

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-524344

(P2017-524344A)

(43) 公表日 平成29年8月31日 (2017.8.31)

| (51) Int.Cl.                         | F I                   | テーマコード (参考) |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------|
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>       | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B 0 5 0   |
| <b>A 6 1 K 38/47 (2006.01)</b>       | A 6 1 K 38/47         | 4 C 0 8 1   |
| <b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>       | A 6 1 P 31/00         | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 P 17/02 (2006.01)</b>       | A 6 1 P 17/02         | 4 C 0 8 7   |
| <b>A 6 1 P 27/02 (2006.01)</b>       | A 6 1 P 27/02         |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く |                       |             |

(21) 出願番号 特願2016-571249 (P2016-571249)  
 (86) (22) 出願日 平成27年6月5日 (2015.6.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月11日 (2017.1.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2015/000361  
 (87) 国際公開番号 W02015/184526  
 (87) 国際公開日 平成27年12月10日 (2015.12.10)  
 (31) 優先権主張番号 62/008,836  
 (32) 優先日 平成26年6月6日 (2014.6.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501181075  
 ザ・ホスピタル・フォー・シック・チルドレン  
 THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN  
 カナダ、エム5ジー・1エックス8、オンタリオ、トロント、ユニバーシティ・アベニュー555番  
 (71) 出願人 510042677  
 ザ ロイヤル インスティテューション  
 フォー ザ アドバンスメント オブ ラーニング/マギル ユニバーシティ  
 カナダ国 ケベック州 モントリオール  
 シャープブルック ストリート ウェスト 845

最終頁に続く

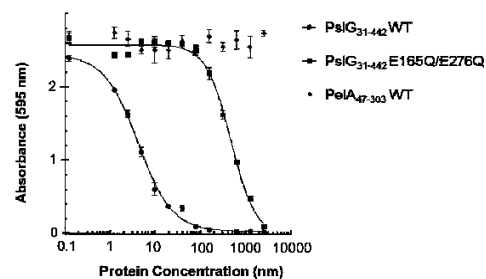
(54) 【発明の名称】 バイオフィルムの阻害及び分散における可溶性細菌及び真菌タンパク質並びに方法並びにそれらの使用

## (57) 【要約】

本開示は、菌体外多糖生成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質を投与することを含むバイオフィルム関連感染症を治療又は予防する方法並びに留置医療装置、インプラント、及び非医療用表面のバイオフィルム形成を防止及び処理する方法に関する。該タンパク質はグリコシルヒドロラーゼドメインを含む。さらに、本開示は特定の可溶性グリコシルヒドロラーゼ及びその組成物を提供する。

【選択図】 図 1 0

Figure 10



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの、又は全ての：( i ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、及び ( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログを、それらを必要としている動物又は植物に投与することを含むバイオフィーム関連感染症を治療又は予防する方法。

10

## 【請求項 2】

前記 S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 6 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 3 配列のアミノ酸 5 2 ~ 2 9 8 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記 S p h 3 G H ドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A W 0 9 3 7 9 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 3 配列のアミノ酸 5 4 ~ 3 0 4 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 S p h 3 G H ドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A A 6 3 5 2 3 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 配列のアミノ酸 4 3 ~ 2 9 9 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記 P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A G 0 6 4 5 2 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 4 7 ~ 3 0 3 若しくはアクセッション番号 A A Y 9 2 2 4 4 . 2 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 3 5 ~ 2 9 1 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記 P e l A G H ドメインオーソログを含むタンパク質が、アクセッション番号 C A Q 6 2 2 0 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている R a g A 配列のアミノ酸 6 1 ~ 3 1 7 若しくはアクセッション番号 A B B 3 2 1 9 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 2 3 ~ 2 7 7 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

前記 B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 C A E 3 2 2 6 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている B p s B 配列のアミノ酸 3 1 8 ~ 6 7 0 若しくはアミノ酸 2 7 ~ 7 0 1 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記 P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A C 7 4 1 0 8 . 1 でジェンバンクに寄託されている P g a B 配列のアミノ酸 3 1 0 ~ 6 7 2 若しくはアミノ酸 2 2 ~ 6 7 2 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 9】

前記 P s l G G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A G 0 5 6 2 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている P s l G 配列のアミノ酸 3 1 ~ 4 4 2 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記 E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A L 9

50

2787.1でジェンバンクに寄託されているEga3配列のアミノ酸46～318又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記バイオフィーム関連感染症が、前記動物における創傷、熱傷後感染、角膜炎、生物義装具、又は留置医療装置感染の結果である請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記バイオフィーム関連感染症が前記動物の肺にあり、前記動物が慢性肺疾患又は肺感染症をもつ請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記バイオフィーム関連感染症が前記植物又は植物部位の表面にある請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記バイオフィーム関連感染症の前記バイオフィームが、Pel依存性、Psl依存性、PNAG依存性、及び/又はGAG依存性バイオフィームである請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記バイオフィーム関連感染症が、*P. aeruginosa*、*S. aureus*、*E. coli*、*Candida* spp.、*Aspergillus* spp.、*Acinetobacter* spp.、*T. asahii*、*B. cineria*、及び*Fusarium* spp.によって引き起こされる請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

抗菌剤を前記それらを必要としている動物又は植物に併用投与することをさらに含む請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記抗菌剤が抗生物質又は抗真菌薬である請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記少なくとも1つの可溶性タンパク質がベクターによって発現され、前記方法が前記ベクターを前記それらを必要としている動物又は植物に投与することを含む請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記ベクターが、前記バイオフィームの細菌に侵入できるファージベクターである請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記ベクターが、前記バイオフィームの真菌に侵入できるマイコウイルスベクターである請求項18に記載の方法。

【請求項21】

留置医療装置又はインプラントにおけるバイオフィーム形成を防止する方法であって、少なくとも1つの、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、又はすべての：(i) Sph3 GHドメインを含む可溶性タンパク質、(ii) PelA GHドメインを含む可溶性タンパク質、(iii) BpsB GHドメインを含む可溶性タンパク質、(iv) PgaB GHドメインを含む可溶性タンパク質、(v) Psl GHドメインを含む可溶性タンパク質、及び(vi) Ega3 GHドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログで、それらを必要としている動物に使用する前に、前記装置を被覆することを含む方法。

【請求項22】

前記Sph3 GHドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号EAL92786.1でジェンバンクに寄託されているSph3配列のアミノ酸52～298又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記Sph3 GHドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番

10

20

30

40

50

号 E A W 0 9 3 7 9 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 3 配列のアミノ酸 5 4 ~ 3 0 4 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 S p h 3 G H ドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A A 6 3 5 2 3 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 配列のアミノ酸 4 3 ~ 2 9 9 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記 P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A G 0 6 4 5 2 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 4 7 ~ 3 0 3 若しくはアクセッション番号 A A Y 9 2 2 4 4 . 2 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 3 5 ~ 2 9 1、又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 6】

前記 P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質オーソログが、アクセッション番号 C A Q 6 2 2 0 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている R a g A 配列のアミノ酸 6 1 ~ 3 1 7 若しくはアクセッション番号 A B B 3 2 1 9 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 2 3 ~ 2 7 7、又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 C A E 3 2 2 6 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている B p s B 配列のアミノ酸 3 1 8 ~ 6 7 0 若しくはアミノ酸 2 7 ~ 7 0 1 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 2 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 8】

前記 P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A C 7 4 1 0 8 . 1 でジェンバンクに寄託されている P g a B 配列のアミノ酸 3 1 0 ~ 6 7 2 若しくはアミノ酸 2 2 ~ 6 7 2 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 P s l G G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A G 0 5 6 2 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている P s l G 配列のアミノ酸 3 1 ~ 4 4 2 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 2 1 に記載の方法。

30

【請求項 3 0】

前記 E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 7 . 1 でジェンバンクに寄託されている E g a 3 配列のアミノ酸 4 6 ~ 3 1 8 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記留置医療装置又はインプラントがカテーテル又は静脈内チューブである請求項 2 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記留置医療装置又はインプラントが人工関節又は生物義装具である請求項 2 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 3】

前記バイオフィルムが、P e l 依存性、P s l 依存性、P N A G 依存性、及び / 又は G A G 依存性バイオフィルムである請求項 2 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記バイオフィルムが P. aeruginosa、S. aureus、E. coli、S. epidermidis、Y. pestis、B. pertussis、Burkholderia spp.、Candida spp.、Aspergillus spp.、Acinetobacter spp.、及び Fusarium spp. によって引き起こされる請求項 2 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 35】

前記留置医療装置又はインプラントを抗菌剤で被覆することをさらに含む請求項 21～34 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 36】

前記抗菌剤が抗生物質又は抗真菌薬である請求項 35 に記載の方法。

## 【請求項 37】

バイオフィルム形成の影響を受けやすい非医療用表面のバイオフィルム形成を処理又はする方法であって、少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの、又はすべての：(i) Sph3 GH ドメインを含む可溶性タンパク質、(ii) PelA GH ドメインを含む可溶性タンパク質、(iii) BpsB GH ドメインを含む可溶性タンパク質、(iv) PgaB GH ドメインを含む可溶性タンパク質、(v) PslG グリコシルヒドロラーゼ (GH) ドメインを含む可溶性タンパク質、及び (vi) Ega3 GH ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログで、それらを必要としている動物に使用する前に、前記表面を塗布すること又は前記表面を被覆することを含む方法。

## 【請求項 38】

前記 Sph3 GH ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 EAL92786.1 でジェンバンクに寄託されている Sph3 配列のアミノ酸 52～298 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 39】

前記 Sph3 GH ドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 EAW09379.1 でジェンバンクに寄託されている Sph3 配列のアミノ酸 54～304 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 40】

前記 Sph3 GH ドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 EAA63523.1 でジェンバンクに寄託されている Sph 配列のアミノ酸 43～299 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 41】

前記 PelA GH ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 AAG06452.1 でジェンバンクに寄託されている PelA 配列のアミノ酸 47～303 若しくはアクセッション番号 AAY92244.2 でジェンバンクに寄託されている PelA 配列のアミノ酸 35～291 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記 PelA GH ドメインを含む可溶性タンパク質オーソログが、アクセッション番号 CAQ62201.1 でジェンバンクに寄託されている RagA 配列のアミノ酸 61～317 若しくはアクセッション番号 ABB32191.1 でジェンバンクに寄託されている PelA 配列のアミノ酸 23～277、又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 43】

前記 BpsB GH ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 CAE32265.1 でジェンバンクに寄託されている BpsB 配列のアミノ酸 318～670 若しくはアミノ酸 27～701 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 44】

前記 PgaB GH ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 AAC74108.1 でジェンバンクに寄託されている PgaB 配列のアミノ酸 310～672 若しくはアミノ酸 22～672 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 45】

前記 P s l G G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A G 0 5 6 2 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている P s l G 配列のアミノ酸 3 1 ~ 4 4 2 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記 E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 7 . 1 でジェンバンクに寄託されている E g a 3 配列のアミノ酸 4 6 ~ 3 1 8 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記バイオフィーム関連感染症の前記バイオフィームが、P e l 依存性、P s l 依存性、P N A G 依存性、及び / 又は G A G 依存性バイオフィームである請求項 3 7 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 4 8】

前記バイオフィームが、P. aeruginosa、S. aureus、E. coli、S. epidermidis、Y. pestis、B. pertussis、Burkholderia spp.、Candida spp.、Aspergillus spp.、Acinetobacter spp.、及び / 又は Fusarium spp. によって引き起こされる請求項 3 7 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

抗菌剤と併用投与する又は抗菌剤で被覆することをさらに含む請求項 3 7 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

20

前記抗菌剤が抗生物質又は抗真菌薬である請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの、又はすべての：( i ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、及び ( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログで被覆された留置医療装置又はインプラント。

【請求項 5 2】

30

前記 S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 6 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 3 配列のアミノ酸 5 2 ~ 2 9 8 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

【請求項 5 3】

前記 S p h 3 G H ドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A W 0 9 3 7 9 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 3 配列のアミノ酸 5 4 ~ 3 0 4 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

【請求項 5 4】

40

前記 S p h 3 G H ドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A A 6 3 5 2 3 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 配列のアミノ酸 4 3 ~ 2 9 9 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

【請求項 5 5】

前記 P e l A G H ドメインを含むタンパク質が、アクセッション番号 A A G 0 6 4 5 2 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 4 7 ~ 3 0 3 若しくはアクセッション番号 A A Y 9 2 2 4 4 . 2 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 3 5 ~ 2 9 1 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

50

## 【請求項 5 6】

前記 P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質オーソログが、アクセッション番号 C A Q 6 2 2 0 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている R a g A 配列のアミノ酸 6 1 ~ 3 1 7 若しくはアクセッション番号 A B B 3 2 1 9 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 2 3 ~ 2 7 7、又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

## 【請求項 5 7】

前記 B p s B G H ドメインを含むタンパク質が、アクセッション番号 C A E 3 2 2 6 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている B p s B 配列のアミノ酸 3 1 8 ~ 6 7 0 若しくはアミノ酸 2 7 ~ 7 0 1 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

10

## 【請求項 5 8】

前記 P g a B G H ドメインを含むタンパク質が、アクセッション番号 A A C 7 4 1 0 8 . 1 でジェンバンクに寄託されている P g a B 配列のアミノ酸 3 1 0 ~ 6 7 2 若しくはアミノ酸 2 2 ~ 6 7 2 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

## 【請求項 5 9】

前記 P s l G G H ドメインを含むタンパク質が、アクセッション番号 A A G 0 5 6 2 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている P s l G 配列のアミノ酸 3 1 ~ 4 4 2 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

20

## 【請求項 6 0】

前記 E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 7 . 1 でジェンバンクに寄託されている E g a 3 配列のアミノ酸 4 6 ~ 3 1 8 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

## 【請求項 6 1】

前記装置又はインプラントがさらに抗菌剤で被覆される請求項 5 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

## 【請求項 6 2】

前記抗菌剤が抗生物質又は抗真菌薬である請求項 6 1 に記載の留置医療装置又はインプラント。

30

## 【請求項 6 3】

前記留置医療装置がカテーテル又は静脈内チューブである請求項 5 1 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の留置医療装置又はインプラント。

## 【請求項 6 4】

前記留置医療装置が人工関節又は生物義装具である請求項 5 1 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の留置医療装置又はインプラント。

## 【請求項 6 5】

前記バイオフィルムが、P e l 依存性、P s l 依存性、P N A G 依存性、及び / 又は G A G 依存性バイオフィルムである請求項 5 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の留置医療装置又はインプラント。

40

## 【請求項 6 6】

前記バイオフィルムが、P. aeruginosa、S. aureus、E. coli、S. epidermidis、Y. pestis、B. pertussis、Burkholderia spp.、Candida spp.、Aspergillus spp.、Acinetobacter spp. 及び / 又は Fusarium spp. によって引き起こされる請求項 5 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の留置医療装置又はインプラント。

## 【請求項 6 7】

( i ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク

50

質、( i v ) P g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、若しくは ( v i ) E g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログ、又はその組み合わせをコードするベクター。

【請求項 6 8】

前記 S p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 6 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 3 配列のアミノ酸 5 2 ~ 2 9 8 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 6 9】

前記 S p h 3 G Hドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A W 0 9 3 7 9 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 3 配列のアミノ酸 5 4 ~ 3 0 4 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 7 0】

前記 S p h 3 G Hドメインオーソログを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A A 6 3 5 2 3 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 配列のアミノ酸 4 3 ~ 2 9 9 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 7 1】

前記 P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A G 0 6 4 5 2 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 4 7 ~ 3 0 3 若しくはアクセッション番号 A A Y 9 2 2 4 4 . 2 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 3 5 ~ 2 9 1 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 7 2】

前記 P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質オーソログが、アクセッション番号 C A Q 6 2 2 0 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている R a g A 配列のアミノ酸 6 1 ~ 3 1 7 若しくはアクセッション番号 A B B 3 2 1 9 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 2 3 ~ 2 7 7、又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 7 3】

前記 B p s B G Hドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 C A E 3 2 2 6 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている B p s B 配列のアミノ酸 3 1 8 ~ 6 7 0 若しくはアミノ酸 2 7 ~ 7 0 1 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 7 4】

前記 P g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A C 7 4 1 0 8 . 1 でジェンバンクに寄託されている P g a B 配列のアミノ酸 3 1 0 ~ 6 7 2 若しくはアミノ酸 2 2 ~ 6 7 2 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 7 5】

前記 P s l G G Hドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 A A G 0 5 6 2 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている P s l G 配列のアミノ酸 3 1 ~ 4 4 2 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 7 6】

前記 E g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質が、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 7 . 1 でジェンバンクに寄託されている E g a 3 配列のアミノ酸 4 6 ~ 3 1 8 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 7 7】

前記ベクターが溶菌ファージである請求項 6 7 ~ 7 7 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 7 8】

10

20

30

40

50

前記ベクターがマイコウイルスである請求項 67～77 のいずれか一項に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2014年6月6日に出版された米国仮特許出願第62/008,836号に基づく優先権を主張し、該仮出願の内容は参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、グリコシルヒドロラーゼ含有可溶性微生物タンパク質に関する。具体的には、本開示は微生物バイオフィルムの治療及び予防における組成物及び方法並びにそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

微生物バイオフィルム

微生物バイオフィルムの組成物は、株/種及び環境条件の間でさまざまであるが、一般に主な構成成分として、タンパク性のアドヘシン、核酸、及び菌体外多糖を含む (Branda et al 2005, Sutherland 2001a, Vu et al 2009)。菌体外多糖は、多くの微生物の大部分を占めるバイオフィルムマトリックス構成成分であり、バイオフィルム付着、構造、及び耐性に寄与する (Colvin et al 2011, Colvin et al 2012, Ma et al 2009, Ma et al 2006, Mah et al 2003, Matsukawa & Greenberg 2004)。バイオフィルムは、肺上皮細胞又は他の器官などの生物的表面、及び限定されないが、医療装置及びインプラントを含む非生物的表面に形成され、限定されないが、パイプ及び排水設備、水濾過装置、並びに食品接触表面を含む工業的及び商業的環境における生物付着の原因である (Bjarnsholt et al 2013, Kumar & Anand 1998)。慢性のバイオフィルム関連感染症の顕著な特徴は、抗生物質に対する高度な耐性及び宿主免疫系から逃れる能力である (Bjarnsholt 2013, Høiby et al 2010, Kim et al 2009, Mishra et al 2012, Rybtke et al 2011, Stewart 2003, Stewart & Costerton 2001)。細菌性バイオフィルムの抗生物質及び界面活性剤に対する耐性は、多くの場合、その浮遊するものと比較して1,000倍高い (Alhede et al 2011, Costerton et al 1987, Costerton et al 1999, Davies 2003)。成熟したバイオフィルムは、栄養素及び老廃物が移動できる高度に複雑な構造を有する (Hall-Stoodley et al 2004, Sutherland 2001b)。バイオフィルムは、多くの病原性細菌種を含む大きな微生物集団を隔離する働きをして、各生物が宿主での生存する力を共生的に利用する (Wolcott et al 2013)。したがって、バイオフィルムを阻害する戦略は、微生物バイオマス全体を減らすという意味合いをもつことになりうる (Bragonzi et al 2012)。

【0004】

P. aeruginosa及びバイオフィルム形成

感染中、細菌P. aeruginosaは、自由に遊泳する状態から、表面に付着し、マトリックスに埋め込まれたバイオフィルム状態への生活環の変化を経る (図1)。バイオフィルムは抗生物質に対して強い耐性があり、変化する環境に細菌が適応する助けとなるので、バイオフィルムが確立されると、感染症は慢性で且つ治療不可能になる (Colvin et al 2011, Mishra et al 2012, Zegans et al 2012)。CF患者では、このバイオフィルムは、細菌が肺内に何十年も生き続けることを可能にし (Ma et al 2012, Mann & Wozniak 2012, Starkey et al 2009)、一方創傷では、バイオフィルムは初期コロニー形成及び防御を可能にする。P. aeruginosaバイオフィルムは、主に菌体外多糖; Psl、Pel、及びアルギン酸塩から成る。3種の多糖は全て重要な病原性因子であり、細菌の遺伝的適応の助けとなる (Skurnik et al 2013)。2つの一般的な臨床バイオフィルム形成株、P. aeruginosa PA14及びPAO1が広く研究されてきた (Hare et al 2012, Kukavica-Ibrulj et al 2008)。PA14は世界中で最も多い株 (Wiehlmann et al 2007)であり、も

10

20

30

40

50

ともと熱傷分離株中で同定された (Rahme et al 1995)。この株は病原性が強く、P e l だけを利用し (Colvin et al 2012)、一方でもう一つの臨床株 P A O 1 は、バイオフィルム産生のために主に P s l を利用する中程度に病原性をもつ株 (Lee et al 2006) である (Colvin et al 2012)。強制的には、P s l の産生が低下した場合 P A O 1 は P e l を利用でき (Colvin et al 2012)、宿主中での感染症の維持を可能にする (Byrd et al 2011)。幾つかの最近の研究から、P e l 及び P s l はバイオフィルム形成の初期の間に決定的に重要であることが示された。くわえて、C F 患者で示されているように、P s l は確立されたバイオフィルムの継続的な維持に重要であることが示されている (Billings et al 2013, Huse et al 2013, Irie et al 2012, Wang et al 2013, Zhao et al 2013)。

10

#### 【 0 0 0 5 】

##### P s l 多糖

P s l は、D - マンノース、D - グルコース、及び L - ラムノースの五糖類反復単位から成り、他の既知の多糖と化学的に異なる (図 2)。p s l オペロンは 2 0 0 4 年に発見され (Jackson et al 2004)、1 5 個のオープンリーディングフレーム (O R F) p s l A B C D E F G H I J K L M N O から成り、菌体外多糖の生合成に必要な推定タンパク質をコードする。これらの O R F のうち 4 つ、p s l B、p s l M、p s l N、p s l O は P s l 生合成に必要なではない (Byrd et al 2009)。p s l オペロンは多くの *Pseudomonas* 株に存在する (図 3)。P s l 生合成の最初の初期段階は細胞質で起こるという説が出されており、次いでペリプラズムに移行した後、外膜を通して分泌される (Franklin et al 2011)。

20

#### 【 0 0 0 6 】

P s l は細菌付着のための「分子接着剤」として機能し、非生物的表面及び生物的表面への浮遊又は「自由遊泳」細菌の初期付着に重要である (Byrd et al 2010, Byrd et al 2009, Ma et al 2006)。また、P s l は構造安定性及び成熟したバイオフィルムの構造の維持を助ける (Ma et al 2009, Ma et al 2012)。多糖は免疫系に対する保護を与え (Mishra et al 2012)、バイオフィルム発生の初期段階の間、特に多様な標的及び生化学的特性をもつ抗生物質による攻撃に対して防御の最前線である (Billings et al 2013)。例えば、P s l 産生バイオフィルムは、*P. aeruginosa* 感染症の治療にクリニックで使われる標準的な抗生物質である、ポリミキシン B、 Tobramycin、及びシプロフロキサシンに対する耐性を ~ 3 5 ~ 5 0 % 増加させ、多剤耐性 *P. aeruginosa* に対して最後の手段として用いられる抗生物質の 1 つである コリスチン に対する耐性を 7 5 % 増加させる (Billings et al 2013)。非 P s l 産生、抗生物質感受性 *P. aeruginosa*、*Escherichia coli*、及び *Staphylococcus aureus* は、P s l 含有バイオフィルムに組み入れられることによって抗生物質耐性を獲得する。阻害濃度未満のこれらの抗生物質はさらにバイオフィルム形成を誘導し (Hoffman et al 2005)、感染症を悪化させる。アルギン酸塩が慢性 C F 肺感染症の主要な菌体外多糖である一方で、最近のエビデンスから、P s l が長期間のコロニー形成 (~ 4 0 , 0 0 0 の細菌発生) の間に同じように重要であることが示唆される (Huse et al 2013)。 *P. aeruginosa* 感染症から回復している患者は P s l に対する特異的抗体をもち、P s l が感染症の間に臨床的に関連することを示している (Digianico et al 2012)。

30

40

#### 【 0 0 0 7 】

##### P e l 多糖

気液界面に形成するバイオフィルムはペリクルと呼ばれる。臨床分離株 *P. aeruginosa* P A 1 4 によって形成されるペリクルは 7 つの遺伝子オペロン p e l A B C D E F G にコードされ、それらすべてが P e l 依存性バイオフィルム形成に必要なである (図 4) (Colvin et al 2011, Friedman & Kolter 2004a)。p e l オペロンは、2 0 0 4 年にトランスポゾンライブラリ中で最初に発見された (Friedman & Kolter 2004b)。P e l 及び結合の化学組成は現在のところわかっていない。その生合成は細胞質で開始されると考えられ、ポリマーはペリプラズムを通る移動に向けて内膜を横切って輸送される。最近の研究

50

から、バイオフィーム形成が生じるには、マルチドメインペリプラズムタンパク質 P e 1 A によって P e 1 多糖が脱アセチル化又は部分的に脱アセチル化されなければならないことが示唆されている (Colvin et al 2013)。他の株と比較して、*P. aeruginosa* P A 1 4 は付着及び細胞間相互作用に関して主に P e 1 多糖を依存する。多糖は細胞間相互作用の維持に決定的に重要であり、バイオフィーム群落のための構造的スキャホールドを形成する (Colvin et al 2011)。また P e 1 は、広く一般に使用されている抗生物質トブラマイシン及びシプロフロキサシンに対して保護的な役割を担う (Colvin et al 2011)。

#### 【 0 0 0 8 】

##### グラム陽性及びグラム陰性細菌の P N A G バイオフィーム

多糖 P N A G ( 図 5 ) は、*Staphylococcus epidermidis* (Mack et al 1996)、*S. aureus* (McKenney et al 1999)、*E. coli* (Wang et al 2004)、*Pseudomonas fluorescens* (Itoh et al 2005)、*Acinetobacter baumannii* (Choi et al 2009)、*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Izano et al 2007)、*Yersinia pestis* (Jarrett et al 2004)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Izano et al 2008)、*Bordetella bronchiseptica* (Sloan et al 2007)、*Bordetella pertussis* (Conover et al 2010)、及び *Burkholderia* spp. のバイオフィームに見出されている (Yakandawala et al 2011)。P N A G の合成は、グラム陽性及びグラム陰性細菌において *icaA* D B C 及び *pga* A B C D オペロンを必要とする。興味深いことに、P N A G の生合成のための標準的な遺伝子座を含まない多種多様な原核病原体及び真核病原体の細胞表面を調べた最近の免疫原性研究から、表面結合 P N A G の存在が明らかになった (Cywes-Bentley et al 2013)。それには、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus dysgalactiae*、*Enterococcus faecalis*、*Listeria monocytogenes*、*Clostridium difficile*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Mycobacterium smegmatis*、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*nontypable Haemophilus influenzae*、*Haemophilus ducreyi*、*Helicobacter pylori*、*Campylobacter jejuni*、*Citrobacter rodentium*、*Salmonella enterica*、*Candida albicans*、*Aspergillus flavus*、*Fusarium solani*、*Cryptococcus neoformans*、*Trichomonas vaginalis*、*Plasmodium berghei*、及び *Plasmodium falciparum* (Cywes-Bentley et al 2013) が含まれた。さらに、P N A G に結合するモノクローナル抗体の投与は、多くの病原菌による局所又は全身感染症に対してマウスを保護する補体依存オプソニン食作用又は殺作用を媒介できた (Cywes-Bentley et al 2013)。

#### 【 0 0 0 9 】

##### P N A G 多糖

P N A G は、キチンと同様、N - アセチル - D - グルコサミンユニットを反復するホモポリマーであるが、P N A G は ( 1 , 6 ) 結合で合成される。成熟した形態の P N A G は部分的に脱アセチル化され、一般的に d P N A G と呼ばれ、多数の細菌においてバイオフィームの形成に必要とされる ( 図 6 )。グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の細胞壁構造の違いを考えると、2 つの遺伝子座のタンパク質産物の間の配列相同性は、*IcaA* と *PgaC*、及び *IcaB* と *PgaB* の N 末端ドメインに限られる。*PgaB*、2 ドメイン外膜リポタンパク質、及び *IcaB*、細胞外単一ドメインタンパク質は、P N A G の部分的な脱 - N - アセチル化に必要である (Little et al 2012a, Pokrovskaya et al 2013)。P N A G の脱 - N - アセチル化の機能障害は *E. coli*、*S. aureus*、及び *S. epidermidis* においてバイオフィーム形成を妨げることが示されている (Cerca et al 2007, Itoh et al 2008, Vuong et al 2004)。

#### 【 0 0 1 0 】

##### *Aspergillus fumigatus* 及びバイオフィーム形成

*Aspergillus fumigatus* は病原真菌であり、免疫機能の低下した人で疾患を引き起こす最も一般的な *Aspergillus* 種の 1 つである (Geiser et al 2007)。*Aspergillus* 種は *C. albicans* に次いで、ヘルスケアの環境における真菌感染の 2 番目に多い原因である (Ellis et al 2000)。平均的な人は日々、数百個の *A. fumigatus* 分生子 (真菌胞子) を吸い込み、気道を通して、肺胞に堆積される。重要なことには、これらの分生子は全空中浮遊真菌

分生子の 0.1%未満を占める一方で、*A. fumigatus*分生子はヒトの侵襲性感染症の > 80%を占める。正常な肺機能をもつ健常人では、分生子は粘液線毛エレベーター (elevator) によって除去されるか、又は肺胞マクロファージによって急速に貪食され、死滅させられ、感染を防ぐ。しかし、免疫機能の低下した人では、これらの分生子は死滅せず、代わりに肺上皮細胞及びマクロファージに付着した後、宿主細菌内に内部移行し、発芽する (Wasylnka et al 2005, Wasylnka & Moore 2002, Wasylnka & Moore 2003)。発芽に続いて、新たに形成した菌糸は宿主の上皮、内皮、及び免疫細胞と密接に結合したままで、結果として炎症及び組織傷害になることがありうる (Gravelat et al 2013, Wasylnka & Moore 2000)。免疫系が完全である、慢性肺疾患をもつ患者では、*Aspergillus* 孢子が発芽して気道又は既存の肺腔にコロニーを作る菌糸を生じるが、組織の中には侵襲しない。*Aspergillus* 感染症のこれらの形態は、持続性の気道の炎症、アレルギー反応、及び肺機能の低下に関連する。侵襲性及び慢性の肺アスペルギルス感染症の両方において、真菌の菌糸は密集した細胞外マトリックス内に見出される (Loussert et al 2010)。バイオフィルム形成及び菌糸の上皮細胞への付着が、菌体外多糖、ガラクトサミノガラクトタン (galactosaminogalactan) (GAG) によって媒介されることが示されている (Gravelat et al 2013)。*Aspergillus* 属はまた、創傷及び角膜感染症の原因でもある。他のアスペルギルス種及び非*Aspergillus* 属真菌、例えば病原真菌 *Fusarium*、並びに多くの植物病原真菌が GAG を産生する遺伝的能力をもつ。

10

20

30

40

50

#### 【0011】

#### ガラクトサミノガラクトタン (Galactosaminogalactan) (GAG)

ガラクトサミノガラクトタン (GAG) は 1 - 4 結合ガラクトース及び 1 - 4 結合 N - アセチルガラクトサミンから成る混成直鎖細胞外多糖である (Fontaine et al 2011)。菌体外多糖は *A. fumigatus* によって分泌されてバイオフィルムを形成し、菌糸を封入し、生物的 (上皮細胞及びフィブロンectin) 並びに非生物的 (ガラス及びプラスチック) 表面の両方への付着を可能にする (Gravelat et al 2013)。くわえて、GAG は *A. fumigatus* 細胞壁の構成成分であり、静置 (static) 及び気中菌糸の細胞壁の総多糖の ~ 2% を構成する (Loussert et al 2010)。*A. fumigatus* 発症機序における GAG の機能は次の通りである (Gravelat et al 2013) ; *A. fumigatus* 菌糸の生物的表面及び非生物的表面への付着を媒介し (Gravelat et al 2013)、免疫抑制体として作用し (Fontaine et al 2011)、菌糸の表面上の - グルカン及び他の病原菌関連分子パターン分子を覆い隠すことを通して宿主免疫応答を変化させる (Gravelat et al 2013)。

#### 【0012】

#### 菌体外多糖生合成に関する加水分解酵素

セルロース、アルギン酸塩、Psl、Pel、及び GAG 多糖の系を含む、多くの菌体外多糖生合成の機構系は、推定グリコシルヒドロラーゼ又は機能的に特徴付けられたグリコシルヒドロラーゼをコードする。これらの酵素はバイオフィルム形成が起こるのに必要である可能性があるが、この過程の正確な生物学的役割は依然として定かでない。

#### 【0013】

#### 推定グリコシルヒドロラーゼ PslG (Psl 多糖系)

PslG はポリマー産生 (Byrd et al 2009) に必須であるが、Psl の生合成における PslG の生物学的役割は十分に分かっていない。グリコシルヒドロラーゼ (GH) はアミノ酸配列に基づいてファミリーに分類されている (Davies & Henrissat 1995, Henrissat & Bairoch 1996)。アミノ酸配列同一性に基づいて、糖質関連酵素データベース (CAZy) (Lombard et al 2014) は PslG を GH39 ファミリーのメンバーに分類する。興味深いことに、このファミリーの現在の細菌メンバーはすべて、現時点では - キシロシダーゼとして注釈付けられ、一方でヒトメンバーは - L - イズロニダーゼとして注釈付けられる。構造はすべて、保存された活性部位を含有する N 末端の ( / )。TIM バレル及び C 末端の - サンドウィッチドメインから成る。触媒作用に關与する 2 つの触媒グルタミン酸残基をもつ機構を保持することを介して触媒反は起こる (Vocadlo et al 2002)。

## 【 0 0 1 4 】

マルチドメインタンパク質 P e l A ( P e l 多糖系)

P e l A のバイオインフォマティクス解析から、P e l A は 3 つの潜在的な触媒活性をもつマルチドメインペリプラズムタンパク質であることが示された。P h y r e <sup>2</sup> (Kell ey & Sternberg 2009) サーバーは、該タンパク質は、残基 4 7 ~ 3 0 3 を構成する予想 T I M バレルドメイン、残基 3 0 4 ~ 4 0 9 のレダクターゼドメイン、残基 5 2 0 ~ 8 0 0 の脱アセチル化酵素ドメイン、及び残基 8 4 0 ~ 9 2 7 の - ジェリーロールフォールド構造 (Colvin et al 2013) を含む、5 つを超える異なるドメイン (図 7) を有することを示唆する (Colvin et al 2013)。脱アセチル化酵素ドメインの推定触媒残基の部位特異的突然変異がバイオフィーム形成を妨げたことが以前に示されている (Colvin et al 2013)。ヒドロラーゼドメインの提案されている触媒機能が P e l 生合成に必要なか否かはわかっていない。

10

## 【 0 0 1 5 】

P g a B / B p s B は P N A G 脱アセチル化酵素及び推定グリコシルヒドロラーゼである

バイオインフォマティクス解析から、P g a B は触媒脱 N - アセチル化ドメイン及び予想炭水化物結合ドメインをもつ p g a 生合成オペロン中で唯一のペリプラズムタンパク質であることを示す。P N A G の脱 N - アセチル化に必須であることは公知であるが、P N A G の脱 - N - アセチル化における P g a B C 末端ドメイン (P g a B <sub>3 1 0 - 6 7 2</sub>) の生物学的役割はごく最近になって究明されてきた (Little et al 2014)。P g a B <sub>3 1 0 - 6 7 2</sub> は P N A G オリゴマーに結合することが示され、N - アセチルグルコサミン (G l c N A c)、グルコサミン (G l c N)、及び P N A G 六量体をもつ複合体の構造と組み合わせた分子動力学シミュレーションから、該ドメインが d P N A G に優先的に結合することが示唆される。Bordetella spp. では、p g a A B C D オペロンは b p s A B C D として知られている (図 6) (Parise et al 2007)。B. bronchiseptica の B p s B は、P g a B 及び I c a B に対してそれぞれ 4 0 % 及び 2 4 % の配列同一性を共有する脱アセチル化酵素ドメインを含むことが予想される (Parise et al 2007)。

20

## 【 0 0 1 6 】

最近、C A Z y データベース (Lombard et al 2014) は、アミノ酸配列同一性に基づいて B p s B 及び P g a B C 末端ドメインの両方を G H 1 3 ファミリーのメンバーとして分類した。この G H スーパーファミリーは機能的 ( / )。T I M バレル触媒ドメインを含む (Little et al 2014, Lombard et al 2014)。構造予測サーバーは該タンパク質がファミリー G H 1 8 及び G H 2 0 と高い構造類似性をもつことが示唆する。しかし、P N A G オリゴマー及び人工パラニトロフェニル (p N P) グリコシド基質を用いて P g a B <sub>3 1 0 - 6 7 2</sub> ヒドロラーゼ活性を示すための、これまで及び現在進行中の試みは不成功であることが判明している (Little et al 2012a)。興味深いことに、P g a B <sub>3 1 0 - 6 7 2</sub> と G H 1 3、G H 1 8、及び G H 2 0 ファミリーメンバーとの配列比較及び構造比較から、触媒コンセンサス配列 A E D、D X X D X D X E、又は G G D E がそれぞれ存在しないことを明らかにされる。

30

## 【 0 0 1 7 】

微生物バイオフィームの臨床的及び経済的意義

バイオフィーム関連感染症はすべての慢性、持続性細菌感染症の 6 5 ~ 8 0 % を占め、バイオフィームを伴う感染症及び病態の数は増え続けている (Bjarnsholt et al 2013, Flemming & Wingender 2010)。P. aeruginosa 及びその強い抵抗性を示すバイオフィームの形成は、3 つ具体的な領域；熱傷患者、慢性創傷感染症、及び嚢胞性線維症 (C F) において主要な細菌種である。また、他の細菌、限定されないが、S. epidermis、S. aureus、及び E. coli など、バイオフィーム形成、特に、医療装置関連感染症に大きな影響を与える。産業では、生物付着 - 非生物表面のバイオフィームに埋まっている微生物の蓄積 - は、非生物的表面と生物的表面の間のバイオトランスファー・ポテンシャル (biotransfer potential) に起因して大きな問題であり (Van Houdt & Michiels 2010)、且つ効力 (drag) の増加に起因してパイプ及び他の物体中の流量を減少させる (Tian et al 2

40

50

014)。

#### 【0018】

*Aspergillus fumigatus*は病原真菌であり、免疫機能の低下した人で疾患を引き起こす最も一般的な*Aspergillus*種の1つである。重要なことには、*A. fumigatus*分生子は全空中浮遊真菌分生子の0.1%未満を占める一方で、*A. fumigatus*分生子はヒトの侵襲性感染症の>80%を占める。侵襲性アスペルギルス症は、特に免疫機能の低下した患者では高い罹病率及び死亡率と関連する(Tong et al 2009)。研究調査では、死亡率は、骨髄移植では80%を超え、肝臓移植を受けた人では90%、及び白血病又はリンパ腫の患者では49%と報告されている(Lin et al 2001, Singh 2000)。*A. fumigatus*は、*C. albicans*に次いで、入院患者/ヘルスケアの環境で見られる真菌感染の2番目に多い原因である(Ellis et al 2000)。

10

#### 【0019】

菌体外多糖産生真菌は重大な植物病原菌である。*Botrytis cinerea*は、ブドウ、タマネギ、イチゴ、及び観賞切り花を含む200種を超える顕花植物及び球根を作る植物に影響を及ぼす(Dean et al 2012)。*Botrytis*感染症に起因する作物の損失及びこれらの損失に対処する殺真菌剤のコストは経済的に大きな問題である。2001年には、推定5億4千万ユーロが*Botrytis*感染症のコントロールのみに費やされた(Dean et al 2012)。さらに、殺真菌剤に対する耐性が増え続けている(Bardas et al 2010, Grabke et al 2014, Leroch et al 2013, Rodriguez et al 2014)。他の病原菌も重大な経済的損失の原因となる。*Blumeria graminis*は小麦及び大麦の重大な病原体である(Dean et al 2012)。一方、*Fusarium oxysporum*は100を超える異なる植物宿主に感染でき、トマト、ワタ、メロン、及びバナナなどの作物の重大な損失に関連する(Michielse & Rep 2009)。

20

#### 【0020】

##### 細菌及び真菌バイオフィルムに対する治療

バイオフィルム内の微生物が抗菌剤の作用及び宿主防御に耐える能力は非常に大きな課題を提起する。外科的介入(適切な場合)は別として、抗菌剤が唯一の治療の選択肢として残り、保護的なバイオフィルムバリアを透過し、感染を根絶するために長期間投与される。この方法は細菌及び真菌による抗菌耐性の増加の責任を部分的に負うべきである。非致死量の抗菌剤が持続して存在することは感受性を下げることにつながり、それによって、耐性突然変異菌の選択を誘発する(Hoiby et al 2011)。インビトロでも生体内でも、バイオフィルムの進化的変異率はより速く起こることが示されている。さらに、*P. aeruginosa*感染症の治療に使用された阻害濃度未満の抗生物質はバイオフィルム形成を誘導し、これらの細菌感染への対処不能をさらに深刻にすることが示されている(Hoffman et al 2005)。

30

#### 【0021】

酵素治療が細菌性バイオフィルムに対する対する実行可能な治療選択肢であるという先例がある。1つの例はグリコシルヒドロラーゼDspB又はDispersinB(登録商標)(米国特許第7,989,604号B2)である(Kaplan et al 2004, Manuel et al 2007)。該酵素は、*A. actinomycetemcomitans*から最初に単離され、数種の病原生物、例えば、限定されないが、*E. coli*、*S. aureus*、及び*S. epidermidis*によって用いられるバイオフィルム菌体外多糖ポリ-1,6-N-アセチルグルコサミンを分解する(PNAG)(Darouiche et al 2009, Donelli et al 2007, Gawande et al 2014, Kaplan et al 2004, Turk et al 2013)。DspBも該酵素のホモログも、*A. actinomycetemcomitans*のPNAG生合成オペロン内に見出されない。*P. aeruginosa*又は*A. fumigatus*はPNAGを産生する遺伝的能力をもたないので、DispersinB(登録商標)はこれらの細菌のバイオフィルムを阻害及び分散する能力をもたない。

40

#### 【発明の概要】

#### 【0022】

微生物がバイオフィルムを作ることができないことによって、生物的表面及び非生物的表面への付着が減り、抗菌剤(Davies 2003)及び宿主免疫系(Bakkevig et al 2005, Ja

50

in & Ohman 1998, Maharaj et al 1993, Monday & Schiller 1996) に対する微生物の感受性が増加する。本発明の発明者は、細菌タンパク質又は真菌タンパク質：P e l A、P s l G、B p s B、P g a B、S p h 3、E g a 3、及びそれらのオーソログを含有する可溶性形態のグリコシルヒドロラーゼを外から適用することが微生物バイオフィルム防止及び/又は阻害をもたらすことを示している。よって、発明者らは、バイオフィルムの形成における任意の微生物種の任意の菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターの使用の結果として生じる、形成された微生物バイオフィルムを阻害し且つ分散させるために、該生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターにある任意の可溶性グリコシルヒドロラーゼタンパク質を使用することを提案した。

【0023】

したがって、1つの態様では、本開示は、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質を投与することを含むバイオフィルム関連感染症を治療又は予防する方法を提供する。また本明細書で提供されるのは、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防するための、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質の使用である。さらに提供されるのは、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防するための薬剤の製造における、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質の使用である。さらに一層提供されるのは、バイオフィルム関連感染症の治療又は予防で用いる、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質である。

【0024】

1つの実施形態では、本開示は、少なくとも1つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ (G H) ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i i) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i v) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(v) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び(v i) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログを、それらを必要としている動物又は植物に投与することを含むバイオフィルム関連感染症を治療又は予防する方法を提供する。また提供されるのは、それらを必要としている動物又は植物における、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防するための、少なくとも1つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ (G H) ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i i) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i v) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(v) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び(v i) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログの使用である。さらに一層提供されるのは、それらを必要としている動物又は植物における、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防するための薬剤を調製する際の、少なくとも1つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ (G H) ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i i) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i v) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び(v i) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログの使用である。さらに一層提供されるのは、それらを必要としている動物又は植物における、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防で用いる、少なくとも1つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ (G H) ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i i) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i v) P g a B

10

20

30

40

50

G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログである。

【 0 0 2 5 】

ある実施形態では、本明細書で開示される方法又は使用は、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、又はすべての可溶性タンパク質を含む。

【 0 0 2 6 】

ある実施形態では、本明細書で開示される方法又は使用は、アルギン酸塩及び/又はセルロースなどのバイオフィルムの他の構成成分を分解する他の可溶性タンパク質を投与することをさらに含む。

【 0 0 2 7 】

1つの実施形態では、バイオフィルム関連感染症は動物における創傷又は熱傷後感染の結果でありうる。

【 0 0 2 8 】

1つの実施形態では、バイオフィルム関連感染症は動物における角膜炎の結果でありうる。

【 0 0 2 9 】

別の実施形態では、バイオフィルム関連感染症は慢性肺疾患をもつ動物における肺感染症の結果でありうる。

【 0 0 3 0 】

別の実施形態では、バイオフィルム関連感染症は動物における医療装置若しくはインプラント上の又はそれらの微生物汚染の結果でありうる。

【 0 0 3 1 】

別の実施形態では、バイオフィルム関連感染症は動物における肺感染症でありうる。例としては、免疫機能の低下した宿主の急性疾患である侵襲性アスペルギルス症又は肺機能が低下した免疫機能正常の人に起こる慢性アスペルギルス感染症が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 2 】

ある実施形態では、グリコシルヒドロラーゼを含む少なくとも1つの可溶性タンパク質は好中球の微生物殺作用を強化する。特定の実施形態では、可溶性タンパク質は本明細書で開示される P e l A タンパク質である。

【 0 0 3 3 】

さらに別の実施形態では、バイオフィルム関連感染症は、動物又は植物において菌体外多糖鞘 ( sheath ) を産生する真菌によって媒介される。ある実施形態では、植物としては果実又は花などの植物材料が挙げられる。

【 0 0 3 4 】

さらに別の実施形態では、バイオフィルム関連感染症は、いずれの微生物又はその幾つか若しくはすべてが菌体外多糖、 P e l 、 P s l 、 P N A G 、 及び/若しくは G A G 並びにそれらの組み合わせを合成する遺伝的能力をもつ微生物の群によって引き起こされうる。それらの生物としては、 P . aeruginosa 、 S . aureus 、 E . coli 、 S . epidermidis 、 Y . pestis 、 B . pertussis 、 Burkholderia spp . 、 Candida spp . 、 Aspergillus spp . 、 Acinetobacter spp . 、 T . asahii 、 B . cineria 、 及び Fusarium spp . が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、バイオフィルムは、本明細書で開示される可溶性グリコシルヒドロラーゼによって分解できるいずれの菌体外多糖の分泌に依存しうる。

【 0 0 3 5 】

さらに別の実施形態では、本明細書で開示される方法又は使用は抗菌剤をそれらを必要としている動物又は植物に併用投与することをさらに含む。1つの実施形態では、抗菌剤は抗生物質である。別の実施形態では、抗菌剤は抗真菌薬である。さらに別の実施形態では、抗菌剤は植物で用いる殺真菌剤である。

10

20

30

40

50

## 【0036】

さらなる実施形態では、少なくとも1つの可溶性タンパク質はベクターによって発現されてよく、本明細書で開示される方法又は使用は、それらを必要としている動物又は植物へのベクター使用又は投与を含む。ある実施形態では、ベクターはバイオフィルムの細菌に入り込むことができる溶菌ファージである。別の実施形態では、ベクターはマイコウイルスである。

## 【0037】

別の態様では、本開示は、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質で装置を被覆することを含む留置医療装置又はインプラントにおけるバイオフィルム形成を防止する方法を提供する。

10

## 【0038】

1つの実施形態では、本開示は、少なくとも1つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ (G H) ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i i) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i v) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(v) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び(v i) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログで、それらを必要としている動物に使用する前に、装置を被覆することを含む留置医療装置又はインプラントにおけるバイオフィルム形成を防止する方法を提供する。ある実施形態では、該方法は、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、又はすべての可溶性タンパク質を含む。

20

## 【0039】

留置医療装置又はインプラントは、動物の体内に挿入され、且つバイオフィルム形成の影響を受けやすいいずれの装置又はインプラントであることができる。ある実施形態では、留置医療装置又はインプラントは、カテーテル、静脈内チューブ、生物義装具、例えば、限定されないが心臓弁又は人工関節などである。

## 【0040】

ある実施形態では、バイオフィルムは、菌体外多糖、P e l、P s l、P N A G 及び/又はG A G 並びにそれらの組み合わせを合成する遺伝的能力をもついずれの微生物 (microorganism) 又は複数の微生物 (microorganisms) によって引き起こされる。それらの生物としては、P. aeruginosa、S. aureus、E. coli、S. epidermidis、Y. pestis、B. pertussis、Burkholderia spp.、Candida spp.、Aspergillus spp.、Botrytis spp.、Trichosporon spp.、Acinetobacter spp.、及びFusarium spp.が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、バイオフィルムは、本明細書で開示される可溶性グリコシルヒドロラーゼによって分解できるいずれの菌体外多糖の分泌に依存しうる。

30

## 【0041】

さらに別の実施形態では、本明細書において開示される方法は、留置医療装置又はインプラントに抗菌剤を被覆することをさらに含む。1つの実施形態では、抗菌剤は抗生物質である。別の実施形態では、抗菌剤は抗真菌薬である。

## 【0042】

一層さらなる態様では、本明細書で提供されるのは、バイオフィルムの影響を受けやすい非医療用表面のバイオフィルムを防止又は処理する方法であって、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質を該表面に被覆又は塗布することを含む方法である。

40

## 【0043】

1つの実施形態では、本開示は、バイオフィルム形成の影響を受けやすい非医療用表面のバイオフィルムを防止又は処理する方法であって、少なくとも1つの(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ (G H) ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i i) B p s B G H ドメインを含む可溶性タ

50

ンパク質、( i v ) P g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質( v ) S p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログを、表面に被覆又は塗布することを含む方法を提供する。ある実施形態では、該方法は、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、又はすべての可溶性タンパク質を含む。

【0044】

さらに別の実施形態では、本明細書において開示される方法は、非医療用表面に抗菌剤を被覆又は塗布することをさらに含む。1つの実施形態では、抗菌剤は抗生物質である。別の実施形態では、抗菌剤は抗真菌薬である。

【0045】

また本明細書で提供されるのは、本明細書において開示される方法によって作製される留置医療装置又はインプラントである。

【0046】

ある実施形態では、P s l G G Hドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号A A G 0 5 6 2 5 . 1でジェンバンクに寄託されているP s l G配列のアミノ酸31 ~ 442又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む。

【0047】

ある実施形態では、P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号A A G 0 6 4 5 2 . 1でジェンバンクに寄託されているP e l A配列のアミノ酸47 ~ 303若しくはアクセッション番号A A Y 9 2 2 4 4 . 2でジェンバンクに寄託されているP e l A配列のアミノ酸35 ~ 291又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む。

【0048】

ある実施形態では、P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質オーソログは、アクセッション番号C A Q 6 2 2 0 1 . 1でジェンバンクに寄託されているR a g A配列のアミノ酸61 ~ 317若しくはアクセッション番号A B B 3 2 1 9 1 . 1でジェンバンクに寄託されているP e l A配列のアミノ酸23 ~ 277、又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む。

【0049】

ある実施形態では、B p s B G Hドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号C A E 3 2 2 6 5 . 1でジェンバンクに寄託されているB p s B配列のアミノ酸318 ~ 670若しくはアミノ酸27 ~ 701又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む。

【0050】

ある実施形態では、P g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号A A C 7 4 1 0 8 . 1でジェンバンクに寄託されているP g a B配列のアミノ酸310 ~ 672若しくはアミノ酸22 ~ 672又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む。

【0051】

ある実施形態では、S p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号E A L 9 2 7 8 6 . 1でジェンバンクに寄託されているAspergillus fumigatusのS p h 3配列のアミノ酸52 ~ 298又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む。

【0052】

ある実施形態では、S p h 3 G Hドメインオーソログを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号E A W 0 9 3 7 9 . 1でジェンバンクに寄託されているAspergillus clavatus N R R L 1のS p h 3 A C配列のアミノ酸54 ~ 304又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエントを含む。

【0053】

ある実施形態では、S p h 3 G Hドメインオーソログを含む可溶性タンパク質は、ア

10

20

30

40

50

クセッション番号 E A A 6 3 5 2 3 . 1 でジェンバンクに寄託されている *Aspergillus nidulans* F G S C A 4 の S p h 3 <sub>A N</sub> 配列のアミノ酸 4 3 ~ 2 9 9 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

#### 【 0 0 5 4 】

ある実施形態では、E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 7 . 1 でジェンバンクに寄託されている *Aspergillus fumigatus* の E g a 3 配列のアミノ酸 4 6 ~ 3 1 8 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

#### 【 0 0 5 5 】

一層さらなる態様では、本明細書で提供されるのは、アクセッション番号 A A G 0 5 6 2 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている P s l G 配列のアミノ酸 3 1 ~ 4 4 2 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 A A G 0 6 4 5 2 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 4 7 ~ 3 0 3 若しくはアクセッション番号 A A Y 9 2 2 4 4 . 2 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 3 5 ~ 2 9 1 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 C A Q 6 2 2 0 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている R a g A 配列のアミノ酸 6 1 ~ 3 1 7 若しくはアクセッション番号 A B B 3 2 1 9 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 2 3 ~ 2 7 7 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 C A E 3 2 2 6 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている B p s B 配列のアミノ酸 3 1 8 ~ 6 7 0 若しくはアミノ酸 2 7 ~ 7 0 1 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 A A C 7 4 1 0 8 . 1 でジェンバンクに寄託されている P g a B のアミノ酸 3 1 0 ~ 6 7 2 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 6 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 3 配列のアミノ酸 5 2 ~ 2 9 8 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 E A W 0 9 3 7 9 . 1 でジェンバンクに寄託されている *Aspergillus clavatus* N R R L 1 の S p h 3 <sub>A C</sub> 配列のアミノ酸 5 4 ~ 3 0 4 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 E A A 6 3 5 2 3 . 1 でジェンバンクに寄託されている *Aspergillus nidulans* F G S C A 4 の S p h 3 <sub>A N</sub> 配列のアミノ酸 4 3 ~ 2 9 9 から成る単離タンパク質、及び / 又はアクセッション番号 E A L 9 2 7 8 7 . 1 でジェンバンクに寄託されている E g a 3 配列のアミノ酸 4 6 ~ 3 1 8 から成る単離タンパク質である。

#### 【 0 0 5 6 】

さらに別の態様では、本開示は、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも 1 つの可溶性微生物タンパク質をコードするベクターを提供する。1 つの実施形態では、ベクターは微生物に入り込むことができる。ある実施形態では、ベクターは溶菌ファージである。別の実施形態では、ベクターはマイコウイルスである。

#### 【 0 0 5 7 】

1 つの実施形態では、本開示は、( i ) 本明細書に記載の P s l G G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) 本明細書に記載の P e l A G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) 本明細書に記載の B p s B G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) 本明細書に記載の P g a B G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) 本明細書に記載の S p h 3 G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又は ( v i ) 本明細書に記載の E g a 3 G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログ、又はそれらの組み合わせをコードするベクターを提供する。ある実施形態では、ベクターは溶菌ファージである。別の実施形態では、ベクターはマイコウイルスである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 8 】

さらに別の態様では、本開示は、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質及び薬理的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。ある実施形態では、薬理的に許容される担体はボロクサマーなどのゲルである。

## 【 0 0 5 9 】

1つの実施形態では、本開示は、少なくとも1つの、少なくとも2の、少なくとも3の、少なくとも4つの、少なくとも5つの、又はすべての：(i)本明細書に記載のP s l G G H可溶性タンパク質若しくはオーソログなどのP s l Gグリコシルヒドロラーゼ(G H)ドメインを含む可溶性タンパク質、(i i)本明細書に記載のP e l A G H可溶性タンパク質若しくはオーソログなどのP e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質、(i i i)本明細書に記載のB p s B G H可溶性タンパク質若しくはオーソログなどのB p s B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、(i v)本明細書に記載のP g a B G H可溶性タンパク質若しくはオーソログなどのP g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、(v)本明細書に記載のS p h 3 G H可溶性タンパク質若しくはオーソログなどのS p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、及び(v i)本明細書に記載のE g a 3 G H可溶性タンパク質若しくはオーソログなどのE g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログ、及び薬理的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 0 6 0 】

以下の詳細な記載から、本開示の他の特徴及び利点が明らかになるであろう。しかし、この詳細な記載から本開示の趣旨と範囲内のさまざまな変更及び修正が当業者に明らかになるので、詳細な記載及び具体的な例が本開示を実施形態を示す一方で、例示としてのみ与えられていることが理解されるべきである。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 6 1 】

以下、次の図面に照らして本開示を記載する。

## 【 0 0 6 2 】

【 図 1 】 図 1 は、微生物バイオフィルムの描写及び構成を示す。バイオフィルムの形成は4つの異なる段階に分けられることができる。浮遊細胞が肺上皮細胞などの生物的表面に付着する。ここで、細菌は生物的表面又は非生物的表面への付着を可能にする菌体外多糖を分泌し始め、それによってバイオフィルムを引き起こす。

## 【 0 0 6 3 】

【 図 2 】 図 2 は、P s lの化学構造を示す。P s lは、D - マンノース、D - グルコース、及びL - ラムノースの五糖類反復単位から成り、他の既知の多糖と化学的に異なる。

## 【 0 0 6 4 】

【 図 3 】 図 3 は、幾つかのP. aeruginosa種のP s lオペロンを示す。p s lオペロンは多くのPseudomonas種で見出されているが(すべてが図示されているわけではない)、すべての種が菌体外多糖を産生するか否かはわかっていない。P. aeruginosa P A 1 4は、その株中の変異に起因して、P s l多糖を合成できないことが示されている。P s l Gの位置は種にわたってオペロン内の同じ位置(position)にあり、P. aeruginosa P A O 1由来のP s l Gに対するそのアミノ酸配列同一性が示されている。配列同一性はP. aeruginosa P A O 1由来のP s l Gに対するアミノ酸配列同一性を指す。

## 【 0 0 6 5 】

【 図 4 】 図 4 は、幾つかの細菌種のP e lオペロンを示す。p e lオペロンは、Geobacter metallireducens及びRalstonia solanacearumの種を含む多くの細菌種で見出されている(該オペロンを含有するすべての種がこの図に描かれているわけではない)。P e l Aは各オペロンの最初の部分に位置する。

## 【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

【図 5】図 5 は、ポリ - ( 1 , 6 ) - N - アセチル - D - グルコサミン ( P N A G ) の化学構造を示す。P N A G は、キチンと同様、N - アセチル - D - グルコサミンユニットを反復するホモポリマーであるが、P N A G は ( 1 , 6 ) 結合で合成される。バイオフィルムに存在する P N A G は、多くの場合、部分的に脱アセチル化されている。該ポリマーのこの形態は一般に d P N A G と呼ばれ、医学的に関連する形態である。

【 0 0 6 7 】

【図 6】図 6 は、幾つかのグラム陰性種の P g a オペロンを示す。p g a オペロンは多くの細菌種で見出されている。

【 0 0 6 8 】

【図 7】図 7 は、P e l A のドメイン境界 ( boundaries ) を示す。各ドメインに関するおおよその境界が、各予想領域の残基の数に比例した相対サイズとともにダイアグラム上に示されている。P h y r e <sup>2</sup> ( Kelley & Sternberg 2009 ) によって予想されるように、以下のドメインが P e l A のドメイン境界である ; G H ( ヒドロラーゼ )、還元酵素、炭水化物脱アセチル化酵素、及び予想される機能をもたない領域、 - ジェリーロール。小さい灰色の長方形は、P h y r e <sup>2</sup> が高信頼度の予想をできなかったか、又は全領域をモデル化できなかった P e l A <sub>47-303</sub> タンパク質の領域を示す。

10

【 0 0 6 9 】

【図 8】図 8 は、P s l G <sub>31-442</sub> のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( S D S - P A G E ) ゲルを示す。S D S - P A G E ゲルの解析は、タンパク質が > 95 % の純度で、分子量が ~ 48 k D aであることを示し、精製タンパク質の予想分子量と一致する。

20

【 0 0 7 0 】

【図 9】図 9 は、P s l G <sub>31-442</sub> の X 線結晶構造を示す。( A ) 酵素は T I M バレルドメイン及び - サンドウィッチドメインから成る 2 ドメイン ( two-domain ) タンパク質である。( B ) 提案されている触媒残基を含有する推定活性部位グループは、長さが ~ 40 オングストロームであり、T I M バレルドメインをエカトリアルに横切る。

【 0 0 7 1 】

【図 10】図 10 は、P. aeruginosa P A O 1 p B A D p s l 株の P s l バイオフィルムの阻害を示す。誘導可能な P s l 産生を用いた静置 P. aeruginosa 培養物への P s l G <sub>31-442</sub> の滴定は、> 10 n M の P s l G <sub>31-442</sub> の添加が P s l バイオフィルム形成を阻害するのに十分であることを示す。また、P s l G <sub>31-442</sub> E 165 Q / E 276 Q ( E C <sub>50</sub> = 466 . 5 ± 1 . 1 n M ) の滴定は、バイオフィルム阻害をもたらしたが、野生型酵素 ( E C <sub>50</sub> = 4 . 1 ± 1 . 1 n M ) と比べて著しく高い濃度のタンパク質を必要とする。

30

【 0 0 7 2 】

【図 11 A】図 11 は、予め形成された P s l バイオフィルムの分散を示す。( A ) 86 n M の P s l G <sub>31-442</sub> の予め形成された P s l バイオフィルムへの添加は、20 分後にはバイオフィルムの顕著な減少をもたらし、35 分後にはバイオフィルムの完全な消失をもたらした。( B ) 58 n M の P s l G <sub>31-442</sub> の添加は、バイオフィルムを 30 分で分散できた。P s l G <sub>31-442</sub> E 165 Q / E 276 Q 二重触媒バリエーションが、非バリエーション酵素 ( 5 μ M ) と比べて 100 倍過剰に加えられたとき、未処理バイオフィルムと比較して有意差は見られなかった。また、単一酵素触媒バリエーションはバイオフィルムを破壊する能力が損なわれた。

40

【図 11 B】同上。

【 0 0 7 3 】

【図 12】図 12 は、P e l A <sub>47-303</sub> のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( S D S - P A G E ) ゲルを示す。S D S - P A G E ゲルの解析は、タンパク質が > 95 % の純度で、分子量が ~ 28 k D aであることを示し、精製タンパク質の予想分子量と一致する。

【 0 0 7 4 】

50

【図13】図13は、PelA<sub>47-303</sub>のX線結晶構造を示す。コア構造は、薄い灰色のシート及び濃い灰色のヘリックスをもつ<sub>8/7</sub>TIMバレルフォールドである。コア骨格構造内のエキストラループ挿入を薄い灰色で図示した。(A)PelA<sub>47-303</sub>のイラスト表現(cartoon representation)の上面図。(B)2つの主なグループに集まっているエキストラループを示すPelA<sub>47-303</sub>イラスト表現側面図。(C)TIMバレルのコア構造の8つのシート及び7つのヘリックスを詳細に示すトポロジー表現。コア構造内に挿入され、ループ1~ループ4と名前を付けられた4つのループが存在する。薄い灰色の部分は、以下の推定レダクターゼドメインにつながるC末端を示す。N末端及びC末端はどちらの末端でもそれぞれN及びCで示される。

【0075】

【図14】図14は、PelA<sub>47-303</sub>の推定結合クレフトに一行に並んでいる保存された残基を示す。(A)ConSurfサーバー(Ashkenazy et al 2010)によって提示されたPelA<sub>47-303</sub>の保存解析結果。保存バー(bar)が示されている。(B)PelA<sub>47-303</sub>の高度に保存された領域のクローズアップ。高度に保存された酸性残基はタンパク質の推定結合クレフトに1列に並ぶ。空間的な間隔は残基のカルボキシル酸素間で測定され、オングストローム単位で示された。

【0076】

【図15】図15は、PelA<sub>47-303</sub>によるPelバイオフィルム形成の阻害を示す。0.5、1、2、4、8、及び16µMの増加する濃度での精製されたPelA<sub>47-303</sub>及びバリエーション。0.5%(重量/体積)でアラビノースを加えてPel多糖産生を誘導した。各グラフの最初のバーはバッファードを含有し、陽性対照を表わす。結果は各プレートのバッファード対照に対して正規化した。3連の反応を周囲温度で48時間インキュベーションした。エラーバーは平均値の標準誤差を表わす。

【0077】

【図16】図16は、P. protogens Pf-5のPelA<sub>35-291</sub>によるPelバイオフィルムの阻害を示す。野生型P. aeruginosa PAO1 w s p F p s l P<sub>BAD</sub> pel 静置培養におけるP. protogens Pf-5のPelA<sub>35-291</sub>の滴定。P. protogens Pf-5のPelA<sub>35-291</sub>の添加は70nMでバイオフィルム形成を妨げ、EC<sub>50</sub>は69.3±1.2nMであった。P s l G<sub>31-442</sub>はバイオフィルム形成を防止できなかった。この阻害が酵素特異的であることが示される。

【0078】

【図17A】図17は、予め形成されたPelバイオフィルムの分散を示す。(A)P. aeruginosa PAO1のPelA<sub>47-303</sub>の予め形成されたPelバイオフィルムへの添加は2時間後にバイオフィルム分散をもたらし、一方で推定触媒バリエーションは大部分のバイオフィルムを保持した。(B)P. protogens Pf-5の野生型PelA<sub>35-291</sub>の予め形成されたPelバイオフィルムへの滴定は、わずか30分ほどでバイオフィルム分散できた。

【図17B】同上。

【0079】

【図18A】図18は、P s l G<sub>31-442</sub>及びPelA<sub>47-303</sub>をポリスチレンプラスチックに被覆することを通じたバイオフィルム阻害を示す。(A)1×PBSバッファード中40µg/mLのPelA<sub>47-303</sub>又はBSAを用いた4での一晩のポリスチレンプレートの処理。細菌を植え付ける前にウェルを洗った。(B)共焦点顕微鏡法を用いて可視化したところSYTOX Green染色を欠くことから、40µg/mLの吸着P s l G<sub>31-442</sub>でのポリスチレンスライドの処理は細菌細胞付着及びバイオフィルム形成を防いだ。(C)P s l G<sub>31-442</sub>のガラスへの共有結合もまた、バイオフィルム形成を防ぐのに効果的であったが、BSA(陰性対照)はバイオフィルム形成を防ぐことができなかった。(D)可視化してSYTOX Green染色を欠くことから、P s l G<sub>31-442</sub>のガラスへの共有結合は細胞付着及びバイオフィルム形成の防止に少なくとも8日間効果的であった。

10

20

30

40

50

【図 18 B C D】同上。

【0080】

【図 19】図 19 は、B p s B 構築物のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) ゲルを示す。S D S - P A G E ゲルの解析は、各タンパク質が > 95 % の純度で、分子量が B p s B<sub>27-701</sub> については ~ 79 k D a、B p s B<sub>318-670</sub> については ~ 42 k D aであることを示し、各精製タンパク質の予想分子量と一致する。

【0081】

【図 20】図 20 は、B p s B<sub>318-670</sub> の結晶構造を示す。酵素は長さが ~ 41 オングストローム、幅が 11 オングストロームの電子陰性グループをもつ ( / )<sub>8</sub> T I M バレルフォールドである。

10

【0082】

【図 21】図 21 は、P g a B<sub>310-672</sub> のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) ゲルを示す。S D S - P A G E ゲルの解析は、タンパク質が > 95 % の純度で、P g a B<sub>310-672</sub> に関して分子量が ~ 42 k D aであることを示し、精製タンパク質の予想分子量と一致する。

【0083】

【図 22 A】図 22 は、P N A G 依存性バイオフィルムの阻害を示す。( A ) E. coli バイオフィルムの阻害のための、植え付け前に加えられた B p s B<sub>27-701</sub>、B p s B<sub>318-670</sub>、P g a B<sub>22-672</sub>、及び P g a B<sub>310-672</sub> の滴定曲線。( B ) Staphylococcus carnosus バイオフィルム形成の阻害に関する B p s B<sub>318-670</sub> の試験。背景染色はゲンタマイシンで処理した S. carnosus である。

20

【図 22 B】同上。

【0084】

【図 23 A】図 23 は、予め形成された P N A G 依存性バイオフィルムの分散を示す。( A ) 60 分間のインキュベーション後の、前形成された E. coli バイオフィルムに対する、B p s B<sub>27-701</sub>、B p s B<sub>318-670</sub>、P g a B<sub>22-672</sub>、及び P g a B<sub>310-672</sub> の滴定曲線。( B ) B p s B によって媒介される E. coli バイオフィルム分散に関する異なる 96 ウェルプレートの試験。( C ) 他の既知のバイオフィルム分解酵素、P e l A<sub>47-303</sub> 及び P s l G<sub>31-442</sub> と、B p s B によって媒介される E. coli バイオフィルム分散との比較。

30

【図 23 B】同上。

【図 23 C】同上。

【0085】

【図 24】図 24 は、d P N A G に関する還元糖アッセイを示す。B p s B<sub>27-701</sub>、B p s B<sub>318-670</sub>、P g a B<sub>22-672</sub>、及び P g a B<sub>310-672</sub> は、d P N A G を加水分解する。還元糖アッセイを用いて、B p s B<sub>27-701</sub> 及び B p s B<sub>318-670</sub> は、P g a B<sub>22-672</sub> / P g a B<sub>310-672</sub> と比べて ~ 4 倍高い率の d P N A G 加水分解を示す。

【0086】

40

【図 25 A】図 25 は、P e l A<sub>47-303</sub> による G A G 依存性バイオフィルム形成の阻害を示す。( A ) バイオフィルム形成前に、精製 P e l A<sub>47-303</sub> 及びバリエーションを A. fumigatus 培養物に加えた。培養物をブレイン培地中で 20 時間増殖させた。( B ) 精製 P. protogens P e l A<sub>35-291</sub> を同様に加え、やはり G A G 依存性バイオフィルム形成を防ぐことが示された。増殖後に存在する G A G バイオフィルムの量クリスタルバイオレット染色を用いて評価した。

【図 25 B】同上。

【0087】

【図 26】図 26 は、グリコシルヒドロラーゼ P e l A<sub>47-303</sub> 及びその不活性触媒バリエーション E 218 A 並びに S p h<sub>352-298</sub> 及びその不活性変異体 D 166 A で A.

50

fumigatusの精製GAGを処理したときの還元糖アッセイの結果を示す。還元末端の増加は、酵素がGAG多糖のグリコシド結合を加水分解できることを示す。アッセイ条件下で、PelA<sub>47-303</sub>はSph3<sub>52-298</sub>と比べて~2倍多くの還元末端を作ることにつながった。PelAはPelA<sub>47-303</sub>を指し、Sph3はSph3<sub>52-298</sub>を指す。

【0088】

【図27】図27は、PelA<sub>47-303</sub>及びP. protogens PelA<sub>35-291</sub>を用いた予め形成されたGAGバイオフィルムの分散を示す。予め形成されたA. fumigatus GAGバイオフィルムへのPelA<sub>47-303</sub>及びP. protogens PelA<sub>35-291</sub>の外からの添加は、クリスタルバイオレットアッセイを通して見られるように、GAGバイオフィルムの消失をもたらした。比較すると、PelA<sub>47-303</sub>バリエーションD160A及びE218A並びにBSA対照はバイオフィルムを分散させなかった。

10

【0089】

【図28】図28は、RagA<sub>61-317</sub>及びGmPelA<sub>23-277</sub>を用いた予め形成されたGAGバイオフィルムの分散を示す。予め形成されたA. fumigatus GAGバイオフィルムへのRagA<sub>61-317</sub>の添加は、クリスタルバイオレットアッセイを通して見られるように、GAGバイオフィルムの消失をもたらした。推定グリコシルヒドロラーゼPelA<sub>47-303</sub>が陽性対照として用いられ、一方でPelA<sub>47-303</sub>バリエーションE218Aが陰性対照となった。GmPelA<sub>23-277</sub>は、クリスタルバイオレットアッセイを通して見られるように、PelA及びRagAと比べてGAGバイオフィルムをなくすのに効果的ではなかった。

20

【0090】

【図29】図29はPelA<sub>47-303</sub>がA. fumigatus感染症によって引き起こされた傷害から上皮細胞を保護することを示す。野生型PelA<sub>47-303</sub>の外からの添加は、クロム放出アッセイによって測定されるように、A. fumigatusが肺上皮細胞傷害を誘発する能力を16時間にわたって妨げた。一方でPelA<sub>47-303</sub> E218Aは上皮細胞傷害を防がなかった。細胞傷害はクロム放出をもたらし、よって少ない傷害は低い%割合のクロム放出によって視覚化される。

【0091】

【図30】図30は、PelA<sub>47-303</sub>の存在下でのHL60好中球様細胞系の殺菌特性が増強されることを示す。pelオペロンを過剰に発現するP. aeruginosaのバイオフィルムを20時間成長させ、好中球様分化HL60細胞と2時間インキュベーションした。P. aeruginosa殺作用は定量的CFU平板培養によって評価した。PelA<sub>47-303</sub>と好中球の存在は、好中球のみと比べて~2倍の殺菌作用につながった。

30

【0092】

【図31】図31は、PelA<sub>47-303</sub>を熱可逆性ゲルPF-127への封入の結果を示す。1xPBS又は20% PF-127の添加はPel依存性バイオフィルムの分散をもたらさなかったが、3つ異なる濃度でのPelA<sub>47-303</sub>の添加は1時間でバイオフィルムを分散できた。

【0093】

40

【図32】図32は、PelA<sub>47-303</sub>、PslG<sub>31-442</sub>、及びこれらの酵素の併用によるP. aeruginosaの臨床分離株及び環境分離株のバイオフィルム分散の結果を示す。PelA<sub>47-303</sub>とPslG<sub>31-442</sub>の組み合わせは、クリスタルバイオレットアッセイを通して見られるように、バイオフィルムバイオマスの90%の減少をもたらした。クラスI (Class I) 及びクラスII株はそれぞれPel及びPsl産生に依存している。クラスIII株は、マイクロタイターディッシュアッセイにおいてバイオフィルム産生を消失させるのにpelオペロンとpslオペロンの両方の変異が必要であるので、重複した菌体外多糖マトリックス産生株である。そして最後に、クラスIV株は、Pel及びPslの過剰産生を特徴とするバイオフィルムを形成するマトリックス過剰産生株である。

50

【 0 0 9 4 】

【図 3 3】図 3 3 は、*A. fumigatus* の第 3 染色体上の G A G の生合成に必要な遺伝子のダイアグラムを示す。

【 0 0 9 5 】

【図 3 4】図 3 4 は、S p h 3<sub>52-298</sub> 構築物生成を示す。T M H M M サーバーはアミノ酸 20 ~ 42 が膜貫通領域を構成することを示す。残基 52 ~ 298 から成る構築物を用いて可溶性タンパク質を生成させた。

【 0 0 9 6 】

【図 3 5】図 3 5 は、S p h 3<sub>52-298</sub> のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( S D S - P A G E ) ゲルを示す。S D S - P A G E ゲルの解析は、タンパク質が > 95 % の純度で、分子量が ~ 30 k D aであることを示し、精製タンパク質の予想分子量と一致する。

10

【 0 0 9 7 】

【図 3 6】図 3 6 は、S p h 3 を用いた予め形成された G A G バイオフィルムの分散を示す。S p h 3<sub>52-298</sub> の予め形成された *A. fumigatus* G A G バイオフィルムへの添加は、クリスタルバイオレットアッセイを通して見られるように、G A G バイオフィルムの消失をもたらした。推定グリコシルヒドロラーゼ P e l A<sub>47-303</sub> が陽性対照として用いられ、一方で P e l A<sub>47-303</sub> バリアント E 2 1 8 A が陰性対照となった。

【 0 0 9 8 】

【図 3 7】図 3 7 は、異なる *Aspergillus* 種のオーソログ S p h 3<sub>52-298</sub> 及び S p h 3<sub>A C ( 54-304 )</sub> が G A G 依存性バイオフィルムを分散できることを示す。推定触媒残基の変異は酵素によるバイオフィルム破壊を妨げる。S p h 3<sub>A C</sub> は S p h 3<sub>A C ( 54-304 )</sub> を指す。

20

【 0 0 9 9 】

【図 3 8】図 3 8 は、複数の臨床分離株の予め形成されたバイオフィルムに対する組換え S p h 3<sub>52-298</sub> の投与量依存的活性を示す。図に示された *A. fumigatus* 株のバイオフィルムを 24 時間成長させ、次に、図に示された濃度の S p h 3<sub>52-298</sub> とともに 1 時間インキュベーションした。バイオフィルムの破壊は、静かに洗った後の残りのバイオフィルム質量のクリスタルバイオレット染色によって測定した。

【 0 1 0 0 】

30

【図 3 9】図 3 9 は、日和見感染病原真菌 *Trichosporon asahii* が G a l N A c 特異的レクチンによって認識される菌体外多糖を産生することを示し、*T. asahii* の表面の G A G の存在を示している。この菌体外多糖は、0.5 μ M S p h 3<sub>A C ( 54-304 )</sub> での 3 時間の処理によって分解でき、検出可能な表面 G a l N A c の完全な消失をもたらした ( 右上 )。真菌を D R A Q 5 で対比染色した ( 下のパネル )。S p h 3<sub>A C</sub> は S p h 3<sub>A C ( 54-304 )</sub> を指す。

【 0 1 0 1 】

【図 4 0】図 4 0 は、組換えヒドロラーゼが病原菌誘導傷害から気道上皮細胞を保護することを示す。( A ) クロムを入れた ( loaded ) 気道上皮細胞株 A 5 4 9 を、A f 2 9 4 3 分生子及び組換えヒドロラーゼとともにインキュベーションした。図に示された時点で、上清に放出されたクロムを測定した。活性のあるヒドロラーゼの存在は、より少ないクロム放出がより少ない結果をもたらした。一方で、酵素バリエーションは気道細胞を保護できず、対照に等しいクロムを失った。( B ) *P. aeruginosa* による上皮細胞傷害は、S p h 3<sub>A N ( 43-299 )</sub> の存在及び非存在下で乳酸脱水素酵素 ( L D H ) の画分を測定することによって測定した。この結果は、S p h 3<sub>A N ( 43-299 )</sub> が細菌による傷害の防止に効果的であることを示す。

40

【 0 1 0 2 】

【図 4 1 - 1】図 4 1 は、ヒドロラーゼは抗真菌薬との併用で、*A. fumigatus* の代謝活性に対する相乗効果をもつことを示す。さまざまな濃度での、図に示された抗真菌薬及びヒドロラーゼの存在下で、37、5 % C O<sub>2</sub> にて、*A. fumigatus* 分生子を 20 時間生育

50

させ、その代謝活性を X T T アッセイによって測定した。M I C<sub>50</sub> は、薬物に曝さなかった試料の代謝活性の 50 % をもたらす薬物濃度として定義された。S p h 3<sub>A C</sub> は S p h 3<sub>A C</sub> ( 5 4 - 3 0 4 ) を指し、S p h 3<sub>A N</sub> は S p h 3<sub>A N</sub> ( 4 3 - 2 9 9 ) を指し、且つ S p h 3<sub>A F</sub> は S p h 3<sub>5 2 - 2 9 8</sub> を指す。N D : 未決定

【図 4 1 - 2】同上。

【図 4 1 - 3】同上。

【0 1 0 3】

【図 4 2】図 4 2 は、グリコシルヒドロラーゼ P s l G<sub>3 1 - 4 4 2</sub> 及び P e l A<sub>4 7 - 3 0 3</sub> は、100 μg / mL の最終濃度で投与された抗生物質コリスチンの薬効を高めることができることを示す。L B 寒天プレートでは増殖が観察されず ( N G )、グリコシルヒドロラーゼの存在下では、コリスチンは酵素の不在下と比べて > 100 倍強い細菌殺作用をもたらしたことを示した。

10

【0 1 0 4】

【図 4 3】図 4 3 は、S p h 3<sub>A C</sub> ( 5 4 - 3 0 4 ) による A. fumigatus を被覆する G A G 菌体外多糖の分解が、真菌細胞に浸透する能力を増強することを通して抗真菌剤の活性を増加することを示す。S p h 3<sub>A C</sub> は S p h 3<sub>A C</sub> ( 5 4 - 3 0 4 ) を指す。

【0 1 0 5】

【図 4 4 - 1】図 4 4 は、バイオインフォマティクス解析を通して同定された G A G 生合成クラスターを含有する真菌のクラスの分類学的関係を示す。

【図 4 4 - 2】同上。

20

【0 1 0 6】

【図 4 5】図 4 5 は、G a l N A c 特異的レクチンでの Botrytis cinerea の染色が B. cinerea の表面の G A G の存在を検出することを示す。組換え A. clavatus S p h 3<sub>A C</sub> ( 5 4 - 3 0 4 ) での B. cinerea の菌系の処理は、この菌体外多糖の完全消失をもたらした。S p h 3<sub>A C</sub> ( 5 4 - 3 0 4 ) が菌系の表面の G A G を分解できることを示している。S p h 3<sub>A C</sub> は S p h 3<sub>A C</sub> ( 5 4 - 3 0 4 ) を指す。

【0 1 0 7】

【図 4 6】図 4 6 は、E g a 3<sub>4 6 - 3 1 8</sub> のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動された ( S D S - P A G E ) ゲルを示す。グリコシル化に起因して E g a 3<sub>4 6 - 3 1 8</sub> の見かけの質量が大きいか否かを決定するために、タンパク質の試料をエンドグリコシダーゼ H ( E n d o H ) で処理した。E n d o H で処理した E g a 3<sub>4 6 - 3 1 8</sub> は、31 k D a で非グリコシル化タンパク質の予想質量に近いバンドを生じた。

30

【0 1 0 8】

【図 4 7】図 4 7 は、E g a 3<sub>4 6 - 3 1 8</sub> が A. fumigatus バイオフィルムを阻害し、分散させる能力を示す。( A ) E g a 3<sub>4 6 - 3 1 8</sub> の存在は、マイクロタイターディッシュにおいてバイオフィルム形成を妨げ、且つバイオフィルムの破壊を可能にした。( B ) 未処理の菌系は G a l N A c 特異的蛍光レクチン S B A - F I T C での広範囲の染色を示す一方で、0.5 μM E g a 3<sub>4 6 - 3 1 8</sub> での菌系の 3 時間の処理は表面の検出可能な G a l N A c の完全な消失をもたらした。

【発明を実施するための形態】

40

【0 1 0 9】

本発明の発明者は、菌体外多糖：P s l、P e l、ポリ - ( 1 , 6 ) - N - アセチル - D - グルコサミン ( P N A G )、及びガラクトサミノガラクトン ( G A G ) の生合成に関与する推定ヒドロラーゼを外からの加えることを利用して、バイオフィルム形成にこれらの糖ポリマーを用いる微生物バイオフィルムを阻害し、且つ分散させうることを示した。

【0 1 1 0】

## 定義

別途定義されない限り、本明細書で用いられる専門用語及び科学用語はすべて、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味をもつ。以下の定義は当該技術分野での用語を補足し、本開示を対象にするもので、いかなる関連事例又は

50

非関連事例に帰属すべきではない。一般に、本明細書に記載されている、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質及び核酸化学、並びにハイブリダイゼーションに関して使用される術語体系、並びに分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質及び核酸化学、並びにハイブリダイゼーションの技術は、当該技術分野において周知で、よく使用されているものである。本開示で採用される方法及び技術は全体として、当該技術分野において公知の常法に従って、例えば、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)及びAusubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)などの一般的な参考文献に記載のように実施された。本明細書に記載のものに類似又は同等のいずれの方法及び材料が本発明の実行に使用できるが、特定の材料及び方法が本明細書に記載されている。

10

【0111】

本明細書及び添付の請求項で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈から明らかにそうでないことが示されていない限り、複数のものを包含する。

【0112】

本明細書で使用される場合、「含むこと (comprising)」（並びに「含む (comprise)」及び「含む (comprises)」などの含むこと (comprising) のいずれの形)、「有すこと (having)」（並びに「有する (have)」及び「有する (has)」などの有すこと (having) のいずれの形)、「含むこと (including)」（並びに「含む (includes)」及び「含む (include)」などの含むこと (including) のいずれの形)又は「含有すること (containing)」（並びに「含有する (contains)」及び「含有する (contain)」などの含有すること (containing) のいずれの) という語は、包括的又は非限定的 (inclusive or open-ended) であり、記載されていないさらなる構成要素又は方法工程を除外しない。

20

【0113】

「投与すること」という用語は、薬剤 (例えば、治療薬) を動物又は植物に効果的な経路によって供給する又は与えることを意味する。

【0114】

本明細書で使用される場合、「バイオフィルム」という用語は、生物的又は非生物的表面に形成される微生物株/種の組成物又はマトリックスを指す。これらの微生物は、一般にタンパク質、核酸、及び菌体外多糖を主要構成成分として含むマトリックスに封入されている。

30

【0115】

本明細書で使用される場合、「バイオフィルム関連感染症」という句は、限定されないが、皮膚の上皮細胞、眼、及び肺及び呼吸器系などの器官、並びに植物の表面及び組織を含む生物的表面のバイオフィルムの形成に関連する感染症を指す。

【0116】

本明細書で使用される場合、「肺感染症」という用語は、呼吸器感染症又は呼吸器疾患を指し、免疫機能の低下した宿主の急性疾患である侵襲性アスペルギルス症又は肺機能が低下した免疫機能正常の人に起こる慢性アスペルギルス感染症が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0117】

本明細書で使用される場合、「慢性肺疾患」という用語は、呼吸器感染症又は呼吸器疾患を指し、嚢胞性線維症及び肺炎が挙げられるが、これらに限定されない。

【0118】

本明細書で使用される場合、「菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる」という用語は、微生物による菌体外多糖の産生に関与するタンパク質をコードする微生物オペロン又は機能遺伝子クラスターの核酸配列を指す。

【0119】

本明細書で使用される場合、「グリコシルヒドロラーゼドメイン」又は「GHドメイン」という用語は、既知のグリコシルヒドロラーゼファミリーメンバーと比較することによ

50

って同定されうる、推定グリコシルヒドロラーゼをコードするタンパク質ドメインを指す。グリコシルヒドロラーゼ酵素はグリコシド結合を加水分解できる。

#### 【 0 1 2 0 】

「単離された」という用語は、組み換え DNA 技術で作られた場合は、細胞物質又は培養培地、又は化学的に合成された場合は化学的前駆体となる化学物質若しくは他の化学物質を実質的に含まない核酸又はタンパク質を指す。

#### 【 0 1 2 1 】

本明細書で使用される場合、「P s l」という用語は、D - マンノース、D - グルコース、及び L - ラムノースの五糖類反復ユニットから成る菌体外多糖を指し、他の既知の多糖と異なる（図 2）。

10

#### 【 0 1 2 2 】

本明細書で使用される場合、「p s l G」という用語は、P s l の生合成のために必要なタンパク質をコードする p s l オペロンの 7 番目のオープンリーディングフレームを指す。p s l オペロンは幾つかの *Pseudomonas* 種で見出されている。本明細書で使用される場合、「P s l G」という用語は、文脈で明らかなように、コードされているタンパク質を指す。

#### 【 0 1 2 3 】

本明細書で使用される場合、「P e l」という用語は、気液界面に形成するバイオフィルムの主要構成成分の 1 つである菌体外多糖を指し、ペリクルと呼ばれる。

#### 【 0 1 2 4 】

20

本明細書で使用される場合、「p e l A」という用語は、P e l の生合成のために必要なタンパク質をコードする p e l オペロンの 1 番目のオープンリーディングフレームを指す。p e l オペロンは多くの *Pseudomonas* 種で見出されている。p e l A オソログとしては、*Ralstonia solanacearum* の r a g A 及び *Geobacter metallireducens* の p e l A が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「P e l A」又は「R a g A」という用語は、文脈で明らかなように、コードされているタンパク質を指す。

#### 【 0 1 2 5 】

本明細書で使用される場合、「P N A G」という用語は、キチンと同様、N - アセチル - D - グルコサミンユニットを反復するホモポリマーを指すが、P N A G は ( 1 , 6 ) 結合で合成される。部分的に脱アセチル化された形は d P N A G と呼ばれる。

30

#### 【 0 1 2 6 】

本明細書で使用される場合、「b p s B」という用語は、P N A G 生合成のために必要なタンパク質をコードする b p s オペロンの 2 番目のオープンリーディングフレームを指す。b p s オペロンは *Bordetella* 種で見出されている。本明細書で使用される場合、「B p s B」という用語は、文脈で明らかなように、コードされているタンパク質を指す。

#### 【 0 1 2 7 】

本明細書で使用される場合、「p g a B」という用語は、P N A G 生合成のために必要なタンパク質をコードする p g a オペロンの 2 番目のオープンリーディングフレームを指す。p g a オペロンは *E. coli* 及び多くのグラム陰性種で見出され、h m s オペロンと注釈を付けられることがある。本明細書で使用される場合、「P g a B」という用語は、文脈で明らかなように、コードされているタンパク質を指す。

40

#### 【 0 1 2 8 】

本明細書で使用される場合、「G A G」という用語は、1 - 4 結合ガラクトース及び 1 - 4 結合の部分的脱アセチル化 N - アセチルガラクトサミンから成る混成直鎖細胞外ポリマーを指す。

#### 【 0 1 2 9 】

本明細書で使用される場合、「s p h 3」という用語は、*A. fumigatus* A f 2 9 3 の第 3 染色体上の機能遺伝子クラスターにあるエクソン染色体配座 ( coordinate ) 1 , 9 9 9 , 8 7 1 ~ 1 , 9 9 9 , 6 5 4 及び 1 , 9 9 9 , 5 4 1 ~ 1 , 9 9 9 , 1 8 4 及び 1 , 9 9 8 , 9 9 1 ~ 1 , 9 9 8 , 6 7 1 をもつエクソンコード配列を指し、推定グリコシル

50

ヒドロラーゼをコードする。s p h 3 オソログとしては、Aspergillus clavatusの s p h 3<sub>A C</sub> 及びAspergillus nidulansの s p h 3<sub>A N</sub> が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「S p h 3」、「S p h 3<sub>A C</sub>」、又は「S p h 3<sub>A N</sub>」という用語は、文脈で明らかなように、それぞれコードされているタンパク質を指す。

【0130】

本明細書で使用される場合、「e g a 3」という用語は、A. fumigatus A f 2 9 3 の第3染色体上の機能遺伝子クラスターに位置するエクソン染色体配座1, 9 9 5, 8 4 3 ~ 1, 9 9 6, 7 9 9をもつエクソンコード配列を指し、推定グリコシルヒドロラーゼをコードする。本明細書で使用される場合、「E g a 3」という用語は、文脈で明らかなように、それぞれコードされているタンパク質を指す。

10

【0131】

本明細書で使用される場合、「可溶性タンパク質」という用語は、シグナル配列又は膜貫通領域を欠くタンパク質を指し、細胞内でヌクレオチド配列から発現された場合、膜又は他の不溶性構成成分に結合しない。

【0132】

本明細書で使用される場合、「抗菌剤」という用語は、微生物を死滅させる、又はその増殖を阻害するいずれの物質を指す。これらの抗菌剤としては、抗生物質、抗微生物ペプチド、化学療法剤、抗真菌剤、殺真菌剤、限定されないが、アルコール、アルデヒド、及び銀などの化学消毒剤、抗微生物ペプチド、塩化ベンザルコニウム(B A C)、塩化セチルピリジニウム(C P C)、及びクロルヘキシジン(C H X)などの殺生物剤、又は抗微生物活性を示すいずれの天然若しくは組換え薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0133】

「被覆」という用語は、当該技術分野で実際に行われている、タンパク質吸収及び化学架橋結合を通して非特異的に、又は組換え若しくは化学的手段、例えば限定されないが、シュタウディングーライゲーション反応、「クリック」ケミストリー、発現タンパク質ライゲーション、化学的酵素的方法を通して特異的に、又は表面修飾を通して可溶性タンパク質を固体非生物的支持体に固定化することを指す。

【0134】

本明細書で使用される場合、「バイオフィルムの影響を受けやすい表面」という句は、細菌コロニー形成、成長、及びバイオフィルム形成の傾向があるいずれの生物学的又は非生物的表面を指す。

30

【0135】

「生物付着」という用語は、バイオフィルムの使用を通じた非生物的表面の微生物の付着及び蓄積を指す。

【0136】

動物に投与するという文脈での「投与すること」という用語は、当業者に公知のように、例えば、バイオフィルムの軽減又は防止に使用するために、薬剤を動物に投与するいずれの従来の経路として定義される。この例としては、非経口(すなわち、皮下、皮内、筋肉内など)を経る投与、粘膜表面経路を経る投与、又はエアロゾル適用を通じた、例えば、動物の気道に投与するためのネブライザーの使用を通じた投与が挙げられうる。その他の実施形態では、これは動物への経口投与を含みうる。薬剤の投与量は、動物の健康状態、年齢、体重、及び性別などの要因に応じてさまざまである。用法(dosage regime)は至適投与量を提供するよう調整されうる。用法は過度な実験なしに決定及び/又は最適化できることを当業者なら理解するであろう。

40

【0137】

植物の文脈での「投与すること」という用語は、植物の表面に噴霧することによって塗布することとして定義される。また、分泌可能な機能的グリコシルヒドロラーゼを産生する能力を植物がもつように、グリコシルヒドロラーゼをコードする遺伝子をゲノム又は植物中のプラスミドに挿入することも含みうる。

50

## 【0138】

バイオフィーム形成などの活性を「阻害する」又は「抑制する」又は「低下させる」又は「減少させる」ことは、対象となる条件若しくはパラメーターを除いてそれ以外は同じ条件と比較して、又は代替的に別の条件若しくは対照と比較して機能又は活性を減少させることである。

## 【0139】

バイオフィームなどを「分散させる」ことは、バイオフィームの一部であるか、又はバイオフィームに関連するバイオマス由来資源及びそのマトリックス構成成分を、別の条件又は対照と比較して減少、放出、又は分解させることである。

## 【0140】

本明細書で使用される場合、「動物」という用語は、哺乳類、好適にはヒトを含む動物界のメンバーすべてを含む。

## 【0141】

本明細書で使用される場合、「植物」という用語は、顕花植物及び球根形成植物などの、植物界のメンバーすべてを含み、全草及び、植物病原菌のバイオフィームの形成の影響を受けやすい果実などの植物部位を含む。

## 【0142】

本明細書で使用される場合、「治療又は治療すること」という用語は、有益な又は所望の結果、例えば、臨床成果を得るアプローチを意味する。有益な又は所望の臨床成果としては、検出可能であるか検出不能であるかに関わらず、1つ以上の症状又は病態の緩和又は改善、疾患の程度の軽減、疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患の拡大の防止、疾患進行の遅延若しくは緩徐化又は疾患状態の緩和、及び（部分的又は完全な）寛解が挙げられることができるが、これらに限定されない。

## 【0143】

本明細書で使用される場合、「バイオフィーム関連感染症を治療する」という用語は、本明細書において、バイオフィームに浸透すること又はバイオフィームを分散させてバイオフィームバイオマスが減少するか又は損なわれることによって、微生物が免疫系による又は抗微生物剤などの性質が化学的若しくは生物学的な外因性薬剤による攻撃に曝され、脆弱になることを指す。

## 【0144】

本開示の組成物の「治療有効量」、「有効量」、又は「十分量」という用語は、例えばヒトなどの哺乳類を含む動物又は植物に投与されたとき、臨床的な結果を含む有益又は所望の結果をもたらすのに十分な量であり、したがって、「有効量」又はそれに対する類語は、それが適用されている文脈に依存する。例えば、バイオフィーム形成を阻害する又はバイオフィームを分散させるという文脈では、該薬剤を投与することなく得られる反応と比較して、そのような阻害又は分散が達成されるのに十分な薬剤の量である。そのような量に相当することになる所与の薬剤の量は、所与の薬剤、製薬処方、投与経路、病態、疾患、又は障害の種類、治療される動物/植物又は宿主の固有の性質などのさまざまな要因に依存して異なることになるが、それでも当業者によって慣用的に決定できる。本明細書で定義される場合、薬剤の治療有効量は当該技術分野において公知の常法で当業者によって容易に決定されうる。

## 【0145】

そのうえ、薬剤の治療有効量での「治療」又は「防止」レジームは単一投与から構成されてもよく、又は代替的に一連の適用を含んでもよい。例えば、薬剤は少なくとも週に1回投与されうる。しかし、別の実施形態では、薬剤は所与の治療のために週に約1回から1日に約1回以上投与されうる。治療期間の長さは、疾患の重症度、動物又は植物の年齢、薬剤の濃度及び活性、又はそれら組み合わせなどのさまざまな要因に依存する。また、治療又は予防に使用される薬剤の有効投与量は特定の治療または予防レジームの間に増加又は減少しうるということが理解されるであろう。投与量の変化が結果的に起こり、当技術分野において公知である標準的な診断検査によって明らかになりうる。場合によっては、長期

10

20

30

40

50

投与を要することがある。

【0146】

本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、天然塩基、糖、及び糖間（主鎖）結合から成るヌクレオチド又はヌクレオシド単量体の配列を指し、一本鎖及び二本鎖分子、RNA、並びにDNAを含む。また該用語は、「ペプチド核酸」など、同様に機能する非天然単量体又はその部分を含む改変又は置換オリゴマーを包含し、本明細書では「化学的アナログ」及び／又は「オリゴヌクレオチドアナログ」と呼ばれる。そのような改変又は置換核酸は、ヌクレアーゼの存在下で増強された細胞取込み又は高い安定性などの特性をもつので、天然の形のものより好ましいことがある。また該用語は、2つ以上の化学的に異なる領域を含有するキメラ核酸を包含する。例えば、キメラ核酸は、有益な特性（例えば、増加したヌクレアーゼ耐性、細胞への増加した取込み）を与える修飾ヌクレオチドの少なくとも1つの領域を含有してもよく、又は本開示の2つ以上の核酸は連結してキメラ核酸を形成してもよい。

10

【0147】

本明細書で使用される場合、「単離核酸分子」という用語は、組み換えDNA技術で作られた場合は、細胞物質又は培養培地、又は化学的に合成された場合は化学的前駆体となる化学物質若しくは他の化学物質を実質的に含まない核酸を指す。また単離核酸分子は、核酸が由来する核酸（すなわち、核酸の5'及び3'末端に位置する配列）に本来隣接する配列を実質的に含まない。「核酸」という用語は、DNA及びRNAを含むことが意図され、二本鎖又は一本鎖のいずれかであることができ、センス鎖又はアンチセンス鎖を表わす。

20

【0148】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」という用語は、実質的に同じように実質的に同じ機能を果たす、本明細書で開示されている核酸又はアミノ酸配列の変形、置換、付加、誘導体、アナログ、断片、又は化学的等価物を含む。

【0149】

本明細書で使用される場合、「そのグリコシルヒドロラーゼバリエーション」という用語は、対象となるアミノ酸配列に対して少なくとも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%配列同一性をもち、微生物バイオフィルムを阻害するか、又は分散させるように機能するアミノ酸配列を意味する。幾つかの実施形態では、ある特定の触媒残基が維持され、その一方で他の残基が変更される。特に触媒機能に関係する残基としては、実施例に開示される残基が挙げられる。

30

【0150】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」又は「ポリペプチド」という用語は、核酸分子によってコードされるアミノ酸残基の配列を指す。本開示の文脈内で、本開示のポリペプチドは、1つの実施形態では、一次タンパク質のさまざまな構造形態を含みうる。例えば、本開示のポリペプチドは、酸性若しくは塩基性塩の形態又は中性の形態で存在してよい。くわえて、個々のアミノ酸残基は酸化又は還元によって改変されてもよい。

【0151】

また、本開示のタンパク質及びポリペプチドは、微生物バイオフィルムを阻害する、且つ／又は分散させる能力並びに／又はバイオフィルム形成を防止する能力など、本開示のタンパク質又はポリペプチドと実質的に同じ機能をもつ、本明細書に記載されているタンパク質及びポリペプチドの短縮化、アナログ、ホモログ、及びオーソログを含みうる。

40

【0152】

本明細書に記載されているタンパク質のアナログとしては、1つ以上のアミノ酸置換、挿入、及び／又は欠失を含むアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。アミノ酸置換は保存的又は非保存的な性質をもちうる。保存的アミノ酸置換は、同様の電荷、サイズ、及び／又は疎水性特徴のアミノ酸をもつ本開示のタンパク質の1つ以上のアミノ酸を置換することを含む。保存的置換のみがなされた場合、結果として生じるアナログは

50

機能的に等価物でなければならない。非保存的置換は、異なる電荷、サイズ、及び／又は疎水性特徴をもつ1つ以上のアミノ酸を含むアミノ酸配列1つ以上のアミノ酸を置換することを含む。

#### 【0153】

保存的置換は、例えば、米国特許第5,264,558号などの特許文献に記載されている。例えば、非極性脂肪族中性アミノ酸、グリシン、アラニン、プロリン、バリン、及びイソロイシンの間で置換が可能であろうことが予想される。同様に、極性脂肪族中性アミノ酸、セリン、トレオニン、メチオニン、アスパラギン、及びグルタミンの間に置換がなされる可能性がありうる。荷電した塩基性アミノ酸、リジン及びアルギニンの間の置換がなされうるように、荷電した酸性アミノ酸、アスパラギン酸及びグルタミン酸の間の置換が恐らくなされうる。フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン、及びチロシン芳香族アミノ酸の間の置換も恐らく可能であろう。他の置換も可能であろう。

10

#### 【0154】

本明細書で使用される場合、「配列同一性」という用語は、2つポリペプチド配列又は2つの核酸配列の間の配列同一性の%割合を指す。2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するためには、配列は最適に比較する目的でアラインメントされる（例えば、第二のアミノ酸又は核酸配列とのアラインメントを最適にするために、ギャップを第一のアミノ酸の配列又は核酸配列に導入できる）。次に、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第一の配列での位置が、第二の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占められる場合、分子はその位置で同一である。2つの配列の間の同一性パーセントは、配列に共通の同一位置の数の関数である（すなわち、 $\% \text{同一性} = \text{同一重複位置の数} / \text{位置の総数} \times 100\%$ ）。1つの実施形態では、2つの配列は同じ長さである。また、2つの配列の間の同一性パーセントの決定は数学的アルゴリズムを用いて遂行できる。2つの配列の比較のために利用された数学的アルゴリズムの随意で非限定的な例は、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877にあるように改変された、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTヌクレオチドプログラムパラメーターセット、例えば、スコア = 100、文字長 (wordlength) = 12で行って、本開示の核酸分子に相同性のあるヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラムパラメーターセット、例えば、スコア = 50、文字長 = 3で行って、本開示のタンパク質分子に相同性のあるアミノ酸配列を得ることができる。比較する目的のためにギャップを含むアラインメントを得るには、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるように利用できる。代替的に、PSI-BLASTが使用されて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実行できる（同著者）。BLAST、Gapped BLAST、及びPSI-BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムの（例えば、XBLAST及びNBLASTの）初期パラメーターが使用できる（例えば、NCBIウェブサイトを参照されたい）。配列の比較のための利用される数学的アルゴリズムの別の随意で非限定的な例は、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み付き残基表 (weight residue table)、ギャップ長ペナルティ (gap length penalty) 12、及びギャップ長ペナルティ (gap penalty) 4が用いられることができる。2つの配列の間の同一性パーセントは、ギャップを許容するか又は許容せずに、上記のものと同様のテクニックを用いて決定できる。同一性パーセントを計算するにあたっては、典型的には完全位一致のみがカウントされる。

20

30

40

#### 【0155】

50

【 0 1 5 6 】

【 0 1 5 7 】

1つの態様では、本開示は、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質を投与することを含むバイオフィルム関連感染症を治療又は予防する方法を提供する。また本明細書で提供されるのは、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防するための、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質の使用である。さらに提供されるのは、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防するための薬剤の製造における、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質の使用である。さらに一層提供されるのは、バイオフィルム関連感染症の治療又は予防で用いる、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質である。

また本開示は、少なくとも１つの：（i）P s l G グリコシルヒドロラーゼ（G H）ドメインを含む可溶性タンパク質、（i i）P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、（i i i）B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、（i v）P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、（v）S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び（v i）E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログを、それらを必要としている動物又は植物に投与することを含むバイオフィルム関連感染症を治療又は予防する方法を提供する。

また提供されるのは、それらを必要としている動物又は植物における、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防するための、少なくとも1つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログの使用である。さらに提供されるのは、それらを必要としている動物又は植物における、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防するための薬剤を調製する際の、少なくとも1つの：( i ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログの使用である。さらに一層提供されるのは、それらを必要としている動物又は植物における、バイオフィルム関連感染症の治療又は予防で用いる、少なくとも1つの：( i ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、

溶性タンパク質、又はそのオーソログである。

【0160】

ある実施形態では、少なくとも2つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが投与又は使用されうる。

【0161】

別の実施形態では、少なくとも3つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが投与又は使用されうる。

10

【0162】

さらに別の実施形態では、少なくとも4つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが投与又は使用されうる。

20

【0163】

さらなる実施形態では、少なくとも5つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが投与又は使用されうる。

【0164】

さらに別の実施形態では、( i ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが投与又は使用されうる。

30

【0165】

1つの実施形態では、P s l G G H ドメインを含む可溶性タンパク質及びP e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログが投与又は使用されうる。

40

【0166】

別の実施形態では、P s l G G H ドメインを含む可溶性タンパク質並びにB p s B 及び/若しくはP g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログが投与又は使用されうる。

【0167】

さらに別の実施形態では、P s l G G H ドメインを含む可溶性タンパク質及びS p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが投与又は使用されうる。

【0168】

さらなる実施形態では、P s l G G H ドメインを含む可溶性タンパク質及びE g a 3

50

G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが投与又は使用されうる。

【0169】

1つの実施形態では、P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質又はそのオーソログ並びにB p s B及び/若しくはP g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログが投与又は使用されうる。

【0170】

さらに別の実施形態では、P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質又はそのオーソログ及びS p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質又はそのオーソログが投与又は使用されうる。

【0171】

さらなる実施形態では、P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質又はそのオーソログ及びE g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質又はそのオーソログが投与又は使用されうる。

【0172】

1つの実施形態では、B p s B及び/若しくはP g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質並びにS p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログが投与又は使用されうる。

【0173】

別の実施形態では、B p s B及び/若しくはP g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質並びにE g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログが投与又は使用されうる。

【0174】

バイオフィーム関連感染症は、体表面又は医療インプラント又は生物義装具上にバイオフィームの層を形成している体内のいずれの微生物感染症でありうる。1つの実施形態では、バイオフィーム関連感染症は、創傷、熱傷後感染、又は角膜炎の結果でありうる。別の実施形態では、バイオフィーム関連感染症は肺感染症でありうる。そこにおいては動物は慢性肺疾患をもつ。別の実施形態では、バイオフィーム関連感染症は肺感染症でありうる。そこにおいては動物は侵襲性アスペルギルス症をもつ。別の実施形態では、バイオフィーム関連感染症は慢性肺疾患に由来しうる。

【0175】

ある実施形態では、グリコシルヒドロラーゼを含む少なくとも1つの可溶性タンパク質は好中球の微生物殺作用を強化する。特定の実施形態では、可溶性タンパク質は本明細書で開示されるP e l Aタンパク質である。

【0176】

別の実施形態では、植物又は植物部位の表面又は内部にバイオフィームの層を形成している体内のいずれの微生物感染症でありうる。

【0177】

ある実施形態では、バイオフィーム関連感染症は、いずれのP e l依存性、P s l依存性、P N A G依存性、又はG A G依存性バイオフィームによって引き起こされうる。1つの実施形態では、バイオフィーム関連感染症は、菌体外多糖、P e l、P s l、P N A G髄腔内及び/若しくはG A G並びにそれらの組み合わせを合成する遺伝的能力をもついずれの微生物によって引き起こされうる。それらの生物としては、P. aeruginosa、S. aureus、E. coli、S. epidermidis、Y. pestis、B. pertussis、Burkholderia spp.、Candida spp.、Aspergillus spp.、Acinetobacter spp.、Trichosporon asahii、Saccharata proteae、Zopfia rhizophila、Phaeosphaeria nodorum、Setosphaeria turcica、Botrytis cinerea、Cryphonectria parasitica、Melanconium sp.、Verticillium dahlia、Nectria haematococca、Neurospora crassa、Leptosphaeria maculans、Pleomassaria siparia、Cochliobolus heterostrophus、Pyrenophora tritici-repentis、Blumeria graminis、Marssonina brunnea、Sclerotinia sclerotiorum、Taphrina deformans、Cercospora zeae-maydis、及びFusarium spp.が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、バ

10

20

30

40

50

イオフィルムは、本明細書で開示される可溶性グリコシルヒドロラーゼによって分解できるいずれの菌体外多糖の分泌に依存しうる。

【0178】

本明細書で開示される可溶性タンパク質はバイオフィルムの分散又は分解をもたらし、他の抗菌薬が微生物感染症にアクセスし、且つ微生物感染症を治療する機会を提供する。したがって、別の実施形態では、バイオフィルム関連感染症を治療又は予防するための方法及び使用は、抗真菌剤又は抗細菌剤などの抗菌薬をそれらを必要としている動物又は植物に併用投与することをさらに含む。1つの実施形態では、抗菌薬は抗生物質である。

【0179】

微生物感染症を治療するのに有用な他の薬剤と併用して使用された場合、本明細書で開示される薬剤は好適にそれらの他の薬剤と同時に投与される。本明細書で使用される場合、2つの物質の個々の動物又は植物への「同時投与」又は「併用投与」とは、2つの物質がともに個体中で同時に生体活性があるようにそれらの各々を与えることを意味する。投与の正確な詳細は、2つの物質の互いの存在下での薬物動態学に依存することになり、2つの物質を互いに数時間以内に投与すること又は互いの投与の24時間以内に1つの物質を投与することでさえ包含できる。好適な用法の設計は当業者にとって通常の日常的なことである。特定の実施形態では、2つの物質は実質的に同時に、すなわち、互いに数分以内に、又は両物質を含む単一組成物で投与されることになる。

【0180】

ある実施形態では、少なくとも1つの可溶性タンパク質はベクターによって発現され、ベクターはそれらを必要としている動物又は植物に投与される。

【0181】

1つの実施形態では、ベクターはバイオフィルムの細菌に入り込むことができる溶菌ファージである。

【0182】

1つの実施形態では、ベクターは真菌バイオフィルムに入り込むことができるマイコウイルスである。

【0183】

ある実施形態では、本明細書で開示される方法又は使用は、アルギン酸塩及び/又はセルロースなどのバイオフィルムの他の構成成分を分解する他の可溶性タンパク質を投与することをさらに含む。

【0184】

さらに別の態様では、留置医療装置又はインプラントにおけるバイオフィルム形成を防止する方法であって、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質で該装置を被覆することを含む方法が提供される。

【0185】

ある実施形態では、留置医療装置又はインプラントにおけるバイオフィルム形成を防止する方法であって、少なくとも1つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質 ( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び ( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログで、それらを必要としている動物に使用する前に、該装置を被覆することを含む方法が提供される。上記の可溶性タンパク質の特定の組み合わせが装置又はインプラントに被覆されてもよい。

【0186】

ある実施形態では、少なくとも2つの：( i ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タン

10

20

30

40

50

パク質、( i i i ) B p s B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが装置又はインプラントに被覆されう。

【 0 1 8 7 】

別の実施形態では、少なくとも3つの：( i ) P s l Gグリコシルヒドロラーゼ( G H )ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが装置又はインプラントに被覆されう。

10

【 0 1 8 8 】

さらに別の実施形態では、少なくとも4つの：( i ) P s l Gグリコシルヒドロラーゼ( G H )ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが装置又はインプラントに被覆されう。

【 0 1 8 9 】

さらなる実施形態では、少なくとも5つの：( i ) P s l Gグリコシルヒドロラーゼ( G H )ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが装置又はインプラントに被覆されう。

20

【 0 1 9 0 】

さらに別の実施形態では、( i ) P s l Gグリコシルヒドロラーゼ( G H )ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G Hドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G Hドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが装置又はインプラントに被覆されう。

30

【 0 1 9 1 】

別の実施形態では、装置又はインプラントは、アルギン酸塩及び/又はセルロースなどのバイオフィルムの他の構成成分を分解する他の可溶性タンパク質でさらに被覆される。

【 0 1 9 2 】

留置医療装置又はインプラントは、動物の体内に挿入され、その表面がバイオフィルム形成の影響を受けやすいことになるいずれの装置又はインプラントでありうる。ある実施形態では、留置医療装置又はインプラントは、カテーテル、静脈内チューブ、人工関節、又は生物義装具でありうる。

40

【 0 1 9 3 】

ある実施形態では、バイオフィルムはいずれのP e l依存性、P s l依存性、P N A G依存性、及び/若しくはG A G依存性バイオフィルム、又はいずれのそれらの組み合わせによって引き起こされう。1つの実施形態では、バイオフィルムは、菌体外多糖、P e l、P s l、P N A G、及び/若しくはG A G並びにそれらの組み合わせを合成する遺伝的能力をもついずれの微生物又は微生物の群によって引き起こされう。それらの生物としては、P. aeruginosa、S. aureus、E. coli、S. epidermidis、Y. pestis、B. pertussis、Burkholderia spp.、Candida spp.、Aspergillus spp.、Acinetobacter spp.、及びFusarium spp.が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、バイオフィルムは、本明細書で開示される可溶性グリコシルヒドロラーゼによって分解できるいずれの

50

菌体外多糖の分泌に依存しうる。

【0194】

さらに別の実施形態では、明細書において開示される方法は、留置医療装置又はインプラントに抗菌剤を被覆することをさらに含む。1つの実施形態では、抗菌剤は抗生物質である。別の実施形態では、抗菌剤は抗真菌薬である。

【0195】

さらに別の態様では、非医療用表面のバイオフィーム形成を処理又は防止する方法であって、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質で該表面を被覆又は塗布することを含む方法が提供される。

10

【0196】

また本明細書で提供されるのは、バイオフィーム形成の影響を受けやすい非医療用表面のバイオフィーム形成を処理又は防止する方法であって、少なくとも1つの：(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログで、それらを必要としている動物に使用する前に、該表面を被覆又は塗布することを含む方法である。上記の可溶性タンパク質の特定の組み合わせが非医療用表面に塗布又は被覆されてもよい。

20

【0197】

ある実施形態では、少なくとも2つの：( i ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが非医療用表面に塗布又は被覆されうる。

【0198】

別の実施形態では、少なくとも3つの：( i ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが非医療用表面に塗布又は被覆されうる。

30

【0199】

さらに別の実施形態では、少なくとも4つの：( i ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが非医療用表面に塗布又は被覆されうる。

40

【0200】

さらなる実施形態では、少なくとも5つの：( i ) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログが非医療用表面に塗布又は被覆されうる。

【0201】

50

さらに別の実施形態では、(i) P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( i v ) E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログが非医療用表面に塗布又は被覆されうる。

#### 【 0 2 0 2 】

別の実施形態では、非医療用表面は、アルギン酸塩及び/又はセルロースなどのバイオフィルムの他の構成成分を分解する他の可溶性タンパク質でさらに被覆される。

#### 【 0 2 0 3 】

非医療用表面を被覆する上記の方法は、生物付着を防止又は破壊するのに使用されうる。そのような非生物的表面としては、蛇口、排水溝、パイプ、水濾過関連装置、及び動物界のメンバー例えば哺乳類、好適にはヒトによる消費のための食品の製造、調製、及び提供に関連する食品接触表面が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 2 0 4 】

ある実施形態では、バイオフィルムは、バイオフィルム、限定されないが、*P. aeruginosa*、*S. aureus*、*E. coli*、*S. epidermidis*、*Y. pestis*、*B. pertussis*、*Burkholderia* spp.、*Candida* spp.、*Aspergillus* spp.、*Acinetobacter* spp.、及び*Fusarium* spp.を含む生物と、1つ以上の次の菌体外多糖；P s l、P e l、P N A G、及びG A Gを産生する遺伝的能力をもつ微生物又は微生物の群によって引き起こされる。別の実施形態では、バイオフィルムは、本明細書で開示される可溶性グリコシルヒドロラーゼによって分解できるいずれの菌体外多糖を産生する遺伝的能力をもつ微生物又は微生物の群によって引き起こされうる。

#### 【 0 2 0 5 】

さらに別の実施形態では、本明細書で開示される方法は、抗菌剤を非医療用表面に被覆することをさらに含む。1つの実施形態では、抗菌剤は抗生物質である。別の実施形態では、抗菌剤は抗真菌薬である。

#### 【 0 2 0 6 】

1つの実施形態では、本明細書で開示されるP s l G G H ドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号A A G 0 5 6 2 5 . 1でジェンバンクに寄託されている(若しくは配列番号11で示される)P s l G 配列のアミノ酸31~442又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

#### 【 0 2 0 7 】

1つの実施形態では、本明細書で開示されるP e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号A A G 0 6 4 5 2 . 1でジェンバンクに寄託されている(若しくは配列番号12で示される)P e l A 配列のアミノ酸47~303又はアクセッション番号A A Y 9 2 2 4 4 . 2でジェンバンクに寄託されている(若しくは配列番号13で示される)P e l A 配列のアミノ酸35~291又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

#### 【 0 2 0 8 】

1つの実施形態では、本明細書で開示されるP e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質オーソログは、アクセッション番号C A Q 6 2 2 0 1 . 1でジェンバンクに寄託されている(若しくは配列番号15で示される)R a g A 配列のアミノ酸61~317又はアクセッション番号A B B 3 2 1 9 1 . 1でジェンバンクに寄託されている(若しくは配列番号14で示される)P e l A 配列のアミノ酸23~277又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

#### 【 0 2 0 9 】

1つの実施形態では、本明細書で開示されるB p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号C A E 3 2 2 6 5 . 1でジェンバンクに寄託されている(又はそれぞれ配列番号19若しくは18で示される)B p s B 配列のアミノ酸318~6

10

20

30

40

50

70 若しくはアミノ酸 27 ~ 701 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

【0210】

1つの実施形態では、本明細書で開示される PgaB GHドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号 AAC74108.1 でジェンバンクに寄託されている（又はそれぞれ配列番号 17 若しくは 16 で示される）PgaB 配列のアミノ酸 310 ~ 672 若しくはアミノ酸 22 ~ 672 又はそれらのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

【0211】

1つの実施形態では、本明細書で開示される Sph3 GHドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号 EAL92786.1 でジェンバンクに寄託されている（若しくは配列番号 20 で示される）Sph3 配列のアミノ酸 52 ~ 298 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

10

【0212】

ある実施形態では、本明細書で開示される Sph3 GHドメインオーソログを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号 EAW09379.1 でジェンバンクに寄託されている（若しくは配列番号 22 で示される）*Aspergillus clavatus* NRRL 1 の Sph3<sub>AC</sub> 配列のアミノ酸 54 ~ 304 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

【0213】

ある実施形態では、本明細書で開示される Sph3 GHドメインオーソログを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号 EAA63523.1 でジェンバンクに寄託されている（若しくは配列番号 23 で示される）*Aspergillus nidulans* FGSC A4 の Sph3<sub>AN</sub> 配列のアミノ酸 43 ~ 299 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

20

【0214】

1つの実施形態では、本明細書で開示される Ega3 GHドメインを含む可溶性タンパク質は、アクセッション番号 EAL92787.1 でジェンバンクに寄託されている（若しくは配列番号 21 で示される）Ega3 配列のアミノ酸 46 ~ 318 又はそのグリコシルヒドロラーゼバリエーションを含む。

30

【0215】

本明細書においてさらに記載されるように、可溶性タンパク質は上記のジェンバンクアクセッション番号を用いて参照されるが、配列表、配列番号：11 ~ 23 で示されるもの及び上記のものと同じである。

【0216】

装置

本発明の発明者らは、プラスチック表面を本明細書で開示される可溶性タンパク質で予め被覆することが、表面にバイオフィーム層を形成する微生物の能力を減少させることを示した。

【0217】

したがって、本明細書で提供されるのは、グリコシルヒドロラーゼドメインを含む、細菌タンパク質又は真菌タンパク質などの、菌体外多糖生合成オペロン又は機能遺伝子クラスターによってコードされる少なくとも1つの可溶性微生物タンパク質で被覆された留置医療装置又はインプランである。

40

【0218】

また本明細書で提供されるのは、少なくとも1つの、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、又は全ての：(i) 本明細書に記載の PslG GH可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの PslG グリコシルヒドロラーゼ (GH) ドメインを含む可溶性タンパク質、(ii) 本明細書に記載の PelA GH可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの PelA GHドメインを含む可溶性タンパク

50

質、( i i i ) 本明細書に記載の B p s B G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) 本明細書に記載の P g a B G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) 本明細書に記載の S p h 3 G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び( v i ) 本明細書に記載の E g a 3 G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそのオーソログで被覆された留置医療装置又はインプラントである。上記の可溶性タンパク質の特定の組み合わせが装置又はインプラントに被覆されてもよい。

#### 【 0 2 1 9 】

本明細書で開示される可溶性タンパク質は非特異的タンパク質吸収又は化学的架橋を通して固体担体に固定化されうること当業者なら理解するであろう。くわえて、当該技術分野で実際に行われているように、限定されないが、シュタウディングーライゲーション反応、「クリック」ケミストリー、発現タンパク質ライゲーション、化学的酵素的方法、又は表面修飾を含む組換え又は化学的手段を通して可溶性タンパク質が改変されて固体担体への付着が可能になる。

#### 【 0 2 2 0 】

本明細書で開示される可溶性タンパク質は、ポロクサマー、さまざまな物質組成物のヒドロゲル、例えば、限定されないが、タンパク質ベースヒドロゲル、多糖ベースヒドロゲル、及び D N A ベースヒドロゲルなどの合成ポリマーなどの局所的送達法を用いて封入されたり、皮膚又は表面創傷に輸送されたりしうること当業者なら理解するであろう。他の送達方法としては、ナノ粒子、軟膏、ワセリン、送達に適合する他の水溶液が挙げられる。くわえて、可溶性タンパク質は組換え又は化学的手段を通して改変されて、より高い安定性、浸透性、及び送達組成物との適合性を可能にしう。

#### 【 0 2 2 1 】

別の実施形態では、装置又はインプラントは、アルギン酸塩及び / 又はセルロースなどのバイオフィルムの他の構成成分を分解する他の可溶性タンパク質でさらに被覆される。

#### 【 0 2 2 2 】

留置医療装置又はインプラントは、バイオフィルム形成の影響を受けやすい表面をもつと思われる体に導入されういずれの医療装置でありうる。1つの実施形態では、留置医療装置又はインプラントはカテーテル又は静脈内チューブである。

#### 【 0 2 2 3 】

別の実施形態では、留置医療装置又はインプラントは、人工関節又は生物義装具、例えば、限定されないが、心臓弁などである。

#### 【 0 2 2 4 】

表面に形成されうるバイオフィルムは、P e l 依存性、P s l 依存性、P N A G 依存性バイオフィルム、又は G A G 依存性を形成するいずれの微生物又は微生物の群、例えば、限定されないが、P. aeruginosa、S. aureus、E. coli、S. epidermidis、Y. pestis、B. pertussis、Burkholderia spp.、Candida spp.、Aspergillus spp.、Acinetobacter spp.、及びFusarium spp.などによって引き起こされうる。別の実施形態では、バイオフィルムは、本明細書で開示される可溶性グリコシルヒドロラーゼによって分解できる微生物又は微生物の群によって産生されるいずれの体外多糖の蓄積によって引き起こされうる。

#### 【 0 2 2 5 】

さらに別の実施形態では、留置医療装置又はインプラントは、装置又はインプラントに被覆された抗菌剤をさらに含む。1つの実施形態では、抗菌剤は抗生物質である。別の実施形態では、抗菌剤は抗真菌薬である。

#### 【 0 2 2 6 】

#### 組成物

また本明細書で提供されるのは、アクセッション番号 A A G 0 5 6 2 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている P s l G 配列のアミノ酸 3 1 ~ 4 4 2 から成る単離タンパク質、ア

10

20

30

40

50

クセッション番号 A A G 0 6 4 5 2 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 4 7 ~ 3 0 3 若しくはアクセッション番号 A A Y 9 2 2 4 4 . 2 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 3 5 ~ 2 9 1 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 C A Q 6 2 2 0 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている R a g A 配列のアミノ酸 6 1 ~ 3 1 7 若しくはアクセッション番号 A B B 3 2 1 9 1 . 1 でジェンバンクに寄託されている P e l A 配列のアミノ酸 2 3 ~ 2 7 7 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 C A E 3 2 2 6 5 . 1 でジェンバンクに寄託されている B p s B 配列のアミノ酸 3 1 8 ~ 6 7 0 若しくはアミノ酸 2 7 ~ 7 0 1 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 A A C 7 4 1 0 8 . 1 でジェンバンクに寄託されている P g a B 配列のアミノ酸 3 1 0 ~ 6 7 2 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 E A L 9 2 7 8 6 . 1 でジェンバンクに寄託されている S p h 3 配列のアミノ酸 5 2 ~ 2 9 8 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 E A W 0 9 3 7 9 . 1 でジェンバンクに寄託されている *Aspergillus clavatus* N R R L 1 の S p h 3 <sub>A C</sub> 配列のアミノ酸 5 4 ~ 3 0 4 から成る単離タンパク質、アクセッション番号 E A A 6 3 5 2 3 . 1 でジェンバンクに寄託されている *Aspergillus nidulans* F G S C A 4 の S p h 3 <sub>A N</sub> 配列のアミノ酸 4 3 ~ 2 9 9 から成る単離タンパク質、及び / 又はアクセッション番号 E A L 9 2 7 8 7 . 1 でジェンバンクに寄託されている E g a 3 配列のアミノ酸 4 6 ~ 3 1 8 から成る単離タンパク質である。

10

#### 【 0 2 2 7 】

さらに別の態様では、本開示は、少なくとも 1 つの、少なくとも 2 の、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの、又は 6 つすべての：( i ) 本明細書に記載の P s l G G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) 本明細書に記載の P e l A G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) 本明細書に記載の B p s B G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) 本明細書に記載の P g a B G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) 本明細書に記載の S p h 3 G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、及び ( v i ) 本明細書に記載の E g a 3 G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又はそれらのオーソログ；並びに薬理的に許容される担体を含む、医薬組成物などの組成物を提供する。上記の可溶性タンパク質の特定の組み合わせは組成物に含まれうる。

20

30

#### 【 0 2 2 8 】

薬剤を含有する組成物は、動物、随意にヒトに投与できる薬理的に許容される組成物を調製する公知の方法によって調製でき、その結果、有効量の活性剤が薬理的に許容される媒体との混合物に混合される。好適な媒体は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (2003 - 20th edition) 及び 1 9 9 9 年に刊行された米国薬局方：国民医薬品集 ( U S P 2 4 N F 1 9 ) に記載される。これに基づいて、組成物は、他を除外しないが、1 つ以上の薬理的に許容される媒体又は希釈剤を伴った、好適な pH をもち、生理液と等張の緩衝化溶液に含有される薬剤の溶液が挙げられる。

40

#### 【 0 2 2 9 】

本開示の方法及び使用においては、開示された薬剤、その塩、又はその溶媒和物は、当業者なら理解するであろうように、選ばれた投与経路に依存してさまざまな形態で動物、随意にヒトに投与されうる。例えば、経口投与、非経口投与、口腔投与、舌下投与、鼻内投与、経直腸投与、パッチ、ポンプ、又は経皮 ( 局所 ) 投与、及びそれらに応じて製剤される医薬組成物によって、組成物は投与されうる。非経口投与としては、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、経上皮、鼻内、肺内、髄腔内、経直腸、及び局所の投与方式が挙げられる。非経口投与は選択された期間にわたる持続注入による場合がある。

#### 【 0 2 3 0 】

1 つの実施形態では、薬理的に許容される担体は、ボロクサマーなどのゲルである。

50

## 【0231】

薬剤を含有する植物に適した組成物は、植物又は植物部位に投与できる許容可能な組成物を調製するための公知の方法で調製できる。

## 【0232】

薬剤は動物又は植物に単独で投与してもよく、又は上で述べたように、薬理的に許容される担体及び／若しくは抗生物質などの他の医薬活性薬剤と併用して投与してもよく、その併用の割合は、薬剤の溶解度及び化学的性質、選択投与経路、並びに標準的な薬務決定される。

## 【0233】

薬剤及び／又は組成物の投与量は、薬剤の薬力学的特性、投与方法、被投与動物又は植物の年齢、健康状態、及び重量、症状の性質及び程度、治療の頻度、及び同時治療の種類、及びもしあれば、治療する動物又は植物での組成物のクリアランス率などの多くの要因に依存して変更できる。当業者は上記要因の基づいて適切な投与量を決定できる。薬剤は初めは好適な投与量で投与されてよく、その投与量は臨床的な反応に応じて適宜調節されてよい。短時間、例えば、30分間～1時間以上の動物細胞の生体外処理には、動物の長期、生体内治療と比べて高い投与量の薬剤が使用されうる。

10

## 【0234】

本明細書で開示される可溶性タンパク質は幾通りかの方法のいずれか、例えば、限定されないが、組換え法を用いることによって調製されうる当業者なら理解するであろう。

## 【0235】

したがって、本開示のタンパク質をコードする核酸分子は、タンパク質の良好な発現を確実にする適切な発現ベクターに公知のやり方で組み込まれうる。可能性のある発現ベクターとしては、使用される宿主細胞と適合する限り、コスミド、プラスミド、又は改変ウイルス（例えば複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）が挙げられるが、これらに限定されない。発現ベクターが「宿主細胞の形質転換に適する」とは、発現ベクターが、本願の核酸分子及び発現用に使用される宿主細胞に基づいて選ばれた制御配列を含有することを意味する。その制御配列は核酸分子に作動可能に連結されている。作動可能に連結とは、核酸が発現可能な方法で制御配列に連結されていることを意味することを意図する。

20

## 【0236】

したがって、本開示は、本明細書で開示される核酸分子及び、挿入されたタンパク質配列の転写及び翻訳のために必要な制御配列を含有する組換え発現ベクターを企図する。

30

## 【0237】

好適な制御配列は、細菌遺伝子、真菌遺伝子、ウイルス遺伝子、哺乳類遺伝子、又は昆虫遺伝子を含むさまざまな供給源に由来しうる（例えば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))に記載の制御配列を参照されたい）。適切な制御配列の選択は下記で議論されるように選ばれる宿主細胞に依存し、当業者によって容易に達成されうる。そのような制御配列の例としては、転写プロモーター及びエンハンサー又はRNAポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含むリボソーム結合配列が挙げられる。くわえて、選ばれた宿主細胞及び採用されるベクターに応じて、複製起点、さらなるDNA制限酵素認識部位、エンハンサー、及び転写の誘導能を付与する配列などの他の配列が、発現ベクター組み込まれてもよい。

40

## 【0238】

また、本開示の組換え発現ベクターは、本願の組み換え分子で形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞の選択を容易にする選択可能マーカー遺伝子を含有してもよい。選択可能マーカー遺伝子の例は、ある特定の薬物に対する耐性を与えるG418及びハイグロマイシンなどのタンパク質、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、又は免疫グロブリン若しくはその部分、例えば、免疫グロブリン、随意にIgGのFc部分などをコードする遺伝子である。選択可能マーカー遺伝子の転写は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルト

50

ランスフェラーゼ、又はホタルルシフェラーゼなどの選択可能マーカータンパク質の濃度の変化によってモニターされる。選択可能マーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性などの抗生物質に対する耐性を与えるタンパク質をコードする場合、形質転換体細胞はG 4 1 8で選択できる。選択可能マーカー遺伝子を組み込んでいる細胞は生存することになり、一方で他の細胞は死滅する。これによって、本願の組換え発現ベクターの発現の可視化及びアッセイが可能になり、特に、発現及び表現型に対する変異の効果を決定することが可能になる。選択可能マーカーは対象となる核酸とは別のベクターに導入できることが理解されよう。

#### 【0239】

また、組換え発現ベクターは、組換えタンパク質の発現の増加、組換えタンパク質の溶解度の増加、及びアフィニティー精製におけるリガンドとして機能することによる標的組換えタンパク質の精製の補助をもたらす融合部分をコードする遺伝子を含んでもよい。例えば、タンパク質分解の切断部位が標的組換えタンパク質に加えられて、融合タンパク質の精製に続いて組換えタンパク質を融合部分から分離することを可能にする。典型的な融合発現ベクターとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、又はプロテインAをそれぞれ組換えタンパク質に融合する、pGEX(Amrad Corp.社、メルボルン、オーストラリア)、pMal(ニュー・イングランド・バイオラボ社、ビバリー、マサチューセッツ州)、及びpRIT5(ファルマシア社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州)が挙げられる。

#### 【0240】

組換え発現ベクターは宿主細菌に導入されて、形質転換された宿主細胞を作ることができる。「で形質転換された(transformed with)」、「でトランスフェクションされた(transfected with)」、「形質転換」、及び「トランスフェクション」という用語は、当技術分野において公知である多くの実行可能な技術の1つによって核酸(例えば、ベクター)を細胞に導入することを包含することを意図する。本明細書で使用される場合、「形質転換された宿主細胞」という用語は、本開示の組換え発現ベクターで形質転換されたグリコシル化可能な細胞を含むことも意図する。原核細胞は例えば、エレクトロポレーション又は塩化カルシウム媒介形質転換によって核酸で形質転換できる。例えば、核酸は、リン酸カルシウム若しくは塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクシン、エレクトロポレーション、又はマイクロインジェクションなどの従来技術を介して哺乳類細胞に導入できる。宿主細菌を形質転換及びトランスフェクションする好適な方法は、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)及び他の実験教科書に見出すことができる。

#### 【0241】

好適な宿主細菌としては幅広い種類の真核宿主細菌及び原核細胞が挙げられる。例えば、本開示のタンパク質は酵母細胞又は哺乳類細胞で発現されうる。他の好適な宿主細菌はGoeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991)に見出すことができる。くわえて、本開示のタンパク質はEscherichia coliなどの原核細胞で発現されうる(Zhang et al., Science 303(5656): 371-3 (2004))。くわえて、P. fluorescensなどのPseudomonas属に基づく発現系が使用できる(米国特許出願公開第2005/018666号、Schneider, Jane C et al.)。

#### 【0242】

したがって、本開示の核酸分子を含む宿主細胞も本明細書で提供される。

#### 【0243】

また、本開示のタンパク質をコードする核酸分子は、バイオフィームに見出される細菌に感染できるファージのゲノムに公知のやり方で組み込まれうる。溶菌ファージとしては、1つ以上の菌体外多糖; Psl、Pel、PNAG、及びGAGを産生できる遺伝的能力をもつ細菌を標的とするものが挙げられる。当業者なら標的細菌に特異的な溶菌ファージを容易に特定及び使用するであろう。

## 【 0 2 4 4 】

また、本開示のタンパク質をコードする核酸分子は、G A G バイオフィームに見出される真菌に感染できるマイコウイルスのゲノムに公知のやり方で組み込まれうる。当業者なら標的細菌に特異的なマイコウイルスを容易に特定及び使用するであろう。

## 【 0 2 4 5 】

したがって、( i ) 本明細書に記載の P s l G G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P s l G グリコシルヒドロラーゼ ( G H ) ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i ) 本明細書に記載の P e l A G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P e l A G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i i i ) 本明細書に記載の B p s B G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの B p s B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( i v ) 本明細書に記載の P g a B G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの P g a B G H ドメインを含む可溶性タンパク質、( v ) 本明細書に記載の S p h 3 G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの S p h 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、又は ( v i ) 本明細書に記載の E g a 3 G H 可溶性タンパク質若しくはオーソログなどの E g a 3 G H ドメインを含む可溶性タンパク質、若しくはそのオーソログ、又はそれらの組み合わせをコードする溶菌ファージ又はマイコウイルスが本明細書で提供される。

10

## 【 0 2 4 6 】

上記開示は全体として本願を記載する。より完全な理解が以下の具体的な例を参照することによって得られることができる。これらの例は例示の目的でのみ記載され、本開示の範囲を限定することを意図しない。状況が得策を示唆又は提供する場合、形態の変更及び等価物の置換が企図される。特有の用語が本明細書で用いられてきたが、そのような用語は記述的な意味を表し、限定する目的のためではない。

20

## 【 0 2 4 7 】

以下の非限定的な例は本開示の例示である。

## 【 実施例 】

## 【 0 2 4 8 】

実施例 1 - P. aeruginosa P A O 1 の P s l G <sub>3 1 - 4 4 2</sub> は可溶性タンパク質である方法 :

P. aeruginosa P A O 1 の p s l G のアミノ酸配列は、2 0 0 0 年 8 月にアクセッション番号 A A G 0 5 6 2 5 . 1 でジェンバンクに寄託され、公開された ( Stover et al 2 0 0 0 ) 。 T M H M M サーバー v 2 . 0 ( Krogh et al 2 0 0 1 ) は、Pseudomonas aeruginosa P A O 1 の P s l G が触媒ドメインを細胞膜に連結する残基 5 ~ 2 4 の膜貫通ヘリックスをもつことを示す。P. aeruginosa の p s l G 遺伝子の可溶性タンパク質構築物を得るために、ゲノム DNA をプライマー G G G C A T A T G G A G A T C C A G G T A C T G A A G ( 配列番号 1 ) 及び G G G A A G C T T T C A C T C C C A G A C C A G C A ( 配列番号 2 ) を用いる P C R によって増幅した。

30

## 【 0 2 4 9 】

E. coli B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞をタンパク質発現ベクターで形質転換し、5 0 μ g / m L のカナマイシンを含有する 1 L のルリア - ベルターニ ( L B ) 培地中で 3 7 ° にて増殖させた。細胞培養物の O D <sub>6 0 0</sub> が 0 . 4 ~ 0 . 5 に達したとき、温度を 1 8 ° に 2 0 ~ 3 0 分間下げ、イソプロピル - β - D - 1 - チオガラクトピラノシド ( I P T G ) を 1 m M の最終濃度に添加することによってタンパク質発現を誘導した。培養物を誘導後、1 8 ° で一晩振盪しながらインキュベーションし、次に 5 , 0 0 0 × g にて 2 0 分間、4 ° で遠心分離して採取した。

40

## 【 0 2 5 0 】

細胞ペレットを 4 0 m L のバッファー A ( 2 0 m M イミダゾール、5 0 m M トリス p H 7 . 5、3 0 0 m M N a C l、2 % ( 体積 / 体積 ) グリセロール、及び 1 個の S I G M A F A S T ( 商標 ) プロテアーゼ阻害剤錠剤 ) に再懸濁し、細胞を E m u l s i f l e x C 3 ( A v e s t i n 社 ) に 1 0 0 M P a で少なくとも 3 回通すことによって溶

50

解した。結果として生じた細胞残屑を、 $35,000 \times g$ で30分間遠心分離することによって可溶性タンパク質から分離した。バッファーAで予め平衡化した5 mL Ni-NTA Superflow重力カラム（キアゲン社）に上清を載せた。カラムを3カラムボリューム（CV）のバッファーAで洗い、発現したタンパク質を250 mM イミダゾールを補充したバッファーAで溶出した。溶出画分を集め、4 LのバッファーB（50 mM トリス pH 7.5、150 mM NaCl、2%（体積/体積）グリセロール）に対して4 で一晩透析した。タンパク質4 mg 当たり1ユニットのトロンビン（ノバジェン社）を用いて25 で3時間、タンパク質をインキュベーションすることによってHis タグを取り除いた。バッファーAで予め平衡化した5 mL Ni-NTA Superflow重力カラムで精製することによって、タグのないタンパク質をタグ付きのタンパク質から分離した。タグのないタンパク質を回収し、緩衝液をHiload 16/60 Superdex 200ゲル濾過カラム（GEヘルスケア）を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによってバッファーBに交換した。

【0251】

結果：

残基31～442を含む可溶性PslG構築物を発現させ、精製した。発現タンパク質は細菌培養物1リットル当たり7 mg 生じ、分子量は46.9 kDaである（図8）。タンパク質の純度はSDS-PAGEによって>95%であると判断された。タンパク質を8～10 mg/mLに濃縮し、沈殿又は分解することなく4 で1か月を超えて保存できた。

【0252】

実施例2 - PslG<sub>31-442</sub>は、異なる活性部位グループをもつ2ドメインタンパク質である

方法：

Gryphonロボット（Art Robbins社）を96ウェルArt Robbins Instruments Intelli-Plates（登録商標）（Hampton Research社）及びMicrolytic社のMCSG1-4スパースマトリックススクリーンとともに用いて、初期結晶化試験を8 mg/mL PslG<sub>31-442</sub>で行った。タンパク質（1 µL）を1：1の割合で沈殿剤と混ぜ、20 でシッティングドロップ蒸気拡散法を用いて60 µLの沈殿剤に対して平衡化した。48ウェルVDXプレート（Hampton Research社）中で、等量の沈殿剤（1 mM CdCl<sub>2</sub>、0.1 M HEPES pH 7.0、及び5%（重量/体積）PEG3350）とともに1 µLのタンパク質を用いて最適結晶を成長させ、130 µLの沈殿剤に対して20 で平衡化した。PslG<sub>31-442</sub>結晶を、25%（体積/体積）エチレングリコールを補充した沈殿剤溶液中で10秒間凍結保護した後、液体窒素中でガラス化した。回折データをビームラインX29、国立シンクロトロン光源研究所（National Synchrotron Light Source）（NSLS）で1.075オングストロームの波長を用いて100 Kにて集めた。0.16 mmコリメーターを使用して、ADSC Quantum-315検出器にて250 mmの結晶検出器間距離及び1画像当たり0.3秒の露出時間で、合計720の0.5°振動の画像を含む高い冗長性（redundancy）360°データセットを収集した。ビームを弱め、2°振動の90の画像を180°にわたって収集した。HKL2000を用いて、統合データを積分し、縮小し、及びスケーリングした（Otwinowski & Minor 1997）。PslG<sub>31-442</sub>については、Autosolve（Terwilliger & Berendzen 1999）を使用して、カドミウム単一波長分散（SAD）法を用いて実験的位相を生じさせた。合計で4つのカドミウム結合部位が見つかり、続いてそれらを使用して密度改変マップ（density-modified map）を作成した。各マップの得られた電子密度は質が高く、PHENIX AutoBuildが>95%のタンパク質を作れることを可能にした。COOTで残りの残基を手作業で作った（Adams et al 2010, Emsley & Cowtan 2004）。PHENIX.REFINEを用いて精密化を行った（Afonine et al 2010）。TLSグループをTLSMDサーバーの使用を通したPHENIXでの精密化に加えた（

Painter & Merritt 2006)。PyMOL分子グラフィックシステム(DeLano Scientific社)を用いて構造図を作成した(Dolinsky et al 2007)。

#### 【0253】

##### 結果：

Ni、Cu、Co、Zn、及びCdを含む二価金属イオンの存在下でPslG<sub>31-442</sub>を結晶化し、1mM CdCl<sub>2</sub>の存在下で成長した結晶で2.0オングストロームに回折データを集めた。該タンパク質は4つのカドミウムイオンと結合し、カドミウムSAD法を用いて構造を解明することができた。精密化によって、良好な形状及びR因子をもつ最終モデルが生み出された。PslGは空間群P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2に晶出し、非対称ユニットに1つのプロモーターを有した。これは、PslGが溶液中で単量体であることを示す較正分析用サイズ排除カラムと一致する。該酵素は2つドメインを含有する：TIMバレルモチーフ及びN末端からの1つの鎖及びタンパク質のC末端からの数個の鎖から成る - サンドウィッチドメイン(図9A)。TIMバレルフォールドは、既知のタンパク質構造のタンパク質データバンク(PDB)中で最もよく見られる酵素フォールドである。このフォールドを含有する既知のすべての酵素のうち10%と推定されている(Wierenga 2001)。推定活性部位はTIMバレルドメインに位置し、該ドメインをエカトリアルに4.0オングストローム横切る(図9B)。PatchDockを用いた、Psl多糖の分子ドッキングシミュレーション(Schneidman-Duhovny et al 2005)は、このグループが理論的に12~15個の糖ユニットを収容できることを示唆する。GH39ファミリーの他のメンバーと一致して、TIMバレルドメインのみを単離する試みは不成功であった(St John et al 2010)。このことは、 - サンドウィッチが適切なタンパク質フォールド及び/又はタンパク質の安定性に決定的に重要であるという仮説を支持する。

#### 【0254】

他のGH39メンバーとPslGのアミノ酸配列及び結晶構造の比較から、2つの酸性残基、Glu165及びGlu276が高度に保存されていることが示唆される。Dallite(Holm et al 2008)を用いた構造アラインメントは、Glu165及びGlu276は推定活性部位グループの中央に位置し、他のGH39ファミリーメンバーと同じ位置にあることを示す。GH39メンバーであるXynBの以前の特徴付けから、反応においてGlu165は酸/塩基であり、一方でGlu276は求核体として機能すると思われることを示唆される(Nieman et al 2003, Vocadlo et al 1998)。グループに一列に並ぶアミノ酸は遠縁ホモログでは良く保存されていない。ホモログの多くは、Pslと異なる多糖、キシランに対して活性を示す。活性部位に保存がないことから、示唆されるのは、ホモログは特異的なポリマーと結合するように進化的に選択され、且つPslと結合できずPslの加水分解を触媒できないと思われることである。

#### 【0255】

実施例3 - PslG<sub>31-442</sub>は静置培養におけるバイオフィーム形成を防止できる方法：

Psl - アラビノースで誘導可能なP. aeruginosa PAO1 pBADpslを37にて200rpmで振盪しながら一晚増殖させた。培養物をLBで1:100希釈し、アラビノースを0.5%(重量/体積)の最終濃度で加えてPsl生合成を誘導した。95µLの希釈培養物を滅菌96ウェルポリスチレンマイクロタイタープレート(サーモサイエンティフィック社、カタログ番号243656)に加えて、さまざまな濃度(1nM~10µM)のPelA<sub>47-303</sub>又はPslG<sub>31-442</sub>を5µLの分注量で加え、最終体積を100µLとした。次の日、一晚培養したものから1:100の希釈を用いて新鮮な培養物を調製した。95µLの希釈培養物を滅菌96ウェルポリスチレン丸底マイクロタイタープレートに加えて、さまざまな濃度(2nM~5µM)のPslG<sub>31-442</sub>を5µLの分注量で加え、最終体積を100µLとした。培養物を26で24時間静的にインキュベーションしてバイオフィーム形成をさせた。エッジ効果をなくするため、~200µLの滅菌水をすべての外側ウェルに入れ、プレートをパラフィルムで密封した。インキュベーション後、プレートを脱イオン水で十分に洗うことによって非付着細胞

及び培地を除去した。ウェルを150  $\mu$ Lの0.1% (重量/体積) クリスタルバイオレットで10分間染色した後、水で洗い流した。残った色素を200  $\mu$ Lの95% (体積/体積) エタノールを加えることによって溶かし、10分間放置した後、吸光度をモレキュラーデバイス社 (サニーベール、カリフォルニア州) のSpectraMax M2を用いて595 nmで測定した。バイオフィルムの量はクリスタルバイオレットでの染色の吸光度に比例する (Merritt et al 2005)。反応はすべて3連で行い、精製PelA<sub>47-303</sub>及びバッファーBを陰性対照として加えた。細胞増殖が起こらないので、バイオフィルム形成前の2.5 mg/mLのカナマイシンの培養物への添加を陽性対照として用いた。

#### 【0256】

##### 結果：

臨床的なPAO1株と比べて、顕著に多くのPslを産生するP. aeruginosa PAO1 pBADpslでは、PslG<sub>31-442</sub>の添加は50 nMでバイオフィルム形成を防止し、EC<sub>50</sub>が4.1  $\pm$  1.1 nMであった (図10)。効果がPslG活性の直接的な結果が否かを調べるために、二重触媒バリエーションPslG<sub>31-442</sub> E165Q/E276Qを構築して試験した。このバリエーションの添加によって、pBADpsl誘導可能株ではEC<sub>50</sub>が>100倍増加した (図10)。10  $\mu$ Mを超える酵素濃度はPsl依存性バイオフィルム形成を防いだ。別の推定グリコシルヒドロラーゼであるPelA<sub>47-303</sub>の添加は、Pslバイオフィルム形成を阻害しなかった。バイオフィルム阻害はタンパク質特異的であることを示唆している。くわえて、10  $\mu$ MのPslG<sub>31-442</sub>はPAO1増殖を防がなかった。バイオフィルムの消失は細菌増殖の混乱に起因しないことを示唆している。理論に拘束されるものではないが、酵素バリエーションは多糖に結合する能力を持ち続け、それによって非生物的プレートに付着する細菌の能力を減少させる可能性がある。

#### 【0257】

##### 実施例4 - PslG<sub>31-442</sub>は予め形成されたPslバイオフィルムを分散できる

##### 方法：

Pslを発現している細菌培養物を上述のように植え付け、37℃にて200 rpmで振盪しながら一晚増殖させた。培養物をすべてLBで1:100希釈し、アラビノースを0.5% (重量/体積) の最終濃度で加えてPsl生合成を誘導した。Psl産生培養物を含む培地を200  $\mu$ g/mL アンピシリン及び100  $\mu$ g/mL カナマイシンで補充した。培養物を26℃で24時間静的にインキュベーションしてバイオフィルム形成を可能にした。インキュベーション後、非付着細胞及び培地はプレートを脱イオン水で3回洗うことによって除去した。ウェルに95  $\mu$ Lの100 mM ナトリウムHEPESバッファー pH 7.0を入れた後、5  $\mu$ Lのさまざまな濃度 (2 nM ~ 5  $\mu$ M) の各加水分解酵素を入れた。回転ニューテーター上で最大60分間25℃にて反応を進行させ、その後プレートを脱イオン水で洗うことによって反応を止めた。ウェルを200  $\mu$ Lの0.1% (重量/体積) クリスタルバイオレットで10分間染色し、水で3回洗った。Psl培養物のクリスタルバイオレット色素を100  $\mu$ Lの95%エタノールで回転しながら10分間溶かし、その後、吸光度をモレキュラーデバイス社 (サニーベール、カリフォルニア州) のSpectraMax M2を用いて595 nmで測定した。バイオフィルムの量はクリスタルバイオレットでの染色の吸光度に比例する (Merritt et al 2005)。反応はすべて少なくとも3連で行い、100 mM ナトリウムHEPESバッファー pH 7.0を未処理対照として用いた。細胞増殖が起こらないので、バイオフィルム形成前の2.5 mg/mLのカナマイシンの培養物への添加を陽性対照として用いた。

#### 【0258】

##### 結果：

86 nMのPslG<sub>31-442</sub>の添加は35分でバイオフィルムを分散できた (図11A)。このことから、試験した条件下ではこれらのバイオフィルムを分散させるのに非常に少量のタンパク質しか必要でないことが示唆される。PslG<sub>31-442</sub> E165Q/E276Q

5 Q / E 2 7 6 Q 二重触媒バリエーションを野生型酵素 ( 5 μ M ) に対して 1 0 0 倍過剰で加えた場合、未処理のバイオフィルム非常に少量のタンパク質しかと比べて有意差は見られなかった ( 図 1 1 B ) 。このことから、これらの残基が触媒作用に決定的に重要であることが示唆される。また、バイオフィルム阻害が触媒活性の真の指標ではないことが示される。P e l A<sub>47-303</sub> のヒドロラーゼドメインの添加は、P s l 依存性バイオフィルムの消失をもたらさなかった。分散がタンパク質特異的であることを示唆している。

#### 【 0 2 5 9 】

実施例 5 - P. aeruginosa P A O 1 由来の P e l A<sub>47-303</sub> 並びにそのオーソログである R a g A<sub>61-317</sub> 及び G m e t P e l A<sub>23-277</sub> は高収量の可溶性タンパク質である。

#### 方法：

P. aeruginosa P A O 1 の p e l A のタンパク質配列は、2 0 0 0 年 8 月にアクセッション番号 A A G 0 6 4 5 2 . 1 でジェンバンクに寄託され、公開された ( Stover et al 2000 ) 。 P R E D - T A T サーバー ( Bagos et al 2010 ) は、Pseudomonas aeruginosa

P A O 1 の P e l A が、タンパク質を細胞質基質からペリプラズムに折りたたまれた状態で移行させることを可能にする残基 1 ~ 4 5 の T A T シグナル配列をもつことを示す。

可溶性タンパク質構築物 p e l A<sub>47-303</sub> を得るために、遺伝子 ( 残基 4 7 ~ 3 0 3 ) を P. aeruginosa P O A 1 のゲノム D N A からプライマー C T G C A T A T G G G C G G G C C G T C C A G C G T G G C G ( 配列番号 3 ) 及び T T T C T C G A G T C A C G G T T G C A C C T C G A C G T C ( 配列番号 4 ) を用いる P C R によって増幅した。

Ralstonia solanacearum の R a g A の残基 6 1 ~ 3 1 7 をコードする構築物をプライマー G C G C A T A T G G C G G A C G C A C C G A A C A T T G C C ( 配列番号 5 ) 及び G G G A A G C T T T C A C G G C A G C A C C T C G A T G C G C C ( 配列番号 6 ) を用いて単離し、Geobacter metallireducens の P e l A の残基 2 3 - 2 7 7 をプライマー G G G C A T A T G C A C C T C C T T T A A G C G T G G C C T T G ( 配列番号 7 ) 及び G C G A A G C T T T C A C G G C A T A A C C T C C A C G C T C C C ( 配列番号 8 ) を用いて単離して、細胞質基質にタンパク質を発現するためのシグナル配列を除去した。

下線は導入した N d e I、H i n d I I I、及び X h o I 制限酵素認識部位である。各遺伝子を N 末端の H i s タグをコードする p E T 2 8 a ( ノバジェン社 ) 発現ベクターにライゲーションした。P e l A<sub>47-303</sub> 及びそのオーソログのタンパク質発現は実施例 1 で P s l G<sub>31-442</sub> について記載したのと同じであった。

#### 【 0 2 6 0 】

細胞ペレットを 4 0 m L のバッファー C ( 2 0 m M イミダゾール、5 0 m M トリス p H 8 . 0、3 0 0 m M N a C l、1 0 % ( 体積 / 体積 ) グリセロール、及び 1 個のプロテアーゼ錠剤 ( シグマ社 ) ) に再懸濁し、細胞を E m u l s i f l e x C 3 ( A v e s t i n 社 ) に 1 0 0 M P a で少なくとも 3 回通すことによって溶解した。結果として生じた細胞残屑を、3 5 , 0 0 0 × g で 3 0 分間遠心分離することによって可溶性タンパク質から分離した。バッファー C で予め平衡化した 5 m L N i - N T A S u p e r f l o w 重力カラム ( キアゲン社 ) に上清を載せた。カラムを 3 カラムボリューム ( C V ) のバッファー A で洗浄し、発現したタンパク質を 2 5 0 m M イミダゾールを補充したバッファー A で溶出した。溶出画分を集め、4 L のバッファー D ( 5 0 m M トリス p H 8 . 0、1 5 0 m M N a C l、1 0 % ( 体積 / 体積 ) グリセロール ) に対して 4 で一晚透析した。最少培地での P e l A<sub>47-303</sub> のセレン - メチオニン誘導体の発現を、以前に記載されたように ( L e e e t a l 2 0 0 1 )、B 8 3 4 M e t - E. coli 細胞 ( ノバジェン社 ) を用いて実施した。 ( S e M e t ) で標識した P e l A<sub>47-303</sub> 及びバリエーションの精製を、野生型酵素に関して記載したように完了した。

#### 【 0 2 6 1 】

#### 結果：

残基 4 7 ~ 3 0 3 を含む P e l A<sub>47-303</sub> 構築物を発現させ、精製した。発現タンパク質は 1 リットルの細菌培養物当たり ~ 5 0 m g 生じ、分子量は 2 8 . 2 k D a である

10

20

30

40

50

(図12)。タンパク質の純度はSDS-PAGEによって>95%であると判断された。タンパク質を8~10mg/mLに濃縮し、沈殿又は分解することなく4で1か月を超えて保存できた。比較すると、アミノ酸残基47~948を含む可溶性全長構築物PelA<sub>47-948</sub>は、~1m/Lの細菌培養物しか生じない(Colvin et al 2013)。

#### 【0262】

実施例6 - PelA<sub>47-303</sub>は<sub>8</sub>/<sub>7</sub> TIMバレル構造をもつ

#### 方法：

精製PelA<sub>47-303</sub>を20mg/mLに濃縮し、市販の結晶化スクリーニングキット(Microlytic社)を用いてスクリーニングした。広く用いられているハンギングドロップ蒸気拡散法で、ネイティブ結晶をセットアップし、成長させた。結晶を1:2のタンパク質対ウェル溶液比を用いて最適化し、25%(重量/体積)PEG MM E 5K及び20でpH7.5のビス-トリスから成る溶液スクリーン(solution screen)で結晶化した。セレノメチオニン(SeMet)で標識したPelA<sub>47-303</sub>を同様にセットアップし、その条件が僅かに高いPEG濃度(26%(体積/体積))を含んだことを除いて同じスクリーニング条件で結晶化した。15%(体積/体積)エチレングリコールを補充した結晶溶液を用いて、結晶を凍結保護した後、液体窒素でガラス化した。ビームラインX29でのデータ収集のために、結晶をNSLSに送付した。セレンSAD位相決定にはPelA<sub>47-303</sub>のセレン部位を用いた。すべてのモデル構築及び精密化を、実施例2で前述したように完了した。

#### 【0263】

#### 結果：

P. aeruginosaのPelA<sub>47-303</sub>を発現させ、精製し、結晶化した。SDS-PAGE分析から明らかなように最終タンパク質試料を精製して均一にし、1Lのルリア-ベルターニ培地から~40mgのタンパク質の高い収量を生じた。ネイティブタンパク質結晶及びSeMetタンパク質結晶からそれぞれ1.5オングストローム及び1.9オングストロームにて回折データを収集した。SAD法を用いて構造を解明し、1.5オングストロームの最終分解能まで精密化した。良好な精密化統計を含んだ。PelA<sub>47-303</sub>は直方晶系空間群P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2で晶出し、非対称ユニットに1つのプロモーターを有した。構造は、PelA<sub>47-303</sub>が合計で12個のシート及び9個のヘリックスを含むTIMバレル様のフォールドをもつことを示す(図13)。推定活性部位はTIMバレルドメインに位置し、エカトリアルにドメインを横切る深い電子陰性グループから成る(図14)。このグループの電気陰性度は、Pelが以前に提案されていたように(Colvin et al 2011)負に帯電していないことを示唆する。グルコサミン残基のポリマーのPatchDockを用いた分子ドッキングシミュレーション(Schneidman-Duhovny et al 2005)から、このグループが理論的に8個の糖ユニットを収容できることが示唆される。

#### 【0264】

CAZymes Analysis Toolkit(CAT)(Park et al 2010)から、ヒドロラーゼドメイン(残基47~303)がGHファミリー114に属することを示唆される。推定触媒グループでアミノ酸が高度に保存されていることは非常に重要である。触媒残基は現在のところわかっていないが、反応で求核及び触媒酸/塩基として機能しうる高度に保存された数個の酸性残基が存在する(図14)。

#### 【0265】

実施例7 - PelA<sub>47-303</sub>及びオーソログは静置培養におけるPelバイオフィルム形成を防止できる

#### 方法：

Pelバイオフィルム形成の阻害を調べる方法は、使用した株がP. aeruginosa PAO1 wspF pslpBADpelであることを除いて、実施例3でPs1バイオフィルムについて前述したものと同一である。Pelの化学組成は現在のところわかっていない。

## 【0266】

結果：

バイオフィーム形成前に外から加えた *Pe1A* が *Pe1* 多糖バイオフィーム形成を防止できるか否かを調べるために生体外アッセイを採用した。*Ps1* 多糖を産生できない *Pe1* 過剰産生株 (*PAO1 wspF ps1PBADpe1*) を全ての実験に用いた。この株は、培養培地にアラビノースを添加すると誘導可能に *Pe1* 多糖を過剰発現できる。 $500\text{ nM}$  の *P. aeruginosa PAO1* の *Pe1A<sub>47-303</sub>* の添加は *Pe1* 依存性バイオフィームの形成を防いだ。比較すると、2つの推定触媒バリエーション、*D160A* 及び *E218A* はこの濃度でバイオフィーム形成を防止できなかった (図15)。 *P. protegens Pf-5* の *Pe1A<sub>35-291</sub>* の添加は、バイオフィーム形成を  $70\text{ nM}$  で防止し、*EC<sub>50</sub>* が  $69.3 \pm 1.2\text{ nM}$  であった (図16)。 *Ps1G<sub>31-442</sub>*、別の推定グリコシルヒドロラーゼの添加は *Pe1* バイオフィーム形成を阻害しなかった。バイオフィーム阻害がタンパク質特異的であることが示唆される。理論に拘束されるものではないが、酵素バリエーションは多糖に結合する能力を持ち続け、それによって非生物学的プレートに付着する細菌の能力を減少させる可能性がある。

10

## 【0267】

実施例 8 - *Pe1A<sub>47-303</sub>* 及びそのオーソログは予め形成された *Pe1* バイオフィームを分散できる

方法：

予め形成された *Pe1* バイオフィームを産生させる方法は、使用した株が *P. aeruginosa PAO1 wspF ps1PBADpe1* であることを除いて、実施例 4 で記載した *Ps1* バイオフィームのものと同一である。

20

## 【0268】

結果：

*Pe1A<sub>47-303</sub>* 並びに2つの推定触媒バリエーション *D160A* 及び *E218A* を2つの濃度； $1.14\text{ mg/mL}$  ( $38\text{ }\mu\text{M}$ ) 及び  $0.57\text{ mg/mL}$  ( $19\text{ }\mu\text{M}$ ) でインキュベーションした。2時間インキュベーションした後、*Pe1A<sub>47-303</sub>* は *Pe1* バイオフィームを成功裡に分散させた。一方で、*E218A* バリエーションはバッファー対照と同様のバイオフィームレベルを保持した。*D160A* バリエーションは、バッファー対照のように  $\sim 50\%$  のバイオフィームレベルを保持した (図17A)。このことから、アミノ酸 *D160* 及び *E218* が触媒反応に重要であることを示唆する。同様の実験を *P. protegens Pf-5* の *Pe1A<sub>35-291</sub>* を用いて完了し、 $1\text{ }\mu\text{M}$  の酵素は最短30分でもバイオフィームを分散でき、10倍希釈はほとんどすべてのバイオフィームを1時間で分散できることを明らかにした (図17B)。これは両方の野生型ヒドロラーゼドメインがともに触媒として活性があり、効率良く加えられてバイオフィームを分散できることを示唆する。

30

## 【0269】

実施例 9 - 加水分解酵素はプラスチックに予め被覆されてバイオフィーム形成を防止できる

方法：

各ウェルに  $40\text{ }\mu\text{g/mL}$  の *Pe1A<sub>47-303</sub>* 又は *Ps1G<sub>31-442</sub>* を含む  $100\text{ }\mu\text{L}$  の  $1\times\text{PBS}$  ( $\text{pH}7.4$ ) を4で12時間浸すことによって、滅菌96-ウェルポリスチレンプレートを予め被覆した。酵素溶液を取り除き、 $100\text{ }\mu\text{L}$  の  $1\times\text{PBS}$  ( $\text{pH}7.4$ ) 5分間加えた後、取り除くことによってウェルを洗った。プレートを37で1時間乾燥させ、使用した。最終濃度が  $40\text{ }\mu\text{g/mL}$  のウシ血清アルブミン (*BSA*) を対照として使用した。次の日、 $1:100$  希釈した *P. aeruginosa Ps1* 又は *Pe1* アラビノース誘導可能培養物をプレートに植え付けた。吸着又は架橋結合のいずれかによる *Ps1G<sub>31-442</sub>* 又は *BSA* の固定化は、耐蝕性の平板ガラススライド上に均一に薄く ( $0.17\sim 0.25\text{ mm}$ ) 行った。まず最初に、ガラス表面をピラニア溶液 ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 、3:1) に30分間浸けて、いずれの有機物質残渣も除去し

40

50

、表面をヒドロキシル化することによって活性化し、次に再蒸留水で数回洗い流して残留化学物質残留物を除去した。化学的架橋による固定化については、カバーガラスを3-アミノプロピルトリメトキシシラン (APTMS) 溶液 (80% (体積/体積) エタノール中 0.05 g/mL) に室温で2時間浸けるシラン処理によって表面をアミン (NH<sub>2</sub>) 基で官能基化した。表面を80% (体積/体積) エタノールで3回洗浄して未反応のAPTMSを除去した。静かに攪拌する室温の条件下でPBS緩衝溶液 (pH 7.2) 中の4%グルタルアルデヒドに表面を2時間浸けることによって、PslG<sub>31-442</sub>を分子カップリング剤、グルタルアルデヒドを介してアミノ官能基化したガラス表面に連結した。次に混合物を3時間、80% エタノールで洗い流して未反応のグルタルアルデヒドを除去した。活性化ガラス又は変性ガラス (NH<sub>2</sub>-グルタルアルデヒド) を酵素溶液 (80 μg/mL) に浸し、4°Cで一晩インキュベーションした。最後に、表面をPBSバッファーで数回洗浄して結合していない酵素を除去した。次の日、1:100希釈した*P. aeruginosa* Psl又はPelアラビノース誘導可能培養物をプレートに植え付けた。培養物を少なくとも20時間静的に増殖させ、その後バイオフィーム形成を実施例4で前述したクリスタルバイオレット法又はSYTOX Greenを用いて測定して細菌を共焦点顕微鏡法を介して可視化した。

【0270】

結果：

PelA<sub>47-303</sub>でウェルを予め被覆することは、試験した条件下でバイオフィームを完全に妨げた (図18A)。くわえて、BSAで処理したウェルはバイオフィームを減少させなかった。PelA<sub>47-303</sub>での被覆は特異的に*P. aeruginosa*バイオフィーム形成を標的とし、阻害することが示唆される。また、酵素処理は、共焦点顕微鏡法を用いて可視化された細胞及びバイオフィーム付着を防いだので、PslG<sub>31-442</sub>はプラスチックに吸着できた (図18B)。また、PslG<sub>31-442</sub>はグルタルアルデヒドを用いてガラスに化学的に架橋でき、この処理も細胞付着及びバイオフィーム形成を防止した (図18C)。BSAでの処理は、非特異的なタンパク質被覆はバイオフィーム形成を防ぐのに不十分であることを示した。PslG<sub>31-442</sub>と共有結合したガラス表面は少なくとも8日間、バイオフィーム形成を防ぐことができた (図18D)。理論に拘束されるものではないが、恐らく他の酵素オーソログもプラスチックに吸着でき、細菌付着及びバイオフィーム形成を防ぐのに使用されうるであろう。

【0271】

実施例10 - BpsB及び単離されたそのC末端ドメインは安定した可溶性タンパク質である

方法：

*B. bronchiseptica* RB50のbpsBのタンパク質配列は、2008年7月にアクセッション番号CAE32265.1でジェンバンクに寄託され、公開された。SignalPサーバーv4.0 (Petersen et al 2011) は、*B. bronchiseptica* RB50のBpsBが、残基1~26のペリプラズムシグナル配列をもつことを示す。可溶性タンパク質作成に関して、残基27~701を含むbpsB遺伝子をゲノムDNAから、隣接するNdeI及びHindIIIエンドヌクレアーゼ制限酵素認識部位とともにインバースPCRによって増幅し、次に切断して、N末端ヘキサヒスチジンタグをコードするPET28a (ノバジェン社) 発現ベクターにライゲーションした。次に、結果として得たプラスミド、PET28-BpsB<sub>27-701</sub>を、BpsBのC末端ドメイン、残基318~670をクローニングするための鋳型として用いて、上記と同様の手順でプラスミドPET28-BpsB<sub>318-670</sub>を得た。BpsBのタンパク質発現はPslG<sub>31-442</sub>について記載したのと同じであった。

【0272】

QuickChange部位特異的突然変異誘発キットを製造業者の取扱説明書に従って用いて活性部位アラニンパリアントを作成し、BpsBについて前述したように発現させて、精製した。

## 【0273】

細胞ペレットを40 mLのバッファーE (50 mM HEPES pH 8.0、300 mM NaCl、10 mM イミダゾール、5% (体積/体積) グリセロール、及び1個のSIGMAFAST (商標) プロテアーゼ阻害剤錠剤) に再懸濁した。細胞をEmulsiflex C3 (Avestin社) に100 MPaで3回通すことによって溶解した。30,000 × gで30分間遠心分離することによって可溶性タンパク質から不溶性残屑及び細胞残屑を除いた。緩衝液F (20 mM HEPES pH 8.0、300 mM NaCl、10 mM イミダゾール) で予め平衡化した30 mL重力カラムに充填した4 mLのNi-NTA Superflow 樹脂 (キアゲン社) に上清を載せた。カラムを10カラムボリューム (CV) の緩衝液Fで洗浄し、発現タンパク質を200 mM イミダゾールを補充した緩衝液Bで溶出した。溶出画分を集め、1 LのバッファーG (20 mM HEPES pH 8.0、300 mM NaCl) に対して4 で一晩透析した。タンパク質4 mg当たり1ユニットのトロンピン (ノバジェン社) を用いて25 で2時間、タンパク質をインキュベーションすることによってHisタグを取り除いた。2回目のNi-NTA精製によってタグのないタンパク質をタグ付きのタンパク質から分離し、フロースルー及び洗浄画分を回収して濃縮し、バッファーH (20 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl) で平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 200ゲル濾過カラム (GEヘルスケア) に載せた。

10

## 【0274】

## 結果：

残基27～701を含む全長BpsB (BpsB<sub>27-701</sub>) 及び残基318～670を含むC末端ヒドロラーゼドメイン構築物 (BpsB<sub>318-670</sub>) を発現させ、精製した。BpsB<sub>27-701</sub> タンパク質は、1リットルの細菌培養物当たり～30 mg生じ、分子量は78.5 kDaであり (図19)、一方でBpsB<sub>318-670</sub> は、1リットルの細菌培養物当たり～50 mg生じ、分子量は42.3 kDaである。各タンパク質の純度はSDS-PAGEによって>95%であると判断された。タンパク質を8～10 mg/mLに濃縮し、沈殿又は分解することなく4 で1か月を超えて保存できた。

20

## 【0275】

実施例11 - BpsB<sub>318-670</sub> は異なる電子陰性グループをもつ ( / )<sub>8</sub> バレルをとる

30

## 方法：

精製したBpsB<sub>318-670</sub> を10 mg/mLに濃縮し、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて、48ウェルVDXプレート (Hampton Research社) 及びMCSG1-4 スパースマトリックススイート (Microlytic社) で結晶化条件に対して20 でスクリーニングした。初期結晶化ヒットがMCSG-1スイートの条件#7で得られた。8.6 mg/mL BpsB<sub>318-670</sub> を、250 µLの沈殿剤溶液 (0.1 M ビス(2-ヒドロキシエチル) アミノ トリス(ヒドロキシメチル) メタン(ビス-トリス) pH 6.9、及び1.7 M 硫酸アンモニウム) に対して平衡化した等量のタンパク質及び沈殿剤を含む3 µLの液滴とともに用いて最適結晶を成長させた。液体窒素中でガラス化する前に、BpsB<sub>318-670</sub> 結晶を、25% (体積/体積) エチレングリコールを補充した沈殿剤溶液中で10秒間凍結保護した。回折データを、NSLSでビームラインX29上で1.075 オングストロームの波長を用いて100 Kにて集めた。0.16 mm コリメーターを使用して、ADSC Quantum-315 r 検出器にて220 mmの結晶検出器間距離及び1画像当たり0.4秒の露出時間で、1.0°振動の360°データセットを収集した。ビームを弱め、2°振動の90の画像を180°にわたって収集した。AutoMRを使用して、PgaB残基310～646との分子置換を通して位相情報を得た (PDB 4F9D)。

40

## 【0276】

## 結果：

BpsB<sub>318-670</sub> は空間群P2<sub>1</sub>で結晶化し、回折データを1.76 オングスト

50

ローム分解能で集めた。構造を分子置換法を用いて解明し、精密化は良好な形状及びR因子をもつ非対称ユニットに2分子を含有する最終モデルを生み出した。分析用サイズ排除クロマトグラフィーによって、BpsB<sub>318-670</sub>が溶液中で単量体であることを示される。BpsB<sub>318-670</sub>は、グリコシルヒドロラーゼではよく見られる( / )<sub>8</sub>バレルフォールドをとり(図20)、既知のタンパク質構造のタンパク質データバンク(PDB)中で最もよく見られる酵素フォールドである。推定活性部位は( / )<sub>8</sub>バレルの上部でグループ内に位置し、長さが41オングストロームで、幅が11オングストロームである(図20)。BpsB<sub>318-670</sub>及びPNAGのPatchDockを用いた分子ドッキングシミュレーション(Schneidman-Duhovny et al 2005)は、このグループが理論的に10~12個の糖ユニットを収容できることを示唆する。

10

#### 【0277】

BpsB<sub>318-670</sub>のアミノ酸配列及び結晶構造の他のGH13、GH18、及びGH20メンバーとの比較から、BpsB<sub>318-670</sub>が標準的な触媒配列モチーフを含有しないことが示唆される。Dallilite(Holm et al 2008)を用いた構造アライメントは、His473及びAsp474は推定活性部位グループの中央に位置し、GH13、GH18、及びGH20ファミリーメンバーの触媒Asp及びGlu残基と同じ位置にあることを示す。このことから、BpsB及びPgabがdPNAG加水分解の新規メカニズムを提示しうるか、ユニークなGHファミリーに属することが示唆される。菌体外多糖を切断する能力を維持するバリエーションはそのような残基が維持されることを恐らく必要とするであろう。代替的に、そのような残基はさらに最適化されうる。当業者ならば変異に際して活性が増加するか減少するかを容易に判断できるであろう。

20

#### 【0278】

実施例12 - PgabのC末端ドメインは安定な可溶性タンパク質である

##### 方法：

プラスミドpET28-Pgab<sub>22-672</sub>(Little et al 2012a, Little et al 2012b)を鋳型として用い、pgab特異的プライマーを設計して、インバースPCRを用いて残基遺伝子断片に隣接するNdeI及びXhoIサイトとともに310~672をpET28a発現ベクター(ノバジェン社)にサブクローニングした。結果として得たプラスミドpET28-Pgab<sub>310-672</sub>は、トロンピンで切断可能なヘキサヒスチンタグをもつPgabのC末端ドメインをコードする。精製中はグリセロールを溶解バッファにのみ含みという修正を加えて、以前に記載されたように(Little et al 2012a, Little et al 2012b)、Pgab<sub>310-672</sub>を発現させ、精製した。

30

#### 【0279】

##### 結果：

残基22~672を含むPgab(Pgab<sub>22-672</sub>)を作成する方法は以前に記載されている(Little et al 2012a, Little et al 2012b)。本明細書において、Pgabの残基310~672を含むC末端ヒドロラーゼドメイン構築物(Pgab<sub>310-672</sub>)を発現させ、精製した。~10m/Lの細菌培養物のPgab<sub>310-672</sub>の収量が得られた。タンパク質の純度はSDS-PAGEによって>95%であると判断された(図21)。タンパク質は8~10mg/mLに濃縮できたが、沈殿及び分解最小限にするために0.5~1.0mg/mLで4にて2週間保存した。

40

#### 【0280】

実施例13 - BpsB<sub>27-701</sub>、BpsB<sub>318-670</sub>、Pgab<sub>22-672</sub>、及びPgab<sub>310-672</sub>は静置培養においてバイオフィーム形成を防止できる

##### 方法：

PNAGバイオフィームを阻害する方法は実施例3に記載のPslバイオフィームのものと同一である。簡潔に、PNAG過剰産生E. coli又はS. carnosusを37で一晩、200µg/mLアンピシリン及び100µg/mLカナマイシン、並びに10µg/mLテトラサイクリンをそれぞれ補充したLB培地中で200rpmで振盪しながら増殖させた。一晩培養したものから、E. coliにはLB培地、S. carnosusにはトリブチック

50

ソイブロスを用いて 1 : 100 の希釈で抗生物質を含む新鮮な培養物を調製した。95  $\mu$ L の希釈培養物を滅菌 96 ウェルポリスチレン丸底マイクロタイタープレートに加えて、さまざまな濃度 (2 nM ~ 5  $\mu$ M) のタンパク質を 5  $\mu$ L の分注量で加え、100  $\mu$ L の最終体積を得た。培養物を、*E. coli* については 26 で、*S. carnosus* については 37 で 24 時間静的にインキュベーションしてバイオフィーム形成させた。エッジ効果をなくするために、~ 200  $\mu$ L の滅菌水をすべての外側ウェルに入れ、プレートをパラフィルムで密封した。インキュベーション後、プレートを脱イオン水で 3 回洗うことによって非付着細胞及び培地を取り除いた。ウェルを 150  $\mu$ L の 0.1% (重量/体積) クリスタルバイオレットで 10 分間染色した後、水で 3 回洗った。残った色素を 100  $\mu$ L の 33% (体積/体積) 酢酸で 10 分間回転しながら溶かし、その後、吸光度をモレキュラーデバ

10

#### 【0281】

##### 結果：

抗生物質の添加で活性化できる *E. coli* 及び *S. carnosus* の過剰産生 PNA G 株を用いた。BpsB<sub>27-701</sub>、BpsB<sub>318-670</sub>、PgaB<sub>22-672</sub>、及び PgaB<sub>310-670</sub> の *E. coli* 培養物への添加はバイオフィーム形成を防止し、EC<sub>50</sub> 値がそれぞれ ~ 40 nM、~ 60 nM、~ 90 nM、及び ~ 230 nM であった (図 22 A)。PNA G 依存性 *S. carnosus* バイオフィームに関するバイオフィーム阻害の予備試験は、BpsB<sub>318-670</sub> はバイオフィーム形成を 5  $\mu$ M で阻害することを示す (図 22 B)。

20

#### 【0282】

実施例 14 - BpsB<sub>27-701</sub>、BpsB<sub>318-670</sub>、PgaB<sub>22-672</sub>、及び PgaB<sub>310-672</sub> は予め形成された PNA G 依存性バイオフィームを分散できる

##### 方法：

以下の異なる点を除いて、PNA G 依存性バイオフィームを形成する方法は、実施例 4 で記載した Psl のものと同様の方法を利用する。PNA G 過剰産生 *E. coli* は 37 で一晩、200  $\mu$ g/mL アンピシリン及び 100  $\mu$ g/mL カナマイシンを補充した LB 培地中で、200 rpm で振盪しながら増殖させた。*E. coli* pgaABCD ノックアウト株を背景染色用の非バイオフィーム形成対照として用いた。異なる製造業者プレートを試験するために、ヌンク社及びザルスタット社の両社の滅菌 96 ウェルポリスチレン丸底マイクロタイタープレートを用いて実験を行った。

30

#### 【0283】

##### 結果：

BpsB<sub>27-701</sub>、BpsB<sub>318-670</sub>、PgaB<sub>22-672</sub>、及び PgaB<sub>310-672</sub> が予め形成された PNA G バイオフィームを分解できるか否かを調べるために、*E. coli* バイオフィームを一晩増殖させた後、酵素を加えた。酵素反応の触媒反応速度は基質の量及び加えた酵素の量の両方に依存する。したがって、バイオフィーム質量の実験間の変動に留意することが重要である。BpsB<sub>27-701</sub>、BpsB<sub>318-670</sub>、PgaB<sub>22-672</sub>、及び PgaB<sub>310-672</sub> の、60 分間、平均開始 OD<sub>595</sub> が 0.5 の予め形成されたバイオフィームへの添加は、バイオフィームを分解し、EC<sub>50</sub> 値がそれぞれ 170 nM、90 nM、> 1000 nM、及び 200 nM であった (図 23 A)。また、異なる製造業者のプレートを試験したところ、異なるレベルの付着が生じたが、分散のレベルは同様であった (図 23 B)。最後に、バイオフィーム分解酵素 PelA<sub>47-303</sub> 及び PslG<sub>31-442</sub> は影響がなかったので、PNA G 依存性バイオフィームの分散は特異的であることが示された (図 23 C)。次の Bp

40

50

s Bのアラニンバリエーション：D 3 2 6 A、D 3 2 8 A、H 4 7 3 A、D 4 7 4 A、及びE 5 8 5 AはP N A G依存性バイオフィルムを分散できなかった。これらの残基がP N A Gの結合及び/又は加水分解に重要な役割を果たすことが示唆される。菌体外多糖を切断する能力を維持するバリエーションはそのような残基が維持されることを恐らく必要とするであろう。代替的に、そのような残基はさらに最適化されうる。当業者ならば変異に際して活性が増加するか減少するかを容易に判断できるであろう。

#### 【0284】

実施例 15 - B p s B<sub>27-701</sub>、B p s B<sub>318-670</sub>、P g a B<sub>22-672</sub>、及びP g a B<sub>310-672</sub>はS. aureusから精製されたd P N A Gを加水分解できる方法：

S. aureus株 MN 8 m由来の単離d P N A Gを6 N H C l中で $\sim 10 \text{ mg/mL}$ に溶かした。10 N N a O Hを用いて中性 $\sim \text{pH } 7 \sim 8$ に達するまで再懸濁液を滴定した。50  $\mu\text{L}$ の反応で、1  $\mu\text{M}$  B p s B<sub>318-670</sub>を、1 $\sim 5 \text{ mg/mL}$ のd P N A Gとともに100 mM H E P E S pH 7.0中で18時間インキュベーションした。試料を2つの20  $\mu\text{L}$ の分注量の分け、D T T / 3 - メチル - 2 - ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩水和物で処理して、80 で15分間加熱した。0.5% (重量/重量) 鉄(III) 硫酸アンモニウム十二水和物、0.5% (重量/重量) スルファミン酸、及び0.25 N 塩酸の溶液を加えて混合し、室温に冷やした。次に、100  $\mu\text{L}$ を96 ウェル透明底プレートに移し、吸光度をモレキュラーデバイス社(サニーベール、カリフォルニア州)のS p e c t r a M a x M 2を用いて620 nmで測定した。バッファーH中のタンパク質及びd P N A Gを背景対照として用いた。

#### 【0285】

結果：

B p s B及びP g a Bの抗バイオフィルム活性がP N A G多糖の切断に直接起因するかどうかを試験するために、還元糖アッセイを行った。24時間エンドポイントアッセイを用いた結果はバックグラウンドを超えた明らかな信号を示し、酵素が多糖を加水分解できることを示している(図24)。d P N A Gは $\sim 5\%$  脱アセチル化されていると推定され、d P N A Gポリマーの平均の長さ( $\sim 200$ ユニット)及び加水分解アッセイで生じた信号から、切断がグルコサミン残基で起こりうることを示唆される。これによって、ポリマーあたり約10個のさらなる還元末端が生じることになると思われる。理論に拘束されるものではないが、この結果は加水分解がグルコサミン残基で起こりうることを示すので、脱アセチル化酵素ドメインを含むB p s B又はP g a B構築物をもつことは、d P N A Gに存在するグルコサミン残基の量を増やし、その結果加水分解の部位を増やすのに有益なはずである。これによって今度は、バイオフィルム阻害及び分解の効率を上げるはずである。くわえて、B p s B<sub>27-701</sub>及びB p s B<sub>318-670</sub>は、P g a B<sub>22-672</sub>及びP g a B<sub>310-672</sub>と比べて約4倍の加水分解活性を示した。このアッセイの条件下では、B p s B<sub>27-701</sub>及びB p s B<sub>318-670</sub>がより良好なヒドロラーゼであることを示唆している。この結果はバイオフィルムアッセイと相関する(図23A)。B p s Bの次のアラニンバリエーション：D 3 2 6 A、D 3 2 8 A、H 4 7 3 A、D 4 7 4 A、及びE 5 8 5 Aは、d P N A Gを加水分解できなかった。これらの残基がd P N A Gの結合又は加水分解に重要な役割を担っていることを示唆している。上述のように、菌体外多糖を切断する能力を維持するバリエーションはそのような残基が維持されることを恐らく必要とするであろう。代替的に、そのような残基はさらに最適化されうる。当業者ならば変異に際して活性が増加するか減少するかを容易に判断できるであろう。

#### 【0286】

実施例 16 - P e l A<sub>47-303</sub>はA. fumigatus G A G依存性バイオフィルムを防止できる

方法：

P e l A<sub>47-303</sub>がG A G依存性バイオフィルムの形成を阻害しうるかどうかを調べるために、 $5 \times 10^4$ 個のA. fumigatus分生子/ウェルをP e l A<sub>47-303</sub>を補充し

たブレイン培地中で37℃及び5% CO<sub>2</sub>にて20時間増殖させた。GAGバイオフィルム形成を定量するために、各ウェルを400 µLのdH<sub>2</sub>Oで2回洗い、300 µLの0.1% (重量/体積) クリスタルバイオレットで10分間染色した (Merritt et al 2005)。この染色に続いて、ウェルを2回洗い、残った色素を300 µLの95% (体積/体積) エタノールを加えることによって溶かし、10分間放置した後、吸光度を600 nmで測定した。

#### 【0287】

##### 結果：

バイオフィルム形成前に外から加えたPelAがGAG多糖バイオフィルムを防止できるか否かを調べるために生体外アッセイを採用した。クリスタルバイオレットアッセイを通して見られるように、2 µMのPelA<sub>47-303</sub>の添加はGAGバイオフィルム形成を防止するのに充分であった (図25A)。また、2つの推定触媒バリエーションD160A及びE218Aもこれらの濃度で阻害することが示された。同様の結果がPpPelA<sub>35-291</sub>についても得られた (図25B)。理論に拘束されるものではないが、酵素バリエーションは多糖に結合する能力を持ち続け、それによって非生物学的プレートに付着する*A. fumigatus*の能力を減少させ可能性がある。

#### 【0288】

実施例17 - PelA<sub>47-303</sub>は*A. fumigatus*のGAG多糖を加水分解できる

##### 方法：

粗GAGを*A. fumigatus*バイオフィルムから分離した。200 µLのGAG分注量を遠心分離してゼラチン状の画分を沈殿させた。ペレットを350 µLのPBSで2回洗った。洗浄手順には、5分間ボルテックスすること、浴内で3分間超音波処理すること、及びピペット操作によって均一に達するまで手で混ぜることが含まれた。最終ペレットを200 µLのPBSに再懸濁した。試料を10~20 µM タンパク質で処理し、26℃でインキュベーションした。24時間で試料を取り出した。少し修正を加えた、以前に記載されている還元糖アッセイを用いて (Anthon & Barrett 2002)、GAG加水分解を定量した。簡潔に、20 µLの酵素反応を20 µLの0.5M NaOH並びに20 µLのMBTH/DTT溶液 (1.5 m/L 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラジン (MBTH) 及び0.5 m/L DTT) と混ぜた。試料を80℃で15分間インキュベーションした後、40 µLの酸性鉄試薬 (0.5% (FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) · 12H<sub>2</sub>O、0.5% スルファミン酸、及び0.25N HCl) を加えた。試料を水で2倍に希釈した後、吸光度を620 nmで定量した。

#### 【0289】

##### 結果：

PelA<sub>47-303</sub>がGAG多糖を加水分解できるか否かを決定するために、*A. fumigatus*株Af293由来の精製GAGを用いて還元糖アッセイを完了した。未処理試料と比較して、溶液中の還元末端の数は24時間の反応時間にわたって増加した (図26)。キチン及びキトサンの放出が背景加水分解より顕著ではなかったため、活性は特異的であった。単一位置バリエーションE218Aは活性を失った。菌体外多糖を切断する能力を維持するバリエーションはそのような残基が維持されることを恐らく必要とするであろう。代替的に、そのような残基はさらに最適化されうる。当業者ならば変異に際して活性が増加するか減少するかを容易に判断できるであろう。

#### 【0290】

実施例18 - PelA<sub>47-303</sub>及びオーソログは*A. fumigatus* GAG依存性バイオフィルムを分散できる

##### 方法：

計5 × 10<sup>4</sup>個の*A. fumigatus*分生子/ウェルをブレイン培地中で37℃及び5% CO<sub>2</sub>にて20時間増殖させて、GAGを産生させ、滅菌24ウェルプレートに付着させた。GAGバイオフィルムの分散を測定するために、培地を吸引し、PelA<sub>47-303</sub>又は推定触媒バリエーションを0.28 µMの低濃度で含む培地と交換し、新鮮な培地中でさ

らに20時間インキュベーションした。反応を止めるために、各ウェルを400  $\mu$ Lのd H<sub>2</sub>Oで2回洗い、300  $\mu$ Lの0.1% (重量/体積) クリスタルバイオレットで10分間染色した。この染色に続いて、ウェルを2回洗い、残った色素を300  $\mu$ Lの95% (体積/体積) エタノールを加えることによって溶かし、10分間放置した後、吸光度を600 nmで測定した。

#### 【0291】

##### 結果：

P. aeruginosa PAO1のPel A<sub>47-303</sub>及びP. protogensのPel A<sub>35-291</sub>はGAGバイオフィルムの消失をもたらしたが、一方で推定触媒バリエーション及びBSA対照はバイオフィルムを分散できなかったことが観察された(図27)。また、Pel AオーソログRagA<sub>61-317</sub>はGAG依存性バイオフィルムを分散できた。一方でG. metallireducensのPel Aオーソログ(GmetPel A<sub>23-277</sub>)は効果は少なかったものの(図28)、それでもなお作用した。

#### 【0292】

実施例19 - Pel A<sub>47-303</sub>はA. fumigatus感染症によって引き起こされる上皮細胞傷害を予防できる

##### 方法：

24ウェル組織培養プレートで培養した単層を、3mCiの<sup>51</sup>Crとともに37℃にて5% CO<sub>2</sub>中で24時間インキュベーションすることによって、不死化気道上皮細胞株A549にクロム51を入れた。過剰なクロムをハンス平衡塩溶液(HBSS)で洗うことによって取り除いた。次に、標識したA549細胞を、0.5  $\mu$ M Pel A<sub>47-303</sub>又はE218Aバリエーションを含む1mLの血清を含まないDF12K培地5  $\times$  10<sup>5</sup>個の分生子で感染させた。発芽管を試験するために、分生子をSAB培地中で37℃にて7時間生育させ、次に真菌を集め、DF12K培地に再懸濁した後、0.5  $\mu$ Mのヒドロラーゼを加えた。発芽管をヒドロラーゼと1時間インキュベーションした後、A549細胞に加えた。16、20、及び24時間共インキュベーションした後、細胞上部の培地の分注量を取り出し、新鮮な培地と換えた。次に細胞を6N NaOHで溶かし、溶解物を集めた。次いで、培地及び溶解物の<sup>51</sup>Cr含有量をガンマカウンターで測定し、上皮細胞傷害の程度を<sup>51</sup>Cr放出の度合いの関数として計算した。各株を3連で試験して、結果はすべて、非感染上皮細胞による自然発生的なクロム放出に対して補正した。

#### 【0293】

##### 結果：

16時間にわたるクロム放出アッセイによって測定されるように、外からのPel A<sub>47-303</sub>の添加はA. fumigatusの肺上皮細胞傷害を誘発する能力を阻止した(図29)。比較すると、以前にGAG依存性バイオフィルムを分散できなかったことが示されているPel A<sub>47-303</sub> E218Aの外からの添加は上皮細胞傷害を防止しなかった。野生型酵素で観察された保護効果がGAG依存性バイオフィルムの阻害及び分散における直接的な結果であることが裏付けられる。理論に拘束されるものではないが、本明細書で言及されるPel Aオーソログは恐らく同じ機能を果たす。上述のように、菌体外多糖を切断する能力を維持するバリエーションはそのような残基が維持されることを恐らく必要とするであろう。代替的に、そのような残基はさらに最適化されうる。当業者ならば変異に際して活性が増加するか減少するかを容易に判断できるであろう。

#### 【0294】

実施例20 - Pel A<sub>47-303</sub>はヒト好中球のP. aeruginosa殺作用を増強できる

##### 方法：

P. aeruginosa PAO1 w s p F p s l p<sub>BAD</sub> pelを一晩培養したものをLB+0.5%アラビノースでOD<sub>600</sub>が0.05に希釈して、96ウェルの組織培養用に処理したプレートに100  $\mu$ L/ウェルの最終体積で植え付けた。プレートを28℃で20時間静的にインキュベーションした。上清を吸引し、0.5  $\mu$ MのPel A<sub>47-303</sub>を含む100  $\mu$ Lのフェノールレッドを含まないRPMI+10%ウシ胎児血

清 ( F B S ) を加えた。プレートにニュートナー上で室温にて 1 時間インキュベーションした。ヒドロラーゼで前処理した後、 $6 \times 10^6$  個の分化 H L - 6 0 細胞を含む  $100 \mu\text{L}$  R P M I + 10 % F B S をウェルに加え、プレートを 37 °C、5 %  $\text{CO}_2$  で 90 分間インキュベーションした。ウェルを吸引し、上清を  $1/200000 \sim 1/400000$  に希釈して、L B 寒天上に蒔いた ( $50 \mu\text{L}$ )。吸引したウェルに、 $200 \mu\text{L}$  の「破壊溶液 (disruption solution)」（ $2 \mu\text{M}$  の P e l A<sub>47-303</sub> 及び  $2 \mu\text{M}$  P s l G<sub>31-442</sub> を含む P B S ) を加え、プレートをニュートナー上で室温にて 1 ~ 1.5 時間インキュベーションした。ウェルを吸引し、希釈し、上記のように L B 寒天上に蒔いた。

【 0 2 9 5 】

結果：

ヒドロラーゼ処理が免疫殺作用に対する微生物の感受性を増強しうるか否かを判断するために、P. aeruginosa の好中球に対する感受性を増強する P e l A<sub>47-303</sub> の能力を調べた。P e l A での P e l 含有 P. aeruginosa バイオフィルムの処理は、H L - 6 0 好中球細胞株による微生物殺作用の程度を約 22 % から 42 % に増加させた (図 30)。他の可溶性グリコシルヒドロラーゼもまた、似たように機能して好中球殺作用を強めることが予想される。

【 0 2 9 6 】

実施例 21 - P e l A<sub>47-303</sub> はゲル中に製剤されて P e l 依存性 P. aeruginosa バイオフィルムを分散できる

方法：

ボロクサマー 407 (商品名ブルロニック (登録商標) F - 127 又は P F - 127) は親水性非イオン界面活性剤であり、多くの投与経路のための薬物送達システムとして使用されてきた (Escobar-Chavez et al 2006)。P F - 127 の 20 % ゲルを  $1 \times$  P B S をブルロニック (登録商標) F - 127 とポリマーが溶けるまで 4 で混ぜることによって調製した。P e l A<sub>47-303</sub> を、3つの濃度； $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  でこの溶液に加えた。株 P. aeruginosa P A O 1 w s p F p s l p B A D p e l の P e l 依存性バイオフィルムを実施例 8 で記載したように形成した。バッファー、ゲル、及びさまざまな濃度の P e l A<sub>47-303</sub> を含有するゲルをバイオフィルムに加えた。

【 0 2 9 7 】

結果：

$1 \times$  P B S バッファー又は 20 % ブロロニック (ブルロニック) (登録商標) F - 127 でのバイオフィルムの処理は、バイオフィルム分散をもたらさなかった。しかし、1 時間の処理後のクリスタルバイオレット染色 (図 31) を通して明らかのように、3つの濃度の P e l A<sub>47-303</sub> を含むブルロニック (ブルロニック) (登録商標) F - 127 は成功裡にバイオフィルムを分散させた。理論に拘束されるものではないが、同様の送達戦略が、酵素を封入できる薬剤を用いて、本明細書に開示のグリコシルヒドロラーゼのいずれにも利用できると思われる。

【 0 2 9 8 】

実施例 22 - P s l G<sub>31-442</sub> 及び P e l A<sub>47-303</sub> は組み合わせて P. aeruginosa の臨床分離株及び環境分離株の P e l 及び P s l 含有バイオフィルムを分散できる

方法：

臨床及び環境 P. aeruginosa 分離株のバイオフィルムを増殖及び分散させる方法は、初めに実施例 4 で記載した実験室株のものと同一である。この方法の 1 つの例外は、L - アラビノースはそれらの株ではバイオフィルムの形成を誘導するのに必要ではなく、したがってバイオフィルム形成能は株特異的なことである。それらの選ばれた株の多様性は以前に報告されており (Wolfgang et al 2003)、それらの株が P e l 及び P s l 多糖を利用する傾向が、p e l オペロン及び p s l オペロンの遺伝子欠失を用いて特徴付けられた (Colvin et al 2012)。

10

20

30

40

50

## 【0299】

## 結果：

外から加えた P s l G、P e l A、及びそれらの組み合わせが利用されて、臨床及び環境 *P. aeruginosa* 分離株によって形成されるバイオフィルムを分散できうるか否かを調べるために生体外アッセイを採用した。100 ~ 1000 nM の P s l G<sub>31-442</sub>、P e l A<sub>47-303</sub>、又は等モル濃度の両酵素の添加はともに、クリスタルバイオレット染色を通して見られるように、1時間でバイオフィルムバイオマスの90%の減少をもたらした(図32)。これは、これらのグリコシルヒドロラーゼが組み合わせて適用されて、臨床的に関連する株のバイオフィルムを分散できることを示す。

## 【0300】

実施例23 - S p h 3<sub>52-298</sub> は可溶性タンパク質である

## 方法：

G A G 産生が損なわれた転写因子変異体の比較トランスクリプトーム解析から、G A G 生合成に必要なタンパク質をコードすることが予想される5つの同時調節遺伝子のクラスターが特定された。*A. fumigatus* の G A G 生合成に必要な幾つかの遺伝子は、ゲノムの第3染色体上にコードされる(図33)。構築された s p h 3 ノックアウトは脱アセチル化 G A G を作ることができない。*A. fumigatus* A f 293 の s p h 3 及び e g a 3 のタンパク質コード配列はそれぞれ、アクセッション番号 E A L 92786.1 及び E A L 92787.1 でジェンバンクに寄託された。S p h 3 は、膜貫通ヘリックス(アミノ酸20 ~ 42)をそのN末端に含有することが T M H M M サーバーによって予想されている298個のアミノ酸のタンパク質である(Krogh et al 2001)。TMHMMは、S p h 3 は細胞の細胞外表面にC末端ドメインをもつ I I 型膜タンパク質として分類する。構造相同性検索から、S p h 3<sub>52-298</sub> が ( )<sub>8</sub> T I M バレルフォールドから成ることが示唆されている。P h y r e<sup>2</sup> では、これらのモデルは最高で96.9%の信頼度でグリコシルヒドロラーゼに基づく(Kelley & Sternberg 2009)。ヌクレオチド配列を用いて、推定膜貫通ヘリックスを除く残基52 ~ 298をコードする領域を増幅することになる遺伝子特異的プライマーを設計した。S p h 3 について、フォワードプライマー、5' - G G G C A T A T G T C C A A G G T C T T T G T G C C T C T C T A T G T G - 3' (配列番号9) は N d e I 部位をコードし、リバース5' - G G C T C G A G C T A T T T T C C C A T C A A A T C C A C A A A C T C - 3' (配列番号10) は X h o I 部位を含む(図34)。P C R 増幅産物を N d e I 及び X h o I エンドヌクレアーゼを用いて切断し、次に p E T 28 a ベクター(ノバジェン社)にライゲーションした。配列は使用前に、A C G T D N A T e c h n o l o g i e s C o r p o r a t i o n によって確認された。

## 【0301】

タンパク質発現プラスミドを *E. coli* B L 21 (D E 3) 細胞に形質転換し、50 µg / mL カナマイシンを含む1.5 L のルリア - ベルターニ (L B) 培地で37 にて O D 600 が ~ 0.35 ~ 0.40 まで増殖させた。温度を18 に下げ、~ 0.5 ~ 0.6 の O D 600 において、タンパク質発現を0.5 mM イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (I P T G) を用いて誘導した。誘導後、細胞を一晩増殖させ、4000 × g での20分間の遠心分離によって集めた。細胞をプロテアーゼ錠剤(シグマ社)を含むバッファー I (50 mM C H E S pH 9.0、300 mM N a C l、2% (体積 / 体積) グリセロール、10 mM イミダゾール、2 mM T C E P) に懸濁し、E m u l s i f l e x C 3 ホモジナイザーを用いて15,000 プサイにて溶解した。細胞残屑を30,000 × g で遠心分離することによって沈殿させ、上清を N i - N T A アガロースカラム(キアゲン社)に載せた。カラムを10カラムボリュームのバッファー I 及び20 mM イミダゾールを含む4カラムボリュームのバッファー A で洗浄した。次に、ヘキサヒスチジンタグタンパク質を200 mM イミダゾールを含むバッファー I を用いて溶出し、結果として得た画分を A m i c o n U l t r a 濾過器(ミリポア社)を用いて2 mL の体積に濃縮した。さらに、濃縮したタンパク質をバッファー J (50

10

20

30

40

50

mM CHES pH 9.0、150 mM NaCl、1 mM TCEP) で平衡化した Hi Load Superdex 200 サイズ排除カラム (GEヘルスケア) を用いて精製した。

#### 【0302】

##### 結果：

残基 52 ~ 298 を含む Sph3<sub>52-298</sub> 構築物を発現させ、精製した。発現タンパク質は 1 リットルの細菌培養物当たり ~ 10 mg 生じ、分子量は 29.6 kDa である。タンパク質は SDS-PAGE によって純度が > 95 % であると判断された。タンパク質を 8 ~ 10 mg/mL に濃縮し、4℃ で保存できた (図 35)。

#### 【0303】

実施例 24 - Sph3<sub>52-298</sub> は GAG 多糖を加水分解できる

##### 方法：

Sph3<sub>52-298</sub> を用いる GAG 多糖の加水分解を調べる方法は、PelA<sub>47-303</sub> の使用に関して実施例 17 で前述したものと同一である。

#### 【0304】

##### 結果：

Sph3<sub>52-298</sub> が GAG 多糖を加水分解できるか否かを判断するために、精製した GAG を用いて還元糖アッセイを完了した。未処理試料と比較して、溶液中の還元末端の数は 24 時間の反応期間にわたって増加した (図 26)。単一位置バリエーション D166A は活性を失った。菌体外多糖を切断する能力を維持するバリエーションはそのような残基が維持されることを恐らく必要とするであろう。代替的に、そのような残基はさらに最適化されうる。当業者ならば変異に際して活性が増加するか減少するかを容易に判断できるであろう。

#### 【0305】

実施例 25 - Sph3<sub>52-298</sub> は、A. fumigatus 臨床分離株を含む A. fumigatus GAG バイオフィルムを予防及び分散できる

##### 方法：

Sph3<sub>52-298</sub> を用いる GAG バイオフィルムの分散を調べる方法は、PelA<sub>47-303</sub> の使用に関して実施例 18 で前述したものと同一である。A. fumigatus の臨床分離株はマギル大学ヘルスセンターの臨床菌学研究室 (clinical mycology lab) から入手した。

#### 【0306】

##### 結果：

外から加えた Sph3<sub>52-298</sub> が予め形成されたバイオフィルムを分散できるか否かを調べるために生体外アッセイを採用した。クリスタルバイオレットアッセイを通してされるように、280 nM の Sph3<sub>52-298</sub> の添加は GAG バイオフィルム形成を防止するのに十分であった (図 36)。このことから、Sph3<sub>52-298</sub> は、PelA<sub>47-303</sub> が P. aeruginosa の Pel 多糖バイオフィルムを分散させるのと同様の方法で、GAG バイオフィルムを分散できること、及びこの酵素が新規の抗真菌療法でありうることが示唆される。A. fumigatus、A. nidulans、及び A. clavatus の組換え Sph3 はすべて、A. fumigatus バイオフィルムの形成を用量依存的に阻害する。同様に、3 つのアスペルギルス種の可溶性 Sph3 はすべて、前形成された A. fumigatus のバイオフィルムを用量依存的に破壊した (図 37)。これらの可溶性 Sph3 タンパク質の触媒ドメインに点変異を導入することは、活性の減少又は消失につながった。これらのタンパク質の抗バイオフィルム活性が酵素活性によって媒介されることが示唆される。A. fumigatus の Sph3<sub>52-298</sub> は、A. fumigatus の複数の株に対して活性があることが見出された。これらの薬剤は多様な臨床分離株に対して活性があると思われることが示唆される (図 38)。

#### 【0307】

実施例 26 - Sph3<sub>AC(54-304)</sub> は病原真菌 Trichosporon asahii の GAG バ

10

20

30

40

50

イオフィルムを分散できる方法：

ヒドロラーゼ処理のTrichosporon asahiiに対する効果を評価するために、 $1 \times 10^5$  個のT. asahii酵母細胞又はA. fumigatus分生子をダルベッコ改変イーグル培地 (DME M) に植え付け、37、5%  $CO_2$  にてカバーガラス上で10時間増殖させた。ウェルをハムF-12K (カイン (Kaighn's)) 培地 (F12K) 培地で1回静かに洗い、Sph3<sub>AC</sub> (54-304) を0.5  $\mu$ Mの最終濃度でF12Kに加えた、37、5%  $CO_2$  にてさらに3時間インキュベーションした。若い菌糸をPBSで2回洗い、FITCタグSBAで1時間染色した。染色した試料をPBSで洗い、4% PFAで15分間固定した。次に、スライドをマウントし、シールし、488nmレーザーを備える共焦点顕微鏡 (ツァイス) 下で撮像した。

【0308】

結果：

図39に示されるように、日和見感染病原真菌Trichosporon asahiiは、Sph3<sub>AC</sub> (54-304) によって分解できる、GalNAcに富む菌体外多糖を産生する。SBA-FITC染色によって判断されるように、A. fumigatusと同様に、未処理T. asahiiは細胞表面にGalNAc修飾を呈する (左上及び中央)。しかし、0.5  $\mu$ M Sph3<sub>AC</sub> (54-304) での3時間の処理は、検出可能な表面GalNAcの完全な消失をもたらす (右上)。真菌をDRAQ5で対比染色した (下パネル)。

【0309】

実施例27 - Sph3<sub>52-298</sub>はA. fumigatus感染症及びP. aeruginosa感染症によって引き起こされる上皮細胞傷害を予防できる

方法：

Sph3<sub>52-298</sub>を用いたA. fumigatusによって引き起こされる上皮細胞傷害を予防する方法は、PelA<sub>47-303</sub>の使用に関して実施例19で前述したものと同一である。P. aeruginosaによって誘発される傷害に関して、0.5  $\mu$ MのSph3<sub>AN</sub> (43-299) の存在又は非存在下でPel産生P. aeruginosaにA549を16時間曝し、哺乳類細胞傷害を乳酸脱水素酵素 (LDH) の上清への放出によって分析した。

【0310】

結果：

組換えヒドロラーゼがA. fumigatusによる傷害から宿主細菌を保護できうるか否かを判断するために、クロム放出傷害アッセイを用いてA. fumigatusによるA549肺上皮細胞株の傷害を評価した。A. clavatus、A. nidulans、又はA. fumigatus由来のSph3でのA. fumigatusの処理は上皮細胞への真菌による傷害を減らした (図40A)。なお注目すべきことに、A. clavatus (Sph3<sub>AC</sub> (54-304)) 及びA. nidulans (Sph3<sub>AN</sub> (43-299)) のSph3は上皮細胞をA. fumigatusによる傷害から24時間完全に保護した。また、Sph3<sub>AN</sub> (43-299) はP. aeruginosaによって引き起こされる傷害を減らすことができる (図40B)。

【0311】

実施例28 - グリコシドヒドロラーゼPslG<sub>31-442</sub>、PelA<sub>47-303</sub>、並びにSph3<sub>52-298</sub>、並びにそのオーソログSph3<sub>AC</sub> (54-304)、及びSph3<sub>AN</sub> (43-299) はP. aeruginosa感染症及びA. fumigatus感染症の治療に使用される抗微生物化合物を増強できる

方法：

抗真菌剤と、Sph3<sub>AC</sub> (54-304) 又はPelA<sub>47-303</sub>との併用治療のA. fumigatus分生子の生育に対する効果をマルチタイタープレートアッセイを用いて判定した。MOPSS (3-(N-モルホリノ)プロパン-スルホン酸) (フィッシャー) で緩衝化したRPMI 1640培地 (Life Technology社) (RPMI-MOPSS) 中の休眠A. fumigatus分生子を、組織培養用に処理したマルチタイタープレート (BDファルコン社) に加えた。分生子を37、5%  $CO_2$  にて9時間インキュベシ

10

20

30

40

50

ョンした。抗真菌剤のストック溶液をジメチルスルホキシド (DMSO) で調製し、さらに R P M I - M O P S で希釈した。ヒドロラーゼのストック溶液を R P M I - M O P S で調製及び希釈した。抗真菌化合物を、横列にわたって 2 倍段階希釈し、 $0.5 \mu\text{M}$  の S p h 3 A C ( 5 4 - 3 0 4 ) 又は P e l A 4 7 - 3 0 3 を加えた。次に、プレートを 3 7 及び 5 % C O <sub>2</sub> でインキュベーションし、15 時間後に倒立光学顕微鏡 ( ツアイス社 ) 下で観察し、I n f i n i t y 2 カメラ ( ルメネラ社 ) を用いて画像を取得した。続いて、真菌の生存性を測定するために、X T T [ 2 , 3 - ビス - ( 2 - メトキシ - 4 - ニトロ - 5 - スルホフェニル ) - 2 H - テトラゾリウム - 5 - カルボキシアニリド ] ( シグマ社 ) 代謝アッセイを行った。メナジオン ( シグマ社 ) を X T T 溶液に加え、さらに R P M I - M O P S で希釈した。溶液を菌系に加え、90 分間インキュベーションした。分光光度計 ( A S Y S U V M 3 4 0 ) を用いて O D <sub>450</sub> を測定した。

10

#### 【0312】

抗生物効力増強に対する P e l A 4 7 - 3 0 3 及び P s l G 3 1 - 4 4 2 の効果を調べるために、P e l 依存性及び P s l 依存性バイオフィルムを、それぞれ  $1 \mu\text{M}$  の P e l A 4 7 - 3 0 3 又は P s l G 3 1 - 4 4 2 の非存在下又は存在下で、実施例 4 で前述したように増殖させた。24 時間後、試料をすべて  $100 \mu\text{g} / \text{mL}$  のコリスチンで処理し、25 で 24 時間インキュベーションした。この処理の後、浮遊細胞をピペット操作で取り除き、残ったバイオフィルムを緩衝液に懸濁し、実施例 4 で概説したヒドロラーゼ処理に供した。浮遊バイオマス及びバイオフィルムバイオマスを集め、コロニーカウント用 L B 寒天プレート上に段階希釈した。

20

#### 【0313】

##### 結果：

組換えヒドロラーゼでの処理が抗微生物剤の活性を増強しうるか否かを判断するために、S p h 3 A C ( 5 4 - 3 0 4 ) 及び P e l A 4 7 - 3 0 3 の A. fumigatus の抗真菌剤感受性に対する効果を調べた。S p h 3 A F、S p h 3 A C ( 5 4 - 3 0 4 )、S p h 3 A N ( 4 3 - 2 9 9 )、又は P e l A 4 7 - 3 0 3 での A. fumigatus バイオフィルムの処理は、抗真菌剤サコナゾール、アンホテリシン B、及びキャスポファンギンの最小発育阻止濃度のポ 50 % の減少をもたらした ( 図 4 1 )。A. fumigatus の感受性株及び耐性株に関して、同様の M I C の減少が見られた。

30

#### 【0314】

また、P e l A 4 7 - 3 0 3 及び P s l G 3 1 - 4 4 2 も  $100 \mu\text{g} / \text{mL}$  の最終濃度で投与された抗生物質コリスチンを増強できた。L B プレート上で増殖が見られなかったように、いずれかの酵素の添加は殺菌作用の 100 倍を超える増加につながる ( 図 4 2 )。理論に拘束されるものではないが、抗生物質保護における菌体外多糖の関与を考えれば、異なる作用機序をもつ他のクラスの抗生物質も、どのグリコシルヒドロラーゼによっても恐らく効力が増強されるであろう。

#### 【0315】

実施例 29 - S p h 3 A C ( 5 4 - 3 0 4 ) での A. fumigatus の処理は抗真菌薬の浸透を増加させる

##### 方法：

赤色蛍光タンパク質 ( R F P ) を発現する A f 2 9 3 の菌系を、 $0.5 \mu\text{M}$  S p h 3 A C ( 5 4 - 3 0 4 ) ヒドロラーゼで 90 分間前処理した後、ボディピー結合ボサコナゾール ( B D P - P C Z ) で処理した。異なる時点で、試料を固定し、蛍光共焦点顕微鏡法を用いて撮像して、菌系の薬物浸透の速度論を決定した。

40

#### 【0316】

##### 結果：

組換えグリコシルヒドロラーゼの存在下での抗真菌薬の感受性の増加が、菌体外多糖の非存在下の細胞への浸透の増強に由来するか否かを判断するために、A. fumigatus によるボサコナゾールの取り込みの速度を S p h 3 A C ( 5 4 - 3 0 4 ) の存在又は非存在下で調べた。共焦点顕微鏡法によって可視化されたように、S p h 3 A C ( 5 4 - 3 0 4 ) で

50

の菌系の処理は、蛍光標識したボサコナゾールの取り込みの速度及び程度を増加させた（図43）。まとめると、これらのデータは、組換えヒドロラーゼによる菌体外多糖の分解は、真菌細胞を浸透する能力を増強することを通して抗真菌薬の活性を増加できることを示す。

#### 【0317】

実施例30 - GAGを合成し、GAG依存性バイオフィルムを形成する遺伝的能力を有する他の種の同定

##### 方法：

バイオインフォマティクス解析のために、GAG生合成クラスター：AFU\_\_3G07860 (Gtb3)、AFU\_\_3G7870 (Agd3)、AFU\_\_3G7890 (Ega3)、AFU\_\_3G7900 (Sph3)、及びAFU\_\_3G7910 (Uge3)内の遺伝子のアミノ酸配列をAspergillus属ゲノムデータベース (<http://www.aspergillusgenome.org>) から入手し、NCBIタンパク質データベースのBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で照会した。保存ドメインデータベース (Conserved Domain Database) (CDD) を使用して各推定タンパク質の機能ドメインを予想した。クラスター遺伝子に類似するドメインをもつタンパク質のアミノ酸配列を、ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) を用いた多重整列 (MSA) によってアラインメントした。TreeVector (<http://supfam.cs.bris.ac.uk/TreeVector/>) を用いてクラスターの各メンバーを視覚化するために、得られた系統関係結果 (output) をエクスポートし、フォーマットし、描写した。分類学的解析に関して、GAGクラスターを含有する真菌のクラスを選択し、PhyloT (<http://phylo.t.biobyte.de>) を用いて視覚化した。

#### 【0318】

Trichosporon asahiiのGAG産生をダイズ凝集素 (SBA) レクチン染色を用いて評価した。簡潔に、 $1 \times 10^5$  個のT. asahii酵母細胞又はA. fumigatus分生子をRPMI 1640に植え付け、37、5%  $CO_2$  にてカバーガラス上で9時間増殖させる。ポリ-D-リジンで被覆したカバーガラス (コーニング社、ベッドフォード、マサチューセッツ州) 上で、(カナダ農務・農産食品省、サン・ジャン・シュル・リシュリユー、ケベック州のCarisse博士及びTremblay博士からの) Botrytis cinerea分離株7b1を $6 \times 10^3$  個の分生子/mLの濃度で500  $\mu$ lのブレイン培地に、17時間、室温にて暗中で植え付けた。結果として生じた若い菌系を4% PFAで30分間固定し、PBSで洗い、FITCタグ付きSBAで2時間染色した。染色試料をPBSで洗い、マウントし、シールし、488nmレーザーを備える共焦点顕微鏡 (オリンパス社) で撮像した。

#### 【0319】

##### 結果：

バイオインフォマティクス解析から、多くの子囊菌及び担子菌Trichosporonの真菌内にGAG生合成の遺伝子クラスターが存在することが明らかになった (図44)。これらに真菌としては、植物病原菌種: Saccharata proteae、Zopfia rhizophila、Phaeosphaeria nodorum、Setosphaeria turcica、Botrytis cinerea、Cryphonectria parasitica、Melanconium sp.、Verticillium dahlia、Nectria haematococca、Neurospora crassa、Leptosphaeria maculans、Pleomassaria siparia、Cochliobolus heterostrophus、Pyrenophora tritici-repentis、Blumeria graminis、Marssonina brunnea、Sclerotinia sclerotiorum、Taphrina deformans、Cercospora zeae-maydis、並びにヒト病原真菌: Fusarium、Trichosporon、及びAspergillus種が挙げられる。これらのクラスターの他の真菌での存在がGAGの産生を予想することを確認するために、T. asahiiの菌系 (図39)、及びB. cinerea (図45) をGalNAc特異的レクチンで染色してGAGの存在を検出した。これらの種のゲノム内にGAG生合成のクラスターが存在することと一致して、両生物にお

いてレクチン染色はG A G様の菌体外多糖の産生を示した。

【0320】

実施例31 - Botrytis cinereaはSph3<sub>AC</sub>(54-304)によって消化できるG A G依存性バイオフィルムを産生できる

方法：

ポリ-D-リジンを被覆したカバーガラス(コーニング社、ベッドフォード、マサチューセッツ州)上で、Botrytis cinerea分離株7b1を $6 \times 10^3$ 個の分生子/mLの濃度で500 $\mu$ lのブレイン培地に、17時間、室温にて暗中で植え付けた。1 $\mu$ M Sph3<sub>AC</sub>(54-304)の存在下又は非存在下で試料をインキュベーションした。次に培地を除去し、菌糸を1 $\mu$ M Sph3<sub>AC</sub>(54-304)を含むPBS又は含まないPBS中で室温にて1時間インキュベーションした。試料をPBSで2回洗い、30 $\mu$ g/mLの、フルオレセインに結合したWisteria fluoribunda(WFL)レクチンで4にて2時間染色した。試料をPBSで2回洗い、4%パラホルムアルデヒドで10分間、4で固定した。試料を1回洗い、1:1000希釈のDRAQ5(商標)(イーバイオサイエンス社、サンディエゴ、カリフォルニア州)で室温にて5分間染色した。試料をPBSで1回洗い、Slow Fade(登録商標)Gold褪色防止剤(ライフテクノロジーズ(商標)、ユージーン、オレゴン州)を用いて顕微鏡スライドにマウントし、マニキュア液でシールした。BA505-525及びBA650IFフィルターとそれぞれ連結した488及び633nmレーザーを用いてオリンパスFluoview共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得した。ImageJソフトウェア(アメリカ国立衛生研究所)を用いて、0.2 $\mu$ mづつの増加のzスタックを取り込み、3Dレンダリングした。

【0321】

結果：

Sph3<sub>AC</sub>(54-304)でのB. cinereaの菌糸の処理は、その菌体外多糖の完全な消失をもたらした(図45)。理論に拘束されるものではないが、このデータは組換えヒドロラーゼが他の真菌種のG A Gバイオフィルムを消化できることを示唆する。

【0322】

実施例32 - Ega3<sub>46-318</sub>は可溶性タンパク質である

方法：

バイオインフォマティクス予想は、Ega3がアミノ酸23~45の単一膜貫通(TM)ヘリックスをもつことを示唆する。アミノ酸46~318を含むC末端ドメインはTMHMMによって細胞外にあることが予想されている。Phyre<sup>2</sup>構造相溶性認識サーバーは、タンパク質が( )<sub>8</sub>TIMバレルを含有し、グリコシルヒドロラーゼファミリーGH114に合致すると予想する。E. coliでの発現に最適化されたega3遺伝子コドンを含むプラスミドをGeneArt社から入手した。予想される細胞外ドメイン、アミノ酸46~318をコードする配列をpET28ベクターのNdeI及びHindIII部位の間にサブクローニングした。MlyI部位をコードするフォワードプライマー、5'-GGGAGTCATCGTATGGGCAGCAGCCATCATCATCATC-3'(配列番号24)及びKpnI部位を含有したリバー、5'-GGGGGTACCTTAGCAATATTCCACCCCA-3'(配列番号25)を用いて、N末端ヘキサヒスチンタグをもつEga3<sub>46-318</sub>構築物を増幅した。PCR増幅産物をMlyI及びKpnIエンドヌクレアーゼを用いて切断し、次にエンドヌクレアーゼStuI及びKpnIで予め切断したpPink-HCベクター(インビトロジェン社)にライゲーションした。配列は使用前に、ACGT DNA Technologies Corporationによって確かめられた。

【0323】

タンパク質発現プラスミドを、ピキアアデニンドロップアウト(PAD)選択プレート上に蒔いたPichia pastoris(Pichia Pink株4)に形質転換して、形質転換コロニーを特定した。コロニーを選択し、2mLの緩衝化複合グリセロール培地(buffered complex methanol medium)(BGMY)培地中で30にて生育させた。接種菌(Star

ters) を用いて 500 mL の B M G Y に植え付け、次に 26 で一晩増殖させた。この多量培養物を採取し、次に 450 mL の緩衝化複合メタノール培地 (buffered complex methanol medium) (B M M Y) 培地に再懸濁し、タンパク質発現のために 26 で振盪しながら増殖させた。48 時間後に、4000 × g で 20 分間遠心分離することによって細胞を採取した。培養上清を 3 mL の N i - N T A アガロースカラム (キアゲン社) に載せた。カラムを 10 カラムボリュームのバッファーク (50 mM H E P E S pH 7.5、300 mM N a C l、5 mM イミダゾール) で洗った。次に、ヘキサヒスチジンタグタンパク質を 200 mM イミダゾールを補充したバッファークを用いて溶出し、結果として得た画分を A m i c o n U l t r a 濾過器 (ミリポア社) を用いて 2 mL の体積に濃縮した。さらに、濃縮したタンパク質をバッファーク (50 mM H E P E S pH 7.5、300 mM N a C l) で平衡化した H i L o a d S u p e r d e x 200 サイズ排除カラム (G E ヘルスケア) を用いて精製した。

10

#### 【0324】

##### 結果：

残基 46 ~ 318 を含む E g a 3<sub>46-318</sub> 構築物を発現させ、精製した。発現タンパク質は 1 リットルの酵母培養物当たり ~ 3 mg 生じ、分子量は 31.8 kDa である。タンパク質は S D S - P A G E によって > 95 % の純度であると判断された (図 46)。タンパク質グリコシル化は、P. pastoris において組み換えタンパク質発現及び分泌の間に良く起こる。グリコシル化に起因して E g a 3<sub>46-318</sub> の見かけの質量がより大きいかな否かを判断するために、タンパク質の試料をエンドグリコシダーゼ H (E n d o H) で処理した。処理後、試料を S D S - P A G E にかけた。E n d o H で処理した E g a 3<sub>46-318</sub> は、31 kDa で非グリコシル化タンパク質の予想質量に近いバンドを生じた。

20

#### 【0325】

実施例 33 - E g a 3<sub>46-318</sub> は A. fumigatus の G A G バイオフィルムを阻害及び分散できる

##### 方法：

A. fumigatus 分生子を、ポリスチレンの丸底 24 ウェルプレートに、D M E M 培地中 10<sup>5</sup> 個の分生子 / ウェルの濃度で植え付けた。バイオフィルム形成の阻害を評価するために、1 μM の最終濃度で E g a 3<sub>46-318</sub> を加え、分生子を 37、5 % C O<sub>2</sub> にて 18 時間インキュベーションした。次に、結果として生じたバイオフィルムを静かに蒸留水で 2 回洗い、0.1 % クリスタルバイオレットで 10 分間染色した。試料を水で 2 回洗い、ウェルを撮像した。

30

#### 【0326】

ヒドロラーゼの効果が前形成されたバイオフィルムに及ぶかな否かを決定するために、ウェル当たり 10<sup>5</sup> 個の A. fumigatus 分生子を、上記のように、但しヒドロラーゼの非存在下で D M E M 培地に植え付けた。37、5 % C O<sub>2</sub> にて 18 時間インキュベーションした後、ニュートーター上で室温にて、結果として生じたバイオフィルムを E g a 3<sub>46-318</sub> で 1 μM の最終濃度にて 1.5 時間処理した。次に、バイオフィルムを洗い、上記のように染色した。

40

#### 【0327】

##### 結果：

未処理の 18 時間増殖 A. fumigatus バイオフィルムが、静かに洗った後にポリスチレンに付着したままであった一方で、1 μM E g a 3<sub>46-318</sub> の存在下で増殖させた分生子は全く付着しないことが見出された (図 47)。また、1 μM の濃度での E g a 3<sub>46-318</sub> の、前形成された、18 時間、A. fumigatus バイオフィルムへの添加及び室温での 1.5 時間のインキュベーションは、バイオフィルムの破壊をもたらした。図 47 から、E g a 3<sub>46-318</sub> が A. fumigatus の表面から N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 残基を分解できることが示唆される。蛍光レクチン S B A - F I T C で染色したとき、未処理の菌糸が広い範囲の表面 G a l N A c 修飾を示す一方で (左上)、0.5

50

μM E g a 3<sub>46</sub> - 3<sub>18</sub>での菌系の3時間の処理は表面の検出可能なG a l N A cの完全な消失をもたらした(右上)。菌系をD R A Q 5で対比染色した(下パネル)。両試料はともにA. fumigatus分生子の同じ密度で植え付け、E g a 3<sub>46</sub> - 3<sub>18</sub>での処理は結果として付着の消失、すなわち保持された菌系の消失をもたらしたことに留意することは重要である。

【0328】

本開示は現在のところ例とみなされることを参照して記載されてきたが、本開示は開示されている例に限定されないことが理解されるべきである。それとは反対に、本開示は添付の請求項の趣旨と範囲内に含まれるさまざまな修正及び同等の構成をカバーすることを意図する。

10

【0329】

刊行物、特許、及び特許出願はすべて、それぞれ個々の刊行物、特許、又は特許出願が参照によりその全体が組み込まれることが具体的且つ個々に示された場合と同程度に、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0330】

配列表

P s l G<sub>31</sub> - 4<sub>42</sub> (P. aeruginosa P A O 1)

E I Q V L K A P R A V V W K D F L G V N A Q F L W F S P E R Y N K Q I D R L Q D  
L G L E W V R L D L H W D R L E T A E D Q Y Q L A S L D Q L V K D L E A R Q L K  
S V F Y L V G S A R F I T T A P F Y S P F Q D Q Y P P R D P E V F A R R M A M L  
S Q R Y P S V A A W Q V W N E P N L I G F W R P K A D P E G Y A K L L Q A S T I  
A L R M V D P E K P V V S A G M A F F S E M P D G R T M F D A L G H L G V E S L  
G T I A T Y H P Y T Q L P E G N Y P W N L D F V S H A N Q I N R A L R N A G V P  
A I W S T E W G W S A Y K G P K E L Q D I I G V E G Q A D Y V L R R L A L M S A  
L D Y D R I F L F T L S D L D Q R A S V R D R D Y G L L D L D A N P K P V Y L A  
L Q R F L K V T G P K L R P A D P P V T E D L P D G S F S I G W T R E D G R N V  
W L F W S A R G G N V R L P K L K E A T L H D P L S G K V T P L S G S D G L E V  
P V K S S L Q M L V W E (配列番号11)

20

P e l A<sub>47</sub> - 3<sub>03</sub> (P. aeruginosa P A O 1)

G G P S S V A F W Y A E R P P L A E L S Q F D W V V L E A A H L K P A D V G Y L  
K E Q G S T P F A Y L S V G E F D G D A A A I A D S G L A R G K S A V R N Q A W  
N S Q V M D L A A P S W R A H L L K R A A E L R K Q G Y A G L F L D T L D S F Q  
L Q A E E R R E G Q R R A L A S F L A Q L H R Q E P G L K L F F N R G F E V L P  
E L P G V A S A V A V E S I H A G W D A A A G Q Y R E V P Q D D R D W L K G H L  
D A L R A Q G M P I V A I D Y L P P E R R D E A R A L A A R L R S E G Y V P F V  
S T P A L D Y L G V S D V E V Q P (配列番号12)

30

P e l A<sub>35</sub> - 2<sub>91</sub> (P. protogens P f - 5)

A A P A S V G F W Y A E Q P P L Q E L A Q F E W A V V E P G H M A S A D V A T L  
R K L G S Q P F A Y L S V G E F D G N R A A L A K Q A L A Q G A S P V R N K A W  
D S Q V M D I A T P A W R E H L F K R A K A L Q D Q G Y A G L F L D T L D S F Q  
L L P E A D R E P Q R K A L A S F L R E L H S R L P N L K L F F N R G F E V L G  
E L D G V A S A V A V E S I H A G W D A S A K R Y R P V S E A D R T W L E G E L  
K P L R A R N I P L V A I D Y L P A N R R E E A R K L V R Q L S Q E G F I P V V  
T T P D L N A L S M S T V E V Q P (配列番号13)

40

P e l A<sub>23</sub> - 2<sub>77</sub> (Geobacter metallireducens)

P P L S V A L Y Y G K Q P P V N D L H A F D I V V I D P D S G L T P S E Y G S G  
R S E L F A Y V S V G E A D T A R S Y T K Q M P D R W I I G K N P V W K S K I V

50

D V S S E E W K Q F F L D D V V E P L W Q A G Y R G F F L D T L D S Y L I A A P  
T E A H P R M E A G L V S V V R A I R Q R H P E A R L I L N R G F E I F D R V K  
D L V Y A V A A E S L F Q N F N T V S G K Y G A V D D K D R S W L T S R L N V I  
R E T G V P V I A I D Y V D P G N R P L M R E T A D K I R S L G F T P W V T D K  
D L A G L G I G S V E V M P R T V L G L Y D G G E G A G ( 配列番号 1 4 )

R a g A<sub>6 1 - 3 1 7</sub> ( *Ralstonia solanacearum* G M I 1 0 0 0 )

A D A P N I A W F Y G D K P P V A Q L R A F D A V V V E P D H G F D P S R A K T  
P T T Q W F A Y V S V G E V A P E R R W Y K E L P K A W L A G S N A A W A S H V  
I D Q S Q P Q W P A F Y V D R V I A P L W D R G Y R G F F L D T L D S Y Q L V A  
K D D A A R A A Q E A G M V R V I R A I K A R Y P E A K L I F N R G F E I L P Q  
V H D L A Y A V A F E S L Y R A W D Q G N K Q Y R E V N D A D R A W L M G Q A R  
K I Q D E Y H L P V I S I D Y C P P A D R A C A R E T A K R I K A Q G L I P Y V  
T D P A L S T I G V G R I E V L P ( 配列番号 1 5 )

10

P g a B<sub>2 2 - 6 7 2</sub> ( *Escherichia coli* K - 1 2 M G 1 6 5 5 )

I S Q S R T S F I P P Q D R E S L L A E Q P W P H N G F V A I S W H N V E D E A  
A D Q R F M S V R T S A L R E Q F A W L R E N G Y Q P V S I A Q I R E A H R G G  
K P L P E K A V V L T F D D G Y Q S F Y T R V F P I L Q A F Q W P A V W A P V G  
S W V D T P A D K Q V K F G D E L V D R E Y F A T W Q Q V R E V A R S R L V E L  
A S H T W N S H Y G I Q A N A T G S L L P V Y V N R A Y F T D H A R Y E T A A E  
Y R E R I R L D A V K M T E Y L R T K V E V N P H V F V W P Y G E A N G I A I E  
E L K K L G Y D M F F T L E S G L A N A S Q L D S I P R V L I A N N P S L K E F  
A Q Q I I T V Q E K S P Q R I M H I D L D Y V Y D E N L Q Q M D R N I D V L I Q  
R V K D M Q I S T V Y L Q A F A D P D G D G L V K E V W F P N R L L P M K A D I  
F S R V A W Q L R T R S G V N I Y A W M P V L S W D L D P T L T R V K Y L P T G  
E K K A Q I H P E Q Y H R L S P F D D R V R A Q V G M L Y E D L A G H A A F D G  
I L F H D D A L L S D Y E D A S A P A I T A Y Q Q A G F S G S L S E I R Q N P E  
Q F K Q W A R F K S R A L T D F T L E L S A R V K A I R G P H I K T A R N I F A  
L P V I Q P E S E A W F A Q N Y A D F L K S Y D W T A I M A M P Y L E G V A E K  
S A D Q W L I Q L T N Q I K N I P Q A K D K S I L E L Q A Q N W Q K N G Q H Q A  
I S S Q Q L A H W M S L L Q L N G V K N Y G Y Y P D N F L H N Q P E I D L I R P  
E F S T A W Y P K N D ( 配列番号 1 6 )

20

30

P g a B<sub>3 1 0 - 6 7 2</sub> ( *Escherichia coli* K - 1 2 M G 1 6 5 5 )

E K S P Q R I M H I D L D Y V Y D E N L Q Q M D R N I D V L I Q R V K D M Q I S  
T V Y L Q A F A D P D G D G L V K E V W F P N R L L P M K A D I F S R V A W Q L  
R T R S G V N I Y A W M P V L S W D L D P T L T R V K Y L P T G E K K A Q I H P  
E Q Y H R L S P F D D R V R A Q V G M L Y E D L A G H A A F D G I L F H D D A L  
L S D Y E D A S A P A I T A Y Q Q A G F S G S L S E I R Q N P E Q F K Q W A R F  
K S R A L T D F T L E L S A R V K A I R G P H I K T A R N I F A L P V I Q P E S  
E A W F A Q N Y A D F L K S Y D W T A I M A M P Y L E G V A E K S A D Q W L I Q  
L T N Q I K N I P Q A K D K S I L E L Q A Q N W Q K N G Q H Q A I S S Q Q L A H  
W M S L L Q L N G V K N Y G Y Y P D N F L H N Q P E I D L I R P E F S T A W Y P  
K N D ( 配列番号 1 7 )

40

B p s B<sub>2 7 - 7 0 1</sub> ( *Bordetella bronchiseptica* R B 5 0 )

Y K V D M L P P P D P D D G L T F R V L C M H D V R D N L R A S F A D M P D Q F  
A I E T R T L T D L F E W I R V K G F N P I S M Q Q I I D S R A G V R P L P P R  
P I L L T F D D G Y A S T Y T K V F P L L K K F N Y P A V V A V V T S W T D A P

50

AGTKIRLSPKIEVPHDFFMTWAQLREMAQSGLVELASHSH  
NLHRGVLANPQGNEQPAASSRQYLPASGRYENDA EYRARV  
RQDLKTSADLIREHTGVTIRSIVWPYGAHNRD TDQVAAEV  
GLNIGLTLQPGPNTPDVALTQIRRS LVDYEVNVATVARAM  
REPVS YHGQVRPIERIVQVDLDYIYDPDPEQQNRNLGQLI  
DRMKDLAPSAVY LQAFADPKGDGDITEVYFPNRHLPMRAD  
LFNRVAWQLKTRAGVMVYAWLPVLTFSVP PGNPAYGKVVQ  
STTRKPGERGLGSPTRLSPFHPDAHRVISEIYEDLAKAAH  
FDGLLFHDDAVLDDTEDSSPEALATYQGWGLPPDIAAIRA  
DPKLAQQWSK GKIRYLIDFTMHLRHIVSGYQNDRDMVVAR  
NLYAQPVLDPVSEAWYGQSLPEFLKSYDFVALMAMPNMEG  
AARPEQWMRQLVAAVARQKGLDRTIFELQARDWRVGKPID  
TEILRRQM VQLRSLGAINYGYYPDDFI ANHPDAEALRDVM  
SLKSTLEKRRLTKAQELSRQT TLYGSASQA EPTQR (配列番号  
18)

10

BpsB<sub>318-670</sub> (*Bordetella bronchiseptica* RB50)

PIERIVQVDLDYIYDPDPEQQNRNLGQLIDRMKDLAPSAV  
YLQAFADPKGDGDITEVYFPNRHLPMRADLFNRVAWQLKT  
RAGVMVYAWLPVLTFSVP PGNPAYGKVVQSTTRKPGERGL  
GSPTRLSPFHPDAHRVISEIYEDLAKAAHFDGLLFHDDAV  
LDDTEDSSPEALATYQGWGLPPDIAAIRADPKLAQQWSK G  
KIRYLIDFTMHLRHIVSGYQNDRDMVVARNLYAQPVLDPV  
SEAWYGQSLPEFLKSYDFVALMAMPNMEGAARPEQWMRQL  
VAAVARQKGLDRTIFELQARDWRVGKPIDTEILRRQM VQL  
RSLGAINYGYYPDDFI ANHPDAEALRDVMSLK S (配列番号19  
)

20

Sph3<sub>52-298</sub> (*Aspergillus fumigatus* Af293)

SKVFVPLYVYPAPGAWTPLEDVISKHPDVNFTTVVINPGSG  
PGPNALPDGNYTREIPKLASYENVRL LGYVATTYAKRNIS  
LVRRDIETYAAWPTNS SNPALAVRG IFFDET PQQYDE DAL  
AYLQELTDVVKNT PGLGPDHYV VHNPGAI PDSRYLSTADS  
TVVFEATYDTFQERHGAKLFEAIPDSNRSQLCAVIHSVPE  
SVEGSALRS LVKQVRKVADEIFITHLDTDY YASFGRQWPE  
FVDLMGK (配列番号20)

30

Sph3<sub>AC</sub> (54-304) (*Aspergillus clavatus* NRRL 1)

MGP KSKVFVPLYVYPAPGAWDPLEDVISKHPDVNFTTVVIN  
PGSGPGPEALPDGNYTREIPKLASYENVRL LGYVATTYAK  
RNISEVRRDIETYAAWPTQS SNANLAVRG IFFDET PQQ Y  
DADILAYLRELTDVVKGTSG L GPDHYV VHNPGAI PDSRYL  
STADSTVVFEATYATFQERHGAELFD T I PDSHRDQLCAVI  
HSVP TSVEGS DLRGLVKQVRQVADEIFITHLETDY YAGFG  
GQWSEFVDLMAS (配列番号22)

40

Sph3<sub>AN</sub> (43-299) (*Aspergillus nidulans* FGSC A4)

RRKNNNMGP KAKVFVPLYVYPAPGAWDPLVNVITAH P DVN  
FTVVVNPGSGPGPNPLPDRNYTQEIPRLTAHDNVRVLGYV  
ATTYAKRNIS SVRNDIETYAAWPTIS ANPKLAVRG IFFDE

50

T P Q Q Y N A S D L A Y L E E L T S V V K N T P G L G P D H F V F H N P G V V P  
D P R Y L S T A D S T V V F E A T Y D T F Q D R D G A R L F E T I P N S N R S Q  
L C A V V H S V P D S V E G S E L R K F V K Q A R R V A D E I F V T H L S T N Y  
Y A S F G D K W D D F V R L M A Q ( 配列番号 2 3 )

E g a 3 4 6 - 3 1 8 *Aspergillus fumigatus* A f 2 9 3 )

G L G G G G G G E G E E G S G G E T T P P E G N Y T T A K W Q P A V G T K W Q I  
E L L Y A L N D T S V D A E I Y D I D L F I N D K S T I A G L Q R A G R K V I C  
Y F S A G S Y E N W R P D K D K F K D S D L G H D L D D W P G E K W L N I S S A  
N V R Q I M L D R L D M A R D K G C D G V D P D N V D G Y D N D N G L D L T Q A  
D S I S F V N F L A N A A H A R N M S I G L K N A G D I I P S V I K N M Q W S V  
N E Q C A Q Y N E C D T Y A V F P Q N G K P V F H I E Y P K G D K T N N D L S V  
T A S Q K N A A C D F A G S A N F S T V I K N M N L N N W V E Y C ( 配列番号 2 1  
)

10

【 0 3 3 1 】

#### 参考文献

- Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, et al. 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 213-21
- Afonine PV, Mustyakimov M, Grosse-Kunstleve RW, Moriarty NW, Langan P, Adams PD. 2010. Joint X-ray and neutron refinement with phenix.refine. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66: 1153-63
- Alhede M, Kragh KN, Qvortrup K, Allesen-Holm M, van Gennip M, et al. 2011. Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. *PLoS one* 6: e27943
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-10
- Anthon GE, Barrett DM. 2002. Determination of reducing sugars with 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Analytical biochemistry* 305: 287-9
- Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N. 2010. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 38: W529-33
- Bagos PG, Nikolaou EP, Liakopoulos TD, Tsirigos KD. 2010. Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. *Bioinformatics* 26: 2811-7
- Bakkevig K, Sletta H, Gimmetstad M, Aune R, Ertesvag H, et al. 2005. Role of the *Pseudomonas fluorescens* alginate lyase (AlgL) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment. *J Bacteriol* 187: 8375-84
- Bardas GA, Veloukas T, Koutita O, Karaoglanidis GS. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest management science* 66: 967-73
- Billings N, Millan M, Caldara M, Rusconi R, Tarasova Y, et al. 2013. The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* 9: e1003526
- Bjarnsholt T. 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS. Supplementum*: 1-51
- Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Hoiby N. 2013. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nature reviews. Drug discovery* 12: 791-808
- Bragonzi A, Farulla I, Paroni M, Twomey KB, Pirone L, et al. 2012. Modelling co-

20

30

40

50

- infection of the cystic fibrosis lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* reveals influences on biofilm formation and host response. *PloS one* 7: e52330
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology* 13: 20-6
- Byrd MS, Pang B, Hong W, Waligora EA, Juneau RA, et al. 2011. Direct evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm mediators in a chronic infection model. *Infection and immunity* 79: 3087-95
- Byrd MS, Pang B, Mishra M, Swords WE, Wozniak DJ. 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF-kappaB activation in A549 cells. *mBio* 1
- Byrd MS, Sadovskaya I, Vinogradov E, Lu H, Sprinkle AB, et al. 2009. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol* 73: 622-38
- Cerca N, Jefferson KK, Maira-Litran T, Pier DB, Kelly-Quintos C, et al. 2007. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. *Infect Immun* 75: 3406-13
- Choi AH, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litran T. 2009. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol* 191: 5953-63
- Colvin KM, Alnabelseya N, Baker P, Whitney JC, Howell PL, Parsek MR. 2013. PelA deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 195: 2329-39
- Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, et al. 2011. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* 7: e1001264
- Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, et al. 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental microbiology* 14: 1913-28
- Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. 2010. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* 77: 1439-55
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, et al. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of microbiology* 41: 435-64
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-22
- Cywes-Bentley C, Skurnik D, Zaidi T, Roux D, Deoliveira RB, et al. 2013. Antibody to a conserved antigenic target is protective against diverse prokaryotic and eukaryotic pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2209-18
- Darouiche RO, Mansouri MD, Gawande PV, Madhyastha S. 2009. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB combination. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64: 88-93
- Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews. Drug discovery* 2: 114-22
- Davies G, Henrissat B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-9
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, et al. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*

gy 13: 414-30

Digiandomenico A, Warrener P, Hamilton M, Guillard S, Ravn P, et al. 2012. Identification of broadly protective human antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl by phenotypic screening. *The Journal of experimental medicine* 209: 1273-87

Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, et al. 2007. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res* 35: W522-5

Donelli G, Francolini I, Romoli D, Guaglianone E, Piozzi A, et al. 2007. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 2733-40

Ellis M, Richardson M, de Pauw B. 2000. *Epidemiology. Hospital medicine* 61: 605-9

Emsley P, Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2126-32

Escobar-Chavez JJ, Lopez-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. 2006. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 9: 339-58

Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology* 8: 623-33

Fontaine T, Delangle A, Simenel C, Coddeville B, van Vliet SJ, et al. 2011. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* 7: e1002372

Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. 2011. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* 2: 167

Friedman L, Kolter R. 2004a. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* 51: 675-90

Friedman L, Kolter R. 2004b. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* 186: 4457-65

Gawande PV, Leung KP, Madhyastha S. 2014. Antibiofilm and Antimicrobial Efficacy of DispersinB-KSL-W Peptide-Based Wound Gel Against Chronic Wound Infection Associated Bacteria. *Current microbiology*

Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in mycology* 59: 1-10

Grabke A, Fernandez-Ortuno D, Amiri A, Li X, Peres NA, et al. 2014. Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology* 104: 396-402

Gravelat FN, Beauvais A, Liu H, Lee MJ, Snarr BD, et al. 2013. *Aspergillus galactosaminogalactan* mediates adherence to host constituents and conceals hyphal  $\beta$ -glucan from the immune system. *PLoS pathogens* 9: e1003575

Gravelat FN, Doedt T, Chiang LY, Liu H, Filler SG, et al. 2008. In vivo analysis of *Aspergillus fumigatus* developmental gene expression determined by real-time reverse transcription-PCR. *Infect. Immun.* 76: 3632-39

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the na

10

20

30

40

50

- tural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108
- Hare NJ, Solis N, Harmer C, Marzook NB, Rose B, et al. 2012. Proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* AES-1R, PAO1 and PA14 reveals potential virulence determinants associated with a transmissible cystic fibrosis-associated strain. *BMC microbiology* 12: 16
- Henrissat B, Bairoch A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *The Biochemical journal* 316 ( Pt 2): 695-6
- Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436: 1171-5
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35: 322-32
- Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, et al. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *International journal of oral science* 3: 55-65
- Holm L, Kaariainen S, Rosenstrom P, Schenkel A. 2008. Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* 24: 2780-1
- Huse HK, Kwon T, Zlosnik JE, Speert DP, Marcotte EM, Whiteley M. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* Enhances Production of a Non-Alginate Exopolysaccharide during Long-Term Colonization of the Cystic Fibrosis Lung. *PloS one* 8: e82621
- Irie Y, Borlee BR, O'Connor JR, Hill PJ, Harwood CS, et al. 2012. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 20632-6
- Itoh Y, Rice JD, Goller C, Pannuri A, Taylor J, et al. 2008. Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin in poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *Journal of bacteriology* 190: 3670-80
- Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston JF, 3rd, Romeo T. 2005. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *Journal of bacteriology* 187: 382-7
- Izano EA, Sadovskaya I, Vinogradov E, Mulks MH, Velliyagounder K, et al. 2007. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial pathogenesis* 43: 1-9
- Izano EA, Sadovskaya I, Wang H, Vinogradov E, Ragunath C, et al. 2008. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial pathogenesis* 44: 52-60
- Jackson KD, Starkey M, Kremer S, Parsek MR, Wozniak DJ. 2004. Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *Journal of bacteriology* 186: 4466-75
- Jain S, Ohman DE. 1998. Deletion of algK in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* blocks alginate polymer formation and results in uronic acid secretion. *Journal of bacteriology* 180: 634-41
- Jarrett CO, Deak E, Isherwood KE, Oyston PC, Fischer ER, et al. 2004. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *J Infect Dis* 190: 783-92
- Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of molecular biology* 338: 1027-36
- Kaplan JB, Velliyagounder K, Ragunath C, Rohde H, Mack D, et al. 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *Journal of bacteriology* 186: 8213-20
- Kelley LA, Sternberg MJ. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case s

tudy using the Phyre server. Nature protocols 4: 363-71

Kim J, Hahn JS, Franklin MJ, Stewart PS, Yoon J. 2009. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. The Journal of antimicrobial chemotherapy 63: 129-35

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. Journal of molecular biology 305: 567-80

Kukavica-Ibrulj I, Bragonzi A, Paroni M, Winstanley C, Sanschagrin F, et al. 2008. In vivo growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PA01 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. Journal of bacteriology 190: 2804-13

Kumar CG, Anand SK. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International journal of food microbiology 42: 9-27

Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, et al. 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome biology 7: R90

Lee JE, Cornell KA, Riscoe MK, Howell PL. 2001. Structure of *E. coli* 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase reveals similarity to the purine nucleoside phosphorylases. Structure 9: 941-53

Leroch M, Plesken C, Weber RW, Kauff F, Scalliet G, Hahn M. 2013. Gray mold populations in german strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. Appl Environ Microbiol 79: 159-67

Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. 2001. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 32: 358-66

Little DJ, Li G, Ing C, DiFrancesco BR, Bamford NC, et al. 2014. Modification and periplasmic translocation of the biofilm exopolysaccharide poly- $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine. Proc Natl Acad Sci U S A Submitted

Little DJ, Poloczek J, Whitney JC, Robinson H, Nitz M, Howell PL. 2012a. The structure- and metal-dependent activity of *Escherichia coli* PgaB provides insight into the partial de-N-acetylation of poly- $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine. The Journal of biological chemistry 287: 31126-37

Little DJ, Whitney JC, Robinson H, Yip P, Nitz M, Howell PL. 2012b. Combining in situ proteolysis and mass spectrometry to crystallize *Escherichia coli* PgaB. Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications 68: 842-5

Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic acids research 42: D490-5

Loussert C, Schmitt C, Prevost MC, Balloy V, Fadel E, et al. 2010. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. Cellular microbiology 12: 405-10

Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. PLoS pathogens 5: e1000354

Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek MR, Wozniak DJ. 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. Journal of bacteriology 188: 8213-21

Ma L, Wang S, Wang D, Parsek MR, Wozniak DJ. 2012. The roles of biofilm matrix polysaccharide Psl in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. FEMS immunology and

10

20

30

40

50

- medical microbiology 65: 377-80
- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, et al. 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 178: 175-83
- Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426: 306-10
- Maharaj R, May TB, Wang SK, Chakrabarty AM. 1993. Sequence of the alg8 and alg44 genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 136 : 267-9 10
- Mann EE, Wozniak DJ. 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS microbiology reviews* 36: 893-916
- Manuel SG, Ragunath C, Sait HB, Izano EA, Kaplan JB, Ramasubbu N. 2007. Role of active-site residues of dispersin B, a biofilm-releasing beta-hexosaminidase from a periodontal pathogen, in substrate hydrolysis. *The FEBS journal* 274: 5987-99
- Matsukawa M, Greenberg EP. 2004. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of bacteriology* 186: 4449-56
- McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, et al. 1999. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 284: 1523-7 20
- Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. 2005. Growing and analyzing static biofilms. *Current protocols in microbiology* Chapter 1: Unit 1B 1
- Michielse CB, Rep M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology* 10: 311-24
- Mishra M, Byrd MS, Sergeant S, Azad AK, Parsek MR, et al. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cellular microbiology* 14: 95-106 30
- Monday SR, Schiller NL. 1996. Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of AlgL (alginate lyase) and AlgX. *Journal of bacteriology* 178: 625-32
- Nieman CE, Wong AW, He S, Clarke L, Hopwood JJ, Withers SG. 2003. Family 39 alpha-L-iduronidases and beta-D-xylosidases react through similar glycosyl-enzyme intermediates: identification of the human iduronidase nucleophile. *Biochemistry* 42: 8054-65
- Otwinowski Z, Minor W. 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, pp. 307-26: Elsevier
- Painter J, Merritt EA. 2006. Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62: 439-50 40
- Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R. 2007. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* 189: 750-60
- Park BH, Karpinets TV, Syed MH, Leuze MR, Uberbacher EC. 2010. CAZymes Analysis Toolkit (CAT): web service for searching and analyzing carbohydrate-active enzymes in a newly sequenced organism using CAZy database. *Glycobiology* 20: 1574-84
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8: 785-6
- Pokrovskaya V, Poloczek J, Little DJ, Griffiths H, Howell PL, Nitz M. 2013. Functional characterization of *Staphylococcus epidermidis* IcaB, a de-N-acetylase imp 50

important for biofilm formation. *Biochemistry* 52: 5463-71

Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268 : 1899-902

Rodriguez A, Acosta A, Rodriguez C. 2014. Fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in tomato greenhouses in the Canary Islands and effectiveness of non-chemical treatments against gray mold. *World journal of microbiology & biotechnology* 30: 2397-406

Rybtke MT, Jensen PO, Hoiby N, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. 2011. The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections. *Inflammation & allergy drug targets* 10: 141-57 10

Sang H, Hulvey J, Popko JT, Jr., Lopes J, Swaminathan A, et al. 2015. A pleiotropic drug resistance transporter is involved in reduced sensitivity to multiple fungicide classes in *Sclerotinia homoeocarpa* (F.T. Bennett). *Molecular plant pathology* 16: 251-61

Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. 2005. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic acids research* 33: W363-7

Singh N. 2000. The current management of infectious diseases in the liver transplant recipient. *Clinics in liver disease* 4: 657-73, ix

Skurnik D, Roux D, Aschard H, Cattoir V, Yoder-Himes D, et al. 2013. A comprehensive analysis of in vitro and in vivo genetic fitness of *Pseudomonas aeruginosa* using high-throughput sequencing of transposon libraries. *PLoS pathogens* 9: e1003582 20

Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R. 2007. The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol* 189: 8270-6

St John FJ, Gonzalez JM, Pozharski E. 2010. Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: a dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups. *FEBS letters* 584: 4435-41

Starkey M, Hickman JH, Ma L, Zhang N, De Long S, et al. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* 191: 3492-503 30

Stewart PS. 2003. New ways to stop biofilm infections. *Lancet* 361: 97

Stewart PS, Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-8

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, et al. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-64

Sutherland I. 2001a. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9 40

Sutherland IW. 2001b. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9: 222-7

Terwilliger TC, Berendzen J. 1999. Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55: 849-61

Tian L, Xu S, Hutchins WC, Yang CH, Li J. 2014. Impact of the exopolysaccharides Pel and Psl on the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to sand. *Biofouling* 30: 213-22

Tong KB, Lau CJ, Murtagh K, Layton AJ, Seifeldin R. 2009. The economic impact of aspergillosis: analysis of hospital expenditures across patient subgroups. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the In* 50

ternational Society for Infectious Diseases 13: 24-36

Turk R, Singh A, Rousseau J, Weese JS. 2013. In vitro evaluation of DispersinB on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* biofilm. *Veterinary microbiology* 166: 576-9

Van Houdt R, Michiels CW. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology* 109: 1117-31

Vocadlo DJ, MacKenzie LF, He S, Zeikus GJ, Withers SG. 1998. Identification of Glu-277 as the catalytic nucleophile of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* beta-xylorhammase using electrospray MS. *The Biochemical journal* 335 ( Pt 2): 449-55

Vocadlo DJ, Wicki J, Rupitz K, Withers SG. 2002. A case for reverse protonation: identification of Glu160 as an acid/base catalyst in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* beta-xylorhammase and detailed kinetic analysis of a site-directed mutant. *Biochemistry* 41: 9736-46

Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14: 2535-54

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao YF, Fischer ER, et al. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 279: 54881-86

Wang S, Parsek MR, Wozniak DJ, Ma LZ. 2013. A spider web strategy of type IV pili-mediated migration to build a fibre-like Psl polysaccharide matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 15: 2238-53

Wang X, Preston JF, 3rd, Romeo T. 2004. The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* 186: 2724-34

Wasylnka JA, Hissen AH, Wan AN, Moore MM. 2005. Intracellular and extracellular growth of *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology* 43 Suppl 1: S27-30

Wasylnka JA, Moore MM. 2000. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infection and immunity* 68: 3377-84

Wasylnka JA, Moore MM. 2002. Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infection and immunity* 70: 3156-63

Wasylnka JA, Moore MM. 2003. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *Journal of cell science* 116: 1579-87

Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, et al. 2007. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 8101-6

Wierenga RK. 2001. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS letters* 492: 193-8

Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. 2013. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19: 107-12

Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, Boyd D, Wu K, et al. 2003. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8484-9

Yakandawala N, Gawande PV, LoVetri K, Cardona ST, Romeo T, et al. 2011. Characterization of the poly-beta-1,6-N-acetylglucosamine polysaccharide component of *Burkholderia* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 77: 8303-9

Zegans ME, Wozniak D, Griffin E, Toutain-Kidd CM, Hammond JH, et al. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl promotes resistance to the biofilm inhibitor polysorbate 80. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56: 4112-22

Zhao K, Tseng BS, Beckerman B, Jin F, Gibiansky ML, et al. 2013. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 497: 388-91

【 図 1 】

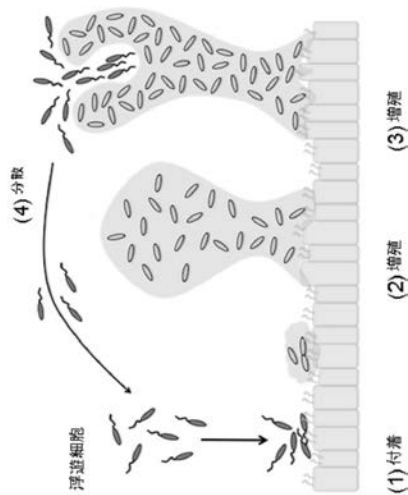


図 1

【 図 2 】

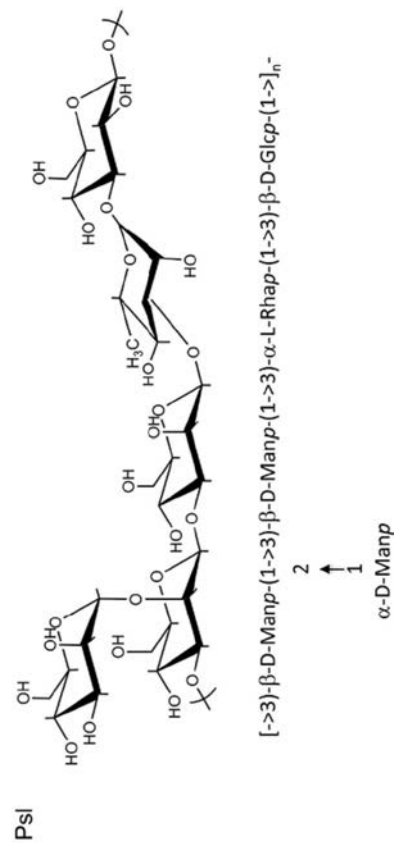


図 2

図3

【図3】

pelGに対する  
配列同一性

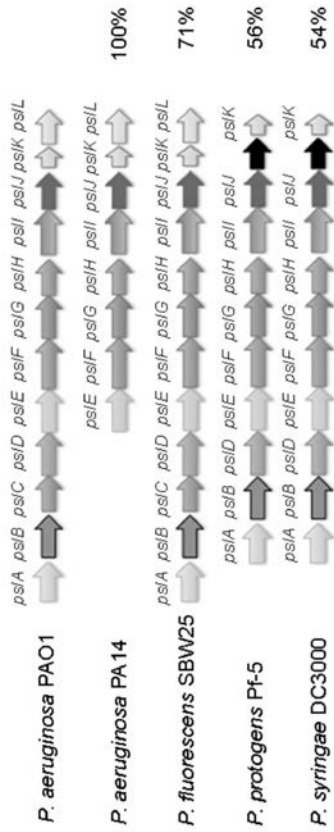


図5

【図5】

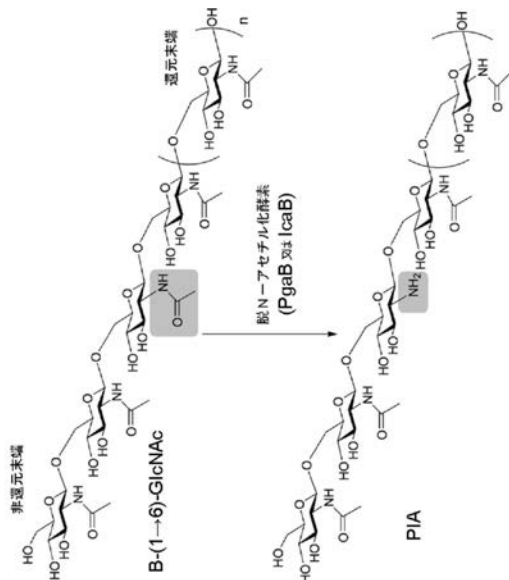


図4

【図4】

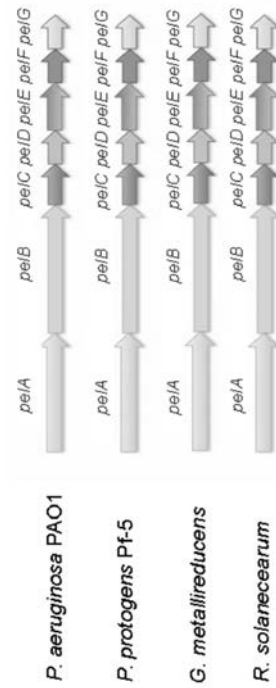


図6

【図6】

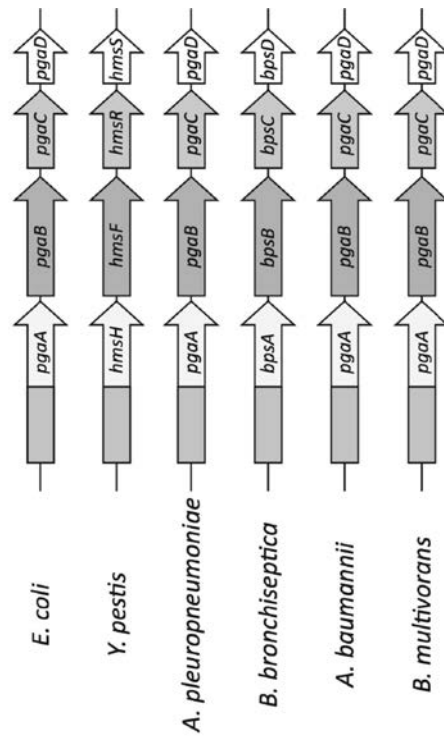
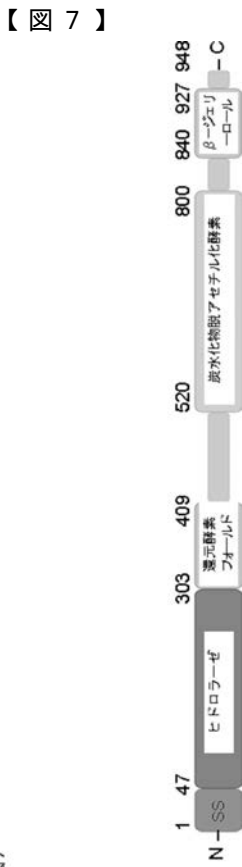


図7



【図9】

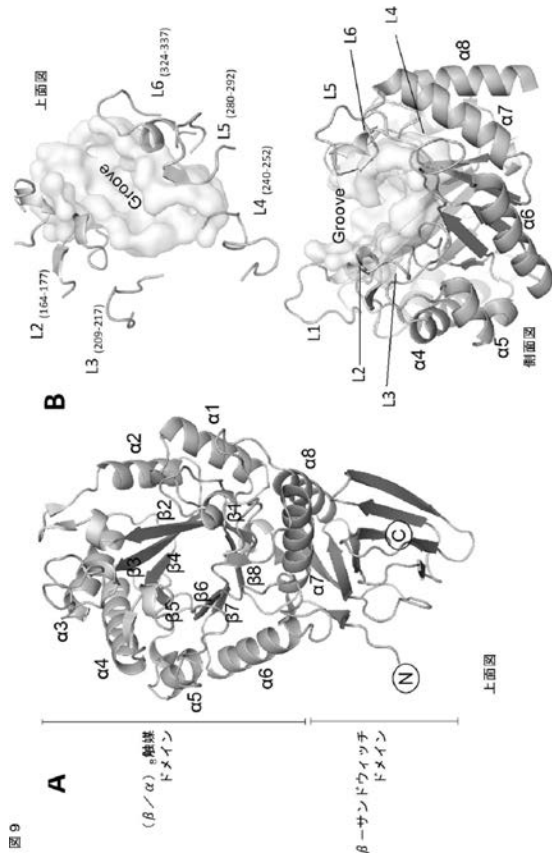
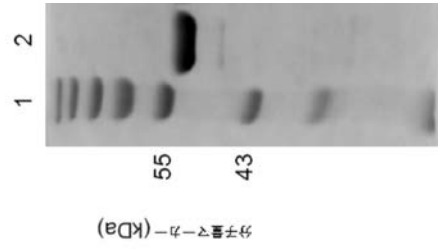


図8

【図8】



【図10】

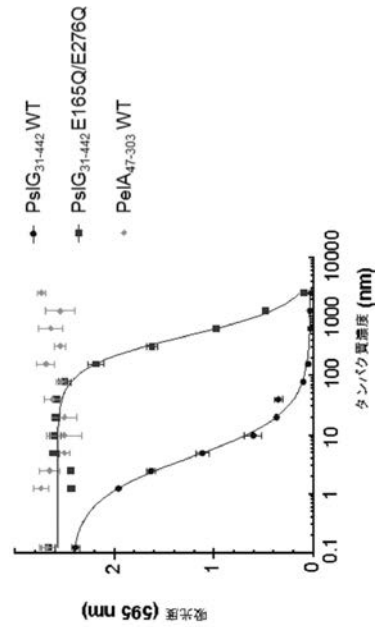


図 1 1 A

【 図 1 1 A 】

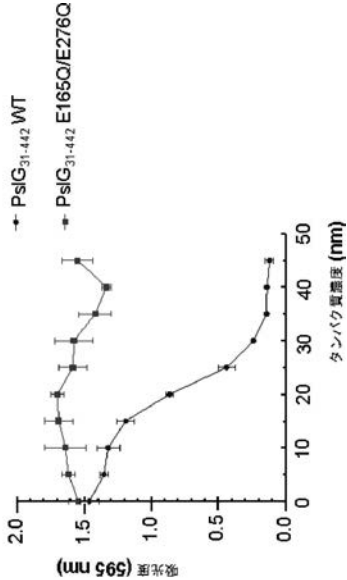


図 1 2

【 図 1 2 】

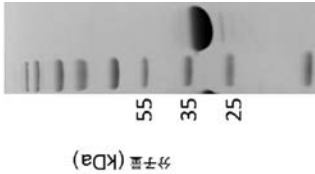


図 1 1 B

【 図 1 1 B 】

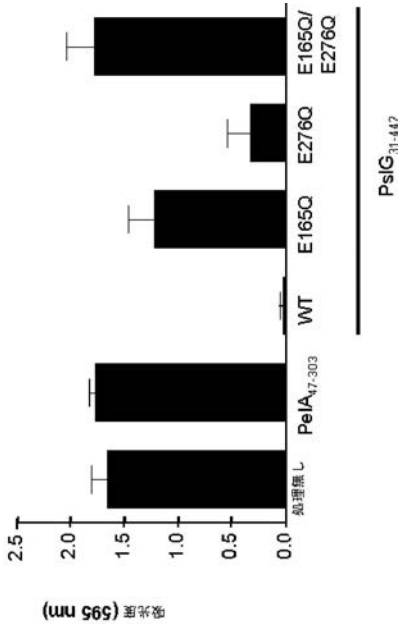
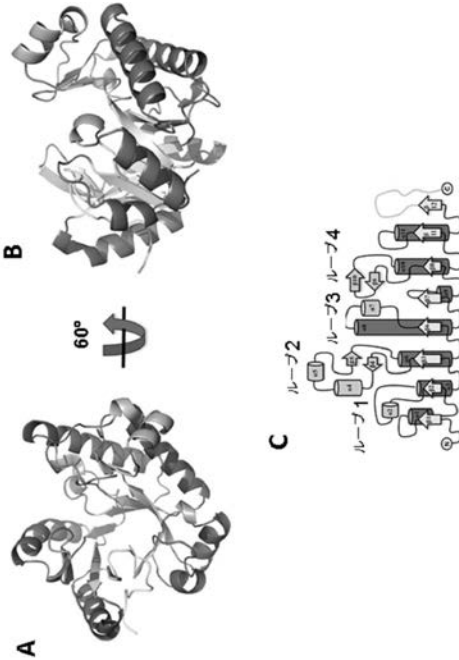


図 1 3

【 図 1 3 】



【図 14】

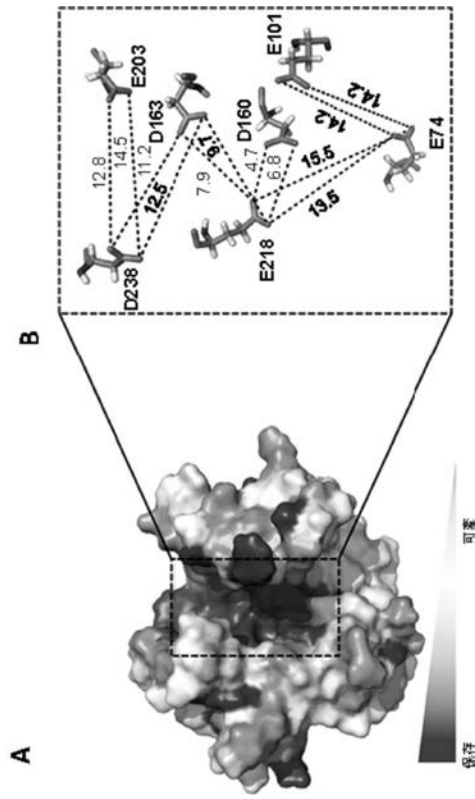


図 14

【図 16】

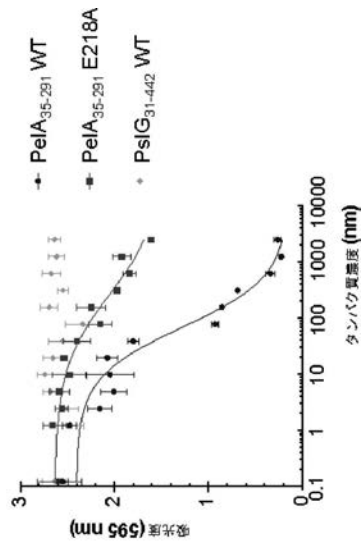


図 16

【図 15】

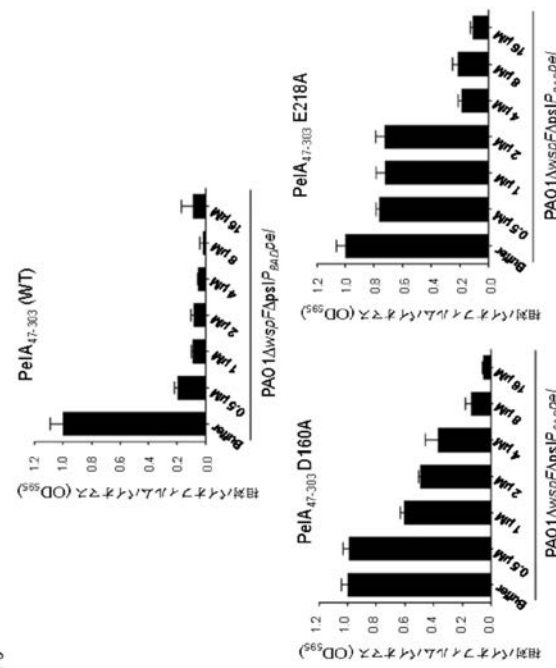


図 15

【図 17 A】

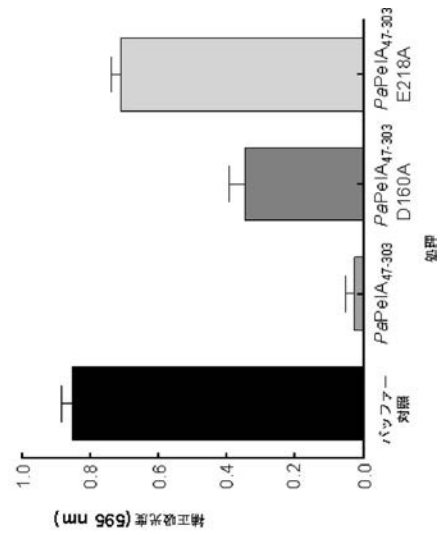


図 17 A

図17B

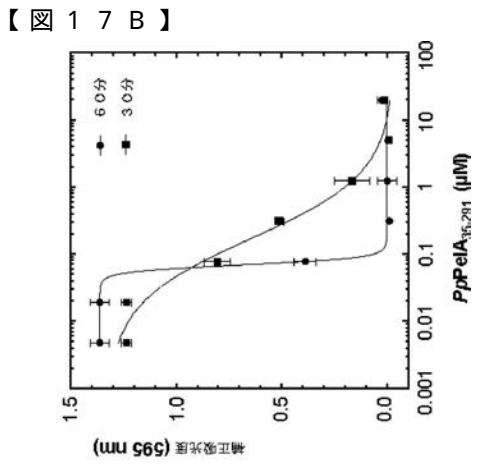


図18A

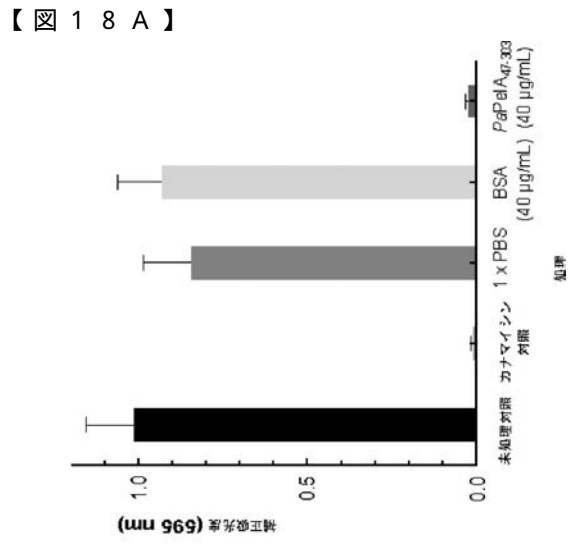


図18B-D

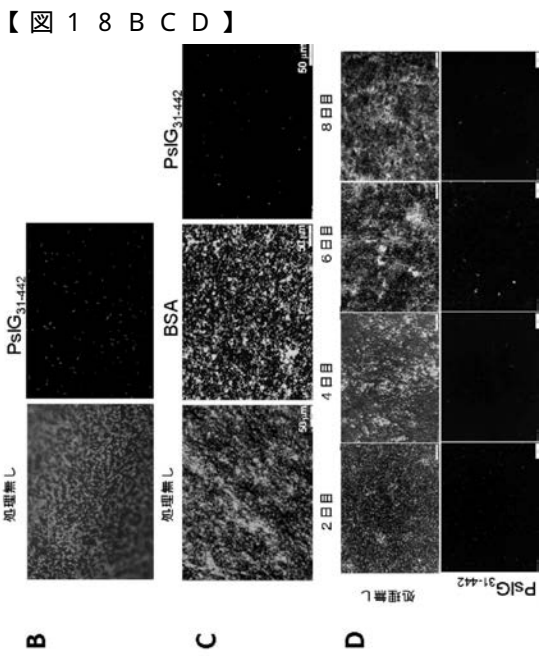
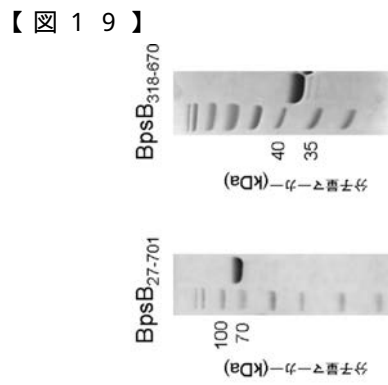


図19



【 図 2 0 】

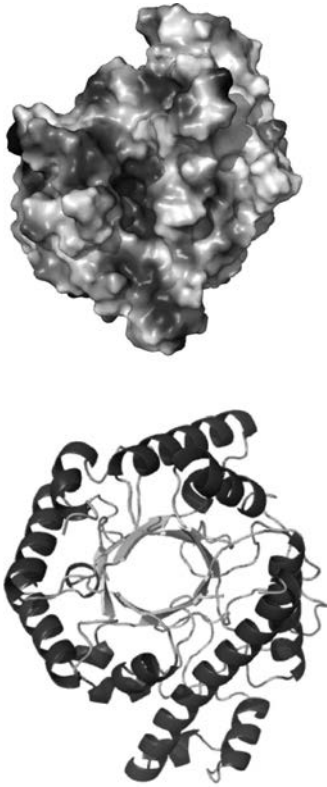


図 2 0

【 図 2 1 】

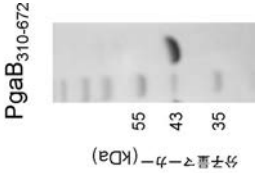


図 2 1

【 図 2 2 A 】

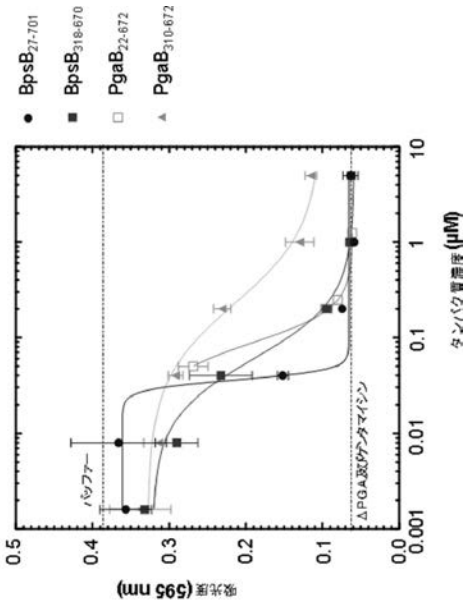


図 2 2 A

【 図 2 2 B 】

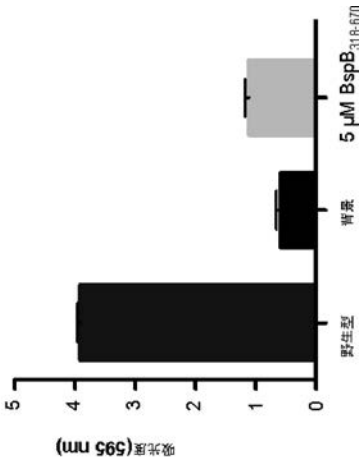


図 2 2 B

【図 2 3 A】

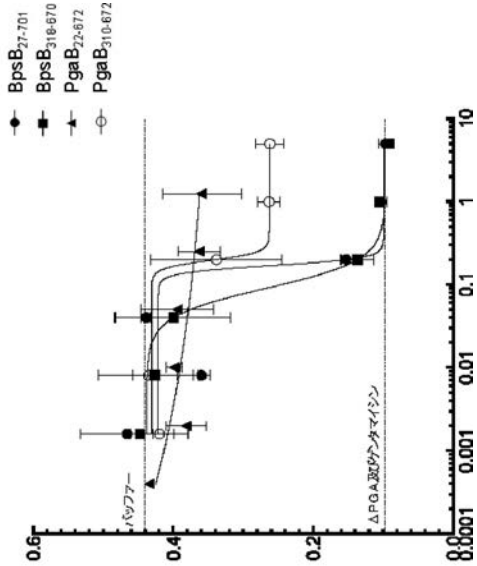


図 2 3 A

【図 2 3 B】

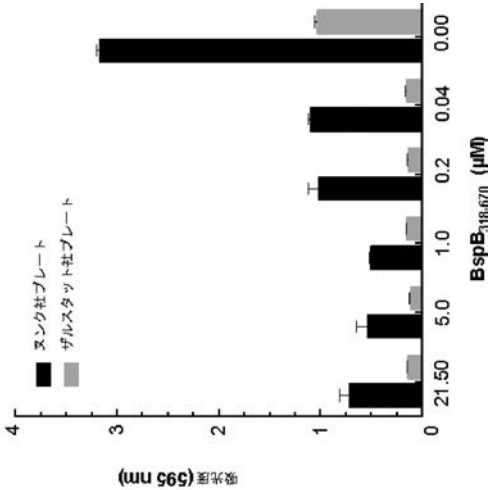


図 2 3 B

【図 2 3 C】

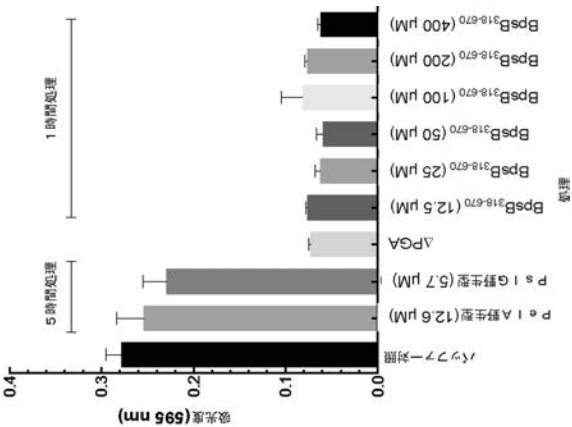


図 2 3 C

【図 2 4】

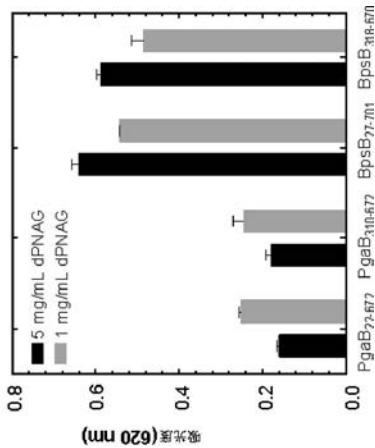


図 2 4

【 図 2 5 A 】

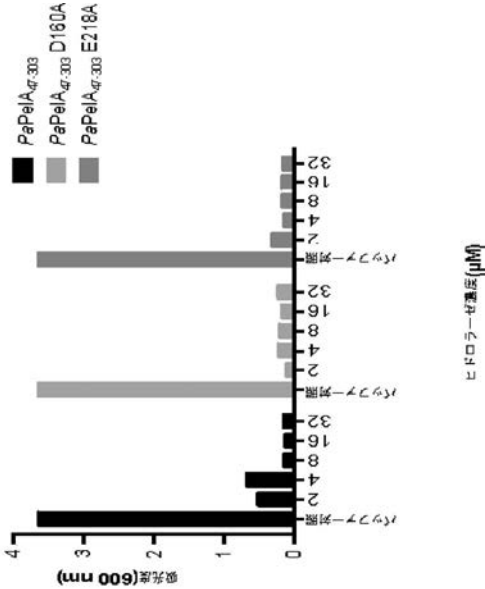


図 2 5 A

【 図 2 5 B 】

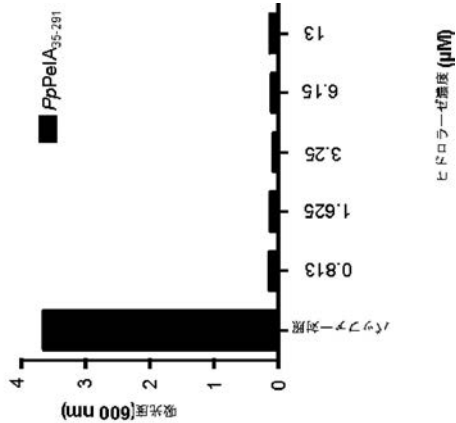


図 2 5 B

【 図 2 6 】

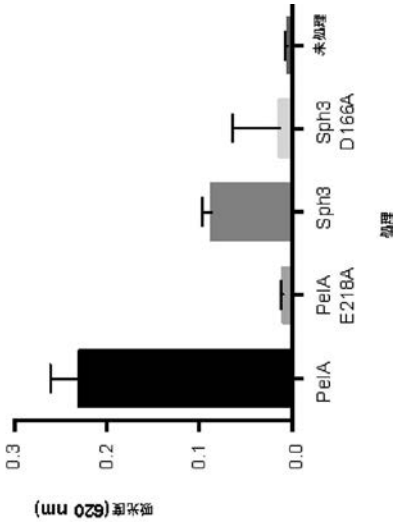


図 2 6

【 図 2 7 】

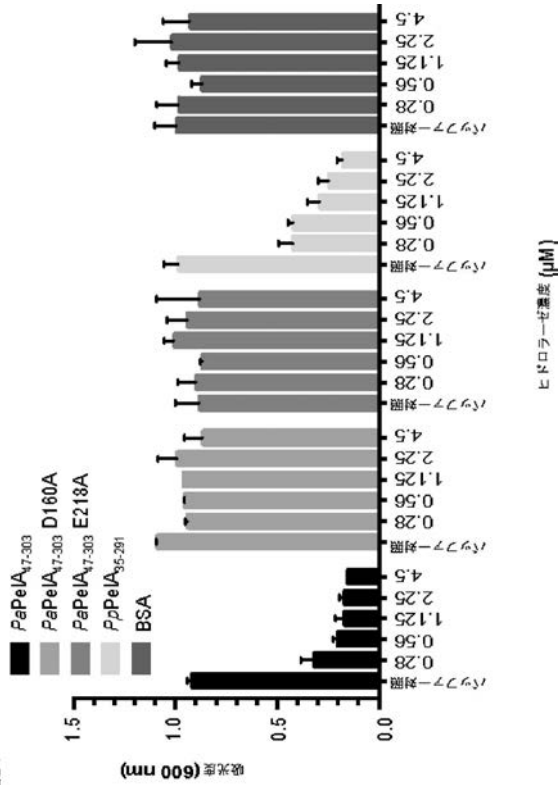
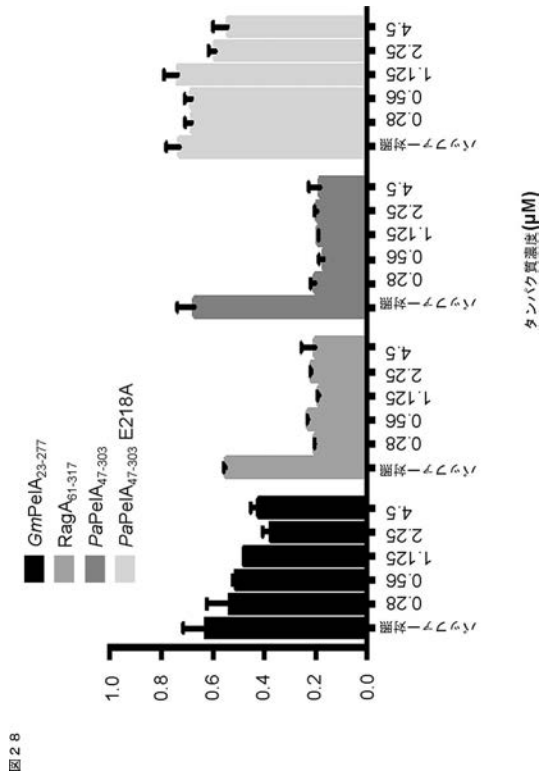
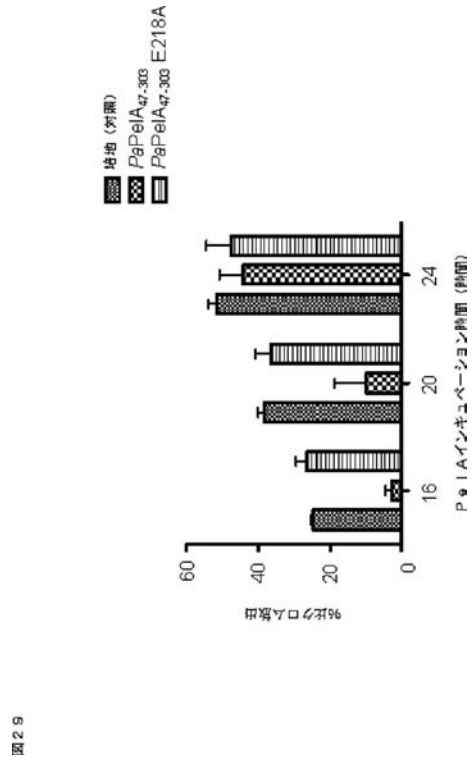


図 2 7

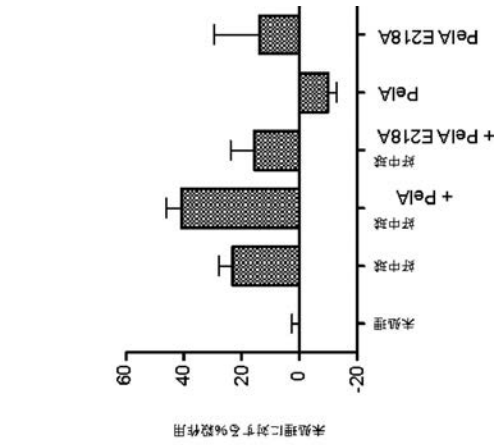
【図28】



【図29】



【図30】



【図31】

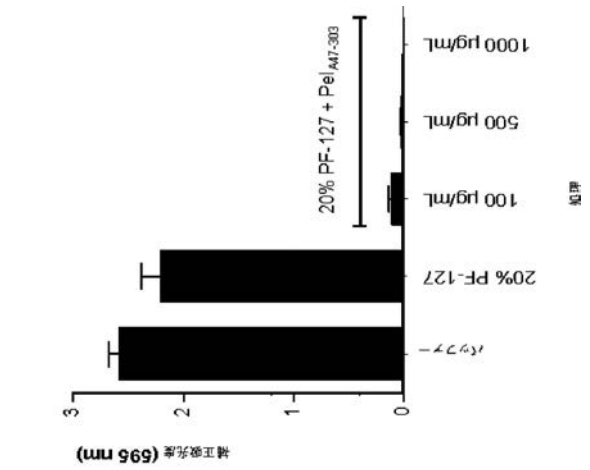


図28

図29

図30

図31

【 図 3 2 】

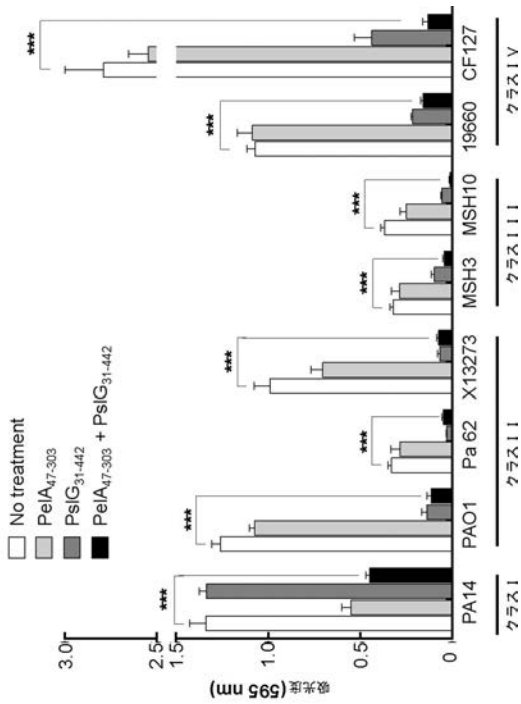


図 3 2

【 図 3 4 】

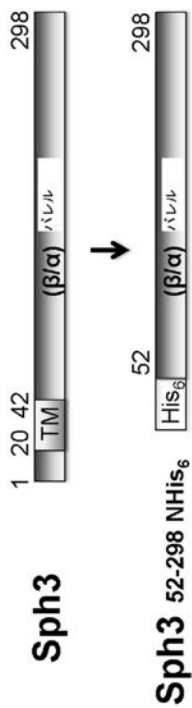


図 3 4

【 図 3 3 】

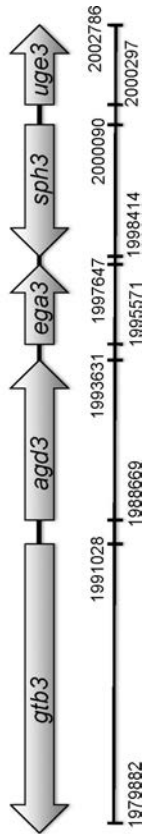


図 3 3

【 図 3 5 】

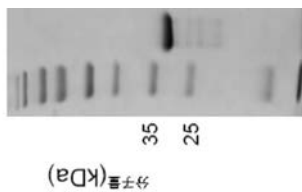
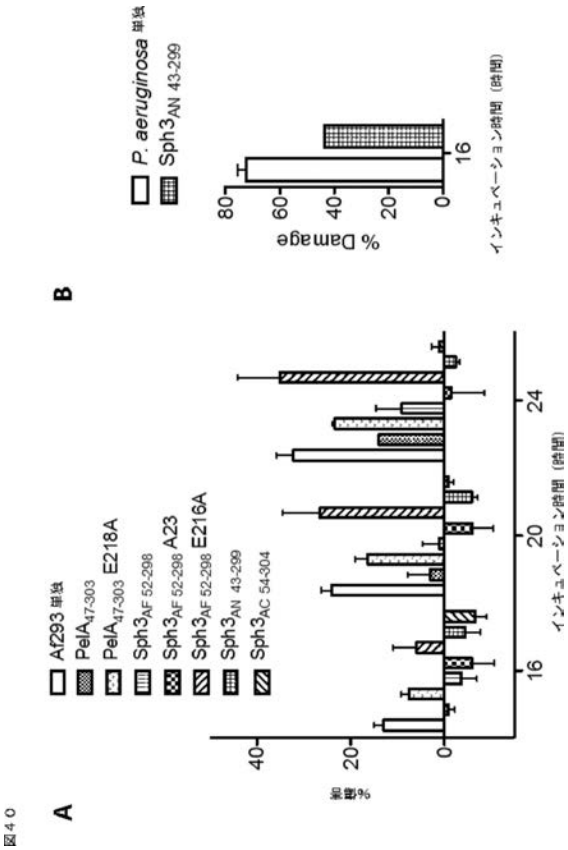


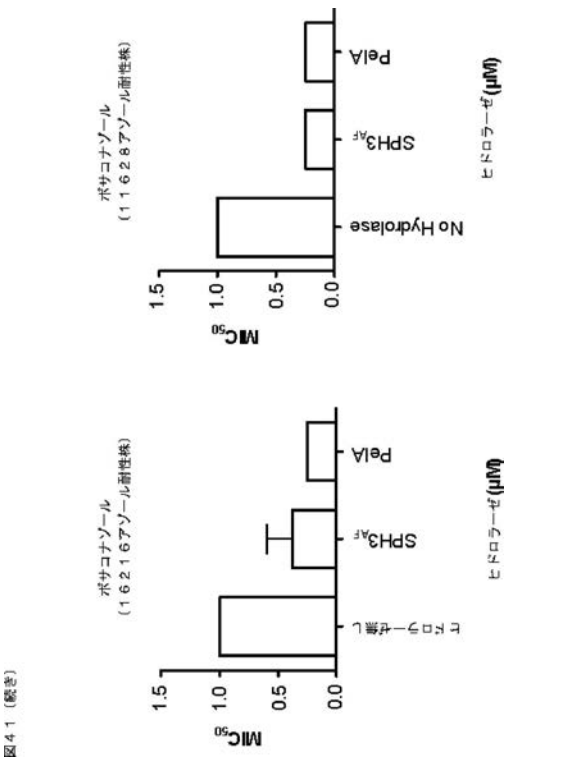
図 3 5



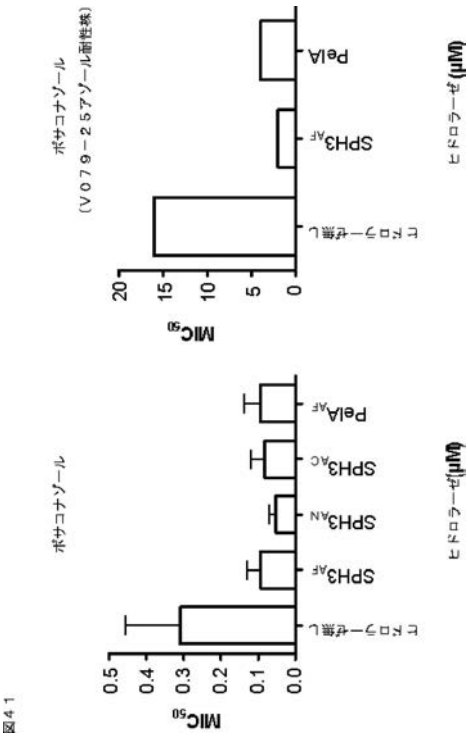
【図 4 0】



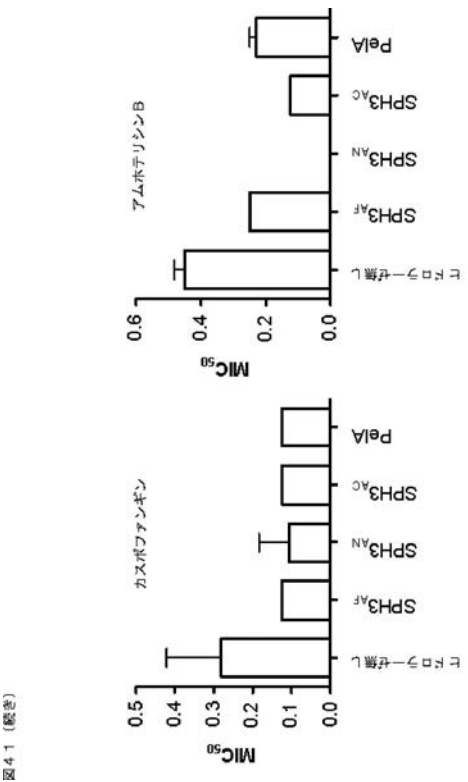
【図 4 1 - 2】



【図 4 1 - 1】



【図 4 1 - 3】



【図 4 2】

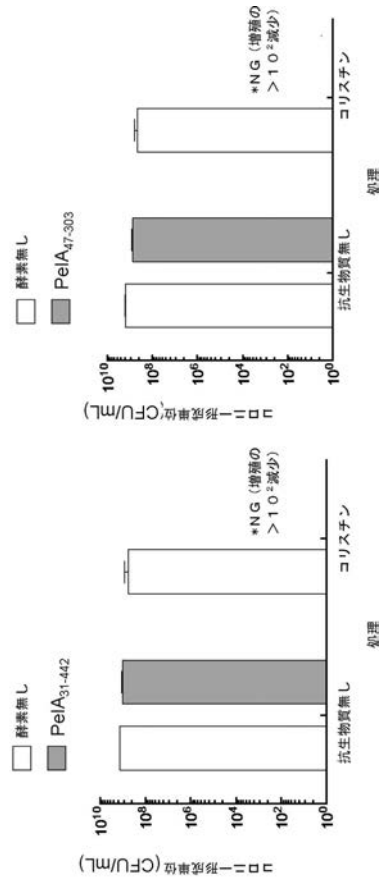


図 4 2

【図 4 4 - 1】

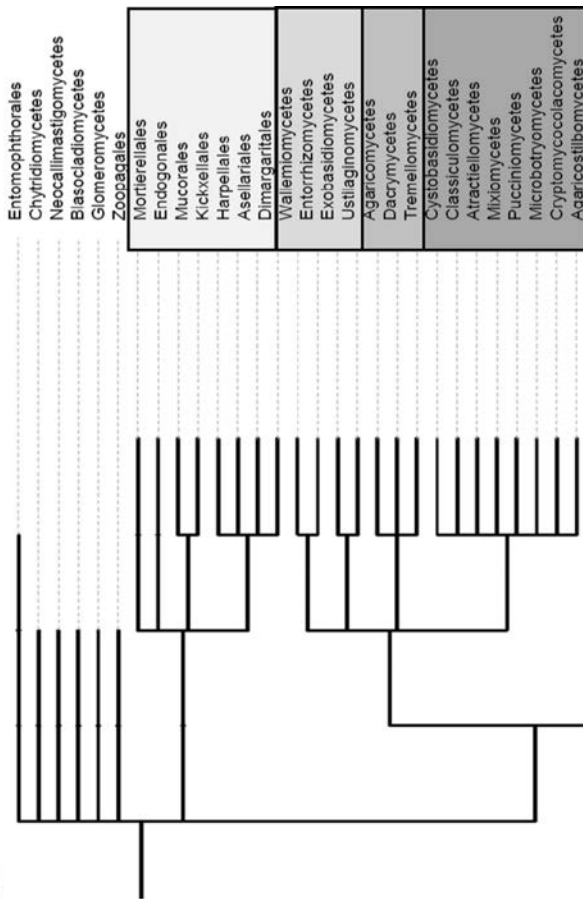


図 4 4

【図 4 3】

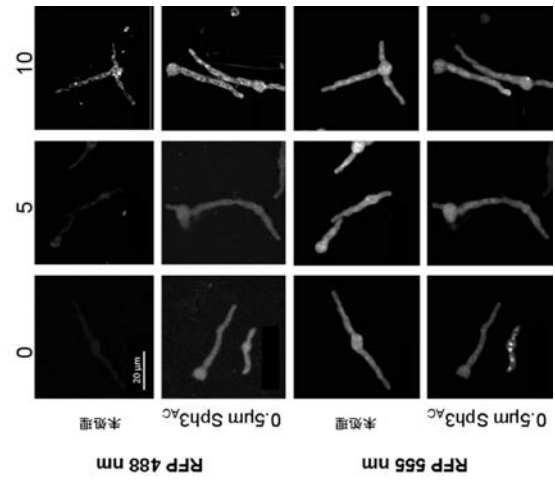


図 4 3

【図 4 4 - 2】

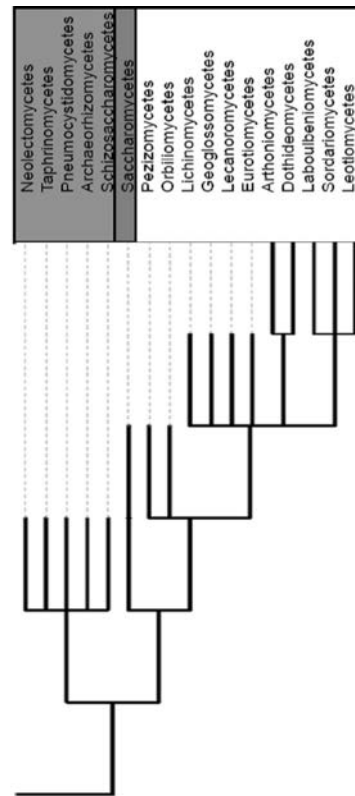


図 4 4 (続)

【 図 4 5 】

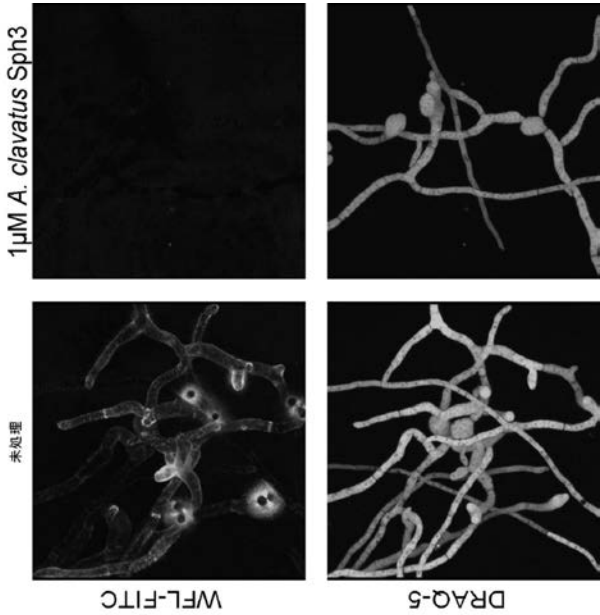


図 4 5

【 図 4 6 】

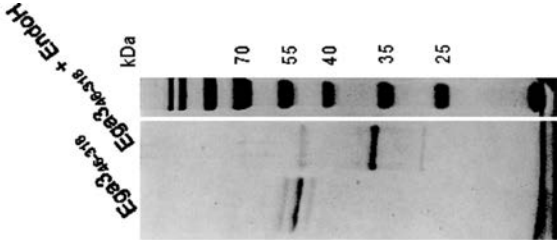


図 4 6

【 図 4 7 】

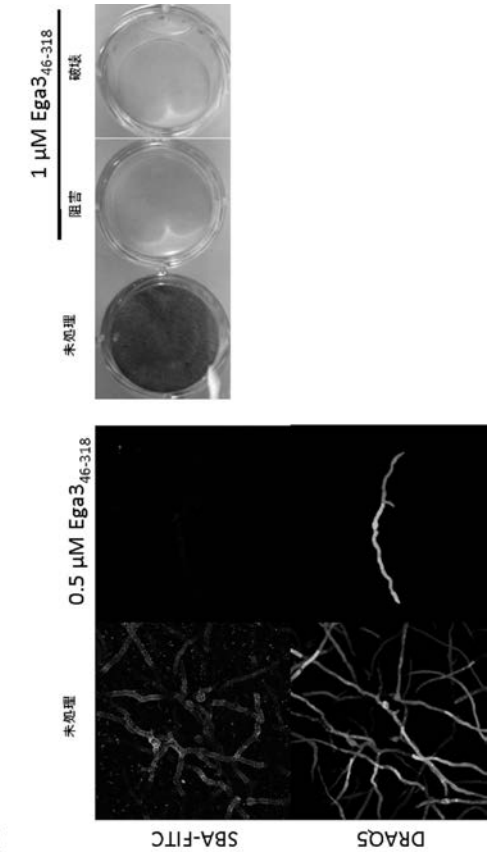


図 4 7

【配列表】

2017524344000001.app

## 【 国際調査報告 】

| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>   |  | International application No.<br><b>PCT/CA2015/000361</b> |
|--|--|---|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC: <i>C12N 9/24</i> (2006.01), <i>A01N 63/00</i> (2006.01), <i>A01P 1/00</i> (2006.01), <i>A01P 3/00</i> (2006.01),<br><i>A61K 38/16</i> (2006.01), <i>A61L 2/16</i> (2006.01) (more IPCs on the last page)  |  |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |  |   |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC: <i>C12N 9/24</i> (2006.01), <i>A01N 63/00</i> (2006.01), <i>A01P 1/00</i> (2006.01), <i>A01P 3/00</i> (2006.01), <i>A61K 38/16</i> (2006.01), <i>A61L 2/16</i> (2006.01), <i>A61L 27/22</i> (2006.01), <i>A61L 27/54</i> (2006.01), <i>A61L 31/10</i> (2006.01), <i>A61L 31/16</i> (2006.01), <i>A61P 31/00</i> (2006.01), <i>C12N 15/56</i> (2006.01), <i>C12N 15/63</i> (2006.01), <i>C12N 15/80</i> (2006.01), <i>C12N 7/01</i> (2006.01)   |  |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  |  |   |
| Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)<br>Databases: Canadian Patent Database, Orbit, GenomeQuest, Scopus, PubMed, Google; Search terms used: SEQ ID NOS:20, 22 and 23, biofilm, sph3, cell surface spherulin 4-like protein, glycosyl hydrolase, glycoside hydrolase, GH, hydrolase, Aspergillus, enzyme, galactosaminogalactan   |  |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |   |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                                     |
| X  | US 7,989,604 B2 (KAPLAN, J.)<br>2 August 2011 (02-08-2011)<br>see the whole document, especially abstract, column 1, line 15-31, column 1, line 56 to column 2, line 21 and column 16, line 62 to column 17, line 22   | 1-4, 11-24, 31-40, 47-54, 61-70,<br>77 and 78             |
| A  | CHEN, M. ET AL.: "Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections", International Journal of Molecular Sciences, 6 September 2013 (06-09-2013), vol. 14, no. 9, pages 18488-18501, ISSN: 1422-0067<br>see the whole document   | 1-4, 11-24, 31-40, 47-54, 61-70,<br>77 and 78             |
| A  | GRAVELAT, F. ET AL: "Identification of a gene cluster mediating the biosynthesis of the <i>Aspergillus fumigatus</i> cell wall and secreted polysaccharide, galactosaminogalactan", The Tenth International <i>Aspergillus</i> Meeting, March 2013 (03-2013), abstract #6, retrieved from the internet at URL:< <a href="http://www.fgsc.net/Aspergillus/10thAsperfest/Aperfest10%20Program.pdf">www.fgsc.net/Aspergillus/10thAsperfest/Aperfest10%20Program.pdf</a> ><br>see the whole document   | 1-4, 11-24, 31-40, 47-54, 61-70,<br>77 and 78             |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |  |   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |   |
| Date of the actual completion of the international search<br>04 August 2015 (03-08-2015)   | Date of mailing of the international search report<br>27 August 2015 (27-08-2015)  |   |
| Name and mailing address of the ISA/CA<br>Canadian Intellectual Property Office<br>Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT<br>50 Victoria Street<br>Gatineau, Quebec K1A 0C9<br>Facsimile No.: 001-819-953-2476  | Authorized officer<br><br>Sandra Hurley (819) 934-7934   |   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/CA2015/000361**

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |   |
|---|---|---|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                         |
| A   | LOUSSERT, C. ET AL.: " <i>In vivo</i> biofilm composition of <i>Aspergillus fumigatus</i> ", Cellular Microbiology, 2010, vol. 12, no. 3, pages 405-410, ISSN:1462-5814<br>see the whole document | 1-4, 11-24, 31-40, 47-54, 61-70,<br>77 and 78 |

|  |   |
|--|---|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>   | International application No.<br><b>PCT/CA2015/000361</b> |
| <b>Box No. II      Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)</b>   |   |
| <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos.: 1-4, 11, 12 and 14-20 (of searched <b>Group A</b> detailed in Box No. III)<br/>because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:<br/>Although claims 1-4, 11, 12 and 14-20 (of searched <b>Group A</b> detailed in Box No. III) of the present application are directed to a method of medical treatment, which this Authority is not obliged to search under Rule 39.1(iv) of the PCT, the search has been carried out on the basis of the use of the protein specified in these claims in the indicated treatment and prevention.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Claim Nos.:<br/>because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Claim Nos.:<br/>because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>  |   |
| <b>Box No. III      Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>   |   |
| <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:<br/>(See extra sheet on page 7)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:</li> <li>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:<br/>1, 11-21, 31-37, 47-51, 61-67, 77 and 78 (all partially) and claims 2-4, 22-24, 38-40, 52-54 and 68-70 (all completely) (corresponding to <b>Group A</b>)</li> </ol> <p><b>Remark on Protest</b></p> <div style="margin-left: 20px;"> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.<br/> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.<br/> <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.         </div> |   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CA2015/000361**

(CONTINUATION OF BOX NO. III)

There are six (6) alleged inventions claimed in the application as follows:

**Group A** - Claims 1, 11-21, 31-37, 47-51, 61-67, 77 and 78 (all partially) and claims 2-4, 22-24, 38-40, 52-54 and 68-70 (all completely) pertain to a soluble protein comprising a Sph3 glycosyl hydrolase domain and methods of use thereof in treating or preventing biofilm infections and formation;

**Group B** - Claims 1, 11-21, 31-37, 47-51, 61-67, 77 and 78 (all partially) and claims 5, 6, 25, 26, 41, 42, 55, 56, 71 and 72 (all completely) pertain to a soluble protein comprising a PelA glycosyl hydrolase domain and methods of use thereof in treating or preventing biofilm infections and formation;

**Group C** - Claims 1, 11-21, 31-37, 47-51, 61-67, 77 and 78 (all partially) and claims 7, 27, 43, 57 and 73 (all completely) pertain to a soluble protein comprising a BpsB glycosyl hydrolase domain and methods of use thereof in treating or preventing biofilm infections and formation;

**Group D** - Claims 1, 11-21, 31-37, 47-51, 61-67, 77 and 78 (all partially) and claims 8, 28, 44, 58 and 74 (all completely) pertain to a soluble protein comprising a PgaB glycosyl hydrolase domain and methods of use thereof in treating or preventing biofilm infections and formation;

**Group E** - Claims 1, 11-21, 31-37, 47-51, 61-67, 77 and 78 (all partially) and claims 9, 29, 45, 59 and 75 (all completely) pertain to a soluble protein comprising a PslG glycosyl hydrolase domain and methods of use thereof in treating or preventing biofilm infections and formation; and

**Group F** - Claims 1, 11-21, 31-37, 47-51, 61-67, 77 and 78 (all partially) and claims 10, 30, 46, 60 and 76 (all completely) pertain to a soluble protein comprising a Ega3 glycosyl hydrolase domain and methods of use thereof in treating or preventing biofilm infections and formation.

An *a posteriori* analysis has concluded that soluble proteins comprising glycosyl hydrolase domains and methods of use thereof for treating or preventing biofilm infections and formation were known in the art before the priority date of the instant application as from the following document:

US 7,989,604 B2 (KAPLAN, J.), 2 August 2011 (02-08-2011).

Therefore, the subject matters of the above-mentioned **Groups** of claims are not so linked as to form a single general inventive concept.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CA2015/000361**

| Patent Document<br>Cited in Search Report | Publication<br>Date         | Patent Family<br>Member(s)   | Publication<br>Date   |
|---|-----------------------------|--|---|
| US7989604B2                               | 02 August 2011 (02-08-2011) | US2008166760A1<br>AU2003284385A1<br>AU2003284385B2<br>CA2511103A1<br>EP1585809A2<br>EP1585809A4<br>EP2302031A1<br>JP2006511226A<br>JP5073169B2<br>NZ540731A<br>NZ555378A<br>US2006246049A1<br>US7294497B2<br>US2008181925A1<br>US7833523B2<br>US2012021033A1<br>US8580551B2<br>US2012258089A1<br>US8821862B2<br>US2011008402A1<br>WO2004061117A2<br>WO2004061117A3<br>WO2008043175A1 | 10 July 2008 (10-07-2008)<br>29 July 2004 (29-07-2004)<br>27 August 2009 (27-08-2009)<br>22 July 2004 (22-07-2004)<br>19 October 2005 (19-10-2005)<br>02 August 2006 (02-08-2006)<br>30 March 2011 (30-03-2011)<br>06 April 2006 (06-04-2006)<br>14 November 2012 (14-11-2012)<br>30 April 2008 (30-04-2008)<br>31 October 2008 (31-10-2008)<br>02 November 2006 (02-11-2006)<br>13 November 2007 (13-11-2007)<br>31 July 2008 (31-07-2008)<br>16 November 2010 (16-11-2010)<br>26 January 2012 (26-01-2012)<br>12 November 2013 (12-11-2013)<br>11 October 2012 (11-10-2012)<br>02 September 2014 (02-09-2014)<br>13 January 2011 (13-01-2011)<br>22 July 2004 (22-07-2004)<br>30 June 2005 (30-06-2005)<br>17 April 2008 (17-04-2008) |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CA2015/000361**

*A61L 27/22* (2006.01), *A61L 27/34* (2006.01), *A61L 31/10* (2006.01), *A61L 31/16* (2006.01),  
*A61P 31/00* (2006.01), *C12N 15/56* (2006.01), *C12N 15/63* (2006.01), *C12N 15/80* (2006.01),  
*C12N 7/01* (2006.01)

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.                    | F I           | テーマコード(参考) |
|--------------------------------|---------------|------------|
| <b>A 6 1 K 35/76 (2015.01)</b> | A 6 1 K 35/76 |            |
| <b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b> | A 6 1 K 45/00 |            |
| <b>A 6 1 L 29/08 (2006.01)</b> | A 6 1 L 29/08 | 1 0 0      |
| <b>A 6 1 L 31/10 (2006.01)</b> | A 6 1 L 31/10 |            |
| <b>C 1 2 N 9/14 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 9/14  |            |

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

(74)代理人 110001656

特許業務法人谷川国際特許事務所

(72)発明者 ハウエル, リン

カナダ国 エム5 ジェイ 2アール9 オンタリオ州 トロント、クイーンズ キー ウェスト  
1 7 0 4 - 1 0

(72)発明者 ベイカー, ペリン

カナダ国 エム8 ワイ 0エイ1 オンタリオ州 トロント、リージョン ロード 6 0 6 - 1 8  
5

(72)発明者 アルナベルセヤ, ヌール

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 0 9、サンフランシスコ、バレイヨ ストリート 1  
1 7 6

(72)発明者 バンフォード, ナタリー

カナダ国 エム4 ジェイ 2ケイ6 オンタリオ州 トロント、ゴーワン アベニュー 1 8 8

(72)発明者 リトル, ダスティン

カナダ国 エル7 エム 5 ビー8 オンタリオ州 バーリントン、フォレスト ラン アベニュー  
6 8 - 4 0 5 5

(72)発明者 シェパード, ドナルド

カナダ国 エイチ3 ワイ 2ダブリュ6 ケベック州、モントリオール、マレー ヒル 6 3 6

(72)発明者 スナー, ブレンダン

カナダ国 エイチ4 エイ 3 エイチ2 ケベック州、モントリオール、アベニュー プリュドム  
2 1 9 6、アパートメント 1 1

(72)発明者 リー, マーク ジョー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 5 0 6、パーバンク、ウェスト アラメダ アベニュー  
4 0 5、アパートメント エフ

F ターム(参考) 4B050 CC07 LL01

4C081 AB05 AB32 AC07 AC08 BA17 CD112

4C084 AA02 AA19 BA02 BA22 CA53 DC22 DC29 MA02 NA06 ZA33  
ZA89 ZB31

4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA16 MA02 NA06 ZA33 ZA89 ZB31