

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-529344

(P2019-529344A)

(43) 公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(51) Int.Cl.

A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01)

F 1

A 61 K 38/16
C 07 K 14/315
A 23 L 33/18
C 07 K 17/00
C 12 N 1/06

テーマコード(参考)

4 B 01 8
4 B 06 3
4 B 06 5
4 C 08 3
4 C 08 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-501691 (P2019-501691)
(86) (22) 出願日 平成29年7月14日 (2017.7.14)
(85) 翻訳文提出日 平成31年2月19日 (2019.2.19)
(86) 國際出願番号 PCT/US2017/042206
(87) 國際公開番号 WO2018/013967
(87) 國際公開日 平成30年1月18日 (2018.1.18)
(31) 優先権主張番号 62/362,788
(32) 優先日 平成28年7月15日 (2016.7.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31) 優先権主張番号 62/362,809
(32) 優先日 平成28年7月15日 (2016.7.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71) 出願人 508087044
イントレキソン コーポレーション
アメリカ合衆国 バージニア州 2406
O, ブラックスバーグ, クラフト ドライ
ブ 1750, スイート 1400
(74) 代理人 100092783
弁理士 小林 浩
(74) 代理人 100120134
弁理士 大森 規雄
(74) 代理人 100147762
弁理士 藤 拓也
(74) 代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ランチビオティックバリアントおよびその使用

(57) 【要約】

本開示は、野生型ランチビオティックに比べて抗微生物特性が向上したランチビオティックの構造的なバリアント、およびその使用に関する。実施形態は、非天然由来のランチビオティックを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- MU1140のアミノ酸配列を含み、
 a. 13位のアルギニンのアスパラギンへの変更(R13N)；
 b. 17位のフェニルアラニンのロイシン(F17L)またはチロシン(F17Y)
 への変更；
 c. 18位のアスパラギンのアラニンへの変更(N18A)；
 d. 20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更(Y20F)；または
 e. それらの組合せ、を含む変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項 2】

- MU1140のアミノ酸配列を含み、二つの変異をさらに含み、一つの変異が：
 a. 13位のアルギニンのアスパラギンへの変更(R13N)；
 b. 17位のフェニルアラニンのロイシン(F17L)またはチロシン(F17Y)
 への変更；
 c. 18位のアスパラギンのアラニンへの変更(N18A)；
 d. 20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更(Y20F)；または
 e. それらの組合せ、を含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項 3】

一つの変異が、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更(R13N)である、請求項2に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項 4】

一つの変異が、1位のフェニルアラニンのバリンへの変更(F1V)である、請求項2または3に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項 5】

- MU1140のアミノ酸配列を含み、二つの変異をさらに含み、一つの変異が、
 a. 1位のフェニルアラニンのバリンへの変更(F1V)；
 b. 1位のフェニルアラニンのアラニンへの変更(F1A)；
 c. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更(F1I)；
 d. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更(F1L)；
 e. 1位のフェニルアラニンのスレオニンへの変更(F1T)；または
 f. 1位のフェニルアラニンのチロシンへの変更(F1Y)、を含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項 6】

一つの変異が、1位のフェニルアラニンのバリンへの変更(F1V)である、請求項5に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項 7】

一つの変異が、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更(R13N)である、請求項5または6に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項 8】

- MU1140のアミノ酸配列を含み、
 a. 1位のフェニルアラニンのアラニンへの変更と、13位のアルギニンの：
 i. アラニン(F1A R13A)、
 ii. バリン(F1A R13V)、
 iii. アスパラギン(F1A R13N)、もしくは
 iv. セリン(F1A R13S)への変更との組合せ；
 b. 1位のフェニルアラニンのグリシンへの変更と、13位のアルギニンの：
 i. グリシン(F1G R13G)への変更との組合せ；
 c. 1位のフェニルアラニンのヒスチジンへの変更と、13位のアルギニンの：
 i. アスパラギン(F1H R13N)への変更との組合せ；
 d. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンの：

10

20

30

40

50

i . アラニン (F 1 I R 1 3 A) 、
 ii . グリシン (F 1 I R 1 3 G) 、
 iii . イソロイシン (F 1 I R 1 3 I) 、
 iv . アスパラギン (F 1 I R 1 3 N) 、
 v . プロリン (F 1 I R 1 3 P) 、
 vi . グルタミン (F 1 I R 1 3 Q) 、
 vii . グルタミン酸 (F 1 I R 1 3 S) 、
 viii . セリン (F 1 I R 1 3 V) 、もしくは
 ix . バリン (F 1 I R 1 3 E) への変更との組合せ ;

e . 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンの : 10

i . アラニン (F 1 L R 1 3 A) 、
 ii . アスパラギン酸 (F 1 L R 1 3 D) 、
 iii . グリシン (F 1 L R 1 3 G) 、
 iv . アスパラギン (F 1 L R 1 3 N) 、
 v . プロリン (F 1 L R 1 3 P) 、もしくは
 vi . グルタミン (F 1 L R 1 3 Q) への変更との組合せ ;

f . 1位のフェニルアラニンのスレオニンへの変更と、13位のアルギニンの : 20

i . アラニン (F 1 T R 1 3 A) 、
 ii . アスパラギン (F 1 T R 1 3 N) 、もしくは
 iii . バリン (F 1 T R 1 3 V) への変更との組合せ ;

g . 1位のフェニルアラニンのバリンへの変更と、13位のアルギニンの : 20

i . アラニン (F 1 V R 1 3 A) 、
 ii . アスパラギン (F 1 V R 1 3 N) 、
 iii . グルタミン (F 1 V R 1 3 Q) 、
 iv . アスパラギン酸 (F 1 V R 1 3 D) 、
 v . バリン (F 1 V R 1 3 V) 、もしくは
 vi . プロリン (F 1 V R 1 3 P) への変更との組合せ ; または

h . 1位のフェニルアラニンのチロシンへの変更と、13位のアルギニンの : 30

i . アスパラギン酸 (F 1 Y R 1 3 D) 、もしくは

ii . グリシン (F 1 Y R 1 3 G) 、への変更との組合せ、を含む二つの変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項 9】

1位のフェニルアラニンのバリンへの変更と、13位のアルギニンの :

i . アラニン (F 1 V R 1 3 A) 、
 ii . アスパラギン (F 1 V R 1 3 N) 、
 iii . グルタミン (F 1 V R 1 3 Q) 、
 iv . アスパラギン酸 (F 1 V R 1 3 D) 、
 v . バリン (F 1 V R 1 3 V) 、または
 vi . プロリン (F 1 V R 1 3 P) 、への変更との組合せを含む二つの変異を含む、請求項 8 に記載の非天然由来のランチビオティック。

40

【請求項 10】

前記二つの変異が、1位のフェニルアラニンのバリンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ (F 1 V R 1 3 N) とからなる、請求項 9 に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項 11】

M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列を含み、

a . 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、15位のグリシンのアラニンへの変更との組合せ (F 1 I R 1 3 A G 1 5 A) ；

b . 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアス

50

パラギン酸への変更との組合せ、15位のグリシンのアラニンへの変更との組合せ(F 1 I R 1 3 D G 1 5 A)；

c. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4位のトリプトファンのイソロイシンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F 1 I W 4 I R 1 3 A)；

d. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ(F 1 I W 4 M R 1 3 D)；

e. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ(F 1 I W 4 M R 1 3 N)；

f. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F 1 I K 2 A R 1 3 A)；

g. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、6位のロイシンのバリンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F 1 I L 6 V R 1 3 A)；

h. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F 1 I R 1 3 A Y 2 0 F)；

i. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F 1 I R 1 3 D Y 2 0 F)；

j. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F 1 I R 1 3 N Y 2 0 F)；

k. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F 1 L R 1 3 N Y 2 0 F)；

l. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F 1 L R 1 3 A Y 2 0 F)；または

m. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F 1 L R 1 3 D Y 2 0 F)を含む三つの変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項12】

MU1140のアミノ酸配列を含み、

a. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのリジンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F 1 I K 2 A W 4 K R 1 3 A)；または

b. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのリジンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ(F 1 I K 2 A W 4 K R 1 3 D)の変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項13】

MU1140のアミノ酸配列を含み、1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F 1 I K 2 A W 4 K R 1 3 A Y 2 0

10

20

30

40

50

F) の変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項 14】

- MU1140 のアミノ酸配列（配列番号 1156）を含み、
 a . 13 位のアルギニンのアスパラギンへの変更（R13N）；
 b . 17 位のフェニルアラニンのロイシン（F17L）またはチロシン（F17Y）
 への変更；
 c . 18 位のアスパラギンのアラニンへの変更（N18A）；
 d . 20 位のチロシンのフェニルアラニンへの変更（Y20F）；または
 e . それらの組合せ を含む変異をさらに含む、非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

10

【請求項 15】

- MU1140 のアミノ酸配列（配列番号 1156）を含み、二つの変異をさらに含み、
 一つの変異は：
 a . 13 位のアルギニンのアスパラギンへの変更（R13N）；
 b . 17 位のフェニルアラニンのロイシン（F17L）またはチロシン（F17Y）
 への変更；
 c . 18 位のアスパラギンのアラニンへの変更（N18A）；
 d . 20 位のチロシンのフェニルアラニンへの変更（Y20F）；または
 e . それらの組合せ を含む、非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

20

【請求項 16】

一つの変異が、13 位のアルギニンのアスパラギンへの変更（R13N）である、請求項 15 に記載の非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

【請求項 17】

一つの変異が、1 位のフェニルアラニンのバリンへの変更（F1V）である、請求項 15 または 16 に記載の非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

【請求項 18】

- MU1140 のアミノ酸配列（配列番号 1156）を含み、二つの変異をさらに含み、
 一つの変異は：
 a . 1 位のフェニルアラニンのバリンへの変更（F1V）；
 b . 1 位のフェニルアラニンのアラニンへの変更（F1A）；
 c . 1 位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更（F1I）；
 d . 1 位のフェニルアラニンのロイシンへの変更（F1L）；
 e . 1 位のフェニルアラニンのスレオニンへの変更（F1T）；または
 f . 1 位フェニルアラニンのチロシンへの変更（F1Y）を含む、非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

30

【請求項 19】

一つの変異が、1 位のフェニルアラニンのバリンへの変更（F1V）である、請求項 18 に記載の非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

【請求項 20】

一つの変異が、13 位のアルギニンのアスパラギンへの変更（R13N）である、請求項 18 または 19 に記載の非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

40

【請求項 21】

- MU1140 のアミノ酸配列（配列番号 1156）を含み、
 a . 1 位のフェニルアラニンのアラニンへの変更と 13 位のアルギニンの：
 i . アラニン（F1A R13A）、
 i i . バリン（F1A R13V）、
 i i i . アスパラギン（F1A R13N）、もしくは
 i v . セリン（F1A R13S）への変更との組合せ；
 b . 1 位のフェニルアラニンのグリシンへの変更と 13 位のアルギニンの：
 i . グリシン（F1G R13G）への変更との組合せ；

50

c . 1位のフェニルアラニンのヒスチジンへの変更と13位のアルギニンの :

i . アスパラギン (F 1 H R 1 3 N)への変更との組合せ ;

d . 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と13位のアルギニンの :

i . アラニン (F 1 I R 1 3 A)、

i i . グリシン (F 1 I R 1 3 G)、

i i i . イソロイシン (F 1 I R 1 3 I)、

i v . アスパラギン (F 1 I R 1 3 N)、

v . プロリン (F 1 I R 1 3 P)、

v i . グルタミン (F 1 I R 1 3 Q)、

v i i . グルタミン酸 (F 1 I R 1 3 S)、

v i i i . セリン (F 1 I R 1 3 V)、もしくは

i x . バリン (F 1 I R 1 3 E)への変更との組合せ ;

e . 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と13位のアルギニンの :

i . アラニン (F 1 L R 1 3 A)、

i i . アスパラギン酸 (F 1 L R 1 3 D)、

i i i . グリシン (F 1 L R 1 3 G)、

i v . アスパラギン (F 1 L R 1 3 N)、

v . プロリン (F 1 L R 1 3 P)、もしくは

v i . グルタミン (F 1 L R 1 3 Q)への変更との組合せ ;

f . 1位のフェニルアラニンのスレオニンへの変更と13位のアルギニンの :

i . アラニン (F 1 T R 1 3 A)、

i i . アスパラギン (F 1 T R 1 3 N)、もしくは

i i i . バリン (F 1 T R 1 3 V)への変更との組合せ ;

g . 1位のフェニルアラニンのバリンへの変更と13位のアルギニンの :

i . アラニン (F 1 V R 1 3 A)、

i i . アスパラギン (F 1 V R 1 3 N)、

i i i . グルタミン (F 1 V R 1 3 Q)、

i v . アスパラギン酸 (F 1 V R 1 3 D)、

v . バリン (F 1 V R 1 3 V)、もしくは

v i . プロリン (F 1 V R 1 3 P)への変更との組合せ ; または

h . 1位フェニルアラニンのチロシンへの変更と13位のアルギニンの :

i . アスパラギン酸 (F 1 Y R 1 3 D)、もしくは

i i . グリシン (F 1 Y R 1 3 G)への変更との組合せ、を含む二つの変異をさらに含む、非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

【請求項 2 2】

1位のフェニルアラニンのバリンへの変更と13位のアルギニンの :

i . アラニン (F 1 V R 1 3 A)、

i i . アスパラギン (F 1 V R 1 3 N)、

i i i . グルタミン (F 1 V R 1 3 Q)、

i v . アスパラギン酸 (F 1 V R 1 3 D)、

v . バリン (F 1 V R 1 3 V)、または

v i . プロリン (F 1 V R 1 3 P)、への変更との組合せを含む二つの変異を含む、請求項 2 1 に記載の非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

【請求項 2 3】

前記二つの変異が、1位のフェニルアラニンのバリンへの変更と13位のアルギニンのアスパラギンへの変更 (F 1 V R 1 3 N) (配列番号 5 5 0) とからなる、請求項 2 2 に記載の非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

【請求項 2 4】

M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 5 6) を含み、

a . 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラ

10

20

30

40

50

ニンへの変更との組合せ、15位のグリシンのアラニンへの変更との組合せ(F1I R 13A G 15A)；

b. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、15位のグリシンのアラニンへの変更との組合せ(F1I R 13D G 15A)；

c. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4位のトリプトファンのイソロイシンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F1I W 4 I R 13A)；

d. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ(F1I W 4 M R 13D)；

e. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ(F1I W 4 M R 13N)；

f. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F1I K 2 A R 13A)；

g. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、6位のロイシンのバリンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F1I L 6 V R 13A)；

h. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1I R 13A Y 20F)；

i. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1I R 13D Y 20F)；

j. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1I R 13N Y 20F)；

k. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1L R 13N Y 20F)；

l. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1L R 13A Y 20F)；または

m. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1L R 13D Y 20F)を含む三つの変異をさらに含む、非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

【請求項25】

MU1140のアミノ酸配列(配列番号1156)を含み、

a. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのリジンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F1I K 2 A W 4 K R 13A)；または

b. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのリジンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ(F1I K 2 A W 4 K R 13D)の変異をさらに含む、非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

【請求項26】

MU1140のアミノ酸配列(配列番号1156)を含み、1位のフェニルアラニンの

10

20

30

40

50

イソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1I K2A W4K R13A Y20F)の変異をさらに含む、非天然由来の翻訳後修飾されたランチビオティック。

【請求項27】

MU1140の単アミノ酸変異を含み、配列番号2から431のいずれか一つによってコードされるアミノ酸配列を有する、非天然由来のランチビオティック。

【請求項28】

MU1140の複数箇所のアミノ酸変異を含み、図7に記載されるようなバリエントである、非天然由来のランチビオティック。 10

【請求項29】

図8：第1群、第2群、または第3群に記載されるようないずれかのバリエントを含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項30】

図8：第1群に記載されるようないずれかのバリエントを含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項31】

図6に記載されるようなMU1140の単アミノ酸変異を含む、非天然由来のランチビオティック。 20

【請求項32】

配列番号550のアミノ酸配列を含む、非天然由来のランチビオティック。

【請求項33】

翻訳後修飾される、請求項27から32のいずれか1項に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項34】

前記翻訳後修飾が、5位にDhaを含む、請求項33に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項35】

前記翻訳後修飾が、8位にAbuを含む、請求項33または請求項34に記載の非天然由来のランチビオティック。 30

【請求項36】

前記翻訳後修飾が、14位にDhbを含む、請求項33から請求項35のいずれか1項に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項37】

前記翻訳後修飾が、5位にDhaを、8位にAbuを、14位にDhbを含む、請求項33から請求項36のいずれか1項に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項38】

前記翻訳後修飾が、図1に記載されるように(A1a₃-S-A1a₇)間のランチオニン(A1a-S-A1a)残基によって形成される環(環A)を含む、請求項33から請求項37のいずれか1項に記載の非天然由来のランチビオティック。 40

【請求項39】

前記翻訳後修飾が、図1に記載されるように、8位のアルファ-アミノ酪酸残基と11位のA1aとを含む環である環B(Abu₈-S-A1a₁₁)を形成するメチル-ランチオニン残基(Abu-S-A1a)を含む、請求項33から請求項38のいずれか1項に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項40】

前記翻訳後修飾が、図1に記載されるように(A1a₁₆-S-A1a₂₁)間のランチオニン(A1a-S-A1a)残基によって形成される環(環C)を含む、請求項33から請求項39のいずれか1項に記載の非天然由来のランチビオティック。 50

【請求項 4 1】

前記翻訳後修飾が、図 1 に記載されるようにチオエーテル連結によってアミノビニル基に連結された 19 位の A1a (A1a₁₉-S-CH=CH-NH-) である環 D を含む、請求項 33 から請求項 40 のいずれか 1 項に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項 4 2】

前記翻訳後修飾が、環 A、B、C、および D を含む、請求項 33 から請求項 41 のいずれか 1 項に記載の非天然由来のランチビオティック。

【請求項 4 3】

前記翻訳後修飾された M U 1 1 4 0 バリアントが、環 A、環 B、環 C、および環 D を含み、
10

a . これらの環のうち二つが、環 A 中の一つ (A1a₃-S-A1a₇) と環 C 中の一つ (A1a₁₆-S-A1a₂₁) とを含むランチオニン (A1a-S-A1a) 残基によって形成され；

b . メチル - ランチオニン残基 (Abu-S-A1a) が、8 位のアルファ - アミノ酪酸残基と 11 位の A1a とを含む環 B (Abu₈-S-A1a₁₁) を形成し；

c . 第 4 の環である D が、チオエーテル連結によってアミノビニル基に連結された 19 位の A1a (A1a₁₉-S-CH=CH-NH-) から構成され、
ならびに、5 位のアミノ酸が、Dha に修飾され、8 位のアミノ酸が、Abu に修飾され、14 位のアミノ酸が、Dhb に修飾されている、請求項 33 から 42 のいずれか 1 項に記載の非天然由来のランチオビオティック。
20

【請求項 4 4】

図 5 または図 7 のランチビオティックバリアントをコードするポリヌクレオチドからポリペプチドを発現することによって宿主細胞中に生産され、前記発現されたポリペプチドは、前記宿主細胞中で翻訳後修飾される、単離されたランチビオティックバリアント。

【請求項 4 5】

前記宿主細胞が、S. ミュータンスである、請求項 44 に記載の単離されたランチビオティックバリアント。

【請求項 4 6】

配列番号 1157 のアミノ酸配列を含む、翻訳後修飾された非天然由来のランチビオティック。
30

【請求項 4 7】

請求項 1 から 26 または 33 から 46 のいずれか 1 項に記載の非天然由来のランチビオティックと、医薬的に許容可能な担体、医薬的に許容可能な希釈剤、他の希釈剤または賦形剤とを含む、抗微生物組成物。

【請求項 4 8】

抗真菌剤、追加の抗微生物剤、膜破壊剤、またはそれらの組合せをさらに含む、請求項 47 に記載の抗微生物組成物。

【請求項 4 9】

前記追加の抗微生物剤が、グラム陰性の静菌または殺細菌の活性を有し、前記膜破壊剤が、グラム陰性細菌を前記バリアントランチビオティックに対し感受性にする、請求項 48 に記載の抗微生物組成物。
40

【請求項 5 0】

非天然由来のランチビオティックが、組成物中に約 0.001、0.01、0.1、1、5、10、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、または 1,000 mg/kg または mg/L で存在する、請求項 47 から 49 のいずれか 1 項に記載の抗微生物組成物。

【請求項 5 1】

治療有効量の請求項 47 から 50 のいずれか 1 項に記載の抗微生物組成物を対象に投与することを含む、対象の中または上に存在する、細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減する方法。
50

【請求項 5 2】

前記対象がヒトである、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記組成物が、経口的に、局所的に、経鼻的に、バッカルで、舌下に、経粘膜的に、直腸性に、経皮的に、吸入によって、注射によって、または髄腔内に投与される、請求項 4 7 または 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記注射が、筋肉内、静脈内、肺内、筋肉内、皮内、腹腔内、くも膜下腔内、または皮下の注射である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

3 と 8 の間の pH の生理的溶液中に請求項 1 から 2 6 または 3 3 から 4 6 のいずれか 1 項に記載の有効量の非天然由来のランチビオティックを含む保存剤。

10

【請求項 5 6】

組成物中の細菌の繁殖または細菌数を低減するのに充分な、ある量の請求項 1 から 2 6 または 3 3 から 4 6 のいずれか 1 項に記載の非天然由来のランチビオティックを含む、食品、飲料、ガム、または歯磨き剤の組成物。

20

【請求項 5 7】

組成物もしくは物体の中もしくは上の細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減するのに有效的な期間、請求項 1 から 2 6 または 3 3 から 4 6 のいずれか 1 項に記載の抗微生物組成物を、前記組成物または物体に接触させることを含む、組成物もしくは物体の中もしくは上に存在する細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減する方法。

【請求項 5 8】

前記組成物が、食品、飲料、ガム、または歯磨き剤である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

固体表面または布地を、請求項請求項 1 から 2 6 または 3 3 から 4 6 に記載のランチビオティック組成物、または前記固体表面もしくは布地に被覆、固相化、連結、もしくは結合されている前記組成物とともに含む、組成物。

20

【請求項 6 0】

バイオフィルムもしくは生物付着の状態の中もしくは上で細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減するのに有效的な期間、請求項 4 7 から 5 0 のいずれか 1 項に記載の抗微生物組成物を、前記バイオフィルムまたは生物付着の状態に接触させることを含む、バイオフィルムまたは生物付着の状態を低減する方法。

30

【請求項 6 1】

請求項 1 から 2 6 または 3 3 から 4 6 のいずれか 1 項に記載のランチビオティックと、一つまたは複数のアプリケーターとを含むキット。

【請求項 6 2】

請求項 1 から 2 6 または 3 3 から 4 6 のいずれか 1 項に記載の非天然由来のランチビオティックを投与することを含む、細菌感染と診断された対象を予防または治療する方法。

【請求項 6 3】

前記対象がヒトである、請求項 6 2 に記載の方法。

40

【請求項 6 4】

前記対象が、グラム陽性細菌に感染している、請求項 6 2 または 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記グラム陽性細菌が、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*S t a p h y l o c o c c u s e p i d e r m i d i s*)、パンコマイシン耐性のエンテロコッカス (*E n t e r o c o c c i*)、パンコマイシン耐性のエンテロコッカス・フェカリス (*E n t e r o c o c c u s f a e c a l i s*)、エンテロコッカス・フェカリス (*E n t e r o c o c c u s f a e c a l i s*)、エンテロコッカス・フェシウム (*E n t e r o c o c c u s f a e c i u m*)、プロピオニバクテリウム・アクネス (*P r o p i o n i b a c t e r i u m a c n e s*)、ストレプトコッカス・サリバリウス (*S t r e p t o*

50

coccus salivarius)、ストレプトコッカス・サンギス (Streptococcus sanguis)、ストレプトコッカス・ミティス (Streptococcus mitis)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes)、ラクトバチルス・サリバリウス (Lactobacillus salivarius)、リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes)、アクチノマイセス・イスラエリー (Actinomyces israelii)、アクチノマイセス・ネスランディ (Actinomyces naeslundii)、アクチノマイセス・ビスコーサス (Actinomyces viscosus)、バチルス・アンシラシス (Bacillus anthracis)、ストレプトコッカス・アガラクティイエ (Streptococcus agalactiae)、ストレプトコッカス・インターメディウス (Streptococcus intermedius)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae)、コリネバクテリウム・ジフテリア (Corynebacterium diphtheriae)、クロストリジウム・スポロゲネス (Clostridium sporogenes)、クロストリジウム・ボツリナム (Clostridium botulinum)、クロストリジウム・パーフリンゲンス (Clostridium perfringens)、クロストリジウム・テタニ (Clostridium tetani)、またはクロストリジウム・ディフィシル (Clostridium difficile) のうち一つまたは複数である、請求項 64 に記載の方法。
 【請求項 66】
 前記グラム陽性細菌が、クロストリジウム・ディフィシルである、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

前記対象が、グラム陰性細菌に感染している、請求項 62 または 63 に記載の方法。

【請求項 68】

前記グラム陰性細菌が、アシネットバクター・バウマニ、ボルデテラ・パートシス、ボレリア・ブルグドルフェリ、ブルセラ・アボルタス、ブルセラ・カニス、ブルセラ・メリテンシス、ブルセラ・スイス (Brucella suis)、カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni)、コクシエラ・バーネッティ (Coxiella burnetii)、大腸菌 (Escherichia coli)、フランシセラ・ツラレンシス (Francisella tularensis)、ヘモフィルス・インフルエンザ (Haemophilus influenzae)、ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori)、クレブシエラ・ニューモニエ (Klebsiella pneumoniae)、レジオネラ・ニューモフィラ (Legionella pneumophila)、レプトスピラ・インターロガンス (Leptospira interrogans)、ナイセリア・ゴノレア (Neisseria gonorrhoeae)、ナイセリア・メンингイティディス (Neisseria meningitidis)、シュードモナス・エルギノーザ (Pseudomonas aeruginosa)、リケッチャ・リケッチャ (Rickettsia rickettsii)、サルモネラ・エンテリティディス (Salmonella enteritidis)、サルモネラ・ティフィ (Salmonella typhi)、サルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella typhimurium)、セラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens)、シゲラ・ソンネ (Shigella sonnei)、トレポネーマ・パリズム (Treponema pallidum)、ビブリオ・コレラ (Vibrio cholera)、エルシニア・エンテロコリチカ (Yersinia enterocolitica)、またはエルシニア・ペスティス (Yersinia pestis) のうち一つまたは複数である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記非天然由来のランチビオティックが、一つまたは複数の追加の抗微生物剤、膜破壊

10

20

30

40

50

剤、またはそれらの組合せをさらに含む、請求項 6 2 から 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 0】

請求項 4 6 に記載の非天然由来のランチビオティックと、医薬的に許容可能な担体、医薬的に許容可能な希釈剤、他の希釈剤、賦形剤、またはそれらの組合せとを含む、抗微生物組成物。

【請求項 7 1】

抗真菌剤、追加の抗微生物剤、膜破壊剤またはそれらの組合せをさらに含む、請求項 4 7 に記載の抗微生物組成物。

【請求項 7 2】

前記追加の抗微生物剤が、グラム陰性の静菌または殺細菌の活性を有し、前記膜破壊剤が、グラム陰性細菌を前記バリアントランチビオティックに対し感受性にする、請求項 4 8 に記載の抗微生物組成物。

【請求項 7 3】

前記非天然由来のランチビオティックが、約 0 . 0 0 1 、 0 . 0 1 、 0 . 1 、 1 、 5 、 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 7 5 、 1 0 0 、 1 5 0 、 2 0 0 、 3 0 0 、 4 0 0 、 5 0 0 、 6 0 0 、 7 0 0 、 8 0 0 、 9 0 0 、 または 1 , 0 0 0 m g / k g または m g / L で前記組成物中に存在する、請求項 7 0 から 7 2 のいずれか 1 項に記載の抗微生物組成物。

【請求項 7 4】

請求項 7 0 から 7 3 のいずれか 1 項に記載の治療有効量の抗微生物組成物を対象に投与することを含む、対象の中または上に存在する細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減する方法。

【請求項 7 5】

前記対象がヒトである、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記組成物が、経口的に、局所的に、経鼻的に、バッカルで、舌下に、経粘膜的に、直腸性に、経皮的に、吸入によって、注射によって、または髄腔内に投与される、請求項 7 3 または 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記注射が、筋肉内、静脈内、肺内、筋肉内、皮内、腹腔内、くも膜下腔内、または皮下の注射である、請求項 7 5 の方法。

【請求項 7 8】

3 と 8 の間の pH の生理的溶液中に、有効量の請求項 4 6 に記載の非天然由来のランチビオティックを含む保存剤。

【請求項 7 9】

組成物中の細菌の繁殖または細菌数を低減するのに充分な量の請求項 4 6 に記載の非天然由来のランチビオティックを含む、食品、飲料、ガム、または歯磨き剤の組成物。

【請求項 8 0】

組成物もしくは物体の中もしくは上の細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減するのに有效的な期間、請求項 4 6 に記載の非天然由来のランチビオティックを、前記組成物または物体に接触させることを含む、組成物もしくは物体の中もしくは上に存在する細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減する方法。

【請求項 8 1】

前記組成物が、食品、飲料、ガム、または歯磨き剤である、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

固体表面または布地を、請求項 4 6 に記載の非天然由来のランチビオティック、または前記固体表面もしくは布地に被覆、固相化、連結、もしくは結合されている前記ランチビオティックとともに含む、組成物。

【請求項 8 3】

バイオフィルムもしくは生物付着の状態の中もしくは上で細菌の繁殖を低減するかまた

10

20

30

40

50

は細菌数を低減するのに有効な期間、請求項 4 6 に記載の非天然由来のランチビオティックを、前記バイオフィルムまたは生物付着の状態に接触させることを含む、バイオフィルムまたは生物付着の状態を低減する方法。

【請求項 8 4】

請求項 4 6 に記載のランチビオティックおよび一つまたは複数のアプリケーターを含むキット。

【請求項 8 5】

請求項 4 6 に記載の非天然由来のランチビオティックを投与することを含む、細菌感染と診断された対象を予防または治療する方法。

【請求項 8 6】

前記対象がヒトである、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記対象が、グラム陽性細菌に感染している、請求項 8 5 または 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記グラム陽性細菌が、スタフィロコッカス・エピデルミディス、バンコマイシン耐性のエンテロコッカス、バンコマイシン耐性のエンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェシウム、プロピオニバクテリウム・アクネス、ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・サンギス、ストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ラクトバチルス・サリバリウス、リストリア・モノサイトゲネス、アクチノマイセス・イスラエリー、アクチノマイセス・ネスランディ、アクチノマイセス・ビスコーラス、バチルス・アンシラシス、ストレプトコッカス・アガラクティエ、ストレプトコッカス・インターメディウス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、コリネバクテリウム・ジフテリア、クロストリジウム・スポロゲネス、クロストリジウム・ボツリナム、クロストリジウム・パーフリンゲンス、クロストリジウム・テタニ、クロストリジウム・ディフィシルのうち一つまたは複数である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記グラム陽性細菌が、クロストリジウム・ディフィシルである、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記対象が、グラム陰性細菌に感染している、請求項 8 5 または 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記グラム陰性細菌が、アシネットバクター・バウマニ、ボルデテラ・パーツシス、ボレリア・ブルグドルフェリ、ブルセラ・アボルタス、ブルセラ・カニス、ブルセラ・メリテンシス、ブルセラ・スイス、カンピロバクター・ジェジュニ、コクシエラ・バーネッティ、エシェリキア・コリ、フランシセラ・ツラレンシス、ヘモフィルス・インフルエンザ、ヘリコバクター・ピロリ、クレブシエラ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、レブトスピラ・インターロガンス、ナイセリア・ゴノレア、ナイセリア・メニンギティディス、シュードモナス・エルギノーザ、リケッチア・リケッチイ、サルモネラ・エンテリティディス、サルモネラ・ティフィ、サルモネラ・ティフィムリウム、セラチア・マルセッセンス、シゲラ・ソンネ、トレポネーマ・パリズム、ビブリオ・コレラ、エルシニア・エンテロコリチカ、またはエルシニア・ペスティスのうち一つまたは複数である、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記非天然由来のランチビオティックが、一つまたは複数の追加の抗微生物剤、膜破壊剤、またはそれらの組合せをさらに含む、請求項 8 5 から 9 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 3】

配列番号 2 ~ 4 3 1 のいずれか一つを含むか、または図 7 に記載されるようなバリアントをコードする、精製ポリヌクレオチドまたはそれらの組合せ。

10

20

30

40

50

【請求項 9 4】

配列番号 756、757、758、759、または760のいずれか一つを含む、精製ポリヌクレオチド。

【請求項 9 5】

配列番号 709、714、716、735、747、751、754、または758のいずれか一つを含む、精製ポリヌクレオチド。

【請求項 9 6】

配列番号 758 を含む、精製ポリヌクレオチド。

【請求項 9 7】

配列番号 1163 を含む、精製ポリヌクレオチド。

10

【請求項 9 8】

配列番号 758 のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 9 9】

配列番号 1163 のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 10 0】

配列番号 758 のポリヌクレオチドを含む、単離された組換えストレプトコッカス・ミュータンス株。

【請求項 10 1】

配列番号 1163 のポリヌクレオチドを含む、単離された組換えストレプトコッカス・ミュータンス株。

20

【請求項 10 2】

配列番号 1161 のアミノ酸配列を含む非天然由来のポリペプチド。

【請求項 10 3】

(a) 乳酸の発現が野生型 S. ミュータンス株に比べて約 80 % 以上減るような、乳酸合成に関するポリヌクレオチド中の変異；(b) 組換えアルコールデヒドロゲナーゼのポリヌクレオチド；および(c) 請求項 1 から 26 または 33 から 46 のいずれか 1 項に記載の非天然由来のランチビオティックをコードする組換えポリヌクレオチド、を含む、単離された組換えストレプトコッカス・ミュータンス株。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

30

【0001】**関連出願との相互参照**

本出願は、2016年7月15日出願の米国仮特許出願第 62 / 362,788 号、2016年7月15日出願の第 62 / 362,809 号、および2016年11月10日出願の第 62 / 420,328 号の利益を請求し、これらはそれぞれ、参照によりその全体を本明細書に組み込まれる。

【0002】**配列表への参照**

本出願は、ASCII フォーマットで電子出願された配列表を含み、ここに参照によりその全体を組み込まれる。2017年7月12日に作製された前記 ASCII コピーは、0100-0017 WO1_S L.t x t と名付けられ、421, 465 バイトのサイズである。

40

【0003】

本願発明は、概して、分子生物学、感染疾患、およびポリペプチドベースの抗生物剤の分野に関する。さらに具体的には、本発明のある特定の態様は、新規のランチビオティック（ポリペプチド）バリエント、および一つまたは複数のランチビオティック（ポリペプチド）バリエントをコードする核酸配列に関する。本発明のある特定の他の態様は、一つまたは複数のランチビオティックバリエントをコードする一つまたは複数の核酸配列を含む組換えベクター、前記ベクターを用いて形質転換された宿主細胞、ランチビオティックバリエントを生産するための方法、およびそれらの使用の方法に関する。

50

【背景技術】

【0004】

疾患を引き起こす細菌の数多くの株が、現在利用可能な抗生素剤に対し次第に耐性となりつつある。多剤耐性の病原体に起因する医療関連の感染は、特に難題である。世界中で何万人もが、抗生素耐性の感染に苦しみ、この感染により、医療システムに莫大なコストが生じている。新しい抗生素の必要性は、医学界で極めて重要なアンメットニーズとなりつつある。

【0005】

臨床的意義を持つ可能性のある抗生素剤のクラスであるランチビオティック (Smith & Hillman, (2008) Curr. Opin. Microbiol. 11 : 401 - 408 に概説されている) は、存在する特徴的なランチオニン環ゆえにその名称を得た。ランチビオティックはまた、2,3-ジデヒドロアラニン (Dha)、2,3-ジデヒドロブチリン (Dhb)、S-アミノビニ-D-システイン (Avicys)、アミノ酪酸 (Abu)、2-オキソプロピオニル、2-オキソブチリルやヒドロキシプロピオニルなど、様々な通常にないアミノ酸を有することが知られている (Hasper et al. (2006) Science 313 : 1636 - 1637.)。ミュータシン 1140 ('MU1140') は、口腔微生物ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans) の特定の株が生産することができるランチビオティックの1タイプである (Smith et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267 : 6810 - 6816.)。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0006】

本願開示は、MU1140の単アミノ酸変異を含む非天然由来のランチビオティックを提供し、このランチビオティックは、配列番号2から431のうちのいずれか一つをコードするアミノ酸配列を有する。

【0007】

本願開示はまた、MU1140の複数部位のアミノ酸変異を含み、図7に記載されるようなバリエントである、非天然由来のランチビオティックを提供する。

【0008】

本願開示はまた、図8：第1群、第2群、または第3群に記載されるようないずれかのバリエントを含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。実施形態によっては、非天然由来のランチビオティックは、図8：第1群に記載されるようないずれかのバリエントを含む。

【0009】

本願開示はまた、図6に記載されるようなMU1140の単アミノ酸変異を含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。

【0010】

本願開示はまた、MU1140のアミノ酸配列（例えば配列番号1156）を含み、(a) 13位のアルギニンのアスパラギンへの変更 (R13N)；(b) 17位のフェニルアラニンのロイシン (F17L) またはチロシン (F17Y) への変更；(c) 18位のアスパラギンのアラニンへの変更 (N18A)；(d) 20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更 (Y20F)；または(e) それらの組合せである変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。実施形態によっては、非天然由来のランチビオティックは、MU1140のアミノ酸配列（例えば配列番号1156）を含み、二つの変異をさらに含み、一つの変異が：(a) 13位のアルギニンのアスパラギンへの変更 (R13N)；(b) 17位のフェニルアラニンのロイシン (F17L) またはチロシン (F17Y) への変更；(c) 18位のアスパラギンのアラニンへの変更 (N18A)；(d) 20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更 (Y20F)；または(e) それらの組合せである。実施形態によっては、非天然由来のランチビオティックは、MU1140のアミノ酸配列（例えば配列番号1156）を含み、二つの変異をさらに含み、一つの変異

が、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更(R13N)である。

【0011】

実施形態によつては、本開示は、MU1140のアミノ酸配列(例えば配列番号1156)を含む非天然由来のランチビオティックを提供し、二つの変異をさらに含み、一つの変異が:(a)1位のフェニルアラニンのバリンへの変更(F1V);(b)1位のフェニルアラニンのアラニンへの変更(F1A);(c)1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更(F1I);(d)1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更(F1L);(e)1位のフェニルアラニンのスレオニンへの変更(F1T);または(f)1位のフェニルアラニンのチロシンへの変更(F1Y)である。実施形態によつては、本開示は、MU1140のアミノ酸配列(例えば配列番号1156)を含む非天然由来のランチビオティックを提供し、二つの変異をさらに含み、一つの変異が、1位のフェニルアラニンのバリンへの変更(F1V)である。本願開示はまた、MU1140のアミノ酸配列(例えば配列番号1156)を含み:(a)1位のフェニルアラニンのアラニンへの変更と、13位のアルギニンの:(i)アラニン(F1A R13A)、(ii)バリン(F1A R13V)、(iii)アスパラギン(F1A R13N)、もしくは(iv)セリン(F1A R13S)への変更との組合せ;(b)1位のフェニルアラニンのグリシンへの変更と、13位のアルギニンの:(i)グリシン(F1G R13G)への変更との組合せ;(c)1位のフェニルアラニンのヒスチジンへの変更と、13位のアルギニンの:(i)アスパラギン(F1H R13N)への変更との組合せ;(d)1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンの:(i)アラニン(F1I R13A)、(ii)グリシン(F1I R13G)、(iii)イソロイシン(F1I R13I)、(iv)アスパラギン(F1I R13N)、(v)プロリン(F1I R13P)、(vi)グルタミン(F1I R13Q)、(vii)グルタミン酸(F1I R13S)、(viii)セリン(F1I R13V)、もしくは(viiii)バリン(F1I R13E)への変更との組合せ;(e)1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンの:(i)アラニン(F1L R13A)、(ii)アスパラギン酸(F1L R13D)、(iii)グリシン(F1L R13G)、(iv)アスパラギン(F1L R13N)、(v)プロリン(F1L R13P)、もしくは(vi)グルタミン(F1L R13Q)への変更との組合せ;(f)1位のフェニルアラニンのスレオニンへの変更と、13位のアルギニンの:(i)アラニン(F1T R13A)、(ii)アスパラギン(F1T R13N)、もしくは(iii)バリン(F1T R13V)への変更との組合せ;(g)1位のフェニルアラニンのバリンへの変更と、13位のアルギニンの:(i)アラニン(F1V R13A)、(ii)アスパラギン(F1V R13N)、(iii)グルタミン(F1V R13Q)、(iv)アスパラギン酸(F1V R13D)、(v)バリン(F1V R13V)、もしくは(vi)プロリン(F1V R13P)への変更との組合せ;または(h)1位のフェニルアラニンのチロシンへの変更と、13位のアルギニンの:(i)アスパラギン酸(F1Y R13D)もしくは(ii)グリシン(F1Y R13G)への変更との組合せを含む二つの変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。実施形態によつては、本開示は、MU1140のアミノ酸配列(例えば配列番号1156)を含み、1位のフェニルアラニンのバリンへの変更と、13位のアルギニンの:(i)アラニン(F1V R13A)、(ii)アスパラギン(F1V R13N)、(iii)グルタミン(F1V R13Q)、(iv)アスパラギン酸(F1V R13D)、(v)バリン(F1V R13V)、または(vi)プロリン(F1V R13P)への変更との組合せを含む二つの変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。実施形態によつては、本開示は、二つの変異を有するMU1140のアミノ酸配列(例えば配列番号1156)を含み、上記二つの変異が、1位のフェニルアラニンのバリンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ(F1V R13N)(例えば、配列番号1157)からなる、非天然由来のランチビオティックを提供する。

【0012】

10

20

30

40

50

本願開示はまた、M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1 1 5 6）を含み：（a）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、15位のグリシンのアラニンへの変更との組合せ（F 1 I R 1 3 A G 1 5 A）；（b）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、15位のグリシンのアラニンへの変更との組合せ（F 1 I R 1 3 D G 1 5 A）；（c）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4位のトリプトファンのイソロイシンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ（F 1 I W 4 I R 1 3 A）；（d）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ（F 1 I W 4 M R 1 3 D）；（e）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ（F 1 I W 4 M R 1 3 N）；（f）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ（F 1 I K 2 A R 1 3 A）；（g）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、6位のロイシンのバリンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ（F 1 I L 6 V R 1 3 A）；（h）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ（F 1 I R 1 3 A Y 2 0 F）；（i）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ（F 1 I R 1 3 D Y 2 0 F）；（j）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ（F 1 I R 1 3 N Y 2 0 F）；（k）1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ（F 1 L R 1 3 N Y 2 0 F）；（l）1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ（F 1 L R 1 3 A Y 2 0 F）；または（m）1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ（F 1 L R 1 3 D Y 2 0 F）を含む三つの変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。

【0 0 1 3】

本願開示はまた、M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1 1 5 6）を含み：（a）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのリジンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ（F 1 I K 2 A W 4 K R 1 3 A）；および（b）1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのリジンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更（F 1 I K 2 A W 4 K R 1 3 D）を含む変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。

【0 0 1 4】

本願開示はまた、M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1 1 5 6）を含み、1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ（F 1 I K 2 A W 4 K R 1 3 A Y 2 0 F）を含む変異をさらに含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。

【0 0 1 5】

実施形態によっては、本開示は、本明細書に記載されるような非天然由来のランチビオ

10

20

30

40

50

ティックと、医薬的に許容可能な担体、医薬的に許容可能な希釈剤、他の希釈剤または賦形剤とを含む、抗微生物組成物に向けられる。実施形態によっては、本組成物は、抗真菌剤、追加の抗微生物剤、膜破壊剤、またはそれらの組合せをさらに含む。実施形態によっては、上記追加の抗微生物剤は、グラム陰性の静菌または殺細菌の活性を有し、上記膜破壊剤は、グラム陰性細菌をバリアントランチビオティックに対し感受性にする。

【0016】

実施形態によっては、一つまたは複数の単離されたランチビオティックは、組成物中に約0.001、0.01、0.1、1、5、10、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、または1,000mg/kgまたはmg/Lで存在する、

10

【0017】

実施形態によっては、本開示は、治療有効量の本明細書に記載されるような抗微生物組成物を対象に投与することを含む、対象の中または上に存在する、細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減する方法に向けられる。実施形態によっては、対象はヒトである。

【0018】

実施形態によっては、本組成物は、経口的に、局所的に、経鼻的に、バッカルで、舌下に、経粘膜的に、直腸に、経皮的に、吸入によって、注射によって、または髄腔内に投与される。実施形態によっては、注射は、筋肉内、静脈内、肺内、筋肉内、皮内、腹腔内、くも膜下腔内、または皮下の注射である、

20

【0019】

実施形態によっては、本開示は、3と8の間のpHで生理的溶液中に、有効量の本明細書に記載されるような非天然由来のランチビオティックを含む保存剤に向けられる。

【0020】

実施形態によっては、本開示は、組成物中の細菌の繁殖または細菌数を低減するのに充分な、ある量の本明細書に記載されるような非天然由来のランチビオティックを含む、食品、飲料、ガム、または歯磨き剤の組成物に向けられる。

30

【0021】

実施形態によっては、本開示は、組成物もしくは物体の中もしくは上の細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減するのに有効な期間、本明細書に記載されるような抗微生物組成物を、組成物または物体に接触させることを含む、組成物もしくは物体の中もしくは上に存在する細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減する方法に向けられる。実施形態によっては、組成物は、食品、飲料、ガム、または歯磨き剤である。

【0022】

実施形態によっては、本開示は、配列番号2～431のいずれか一つを含むかもしくは図7に記載されたバリアントをコードする精製ポリヌクレオチド、またはそれらの組合せに向けられる。実施形態によっては、本開示は、配列番号756、757、758、559、760、または761のいずれか一つを含む、精製ポリヌクレオチドを提供する。実施形態によっては、本開示は、配列番号709、714、716、735、747、751、754、または758のいずれか一つを含む、精製ポリヌクレオチドを提供する。実施形態によっては、本開示は、配列番号758を含む、精製ポリヌクレオチドに向けられる。

40

【0023】

実施形態によっては、本開示は、固体表面または布地を本明細書に記載されるようなランチビオティック組成物と共に含むか、または固体表面もしくは布地に被覆、固相化、連結、もしくは結合されている、組成物に向けられる。

【0024】

実施形態によっては、本開示は、バイオフィルムもしくは生物付着の状態の中もしくは上で細菌の繁殖を低減するかまたは細菌数を低減するのに有効な期間、本明細書に記載されるような抗微生物組成物を、バイオフィルムまたは生物付着の状態に接触させることを含む、バイオフィルムまたは生物付着の状態を低減する方法に向けられる。

50

〔 0 0 2 5 〕

実施形態によっては、本開示は、本明細書に記載されるようなランチビオティックと、一つまたは複数のアプリケーターとを含むキットに向けられる。

【 0 0 2 6 】

実施形態によっては、本開示は、本明細書に記載されるような非天然由来のランチビオティックを投与することを含む、細菌感染と診断された対象を予防または治療する方法に向けられる。実施形態によっては、対象はヒトである。実施形態によっては、対象は、グラム陽性細菌に感染している。実施形態によっては、グラム陽性細菌は、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*)、バンコマイシン耐性のエンテロコッカス (*Enterococcus*)、バンコマイシン耐性のエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、プロピオニバクテリウム・アクネス (*Propionibacterium acnes*)、ストレプトコッカス・サリバリウス (*Streptococcus salivarius*)、ストレプトコッカス・サンギス (*Streptococcus sanguis*)、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus mitis*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、アクチノマイセス・イスラエリー (*Actinomyces israelii*)、アクチノマイセス・ネスランディ (*Actinomyces naeslundii*)、アクチノマイセス・ビスコーサス (*Actinomyces viscosus*)、バチルス・アンシラシス (*Bacillus anthracis*)、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス・インターメディウス (*Streptococcus intermedius*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheriae*)、クロストリジウム・スプロゲネス (*Clostridium sporogenes*)、クロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・パーフリンゲンス (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・テタニ (*Clostridium tetani*)、およびクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) のうち一つまたは複数である。実施形態によっては、グラム陽性細菌は、クロストリジウム・ディフィシルである。

【 0 0 2 7 】

ria gonorrhoeae)、ナイセリア・メンингイティディス(*Neisseria meningitidis*)、シュードモナス・エルギノーザ(*Pseudomonas aeruginosa*)、リケッチャ・リケッチャ(*Rickettsia rickettsii*)、サルモネラ・エンテリティディス(*Salmonella enteritidis*)、サルモネラ・ティフィ(*Salmonella typhi*)、サルモネラ・ティフィムリウム(*Salmonella typhimurium*)、セラチア・マルセッセンス(*Serratia marcescens*)、シゲラ・ソンネ(*Shigella sonnei*)、トレポネーマ・パリズム(*Treponema pallidum*)、ビブリオ・コレラ(*Vibrio cholera*)、エルシニア・エンテロコリチカ(*Yersinia enterocolitica*)、およびエルシニア・ペスティス(*Yersinia pestis*)のうち一つまたは複数である。実施形態によっては、非天然由来のランチビオティックは、一つまたは複数の追加の抗微生物剤、膜破壊剤、またはそれらの組合せをさらに含む。

【0028】

実施形態によっては、本開示は、(a)野生型 *S. ミュータンス* 株に比べて乳酸の発現が約80%以上消失するような、乳酸合成に関するポリヌクレオチド中の変異；(b)組換えアルコールデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド；および(c)図5または図7に記載されるような非天然由来のランチビオティックをコードする組換えポリヌクレオチドを含む、単離された組換えストレプトコッカス・ミュータンス株に向けられる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】野生型(生来の)成熟MU1140ランチビオティックポリペプチド(配列番号1156)の一次アミノ酸配列、二次構造、および大環状環(図1Aおよび図1B)、ならびに成熟MU1140ランチビオティックポリペプチド(配列番号1157)の複数部位バリアントF1V R13Nの一次アミノ酸配列、二次構造、および大環状環(図1Cおよび図1D)を示す図である。アミノ酸の略称は以下を含む。Ala-S-Alaはランチオニンであり；Abu-S-Alaは3-メチルランチオニンであり；Dhaは-,ジデヒドロアラニンであり；Dhbは-,ジデヒドロブチリン(Smith et al., Biochemistry, 42(35):10372-84(2003))である。

【0030】

【図2】PLAN042のプラスミドベクター地図を示す図である。

【0031】

【図3】PLAN126のプラスミド地図を示す図である。

【0032】

【図4】MU1140の単アミノ酸バリアントの一覧であり、配列番号1(MU1140)と、バリアントをコードし得る配列番号2~431(MU1140のバリアント)とのポリヌクレオチドを含む。

【0033】

【図5】配列番号432(MU1140)およびMU1140の単アミノ酸バリアントの一覧である。

【0034】

【図6】*S. ミュータンス*内に染色体組込みされたMU1140の単アミノ酸バリアントの一覧である。

【0035】

【図7】MU1140の単数または複数のアミノ酸バリアントの特徴を示す配列番号432(MU1140)の一覧である。

【0036】

【図8】様々な変異体の透明域化の結果の概要を示す図である。透明域化能は、6群に分けられる。第1群：活性 > SM253対照株(透明域 > 0.319cm2)；第2群：

10

20

30

40

50

回の反復実験で活性 > S M 2 5 3 (1 回の反復実験 ; 第 3 群 : 1 回の反復で活性 > S M 2 5 3 であり、 1 回の反復実験で活性 S M 2 5 3 ; 第 4 群 : 活性 > S M 2 5 3 対照株 (透明域 > 0 . 1 6 7 c m 2 であるが透明域 < 0 . 3 1 9 c m 2) ; 第 5 群活性 S M 2 5 3 対照 (透明域 0 . 1 6 7 c m 2) ; および第 6 群 : 決定せず。)

【 0 0 3 7 】

【 図 9 】二次構造、例えば環を持たない、翻訳後修飾されたランチビオティックの野生型 (配列番号 1 1 5 9) およびランチビオティックバリアントの F 1 V R 1 3 N (配列番号 1 1 5 8) の配列の例を標示する図である。

【 0 0 3 8 】

【 図 1 0 】図 1 0 A は M U 1 1 4 0 の全長 6 3 アミノ酸の前駆タンパク質の配列 (配列番号 1 1 6 0 であり、生物活性を持つ成熟したランチビオティックの一部となり得る「コアペプチド」残基と、翻訳後修飾中に切断される「切断ペプチド」残基とを示す図である。図 1 0 B は F 1 V R 1 3 N の全長 6 3 アミノ酸前駆タンパク質の配列 (配列番号 1 1 6 1) であり、また「コアペプチド」残基および「切断ペプチド」残基を示す図である。

【 0 0 3 9 】

【 図 1 1 】図 1 1 A は M U 1 1 4 0 の全長 6 3 アミノ酸の前駆タンパク質のヌクレオチド配列 (配列番号 1 1 6 2) を示す図である。図 1 1 B : バリアント F 1 V R 1 3 N の全長 6 3 アミノ酸前駆タンパク質のヌクレオチド配列 (配列番号 1 1 6 3) を示す図である。図 1 1 C は切断されたタンパク質、すなわち、全長 6 3 アミノ酸の前駆タンパク質からコアペプチドを差し引いたアミノ酸配列を示す図である。図 1 1 D は切断されたタンパク質のヌクレオチド配列を示す図である。

【 0 0 4 0 】

ランチビオティック M U 1 1 4 0 のバリエント

野生型 M U 1 1 4 0 は、図 1 A および図 1 B に示されている。用語「 M U 1 1 4 0 」とは、(1) 翻訳された全長 6 3 アミノ酸の M U 1 1 4 0 の前駆タンパク質 (配列番号 1 1 6 0) 、(2) 翻訳および切断された 2 2 アミノ酸の M U 1 1 4 0 のポリペプチド (配列番号 4 3 2) 、ならびに(3) 翻訳後修飾された生物活性の M U 1 1 4 0 の、二次構造環の標示のあるもの (配列番号 1 1 5 6) 、または二次構造環の標示のないもの (配列番号 1 1 5 9) を指す。配列番号 1 1 6 0 は、ランチビオティックの前駆タンパク質形態であり、この形態は、タンパク質分解による切断と、宿主細胞中に存在する他の要因によるプロセッシングの後に、結果として M U 1 1 4 0 (配列番号 1 1 5 6 または配列番号 1 1 5 9) の合成を生じる。配列番号 4 3 2 は、翻訳後修飾、例えば、位置的な変異および環の形成が指定されていない、切断された 2 2 アミノ酸のタンパク質 (「コアペプチド」) である。明確にするために、「 M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列を含むランチビオティック」相とは、(1) 全長 6 3 アミノ酸の M U 1 1 4 0 の前駆タンパク質、(2) 翻訳後修飾および切断された 2 2 アミノ酸の M U 1 1 4 0 のポリペプチド、ならびに(3) 翻訳後修飾された生物活性の M U 1 1 4 0 を含めた、様々な形態のポリペプチドを指す。 M U 1 1 4 0 としては、「ランチビオティック」活性を持つこともあれば持たないこともある、上に記載されたようなポリペプチドの形態を挙げることができる。そのため、ランチビオティック活性を失っていることがある全長 6 3 アミノ酸の M U 1 1 4 0 の前駆タンパク質は、やはり「 M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列を含むランチビオティック」であるものと考えられ、それはなぜなら、そのような前駆タンパク質は、翻訳後修飾されてランチビオティック活性を獲得できるためである。

【 0 0 4 1 】

用語「翻訳後の切断されたポリペプチド」とは、翻訳後修飾の間に切断除去された、ランチビオティックの一部ではないポリペプチド (配列番号 1 1 6 4) を指す。配列番号 1 1 5 6 は、切断および翻訳後修飾された生物活性の M U 1 1 4 0 を指す。翻訳後修飾された生物活性の M U 1 1 4 0 は、A、B、C、およびDと標識された四つの環を有する。これらの環のうち二つは、環 A 中の一つ (A 1 a₃ - S - A 1 a₇) と環 C 中の一つ (A 1 a₁₆ - S - A 1 a₂₁) とを含むランチオニン (A 1 a - S - A 1 a) 残基によって形成され

10

20

30

40

50

; アルファ - アミノ酪酸残基を 8 位に、 A l a を 11 位に含む環 B (A b u₈ - S - A l a₁₁) を形成するメチル - ランチオニン残基 (A b u - S - A l a) があり ; 第 4 の環である D は、チオエーテル連結によってアミノビニル基に連結された 19 位の A l a (A l a₁₉ - S - C H = C H - N H -) から構成される。用語「環」または「複数の環」は、「架橋（複数可）」または「連結（複数可）」と共に互換的に使用されることがある。用語「生物活性の」または「生物学的に機能的な」とは、グラム陽性またはグラム陰性の細菌を死滅させるかまたはその成長を阻害することができる、すなわち抗微生物活性を有する、ポリペプチドを指す。

【 0 0 4 2 】

本明細書に記載される M U 1 1 4 0 のバリアントは、全長 63 アミノ酸の前駆タンパク質（配列番号 1160）、翻訳後の切断された 22 アミノ酸のポリペプチド（配列番号 432）、および / または翻訳後修飾された生物活性の M U 1 1 4 0 （配列番号 1156）に適用される。M U 1 1 4 0 のバリアントは、(1) 変更されている本来のアミノ酸の同一性（1 文字指定）、(2) 変更されているアミノ酸の場所、および (3) バリアント中のアミノ酸の同一性を特定することによって、本明細書に指定されている。明確にするために、本明細書に使用される位置的な命名法は、22 アミノ酸タンパク質の相対的な位置を指す。そのため、全長 63 アミノ酸の前駆タンパク質を指す場合であっても、「1 位」とは、22 アミノ酸の翻訳後の切断されたタンパク質中に見出されるであろう最初のアミノ酸を指す。図 10 A は、例えば、1 から 22 まで指定された M U 1 1 4 0 中のアミノ酸の位置的な命名を図示する。例えば、「R 1 3 T」と指定されたバリアントは、22 アミノ酸のポリペプチドの 13 番目のアミノ酸（本来はアルギニン「R」）がスレオニン「T」に置換されている）、M U 1 1 4 0 ポリペプチドを指す。同じく、野生型 M U 1 1 4 0 の複数のアミノ酸が置換されている場合、置換されているアミノ酸のそれぞれは、同様の方法で指定される。例えば、「F 1 T R 1 3 T」と指定されたバリアントは、22 アミノ酸のポリペプチドの 1 番目のアミノ酸がフェニルアラニン「F」からスレオニン「T」に変更され、22 アミノ酸ポリペプチドの 13 番目のアミノ酸が、アルギニン「R」からスレオニン「T」に変更されている、M U 1 1 4 0 ポリペプチドを指す。同様の名付けの決まりが、野生型 M U 1 1 4 0 とは異なる、3 個、4 個、5 個、またはそれを超えるアミノ酸を有するバリアントに適用される。

【 0 0 4 3 】

実施形態では、本開示は、ランチビオティック M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1156）の以下の変異：

- a . 13 位のアルギニンのアスパラギンへの変更 (R 1 3 N) ;
- b . 17 位のフェニルアラニンのロイシン (F 1 7 L) またはチロシン (F 1 7 Y) への変更；
- c . 18 位のアスパラギンのアラニンへの変更 (N 1 8 A) ;
- d . 20 位のチロシンのフェニルアラニンへの変更 (Y 2 0 F) ; および
- e . それらの組合せ、を含む、ランチビオティックを提供する。

【 0 0 4 4 】

実施形態によつては、本非天然由来のランチビオティックは、M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1156）を含み、二つの変異をさらに含み、ここで、一つの変異は：

- a . 13 位のアルギニンのアスパラギンへの変更 (R 1 3 N) ;
- b . 17 位のフェニルアラニンのロイシン (F 1 7 L) またはチロシン (F 1 7 Y) への変更；
- c . 18 位のアスパラギンのアラニンへの変更 (N 1 8 A) ;
- d . 20 位のチロシンのフェニルアラニンへの変更 (Y 2 0 F) ; または
- e . それらの組合せ、である。

【 0 0 4 5 】

実施形態によつては、非天然由来のランチビオティックは、M U 1 1 4 0 のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列（例えば配列番号 1 1 5 6）を含み、二つの変異をさらに含み、ここで、一つの変異は、1 3 位のアルギニンのアスパラギンへの変更（R 1 3 N）である。

【0 0 4 6】

実施形態によつては、本開示は、M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1 1 5 6）を含む非天然由来のランチビオティックを提供し、二つの変異をさらに含み、ここで、一つの変異は：

- a . 1 位のフェニルアラニンのバリンへの変更（F 1 V）；
- b . 1 位のフェニルアラニンのアラニンへの変更（F 1 A）；
- c . 1 位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更（F 1 I）；
- d . 1 位のフェニルアラニンのロイシンへの変更（F 1 L）；
- e . 1 位のフェニルアラニンのスレオニンへの変更（F 1 T）；または
- f . 1 位のフェニルアラニンのチロシンへの変更（F 1 Y）である。

10

【0 0 4 7】

実施形態によつては、本開示は、M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1 1 5 6）を含む非天然由来のランチビオティックを提供し、二つの変異をさらに含み、ここで、一つの変異は、1 位のフェニルアラニンのバリンへの変更（F 1 V）である。

【0 0 4 8】

実施形態によつては、本開示は、M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1 1 5 6）を含む非天然由来のランチビオティックを提供し、二つの変異をさらに含み、ここで、一つの変異は1 位にあり、一つの変異は1 3 位にある。実施形態によつては、本開示は、M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1 1 5 6）を含む非天然由来のランチビオティックを提供し、二つの変異をさらに含み、ここで、1 位のフェニルアラニンは、バリンに変更され、1 3 位のアルギニンは、アスパラギンに変更されている（F 1 V R 1 3 N）。例えば、配列番号 5 5 0 を参照されたい。

20

【0 0 4 9】

実施形態では、本開示は、二つ以上の上記の変異を有するM U 1 1 4 0（例えば配列番号 1 1 5 6）のバリエントを提供する。

【0 0 5 0】

実施形態では、本開示は、ランチビオティック M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1 1 5 6）の以下の二つの変異：

30

- a . 1 位のフェニルアラニンのアラニンへの変更と、1 3 位のアルギニンの：

i . アラニン（F 1 A R 1 3 A）、

i i . バリン（F 1 A R 1 3 V）、

i i i . アスパラギン（F 1 A R 1 3 N）、または

i v . セリン（F 1 A R 1 3 S）への変更との組合せ、

- b . 1 位のフェニルアラニンのグリシンへの変更と、1 3 位のアルギニンの：

i . グリシン（F 1 G R 1 3 G）への変更との組合せ；

- c . 1 位のフェニルアラニンのヒスチジンへの変更と、1 3 位のアルギニンの：

i . アスパラギン（F 1 H R 1 3 N）への変更との組合せ；

- d . 1 位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、1 3 位のアルギニンの：

40

i . アラニン（F 1 I R 1 3 A）；

i i . グリシン（F 1 I R 1 3 G）；

i i i . イソロイシン（F 1 I R 1 3 I）；

i v . アスパラギン（F 1 I R 1 3 N）；

v . プロリン（F 1 I R 1 3 P）；

v i . グルタミン（F 1 I R 1 3 Q）；

v i i . グルタミン酸（F 1 I R 1 3 S）；

v i i i . セリン（F 1 I R 1 3 V）；または

i x . バリン（F 1 I R 1 3 E）への変更との組合せ；

- e . 1 位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、1 3 位のアルギニンの：

50

i . アラニン (F 1 L R 1 3 A) ;
 i i . アスパラギン酸 (F 1 L R 1 3 D) ;
 i i i . グリシン (F 1 L R 1 3 G) ;
 i v . アスパラギン (F 1 L R 1 3 N) ;
 v . プロリン (F 1 L R 1 3 P) ; または
 v i . グルタミン (F 1 L R 1 3 Q) への変更との組合せ ;
 f . 1 位のフェニルアラニンのスレオニンへの変更と、1 3 位のアルギニンの :
 i . アラニン (F 1 T R 1 3 A) ;
 i i . アスパラギン (F 1 T R 1 3 N) ; または
 i i i . バリン (F 1 T R 1 3 V) への変更との組合せ ; 10
 g . 1 位のフェニルアラニンのバリンへの変更と、1 3 位のアルギニンの :
 i . アラニン (F 1 V R 1 3 A) ;
 i i . アスパラギン (F 1 V R 1 3 N) ;
 i i i . グルタミン (F 1 V R 1 3 Q) ;
 i v . アスパラギン酸 (F 1 V R 1 3 D) ;
 v . バリン (F 1 V R 1 3 V) ; または
 v i . プロリン (F 1 V R 1 3 P) への変更との組合せ ;
 h . 1 位のフェニルアラニンのチロシンへの変更と、1 3 位のアルギニンの :
 i . アスパラギン酸 (F 1 Y R 1 3 D) ; または
 i i . グリシン (F 1 Y R 1 3 G) への変更との組合せ、を含む、非天然由来のラン
 チビオティックを提供する 20

【 0 0 5 1 】

実施形態によっては、本開示は、ランチビオティック M U 1 1 4 0 のアミノ酸配列（例えば配列番号 1 1 5 6 ）を含む非天然由来のランチビオティックを提供し、ここで、1 位のフェニルアラニンはバリンに変更され、1 3 位のアルギニンは :

i . アラニン (F 1 V R 1 3 A) ;
 i i . アスパラギン (F 1 V R 1 3 N) ;
 i i i . グルタミン (F 1 V R 1 3 Q) ;
 i v . アスパラギン酸 (F 1 V R 1 3 D) ;
 v . バリン (F 1 V R 1 3 V) ; または
 v i . プロリン (F 1 V R 1 3 P) に変更されている。 30

【 0 0 5 2 】

実施形態では、本開示は、M U 1 1 4 0 （例えば配列番号 1 1 5 6 ）の以下の三つの変異の組合せ :

a . 1 位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、1 3 位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、1 5 位のグリシンのアラニンへの変更との組合せ (F 1 I R 1 3 A G 1 5 A) ;
 b . 1 位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、1 3 位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、1 5 位のグリシンのアラニンへの変更との組合せ (F 1 I R 1 3 D G 1 5 A) ;
 c . 1 位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4 位のトリプトファンのイソロイシンへの変更との組合せ、1 3 位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ (F 1 I W 4 I R 1 3 A) ;
 d . 1 位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4 位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、1 3 位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ (F 1 I W 4 M R 1 3 D) ;
 e . 1 位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、4 位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、1 3 位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ (F 1 I W 4 M R 1 3 N) ;
 f . 1 位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2 位のリジンのアラニンへの 50

変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F1I K2A R13A)；

g. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、6位のロイシンのバリンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F1I L6V R13A)；

h. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1I R13A Y20F)；

i. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1I R13D Y20F)；

j. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1I R13N Y20F)；

k. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1L R13N Y20F)；

l. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1L R13A Y20F)；または

m. 1位のフェニルアラニンのロイシンへの変更と、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1L R13D Y20F)を有する、非天然由来のランチビオティックを提供する。

【0053】

実施形態では、本開示は、以下の変異の組合せ：

a. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのリジンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ(F1I K2A W4K R13A)；および

b. 1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのリジンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアスパラギン酸への変更との組合せ(F1I K2A W4K R13D)を有する、MU1140(例えば配列番号1156)のバリエントを提供する。

【0054】

実施形態では、本開示は、以下の変異の組合せを有するMU1140(例えば配列番号1156)のバリエントを提供し、そのようなものとしては、1位のフェニルアラニンのイソロイシンへの変更と、2位のリジンのアラニンへの変更との組合せ、4位のトリプトファンのメチオニンへの変更との組合せ、13位のアルギニンのアラニンへの変更との組合せ、20位のチロシンのフェニルアラニンへの変更との組合せ(F1I K2A W4K R13A Y20F)が挙げられる。

【0055】

実施形態では、本開示は、MU1140の単アミノ酸変異を含む、非天然由来のランチビオティックを提供し、ここで、ランチビオティックは、配列番号2から431のいずれか一つを含むポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を有する。本開示はまた、配列番号2から431または708から763のいずれか一つによってコードされるアミノ酸配列を含む全長63アミノ酸の前駆タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を提供する。例えば、配列番号764の前駆タンパク質ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1165および配列番号2を含み得る。実施形態では、本開示は、MU1140の一つまたは複数のアミノ酸変異を含む、非天然由来のランチビオティックを提供し、ここでは、ランチビオティックは、配列番号433～707のいずれか一つを含むアミノ酸配列を有する。実施形態では、本開示は、図8：第1群、第2群、

10

20

30

40

50

または第3群にあるいずれかのバリアントを含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。実施形態では、本開示は、図8：第1群にあるいずれかのバリアントを含む、非天然由来のランチビオティックを提供する。本開示はまた、図8の第1群、第2群、または第3群にあるいずれかのバリアントを含む、非天然由来の全長63アミノ酸の前駆タンパク質を提供する。本開示はまた、図8の第1群にあるいずれかのバリアントを含む、非天然由来の全長63アミノ酸の前駆タンパク質を提供する。

【0056】

図5のランチビオティックバリアントは、単アミノ酸バリアントを含む。実施形態によつては、本開示は、図5に見出されるようなMU1140の単アミノ酸変異を含む、非天然由来のランチビオティックに向けられる。本開示はまた、図5に記載されるような、非天然由来の全長63アミノ酸前駆タンパク質形態のランチビオティックバリアントを提供する。例えば、配列番号766の前駆タンパク質形態は、配列番号1164および配列番号766を含むことがあり、配列番号767の前駆タンパク質形態は、配列番号1164および配列番号767などを含み得る。

10

【0057】

実施形態によつては、本開示は、図7に見出されるようなランチビオティックバリアントを提供する。図7のランチビオティックバリアントは、「コアペプチド」を含む。本開示はまた、図7に記載されるような、非天然由来の全長63アミノ酸の前駆タンパク質形態の「コアペプチド」バリアントを提供する。例えば、配列番号703の前駆タンパク質形態は、配列番号1164および配列番号703を含み得る。

20

【0058】

本開示のランチビオティックは、ランチビオティックバリアントを含み、このバリアントは、非天然由来のランチビオティックバリアントとすることができる。用語「ランチビオティックバリアント」、「MU1140バリアント」、「非天然由来のランチビオティック」、または「バリアント」は、互換的であり、一つまたは複数の（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、またはそれを超えるアミノ酸の置換（修飾アミノ酸置換を含む）、欠失、または挿入を有するMU1140（すなわち野生型ランチビオティック）ポリペプチド（配列番号432）を指す。用語「修飾アミノ酸置換」は、修飾アミノ酸へのアミノ酸の置換を含む。実施形態によつては、用語「ランチビオティックバリアント」、「MU1140バリアント」、「非天然由来のランチビオティック」、または「バリアント」とは、一つまたは複数の（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、またはそれを超えるアミノ酸の置換（修飾アミノ酸置換を含む）、欠失、または挿入を有する、翻訳された全長63アミノ酸のMU1140の前駆タンパク質（配列番号1160）を指す。実施形態によつては、用語「ランチビオティックバリアント」、「MU1140バリアント」、「非天然由来のランチビオティック」、または「バリアント」とは、一つまたは複数の（（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、またはそれを超えるアミノ酸の置換（修飾アミノ酸置換を含む）、欠失、または挿入を有する、翻訳後修飾されている成熟した生物活性のMU1140（すなわち野生型ランチビオティック）ポリペプチド（配列番号1156）を指す。修飾アミノ酸としては、例えば、2,3-ジデヒドロアラニン（Dha）、2,3-ジデヒドロブチリン（Dhb）、S-アミノビニ-D-システイン（Avicys）、アミノ酪酸（Abu）、2-オキソプロピニル、2-オキソブチリル、およびヒドロキシプロピオニルが挙げられる。本明細書に使用される際に、「単一部位バリアント（複数可）」とは、1アミノ酸の置換（修飾アミノ酸置換を含む）、欠失、または挿入を有するMU1140（すなわち野生型ランチビオティック）ポリペプチド（例えば、配列番号432または1156）を指し、「複数部位バリアント（複数可）」とは、2個以上の（例えば、2個、3個、4個、5個、またはそれを越えるアミノ酸の置換（修飾アミノ酸置換を含む）、欠失、または挿入を有するMU1140（すなわち野生型ランチビオティック）ポリペプチド（例えば、配列番号432または1156）を指す。実施形態によつては、「野生型」ランチビオティックMU1140（すなわち野生型ランチビオティック）ポリペプチド（配列番号432）または本明細書に記載されるいずれかのバリアントを、

30

40

50

翻訳後修飾することができる（例えば、配列番号 1156）。翻訳後修飾は、参照によりその全体を本明細書に組み込まれている米国特許第 6,964,760 号に記載されている。様々な翻訳後修飾としては、例えば、無水残基およびランチオニン環の存在を挙げることができる。実施形態によつては、修飾残基の 2,3-ジデヒドロアラニン (Dha) および 2,3-ジデヒドロブチリン (Dhb) は、それぞれセリンおよびスレオニンの脱水から形成することができる。実施形態によつては、翻訳後修飾としては、スレオニンから形成される修飾残基 S-2-アミノ酪酸 (Abu) を挙げることができる。実施形態によつては、翻訳後修飾としては、ランチオニンまたはメチルランチオニン環をそれぞれ形成するようなシスティンと Dha または Dh b のどちらかとの間の環化を挙げることができる。実施形態によつては、3 位、5 位、16 位、および / または 19 位のセリンは、Dha 残基に修飾され、8 位は、Abu に修飾され、14 位は、Dhb に修飾されている。実施形態によつては、翻訳後修飾は、本明細書に記載されるいづれかの宿主細胞中で起こり、例えば、実施形態によつては、本明細書に示されるようなランチビオティックバリヤントは、ストレプトコッカス・ミュータンスによって修飾され得る。

10

【0059】

実施形態によつては、翻訳後修飾は、5 位に Dha を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾は、8 位に Abu を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾は、14 位に Dh b を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾は、5 位に Dha を、8 位に Abu を、14 位に Dh b を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾は、図 1 に記載されるように (A1a₃-S-A1a₇) 間のランチオニン (A1a-S-A1a) 残基によって形成される環 (環 A) を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾は、図 1 に記載されるように、8 位のアルファ-アミノ酪酸残基と 11 位の A1a とを含む環である環 B (Abu₈-S-A1a₁) を形成するメチル-ランチオニン残基 (Abu-S-A1a) を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾は、図 1 に記載されるように (A1a₁₆-S-A1a₂₁) 間のランチオニン (A1a-S-A1a) 残基によって形成される環 (環 C) を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾は、図 1 に記載されるようにチオエーテル連結によってアミノビニル基に連結された 19 位の A1a (A1a₁₉-S-CH=CH-NH-) である環 D を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾は、環 A、B、C、および D を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾された MU1140 バリヤントは、環 A、環 B、環 C、および環 D を含み、ここでは、(a) これらの環のうち二つが、環 A 中の一つ (A1a₃-S-A1a₇) と環 C 中の一つ (A1a₁₆-S-A1a₂₁) とを含むランチオニン (A1a-S-A1a) 残基によって形成され；(b) メチル-ランチオニン残基 (Abu-S-A1a) が、8 位のアルファ-アミノ酪酸残基と 11 位の A1a とを含む環 B (Abu₈-S-A1a₁) を形成し；(c) 第 4 の環である D が、チオエーテル連結によってアミノビニル基に連結された 19 位の A1a (A1a₁₉-S-CH=CH-NH-) から構成され、ならびに、5 位のアミノ酸が、Dha に修飾され、8 位のアミノ酸が、Abu に修飾され、14 位のアミノ酸が、Dhb に修飾されている。実施形態によつては、単離されたランチビオティックバリヤントが、図 5 または図 7 のランチビオティックバリヤントをコードするポリヌクレオチドからポリペプチドを発現することによって宿主細胞中に生産され、発現されたポリペプチドは、宿主細胞中で翻訳後修飾される。実施形態によつては、宿主細胞は S. ミュータンスである。実施形態によつては、翻訳後修飾されランチビオティックバリヤントは、配列番号 1157 のアミノ酸配列を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾されランチビオティックバリヤントは、配列番号 1158 (二次構造、例えば環を指定しない) のアミノ酸配列を含む。実施形態によつては、翻訳後修飾されたランチビオティックバリヤントは、配列番号 1161 のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0060】

例えば、実施形態によつては、ランチビオティックバリヤントとしては、図 1 の配列番号 1157 のポリペプチドを挙げることができる。実施形態によつては、ランチビオティックバリヤントとしては、図 9 の配列番号 1158 のポリペプチドを挙げることができる。実施形態によつては、ランチビオティックバリヤントとしては、配列番号 1161 のポ

40

50

リペプチドを挙げることができる。

【0061】

実施形態によっては、本開示は、単離されたランチビオティックバリアントに備えるものであり、ここでは、単離されたランチビオティックバリアントは、図5または図7のランチビオティックバリアントをコードするポリヌクレオチドからポリペプチドを発現することによって宿主細胞中に生産され、発現されたポリペプチドは、宿主細胞中で翻訳後修飾される。このように、明確にするために、本開示は、本明細書に記載されるランチビオティックバリアント、ならびに翻訳後修飾を有するランチビオティックバリアントに備えるものである。実施形態によっては、宿主細胞は、S. ミュータンスである。実施形態によっては、本開示は、配列番号1157のアミノ酸配列を含む、翻訳後修飾された非天然由来のランチビオティックを提供する。

10

【0062】

実施形態では、本開示のランチビオティックバリアントの生物活性の等価体はまた、一つもしくは複数の保存されたアミノ酸のバリエーションまたは他の軽微な修飾を有し、上記に開示されたアミノ酸変更に加えて、生物活性を保持している。生物活性の等価体は、対応のランチビオティックと比べて、実質的に等しい機能を有する。実施形態では、本開示のランチビオティックバリアントは、約1個、2個、3個、4個、または5個の保存されたアミノ酸置換を有する。保存された置換とは、あるアミノ酸が同様の特性を持つ別のアミノ酸に置換され、その結果、そのポリペプチドの二次構造および全般的な性質が実質的に不变であるものとペプチド化学分野の当業者が予想することになるものである。保存された置換の例は、例えば、Yampolsky, et al., Genetics 170(4):1459-1472(2005)に見出すことができる。実施形態によっては、保存された置換は、それらのクラス、例えば、

20

クラス	アミノ酸の名称
脂肪族	グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン
ヒドロキシルまたは硫黄/セレン含有セリン、システイン、セレノシステイン、スレオニン、メチオニン	

20

環状

プロリン

芳香族

フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン

塩基性

ヒスチジン、リジン、アルギニン

30

酸性およびそれらのアミド
によって特徴付けることができる。

【0063】

実施形態によっては、保存された置換は、以下の群内で作製することができる。

第1群：正電荷性（R - Arg、H - His、およびK - Lys）

第2群：負電荷性（D - Asp およびE - Glu）

第3群：極性非電荷性（S - Ser、T - Thr、N - Asn、Q - Gln）

第4群：疎水性（A - Ala、V - Val、I - Ile、L - Leu、M - Met、F - Phe、Y - Tyr、W - Trp）

第5群：「その他」（C - Cys、G - Gly、P - Pro）

40

例えば、HとRの両方が第1群にあることから、保存された置換を、HのRへの置換とすることができる。例として、実施形態によっては、本開示は、1位のフェニルアラニンが脂肪族クラスの残基、例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンに置換された、ランチビオティックのバリアントを提供する。本開示はまた、13位のアルギニンが酸性およびそれらのアミドのクラスの残基、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンに置換された、ランチビオティックのバリアントを提供する。

【0064】

実施形態では、本開示のランチビオティックは、翻訳後修飾、すなわち、ポリペプチドが翻訳された後の化学的または生化学的な修飾を含む、ポリペプチドである。

50

【0065】

精製ランチビオティックとは、細胞物質、他のタイプのポリペプチド、化学前駆体、ポリペプチドの合成に使用された化学物質、またはそれらの組合せを実質的に含まない、ランチビオティック調製物である。細胞物質、培養培地、化学前駆体、ポリペプチドの合成に使用された化学物質などを実質的に含まない精製ランチビオティック調製物は、約30%、20%、10%、5%、1%未満の他のポリペプチド、培養培地、化学前駆体、および/または合成に使用された他の化学物質を有する。そのため、精製ランチビオティックは、約70%、80%、90%、95%、99%、またはそれを超えて純粋である。精製ランチビオティックは、70%未満の純度の未精製または準精製の細胞抽出物またはポリペプチドの混合物を含まない。

10

【0066】

本開示のランチビオティックは、本ランチビオティックが天然では通常関連のないアミノ酸配列、すなわち異種のアミノ酸配列に、共有結合的にまたは非共有結合的に連結させることができる。例えば、異種のアミノ酸配列は、ランチビオティックを天然に生産しない生物、合成配列、または天然由来のランチビオティックのカルボキシ末端またはアミノ末端に普段は位置しない配列に由来する。さらに、本開示のランチビオティックは、標示試薬などのアミノ酸以外の化合物または分子に、共有結合的にまたは非共有結合的に連結させることができる。本開示のランチビオティックは、アミノ酸スペーサー、アミノ酸リンカー、シグナル配列、輸送停止配列、トランスファー-メッセンジャーRNA(TMR)移送停止配列、膜貫通ドメイン、タンパク質精製リガンド、またはそれらの組合せと共有結合的にまたは非共有結合的に連結させることができる。ポリペプチドはまた、精製を容易にする部分(すなわち、ポリペプチドまたは他の化合物とし得る官能基)[例えば、6ヒスチジンタグ(配列番号1166)、trpE、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、スタフィロコッカスのプロテインAなどのアフィニティータグ]、またはポリペプチドの安定性を促進する部分(例えば、ポリエチレングリコール;アセチル、プロピル、スクシニル、ベンジル、ベンジルオキシカルボニルやt-ブチルオキシカルボニルなどのアミノ末端保護基;アミド、メチルアミドやエチルアミドなどのカルボキシル末端保護基)に、連結させることができる。本開示の一実施形態では、タンパク質精製リガンドを、例えば、本開示のポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端の一つまたは複数のアミノ酸残基とすることができる。アミノ酸スペーサーは、天然では本開示のポリペプチドに関連のないアミノ酸の配列である。アミノ酸スペーサーは、約1、5、10、20、100、または1,000アミノ酸を含み得る。

20

30

【0067】

実施形態では、本開示のランチビオティックは、異種のアミノ酸配列を含有し得る融合タンパク質の一部である。異種のアミノ酸配列は、本開示のランチビオティックのC末端またはN末端に存在して、融合タンパク質を形成することができる。実施形態では、本開示の二つ以上のランチビオティックは、融合タンパク質中に存在する。本開示のランチビオティックの断片は、本開示の融合タンパク質中に存在し得る。本開示の融合タンパク質は、本開示の一つまたは複数のランチビオティック、それらの断片、またはそれらの組合せを含み得る。

40

【0068】

医薬的に許容可能な塩、エステル、アミド、およびプロドラッグは、本ランチビオティックのカルボン酸塩、アミノ酸付加塩、エステル、アミド、およびプロドラッグであり、本願開示の一部である。これらの化合物は、対象を伴う使用に適しており、過度の毒性、刺激、またはアレルギー反応を引き起こさず、理に適ったベネフィット/リスク比に見合うものであり、それらの目的とする使用に有効である。塩は、本開示のランチビオティックの実質的に非毒性の無機酸または有機酸の付加塩である。塩としては、例えば、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、硫化水素塩、硝酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、ギ酸塩、シュウ酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、ホウ酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシレート、クエン酸塩、マレイイン酸塩、

50

フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシリ酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、ラウリルスルホン酸塩などが挙げられる。これらは、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ金属およびアルカリ土類金属に基づくカチオン；ならびに以下に限定されないがアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどを含む非毒性のアンモニウム、4級のアンモニウムおよびアミンのカチオンを含むことがある。

【0069】

本開示のランチビオティックの医薬的に許容可能な非毒性のエステルとしては、例えば、アルキル基が直鎖または分枝鎖であるC1-C6アルキルエステルが挙げられる。他のエステルとしては、C5-C7環状アルキルエステル、ならびに以下に限定されないがベンジルC1-C4アルキルエステルなどのアリールアルキルエステルが挙げられる。10

【0070】

本開示のランチビオティックの医薬的に許容可能な非毒性アミドとしては、アンモニア、1級C1-C6アルキルアミン、および2級C1-C6ジアルキルアミンに由来するアミドが挙げられ、ここでは、アルキル基が直鎖または分枝鎖である。2級アミンの場合、アミンは、1個の窒素原子を含有する5員または6員の複素環の形態であることがある。また挙げられるのは、アンモニア、C1-C3アルキル1級アミン、およびC1-C2ジアルキル2級アミンに由来するアミドである。

【0071】

ランチビオティックを生産するための系

実施形態によっては、本開示のランチビオティックポリペプチドは、D P O L Tの方法論を使用して合成することができる。例えば、それぞれが参照によりその全体を本明細書に組み込まれている米国特許第7,521,529号；米国特許公開公報第2009/0215985号を参照されたい。本開示のランチビオティックは、組換えで生産することができる。実施形態では、本開示のランチビオティックをコードするポリヌクレオチドは、組換え発現ベクター内に導入され、このベクターは、当技術分野に周知の手法を用いて、適した発現宿主細胞系で発現される。種々の細菌、酵母、植物、哺乳動物、および昆虫の発現系が、当技術分野で利用可能であり、任意のそのような発現系を使用することができる。本開示のランチビオティックはまた、S.ミュータンスの細胞培養物から精製することもできる。30

【0072】

上記に言及したように、本開示は、当技術分野に周知の手法を用いて、適した発現宿主細胞系で発現することによって組換えで生産される、ランチビオティックを提供する。実施形態では、生来のランチビオティック生産細菌が、本開示のランチビオティックを生産するために使用される。そのような細菌としては、以下に限定されないが、ストレプトコッカス・ミュータンス、ラクトコッカス・ラクティス(*Lactococcus lactis*)、バチルス・サブチルス(*Bacillus subtilis*)、ストレプトコッカス・ビオゲネス、スタフィロコッカス・エピデルミディス、スタフィロコッカス・ガリナリウム(*Staphylococcus gallinarium*)、ミクロコッカス・バリアンス(*Micrococcus varians*)、ストレプトコッカス・サリバリウス、ラクトバチルス・サケイ(*Lactobacillus sakei*)、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)OH-4156、ラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)、ブチリビブリオ・フィブリオソルベンス(*Butyrivibrio fibriosolvens*)、ストレプトマイセス・シナモネウス(*Streptomyces cinnamoneus*)、ストレプトバーティシリウム・ハチジョエンス(*Streptoverticillium hachijoense*)、ストレプトバーティシリウム、ストレプトマイセス・グリセオルテウス(*Streptomyces griseoluteus*)、バチルス種のHIL-Y-85株、アクチノプラネス・リングリエ(*Actinoplanes*4050)

linguria e)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、エンテロコッカス・フェカリス、ルミノコッカス・グナブス (*Ruminococcus gnavus*)、カルノバクテリウム・ピスシコラ (*Carnobacterium piscicola*)、ストレプトコッカス・マセドニクス (*Streptococcus macedonicus*)、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*)、スタフィロコッカス・ワーネリー (*Staphylococcus warneri*)、ストレプトマイセス・コエリコロル (*Streptomyces coelicolor*)、およびストレプトマイセス種が挙げられる。実施形態によっては、本明細書に記載されるランチビオティックバリアントは、上記に挙げられたいずれかの細菌によって翻訳後修飾され得る。

10

【0073】

また、本開示のランチビオティックを生産するための系としては、遺伝子的に扱い易い宿主でありかつ異種によるランチビオティックの生産が可能な公知の細菌または酵母、すなわち、生来はランチビオティックを生産しない酵母または細菌が挙げられる。そのような生物としては、以下に限定されないが、大腸菌およびシュードモナス属 (*Pseudomonas*) の細菌、グラム陰性細菌、およびサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属またはピキア (*Pichia*) 属の酵母が挙げられる。実施形態では、*P. フルオレッセンス* (*fluorescens*) が、本開示のランチビオティックを生産するために使用される。

20

【0074】

実施形態では、本開示は、本開示のランチビオティックを生産する組換え細菌株を提供する。例えば、本開示は、機能的なバリアントの MU1140 を発現するポリヌクレオチドを含む、上記に挙げられたようなランチビオティックを生産する組換え細菌株を提供する。MU1140 のランチビオティックバリアントの生物活性は、当技術分野に公知の方法、例えば阻害域アッセイを用いてアッセイすることができる。

【0075】

実施形態によっては、本開示は、(a) 乳酸の発現が野生型 *S. ミュータンス* 株に比べて約 80 % 以上減るような、乳酸合成に関するポリヌクレオチド中の変異；(b) 組換えアルコールデヒドロゲナーゼのポリヌクレオチド；および(c) 本明細書に記載されるような非天然由来のランチビオティック、例えば図 5 および図 7 のランチビオティックをコードする組換えポリヌクレオチドを含む、単離された組換えストレプトコッカス・ミュータンス 株に向けられる。

30

【0076】

ポリヌクレオチド

本開示のポリヌクレオチドは、全微生物ゲノムよりも少ないものを含有し、1本鎖または二重鎖の核酸とすることができます。ポリヌクレオチドは、RNA、DNA、cDNA、ゲノムDNA、化学合成されたRNAもしくはDNA、またはそれらの組合せとすることができます。ポリヌクレオチドは、タンパク質、脂質や他のポリヌクレオチドなどの他の構成成分を含まないように精製することができます。例えば、ポリヌクレオチドを、50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100% 精製することができる。例えば cDNA ライブラリーまたはゲノムライブラリー内の何百から何万もの他の核酸分子の中に存在する核酸分子、またはゲノムDNA の制限酵素消化物を含有するゲル切片は、単離されたポリヌクレオチドとみなされることはない。本開示のポリヌクレオチドは、上に記載されるポリペプチドをコードする。配列番号 1162 は、63 アミノ酸の MU1140 の前駆タンパク質をコードする。配列番号 1 は、野生型 MU1140 のコアタンパク質をコードする。配列番号 1165 は、本明細書に記載されるような切断ペプチドをコードする。実施形態では、本開示は、配列番号 2 ~ 431 に示される精製ポリヌクレオチドを提供する。実施形態では、本開示は、配列番号 708 ~ 763 に示される精製ポリヌクレオチドを提供する。実施形態によっては、本開示は、配列番号 756、757、758、759、760、または 761 のいずれか一つを含む精製ポリヌクレオ

40

50

チドを提供する。実施形態によっては、本開示は、配列番号 709、714、716、735、747、751、754、または758のいずれか一つを含む精製ポリヌクレオチドを提供する。実施形態によっては、本開示は、配列番号 758 (FIV R13N) を含む精製ポリヌクレオチドを提供する。実施形態によっては、本開示は、配列番号 1163 (FIV R13N) を含む精製ポリヌクレオチドを提供する。

【0077】

本明細書の開示は、63アミノ酸のMU1140の前駆タンパク質のバリエントをコードするポリヌクレオチドを提供する。そのため、本開示は、切断ペプチド（配列番号 1165）をコードする、本明細書に記載されるいづれかのヌクレオチドを提供する。

【0078】

本開示のポリヌクレオチドは、約 66、60、50、45、30、15未満の（または約 66 と 15 との間の任意の範囲）の連続したヌクレオチドからなり得る。精製ポリヌクレオチドは、追加の異種ポリヌクレオチドを含むことができる。本開示のポリヌクレオチドは、リンカー、シグナル配列、TMR停止移送配列、膜貫通ドメイン、またはタンパク質精製に有用なリガンド、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジンタグやスタフィロコッカスのプロテインAなどをコードする配列など、他のヌクレオチド配列を含むことができる。本開示の一実施形態は、少なくとも約 6 個、10 個、15 個、20 個、25 個、30 個、40 個、45 個、50 個、60 個、66 個、またはそれを超える配列番号 2 ~ 431 の連続したヌクレオチドを含む、精製ポリヌクレオチドを提供する。本開示の一実施形態は、少なくとも約 6 個、10 個、15 個、20 個、25 個、30 個、40 個、45 個、50 個、60 個、66 個、またはそれを超える配列番号 1163 の連続したヌクレオチドを含む、精製ポリヌクレオチドを提供する。

【0079】

本開示のポリヌクレオチドは単離され得る。単離されたポリヌクレオチドは、天然に関連する 5' および 3' のフランкиングゲノム配列の一方または両方に直に隣接していない、天然由来のポリヌクレオチドである。単離されたポリヌクレオチドは、例えば、任意の長さの組換えDNA分子とすることができます。単離されたポリヌクレオチドはまた、非天然由来の核酸分子を含むことができる。本開示のポリヌクレオチドは、全長ペプチド、ペプチド断片、およびバリエントまたは融合ペプチドをコードすることができます。

【0080】

本開示のポリヌクレオチド配列とその相補体に少なくとも約 80 %、または約：90、95、96、97、98、もしくは 99 % の同一性がある本開示のポリペプチドをコードする縮重ヌクレオチド配列、ならびに相同なヌクレオチド配列もまた、本開示のポリヌクレオチドである。縮重ヌクレオチド配列とは、本開示のポリペプチドおよびその断片をコードするが、遺伝コードの縮重性があるために所与のポリヌクレオチド配列とは核酸配列が異なるポリヌクレオチドである。パーセント配列同一性は、当技術分野で認識されている意味を有し、二つのポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の間の同一性を測定するための多数の方法がある。例えば、Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds. Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heijne, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); and Gribskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, New York, (1991) を参照されたい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを整列化する方法は、コンピュータプログラ

10

20

30

40

50

ムに成文化されており、そのようなプログラムとしては、G C G プログラムパッケージ [Devereux et al. (1984) Nuc. Acids Res. 12 : 387] 、BLASTP、BLASTN、FASTA [Atschul et al. (1990) J. Molec. Biol. 215 : 403] 、ならびに Smith および Waterman の局所相同意アルゴリズム [(1981) Adv. Appl. Math., 2 : 482 - 489] を使用する Best fit プログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix 用バージョン 8, Genetics Computer Group) 、ユニバーシティリサーチパーク、サイエンスドライブ 575 、マディソン、ウィスコンシン州 53711) が挙げられる。例えば、FASTA アルゴリズムを採用するコンピュータプログラム ALIGN を使用することができ、このプログラムでは、ギャップ開始ペナルティ - 12 とギャップ伸張ペナルティ - 2 によるアフィンギャップサーチを用いる。

10

【0081】

いずれかの配列整列化プログラムを使用して、ある特定の配列が例えば参照配列と約 95 % の同一性を持つか否かを決定する際には、同一性のパーセンテージが参照ポリヌクレオチドの全長にわたって計算され、かつ同一性のギャップを参照ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの総数の最大 5 % とすることが可能になるように、パラメーターが設定される。

20

【0082】

本開示のポリヌクレオチドは、例えば細菌試料に存在する核酸配列から単離することができる。ポリヌクレオチドは、実験室でも、例えば自動合成機を使用して合成することができる。PCR などの增幅方法は、ポリペプチドをコードするゲノム DNA または cDNA のどちらかからポリヌクレオチドを増幅するために、使用することができる。

20

【0083】

本開示のポリヌクレオチドは、天然由来のポリペプチドのためのコード配列を含み得るか、または天然では発生しない変更された配列をコードし得る。所望に応じて、ポリヌクレオチドは、発現制御エレメントを含む発現ベクター内にクローニングすることができ、そのようなエレメントとしては、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー、または宿主細胞における本開示のポリヌクレオチドの発現を駆動する他の調節エレメントが挙げられる。発現ベクターは、例えばプラスミドとすることができます。MC や MC1 などのミニ染色体、バクテリオファージ、ファージミド、酵母人工染色体、細菌人工染色体、ウイルス粒子、ウイルス様粒子、コスマド (ラムダファージの cos 部位が内部に挿入されているプラスミド) 、およびレブリコン (細胞中でそれ自体の制御下で複製する可能な遺伝子エレメント) を使用することができます。

30

【0084】

発現制御配列に動作可能に連結されたポリヌクレオチドを調製し、それらを宿主細胞中で発現するための方法は、当技術分野に周知である。例えば、米国特許第 4,366,246 号を参照されたい。本開示のポリヌクレオチドは、一つまたは複数の発現制御エレメントに隣接または近接して位置する際に、動作可能に連結され、このエレメントは、ポリヌクレオチドの転写および / または翻訳に向けられているものである。

40

【0085】

組成物

実施形態では、本開示の一つまたは複数のランチビオティック (例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上) が、抗微生物剤、消毒剤、抗生物剤、防腐剤、保存剤、抗ウイルス剤、または除染剤である組成物中に存在する。抗微生物組成物は、細菌などの微生物を死滅させるか、または微生物の繁殖を遅らせる。消毒剤組成物は、細菌などの微生物を死滅させるか、または微生物の繁殖を遅らせるために、非生物の物体に適用される。抗生物剤は、対象の体内または細胞もしくは組織中で、細菌などの微生物を死滅させるか、または微生物の繁殖を遅らせる。防腐剤は、皮膚、組織、または器官上で、細菌などの微生物を死滅させるか、または微生物の繁殖を遅らせる。保存剤組成物は、

50

塗料、木材、食品、飲料、生体試料、細胞もしくは組織の培養物、または医薬組成物などの製品で、微生物を死滅させるかまたは微生物の繁殖を遅らせて、細菌などの微生物による分解を防止する。除染剤は、生きた生物、細胞、組織、または物体の中または上で、細菌などの微生物を死滅させるかまたは微生物の繁殖を低減するために使用することができる洗浄剤である。

【0086】

実施形態では、本開示は、細菌を死滅させる本開示の一つまたは複数のランチビオティックを含む組成物を提供する。実施形態では、バリアントMU1140ランチビオティック（すなわち本開示のランチビオティック）を含む組成物は、それらが接触する約：5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%（または約5%と100%の間の任意の範囲）の細菌を死滅させる。ランチビオティックが静菌剤と殺細菌剤のどちらとして作用するのかの違いは、処置される対象、組成物、または物体に送達されるランチビオティックの量または濃度とことができる。実施形態では、本開示のランチビオティックは、処置される組成物、対象、細胞、または組織に存在する細菌数を低減する。本開示の一実施形態では、本開示のランチビオティックを含む組成物は、細菌数を約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%（または約5%と100%の間の任意の範囲）低減する。

10

【0087】

実施形態では、本開示のバリアントランチビオティックは、本開示の一つまたは複数の単離されたランチビオティックと、一つまたは複数の医薬的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤（固体または液体）とを含む抗微生物組成物中に存在する。本開示の一実施形態では、本バリアントランチビオティックは、少なくとも1タイプのグラム陽性細菌の細菌繁殖を約：5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%（または約5%と100%の間の任意の範囲で）実質的に低減するのに有効な量で、組成物中に存在する。本開示の実施形態では、バリアントMU1140ランチビオティックは、少なくとも1タイプのグラム陽性細菌の数を約：5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%（または約5%と100%の間の任意の範囲で）実質的に低減するのに有効な量で、組成物中に存在する。実施形態では、グラム陽性細菌のうち少なくとも1タイプは、例えば、スタフィロコッカス・アウレウス、メチシリン耐性のスタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・サプロフィティカス（*Staphylococcus saprophyticus*）、スタフィロコッカス・エピデルミディス、パンコマイシン耐性のエンテロコッカス、パンコマイシン耐性のエンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェシウム、プロピオニバクテリウム・アクネス、ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・サンギス、ストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ラクトバチルス・サリバリウス、リステリア・モノサイトゲネス、アクチノマイセス・イスラエリー、アクチノマイセス・ネスランディ、アクチノマイセス・ビスコーサス（*Actinomycetes viscosus*）、バチルス・アンシラシス、ストレプトコッカス・アガラクティエ、ストレプトコッカス・インターメディウス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、コリネバクテリウム・ジフテリア、クロストリジウム・スプロゲネス、クロストリジウム・ボツリナム、クロストリジウム・パーフリンゲンス、クロストリジウム・テタニ、およびクロストリジウム・ディフィシルである。全てのグラム陽性種類は、本開示のランチビオティックバリアントに対し感受性である。

20

30

40

【0088】

さらに、グラム陰性細菌を、本開示のランチビオティックバリアントに感受性とすることができます。任意選択で、グラム陰性細菌の外膜を、例えばTris、Tris-EDTAやEDTAなどのキレート剤を用いて破壊することができる。任意の膜破壊化合物を、本開示のランチビオティックバリアントに対するグラム陰性細菌の感受性を増加させるために本開示の組成物に添加することができ、そのようなものとしては、例えば、ポリミキシン、膜破壊抗生物剤、セクロピン（例えば、イエバエ（*Musca domestica*

50

a) のセクロピン、ヤロフォラ蛾 (*hyalophora*) のセクロピン、セクロピンB、セクロピンP1)、G1 OKHc [Eckert et al., (2006) *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 1480を参照]；アルファディフェンシンおよびベータディフェンシン、ヒツジ由来のカテリシン [Anderson et al., (2004) *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 673を参照]、スクアラミン誘導体 [例えばSM-7、Kikuchi et al., (1997) *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 1433を参照]、ヘキサメタリン酸ナトリウム、顆粒球の細胞性酵素 [van den Broek, (1989) *Rev. Infect. Dis.* 11: 213]、EM49 [Rosenthal et al., (1976) *Biochemistry*, 15: 5783]、およびラウリルサルコシンナトリウムがある。本開示のランチビオティックバリアントと膜破壊剤および/または他の抗生物剤もしくはグラム陰性種を標的とする薬剤との組合せは、グラム陽性種とグラム陰性種の両方に対して有効な組成物を提供することができる。そのため、本開示は、本開示の一つまたは複数のランチビオティックと、一つまたは複数の追加の抗微生物剤または膜破壊剤とを含む組成物を含む。上記一つまたは複数の追加の抗微生物剤は、グラム陰性静菌または殺細菌の活性を有し得る。上記膜破壊剤は、グラム陰性細菌を、本開示のランチビオティックに対し感受性とすることができる（すなわち、膜破壊剤と一つまたは複数の本開示のランチビオティックバリアントとの組合せは、グラム陰性細菌に対し静菌性または殺細菌である）。グラム陰性細菌としては、例えば、アシネットバクター・バウマニ、ボルデテラ・パーツシス、ボレリア・ブルグドルフェリ、ブルセラ・アボルタス、ブルセラ・カニス、ブルセラ・メリテンシス、ブルセラ・スイス、カンピロバクター・ジェジュニ、コクシエラ・バーネッティ、エシェリキア・コリ、フランシセラ・ツラレンシス、ヘモフィルス・インフルエンザ、ヘリコバクター・ピロリ、クレブシエラ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、レプトスピラ・インターロガヌス、ナイセリア・ゴノレア、ナイセリア・メニンギティディス、シュードモナス・エルギノーザ、リケッチア・リケッチイ、サルモネラ・エンテリティディス、サルモネラ・ティフィ、サルモネラ・ティフィムリウム、セラチア・マルセッセンス、シゲラ・ソンネ、トレポネーマ・パリズム、ビブリオ・コレラ、エルシニア・エンテロコリチカ、およびエルシニア・ペスティスが挙げられる。

【0089】

グラム可変性およびグラム不定性の細菌もまた、本開示のランチビオティックバリアントに対し感受性とすることができる。任意選択で、これらの生物の外膜を破壊するために、EDTAなどのキレート剤を本開示の組成物に添加することができる。グラム可変性およびグラム不定性の細菌としては、例えば、クラミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、クラミジア・トリコマティス (*Chlamydia trachomatis*)、クラミジア・シッタシ (*Chlamydia psittaci*)、マイコバクテリウム・レプレ (*Mycobacterium leprae*)、マイコバクテリウム・ツベルクローシス (*mycobacterium tuberculosis*)、マイコバクテリウム・ウルセラヌス (*Mycobacterium ulcerans*)、およびマイコバクテリウム・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*)が挙げられる。

【0090】

本開示のランチビオティックは、動物、組成物、または物体への適用に適した一つまたは複数の医薬的に許容可能な担体、他の担体、希釈剤、アジュバント、賦形剤、または被包基質とともに、製剤中に組み合わせることができる。例示的な医薬的に許容可能な担体、他の担体、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはそれらの被包基質としては、糖、例えばラクトース、グルコース、デキストロースやスクロースなど；デンプン、例えばトウモロコシデンプンやジャガイモデンプンなど；セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロースやメチルセルロースなど；多糖、例えばラテックス機能化SEPHAROSE (登録商

10

20

30

40

50

標) やアガロースなど; 粉末トラガカント; グリセロール; 麦芽; ゼラチン; タルク; 固体滑沢剤、例えばステアリン酸やステアリン酸マグネシウム; 硫酸カルシウム; 植物油、例えばピーナツ油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油; ポリオール、例えばプロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、プロピレングリコールやポリエチレングリコール; タンパク質、例えば血清アルブミン、スカシ貝ヘモシアニン、イムノグロブリン分子、サイログロブリン、オバルブミン、破傷風トキソイド; アルギン酸; 乳化剤、例えばT W E E N (登録商標) (ポリソルベート); ポリ乳酸; ポリグリコール酸; ポリマー・アミノ酸、例えばポリグルタミン酸やポリリジンなど; アミノ酸コポリマー; ペプトイド; リピトイド; 不活性かつ非病原性のウイルス粒子または細菌細胞; リポソーム; ハイドロゲル; シクロデキストリン; 生分解性のナノカプセル; 生体接着材; 湿潤剤、そのようなラウリル硫酸ナトリウム; 着色剤; 着香剤; 錠剤化剤; 安定化剤; 抗酸化剤; 保存剤; パイロジエン不含水; 等張生理食塩水; エタノール; オレイン酸エチル; ピロリドン; リンゲル溶液、デキストロース溶液、ハンクス溶液; アルギン酸ナトリウム; ポリビニルピロリドン; トラガカントゴム; アカシアゴム; ならびに滅菌水および水性緩衝液および生理的リン酸緩衝食塩水などの溶液が挙げられる。治療用途のための担体、例えば医薬的に許容可能な担体や希釈剤などは、当技術分野に周知であり、例えば, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. [A. R. Gennaro ed. (1985)] に記載されている。医薬的に許容可能な塩もまた、本開示の組成物に使用することができ、そのようなものとしては例えば、鉱塩、例えば塩酸塩、リン酸塩や硫酸塩など、ならびに有機酸塩、例えば酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩や安息香酸塩がある。

10

20

30

40

50

【0091】

様々な剤形が、本明細書に記載されるようなランチビオティック組成物を含むことができる。実施形態によっては、剤形は、経口、直腸、腔、尿道、局所(経粘膜および経皮を含む)、筋肉内、静脈内、皮内、皮下、筋肉内、または腹腔内へのランチビオティックの送達に適合させることができる。

【0092】

バリアントランチビオティック組成物は、製剤中に、経口送達に適した形態、例えば錠剤、トローチ、菱形剤、口腔洗浄剤、歯磨き剤、バッカル錠剤、溶液、水性もしくは油性の懸濁液、分散性の粉末もしくは顆粒、エマルジョン、硬カプセルもしくは軟カプセル、またはシロップもしくはエリキシルなどとすることができます。そのような組成物は、一つまたは複数の剤、例えば乳化剤、湿潤剤、pH緩衝剤、甘味剤、着香剤、着色剤や保存剤などを含有し得る。本ランチビオティック組成物は、使用前に水または他の適した液体を用いて再構成するための、乾燥製品とすることができる。

【0093】

本開示のランチビオティックはまた、直腸、腔、または尿道への薬剤の投与のために、坐剤の形態で投与することができる。これらの組成物は、通常の温度では固体であるが体温では液体であるがゆえに直腸内では融解して薬剤を放出することになる適した非刺激性の担体に、バリアントランチビオティックを混合することによって、調製することができる。そのような素材は、ココアバターおよびポリエチレングリコールである。

【0094】

本開示のランチビオティックはまた、例えば、ローション、ゲル、または小単層ベシクル、大単層ベシクルや多層ベシクルなどのリポソーム送達系の形態で、局所的に投与することができる。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミンやホスファチジルコリンなどの種々のリン脂質から形成することができる。他の剤形としては、例えば、注射可能な、舌下の、浣腸の、および経鼻の剤形が挙げられる。吸入に用いる組成物は、典型的には、乾燥粉末として投与することができる溶液、懸濁液、もしくはエマルジョンの形態で、または従来の噴霧剤(例えば、ジクロロジフルオロメタンもしくはトリクロロフルオロメタン)を用いたエアロゾルの形態で、提供することができる。

【0095】

製剤は、約 0 . 0 0 0 1 % と約 9 9 . 9 9 9 9 %との間の重量の本開示の一つまたは複数のランチビオティック(複数可)、通常は少なくとも約 5 、 1 0 、 1 5 、 2 0 、 2 5 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、または 1 0 0 % (重量%) の本願開示の一つまたは複数のランチビオティックバリアントを、含有することができる。いくつかの実施形態は、約 2 5 % から約 5 0 % まで、または 5 % から 7 5 % までの開示のランチビオティックを含有する。

【 0 0 9 6 】

本開示の一つまたは複数のランチビオティックは、一つまたは複数の抗微生物、抗生物剤、バクテリオシン、抗ウイルス性の化合物もしくは分子、殺ウイルス性の化合物もしくは分子、または抗真菌性の化合物もしくは分子と組み合わせて、本開示の方法で有用な組成物を形成することができる。10

【 0 0 9 7 】

抗生素としては、例えば、ペニシリン、セファロスポリン、ポリミキシン、キノロン、スルホンアミド、アミノグリコシド、マクロライド、テトラサイクリン、環状リポペプチド(例えばダプトマイシン)、グリシルサイクリン(例えばチゲサイクリン)、およびオキサゾリジノン(例えばリネゾイド(l i n e z o i d))が挙げられる。

【 0 0 9 8 】

バクテリオシンとしては、例えば、アシドシン、アクタガルジン、アグロシン、アルベイシン(a l v e i c i n)、オーレオシン(a u r e o c i n)、カルノシン、コリシン、クルバチシン(c u r v a t i c i n)、ダイバーシン(d i v e r c i n)、デュラマイシン、エンテロシン、エンテロリシン、エピデルミン、エルウィニオシン、ガリデルミン、グリシネシン(g l y c i n e c i n)、ハロシン、ハロデュラシン(h a l o d u r a c i n)、ラクトコシン(l a c t o c o c i n)、ラクチシン、ロイコシン、マセドシン(m a c e d o c i n)、メルサシジン(m e r s a c i d i n)、メセンテリシン(m e s e n t e r i c i n)、ミクロビスピリシン、ミュータシン、ナイシン、パエニバシリン(p a e n i b a c i l l i n)、プラノスピリシン(p l a n o s p o r i c i n)、ペディオシン、ペントシン(p e n t o c i n)、プランタリシン、ロイテリシン(r e u t e r i c i n)、サカシン(s a k a c i n)、サリバリシン、サブチリン、スルホロビシン(s u l f o l o b i c i n)、スリシン 17 、トリホリトキシン(t r i f o l i t o x i n)、バリアシン、ビブリオシン、ワルネリシン(w a r n e r i c i n)、およびワーネリン(w a r n e r i n)が挙げられる。20

【 0 0 9 9 】

抗真菌としては、例えば、ポリエン抗真菌剤(例えば、アンホテリシン B 、ナタマイシン、リモシジン、フィリピン、ナイスタチン、カンディシン(c a n d i c i n)、ハマイシン)、アゾール抗真菌剤(例えば、イミダゾール、トリアゾール、チアゾール)、イミダゾール(例えば、ミコナゾール、ケトコナゾール、クロトリマゾール、エコナゾール、オモコナゾール、ビホナゾール、ブトコナゾール、フェンチコナゾール、イソコナゾール、オキシコナゾール、セルタコナゾール、スルコナゾール、チオコナゾール)、トリアゾール(例えば、フルコナゾール、イトラコナゾール、イサブコナゾール、ラブコナゾール、ポサコナゾール、ボリコナゾール、テルコナゾール、アルバコナゾール)、チアゾール(例えば、アバガンジン(a b a g u n g i n))、アリルアミン(例えば、テルビナフィン、ナフチフィン、ブテナフィン)、エキノキヤンディン(例えば、アニデュラファンギン、カスポファンギン、ミカファンギン)、ポリゴジアール、安息香酸、シクロピロクスオラミン、トルナフテート、ウンデシレン酸、フルシトシン、およびグリセオフルビンが挙げられる。30

【 0 1 0 0 】

抗ウイルス剤および殺ウイルス剤としては、例えば、アバカビル、アシクロビル(a c i c l o v i r e)、アデフォビル、アマンタジン、アンプレナビル、アンブリジエン、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、ボセプレビル、シドフォビル、コンビビル、デラビルジン、ディダノシン、ドコサノール、エファビレンツ、エムトリシタビン、エン

10

20

30

40

50

フビルチド、エンテカビル、侵入阻害剤、ファムシクロビル、ホミビルセン、ホスアンプレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、ガンシクロビル、イバシタビン、イムノビル、イドクスウリジン、イミキモド、インジナビル、イノシン、インテグラーゼ阻害剤、インターフェロン i、i i もしくは i i i 型、インターフェロン、ラミブジン、ロピナビル、ロビリド、マラビロク、モロキシジン、メチサゾン、ネルフィナビル、ネビラピン、ネキサビル (n e x a v i r)、ヌクレオシド類似体、オセルタミビル、ペグインターフェロンアルファ - 2 a、ベンシクロビル、ペラミビル、プレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害剤、ラルテグラビル、逆転写酵素阻害剤、リバビリン、リマンタジン、リトナビル、ピラミジン、サクイナビル、スタブジン、テノホビル、テノホビルジソプロキシル、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル、バルガンシクロビル、ビクリビロク、ビダラピン、ビラミジン、ザルシタビン、ザナミビル、およびジドブジンが挙げられる。

10

【0101】

組換え S . ミュータンスを含む組成物

本開示の組成物は、本明細書に記載されるような一つまたは複数の株の組換え S . ミュータンス株、および医薬的に許容可能なまたは栄養的に許容可能な担体によって、発現させることができる。例えば、組換え S . ミュータンス株は、1) 乳酸欠乏性、および 2) 組換え A D H の生産、3) バリアント M U 1 1 4 0 の生産、4) 任意選択で、特異的な有機物質（例えば、D - アラニンなどのDアミノ酸）に対する栄養要求性、5) 任意選択で、C o m E 発現の欠乏性、またはそれらの組合せによって、特徴付けることができる。

20

【0102】

担体は、投与される対象の範囲に生理的に適合性がある。担体は、錠剤、カプセル、菱形剤、または粉末形態に製剤化するために、固体ベースの乾燥素材から構成され得る。担体はまた、液体またはゲルベースの素材から構成され得る。

【0103】

ランチビオティックの使用

実施形態によっては、本開示のランチビオティックは、細菌の成長を低減するために、細菌の成長を防止するために、細菌の繁殖を防止するために、細菌の繁殖を低減するために、または物体、組成物、もしくは対象の中もしくは上に存在する細菌数を低減もしくは排除するために、使用される。本開示の一実施形態では、細菌は、少なくとも 1 タイプのグラム陽性細菌、少なくとも 1 タイプのグラム陰性細菌、少なくとも 1 タイプのグラム可変もしくはグラム不定の細菌、または少なくとも 1 タイプのグラム陽性もしくは少なくとも 1 タイプのグラム陰性の細菌または少なくとも 1 タイプのグラム可変もしくはグラム不定の細菌の組合せである。実施形態では、本開示のランチビオティックは、組成物に、または治療を必要とする対象に、添加するかまたは接触させるために投与される。

30

【0104】

本開示の実施形態では、本開示のランチビオティックの静菌作用によって、細菌の繁殖が約 : 5 、 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、または 1 0 0 % (または約 5 % と 1 0 0 % の間の任意の範囲で) 低減される。実施形態では、本開示のランチビオティックは、細菌を死滅させる。本開示の実施形態では、バリアント M U 1 1 4 0 ランチビオティックは、それらが接触する約 : 5 、 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、または 1 0 0 % (または約 5 % と 1 0 0 % の間の任意の範囲) の細菌を死滅させる。ランチビオティックが静菌剤と殺細菌剤のどちらとして作用するのかの違いは、処置される対象、組成物、または物体に送達されるランチビオティックの量または濃度とすることができます。本開示のランチビオティックは、処置される組成物、対象、細胞、または組織に存在する細菌数を低減することができる。本開示の一実施形態では、バリアント M U 1 1 4 0 ランチビオティックは、細菌数を約 5 、 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、または 1 0 0 % (または約 5 % と 1 0 0 % の間の任意の範囲に) 低減する。

40

【0105】

50

そのため、本開示は、疾患、感染、またはコロニー形成を治療、寛解、または予防する方法を提供する。疾患とは、感染の結果生じ、かつ特定可能な一群の徴候および症状によって特徴付けられる、生物の一部、器官、または系の病的な状態である。感染とは、身体の一部または組織中の細菌などの病原性微生物による侵入および増殖であり、それは続いて、組織の傷害を生じ、種々の細胞機構または毒性機構を通じて顕在的な疾患を進行させことがある。コロニー形成とは、宿主または物体の上または内部でそれ自体を確立する細菌などの微生物の作用または過程である。コロニー形成は、下に記載されるように、引き続きバイオフィルムまたは生物付着の状態を生じることがある。実施形態では、本開示のランチビオティックは、疾患、感染、もしくはコロニー形成を防止するために、または疾患もしくは感染の広がりを防止するために、予防的に使用される。本開示の組成物および方法が治療または予防することのできる疾患、感染、およびコロニー形成の例としては、例えば、敗血症、細菌性髄膜炎、囊胞性線維症、ウシ乳房炎、膿瘍疹、細菌性膣症、細菌性肺炎、尿路感染、細菌性胃腸炎、丹毒、蜂巣炎、炭疽、百日咳、ブルセラ症、腸炎、日和見感染、市中感染の呼吸器感染、上気道および下気道感染、ジフテリア、院内感染、下痢、潰瘍、気管支炎、リストリア症、結核、淋病、シードモナス感染、サルモネラ症、赤痢菌感染症、大腸菌感染、スタフィロコッカス感染、ストレプトコッカス感染、再発性または原発性のC.ディフィシル関連感染、および壊死性筋膜炎が挙げられる。

10

【0106】

実施形態では、本開示は、本開示のランチビオティックを投与することによって細菌感染を有する対象を治療する方法を提供する。実施形態では、本開示は、本開示のランチビオティックを投与することによって、医師、看護師や医師助手などの医療提供者により細菌感染と診断されている対象を治療する方法を提供する。実施形態では、治療することは、対象の中または上の細菌数を低減または排除することを含む。実施形態では、本開示は、本開示のランチビオティックを投与することによって、細菌感染を予防する方法をさらに提供する。実施形態では、対象は、グラム陽性細菌に感染している。実施形態では、グラム陽性細菌は、スタフィロコッカス・アウレウス、メチシリン耐性のスタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・サブロフィティカス、スタフィロコッカス・エピデルミディス、バンコマイシン耐性のエンテロコッカス、バンコマイシン耐性のエンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェシウム、プロピオニバクテリウム・アクネス、ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・サンギス、ストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ラクトバチルス・サリバリウス、リストリア・モノサイトゲネス、アクチノマイセス・イスラエリー、アクチノマイセス・ネスランディ、アクチノマイセス・ビスコーサス、バチルス・アンシラシス、ストレプトコッカス・アガラクティエ、ストレプトコッカス・インターメディウス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、コリネバクテリウム・ジフテリア、クロストリジウム・スポロゲネス、クロストリジウム・ボツリナム、クロストリジウム・パーフリンゲンス、クロストリジウム・テタニおよびクロストリジウム・ディフィシルである。実施形態では、本開示は、本開示のランチビオティックを対象に投与することによって、C.ディフィシル感染を有する対象を治療する方法、例えば、対象中のC.ディフィシルの細菌数を低減する方法を提供する。実施形態では、本開示は、対象に本開示のランチビオティックを投与することによって、対象でC.ディフィシル感染を予防する方法を提供する。実施形態では、対象はヒトである。対象が細菌感染を有するか否かを決定する方法は、当技術分野で周知である。

20

【0107】

実施形態では、対象は、哺乳動物、例えばマウス、ウサギ、モルモット、マカクザル、ヒヒ、チンパンジー、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコなど、または非哺乳動物、例えばニワトリ、アヒルや魚などである。本開示のランチビオティックはまた、植物、種類子、または土壤などの植物培地に投与することができる。

30

【0108】

本開示のランチビオティックの投与は、従来の非毒性の医薬的に許容可能な担体、希釈

40

50

剤、賦形剤、アジュバント、および媒体を含有する投薬単位製剤で、注射（例えば、筋肉内、静脈内、肺内、筋肉内、皮内、腹腔内、くも膜下腔内、もしくは皮下の注射）、エアロゾル、鼻腔内、輸液ポンプ、坐剤（直腸、膣、尿道）、経粘膜的に、局所的に、バッカルで、経口的に、非経口的に、輸液法、浣腸により、吸入により、浣腸、または噴霧、舌下に、経皮的に、眼科用溶液として、脊髄内適用、または他の手段を含めた、当技術分野に公知の任意の手段によるものとすることができる。投与方法の組合せもまた、使用することができる。

【0109】

治療用途では、本開示のランチビオティック組成物は、細菌の繁殖を低減するか、または細菌数を低減するか、またはその両方のために、対象に投与される。組成物中のランチビオティックの具体的な投薬量は、数多くの要因に依存するものとなり、そのような要因としては、以下に限定されないが、組成物が投与される対象の種類、年齢、性別、感染の重症度、併用の薬物療法、全身状態、および組成物の投与モードが挙げられる。本開示の組成物の有効量は、定型の実験作業のみを使用して、容易に決定することができる。治療有効量とは、細菌感染またはコロニー形成の治療、寛解、または予防に有効な単位用量でまたは一連の一部としてのどちらかで、その量を対象へ投与することを意味する。治療有効量とはまた、感染の症状を寛解もしくは低減する際に、または対象の中もしくは上で細菌の繁殖を低減するかまたは対象の中もしくは上で細菌の量を低減する際に、有効な量である。

【0110】

組成物中のランチビオティックの濃度は、様々とすることができます、主に、選択された具体的な投与方法および対象の要求に従って、上に記載されるようなランチビオティックの活性、対象の体重、対象の全体的な健康状態などに基づき選択されるものとなる。しかし、濃度は、典型的には、約：0.001、0.01、0.1、1、5、10、20、30、40、50、75、100、150 mg / kg / 日（または約0.001と150 mg / kg / 日との間の任意の範囲）からに及ぶ、および時にはそれよりも高い、投薬量を提供するよう選択されるものとなる。典型的な投薬量は、約0.1 mg / kg / 日から約5 mg / kg / 日まで、約0.1 mg / kg / 日から約15 mg / kg / 日まで、約0.1 mg / kg / 日から約20 mg / kg / 日まで、および約0.1 mg / kg / 日から約50 mg / kg / 日までに及ぶ。

【0111】

本開示のランチビオティックは、疾患、感染、コロニー形成、バイオフィルム、または生物付着の状態を予防または低減するために、時間をかけて期日（例えば、1日、3日、1週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年、もしくはそれを超える）当たり数回投与するか、または長期間にわたって維持用量で投与することができる。

【0112】

本開示のランチビオティックは、細菌による感染がないかもしくはコロニー形成がない動物に投与することができるか、または、細菌感染もしくはコロニー形成のある動物に投与することができる。

【0113】

本開示の一実施形態は、無生物の物体の上または中で除染または細菌成長を低減するための方法を提供し、この方法は、少なくとも1タイプの細菌の細菌成長を実質的に阻害するのに有効な期間、本開示のランチビオティックに物体を接触することを含む。接触は、1分間、15分間、30分間、もしくは60分間、または2時間、3時間、10時間、12時間、24時間、36時間もしくは48時間（または約1分間と48時間の間の任意の範囲）とすることができる。物体は、例えば、食品調理の表面、食品調理の器具、工業器具、管、または医療デバイス、例えばカテーテル、メス、ナイフ、ハサミ、スパチュラ、エキスパンダ、クリップ、ピンセット、スペキュラ、開創器、縫合糸、外科用メッシュ、チゼル、ドリル、水準器、やすり、のこぎり、スプリント、ノギス、クランプ、鉗子、フック、ランセット、針、カニューレ、キュレット、圧低器、拡張器、起子、咬合器、抽出

10

20

30

40

50

器、探針、ステープル、人工関節、創傷被覆材、カテーテル、ステント、チューブ、ボウル、トレイ、スポンジ、シューリング、スプーン、シリング、ペースメーカー、ねじ、プレート、ピン、ワイヤ、ガイドワイヤ、ペースメーカーリード、インプラント、センサー、グルコースセンサー、血管バイパスチューブ、静注バッグ、心室補助装置部材、眼科用レンズ、およびバルーンとことができる。

【0114】

除染可能な他の物体としては、布地、例えば織布材（天然もしくは非天然の素材または天然素材と合成素材との混紡から織られた）または不織布材（例えば、弾性もしくは非弾性の熱可塑性ポリマー）が挙げられる。布地は、例えば、患者、医療従事者、または潜在的な感染性因子もしくは微生物に接触する可能性のある他の人間が着用する保護用品、例えばガウン、ローブ、フェイスマスク、頭部カバー、靴カバー、または手袋に使用することができる。他の保護布としては、外科用覆布、外科用カバー、覆布、シート、寝具またはリネン類、パッド、ガーゼ包帯、ワイプ、スポンジ、ならびに家庭、施設、医療、および工業用途のための他の抗微生物用品を挙げることができる。

10

【0115】

本開示の実施形態では、ランチビオティックは、食品調理の表面、食品調理の器具、工業器具、管、または医療デバイス、例えばカテーテル、メス、ナイフ、ハサミ、スパチュラ、エキスパンダ、クリップ、クリップ、ピンセット、スペキュラ、開創器、縫合糸、外科用メッシュ、チゼル、ドリル、水準器、やすり、のこぎり、スプリント、ノギス、クランプ、鉗子、フック、ランセット、針、カニューレ、キュレット、圧低器、拡張器、起子、咬合器、抽出器、探針、ステープル、人工関節、創傷被覆材、カテーテル、ステント、チューブ、ボウル、トレイ、スポンジ、シューリング、スプーン、シリング、ペースメーカー、ねじ、プレート、ピン、ワイヤ、ガイドワイヤ、ペースメーカーリード、インプラント、センサー、グルコースセンサー、血管バイパスチューブ、静注バッグ、心室補助装置部材、眼科用レンズ、およびバルーン、ならびに上に記載された布地などの固体表面の上に被覆されるか、固相化されるか、連結されるか、または結合される。

20

【0116】

本開示の別の実施形態では、本開示のランチビオティック組成物は、経皮製剤中に存在する。ランチビオティック組成物が投与部位で局所的に、または動物もしくはヒトの血液循環に入ることによって全身的に作用するように、経皮製剤を設計することができる。そのため、送達は、ランチビオティック組成物を軟膏またはローションの形態で直接的に局所適用することによって、またはランチビオティック組成物を、もしくはランチビオティック組成物を保持し一斉にもしくは時間制御方式で皮膚に放出するリザーバーを、埋め込んだパッチを貼付することによって起こる。

30

【0117】

任意選択で、ランチビオティック組成物を、経皮送達または局所送達のための微粒子、ミクロスフェア、リポソーム、脂質ベシクルやトランスファーソームなどのベシクル内に含有させることができる。衝撃波を生成して孔を広げるための超音波デバイス、皮膚を横切って物質を射出するための電流の使用、皮膚を穿孔してランチビオティック組成物を血流中に送達するためのマイクロニードルの使用もまた、経皮投与または局所投与と共に使用することができる。本開示のランチビオティックなどのペプチドを表面上に被覆、結合、または固相化する方法は、当技術分野に周知である。例えば、Modern Methods of Protein Immobilization, William H. Scouten, first Ed. (2001) CRC Press; Protein Immobilization (Biotechnology and Bioprocessing), Richard F. Taylor (1991) CRC Pressを参照されたい。

40

【0118】

本開示の方法はまた、生物付着またはバイオフィルムを寛解、低減、除去、または防止するために使用することができる。生物付着とは、溶媒に曝露された構造の上の細菌など

50

の微生物の望ましくない蓄積である。生物付着は、例えば、船の船体の上に、膜バイオリアクターや逆浸透渦巻き型膜などの膜システム、大型工業用器具の水冷却システムおよび発電所、ならびに例えば使用済み油、切削油、可溶化油や油圧油などを運ぶ油送管の中に、起こり得る。

【0119】

バイオフィルムは、生物付着を引き起こすことがあり、生物の凝集体であり、そこでは、生物が互いに、表面に、またはその組合せで接着している。バイオフィルムは、細菌、真菌、糸状菌、酵母、藻類、ラン藻、ウイルス、および原虫ならびにそれらの組合せのうち一つまたは複数の種を含むことができる。バイオフィルム中に存在する微生物は、細胞外ポリマー性基質の自己産生マトリックス内に埋め込むことができる。微生物がバイオフィルムの成長モードに切り替わると、行動の表現型シフトを経ることがあり、その際に、数多くの一揃いの遺伝子が差時的に調節される。微生物のほぼどの種類も、バイオフィルムを形成することができる。バイオフィルムは、生きている生物の上もしくは中に、または非生物の構造の中または上に、見出すことができる。バイオフィルムは、天然由来の水場または人造の水場の中に含まれている構造の上、水の表面、湿気に曝露された表面、パイプの内部、冷却水システム、海洋システム、艇体、歯の上、植物表面、植物の内部、ヒトおよび動物の体表、ヒトおよび動物の内部、コンタクトレンズ上、カテーテル、人工心臓弁、他の装具、子宫内デバイス、ならびに他の構造 / デバイス上に、存在し得る。

10

【0120】

バイオフィルムは、金属表面の腐食を引き起こし、船舶の速度を阻害し、植物病を引き起こし、ヒトおよび動物の疾患を引き起こし得る。バイオフィルムは、ヒトおよび動物の感染に関与し、そのようなものとしては、例えば、尿路感染、カテーテル感染、中耳感染、歯のプラーク、歯肉炎、歯のう蝕、歯周疾患、心内膜炎、囊胞性線維症での感染、慢性副鼻腔炎、および人工関節や心臓弁などの永久留置デバイスの感染が挙げられる。バイオフィルムはまた、感染している皮膚の創傷を治癒させるかまたは治療する際に、皮膚の創傷の治癒を弱め、局所的な抗細菌効率を低減し得る。

20

【0121】

バイオフィルムを形成し得る、生物付着を引き起こし得る、ならびに / またはヒトおよび動物で疾患を引き起こし得る、いくつかの微生物としては、例えば、上に記載されたような細菌、真菌、酵母、藻類、原虫、およびウイルスが挙げられる。バイオフィルムは、上に記載されるように生きた生物中で処理することができる。非生物の表面のバイオフィルムおよび生物付着の状態は、非生物の表面に、またはその表面の周囲の範囲に、本開示のランチビオティックを適用することによって、処置することができる。本開示のランチビオティックはまた、水、油、または非生物の表面を囲んでいるかもしくは接触している他の流体に、添加することができる。

30

【0122】

本開示は、細菌などの一つまたは複数の微生物によって引き起こされる生物付着の状態またはバイオフィルムの状態を対応または予防する方法を提供する。この方法は、バリアントランチビオティックのうち一つまたは複数を、生物付着の状態またはバイオフィルムの状態に投与することを含み、その際に、生物付着の状態またはバイオフィルムの状態は対応される。

40

【0123】

一つまたは複数のランチビオティックは、バイオフィルムもしくは生物付着の状態を有する表面に投与することができるか、または予防的処置として表面に投与することができる。本ランチビオティックは、乾燥形態（例えば、凍結乾燥もしくは錠剤の形態）または液体溶液もしくは懸濁液の形態とすることができます。乾燥または液体の形態は、表面（例えば、管もしくは膜）じゅうを拭くか、注ぐか、噴霧するか、洗い流すか、またはその他表面に適用することができる。本開示のランチビオティックは、組成物中に担体または希釈剤と共に、約 0.001、0.01、0.1、1、5、10、20、30、40、50、75、100、150 mg / m²（または約 0.001 と約 30 150 mg / m² の間

50

の任意の範囲)から、および時にはそれよりも高い量で、存在することができる。

【0124】

バイオフィルムがヒトもしくは動物(例えば、カテーテルまたは医療デバイス)内の人工表面に存在するかまたは存在する可能性がある際に、その人工表面を、ヒトまたは動物中に挿入する前に、一つまたは複数のランチビオティックに接触させることができる。任意選択で、人工表面がヒトまたは動物中に挿入された後に、本ランチビオティックをその表面に送達することができる。

【0125】

本開示の一実施形態では、バリエントランチビオティックは、生体組織または細胞培養において除染するかまたは細菌繁殖もしくは細菌数を低減するために、使用することができる。本ランチビオティックは、医薬的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤中に、上に記載された医薬組成物に関する投薬比率で存在することができる。本ランチビオティックまたはランチビオティック組成物は、少なくとも1タイプの細菌の細菌成長を実質的に阻害するのに有効な期間、組織または細胞培養物に接触させることができる。ランチビオティックは、生体組織または細胞の生理的な特徴を維持するのに有効な量で、および/または生体組織または細胞の生存性を実質的に維持するのに有効な量で、提供することができる。

10

【0126】

本開示の一実施形態は、同種移植の器官、組織、もしくは細胞、自家移植の組織もしくは細胞、同種異系移植の器官、組織もしくは細胞、異種移植の器官、組織、もしくは細胞、または移植に用いる他の細胞もしくは組織を調製するための方法を提供する。この方法は、少なくとも1タイプのグラム陽性細菌の細菌成長または細菌数を阻害または低減するのに有効な期間、器官、細胞、または組織を本開示のランチビオティック組成物に接触させることを含む。細胞、器官、または組織は、例えば、心臓弁、血管、心膜または筋骨格系組織、前十字靭帯などの靭帯、膝関節、股関節、足首関節、半月板組織、皮膚、角膜、心臓、肺、小腸、腸、肝臓、腎臓、骨髄、骨、および腱とすることができます。

20

【0127】

接触ステップは、約2から約42の温度で約:0.5、1、2、3、5、10、24、36、または48時間、実施することができる。本ランチビオティック組成物は、例えばバンコマイシン、イミペネム、アミカシンやアムホテリシンBなどの一つまたは複数の広範なスペクトラムの抗微生物剤および/または一つまたは複数の抗真菌剤をさらに含む、生理的溶液をさらに含むことができる。

30

【0128】

本開示のランチビオティック組成物はまた、同種異系移植および異種移植の過程の溶液、ならびに細胞培養および組織の溶液に用いる保存剤として、使用することができる。この溶液は、有効量の一つまたは複数のランチビオティックを、生理的溶液中に3と8との間のpHで含むことができる。

【0129】

一つまたは複数の本開示のランチビオティックは、保存剤として、食品または飲料に添加することができる。食品の例としては、プロセスチーズ製品、低温殺菌された乳製品、野菜の缶詰、高水分の高温焼成された小麦粉製品、低温殺菌された液体卵、およびナチュラルチーズ製品が挙げられる。本開示のランチビオティックはまた、食品中のリストリアを制御して、例えば、ビール、ワイン、アルコールの生産、およびサラダドレッシングなどの低pHの食品における乳酸細菌による損傷を制御するために、使用することができる。本開示のランチビオティックは、高圧滅菌やエレクトロポレーションなどの食品加工技術での添加物としても使用することができる。ランチビオティックは、食品または飲料中に、約:0.001、0.01、0.1、1、5、10、20、30、40、50、75、100、150、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000またはそれを超えるmg/kgまたはmg/L(または約0.001と約1,000mg/kgもしくは10mg/Lと何倍かの高さとの間の任意の範囲からの量で

40

50

存在することができる。

【0130】

本開示のランチビオティックはまた、分子ワイヤ、分子スイッチ、または分子ベースのメモリシステムとして使用することもできる。そのため、バリアントランチビオティックおよび野生型ランチビオティックは、ナノ回路の構築、ならびに他のナノベースの適用のために使用される可能性を有する。分子ワイヤ（分子ナノワイヤとしても知られる）は、電流を伝える分子スケールの基質であり、分子電子デバイスに用いるための基本的なビルディングブロックである。分子ワイヤの典型的な径は、3ナノメートル未満であり、一方、長さは、センチメートル以上に伸長することができる、分子ワイヤによって、ワイヤの一端からワイヤの他端まで電子を流すことが可能になる。分子ワイヤは、ナノ電子デバイスの追加の構成部材と接触するための少なくとも二つの末端を含むことができる。

10

【0131】

分子スイッチ（制御可能ワイヤとしても知られる）は、要求に応じて電子の流れをオンとオフとに切り替えることができる分子構造である。分子ベースのメモリシステムは、電子の貯蔵によってその導電性を変える能力を有する一つまたは複数の分子ワイヤまたはスイッチである。分子ワイヤ、スイッチ、または分子ベースのメモリシステムは、シリコンウエハ、合成ポリマー支持体、ガラス、アガロース、ニトロセルロース、ナイロン、Au、Cu、Pd、Pt、Ni、Al、Al₂O₃、ニッケルグリッドまたはディスク、カーボン支持体、アミノシラン処理シリカ、ポリリジン被覆ガラス、雲母や半導体などの基質に、存在するかまたは係留することができる。

20

【0132】

実施形態では、本開示は、一つまたは複数の本開示のランチビオティックバリアントを生産する組換えS.ミュータンス株を提供する。そのような株の例としては、JH1000またはJH1140が挙げられる。組換えS.ミュータンス株は、mutA'-mutB遺伝子間領域にエリスロマイシン遺伝子をさらに含有し得る。そのような株の例としては、SM152が挙げられる。組換えS.ミュータンス株はまた、例えば、野生型組換えS.ミュータンス株よりも2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、100×、1000×多くランチビオティックを生産する株とすることができます。

30

【0133】

実施形態では、本開示は、野生型のう蝕性のS.ミュータンスを競り負かして宿主の口腔から実質的に排除する[例えば、野生型S.ミュータンスの数を約：5、10、25、50、75、90、95、99、または100%（または約5%と約100%の間の任意の範囲で）低減する]、一つまたは複数の本開示のランチビオティックバリアントを生産する組換えS.ミュータンス株を提供する。野生型MU1140ランチビオティックに比べて生物活性が増強された本発明のランチビオティックバリアントの生産は、それゆえ、宿主の口腔中に存在するMU1140生産性の、非MU1140ランチビオティック生産性の、または非ランチビオティック生産性のS.ミュータンス株を超える選択的な利点を有するS.ミュータンスを、提供することができる。本開示のランチビオティックバリアントは、本開示の組換えS.ミュータンス株によって発現される際に、ランチビオティック感受性の常在のS.ミュータンス株を排除し、それゆえランチビオティック感受性株のコロニー形成に干渉し、口腔の組換えS.ミュータンスのコロニー形成を促進する。野生型の本来のS.ミュータンスが口腔から追い出されることから、歯のう蝕の発生率および/または重症度は低減する、

40

【0134】

本開示の一実施形態では、組換え株は、lanB、lanC、lanD、lanE、lanF、lanG、lanK、lanM、lanP、lanR、lanT、lanI、mutR、mutAA'、mutBCDPT、mutFEGまたはこれらのS.ミュータンスポリペプチドのうち二つ以上の組合せを追加的に発現することができる。

【0135】

実施形態では、本開示の組換えS.ミュータンス株は、乳酸欠損性であり、このことは

50

、組換え S . ミュータンス株が、野生型 S . ミュータンスに比べて実質的に減少した量の乳酸を生産することを意味する。実質的に減少した量の乳酸とは、野生型 S . ミュータンス株 [例えば S . ミュータンス株 UA 159 (ATCC 700610)] またはストレプトコッカス・ソブリヌス (*S treptococcus sobrinus*) [例えば S . ソブリヌス SL 1 株 (ATCC 33478)] 、ストレプトコッカス・ラタス (*S treptococcus rattus*) [例えば S . ラタス FA 1 株 (ATCC 19645)] 、ストレプトコッカス・クリセタス (*S treptococcus ceticus*) [S . クリセタス HS 6 株 (ATCC 19642)] 、およびストレプトコッカス・フェラス (*S treptococcus ferus*) [S . フェラス 8S 1 株)) を含めたストレプトコッカス属に属する他の種類によって生産されるよりも、約 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 95 、または 100 % (または約 40 % と約 100 % の間の任意の範囲) 少ない乳酸である。本開示の一実施形態では、乳酸欠損 S . ミュータンスエフェクター株は、検出可能な乳酸を生産しない。乳酸の発現は、例えば、 Hillman et al . , Infect . Immun . 62 : 60 (1994) ; Hillman et al . , Infect . Immun . 64 : 4319 (1996) ; Hillman et al . , 1990 , Infect . Immun . , 58 : 1290 - 1295 に記載されるように検出することができる。

10

20

30

40

50

【 0136 】

本開示の組換え S . ミュータンス株は、そのそれぞれが参照によりその全体を本明細書に組み込まれる国際出願 PCT / US 2013 / 027340 または米国特許第 5,607,672 号に開示されるように、非機能的な、不活性化された、部分的に機能的な、または部分的に不活性化された乳酸合成の調節領域、翻訳シグナル、転写シグナル、または構造配列の結果として、乳酸欠損とすることができます。

【 0137 】

乳酸合成の欠乏は、 S . ミュータンスにとって致死的であることから、組換えの乳酸欠損 S . ミュータンス株におけるこの欠乏は、組換えアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) の生産によって補完される必要がある。例えば、 Hillman et al . , Infect . Immun . 64 : 4319 (1996) を参照されたい。組換え ADH の生産によって、その他乳酸欠損 S . ミュータンスの死を引き起こす代謝物、例えばピルベートの蓄積が防止される。

【 0138 】

S . ミュータンス株は、参照によりその全体を本明細書に組み込まれる国際出願 PCT / US 2013 / 027340 に開示されるように、組換えアルコールデヒドロゲナーゼを発現するように遺伝子工学的に作製することができる。本開示の組換え S . ミュータンス株は、通常は口腔または宿主の食事の中には存在しない有機物質に対する栄養要求性を持つように、任意選択で遺伝子工学的に作製することができ、その結果、その組換え S . ミュータンス株による口腔内のコロニー形成を制御することができる。すなわち、組換え S . ミュータンス株は、国際出願 PCT / US 2013 / 027340 に開示されるように、成長に必要な特定の有機化合物を合成できないように、任意選択で遺伝子工学的に作製することができる。

【 0139 】

任意選択で、本開示の組換え S . ミュータンス株は、不活性化されているかまたは非機能的な comE 遺伝子を含むことができる。「 comE 欠損である」または「 comE 生産の欠損」とは、野生型 S . ミュータンスに比べて実質的に減少した量の comE タンパク質を組換え S . ミュータンス株が生産することを意味する。実質的に低減した量の comE とは、野生型 S . ミュータンス株によって生産されるよりも、約 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 95 、または 100 % (または約 40 % と約 100 % の間の任意の範囲) 少ない comE タンパク質である。本開示の一実施形態では、 comE 欠損組換え S . ミュータンス株は、検出可能な comE タンパク質を生産しない。 comE 発現は、例えば、 Chen & Gotschlich , J . Bact . 183 : 3160 (2001)

)に記載されるようにアッセイすることができる。本開示の組換えS.ミュータンス株は、国際出願PCT/US2013/027340に開示されるように、非機能的な、不活性化された、部分的に機能的な、または部分的に不活性化されたCOME合成の調節領域、翻訳シグナル、転写シグナル、または構造配列の結果として、COME欠損とすることができます。

【0140】

実施形態では、本開示の組換えS.ミュータンスは、本開示の組成物中に治療有効量で存在する。治療的に有効とは、数または発生率を予防または低減する(例えば、組成物を受けなかった対照よりもう蝕が5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%少ない)、および/またはう蝕の重症度を低減する(例えば、組成物を受けなかった対照よりもう蝕の重症度が5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%低い)のに有効であることを意味する。

10

【0141】

治療的に有効な量または投薬量とは、健全な医療/歯科的な判断の範囲内で、う蝕を予防する、ならびに/またはう蝕の数および/もしくはう蝕の重症度を低減するのに充分に高いレベルであるが重篤な副作用を(理に適ったベネフィット/リスク比で)回避するのに充分に低い、本開示の組成物の量または投薬量である。本開示の組成物は、当技術分野に公知の方法を用いて、う蝕の治療および/または予防のために、治療有効量で宿主の口腔に適用することができる。

20

【0142】

本開示の一実施形態では、組成物は、当技術分野に公知の方法を用いて、一つまたは複数の単離されたストレプトコッカス・オラリス(*Streptococcus oralis*)株、一つまたは複数の単離されたS.ラタス株、および/または一つまたは複数の単離されたストレプトコッカス・ウベリス(*Streptococcus uberis*)株と併せて、本開示の一つまたは複数の単離された組換え株を含むことができる。

【0143】

本開示の一実施形態は、歯のう蝕を治療する方法を提供し、この方法は、当技術分野に公知の方法を用いて、本開示の一つまたは複数の組換えS.ミュータンス株を含む組成物を、それを必要とする対象の口腔に投与することを含む。

30

【0144】

本開示はまた、対象で歯のう蝕を引き起こし得る細菌の量を低減する方法を提供する。本開示の別の実施形態は、対象で歯のう蝕を予防する方法を提供し、例えば、本開示の組換えS.ミュータンス株を含む組成物は、当技術分野に公知の方法を用いて、動物などの宿主または対象の口腔に投与され、そのような動物としては、哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヤギ、またはウサギが挙げられる。本開示の組成物は、当技術分野に公知の方法を用いて、経口的に投与することができる。

30

【0145】

キット

本開示の組成物は、一つまたは複数の本開示のランチビオティックの容器を含むキット中に存在し得る。本ランチビオティックは、凍結して、凍結粉末もしくは錠剤の形態とするか、または溶液もしくは懸濁液として、任意選択で緩衝剤、賦形剤、希釈剤、アジュバント、もしくは医薬的に許容可能な担体を共存させることができる。キットはまた、身体の一部または組織または表面へ一つまたは複数のランチビオティックを用いるための一つまたは複数のアプリケーターを含むことができる。アプリケーターは、例えば、スワブ、シリンジ(針を持つか持たない)、点滴器、噴霧器、外科用被覆材、創傷包装材、または包帯とすることができます。任意選択で、キットは、一つまたは複数のバリエントMU1140ランチビオティックを再構成、希釈、または調製するために、一つまたは複数の緩衝剤、希釈剤、アジュバント、治療的に許容可能な担体、または医薬的に許容可能な担体を含むことができる。

40

【0146】

50

本開示のキットは、単回用量の、1週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、または12か月の供給の本開示の組成物を含有することができる。本開示の組成物は、梱包することができ、複数の包装された組成物は、順次、貯蔵容器または外装またはカートンで提供することができる。一つまたは複数のS.ミュータンスの株が栄養要求性である際には、キットは、細菌の栄養要求性を維持する量の有機物質、例えば、D-アラニンなどのD-アミノ酸を含む組成物を含むことができる。

【0147】

本明細書のどこかで言及されている全ての特許、特許出願、および他の科学文書または技術文書は、参照によりその全体を本明細書に組み込まれる。本明細書に説明的に記載されている本開示は、本明細書に具体的に開示されていないいかなる一つまたは複数の構成要素、一つまたは複数の限定の不在下でも、適切に実践することができる。それゆえ、例えば、本明細書中の各場合で、「含む」、「から本質的になる」および「からなる」のいずれの用語も、それらの本来の意味を保持しつつ、他の二つの用語のどちらかと置き換えることがある。採用されている用語および表現は、限定の用語ではなく記載の用語として使用され、そのような用語および表現の使用に際して、呈示および記載される特長のいかなる等価物またはその一部も排除することを意図するものではないが、特許請求の範囲にある本開示の範囲内で様々な改変が可能であることが認識される。それゆえ、本願開示が実施形態によって具体的に開示されているとはいえ、本明細書に開示される概念の任意選択的な特長、改変、およびバリエーションが、当業者によって行われることがあること、ならびにそのような改変およびバリエーションは、本記載および添付の特許請求の範囲によって規定されるこの開示の範囲内にあるものとみなされることが、認識されるべきである。

10

20

30

40

【0148】

以下は、例証の目的のみで示され、上記の幅広い用語に記載される本開示の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0149】

本願開示は、以下の実施例にてさらに規定される。本明細書に明記される実施例は、本開示のある特定の特長、構成要素、および実施形態を表し、本開示の範囲を限定すると意図するものではなく解釈されるべきものでもない。

【0150】

(成熟した)22アミノ酸の生来の(野生型)M U 1 1 4 0 ポリペプチド配列(配列番号1156、図1)内の選ばれた單一および複数のアミノ酸の組合せを変異させることによって、抗微生物/抗生物活性および/または安定性が向上したM U 1 1 4 0 バリアント(すなわち、非天然由来のバリアントを含むM U 1 1 4 0 ポリペプチドバリアント)を生じた。p L A N 0 4 2 を用いてm u t A バリアントを構築した。p L A N 0 4 2 由来の線状のアンプリコンを使用して、コドン置換を含有するm u t A 配列に生来のm u t A 配列を置換した。S M 1 5 2 (J H 1 1 4 0 l a n A ' B : : e r m)内のm u t A バリアントライブラリーの形質転換を行い、m u t A 中のコドン置換を確認した後、S.ミュータンスバリアントのクローニングを拾って発現し、抗微生物活性(下記の表1および表2を参照)および安定性を分析した。m u t A 不変の対照のS M 1 5 2 および野生型の親株J H 1 1 4 0 を用いた各ランチビオティックバリアント生産株について透明域のサイズを定性的に比較することによって、データを解釈した。

【0151】

実施例1

M U 1 1 4 0 の單一部位および複数部位でのバリアント

m u t A バリアント株の構築

M U 1 1 4 0 バリアントの構築用のプラスミドは、S.ミュータンス中のM U 1 1 4 0 プロペプチドをコードする主要な構造遺伝子であるm u t A を用いて構築した。エピソームプラスミドは、C o l E 1 複製起点、大腸菌でのアンピシリン耐性、およびS.ミュ-

50

タンスでのクロラムフェニコール耐性を有するプラスミドであるプラスミド pMK4 (GenBank受入番号: EU549778.1) を用いて構築した。mutAA' 遺伝子座を含有する S. ミュータンス JH1140 (ATCC 寄託: 55676) のDNA断片を、pMK4 内にライゲーションし、pLAN042 (図2) と命名した。表1A に一覧にしたコドン置換を用いて、プラスミド pLAN042 を鋳型として使用し、PCR 変異生成法を用いて mutA バリアントを造成した (Raman and Martin, Nature Methods, 11, 2014)。

【0152】

相同組換えを用いた染色体組込みストラテジーを採用して、生来の染色体 mutA 遺伝子を、コドン置換をコードする mutA バリアントに置き換えることによって、S. ミュータンス JH1140 で MU1140 バリアントを生産した。mutAA' の上流の組込みアーム、mutAA' の下流の組込みアーム、およびエリスロマイシン耐性遺伝子を、PCR によって増幅し、スプライシングオーバーラップ伸長 PCR (SOE PCR) を用いてアセンブリした。SOE 産物を、pMK4 にライゲーションし、大腸菌中に形質転換し、DNA シークエンシングによって確認して、pLAN126 (図3) と命名した。

10

【0153】

MutA バリアントライブラリーは、上流および下流の組換えアームを pLAN126 鋳型から PCR 増幅し、続いて、pLAN042 mutA バリアントライブラリーから PCR 增幅した mutA バリアント (表1A) または mutA コドンバリアントをコードするオリゴヌクレオチドライブラリー (表1B) に、SOE PCR を用いてアセンブリすることによって、構築した。最後の PCR 反応を使用して、750 bp の組換えアームを含有する単一の SOE 産物を増幅した。

20

【0154】

DNA ベクターを、標準的な手法 [Biswas et al., Biotechniques 42.4: 487 (2007)] を用いて S. ミュータンス JH1140 中に形質転換した。形質転換体を、3 μg / mL エリスロマイシンを含有する TSYEX 寒天 (Ghobrial 2008, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the lantibiotic MU1140. Ph.D. 論文、フロリダ大学) 上に播き、キャンドルジャー中、37 度で 3 日間インキュベーションした。PCR およびサンガード DNA シークエンシングを利用して、mutA の染色体性コピーが、組込みベクター上にコードされた mutA バリアントに置き換わったことを確定した。

30

【表1】

変異	コアペプチド配列															
MU1140 (野生型) 配列番号 1	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
F1I 配列番号 19	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
F1L 配列番号 4	CTT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
R13N 配列番号 241	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGT	ACA	GGT	AGT
F17L 配列番号 316	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
F17Y 配列番号 320	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
N18A 配列番号 335	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
Y20F 配列番号 384	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT

表1A: mutA バリエントのスクレオチドの同一性

【表2】

表1B:複数部位mutAペリアントおよび対照株(單一部位バリアント)のヌクレオチドの同一性

変異	コアペプチド配列															
MU1140 (野生型)	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
F1L 配列番号 1	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AAT
F1L 配列番号 19	CTT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
F1L 配列番号 4	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
R13N 配列番号 241	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AAT	ACA	GGT	AGT
F17L 配列番号 316	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
F17Y 配列番号 320	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
N18A 配列番号 335	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
Y20F 配列番号 384	TTC	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGG	ACA	GGT	AGT
F1A R13A 配列番号 1167	GCT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT
F1A R13G 配列番号 708	GCT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT
F1A R13N 配列番号 709	GCT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AAT	ACA	GGT	AGT
F1A R13S 配列番号 710	GCT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGT	ACA	GGT	AGT
F1A R13V 配列番号 711	GCT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GTT	ACA	GGT	AGT

FIG R13A 配列番号 712	GGT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
FIG R13G 配列番号 713	GGT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
FIG R13N 配列番号 714	GGT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
FIG R13V 配列番号 715	GGT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GTT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I R13N 配列番号 716	CAT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I R13A G15A 配列番号 717	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GCT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I R13D G15A 配列番号 718	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GAT	ACA	GCT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I R13N G15A 配列番号 719	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AAT	ACA	GCT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I W4I R13A 配列番号 720	ATT	AAA	AGT	ATT	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I W4I R13D 配列番号 721	ATT	AAA	AGT	ATT	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I W4M R13A 配列番号 722	ATT	AAA	AGT	ATG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I W4M R13N 配列番号 723	ATT	AAA	AGT	ATG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I K2A R13A 配列番号 724	ATT	GCT	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I K2A W4K R13A	ATT	GCT	AGT	AAA	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I K2A W4K 配列番号 725	ATT	GCT	AGT	AAA	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F1I K2A W4K R13D	ATT	GCT	AGT	AAA	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
配列番号 726																						

F11 K2A W4K R13A Y20F 配列番号 727	ATT	GCT	AGT	AAA	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TTT	TGT	TGC
F11 L6V R13A 配列番号 728	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	GTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13A 配列番号 729	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13A Y20F 配列番号 730	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TTT	TGT	TGC
F11 R13D 配列番号 731	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13D Y20F 配列番号 732	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TTT	TGT	TGC
F11 R13G 配列番号 733	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13I 配列番号 734	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	ATT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13N 配列番号 735	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13N Y20F 配列番号 736	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AAT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TTT	TGT	TGC
F11 R13P 配列番号 737	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	CCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13Q 配列番号 738	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	CAA	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13S 配列番号 739	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	AGT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13W 配列番号 740	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GTT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13E 配列番号 741	ATT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GAA	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC
F11 R13A	CTT	AAA	AGT	TGG	AGC	CTT	TGT	ACG	CCT	GGT	TGT	GCA	GCT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT	TAC	TGT	TGC

配列番号 758																			
F1V R13Q	GTT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	CAA	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	TAC
配列番号 759	GTT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	CAA	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT
F1V R13V	GTT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	G TT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	TAC
配列番号 760	GTT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	C CT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT
F1V R13P	GTT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	G TT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT
配列番号 761	GTT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	C CT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT
F1Y R13D	TAT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	G AT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT
配列番号 762	TAT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	G AT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT
F1Y R13G	TAT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	G GT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT
配列番号 763	TAT	AAA	AGT	TGG	AGC	C TT	T GT	ACG	C CT	GGT	T GT	GCA	G GT	ACA	GGT	AGT	TTC	AAT	AGT

【 0 1 5 5 】

50

10

20

30

40

このようにして、pLANT042を基本ベクターとして用いて、418種類のmutAバリアントのプラスミドライブラーをそれゆえ構築した。指定のアミノ酸変化をもたらすような単一のコドン変異を418種類のベクターそれぞれのデザインに含有させて、mutAバリアントライブラーを、アドレス指定可能な方式で構築した。418種類のバリアントそれぞれのコドン変化の確認は、DNAシークエンシングによって確かめた。

【0156】

MU1140バリアントの生産のレベルと一致性とを向上させるため、同様のゲノム組込みストラテジーを用いて、複数部位mutAバリアントも構築した。

【0157】

実施例2

10

MU1140 単一および複数部位バリアントの非正規化試験

工学的に作製されたS.ミュータンスmutAバリアント株が抗微生物活性のMU1140バリアントを生産するか否かを決定するために、まず、MU1140感受性抗生物標示株であるミクロコッカス・ルテウス(*Micrococcus luteus*)272に対し透明域を形成を誘導する能力について、mutAバリアント株の培養上清を試験した。

【0158】

ハイスループット(HTP)成長

1mLのTSYEX(3%トリプシン消化大豆プロスおよび0.3%酵母抽出物)および3μg/mLエリスロマイシンを含有する2.2mLの96ウェル深底プレート内に、S.ミュータンスのコロニーを拾った。プレートを攪拌せずに、微好気的に37で一晩成長させた。900μLのGhobrial発現培地(5%酵母抽出物、4%グルコース、0.1%CaCl₂、100mMビス-トリス緩衝液pH6.7; Ghobrial、2008)を含有する2.2mLの96ウェル深底プレートに、100(100)μLの一晩培養物を移し入れた。発現プレートを多孔性シールで密封し、37、900rpmで20時間攪拌した。細胞培養物を3220×gで10分間遠心分離し、ミクロコッカス・ルテウスバイオアッセイでの試験用に上清を除去した。S.ミュータンス株の一晩TSYEX培養物を25%グリセロール(終体積)で希釈して-80でインキュベーションすることによって、冷凍庫ストックを構築した。

20

【0159】

ミクロコッカス・ルテウスHTPバイオアッセイ

M.ルテウス(ATCC寄託番号:272)をLB寒天プレート上に筋状に付け、30で48時間成長させ、次いで、5mLのLBプロスを14mL培養チューブに移した。M.ルテウス細胞を、プレート培養物から接種し、振盪器中250rpm、30で一晩成長させた。細胞を、250mL三角フラスコ中、50mL体積のLBプロスを用いて1:100に希釈し、30で2時間成長させた。続いて、M.ルテウス細胞を3220×gで5分間遠心分離し、5mLの新鮮LBに再懸濁し、45溶融の125mLの軟栄養寒天(5g/L Bacto寒天、8g/L Difco栄養プロス)中にOD6000.1で接種類して、QTray(Genetix)中に注ぎ入れた。クリーンベンチ(laminar flow hood)内で蓋を取り、QTrayを30分間乾燥した。96本の金属ピンヘッドを取り付けたQPIX(商標)450格子口ボットを使用し、150μLの培地を含有する96ウェルソースプレート(GreinerのU字浅底)からQTrayへ、各バリアントのスポットを10回反復した。QTraysを30で一晩インキュベーションし、EPSON(登録商標)Expression 10,000XL光学スキャナーを用いて画像化した。透明域を、SM152('1'を標示)以下の活性およびSM152を超える活性('2'を標示)としてスコア化した。

40

【0160】

MU1140 単一部位バリアント(エピソームプラスミド上で発現)の結果

S.ミュータンス株の一晩成長物から得られた非正規化培養上清を使用したM.ルテウス透明域アッセイを用いて、MU1140バリアント生産株を抗微生物活性の向上につい

50

て評価した（表2）。S.ミュータンス株JH1140とSM152の両方では、均一な（ウェル間およびプレート間）透明域が、観察された。S.ミュータンスSM152株（mutA不变）およびバリアント生産mutAバリアント株は、pLAN126ベースの組込みベクター由来のmutA' mutB遺伝子間領域にエリスロマイシン耐性遺伝子を含有する（図3）。SM152 mutA不变株の妥当性確認の間、エリスロマイシン耐性カセットの挿入によって、観察された活性域のサイズに、親株JH1140で観察された活性域のサイズと比べて均一な機能獲得の向上が引き起こされたことが見出された（表2）。観察された抗微生物活性の増加は、上流のmutAA'または下流のmutBCDPTのオペロンの高レベルの発現をもたらす調節領域の調節解除に起因する可能性がある。このアッセイにおける透明域のサイズの変化は、特異的な抗微生物活性、安定性、力価、および／もしくは拡散性、またはそのような要因の組合せの増加に起因した可能性があった。

【0161】

続いて、1箇所以上のアミノ酸位置の変異がM.ルテウス透明域アッセイにおける性能の向上をもたらすか否かを決定するために、複数部位MU1140バリアント生産株を試験した（表3）。供試した複数部位バリアントは、SM152ならびに単アミノ酸バリアント株F1IおよびF1Lよりも大きな透明域を示し、このことは、特異的な抗微生物活性、安定性、力価、および／もしくは拡散性、またはそのような要因の組合せの増加があった可能性を標示している。

【表3】

10

20

表2：M.ルテウス透明域アッセイで検出された透明域の非正規化サイズ スコア1（1）は、親株JH1140によって生じた透明域のサイズを示す。スコア2（2）は、JH1140を超えてサイズの大きな透明域を示す。最低二つの独立した実験で株を再現した。

バリエント	透明域1	透明域2
JH1140 (wt)	1	1
SM152	2	2
F1I	2	2
F1L	2	2
R13N	2	2
F17I	2	2
F17L	2	2
N18A	2	2
Y20F	2	2

30

【表4】

表3：M. ルテウス透明域アッセイで検出された透明域の非正規化サイズ スコア1（1）は、対照株SM152によって生じた透明域のサイズを示す。スコア2（2）は、SM152を超えてサイズの大きな透明域を標示する。最低二つの独立した反復実験で株を再現した。

パリアント	透明域1	透明域2	
SM152	1	1	
F1I	1	1	
F1L	1	1	
F1A R13A	2	2	10
F1A R13V	2	2	
F1A R13G	2	2	
F1A R13N	2	2	
F1A R13S	2	2	
F1G R13A	2	2	
F1G R13G	2	2	
F1G R13N	2	2	
F1G R13V	2	2	
F1H R13N	2	2	
F1I R13A G15A	2	2	20
F1I R13D G15A	2	2	
F1I R13N G15A	2	2	
F1I W4I R13A	2	2	
F1I W4I R13D	2	2	
F1I W4M R13A	2	2	
F1I W4M R13N	2	2	
F1I K2A R13A	2	2	
F1I K2A W4K R13A	2	2	
F1I K2A W4K R13D	2	2	
F1I K2A W4K R13A Y20F	2	2	
F1I L6V R13A	2	2	30
F1I R13A	2	2	
F1I R13A Y20F	2	2	
F1I R13D	2	2	
F1I R13D Y20F	2	2	
F1I R13G	2	2	
F1I R13I	2	2	
F1I R13N	2	2	
F1I R13N Y20F	2	2	
F1I R13P	2	2	
F1I R13Q	2	2	40

F1I R13S	2	2	
F1I R13V	2	2	
F1I R13E	1	1	
F1L R13A	2	2	
F1L R13A Y20F	2	2	
F1L R13D	2	2	
F1L R13G	2	2	
F1L R13N	2	2	
F1L R13P	2	2	
F1L R13Q	2	2	
F1L R13N Y20F	2	2	
F1L R13D Y20F	2	2	
F1S R13N	2	2	
F1T R13A	2	2	
F1T R13G	2	2	
F1T R13N	2	2	
F1T R13V	2	2	
F1V R13A	2	2	
F1V R13N	2	2	
F1V R13Q	2	2	
F1V R13D	2	2	
F1V R13P	2	2	
F1V R13V	2	2	
F1Y R13D	2	2	
F1Y R13G	2	2	

10

20

30

40

【0162】

アドレス指定可能な418種類のmutAバリアントライブラーを形質転換した後、mutAバリアント当たり二つのS.ミュータンスSM126 mutAA' pLA N042バリアントクローンを拾い、発現し、抗微生物活性を分析した（下記の表4のプレート1～6を参照）。陽性対照のSM126 mutAA' pLAN042および陰性対照のSM126 mutAA' pMK4（空ベクター）を用いた各バリアント生産株について透明域のサイズを定性的に比較することによって、データを解釈した。41（41）種類のバリアントが、2クローンのうち少なくとも一つについて、陽性対照よりも大きな抗微生物活性を示した（表4）。73（73）種類のバリアントが、2クローンのうち少なくとも一つについて、対照と等しい抗微生物活性を示した。83（83）種類のバリアントが、陽性対照よりも少ない活性を示したが、検出可能な透明域を依然として生成した。221（221）種類のバリアントが、供試されたどちらのクローンでも、検出可能な透明域を生成しなかった。

【0163】

このプラスミド媒介性相補系を用いて、クローン間および実験間でバリエーションが観察され、それは、各96ウェルプレート実験に含まれた対照が、検出可能な抗微生物活性がないものから対照よりも大きな抗微生物活性があるものまで大幅なバリエーションを示した通りであった（表5）。実験的なエラー源としてのpLAN042プラスミドのDNA変異を除外するために、個々のクローンをスポットシーケンシングした。

【表5】

表4 (プレート1) : MU1140バリエントによって生成された透明域

ウェル	変異	Mルテウスの透明域 コロニー1	Mルテウスの透明域 コロニー2	ウェル	変異	Mルテウスの透明域 コロニー1	Mルテウスの透明域 コロニー2
A01	F1K	1	1	E01	F1L	3	2
A02	F1N	2	3	E02	F1Q	1	1
A03	F1R	2	2	E04	K2N	2	2
A04	K2A	2	2	E05	K2R	0	0
A05	K2P	0	0	E06	S3W	0	0
A06	K2T	0	0	E07	S3D	0	0
A07	S3M	0	0	E08	S3T	1	0
A08	S3G	0	0	E09	W4Y	2	1
A10	W4Q	1	1	E10	W4I	0	3
A11	S5V	0	0	E11	S5C	0	0
A12	S5D	0	0	E12	S5G	1	0
B01	F1V	3	3	F01	WT	2	2
B02	F1Y	2	1	F02	WT	2	2
B03	F1H	3	2	F03	WT	2	2
B04	K2L	2	1	F04	WT	2	2
B05	K2Q	2	1	F05	WT	2	2
B06	K2I	2	2	F06	WT	2	2
B07	S3C	0	0	F07	pMK4	0	0
B08	S3R	0	0	F08	pMK4	0	0
B09	W4M	3	3	F09	pMK4	0	0
B10	W4F	3	3	F10	pMK4	0	0
B11	S5W	0	2	F11	pMK4	0	0
B12	S5P	0	0	F12	pMK4	0	0
C01	F1W	0	1	G01	F1M	2	3
C02	F1D	0	0	G03	K2V	0	2
C03	F1S	3	3	G04	K2Y	0	1
C04	K2M	2	2	G05	K2H	1	2
C05	K2F	2	2	G06	S3A	0	0
C06	S3K	0	0	G07	S3P	0	0
C07	S3N	0	0	G08	W4K	1	1
C08	S3H	0	0	G09	W4P	0	0
C09	W4C	0	0	G10	S5K	0	0
C10	W4R	0	1	G11	S5N	1	0
C11	S5A	0	2	G12	S5R	0	0
C12	S5Q	1	2	H01	F1C	1	0
D01	F1A	3	1	H02	F1G	2	3
D02	F1P	3	2	H03	K2W	1	0

10

20

30

40

D03	F1T	2	3	H04	K2D	1	0
D04	K2C	1	2	H05	K2S	1	2
D05	K2G	1	0	H06	S3L	1	0
D06	S3V	0	0	H07	S3F	0	0
D07	S3Y	0	0	H08	W4V	0	2
D09	W4N	1	0	H09	空		
D10	W4H	3	2	H10	空		
D11	S5L	1	2	H11	空		
D12	S5F	1	0	H12	空		

層域を、0（透明域なし）、1（陽性対照よりも小さな透明域）、2（陽性対照と同じ透明域）、または3（陽性対照よりも大きな透明域）としてスコア化した。

【 0 1 6 4 】

【表6】

表4 (プレート2) : MU1140バリエントによって生成された透明域

ウェル	変異	Mルテウスの透明域 コロニー1	Mルテウスの透明域 コロニー2	ウェル	変異	Mルテウスの透明域 コロニー1	Mルテウスの透明域 コロニー2
A01	S5H	3	2	E01	L6W	3	1
A02	L6C	0	1	E02	L6P	0	1
A03	L6G	0	1	E03	L6I	0	2
A04	C7W	0	1	E04	C7D	0	0
A05	C7F	0	0	E05	C7S	0	0
A06	T8K	0	0	E06	T8L	0	0
A07	T8N	0	0	E07	T8Q	0	0
A08	T8R	0	0	E08	T8I	0	0
A09	P9A	0	0	E09	P9D	1	1
A10	P9F	0	0	E10	P9T	2	0
A11	G10K	0	0	E11	G10C	1	1
A12	G10Y	0	0	E12	G10F	1	1
B01	S5T	2	0	F01	WT	2	2
B02	L6N	2	2	F02	WT	2	2
B03	L6R	2	0	F03	WT	2	2
B04	C7A	1	0	F04	WT	2	2
B05	C7G	0	0	F05	WT	2	2
B06	T8V	0	0	F06	WT	2	2
B07	T8Y	0	1	F07	pMK4	0	0
B08	T8H	0	1	F08	pMK4	0	0
B09	P9L	0	1	F09	pMK4	0	0
B10	P9R	0	1	F10	pMK4	0	0
B11	G10V	0	0	F11	pMK4	0	0
B12	G10D	0	1	F12	pMK4	0	0
C01	S5I	2	0	G01	L6A	2	2
C02	L6Y	2	0	G02	L6Q	3	0
C03	L6H	2	2	G03	C7K	1	0
C04	C7L	0	1	G04	C7P	2	0
C05	C7R	0	2	G05	C7T	0	0
C06	T8W	0	1	G06	T8M	0	2
C07	T8D	0	1	G07	T8F	0	0
C08	T8S	2	2	G08	P9V	1	0
C09	P9M	1	2	G09	P9Q	0	1
C10	P9H	2	2	G10	P9I	0	1
C11	G10L	1	1	G11	G10N	0	1

10

20

30

40

C12	G10P	1	1	G12	G10R	0	1
D01	L6V	2	0	H02	L6F	1	1
D02	L6D	1	0	H03	C7V	1	0
D03	L6T	2	3	H04	C7Q	1	0
D04	C7M	0	2	H05	C7I	0	0
D05	C7H	0	1	H06	T8C	0	0
D06	T8A	0	2	H07	T8G	0	0
D07	T8P	0	1	H08	P9W	0	0
D09	P9N	1	2	H09	空		
D10	P9S	0	1	H10	空		
D11	G10M	0	1	H11	空		
D12	G10Q	0	1	H12	空		

層域を、0（透明域なし）、1（陽性対照よりも小さな透明域）、2（陽性対照と同じ透明域）、または3（陽性対照よりも大きな透明域）としてスコア化した。

【表7】

表4（プレート3）：MU1140バリアントによって生成された透明域

ウェル	変異	Mルテウス 透明域: コ ロニ-1	Mルテウス 透明域: コロ ニ-2	ウェル	変異	Mルテウス 透明域: コロ ニ-1	Mルテウス 透明域: コ ロニ-2
A01	C21N	0	0	E01	C21Q	0	1
A02	C21R	1	0	E02	C21I	2	0
A03	C22W	0	0	E04	C22I	0	0
A04	C22F	0	0	E05	C7E	0	0
A05	S3E	0	0	E06	G15E	0	1
A06	G10E	0	0	E07	C22E	0	1
A07	N18E	0	0	E08	S5Y	2	0
A08	W4D	0	0	E09	P9C	2	1
A09	L6M	2	2	E10	G10I	2	1
A10	P9G	0	0	E11	R13V	1	1
A11	A12C	0	0	E12	G15A	1	3
B01	C21Y	0	0	F01	WT	2	2
B02	C21H	0	0	F02	WT	2	2
B03	C22A	0	0	F03	WT	2	2
B04	C22R	0	0	F04	WT	2	2
B05	W4E	0	0	F05	WT	2	2
B06	C11E	2	3	F06	WT	2	2
B07	S19E	0	0	F07	pMK4	0	0
B08	W4G	0	0	F08	pMK4	0	0
B09	L6S	1	1	F09	pMK4	0	0
B10	G10W	1	0	F10	pMK4	0	0
B11	A12P	1	1	F11	pMK4	0	0
B12	R13T	1	2	F12	pMK4	0	0
C01	C21D	0	1	G01	C21F	0	0
C02	C21S	0	1	G02	C22K	0	0
C03	C22L	1	0	G03	C22D	0	1
C04	C22S	0	0	G04	F1E	0	1
C05	S5E	0	0	G05	T8E	0	1
C06	R13E	0	3	G06	S16E	0	0
C07	Y20E	1	1	G07	S3Q	0	0
C08	W4S	0	1	G09	P9Y	1	0
C09	C7N	0	0	G10	C11A	2	3
C10	G10A	1	1	G11	R13N	2	1
C11	A12G	2	1	G12	G15D	1	0
C12	G15K	1	0	H01	C21G	0	2

10

20

30

40

D01	C21P	1	0	H02	C22V	0	0
D02	C21T	0	2	H03	C22P	0	0
D03	C22M	2	0	H04	K2E	2	3
D04	C22T	0	0	H05	P9E	1	2
D05	L6E	0	1	H06	F17E	1	0
D06	T14E	0	2	H07	W4L	1	3
D07	C21E	0	1	H08	L6K	0	0
D08	S5M	2	2	H09	空		
D09	P9K	1	2	H10	空		
D10	G10S	2	1	H11	空		
D11	A12T	1	3	H12	空		
D12	G15W	1	0				

層域を、0（透明域なし）、1（陽性対照よりも小さな透明域）、2（陽性対照と同じ透明域）、または3（陽性対照よりも大きな透明域）としてスコア化した。

【表8】

表4 (プレート4) : MU1140バリエントによって生成された透明域

ウ エル	変異	Mルテウス 透明域: コ ロニー1	Mルテウス 透明域: コ ロニー2	ウ エル	変異	Mルテウス 透明域: コ ロニー1	Mルテウス 透明域: コ ロニー2
A01	G10H	0	0	E01	C11W	0	0
A02	C11N	0	0	E02	C11Q	2	0
A03	C11R	0	0	E03	C11I	0	0
A04	A12W	0	0	E04	A12N	0	0
A05	A12Q	0	0	E05	A12S	0	0
A06	R13W	1	0	E06	R13C	0	0
A07	R13Q	0	0	E07	R13S	2	3
A08	T14A	0	0	E08	T14N	0	0
A09	T14P	0	0	E09	T14R	0	0
A10	T14S	0	0	E10	G15C	0	0
A11	G15Y	0	0	E11	G15H	0	0
A12	G15T	0	0	E12	S16A	0	0
B01	G10T	0	0	F01	WT	2	2
B02	C11Y	0	0	F02	WT	2	2
B03	C11H	0	0	F03	WT	2	2
B05	A12F	0	0	F04	WT	2	2
B06	R13A	2	0	F05	WT	2	2
B07	R13F	0	3	F06	WT	2	2
B08	T14L	0	0	F07	pMK4	0	0
B09	T14Q	2	0	F08	pMK4	0	0
B10	G15V	0	0	F09	pMK4	0	0
B11	G15P	0	0	F10	pMK4	0	0
B12	S16K	0	0	F11	pMK4	0	0
C01	C11K	0	0	F12	pMK4	0	0
C02	C11D	0	0	G01	C11L	0	0
C03	C11S	0	0	G02	C11F	0	0
C04	A12L	0	0	G03	A12K	0	0
C05	A12R	0	0	G04	A12Y	0	0
C06	R13L	0	0	G05	A12I	0	0
C08	T14M	0	0	G06	R13Y	0	0
C09	T14F	0	0	G07	R13I	0	0
C10	G15L	0	0	G08	T14Y	0	0
C11	G15Q	0	0	G09	T14H	0	0
C12	S16V	0	0	G10	G15N	2	3

10

20

30

40

D01	C11V	0	0	G11	G15S	2	3
D02	C11P	0	0	G12	S16L	0	0
D03	C11T	0	0	H01	C11M	0	0
D04	A12M	0	0	H02	C11G	2	0
D05	A12H	0	0	H03	A12V	2	0
D06	R13M	0	0	H04	A12D	2	0
D07	R13H	0	0	H05	R13K	0	0
D08	T14C	0	0	H06	R13P	0	0
D09	T14G	0	0	H07	T14K	0	0
D10	G15M	0	0	H08	T14D	0	0
D11	G15F	0	0	H09	空		
D12	S16W	0	0	H10	空		
				H11	空		
				H12	空		

層域を、0（透明域なし）、1（陽性対照よりも小さな透明域）、2（陽性対照と同じ透明域）、または3（陽性対照よりも大きな透明域としてスコア化した。)

【表9】

表4 (プレート5) : MU1140バリエントによって生成された透明域

ウェル	変異	Mルテウス 透明域 コロ ニ-1	Mルテウス 透明域 コロ ニ-2	ウェル	変異	Mルテウス 透明域 コロ ニ-1	Mルテウス 透明域 コロ ニ-2
A01	S16M	0	0	E01	S16D	0	0
A02	S16G	0	0	E02	S16I	0	0
A03	F17W	0	0	E03	F17Y	2	3
A04	F17Q	2	0	E04	F17S	0	0
A05	N18V	0	0	E05	N18M	0	0
A06	N18D	0	0	E06	N18G	0	0
A07	N18T	0	0	E07	S19C	0	0
A08	S19D	0	0	E08	S19G	0	0
A09	S19S	1	2	E09	Y20W	0	0
A10	Y20M	1	2	E10	Y20D	0	0
A11	Y20F	3	3	E11	Y20S	0	0
A12	Y20I	1	0	E12	C21L	1	0
B01	S16C	0	0	F01	WT	2	2
B02	S16R	0	0	F02	WT	2	2
B03	F17L	2	0	F03	WT	2	2
B05	N18W	0	0	F04	WT	2	2
B06	N18P	0	0	F05	WT	2	2
B07	S19V	0	0	F06	WT	2	2
B08	S19P	0	0	F07	pMK4	0	0
B09	S19T	0	0	F08	pMK4	0	0
B10	Y20C	0	0	F09	pMK4	0	0
B11	Y20G	0	0	F10	pMK4	0	0
B12	C21V	2	0	F11	pMK4	0	0
C01	S16N	0	0	F12	pMK4	0	0
C02	S16H	0	0	G01	S16P	0	0
C03	F17C	0	0	G02	F17K	0	0
C04	F17G	0	0	G03	F17D	0	0
C05	N18A	2	0	G04	F17T	2	0
C06	N18Q	0	0	G05	N18C	0	0
C07	S19A	0	0	G06	N18H	0	0
C08	S19Q	0	0	G07	S19N	0	0
C09	Y20K	0	0	G08	S19R	0	0
C10	Y20N	0	0	G09	Y20L	2	0
C11	Y20R	0	0	G10	Y20Q	0	0
C12	C21W	0	0	G11	Y20T	0	0

10

20

30

40

D01	S16Y	2	0	G12	C21M	0	0
D02	S16T	0	0	H01	S16Q	0	0
D03	F17N	0	0	H02	F17V	0	0
D04	F17H	2	3	H03	F17P	0	0
D05	N18L	0	0	H04	F17I	2	0
D06	N18F	0	0	H05	N18Y	0	0
D07	S19M	0	0	H06	N18S	0	0
D08	S19F	0	0	H07	S19Y	0	0
D09	Y20V	0	0	H08	S19H	0	0
D11	Y20H	0	0	H09	空		
D12	C21A	0	0	H10	空		
				H11	空		
				H12	空		

層域を、0（透明域なし）、1（陽性対照よりも小さな透明域）、2（陽性対照と同じ透明域）、または3（陽性対照よりも大きな透明域）としてスコア化した。

【表10】

表4 (プレート6) : MU1140バリエントによって生成された透明域

ウェル	変異	Mルテウス 透明域 コロ ニ-1	Mルテウス 透明域 コロ ニ-2	ウェル	変異	Mルテウス 透明域 コロ ニ-1	Mルテウス 透明域 コ ロニ-2
A01	G15R	0	0	E01	F17A	3	0
A02	N18K	0	0	E02	S19W	0	0
A03	Y20A	1	0	E03	C22Q	0	0
A04	A12E	0	2	E04	R13G	0	0
A05	T14I	0	0	E05	空	0	0
A06	R13Q	1	3	E06	空	0	0
A07	T14P	0	3	E07	空	0	0
A08	T14S	2	0	E08	空	0	0
A09	G15Y	0	0	E09	空	0	0
A10	G15P	0	0	E10	空	0	0
A11	S16K	0	0	E11	空	0	0
A12	R13L	3	3	E12	空	0	0
B01	G15I	2	2	F01	WT	2	2
B02	N18R	0	0	F02	WT	2	2
B03	C21K	0	0	F03	WT	2	2
B04	S3I	0	0	F04	WT	2	2
B05	Y20P	0	0	F05	WT	2	2
B06	C11V	0	0	F06	WT	2	2
B07	R13M	0	0	F07	pMK4	0	0
B08	A12I	0	0	F08	pMK4	0	0
B09	T14H	2	1	F09	pMK4	0	0
B11	C21M	0	1	F10	pMK4	0	0
B12	空	0	0	F11	pMK4	0	0
C01	S16F	0	0	F12	pMK4	0	0
C02	N18I	0	1	G01	F17M	3	0
C03	C22N	0	1	G02	S19L	0	0
C04	W4T	1	0	G03	C22G	0	0
C05	空	0	0	G04	T14V	0	0
C06	空	0	0	G05	空	0	0
C07	空	0	0	G06	空	0	0
C08	空	0	0	G07	空	0	0
C09	空	0	0	G08	空	0	0
C10	空	0	0	G09	空	0	0
C11	空	0	0	G10	空	0	0

10

20

30

40

C12	空	0	0	G11	空	0	0
D02	S19K	0	0	G12	空	0	0
D03	C22Y	0	0	H01	F17R	3	2
D04	C7Y	0	0	H02	S19I	0	0
D05	空	0	0	H03	C22H	0	0
D06	空	0	0	H04	T14W	0	0
D07	空	0	0	H05	空	0	0
D08	空	0	0	H06	空	0	0
D09	空	0	0	H07	空	0	0
D10	空	0	0	H08	空	0	0
D11	空	0	0	H09	空	0	0
D12	空	0	0	H10	空	0	0
				H11	空	0	0
				H12	空	0	0

層域を、0（透明域なし）、1（陽性対照よりも小さな透明域）、2（陽性対照と同じ透明域）、または3（陽性対照よりも大きな透明域）としてスコア化した。

10

【表11】

20

表5：異なる96ウェルプレートおよびウェル中で成長させた同一のジェノタイプによる、M.ルテウスの透明域サイズに観察された不一致性

プレート1	G02	F1F	1	2
プレート1	D08	S3S	2	0
プレート3	G08	S5S	3	2
プレート2	H01	L6L	1	1
プレート2	D08	T8T	0	1
プレート4	B04	A12A	0	0
プレート4	C07	R13R	0	0
プレート6	D01	S16S	1	0
プレート5	B04	F17F	0	3
プレート5	A09	S19S	1	2
プレート5	D10	Y20Y	0	0
プレート3	E03	C22C	1	0

30

40

【0165】

50

418種類のmutAバリアントを含有する飽和スキャニング変異ライブラリーを構築および試験することによって、感受性標示微生物（すなわちM.ルテウス）に対する抗微生物活性の向上をもたらすバリアントをスクリーニングするために、MU1140アミノ酸配列を偏りなくサンプリングすることが可能になる。この研究に使用されるmutAバリアントプラスミド発現系は、抗微生物活性の差次的な変化を決定するには充分な堅牢性がないことがあり、それは、このプラスミドベースの系を用いて実験的なバリエーションが観察された通りである。プラスミドベースのmutA発現に由来する抗微生物活性のレベルは低く、一致性がなく、タンパク質生産のレベルに対して正規化されていなかった（例えば表5を参照）。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、表1に明示されるある種類のMU1140バリアントは、これらのバリアントがS.ミュータンスSM126宿主細胞を著しく阻害するかまたは死滅させ得るほどに高いレベルの抗生物／抗微生物活性を有する可能性があるものと、出願人は想定している。

10

【0166】

合計で41種類のmutAバリアントが、供試された2クローンのうち少なくとも一つについて、陽性対照株（すなわちSM126 mutAA'）よりも大きな透明域を生成し、このことは、MU1140ポリペプチドの22箇所のあり得るアミノ酸位置のうち12箇所を表す。下記の実施例2に明示されているように、mutAバリアントのゲノム組込みを、MU1140バリアント生産のレベルおよび一致性を向上させるための代替の発現ストラテジーとして選択した。

20

【0167】

MU1140単一部位バリアント（染色体内に安定的に組み込まれている）の結果

418種類のMU1140バリアントの第1世代ライブラリーを構築し、S.ミュータンス中で試験し（実施例1を参照）、その結果、M.ルテウスに対するすなわち生来の（野生型）MU1140に比べて]等しいかまたは向上した抗微生物活性を示す、114種類のバリアントが検出された。114種類のMU1140バリアント生産株のうち58メンバーのサブセットを、S.ミュータンス染色体上のmutA遺伝子座に部位特異的に組み込むように設計したベクターを用いて再構築し、生来のmutAのコピーを置き換えた。M.ルテウスに対する抗微生物活性の向上に基づき、58種類のMU1140バリアントを選択した。図6を参照されたい。

30

【0168】

58種類のMU1140バリアント生産株を、抗微生物活性の向上について、S.ミュータンス株の一晩成長物から得られた非正規化培養上清を使用したM.ルテウス透明域アッセイを用いて評価した。S.ミュータンス株のJH1140およびSM152の両方について、一致性のある（ウェル間およびプレート間）透明域が観察された。陽性対照（SM152株）よりも大きな透明域を生成した26（26）種類の異なるバリアントを発現する株を、さらに進んだ分析のために特定した。追加の15種類のバリアントを発現する株（対照株SM152と同様のまたはそれよりも小さな透明域を有する）を特定したが、このことは、新規のおよび／または充分に表されていないアミノ酸位置があることを表す。合計で41バリアントを、さらに進んだ分析のために、抗微生物活性と位置多様性の基準に基づき特定した（表6）。

40

【表12】

表6：非正規化透明域のサイズおよび／または位置の多様性に基づくさらに進んだ解析のために選択された株

透明域		
SM152 よりも大きい	SM152 と同様	SM152 よりも小さい
F1A	F1N	W4V
F1I	F1L	S5M
F1S	K2I	P9H
F1T	K2M	C11E
F1Y	S5A	
K2A	L6H	
K2E	L6N	
K2N	L6V	
K2Q	C11A	
W4A	R13S	
W4F	Y20F	
W4Y		
L6A		
L6T		
C11G		
R13A		
R13D		
R13L		
R13N		
R13Q		
R13T		
G15N		
G15S		
F17L		
F17Y		
N18A		

10

20

30

40

【0169】

実施例3

生来のMU1140およびMU1140バリアントの質量スペクトル

質量分析を使用し、S. ミュータンス JH1140 中で mutA 遺伝子のコドン置換を用いて生産された MU1140 バリアントの同一性を確かめた。MU1140 の公表されている 2,266 ダルトン (Da) の分子量 (Chen et al., Microbiology, 1997, 141, 2013) に基づき、特異的なアミノ酸残基の分子量を差し引いて、置き換えたアミノ酸残基の分子量を加え、適切であれば環加水分解 (18 Da) または 2,3-ジデヒドロアラニン (DHA) 置換 (2 Da) につき調整することによって、各バリアントの理論分子量を算出した。

【0170】

結果

標準的な方法を用いて LC - MS によって、複数部位コドン MU1140 バリアントを

50

個別に解析した。単一部位バリアントおよび複数部位バリアントについての結果を、表7および表8にそれぞれ示す。

【表13】

表7：単一部位MU1140バリアントの質量スペクトル分析

変異	LC-MS の保持時間	MW の計算値	MS 分析による MW
F1I	2.26	2232	2231.1
F1L	2.29	2232	2230.5
R13N	2.63	2223.9	2223
F17L	2.35	2232	2230.8
F17Y	2.16	2282	2280.6
N18A	2.42	2223	2220
Y20F	2.53	2268	2248.2

10

20

【表14】

表8：複数部位MU1140バリアントの質量スペクトル分析

類似体	MW の計算値	質量の測定値(モノアイソトピック)	LC-MS の保持時間 (分) ¹
F1I	2232	2231	16.06
F1A R13A	2104.8	2102.8	16.94
F1I R13D	2190.9	2189.9	17.58
F1T R13G	2120.8	2119.8	16.78
F1L R13D	2190.9	2188.9	17.73
F1I R13N	2189.9	2187.9	17.23
F1I R13N G15A	2203.9	2201.9	17.51
F1I W4M R13A	2091.9	2089.9	16.51
F1I R13A	2146.9	2144.9	17.58
F1L R13N	2189.9	2187.9	17.35
F1L R13A	2146.9	2144.9	17.68
F1S R13N	2163.8	2161.9	16.45
F1V R13N	2175.8	2173.9	16.93
F1G R13N	2133.8	2131.8	16.42
F1I R13N Y20F	2173.9	2171.9	17.91

30

40

【0171】

バリアントの分子量は、分子量の計算値に2.0ダルトン以内で一致することが見出された。分子量の実験値と計算値との間の一一致は、S.ミュータンスで工学的に作製されたようなバリアントの生産を確定するものである。

【0172】

50

実施例 4MU1140 バリアントの治療特性スケールアップおよび精製

S. ミュータンス株を、1 L攪拌フラスコまたは1 L発酵槽中で成長させた。清澄にした培養上清を、クロロホルム抽出を用いて回収し [Chen et al. Microbiology, 79 (13), 4015-23, 2013]、フラッシュクロマトグラフィーを用い、標準的な手法を用いて280 nmでの吸光度に基づき90%超の純度に精製した。バリアントを凍結乾燥して乾燥状態とし、乾燥重量およびUPLCによって定量し、次いで、C.ディフィシルMICおよび擬似腸液安定性アッセイを用いて活性をアッセイした。

10

【0173】

動物モデルにおけるMU1140バリアントの性能の追跡試験では、処置当たり200 mg超の純粹なバリアントが必要であった。選ばれたバリアントを、5 L発酵槽にスケールアップし、2段階のクロマトグラフィー精製を用いて、280 nmでの吸光度に基づき90%超の純度に精製した。

【0174】C.ディフィシルMICアッセイ

最小阻害濃度(MIC)評価は、嫌気性のヒト胃腸病原体クロストリジウム・ディフィシルを用いて実施した。バクテロイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)感受性試験用のCLSI M11-A8プロス希釈法の改変を、C.ディフィシルに使用した。[Methods for Dilution In Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-eighth Edition. CLSI document M07-A8 (ISBN 1-56238-689-1). Vol. 29 No. 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2009]。試験では、バンコマイシンおよびMU1140バリアントのMICを決定し、このMICは、プロス培地中、目に見える細菌の成長を完全に防止する抗微生物剤の最低濃度として規定した。C.ディフィシルを、血液寒天プレート上に筋状に付けて、嫌気性条件下でインキュベーションした。バンコマイシンおよびMU1140バリアントを、溶解して、100%DMSOにより2倍希釈物に希釈した。C.ディフィシル株を(選択した単一および/または複数部位バリアントについてはATCC 9689、BAA-1805、ATCC 70057、ATCC 43596、ATCC 43255、BI1、およびBAA-1875を、選択した複数部位バリアントについてはUNT103-1、UNT107-1、ATCC BAA-1874、ATCC 43597、およびATCC BAA-1808を)、64から0.0625 µg/mLまでの2倍順次希釈による11通りのバノマイシンまたはMU1140バリアントの濃度で、それぞれ試験した。各希釀物の4 µLのアリコートを、96ウェルプレートのウェル中、被験株を含む196 µLの強化クロストリジウム培地(RCM)に添加した。終体積を各ウェル200 µLとした。アッセイプレートをビニール袋で緩く覆い、C.ディフィシルを嫌気性条件下、36度46~48時間インキュベーションし、次いで可視的に調べて、成長もしくは濁りの阻害には陽性(+)を、または成長もしくは濁りに効果のないものには陰性(-)を、スコア付けした。

20

【0175】他のグラム陽性および抗酸性の微生物に対するMICアッセイ

複数の他のグラム陽性微生物およびマイコバクテリウム・フレイ(Mycobacterium phlei)(抗酸性生物)に対する最小阻害濃度(MIC)の評価を、CLSI(CLSI文書M07-A8)に記載されているプロス希釈アッセイにより行った。単一部位バリアントを、3種類のバンコマイシン耐性のエンテロコッカス[VRE; 2種類のエンテロコッカス・フェカリス株(ATCC 51575およびATCC 51299

30

40

50

)、1種類のエンテロコッカス・フェシウム株 (ATCC 700221)]、5種類のスタフィロコッカス・アウレウス株 (ATCC 29213、19636、33591、700699、およびBAA-1717)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (ATCC 700675)、ならびにマイコバクテリウム・フレイ (ATCC 11758) に対して供試した。複数部位バリエントを、3種類のVRE株 [2種類のエンテロコッカス・フェカリス株 (CCUG 47775およびATCC 700221)、1種類のエンテロコッカス・フェシウム株 (ATCC 700221)]、クロストリジウム・シンデンス (*Clostridium scindens*) (ATCC 35704)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) (ATCC 15700)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) (CCUG 4356)、ペプトストレプトコッカス・アナエロビウス (*Peptostreptococcus anaerobius*) (ATCC 27337)、ならびにエガセラ・レンタ (*Eggerthella lenta*) (ATCC 27337) に対して供試した。各株に対する試料および標準参照剤（適用可能である場合にはリネゾリド、アンピシリン、ゲンタマイシン、バンコマイシン）を、100%DMSOに溶解して希釈し、4 µLを、被験生物を播種した196 µLのプロスと共に、96ウェルプレートにウェル当たりに添加した。試料を64から0.0625 µg/mLまでの11通りの濃度で供試した。アッセイプレートをビニール袋で緩く覆い、エンテロコッカス属、S.アウレウス、M.フレイ、およびP.エルギノーザを好気性条件下で、S.ニューモニエ、C.シンデンス、B.ブレーベ、L.アシドフィルス、P.アナエロビウス、およびE.レンタを5% CO₂下で、36度20~24時間インキュベーションし、次いで可視的に調べて、成長もしくは濁りの阻害には陽性(+)を、または成長もしくは濁りに効果のないものには陰性(-)を、スコア付けした。

【0176】

グラム陰性 (H. pylori を含む) に対するMIC

シュードモナス・エルギノーザ（グラム陰性細菌）に対する最小阻害濃度（MIC）の評価を、単一部位バリエントについて、CLSI (CLSI文書M07-A8) に記載されているプロス希釈アッセイにより行った。試料およびオフロキサシン対照を、100%

DMSOに溶解して順次希釈し、4 µLを、P.エルギノーザの播種された196 µLのカチオン調整ミューラーヒントンIIプロスと共に、96ウェルプレートにウェル当たり添加した。化合物を64から0.0625 µg/mLまでの11通りの濃度で供試した。アッセイプレートをビニール袋で緩く覆い、36度（好気性条件）で20~24時間インキュベーションし、次いで可視的に調べて、成長もしくは濁りの阻害には陽性(+)を、または成長もしくは濁りに効果のないものには陰性(-)を、スコア付けした。

ヘリコバクター・ピロリ（グラム陰性）に対する最小阻害濃度（MIC）の評価を、複数部位バリエントについて、CLSI (CLSI文書M07-A8) に記載されているプロス希釈アッセイにて、0.05M EDTA（エチレンジアミン四酢酸、細胞膜増感剤）の添加の存在および不在下で行った。試料およびテトラサイクリン対照を、100%DMSOに溶解して順次希釈し、4 µLを、H.ピロリ±0.05M EDTAの播種された196 µLのブルセラプロス-7% FBSと共に、96ウェルプレートにウェル当たり添加した。化合物を64から0.0625 µg/mLまでの11通りの濃度で供試した。アッセイプレートをビニール袋で緩く覆い、36度、5% CO₂（嫌気性条件）下で20~24時間インキュベーションし、次いで可視的に調べて、成長もしくは濁りの阻害には陽性(+)を、または成長もしくは濁りに効果のないものには陰性(-)を、スコア付けした。

【0177】

擬似腸液アッセイ

in vitro 擬似腸液安定性アッセイを、擬似腸液およびプロテアーゼの存在下、胃腸管中でのMU1140バリエントの安定性を模擬実験するために実施した。アッセイのインキュベーション条件は、96ウェルフォーマットで、1%ブタパンクレアチン、3

10

20

30

30

40

50

$\mu\text{g}/\text{mL}$ ウシトリプシン、および $3\mu\text{g}/\text{mL}$ ウシキモトリプシンを含有する $475\mu\text{L}$ の擬似腸液 [F a S S I F - v 2 (E k a r a t e t a l . , P h a r m R e s . V o l . 2 5 , N o . 7 , J u l y 2 0 0 8)] を、 $25\mu\text{L}$ の $1\text{mg}/\text{mL}$ バリアントと混合して終濃度 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ バリアントとして含んでいた。試料を 37°C でインキュベーションし、LC-MS/MS を用いて基質の損失について分析した。残存する消失速度定数 (K_e) のパーセントおよび *in vitro* のタンパク質の半減期を算出した。

【 0 1 7 8 】

擬似胃液アッセイ

in vitro 擬似胃液安定性アッセイを、擬似胃液およびプロテアーゼの存在下、胃袋中での 9 種類の MU1140 バリアントの安定性を模擬実験するために実施した。アッセイのインキュベーション条件は、マイクロチューブ中、 $1.75\text{mg}/\text{mL}$ ペプシン ($3200 \sim 4500\text{U/mg}$) を含有する $242.5\mu\text{L}$ の擬似胃液 (SGF、U S P 39 試験溶液; $2\text{g}/\text{L}$ NaCl、 $7\text{mL}/\text{L}$ 氷 HCl、pH 1.4) を、 $7.5\mu\text{L}$ の $10\text{mg}/\text{mL}$ バリアント (または陽性対照、NH₂-Met-Arg-Phe-Ala-OH、MRFA、CAS # 67368-29-0) と混合して終濃度 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ バリアントとして含んでいた。試料を 37°C でインキュベーションし、HPLC または LC-MS を用いて基質の損失について分析した。残存する消失速度定数 (K_e) のパーセントおよび *in vitro* のタンパク質の半減期を算出した。酵素を含まない SGF の対照も各バリアントについて実施し、同じ方式で分析した。

【 0 1 7 9 】

動物試験

カニューレ挿入されたシリアンハムスターの C. ディフィシルモデルを使用して、C. ディフィシル感染の処置における MU1140 バリアントの効能を評価した。回腸のカニューレ挿入手術と回復の後、雄のゴールデンシリアンハムスターに、クロストリジウム・ディフィシル UNT103-1 [VA11、非流行性 (cdtB-、REAG グループ J) Curtis Donskey、クリーブランド VA 病院、クリーブランド、オハイオ州] を接種した。1日目、感染の 24 時間後に、全ての動物は、クリンダマイシン ($10\text{mg}/\text{kg}$) の単回皮下注射を受けた。被験物質製剤を 1 日 3 回 (TID)、2 日目にクリンダマイシン注射の 18 時間後に開始して 5 連続日の間 (2 日目から 6 日目)、投与した。バンコマイシン (陽性対照) を、2 日目から 6 日目に 1 日 1 回、 $20\text{mg}/\text{kg}$ で投与し、その後 22 日目まで再発を評価した。試験で死亡したかまたは終了時 (21 日目) に安樂死させた全てのハムスターの盲腸の内容物を、C. ディフィシル毒素 A および毒素 B (tgc BIOMICS ELISA キット、カタログ番号 TGC-E002-1) について、および C. ディフィシルの胞子数について、試験した。盲腸の内容物を 50% 終濃度のエタノール中、室温で 60 分間インキュベーションし、遠心分離し、ペレットをナノピュア水に再懸濁することによって、胞子力値を決定した。再懸濁物を 65°C で 15 分間インキュベーションし、再度遠心分離して、ペレットを再度ナノピュア水に再懸濁した。試料を希釈して、7% ウマ溶血血液、 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ シクロセリン、 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ セフォキシチン、および $1\text{mg}/\text{mL}$ タウロコール酸を含むコロンビア寒天プレート上に斑点状に付けた。嫌気性インキュベーションの 48 時間後、コロニー形成単位 (CFU) として胞子数を決定した。

【 0 1 8 0 】

追跡試験のカニューレ挿入のないシリアンハムスターの C. ディフィシル感染モデルを使用して、経口胃管栄養レジメン後の C. ディフィシル感染の処置における 7 種類の MU1140 バリアントの効能を評価した。回復期の後、雄のゴールデンシリアンハムスターに、クロストリジウム・ディフィシル UNT103-1 [VA11、非流行性 (cdtB-、REAG グループ J) Curtis Donskey、クリーブランド VA 病院、クリーブランド、オハイオ州] を接種した。1日目、感染の 24 時間後に、全ての動物は、クリンダマイシン ($10\text{mg}/\text{kg}$) の単回皮下注射を受けた。被験物質製剤を 1 日 3 回

10

20

30

40

50

(TID)、2日目にクリンダマイシン注射の18時間後に開始して5連続日の間(2日目から6日目)投与し、その後22日目まで再発を評価した。バンコマイシン(陽性対照)を、2日目から6日目に1日1回、20mg/kgで投与した。盲腸の胞子数ならびに毒素AおよびBを、上に記載されたように決定した。

【0181】

第2のカニューレ挿入のないシリアンハムスターC.ディフィシル感染モデルを使用して、経口胃管栄養レジメン後のC.ディフィシル感染の処置における2種類のMU1140バリアントの最適な治療レジメンをさらに突き詰めて規定した。回復期の後、雄のゴールデンシリアンハムスターに、クロストリジウム・ディフィシルUNT103-1[V A 11、非流行性(c d t B -、REAGループJ)Curtis Donskey、クリーブランドVA病院、クリーブランド、オハイオ州]を接種した。1日目、感染の24時間後に、全ての動物は、クリンダマイシン(10mg/kg)の単回皮下注射を受けた。3通りから5通りの異なる用量の被験物質製剤を、1日3回(TID)、2日目にクリンダマイシン注射の18時間後に開始して5連続日の間(2日目から6日目)投与し、その後22日目まで再発を評価した。バンコマイシン(陽性対照)を、2日目から6日目に1日1回、20mg/kgで投与した。盲腸の胞子数ならびに毒素AおよびBを、上に記載されたように決定した。

10

【0182】

結果

バリアントを、嫌気性グラム陽性病原体であるC.ディフィシルに対する特異的な抗微生物活性について、重量/体積に基づき試験した(表9)。3種類の個々のC.ディフィシル株を検討し、C.ディフィシルに対するMU1140バリアントの活性のスペクトルを評価した。M.ルテウスに対する非正規化培養上清中に抗微生物活性の向上が観察されたものの、正規化されたアッセイでは、バリアントは、MU1140に比べて、C.ディフィシルに対する抗微生物活性の向上を示さなかった。しかし、供試したバリアントは、C.ディフィシル感染に対するケアの現在の標準であるバンコマイシンよりも優れた、特異的な抗微生物活性を示した。

20

【0183】

続いて、複数部位バリアントを、C.ディフィシルMICアッセイにおいて、特異的な抗微生物活性について試験した(表10)[Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria Approved Standard-seventh Edition. CLSI document M11-A8 (ISBN 1-56238-790-1). Vol. 32 No. 5. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2012]。

30

【表 15】

表9: MIC アッセイ C. ディフィシルに対する単一部位バリアント

バリアント/バ ンコマイシン	C. ディフィシルMIC(μg/mL)						
	ATCC 9689	BAA-1805	BAA-1875	ATCC 43596	ATCC 43255	ATCC 70057	BI1
MU1140	1, 1	0.25	0.5	0.5	0.25	0.06, 0.1	0.11
F1I	4	N/A	N/A	N/A	N/A	0.06	0.49
F1L	4, 4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.07, 0.5	0.07
R13N	4, 4	0.5	0.5	0.5	0.5	1.6, 0.5	0.81
F17L	4	N/A	N/A	N/A	N/A	0.07	0.07
F17Y	2	N/A	N/A	N/A	N/A	0.07	2.4
N18A	2, 4	0.5	2	0.5	0.5	0.2, 2	0.19
Y20F	2, 0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	N/A, 0.25	N/A
バンコマイシン	4, 8	1	1	1	1	0.5, 1	8

備考: 独立した2回で供試されたバリアントについて、二つの値(x, y)が示されている。

10

20

【表16】

表 10: MIC アッセイ C. ディフィシルに対する複数部位バリアント

バリアント	C. ディフィシル MIC(ug/mL)							
	ATCC 9689	ATCC BAA-1805	ATCC BAA- 1875	103-1	107-1	ATCC BAA- 1874	ATCC 43597	ATCC BAA- 1808
パンコマイシン	0.5	1	0.5	1	4	0.5	0.5	0.5
F1I 標準	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.25	0.25	0.125
F1I	0.5	0.5	0.25	0.06249	0.25	0.25	0.25	0.25
F1A R13A	2	2	2	0.5	4	4	2	1
F1I R13D	2	1	1	0.5	2	0.5	1	1
F1T R13G	8	8	8	4	16	8	8	8
F1L R13D	1	1	1	0.5	2	1	1	1
F1I R13N	0.5	0.25	0.5	0.125	1	0.5	0.25	0.5
F1I R13N G15A	8	8	8	2	8	8	8	8
F1I W4M R13A	8	4	4	1	4	4	4	8
F1I R13A	1	0.25	0.5	0.25	1	0.5	0.5	0.25
F1L R13N	0.5	0.25	0.5	0.125	0.5	0.25	0.25	0.25
F1L R13A	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
F1S R13N	16	8	16	2	16	16	8	8
F1V R13N	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.25
F1G R13N	8	8	8	2	16	16	8	8
F1I R13N Y20F	0.5	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25
F1A R13G	8	8	8	2	8	8	4	8

10

20

30

【0184】

単一部位バリアントを、グラム陽性の宿主および抗酸性微生物に対する特異的な抗微生物活性について（表11）、重量 / 体積に基づき試験した。3種類の個々のエンテロコッカス株を検討し、VRE、5種類の、S. オウレウスの株、S. ニューモニエ、および抗酸性株 M. フレイに対する MU1140 バリアントの活性のスペクトルを評価した。供試したバリアントが MU1140 とは大幅な差を示さなかった一方で、多くが対照よりも感受性が低かったとはいえ、全てが、供試した範囲（64 μg / mL）で、供試した全ての生物に対し特異的な抗微生物活性を示した。

【0185】

複数部位バリアントを、グラム陽性微生物の宿主に対する特異的な抗微生物活性について、重量 / 体積に基づき試験した（表12）。個々のエンテロコッカス株を検討して、VRE に対する MU1140 バリアントの活性のスペクトルを評価し、C. シンデンス、B. ブレーベ、L. アシドフィルス、P. アナエロビウス、E. レンタの株も評価した。複数部位バリアントは、その多くが対照よりも感受性が低かったとはいえ、供試した生物の殆どに対して MIC を示した。少数の複数部位バリアントが、供試したいいくつかの VRE 株に対し何の活性も示さなかった。

40

【表17】

表11：他のグラム陽性-MICアッセイ 単一部位バリアント

バリエント/対照	グラム陽性/抗酸性微生物のMIC(μg/mL)									
	VRE ATCC 51575	VRE ATCC 51299	VRE ATCC 70022 1	S.ア ウレ ウス ATCC 29213	S.ア ウレ ウス ATCC 19636	SS.ア ウレ ウス ATCC 33591	S.ア ウレ ウス BAA- 1717	S.ア ウレ ウス ATCC 70069 9	S.ニ ュー モニ エ	pM.フ レイ
MU1140	4	4	2	2	1	1	2	2	8	2
F1I	8	8	4	4	4	0.5	2	4	16	2
F1L	8	4	2	4	2	0.5	2	2	16	2
R13N	8	16	4	2	2	0.5	2	4	32	8
F17L	8	16	2	4	2	1	2	2	64	2
F17Y	8	8	4	2	1	1	2	2	32	2
N18A	16	8	2	4	4	2	2	2	32	2
Y20F	64	4	1	2	1	1	2	2	8	2
Control	L	L	L	G	G	G	G	V	A	V
MIC	2	2	2	0.25	0.125	1	0.25	2	1	0.25

対照: L=リネゾイド(linezoid)、G=ゲンタマイシン、V=バンコマイシン、A=アンピシリソ

【表18】

表12：他のグラム陽性-MIC アッセイ 複数部位バリアント

バリアント/ 対照	グラム陽性微生物 MIC(μg/mL)							
	VRE CCUG 4777 5	VRE ATCC 51575	VRE ATCC 700221	C.シン デンス	B.プレ ーベ	L.アシ ドフィ ルス	P.アナ エロビ ウス	E.レン タ
F1I 標準	8	4	4	2	0.5	0.25	0.25	0.25
F1I	8	4	4	2	0.5	0.5	0.25	0.5
F1A R13A	32	32	16	16	4	8	2	4
F1I R13D	32	32	32	8	2	2	1	2
F1T R13G	64	64	32	64	16	8	8	8
F1L R13D	32	64	32	8	2	8	2	1
F1I R13N	16	16	32	2	1	0.5	0.25	0.5
F1I R13N G15A	> 64	32	32	16	8	8	4	8
F1I W4M R13A	> 64	> 64	> 64	32	8	32	8	16
F1I R13A	16	16	8	4	1	0.5	1	2
F1L R13N	16	16	16	4	1	0.5	0.25	0.25
F1L R13A	16	32	16	4	1	0.5	0.5	0.5
F1S R13N	> 64	> 64	64	32	16	16	8	16
F1V R13N	32	32	16	4	1	0.5	0.25	0.5
F1G R13N	> 64	> 64	32	16	16	8	4	16
F1I R13N Y20F	16	8	8	2	0.5	0.5	0.125	0.125
F1A R13G	> 64	> 64	32	32	8	16	4	16
対照 MIC	L 2	L 2	L 4	V 1	V 0.5	V 1	V 1	L 1

対照: L=リネゾイド(linezoid)、V=バンコマイシン

10

20

30

【0186】

単一部位バリアントを、P.エルギノーザ（グラム陰性微生物）に対する特異的な抗微生物活性について、重量／体積に基づき試験した（表13）。全ての単一部位バリアントは、供試した全ての希釀物で成長の阻害を示さず（MIC > 64 μg / mL）、グラム陽性生物に対する活性についてのMU1140の特異性と一致した。

【0187】

複数部位バリアントを、H.ピロリ（グラム陰性微生物）に対する特異的な抗微生物活性について、0.05M EDTA（膜増感剤）の存在または不在下、重量／体積に基づき試験した（表14）。成長の阻害が、いくつかのバリアントについて観察されたが、テトラサイクリン対照よりも大幅に高いレベルにおいてであった。0.05M EDTAの添加は、全てではないがいくつかのバリアントのMIC値に、顕著な正の効果を及ぼした。

40

【表 19】

表13：グラム陰性に対する単一部位バリアントのMICアッセイ

バリアント/対照	P.エルギノーザに対するMIC
MU1140	> 64 μg/mL
F1I	> 64 μg/mL
F1L	> 64 μg/mL
R13N	> 64 μg/mL
F17L	> 64 μg/mL
F17Y	> 64 μg/mL
N18A	> 64 μg/mL
Y20F	> 64 μg/mL
オフロキサシン対照	1 μg/mL

10

20

【表 20】

表14：MIC アッセイ H. pylori に対する複数部位バリアント

バリアント/対照	EDTA(μg/mL)不在下のH.ピロリに対するMIC	0.05M EDTA(μg/mL)存在下のH.ピロリに対するMIC
F1I 標準	16	8
F1I	16	8
F1A R13A	> 64	64
F1I R13D	8	8
F1T R13G	> 64	> 64
F1L R13D	8	4
F1I R13N	8	8
F1I R13N G15A	> 64	64
F1I W4M R13A	64	64
F1I R13A	8	8
F1L R13N	8	8
F1L R13A	8	8
F1S R13N	> 64	> 64
F1V R13N	8	8
F1G R13N	> 64	> 64
F1I R13N Y20F	8	4
F1A R13G	> 64	> 64
テトラサイクリン対照	0.5	0.25

30

40

【0188】

MU1140バリアントを擬似腸液アッセイにて試験し、パンクレアチン、トリプシン、およびキモトリプシンの存在下でのバリアントの安定性を決定した（表15）。53.2分から72.4分の半減期がMU1140に観察された一方で、1位の置換（推定ペプ

50

シン切断部位)によって、バリアントF1IおよびF1Lの半減期がそれぞれ95分および77.3分に延長された。推定トリプシン切断部位である13位の変異によって、バリアントR13Nの半減期が>240分に延長された。推定キモトリプシン部位である20位の変異によって、バリアントY20Fの半減期が148分に延長された。しかし、18位のN18Aへの変異によって、分子がタンパク質消化性分解に対し感受性となり、半減期が24分に短縮された。

【表21】

表15：擬似腸液アッセイ

10

バリアント	FaSSIF+中での半減期(分)
MU1140	53.2
SM152	72.4
F1I	95
F1L	77.3
R13N	>240
N18A	24
Y20F	148

20

【0189】

次に、独立した変異が、相加的な様式でバリアントの安定性を増加させるという仮説を試験した。パンクレアチン、トリプシン、およびキモトリプシンを含有する擬似腸液中で、複数部位バリアントを試験し、複数部位バリアントの半減期が残存性の向上を示すか否かを決定した(表16)。供試した15種類の複数部位バリアントのうち10種類が、720分を超える半減期を示したのに對し、複数部位バリアントと同じ条件を用いて精製されたSM253参照標準および陽性対照F1Iでは、48分および58分の半減期が観察された。単一部位バリアントSM253に比べて複数部位バリアントの安定性が向上したことは、ランチビオティックが広範囲の翻訳後修飾を持つにも関わらず、生来のMU1140の推定プロテアーゼ切断部位が、生理条件下でプロテアーゼ媒介性切断に感受性であることを示す。

30

【表 2 2】

表 1 6 : 擬似腸液アッセイ

バリアント	FaSSIFのみ 半減期(分)	FaSSIF+1%パンクレアチン +3 μg/mLトリプシン+3 μg/mLキモトリプシン 半減期(分)
FII 参照標準	>720	48&58(2試験)
F1A R13A	>720	130
F1I R13D	>720	>720
F1T R13G	>720	114
F1L R13D	>720	>720
F1I R13N	>720	>720
F1I R13N G15A	>720	>720
F1I W4M R13A	>720	349
F1I R13A	>720	>720
F1L R13N	>720	>720
F1L R13A	>720	>720
F1S R13N	>720	>720
F1V R13N	>720	>720
F1G R13N	>720	225
F1I R13N Y20F	>720	>720
F1A R13G	299	124

10

20

30

【0 1 9 0】

次に、ランチビオティックは(c 末端アミノ酸を欠くために)ペプシンを含む胃液中で分解されず、鍵となる独立した変異はこの安定性に影響を及ぼさなかった、という仮説を試験した。FaSSIF 中で安定性の向上を示し、かつ F1I (SM253) 以上のMIC を有していた複数部位バリアントを、ペプシンを含有する擬似胃液(pH 1.5) 中で試験し、複数部位バリアントの半減期が分解において差を示すか否かを決定した(表 1 7)。供試した 8 種類のバリアント全てが、F1I に匹敵する 1440 分(24 時間)を超える半減期を示した。複数部位バリアントの安定性が延長したということは、性能の向上をもたらすペプチド内の変異が、胃上部での移行中の安定性の低減に繋がらないことを示す。

40

【表23】

表17：擬似胃液アッセイ

バリエント	SGFのみ 半減期(分)	SGF+1.75mg/mLペプシン 半減期(分)
F1I参考標準	>1440	>1440
F1I R13D	>1440	>1440
F1L R13D	>1440	>1440
F1I R13N	>1440	>1440
F1I R13A	>1440	>1440
F1L R13N	>1440	>1440
F1L R13A	>1440	>1440
F1V R13N	>1440	>1440
F1I R13N Y20F	>1440	>1440
陽性対照	>1440	906

10

20

30

【0191】

C. ディフィシルのカニューレ挿入されたシリアンハムスター モデルを用いて、6種類のバリエントを *in vivo* で検討し、ケアの現在の臨床標準であるバンコマイシン (Surawicz et al. Am J Gastroenterol., 108 (4) : 478 - 98, 2013) に比べて、C. ディフィシルの処置における効能の向上を観察することができるか否かを決定した。C. ディフィシルを感染させて媒体、バンコマイシン、または MU1140 バリエントで処置したハムスターについての生存結果を、表18に提示する。21日目の試験の終了まで、バリエント F1I、R13N、および Y20F は、バンコマイシンを超える優位性を示し、それは、バンコマイシン対照に 33% の生存率が観察されたのに対して、バリエントを処置したハムスターに最大 100% の生存率が観察された通りであった。試験終了時の動物中の胞子数および毒素レベルは、臨床生存像に一致した。

【表24】

表18：回腸にカニューレ挿入されたハムスターのC. ディフィシル感染モデルにおける効能試験

処置	22日目の生存率パーセント	22日目の糞便ホモジネートの平均LOG ₁₀ CFU/mL(盲腸の胞子数)	22日目の毒素(A/B)レベル(ng/mL)
媒体	0	4.09	1955.0/1368.7
バンコマイシン	33	3.24	2435.9/1209.1
F17L	33	3.33	1490.4/1149.9
F1I	100	<1.62*	<1.6/<1.6**
Y20F	67	2.21	369.5/331.3
F1L	17	4.31	269.5/328.3
N18A	33	3.52	684.2/614.6
R13N	67	2.24	1944.0/956.3

*検出限界(LOD)=1.62 LOG₁₀ CFU/試料グラム

**LOD=1.6 ng/mL 毒素

10

20

30

【0192】

C. ディフィシルのシリアンハムスターモデルを用いて、8種類のバリアントを i n v i v o で検討し、このモデルでは、上記ペプチドを経口胃管栄養により送達し、ケアの現在の臨床標準であるバンコマイシンに比べて、C. ディフィシルの処置における効能の向上を観察することができるか否かを決定した。C. ディフィシルを感染させて媒体、バンコマイシン、またはM U 1 1 4 0 バリアントで処置したハムスターについての生存結果を、表19に提示する。21日目の試験の終了まで、バリアント F 1 V R 1 3 N および F 1 I R 1 3 N Y 2 0 F は、バンコマイシン処置された動物に比べて、等価または優位な効能を示した。試験終了時の動物中の胞子数および毒素レベルは、臨床生存像に一致した。

【表 2 5】

表 19：経口胃管栄養によるハムスターの C. ディフィシル感染モデルにおける効能試験

処置	22日目の生存率 パーセント	22日目の糞便ホモジネートの平均 $\text{LOG}_{10}\text{CFU/mL}$ (盲腸の 胞子数)	22日目の毒素(A/B) レベル(ng/mL)
媒体	0	7.23	6630.9/2351.1
バンコマイシン	83	2.96	84.2/8
F1I	0	7.21	4313.7/1488.3
F1I R13D	50	4.8	648.5/216.6
F1I R13N	66	3.64	138.1/120.2
F1I R13A	50	4.67	147/205.5
F1L R13N	0	7.36	5477.8/2189.1
F1L R13A	0	7.28	4532.5/1795.5
F1V R13N	100	2.4*	0.8/0.8**
F1I R13N Y20F	83	2.65	5.1/6

*検出限界=2.40

**検出限界=0.8

10

20

30

【0193】

C. ディフィシルのシリアンハムスター モデルを用いて、2種類の選択したバリアントを in vivo で検討し、このモデルでは、上記ペプチドを経口胃管栄養により送達し、上述の用量レジメンに従って、ケアの現在の臨床標準であるバンコマイシンに比べて C. ディフィシルの処置における効能の向上を観察することができるか否かを決定した。C. ディフィシルを感染させて媒体、バンコマイシン、または MU1140 バリアントで処置したハムスターについての生存結果を、表 20 に提示する。21日目の試験の終了まで、バリアント F1V R13N は、同じ用量でバンコマイシン処置された動物に比べて優位な効能を示し、用量依存的な応答を辿った。試験終了時の動物中の胞子数および毒素レベルは、臨床生存像に一致した。

【表26】

表20：経口胃管栄養によるハムスターのC. ディフィシル感染モデルにおける効能試験および用量範囲検索

処置(用量)	22日目の生存率パーセント	22日目の糞便ホモジネートの平均LOG ₁₀ CFU/mL(盲腸の胞子数)	22日目の毒素(A/B)レベル(ng/mL)
媒体	0	5.15	2857.1/1852.8
バンコマイシン	50	6.66	292.6/71.1
F1V R13N (2 mg/Kg)	0	6.13	578.5/462.7
F1V R13N (6 mg/Kg)	50	4.27	266.2/238.1
F1V R13N (20 mg/Kg)	66	3.88	74.2/57.8
F1V R13N (35 mg/Kg)	100	2.40*	0.8/0.8**
F1V R13N (60 mg/Kg)	83	2.51	7.3/5.5
F1I R13N Y20F (6 mg/Kg)	0	5.47	215.5/242.2
F1I R13N Y20F (20 mg/Kg)	33	5.37	165.5/272.3
F1I R13N Y20F (60 mg/Kg)	83	3.18	47.6/108.7

*検出限界=2.40

**検出限界=0.8

10

20

30

40

50

【0194】

実施例5

複数アミノ酸置換

単アミノ酸置換を含むバリアントの生産の追跡試験として、305種類のバリアントを設計し、22アミノ酸の成熟ペプチド配列のうち1位、2位、4位、5位、6位、7位、12位、13位、15位、および20位で、バリアント当たり最大8個のアミノ酸置換を組み合わせた。mutA遺伝子座のコロニーPCRおよびDNA配列確定により確認したところ、270種類のバリアント株を造成することに成功した。ベクター構築および形質転換でのいくつかの試みが実行されたにも関わらず、我々は、株の構築が技術的な理由によりできなかつたのか、または生物学的な理由（そのバリアントが宿主にとって毒性であった）によりできなかつたのかを決定できていない。

【0195】

バリアント生産株を、抗微生物活性の向上について、S.ミュータンス株の一晩成長物から得られた非正規化培養上清を使用したM.ルテウス透明域アッセイを用いて評価した。より大きな透明域が、より高い特異性の抗微生物活性を持つバリアントの生産に起因するのか、または、より高い力値が、より大きな透明域に関与するのかは、知られていない。透明域に一致した生産が、JH1140およびSM253の両方のS.ミュータンス株に、ウェル間およびプレート間で観察された。F1N、F1P、F1E、S5F、L6I、およびA12T変異をコードする株は、結果として、低レベルの抗微生物活性かまたは検出レベルを下回る活性かのどちらかを生じる。バリアントライブラーの大多数が、現在のリード候補物および対照株F1I以上の抗微生物活性を示した。

【0196】

バリアントの安定性は、胃腸管適用のための好結果をもたらす治療剤としてMU1140の開発を成功させるのに不可欠な医薬特性である。生来のMU1140は、トリプシン

切断部位を R 13 位に含有するが、尤も、この部位は、効率の良いプロテアーゼ切断から保護されていることがある (Chen et al., Microbiology, 79 (13), 4015 - 23, 2013)。F1 および R13へのアミノ酸置換はそれぞれ、結果として、擬似腸液中で精製 MU1140 バリアントの半減期の延長をもたらす。

【0197】

F1 残基および K2 残基の変異は、プロテアーゼmutP による MU1140 プロペプチドの成熟、ならびにペプシンおよびキモトリプシンによる切断に影響を与えることがある。F1E 置換および F1P 置換を含有する株は、それぞれ SM253 対照株 (F1I) を下回る性能を示す。しかし、F1A 置換、F1G 置換、F1I 置換、および F1V 置換は、概して、SM253 よりも高い活性を產生する。

【0198】

13種類の異なるアミノ酸置換を 13 位に作製した。全てが機能的であり、少なくとも一つのバリアントで SM253 の性能を示した。R13A 変異は、透明域 > 0.319 cm² を生成した高性能のバリアント群では大きな比率を占める。

【0199】

アミノ酸置換の概要は、図 8 に見られ、6 つの異なる群に分けられる。

第1群：活性 > SM253 対照株（透明域 > 0.319 cm²）

第2群：2回の反復実験で活性 > SM253（1回の反復実験

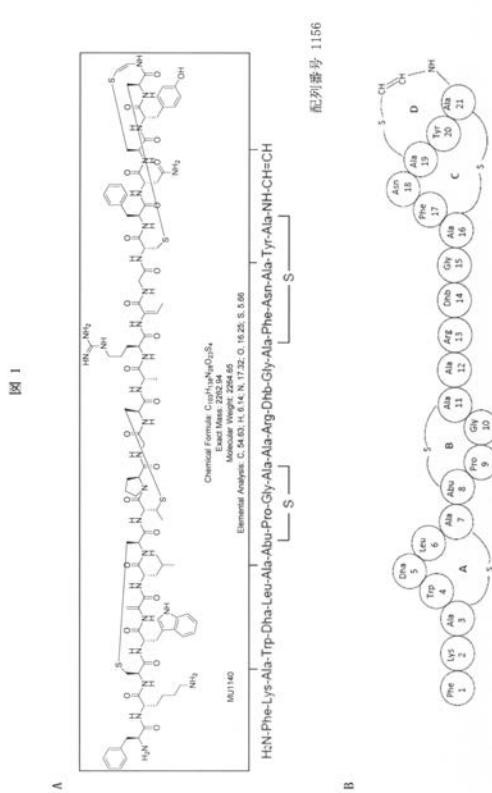
第3群：1回の反復で活性 > SM253 であり、1回の反復実験で活性 SM253

第4群：活性 > SM253 対照株（透明域 > 0.167 cm² であるが透明域 < 0.319 cm²）

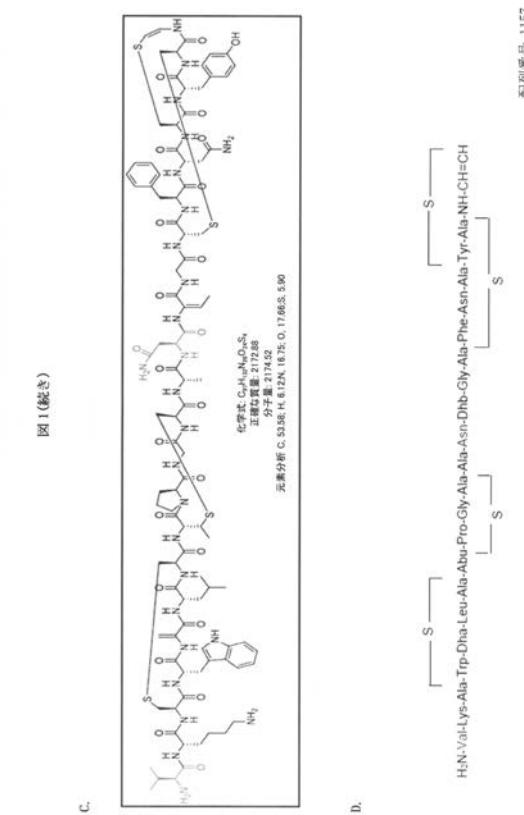
第5群：活性 SM253 対照（透明域 0.167 cm²）

第6群：決定せず

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



配列番号 1157

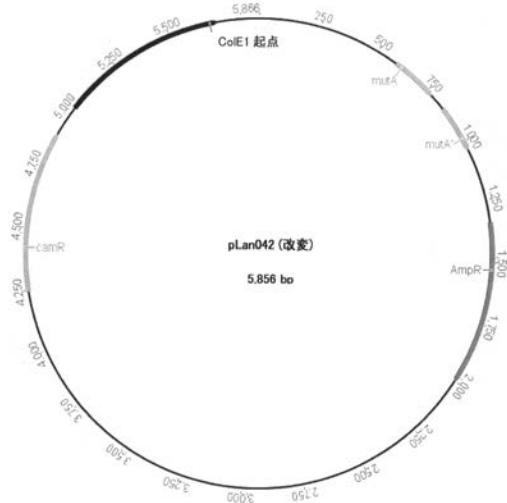
D.

10

20

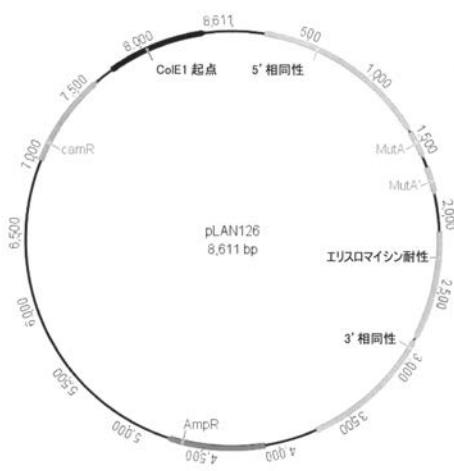
【図2】

図2



【図3】

図3



【図4-1】

図4

配列番号	配列	スクレオチド配列
1	MCI40	TTC AAA ACT TGG ACG CTT TGT AGC CCT GET TGT GCA AGG ACA GET AGT TTC AMT AGT TAC TGT TGC
2	F1W	tgg aaa agg tgg aac ctt tct acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
3	F1A	gtt aaa agg tgg aac ctt tct acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
14B	F1L	tta aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
5	F1M	atg aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
6	F1C	tgt aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
7	F1N	aat aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
8	F1Y	tat aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
9	F1D	gtt aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
10	F1E	gaa aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
11	F1P	cct aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
12	F1Q	caa aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
13	F1F	ttt aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
14	F1G	ggg aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
15	F1R	cgt aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
16	F1H	cat aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
17	F1S	tct aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
18	F1T	aca aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
19	F1I	att aaa agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
20	K2V	ttc gtg agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
21	K2W	ttc tag agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
22	K2A	ttc got agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
23	K2L	ttc tta agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
24	K2M	ttc atg agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
25	K2C	ttc ttt agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
26	K2N	ttc gan agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
27	K2Y	ttc tat cct agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
28	K2D	ttc gat agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
29	K2E	ttc gtt agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
30	K2P	ttc cct ctt agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
31	K2Q	ttc cba agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
32	K2F	ttc ttt agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
33	K2G	ttc gtt agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
34	K2R	ttc ctt agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
35	K2H	ttc cat agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
36	K2S	ttc tct agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc
37	K2T	ttc aca agg tgg aac ctt ttt acg ccc gtt ttt gca agg aca agg agg ttc aat agg ttc aat agg tac tgt tgc

【図4-2】

【図4-3】

K21	38	tte aat agg tgg aec ctt tgt aec oct ggt tgt gen agg aca ggt aat ttc aat agt tac tgt tgc
	39	SSK
	40	S3V
	41	S3W
	42	S3A
	43	S3L
	44	S3M
	45	S3C
	46	S3N
	47	S3Y
	48	S3D
	49	S3E
	50	S3P
	51	S3Q
	52	S3F
	53	S3G
	54	S3R
	55	S3H
	56	S3S
	57	S3T
	58	S3I

【図4-5】

S5W		ttc aac agg tgg ctt tgg ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
31	\$5A	ttt aau agg tgg gct tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
32	\$5L	ttt aau agg tgg tta ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
33	\$5M	ttt aau agg tgg atg ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
44	\$5C	ttt aau agg tgg tgg ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
55N		ttt aau agg tgg aat ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
56	\$5Y	ttt aau agg tgg tat ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
57	\$5D	ttt aau agg tgg gat ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
58	\$5E	ttt aau agg tgg gaa ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
59	\$5P	ttt aau agg tgg ctt ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
60	\$5Q	ttt aau agg tgg caa ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
61	\$5F	ttt aau agg tgg tt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
62	\$5G	ttt aau agg tgg agg ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
63	\$5R	ttt aau agg tgg agg ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
64	\$5H	ttt aau agg tgg cat ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
65	\$5S	ttt aau agg tgg ict ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
66	\$5T	ttt aau agg tgg aca ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
67	\$5I	ttt aau agg tgg att ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
68	L6K	ttt aau agg tgg agc aat ctt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
69	L6V	ttt aau agg tgg age gtt tgg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg
70	L6W	ttt aau agg tgg age lgg lgt agg ccc gat tgt gca agg aca gat agg ttc aat agg tac tgg

【図4-4】

59	W4K	ttc aaa agt aaa agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
60	W4V	ttc aaa agt gtt agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
61	W4A	ttc aaa agt gct agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
62	W4L	ttc aaa agt tta agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
63	W4M	ttc aaa agt utg agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
64	W4C	ttc aaa agt tgg agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
65	W4N	ttc aaa agt aat agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
66	W4Y	ttc aaa agt tat agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
67	W4D	ttc aaa agt gat agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
68	W4E	ttc aaa agt gan agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
69	W4P	ttc aaa agt cct agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
70	W4Q	ttc aaa agt can agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
71	W4F	ttc aaa agt ttg agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
72	W4G	ttc aaa agt ggt agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
73	W4R	ttc aaa agt ggt agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
74	W4H	ttc aaa agt cat agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
75	W4S	ttc aaa agt tct agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
76	W4T	ttc aaa agt aac agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
77	W4I	ttc aaa agt att agg ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
78	SSK	ttc aaa agt tgg aac ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc
79	SSV	ttc aaa agt utg ktt ctt tgt acg oct 8gt tgc gaa agg acca ggt agt ttc bat agt tac tgc

【図4-6】

L6A	ltc ana agt lgg agg gct lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6L	ltc ana agt lgg agg ctt lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6M	ltc ana agt lgg agg atg lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6N	ltc ana agt lgg agg lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6C	ltc ana agt lgg agg lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6N	ltc ana agt lgg agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6V	ltc ana agt lgg agg int lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6D	ltc ana agt lgg agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6E	ltc ana agt lgg agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6P	ltc ana agt lgg agg cct lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6Q	ltc ana agt lgg agg ctt lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6F	ltc ana agt lgg agg ctt lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6G	ltc ana agt lgg agg ctt lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6R	ltc ana agt lgg agg ctt lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6H	ltc ana agt lgg agg cat lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6S	ltc ana agt lgg agg tet lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6T	ltc ana agt lgg agg acn lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
L6I	ltc ana agt lgg agg acn lgt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
C7K	ltc ana agt lgg agg ctt saa acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
C7V	ltc ana agt lgg agg ctt gtt acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
C7W	ltc ana agt lgg agg ctt lgg acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc
C7A	ltc ana agt lgg agg ctt ret acg cct gct gct lgt gca agg acn get agt itc ant agt tac tgc

【図4-7】

122	CTL	ttc aac agt tgg agg ctt ttg aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
123	CTM	ttc aac agt tgg agg ctt ttg aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
124	CTN	ttc aac agt tgg agg ctt att aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
125	CTY	ttc aac agt tgg agg ctt tat aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
126	CTD	ttc aac agt tgg agg ctt gag aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
127	CTE	ttc aac agt tgg agg ctt gag aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
128	CTP	ttc aac agt tgg agg ctt aca aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
129	CTQ	ttc aac agt tgg agg ctt caa aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
130	CTF	ttc aac agt tgg agg ctt ttg aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
131	CTG	ttc aac agt tgg agg ctt ttg aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
132	CTR	ttc aac agt tgg agg ctt cgt aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
133	CTH	ttc aac agt tgg agg ctt cat aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
134	CTS	ttc aac agt tgg agg ctt tct aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
135	CTT	ttc aac agt tgg agg ctt aca aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
136	C7I	ttc aac agt tgg agg ctt att aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
137	T8K	ttc aac agt tgg agg ctt tgg aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
138	T8V	ttc aac agt tgg agg ctt tgg aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
139	T8W	ttc aac agt tgg agg ctt tgg ctg tgg aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
140	T8A	ttc aac agt tgg agg ctt tgg ctg ctg tgg aca cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
141	T8L	ttc aac agt tgg agg ctt tgg ttt cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc
142	T8M	ttc aac agt tgg agg ctt tgg ttt cct gg ^t tgt gca agg aca ggt agg ttc aat aat tac tt tgc

【 図 4 - 8 】

143	TBC	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt cat get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
144	TBN	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt aat cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
145	TBY	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt tat cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
146	TBD	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt gal cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
147	TBE	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt gan cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
148	TBP	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt ecf cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
149	TBQ	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt can cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
150	TBF	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt ttt cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
151	TBG	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt gfe cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
152	TBR	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt egi cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
153	THH	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt cat cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
154	TSS	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt tct cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
155	TTT	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt ace cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
156	TII	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt att cct get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
157	PKK	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt aag aac get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
158	PGV	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt aeg gtt get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
159	PGW	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt aeg tgg get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
160	PFA	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt aeg get get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
161	PFL	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt aeg tta get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
162	PMI	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt aeg atg get tgt gen agg aca gat spf ttc aat agt tac tgt tcc
163	PGC	ttc aaa agt tgg acc ctt tgt aeg ttt get tgt gen agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt tcc

【 図 4 - 9 】

【図4-10】

185	G10D	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
186	G10E	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get gaa tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
187	G10P	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get cct ctt tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
188	G10Q	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get ctt ctt tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
189	G10F	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
190	G10R	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt ctt tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
191	G10H	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt cat tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
192	G10S	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt tet tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
193	G10T	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt aca tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
194	G10I	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt att tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
195	C11K	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt gtt aaa gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
196	C11V	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt gtt gtt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
197	C11W	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt gtt tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
198	C11A	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get get gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
199	C11L	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
200	C11M	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
201	C11N	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get gat gaa gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
202	C11Y	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get tgt gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
203	C11D	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get get gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
204	C11E	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get gan gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc
205	C11P	tic aas agt tag age ctt tgt aeg ctt get ggt cct gca egg aca gat est tic aas agt tac tgt tbc

【 図 4 - 1 1 】

【図4-12】

2227	A12F	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2228	A12G	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2229	A12R	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2230	A12H	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2231	A12S	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2232	A12T	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2233	A12I	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2234	R13K	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2235	R13V	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2236	R13W	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2237	R13A	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2238	R13L	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2239	R13M	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2240	R13C	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2241	R13N	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2242	R13Y	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2243	R13D	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2244	R13E	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2245	R13P	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2246	R13Q	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc
2247	R13F	ttc aac agt tgg aag ctt tgt aca ect ggt tgt tgg aac gat aat ttg ant act tac tgc

【 図 4 - 1 3 】

【図4-14】

【 図 4 - 1 9 】

374	Y20A	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt tat ttg tgc
375	Y20L	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt tat ttg tgc
376	Y20M	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt aag ttg ttg tgc
377	Y20C	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt ttg ttg tgc
378	Y20N	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt aat ttg tgc
379	Y20Y	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt tat ttg tgc
380	Y20D	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt aat ttg ttg tgc
381	Y20E	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt gaa ttg tgc
382	Y20P	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt cat ttg tgc
383	Y20Q	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt caa ttg tgc
384	Y20F	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt ttg ttg tgc
385	Y20G	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt gat ttg tgc
386	Y20R	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt cat ttg tgc
387	Y20H	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt cat ttg tgc
388	Y20S	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt cat ttg tgc
389	Y20T	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt aca ttg tgc
390	Y20I	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt aat ttg tgc
391	C24K	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt aac ttg tgc
392	C24V	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt aac ttg tgc
393	C24W	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt aac ttg tgc
394	C24A	ttc aaa agt tgg tgc ctt tgt aag oct ggt tgt gen agg aca ggt tgt tc ant agt aac ttg tgc

【 図 4 - 2 0 】

395	C21L	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc get setttc ant agt tac ttatgc
396	C21M	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc get setttc ant agt tac atg tgc
397	C21N	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc get setttc ant agt tac atg tgc
398	C21Y	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc get setttc ant agt tac tat tgc
399	C21D	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac tat gat tgc
400	C21E	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tan gaa tgc
401	C21P	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac cct tgc
402	C21Q	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tan can tgc
403	C21F	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac tt tgc
404	C21G	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac ggt tgc
405	C21R	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac cgt tgc
406	C21H	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac cat tgc
407	C21S	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac tt tgc
408	C21T	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac acc tgc
409	C21I	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac att tgc
410	C22K	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac tgt ann
411	C22V	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac tgt gtt
412	C22W	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac tgt tgg
413	C22A	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac tgt gct
414	C22L	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac tgt tta
415	C22M	ltc aaa agg tgg agg ctt lgt agg cct settgt gca agg acc gettgc ant agt tac tgt atg

【図4-21】

416	C22C	tcc aac agt tag agc ctt tgt aag cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt tgt
417	C22N	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt tgt
418	C22Y	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt tgt
419	C22D	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt tgt
420	C22E	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt gaa
421	C22P	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt cat
422	C22Q	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt cab
423	C22F	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt tt
424	C22G	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt ggt
425	C22R	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt cgt
426	C22H	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt cat
427	C22S	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt ct
428	C22T	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt aca
429	C22I	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt att
430	C21E	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac gca
431	C22E	tcc aac agt tag agc ctt tgt aeg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt ttc aat agt tac tgt gaa

【図 5 - 1】

配列番号	ベリアン ト	配列
4732	MU1140	F K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7664	F11W	W K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7665	F11A	A K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7666	F11L	L K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7667	F11M	M K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7668	F11C	C K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7669	F11N	N K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7700	F11Y	Y K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7711	F11D	D K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7722	F11P	E K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7733	F11E	P K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7744	F11Q	Q K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7755	F11G	G K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7766	F11R	R K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7777	F11H	H K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7788	F11S	S K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7799	F11T	T K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7800	F11I	I K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7811	K21Y	F V S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7822	K21W	F W S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7833	K21L	F A S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
7844	K21Z	F L S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C

5

【図 5 - 2】

【図5-3】

1185	S3H	F K H W S L C T P G A R T G S F N S Y C C
1186	S3T	F K T W S L C T P G A R T G S F N S Y C C
1187	S3I	F K I W S L C T P G A R T G S F N S Y C C
1188	W4K	F K S K S L C T P G A R T G S F N S Y C C
800	W4V	F K S V S L C T P G A R T G S F N S Y C C
801	W4A	F K S A S L C T P G A R T G S F N S Y C C
802	W4L	F K S S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
803	W4M	F K S M S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
804	W4C	F K S C S L C T P G A R T G S F N S Y C C
805	W4N	F K S N S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
806	W4Y	F K S Y S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
807	W4D	F K S D S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
808	W4P	F K S E S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
809	W4P	F K S P S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
810	W4Q	F K S Q S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
811	W4F	F K S F S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
812	W4G	F K S G S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
813	W4R	F K S R S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
814	W4L	F K S H S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
815	W4S	F K S S S W L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
816	W4T	F K S T S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
817	W4I	F K S I S L S L C T P G A R T G S F N S Y C C
818	S5K	F K S W K L C T P G A R T G S F N S Y C C
819	S5V	F K S W V L C T P G A R T G S F N S Y C C
820	S5W	F K S W W V L C T P G A R T G S F N S Y C C
821	S5A	F K S W A L C T P G A R T G S F N S Y C C
822	S5M	F K S W M L C T P G A R T G S F N S Y C C
823	S5W	F K S W M W L C T P G A R T G S F N S Y C C
824	S5C	F K S W C L C T P G A R T G S F N S Y C C
825	S5N	F K S W N L C T P G A R T G S F N S Y C C
826	S5E	F K S W V Y L C T P G A R T G S F N S Y C C

【図 5 - 4】

【図 5 - 5】

C7W	F K S W S L W T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7A	F K S W S L L T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7L	F K S W S L L T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7M	F K S W S L M T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7N	F K S W S L N T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7V	F K S W S L V T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7D	F K S W S L D T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7E	F K S W S L S T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7F	F K S W S L P T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7Q	F K S W S L Q T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7K	F K S W S L F T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7G	F K S W S L G T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7R	F K S W S L R T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7H	F K S W S L S L T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7S	F K S W S L S T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7T	F K S W S L S L T P G C A R T G S F S N S Y C C
C7I	F K S W S L S L T P G C A R T G S F S N S Y C C
T8K	F K S W S L C K P G C A R T G S F S N S Y C C
T8V	F K S W S L C V P G C A R T G S F S N S Y C C
T8W	F K S W S L C W P G C A R T G S F S N S Y C C
T8A	F K S W S L S L C A P G C A R T G S F S N S Y C C
T87	F K S W S L C M P G C A R T G S F S N S Y C C
T89	F K S W S L C M P G C A R T G S F S N S Y C C
T81	F K S W S L C L C P G C A R T G S F S N S Y C C
T82	F K S W S L C N C P G C A R T G S F S N S Y C C
T8Y	F K S W S L C Y P G C A R T G S F S N S Y C C
T83	F K S W S L C Y P G C A R T G S F S N S Y C C
T8D	F K S W S L C D P G C A R T G S F S N S Y C C
T8E	F K S W S L C E P G C A R T G S F S N S Y C C
T86	F K S W S L C P P G C A R T G S F S N S Y C C
T8P	F K S W S L C L Q P G C A R T G S F S N S Y C C
T8Q	F K S W S L C F P G C A R T G S F S N S Y C C
T8F	F K S W S L C L C P G C A R T G S F S N S Y C C

【図 5 - 6】

951	A12K	F K S W S L C T P G C K R T G S F N S Y C C
952	A12V	F K S W S L C T P G C V R T G S F N S Y C C
953	A12W	F K S W S L C T P G C W R T G S F N S Y C C
954	A12L	F K S W S L C T P G C L R T G S F N S Y C C
955	A12M	F K S W S L C T P G M R T G S F N S Y C C
956	A12C	F K S W S L C T P G C C R T G S F N S Y C C
957	A12N	F K S W S L C T P G C N R T G S F N S Y C C
958	A12Y	F K S W S L C T P G C Y R T G S F N S Y C C
959	A12D	F K S W S L C T P G C D R T G S F N S Y C C
960	A12E	F K S W S L C T P G C E R T G S F N S Y C C
961	A12P	F K S W S L C T P G C F R T G S F N S Y C C
962	A12T	F K S W S L C T P G C Q R T G S F N S Y C C
963	A12F	F K S W S L C T P G C F R T G S F N S Y C C
964	A12G	F K S W S L C T P G C G R T G S F N S Y C C
965	A12R	F K S W S L C T P G C R T G S F N S Y C C
966	A12H	F K S W S L C T P G C H R T G S F N S Y C C
967	A12S	F K S W S L C T P G C S R T G S F N S Y C C
968	A12L	F K S W S L C T P G C T R T G S F N S Y C C
969	A12I	F K S W S L C T P G C I R T G S F N S Y C C
970	R12K	F K S W S L C T P G C A K T G S F N S Y C C
971	R13V	F K S W S L C T P G C A V T G S F N S Y C C
972	R13W	F K S W S L C T P G C A W T G S F N S Y C C
973	R13A	F K S W S L C T P G C A I T G S F N S Y C C
974	R13L	F K S W S L C T P G C A I T G S F N S Y C C
975	R13M	F K S W S L C T P G C A M T G S F N S Y C C
976	R13C	F K S W S L C T P G C A C T G S F N S Y C C
703	R13N	F K S W S L C T P G C A N T G S F N S Y C C
977	R13Y	F K S W S L C T P G C A Y T G S F N S Y C C
978	R13D	F K S W S L C T P G C A D T G S F N S Y C C
979	R13E	F K S W S L C T P G C A E T G S F N S Y C C
980	R13P	F K S W S L C T P G C A P T G S F N S Y C C

【図 5 - 7】

889	T8G	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
890	T8R	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
891	T8H	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
892	T8L	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
893	T8I	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
894	T9K	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
895	P9V	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
896	P9W	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
897	P9A	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
898	P9L	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
899	P9M	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
900	P9C	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
901	P9N	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
902	P9Y	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
903	P9D	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
904	P9E	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
905	P9Q	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
906	P9F	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
907	P9G	F K S W S L C T P K C A R T G S F N S Y C C
908	P9R	F K S W S L C T P C A R T G S F N S Y C C
909	P9H	F K S W S L C T P G C A V T G S F N S Y C C
910	P9S	F K S W S L C T P G C A W T G S F N S Y C C
911	P9T	F K S W S L C T P G C A I T G S F N S Y C C
912	P9I	F K S W S L C T P G C A I T G S F N S Y C C
913	G10K	F K S W S L C T P G C A M T G S F N S Y C C
914	G10V	F K S W S L C T P G C A C T G S F N S Y C C
915	G10W	F K S W S L C T P W C A R T G S F N S Y C C
916	G10A	F K S W S L C T P W C A R T G S F N S Y C C
917	G10L	F K S W S L C T P L C A R T G S F N S Y C C
918	G10M	F K S W S L C T P M C A R T G S F N S Y C C
919	G10C	F K S W S L C T P C C A R T G S F N S Y C C

【図 5 - 8】

981	R13Q	F K S W S L C T P G C A Q T G S F N S Y C C
982	R13F	F K S W S L C T P G C A F T G S F N S Y C C
983	R13G	F K S W S L C T P G C A G T G S F N S Y C C
984	R13H	F K S W S L C T P G C A H T G S F N S Y C C
985	R13P	F K S W S L C T P G C A S T G S F N S Y C C
986	R13T	F K S W S L C T P G C A T T G S F N S Y C C
987	R13I	F K S W S L C T P G C A I T G S F N S Y C C
988	R14K	F K S W S L C T P G C A R G S F N S Y C C
989	R14V	F K S W S L C T P G C A R V G S F N S Y C C
990	R14W	F K S W S L C T P G C A R W G S F N S Y C C
991	R14A	F K S W S L C T P G C A R A G S F N S Y C C
992	R14L	F K S W S L C T P G C A R A L G S F N S Y C C
993	R14M	F K S W S L C T P G C A R M G S F N S Y C C
994	R14C	F K S W S L C T P G C A R Q G S F N S Y C C
995	R14N	F K S W S L C T P G C A R N G S F N S Y C C
996	R14Y	F K S W S L C T P G C A R Y G S F N S Y C C
997	R14D	F K S W S L C T P G C A R D G S F N S Y C C
998	R14E	F K S W S L C T P G C A R E G S F N S Y C C
999	R14P	F K S W S L C T P G C A R G S F N S Y C C
1000	R14Q	F K S W S L C T P G C A R Q G S F N S Y C C
1001	R14F	F K S W S L C T P G C A R F G S F N S Y C C
1002	R14G	F K S W S L C T P G C A R G S F N S Y C C
1003	R14R	F K S W S L C T P G C A R G S F N S Y C C
1004	R14H	F K S W S L C T P G C A R H G S F N S Y C C
1005	R14S	F K S W S L C T P G C A R P G S F N S Y C C
1006	R14I	F K S W S L C T P G C A R I G S F N S Y C C
1007	R15K	F K S W S L C T P G C A R T K S F N S Y C C
1008	R15V	F K S W S L C T P G C A R T V S F N S Y C C
1009	R15W	F K S W S L C T P G C A R T W S F N S Y C C
1010	R15A	F K S W S L C T P G C A R T A S F N S Y C C
1011	R15L	F K S W S L C T P G C A R T L S F N S Y C C

【図 5 - 9】

920	G10N	F K S W S L C T P N C A R T G S F N S Y C C
921	G10Y	F K S W S L C T P Y C A R T G S F N S Y C C
922	G10D	F K S W S L C T P D C A R T G S F N S Y C C
923	G10E	F K S W S L C T P E C A R T G S F N S Y C C
924	G10P	F K S W S L C T P Q C A R T G S F N S Y C C
925	G10Q	F K S W S L C T P Q C A R T G S F N S Y C C
926	G10F	F K S W S L C T P R C A R T G S F N S Y C C
927	G10R	F K S W S L C T P R C A R T G S F N S Y C C
928	G10H	F K S W S L C T P H C A R T G S F N S Y C C
929	G10S	F K S W S L C T P T C A R T G S F N S Y C C
930	G10T	F K S W S L C T P T C A R T G S F N S Y C C
931	G10I	F K S W S L C T P I C A R T G S F N S Y C C
932	G11K	F K S W S L C T P Q C A R T G S F N S Y C C
933	G11V	F K S W S L C T P G V A R T G S F N S Y C C
934	G11W	F K S W S L C T P G W A R T G S F N S Y C C
935	G11A	F K S W S L C T P G W A R T G S F N S Y C C
936	G11L	F K S W S L C T P G L A R T G S F N S Y C C
937	G11M	F K S W S L C T P G M A R T G S F N S Y C C
938	G11N	F K S W S L C T P G N A R T G S F N S Y C C
939	G11Y	F K S W S L C T P G V A R T G S F N S Y C C
940	G11D	F K S W S L C T P G D A R T G S F N S Y C C
941	G11E	F K S W S L C T P G F A R T G S F N S Y C C
942	C11P	F K S W S L C T P G P A R T G S F N S Y C C
943	C11Q	F K S W S L C T P G Q A R T G S F N S Y C C
944	C11F	F K S W S L C T P G F A R T G S F N S Y C C
945	C11G	F K S W S L C T P G A R T G S F N S Y C C
946	C11R	F K S W S L C T P G R A T G S F N S Y C C
947	C11H	F K S W S L C T P G H A R T G S F N S Y C C
948	C11S	F K S W S L C T P G S A R T G S F N S Y C C
949	C11T	F K S W S L C T P G T A R T G S F N S Y C C
950	C11I	F K S W S L C T P G I A R T G S F N S Y C C

【図 5 - 10】

1071	N18P	F K S W S L C T P G C A R T G S F P S Y C C
1072	N18Q	F K S W S L C T P G C A R T G S F Q S Y C C
1073	N18F	F K S W S L C T P G C A R T G S F F S Y C C
1074	N18G	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
1075	N18R	F K S W S L C T P G C A R T G S F R S Y C C
1076	N18H	F K S W S L C T P G C A R T G S F H S Y C C
1077	N18S	F K S W S L C T P G C A R T G S F S S Y C C
1078	N18T	F K S W S L C T P G C A R T G S F T S Y C C
1079	N18I	F K S W S L C T P G C A R T G S F N P Y C C
1080	S19K	F K S W S L C T P G C A R T G S F N K Y C C
1081	S19W	F K S W S L C T P G C A R T G S F N V Y C C
1082	S19Z	F K S W S L C T P G C A R T G S F N W Y C C
1083	S19A	F K S W S L C T P G C A R T G S F N A Y C C
1084	S19R	F K S W S L C T P G C A R T G S F N L Y C C
1085	S19W	F K S W S L C T P G C A R T G S F N M Y C C
1086	S19C	F K S W S L C T P G C A R T G S F N C Y C C
1087	S19N	F K S W S L C T P G C A R T G S F N Y C C
1088	S19Y	F K S W S L C T P G C A R T G S F N Y Y C C
1089	S19D	F K S W S L C T P G C A R T G S F N D Y C C
1090	S19E	F K S W S L C T P G C A R T G S F N E Y C C
1091	S19P	F K S W S L C T P G C A R T G S F N P Y C C
1092	S19Q	F K S W S L C T P G C A R T G S F N Q Y C C
1093	S19F	F K S W S L C T P G C A R T G S F N F Y C C
1094	S19G	F K S W S L C T P G C A R T G S F N G Y C C
1095	S19R	F K S W S L C T P G C A R T G S F N R Y C C
1096	S19H	F K S W S L C T P G C A R T G S F N H Y C C
1097	S19T	F K S W S L C T P G C A R T G S F N T Y C C
1098	S19I	F K S W S L C T P G C A R T G S F N I Y C C
1099	Y20K	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S K C C
1100	Y20V	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S V C C
1101	Y20W	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S W C C

【図 5 - 11】

1012	G15M	F K S W S L C T P G C A R T M S F N S Y C C
1013	G15C	F K S W S L C T P G C A R T C S F N S Y C C
1014	G15N	F K S W S L C T P G C A R T N S F N S Y C C
1015	G15Y	F K S W S L C T P G C A R T Y S F N S Y C C
1016	G15D	F K S W S L C T P G C A R T D S F N S Y C C
1017	G15E	F K S W S L C T P G C A R T E S F N S Y C C
1018	G15P	F K S W S L C T P G C A R T P S F N S Y C C
1019	G15Q	F K S W S L C T P G C A R T Q S F N S Y C C
1020	G15F	F K S W S L C T P G C A R T F S F N S Y C C
1021	G15R	F K S W S L C T P G C A R T R S F N S Y C C
1022	G15H	F K S W S L C T P G C A R T H S F N S Y C C
1023	G15S	F K S W S L C T P G C A R T S F N S Y C C
1024	G15T	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1025	G15I	F K S W S L C T P G C A R T I S F N S Y C C
1026	S16K	F K S W S L C T P G C A R T K F N S Y C C
1027	S16Y	F K S W S L C T P G C A R T V F N S Y C C
1028	S16W	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1029	S16A	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1030	S16L	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1031	S16H	F K S W S L C T P G C A R T G M F N S Y C C
1032	S16C	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1033	S16N	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1034	S16Y	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1035	S16D	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1036	S16E	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1037	S16P	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1038	S16Q	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1039	S16F	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1040	S16G	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1041	S16R	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1042	S16H	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C

【図 5 - 12】

1102	Y20A	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S A C C
1103	Y20L	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S L C C
1104	Y20M	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S M C C
1105	Y20C	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S C C
1106	Y20N	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S D C C
1107	Y20D	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S E C C
1108	Y20E	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S F C C
1109	Y20P	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S P C C
1110	Y20Q	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Q C C
1007	Y20F	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S F C C
1111	Y20G	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S G C C
1112	Y20R	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S R C C
1113	Y20H	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S H C C
1114	Y20S	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S S C C
1115	Y20T	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S T C C
1116	Y20I	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S I C C
1117	C21R	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y C C
1118	C21V	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y V C
1119	C21W	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y W C
1120	C21A	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y A C
1121	C21L	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y L C
1122	C21M	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y M C
1123	C21N	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y K C
1124	C21V	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y V C
1125	C21D	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y D C
1126	C21E	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y E C
1127	C21P	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y P C
1128	C21Q	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y Q C
1129	C21F	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y F C
1130	C21G	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y G C
1131	C21R	F K S W S L C T P G C A R T G S F N S Y R C

1043	S16T	F K S W S L C T P G C A R T G F N S Y C C
1044	S16I	F K S W S L C T P G C A R T G I F N S Y C C
1045	F17K	F K S W S L C T P G C A R T G S K N S Y C C
1046	F17V	F K S W S L C T P G C A R T G F S N S Y C C
1047	F17W	F K S W S L C T P G C A R T G F S N S Y C C
1048	F17A	F K S W S L C T P G C A R T G S A N S Y C C
1049	F17L	F K S W S L C T P G C A R T G S M N S Y C C
1050	F17C	F K S W S L C T P G C A R T G S C N S Y C C
1051	F17N	F K S W S L C T P G C A R T G S N S Y C C
704	F17Y	F K S W S L C T P G C A R T G S Y N S Y C C
1052	F17D	F K S W S L C T P G C A R T G S D N S Y C C
1053	F17E	F K S W S L C T P G C A R T G S T S N S Y C C
1054	F17P	F K S W S L C T P G C A R T G S P N S Y C C
1055	F17Q	F K S W S L C T P G C A R T G S Q N S Y C C
1056	F17G	F K S W S L C T P G C A R T G S N S Y C C
1057	F17R	F K S W S L C T P G C A R T G S R N S Y C C
1058	F17H	F K S W S L C T P G C A R T G S H N S Y C C
1059	F17S	F K S W S L C T P G C A R T G S F S N S Y C C
1060	F17T	F K S W S L C T P G C A R T G S T S N S Y C C
1061	F17I	F K S W S L C T P G C A R T G S I N S Y C C
1062	N18K	F K S W S L C T P G C A R T G S G N S Y C C
1063	N18V	F K S W S L C T P G C A R T G S R N S Y C C
1064	N18A	F K S W S L C T P G C A R T G S H N S Y C C
706	N18W	F K S W S L C T P G C A R T G S F W S Y C C
1065	N18L	F K S W S L C T P G C A R T G S S F L S Y C C
1066	N18M	F K S W S L C T P G C A R T G S F M S Y C C
1067	N18C	F K S W S L C T P G C A R T G S F P C S Y C C
1068	N18Y	F K S W S L C T P G C A R T G S F S Y S Y C C
1069	N18D	F K S W S L C T P G C A R T G S F D S Y S Y C C
1070	N18E	F K S W S L C T P G C A R T G S F E S Y C C

【図 5 - 14】

パリアント	
配列器番号:432	MU1140
配列器番号:703	R13N
配列器番号:704	F17Y
配列器番号:705	F17L
配列器番号:706	N18A
配列器番号:707	V20F
配列器番号:433	F1I R13N
配列器番号:434	F1I R13D
配列器番号:435	F1I R13A
配列器番号:436	F1I R13T
配列器番号:437	F1I R13K
配列器番号:438	F1I R13S
配列器番号:439	F1I R13G
配列器番号:440	F1I R13W
配列器番号:441	F1I R13I
配列器番号:442	F1I R13P
配列器番号:443	F1I R13Q
配列器番号:444	F1I R13E
配列器番号:445	F1I R13H
配列器番号:446	F1I R13N
配列器番号:447	F1I R13D
配列器番号:448	F1I R13A
配列器番号:449	F1I R13T
配列器番号:450	F1I R13K
■列	
FKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	
FKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	
FKSWSLCTPGCARTGSYNSYCC	
FKSWSLCTPGCARTGSYNSYCC	
FKSWSLCTPGCARTGSFASYCC	
FKSWSLCTPGCARTGSFNSFCC	
IKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAATGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCACATGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAKTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCASTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAGTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAQTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAATGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCACATGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAKTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCASTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAGTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAQTGSFNSYCC	
IKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC	
LKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	
LKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC	
LKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC	
LKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	
LKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC	
LKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC	
LKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC	
AKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC	
NKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	
NKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC	
NKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC	
NKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	
NKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC	
NKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC	
NKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC	

【図 6】

C21H	FKSWSLCTPGCARTGSFNSYHC
C21S	FKSWSLCTPGCARTGSFNSYSC
C21T	FKSWSLCTPGCARTGSFNSYTC
C21L	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSY1C
C22K	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYCK
C22Y	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYCY
C22W	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYW
C22A	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYC
C22L	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYCL
C22M	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYM
C22N	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYN
C22Y	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYV
C22D	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYC
C22E	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYE
C22P	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYP
C22Q	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYQ
C22F	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYF
C22G	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYG
C22R	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYR
C22H	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYH
C22S	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYS
C22T	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYI
C22I	FKSWSLCTPGCARTRGSFNSYC
K2N	
K2Q	
W4A	
W4F	
W4H	
W4I	
W4V	
S5A	
S5M	
L6A	
L6H	
L6T	
L6V	
P9H	
N18A	
Y20F	
C11A	
C11E	

【図 7 - 1】

配列器番号:451	
配列器番号:452	F1I R13S
配列器番号:453	F1I R13G
配列器番号:454	F1I R13W
配列器番号:455	F1I R13P
配列器番号:456	F1I R13Q
配列器番号:457	F1I R13E
配列器番号:458	F1I R13H
配列器番号:459	F1A R13N
配列器番号:460	F1A R13D
配列器番号:461	F1A R13A
配列器番号:462	F1A R13T
配列器番号:463	F1A R13K
配列器番号:464	F1A R13S
配列器番号:465	F1A R13G
配列器番号:466	F1A R13W
配列器番号:467	F1A R13I
配列器番号:468	F1A R13P
配列器番号:469	F1A R13Q
配列器番号:470	F1A R13E
配列器番号:471	F1A R13H
配列器番号:472	FIN R13N
配列器番号:473	FIN R13D
配列器番号:474	FIN R13A
配列器番号:475	FIN R13T
配列器番号:476	FIN R13K
配列器番号:477	FIN R13S
配列器番号:478	FIN R13G

【図 7 - 2】

LKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	LKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC
LKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC	LKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC
LKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC	LKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC
LKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	LKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC
LKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC	LKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC
LKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC	LKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC
LKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC	LKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC
AKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	AKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC
AKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC	AKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC
AKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC	AKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC
AKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	AKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC
AKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC	AKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC
AKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC	AKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC
AKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC	AKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC
NKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC	NKSWSLCTPGCANTGSFNSYCC
NKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC	NKSWSLCTPGCADTGSFNSYCC
NKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC	NKSWSLCTPGCAVTGSFNSYCC
NKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC	NKSWSLCTPGCAITGSFNSYCC
NKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC	NKSWSLCTPGCAPTGSCAPTGSFNSYCC
NKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC	NKSWSLCTPGCAETGSFNSYCC
NKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC	NKSWSLCTPGCAHTGSFNSYCC

【図 7 - 3】

酚处理器:479	FIN R13V	NKWSWLCTPGCAINTGFSNSYCC
酚处理器:480	FIN R13I	NKWSWLCTPGCAITGSNSYCC
配列器:481	FIN R13P	NKWSWLCTPGCAPTSNSYCC
酚处理器:482	FIN R13O	NKWSWLCTPGCAQTSNSYCC
酚处理器:483	FIN R13E	NKWSWLCTPGCAETGSNSYCC
酚处理器:484	FIN R13H	NKWSWLCTPGCAHTGSNSYCC
配列器:485	FIS R13N	SKSWSLCTPGCANTGFSNSYCC
酚处理器:486	FIS R13D	SKSWSLCTPGCADTGSNSYCC
酚处理器:487	FIS R13A	SKSWSLCTPGCAATGSNSYCC
配列器:488	FIS R13T	SKSWSLCTPGCATTSNSYCC
酚处理器:489	FIS R13K	SKSWSLCTPGCAGTGSNSYCC
酚处理器:490	FIS R13S	SKSWSLCTPGCASTGSNSYCC
酚处理器:491	FIS R13G	SKSWSLCTPGCAGTGSNSYCC
酚处理器:492	FIS R13W	SKSWSLCTPGCAVTGSNSYCC
配列器:493	FIS R13I	SKSWSLCTPGCAITGSNSYCC
酚处理器:494	FIS R13P	SKSWSLCTPGCAITGSNSYCC
酚处理器:495	FIS R13Q	SKSWSLCTPGCAQTSNSYCC
酚处理器:496	FIS R13E	SKSWSLCTPGCAETGSNSYCC
酚处理器:497	FIS R13H	SKSWSLCTPGCAHTGSNSYCC
酚处理器:498	FIT R13N	TKSWSLCTPGCANTGFSNSYCC
酚处理器:499	FIT R13D	TKSWSLCTPGCADTGSNSYCC
酚处理器:500	FIT R13A	TKSWSLCTPGCAATGSNSYCC
酚处理器:501	FIT R13T	TKSWSLCTPGCASTGSNSYCC
配列器:502	FIT R13K	TKSWSLCTPGCAGTGSNSYCC
酚处理器:503	FIT R13S	TKSWSLCTPGCAVTGSNSYCC
酚处理器:504	FIT R13G	TKSWSLCTPGCAITGSNSYCC
酚处理器:505	FIT R13W	TKSWSLCTPGCAQTSNSYCC
酚处理器:506	FIT R13I	TKSWSLCTPGCAETGSNSYCC

【図 7 - 4】

配列番号:507	FIT R13P	T KWSL CTPGCA TGSNSYCC
配列番号:508	FIT R13Q	T KWSL CTPGCA QTGSNSYCC
配列番号:509	FIT R13D	T KWSL CTPGCA ETGSNSYCC
配列番号:510	FIT R13H	T KWSL CTPGCA HTGSNSYCC
配列番号:511	FIV R13N	Y KWSL CTPGCA NTGSNSYCC
配列番号:512	FIV R13D	Y KWSL CTPGCA DTGSNSYCC
配列番号:513	FIV R13A	Y KWSL CTPGCA ATGSNSYCC
配列番号:514	FIV R13T	Y KWSL CTPGCA TTGSNSYCC
配列番号:515	FIV R13K	Y KWSL CTPGCA KTGSNSYCC
配列番号:516	FIV R13S	Y KWSL CTPGCA STGSNSYCC
配列番号:517	FIV R13G	Y KWSL CTPGCA GTGSNSYCC
配列番号:518	FIV R13V	Y KWSL CTPGCA VTGSNSYCC
配列番号:519	FIV R13I	Y KWSL CTPGCA ITGSNSYCC
配列番号:520	FIV R13P	Y KWSL CTPGCA PTGSNSYCC
配列番号:521	FIV R13Q	Y KWSL CTPGCA QTGSNSYCC
配列番号:522	FIV R13E	Y KWSL CTPGCA ETGSNSYCC
配列番号:523	FIV R13H	Y KWSL CTPGCA HTGSNSYCC
配列番号:524	FIV R13N	H KWSL CTPGCA NTGSNSYCC
配列番号:525	FIV R13D	H KWSL CTPGCA DTGSNSYCC
配列番号:526	FIV R13A	H KWSL CTPGCA ATGSNSYCC
配列番号:527	FIV R13T	H KWSL CTPGCA TTGSNSYCC
配列番号:528	FIV R13K	H KWSL CTPGCA KTGSNSYCC
配列番号:529	FIV R13S	H KWSL CTPGCA STGSNSYCC
配列番号:530	FIV R13G	H KWSL CTPGCA GTGSNSYCC
配列番号:531	FIV R13V	H KWSL CTPGCA VTGSNSYCC
配列番号:532	FIV R13I	H KWSL CTPGCA ITGSNSYCC
配列番号:533	FIV R13P	H KWSL CTPGCA PTGSNSYCC
配列番号:534	FIV R13Q	H KWSL CTPGCA QTGSNSYCC

【図 7 - 5】

配列番号:535	F1R13E	H K S W S L C T P G C A T T G S F N S Y C C
配列番号:536	F1H R13H	H K S W S L C T P G C A T T G S F N S Y C C
配列番号:537	F1P R13N	P K S W S L C T P G C A N T G S F N S Y C C
配列番号:538	F1P R13O	P K S W S L C T P G C A D T G S F N S Y C C
配列番号:539	F1P R13A	P K S W S L C T P G C A T G S F N S Y C C
配列番号:540	F1P R13T	P K S W S L C T P G C A T T G S F N S Y C C
配列番号:541	F1P R13K	P K S W S L C T P G C A T G S F N S Y C C
配列番号:542	F1P R13S	P K S W S L C T P G C A S T G S F N S Y C C
配列番号:543	F1P R13G	P K S W S L C T P G C A G T G S F N S Y C C
配列番号:544	F1P R13W	P K S W S L C T P G C A T G S F N S Y C C
配列番号:545	F1P R13I	P K S W S L C T P G C A I T G S F N S Y C C
配列番号:546	F1P R13P	P K S W S L C T P G C A Q T G S F N S Y C C
配列番号:547	F1P R13Q	P K S W S L C T P G C A T G S F N S Y C C
配列番号:548	F1P R13E	P K S W S L C T P G C A E T G S F N S Y C C
配列番号:549	F1P R13H	P K S W S L C T P G C A H T G S F N S Y C C
配列番号:550	F1W R13N	V K S W S L C T P G C A N T G S F N S Y C C
配列番号:551	F1V R13D	V K S W S L C T P G C A D T G S F N S Y C C
配列番号:552	F1V R13A	V K S W S L C T P G C A T G S F N S Y C C
配列番号:553	F1V R13T	V K S W S L C T P G C A T T G S F N S Y C C
配列番号:554	F1V R13K	V K S W S L C T P G C A T G S F N S Y C C
配列番号:555	F1V R13S	V K S W S L C T P G C A S T G S F N S Y C C
配列番号:556	F1V R13G	V K S W S L C T P G C A G T G S F N S Y C C
配列番号:557	F1V R13W	V K S W S L C T P G C A I T G S F N S Y C C
配列番号:558	F1V R13I	V K S W S L C T P G C A Q T G S F N S Y C C
配列番号:559	F1V R13P	V K S W S L C T P G C A I T G S F N S Y C C
配列番号:560	F1V R13Q	V K S W S L C T P G C A T G S F N S Y C C
配列番号:561	F1V R13E	V K S W S L C T P G C A E T G S F N S Y C C
配列番号:562	F1V R13H	V K S W S L C T P G C A H T G S F N S Y C C

【 図 7 - 6 】

配列番号:563	FIG R13N	G KWSLCTPGCANTGSFNSYCC
配列番号:564	FIG R13D	G KWSLCTPGCAGTGSFNSYCC
配列番号:565	FIG R13A	G KWSLCTPGCAATGSFNSYCC
配列番号:566	FIG R13T	G KWSLCTPGCATTGSFNSYCC
配列番号:567	FIG R13K	G KWSLCTPGCAGTGSFNSYCC
配列番号:568	FIG R13S	G KWSLCTPGCASTGSFNSYCC
配列番号:569	FIG R13G	G KWSLCTPGCAGTGSFNSYCC
配列番号:570	FIG R13W	G KWSLCTPGCAVTGSFNSYCC
配列番号:571	FIG R13I	G KWSLCTPGCAITGSFNSYCC
配列番号:572	FIG R13P	G KWSLCTPGCAGTGSFNSYCC
配列番号:573	FIG R13Q	G KWSLCTPGCAQGSFNSYCC
配列番号:574	FIG R13E	G KWSLCTPGCAETGSFNSYCC
配列番号:575	FIG R13H	G KWSLCTPGCAHTGSFNSYCC
配列番号:576	FIG R13N	EKWSLCTPGCANTGSFNSYCC
配列番号:577	FIG R13D	EKWSLCTPGCAGTGSFNSYCC
配列番号:578	FIG R13A	EKWSLCTPGCAATGSFNSYCC
配列番号:579	FIG R13T	EKWSLCTPGCAGTGSFNSYCC
配列番号:580	FIG R13K	EKWSLCTPGCASTGSFNSYCC
配列番号:581	FIG R13S	EKWSLCTPGCAGTGSFNSYCC
配列番号:582	FIG R13G	EKWSLCTPGCAVTGSFNSYCC
配列番号:583	FIG R13W	EKWSLCTPGCAITGSFNSYCC
配列番号:584	FIG R13I	EKWSLCTPGCAGTGSFNSYCC
配列番号:585	FIG R13P	EKWSLCTPGCAETGSFNSYCC
配列番号:586	FIG R13Q	EKWSLCTPGCAQGSFNSYCC
配列番号:587	FIG R13E	EKWSLCTPGCAHTGSFNSYCC
配列番号:588	FIG R13H	EKWSLCTPGCAHTGSFNSYCC
配列番号:589	E11 R13N Y20E	IKWSLCTPGCANTGSFNSYCC

【図 7 - 7】

配列番号:590	F11 R13D Y20F	I KWSLCLTPGCACTGSFSNSFC
配列番号:591	F11 R13A Y20F	I KWSLCLTPGCAATGSFSNSFC
配列番号:592	F11 R13N Y20F	I KWSLCLTPGCANTGSFSNSFC
配列番号:593	F11 R13D Y20F	I KWSLCLTPGCACTGSFSNSFC
配列番号:594	F11 R13A Y20F	I KWSLCLTPGCAATGSFSNSFC
配列番号:595	F11 R2A R13N	I AWSLCLTPGCANTGSFSNSYCC
配列番号:596	F11 R2A R13D	I AWSLCLTPGCADTGFSNSYCC
配列番号:597	F11 R2A R13A	I AWSLCLTPGCATGSFSNSYCC
配列番号:598	F11 R2A R13T	I AWSLCLTPGCATTGSFSNSYCC
配列番号:599	F11 R2A R13K	I AWSLCLTPGCAGTGFSNSYCC
配列番号:600	F11 R2A R13S	I AWSLCLTPGCASTGSFSNSYCC
配列番号:601	F11 R2A R13G	I AWSLCLTPGCCACTGSFSNSYCC
配列番号:602	F11 R2A R13W	I AWSLCLTPGCAVTGSFSNSYCC
配列番号:603	F11 R2A R13I	I AWSLCLTPGCALTGSFSNSYCC
配列番号:604	F11 R2A R13P	I AWSLCLTPGCAPTGFSNSYCC
配列番号:605	F11 R2A R13Q	I AWSLCLTPGCACTGSFSNSYCC
配列番号:606	F11 R2A R13E	I AWSLCLTPGCAATGSFSNSYCC
配列番号:607	F11 R2A R13H	I AWSLCLTPGCAHTGSFSNSYCC
配列番号:608	F11 R2A R13N Y20F	I AWSLCLTPGCANTGSFSNSFC
配列番号:609	F11 R2A R13D Y20F	I AWSLCLTPGCADTGFSNSFC
配列番号:610	F11 R2A R13A Y20F	I AWSLCLTPGCATGSFSNSFC
配列番号:611	F11 R2A R13T Y20F	I AWSLCLTPGCAKTGFSNSFC
配列番号:612	F11 R2A R13K Y20F	I AWSLCLTPGCASTGSFSNSFC
配列番号:613	F11 R2A R13S Y20F	I AWSLCLTPGCATGSFSNSFC
配列番号:614	F11 R2A R13G Y20F	I AWSLCLTPGCAGTGFSNSFC
配列番号:615	F11 R2A R13W Y20F	I AWSLCLTPGCAVTGSFSNSFC
配列番号:616	F11 R2A R13D Y20F	I AWSLCLTPGCACTGSFSNSFC

【 図 7 - 8 】

配列番号:617	F11 K2A R13P Y20F	I A S W S L C T P G C A P T G S F N S F C C
配列番号:618	F11 K2A R13Q Y20F	I A S W S L C T P G C A Q T G S F N S F C C
配列番号:619	F11 K2A R13E Y20F	I A S W S L C T P G C A E T G S F N S F C C
配列番号:620	F11 K2A R13H Y20F	I A S W S L C T P G C A H T G S F N S F C C
配列番号:621	F11 K2A W4K R13N	I A S K S L C T P G C A T T G S F N S Y C C
配列番号:622	F11 K2A W4K R13D	I A S K S L C T P G C A D T G S F N S Y C C
配列番号:623	F11 K2A W4K R13A	I A S K S L C T P G C A T T G S F N S Y C C
配列番号:624	F11 K2A W4K R13N Y20F	I A S K S L C T P G C A N T G S F N S F C C
配列番号:625	F11 K2A W4K R13D Y20F	I A S K S L C T P G C A D T G S F N S F C C
配列番号:626	F11 K2A W4K R13A Y20F	I A S K S L C T P G C A T T G S F N S F C C
配列番号:627	F11 K2A W4K S5F R13N	I A S K F L C T P G C A N T G S F N S Y C C
配列番号:628	F11 K2A W4K S5F R13D	I A S K F L C T P G C A D T G S F N S Y C C
配列番号:629	F11 K2A W4K S5F R13A	I A S K F L C T P G C A A T G S F N S Y C C
配列番号:630	F11 K2A W4K S5F R13N Y20F	I A S K F L C T P G C A N T G S F N S F C C
配列番号:631	F11 K2A W4K S5F R13D Y20F	I A S K F L C T P G C A D T G S F N S F C C
配列番号:632	F11 K2A W4K S5F R13A Y20F	I A S K F L C T P G C A A T G S F N S F C C
配列番号:633	F11 K2T R13N	I T W S L C T P G C A N T G S F N S Y C C
配列番号:634	F11 K2T R13D	I T W S L C T P G C A D T G S F N S Y C C
配列番号:635	F11 K2T R13A	I T W S L C T P G C A T T G S F N S Y C C
配列番号:636	F11 K2T R13T	I T W S L C T P G C A T G S F N S Y C C
配列番号:637	F11 K2T R13K	I T W S L C T P G C A S T G S F N S Y C C
配列番号:638	F11 K2T R13S	I T W S L C T P G C A S T G S F N S Y C C
配列番号:639	F11 K2T R13C	I T W S L C T P G C A G T G S F N S Y C C
配列番号:640	F11 K2T R13W	I T W S L C T P G C A I T G S F N S Y C C
配列番号:641	F11 K2T R13I	I T W S L C T P G C A V G S F N S Y C C

【図 7 - 9】

【図7-10】

【 図 7 - 1 1 】

航务编号:6900	F11 LAV R13D	I KSWSLC TPG CADTGSFNSYCC
航务编号:6901	F11 LAV R13A	I KSWSLC TPG CAATGSFNSYCC
航务编号:6902	F11 A12T R13N	I KSWSLC TPG CNTGSFNSYCC
航务编号:6903	F11 A12T R13D	I KSWSLC TPG CADTGSFNSYCC
航务编号:6904	F11 A12T R13A	I KSWSLC TPG CAATGSFNSYCC
航务编号:6905	F11 R13N G15A	I KSWSLC TPG CANTGSFNSYCC
航务编号:6906	F11 R13D G15A	I KSWSLC TPG CADTASFSNSYCC
航务编号:6907	F11 R13A G15A	I KSWSLC TPG CAATASFSNSYCC
航务编号:6908	F11 K2T WAV R13N	I TSVSLC TPG CANTGSFNSYCC
航务编号:6909	F11 K2T WAV R13D	I TSVSLC TPG CADTGSFNSYCC
航务编号:7000	F11 K2T WAV R13A	I TSVSLC TPG CAATGSFNSYCC
航务编号:7001	F11 K2T WAV R13N	I TSMSLC TPG CADTGSFNSYCC
航务编号:7002	F11 K2T WAV R13D	I TSMSLC TPG CADTGSFNSYCC
航务编号:7135	F11 K2T WAV R13A	I TSMSLC TPG CAATGSFNSYCC

【 図 8 - 1 】

【図 8 - 2】

F11 K2A R1T	F1A R13D	F1Y R13K	F1G R13K
F11 K2A R13W	F1H R13D	F1H R13D	F1G R13I
F11 K2A R13A	F1A R13K	F1H R13C	F1G R13P
Y20F			
F11 K2A R13C	F1A R13Q	F1H R13P	F1E R13Q
Y20F			
F11 K2A R13Q	F1A R13E	F1H R13E	F1I K2A R13N
Y20F			
F11 K2A #4K	F1A R13H	F1P R13A	F1I K2A R13D
R13A			
F11 K2A #4K	F1N R13K	F1P R13T	F1I K2A R13G
R13N Y20F			
F11 K2A #4K	F1S R13N	F1P R13K	F1I K2A R13D Y20F
R13A Y20F			
F11 K2T #4K	F1S R13A	F1P R13S	F1I K2A R13S Y20F
R13S Y20F			
F11 #4M R13N	F1S R13T	F1P R13V	F1I K2A W4K S5F R13A Y20F
F11 WWW R13A	F1S R13K	F1P R13I	F1I K2T R13H Y20G
F11 #4L R13A	F1P R13P	F1L L6V R13N	F1I K2T R13A Y20N
F11 R13N G15A	F1S R13V	F1P R13E	F1I K2T R13A Y20N
F11 R13A G15A	F1S R13Q	F1P R13H	F1I K2T R13A G15A
F11 R13E	F1P R13D	F1G R13D	F1I K2A W4I R13N
F1T R13N	F1P R13E	F1P R13E	F1I K2A W4I R13D
F1T R13I	F1E R13N	F1E R13D	F1E Y19F
F1T R13D	F1E R13D	F1E R13A	
F1T R13Q	F1T R13H	F1E R13T	
F1Y R13D	F1Y R13D	F1E R13K	
F1Y R13T	F1Y R13S	F1E R13S	

【図 8 - 3】

【図 8 - 4】

アリアンント	
MU1140	Phe Lys Ser Trp Ser Leu Cys Thr Pro Gly Cys Ala Arg Thr Gly Ser Phe Asn Ser Tyr Cys Cys
MU1140	FIV R13N (初期後修飾されるが、- 次構造なし)
MU1159	Phe Lys Ala Trp Phe Leu Ala Abu Pro Gly Ala Arg Dib Gly Ala Phe Asn Ala Tyr Ala Cys
MU1158	Val Lys Ala Trp Phe Leu Ala Abu Pro Gly Ala Abu Asn Dib Gly Ala Phe Asn Ala Tyr Ala Cys (初期後修飾されるが、- 次構造なし)

【図 8 - 5】

F11 R13N Y20F	F11 K2T R13Q Y20F
F11 R13D Y20F	F11 K2T R13E Y20F
F11 R13A Y20F	F11 K2T SSF L61 CTG R13N Y20F
F11 R2A R13K	F11 K2T SSF L61 CTG R13P Y20F
F11 R2A R13S	F11 K2T SSF L61 CTG R13W Y20F
F11 R2A R13I	F11 K2T SSF L61 CTG A126 R13N Y20F
F11 R2A R13P	F11 K2T SSF L61 CTG A126 R13A Y20F
F11 R2A R13Q	F11 K2T SSF L61 CTG A126 R13A Y20F
F11 R2A R13H	F11 K2T W4K R13D
F11 R2A R13N Y20F	F11 K2T R13D
F11 R2A R13T Y20F	F11 K2T R13A
F11 R2A R13K Y20F	F11 K2T R13N Y20F
F11 R2A R13E Y20F	F11 K2T R13D Y20F
F11 R2A R13M Y20F	F11 K2T R13A Y20F
F11 R2A R13W Y20F	F11 K2T R13K Y20F
F11 R2A R13N Y20F	F11 K2T R13A Y20F
F11 R2A W4K R13N	F11 K2T W4K R13D Y20F
F11 R2A W4K R13D	F11 K2T W4K R13A Y20F
F11 R2A W4K R13D Y20F	F11 K2T W4K R13A Y20F
F11 R2T R13T Y20F	F11 W4A R13N
F11 R2T R13K Y20F	F11 A12T R13D
F11 R2T W4K R13N	F11 K2T W4V R13D
F11 K2T W4K R13A	F11 K2T W4M R13N
F11 K2T W4K R13N Y20F	F11 K2T W4K R13D Y20F
F11 K2T W4K R13D Y20F	F11 K2T W4K R13A Y20F
F11 K2T W4K R13A	F11 K2T W4V R13A
F11 K2T W4V R13A	F11 K2T A127 R13D
F11 K2T W4M R13N	F11 K2T A127 R13N
F11 K2T W4K R13N Y20F	F11 K2T A127 R13D Y20F
F11 W4M R13D	F11 K2T A127 R13N

【図 9】

アリアンント	
MU1140	M5N1Q1LLEV1LGTETP1DQEDLFAFDOTDPTIDTIVAS1NDDPDTIKF1SWSLCTPGLCA1TG5F1NS1C1C221 MU1140 M5N1Q1LLEV1LGTETP1DQEDLFAFDOTDPTIDTIVAS1NDDPDTIKF1SWSLCTPGLCA1TG5F1NS1C1C221 初期ペプチド 初期ペプチド
MU1159	M5N1Q1LLEV1LGTETP1DQEDLFAFDOTDPTIDTIVAS1NDDPDTIKF1SWSLCTPGLCA1TG5F1NS1C1C221 MU1159 M5N1Q1LLEV1LGTETP1DQEDLFAFDOTDPTIDTIVAS1NDDPDTIKF1SWSLCTPGLCA1TG5F1NS1C1C221 初期ペプチド 初期ペプチド
MU1158	M5N1Q1LLEV1LGTETP1DQEDLFAFDOTDPTIDTIVAS1NDDPDTIKF1SWSLCTPGLCA1TG5F1NS1C1C221 MU1158 M5N1Q1LLEV1LGTETP1DQEDLFAFDOTDPTIDTIVAS1NDDPDTIKF1SWSLCTPGLCA1TG5F1NS1C1C221 初期ペプチド 初期ペプチド

【図 10】

A.	F11 W4I R13D	F11 K2T A12T R13D
	F11 L6V R13D	F11 K2T A12T R13A
	F11 L6V R13A	F11 K2T R13D G15A
	F11 A12T R13N	F11 K2A WAV R13N
	F11 R13D G15A	F11 K2A WAV R13D
	F11 K2T WAV R13N	F11 K2A WAV R13N
	F11 K2T WAV R13N	F11 K2A L6V R13D
	F11 K2T WAV R13A	F11 K2A A12T R13N
	F11 K2T L6V R13A	F11 K2A A12T R13D
	F11 K2A WAV R13A	F11 K2A A12T R13A
	F11 K2A W4I R13A	F11 K2A L6V R13N G15A
	F11 K2A L6V R13N	F11 K2A R13D G15A
	F11 K2A R13A G15A	F11 K2A R13A G15A
B.	F11 R13N	F11 K2A R13W Y20F
	F11 R13W Y20F	F11 K2T W4V R13A

【図 1 1】

図11

A. 配列番号: 1162

```
atg tca aac aca caa tta tta gaa gtc ctt ggt act gaa act ttt gat gtt caa gaa  
gat ctc ttt gct ttt gat aca aca gat act act att gtg gca agc aac gac gat cca  
gat act cgt ttc aaa aat tgg agc ctt tgt acg cct ggt tgt gca agg aca ggt agt  
ttc aat aat tac tgt tgc
```

B. 配列番号: 1163

```
atg tca aac aca caa tta tta gaa gtc ctt ggt act gaa act ttt gat gtt caa gaa  
gat ctc ttt gct ttt gat aca aca gat act act att gtg gca agc aac gac gat cca  
gat act cgt gtt aaa aat tgg agc ctt tgt acg cct ggt tgt gca aat aca ggt agt  
ttc aat aat tac tgt tgc
```

C. 配列番号: 1164

```
MSNTQ LLEVL GTETF DVQED LFADF TTDFT IVASN DDPDT R
```

D. 配列番号: 1165

```
atg tca aac aca caa tta tta gaa gtc ctt ggt act gaa act ttt gat gtt caa gaa  
gat ctc ttt gct ttt gat aca aca gat act act att gtg gca agc aac gac gat cca  
gat act cgt
```

【配列表】

2019529344000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/042206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K8/64 A61Q11/00 C07K14/315 C12N9/04 ADD.
--

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) A61K A61Q C07K C12N
--

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)
--

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/130349 A1 (ORAGENICS INC [US]; TEXAS A & M UNIVESITY SYSTEM [US]) 6 September 2013 (2013-09-06) example 3 claims 1-23 -----	5
Y	----- SHAORONG CHEN ET AL: "Site-Directed Mutations in the Lanthipeptide Mutacin 1140", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 79, no. 13, 19 April 2013 (2013-04-19), pages 4015-4023, XP055405976, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00704-13 the whole document -----	1-103
X	-----	5
Y	----- -/-	1-103

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.
--

<input checked="" 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
- *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

Date of mailing of the international search report
--

18 September 2017

27/09/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Authorized officer

Bayer, Martin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/042206

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ELVIS LEGALA ONGEY ET AL: "Lanthipeptides: chemical synthesis versus in vivo biosynthesis as tools for pharmaceutical production", MICROBIAL CELL FACTORIES, vol. 15, no. 1, 7 June 2016 (2016-06-07), XP055406099, DOI: 10.1186/s12934-016-0502-y the whole document -----	1-103

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/042206

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013130349 A1	06-09-2013	AU 2013226402 A1	21-08-2014
		AU 2013226404 A1	21-08-2014
		CA 2865395 A1	06-09-2013
		CA 2865405 A1	06-09-2013
		CN 104302307 A	21-01-2015
		CN 104321338 A	28-01-2015
		EP 2820036 A1	07-01-2015
		EP 2833902 A1	11-02-2015
		EP 3219325 A1	20-09-2017
		HK 1205458 A1	18-12-2015
		HK 1205519 A1	18-12-2015
		JP 2015509715 A	02-04-2015
		JP 2015509945 A	02-04-2015
		US 2015044146 A1	12-02-2015
		US 2015125503 A1	07-05-2015
		WO 2013130349 A1	06-09-2013
		WO 2013130351 A1	06-09-2013

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 8/64	
A 6 1 Q 11/00 (2006.01)	A 6 1 Q 11/00	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

(31) 優先権主張番号 62/420,328

(32) 優先日 平成28年11月10日(2016.11.10)

(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,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,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,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72) 発明者 ハンドフィールド, マーティン

アメリカ合衆国 フロリダ州 32608 ゲインズビル, エスタブリュー 41エスティー
レーン 9222

(72) 発明者 カーズ, ヨハン, アンソニー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02482 ウェレスキー エイボン ロード 9

(72) 発明者 ムレイ, シーラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94539 フリーモント ロングフェロー ドライブ 7
75

(72) 発明者 マヨ, メリッサ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94404 フォスター シティー ロック ハーバー レ
ーン 41

(72) 発明者 コルベック, ジエフリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94002 ベルモント コンチネンタルズ ウェイ 10
01, アパートメント. 211

(72) 発明者 シャープ, ロバート, エリル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94002 ベルモント アルハンブラ ドライブ 281
7

(72) 発明者 フオスモー, アルバート, ジー., トニー

アメリカ合衆国 フロリダ州 32608 ゲインズビル エスタブリュー 43アールディー
プレイス 7815

(72) 発明者 デフォスコ, アンソニー, ダブリュー

アメリカ合衆国 フロリダ州 32669 ニューベリー エヌダブリュー 144ティーエイチ
ウェイ 2525

F ターム(参考) 4B018 LB08 MD20 MD85 ME09 MF14

4B063 QA01 QA06 QA18 QQ06 QR48 QR68 QS05 QS38

4B065 AA01X AA49X AA49Y AB01 AC14 BA02 BB02 BB15 BB19 BB26
BB29 BB37 BC02 BC03 BC09 BC10 BC26 BC33 BD03 BD09
BD12 BD13 BD15 CA24 CA28 CA34 CA41 CA44 CA50
4C083 AD411 CC41 EE31
4C084 AA02 AA19 BA01 BA08 BA18 BA23 MA02 MA52 MA57 MA66
NA05 NA14 ZB351 ZB352
4H045 AA10 AA30 BA05 BA17 BA60 CA11 DA83 EA01 EA06 EA15
EA20 FA74 GA15