

(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2011-504366

(P2011-504366A)

(43) 公表日 平成23年2月10日 (2011.2.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/005 (2006.01)	C O 7 K 14/005	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C O 7 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-534544 (P2010-534544)
 (86) (22) 出願日 平成20年11月24日 (2008.11.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年7月13日 (2010.7.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2008/003923
 (87) 国際公開番号 W02009/068858
 (87) 国際公開日 平成21年6月4日 (2009.6.4)
 (31) 優先権主張番号 60/996,563
 (32) 優先日 平成19年11月26日 (2007.11.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500060766
 ブラント バイオサイエンス リミティド
 イギリス国, ノーフォーク エヌアール4
 7ユーエイチ, ノーウィッチ, コロニー
 レーン, ノーウィッチ リサーチ パー
 ク
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 マイケル・ガッソン
 イギリス国ノーフォークエヌアール2 1
 オージェイ, スティバード, ムーアエン
 ド, ムーアエンドコテージ

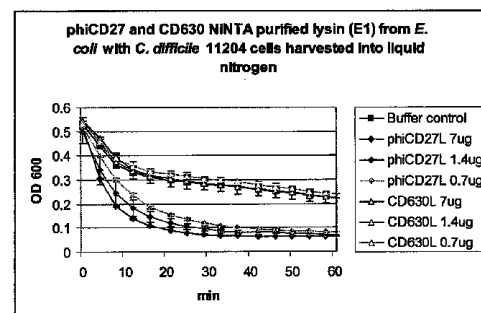
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンドリシン活性を有する新規ポリペプチド及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、クロストリジウム・ディフィシレの細胞に特異的に結合し及び/又はそれを溶解させることができる、配列番号1のアミノ酸配列を含む単離したポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、誘導体又は融合体、及びそのフラグメント、バリエーション、誘導体又は融合体がクロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージの天然リシンではないという条件で、それを製造する手段を提供する。本発明は、クロストリジウム・ディフィシレの細胞など細菌細胞を殺細胞し、その感染に関連する疾患及び状態を診断、治療、そして予防する方法を更に提供する。本発明は、また、当該方法に使用するための診断キットを提供する。

Figure 8



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

クロストリジウム・ディフィシレの細胞に特異的に結合し及び／又はそれを溶解させることができる、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む単離したポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、誘導体若しくは融合体。

【請求項 2】

ポリペプチドが、クロストリジウム・ディフィシレ株 630 (CD630) のバクテリオファージ CD119、バクテリオファージ C2 又はプロファージ 1 若しくは 2 のリシンではない、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドであって、そのフラグメント、バリエーション、誘導体又は融合体が、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 60% 同一性を示すポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであって、そのフラグメント、バリエーション、誘導体又は融合体が、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージの天然リシンではないポリペプチド。

【請求項 5】

クロストリジウム・ディフィシレの細胞に特異的に結合することができる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 6】

クロストリジウム・ディフィシレの細胞を溶解させることができる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 7】

クロストリジウム・ディフィシレの細胞に特異的に結合し及び／又はそれを溶解させることができる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 1 のアミノ酸配列から成る、請求項 8 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号 1 のアミノ酸配列のフラグメントを含み又はそれから成る、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の単離したポリペプチドであって、フラグメントが、配列番号 1 の少なくとも 50 の隣接アミノ酸、例えば、配列番号 1 の少なくとも 60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260 又は 265 の隣接アミノ酸を含むポリペプチド。

【請求項 12】

フラグメントが配列番号 1 の酵素（細胞溶解）ドメインを含み又はそれから成る、請求項 10 又は 11 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 13】

フラグメントが配列番号 1 の細胞壁結合ドメインを含み又はそれから成る、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号 1 のアミノ酸配列のバリエーション、又はそのフラグメントを含み又はそれから成る、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

請求項 14 に記載の単離したポリペプチドであって、バリエントが、配列番号 1 のアミノ酸配列、又はそのフラグメントに対して少なくとも 60 % 同一性、より好ましくは該配列に対して少なくとも 70 % 又は 80 % 又は 85 % 又は 90 % 同一性、そして最も好ましくは該アミノ酸配列に対して少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % 同一性を有するアミノ酸配列を含み又はそれから成るポリペプチド。

【請求項 16】

配列番号 1 のアミノ酸配列の誘導体、又はそのフラグメント若しくはバリエントを含み又はそれから成る、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 17】

配列番号 1 のアミノ酸配列の融合体、又はそのフラグメント、バリエント若しくは誘導体を含み又はそれから成る、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

10

【請求項 18】

配列番号 1 のアミノ酸配列、又はそのフラグメント、バリエント若しくは誘導体の N - 及び / 又は C - 末端に挿入された 1 つ又はそれ以上の更なるアミノ酸を含み又はそれから成る、請求項 17 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 19】

配列番号 1 の細胞壁結合ドメイン及び配列番号 1 中のものと異なる酵素（細胞溶解）ドメインを含み又はそれから成る、請求項 17 又は 18 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 20】

ポリペプチドが、クロストリジウム・ディフィシレの複数株の細胞を溶解させることができる、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

20

【請求項 21】

ポリペプチドが、バシラス種（例えば、バシラス・セレウス、枯草菌及び炭疽菌）、他のクロストリジウム種（例えば、クロストリジウム・ソルデリ及びクロストリジウム・ビフェルメンタンス）及びリステリア種（例えば、リステリア・イバノビイ）の細胞から成る群から選択される 1 つ又はそれ以上の細胞型を溶解させることができる、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 22】

ポリペプチドが、クロストリジウム・レブツム、クロストリジウム・ネキシル、クロストリジウム・コッコイデス、クロストリジウム・イノクーム、クロストリジウム・ラモスム及び / 又はアネロコッカス・ヒドロジェナリスの細胞を溶解しない、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

30

【請求項 23】

ポリペプチドがクロストリジウム・ディフィシレリボタイプ 027 の細胞を溶解することができる、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 24】

ポリペプチドが、クロストリジウム・ディフィシレリボタイプ 027 の細胞に対して配列番号 1 のポリペプチドの少なくとも 10 %、例えば、少なくとも 20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 % 又はそれ以上の溶解活性を示す、請求項 23 に記載の単離したポリペプチド。

40

【請求項 25】

ポリペプチドが、クロストリジウム・ディフィシレリボタイプ 027 の細胞に対して配列番号 1 のポリペプチドの少なくとも 100 %、例えば、少なくとも、120 %、130 %、140 %、150 %、160 %、170 %、180 %、190 %、200 %、250 %、300 %、500 % 又はそれ以上の溶解活性を示す、請求項 24 に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 26】

ポリペプチドが病原菌の細胞を選択的に溶解することができる、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

50

【請求項 27】

ポリペプチドが組み換えポリペプチドである、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の単離したポリペプチド。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコード化する単離した核酸分子。

【請求項 29】

核酸分子が配列番号 2 の核酸配列を含み又はそれから成る、請求項 28 に記載の核酸分子。

【請求項 30】

請求項 28 又は 29 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 31】

ベクターが発現ベクターである、請求項 30 に記載のベクター。

【請求項 32】

ベクターが pET15b 及び pACYC184 から成る群から選択される、請求項 30 又は 31 に記載のベクター。

【請求項 33】

請求項 28 又は 29 に記載の核酸分子又は請求項 30 又は 31 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 34】

宿主細胞が請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを発現することができる、請求項 33 に記載の宿主細胞。

【請求項 35】

宿主細胞が微生物細胞である、請求項 33 又は 34 に記載の宿主細胞。

【請求項 36】

宿主細胞が細菌細胞である、請求項 33 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞。

【請求項 37】

宿主細胞が非病原性である、請求項 35 又は 36 に記載の宿主細胞。

【請求項 38】

宿主細胞が、大腸菌、ラクトコッカス種、バクテロイデス種、ラクトバシラス種、エンテロコッカス種及びバシラス種の細胞から成る群から選択される、請求項 33 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞。

【請求項 39】

宿主細胞が乳酸連鎖球菌細胞である、請求項 38 に記載の宿主細胞。

【請求項 40】

ポリペプチドを発現する条件下で請求項 28 又は 29 に記載の核酸分子、又は請求項 30 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む宿主細胞集団を培養し、そこからポリペプチドを単離することを含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを生産する方法。

【請求項 41】

以下のもの：

(a) 請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド；

(b) 請求項 28 又は 29 に記載の核酸分子；

(c) 請求項 30 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のベクター；

(d) 請求項 33 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の宿主；及び / 又は

(e) 本発明の第 1 の態様に記載のポリペプチドを発現することができるバクテリオファージ；

及び薬学的に許容される担体、賦形剤又は医薬品添加剤を含む医薬組成物。

【請求項 42】

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む、請求項 41 に記載の医薬

10

20

30

40

50

組成物。

【請求項 4 3】

経口投与のための、請求項 4 1 又は 4 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 4】

ポリペプチドがマイクロカプセル化された、請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 5】

ポリペプチドを胃腸管に送達することができる、請求項 4 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 6】

請求項 2 8 又は 2 9 に記載の核酸分子及び / 又は請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む、請求項 4 1 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 7】

請求項 3 3 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞を含む、請求項 4 1 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 8】

請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを発現するように、そして胃腸管内の所定の場所に到達時に該ポリペプチドを放出するように、遺伝子組み換えした病原性細菌宿主細胞を含む、請求項 4 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを発現することができるバクテリオファージを含む、請求項 4 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5 0】

組成物が胃腸管内でポリペプチドの持続性又は徐放性放出を可能にする、請求項 4 1 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5 1】

医薬に使用するための、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又は請求項 4 1 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5 2】

患者中の微生物細胞を殺細胞し及び / 又はその増殖を阻害 / 抑制するための薬剤の製造における、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用であって、微生物細胞が、クロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用。

【請求項 5 3】

患者中の微生物細胞を殺細胞し及び / 又はその増殖を阻害 / 抑制に使用するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージであって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される、ポリペプチド又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージ。

【請求項 5 4】

患者中の微生物細胞に関連する疾患又は病態の治療又は予防のための薬剤製造における、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用。

10

20

30

40

50

【請求項 5 5】

患者中の微生物細胞に関連する疾患又は病態の治療又は予防に使用するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージであって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される、ポリペプチド又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージ。

【請求項 5 6】

請求項 5 2 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の使用であって、細胞溶解活性を有するポリペプチドが以下のもの：

10

(a) バクテリオファージ C D 2 7 のリシン；

(b) バクテリオファージ C D 1 1 9 のリシン；

(c) バクテリオファージ C 2 のリシン；及び

(d) クロストリジウム・ディフィシレ株 6 3 0 (C D 6 3 0) のプロファージ 1 及び 2 のリシン；

から成る群から選択される使用。

【請求項 5 7】

請求項 5 2 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の使用であって、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドが請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであり、そして微生物細胞が、クロストリジウム・ディフィシレ細胞及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触時に溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用。

20

【請求項 5 8】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞である、請求項 5 2 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5 9】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ・リボタイプ 0 2 7 細胞である、請求項 5 8 に記載の使用。

30

【請求項 6 0】

クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージを患者に投与することを含む、患者中の微生物細胞を殺細胞し及び / 又はその増殖を阻害 / 抑制する方法であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される方法。

【請求項 6 1】

クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージを患者に投与することを含む、患者中の微生物細胞に関連する疾患又は病態を治療又は予防する方法であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される方法。

40

【請求項 6 2】

請求項 6 0 又は 6 1 に記載の方法であって、細胞溶解活性を有するポリペプチドが以下のもの：

(a) バクテリオファージ C D 2 7 のリシン；

(b) バクテリオファージ C D 1 1 9 のリシン；

(c) バクテリオファージ C 2 のリシン；及び

(d) クロストリジウム・ディフィシレ株 6 3 0 (C D 6 3 0) のプロファージ 1 及び

50

2 のリシン；

から成る群から選択される方法。

【請求項 6 3】

請求項 6 0 ～ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法であって、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドが請求項 1 ～ 2 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであり、そして微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触時に溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される方法。

【請求項 6 4】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞である、請求項 6 0 ～ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 6 5】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ・リボタイプ 0 2 7 細胞である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

インビトロ及び／又はエクスビボで微生物細胞を殺細胞し及び／又はその増殖を阻害／抑制するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用。 20

【請求項 6 7】

請求項 6 6 に記載の使用であって、細胞溶解活性を有するポリペプチドが以下のもの：

- (a) バクテリオファージ C D 2 7 のリシン；
- (b) バクテリオファージ C D 1 1 9 のリシン；
- (c) バクテリオファージ C 2 のリシン；及び
- (d) クロストリジウム・ディフィシレ株 6 3 0 のプロファージ 1 及び 2 のリシン；

から成る群から選択される使用。

【請求項 6 8】

請求項 6 6 又は 6 7 に記載の使用であって、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドが請求項 1 ～ 2 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであり、そして微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触時に溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用。 30

【請求項 6 9】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞である、請求項 6 6 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7 0】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ・リボタイプ 0 2 7 細胞である、請求項 6 9 に記載の使用。 40

【請求項 7 1】

クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージを含む、試料中の微生物細胞の存在を検出するためのキットであって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択されるキット。

【請求項 7 2】

請求項 7 1 に記載のキットであって、細胞溶解活性を有するポリペプチドが以下のもの：

- (a) バクテリオファージ C D 2 7 のリシン；

(b) バクテリオファージ CD 1 1 9 のリシン；

(c) バクテリオファージ C 2 のリシン；及び

(d) クロストリジウム・ディフィシレ株 6 3 0 のプロファージ 1 及び 2 のリシン；

から成る群から選択されるキット。

【請求項 7 3】

請求項 7 1 又は 7 2 に記載のキットであって、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドが請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであり、そして微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触時に溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択されるキット。

10

【請求項 7 4】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞である、請求項 7 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 7 5】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ・リボタイプ 0 2 7 細胞である、請求項 7 4 に記載のキット。

【請求項 7 6】

ポリペプチドが表面に固定化されている、請求項 7 1 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 7 7】

試料が細胞試料である、請求項 7 1 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載のキット。

20

【請求項 7 8】

試料が微生物細胞による汚染の試験をするために表面から採取された拭い液由来である、請求項 7 1 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 7 9】

陰性対照試料を更に含む、請求項 7 1 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 8 0】

陽性対照試料を更に含む、請求項 7 1 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 8 1】

クロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される、微生物細胞に関連する疾患又は病態の診断薬の製造における、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞壁結合活性及び / 又は細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用。

30

【請求項 8 2】

クロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される微生物細胞に関連する疾患又は病態診断に使用するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞壁結合活性及び / 又は細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージ。

40

【請求項 8 3】

インビトロ及び / 又はエクスビボで試料中の微生物細胞の存在を検出するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞壁結合活性及び / 又は細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用。

【請求項 8 4】

請求項 8 1 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の使用であって、細胞壁結合活性及び / 又は細胞溶解活性を有するポリペプチドが以下のもの：

50

- (a) バクテリオファージ C D 2 7 のリシン ;
- (b) バクテリオファージ C D 1 1 9 のリシン ;
- (c) バクテリオファージ C 2 のリシン ; 及び
- (d) クロストリジウム・ディフィシレ株 6 3 0 (C D 6 3 0) のプロファージ 1 及び 2 のリシン ;

から成る群から選択される使用。

【請求項 8 5】

請求項 8 1 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の使用であって、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞壁結合活性及び / 又は細胞溶解活性を有するポリペプチドが請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであり、そして微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触時に溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用。

10

【請求項 8 6】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞である、請求項 8 1 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8 7】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ・リボタイプ 0 2 7 細胞である、請求項 8 6 に記載の使用。

【請求項 8 8】

クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージを用いて試験するために患者の細胞試料を接触させ、そして試料中の細胞がそれにより溶解されるかどうかを測定することを含む、患者中の微生物細胞に関連する疾患又は病態を診断する方法であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される方法。

20

【請求項 8 9】

請求項 8 8 に記載の方法であって、細胞溶解活性を有するポリペプチドが以下のもの :

- (a) バクテリオファージ C D 2 7 のリシン ;
- (b) バクテリオファージ C D 1 1 9 のリシン ;
- (c) バクテリオファージ C 2 のリシン ; 及び
- (d) クロストリジウム・ディフィシレ株 6 3 0 のプロファージ 1 及び 2 のリシン ;

30

から成る群から選択される方法。

【請求項 9 0】

請求項 8 8 又は 8 9 に記載の方法であって、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドが請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであり、そして微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触時に溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される方法。

【請求項 9 1】

40

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞である、請求項 8 8 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 2】

微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ・リボタイプ 0 2 7 細胞である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りの、単離したポリペプチド。

【請求項 9 4】

実質的に実施例に関連した本明細書に記載した通りの単離した核酸分子。

【請求項 9 5】

50

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りのベクター。

【請求項 9 6】

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りの宿主細胞。

【請求項 9 7】

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りの、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載したポリペプチドを製造する方法。

【請求項 9 8】

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りの、医薬組成物。

【請求項 9 9】

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りの、微生物細胞を殺細胞し及び / 又はその増殖を阻害 / 抑制するためのポリペプチドの使用。

10

【請求項 1 0 0】

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りの、微生物細胞に関連する疾患又は病態を治療又は予防するための薬剤製造におけるポリペプチドの使用。

【請求項 1 0 1】

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りの、試料中の微生物細胞の存在を検出するためのキット。

【請求項 1 0 2】

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りの、微生物細胞に関連する疾患又は病態の診断薬の製造におけるポリペプチドの使用。

20

【請求項 1 0 3】

実質的に実施例に関連して本明細書に記載した通りの、試料中の微生物細胞の存在を検出するためのポリペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) のバクテリオファージからのエンドリシン由来新規ポリペプチド及びそれをコードする核酸分子、並びにその組成物に関する。本発明は、クロストリジウム・ディフィシレなどの微生物細胞に関連する病態及び疾患の診断及び治療における当該ポリペプチド及び核酸分子の使用をも提供する。特に、本発明は、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ C D 2 7 由来エンドリシン活性を有する新規ポリペプチド及びその使用を提供する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

クロストリジウム・ディフィシレに関連する高まりつつある問題、特に、抗生物質使用にしばしば関連する院内感染におけるその役割は十分裏付けられている (非特許文献 1)。C.ディフィシレは、加熱、乾燥及び消毒剤に耐性を有する孢子形成能を有する嫌気性グラム陽性菌である。非塩素系の洗浄剤への露出は、実際に孢子形成を増加させるという幾つかの証拠がある。これらの特性は、この生物が病院環境中に生き残る能力に寄与し、それにより患者に感染する能力を有する病原体の貯蔵庫を維持する。C.ディフィシレ関連疾患 (C D A D) は、その増大する速度及び深刻さの双方を伴い、U K においても世界的にも高まりつつある問題である。イングランド及びウェールズでは、C.ディフィシレに関連する死亡が 1 9 9 9 年の 9 7 5 人から 2 0 0 4 年の 2 , 2 4 7 人まで増加した。C D A D の届出は、1 9 9 9 年の 1 0 0 0 人から 2 0 0 0 年の 1 5 , 0 0 0 人、そして 2 0 0 3 年の 3 5 , 5 0 0 人まで増加した (非特許文献 2)。上記のヒトの健康への脅威に加えて、C.ディフィシレが、動物、特に子ウシ及びヒツジなどの家畜における罹患及び死亡の重大な原因でもあることを銘記すべきである。従って、ヒトにおけるこの問題に対処する方法に関する本明細書での開示は、同様に家畜対象にも当てはまると読み取るべきである。

40

【0 0 0 3】

50

特に重大な進展は、当初カナダとUSAにおける、しかし現在はUKと幾つかの他のヨーロッパ諸国で著しい、C.ディフィシレの高毒性株の出現である。C.ディフィシレリボタイプ027と特定されたこの新菌株は、174例及び19名の死亡にかかわる大流行において2003年にUKで検出された。2006年までに75の病院からC.ディフィシレリボタイプ027の450の別のUK分離株が認められた（非特許文献1）。

【0004】

C.ディフィシレは土壌及び動物の腸管に広く分布している。それは、3%のヒト成人並びに80%の健常新生児及び小児の便から培養することができる（非特許文献1）。病原性能力は、C.ディフィシレの強力な毒素を産生する能力に関連する；2つの主要な特徴的毒素は、308kDaの外毒素の毒素A（TcdA）及び270kDaの細胞毒素の毒素B（TcdB）であり、これらはアミノ酸レベルで63%の相同性を共有する（非特許文献3）。これらの毒素をコード化する遺伝子は、病原性島PaLoc（非特許文献4）に関係し、そして菌株はこれらの2つの毒素を産生するそれらの能力の点で異なる。他の毒性因子も関与していると考えられ、そして別の2成分系毒素CDTが明らかにされている（非特許文献5、6）。

10

【0005】

毒性C.ディフィシレ株の病原性能力は、胃腸管（GIT）マイクロフローラが損なわれ又はアンバランスになっている場合に成り立ち、そしてこれは抗生物質治療の一般的な帰結である。このように、病院環境はヒトの病気を蔓延させ引き起こすC.ディフィシレの理想的な環境である（非特許文献1）。

20

【0006】

CDAは、C.ディフィシレの病原性株が十分強い地位をGITマイクロフローラ内で獲得すると起こり、宿主上皮を損傷する1つ又は複数の毒素を産生する。GITマイクロフローラは病原性微生物に対する重要なバリアであり、宿主と有利な様式で相互作用しながらホメオスタシス平衡に維持される、凡そ500から1000の異なる種の複合群落を形成する。古典的な抗生物質治療は、程度の差はあるが無差別的であり、それはGITの微生物群落の微妙なバランスを損なう可能性がある。従来抗生物質治療又は他の要因の結果として、正常なマイクロフローラの破壊はCDAの発症の主な要因である。

【0007】

それ故、複合GITマイクロフローラの保護能力を損傷しない、C.ディフィシレの制御に対する新しい処置法及び取り組み方法の必要性が高まっている。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Kuijper, E. J., Coignard, B. & Tull, P. (2006) Clin Microbiol Infect 12 Suppl 6, 2-18.

【非特許文献2】Anonymous (2006) Health Statistics Quarterly 30, 56-60.

【非特許文献3】Rupnik, M., Dupuy, B., Fairweather, N. F., Gerding, D. N., Johnson, S., Just, I., Lyster, D. M., Popoff, M. R., Rood, J. I., Sonenshein, A. L., Thelestam, M., Wren, B. W., Wilkins, T. D. & von Eichel-Streiber, C. (2005) J Med Microbiol 54, 113-7.

40

【非特許文献4】Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M. & von Eichel-Streiber, C. (1996) Gene 181, 29-38.

【非特許文献5】Goncalves, C., Decre, D., Barbut, F., Burghoffer, B. & Petit, J. C. (2004) J Clin Microbiol 42, 1933-9.

【非特許文献6】Popoff, M. R., Rubin, E. J., Gill, D. M. & Boquet, P. (1988) Infect Immun 56, 2299-306.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

50

本発明の第 1 の態様は、クロストリジウム・ディフィシレの細胞に特異的に結合し及び / 又はそれを溶解させることができる、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、誘導体若しくは融合体を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

下記のアミノ酸配列は、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ CD 27 の野生型（即ち、天然産）エンドリシンの配列である。

【化 1】

MKICITVGHSILKSGACTSADGVVNEYQYNKSLAPVLADTFRKEGHKVDVIICPEKQFKT
KNEEKSYKIPRVNSGGYDLLIELHLNASNGQGKSEVLYYSNKGLEYATRICKLGTVFK
NRGAKLDRKRLYLNSSKPTAVLIESFFCDNKEDYDKAKKLGHEGIAKLIVEGVLNKNINNE
GVKQMYKHTIVYDGEVDKISATVVGWGYNDGKILICDIKDYVPGQTQNLVVGGGACEK
ISSITKEKFIMIKGNDRFDTLYKALDFINR

10

[配列番号 1]

【0011】

NCBI 受入番号 YP_002290910 及び ACH91325 をも参照されたい。

【0012】

1 つの実施態様では、ポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレ（CD 27 以外の）のバクテリオファージの天然リシンではない。従って、本発明の第 1 の態様は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含み又はそれから成る単離したポリペプチド、及びその非天然型フラグメント、バリエーション、誘導体若しくは融合体を提供する。

20

【発明を実施するための形態】

【0013】

本明細書で使用される用語「アミノ酸」は、遺伝的にコード化された 20 の標準アミノ酸及びそれらの対応する「D」型の立体異性体（天然の「L」型と比較して）、 α -アミノ酸及び他の天然アミノ酸、特殊アミノ酸（例えば、 β -ジ置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸など）並びに化学誘導アミノ酸（下記を参照）を含む。

【0014】

従って、アミノ酸を、「アラニン」又は「Ala」又は「A」のように特別に羅列する場合、この用語は特に明示しない限り L-アラニン及び D-アラニンの両方を指す。所望の機能特性がそのポリペプチドにより保持される限り、他の特殊アミノ酸も本発明のポリペプチドの好適な成分であり得る。例示したペプチドに対して、コード化されたアミノ酸残基は、それぞれ、必要に応じて標準アミノ酸の慣用名に対応する単一文字記号表示によって表わされる。

30

【0015】

好ましくは、ポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、融合体若しくは誘導体は、L-アミノ酸を含み又はそれから成る。

【0016】

「単離した」により、本発明のポリペプチド、特にバクテリオファージ CD 27 の野生型エンドリシンが天然に見出されるもの以外の形態で提供されることを意味する。好ましくは、ポリペプチドはインタクトバクテリオファージを含まないで提供される。

40

【0017】

1 つの実施態様では、単離した形態で与えられるバクテリオファージ CD 27 [配列番号 1] の天然エンドリシンである。

【0018】

先行技術において公知のクロストリジウム・ディフィシレバクテリオファージの他の天然リシンは、本発明の第 1 の態様に包含されない。特に、クロストリジウム・ディフィシレバクテリオファージの以下のリシンは、本発明の第 1 の態様の範囲から明確に除外される：

50

- (a) バクテリオファージ CD 119 のリシン (lysin) ;
 (b) バクテリオファージ C 2 のリシン ; 及び
 (c) クロストリジウム・ディフィシレ株 630 (CD 630) のプロファージ 1 及び 2 のリシン。

【0019】

例えば、以下の公知のタンパク質 (それらの NCBI 受入番号を参照することにより定義される) :

Ph i C 2 推定エンドリシン : Y P _ 0 0 1 1 1 0 7 5 4 ;
 C D 6 3 0 ファージエンドリシン : Y P _ 0 0 1 0 8 7 4 5 3 ;
 p h i C D 1 1 9 推定リシン : Y P _ 5 2 9 5 8 6 ;
 Q C D - 3 2 g 5 8 仮想タンパク質 : Z P _ 0 1 8 0 3 3 9 8 ;
 Q C D - 3 2 g 5 8 仮想タンパク質 : Z P _ 0 1 8 0 3 2 2 8 ;

は、本発明の第 1 の態様の範囲から明確に除外される。

【0020】

1 つの実施態様では、本発明の第 1 の態様のポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む。例えば、ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列から成ることができる。

【0021】

しかしながら、本発明の第 1 の態様は、クロストリジウム・ディフィシレの細胞に特異的に結合し及び / 又はそれを溶解させることができる配列番号 1 のアミノ酸のフラグメント、バリエーション、誘導体及び融合体にも及ぶ。

【0022】

「クロストリジウム・ディフィシレの細胞に特異的に結合することができる」により、ポリペプチドがクロストリジウム・ディフィシレの細胞に優先的に結合することができることを意味する。しかし、当然のことながら、当該ポリペプチドは 1 つ又はそれ以上の異なる細胞型にも優先的に結合することができる。好ましくは、クロストリジウム種の細胞に排他的に結合する。当該細胞結合活性は、当技術分野で周知の方法を用いて測定することができる。

【0023】

「クロストリジウム・ディフィシレの細胞を溶解させることができる」により、ポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、誘導体若しくは融合体が、バクテリオファージ CD 27 の野生型エンドリシンが細菌性細胞を溶解させる能力 (少なくとも一部) を保持することを意味する。当然のことながら、当該溶解活性は、全細胞型に対する非特異的細胞毒性活性よりむしろ細胞特異的 (例えば、クロストリジウム・ディフィシレの細胞に対して) であるべきである。当該細胞溶解活性は、以下の実施例に詳述される方法 (Loessner et al. [37] をも参照されたい、その開示内容は参照することにより本明細書に組み入れられている) など当技術分野で周知の方法を用いて測定することができる。好ましくは、ポリペプチドがクロストリジウム・ディフィシレの細胞を溶解させる能力は新鮮細胞を用いて測定される。

【0024】

好ましい実施態様では、ポリペプチドがクロストリジウム・ディフィシレの細胞を溶解させる能力は、11204 菌株の細胞を用いて測定される。

【0025】

当業者には当然のことながら、ポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、誘導体若しくは融合体は、細菌細胞を溶解させるバクテリオファージ CD 27 の野生型エンドリシンの全能力を保持する必要はない。むしろ、該ポリペプチド、フラグメント、バリエーション、誘導体又はその融合体は、細菌細胞を溶解するバクテリオファージ CD 27 の野生型エンドリシンのただ単に少なくとも 10 % の能力を保持する必要があるだけである。しかしながら、好ましくは、ポリペプチド、フラグメント、バリエーション、誘導体又はその融合体は、少なくとも 20 % の、例えば、少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、150 %、200 % 又はそれ以上の、細菌細胞

10

20

30

40

50

を溶解させるバクテリオファージ C D 2 7 の野生型エンドリシンの能力を示す。

【 0 0 2 6 】

それ故に、本発明の第 1 の態様の実施態様では、ポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレの細胞を溶解させることができる、配列番号 1 のアミノ酸配列のフラグメントを含み又はそれから成る。

【 0 0 2 7 】

多くのバクテリオファージ・エンドリシンが 2 つの異なるドメイン（例えば、Sheehan et al., 1996, FEMS Microbiology Letters 140:23-28を参照されたい、その開示内容は参照することにより本明細書に組み入れられている）から成ることは十分立証されている。1 つは細胞壁分解に關与する触媒ドメインであり、これらは幾つかの異なる形態で存在することが知られている。他のドメインは、細胞表面モチーフを認識する細胞壁結合ドメインであり、その標的細胞へのエンドリシンの付着を可能にする。

【 0 0 2 8 】

酵素ドメインは、同じタイプの溶解活性を共有する溶菌酵素の他の類似領域に対するそのアミノ酸相同性によって同定することができる。バクテリオファージ C D 2 7 のエンドリシンの場合、酵素ドメインは N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼと同定されており、それはエンドリシンのアミノ末端領域を占有する（これは公知酵素ドメインによる配列番号 1 の並列解析によって、例えば、N C B I C D D 検索ツールを用いて確認することができる；Marchler-Bauer & Bryant, 2004, Nuc. Acids Res. 32[W]:327-331を参照されたい。その開示内容は、参照することにより本明細書に組み入れられている）。細胞壁結合ドメインは、エンドリシンのカルボキシ末端領域を占有すると考えられる。

【 0 0 2 9 】

1 つの実施態様では、酵素ドメインは配列番号 1 の 1 から 1 7 5 のアミノ酸内に含まれる。従って、酵素ドメインを含むフラグメントは、アミノ酸 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90 又は 100 のいずれかから開始し、そしてアミノ酸 175、170、165、160、155、150、145、140、135、130、125、120、115、110 又は 105 のいずれかで終了する配列番号 1 の配列から成ると考えられる。例えば、酵素ドメインを含むフラグメントは、配列番号 1 の 10 から 140 までのアミノ酸、又は配列番号 1 の 25 から 155 までのアミノ酸、又は上記の開始及び終点の他の可能な順列のいずれかからなると考えられる。

【 0 0 3 0 】

1 つの実施態様では、細胞壁結合ドメインは配列番号 1 の 175 から 270 のアミノ酸内に含まれる。従って、細胞壁結合ドメインを含むフラグメントは、アミノ酸 175、180、185、190、195、200、205、210、215、220 のいずれかから開始し、そしてアミノ酸 270、265、260、255、250、245、240、235、230 又は 225 のいずれかで終了する配列番号 1 の配列から成ると考えられる。例えば、細胞壁結合ドメインを含むフラグメントは、配列番号 1 の 195 から 265 までのアミノ酸、又は配列番号 1 の 180 から 240 までのアミノ酸、又は上記の開始及び終点の他の可能な順列のいずれかからなると考えられる。

【 0 0 3 1 】

本発明の第 1 の態様のポリペプチドは、好ましくは酵素ドメイン及び細胞壁結合ドメインの両方に対応する、配列番号 1 のアミノ酸配列の 1 つ又はそれ以上のフラグメントを含み又はそれから成る。

【 0 0 3 2 】

しかしながら、当業者には当然のことながら、配列番号 1 の細胞壁結合ドメインは、代わりにクロストリジウム・ディフィシレの細胞を溶解させることができる別の起源からの酵素（溶解）ドメインに融合するか又はそうでなければ結合してもよい。キメラ的なリシンの製造は、Sheehan et al., 1996, FEMS Microbiology Letters 140:23-28に記載されており、その開示内容は参照することにより本明細書に組み入れられている。従って、別

の実施態様では、本発明の第 1 の態様のポリペプチドは、細胞壁結合ドメインに対応する配列番号 1 のアミノ酸配列の 1 つ又はそれ以上のフラグメントを含み又はそれから成ることができる。

【0033】

フラグメントは、配列番号 1 の少なくとも 50 の隣接アミノ酸、例えば、配列番号 1 の、少なくとも 60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、175、180、190、200、210、220、230、240、250、260 又は 265 の隣接アミノ酸を含み又はそれから成ることができる。

【0034】

別の実施態様では、本発明の第 1 の態様のポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレの細胞を溶解させることができる、配列番号 1 のアミノ酸配列のバリエーション、又はそのフラグメントを含み又はそれから成ることができる。

10

【0035】

ポリペプチドの「バリエーション」により、配列番号 1 のアミノ酸配列に関連して保存性であれ又は非保存性であれ、挿入、欠失及び/又は置換を含む。特に、バリエーションポリペプチドは、非天然バリエーションであってもよい。

【0036】

例えば、ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 60% の同一性、より好ましくは該配列に対して少なくとも 70% 又は 80% 又は 85% 又は 90% の同一性、そして最も好ましくは該アミノ酸配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

20

【0037】

当然のことながら、上記の配列同一性は配列番号 1 のアミノ酸配列の全長にわたり、又はその一部にわたってもよい。しかしながら、好ましくは、配列同一性は、配列番号 1 のアミノ酸配列の少なくとも 50 のアミノ酸にわたり、例えば、その中の少なくとも 60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260 又はそれ以上のアミノ酸にわたる。

【0038】

同一性パーセントは、当技術分野で周知の方法、例えば、ExPASy ファシリティ ウェブサイトでの LALIGN プログラム (Huang and Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357、その開示内容は参照することにより本明細書に組み入れられている) :

30

www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html

を用いて、パラメーターとしてグローバルアラインメントオプション、スコアリングマトリックス BLOSUM62、開口ギャップペナルティ - 14、拡張ギャップペナルティ - 4 を用いて測定することができる。

【0039】

或いはまた、2 ポリペプチド間の配列同一性パーセントは、適切なコンピュータプログラム、例えば、AlignX, Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Corporation から) 又は GAP プログラム (University of Wisconsin Genetic Computing Group から) を用いて測定してもよい。

40

【0040】

当然のことながら、同一性パーセントは、その配列が最適にアラインメントされているポリペプチドに関して計算される。

【0041】

配列番号 1 のアミノ酸配列のフラグメント及びバリエーションは、当技術分野で周知のタンパク質工学及び部位特異的変異誘発の方法を用いて作製されてもよい (例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edition (「分子クローニング: 実験室マニュアル第 3 版」), Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press を参照されたい。その開示内容は参照することにより本明細書に組み入れられている)。

50

【 0 0 4 2 】

当業者には当然のことながら、本発明のポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション若しくは融合体は、修飾又は誘導体化された1つ又はそれ以上のアミノ酸を含んでもよい。従って、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列の誘導体、又はそのフラグメント若しくはバリエーションを含み又はそれから成ることができる。

【 0 0 4 3 】

1つ又はそれ以上のアミノ酸の化学誘導体は、官能性側鎖基との反応により得ることができる。当該誘導体化分子は、例えば、遊離アミノ基が誘導体化されて、アミン塩酸塩、p - トルエンスルホニル基、カルボキシベンゾキシ基、t - ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基又はホルミル基を形成するそれらの分子を含む。遊離カルボキシル基は、誘導体化して塩、メチル及びエチルエステル又は他のタイプのエステル及びヒドラジドを形成してもよい。遊離のヒドロキシル基は、誘導体化してO - アシル又はO - アルキル誘導体を形成してもよい。化学誘導体としては、20の標準アミノ酸の天然アミノ酸誘導体を含むそれらのペプチドも含まれる。例えば：4 - ヒドロキシプロリンは、プロリンと置換してもよい；5 - ヒドロキシリジン、リジンと置換してもよい；3 - メチルヒスチジンは、ヒスチジンと置換してもよい；ホモセリンはセリンと、そしてオルニチンはリジンと置換してもよい。誘導体は、また、必要活性が維持される限り、1つ又はそれ以上の付加又は欠失を含むペプチドをも含む。含まれる他の修飾は、アミド化、アミノ末端アシル化（例えば、アセチル化又はチオグリコール酸アミド化）、末端カルボキシアミド化（例えば、アンモニア又はメチルアミンによる）、などの末端修飾である。

【 0 0 4 4 】

当業者には更に当然のことながら、ペプチド模倣的化合物も有用であり得る。従って、「ポリペプチド」により、エンドリシン活性を呈するペプチド模倣的化合物を含む。用語「ペプチド模倣的」は、治療薬として特定のポリペプチドの立体配座及び所望の特徴を模倣した化合物を指す。

【 0 0 4 5 】

例えば、本明細書に記載のポリペプチドは、アミノ酸残基がペプチド（- C O - N H - ）結合によって結合される分子だけでなく、ペプチド結合が逆向きの分子も含む。当該逆反転ペプチド模倣体は、当技術分野で公知の方法、例えば、Mezriere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237に記載の方法などを用いて作製してもよく、その開示内容は参照することにより本明細書に組み入れられている。C O - N Hの代わりにN H - C O結合を含む当該逆反転ペプチド模倣体は、タンパク質分解に対して更にいっそう抵抗性である。或いはまた、本発明のポリペプチドは、1つ又はそれ以上のアミノ酸残基が、通常のアミド結合の代わりに - （C H₂ N H） - 結合によって結合したペプチド模倣的化合物であってもよい。

【 0 0 4 6 】

当然のことながら、ポリペプチドは、細胞外タンパク質分解消化に対する感受性を低減するのを助けるために、そのN - 又はC - 末端において、例えば、アミド化により都合よくブロックしてもよい。

【 0 0 4 7 】

上記のように、D - アミノ酸及びN - メチルアミノ酸などの様々な非コード又は修飾アミノ酸は、本発明のポリペプチドを修飾するのに使用してもよい。加えて、推定生物活性立体配座は、環化などの共有結合修飾により、又はラクタムの組み込み若しくは他のタイプの架橋によって安定化してもよい。ジスルフィド、スルフィド及びアルキレン架橋を含む、環状ホモデチックペプチド及び環状ヘテロデチックペプチドの合成方法は、米国特許第5643872号に開示されている。環化方法の他の例は、米国特許第6008058号にて検討され開示されており、それらの文書における関連開示内容は、参照することにより本明細書に組み入れられている。環状の安定化ペプチド模倣的化合物の合成への更なる取り組みは、閉環メタセシス（RCM）である。

【 0 0 4 8 】

要約すれば、周知のような末端修飾は、プロテイナーゼ消化による感受性を低減させ、その結果、溶液中、特にプロテアーゼが存在すると考えられる生体液中のペプチドの半減期を延長するのに有用である。ポリペプチド環化は、また、有用な修飾であり、環化によって形成される安定構造に因りそして環状ペプチドで認められる生物活性の点で好ましい。

【0049】

従って、1つの実施態様では、ポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、融合体若しくは誘導体は環状である。しかしながら、好ましい実施態様では、ポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、融合体若しくは誘導体は線状である。

【0050】

本発明の第1の態様の更なる実施態様では、ポリペプチドは配列番号1のアミノ酸配列の融合体、又はそのフラグメント、バリエーション若しくは誘導体を含み又はそれから成る。

【0051】

ポリペプチドの「融合体」は、その他のポリペプチドに融合したポリペプチドを含む。例えば、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列の内部に及び/又はN-及び/又はC-末端に挿入された1つ又はそれ以上の更なるアミノ酸、又はそのフラグメント、バリエーション若しくは誘導体を含んでもよい。

【0052】

従って上記のように、1つの実施態様では、本発明の第1の態様のポリペプチドは、異なる起源の酵素ドメインがそれに融合した、細胞壁結合ドメイン（又はその細胞壁結合活性を保持するようなドメイン配列のバリエーション）から成る配列番号1のフラグメントを含む。

【0053】

他の好適な酵素ドメインの例は：

L-アラニル-D-グルタミン酸エンドペプチダーゼ；D-グルタミル-m-DAPエンドペプチダーゼ；ペプチド間架橋特異的エンドペプチダーゼ；N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ（＝ムラモイルヒドロラーゼ）；N-アセチル-D-ムラミダーゼ（＝リゾチーム）；溶菌性トランスグリコシラーゼを含む。

【0054】

また、他の起源からのN-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼも利用可能である（Loessner, 2005, Current Opinion in Microbiology 8: 480-487を参照されたい。その開示内容は参照することにより本明細書に組み入れられている）。

【0055】

例えば、該ポリペプチドは、該ポリペプチドの精製を容易にするために、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）又はタンパク質Aのようなポリペプチドに融合してもよい。当該融合体の例は当業者に周知である。同様に、該ポリペプチドは、His6などのオリゴヒスチジンタグに、又は周知のMycタグエピトープなどの抗体によって認識されるエピトープに融合してもよい。該ポリペプチドのいずれのフラグメント、バリエーション又は誘導体に対する融合体も、本発明の範囲内に含まれる。当然のことながら、所望の特性、即ち、エンドリシン活性を保持する融合体（又はそのバリエーション若しくは誘導体）が好ましい。融合体が本明細書に記載の方法に使用するのに好適なものであれば、それも特に好ましい。

【0056】

例えば、融合体は、本発明の該ポリペプチドに所望の特性を賦与する更なる部分を含んでもよい；例えば、その部分はポリペプチドを検出又は単離し、ポリペプチドの細胞内取り込みを促進し、又は細胞からのタンパク質の分泌を導くのに有用と考えられる。その部分は、当業者に周知の、例えば、ビオチン部分構造、放射性部分構造、蛍光部分構造、例えば、小分子蛍光プローブ又は緑色蛍光タンパク質（GFP）蛍光プローブであってもよい。その部分構造は、当業者に周知の免疫原性タグ、例えば、Mycタグであってもよく、又は当業者に周知の、ポリペプチドの細胞内取り込みを促進することができる親油性分

10

20

30

40

50

子若しくはポリペプチドドメインであってもよい。

【0057】

当業者には当然のことながら、本発明のポリペプチドは、また、上記ポリペプチドの薬学的に許容される酸又は塩基付加塩をも含む。本発明において有用な、上記の塩基化合物の薬学的に許容される酸付加塩を製造するために使用される酸は、非毒性酸付加塩、即ち、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、過リン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、酸性酒石酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、糖酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、及びとりわけ、パモエート[即ち、1,1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエート)]塩などの、薬学的に許容されるアニオンを含有する塩を形成する酸である。

10

【0058】

薬学的に許容される塩基付加塩も、また、ポリペプチドの薬学的に許容される塩の形態を生成するために使用してもよい。本来酸性の本発明化合物の、薬学的に許容される塩基塩を製造する試薬として使用してもよい化学塩基は、当該化合物と非毒性塩基塩を形成する塩基である。当該非毒性塩基塩は、アルカリ金属カチオン(例えば、カリウム及びナトリウム)及びアルカリ土類金属カチオン(例えば、カルシウム及びマグネシウム)、N-メチルグルカミン(メグルミン)などの、アンモニウム又は水溶性アミン付加塩、並びに、とりわけ、薬学的に許容される有機アミンの低級アルカノールアンモニウム及び他の塩基塩などの当該薬学的に許容されるカチオンから由来する塩を含むが、これらに限定されるものではない。

20

【0059】

ポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、融合体若しくは誘導体は、また、貯蔵のために凍結乾燥し、そして使用前に好適な担体中に再構成することもできる。いずれの好適な凍結乾燥方法(例えば、噴霧乾燥、ケーキ乾燥)及び/又は再構成方法も採用することができる。当業者には当然のことながら、凍結乾燥及び再構成は様々な程度の活性ロスをもたらし、そして使用レベルはそれを補うために上方へ調整しなければならない。好ましくは、凍結乾燥(フリーズドライ)ポリペプチドは、再水和した場合、その活性(凍結乾燥する前)の、最高で約20%、又は最高で約25%、又は最高で約30%、又は最高で約35%、又は最高で約40%、又は最高で約45%、又は最高で約50%を失う。

30

【0060】

本発明のポリペプチドの本質的な特徴は、クロストリジウム・ディフィシレの細胞の溶解能力である。好ましくは、ポリペプチドはクロストリジウム・ディフィシレの複数の株の細胞を溶解することができる。例えば、ポリペプチドは、配列番号1のCD27リシンによって溶解するクロストリジウム・ディフィシレの1つ又はそれ以上の菌株を溶解することができる(下の表1を参照)。

【0061】

当然のことながら、本発明のポリペプチドは、また、バシラス種(例えば、バシラス・セレウス(*Bacillus cereus*)、枯草菌及び/又は炭疽菌)、他のクロストリジウム種(例えば、クロストリジウム・ビフェルメンタンス(*Clostridium bifermentans*))及び/又はリステリア種(例えば、リステリア・イバノヴィイ(*Listeria ivanovii*))など他の細菌種の細胞を溶解することができる。

40

【0062】

1つの実施態様では、本発明のポリペプチドは、健常な腸生理を維持するのに有用な細菌を実質的に溶解することができない。例えば、ポリペプチドが、クロストリジウム・レプトム(*Clostridium leptum*)、クロストリジウム・ネキシル(*Clostridium nexile*)、クロストリジウム・コッコイデス(*Clostridium coccoides*)、クロストリジウム・イノクーム(*Clostridium innocuum*)、クロストリジウム・ラモスム(*Clostridium ramosum*)及び/又はアネロコッカス・ヒドロジェナリス(*Anaerococcus hydrogenalis*)の細胞

50

を溶解しない場合、それは有益である。

【0063】

最も好ましくは、本発明のポリペプチドは、カナダ、US及び現在全ヨーロッパで出現しているクロストリジウム・ディフィシレの高病原性株である、クロストリジウム・ディフィシレ株リボタイプ027の細胞を溶解することができる。例えば、ポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレリボタイプ027の細胞に対して、配列番号1のポリペプチドの少なくとも10%、例えば、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%又はそれ以上の溶解活性を示すことができる。ポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレリボタイプ027の細胞に対して、配列番号1のポリペプチドより大きい溶解活性、例えば、少なくとも110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、500%又はそれ以上の溶解活性さえも示すことができる。

10

【0064】

有利なことには、ポリペプチドは、病原性細菌の細胞を選択的に、即ち、非病原性細菌よりも大幅に溶解させることができる。

【0065】

本発明の第1の態様において使用するポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、融合体若しくは誘導体の製造方法は、当技術分野で周知である。好都合なことには、ポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、融合体若しくは誘導体は、組み換えポリペプチドであり又はそれを含む。

20

【0066】

このように、ポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、融合体若しくは誘導体をコード化する核酸分子（又はポリヌクレオチド）は、好適な宿主及びそれから得られるポリペプチドに発現することができる。当該組み換えポリペプチドの好適な生産方法は、当技術分野で周知である（例えば、Sambrook & Russell, 2000, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition（「分子クローニング、実験室マニュアル、第3版」）, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照されたい。その文書の関連する開示内容は、参照することにより本明細書に組み入れられている）。

【0067】

簡潔にいうと、発現ベクターは、適切な宿主内で核酸分子によりコード化されるポリペプチドを発現することができる核酸分子を含んで、構成することができる。

30

【0068】

核酸分子、特にDNAを、例えば、相補的凝集性末端経路で、操作可能的にベクターに結合する様々な方法が開発されている。例えば、相補的ホモポリマー領域は、ベクターDNAに挿入するようにDNAセグメントに付加することができる。次いで、ベクター及びDNAセグメントは、相補的ホモポリマーの尾部間で水素結合により接続し、組み換えDNA分子を形成する。

【0069】

1つ又はそれ以上の制限部位を含む合成リンカーは、DNAセグメントをベクターへ接続する代替法を提供する。例えば、エンドヌクレアーゼ制限消化により生成するDNAセグメントは、3' - 5' - エキソヌクレアーゼ活性を有する突出3' - 1本鎖末端を除去し、そしてそれらのポリメラーゼ活性を有する陥凹3' - 末端を埋める酵素である、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ又は大腸菌DNAポリメラーゼIで処理される。

40

【0070】

従って、これらの活性の組み合わせは平滑末端DNAセグメントを産生する。次いで、平滑末端セグメントは、バクテリオファージT4 DNAリガーゼなどの、平滑末端DNA分子の連結反応を触媒することができる酵素の存在下に、大過剰モルのリンカー分子とインキュベートされる。このように、反応の生成物は、それらの末端に高分子リンカー配列を持っているDNAセグメントである。次いで、これらのDNAセグメントは好適な制限酵素により切断され、そしてDNAセグメントの末端と適合する末端を生成する酵素で切

50

断されている発現ベクターに連結される。

【0071】

DNA（又はレトロウイルスベクター、RNA）は、次いで、好適な宿主に発現してポリペプチドを産生する。このように、ポリペプチドをコード化するDNAは公知の方法に従って使用され、本明細書に含まれる教示を勘案して適切に修正されて発現ベクターを構築し、そのベクターは、次いで、本発明の化合物又はその結合部分を発現及び産生するように、適切な宿主細胞を形質転換するために使用することができる。当該技術は当技術分野で周知である。

【0072】

ポリペプチドをコード化するDNA（又はレトロウイルスベクターの場合には、RNA）は、適切な宿主への導入のために多種多様な他のDNA配列に結合してもよい。相手のDNAは、宿主の性質、宿主へのDNAの導入様式、及びエピソームの保持又は統合が求められるかどうかによって決まる。

10

【0073】

一般的に、DNAは、適正な方向に及び発現のための正しいリーディングフレームにおいて、プラスミドなどの発現ベクターに挿入される。必要に応じて、DNAは、所望の宿主によって認識される適切な転写及び翻訳調節制御ヌクレオチド配列に結合し得るが、当該制御は一般的に発現ベクター中で実現可能である。次いで、ベクターは標準的方法を介して宿主に導入される。一般的に、全ての宿主がベクターにより形質転換されるわけではない。従って、形質転換宿主細胞を選択する必要がある。1つの選択方法は、抗生物質耐性などの、形質転換細胞中の選択可能な形質をコードするあらゆる必要な制御要素によって、発現ベクターにDNA配列を組み込むことを含む。或いはまた、当該選択可能な形質の遺伝子は、所望の宿主細胞を同時形質転換するのに使用される別のベクター上にあり得る。

20

【0074】

発現ベクターにより形質転換されている宿主細胞は、次いで、十分な時間そしてポリペプチドの発現を可能にする本明細書に開示の教示に照らして当業者に公知の適切な条件下で培養し、次いでこれを回収することができる。

【0075】

多くの発現系が知られており、細菌（大腸菌、枯草菌）、酵母（例えば、サッカロミセス・セレビジエ）、糸状菌（例えば、アスペルギルス）、植物細胞、動物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。

30

【0076】

代表的なベクターは、典型的には、ベクターが他の非原核生物細胞型における発現に使用される場合でも、原核生物中の増殖のためのColE1複製起点(ori)などの原核生物レプリコンを含む。ベクターは、また、それによって形質転換した大腸菌などの細菌性宿主細胞における遺伝子の発現（転写及び転座）を導くことができる、原核生物プロモーターなどの適切なプロモーターをも含むことができる。

【0077】

代表的な原核生物ベクタープラスミドは、Biorad Laboratories (Richmond, CA, USA) から入手できるpUC18、pUC19、pBR322及びpBR329、及びPharmacia (Piscataway, NJ, USA) から入手できるpTrc99及びpKK223-3である。

40

【0078】

代表的な哺乳動物細胞ベクタープラスミドは、Pharmacia, Piscataway (NJ, USA) から入手できるpSVLである。このベクターは、クローン化遺伝子の発現を推進するSV40後期プロモーターを用いるが、発現の最高レベルはCOS-1細胞などのT抗原産生細胞において、見出されている。

【0079】

誘導型哺乳動物ベクターの例は、Pharmaciaから同様に入手できるpMSGである。このベクターは、クローン化遺伝子の発現を推進するために、マウス哺乳動物腫瘍ウイルス

50

の長い末端反復のグルコシルチコイド誘導プロモーターを用いる。

【 0 0 8 0 】

他のベクター及び発現系は、様々な宿主細胞を用いて使用するために当技術分野で周知である。

【 0 0 8 1 】

宿主細胞は原核細胞であっても又は真核細胞であってもよい。細菌細胞は、好ましい原核宿主細胞であり、そして一般的には、例えば、Bethesda Research Laboratories Inc. (Bethesda, MD, USA) から入手できる大腸菌 D H 5 株、及びAmerican Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) (No. ATCC 31343) から入手できる R R 1 などの大腸菌の 1 菌株である。好ましい真核宿主細胞は、酵母、昆虫及び哺乳動物細胞、好ましくはマウス、ラット、サル又はヒト線維芽細胞及び腎細胞系などの脊椎動物細胞である。酵母宿主細胞は、Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA) から一般に入手できる Y P H 4 9 9、Y P H 5 0 0 及び Y P H 5 0 1 を含む。好ましい哺乳動物宿主細胞は、ヒト胚性腎細胞である C R L 1 6 5 8 及び 2 9 3 細胞のような ATCC から入手できるチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞を含む。好ましい昆虫細胞はバキュロウイルス発現ベクターで形質転換し得る S f 9 細胞である。

【 0 0 8 2 】

宿主細胞を培養しそして組み換えタンパク質を分離する方法は、当技術分野で周知である。当然のことながら、宿主細胞によっては、産生される本発明のポリペプチドは異なってもよい。例えば、酵母又は細菌細胞などの特定の細胞は、違った方法で翻訳後修飾されると考えられる本発明の化合物の形態の産生をもたらす可能性のある、異なる翻訳後修飾系を有しないか又は有する。

【 0 0 8 3 】

本発明のポリペプチドは、また、ウサギ網状赤血球溶血液又はコムギ胚芽溶解物 (Promega から入手できる) などの市販のインビトロ翻訳系を用いてインビトロで製造してもよい。好ましくは、翻訳系はウサギ網状赤血球溶血液である。都合の良いことには、翻訳系は、T N T 転写 - 翻訳系 (Promega) などの転写系に連結されてもよい。この系は、翻訳と同じ反応でコード化 D N A ポリヌクレオチドからの好適な m R N A 転写物を産生する利点を有する。

【 0 0 8 4 】

CS Bio Company Inc. (Menlo Park, USA) から入手できるもののような、自動ポリペプチド合成機も、また、使用することができる。

【 0 0 8 5 】

従って、本発明の第 2 の態様は、本発明の第 1 の態様のポリペプチドをコード化する単離した核酸分子を提供することである。

【 0 0 8 6 】

核酸分子は D N A (例えば、c D N A) 又は R N A であってもよい。

【 0 0 8 7 】

好ましい実施態様では、核酸分子は図 3 に示されるヌクレオチド配列 [配列番号 2] を含み又はそれから成る。

【 0 0 8 8 】

本発明の第 3 の態様は、本発明の第 2 の態様の核酸分子を含むベクターを提供することである。1 つの実施態様では、ベクターは発現ベクターである。好ましくは、ベクターは p E T 1 5 b 及び p A C Y C 1 8 4 から成る群から選択される。

【 0 0 8 9 】

当業者には当然のことながら、発現ベクターの選択は宿主細胞の選択により決定してもよい。従って、乳酸連鎖球菌における本発明のポリペプチドの発現では、2 成分制御系をコード化する nisR 及び nisK 遺伝子をも発現する乳酸連鎖球菌のバックグランド株を用いて、本発明のポリペプチドが nisA オペロンのプロモーターの制御下に発現する、ナイシン (nisin) 発現系を使用することができる。この系の下での発現は正に調節され、そして

外因性ナイシンの供給により誘導される (Ruyter et al., 1996, Applied and Environmental Microbiology 62:3662-3667を参照されたい。その開示内容は、参照することにより本明細書に組み入れられている)。

【0090】

代わりの実施態様では、ナイシンの全生合成遺伝子クラスターは、インデューサーがその細胞によって合成される場合と同じ宿主細胞内にもたらされる。

【0091】

更なる代わりの実施態様では、本発明のポリペプチドは、プラスミド系か又は染色体に組み込まれた系を用いて、ラクトース異化オペロンの制御下に乳酸連鎖球菌に発現してもよい (例えば、Payne et al., 1996, FEMS Microbiology Letters 136: 19-24及びvan Roijen et al., 1992, Journal of Bacteriology 174: 2273-2280を参照されたい。その開示内容は、参照することにより本明細書に組み入れられている)。

10

【0092】

本発明の第4の態様は、本発明の第2の態様の核酸分子又は本発明の第3の態様のベクターを含む宿主細胞を提供することである。1つの実施態様では、宿主細胞は微生物細胞、例えば、細菌細胞である。好ましくは、宿主細胞は非病原性である。

【0093】

例えば、宿主細胞は、大腸菌、ラクトコッカス種、バクテロイデス種、ラクトバシラス種、エンテロコッカス種及びバシラス種から成る群から選択してもよい。

20

【0094】

好ましい実施態様では、宿主細胞は乳酸連鎖球菌の細胞である。

【0095】

或いはまた、宿主細胞は酵母細胞、例えば、サッカロミセス種であってもよい。

【0096】

本発明の第5の態様は、ポリペプチドを発現させる条件下に、本発明の第2の態様の核酸分子又は本発明の第3の態様のベクターを含む宿主細胞集団を培養し、それからポリペプチドを単離することを含む、本発明のポリペプチドを製造する方法を提供することである。

【0097】

本発明の第6の態様は、以下のもの：

30

(a) 本発明の第1の態様のポリペプチド；

(b) 本発明の第2の態様の核酸分子；

(c) 本発明の第3態様のベクター；

(d) 本発明の第4態様の宿主；及び/又は

(e) 本発明の第1の態様のポリペプチドを発現することができるバクテリオファージ

；

及び薬学的に許容される担体、賦形剤又は医薬品添加剤を含む、医薬組成物を提供することである。

【0098】

本明細書で使用される「医薬組成物」は、本発明の方法に使用するための治療上有効な製剤を意味する。

40

【0099】

本明細書で使用される「治療的有效量」、又は「有効量」、又は「治療的に有効な」は、所定の病態及び投与レジメンに対し治療的效果を与える量を指す。これは、所要の添加剤及び賦形剤、即ち、担体又は投与賦形剤と併せて、所望の治療的效果をもたらすように算出される活性物質の所定量である。更に、宿主の活動性、機能及び反応性の臨床的に重大な欠如を減少させ、そして最も好ましくはそれを予防するのに十分な量を意味することを意図している。或いはまた、治療的有效量は、宿主の臨床的に重大な病態の改善をもたらすのに十分な量である。当業者には当然のことながら、化合物の量はその比活性度によって変動してもよい。好適な用量は、所要の賦形剤と併せて所望の治療効果をもたらすよ

50

うに算出される活性組成物の所定量を含むことができる。本発明の組成物を製造するための方法及び使用では、活性成分の治療的有効量が供給される。治療的有効量は、当技術分野で周知のように、年齢、体重、性別、病態、合併症、他の疾患など、患者の特性を基準にして通常の技量の医療又は獣医従事者により決定することができる。

【0100】

本発明の1つの実施態様では、医薬組成物は、本発明の第1の態様のポリペプチドを含む。

【0101】

ポリペプチドは、使用されるポリペプチドの有効性/毒性に応じて種々の濃度で製剤化し得る。好ましくは、製剤は、 $0.1\text{ }\mu\text{M}$ と 1 mM の間、より好ましくは $1\text{ }\mu\text{M}$ と $100\text{ }\mu\text{M}$ の間、 $5\text{ }\mu\text{M}$ と $50\text{ }\mu\text{M}$ の間、 $10\text{ }\mu\text{M}$ と $50\text{ }\mu\text{M}$ の間、 $20\text{ }\mu\text{M}$ と $40\text{ }\mu\text{M}$ の間、及び最も好ましくは約 $30\text{ }\mu\text{M}$ の濃度でポリペプチドを含む。インビトロ適用の場合は、製剤は類似濃度のポリペプチドを含むことができる（しかし、当然のことながら、より高濃度も使用してもよい）。

10

【0102】

従って、この医薬製剤は、当該細胞により感染し又は感染を起こし易い患者において、クロストリジウム・ディフィシレの細胞増殖を少なくとも部分的に阻害するのに十分な量のポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、融合体若しくは誘導体を含むことができる。好ましくは、医薬製剤は、患者においてクロストリジウム・ディフィシレの細胞を死滅させるのに十分な量のポリペプチド、又はそのフラグメント、バリエーション、融合体若しくは誘導体を含む。

20

【0103】

当業者には当然のことながら、本発明のポリペプチドは、一般的に、所定の投与経路及び標準的薬剤治療（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition（「薬学の科学及び実践、第19版」）、1995, Ed. Alfonso Gennaro, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USAを参照されたい。その開示内容は、参照することにより本明細書に組み入れられている）に関して選択される好適な医薬品添加剤、賦形剤又は担体との混合物で投与される。

【0104】

例えば、ポリペプチドは、即時性、遅延性又は放出制御の適用のために、着香剤又は着色剤を含んでもよい錠剤、カプセル剤、腔坐剤、エリキシル剤、水剤又は懸濁剤の形態で、経口、口腔内又は舌下で投与することができる。ポリペプチドは、直接注射（例えば胃腸管へ）を経て投与してもよい。

30

【0105】

しかしながら、好ましくは、ポリペプチド及びその医薬組成物は、経口投与用である。

【0106】

好適な錠剤処方は、微結晶セルロース、乳糖、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、第二リン酸カルシウム及びグリシンなどの医薬品添加剤、澱粉（好ましくは、トウモロコシ、ジャガイモ又はタピオカ澱粉）、澱粉グリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、及び特定の複合珪酸塩などの崩壊剤、及びポリビニルピロリドン、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシ-プロピルセルロース（HPC）、蔗糖、ゼラチン及びアラビアゴムなどの造粒結合剤を含んでもよい。加えて、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、グリセリルベヘナート及びタルクなどの滑沢剤が含まれ得る。

40

【0107】

類似タイプの固形組成物も、ゼラチンカプセル剤の充填剤として用いてもよい。この関連の好ましい医薬品添加剤は、ラクトース、澱粉、セルロース、乳糖又は高分子量ポリエチレングリコールをも含むことができる。水性懸濁剤及び/又はエリキシル剤では、ポリペプチドは種々の甘味剤又は着香剤、着色料又は色素と、乳化剤及び/又は懸濁剤と及び水、エタノール、プロピレングリコール及びグリセリンなどの希釈剤、及びその組み合わせ

50

せと併用してもよい。

【0108】

ポリペプチドは、非経口で、例えば、静脈内、関節内、動脈内、腹腔内、髄腔内、心室内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内若しくは皮下に投与してもよく、又は注入法で投与してもよい。それらは、他の物質、例えば、血液と等張溶液にするのに十分な塩又はグルコースを含有してもよい滅菌水溶液の形態での使用に最も適している。水溶液は、必要に応じて、好適に緩衝化（好ましくは3から9のpHに）すべきである。無菌状態での好適な非経口製剤の調剤は、当業者に周知の標準的調剤技術により容易に達成し得る。

【0109】

非経口投与に好適な製剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌薬、及び製剤を対象とする受容者の血液と等張にする溶質を含有してもよい水溶性又は非水溶性無菌注射液；及び懸濁剤及び濃稠化剤を含有してもよい水溶性又は非水溶性滅菌懸濁液を含む。製剤は、1回用量又は多回用量容器、例えば、密封アンプル及びバイアルで提供してもよく、そして使用直前に滅菌液体担体、例えば、注射用蒸留水の添加だけを必要とする凍結乾燥（凍乾）状態で保存してもよい。即時注射液及び懸濁液は、前記の種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調剤してもよい。

10

【0110】

ヒトの患者への経口及び非経口投与では、ポリペプチドの日用量レベルは、通常成人当たり1から100mg（即ち、約0.015から15mg/kg）であち、単回用量又は分割用量で投与される。例えば、3mg/kgのような、1~10mg/kgの用量が使用

20

【0111】

本発明の別の実施態様では、医薬組成物は、ポリペプチドそのものを含まないで、代わりに該ポリペプチドを発現することができる核酸分子を含む。好適な核酸分子、発現ベクター、及び宿主は詳細に上述されている。

【0112】

例えば、組み換えプロバイオティックを使用してもよい（LAB株、例えば、乳酸連鎖球菌又はラクトバシラス種）。

【0113】

本発明の更なる実施態様では、医薬組成物は、本発明の第1の態様のポリペプチドを発現することができるバクテリオファージを含む。例えば、本発明の第1の態様のポリペプチドを送達するために、野生型バクテリオファージCD27を使用してもよい。当該バクテリオファージに基づく治療を実施する方法は、当技術分野において周知である（例えば、Watanabe et al., 2007, Antimicrobial Agents & Chemotherapy 51:446-452を参照されたい）。

30

【0114】

このように、本明細書に記載の細菌感染症の処置では、本発明のポリペプチドは、同種の（cognate）タンパク質として、核酸構築物、ベクター又は同種のタンパク質を発現する宿主細胞として、同種のタンパク質（バクテリオファージを含む）を発現する生物の一部として、又はその細菌標的とリシンの接触を達成するために、それがC. ディフィシレのような病原性細菌であれ、又は本明細書に更に記載される別の病原体若しくは潜在的病原体であれ、当技術分野で公知のその他簡便な方法によって投与してもよい。

40

【0115】

理想的には、タンパク質は保護された形態で胃腸管に送達される。これは当技術分野で公知の多種多様の方法によって達成され得る。例えば、適切な用量のリシンは、胃の酸性状態は切り抜けるが、腸に入るにつれてタンパク質を放出する形態でマイクロカプセル化される。送達は、乳酸連鎖球菌、ラクトバシラス種、ビフィドバクテリウム種又はバクテロイデスを含むがこれらに限定されない、胃腸管通過を切り抜ける非病原性微生物によって行われる。当業者は、本明細書に開示されるリシンなどの活性化化合物の胃腸管送達のためのそのような手段に使用できる選択肢について熟知している。これらの手段は、細胞内

50

産生、s e c A分泌又は別の分泌経路による分泌、及び制御溶解による送達を含む。好ましくは、タンパク質は一度に全て放出されるのではなく、投与されたボラスが胃腸管を横断するにつれて漸増的に放出される。或いはまた、リシンは、胃腸管における適切な位置で又は適切なシグナルの受信時にリシンを発現する、良性細菌の一部として導入される。本明細書に開示の好ましい実施態様では、非病原性ラクトコッカスが、胃腸管の特定の位置に到達時に C D 2 7 リシンを発現するように処理される。発現シグナルは、p H 感受性プロモーター、又はこの目的のために当技術分野で公知の別の手段によって規定することができる。

【 0 1 1 6 】

送達の他の手段としては、以下：

- (a) 国際公開公報第 2 0 0 6 / 1 1 1 5 5 3 号 (ポリ尿素及び他の多層カプセル材) ；
- (b) 国際公開公報第 2 0 0 6 / 1 1 1 5 7 0 号及び欧州特許第 1 7 1 5 7 3 9 号 (シクロデキストリンカプセル化) ；
- (c) 国際公開公報第 2 0 0 6 / 1 0 0 3 0 8 号及び欧州特許第 1 7 4 2 7 2 8 号 (酵母及び他の微生物細胞カプセル化技術) ；
- (d) 米国特許第 5 1 5 3 1 8 2 号、欧州特許第 1 4 9 9 1 8 3 号及び国際公開公報第 0 3 / 0 9 2 3 7 8 号；米国特許第 6 8 3 1 0 7 0 号 (腸細胞発現による治療遺伝子産物送達) ；
- (e) 米国特許第 7 2 0 2 2 3 6 号 (放出調節用医薬製剤) ；
- (f) 米国特許第 5 7 6 2 9 0 4 号 (本発明のリシンを送達するために改変し得る、重合リポソームを用いるワクチンの経口デリバリー) ；
- (g) 米国特許第 7 1 9 5 9 0 6 号 (本発明のリシンを発現させるために改変し得るビフィドバクテリウム) ；及び
- (h) 本明細書に引用された文献 ；

が含まれ、これらの全ては、本発明の新規な送達方法及び組成物を達成するために、当業者が本発明の開示内容を活用するのを可能にする目的で、参照することにより本明細書に組み入れられている。

【 0 1 1 7 】

このように、本発明の医薬組成物の好ましい実施態様では、ポリペプチド、それをコード化する核酸分子などはマイクロカプセル化される (例えば、シクロデキストリン若しくは脂質二重層などの化学エンベロープ内で、又は処理したラクトコッカス細胞などの生存又は非生存微生物細胞内で) 。このような方法で、ポリペプチド、核酸分子などは、胃腸管の作用部位への途中で胃の酸性状態に対して保護することができる。

【 0 1 1 8 】

本発明の第 7 の態様は、医薬に使用するための、本発明の第 1 の態様のポリペプチド又は本発明の第 6 の態様の医薬組成物を提供することである。

【 0 1 1 9 】

本発明の第 8 の態様は、患者中の微生物細胞を殺細胞し及び / 又はその増殖を阻害 / 抑制する薬剤の製造における、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用を提供することである。

【 0 1 2 0 】

当然のことながら、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を示すポリペプチドは、必ずしもクロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージから由来する必要はない。例えば、ポリペプチドは以下の群：

- (a) バクテリオファージ C D 2 7 のリシン ；
- (b) バクテリオファージ C D 1 1 9 のリシン ；

(c) バクテリオファージ C 2 のリシン ; 及び

(d) クロストリジウム・ディフィシレ株 6 3 0 (C D 6 3 0) のプロファージ 1 及び 2 のリシン ;
から選択することができる。

【 0 1 2 1 】

或いはまた、ポリペプチドは、クロストリジウム・ビフェルメンタンス又はクロストリジウム・ソルデリ (Clostridium sordelli) などの異なるクロストリジウム種のバクテリオファージから由来 (例えば、コード化) してもよい。

【 0 1 2 2 】

しかしながら、好ましい実施態様では、ポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージから由来する。

【 0 1 2 3 】

従って、本発明の第 8 の態様の使用は、本発明の第 1 の態様のポリペプチドに限定されるものではなく、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するいずれのポリペプチドの使用をも包含する (Goh et al., 2007, Microbiology 153:676-685に記載の C 2 のリシンを含む。その開示内容は、参照することにより本明細書に組み入れられている)。

【 0 1 2 4 】

本発明の関連する態様は、患者中の微生物細胞を殺細胞し及び / 又はその増殖を阻害 / 抑制するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用を提供することである。

【 0 1 2 5 】

本発明の更なる態様は、患者中の微生物細胞に関連する疾患又は病態の治療又は予防のための薬剤の製造における、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用を提供することである。本発明の関連する態様は、患者中の微生物細胞に関連する疾患又は病態を治療又は予防するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドの使用であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用を提供することである。

【 0 1 2 6 】

「患者中の微生物細胞に関連する疾患又は病態」には、クロストリジウム・ディフィシレによる患者の感染から生じ又は拮抗する疾患及び病態が包含される。当該疾患及び病態には、クロストリジウム・ディフィシレ関連疾患 (C D A D) が含まれる。

【 0 1 2 7 】

本発明の上記の使用の 1 つの実施態様では、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドは、本発明の第 1 の態様のポリペプチドであって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触により溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択されるポリペプチドである (下記の表 1 と 2 を参照)。

【 0 1 2 8 】

好ましくは、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレを含み又はそれから成る。このように、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレ細胞による感

10

20

30

40

50

染に関連する疾患及び病態（クロストリジウム・ディフィシレ関連疾患、C D A D など）を治療又は予防するのに使用することができる。

【0129】

最も好ましくは、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレリボタイプ027細胞を含み又はそれから成る。

【0130】

従って、本発明は更に以下の方法：

（a）患者中の微生物細胞を殺滅し及び／又はその増殖を阻害／抑制するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージを患者に投与することを含む方法であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される方法；

（b）患者において微生物細胞に関連する疾患又は病態を治療又は予防するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージを患者に投与することを含む方法であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される方法；

を提供する。

【0131】

本発明の上記の方法の1つの実施態様では、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドは本発明の第1の態様のポリペプチドであって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び配列番号1のポリペプチドとの接触により溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択されるポリペプチドである（下記の表1と2を参照）。好ましくは、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレ細胞を含み又はそれから成る。このように、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレ細胞による感染に関連する疾患及び病態（クロストリジウム・ディフィシレ関連疾患、C D A D など）を治療又は予防するのに使用することができる。最も好ましくは、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレリボタイプ027の細胞を含み又はそれから成る。

【0132】

当業者には更に当然のことながら、本発明の使用及び方法は医学及び獣医学分野の両方で有用性を有する。従って、本薬剤はヒト及び非ヒト動物（ウマ、ウシ、イヌ及びネコなど）の両方の治療に使用することができる。しかしながら、好ましくは、患者はヒトである。

【0133】

「治療」には、患者の治療的及び予防的治療法が含まれる。用語「予防的」は、患者又は対象におけるクロストリジウム・ディフィシレによる感染の可能性を防止するか低減する、本明細書に記載のポリペプチド又は製剤の使用を包含するように用いられる。

【0134】

上記のように、用語「有効量」は、治療する疾患又は病態の好ましい変化をもたらすのに使用することができる、本発明のポリペプチドの濃度又は量を記載するために本明細書で用いられるが、その変化が寛解、好ましい生理的結果、治療する病状又は病態の好転又は減弱、惹起している病態又は病状の可能性の予防又は低減であるかは、治療する疾患又は病態によって決まる。

【0135】

当然のことながら、本明細書に記載の薬剤は、1つ又はそれ以上の更なる治療薬との併用で患者に投与してもよい。

【 0 1 3 6 】

例えば、本明細書に記載の薬剤は：

(a) 1 つ又はそれ以上の従来の抗生物質治療 (- ラクタム、アミノグリコシド及び / 又はキノロン) ；

(b) 1 つ又はそれ以上の更なるリシン、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージ；

(c) 1 つ又はそれ以上の抗生物質、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくは細菌；及び / 又は

(d) 腸内のクロストリジウム・ディフィシレ細胞の細菌溶菌時に放出される毒素を中和する療法；

と併用して投与してもよい。好適な中和療法は、抗生物質 (Babcock et al., 2006, Infect. Immun. 74:6339-6347 を参照されたい) 及びトレバマー (tolevamer) などの毒素吸収剤 (Barker et al., 2006, Aliment. Pharmacol. Ther. 24:1525-1534 を参照されたい) を含んでもよい。

【 0 1 3 7 】

本発明の更なる態様は、インビトロ及び / 又はエクスビボで微生物細胞を殺細胞し及び / 又はその増殖を阻害 / 抑制するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用を提供することである。例えば、エンドリシン活性を有する該ポリペプチドは、そのような細菌細胞で汚染され易い病院、キッチンなどの表面を清浄化するのに使用することができる。

【 0 1 3 8 】

好ましくは、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドは、本発明の第 1 の態様のポリペプチドであって、その微生物細胞が、クロストリジウム・ディフィシレ及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触時に溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択されるポリペプチドである (下記の表 1 及び 2 を参照) 。例えば、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレ細胞を含み又はそれから成ってよい。最も好ましくは、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレ・リボタイプ 0 2 7 の細胞を含み又はそれから成る。

【 0 1 3 9 】

本発明の更なる態様は、試料中の微生物細胞の存在を検出するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性及び / 又は細胞結合特異性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージを含むキットであって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択されるキットを提供することである。

【 0 1 4 0 】

好ましい実施態様では、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドは、本発明の第 1 の態様のポリペプチドであって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触時に溶解を起こし易い他の細菌細胞からなる群から選択されるポリペプチドである (下記の表 1 及び 2 を参照) 。例えば、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレ細胞を含み及びそれから成ってよい。最も好ましくは、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレリボタイプ 0 2 7 の細胞を含み又はそれから成る。

【 0 1 4 1 】

本発明のキットの更なる実施態様では、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドは、マルチウェルプレートなどの好適な表面に固定化される。

【 0 1 4 2 】

キットは、組織試料、細胞培養試料及び拭い液由来の細胞試料（例えば、微生物細胞による汚染を試験する表面から採取される）などの、いずれの好適な細胞試料と併せて使用してもよい。

【 0 1 4 3 】

場合により、キットは、陰性対照試料（例えば、クロストリジウム・ディフィシレ細胞を試験するための細胞型を含まない）及び／又は陽性対照試料（試験するための細胞を含む）を更に含む。

【 0 1 4 4 】

本発明の関連する態様は、以下の使用及び方法：

10

（ a ）クロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される、微生物細胞に関連する疾患又は病態の診断薬の製造における、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞壁結合活性及び／又は細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用；

（ b ）クロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される、微生物細胞に関連する疾患又は病態を診断するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞壁結合活性及び／又は細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用；

20

（ c ）インビトロ及び／又はエキスピボで試料中の微生物細胞の存在を検出するための、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞壁結合活性及び／又は細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージの使用であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される使用；及び

（ d ）患者中の微生物細胞に関連する疾患又は病態を診断するための、試験すべき患者からの細胞試料をクロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞壁結合活性及び／又は細胞溶解活性を有するポリペプチド、又はそれを発現することができる核酸分子、ベクター、宿主細胞若しくはバクテリオファージに接触させ、そして試料中の細胞がそれにより溶解されるかどうかを測定することを含む方法であって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び該エンドリシンによる溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択される方法；
を提供することである。

30

【 0 1 4 5 】

本発明の上記の使用及び方法の 1 つの実施態様では、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドは、本発明の第 1 の態様のポリペプチドであって、微生物細胞がクロストリジウム・ディフィシレ細胞及び配列番号 1 のポリペプチドとの接触時に溶解を起こし易い他の細菌細胞から成る群から選択されるポリペプチドである（下記の表 1 及び 2 を参照）。好ましくは、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレ細胞を含み又はそれから成る。このように、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞溶解活性を有するポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレ細胞による感染に関連する疾患及び病態（クロストリジウム・ディフィシレ関連疾患、C D A D など）を診断するのに使用することができる。最も好ましくは、微生物細胞は、クロストリジウム・ディフィシレ・リボタイプ 0 2 7 の細胞を含み又はそれから成る。

40

【 0 1 4 6 】

当該診断のための使用及び方法では、細胞の溶解は当技術分野で周知の方法を用いて検出し得る。例えば、A T P のレベルは、細胞溶解の指標として測定し得る。

【 0 1 4 7 】

50

本発明の上記の使用及び方法の他の実施態様では、ポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシレのバクテリオファージ由来エンドリシンの細胞壁結合ドメインを含み又はそれから成る。検出を可能にするために、このようなポリペプチドは、磁気ビーズに融合され又は好適なレポーター（例えば、緑色蛍光タンパク質）を含む融合タンパク質として使用してもよい。

【0148】

当該診断方法は、リステリアエンドリシンなど他の系由来のエンドリシンにて十分確立されている（例えば、Loessner et al., 2002, Mol Microbiol 44, 335-49; Kretzer et al., 2007, Applied Environ. Microbiol. 73:1992-2000を参照されたい。その開示内容は、参照することにより本明細書に組み入れられている；好適な分析法も、また、例えば Profos, Germany [www.profos.de/content/view/164/69/lang,en/でそれらのウェブサイト

10

【0149】

本発明の典型的な実施態様は、以下の図を参照しながら、以下の非限定的実施例にて記載される。

【図面の簡単な説明】

【0150】

【図1】 CD27の電子顕微鏡写真。試料は飽和酢酸ウラニル中でネガティブ染色された。

【図2】 予測されたORFを示す CD27ゲノム地図。矢印は転写の方向を示す。提案された機能モジュールは、BLAST結果並びに CD119、C2、及びC.ディフィシレ株630プロファージの公表配列との類似性に基づいて表示される。

20

【図3】 CD27リシンのヌクレオチド配列、配列番号2。

【図4a-1】 公表C.ディフィシレのバクテリオファージ（C2(32)；CD119(31)）、又はプロファージ（配列ゲノムからのCD630プロファージ1及び2(36)）配列による、CD27ヌクレオチド配列のアラインメント。AlignX、Vector NTI Advance 10, Invitrogenにより行なわれたアラインメント。CD27アミノ酸配列は配列番号2である。

【図4a-2】 図4a-1の続きである。

【図4a-3】 図4a-2の続きである。

30

【図4b】 公表C.ディフィシレのバクテリオファージ（C2(32)；CD119(31)）、又はプロファージ（配列ゲノムからのCD630プロファージ1及び2(36)）配列による、CD27推定アミノ酸配列のアラインメント。AlignX、Vector NTI Advance 10, Invitrogenにより行なわれたアラインメント。CD27アミノ酸配列は配列番号2である。

【図5】 pET15bベクター（Novagen）のクローニング部位。

【図6a】 (a) CD27リシンを発現する大腸菌からの粗タンパク質溶解産物のゲル解析。レーン1は、SeeBlueマーカー（Invitrogen、サイズ191、97、64、51、39、28及び19kDa）、レーン2～5は、BL21(DE3)pET15b CD27L総蛋白質抽出物。レーン2～4は、IPTG-2で3時間誘導した抽出物及び20mMのTris-HCl、pH8、50mMのNaClで抽出した3、プロテアーゼ阻害剤（Roche Complete mini EDTA-free）を含む3及び変性緩衝液（8Mの尿素、0.1MのNaH₂PO₄、0.01MのTris-HCl、pH8.0）で抽出した4。レーン5は20mMのTris-HCl、pH8、50mMのNaClで抽出した非誘導対照。レーン6及び7は、20mMのTris-HCl、pH8、50mMのNaClで抽出したBL21(DE3)pET15b CD630L1総蛋白質抽出物、レーン6は、IPTGで3時間誘導しただけの(a)6xHis抗体による(b)ゲルのウェスタン解析。

40

【図6b】 (a) CD27リシンを発現する大腸菌からの粗タンパク質溶解産物のゲル解析。レーン1は、SeeBlueマーカー（Invitrogen、サイズ191、97、64、51、39、28及び19kDa）、レーン2～5は、BL21(DE3)pET15b CD2

50

7 L 総蛋白質抽出物。レーン 2 ~ 4 は、I P T G - 2 で 3 時間誘導した抽出物及び 2 0 m M の T r i S - H C l、p H 8、5 0 m M の N a C l で抽出した 3、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Complete mini EDTA-free) を含む 3 及び変性緩衝液 (8 M の尿素、0.1 M の N a H₂P O₄、0.01 M の T r i S - H C l、p H 8.0) で抽出した 4。レーン 5 は 2 0 m M の T r i S - H C l、p H 8、5 0 m M の N a C l で抽出した非誘導対照。レーン 6 及び 7 は、2 0 m M の T r i S - H C l、p H 8、5 0 m M の N a C l で抽出した B L 2 1 (D E 3) p E T 1 5 b C D 6 3 0 L 1 総蛋白質抽出物、レーン 6 は、I P T G で 3 時間誘導しただけの (a) 6 x H i s 抗体による (b) ゲルのウェスタン解析。

【図 7】N i N T A カラム精製 H i s タグ化 C D 2 7 リシンのゲル解析。レーン 1 は、SeeBlue マーカー (Invitrogen、サイズ 191、97、64、51、39、28 及び 19 k D a)、レーン 2 ~ 5 は、I P T G で誘導後の B L 2 1 (D E 3) p E T 1 5 b C D 2 7 L 総蛋白質抽出物、レーン 1 は、粗溶解産物、レーン 2 は、カラム流入、レーン 3 は、一次洗浄溶離液、レーン 4 は、洗浄二次溶離液、レーン 5 は、一次溶出液 (E 1、1 m l)、レーン 6 は、二次溶出液 (E 2)。

【図 8】エンド対数に増殖し、液体室素中で急速冷凍し、次いで P B S 中に再懸濁した C . ディフィシレ 1 1 2 0 4 の細胞による Bioscreen 溶解試験。C D 2 7 リシン及び C D 6 3 0 リシンは大腸菌に発現し、そして N i N T A カラムで H i s タグを用いて精製された (図 6 を参照)。270 µ l の細胞を E 1 抽出物の 30 µ l の希釈液に加えた。値は二重複分析の平均値 + / - 標準偏差である。C D 6 3 0 L 1 抽出物による細胞溶解は、緩衝液だけの対照に見られるものと同等であった。

【図 9】エンド対数に増殖し、4 で遠心分離により採取し、次いで P B S 中に再懸濁した C . ディフィシレ 1 1 2 0 4 の細胞による Bioscreen 溶解試験は、1 ~ 1.5 の間の O D を与えた。C D 2 7 リシンは大腸菌に発現し、そして N i N T A カラムで H i s タグを用いて精製された (図 6 を参照)。270 µ l の細胞を溶離緩衝液で希釈した溶出液 1 (E 1) の 30 µ l 試料に加えて、1 分析当たり 10.5 µ g から 0.35 n g の範囲の濃度を与えた。新鮮細胞の使用は、緩衝液だけの対照において有意に少ない溶解を与えた。70 n g 未満の N i N T A 精製タンパク質で緩衝液だけの対照と差が見られなかった。

【図 10 a】活性のスペクトルを試験するために C . ディフィシル細胞に添加された C D 2 7 リシンの Bioscreen 溶解試験。細胞を大腸菌から産生した 3.5 µ g N i N T A 精製タンパク質 (E 1) とインキュベートした。試験した 30 株のうち、宿主株 1 2 7 2 7 及び C D 2 7 非感受性株 1 1 2 0 8 及び高毒性リボタイプ 0 2 7 R 2 3 6 1 3 を含み、全てが感受性であった。インキュベーションは緩衝液 (B) か又はリシン (L) を用いて二重複でなされた。

【図 10 b】活性のスペクトルを試験するために C . ディフィシル細胞に添加された C D 2 7 リシンの Bioscreen 溶解試験。細胞を大腸菌から産生した 3.5 µ g N i N T A 精製タンパク質 (E 1) とインキュベートした。試験した 30 株のうち、宿主株 1 2 7 2 7 及び C D 2 7 非感受性株 1 1 2 0 8 及び高毒性リボタイプ 0 2 7 R 2 3 6 1 3 を含み、全てが感受性であった。インキュベーションは緩衝液 (B) か又はリシン (L) を用いて二重複でなされた。

【図 10 c】活性のスペクトルを試験するために C . ディフィシル細胞に添加された C D 2 7 リシンの Bioscreen 溶解試験。細胞を大腸菌から産生した 3.5 µ g N i N T A 精製タンパク質 (E 1) とインキュベートした。試験した 30 株のうち、宿主株 1 2 7 2 7 及び C D 2 7 非感受性株 1 1 2 0 8 及び高毒性リボタイプ 0 2 7 R 2 3 6 1 3 を含み、全てが感受性であった。インキュベーションは緩衝液 (B) か又はリシン (L) を用いて二重複でなされた。

【図 11 a - 1】クロストリジウム種及び一般的な腸細菌に対する C D 2 7 リシンの活性。細胞を後期安定相で採取し、P B S 中で再懸濁し、大腸菌から産生した 7 µ g N i N T A 精製タンパク質 (E 1) とインキュベートした。結果は、二重複分析の平均値 + / - 標準偏差である。C D 2 7 リシンは大部分の種において細胞溶解を誘導しなかった (a 及び表 2 を参照)。例外として (b 及び表 2 を参照)、クロストリジウム・ピフェルメン

タンスの迅速溶解、バシラス・セレウスの溶解、そして長い誘導期を有する B. サチリス、及びリステリア・イバノビイ (b) に対する微弱作用が含まれる。

【図 1 1 a - 2】図 1 1 a - 1 の続きである。

【図 1 1 a - 3】図 1 1 a - 2 の続きである。

【図 1 1 a - 4】図 1 1 a - 3 の続きである。

【図 1 1 b - 1】クロストリジウム種及び一般的な腸細菌に対する C D 2 7 リシンの活性。細胞を後期安定相で採取し、P B S 中で再懸濁し、大腸菌から産生した $7 \mu\text{g NiNTA}$ 精製タンパク質 (E 1) とインキュベートした。結果は、二重複分析の平均値 + / - 標準偏差である。C D 2 7 リシンは大部分の種において細胞溶解を誘導しなかった (a 及び表 2 を参照)。例外として (b 及び表 2 を参照)、クロストリジウム・ピフェルメンタンスの迅速溶解、バシラス・セレウスの溶解、そして長い誘導期を有する B. サチリス、及びリステリア・イバノビイ (b) に対する微弱作用が含まれる。

10

【図 1 1 b - 2】図 1 1 b - 1 の続きである。

【図 1 1 b - 3】図 1 1 b - 2 の続きである。

【図 1 1 b - 4】図 1 1 b - 3 の続きである。

【図 1 2】C D 2 7 リシン活性の pH プロファイル。C. ディフィシレ 1 1 2 0 4 細胞を一定の範囲の pH に調整した P B S で再懸濁し、そして大腸菌から産生した Ni - N T A 精製リシン E 1 の活性を前と同様に bioscreen で測定した。

【図 1 3 A】(a) C D 2 7 リシンを発現する乳酸連鎖球菌由来の粗タンパク質溶解物のゲル分析。レーン 1 及び 10 は、SeeBlue (Invitrogen、サイズ 191、97、64、51、39、28 及び 19 kDa)、レーン 2 ~ 5 は、5 時間 (2、4) 誘導又は非誘導 (3、5) の phi C D 2 7 L p U K 2 0 0 H I S (2、3) 又は空ベクター p U K 2 0 0 H I S 対照 (4、5) を含有する乳酸連鎖球菌 U K L C 10。レーン 6 ~ 9 は、全て 4 時間誘導した (レーン当り $10 \mu\text{g}$) phi C D 2 7 L p E T 1 5 b (6、8、9) 又は空ベクター対照 (7) を含有する大腸菌 B L 2 1 (DE3)。全タンパク質を、レーン 8 (20 mM のリン酸ナトリウム、pH 8) 及び 9 (50 mM の Tris HCl、pH 7.5) を除いて 20 mM の Tris - HCl、pH 8、50 mM の NaCl で抽出した。(a) $6 \times \text{His}$ 抗体による (b) ゲルのウェスタン分析。

20

【図 1 3 B】(a) C D 2 7 リシンを発現する乳酸連鎖球菌由来の粗タンパク質溶解物のゲル分析。レーン 1 及び 10 は、SeeBlue (Invitrogen、サイズ 191、97、64、51、39、28 及び 19 kDa)、レーン 2 ~ 5 は、5 時間 (2、4) 誘導又は非誘導 (3、5) の phi C D 2 7 L p U K 2 0 0 H I S (2、3) 又は空ベクター p U K 2 0 0 H I S 対照 (4、5) を含有する乳酸連鎖球菌 U K L C 10。レーン 6 ~ 9 は、全て 4 時間誘導した (レーン当り $10 \mu\text{g}$) phi C D 2 7 L p E T 1 5 b (6、8、9) 又は空ベクター対照 (7) を含有する大腸菌 B L 2 1 (DE3)。全タンパク質を、レーン 8 (20 mM のリン酸ナトリウム、pH 8) 及び 9 (50 mM の Tris HCl、pH 7.5) を除いて 20 mM の Tris - HCl、pH 8、50 mM の NaCl で抽出した。(a) $6 \times \text{His}$ 抗体による (b) ゲルのウェスタン分析。

30

【図 1 4】エンブティーベクター対照からの抽出物と比較した、C. ディフィシレ株 1 1 2 0 4 の新鮮細胞とインキュベートした phi C D 2 7 リシン発現大腸菌及び乳酸連鎖球菌由来の粗タンパク質抽出物の Bioscreen 分析。 $50 \mu\text{g}$ タンパク質を各分析で使用し、結果は二重複分析の平均値 + / - 標準偏差である。

40

【図 1 5】Zeba 緩衝液交換カラム (Pierce) を 20 mM のリン酸ナトリウム、pH 6.0 に通した分割量と比較した、元の抽出物の活性を示す大腸菌産生 Ni - N T A 精製リシン E 1 の Bioscreen 分析。リシン及び緩衝液対照を C. ディフィシレ株 1 1 2 0 4 の急速冷凍細胞とインキュベートした。結果は二重複分析の平均値 + / - 標準偏差である。

【図 1 6】L M 4 - C D 2 7 L (レーン 2) 及び L M 4 - C D 2 7 L E (レーン 3) の粗細胞抽出物の SDS - PAGE、及び His タグ化タンパク質を強調表示する対応のウェスタンブロット。タンパク質を 20 mM のリン酸ナトリウム、pH 6.0 で抽出し、そして $10 \mu\text{g}$ 分割量を M O P S 緩衝液 (Invitrogen) 中の 10 % Bis-Tris NuPage ゲルで電気

50

泳動した。レーン 1 は、SeeBlue マーカー。

【図 17】中期対数まで増殖し、次いで液体窒素中で急速冷凍した C . ディフィシレ株 1204 細胞の溶解を示す Bioscreen 分析。細胞を 10 μ g NiNTA 精製 E 1 (溶出液 1) 又は対照としての溶出緩衝液とインキュベートした。

【実施例】

【0151】

背景

抗菌薬としての細菌ウイルスの利用で、近年多少のルネサンスを経験している。一部において、これは、薬剤耐性病原体の継続的出現に続く従来型抗生物質の代替を見出す必要性を反映している。最近のレビューはこの可能性を強調しているが、バクテリオファージの使用に内在する限界をも強調している (7、8)。

10

【0152】

一般的に、バクテリオファージは顕著な系統差を示すことから、それらは限定範囲の個々の菌株に対して活性であることを意味する。バクテリオファージとその細菌宿主間の相互作用の動力学は、バクテリオファージ攻撃に抵抗性の宿主変異体の即時選択を含む。他の関連する問題は、宿主生菌によるバクテリオファージ製剤の汚染可能性、及びバクテリオファージが遺伝子流動及び毒性因子の拡大に寄与する可能性を含む (9)。バクテリオファージによる毒素遺伝子の輸送は特に十分立証されており、その例はコレラ毒素 (10)、ボツリヌス毒素 (9)、志賀毒素 (11) 及びジフテリア毒素 (9) を含む。これらの限定にもかかわらず、バクテリオファージは、マウスモデルにおける大腸菌 (12)、黄色ブドウ球菌 (13) 及びバンコマイシン耐性エンテロコッカス・フェシウム (14) を制御するのに実験的に使用されている。バクテリオファージ療法はニワトリにおけるカンピロバクター (15) 及び大腸菌 (16) の制御のために研究中である。クロストリジウムに関して、ハムスターモデルにおける C . ディフィシレを標的とする研究が報告されている (17)。更に、FDA は、最近全食品におけるリステリア制御のためのバクテリオファージ (LISTEX (登録商標), EBI Food Safety) への GRAS 承認を更に拡大した (18)。

20

【0153】

インタクト・バクテリオファージの使用に加えて、抗菌薬としてバクテリオファージ・エンドリシスを使用する可能性がある。バクテリオファージ・ライフサイクルの最終段階は、新たに複製されたインタクト・バクテリオファージ粒子のプールを放出するための細菌宿主細胞の溶解を含む。一般的に、これは、膜破壊性ホリンの厳密な時限産生が、そのペプチドグリカン標的に細胞壁分解性エンドリシンが接近することを可能にする、2段階過程によって達成される。エンドリシン酵素は分泌されず、ホリンの作用により及び細胞壁を分解するそれ自体の能力により細胞から放出される。一度放出された場合、エンドリシンは細胞の外側からペプチドグリカンを攻撃することができ、この現象は初期のバクテリオファージ研究の時から観察されている：それを「外部からの溶解」と称する。最も特徴的なバクテリオファージ・エンドリシンの構造は、触媒ドメイン及び特徴的な細胞壁結合ドメイン (CBD) を有するモジュール構造である。触媒ドメインは変化することができ、そしてほとんどの場合それはアミダーゼか又はムラミダーゼである。CBD は細胞壁表面上の糖モチーフを認識するレクチン様能力を有し、そして関係する特異性の変動は、エンドリシンに特異的な分類群へのそれらの特徴的なターゲティングをもたらす (19、20)。

30

40

【0154】

Gasson らは、新しい抗菌薬として及びモデル系としてのリステリア及びクロストリジウムを用いた新しい検出技術の基礎の両方で、バクテリオファージ・エンドリシンの開発の先駆者となった (21)。その後、標的抗菌薬としてのエンドリシンの可能性が、炭疽菌 (23)、肺炎連鎖球菌 (24) 及びエンテロコッカス・フェカーリスを標的とする公表例により広く認識されている (22)。リステリアに関して、重要な更なる研究が Martin Loessner at ETH, Switzerland により行なわれている (19、20)。加えて、クロス

50

トリジウム・パーフリンジェンスに対して活性なエンドリシンが特徴付けられている(26)。

【0155】

新しいバクテリオファージ・リシンの特徴付け及びその使用方法

テンプレート・バクテリオファージ CD27は、クロストリジウム・ディフィシレ菌株保存株 NCTC 12727 から単離された。他の25のC.ディフィシレ株に対してCD27を試験し、そしてタイプ株 11204を含む他の4株に対して有効なことが示された。バクテリオファージ・ゲノムDNAを抽出して配列決定し、そしてBLAST検索によりエンドリシン配列が同定された。その配列は、公表されたC.ディフィシレのバクテリオファージ・エンドリシン(CD119、C2、配列決定されたC.ディフィシレCD630におけるプロファージ1及び2)と明瞭なアミノ酸及びヌクレオチド相同性を示した。リシンはpET15bヘサブクローニングされ、そして6×Hisタグにより大腸菌に発現された。リシンはニッケルカラムで一部精製され、そしてファージ感受性及び非感受性株の両方を溶解することが、37℃でインキュベーション時の光学密度の減少により証明された。試験した30株のうち、毒性リボタイプ027株を含む全てが溶解することを示した。一連の菌属からの多数の他の細菌は、リシンに対して感受性を示さなかった。しかしながら若干の活性がC.ピフェルメンタンス、C.ソルデリ、セレウス菌、枯草菌に対して認められ、そしてリステリア・イバノビイに対して非常にわずかな活性が認められた。部分精製リシンの比活性は、C.ディフィシレ株によって変動した。従って、本明細書に開示されたリシンは、C.ディフィシレ病原性の治療及び検出に対する新しい強力な武器となる。

10

20

【0156】

本明細書で同定されそして特徴付けられたリシンは、C.ディフィシレ感染症、及びヒト及び動物の他の細菌感染症を治療するために使用できる新しい組成物である。本発明によれば、CD27リシンは、当技術分野で公知の方法によって生産してもよい。それは、この目的のために増殖したウイルスから使用のために単離してもよい。しかしながら、好ましくは、それは本明細書に開示した組み換え法により、そして当業者に公知の代替法により生産される。この分子の関連サブポーションについて、細菌に特異的に結合し、それらの細菌を溶解するそれらの能力が特徴付けられた。これらの分子サブポーションは、天然分子として別々に又は同時に生産され、そして使用されてもよい。

30

【0157】

CD27リシンの発見、クローニング及び活性

溶解物の生産及び活性分析は、記載のように行われた(27)。C.ディフィシレ株 NCTC 12727 (the Health Protection Agency, Colindale, London から入手可能 - 糞便から単離され、1992年にS. Tabaqchali, St. Bart's Hospital, London により寄託)は、BHI+C(ビタミンK(10 µl、0.5容量%/l)、ヘミン(5 mg/l)、レザズリン(1 mg/l)及びL-システイン(0.5 g/l)を補充したBHI(Oxoid))中、37℃で嫌氣的に24時間増殖させた。バクテリオファージ生産をマイトマイシンC(Sigma)により3 µg/mlの最終濃度で24時間誘導した。培養液を4において4000×gで20分間遠心分離し、上清を0.45 µmフィルターユニット(Millipore)を通して濾過し、そして4℃で保存した。150 µlの一夜C.ディフィシレBHI+C培養液を加えたBHI軟寒天(0.75%)を重層化したBHIプレート(1.5%寒天)上に、上清の25 µl部をスポットし、そして37℃で一夜嫌氣的にインキュベートした。培養液(表1を参照)を2重複で試験し、12727上清からの明瞭なブランク形成を、4株-C.ディフィシレ11204(タイプ株)、11205、11207及び11209で確認した。菌株11204からのブランクは、滅菌パスツールピペットで250 µl BHI+C中へ採取し、4℃で一夜インキュベートした。バクテリオファージ-CD27の存在は電子顕微鏡で確認したが、それがカウドウイルス目に属することを示した(28)(図1)。総数で25のC.ディフィシレ株がマイトマイシンCで誘導され、その上清は25株全てに対して交差試験した。CD27は、この方法で発見され

40

50

た唯一のブランク形成単位であった。C.ディフィシレからのバクテリオファージ発見が稀なことはこれまでの刊行物にも示されており、それには94分離株から2バクテリオファージ産生株(29)又は56分離株から3産生株(30)が見出される。

【0158】

力価を増加させるために、100 μ lのブランク溶出液を100 μ lのC.ディフィシレ24時間培養液と5ml BHI軟寒天中で混合し、BHI寒天上に塗布した。37 度一夜の嫌気性培養は近似融合溶菌を与え、そして5ml BHI + Cで2時間の溶離は、 2×10^6 p f u / mlの力価を与えた。力価は、11204の液体培養での連続インキュベーションにより増加し、初期から中期対数期まで25ml BHI + C培養における細胞を増殖させ、バクテリオファージ：細胞の比を少なくとも4：1にする光学密度(OD)を与えた。この方法は、細菌懸濁液の完全透明化をもたらし、そして2代継代は 2.5×10^{11} p f u / mlの力価を与えた。DNA抽出のために、OD 0.3の細胞をc.7.の感染の多重度まで濾過溶解物でインキュベートした。3時間のインキュベーションは完全溶解をもたらし、上清を上記のように採取して濾過し、そして2つの50ml部をQiagen midikit (Qiagen)中で使用した結果、c.160 μ gのバクテリオファージのゲノムDNA収量を得た。

【0159】

バクテリオファージ CD27ゲノムのシーケンシング及びアセンブリーを、Phred-Phrapプログラムを用いてBiochemistry DNA Sequencing Facility (University of Cambridge, UK)により実施した。循環ゲノムは50,930bpであり、75の提案されたオープン・リーディング・フレーム(orf)を含んだ(図2)。これらの多くは、C.ディフィシレのバクテリオファージ CD119(31)及び C2(32)からのものを含み、同定したバクテリオファージORFに顕著な相同性を示した。ORFは、BITS (Harpenden)を経て行なわれたArtemis (33)及びBlastP 検索(34, 35)により解析した。提案された CD27リシン配列は816bpであり、N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼに相同性を示す271アミノ酸予測タンパク質をコードした。ヌクレオチド及びアミノ酸配列(図3)の両方は、C.ディフィシレのバクテリオファージ及びプロファージ(図4)の公表配列に合っていたが、C2に対してその最大相同性(95.9%ヌクレオチド及びアミノ酸同一性)を有した。

【0160】

CD27リシン配列はプライマーを用いてゲノムDNAから増幅され、初めのMet残基(プライマーCD27L__NDE、5'-TTA CAT ATG AAA ATA TGT ATA ACA GTA GG[配列番号3]、Sigma Genosys)周囲のNdeI(CATATG)部位を、そしてコード配列(プライマーCD27L__XHO、5'-CAA CCA CCT CGA GTT GAT AAC[配列番号4]の下流にXhoI部位(CTCGAG)を作製し、発現ベクターpET15b(Novagen)におけるサブクロニングを促進させた。増幅は、1xPhusion緩衝液、200 μ MのdNTP、0.5 μ Mの各プライマー、200ngのゲノムDNA鋳型を含む50 μ lの反応液中、高性能PhusionDNAポリメラーゼ(0.02U/ μ l、Finnzymes)により実施した。増幅条件は、98 度30秒間の初期変性、その後30サイクルの変性(90 度10秒)、アニーリング(58 度30秒)及び伸長(90 度10秒)、次いで72 度5分間の最終伸長が続いた。平滑末端PCR産物はSureClean (BioLine)を用いて精製し、そして72 度20分間インキュベートして、1xAmpliTaq緩衝液、0.2mMのdATP及び1UのAmpliTaqDNAポリメラーゼ(Applied Biosystems)を含む50 μ lの反応液中に3' A-オーバーハングがもたらされた。生成物をSureCleanで精製し、次いでTAクローニングキット(Invitrogen)を用いてpCR2.1に結合された。ライゲーション生成物は、TOP10化学的コンピュメント大腸菌(Invitrogen)中へ形質転換して、陽性菌を100 μ g/mlアンピシリンを補充したL寒天で選択し、そしてブルー・ホワイト選択のために40mg/ml X-ガル溶液の40 μ lで重層化した。プラスミドDNAをプラスミドミニキット(Qiagen)を用いて抽出し、挿入部分をベクタープライマー及びBigDye v3.1

シーケンシングキット (Applied Biosystems) を用いて配列決定した。リシン原配列と 100% 配列相同性を示すが、付加した NdeI 及び XhoI 部位を有するクローンは挿入部分を放出するのが限定的であった。これはゲル精製され (Qiaex II, Qiagen)、そして Fast-Link DNA リガーゼ (Epicentre) を用いて、リシン配列が IPTG 誘導性 lac オペレーターによる高発現 T7 プロモーターの制御下に 6 - ヒスチジンタグの下流に発現するように、pET15b へと結合された。ライゲーション産物は、先ず配列確認のために TOP10 細胞へ、次いでタンパク質発現のために化学的コンピテント BL-21 (DE3) 細胞 (Invitrogen) へ形質転換された。配列決定した C.ディフィシレ (36) のプロファージ 1 からのリシン配列を、ベクター pUC57 へと Genscript Corp. (Piscataway, USA) によって合成し、そしてプライマー CD630L1__NDE (5' - TGC TCA TAT GAA AAT AGG TAT AAA TTG) [配列番号 5]、及び XhoI 部位を含む特定のベクター DNA でリシンを増幅した M13 前方 (5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT) [配列番号 6] を用いて、同様に His - タグ化発現のためにサブクロニングした。

【0161】

His - タグ化リシンは、メーカーにより示唆されたように、OD₆₀₀ 0.4 まで 100 µg/ml アンピシリンにより 10 ml LB ブロス中に増殖した BL21 (DE3) 細胞に発現し、次いで 0.5 mM の IPTG (Melford Biosciences) で 3 ~ 4 時間誘導した。細胞を 4000 × g で遠心分離することにより採取し、次いで 1 ml の懸濁液 (20 mM Tris - HCl、pH 8、50 mM の NaCl) 中 4 で 20 分間再懸濁し、そして 2 ml スクリューキャップチューブに移した。粗タンパク質溶解物は、FastPrep FP120 細胞破壊器 (Savant) 中の 0.1 mm 酸洗浄ガラスビーズ (Sigma) を用いて、バースト間に 5 ~ 10 分間氷上でインキュベートしながら 4 × 30 秒のバースト (速度 10) での細胞破壊によって得られた。破壊細片を 13,000 × g で 4 にて 20 分間遠心分離によりペレット化し、上清を 4 で保存した。粗溶解物は、IPTG 誘導無しで増殖したリシンを含む細胞から、及び誘導の有り無しで増殖した pET15b 空ベクターを含む細胞からも製造された。タンパク質含量を Bradford 試薬 (Bio Rad) を用いて測定し、10 µg 部を MOPS 緩衝液 (Invitrogen) 中 10% NuPage Novex Bis Tris ゲルで電気泳動した。His - タグ化リシンの存在は、抗 His タグモノクローナル抗体 (Novagen) を用いてウェスタンブロットにより確認した。タンパク質は NuPage 緩衝液 (Invitrogen) を用いて PVDF 膜に移され、そして検出は二次抗体として抗マウス IgG を用いて Qiagen (Qiaexpress 検出及び分析便覧) に記載のように行なわれ、そして比色検出は Sigma FastBCIP/NBT アルカリ性ホスファターゼ基質でなされた。これにより、IPTG 誘導溶解物における c. 33 kDa の His タグ化バンドの高発現及び非誘導溶解物の低発現を証明した (図 6)。

【0162】

粗溶解物による C.ディフィシレの 11204 及び 11207 株細胞のリシスは、Loessner ら (37) によって記載された方法を用いて評価した。11204 株細胞は、エンド対数期まで増殖し、1.8 ml 分割量を スクリューキャップチューブ (13,000 × g、2 分) 中への遠心分離によって採取し、そしてペレットは液体窒素中で急速冷凍して -20 で保存した。ペレットは 900 µl の 20 mM の Tris - HCl、pH 8 中氷上で再懸濁し、そして 100 µl の粗タンパク質溶解物を含むキュベットに加えて、その後 OD₆₀₀ の低下を読み込み前に混合して 1 時間モニターした。この系で、C.ディフィシレ細胞は緩衝系中で一定量の溶解を示したが、CD27 リシン粗抽出物による溶解はより急速で多大であった。しかしながら、誘導 pET15b エンプティーベクター粗溶解物によるその後の試験は同等の溶解を示し、大腸菌 リゾチームの活性を示唆した。この問題を回避するために、CD27 及び CD630L1 リシンを Qiagen NINTA キットでアフィニティー精製した。BL-21 (DE3) 細胞は、100 µg/ml のアンピシリンを含む 250 ml の LB ブロス中で OD₆₀₀ 0.6 まで増殖し、次いで 1 mM の最終濃度で IPTG により 5 時間誘導した。細胞を 4000 × g で 4 にて 20 分間遠心分離することによ

り採取して、-20℃で保存した。タンパク質を自然条件で精製し、そして精製はNuPageゲル分析によって確認した(図7)。この方法は大部分がリシンの部分精製タンパク質を産生し、その収量は第1のCD27溶出液(E1)では2.3mg総タンパク質であり、第2(E2)では0.5mgであった。E1溶出液の希釈液のインキュベーションは、同様に調製した細胞からの溶出液に比べて11204株細胞の急速溶解を示したが、pET15b空ベクターを発現した。しかしながら、CD630L1E1溶出液は11204株を溶解せずに、そしてCD27リシンとの相乗効果は見られなかった。

【0163】

溶解分析は、Bioscreen C (Labsystems) 及び溶出緩衝液(EB, Qiagen)でのNiNTA部分精製リシン抽出物を用いたマルチウェルプレート中で継続した。初期分析は、分光光度計分析におけるように、30µlのEB及び270µlの細胞の全容積中の約(c.)7µgのタンパク質を用いた。分析は氷上にセットアップし、次いで37℃に予熱されたBioscreen Cに移し、そしてプログラムは以下のように実施した: 600nmの光学密度でサンプリング前に10秒振盪して2分毎にサンプリングした。各分析は、緩衝液だけの2ウェル及びリシンの2ウェルで実施し、全部で4ウェルに同じ細菌細胞懸濁液から植菌した。この系では、感受性株のリシンウェル中の溶解は迅速であり-その差は5分以内で顕著であった。しかしながら、リシン誘導溶解よりもはるかに低速にもかかわらず、緩衝液だけの対照での溶解も顕著であった(図8)。

【0164】

C.ディフィシレ及び他の細菌細胞の両方は、エンド対数まで増殖して、凍結せずに氷上で採取し、次いで可及的速やかに分析した場合、緩衝液だけの溶解は減少し又は全体的に欠如しており(図9)、他の種全ての溶解は、クロストリジウム・ビフェルメンタンス、クロストリジウム・ソルデリ、バシラス・セレウスを注目すべき例外として欠如しており、そして枯草菌及びリステリア・イバノビイで若干欠如していた(図11、表2)。胃腸管マイクロフローラのATリッチクロストリジウム様成分の代表である更なる菌株について、CD27リシンに対する感受性を試験した。表3に示されるように、試験したいずれもリシンに感受性ではなかった。

【0165】

新鮮細胞の使用は、12分までの顕著な遅延を伴う、C.ディフィシレへの溶解の迅速開始の程度は小さかった(図9)。全てのC.ディフィシレ株を第2NiNTAカラムから単離した3.5µgのリシンを用いて再試験した(第1精製と同等のリシスを示すことを試験した; 図10)。新鮮又は凍結細胞を用いたいずれの場合にも、感受性プロファイルは、リシンに対して明らかな感受性示す30株全てで同様であった(表1)。

【0166】

CD27リシンのpHプロファイルはを、感受性株11204を用いて試験した-活性は、pH4.5、5.8、6.5、7.0、7.3(PBSの通常のpH)、7.6及び8.3で試験して、かなりのpH範囲内でほとんど変動を示さなかった。希釈系列は、300µl分析において10.5µgタンパク質での活性が最大であったが、良好な溶解は3.5µg及び0.7µgでも見られた。しかしながら、0.35µgは緩衝液対照をわずかに下回る反応を示し、より低い量では45分分析内で溶解を示さなかった。

【0167】

胃腸管へのCD27リシンの送達は、物理的カプセル化又は乳酸菌の1メンバーなどの組み換え片利共生微生物の使用により達成することができた。乳酸連鎖球菌はこの点で可能性を確立しており、それ故この種におけるCD27リシンのサブクロニング及び発現が実証された。CD27リシン配列をベクターpUK200Hisへサブクロニングした。これは、NcoIによるpUK200の制限、末端充填、次いでナイシン誘導性プロモーターから下流の6-ヒスチジンタグ(AGTCATCACCATCACGC)[配列番号7]をコード化するオリゴマーの挿入により構築される、nisA翻訳融合プラスミドpUK200の誘導体である(38)。再循環した場合、これはサブクロニングのためのNcoI部位を再作製した(Hornら、未発表)。ベクターpU

K 2 0 0 H i s は、NcoIで制限され、T 4 D N A ポリメラーゼ (Promega) で末端充填されて、nisAプロモーターの制御下翻訳融合のための最初のA T Gコドンを作製した。phic d27I配列は、p C R 2 . 1 (上記)においてサブクローニングされたC D 2 7 L - N D E ... C D 2 7 L - X H O P C R産物から増幅された。プライマーC D 2 7 L C O D 2 _ _ F (5 ' - A A A A T A T G T A T A A C A G T A G G A C A C) [配列番号 8] 及びM 1 3 前方 (5 ' - G T A A A A C G A C G G C C A G T) [配列番号 9] は、第2コドンA A Aからの完全配列、及びある種のベクター配列を増幅し、リシンコード配列のすぐ後にEcoRI部位を与えた。増幅は上記のようであったが、アニーリング温度は5 6 °Cであった。P C R産物及びNcoI-カットの、末端充填p U K 2 0 0 H i s ベクターは、EcoRIにより制限され、そして相互に連結されてnisAプロモーターの制御下にH i s タグ化翻訳融合体が作製された。連結反応産物は、配列検証のためにエレクトロコンピテント大腸菌株M C 1 0 2 2 に形質転換され、陽性形質転換体をクロラムフェニコール (1 5 µ g / m l) で選択した。次いで精製プラスミド調製品をエレクトロコンピテント乳酸連鎖球菌株F I 1 0 6 7 6 に形質転換し、そして5 µ g / m l クロラムフェニコールを補充したG M 1 7 寒天で選択した。

10

【 0 1 6 8 】

p U K 2 0 0 H i s - p h i C D 2 7 L 又は p U K 2 0 0 H i s 空ベクター制御を発現する乳酸連鎖球菌株は、3 0 °C 静置で5 µ g / m l のクロラムフェニコールにより1 0 m l のG M 1 7 ブロス中で増殖した。1 0 0 µ l の一夜培養液を使用して予熱ブросを植菌した結果、培養液は中間期対数 (O D ₆₀₀ 0 . 5) まで増殖した。発現は3 0 °C で5 時間 1 n g / m l のナイシンで誘導し、粗タンパク質溶解物は、2 0 m M の T r i s - H C l 、p H 8 . 5 、5 0 m M の N a C l 中に大腸菌で記載のように産生した。C D 2 7 リシンの乳酸菌発現の証明が、タンパク質ゲル解析で示された (図 1 3) 。乳酸連鎖球菌に発現した C D 2 7 リシンに対するクロストリジウム・ディフィシレ株 1 1 2 0 4 の感受性が、図 1 4 に示されるように粗タンパク質抽出物を用いて証明された。

20

【 0 1 6 9 】

【表 1】

表 1 (次ページにわたる)、バクテリオファージ及びリシン分析試験に使用されるクロストリジウム・ディフィシレの菌株。供給元 a : National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, 61, Colindale Ave, London; b : Dr Jonathan Brazier, Anaerobe Reference Unit, Dept. of Medical Microbiology and PHLS, University Hospital of Wales, Heath Park, Cardiff; c : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), GmbH Inhoffenstrasse 7 B, 38124 Braunschweig, Germany。S=バクテリオファージΦCD27による感染に対する感受性を示し、R=バクテリオファージΦCD27による感染に非感受性、nt=未試験; L=ΦCD27リシンで溶解した。

菌株	供給元	詳細	バクテリオ ファージ	リシン
NCTC 11204 N1	a	新生児の胎便, 1970	S	L
NCTC 11205 N2	a	新生児の胎便, 1970	S	L
NCTC 11206 N3	a	新生児の胎便, 1970	R	L
NCTC 11207 N4	a		S	L
NCTC 11208 N5	a		R	L
NCTC 11209 N6	a		S	L
NCTC 11223 335722	a	糞便	R	L
NCTC 12726	a	糞便, 35S メチオニンタンパク質 タイプ A	R	L
NCTC 12727	a	糞便, 35S メチオニンタンパク質 タイプ B	R	L
NCTC 12728	a	糞便, 35S メチオニンタンパク質 タイプ C	R	L
NCTC 13287	a	R7404	nt	L
NCTC 13307	a	630 株	nt	L
NCTC 12731	a	糞便, 35S メチオニンタンパク質 タイプ W	R	L
NCTC 13366	a	R2029	nt	L
NCTC 11382 74/1451	a	血液培養物, New Zealand, 1980	R	L
R23 521	b	リボタイプ 118	R	L
R23 524	b	リボタイプ 001	R	L
R23 613	b	リボタイプ 027	R	L

【表 2】

表 1 (続き)

菌株	供給元	詳細	バクテリオ ファージ	リシン
R23 614	b	リボタイプ 106	R	L
R23 621	b	リボタイプ 179	R	L
R23 635	b	リボタイプ 015	R	L
R23 639	b	リボタイプ 014	R	L
R23 642	b	リボタイプ 012	R	L
R23 720	b	リボタイプ 005	R	L
R23 727	b	リボタイプ 001	R	L
R23 732	b	リボタイプ 027	R	L
R23 737	b	リボタイプ 106	R	L
G83/03	b	リボタイプ 180	R	L
12056	c	新生子ヒツジのルーメン	nt	L
12057	c	新生子ヒツジのルーメン	nt	L

10

20

【 0 1 7 1 】

【表 3】

表2、一連の細菌に対するΦCD27リシンの活性のスペクトラム。－＝溶解なし、
 +++＝明瞭な溶解、＋＝限定溶解

細菌	菌株	溶解試験
バシラス・セレウス (<i>Bacillus cereus</i>)	ATCC 9139	++
枯草菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	ATCC 6633	+
ビフィドバクテリウム・アドレッセンチス (<i>Bifidobacterium adolescentis</i>)	DSMZ 20083	－
ビフィドバクテリウム・アングラタム (<i>Bifidobacterium angulatum</i>)	DSMZ 20098	－
ビフィドバクテリウム・ビフィダム (<i>Bifidobacterium bifidum</i>)	DSMZ 20082	－
ビフィドバクテリウム・ロンガム (<i>Bifidobacterium longum</i>)	DSMZ 20219	－
ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム (<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>)	DSMZ 20438	－
クロストリジウム・ココイデス (<i>Clostridium coccoides</i>)	NCTC 11035	－
クロストリジウム・ペルFRINGENS (<i>Clostridium perfringens</i>)	NCTC 3110	－
クロストリジウム・ビフェルメンタンス (<i>Clostridium bifermentans</i>)	C22/10	+++
クロストリジウム・ビフェルメンタンス (<i>Clostridium bifermentans</i>)	NCTC 13019	++
クロストリジウム・ソルデリイ (<i>Clostridium sordelli</i>)	NCTC 13356	++
クロストリジウム・スポロゲネス (<i>Clostridium sporogenes</i>)	ATCC 17886	－
エンテロコッカス・フェカリス (<i>Enterococcus faecalis</i>)	FI10734	－
エンテロコッカス・フェシウム (<i>Enterococcus faecium</i>)	FI10735	－

【0172】

【表 4】

表 2 (続き)

細菌	菌株	溶解試験
エンテロコッカス・ヒラエ (<i>Enterococcus hirae</i>)	FI10477	-
大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) 野生型	K12	-
ラクトバシラス・ブルガリカス (<i>Lactobacillus bulgaricus</i>)	FI10643	-
ラクトバシラス・カセイ (<i>Lactobacillus casei</i>)	FI107346	-
ラクトバシラス・ガセリ (<i>Lactobacillus gasserii</i>)	NCIMB1171	-
ラクトバシラス・ジョンソニー (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	FI109785	-
ラクトバシラス・プランタラム (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	FI108595	-
ラクトバシラス・ラムノサス (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	FI107347	-
ラクトバシラス・サケイ (<i>Lactobacillus sakei</i>)	FI10645	-
乳桿菌 (<i>Lactococcus lactis</i>)	MG1316	-
ラクトコッカス・ガルビエア (<i>Lactococcus garvieae</i>)	FI08174	-
リステリア・イノキュア (<i>Listeria innocua</i>)	NCTC 11288	-
リステリア・イバノビイ (<i>Listeria ivanovii</i>)	NCTC 11007	+
リステリア・モノシトゲネス (<i>Listeria monocytogenes</i>)	NCTC 5412	-
ミクロコッカス・ルテウム (<i>Micrococcus luteus</i>)	FI106340	-
ペディオコッカス・ペントサセウム (<i>Pediococcus pentosaceus</i>)	FI10642	-
ペディオコッカス・アシディラクチシ (<i>Pediococcus acidilactici</i>)	FI10738	-

10

20

30

40

【表 5】

表 2 (続き)

細菌	菌株	溶解試験
サルモネラ・エンテリカ・セロバル・ ティフィムリウム (<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium)	FI10739	—
腸炎菌 (<i>Salmonella enteritidis</i>)	FI10113	—
黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	FI10139	—
スタフィロコッカス・アンギノスス (<i>Streptococcus anginosus</i>)	FI10740	—
ベーヨネラ・アティピカル (<i>Veilonella atypical</i>)	FI10741	—

10

【0174】

20

上記に加えて、健常腸生理を維持するために、望ましくは有害でない片利共生生物株を代表する多くの追加菌株は、本発明のリシンとの接触により害されないことが知られている。CD27に対して試験した以下のクロストリジウム種の全て、DSMZからの全てにおいて、全てが溶解をもたらさなかった。これらの菌株は、Eckbergら(2005) Science 308 1635- 及び補充論文、及び Kikuchi ら (2002) Microbiol. Immunol. 46, 353 及び引用文献を参考にして、ヒトの腸に通常見られる主要クロストリジウム菌株群の代表であることを基準に、特異的に選択された。

【0175】

【表 6】

表3、ΦCD27リシンにより溶解されない胃腸管クロストリジウム及びクロストリジウム様種

細菌細胞	寄託	菌株群
クロストリジウム・セロビオパラム (<i>Clostridium cellobioparum</i>)	DSMZ 1351	クラスター I I I
クロストリジウム・レプタム (<i>Clostridium leptum</i>)	DSMZ 753	クラスター I V
クロストリジウム・ネキシル (<i>Clostridium nexile</i>)	DSMZ 1787	クラスター X I V a
クロストリジウム・コリナム (<i>Clostridium colinum</i>)	DSMZ 6011	クラスター X I V b
クロストリジウム・イノクーム (<i>Clostridium innocuum</i>)	DSMZ 1286	クラスター X I V b
クロストリジウム・ラモサム (<i>Clostridium ramosum</i>)	DSMZ 1402	クラスター X V I I I
ユーバクテリウム・バルケリ (<i>Eubacterium barkeri</i>) (以前は クロストリジウム・バルケリ (<i>C. barkeri</i>))	DSMZ 1223	クラスター X V
アナエロコッカス・ヒドロゲナリス (<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>)	DSMZ 7454	クラスター X I I I

10

20

30

【0176】

全てのC.ディフィシレ株を、同じ方法で大腸菌に発現したC.ディフィシレ株630のプロファージ1リシンに対して試験し、その結果CD630L1リシンは溶解をもたらさなかった。

【0177】

細胞生存性

細胞生存性に対するphiCD27の効果を測定するために、反復分析が前還元(pre-reduced)緩衝液及び培地を用いて嫌気性条件下に設定された。細胞はエンド対数で増殖され、嫌気性条件下で遠心分離により採取し、次いでPBS緩衝液中pH7.3で再懸濁した。PBS中で $c.1 \times 10^8$ 細胞から $c.1 \times 10^3$ 細胞まで10倍希釈を行なった；各分析において細胞数の評価が可能のように、それらの10μl分割量を0時点でBHI寒天上にスポットした。分析は2回ずつとし、100μgの部分精製エンドリシン(E1)か又は等量(50μl)の緩衝液(EB)及び300μlの最終量までの細胞を含有した。連続的な穏やかな振盪による2時間のインキュベーション後、PBS中の10倍連続希釈で30μlの試料を採取した；これらの希釈液の10μl分割量をBHI寒天上にスポットし、各2回ずつのペアの1つから残りの270μl分析量を細胞計数可能のように塗布した。

40

【0178】

50

0 時点で $c.1 \times 10^8$ 細胞を含む分析では、2 時間のインキュベーション後 1 対数の低下を示したが、一方で 1×10^7 細胞又は 1×10^6 細胞が加えられた分析では、緩衝液対照に比べて 2 対数の低下を示した。低めの初期細胞数による分析では、リシンはより有効で、 1×10^5 細胞を植菌した分析からわずか 4 生存コロニーが回収されただけで、 1×10^4 細胞以下の分析では生存細胞は残っていなかった。

【0179】

次いで上記の生存性分析を、Ni-NTA 溶出緩衝液 (EB) を 20 mM の pH 6 リン酸緩衝液 (NP) で置き換えるために、2 ml の Zeba Desalt スピンカラム (Pierce) を用いて、緩衝液交換にかけていた E1 の 400 μ l の分割量を用いて繰り返した。NP 緩衝液中のリシンは、クロストリジウム・ディフィシレ 11204 の凍結細胞に対して元の Ni-NTA E1 と同等の活性を示した (図 15)。50 μ g の E1-NP 又は NP 緩衝液対照及び $c.1 \times 10^6$ 細胞を用いて、上記の生存性分析を繰り返した；リシンによる 2 時間インキュベーションは緩衝液対照に比べて 3 対数の低下をもたらした。

【0180】

上記データはその後公表科学論文原稿 (Mayer et al., 2008, J. Bacteriol. 190:6734-6740) の基礎となったが、その開示内容は、参照により本明細書に組み込まれている。

【0181】

ドメイン交換

スプライス重複 PCR による CD27L エンドリシン上への新しい酵素ドメインの設計

リステリア・モノサイトゲネスに対して活性なバクテリオファージ LM4 からのエンドリシン LM-4 は、宿主細胞の有効な溶解をもたらすことが示された (英国特許公開公報第 2255561 (B) 号)。エンドリシンは 864 bp の長さで、pfam2557、VanY、蛋白質の始部の D-アラニル-D-アラニルカルボキシペプチダーゼ及び COG5632、全配列にわたり N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ (NCBI Blast) に相同性を示す 287 アミノ酸のタンパク質を与えた。提案酵素活性ドメイン (EAD) をコード化する配列の前半は、スプライス重複伸長 PCR により、CD27L 細胞壁結合ドメイン (CBD、Asn180 から最終の Arg270) が又は全 270 アミノ酸酵素の上流に挿入された。LM4 酵素ドメインは、LM4 の ATG の NdeI 部位を作製するために、プライマー LM4Nde5'-GGA TGA TTA CAT ATG GCA TTA ACA G [配列番号 10]、及び 2 つのスプライス重複プライマーの 1 つ：LM4 EAD-CD27L EAD-CBD を与えるために、CD27L 酵素の最初の 15 ヌクレオチドに適合する尾部を有する LM4 配列の、ヌクレオチド 439~453、Thr147 から Asn151 を表わす、LM4-スプライス-CD27LE 5'-TAT ACA TAT TTT CAT GTT TTG TGT CGC AGT [配列番号 11]；又は、LM4 EAD-CD27L CBD を与えるために、Asn180 から Arg270 の CD27L の提案 C 末端結合ドメインに適合する尾部を有する LM4 配列のヌクレオチド 439~453、Thr147 から Asn151 を表わす、LM4-スプライス-CD27L 5'-TTT AAC TCC CTC ATT GTT TTG TGT CGC AGT [配列番号 12]、を用いてプラスミド pFI567 (Payne et al., 1996 FEMS Microbiology Letters 136: 19-24) から PCR によって増幅した。同様に、CD27L 全配列又は CBD は、ベクター、T7T 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G [配列番号 13] からのプライマー、及び LM4 EAD 配列末端-そこでプライマーの最後の 20 nt が Met1 から CD27L 配列の始めをコード化する、全配列に対する、CD27LE スプライス LM4 5'-ACT GCG ACA CAA AAC ATG AAA ATA TGT AT A ACA GT [配列番号 14]；及びプライマーの最後の 16 nt が Asn180 からの CD27L 配列の提案 CBD をコード化する、CBD だけに対する CD27L スプライス LM4 5'-CT GCG ACA CAA AAC AAT GAG GGA GTT AAA C [配列番号 15] に適合する尾部を有したスプライシングプライマー、を用いて CD27L-pET15b から増幅した。PCR を、元の鋳型に 100%

適合を与えるスプライシングプライマー部分に適合するように5サイクルのアニーリング温度を用い、次いで20サイクルは全スプライシングプライマーに適合するアニーリング温度にて、メーカー推奨の条件でPhusion (Finnzymes) により実施した。生成物は、SureClean (Bioline) を用いて精製し、50 μ l の容積に再懸濁した。これらの鋳型を100倍希釈し、そして1 μ l 分割量を、2配列のスプライシングを可能にするアニーリング温度(54)で、元の外側プライマー - LM4 Nde 及び T7T - を用いてPCR反応に使用した。最終生成物をSureCleanで精製し、Nde I 及び Xho I で制限し、そしてHis - タグ化 LM4 - CD27LE 及び LM4 - CD27L を生産するために、pET15b にサブクロニングした。次いでこれらのプラスミドは大腸菌に形質転換され、それらの配列が確認された。

10

【0182】

複合酵素の粗抽出物及びNiNTA精製抽出物の両方を生成して、SDS - PAGE 及びウェスタンブロット法で解析し、そして前述のように分析した(図16参照)。His - タグ化 LM4 - CD27LE 及び LM4 - CD27L の両方は、粗抽出物中に高レベルで存在した。C.ディフィシレ11204の凍結細胞をPBS緩衝液中、pH5.8でインキュベートした場合、10 μ g のNiNTA精製抽出物は、緩衝液対照に比べて迅速溶解をもたらした(図17参照)、LM4 - CD27LE は天然のCD27Lと同様の溶解速度を示した。細胞希釈剤としてpH7.3でPBS緩衝液を用いて等価活性が見られた。

【0183】

生存性分析において、LM4 - CD27LE 及び LM4 - CD27L の両方のNiNTA精製溶出液は生存数の低下をもたらした(図17参照)。50 μ g NiNTAE1を用いた、 $c.1 \times 10^4$ 細胞を含む分析は、緩衝液対照に比べて2時間インキュベーション後に少なくとも1対数の減少を示した。この低下は天然酵素で見られたほどに大きくはなく、他の酵素ドメインの添加は、C.ディフィシレを死滅させる能力を有する活性な新しい酵素を生産することができるという原理を証明した。

20

【0184】

野生型 LM4 及びドメインを交換したリシンのヌクレオチド及びアミノ酸配列

【化 2】

LM4

ATGGCATTAAACAGAGGCATGGCTAATTGAAAAAGCAAATCGCAAATTGAATACGTCA
GGTATGAATAAAGCTACATCTGATAAGACTCGGAATGTAATTAATAAATGGCAAAA
GAAGGGATTTATCTTTGTGTTGCGCAAGGTTACCGCTCAACAGCGGAACAAAATGC
GCTATATGCACAAGGGAGAACCAAACCTGGAGCGATTGTTACTAATGCTAAAGGTG
GGCAATCTAATCATAATTTCCGGTGTAGCAGTTGATTTGTGCTTGTATACGAGCGACG
GAAAAGATGTTATTTGGGAGTCGACAACCTCCCGGTGGAAAAAGGTTGTTGCTGCT
ATGAAAGCGGAAGGATTCGAATGGGGCGGAGATTGGAAAAGTTTTAAAGACTATCC
GCATTTTGAAGTATGTGACGCTGTAAGTGGTGAGAAAATCCCTACTGCGACACAAAA
CACCAATCCAAACAGACATGATGGGAAAATCGTTGACAGCGCGCCACTATTGCCAA
AAATGGACTTTAAATCAAATCCAGCGCGCATGTATAAATCAGGAAGTGAAGTTCTTAG
TATATGAACATAATCAATATTGGTACAAGACGTACATCAACGACAAATTATACTACAT
GTATAAGAGCTTTTTCGATGTTGTAGCTAAAAAGATGCAAAAGGACGCATCAAAGT
TCGAATTAAGAGCGCGAAAGACTTACGAATTCAGTTTGGAAATAACACAAAATTGAA
TTCTGGGAAAATTAATGGTATGCACCCAATACAAAATTAGCATGGTACAACAACGG
AAAAGGATACTTGGAAGTCTGGTATGAAAAGGATGGCTGGTACTACACAGCGAACT
ACTTCTTAAATAA

[配列番号 16]

10

20

MALTEAWLIEKANRKLNTSGMNKATSDKTRNVIKKMAKEGIYLCVAQGYRSTAEQNALY
AQGRTPGAIVTNAKGGQSNHNFGVAVDLCLYTSKGKDVWESTTSRWKKVVAAMKA
EGFEWGGDWKSFKDYPHFELCDAVSGEKIPTATQNTNPNRHDGKIVDSAPLLPKMDFK
SNPARMYKSGTEFLVYEHNQYWKTYINDKLYMYKSFCDVVAKKDAKGRIKVRIKSAK
DLRIPVWNNTKLNSGKIKWYAPNTKLAWYNNGKGYLELWYEKDGWYYTANYFLK

[配列番号 17]

30

【0185】

【化 3】

LM4-CD27LE

ATGGCATTAAACAGAGGCATGGCTAATTGAAAAAGCAAATCGCAAATTGAATACGTCA
GGTATGAATAAAGCTACATCTGATAAGACTCGGAATGTAATTAAAAAAATGGCAAAA
GAAGGGATTATCTTTGTGTTGCGCAAGGTTACCGCTCAACAGCGGAACAAAATGC
GCTATATGCACAAGGGAGAACCAAACCTGGAGCGATTGTTACTAATGCTAAAGGTG
GGCAATCTAATCATAATTTCCGGTGTAGCAGTTGATTTGTGCTTGATACGAGCGACG
GAAAAGATGTTATTTGGGAGTCGACAACCTCCCGGTGGAAAAAGGTTGTTGCTGCT
ATGAAAGCGGAAGGATTCTGAATGGGGCGGAGATTGGAAAAGTTTTAAAGACTATCC
GCATTTTGAAGTATGTGACGCTGTAAGTGGTGAGAAAATCCCTACTGCGACACAAAA
CATGAAAATATGTATAACAGTAGGACACAGTATTTTAAAAAGTGGAGCATGTACTTCT
GCTGATGGAGTAGTTAACGAGTATCAATACAACAAATCTCTTGACCAGTATTAGCA
GATACATTTAGAAAAGAAGGGCATAAGGTAGATGTAATAATATGCCCAGAAAAGCAG
TTTAAACTAAGAATGAAGAAAAGTCTTATAAAATACCTAGAGTTAATAGTGGAGGAT
ATGATTTACTTATAGAGTTACATTTAAATGCAAGTAACGGTCAAGGTAAAGGTTTCAGA
AGTCCTATATTATAGTAATAAAGGCTTAGAGTATGCAACTAGAATATGTGATAAACTA
GGTACAGTATTTAAAAATAGAGGTGCTAAATTAGATAAAAAGATTATATATCTTAAATA
GTTCAAAGCCTACAGCAGTATTAATTGAAAGTTTCTTCTGTGATAATAAAGAAGATTA
TGATAAAGCTAAGAACTAGGTCATGAAGGTATTGCTAAGTTAATTGTAGAAGGTGT
ATTAAATAAAAAATATAAATAATGAGGGAGTTAAACAGATGTACAAACATACAATTGTT
TATGATGGAGAAGTTGACAAAATCTCTGCAACTGTAGTTGGTTGGGGTTATAATGAT
GGGAAAATACTGATATGTGATATAAAAGATTACGTGCCAGGTCAGACGCAAAATCTT
TATGTTGTAGGAGGTGGCGCATGTGAAAAGATAAGTTCTATTACTAAAGAAAAATTT
ATTATGATAAAAGGTAATGATAGATTTGATACACTTTATAAAGCATTGGATTTTATTAA
TAGATAG

[配列番号 18]

MALTEAWLIEKANRKLNTSGMKNKATSDKTRNVIKKMAKEGIYLCVAQGYRSTAEQNALY
AQGRTPGAIVTNAKGGQSNHNFVAVDLCLYTSKGKDIWESTTSRWKKVVAAMKA
EGFEWGGDWKSFKDYPHFELCDAVSGEKIPTATQNMKICITVGHSLKSGACTSADGVV
NEYQYNKSLAPVLADTFRKEGHKVDVVICPEKQFKTKNEEKSYKIPRVNSGGYDLLIELH
LNASNGQGKGSEVLYYSNKGLEYATRICDKLGTVFKNRGAKLDRLYILNSSKPTAVLIE
SFFCDNKEDYDKAKKLGHEGIAKLIVEGVNLKNINNEGKQMYKHTIVYDGEVDKISATV
VGWGYNDGKILICDIKDYPGQTQNLVYVGGGACEKISSITKEKFIMIKGNDRFDLYKAL
DFINR

[配列番号 19]

【0186】

【化 4】

LM4-CD27L

ATGGCATTAAACAGAGGCATGGCTAATTGAAAAAGCAAATCGCAAATTGAATACGTCA
 GGTATGAATAAAGCTACATCTGATAAGACTCGGAATGTAATTAATAAATGGCAAAA
 GAAGGGATTTATCTTTGTGTTGCGCAAGGTTACCGCTCAACAGCGGAACAAAATGC
 GCTATATGCACAAGGGAGAACCAAACCTGGAGCGATTGTTACTAATGCTAAAGGTG
 GGCAATCTAATCATAATTTCCGGTGTAGCAGTTGATTTGTGCTTGTATACGAGCGACG
 GAAAAGATGTTATTTGGGAGTCGACAACTTCCCGGTGGAAAAAGGTTGTTGCTGCT
 ATGAAAGCGGAAGGATTCTGAATGGGGCGGAGATTGGAAAAGTTTTAAAGACTATCC
 GCATTTTGAAGTATGTGACGCTGTAAGTGGTGAGAAAATCCCTACTGCGACACAAAA
 CAATGAGGGAGTTAAACAGATGTACAAACATACAATTGTTTATGATGGAGAAGTTGA
 CAAAATCTCTGCAACTGTAGTTGGTTGGGGTTATAATGATGGGAAAATACTGATATG
 TGATATAAAAGATTACGTGCCAGGTCAGACGCAAAATCTTTATGTTGTAGGAGGTGG
 CGCATGTGAAAAGATAAGTTCTATTACTAAAGAAAAATTTATTATGATAAAAGGTAAT
 GATAGATTTGATACACTTTATAAAGCATTGGATTTTATTAATAGATAG

10

20

[配列番号 2 0]

MALTEAWLIEKANRKLNTSGMNKATSDKTRNVIKKMAKEGIYLCVAQGYRSTAEQNALY
 AQGRTPGAIVTNAKGGQSNHNFVAVDLCLYTSKGKDVWESTTSRWKKVAAMKAE
 GFEWGGDWKSFKDYPHFELCDAVSGEKIPTATQNNEGVKQMYKHTIVYDGEVDKISAT
 VVGWGYNDGKILICDIKDYVPGQTQNLVVGGGACEKISSITKEKFIMKGNDRFDTLYKA
 LDFINR

[配列番号 2 1]

30

【 0 1 8 7 】

参考文献

1. Kuijper, E. J., Coignard, B. & Tull, P. (2006) Clin Microbiol Infect 12 Suppl 6, 2-18.
2. Anonymous (2006) Health Statistics Quarterly 30, 56-60.
3. Rupnik, M., Dupuy, B., Fairweather, N. F., Gerding, D. N., Johnson, S., J ust, I., Lyerly, D. M., Popoff, M. R., Rood, J. I., Sonenshein, A. L., Thelestam, M., Wren, B. W., Wilkins, T. D. & von Eichel-Streiber, C. (2005) J Med Microbiol 54, 113-7.
4. Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M. & von Eichel-Streib er, C. (1996) Gene 181, 29-38.
5. Goncalves, C., Decre, D., Barbut, F., Burghoffer, B. & Petit, J. C. (2004) J Clin Microbiol 42, 1933-9.
6. Popoff, M. R., Rubin, E. J., Gill, D. M. & Boquet, P. (1988) Infect Immun 56, 2299-306.
7. Skurnik, M. & Strauch, E. (2006) Int J Med Microbiol 296, 5-14.
8. Projan, S. (2004) Nat Biotechnol 22, 167-8.
9. Brussow, H., Canchaya, C. & Hardt, W. D. (2004) Microbiol Mol Biol Rev 68, 560-602.
10. Davis, B. M. & Waldor, M. K. (2003) Curr Opin Microbiol 6, 35-42.

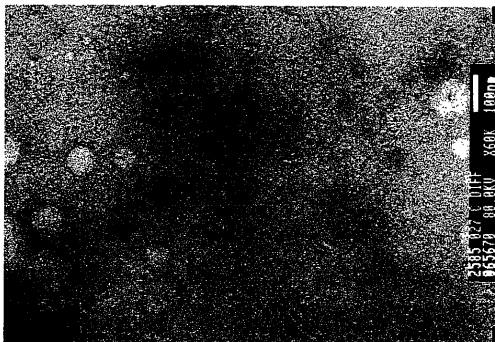
40

50

11. Strauch, E., Schaudinn, C. & Beutin, L. (2004) *Infect Immun* 72, 7030-9.
12. Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Kutter, E., Sarker, S. & Brussow, H. (2004) *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2558-69.
13. Matsuzaki, S., Yasuda, M., Nishikawa, H., Kuroda, M., Ujihara, T., Shuin, T., Shen, Y., Jin, Z., Fujimoto, S., Nasimuzzaman, M. D., Wakiguchi, H., Sugihara, S., Sugiura, T., Koda, S., Muraoka, A. & Imai, S. (2003) *J Infect Dis* 187, 613-24.
14. Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A. N., Powell, B., Carlton, R. & Merrill, C. R. (2002) *Infect Immun* 70, 204-10.
15. Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., el-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A. & Connerton, I. F. (2005) *Appl Environ Microbiol* 71, 6554-63. 10
16. Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M. & Donoghue, A. M. (2004) *Poult Sci* 83, 1944-7.
17. Ramesh, V., Fralick, J. A. & Rolfe, R. D. (1999) *Anaerobe* 5, 69-78.
18. Wray, T. (2007) *National Provisioner* 5th July
19. Loessner, M. J., Kramer, K., Ebel, F. & Scherer, S. (2002) *Mol Microbiol* 44, 335-49.
20. Loessner, M. J. (2005) *Curr Opin Microbiol* 8, 480-7.
21. Gasson (1995-2003) Patents GB 2255561 B (1995); AU 650737B (1994); US 5763251 (1998); US 6083684 (2000); CA 2066387 (2003); EP 0510907B (2003). 20
22. Fischetti, V. A. (2005) *Trends Microbiol* 13, 491-6.
23. Schuch, R., Nelson, D. & Fischetti, V. A. (2002) *Nature* 418, 884-9.
24. Loeffler, J. M., Djurkovic, S. & Fischetti, V. A. (2003) *Infect Immun* 71, 6199-204.
25. Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D. & Fischetti, V. A. (2004) *J Bacteriol* 186, 4808-12.
26. Zimmer, M., Vukov, N., Scherer, S. & Loessner, M. J. (2002) *Appl Environ Microbiol* 68, 5311-7.
27. Sell, T. L., Schaberg, D. R. & Fekety, F. R. (1983) *J Clin Microbiol* 17, 1148-52. 30
28. Nelson, D. (2004) *J Bacteriol* 186, 7029-31.
29. Mahony, D. E., Bell, P. D. & Easterbrook, K. B. (1985) *J Clin Microbiol* 21, 251-4.
30. Goh, S., Riley, T. V. & Chang, B. J. (2005) *Appl Environ Microbiol* 71, 1079-83.
31. Govind, R., Fralick, J. A. & Rolfe, R. D. (2006) *J Bacteriol* 188, 2568-77.
32. Goh, S., Ong, P. F., Song, K. P., Riley, T. V. & Chang, B. J. (2007) *Microbiology* 153, 676-85.
33. Rutherford, K., J. Parkhill, J. Crook, T. Horsnell, P. Rice, M-A. Rajandream and B. Barrell . (2000) *Bioinformatics* 16, 944-945. 40
34. Altschul, S. F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, & Jinghui Zhang, Z. Z., Webb Miller, and David J. Lipman (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402
35. Schaffer, A. A., L. Aravind, Thomas L. Madden, Sergei , Shavirin, J. L. S., Yuri I. Wolf, Eugene V. Koonin, and & Altschul, S. F. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29, 2994-3005.
36. Sebaihia, M., Wren, B. W., Mullany, P., Fairweather, N. F., Minton, N., Shtabler, R., Thomson, N. R., Roberts, A. P., Cerdeno-Tarraga, A. M., Wang, H., Holden, M. T., Wright, A., Churcher, C., Quail, M. A., Baker, S., Bason, N., Brook 50

- s, K., Chillingworth, T., Cronin, A., Davis, P., Dowd, L., Fraser, A., Feltwell, T., Hance, Z., Holroyd, S., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Price, C., Rabinowitsch, E., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Unwin, L., Whithead, S., Dupuy, B., Dougan, G., Barrell, B. & Parkhill, J. (2006) Nat Genet 38, 779-86.
37. Loessner, M. J., Wendlinger, G. & Scherer, S. (1995) Mol Microbiol 16, 1231-41.
38. Wegmann, U., Klein, J. R., Drumm, I., Kuipers, O. P. & Henrich, B. (1999) Appl Environ Microbiol 65, 4729-33.

【図 1】

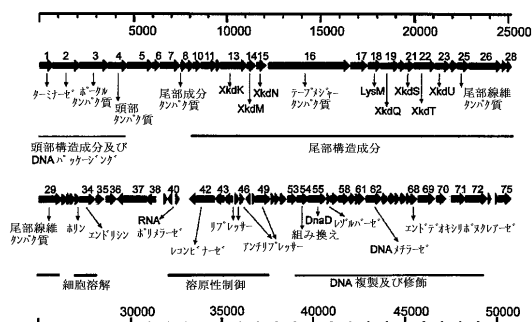


【図 3】

ATGAAAATATGTATAACAGTAGGACACAGTATTTAAAAAGTGGAGCATGTA
CITCTGCTGATGGAGTAGTTAACGAGTATCAATACAACAAATCTCTTGCACC
AGTATTAGCAGATACATTTAGAAAAGAAGGGCATAAGGTAGATGTAATAATA
TGCCAGAAAAGCAGTTTAAAGCTAAGAATGAAGAAAAGTCTTATAAATAC
CTAGAGTTAATAGTGGAGGATATGATTTACTTATAGAGTTACATTTAAATGCA
AGTAACGGTCAAGGTAAAGGTTCAAGCTCTATATTATAGTAATAAAGGCT
TAGAGTATGCAACTAGAAATATGTGATAAACTAGGTACAGTATTTAAAAATAGA
GGTGCTAAATTAGATAAAAGATTATATCTTAAATAGTTCAAGCCCTACAGC
AGTATTAATTGAAAAGTTTCTTCTGTGATAATAAGAAAGATTATGATAAGCTA
AGAACTAGGTCAAGGATTGCTAAGTTAATTGTAAGGTTGATTATAA
TAAAAATATAAATAATGAGGGAGTTAAACAGATGTACAACATACAATTGTTT
ATGATGGGAAAGTTGACAAAATCTCTGCAACTGTAGTTGGTTGGGGTTATAA
TGATGGGAAAATCTGATATGTGATATAAAGATTACGTGCCAGGTCAGACG
CAAAATCTTTATGTTGATAGGAGGTGGCGCATGTGAAAAGATAAGTTCTATTA
CTAAAGAAAAATTTATTATGATAAAAGGTAATGATAGATTGATACACTTTAT
AAAGCAITGGATTTTATTAATAGATAG

[配列番号 2]

【図 2】



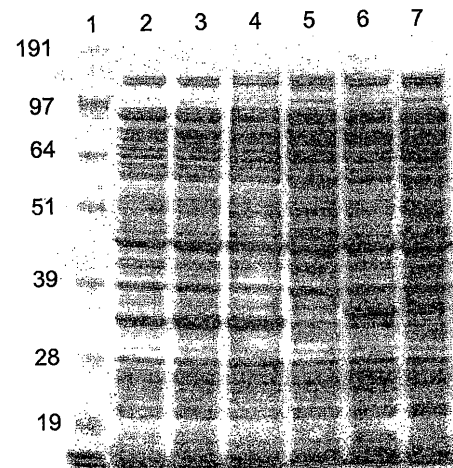
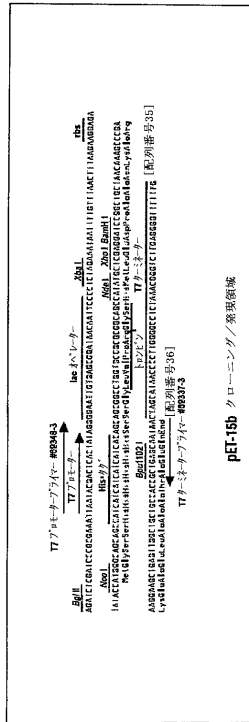
【 図 4 a - 2 】

[illegible]

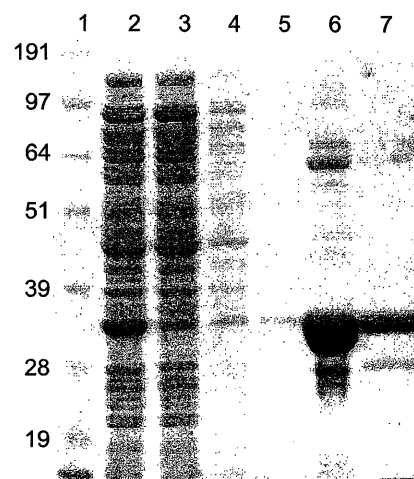
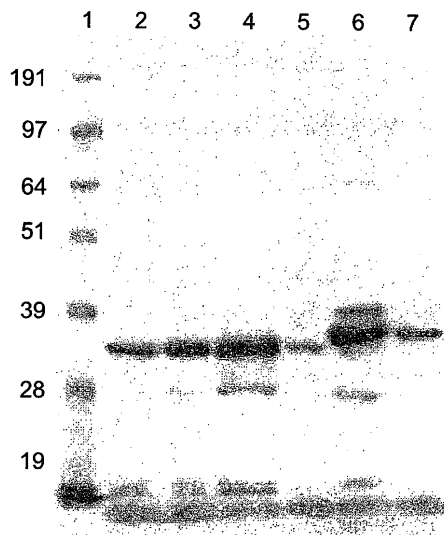
【 図 4 b 】

[illegible]

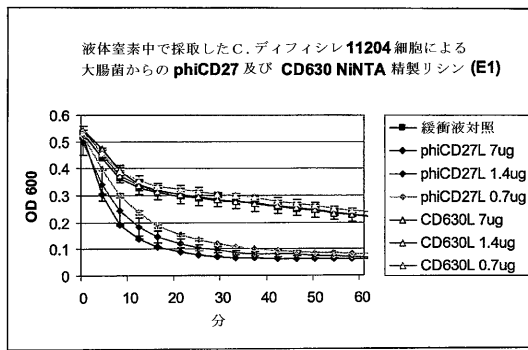
【 図 6 a 】



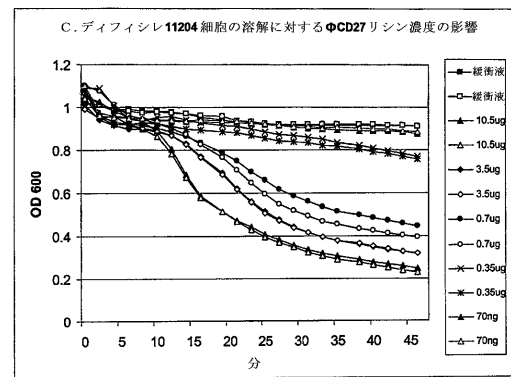
【 図 7 】



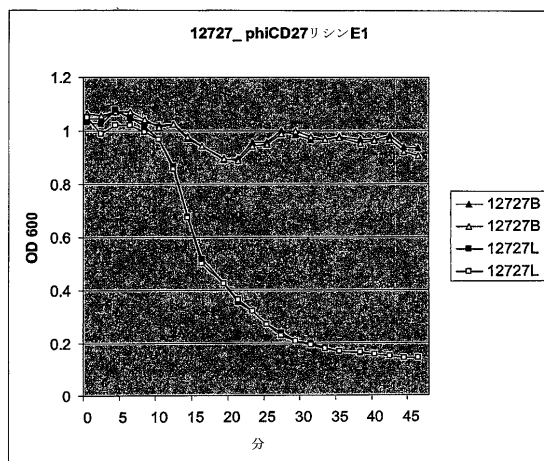
【 図 8 】



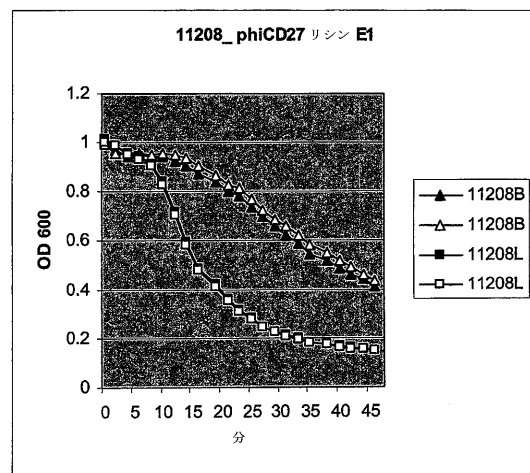
【 図 9 】



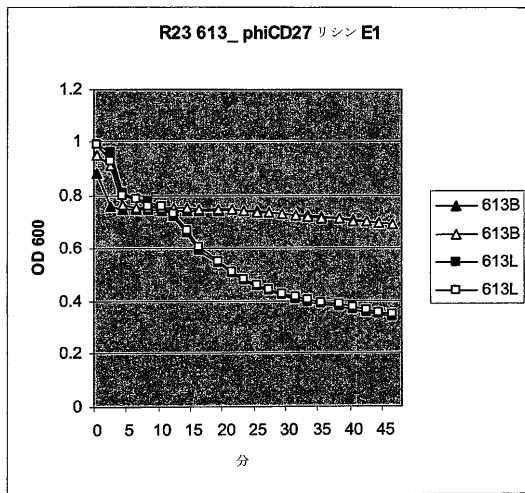
【 図 10 a 】



【 図 10 b 】

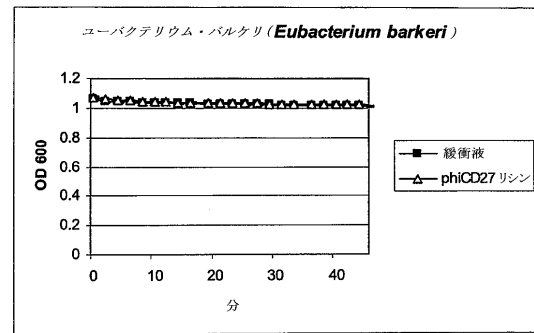


【図 10 c】



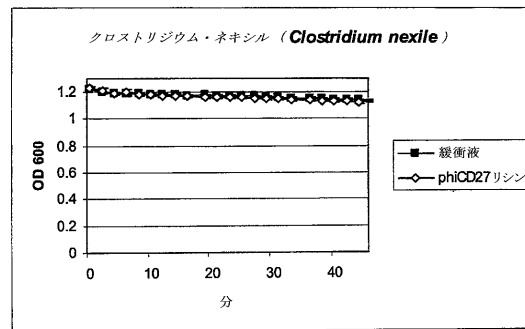
【図 11 a - 1】

(a)



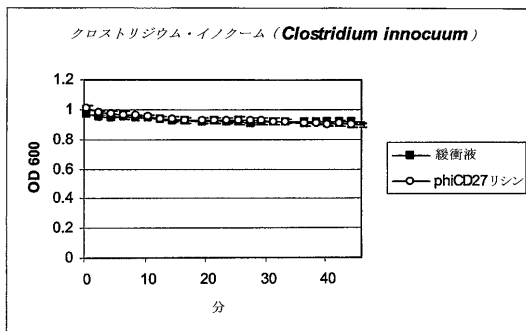
【図 11 a - 2】

(a) - 続き



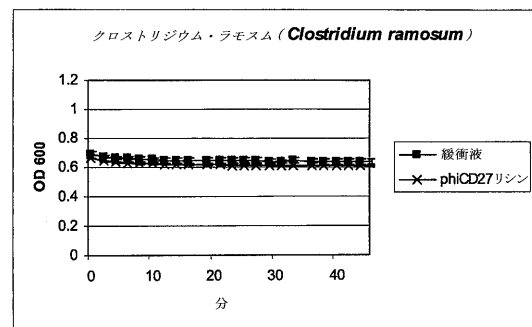
【図 11 a - 3】

(a) - 続き



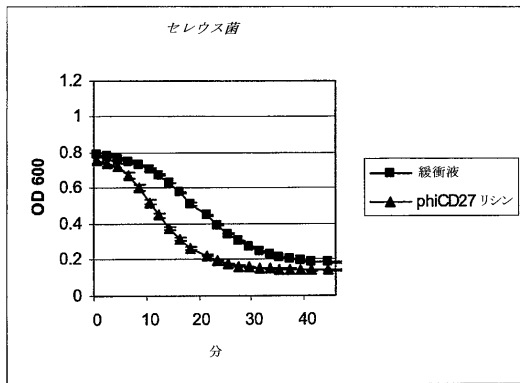
【図 11 a - 4】

(a) - 続き



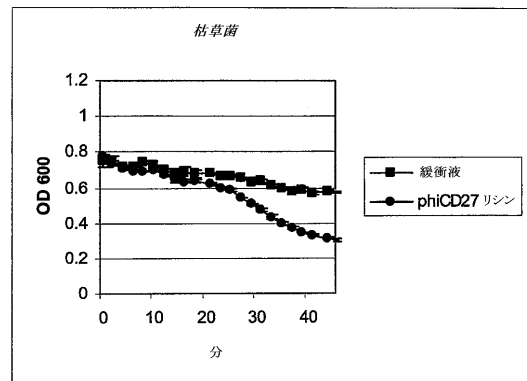
【図 1 1 b - 1】

(b)



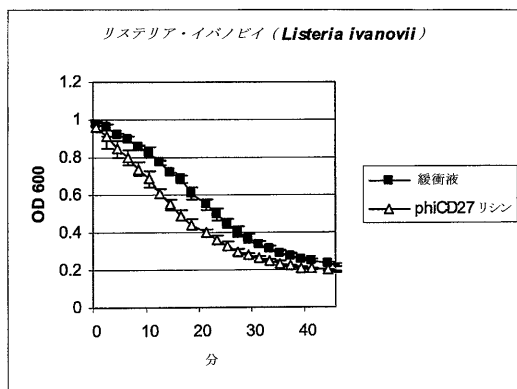
【図 1 1 b - 2】

(b) - 続き



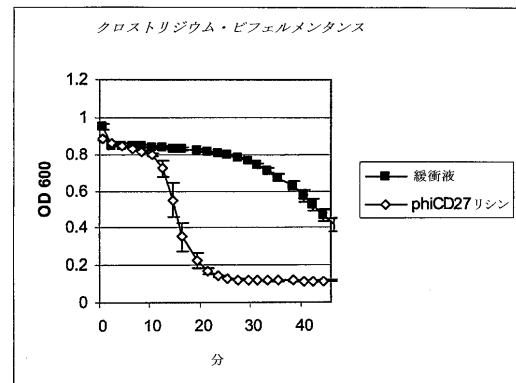
【図 1 1 b - 3】

(b) - 続き

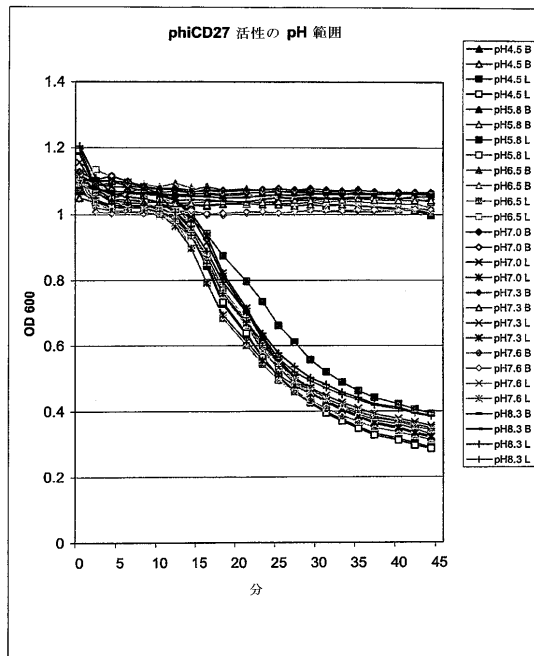


【図 1 1 b - 4】

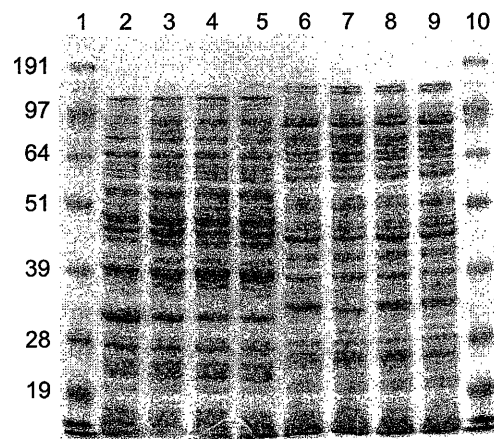
(b) - 続き



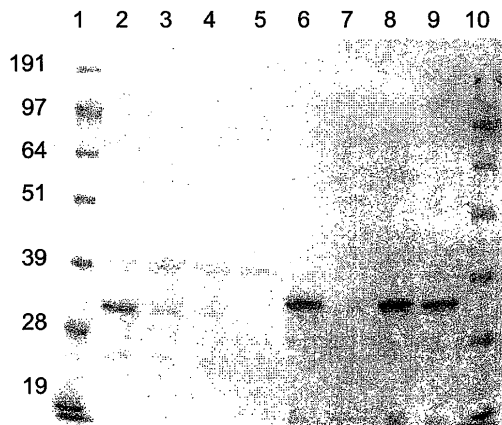
【図 1 2】



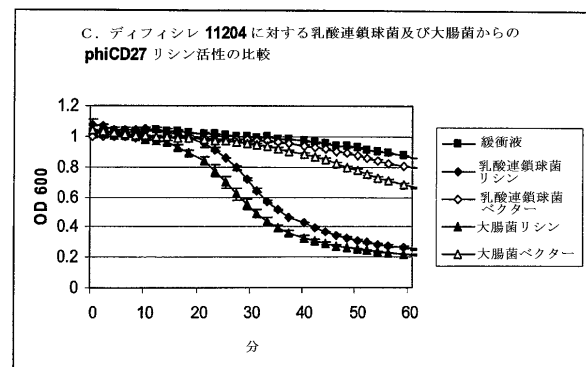
【図 1 3 A】



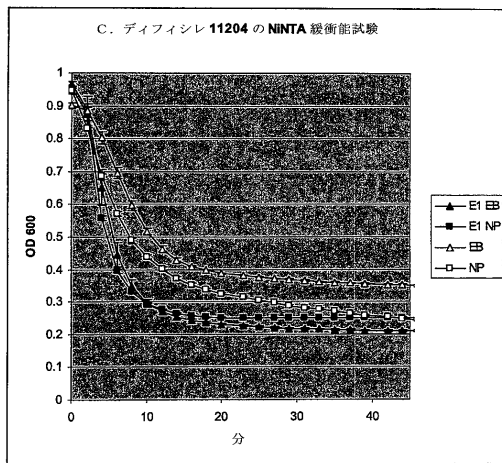
【図 1 3 B】



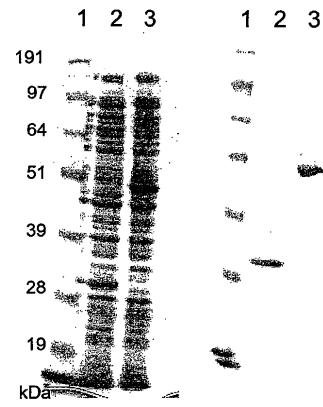
【図 1 4】



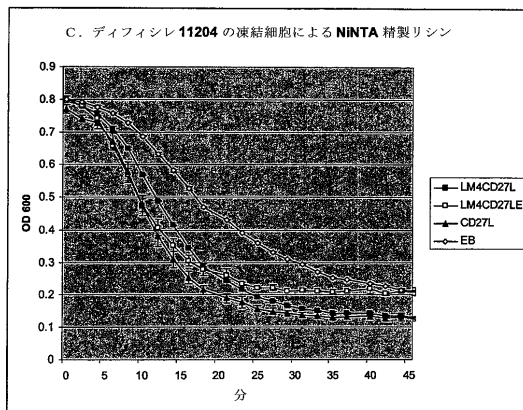
【図 15】



【図 16】



【図 17】



【配列表】

2011504366000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2008/003923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/01 C12N9/36		
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) 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 practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOH SHAN ET AL: "The complete genome sequence of Clostridium difficile phage phiC2 and comparisons to phiCD119 and inducible prophages of CD630." MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) MAR 2007, vol. 153, no. Pt 3, March 2007 (2007-03), pages 676-685, XP002513941 ISSN: 1350-0872 page 679, right-hand column, line 13 - line 16 figure 2 -& DATABASE UniProt [Online] 3 April 2007 (2007-04-03), "Putative amidase/endolysin" XP002513945 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A3QSC7 Database accession no. A3QSC7 ----- -/--	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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 February 2009		Date of mailing of the international search report 25/02/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Niebuhr-Ebel, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2008/003923

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>EP 1 472 344 A (PROFOS AG [DE]) 3 November 2004 (2004-11-03) "BACTERIOPHAGE LYSIN" page 9, paragraph 116 - paragraph 139 page 18, paragraph 235 - paragraph 239 page 20, paragraph 244 - paragraph 248 page 21; example 2 page 24; table 1</p>	41-103
X	<p>BORYSOWSKI J ET AL: "Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents" EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE 200604 US, vol. 231, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 366-377, XP002513942 ISSN: 1535-3702 1535-3699 page 369, left-hand column, line 10 - line 14 page 370, left-hand column, last paragraph - page 372, right-hand column, paragraph 3</p>	41-103
A	<p>GOH SHAN ET AL: "Isolation and characterization of temperate bacteriophages of Clostridium difficile" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 71, no. 2, February 2005 (2005-02), pages 1079-1083, XP002513943 ISSN: 0099-2240 the whole document</p>	1-103
P,X	<p>MAYER MELINDA J ET AL: "Molecular characterization of a Clostridium difficile bacteriophage and its cloned biologically active endolysin." JOURNAL OF BACTERIOLOGY OCT 2008, vol. 190, no. 20, October 2008 (2008-10), pages 6734-6740, XP002513944 ISSN: 1098-5530 the whole document</p>	1-103

International Application No. PCT/GB2008/003923

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 60-65 are directed to a method of treatment of the human body, and claims 88-92 are directed to a diagnostic method practised on the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: -

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2008/003923**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2008/003923

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1472344	A	03-11-2004	AT 382685 T 15-01-2008
		AU 2003205993 A1	02-09-2003
		CA 2474145 A1	14-08-2003
		CN 1813062 A	02-08-2006
		DE 60318391 T2	02-01-2009
		DK 1472344 T3	05-05-2008
		ES 2298495 T3	16-05-2008
		WO 03066845 A2	14-08-2003
		JP 2005516618 T	09-06-2005
		US 2005153415 A1	14-07-2005

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 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02		4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00		4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/74 (2006.01)		A 6 1 K 35/74	A	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)		A 6 1 K 35/76		
A 6 1 K 9/52 (2006.01)		A 6 1 K 9/52		
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 メリンダ・マイアー

イギリス国ノーフォークエヌアール 1 6 1 ビーエー・レニングハム・チャーチロード・ザローレルズ

(72)発明者 アルヤン・ナルバド

イギリス国ノーフォークエヌアール 2 3 キューアール・ノーウィッチ・ザアベニューズ 6 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA80 CA02 DA05 EA03 HA11 HA17
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ06 QR39 QR79 QS40
 4B064 AG32 CA02 CA19 CC24 DA02 DA15
 4B065 AA01X AA15X AA26X AA30X AA98Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 CA46
 4C076 AA61 AA94 BB04 BB05 CC32 CC41
 4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 BA01 BA02 BA22 BA23 CA04
 CA53 DA42 DC01 MA38 MA52 NA12 NA14 ZB352
 4C087 AA01 AA02 BB65 BC34 BC53 BC56 BC64 BC83 CA12 CA16
 CA44 MA38 MA52 NA12 NA14 ZB35
 4H045 AA10 AA20 AA30 CA01 EA29 EA52