応じて*S. epidermidis*プロモーター配列、ならびに*S. aureus P3*プロモーター配列、または*S. aureus P2*プロモーター配列および*S. aureus P3*プロモーター配列を含む、請求項14～22のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項24】

前記構成的プロモーター配列または前記*S. aureus P2*プロモーター配列は、前記*S. aureus agrA*コード配列および前記*S. aureus agrC*コード配列に作動可能に連結され、前記*S. aureus P3*プロモーター配列は、前記抗菌ペプチドコード配列に作動可能に連結される、請求項23に記載の操作された細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

前記 *S. aureus agrA* コード配列および前記 *S. aureus agrC* コード配列は、*S. aureus* I 型、II 型、III 型、または IV 型コード配列として分類される、請求項 7～24 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 26】

前記 *S. aureus agrA* コード配列および前記 *S. aureus agrC* コード配列は、*S. aureus* I 型コード配列として分類される、請求項 25 に記載の操作された細胞。

【請求項 27】

前記 *S. epidermidis* 細胞は、Tue3298 株またはその *agr* 欠損変異体として分類される、前述の請求項のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。 10

【請求項 28】

前記操作された核酸は、前記 *S. epidermidis* 細胞のゲノムへと組み込まれる、前述の請求項のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 29】

前記 *S. epidermidis* 細胞のゲノムは、単一コピーの前記操作された核酸を含む、請求項 28 に記載の操作された細胞。

【請求項 30】

前記 *S. aureus agrA* コード配列、前記 *S. aureus agrC* コード配列、および／または前記抗菌ペプチドコード配列は、*S. epidermidis* における発現のためにコドン最適化される、請求項 7～29 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。 20

【請求項 31】

前記細胞は、前記抗菌ペプチドに対して免疫性である、前述の請求項のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 32】

前記細胞は、前記抗菌ペプチドに対する耐性を付与する遺伝子を含む、請求項 31 に記載の操作された細胞。

【請求項 33】

前記抗菌ペプチドは、分泌シグナル配列に連結される、請求項 6～32 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。 30

【請求項 34】

前述の請求項のいずれか 1 項に記載の操作された細胞を含む組成物。

【請求項 35】

局所投与のために製剤化される、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

バイオフィルム、クリーム剤、ローション剤、またはゲルとして製剤化される、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

(a) LL-37 コード配列に作動可能に連結された第 1 のプロモーター配列、ならびに
(b) *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に作動可能に連結された第 2 のプロモーター配列を含む操作された核酸であって、ここで前記第 1 のプロモーターは、*S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される、操作された核酸。 40

【請求項 38】

(a) エラフィンコード配列に作動可能に連結された第 1 のプロモーター配列、ならびに
(b) *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に作動可能に連結された第 2 のプロモーター配列を含む操作された核酸であって、ここで前記第 1 のプロモーターは、*S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される、操作された核酸。 50

【請求項 39】

(a) ヒラシンコード配列に作動可能に連結された第1のプロモーター配列、ならびに (b) *S. aureus agrA*コード配列および*S. aureus agrC*コード配列に作動可能に連結された第2のプロモーター配列を含む操作された核酸であって、ここで前記第1のプロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、操作された核酸。

【請求項 40】

前記第1のプロモーター配列および第2のプロモーター配列は、互いに対して反対の方向に配向される、請求項37～39のいずれか1項に記載の操作された核酸。

【請求項 41】

前記第1のプロモーター配列および前記第2のプロモーター配列は、双方向プロモーターの構成要素である、請求項40に記載の操作された核酸。

【請求項 42】

前述の請求項のいずれか1項に記載の2種の細胞、第1の細胞および第2の細胞を含む組成物であって、ここで前記第1の細胞の*S. aureus*クオラムセンシングシグナル応答システムは、第1の株のものであり、前記第2の細胞の*S. aureus*クオラムセンシングシグナル応答システムは、第2の株のものである、組成物。

【請求項 43】

前記第1の株および前記第2の株は、I型 *S. aureus*株、II型 *S. aureus*株、III型 *S. aureus*株、およびIV型 *S. aureus*株から選択される、請求項42に記載の組成物。

【請求項 44】

(a) 前記第1の株は、I型 *S. aureus*株であり、前記第2の株は、II型 *S. aureus*株である；
(b) 前記第1の株は、I型 *S. aureus*株であり、前記第2の株は、III型 *S. aureus*株である；
(c) 前記第1の株は、I型 *S. aureus*株であり、前記第2の株は、IV型 *S. aureus*株である；
(d) 前記第1の株は、II型 *S. aureus*株であり、前記第2の株は、III型 *S. aureus*株である；
(e) 前記第1の株は、II型 *S. aureus*株であり、前記第2の株は、IV型 *S. aureus*株である；または
(f) 前記第1の株は、III型 *S. aureus*株であり、前記第2の株は、IV型 *S. aureus*株である、
請求項43に記載の組成物。

【請求項 45】

前述の請求項のいずれか1項に記載の3種の細胞、第1の細胞、第2の細胞および第3の細胞を含む組成物であって、ここで前記第1の細胞の*S. aureus*クオラムセンシングシグナル応答システムは、第1の株のものであり、前記第2の細胞の*S. aureus*クオラムセンシングシグナル応答システムは、第2の株のものであり、前記第3の細胞の*S. aureus*クオラムセンシングシグナル応答システムは、第3の株のものである、組成物。

【請求項 46】

前記第1の株、前記第2の株、および前記第3の株は、I型 *S. aureus*株、II型 *S. aureus*株、III型 *S. aureus*株、およびIV型 *S. aureus*株から選択される、請求項45に記載の組成物。

【請求項 47】

前記第1の株は、I型 *S. aureus*株であり、

(a) 前記第2の株は、II型 *S. aureus*株であり、前記第3の株は、III型 *S. aureus*株である；

(b) 前記第2の株は、II型 *S. aureus* 株であり、前記第3の株は、IV型 *S. aureus* 株である；または

(c) 前記第2の株は、III型 *S. aureus* 株であり、前記第3の株は、IV型 *S. aureus* 株である、
請求項46に記載の組成物。

【請求項48】

前述の請求項のいずれか1項に記載の4種の細胞、第1の細胞、第2の細胞、第3の細胞および第4の細胞を含む組成物であって、ここで前記第1の細胞の*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第1の株のものであり、前記第2の細胞の*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第2の株のものであり、前記第3の細胞の*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第3の株のものであり、前記第4の細胞の*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第4の株のものである、組成物。

10

【請求項49】

前記第1の株、前記第2の株、前記第3の株および前記第4の株は、I型 *S. aureus* 株、II型 *S. aureus* 株、III型 *S. aureus* 株、およびIV型 *S. aureus* 株から選択され、各細胞は、互いに対して異なる株のものである、請求項48に記載の組成物。

【請求項50】

前述の請求項のいずれか1項に記載の組成物を被験体に投与する工程を包含する方法。

20

【請求項51】

前記被験体は、毒性の細菌感染を有する、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記毒性の細菌感染は、皮膚の細菌感染である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記毒性の細菌感染は、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染である、請求項51または52に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

政府のライセンスの権利

本発明は、米国国防総省によって授与されたW81XWH181 0229の下で政府支援を得て行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0002】

関連出願

本出願は、特許法第119条(e)の下で、2020年10月21日出願の米国仮特許出願第63/094,858号(これは、その全体において本明細書に参考として援用される)の利益を主張する。

【背景技術】

【0003】

40

背景

メチシリン耐性 *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* (MRSA) のような病原体の出現および毒性は、急激に増大しつつあり、利用可能な、または感染(特に、皮膚と関連するもの)を処置するための開発において、抗生物質の数は限られている。防止および急性期ケアのための新たな治療剤の重大な必要性が存在する。

【0004】

既存の抗菌剤の潜在的な限界は、それらが代表的には、スペクトラムが広く、周辺の皮膚のマイクロバイオーームに重大に影響を与え得ることである。マイクロバイオーームの多様性は、皮膚の健康状態を改善し、病原体のコロニー形成に耐え、病原体に対する宿主免疫応答を支持することが示されている。さらに、使用が増大すると、抗生物質耐性が発生し

50

、拡がる相対的リスクが増大し得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

要旨

本開示は、いくつかの局面において、抗菌剤曝露の空間的かつ時間的制御を提供する皮膚用の微生物治療バイオセンサーを提供する。本明細書で記載されるように、抗菌剤を制御された様式で送達するための操作された微生物設計の使用は、天然に存在する抗菌剤を分泌するプロバイオティック株の使用を超える重要な利益を提供する。例えば、操作された片利共生生物は、上記プロバイオティックに対する任意の固有の制限に対して、そのコロニー形成、寿命、および抗菌特性を改善する所望の特性を有するように改変され得、これは、皮膚において制限されたまたは差別的な（*differential*）コロニー形成の成功を有し得る。標的化され、操作され、要求に応じた抗菌治療剤の概念の総和として、バイオセンサー生物は、病原性細菌（例えば、*S. aureus*）の存在を検出し得、それに応じて応答し得、一連の異なる人由来または細菌由来の抗菌剤を生成する。

10

【0006】

本開示のいくつかの局面は、*S. aureus* クオラムセンシングレセプターを含む操作された *Staphylococcus (S.) epidermidis* 細胞を提供する。いくつかの実施形態において、上記 *S. aureus* クオラムセンシングレセプターは、*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムの構成要素である。

20

【0007】

いくつかの実施形態において、上記細胞は、*agr* 欠損変異体 *S. epidermidis* 細胞である。

【0008】

いくつかの実施形態において、上記クオラムセンシングシグナル応答システムは、治療用ペプチドコード配列に作動可能に連結された第1のプロモーター配列を含む。

【0009】

いくつかの実施形態において、上記プロモーター配列は、上記クオラムセンシングシグナル応答システムのシグナル伝達によって活性化される。

【0010】

いくつかの実施形態において、上記治療用ペプチドコード配列は、抗菌ペプチドコード配列である。

30

【0011】

いくつかの実施形態において、上記クオラムセンシングシグナル応答システムは、（a）*AgrA* をコードする *S. aureus agrA* コード配列および（b）*S. aureus AgrC* をコードする *S. aureus agrC* コード配列を含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、上記第1のプロモーター配列は、*S. aureus AgrA* によって活性化される。

【0013】

いくつかの実施形態において、上記 *S. aureus agrA* コード配列は、第2のプロモーター配列に作動可能に連結される。

40

【0014】

いくつかの実施形態において、上記 *S. aureus agrC* コード配列は、第2のプロモーター配列に作動可能に連結される。

【0015】

いくつかの実施形態において、上記 *S. aureus agrA* コード配列および上記 *S. aureus agrC* コード配列は、第2のプロモーター配列に作動可能に連結される。

【0016】

50

いくつかの実施形態において、上記第2のプロモーター配列は、構成的プロモーター配列である。

【0017】

いくつかの実施形態において、上記第1のプロモーター配列および第2のプロモーター配列は、互いに対して反対の方向に配向される。

【0018】

いくつかの実施形態において、上記第1のプロモーター配列および上記第2のプロモーター配列は、双方向プロモーターの構成要素である。

【0019】

本開示の他の局面は、双方向プロモーターを含む核酸を含む操作された *agr* 欠損変異体 *Staphylococcus* (S.) *epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、(a) *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(b) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結され、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される操作された細胞を提供する。

10

【0020】

いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドのサイズは、5 kD ~ 100 kD、または 5 kD ~ 50 kD である。

【0021】

いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドは、LL-37 である。いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドは、エラフィンである。いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドは、ヒラシン (hiracin) である。

20

【0022】

本開示のさらに他の局面は、双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む操作された *agr* 欠損変異体 *Staphylococcus* (S.) *epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、(a) *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(b) 抗菌 LL-37 ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結され、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される操作された細胞を提供する。

30

【0023】

本開示のさらに他の局面は、双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む操作された *agr* 欠損変異体 *Staphylococcus* (S.) *epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、(a) *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(b) 抗菌エラフィンペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結され、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される操作された細胞を提供する。

【0024】

本開示のいくつかの局面は、双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む操作された *agr* 欠損変異体 *Staphylococcus* (S.) *epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、(a) *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(b) 抗菌ヒラシンペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結され、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される操作された細胞を提供する。

40

【0025】

いくつかの実施形態において、上記双方向プロモーターは、構成的プロモーター配列、必要に応じて *S. epidermidis* プロモーター配列、ならびに *S. aureus*

50

P 3 プロモーター配列、または *S. aureus* P 2 プロモーター配列および *S. aureus* P 3 プロモーター配列を含む。

【0026】

いくつかの実施形態において、上記構成的プロモーター配列または上記 *S. aureus* P 2 プロモーター配列は、*S. aureus* *agrA* コード配列および上記 *S. aureus* *agrC* コード配列に作動可能に連結され、上記 *S. aureus* P 3 プロモーター配列は、上記抗菌ペプチドコード配列に作動可能に連結される。

【0027】

いくつかの実施形態において、上記 *S. aureus* *agrA* コード配列および上記 *S. aureus* *agrC* コード配列は、*S. aureus* I 型、II 型、III 型、または IV 型コード配列として分類される。

10

【0028】

いくつかの実施形態において、上記 *S. aureus* *agrA* コード配列および上記 *S. aureus* *agrC* コード配列は、*S. aureus* I 型コード配列として分類される。

【0029】

いくつかの実施形態において、上記 *S. epidermidis* 細胞は、Tue 3 2 9 8 株またはその *agr* 欠損変異体として分類される。

【0030】

いくつかの実施形態において、上記操作された核酸は、上記 *S. epidermidis* 細胞のゲノムへと組み込まれる。

20

【0031】

いくつかの実施形態において、上記 *S. epidermidis* 細胞のゲノムは、単一コピーの上記操作された核酸を含む。

【0032】

いくつかの実施形態において、上記 *S. aureus* *agrA* コード配列、上記 *S. aureus* *agrC* コード配列、および／または上記抗菌ペプチドコード配列は、*S. epidermidis* における発現のためにコドン最適化される。

【0033】

いくつかの実施形態において、上記細胞は、上記抗菌ペプチドに対して免疫性である。

30

【0034】

いくつかの実施形態において、上記細胞は、上記抗菌ペプチドに対する耐性を付与する遺伝子を含む。

【0035】

いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドは、分泌シグナル配列に連結される。

【0036】

本開示のいくつかの局面は、前述の段落のいずれか 1 つに記載の操作された細胞を含む組成物を提供する。

【0037】

いくつかの実施形態において、上記組成物は、局所投与のために製剤化される。例えば、上記組成物は、バイオフィルム、クリーム剤、ローション剤、またはゲルとして製剤化され得る。

40

【0038】

本開示の他の局面は、(a) LL-37 コード配列に作動可能に連結された第 1 のプロモーター配列、ならびに (b) *S. aureus* *agrA* コード配列および *S. aureus* *agrC* コード配列に作動可能に連結された第 2 のプロモーター配列を含む操作された核酸であって、ここで上記第 1 のプロモーターは、*S. aureus* AgrA タンパク質によって活性化される操作された核酸を提供する。

【0039】

本開示のさらに他の局面は、(a) エラフィンコード配列に作動可能に連結された第 1

50

のプロモーター配列、ならびに (b) *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に作動可能に連結された第 2 のプロモーター配列を含む操作された核酸であって、ここで上記第 1 のプロモーターは、*S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される操作された核酸を提供する。

【0040】

本開示のさらなる局面は、(a) ヒラシンコード配列に作動可能に連結された第 1 のプロモーター配列、ならびに (b) *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に作動可能に連結された第 2 のプロモーター配列を含む操作された核酸であって、ここで上記第 1 のプロモーターは、*S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される操作された核酸を提供する。

10

【0041】

いくつかの実施形態において、上記第 1 のプロモーター配列および第 2 のプロモーター配列は、互いに対して反対の方向に配向される。

【0042】

いくつかの実施形態において、上記第 1 のプロモーター配列および上記第 2 のプロモーター配列は、双方向プロモーターの構成要素である。

【0043】

本開示のいくつかの局面は、前述の段落のいずれかに記載の 2 種の細胞、第 1 の細胞および第 2 の細胞を含む組成物であって、ここで上記第 1 の細胞の *S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第 1 の株のものであり、上記第 2 の細胞の *S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第 2 の株のものである組成物を提供する。

20

【0044】

いくつかの実施形態において、上記第 1 の株および上記第 2 の株は、I 型 *S. aureus* 株、II 型 *S. aureus* 株、III 型 *S. aureus* 株、および IV 型 *S. aureus* 株から選択される。

【0045】

いくつかの実施形態において、(a) 上記第 1 の株は、I 型 *S. aureus* 株であり、上記第 2 の株は、II 型 *S. aureus* 株である；(b) 上記第 1 の株は、I 型 *S. aureus* 株であり、上記第 2 の株は、III 型 *S. aureus* 株である；(c) 上記第 1 の株は、I 型 *S. aureus* 株であり、上記第 2 の株は、IV 型 *S. aureus* 株である；(d) 上記第 1 の株は、II 型 *S. aureus* 株であり、上記第 2 の株は、III 型 *S. aureus* 株である；(e) 上記第 1 の株は、II 型 *S. aureus* 株であり、上記第 2 の株は、IV 型 *S. aureus* 株である；または (f) 上記第 1 の株は、III 型 *S. aureus* 株であり、上記第 2 の株は、IV 型 *S. aureus* 株である。

30

【0046】

本開示の他の局面は、前述の段落のいずれか 1 項に記載の 3 種の細胞、第 1 の細胞、第 2 の細胞および第 3 の細胞を含む組成物であって、ここで上記第 1 の細胞の *S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第 1 の株のものであり、上記第 2 の細胞の *S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第 2 の株のものであり、上記第 3 の細胞の *S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第 3 の株のものである組成物を提供する。

40

【0047】

いくつかの実施形態において、上記第 1 の株、上記第 2 の株および上記第 3 の株は、I 型 *S. aureus* 株、II 型 *S. aureus* 株、III 型 *S. aureus* 株、および IV 型 *S. aureus* 株から選択される。

【0048】

いくつかの実施形態において、上記第 1 の株は、I 型 *S. aureus* 株であり、(a) 上記第 2 の株は、II 型 *S. aureus* 株であり、上記第 3 の株は、III 型

50

S. aureus 株である；(b) 上記第2の株は、II型 *S. aureus* 株であり、上記第3の株は、IV型 *S. aureus* 株である；または(c) 上記第2の株は、III型 *S. aureus* 株であり、上記第3の株は、IV型 *S. aureus* 株である。

【0049】

本開示のさらに他の局面は、前述の段落のいずれか1項に記載の4種の細胞、第1の細胞、第2の細胞、第3の細胞および第4の細胞を含む組成物であって、ここで上記第1の細胞の*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第1の株のものであり、上記第2の細胞の*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第2の株のものであり、上記第3の細胞の*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第3の株のものであり、上記第4の細胞の*S. aureus* クオラムセンシングシグナル応答システムは、第4の株のものである組成物を提供する。

10

【0050】

いくつかの実施形態において、上記第1の株、上記第2の株、上記第3の株および上記第4の株は、I型 *S. aureus* 株、II型 *S. aureus* 株、III型 *S. aureus* 株、およびIV型 *S. aureus* 株から選択され、各細胞は、互いに対して異なる株のものである。

【0051】

本開示のさらなる局面は、前述の段落のいずれか1つに記載の組成物を被験体に投与する工程を包含する方法を提供する。

20

【0052】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、毒性の細菌感染を有する。例えば、上記毒性の細菌感染は、皮膚の細菌感染であり得る。いくつかの実施形態において、上記毒性の細菌感染は、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染である。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】図1A～1C。 バイオセンサーデザイン。(図1A) *agr* 型(I～IV)の各々に関する*agr* グループおよび自己誘導因子構造を有する選択された *staphylococci* の系統樹が示される。配列番号3は、*agr* I型グループ(AIP-1)の自己誘導因子ペプチド配列である。配列番号4は、*agr* IV型グループ(AIP-2)の自己誘導因子ペプチド配列である。配列番号5は、*agr* III型グループ(AIP-3)の自己誘導因子ペプチド配列である。配列番号6は、*agr* II型グループ(AIP-4)の自己誘導因子ペプチド配列である。(図1B) 単一構成要素システムとして上記4つの型に由来する*agr* 構成要素を使用するバイオセンサー構築物のスキーム。(図1C) バイオセンサー制御下での抗菌ペプチド(LL-37)の例。

30

【0054】

【図2-1】図2A～2B。 バイオセンサー検証。(図2A) I型 *S. aureus* (1型 USA300)、II型 *S. aureus* (2型 NR-46204)、III型 *S. aureus* (3型 NR-46081)、IV型 *S. aureus* (4型 NR-45944)、または培地コントロール(TSB)上清を、I型、II型、III型、IV型、またはコントロールプラスミド(pCN34) バイオセンサーを発現する *S. epidermidis* Tue3298細胞に添加し、上記バイオセンサーによって生成されるGFP蛍光を測定した(OD正規化GFP蛍光)。(図2B) I型バイオセンサーを、*S. epidermidis* 株 NRL Lへと組み込み、上記I型バイオセンサーの活性化を、親 *S. epidermidis* NRL L株に対して、I型 *S. aureus* 上清の種々の希釈物(1:10、1:20、1:40、1:80、1:160)または培地コントロール(TSB)で測定した。

40

【図2-2】同上。

【0055】

50

【図3】図3. インビボでのバイオセンサー検証。無菌C57BL/6Jマウスに傷をつけ、(1) 10^5 USA300 (「USA300」, メチシリン耐性 *S. aureus* agr 1型株) + 10^8 *S. epidermidis* (「*S. epi*」) Tu3298Δagr (グループ1; USA300 + コントロール *S. epidermidis*) または (2) 10^5 USA300 + 10^8 *S. epidermidis* リソスタフィン生成バイオセンサー (グループ2; USA300 + バイオセンサー *S. epidermidis*) で処置した。プレートされるコロニー形成細菌を、マンニトール塩アガー上にプレートし、*S. aureus* および *S. epidermidis* コロニーを、定量した (コロニー形成単位)。グループ1に関しては $n = 4$; グループ2に関しては $n = 5$ 。

10

【発明を実施するための形態】

【0056】

詳細な説明

本開示の治療用バイオセンサーのデザインは、種内の細胞-細胞コミュニケーションの機序であるクオラムセンシングに基づく。*Staphylococcus* (*S.*) *aureus* は、シグナル伝達物質 AgrA を介して細胞内の下流のプロセスを活性化するために、膜貫通型タンパク質 (AgrC) によって感知され得る、自己誘導因子ペプチド (AIP) と称される化学物質を生成する (例えば、Novick RPら. *Annu. Rev. Genet.* 2008 42: 541-64の図1参照)。*S. aureus* クオラムセンシング機序は、4種の主要な agr 「型」へと分類されており、その各々は、異なる毒性の株から構成される。本明細書で提供される治療用バイオセンサーは、いくつかの実施形態において、*S. aureus* AgrC および AgrA の対の各型を発現するように操作された皮膚の片利共生 *S. epidermidis* 株に基づく (例えば、Olson ME et al. *J Bacteriol.* 2014 Oct; 196 (19): 3482-3493を参照のこと)。これらの株は、環境中の *S. aureus* の存在を感知し、P3プロモーターの制御下で配置される遺伝子をオンにし、そうすると、AgrC/AgrAシグナル伝達のAIP刺激の相当する型に応答する。

20

【0057】

治療用バイオセンサー組成物および細胞

本開示のいくつかの局面は、片利共生細菌細胞 (例えば、*S. aureus* agrA コード配列および *S. aureus* agrC コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* AgrA タンパク質によって活性化される、細胞 (例えば、agr欠損 *S. epidermidis* 細胞)) を含む組成物を提供する。

30

【0058】

他の局面は、片利共生細菌細胞 (例えば、*S. aureus* agrA コード配列および *S. aureus* agrC コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* AgrA タンパク質によって活性化される、細胞 (例えば、agr欠損 *S. epidermidis* 細胞)) を提供する。

40

【0059】

Staphylococci は、ヒトおよび他の哺乳動物の皮膚および粘膜の一般的な定着細菌 (bacterial colonizer) である (Kloos W, Schleifer K H. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. PHA S, SM, MES, JGH, 編者. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986)。*S. epidermidis* は、凝固酵素陰性 *staphylococci* (CONS) のグループに

50

属し、上記酵素、凝固酵素を欠くことによって、凝固酵素陽性 *staphylococci* (例えば、*S. aureus*) から区別される。その種は、74の同定された配列型 (ST) を有する高度の多様性を示す (Miragaia Mら, *J Bacteriol.* 2007 Mar; 189 (6): 2540-52)。大部分の単離物は、クローナルコンプレックス (clonal complex) (CC) 2に属し、これは、最も頻繁に単離されるST2を含む。おそらくは、ST2の成功裡の拡がりは、全てのST2単離物が、IS256挿入配列およびica遺伝子を含むという事実に起因し得 (Li Mら, *J Med Microbiol.* 2009 Apr; 58 (Pt 4): 456-461)、その2つの要因は、*S. epidermidis* 侵襲性と相関することが見出された (Faurischou Mら, *Microbes Infect.* 2003; 5: 1317-1327; Yao Yら, *J Infect Dis.* 2005; 191: 289-298; Khardori Nら, *J Ind Microbiol.* 1995; 15: 148-151; Duguid IGら, *Antimicrob Chemother.* 1992; 30: 803-810)。さらに、大部分のST2単離物は、インビトロでバイオフィルムを形成する能力を示す (Li Mら, *J Med Microbiol.* 2009; 58: 456-461.)。ゲノム情報は、*S. epidermidis* のいくつかの株 (バイオフィルム陰性ATCC 12228 (Zhang YQら, *Mol Microbiol.* 2003; 49: 1577-1593)、バイオフィルム陽性臨床単離物RP62A (Rogers KLら, *Infect Dis Clin North Am.* 2009; 23: 73-98)、およびそのエピデルミン (epidermin) の生成およびicaABCDオペロンの非存在に関して公知のTue3298 (Moran JCら, *Genome Announc.* 2016 Mar-Apr; 4 (2): e00112-16)を含む) に関して入手可能である。いくつかの実施形態において、上記*S. epidermidis* 細胞は、株Tue3298として分類される。

10

20

30

40

50

【0060】

本明細書で提供される*S. epidermidis* 細胞は、いくつかの実施形態において、agr欠損性である。*S. epidermidis* 細胞は、本明細書において、その細胞がAgrAタンパク質もAgrCタンパク質も発現しない場合、agr欠損性と考えられる。例えば、Vuong C.ら, *Infect Immun.* 2000 Mar; 68 (3): 1048-1053を参照のこと。いくつかの実施形態において、agrオペロン (AgrBDCAをコードする) 全体が不活性化される (例えば、改変または欠失される)。

【0061】

メチシリン耐性*Staphylococcus aureus* (MRSA) は、医療状況にける重篤な皮膚感染と関連する多剤耐性グラム陽性*Staphylococci* (Carrel, M., Perencevich, E. N., and David, M. Z. (2015) *USA300 Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, United States, 2000-2013. Emerging Infect. Dis.* 21, 1973)であり、これは、敗血症および死亡をもたらし得る (Lowy, F. N. *Engl. J. Med.* 1998; 339: 520)。MRSA関連死の頻度は、HIVによって引き起こされるものを上回っており、疾病予防管理センター (CDC) によって、重大な公衆衛生上の脅威として分類されている (Gupta, AKら, *Int. J. Dermatol.* 2015; 54, 1226-32)。グラム陽性*S. aureus* は、微生物の運動および固着性 (sessile) の生活様式を制御するために、ペプチドベースの2構成要素のクオラムセンシングシステム (Agrクオラムセンシング (agrQS) として公知) を使用して、多くの毒性遺伝子の発現およびバイオフィルム形成を調節する (Gupta, Rら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; 112 (45): 14036-41)。こ

のシステムは、2つのプロモーターP2およびP3によって調節され、それぞれ、多様な転写ユニット、RNAIIおよびRNAIIIをコードする。RNAII転写物は、全4種の遺伝子、agrB、agrD、agrC、およびagrAをコードする一方で、RNAIIIは、α毒素およびデルタ溶血素のような毒性因子の発現を含む、Agr標的を制御する細胞内エフェクター分子である（Otto, Mら. FEMS Microbiol. Lett. 2015; 241: 135）。AgrDは、クオラムセンシング分子自己誘導因子ペプチド（AIP）を形成するプロペプチドである一方で、AgrBは、AgrDの環化を担う膜貫通型ペプチドであり、AIPを形成する。AgrCおよびAgrAは、それぞれ、AIP検出および応答リレーを担う2構成要素のシステムを形成する（Otto, Mら. 2015）。AIPに結合すると、AgrC（膜貫通型ヒスチジンキナーゼレセプター）は、転写活性化因子AgrAのリン酸化を促進する。そのリン酸化されたAgrAは、次に、P2およびP3プロモーターによって調節される遺伝子発現を活性化し、AIP生成の正のフィードバックループを生じ、種々の下流の毒性因子を活性化する（Koenig, R. L.ら, J. Bacteriol. 2004; 186, 7549-55）。AIP I~IV型をそれぞれ特異的に検出する、異なるStaphylococcus（I~IV型）によってコードされる4つの型のAgrCが存在する（Geisinger, E.ら, J. Biol. Chem. 2008; 283 (14): 8930-38）。

10

【0062】

いくつかの実施形態において、上記S. aureus agrAコード配列および上記S. aureus agrCコード配列は、S. aureus I型コード配列として分類される。いくつかの実施形態において、上記S. aureus agrAコード配列および上記S. aureus agrCコード配列は、S. aureus II型コード配列として分類される。いくつかの実施形態において、上記S. aureus agrAコード配列および上記S. aureus agrCコード配列は、S. aureus III型コード配列として分類される。いくつかの実施形態において、上記S. aureus agrAコード配列および上記S. aureus agrCコード配列は、S. aureus IV型コード配列として分類される。

20

【0063】

操作された核酸

30

S. aureus agrAコード配列およびS. aureus agrCコード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸であって、ここで上記双方向プロモーターは、S. aureus AgrAタンパク質によって活性化される操作された核酸がまた、本明細書で提供される。

【0064】

操作された核酸は、天然に存在しない核酸（例えば、一緒に共有結合的に連結され、場合によっては、ホスホジエステル結合（ホスホジエステル骨格といわれる）を含む少なくとも2個のヌクレオチド）である。操作された核酸は、組換え核酸および合成核酸を含む。組換え核酸は、2種の異なる生物（例えば、ヒトおよびマウス）に由来する核酸（例えば、単離された核酸、合成核酸またはこれらの組み合わせ）を結合することによって構築される分子である。合成核酸は、増幅されるかまたは化学的にもしくは他の手段によって合成される分子である。合成核酸は、化学的に改変されるかまたは別の手段で改変されるが、天然に存在する核酸分子と塩基対形成（結合）し得る分子を含む。組換え核酸および合成核酸はまた、前述のうちのいずれかの複製から生じる分子を含む。

40

【0065】

操作された核酸は、全体として、天然に存在しないが、野生型ヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態において、操作された核酸は、異なる生物から得られた（例えば、異なる種から得られた）ヌクレオチド配列を含む。例えば、いくつかの実施形態において、S. epidermidisに導入される操作された核酸は、S. aureusヌ

50

クレオチド配列を含む。

【0066】

操作された核酸は、DNA（例えば、ゲノムDNA、cDNA、またはゲノムDNAおよびcDNAの組み合わせ）、RNAまたはハイブリッド分子を含み得る（例えば、核酸が、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチド（例えば、人工または天然）の任意の組み合わせ、ならびにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシンおよびイソグアニンを含む2またはこれより多くの塩基の任意の組み合わせを含む場合）。

【0067】

本開示の操作された核酸は、標準的な分子生物学方法を使用して生成され得る（例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2012, Cold Spring Harbor Pressを参照のこと）。いくつかの実施形態において、核酸は、GIBSON ASSEMBLY（登録商標）Cloningを使用して生成される（例えば、Gibson, D.G.ら. Nature Methods, 343-345, 2009; および Gibson, D.G.ら. Nature Methods, 901-903, 2010（これらの各々は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと）。GIBSON ASSEMBLY（登録商標）は、代表的には、単一チューブ反応において3種の酵素活性：5'エキソヌクレアーゼ活性、DNAポリメラーゼの3'伸長活性およびDNAリガーゼ活性、を使用する。上記5'エキソヌクレアーゼ活性は、5'末端配列を部分的に切断し（chew back）、アニーリングのためにその相補的な配列を露出する。次いで、ポリメラーゼ活性は、そのアニールしたドメイン上のギャップを埋める。次いで、DNAリガーゼは、ニックをシールし、そのDNAフラグメントと一緒に共有結合的に連結する。その隣接するフラグメントの重なり合う配列は、Golden Gate Assemblyにおいて使用されるものより遙かに長く、従って、より高いパーセンテージの正確なアセンブリを生じる。操作された核酸を生成する他の方法が、本開示に従って使用されてもよい。

【0068】

遺伝子は、ヌクレオチドの明確な配列であり、その順序は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドにおけるモノマーの順序を決定する。遺伝子は、代表的には、タンパク質をコードする。遺伝子は、内因性（宿主生物の中に天然に存在する）または外因性（天然にまたは遺伝子操作によって、宿主生物へと移入される）であり得る。遺伝子は、いくつかの実施形態において、プロモーター配列、コード領域（例えば、エキソン）、非コード領域（例えば、イントロン）、および調節領域（調節配列ともいわれる）を含む。プロモーターは、RNAポリメラーゼが最初の転写に結合するヌクレオチド配列である（例えば、ATG）。プロモーターは、代表的には、転写開始部位から直ぐ上流（その5'末端に）位置する。コード配列（または他のヌクレオチド配列）は、プロモーターが上記コード配列の転写を調節する場合に、そのプロモーターに作動可能に連結されるとみなされる。

【0069】

双方向プロモーターは、双方向遺伝子対において遺伝子の5'末端の間のDNAの短い（<1 kbp）遺伝子間領域である。「双方向遺伝子対（bidirectional gene pair）」とは、対向する鎖にコードされる2つの隣接する遺伝子であって、それらの5'末端が互いに向かって配向されるものをいう。双方向プロモーターの例は、図1Cに示めされる*S. aureus* P2/P3プロモーターであり、これは、agrCおよびagrAコード配列を含むカセットに作動可能に連結されたP2プロモーター領域、ならびにLL-37コード配列に作動可能に連結されたP3領域を示す。双方向プロモーターは、プロモーターが作動可能に連結された核酸の転写が、そのプロモーターへの*S. aureus* AgrAタンパク質の結合の際にまたは結合後に開始される場合に、*S. aureus* AgrAタンパク質によって活性化されるとみなされる。

【0070】

いくつかの実施形態において、双方向プロモーターは、構成的プロモーターを含む。構成的プロモーターは、関連付けられたヌクレオチド配列の継続的な転写を可能にする調節されないプロモーターである。ある実施形態において、構成的プロモーターは、構成的 *S. epidermidis* プロモーターである。例えば、構成的プロモーターは、*Staphylococcal* アクセサリーレギュレーター A (*SarA*) プロモーターであり得る。他の構成的プロモーターも本明細書で企図される。

【0071】

他の実施形態において、双方向プロモーターは、*S. aureus* P2 プロモーター（例えば、*S. aureus* USA300 P2 プロモーター； ATTTAACA G TTAAGTATTTATTTCTACAGTTAGGCAA TATAATGATA AAAGATTGTACTAAATCGTATAATGACAGTGAG（配列番号1））を含む。本明細書で提供される双方向プロモーターは、いくつかの実施形態において、*S. aureus* P3 プロモーター（*S. aureus* USA300 P3 プロモーター： AAATTACAGTTAAGAATAAAAAACGACTA GTTAAG AAAAATTGGAAAATAAATGCTTTTAGCATGTTTTTAATATA ACTAG（配列番号2））を含む。例えば、Rajasree K. ら、*Biochemistry and Biophysics Reports*; 6: 124-134 を参照のこと。

【0072】

構成的 *S. epidermidis* プロモーターまたは *S. aureus* P2 プロモーターは、いくつかの実施形態において、*S. aureus* *agrA* コード配列および *S. aureus* *agrC* コード配列に作動可能に連結される一方で、*S. aureus* P3 プロモーターは、抗菌ペプチドコード配列に作動可能に連結される。上記 *S. aureus* *agrC* コード配列は、いくつかの実施形態において、*S. aureus* *agrA* コード配列から上流（5'）にインフレイムで位置し、その結果、上記構成的プロモーターまたは上記 P2 プロモーターの活性化は、例えば、上記 *S. aureus* *agrC* および上記 *S. aureus* *agrA* コード配列の両方の転写を生じる。他の実施形態において、上記 *S. aureus* *agrA* コード配列は、上記 *S. aureus* *agrC* コード配列から上流（5'）にインフレイムで位置する。

【0073】

いくつかの実施形態において、上記操作された核酸は、*S. epidermidis* 細胞のゲノムに組み込まれる。組み込みとは、宿主核酸と連続した共有結合的に連結された核酸を形成するために、外来核酸（例えば、操作された核酸）を染色体に、または別のレプリコンを挿入することを媒介するプロセスをいう。他の実施形態において、上記操作された核酸は、*S. epidermidis* 細胞においてエピソームで維持される。

【0074】

S. epidermidis 細胞は、いくつかの実施形態において、単一コピーの上記操作された核酸を含む。他の実施形態において、*S. epidermidis* 細胞は、複数のコピー（例えば、2 またはこれより多くの、例えば、2~10、2~15、または 2~20 のコピー）の上記操作された核酸を含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、上記 *S. aureus* *agrA* コード配列は、*S. epidermidis* における発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態において、上記 *S. aureus* *agrC* コード配列は、*S. epidermidis* における発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドコード配列は、*S. epidermidis* における発現のためにコドン最適化される。コドン最適化とは、アミノ酸配列を変化させることなく、種々の基準に基づいて組換え遺伝子のコドン組成を改善するように設計された実験的アプローチをいう。例えば、Frelin L. et al. *Gene Ther.* 2004 Mar; 11(6): 522-33 を参照のこと。

【0076】

抗菌ペプチド

多くの抗菌ペプチド（AMP）は、細菌、真菌およびウイルスに対して広いスペクトラムおよび強力な抗菌有効性を示す。それらは、種々の微生物およびさらには薬物耐性の微生物を処置するために適用され得る。AMPは、種々の生物（細菌、真菌、動物および植物）に存在し、数千ものAMPが、発見されて、示されている（Jenssen Hら, Clin Microbiol Rev. 2006 Jul; 19(3):491-511; および Kosciuczuk EMら, Mol Biol Rep. 2012 Dec; 39(12):10957-70）。それらのうち、大部分はカチオン性AMPであり、重要な抗菌の役割を果たす。例えば、AMPの非限定的な例については Lei Jら, Am J Transl Res. 2019; 11(7):3919-3931; Bechinger Bら, J Dent Res. 2017 Mar; 96(3):254-260; および Nuti Rら, Curr Med Chem. 2017; 24(38):4303-4314を参照のこと（これらの各々は、本明細書に参考として援用される）。

10

【0077】

本明細書で提供されるように使用され得る抗菌ペプチドの非限定的な例としては、LL-37、エラフィン、ヒラシン、BMAP-27、ホウリシジン（Fowllicidin）-1、ホウリシジン-2、ホウリシジン-3、 α -ディフェンシン1、 α -ディフェンシン2、 α -ディフェンシン3、 α -ディフェンシン4、 α -ディフェンシン5、 α -ディフェンシン6、 β -ディフェンシン1、 β -ディフェンシン2、 β -ディフェンシン3、 β -ディフェンシン4、ディフェンシン様ペプチド-2、プロテグリン（protegrin）-3、抗真菌性ヘリオマイシン（antifungal heliomicin）、およびサトウキビディフェンシン5が挙げられる。食品医薬品局（FDA）によって承認されている抗菌ペプチド薬物の非限定的な例としては、バシトラシン、ダルババンシン（dalbavancin）、ダプトマイシン、エンフビルチド、オリタバンシン、テイコプラニン、テラプレビル、テラバンシン、およびバンコマイシンが挙げられる。他の抗菌ペプチドが使用されてもよい。

20

【0078】

いくつかの実施形態において、抗菌ペプチドのサイズは、5 kD~100 kDである。例えば、抗菌ペプチドのサイズは、5 kD~75 kD、5 kD~50 kD、5 kD~25 kD、5 kD~15 kD、または5 kD~10 kDであり得る。いくつかの実施形態において、抗菌ペプチドのサイズは、5 kD、6 kD、7 kD、8 kD、9 kD、10 kD、11 kD、12 kD、13 kD、14 kD、15 kD、20 kD、25 kD、30 kD、35 kD、40 kD、45 kD、50 kD、55 kD、60 kD、65 kD、70 kD、75 kD、80 kD、85 kD、90 kD、95 kD、または100 kDである。

30

【0079】

いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドは、LL-37である。単一のヒトカテリシジンペプチドLL-37は、多数のグラム陽性およびグラム陰性ヒト病原体に対して抗菌および抗バイオフィーム活性を有し、宿主に対して創傷治癒効果を有することが示されている。LL-37の抗バイオフィーム効果および創傷治癒特性の組み合わせは、それを局所適用した場合に、複数の微生物に感染した創傷を消散させるにあたって非常に有効にし得る。例えば、Duplantier AJ, et al. Immunol. 2013 July 2013を参照のこと。

40

【0080】

いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドは、エラフィンである。エラフィンは、抗タンパク質分解特性を有する、N末端トランスグルタミナーゼ基質モチーフおよびC末端WAP（ホエイ酸性タンパク質）ドメインから構成される内因性ヒトタンパク質である。エラフィンは、上皮組織において主に発現され、好中球由来のセリンプロテアーゼであるエラスターゼおよびプロテイナーゼ-3を、競合的な密着結合機序によって強力に阻

50

害する。例えば、Shaw, L.ら. Biochem Soc Trans 2011 Oct; 39 (5): 1450-4を参照のこと。

【0081】

いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドは、ヒラシンである。ヒラシンは、Enterococcus hiraeによって生成されるSec依存性バクテリオシンである。バクテリオシンは、抗菌活性を有する、リボソームで合成されるペプチドまたはタンパク質であり、食品、医薬品、栄養補助食品、ならびに獣医学的およびヒトの医療におけるそれらの潜在的適用が原因で、乳酸菌(LAB)によって生成されるバクテリオシンにかなりの研究の関心が集まっている。例えば、Hassan, M.ら. Adv Pharm Bull. 2015 Sep; 5 (3): 393-401を参照のこと。

10

【0082】

S. epidermidis細胞が免疫性である抗菌ペプチドがまた、本明細書で企図される。すなわち、S. epidermidis細胞によって発現される抗菌ペプチドへのS. epidermidis細胞の曝露は、S. epidermidis細胞を殺滅させない。例えば、上記S. epidermidisは、抗菌ペプチドの阻害スペクトル外であり得る。別の例として、上記S. epidermidis細胞は、抗菌ペプチドに対する耐性を付与する遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態において、エピデルミン耐性遺伝子は、S. epidermidis細胞に導入される(例えば、Tue3298細胞)。

【0083】

いくつかの実施形態において、上記抗菌ペプチドは、分泌シグナル配列(例えば、シグナルペプチド)に連結される。分泌シグナル配列は、分泌経路に向かうことが定められた、新たに合成されたタンパク質の大部分のN末端において存在する短いアミノ酸配列(例えば、15~30アミノ酸長)である(例えば、Rapoport T. Nature. 2007; 450 (7170): 663-9を参照のこと)。

20

【0084】

治療用バイオセンサーカクテル

本開示は、いくつかの局面において、S. aureus株の1より多くの型に応答するように操作されたS. epidermidis細胞を含む「カクテル」組成物を提供する。このような組成物は、例えば、(a) (i) 第1の株のS. aureus agrAコード配列およびS. aureus agrCコード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含むagr欠損S. epidermidis細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、上記第1の株S. aureus AgrAタンパク質によって活性化される、細胞；ならびに(b) (i) 第2の株のS. aureus agrAコード配列およびS. aureus agrCコード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含むagr欠損S. epidermidis細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、上記第2の株のS. aureus AgrAタンパク質によって活性化される、細胞を含み得る。

30

40

【0085】

上記第1の株は、いくつかの実施形態において、I型 S. aureus株である。上記第2の株は、いくつかの実施形態において、II型、III型、またはIV型 S. aureus株である。いくつかの実施形態において、上記第1の株は、I型 S. aureus株であり、上記第2の株は、II型 S. aureus株である。他の実施形態において、上記第1の株は、I型 S. aureus株であり、上記第2の株は、III型 S. aureus株である。さらに他の実施形態において、上記第1の株は、I型 S. aureus株であり、上記第2の株は、IV型 S. aureus株である。

50

【0086】

いくつかの実施形態において、組成物は、(a) (i) I型 *S. aureus agrA*コード配列およびI型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む*agr*欠損*S. epidermidis*細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* I型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞；および(b) (i) II型 *S. aureus agrA*コード配列およびII型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む*agr*欠損*S. epidermidis*細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* II型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を含む。

10

【0087】

他の実施形態において、組成物は、(a) (i) I型 *S. aureus agrA*コード配列およびI型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む*agr*欠損*S. epidermidis*細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* I型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞；および(b) (i) III型 *S. aureus agrA*コード配列およびIII型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む*agr*欠損*S. epidermidis*細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* III型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を含む。

20

【0088】

さらに他の実施形態において、組成物は、(a) (i) I型 *S. aureus agrA*コード配列およびI型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む*agr*欠損*S. epidermidis*細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* IV型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞；および(b) (i) IV型 *S. aureus agrA*コード配列およびIV型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む*agr*欠損*S. epidermidis*細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* IV型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を含む。

30

【0089】

いくつかの実施形態において、組成物は、(a) (i) II型 *S. aureus agrA*コード配列およびII型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む*agr*欠損*S. epidermidis*細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* II型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞；および(b) (i) III型 *S. aureus agrA*コード配列およびIII型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む*agr*欠損*S. epidermidis*細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* III型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を含む。

40

50

【0090】

他の実施形態において、組成物は、(a) (i) II型 *S. aureus agrA*コード配列およびII型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* II型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞；および(b) (i) IV型 *S. aureus agrA*コード配列およびIV型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* IV型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を含む。

10

【0091】

さらに他の実施形態において、組成物は、(a) (i) III型 *S. aureus agrA*コード配列およびIII型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* III型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞；および(b) (i) IV型 *S. aureus agrA*コード配列およびIV型 *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* IV型 *AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を含む。

20

【0092】

製剤

本明細書中の組成物は、局所投与のために製剤化され得る。例えば、組成物は、バイオフィルム、クリーム剤、ローション剤、またはゲルとして製剤化され得る。組成物は、これがヒト皮膚への適用に適した賦形剤を含む場合に、「局所適用のために製剤化されている」とみなされる。

30

【0093】

細菌細胞を含む製剤は、例えば、治療上有効な量の組換えポリペプチドを生成する任意の量の上記操作された微生物を含み得る。いくつかの実施形態において、製剤は、少なくとも0.01重量%、0.05重量%、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.5重量%、2.0重量%、3.0重量%、4.0重量%、5.0重量%、6.0重量%、7.0重量%、8.0重量%、9.0重量%、10.0重量%、11.0重量%、12.0重量%、13.0重量%、14.0重量%、15.0重量%、16.0重量%、17.0重量%、18.0重量%、19.0重量%、20.0重量%、25.0重量%、30.0重量%、35.0重量%、40.0重量%、45.0重量%、50.0重量%またはより高い重量%の操作された微生物を含む。いくつかの実施形態において、上限は、90.0重量%の操作された微生物である。

40

【0094】

いくつかの実施形態において、製剤は、少なくとも0.01重量%~30重量%、0.01重量%~20重量%、0.01重量%~5重量%、0.1重量%~30重量%、0.1重量%~20重量%、0.1重量%~15重量%、0.1重量%~10重量%、0.1重量%~5重量%、0.2重量%~5重量%、0.3重量%~5重量%、0.4重量%~5重量%、0.5重量%~5重量%、1重量%~5重量%、またはより高い重量%の操作された微生物を含む。

50

【0095】

局所投与または経皮的投与のための投与形態は、散剤、スプレー、軟膏剤、パスタ剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル、液剤、パッチ、滴剤および吸入剤を含む。細菌細胞および／または組換えポリペプチドは、無菌条件下で、適切な薬学的に受容可能な賦形剤（例えば、希釈剤および／またはキャリア）と混合され得る。従って、軟膏剤、パスタ剤、クリーム剤およびゲルは、賦形剤を含み得る、散剤およびスプレーは、賦形剤および／または噴霧体を含み得る。

【0096】

いくつかの実施形態において、製剤は、局所製剤である。局所製剤は、例えば、身体表面への適用に適した任意の形態（例えば、クリーム剤、ローション剤、スプレー、液剤、ゲル、軟膏剤、パスタ剤、硬膏剤、塗布剤（paint）、生体接着剤、懸濁物、エマルジョンなど）にあり得る、ならびに／またはリポソーム、ミセル、および／若しくはマイクロスフェアを含むように調製され得る。このような製剤は、身体表面から蒸発する水分が、身体表面への適用時およびその後製剤内で維持されるように、閉鎖性被覆層と組み合わせ使用され得る。いくつかの実施形態において、製剤は、生細胞培養組成物を含み得、治療上有効な組換えポリペプチドを生じる少なくとも1種の操作された細菌株を含み得る。この操作された生細胞培養組成物は、上記組換えポリペプチドを、例えば、異常な皮膚状態を処置または防止するために、皮膚に直接送達し得る。

【0097】

局所製剤は、任意の他の活性成分が、当該分野で公知の皮膚用ビヒクル（例えば、水性または非水性のゲル、軟膏剤、油中水型または水中油型エマルジョン）の中に溶解または分散されるものを含む。このようなビヒクルの成分は、水、水性緩衝溶液、非水性溶媒（例えば、エタノール、イソプロパノール、ベンジルアルコール、2-（2-エトキシエトキシ）エタノール、プロピレングリコール、プロピレングリコールモノラウレート、グリコフロールまたはグリセロール）、油（例えば、流動パラフィンのような鉱油、天然もしくは合成のトリグリセリド（例えば、MIGLYOL™）またはシリコンオイル（例えば、ジメチコン））を含み得る。特に、製剤の性質ならびにその意図した使用および適用部位に依存して、使用される製剤は、以下のリストから選択される少なくとも1つの構成要素（例えば、上記製剤が水性ゲルである場合には、水に加えて構成要素）を含み得る：
可溶化剤もしくは溶媒（例えば、β-シクロデキストリン（例えば、ヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリン）、またはアルコールもしくはポリオール（例えば、エタノール、プロピレングリコールもしくはグリセロール））；濃化剤（例えば、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはカルボマー）；ゲル化剤（例えば、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー）；保存剤（例えば、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、クロルヘキシジン、クロルブタノール、ベンゾエート、ソルビン酸カリウムまたはEDTA若しくはその塩）；ならびにpH緩衝化剤（例えば、リン酸二水素塩およびリン酸水素塩の混合物、またはクエン酸およびリン酸水素塩の混合物）。

【0098】

薬学的に受容可能な賦形剤はまた、製剤中に組み込まれ得、当該分野で従来から使用される任意の賦形剤（例えば、キャリア）であり得る。非限定的な例としては、水、低級アルコール、高級アルコール、多価アルコール、モノサッカリド、ジサッカリド、ポリサッカリド、炭化水素油、脂肪および油、ワックス、脂肪酸、シリコンオイル、非イオン性界面活性剤、イオン性界面活性剤、シリコン界面活性剤、ならびにこのようなキャリアの水ベースの混合物およびエマルジョンベースの混合物が挙げられる。

【0099】

薬学的に受容可能な希釈剤またはキャリアは、当該分野で周知であり（例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy（第21版, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.）およびThe National Fo

10

20

30

40

50

rmulary (American Pharmaceutical Association, Washington, D. C.) を参照のこと)、以下が挙げられる:
糖 (例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、およびソルビトール)、デンプン、セルロース調製物、リン酸カルシウム (例えば、リン酸ニカルシウム、リン酸三カルシウム、およびリン酸水素カルシウム)、クエン酸ナトリウム、水、水性溶液 (例えば、生理食塩水、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、乳酸添加リンゲル注射液)、アルコール (例えば、エチルアルコール、プロピルアルコール、およびベンジルアルコール)、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、およびポリエチレングリコール)、有機エステル (例えば、オレイン酸エチルおよびトリグリセリド)、生分解性ポリマー (例えば、ポリラクチド-ポリグリコリド、ポリ (オルトエステル)、およびポリ (無水物))、エラストマーマトリクス、リポソーム、マイクロスフェア、油 (例えば、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、ゴマ油、綿実油、およびラッカセイ油)、カカオ脂、ワックス (例えば、坐剤用ワックス)、パラフィン、シリコン、タルク、シリケート (silicylate) など。本発明の薬学的組成物において使用される各薬学的に受容可能な希釈剤またはキャリアは、上記製剤の他の成分と適合性でありかつ被験体に対して有害でないという意味において「受容可能」でなければならない。選択される投与形態および意図される投与経路に適した希釈剤またはキャリアは、当該分野で周知であり、選択される投与形態および投与方法のための受容可能な希釈剤またはキャリアは、当該分野の通常の技術を使用して決定され得る。

10

20

【0100】

フィルム形成剤 (film former) は、乾燥する場合、適用部位の上に保護フィルムを形成する。上記フィルムは、活性成分の除去を阻害し、処置される部位と接触した状態で維持する。本明細書での使用に適したフィルム形成剤の例は、Flexible Collodion (USP) である。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995) の第1530頁に記載されるように、コロジオンは、ピロキシリン (ニトロセルロース) を含むエチルエーテル/エタノール溶液であり、これは、蒸発して、ピロキシリンのフィルムを残す。フィルム形成剤は、さらにキャリアとしても作用し得る。乾燥してフィルムを形成する溶液は、ときおり、塗布剤といわれる。クリーム剤は、製剤分野において周知であるように、水中油型または油中水型いずれかの粘性の液体または半固体のエマルジョンである。

30

【0101】

クリーム基剤は、水で洗浄可能であり、油相、乳化剤、および水性相を含む。その油相は、「内部」相とも称され、ワセリンおよび脂肪アルコール (例えば、セチルアルコールまたはステアリルアルコール) から概して構成される。その水性相は通常、必ずではないものの、容積において油相を上回り、保湿剤を概して含む。クリーム製剤中の乳化剤は、概して非イオン性、アニオン性、カチオン性または両性の界面活性剤である。

【0102】

ローション剤は、摩擦なしに皮膚表面に適用されるための調製物であり、代表的には、粒子 (活性剤を含む) が水またはアルコール基剤の中に存在する液体または半液体の調製物である。ローション剤は通常、固体の懸濁物であり、いくつかの実施形態において、水中油型の液体の油性エマルジョンを含む。ローション剤は、より流動性の組成物を適用する方が容易であることから、大きな体表面積を処置するために使用され得る。ローション剤は、いくつかの実施形態において、より良好な分散を生じる懸濁化剤、および活性成分を局在させ、皮膚と接触した状態に保持するために有用な化合物 (例えば、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなど) を含む。

40

【0103】

液剤は、1またはこれより多くの化学物質 (溶質) を液体中に溶解することによって調製される均質な混合物であり、その結果、溶解した物質の分子は、溶媒の物質の中で分散

50

される。液剤は、上記溶質を緩衝化、安定化または保存するために、他の薬学的にまたは美容的に受容可能な化学物質を含み得る。液剤を調製するにあたって使用される溶媒の一般的な例は、エタノール、水、プロピレングリコールまたは任意の他の受容可能なビヒクルである。当然のことながら周知であるように、ゲルは、半固体の懸濁物タイプの系である。単一相ゲルは、キャリア液体（これは、代表的には水性であるが、好ましくは、アルコール、および必要に応じて油をも含む）全体に実質的に均一に分布した有機高分子を含む。有機高分子（例えば、ゲル化剤）の例は、架橋アクリル酸ポリマー（例えば、カルボマーファミリーのポリマー、例えば、CARBOPOL（登録商標）商標の下で商業的に得られ得るカルボキシポリアルキレン）である。他の例は、親水性ポリマー（例えば、ポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンコポリマーおよびポリビニルアルコール）；セルロースポリマー（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、およびメチルセルロース）；ガム（例えば、トラガカントガムおよびキサンタンガム）；アルギン酸ナトリウム；ならびにゼラチンである。均質なゲルを調製するために、分散剤（例えば、アルコールまたはグリセリン）が添加され得るか、またはゲル化剤は、研和、機械的混合もしくは攪拌、またはこれらの組み合わせによって分散され得る。軟膏剤は、同様に当該分野で周知であるように、代表的には、ワセリンまたは他の石油派生物に基づく半固体調製物である。使用されるべき具体的な軟膏基剤は、当業者によって認識されるように、多くの望ましい特性（例えば、皮膚軟化性（emolliency）など）を提供するものである。他のキャリアまたはビヒクルと同様に、軟膏基剤は、不活性であり、安定しており、非刺激性であり、非感作性（nonsensitizing）であるべきである。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995) の第1399～1404頁に説明されるように、軟膏基剤は、4つのクラスに分けられ得る：油性基剤；乳化可能な基剤；エマルジョン基剤；および水溶性基剤。油性軟膏基剤としては、例えば、植物油、動物から得られる脂肪、および石油から得られる半固体炭化水素が挙げられる。

10

20

【0104】

乳化可能な軟膏基剤は、吸収性軟膏基剤（absorbent ointment base）としても公知であり、ほとんどまたは全く水を含まず、例えば、硫酸ヒドロキシステアリン、無水ラノリン、および親水性ワセリンを含む。

30

【0105】

エマルジョン軟膏基剤は、油中水型（W/O）エマルジョンまたは水中油型（O/W）エマルジョンのいずれかであり、例えば、アセチルアルコール、モノステアリン酸グリセリル、ラノリン、およびステアリン酸を含む。好ましい水溶性軟膏基剤は、種々の分子量のポリエチレングリコールから調製される；さらなる情報に関しては、Remington: The Science and Practice of Pharmacyを参照のこと。

40

【0106】

パスタ剤は、活性薬剤が適切な基剤中に懸濁されている半固体の投与形態である。基剤の性質に依存して、パスタ剤は、脂肪性のパスタ剤または単一相水性ゲルから作製されるものとの間で分けられる。脂肪性パスタ剤における基剤は、概してワセリンまたは親水性ワセリンなどである。単一相の水性ゲルから作製されるパスタ剤は概して、基剤としてカルボキシメチルセルロースなどを組み込む。

【0107】

増強因子（enhancer）は、代表的には可塑化増強因子と呼ばれる親油性共増強因子（co-enhancer）（例えば、150～1000の範囲の分子量、1重量%未満、0.5重量%未満、または0.2重量%未満の溶解度を有する増強因子）といわれる）である。可塑化増強因子のHildebrand溶解度パラメーター（ δ ）は、2

50

・ 5 ～ 10 の範囲、または 5 ～ 10 の範囲にある。親油性増強因子の例としては、脂肪エステル、脂肪アルコール、および脂肪エーテルが挙げられる。具体的な脂肪酸エステルの例としては、ラウリン酸メチル、オレイン酸エチル、プロピレングリコールプロピレングリセロールジラウレート、グリセロールモノラウレート、グリセロールモノオレート、イソプロピル n-デカノエート、およびオクチルドデシルミリステートが挙げられる。脂肪アルコールとしては、例えば、ステアリルアルコールおよびオレイルアルコールが挙げられる一方で、脂肪エーテルとしては、ジオールまたはトリオール、好ましくは C₂ - C₄ アルカンジオールまたはトリオールが、1 個または 2 個の脂肪エーテル置換基で置換されている化合物が挙げられる。

【0108】

さらなる透過増強因子は、局所薬物送達分野で当業者に公知である、および／または関連するテキストおよび文献中に記載される。例えば、Percutaneous Penetration Enhancers, Smithら編 (CRC Press, 1995) を参照のこと。

【0109】

種々の他の添加剤が、上記のものに加えて、本開示の組成物中に含まれ得る。これらとしては、抗酸化剤、収斂薬、芳香剤、保存剤、軟化薬、顔料、色素、保湿剤、噴霧体、および日焼け止め剤、ならびに他のクラスの物質（その存在が薬学的にまたは別の点で所望であり得る）が挙げられるが、これらに限定されない。本開示の製剤中に含めるための選択肢的な添加剤の代表的な例は、以下のとおりである： 保存剤（例えば、ソルベート）；溶媒（例えば、イソプロパノールおよびプロピレングリコール）；収斂薬（例えば、メントールおよびエタノール）；軟化薬（例えば、ポリアルキレンメチルグルコシド）；保湿剤（例えば、グリセリン）；乳化剤（例えば、グリセロールステアレート、PEG-100 ステアレート、ポリグリセリル-3 ヒドロキシラウリルエーテル、およびポリソルベート 60）；ソルビトールおよび他のポリヒドロキシアアルコール（例えば、ポリエチレングリコール）；日焼け止め剤（例えば、オクチルメトキシシンナメート（Parsol MCX として市販）およびブチルメトキシベンゾイルメタン（商標 PARSOL（登録商標） 1789 の下で入手可能））；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸（ビタミン C）、 α -トコフェロール（ビタミン E）、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、 δ -トコフェロール、 ϵ -トコフェロール、 ζ -トコフェロール、 η -トコフェロール、およびレチノール（ビタミン A））；精油、セラミド、必須脂肪酸、鉱油、植物油（例えば、ダイズ油、パーム油、シアバターの液体画分、ヒマワリ油）、動物性油（例えば、ペルヒドロスクアレン）、合成油、シリコンオイルまたはワックス（例えば、シクロメチコンおよびジメチコン）、フッ化オイル（概してペルフルオロポリエーテル）、脂肪アルコール（例えば、セチルアルコール）、およびワックス（例えば、蜜蝋、カルナウバ蝋、およびパラフィンワックス）；皮膚感触改質剤（skin-feel modifier）；ならびに濃化剤および構造化剤（structuring agent）（例えば、膨潤クレイおよび CARBOPOL（登録商標）商標の下で商業的に得られる架橋カルボキシポリアルキレン）。他の添加剤としては、有益な薬剤（例えば、皮膚（特に、角質層における皮膚の上層）を整える、ならびにその水分含有量の減少を遅らせることによって皮膚を柔らかく維持するおよび／もしくは皮膚を保護する物質）が挙げられる。このような調整剤および保湿剤（moisturizing agent）は、例示によれば、ピロリジン カルボン酸およびアミノ酸；有機性抗菌剤（例えば、2, 4, 4'-トリクロロ-2-ヒドロキシジフェニルエーテル（トリクロサン）および安息香酸；抗炎症剤（例えば、アセチルサリチル酸およびグリチルレチン酸）；抗脂漏性薬剤（anti-seborrheic agent）（例えば、レチノイン酸）；血管拡張薬（例えば、ニコチン酸）；メラニン形成のインヒビター（例えば、コウジ酸）；ならびにこれらの混合物を含む。さらに、追加の活性薬剤は、例えば、 α -ヒドロキシ酸、 α -ケト酸、ポリマーヒドロキシ酸、保湿剤、コラーゲン、海産物の抽出物（marine extract）、および抗酸化剤、ならびに／またはこれらの薬学的に受容可能な塩、エステル、アミドもしくは他の誘導体を

10

20

30

40

50

含む。追加の薬剤は、皮膚組織において酸素供給を改善し得るものを含む。日焼け止め剤およびUV吸収化合物がまた、含められ得る。このような日焼け止め剤およびUV吸収化合物の非限定的な例としては、アミノ安息香酸（PABA）、アボベンゾン、シノキサート、ジオキシベンゾン、ホモサート、アントラニル酸メンチル、オクトクリレン、オクチルメトキシシナメート（octyl methoxycinnamate）、サリチル酸オクチル、オキシベンゾン、パディメートO（padirnat O）、フェニルベンズイミダゾールスルホン酸（phenylbenzimidazole sulfonic acid）、スリソベンゾン、二酸化チタン、トロラミンサリチル酸（trolamine salicylate）、酸化亜鉛、エンスリゾール、メラジラート（meradiraate）、オクチノキサート、サリチル酸オクチル（octisalate）、およびオクトクリレンが挙げられる。

10

【0110】

他の実施形態は、本発明の製剤での処置を促進する種々の非発がん性、非刺激性の治療物質を含み得る。このような治療物質としては、栄養素、ミネラル、ビタミン、電解質、酵素、薬草、植物抽出物、腺もしくは動物抽出物、または皮膚障害の治療を促進するために製剤に添加され得る安全な治療剤が挙げられ得る。

【0111】

これらの種々の添加剤の量は、化粧品分野において従来から使用されるものであり、例えば、局所製剤の総重量の0.01%～20%の範囲に及ぶ。

【0112】

本開示の製剤はまた、従来の添加剤（例えば、乳白剤、香料、着色料、安定化剤、界面活性剤など）を含み得る。いくつかの実施形態において、貯蔵の際の損傷を防止するために、すなわち、酵母およびかびのような微生物の増殖を阻害するために、他の薬剤がまた添加され得る（例えば、抗菌剤）。

20

【0113】

適切な抗菌剤は、代表的には、p-ヒドロキシ安息香酸のメチルエステルおよびプロピルエステル（メチルパラベンおよびプロピルパラベン）、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、イミド尿素（imidurea）、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される。他の実施形態において、他の薬剤をまた添加して（例えば、抑制因子および誘導因子）、例えば、目的のポリペプチドの生成を阻害する（グリコース）または誘導する（キシロース）。このような添加剤は、これらが上記製剤の機能と適合性でありかつ干渉しないことを条件として使用され得る。

30

【0114】

製剤はまた、投与されることになる化学的実体、または組成物の他の構成要素から生じる皮膚刺激もしくは皮膚損傷の可能性を最小限にするかまたは排除するために、刺激を緩和する添加剤を含み得る。

【0115】

適切な、刺激を緩和する添加剤としては、例えば、α-トコフェロール；モノアミンオキシダーゼインヒビター、特に、フェニルアルコール（例えば、2-フェニル-1-エタノール）；グリセリン；サリチレート；アスコルベート；イオノフォア（例えば、モネンシン）；両親媒性アミン；塩化アンモニウム；N-アセチルシステイン；カプサイシン；およびクロロキンが挙げられる。刺激を緩和する添加剤は、存在する場合、刺激または皮膚損傷を緩和するために有効な濃度で上記組成物へと組み込まれ得る（代表的には、上記製剤の20重量%以下、より代表的には5重量%以下を示す）。

40

【0116】

さらに、いくつかの実施形態において本発明の製剤に組み込まれ得る、従って、上記操作された微生物および／もしくは組換えポリペプチドとともに局所適用され得る、適切な薬理学的に活性な薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：色素沈着したまたは色素沈着していないシミ（pigmented or non-pigmented age spots）、角化症、およびシワを改善または根絶する薬剤；抗菌剤

50

；抗細菌剤；鎮痒薬および抗乾燥薬剤（antixerotic agent）；抗炎症剤；局所麻酔薬および鎮痛薬；コルチコステロイド；レチノイド；ビタミン；ホルモン；ならびに代謝拮抗物質。

【0117】

局所的な薬理学的に活性な薬剤のいくつかの例としては、以下が挙げられる： アシクロビル、アンホテリシン、クロルヘキシジン、クロトリマゾール、ケトコナゾール、エコナゾール、ミコナゾール、メトロニダゾール、ミノサイクリン、ナイスタチン、ネオマイシン、カナマイシン、フェニトイン、パラアミノ安息香酸エステル、オクチルメトキシシンナメート（octyl methoxycinnamate）、サリチル酸オクチル、オキシベンゾン、ジオキシベンゾン、トコフェロール、酢酸トコフェロール、硫化セレン、ジंकピリチオン、ジフェンヒドラミン、プラモキシ（pramoxine）、リドカイン、プロカイン、エリスロマイシン、テトラサイクリン、クリンダマイシン、クロタミトン、ヒドロキノンならびにそのモノメチルおよびベンジルエーテル、ナプロキセン、イブプロフェン、クロモリン、レチノール、パルミチン酸レチニル、酢酸レチニル、コールタール、グリセオフルビン、エストラジオール、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン21-アセテート、ヒドロコルチゾン17-バレレート、ヒドロコルチゾン17-ブチレート、プロゲステロン、吉草酸ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、トリアムシノロンアセトニド、フルオシノニド、プロピオン酸クロベタゾール、ミノキシジル、ジピリダモール、ジフェニルヒダントイン、過酸化ベンゾイル、および5-フルオロウラシル。

10

【0118】

クリーム剤、ローション剤、ゲル、軟膏剤、パスタ剤などは、影響を受けた表面に拡げられ得、穏やかにすり込まれ得る。液剤は、同様に適用され得るが、より代表的には、滴瓶、スワブなどで適用され、影響を受けた領域に注意深く適用される。

20

【0119】

適用レジメンは、容易に決定され得る多くの因子に依存する（例えば、状態の重篤度および最初の処置に対するその応答性）が、通常は、継続的に1日あたり1回またはより多くの適用を要する。当業者は、投与されるべき製剤の最適な量、投与方法および反復速度を容易に決定し得る。概して、本発明の製剤が、1週間に1回または2回から1日に1回または2回までの範囲において適用されることが企図される。

【0120】

治療法／予防法

本明細書で提供される組成物および細胞は、細菌細胞感染を処置または防止するために使用され得る。

30

【0121】

本開示のいくつかの局面は、*S. aureus* agrAコード配列および*S. aureus* agrCコード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含むagr欠損*Staphylococcus* (*S.*) *epidermidis*細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* AgrAタンパク質によって活性化される、細胞を含む組成物を被験体に投与する工程を包含する方法を提供する。

40

【0122】

被験体は、いくつかの実施形態において、ヒト被験体である。いくつかの実施形態において、上記被験体は、毒性の細菌感染（例えば、*S. aureus*感染）を有する。毒性は、生物（例えば、細菌）が、宿主（例えば、ヒト）に感染し、疾患を引き起こす能力である。*S. aureus*感染は、いくつかの実施形態において、メチシリン耐性*Staphylococcus aureus* (MRSA)感染である。MRSAは、いくつかの抗生物質に対する耐性が原因で処置することが困難な*S. aureus* (*staph*)感染の原因である。この型の細菌は、しばしば皮膚に存在する。*S. aureus*はしばしば無害であるが、敗血症または死をもたらし得る重篤な感染を引き起こし得る。

50

【0123】

本明細書で提供されるように処置され得る一般的な皮膚感染としては、蜂巣織炎、丹毒、膿痂疹、毛包炎、ならびにせつおよびようが挙げられる。他の皮膚感染は、本開示の組成物および／または細胞を使用して処置され得る。

【0124】

いくつかの実施形態において、方法は、*S. aureus agrA*コード配列および *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、*LL-37*ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を含む組成物を被験体に投与する工程を包含する。

10

【0125】

いくつかの実施形態において、方法は、*S. aureus agrA*コード配列および *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、エラフィンペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を含む組成物を被験体に投与する工程を包含する。

【0126】

いくつかの実施形態において、方法は、*S. aureus agrA*コード配列および *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、ヒラシンペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を含む組成物を被験体に投与する工程を包含する。

20

【0127】

いくつかの実施形態において、方法は、*S. aureus agrA*コード配列および *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、細胞を被験体に投与する工程を包含する。

30

【0128】

いくつかの実施形態において、方法は、*S. aureus agrA*コード配列および *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、*LL-37*コード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、核酸を被験体に投与する工程を包含する。

【0129】

いくつかの実施形態において、方法は、*S. aureus agrA*コード配列および *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、エラフィンコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、核酸を被験体に投与する工程を包含する。

40

【0130】

いくつかの実施形態において、方法は、*S. aureus agrA*コード配列および *S. aureus agrC*コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、ヒラシンコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus AgrA*タンパク質によって活性化される、核酸を被験体に投与する工程を包含する。

50

【0131】

いくつかの実施形態において、方法は、(a) (i) 第1の株の *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、上記第1の株の *S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される、細胞；ならびに (b) (i) 第2の株の *S. aureus agrA* コード配列および *S. aureus agrC* コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、上記第2の株の *S. aureus AgrA* タンパク質によって活性化される、細胞を含む組成物を被験体に投与する工程を包含する。

10

【0132】

いくつかの実施形態において、方法は、(a) (i) I型 *S. aureus agrA* コード配列および I型 *S. aureus agrC* コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* I型 *AgrA* タンパク質によって活性化される、細胞；ならびに (b) (i) II型、III型、またはIV型 *S. aureus agrA* コード配列および II型、III型、またはIV型 *S. aureus agrC* コード配列に対して一方の配向で作動可能に連結され、(ii) 抗菌ペプチドコード配列に対してもう一方の配向で作動可能に連結された双方向プロモーターを含む操作された核酸を含む *agr* 欠損 *S. epidermidis* 細胞であって、ここで上記双方向プロモーターは、*S. aureus* II型、III型、またはIV型 *AgrA* タンパク質によって活性化される、細胞を含む組成物を被験体に投与する工程を包含する。

20

【0133】

本開示の組成物および／または細菌細胞は、いくつかの実施形態において、予防上有効な量または治療上有効な量において投与される。予防上有効な量は、いくつかの実施形態において、細菌細胞感染を予防するために有効である。いくつかの実施形態において、治療上有効な量は、細菌細胞感染を処置するために有効である。上記細菌細胞感染は、例えば、*S. aureus* (例えば、MRSA) 感染であり得る。

30

【0134】

細菌感染の防止に関して、細胞または組成物の予防上有効な量が細菌を完全に根絶する必要はないが、被験体に、例えば、被験体の皮膚に存在する細菌細胞集団が疾患の症状 (例えば、発熱、発疹、悪心など) を引き起こすことを防止するべきであることは、理解されるべきである。いくつかの実施形態において、細胞または組成物の予防上有効な量は、被験体に (被験体の皮膚に) 存在する細菌細胞集団を、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%低減する。同様に、細菌感染の処置に関して、細胞または組成物の治療上有効な量が細菌感染と関連する疾患を治癒するかまたは細菌細胞集団を完全に根絶する必要はないが、疾患の症状のうちの少なくとも1つを緩和し、被験体に (または被験体の皮膚に) 存在する細菌細胞集団を少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%低減することは、理解されるべきである。

40

【実施例】

【0135】

実施例1： バイオセンサー開発

S. aureus の全4種の *agr* 型を感知するために *S. epidermidis* バ

50

イオセンサー株は有利であることから、センサー遺伝子座の3種の異なるバージョンを操作し、*S. epidermidis*に組み込んだ（III型は、IIIおよびIV AIPの両方を検出し得ることから、3バージョン）（図1B、1C）。最初の設計は、「4構成要素」センサーを作り、ここで全4種の構成要素のAgrC/AgrC機序を単一構築物として合成した。上記センサー遺伝子座のうちの3つのバージョンの「カクテル」、ならびに上記センサー遺伝子座の単一のI型バージョンも設計した。なぜならI型は、MRSA大流行型の大部分を占めるからである。

【0136】

上記バイオセンサー構築物の最初の検証を、*S. epidermidis*のagr欠損株（Tue3298）へと形質転換された*Staphylococcus*シャトルプラスミドベクターにおいて行った。全4種のagr型に由来するセンサーを生成し、試験し、特徴付けを行って、特異性および感度を決定した（図2A）。*S. aureus*上清の存在下で、Types III型とIV型との間での重複を伴って、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するバイオセンサーの強かつ特異的な誘導が観察された。その後、血漿維持の要件を回避するために、上記バイオセンサー構築物のゲノム組み込みを作製した。そのゲノム組み込み体は、提供された*S. aureus* I型培養上清の量に応じて、I型を組み込んだバイオセンサーの同様に強い用量依存性活性化を示した。その組み込み体はまた、マルチコピープラスミドに対して単一コピーゲノム発現におそらく起因して、上記バイオセンサーの基底発現に由来する低減したバックグラウンドを示した（図2B）。

【0137】

全4種のagr型に由来するセンサーは、再構築したヒト表皮およびマウス皮膚において試験している最中である。

【0138】

上記バイオセンサーの制御下で、任意の分子が理論的に配置され得るが、理想的な分子は、サイズが小さかつ発現および排出を容易にするためにプロセッシングおよび修飾に関して単純なものである。理想的な分子の選択に関する他の考慮事項は、その分子に関する*S. epidermidis*株の免疫、分泌／輸送される能力、標的*S. aureus*における抗菌剤耐性獲得の可能性、他の片利共生皮膚微生物の標的化を回避するための阻害スペクトラムの狭さ、および*S. epidermidis*における発現のためのコドン最適化の必要性である。

【0139】

既知のおよび仮定の抗*S. aureus*分子の100を超える潜在的候補のリストが、文献から特定され、産生株である*S. epidermidis*を保護するために、サイズおよび耐性遺伝子の利用可能性を含む理想的な特性に基づいて、3種の微生物およびヒト由来の候補にまで狭められた（表1）。その3種の候補は、エラフィン（ヒト起源）、ヒラシン（*Enterococcus hirae*起源）、およびLL-37（ヒト起源）である。

表1.

【表1】

遺伝子	供給源	免疫	ペプチドのサイズ	ペプチド複合体のサイズ
エラフィン	ヒト*	なし	61 aa; 6.6 kD	11.4 kD
ヒラシン	<i>Enterococcus hirae</i>	あり	74 aa; 8.1 kD	12.9 kD
LL-37	ヒト*	なし	37 aa; 4.5 kD	9.4 kD

*コドン最適化した配列

【0140】

上記3種の候補分子の各々をコードする遺伝子を、誘導性テトラサイクリンベクターへとクローニングし、*S. epidermidis*株Tue3298へと形質転換して、基底

活性を評価した。上記AMP LL-37を、いくつかの排出シグナルペプチド (export signaling peptide) で試験した。全3種の候補分子は、強い抗*S. aureus*活性を示した(データは示さず)。上記3種の候補分子の各々は、I型バイオセンサーにおいてインビトロおよびインビボで評価されている最中である。

【0141】

実施例2. バイオセンサー活性

4種のagr型の*S. aureus*株を、それぞれ、TSAプレートにプレートした(各 10^5 細胞)。各プレート上に、*S. epidermidis*バイオセンサー株(異なるagr型のクオラムセンシング制御下での抗菌ペプチドの染色体組み込み体の特徴とする)をスポットする。2個のクローンを各型に使用し、各クローンを、それぞれ、2用量、 10^4 細胞および 10^6 細胞でスポットする。組み込みについての親株*S. epidermidis* Tu3298 Δ agrもまた、それぞれ、 10^4 細胞および 10^6 細胞でコントロールとしてスポットする。上記スポットの周りのハローは、テストである*S. aureus*株の殺滅を示し、バイオセンサーagr型の間の交差反応性を試験する。

【0142】

実施例3. MRSAに対するインビボ有効性

無菌C57BL/6Jマウスの実験群(各 $n=4$ または5)を脱毛し、 3×3 mmの背側パンチ生検で傷を付けた。(1) 10^5 USA300(メチシリン耐性*S. aureus* (MRSA) agr 1型株)+ 10^8 *S. epidermidis* Tu3298 Δ agr(親*S. epidermidis*株、バイオセンサーなし、グループ1)または(2) 10^5 USA300+ 10^8 *S. epidermidis* リソスタフィン生成バイオセンサー(グループ2)の混合物を、各マウスの傷を付けた領域にワセリンゼリー中で塗布した。48時間後にそのパンチの周りの皮膚 1cm^2 で細菌を回収し、 1mL $1\times$ リン酸緩衝化生理食塩水中で均質化し、1:10、1:100、1:1000、1:10000、および1:100000に希釈した。上記希釈物のうちの $10\mu\text{L}$ を、マンニトール塩アガープレートにプレートして、USA300 *S. aureus*を*S. epidermidis*から区別し、コロニー形成単位を定量した。細菌の正体を、コロニーサイズ、色によって、およびMALDI-TOFによって決定する。*S. aureus*コロニー形成単位(CFU)の数字は、*S. epidermidis* リソスタフィン生成バイオセンサーの存在下で低減した(図3)。従って、バイオセンサーを発現する*S. epidermidis*は、インビボでMRSAを処置するにあたって有効である。

【0143】

本明細書で開示される全ての参考文献、特許および特許出願は、各々が引用される主題に関して参考として援用され、場合によっては、その文書の全体を包含し得る。本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、不定冠詞「a(1つの、ある)」、「an(1つの、ある)」は、そうでないことが明らかに示されなければ、「少なくとも1」を意味することが理解されるべきである。

【0144】

そうでないことが明らかに示されなければ、1より多くの工程または行為を含む本明細書で開示される任意の方法において、上記方法の工程または行為の順序は、上記方法の工程または行為の順序が記載される順序に必ずしも限定されないことも、理解されるべきである。

【0145】

特許請求の範囲において、および上記の明細書において、全ての移行句(例えば、「包含する、含む(comprising)」、「含む、包含する(including)」、「有する(carrying)」、「有する(having)」、「含む、含有する(containing)」、「包含する、関わる(involve)」、「保持する(holding)」、「から構成される(composed of)」など)は、制限がない(すなわち、が挙げられるが、これらに限定されない、を意味する)と理解される

べきである。移行句「からなる (consisting of)」および「から本質的になる (consisting essentially of)」のみが、それぞれ、米国特許商標庁の特許審査基準、セクション 2111.03 に示されるとおり、閉鎖系または半閉鎖系の移行句であるものとする。

【0146】

数値の前にある用語「約 (about)」および「実質的に (substantially)」は、その記載される数値の $\pm 10\%$ を意味する。

【0147】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上端と下端の間の各値は、具体的に企図され、本明細書で記載される。

【図面】

【図 1】

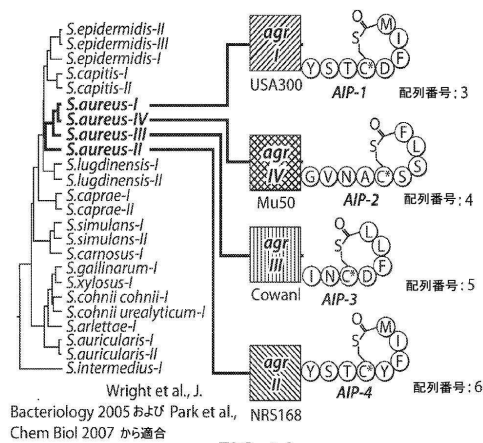


FIG. 1A

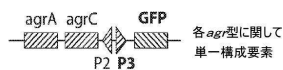


FIG. 1B



FIG. 1C

【図 2 - 1】

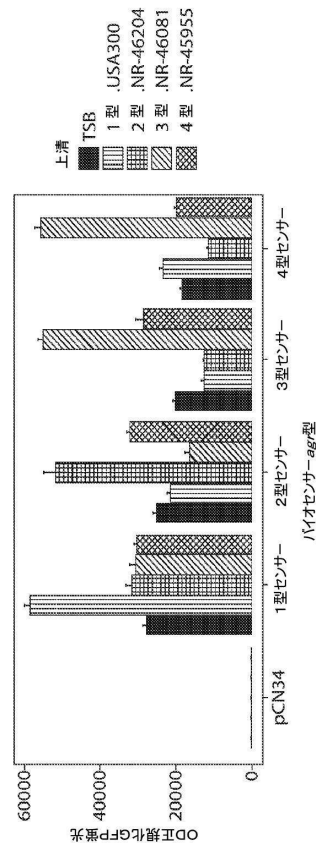


FIG. 2A

10

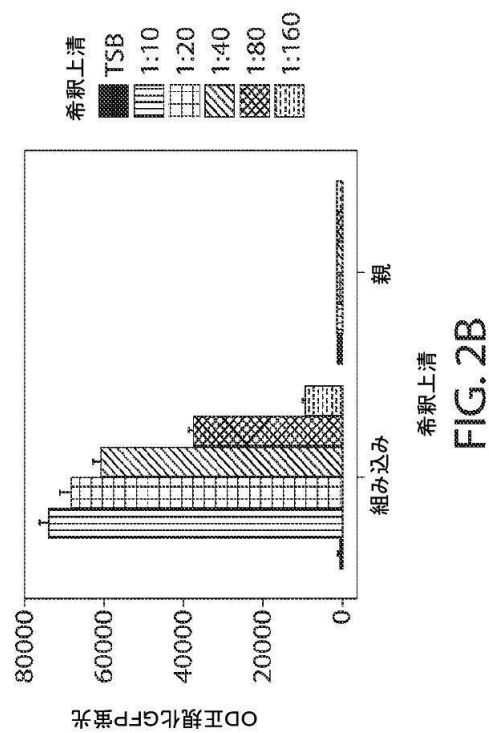
20

30

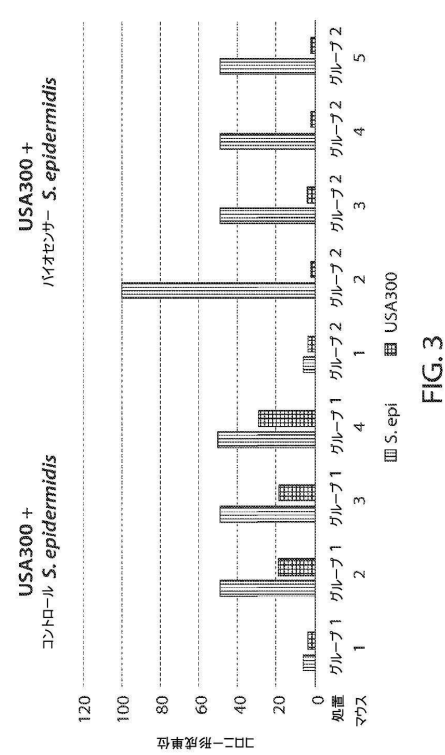
40

50

【 図 2 - 2 】



【 図 3 】



【 配 列 表 】

2023546925000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/55744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 35/74, C07K 14/31, A61P 31/04 (2021.01)

CPC - A61K 38/1709, C12N 15/70, A61K 2035/11, C12N 15/74, Y02A 50/30

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2018/0161380 A1 (AZITRA) 14 June 2018 (14.06.2018) Abstract; para [0024]	1-3, 15, 20-22
Y	US 2015/0209393 A1 (NANYANG TECHNOLOGICAL UNIVERSITY) 30 July 2015 (30.07.2015) Abstract; para [0007], [0044], [0062]	1-3, 15, 20-22, 37-41
Y	GLATTHARDT et al., Small Molecules Produced by Commensal Staphylococcus epidermidis Disrupt Formation of Biofilms by Staphylococcus aureus, Applied and Environmental Microbiology, March 2020, Vol. 86, No. 5; p 1-15; Especially: Abstract; p 9, para 3	1-3, 15, 20-22, 37-41
Y	US 2011/0218226 A1 (SHOHAM) 8 September 2011 (08.09.2011) para [0029], [0030], [0032], Fig. 1	15, 21-22, 37, (40-41)/37
Y	US 2017/0081378 A1 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION et al.) 23 March 2017 (23.03.2017) Abstract	20, 37, (40-41)/37
Y	US 2011/0038917 A1 (KAPPERS et al.) 17 February 2011 (17.02.2011) para [0011], [0038], [0099]	21, 38, (40-41)/38
Y	US 2015/0265660 A1 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 24 September 2015 (24.09.2015) para [0015]	22, 39, (40-41)/39

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent 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

16 December 2021 (16.12.2021)

Date of mailing of the international search report

JAN 26 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/55744

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/55744

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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.: 4-14, 16-19, 23-36 and 42-53
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 17/00 (2006.01)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)

F I

A 6 1 P 17/00 1 0 1
C 1 2 N 15/09 Z

テーマコード (参考)

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士 山本 健策

(72)発明者 オー, ジュリア

アメリカ合衆国 メイン 0 4 6 0 9, バー ハーバー, メイン ストリート 6 0 0

F ターム (参考)

4B065 AA53X AA53Y AB01 AC20 BA02 CA43 CA44
4C084 AA02 AA03 BA44 DA41 MA17 MA28 MA63 NA14 ZA901 ZA902
ZB351 ZB352
4C087 AA01 AA02 AA03 BC70 CA09 CA16 CA31 CA32 CA33 MA28
MA63 NA14 ZA90 ZB35