

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7665337号
(P7665337)

(45)発行日 令和7年4月21日(2025.4.21)

(24)登録日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	31/13 (2006.01)	A 6 1 K	31/13
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	31/198(2006.01)	A 6 1 K	31/198
A 6 1 K	31/155(2006.01)	A 6 1 K	31/155
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
請求項の数 12 (全152頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-571817(P2020-571817)	(73)特許権者	515289842
(86)(22)出願日	令和1年6月28日(2019.6.28)		リサーチ インスティテュート アット
(65)公表番号	特表2021-529180(P2021-529180 A)		ネーションワイド チルドレンズ ホスピタル
(43)公表日	令和3年10月28日(2021.10.28)		アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 0 5 ,
(86)国際出願番号	PCT/US2019/040008		コロンバス, チルドレンズ ドライブ
(87)国際公開番号	WO2020/006528		7 0 0 , ルーム ダブリュー 1 7 2
(87)国際公開日	令和2年1月2日(2020.1.2)	(74)代理人	100078282
審査請求日	令和4年6月20日(2022.6.20)		弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	62/692,581	(74)代理人	100113413
(32)優先日	平成30年6月29日(2018.6.29)		弁理士 森下 夏樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 E P Sを媒介するための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象において、確立されたバイオフィルムの安定性を阻害するための方法、または確立されたバイオフィルムを処置するための方法において使用するための、ポリアミンの前記バイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する少なくとも1つの作用物質を含む組成物であって、前記方法が、前記確立されたバイオフィルムを、前記作用物質と接触させることを含み、前記作用物質が、H M G B 1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもなく、前記ポリアミンの前記バイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する前記作用物質が、tRNA、ジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド、メチルグリオキサールービス〔グアニルヒドラゾン〕（M G B G）、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプラチン、シスプラチン、またはジシクロヘキシルアミンから選択される、組成物。

【請求項2】

請求項1に記載の使用のための組成物であって、前記方法がさらに、前記確立されたバイオフィルムを、バイオフィルムを形成することができる生物の複製を阻害する作用物質と接触させることを含む、組成物。

【請求項3】

前記接触させることが、in vitroまたはin vivoである、請求項1に記載の使用のための組成物。

【請求項4】

前記ポリアミンが、プトレシン、スペルミン、カダベリン、1,3-ジアミノプロパンまたはスペルミジンの群から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項5】

前記接触させることが、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の作用物質でコーティングすることを含み、前記作用物質が、HMB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、請求項3に記載の使用のための組成物。

【請求項6】

前記カチオンを枯渇させる作用物質が、カチオン交換樹脂、アミノポリカルボン酸、クラウンエーテル、アザクラウンまたはクリプタンドから選択される、請求項5に記載の使用のための組成物。

【請求項7】

前記バイオフィルムからカチオンを枯渇させる前記作用物質が、正味の負電荷を有する、請求項5に記載の使用のための組成物。

【請求項8】

前記方法が、DNアーゼ酵素の投与の非存在下で行われる、請求項1～6のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項9】

確立されたバイオフィルムの安定性を阻害する、または処置するための組成物であって、ポリアミンの前記確立されたバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質を含み、前記作用物質が、バイオフィルムを形成することができる生物の複製を阻害する作用物質と組み合わせて投与されることを特徴とし、前記ポリアミンの前記確立されたバイオフィルム中のDNAへの前記結合に干渉する前記作用物質が、tRNA、ジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド、メチルグリオキサールービス〔グアニルヒドラゾン〕(MGBG)、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプラチン、シスプラチン、またはジシクロヘキシルアミンから選択される、組成物。

【請求項10】

確立されたバイオフィルムの安定性を阻害する、または処置するための組成物であって、前記確立されたバイオフィルムにおいて、バイオフィルムを形成することができる生物の複製を阻害する作用物質を含み、前記作用物質が、ポリアミンの前記確立されたバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質と組み合わせて投与されることを特徴とし、前記ポリアミンの前記確立されたバイオフィルム中のDNAへの前記結合に干渉する前記作用物質が、tRNA、ジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド、メチルグリオキサールービス〔グアニルヒドラゾン〕(MGBG)、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプラチン、シスプラチン、またはジシクロヘキシルアミンから選択される、組成物。

【請求項11】

クロロキンと、確立されたバイオフィルム中のDNAへのポリアミンの結合に干渉する作用物質とを含む組成物であって、前記作用物質が、tRNA、ジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド、メチルグリオキサールービス〔グアニルヒドラゾン〕(MGBG)、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプラチン、シスプラチン、またはジシクロヘキシルアミンから選択される、組成物。

【請求項12】

確立されたバイオフィルムの安定性を阻害する、または処置するための組成物であって、クロロキンと、前記確立されたバイオフィルム中のDNAへのポリアミンの結合に干渉する作用物質とを含み、前記作用物質が、tRNA、ジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド、メチルグリオキサールービス〔グアニルヒドラゾン〕(MGBG)、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプ

10

20

30

40

50

ラチン、シスプラチン、またはジシクロヘキシルアミンから選択される、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条(e)(35 U. S. C. § 119 (e))の下、2018年6月29日出願の米国仮出願第62/692, 581号の優先権を主張し、当該出願の内容は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は概して、細菌の細胞外高分子物質(EPS: extracellular polymeric substance)を除去または阻害するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

バイオフィームは、医療、農業および産業環境において主要な役割を果たす。バイオフィームは、動物および植物の両方の疾患のかなりの部分、および産業設備の汚損の原因であり、そのため、熱心な研究努力の的となっている。バイオフィームの根絶または処置は、抗微生物エフェクターに対する物理的障壁を形成する細胞外マトリックスの産生、環境ストレスの影響を受けにくい生理機能の変化、およびバイオフィームの構成要素間の協同的相互作用を含む、複数の要因のために達成することが特に困難である。バイオフィームマトリックスは不定に、多糖、タンパク質および、おそらく普遍的に、細胞外DNA(eDNA: extracellular DNA)からなる。微生物バイオフィームのeDNAは、保護を提供する細胞外マトリックスの重要な構成要素である。DNA分解または構造を安定化するDNA結合タンパク質の除去を介してバイオフィームeDNA構造を傷付けると、バイオフィームの破局的崩壊および常在菌の放出をもたらす、より脆弱な状態になる。

【0004】

細菌は、天然では2つの別個の状態で見出され；浮遊性細菌は、自由生活であり、一方で、発達して群集アーキテクチャ(community architecture)になる細菌は、バイオフィーム(表面上または凝集物としてのいずれか)と呼ばれる。CDCおよびNIHは、全ての細菌感染の約80%は、必要なバイオフィームの状態に関与すると見積もっている。Dongari-Bagtzoglou et al. (2008) Expert Rev Anti Infect Ther. 6(2):201-8。これらには、数ある中で、中耳炎(OM: otitis media)、慢性副鼻腔炎(CRS: chronic rhinosinusitis)、慢性肺感染、慢性創傷感染、歯周炎、膀胱炎、および医療用インプラントおよび留置カテーテルの感染が含まれる。実際に、小児医療を求める最も一般的な理由の1つはOM[分類不能(Nontypeable) Haemophilus influenzae (NTHI)、Streptococcus pneumoniae、Moraxella catarrhalisにより引き起こされる]であり、成人については、膀胱炎[例えば、尿路病原性E. coli (UPEC: Uropathogenic E. coli)]であり；したがって、これらの病訴については抗生物質処方が最も一般的である。米国内では、毎年500,000件の死亡が細菌バイオフィーム感染症の直接的結果によると見積もられている。経済への影響は驚異的である[慢性創傷に250億ドル、歯周炎に140億ドル、OMに50億ドルおよび膀胱炎に10億ドル]。バイオフィーム媒介疾患の世界的流行、特に高優先度ESKAPE病原体(Enterobacter spp.、Staphylococcus aureus、Klebsiella pneumoniae、Acinetobacter baumannii、Pseudomonas aeruginosa、Enterococcus faecium)の中の抗生物質抵抗性細菌感染症の増加率、および大きな金融負担により、組織化細菌群集により引き起こされる不応性感染症を処置するため

10

20

30

40

50

の新規手法を開発することへの決定的な必要性が生じる。

したがって、関連付けられる細菌感染症を処置または死滅させ、表面および水系からそれらを取り除くためにバイオフィルムの保護的障壁を切り抜けることへの必要性が存在している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】 Dongari-Bagtzoglou et al. (2008) Expert Rev Anti Infect Ther. 6(2):201-8

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

バイオフィルムは、慢性感染症および再発性感染症を引き起こす細菌の不応性リザーバーとして働くので、バイオフィルム内に常在する細菌を免疫クリアランスおよび抗微生物薬から保護する自己産生細胞外マトリックス（または細胞外高分子物質、EPS）は、これらの疾患を引き起こす病原性バイオフィルムに必須である。EPS構成要素は、個々の細菌種に特異的であるが、普遍的に、バイオフィルム内に常在する細菌由来の細胞外DNA（eDNA）を含有する。実際に、様々な属の細菌は典型的に、多種バイオフィルムの共有群集アーキテクチャに入り、これは、EPSが、全ての構成要素種にとって構造的に助けになるだけでなく、常在細菌の全てに由来するか、または常在細菌の全てが使用できるEPS構成成分を含有することも必要とする。この点において、単一種および複数種のバイオフィルムのEPSは、基礎をなす普遍的EPSの共通構造であるように見えるスキャフォールドeDNAを含有する。本明細書で開示される通り、出願人は、このeDNA依存性構造が、細菌DNA結合タンパク質の遍在性DNABIIファミリーによって安定化されていることを発見した。出願人は、外因性DNAおよびDNABIIタンパク質が、自由生活（浮遊性）細菌をバイオフィルムの群集アーキテクチャに至らせることができることを示したが、これらの2つの構成成分は、シグネチャーeDNAスキャフォールドを再現するためには不十分である。

【0007】

出願人は本明細書で、ポリアミンが、普遍的eDNA-DNABII依存性EPSの第3の重要な構成成分であることを開示する。ポリアミンは、DNAに結合すると、ヌクレオチドリン酸のポリアニオン性電荷を中和し、DNA分子を富化／凝集させる、細胞内および細胞外の両方に遍在する正に荷電した短い有機分子である。重要なことに、出願人は本明細書で、ポリアミンが、DNAを最も一般的な右巻きB型から、ヌクレアーゼ抵抗性である左巻きZ型DNAに至らせることができることを開示する。実際に、ヌクレアーゼは、細菌バイオフィルム形成を予防し得るが、それらは、成熟バイオフィルムを破壊することができない。バイオフィルムが熟成するにつれて、（1）ポリアミンの増加および（2）Z型DNAの出現の両方に付随して、それらはヌクレアーゼ抵抗性を取得する。

【0008】

バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質と接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法が、本明細書で説明される。一態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質と接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。また、本開示は、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質と*in vitro*で接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、接触さ

せることが、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の作用物質でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法に関する。一態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質と *in vitro* で接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなってもよく、接触させることは、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の1種または複数種の作用物質でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。接触させることは、*in vitro* または *in vivo* であり得る。

10

【0009】

一実施形態では、作用物質は、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する。第2の実施形態では、作用物質は、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第3の実施形態では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス(メチジウム)スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ[c]フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第4の実施形態では、作用物質は、クロロキンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。

20

【0010】

バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、バイオフィルムを、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体と *in vitro* で接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、接触させることが、表面を、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる、方法が、本明細書でさらに説明される。また、本開示は、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、バイオフィルムを、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体と *in vitro* で接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、接触させることが、表面を、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる、方法に関する。接触させることは、*in vitro* または *in vivo* であり得る。

30

【0011】

また、対象においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムに感染した対象にポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法が、本明細書で提供される。一態様では、対象においてバイオフィルムを処置するための方法は、バイオフィルムに感染した対象にポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。

40

【0012】

また、本開示は、バイオフィルムを発生しやすい対象においてバイオフィルムの形成を予防するための方法であって、対象にポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、作用物質が、HMGB1タンパク質でも、そ

50

の断片でも、その各々の等価物でもない、方法に関する。一態様では、バイオフィルムを発生しやすい対象においてバイオフィルムの形成を予防するための方法は、対象にポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。

【0013】

本開示は、それを必要とする対象においてバイオフィルムを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法であって、対象にポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質とその生物の複製を阻害する作用物質とを投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法にさらに関する。一態様では、それを必要とする対象においてバイオフィルムを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法は、対象にポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。

【0014】

上記に説明する方法のいずれかについて、ポリアミンは、プトレシン、スペルミン、カダベリン、1,3-ジアミノプロパンまたはスペルミジンの群から選択され得る。一実施形態では、上記に説明する方法について、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質は、tRNAである。別の実施形態では、作用物質は、ポリアミン合成の阻害剤、またはポリアミンのDNAへの結合を阻害する作用物質である。第2の実施形態では、作用物質は、ポリアミンアナログであるジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド(sardomozide)、メチルグリオキサールビス[グアニルヒドラゾン](MGBG: methylglyoxal-bis[guanyldihydrazone])、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプラチン、シスプラチン、ジシクロヘキシルアミン、任意のその誘導体、またはその塩を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第3の実施形態では、作用物質は、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質、必要に応じて、カチオン交換樹脂、アミノポリカルボン酸、クラウンエーテル、アザクラウンまたはクリプタンドを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第4の実施形態では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質は、スルホネート、スルホプロピル、ホスホセルロース、P11ホスホセルロース、ヘパリン硫酸またはその誘導体もしくはアナログの群から選択される。第5の実施形態では、作用物質は、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する。第6の実施形態では、作用物質は、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第8の実施形態では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス(メチジウム)スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ[c]フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第9の実施形態では、作用物質は、クロロキンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質は、正味の負電荷を有する。別の態様では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質は、正味の中性電荷を有する。

【0015】

また、全身性エリテマトーデス(SLE: systemic lupus erythematosus)および/または嚢胞性線維症(CF: cystic fibrosis)を患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムま

10

20

30

40

50

たはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法が、本明細書で提供される。全身性エリテマトーデス(SLE)および／または囊胞性線維症(CF)および／またはTBを患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法が、本明細書で開示される。一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で投与される。一実施形態では、作用物質は、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する。第2の実施形態では、作用物質は、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第3の実施形態では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス(メチジウム)スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ[c]フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第4の実施形態では、作用物質は、クロロキンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、クロロキン誘導体は、DNA塩基間に介入する能力を保持する。

10

20

【0016】

また、全身性エリテマトーデス(SLE)および／または囊胞性線維症(CF)を患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる方法が、本明細書で提供される。一態様では、全身性エリテマトーデス(SLE)および／または囊胞性線維症(CF)および／または結核(TB: tuberculosis)を患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法は、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。また、本開示は、プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において化学療法の投与に付随するバイオフィルム産生感染を処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法に関する。一態様では、方法は、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で投与される。さらなる態様では、作用物質は、クロロキンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。特定の一態様では、クロロキン誘導体は、DNA塩基間に介入する能力を保持する。またさらなる態様では、作用物質は、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一実施形態では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス(メチジウム)スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ[c]フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。

30

40

【0017】

本開示は、プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において化学

50

療法の投与に付随するバイオフィーム産生感染を処置するための方法であって、有効量の HMGB1 タンパク質またはその生物活性断片および抗 B-DNA 抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる方法にさらに関する。また、プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において化学療法の投与に付随するバイオフィーム産生感染を処置するための方法であって、有効量のクロロキンおよび抗 B-DNA 抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる方法が、本明細書で提供される。

【0018】

上記に説明する方法は、eDNA の DNA 結合タンパク質への結合に干渉する有効量の作用物質および／または抗菌剤を、バイオフィームと接触させること、またはあるいは、対象に投与することをさらに含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなってもよく、作用物質は、HMGB1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。一態様では、eDNA の DNA 結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、抗 DNAse I 抗体、抗 IHF 抗体および／もしくは抗 HU 抗体またはその各々の断片のうちの 1 つまたは複数を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一実施形態では、eDNA の DNA 結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の負電荷を有する。第 2 の実施形態では、eDNA の DNA 結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の中性電荷を有する。第 3 の実施形態では、eDNA の DNA 結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の正電荷を有する。一態様では、作用物質は、DNase の非存在下で投与される。上記に説明する方法は、DNase 酵素の投与の非存在下で行われ得る。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

バイオフィームの安定性を阻害するための方法であって、前記バイオフィームを、ポリアミンの前記バイオフィーム中の DNA への結合に干渉する有効量の作用物質と接触させることを含み、前記作用物質が、HMGB1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目 2)

対象においてバイオフィームを処置するための方法であって、バイオフィームに感染した前記対象に、ポリアミンの前記バイオフィーム中の DNA への結合に干渉する有効量の作用物質を投与することを含み、前記作用物質が、HMGB1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目 3)

バイオフィームを発生しやすい対象においてバイオフィームの形成を予防するための方法であって、前記対象に、ポリアミンの前記バイオフィーム中の DNA への結合に干渉する有効量の作用物質を投与することを含み、必要に応じて、前記作用物質が、HMGB1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目 4)

それを必要とする対象において、バイオフィームを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法であって、前記対象に、ポリアミンの前記バイオフィーム中の DNA への結合に干渉する有効量の作用物質と、前記生物の複製を阻害する作用物質とを投与することを含み、必要に応じて、前記作用物質が、HMGB1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目 5)

バイオフィームの安定性を阻害するための方法であって、前記バイオフィームを、ポリアミンの前記バイオフィーム中の DNA への結合に干渉する有効量の 1 種または複数種の作用物質と接触させることを含み、前記作用物質が、HMGB1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目 6)

対象においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムに感染した前記対象に、ポリアミンの前記バイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含み、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目7)

バイオフィルムを発生しやすい対象においてバイオフィルムの形成を予防するための方法であって、前記対象に、ポリアミンの前記バイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含み、必要に応じて、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目8)

それを必要とする対象において、バイオフィルムを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法であって、前記対象に、ポリアミンの前記バイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質と、前記生物の複製を阻害する作用物質とを投与することを含み、必要に応じて、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目9)

前記接触させることが、in vitroまたはin vivoである、項目1または5に記載の方法。

(項目10)

ポリアミンの前記バイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する前記作用物質が、tRNAである、項目1、5または9のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記作用物質が、ポリアミン合成の阻害剤、または前記ポリアミンの前記DNAへの結合を阻害する作用物質であり、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、いずれかの前記項目に記載の方法。

(項目12)

前記ポリアミンが、ブトレシン、スペルミン、カダベリン、1,3-ジアミノプロパンまたはスペルミジンの群から選択される、いずれかの前記項目に記載の方法。

(項目13)

前記作用物質が、ポリアミンアナログであるジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド、メチルグリオキサール-ビス[グアニルヒドラゾン](MGBG)、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプラチン、シスプラチン、ジシクロヘキシルアミン、任意のその誘導体、またはその塩を含む、項目11に記載の方法。

(項目14)

前記作用物質が、前記バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質、必要に応じて、カチオン交換樹脂、アミノポリカルボン酸、クラウンエーテル、アザクラウンまたはクリプタンドを含む、項目1~9のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記バイオフィルムからカチオンを枯渇させる前記作用物質が、スルホネート、スルホプロピル、ホスホセルロース、P11ホスホセルロース、ヘパリン硫酸またはその誘導体もしくはアナログの群からの作用物質である、項目14に記載の方法。

(項目16)

バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、前記バイオフィルムを、ポリアミンの前記バイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質とin vitroで接触させることを含み、前記接触させることが、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の作用物質でコーティングすることを含み、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目17)

バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、前記バイオフィルムを、ポリ

10

20

30

40

50

アミンの前記バイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質と *in vitro* で接触させることを含み、前記接触させることが、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の1種または複数種の作用物質でコーティングすることを含み、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目18)

前記作用物質が、前記バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する、項目1～9または16もしくは17のいずれか一項に記載の方法。

(項目19)

前記作用物質が、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含む、項目16～18のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目20)

前記作用物質が、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス(メチジウム)スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ[c]フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含む、項目16～18のいずれか一項に記載の方法。

(項目21)

前記作用物質が、クロロキンまたはその誘導体を含む、項目16～18のいずれか一項に記載の方法。

(項目22)

20

バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、前記バイオフィルムを、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体と *in vitro* で接触させることを含み、前記接触させることが、表面を、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体でコーティングすることを含む、方法。

(項目23)

バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、前記バイオフィルムを、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体と *in vitro* で接触させることを含み、前記接触させることが、表面を、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体でコーティングすることを含む、方法。

30

(項目24)

全身性エリテマトーデス(SLE)および／または嚢胞性線維症(CF)を患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、前記バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の作用物質を投与することを含み、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目25)

全身性エリテマトーデス(SLE)および／または嚢胞性線維症(CF)を患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、前記バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含み、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

40

(項目26)

前記作用物質が、クロロキンまたはその誘導体を含む、項目22または25に記載の方法。

(項目27)

前記作用物質が、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含む、項目22または25に記載の方法。

(項目28)

前記作用物質が、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス(メチジウム)スペルミ

50

ン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ〔c〕フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含む、項目22または25に記載の方法。

(項目29)

全身性エリテマトーデス(SLE)および／または嚢胞性線維症(CF)を患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含む方法。

(項目30)

全身性エリテマトーデス(SLE)および／または嚢胞性線維症(CF)を患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含む方法。

(項目31)

プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において前記化学療法の投与に付随するバイオフィルム産生感染を処置するための方法であって、前記バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の作用物質を投与することを含み、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目32)

プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において前記化学療法の投与に付随するバイオフィルム産生感染を処置するための方法であって、前記バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含み、前記作用物質が、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない、方法。

(項目33)

前記作用物質が、クロロキンまたはその誘導体を含む、項目31または32に記載の方法。

(項目34)

前記作用物質が、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含む、項目31または32に記載の方法。

(項目35)

前記作用物質が、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス(メチジウム)スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ〔c〕フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含む、項目31または32に記載の方法。

(項目36)

プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において前記化学療法の投与に付随するバイオフィルム産生感染を処置するための方法であって、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含む方法。

(項目37)

プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において前記化学療法の投与に付随するバイオフィルム産生感染を処置するための方法であって、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含む方法。

(項目38)

前記バイオフィルムを、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する有効量の作用物質および／または抗菌剤と接触させることをさらに含む、項目1または5に記載の方法。

(項目39)

前記eDNAの前記DNA結合タンパク質への結合に干渉する前記作用物質が、抗DN

10

20

30

40

50

ABII抗体、抗IHf抗体および／もしくは抗HU抗体またはその各々の断片のうちの1つまたは複数を含む、項目38に記載の方法。

(項目40)

前記対象に、前記eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する有効量の作用物質および／または抗菌剤を投与することをさらに含む、項目2～39のいずれかに記載の方法。

(項目41)

前記eDNAの前記DNA結合タンパク質への結合に干渉する前記作用物質が、抗DNAII抗体、抗IHf抗体および／もしくは抗HU抗体またはその各々の断片のうちの1つまたは複数を含む、項目40に記載の方法。

10

(項目42)

前記バイオフィームからカチオンを枯渇させる前記作用物質が、正味の負電荷を有する、項目14または15に記載の方法。

(項目43)

前記バイオフィームからカチオンを枯渇させる前記作用物質が、正味の中性電荷を有する、項目14または15に記載の方法。

(項目44)

前記eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する前記作用物質が、正味の負電荷を有する、項目38に記載の方法。

(項目45)

20

前記eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する前記作用物質が、正味の中性電荷を有する、項目38に記載の方法。

(項目46)

前記eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する前記作用物質が、正味の正電荷を有する、項目38に記載の方法。

(項目47)

前記方法が、DNアーゼ酵素の投与の非存在下で行われる、項目1～46のいずれか一項に記載の方法。

(項目48)

ポリアミンのバイオフィーム中のDNAへの結合に干渉する作用物質、バイオフィームからカチオンを枯渇させる作用物質、バイオフィームまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する作用物質、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質および／または抗菌剤のうちの1、2もしくは3つまたはそれよりも多くを含む組成物。

30

(項目49)

薬学的に許容される担体をさらに含む、項目48に記載の組成物。

(項目50)

ポリアミンの前記バイオフィーム中のDNAへの結合に干渉する前記作用物質が、ポリアミンアナログであるジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド、メチルグリオキサールービス「グアニルヒドラゾン」(MGBG)、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプラチン、シスプラチンおよび／もしくはジシクロヘキシルアミン、任意のその誘導体、またはその塩のうちの1つまたは複数を含む、項目48または49に記載の組成物。

40

(項目51)

前記バイオフィームからカチオンを枯渇させる前記作用物質が、カチオン交換樹脂、アミノポリカルボン酸、クラウンエーテル、アザクラウンまたはクリプタンド、スルホネート、スルホプロピル、ホスホセルロース、P11ホスホセルロースおよび／もしくはヘパリン硫酸またはその誘導体もしくはアナログのうちの1つまたは複数を含む、項目48または49に記載の組成物。

(項目52)

50

前記バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する前記作用物質が、HMGB1タンパク質、その断片もしくはその各々の等価物、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体、および／またはクロロキン、または任意のその誘導体のうちの1つまたは複数を含む、項目48または49に記載の組成物。

(項目53)

前記eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する前記作用物質が、抗DNABII抗体、抗IHf抗体および／もしくは抗HU抗体またはその各々の断片のうちの1つまたは複数を含む、項目48または49に記載の組成物。

(項目54)

項目48～53のいずれか一項に記載の組成物と使用のための指示とを含むキットであって、必要に応じて、前記作用物質が、組み合わせられているか、または別々に包装されている、キット。

(項目55)

使用のための前記指示が、項目1～47のいずれか一項に記載の方法を行うための使用法を提供する、項目54に記載のキット。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1A～図1Cは、ポリアミンが、DNA構造をモジュレートすることを示す。(図1A) NTHIによる急性OMを有するチンチラ中耳に見出される粘膜バイオフィルムEPSの免疫蛍光顕微鏡画像 (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4 (6): 625-37から適応)。DNABIIタンパク質 (灰色の玉) およびeDNA (白色の領域) についてプローブした。DNABIIは、in vivoでバイオフィルム中のeDNA鎖頂点に局在する。(図1B) 一般的なポリアミンの化学構造 (Di Martino et al. (2013) Int J Med Microbiol. 303 (8): 484-91から適応)。(図1C) DNA単独、またはポリアミンとのインキュベーション後のDNAの原子間力顕微鏡画像 (Iacomo et al. (2011) Biomacromolecules. 12 (4): 1178-86から適応)。ポリアミンは、eDNAにおける太い繊維の形成および構造的複雑性を誘導する。

【0020】

【図2】図2A～図2Bは、ポリアミンが、eDNAスキャフォールド構造を誘導することを示す図である。(図2A) NTHIによる急性OMを有するチンチラ中耳に見出される粘膜バイオフィルムEPSの免疫蛍光CLSM画像。ポリアミン (白色のドット) [プトレシン (Put)、カダベリン (Cad)、スペルミジン (Spd)] およびeDNA (白色) についてプローブし、DAPIにより対比染色した (灰色の領域)。ポリアミンは、in vivoで形成されたバイオフィルム中のeDNA鎖に局在する; スペルミジンは、バイオフィルムEPSにおいて最も多く見られるポリアミンである。(図2B) DNA (5 μM) およびスペルミジン (700 μM) (上) ならびにDNA (5 μM)、スペルミジン (700 μM) およびHU (50 nM) (下) の複合体の透過型電子顕微鏡画像 (Sarkar et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35 (3): 951-61から適応)。同様の構造が、DNA-ポリアミン-IHf複合体によって形成される。Sarkar et al. (2009) Biochemistry. 48 (4): 667-75。ポリアミンは、DNA凝縮を誘導し、DNABIIタンパク質と組み合わせて、太い繊維を形成する。

【0021】

【図3】図3A～図3Cは、ポリアミン合成阻害剤が、バイオフィルム形成を低減させることを示す。(図3A) ジシクロヘキシルアミン (DCHA、50 μM)、スペルミジン (Spd) シンターゼ阻害剤、Spd (1 mM) またはその両方の存在下で成長させた、LIVE/DEAD (登録商標) 染色したNTHIバイオフィルムのCOMSTAT定量。バーは、SEMを表す。対照と比較した統計的有意性は、対応のないt検定によって評

10

20

30

40

50

価した、* $P < 0.05$ 。バイオフィルムの平均の厚さは、DCHAによって減少したが、外因性Spdの同時添加は、バイオフィルム形成を回復させた。(図3B) DCHA (50 μ M) の存在下で3時間成長させたNTHI *in vitro* バイオフィルム中のeDNAスカフォールド構造の免疫蛍光顕微鏡画像。dsDNAについてプローブした(白色の領域)。eDNAスカフォールド構造産生は、ポリアミン合成の阻害によって大幅に低減された。(図3C) DCHAの存在下で40時間成長させたNTHI *in vitro* バイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。Spdについてプローブし(図3C下部パネルにおける白色のドット)、DAPIにより対比染色した(灰色の領域)。DCHAは、バイオフィルムEPSへのポリアミン取り込みを阻害する。

【0022】

【図4】図4A～図4Bは、抗DNABIIが、DNABII-ポリアミン(PA)依存性構造を破壊することを示す。(図4A) DNA構造は、ゲノムDNA(gDNA; 2 μ g/ml)を含有する緩衝液中スペルミジン(300 μ M)およびHU(1 μ M)を40時間インキュベートすることにより形成された。DNABII-ポリアミン依存性DNA構造の免疫蛍光CLSM画像。DNABIIタンパク質についてプローブし(白色; 画像の右側に指し示す)、DAPIにより対比染色した(白色; 画像の左側に指し示す)。DNABIIポリアミン依存性DNA構造は、DNABIIタンパク質を取り込む。(図4B) EPS構造は、(図4A)と同様に24時間で形成され、DNABII抗血清の1:50希釈物でさらに16時間処置した(画像の下に指し示す)。DAPIで染色した蛍光CLSM画像(白色)。DNABII-ポリアミン依存性DNA構造は、DNABIIタンパク質を要求する。

【0023】

【図5】図5は、カチオン交換体ホスホセルロース(P11)が、NTHIバイオフィルム形成を破壊することを示す。P11(1%)を頂端側チャンバーに添加した一方、NTHIバイオフィルム成長は、トランスウェルプレートシステムの基底側チャンバーにおいて開始された。スペルミジン(1mM)およびHU(1 μ M)を、播種時に添加し、16時間維持した。バイオフィルムをCLSMにより可視化し、COMSTATによって解析した。平均の厚さ(図示せず)は、同一の傾向を示した。バーは、SEMを表す。対照と比較した統計的有意性は、対応のないt検定によって評価した、* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。P11は、バイオフィルム形成を予防する。外因性スペルミジンおよびHUは一緒に、バイオフィルム発達を回復するが、いずれか単独では回復せず(図示せず)、この結果は、P11抗バイオフィルム(antibiofilm)活性が、バイオフィルムEPS由来の構成成分(ポリアミンおよびDNABIIタンパク質)の滴定の結果であることを示唆する。

【0024】

【図6】図6は、成熟バイオフィルムが、DNアーゼによる破壊に対し抵抗性であることを示す。DNアーゼ(プルモザイム(Pulmozyme); 5ユニット)を、播種時に(予防)または24時間目に(破壊)、それぞれの*in vitro*で予め形成されたNTHIおよびUPECバイオフィルムへと添加した。総計40時間後に、バイオフィルムをLIVE/DEAD(登録商標)で染色し、CLSMにより可視化し、COMSTATによって解析した。バーは、SEMを表す。対照と比較した統計的有意性は、対応のないt検定によって評価した、* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。DNアーゼは、バイオフィルムを予防することができるが、現存するバイオフィルムを破壊しない。

【0025】

【図7】図7A～図7Dは、DNABIIタンパク質およびポリアミン(PA)が、相乗的に相互作用して、DNアーゼ抵抗性を誘導することを示す。(図7A) 40時間成長させたNTHI *in vitro* バイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。スペルミジン(暗灰色の玉)、HU(淡灰白の玉)についてプローブし、DAPIにより対比染色した(灰色の領域)。ポリアミンおよびDNABIIタンパク質は、*in vitro*でバイオフィルムEPSにおいて共局在する(白色の玉)。(図7B) NTHIによる急性OMを

10

20

30

40

50

有するチンチラ中耳に見出される粘膜バイオフィルムEPSの免疫蛍光CLSM画像。プトレシン（白色の玉）およびHU（淡灰白の玉）についてプローブし、DAPIにより対比染色した（暗灰色の領域）。ポリアミンおよびDNABIIタンパク質は、*in vivo*でバイオフィルム中のeDNA鎖に共局在する（白色の領域）。（図7C）漸増レベルのスペルミジン（Spd）およびHUを、別々にまたは一緒に、ゲノムDNA（2 μ g / ml）と共に37℃で1.5時間インキュベートし、続いてプルモザイム（登録商標）で20分間処置した。アガロースゲル電気泳動を使用して、DNA分解をアッセイした。SpdおよびHUは、DNアーゼ消化からゲノムDNAを相乗的に保護する。（図7D）Spd（300 μ M）およびHU（1 μ M）をゲノムDNA（2 μ g / ml）と共に40時間インキュベートし、続いて20分間プルモザイム（登録商標）処置した。構造をLIVE / DEAD（登録商標）で染色し、CLSMによって撮像した（白色）。HU-Spd依存性DNA構造は、DNアーゼ処置に対して抵抗性である。

【0026】

【図8】図8A～図8Bは、DNABIIおよびポリアミンが組み合わさって、B-DNA形態をZ-DNA形態に変換することを示す。（図8A）DNABII-ポリアミン依存性DNA構造は、ゲノムDNA（2 μ g / ml）をHU（1 μ M）およびスペルミジン（300 μ M）と共に16時間インキュベートすることにより形成された。DNABII-ポリアミン依存性DNA構造の免疫蛍光CLSM画像。Z-DNAについてプローブし（白色）、DAPIで染色した（暗灰色）。ポリアミンおよびDNABIIタンパク質は、相乗作用して、B-DNAからZ-DNAへの変換を誘導する。（図8B）上：漸増濃度のZ-DNA触媒によってZ-DNAへと変換されるB-DNA基質の円二色性スペクトル（Jang et al. (2015) Sci Rep. 5:9943から適応）。250 nm前後の負のピークおよび280 nm前後の正のピークの反転に留意されたい。下：ポリ（dGdC）DNA（20 μ g / ml）をHU（15 μ M）と共に2時間インキュベートし、CDスペクトルを収集した。HUは、ポリ（dGdC）のCDスペクトルをZ-DNAシグネチャーに向かってシフトさせる。

【0027】

【図9】図9は、Z-DNAが、複数のヒト病原体のバイオフィルムEPS内に存在することを示す。上：一次抗体なし（1°なし）またはZ-DNA抗体（白色）でプローブした、指し示された細菌の40時間バイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。Z-DNAは、異なる定常状態レベルにおける複数細菌バイオフィルムのEPSの成分である。下：HU（白色）およびスペルミジン（暗灰色）抗体でプローブした、指し示されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像、共局在は（白色）である。DNABIIおよびポリアミン成分は、定常状態レベルにおける複数細菌バイオフィルムのEPSにおいて共局在し、これは、Z-DNA存在量と相関する。

【0028】

【図10】図10は、UPECおよびNTHIバイオフィルムが成熟するにつれて、Z-DNAおよびポリアミンは存在量が増加することを示す。抗Z-DNA（白色）または抗スペルミジン（暗灰色）でプローブした、形成の様々なステージにおけるUTH89およびNTHI *in vitro*バイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。成熟バイオフィルムは、経時的にバイオフィルムEPS内に、Z-DNA（白色）およびスペルミジン（暗灰色）の取り込み量を増加せる。

【0029】

【図11】図11は、HUが、B-DNAからZ-DNAへの変換、およびバイオフィルムEPSへのポリアミンの取り込みに要求されることを示す。スペルミジン（暗灰色）または抗Z-DNA（白色）でプローブした、40時間NTHI野生型および Δ HU変異体 *in vitro*バイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。HUの非存在下で、ポリアミンおよびZ-DNAは、バイオフィルムEPS内で存在量が減少する。

【0030】

【図12】図12は、8ウェルチャンバーのカバーガラススライドにおける補充したBH

10

20

30

40

50

I 培地において、37℃および5%CO₂で、分類不能 *Haemophilus influenzae* バイオフィルムを40時間成長させたことを示す。バイオフィルムを洗浄し、指し示された一次抗体、蛍光二次抗体でプローブし（暗灰色のドット）、DAPIで染色した（灰色の領域）。留意：下の最左部の画像における最小の暗灰色染色は、バックグラウンドを表す。プトレシン、スペルミジンおよびスペルミンは全て、バイオフィルムマトリックス全体にわたって存在した。

【0031】

【図13】図13は、96ウェルプレートにおける上に指し示す添加物を含有する補充したBHI培地において、37℃および5%CO₂で、分類不能 *Haemophilus influenzae* を16時間成長させたことを示す。490nmにおける分光光度計吸光度によって（左）、また、コロニー形成単位の計数によって（右）、成長を定量した。スペルミジンシンターゼ阻害剤は、正常な成長に影響を与えなかった。

10

【0032】

【図14】図14は、8ウェルチャンバーのカバーガラススライドにおける各バーの下に指し示す添加物を含有する補充したBHI培地において、37℃および5%CO₂で、分類不能 *Haemophilus influenzae* バイオフィルムを40時間成長させたことを示す。バイオフィルムを洗浄し、LIVE/DEAD（登録商標）で染色し、固定し、CLSMによって撮像した。COMSTATソフトウェアを使用して、バイオフィルムパラメーターを定量した。ジシクロヘキシルアミンは、バイオフィルム生物発生を阻害したが、外因性スペルミジンは、バイオフィルム成長をレスキューすることができた。

20

【0033】

【図15】図15は、8ウェルチャンバーのカバーガラススライドにおける上に指し示す添加物を含有する補充したBHI培地において、37℃および5%CO₂で、分類不能 *Haemophilus influenzae* バイオフィルムを40時間成長させたことを示す。バイオフィルムを洗浄し、スペルミジンに対する一次抗体、蛍光二次抗体でプローブし（暗灰色のドット）、DAPIで染色した（灰色の領域）。スペルミジンシンターゼ阻害剤は、バイオフィルムマトリックスにおけるスペルミジンの存在を低減した。

【0034】

【図16】図16は、フルオロディッシュ（Fluorodish）カバーガラスディッシュにおける上に指し示す添加物を含有する補充したBHI培地において、37℃および5%CO₂で、表面付着した分類不能 *Haemophilus influenzae* を3時間成長させたことを示す。バイオフィルムを洗浄し、二本鎖DNAに対する一次抗体および蛍光二次抗体でプローブした（白色）。スペルミジンシンターゼ阻害剤は、バイオフィルムマトリックス内の細胞外DNA構造の存在および複雑性の両方を低減させる。

30

【0035】

【図17】図17A～図17Dは、スペルミジンが、複数のヒト病原体によって形成されたバイオフィルムEPS内に存在することを示す。（図17A）HU抗体（淡灰白）およびスペルミジン（暗灰色）抗体でプローブした、指し示されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像、共局在は白色である。DNABEIおよびポリアミン成分は、定常状態レベルにおける複数細菌バイオフィルムのEPSにおいて共局在する。（図17B）スペルミジン生合成のジシクロヘキシルアミン（DCHA）阻害は、IFシグナルの減少によって指し示される、NTHIおよびUPECバイオフィルムにおけるスペルミジンレベルを低減させ、sBHI対照と比較して有意に減少した平均の厚さをもたらす（図17C）。LB対照と比較した平均の厚さのパーセント変化として表されるUPEC（図17D）。

40

【0036】

【図18】図18A～図18Bは、ホスホセルロースが、*in vitro*でバイオフィルム形成および予め形成されたNTHIバイオフィルムの安定性に用量依存性の負の効果を有することを示す。（図18A）バイオフィルム成長を開始させ、次いで24時間維持し、次いで0（sBHI対照）、0.1%、1%および5%（w/v）のホスホセルロース（Phoshocellulose）（P11）で16時間処置した。（図18B）バ

50

イオフィルム成長を開始させ、次いで0 (s B H I 対照)、0.1%、1%および5% (w/v) の (P 1 1) の存在下で40時間維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、L I V E / D E A D (登録商標) 染色剤で染色した。画像をC O M S T A Tによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを計算した。全ての画像は、63×対物レンズを用いてキャプチャーした。

【0037】

【図19】図19は、ヘパリンセファロースが、in vitroでNTHIバイオフィルム形成に負の効果を有することを示す。バイオフィルム成長を開始させ、次いで0 (s B H I 対照) または5% (w/v) のヘパリンセファロース樹脂の存在下で40時間維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、L I V E / D E A D (登録商標) 染色剤で染色した。画像をC O M S T A Tによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを計算した。全ての画像は、63×対物レンズを用いてキャプチャーした。

10

【0038】

【図20】図20は、H U の外因性添加が、in vitroでNTHIバイオフィルム安定性におけるホスホセルロースの負の効果をレスキューすることを示す。バイオフィルム成長を開始させ、24時間維持し、次いで指し示される通りに16時間処置した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、L I V E / D E A D (登録商標) 染色剤で染色した。画像をC O M S T A Tによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを計算し、s B H I 対照と比較した。全ての画像は、63×対物レンズを用いてキャプチャーした。バーは、S E Mを表す。対照と比較した統計的有意性は、対応のないt検定によって評価した、* P < 0.05 ; ** P < 0.01。

20

【0039】

【図21】図21は、M g C l ₂ の外因性添加が、in vitroでNTHIバイオフィルム安定性におけるホスホセルロースの負の効果をレスキューすることを示す。バイオフィルム成長を開始させ、24時間維持し、次いで指し示される通りに16時間処置した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、L I V E / D E A D (登録商標) 染色剤で染色した。画像をC O M S T A Tによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを計算した。全ての画像は、63×対物レンズを用いてキャプチャーした。

【0040】

【図22】図22は、スペルミジンの外因性添加が、in vitroでNTHIバイオフィルム安定性におけるホスホセルロースの負の効果をレスキューすることを示す。バイオフィルム成長を開始させ、次いで24時間維持し、次いで指し示される通りに16時間処置した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、L I V E / D E A D (登録商標) 染色剤で染色した。画像をC O M S T A Tによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを計算した。全ての画像は、63×対物レンズを用いてキャプチャーした。

30

【0041】

【図23】図23は、P 1 1 ホスホセルロースのカチオン枯渇効果が、バイオフィルムとの直接的接触を要求しないことを示す。トランスウェルプレートシステムの基底側チャンバーにおいてバイオフィルム成長を開始させた一方、0、0.5、1または1.5% (w/v) P 1 1 ホスホセルロースを頂端側チャンバーに添加し、16時間維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、L I V E / D E A D (登録商標) 染色剤で染色した。画像をC O M S T A Tによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを計算し、s B H I 対照と比較した。全ての画像は、63×対物レンズを用いてキャプチャーした。バーは、S E Mを表す。対照と比較した統計的有意性は、対応のないt検定によって評価した、* P < 0.05 ; ** P < 0.01。

40

【0042】

【図24】図24は、スペルミジンの外因性添加が、バイオフィルムとの直接的接触を要求することなく、P 1 1 ホスホセルロースのカチオン枯渇効果を低減させることを示す。トランスウェルプレートシステムの基底チャンバー (b a s a l c h a m b e r) においてバイオフィルム成長を開始させた一方、0または1.5% (w/v) P 1 1 ホスホセ

50

ルロースを頂端側チャンバーに添加し、100、500または1000 μ M スペルミジンの存在下で16時間維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD（登録商標）染色剤で染色した。画像をCOMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを計算し、SBHI対照と比較した。全ての画像は、63 $\times$ 対物レンズを用いてキャプチャーした。バーは、SEMを表す。対照と比較した統計的有意性は、対応のないt検定によって評価した、* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 。角括弧は、条件間の統計的比較を指し示す。

【0043】

【図25】図25は、スペルミジンおよびDNABIIの外因性添加が、バイオフィルムと直接接触することなしに、P11ホスホセルロースのカチオン枯渇効果を低減させることを示す。トランスウェルプレートシステムの基底側チャンバーにおいてバイオフィルム成長を開始させた一方、0または1.5% (w/v) P11ホスホセルロースを頂端側チャンバーに添加し、100 μ M スペルミジンもしくは500 nM HUまたはその組合せの存在下で16時間維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD（登録商標）染色剤で染色した。画像をCOMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを計算し、SBHI対照と比較した。全ての画像は、63 $\times$ 対物レンズを用いてキャプチャーした。バーは、SEMを表す。対照と比較した統計的有意性は、対応のないt検定によって評価した、* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 。角括弧は、条件間の統計的比較を指し示す。

【0044】

【図26】図26A～図26Bは、カチオン交換樹脂による非生物的表面のコーティングが、用量依存性様式でバイオフィルム形成を予防することを示す。指し示される通りに、P11ホスホセルロース（図26A）またはヘパリンセファロース（図26B）溶液でチャンバースライドをコーティングした。バイオフィルム成長を開始させ、コーティングされたスライド上で40時間維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD（登録商標）染色剤で染色した。画像をCOMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを計算した。全ての画像は、63 $\times$ 対物レンズを用いてキャプチャーした。バーは、SEMを表す。

【0045】

【図27】図27は、成熟バイオフィルムが、DNアーゼによる破壊に対して抵抗性をであることを示す。DNアーゼ（プルモザイム；5ユニット）を、播種時に（予防）または24時間目に（破壊）、それぞれの*in vitro*で予め形成されたNTHIまたはUPECバイオフィルムに添加した。総計40時間後に、バイオフィルムをLIVE/DEAD（登録商標）で染色し、CLSMにより可視化し、COMSTATによって解析した。バーは、SEMを表す。バイオマスについて、同様の傾向が観察された。対照と比較した統計的有意性は、対応のないt検定によって評価した、* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 。DNアーゼは、バイオフィルムを予防することができるが、現存するバイオフィルムを破壊しない。

【0046】

【図28】図28は、UPECおよびNTHIバイオフィルムが成熟するにつれて、Z-DNAおよびポリアミンは存在量が増加することを示す。抗Z-DNA（淡灰白）または抗スペルミジン（暗灰色）でプローブした、成熟化の様々なステージにおける*in vitro*で形成されたUPECおよびNTHIバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。成熟バイオフィルムは、経時的にバイオフィルムEPS内に、Z-DNA（淡灰白）およびスペルミジン（暗灰色）の取り込み量を増加せる。

【0047】

【図29】図29は、Z-DNAが、成熟病原性真菌バイオフィルム中に存在することを示す。DAPIにより対比染色され、抗B-DNA、抗Z-DNAまたは一次抗体なし（no primary）（淡灰白）でプローブされた、*in vitro*でCandida albicansによって形成されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。成熟真菌

バイオフィームは、バイオフィームEPS内にZ-DNA（淡灰白）を取り込む。

【0048】

【図30】図30は、抗Z-DNA抗体が、バイオフィーム生物発生を刺激することを示す。抗Z-DNA抗体（1mg）を、播種時にNTHI *in vitro*バイオフィームに添加した。16時間後に、バイオフィームをLIVE/DEAD（登録商標）で染色し、CLSMにより可視化し、COMSTATによって解析した。バーは、SEMを表す。バイオマスについて、同様の傾向が観察された。対照と比較した統計的有意性は、対応のあるt検定によって評価した。抗Z-DNA抗体は、バイオフィーム細胞外マトリックスを安定化し、バイオフィーム生物発生を刺激し、一方、B-DNAに対する抗体（例えば、抗dsDNA）は、バイオフィーム生物発生を刺激しない。

10

【0049】

【図31】図31は、DNアーゼが、バイオフィーム細胞外マトリックス内で、B-DNAを分解するが、Z-DNAを分解しないことを示す。DNアーゼ（プルモザイム；5ユニット）をバイオフィーム播種後24時間目に、*in vitro*で予め形成されたNTHIバイオフィームに添加した。総計40時間後に、バイオフィームを、抗Z-DNAで、抗B-DNAで、または一次抗体なしでプローブし、これは、対応する二次蛍光抗体の使用により明らかにされ、CLSMにより可視化された。DNアーゼ処置は、バイオフィーム細胞外マトリックス内で、B-DNA形態のeDNA構造を分解するが、大規模なZ-DNA形態のeDNAを明らかにする。

【0050】

20

【図32】図32は、Z-DNA形成が、ヌクレアーゼ分解からDNAを保護することを示す。ポリ（dG-dC）基質を、上に指し示される通り、漸増濃度のNaCl、スペルミンまたはスペルミジンにおいて、塩活性化ヌクレアーゼ（SAN）またはDNアーゼIと共にインキュベートした。分解産物をゲル電気泳動によって可視化した。高塩およびポリアミンは、Z-DNA形態への変換により、分解からDNAを保護する。

【0051】

【図33】図33は、DNABIIタンパク質およびポリアミンが、バイオフィーム細胞外マトリックス内に共局在することを示す。8ウェルチャンバーのカバーガラススライドにおける補充したBHI培地において、37℃および5%CO₂で、分類不能Haemophilus influenzaeバイオフィームを成長させた。バイオフィームを洗浄し、DNABIIタンパク質（淡灰白）またはポリアミン（暗灰色）に対する一次抗体、蛍光二次抗体でプローブし、DAPIで染色し（灰色の領域）、蛍光顕微鏡法により可視化した。ポリアミンは、バイオフィームマトリックスにおいて、HUと共局在するが、IHFとは共局在しない。HUを産生することができないNTHI株は、バイオフィームマトリックスにおけるポリアミンの低減した蓄積を有した。DNABIIタンパク質およびポリアミンは相互作用して、バイオフィーム細胞外マトリックスを安定化する。

30

【0052】

【図34】図34A～図34Bは、DNABIIタンパク質が、Z-DNA形態にシフトさせることによりDNAを保護することを示す。（図34A）ポリ（dG-dC）基質を、上に指し示される通り、漸増濃度のNTHI HUにおいてDNアーゼIと共にインキュベートした。分解産物をゲル電気泳動によって可視化した。HUは、分解からDNAを保護した。（図34B）上：漸増濃度のZ-DNA触媒によってZ-DNAに変換されるB-DNA基質の円二色性スペクトル（Rahmouni（1992）Mol Microbiol. 6（5）：569-72から適応）。250nm前後の負のピークおよび280nm前後の正のピークの反転に留意されたい。下：ポリ（dGdC）DNA（5μg）をHU（15μM）と共に2時間インキュベートし、CDスペクトルを収集した。HUは、ポリ（dGdC）のCDスペクトルをZ-DNAシグネチャーに向かってシフトさせる。

40

【0053】

【図35】図35A～図35Dは、DNABIIタンパク質およびポリアミン（PA）が

50

相乗的に相互作用して、DNアーゼ抵抗性を誘導することを示す。(図35A) 漸増レベルのスペルミジン (Spd) およびHUを、別々にまたは一緒に、ゲノムDNA (gDNA; $2 \mu\text{g}/\text{mL}$) と共に1.5時間37°Cでインキュベートし、続いて、プルモザイム (登録商標) で20分間処置した。アガロースゲル電気泳動を使用して、DNA分解をアッセイした。SpdおよびHUは、DNアーゼ消化からゲノムDNAを相乗的に保護する。(図35B) Spd ($300 \mu\text{M}$) およびHU ($1 \mu\text{M}$) を、ゲノムDNA ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) と共に40時間インキュベートし、続いて20分間のプルモザイム (登録商標) 処置を行った。構造をLIVE/DEAD (登録商標) で染色し、CLSMによって撮像した (白色)。(図35C) NTHIによる実験的OMを有するチンチラ中耳に見出される粘膜バイオフィルムEPSの免疫蛍光CLSM画像。プトレシン (暗灰色) およびHU (淡灰白) についてプローブし、DAPIにより対比染色した (灰色)。HU-Spd依存性DNA構造は、DNアーゼ処置に対して抵抗性である。ポリアミンおよびDNABIIタンパク質は、*in vivo*でバイオフィルム中のeDNA鎖上に共局在する (白色)。(図35D) : 漸増濃度のDNアーゼを、播種時に (予防) または24時間目に (破壊)、NTHIまたはUPECバイオフィルムに16時間添加した。バイオフィルムを染色し、固定し、CLSMにより可視化し、COMSTATによって解析した。バーは、SEMを表す。対照 (DNアーゼなし) と比較した統計的有意性を対応のないt検定によって評価した、** $P < 0.01$ 。DNアーゼは、バイオフィルムの形成を予防することができるが、現存するバイオフィルムを破壊しない。

【0054】

【図36】図36は、Z-DNAが、複数のヒト病原体のバイオフィルムEPS内に存在することを示す。上：一次抗体なし (1° なし) またはZ-DNA特異的抗体 (淡灰白) のいずれかでプローブされた、指し示された細菌によって形成された40時間バイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。Z-DNAは、異なる定常状態レベルにおける複数細菌バイオフィルムのEPSの成分である。下：HU (淡灰白) およびスペルミジン (暗灰色) 抗体でプローブした、指し示されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像、共局在は (白色) である。DNABIIおよびポリアミン成分は、定常状態レベルにおける複数細菌バイオフィルムのEPSにおいて共局在し、これは、Z-DNA存在量と相関する。

【0055】

【図37】図37は、HMGB1が、バイオフィルム細胞外マトリックス中のZ-DNA構造を不安定化することを示す。8ウェルチャンバーのカバーガラススライドにおける補充したBHI培地において、37°Cおよび5% CO_2 で、分類不能 *Haemophilus influenzae* バイオフィルムを成長させた。24時間後に、上に指し示される通り、バイオフィルムを処置した。40時間後に、バイオフィルムを洗浄し、Z-DNAに対する一次抗体 (淡灰白のドット)、蛍光二次抗体でプローブし、DAPIで染色し (灰色の領域)、蛍光顕微鏡法により可視化した。HMGB1処置は、バイオフィルムマトリックス中のZ-DNA構造を低減させた。

【0056】

【図38】図38A~図38Cは、HMGB1が、DNABIIタンパク質を押し付け、これによりNTHIバイオフィルムを破壊することを示す。8ウェルチャンバーのカバーガラススライドにおける補充したBHI培地において、37°Cおよび5% CO_2 で、分類不能 *Haemophilus influenzae* バイオフィルムを成長させた。24時間後に、指し示される通りにバイオフィルムを処置した。(図38A) 40時間後に、バイオフィルムを洗浄し、DNABIIタンパク質に対する一次抗体 (淡灰白のドット)、蛍光二次抗体でプローブし、DAPIで染色し (灰色の領域)、蛍光顕微鏡法により可視化した。(図38B) バイオフィルム培養物から培地を収集し、DNABIIタンパク質を認識する一次抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。HMGB1処置は、バイオフィルムマトリックスからDNABIIタンパク質を押し付けた。(図38C) LIVE/DEAD (登録商標) で染色し、 $5 \text{mg}/\text{mL}$ HMGB1による処置後に共焦点顕微鏡で可視化した、COMSTAT定量NTHIバイオフィルム。HMGB1は、D

N A B I I タンパク質を押しつけることにより、バイオフィルムを破壊する。

【0057】

【図39】図39A～図39Bは、HMGB1が、OMの実験的モデル（チンチラ宿主）におけるバイオフィルム溶解を促進することを示す。NTHI感染後4および5日目に、希釈剤または5 μ g rHMGB1もしくはmHMGB1を、チンチラの中耳に直接的に送達した。動物を24時間後に殺し、その中耳を撮像し（図39A）、（図39A）の下に記載されている基準に基づき、盲検的にスコアリングした（図39B）。バーは、SEMを表す。*** $P < 0.001$ 。画像およびスコアリングは、HMGB1が、*in situ*で既存のNTHIバイオフィルムのクリアランスを促進したことを実証する。

【0058】

【図40】図40A～図40Cは、HMGB1が、*Burkholderia cenocepacia* バイオフィルムを破壊することを示す。（図40A）8ウェルチャンバーのカバーガラススライドにおけるLB培地において、37℃および5%CO₂で、*B. cenocepacia* バイオフィルムを成長させた。24時間後に、バイオフィルムを5mg/mL HMGB1で処置した。総計40時間後に、バイオフィルムをLIVE/DEAD（登録商標）で染色し、CLSMにより可視化し、COMSTATによって解析した。バーは、SEMを表す。（図40B）C57BL/6マウスに、10⁷ CFU i.t.を感染させ、同時に、5mg rHMGB1またはmHMGB1、C45S非炎症性バリエーションを与えた。*B. cenocepacia*の凝集物は、 α -*B. cenocepacia*抗体でプローブした切片において、蛍光顕微鏡法によって見ることができた（灰色）。18時間後に、（図40C）BALにおいてCFUを定量した。バーは、SDを表す。 $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。HMGB1処置は、*in situ*で*B. cenocepacia*バイオフィルムを有意に破壊する。

【0059】

【図41】図41は、HMGB1が、ポリアミン誘導性Z-DNAをヌクレアーゼ感受性B-DNA状態に戻すことを示す。ポリ(dG-dC)基質を、スペルミジンおよびHMGB1と共にインキュベートした。分解産物をゲル電気泳動によって可視化した。HMGB1処置は、スペルミジン誘導性Z-DNA基質に対するヌクレアーゼ感受性を回復させた。

【0060】

【図42】図42A～図42Dは、DNABIIタンパク質およびポリアミンの両方が、カチオン交換体（P11）媒介性バイオフィルム予防をレスキューするために必要とされることを示す。（図42A）トランスウェルプレートシステムの基底側チャンバーにおける37℃、5%CO₂で、NTHIバイオフィルム成長を開始させ、一方、P11樹脂を頂端側チャンバーに添加し、16時間インキュベートした。（図42B）バイオフィルムを染色し、固定し、CLSMにより可視化し、COMSTATによって解析した。バーは、SEMを表す。対照（P11なし）と比較した統計的有意性を対応のないt検定によって評価した、**** $P < 0.0001$ 。（図42C）スペルミジン（Spd、300 μ M）およびHU（500 nM）を、播種時に添加した。（図42B）と同様にバイオフィルムを定量した。対照（P11なし）と比較して、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ および**** $P < 0.0001$ 。（図42D）（図42C）において定量された条件において形成されたバイオフィルムの代表的な画像、平均バイオマスを右上に示す。P11添加は、用量依存性様式でバイオフィルム形成を予防する。外因性スペルミジンおよびHUは一緒にバイオフィルム発達を回復させるが、いずれか単独では回復させず、このことは、P11抗バイオフィルム活性が、直接の接触なしで、バイオフィルムEPSから離れた、構造成分（ポリアミン、DNABIIタンパク質）の滴定の結果であることを示唆する。

【0061】

【図43】図43A～図43Bは、B-DNA抗体およびZ-DNA抗体の特異性を示す。（図43A）臭素化ゲノムDNA（2 μ g/mL）およびポリdGdCを緩衝液中でインキュベートし、260nmおよび295nmにおける吸光度の値を測定し、A260/

10

20

30

40

50

295比を計算した。比>8.6は、B-DNA（暗灰色）を指し示すが、3.2付近の値は、Z-DNA（白色）を指し示す。（図43B）ELISAプレートを1 μ gのポリdGdC（B-DNA）または臭素化ポリdGdCでコーティングし（Z-DNA、Hindler et al. (2013) J Clin Microbiol. 51(6):1678-84.）、続いて0.5%BSAでブロッキングした。次に、ウェルをマウス（ms）IgG1（陰性対照）、マウス抗B-DNAまたはマウス抗Z-DNAでプローブし、二次ヤギ抗マウスIgG-HRPで検出した。TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）は、HRP検出に使用される比色分析基質であった（暗灰色ウェル）。抗B抗体および抗Z抗体は、それぞれのDNA形態に特異的であった。

【0062】

【図44】図44は、DNABIIタンパク質、ポリアミンおよびeDNA（B-DNAおよびZ-DNA）が、NTHIバイオフィルムのEPS内に経時的に着実に蓄積することを示す。抗B-DNA抗体（淡灰白；左から1番目）、抗抗スペルミジン（anti-spermidine）（淡灰白；左から2番目）、抗DNABII（灰色；左から3番目）または抗Z-DNA（白色；左（left）から4番目）でプローブされた、形成の様々なステージにおけるNTHIバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。成熟バイオフィルムは、時間の経過と共にEPS内への各TEDS成分の取り込み量を増加させる。

【0063】

【図45】図45は、ポリアミンおよびDNABIIタンパク質が、DNアーゼ抵抗性であるZ-DNAを刺激することを示す。精製されたゲノムDNA（2 μ g/ml）へのDNABIIタンパク質（HUNTHI、500nM）およびスペルミジン（300 μ M）の添加、ならびに37℃で16時間のインキュベーションによってde novo形成された、EPSスキャフォールド模倣物の免疫蛍光画像。バイオフィルムスキャフォールド模倣物をプルモザイム（登録商標）（DNアーゼ、5U/ml）と共に1時間インキュベートし、次いでB-DNA（暗灰色）およびZ-DNA（白色）についてプローブした。スケールバー10 μ m。B-DNAおよびZ-DNAは、模倣物構造内に観察され、DNアーゼ添加は、B-DNAを選択的に排除した一方で、Z-DNAはインタクトなままであった。よって、ポリアミンおよびDNABIIタンパク質は、B-DNAからZ-DNAへのeDNAの変換によって、DNアーゼ抵抗性状況を誘導することができる。

【0064】

【図46】図46は、TEDSおよびZ-DNAが、複数のヒト病原体によって形成されたバイオフィルムEPS内に存在することを示す。（A）上：未処理（naive）または抗HU（灰色）および抗スペルミジン（Spd、淡灰白）抗体でプローブした、指し示されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像、共局在は白色である。下：未処理または抗B-DNA（暗灰色）および抗Z-DNA抗体（白色）でプローブした、指し示された細菌の40時間形成されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像。十分に特徴付けされたZ-DNA特異的モノクローナル抗体（クローンZ22、Heydorn et al. (2002) COMSTAT. Microbiology; 146; Yang et al. (2017) Paediatr Respir Rev. 21:65-7; Xu et al. (2016) Molecules; 21(8).)を使用して、Z-DNAを検出した。DNABII、ポリアミン、Z-DNAおよびB-DNA成分は全て、複数細菌バイオフィルムのEPS中に存在する。Z-DNAは、異なる定常状態レベルにおける複数細菌バイオフィルムのEPSの不可欠な部分である。

【0065】

【図47】図47A～図47Bは、Z-DNAが、in vivoおよびex vivo試料中に存在することを示す。左：（図47A）実験的NTHI誘発OM中のNTHIバイオフィルムおよび（図47B）嚢胞性線維症患者由来の痰内のZ-DNA（白色）およびB-DNA（暗灰色）。挿入図、陰性対照。スケールバー10 μ m。右：（図47A）実験的NTHI誘発OM中のNTHIバイオフィルムおよび（図47B）嚢胞性線維症患者

10

20

30

40

50

由来の痰内のDNA B I Iタンパク質（灰色）およびスペルミジン（S p d、淡灰白）。挿入図、陰性対照。スケールバー10 μ m。DNA B I I、ポリアミン、Z-DNAおよびB-DNA成分は全て、NTHIバイオフィルムに感染したチンチラ中耳の切片内に存在する。Z-DNAは、異なる定常状態レベルにおける複数細菌バイオフィルムのEPSの不可欠な部分である。

【0066】

【図48】図48A～図48Bは、バイオフィルム中のZ-DNAが、ヌクレアーゼ抵抗性スキャフォールドを形成することを示す。（図48A）指し示された細菌（K p = K . p n e u m o n i a e）によって24時間形成されたバイオフィルムを、DNアーゼ（ブルモザイム（登録商標）；40 U / m l）と共にさらに16時間インキュベートした。次に、バイオフィルムを抗B-DNA（暗灰色）および抗Z-DNA（白色）抗体でプローブし、細菌細胞膜染色剤FM4-64（商標）で対比染色した（図示せず）。（図48B）Image Jを使用して、DNアーゼの非存在下での蛍光強度（対照）で割った、DNアーゼ添加後のB-DNAまたはZ-DNAの蛍光強度の比の計算によって、B-DNAまたはZ-DNAの存在量の変化を定量した。FM4-64（商標）染色細胞の蛍光シグナルに対して、蛍光強度を正規化した。バーは、SEMを表す。対照（DNアーゼなし、点線）と比較した統計的有意性を、対応のあるt検定によって評価した、* P < 0 . 0 5 ; * * * * P < 0 . 0 0 0 1。B-DNAは、DNアーゼによって分解されるが、Z-DNAは抵抗性であり、バイオフィルムEPSの構造的統合性を維持するように機能する。

【0067】

【図49】図49は、Z-DNA安定化が、バイオフィルム形成を刺激することを示す。16時間の未処理または抗Z-DNA抗体（5 m g / m l）の存在下において、NTHIおよびUPECバイオフィルム成長を開始させた。バイオフィルムを染色し、固定し、CLSMにより可視化し、COMSTATによって解析した。バーは、SEMを表す。対照（抗体なし）と比較した統計的有意性を、対応のあるt検定によって評価した、* P < 0 . 0 5、* * P < 0 . 0 1。抗Z-DNA抗体は、用量依存性様式でバイオフィルム形成を刺激し、一方、未処理抗体は刺激しない。

【0068】

【図50】図50A～図50Bは、B-DNAからZ-DNAへの変換の平衡シフトが、バイオフィルム形成を変更することを示す。24時間形成されたNTHIバイオフィルムを、塩化セリウム（C e C l ₃）またはクロロキンと共にさらに16時間インキュベートし、免疫蛍光CLSMによって未処理または抗Z-DNA（白色）でプローブした。（図50A）NTHIバイオフィルムの代表的な画像は、1 m M C e C l ₃の添加後にZ-DNA存在量の増加を指し示した。（図50B）NTHIバイオフィルムの代表的な画像は、1 μ Mクロロキンの添加後にZ-DNA存在量の減少を指し示した。

【0069】

【図51】図51A～図51Bは、B-DNAからZ-DNAへの変換の平衡シフトが、バイオフィルム形成を変更することを示す。24時間形成されたNTHIバイオフィルムを、塩化セリウム（C e C l ₃）（図51A）またはクロロキン（図51B）と共にさらに16時間インキュベートした。抗Z-DNAを使用したIFおよびCLSMによってZ-DNAを測定し、細胞を膜染色剤FM4-64で染色した。バーは、SEMを表す。対照と比較した統計的有意性は、対応のあるt検定によって評価した、* P < 0 . 0 5、* * P < 0 . 0 1。C e C l ₃は、Z-DNAおよびバイオフィルム形成を増加させ、一方、クロロキンは、Z-DNAおよびバイオフィルム発達を低減させた。

【0070】

【図52】図52A～図52Bは、RNAホメオスタシスが、細菌バイオフィルム発達をモジュレートすることを示す。（図52A）16時間のRNアーゼ Aの存在下において、NTHIバイオフィルム成長を開始させた。バイオフィルムを染色し、固定し、CLSMにより可視化し、COMSTATによって解析した。RNアーゼ Aの添加は、おそらく、B-DNAからZ-DNAへの細胞外変換のための決定的な触媒であるポリアミン

の放出によって、用量依存性様式でバイオフィルム形成を刺激した。(図52B)16時間形成されたNTHIバイオフィルムをtRNAと共にインキュベートし、(図52A)と同様に解析した。グアノシンーリン酸(GMP)を陰性対照とした。バーは、SEMを表す。対照(RNアーゼAまたはtRNA/GMPなし)と比較した統計的有意性を対応のある検定によって評価した、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。tRNA(GMPではない)の添加は、おそらく、バイオフィルムEPSからのポリアミンの除去(sequestration)によって、用量依存性様式で初期NTHIバイオフィルムを破壊した。

【0071】

【図53】図53は、DNABIIおよびポリアミンが相乗作用して、B-DNAからZ-DNAに変換(convert)することを示す。一態様では、DNアーゼの非存在下で、作用物質が投与される。左：ゲノムDNA($2\mu\text{g}/\text{mL}$)を、スペルミジン(spd: $300\mu\text{M}$)、HU(500nM)、spdおよびHUの両方の組合せと共に2時間37°Cでインキュベートした。3.6M NaClとgDNAとのインキュベーションを陽性Z-DNA対照として使用した。中央：gDNA($2\mu\text{g}/\text{mL}$)を、Z-DNAを誘導することが公知である、漸増濃度の塩化セリウム(CeCl_3)と共にインキュベートした。右：ポリ(dGdC)($1\mu\text{g}$)を、NaCl(3.6M)、クロロキン($100\mu\text{M}$)、またはNaClおよびクロロキンの両方の組合せのいずれかと共にインキュベートした。クロロキンは、B-DNAからZ-DNAへの移行を予防する。260nmおよび295nmにおける吸光度の値を測定し、 A_{260}/A_{295} 比を計算した。比 > 8.6 は、B-DNAを指し示す一方、3.2付近の値は、Z-DNAを指し示す。十分に確立および検証された分光学的吸光度比アッセイに合致して、DNABIIおよびポリアミンと共に CeCl_3 は相乗作用して、Z-DNAを誘導した一方で、クロロキンは、Z-DNA変換を予防した。

【発明を実施するための形態】

【0072】

別に定義されない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で提供される全てのヌクレオチド配列は、5'~3'方向で示される。本明細書で説明する方法および材料と類似または等価の任意の方法および材料は、本開示の実施または試験において使用することができるが、特定の非限定的な例示的方法、デバイスおよび材料をここで説明する。本明細書で引用する全ての技術出版物および特許出版物は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書中のいずれも、先行発明によって、本開示がそのような開示を先行するものとする権利を与えられないことの承認として解釈されるべきではない。

【0073】

本開示の実施は、別に示されない限り、当該技術分野の技術の範囲内である組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学および組換えDNAの従来技術を使用する。例えば、Sambrook and Russell eds, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; 叢書Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology; 叢書Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait

ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; 米国特許第4,683,195号; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); および Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology* を参照されたい。

【0074】

範囲を含む全ての数字表示、例えば、pH、温度、時間、濃度および分子量は、適宜1.0または0.1の増分で、またはあるいは+/-15%、またはあるいは10%、またはあるいは5%、またはあるいは2%の変動で(+)または(-)に変動する近似値である。必ずしも明白に示されていないが、全ての数字表示に、「約」という用語が先行することが理解されるべきである。また、必ずしも明白に示されていないが、本明細書で説明する試薬は単に例示であり、かつそのようなものの等価物は当該技術分野で公知であることが理解されるべきである。

【0075】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに別のように規定しない限り、複数の指示物を含む。例えば、「ポリペプチド (a polypeptide)」という用語は、その混合物を含む複数のポリペプチドを含む。

【0076】

本明細書で使用される場合、「～を含む (comprising)」という用語は、組成物および方法が、列挙される要素を含むが、その他のものを除外しないことを意味すると意図される。「～から本質的になる」は、組成物および方法を定義するために使用される場合、意図される使用のための組合せにとって任意の本質的に重要な他の要素を除外することを意味する。したがって、本明細書で定義する要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法からの微量夾雑物、および薬学的に許容される担体、例えば、リン酸緩衝食塩水、保存剤等を除外しない。「～からなる」は、他の成分および本明細書で開示する組成物を投与するための実質的な方法ステップの微量要素より多くのものを除外することを意味する。これらの遷移用語の各々によって定義される実施形態は、本開示の範囲内である。

【0077】

「バイオフィルム」とは、微生物が分泌および/または放出するDNA等の高分子と共に、有機または無機であり得る構造表面に付着することもある、組織化された微生物群集を意図する。バイオフィルムは、マイクロバイオティクス (microbiotics) および抗微生物剤に非常に抵抗性である。それらは、歯肉組織、歯および修復物上で生存し、歯周プラーク疾患としても公知の、歯および歯周病を引き起こす。また、それらは、慢性中耳感染を引き起こす。また、バイオフィルムは、歯科インプラント、ステント、カテーテル系およびコンタクトレンズの表面上に形成し得る。それらは、ペースメーカー、心臓弁置換物、人工関節および他の外科的インプラント上で生育する。疾病管理センタ

ー (Centers for Disease Control) は、院内 (病院内で獲得される) 感染の 65% より多くが、バイオフィルムによって引き起こされると見積もっている。それらは、慢性膿感染を引き起こし、免疫系が妨げられている人々において生命を脅かす全身性感染をもたらす。また、バイオフィルムは、多くの疾患に関与する。例えば、嚢胞性線維症患者は、多くの場合抗生物質抵抗性バイオフィルムをもたらす *Pseudomonas* 感染を有する。

【0078】

「阻害すること、競合することまたは滴定すること」という用語は、微生物バイオフィルムの構成成分である DNA / タンパク質マトリックスの形成の低減を意図する。

【0079】

「DNA BII ポリペプチドまたはタンパク質」は、DNA 結合ドメインからなり、したがって、微生物 DNA について特異的または一般的親和性を有する DNA 結合タンパク質またはポリペプチドを意図する。一態様では、それらは、DNA の副溝 (minor groove) に結合する。DNA BII タンパク質の非限定的な例は、組込み宿主因子 (IHF: integration host factor) タンパク質および *E. coli* 株 U93 からヒストン様タンパク質 (HU: histone-like protein from *E. coli* strain U93) である。バイオフィルムと関連付けられ得る他の DNA 結合タンパク質には、DPS (ジェンバンク (Genbank) アクセッション番号 CAA49169)、H-NS (ジェンバンクアクセッション番号 CAA47740)、Hfq (ジェンバンクアクセッション番号 ACE63256)、CbpA (ジェンバンクアクセッション番号 BAA03950) および CbpB (ジェンバンクアクセッション番号 NP_418813) が含まれる。

【0080】

「組込み宿主因子」または (of) 「IHF」タンパク質は、バクテリオファージによってそれらの DNA を宿主細菌に組み込むために使用される細菌タンパク質である。また、それらは、細胞外微生物 DNA に結合する。*E. coli* において IHF タンパク質サブユニットをコードする遺伝子は、himA (ジェンバンクアクセッション番号 POA6X7.1) および himD (POA6Y1.1) 遺伝子である。これらの遺伝子のホモログは他の生物において発見されており、他の生物からのこれらの遺伝子に対応するペプチドは当該技術分野で、例えば、米国特許第 8,999,291 号の表 10 で開示されている。

【0081】

「HMGB1」は、DNA の副溝に結合し、これを歪めると報告されており、かつ作用物質の一例である高移動度群ボックス (HMGB: high mobility group box) 1 タンパク質である。組換えまたは単離されたタンパク質およびポリペプチドは、Atgenglobal、ProSpecBio、Protein1 および Abnova から市販されている。HMGB1 は、3つのドメイン: 各々が 80 個のアミノ酸から構成される 2つの正荷電ドメイン A および B ボックス、ならびに約 30 個の連続アスパラギン酸残基およびグルタミン酸残基からなる負荷電カルボシル末端酸性 C 尾部からなる 215 個のアミノ酸タンパク質 (約 30 Kda) の小タンパク質である。野生型 HMGB1 のポリペプチド配列の非限定的な例を、以下に示す。

【化 1】

MGKGDPPKPRRKMSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGGKFEDMAKADKARYEREMKTYI_PPKGETKKKF_KDPNAPKRPPSAFFLF
CSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKA EKLKEKYEKDIAAYRAK
GKPDAAKKGVV_KAEKSKKKKEEEEGEEDEEEDDEEEDDEEEDDDDE

太字のアミノ酸 (アミノ酸 1~70) は、A ボックスドメインを表す。

イタリック体のアミノ酸 (アミノ酸 88~164) は、B ボックスドメインを表す。

下線のアミノ酸（アミノ酸186～215）は、C尾部ドメインを表す。これらは、断片、例えば、Aボックスドメイン、Bボックスドメイン、AおよびBボックスドメイン（ABボックスドメイン）、C尾部ドメインおよびNドメイン（アミノ酸1～185）の非限定的な例である。一態様では、断片は、C末端ドメイン、またはBボックスドメインを含むポリペプチドから本質的になる。

【0082】

「HU」または「E. coli株U93からのヒストン様タンパク質」とは、典型的にE. coliに付随するあるクラスのヘテロ二量体タンパク質を指す。HUタンパク質は、DNA接合部に結合することが公知である。関連タンパク質が、他の微生物から単離されている。E. coli HUの完全なアミノ酸配列は、Laine et al. (1980) Eur. J. Biochem 103 (3) 447-481によって報告された。HUタンパク質に対する抗体は、Abeamから市販されている。

【0083】

「表面抗原」または「表面タンパク質」という用語は、細胞、例えば、細菌細胞の表面上のタンパク質またはペプチドを指す。表面抗原の例は、外膜タンパク質、例えば、OMP P5（ジェンバンクアクセッション番号YP_004139079.1）、OMP P2（ジェンバンクアクセッション番号ZZX87199.1）、OMP P26（ジェンバンクアクセッション番号YP_665091.1）、rsPilAまたは組換え可溶型PilA（ジェンバンクアクセッション番号EFU96734.1）およびIV型Pilin（ジェンバンクアクセッション番号Yp_003864351.1）である。

【0084】

「Haemophilus influenzae」という用語は、多くの様々な感染症、例えば、耳感染症、眼感染症および副鼻腔炎等を引き起こし得る病原性細菌を指す。Haemophilus influenzaeの多くの様々な株が単離されており、IhfA遺伝子またはタンパク質を有する。Haemophilus influenzaeの様々な株の一部の非限定的な例には、Rd KW20、86-028NP、R2866、PittGG、PittEE、R2846および2019が含まれる。

【0085】

「微生物DNA」とは、バイオフィルムを産生する微生物からの一本鎖または二本鎖DNAを意図する。

【0086】

バイオフィルムを「阻害すること、予防することまたは破壊すること」とは、バイオフィルムの構造の予防的または治療的低減を意図する。

【0087】

「ベントポリヌクレオチド」とは、1つの鎖に他の鎖と対形成しない小ループを含有する二本鎖ポリヌクレオチドを意図する。一部の実施形態では、ループは、1塩基～約20塩基の長さ、またはあるいは2塩基～約15塩基の長さ、またはあるいは約3塩基～約12塩基の長さ、またはあるいは約4塩基～約10塩基の長さであるか、またはあるいは約4、5または6、または7、または8、または9、または10塩基を有する。

【0088】

診断または処置の「対象」は、細胞または動物、例えば、哺乳動物またはヒトである。診断または処置に供される非ヒト動物は、感染に供される非ヒト動物または動物モデル、例えば、サル類、ネズミ科、例えば、ラット、マウス、チンチラ、イヌ科、例えば、イヌ、ウサギ類、例えば、ウサギ、家畜、競技用動物およびペットである。「対象」、「宿主」、「個体」および「患者」という用語は、本明細書で互換的に使用される場合、動物、典型的に哺乳動物を指すものである。哺乳動物の非限定的な例には、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、類人猿、テナガザル、チンパンジー、オランウータン、サル、マカク等）、飼育動物（例えば、イヌおよびネコ）、家畜動物（例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）および実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）が含まれる。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。哺乳動物は、任意の年齢または任意の発達段階

であってもよい（例えば、成体、青年期、子、幼体または子宮内の哺乳動物）。哺乳動物は、雄または雌であり得る。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0089】

「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、互換的に、かつそれらの最も広い意味で使用されて、2つまたはそれよりも多いサブユニットアミノ酸、アミノ酸アナログまたはペプチドミメティクスの化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合によって連結され得る。別の実施形態では、サブユニットは、他の結合、例えば、エステル、エーテル等によって連結され得る。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質の配列またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸の最大数に限定は設けられていない。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、グリシンならびにDおよびL光学異性体の両方を含む天然および／もしくは非天然または合成アミノ酸のいずれか、アミノ酸アナログおよびペプチドミメティクスを指す。

【0090】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、任意の長さのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれかのヌクレオチドまたはそのアナログの重合形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有することができ、公知または未知の任意の機能を行い得る。以下のもの：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマーは、ポリヌクレオチドの非限定的な例である。ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造への改変は、ポリヌクレオチドの組立て前または後に与えられ得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、標識化構成成分とのコンジュゲーションによって、重合化後にさらに改変してもよい。また、この用語は、二本鎖および一本鎖分子の両方を指す。別に特定または要求されない限り、ポリヌクレオチドである本明細書で開示する任意の実施形態は、二本鎖形態、および二本鎖形態を構成することが公知または予想される2つの相補的一本鎖形態の各々の両方を包含する。

【0091】

ポリヌクレオチドは、4つのヌクレオチド塩基：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；およびポリヌクレオチドがRNAである場合チミンの代わりにウラシル（U）の特定の配列からなる。したがって、「ポリヌクレオチド配列」という用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表現である。このアルファベット表現は、中央処理装置を有するコンピュータのデータベースに入力され、バイオインフォマティクス適用、例えば、機能ゲノミクスおよび相同性検索に使用され得る。

【0092】

「単離された」または「組換え」という用語は、核酸、例えば、DNAまたはRNAについて本明細書で使用される場合、高分子の天然源に存在する、それぞれ、他のDNAまたはRNAおよびポリペプチドから分離された分子を指す。「単離された、または組換え核酸」という用語は、断片として天然に存在しない、天然状態で見出されない核酸断片を含むことを意味する。また、「単離された」という用語は、他の細胞タンパク質から単離されたポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびタンパク質を指すために本明細書で使用され、精製されたポリペプチドおよび組換えポリペプチドの両方を包含することを意味する。他の実施形態では、「単離された、または組換え」という用語は、細胞の構成要素、およびそうでなければ、通常天然で会合している細胞、組織、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片（複数可）から分離されていることを意味する。例えば、単離された細胞は、似ていない表現型または遺伝子型の組織または細

胞から分離されている細胞である。単離されたポリヌクレオチドは、それが通常そのネイティブまたは天然環境で、例えば、染色体上で、会合している3'および5'隣接ヌクレオチドから分離されている。当業者に明らかである通り、天然に存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片（複数可）は、その天然に存在する相対物からそれを区別するための「単離」を必要としない。

【0093】

本開示がポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体に関する場合、そのようなものの等価物または生物学的等価物が、本開示の範囲内で意図されることは、明白な列挙なしで、かつ別のように意図されない限り、推測されるべきである。本明細書で使用される場合、「その生物学的等価物」という用語は、参照タンパク質、抗体、断片、ポリペプチドまたは核酸について言及する場合、「その等価物」と同義であると意図され、最小限の相同性を有する一方で、それでも所望の構造または機能性を維持するものを意図する。本明細書で特に列挙されない限り、本明細書で挙げる任意のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質もまたその等価物を含むことが企図される。一態様では、等価なポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下において、説明される方法において使用するための本明細書で説明するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの相補物にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。別の態様では、等価な抗体または抗原結合性ポリペプチドは、少なくとも70%、またはあるいは少なくとも75%、またはあるいは少なくとも80%、またはあるいは少なくとも85%、またはあるいは少なくとも90%、またはあるいは少なくとも95%の親和性またはそれよりも高い親和性で、参照抗体または抗原結合性断片に結合する抗体または抗原結合性ポリペプチドを意図する。別の態様では、その等価物は、競合ELISAアッセイ下で（*t i n d e r a c o m p e t i t i v e E L I S A a s s a y*）、抗体または抗原結合性断片の、その抗原への結合と競合する。別の態様では、等価物は、少なくとも約80%の相同性または同一性、およびあるいは少なくとも約85%、またはあるいは少なくとも約90%、またはあるいは少なくとも約95%、またはあるいは98%のパーセント相同性または同一性を意図し、参照タンパク質、ポリペプチドまたは核酸に対して実質的に等価な生物活性を示す。

【0094】

別の配列に対してある特定のパーセンテージ（例えば、80%、85%、90%または95%）の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）は、整列した場合、塩基（またはアミノ酸）のそのパーセンテージが、2つの配列の比較において同じであることを意味する。整列およびパーセント相同性または配列同一性は、当該技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、*C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y*（*A u s u b e l e t a l . , e d s . 1 9 8 7*）*S u p p l e m e n t 3 0 , s e c t i o n 7 . 7 . 1 8 , T a b l e 7 . 7 . 1*で説明されるソフトウェアプログラムを使用して決定することができる。ある特定の実施形態では、デフォルトパラメーターが整列に使用される。非限定的な例示的整列プログラムは、デフォルトパラメーターを使用する、BLASTである。特に、例示的なプログラムには、以下のデフォルトパラメーター：遺伝子コード＝標準；フィルター＝なし；鎖＝両方；カットオフ＝60；予測＝10；マトリックス＝BLOSUM62；記載＝50個の配列；分類＝高スコア；データベース＝非重複ジェンバンク＋EMBL＋DDBJ＋PDB＋ジェンバンクCDS翻訳＋SwissProtein＋S P u p d a t e ＋ P I Rを使用する、BLASTNおよびBLASTPが含まれる。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレス：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLASTで見出すことができる。配列同一性およびパーセント同一性は、それらを*c l u s t a l W*（ウェブアドレス：align.genome.jp（最終アクセス2011年3月7日）で入手可能）に組み込むことによって決定した。

【0095】

「相同性」または「同一性」または「類似性」とは、2つのペプチド間または2つの核

酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較の目的のために整列され得る各配列中の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列中の位置が、同じ塩基またはアミノ酸によって占有されている場合、分子はその位置で相同である。配列間の相同性の程度は、配列によって共有される整合位置または相同位置の数の関数である。「非関連」または「非相同」配列は、本開示の配列のうちの1つと40%未満の同一性、またはあるいは25%未満の同一性を共有する。

【0096】

また、「相同性」または「同一性」または「類似性」は、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸分子を指し得る。

【0097】

「ハイブリダイゼーション」とは、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン-クリック塩基対形成、フーグスティーン結合によって、または他の任意の配列特異的様式で起こり得る。複合体は、二本鎖構造を形成する2つの鎖、多鎖複合体を形成する3つまたはそれよりも多い鎖、単一の自己ハイブリダイズ鎖、またはこれらの任意の組合せを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、より広範なプロセスのステップ、例えば、PCR反応の開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素切断を構成し得る。

【0098】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例には：約25℃～約37℃のインキュベーション温度；約6×SSC～約10×SSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約0%～約25%のホルムアミド濃度；および約4×SSC～約8×SSCの洗浄溶液が含まれる。中程度のハイブリダイゼーション条件の例には：約40℃～約50℃のインキュベーション温度；約9×SSC～約2×SSCの緩衝液濃度；約30%～約50%のホルムアミド濃度；および約5×SSC～約2×SSCの洗浄溶液が含まれる。高ストリンジェンシー条件の例には：約55℃～約68℃のインキュベーション温度；約1×SSC～約0.1×SSCの緩衝液濃度；約55%～約75%のホルムアミド濃度；および約1×SSC、0.1×SSCの洗浄溶液または脱イオン水が含まれる。一般的に、ハイブリダイゼーションインキュベーション時間は、5分間～24時間であり、1、2回またはそれよりも多い洗浄ステップを伴い、洗浄インキュベーション時間は、約1、2または15分間である。SSCは、0.15M NaClおよび15mMクエン酸緩衝液である。他の緩衝液系を使用するSSCの等価物が使用され得ることが理解される。

【0099】

本明細書で使用される場合、「発現」とは、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス、および／または転写されたmRNAが次に、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。

【0100】

「コードする」という用語は、それがポリヌクレオチドに適用されるとき、そのネイティブ状態で、または当業者に周知の方法によって操作された場合、それが転写および／または翻訳されて、mRNAそしてポリペプチドおよび／またはその断片を産生することができる場合、ポリペプチドを「コードする」と言われるポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補物であり、コード配列は、それから推定することができる。

【0101】

本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置」等の用語は、所望の薬理的効果および／または生理的効果を得ることを意味するために本明細書で使用される。効果は、障害および／または障害に起因する有害効果についての部分的または完全な治癒の点で治療的であり得る。本明細書で使用される場合、また、対象における疾患の「処置すること」または「処置」とは、(1) 疾患にかかりやすいか、または疾患の症状をまだ示していな

10

20

30

40

50

い対象において症状または疾患が起こることを予防すること；（２）疾患を阻害することまたはその発症を阻止すること；または（３）疾患または疾患の症状を改善することまたはその退縮をもたらすことを指し得る。当該技術分野で理解される通り、「処置」とは、臨床結果を含む、有益な結果または所望の結果を得るための手法である。本技術の目的のために、有益な結果または所望の結果は、１つまたは複数の：１つまたは複数の症状の軽減または改善；状態（疾患を含む）の程度の減弱；状態（疾患を含む）の安定化（すなわち、悪化していない）状況；状態（疾患を含む）の遅延または緩慢化、；状態（疾患を含む）、状況および寛解（部分的であるか、全体的であるかにかかわらず）の進行、改善または緩和を、検出可能であるか、検出不能であるかにかかわらず、含み得るが、これらに限定されない。一態様では、処置は、予防を除外する。疾患がＳＬＥ（全身性エリテマトーデス）および／または嚢胞性線維症（ＣＦ）である場合、処置の証拠は、炎症の証拠および／または自己免疫活性もしくは症状のレベルの低減を含んだ。

10

【０１０２】

予防することは、障害または影響（*effect*）にかかりやすい系または対象において、*in vitro*または*in vivo*で障害または影響を予防することを意図する。そのようなことの一例は、バイオフィルムを産生することが公知の微生物に感染した系において、バイオフィルムの形成を予防することである。

【０１０３】

「組成物」とは、活性剤と、不活性（例えば、検出可能な剤または標識）または活性な、別の化合物または組成物、例えば、アジュバント、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝液、塩、親油性溶媒、保存剤、アジュバントなどとの組合せを意味することを意図し、薬学的に許容される担体を含む。また、担体は、医薬賦形剤および添加剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質および炭水化物（例えば、単糖、ジ、トリ、テトラオリゴ糖およびオリゴ糖を含む糖；誘導体化糖、例えば、アルジトール、アルドン酸、エステル化糖等；および多糖または糖高分子）を含み、それらは、単独または１～９９．９９重量％または体積％の組合せを含む、単独で、または組合せで存在し得る。例示的なタンパク質賦形剤には、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（*HSA: human serum albumin*）、組換えヒトアルブミン（*rHA: recombinant human albumin*）、ゼラチン、カゼイン等が含まれる。緩衝能においても機能し得る代表的なアミノ酸／抗体構成成分には、アラニン、アルギニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテーム等が含まれる。また、炭水化物賦形剤は、この技術の範囲内で意図され、その例には、単糖、例えば、果糖、麦芽糖、ガラクトース、ブドウ糖、Ｄ－マンノース、ソルボース等；二糖、例えば、乳糖、ショ糖、トレハロース、セロビオース等；多糖、例えば、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプン等；およびアルジトール、例えば、マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール（グルシトール）およびミオイノシトールが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【０１０４】

「医薬組成物」とは、活性剤と、組成物を*in vitro*、*in vivo*または*ex vivo*での診断的または治療的使用に好適にする不活性または活性な担体との組合せを含むことを意図する。

40

【０１０５】

「薬学的に許容される担体」とは、本明細書で開示される組成物において使用され得る任意の希釈剤、賦形剤または担体を指す。薬学的に許容される担体には、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えば、ホスフェート、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質

50

、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、蠟、ポリエチレンーポリオキシプロピレンーブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂が含まれる。好適な医薬担体は、この分野の標準の参考教本である Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company で説明されている。それらは、意図される剤形、すなわち、経口錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、シロップ剤等に関して、かつ従来の医薬実務と一致して選択され得る。

【0106】

本開示に従って使用される組成物は、投与の容易さおよび投与量の均一性のために投与単位形態で包装され得る。「単位用量」または「投与量」という用語は、対象における使用に好適な物理的に別個の単位を指し、各単位は、その投与、すなわち、適切な経路およびレジメンに付随して所望の応答をもたらすように計算された所定の量の組成物を含有する。処置の回数および単位用量の両方による、投与されるべき量は、所望される結果および／または保護に依存する。また、組成物の正確な量は、実施者の判断に依存し、各個体に特有である。用量に影響を与える因子には、対象の身体的および臨床的状态、投与経路、意図される処置の目的（症状の軽減対治療）ならびに特定の組成物の効力、安定性および毒性が含まれる。製剤化に際して、液剤は、投与用製剤と適合性の様式で、かつ治療的または予防的に有効な量で投与される。製剤は、様々な剤形、例えば、本明細書で説明する注射用液剤のタイプで容易に投与される。

【0107】

「接触させること」という用語は、2つまたはそれよりも多くのものの間の直接的または間接的結合または相互作用を意味する。直接的相互作用の特定の例は、結合である。間接的相互作用の特定の例は、1つの実体が中間の分子に作用し、次にそれが第2の参照実体に作用する場合である。接触させることは、本明細書で使用される場合、溶液中、固相中、*in vitro*で、*ex vivo*で、細胞で、および *in vivo*で接触させることを含む。*in vivo*で接触させることは、投与することまたは投与と呼ばれ得る。

【0108】

「生物活性剤」または本明細書で開示される活性剤とは、単離された、もしくは組換えポリペプチド、単離された、もしくは組換えポリヌクレオチド、ベクター、単離された宿主細胞または抗体のうちの1つまたは複数、およびこれらのうちの1つまたは複数を含む組成物を意図する。

【0109】

「投与」は、1つの用量で、処置の過程全体を通して連続的または断続的にもたらされ得る。投与の最も有効な手段および投与量を決定する方法は、当業者に公知であり、治療に使用される組成物、治療の目的、処置される標的細胞および処置される対象によって変動する。単回または複数回の投与は、処置する医師によって選択される用量レベルおよびパターンで行われ得る。好適な投与用製剤およびその作用物質を投与する方法は、当該技術分野で公知である。また、投与経路を決定することができ、最も有効な投与経路を決定する方法は、当業者に公知であり、処置に使用される組成物、処置の目的、処置される対象の健康状態または疾患段階および標的細胞または組織によって変動する。投与経路の非限定的な例には、経口投与、経鼻投与、注射および局所適用が含まれる。

【0110】

本開示の作用物質は、任意の好適な投与経路によって治療のために投与され得る。また、最適な経路は、レシピエントの状態および年齢ならびに処置される疾患によって変動することが理解される。

【0111】

「有効量」という用語は、所望の効果を達成するために十分な量を指す。治療または予防適用に関して、有効量は、問題の状態のタイプおよび重症度、ならびに個体対象の特徴、例えば、健康全般、年齢、性別、体重および医薬組成物に対する耐容性に依存する。免疫原性組成物に関して、一部の実施形態では、有効量は、病原体に対する保護的応答をも

10

20

30

40

50

たらすために十分な量である。他の実施形態では、免疫原性組成物の有効量は、抗原に対する抗体生成をもたらすために十分な量である。一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に対して受動免疫を与えるために必要な量である。免疫原性組成物について、一部の実施形態では、有効量は、上記に説明する因子に加えて、意図される使用、特定の抗原性化合物の免疫原性の程度および対象の免疫系の健康／応答性に依存する。当業者は、これらおよび他の因子に依存して適切な量を決定することができる。

【0112】

in vitro 適用の場合、一部の実施形態では、有効量は、問題の適用のサイズおよび性質に依存する。また、それは、*in vitro* 標的の性質および感度ならびに使用における方法に依存する。当業者は、これらおよび他の考慮事項に基づいて有効量を決定することができる。有効量は、実施形態に依存して組成物の1回または複数回の投与を含み得る。

【0113】

「ペプチドコンジュゲート」とは、1つまたは複数のポリペプチドと別の化学的または生物学的化合物との共有または非共有結合による会合を指す。非限定的な例では、ポリペプチドと化学的化合物との「コンジュゲーション」は、ポリペプチドの意図される目的について改善されたポリペプチドの安定性または有効性をもたらす。一実施形態では、ペプチドは担体とコンジュゲートされ、担体はリポソーム、ミセルまたは薬学的に許容される高分子である。

【0114】

「リポソーム」とは、同心円状の脂質二重層からなる微視的小胞である。構造的に、リポソームは、大きさおよび形状が長管〜球に及び、寸法が数百オングストローム〜数分の1ミリメートルに及ぶ。小胞形成脂質は、外層の脂質組成を提供する最終複合体の特定された程度の流動性または剛性を達成するように選択される。これらは、中性（コレステロール）または双極性であり、リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（PC: phosphatidylcholine）、ホスファチジリエタノールアミン（PE: phosphatidylethanolamine）、ホスファチジリンシトール（PI: phosphatidylinositol）およびスフィンゴミエリン（SM: sphingomyelin）、ならびに14〜22の範囲の炭化水素鎖長を有し、かつ飽和であるか、または1つまたは複数の二重C=C結合を有する、非限定的に、ジオレオイルホスファチジリエタノールアミン（DOPE: dioleoylphosphatidylethanolamine）を含む他のタイプの双極性脂質を含む。単独で、または他の脂質構成成分との組合せで、安定なリポソームを生成することができる脂質の例は、リン脂質、例えば、水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC: hydrogenated soy phosphatidylcholine）、レシチン、ホスファチジリエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジリエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンシトール、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジステアロイルホスファチジリエタノールアミン（DSPE: distearoylphosphatidylethanolamine）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC: dioleoylphosphatidylcholine）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC: palmitoyl oleoylphosphatidylcholine）、パルミトイルオレオイルホスファチジリエタノールアミン（POPE: palmitoyl oleoylphosphatidylethanolamine）およびジオレオイルホスファチジリエタノールアミン4-（N-マレイミドトリエチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（DOPE-mal: dioleoylphosphatidylethanolamine 4-（N-maleimido-triethyl）cyclohexane-1-carboxylate）である。リポソームに組み込むことができる追加のリン非含有脂質には、ステアリルアミン、ドデシ

10

20

30

40

50

ルアミン、ヘキサデシルアミン、イソプロピルミリステート、トリエタノールアミン、ラウリルサルフェート、アルキル-アリアルサルフェート、アセチルパルミテート、グリセロールリシノレエート、ヘキサデシルステレエート (hexadecyl stearate)、両性アクリルポリマー、ポリエチルオキシ化脂肪酸アミドおよび上記に挙げるカチオン性脂質 (DDAB、DODAC、DMRIE、DMTAP、DOGS、DOTAP (DOTMA)、DOSPA、DPTAP、DSTAP、DC-Chol) が含まれる。負荷脂質には、ホスファチジン酸 (PA: phosphatidic acid)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG: dipalmitoyl phosphatidylglycerol)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG: dioleoyl phosphatidylglycerol) および小胞を形成することができるジセチルホスフェートが含まれる。典型的に、リポソームは、それらの全体的なサイズおよび層状構造の性質に基づいて3つのカテゴリーに分けることができる。1977年12月のニューヨークアカデミー科学会議「Liposomes and Their Use in Biology and Medicine」によって展開された3つの分類は、多層小胞 (MLV: multi-lamellar vesicle)、小型単層小胞 (SUV: small uni-lamellar vesicle) および大型単層小胞 (LUV: large uni-lamellar vesicle) である。生物活性剤は、本明細書で説明する方法に従う投与のためにそのようなものに被包され得る。

10

【0115】

20

「ミセル」は、液体コロイド中に分散した界面活性分子の凝集物である。水溶液中の典型的なミセルは、親水性の「頭部」領域を周囲の溶媒と接触させ、疎水性尾部領域をミセル中心に隔離した凝集物を形成する。このタイプのミセルは、順相ミセル (水中油ミセル) として公知である。逆ミセルは、中心に頭部基を有し、尾部を外に向けている (油中水ミセル)。ミセルは、本明細書で説明するポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体または組成物を結合して、標的細胞または組織への効率的な送達を促進するために使用され得る。

【0116】

「薬学的に許容される高分子」という句は、本明細書で説明する1つまたは複数のポリペプチドにコンジュゲートされ得る化合物の群を指す。高分子のポリペプチドへのコンジュゲーションは、in vivo および in vitro でのポリペプチドの半減期を延長することができることが企図される。非限定的な例には、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、セルロース誘導体、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、糖、ポリオールおよびその混合物が含まれる。生物活性剤は、本明細書で説明する方法に従う投与のために薬学的に許容される高分子にコンジュゲートされ得る。

30

【0117】

「遺伝子送達媒体」は、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞に運搬することができる任意の分子として定義される。遺伝子送達媒体の例は、リポソーム；ミセル；天然高分子および合成高分子を含む生物適合性高分子；リポタンパク質；ポリペプチド；多糖；リポ多糖；人工ウイルスエンベロープ；金属粒子；ならびに細菌またはウイルス、例えば、バキュロウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクター、および様々な真核および原核宿主における発現について説明されており、遺伝子治療および単純なタンパク質発現に使用され得る当該技術分野で典型的に使用される他の組換え媒体である。

40

【0118】

本明細書で開示するポリヌクレオチドは、遺伝子送達媒体を使用して細胞または組織に送達され得る。「遺伝子送達」、「遺伝子導入」、「形質導入」等は、本明細書で 사용되는場合、導入に使用される方法にかかわらず、外因性ポリヌクレオチド (ときには「導入遺伝子」と呼ばれる) の宿主細胞への導入について言及する用語である。そのような方法には、様々な周知の技術、例えば、ベクター媒介遺伝子導入 (例えば、ウイルス感染／トランスフェクション、または様々な他のタンパク質ベースまたは脂質ベースの遺伝子

50

送達複合体による) および「ネイキッド」ポリヌクレオチドの送達を促進する技術(例えば、電気穿孔、「遺伝子銃」送達、およびポリヌクレオチドの導入に使用される様々な他の技術)が含まれる。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞において安定に、または一過性に維持され得る。安定な維持は、典型的に、導入されたポリヌクレオチドが、宿主細胞と適合性の複製起点を含有するか、または宿主細胞のレプリコン、例えば、染色体外レプリコン(例えば、プラスミド)または核染色体もしくはミトコンドリア染色体に統合することのいずれかを必要とする。当該技術分野で公知かつ本明細書で説明される通り、いくつかのベクターは、遺伝子の哺乳動物細胞への移入を媒介することができることが公知である。

【0119】

本明細書で使用される場合、「eDNA」という用語は、病原性バイオフィルムの構成成分として見出される細胞外DNAを指す。

【0120】

「プラスミド」は、染色体DNAとは独立して複製することができる、染色体DNAから分離している染色体外DNA分子である。多くの場合、それは環状かつ二本鎖である。プラスミドは、微生物の集団内で水平方向の遺伝子導入のための機構を提供し、典型的に、所与の環境状態で選択的利益を提供する。プラスミドは、競合的環境ニッチにおいて天然に存在する抗生物質に対する抵抗性を提供する遺伝子を運搬し得るか、またはあるいは、産生されるタンパク質は、同様の条件下で毒素として作用し得る。

【0121】

遺伝子工学において使用される「プラスミド」は、「プラスミドベクター」と呼ばれる。多くのプラスミドは、そのような使用のために市販されている。複製すべき遺伝子を、細胞を特定の抗生物質に対して抵抗性にする遺伝子と、いくつかの一般的に使用される制限部位を含有し、この場所でのDNA断片の容易な挿入を可能にする短い領域であるマルチクローニングサイト(MCS: multiple cloning site、またはポリリンカー)とを含有するプラスミドのコピーに挿入する。プラスミドの別の主要な使用は、大量のタンパク質を製造することである。この場合、研究者らは、目的の遺伝子を宿すプラスミドを含有する細菌を成長させる。細菌が、その抗生物質抵抗性を与えるタンパク質を産生するのと同じように、それはまた挿入された遺伝子から大量のタンパク質を産生するように誘導され得る。これは、遺伝子またはそして遺伝子がコードするタンパク質を大量産生する安価で容易な方法である。

【0122】

「酵母人工染色体」または「YAC (yeast artificial chromosome)」とは、大きなDNA断片(100kbよりも大きく、最大で3000kb)をクローニングするために使用されるベクターを指す。それは、人工的に構築された染色体であり、酵母細胞における複製および保存に必要とされるテロメア配列、セントロメア配列および複製起点配列を含有する。初期環状プラスミドを使用して組み立てると、それらを、制限酵素を使用することによって直鎖状にし、その後DNAリガーゼにより、付着末端の使用によって直鎖分子内に目的の配列または遺伝子を付加することができる。酵母発現ベクター、例えば、YAC、YIp (酵母組込みプラスミド: yeast integrating plasmid) およびYEp (酵母エピソームプラスミド: yeast episomal plasmid) は、酵母はそれ自体、真核細胞であるため、翻訳後改変を有する真核生物タンパク質生成物を得ることができるので、非常に有用であるが、しかしながら、YACは、BACよりも不安定であり、キメラ効果を生ずることが分かっている。

【0123】

「ウイルスベクター」は、in vivo、ex vivoまたはin vitroのいずれかで、宿主細胞に送達されるべきポリヌクレオチドを含む組換え産生ウイルスまたはウイルス粒子として定義される。ウイルスベクターの例には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクター等が

10

20

30

40

50

含まれる。感染性タバコモザイクウイルス (TMV: tobacco mosaic virus) ベースのベクターは、タンパク質を製造する (manufacturer) ために使用される場合があり、タバコ葉においてグリフィスシン (Griffithsin) を発現することが報告されている (O'Keefe et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (15): 6099-6104)。また、アルファウイルスベクター、例えば、セムリキ森林ウイルスベースのベクターおよびシンドビスウイルスベースのベクターは、遺伝子治療および免疫療法における使用のために開発されている。Schlesinger & Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5: 434-439 および Ying et al. (1999) Nat. Med. 5 (7): 823-827 を参照されたい。遺伝子導入がレトロウイルスベクターによって媒介される態様では、ベクター構築物とは、レトロウイルスゲノムまたはその部分と治療用遺伝子とを含むポリヌクレオチドを指す。

【0124】

本明細書で使用される場合、「レトロウイルス媒介遺伝子導入」または「レトロウイルス形質導入」は、同じ意味を有し、細胞に入り、ウイルスのゲノムを宿主細胞ゲノムに組み込むウイルスによって、遺伝子または核酸配列が宿主細胞に安定に移入されるプロセスを指す。ウイルスは、その正常な感染機構を介して宿主細胞に入ってもよく、ウイルスが異なる宿主細胞表面受容体またはリガンドに結合して細胞に入るように改変されてもよい。本明細書で使用される場合、レトロウイルスベクターとは、ウイルスまたはウイルス様侵入機構を通して外因性核酸を細胞に導入することができるウイルス粒子を指す。

【0125】

レトロウイルスは、それらの遺伝子情報をRNAの形態で運搬する；しかしながら、ウイルスが細胞に感染すると、RNAは、DNA形態に逆転写され、それは感染した細胞のゲノムDNAに組み込まれる。組み込まれたDNA形態は、プロウイルスと呼ばれる。

【0126】

遺伝子導入がDNAウイルスベクター、例えば、アデノウイルス (Ad: adenovirus) またはアデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) によって媒介される態様では、ベクター構築物とは、ウイルスゲノムまたはその部分と導入遺伝子とを含むポリヌクレオチドを指す。アデノウイルス (Ad) は、比較的十分に特徴付けられているウイルスの同種の群であり、50個を超える血清型を含む。例えば、PCT国際出願公開番号WO95/27071号を参照されたい。Adは、宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。組換えAd由来ベクター、特に組換えおよび野生型ウイルスの生成の潜在性を低減した組換えAd由来ベクターもまた、構築されている。PCT国際出願公開番号WO95/00655号およびWO95/11984号を参照されたく、野生型AAVは、宿主細胞ゲノムへ組み込まれる高感染力および特異性を有する。Hermonat & Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6466-6470 および Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 3988-3996 を参照されたい。

【0127】

ポリヌクレオチドが作動可能に連結され得るプロモーターおよびクロニングサイトの両方を含むベクターは、当該技術分野で周知である。そのようなベクターは、in vitro または in vivo でRNAを転写することができ、Stratagene (La Jolla, Calif.) および Promega Biotech (Madison, Wis.) 等の供給元から市販されている。発現および／または in vitro 転写を最適化するために、クローンの5' および／または3' 非翻訳部分を除去、付加または変更して、余分の潜在的で不適切な選択的翻訳開始コドン、または転写または翻訳レベルのいずれかで発現に干渉するか、またはこれを低減し得る他の配列を削除することが必要であり得る。あるいは、コンセンサスリボソーム結合部位は、開始コドンのすぐ5' に挿

入されて発現を向上し得る。

【0128】

また、遺伝子送達媒体には、DNA／リボソーム複合体、ミセルおよび標的とされたウイルスタンパク質－DNA複合体が含まれる。また、ターゲティング抗体またはその断片を含むリボソームは、本明細書で開示する方法で使用することができる。ポリヌクレオチドの細胞または細胞集団への送達に加えて、本明細書で説明するタンパク質の細胞または細胞集団への直接的導入は、タンパク質トランスフェクションの非限定的な技術によって行ってもよく、あるいは、本明細書で開示するタンパク質の発現の向上および／または活性の促進を可能にする培養条件は、他の非限定的な技術である。

【0129】

本明細書で使用される場合、「抗体」、「複数の抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、抗体全体および任意の抗原結合性断片またはその単一の鎖を含む。したがって、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む任意のタンパク質またはペプチド含有分子を含む。また、「抗体」、「複数の抗体」および「免疫グロブリン」という用語には、任意のアイソタイプの免疫グロブリン；非限定的に、Fab、Fab'、F(ab)₂、Fv、scFv、dsFv、Fd断片、dAb、VH、VL、VhHおよびV-NARドメインを含む抗原への特異的結合を保持する抗体の断片；ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディおよびカップボディ；抗体断片および1つまたは複数の単離されたものから形成された多重特異性抗体断片が含まれる。そのようなものの例には、重鎖もしくは軽鎖またはそのリガンド結合性部分の相補性決定領域（CDR：complementarity determining region）、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク（FR：framework）領域、またはその任意の部分、結合性タンパク質の少なくとも一部分、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、および抗体の抗原結合性部分と非抗体タンパク質とを含む融合タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体（Ab）の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織への結合を媒介し得る。「抗～」という用語は、例えば、抗DNABII、抗IHF、抗HU、抗OMP P5のように、タンパク質名称の前に使用される場合、特定のタンパク質への結合および／または特定のタンパク質への親和性の所有を示すモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を指す。例えば、「抗IHF」とは、IHFタンパク質に結合する抗体を指す。特異的抗体は、タンパク質であってその抗体がそれに対して産生されたタンパク質以外のタンパク質への親和性を有するか、または結合し得る。例えば、抗IHFは、IHFタンパク質に対して特異的に産生されたものであるが、配列相同性を通じて、または構造相同性を通じて関連する他のタンパク質にも結合し得る。

【0130】

抗体は、それらが、所望の生物活性を示す限り、ポリクローナル、モノクローナル、多特異性（例えば、二重特異性抗体）および抗体断片であり得る。抗体は、任意の好適な生物学的供給源、例えば、ネズミ科、ラット、ヒツジおよびイヌ科から単離することができる。

【0131】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体を指す。各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して向けられているので、モノクローナル抗体は、高度に特異的である。抗体は、例えば、放射性同位体、検出可能な生成物を生成する酵素、蛍光タンパク質等で検出可能に標識され得る。抗体は、他の部分、例えば、特異的結合対のメンバー、例えば、ビオチン（ビオチン－アビジン特異的結合対のメンバー）等にさらにコンジュゲートされ得る。また、抗体は、非限定的に、ポリスチレンプレートまたはビーズ等を含む固体支持体に結合され得る。

【0132】

モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知のハイブリドーマ技術または組換えDNA

10

20

30

40

50

法を使用して生成され得る。ハイブリドーマは、抗体産生リンパ球と抗体非産生がん細胞、通常、骨髄腫またはリンパ腫との融合から研究室で産生される細胞である。ハイブリドーマは増殖し、特異的モノクローナル抗体の連続試料を産生する。抗体を生成または選択するための代替の技術には、リンパ球の目的の抗原への *in vitro* 曝露、および細胞、ファージまたは同様の系における抗体ディスプレイライブラリーのスクリーニングが含まれる。

【0133】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体を含むことを意図する。本明細書で開示するヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、*in vitro* でランダムまたは部位特異的変異誘発によって、または *in vivo* で体細胞変異によって導入された変異）を含み得る。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、別の哺乳動物種、例えば、マウスの生殖細胞系列に由来する CDR 配列がヒトフレームワーク配列上にグラフトされた抗体を含むことを意図しない。したがって、本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、タンパク質の実質的にどの部分（例えば、CDR、フレームワーク、C_L、C_H ドメイン（例えば、C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}）、ヒンジ、（V_L、V_H））も、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、少ない配列変化または変動のみを伴う抗体を指す。同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジー等）、げっ歯類（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター等）および他の哺乳動物指定の抗体は、そのような種、亜属、属、亜科、科特異的抗体を指定する。さらに、キメラ抗体は、上記の任意の組合せを含む。そのような変化または変動は、必要に応じて、非改変抗体と比較してヒトまたは他の種において免疫原性を保持または低減する。したがって、ヒト抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体とは別個である。ヒト抗体は、機能的に再配置されたヒト免疫グロブリン（例えば、重鎖および／または軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物または原核細胞もしくは真核細胞によって産生され得ることが指摘される。さらに、ヒト抗体が単鎖抗体である場合、それは、ネイティブヒト抗体で見られないリンカーペプチドを含み得る。例えば、F_v は、リンカーペプチド、例えば、2～約8個のグリシンまたは他のアミノ酸残基を含む場合があり、それは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域とを接続する。そのようなリンカーペプチドは、ヒト起源のものと考えられる。

【0134】

本明細書で使用される場合、抗体が、ヒト免疫グロブリン配列を使用する系から、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスを免疫することによって、またはヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって得られる場合、ヒト抗体は特定の生殖細胞系列配列に「由来」する。ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に「由来」するヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較することによってそれ自体特定することができる。典型的に、選択されたヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一であり、他の種の生殖細胞系列免疫グロブリンアミノ酸配列（例えば、ネズミ科生殖細胞系列配列）と比較した場合、ヒト抗体をヒト抗体であると特定するアミノ酸残基を含有する。ある特定の場合、ヒト抗体は、生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とアミノ酸配列において少なくとも95%、またはさらに、少なくとも96%、97%、98%もしくは99%同一であり得る。典型的に、特定のヒト生殖細胞系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と10個以下のアミノ酸の相違を示す。ある特定の場合、ヒト抗体は、生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と5個以下、またはさらに、4、3、2もしくは1個以下のアミノ酸の相違を示し得る。

【0135】

「ヒトモノクローナル抗体」とは、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可

変領域および定常領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。また、この用語は、組換えヒト抗体を意図する。これらの抗体を製造する方法は、本明細書で説明される。

【0136】

「組換えヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、組換え手段によって調製、発現、作出または単離された全てのヒト抗体、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックまたは染色体導入動物（例えば、マウス）またはそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体；抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体；組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体；およびヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングに關与する他の任意の手段によって調製、発現、作出または単離された抗体を含む。そのような組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、*in vitro*変異誘発（またはヒトIg配列についてトランスジェニックな動物が使用される場合、*in vivo*体細胞変異誘発）に供される場合があり、したがって、組換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列VHおよびVL配列に由来し、かつ関連している一方、*in vivo*でヒト抗体生殖細胞系列レパートリー内に天然に存在しない場合がある配列である。これらの抗体を製造する方法は、本明細書で説明される。

10

【0137】

本明細書で使用される場合、キメラ抗体は、異なる種に属する抗体可変領域および定常領域遺伝子から、典型的に遺伝子工学によって、軽鎖および重鎖遺伝子が構築された抗体である。

20

【0138】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」または「ヒト化免疫グロブリン」という用語は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限配列を含有するヒト／非ヒトキメラ抗体を指す。ほとんどの部分について、ヒト化抗体は、レシピエントの可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種、例えば、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類の可変領域（ドナー抗体）からの残基によって置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ヒト化抗体は、レシピエント抗体で、またはドナー抗体で見出されない残基を含み得る。また、ヒト化抗体は、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分；フレームワーク領域、定常領域またはCDR中に、ヒト抗体からの、対応して位置付けられるアミノ酸で置換された1つまたは複数のアミノ酸を含有する非ヒト抗体を含み得る。一般的に、ヒト化抗体は、同じ抗体の非ヒト化バージョンと比較して、ヒト宿主において免疫応答の低減をもたらすことが予測される。ヒト化抗体は、抗原結合または他の抗体機能に実質的に影響を有しない保存的アミノ酸置換を有し得る。保存的置換分類には、グリシンーアラニン、バリンーロイシンーイソロイシン、フェニルアラニンーチロシン、リシンーアルギニン、アラニンーバリン、セリントレオニンおよびアスパラギンーグルタミンが含まれる。

30

【0139】

「ポリクローナル抗体」または「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、本明細書で使用される場合、様々なB細胞系に由来する抗体の調製物を指す。それらは、特定の抗原に対して分泌された免疫グロブリン分子の混合物であり、各々は異なるエピトープを認識する。

40

【0140】

本明細書で使用される場合、「抗体誘導體」という用語は、アミノ酸のうちの1つまたは複数、例えば、抗体を第2の分子に連結するために、アルキル化、ペグ化、アシル化、エステル形成またはアミド形成などによって化学改変されている全長抗体または抗体の断片を含む。これは、ペグ化抗体、システインーペグ化抗体およびそのバリエーションを含むが、これらに限定されない。

50

【0141】

本明細書で使用される場合、「標識」という用語は、「標識された」組成物を生成するために、検出すべき組成物に直接的または間接的にコンジュゲートされた直接的または間接的検出可能化合物または組成物、例えば、N末端ヒスチジンタグ（N-His）、磁氣的旋光同位体、例えば、 ^{115}Sn 、 ^{117}Sn および ^{119}Sn 、非放射性同位体、例えば、 ^{13}C および ^{15}N 、ポリヌクレオチドまたはタンパク質、例えば、抗体を意図する。また、この用語は、挿入された配列の発現に際してシグナルを提供する、ポリヌクレオチドにコンジュゲートされた配列、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP: green fluorescent protein）等を含む。標識は、それ自体で検出可能であってもよく（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学変化を触媒してもよい。標識は、小スケール検出に好適であっても、ハイスループットスクリーニングにより好適であってもよい。よって、好適な標識には、磁氣的旋光同位体、非放射性同位体、放射性同位体、蛍光色素、化学発光化合物、染料、および酵素を含むタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。標識は単純に検出してもよく、標識は定量してもよい。単純に検出される応答は、一般的に、存在が単に確認される応答を含み、一方で、定量される応答は、一般的に、定量可能な（例えば、数字で報告可能な）値、例えば、強度、分極および／または他の特性を有する応答を含む。発光または蛍光アッセイにおいて、検出可能な応答は、実際に結合に参与するアッセイ構成成分と会合した発光団または蛍光団を使用して直接的に、または別の（例えば、レポーターまたはインジケーター）構成成分と会合した発光団または蛍光団を使用して間接的に生成され得る。シグナルを産生する発光標識の例には、生物発光および化学発光が含まれるが、これらに限定されない。検出可能な発光応答は、一般的に、発光シグナルの変化、または発光シグナルの発生を含む。アッセイ構成成分を発光標識するために好適な方法および発光団は、当該技術分野で公知であり、例えば、Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th ed) で説明されている。発光プローブの例には、エクオリンおよびルシフェラーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【0142】

本明細書で使用される場合、「イムノコンジュゲート」という用語は、第2の作用物質、例えば、細胞傷害剤、検出可能な剤、放射性剤、ターゲティング剤、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、半合成抗体または多重特異性抗体と会合した、または連結した抗体または抗体誘導体を含む。

【0143】

好適な蛍光標識の例には、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルークマリン、ピレン、マラカイトグリーン（Malacite green）、スチルベン、ルシファーイエロー、Cascade Blue（商標）およびテキサスレッドが含まれるが、これらに限定されない。他の好適な光学染料は、Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th ed.) で説明されている。

【0144】

別の態様では、蛍光標識は、細胞表面マーカーのように、細胞もしくは組織内、または細胞表面もしくは組織表面上に存在している細胞構成成分への共有結合を促進するように官能化される。好適な官能基には、イソチオシアネート基、アミノ基、ハロアセチル基、マレイミド、スクシンイミジルエステルおよびスルホニルハライドが含まれるが、これらに限定されず、これらの全ては、蛍光標識を第2の分子に結合するために使用され得る。蛍光標識の官能基の選択は、リンカー、作用物質、マーカーまたは第2の標識剤のいずれかへの結合部位に依存する。

【0145】

「真核細胞」は、モネラ界を除く全ての生命界を含む。それらは、膜結合核によって容易に区別することができる。動物、植物、真菌および原生生物は、真核生物、または細胞が内部膜および細胞骨格によって複合体構造に組織化されている生物である。最も特徴的な膜結合構造は、核である。特に列挙しない限り、「宿主」という用語は、例えば、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む真核生物宿主を含む。真核細胞または宿主の非限定的な例には、サル類、ウシ属、ブタ、ネズミ科、ラット、鳥類、爬虫類およびヒトが含まれる。

【0146】

「原核細胞」は、通常、核または他の任意の膜結合オルガネラを欠き、2つのドメイン、細菌および古細菌に分けられる。染色体DNAに加えて、これらの細胞は、エピソームと呼ばれる環状ループ内の遺伝子情報も含有し得る。細菌細胞は、非常に小さく、およそ動物ミトコンドリアのサイズ（直径約1～2 μmおよび10 μmの長さ）である。原核細胞は、3つの主要な形状：桿状、球状およびらせん状を特徴とする。真核生物のような精巧な複製プロセスを経る代わりに、細菌細胞は、二分裂によって分裂する。例には、*Bacillus* 細菌、*E. coli* 細菌および *Salmonella* 細菌が含まれるが、これらに限定されない。

【0147】

「ネイティブ」または「天然」抗原は、天然の生物学的供給源から単離され、かつ対象において抗原受容体、特に、T細胞抗原受容体（TCR: T cell antigen receptor）に特異的に結合し得る、エピトープを含有するポリペプチド、タンパク質または断片である。

【0148】

「抗原」および「抗原性」という用語は、抗体によって認識される能力、またはそうでなければ、抗体ーリガンド対のメンバーとして作用する能力を有する分子を指す。「特異的結合」とは、抗原と免疫グロブリン重鎖および軽鎖の可変領域との相互作用を指す。抗体ー抗原結合は、*in vivo* または *in vitro* で起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含む巨大分子は、抗原として作用する潜在性を有することを理解する。当業者は、抗体リガンドとして作用する潜在性を有するタンパク質をコードする核酸は、必然的に抗原をコードすることをさらに理解する。当業者は、抗原は、全長分子に限定されず、部分的分子も含み得ることをさらに理解する。「抗原性」という用語は、抗原の特性を有する分子についての形容詞的言及である。この用語は、免疫原性である物質、すなわち、免疫原、および免疫学的不応答性またはアネルギーを誘導する物質、すなわち、アナジェン（*anergen*）を包含する。

【0149】

「変更された抗原」とは、対応する野生型抗原の一次配列とは異なる一次配列を有する抗原である。変更された抗原は、合成または組換え法によって製造することができ、例えば、リン酸化；グリコシル化；架橋結合；アシル化；タンパク質分解切断；抗体分子、膜分子または他のリガンドへの連結によって、翻訳中または翻訳後に差次的に改変される抗原性ペプチドを含むが、これらに限定されない。（*Ferguson et al.* (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57: 285-320）。本明細書で開示する合成抗原または変更された抗原は、天然エピトープと同じTCRに結合することを意図する。

【0150】

「免疫応答」とは、リンパ球の外来性物質への抗原特異的応答を広範に指す。「免疫原」および「免疫原性」という用語は、免疫応答を誘導する能力を有する分子を指す。全ての免疫原は抗原であるが、しかしながら、全ての抗原が免疫原性というわけではない。本明細書で開示する免疫応答は、体液性（抗体活性を介する）または細胞媒介性（T細胞活性化を介する）であり得る。応答は、*in vivo* または *in vitro* で起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含む様々な巨大分子は、免疫原性である潜在性を有することを理解する。当業者は、免疫応答を誘導するこ

10

20

30

40

50

とができる分子をコードする核酸は、必然的に免疫原をコードすることをさらに理解する。当業者は、免疫原は、全長分子に限定されず、部分的分子を含み得ることをさらに理解する。

【0151】

「受動免疫」という用語は、抗体の移入を通した1つの対象から別の対象への免疫の移入を指す。受動免疫は、母体の抗体が胎児に移入した場合、天然に起こり得る。また、受動免疫は、抗体組成物が非免疫対象に投与された場合、人工的に起こり得る。抗体ドナーおよびレシピエントは、ヒトまたは非ヒト対象であり得る。実施形態に依存して、抗体は、ポリクローナルであっても、モノクローナルであってもよく、*in vitro*で生成しても、*in vivo*で生成してもよく、精製しても、部分精製しても、非精製であってもよい。本明細書で説明する一部の実施形態では、受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識するか、またはそれに結合する抗体または抗原結合性断片の投与を通して、それを必要とする対象に与えられる。一部の実施形態では、受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識するか、またはそれに結合する抗体または抗原結合性断片をコードする単離された、または組換えポリヌクレオチドの投与を通して与えられる。

【0152】

本開示の文脈において、「リガンド」とは、ポリペプチドである。一態様では、「リガンド」という用語は、本明細書で使用される場合、別の分子上の特定の部位に結合する任意の分子を指す。換言すれば、リガンドは、免疫エフェクター細胞またはタンパク質に対する抗体またはタンパク質に対するDNAとの反応においてそのタンパク質の特異性を付与する。一態様では、免疫エフェクター細胞上の相補的結合部位と直接的に組み合わせるものは、タンパク質内のリガンド部位である。

【0153】

本明細書で使用される場合、「対象において免疫応答を誘導すること」という用語は、当該技術分野で十分に理解されている用語であり、対象への抗原（またはエピトープ）の導入前の免疫応答（もしあれば）と比較して、対象への抗原（またはエピトープ）の導入後に抗原（またはエピトープ）への免疫応答における少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約100倍、少なくとも約500倍もしくは少なくとも約1000倍またはそれよりも大きな増加が、検出または測定され得ることを意図する。抗原（またはエピトープ）への免疫応答には、抗原特異的（またはエピトープ特異的）抗体の産生、および表面上に抗原（またはエピトープ）に特異的に結合する分子を発現する免疫細胞の産生が含まれるが、これらに限定されない。所与の抗原（またはエピトープ）への免疫応答が誘導されたかどうかを決定する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、抗原特異的抗体は、非限定的に、例えば、試料中の抗体の固定化抗原（またはエピトープ）への結合が、検出可能に標識された二次抗体（例えば、酵素標識マウス抗ヒトIg抗体）で検出されるELISAを含む、当該技術分野で公知の様々なイムノアッセイのいずれかを使用して検出することができる。

【0154】

本明細書で使用される場合、互換的に使用される「固相支持体」または「固体支持体」は、特定のタイプの支持体に限定されない。むしろ、多数の支持体が使用可能であり、当業者に公知である。固相支持体には、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、アルミナゲルが含まれる。また、本明細書で使用される場合、「固体支持体」には、合成抗原提示マトリックス、細胞およびリポソームが含まれる。好適な固相支持体は、所望の最終使用、および様々なプロトコールについての好適性に基づいて選択され得る。例えば、ペプチド合成について、固相支持体は、樹脂、例えば、ポリスチレン（例えば、Bachem Inc.、Peninsula Laboratories等から得られるPAM-樹脂）、POLYHIPE（登録商標）樹脂（Aminotech、Canadaから得られる）、ポリアミド樹脂（Peninsula Laboratoriesから得られる）、ポリエチレングリコールとグラフトしたポリスチレン樹脂（TentaGel（登録商標）、Rapp Polymere、

10

20

30

40

50

Tubingen, Germany) またはポリジメチルアクリルアミド樹脂 (Milligen/Bioscience, Calif. から得られる) を指し得る。

【0155】

固相支持体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩ならびにマグネタイトが含まれる。担体の性質は、ある程度まで可溶性、または不溶性のいずれかであり得る。支持体材料は、結合した分子がポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは抗体に結合することができる限り、事実上、任意の可能な構造的配置を有し得る。したがって、支持体配置は、ビーズにおけるように球状、または試験管の内側表面または棒の外部表面におけるように円柱状であり得る。あるいは、表面は、平面、例えば、シート、試験紙等、またはあるいはポリスチレンビーズであり得る。当業者は、抗体または抗原を結合させるための多くの他の好適な担体を知っているか、またはルーチン実験の使用によってこれを確認することができる。

10

【0156】

「免疫応答をモジュレートする」という用語は、免疫応答を誘導すること（増加させること、誘発すること）、および免疫応答を低減すること（抑制すること）を含む。免疫調節法（またはプロトコール）は、対象において免疫応答をモジュレートする方法である。本開示を行うための様式

I. バイオフィルム構造および疾患

【0157】

慢性および再発性細菌感染症を維持する細菌のリザーバーは、表面に付着し、かつこの状態では宿主免疫系によるクリアランスおよび抗微生物薬によるクリアランスに抵抗し得る細菌の群集であるバイオフィルム内に常在する。実際に、バイオフィルム状態内の細菌は、典型的に、自由生活状態または浮遊状態 (planktonic state) の同じ細菌よりも抗生物質に対して1000倍を超える抵抗性である。Ceri et al. (1999) J Clin Microbiol. 37 (6): 1771-6。バイオフィルム細菌のクリアランスに抵抗する能力は、大部分は、環境ハザードへの物理的障壁として作用し、かつこの抵抗性状態を増強するために代謝を制限する変更された生理機能のための条件を作り出す半浸透性の自作マトリックスまたは細胞外高分子物質 (EPS) によるものである。EPSの構成要素は、各細菌に特異的であり、タンパク質、多糖、脂質および核酸を含むが、EPSの性質は、生産的に（例えば、代謝パートナーとして）相互作用するために全体として細菌属に十分に資するものである必要がある。この目的のために、いくつかの最近の発見により、全ての真正細菌に共通する基礎をなす普遍的EPS構造の可能性がもたらされた。Whitchurchおよび共同研究者ら (Whitchurch et al. (2002) Science. 295 (5559)) は、細胞外DNA (eDNA) が共通EPS構成要素であること、および細菌のDNアーゼによる処理はバイオフィルム形成を妨げるのに十分であることを示した。この結果は複数の属について再現された一方で、eDNAがバイオフィルムの生活環全体を通してバイオフィルム内で明らかであるという事実にもかかわらず、DNアーゼの使用は、バイオフィルム播種後、1日または2日より長く現存するバイオフィルムを処置することができなかった。別に、出願人らは、以前に、全ての真正細菌に共通する唯一の核様体タンパク質 (NAP: nucleoid associated protein) のファミリーであるDNABIIタンパク質を、eDNA依存性EPSの必要構成成分であると特定した。実際に、DNABIIタンパク質に対して向けられた抗体は、バルク培地からDNABIIタンパク質を滴定し、それによって、DNABIIタンパク質の平衡をeDNA結合状態から非結合状態にシフトさせ、このことは今までに試験した全ての細菌バイオフィルムの破局的崩壊をもたらし、これには混合種バイオフィルムを含む。Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4 (6): 625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8 (6): e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96 (6):

20

30

40

50

1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32 (2): 118-30; Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12 (4): 384-9; Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10: 33-44。重要なことに、DNアーゼとは異なり、DNABIIタンパク質に対して向けられた抗体による処理は、バイオフィルム発達の全ての段階において有効であり、このことは、eDNA依存性EPSがバイオフィルムの時期にかかわらず重要構造であることを実証する。Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93 (6): 1246-58。eDNAおよびDNABIIファミリーのメンバーがEPSの必須構成成分であることが分かっているにもかかわらず、完全なEPS構造の理解ははっきりしないことが判明しており、DNABIIタンパク質およびDNAは、*in vitro*で機能的EPS構造を再現するのに不十分である。出願人は、複数のヒト病原体について、バイオフィルムが成熟するにつれて、eDNA依存性EPSは、DNABIIタンパク質およびポリアミンの両方に依存し、そのため、eDNAは、B-DNAからZ-DNAコンフォメーションにシフトすることを本明細書で説明している。この後者の結果は、DNアーゼが成熟バイオフィルムを破壊することができなかったことを説明する可能性があるため、それは特に興味深く、ヌクレアーゼは、より古典的なB型のDNAのみを切断する。

10

細胞内細菌核様体

【0158】

細菌内のDNAは、高度に構造化されており、DNA複製、修復、転写および組換えを含む全ての型の核酸プロセスの調節を促進する。真核細胞とは異なり、細菌は、ヒストンを欠く。その代わりに、細菌DNAは、一部には、核様体タンパク質(NAP)と呼ばれるあるクラスのタンパク質によって構造化されている。NAPは、集合的に、DNAに結合して、機能的構造を作り出す。Dillon et al. (2010) Nat Rev Microbiol. 8 (3): 185-95。属全体にわたり存在する多数のNAPメンバーの中で、DNABIIファミリーのみが、全ての真正細菌の中で遍在性である。Dey et al. (2017) Mol Phylogenet Evol. 107: 356-66。DNABIIファミリーのタンパク質は、二量体(種によってホモ二量体またはヘテロ二量体)として機能し、ヒストン様タンパク質HUおよびIHFを含む。HUは、二本鎖DNA(dsDNA: double-stranded DNA)に弱く、かつ非特異的に結合し、それを曲げるが、事前に曲げられた、または構造化されたdsDNA3についてかなり高い親和性を有する。IHFは、HUと同様に、事前に曲げられた／構造化DNAについて強い優先度でDNAに結合し、それを曲げる。HUとは異なり、IHFは、プロテオバクテリアによってのみ発現され、また特異的DNAコンセンサス配列について優先度を有する。Swinger et al. (2004) Curr Opin Struct Biol. 14 (1): 28-35。

20

30

細胞外細菌核様体(nucleoi)

【0159】

細胞外DNA(eDNA)は、「形質転換原理」はDNAの結果であるという発見以来、生物学的役割を有することが公知である。Avery et al. (1944) J Exp Med. 79 (2): 137-58。また、実際に、eDNAは、細菌バイオフィルムの細胞外マトリックス(細胞外高分子物質、EPS)にとって重要である。Gun et al. (2016) J Biol Chem. 291 (24): 12538-46。しかしながら、バイオフィルムeDNA構造およびeDNA機能のためのその構造の重要性は、今までのところ、調査されていない。

40

慢性および再発性感染症は、細菌バイオフィルムの結果である

【0160】

バイオフィルムは、細胞間連通および輸送系によって浮遊性細菌とはさらに区別されるが、それらの最も特有の特色は、半浸透性障壁として作用することおよび変更／緩慢化された代謝のための環境を作り出すことの両方により常在バイオフィルム細菌を保護するそ

50

これらの自作EPSであり；実際に、バイオフィルム細菌は、それらの浮遊性相対物よりも抗生物質に対して1000倍を超える抵抗性である。Ceri et al. (1999) J Clin Microbiol. 37(6):1771-6。興味深いことに、各細菌のEPSは、特徴的であり、様々なタンパク質、脂質、多糖および核酸からなる。Gunn et al. (2016) J Biol Chem. 291(24):12538-46。しかしながら、バイオフィルムが単一の種からなり得る一方で、一般的に慢性感染症において、および常に環境において、それらは多数の属からなり、よって、生産的に相互作用することができる必要がある（例えば、特定の代謝パートナーとの共凝集 Stacy et al. (2016) Nat Rev Microbiol. 14(2):93-105; Wolcott et al. (2013) Clin Microbiol Infect. 19(2):107-12)。この群集概念は、様々なEPS組成にもかかわらず、各EPSは、多様な細菌がバイオフィルム内で相互作用することを可能にするように十分に収容性でなければならないことを意味し、かつさらに、バイオフィルムEPSは、普遍的な基礎をなす構造を有するようであることを示唆する。eDNA依存性EPSは、普遍的な基礎をなすアーキテクチャの質を有する【0161】

ヒトおよび生態学的属の両方からの細菌バイオフィルムと関連付けられるeDNAを、多数のグループが調べ、スキャフォールド構造を観察した(図1A)。Jurcisek et al. (2017) Proc Natl Acad Sci U S A. 114(32):E6632-E41; Sena-Velez et al. (2016) PLoS One. 11(6):e0156695; Wang et al. (2015) Environ Microbiol Rep. 7(2):330-40。Whitchurchおよび共同研究者らは、P. aeruginosaバイオフィルムが、デオキシヌクレアーゼI(DNアーゼ)処理によって妨げられ得ることを最初に示し(Whitchurch et al. (2002) Science. 295(5559))、これは、eDNAが、EPSの重要な構造構成成分であることを示す。DNアーゼは、多くの属において初期バイオフィルム形成を阻害し得る(Frederiksen et al. (2006) Acta Paediatr. 95(9):1070-4; Martins et al. (2012) Mycoses. 55(1):80-5; Hymes et al. (2013) J Infect Dis. 207(10):1491-7)が、バイオフィルムが成熟するにつれて、eDNAが明らかに存続しているという事実にもかかわらず、バイオフィルムは経時的にDNアーゼに不応性になる。Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Hall-Stoodley et al. (2008) BMC Microbiol. 8:173; Izano et al. (2009) Microb Pathog. 46(4):207-13; Kaplan et al. (2012) J Antibiot (Tokyo). 65(2):73-7; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Tetz et al. (2010) DNA Cell Biol. 29(8):399-405。この成果は多くの場合、eDNAがEPSの構造的完全性にもはや重要でないことを意味すると解釈されたが、出願人らは、eDNAが存続するだけでなく、それが主要な基礎をなすEPS構造になることを示した。Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58。DNABIIファミリーのタンパク質は、バイオフィルムeDNA-スキャフォールド化EPSの構造的完全性を維持する要である

10

20

30

40

50

【0162】

出願人らはこれまで、遍在性DNABIIタンパク質は、eDNAの構造的構成要素であり、おそらく他のNAPは構造的構成要素ではないこと(Devaraj et al. (2017) Microbiology open.)、および、一旦除去すると、eDNA構造が破壊されることを示した。Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4 (6) : 625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8 (6) : e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96 (6) : 1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32 (2) : 118-30。実際に、DNABIIタンパク質は、in vivoで形成されるバイオフィルムのeDNAスキャフォールドの頂点(事前に曲げられたDNA)に特異的に結合することが分かり、一方で、DNABIIタンパク質に対して向けられた抗体は、eDNA-スキャフォールド化EPSの構造を傷つけるのに十分であり、結果として、バイオフィルム成熟にかかわらず、出願人らが調査したどの種についても単一種および多種バイオフィルムの両方の破局的崩壊を引き起こす(Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4 (6) : 625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8 (6) : e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96 (6) : 1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32 (2) : 118-30)。Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93 (6) : 1246-58。この破壊は、常在細菌を放出して浮遊性にし、したがって、抗微生物薬感受性および免疫感受性状態にし(Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4 (6) : 625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8 (6) : e67629; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93 (6) : 1246-58)、このことは、バイオフィルム構造内のこのファミリーのタンパク質の重要性および普遍性を実証する。DNABIIファミリーのDNAとの公知の相互作用を仮定すれば、出願人らがDNAとDNABIIタンパク質だけで細菌バイオフィルムにおいて観察される3次元スキャフォールド様構造を再現する条件を作り出すことができないことは予想外であった。

ポリアミンは、細胞内外で遍在性であり、バイオフィルムのeDNA-スキャフォールド化EPS構造に必要とされる

【0163】

ポリアミンは、典型的に、中性pHで正に荷電し(塩基性)、かつ一般にアミノ酸の脱炭酸によって派生する多数の第1級アミンを含有する短い有機分子である(図1B)。Michael et al. (2016) Biochem J. 473 (15) : 2315-29。ポリアミンは、天然で遍在性であり、細胞内および細胞外の両方でmM濃度の高さで見出され(Tabor et al. (1985) Microbiol Rev. 49 (1) : 81-99)、スベルミジン、スベルミンおよびプトレシンは、最も豊富である。ポリアミンは、細菌生理機能において多数のプロセスに関与するが、それらは、おそらく、5つの理由のためにeDNA-スキャフォールド化EPSにとって最も重要である。第1に、それらは、DNAに結合し、リン酸骨格の負電荷を中和し、結果として、DNA構造を変更する。Bachrach et al. (2005) Curr Protein Pept Sci. 6 (6) : 559-66; Pasini et al. (2014) Amino Acids. 46 (3) : 595-603。第2に、ポリアミンは、低濃度(mM)でタンパク質-DNA相互作用を促進する傾向がある一方で、それらは、より高濃度(mM)では干渉する傾向があるが、唯一の例外は、DNAに厚い繊維を形成させるDNABII-DNA相互作用である。Sarkar et al. (2009) Biochemistry. 48 (4) : 667-75; Sarkar et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35 (3) : 951

61. 第3に、ポリアミン合成は、バイオフィーム形成中に誘導されること、およびこれらの効果の一部は、細胞外で起こること（今まで細菌膜について調べられたのみであるが）が分かっている。Wilton et al. (2015) Antimicrob Agents Chemother. 60(1):544-53. 第4に、ポリアミンとDNAとの混合物を可視化する原子間力顕微鏡法 (AFM: atomic force microscopy) による実験により、バイオフィームeDNAスキャフォールドと高度に類似する構造が明らかになっている (図1C)。最後に、ポリアミンは、生理的濃度 (100 μM) で傾向配列 (prone sequence) においてネイティブB型DNAのZ型DNAへの変換を誘導し得る。Thomas et al. (1986) Nucleic Acids Res. 14(16):6721-33; Thomas et al. (1988) J Mol Biol. 201(2):463-7.

B-DNAのZ-DNAへの変換は、eDNA-スキャフォールド化EPSをヌクレアーゼ抵抗性にし、安定な構造材料を作り出すための新規手段であり得る

【0164】

B-DNAおよびZ-DNAは、dsDNAの、平衡で存在する別個のコンフォメーションであり、B-DNAは、ほとんどの生理的条件下で優勢である。交互のプリンおよびピリミジン（特にdGdC）は、高塩（モル濃度の一価または二価カチオン）において、または負の超らせん下において、よりZ-DNAとして存在する傾向がある。Pohl et al. (1983) Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 47 Pt 1:113-7; Pohl et al. (1986) Proc Natl Acad Sci U S A. 83(14):4983-7. 後者の場合、Z-DNAを形成する傾向のある領域は、負の超らせんが一過性に誘導される場合、転写中に一時的にB-DNAの隣に並置され得る。Rahmouni et al. (1992) Mol Microbiol. 6(5):569-72. B-DNA塩基は右巻きヘリックス (10 bp/ターン) を採用するが、Z-DNAは左巻きヘリックス (12 bp/ターン) を形成する。Jovin et al. (1987) Ann Rev Phys Chem. 38:521-60. B-DNAは2つの溝（主溝および副溝）を有し、ほとんどの相互作用するタンパク質は、より大きなサイズのために主溝を認識/結合し、各ヌクレオチド塩基の水素結合ドナーおよびアクセプターを識別する。対照的に、Z-DNAでは主溝は非存在であり、それらの結合接触のほとんどは、凸面で見出される。Jovin et al. (1987) Ann Rev Phys Chem. 38:521-60. Z-DNAは、B-DNAの副溝に対応する単一の溝を所有する。興味深いことに、DNABIIタンパク質は、副溝に結合するほんの少数のDNA結合タンパク質のうちの1つであり (Kim et al. (2014) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 70(Pt 12):3273-89)、それらがZ-DNAに結合し得ることを示唆する。eDNAのB-DNAからZ-DNAへのシフトは、eDNA-スキャフォールド化EPSの4つの観察と一致する。第1に、Z-DNAへのシフトは、バイオフィームEPSに存在する条件下で起こり；傾向配列は、生理的濃度 (100 mM) の一部のポリアミン（スベルミジンおよびスベルミン）の存在下でZ-DNAにシフトする。第2に、Z-DNAは、凝集し、繊維を形成する傾向がある。Chaires et al. (1988) J Biomol Struct Dyn. 5(6):1187-207. Z-DNA骨格中のホスフェートは、B-DNA中のホスフェートよりも緊密にまとめられるので、リン酸骨格の強い負電荷の中和（例えば、ポリアミン）は、Z-DNAを好むが、DNA凝集にも許容的である。第3に、Z-DNAは、B-DNAよりも硬く、出願人らがeDNAスキャフォールドで観察している直線繊維と一致する、持続長のほぼ3倍の増加を有する (Thomas et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11(6):1919-30) (図1A、図2、図3)。そして最後に、Z-DNAは、ヌクレアーゼ抵抗性である。標準的なB-DNA結合タンパク質とは異なり、Z-DNAを認識する公知のタンパク質は、ほんの少数である (Athanasiadis et al. (2012) Semin

10

20

30

40

50

Cell Dev Biol. 23 (3) : 275-80) (しかしながら、Z-DNA 対 B-DNA 識別抗体は利用可能である)。Bergen et al. (1987) J Immunol. 139 (3) : 743-8。興味深いことに、Z-DNA 結合タンパク質は、相同であり、B-DNA よりも Z-DNA に 1,000~10,000 倍高い親和性で結合し (Herbert et al. (1996) J Biol Chem. 271 (20) : 11595-8)、傾向配列において Z-DNA コンフォメーションを誘導し、少なくとも ZBP1 の場合、微生物 DNA の存在を検出する自然免疫系の部分である。Athanasiadis et al. (2012) Semin Cell Dev Biol. 23 (3) : 275-80。重要なことに、ワトソクリック塩基対形成が保存されているという事実にもかかわらず、B-DNA を基質として使用するタンパク質 (例えば、ヌクレアーゼ) は、Z 配置の同じ DNA 配列を認識することができず、したがって、これに対して機能することができない。

II. 3 部構成のアプローチ

【0165】

出願人らは、以前に、eDNA-DNABII 相互作用は、バイオフィルム EPS の構造的完全性を維持するために働くこと (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4 (6) : 625-37; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8 (6) : e67629; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96 (6) : 1119-35; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32 (2) : 118-30; Devaraj et al. (2017) Microbiol open. ; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93 (6) : 1246-58)、およびこれらの相互作用を破壊することは、ex vivo で (Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12 (4) : 384-9)、および in vivo で (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4 (6) : 625-37; Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10 : 33-44; Freire et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32 (1) : 74-88) 正の成果をもたらすことを示した。DNA および DNABII タンパク質の両方が必要であることが示されたが、それらは、EPS スキャフォールドアーキテクチャを再現するために十分ではない。(1) eDNA、(2) DNABII タンパク質および新しく発見された EPS 構成要素 (3) ポリアミンの存在および相対的場所に依拠する、eDNA-DNABII 依存性 EPS の 3 部構成の eDNA 依存性スキャフォールド (TEDS: tripartite eDNA-dependent scaffold) が、本明細書で開示される。

【0166】

一態様では、出願人らは、eDNA および DNABII タンパク質に加えて、ポリアミンは、細菌バイオフィルムの TEDS 構造の必須構成成分であることを示す。第 2 に、出願人らは、合わせて、これらの構成成分のうちの全ての 3 つは、保護的バイオフィルム状態において細菌属の中で生産的相互作用を育成し得る普遍的 EPS の形成を促進することを示す。第 3 に、これらの構成成分を使用して、出願人らは、この普遍的構造を定義、かつ再現し、厚い二本鎖 DNA 繊維の観察と一致する証拠、ヌクレアーゼ抵抗性状態 (nuclease resistant state) の誘導を提供し、この状態が構造的エンドポイントとして Z-DNA を必要とするかどうかを実証する。最後に、このことは、介入のための標的として TEDS 構造それ自体に焦点を当てる診断および治療介入を提供する。

A. ポリアミン

ポリアミンは DNABII タンパク質と共同して機能して、eDNA スキャフォールドのアセンブリーを方向付ける

【0167】

NTHIにより引き起こされた急性中耳炎のチンチラモデルは、ヒト疾患の過程および病態生理を忠実に再現し (Bakaletz et al., (2009) Expert Rev Vaccines. 8 (8): 1063-82)、中耳における不応性バイオフィルムに依存する。このモデルを使用して、出願人らは、以前に、DNABIIタンパク質がeDNAと会合し、それがeDNA鎖の頂点に局在すること (図1A) (Goodman et al., (2011) Mucosal Immunol. 4 (6): 625-37)、およびこれらのeDNA鎖は、AFMによってDNAで可視化されたポリアミンに著しく類似しているようであること (図1C) を示した。Iacomino et al., (2011) Biomacromolecules. 12 (4): 1178-86。DNABIIタンパク質は、*in vitro*でmM濃度のスペルミジンの存在下においてDNAに結合し (図2B)、このことから、バイオフィルムeDNAスキャフォールド構造を産生するDNABIIタンパク質とポリアミンとの間の潜在的相互作用を調査した。出願人らは、固定包埋中耳粘膜バイオフィルムの切片について免疫蛍光共焦点レーザー走査顕微鏡法 (CLSM: confocal laser scanning microscopy) を行って、出願人らが以前にDNABIIタンパク質について観察したように、バイオフィルムEPS内のeDNAと相互作用するポリアミンを可視化した。免疫蛍光画像により、eDNAとポリアミンとは、粘膜バイオフィルム内に存在する繊維に沿って共局在し (図2A)、*in vitro*でDNABIIタンパク質およびポリアミンについてHudおよび共同研究者らによって観察されたものと視覚的に類似することが示される (Sarkar et al., (2009) Biochemistry. 48 (4): 667-75; Sarkar et al., (2007) Nucleic Acids Res. 35 (3): 951-61) (図2B)。

ポリアミン生合成は、バイオフィルム構造に必要とされる

【0168】

出願人らは、広範囲作用ポリアミン生合成阻害剤であるジシクロヘキシルアミン (DCHA: dicyclohexylamine) が、*in vitro*でNTHIバイオフィルムバイオジェネシスを変更し得るかどうかを調査した。DCHAは、プトレシンのスペルミジンへの変換を触媒する酵素であるスペルミジンシンターゼを阻害する (Paulin et al., (1986) Antonie Van Leeuwenhoek. 52 (6): 483-90; Pegg et al., (1983) FEBS Lett. 155 (2): 192-6)。DCHAはNTHI成長に影響を及ぼさなかったが (データは示さず)、LIVE/DEAD (登録商標) 染色したNTHIバイオフィルムのCLSM画像のCOMSTAT分析 (Heydorn et al., (2000) Microbiology. 146 (Pt 10): 2395-407) によって決定される通り、DCHAは、*in vitro*でバイオフィルムバイオジェネシスを阻害し、平均の厚さおよびバイオマスを減少させた (図3A)。さらに、出願人らは、DCHAが、初期バイオフィルム発達においてeDNAスキャフォールドの産生を阻害すること (図3B) を発見し、このことは、ポリアミン生合成がバイオフィルム形成に必要なステップであることを示唆する。これらの発見を支持して、出願人らは、免疫蛍光によって、DCHAが細胞外ポリアミンのバイオフィルムEPSへの組込みを低減すること (図3C)、およびバイオフィルムバイオジェネシスの欠陥は外因性スペルミジンの添加によって補われ得ること (図3A) を観察した。合わせて、これらの結果は、ポリアミンのEPSへの組込みは、強固なバイオフィルム成長の支持におけるeDNAスキャフォールドの発達および機能に重要であることを明らかにする。

抗DNABIIは、DNABII-ポリアミン依存性DNA構造を破壊する

【0169】

免疫蛍光を使用して、DNABIIタンパク質がEPSミメティック構造に組み込まれるかどうかを決定した。スペルミジン (300 μ M) およびHU (1 μ M) を、ゲノムDNA (2 μ g/ml) とインキュベートした。その後、EPSミメティック構造を、ナイーブ (対照) または抗DNABII IgG、蛍光二次抗体でプローブし、DAPIで染

色し、CLSMによって画像化した。DNABIIタンパク質は、EPS構造に完全に組み込まれた(図4A)。次に、EPSミメティック構造を形成させ、抗DNABII抗体で処理し、DAPIで染色し、CLSMによって画像化した。抗DNABII抗体による、DNABIIタンパク質のEPSミメティックからの隔離は、凝集構造の存在量およびサイズを劇的に低減し(図4B)、このことにより、DNABII組込み、およびDNA構造安定性のためのその重要性をさらに確認した。

カチオン交換体P11によるNTHIバイオフィルム破壊は、外因性DNABII(HU)およびスペルミジン添加によって妨げられ得る

【0170】

ホスホセルロース(P11)は、正荷電分子、例えば、ポリアミンおよびDNABIIタンパク質について高親和性を有する負荷電樹脂である。細菌バイオフィルム形成に対するこれらの分子のP11による隔離の効果を決定するために、出願人は、トランスウェル系を利用した。NTHI成長を基底側チャンバーで開始し、一方で、P11(1% w/v)を、播種時に頂端側チャンバーに添加した。16時間で、バイオフィルムを洗浄し、LIVE/DEAD(登録商標)で染色し、CLSMを使用して画像化し、COMSTATにより分析した。P11は、平均の厚さおよびバイオマスを有意に低減させた(図5)。P11によるカチオン枯渇がポリアミンおよび/またはDNABIIタンパク質を含んだかどうかを決定するために、基底側チャンバーにおいてNTHI成長を、1mMスペルミジンおよび1μM HUの外因性添加を伴って開始し、一方で、P11を頂端側チャンバーに1% w/vで添加した。スペルミジンおよびHUの両方は、バイオフィルマトリックスの構造構成成分に必要とされ、共に存在するときのみP11によるバイオフィルム破壊を妨げ(図5)；個々では、HUおよびスペルミジンは不十分であった(データは示さず)。

DNアーゼは、成熟病原性細菌バイオフィルムを破壊することができない

【0171】

出願人は、肺機能を改善するために嚢胞性線維症(CF)患者の管理のための標準療法と共に使用される組換えヒトDNアーゼであるPulmozyme(登録商標)の抗バイオフィルム効果を評価した。Yang et al. (2017) Paediatr Respir Rev. 21:65-7。播種時(バイオフィルム予防)または事前に形成されたバイオフィルム(バイオフィルム破壊)のいずれかに、Pulmozyme(登録商標)を添加した(図6)。結果として生じるバイオフィルムを、LIVE/DEAD(登録商標)で染色し、CLSMおよびCOMSTAT分析を使用して評価した。播種時のDNアーゼの添加は、非処理のバイオフィルムと比較して、NTHIおよびUPECバイオフィルムの平均の厚さおよびバイオマスの有意な低減をもたらした(図6)。しかしながら、DNアーゼは、成熟バイオフィルムを破壊することができず(図6)、このことは、バイオフィルムが発達するにつれてeDNAはヌクレアーゼ消化に対する感受性を失うことを示唆する。出願人は、バイオフィルムが成熟するにつれて、eDNAがヌクレアーゼから立体的に保護されること、および/またはeDNAがヌクレアーゼ消化に対して不応性になる新規の構造をとるかのいずれかであることを提案する。

DNABIIタンパク質およびポリアミンは、相乗的に相互作用してDNAにヌクレアーゼ抵抗性を与える

【0172】

抗DNABIIおよび抗スペルミジン抗体でプローブしたNTHIバイオフィルムの免疫蛍光は、ポリアミンがin vitro(図7A)およびin vivo(図7B)でDNABIIタンパク質と共に共局在することを示した。出願人は、DNABIIおよびポリアミンはeDNAと相乗的に相互作用して、成熟バイオフィルムにDNアーゼ抵抗性を与えると仮定した。in vitroでの相乗作用を試験するために、出願人は、HU(50または100nM)およびDNアーゼ(0.5ユニット)の存在下または非存在下でNTHIゲノムDNA(gDNA)をスペルミジン(10、20、50または100μM)とインキュベートした。アガロースゲル電気泳動およびUV照射によって分解を評

10

20

30

40

50

価した。スペルミジン（ $100\text{ }\mu\text{M}$ を超える）およびHU（ $1\text{ }\mu\text{M}$ ）は個々にgDNAを保護した一方で、混合した、より低レベルのスペルミジン（ $50\text{ }\mu\text{M}$ 未満）およびHU（ 100 nM 未満）はgDNA消化を相乗的に阻害し（図7）、ヌクレアーゼ抵抗性は、バイオフィルムマトリックス内のDNABIIタンパク質とポリアミンとの組合せのためであることを示唆した。次に、出願人らは、EPSミメティック構造がDNアーゼに抵抗性であるかどうかを試験することにした。HU（ $1\text{ }\mu\text{M}$ ）およびスペルミジン（ 300 mM ）を、gDNA（ $2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ）と40時間インキュベートして、EPSスキャフォールドミメティックを作製し、次にDNアーゼ（5ユニット）で処理した。CLSMによって示される通り、これらのDNABII-ポリアミン依存性DNA構造は、成熟バイオフィルムと同様に、DNアーゼに抵抗性であった（図7D）。

10

B. DNABII、ポリアミンおよびDNAは*in vitro*でZ-DNAを形成する【0173】

ポリアミンは、結合に際して、Z-DNA傾向配列を、B-Z平衡からZ-DNA配置にシフトさせ（Thomas et al. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14 (16): 6721-33; Thomas et al. (1988) *J Mol Biol.* 201 (2): 463-7）、一方で、DNABIIタンパク質は、DNAを曲げ、凝縮させる。出願人らの*in vitro* DNアーゼ分解アッセイ（図7）におけるHUおよびスペルミジン結合による阻害の相乗作用、およびZ-DNAのDNアーゼに抵抗する能力のために、出願人らは、EPSミメティック構造がZ-DNAを含有し得ると仮定した。EPS構造を、図4および図7のようにgDNAで16時間形成させた。抗Z-DNA抗体でプローブして免疫蛍光CLSMを行い、これにより、Z-DNAの存在を確認した（白色に留意されたい；図8A）。DNABIIタンパク質がB-Z平衡に影響を及ぼすかどうかを決定するために、出願人らは、円二色性（CD: *circular dichroism*）を使用した。HUおよびポリ（dGdC）DNA基質の混合物は、特徴的なZ-DNAスペクトルと類似する、B-DNA単独楕円率ピーク（ 250 および 280 nm ）の反転を示す（Jang et al. (2015) *Sci Rep.* 5: 9943）（図8B）。

20

細菌バイオフィルム中のEPSはZ-DNAおよびポリアミンを含有する

【0174】

Z-DNAとポリアミンとの会合をさらに特徴付けるために、出願人らは、40時間のバイオフィルムについて免疫蛍光を行った。示される細菌病原体のバイオフィルムを、抗DNABIIおよび抗スペルミジン、または抗Z-DNA抗体でプローブした後にCLSMによって画像化すると；Z-DNAが、細菌病原体の各々のバイオフィルムEPS内で検出された（図9）一方で、明らかに種間で階層が存在した（UPEC = *Staphylococcus epidermidis* < *K. pneumoniae* < NTHI）。全ての場合で、DNABII（HU）とスペルミジンとの間で広範な共局在が存在し（白色に留意されたい）、かつZ-DNAの存在量に対応した。出願人らは、NTHIおよびUPECバイオフィルムをバイオフィルム形成の様々な段階（24、40および90時間）でさらに調べ、スペルミジンおよびZ-DNAが、バイオフィルムの熟成と共にバイオフィルムEPS内で併せて増加することを観察した（図10）。これらのデータは、Z-DNAおよびスペルミジンが、実際に、バイオフィルムEPSの不可欠な部分であり、その構造およびDNアーゼ抵抗性状態に寄与するようであることを示唆する。

30

HU欠損NTHIはネイティブバイオフィルムを形成すること、ポリアミンを組み込むこと、およびB-DNAからZ-DNAへのシフトを誘導することができない

【0175】

ポリアミンは、*in vitro*（図7Aおよび図9）および*in vivo*（図7B）でNTHIバイオフィルムEPS内においてHUと共局在するので、出願人らは、NTHIバイオフィルムEPS内でのポリアミンおよびZ-DNAの組込みにおけるHUの役割を評価した。免疫蛍光により、HU欠損NTHI（*hupA*欠損；DHU）を、ポリアミンおよびZ-DNAの存在についてWT NTHIバイオフィルムと比較した。HUの欠

40

50

損は、WTと比較してバイオフィームEPS内のポリアミンおよびZ-DNAの有意な低減をもたらし（図11）、このことは、HUがNTHIバイオフィームEPS内でポリアミンおよびZ-DNAの存在に必要とされることを示唆する。

III. 診断方法および治療方法

【0176】

対象においてバイオフィームを処置するための方法であって、バイオフィームに感染した対象に、ポリアミンのバイオフィーム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる方法が、本明細書で提供される。一態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。別の態様では、作用物質は、DNAアーゼの非存在下で提供される。さらなる態様では、DNAアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では（In one particulate aspect）、投与されるDNAアーゼは、Pulmozymeである。一態様では、対象においてバイオフィームを処置するための方法は、バイオフィームに感染した対象に、ポリアミンのバイオフィーム中のDNAへの結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。別の態様では、作用物質は、DNAアーゼの非存在下で提供される。さらなる態様では、DNAアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNAアーゼは、Pulmozymeである。別の態様では、対象においてバイオフィームを処置するための方法は、バイオフィームに感染した対象に、ポリアミンのバイオフィーム中のDNAへの結合に干渉する有効量の2種またはそれよりも多くの種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNAアーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNAアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNAアーゼは、Pulmozymeである。さらなる態様では、対象においてバイオフィームを処置するための方法は、バイオフィームに感染した対象に、ポリアミンのバイオフィーム中のDNAへの結合に干渉する有効量の3種またはそれよりも多くの種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNAアーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNAアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNAアーゼは、Pulmozymeである。またさらなる態様では、対象においてバイオフィームを処置するための方法は、バイオフィームに感染した対象に、ポリアミンのバイオフィーム中のDNAへの結合に干渉する有効量の4種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、5種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、6種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、7種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、8種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、9種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、10種もしくはそれよりも多くの種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNAアーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNAアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNAアーゼは、Pulmozymeである。

【0177】

また、本開示は、バイオフィームを発生しやすい対象においてバイオフィームの形成を予防するための方法であって、対象に、ポリアミンのバイオフィーム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的

10

20

30

40

50

になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質が、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもなく、別の態様では、作用物質が、D N アーゼの非存在下で投与される、方法に関する。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。一態様では、バイオフィルムを発生しやすい対象においてバイオフィルムの形成を予防するための方法は、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもなく、別の態様では、作用物質は、D N アーゼの非存在下で投与される。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。別の態様では、バイオフィルムを発生しやすい対象においてバイオフィルムの形成を予防するための方法は、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の2種またはそれよりも多くの種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、D N アーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。さらなる態様では、バイオフィルムを発生しやすい対象においてバイオフィルムの形成を予防するための方法は、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の3種またはそれよりも多くの種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、D N アーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。またさらなる態様では、バイオフィルムを発生しやすい対象においてバイオフィルムの形成を予防するための方法は、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の4種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、5種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、6種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、7種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、8種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、9種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、10種もしくはそれよりも多くの種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、D N アーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。

【0178】

本開示は、それを必要とする対象において、バイオフィルムを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法であって、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の作用物質と、その生物の複製を阻害する作用物質とを投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質が、D N アーゼの非存在下で投与される、方法にさらに関する。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。一態様では、それを必要とする対象において、バイオフィルムを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法は、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか

10

20

30

40

50

、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。別の態様では、それを必要とする対象において、バイオフィルムを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法は、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の2種またはそれよりも多くの種の作用物質と、その生物の複製を阻害する作用物質とを投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNアーゼは、Pulmozymeである。さらなる態様では、それを必要とする対象において、バイオフィルムを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法は、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の3種またはそれよりも多くの種の作用物質と、その生物の複製を阻害する作用物質とを投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNアーゼは、Pulmozymeである。またさらなる態様では、それを必要とする対象において、バイオフィルムを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法は、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の4種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、5種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、6種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、7種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、8種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、9種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、10種もしくはそれよりも多くの種の作用物質と、その生物の複製を阻害する作用物質とを投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNアーゼは、Pulmozymeである。

【0179】

上記に説明する方法のうちのいずれかについて、ポリアミンは、プトレシン、スペルミン、カダベリン、1,3-ジアミノプロパンまたはスペルミジンの群から選択され得る。一実施形態では、上記に説明する方法について、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質は、tRNAである。別の実施形態では、作用物質は、ポリアミン合成の阻害剤、またはポリアミンのDNAへの結合を阻害する作用物質である。第2の実施形態では、作用物質は、ポリアミンアナログであるジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド、メチルグリオキサールビス[グアニルヒドラゾン](MGBG)、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプラチン、シスプラチン、ジシクロヘキシルアミン、任意のその誘導体、またはその塩を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、これらの化合物の誘導体は、同じ質量対電荷比を維持する。第3の実施形態では、作用物質は、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質、必要に応じて、カチオン交換樹脂、アミノポリカルボン酸、クラウンエーテル、アザクラウンまたはクリプタンドを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第4の実施形態では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質は、スルホネート、スルホプロピル、ホスホセルロース、P11ホスホセルロース、ヘパリン硫酸またはその誘導体もしくはアナログの群から選択される。一態様では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質の誘導体またはアナログは、正味の負電荷を有する樹脂である。第5の実施形態では、作用物質は、バイオフィルムまたはその局所環

10

20

30

40

50

境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する。第6の実施形態では、作用物質は、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、ポリクローナルまたはモノクローナル抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体は、Z型DNAよりもB型DNAを、少なくとも10倍の親和性／結合活性で認識する。第7の実施形態では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス（メチジウム）スペルミン、ダウノルピシン、TMPyP4、第四級ベンゾ[c]フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第8の実施形態では、作用物質は、クロロキンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、化合物の誘導体は、DNA塩基間に介入する能力を保持する。一態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でもその断片でもない。一態様では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質は、正味の負電荷を有する。別の態様では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質は、正味の中性電荷を有する。

【0180】

また、全身性エリテマトーデス（SLE）および／または嚢胞性線維症（CF）を患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与される、方法が、本明細書で提供される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNアーゼは、Pulmozymeである。全身性エリテマトーデス（SLE）および／または嚢胞性線維症（CF）および／またはTBを患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与される、方法が、本明細書で開示される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNアーゼは、Pulmozymeである。一態様では、全身性エリテマトーデス（SLE）および／または嚢胞性線維症（CF）および／またはTBを患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の2種またはそれよりも多くの種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与される、方法が、本明細書で開示される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNアーゼは、Pulmozymeである。別の態様では、全身性エリテマトーデス（SLE）および／または嚢胞性線維症（CF）および／またはTBを患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の3種またはそれよりも多くの種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる方法が、本明細書で開示される。さらなる態様では、全身性エリテマトーデス（SLE）および／または嚢胞性線維症（CF）および／またはTBを患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の4種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、5

10

20

30

40

50

種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、6種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、7種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、8種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、9種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、10種もしくはそれよりも多くの種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与される、方法が、本明細書で開示される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNアーゼは、Pulmozymeである。一実施形態では、作用物質は、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する。第2の実施形態では、作用物質は、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、ポリクローナルまたはモノクローナル抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体は、Z型DNAよりもB型DNAを、少なくとも10倍の親和性／結合活性で認識する。第3の実施形態では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス（メチジウム）スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ[c]フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第4の実施形態では、作用物質は、クロロキンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、化合物の誘導体は、DNA塩基間に介入する能力を保持する。作用物質は、HMGB1タンパク質でもその断片でもない。

【0181】

また、全身性エリテマトーデス（SLE）および／または嚢胞性線維症（CF）および／またはTBを患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、タンパク質および抗体が、DNアーゼの非存在下で投与される、方法が、本明細書で提供される。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNアーゼは、Pulmozymeである。一態様では、ポリクローナルまたはモノクローナル抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体は、Z型DNAよりもB型DNAを、少なくとも10倍の親和性／結合活性で認識する。HMGB1の生物活性断片は、Aボックス、Bボックスおよび／もしくはABボックス、C末端断片またはN末端断片のうちの1つまたは複数を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合がある。特定の実施形態では、HMGB1の生物活性断片は、DNAを結合することができるBボックスドメインを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合がある。一態様では、全身性エリテマトーデス（SLE）および／または嚢胞性線維症（CF）および／またはTBを患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法は、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、クロロキンおよび抗体は、DNアーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるDNアーゼは、Pulmozymeである。また、本開示は、プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において化学療法の投与に付随するバイオフィルム産生感染を処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存

10

20

30

40

50

在下で投与される、方法に関する。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。一態様では、本方法は、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-D N A のZ-D N A への変換に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、D N アーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。さらなる態様では、作用物質は、クロロキンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。またさらなる態様では、作用物質は、抗B-D N A 抗体またはその断片もしくは誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、ポリクローナルまたはモノクローナル抗B-D N A 抗体またはその断片もしくは誘導体は、Z型D N A よりもB型D N A を、少なくとも10倍の親和性／結合活性で認識する。一実施形態では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス（メチジウム）スペルミン、ダウノルビシン、T M P y P 4、第四級ベンゾ[c]フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。特定の一態様では、化合物の誘導体は、D N A 塩基間に介入する能力を保持する。

【0182】

本開示は、プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において化学療法の投与に付随するバイオフィルム産生感染を処置するための方法であって、有効量のH M G B 1 タンパク質またはその生物活性断片および抗B-D N A 抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、タンパク質および抗体が、D N アーゼの非存在下で投与される、方法にさらに関する。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。一態様では、ポリクローナルまたはモノクローナル抗B-D N A 抗体またはその断片もしくは誘導体は、Z型D N A よりもB型D N A を、少なくとも10倍の親和性／結合活性で認識する。H M G B 1 の生物活性断片は、Aボックス、Bボックスおよび／もしくはA B ボックス、C末端断片またはN末端断片のうちの1つまたは複数を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合がある。特定の実施形態では、H M G B 1 の生物活性断片は、D N A を結合することができるBボックスドメインを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合がある。また、プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において化学療法の投与に付随するバイオフィルム産生感染を処置するための方法であって、有効量のクロロキンおよび抗B-D N A 抗体またはその断片もしくは誘導体を投与することを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、クロロキンおよび抗体が、D N アーゼの非存在下で投与される、方法が、本明細書で提供される。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。一態様では、ポリクローナルまたはモノクローナル抗B-D N A 抗体またはその断片もしくは誘導体は、Z型D N A よりもB型D N A を、少なくとも10倍の親和性／結合活性で認識する。

【0183】

上記に説明する方法は、対象に、e D N A のD N A 結合タンパク質への結合に干渉する有効量の作用物質および／または抗菌剤を投与することをさらに含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合があり、一態様では、

作用物質は、D N アーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。一態様では、本方法は、対象に、e D N A のD N A 結合タンパク質への結合に干渉する有効量の作用物質および／または抗菌剤を投与することをさらに含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、D N アーゼの非存在下で投与される。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、投与されるD N アーゼは、P u l m o z y m e である。別の態様では、e D N A のD N A 結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、抗D N A B I I 抗体、抗I H F 抗体および／もしくは抗H U 抗体またはその各々の断片のうちの1つまたは複数を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一実施形態では、e D N A のD N A 結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の負電荷を有する。第2の実施形態では、e D N A のD N A 結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の中性電荷を有する。第3の実施形態では、e D N A のD N A 結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の正電荷を有する。

【0184】

バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の作用物質と接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質が、D N アーゼの非存在下で接触させられる、方法が、本明細書で説明される。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、D N アーゼは、P u l m o z y m e である。一態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の1種または複数種の作用物質と接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、D N アーゼの非存在下で接触させられる。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、D N アーゼは、P u l m o z y m e である。別の態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の2種またはそれよりも多くの種の作用物質と接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、D N アーゼの非存在下で接触させられる。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、D N アーゼは、P u l m o z y m e である。さらなる態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の3種またはそれよりも多くの種の作用物質と接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、D N アーゼの非存在下で接触させられる。別の態様では、作用物質は、H M G B 1 タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、D N アーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、D N アーゼは、P u l m o z y m e である。またさらなる態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のD N A への結合に干渉する有効量の4種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、5種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、6種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、7種もしくはそれよりも多くの種の、また

10

20

30

40

50

はあるいは、8種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、9種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、10種もしくはそれよりも多くの種の作用物質と接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で接触させられる。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。接触させることは、in vitroまたはin vivoであり得る。

【0185】

また、本開示は、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質とin vitroで接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、接触させることが、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の作用物質でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で接触させられ、一方で、別の態様では、DNアーゼが、本方法に従って接触させられる、方法に関する。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。一態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質とin vitroで接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合があり、接触させることは、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の1種または複数種の作用物質でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で接触させられ、一方で、別の態様では、DNアーゼは、本方法に従って接触させられる。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。

【0186】

別の態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質とin vitroで接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合があり、接触させることは、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の2種またはそれよりも多くの種の作用物質でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で接触させられ、一方で、別の態様では、DNアーゼは、本方法に従って接触させられる。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。

【0187】

さらなる態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質とin vitroで接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合があり、接触させることは、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の3種またはそれよりも多くの種の作用物質でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で接触させられ、一方で、別の態様では、DNアーゼは、本方法に従って接触させられる。別の態様では、作用物質は、HMGB1タン

10

20

30

40

50

パク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。またさらなる態様では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法は、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質とin vitroで接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合があり、接触させることは、表面を、カチオンを枯渇させる有効量の4種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、5種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、6種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、7種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、8種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、9種もしくはそれよりも多くの種の、またはあるいは、10種もしくはそれよりも多くの種の作用物質でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一実施形態では、作用物質は、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉し、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で接触させられ、一方で、別の態様では、DNアーゼは、本方法に従って接触させられる。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。第2の実施形態では、作用物質は、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。一態様では、ポリクローナルまたはモノクローナル抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体は、Z型DNAよりもB型DNAを、少なくとも10倍の親和性／結合活性で認識する。第3の実施形態では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス(メチジウム)スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ[c]フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。第5の実施形態では、作用物質は、クロロキンまたはその誘導体を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる。特定の一態様では、化合物の誘導体は、DNA塩基間に介入する能力を保持する。作用物質は、HMGB1タンパク質でもその断片でもない。

【0188】

バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、バイオフィルムを、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体とin vitroで接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、接触させることが、表面を、有効量のHMGB1タンパク質またはその生物活性断片および抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、タンパク質および抗体が、DNアーゼの非存在下で接触させられ、一方で、別の態様では、DNアーゼが、本方法に従って接触させられる、方法が、本明細書でさらに説明される。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。

【0189】

一態様では、ポリクローナルまたはモノクローナル抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体は、Z型DNAよりもB型DNAを、少なくとも10倍の親和性／結合活性で認識する。HMGB1の生物活性断片は、Aボックス、ABボックス、Bボックス、C末端断片および／またはN末端断片のうちの1つまたは複数を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合がある。特定の実施形態では、HMGB1の生物活性断片は、DNAを結合することができるBボックスドメインを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合がある。また、本開示は、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、

バイオフィルムを、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体と *in vitro* で接触させることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、接触させることが、表面を、有効量のクロロキンおよび抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体でコーティングすることを含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、クロロキンおよび抗体が、DNアーゼの非存在下で接触させられる、方法に関する。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。一態様では、ポリクローナルまたはモノクローナル抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体は、Z型DNAよりもB型DNAを、少なくとも10倍の親和性／結合活性で認識する。

10

【0190】

上記に説明する方法は、バイオフィルムを、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する有効量の作用物質および／または抗菌剤と接触させることをさらに含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなる場合があり、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で接触させられ、一方で、別の態様では、DNアーゼは、本方法に従って接触させられる。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。一態様では、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、抗DNABII抗体、抗IHF抗体および／もしくは抗HU抗体またはその各々の断片のうちの1つまたは複数を含むか、またはあるいは、それから本質的になるか、またはまたさらに、それからなり、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で接触させられる。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。一実施形態では、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の負電荷を有し、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で接触させられる。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。第2の実施形態では、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の中性電荷を有し、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で接触させられ、一方で、別の態様では、DNアーゼは、本方法に従って接触させられる。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。第3の実施形態では、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の正電荷を有する。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。

20

30

【0191】

バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質と接触させることを含み、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で接触させられ、一方で、別の態様では、DNアーゼが、本方法に従って接触させられる、方法が、本明細書で提供される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質との接触に続いて接触させられる。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。接触させることは、*in vitro* または *in vivo* であり得る。

40

【0192】

また、対象においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムに感染した対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作

50

用物質を投与することを含み、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与され、一方で、別の態様では、DNアーゼが、投与される、方法が、提供される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。

【0193】

バイオフィルムを発生しやすい対象においてバイオフィルムの形成を予防するための方法であって、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質を投与することを含み、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与され、一方で、別の態様では、DNアーゼが、投与される、方法が、さらに提供される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。

10

【0194】

それを必要とする対象において、バイオフィルムを産生する細菌によって引き起こされる感染を処置するための方法であって、対象に、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する有効量の作用物質と、その生物の複製を阻害する作用物質とを投与することを含み、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与され、一方で、別の態様では、DNアーゼが、投与される、方法が、またさらに提供される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。

20

【0195】

一態様では、作用物質は、ポリアミン合成の阻害剤、またはポリアミンのDNAへの結合を阻害する作用物質である。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。ポリアミンの非限定的な例には、プトレシン、スペルミン、カダベリン、1,3-ジアミノプロパンまたはスペルミジンが含まれる。別の態様では、作用物質は、ポリアミンアナログであるジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド (Boc Sciences)、メチルグリオキサールービス [グアニルヒドラゾン] (メチルーGAG)、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン (AKos Consulting & Solutions)、オキサリプラチン、シスプラチン、ジシクロヘキシルアミン、任意のその誘導体、またはその塩を含む (この段落の全ての作用物質は、別に示されない限り、Millipore Sigmaから市販されている)。一態様では、これらの化合物の誘導体は、同じ質量対電荷比を維持する。

30

【0196】

さらなる態様では、作用物質は、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質、必要に応じて、カチオン交換樹脂、アミノポリカルボン酸、クラウンエーテル、アザクラウンまたはクリプタンドを含む (各クラスの作用物質の様々な代表的化合物はMillipore Sigmaから入手可能である)。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。カチオン交換樹脂の非限定的な例には、スルホネート、スルホプロピル、ホスホセルロース、P11ホスホセルロース、ヘパリン硫酸、またはその誘導体またはアナログを含有する樹脂が含まれる。一実施形態では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質は、正味の負電荷を有する。一実施形態では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質は、正味の中性電荷を有する。

40

【0197】

一実施形態では、バイオフィルムの安定性を阻害するための方法であって、バイオフィルムを、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質と *in vitro* で接触させることを含み、接触させることが、表面を、カチオンを枯渇させる作

50

用物質でコーティングすることを含み、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与され、一方で、別の態様では、DNアーゼが、投与される、方法が、本明細書で提供される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。

【0198】

上記の方法の一態様では、作用物質は、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉し、一態様では、作用物質は、DNアーゼの非存在下で投与され、一方で、別の態様では、DNアーゼは、投与される。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。そのようなものの例には、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体が含まれる。さらなる態様では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス（メチジウム）スペルミン、(Dervan et al. (1978) 100 (6) : 1968-1970) ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ [c] フェナントリジンアルカロイド、(Rajeczy et al. (2015) ; Le et al. (2004) 69 (8) : 2768-2772) キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体の群からの作用物質を含む（このさらなる態様の全ての作用物質は、別に示されない限り、Millipore Sigmaから市販されている）。作用物質は、HMGB1タンパク質でもその断片でもない。

【0199】

全身性エリテマトーデス（SLE）および／または嚢胞性線維症（CF）を患う患者においてバイオフィルムを処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の作用物質を投与することを含み、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与され、一方で、別の態様では、DNアーゼが、投与される、方法が、さらに提供される。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。そのようなものの例には、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体が含まれる。さらなる態様では、作用物質は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス（メチジウム）スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ [c] フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体の群からの作用物質を含む。一態様では、本方法は、DNアーゼの非存在下で行われ、一態様では、CFの処置は、DNアーゼの非存在下で行われる。作用物質は、HMGB1タンパク質でもその断片でもない。

【0200】

別の態様では、プラチナベースの化学療法を受けているか、または受けた患者において化学療法の投与に付随するバイオフィルム産生感染を処置するための方法であって、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する有効量の作用物質を投与することを含み、一態様では、作用物質が、DNアーゼの非存在下で投与され、一方で、別の態様では、DNアーゼが、投与される、方法が、本明細書で提供される。さらなる態様では、DNアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、DNアーゼは、Pulmozymeである。そのようなものの例には、抗B-DNA抗体またはその断片もしくは誘導体が含まれる。さらなる態様では、作用物質（the gent）は、リボフラビン、エチジウムブロマイド、ビス（メチジウム）スペルミン、ダウノルビシン、TMPyP4、第四級ベンゾ [c] フェナントリジンアルカロイド、キナクリン、9-アミノアクリジンまたはその誘導体の群からの作用物質を含む。作用物質は、HMGB1タンパク質でもその断片でもない。

【0201】

上記に示される方法は、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する有効量の作用物質および／または抗菌剤を、バイオフィルムと接触させること（in vitro の場合）、または対象に投与することをさらに含む場合があり、一態様では、作用物質は

、DNAアーゼの非存在下で投与され、一方で、別の態様では、DNAアーゼは、投与される。別の態様では、作用物質は、HMGB1タンパク質でも、その断片でも、その各々の等価物でもない。さらなる態様では、DNAアーゼは、作用物質の投与に続いて投与される。特定の一態様では、DNAアーゼは、Pulmozymeである。一実施形態では、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の正電荷を有する。一実施形態では、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の負電荷を有する。一実施形態では、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、正味の中性電荷を有する。

【0202】

in vitroで実施される場合、本方法は、本明細書で開示するポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、宿主細胞、小分子および組成物と同じ、同様の、または反対の能力を有する作用物質をスクリーニングまたは確認するために有用である。あるいは、それらは、どの作用物質が微生物感染を処置するために最も適しているか、または処置が有効であったかどうかを特定するために使用され得る。例えば、例えばDNABIIポリペプチドおよび微生物DNAならびに試験されるべき作用物質を含有する2つの試料を有することによって、新しい作用物質または組合せ治療をスクリーニングすることができる。第2の試料は、DNABIIポリペプチドおよび微生物DNA、ならびに陽性対照としてはたらくための、活性であることが公知の作用物質、例えば、抗IHf抗体または小分子を含有する。さらなる態様では、いくつかの試料が提供され、臨床環境における対象の処置において有効である可能性がある最適用量を決定するために、作用物質を、希釈を増やしながらい系に添加する。当業者に明らかである通り、DNABIIポリペプチドおよび微生物DNAを含有する陰性対照を提供してもよい。さらなる態様では、DNABIIポリペプチドおよび微生物DNAは、検出可能に、例えば、互いに緊密に接触した場合にシグナルを放出する発光分子で、標識される。試料を、作用物質が、DNABIIポリペプチドと微生物DNAとの間の相互作用を阻害、競合または滴定するために有効な時間の間、同様の条件下で含有し、その後、試料を、発光分子からのシグナルの放出についてアッセイする。試料がシグナルを放出する場合、作用物質は、結合を阻害するために有効ではない。

【0203】

別の態様では、in vitro法は、感染を引き起こす微生物（例えば、細菌）分離菌がヒト／動物から単離され、その後、培養されて、それがin vitroでバイオフィームとして増殖することを可能にし得る小型化チャンバースライド系で実施される。作用物質（例えば、抗DNABIIまたはIHf抗体）または試験作用物質もしくは潜在的な作用物質を、潜在的な作用物質または作用物質、例えば、抗DNABIIまたはIHf（または他の抗体、小分子、作用物質等）の希釈を増やしながらい、または増やさずに、培養物に単独で、または別の作用物質と組み合わせて添加して、感染が存在した対象に送達された場合にその患者を処置することにおいて有効であり得るような最適用量を見出す。当業者に明らかである通り、陽性対照および陰性対照を同時に行ってもよい。

【0204】

さらなる態様では、本方法は、フローセル中の作用物質（例えば、抗DNABIIまたはIHf抗体）および／または潜在的な作用物質（単独で、または別の作用物質と組み合わせて）を伴うハイスループットプラットフォームにおいて実施される。作用物質（例えば、抗DNABIIまたはIHf抗体）または潜在的な作用物質バイオフィームを、潜在的な作用物質または作用物質、例えば、抗DNABIIまたはIHf（または他の抗体、小分子、作用物質等）の希釈を増やしながらい、または増やさずに、培養物に単独で、または別の作用物質と組み合わせて添加して、感染が存在した対象に送達された場合にその患者を処置することにおいて有効であり得るような最適用量を見出す。バイオフィーム分離菌を超音波処理して、微生物DNAに結合したDNABIIポリペプチド、例えば、IHfからバイオフィーム細菌を分離する。DNABIIポリペプチド-DNA複合体は、プラットフォーム上の抗DNABIIまたはIHf抗体によって分離される。その後、微生物DNAを、例えば、塩洗浄で放出させ、添加されたバイオフィーム細菌を同定するために使用する

。その後、遊離したDNAを、例えば、PCR配列決定することによって同定する。DNAが遊離しない場合、作用物質（複数可）が、微生物DNAにうまく作用したか、または微生物DNAにうまく結合した。DNAが試料中に見られる場合、作用物質は、DNABIIポリペプチドー微生物DNA結合に干渉しなかった。当業者に明らかである通り、陽性対照および／または陰性対照を同時に行ってもよい。

【0205】

また、所与の細菌種は、別の作用物質よりもある作用物質によるそのバイオフィルムの破壊に対してよりよく応答する可能性があるので、上記の方法は、診断試験として使用することができ、この迅速なハイスループットアッセイ系は、当業者が、可能性のある抗DNABIIまたはIHF様作用物質の集団をアッセイして、群のうちの最も効果的なものを特定することを可能にし得る。

10

【0206】

これらの方法の利点は、ほとんどの院内臨床微生物検査室は、既に、液体培養で（または浮遊性で）成長している細菌を使用するこれらの種類のアッセイ（すなわち、MIC、MBC値の決定）を行うための備えがあることである。当業者に明らかである通り、細菌は、一般的に、それらが疾患を引き起こしている場合、浮遊性で成長しない。その代わりに、それらは安定なバイオフィルムとして成長しており、これらのバイオフィルムは、抗生物質、抗体または他の治療薬による処置に対して有意により抵抗性である。この抵抗性は、ほとんどのMIC／MBC値が正確に*in vivo*での有効性を予測することができないことの理由である。したがって、どの「用量」の作用物質が（上記に説明されるように）*in vitro*で細菌バイオフィルムを逆転し得るかを決定することによって、出願人らの前臨床アッセイは、個別化医療の適用としてでさえも、臨床有効性のより信頼できる予測因子になり得る。

20

【0207】

臨床環境に加えて、本方法は、産業的環境において感染を引き起こす微生物を特定することおよび／または有効な作用物質を確認することのために使用することができる。したがって、産業的環境において、作用物質を使用して、バイオフィルムを処置、阻害または滴定することができる。

【0208】

上記の方法のさらなる態様では、基礎をなす感染の成長を阻害することが公知の抗生物質または抗微生物薬を、順次、または併せて添加して、感染が阻害され得るかどうかを決定する。また、作用物質を微生物DNAまたはDNABIIポリペプチドに添加し、その後、欠損した複合体を添加して、バイオフィルム阻害についてアッセイすることが可能である。

30

【0209】

非ヒト動物、例えば、チンチラにおいて*in vivo*で実施される場合、本方法は、前臨床スクリーニングを提供して、バイオフィルムを破壊するために単独で、または他の作用物質と組み合わせて使用され得る作用物質を特定する。

【0210】

別の態様では、対象に、有効量の作用物質を投与し、それによって、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊することによる、対象においてバイオフィルムを阻害、予防または破壊する方法が、本明細書で提供される。そのような対象の非限定的な例には、哺乳動物、例えば、ペットおよびヒト患者が含まれる。

40

【0211】

本明細書で開示する作用物質および組成物は、他の抗微生物剤および／または表面抗原と共に併せて、または順次投与され得る。特定の一態様では、投与は、例えば、直接注射によって、または吸入によって、感染の部位について局所である。投与の他の非限定的な例には、経皮に、尿道に、舌下に、直腸に、膣に、眼に、皮下、筋内に、腹腔内に、鼻内に、吸入による、または経口に、を含む1つまたは複数の方法による投与が含まれる。

【0212】

50

本明細書で開示する方法によって処置され得る微生物感染および疾患には、生物である *Streptococcus agalactiae*、*Neisseria meningitidis*、*Treponemes denticola*、*Treponemes pallidum*、*Burkholderia cepacia* または *Burkholderia pseudomallei* による感染が含まれる。一態様では、微生物感染は、*Haemophilus influenzae* (分類不能)、*Moraxella catarrhalis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Mycobacterium tuberculosis* のうちの1つまたは複数である。これらの微生物感染は、上気道、中気道および下気道に存在し得る（耳炎、副鼻腔炎、気管支炎、それだけでなく、慢性閉塞性肺疾患（COPD: chronic obstructive pulmonary disease）の増悪、慢性咳嗽、嚢胞性線維症（CF）の合併症および／またはCFの主因ならびに市中感染性肺炎（CAP: community acquired pneumonia））。したがって、本明細書で開示する *in vivo* 法を実施することによって、これらの疾患およびこれらの感染からの合併症もまた、予防または処置され得る。

【0213】

また、感染症は、口腔（う歯、歯周炎）で起こり、*Streptococcus mutans*、*Porphyromonas gingivalis*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* によって引き起こされ得る。また、感染症は、皮膚に局在し（膿瘍、「ブドウ球菌」感染、膿痂疹、熱傷の二次感染、ライム病）、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Pseudomonas aeruginosa* および *Borrelia burgdorferi* によって引き起こされ得る。尿路感染症（UTI: Infections of the urinary tract）もまた処置することができ、典型的に、*Escherichia coli* によって引き起こされる。胃腸管感染症（GI: Infections of the gastrointestinal tract）（下痢、コレラ、胆石、胃潰瘍）は、典型的に、*Salmonella enterica* serovar、*Vibrio cholerae* および *Helicobacter pylori* によって引き起こされる。生殖器感染症は、典型的に、*Neisseria gonorrhoeae* を含み、これによって引き起こされる。感染症は、*Enterococcus faecalis* によって引き起こされる膀胱の感染症または留置デバイスの感染症であり得る。典型的に、様々な細菌によって引き起こされる、埋入された補綴デバイス、例えば、人工腎部もしくは膝置換物、または歯科インプラント、または医療デバイス、例えば、ポンプ、カテーテル、ステントもしくはモニタリング系と関連付けられる感染症は、本明細書で開示する方法によって処置することができる。これらのデバイスは、本明細書で説明する作用物質でコーティングするか、またはこれにコンジュゲートすることができる。したがって、本明細書で開示する *in vivo* 法を実施することによって、これらの疾患およびこれらの感染症からの合併症もまた予防または処置することができる。

【0214】

また、*Streptococcus agalactiae* によって引き起こされる感染は、本明細書で開示する方法によって処置することができ、それは、新生児における細菌性敗血症の主原因である。髄膜炎を引き起こし得る *Neisseria meningitidis* によって引き起こされる感染もまた、処置することができる。

【0215】

したがって、本明細書で開示する方法に適用可能な投与経路には、鼻内、筋内、尿道、気管内、皮下、皮内、経皮、局所適用、静脈内、直腸、鼻、経口、吸入ならびに他の経腸および非経口投与経路が含まれる。投与経路は、作用物質および／または所望の効果に依存して、所望の場合、組み合わせられ、または調整され得る。活性剤は、単回用量で、ま

たは複数回用量で投与され得る。これらの方法および送達に好適な経路の実施形態には、全身性経路または局部経路が含まれる。概して、本明細書で開示する方法に好適な投与経路には、直接注射、経腸、非経口または吸入経路が含まれるが、これらに限定されない。

【0216】

吸入投与以外の非経口投与経路には、局所、経皮、皮下、筋内、眼窩内、嚢内、脊髄内、胸骨内および静脈内経路、すなわち、消化管を通る経路以外の任意の投与経路が含まれるが、これらに限定されない。非経口投与は、阻害する作用物質 (inhibiting agent) の全身性または局所送達をもたらすように行われ得る。全身送達が所望される場合、投与は、典型的に、医薬調節物の浸潤性または全身吸収性の局所投与または粘膜投与を含む。

【0217】

また、本明細書で開示する作用物質は、経腸投与によって対象に送達され得る。経腸投与経路には、経口および直腸（例えば、坐剤を使用する）送達が含まれるが、これらに限定されない。

【0218】

皮膚または粘膜を通した活性剤の投与の方法には、好適な医薬調製物の局所適用、経皮的伝達、経皮伝達、注射および上皮投与が含まれるが、これらに限定されない。経皮伝達のために、吸収促進剤またはイオン導入は、好適な方法である。イオン導入伝達は、製品を、壊れていない皮膚を通して電気パルスを通じて連続的に数日間またはそれよりも長い期間の間送達する市販の「パッチ」を使用して達成することができる。

【0219】

本明細書で開示する方法の様々な実施形態では、作用物質は、連続して毎日のように、少なくとも1日1回 (QD) および様々な実施形態では、1日2回 (BID)、3回 (TID) またはさらに4回、吸入により、注射により、または経口で投与される。典型的に、治療有効1日量は、少なくとも約1mg、または少なくとも約10mg、または少なくとも約100mg、または約200~約500mg、およびときには、化合物に依存して、最大で約1g~約2.5gほどであり得る。

【0220】

投与 (Dosing of) は、カプセル剤、錠剤、経口懸濁剤、筋内注射用懸濁剤、静脈内点滴用懸濁剤、局所適用用ゲル剤 (gel) もしくはクリーム剤、または関節内注射用懸濁剤を使用して、本明細書で開示する方法に従って達成することができる。

【0221】

本明細書で説明する組成物の投与量、毒性および治療の有効性は、例えば、LD50（集団の50%に致死的な用量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準の薬学的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、それは、比LD50/ED50として表すことができる。ある特定の実施形態では、組成物は、高い治療指数を示す。毒性副作用を示す化合物が使用され得る一方で、非感染細胞への潜在的損傷を最小限にし、それによって、副作用を低減するために、そのような化合物を、罹患組織部位を標的とする送達系を設計するように注意を払うべきである。

【0222】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータは、ヒトにおける使用のためのある範囲の投与量を製剤化するために使用され得る。そのような化合物の投与量は、ある特定の実施形態では、毒性をほとんどまたは全く有しないED50を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変動し得る。本方法において使用される任意の化合物について、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから見積もることができる。用量は、細胞培養物において決定されたIC50（すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて製剤化され得る。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、

高速液体クロマトグラフィーによって、測定され得る。

【0223】

一部の実施形態では、治療効果または予防効果を達成するために十分な組成物の有効量は、1投与当たり体重1キログラム当たり約0.000001mg～1投与当たり体重1キログラム当たり約10,000mgに及ぶ。好適には、投与量範囲は、1投与当たり体重1キログラム当たり約0.0001mg～1投与当たり体重1キログラム当たり約100mgである。投与は、初期用量として提供され、続いて1つまたは複数の「ブースター」用量が提供され得る。ブースター用量は、初期用量の1日、2日、3日、1週間、2週間、3週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月または12ヶ月後に提供され得る。一部の実施形態では、ブースター用量は、前の投与に対する対象の応答の評価後に投与される。

10

【0224】

当業者は、非限定的に、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の健康全般および／または年齢ならびに存在する他の疾患を含む、ある特定の因子が、対象を有効に処置するために必要とされる投与量および時間調整に影響を及ぼし得ることを理解する。さらに、治療有効量の本明細書で説明する治療組成物による対象の処置は、単回処置または一連の処置を含み得る。

抗体およびその誘導体

【0225】

本開示は、また、本明細書に開示される方法における使用のための、B DNAに結合する、および／またはこれを特異的に認識して結合する抗体を提供する。抗体は、本明細書に記載される様々な抗体のいずれかとなることができ、そのようなものの非限定的な例は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ベニア化 (veneer) 抗体、ダイアボディ (diabody)、ヒト化抗体、抗体誘導体、組換えヒト化抗体、またはその各々の誘導体もしくは断片を含む。一態様では、断片は、抗体のCDRを含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる。一態様では、抗体は、検出可能に標識される、またはこれにコンジュゲートされた検出可能な標識をさらに含む。本明細書に開示されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系も提供される。上述の実施形態のうちの1つまたは複数を含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる組成物が、本明細書にさらに提供される。抗体および断片のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、ならびに抗体ポリペプチドおよびその断片を組換えにより産生するまたは化学合成する方法がさらに提供される。抗体ポリペプチドは、真核もしくは原核細胞において、または当技術分野で公知であり本明細書に記載される他の方法によって産生することができる。

20

30

【0226】

本方法論の変形形態は、最適な産生および動物の人道的な扱いのための、アジュバント、投与の経路および部位、部位当たりの注射体積、ならびに動物当たりの部位の数の改変を含む。例えば、アジュバントは典型的に、抗原に対する免疫応答の改善または増強に使用される。大部分のアジュバントは、流入領域リンパ節への抗原の緩徐放出 (slow release) を可能にする、注射部位抗原デポを提供する。他のアジュバントは、大規模な表面積および免疫賦活性分子にわたるタンパク質抗原分子の富化を促進する界面活性物質を含む。ポリクローナル抗体生成のためのアジュバントの非限定的な例は、フロイントアジュバント、Rib i アジュバントシステムおよびTitermaxを含む。当技術分野で公知の方法を使用して、ポリクローナル抗体を生成することができ、そのうちいくつかは、米国特許第7,279,559号；同第7,119,179号；同第7,060,800号；同第6,709,659号；同第6,656,746号；同第6,322,788号；同第5,686,073号；および同第5,670,153号に記載されている。

40

【0227】

当技術分野で公知であり文献において十分に記載されている従来のハイブリドーマ技法を使用して、モノクローナル抗体を生成することができる。例えば、適した不死細胞系 (

50

例えば、Sp2/0、Sp2/0-AG14、NSO、NS1、NS2、AE-1、L. 5、P3X63Ag8, 653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U397、MIA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 313、HL-60、MLA 144、NAMIWA、NEURO 2A、CHO、PerC. 6、YB2/O等が挙げられるがこれらに限定されない、ミエローマ細胞系) などまたはヘテロミエローマ (heteromyeloma)、その融合産物、またはそれに由来するいずれかの細胞もしくは融合細胞、または当技術分野で公知の他のいずれかの適した細胞系 (次のウェブアドレス、例えば、atcc.org, lifetech.com、最終アクセス2007年11月26日における細胞系を参照) を、内因性もしくは異種核酸として、組換えもしくは内因性の、ウイルスの、細菌の、藻類の、原核生物の、両生類の、昆虫の、爬虫類の、魚類の、哺乳動物の、齧歯類の、ウマの、ヒツジの、ヤギの、羊の、霊長類の、真核生物の、ゲノムDNA、cDNA、rDNA、ミトコンドリアDNAもしくはRNA、葉緑体DNAもしくはRNA、hnRNA、mRNA、tRNA、一本、二本もしくは三本鎖の、ハイブリダイズしたものなど、またはこれらのいずれかの組合せとして、重鎖または軽鎖定常または可変またはフレームワークまたはCDR配列を発現する、単離されたまたはクローニングされた脾臓、末梢血、リンパ、扁桃腺または他の免疫もしくはB細胞含有細胞、または他のいずれかの細胞等が挙げられるがこれらに限定されない抗体産生細胞と融合することにより、ハイブリドーマが産生される。抗体産生細胞を、目的の抗原で免疫されたヒトまたは他の適した動物の、末梢血から、または特定の実施形態では、脾臓もしくはリンパ節から得て、次いで、目的の活性に関してスクリーニングすることもできる。本開示の抗体、その指定の断片またはバリエーションをコードする異種または内因性核酸を発現させるために、他のいずれかの適した宿主細胞を使用することもできる。融合された細胞 (ハイブリドーマ) または組換え細胞を、選択的培養条件または他の適した公知方法を使用して単離し、限界希釈もしくは細胞選別、または他の公知方法によってクローニングすることができる。

【0228】

当技術分野で公知の方法を使用して、ペプチドまたはタンパク質ライブラリー (例えば、バクテリオファージ、リボソーム、オリゴヌクレオチド、cDNA、またはその他のディスプレイライブラリーが挙げられるがこれらに限定されない; 例えば、Morphosys (Martinsreid/Planegg, Del.), BioInvent (Lund, Sweden), Affitech (Oslo, Norway) 等の様々な商業的ベンダーから入手できるような) から組換え抗体を選択する方法を含むがこれらに限定されない、必要な特異性の抗体を産生または単離する他の適した方法を使用することができる。当技術分野の公知方法は、特許文献に記載されており、そのうちいくつかは、米国特許第4,704,692号; 同第5,723,323号; 同第5,763,192号; 同第5,814,476号; 同第5,817,483号; 同第5,824,514号; および同第5,976,862号を含む。代替方法は、当技術分野で公知の通り、および/または本明細書に記載される通り、ヒト抗体のレパートリーを産生することができる、トランスジェニック動物 (例えば、SCIDマウス、Nguyen et al. (1977) Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al. (1996) Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118; Eren et al. (1998) Muma 93:154-161) の免疫に依拠する。斯かる技法は、リボソームディスプレイ (Wanes et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-4942; Hanes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14130-14135); 単一細胞抗体産生技術 (例えば、選択されたリンパ球抗体方法 (selected lymphocyte antibody method) (「SLAM」) (米国特許第5,627,052号; Wen et al. (1987) J. Immunol 17:887-892; B

10

20

30

40

50

abcook et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848); ゲル微小液滴およびフローサイトメトリー (Powell et al. (1990) Biotechnol. 8:333-337; One Cell Systems (Cambridge, Mass.); Gray et al. (1995) J. Imm. Meth. 182:155-163; および Kenny et al. (1995) Bio. Technol. 13:787-790); B細胞選択 (Steenbakkers et al. (1994) Molec. Biol. Reports 19:125-134) を含むがこれらに限定されない。

【0229】

本開示の抗体誘導体は、本明細書に開示される抗体をコードするポリヌクレオチドに適した宿主に送達して、例えば、斯かる抗体をその乳汁中に産生する、例えばヤギ、ウシ、馬、羊などのトランスジェニック動物または哺乳動物を用意することにより調製することもできる。このような方法は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,827,690号; 同第5,849,992号; 同第4,873,316号; 同第5,849,992号; 同第5,994,616号; 同第5,565,362号; および同第5,304,489号に記載されている。

【0230】

用語「抗体誘導体」は、抗体または断片の線形ポリペプチド配列に対する翻訳後改変を含む。例えば、米国特許第6,602,684(B1)号は、増強されたFc媒介性細胞毒性を有する、抗体全体の分子、抗体断片、または免疫グロブリンのFc領域と等価の領域を含む融合タンパク質を含む、改変されたグリコール形態の抗体の生成のための方法と、そのようにして生成された糖タンパク質について記載する。

【0231】

本明細書に開示される抗体は、共有結合による付着が、抗体が抗イディオタイプ応答を生成することを妨げないような、抗体へのいずれかの種類の分子の共有結合による付着によって改変された誘導体も含む。抗体誘導体は、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／遮断基による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結等によって改変された抗体を含むがこれらに限定されない。その上、誘導体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有することができる。

【0232】

抗体誘導体は、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを送達して、植物部分またはそれから培養された細胞において斯かる抗体、指定の部分またはバリエーションを産生するトランスジェニック植物および培養された植物細胞（例えば、タバコ、トウモロコシおよびウキサが挙げられるがこれらに限定されない）を用意することにより調製することもできる。例えば、Cramer et al. (1999) Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118およびその中で引用されている参考文献は、例えば、誘導性プロモーターを使用した、大量の組換えタンパク質を発現するトランスジェニックタバコ葉の産生について記載する。トランスジェニックトウモロコシを使用して、他の組換え系において産生されたまたは天然の供給源から精製されたものと等価の生物活性を有する哺乳動物タンパク質を商業的産生レベルで発現させた。例えば、Hood et al. (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147およびその中で引用されている参考文献を参照されたい。抗体誘導体は、また、タバコ種子およびジャガイモ塊茎を含む、単鎖抗体(scFv)等の抗体断片を含むトランスジェニック植物種子から大量に産生された。例えば、Conrad et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109およびその中で引用されている参考文献を参照されたい。よって、公知(know)方法に従ってトランスジェニック植物を使用して、抗体を産生することもできる。

【0233】

抗体誘導体は、例えば、外因性配列を付加して、免疫原性を改変する、または結合、親和性、オンレート (on-rate)、オフレート (off-rate)、アビディティ、特異性、半減期もしくは他のいずれかの適した特徴を低減、増強もしくは改変することにより産生することもできる。一般に、非ヒトまたはヒトCDR配列の一部または全体が維持される一方で、可変および定常領域の非ヒト配列が、ヒトまたは他のアミノ酸または他のアイソタイプ由来の可変もしくは定常領域に置き換えられる。

【0234】

一般に、CDR残基は、抗原結合性への影響に直接的にかつ最も実質的に関与する。抗体のヒト化または操作は、米国特許第5,723,323号；同第5,976,862号；同第5,824,514号；同第5,817,483号；同第5,814,476号；同第5,763,192号；同第5,723,323号；同第5,766,886号；同第5,714,352号；同第6,204,023号；同第6,180,370号；同第5,693,762号；同第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,225,539号；および同第4,816,567号に記載されている方法等が挙げられるがこれらに限定されない、いずれか公知の方法を使用して行うことができる。

【0235】

本開示のキメラ、ヒト化または霊長類化 (primatized) 抗体は、標準分子生物学技法を使用して調製された参照モノクローナル抗体の配列に基づき調製することができる。標準分子生物学技法を使用して、重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAを目的のハイブリドーマから得て、非参照 (例えば、ヒト) 免疫グロブリン配列を含有するように操作することができる。例えば、キメラ抗体を作製するために、当技術分野で公知の方法 (米国特許第4,816,567号) を使用して、マウス可変領域をヒト定常領域に連結することができる。ヒト化抗体を作製するために、当技術分野で公知の方法 (米国特許第5,225,539号ならびに米国特許第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,693,762号；および同第6,180,370号) を使用して、マウスCDR領域をヒトフレームワークに挿入することができる。同様に、霊長類化抗体を作製するために、当技術分野で公知の方法 (WO93/02108およびWO99/55369) を使用して、マウスCDR領域を霊長類フレームワークに挿入することができる。

【0236】

部分的～完全にヒト抗体を作製するための技法は、当技術分野で公知であり、いかなる斯かる技法を使用することもできる。一実施形態において、完全にヒト抗体配列は、ヒト重鎖および軽鎖抗体遺伝子を発現するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて作製される。異なるクラスの抗体を産生することができる、斯かるトランスジェニックマウスの複数の系統が作製された。望ましい抗体を産生しているトランスジェニックマウス由来のB細胞を融合させて、所望の抗体の持続的産生のためのハイブリドーマ細胞系を作製することができる (例えば、Russell et al. (2000) Infection and Immunity April 2000:1820-1826; Gallo et al. (2000) European J. of Immun. 30:534-540; Green (1999) J. of Immun. Methods 231:11-23; Yang et al. (1999A) J. of Leukocyte Biology 66:401-410; Yang (1999B) Cancer Research 59(6):1236-1243; Jakobovits (1998) Advanced Drug Reviews 31:33-42; Green and Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188(3):483-495; Jakobovits (1998) Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4):607-614; Tsuda et al. (1997) Genomics 42:413-421; Sherman-Gold (1997) Genetic Engineering News 17(14); Mendez et al. (1997) Nature Genetics 15:146-156; Jak

10

20

30

40

50

obovits (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) Current Opinion in Biotechnology 6:561-566; Mendez et al. (1995) Genomics 26:294-307; Jakobovits (1994) Current Biology 4(8):761-763; Arbones et al. (1994) Immunity 1(4):247-260; Jakobovits (1993) Nature 362(6417):255-258; Jakobovits et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(6):2551-2555; および米国特許第6,075,181号を参照)。

10

【0237】

本明細書に開示される抗体を改変して、キメラ抗体を作製することもできる。キメラ抗体は、抗体の重鎖および軽鎖の様々なドメインが、2つ以上の種由来のDNAによってコードされた抗体である。例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい。

【0238】

あるいは、本明細書に開示される抗体を改変して、ベニア化抗体を作製することもできる。ベニア化抗体は、第1の種の抗体が、第2の種において免疫原性とならず、これにより抗体の免疫原性を低減させるように、ある1つの種の抗体の外表面アミノ酸残基が、第2の種のアミノ酸残基に賢明に置き換えられたまたは「ベニア化された」抗体である。タンパク質の抗原性は、その表面の性質に主に依存するため、別の哺乳動物種の抗体において通常見出される残基と異なる露出した残基を置き換えることにより、抗体の免疫原性を低減させることができる。このような賢明な外表面残基置き換えは、内側ドメインまたはドメイン間接触に対して影響を殆どまたは全く与えないはずである。よって、可変領域フレームワーク残基に限定される変更の帰結として、リガンド結合特性は影響を受けないはずである。抗体の外表面または外皮(skin)のみが変更され、支持的残基は乱されないままであるため、このプロセスは、「ベニア化(veneering)」と称される。

20

【0239】

「ベニア化」のための手順は、Kabat et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological interest, 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Healthによってコンパイルされたヒト抗体可変ドメインのための利用できる配列データ、このデータベースのアップデート、ならびに他のアクセス可能な米国および外国のデータベース(核酸およびタンパク質の両方)を活用する。ベニア化抗体(veneered antibody)の生成に使用される方法の非限定的な例は、EP519596;米国特許第6,797,492号を含み;Padlan et al. (1991) Mol. Immunol. 28(4-5):489-498に記載されている。

30

【0240】

用語「抗体誘導体」は、2個の抗原結合性部位を有する小型の抗体断片である「ダイアボディ」も含み、この断片は、同じポリペプチド鎖において軽鎖可変ドメイン(VL)に接続された重鎖可変ドメイン(VH)を含む(例えば、EP404,097;WO93/11161;およびHollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448を参照)。同じ鎖における2個のドメインの間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対形成することを余儀なくされ、2個の抗原結合性部位を作り出す(親抗体の超可変領域に挿入された1つまたは複数のアミノ酸を有し、抗原に対する親抗体の結合親和性よりも少なくとも約2倍強い、標的抗原に対する結合親和性を有する抗体バリエーションを開示する、米国特許第6,632,926号、Chen et al.も参照)。

40

50

【0241】

用語「抗体誘導体」は、s c F v、d A b、ナノボディ、ミニボディ (mini body)、ユニボディ (Unibody) およびアフィボディ (Affibody) 等、操作された抗体分子、断片および単ドメインをさらに含む (& Hudson (2005) Nature Biotech 23 (9): 1126-36; 米国特許出願公開第2006/0211088号; PCT国際出願公開番号WO2007/059782; 米国特許第5,831,012号)。

【0242】

用語「抗体誘導体」は、「線形抗体」をさらに含む。線形抗体を作製するための手順は、当技術分野で公知であり、Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8 (10): 1057-1062に記載されている。簡潔に説明すると、このような抗体は、一対の抗原結合性領域を形成する一対のタンデムEdセグメント (V_H-C_H1-V_H-C_H1) を含む。線形抗体は、二特異性または単一特異性となることができる。

10

【0243】

本明細書に開示される抗体は、プロテインA精製、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含むがこれらに限定されない公知の方法によって、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。高速液体クロマトグラフィー (「HPLC」) を精製に使用することもできる。

20

【0244】

本開示の抗体は、天然で精製された産物、化学合成手順の産物、ならびに例えば、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む真核生物宿主からまたはあるいは、上述の通り原核生物宿主から組換え技法によって産生された産物を含む。いくつかの抗体産生系が、Birch & Radner (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58: 671-685に記載されている。

【0245】

検査されている抗体が、タンパク質またはポリペプチドと結合する場合、検査されている抗体と本開示によって提供される抗体は、等価物である。検査されている抗体によって、本明細書に開示される抗体が、この抗体が正常に反応するタンパク質またはポリペプチドに結合することができなくなるかを決定することにより、過度の実験法を行わずに、抗体が、本明細書に開示される抗体と同じ特異性を有するかを決定することも可能である。本明細書に開示されるモノクローナル抗体による結合の減少によって示される通り、検査されている抗体が、本明細書に開示される抗体と競合する場合、この2種の抗体が、同じまたは密接に関係しているエピトープに結合する可能性がある。あるいは、本明細書に開示される抗体を、それが正常に反応するタンパク質と共にプレインキュベートし、検査されている抗体が、抗原に結合するその能力において阻害されるかを決定することができる。検査されている抗体が阻害される場合、ほぼ確実に、これは、本明細書に開示される抗体と同じまたは密接に関係しているエピトープ特異性を有する。

30

40

【0246】

用語「抗体」はまた、あらゆる免疫グロブリンアイソタイプおよびサブクラスの抗体を含むことも意図する。特定のアイソタイプのモノクローナル抗体は、初期融合物から選択することにより直接的に調製することができる、またはs i b選択技法を使用することにより異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製して、Steplewski et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8653またはSpira et al. (1984) J. Immunol. Methods 74: 307に記載の手順を使用してクラススイッチバリエーションを単離することができる。あるいは、組換えDNA技法を使用することができる。

50

【0247】

本明細書に記載されるモノクローナル抗体の特異性を有する他のモノクローナル抗体の単離は、当業者によって、抗イディオタイプ抗体を産生することにより達成することもできる。Herlyn et al. (1986) Science 232:100。抗イディオタイプ抗体は、目的のモノクローナル抗体に存在する特有の決定基を認識する抗体である。

【0248】

本明細書に開示される一部の態様では、抗体を検出可能にまたは治療的に標識することが有用である。適した標識は、上に記載されている。これらの作用物質に抗体をコンジュゲートするための方法は、当技術分野で公知である。単なる説明目的で、抗体は、例えば放射性原子、発色団、フルオロフォアなどの検出可能な部分で標識することができる。斯かる標識された抗体は、in vivoで、または単離された検査試料において、診断技法に使用することができる。

【0249】

低分子量ハプテンへの抗体のカップリングは、アッセイにおける抗体の感度を増加させることができる。次いで、ハプテンは、第2の反応を用いて特異的に検出することができる。例えば、アビジンと反応するビオチン、または特異的抗ハプテン抗体と反応することができるジニトロフェノール、ピリドキサルおよびフルオレセイン等のハプテンを使用することが一般的である。Harlow and Lane (1988) 上記、を参照されたい。

【0250】

本開示の抗体の可変領域は、VHおよび／またはVL CDR1、CDR2および／またはCDR3領域内のアミノ酸残基を変異させて、抗体の1つまたは複数の結合特性（例えば、親和性）を改善することにより改変することができる。変異は、部位特異的変異誘発またはPCR媒介性変異誘発によって導入することができ、目的の抗体結合または他の機能特性における効果を適切なin vitroまたはin vivoアッセイにおいて評価することができる。ある特定の実施形態では、保存的改変が導入され、典型的に、CDR領域内の1、2、3、4または5残基以下が変更される。変異は、アミノ酸置換、付加または欠失であってよい。

【0251】

例えば、1つまたは複数のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列へと「戻し変異 (backmutating)」させることにより、フレームワーク改変を抗体に為して、免疫原性を減少させることができる。

【0252】

加えて、本明細書に開示される抗体は、Fc領域内に改変を含むように操作して、血清半減期 (half-life)、補体固定、Fc受容体結合および／または抗原依存性細胞性細胞傷害等の抗体の1つまたは複数の機能特性を変更することができる。斯かる改変は、軽鎖および重鎖のアセンブリーを容易にするためまたは抗体の安定性を増加もしくは減少させるためのヒンジ領域におけるシステイン残基の数の変更（米国特許第5,677,425号）、および抗体の生物学的半減期を減少させるためのFcヒンジ領域におけるアミノ酸変異（米国特許第6,165,745号）を含むがこれらに限定されない。

【0253】

その上、本明細書に開示される抗体は、化学的に改変することができる。抗体のグリコシル化は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つまたは複数の部位を改変して、抗原に対する抗体の親和性を増加させることにより変更することができる（米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号）。あるいは、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を増加させるために、変更されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることにより、低減された量のフコシル残基を有する低フコシル化 (hypofucosylated) 抗体、または増加されたバイセクト型GlcNAc構造を有する抗体を得ることができる (Shields, R. L. et al. (2002)

J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180)。

【0254】

1つまたは複数のポリエチレングリコール (PEG) 基が抗体または抗体断片に結合されるようになる条件下で、抗体またはその断片を PEG または PEG の反応性エステルもしくはアルデヒド誘導体と反応させることにより、本明細書に開示される抗体をペグ化して、生物学的半減期を増加させることができる。抗体ペグ化は、反応性 PEG 分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応によって実行することができる。本明細書で使用される場合、用語「ポリエチレングリコール」は、モノ (C1~C10) アルコキシーもしくはアリールオキシーポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミド等、他のタンパク質を誘導体化するのに使用されたことがある PEG 形態のいずれかを包含することを意図する。ペグ化されるべき抗体は、無グリコシル化 (aglycosylated) 抗体となることができる。タンパク質をペグ化するための方法は、当技術分野で公知であり、本明細書に開示される抗体に適用することができる (EP0154316 および EP0401384)。

10

【0255】

その上、抗体は、ヒト血清アルブミン等の血清タンパク質に抗体の抗原結合性領域をコンジュゲートまたは融合することにより化学的に改変して、結果として生じる分子の半減期を増加させることができる。斯かるアプローチは、例えば、EP0322094 および EP0486525 に記載されている。

20

【0256】

本開示の抗体またはその断片は、診断剤にコンジュゲートし、診断的に使用して、例えば、疾患の発症または進行をモニターし、所与の処置レジメンの有効性を決定することができる。診断剤の例は、酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、様々なポジトロン放出断層撮影を使用したポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンを含む。検出可能な物質は、当技術分野で公知の技法を使用して、抗体もしくはその断片に直接的に、またはリンカーを介して間接的に、カップリングまたはコンジュゲートすることができる。適した酵素の例は、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを含む。適した補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含む。適した蛍光材料の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン (dichlorotriazinylamine) フルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンを含む。発光材料の例は、ルミノールを含む。生物発光材料の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンを含む。適した放射性材料の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、インジウム-111、ルテチウム-171、ビスマス-212、ビスマス-213、アスタチン-211、銅-62、銅-64、銅-67、イットリウム-90、ヨウ素-125、ヨウ素-131、リン-32、リン-33、スカンジウム-47、銀-111、ガリウム-67、プラセオジウム-142、サマリウム-153、テルビウム-161、ジスプロシウム-166、ホルミウム-166、レニウム-186、レニウム-188、レニウム-189、鉛-212、ラジウム-223、アクチニウム-225、鉄-59、セレンウム-75、ヒ素-77、ストロンチウム-89、モリブデン-99、ロジウム-1105、パラジウム-109、プラセオジウム-143、プロメチウム-149、エルビウム-169、イリジウム-194、金-198、金-199 および鉛-211を含む。モノクローナル抗体は、抗体に共有結合により連結された二官能性キレート化剤の使用により、放射性金属イオンと間接的にコンジュゲートすることができる。キレート化剤は、アミノ基 (amities) (Meares et al. (1984) Anal. Biochem. 142:68-78); アミノ酸残基のスルフィドリル (sulfhydryl) 基 (Koyama (1994) Chem. Abstr. 120:217-262) および炭水化物基 (Rodwell et al. (1986) PNAS USA 83:26

30

40

50

32-2636; Quadri et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:559-570) を介して結合することができる。

【0257】

さらに、本開示の抗体またはその断片は、治療剤にコンジュゲートすることができる。適した治療剤は、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド (tenoposide)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン (dihydroxy anthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシン、代謝拮抗薬 (メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン (fludarabine)、5-フルオロウラシル、ダカルバジン (decarbazine)、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン (gemcitabine)、クラドリビン等)、アルキル化剤 (メクロレタミン、チオデパ (thioepa)、クロラムブシル (chlorambucil)、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、ロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン (DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、およびカルボプラチン等の他の白金誘導体等)、抗生物質 (ダクチノマイシン (以前はアクチノマイシン)、プレオマイシン、ダウノルピシン (以前はダウノマイシン)、ドキシソルピシン、イダルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン (AMC) 等)、ジフテリア毒素および関連分子 (ジフテリアA鎖およびその活性断片、ならびにハイブリッド分子等)、リシン毒素 (リシンAまたは脱グリコシル化リシンA鎖毒素等)、コレラ毒素、志賀毒素様毒素 (SLT-I、SLT-II、SLT-IIIV)、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、大豆ボウマン・バークプロテアーゼインヒビター、Pseudomonas外毒素、アロリン (alorin)、サポリン、モデクシン (modeccin)、ゲラニン (gelanin)、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファ-サルシン (sarcin)、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチン (dianthin) タンパク質、Phytolacca americanaタンパク質 (PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、Momordica charantiaインヒビター、クルシン (curcin)、クロチン (crotonin)、Saponaria officinalisインヒビター、ゲロニン、ミトゲリン (mitogellin)、レストリエトシン (restrietocin)、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin) 毒素および混合毒素を含む。

【0258】

追加の適したコンジュゲートされた分子は、リボヌクレアーゼ (RNアーゼ)、DNアーゼ I、アンチセンス核酸、siRNA分子等の阻害性RNA分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子、および外部ガイド配列を含む。アプタマーは、ステム・ループまたはG-カルテット等、定義された二次および三次構造へと折り畳む、15~50塩基の長さおよび小型の核酸であり、ATP (米国特許第5,631,146号) およびテオフィリン (theophylline) (米国特許第5,580,737号) 等の小分子、ならびに逆転写酵素 (米国特許第5,786,462号) およびトロンビン (米国特許第5,543,293号) 等の大分子に結合することができる。リボザイムは、分子内または分子間のいずれかで、化学反応を触媒することができる核酸分子である。リボザイムは典型的に、標的基質の認識および結合と、その後の切断により、核酸基質を切断する。3本のDNA鎖が、ワトソン・クリックおよびフーグスティーン塩基対形成の両方に依存する複合体を形成する、三重鎖を形成することにより、三重鎖形成機能核酸分子は、二本鎖または一本鎖核酸と相互作用することができる。三重鎖分子は、高い親和性および特異性で、標的領域に結合することができる。

【0259】

機能的核酸分子は、標的分子によって保有される比活性のエフェクター、インヒビター、モジュレーターおよび刺激因子として作用することができる、または機能的核酸分子は、他のいかなる分子からも独立した *de novo* 活性を保有することができる。

【0260】

治療剤は、多数の利用できる方法のいずれかを使用して、直接的にまたは間接的に抗体に連結することができる。例えば、作用物質は、還元した抗体成分のヒンジ領域において、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) 等の架橋剤を使用したジスルフィド結合形成を介して、または抗体のFc領域における炭水化物部分を介して、結合することができる (Yu et al. 1994 Int. J. Cancer 56: 244; Upeslakis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995))。

【0261】

治療剤を抗体にコンジュゲートするための技法は、周知されている (Amon et al. "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy; Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.); Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) および Thorpe et al. "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," (1982) Immunol. Rev. 62:119-58)。

【0262】

本明細書に開示される抗体またはその抗原結合性領域は、別の抗体または受容体のリガンド等、別の機能的分子に連結して、少なくとも2種またはそれよりも多くの種の異なる結合部位または標的分子に結合する二特異性または多特異性分子を生成することができる。別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣物等、1つまたは複数の他の結合分子への抗体の連結は、例えば、化学的カップリング、遺伝的融合または非共有結合的会合によって為すことができる。多特異性分子は、第1および第2の標的エピトープに加えて、第

3の結合特異性をさらに含むことができる。

【0263】

二特異性および多特異性分子は、当技術分野で公知の方法を使用して調製することができる。例えば、二特異的分子(hi-specific molecule)の各結合単位を別々に生成し、次いで互いにコンジュゲートすることができる。結合分子がタンパク質またはペプチドである場合、種々のカップリング剤または架橋剤を共有結合コンジュゲーションに使用することができる。架橋剤の例は、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジルS-アセチル-L-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸(nitrobenzoyl acid)) (DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)およびスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン(cyclohexane)-E-カルボキシレート(スルホ-SMCC)を含む(Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。結合分子は、抗体である場合、2個の重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合によってコンジュゲートすることができる。

【0264】

本開示の抗体またはその断片は、抗体が結合される細胞に対して毒性がある部分に連結して、「枯渇」抗体を形成することができる。

【0265】

本明細書に開示される抗体は、標的抗原のイムノアッセイまたは精製に特に有用な固体支持体に結合することもできる。斯かる固体支持体は、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンを含むがこれらに限定されない。

【0266】

抗体は、多くの異なる担体に結合させることもできる。よって、本開示はまた、抗体と、活性または不活性の別の物質とを含有する組成物を提供する。周知の担体の例は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ(amylose)、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、ならびにマグネタイトを含む。担体の性質は、本明細書に開示される目的のため、可溶性または不溶性のいずれかとなることができる。当業者であれば、モノクローナル抗体の結合のための他の適した担体について知っている、またはルーチンの実験法を使用して、そのようなものを確かめることができる。

【0267】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、全長抗体である。

【0268】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0269】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、キメラまたはヒト化である。

【0270】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、Fab、F(ab)'₂、Fab'、scFvおよびFvからなる群から選択される。

【0271】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、Fcドメインを含む。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、非ヒト動物、例えば、ラット、羊、ウシ、イヌ、ネコまたはウサギ抗体である。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、ヒトもしくはヒト化抗体である、またはヒトにおいて非免疫原性である。

【0272】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、ヒト抗体フレームワーク領域を含む。

【0273】

他の態様では、本明細書に提供される抗体のCDRにおける1つまたは複数のアミノ酸残基は、別のアミノ酸で置換される。置換は、同じアミノ酸ファミリー内の置換であるという意味で「保存的」となることができる。天然に存在するアミノ酸は、次の4つのファミリーに分けることができ、保存的置換は、これらのファミリー内で行われる。

【0274】

1) 塩基性側鎖を有するアミノ酸：リシン、アルギニン、ヒスチジン。

【0275】

2) 酸性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸

【0276】

3) 無電荷極性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン。

【0277】

4) 非極性側鎖を有するアミノ酸：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システイン。

【0278】

別の態様では、1つまたは複数のアミノ酸残基が、抗体の1つまたは複数のCDRに付加されるまたはこれから欠失される。斯かる付加または欠失は、CDRのNもしくはC末端でまたはCDR内の位置で起こる。

【0279】

アミノ酸の付加、欠失または置換によって抗体のCDRのアミノ酸配列を変動させることにより、標的抗原に対する結合親和性増加等、様々な効果を得ることができる。

【0280】

斯かる変動されたCDR配列を含む本開示の抗体が、依然として、開示されている抗体と同様の特異性および感度プロファイルで、DNABIIタンパク質に結合することを十分に理解するべきである。このことは、結合アッセイによって検査することができる。

【0281】

さらなる態様では、抗体は、適切なアッセイおよびスクリーニングを使用して決定される通り、免疫優性および免疫保護の両方であることによって特徴付けされる。

抗体による機能解析

【0282】

本明細書に開示される抗体を使用して、本明細書に開示されるポリペプチドを精製し、生物学的に等価なポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを同定することができる。本明細書に開示される抗体を使用して、本明細書に開示されるポリペプチドの機能を改変する作用物質を同定することもできる。このような抗体は、当業者にとって馴染みがあり上に記載されている、ポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、およびこのような調製物に由来する様々な試薬を含む。

【0283】

同定された遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を中和する抗体を*in vivo*および*in vitro*で使用して、*in vivo*および*in vitro*検査システムに斯かる中和抗体を添加することにより、機能を実証することもできる。抗体は、本明細書に開示されるポリペプチドの活性をモジュレートするための医薬品としても有用である。

【0284】

ELISAアッセイまたはウエスタンブロット等の解析方法において様々な抗体調製物を使用して、*in vitro*または*in vivo*で、検査細胞による、同定された遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を実証することもできる。適切なポリクローナル抗血清と実験的試料に由来する試料を使用することにより、代謝においてプロテアーゼ分解によって生成された斯かるタンパク質の断片を同定することもできる。

【0285】

本明細書に開示される抗体は、単独で、またはペプチドもしくはタンパク質に基づくワクチンまたは樹状細胞に基づくワクチンと組み合わせて、ワクチン接種にまたはワクチン接種のブーストに使用することができる。

組成物

【0286】

本開示は、さらに、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質、バイオフィルムもしくはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する作用物質、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質、および／または抗菌剤のうちの1つ、2つまたはそれよりも多く、3つまたはそれよりも多くを含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる組成物を提供する。一態様では、組成物は、HMB1タンパク質、その断片およびその等価物を含まない、これから本質的にならない、さらになお、これからならない。別の態様では、組成物は、DNアーゼを含む、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる。さらなる態様では、組成物は、DNアーゼを含まない、これから本質的にならない、さらになお、これからならない。一実施形態では、組成物は、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質、およびバイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する作用物質を含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる。第2の実施形態では、組成物は、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する作用物質、およびeDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質を含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる。第3の実施形態では、組成物は、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する作用物質、およびeDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質を含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる。第4の実施形態では、組成物は、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質(an agent an agent)、およびeDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質を含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる。第5の実施形態では、組成物は、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質(an agent an agent)、およびeDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質、および／または抗菌剤を含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる。第6の実施形態では、組成物は、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質(an agent an agent)、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質、およびeDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質を含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる。第7の実施形態では、組成物は、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質(an agent an agent)、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質、およびバイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する作用物質を含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなる。

【0287】

本開示の組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなることができる。

【0288】

一態様では、ポリアミンのバイオフィルム中のDNAへの結合に干渉する作用物質は、ポリアミンアナログであるジフルオロメチルオルニチン、トランス-4-メチルシクロヘキシルアミン、サルドモジド、メチルグリオキサールビス[グアニルヒドラゾン](MGBG)、1-アミノオキシ-3-アミノプロパン、オキサリプラチン、シスプラチンおよび／またはジシクロヘキシルアミン、任意のその誘導体、またはその塩のうちの1つま

たは複数を含む。別の態様では、バイオフィルムからカチオンを枯渇させる作用物質は、カチオン交換樹脂、アミノポリカルボン酸、クラウンエーテル、アザクラウン、またはクリプタンド、スルホネート、スルホプロピル、ホスホセルロース、P 1 1 ホスホセルロースおよび／またはヘパリン硫酸、またはその誘導体もしくはアナログのうちの1つまたは複数を含む。さらに別の態様では、バイオフィルムまたはその局所環境においてB-DNAのZ-DNAへの変換に干渉する作用物質は、HMGB1タンパク質、その断片もしくはその各々の等価物、抗B-DNA抗体、またはその断片もしくは誘導体、および／またはクロロキン、または任意のその誘導体のうちの1つまたは複数を含む。特定の一態様では、eDNAのDNA結合タンパク質への結合に干渉する作用物質は、抗DNA B E I抗体、抗I H F抗体および／または抗H U抗体、またはその各々の断片のうちの1つまたは複数を含む。

10

【0289】

組成物がさらに提供される。組成物は、担体と、本明細書に開示される単離されたポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベクター、本明細書に開示される単離された宿主細胞、本明細書に開示される小分子または抗体のうちの1つまたは複数を含む。担体は、固体支持体または薬学的に許容される担体のうちの1つまたは複数となることができる。組成物は、アジュバントまたはワクチンとしての投与に適した他の成分をさらに含むことができる。一態様では、組成物は、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、担体および／またはアジュバントと共に製剤化される。加えて、本開示の組成物の実施形態は、1つまたは複数の薬学的に許容される物質と共に製剤化された、本明細書に開示される単離されたポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベクター、本明細書に開示される小分子、単離された宿主細胞または本開示の抗体のうちの1つまたは複数を

20

【0290】

経口調製物のため、本明細書に記載される単離されたまたは組換えポリペプチド、本明細書に記載される単離されたまたは組換えポリヌクレオチド、本明細書に記載されるベクター、本明細書に記載される単離された宿主細胞、本明細書に記載される小分子または抗体のうちのいずれか1つまたは複数を、単独で使用するか、または錠剤、散剤、顆粒剤またはカプセル剤を作製するための適切な添加物と組み合わせ、例えば、ラクトース、マンニトール、トウモロコシデンプンまたはジャガイモデンプン等の従来の添加物と；結晶性セルロース、セルロース誘導体、アカシア、トウモロコシデンプンまたはゼラチン等の結合剤と；トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプンまたはカルボキシメチルセルロースナトリウム等の崩壊剤と；タルクまたはステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤と；および所望であれば、希釈剤、緩衝剤、保湿剤、保存剤および香味剤と、組み合わせ化合物を含むもしくはこれから本質的になる本明細書に開示される医薬製剤において使用することができる。薬学的に適合性な結合剤 (binding agent) および／またはアジュバント材料が、組成物の一部として含まれてよい。錠剤、丸剤、カプセル剤、トロージクなど、次の成分または同様の性質の化合物のいずれかを含有することができる：微結晶性セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチン等の結合剤 (binder)；デンプンもしくはラクトース等の賦形剤、アルギン酸、Primogelもしくはトウモロコシデンプン等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotes等の滑沢剤；コロイド性二酸化ケイ素等の滑剤 (glidant)；スクロースもしくはサッカリン等の甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジ香味料等の香味剤。

30

40

【0291】

経口投与に適した医薬製剤および単位用量形態は、慢性状態、感染症の処置、および患者が薬物を自己投与する治療法において特に有用である。一態様では、製剤は、小児投与に特異的である。

【0292】

本開示は、医薬製剤を提供し、この医薬製剤において、本明細書に開示される単離され

50

たポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベクター、本明細書に開示される単離された宿主細胞、または本明細書に開示される抗体のうちの1つまたは複数は、これらを、植物油もしくは他の同様の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステル、またはプロピレングリコール等の水性または非水性溶媒に溶解、懸濁または乳化することにより、本開示に従って注射用調製物へと、所望であれば、可溶化剤、等張剤、懸濁化剤、乳化剤、安定剤および保存剤または他の抗微生物剤等の従来の添加物と共に、製剤化され得る。そのようなものの非限定的な例は、表面抗原、例えば、OMP P5、OMP 26、OMP P2またはIV型ピリントパク質 (Jurcisek and Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189 (10) : 3868-3875およびMurphy, T F, Bakaletz, L O and Smeesters, P R (2009) The Pediatric Infectious Disease Journal, 28 : S121-S126を参照) 等の他のワクチン成分、および抗菌剤等の抗微生物剤である。静脈内投与のため、適した担体は、生理的静菌水、Cremophor EL (商標) (BASF, Parsippany, N. J.) またはリン酸緩衝食塩水 (PBS) を含む。全ての事例において、非経口投与のための組成物は、滅菌されていなければならず、容易に注射できる程度まで流動性があるべきである。

【0293】

本開示によって提供されるエアロゾル製剤は、吸入により投与することができ、噴射剤または非噴射剤ベースとなることができる。例えば、本明細書に開示される医薬製剤の実施形態は、例えばジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧された許容される噴射剤中に製剤化された本明細書に開示される化合物を含む。吸入による投与のため、化合物は、適した噴射剤、例えば、二酸化炭素等のガスを含有する加圧された容器もしくはディスペンサーまたはネブライザーからエアロゾルスプレーの形態で送達することができる。非噴射剤の非限定的な例は、機械力 (すなわち、指でピストンを押し下げること、または容器の壁に加えられる圧縮力もしくは壁それ自体によって、例えば、弾性囊によって及ぼされる弾性力等、容器の圧縮による) を用いて閉鎖容器から駆出されるポンプスプレーである。

【0294】

本明細書に開示される坐剤は、本明細書に開示される化合物を、乳化基剤または水溶性基剤等の種々の基剤のいずれかと混合することにより調製することができる。本明細書に開示される化合物のこのような医薬製剤の実施形態は、坐剤により直腸投与することができる。坐剤は、体温で融解するが室温で凝固する、カカオバター、カルボワックス (c a r b o w a x) およびポリエチレングリコール等の媒体を含むことができる。

【0295】

シロップ剤、エリキシル剤および懸濁剤等、経口または直腸投与のための単位剤形を提供することができ、各投薬量単位、例えば、茶匙1杯 (t e a s p o o n f u l) 、食匙1杯 (t a b l e s p o o n f u l) 、錠剤または坐剤は、本明細書に開示される1つまたは複数の化合物を含有する組成物の所定の量を含有する。同様に、注射または静脈内投与のための単位剤形は、滅菌水、生理的食塩水 (n o r m a l s a l i n e) または別の薬学的に許容される担体中の液剤としての組成物中に本明細書に開示される化合物を含むことができる。

【0296】

本明細書に開示される医薬製剤の実施形態は、本明細書に開示される単離されたポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベクター、本開示における使用のための小分子、本明細書に開示される単離された宿主細胞または本明細書に開示される抗体のうちの1つまたは複数、注射用組成物中に製剤化される実施形態を含む。本明細書に開示される注射用医薬製剤は、液体の液剤もしくは懸濁剤として；または注射に先立つ液体媒体への溶解もしくは懸濁に適した固体形態として調製される。本明細書に開示される医薬製剤の他の実施形態に従って、調製物は、乳化するこ

ともできる、またはリポソーム媒体に被包された活性成分となることもできる。

【0297】

ある実施形態では、本明細書に開示される単離されたポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベクター、本明細書に開示される単離された宿主細胞または本明細書に開示される抗体のうちの1つまたは複数は、持続的送達系による送達のために製剤化される。用語「持続的送達系」は、「制御された送達系」と互換的に本明細書で使用され、そのうち多種多様なものが当技術分野で公知である、カテーテル、注射デバイスなどと組み合わせた、持続的（例えば、制御された）送達デバイス（例えば、ポンプ）を包含する。

【0298】

機械的または電気機械的注入ポンプも、本開示による使用に適する場合がある。斯かるデバイスの例は、例えば、米国特許第4,692,147号；同第4,360,019号；同第4,487,603号；同第4,360,019号；同第4,725,852号；同第5,820,589号；同第5,643,207号；同第6,198,966号などに記載されているデバイスを含む。一般に、本明細書に開示される化合物の送達は、種々の詰め替え可能なポンプシステムのいずれかを使用して達成することができる。ポンプは、経時的に一貫した制御放出をもたらす。一部の実施形態では、本明細書に開示される化合物は、薬物不透過性リザーバー内の液体製剤中に存在し、持続的様式で個体に送達される。

【0299】

一実施形態では、薬物送達系は、少なくとも部分的に植込み型デバイスである。植込み型デバイスは、当技術分野で周知の方法およびデバイスを使用して、いずれか適した植込み部位に植え込むことができる。植込み部位は、薬物送達デバイスが導入され置かれる、対象の身体内の部位である。植込み部位は、真皮下、皮下、筋肉内、または対象の身体内の他の適した部位を含むが、これらに必ずしも限定されない。皮下植込み部位は、一部の実施形態では、薬物送達デバイスの植込みおよび除去における便宜のために使用される。

【0300】

本開示における使用に適した薬物放出デバイスは、種々の操作機序のいずれかに基づくことができる。例えば、薬物放出デバイスは、拡散システム、対流システムまたは侵食性システム（例えば、侵食に基づくシステム）に基づくことができる。例えば、薬物放出デバイスは、電気化学的ポンプ、浸透圧ポンプ、電気浸透圧ポンプ、蒸気圧ポンプまたは浸透圧バーストマトリックスとなることができ、この場合、例えば、薬物は、ポリマーに取り込まれ、ポリマーは、薬物含浸ポリマー材料（例えば、生分解性、薬物含浸ポリマー材料）の分解に付随して薬物製剤の放出をもたらす。他の実施形態では、薬物放出デバイスは、電気拡散システム、電解ポンプ、発泡ポンプ、圧電ポンプ、加水分解システム等に基づく。

【0301】

機械的または電気機械的注入ポンプに基づく薬物放出デバイスも、本開示による使用に適する場合がある。斯かるデバイスの例は、例えば、米国特許第4,692,147号；同第4,360,019号；同第4,487,603号；同第4,360,019号；同第4,725,852号などに記載されているデバイスを含む。一般に、対象処置方法は、種々の詰め替え可能で交換不可能なポンプシステムのいずれかを使用して達成することができる。ポンプおよび他の対流システムは、それらには、経時的に一般的により一貫性のある制御放出があるという理由から利用することができる。浸透圧ポンプは、一部の実施形態では、それらには、より一貫性のある制御放出と比較的小さいサイズという複合的利点があるという理由から使用される（例えば、PCT国際出願公開番号WO97/27840ならびに米国特許第5,985,305号および同第5,728,396号を参照）。本開示における使用に適した例示的な浸透圧により駆動されるデバイスは、米国特許第3,760,984号；同第3,845,770号；同第3,916,899号；同第3,923,426号；同第3,987,790号；同第3,995,631号；同第3

10

20

30

40

50

、916、899号；同第4、016、880号；同第4、036、228号；同第4、111、202号；同第4、111、203号；同第4、203、440号；同第4、203、442号；同第4、210、139号；同第4、327、725号；同第4、627、850号；同第4、865、845号；同第5、057、318号；同第5、059、423号；同第5、112、614号；同第5、137、727号；同第5、234、692号；同第5、234、693号；同第5、728、396号などに記載されているデバイスを含むが、これらに必ずしも限定されない。本開示に適応され得るさらに例示的なデバイスは、Synchromed注入ポンプ（Medtronic）である。

【0302】

一部の実施形態では、薬物送達デバイスは、植込み型デバイスである。薬物送達デバイスは、当技術分野で周知の方法およびデバイスを使用して、いずれか適した植込み部位に植え込むことができる。本明細書に記述される通り、植込み部位は、薬物送達デバイスが導入され置かれる、対象の身体内の部位である。植込み部位は、真皮下、皮下、筋肉内、または対象の身体内の他の適した部位を含むが、これらに必ずしも限定されない。

【0303】

本明細書に開示される化合物に適した賦形剤媒体は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組合せである。加えて、所望であれば、媒体は、湿潤剤または乳化剤またはpH緩衝剤等、少量の補助的物質を含有することができる。斯かる剤形を調製する方法は、公知である、または本開示を考慮することにより、当業者には明らかとなる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 17th edition, 1985を参照されたい。投与されるべき組成物または製剤は、いかなる場合であっても、処置されている対象における所望の状態の達成に適切な化合物の含量を含有する。

【0304】

本開示の組成物は、徐放性マトリックスまたは制御放出マトリックスを含む組成物を含む。加えて、本開示の実施形態は、徐放性製剤を使用する他の処置と併せて使用することができる。本明細書で使用される場合、徐放性マトリックスは、酵素によるもしくは酸に基づく加水分解または溶解によって分解可能な材料、通常、ポリマーから作られたマトリックスである。身体内に挿入されると、マトリックスは、酵素および体液の作用を受ける。徐放性マトリックスは、望ましくは、リポソーム、ポリラクチド（ポリ乳酸）、ポリグリコリド（グリコール酸のポリマー）、ポリラクチドc o -グリコリド（乳酸およびグリコール酸のコポリマー）、ポリ酸無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、コンドロイチンサルフェート、カルボン酸（carboxylic acid）、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、フェニルアラニン（phenylalanine）、チロシン、イソロイシン等のアミノ酸、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドンおよびシリコン等の生体適合性材料から選択される。説明目的の生分解性マトリックスは、ポリラクチドマトリックス、ポリグリコリドマトリックスおよびポリラクチドc o -グリコリド（乳酸およびグリコール酸のコポリマー）マトリックスを含む。

【0305】

別の実施形態では、作用物質（および組合せ組成物）は、制御放出システムにおいて送達される。例えば、本明細書に開示される化合物は、静脈内注入、植込み型浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソームまたは他の投与機序を使用して投与することができる。一実施形態では、ポンプを使用することができる（Sefton（1987）CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al.（1980）Surgery 88:507; Saudek et al.（1989）N. Engl. J. Med. 321:574）。別の実施形態では、ポリマー材料が使用される。さらに別の実施形態では、制御放出システムは、治療標的、すなわち、肝臓に近接して配置され、よって、全身性用量のごく一部しか要求しない。さらに別

の実施形態では、制御放出システムは、治療標的に近接して配置され、よって、全身性用量のごく一部しか要求しない。他の制御放出システムは、L a n g e r (1 9 9 0) S c i e n c e 2 4 9 : 1 5 2 7 - 1 5 3 3 による概説において考察されている。

【 0 3 0 6 】

別の実施形態では、本開示の組成物（および別々のまたは一緒にの組合せ組成物）は、組成物を送達するために、縫合糸、包帯およびガーゼ等の吸収性材料への本明細書に記載される阻害する作用物質の含浸によって形成された組成物、または手術用ステープル、ジッパーおよびカテーテル等の固相材料の表面にコーティングされた組成物を含む。この種の他の送達系は、当業者には、本開示を考慮して容易に明らかとなる。

【 0 3 0 7 】

本開示は、微生物感染の処置のための、作用物質のうちの1つまたは複数の宿主（例えば、ヒト）への投与のための方法および組成物を提供する。様々な実施形態では、本明細書に開示されるこのような方法は、i n v i v o および e x v i v o 方法、ならびに全身性および局部投与経路を含む、薬物送達に適したほぼ全ての利用する方法および経路に及ぶ。

スクリーニングアッセイ

【 0 3 0 8 】

本開示は、本明細書に記載されるポリクローナル抗体と等価なモノクローナル抗体等の等価な作用物質、および活性剤の活性をモジュレートする様々な作用物質、および本明細書に開示される医薬組成物、または本明細書に開示されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドもしくはペプチド産物の機能に関してスクリーニングするための方法を提供する。本開示の目的のため、「作用物質」は、単純もしくは複雑な有機もしくは無機分子、ペプチド、タンパク質（例えば、抗体）、ポリヌクレオチド（アンチセンス）、またはリボザイム等の生物学的または化学的な化合物を含むが、これらに限定されないことを意図する。広範囲の化合物、例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチド等のポリマー、ならびに様々なコア構造に基づく合成有機化合物を合成することができ、これらもまた、用語「作用物質」に含まれる。加えて、例えば植物または動物抽出物など、様々な天然の供給源が、スクリーニングのための化合物をもたらすことができる。必ずしも明確に記述されているとは限らないが、作用物質が、単独で、または発明に関するスクリーニングによって同定される作用物質と同じもしくは異なる生物活性を有する別の作用物質と組み合わせて使用されることを理解されたい。

【 0 3 0 9 】

当業者には明らかなように、マイクロタイタープレートにおいて適した細胞を培養することができ、遺伝子型変化、表現型変化または微生物力価の低減に注目することにより、いくつかの作用物質を同時にアッセイすることができる。

【 0 3 1 0 】

作用物質が、上述の通り、小分子等、DNA または RNA 以外の組成物である場合、作用物質は、細胞培養物に直接的に添加することができる、または添加のための培養培地に添加することができる。当業者には明らかなように、経験的に決定することができる「有効」量 (a m o u n t) が添加されなければならない。

【 0 3 1 1 】

作用物質が、抗体または抗原結合性断片である場合、作用物質は、競合的 E L I S A を行うための条件下で、標的抗原および本明細書に記載されるポリクローナル抗体と接触させるまたはこれと共にインキュベートすることができる。斯かる方法は、当業者にとって公知である。

【 0 3 1 2 】

アッセイは、対象において行うこともできる。対象が、ラット、チンチラ、マウスまたはサル等の動物である場合、本方法は、ヒト患者における作用物質の臨床検査に先立ち使用することができる簡便な動物モデルシステムを提供する。このシステムにおいて、疾患または微生物感染の症状が、同じ感染を有する無処置動物とそれぞれ比較して低減または

10

20

30

40

50

排除される場合、候補作用物質は、潜在的な薬物である。比較のための基礎を提供する、健康で処置されない細胞または動物の別々の陰性対照群を有することは有用であり得る。

【0313】

作用物質および組成物は、医薬組成物における活性成分等、医薬の製造において、また、従来の手順に従った投与によるヒトおよび他の動物の処置のために使用することができる。

併用療法

【0314】

本開示の組成物および関連方法は、他の療法の投与と組み合わせて使用することができる。これらは、DNアーゼ酵素、抗生物質、抗微生物薬または他の抗体の投与を含むがこれらに限定されない。一態様では、作用物質は、DNアーゼ酵素の非存在下で投与される。

【0315】

他の実施形態では、方法および組成物は、抗生物質および／または抗微生物薬と組み合わせることができる。抗微生物薬は、細菌、真菌または原生動物等の微生物の成長を死滅させるまたは阻害する物質である。バイオフィームは一般に、抗生物質の作用に対し抵抗性であるが、本明細書に記載される組成物および方法を使用して、バイオフィームが関与する感染を、感染を処置するための従来の治療方法に対して感受性にすることができる。他の実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物と組み合わせた抗生物質または抗微生物薬の使用は、抗微生物薬および／またはバイオフィーム低減剤の有効量の低減を可能にする。本開示の方法と組み合わせて有用な抗微生物薬および抗生物質の一部の非限定的な例は、アモキシシリン、アモキシシリン・クラブラン酸塩、セフジニル、アジスロマイシンおよびスルファメトキサゾール・トリメトプリムを含む。バイオフィーム低減剤と組み合わせた抗微生物薬および／または抗生物質の治療有効用量は、従来の方法によって容易に決定することができる。一部の実施形態では、バイオフィーム低減剤と組み合わせた抗微生物剤の用量は、他の細菌感染、例えば、感染の病因がバイオフィームを含まない細菌感染において有効であることが示された平均有効用量である。他の実施形態では、用量は、平均有効用量の0.1、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0または5倍である。抗生物質または抗微生物薬は、抗DNA B I I抗体の添加の前に、それと同時にまたはその後に添加することができる。

【0316】

他の実施形態では、方法および組成物は、細菌感染を処置する抗体と組み合わせることができる。本明細書に記載される方法および組成物と組み合わせて有用な抗体の一例は、無関係の外膜タンパク質（すなわち、OMP P5）に対する抗体である。この抗体単独による処置は、*in vitro*でバイオフィームを減量しない。この抗体およびバイオフィーム低減剤による組み合わせた治療法は、同じ濃度で単独で使用されたいずれかの試薬によって達成され得る効果よりも大きい効果をもたらす。バイオフィーム低減剤またはバイオフィームを低減するための方法と組み合わせたときに相乗効果を生じさせることができる他の抗体は、抗*r s P i l A*、抗OMP 26、抗OMP P2および抗OMP全体調製物を含む。

【0317】

本明細書に記載される組成物および方法を使用して、バイオフィームが関与する細菌感染を、バイオフィームによらない細菌感染の処置において有効であるが、他の面では、バイオフィームが関与する細菌感染の処置において無効な一般的治療モダリティに対して感受性にするすることができる。他の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法は、バイオフィームが関与する細菌感染の処置において有効な治療モダリティと組み合わせて使用することができるが、斯かる追加の治療法およびバイオフィーム低減剤または方法の組合せは、バイオフィーム低減剤または追加の治療剤のいずれかの有効用量が低減され

得るような相乗効果を生じさせる。他の実例では、斯かる追加の治療法およびバイオフィルム低減剤または方法の組合せは、処置が増強されるような相乗効果を生じさせる。処置の増強は、より短い時間量が感染の処置に要求されることによって証明することができる。

【0318】

追加の治療的処置は、バイオフィルムの低減に使用される方法または組成物の前に、それと同時にまたはその後に添加することができ、同じ製剤 (f o r m a t i o n) 内にまたは別々の製剤として含有され得る。

キット

【0319】

本明細書に開示される組成物と、使用のための指示とを含む、またはあるいは、これから本質的になる、またはさらになお、これからなるキットが本明細書に提供される。一態様では、使用のための指示は、本明細書に開示される方法のいずれかを行うための使用法 (d i r e c t i o n) を提供する。一態様では、開示される方法における使用のための作用物質のうちの1つもしくは複数、2つもしくはそれよりも多くまたは3つもしくはそれよりも多くは、キット内に独立してまたは一緒に包装される。

【0320】

本明細書に記載される *i n v i t r o* および *i n v i v o* 方法を行うために必要な作用物質および指示を含有するキットも請求される。したがって、本開示は、これらの方法を実施するためのキットを提供し、そのキットは、本明細書に開示されるもの、ならびに、組織収集および／またはスクリーニング実施および／または結果解析および／または本明細書に定義される有効量の作用物質の投与等の本明細書に開示される方法を実行するための指示を含むことができる。これらは、単独で、または他の適した抗微生物剤と組み合わせて使用することができる。

【0321】

次の実施例は、説明を意図し、本明細書に開示される実施形態を限定するものではない。

【実施例】

【0322】

(実施例1)

実験番号1

ポリアミンは、殆ど全ての生物によって産生および利用される、遍在性で小型の脂肪族ポリカチオンである。Michael et al. (2016) J Biol Chem. 291 (29) : 14896-903; D'Agostino et al. (2005) FEBS J. 272 (15) : 3777-87。ポリアミンは、アミノ酸から得られ、転写、翻訳、転写調節、オートファジーおよびストレス抵抗性を含む、成長および増殖の中心となる数多くの細胞機能において役割を果たす。Miller-Fleming et al. (2015) J Mol Biol 427 (21) : 3389-406。ポリアミン合成のための複数の経路が存在し、代謝レパートリーにおけるその存在は、種間で変動する。Michael et al. (2016) Biochem J. 473 (15) : 2315-29。その静電媒介性相互作用の非特異的性質のため、ポリアミン合成は、転写、翻訳およびタンパク質分解機構の組合せにより密接に調節される。Miller-Fleming et al. (2015) J Mol Biol 427 (21) : 3389-406。

【0323】

生物によって産生される、5種の主要ポリアミン分子が存在する；スペルミン、スペルミジン、プトレシン、カダベリンおよび1, 3-ジアミノプロパン。Miller-Fleming et al. (2015) J Mol Biol 427 (21) : 3389-406。追加の種類のポリアミンは、より種特異的な様式で産生される。各ポリアミンは、カチオン性性状および電荷分布を規定するアミン基の長さおよび数の差のため、僅かに異なる特質を有する。Michael et al. (2016) J Biol Chem. 291 (29) : 14896-903。この変動は、ポリアミン活性における

ある程度の特異性レベルを可能にすると共に、ポリアミン凝集物のアセンブリーを方向付ける。D'Agostino et al. (2005) FEBS J. 272 (15) : 3777-87; D'Agostino et al. (2006) IUBMB Life 58 (2) : 75-82.

【0324】

ポリアミン機能は、ポリアミン濃度の調節不全と相関する複数の疾患状態によって証明される通り、濃度依存性である。Miller-Fleming et al. (2015) J Mol Biol 427 (21) : 3389-406。全般的代謝プロセスは、ポリアミンのレベル変更により破壊することができ、特異的プロセスは、ポリアミンのレベルの特異的または全体的変化によって変更することができる。例えば、特異的ポリアミン濃度は、微生物バイオフィーム産生の異なる成果を媒介することができる。複数の種において、細胞内ポリアミンレベルが、バイオフィーム生物発生を調節し、この調節が、特異的ポリアミンの細胞内感知によるものである可能性があることが実証された。Karatan et al. (2013) Biotechnol Lett. 35 (11) : 1715-7; McGinnis et al. (2009) FEMS Microbiol Lett. 299 (2) : 166-74; Wortham et al. (2010) Environ Microbiol. 12 (7) : 2034-47。いずれのポリアミンがこれらの表現型を媒介するかは、種特異的である可能性がある。特異的ポリアミンを産生する能力を欠く変異体株において、合成できない当該ポリアミンの外因性添加は、バイオフィーム形成を回復させたが、他のポリアミンの添加は、回復させなかった。その上、文献には、内因性または高濃度の外因性特異的ポリアミンおよびこれらの誘導体によって阻害される細菌バイオフィーム形成の例が豊富にあるが、他のポリアミンには効果がない。Karatan et al. (2013) Biotechnol Lett. 35 (11) : 1715-7; Goytia et al. (2013) FEMS Microbiol Lett. 343 (1) : 64-9; Cardile et al. (2017) Adv Exp Med Biol. 973 : 53-70; Wang et al. (2016) J Bacteriol. 198 (19) : 2682-91; Qu et al. (2016) Microbiologyopen. 5 (3) : 402-12; Konai et al. (2015) Bioconjug Chem. 26 (12) : 2442-53; Si et al. (2015) Appl Microbiol Biotechnol. 99 (24) : 10861-70; Dewangan et al. (2014) Antimicrob Agents Chemother. 58 (9) : 5435-47; Ding et al. (2014) Appl Environ Microbiol. 80 (4) : 1498-506; Planet et al. (2013) MBio. 4 (6) : e00889-13。しかし、ある種を阻害する同じポリアミンは、バイオフィーム生物発生を阻害しない場合があり、さらには、他の細菌種において、バイオフィーム産生に必要となる場合がある。Karatan et al. (2013) Biotechnol Lett. 35 (11) : 1715-7; McGinnis et al. (2009) FEMS Microbiol Lett. 299 (2) : 166-74; Wortham et al. (2010) Environ Microbiol. 12 (7) : 2034-47; Wang et al. (2016) J Bacteriol. 198 (19) : 2682-91; Hobley et al. (2017) J Biol Chem. 292 (29) : 12041-53; Ou et al. (2017) Mol Med Rep. 15 (1) : 21-20; Nesse et al. (2015) Appl Environ Microbiol. 81 (6) : 2226-32; Ramon-Perez et al. (2015) Microb Pathog. 79 : 8-16; Hobley et al. (2014) Cell. 156 (4) : 844-54; Sakamoto et al. (2012) Int J Biochem Cell Biol. 44 (11) : 1877-86; Burrell et al. (2010) J B

10

20

30

40

50

iol Chem. 285 (50) : 39224-38; Lee et al. (2009) J Biol Chem. 284 (15) : 9899-907; Patel et al. (2006) J Bacteriol. 188 (7) : 2355-63。さらに、真菌バイオフィーム発達におけるポリアミンの役割は、十分に定義されていないが、ポリアミン合成における *Candida albicans* 変異体は、バイオフィーム産生が欠損しており、ポリアミン合成阻害剤による *C. albicans* の処置は、バイオフィーム成長に否定的に影響する。Chen et al. (2014) Mol Biosyst. 10 (1) : 74-85; Liao et al. (2015) Int J Antimicrob Agents. 46 (1) : 45-52。

【0325】

eDNA 安定化の潜在的な供給源の1つは、バイオフィームマトリックスにおけるポリアミンの存在である。ポリアミンは、DNA 構造をモジュレートし (Pasini et al. (2014) Amino Acids. 46 (3) : 595-603)、外部改変剤または危険な条件からDNAを保護することが観察された。D'Agostino et al. (2005) FEBS J. 272 (15) : 3777-87; Baeza et al. (1991) Orig Life Evol Biosph. 21 (4) : 225-42; Nayvelt et al. (2010) Biomacromolecules. 11 (1) : 97-105。細胞内クロマチン安定化におけるポリアミンの役割は、十分に実証されている。Pasini et al. (2014) Amino Acids. 46 (3) : 595-603。そこで、出願人らは、細胞外ポリアミンが、細菌バイオフィームのeDNA構造を安定化すると仮定し、細菌バイオフィーム群集を破壊する手段として、ポリアミン含量および細胞外でバイオフィームマトリックス中のeDNAに結合するポリアミンの能力を変更することを示す。出願人らは、ポリアミンの合成阻害またはアンタゴニズムが、確立された細菌バイオフィームを破壊し、ポリアミン枯渇細菌の補充が、eDNA構造を回復させたことを観察した。ポリアミンは細菌バイオフィームの細胞外マトリックスに存在する

【0326】

ポリアミンがバイオフィームマトリックスに存在するかどうかを決定するために、モデルヒト病原体として、出願人らは、分類不能 *Haemophilus influenzae* (NTHi) バイオフィームを *in vitro* で成長させ、プトレシン、スペルミンまたはスペルミジンに対する抗体により免疫蛍光を行った。共焦点レーザー走査顕微鏡法 (CLSM; 図12) を使用して、バイオフィーム細胞外マトリックス内のポリアミン局在を可視化した。バイオフィーム全体にわたり、免疫蛍光顕微鏡法によって全3種のポリアミンが検出された。

ポリアミン合成阻害またはポリアミンアンタゴニズムは細菌バイオフィームを破壊する

【0327】

ジシクロヘキシルアミンは、競合的阻害機構を介して、スペルミジンシンターゼを、すなわち、そのタンパク質上のプトレシン基質が結合する部位と同じ部位に結合することにより、阻害する。したがって、出願人らは、ジシクロヘキシルアミンが、NTHi バイオフィーム発達を阻害するであろうと仮定した。まず、出願人らは、ジシクロヘキシルアミンが、最大10mMまでNTHi 成長に影響を与えないことを確認した (図13)。しかし、50μMジシクロヘキシルアミンの添加は、COMSTAT 解析によって評価される通り、NTHi バイオフィーム形成を有意に阻害し、バイオフィームの厚さおよびバイオマスをおよそ40%低減させた一方で、バイオフィームの粗さを増加させた (図14)。ジシクロヘキシルアミンで処置した残存NTHi バイオフィームにおけるスペルミジンの存在に関するその後の免疫蛍光顕微鏡法は、バイオフィームマトリックスに存在するスペルミジンの統計的に有意な対応する減少を明らかにした (図15)。ジシクロヘキシルアミンは、初期バイオフィーム形成中に産生されたeDNAスキャフォールド構造の量および複雑性も低減させた (図16)。ジシクロヘキシルアミン処置NTHi バイオフィームへの1mMスペルミジンの外因性添加は、正常なバイオフィームの厚さ、バイオマスおよ

び粗さを回復させ（図14）、ジシクロヘキシルアミンが、バイオフィルム細胞外マトリックスにおけるスペルミジンシンターゼおよび／または外因性スペルミジンのいずれかの競合的阻害剤として機能していたことを指し示す。これらのデータは、ポリアミン合成の阻害またはポリアミン結合部位へのアンタゴニスト性の結合により、バイオフィルムマトリックスにおいてeDNAに結合する細胞外ポリアミンに向けられた化合物が、バイオフィルム生物発生の予防および確立されたバイオフィルムの破壊のための潜在力を有することを明らかにする。

（実施例2）

実験番号2

【0328】

疾病管理予防センター（Centers for Disease Control and Prevention）によると、全ての細菌感染性疾患の>80%の病理発生が、疾患経過の病理発生において必要なバイオフィルム状態を含むことが推定される。バイオフィルムは、核酸、タンパク質、脂質、バイオポリマー（Davies（2003）Nat Rev Drug Discov. 2（2）：114-22）および二価カチオン（Cavaliere et al.,（2014）Microbiology Open. 3（4）：557-567）を含む、細胞外ポリマー物質（EPS）内に包埋された構造化集団へと進行した、非生物学的および生物学的表面に付着した細菌細胞で構成される。EPSは、厳しい環境および抗生物質等の抗微生物剤および宿主免疫エフェクターに対する防護壁として作用する（Devaraj et al.,（2013）、上記参照）。バイオフィルムマトリックスの決定的な構成成分およびアーキテクチャ成分は、細胞外DNA（eDNA）およびDNABIIファミリーのDNA結合タンパク質（IHFおよびHU）である。DNABIIタンパク質は、高い親和性でeDNAに結合し、これにより、バイオフィルムの安定化が可能となる。DNABIIを標的とする抗体は、in vitroおよびin vivoで常在性細菌の放出によるバイオフィルムの崩壊を誘導する（Novotny et al.（2016）EBioMedicine.（10）：33-44）；およびGoodman et al.（2011）Mucosal Immunology. 4（6）：625-637）。DNアーゼ処置は、細菌種がバイオフィルムを形成することを予防することができるが、既存のバイオフィルムには効果が殆どないまたは全くない（Flemming and Wingender,（2010）Nature Reviews Microbiology. 8：623-633）。正電荷を有する二価カチオン（ Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} および Ca^{2+} ）は、隣接する負電荷を有するDNA分子の間の分子間架橋を媒介する。この相互作用は、DNA構造およびその後のDNA-タンパク質相互作用を安定化する（Gueroult et al.（2012）PLOS ONE.（7）-7-e41704；およびTan and Chen,（2006）Biophysical Journal.（90）：1175-1190；Hackl et al.（2005）International Journal of Biological Macromolecules 35：175-191）。さらに、バイオフィルムからの Mg^{2+} カチオンの除去は、抗生物質処置に対する分類不能Haemophilus influenzae（NTHi）の感受性を増加させる（Cavaliere et al.（2014）Microbiology Open. 3（4）：557-567）。最後に、ポリアミン（短いポリカチオン性生体アミン）も、複数の細菌種によるバイオフィルム形成に重要である（Patel et al.（2006）Journal of Bacteriology. 2355-2363；およびHobley et al.,（2017）Journal of Biological Chemistry. 292（29）：12041-12053）。スペルミジンの存在についてプローブした場合、多くの病原性細菌によって形成されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM（IF）画像は、ポリアミンが、細菌バイオフィルムのEPSの一部であり、さらには、DNABIIタンパク質HUと共局在することを指し示す（図17A）。酵素阻害剤ジシクロヘキシルア

10

20

30

40

50

ミン（DCHA）によるNTHIにおけるスペルミジン生合成経路の阻害は、IFによって測定される通りのスペルミジンレベルの全体的な減少、およびバイオフィルムの平均の厚さの有意な減少をもたらし、よって、ポリアミンが、バイオフィルムの安定性に決定的であることを指し示す（図17Bおよび図17C）。

【0329】

微生物がバイオフィルムを形成する能力は、広範囲の産業の間で非常に問題であり至る所にある。例えば、機械心臓弁、尿路カテーテルおよび静脈カテーテルの院内のデバイス関連感染は、バイオフィルムの形態の細菌汚染の結果である（Donlan, (2001) *Emerging Infectious Diseases*, 7(2):277-281）。農業および食品加工施設におけるバイオフィルム形成の制御も、疾患および大規模な食品ロスの防止に重要である。Chmielewski and Frank (2006) *Compr Rev Food Sci F* 2:22-32。廃水処理施設も、適切な膜濾過を妨げて水質汚染をもたらす、EPSおよび微生物の蓄積である生物汚染等、バイオフィルム媒介性の問題を生じさせる（Wood et al., (2016) *PNAS*, E2802-E2811）。

【0330】

カチオン交換樹脂（スルホネート、スルホプロピル、ホスホセルロースまたはヘパリンセファロース）によるバイオフィルムの表面コーティングおよび／または処置は、EPSの正電荷を有する成分（すなわち、ポリアミン、二価金属カチオンおよびDNABIIタンパク質）を標的とする、負電荷を有する樹脂化学の特性を利用する。これは、生物学的および非生物的表面の両方におけるバイオフィルム破壊および予防をもたらす。そこで、出願人らは、カチオン交換樹脂P11ホスホセルロースおよびヘパリンセファロースが、バイオフィルム形成を予防し、予め形成されたバイオフィルムを破壊することができることを実証する。

カチオン交換樹脂は、分類不能*Haemophilus influenzae* (NTHI) による予め形成されたバイオフィルムおよびバイオフィルム形成に負の効果をも有する

【0331】

出願人らは、バイオフィルムに浸透することができない負電荷を有する樹脂が、細菌バイオフィルム形成に普遍的に要求される正電荷を有する分子（すなわち、ポリアミン、二価金属カチオンおよびDNABIIタンパク質）の排除（titrate out）に作用することができるかを問題にした。2種の樹脂、例えば、ホスホセルロース（P11）およびヘパリンセファロースを選択し、これらは両者共に、イオン交換クロマトグラフィーに使用されるカチオン交換体であるが、DNABIIタンパク質の親和性精製にも使用される（Nash et al., (1987) *Journal of Bacteriology*, 4124-4127；およびVorgias and Wilson, (1991) *Escherichia coli. Protein Expression and Purification*, 2(5-6):317-20）。

【0332】

予め形成されたバイオフィルムにおけるカチオン交換樹脂の抗バイオフィルム活性（すなわち、現存するバイオフィルムを破壊する能力）を決定するために、NTHI成長を開始させ、24時間維持し、次いで、0（sBHI対照）、0.1、1または5%（w/v）のP11ホスホセルロースで16時間処置した（図18A）。バイオフィルム形成を予防するカチオン交換樹脂の抗バイオフィルム活性を決定するために、NTHI成長を開始させ、0（sBHI対照）、0.1、1および5% w/vのP11ホスホセルロース（図18B）または5%（w/v）ヘパリンセファロース（図19）の存在下で維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD（登録商標）で染色し、共焦点走査顕微鏡法（CSLM）で可視化し、COMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを決定した。図18に指し示す通り、P11ホスホセルロースは、予め形成されたバイオフィルム（これを破壊することができた）およびバイオフィルム形成（これを予防することができた）の両方に負の効果をも有し、このことは、平均の厚さおよびバイオ

マスの減少によって明らかにされた。ヘパリンセファロースも、バイオフィーム形成に負の効果をもたらし、この場合、平均の厚さおよびバイオマスの減少が観察された（図18）。これらのデータは、カチオン交換樹脂が、*in vitro*でバイオフィーム形成の破壊および予防の両方が可能であることを示唆する。

DNA BII (HU) は、カチオン枯渇された予め形成されたNTHIバイオフィームを部分的に回復した

【0333】

DNA BIIタンパク質の除去が、観察されたバイオフィーム破壊および予防の原因の一部となったかを決定するために、NTHI成長を開始させ、24時間の0 (sBHI対照) または1% P11ホスホセルロース (w/v) と、16時間の1または5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のHUタンパク質の外因性添加の存在下で維持した。バイオフィームを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD (登録商標) で染色し、CSLMで可視化し、COMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを決定した。図19に示す通り、HUは、*in vitro*でホスホセルロースの負の効果をも部分的に補償することができる。これらのデータは、HUが、カチオン交換樹脂によって標的とされることを示唆する。

二価金属は、カチオン枯渇された予め形成されたNTHIバイオフィームを部分的に回復する

【0334】

Mg^{2+} が、カチオン枯渇されたバイオフィームを回復させることができるかどうかを決定するために、NTHI成長を開始させ、24時間の0 (sBHI対照) または1% P11ホスホセルロース (w/v) と、16時間の MgCl_2 (0~10 mM) の外因性添加の存在下で維持した。バイオフィームを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD (登録商標) で染色し、CSLMで可視化し、COMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを決定した。図20に示す通り、 MgCl_2 は、*in vitro*でホスホセルロースの破壊効果を部分的に補償することができる。これらのデータは、P11ホスホセルロースが、バイオフィームマトリックスから二価金属を枯渇させることを示唆する。スペルミジンは、カチオン枯渇された予め形成されたNTHIバイオフィームを部分的に回復する

【0335】

スペルミジンが、カチオン枯渇されたバイオフィームを回復させることができるかどうかを決定するために、NTHI成長を開始させ、24時間の0 (sBHI対照) または1% P11ホスホセルロース (w/v) と、16時間のスペルミジン (0~5 mM) の外因性添加の存在下で維持した。バイオフィームを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD (登録商標) で染色し、CSLMで可視化し、COMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを決定した。図21に示す通り、スペルミジンは、*in vitro*でホスホセルロースの負の効果をも部分的に補償することができる。これらのデータは、P11ホスホセルロースが、バイオフィームマトリックスからポリアミンを枯渇させることを示唆する。

P11ホスホセルロースのカチオン枯渇効果は、バイオフィームとの直接的接触を要求しない

【0336】

バイオフィーム形成の減少が、直接的細胞接触に依存したかどうかを決定するために、頂端側および基底側チャンバーを隔てる膜内に0.4 μm ポアサイズを含有するトランスウェルプレートシステムの基底側チャンバーにおいて、NTHI成長を開始させた。これは、2個のチャンバー間で小型の分子、例えば、タンパク質 (DNA BII)、ポリアミンおよび二価金属カチオンの拡散を可能にするが、細菌細胞は拡散できない。頂端側チャンバーは、播種時に0 (sBHI対照)、0.5、1または1.5% (w/v) P11ホスホセルロースを含有し、16時間維持した。バイオフィームを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD (登録商標) で染色し、CSLMで可視化し、COMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを決定した。図22に指し示す通り、バイオフィームの

10

20

30

40

50

平均の厚さおよびバイオマスの用量依存性減少は、カチオン交換樹脂との直接的接触と無関係である。

スペルミジンの外因性添加は、トランスウェルシステムにおけるP 1 1ホスホセルロースのカチオン枯渇効果を補償する

【0337】

ポリアミン（スペルミジン）が、トランスウェルシステムにおいて直接的接触せずにP 1 1ホスホセルロースによって枯渇されるかどうかを決定するために、0、100、500または1000 μ Mスペルミジンを含有する基底側チャンバーにおいて、NTHI成長を開始させ、一方、0（sBHI対照）または1.5%（w/v）P 1 1ホスホセルロースを頂端側チャンバーに添加し、16時間維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD（登録商標）で染色し、CSLMで可視化し、COMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを決定した。図23に指し示す通り、スペルミジン単独は、用量依存性様式でカチオン枯渇されたバイオフィルムを回復させることができる。

スペルミジンおよびDNABIIは、相乗的に作用して、非接触媒介性P 1 1ホスホセルロースによりカチオン枯渇されたバイオフィルムを回復させる。

【0338】

P 1 1ホスホセルロースによりカチオン枯渇されたバイオフィルムは、用量依存性様式でHU（図20）およびスペルミジン（図22および図24）の外因性添加によって回復させることができる。図17Aに示す通り、免疫蛍光CSLMは、スペルミジンおよびDNABII（HU）も、複数の病原性細菌種によって形成されたバイオフィルムに共局在することを指し示す。これによって、出願人らは、HUおよびスペルミジンが、*in vitro*で相乗的に作用するかどうかを決定することを必要とした。100 μ Mスペルミジンもしくは500 nM HUのいずれかまたは両方の成分の組合せを含有するトランスウェルシステムの基底側チャンバーにおいて、NTHI成長を開始させた。一方、0または1.5% P 1 1ホスホセルロースを頂端側チャンバーに添加し、16時間維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD（登録商標）で染色し、CSLMで可視化し、COMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを決定した。図25に指し示す通り、最適に満たない濃度のスペルミジンおよびHUの両方の組合せは、sBHI対照バイオフィルムと比較して、相乗的様式でカチオン枯渇されたバイオフィルムを回復させる。

カチオン交換樹脂でコーティングされた非生物的表面は、用量依存性様式でバイオフィルム形成を予防する

【0339】

ガラスチャンバースライドを、0、0.1、1または5% P 1 1ホスホセルロースおよび5%ヘパリンセファロース（w/v）の溶液でコーティングした。NTHI成長を開始させ、コーティングされたスライド上で40時間維持した。バイオフィルムを食塩水で洗浄し、LIVE/DEAD（登録商標）で染色し、CSLMで可視化し、COMSTATによって解析して、平均の厚さおよびバイオマスを決定した。図26は、P 1 1ホスホセルロースおよびヘパリンセファロースの両方が、用量依存性様式でバイオフィルム形成を予防することを指し示す。これらのデータは、カチオン交換樹脂による表面のコーティングが、*in vitro*で細菌付着およびその後のバイオフィルム形成を予防し得ることを示唆する。

（実施例3）

実験番号3

【0340】

バイオフィルムは、もっぱら細菌、もっぱら酵母またはその両方の微生物の群集からなる。細菌病原体のため、抗生物質が、処置の第一選択である。バイオフィルム内に常在性の細菌は、全細菌感染のおよそ80%の病理発生に有意に寄与し、感染性疾患の慢性および反復性の性質に寄与することが公知である。また、バイオフィルム内に常在性の細菌は

10

20

30

40

50

、抗生物質に対し、その自由生活対応物よりも最大で1000倍抵抗性である。この抵抗性は、大部分は、敵対的環境から常在性微生物を保護する細胞外マトリックスによるものである。バイオフィーム媒介性細菌感染の慢性および反復性の性質は、抗生物質の過剰使用を要求し、これは次いで、世界的に多抗生物質耐性菌の驚異的な出現をもたらしたことがある。この高まりつつある抗生物質抵抗性表現型は、抗生物質療法の失敗をもたらす。また、抗生物質の主要な副作用は、共生微生物叢に否定的に影響し、これにより、宿主に、複数の副作用および二次感染に対する易罹患性のいずれかを残し得ることである。以前に、出願人らは、現在までに研究した全ての細菌バイオフィームマトリックス内の普遍的な標的として、DNAおよびDNABIIファミリーのタンパク質を同定した。出願人らは、治療抗体によりDNABIIタンパク質を除去し、バイオフィームの構造崩壊および常在性細菌の放出をもたらすことができることを示した。対照的に、酵母バイオフィームは、DNABIIタンパク質を発現しないが、依然として、そのマトリックスの一部でもある細胞外DNA(eDNA)を含有する。この新たなアプローチは、抵抗性機構を発達するように細菌に圧をかける殺菌活性を有する化合物に頼らず、むしろ、バイオフィーム細胞外マトリックス構造それ自体を標的とし、これにより、バイオフィームの破壊および脆弱でアクセス可能な状態への常在性細菌の放出をもたらすという点において、現在の治療技術を上回る改善である。あらゆるバイオフィームは、構成物の細菌または酵母に関係なく、DNA依存性構造を作り出すが、B-DNA(細胞内で優勢である標準の形態)として存在するこれらの構造よりもむしろ、バイオフィームマトリックス内に存在する最も重要な構造eDNAは、Z-DNAとして存在する。重要なことに、Z-DNAは、より強固であり、これにより、より優れた構造材料となり、Z-DNAは、B-DNAを分解する酵素であるヌクレアーゼに対し完全に抵抗性である。したがって、いずれかの潜在的治療法の標的は、変更(すなわち、B-DNAに戻す)または破壊される場合に、現在の治療法の有効性を強めるであろう、バイオフィームマトリックスの以前に認識されなかった構造エレメントである。重要なことに、Z-DNAに結合するタンパク質も、Z-DNAを安定化する。Z-DNAは、バイオフィームの天然の構成物であるため、Z-DNAに結合する抗体は、バイオフィーム成長を容易にする。逆に、B-DNAに結合する分子は、B-DNAを安定化し、B-DNAからZ-DNAへの変換を防止し、よって、バイオフィームを予防する。重要なことに、Z-DNAに対する抗体の形成を天然に誘導する疾患状態、例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)および／または嚢胞性線維症(CF)は、バイオフィーム形成を容易にする。よって、SLE患者において発症する慢性感染は、一部には、SLE由来Z-DNA抗体の結果である。加えて、DNAを損傷する一部の化学療法剤、例えば、プラチナベースの化学療法も、DNAをZ形態にシフトさせる。したがって、これらの作用物質は、バイオフィーム成長の安定化またはこれを容易にすることに寄与する。Z-DNAを破壊する治療法を対象とすることは、SLEおよび／または嚢胞性線維症(CF)、ならびに慢性感染の化学療法による増悪に対する新たな治療アプローチである。

【0341】

バイオフィームは、群集アーキテクチャおよび挙動(群集内シグナル伝達、輸送、分業等)を呈する、表面に凝集または接着した微生物の集合体である。この群集アーキテクチャは、一部には、宿主において免疫系および抗微生物薬を含む、危険な条件から常在性微生物を保護する自作の細胞外マトリックスによって区別される。バイオフィームは、動物および植物の両方における疾患の相当な部分、ならびに工業的、例えば、工業機器の汚損の原因となり、そのため、医学、農業および工業状況におけるその重要性から、集中的な研究努力の焦点となる。Visick et al. (2016) J Bacteriol. 198(19):2553-63; Hoiby et al. (2017) APMIS. 125(4):272-5。病原性バイオフィームの根絶または処置は、保護的細胞外マトリックスの産生を含む複数の要因のため、達成が特に困難である。Hoiby et al. (2017) APMIS. 125(4):272-5。バイオフィームマトリックスは、多糖、タンパク質および細胞外DNA(eDNA)で様々に構成

10

20

30

40

50

されている。細菌バイオフィルムのeDNAは、普遍的であり、細胞外マトリックスの安定性および保護機能に必須である。Okshevsky et al. (2015) Crit Rev Microbiol. 41 (3): 341-52; Wilton et al. (2015) Antimicrob Agents Chemother. 60 (1): 544-53。DNA分解、または構造を安定化するDNA結合タンパク質の除去による、バイオフィルムeDNA構造の弱体化は、バイオフィルムの壊滅的な崩壊およびより脆弱な状態への常在性細菌の放出をもたらす。Brandstetter et al. (2013) Nasopore. Laryngoscope. 123 (11): 2626-32; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93 (6): 1246-58; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96 (6): 1119-35; Freire et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32 (1): 74; Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12 (4): 384-9; Novotny et al. (2017) Clin Vaccine Immunol. 24 (6); Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10: 33-44; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32 (2): 118-30; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8 (6): e67629; Baelo et al. (2015) J Control Release. 209: 150-8; Brown et al. (2015) Front Microbiol. 6: 699; Frederiksen et al. (2006) Acta Paediatr. 95 (9): 1070-4; Martins et al. (2012) Mycoses. 55 (1): 80-5; Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4 (6): 625-37。

【0342】

バイオフィルム統合性におけるeDNAの中心的役割に基づく、ヌクレアーゼ処置は、明らかな治療潜在力を保有する。実際に、多くの細菌は、内因性分泌ヌクレアーゼを利用して、バイオフィルム構造をモジュレートし、バイオフィルムからの分散を媒介する。Cho et al. (2015) Infect Immun. 83 (3): 950-7; Kiedrowski et al. (2011) PLoS One. 6 (11): e26714; Liu et al. (2017) Front Cell Infect Microbiol. 7: 97; Steichen et al. (2011) Infect Immun. 79 (4): 1504-11。しかし、外因性ヌクレアーゼは典型的に、バイオフィルム形成の開始時に投与されたときに、有効なバイオフィルム予防活性しか示さず、確立されたバイオフィルムは、いずれか中程度のバイオフィルム破壊を観察するためには高濃度のヌクレアーゼを要求する。Hall-Stoodley et al. (2008) BMC Microbiol. 8: 173; Izano et al. (2009) Microb Pathog. 46 (4): 207-13; Kaplan et al. (2012) J Antibiot (Tokyo). 65 (2): 73-7; Tetz et al. (2010) DNA Cell Biol. 29 (8): 399-405。慢性肺感染が罹患率および死亡率の主な原因である、嚢胞性線維症患者において、治療ヌクレアーゼは、バイオフィルム群集を形成するために細菌によって産生されたeDNAよりもむしろ、宿主由来eDNAによって作製された閉塞に対して標的とする粘液溶解剤として主に使用され、このようなヌクレアーゼ（すなわち、ブルモザイム）は、慢性感染が確立する前の非常に早い時期に投与されたときにのみ、微生物群集を変化させることが観察された。Frederiksen et al. (2006) Acta Paediatr. 95 (9): 1070-4。細菌バイオフィルムeDNAがヌクレアーゼ分解に対して抵抗性となる理由は、未決問題のままである。

【0343】

細菌バイオフィルムeDNAが、外因性ヌクレアーゼによって不十分に分解される理由

については、複数の仮説が存在する。これらの仮説のうち、細菌が、ヌクレアーゼに対して非感受性の形態へとeDNAの構造を活発に変更する可能性が挙げられる。ヌクレアーゼ抵抗性であるスカルDNA構造エレメントの1つは、代替の左巻きヘリックス形態であるZ-DNAである。Z-DNAは、*in vitro*での特異的条件および*in vivo*での限定された細胞内条件下でのみ記載されたが、特に、様々な細胞内プロセスを調節するZ-DNA結合タンパク質の同定により、正常細胞生理学におけるZ-DNAの役割に関する証拠は増えつつある。Wang et al. (2007) Front Biosci. 12:4424-38; Barraud et al. (2012) Curr Top Microbiol Immunol. 353:35-60。標準的なB-DNAからZ-DNA形態へと平衡をシフトさせるために、二重らせんの負のスーパーコイル形成、負電荷を有するリン酸-デオキシリボース骨格の反発を相殺するための高いカチオン濃度、および構造を安定化するためのZ-DNA結合タンパク質相互作用を含む、追加の要因が必要とされる(Choi et al. (2011) Chem Soc Rev. 40(12):5893-909; Yang, et al. (2012) Curr Med Chem. 2012;19(4):557-68)。金属カチオンおよびポリカチオン性ポリアミンは両者共に、特に、ポリ(dG-dC)トラクトにおいて、Z-DNA形成を誘導することができる(D'Agostino et al. (2006) IUBMB Life. 58(2):75-82; Balasundaram et al. (1991) Mol Cell Biochem. 100(2):129-40)。Thomas et al. (1991) J Biol Chem. 266(10):6137-41。他方では、B-DNAに戻るZ-DNA移行は、挿入剤(Kim et al. (1993) Biopolymers. 33(11):1677-86; Mirau et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11(6):1931-41)および潜在的には、真核生物クロマチンタンパク質、HMGB1によって触媒される。Waga et al. (1988) Biochem Biophys Res Commun. 153(1):334-9。

[0344]

バイオフィルムマトリックスは、DNABIIファミリーの細菌クロマチンタンパク質によって安定化される。このようなタンパク質は、eDNAスキャフォールドにおける屈曲したDNA構造を占有し、その除去は、バイオフィルムの崩壊および常在性細菌の放出をもたらす。Brandstetter et al. (2013) Nasopore. Laryngoscope. 123(11):2626-32; Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58; Devaraj et al. (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Freire et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(1):74-88; Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9; Novotny et al. (2017) Clin Vaccine Immunol. 24(6); Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Rocco et al. (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Novotny et al. (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37。その上、ポリアミンは、DNA構造をモジュレートし(Pasini et al. (2014) Amino Acids. 46(3):595-603)、これを外部改変剤から保護することが観察された。Baeza et al. (1991) Orig Life Evol Biosph. 21(4):225-42; D'Agostino et al. (2005) FEBS J. 272(15):3777-87; Nayvelt et al. (2010) Biomacromolecules. 11(1):97-105。そこで、出願人らは、細胞外ポリアミンが、DNABIIタンパク質と協力して、細菌バイオフィルム内の

10

20

30

40

50

eDNAにおけるZ-DNA構造を誘導することを示し、Z-DNAからB-DNAへの復帰が、細菌バイオフィーム構造を弱体化して、それを従来の治療法に対し感受性にするか、またはそれ自体が、バイオフィームを破壊するかどうかについて確立する。細菌バイオフィームは、Z-DNAが蓄積するにつれて、ヌクレアーゼ破壊に対して抵抗性になる

【0345】

分類不能 *Haemophilus influenzae* (NTHi) は、急性および慢性気道感染の一般的な原因であり、この生物によって引き起こされる疾患は、その慢性化のためにバイオフィーム形成に依拠する。Duell et al. (2016) F EBS Lett. 590 (21): 3840-53。同様に、尿路病原性 *Escherichia coli* (UPEC) は、尿路感染の主要病原因子であり、これもまた、慢性膀胱炎を引き起こすその能力のためにバイオフィーム産生に依拠する。Blango et al. (2010) Antimicrob Agents Chemother. 54 (5): 1855-63。ヌクレアーゼの非存在または存在下で *in vitro* において成長した NTHi および UPEC バイオフィームは、ヌクレアーゼが存在した場合、バイオフィーム生物発生の有意な機能障害を示した (図27)。対照的に、このようなヌクレアーゼによる予め確立されたバイオフィームの処置は、バイオフィームの厚さまたはバイオマスを縮小せず、ヌクレアーゼに対するバイオフィームマトリックスにおける eDNA の抵抗性が、バイオフィームが成熟するにつれて確立されることを指し示す。

【0346】

出願人らは、Z-DNA に対する抗体を使用して、NTHi および UPEC バイオフィームを *in vitro* で、それらが発達したときにプローブした。抗体染色および免疫蛍光顕微鏡法は、Z-DNA が、バイオフィームが成熟するにつれてバイオフィームマトリックスの底部に蓄積することを明らかにし (図28)、これは成熟バイオフィームにおけるヌクレアーゼ抵抗性増加と対応する。主要な真菌病原体 *Candida albicans* も、そのバイオフィーム細胞外マトリックス内に Z-DNA を含有することが見出された (図29)。さらに、Z-DNA に特異的に結合する (したがって、これを安定化する) 抗体による新生バイオフィームの処置は、NTHi バイオフィーム生物発生を刺激したが、B-DNA に対する抗体は刺激しなかったため、Z-DNA の蓄積は、バイオフィーム構築プロセスの中心である (図30)。Z-DNA は、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗性をバイオフィーム細胞外マトリックスに付与する可能性があり、このことは、ヌクレアーゼで処置したバイオフィームに存在する eDNA 含量および DNA の形態を試験することによって実証される。ヌクレアーゼ処置は、NTHi バイオフィーム細胞外マトリックスにおける B-DNA 可視化を大幅に低減させる一方、Z-DNA 存在は、より明らかになる (図31)。

ポリアミンおよび DNA BII タンパク質は協同して、バイオフィームマトリックスにおける Z-DNA 構造を安定化する

【0347】

ポリ (dG-dC) で構成されたオリゴヌクレオチド基質は、Z-DNA を形成する傾向があることが公知であり (すなわち、高い NaCl 濃度またはポリアミンの存在のため)、そのため、ヌクレアーゼによる分解から保護される (図32)。したがって、出願人らは、 $\lambda_{295}/\lambda_{260}$ 吸光度比の分光光度的測定により、ポリアミンが、この基質の Z-DNA 形成を誘導することも観察した (データ図示せず)。ポリアミン媒介性 eDNA 安定化に加えて、出願人らは既に、バイオフィーム構造の補強における DNA BII 細菌クロマチンタンパク質の重要性を実証した。ここで、出願人らは、ポリアミンおよび DNA BII タンパク質が、一緒に機能して、eDNA スキャフォールドを安定化するかどうかを決定しようと試みた。2種の関連ポリアミンであるスペルミジンおよびスペルミンに対する抗体、ならびに2種の DNA BII ファミリータンパク質である IHF および HU を認識する抗体を使用して、出願人らは先ず、免疫蛍光顕微鏡法によってバイオフィームマトリックスにおけるポリアミンおよび DNA BII タンパク質の分布を可視化した。出

願人らは、DNABIIタンパク質（主にHU）が、NTHiバイオフィルム細胞外マトリックス内でポリアミンと共局在したことを見出した（図33）。さらに、ポリアミン特異的抗体でプローブした、HUを発現できなくなるように操作されたNTHi株によって形成されたバイオフィルムの免疫蛍光顕微鏡検査は、HUが、バイオフィルムにおける正常ポリアミン分布に要求されることを実証した（図33）。

【0348】

NTHi DNABIIタンパク質は、バイオフィルムマトリックス統合性において中心的役割を果たすため、Brockson et al. (2014) Mol Microbiol. 93 (6):1246-58; Novotny et al. (2017) Clin Vaccine Immunol. 24 (6); Novotny et al. (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4 (6):625-37、出願人らは、NTHi DNABIIタンパク質が、DNAヌクレアーゼ抵抗性に寄与し得ると推論した。実際に、NTHi HUは、in vitroでポリ(dG-dC)基質にヌクレアーゼ抵抗性を付与し、ポリ(dGdC)基質をZ-DNA形態にシフトさせることができた（図34）Jang et al. (2015) Sci Rep. 5:9943。バイオフィルムマトリックスにおけるNTHi HUおよびポリアミンの共局在の観察のため、出願人らは、NTHi HUおよびポリアミンが、ヌクレアーゼ分解を阻害するそれらの能力において相乗作用を呈するか検査した。単独ではポリ(dG-dC)基質を保護しなかったポリアミンおよびHUの濃度において、両者の組合せは、ヌクレアーゼ抵抗性を付与する相乗的能力を実証した（図35）。ポリアミンおよびDNABIIタンパク質の共局在ならびにしたがって、結果としてのヌクレアーゼ抵抗性表現型は、NTHiによる実験的中耳炎における中耳にin vivoで形成されたバイオフィルムにおいても観察された（図35）。さらに、バイオフィルム細胞外マトリックスへのDNABIIおよびポリアミン取り込みのレベルは、種間で変動し、免疫蛍光によるZ-DNA検出のレベルと相関する（図36）。まとめると、これらの結果は、細菌DNABIIタンパク質および内因性ポリアミンと一緒に相互作用して、潜在的に、バイオフィルムのeDNAスキャフォールド内のZ-DNA構造エレメントへの変換およびその安定化により、細菌バイオフィルムマトリックスを維持することを示唆する。

Z-DNAからB-DNAへの復帰は、ヌクレアーゼ感受性を回復する

【0349】

Z-DNAが細菌バイオフィルムにおいて経時的に蓄積し、このことが、成熟バイオフィルムがヌクレアーゼ破壊に対して抵抗性である理由を説明することができるという出願人らの新規知見を活用するために、出願人らは、Z-DNAからB-DNAへと平衡をシフトさせることができる分子が、バイオフィルムをモジュレートすることができるかどうか検査に努めた。真核生物クロマチンタンパク質HMGB1は、Z-DNAをB-DNAに変換することが報告された、Waga et al. (1988) Biochem Biophys Res Commun. 153 (1):334-9。そのため、HMGB1で処置したNTHiバイオフィルムの免疫蛍光顕微鏡検査は、縮小されたZ-DNA含量を明らかにした（図37）。DNABIIタンパク質は、HMGB1処置によってバイオフィルムから放出され（図38）、DNABII媒介性Z-DNA安定化の非存在下で、Z-DNAをB-DNAに復帰させることによりeDNA構造を不安定化し、有意なバイオフィルム破壊をもたらす。したがって、HMGB1または非炎症性HMGB1バリエーションによる、チンチラ中耳におけるNTHiによって誘発された急性中耳炎の処置は、接着性バイオフィルムの効率的溶解をもたらした（図39）。HMGB1は、嚢胞性線維症肺バイオフィルム感染に関連する致命的日和見性病原体であるBurkholderia cenocepaciaによってin vitroで形成されたバイオフィルムの破壊においても有効であった一方、HMGB1の予防的投与は、マウスの肺においてB. cenocepacia凝集物バイオフィルム形成を予防した（図40）。保護的濃度のポリアミンの存在下におけるポリ(dG-dC)基質へのHMGB1の添加は、ヌクレアーゼ

感受性を回復させた（図 4 1）。

【0350】

これらの組み合わせたデータは、ポリアミンおよび DNA B I I タンパク質による DNA の一部の Z-高次構造への変換が、バイオフィルムの細胞外マトリックスにおける構造的 material のための基礎を作り出すのみならず、成熟バイオフィルムを破壊する従来のヌクレアーゼに対するその抵抗性を説明することも実証する。Ch o e t a l. （2015） *I n f e c t I m m u n.* 83（3）：950-7。まとめると、したがってこれらのデータは、Z-DNA を B-DNA にまたは Z-DNA 立体配置のバイオフィルム e DNA を B-DNA に変換することができる方法および物質（例えば、DNA B I I タンパク質またはポリアミンを除去または阻害することにより）が、ヌクレアーゼ感受性を回復させることができ、潜在的に、*i n v i v o* で成熟不応性バイオフィルムに対するヌクレアーゼの活性を強めることができる作用物質の開発を可能にすることを指し示す。これは、微生物バイオフィルムを、その Z-DNA 含量によって特定することができ、Z-DNA 定量が、バイオフィルム感染に特徴的な潜在的に有用なバイオマーカーとなることも示す。

（実施例 4）

実験番号 4

【0351】

本実験は、嚢胞性線維症を処置するための薬物、作用物質および方法の前臨床検査のためのブタモデルを提供する。S t o l t z e t a l. （2010） *S c i e n c e T r a n s l a t i o n a l M e d i c i n e* 2（29）：29-31 を参照されたい。嚢胞性線維症は、CF 膜コンダクタンス制御因子（CFTR と呼ばれる）アニオンチャネルをコードする遺伝子における変異による常染色体劣性疾患である。このモデルにおいて、「CFTR」と呼ばれる遺伝子に欠損を保有するように特異的に育種された豚は、CF 豚と呼ばれ、複数の細菌種による下気道の感染を含む CF 肺疾患の特徴的なフィーチャを自発的に発症する。豚は、ポリペプチドまたは他の免疫原性作用物質等の作用物質で免疫され、これにより、肺における細菌バイオフィルムを根絶する抗体の形成を誘導する。本実験は、実験番号 1 に示す通り、能動免疫後のチンチラの中耳内に常在性のバイオフィルムを根絶するための IHF への抗体の送達と同様である。抗 IHF（または他の作用物質）抗体を吸入投与によってこのような豚の肺に送達して、疾患の徴候の寛解および関連する病状を評価することができる。

（実施例 5）

実験番号 5

TEDS の形成に寄与する UPEC ポリアミン合成遺伝子を同定する

【0352】

単一変異体の *E. coli* Keio コレクションを使用して、B a b a e t a l. （2006） *M o l S y s t B i o l.* 2：2006 0008、*s p e A*（アルギニンをプトレシン前駆体アグマチンに変換するのに要求されるアルギニンデカルボキシラーゼ）、*s p e C*（オルニチンをプトレシンに変換するのに要求されるオルニチンデカルボキシラーゼ）、*s p e D*（S-アデノシルメチオニンを *S p e E* 活性のためのプロピルアミンドナーに変換するのに要求されるアデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ）および *s p e E*（プトレシンをスペルミジンに、スペルミジンをスペルミンに変換するのに要求されるアミノプロピルトランスフェラーゼ）遺伝子、T a b o r e t a l. （1985） *M i c r o b i o l R e v.* 49（1）：81-99、の P1 ファージ形質導入によって変異を UPEC UTI89 株へと、まず単独で、次いで組み合わせて移動させる。ポリアミンを産生することができる複数の経路のため、これらの変異を組み合わせ、バイオフィルム表現型を観察することができる（例えば、*S p e A* および *S p e D* は、プトレシン合成の 2 種の別々の経路における初期酵素である；*s p e A* および *s p e D* における二重変異は、プトレシン合成の抑止に必要とされる）。変異は、PCR によって、正確な染色体位置における挿入について確認される。UPEC 株は、定義された時

間（８、２４、４８時間）に、生理的濃度（０、０．１、０．５、１および５ｍＭ）の添加されたポリアミン（スペルミジン、スペルミンまたはプトレシン）の存在または非存在下で、出願人らの *in vitro* eDNA スキャフォールドアッセイおよびバイオフィルム形成アッセイにおいて確立される。Tabor et al. (1985) Microbiol Rev. 49 (1): 81-99。富栄養培地には残存ポリアミンが存在する可能性があるため、これらのアッセイは、富栄養培地（LB）および既知組成培地（CDM; M9）の両方で行われる。初期eDNA構造は、dsDNA、DNABIIタンパク質およびポリアミン（抗スペルミジン、抗プトレシン、抗カダベリン）についてプローブされた免疫蛍光顕微鏡法によって評価され、構造の複雑性は、ImageJにおけるFracLac解析プラグインによって定量される。Karperien et al. (1999-2013) FracLac for ImageJ。バイオフィルム形成は、LIVE/DEAD（登録商標）染色されたバイオフィルムのCLSMによって評価され、バイオフィルムの平均の厚さ、バイオマスおよび粗さは、COMSTAT解析によって定量される。dsDNA、DNABIIタンパク質およびポリアミンについてプローブされたバイオフィルムにおけるeDNA構造は、免疫蛍光CLSMによって評価される。全真正細菌がHUを有し、HU枯渇は普遍的にバイオフィルム機能障害をもたらすため、保存されたエピトープに対する抗HU抗体が使用され、DNABII検出のための属にわたるHUの包括的認識を可能にする。図４６は、未処理または抗HU（灰色）および抗スペルミジン（Spd、淡灰白）抗体でプローブした、指し示されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像を示し、共局在は白色である。

TEDSの形成に寄与するUPECポリアミン搬出遺伝子を同定する
【0353】

Keioコレクションを使用して、potE（プトレシン-オルニチンアンチporter）、Kashiwagi et al. (1992) Proc Natl Acad Sci U S A. 89 (10): 4529-33、cadB（カダベリン-リシンアンチporter）、Soksawatmaekhin et al. (2004) Mol Microbiol. 51 (5): 1401-12、mdtJおよびmdtI（スペルミジン搬出に重要な多剤エクスポーター）、Higashi et al. (2008) J Bacteriol. 190 (3): 872-8、ならびにsapB、sapC、sapDおよびsapF（プトレシン搬出に重要なABCトランスポーターをコードする）、Sugiyama et al. (2016) J Biol Chem. 291 (51): 26343-51、遺伝子の変異をUPEC UTI89へと、まず単独で、次いで組み合わせて移動する（エクスポーター活性の冗長性を克服するために）。欠乏性バイオフィルム表現型を呈する変異を組み合わせることができる。UPECは、定義された時間に、添加されたポリアミン（スペルミジン、スペルミン、プトレシン）の存在または非存在下で、出願人らのeDNAスキャフォールドおよびバイオフィルム形成アッセイにおいて確立される。

【0354】

TEDSおよびバイオフィルム発達におけるポリアミンの役割は、ポリアミンが、eDNAおよびDNABIIタンパク質と協調して機能して、TEDSを作り出すことを示すことにより決定される。図４２Ａ～図４２Ｄは、DNABIIタンパク質およびポリアミンの両方が、カチオン交換体（P11）媒介性バイオフィルム予防のレスキューに要求されることを示す。図４４は、DNABIIタンパク質、ポリアミンおよびeDNA（B-DNAおよびZ-DNA）が、NTHIバイオフィルムのEPS内に経時的に着実に蓄積することを示す。さらに、図４６に示す通り、DNABII、ポリアミン、Z-DNAおよびB-DNA成分は全て、複数細菌バイオフィルムのEPS中に存在する。

【0355】

出願人らは、図４７Ａ～図４７Ｂにおいて、ポリアミン、Z-DNAおよびB-DNA成分が全て、NTHIバイオフィルムに感染したチンチラ中耳の切片内に存在することも見出した。加えて、出願人らは、RNアーゼAの添加が、おそらくは、B-DNAから

Z-DNAへの細胞外変換のための決定的な触媒であるポリアミンの放出によって、用量依存性様式でバイオフィーム形成を刺激し（図52A）、tRNA（GMPではない）の添加が、おそらくは、バイオフィームEPSからのポリアミンの隔絶によって、用量依存性様式で初期NTHIバイオフィームを破壊した（図52B）ことを示した。

馴化培地におけるポリアミンを定量する

【0356】

馴化培地を細菌バイオフィームから収集して、ポリアミン（プトレシン、カダベリン、スペルミジン、スペルミン）の濃度を決定する。ポリアミン放出は、8種の不応性バイオフィーム形成病原体、これは以降、標準8株と称される；ES*KAPE病原体、NTHIおよびUPEC（*は、代表的病原性Staphylococcus、Sabate et al.（2017）Front Microbiol. 8:1401としてのS. epidermidisの使用を指し示し、これはS. aureusが、免疫蛍光アッセイを混乱させ得る抗体結合性プロテインAを産生することを考慮する；扱いやすい場合、この解析は、S. aureusに適用される）の臨床分離株、ならびに変更されたバイオフィームEPS構造を示す変異体バリエーションについて定量されて、細胞外ポリアミン濃度とバイオフィーム表現型を相関させる。バイオフィームは、富栄養培地およびCDMにおいて成長させ、様々な時間（0、4、8、16および24時間）に馴化培地を収集する。無細胞馴化培地（濾過）および培地試料は、貯蔵のために液体N₂中で瞬間（snap）凍結する。LC-MS/MSによるOARDC Metabolite Analysis Clusterによって解析を行う。Hakkinen et al.（2013）J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 941:81-9；Liu et al.（2013）Anal Chim Acta. 791:36-45；Xu et al.（2016）Molecules. 21（8）。

TEDSにおけるポリアミンの定常状態レベルの役割を確立する

【0357】

in vitroでバイオフィーム発達を通していずれのポリアミンが存在するかどうかを決定した後に、検査を行って、これらのポリアミンがeDNA構造に影響を与えるかを区別する。出願人らは、播種時に添加されると、バイオフィーム形成を予防する（ブルモザイム（登録商標）と同様のまたはこれよりも優れた）が、スペルミジンに対する感受性が異なる一連のヌクレアーゼを同定した（表1）。経時的なeDNAスキュフォールドおよびバイオフィーム形成アッセイを用いて、出願人らは、ポリアミン濃度の定性的プローブとしてこれらの酵素を利用して、ヌクレアーゼ活性のポリアミン媒介性阻害またはヌクレアーゼ活性のeDNA構造媒介性阻害の間を区別する（すなわち、Z-DNA等のヌクレアーゼ抵抗性形態への変換）。各事例において、ヌクレアーゼによる処置前に指定の時間（0、4、8、16および24時間）バイオフィームを成長させ、40時間の最終時間までインキュベートする。バイオフィーム環境におけるヌクレアーゼ活性のための対照として、バイオフィーム由来の馴化培地においてインキュベートした（0、4、8、16および24時間）プラスミド基質に対するヌクレアーゼ活性を決定し、これに対し、出願人らは、ポリアミン構成物およびそれぞれの濃度を決定した。標準8株のバイオフィーム破壊は、以前に記載されと通りに評価および解析する。図35A～図35Dにおいて、出願人らは、DNABIIタンパク質が、ポリアミンと相乗作用して、DNアーゼ抵抗性を誘導することを示す。

表1．バイオフィーム形成を予防するヌクレアーゼおよびそのスペルミジン感受性

【表1】

酵素	XhoI	DNase*	PstI	SapI	T4 Pol	NucB	Bal31
Spd 阻害#	50μM	300μM	500μM	10mM	10mM	>10mM	>10mM

10

20

30

40

50

* プルモザイム：# スペルミジンを $10\ \mu\text{M}$ ～ $10\ \text{mM}$ に用量設定して、各ヌクレアーゼが、ゲノムDNAにおいて $<10\%$ 活性に低減された濃度を決定した。

細菌バイオフィームにおけるDNA、DNABIIおよびポリアミンの定常状態レベルの割合の頑強性の検査

【0358】

出願人らは、eDNA、DNABIIタンパク質およびポリアミンがそれぞれ、バイオフィームのTEDSの維持に必須であることを示したが、バイオフィーム形成を生産的に最大化するように相互作用する各成分の割合を決定することができる。細菌がバイオフィームを形成する場合、浮遊性細菌／バイオフィーム細菌の平衡が達成される。実際に、出願人らは、DNABIIタンパク質が、UPECバイオフィームを制限しており（Dev
araj et al. (2015) Mol Microbiol. 96 (6) : 1119-35）、漸増濃度のDNABIIタンパク質が、用量依存性様式で浮遊性細菌をバイオフィーム状態に至らせることを以前に示した。Dev
araj et al. (2015) Mol Microbiol. 96 (6) : 1119-35。HUを欠乏するUPECは、より小型のバイオフィームを産生するが、バイオフィーム状態への浮遊性細菌の駆動において、外因性DNABIIに対しより応答性である。Dev
araj et al. (2015) Mol Microbiol. 96 (6) : 1119-35。同時に、eDNAが枯渇された（DNアーゼにより）UPECバイオフィームは、外因性DNABII添加によりバイオフィームバイオマスをもはや増加させない。対照的に、外因性DNABIIタンパク質またはDNAを添加するいかなる試みも、NTHIバイオフィームに負に影響する（データ図示せず）。出願人らは、バイオフィームEPSが、DNA、DNABIIタンパク質およびポリアミンを、これら3種の成分が互いに関して最適未満で存在するように欠乏する場合、細菌が、浮遊性状態へと優先的に分配されると仮定する。同様に、UPECと同様に、その最適な割合への制限成分（複数可）の補充は、バイオフィーム状態への細菌の分配を改善する筈である。対照的に、全3種の成分が、NTHIにおいて出願人らが考える適切な割合である場合、これらの成分のいずれかの補充は、適切な比を破壊し、バイオフィーム形成に負の影響を有することができる。そこで、ネイティブUPECバイオフィームに対して外因性DNABIIタンパク質を滴定し、バイオフィームおよび浮遊性細菌の割合を測定する。バイオフィームが、外因性DNABIIタンパク質で飽和されると、ポリアミンおよび染色体DNAの両方が変動して、細菌をバイオフィーム状態へとさらに分配する。

【0359】

同定された優勢ポリアミンのそれぞれ（またはこれらの組合せ）は、CDMにおいてバイオフィームを成長させたときに細胞外環境において測定された濃度から最大10倍少ないおよび多い様々な濃度で検査する。出願人らは、DNA、ポリアミンおよびDNABIIタンパク質が、それらの適切な割合で添加される場合、浮遊性細菌をバイオフィームへと至らせるであろうと仮定する。したがって、WT UPECおよびNTHIならびにそれらの同質遺伝子的HU欠乏性株（残っているIHFの存在にもかかわらず、HU欠乏性株は依然として、バイオフィーム欠乏性表現型を有する）も、HU、DNAおよびポリアミンの最適な割合について検査する。in vitroバイオフィーム形成アッセイによるコンビナトリアルバイオフィーム成分添加の効果は、希釈プレーティングによって、浮遊生物相（planktonic phase）対バイオフィーム相に存在する細菌の相対的な割合の決定により評価される。Dev
araj et al. (2015) Mol Microbiol. 96 (6) : 1119-35。出願人らは、図42A～図42Dにおいて、P11添加が、用量依存性様式でバイオフィーム形成を予防することを示す。外因性スペルミジンおよびHUは一緒になって、バイオフィーム発達を回復させるが、いずれか単独では回復させず、このことは、P11抗バイオフィーム活性が、直接の接触なしで、バイオフィームEPSから離れた、構成成分（ポリアミン、DNABIIタンパク質）の滴定の結果であることを示唆する。

TEDSに好まれるポリアミンが存在するかどうかを決定する

【0360】

上に示す通り、物理的に隔てられたチャンバー内のバイオフィームは、カチオン交換体 P11 によって破壊することができる。重要なことに、この破壊を相殺するためには、ポリアミンおよび DNA BII タンパク質の両方をバイオフィームチャンバーに添加する必要があるが、各成分それ自体は無効である。スペルミンおよびスペルミジンは、ブトレシンまたはカダベリンよりも有効に DNA 構造をモジュレートするため (Kabir et al., (2013) PLoS One, 8 (7): e70510)、ポリアミンを、単独でおよび組み合わせて、上述の通り様々な濃度で検査して、特異的ポリアミンが、TEDS 産生を容易にするのに必要とされるかどうかを決定する。HU は、本実験を通して定義された濃度 (上述の通りならびに 5 倍低いおよび高い) で添加される。本実験は、上述の通り標準 8 株により行われ、上述の *in vitro* バイオフィームアッセイを使用して、バイオフィーム形成における様々なポリアミンの効果を定量する。

成果および代替

【0361】

遺伝的アプローチを適用して、UPEC ポリアミン合成の欠損および細胞外ポリアミンの定常状態レベルにおける搬出遺伝子の寄与を試験することにより、TEDS 形成を研究することができる。欠乏性バイオフィーム表現型を生じる変異の単一および組合せが同定され、これは外因性ポリアミンにより補完される。バイオフィーム表現型の試験はないものの (他の細菌におけるバイオフィーム表現型のあまり包括的でない遺伝的解析は、大部分は、ポリアミンの細胞内の役割に着目した)、モデルシステムとしての UPEC の選択は、その臨床重要性 (Subashchandrabose et al., (2015) Microbiol Spectr., 3 (4))、eDNA-DNA BII 依存性 EPS の発表された特徴付け (Devaraj et al., (2015) Mol Microbiol., 96 (6): 1119-35)、および E. coli ポリアミン経路の広範囲のな発表された理解 (Tabor et al., (1985) Microbiol Rev., 49 (1): 81-99) に基づく。Di Martino et al., (2013) Int J Med Microbiol., 303 (8): 484-91; Karatan et al., (2013) Biotechnol Lett., 35 (11): 1715-7。バイオフィーム発達においていずれのポリアミンが存在するか、また、いずれの組合せで存在するか、また、臨床的に重要なバイオフィーム形成病原体が決定される。バイオフィーム発達に天然に寄与するポリアミンが明らかになる。バイオフィーム形成を予防するが、ポリアミンによって様々な程度で阻害されるヌクレアーゼを使用して、構成物ポリアミンが、eDNA 構造に単純に結合しているか、またはこれに結合して変化しているかを決定する。ポリアミンが、DNA 構造に影響していない場合、ポリアミンが時間と共に蓄積するにつれて、ポリアミンに対するこれらのヌクレアーゼ (表 1) の感受性に関係するバイオフィーム破壊の階層が存在するであろう。新たなヌクレアーゼ抵抗性 DNA 構造が形成される場合、許容的濃度のポリアミンであるにもかかわらずヌクレアーゼが機能しない、バイオフィーム成熟の年齢が存在するであろう。無処置バイオフィームおよび最も強いバイオフィーム表現型 (バイオフィーム状態に分配された最大量の細菌) を有するバイオフィームの、qRT-PCR による生合成遺伝子の発現、およびポリアミンの定常状態レベル、およびウエスタン解析による DNA BII タンパク質を試験する。最後に、内因性ポリアミンを、ポリアミンの特異的組合せに置き換えて、TEDS におけるポリアミンの頑健性を検査して、全てのポリアミンがバイオフィーム発達において等しく効果的であるかを決定する。

3 部構成 eDNA 依存性スキャフォールドの発達における Z-DNA の役割を決定する

【0362】

バイオフィームが成熟するにつれ、バイオフィーム EPS 内の eDNA は DNアーゼ抵抗性になる。Z-DNA は、DNアーゼ抵抗性であり、バイオフィームが成熟するにつれて TEDS 中に蓄積することが公知である。

【0363】

他の病原体は、単独で、定義された混合バイオフィルムにおいて、およびヒト試料において試験されて、どの程度まで、細菌バイオフィルムの間でZ-DNAが普遍的であるかを決定する。

単一種バイオフィルムにおけるZ-DNAの存在量を明らかにし、Z-DNAが、ポリアミンおよび／またはDNABIIタンパク質と共局在するかどうかを決定する

【0364】

後述する二重種バイオフィルムを使用することができ、各バイオフィルムが加齢するときに（0、4、16、24、48および96時間）抗Z-DNA抗体を使用した免疫蛍光を行うことができる、11種のバイオフィルム形成病原体を試験する {標準8種およびさらに3種 [M. catarrhalis (OMにおける一般的共病原体 (co-pathogen))、Porphyromonas gingivalis (歯周病原体) およびStreptococcus gordonii (口腔日和見性病原体)]}。試料をZ-DNA特異的抗体でプローブし、未処理抗体陰性対照およびB-DNA特異的抗体と比較して、Z-DNA存在を厳密に同定する。IgG富化抗ポリアミンおよび抗DNABII抗血清、ならびにこれらそれぞれの未処理IgG対照を用いて並列実験を行って、全3種の成分が、バイオフィルムEPS内で共局在するかどうかを決定する。バイオフィルムを、FM4-64等の細菌外膜染色剤で対比染色し、一般的な供給源から得た高度に交差吸着した (cross-adsorbed) 二次抗体で抗体標識を検出し、CLSMによって撮像する。ImageJにおけるColoc 2解析プラグインを使用して、共局在の程度を定量する。Z-DNAの蔓延が、バイオフィルム状態への細菌の分配と相関するかどうか試験するために、本明細書に記載される種毎に浮遊性細菌／バイオフィルム細菌の比を定量する。

二重種バイオフィルムにおけるZ-DNAの存在量を決定し、Z-DNAが、ポリアミンおよび／またはDNABIIタンパク質と共局在するかどうかを決定する

【0365】

二重種バイオフィルムを試験して、Z-DNA含量、分布、ならびにポリアミンおよびDNABIIタンパク質との相互作用が、多微生物性環境の文脈において、バイオフィルムの年齢と共にどのように変化するかを決定する。疾患において起こることが公知であり、出願人らがin vitroで経験がある多微生物性組合せは、NTHI+M. catarrhalis (多微生物性OMバイオフィルムに代表的)、P. gingivalis + S. gordonii (多微生物性歯周バイオフィルムに代表的) 29、およびNTHI+P. aeruginosa (多微生物性CFおよび慢性化膿性OMバイオフィルムに代表的) を含む。臨床観察に指示される通りに、多微生物性バイオフィルム培養物を播種する；例えば、P. aeruginosaは一般的に、NTHI感染の部位において二次感染菌であるため、NTHIバイオフィルムは、P. aeruginosa播種に先立ち確立される。結果としての多微生物性バイオフィルムは、以前に記載された通り免疫蛍光によって、バイオフィルムEPSにおけるZ-DNA含量ならびにポリアミンおよびDNABIIタンパク質の存在に関して解析される。

一方のパートナーが、eDNA、ポリアミンおよびHUに寄与することができない場合の、二重種バイオフィルムにおけるZ-DNAの程度、ならびにZ-DNAが、ポリアミンおよび／またはDNABIIタンパク質と共局在するかについて確立する

【0366】

HU欠乏性NTHI株は、ポリアミンおよびeDNAを欠くマット様バイオフィルムを形成する。この株を、一般的共感染病原体、P. aeruginosaおよびM. catarrhalisならびにWT NTHI (gfp発現遺伝子を保有して、これをHU変異体から区別する) と対にして、WT細菌のそれぞれのeDNA、HUおよびポリアミンが、Z-DNAの形成を含むNTHI変異体における欠乏を補完することができるかについての決定に使用する。バイオフィルム形成は、上述の通りCLSMによって定量され、EPS成分および構造は、免疫蛍光CLSMによって解析される。図46Aにおいて、未処理または抗HU (灰色) および抗スペルミジン (Spd、淡灰白) 抗体でプローブした

、指し示されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像を示し、共局在は白色で指し示す。
ヒト試料におけるZ-DNAの検出

【0367】

出願人らが、DNABIIタンパク質およびポリアミンについて以前に行った通り (Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12 (4): 384-9; Idicula et al. (2016) Laryngoscope. 126 (8): 1946-51)、OMを有する小児から回収された滲出液 (Idicula et al. (2016) Laryngoscope. 126 (8): 1946-51)、CF痰 (Gustave et al. (2013) J Cyst Fibros. 12 (4): 384-9)、およびCRSを有する成人由来の吸引液を含む、ヒトバイオフィルム関連疾患由来の臨床試料を試験し、Z-DNAが存在するかを免疫蛍光顕微鏡法によって決定する。出願人らは、出願人らが対応する微生物学的データを有する、上述のそれぞれに由来する性別混合臨床試料にアクセスした。それぞれの切片 (同数の男性および女性供給臨床試料を検査) を、未処理抗体対照と免疫蛍光を比較しつつ、様々な濃度のZ-DNA特異的抗体でプローブする。以前に記載された通り免疫蛍光によって、Z-DNA検出が、ポリアミンおよびDNABIIタンパク質と空間的にどのように関係するかについても調査する。図46Aにおいて、出願人らは、未処理または抗B-DNA (暗灰色) および抗Z-DNA抗体 (白色) でプローブした、指し示された細菌の40時間形成されたバイオフィルムの免疫蛍光CLSM画像を示す。十分に特徴付けされたZ-DNA特異的モノクローナル抗体 (クローンZ2258, 59, 78) を使用して、Z-DNAを検出した。DNABII、ポリアミン、Z-DNAおよびB-DNA成分は全て、複数細菌バイオフィルムのEPS中に存在する。Z-DNAは、異なる定常状態レベルにおける複数細菌バイオフィルムのEPSの不可欠な部分である。

TEDSの発達におけるZ-DNAの機能を調査する

【0368】

そこで、出願人らは、どの程度まで、Z-DNAが、TEDSにおいて不可欠な構造的役割を果たすかを決定する。

Z-DNAに特異的なヌクレアーゼを使用してTEDSをプローブする

【0369】

文献および出願人らのデータに基づき、Z-DNAは、加齢バイオフィルム内に蓄積するが、相当なB形態DNAが残る可能性があり (データ図示せず)、バイオフィルム全体にわたってB-Z界面が存在することを意味する。Richおよび共同研究者らは、ヒトZ-DNA結合タンパク質ADAR1のN末端Zα Z-DNA結合ドメインを、II型制限エンドヌクレアーゼFokIのC末端触媒F_Nドメインに融合させることにより、Z-DNA特異的ヌクレアーゼを作製し (Kim et al. (1997) Proc Natl Acad Sci U S A. 94 (24): 12875-9)、この場合、Z-DNA結合ドメインは、B-特異的ヌクレアーゼをB-Z接合部に置く。二重hADAR1 Zαドメイン (残基133~209) 融合 (Zaa) により、より高いZ-DNA特異性を呈するこの酵素の改善バージョンが構築され、>95%純度までの精製し、スーパーコイル形成したプラスミドにおけるZ-DNA挿入物の消化により、Z-DNA切断活性を確認する (Shin et al. (2016) DNA Res.に記載されている通り)。補完的アプローチとして、B-Z接合部における機能亢進を呈する酵素であるS1ヌクレアーゼを使用する。Kim et al. (1996) J Biol Chem. 271 (16): 9340-6。Z-DNAが、TEDSの構造的統合性の維持に重要である場合、これらのヌクレアーゼの使用は、バイオフィルムを破壊する筈である。これらの酵素は、機能にZ-DNAを要求するため、バイオフィルム発達の経過にわたりZ-DNAについてのプローブとなることができ、Z-DNAの存在を測定するための並行手段として機能することができる (免疫蛍光に加えて)。以前に記載された通り、in vitroバイオフィルムアッセイを使用して、発達の経過 (0、8、16、24、48および96時間) にわたりバイオフィルム形成を阻害する上述のB-Z接合部特異

的ヌクレアーゼの能力を試験する。Z-DNAトラクトの分解が、バイオフィルムおよび浮遊性細菌の変更された分配をもたらすかについて上述通りに決定する。標準8株と共に、出願人らがZ-DNA検出の相対的蔓延を観察するいずれか追加の種に対するこれらのヌクレアーゼの抗バイオフィルム活性を評価する。

B形態へのDNAの駆動がTEDSに影響を与えるかを決定する

【0370】

挿入剤（例えば、エチジウムブロマイド、クロロキン、DAPI（Kwakyee-Berko et al. (1990) Mol Biochem Parasitol. 39 (2): 275-8; Shafer et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12 (11): 4679-90; Kim et al. (1993) Biopolymers. 33 (11): 1677-86) またはDNA結合分子（例えば、ネトロブシン、分枝ポリアミン）の添加により、B-DNAおよびZ-DNAの間の平衡をB形態へとさらに至らせることができる。Muramatsu et al. (2016) J Chem Phys. 145 (23): 235103; Zimmer et al. (1983) FEBS Lett. 154 (1): 156-60。Z-DNAがTEDSの構造的統合性のための基礎である場合、これらの剤は、バイオフィルムを破壊する筈である。この仮説を検査するために、出願人らは、*in vitro*バイオフィルムアッセイを使用して、Z-DNAからB-DNAへの触媒の添加が、バイオフィルム形成を妨害するかを評価し、CLSMによりバイオフィルム阻害を、希釈プレートイングにより浮遊生物／バイオフィルム分配（*planktonic/biofilm partitioning*）のシフトを、免疫蛍光顕微鏡法によりZ-DNA含量の変化を評価する。マイクロプレート希釈により、化合物毎の最小阻害濃度（MIC）を決定することができ、次いでMICに満たない濃度におけるバイオフィルム破壊およびZ-DNA復帰の用量依存を決定することができる。これらの分子を8種の標準株に対して検査し、最良の抗バイオフィルム活性を有する3種の分子を、出願人らがZ-DNA検出の相対的蔓延を観察するいずれか追加の種によりさらに調査する。

Z形態へのDNAの駆動がTEDSに影響を与えるかを決定する

【0371】

B-DNAおよびZ-DNAの間の平衡は、Z-DNA傾向配列をZ-DNAへと至らせるタンパク質（ADARタンパク質、ZBPタンパク質、ポックスウイルスE3タンパク質）のZαドメインファミリーのメンバーに由来する外因性組換えZαドメインを添加することにより（Athanasiadis et al. (2012) Semin Cell Dev Biol. 23 (3): 275-80）、または交互プリンピリミジントラクトにおけるシトシンのC5をメチル化することにより（例えば、HhaI、M.SssIおよびM.CviPIメチルトランスフェラーゼ）、ポリカチオン（例えば、ポリアミン）のレベルを増加させることにより（Jovin et al. (1987) Ann Rev Phys Chem. 38: 521-60）、Z-DNAに向かって駆動することができる。バイオフィルム形成の程度は変化しない可能性があるが、バイオフィルム形成の動態および全体的構造は変化する可能性がある。FokIヌクレアーゼ融合がないだけの、上述の通りのhADAR1由来の組換えZαドメインが産生され、組換えタンパク質のZ-DNA結合活性が、CDによって確認される。Zαドメイン（0、0.5、5または50 μM）またはメチルトランスフェラーゼ（例えば、0、0.1、1または10 U/mLのHhaIおよびS-アデノシルメチオニン）が、バイオフィルム播種時に添加され、標準8株および他の面では同質遺伝子的なHU欠乏性NTHI（そのバイオフィルムに有意なeDNAを含有しない陰性対照）における播種後4、8、16、24、48および96時間目におけるバイオフィルム形成を、CLSMを使用した*in vitro*バイオフィルムアッセイにより評価し、浮遊生物／バイオフィルム分配のシフトを希釈プレートイングにより評価し、Z-DNA蓄積を免疫蛍光によって観察する。

【0372】

特異的にZ-DNAに結合するDNABIIの能力を決定する。出願人らは、HUが、

DNAをZ-DNAに至らせることを示したが、追加の解析を行って、DNABIIタンパク質、ポリアミンおよびDNAが相乗的に作用して、Z-DNAを形成するかを決定することを行う。

IHFおよびHUがポリアミン誘導性Z-DNAの存在下でDNAに結合するかを決定する【0373】

Hudおよび共同研究者らによる大規模研究(Sarkar et al. (2009) Biochemistry. 48(4):667-75; Sarkar et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35(3):951-61)は、IHFおよびHUの両方が、スペルミジンの存在下でDNAに結合し、その構造を太い繊維に変化させることを示した。定義されるDNA基質[ホリデイジャンクションDNA、IHFコンセンサス配列(WATCAANNNTTR、式中、WはAまたはTであり、Nはいずれかのヌクレオチドであり、Rはプリンである)を含有する35bp二重鎖、同じ配列のスクランブルバージョン、Z-DNA変換する傾向がある35bp(dGdC)、およびその傾向がない35bp(dAdT)]が、ポリアミン(0、0.1、0.5、1および5mMの次に挙げるもの:プトレシン、スペルミジン、スペルミン、カダベリン、または上で決定された組合せ)の存在または非存在下で、Z-DNAを形成するかについて決定する。250および280nmにおける特徴的反転を予測するCD分光測定による楕円率測定によるZ-DNA変換を先ず決定する。次に、サウスウェスタン解析(EMSAと、それに続く抗Z-DNAおよび抗DNABII抗体によるイムノプロット解析)によって判定される、各基質へのDNABIIタンパク質の結合を調査する。Goodman et al. (1989) Nature. 341(6239):251-4。CDで確認されるZ-DNA変換を有する基質(0.2nM)を、50mM HEPES緩衝液pH7.0において25~500nM DNABIIタンパク質と共に30分間室温でインキュベートする。6%非変性ポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動によって反応混合物を分離する。ImageQuantソフトウェアを使用して、バンド強度を定量する。平衡解離定数(K_d)を測定する。Hung, et al. (2011) J Bacteriol. 193(14):3642-52。DNA基質は同位体標識されているため、上に記す同じ細菌株由来のポリアミンおよび/またはDNABIIタンパク質(その後の反応混合物の0、0.05、0.1、0.2および0.5v/v)の供給源としてのバイオフィルム由来の無細胞馴化培地を検査することもできる。

IHFおよびHUがZ-DNAに結合するかを決定する【0374】

IHFおよびHUが、直接的にZ-DNAに結合するかを決定する。DNABIIタンパク質および安定Z-DNAコンフォーマーである35bp臭素化(dGdC)DNA基質によるEMSAを行う。Herbert et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21(11):2669-72。臭素化DNA基質は、Z-DNA状態を安定化するためにポリアミンを要求しないため、本実験は、前の知見を拡張する。基質DNAは、記載された $\alpha^{32}P$ -dGTP、5-ブロモdCTP、dGTPおよびクレノウ(Klenow)とのインキュベーションによって標識および調製される。Herbert et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21(11):2669-72。25~500nM DNABIIタンパク質を、0.2nM標識DNA基質と共にインキュベートし、6%非変性ポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動によって反応混合物を分離し、ImageQuantソフトウェアによってバンド強度を定量し、平衡解離定数(K_d)を測定する。

細菌バイオフィルム破壊におけるEPS成分および構造を標的とする作用物質の有効性を決定する

【0375】

eDNAおよびDNABIIは、バイオフィルム破壊のための公知標的であるが、そこで、出願人らは、従来の抗微生物薬の存在または非存在下でのポリアミンおよびZ-DNAの両方に着目する。出願人らは、TEDS成分および構造に対して向けられた作用物質

10

20

30

40

50

が、従来の抗微生物薬と相乗的に作用すると仮定する。

E P S e DNA スキャフォールドの以前に発見された成分を標的とする作用物質（抗 D N A B I I 抗体およびヌクレアーゼ）が、新たに発見された T E D S 成分／構造を標的とする作用物質（すなわち、ポリアミンおよび Z - D N A）と相乗的であるかどうかを決定する

【0376】

バイオフィーム破壊のためのアプローチとして、T E D S の全 3 種の成分または構造を、単独でまたは組み合わせて、標的とする。出願人らは、T E D S 内の複数の標的を処置することにより、出願人らが、相乗作用を、よって、1 つの標的を単独で標的とするよりも潜在的により優れた有効性があることを実証することができると仮定する。

ポリアミン、D N A B I I タンパク質および／または B 形態 e D N A の標的化

【0377】

公知の細菌ポリアミン合成阻害剤 [ジシクロヘキシルアミン (D C H A) (M a t t i l a e t a l . (1984) B i o c h e m J . 223 (3) : 823-30)、ジフルオロメチルオルニチン (D F M O) (M u t h e t a l . (2014) J M e d C h e m . 57 (2) : 348-63)、メチルグリオキサールービス (シクロペンチルアミジノヒドラゾン) (M G B C P) (T a k a j i e t a l . (1997) L e t t A p p l M i c r o b i o l . 25 (3) : 177-80)] を使用して、別個の成熟化の年齢 (0、8、24 および 48 時間) に標準 8 株によって形成されたバイオフィームを破壊するそれぞれの能力を検査する。病原体毎に D C H A、D F M O および M G B C P の M I C を決定し、M I C を下回る 100 倍希釈系列を破壊活性について検査する。各阻害剤は、個々に、および D N アーゼ (プルモザイム (登録商標) ; 0、0.1、1 U / m l) または H U に対する I g G 富化抗血清 (0、150、300 μ g / m l) と組み合わせて検査する。L I V E / D E A D (登録商標) 染色および C L S M および以前に定量されたバイオフィームパラメーターによって、バイオフィームを解析する。個々の処置および処置なし対照と比較した各処置組合せの有効性を評価する。加えて、常在性細菌のいずれかの殺滅または単純にバイオフィームの破壊が存在するかを決定するための、バイオフィームおよび浮遊生物 (p l a n k t o n i c) に残る C F U の分配を試験する。次に、不応性痰バイオマスを破壊する能力について、10 名の患者由来の C F (ヒト多微生物性バイオフィーム様群集の例として (G u s t a v e e t a l . (2013) J C y s t F i b r o s . 12 (4) : 384-9)) 試料における全 8 種の病原体のための 5 種の最も有効な組合せを検査する。G u s t a v e e t a l . (2013) J C y s t F i b r o s . 12 (4) : 384-9。簡潔に説明すると、痰試料を 24 時間処置し、撮像する。以前に記載された通り、無処置対照と比較した濁度の増加によって判定される痰試料の破壊を使用して、処置有効性を定量する。G u s t a v e e t a l . (2013) J C y s t F i b r o s . 12 (4) : 384-9。Z - D N A、D N A B I I タンパク質および／または B 形態 e D N A の標的化

【0378】

決定された最良の Z - D N A 阻害剤／破壊因子（またはこれらの最良の組合せ）を使用して、成熟の様々な年齢で、標準 8 株によって形成されたバイオフィームを破壊する、個々のおよび抗 D N A B I I 抗体または D N アーゼと組み合わせた M I C に満たない濃度でのそれぞれの能力を検査する。上で利用された Z - D N A 特異的ヌクレアーゼが、バイオフィーム形成を阻害する場合、これらのヌクレアーゼを、抗 D N A B I I 抗体または D N アーゼと共投与 (c o - a d m i n s i t e r) する。バイオフィーム破壊活性および C F 痰破壊活性に最も有効な組合せを解析する。

ポリアミン、Z - D N A、D N A B I I タンパク質および B 形態 e D N A の標的化

【0379】

ポリアミン合成阻害剤および Z - D N A 阻害剤を使用して、成熟の様々な年齢 (0、8、24 および 48 時間) で標準 8 株のそれぞれによって形成されたバイオフィームを破壊する、組み合わせたそれぞれの能力を検査する。抗 D N A B I I 抗体または D N アーゼに

て、バリアコロニーにおいてSPFモルモットを維持し、ほぼ20cfuの*M. tuberculosis*株Erdman K01桿菌をその肺に送達するためのエアロゾル化スプレーにより感染させる。細菌負荷および病理組織学的評価のための組織の回収の決定により、曝露後日数25、50、75、100、125および150日目に動物を殺す。TBの古典的徴候を発症しないマウスとは異なり、この様式で曝露したモルモットは、ヒト疾患の特質である中心の壊死を有するよく組織化された肉芽腫を発症する。さらに、ヒトと同様に、モルモットは、一次病変複合体の一部として、重症化膿性肉芽腫性（severe pyogranulomatous）および流入領域リンパ節の壊死性リンパ節炎を発症する。このモデルの使用は、治療法を確認および同定するための前臨床スクリーニング、ならびに曝露後にこれらの動物の肺に形成することが観察され、疾患の病理発生および慢性化の両方に寄与することが考えられる、結果として生じる*M. tuberculosis*バイオフィルムの低減および／または排除のための予防戦略を提供する。

（実施例6）

実験番号6

【0384】

カテーテル／留置デバイスバイオフィルム感染の複数の動物モデルが公知である。Otto（2009）Nature Reviews Microbiology 7:555を参照されたい。正常皮膚細菌叢と典型的に考慮されるが、微生物*Staphylococcus epidermidis*は、多くの者が、院内感染の原因因子の中でも第1位の、肝要な日和見病原体として配慮するものになった。主に、この細菌は、留置医療デバイスにおいて発症する感染の大部分の原因となり、留置医療デバイスは、デバイス挿入の際にこの一般的な皮膚生着菌によって汚染される。これは典型的に生命を脅かすものではないが、このようなバイオフィルム感染の処置に関連した困難は、その頻度と組み合わせ、重篤な公衆衛生上の負担となる。*S. epidermidis*による血管カテーテル関連血流感染単独の処置に関連した現在のコストは、米国において年間\$20億に達する。*S. epidermidis*に加えて、*E. faecalis*および*S. aureus*も、留置医療デバイスに見出される汚染である。ウサギ、マウス、モルモットおよびラットを含む、カテーテル関連の*S. epidermidis*感染のいくつかの動物モデルが存在し、これらは全て、病理発生の分子機構の研究に使用されており、予防および／または治療法の研究に役立つ。ラット頸静脈カテーテルが使用されて、*E. faecalis*、*S. aureus*および*S. epidermidis*バイオフィルム形成に干渉する治療法を評価した。バイオフィルム低減は、3つの仕方で測定されることが多い—（i）カテーテルを超音波処理し、CFUを計算する、（ii）カテーテルを薄切りにするもしくは単純にプレート上に置き、スコア化する、または（iii）バイオフィルムは、クリスタルバイオレットまたは別の色素で染色し、溶出させ、CFUの代理としてOD測定することができる。

（実施例7）

実験番号7

【0385】

本明細書に記載される方法を使用して、非免疫対象に受動免疫を付与することができる。所与の抗原に対する受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識するまたはこれに結合する抗体または抗原結合性断片の移入により付与することができる。抗体ドナーおよびレシピエントは、ヒトまたは非ヒト対象となることができる。その上またはあるいは、抗体組成物は、特定の抗原を特異的に認識するまたはこれに結合する抗体または抗原結合性断片をコードする単離されたまたは組換えポリヌクレオチドを含むことができる。

【0386】

免疫原性組成物の投与がレシピエント対象にリスクを課す、レシピエント対象が免疫低下状態である、またはレシピエント対象が即時免疫を要求する場合に、受動免疫を付与することができる。免疫原性組成物は、選択された投与機序と一貫した様式で調製することができる。組成物は、抗体全体、抗原結合性断片、ポリクローナル抗体、モノクローナル

10

20

30

40

50

抗体、*in vivo*で生成された抗体、*in vitro*で生成された抗体、精製されたもしくは部分的に精製された抗体、または全血清を含むことができる。投与は、単一用量の抗体組成物、または初期投与とそれに続く1つもしくは複数のブースター用量を含むことができる。ブースター用量は、初期用量後1日、2日、3日、1週間、2週間、3週間、1、2、3、6もしくは12ヶ月に、または他のいずれかの時点で提供することができる。ブースター用量は、対象の抗体力価の評価後に投与することができる。

等価物

【0387】

上述の実施形態と併せて本開示について記載してきたが、前述の記載および実施例が、説明を意図し、本開示の範囲を限定するものではないことを理解されたい。本開示の範囲内の他の態様、利点および改変は、本開示が属する技術分野の当業者には明らかとなる。

【0388】

他に規定がなければ、本明細書で使用されるあらゆる技術および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意義を有する。本明細書に提供されるあらゆるヌクレオチド配列は、5'から3'の方向で提示される。

【0389】

説明目的で本明細書に記載される実施形態は、特に本明細書に開示されていないいかなるエレメント（単数または複数）、限定（単数または複数）の非存在下であっても、適切に実施することができる。よって、例えば、用語「を含む（*comprising*）」、「を含む（*including*）」、「を含有する（*containing*）」等は、拡大的に限定することなく読むべきである。その上、本明細書で用いられる用語および表現は、限定ではなく記載の用語として使用しており、斯かる用語および表現の使用において、示され記載された特色またはその部分のいかなる等価物を除外する意図もないが、本開示の範囲内で様々な改変が可能であることが認識される。

【0390】

よって、特異的な実施形態および必要に応じた特色によって本開示を特に開示してきたが、本明細書に開示されるその中の実施形態の改変、改善および変形形態は、当業者によって用いることができ、斯かる改変、改善および変形形態が、本開示の範囲内にあると考慮されることを理解されたい。本明細書に提供される材料、方法および実施例は、特定の実施形態を代表し、例示的であり、本開示の範囲における限定として意図するものではない。

【0391】

本開示の範囲（*scoped*）を、本明細書で広く包括的に記載してきた。包括的な開示に含まれるより狭い種および亜属のグループ分けのそれぞれもまた、本開示の一部を形成する。これは、切り取られた材料が本明細書に特に列挙されているか否かに関係なく、属からいずれかの主題を除去する、条件付きの包括的な記載または否定的な制限を含む。

【0392】

加えて、本開示の特色または態様が、マーカッシュ群の観点から記載されている場合、当業者であれば、これにより、本開示の実施形態を、マーカッシュ群のいずれか個々のメンバーまたはメンバーのサブグループの観点から記載できることも認識する。

【0393】

本明細書に言及されているあらゆる刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、あたかもそれぞれが個々に参照により本明細書に組み込まれるのと同じ程度まで、それらの全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる。矛盾が生じる場合、定義を含めて本明細書が優先するものとする。

参考文献

10

20

30

40

50

【化 2 - 1】

1. Dillon SC, Dorman CJ. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(3):185-95. doi: 10.1038/nrmicro2261. PubMed PMID: 20140026.
2. Dey D, Nagaraja V, Ramakumar S. Structural and evolutionary analyses reveal determinants of DNA binding specificities of nucleoid-associated proteins HU and IHF. *Mol Phylogenet Evol.* 2017;107:356-66. doi: 10.1016/j.ympev.2016.11.014. PubMed PMID: 27894997. 10
3. Swinger KK, Rice PA. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol.* 2004;14(1):28-35. doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.003. PubMed PMID: 15102446.
4. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med.* 1944;79(2):137-58. PubMed PMID: 19871359; PMCID: PMC2135445. 20
5. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. *J Biol Chem.* 2016;291(24):12538-46. doi: 10.1074/jbc.R115.707547. PubMed PMID: 27129225; PMCID: PMC4933457.
6. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6(2):201-8. doi: 10.1586/14787210.6.2.201. PubMed PMID: 18380602; PMCID: PMC2712878. 30
7. Steele L, Fawal H. 4th Decennial International Conference on nosocomial and healthcare-associated infections: a challenge for change. *Am J Infect Control.* 2000;28(3):207-10. doi: 10.1067/mic.2000.107275. PubMed PMID: 10840339.
8. Apicella MA. Bacterial otitis media, the chinchilla middle ear, and biofilms. *J Infect Dis.* 2009;199(6):774-5. PubMed PMID: 19434910. 40

【化 2 - 2】

9. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol.* 2000;10(8):509-15. PubMed PMID: 11118930.
10. Mancl KA, Kirsner RS, Ajdic D. Wound biofilms: lessons learned from oral biofilms. *Wound Repair Regen.* 2013;21(3):352-62. doi: 10.1111/wrr.12034. PubMed PMID: 23551419; PMCID: PMC3648594.
11. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(3):297-308. doi: 10.1586/eri.13.12. PubMed PMID: 23458769. 10
12. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1771-6. PubMed PMID: 10325322; PMCID: PMC84946.
13. Stacy A, McNally L, Darch SE, Brown SP, Whiteley M. The biogeography of polymicrobial infection. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(2):93-105. doi: 10.1038/nrmicro.2015.8. PubMed PMID: 26714431; PMCID: PMC5116812. 20
14. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(2):107-12. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x. PubMed PMID: 22925473.
15. Jurcisek JA, Brockman KL, Novotny LA, Goodman SD, Bakaletz LO. Nontypeable *Haemophilus influenzae* releases DNA and DNABII proteins via a T4SS-like complex and ComE of the type IV pilus machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(32):E6632-E41. doi: 10.1073/pnas.1705508114. PubMed PMID: 28696280; PMCID: PMC5559034. 30
16. Sena-Velez M, Redondo C, Graham JH, Cubero J. Presence of Extracellular DNA during Biofilm Formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Strains with Different Host Range. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156695. doi: 10.1371/journal.pone.0156695. PubMed PMID: 27248687; PMCID: PMC4889101.
17. Wang S, Liu X, Liu H, Zhang L, Guo Y, Yu S, Wozniak DJ, Ma LZ. The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton 40

【化 2 - 3】

- in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep*. 2015;7(2):330-40. doi: 10.1111/1758-2229.12252. PubMed PMID: 25472701; PMCID: PMC4656019.
18. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002;295(5559):1487. doi: 10.1126/science.295.5559.1487. PubMed PMID: 11859186.
19. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Hoiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr*. 2006;95(9):1070-4. doi: 10.1080/08035250600752466. PubMed PMID: 16938752. 10
20. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses*. 2012;55(1):80-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x. PubMed PMID: 21668524; PMCID: PMC3175262.
21. Hymes SR, Randis TM, Sun TY, Ratner AJ. DNase inhibits *Gardnerella vaginalis* biofilms *in vitro* and *in vivo*. *J Infect Dis*. 2013;207(10):1491-7. doi: 10.1093/infdis/jit047. PubMed PMID: 23431033; PMCID: PMC3627197. 20
22. Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol*. 2011;4(6):625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27. PubMed PMID: 21716265.
23. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Ehrlich GD, Post JC. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol*. 2008;8:173. doi: 10.1186/1471-2180-8-173. PubMed PMID: 18842140; PMCID: PMC2600794. 30
24. Izano EA, Shah SM, Kaplan JB. Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Microb Pathog*. 2009;46(4):207-13. doi: 10.1016/j.micpath.2009.01.004. PubMed PMID: 19490830; PMCID: PMC2691864. 40

【化 2 - 4】

25. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, Izano EA. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012;65(2):73-7. doi: 10.1038/ja.2011.113. PubMed PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126.
26. Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacteriuml nucleic acid binding protein. *PLoS One*. 2013;8(6):e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629. PubMed PMID: 23799151; PMCID: PMC3682984. 10
27. Tetz VV, Tetz GV. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. *DNA Cell Biol*. 2010;29(8):399-405. doi: 10.1089/dna.2009.1011. PubMed PMID: 20491577.
28. Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol Microbiol*. 2015;96(6):1119-35. doi: 10.1111/mmi.12994. PubMed PMID: 25757804; PMCID: PMC4464964. 20
29. Rocco CJ, Davey ME, Bakaletz LO, Goodman SD. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(2):118-30. doi: 10.1111/omi.12157. PubMed PMID: 26988714; PMCID: PMC5023461.
30. Devaraj A, Buzzo J, Rocco CJ, Bakaletz LO, Goodman SD. The DNABII family of proteins is comprised of the only nucleoid associated proteins required for nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm structure. *Microbiologyopen*. 2017. doi: 10.1002/mbo3.563. PubMed PMID: 29230970. 30
31. Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. *Mol Microbiol*. 2014;93(6):1246-58. doi: 10.1111/mmi.12735. PubMed PMID: 25069521; PMCID: PMC4160410.
32. Michael AJ. Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules. *Biochem J*. 2016;473(15):2315-29. doi: 10.1042/BCJ20160185. PubMed PMID: 27470594. 40

【化 2 – 5】

33. Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev.* 1985;49(1):81-99. PubMed PMID: 3157043; PMCID: PMC373019.
34. Bachrach U. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Curr Protein Pept Sci.* 2005;6(6):559-66. PubMed PMID: 16381604.
35. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. *Amino Acids.* 2014;46(3):595-603. doi: 10.1007/s00726-013-1550-9. PubMed PMID: 23836422. 10
36. Sarkar T, Petrov AS, Vitko JR, Santai CT, Harvey SC, Mukerji I, Hud NV. Integration host factor (IHF) dictates the structure of polyamine-DNA condensates: implications for the role of IHF in the compaction of bacterial chromatin. *Biochemistry.* 2009;48(4):667-75. doi: 10.1021/bi8019965. PubMed PMID: 19132923.
37. Sarkar T, Vitoc I, Mukerji I, Hud NV. Bacterial protein HU dictates the morphology of DNA condensates produced by crowding agents and polyamines. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(3):951-61. doi: 10.1093/nar/gkl1093. PubMed PMID: 17259223; PMCID: PMC1807954. 20
38. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60(1):544-53. doi: 10.1128/AAC.01650-15. PubMed PMID: 26552982; PMCID: PMC4704225.
39. Thomas TJ, Messner RP. A left-handed (Z) conformation of poly(dA-dC).poly(dG-dT) induced by polyamines. *Nucleic Acids Res.* 1986;14(16):6721-33. PubMed PMID: 3748821; PMCID: PMC311676. 30
40. Thomas TJ, Messner RP. Structural specificity of polyamines in left-handed Z-DNA formation. Immunological and spectroscopic studies. *J Mol Biol.* 1988;201(2):463-7. PubMed PMID: 3418706.
41. Pohl FM. Salt-induced transition between two double-helical forms of oligo (dC-dG). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1983;47 Pt 1:113-7. PubMed PMID: 6574834.
42. Pohl FM. Dynamics of the B-to-Z transition in supercoiled DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(14):4983-7. PubMed PMID: 3460079; PMCID: PMC323873. 40

【化 2 - 6】

43. Rahmouni AR. Z-DNA as a probe for localized supercoiling in vivo. *Mol Microbiol.* 1992;6(5):569-72. PubMed PMID: 1552856.
44. Jovin TMS, D. M.; McIntosh, L. P. The Transition Between B-DNA and Z-DNA. *Ann Rev Phys Chem.* 1987;38:521-60.
45. Kim DH, Im H, Jee JG, Jang SB, Yoon HJ, Kwon AR, Kang SM, Lee BJ. beta-Arm flexibility of HU from *Staphylococcus aureus* dictates the DNA-binding and recognition mechanism. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014;70(Pt 12):3273-89. doi: 10.1107/S1399004714023931. PubMed PMID: 25478845. 10
46. Chaires JB, Norcum MT. Structure and stability of Z* DNA. *J Biomol Struct Dyn.* 1988;5(6):1187-207. doi: 10.1080/07391102.1988.10506463. PubMed PMID: 3271507.
47. Thomas TJ, Bloomfield VA. Chain flexibility and hydrodynamics of the B and Z forms of poly(dGdC). poly(dG-dC). *Nucleic Acids Res.* 1983;11(6):1919-30. PubMed PMID: 6835843; PMCID: PMC325846.
48. Athanasiadis A. Zalpha-domains: at the intersection between RNA editing and innate immunity. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(3):275-80. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.11.001. PubMed PMID: 22085847. 20
49. Bergen HR, 3rd, Losman MJ, O'Connor T, Zacharias W, Larson JE, Accavitti MA, Wells RD, Koopman WJ. Specificity of monoclonal anti-Z-DNA antibodies from unimmunized MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Immunol.* 1987;139(3):743-8. PubMed PMID: 3496387.
50. Herbert A, Rich A. The biology of left-handed Z-DNA. *J Biol Chem.* 1996;271(20):11595-8. PubMed PMID: 8662853. 30
51. Gustave JE, Jurcisek JA, McCoy KS, Goodman SD, Bakaletz LO. Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2013;12(4):384-9. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.011. PubMed PMID: 23168017; PMCID: PMC3582735.
52. Novotny LA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo. *EBioMedicine.* 2016;10:33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022. PubMed PMID: 27342872; PMCID: PMC5006588. 40

【化 2 – 7】

53. Freire MO, Devaraj A, Young A, Navarro JB, Downey JS, Chen C, Bakaletz LO, Zadeh HH, Goodman SD. A bacteriuml-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(1):74-88. doi: 10.1111/omi.12155. PubMed PMID: 26931773; PMCID: PMC5010536.
54. Bakaletz LO. Chinchilla as a robust, reproducible and polymicrobial model of otitis media and its prevention. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(8):1063-82. doi: 10.1586/erv.09.63. PubMed PMID: 19627188. 10
55. Iacomino G, Picariello G, Sbrana F, Di Luccia A, Raiteri R, D'Agostino L. DNA is wrapped by the nuclear aggregates of polyamines: the imaging evidence. *Biomacromolecules.* 2011;12(4):1178-86. doi: 10.1021/bm101478j. PubMed PMID: 21401020.
56. Paulin L, Lindberg LA, Poso H. Reversible inhibition of flagella formation after specific inhibition of spermidine synthesis by dicyclohexylamine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1986;52(6):483-90. PubMed PMID: 3101591. 20
57. Pegg AE, Bitonti AJ, McCann PP, Coward JK. Inhibition of bacterial aminopropyltransferases by Sadenosyl- 1, 8-diamino-3-thiooctane and by dicyclohexylamine. *FEBS Lett.* 1983;155(2):192-6. PubMed PMID: 6406265.
58. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* 2000;146 (Pt 10):2395-407. doi: 10.1099/00221287-146-10-2395. PubMed PMID: 11021916. 30
59. Yang CL, Chilvers M, Montgomery M, Nolan SJ. Dornase alfa for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2017;21:65-7. doi: 10.1016/j.prrv.2016.09.001. PubMed PMID: 27769785.
60. Jang YJ, Lee C, Kim SK. Formation of Poly[d(A-T)2] Specific Z-DNA by a Cationic Porphyrin. *Sci Rep.* 2015;5:9943. doi: 10.1038/srep09943. PubMed PMID: 25943171; PMCID: PMC4421867. 40

【化 2 – 8】

61. Segall AM, Goodman SD, Nash HA. Architectural elements in nucleoprotein complexes: interchangeability of specific and non-specific DNA binding proteins. *EMBO J.* 1994;13(19):4536-48. PubMed PMID: 7925295; PMCID: PMC395386.
62. Tjokro NO, Rocco CJ, Priyadarshini R, Davey ME, Goodman SD. A biochemical analysis of the interaction of *Porphyromonas gingivalis* HU PG0121 protein with DNA. *PLoS One.* 2014;9(3):e93266. doi: 10.1371/journal.pone.0093266. PubMed PMID: 24681691; PMCID: PMC3969353. 10
63. Ayala E, Downey JS, Mashburn-Warren L, Senadheera DB, Cvitkovitch DG, Goodman SD. A biochemical characterization of the DNA binding activity of the response regulator VicR from *Streptococcus mutans*. *PLoS One.* 2014;9(9):e108027. doi: 10.1371/journal.pone.0108027. PubMed PMID: 25229632; PMCID: PMC4168254.
64. Hung DC, Downey JS, Ayala EA, Kreth J, Mair R, Senadheera DB, Qi F, Cvitkovitch DG, Shi W, Goodman SD. Characterization of DNA binding sites of the ComE response regulator from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2011;193(14):3642-52. doi: 10.1128/JB.00155-11. PubMed PMID: 21602345; PMCID: PMC3133340. 20
65. Idicula WK, Jurgisek JA, Cass ND, Ali S, Goodman SD, Elmaraghy CA, Jatana KR, Bakaletz LO. Identification of biofilms in post-tympanostomy tube otorrhea. *Laryngoscope.* 2016;126(8):1946-51. doi: 10.1002/lary.25826. PubMed PMID: 27426942; PMCID: PMC4955598.
66. Brandstetter KA, Jurgisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S. Antibodies directed against integration host factor mediate biofilm clearance from Nasopore. *Laryngoscope.* 2013;123(11):2626-32. doi: 10.1002/lary.24183. PubMed PMID: 23670606; PMCID: PMC4060527. 30
67. Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. PubMed PMID: 26350328; PMCID: PMC4566162.
68. Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. PubMed PMID: 26350328; PMCID: PMC4566162. 40

【化 2 - 9】

69. Justice SS, Li B, Downey JS, Dabdoub SM, Brockson ME, Probst GD, Ray WC, Goodman SD. Aberrant community architecture and attenuated persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the absence of individual IHF subunits. *PLoS One*. 2012;7(10):e48349. doi: 10.1371/journal.pone.0048349. PubMed PMID: 23133584; PMCID: PMC3485042.
70. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*. 2006;2:2006 0008. doi: 10.1038/msb4100050. PubMed PMID: 16738554; PMCID: PMC1681482. 10
71. Karperien A. FracLac for ImageJ 1999-2013. Available from: rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm.
72. Kashiwagi K, Miyamoto S, Suzuki F, Kobayashi H, Igarashi K. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4529-33. PubMed PMID: 1584788; PMCID: PMC49116. 20
73. Soksawatmaekhin W, Kuraishi A, Sakata K, Kashiwagi K, Igarashi K. Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2004;51(5):1401-12. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03913.x. PubMed PMID: 14982633.
74. Higashi K, Ishigure H, Demizu R, Uemura T, Nishino K, Yamaguchi A, Kashiwagi K, Igarashi K. Identification of a spermidine excretion protein complex (MdtJI) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2008;190(3):872-8. doi: 10.1128/JB.01505-07. PubMed PMID: 18039771; PMCID: PMC2223573. 30
75. Sugiyama Y, Nakamura A, Matsumoto M, Kanbe A, Sakanaka M, Higashi K, Igarashi K, Katayama T, Suzuki H, Kurihara S. A Novel Putrescine Exporter SapBCDF of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2016;291(51):26343-51. doi: 10.1074/jbc.M116.762450. PubMed PMID: 27803167; PMCID: PMC5159496.
76. Sabate Bresco M, Harris LG, Thompson K, Stanic B, Morgenstern M, O'Mahony L, Richards RG, Moriarty TF. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. *Front Microbiol*. 2017;8:1401. doi: 10.3389/fmicb.2017.01401. PubMed PMID: 28824556; PMCID: PMC5539136. 40

【化 2 – 1 0】

77. Hakkinen MR, Roine A, Auriola S, Tuokko A, Veskimäe E, Keinänen TA, Lehtimäki T, Oksala N, Vepsäläinen J. Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013;941:81-9. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.10.009. PubMed PMID: 24185098.
78. Liu R, Li Q, Ma R, Lin X, Xu H, Bi K. Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to identify potential markers for human hepatic cancer. *Anal Chim Acta.* 2013;791:36-45. doi: 10.1016/j.aca.2013.06.044. PubMed PMID: 23890604. 10
79. Xu H, Liu R, He B, Bi CW, Bi K, Li Q. Polyamine Metabolites Profiling for Characterization of Lung and Liver Cancer Using an LC-Tandem MS Method with Multiple Statistical Data Mining Strategies: Discovering Potential Cancer Biomarkers in Human Plasma and Urine. *Molecules.* 2016;21(8). doi: 10.3390/molecules21081040. PubMed PMID: 27517900.
80. Kabir A, Suresh Kumar G. Binding of the biogenic polyamines to deoxyribonucleic acids of varying base composition: base specificity and the associated energetics of the interaction. *PLoS One.* 2013;8(7):e70510. doi: 10.1371/journal.pone.0070510. PubMed PMID: 23894663; PMCID: PMC3722294. 20
81. Di Martino ML, Campilongo R, Casalino M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(8):484-91. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.06.008. PubMed PMID: 23871215.
82. Karatan E, Michael AJ. A wider role for polyamines in biofilm formation. *Biotechnol Lett.* 2013;35(11):1715-7. doi: 10.1007/s10529-013-1286-3. PubMed PMID: 23881324. 30
83. Kim YG, Kim PS, Herbert A, Rich A. Construction of a Z-DNA-specific restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24):12875-9. PubMed PMID: 9371768; PMCID: PMC24231.
84. Shin SI, Ham S, Park J, Seo SH, Lim CH, Jeon H, Huh J, Roh TY. Z-DNA-forming sites identified by ChIP-Seq are associated with actively transcribed regions in the human genome. *DNA Res.* 2016. doi: 10.1093/dnares/dsw031. PubMed PMID: 27374614; PMCID: PMC5066173. 40

【化 2 – 1 1】

85. Kim J, Yang C, DasSarma S. Analysis of left-handed Z-DNA formation in short d(CG)_n sequences in *Escherichia coli* and *Halobacterium halobium* plasmids. Stabilization by increasing repeat length and DNA supercoiling but not salinity. *J Biol Chem.* 1996;271(16):9340-6. PubMed PMID: 8621598.
86. Kwakye-Berko F, Meshnick S. Sequence preference of chloroquine binding to DNA and prevention of Z-DNA formation. *Mol Biochem Parasitol.* 1990;39(2):275-8. PubMed PMID: 2320060. 10
87. Shafer RH, Brown SC, Delbarre A, Wade D. Binding of ethidium and bis(methidium)spermine to Z DNA by intercalation. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(11):4679-90. PubMed PMID: 6739293; PMCID: PMC318867.
88. Kim SK, Eriksson S, Norden B. Z-->B transition in poly[d(G-m5C)2] induced by interaction with 4',6-diamidino-2-phenylindole. *Biopolymers.* 1993;33(11):1677-86. doi: 10.1002/bip.360331105. PubMed PMID: 8241427.
89. Muramatsu A, Shimizu Y, Yoshikawa Y, Fukuda W, Umezawa N, Horai Y, Higuchi T, Fujiwara S, Imanaka T, Yoshikawa K. Naturally occurring branched-chain polyamines induce a crosslinked meshwork structure in a giant DNA. *J Chem Phys.* 2016;145(23):235103. doi: 10.1063/1.4972066. PubMed PMID: 28010109. 20
90. Zimmer C, Marck C, Guschlbauer W. Z-DNA and other non-B-DNA structures are reversed to B-DNA by interaction with netropsin. *FEBS Lett.* 1983;154(1):156-60. PubMed PMID: 6299791.
91. Temiz NA, Donohue DE, Bacolla A, Luke BT, Collins JR. The role of methylation in the intrinsic dynamics of B- and Z-DNA. *PLoS One.* 2012;7(4):e35558. doi: 10.1371/journal.pone.0035558. PubMed PMID: 22530050; PMCID: PMC3328458. 30
92. Goodman SD, Nash HA. Functional replacement of a protein-induced bend in a DNA recombination site. *Nature.* 1989;341(6239):251-4. doi: 10.1038/341251a0. PubMed PMID: 2528697.
93. Herbert AG, Rich A. A method to identify and characterize Z-DNA binding proteins using a linear oligodeoxynucleotide. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(11):2669-72. PubMed PMID: 8332463; PMCID: PMC309597. 40

【化 2 – 1 2】

94. Shishido K, Sakaguchi R, Nosoh Y. Enhancement of S1 nuclease-susceptibility of negatively superhelical DNA by netropsin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;124(2):388-92. PubMed PMID: 6093797.
95. Mattila T, Honkanen-Buzalski T, Poso H. Reversible inhibition of bacterial growth after specific inhibition of spermidine synthase by dicyclohexylamine. *Biochem J.* 1984;223(3):823-30. PubMed PMID: 6508744; PMCID: PMC1144368.
96. Muth A, Madan M, Archer JJ, Ocampo N, Rodriguez L, Phanstiel Ot. Polyamine transport inhibitors: design, synthesis, and combination therapies with difluoromethylornithine. *J Med Chem.* 2014;57(2):348-63. doi: 10.1021/jm401174a. PubMed PMID: 24405276. 10
97. Takaji S, Hibasami H, Imoto I, Hashimoto Y, Nakao K, Ikemura N, Taguchi Y, Nakashima K. Growth inhibition of *Helicobacter pylori* by a polyamine synthesis inhibitor, methylglyoxal bis(cyclopentylamidino)hydrazone. *Lett Appl Microbiol.* 1997;25(3):177-80. PubMed PMID: 9351259.
98. Weinstein MP. Comparative evaluation of penicillin, ampicillin, and imipenem MICs and susceptibility breakpoints for vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(7):2729-31. doi: 10.1128/JCM.39.7.2729-2731.2001. PubMed PMID: 11427608; PMCID: PMC88224. 20
99. LaPlante KL, Leonard SN, Andes DR, Craig WA, Rybak MJ. Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and in vitro pharmacodynamic models. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(6):2156-62. doi: 10.1128/AAC.01046-07. PubMed PMID: 18411321; PMCID: PMC2415789. 30
100. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira A, Bartolomeu AR, Camargo CH, Cunha ML. Susceptibility Profile of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Isolated from Blood Cultures to Vancomycin and Novel Antimicrobial Drugs over a Period of 12 Years. *Microb Drug Resist.* 2016;22(4):283-93. doi: 10.1089/mdr.2015.0064. PubMed PMID: 26623676.
101. Sader HS, Mendes RE, Streit JM, Flamm RK. Antimicrobial Susceptibility Trends among *Staphylococcus aureus* Isolates from U.S. Hospitals: Results from 7 40

【化 2 – 1 3】

- Years of the Ceftaroline (AWARE) Surveillance Program, 2010 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(9). doi: 10.1128/AAC.01043-17. PubMed PMID: 28630196; PMCID: PMC5571371.
102. Liang-Yu C, Kuo SC, Liu CY, Luo BS, Huang LJ, Lee YT, Chen CP, Chen TL, Fung CP. Difference in imipenem, meropenem, sulbactam, and colistin nonsusceptibility trends among three phenotypically undifferentiated *Acinetobacter baumannii* complex in a medical center in Taiwan, 1997-2007. *J Microbiol Immunol Infect.* 2011;44(5):358-63. doi: 10.1016/j.jmii.2011.01.032. PubMed PMID: 21524973. 10
103. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1678-84. doi: 10.1128/JCM.03385-12. PubMed PMID: 23486719; PMCID: PMC3716094.
104. Rivera CG, Narayanan PP, Patel R, Estes LL. Impact of Cefepime Susceptible-Dose-Dependent MIC for Enterobacteriaceae on Reporting and Prescribing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(6):3854-5. doi: 10.1128/AAC.00442-16. PubMed PMID: 27067319; PMCID: PMC4879407. 20
105. Dervan PB, Becker, MM. Molecular recognition of DNA by small molecules. Synthesis of bis(methidium)spermine, a DNA polyintercalating molecule. 1978;100(6):1968-1970
106. Rajecky, M (2015) Interaction of benzo[c]phenanthridine alkaloids with DNA. Retrieved from Masaryk University. 30
107. Le TN, et al., A Versatile Total Synthesis of Benzo[c]phenanthridine and Protoberberine Alkaloids Using Lithiated Toluamide–Benzonitrile Cycloaddition. 2004;69(8):2768-2772.
108. Michael AJ. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. *J Biol Chem.* 2016;291(29):14896-903. doi: 10.1074/jbc.R116.734780. PubMed PMID: 27268252; PMCID: PMC4946907.
109. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and 40

【化 2 – 1 4】

- conformation. *FEBS J.* 2005;272(15):3777-87. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04782.x. PubMed PMID: 16045750.
110. Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J Mol Biol.* 2015;427(21):3389-406. doi: 10.1016/j.jmb.2015.06.020. PubMed PMID: 26156863.
 111. Michael AJ. Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules. *Biochem J.* 2016;473(15):2315-29. doi: 10.1042/BCJ20160185. PubMed PMID: 27470594. 10
 112. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines. *IUBMB Life.* 2006;58(2):75-82. doi: 10.1080/15216540600662525. PubMed PMID: 16608821.
 113. Karatan E, Michael AJ. A wider role for polyamines in biofilm formation. *Biotechnol Lett.* 2013;35(11):1715-7. doi: 10.1007/s10529-013-1286-3. PubMed PMID: 23881324. 20
 114. McGinnis MW, Parker ZM, Walter NE, Rutkovsky AC, Cartaya-Marin C, Karatan E. Spermidine regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation via transport and signaling pathways. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;299(2):166-74. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01744.x. PubMed PMID: 19694812.
 115. Wortham BW, Oliveira MA, Fetherston JD, Perry RD. Polyamines are required for the expression of key Hms proteins important for *Yersinia pestis* biofilm formation. *Environ Microbiol.* 2010;12(7):2034-47. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02219.x. PubMed PMID: 20406298; PMCID: PMC3039482. 30
 116. Goytia M, Dhulipala VL, Shafer WM. Spermine impairs biofilm formation by *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;343(1):64-9. doi: 10.1111/1574-6968.12130. PubMed PMID: 23506248; PMCID: PMC3651792.
 117. Cardile AP, Woodbury RL, Sanchez CJ, Jr., Becerra SC, Garcia RA, Mende K, Wenke JC, Akers KS. Activity of Norspermidine on Bacterial Biofilms of Multidrug-Resistant Clinical Isolates Associated with Persistent Extremity Wound Infections. *Adv Exp Med Biol.* 2017;973:53-70. doi: 10.1007/5584_2016_93. PubMed PMID: 27864804; PMCID: PMC5438303. 40

【化 2 – 1 5】

118. Wang Y, Kim SH, Natarajan R, Heindl JE, Bruger EL, Waters CM, Michael AJ, Fuqua C. Spermidine Inversely Influences Surface Interactions and Planktonic Growth in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 2016;198(19):2682-91. doi: 10.1128/JB.00265-16. PubMed PMID: 27402627; PMCID: PMC5019071.
119. Qu L, She P, Wang Y, Liu F, Zhang D, Chen L, Luo Z, Xu H, Qi Y, Wu Y. Effects of norspermidine on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication. *Microbiologyopen.* 2016;5(3):402-12. doi: 10.1002/mbo3.338. PubMed PMID: 26817804; PMCID: PMC4905993. 10
120. Konai MM, Adhikary U, Samaddar S, Ghosh C, Halder J. Structure-Activity Relationship of Amino Acid Tunable Lipidated Norspermidine Conjugates: Disrupting Biofilms with Potent Activity against Bacterial Persisters. *Bioconj Chem.* 2015;26(12):2442-53. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00494. PubMed PMID: 26452096.
121. Si X, Quan X, Wu Y. A small-molecule norspermidine and norspermidine-hosting polyelectrolyte coatings inhibit biofilm formation by multi-species wastewater culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(24):10861-70. doi: 10.1007/s00253-015-6943-0. PubMed PMID: 26350146. 20
122. Dewangan RP, Joshi S, Kumari S, Gautam H, Yar MS, Pasha S. N-terminally modified linear and branched spermine backbone dipeptidomimetics against planktonic and sessile methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5435-47. doi: 10.1128/AAC.03391-14. PubMed PMID: 24982082; PMCID: PMC4135887.
123. Ding Y, Peng N, Du Y, Ji L, Cao B. Disruption of putrescine biosynthesis in *Shewanella oneidensis* enhances biofilm cohesiveness and performance in Cr(VI) immobilization. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(4):1498-506. doi: 10.1128/AEM.03461-13. PubMed PMID: 24362428; PMCID: PMC3911039. 30
124. Planet PJ, LaRussa SJ, Dana A, Smith H, Xu A, Ryan C, Uhlemann AC, Boundy S, Goldberg J, Narechania A, Kulkarni R, Ratner AJ, Geoghegan JA, Kolokotronis SO, Prince A. Emergence of the epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 coincides with horizontal transfer of the arginine catabolic mobile element and speG-mediated adaptations for survival on 40

【化 2 - 1 6】

- skin. MBio. 2013;4(6):e00889-13. doi: 10.1128/mBio.00889-13. PubMed PMID: 24345744; PMCID: PMC3870260.
125. Hobley L, Li B, Wood JL, Kim SH, Naidoo J, Ferreira AS, Khomutov M, Khomutov A, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Spermidine promotes *Bacillus subtilis* biofilm formation by activating expression of the matrix regulator *slrR*. J Biol Chem. 2017;292(29):12041-53. doi: 10.1074/jbc.M117.789644. PubMed PMID: 28546427; PMCID: PMC5519356. 10
126. Ou M, Ling J. Norspermidine changes the basic structure of *S. mutans* biofilm. Mol Med Rep. 2017;15(1):210-20. doi: 10.3892/mmr.2016.5979. PubMed PMID: 27922663; PMCID: PMC5355703.
127. Nesse LL, Berg K, Vestby LK. Effects of norspermidine and spermidine on biofilm formation by potentially pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* wild-type strains. Appl Environ Microbiol. 2015;81(6):2226-32. doi: 10.1128/AEM.03518-14. PubMed PMID: 25595767; PMCID: PMC4345383.
128. Ramon-Perez ML, Diaz-Cedillo F, Contreras-Rodriguez A, Betanzos-Cabrera G, Peralta H, Rodriguez-Martinez S, Cancino-Diaz ME, Jan-Roblero J, Cancino Diaz JC. Different sensitivity levels to norspermidine on biofilm formation in clinical and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains. Microb Pathog. 2015;79:8-16. doi: 10.1016/j.micpath.2014.12.004. PubMed PMID: 25549879. 20
129. Hobley L, Kim SH, Maezato Y, Wyllie S, Fairlamb AH, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Norspermidine is not a self-produced trigger for biofilm disassembly. Cell. 2014;156(4):844-54. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.012. PubMed PMID: 24529384; PMCID: PMC3969229. 30
130. Sakamoto A, Terui Y, Yamamoto T, Kasahara T, Nakamura M, Tomitori H, Yamamoto K, Ishihama A, Michael AJ, Igarashi K, Kashiwagi K. Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and ribosome recycling factor. Int J Biochem Cell Biol. 2012;44(11):1877-86. doi: 10.1016/j.biocel.2012.07.010. PubMed PMID: 22814172.
131. Burrell M, Hanfrey CC, Murray EJ, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Evolution and multiplicity of arginine decarboxylases in polyamine biosynthesis and essential 40

【化 2 - 1 7】

- role in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *J Biol Chem*. 2010;285(50):39224-38. doi: 10.1074/jbc.M110.163154. PubMed PMID: 20876533; PMCID: PMC2998088.
132. Lee J, Sperandio V, Frantz DE, Longgood J, Camilli A, Phillips MA, Michael AJ. An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*. 2009;284(15):9899-907. doi: 10.1074/jbc.M900110200. PubMed PMID: 19196710; PMCID: PMC2665113. 10
133. Patel CN, Wortham BW, Lines JL, Fetherston JD, Perry RD, Oliveira MA. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J Bacteriol*. 2006;188(7):2355-63. doi: 10.1128/JB.188.7.2355-2363.2006. PubMed PMID: 16547021; PMCID: PMC1428407.
134. Chen X, Wu H, Cao Y, Yao X, Zhao L, Wang T, Yang Y, Lv D, Chai Y, Cao Y, Zhu Z. Ion-pairing chromatography on a porous graphitic carbon column coupled with time-of-flight mass spectrometry for targeted and untargeted profiling of amino acid biomarkers involved in *Candida albicans* biofilm formation. *Mol Biosyst*. 2014;10(1):74-85. doi: 10.1039/c3mb70240e. PubMed PMID: 24150280. 20
135. Liao Z, ZhangGuan X, Zhu Z, Yao X, Yang Y, Jiang Y, Cao Y. Enhancement of the antibiofilm activity of amphotericin B by polyamine biosynthesis inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46(1):45-52. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.021. PubMed PMID: 25937097.
136. Visick KL, Schembri MA, Yildiz F, Ghigo JM. Biofilms 2015: Multidisciplinary Approaches Shed Light into Microbial Life on Surfaces. *J Bacteriol*. 2016;198(19):2553-63. doi: 10.1128/JB.00156-16. PubMed PMID: 26977109; PMCID: PMC5019050. 30
137. Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*. 2017;125(4):272-5. doi: 10.1111/apm.12686. PubMed PMID: 28407426.
138. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. *J Biol Chem*. 2016;291(24):12538-46. doi: 10.1074/jbc.R115.707547. PubMed PMID: 27129225; PMCID: PMC4933457. 40

【化 2 – 1 8】

139. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia*. 2010;169(5):323-31. doi: 10.1007/s11046-009-9264-y. PubMed PMID: 20012895; PMCID: PMC3973130.
140. Brandstetter KA, Jurgisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S. Antibodies directed against integration host factor mediate biofilm clearance from Nasopore. *Laryngoscope*. 2013;123(11):2626-32. doi: 10.1002/lary.24183. PubMed PMID: 23670606; PMCID: PMC4060527. 10
141. Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurgisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. *Mol Microbiol*. 2014;93(6):1246-58. doi: 10.1111/mmi.12735. PubMed PMID: 25069521; PMCID: PMC4160410.
142. Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol Microbiol*. 2015;96(6):1119-35. doi: 10.1111/mmi.12994. PubMed PMID: 25757804; PMCID: PMC4464964. 20
143. Freire MO, Devaraj A, Young A, Navarro JB, Downey JS, Chen C, Bakaletz LO, Zadeh HH, Goodman SD. A bacteriuml-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(1):74-88. doi: 10.1111/omi.12155. PubMed PMID: 26931773; PMCID: PMC5010536.
144. Gustave JE, Jurgisek JA, McCoy KS, Goodman SD, Bakaletz LO. Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2013;12(4):384-9. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.011. PubMed PMID: 23168017; PMCID: PMC3582735. 30
145. Novotny LA, Clements JD, Goodman SD, Bakaletz LO. Transcutaneous Immunization with a Band-Aid Prevents Experimental Otitis Media in a Polymicrobial Model. *Clin Vaccine Immunol*. 2017;24(6). doi: 10.1128/CVI.00563-16. PubMed PMID: 28381402; PMCID: PMC5461379.
146. Novotny LA, Jurgisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce 40

【化 2 - 1 9】

- bacterial clearance in vivo. *EBioMedicine*. 2016;10:33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022. PubMed PMID: 27342872; PMCID: PMC5006588.
147. Novotny LA, Jurcisek JA, Ward MO, Jr., Jordan ZB, Goodman SD, Bakaletz LO. Antibodies against the majority subunit of type IV Pili disperse nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms in a LuxS-dependent manner and confer therapeutic resolution of experimental otitis media. *Mol Microbiol*. 2015;96(2):276-92. doi: 10.1111/mmi.12934. PubMed PMID: 25597921; PMCID: PMC4423401. 10
148. Rocco CJ, Davey ME, Bakaletz LO, Goodman SD. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(2):118-30. doi: 10.1111/omi.12157. PubMed PMID: 26988714; PMCID: PMC5023461.
149. Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacterium nucleic acid binding protein. *PLoS One*. 2013;8(6):e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629. PubMed PMID: 23799151; PMCID: PMC3682984. 20
150. Baelo A, Levato R, Julian E, Crespo A, Astola J, Gavalda J, Engel E, Mateos-Timoneda MA, Torrents E. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *J Control Release*. 2015;209:150-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.028. PubMed PMID: 25913364.
151. Brown HL, Hanman K, Reuter M, Betts RP, van Vliet AH. *Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. *Front Microbiol*. 2015;6:699. doi: 10.3389/fmicb.2015.00699. PubMed PMID: 26217328; PMCID: PMC4498105. 30
152. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Hoiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr*. 2006;95(9):1070-4. doi: 10.1080/08035250600752466. PubMed PMID: 16938752.
153. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. 40

【化 2 – 2 0】

- Mycoses. 2012;55(1):80-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x. PubMed PMID: 21668524; PMCID: PMC3175262.
154. Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol.* 2011;4(6):625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27. PubMed PMID: 21716265. 10
155. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. *Amino Acids.* 2014;46(3):595-603. doi: 10.1007/s00726-013-1550-9. PubMed PMID: 23836422.
156. Baeza I, Ibanez M, Wong C, Chavez P, Gariglio P, Oro J. Possible prebiotic significance of polyamines in the condensation, protection, encapsulation, and biological properties of DNA. *Orig Life Evol Biosph.* 1991;21(4):225-42. PubMed PMID: 1668678.
157. Nayvelt I, Hyvonen MT, Alhonen L, Pandya I, Thomas T, Khomutov AR, Vepsäläinen J, Patel R, Keinanen TA, Thomas TJ. DNA condensation by chiral alpha-methylated polyamine analogues and protection of cellular DNA from oxidative damage. *Biomacromolecules.* 2010;11(1):97-105. doi: 10.1021/bm900958c. PubMed PMID: 19919070. 20
158. Cavaliere R., Ball J. L., Turnbull L., and Whitchurch C. (2014). The biofilm matrix destabilizers, EDTA, and DNaseI, enhance biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. *Microbiology Open.* 3(4):557-567.
159. Chmielewski R.A.N. and Frank J.F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* Vol. 2. 22-32. 30
160. Devaraj A., Justice S.S., Bakaletz L.O. , and Goodman S.D. (2015). DNABII Proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Molecular Microbiology.* 96 (6): 1119-1135.
161. Dongari-Bagtzoglou A. (2008). Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther.*6(2):201-8. Donlan R.M. 40

【化 2 - 2 1】

- (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*. 7(2):277-281.
162. Flemming H. and Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8:623-633
163. Goodman S.D., Obergefell K.P., Jurcisek J.A., Novotny L.A., Downey J.S., Ayala E.A., Tjokro N., Li B., Justice S.S., and Bakaletz L.O. (2011). Mucosal Immunology. 4 (6): 625-637. 10
164. Gueroult M., Boittin O., Mauffret O., Etchebest C., and Hartmann B. (2012). Mg 2+ in the Major Groove Modulates B-DNA Structure and Dynamics. *PLOS ONE*. (7)-7-e41704.
165. Hackl E. V., Kornilova S.V., and Blagoi Y. P. (2005) DNA structural transitions induced by divalent metals ions in aqueous solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* 35:175-191.
166. Hobley L., Li B., Wood J.L., Kim S.H., Naidoo J., Ferreira A.S., Khomutov M., Khomutov A., Stanley-Wall N.R., and Michael A.J. (2017). Spermidine promotes *Bacillus subtilis* biofilm formation by activating expression of the matrix regulator *slrR*. *Journal of Biological Chemistry*. 292(29): 12041-12053. 20
167. Nash H. A., Robertson C. A., Flamm E., Weisberg R. A., and Miller H. I. (1987). Overproduction of *Escherichia coli* Integration Host Factor, a Protein with Nonidentical Subunits. *Journal of Bacteriology*. 4124-4127.
168. Novotny L.A., Jucisek J.A., Goodman S. D., and Bakaletz L.O. (2016). Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo. *EBioMedicine*. (10) :33-44. 30
169. Patel C.N., Wortham B.W., Lines J.L., Fetherston J.D., Perry R.D., and Oliveira M.A. (2006). Polyamines Are Essential for the Formation of Plague Biofilm. *Journal of Bacteriology*. 2355-2363.
170. Tan Z-J. and Chen S-J. (2006). Nucleic Acid Helix Stability: Effects of Salt Concentration, Cation Valence and Size, and Chain Length. *Biophysical Journal*. (90): 1175-1190. 40

【化 2 – 2 2】

171. Vorgias C. E., and Wilson K. S. (1991). A rapid purification procedure of recombinant integration host factor from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2(5-6):317-20.
172. Wood T.L. , Guha R., Tang. L., Geitner M., Kumar M., and Wood T.K. (2016). Living biofouling-resistant membranes as a model for the beneficial use of engineered biofilms. *PNAS*. E2802-E2811.
173. Visick KL, Schembri MA, Yildiz F, Ghigo JM. Biofilms 2015: Multidisciplinary Approaches Shed Light into Microbial Life on Surfaces. *J Bacteriol*. 2016;198(19):2553-63. doi: 10.1128/JB.00156-16. PubMed PMID: 26977109; PMCID: PMC5019050. 10
174. Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*. 2017;125(4):272-5. doi: 10.1111/apm.12686. PubMed PMID: 28407426.
175. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. *J Biol Chem*. 2016;291(24):12538-46. doi: 10.1074/jbc.R115.707547. PubMed PMID: 27129225; PMCID: PMC4933457. 20
176. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2015;41(3):341-52. doi: 10.3109/1040841X.2013.841639. PubMed PMID: 24303798.
177. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60(1):544-53. doi: 10.1128/AAC.01650-15. PubMed PMID: 26552982; PMCID: PMC4704225. 30
178. Brandstetter KA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S. Antibodies directed against integration host factor mediate biofilm clearance from Nasopore. *Laryngoscope*. 2013;123(11):2626-32. doi: 10.1002/lary.24183. PubMed PMID: 23670606; PMCID: PMC4060527.
179. Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. *Mol* 40

【化 2 - 2 3】

- Microbiol. 2014;93(6):1246-58. doi: 10.1111/mmi.12735. PubMed PMID: 25069521; PMCID: PMC4160410.
180. Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol Microbiol.* 2015;96(6):1119-35. doi: 10.1111/mmi.12994. PubMed PMID: 25757804; PMCID: PMC4464964.
181. Freire MO, Devaraj A, Young A, Navarro JB, Downey JS, Chen C, Bakaletz LO, Zadeh HH, Goodman SD. A bacteriuml-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(1):74-88. doi: 10.1111/omi.12155. PubMed PMID: 26931773; PMCID: PMC5010536. 10
182. Gustave JE, Jurcisek JA, McCoy KS, Goodman SD, Bakaletz LO. Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2013;12(4):384-9. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.011. PubMed PMID: 23168017; PMCID: PMC3582735.
183. Novotny LA, Clements JD, Goodman SD, Bakaletz LO. Transcutaneous Immunization with a Band-Aid Prevents Experimental Otitis Media in a Polymicrobial Model. *Clin Vaccine Immunol.* 2017;24(6). doi: 10.1128/CVI.00563-16. PubMed PMID: 28381402; PMCID: PMC5461379. 20
184. Novotny LA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo. *EBioMedicine.* 2016;10:33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022. PubMed PMID: 27342872; PMCID: PMC5006588.
185. Rocco CJ, Davey ME, Bakaletz LO, Goodman SD. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(2):118-30. doi: 10.1111/omi.12157. PubMed PMID: 26988714; PMCID: PMC5023461. 30
186. Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacteriuml nucleic acid binding protein. *PLoS One.* 2013;8(6):e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629. PubMed PMID: 23799151; PMCID: PMC3682984. 40

【化 2 - 2 4】

187. Baelo A, Levato R, Julian E, Crespo A, Astola J, Gavalda J, Engel E, Mateos-Timoneda MA, Torrents E. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *J Control Release*. 2015;209:150-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.028. PubMed PMID: 25913364.
188. Brown HL, Hanman K, Reuter M, Betts RP, van Vliet AH. *Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. *Front Microbiol*. 2015;6:699. doi: 10.3389/fmicb.2015.00699. PubMed PMID: 26217328; PMCID: PMC4498105. 10
189. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Hoiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr*. 2006;95(9):1070-4. doi: 10.1080/08035250600752466. PubMed PMID: 16938752.
190. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses*. 2012;55(1):80-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x. PubMed PMID: 21668524; PMCID: PMC3175262. 20
191. Goodman SD, Obergefell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol*. 2011;4(6):625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27. PubMed PMID: 21716265.
192. Cho C, Chande A, Gakhar L, Bakaletz LO, Jurcisek JA, Ketterer M, Shao J, Gotoh K, Foster E, Hunt J, O'Brien E, Apicella MA. Role of the nuclease of nontypeable *Haemophilus influenzae* in dispersal of organisms from biofilms. *Infect Immun*. 2015;83(3):950-7. doi: 10.1128/IAI.02601-14. PubMed PMID: 25547799; PMCID: PMC4333478. 30
193. Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, Bayles KW, Horswill AR. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2011;6(11):e26714. doi: 10.1371/journal.pone.0026714. PubMed PMID: 22096493; PMCID: PMC3214024. 40

【化 2 – 2 5】

194. Liu J, Sun L, Liu W, Guo L, Liu Z, Wei X, Ling J. A Nuclease from *Streptococcus mutans* Facilitates Biofilm Dispersal and Escape from Killing by Neutrophil Extracellular Traps. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:97. doi: 10.3389/fcimb.2017.00097. PubMed PMID: 28401067; PMCID: PMC5368189.
195. Steichen CT, Cho C, Shao JQ, Apicella MA. The *Neisseria gonorrhoeae* biofilm matrix contains DNA, and an endogenous nuclease controls its incorporation. *Infect Immun.* 2011;79(4):1504-11. doi: 10.1128/IAI.01162-10. PubMed PMID: 21300774; PMCID: PMC3067525. 10
196. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Ehrlich GD, Post JC. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol.* 2008;8:173. doi: 10.1186/1471-2180-8-173. PubMed PMID: 18842140; PMCID: PMC2600794. 20
197. Izano EA, Shah SM, Kaplan JB. Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Microb Pathog.* 2009;46(4):207-13. doi: 10.1016/j.micpath.2009.01.004. PubMed PMID: 19490830; PMCID: PMC2691864. 30
198. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, Izano EA. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo).* 2012;65(2):73-7. doi: 10.1038/ja.2011.113. PubMed PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126. 40
199. Tetz VV, Tetz GV. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. *DNA Cell Biol.* 2010;29(8):399-405. doi: 10.1089/dna.2009.1011. PubMed PMID: 20491577.
200. Wang G, Vasquez KM. Z-DNA, an active element in the genome. *Front Biosci.* 2007;12:4424-38. PubMed PMID: 17485386.
201. Barraud P, Allain FH. ADAR proteins: double-stranded RNA and Z-DNA binding domains. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;353:35-60. doi: 10.1007/82_2011_145. PubMed PMID: 21728134; PMCID: PMC3226063. 50

【化 2 – 2 6】

202. Choi J, Majima T. Conformational changes of non-B DNA. *Chem Soc Rev*. 2011;40(12):5893-909. doi: 10.1039/c1cs15153c. PubMed PMID: 21901191.
203. Yang L, Wang S, Tian T, Zhou X. Advancements in Z-DNA: development of inducers and stabilizers for B to Z transition. *Curr Med Chem*. 2012;19(4):557-68. PubMed PMID: 22204344.
204. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines. *IUBMB Life*. 2006;58(2):75-82. doi: 10.1080/15216540600662525. PubMed PMID: 16608821. 10
205. Balasundaram D, Tyagi AK. Polyamine--DNA nexus: structural ramifications and biological implications. *Mol Cell Biochem*. 1991;100(2):129-40. PubMed PMID: 2008175.
206. Thomas TJ, Gunnia UB, Thomas T. Polyamine-induced B-DNA to Z-DNA conformational transition of a plasmid DNA with (dG-dC)_n insert. *J Biol Chem*. 1991;266(10):6137-41. PubMed PMID: 1848849. 20
207. Kim SK, Eriksson S, Norden B. Z-->B transition in poly[d(G-m5C)2] induced by interaction with 4',6-diamidino-2-phenylindole. *Biopolymers*. 1993;33(11):1677-86. doi: 10.1002/bip.360331105. PubMed PMID: 8241427.
208. Mirau PA, Kearns DR. The effect of intercalating drugs on the kinetics of the B to Z transition of poly(dG-dC). *Nucleic Acids Res*. 1983;11(6):1931-41. PubMed PMID: 6835844; PMCID: PMC325847.
209. Waga S, Mizuno S, Yoshida M. Nonhistone protein HMG1 removes the transcriptional block caused by left-handed Z-form segment in a supercoiled DNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;153(1):334-9. PubMed PMID: 3377790. 30
210. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. *Amino Acids*. 2014;46(3):595-603. doi: 10.1007/s00726-013-1550-9. PubMed PMID: 23836422.
211. Baeza I, Ibanez M, Wong C, Chavez P, Gariglio P, Oro J. Possible prebiotic significance of polyamines in the condensation, protection, encapsulation, and biological properties of DNA. *Orig Life Evol Biosph*. 1991;21(4):225-42. PubMed PMID: 1668678. 40

【化 2 – 2 7】

212. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and conformation. *FEBS J.* 2005;272(15):3777-87. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04782.x. PubMed PMID: 16045750.
213. Nayvelt I, Hyvonen MT, Alhonen L, Pandya I, Thomas T, Khomutov AR, Vepsäläinen J, Patel R, Keinänen TA, Thomas TJ. DNA condensation by chiral alpha-methylated polyamine analogues and protection of cellular DNA from oxidative damage. *Biomacromolecules.* 2010;11(1):97-105. doi: 10.1021/bm900958c. PubMed PMID: 19919070. 10
214. Duell BL, Su YC, Riesbeck K. Host-pathogen interactions of nontypeable *Haemophilus influenzae*: from commensal to pathogen. *FEBS Lett.* 2016;590(21):3840-53. doi: 10.1002/1873-3468.12351. PubMed PMID: 27508518. 20
215. Blango MG, Mulvey MA. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):1855-63. doi: 10.1128/AAC.00014-10. PubMed PMID: 20231390; PMCID: PMC2863638.
216. Jang YJ, Lee C, Kim SK. Formation of Poly[d(A-T)₂] Specific Z-DNA by a Cationic Porphyrin. *Sci Rep.* 2015;5:9943. doi: 10.1038/srep09943. PubMed PMID: 25943171; PMCID: PMC4421867. 30

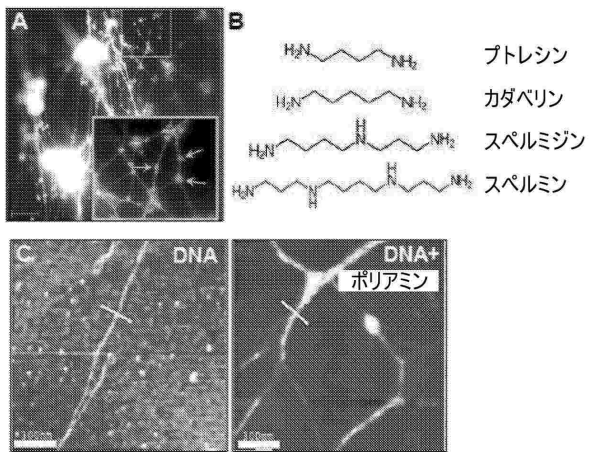
30

40

50

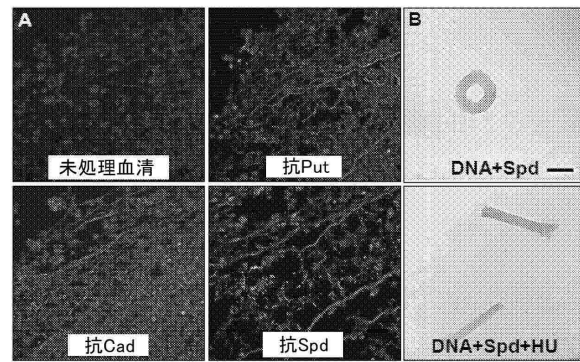
【図面】

【図 1】



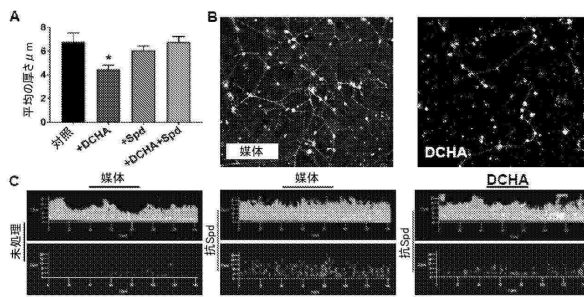
FIGS. 1A – 1C

【図 2】



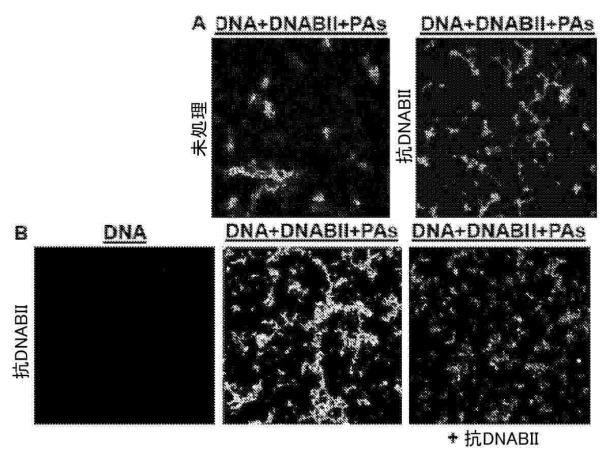
FIGS. 2A – 2B

【図 3】



FIGS. 3A – 3C

【図 4】



FIGS. 4A – 4B

10

20

30

40

50

【図 5】

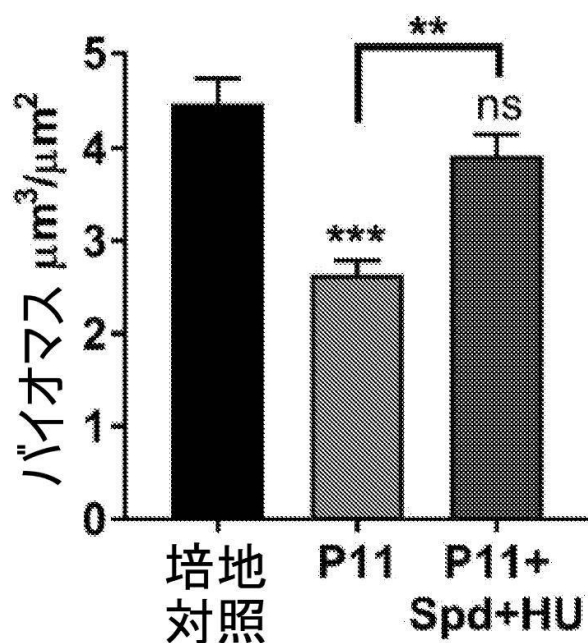


FIG. 5

【図 6】

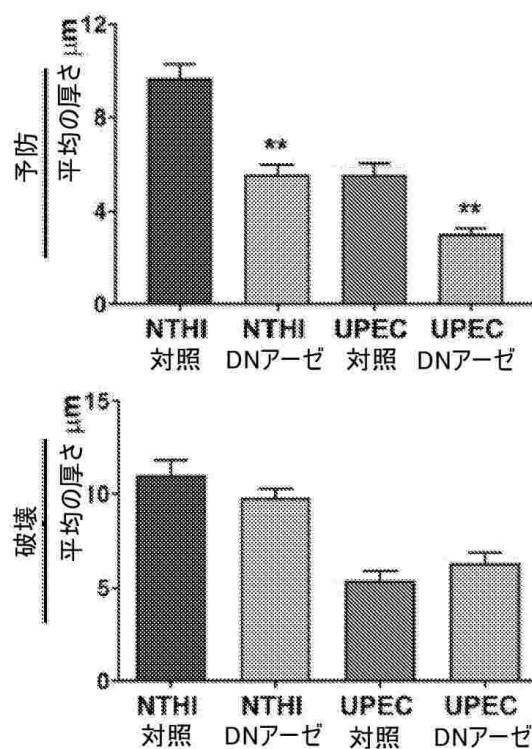
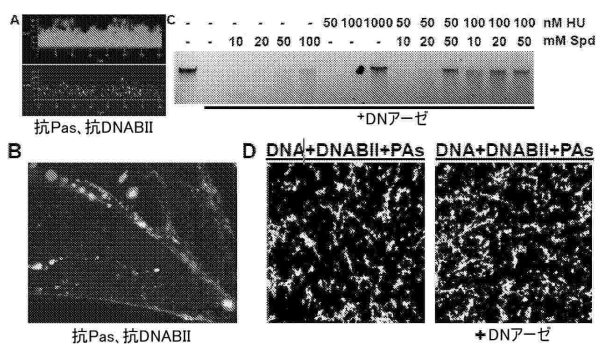


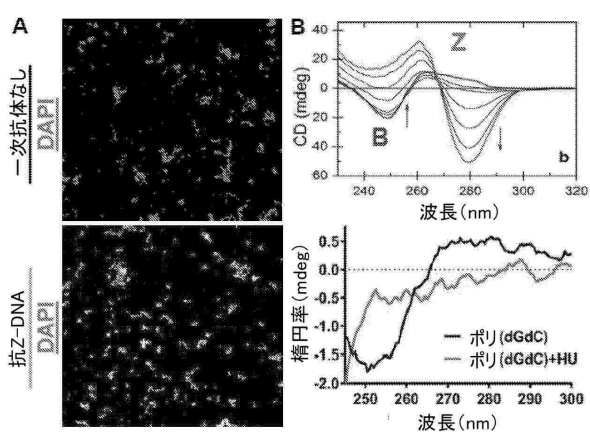
FIG. 6

【図 7】



FIGS. 7A – 7D

【圖 8】



FIGS. 8A – 8B

【図 9】

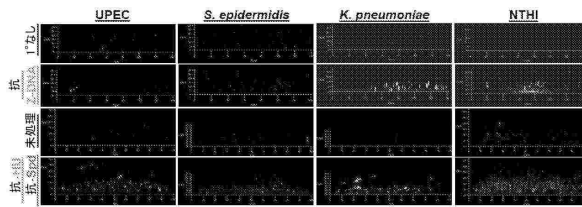


FIG. 9

【図 10】

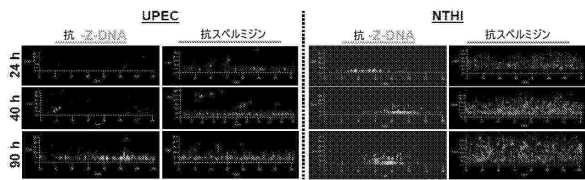


FIG. 10

【図 11】

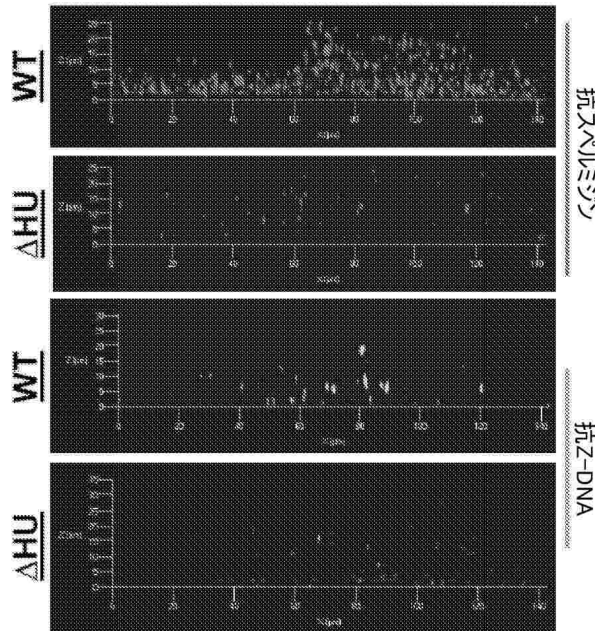


FIG. 11

【図 12】

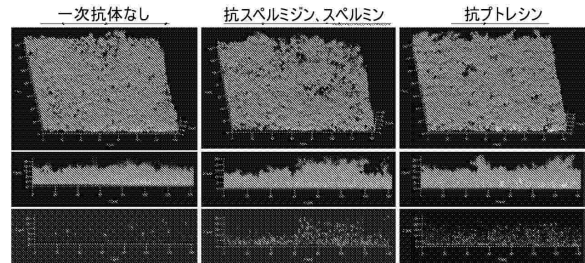


FIG. 12

【図 13】

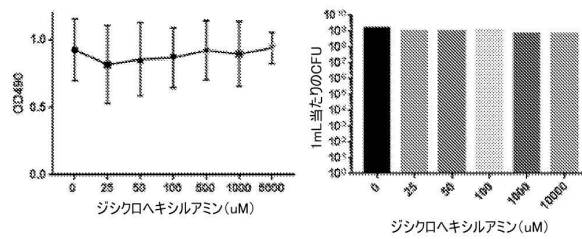


FIG. 13

【図 14】

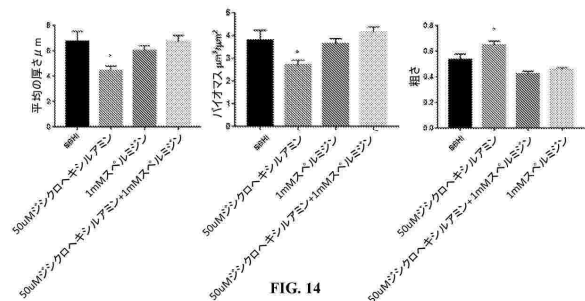


FIG. 14

10

20

30

40

50

【図 15】

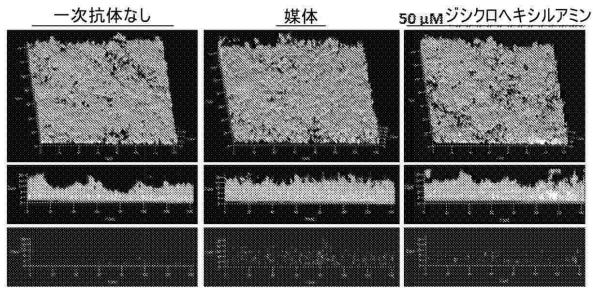


FIG. 15

【図 16】

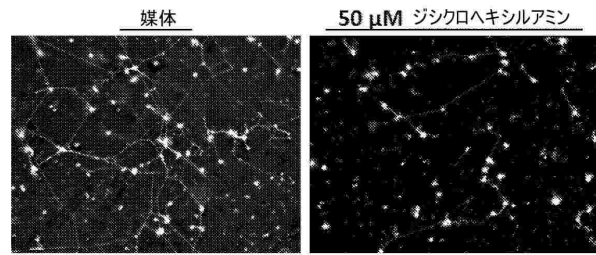
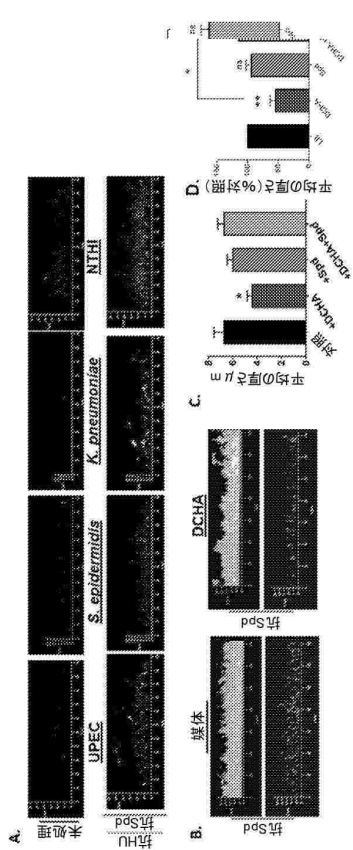


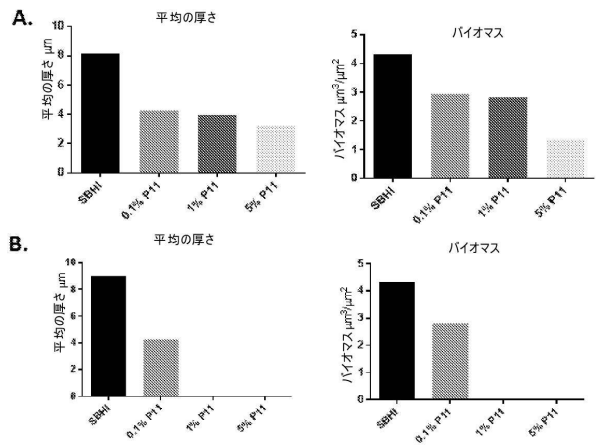
FIG. 16

【図 17】



FIGS. 17A - 17D

【図 18】



FIGS. 18A - 18B

10

20

30

40

50

【図 19】

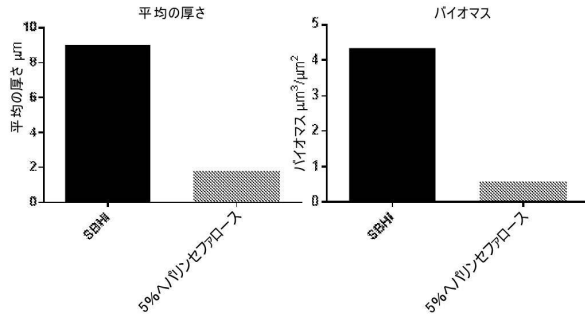


FIG. 19

【図 20】

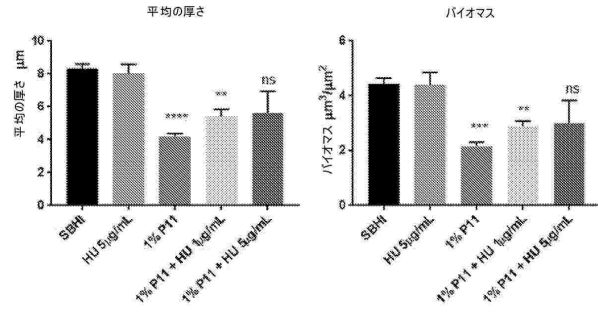


FIG. 20

【図 21】

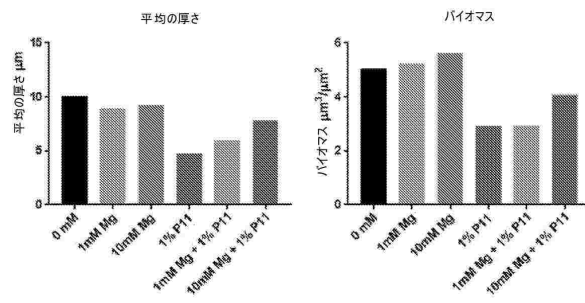


FIG. 21

【図 22】

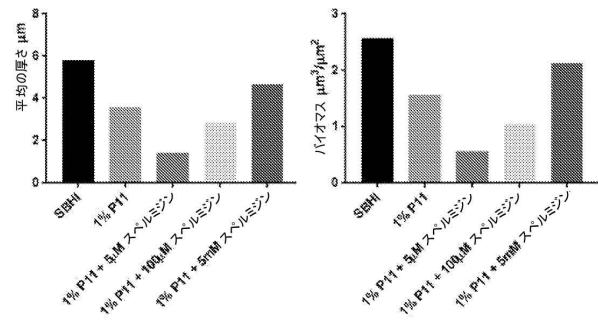


FIG. 22

【図 23】

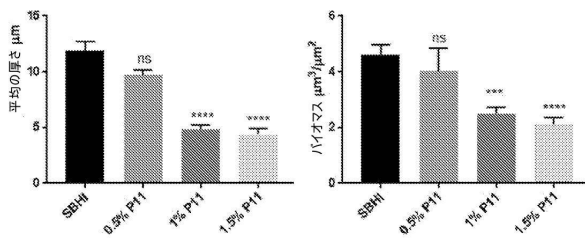


FIG. 23

【図 24】

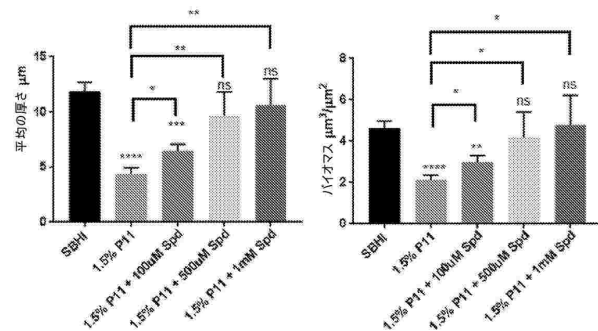


FIG. 24

10

20

30

40

50

【図 25】

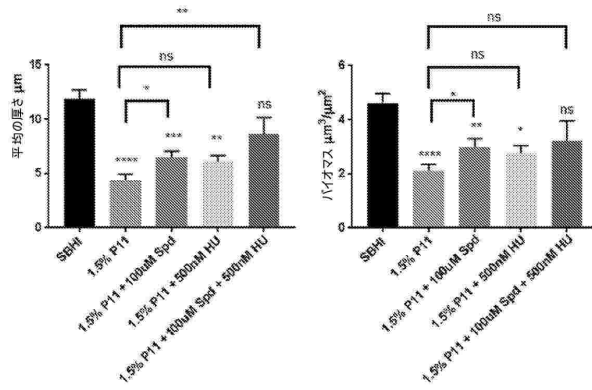
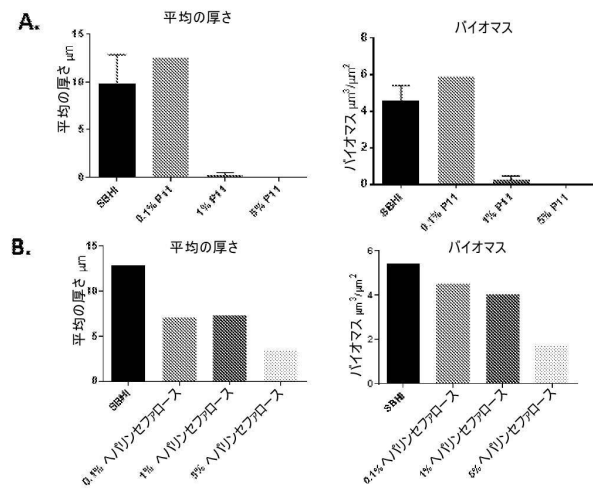


FIG. 25

【図 26】



FIGS. 26A – 26B

【図 27】

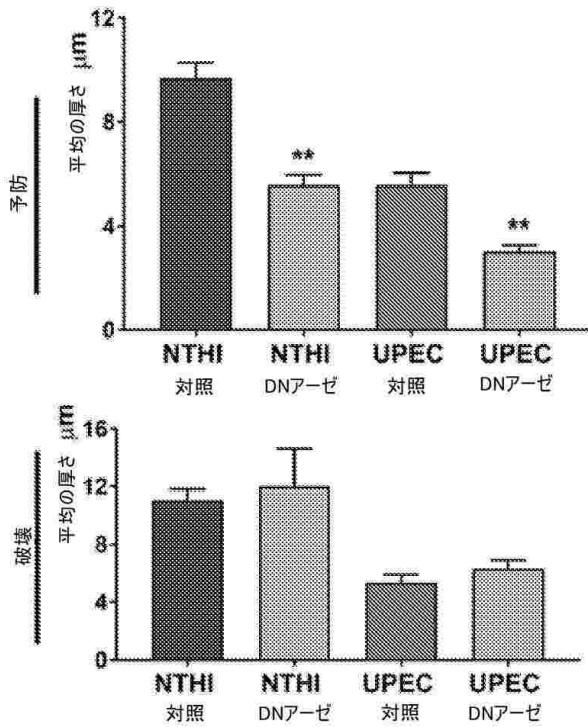


FIG. 27

【図 28】

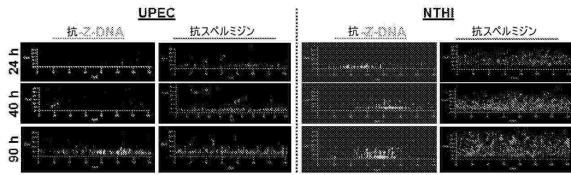


FIG. 28

10

20

30

40

50

【図 2 9】

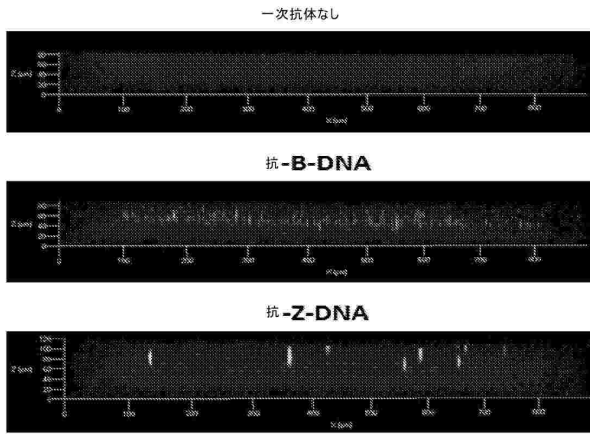


FIG. 29

【図 3 0】

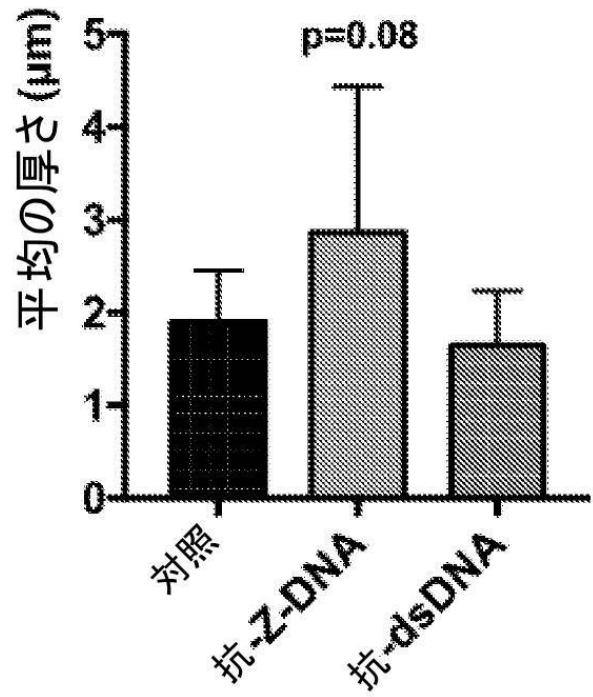


FIG. 30

【図 3 1】

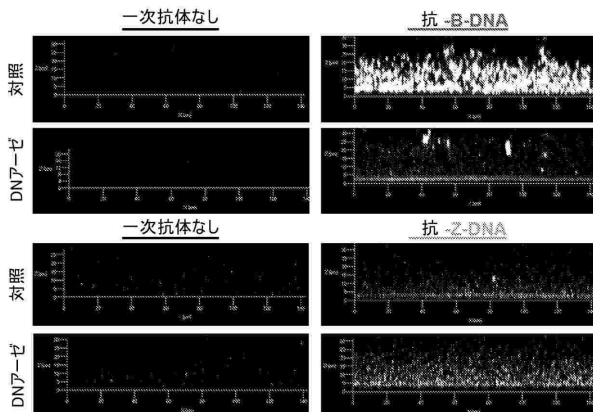


FIG. 31

【図 3 2】

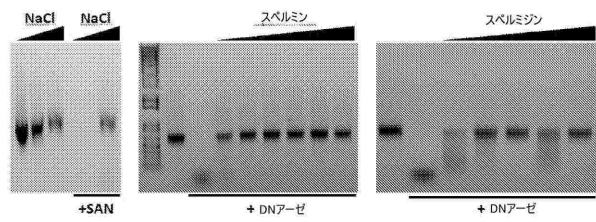


FIG. 32

10

20

30

40

50

【図 3 3】

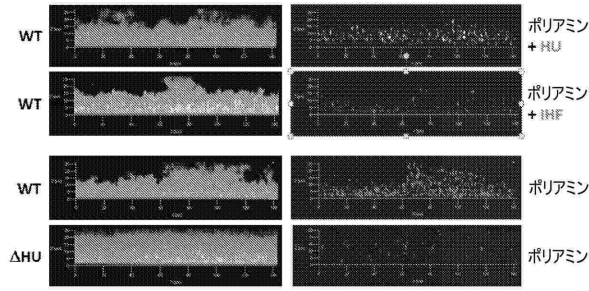
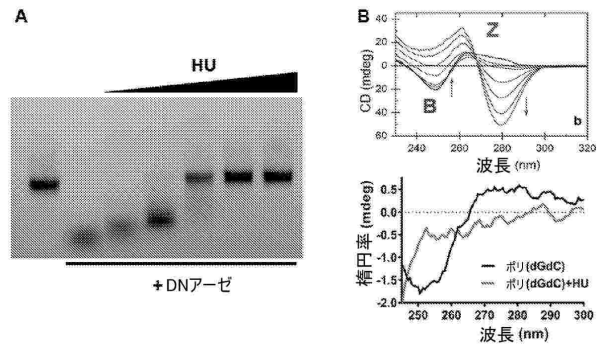


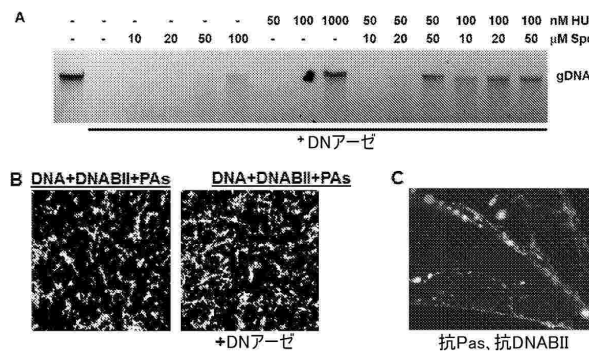
FIG. 33

【図 3 4】



FIGS. 34A - 34 B

【図 3 5】



【図 3 6】

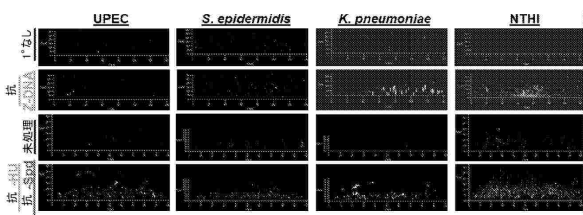


FIG. 36

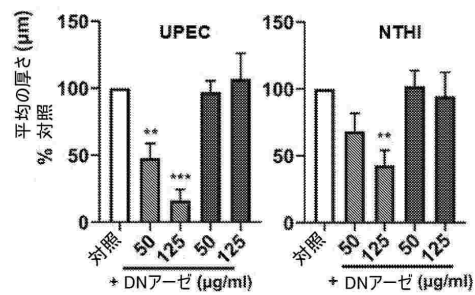


FIG. 35A-35D

10

20

30

40

50

【図 37】

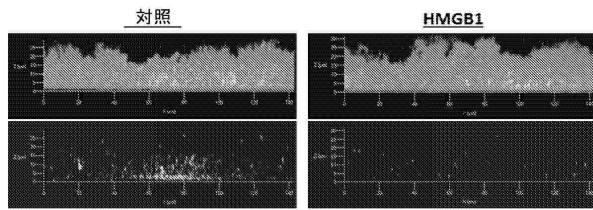
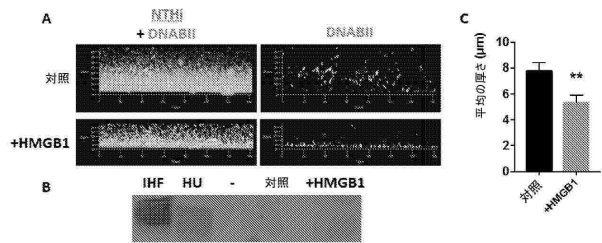


FIG. 37

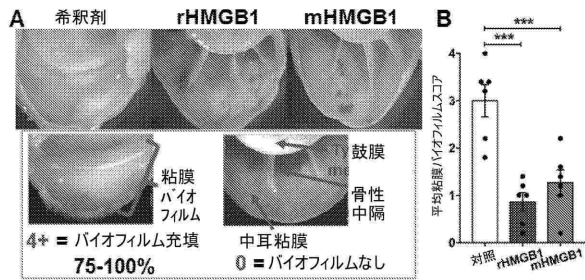
【図 38】



FIGS. 38A – 38C

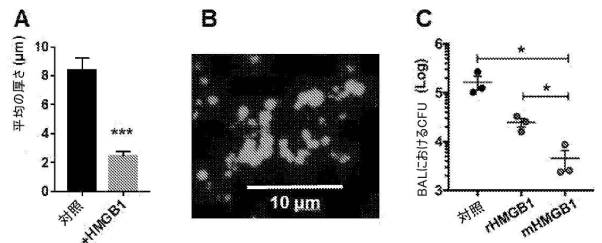
10

【図 39】



FIGS. 39A – 39B

【図 40】



FIGS. 40A – 40C

20

30

40

50

【図 4 1】

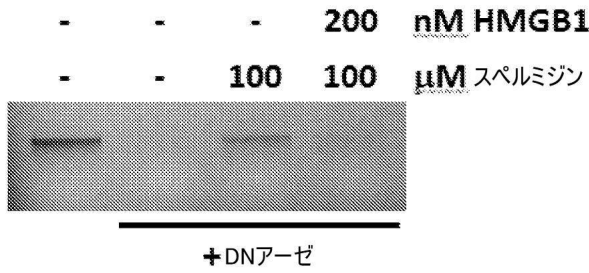
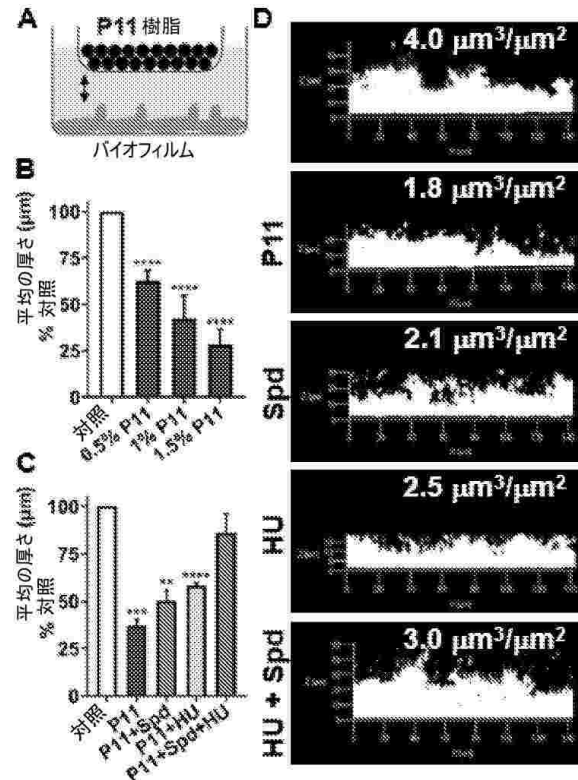


FIG. 41

【図 4 2】



FIGS. 42A - 42D

【図 4 3】

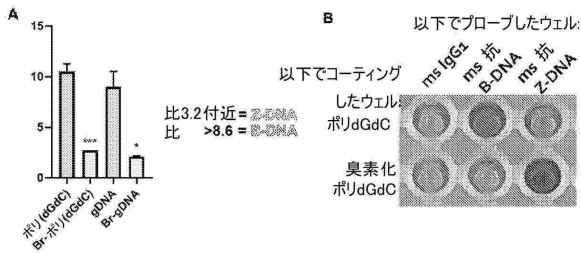


FIG. 43A - 43B

【図 4 4】

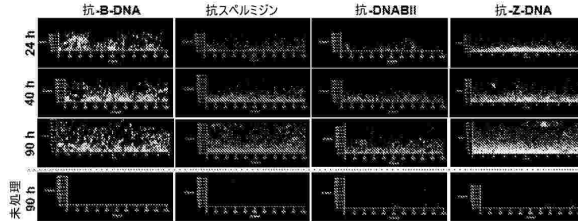


FIG. 44

【図 4 5】

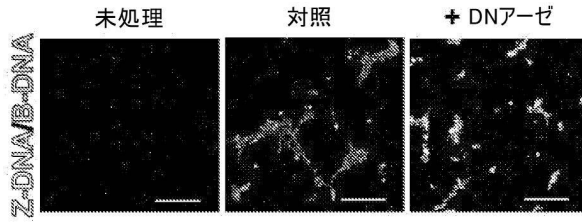


FIG. 45

【図 4 6】

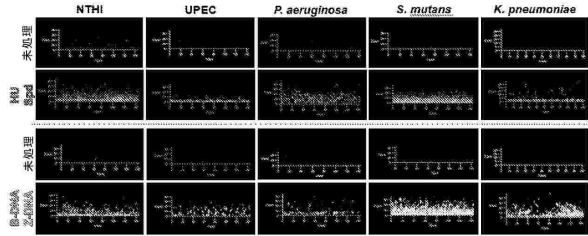
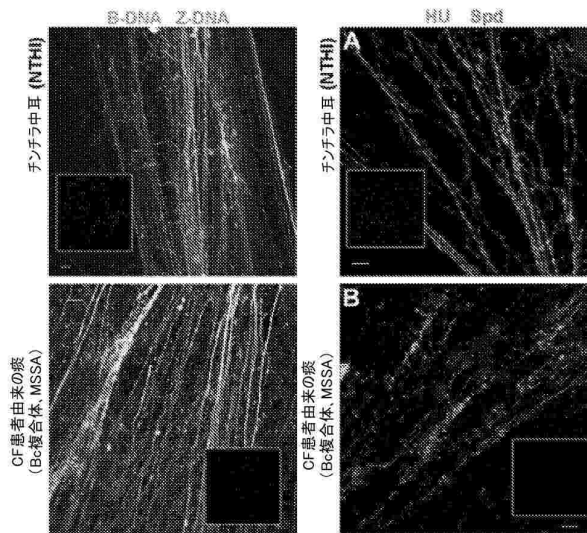


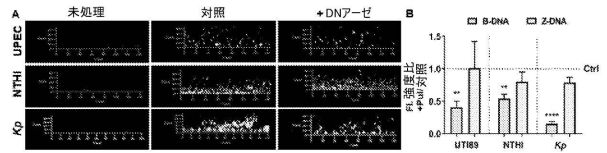
FIG. 46

【図 4 7】



FIGS. 47A – 47B

【図 4 8】



FIGS. 48A – 48B

10

20

30

40

50

【図 49】

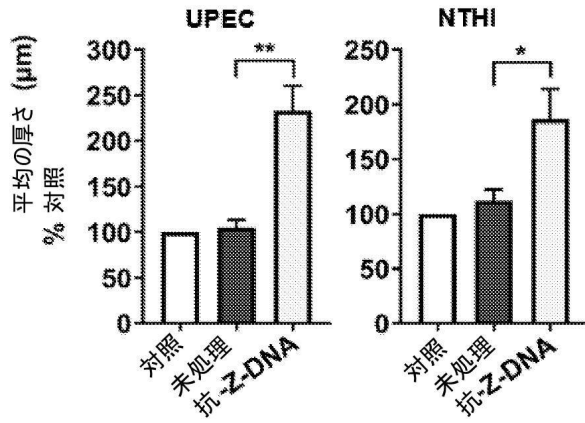
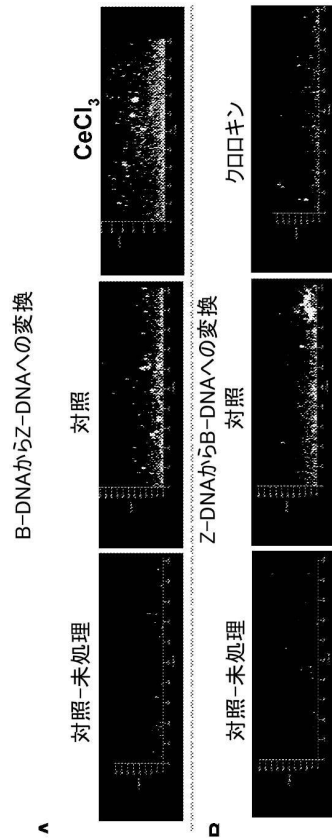


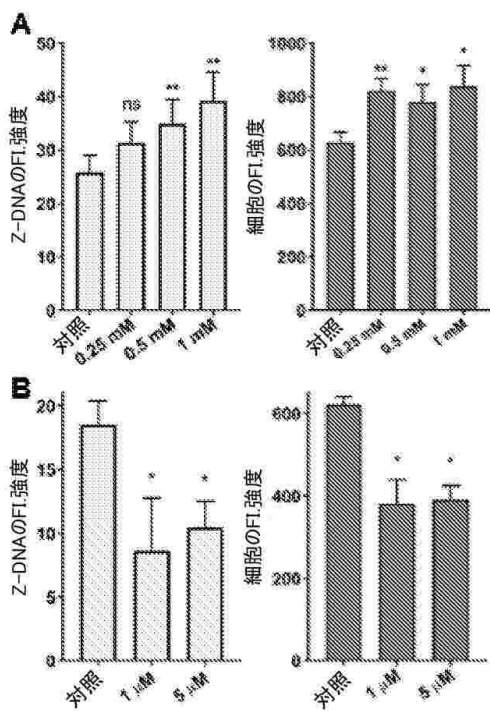
FIG. 49

【図 50】



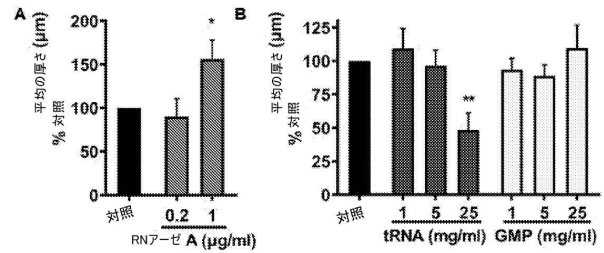
FIGS. 50A - 50B

【図 51】



FIGS. 51A - 51B

【図 52】



FIGS. 52A - 52B

10

20

30

40

50

【図 5 3】

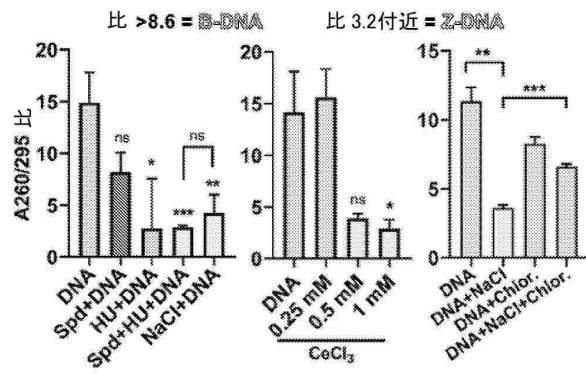


FIG. 53

【配列表】

0007665337000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	31/132 (2006.01)	A 6 1 K	31/132		
A 6 1 K	31/282 (2006.01)	A 6 1 K	31/282		
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	31/4706 (2006.01)	A 6 1 K	31/4706		Z N A
		A 6 1 P	43/00	1 2 1	

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 グッドマン, スティーブン デイビッド

アメリカ合衆国 オハイオ 43205, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 700, リサーチ インスティテュート アット ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル 気付

(72)発明者 バカレッツ, ローレン オプレムカク

アメリカ合衆国 オハイオ 43205, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 700, リサーチ インスティテュート アット ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル 気付

審査官 三上 晶子

(56)参考文献

国際公開第2017/023863 (WO, A1)

特表2016-526038 (JP, A)

特表2017-514887 (JP, A)

Enhancement of the antibiofilm activity of amphotericin B by polyamine biosynthesis inhibitors, International Journal of Antimicrobial Agents, 2015年, 46(1), 45-52

YAKUGAKU ZASSHI, "Regulation of Polyamine and Cancer", Keijiro SAMEJIMA, 2006年08月01日, Vol. 126, No. 8, p.529-542, DOI: 10.1248/yakushi.126.529

F. FLAMIGNI et al., "Polyamine biosynthesis as a target to inhibit apoptosis of non-tumoral cells", Amino Acids, 2007年06月20日, Vol. 33, No. 2, p.197-202, DOI: 10.1007/s00726-007-0514-3

E. AGOSTINELLI et al., "Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology", Amino Acids, 2009年12月15日, Vol. 38, No. 2, p.393-403, DOI: 10.1007/s00726-009-0396-7

Veronica T. DUFE et al., "A structural insight into the inhibition of human and Leishmania donovani ornithine decarboxylases by 1-amino-oxy-3-aminopropane", Biochemical Journal, 2007年06月27日, Vol. 405, No. 2, p.261-268, DOI: 10.1042/BJ20070188

Suzanne HECTOR et al., "Polyamine catabolism in platinum drug action: Interactions between oxaliplatin and the polyamine analogue N1,N11-diethylnorspermine at the level of spermidine/spermine N1-acetyltransferase", Molecular Cancer Therapeutics, 2004年07月01日, Vol. 3, No. 7, p.813-822, DOI: 10.1158/1535-7163.813.3.7

Agnieszka STACHURSKA et al., "Cisplatin up-regulates the in vivo biosynthesis and degradation of renal polyamines and c-Myc expression", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2004年08月, Vol. 1689, No. 3, p.259-266, DOI: 10.1016/j.bbadis.2004.04.003

T MATTILA et al., "Reversible inhibition of bacterial growth after specific inhibition of spermidine synthase by dicyclohexylamine", Biochemical Journal, 1984年11月01日, Vol. 223, No. 3, p.823-830, DOI: 10.1042/bj2230823

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31/00-33/44

A 6 1 P 1/00-43/00

A 6 1 K 45/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)