

(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2006-507850

(P2006-507850A)

(43) 公表日 平成18年3月9日(2006.3.9)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 L 31/00	(2006.01)	A 6 1 L 31/00	B	4 C 0 8 1
A 6 1 F 2/02	(2006.01)	A 6 1 F 2/02		4 C 0 9 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2003-579694 (P2003-579694)	(71) 出願人	502448775
(86) (22) 出願日	平成15年3月26日 (2003.3.26)		バイオシネクサス インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月21日 (2004.9.21)		アメリカ合衆国 20877 メリーラン
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/009354		ド州 ゲイサーズバーグ ゲイザー ロード
(87) 国際公開番号	W02003/082148		9298
(87) 国際公開日	平成15年10月9日 (2003.10.9)	(74) 代理人	100068755
(31) 優先権主張番号	60/367,819		弁理士 恩田 博宣
(32) 優先日	平成14年3月26日 (2002.3.26)	(74) 代理人	100105957
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 恩田 誠
		(72) 発明者	コカイークン、ジョン
			アメリカ合衆国 21703 メリーラン
			ド州 フレデリック サザーランド ドライブ 4921

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌バイオフィルムの酵素破壊

(57) 【要約】

バイオフィルム形成細菌を致死または損傷させる少なくとも1種の抗菌酵素を、バイオフィルムに接触させると少なくとも部分的にバイオフィルムを破壊するのに有効な量投与することにより、損傷組織または留置人工装置もしくはカテーテル上に細菌バイオフィルムが成長している患者を、バイオフィルムを少なくとも部分的に破壊するように治療する方法。さらに、患者を予防的に治療する方法、および、生体外 (ex vivo) で表面を消毒または滅菌してバイオフィルムを除去またはバイオフィルム成長を予防する方法、ならびに、バイオフィルム成長が生じやすいインプラント用品に予防的抗菌酵素コーティングを施したものの開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面上に細菌バイオフィルムが成長している損傷組織または留置人工装置もしくはカテーテルを体内に有する患者を、前記バイオフィルムを少なくとも部分的に破壊するように治療する方法であって、前記患者に、バイオフィルム形成細菌を致死または損傷させる少なくとも 1 種の抗菌酵素を、バイオフィルムと接触させると該バイオフィルムを少なくとも部分的に破壊するのに有効な量投与することを含む方法。

【請求項 2】

前記抗菌酵素量が、前記バイオフィルムが成長している表面から前記バイオフィルムを完全に根絶するのに有効である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

抗菌酵素を少なくとも 1 種の他の抗菌剤と併用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記バイオフィルムがブドウ球菌性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記バイオフィルムが黄色ブドウ球菌を含んでなる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記バイオフィルムが表皮ブドウ球菌を含んでなる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記バイオフィルムが黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌とを含んでなる、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 8】

リソスタフィンまたはリソスタフィン類似体を投与することを含んでなる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

リソスタフィンまたはリソスタフィン類似体もしくはリソスタフィンと同じ酵素活性を有するキメラ分子を投与することを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

組換え発現され完全な活性を有する同種リソスタフィンを投与する、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記リソスタフィンが人工合成されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗菌酵素が人工合成されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記リソスタフィンが天然由来である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記リソスタフィンをブドウ球菌に有効な他の抗生物質と併用する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 15】

前記他の抗生物質が細胞壁合成を妨害または阻害する、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記抗生物質が、ラクタム、セファロスポリン、グリコペプチド、アミノグリコシド、スルホノミド (sulfonamide)、マクロライド、葉酸、ポリペプチドおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記他の抗生物質がタンパク質合成を妨害する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記他の抗生物質が、グリコシド、テトラサイクリンおよびストレプトグラミンを含んでなる、請求項 17 に記載の方法。

50

- 【請求項 19】
バイオフィルム形成細菌を致死または損傷させる少なくとも1種の抗菌酵素を予防上有効な量投与して、患者内のバイオフィルム成長が生じやすいインプラント表面または損傷組織上におけるバイオフィルム成長を予防する方法。
- 【請求項 20】
前記患者が、バイオフィルム成長が生じやすい表面を備えた留置カテーテルまたは人工装置を有する、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 21】
前記バイオフィルムがブドウ球菌のバイオフィルムである、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 22】 10
前記バイオフィルムが黄色ブドウ球菌を含んでなる、請求項 21 に記載の方法。
- 【請求項 23】
前記バイオフィルムが表皮ブドウ球菌である、請求項 21 に記載の方法。
- 【請求項 24】
前記バイオフィルムが、黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌とを含んでなる、請求項 21 に記載の方法。
- 【請求項 25】 20
前記投与が、少なくとも1種のリソスタフィンまたはリソスタフィン類似体もしくはリソスタフィンと同じ酵素活性を有するキメラ分子を投与することを含んでなる、請求項 21 に記載の方法。
- 【請求項 26】
前記投与が、少なくとも1種のリソスタフィンまたはリソスタフィン類似体もしくはリソスタフィンと同じ酵素活性を有するキメラ分子を投与するステップを含んでなる、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 27】
組換え発現され完全な活性を有する同種リソスタフィンを投与する、請求項 25 に記載の方法。
- 【請求項 28】
前記リソスタフィンが人工合成されている、請求項 25 に記載の方法。
- 【請求項 29】 30
前記抗菌酵素が人工合成されている、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 30】
前記リソスタフィンが天然由来である、請求項 25 に記載の方法。
- 【請求項 31】
前記リソスタフィンをブドウ球菌に有効な他の抗生物質と併用する、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 32】
前記他の抗生物質が細胞壁合成を妨害または阻害する、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 33】 40
前記抗生物質が、ラクタム、セファロスポリン、アミノグリコシド、スルホノミド、マクロライド、葉酸、グリコペプチド、ポリペプチドおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 34】
前記他の抗生物質がタンパク質合成を妨害する、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 35】
前記他の抗生物質が、グリコシド、テトラサイクリンおよびストレプトグラミンを含んでなる、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 36】
前記リソスタフィンを、埋め込む前の前記カテーテル内または前記人工装置上に導入する、請求項 20 に記載の方法。

- 【請求項 37】
溶液のポンプ注入により前記リソスタフィンを前記カテーテルに導入する、請求項 36 に記載の方法。
- 【請求項 38】
前記リソスタフィンを挿入後の前記カテーテルに導入する、請求項 20 に記載の方法。
- 【請求項 39】
ボラス注入により前記リソスタフィンを前記カテーテルに導入する、請求項 38 に記載の方法。
- 【請求項 40】
低速注入により前記リソスタフィンを前記カテーテルに導入する、請求項 38 に記載の方法。 10
- 【請求項 41】
表面を生体外 (ex vivo) で消毒または殺菌して、バイオフィーム形成細菌の該表面上での増殖を予防する方法であって、前記表面と、前記バイオフィーム形成細菌を致死または損傷させる少なくとも 1 種の予防上有効な量の抗菌酵素とを接触させることを含んでなる方法。
- 【請求項 42】
前記バイオフィーム形成細菌がブドウ球菌を含む、請求項 41 に記載の方法。
- 【請求項 43】
前記バイオフィーム形成細菌が黄色ブドウ球菌を含む、請求項 42 に記載の方法。 20
- 【請求項 44】
前記バイオフィーム形成細菌が表皮ブドウ球菌を含む、請求項 42 に記載の方法。
- 【請求項 45】
前記バイオフィーム形成細菌が、黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌とを含む、請求項 42 に記載の方法。
- 【請求項 46】
前記接触が、前記表面と、少なくとも 1 種のリソスタフィンまたはリソスタフィン類似体もしくはリソスタフィンと同じ酵素活性を有するキメラ分子とを接触させることを含んでなる、請求項 42 に記載の方法。
- 【請求項 47】
前記接触が、前記表面と、少なくとも 1 種のリソスタフィンまたはリソスタフィン類似体もしくはリソスタフィンと同じ酵素活性を有するキメラ分子とを接触させることを含んでなる、請求項 41 に記載の方法。 30
- 【請求項 48】
前記表面と、組換え発現され完全な活性を有する同種リソスタフィンとを接触させる、請求項 41 に記載の方法。
- 【請求項 49】
前記リソスタフィンが人工合成されている、請求項 48 に記載の方法。
- 【請求項 50】
前記抗菌酵素が人工合成されている、請求項 41 に記載の方法。 40
- 【請求項 51】
前記リソスタフィンを、ブドウ球菌に有効な他の抗生物質と併用する、請求項 48 に記載の方法。
- 【請求項 52】
前記他の抗生物質が細胞壁合成を妨害または阻害する、請求項 51 に記載の方法。
- 【請求項 53】
前記抗生物質が、ラクタム、セファロスポリン、グリコペプチド、ポリペプチドおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 52 に記載の方法。
- 【請求項 54】
前記他の抗生物質がタンパク質合成を妨害する、請求項 51 に記載の方法。 50

- 【請求項 5 5】
前記他の抗生物質がグリコシド、テトラサイクリンおよびストレプトグラミンを含んでなる、請求項 5 4 に記載の方法。
- 【請求項 5 6】
人工装置またはカテーテルであって、それを必要とする患者に埋め込み可能であり、細菌バイオフィームが成長しやすい少なくとも 1 つの表面を有し、バイオフィーム形成の予防に有効な量のバイオフィーム形成細菌を致死させる少なくとも 1 種の抗菌酵素でコーティングされている人工装置またはカテーテル。
- 【請求項 5 7】
前記酵素コーティングが前記表面に共有結合している、請求項 5 6 に記載の装置またはカテーテル。 10
- 【請求項 5 8】
前記少なくとも 1 つの表面は、前記酵素をポリマー表面から実質的に放出させることなく前記ポリマー表面に呈するように、前記ポリマーと前記酵素とのブレンドを含んでなる、請求項 5 6 に記載の装置またはカテーテル。
- 【請求項 5 9】
前記装置が、シャント、ステント、組織構築用足場、栄養補給管、パンクタルプラグ、人工関節、ペースメーカー、人工弁からなる群から選択される、請求項 5 6 に記載の装置またはカテーテル。
- 【請求項 6 0】
前記装置またはカテーテルが埋め込み式金属装置である、請求項 5 9 に記載の装置またはカテーテル。 20
- 【請求項 6 1】
前記金属がチタンである、請求項 6 0 に記載の装置またはカテーテル。
- 【請求項 6 2】
ポリマーと、バイオフィーム形成細菌を致死させる少なくとも 1 種の有効量の抗菌酵素とをブレンドすることを含んでなる、ポリマー組成物を製造する方法であって、該組成物から形成される表面上におけるバイオフィーム形成細菌の増殖に抵抗性のポリマー組成物を製造する方法。
- 【請求項 6 3】
前記バイオフィーム形成細菌がブドウ球菌である、請求項 6 2 に記載の方法。 30
- 【請求項 6 4】
前記バイオフィーム形成細菌が黄色ブドウ球菌を含む、請求項 6 3 に記載の方法。
- 【請求項 6 5】
前記バイオフィーム形成細菌が表皮ブドウ球菌を含む、請求項 6 3 に記載の方法。
- 【請求項 6 6】
前記バイオフィーム形成細菌が黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌とを含む、請求項 6 3 に記載の方法。
- 【請求項 6 7】
前記酵素が、リソスタフィン、リソスタフィン類似体またはリソスタフィンと同じ酵素活性を有するキメラ分子を含んでなる、請求項 6 2 に記載の方法。 40
- 【請求項 6 8】
前記リソスタフィンまたはリソスタフィン類似体が、組換え発現され完全な活性を有する同種リソスタフィンである、請求項 6 7 に記載の方法。
- 【請求項 6 9】
前記リソスタフィンが天然由来である、請求項 6 7 に記載の方法。
- 【請求項 7 0】
前記リソスタフィンが合成由来である、請求項 6 7 に記載の方法。
- 【請求項 7 1】
前記リソスタフィンを、ブドウ球菌に有効な他の抗生物質と併用する、請求項 6 7 に記 50

載の方法。

【請求項 7 2】

前記酵素がリソスタフィンまたはリソスタフィン類似体を含んでなる、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記リソスタフィンが天然由来である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記リソスタフィンが合成由来である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記リソスタフィンを、ブドウ球菌に有効な他の抗生物質と併用する、請求項 6 2 に記載の方法。 10

【請求項 7 6】

前記他の抗生物質が細胞壁合成を妨害または阻害する、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記抗生物質が、ラクタム、セファロスポリン、グリコペプチド、ポリペプチドおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記他の抗生物質がタンパク質合成を妨害する、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記他の抗生物質が、グリコシド、テトラサイクリンおよびストレプトグラミンを含んでなる、請求項 6 2 に記載の方法。 20

【請求項 8 0】

人工装置またはカテーテル製造用ポリマー組成物であって、ポリマー組成物に用いるのに適したポリマーと、前記ポリマー組成物から形成される表面上におけるバイオフィルム形成の予防に有効な量のバイオフィルム形成細菌を致死させる少なくとも 1 種の抗菌酵素とをブレンドしたポリマー組成物。

【請求項 8 1】

前記バイオフィルム形成細菌がブドウ球菌である、請求項 8 0 に記載のポリマー組成物。 30

【請求項 8 2】

前記バイオフィルム形成細菌が黄色ブドウ球菌を含む、請求項 8 1 に記載のポリマー組成物。

【請求項 8 3】

前記バイオフィルム形成細菌が表皮ブドウ球菌を含む、請求項 8 1 に記載のポリマー組成物。

【請求項 8 4】

前記バイオフィルム形成細菌が黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌とを含む、請求項 8 1 に記載のポリマー組成物。

【請求項 8 5】

前記酵素が、リソスタフィン、リソスタフィン類似体またはリソスタフィンと同じ酵素活性を有するキメラ分子を含んでなる、請求項 8 1 に記載のポリマー組成物。 40

【請求項 8 6】

前記リソスタフィンまたはリソスタフィン類似体が組換え発現され完全な活性を有する同種リソスタフィンである、請求項 8 5 に記載のポリマー組成物。

【請求項 8 7】

前記リソスタフィンが天然由来である、請求項 8 5 に記載のポリマー組成物。

【請求項 8 8】

前記リソスタフィンが合成由来である、請求項 8 5 に記載のポリマー組成物。

【請求項 8 9】

前記リソスタフィンがブドウ球菌に有効な他の抗生物質とブレンドされている、請求項 50

85に記載のポリマー組成物。

【請求項90】

前記酵素がリソスタフィンまたはリソスタフィン類似体を含んでなる、請求項80に記載のポリマー組成物。

【請求項91】

前記リソスタフィンが天然由来である、請求項90に記載の方法。

【請求項92】

前記リソスタフィンが合成由来である、請求項90に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、抗菌酵素による細菌バイオフィルムの破壊に関する。より具体的には、本発明は、リソスタフィンによるブドウ球菌バイオフィルムの破壊に関する。

【背景技術】

【0002】

(関連出願の相互参照)

本願は、米国特許法第119条(e)のもとに、2002年3月26日出願の米国仮出願第60/368,112号の優先権を主張するものであり、この仮出願の開示内容は参照により本明細書に援用される。

【0003】

20

A. バイオフィルム

埋め込み医療装置または損傷組織に付着する細菌は、多糖体とタンパク質とからなる水和構造体内に自身を埋め込んで、バイオフィルムとしても知られているスライム層を形成し得る。バイオフィルム関連微生物の高い抗菌剤耐性、および留置医療装置または損傷組織を有する患者におけるこれらの微生物と感染との関連性が原因で、バイオフィルムは公衆衛生上重大な問題をもたらす。バイオフィルム中で増殖する細菌の抗生物質耐性は、感染、例えば埋め込み医療装置に関連した感染の持続および慢性化の一因となる。バイオフィルムの耐性機構は、現在良く知られている個々の細菌細胞に生得的な耐性を付与するプラスミド、トランスポゾンおよび突然変異とは異なる。バイオフィルムの場合、耐性は多細胞的な戦略によるようである。

30

【0004】

バイオフィルムは表面に付着するか、または接触面もしくは損傷組織に結合した複合微生物群集である。現代の微生物学研究が純粋培養、浮遊性の(自由遊泳性の)細菌に集中しているにもかかわらず、自然、臨床および工業条件下に見出されるほとんどの細菌がバイオフィルムとして表面との結合を強力に維持することは今や広く認められている。さらに、これらの微生物群集は、多くの場合、互いに相互作用し、かつ環境と相互作用する複数の種からなる。バイオフィルム構造、特に小集落(細胞集塊)の相互の空間的配置を決定することは、これらの複合群集の機能に関して重大な影響がある。

【0005】

バイオフィルム構造体は、その構成要素である微生物細胞が恒常状態に到達するようであり、すべての利用可能な栄養素を利用するように最適に組織化されている動的環境である。したがって、この構造体は、内部に数々の微小環境が存在しうる高度の微小不均一性を示す。バイオフィルム形成は、細菌細胞が表面に付着し、次いで、細菌が増殖を繰り返して多層細胞集塊に集積するという2段階のプロセスであると考えられている。菌体外多糖は構造体の骨格となるが、バイオフィルム内ではさまざまな酵素活性を検出することができ、そのなかには、構造の完全性および安定性に大きな影響を与えるものがある。

40

【0006】

より具体的には、第1形成期においては、宿主血漿のフィブリノーゲンやフィブロンectinが医療用インプラントまたは損傷組織の表面を覆い、構成的に発現されている微生物の表面成分によって識別され、これらの成分が生体材料または損傷組織の表面への細菌の

50

初期付着を媒介すると仮定される。第2段階では、細菌細胞内の特定の遺伝子座、いわゆる細胞内接着 (*ica* (*intracellular adhesion*)) 遺伝子座が、細菌細胞の相互接着を活性化し、二次バイオフィーム層を形成させる。*ica* 遺伝子座は莢膜多糖オペロン (*capsular polysaccharide operon*) の発現に関与し、莢膜多糖オペロンは、1.6 結合グルコサミノグリカンである糖類ポリ N スクシニルグルコサミン (PNSG) を介して多糖細胞間接着 (PIA) を活性化する。この多糖層ができると、電子顕微鏡を使って見たときに、バイオフィームはスライム様外観を呈する。

【0007】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は極めて伝染力の強いヒト病原菌である。黄色ブドウ球菌もコアグラゼ陰性ブドウ球菌も、埋め込み医療装置や損傷組織上のバイオフィーム形成に関与する主要な院内病原菌として浮上している。これらの微生物はヒトの皮膚や粘膜の常在細菌叢の仲間であり、侵襲手術または長期入院の間および後に合併症を流行させる。細菌は健康な人も病人も持っているので、ブドウ球菌は開いた傷口や生体材料インプラントを介して患者に侵入する日和見病原菌とみなされている。

10

【0008】

黄色ブドウ球菌に関連するバイオフィーム感染は、特に、病院や、老人ホーム、診療所などの環境における罹患や死亡の重大な要因である。リスクの高い患者には、幼児、高齢者、免疫不全患者、免疫抑制患者や、頻繁に入院を必要とする慢性症状を有する患者が含まれる。血管内および他の埋め込み人工装置を有する患者は、免疫力が低下していること、ならびに組織損傷の原因となりかつ/またはバイオフィーム形成表面となる異物が挿入されていることから、黄色ブドウ球菌感染にかかるリスクがさらに高くなる。そのような感染は、命にかかわるとはいわないまでも、慢性化する可能性がある。

20

【0009】

カテーテル関連の感染は、常に、カテーテル挿入を必要とする患者の罹患率および死亡率の重大な原因となっている。米国で報告された発症率は4%であるが、これは、1年あたりの患者200,000人に相当する。さらに、カテーテル関連の感染は寄与死亡率が14~24%であり、入院の長期化により医療費を増大させる。結果として、これらのカテーテル関連の感染の発生を予防することにより、または発生率を低下させるだけでも、保健医療上の大きな利点を得ることができるであろう。

30

【0010】

カテーテル感染は、通常、ブドウ球菌、コアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CONS) または黄色ブドウ球菌のいずれかによって引き起こされる。CONSによって引き起こされる感染は軽い傾向があり、カテーテルを抜去するか、カテーテルを所定の位置に配置した状態で抗生物質治療によって治療できるものもある。黄色ブドウ球菌感染は通常これより重く、カテーテルまたは他の人工装置の抜去に加えて、長期抗生物質治療を必要とする。

【0011】

黄色ブドウ球菌は、並外れた毒素産生菌であり、かつ極めて悪性のヒト病原菌である。黄色ブドウ球菌は、局所的皮膚感染から生死にかかわる菌血症や重要臓器への感染に及ぶ多様なヒト疾患の要因である。黄色ブドウ球菌感染は、早急に制御しないと、たちまち原発感染部位から他の臓器に広がり得る。感染巣がはっきりしない場合もあるが、特に感染しやすい臓器には、心臓弁、腎臓、肺、骨、髄膜および火傷患者の皮膚が含まれる。

40

【0012】

抗生物質感受性のブドウ球菌感染に対して有効な抗菌剤は開発されたが、抗生物質耐性の黄色ブドウ球菌、特に埋め込み人工装置や損傷組織上のバイオフィームに関連する黄色ブドウ球菌を確実に完全に死滅させて、持続的および慢性的なブドウ球菌感染源を除去する薬剤が依然として必要とされている。残念ながら、バイオフィーム中の黄色ブドウ球菌は(浮遊性の状態では抗生物質感受性のものでも)抗生物質に対する感受性が低く、従って感染を除去することがより難しい傾向がある。

50

【0013】

バイオフィルムの抗生物質耐性の要因としては、一部の抗菌剤がバイオフィルムのすべての層に浸透できないこと、ある種のバイオフィルム細胞は増殖速度が遅く、そのために活発な細菌増殖を必要とする抗菌剤に対する感受性が低いこと、およびバイオフィルム中に埋め込まれた細菌細胞による遺伝子の発現パターンが浮遊性（自由遊泳）状態で発現される遺伝子とは異なることを挙げることができる。バイオフィルム関連の細菌におけるこれらの違いによって、浮遊性細菌の殺菌には有効に作用する抗菌剤が、バイオフィルム関連細菌の殺菌には無効になる。多くの場合、バイオフィルムが形成されているカテーテルまたは人工装置を処理する唯一の方法は汚染された装置を抜去することであるが、それには、追加手術を必要として患者にさらなるリスクを与える恐れがある。

10

【0014】

カテーテルまたは他の人工装置を抗菌剤でコーティングする方法は、これらの異物関連感染の制御および予防に有望な方法である。これまでに、6つのタイプの抗菌カテーテル、すなわち、セファゾリン、テイコプラニン、バンコマイシン、銀、クロロヘキシジン、銀スルファジアジンおよびミノサイクリン、リファンピンでコーティングされたカテーテルが臨床試験でテストされてきた。しかし、カテーテル関連の血流感染（CRBI）の発生率を低下させると証明されたのはミノサイクリン、リファンピンコーティングカテーテルだけで、その長期効果は未だ研究されていない。CRBIを減少させてカテーテルの耐久力を向上させる特性を有する新規抗菌剤、および、カテーテル上であれ、人工装置上であれ、または損傷組織上であれ、外科的除去の必要なくその場所でバイオフィルム関連ブドウ球菌感染を除去する能力を有する薬剤を見出す必要があることは明らかである。

20

【0015】

B. リソスタフィン

当初バイオフィルムに対して有効ではないと考えられていたそのような抗菌剤の1つがリソスタフィンである。リソスタフィンは〔かつて、*S. スタフィロリティカス* (*S. staphylolyticus*)として知られていた〕*スタフィロコッカス・シムランス* (*Staphylococcus simulans*)において最初に同定された強力な抗菌酵素である。細菌のグリシルグリシンエンドペプチダーゼであるリソスタフィンは、ブドウ球菌細胞壁の架橋結合しているポリグリシンの特定の架橋部分（ブリッジ）を開裂する能力を有し、したがって、活発に増殖中のブドウ球菌に対しても休止状態のブドウ球菌に対しても高い致死性を示す。リソスタフィンは単一のポリペプチド鎖として発現され、約27kDaの分子量を有する。

30

【0016】

リソスタフィンは、黄色ブドウ球菌の細胞壁ブリッジがグリシンを多く含んでいるために、黄色ブドウ球菌の溶解に特に有効である。また、リソスタフィンは、病院環境で見出される最も一般的なコアグラエゼ陰性菌感染の表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) を溶解する能力があることも実証されている。しかし、バイオフィルム構造の複雑性と、リソスタフィンのブドウ球菌溶解機構とのために、リソスタフィンは定着したバイオフィルム中のブドウ球菌に対しては有効ではないだろうと予想された。

40

【0017】

クリモ (Climo) らの特許文献1は、リソスタフィンによるブドウ球菌病の治療法を開示している。治療には、体重1kgあたり、少なくとも50ミリグラム、好ましくは100ミリグラムという比較的高用量のリソスタフィンが用いられる。リソスタフィンは、単回投与治療または複数回投与治療に用いることも、単独で、または別の抗生剤と組み合わせて使用することも可能である。上記特許文献は、さらに、リソスタフィン遺伝子のクローニングおよび配列決定により、野生型リソスタフィンの特性と類似または異なる特性を有し得る変異型の単離が可能であることも開示している。

【0018】

オキャラハン (O'Callaghan) らの特許文献2は、ブドウ球菌角膜感染の局

50

所治療に有効な抗生物質としてリソスタフィンを使用する方法を開示している。ブラックバーン (Blackburn) らの特許文献 3 は、リソスタフィンを用いて、乳房内注入による乳牛の乳腺炎の治療を含めたブドウ球菌感染の除去・治療法を開示している。

【0019】

ゴールドシュタイン (Goldstein) らの特許文献 4 は、0.5 ~ 45 mg / kg / 日のオーダーの低用量のリソスタフィンならびにその変異体などの類似体および関連酵素が、カテーテルまたは人工装置「に関連する」ものを含めたほとんどのブドウ球菌感染の根絶に「十分」であることを開示している。よって、この公報にも他の刊行物にも、リソスタフィンが、埋め込み人工装置、カテーテルまたは損傷組織の表面に定着したブドウ球菌または他の細菌起源のバイオフィルムの破壊に有効であると期待するように当業者を導く開示は存在しない。

10

【特許文献 1】米国特許第 6,028,051 号

【特許文献 2】米国特許第 6,315,996 号

【特許文献 3】米国特許第 5,760,026 号

【特許文献 4】米国公開特許公報第 2002/0006406 号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

CRBI を減少させてカテーテルの耐久力を向上させる特性を有する新規抗菌剤、および、カテーテル上であれ、人工装置上であれ、または損傷組織上であれ、外科的除去の必要なくその場所でバイオフィルム関連ブドウ球菌感染を除去する能力を有する薬剤を見出す必要があることは明らかである。

20

【課題を解決するための手段】

【0021】

リソスタフィンなどの抗菌酵素が、バイオフィルム中のすべての細菌を死滅させるだけでなく、バイオフィルム構造体を完全に破壊し、バイオフィルムをその形成表面から根絶することが思いがけず発見された。これによって、バイオフィルム関連感染、特に、損傷組織上または留置人工装置およびカテーテルの表面に生じる感染を、外科切除手段に頼ることなく治療することができる。

【0022】

したがって、本発明の 1 つの態様により、表面上にバイオフィルムが成長している損傷組織または留置人工装置もしくはカテーテルを有する患者を、バイオフィルムを少なくとも部分的に破壊するように治療する方法が提供され、この方法は、患者に、バイオフィルム形成細菌を致死または損傷させる少なくとも 1 種の抗菌酵素を、バイオフィルムと接触させると該バイオフィルムを少なくとも部分的に破壊するのに有効な量投与することを含む。ブドウ球菌および他の細菌によるバイオフィルムの場合、バイオフィルム成長の予防にも、すでに定着しているバイオフィルムの根絶にも、リソスタフィンおよびリソスタフィン類似体が特に有効であることが証明された。

30

【0023】

本発明は、さらに、組織損傷または人工装置もしくはカテーテルを有するバイオフィルム感受性患者におけるバイオフィルムの成長を予防するために、抗菌酵素を予防的に投与することを含む。したがって、本発明の別の態様により、バイオフィルム形成細菌を致死または損傷させる抗菌酵素を予防上有効量投与して、バイオフィルム感受性患者におけるバイオフィルム成長を予防する方法が提供される。例えば、リソスタフィンおよびリソスタフィン類似体を予防的に投与して、バイオフィルム感受性患者におけるブドウ球菌バイオフィルムの成長を予防し得る。

40

【0024】

本発明は、さらに、必ずしも患者との接触を対象としない生体外の表面を消毒または滅菌する方法を含む。すなわち、本発明のこの方法は、バイオフィルムがすでに成長しているか、成長する可能性があるが望ましくない、体内に埋め込み可能な任意のもの、例えば

50

、ポリマーやチタンなどの金属を含めた、実質的にあらゆる表面の消毒または滅菌に適している。実際に使用する場合、本発明のこの方法は、主に、苛酷な使用化学物質の微量残留物が有害であると考えられる状況など、バイオフィルムの除去または予防に用いられる比較的厳しい滅菌または消毒条件が適していない状況に用いられるであろう。それゆえ、本発明のこの方法は、患者体内の医療用インプラントを対象とする表面のバイオフィルム成長の予防またはバイオフィルム形成が始まる前の雑菌混入の排除に特に有用である。

【0025】

したがって、本発明の別の態様により、細菌バイオフィルムが成長している表面を生体外で消毒または滅菌して、該表面からバイオフィルムを少なくとも部分的に除去する方法が提供され、この方法においては、表面を、バイオフィルムと接触してバイオフィルムを少なくとも部分的に破壊するのに有効な量の、バイオフィルム形成細菌を致死または損傷させる少なくとも1種の抗菌酵素と接触させる。本発明のこの態様は、表面を消毒または滅菌してバイオフィルム成長を予防または排除するのに特に有効である。

10

【0026】

本発明は、さらに、バイオフィルム感受性表面上のバイオフィルム成長を予防する生体外における方法を含む。したがって、本発明の別の態様により、バイオフィルム形成細菌を致死または損傷させる少なくとも1種類の予防上有効量の抗菌酵素と表面を接触させることにより、生体外で表面を消毒、保護または滅菌してバイオフィルム形成細菌の該表面上での増殖を予防する方法が提供される。本発明のこの態様は、カテーテルや人工装置など患者への医療用埋め込みを目的とした、バイオフィルムが成長しやすい表面を殺菌、保護または滅菌するのに特に有効である。

20

【0027】

リソスタフィンなどの抗菌酵素は、表面、特にポリマー表面に付着する傾向を有する程度に *in situ* でイオン帯電される。それゆえ、抗菌酵素で処理した表面は、生体内で消毒または滅菌状態を維持して該表面上のバイオフィルム形成を予防するのに役立つ酵素コーティングを保持する。したがって、本発明は、埋め込みを必要とする患者に埋め込み可能で細菌バイオフィルム成長が生じやすい少なくとも1つの表面を有する、バイオフィルム形成の予防に有効な量のバイオフィルム形成細菌を致死させる少なくとも1種の抗菌酵素でコーティングされた人工装置およびカテーテルを含む。

【0028】

コーティング剤は酵素のイオン電荷によって物理的に保持され得る。ポリマー表面の場合、ポリマー表面に酵素を共有結合させてコーティング剤を保持してもよいし、酵素をポリマー表面から実質的に放出させることなく表面に提示させる技術を用いて、酵素を表面ポリマーとブレンドしてもよい。したがって、本発明はさらに、ポリマーと、バイオフィルム形成細菌を致死させる少なくとも1種の有効量の抗菌酵素とをブレンドすることによりポリマー組成物を調製する方法であって、該組成物から形成される表面上における細菌バイオフィルムの成長に抵抗性のポリマー組成物を調製する方法を含む。また、本発明は、人工装置またはカテーテル製造用ポリマー組成物であって、ポリマーと、該組成物から形成される表面上におけるバイオフィルム形成の予防に有効な量のバイオフィルム形成細菌を致死させる少なくとも1種の抗菌酵素とがブレンドされている組成物を含む。

30

40

【0029】

人工装置の例としては、シャント、ステント、組織構築用足場、栄養補給管、パンクタルプラグ、人工関節、ペースメーカー、人工弁などを含むがそれらには限定されない、体内挿入用の実質的にすべての装置が含まれる。この定義は、細菌バイオフィルム成長が生じる恐れのある実質的にすべての表面を含むものとする。

【0030】

本発明の上記および他の目的、特徴ならびに利点は、添付図面と併せて以下に記載する発明を実施するための最良の形態からより容易に明らかにされる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

50

本発明は、抗菌酵素を用いて細菌バイオフィルム感染の治療および予防を行う。本発明において、用語「バイオフィルム感染」とは、感染が生じやすい損傷組織上または留置カテーテルもしくは人工装置の表面上のバイオフィルム形成と定義される。この定義は、患者体内でバイオフィルム形成後に続発する持続性感染および慢性感染とは区別され、それらの感染は含まない。これらの二次感染は、従来の治療や、バイオフィルムの完全除去には有効ではないかもしれない本発明の抗菌酵素投与量に一時的に応答し得る。

【0032】

「抗菌酵素」とは、当業者がこの用語に与える意味に従って定義され、ある細菌種またはその特定の菌株を死滅または損傷させる任意のタンパク質分解酵素、孔形成 (pore-forming) 酵素、分解酵素または阻害酵素を指す。その効果は、細菌の細胞壁の損傷、細胞壁に結合しているか細菌内部の細胞膜の破壊、細菌内タンパク質合成の阻害、糖鎖の破壊により、または当業者が抗菌酵素であるとみなすペプチドもしくはタンパク質によって起こる任意の他のメカニズムによって達成され得る。抗菌酵素は、天然の野生型酵素でも、従来技術で修飾した酵素でも、他の分子に結合させた酵素でも、組換え発現酵素でも、合成的に構築された酵素でもよい。

【0033】

これは材料の種類を無制限とするということではない。本明細書から本出願人が抗菌酵素の殺菌能および該殺菌能に基づく細菌バイオフィルム破壊能を発見したことを知れば、当業者は、過度な実験を行うことなく、本発明での使用に適した酵素を容易に特定することができる。抗菌酵素の1例はリソスタフィンである。リソスタフィンはブドウ球菌およびブドウ球菌から形成されたバイオフィルムの処理に有効であるので、重要である。

【0034】

「リソスタフィン」および「リソスタフィン類似体」とは、生体内および生体外 (in vitro) で、ブドウ球菌の細胞壁ペプチドグリカンの架橋結合ポリグリシンブリッジを開裂するタンパク質分解能を保持する、リソスタフィン (野生型)、任意のリソスタフィン突然変異体もしくは変異体、任意の組換え体、または関連酵素 (類似体) もしくは任意の合成体あるいはリソスタフィン断片 (合成かどうかにかかわらず) を包含するものと定義される。これらの酵素は、(生産菌株内に存在する酵素、またはプロセシングの任意のステージで導入される酵素もしくは試薬のいずれかによる) タンパク質の翻訳後プロセシング、または構造遺伝子の突然変異によって産生され得る。突然変異には、部位欠失、挿入、ドメイン除去および置換突然変異が含まれる。

【0035】

本発明のリソスタフィンは、合成的に構築しても、哺乳動物細胞、昆虫、細菌、酵母、は虫類または菌類中で発現させても、細胞培養物またはマウスなどの高等な組換え生物種から組換え発現させてもよいし、あるいはその他の方法でもよい。これには、合成ペプチドおよび合成ポリペプチドを含めた活性を維持した人工合成、あるいはブドウ球菌または他のバイオフィルム形成菌種のいずれかに有効な1種以上の他の抗菌酵素の活性部位を含有する、キメラタンパク質を含めた大型タンパク質もしくはペプチドの一部としてブドウ球菌に対するその活性を担うリソスタフィン酵素部分の組換え発現が含まれるであろう。

【0036】

均質なリソスタフィンの組換え発現、および発現タンパク質から調製した均質で完全な活性を有するリソスタフィン含有組成物が、2002年12月21日に、ジェフリー リチャード スティンソン (Jeffery Richard Stinson)、リュボフ グリンバーグ (Lioubov Grinberg)、ジョン コーカイ クン (Jon Kokai Kun)、アンドリュー リース (Andrew Lees) およびジェームス ヤコブ モンド (James Jacob Mond) により出願された「ブドウ球菌溶解活性が増強されたリソスタフィン分子 (Lysostaphin Molecule with Enhanced Staphylolytic Activity)」と題する米国特許出願に開示されており、同出願は引用によりその全文が本明細書に援用される。同出願は、2001年12月21日出願の米国仮特許出願第60/341,804号の優先権を主張している。

10

20

30

40

50

【0037】

有効な抗菌酵素医薬製剤としては、水溶液または活性物質の非経口送達に適した液体で再構成するための乾燥製剤（例えば、凍結乾燥した結晶または非結晶質（アモルファス））であり、浸透圧平衡を得るための追加の溶質を含んでも含まなくてもよい）がある。製剤は、ポーラスの静注、筋注もしくは末梢注入に適した少量の液体としてもよく、同液体中で再構成しても、または大量の静脈内点滴溶液に添加して再構成してもよく、あるいは、低速静注により投与される大量の液体としても、同液体中で再構成してもよい。

【0038】

送達は、活性物質の最低阻害濃度（MIC）または最低殺菌濃度（MBC）を上回る血中レベルおよび組織レベルを達成することにより、細菌力価を低下させて、形成されているバイオフィルムを破壊するか、または潜在的バイオフィルム形成を阻害するように、静脈内（iv）、筋肉内、皮下、腹腔内経路を介するか、鞘内もしくは吸入によるか、あるいは感染部位（または、予防のためには、バイオフィルム形成が生じやすい組織損傷部位か、留置カテーテルもしくは人工装置部位）への直接注入によるのが好ましい。

【0039】

本発明の抗菌酵素が、細菌種、または状況によりその1種以上の菌株に特異的である場合、医薬製剤は、バイオフィルム感染に対して広範なスペクトルを得るために複数の酵素を含有してもよい。しかし、本発明の抗菌酵素は、単独投与の状況下で同酵素の効力が証明されているようなバイオフィルム感染を治療するためには、単独で投与し得る。

【0040】

本発明の抗菌酵素の適当な投与量および投与計画は、患者の生物種、バイオフィルム感染の重篤度、感染微生物の感受性に依りて異なり、組み合わせ療法の場合には、組み合わせ用いられる特定の抗菌剤に依存し得る。患者候補の生物種はヒトには限定されず、抗菌酵素による治療の利益を享受すると考えられるバイオフィルム感染に罹患しているか罹患の恐れがある実質的にすべての冷血または温血脊椎動物種を含む。投与量は、約0.1～約100mg/kg/日の範囲、典型的には、約5～約50mg/kg/日の範囲であってよく、単回用量または分割用量として投与される。これらの用量は、持続注入または1日当たり複数の投与量に分割することを含めた多くの手段により投与し得る。バイオフィルム形成の予防には、比較的低い用量が有効であろう。

【0041】

さらに、本発明の抗菌酵素は、バイオフィルムをより効果的に破壊し、かつその再発を防止するように、他の抗菌剤と同時または交互に併用（coadministration）することができる。例えば、リソスタフィンおよびその類似体を、細胞壁合成を妨害または阻害する抗生物質、例えば、ペニシリン、ナフシリン、オキサシリン、および他のラクタム抗生物質、セファロチンなどのセファロスポリン、バンコマイシンなどのグリコペプチドや他のポリペプチドと併せて投与することができる。または、リソスタフィンおよびその類似体を、タンパク質合成を阻害する抗生物質、例えば、ストレプトマイシンなどのアミノグリコシド、テトラサイクリンおよびストレプトグラミンと併せて投与し得る。さらに、リソスタフィンおよびその類似体を、モノクローナル抗体；またはリゾチーム、ムタノリシンおよびセロジル（cellozyme）ムラミダーゼなどの他の抗菌酵素；デフェンシンなどのペプチド；およびナイシンなどのランチビオティクス；または任意の他のランチオン（lantibione）含有分子、例えばズブチリンと併せて投与してもよい。リソスタフィンおよびその類似体と共投与しようとする抗ブドウ球菌剤を、一定の組み合わせとして一緒に製剤化してもよいし、または、利用可能かつ実用的などのような製剤中にも、感染部位で適切なレベルの上記薬剤を提供することが知られているどのような経路を介しても即時的に使用し得る。

【0042】

また、バイオフィルム形成が生じやすい少なくとも1つの表面を有する埋め込み型の金属またはプラスチック製カテーテルまたは人工装置を、バイオフィルム形成しやすい表面上にバイオフィルム形成を阻害する本発明の抗菌酵素コーティングを形成するのに十分な

10

20

30

40

50

時間酵素溶液に浸漬することにより、該カテーテルまたは人工装置の表面に同酵素をコーティングすることもできる。最低濃度の酵素でも、ある程度の保護を与えるであろう。典型的には、約10 µg/ml ~ 約100 mg/mlの濃度を用い得る。装置表面の場合、酵素を表面に共有結合させてコーティングを形成させることもできる。ポリマー製装置の場合、酵素を表面から実質的に放出させることなく表面に酵素の金属イオン封鎖または局在化をもたらす技術により酵素と表面ポリマーとをブレンドし得る。また、リソスタフィンおよび他の阻害因子を、カテーテルおよび留置装置の埋め込み前または後に、留置装置またはカテーテルの表面をバイオフィーム形成から保護するリソスタフィンおよび他の阻害因子のコーティングが得られるような速度で、カテーテルおよび留置装置を介して直接導入してもよい。この導入速度には、カテーテルにリソスタフィンおよび他の阻害因子を充填すること、およびリソスタフィンおよび他の阻害因子がカテーテル表面をコーティングする時間を見越してカテーテルを密閉すること、または密閉ループ内または埋め込みカテーテルを介して、リソスタフィンおよび他の因子がカテーテルをコーティングできるような速度でリソスタフィンおよび他の因子をポンプ注入することを含み得る。これらの技術は留置装置の製造業者には周知であり、これ以上の説明は無用である。

10

【0043】

当業者に本発明の実施法を教示する以下の実施例により本発明をさらに説明する。以下の実施例は、単に本発明を例証するに過ぎず、本発明の特定の実施形態の種々の有利な特性を開示するものである。以下の実施例は、特許請求の範囲に記載の発明を限定するものと解釈すべきではない。

20

【実施例1】

【0044】

(in vitroにおける100 µg/mlのリソスタフィンによる黄色ブドウ球菌バイオフィームの破壊)

ブドウ球菌株を、~0.5 mlのトリプシン大豆ブロス(Tryptic Soy Broth (TSB)、ディフコ・バクト社(Difco Bacto)製)のアリコート 中-70 で保存した。各実験の前に、フリーザーからアリコートを1つ取り出し、ヒツジ血液寒天〔リメル社(Remel)〕上に播種し、37 で一晩インキュベートした。

【0045】

【表1】

30

表1 使用した細菌株

種	菌株の表記	情報
<i>S. aureus</i> (黄色ブドウ球菌)	ATCC 49521 (SA5)	莢膜型5型
<i>S. aureus</i>	Col	MRSA
<i>S. aureus</i>	Col-lysoR	上記のリソスタフィン耐性変異株
<i>S. aureus</i>	MBT 5040	MRSA
<i>S. aureus</i>	MBT 5040 lysoR	上記のリソスタフィン耐性変異株
<i>S. aureus</i>	ATCC 35556	下記の野生型
<i>S. aureus</i>	dltA 陰性	バイオフィームを形成しない
<i>S. epidermidis</i> (表皮ブドウ球菌)	SE 380	臨床分離株
<i>S. epidermidis</i>	HAY	臨床分離株
<i>S. epidermidis</i>	SE 1175	臨床分離株
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 35984	高スライム産生株

40

(バイオフィームアッセイ)

0.25%グルコース(シグマアルドリッチ社)を追加した5 mlのTSBに、分離した5つのブドウ球菌コロニーを接種した。培養物を振盪下に37 で一晩インキュベート

50

した。

【0046】

Spectronic (登録商標) 20D+を用いて、一晚培養物を $\sim 3\text{ml}$ PBS (バイオウィッタカー社 (Bio Whittaker)) 中で Abs_{578} が 0.1 になるように調整した。200 μl のTSB+0.25%グルコースを含有する1枚の96ウエルプレート、またはそれぞれ1mlのTSB+0.25%グルコースを含有し、24ウエル組織培養プレート(ナルジェヌクインターナショナル社 (Nalge Nunc International))にはめ込んだ24個の滅菌済 0.02mm Anopore (登録商標)メンブレンポリスチレンプレートインサート(ナルジェヌクインターナショナル社)に、1:200希釈した調整済み一晚培養物を接種した。プレートを37で一晚インキュベートしてバイオフィルムを形成させた。 10

【0047】

(処理)

約24時間成長させた後、半分のウエルまたはインサートに、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリソスタフィン(AMBI社、現在はニュートリション21社 (Nutrition 21)、またはバイオシネクサスインコーポレイテッド社 (Biosynexus Incorporated))を注入した。次いで、プレートを37で一晚インキュベートした。

【0048】

(バイオフィルムの検出)

48時間インキュベートした後、ウエルまたはインサートをPBSで2回軽く洗浄した。洗浄済み96ウエルプレートまたは24インサートを室温下に完全に風乾した。96ウエルプレートはバイオフィルム検出のためにサフラニン(リメル社)で染色し、インサートは、走査電子顕微鏡検査(SEM)に備えて、3 \times グルタルアルデヒド緩衝液(0.7M NaCl、0.014M KCl、0.007M KH_2PO_4 、0.039M Na_2HPO_4 、1M OHC(CH_2) $_3\text{CHO}$)で固定した。 20

【0049】

図1は、リソスタフィンで処理しなかったインサート上のバイオフィルムの成長を示す2レベルの倍率(2,000 \times および660 \times)のSEM写真である。

図2は、リソスタフィンで処理したインサートを示す倍率6,600 \times および660 \times のSEM写真である。24時間の成長後のバイオフィルム形成を破壊するリソスタフィンの能力が直ちに明白である。 30

【実施例2】

【0050】

(*in vitro*における50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリソスタフィンによる黄色ブドウ球菌バイオフィルムの破壊)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌株MBT5040を、実施例1と同様にTSB+グルコース中で一晚増殖させた。24時間後、これも実施例1と同じように、200 μl のTSB+グルコースを含有する96ウエル組織培養プレートに1:200希釈した一晚培養物を接種した。96ウエルプレートを振盪下に37で一晚インキュベートし、静置型の37インキュベータに移してさらに24時間インキュベートした。2回目のインキュベーションの後、ウエルをPBSで2回洗浄して浮遊細胞を除去し、室温下に3時間、リソスタフィンを含まないPBS(-)または50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリソスタフィンを含むPBS(+)と共にインキュベートした。この3時間のインキュベーション後、ウエルをPBSで2回洗浄し、次いで、ブアン液(シグマアルドリッチ社)中で5分間固定した。ウエルをサフラニンで1分間染色し、再度PBSで洗浄した。結果を図3に示すが、この図は、リソスタフィン処理の結果生じたバイオフィルムの破壊を示している。処理しなかったウエルはバイオフィルムを含んでいたが、処理したウエルでは、バイオフィルムが完全に破壊された。 40

【実施例3】

【0051】

(バイオフィルム形成抵抗性リソスタフィンコーティングカテーテルの作製)

6つのウエルを、PBSで希釈して10mg/ml、1mg/mlまたは100μg/mlとしたリソスタフィン300μlと共にインキュベートした。試料はすべて2連とした。該プレートを4℃で一晩インキュベートした。翌朝、ウエルを1mlのPBSで10回洗浄したが、ウエルを空にするために真空吸引を使用した。黄色ブドウ球菌株SA5をPBSで透過率40%に希釈した。この溶液の1:10,000希釈液を作成し、各ウエルに300μl加えた。プレートを、75rpmの振盪式インキュベータに37℃で2時間入れておいた。2時間後、各ウエルから40μlを採取し、血液寒天プレート上に播種し、インキュベータに37℃で一晩入れておいた。翌朝、プレート上のコロニーを計数した。

10

【0052】

2つのアンジオカット (Angiocath (商標)) カテーテル (ベクトンディッキンソン社 (Becton Dickinson)) をリソスタフィンの100μg/ml溶液200μlと共にインキュベートし、他の2つをPBS中でインキュベートした。該カテーテルを4℃で一晩インキュベートした。翌朝、流速1.5ml/分のポンプを用い、カテーテルを50mlのPBSで洗浄した。カテーテルが洗浄されたら、黄色ブドウ球菌SA5をPBSで透過率40%に希釈した。この溶液の1:10,000希釈液を作成し、各カテーテルに100μlを加えた。カテーテルを37℃で2時間インキュベートした。インキュベートした後、カテーテル流出液を血液寒天プレート上に播種し、インキュベータに37℃で一晩入れておいた。翌朝、プレート上のコロニーを計数した。

20

【0053】

【表2】

表2

表面	試料	コーティング	CFU
ポリスチレン	1	無し	625
	2	無し	594
	1	Lys 10 mg/ml	2
	2	Lys 10 mg/ml	0
	1	Lys 1 mg/ml	1
	2	Lys 1 mg/ml	0
	1	Lys 100 μg/ml	4
	2	Lys 100 μg/ml	1
アンジオカット	1	無し	288
	2	無し	475
	1	Lys 100 μg/ml	0
	2	Lys 100 μg/ml	0

30

40

(結果)

リソスタフィンは2つの異なる表面上で細菌 (黄色ブドウ球菌SA5) を効果的に死滅させることができた。ポリスチレン表面を、10mg/ml、1mg/mlおよび100μg/mlの3種の異なる濃度のリソスタフィンと共にインキュベートした。3種の濃度のリソスタフィン全てについて、加えた黄色ブドウ球菌を37℃で2時間の間に死滅させるのに十分な酵素がポリマー表面に結合して残ったが、コーティングされていない対照ウ

50

エルは有意に高い細菌数を示した。

【0054】

アンジオカットカテーテルの内部を100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリソスタフィン溶液と共にインキュベートした。リソスタフィンでコーティングされたカテーテルは黄色ブドウ球菌を37で2時間の間に死滅させることができたが、コーティングされていない対照カテーテルはカテーテル内の細菌を死滅させる効果が全くなかった。

【0055】

(比較実施例)

黄色ブドウ球菌株をトリプシン大豆ブロス(TSB)+グルコース中で一晩増殖させた。24時間後、200 μl のTSB+グルコースを含有する96ウエル組織培養プレートに1:200希釈した一晩培養物を接種した。96ウエルプレートを振盪下に37で一晩インキュベートし、次いで、静置型37インキュベータに移してさらに24時間インキュベートした。2回目のインキュベーション後、ウエルをPBSで2回洗浄して浮遊性細胞を除去し、次いで、室温下に3時間、リソスタフィンを含まないPBS(-)または50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリソスタフィンを含むPBS(+)と共にインキュベートした。この3時間インキュベーションの後、ウエルをPBSで2回洗浄し、次いで、ブアン液中で5分間固定した。固定ウエルをサフラニンで染色し、次いで再度PBSで洗浄した。リソスタフィンが黄色ブドウ球菌のリソスタフィン耐性株のバイオフィルムを破壊できないことが図4に示されているが、これは、リソスタフィンが同酵素に感受性の細菌に対して特異的であることを示している。この知見はさらに、リソスタフィンがバイオフィルム中の細菌細胞そのものに作用し、これらのバイオフィルム関連細胞を破壊すればバイオフィルムを完全に破壊するのに十分であることをも示唆している。

【実施例4】

【0056】

(リソスタフィンは他の抗生物質より迅速かつより効果的に黄色ブドウ球菌のバイオフィルムを破壊する)

黄色ブドウ球菌バイオフィルムの抗生物質感受性の研究には、オキサシリンおよびバンコマイシンが用いられることが多かった。これらの抗生物質を、リソスタフィンが黄色ブドウ球菌株ATCC35556のバイオフィルムの破壊に従来の抗生物質より有効であるかどうかを判定するために、リソスタフィンと比較した。ポリスチレン製96ウエル組織培養プレート中の24時間バイオフィルムを、系列希釈したリソスタフィン、オキサシリンおよびバンコマイシンで処理した(図7)。

【0057】

バイオフィルムに及ぼすリソスタフィン、オキサシリンおよびバンコマイシンの速度論的效果を調べるために、96ウエル組織培養プレートに定着したバイオフィルムの吸光度を経時的に(0~3時間および24時間)測定した。黄色ブドウ球菌SA113のバイオフィルムを有する組織培養ウエルを、系列希釈したリソスタフィン(0.8 g/ml ~200 g/ml)、オキサシリン(1.6 g/ml ~400 g/ml)、またはバンコマイシン(3.2 g/ml ~800 g/ml)と共に24時間インキュベートし、650 nMでの吸光度を、最初の3時間は20分毎に、次いで24時間目に再びモニターした。PBS中6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量のリソスタフィンで処理すると、リソスタフィン処理バイオフィルムの吸光度は、0時間での約0.35から処理後3時間の0.125に低下し、24時間までにベースライン近く(0.04)まで低下した(図7)。バイオフィルムをPBS中400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ もの多量のオキサシリンまたは800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ もの多量のバンコマイシンで処理したにも拘わらず、オキサシリンまたはバンコマイシンで24時間処理したバイオフィルムの吸光度にはほとんど変化がなく、0.325辺りのままであった(図7)。オキサシリンまたはバンコマイシンのような抗菌剤は活発に代謝を行っている細菌に有効なので、類似の実験を行い、ただしバイオフィルムを細菌用培地(TSB)中の3種の抗菌剤と共にインキュベートした。PBS中ではなくTSB中でアッセイを行ったときにも極めて類似した結果が認められた。リソスタフィンは24時間までにバイオフィ

ルムの吸光度をバックグラウンド近くまで低下させたが、オキサシリンおよびバンコマイシンは24時間のインキュベーション後にもほとんど効果がなかった(データは示さず)。

【0058】

上記3種の薬剤の、ポリスチレンウエル中の黄色ブドウ球菌バイオフィルムの破壊能力を、処理ウエルと対照(緩衝液処理)ウエルとの染色強度を比較することにより視覚化することができる。24時間処理した上述の速度論的実験由来のバイオフィルムはウエルの底で黒っぽく染まるが(図8)、バイオフィルムの無いウエルはサフラニンで染まらない。PBS中 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ (図8A)およびTSB+ 0.25% グルコース中 $12.5 \text{g}/\text{ml}$ (図8B)程度の少量のリソスタフィン、トランスウエルからバイオフィルムを除去しているように見えたが、PBSまたはTSB中 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ のオキサシリンまたは $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ のバンコマイシンは24時間処理した後でも定着バイオフィルムに明らかな影響を与えなかった(図8Aおよび8B)。

10

【実施例5】

【0059】

(リソスタフィンは表皮ブドウ球菌バイオフィルムを破壊する)

リソスタフィンは黄色ブドウ球菌バイオフィルムに対して活性を示したが、リソスタフィンに対して感受性が低いことが知られている表皮ブドウ球菌のバイオフィルムもリソスタフィンのバイオフィルム破壊作用に対して感受性であるかどうかを調べることは重要であった。それぞれ異なるグリコカリックス(スライム)産生能力を有する3種の表皮ブドウ球菌株、表皮ブドウ球菌株Hay(低スライム産生株)、表皮ブドウ球菌株SE1175(中程度スライム産生株)および表皮ブドウ球菌ATCC35984(高スライム産生株)、を調べた。予想通り、これら3種の表皮ブドウ球菌株はすべてガラスチャンパスライド上にバイオフィルムを産生し(図9)、ATCC35984が最も厚く、最も黒っぽく染まるバイオフィルムを産生した。これらの表皮ブドウ球菌バイオフィルムを $200 \text{g}/\text{ml}$ のリソスタフィンと共に3時間インキュベートすると、3種の表皮ブドウ球菌株すべてのバイオフィルムが破壊された(図9)。この実験には対照として黄色ブドウ球菌株SA113も含めた。破壊されたバイオフィルムの顕微鏡検査により、この人工表面に結合したまま残る無傷の細菌は存在しないことが判明した(データは示さず)。リソスタフィン処理ウエル中に見える染色された物質は、サフラニンでピンク色に染まった細胞外グリコカリックスであり、無傷のグラム陽性表皮ブドウ球菌細胞は含んでおらず、細胞破片だけがかった。

20

30

【実施例6】

【0060】

(マウスにおいて成立した感染の治療)

頸静脈カテーテル挿入したマウス(チャールスリバーラボラトリーズ社(Charles River Labs))を用いた。尾静脈を介してマウスに黄色ブドウ球菌(カテーテルを挿入していないマウスに感染を成立させるのに通常必要な用量 $5 \times 10^6 \text{CFU}$ 以上よりはるかに低い $10^3 \sim 10^4 \text{CFU}$)を負荷投与した。感染が成立した負荷投与後4日目に治療を開始した。留置カテーテルを介して 200μ 容量のPBS中のリソスタフィンを投与した(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の場合には、治療にナフシリンを加えた)。その日の最終治療後、リソスタフィン(さらに、使用する場合にはナフシリン)を治療に用いたのと同じ濃度で加えた $50 \mu\text{l}$ のロック溶液(50%滅菌グルコース溶液)をカテーテルに入れた。対照マウスには、PBSおよびロック溶液だけで同じ治療をした。

40

【0061】

最終治療の翌日、肝臓、心臓および心臓内のカテーテルの一部を採取した。カテーテル部分は超音波処理して細菌を分離した。回収された細菌(黄色ブドウ球菌)の数(CFU)が表3~表11に示されている。

【0062】

50

【表 3】

表3

MSSA	20 mg/kg	1日3回	4日間
グループ	マウス	肝臓	カテーテル
対照	1	239	TNTC
対照	2	TNTC	TNTC
対照	3	1494	TNTC
対照	4	TNTC	TNTC
リソスタフィン	1	0	0
リソスタフィン	2	27	1
リソスタフィン	3	43	0
リソスタフィン	4	148	387*
リソスタフィン	5	8	1339*

* リソスタフィン耐性

MSSA= メチシリン感受性黄色ブドウ球菌

TNTC = 多すぎて計数不能

【 0 0 6 3 】

【表 4】

表4

MSSA	10 mg/kg	1日2回	4日間	
グループ	マウス	肝臓	心臓	カテーテル
対照	1	>1600	TNTC	TNTC
対照	2	209	>1500	>1600
対照	3	0	0	4
リソスタフィン	1	0	0	0
リソスタフィン	2	TNTC*	TNTC*	>1700*
リソスタフィン	3	0	0	0
リソスタフィン	4	0	1	5
ナフシリン (50)	1	0	0	0
ナフシリン	2	5	0	303
ナフシリン	3	0	0	0
ナフシリン	4	0	0	3

* リソスタフィン耐性

【 0 0 6 4 】

【表 5】

表5

MRSA	10 mg/kg+/	ナフシリン	1日2回	3日間
グループ	マウス	肝臓	心臓	カテーテル
対照	1	1004	961	TNTC
対照	2	17	TNTC	TNTC
対照	3	13	435	TNTC
対照	4	TNTC	TNTC	TNTC
リソスタフィン	1	32	3	981
リソスタフィン	2	23	19	310
リソスタフィン	3	87	74	593
リソスタフィン	4	115	112	83
+ナフシリン(50)	1	7	3	1125
+ナフシリン	2	15	1	1
+ナフシリン	3	5	39	1086

MRSA = メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

10

20

【 0 0 6 5 】

【表 6】

表6

MRSA	10 mg/kg+/	ナフシリン	1日3回	4日間
グループ	マウス	肝臓	心臓	カテーテル
対照	1	583	81	TNTC
対照	2	0	0	334
対照	3	67	TNTC	TNTC
対照	4	0	0	693
リソスタフィン	1	0	0	0
リソスタフィン	2	263	10	932
リソスタフィン	3	28	0	523
リソスタフィン	4	0	0	0
+ナフシリン(50)	1	18	1	15
+ナフシリン	2	0	9	675
+ナフシリン	3	0	0	0
+ナフシリン	4	0	0	0

30

40

【 0 0 6 6 】

【表 7】

表7

MRSA	リススタフィン		1日3回	4日間
グループ	マウス	肝臓	心臓	カテーテル
対照	1	0	0	TNTC
対照	2	337	TNTC	TNTC
対照	3	0	0	TNTC
10 mg/kg	4	0	0	0
10 mg/kg	1	0	0	115
10 mg/kg	2	395	3	558
20 mg/kg	3	0	0	0
20 mg/kg	4	0	0	0
20 mg/kg	1	0	0	13
40 mg/kg	2	0	0	0
40 mg/kg	3	0	0	0
40 mg/kg	4	1	0	1

10

20

【 0 0 6 7 】

【表 8】

表8

MRSA	15 mg/kg+/	ナフシリン	1日3回	4日間
グループ	マウス	肝臓	心臓	カテーテル
対照	1	0	0	0
対照	2	105	11	TNTC
対照	3	1740	80	TNTC
対照	4	0	0	49
リススタフィン	1	183	2	1298
リススタフィン	2	147	0	64
リススタフィン	3	0	0	0
リススタフィン	4	245	6	26
+ナフシリン(50)	1	0	0	0
+ナフシリン	2	1	0	0
+ナフシリン	3	0	0	0
+ナフシリン	4	2	0	0

30

40

【 0 0 6 8 】

【表 9】

表9

MRSA	15 mg/kg+/	ナフシリン		4日間	
		マウス	肝臓	心臓	カテーテル
グループ	マウス	肝臓	心臓	カテーテル	
対照	1	279	149	TNTC	
対照	2	1286	TNTC	TNTC	
対照	3	1218	62	TNTC	
対照	4	1718	104	TNTC	
リソスタフィン	1	250	8	35	
リソスタフィン	2	10	0	0	
リソスタフィン	3	120	0	58	
リソスタフィン	4	215	4	>1200	
+ナフシリン(50)	1	2	0	0	
+ナフシリン	2	0	0	0	
+ナフシリン	3	1	0	0	
+ナフシリン	4	0	0	0	

10

20

【0069】

【表 10】

表10

MRSA	マウス	リソスタフィン+		4日間	
		肝臓	心臓	カテーテル	
グループ	マウス	肝臓	心臓	カテーテル	
対照	1	0	5	4	
対照	2	0	0	1040	
対照	3	802	490	TNTC	
対照	4	152	114	TNTC	
15 mg/kg-1日2回	1	0	9	9	
15 mg/kg-1日2回	2	7	0	53	
15 mg/kg-1日2回	3	18	2	2	
15 mg/kg-1日2回	4	16	6	10	
10 mg/kg-1日2回	1	1144	58	175	
10 mg/kg-1日2回	2	0	0	2	
10 mg/kg-1日2回	3	73	9	15	
10 mg/kg-1日2回	4	0	0	0	

30

40

【0070】

【表 1 1】

表11

MRSA	リソスタフィン+	ナフシリン	1日3回	4日間
グループ	マウス	肝臓	心臓	カテーテル
対照	1	103	92	TNTC
対照	2	306	394	TNTC
対照	3	0	2	66
対照	4	187	272	TNTC
40 (1x)-5 mg/kg	1	20	10	114
40 (1x)-5 mg/kg	2	0	0	0
40 (1x)-5 mg/kg	3	0	0	0
40 (1x)-5 mg/kg	4	16	9	807
15 (3x)-5 mg/kg	1	0	0	0
15 (3x)-5 mg/kg	2	0	0	570
15 (3x)-5 mg/kg	3	3	0	50
15 (3x)-5 mg/kg	4	32	124	237

10

20

マウスにおいて成立したカテーテル感染を除去するためには、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌に対しては20 mg/kgのリソスタフィン、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対しては15 mg/kgリソスタフィン+50 mg/kgナフシリンを1日3回4日間投与する必要があった(注:リソスタフィンおよびナフシリンは黄色ブドウ球菌に対して相乗的殺菌効果を有することが知られている)。リソスタフィンの用量を少なくするか、または異なる投与計画(例えば、40 mg/kgを1回に続いて以後5 mg/kg、または初日に15 mg/kgを3回に続いて以後5 mg/kg)を実施した場合には、黄色ブドウ球菌感染の完全な除去は生じなかった。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌をリソスタフィンだけで治療すると、2, 3のケースでリソスタフィン耐性が発生したが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌をリソスタフィンとナフシリンで組み合わせ治療すると、リソスタフィン耐性は全く検出されなかった。リソスタフィン耐性とラクタム耐性は相互に排他的であることが知られている。SEMにより、黄色ブドウ球菌が埋め込みカテーテル上でバイオフィームとして増殖し(図5)、リソスタフィンがこれらのカテーテルから黄色ブドウ球菌バイオフィームを除去することが示された(図6)。

30

【実施例7】

【0071】

(カテーテル挿入マウスのリソスタフィンによる前処理)

実施例4のように黄色ブドウ球菌を負荷投与する前に、カテーテルを介して頸静脈カテーテル挿入マウスをリソスタフィンで1または2回前処理した。マウスには、リソスタフィン(40 mg/kg)を負荷投与24時間前に1回、またはリソスタフィン(40 mg/kg)を負荷投与24時間前と2時間前の2回投与した。リソスタフィン溶液は負荷投与中カテーテルに入れたままにした。対照マウスには、標準的なリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を投与した。負荷投与後4日目にマウスを屠殺した。

40

【0072】

3匹の対照マウスのうち2匹は、カテーテル、肝臓および心臓に感染していた。処理した8匹のマウスにはいずれも黄色ブドウ球菌はなかった。

上記実施例において、リソスタフィン溶液を細菌の負荷投与時にカテーテルに入れたままにしたので、溶液中のこのリソスタフィンがカテーテルを黄色ブドウ球菌感染から保護

50

したと主張することができよう。もっと厳しい実験を実施するために、カテーテル挿入マウスに、カテーテルを介して200 μ lのPBS中40mg/kgのリソスタフィンを含む50 μ lのロック溶液を投与した。22時間後、これらのマウスすべてのカテーテルをPBSで徹底的にすすいだ。すすぎの2時間後に、動物に10⁴個の黄色ブドウ球菌を負荷投与した。黄色ブドウ球菌負荷投与の4日後に動物を屠殺し、カテーテルと臓器を細菌に関して調査分析した。表12に示すように、過剰なリソスタフィンがすすぎ流されても、カテーテルを黄色ブドウ球菌感染から保護するのに十分なリソスタフィンが頸静脈カテーテルに結合して残っていた。

【0073】

【表12】

10

表12

グループ	感染した動物	CFUs カテーテル	CFUs 心臓	CFUs 肝臓
対照	4/4	>2000	880	251
リソスタフィン カテーテル内、ロック溶液なし	1/4	0	(287) ^a	(341) ^a
リソスタフィン カテーテル内+ロック溶液	0/4	0	0	0

20

^a 1匹の感染動物由来の結果

*in vivo*の実施例における上記結果は、カテーテル感染マウスモデルにおいてリソスタフィンが感染カテーテルから黄色ブドウ球菌バイオフィルムを除去できることを示している。これらの実施例において、マウス内のカテーテルを清浄化するには、最低用量で40mg/kgを1日3回4日間投与する必要があった。上記実施例はさらに、マウス内のカテーテルに単回で40mg/kgのリソスタフィンを予め注入すれば、カテーテルから過剰なリソスタフィンを洗い流しても、カテーテルが黄色ブドウ球菌バイオフィルム形成から保護されるであろうことを実証している。マウスのバイオフィルム感染を除去または防ぐのに必要なリソスタフィン用量はヒトおよび他の動物の治療に必要な用量とは異なり得るので、これらの実施例は本特許の特許請求の範囲を制限することを意図するものではない。

30

【0074】

上記結果は、リソスタフィンがカテーテルに結合してその殺ブドウ球菌活性を維持することを示す実施例3の結果と関連しており、カテーテルの前処理がリソスタフィンをカテーテル感染の療法として用いるよりも実用的であり得ることを示唆している。

【実施例8】

40

【0075】

(リソスタフィンコーティング静脈内カテーテルの生体外(*in vitro*)における効力)

(材料および方法)

(材料) ポリスチレン製24ウェル組織培養プレートは、米国マサチューセッツ州アクトン(Acton)所在のコスター社(Costar)から購入した。アンジオカットカテーテルおよびトリプシン大豆ブ羅斯は、米国メリーランド州スパークス(Sparkss)所在のベクトンディッキンソン社(Becton Dickinson)から購入した。リン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)は、米国メリーランド州ロックビル(Rockville)所在のギブコライフテクノロジーズ社(Gibco Life Techn

50

ologies) から購入した。血液寒天プレートは、米国カンザス州レネクサ (Lenexa) 所在のリメル社から購入した。リソスタフィン (Ambicin (登録商標) L) は、AMBI インコーポレイテッド社 (AMBI, Inc.) から入手した。種々のアッセイにおいて、菌株：黄色ブドウ球菌莢膜型 5 型 (SA5) および 8 型 (臨床分離株)；メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MBT 5040 (WRAMC 由来の臨床分離株)、表皮ブドウ球菌 SE380 (臨床分離株)、1175 (臨床分離株)、ATCC 35984 (ATCC から購入) を用いた。

【0076】

(ポリスチレンウエルのコーティング) PBS に希釈した 10 mg/ml、1 mg/ml または 0.1 mg/ml のリソスタフィン 300 μ l でウエルをコーティングした。プレートを 4 で一晩インキュベートした。ウエルを 1 ml の PBS で 10 回洗浄し、洗浄液を真空吸引して除去した。各ウエルに、黄色ブドウ球菌の 5×10^4 CFU/ml 溶液 300 μ l を加えた。プレートを 37 下に 2 時間、75 rpm で振盪した。次いで、各ウエルから 40 μ l を採取し、血液寒天プレート上に画線塗布 (ストリーク) し、37 下に一晩インキュベートした。

10

【0077】

(カテーテルのコーティング) アンジオカットカテーテルから針を除去し、処分した。1 ml シリンジを用いて、カテーテルをリソスタフィンの 0.1 mg/ml 溶液 200 μ l でコーティングした。カテーテルは、特に断りのない限り、室温下に 1 時間インキュベートした。次いで、蠕動ポンプを用いて 1.5 ml/分の流速で 50 ml のリン酸緩衝生理食塩水によりカテーテルを洗浄した。次いで、カテーテルに、細菌の $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml 溶液 (TSB で希釈したもの) 120 μ l を接種し、37 で 2 時間インキュベートした。次いで、カテーテルから流出させた液を血液寒天プレート上に画線塗布し、37 下に一晩インキュベートした。

20

【0078】

(リソスタフィンの浸出) リソスタフィンがカテーテルから管腔溶液中にゆっくり放出されるかどうかをテストするために、リソスタフィンコーティングカテーテルを 100 μ l の PBS と共に 37 で 2 時間インキュベートした。次いで、PBS をエッペンドルフチューブ内に移し、この流出液に 10^5 CFU の SA5 を加え、37 で 1 時間インキュベートした。試料から 40 μ l を採取し、血液寒天プレート上に画線塗布し、37 で一晩インキュベートした。もう 1 つの方法として、リソスタフィンコーティングカテーテルを PBS と共に 37 で一晩インキュベートした。翌朝、PBS を洗浄除去し、カテーテルに $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml の SA5 を 37 で 2 時間接種した。次いで、流出液を血液寒天プレート上に画線塗布し、37 で一晩インキュベートした。ポリスチレン表面からの浸出を検出するために、ウエルを 10、1 および 0.1 mg/ml のリソスタフィンで 60 分かけてコーティングした。次いで、ウエルを洗浄し、各ウエルに 300 μ l の PBS を加えて 2 時間おいてから取り除いた。この PBS 洗浄液に 5×10^4 CFU/ml 溶液 300 μ l を加え、37 で一晩インキュベートした。次いで、40 μ l を採取し、血液寒天プレート上に画線塗布し、37 で一晩インキュベートした。

30

【0079】

(リソスタフィンの長期浸出) 10 個のリソスタフィンコーティングカテーテル (10 mg/ml のコーティング濃度) を PBS と共に 37 で 2 時間インキュベートした。次いで、カテーテルを洗浄し、10 個のリソスタフィンコーティングカテーテルのうち 2 個を SA5 の 5×10^4 CFU/ml 溶液 200 μ l と共に 37 で 2 時間インキュベートした。流出液を血液寒天プレート上に画線塗布し、37 で一晩インキュベートした。残りのカテーテルを新鮮な PBS と共にインキュベートし、一晩 37 下に放置した。翌日、全 8 個のカテーテルを洗い流し、そのうち 2 個のカテーテルを上記のように細菌と共にインキュベートした。他の 6 個のカテーテルは再び新鮮な PBS と共にインキュベートし、一晩 37 下に放置した。この手順を 4 日間毎日繰り返した。

40

【0080】

50

(細菌のカテーテルへの付着) リソスタフィンコーティングカテーテルを、振盪下に2時間、 0.1 mg/ml のリソスタフィン溶液2ml中に入れておき、カテーテルの外側をコーティングした。次いで、カテーテルを洗浄し、 $5 \times 10^4 \text{ CFU/ml}$ のSA5溶液に入れ、 37°C で3時間インキュベートした。この細菌溶液 $40 \mu\text{l}$ を血液寒天プレート上に画線塗布し、 37°C で一晩インキュベートした。カテーテルを2mlのTSB中 37°C で一晩インキュベートし、増殖について調べた。処理していないカテーテルを50mlのPBSで洗浄し、次いで、 $5 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ の細菌溶液 $120 \mu\text{l}$ を接種し、2または24時間インキュベートした。次いで、カテーテル流出液を血液寒天プレート上に画線塗布し、一晩 37°C 下に放置した。カテーテルを50mlのPBSで洗浄し、最後の1mlの洗浄液を回収し、 $100 \mu\text{l}$ を血液寒天プレート上に画線塗布して 37°C で一晩インキュベートした。次いで、カテーテルを1mlのTSB中 37°C で一晩インキュベートし、増殖について調べた。

【0081】

(血清タンパク質の存在下におけるリソスタフィン活性) カテーテルを室温下に60分かけて 0.1 mg/ml でコーティングした。次いで、カテーテルを洗浄し、ヒト血清またはTBSと共に 37°C で24時間インキュベートした。カテーテルを洗浄し、次いで、 $5 \times 10^4 \text{ CFU/ml}$ の細菌を 37°C で2時間接種した。カテーテルからの流出液を血液寒天プレート上に画線塗布し、 37°C で一晩インキュベートした。

【0082】

固定化されたリソスタフィンにより、ポリスチレンおよびカテーテルの表面から細菌を効果的に除去することができた。対照ウエルからは平均して 610 CFU が回収されたのに対し、リソスタフィンでコーティングしたウエルにはわずか 3 CFU しか残っておらず、細菌数が 99.5% 減少した。3種の濃度はいずれも細菌に対して極めて活性が高かったので、この範囲における殺菌は濃度依存的ではなかった。リソスタフィンコーティングカテーテルでは細菌が完全に除去されたのに対し、対照カテーテルでは 493 CFU が回収された。これらの結果は、リソスタフィンがプラスチック表面に結合している間、黄色ブドウ球菌に対する活性を維持することを示唆している。

【0083】

殺菌活性がリソスタフィンコーティング時間の関数であるかどうかを突きとめるために、カテーテルを、5、10または15分間かけて、 0.1 mg/ml のリソスタフィンでコーティングし、それらの黄色ブドウ球菌殺菌効力を調べた。図10に示すように、カテーテルは、リソスタフィンでわずか5分間コーティングしただけでも高レベルの殺菌活性を有していたが、コーティング時間が長くなるにつれ、効力が増大する傾向があった。細菌数は、5分間のコーティング後には 98.7% 、10分後には 99.4% 減少し、わずか15分間のコーティング後では完全に除去された。

【0084】

(コーティング表面からのリソスタフィンの浸出)

リソスタフィンコーティングカテーテルのPBS洗浄液は、ごくわずかな細菌数減少しか示さなかった(表14)。リソスタフィンコーティングカテーテルは、PBSで一晩洗浄した後でも細菌を完全に除去したことを示したのに対し、非処理カテーテルでは 1500 CFU が回収された。このデータは、リソスタフィンがカテーテルから浸出しているとしても、このような細菌負荷に対しては有効でない量の浸出であることを示唆している。

【0085】

ポリスチレンからのリソスタフィン浸出の結果として、細菌除去に及ぼすコーティング濃度依存的効果が存在する。 10 mg/ml についての洗浄液は、SA5の力価を、対照に比べて 1.41 log 減少させ、 1 mg/ml の洗浄液は 1.31 log 減少させた。しかし、 0.1 mg/ml コーティングでは、浸出による細菌数の減少はわずか 0.33 log であった。一方、 0.1 mg/ml でコーティングしたウエルに同じ細菌力価を直接加えたと、細菌数が 2.41 log 減少した(表13)。

【0086】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表13 黄色ブドウ球菌に対する表面結合リソスタフィンの効力

表面	コーティング濃度	CFU (n=2)
ポリスチレン	10 mg/ml	1
	1 mg/ml	1
	0.1 mg/ml	3
	0 mg/ml	610
アンジオカット	0.1 mg/ml	0
	0 mg/ml	493

10

【 0 0 8 7 】

【表 1 4】

表14 結合リソスタフィンの安定性および抗菌効力に及ぼす浸出の効果

表面	コーティング濃度	生理食塩水 インキュベーション 時間	CFU (n=3)	殺菌場所
アンジオカット	0.1 mg/ml	2 時間	219	洗浄液 ¹
	0 mg/ml	2 時間	323	洗浄液
	0.1 mg/ml	24 時間	0	カテーテル ²
	0 mg/ml	24 時間	1503	カテーテル
ポリスチレン	10 mg/ml	2 時間	26	洗浄液
	1 mg/ml	2 時間	33	洗浄液
	0.1 mg/ml	2 時間	291	洗浄液
	0 mg/ml	2 時間	627	洗浄液

20

30

¹ PBS洗浄液に加えた細菌² カテーテルに加えた細菌

コーティングカテーテルの殺菌活性に及ぼすリソスタフィンの連続浸出の効果を図 1 1 に示す。カテーテルを、24 時間毎に PBS を新しくしながら、最大 96 時間まで PBS とともにインキュベートした。次いで、カテーテルが黄色ブドウ球菌殺菌活性を維持しているかどうかを調べるために、カテーテルを細菌で負荷曝露した。図 1 1 に示すように、PBS と共に 2 時間インキュベートした後では、リソスタフィンコーティングカテーテルから回収された細菌は非コーティングカテーテルに比べて 2.81 log 減少していた。細菌数は、24 時間後には 1.81 log、48 時間後には 1.51 log、72 時間後には 0.71 log、96 時間後には 0.31 log 減少した。

40

【 0 0 8 8 】

(リソスタフィンコーティングカテーテルに対する種々の菌株の感受性)

表 1 5 は、生体外 (in vitro) カテーテルモデルでテストした、MRSA 株および原型のバイオフィilm 産生表皮ブドウ球菌株を含めた数種の黄色ブドウ球菌株および表皮ブドウ球菌株の感受性を示している。

50

【 0 0 8 9 】

【 表 1 5 】

表15: リソスタフィンでコーティングしたカテーテルに対する種々のブドウ球菌株の感受性

コーティング濃度	細菌株	CFU (n=2)
0.1 mg/ml	<i>S. epi</i> 380	4
0 mg/ml	<i>S. epi</i> 380	678
0.1 mg/ml	<i>S. epi</i> 1175	68
0 mg/ml	<i>S. epi</i> 1175	824
0.1 mg/ml	<i>S. epi</i> 35984	16
0 mg/ml	<i>S. epi</i> 35984	757
0.1 mg/ml	SA5	1
0 mg/ml	SA5	785
0.1 mg/ml	SA8	0
0 mg/ml	SA8	1593
0.1 mg/ml	MRSA	1
0 mg/ml	MRSA	910

S. epi: 表皮ブドウ球菌

以前の研究では、リソスタフィンは黄色ブドウ球菌に比べて表皮ブドウ球菌に対して活性が低いことが示されたが、リソスタフィンコーティングカテーテルは、黄色ブドウ球菌株に対するより幾分効果が低いとは言え、表皮ブドウ球菌の3種の菌株を効果的に死滅させることができた。表皮ブドウ球菌380型は表皮ブドウ球菌のうちで最も感受性が高く、 $2.21 \log$ 減少した。バイオフィーム産生表皮ブドウ球菌ATCC35984は、対照試料に対して $1.81 \log$ の減少、表皮ブドウ球菌1175は $1.11 \log$ の減少を示した。リソスタフィンコーティングカテーテルは、黄色ブドウ球菌MBT5040 (MRSA) および黄色ブドウ球菌莢膜型8型 (SA8) のいずれにも非常に有効であった。平均すると、MRSAと共にインキュベートしたカテーテルからは1CFUが回収され、一方、SA8と共にインキュベートしたカテーテルでは完全に清浄化(細菌除去)されたのに比べ、非コーティングカテーテルからは1250CFUの細菌が回収された。

【 0 0 9 0 】

(細菌のカテーテルへの付着)

非コーティングカテーテル流出液中の細菌数は多すぎて数えられなかったが、洗浄液の最後の1mlを回収して、血液寒天プレート上に画線塗布した。洗浄液中の細菌数はインキュベーション時間に比例し、24時間ではより多数の細菌が付着していた。平均して、24時間洗浄液からは1000CFUが回収されたのに対し、2時間洗浄液からは約30CFUが回収された。洗浄液中の細菌数は、カテーテル内の細菌付着レベルを示す可能性が高い。次に、非コーティングカテーテルを培養し、細菌増殖について調べた。培地中で一晚インキュベートすると、カテーテルにはかなりのコロニーが形成され、培地中で細菌が増殖することが示された。このデータは、細菌がカテーテル表面に付着し、感染を引き起こし得ることを示唆している。大量の接種細菌中で3時間インキュベートしたリソスタフィンカテーテルは溶液を清浄化(細菌を除去)した。一晚インキュベートした後、培地

10

20

30

40

50

には細菌がなかったが、これは、リソスタフィンコーティングカテーテルが3時間で細菌溶液を清浄化することができ、カテーテルは無菌状態に保たれることを示唆している。

【0091】

(血清タンパク質存在下のリソスタフィン活性)

図12に示すように、0.1mg/mlのリソスタフィンでコーティングしたカテーテルをヒト血清と共にインキュベートすると、細菌数が99%減少することが示され、一方、10および1mg/mlのリソスタフィンでコーティングしたカテーテルをヒト血清と共にインキュベートすると、細菌が完全に除去された。これらの結果は、血清タンパク質の存在がカテーテル上のリソスタフィンの活性に有意な影響を与えないことを示唆している。

10

【0092】

上記実施例は人工的な表面へのリソスタフィンコーティングの効力を実証している。リソスタフィンでコーティングされた表面は、カテーテル関連感染およびインプラント関連感染のいずれの予防においても重要な新規療法となり得る。

【0093】

上述の特徴の種々の変形形態および組み合わせが、特許請求の範囲に記載されている本発明から逸脱することなく利用可能であることは容易に理解されよう。それらの変形形態は本発明の思想および範囲から逸脱したものとは見なされず、そのような変更形態はすべて以下の特許請求の範囲内に包含されるものとする。

【図面の簡単な説明】

20

【0094】

【図1】リソスタフィンで処理していない組織培養インサート上の黄色ブドウ球菌バイオフィルムの成長を示す、2通りの倍率(左側が2000x、右側が660x)のSEM写真。

【図2】リソスタフィンで処理したインサートを示す、倍率が左側6,600x、右側660xのSEM写真。黄色ブドウ球菌バイオフィルムはすべて根絶されている。

【図3】黄色ブドウ球菌株MBT5040バイオフィルムがそれぞれ50μg/mlのリソスタフィンで処理された(+)8ウエルと、処理されていない(-)8ウエルとからなる16ウエルの組織培養プレートの走査を示す図。

【図4】2種のリソスタフィン耐性黄色ブドウ球菌(LysOR)変異株を含めた種々の黄色ブドウ球菌株のバイオフィルムを50μg/mlのリソスタフィンで処理した(+)ウエルと、比較のために処理していない(-)ウエルとからなる30ウエルの組織培養プレートの走査を示す図。

30

【図5A】リソスタフィンで治療する前の、黄色ブドウ球菌感染マウスの頸静脈カテーテル上に生体内(in vivo)で成長したバイオフィルムを示す倍率4000xのSEM写真。

【図5B】リソスタフィンで治療する前の、黄色ブドウ球菌感染マウスの頸静脈カテーテル上に生体内(in vivo)で成長したバイオフィルムを示す倍率4000xのSEM写真。

【図6A】リソスタフィンによる治療後に、黄色ブドウ球菌に感染した頸静脈カテーテル挿入マウス(図5と類似)のカテーテルからバイオフィルムが除去されたことを示す倍率4000xのSEM写真。

40

【図6B】リソスタフィンによる治療後に、黄色ブドウ球菌に感染した頸静脈カテーテル挿入マウス(図5と類似)のカテーテルからバイオフィルムが除去されたことを示す倍率4000xのSEM写真。

【図7】リソスタフィン(6.25cg/ml)が時間とともに黄色ブドウ球菌バイオフィルムの吸光度を即時かつ連続的に低下させるのに対し、バンコマイシン(800cg/ml)およびオキサシリン(400cg/ml)はバイオフィルムに何の影響も与えないことを示すグラフ。

【図8】オキサシリン(1.6cg/ml~400cg/ml)またはバンコマイシン(

50

3.2 cg/ml ~ 800 cg/ml) が PBS (A) または細菌培地 (B) 中での 24 時間インキュベーション後に黄色ブドウ球菌バイオフィームに何の影響も与えないのに対し、リスタフィンが PBS 中では 0.8 cg/ml (A) で、TSB + 0.25% グルコース中では 12.5 cg/ml (B) でバイオフィームを除去したことを示す走査の図。

【図 9】リスタフィンが、表皮ブドウ球菌バイオフィーム (対照としての黄色ブドウ球菌 (A)、表皮ブドウ球菌株 Hay (B)、表皮ブドウ球菌株 ATCC 35984 (C) または表皮ブドウ球菌株 SE1175 (D)) を破壊することを示す走査の図。2つの拡大部分は、表皮ブドウ球菌株 ATCC 35984 の多層バイオフィーム (上) と、リスタフィン処理後の、無傷のブドウ球菌を含まない同菌株の残留グリコカリックス (下) を示している。

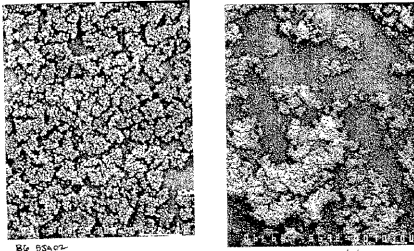
【図 10】リスタフィンコーティング時間の関数としてのカテーテルの抗菌効力を示す図。

【図 11】黄色ブドウ球菌に対するリスタフィンコーティングカテーテルの長期抗菌効力を示す図。

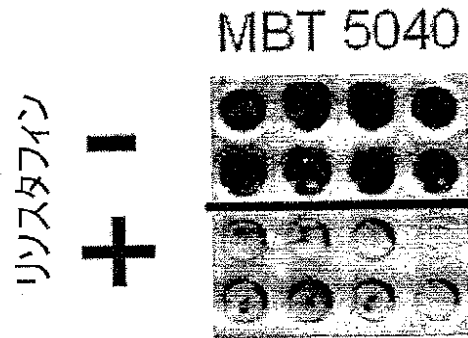
【図 12】血清タンパク質の存在下におけるリスタフィンコーティングカテーテルの抗菌効力を示す図。

【図 1】

FIG. 1

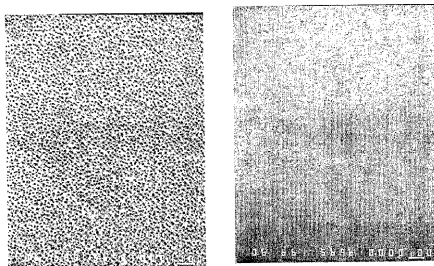


【図 3】

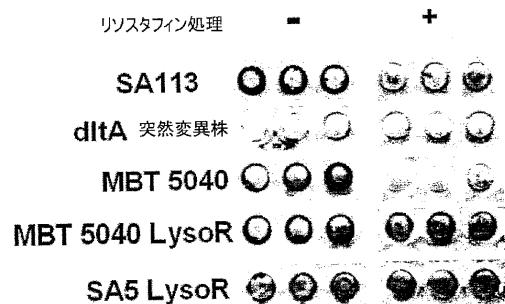


【図 2】

FIG. 2

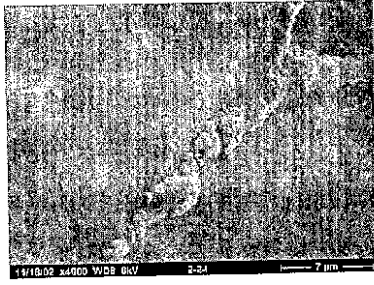


【図 4】



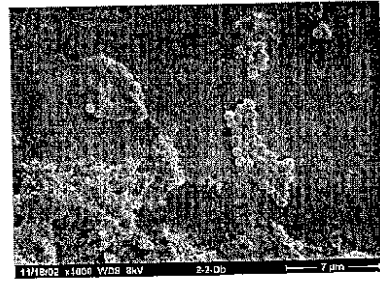
【 図 5 A 】

FIG.5A



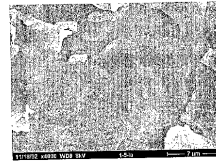
【 図 5 B 】

FIG 5B



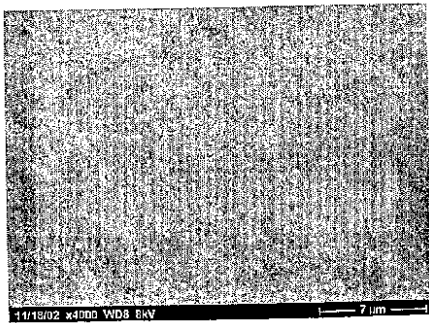
【 図 6 A 】

FIG. 6A

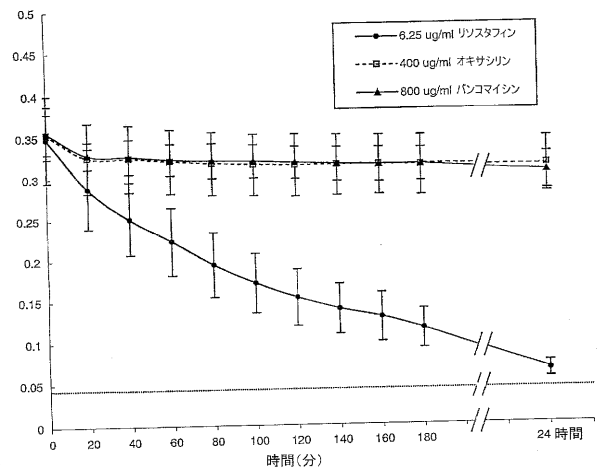


【 図 6 B 】

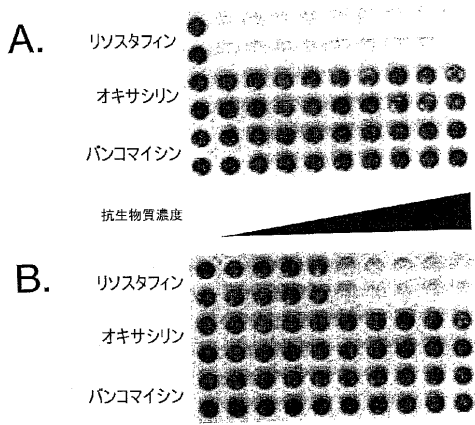
FIG. 6B



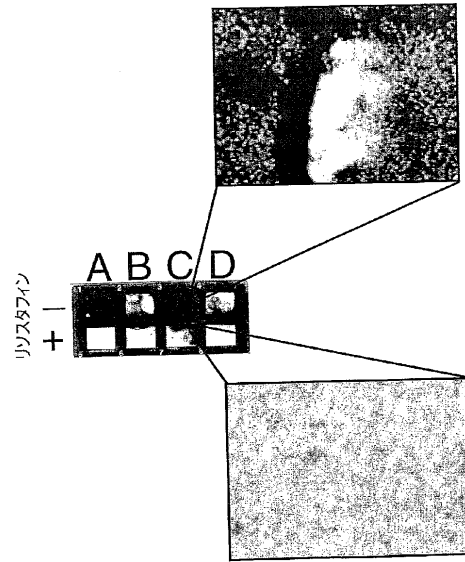
【 図 7 】



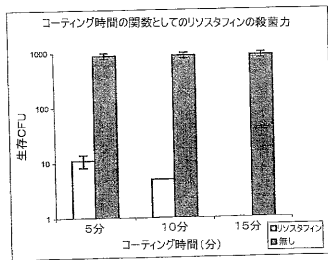
【 図 8 】



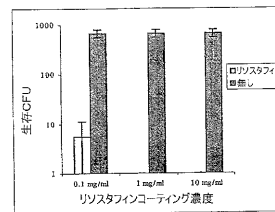
【 図 9 】



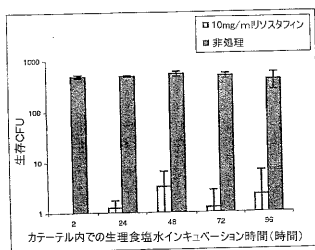
【 図 10 】



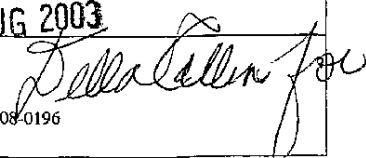
【 図 12 】



【 図 11 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/09354		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : A61F 2/02; A61K 38/48 US CL : 424/94.63, 422, 423 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/94.63, 422, 423				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPAT, USPG-PUBS, EPO, JPO, DERWENT, search terms: lysostaphin, prosthesis, antibiotic, staphylococcus				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X --- Y	US 6,028,051 A (CLIMO et al) 22 February 2000 (22.02.2000), see entire document.	1-55 ----- 56-92		
Y	US 5,820,607 A (TCHOLAKIAN et al) 13 October 1998 (13.10.1998), see entire document.	56-92		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 29 July 2003 (29.07.2003)		Date of mailing of the international search report 21 AUG 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Francisco C Prats Telephone No. 703-308-0196 		

フロントページの続き

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

(72) 発明者 モンド、ジェームズ

アメリカ合衆国 20901 メリーランド州 シルバー スプリング ノースウエスト ドライブ 527

(72) 発明者 ウォルシュ、スコット

アメリカ合衆国 20874 メリーランド州 ジャーマンタウン プリジャー ドライブ 13039

(72) 発明者 シャー、アンジャリ

アメリカ合衆国 20878 メリーランド州 ノース ポトマック チャイナベリー ストリート 15320

(72) 発明者 チャントウリヤ、タチアナ

アメリカ合衆国 20851 メリーランド州 ゲイザーズバーグ ミッドウェイ アベニュー 13114

(72) 発明者 アダムズ - ウー、ジュリー

アメリカ合衆国 21046 メリーランド州 コロンビア エデン ブルック ドライブ 7307

Fターム(参考) 4C081 AB05 AB17 AC02 AC03 AC08 BA14 BC02 CE01 CG01 CG02
DC12 DC14 EA06
4C097 BB01 BB10