

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6836506号
(P6836506)

(45) 発行日 令和3年3月3日(2021.3.3)

(24) 登録日 令和3年2月9日(2021.2.9)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	Z N A
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	

請求項の数 13 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-535141 (P2017-535141)
(86) (22) 出願日	平成27年9月22日 (2015.9.22)
(65) 公表番号	特表2017-529398 (P2017-529398A)
(43) 公表日	平成29年10月5日 (2017.10.5)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/071768
(87) 國際公開番号	W02016/046218
(87) 國際公開日	平成28年3月31日 (2016.3.31)
審査請求日	平成30年9月12日 (2018.9.12)
(31) 優先権主張番号	1416788.6
(32) 優先日	平成26年9月23日 (2014.9.23)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)

(73) 特許権者	301008419 ザ ユニバーシティー コート オブ ザ ユニバーシティー オブ グラスゴー ^{イギリス国 ジー12 8キューキュー} グラスゴー ユニヴァーシティ アベニュー 一 ギルバート スコット ビルディング
(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(74) 代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
(74) 代理人	100120112 弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細菌性呼吸器感染症を処置するためのピオシン類の肺投与

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S型ピオシンを含む、シュードモナス属による呼吸器感染症の予防または処置のための療法組成物であって、該ピオシンが、肺投与により送達される、そして、該S型ピオシンが、S5ピオシンである、前記療法組成物。

【請求項 2】

該シュードモナス属が、シュードモナス・エルジノーサを含む、請求項1に記載の療法組成物。

【請求項 3】

該処置されるべき対象が、細菌性肺炎を有する、または細菌性肺炎を発現するリスクがある、請求項1または2に記載の療法組成物。 10

【請求項 4】

該処置されるべき対象が、弱められた気道機能および/または弱められた免疫機能を有する、請求項3に記載の療法組成物。

【請求項 5】

該処置されるべき対象が、囊胞性纖維症または慢性閉塞性肺疾患を患っている、請求項3または4に記載の療法組成物。

【請求項 6】

該対象が、癌患者またはうっ血性心不全もしくはAIDSに冒されている患者である、請求項3または4に記載の療法組成物。 20

【請求項 7】

該処置されるべき対象が、市中感染性肺炎、人工呼吸器関連肺炎または院内感染性肺炎を有する、またはそれらを発現するリスクがある、請求項 3 - 6 のいずれか 1 項に記載の療法組成物。

【請求項 8】

2 種類以上のピオシン類の組み合わせが該対象に投与される、請求項 1 - 7 のいずれか 1 項に記載の療法組成物。

【請求項 9】

該組み合わせが、さらに、L 1 ピオシン、S 2 ピオシン、SD 2 ピオシンおよび / または A P 4 1 ピオシンを含む、請求項 8 に記載の療法組成物。

10

【請求項 10】

該組み合わせが、L 1 ピオシンおよび S 2 ピオシン； L 1 ピオシンおよび A P 4 1 ピオシン； S 2 ピオシンおよび A P 4 1 ピオシン； または L 1 ピオシン、S 2 ピオシンおよび A P 4 1 ピオシンを、場合により SD 2 ピオシンとの組み合わせで含む、請求項 9 に記載の療法組成物。

【請求項 11】

S 型ピオシンを提供することおよび前記の S 型ピオシンを肺投与のために配合することを含む、ここにおいて、該 S 型ピオシンが、S 5 ピオシンである、シードモナス属による呼吸器感染症の予防または処置のための医薬品を調製する方法。

20

【請求項 12】

療法組成物の対象への肺投与のためのデバイスであって、ここにおいて、該デバイスは請求項 1 - 10 のいずれか 1 項に記載の療法組成物を含む、前記デバイス。

【請求項 13】

吸入器またはネブライザーである、請求項 1 2 に記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、細菌性呼吸器感染症の処置に、特にピオシン類として知られる細菌由来抗生物質のそのような感染症を処置するための使用に関する。

【背景技術】

30

【0002】

グラム陰性病原体、例えばシードモナス・エルジノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) および大腸菌に関して、療法選択肢は、しばしば限られている。これは、抗生物質耐性決定因子の水平獲得および多くのクラスの抗生物質の有効性を重度に制限する高度に不透過性の外膜の存在による^{1 - 3}。日和見性病原体 *P. エルジノーサ* の場合、全ての利用可能な抗生物質に対する耐性を有する臨床分離株が世界中で流行しており、臨床分離株の 18 ~ 25 % は多剤耐性である^{1 - 4}。加えて、*P. エルジノーサ* の慢性感染症の間に多剤耐性バイオフィルムを形成する能力および長引く抗生物質療法の間の抗生物質耐性表現型変異体の出現は、この病原体を既存の抗生物質で本質的に処置できなくし得る^{5 - 7}。下気道の *P. エルジノーサ* による慢性感染は、強い抗生物質療法を受けていてもかかわらず 41.5 年の予測生存期間の中央値を有する囊胞性纖維症を有する患者における死亡率の主因である (2011)⁸。加えて、*P. エルジノーサ* による感染は、人工呼吸器関連肺炎のような院内感染症の主な増大しつつある原因である。*P. エルジノーサ* 感染は、西側世界における死亡の主因である慢性閉塞性肺疾患の発病とも関係している。従って、ここ数十年間これらの処置が困難な細菌に対して有効な新規の低分子抗生物質をほとんどもたらしていない開発パイプラインを増強するために、抗生物質開発に関する代わりの戦略を考える緊急の必要性が存在する^{1 3 - 1 5}。

40

【0003】

有効な抗生物質の発見のための代わりの戦略は、多くの細菌により種内競争のために産

50

生される強力な狭いスペクトルの抗生物質を利用することである。P. エルジノーサ、K. ニューモニエおよび大腸菌では、これらは、それぞれS型ピオシン類、クレブシン類(klebsicins)およびコリシン類として知られる多ドメインタンパク質性抗生物質の形態をとる^{16 - 18}。これらのバクテリオシン類は、グラム陰性細菌に関するアキレス腱である既存の活性な栄養素取り込み経路の貯卵(parasitisation)を通してグラム陰性外膜を効率的に越えるように進化してきた^{19 - 24}。これらのタンパク質性抗生物質の細胞標的は、高度に保存されており、最も一般的にはDNA、rRNAもしくはtRNAを標的とするヌクレアーゼ活性または細胞質膜を標的とする孔形成活性の形をとる細胞毒性活性を有する¹⁷。今日までに特性付けられたピオシン類に関して、ピオシンS1、S2、S3およびAP41は、DNアーゼ活性を示し、ピオシンS4は、tRNアーゼであり、ピオシンS5は、孔形成毒素であることが知られている¹⁶。最近記載されたレクチン様ピオシンL1に関しては、細胞殺傷の機序は未知である。

【発明の概要】

【0004】

ピオシン類は、P. エルジノーサに対する比類無き効力を示し、ピオシンS2は、P. エルジノーサ感染症の無脊椎動物モデルにおいて有効である²⁵が、ピオシン類は、臨床使用に関する良好な候補であることは以前に示唆されておらず、示されてもいいない。細菌由来のポリペプチドとして、それらは、肺中の細菌性タンパク質の存在は敏感な呼吸器組織に非常に有害であり得る免疫応答を誘発することが予想されるであろうため、気道を冒す病気の処置における使用に関して特に不適切であるようであると考えられる。

【0005】

驚くべきことに、本発明者らは、S型ピオシン類は、肺にうまく送達されて、免疫応答を誘発することも他の組織の損傷を引き起こすこともなく細菌負荷における劇的な低減を提供し得ることを見出している。

【0006】

本発明は、細菌性呼吸器感染症の予防または処置の方法における使用のためのS型ピオシンを提供し、ここで、ピオシンは、肺投与により送達される。

本発明は、さらに、細菌性呼吸器感染症の予防または処置のための医薬品の製造におけるS型ピオシンの使用を提供し、ここで、ピオシンは、肺投与により送達される。

【0007】

本発明は、さらに、細菌性呼吸器感染症の予防または処置のための方法を提供し、ここで、S型ピオシンは、対象に肺投与により送達される。

感染性細菌は、典型的にはシードモナス属の種、例えばシードモナス・エルジノーサを含む。

【0008】

処置されるべき対象は、感染の結果として細菌性肺炎を有する可能性があるか、または発現するリスクがある可能性がある。従って、S型ピオシン類は、細菌性肺炎の予防および/または処置のために用いられることができる。

【0009】

処置されるべき対象は、弱められた気道機能および/または弱められた免疫機能を有し得る。

処置されるべき対象は、囊胞性纖維症または慢性閉塞性肺疾患(COPD)を患っている可能性がある。あるいは、対象は、癌患者(特に化学療法を受けている患者)またはうつ血性心不全もしくはAIDSに冒されている患者である可能性がある。

【0010】

処置されるべき対象は、市中感染性肺炎および院内感染症、例えば人工呼吸器関連肺炎および院内感染性肺炎を有する、または発現するリスクがある可能性がある。

下記でより詳細に記載されるように、S型ピオシン類は、標的化部分およびエフェクタ一部を含む。

【0011】

10

20

30

40

50

S型ピオシンは、例えばS2、SD2、S5またはAP41標的化部分を含むことができる。ある態様において、ピオシンは、S5標的化部分を含む。

加えて、またはあるいは、S型ピオシンは、例えばS2、SD2、S5またはAP41エフェクター部分を含むことができる。あるいは、それは、コリシンからの、例えばE2またはE3コリシンからの細胞毒性ドメインを含むことができる。ある態様において、ピオシンは、S5エフェクター部分を含む。

【0012】

ある態様において、S型ピオシンは、S2、SD2、S5、AP41またはL1ピオシン、例えばS5ピオシンである。

2種類以上のピオシン類の組み合わせが対象に投与されることが、望ましい可能性がある。組み合わせは、少なくとも2種類の異なる受容体特異性および/またはエフェクター活性を有するS型ピオシン類を含むことができる。

【0013】

組み合わせは、S5ピオシンを含むことができる。

組み合わせは、L1ピオシンを含むことができる。

組み合わせは、S2ピオシンを含むことができる。

【0014】

組み合わせは、AP41ピオシンを含むことができる。

組み合わせは、SD2ピオシンを含むことができる。

組み合わせは、L1ピオシンおよびS2ピオシン；L1ピオシンおよびAP41ピオシン；S2ピオシンおよびAP41ピオシン；またはL1ピオシン、S2ピオシンおよびAP41ピオシンを含むことができる。これらの組み合わせのいずれも、さらにS5ピオシンおよび/またはSD2ピオシンを含むことができる。どの他のピオシン類が存在しても、その組み合わせはS5ピオシンを含むことが望ましい可能性がある。

【0015】

本発明は、さらに、S型ピオシンを提供することおよび前記のS型ピオシンを肺投与のために配合することを含む、細菌性呼吸器感染症の予防または処置のための医薬品の調製の方法を提供する。

【0016】

S型ピオシンは、組み換え法により発現されたものであることができる。

その方法は、S型ピオシンを組み換えにより発現させ、場合によりS型ピオシンを単離する工程を含むことができる。

【0017】

本発明は、さらに、有効薬剤の対象への肺投与のためのデバイスを提供し、そのデバイスは、S型ピオシンを含む。そのデバイスは、例えば、吸入器（例えば計量吸入器、乾燥粉末吸入器）またはネプライザー（例えば超音波ネプライザー、ジェットネプライザー、振動メッシュネプライザー）であることができる。

【0018】

本発明は、ここで、例として、そして限定としてではなく、添付の図面および実施例への参照により、より詳細に記載されると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】ピオシンで処置されたマウスからのP.エルジノーサP8の細菌回収。全てのピオシン類は、3mg ml⁻¹で与えられた。ホモジナイズされた肺のCFU計数により決定された細菌の計数、(a)マウスは、感染の6時間前にピオシンで処置され、全てのマウスは、感染の5時間後に屠殺された(cullied)。(b)マウスは、感染の6時間前にピオシンで処置され、ピオシンで処置されたマウスは、24時間まで生存した(c)マウスは、感染の1時間後にピオシンで処置され、全てのマウスは、感染の4.5時間後に屠殺された(d)マウスは、感染の1時間後にピオシンで処置され、ピオシンで処置されたマウスは、24時間まで生存した。a) b)およびd)においてピオシンS5で処置

10

20

30

40

50

されたマウスからコロニーは回収されなかった。棒は、平均 \pm S E M を表し、* は、ボンフェローニ補正を適用した片側マン・ホイットニー U 検定による対照に対する処置の比較に関する統計的有意性を意味する。

【図 2】P. エルジノーサ P 8 感染マウスのピオシン S 5 およびトプラマイシン処置。(A) マウスは、感染の 1 時間後に処置され、全てのマウスは、感染の 4 . 5 時間後に屠殺された(B) マウスは、感染の 1 時間後に処置され、S 5 30 ng ml⁻¹ およびトプラマイシン 300 μg ml⁻¹ で処置されたマウスは、24 時間まで生存した。全ての他のマウスは、感染の 5 . 5 時間後に屠殺された。棒は、平均 \pm S E M を表し、* は、ボンフェローニ補正を適用した片側マン・ホイットニー U 検定による対照に対する処置の比較に関する統計的有意性を意味する。

【図 3】ピオシン類に対する獲得寛容は、ある範囲のピオシン類で処置することにより克服され得る。(a) ピオシン S 5、AP 4 1 および L 1 の細胞毒性活性を決定するためのスポット試験。200 μg ml⁻¹ の精製されたタンパク質を、細菌の増殖している菌叢の上にスポットした。透明な領域は、ピオシンの細胞毒性を示す。P 8 AP 4 1 T は、P 8 の AP 4 1 耐性株であり、P 8 AP 4 1 T * は、(b)において示されている未処置の対照マウスから回収された P 8 AP 4 1 T 株である。(b) (a)において示されている P 8 AP 4 1 T に感染させられ、次いで感染の 1 時間後に 3 mg ml⁻¹ のピオシンを用いて処置されたマウスに関する細菌計数。ピオシンで処置されたマウスは、24 時間まで生存した。ピオシン S 5 で処置されたマウスからはコロニーは回収されなかった。棒は、平均 \pm S E M を表し、* は、ボンフェローニ補正を適用した片側マン・ホイットニー U 検定による対照に対する処置の比較に関する統計的有意性を意味する。

【図 4】P. エルジノーサ P 8 に感染したマウスの処置に関するピオシンの組み合わせ。マウスは、感染の 1 時間後に 300 μg ml⁻¹ のストック濃度のピオシン類を用いて処置された；ピオシンで処置されたマウスは、24 時間まで生存した。棒は、平均 \pm S E M を表し、* は、ボンフェローニ補正を適用した片側マン・ホイットニー U 検定による対照に対する処置の比較に関する統計的有意性を意味する。

【図 5】図 1 (c) および (d) における実験の生物学的反復。ピオシンで処置されたマウスからの P. エルジノーサ P 8 細菌回収。全てのピオシン類は、3 mg ml⁻¹ で与えられた。ホモジナイズされた肺の CFU 計数により決定された細菌計数。ピオシンで処置されたマウスからの計数が、PBS で処置されたマウスからの計数に対して比較された(a) マウスは、感染の 1 時間後にピオシンで処置され、全てのマウスは、感染の 4 . 5 時間後に屠殺された。(b) マウスは、感染の 1 時間後にピオシンで処置され、ピオシンで処置されたマウスは、24 時間まで生存した。棒は、平均 \pm S E M を表し、* は、ボンフェローニ補正を適用した片側マン・ホイットニー U 検定による対照に対する処置の比較に関する統計的有意性を意味する。

【図 6】図 2 (a) における実験の反復。P. エルジノーサ P 8 に感染したマウスのピオシン S 5 およびトプラマイシン処置。マウスは、感染の 1 時間後に処置され、全てのマウスは、感染の 4 . 5 時間後に屠殺された。棒は、平均 \pm S E M を表し、* は、ボンフェローニ補正を適用した片側マン・ホイットニー U 検定による対照に対する処置の比較に関する統計的有意性を意味する。

【図 7】P. エルジノーサ PA 0 1 に感染したマウスの処置のためのピオシン S D 2 . マウスは、感染の 1 時間後に 3 mg ml⁻¹ のストック濃度のピオシン S D 2 を用いて処置された。対照のマウスは、感染の 6 時間後に屠殺され、ピオシン S D 2 で処置されたマウスは、24 時間まで生存した。棒は、平均 \pm S E M を表し、* は、ボンフェローニ補正を適用した片側マン・ホイットニー U 検定による対照に対する処置の比較に関する統計的有意性を意味する。

【図 8】ピオシン S 5 は、ピオシン S 5 抗体の存在下で致命的な P. エルジノーサ感染症に対する保護を与えることができる。(a) ピオシン S 5 または PBS に鼻内で繰り返し曝露し、続いて P. エルジノーサ P 8 に感染し、感染後にピオシン S 5 または PBS で処置されたマウスに関する細菌計数。細菌計数は、ホモジナイズされた肺からの CFU 計数

10

20

30

40

50

により決定された。多数回用量のピオシンS5(75μg/用量)が、4週間にわたって2週間離して3回投与された。13週目に、マウスはP.エルジノーサP8に感染させられ、感染の1時間後にピオシンS5(75μg)またはPBSで処置された。^{*}は、ポンフェローニ補正を適用した片側マン・ホイットニーU検定による対照に対する処置の比較に関する統計的有意性を意味する。(b)(a)において記載されたように)ピオシンS5またはPBSに繰り返し曝露したマウスに関するIgGおよびIgA血清レベル。対照群は、ピオシンS5(75μg/用量)をフロイント完全/不完全と共に2週間離して3回皮下投与された。棒は、平均±SEMを表す。(c)および(d)は、マウスが腹腔内(I.P.)経路を介してピオシンS5に繰り返し曝露したこと除いて、(a)および(b)と同様であった。

10

【発明を実施するための形態】

【0020】

ピオシン類

ピオシン類は、シュードモナス属の種、特にP.エルジノーサにより産生され、それに對して有効であるタンパク質性抗微生物毒素である。

【0021】

ピオシン類は、一般に3つのクラス、すなわちS型、R型およびF型に分けられる。

R型(桿様)およびF型(柔軟かつ非収縮性)ピオシン類は、両方ともファージの尾部タンパク質(それぞれP2ファージおよびラムダファージ由来)に関連しており、細菌の膜に孔を形成することにより作用する。

20

【0022】

S型(可溶性)ピオシン類は、(それらが進化的に関連していると信じられている)コリシン類に類似した特徴的な多ドメイン構造を有する。用語“ピオシン”は、本明細書において、文脈が別途要求する場合を除いて、S型ピオシン類を指すように用いられている。S型ピオシン類を産生する生物は、それらが対応するピオシン類に対する拮抗物質として作用する“免疫タンパク質”も産生するため、通常はそれら自身のピオシン類による影響を受けない。

【0023】

S型ピオシン類は、標的化部分およびエフェクター部分を含む。典型的には、標的化部分は、分子のN末端にあり、エフェクター部分は、C末端にある。しかし、これらの部分の順序は、機能に関して必須ではない可能性がある。従って、N末端のエフェクター部分およびC末端の標的化部分を有するピオシン分子の使用も、意図されている。

30

【0024】

エフェクター部分は、単一の独立して折り畳まれたドメインを構成することができる。標的化部分は、単一の独立して折り畳まれたドメインを構成することもでき、または2個以上の独立して折り畳まれたドメインに細分されていることもできる。

【0025】

標的化部分は、標的生物の表面にある(すなわちグラム陰性外膜にある)受容体に結合し、外膜を越えるピオシンの移行を媒介する。誤解を避けるために記すと、用語“受容体”は、単に、標的生物上の分子であって、それに標的化部分が結合する分子を示すために用いられており、単一の生物により発現される分子の対に関して通常意図される意味における協同的受容体-リガンド相互作用を意味するように受け取られるべきではない。

40

【0026】

一般に、ピオシンの標的化部分は、ピオシンの種および株特異性(または向性)を決定する。それらが結合する受容体は、しばしばシュードモナス菌に、例えばシュードモナス属に、またはさらにはP.エルジノーサもしくはその株に特異的である。

【0027】

ほとんどの天然存在S型ピオシンの標的化部分は、3個までの同定可能な部分領域(sub-regions)を含有する特徴的なモジュラー構造を有し、そのそれぞれは、別々に折り畳まれたドメインに相当する可能性があり、または認識可能な二次構造を欠いて

50

おり従って分子の柔軟な領域を形成している可能性もある。これらの部分領域は、しばしば文献において受容体結合領域、未知の機能の領域、および移行領域と呼ばれており、典型的には（排他的にではないが）N～C末端方向の順序で存在する。しかし、これらのタンパク質は、十分に特性付けられておらず、割り当てられた機能は、正しくない可能性がある。従って、これらの領域は、本明細書においてそれぞれ標的化部分の領域I、IIおよびIIIと呼ばれるであろう。

【0028】

特定の理論により束縛されることを望むわけでは一切ないが、領域I、IIおよびIIIは、少なくともある程度までピオシン分子間で互換的である可能性があり、領域IIは、全体が、または一部が不要である可能性があると信じられている。従って、標的化部分は、少なくとも領域I配列および領域II配列が場合により領域III配列、その断片、またはペプチドリンクーにより隔てられたものを含むことができる。領域I、領域IIまたは断片もしくはリンクー（存在するならば）、および領域IIIは、N～C末端方向の順序で存在することが、望ましい可能性がある。

【0029】

エフェクター部分は、典型的には、一度外膜を越えると、細胞殺傷活性を有する。それは、周辺質において作用する可能性があり、またはその細胞殺傷作用を及ぼすために細胞質への輸送を必要とする可能性もある。機序にかかわらず、エフェクター部分は、ピオシン分子の“細胞毒性”部分と呼ばれることができる。

【0030】

ピオシン分子のエフェクターまたは細胞毒性部分は、典型的には孔形成性または酵素的である。孔形成性ピオシン類、例えばピオシンS5は、標的細胞を、細胞質膜の脱分極により殺す。酵素的ピオシン類は、典型的には細胞質においてヌクレアーゼとして作用し、DNアーゼ活性を有する酵素（例えばピオシンS1、S2、SD2、S3およびAP41）およびtRNアーゼ活性を有する酵素（例えばピオシンS4）を含む。

【0031】

エフェクター部分が作用する標的是、細菌王国にわたって高度に保存されている傾向があり、それらの作用機序は、他の抗細菌毒素、例えばコリシン類のエフェクタードメインの作用機序に類似している。実際、E2またはE3コリシンのどちらかからのエフェクター部分に連結されたS1またはS2ピオシンからの標的化部分を含有するキメラピオシン類は、シードモナス菌殺傷活性を保持していることが、実証されている^{3,7}。従って、ピオシンは、エフェクター部分としてのあらゆる適切な抗細菌タンパク質またはタンパク質ドメインを、そのタンパク質またはドメインが1以上のシードモナス菌生物に対する細胞毒性活性を保持している限り、含むことができる。例えば、エフェクター構成要素は、コリシン、例えば（それに限定されないが）E2またはE3コリシンからの細胞毒性ドメインであることができる。

【0032】

ピオシンS2

S2ピオシン類の標的化ドメインは、TonB依存性鉄シデロフォア受容体FpvA1に結合する。S2エフェクタードメインは、DNアーゼ活性を有する。

【0033】

S2ピオシンの一例は、次の配列を有する：

【0034】

10

20

30

40

【化1】

MAVNDYEPGSMVITHQGGGRDI IQYIPARSSYGTFFFVPPGPSPYVGTMQEYRKLSTLD
 KSHSELKKNLKNETLKEVDEIKSEAGLPGKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRP
 ANLYTASDFPQKSES MYSQLLASRKFYGEFLDRHMSELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQL
 ENKARSLEAEAQRRAAEVEADYKARKANVEKKVQSELDQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQL
 VTQAIANKKKLQTANNALI AKAPNALEKQKATYNADLLVDEIASLQARLDKLNAETARRKEI
 ARQAAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIALGRVLASAPSVM
 VGFASLTYSRTAEQWQDQTPDSVRYALGMADAALKLGLPPSVNLNAVAKASGTVDLPMRLTNE 10
 ARGNTTTSVVSTDGVSVPKAVPVRMAAYNATTGLYEVTVPSTTAEAPPLILTWTWPASPPGN
 QNPSSTTPVVPKPVPVYEGATLTPVKATPETYPGVITLPEDLIIGFPADSGIKPIYVMFRDP
 RDVPGAAKGKQGPVSGNWLGAAQSQGEGAPIPSQTADKLRGKTFKNWRDFREQFWIAVANDPE
 LSKQFNPGSLAVMRDGGA PYVRESEQAGGRIKIEHHKVRIADGGGVYNMGNLVAVTPKRHI
 EIHKGK [SEQ ID NO: 1]

【0035】

S 2 ピオシンの標的化部分は、次の配列を有する：

【0036】

【化2】

MAVNDYEPGSMVITHQGGGRDI IQYIPARSSYGTFFFVPPGPSPYVGTMQEYRKLSTLD
 KSHSELKKNLKNETLKEVDEIKSEAGLPGKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRP
 ANLYTASDFPQKSES MYSQLLASRKFYGEFLDRHMSELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQL
 ENKARSLEAEAQRRAAEVEADYKARKANVEKKVQSELDQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQL
 VTQAIANKKKLQTANNALI AKAPNALEKQKATYNADLLVDEIASLQARLDKLNAETARRKEI
 ARQAAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIALGRVLASAPSVM
 VGFASLTYSRTAEQWQDQTPDSVRYALGMADAALKLGLPPSVNLNAVAKASGTVDLPMRLTNE 30
 ARGNTTTSVVSTDGVSVPKAVPVRMAAYNATTGLYEVTVPSTTAEAPPLILTWTWPASPPGN
 QNPSSTTPVVPKPVPVYEGATLTPVKATPETYPGVITLPEDLIIGFPADSGIKPIYVMFRDP
 [SEQ ID NO: 2]

【0037】

S 2 標的化部分の領域 I は、次の配列を有する：

【0038】

【化3】

MAVNDYEPGSMVITHQGGGRDI IQYIPARSSYGTFFFVPPGPSPYVGTMQEYRKLSTLD
 KSHSELKKNLKNETLKEVDEIKSEAGLPGKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRP
 ANLYTASDFPQKSES MYSQLLASRKFYGEFLDRHMSELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQL
 ENKARSLEAEAQRRAAEVEADYKARKANVE [SEQ ID NO: 3] 40

【0039】

S 2 標的化部分の領域 II は、次の配列を有する：

【0040】

【化4】

KKVQSELDQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQLVTQAIANAKKLQTANNALIAKAPNALEKQK
ATYNADLLVDEIASILQARLDKLNAETARRKEIAR [SEQ ID NO: 4]

【0041】

S2 標的化部分の領域 I I は、次の配列を有する：

【0042】

【化5】

AAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAIISDAIAVLGRVLASAPSVMAGF
ASLYSSRTAEQWQDQTPDSVRYALGMDAAKLGPPSVNLNAVAKASGTVDLPMRLTNEARG
NTTTLSVVSTDGVSVPKAVPVRMAAYNATTGLYEVTVPSTTAEAPPPLILTWTPASPPGNQNP
SSTTPVVPKPVPVYEGATLTPVKATPETYPGVITLPEDLIIGFPADSGIKPIYVMFRDP
[SEQ ID NO: 5]

10

【0043】

S2 ピオシンのエフェクター部分は、次の配列を有する：

【0044】

【化6】

20

RDVPGAAATGKGQPVSGNWLGAAASQGEGAPIPSQIADKLRGKTFKNWRDFREQFWIAVANDPE
LSKQFNPGSLAVMRDGGAQPYVRESEQAGGRIKIEHHKVRIADGGGVYNMGNLVAVTPKRHI
EIHKGGK [SEQ ID NO: 6]

【0045】

ピオシン S D 2

原型的 S D 2 ピオシン配列は、McCaughay et al. により記載されている（印刷中）。S D 2 ピオシン類の標的化ドメインは、P. エルジノーサからのリポ多糖類（LPS）に、より具体的には主に D - ラムノースのホモポリマーである LPS 内の共通多糖抗原（C P A）に結合するが、特異的結合は、殺菌のために必要ではない可能性がある。S D 2 エフェクタードメインは、t R N アーゼ活性を有すると信じられている。

30

【0046】

S D 2 ピオシンの一例は、次の配列を有する：

【0047】

【化7】

MAVNDYE^PGSMVITHVQGGGRDIIQYIPARSSYGT^PFVPPGPSPYVGTMQEYRKLSTLD
 KSHSELKKNLKNETLKEVDELKSEAGLPKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRP
 ANLYTASDFPQKSES^MYQSQLLASRKFYGEFLDRHMS^ELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQL
 ENKARSLEAEAQR^AAEVEADYKARKANVEKKVQSEL^DQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQL
 VTQAIANKKLQTANNALI^IKAPNALEKQKATYNADLLVDEIASLQARLDKLNAETARRKEI
 ARQAAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIAVLGRVLASAPSVM^A
 VGFASLTYS^SR^TAEQWQDQTPDSVRYALGMDANKLGLTSSVNLSAVAKAGGTVDLPMRLTNE
 ARGNTT^TLSVVSTDGV^SVPKAAPVRMAAYNATTGLYEV^TVPSTTAEAPPLILTWT^PASP^{PG}N
 QNPSS^TTPV^IPKP^VPVYEGAALT^PLKTGPESYPGM^LLDLN^DLIV^IFPADSGVKPVYMLSSP
 LDSGIFTRRQLOKKFD^HKYDFGLGEKS^ANNGT^LAER^DKILEHLADPATVEKGTYHSEVNS
 KVHY^NARTNIVVIIGEDGMFVSGWR^IE^PGT^DQYNFYMKNEVL [SEQ ID NO: 7]

10

【0048】

SD 2 ピオシンの標的化部分は、次の配列を有する：

【0049】

【化8】

20

MAVNDYE^PGSMVITHVQGGGRDIIQYIPARSSYGT^PFVPPGPSPYVGTMQEYRKLSTLD
 KSHSELKKNLKNETLKEVDELKSEAGLPKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRP
 ANLYTASDFPQKSES^MYQSQLLASRKFYGEFLDRHMS^ELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQL
 ENKARSLEAEAQR^AAEVEADYKARKANVEKKVQSEL^DQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQL
 VTQAIANKKLQTANNALI^IKAPNALEKQKATYNADLLVDEIASLQARLDKLNAETARRKEI
 ARQAAIRAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQVAQGAASLAQAISDAIAVLGRVLASAPSVM^A
 VGFASLTYS^SR^TAEQWQDQTPDSVRYALGMDANKLGLTSSVNLSAVAKAGGTVDLPMRLTNE
 ARGNTT^TLSVVSTDGV^SVPKAAPVRMAAYNATTGLYEV^TVPSTTAEAPPLILTWT^PASP^{PG}N
 QNPSS^TTPV^IPKP^VPVYEGAALT^PLKTGPESYPGM^LLDLN^DLIV^IFPADSGVKPVYVM

30

{SEQ ID NO: 8}

【0050】

SD 2 標的化部分の領域 I は、次の配列を有する：

【0051】

【化9】

MAVNDYE^PGSMVITHVQGGGRDIIQYIPARSSYGT^PFVPPGPSPYVGTMQEYRKLSTLD
 KSHSELKKNLKNETLKEVDELKSEAGLPKAVSANDIRDEKSIVDALMDAKAKSLKAIEDRP
 ANLYTASDFPQKSES^MYQSQLLASRKFYGEFLDRHMS^ELAKAYSADIYKAQIAILKQTSQL
 ENKARSLEAEAQR^AAEVEADYKARKANVE [SEQ ID NO: 9]

40

【0052】

前記のピオシン SD 2 標的化部分の領域 II :

【0053】

【化10】

KKVQSEL^DQAGNALPQLTNPTPEQWLERATQLV^TQAIANKKLQTANNALI^IKAPNALEKQK
 ATYNADLLVDEIASLQARLDKLNAETARRKEIAR [SEQ ID NO: 10]

50

【0054】

S D 2 標的化部分の領域 I I I は、次の配列を有する：

【0055】

【化11】

QAAIRAAANTYAMPANGSVVATAAGRGLIQAQGAASLAQAIASDAIAVLGRVLASAPSVMAVG
 FASLTYSRRTAEQWQDQTPDSVRYALGMDANKLGLTSSVNLSAVAKAGGTVDLPMRLTNEAR
 GNTTLSVVSTDGVSVPKAAPVRMAAYNATTGLYEVTVPSTAEAPPLILTWTPASPPGNQN
 PSSTTPVIPKPVPVYEGAALTPLKTGPESYPGMLLDLNDLIVIFPADSGVKPVYVM [SEQ
 ID NO: 11]

10

【0056】

S D 2 ピオシンのエフェクター部分は、次の配列を有する：

【0057】

【化12】

LSSPLDSCIFTRRQLQKKFD SHKYDFGLGEKSANNGTLAEFRDKILEHLADPATVEKGYHS
 EVNSKVHYNARTNIVVIIGEDGMFVSGWRIEPGTDQYNFYMKNEVL [SEQ ID NO: 12]

【0058】

20

ピオシン S 5

S 5 ピオシンの標的化部分は、T o n B 依存性鉄シデロフォア受容体 F p t A に結合する。S 5 エフェクタードメインは、孔形成活性を有する。

【0059】

ピオシン S 5 の標的化部分の配列分析は、領域 I I I は領域 I の N 末端に存在する可能性があることおよび領域 I I は存在しない可能性があることを示唆している。

S 5 ピオシンの一例は、次の配列を有する：

【0060】

【化13】

MSNDNEVPGSMVIVAQGPDDQYAYEVPPIDSAAVAGNMFGDLIQREIYLQKNIYYPVRSIFE
 QGTKEKKEINKVSDQVDGLLKQITQGKREATRQERVDVMSAVLHKMESDLEGYKKTFTKGP
 FIDYEKQSSLISIYEAWVKIWEKNSWEERKKYPFQQQLVRDELERAVAYYKQDSLSEAVKVLRQ
 EELNKQKALKEKEDELSQLERDYRTRKANLEMKVQSELDQAGSALPPLVSPTPEQWILERATRLV
 TQAIADKKQLQTTNNTLIKNSPTPLEKQKAIYNGELLVDEIASLQARLVKLNAETRRRTEA
 ERKAAEEQALQDAIKFTADFYKEVTEKEGARTSEMARQLAEGARGKNIRSSAEAIKSFEKHK
 DALNKKLSSLKDRQAIKAFDSLKDQMMMAKSLEKFSKGFGVVGKAIDAASLYQEFKISTETGD
 WKPFFVKIETLAAGAAASWLVGIAFATATATPIGILGFALVMAVTGAMIDEDELLEKANNLVI
 SI [SEQ ID NO: 13]

30

【0061】

S 5 ピオシンの標的化部分は、次の配列を有する：

【0062】

40

【化14】

MSNDNEVPGSMVIVAQGPDDQYAYEVPPIDSAAVAGNMFGDLIQREIYLQKNIYYPVRSIFE
 QGTKEKKEINKKVSDQVDGLLKQITQGKREATRQERVDVMSAVLHKMESDLEGYKKTFTKGP
 FIDYEKQSSLSIYEAWVKIWEKNSWEERKKYPFQQLVRDELERAVAYYKQDSLSEAVKVLRQ
 ELNKQKALKEKEDLSQLERDYRTRKANLEMKVQSELDQAGSALPPLVSPTPEQWLERATRLV
 TQAIADKKQLQTTNNNTLIKNSPTPLEKQKAIYNGELLVDEIASLQARLVKLN [SEQ ID
 NO: 14]

【0063】

10

S5 標的化部分の領域Iは、次の配列を有する：

【0064】

【化15】

ERKKYPFQQLVRDELERAVAYYKQDSLSEAVKVLRQEELNKQKALKEKEDLSQLERDYRTRKA
 NLEMKVQSELDQAGSALPPLVSPTPEQWLERATRLVTQAIADKKQLQTTNNNTLIKNSPTPLE
 KQKAIYNGELLVDEIASLQARLVKLN [SEQ ID NO: 15]

【0065】

20

S5 標的化部分の領域IIは、次の配列を有する：

【0066】

【化16】

MSNDNEVPGSMVIVAQGPDDQYAYEVPPIDSAAVAGNMFGDLIQREIYLQKNIYYPVRSIFE
 QGTKEKKEINKKVSDQVDGLLKQITQGKREATRQERVDVMSAVLHKMESDLEGYKKTFTKGP
 FIDYEKQSSLSIYEAWVKIWEKNSWE [SEQ ID NO: 16]

【0067】

S5 ピオシンのエフェクター部分は、次の配列を有する：

【0068】

30

【化17】

AETTRRRTEAERKAAEEQALQDAIKFTADFYKEVTEKFGARTSEMARQLAEGARGKNIRSSA
 EAIKSFEKHKDALKKLSLKDRQAIAKAFDSLQDKQMMMAKSLEKFSKGFGVVGKAIDAASLYQ
 EFKISTETGDWKPFVFVKIETLAAGAAASWLVGIAFATATATPIGILGFALVMAVTGAMIDED
 LLEKANNLVISI [SEQ ID NO: 17]

【0069】

ピオシン A P 4 1

A P 4 1 ピオシン類のエフェクタードメインは、DNアーゼ活性を有する。

40

A P 4 1 ピオシンの一例は、次の配列を有する：

【0070】

【化18】

MSDVF DLGSMTT VATATGQYSFYTPPPPTPIPYLTYIARPGINKFDLPEGAKIKDLIKRYQY
 IGSQIPAAIMIRGVQEEIKKSTNTALANVGAIVDGELAYLASQKKEKLNPAAEATPLQMASAE
 KAAAVELLASKQKELADARTIANAFFGYDPLTVNYVNVMNEIYGRREDKDFSF DNWSKSYS
 AQKIRLIEAKISVLNSRSSALDGKVAELTRLQRLEDAQHAAEAARQTEAERLAQEQRQAEAR
 RQAEEARQAEAQRAELQRILAEEAKRVAEAEKKRQDEINARLQAI VVSESEAKRIEEIYK
 RLEEQDKISNPTVTTPAVDAGSRVDDALAHTGTRVTSGGETGATGGSGRDVDTGTGQGGIT
 ARPVDVGSSVSIPDRRDPKIPDQPRRDLSLVPTFPDFPTFPSFPGVGVPAAKPLIPAGGGA 10
 ASVSR TLKTAVDLLSVARKTPGAMLGQVAAVVATMAVSSFWPKLNNGERQASFAIPVAELSP
 PLAVDWQAIAAAAKGTVDL PYRLKTLNVDGSIQIIAVPTEPGSAAVPVRALTLD SASGTYKYTT
 TTGPGGGTILVTPDTPPGQIDPSSSTPAVPRGPLIMP GTLLIPKEPQIESYPELDQREFNDG
 IYVYPEDSGIPPLYIVYRDPRDEPGVATGNQPV TGNWLAGASQGDGVPIPSQIADQLRGKE
 FKSWRDFREQFWMAVSKDPSALENLSPSNRYFVSQGLAPYAVPEEHGSKEKFEIHHVVPLE
 SGGALYNIDNLVITPKRHSEIHKELKLKRKEK [SEQ ID NO: 18]

【0071】

A P 4 1 ピオシンの標的化部分は、次の配列を有する：

20

【0072】

【化19】

MSDVF DLGSMTT VATATGQYSFYTPPPPTPIPYLTYIARPGINKFDLPEGAKIKDLIKRYQY
 IGSQIPAAIMIRGVQEEIKKSTNTALANVGAIVDGELAYLASQKKEKLNPAAEATPLQMASAE
 KAAAVELLASKQKELADARTIANAFFGYDPLTVNYVNVMNEIYGRREDKDFSF DNWSKSYS
 AQKIRLIEAKISVLNSRSSALDGKVAELTRLQRLEDAQHAAEAARQTEAERLAQEQRQAEAR
 RQAEEARQAEAQRAELQRILAEEAKRVAEAEKKRQDEINARLQAI VVSESEAKRIEEIYK
 RLEEQDKISNPTVTTPAVDAGSRVDDALAHTGTRVTSGGETGATGGSGRDVDTGTGQGGIT
 ARPVDVGSSVSIPDRRDPKIPDQPRRDLSLVPTFPDFPTFPSFPGVGVPAAKPLIPAGGGA 30
 ASVSR TLKTAVDLLSVARKTPGAMLGQVAAVVATMAVSSFWPKLNNGERQASFAIPVAELSP
 PLAVDWQAIAAAAKGTVDL PYRLKTLNVDGSIQIIAVPTEPGSAAVPVRALTLD SASGTYKYTT
 TTGPGGGTILVTPDTPPGQIDPSSSTPAVPRGPLIMP GTLLIPKEPQIESYPELDQREFNDG
 IYVYPEDSGIPPLYIVYRD [SEQ ID NO: 19]

【0073】

A P 4 1 標的化部分の領域 I は、次の配列を有する：

【0074】

【化20】

40

MSDVF DLGSMTT VATATGQYSFYTPPPPTPIPYLTYIARPGINKFDLPEGAKIKDLIKRYQY
 IGSQIPAAIMIRGVQEEIKKSTNTALANVGAIVDGELAYLASQKKEKLNPAAEATPLQMASAE
 KAAAVELLASKQKELADARTIANAFFGYDPLTVNYVNVMNEIYGRREDKDFSF DNWSKSYS
 AQKIRLIEAKISVLNSRSSALDGKVAELTRLQRLEDAQHAAEAARQTEAERLA [SEQ ID
 NO: 20]

【0075】

A P 4 1 標的化部分の領域 II は、次の配列を有する：

【0076】

50

【化21】

QEQRQAEARRQAEARRQAEQRQAEIQLAEEAKRVAEAEKKRQDEINARLQAIIVVSESE
 AKRIEEIYKRLEEQDKISNPTVTPPAVDAGSRVDDALAHTGTRVTSGGETGATGGSGRDVD
 TGTGQGGITARPVDVGSVSIPDPRDPKIPDQPRRDL [SEQ ID NO: 21]

【0077】

AP41標的化部分の領域IIIは、次の配列を有する：

【0078】

【化22】

10

GSLVPTFPDFPTFPSFPGVGVPAAKPLIPAGGGAASVSRTLKTAVDLLSVARKTPGAMLGQ
 VAAVVATMAVSSFWPKLNNGERQASFPIVVAELSPPLAVDWQAIAAAAGTVDLPYRLKTLNV
 DGSIQIIIAVPTEPGSAAVPVRALTLDASAGTYKYTTTGPGGGTILVTPDTPPGQIDPSSSTP
 AVPRGPLIMPGLLIPKEPQIESYPELDQREFNDGIYVYPEDSGIPPLYIVYRD [SEQ ID NO: 22]

【0079】

AP41ピオシンのエフェクター部分は、次の配列を有する：

【0080】

20

【化23】

PRDEPGVATGNQPVGNWLAGASQGDGVPIPSQIADQLRGKEFKSWRDFREQFWMAVSKDP
 SALENLSPSNRYFVSQGLAPYAVPEEHLSKEKFEIHVVPLESGGALYNIDNLVIVTPKRH
 SEIHKELKLKRKEK [SEQ ID NO: 23]

【0081】

ピオシンL1

ピオシンL1は、“レクチン様”ピオシンと考えられることができ、それは、細菌表面上の炭水化物部分に結合する。P.エルジノーサ上のその受容体は、LPS、より具体的にはLPS内の共通多糖抗原(CPA)であると信じられており、それは、主にD-ラムノースのホモポリマーである。

30

【0082】

本明細書の目的に関して、それは可溶性であり、ファージ尾部タンパク質に対する相同意を有しない(従って、R型またはF型ピオシン類と容易に分類可能ではない)ため、それは、S型ピオシンと考えられる。

【0083】

L1ピオシンの一例は、次の配列を有する：

【0084】

【化24】

40

MASSLAPRQVIRDGQFITSPNGKYKLVMQADGNLVLYEDGTKPIWNNTPVPGAKAVMEFNL
 NLYNKAGQVAWSSNVYTAYLFEEFKDEAYLNLQDDGDFGIFSDEAKWGSIVLSRPEVGVKNK
 IIPTGTVMVPGTEYINGNYRLAFQGDGNLVIYQINPQVVIWATYTMGADRAVVQEDGNFVIY
 KGTTALWHTHTATGMPAYLKENTGKLFLSQPTLLWTLKRGSLSKPPKVIPGQHGPLDTTPI
 WSWPHDYP [SEQ ID NO: 24]

【0085】

4つの下線の引かれた配列は、炭水化物結合モチーフに相当すると信じられている。L1ピオシンは、典型的には、コンセンサス配列Q-X-D-X-N/D-X-V/G-Y

50

/ F を有する 1、2、3 または 4 個の炭水化物結合モチーフを含む。

【0086】

従って、本発明における使用のための S 型ピオシンは、標的化部分を含み、それは、以下：

ピオシン S 2、S D 2、S 5 または A P 4 1 からの領域 I 配列（それぞれ S E Q I D N O : 3、9、15 および 20）に対して少なくとも 80% の配列同一性、例えば少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有する領域 I 配列；

ピオシン S 2、S D 2、S 5 または A P 4 1 からの領域 I I I 配列（それぞれ S E Q I D N O : 5、11、16 および 22）に対して少なくとも 80% の配列同一性、例えば少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有する領域 I I I 配列；

および場合により

ピオシン S 2、S D 2 または A P 4 1 からの領域 I I 配列（それぞれ S E Q I D N O : 4、10 および 21）に対して少なくとも 80% の配列同一性、例えば少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有する領域 I I 配列；

を含み得る。

【0087】

標的化部分は、ピオシン S 2、S D 2、S 5 または A P 4 1 からの標的化部分配列（それぞれ S E Q I D N O : 2、8、14 および 19）に対して少なくとも 80% の配列同一性、例えば少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有し得る。

【0088】

そのような標的化部分は、それぞれ S 2、S D 2、S 5 および A P 4 1 標的化部分と記載されることができる。典型的には、それらは、本明細書で提供された典型的な配列と同じ受容体に結合するであろう。

【0089】

本発明における使用のための S 型ピオシンは、ピオシン S 2、S D 2、S 5 または A P 4 1 からのエフェクター領域配列（それぞれ S E Q I D N O : 6、12、17 および 23）に対して少なくとも 80% の配列同一性、例えば少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有し得るエフェクター部分を含む。そのようなエフェクター部分は、それぞれ S 2、S D 2、S 5 および A P 4 1 エフェクター部分と記載されることがある。典型的には、それらは、提供された典型的な配列と同じ細胞毒性活性（すなわち D N アーゼ（S 2、S D 2、A P 4 1）または孔形成（S 5））を有する。

【0090】

あるいは、エフェクター部分は、コリシンからの細胞毒性ドメイン（例えばコリシン E 1、E 3、E 9、D、I a、E 2、E 7、E 8、E 4、E 6、E 5、A、B、N、M または S 4 からの細胞毒性ドメイン。典型的な配列が、国際公開第 2014 / 009744 号において提供されている）またはあらゆる他の適切な細胞毒性タンパク質からの細胞毒性ドメインであることができる。

【0091】

ピオシン分子は、上記で提供されたピオシン S 2、S D 2、S 5、A P 4 1 または L 1 の典型的な配列（それぞれ S E Q I D N O : 1、7、13、18 および 24）に対して少なくとも 80% の配列同一性、例えば少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有し得る。そのような分子は、それぞれ S 2、S D 2、S 5、A P 4 1 または L 1 ピオシン類と記載されることができる。典型的には、それらは、提供された典型的な配列と同じ受容体に結合し、同じ細胞毒性活性を有する。L 1 ピオシンは、典型的には 1、2、3 または 4 個の炭水化物結合モチーフを含み、そ

10

20

30

40

50

れは、それぞれが上記で示されたコンセンサス配列に従う。ある態様において、L 1 ピオシンは、上記の SEQ ID NO : 24 において下線が引かれた特異的な炭水化物結合モチーフの 1 個、2 個、3 個または 4 個全部を含む。

【0092】

参照配列に関するパーセント(%)アミノ酸配列同一性は、配列をアラインメントし、必要であれば最大パーセントの配列同一性を達成するためにギャップを導入した後の、参照配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義されており、保存的置換は配列同一性の一部としては一切考慮しない。%同一性の値は、WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996))により決定されることができる。WU-BLAST-2 は、いくつかの検索パラメーターを使用し、そのほとんどは、デフォルト値に設定される。調節可能なパラメーターは、以下の値を用いて設定される：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップ割合 = 0.125、ワード閾値 (word threshold) (T) = 11。%アミノ酸配列同一性の値は、WU-BLAST-2 により決定されるような一致する同一の残基の数を参照配列の残基の総数（アラインメントスコアを最大化するために WU-BLAST-2 により参照配列中に導入されたギャップは、無視される）で割って 100 を掛けたものにより決定される。

【0093】

ピオシンタンパク質は、あらゆる適切な方法により合成または精製される能够である。例えば、それらは、天然にそれらを発現する生物（シードモナス属の種）から精製されることができ、それらは、化学的方法により合成されることができ、それらは、無細胞系で発現されることができ、またはそれらは、関連するピオシンをコードしている核酸を含む非シードモナス属の宿主細胞により発現されることもできる。

【0094】

宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であることができるが、ピオシン類はそれら自体が細菌性タンパク質であるため、原核細胞宿主が好ましい可能性がある。原核細胞宿主は、グラム陽性またはグラム陰性であることができる。大腸菌は、一般的なグラム陽性宿主細胞の例であり、それは、例えば下記の実施例において記載されるように所望のピオシンをコードする核酸の導入によりピオシン類を発現するように容易に設計することができる。

【0095】

ピオシン類は、典型的にはプラスミド上にコードされている。従って、宿主細胞は、ピオシンをコードするプラスミドを導入することによりピオシン産生のために設計することができるが、染色体に組み込まれる発現コンストラクトを含む他の発現ベクターまたはコンストラクトが、用いられることができる。

【0096】

ある場合では、宿主細胞は、ピオシンに感受性であることができる。そのような場合には、その宿主細胞が相補的免疫タンパク質（すなわちピオシンの活性に拮抗することができるタンパク質）をコードする核酸も含み、その免疫タンパク質を発現することができるが、望ましい。例えば、ピオシン S 2、S D 2 および A P 4 1 が大腸菌中で発現される場合、免疫タンパク質の同時発現が望ましい。ピオシン L 1 および S 5 は、典型的には免疫タンパク質の非存在下で大腸菌中で発現されることがある。ピオシンおよび免疫タンパク質は、同じ発現コンストラクト（例えばプラスミド）上に、または異なる発現コンストラクト上にコードされていることができる。

【0097】

免疫タンパク質配列の例は、以下のタンパク質を含む：

ピオシン S 2 免疫タンパク質：

【0098】

【化25】

MKS KISEY TEKEF LEVK DIYT NKK F PTE ESHI QAV LEFK KLTEH PSG SDLL YYPNENRE
DSPAGVV KEVKEWRASKGLPGFKAG [SEQ ID NO: 25]

【0099】

ピオシン S D 2 免疫タンパク質：

【0100】

【化26】

MSMEMIDI AKRLLASSIDGKT FSEEFFK TWR SERD SGV LAQDDA SLMF GLAD SFTE
GKKER PGELTE GELKIAL SDLL KEY KYI [SEQ ID NO: 26] 10

【0101】

ピオシン S 5 免疫タンパク質：

【0102】

【化27】

MSFKYYWAKFFWG AFFF VLV AWKG SVFP SLAS VNPL VVAGL STIL FPES VKL VED FALKYTE
REFWVTGFFSETPAKT GLYAVFYLSCYLF SIPL GMVFLFY KYGK AS [SEQ ID NO: 27] 20

【0103】

ピオシン A P 4 1 免疫タンパク質：

【0104】

【化28】

MDIKNNLSDY TESEF LEIIE FFKNK SGLKG SELE KRMD KLV KHFE EVT SHPRK SGV IFHPK
PGFETPEGIV KEVKEWRA ANGLPGFKAG [SEQ ID NO: 28]

【0105】

30

ピオシン類が宿主細胞から放出される機序は、十分に特性付けられていない。非シードモナス属の宿主細胞において発現された場合、特定のピオシン類は、自然に分泌することができ、従って培地から回収ができる。他のピオシン類に関して、ピオシンを細胞自体から例えば適切な溶解および精製手順により回収することが好都合である可能性がある。当業者は、彼らの個々の必要性ならびに関係する特定の細胞およびタンパク質に従って適切なプロトコルを設計することが十分に可能である。

【0106】

処置に関する対象および条件

本発明の材料および方法は、シードモナス属、特にシードモナス・エルジノーサによる感染およびそのような感染と関係する細菌性肺炎の予防および/または処置に適している。

40

【0107】

感染症は、急性または慢性である可能性がある。

下気道の P . エルジノーサ感染は、囊胞性纖維症（ここで、それは死亡率の主因に相当する）および慢性閉塞性肺疾患（COPD）を有する患者において特に一般的である。うつ血性心不全を有する患者、AIDS 患者、および例えば癌（特に化学療法）、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性紅斑性狼瘡、サルコイドーシス、巣状分節性糸球体硬化症、クローン病、ベーチェット病、天疱瘡、潰瘍性大腸炎等に関する免疫抑制薬物療法を受けている、または他の免疫抑制療法を受けている患者を含め、弱められた気道機能および/または弱められた免疫機能を有する他の患者も、感染しやすい可能性

50

がある。

【0108】

シュードモナス属と関係する、またはそれにより引き起こされる急性の病気は、市中感染性肺炎および院内感染症、例えば人工呼吸器関連肺炎および院内感染性肺炎を含む。

P. エルジノーサの臨床株の間の変動性により、全てのピオシン類が全ての株に対して有効であることができるわけではないことは、理解されるであろう。ピオシンの有効性または毒性に影響を及ぼす要因は、異なる株の間の免疫タンパク質の差次的分布およびピオシンの標的化部分により結合される表面受容体における遺伝的変動性を含む。

【0109】

投与されるべきピオシンは、P. エルジノーサの感染性株の1種類以上に対して有効であるべきである。従って、対象由来の感染性株（単数または複数）の試料を提供し、前記の株（単数または複数）の同一性を決定し、それに応じて投与されるべきピオシン（類）を選択することが、望ましい可能性がある。

【0110】

例えば、感染が株P5を含む場合、S2以外のピオシンを投与することが、望ましい可能性がある。同様に、感染が株E2を含む場合、S2およびAP41以外のピオシンを投与することが、望ましい可能性がある。感染が株P17を含む場合、L1以外のピオシンを投与することが、望ましい可能性がある。当然、あらゆる感染は、1種類より多くの細菌株を含み得るため、これらのピオシン類を複数のピオシン類を含むカクテルの一部として含めることが、なお望ましい可能性がある。しかし、通常は、優勢な種または株（単数または複数）に対する活性を有する1種類以上のピオシン類を投与することも、賢明であろう。

【0111】

加えて、またはあるいは、対象由来の感染性株（単数または複数）の試料を提供し、ピオシンまたは複数のピオシン類をその感染性株の1種類以上に対するインビトロでの毒性に関して試験し、そして対象の処置における使用に関する適切な毒性を有する1種類以上のピオシン類を選択することが、望ましい可能性がある。

【0112】

上記の方法は、対象から試料を得る工程を含むことができ、または既に得られた試料を利用することもできる。

典型的には、処置されるべき対象は、哺乳類である。対象は、典型的にはヒトであるが、あらゆる他の霊長類（大型類人猿、旧世界猿または新世界猿）、または飼育動物、実験動物もしくは家畜、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ類（例えばウサギ）、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジもしくはヤギであること也可能。

【0113】

医薬組成物

本発明の目的のためのピオシン類の送達は、肺投与による。用語“肺投与”は、有効薬剤が気道を介して肺に送達されるあらゆる適切な送達法を包含することが、意図されている。

【0114】

肺投与の最も一般的な方法は、経口および/または経鼻吸入である。代替案として、気管内点滴注入が、用いられることができるが、これは、典型的にはヒトの対象への臨床投与のための適切な経路とは考えられていない。

【0115】

有効薬剤、すなわちS型ピオシン類は、典型的には療法組成物または薬学的に許容可能な組成物において提供される。それらは、あらゆる適切な様式で、例えば液体または固体（典型的には粉末）形態で、肺投与のために配合されることがある。配合物は、吸入器（例えば計量吸入器、乾燥粉末吸入器）、ネブライザー（例えば超音波ネブライザー、ジェットネブライザー、振動メッシュネブライザー）等を含むあらゆる適切な機序または送達デバイスにより送達ができる。

10

20

30

40

50

【0116】

従って、本発明は、さらに、療法組成物の対象への肺投与のためのデバイスを提供し、その組成物は、本明細書において他の箇所で記載されるS型ピオシンを含む。そのデバイスは、吸入器（例えば計量吸入器、乾燥粉末吸入器）またはネブライザー（例えば超音波ネブライザー、ジェットネブライザー、振動メッシュネブライザー）であることができる。

【0117】

送達のための組成物は、有効薬剤の1種類以上に加えて、薬学的に許容可能な賦形剤、キャリヤー、緩衝剤、安定化剤または当業者に周知の他の材料を含むことができる。そのような材料は、非毒性であるべきであり、有効成分の有効性に干渉すべきでない。キャリヤーまたは他の材料の正確な性質は、用いられる予定の配合物および送達デバイスの正確な性質に依存し得る。10

【0118】

液体組成物は、一般に水性キャリヤー、例えば水または生理食塩水溶液を含む。デキストロースもしくは他の糖類の溶液またはグリコール類、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールが、含まれることができる。

【0119】

エマルジョンおよびナノ粒子封入物（encapsulations）（両方とも脂質を用いる）も、用いられることができる。

固体（例えば粉末）製剤は、糖類、シクロデキストリン類等のようなキャリヤーを利用することができる。それらは、噴霧乾燥、噴霧凍結乾燥、溶媒沈殿、ジェット製粉等を含むあらゆる適切な方法により調製することができる。20

【0120】

全ての場合において、保存剤、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤および／または他の添加剤が、必要に応じて含まれることができる。

投与は、好ましくは“予防的有効量”または“療法上有効量”（場合によるが、予防は療法と考えられることができる）においてであり、これは、個人に利益を示すために十分である。投与される実際の量、ならびに投与の速度および時間経過は、処置されているものの性質および重症度に依存するであろう。処置の処方、例えば投与量等に関する決定は、一般開業医および他の医師の責任の範囲内であり、典型的には処置されるべき障害、個々の患者の状態、送達の部位、投与の方法および専門家に既知の他の要因を考慮する。上記で言及された技法およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第20版, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins出版において見付けられることがある。

【0121】

本発明者らは、ピオシン類への繰り返しの曝露は処置の有効性を有意に損なわないことを示している。従って、処置の過程は、一回の投与または多数回の投与を含む、またはそれで構成されることができる。多数回用量計画は、2回、3回、4回、5回、またはさらにはより多くの個々の投与、例えば10回までの投与を含む、またはそれで構成されることができる。連続する用量は、独立して、あらゆる適切な時間間隔、例えば12時間まで、1日まで、1週間まで、2週間まで、または1ヶ月までの間隔を空けられることがある。30

【0122】

組成物は、処置されるべき病気に応じて、単独で、または他の処置との組み合わせで、同時にまたは連続的に（どちらでもよい）投与されることができる。

【実施例】**【0123】****方法**

研究設計。この研究の目的は、急性P.エルジノーサ肺感染のマウスモデルにおけるピオシン類の有効性を示すことおよび感染の非存在下でのピオシン処置が有害ではないこと40

を示すことであった。全ての実験に関して、体重 15 ~ 21 g の 6 週齢のメスのマウス病原体を有しない C57 / BL6 マウスが、用いられた (Charles Rivers Laboratories、英国)。全てのマウスは、適宜飼料および水を与えられ、実験の間、群で収容された。検出力計算が、試料サイズ (全ての処置実験に関して n = 6) を予め決定するために用いられた。マウスは、採点システムにより決定されるように必要とされた場合は、屠殺され、または予め決定された 24 時間の時点で屠殺された。全てのマウスは、異常値を含め、統計分析に含まれた。実験は、1 回のみかまたは 1 回繰り返してのどちらかで実施された (それぞれの実験に関して定められた)。

【0124】

倫理記載。全ての動物実験は、UK Animals (Scientific procedures) Act に従って実施され、UK Home Office License の下で認可され、グラスゴー大学の動物実験委員会により承認された。動物試験は、この研究ではランダム化されず、盲検法は不可能であった。グラスゴー大学の動物実験委員会により割り当てられたプロジェクトライセンス番号は、60 / 4361 であった。

【0125】

ピオシン類のクローニングおよび精製。ピオシン AP41 およびその免疫タンパク質 (ImAP41) をコードする遺伝子が、P. エルジノーサ C763 のゲノム DNA から、ピオシンをコードする遺伝子の開始点に NdeI 部位を導入するように設計されたプライマー (ACA GAT CAT ATG AGC GAC GTT TTT GAC C TT GG) および ImAP41 をコードする遺伝子の停止コドンの代わりに XhoI 部位を導入するように設計されたプライマー (ACA GAT CTC GAG GCC AGC CTT GAA GCC AGG G) を用いて PCR により増幅された。PCR 産物は、NdeI および XhoI により消化され、大腸菌発現ベクター pET21a の対応する部位中にライゲーションされて pETPyoAP41 を与え、それは、ピオシン AP41 - ImAP41 複合体の生成のために用いられ、ここで、ImAP41 は、C 末端の His₆ タグを担持している。ピオシン S5 をコードする遺伝子が、同様に、PAO1 株のゲノム DNA から、遺伝子の開始点に NdeI 部位を導入するように設計されたプライマー (GAG ACA TAT GTC CAA TGA CAA CGA AGT AC) および停止コドンの後に XhoI 部位を導入するように設計されたプライマー (TTT GAC GTC TCG AGT TAA ATG GAT ATT ACA AGA TTG TTT GC) を用いて増幅され、消化された PCR 産物が、pET15b 中にライゲーションされて pETPyoS5 を与え、それは、N 末端の His₆ タグを有するピオシン S5 をコードしている。ピオシン AP41 および S5 は、関連するプラスミドを担持する大腸菌 BL21 (DE3) pLysS から過剰発現された。タンパク質の産生が、1 mM イソプロピル -D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) の添加により誘導され、細胞は、37 °C においてさらに 4 時間増殖し、遠心分離により回収された。細胞は、20 mM トリス-HCl、500 mM NaCl、5 mM イミダゾール (pH 7.5) 中で再懸濁され、MSE Soniprep 150 (Wolf Laboratories) を用いて溶解され、細胞破砕片が遠心分離により分離された。その無細胞溶解物が、20 mM トリス-HCl、500 mM NaCl、5 mM イミダゾール (pH 7.5) 中で平衡化された 5-mL His Trap HP カラム (GE Healthcare) にかけられ、5 ~ 500 mM イミダゾール勾配にわたって溶離された。残っている混入物は、Superdex S200 26 / 600 カラム (GE Healthcare) 上でのゲルfiltration により除去された。ピオシン L1 およびピオシン S2 - ImS2 複合体は、以前に記載されたように精製された (25, 32)。ピオシン類は、5 kDa の分子量カットオフを有する遠心濃縮器 (Vivaspin 20) を用いて濃縮され、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.3) 中に一夜透析された。混入しているリポ多糖類 (lipopolysaccharide) (LPS) は、1 mL 自然流下式内毒素除去カラム (Thermo Scientific) を用いて除去され、タンパク質は、0.2 μM シリンジフィルターを用いてフィルター滅菌された。ピ

10

20

30

40

50

オシン類は、小分けされて必要になるまで - 80 で保管された。

【0126】

ピオシン感受性アッセイ：重層スポットプレート法。軟寒天重層スポットプレートが、^{3 5}の方法を用いて実施された。150 μl のOD_{600nm} = 0.6の試験株培養物が、6 ml の0.8%軟寒天に添加され、LB寒天プレート上に注がれた。5 μl の様々な濃度のバクテリオシン、肺ホモジネートまたは血液が、プレート上にスポットされ、37で24時間インキュベートされた。

【0127】

ピオシンの送達。未感染の肺へのピオシン送達に関して、25 μl の3 mg ml⁻¹のピオシン(n = 4)が、イソフルラン(isoflurane)による麻酔の導入後に鼻内経路により送達された。マウスは、24時間の時点での二酸化炭素窒息により屠殺された。カニューレが、気管中に挿入され、肺が、一定圧力における10%ホルマリン溶液の2分間の穏やかな注入によりインサイチュで固定された。次いで、肺が取り出され、さらなる固定剤を含む容器中に置かれた。組織学処理およびヘマトキシリン・エオシン(H & E)染色が、グラスゴー大学の獣医学学校内の獣医学診断サービス実験室により実施された。高解像度のスライドの全体画像が、Leica SCN400スライドスキャナー上で捕捉され、スライドが、2人の独立した評価人により、気管支周囲の浸潤物および肺胞の関与(invovement)に関して盲検で採点された。

【0128】

急性肺感染症のモデル。メスのC57/BL6マウスが、鼻内におよそ10⁷ CFUの選択されたP.エルジノーサ株を含有する25 μlの細菌培養物を接種された^{3 6}。抗生素質処置が、感染の6時間前または1時間後のどちらかに施され、それらは1回のみ施された。PBS中で溶解したピオシン類またはトプラマイシンが、上記のように鼻内投与により投与された。2つの異なるエンドポイントが、これらの実験において用いられた。未処置の対照と比較した肺の細菌負荷における低減を決定するため、実験における全てのマウスが、同じ時点(感染の4~6時間後)において二酸化炭素窒息により屠殺された。マウスがピオシンまたはトプラマイシン処置後に感染を生き延びることができるかどうかを決定するため、マウスは密接にモニターされ、採点システムにより決定されるように必要とされた場合は二酸化炭素窒息により屠殺され、または予め決定された24時間の時点で屠殺された。ピオシンで処置された未感染のマウスは、ピオシン処置由来の有害な作用がないことを確かめるために、第1系列の実験において対照として用いられた。これらの対照は、ピオシンが有害ではないことが一度明らかであつたら、後の実験において用いられる動物の数を減らすために中止された。CFUの決定に関して、肺は無菌的に取り出され、ホモジナイズされるまで750 μlのPBS中で氷上で保たれた。ホモジナイズされた肺の10倍希釈液が、シュードモナス選択寒天(1リットルあたり20 gペプトン、1.5 g K₂HPO₄、1.5 g MgSO₄·7H₂O、10 mgグリセロール、15 g寒天、0.025 g Irgasan)上に蒔かれ、37で24時間、次いで室温で24時間インキュベートされた後、コロニーが計数された。

【0129】

繰り返しのピオシン曝露。ピオシンS5またはPBSが、鼻内経路(I.N.群と呼ばれる)または腹腔内経路(I.P.群と呼ばれる)のどちらかを介した投与により2週間離して3回与えられた。I.N.投与に関して、群は、PBSおよびピオシンS5(75 μg; 3 mg ml⁻¹において25 μl)であった。I.P.投与に関して、群は、ピオシンS5(75 μg; 750 μg ml⁻¹において100 μl)であった。PBS I.N.群は、I.P.群に関する対照群の役目を果たした。第1曝露の13週間後、マウス(n = 5)は、鼻内でP.エルジノーサP8に感染させられ(I.N.群は、1.4 × 10⁷ CFUを感染させられ、I.P.群は、5.0 × 10⁶ CFUを感染させられた)、前記のように感染の1時間後に75 μgのピオシンS5またはPBSで鼻内で処置された。

【0130】

10

20

30

40

50

ピオシン S 5 特異的抗体力価の間接 E L I S A による決定。I g G および I g A 応答の分析のため、血液が、二酸化炭素窒息の直後に心臓穿刺により得られた。血清が、試料の 13,500 g における 10 分間の遠心分離、続いて上清の収集により得られた。血清は -80 °C で保管された。Greiner 96 ウェルプレート (MaxiSorp) が、PBS 中の精製された組み換えピオシン S 5 (7.5 µg ml⁻¹, 50 µl / ウェル) タンパク質で 4 において一夜コートされた。プレートは、リン酸緩衝生理食塩水 + 0.05% Tween 20 (PBST) で 3 回洗浄され、次いで 150 µl のブロッキング緩衝液 (PBS 中 1% ウシ血清アルブミン (BSA)) で 37 °C で 1 時間ブロッキングされた。洗浄後、ブロッキング緩衝液中 1/50 の希釈度で開始して 5 倍系列希釈された試料が添加され、37 °C で 2 時間インキュベートされた。ピオシン S 5 + フロイント完全 / 不完全を皮下で 4 週間にわたって 3 回与えられたマウスからの血清が、陽性対照として用いられ、コートされていないウェルが、陰性対照として用いられた。個々のマウスからの血清が、分析され、複製試料が、別の日に実施された。PBST による洗浄後、50 µl の PBST / 0.1% BSA 中の抗マウス I g G (Fc 特異的) - ペルオキシダーゼ抗体 ((1/1000 希釈) Sigma、英国) または抗マウス I g A (α鎖特異的) - ペルオキシダーゼ抗体 ((1/250 希釈) Sigma、英国) が、添加され、プレートが、37 °C で 1 時間インキュベートされた。プレートは、SIGMAFAST OPD (o-フェニレンジアミン二塩酸塩) 錠剤 (Sigma、英国) を用いて現像され、反応は 3 M HCl を用いて停止された。光学密度 (OD) が、FLUOSTAR OPTIMA プレートリーダー (BMG Labtech、ドイツ) を用いて 450 nm において読み取られた。

【0131】

統計学。小さい標本サイズのため、非パラメトリック検定が、分析のために用いられた。クラスカル・ウォリス一元配置分散分析法が、標本が同じ分布に由来するかどうかを試験するために用いられた。次いで、ボンフェローニ補正を用いて多重比較に関して調整された P = 0.05 の有意性閾値を用いる片側マン・ホイットニー U 検定が、特定の標本対を有意差に関して分析するために用いられた。全てのマウスは、異常値を含め、統計分析に含められた。

【0132】

結果

ピオシン類は、マウスの肺中で安定であり、炎症も組織損傷も引き起こさない

ピオシン類が肺に有効に送達され得るかどうかおよびそれらがこの環境において安定であるかどうかを決定するため、組み換えピオシン S 2、S 5、AP 41 および L 1 が、健康な C 57 / BL 6 マウスに鼻内投与された。24 時間のインキュベーション期間の後、上行大静脈の葉が、処置されたマウスから取り出され、ホモジナイズされ、P. エルジノーサの増殖している菌叢（ほとんどのピオシン類に関して P 8 株およびピオシン S 2 に関して P 17 株）の上にスポットすることにより活性なピオシンの存在に関して試験された。P. エルジノーサの殺菌が、ピオシン L 1、S 2 および S 5 で処置されたマウスからの肺ホモジネートに関して検出されたが、ピオシン AP 41 または PBS で処置されたマウスからのホモジネートにおいては観察されなかった（データは示されていない）。これらのデータは、ピオシン類が、鼻内投与後に肺を通して十分に分布し、ピオシン L 1、S 2 および S 5 の場合、この環境で安定であることを示している。ピオシン AP 41 に関して、活性は検出されなかった。これは、P. エルジノーサ指標株の感受性によるものである可能性があり、または、このピオシンは他の試験されたピオシン類よりもインビボでより急速に分解され得ることを示している可能性もある。ピオシン類が宿主に有害であり得るかどうかを確かめるため、ピオシン類は、鼻内に再度投与され、24 時間後にピオシンで処置された肺が固定された。ヘマトキシリンおよびエオシン染色を用いて可視化された肺組織は、次いで気管支周囲の浸潤物および肺胞のマクロファージの関与に関して採点された。ピオシンで処置された肺は、そのような特徴の徵候を示さず、PBS で処置された組織と識別できず、これは、タンパク質抗生物質のこの多様な群のいずれの 1 回の高濃度用量

の投与も、明白な炎症または組織損傷をもたらさないことを示している（データは示されていない）。

【0133】

ピオシン類は、致死性の P. エルジノーサ感染症に対する保護を与えることができる。ピオシン類が肺における細菌負荷を低減するために十分に有効であるかどうかを決定するため、ピオシン S 2、S 5、A P 4 1 および L 1 (3 mg m l^{-1})、または対照マウスに関しては P B S が、P. エルジノーサ P 8 の通常は致死的である用量（おおよそ 10^7 CFU ）による感染の 6 時間前に鼻内投与された。全てのマウスは、感染の 4 時間後に屠殺され、肺ホモジネートからの生存可能な細菌の計数が、決定された（図 1 a）。全てのピオシン類は、細菌負荷を低減したが、この時点では、有効性における差は気付かれず、ピオシン S 2、A P 4 1 および L 1 は、細菌数をそれぞれおおよそ 25 倍、650 倍および 1500 倍低減した。ピオシン S 5 の場合、生存可能な細菌は回収されなかった。10

【0134】

ピオシン活性が P. エルジノーサの通常は致死的である用量に対する保護を与えるのに十分であるかどうかを決定するため、マウスは、同様に P. エルジノーサ P 8 による感染の 6 時間前にピオシン類で予め処置され、疾患に関してモニターされ、病気の臨床スコアの予め決定された重症度に達した際に屠殺された。P B S 対照マウスの 6 匹の内の 5 匹は、感染の 5 時間後の時点で屠殺され、一方で全てのピオシンで処置されたマウスは、24 時間の時点における実験のエンドポイントまで生存した。この時点における生存可能な細菌の計数は、ピオシン S 2、A P 4 1 および L 1 に関する類似の殺菌活性を示しており、それは、全て $10,000$ 倍より大きく細菌計数を有意に低減した。また、この時点で、ピオシン S 5 で処置されたマウスから生存可能な細菌は回収されなかった（図 1 b）。20

【0135】

類似の実験が、ピオシン S D 2 を用いて実施された。C 57 / B L 6 マウス（n = 6）が、おおよそ $1.5 \times 10^7 \text{ CFU}$ の P. エルジノーサ P A 0 1 に感染させられ、感染の 1 時間後に 3 mg m l^{-1} のピオシン S D 2 で処置された。感染したマウスは、疾患に関してモニターされ、十分な臨床スコアに達した場合、あるいは実験のエンドポイントである感染の 24 時間後において屠殺された。ピオシン S D 2 で処置されたマウスは、24 時間の時点の実験のエンドポイントまで生存し、対照のマウスは、感染の 6 時間後に屠殺された。肺の細菌負荷が決定され、対照のマウスは、感染の 6 時間後におおよそ $2 \times 10^5 \text{ CFU}$ / 肺を有していた。ピオシン S D 2 マウスに関して、コロニーがないか、または 10 CFU / 肺のどちらかが、感染の 24 時間後に回収された（図 7）。30

【0136】

次いで、感染後の投与において細菌数を低減するピオシン類の能力が、決定された。P. エルジノーサ P 8 に感染したマウスが、感染の 1 時間後に 3 mg m l^{-1} のピオシン S 2、S 5、A P 4 1 および L 1 で処置された。これらの実験において、マウスは、感染の 4.5 時間後の時点で屠殺され、肺ホモジネートからの細菌の計数が、P B S で処置された対照に対して比較された。前処置実験と類似して、ピオシン S 5 は、細菌数の低減において最大の有効性を示したが、この実験では、生存可能な細菌が、6 匹の S 5 処置マウスの内の 3 匹から回収された。ピオシン L 1、S 2、および A P 4 1 は、細菌負荷をそれぞれおおよそ 20、80 および 130 倍有意に低減した（図 1 c）。この実験は、繰り返され、再度全てのピオシン処置群は、有意に低減した細菌計数を示した（図 5 a）。40

【0137】

感染後のピオシン処置が致死的な P. エルジノーサ感染に対して保護を与えるかどうかを決定するため、マウスは、同様に P. エルジノーサ P 8 に感染させられ、感染の 1 時間後に 3 mg m l^{-1} のピオシン S 2、S 5、A P 4 1 および L 1 で処置された。感染したマウスは、疾患に関してモニターされ、十分な臨床スコアに達した場合、あるいは実験のエンドポイントである感染の 24 時間後において屠殺された。全ての P B S で処置されたマウスは、感染の 4.5 時間後に屠殺され、全てのピオシンで処置されたマウスは、24 時間の時点の実験のエンドポイントまで生存した。肺の細菌負荷が決定され、またもピ50

オシン S 5 は、最大の有効性を示し、6 匹のピオシン S 5 で処置されたマウスのいずれからも細菌は回収されなかった。加えて、ピオシン S 2、L 1 および A P 4 1 は、このモデルにおいても非常に有効であり、4 対数単位を超えて細菌計数を有意に低減した（図 1 d）。この実験は、繰り返され、再度全てのピオシンで処置されたマウスは、24 時間まで生存し、細菌の計数は、同様に有意に低減した（図 5 b）。従って、ピオシン類は、肺における細菌負荷の低減において非常に有効であり、感染の前および後に投与された際に、致死的な P. エルジノーサ感染症に対する保護を与えることができる。

【 0 1 3 8 】

P. エルジノーサの株は、表現型が多様であるため、我々は、ピオシン類の3種類の追加の分離株：P. エルジノーサ P 17 および P. エルジノーサ P 5（粘液性）（両方とも囊胞性纖維症患者からのもの）ならびに P. エルジノーサ E 2（環境分離株）に対する有効性を試験した。ピオシン S 2 は、インビトロでは P. エルジノーサ P 5 または P. エルジノーサ E 2 に対して有効ではなく、従って、インビトロでこれらの株を処置するためには用いられず、同様に、ピオシン L 1 は、P. エルジノーサ P 17 に対しては用いられなかつた。全ての3種類の P. エルジノーサ株は、急性肺感染症のモデルにおける P. エルジノーサ P 8 の病毒性のレベルに類似した病毒性のレベルを示し、P. エルジノーサ P 5、P 17 および E 2 に感染した対照は、全てそれぞれ感染後4.5時間、4時間および5.5時間の時点で屠殺を必要とした。ピオシン S 5、L 1 および S 2 で処置された、P. エルジノーサ P 17、P 5 または E 2 に感染したマウスは、全て24時間の実験のエンドポイントまで生存し、生存可能な細菌の計数は、有意に低いレベルまで低減したか、または存在しないかのどちらかであった（表 1）。対照的に、ピオシン A 4 1 による P. エルジノーサ E 2 の処置は、保護を与えることができず、これらのマウスは、感染後5.5時間の時点で屠殺された。P. エルジノーサ E 2 に感染し、A P 4 1 で処置されたマウスからの肺ホモジネートは、対照マウスと比較して10倍しか低減しなかった高レベルの生存可能な細菌を含有していた（表 1）。しかし、ピオシン A 4 1 処置は、P. エルジノーサ P 5 感染マウスに関して、および P. エルジノーサ P 17 感染マウスの6匹の内の5匹に関して成功した。従って、ピオシン類は、P. エルジノーサの多様な株に対して強い有効性を示し、ピオシン S 5 処置は、細菌負荷の低減への最大の作用を示す。

【 0 1 3 9 】

【表 1】

処置	P5	P17	E2
処置なし	1.7×10^5 CFU/肺	4.4×10^5 CFU/肺	1.5×10^5 CFU/肺
ピオシン L 1	40	X	コロニーは検出されなかつた
ピオシン S 2	X	コロニーは検出されなかつた	X
ピオシン A P 4 1	コロニーは検出されなかつた	コロニーは検出されなかつた*	1.3×10^4 CFU/肺*
ピオシン S 5	コロニーは検出されなかつた	コロニーは検出されなかつた	コロニーは検出されなかつた

表 1. ある範囲の P. エルジノーサ分離株に関するピオシン処置。マウスは、P. エルジノーサの致死的な用量を用いて感染させられた。未処置のマウスは、感染の4時間～5.5時間後に屠殺された。ピオシンで処置されたマウス (3 mg m^{-1}) は、24時間まで生存した。*マウスは、対照と同時に屠殺された。^{*}1匹のマウスが、A P 4 1 処置を諦め、感染の4時間後の時点で屠殺され、細菌計数は 1.3×10^4 CFU/肺であった。X—ピオシンはこの株に対しては用いられなかつた。

【 0 1 4 0 】

ピオシン S 5 は、トブライマイシンと比較してマウスの肺において P. エルジノーサの向上した殺菌を示す

ピオシンの有効性を現行の第一線処置と比較するため、我々は、ピオシン S 5 を、囊胞性纖維症を有する患者における P. エルジノーサ肺感染に関する吸入式処置として広く用いられているトブライマイシンと比較した。マウスは、前記のように P. エルジノーサ P 8

10

20

30

40

50

に感染させられ、感染の1時間後に30もしくは 3 mg ml^{-1} のトプラマイシンまたは 0.3 もしくは 3 mg ml^{-1} のピオシンS5のどちらかにより処置され、感染の4.5時間後に屠殺され、生存可能な細菌の計数が、肺ホモジネートから決定された。全ての4つの処置は、PBS対照と比較して細菌負荷を有意に低減した。両方の濃度におけるピオシンS5は、細菌負荷を、トプラマイシンよりも大きい程度まで低減した(図2a)。この実験は、繰り返され、再度ピオシンS5は、細菌の計数をトプラマイシンより大きい程度まで低減した(図6)。ピオシンS5のトプラマイシンと比較した相対的な効力を決定するため、P.エルジノーサP8感染マウスを、 30 ng ml^{-1} 、 300 pg ml^{-1} または 3 pg ml^{-1} のピオシンS5および $300\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 $3\mu\text{g ml}^{-1}$ または 30 ng ml^{-1} のトプラマイシンで処置した。 30 ng ml^{-1} のピオシンS5で処置された群および $300\mu\text{g ml}^{-1}$ のトプラマイシンで処置された群は、24時間まで生存し、全ての他の群は、感染の重症度により感染の5.5時間後に屠殺された。感染の24時間後に、 30 ng ml^{-1} のピオシンS5および $300\mu\text{g ml}^{-1}$ のトプラマイシンは、両方ともPBS対照と比較して細菌の計数を有意に低減した(図2b)。これらの結果は、ピオシンS5が有効である最も低い濃度は、 30 ng ml^{-1} ~ 300 pg ml^{-1} にあり、トプラマイシンが有効である最も低い濃度は、 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ ~ $3\mu\text{g ml}^{-1}$ にあることを示している。従って、ピオシンS5は、この感染のモデルにおいてトプラマイシンより少なくとも100倍強力である(表2)。

【0141】

10

【表2】

20

ピオシン	試験された最低有効濃度	対応するモル濃度
ピオシンL1	$30\mu\text{g ml}^{-1}$	$1.06\text{ }\mu\text{M}$
ピオシンS2	$30\mu\text{g ml}^{-1}$	358 nM
ピオシンAP41	$30\mu\text{g ml}^{-1}$	319 nM
ピオシンS5	30 ng ml^{-1}	535 pM
トプラマイシン	$300\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$	$641\text{ }\mu\text{M}$

表2. P.エルジノーサP8感染に対する保護を与える試験されたピオシンの最小濃度。試験された

30

最低有効濃度は、処置されたマウスが24時間まで生存した試験された最低濃度に相当する。

【0142】

ピオシンS5がこのモデルにおいて 1 nM 未満の濃度で有効であることを確かめた後、我々は、以前に用いられた濃度よりも低い濃度におけるピオシンS2、L1およびAP41の有効性を試験した。全ての3種類のピオシン類は、 $300\mu\text{g ml}^{-1}$ および $30\mu\text{g ml}^{-1}$ で用いられた。症状の重症度により、 $30\mu\text{g ml}^{-1}$ のピオシンL1で処置された6匹のマウスの内の3匹およびPBS対照マウスは、感染の6時間後の時点で屠殺された。両方の濃度のピオシンS2およびAP41で処置された全てのマウスならびに $300\mu\text{g ml}^{-1}$ のピオシンL1で処置されたマウスは、感染の24時間後における実験のエンドポイントまで生存した(表S1)。従って、P.エルジノーサP8に対して、ピオシンS2およびAP41の最小有効濃度は、 $30\mu\text{g ml}^{-1}$ 以下であり、ピオシンL1の最小有効濃度は、 $30\sim300\mu\text{g ml}^{-1}$ である。表S1は、インビボで試験された全てのピオシン類が、トプラマイシンと比較可能である、またはトプラマイシンより大きい効力を示したことを、示している。

40

【0143】

ピオシン耐性および緩和戦略

ピオシン耐性または抵抗性が、インビボでのピオシン処置の際に獲得されるかどうかを決定するため、この研究で論じられた全ての実験における24時間のエンドポイントまで感染を生存したマウスから回収された生存可能な細菌が、ピオシン感受性に関して試験された。これらの実験から、ピオシン抵抗性コロニーは分離されなかった。しかし、我々は

50

、ピオシン A 4 1 に対する増大した耐性（およそ 1 0 0 0 倍）を示したピオシン A P 4 1（感染後 3 mg m l^{-1} ）で処置された細菌からの単一の分離株（P 8 A P 4 1 T）を得た。重要なことだが、ピオシン S 5 および L 1 に対する感受性は、このピオシン A P 4 1 耐性株においてインビトロで影響を受けておらず（図 3 a）、これは、マウスが P 8 A P 4 1 T に感染した際にインビオでも事実であることも、示されている。感染の 6 時間後に屠殺された P B S 対照とは対照的に、ピオシン処置された（ 3 mg m l^{-1} ）P 8 A P 4 1 T 感染マウスは、24 時間の時点の実験のエンドポイントまで生存し、肺ホモジネートにおいて有意に低減した細菌数を有していた（図 3 b）。興味深いことに、これは、ピオシン L 1、S 2、S 5 を用いた処置に対してだけでなく、ピオシン A P 4 1 を用いた処置にも当てはまり、これは、このピオシン A P 4 1 耐性変異体は、なお高濃度のピオシン A P 4 1 を用いてうまく処置されることを、示している。ピオシン感受性試験は、この株は、感染の間ピオシン A P 4 1 に耐性のままであることを示した（図 3 a）。

【 0 1 4 4 】

この研究において用いられた 4 種類のピオシン類は、全て P . エルジノーサにおける異なる栄養素取り込み受容体に寄生するため、ピオシン耐性の出現を防ぐための明白な戦略は、2 種類以上のピオシン類の組み合わせからなる‘ピオシンカクテル’を用いることである。従って、我々は、P . エルジノーサ P 8 の急性肺感染モデルにおいて 2 種類以上のピオシン類の組み合わせの有効性を試験した。以下のピオシンの組み合わせが、試験された：L 1 / S 2、L 1 / A P 4 1、S 2 / A P 4 1 および L 1 / S 2 / A P 4 1（全てのピオシン類は、 $300 \mu \text{g m l}^{-1}$ で試験された）。P B S 対照マウスは、感染の 4 . 5 時間後に屠殺され、全てのピオシン処置されたマウスは、24 時間まで生存した。生存可能な細菌が、ピオシン処置されたマウスから低レベルで回収され、L 1 / S 2 / A P 4 1 の組み合わせに関して、細菌は、6 匹の処置されたマウスの内の 1 匹のみから回収され、これは、ピオシンの組み合わせが、個々のピオシン類の使用を超える増進された有効性を示すことを、示している（図 4）。多数のピオシン類での処置後に回収された細菌に関しては、ピオシン抵抗性または耐性は、観察されなかった。

【 0 1 4 5 】

ピオシン S 5 は、ピオシン S 5 抗体の存在下で、致死的な P . エルジノーサ感染症に対する保護を与えることができる

ピオシン類に対する繰り返される曝露が処置に有害な抗体反応を引き起こすかどうかを確かめるため、マウスは、抗体反応を誘発するためにピオシン S 5 に繰り返し曝露させられ、ピオシン処置の有効性が、前記のように P . エルジノーサ P 8 による感染の後に決定された。ピオシン S 5 は、鼻内（I . N .）経路または腹腔内（I . P .）経路のどちらかを介して、それぞれの投与の間を 2 週間空けて 3 回投与された。最初の処置の 13 週間後、マウス（n = 5）は、P . エルジノーサ P 8 を鼻内感染させられ（I . N . 群は、 $1 . 4 \times 10^7 \text{ CFU}$ を感染させられ、I . P . 群は、 $5 . 0 \times 10^6 \text{ CFU}$ を感染させられた）、感染の 1 時間後に $75 \mu \text{g}$ のピオシン S 5 または P B S を用いて鼻内処置された。感染の前に P B S のみを鼻内投与された対照群も、含まれた。I . N . 群に関して、全てのピオシン S 5 処置されたマウスは、24 時間の時点まで生存したが、全ての P B S で処置されたマウスは、症状の重症度により感染の 5 時間後に屠殺された。肺の細菌負荷が決定され、生存可能な細菌は、ピオシン S 5 処置されたマウスのいずれからも回収されなかった（図 8 a）。ピオシン S 5 特異的 Ig G および Ig A のレベルが、それぞれのマウスに関して分析された。これらのマウスにおいて検出された Ig A 抗体は存在しなかった；しかし、以前にピオシン S 5 に曝露したマウスにおいて低レベルの（フロイント完全／不完全対照群よりも 10 倍低い）Ig G が存在した（図 8 b）。I . P . 経路を介してピオシン S 5 に繰り返し曝露したマウスに関して、感染後にピオシン S 5 で鼻内処置されたマウスは、全て 24 時間の時点まで生存し、P B S で処置されたマウスは、症状の重症度により感染の 5 時間後に屠殺された。肺の細菌負荷が決定され、生存可能な細菌は、ピオシン S 5 処置されたマウスのいずれからも回収されなかった（図 8 c）。ピオシン S 5 特

10

20

30

40

50

異的 Ig G のレベルは、ピオシン S 5 のみの群において非常に低く（フロイント完全／不完全対照群よりも 1000 倍低い）、ピオシン S 5 特異的 Ig A は、検出されなかった（図 8 d）。従って、ピオシン S 5 は、繰り返しの投与の後に、そしてピオシン S 5 特異的抗体の存在下で、強い有効性を示す。

【0146】

論考

この研究において、我々は、ピオシン類が、肺に直接送達された場合に急性 P. エルジノーサ肺感染症の致死的モデルにおいて細菌負荷の低減および保護の提供において非常に有効であることを示している。特に、ピオシン S 5 は、P. エルジノーサ肺感染症を処置するために広く用いられている抗生物質であるトブラマイシンの最小有効濃度よりも少な 10 くとも 100 倍低い濃度で保護を与えることが示された。インビポで試験された全てのピオシン類は、トブラマイシンと比較可能な、またはトブラマイシンより大きい効力を示した。加えて、これらの高度に安定な染色体にコードされるピオシン類の高濃度での投与は、肺における明白な炎症または組織損傷をもたらさなかった。まとめると、これらのデータは、ピオシン類が P. エルジノーサ肺感染症の処置に関する有用な療法薬を作る可能性を有することを、示唆している。これらは、囊胞性纖維症、院内感染性および人工呼吸器関連肺炎ならびに慢性閉塞性肺疾患（COPD）と関係する P. エルジノーサ感染症を含み、その全てが、現在の満たされていない医学的必要性の領域である^{10, 11}。実際、関連するコリシン様およびレクチン様バクテリオシン類は、抗生物質耐性である頻度の高い病原体、例えばクレブシェラ・ニューモニウムおよびバークホルデリア属の種（Burkholderia spp.）による呼吸器感染症の処置のための有用な療法薬も作り得る。²⁰

【0147】

それらの効力に加えて、コリシン様バクテリオシン類の追加の利点は、それらの狭い殺菌のスペクトルである。これは、細菌感染症をうまく処置する一方で正常な細菌叢を完全なままにする可能性を可能にする。広いスペクトルの抗生物質の使用および腸内菌共生バランス失調と関係する十分に確立された厄介な問題は、抗生物質関連下痢およびクロストリジウム・ディフィシル感染症を含む^{26, 27}。より最近になって、微生物の不均衡は、ある範囲の慢性疾患、例えばクローン病、糖尿病、肥満およびリウマチ性関節炎において役割を果たしていることが示唆されている²⁸⁻³¹。³⁰

【0148】

この研究において試験されたピオシン類の中で、ピオシン S 2 および S 5 に関する受容体は、それぞれ TonB 依存性鉄シデロフォア受容体 FpvA I および FptA であることが知られており^{21, 22}、ピオシン L 1 に関する受容体は、リポ多糖類の共通多糖抗原（CPA）であることが最近示されている³²。しかし、ピオシン AP41 に関する受容体は、発見されていないままである。FptA および CPA は、P. エルジノーサの株の間で広く分布していることが知られており³³、興味深いことに、P. エルジノーサによる CPA 産生は、囊胞性纖維症の肺において上方制御されていることが示されており³⁴、これは、ピオシン L 1 が、インビトロ活性が検出されることができない株に対してインビポで有効である可能性があることを意味している。異なる細胞表面受容体を標的とするピオシン類の‘カクテル’を用いることは、獲得されるピオシン抵抗性の機会を低減し、ピオシン産生株中のピオシン特異的免疫タンパク質遺伝子の存在により付与される抵抗性の可能性も低減するであろう。しかし、ピオシン AP41 および S 5 は多様な環境および臨床分離株の収集物中の株の 87% に対して有効であるため、本来備わっているピオシン特異的免疫は、これらの抗微生物物質の大きな制限ではない。⁴⁰

【0149】

本発明は、上記の典型的な態様と合わせて記載されてきたが、多くの均等な改変およびバリエーションが、本開示を与えられた際に、当業者には明らかであろう。従って、述べられた本発明の典型的な態様は、説明的であり、限定的ではないと考えられる。記載された態様に対する様々な変更が、本発明の精神および範囲から逸脱することなくななるこ⁵⁰

とができる。本明細書で引用された全ての文書は、参照により明確に援用される。

非限定的に、本発明は以下の態様を含む。

[態様 1] 細菌性呼吸器感染症の予防または処置の方法における使用のための S 型ピオシンであって、該ピオシンが、肺投与により送達される S 型ピオシン。

[態様 2] 対象における細菌性呼吸器感染症の予防または処置のための方法であって、S 型ピオシンが、該対象に肺投与により送達される方法。

[態様 3] 態様 1 に記載の使用のための S 型ピオシンまたは態様 2 に記載の方法であって、該感染性細菌が、シュードモナス・エルジノーサを含む、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 4] 態様 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該処置されるべき対象が、細菌性肺炎を有する、または細菌性肺炎を発現するリスクがある、S 型ピオシンまたは方法。 10

[態様 5] 態様 4 に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該処置されるべき対象が、弱められた気道機能および / または弱められた免疫機能を有する、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 6] 態様 4 または態様 5 に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該処置されるべき対象が、囊胞性纖維症または慢性閉塞性肺疾患を患っている、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 7] 態様 4 または態様 5 に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該対象が、癌患者またはうっ血性心不全もしくは AIDS に冒されている患者である、S 型ピオシンまたは方法。 20

[態様 8] 態様 4 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該処置されるべき対象が、市中感染性肺炎、人工呼吸器関連肺炎または院内感染性肺炎を有する、またはそれらを発現するリスクがある、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 9] 前記の態様のいずれか 1 項に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該 S 型ピオシンが、S 2 、 S D 2 、 S 5 または A P 4 1 標的化部分を含む、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 10] 態様 9 に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該ピオシンが、S 5 標的化部分を含む、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 11] 先行する態様のいずれか 1 項に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該 S 型ピオシンが、S 2 、 S D 2 、 S 5 または A P 4 1 エフェクター部分を含む、S 型ピオシンまたは方法。 30

[態様 12] 態様 11 に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該 S 型ピオシンが、S 5 エフェクター部分を含む、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 13] 先行する態様のいずれか 1 項に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該 S 型ピオシンが、S D 2 、 S D 2 、 S 5 、 A P 4 1 または L 1 ピオシンである、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 14] 態様 13 に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該 S 型ピオシンが、S 5 ピオシンである、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 15] 先行する態様のいずれか 1 項に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、2 種類以上のピオシン類の組み合わせが該対象に投与される、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 16] 態様 15 に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該組み合わせが、S 5 ピオシン、L 1 ピオシン、S 2 ピオシン、S D 2 ピオシンおよび / または A P 4 1 ピオシンを含む、S 型ピオシンまたは方法。

[態様 17] 態様 16 に記載の S 型ピオシンまたは方法であって、該組み合わせが、L 1 ピオシンおよび S 2 ピオシン； L 1 ピオシンおよび A P 4 1 ピオシン； S 2 ピオシンおよび A P 4 1 ピオシン； または L 1 ピオシン、S 2 ピオシンおよび A P 4 1 ピオシンを、場合により S 5 ピオシンおよび / または S D 2 ピオシンとの組み合わせで含む、S 型ピオシンまたは方法。 50

[態様 18] S型ピオシンを提供することおよび前記のS型ピオシンを肺投与のために配合することを含む、細菌性呼吸器感染症の予防または処置のための医薬品を調製する方法。

[態様 19] 療法組成物の対象への肺投与のためのデバイスであって、該組成物が、S型ピオシンを含むデバイス。

[態様 20] 吸入器またはネブライザーである、態様 19 に記載のデバイス。

【 0150 】

参考文献

【 0151 】

【化29】

- 1 Souli, M., Galani, I., & Giamarellou, H., (2008) Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance*. **13**, 19045-19045.
- 2 Vila, J. & Luis Martinez, J., Clinical Impact of the Over-Expression of Efflux Pump in Nonfermentative Gram-Negative Bacilli, Development of Efflux Pump Inhibitors. (2008) *Current Drug Targets*. **9**, 797-807. 10
- 3 Nikaido, H., Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. (2003) *Microbiol Mol Biol Rev*. **67**, 593-656.
- 4 Flamm, R.K. et al., Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. (2004) *Antimicrob Agents Chemother*. **48**, 2431-2436. 20
- 5 Mah, T.F. et al., A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. (2003) *Nature*. **426**, 306-310.
- 6 Drenkard, E. & Ausubel, F.M., *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. (2002) *Nature*. **416**, 740-743. 30
- 7 Livermore, D.M., Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? (2002) *Clinical Infectious Diseases*. **34**, 634-640.
- 8 Cystic Fibrosis Trust Annual data report 2011, UK CF Registry, 2013.
- 9 Chastre, J. & Fagon, J.Y., Ventilator-associated pneumonia. (2002) *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **165**, 867-903. 40
- 10 Planquette, B. et al., *Pseudomonas aeruginosa* Ventilator-associated Pneumonia Predictive Factors of Treatment Failure.

【0152】

【化30】

(2013) *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* **188**, 69-76.

11 Martinez-Solano, L., Macia, M.D., Fajardo, A., Oliver, A., & Martinez, J.L., Chronic Pseudomonas aeruginosa Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. (2008) *Clinical Infectious Diseases.* **47**, 1526-1533.

12 Murphy, T.F. et al., Pseudomonas aeruginosa in chronic obstructive pulmonary disease. (2008) *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* **177**, 853-860.

13 Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., & Pompliano, D.L., Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. (2007) *Nat Rev Drug Discov.* **6**, 29-40.

14 Bumann, D., Has nature already identified all useful antibacterial targets? (2008) *Current Opinion in Microbiology.* **11**, 387-392.

15 Shlaes, D.M., Sahm, D., Opiela, C., & Spellberg, B., The FDA Reboot of Antibiotic Development. (2013) *Antimicrob Agents Chemother.* **57**, 4605-4607.

16 Michel-Briand, Y. & Baysse, C., The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. (2002) *Biochimie.* **84**, 499-510.

17 Cascales, E. et al., Colicin biology. (2007) *Microbiol Mol Biol Rev.* **71**, 158-229.

18 Parret, A.H.A. & De Mot, R., Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of pseudomonas and other gamma-proteobacteria. (2002) *Trends Microbiol.* **10**, 107-112.

19 Ferguson, A.D. & Deisenhofer, J., TonB-dependent receptors - structural perspectives. (2002) *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes.* **1565**, 318-332.

20 Kleanthous, C., Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. (2010) *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 843-848.

【0153】

【化31】

- 21 Elfarash, A., Wei, Q., & Cornelis, P., The soluble pyocins S2 and S4 from *Pseudomonas aeruginosa* bind to the same FpvAI receptor. (2012) *MicrobiologyOpen*. **1**, 268-275.
- 22 Elfarash, A. et al., Pore-forming pyocin S5 utilizes the FptA ferricytochelin receptor to kill *Pseudomonas aeruginosa*. (2014) *Microbiology*. **160**, 261-269.
- 23 Housden, N.G. et al., Intrinsically Disordered Protein Threads Thread the Bacterial Outer-Membrane Porin OmpF. (2013) *Science*. **340**, 1570-1574.
- 24 Baysse, C. et al., Uptake of pyocin S3 occurs through the outer membrane ferricytochrome c type II receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. (1999) *J Bacteriol*. **181**, 3849-3851.
- 25 Smith, K. et al., Activity of Pyocin S2 against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. (2012) *Antimicrob Agents Chemother*. **56**, 1599-1601.
- 26 Gorkiewicz, G., Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. (2009) *Int J Antimicrob Agents*. **33**, S37-S41.
- 27 Carroll, K.C. & Bartlett, J.G., Biology of *Clostridium difficile*: Implications for Epidemiology and Diagnosis. (2011) *Annu Rev Microbiol*. **65**, 501-521.
- 28 Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., & Guarner, F., The gut microbiota in IBD. (2012) *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. **9**, 599-608.
- 29 Qin, J. et al., A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. (2012) *Nature*. **490**, 55-60.
- 30 Scher, J.U. & Abramson, S.B., The microbiome and rheumatoid arthritis. (2011) *Nat Rev Rheumatol*. **7**, 569-578.
- 31 Henao-Mejia, J. et al., Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. (2012) *Nature*. **482**, 179-U167.
- 32 McCaughey, L.C. et al., Lectin-like bacteriocins from *Pseudomonas* spp. utilise D-rhamnose containing

【0154】

【化32】

lipopolysaccharide as a cellular receptor. (2014) *PLoS Pathog.* **10**, e1003898.

33 Hao, Y., King, J.D., Huszczynski, S., Kocincova, D., & Lam, J.S., Five New Genes Are Important for Common Polysaccharide Antigen Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. (2013) *Mbio.* **4**.

34 Weisner, A.M., Chart, H., Bush, A., Davies, J.C., & Pitt, T.L., Detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in serum and oral fluid from patients with cystic fibrosis. (2007) *J Med Microbiol.* **56**, 670-674.

10

35 Fyfe, J.A.M., Harris, G., & Govan, J.R.W., Revised Pyocin Typing Method For *Pseudomonas-Aeruginosa*. (1984) *J Clin Microbiol.* **20**, 47-50.

36 Bragonzi, A., Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. (2010) *International Journal of Medical Microbiology.* **300**, 584-593.

20

37 Kageyama M, Kobayashi M, Sano Y, Masaki H. (1996) Construction and characterization of pyocin-colicin chimeric proteins. *J Bacteriol.* **178(1)**, 103-10.

【図1】

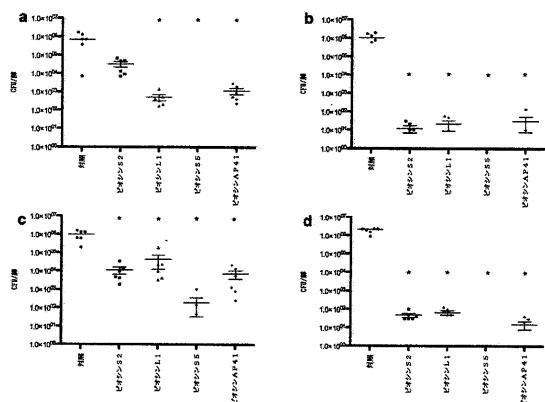


図1

【図3】

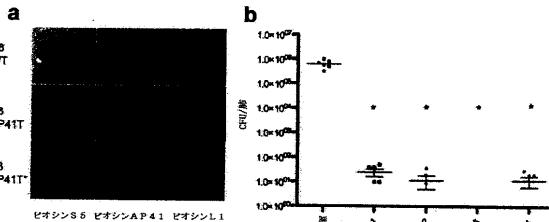


図3

【図4】

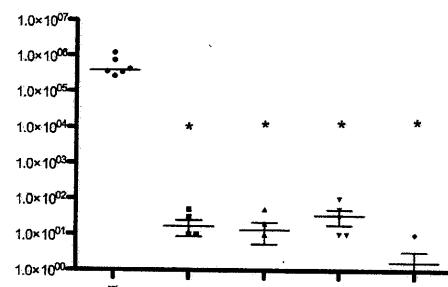


図4

【図2】

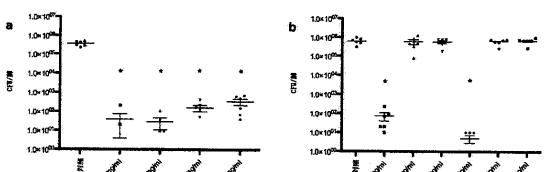


図2

【図5】

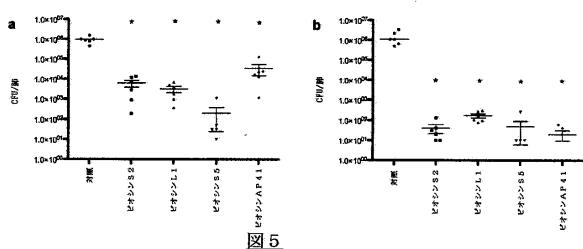


図5

【図6】

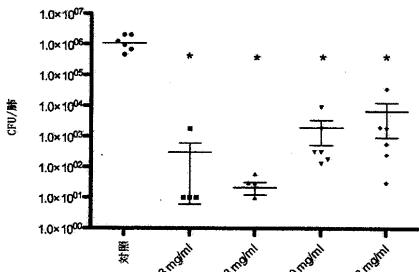


図6

【図7】

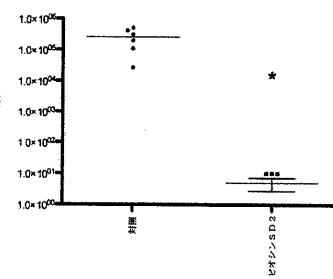


図7

【図8】

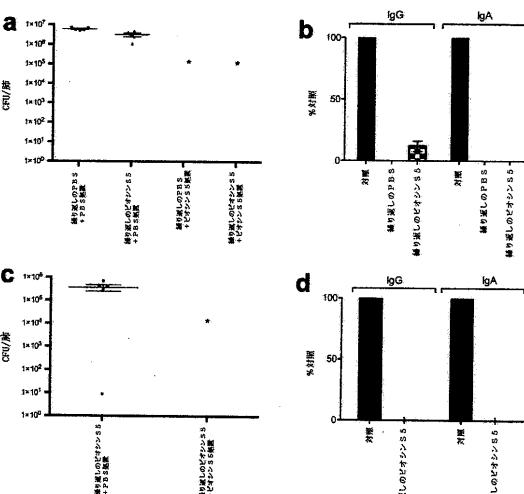


図8

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I

A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K 9/72 (2006.01)	A 6 1 K 9/72
C 0 7 K 14/21 (2006.01)	C 0 7 K 14/21

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 ウォーカー, ダニエル

イギリス国グラスゴー・ストラスクライド ジー 12 8エイティー, ユニバーシティ・オブ・グラスゴー, ヴェテリナリー・アンド・ライフ・サイエンシズ, カレッジ・オブ・メディカル, イミュニティ・アンド・インフラメーション, インスティテュート・オブ・インフェクション

(72)発明者 マッコーイー, ローラ

イギリス国グラスゴー・ストラスクライド ジー 12 8エイティー, ユニバーシティ・オブ・グラスゴー, ヴェテリナリー・アンド・ライフ・サイエンシズ, カレッジ・オブ・メディカル, イミュニティ・アンド・インフラメーション, インスティテュート・オブ・インフェクション

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 2 9 2 4 4 (U S , A 1)

特表 2 0 0 1 - 5 0 5 5 5 7 (J P , A)

特許第 3 6 5 5 6 4 5 (J P , B 2)

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, Vol.56, No.3, pp.1599-1601

CARLA L BROWN, COLICIN-LIKE BACTERIOCINS AS NOVEL THERAPEUTIC AGENTS FOR THE TREATMENT OF CHRONIC 以下備考, BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, 2 0 1 2 年 1 1 月 2 1 日, VOL:7, NR:6, PAGE(S):1549 - 1552, BIOFILM-MEDIATED INFECTION, U R L , <http://dx.doi.org/10.1042/BST20120241>ELFARASH A, PORE-FORMING PYOCIN S5 UTILIZES THE FPTA FERRIPYOCHELIN RECEPTOR TO KILL P SEUDOMONAS AERUGINOSA, MICROBIOLOGY, 英国, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, 2 0 1 4 年 2 月, VOL:160, NR:PART 2, , PAGE(S):261 - 269, U R L , <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.070672-0>HUA LING, A PREDICTED S-TYPE PYOCIN SHOWS A BACTERICIDAL ACTIVITY AGAINST CLINICAL PSEUDOMONAS 以下備考, FEBS LETTERS, NL, ELSEVIER, 2 0 1 0 年 6 月, VOL:584, NR:15, PAGE(S):3354 - 3358, AERUGINOSA ISOLATES THROUGH MEMBRANE DAMAGE, U R L , <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.021>

薬学雑誌, 2007, Vol.127, No.4, pp.643-653

Drug Delivery System, 1991, Vol.6, No.3, pp.207-211

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 4 / 8 2 5

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)