

(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2021-513865

(P2021-513865A)

(43) 公表日 令和3年6月3日 (2021. 6. 3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	4 B 0 5 0
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04 Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-544642 (P2020-544642)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月26日 (2019. 2. 26)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月20日 (2020. 10. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/019638
 (87) 国際公開番号 W02019/165454
 (87) 国際公開日 令和1年8月29日 (2019. 8. 29)
 (31) 優先権主張番号 62/635, 515
 (32) 優先日 平成30年2月26日 (2018. 2. 26)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 514284475
 コントラフェクト コーポレーション
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1070
 1, ヨンカーズ, ウェルズ アベニュー
 28 - 3アールディー フロア
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 シューフ レイモンド
 アメリカ合衆国 07046 ニュージャ
 ージー マウンテン レイクス レイク
 ドライブ 116

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾 P l y S s 2 溶解素及びその使用

(57) 【要約】

配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型 P l y S s 2 溶解素ポリペプチドと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む修飾溶解素ポリペプチドであって、少なくとも1つのアミノ酸置換がCHAPドメイン及び／又はSH3ドメイン中にあり、修飾溶解素ポリペプチド又はそのフラグメントがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる、修飾溶解素ポリペプチドが本明細書に開示される。修飾溶解素ポリペプチドを含む組成物、及び修飾溶解素ポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクターが本明細書に更に開示される。グラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる方法、細菌感染を治療する方法、及び抗生物質の有効性を高めるか、又は抗生物質耐性の発現を低減する方法も本明細書に開示される。

【選択図】 図1

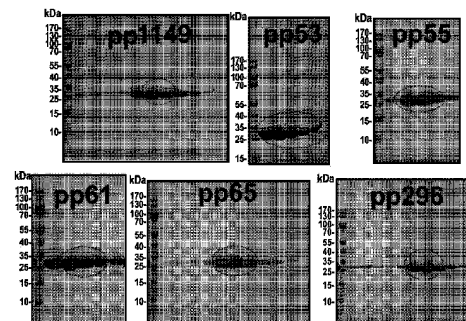


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列、システイン、ヒスチジン依存性アミドヒドロラーゼ／ペプチダーゼ（CHAP）ドメイン及び細胞壁結合（SH3b）ドメインを有する野生型 PlySs2 溶解素ポリペプチドと比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む修飾溶解素ポリペプチドであって、前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が前記 CHAP ドメイン及び／又は前記 SH3b ドメイン中にあり、該修飾溶解素ポリペプチド又はそのフラグメントがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる、修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が前記 CHAP ドメイン中の配列番号 1 のアミノ酸残基 35、92、104、128 及び 137 から選択される少なくとも 1 つの位置、及び／又は前記 SH3b ドメイン中の配列番号 1 のアミノ酸残基 164、184、195、198、204、206、212 及び 214 から選択される少なくとも 1 つの位置にある、請求項 1 に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 3】

前記 CHAP ドメイン中の前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が R35E、L92W、V104S、V128T 及び Y137S の少なくとも 1 つである、請求項 2 に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 4】

前記 SH3b ドメイン中の前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が Y164N、Y164K、N184D、R195E、S198H、S198Q、V204K、V204A、I206E、V212A、V212E 及び V214G の少なくとも 1 つである、請求項 2 に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 5】

R35E、L92W、V104S、V128T 及び Y137S からなる群から選択される前記 CHAP ドメイン中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換と、Y164N、Y164K、N184D、R195E、S198H、S198Q、V204K、V204A、I206E、V212A、V212E 及び V214G からなる群から選択される前記 SH3b ドメイン中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換とを有する、請求項 2 に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 6】

前記 CHAP ドメイン中に少なくとも 2 つのアミノ酸置換を含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 7】

前記 SH3b ドメイン中に少なくとも 2 つのアミノ酸置換又は少なくとも 3 つのアミノ酸置換を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 8】

前記修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 と比較して 3 つ～9 つのアミノ酸置換を含み、該 3 つ～9 つのアミノ酸置換が R35E、L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164N、Y164K、N184D、R195E、S198H、S198Q、V204K、V204A、I206E、V212E、V212A 及び V214G から選択される、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164K、N184D 及び S198Q を含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 10】

前記 CHAP ドメイン中の前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が L92W、V104S、V128T 及び Y137S を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポ

10

20

30

40

50

リペプチド。

【請求項 1 1】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が、

(i) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T 及び Y 1 3 7 S、

(i i) Y 1 6 4 N、N 1 8 4 D、R 1 9 5 E、V 2 0 4 K 及び V 2 1 2 E、

(i i i) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、S 1 9 8 H 及び I 2 0 6 E、

(i v) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、S 1 9 8 Q、V 2 0 4 A 及び V 2 1 2 A、

(v) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 K、N 1 8 4 D 及び S 1 9 8 Q、

(v i) V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S 及び Y 1 6 4 K、

(v i i) R 3 5 E、L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T 及び Y 1 3 7 S、

(v i i i) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 K、V 2 0 4 K 及び V 2 1 2 E、

(i x) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 K、N 1 8 4 D、S 1 9 8 Q、V 2 0 4 K 及び V 2 1 2 E、

(x) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 N 及び N 1 8 4 D、

(x i) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 N 及び R 1 9 5 E

、

(x i i) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、N 1 8 4 D、V 2 0 4 A 及び V 2 1 2 A、

(x i i i) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S 及び Y 1 6 4 K、

(x i v) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 K、I 2 0 6 E 及び V 2 1 4 G、並びに、

(x v) L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、N 1 8 4 D 及び S 1 9 8 H

、
からなる群から選択される、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 1 2】

スタフィロコッカス・アウレウス；リステリア・モノサイトゲネス；スタフィロコッカス・アウレウス；スタフィロコッカス・エピデルミディス群、スタフィロコッカス・サブロフィティカス群、スタフィロコッカス・シミュランス群、スタフィロコッカス・インターメディウス群、スタフィロコッカス・シウリ群及びスタフィロコッカス・ヒイカス群等のコアグラゼ陰性ブドウ球菌；ストレプトコッカス・スイス；ストレプトコッカス・ピオゲネス；ストレプトコッカス・アガラクティアエ；ストレプトコッカス・ディスガラクティアエ；ストレプトコッカス・ニューモニアエ；ストレプトコッカス・アンギノサス群、ストレプトコッカス・ミティス群、ストレプトコッカス・サングイニス群、ストレプトコッカス・ボビス群、ストレプトコッカス・サリバリウス群及びストレプトコッカス・ミュータンス群等の緑色レンサ球菌群に含まれる種；エンテロコッカス・フェカーリス；並びにエンテロコッカス・フェシウムの 1 つ以上に対して野生型 P l y S s 2 溶解素の約 2 倍、約 3 倍又は約 5 倍以下の最小阻止濃度 (M I C) を有する、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 1 3】

前記 M I C がスタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ピオゲネス、リステリア・モノサイトゲネス及びストレプトコッカス・アガラクティアエの 1 つ以上に対して野生型 P l y S s 2 溶解素の約 5 倍以下である、請求項 1 2 に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 1 4】

前記 M I C が野生型 P l y S s 2 溶解素の約 4 倍以下である、請求項 1 2 又は 1 3 に記

10

20

30

40

50

載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 15】

前記 M I C が野生型 P l y S s 2 溶解素の約 2 倍以下である、請求項 12～14 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 16】

野生型 P l y S s 2 溶解素と比較して免疫原性を低下させ、及び／又は炎症応答関連毒性を低下させる、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 17】

グラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖の阻害、その菌数の減少、又はその死滅が M I C 及び／又は最小バイオフィルム根絶濃度 (M B E C) として *i n v i t r o* で評
10 定される、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド。

【請求項 18】

許容可能な担体と、抗菌量の請求項 1～17 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペ
プチドとを含む組成物。

【請求項 19】

前記組成物が医薬組成物であり、前記担体が薬学的に許容可能な担体である、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記抗菌量の修飾溶解素ポリペプチドが、スタフィロコッカス・アウレウス；リステリア・モノサイトゲネス；スタフィロコッカス・エピデルミディス群、スタフィロコッカス・サプロフィティカス群、スタフィロコッカス・シミュランス群、スタフィロコッカス・インターメディウス群、スタフィロコッカス・シウリ群及びスタフィロコッカス・ヒिकास群等のコアグラウゼ陰性ブドウ球菌；ストレプトコッカス・スイス；ストレプトコッカス・ピオゲネス；ストレプトコッカス・アガラクティアエ；ストレプトコッカス・ディスガラクティアエ；ストレプトコッカス・ニューモニアエ；ストレプトコッカス・アンギノサス群、ストレプトコッカス・ミティス群、ストレプトコッカス・サンガイニス群、ストレプトコッカス・ボビス群、ストレプトコッカス・サリバリウス群及びストレプトコッカス・ミュータンス群等の緑色レンサ球菌群に含まれる種；エンテロコッカス・フェカリス；並びにエンテロコッカス・フェシウムからなる群から選択される 1 つ以上のグラム陽性細菌の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させるのに
20 効果的である、請求項 18 又は 19 に記載の組成物。
30

【請求項 21】

前記グラム陽性細菌がメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス又はバンコマイシン耐性スタフィロコッカス・アウレウスである、請求項 18～20 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

溶液、懸濁液、エマルジョン、吸入用粉末、エアロゾル又はスプレーである、請求項 18～21 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

グラム陽性細菌感染の治療に適した 1 つ以上の抗生物質を更に含む、請求項 18～22
40 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 24】

請求項 1～17 のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチドをコードする核酸分子
。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 26】

前記ベクターがプラスミドであり、前記核酸が異種プロモーターに操作可能に連結する、請求項 25 に記載のベクター。

【請求項 27】

グラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる方法であって、前記細菌と請求項18～23のいずれか一項に記載の組成物とを接触させることを含む、方法。

【請求項28】

グラム陽性細菌の少なくとも1つの種によって引き起こされる細菌感染を予防又は治療する方法であって、細菌感染と診断された、そのリスクがある又はその症状を示す被験体に、(1)第1の量の請求項1～17のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチド、及び(2)第2の量のグラム陽性細菌感染の治療に適した抗生物質を同時投与することを含む、方法。

【請求項29】

前記グラム陽性細菌感染の治療に適した抗生物質がメチシリン、バンコマイシン、ダプトマイシン、ムピロシン及びリソスタフィンからなる群から選択される、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

細菌感染の治療に適した抗生物質の有効性を高める方法であって、該抗生物質を請求項1～17のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチドと組み合わせて同時投与することを含み、同時投与が、細菌の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる上で、前記抗生物質又は前記修飾溶解素ポリペプチド若しくはそのフラグメントのいずれか個別の投与よりも効果的である、方法。

【請求項31】

前記抗生物質がメチシリン、バンコマイシン、ダプトマイシン、ムピロシン及びリソスタフィンからなる群から選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

ブドウ球菌又はレンサ球菌細菌に感染した被験体においてブドウ球菌又はレンサ球菌細菌の抗生物質耐性の発現を低減する方法であって、前記被験体に、請求項1～17のいずれか一項に記載の修飾溶解素ポリペプチドとメチシリン、バンコマイシン、ダプトマイシン、ムピロシン及びリソスタフィンから選択される抗生物質との組合せを投与することを含む、方法。

【請求項33】

前記修飾溶解素ポリペプチドを、該修飾溶解素ポリペプチドの最小阻止濃度(MIC)を下回る濃度に相当する量で投与する、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記修飾溶解素ポリペプチド中の少なくとも1つのアミノ酸置換がL92W、V104S、V128T、Y137S、S198Q、V204A及びV212Aを含む、請求項32又は33に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本願は、2018年2月26日付で出願された米国仮特許出願第62/635,515号の利益を主張し、その出願日に依拠し、その開示全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【0002】

[配列表]

本願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が引用することにより本明細書の一部をなす。2019年2月22日付けで作製された上記ASCIIコピーの名前は0341_0004-PC T_S L. t x tであり、36153バイトのサイズである。

【0003】

本開示は、概して抗菌剤、より具体的には修飾された非自然発生溶解素ポリペプチド、

10

20

30

40

50

特に修飾 P l y S s 2 溶菌酵素、並びにグラム陽性細菌を死滅させ、細菌感染及び汚染に対抗する上でのこれらのペプチドの使用に関する。

【背景技術】

【0004】

抗生物質耐性は、世界的に増加しており、特に、(a) 様々な病気及び他の病態を治療するために投与される抗生物質の使用の増加及び長期化、(b) 低い患者コンプライアンス、並びに(c) 既存の抗生物質に対する耐性を発現した病原体に対して採用することができる新たな抗微生物剤の不足の影響を受ける。

【0005】

バクテリオファージエンドリシン(溶解素)は、細菌感染に対抗し、細菌耐性を克服する有望な代替的又は相補的なアプローチである。溶解素は、バクテリオファージによって自然に産生され得るペプチドグリカンヒドロラーゼである。外部から細菌と接触することで、組換えにより作製された溶解素ポリペプチドは、細菌を直接溶解し、死滅させる(1)、(2)。溶解素は、病原体への抗生物質剤のアクセスを促進することによっても抗生物質耐性を克服することができる。近年、幾つかの研究から、器官限局性(organ-confined)感染及び全身感染において粘膜表面上の病原体を制御する、これらの酵素の人間医学及び獣医学における大きな可能性が示されている。

【0006】

グラム陽性細菌は、ポリペプチド及び多糖を含有する細胞壁に囲まれている。グラム陽性細胞壁は、約20nm~80nmの厚さであり得る幅広い緻密な壁のように見え、ペプチドグリカンの多数の相互接続層を含有する。グラム陽性細胞壁の60%~90%が細胞形状、剛構造、及び浸透圧衝撃に対する耐性をもたらすペプチドグリカンである。細胞壁は、グラム染色クリスタルバイオレットを排除せず、細胞が紫色に染色され、したがって「グラム陽性」に分類される。

【0007】

バクテリオファージ溶菌酵素は、様々な投与経路を介した被験体における様々なタイプの感染の特異的治療に有用であるとして確立されている。例えば、特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献5及び特許文献6を参照されたい。Fischetti et al.に対する米国特許第9,034,322号(その全体が引用することにより本明細書の一部をなす)は、溶解素P l y S s 2を含む、ストレプトコッカス・スイス(*Streptococcus suis*)細菌に由来するバクテリオファージ溶解素に関する。これらの溶解素ポリペプチドは、ブドウ球菌、B群レンサ球菌、腸球菌及びリステリア細菌株等のグラム陽性細菌を含む複数の細菌に対して広範な死滅活性を示す。

【0008】

P l y S s 2 溶解素は、動物モデルにおいてスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)細菌を死滅させ、抗生物質と相乗作用を示し、抗生物質耐性を克服(又は予防)することが可能である。P l y S s 2 は、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(MRSA)及びバンコマイシン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(VRSA)等の抗生物質耐性スタフィロコッカス・アウレウスに対して効果的であることが示されている。

【0009】

治療用タンパク質による炎症性免疫応答の誘発は、望ましくない(6)、(8)。タンパク質の免疫原性が、合成起源に由来するか又は生物学的(例えば、組み換え)起源に由来するかに関わらず、外因性タンパク質及びペプチドについて懸念される可能性がある。場合によっては、治療用タンパク質は、重度の有害事象(例えば、貧血、血小板減少症、アナフィラキシー及び先天性免疫応答)を引き起こし、これが更に致命的となる場合もある。よく知られている例としては、トロンボポエチンで治療した患者における血小板減少症、及び機能的に冗長でない内因性EPOと交差反応する中和抗体の誘導による、認可済みのエリトロポエチン(EPO)製剤であるEPREX(商標)で治療した慢性腎疾患患者における赤芽球癆が挙げられる。モノクローナル抗体、トロンボキナーゼ及びPULM

10

20

30

40

50

O Z Y M E（商標）（ドルナーゼアルファ）を含む様々な製品で免疫原性が報告されているため、免疫原性は規制機関、業界及び臨床医による大きな注目を集め続けている。かかる免疫応答は、潜在的な細菌感染のために既に炎症応答を起こしている患者において悪化する可能性がある。

【0010】

P l y S s 2等の溶解素は、タンパク質であるため、宿主に投与した場合に免疫応答を引き起こす可能性がある。上で論考される重大な副作用を引き起こすことに加えて、かかる免疫応答は、溶解素の溶菌活性を低下させる可能性もある。実際に、C p l - 1等の他のタイプの溶解素による幾つかの免疫応答が動物において観察されており、これは溶菌活性の遅延を引き起こしたが、実質的には阻害しなかった。しかしながら、他の研究者により、C p l - 1の投与が炎症性サイトカイン分泌の大幅な増加を伴うことが観察された（9）。

10

【0011】

コンピューターによる計算ガイドツールがタンパク質のエピトープ領域の特定を容易にし、免疫原性である傾向がより低い変異体を設計するために開発されている（11）～（18）。かかる手法は有用であり得るが、幾つかの制約を有する。これらの制約には、例えば幾つかの推定T細胞エピトープを除外する可能性がある抗原プロセッシング、T細胞受容体の多形性及び三次元複雑性のためにコンピューターによる方法を用いてT細胞受容体親和性を予測することができないこと、T細胞エピトープ表現型を予測することができないこと、個々の患者及び翻訳後因子の影響を考慮して患者集団を用いて考案される統計的手法の適用性の限界、並びにコンピューターによる手法及びその根底にある前提の固有の限界が含まれ得る（8）。したがって、ペプチドの免疫原性を低下させるには試行錯誤及び不確実性が残る。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】米国特許第5, 985, 271号

【特許文献2】米国特許第6, 017, 528号

【特許文献3】米国特許第6, 056, 955号

【特許文献4】米国特許第6, 248, 324号

【特許文献5】米国特許第6, 254, 866号

【特許文献6】米国特許第6, 264, 945号

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

このため、所望の抗菌活性を保持するが、低下した免疫原性を有する修飾P l y S s 2溶解素等の修飾溶解素の発見が有益である。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本願は、対応する野生型P l y S s 2溶解素に対して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する一方で抗菌活性及び有効性を保つ修飾溶解素ポリペプチドを開示する。通例、修飾溶解素ポリペプチドは、対応する野生型P l y S s 2溶解素と比較して低下した免疫原性も有する。野生型P l y S s 2溶解素は、P l y S s 2ポリペプチドの酵素活性ドメイン（E A D）であるシステイン、ヒスチジン依存性アミドヒドロラーゼ／ペプチダーゼ（C H A P）エンドペプチダーゼドメインと、C末端S H 3 b _ 5（S H 3 b）細胞壁結合ドメイン（C B D）とを有する。或る特定の態様では、修飾溶解素ポリペプチドは、C H A P中の少なくとも1つのアミノ酸置換及び／又はS H 3 b中の1つ以上のアミノ酸置換を含む。

40

【0015】

1つの態様では、本開示は、配列番号1のアミノ酸配列、システイン、ヒスチジン依存

50

性アミドヒドロラーゼ／ペプチダーゼ（CHAP）ドメイン及び細胞壁結合（SH3b）ドメインを有する野生型 PlySs2 溶解素ポリペプチドと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む修飾溶解素ポリペプチドであって、前記少なくとも1つのアミノ酸置換が前記CHAPドメイン及び／又は前記SH3bドメイン中にあり、該修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる、修飾溶解素ポリペプチドに関する。通例、修飾溶解素ポリペプチドは、野生型 PlySs2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施の形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、CHAPドメイン中にある。或る特定の実施の形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、SH3bドメイン中にある。或る特定の実施の形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換は、CHAPドメイン及びSH3bドメイン中にある。

10

【0016】

或る特定の実施の形態では、少なくとも1つの置換は、CHAPドメイン中の配列番号1のアミノ酸残基35、92、104、128及び137から選択される少なくとも1つの位置にある。或る特定の実施の形態では、少なくとも1つの置換は、SH3bドメイン中の配列番号1のアミノ酸残基164、184、195、198、204、206、212及び214から選択される少なくとも1つの位置にある。或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、CHAPドメイン中の配列番号1のアミノ酸35、92、104、128及び137から選択される少なくとも1つの位置に少なくとも1つの置換を有し、SH3bドメイン中の配列番号1のアミノ酸164、184、195、198、204、206、212及び214から選択される少なくとも1つの位置に少なくとも1つの置換を有する。

20

【0017】

幾つかの実施の形態では、CHAPドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸置換は、R35E、L92W、V104S、V128T及びY137Sからなる群から選択される。或る特定の実施の形態では、SH3bドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸置換は、Y164N、Y164K、N184D、R195E、S198H、S198Q、V204K、V204A、I206E、V212A、V212E及びV214Gからなる群から選択される。

30

【0018】

或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、R35E、L92W、V104S、V128T及びY137Sからなる群から選択される前記CHAPドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸置換と、Y164N、Y164K、N184D、R195E、S198H、S198Q、V204K、V204A、I206E、V212A、V212E及びV214Gからなる群から選択される前記SH3bドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸置換とを有する。

【0019】

また他の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、CHAPドメイン中に少なくとも2つのアミノ酸置換を有する。更に他の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、SH3bドメイン中に少なくとも2つのアミノ酸置換を有する。他の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、SH3bドメイン中に少なくとも3つのアミノ酸置換を有する。また他の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、CHAPドメインとSH3bドメインとの間に分散した5つ、6つ、7つ又は8つのアミノ酸置換を有し、或る特定の実施の形態では、配列番号1のアミノ酸配列は、R35E、L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164N、Y164K、N184D、R195E、S198H、S198Q、V204K、V204A、I206E、V212E、V212A及びV214Gからなる群から選択される3つ～9つのアミノ酸置換によって修飾される。

40

【0020】

或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を有する：（i）L92W、V104S、V128T及びY1

50

37S (pp 55)、(ii) Y164N、N184D、R195E、V204K及びV212E (pp 388)、(iii) L92W、V104S、V128T、Y137S、S198H及びI206E (pp 61)、(iv) L92W、V104S、V128T、Y137S、S198Q、V204A及びV212A (pp 65)、(v) L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164K、N184D及びS198Q (pp 296)、(vi) V128T、Y137S及びY164K (pp 616)、(vii) R35E、L92W、V104S、V128T及びY137S (pp 400)、(viii) L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164K、V204K及びV212E (pp 628)、(ix) L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164K、N184D、S198Q、V204K及びV212E (pp 632)、(x) L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164N及びN184D (pp 324)、(xi) L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164N及びR195E (pp 325)、(xii) L92W、V104S、V128T、Y137S、N184D、V204A及びV212A (pp 341)、(xiii) L92W、V104S、V128T、Y137S及びY164K (pp 619)、(xiv) L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164K、I206E及びV214G (pp 642)、並びに(xv) L92W、V104S、V128T、Y137S、N184D及びS198H (pp 338)。或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号3～17の1つから選択されるアミノ酸配列を有する。

10

【0021】

20

或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を有する：L92W、V104S、V128T及びY137S。或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を有する：L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164K、N184D及びS198Q (pp 296)。

【0022】

本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドの活性フラグメントであって、CHAPドメイン及び／又はSH3bドメイン中に1つ以上のアミノ酸置換を含む、活性フラグメントも開示される。

【0023】

30

本明細書に開示される修飾PlySs2 CHAPドメインと、別の溶解素の結合ドメイン又は別の溶解素の触媒ドメインと、本明細書に開示される修飾PlySs2 SH3bドメインとを含むキメラ溶解素も開示される。

【0024】

幾つかの実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、スタフィロコッカス・アウレウス、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、コアグラエゼ陰性ブドウ球菌 (限定されるものではないが、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*) 群、スタフィロコッカス・サブロフィティカス (*Staphylococcus saprophyticus*) 群、スタフィロコッカス・シミュランス (*Staphylococcus simulans*) 群、スタフィロコッカス・インターメディウス (*Staphylococcus intermedius*) 群、スタフィロコッカス・シウリ (*Staphylococcus sciuri*) 群、スタフィロコッカス・ヒイカス (*Staphylococcus hyicus*) 群からの少なくとも40の認定種、並びに「不特定種群」と称される任意の分離株を含む)、ストレプトコッカス・スイス、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・アガラクティアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス・ディスガラクティアエ (*Streptococcus dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)、緑色レンサ球菌群に含まれる任意の付加的な種 (ストレプトコッカス・アンギノーサス群、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus mitis*) 群、ストレプトコッカス・サングイニス (*Streptococcus sanguinis*) 群、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*) (現ガロリティカス (*gallolyticus*)) 群、ストレプトコッカス・サリバリウス (St

40

50

reptococcus salivarius) 群及びストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans) 群に含まれる全ての種及び株を含むが、これらに限定されない)、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 及びエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) の1つ以上に対して野生型 Ply S s 2 溶解素 (配列番号1) の約2倍以下の最小阻止濃度 (MIC)、又は約3倍～約5倍、例えば約3倍以下、約4倍以下又は約5倍以下のMICを有する。或る特定の実施の形態では、MICは、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス・ピオゲネス、リステリア・モノサイトゲネス及びストレプトコッカス・アガラクティアエの1つ以上に対して野生型 Ply S s 2 溶解素 (配列番号1) の約2倍以下、約3倍以下、約4倍以下又は約5倍以下である。

【0025】

10

幾つかの実施の形態では、本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドは、野生型 Ply S s 2 溶解素 (配列番号1) と比較して免疫原性を低下させ、及び／又は炎症応答関連毒性を低下させる。本開示の或る特定の実施の形態では、グラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖の阻害、その菌数の減少、又はその死滅は、MIC及び／又は最小バイオフィルム根絶濃度 (MBEC) として *in vitro* で評定される。

【0026】

別の態様は、許容可能な担体と本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドとを含む組成物に関する。或る特定の実施の形態では、組成物は医薬組成物であり、担体は薬学的に許容可能な担体である。

【0027】

20

本明細書に開示の組成物の特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドの量は、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス又はバンコマイシン耐性スタフィロコッカス・アウレウス等のグラム陽性細菌の1つ以上の種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させるのに効果的である。或る特定の実施の形態では、組成物は溶液、懸濁液、エマルジョン、吸入用粉末、エアロゾル又はスプレーである。或る特定の実施の形態では、組成物は、グラム陽性細菌感染の治療に適した1つ以上の抗生物質を更に含む。

【0028】

また別の態様では、本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドをコードする核酸分子が提供される。

30

【0029】

別の態様は、本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクターに関する。幾つかの実施の形態では、ベクターは、プラスミドである。幾つかの実施の形態では、核酸分子は、異種プロモーターに操作可能に連結する。

【0030】

別の態様では、グラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる方法であって、グラム陽性細菌の少なくとも1つの種と、抗菌有効量の本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドを含む組成物とを接触させることを含む、方法が提供される。

【0031】

40

更に別の態様では、グラム陽性細菌の少なくとも1つの種によって引き起こされる細菌感染を予防又は治療する方法であって、細菌感染と診断された、そのリスクがある又はその症状を示す被験体に、(1) 第1の量の本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチド、及び(2) 第2の量のグラム陽性細菌感染の治療に適した抗生物質を同時投与することを含む、方法が提供される。

【0032】

幾つかの方法の実施の形態では、抗生物質はメチシリン、バンコマイシン、ダプトマイシン、ムピロシン及びリソスタフィンの1つ以上である。或る特定の実施の形態では、抗生物質はメチシリン、バンコマイシン及びダプトマイシンの1つ以上である。

【0033】

50

幾つかの実施の形態では、上述の方法に使用される修飾溶解素ポリペプチドの量は、抗生物質の非存在下で使用される場合の修飾溶解素ポリペプチドのMICに等しい濃度をもたらす量を下回り得る（すなわち、「MIC以下の溶解素量」）。代替的又は付加的には、上述の方法に使用される抗生物質の量は、修飾溶解素ポリペプチドの非存在下で使用される場合の抗生物質のMICに等しい濃度に相当する、すなわち、それをもたらす量を下回り得る（すなわち、「MIC以下の抗生物質量」）。

【0034】

更に別の態様では、グラム陽性細菌感染の治療に適した抗生物質の有効性を高める方法であって、抗生物質を本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドと組み合わせて同時投与することを含み、同時投与が、グラム陽性細菌の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる上で、抗生物質又は修飾溶解素ポリペプチドのいずれか個別の投与よりも効果的である、方法が提供される。或る特定の実施の形態では、抗生物質はメチシリン、バンコマイシン、ダプトマイシン、ムピロシン及びリソスタフィンからなる群から選択される。

10

【0035】

別の態様では、修飾溶解素ポリペプチドと抗生物質とを含む組合せが提供される。或る特定の実施の形態では、組合せで効果的な修飾溶解素ポリペプチド、抗生物質又はその両方の最少量は、修飾溶解素ポリペプチド及び／又は抗生物質のそれぞれのMIC量を下回る。幾つかの実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチド及び抗生物質は、同じ組成物中で提供され、或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチド及び抗生物質は、異なる組成物中で提供される。

20

【0036】

幾つかの実施の形態では、表面上のブドウ球菌又はレンサ球菌細菌を含有するバイオフィルムを予防、破壊、消散又は処理する方法であって、表面に有効量の本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドを単独で又は抗生物質と組み合わせて送達することを含み、バイオフィルムが効果的に予防、破壊、消散又は処理される、方法が提供される。或る特定の実施の形態では、表面は、医療器具の表面である。更に他の実施の形態では、医療器具は、限定されるものではないが、血液又は他の体液を含むヒトの身体内で又はヒトの身体と接触して使用される。かかる器具の非限定的な例としては、吸入器、挿管具、弁、カテーテル、人工肛門装置又は他の人工装具が挙げられる。

30

【0037】

或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドの活性、例えばグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させるペプチドの能力は、例えばMIC及び／又は最小バイオフィルム根絶濃度(MBEC)として*in vitro*で評定することができる。或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドの活性は、例えばマウス好中球減少性大腿感染(MNTI)モデルによって*in vivo*で評定することができる。更なる実施の形態では、本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドとグラム陽性感染の治療に適した抗生物質、例えばメチシリン、バンコマイシン、ダプトマイシン、ムピロシン及びリソスタフィンの1つ以上との相乗活性は、チェッカーボードアッセイを用いて評定することができる。

40

【0038】

幾つかの或る特定の実施の形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、野生型PlySs2溶解素と同等の抗生物質耐性プロファイルを示し得る。したがって、抗生物質と、抗生物質に対する耐性の発現を回避する、低減する又は遅らせるのに効果的な量の本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドとを同時投与することを含む、ブドウ球菌又はレンサ球菌感染の治療に適した抗生物質に対する耐性の発現を阻害する方法が提供される。

【0039】

更なる実施の形態では、抗生物質耐性プロファイルは、連続継代耐性単独、又は例えばメチシリン、バンコマイシン、ダプトマイシン、ムピロシン及びリソスタフィン等の抗生物質と組み合わせた連続継代によって評定される。

50

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】実施例3に記載される修飾溶解素ポリペプチドpp53、pp55、pp61、pp65及びpp296、並びに対照である野生型Pl y S s 2溶解素タンパク質pp1149（GMPグレードまで精製した）の精製プロセスの最終工程においてサイズ排除カラムから溶出した画分のSDS-PAGEゲルを示す図である。描かれた円に含まれる画分を、この最終精製工程でプールした。

【図2】実施例7に記載されるマウス好中球減少性大腿感染*in vivo*モデルにおける野生型Pl y S s 2溶解素（CF-301と表す）及び対照の野生型Pl y S s 2ポリペプチドpp1149、並びに修飾溶解素ポリペプチドpp55、pp61、pp65及びpp296の殺菌有効性の用量応答プロットである。細菌負荷（処理した大腿1g当たりのコロニー形成単位）を、投与した溶解素の用量（mg/kg）に対してプロットする。

【図3A-3C】実施例6に記載されるような21日間又は26日間の継代にわたる各々の指定の作用物質についての経時的なMICの倍率変化を示す一連の連続継代耐性アッセイの結果を示す図である。図3Aでは、MICの倍率変化（MICの増加として測定される）を、pp296で処理した3つの独立した系統（「pp296-1」、「pp296-2」及び「pp296-3」と表す）、及び野生型Pl y S s 2溶解素（CF-301と表す）又はリソスタフィン（LSP）のいずれかで処理した単一系統について示す。図3Bでは、ダプトマイシン（DAP）のMICの倍率増加を、一定のMIC以下の量（ $1/16 \times \text{MIC}$ ）のpp296と組み合わせたDAP（「DAP+pp296-1」、「DAP+pp296-2」及び「DAP+pp296-3」と表す）及びDAP単独で処理した3つの独立した系統について示す。図3Cでは、バンコマイシン（VAN）のMICの倍率増加を、一定のMIC以下の量（ $1/8 \times \text{MIC}$ ）のpp296と組み合わせたVAN（「VAN+pp296-1」、「VAN+pp296-2」及び「VAN+pp296-3」と表す）及びVAN単独で処理した3つの独立した系統について示す。

【発明を実施するための形態】

【0041】

定義

本明細書で使用される場合、以下の用語及びその同語源語は、文脈上そうでないことが明示されない限り、下記の意味を有するものとする。

【0042】

「担体」は、活性化合物と共に投与される溶媒、添加剤、賦形剤、分散媒、可溶化剤、コーティング剤、保存料、等張剤及び吸収遅延剤（absorption delaying agent）、界面活性剤、噴射剤、希釈剤、ビヒクル等を指す。かかる担体は、滅菌液、例えば水、生理食塩水、デキストロース水溶液、グリセロール水溶液、及び石油、動物、植物又は合成起源のものを含む油、例えばラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等であり得る。

【0043】

「薬学的に許容可能な担体」は、生理学的に適合するあらゆる溶媒、添加剤、賦形剤、分散媒、可溶化剤、コーティング剤、保存料、等張剤及び吸収遅延剤、界面活性剤、噴射剤、希釈剤、ビヒクル等を指す。担体（複数の場合もある）は、薬剤中で通常使用される量で治療対象の被験体に有害でないという意味で「許容可能」でなくてはならない。薬学的に許容可能な担体は、組成物をその意図される目的に不適なものにすることなく組成物の他の成分に適合する。さらに、薬学的に許容可能な担体は、過度の有害な副作用（毒性、刺激及びアレルギー応答等）なしに本明細書に提示される被験体への使用に適している。副作用は、それらのリスクが組成物によってもたらされる利益を上回る場合に「過度」である。薬学的に許容可能な担体又は賦形剤の非限定的な例としては、任意の標準的な医薬担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水、水、並びに油/水エマルジョン及びマイクロエマルジョン等のエマルジョンが挙げられる。好適な医薬担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences by E.W. Martin, 18th Editionに記載されている。

【0044】

「殺菌」は、細菌の初期集団において18時間～24時間にわたって少なくとも3 log 10 (99.9%)以上の減少の程度まで細菌の死滅を引き起こす特性を有するか、又は細菌を死滅させることが可能であることを指す。

【0045】

「静菌」は従来、細菌細胞の増殖を阻害し、それにより細菌の初期集団において18時間～24時間にわたって2 log 10 (99%)以上かつ最大3 log 弱の減少を引き起こすことを含む、細菌増殖を阻害する特性を有することを指す。

【0046】

「抗菌剤」は、静菌剤及び殺菌剤の両方を指す。

10

【0047】

「抗生物質」は、細菌に致死性又は増殖の低減等の負の影響を与える特性を有する化合物を指す。抗生物質は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌又はその両方に負の影響を与えることができる。例としては、抗生物質は、細胞壁ペプチドグリカンの生合成、細胞膜の完全性、又は細菌におけるDNA若しくはタンパク質の合成に影響を及ぼし得る。グラム陽性細菌に対して活性の抗生物質の非限定的な例としては、メチシリン、バンコマイシン、ダプトマイシン、ムピロシン、リソスタフィン、ペニシリン、クロキサシリン、エリスロマイシン、カルバペネム、セファロスポリン、グリコペプチド、リンコサミド、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ロキシスロマイシン、テリスロマイシン、スピラマイシン、及びフィダキソマイシンが挙げられる。

20

【0048】

「薬物耐性」は、概して薬物の抗菌活性に耐性を示す細菌を指す。或る特定の方法で利用される場合、薬物耐性は、特に抗生物質耐性を指し得る。場合によっては、一般に特定の抗生物質の影響を受けやすい細菌は、抗生物質に対する耐性を発現し、それにより薬物耐性微生物又は株となる可能性がある。「多剤耐性」(「MDR」)病原体は、各々が単剤療法として使用される少なくとも2つのクラスの抗微生物薬に対する耐性を発現した病原体である。例えば、スタフィロコッカス・アウレウス (*S. aureus*) の或る特定の株は、メチシリン及び／又はバンコマイシンを含む幾つかの抗生物質に耐性を示すことが見出されている (Antibiotic Resistant Threats in the United States, 2013, U.S. Department of Health and Services, Centers for Disease Control and Prevention)。当業者は、薬物又は抗生物質に対する細菌の感受性又は耐性を決定する日常的な実験技術を用いて、細菌が薬物耐性であるかを容易に決定することができる。

30

【0049】

「有効量」は、適切な頻度又は投与計画で適用又は投与した場合に、細菌増殖若しくは細菌負荷を予防、低減、阻害若しくは解消するか、又は治療される障害(例えば細菌病原体の増殖又は感染)の発症、重症度、期間若しくは進行を予防、低減若しくは改善するか、治療される障害の進展を予防するか、治療される障害の退行を引き起こすか、又は抗生物質若しくは静菌療法等の別の療法の予防効果若しくは治療効果(複数の場合もある)を高める若しくは改善するのに十分な量を指す。

【0050】

40

「同時投与する」は、順次的な2種類の薬剤、例えば溶解素ペプチド及び抗生物質又は任意の他の抗菌剤の別々の投与、並びに実質的に同時の、例えば単一の混合物／組成物中での、又は別個に与えられるが、それでも実質的に同時に、例えば同日又は24時間中に異なる時点で被験体に投与される用量でのこれらの作用物質の投与を包含することを意図する。このような溶解素ペプチドと1つ以上の付加的な抗菌剤との同時投与は、最大数日、数週間又は数ヶ月続く継続的な治療として行うことができる。さらに、用途に応じて、同時投与は、継続的又は同延的 (coextensive) である必要はない。例えば、用途が局所抗菌剤として、例えば細菌性潰瘍又は感染した糖尿病性潰瘍を治療することがであった場合、溶解素ポリペプチドを初めのみ、最初の抗生物質の使用の24時間以内に投与することができ、その後、抗生物質の使用を溶解素ポリペプチドの更なる投与なしに継続しても

50

よい。

【0051】

「被験体」は、哺乳動物、植物、下等動物、単細胞生物又は細胞培養物を指す。例えば、「被験体」という用語は、細菌感染、例えばグラム陽性細菌又はグラム陰性細菌感染の影響を受けやすい又はそれを患う生物、例えば原核生物及び真核生物を含むことを意図する。被験体の例としては、哺乳動物、例えばヒト、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、マウス、ウサギ、ラット及びトランスジェニック非ヒト動物が挙げられる。或る特定の実施形態では、被験体はヒト、例えばかかる感染が全身性であるか、局所性であるか、又は別の形で特定の器官若しくは組織に集中若しくは限局しているかに関わらず、グラム陽性細菌による感染を患う、それを患うリスクがある又はその影響を受けやすいヒトである。

10

【0052】

「ポリペプチド」は、「タンパク質」、「ペプチド」という用語と区別なく使用され、アミノ酸残基からなるポリマーを指す。或る特定の実施形態では、ポリペプチドは、少なくとも約30個のアミノ酸残基を有する。この用語は、単離形態のポリペプチドだけでなく、その活性フラグメント及び誘導体も含み得る。「ポリペプチド」という用語は、本明細書に記載の修飾溶解素ポリペプチドを含み、溶解素機能を維持する融合タンパク質又は融合ポリペプチドも包含する。文脈に応じて、ポリペプチドは、自然発生ポリペプチド、又は組換え、改変若しくは合成的に作製されたポリペプチドであり得る。特定の溶解素ポリペプチドは、例えば、酵素的若しくは化学的切断によって天然タンパク質から得るか若しくは取り出しても、又は従来 of ペプチド合成法（例えば、固相合成）若しくは分子生物学的手法（例えば、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に開示されるもの）を用いて調製しても、又は戦略的に切断若しくはセグメント化して、同じ若しくは少なくとも1つの一般的な標的細菌に対する溶菌活性を維持する活性フラグメントを得てもよい。

20

【0053】

「融合ポリペプチド」は、通例、異なる特性又は機能性を有する2つ以上のドメイン又はセグメントを有する融合発現産物を生じる、2つ以上の核酸セグメントの融合から得られる発現産物を指す。或る特定の実施形態では、「融合ポリペプチド」という用語は、直接、又はアミノ酸若しくはペプチドリンカーを介して共有結合的に連結した2つ以上の異種ポリペプチド又はペプチドを含むポリペプチド又はペプチドも指す。融合ポリペプチドを形成するポリペプチドは通例、C末端からN末端に連結されるが、C末端からC末端、N末端からN末端又はN末端からC末端に連結されてもよい。「融合ポリペプチド」という用語は、「融合タンパク質」という用語と区別なく使用される場合もある。このため、或る特定の構造「を含むポリペプチド」というオープンエンドの表現は、融合ポリペプチド又は構築物等の列挙される構造よりも大きい分子を含む。本明細書で言及される構築物は、融合ポリペプチド又はコンジュゲート（2つ以上の部分を連結することによる）として作製され得る。

30

【0054】

「異種」は、天然では隣接しないヌクレオチド、ペプチド又はポリペプチドの配列を指す。例えば、本開示との関連で、「異種」という用語は、融合ペプチド又はポリペプチドが通常は天然に見られない2つ以上のペプチド及び／又はポリペプチドの組合せ又は融合、例えば増強した溶菌活性を有し得る、修飾溶解素ポリペプチド、並びにカチオン性及び／又はポリカチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、s u s h i ペプチド (Ding et al. Cell Mol Life Sci., 65(7-8):1202-19 (2008))、ディフェンシンペプチド (Ganz, T. Nature Reviews Immunology 3, 710-720 (2003))、疎水性ペプチド及び／又は抗微生物ペプチドを記載するために使用することができる。2つ以上の溶解素ポリペプチド又はその活性フラグメントがこの定義に含まれる。これらを用いて溶菌活性を有する融合ポリペプチドを作製することができる。

40

【0055】

50

「活性フラグメント」は、フラグメントが得られた単離ポリペプチドの1つ以上の機能又は生物活性を保持するポリペプチドの部分を目指す。本明細書で使用される場合、修飾溶解素ポリペプチドの活性フラグメントは、スタフィロコッカス・アウレウス等の少なくとも1つのグラム陽性細菌種の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。

【0056】

「両親媒性ペプチド」は、親水性官能基及び疎水性官能基の両方を有するペプチドを指す。或る特定の実施形態では、二次構造により疎水性及び親水性アミノ酸残基が両親媒性ペプチドの反対側（例えば、ペプチドが水等の溶媒中にある場合、内側対外側）に置かれる。これらのペプチドは、或る特定の実施形態では、 α ヘリックス二次構造等のヘリックス二次構造を取ることができる。

10

【0057】

「カチオン性ペプチド」は、正に帯電したアミノ酸残基を高い割合で有するペプチドを指す。或る特定の実施形態では、カチオン性ペプチドは、8.0以上のpKa値を有するのが好ましい。本開示との関連での「カチオン性ペプチド」という用語は、主に正に帯電したアミノ酸残基、例えばリシン及び／又はアルギニン残基で構成される、合成的に作製されたペプチドであるポリカチオン性ペプチドも包含する。正に帯電していないアミノ酸残基は、中性に帯電したアミノ酸残基、負に帯電したアミノ酸残基、及び／又は疎水性アミノ酸残基であり得る。

【0058】

20

「疎水性基」は、水分子に対する親和性が低いか又は親和性を有しないが、油分子に対してより高い親和性を有するアミノ酸側鎖等の化学基を指す。疎水性物質は、水又は水相への溶解性が低いか又は溶解性を有しない傾向があり、通例非極性であるが、油相への溶解性がより高い傾向がある。疎水性アミノ酸の例としては、グリシン（Gly）、アラニン（Ala）、バリン（Val）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、プロリン（Pro）、フェニルアラニン（Phe）、メチオニン（Met）及びトリプトファン（Trp）が挙げられる。

【0059】

「高める（Augmenting）」は、本明細書で使用される場合、そうでない場合よりも高い抗微生物活性等の作用物質の活性の程度を指す。「高める」は、相加的效果及び相乗（超相加的（superadditive））効果を包含する。

30

【0060】

「相乗的」又は「超相加的」は、独立して働く2つの作用物質の効果の総和を超える、組合せでの2つの物質によってもたらされる有益な効果を指す。或る特定の実施形態では、相乗又は超相加的效果は、独立して働く2つの作用物質の効果の総和を有意に、すなわち統計的に有意に超える。一方又は両方の活性成分を閾値下レベル、すなわち活性物質が個別に用いられる場合に効果を生じないか、又は非常に限られた効果しか生じないレベルで用いることができる。効果は、本明細書に記載されるチェッカーボードアッセイ等のアッセイによって測定することができる。

【0061】

40

「治療」は、ヒトを含む被験体が、直接的又は間接的に、障害を治癒するか、又は病原体を根絶するか、又は被験体の状態を改善する目的で医療を受ける任意のプロセス、行為、適用、療法等を指す。治療は、発生率の低減、若しくは症状の軽減、再発の解消、再発の予防、発生の予防、若しくは発生リスクの低減、症状の改善、予後の改善、又はそれらの組合せも指す。「治療」は、被験体における細菌の集団、増殖速度又は病原性を低減することで、被験体における細菌感染、又は器官、組織若しくは環境の細菌汚染を制御又は低減することを更に包含し得る。このため、発生率を低減する「治療」は、被験体であるか又は環境であるかを問わず、特定のミリュー（milieu）での少なくとも1つのグラム陽性細菌の増殖を阻害するのに効果的である。一方、既に確立された感染の「治療」は、感染又は汚染の原因となるグラム陽性細菌の菌数を減少させるか、それを死滅させるか、そ

50

の増殖を阻害するか、及び／又はそれを根絶することを指す。

【0062】

「予防する」という用語は、細菌感染等の障害の発生、再発、拡大、発症又は確立の予防を含む。本開示が感染の完全な予防又は感染の確立の予防に限定されることは意図されない。幾つかの実施形態では、発症を遅らせるか、又は続いて発症した（contracted）疾患の重症度若しくはその発症の可能性を低減することが予防例を構成する。特にバイオフィルムの予防に関して、この用語は、例えば対象の表面、例えば医療器具（例えば、吸入器、カテーテル、挿管具、弁又は他の人工器官）の表面への細菌の付着を妨げることによるバイオフィルムの形成の予防を含む。

【0063】

「発症した疾患」は、発熱、敗血症又は菌血症の検出等の臨床症状又は不顕性（subclinical）症状が現れた疾患、並びにかかる病理と関連する症状が未だ現れていない場合の細菌病原体の増殖（例えば、培養物中での）によって検出され得る疾患を指す。特に、医療器具に関して、発症した疾患は、ブドウ球菌又はレンサ球菌細菌等の細菌を含有し、かかる器具の使用時に形成されるバイオフィルムを含むものとする。

【0064】

ペプチド又はポリペプチド（本明細書で述べられるように活性フラグメントを含む）との関連での「誘導体」という用語は、例えば溶菌活性等のポリペプチドの活性に実質的に悪影響を与えない若しくは溶菌活性等のポリペプチドの活性を損なわない、アミノ酸以外の1つ以上の化学的部分を含有するように修飾されたポリペプチドを包含することを意図する。化学的部分は、例えばアミノ末端のアミノ酸残基、カルボキシ末端のアミノ酸残基又は内部アミノ酸残基を介してペプチドに共有結合的に連結することができる。かかる修飾は、天然であっても又は非天然であってもよい。或る特定の実施形態では、非天然修飾は、反応性部分への保護基若しくはキャップ基（capping group）の付加、抗体及び／又は蛍光標識等の検出可能な標識の付加、グリコシル化の付加若しくは修飾、又はPEG（ペグ化）等の嵩高基（bulking group）の付加、並びに当業者に既知の他の変化を含み得る。或る特定の実施形態では、非天然修飾は、N末端アセチル化及びC末端アミド化等のキャップ修飾であり得る。溶解素ポリペプチドに付加することができる、例示的な保護基としては、t-Boc及びFmocが挙げられるが、これらに限定されない。限定されるものではないが、緑色蛍光タンパク質（GFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）及びmCherry等の一般に使用される蛍光標識タンパク質は、細胞タンパク質の正常機能に干渉することなく、溶解素ポリペプチドに共有結合的若しくは非共有結合的に結合するか、又は溶解素ポリペプチドに融合させることができる小型のタンパク質である。或る特定の実施形態では、蛍光タンパク質をコードするポリヌクレオチドが溶解素ポリヌクレオチド配列の上流又は下流に挿入される。これにより、細胞機能又はそれが結合した溶解素ポリペプチドの機能を妨げない融合タンパク質（例えば、溶解素ポリペプチド：：GFP）が生じる。タンパク質へのポリエチレングリコール（PEG）のコンジュゲーションが、多くの医薬タンパク質の循環半減期を延長する方法として使用されている。このため、溶解素ポリペプチド誘導体との関連で、「誘導体」という用語は、1つ以上のPEG分子の共有結合によって化学修飾された溶解素ポリペプチドを包含する。ペグ化溶解素ポリペプチドは、生物活性及び治療活性を保持した上で非ペグ化溶解素ポリペプチドと比較して延長された循環半減期を示すことが予想される。別の例は、in vitro 抗菌活性を改善するために短いポリカチオン性及び両親媒性 α ヘリックスを溶解素ポリペプチドのN末端又はC末端に付加する、例えばin vitro 抗レンサ球菌活性を改善するために短いポリカチオン性及び両親媒性 α ヘリックスをレンサ球菌溶解素のN末端又はC末端に付加する「artillysin」の使用である。

【0065】

「パーセントアミノ酸配列同一性」は、最大のパーセント配列同一性を達成するように配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入した後に、任意の保存的置換を配

10

20

30

40

50

列同一性の一部とみなさない、参照ポリペプチド配列、例えば溶解素ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一の候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージを指す。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的でのアラインメントは、当業者の能力の範囲内の様々な方法で、例えばBLAST等の公開されているソフトウェア、又は例えばDNASTARにより市販されているソフトウェアを用いて達成することができる。2つ以上のポリペプチド配列は、0%～100%の間のいずれか、又はその間の任意の整数値で同一であり得る。本開示との関連で、2つのポリペプチドは、アミノ酸残基の少なくとも80%（好ましくは少なくとも約85%、少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%、少なくとも約98%又は少なくとも約99%）が同一である場合に「実質的に同一」である。本明細書に記載される「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」という用語は、ペプチドにも当てはまる。このため、「実質的に同一」という用語は、本明細書に記載されるもの等の単離ポリペプチド及びペプチドの突然変異型、切断型、融合型、又は別の形で配列が修飾された変異体、及びその活性フラグメント、並びに参照（野生型又は他の無傷）ポリペプチドと比較して相当の配列同一性（例えば1つ以上の上記の方法によって測定される、例えば少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%の同一性、少なくとも98%の同一性、又は少なくとも99%の同一性）を有するポリペプチドを包含する。2つのアミノ酸配列は、アミノ酸残基の少なくとも約80%（好ましくは少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%の同一性、又は少なくとも約99%の同一性）が同一であるか、又は保存的置換を示す場合に「実質的に相同」である。本開示のポリペプチドの配列は、ポリペプチド、例えば本明細書に記載の溶解素及び／又は融合ポリペプチドのアミノ酸の1つ以上、又は幾つか、又は最大10%、又は最大15%、又は最大20%が同様の又は保存的アミノ酸置換で置換され、得られるポリペプチド、例えば本明細書に記載の溶解素及び／又は融合ポリペプチドが、参照ポリペプチド、例えば本明細書に記載の溶解素及び／又は融合ポリペプチドの少なくとも1つの活性、抗菌効果及び／又は細菌特異性を有する場合に実質的に相同である。

【0066】

本明細書で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換である。同様の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で規定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。

【0067】

「吸入用組成物」は、日常呼吸又は補助呼吸（例えば、気管気管支内（intratracheobronchial）投与、経肺投与及び／又は経鼻投与による）時の、又はそれと同時の気道への直接送達のために配合されている本開示の医薬組成物を指し、霧化、噴霧化、乾燥粉末及び／又はエアロゾル化配合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0068】

「バイオフィルム」は、表面に付着し、細菌及び／又は宿主に由来する成分で構成され得る水和したポリマーマトリックス中に凝集した細菌を指す。バイオフィルムは、生物表面又は非生物表面上で細胞が互いに接着した微生物の凝集物である。これらの接着細胞は、限定されるものではないが、細胞外高分子物質（EPS）で構成されるマトリックス中に埋め込まれることが多い。バイオフィルムのEPSは、スライム（スライムと記載されたものの全てがバイオフィルムという訳ではない）又はプラークとも称され、一般に細胞外DNA、タンパク質及び多糖で構成されるポリマー集塊である。或る特定の実施形態では、バイオフィルムは、ブドウ球菌及び／又はレンサ球菌細菌を含有し得る。

【0069】

或る特定の細菌に対する使用に適した抗生物質との関連での「適した、好適な (Suitable)」は、耐性が後に発現する場合であっても、これらの細菌に対して効果的であることが見出された抗生物質を指す。

【0070】

「野生型 Ply S s 2 溶解素」及び「Ply S s 2 溶解素」は、アミノ酸配列：MTTVNEALNNVRAQVGSGVSVGNGE CYALASWYERMISP DATVGLGAGVGVWSGAIGDTISAKNIGSSYNWQANGWTVSTSGPFKAGQIVTLGATPGNPYGHVVIVEAVDGDRLTILEQNYG GKRY PVRNYYSAA SYRQQV VHYITPPGTVAQSA PNL AGSR SYRETGTMTVTVDALNVRRAPNTSGEIVAVYKRGESFDYDTV I I DVNGYVWVS Y I G G S G K R N Y V A T G A T K D G K R F G N A W G T F K (配列番号1；翻訳後プロセシング時に除去され、244アミノ酸ペプチドを残す最初のメチオニン残基を含む245個のアミノ酸残基)を有するポリペプチドを指す。

10

【0071】

「修飾溶解素ポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、野生型 Ply S s 2 溶解素の非自然発生の変異体 (又はその活性フラグメント) を指す。修飾溶解素ポリペプチドは、CHAPドメイン及び/又はSH3ドメイン中に少なくとも1つのアミノ酸置換を有し、スタフィロコッカス・アウレウス等のグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。

20

【0072】

「免疫原性の」又は「免疫原性」は、(例えば、コンピューターによる計算ガイド方法により) 1つ以上のT細胞エпитープの存在を確立することによって免疫原性であるか又は免疫原性を有すると予測されることを意味する。本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドの免疫原性は、TCEスコアを得るための任意の利用可能なコンピューターによる計算ガイド方法を用いてTCEスコアによって測定し、同様に得られた、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型 Ply S s 2 溶解素のTCEスコアと比較することができる。代替的には、本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドの免疫原性は、in vitro T細胞応答によって測定することができる。更に言うと、「より免疫原性が低い」、「低下した免疫原性」等は、1つ以上のT細胞エпитープの枯渇 (アミノ酸の置換えによる除去又は減衰を含む) によって、より免疫原性が低いか若しくは低下した免疫原性を有する (すなわち、参照ポリペプチドと比較してより低いTCEスコアを有する) と予測されるか、又は本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドが、低下したT細胞応答を引き起こすことを意味する。したがって、本明細書で使用される場合、修飾溶解素ポリペプチドが、1) 配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型 Ply S s 2 溶解素よりも低いTCEスコア、又は2) 低下したT細胞応答のいずれかを有する場合、修飾溶解素ポリペプチドは、「より免疫原性が低い」又は「低下した免疫原性」を有する等である。

30

【0073】

「低下したT細胞応答」は、ヒト末梢血単核細胞をフルオレセインイソチオシアネート標識抗サイトカイン抗体に曝露し、応答を測定する、CD8+枯渇ヒト末梢血単核細胞を用いる in vitro T細胞増殖 (³ {H} -チミジン取込み) アッセイによって測定されるように、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型 Ply S s 2 溶解素よりも低いT細胞活性化を誘導することを意味する。

40

【0074】

本開示の修飾溶解素ポリペプチドの溶菌活性 (抗微生物活性) との関連で使用される「実質的に」は、少なくとも野生型 Ply S s 2 溶解素の抗菌活性の相当部分を意味し、かかる活性に基づいて、修飾溶解素ポリペプチドは、単独で又は1つ以上の抗生物質及び/又はリソスタフィン等の他の抗微生物剤と共に、細菌を死滅させることによってブドウ球菌又はレンサ球菌感染を阻害する、それに対抗する又はそれを解消するのに有用である。野生型 Ply S s 2 溶解素と比較して実質的なかかる活性の非限定的な例は、野生型溶解

50

素の約 5 倍以下、例えば約 4 倍以下、約 3 倍以下又は約 2 倍以下の M I C を含む。他の活性の尺度は、例えば最小バイオフィーム除去濃度 (M B E C)、又は例えばマウス好中球減少性大腿感染モデル (M N T I) 等の動物モデルを用いた *i n v i v o* 有効性であり得る。更に他の尺度は、野生型 P l y S s 2 溶解素と同様のバンコマイシン若しくはダプトマイシン等の抗生物質と相乗作用を示す能力、又はバンコマイシン若しくはダプトマイシン等の抗生物質の細菌耐性の発現を改善する、予防する若しくは遅らせる能力であり得る。低下した免疫原性との関連で使用される同じ「実質的に」という用語は、例えば T C E スコアによって測定されるように、野生型 P l y S s 2 溶解素の免疫原性の多くとも 6 5 %、例えば多くとも 5 0 %、多くとも 4 0 %、多くとも 3 0 % 又は多くとも 2 5 % を有することを意味する (1 9) 。

10

【 0 0 7 5 】

修飾溶解素ポリペプチド

一態様では、本開示は、溶菌活性を有し、野生型 P l y S s 2 溶解素と比較して低下した免疫原性を有する修飾溶解素ポリペプチドに関する。本明細書で使用される場合、「溶菌活性」は、細菌を死滅させるか、細菌の菌数を減少させるか、又は細菌増殖を阻害する溶解素の能力を包含する。溶菌活性は、バイオフィームを除去又は低減する能力、及び／又は抗生物質の最小阻止濃度 (M I C) を低下させる能力も包含する。

【 0 0 7 6 】

通例、本修飾溶解素ポリペプチドは、細菌細胞壁の主要な構成成分であるペプチドグリカン进行分解し、細胞溶解をもたらすことが可能である。修飾溶解素ポリペプチドは、野生型 P l y S s 2 溶解素と比較して免疫原性を低下させ、及び／又は炎症応答関連毒性を低下させることが更に可能である。

20

【 0 0 7 7 】

本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドの活性を評定するのに適した方法は、当該技術分野で既知であり、実施例に記載されている。簡潔に述べると、M I C 値 (すなわち、対照と比較して少なくとも 8 0 % の細菌増殖を抑制するのに十分なペプチドの最小濃度) を修飾溶解素ポリペプチドについて決定し、例えば野生型 P l y S s 2 溶解素又は不活性化化合物と比較することができる。例えば、修飾溶解素ポリペプチドの M I C 値を、例えばミューラーヒントンブロス、又はウマ血清等の血清を添加したミューラーヒントンブロス中で、例えば実験室スタフィロコッカス・アウレウス株に対して決定することができる。

30

【 0 0 7 8 】

幾つかの実施形態では、本修飾溶解素ポリペプチドは、バイオフィームを低減することが可能である。修飾溶解素ポリペプチドの最小バイオフィーム根絶濃度 (M B E C) を評定する方法では、修正した微量液体希釈 M I C 法の変法を用いて決定することができる (Ceri et al. 1999. J. Clin Microbial. 37:1771-1776 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす) 及び Schuch et al., 2017, Antimicrob. Agents Chemother. 61, pages 1-18 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす) を参照されたい)。この方法では、細菌、例えばメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (M R S A) 及びメチシリン感受性スタフィロコッカス・アウレウス (M S S A) 等のスタフィロコッカス・アウレウスのコロニーを媒体、例えばリン酸緩衝液 (P B S) に懸濁し、例えば T S B g (0 . 2 % グルコースを添加したトリプシンソイブロス) で 1 0 0 倍希釈し、例えば 0 . 1 5 m l アリコートとして C a l g a r y B i o f i l m D e v i c e (9 6 個のポリカーボネートペグを備える蓋を有する 9 6 ウェルプレート ; Innovotech Inc .) に添加し、例えば 3 7 ° C で 2 4 時間インキュベートする。次いで、バイオフィームを洗浄し、例えば T S B g 中の 2 倍希釈系列の溶解素によって、例えば 3 7 ° C で 2 4 時間処理する。処理後に、ウェルを洗浄し、例えば 3 7 ° C で風乾し、例えば 0 . 0 5 % クリスタルバイオレットで 1 0 分間染色する。染色後に、バイオフィームを、例えば 3 3 % 酢酸で脱染し、例えば抽出されたクリスタルバイオレットの O D _{6 0 0} を決定する。各サンプルの M B E C が、クリスタルバイオレット定量化によって評定される、バイオフィームのバ

40

50

イオマスの 95% 超を除去するのに必要とされる最小溶解素濃度である。

【0079】

幾つかの実施形態では、本修飾溶解素ポリペプチドは、抗生物質の最小阻止濃度 (MIC) を低下させる。MIC を評定する任意の既知の方法を用いることができる。幾つかの実施形態では、チェッカーボードアッセイを用いて、抗生物質濃度に対する溶解素の影響を決定する。チェッカーボードアッセイは、微量液体希釈による MIC 決定のための CLSI の方法の修正に基づく (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), CLSI. 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-10th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす) 及び Ceri et al. 1999. J. Clin. Microbiol. 37: 1771-1776 (同様にその全体が引用することにより本明細書の一部をなす) を参照されたい)。

【0080】

チェッカーボードを、初めに横軸に沿って、例えば各ウェルが同量の 2 倍希釈した抗生物質を含む 96 ウェルポリプロピレンマイクロタイタープレートの列を作成することによって構築する。別のプレートに、縦軸に沿って各ウェルが同量の、例えば 2 倍希釈した溶解素を有する比較用の行を作成する。次いで、各列が一定量の抗生物質及び溶解素の 2 倍希釈物を含み、各行が一定量の溶解素及び抗生物質の 2 倍希釈物を含むように、溶解素及び抗生物質の希釈物を組み合わせる。これにより、各ウェルは、溶解素と抗生物質との独自の組合せを有する。細菌を所与の濃度で薬物の組合せに添加する。次いで、単独及び組合せでの各薬物の MIC を、例えば周囲空気中にて 37 °C で 16 時間の後に記録する。部分阻止濃度の総和 (ΣFIC) を各薬物について算出し、最小の ΣFIC 値 (ΣFIC_{min}) を用いて溶解素／抗生物質の組合せの効果を決定する。

【0081】

本明細書に開示の溶解素ポリペプチドを野生型 Ply Ss2 溶解素から修飾した。Ply Ss2 は、ストレプトコッカス・スイス細菌に由来し得るバクテリオファージ溶解素である。Ply Ss2 は、MRSA 及びバンコマイシン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (VISA) 等の抗生物質耐性スタフィロコッカス・アウレウスを含むブドウ球菌、レンサ球菌、エンテロコッカス及びリステリア細菌株を含むグラム陽性細菌を含む複数の細菌に対して広範な死滅活性を示す。野生型 Ply Ss2 は、以下のアミノ酸配列を有する：

MTTVNEALNNVRAQVGSGVSVGNCECYALASWYERMISPDATVGLGAGVGWVSGAI
GDTISAKNIGSSYNWQANGWTVSTSGPFKAGQIVTLGATPGNPYGHVVIVEAVDGD
LTILEQNYGGKRYPRNYSAASYRQQVVHYITPPGTVAQSAPNLAGSRSYRETGTMT
VTVDALNVRRAPNTSGEIVAVYKRGESFDYDTVIIDVNGYVWVSYIGGSGKRNYYA
TGATKDGKREFGNAWGTFK (配列番号 1)。

配列番号 1 は、翻訳後プロセッシング時に除去され、244 アミノ酸ポリペプチドを残す最初のメチオニン残基を含む 245 個のアミノ酸残基を有する。イタリック体のアミノ酸は、CHAPドメイン (アミノ酸 1 ~ 146) を示し、点線下線は、SH3bドメイン (アミノ酸 157 ~ 245) を示す。2つのドメイン間の自然発生リンカーは、PPGTVAQSAP (配列番号 2) である。

【0082】

本明細書に開示されるように、野生型 Ply Ss2 は、CHAPドメイン及び SH3bドメインの両方を含み、その各々が複数の T細胞エпитープ (TCE) を含む。TCE1、TCE2、TCE3 及び TCE4 は、CHAPドメイン中に位置し、TCE5、TCE6、TCE7 及び TCE8 は、SH3bドメイン中に位置する。TCE1 は、配列番号 1 のアミノ酸残基 32 ~ 45 に対応する。TCE2 は、配列番号 1 のアミノ酸残基 84 ~ 9

8に対応する。T C E 3は、配列番号1のアミノ酸残基100～112に対応する。T C E 4は、配列番号1のアミノ酸残基128～145に対応する。T C E 5は、配列番号1のアミノ酸残基164～170に対応する。T C E 6は、配列番号1のアミノ酸残基172～187に対応する。T C E 7は、配列番号1のアミノ酸残基189～201に対応し、T C E 8は、配列番号1のアミノ酸残基204～221に対応する。

【0083】

或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、野生型P l y S s 2ポリペプチド（配列番号1）と比較して少なくとも1つの置換を含み、少なくとも1つの置換がT C E 1、T C E 2、T C E 3又はT C E 4の1つ以上であり、修飾溶解素ポリペプチド又はそのフラグメントがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、野生型P l y S s 2ポリペプチド（配列番号1）と比較して少なくとも1つの置換を含み、少なくとも1つの置換がT C E 5、T C E 6、T C E 7又はT C E 8の1つ以上であり、修飾溶解素ポリペプチド又はそのフラグメントがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、野生型P l y S s 2ポリペプチド（配列番号1）と比較して少なくとも第1の置換及び少なくとも第2の置換を含み、少なくとも第1の置換がT C E 1、T C E 2、T C E 3又はT C E 4の1つ以上であり、少なくとも第2の置換がT C E 5、T C E 6、T C E 7又はT C E 8の1つ以上であり、修飾溶解素ポリペプチド又はそのフラグメントがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。通例、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型P l y S s 2と比較して低下した免疫原性を有する。

【0084】

或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、野生型P l y S s 2ポリペプチド（配列番号1）と比較して少なくとも2つの置換を含み、少なくとも2つの置換がT C E 4にある。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、野生型P l y S s 2ポリペプチド（配列番号1）と比較して少なくとも4つの置換を含み、少なくとも1つの置換がT C E 2にあり、少なくとも1つの置換がT C E 3にあり、少なくとも2つの置換がT C E 4にある。

【0085】

或る特定の実施形態では、本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列をC H A Pドメイン中のアミノ酸残基35、92、104、128及び137から選択される少なくとも1つの位置でのアミノ酸置換、及び／又はS H 3 bドメイン中のアミノ酸残基164、184、195、198、204、206、212及び214から選択される少なくとも1つの位置でのアミノ酸置換によって修飾することで得ることができる。したがって、或る特定の実施形態では、野生型P l y S s 2ポリペプチド（配列番号1）と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する修飾溶解素ポリペプチドであって、C H A Pドメイン中の配列番号1のアミノ酸残基35、92、104、128及び137から選択される少なくとも1つの位置での少なくとも1つのアミノ酸置換、及び／又はS H 3 bドメイン中の配列番号1のアミノ酸残基164、184、195、198、204、206、212及び214から選択される少なくとも1つの位置での少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、修飾溶解素ポリペプチド又はそのフラグメントがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる、修飾溶解素ポリペプチドが本明細書に開示される。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸残基92、104、128及び137にアミノ酸置換を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸残基92、104、128、137、164、184及び198にアミノ酸置換を含む。通例、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型P l y S s 2と比較して低下した免疫原性を有する。

【0086】

或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、少なくとも3つのアミノ酸置換、例えば少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ又は少なくとも9つのアミノ酸置換を含有し得る。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1に対して3つ～9つのアミノ酸置換、例えば4つ～9つ、5つ～9つ、6つ～9つ、7つ～9つ、8つ～9つ又は9つのアミノ酸置換を含有し得る。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1に対してCHAPドメイン中に少なくとも2つ、例えば少なくとも3つ又は少なくとも4つのアミノ酸置換を含み得る。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1に対してSH3bドメイン中に少なくとも2つ、例えば少なくとも3つ又は少なくとも4つのアミノ酸置換を含み得る。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1に対してCHAPドメイン中の2つ、3つ又は4つのアミノ酸置換からなり得る。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1に対してSH3bドメイン中の2つ、3つ又は4つのアミノ酸置換からなり得る。

10

【0087】

或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1に対して以下のアミノ酸置換の1つ以上を含む：R35E、L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164N、Y164K、N184D、R195E、S198H、S198Q、V204K、V204A、I206E、V212E、V212A及びV214G。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、CHAPドメイン中に位置する以下のアミノ酸置換の1つ以上：R35E、L92W、V104S、V128T及びY137S、及び/又はSH3bドメイン中に位置する以下のアミノ酸置換の1つ以上：Y164N、Y164K、N184D、R195E、S198H、S198Q、V204K、V204A、I206E、V212A、V212E及びV214Gを含み、修飾溶解素ポリペプチド又はそのフラグメントがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。通例、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型Plys2と比較して低下した免疫原性を有する。

20

【0088】

本明細書中の置換は、置き換えられる配列番号1中の元のアミノ酸の一文字アミノ酸コード、続いて配列番号1中のアミノ酸位置、続いて配列中に置換され、修飾溶解素ポリペプチドをもたらすアミノ酸を用いて表される。したがって、例として、R35Eは、配列番号1のアミノ酸番号35のアルギニンがグルタミン酸で置き換えられる置換を示す。

30

【0089】

例示的な修飾溶解素ポリペプチドは、pp55、pp61、pp65、pp296、pp324、pp325、pp341、pp338、pp388、pp400、pp616、pp619、pp628、pp632及びpp642として本明細書に開示される。

【0090】

例示的な修飾溶解素ポリペプチドは、下記表1に示されるような配列番号1のアミノ酸配列に対するアミノ酸置換を含む。

【0091】

40

【表 1】

表 1

No.	置換位置							
	TCE 1	TCE 2	TCE 3	TCE 4	TCE 5	TCE 6	TCE 7	TCE 8
pp55		L92W	V104S	V128T 及び Y137S				
pp61		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S			S198H	I206E
pp65		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S			S198Q	V204A 及び V212A
pp296		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S	Y164K	N184D	S198Q	
pp324		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S	Y164N	N184D		
pp325		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S	Y164N		R195E	
pp341		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S		N184D		V204A 及 び V212A
pp338		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S		N184D	S198H	
pp388					Y164N	N184D	R195E	V204K 及 び V212E
pp400	R35E	L92W	V104S	V128T 及 び Y137S				
pp616				V128T 及 び Y137S	Y164K			
pp619		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S	Y164K			
pp628		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S	Y164K			V204K 及 び V212E
pp632		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S	Y164K	N184D	S198Q	V204K 及 び V212E
pp642		L92W	V104S	V128T 及 び Y137S	Y164K			I206E 及 び V214G

【0092】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは p p 5 5 であり、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T 及び Y 1 3 7 S。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 3 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 3 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 3 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 3 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 3 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する。

【0093】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは p p 6 1 であり、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、S 1 9 8 H 及び I 2 0 6 E。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 4 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する。

10

【0094】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは p p 6 5 であり、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、S 1 9 8 Q、V 2 0 4 A、及び V 2 1 2 A。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する。

20

30

【0095】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは p p 2 9 6 であり、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 K、N 1 8 4 D、及び S 1 9 8 Q。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する。

40

【0096】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは p p 3 2 4 であり、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4

50

S、V128T、Y137S、Y164K、及びN184D。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号7と少なくとも80%の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型Ply Ss2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号7と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号7と少なくとも95%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号7と少なくとも98%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号7と少なくとも99%の配列同一性を有する。

10

【0097】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドはpp325であり、配列番号1のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164N、及びR195E。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号8と少なくとも80%の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型Ply Ss2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号8と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号8と少なくとも95%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号8と少なくとも98%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号8と少なくとも99%の配列同一性を有する。

20

【0098】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドはpp381であり、配列番号1のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L92W、V104S、V128T、Y137S、N184D、及びS198H。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号9と少なくとも80%の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型Ply Ss2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号9と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号9と少なくとも95%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号9と少なくとも98%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号9と少なくとも99%の配列同一性を有する。

30

40

【0099】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドはpp341であり、配列番号1のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L92W、V104S、V128T、Y137S、N184D、V204A、及びV212A。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸配列を含み、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型Ply Ss2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾

50

溶解素ポリペプチドは、配列番号10と少なくとも80%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号10と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号10と少なくとも95%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号10と少なくとも98%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号10と少なくとも99%の配列同一性を有する。

【0100】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドはpp388であり、配列番号1のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：Y164N、N184D、R195E、V204K、及びV212E。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号11と少なくとも80%の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型PlySs2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号11と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号11と少なくとも95%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号11と少なくとも98%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号11と少なくとも99%の配列同一性を有する。

【0101】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドはpp400であり、配列番号1のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：R35E、L92W、V104S、V128T及びY137S。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号12のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号12と少なくとも80%の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型PlySs2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号12と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号12と少なくとも95%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号12と少なくとも98%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号12と少なくとも99%の配列同一性を有する。

【0102】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドはpp616であり、配列番号1のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：V128T、Y137S、及びY164K。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号13のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号13と少なくとも80%の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型PlySs2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号13と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号13と少なくとも95%の配列同一

性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 13 と少なくとも 98% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 13 と少なくとも 99% の配列同一性を有する。

【0103】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは pp619 であり、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L92W、V104S、V128T、Y137S、及び Y164K。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 14 と少なくとも 80% の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 PlySs2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 14 と少なくとも 85% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 14 と少なくとも 90% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 14 と少なくとも 95% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 14 と少なくとも 98% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 14 と少なくとも 99% の配列同一性を有する。

【0104】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは pp628 であり、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164K、V204K、及び V212E。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 と少なくとも 80% の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 PlySs2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 と少なくとも 85% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 と少なくとも 90% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 と少なくとも 95% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 と少なくとも 98% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 と少なくとも 99% の配列同一性を有する。

【0105】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは pp632 であり、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164K、N184D、S198Q、V204K、及び V212E。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 80% の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 PlySs2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 85% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 90% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 95% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 98% の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 99% の配列同一性を有する。

【0106】

本明細書に開示の或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは p p 6 4 2 であり、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 K、I 2 0 6 E、及び V 2 1 4 G。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 7 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有し、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2 （配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 7 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 7 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 7 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 7 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 7 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する。

10

【0107】

C H A P 及び／又は C h 3 b ドメイン中の少なくとも 1 つの置換に加えて、修飾溶解素ポリペプチドは、1 つ以上のアミノ酸挿入及び／又は欠失を、これらの修飾が修飾溶解素ポリペプチドの溶菌活性及び／又は免疫原性の低下を妨げない限りにおいて含んでもよい。

20

【0108】

キメラ溶解素ポリペプチドも開示される。キメラ溶解素ポリペプチドは、当該技術分野で既知である。例えば、C l y F は、P l y 1 8 7 溶解素の触媒ドメイン（N 末端の 1 5 7 アミノ酸残基）と P l y S s 2 の結合ドメイン（C 末端の 9 9 残基）とを組み合わせたキメラ溶解素である（1 0）。或る特定の実施形態では、キメラ溶解素ポリペプチドは、本明細書に開示される修飾 P l y S s 2 C H A P ドメインと別の溶解素の結合ドメインとを含む。或る特定の実施形態では、キメラ溶解素ポリペプチドは、別の溶解素の触媒ドメインと本明細書に開示される修飾 P l y S s 2 S H 3 b ドメインとを含む。

30

【0109】

幾つかの実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドの活性フラグメントが得られる。「活性フラグメント」という用語は、参照溶解素の 1 つ以上の生物活性を保持する完全長溶解素の一部を指す。このため、本明細書で使用される場合、修飾溶解素ポリペプチドの活性フラグメントは、少なくとも 1 つのグラム陽性細菌種の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。

【0110】

ポリヌクレオチド

一態様では、本開示は、本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドをコードする核酸分子を含む単離ポリヌクレオチドであって、修飾溶解素ポリペプチドが溶菌活性及び野生型 P l y S s 2 溶解素（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する、単離ポリヌクレオチドに関する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチド又はそのフラグメントは、グラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。

40

【0111】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが T C E 1、T C E 2、T C E 3 又は T C E 4 の 1 つ以上に少なくとも 1 つの置換を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが T C E 5、T C E 6、T C E 7 又は T C E 8 の 1 つ以上に少なくとも 1 つの置換を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2 ポリペプチド（配列

50

番号１）と比較して少なくとも第１の置換及び少なくとも第２の置換を含み、少なくとも第１の置換がＴＣＥ１、ＴＣＥ２、ＴＣＥ３又はＴＣＥ４の１つ以上であり、少なくとも第２の置換がＴＣＥ５、ＴＣＥ６、ＴＣＥ７又はＴＣＥ８の１つ以上にある。或る特定の実施形態では、核酸分子は、野生型ＰｌｙＳｓ２ポリペプチド（配列番号１）と比較して少なくとも２つの置換を含む修飾溶解素ポリペプチドをコードし、少なくとも２つの置換がＴＣＥ４にある。或る特定の実施形態では、核酸分子は、野生型ＰｌｙＳｓ２ポリペプチド（配列番号１）と比較して少なくとも４つの置換を含む修飾溶解素ポリペプチドをコードし、少なくとも１つの置換がＴＣＥ２にあり、少なくとも１つの置換がＴＣＥ３にあり、少なくとも２つの置換がＴＣＥ４にある。

【０１１２】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが野生型ＰｌｙＳｓ２ポリペプチド（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含み、修飾溶解素ポリペプチドがＣＨＡＰドメイン中の配列番号１のアミノ酸残基３５、９２、１０４、１２８及び１３７から選択される少なくとも１つの位置での少なくとも１つのアミノ酸置換、及び／又はＳＨ３ｂドメイン中の配列番号１のアミノ酸残基１６４、１８４、１９５、１９８、２０４、２０６、２１２及び２１４から選択される少なくとも１つの位置での少なくとも１つのアミノ酸置換を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号１のアミノ酸残基９２、１０４、１２８及び１３７にアミノ酸置換を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号１のアミノ酸残基９２、１０４、１２８、１３７、１６４、１８４及び１９８にアミノ酸置換を含む。

【０１１３】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号１に対して以下のアミノ酸置換の１つ以上を含む：Ｒ３５Ｅ、Ｌ９２Ｗ、Ｖ１０４Ｓ、Ｖ１２８Ｔ、Ｙ１３７Ｓ、Ｙ１６４Ｎ、Ｙ１６４Ｋ、Ｎ１８４Ｄ、Ｒ１９５Ｅ、Ｓ１９８Ｈ、Ｓ１９８Ｑ、Ｖ２０４Ｋ、Ｖ２０４Ａ、Ｉ２０６Ｅ、Ｖ２１２Ｅ、Ｖ２１２Ａ及びＶ２１４Ｇ。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがＣＨＡＰドメイン中に位置する以下のアミノ酸置換の１つ以上：Ｒ３５Ｅ、Ｌ９２Ｗ、Ｖ１０４Ｓ、Ｖ１２８Ｔ及びＹ１３７Ｓ、及び／又はＳＨ３ｂドメイン中に位置する以下のアミノ酸置換の１つ以上：Ｙ１６４Ｎ、Ｙ１６４Ｋ、Ｎ１８４Ｄ、Ｒ１９５Ｅ、Ｓ１９８Ｈ、Ｓ１９８Ｑ、Ｖ２０４Ｋ、Ｖ２０４Ａ、Ｉ２０６Ｅ、Ｖ２１２Ａ、Ｖ２１２Ｅ及びＶ２１４Ｇを含む。

【０１１４】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号１に対して以下のアミノ酸置換を含む：Ｌ９２Ｗ、Ｖ１０４Ｓ、Ｖ１２８Ｔ及びＹ１３７Ｓ。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号３のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号３と少なくとも８０％の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも１つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型ＰｌｙＳｓ２（配列番号１）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号３と少なくとも８５％の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号３と少なくとも９０％の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号３と少なくとも９５％の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号３と少なくとも９８％の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号３と少なくとも９９％の配列同一性を有する。

【0115】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号1に対して以下のアミノ酸置換を含む：L92W、V104S、V128T、Y137S、S198H、及びI206E。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号4のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号4と少なくとも80%の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型PlySs2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号4と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号4と少なくとも95%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号4と少なくとも98%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号4と少なくとも99%の配列同一性を有する。

10

【0116】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号1に対して以下のアミノ酸置換を含む：L92W、V104S、V128T、Y137S、S198Q、V204A、及びV212A。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号5のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号5と少なくとも80%の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型PlySs2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号5と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号5と少なくとも95%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号5と少なくとも98%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号5と少なくとも99%の配列同一性を有する。

20

30

【0117】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号1に対して以下のアミノ酸置換を含む：L92W、V104S、V128T、Y137S、Y164K、N184D、及びS198Q。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号6のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号6と少なくとも80%の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型PlySs2（配列番号1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号6と少なくとも85%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号6と少なくとも98%の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、

40

50

配列番号 6 と少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0118】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 K、及び N 1 8 4 D。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 7 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 7 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 7 と少なくとも 85 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 7 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 7 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 7 と少なくとも 98 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 7 と少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

10

【0119】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 N、及び R 1 9 5 E。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 8 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 8 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 8 と少なくとも 85 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 8 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 8 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 8 と少なくとも 98 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 8 と少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

20

30

【0120】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、N 1 8 4 D、及び S 1 9 8 H。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 9 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 9 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 9 と少なくとも 85 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 9 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 9 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 9 と少なくとも 98 % の配列同一性を有

40

50

する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 9 と少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0121】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、N 1 8 4 D、V 2 0 4 A、及び V 2 1 2 A。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 10 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 10 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 10 と少なくとも 85 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 10 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 10 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 10 と少なくとも 98 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 10 と少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0122】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：Y 1 6 4 N、N 1 8 4 D、R 1 9 5 E、V 2 0 4 K、及び V 2 1 2 E。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 11 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 11 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 11 と少なくとも 85 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 11 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 11 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 11 と少なくとも 98 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 11 と少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0123】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：R 3 5 E、L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T 及び Y 1 3 7 S。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 12 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 12 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 12 と少なくとも 85 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 12 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 12 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードさ

れる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 2 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 2 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する。

【0124】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、及び Y 1 6 4 K。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 1 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 3 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 3 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 3 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 3 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 3 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する。

【0125】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、及び Y 1 6 4 K。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 1 4 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 4 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 4 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 4 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 4 と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 4 と少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する。

【0126】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 9 2 W、V 1 0 4 S、V 1 2 8 T、Y 1 3 7 S、Y 1 6 4 K、V 2 0 4 K、及び V 2 1 2 E。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 1 5 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 5 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 1 5 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修

飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 と少なくとも 98 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 15 と少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0127】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 92 W、V 104 S、V 128 T、Y 137 S、Y 164 K、N 184 D、S 198 Q、V 204 K、及び V 212 E。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 16 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 16 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 85 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 98 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 16 と少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0128】

或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 1 に対して以下のアミノ酸置換を含む：L 92 W、V 104 S、V 128 T、Y 137 S、Y 164 K、I 206 E、及び V 214 G。或る特定の実施形態では、核酸分子は、修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドが配列番号 17 のアミノ酸配列を含む。或る特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 17 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する修飾溶解素ポリペプチドをコードし、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも 1 つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、任意に修飾溶解素ポリペプチドが野生型 P l y S s 2（配列番号 1）と比較して低下した免疫原性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 17 と少なくとも 85 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 17 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 17 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 17 と少なくとも 98 % の配列同一性を有する。或る特定の実施形態では、コードされる修飾溶解素ポリペプチドは、配列番号 17 と少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

【0129】

ベクター及び宿主細胞

別の態様では、本開示は、本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドのいずれかをコードする核酸分子を含む単離ポリヌクレオチド又は本単離ポリヌクレオチドの相補配列を含むベクターに関する。幾つかの実施形態では、ベクターはプラスミド又はコスミドである。他の実施形態では、ベクターはウイルスベクターであり、付加的な DNA セグメントをウイルスゲノムにライゲートすることができる。幾つかの実施形態では、ベクターは、それが導入された宿主細胞において自律的に複製することができる。幾つかの実施形態では、ベクターは、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれることで、宿主ゲノムと共に複製され得る。

【0130】

幾つかの実施形態では、本明細書で「組み換え発現ベクター」又は「発現ベクター」と称される特定のベクターは、それらが操作可能に連結した遺伝子の発現を誘導することができる。ポリヌクレオチド配列は、別のヌクレオチド配列と機能的関係に置かれる場合、「操作可能に連結する」。例えば、プロモーター又は調節DNA配列は、RNA及び／又はタンパク質をコードするDNA配列に、2つの配列が操作可能に連結する、すなわちプロモーター又は調節DNA配列がコード又は構造DNA配列の発現レベルに影響を及ぼすように位置する場合に「操作可能に連結した」と言われる。操作可能に連結したDNA配列は、必ずしもというわけではないが、通例、連続する。

【0131】

概して、ポリペプチドを宿主内で維持、増加又は発現するのに適した任意の系又はベクターを本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチド又はそのフラグメントの発現に使用することができる。適切なDNA／ポリヌクレオチド配列を様々な既知の日常的な手法、例えばSambrook et al., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (2001)に記載される手法のいずれかによって発現系に挿入することができる。さらに、簡便な単離方法を得るためにタグ、例えばc-myc、ピオチン、poly-His等を本開示の修飾溶解素ポリペプチドに付加することもできる。かかる発現系のキットが市販されている。

【0132】

広範な宿主／発現ベクターの組合せを、本修飾溶解素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の発現に用いることができる。多数の好適なベクターが当業者に既知であり、市販されている。適切なベクターの例は例えば、Sambrook et al., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (2001)に提示されている。かかるベクターとしては、特に染色体ベクター、エピソームベクター及びウイルス由来ベクター、例えば細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入因子、酵母染色体要素、バキュロウイルス、SV40等のパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス及びレトロウイルス等のウイルスに由来するベクター、並びにそれらの組合せに由来するベクター、例えばプラスミドとコスミド及びファージミド等のバクテリオファージ遺伝要素とに由来するベクターが挙げられる。

【0133】

さらに、上記ベクターは、本開示の修飾溶解素ポリペプチドの構成的又は誘導性発現をもたらすことができる。好適なベクターとしては、SV40の誘導體、並びに既知の細菌プラスミド、例えば大腸菌プラスミドcolE1、pCR1、pBR322、pMB9及びそれらの誘導體、RP4、pBAD24及びpBAD-TOP0等のプラスミド；ファージDNA、例えばファージAの多数の誘導體、例えばNM989、並びに他のファージDNA、例えばM13及び繊維状一本鎖ファージDNA；2Dプラスミド等の酵母プラスミド又はその誘導體；昆虫又は哺乳動物細胞に有用なベクター等の真核細胞に有用なベクター；ファージDNA又は他の発現制御配列を用いるように改変されたプラスミド等のプラスミドとファージDNAとの組合せに由来するベクター等が挙げられるが、これらに限定されない。上述のベクターの多くがNew England Biolabs Inc.、Addgene、Takara Bio Inc.、ThermoFisher Scientific Inc.等の供給業者から市販されている。

【0134】

さらに、ベクターは、様々な調節要素（プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、エンハンサー、発現レベルを制御する様々なシスエレメントを含む）を含んでもよく、ベクターは、宿主細胞に応じて構築される。広範な発現制御配列（それに操作可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現を制御する配列）のいずれかを、本開示の修飾溶解素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現するために、これらのベクターに用いることができる。有用な制御配列としては、例えばSV40、CMV、ワクシニア、ポリオーマ又はアデノウイルスの初期又は後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、LTR系、ファージAの主要オペレーター及びプロモーター領

10

20

30

40

50

域、f d 外被タンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼ（例えば、Pho5）のプロモーター、酵母接合因子のプロモーター、細菌における発現のための大腸菌プロモーター、並びに原核若しくは真核細胞、又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られる他のプロモーター配列、並びにそれらの様々な組合せが挙げられるが、これらに限定されない。通例、修飾溶解素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、異種プロモーター又は調節要素に操作可能に連結する。

【0135】

別の態様では、本開示は、本開示の修飾溶解素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む本明細書に開示のベクターのいずれかを含む単離宿主細胞に関する。広範な宿主細胞が本ポリペプチドの発現に有用である。本ポリペプチドの発現に適した宿主細胞の非限定的な例としては、大腸菌、シュードモナス属、バシラス属、ストレプトミセス属の株、酵母等の真菌、並びに組織培養物中のCHO、R1.1、B-W及びL-M細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（例えば、COS1、COS7、BSC1、BSC40及びBMT10）等の動物細胞、昆虫細胞（例えば、Sf9）、並びにヒト細胞及び植物細胞等の既知の真核生物及び原核生物宿主が挙げられる。

【0136】

発現宿主は、任意の既知の発現宿主細胞であってもよいが、典型的な実施形態では、発現宿主は大腸菌株の1つである。これらとしては、Top10 (ThermoFisher Scientific, Inc.)、DH5a (Thermo Fisher Scientific, Inc.)、XL1-Blue (Agilent Technologies, Inc.)、SCS110 (Agilent Technologies, Inc.)、JM109 (Promega, Inc.)、LMG194 (ATCC) 及びBL21 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 等の市販の大腸菌株が挙げられるが、これらに限定されない。大腸菌を宿主系として使用することの利点は幾つかあり、最適な環境条件下で、その倍加時間が約20分間である急速な増殖動態 (Sezonov et al., J. Bacterial. 189 8746-8749 (2007))、容易に達成される高密度の培養物、外来性DNAによる容易かつ急速な形質転換等が挙げられる。プラスミド選択及び株選択を含む、大腸菌におけるタンパク質発現に関する詳細は、Rosano, G. and Ceccarelli, E., Front Microbial., 5: 172 (2014) に詳細に論考されている。

【0137】

本修飾溶解素ポリペプチドの効率的な発現は、最適発現シグナル（転写及び翻訳の両方のレベルで）、正確なタンパク質フォールディング及び細胞増殖特性等の様々な要因によって決まる。ベクターを構築する方法及び構築した組換えベクターを宿主細胞に形質導入する方法に関して、当該技術分野で既知の従来の方法を利用することができる。全てのベクター、発現制御配列及び宿主が本開示の修飾溶解素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現するよう同様に良好に機能するわけではないことが理解されるが、当業者は、本開示の範囲から逸脱することなく所望の発現を達成するために過度な実験なしに適当なベクター、発現制御配列及び宿主を選択することが可能である。

【0138】

本開示の修飾溶解素ポリペプチドは、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含む既知の方法によって組換え細胞培養物から回収し、精製することができる。高速液体クロマトグラフィーを溶解素ポリペプチド精製に用いることもできる。

【0139】

代替的には、本開示の修飾溶解素ポリペプチドの作製に用いられるベクター系は、無細胞発現系であってもよい。様々な無細胞発現系が市販されており、限定されるものではないが、Promega、LifeTechnologies、Clonetech等から入手可能なものが挙げられる。

【0140】

修飾溶解素ポリペプチドを含む組成物

10

20

30

40

50

本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドは、単独で又は1つ以上の従来の抗生物質及び他の殺菌剤と共に抗微生物及び殺菌組成物、並びにその単位剤形に組み込まれ得る。

【0141】

通例、組成物は、本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドをスタフィロコッカス・アウレウス；リステリア・モノサイトゲネス；スタフィロコッカス・エピデルミディス群、スタフィロコッカス・サブロフィティカス群、スタフィロコッカス・シミュランス群、スタフィロコッカス・インターメディウス群、スタフィロコッカス・シウリ群及びスタフィロコッカス・ヒイカス群等のコアグララーゼ陰性ブドウ球菌；ストレプトコッカス・スイス；ストレプトコッカス・ピオゲネス；ストレプトコッカス・アガラクティアエ；ストレプトコッカス・ディスガラクティアエ；ストレプトコッカス・ニューモニアエ；ストレプトコッカス・アンギノーサス群、ストレプトコッカス・ミティス群、ストレプトコッカス・サングイニス群、ストレプトコッカス・ボビス群、ストレプトコッカス・サリバリウス群及びストレプトコッカス・ミュータンス群等の緑色レンサ球菌群に含まれる種；エンテロコッカス・フェカリス；並びにエンテロコッカス・フェシウムからなる群から選択されるグラム陽性細菌を死滅させるのに効果的な量で含有する。

10

【0142】

本明細書に開示の組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、ペレット、カプセル、液体を含むカプセル、散剤、徐放製剤、坐剤、タンポン塗布、エアロゾル、スプレー、ロゼンジ剤、トローチ剤、キャンディ、注射剤、チューインガム、軟膏、擦り込み剤、時間放出貼付剤、液体を吸収したワイプ、及びそれらの組合せの形態を取り得る。したがって、組成物は、固体、例えば錠剤、再構成のための凍結乾燥散剤、リポソーム若しくはミセルとして利用され得るか、又は組成物は、液体、例えば液剤、懸濁剤、含嗽剤（gargles）、乳剤、若しくは固体若しくは液体を充填した、例えば経口使用のためのカプセルとして利用され得る。或る特定の実施形態では、組成物は、直腸投与のための坐剤若しくはカプセルの形態、又は非経口（例えば、静脈内又は皮下を含む）若しくは局所、例えば皮膚、鼻、咽頭若しくは肺への使用のための滅菌注射用若しくは吸入用溶液若しくは懸濁液の形態であり得る。かかる組成物には医薬組成物が含まれ、その単位剤形は、付加的な活性化化合物又は成分を伴う又は伴わない、従来の又は特別な割合での従来の又は新たな成分を含み得る。かかる単位剤形は、用いるべき意図される1日投与量範囲に応じた任意の好適な有効量の活性成分を含有し得る。

20

30

【0143】

担体及び賦形剤は、ヒト又は動物への使用に許容可能な多種多様の物質から選択することができる。薬学的に許容可能な担体又は賦形剤の非限定的な例としては、標準的な薬学的担体、例えばリン酸緩衝食塩水、水、ポリオール、二糖又は多糖、並びにエマルション、例えば油／水エマルション及びマイクロエマルションが挙げられる。他の安定化賦形剤としては、安定化剤及び保護溶液（SPS）の保護されたブレンド、シクロデキストリン、並びに組換えヒトアルブミン（rHSA）が挙げられる。他の賦形剤としては、充填剤、緩衝剤、浸透圧調整剤（例えば塩及びアミノ酸）、界面活性剤、保存料、抗酸化剤、及び共溶媒を挙げることができる。本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドを含む固形経口組成物について、好適な薬学的に許容可能な賦形剤としては、限定されないが、デンプン、糖、希釈剤、顆粒化剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤等が挙げられる。液体経口組成物について、好適な薬学的に許容可能な賦形剤としては、限定されないが、水、グリコール、油、アルコール、矯味剤、保存料等を挙げることができる。局所固形組成物、例えばクリーム剤、ゲル剤、フォーム、軟膏、又はスプレーについて、好適な賦形剤としては、限定されないが、セルロース性又は油性のクリーム剤、乳化剤、硬化剤、レオロジー調整剤又は増粘剤、界面活性剤、皮膚軟化剤、保存料、保湿剤、アルカリ化剤又は緩衝剤、及び溶媒を挙げることができる。

40

【0144】

例えば、本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドは、液体懸濁液、溶液又はエマルションのpHを修飾溶解素ポリペプチドの活性に実質的に影響を及ぼさない範囲内に維持す

50

る緩衝液と組み合わせることができる。例えば、組成物又は投与時に活性成分が見られる環境の望ましいpH範囲は約4.0～約9.0、例えば約4.5～約8.5であり得る。

【0145】

修飾溶解素ポリペプチドが最適化された形で活性を発揮するように安定化緩衝液が任意に含まれていてもよい。緩衝液は、ジチオスレイトール等の還元試薬を含有し得る。安定化緩衝液は、エチレンジアミン四酢酸ジナトリウム塩等の金属キレート試薬であっても若しくはそれを含んでいてもよく、又はリン酸緩衝液若しくはクエン酸リン酸緩衝液、若しくはTris若しくはコハク酸エステル等の任意の他の緩衝剤を含有していてもよい。

【0146】

温和な界面活性剤が、組成物に使用される修飾溶解素ポリペプチドの治療効果を高めるのに効果的な量で医薬組成物中に含まれていてもよい。好適な温和な界面活性剤としては、特にポリオキシエチレンソルビタン及び脂肪酸のエステル(Tweenシリーズ等)、オクチルフェノキシポリエトキシエタノール(Triton-Xシリーズ等)、n-オクチル-β-D-グルコピラノシド、n-オクチル-β-D-チオグルコピラノシド、n-デシル-β-D-グルコピラノシド、n-ドデシル-β-D-グルコピラノシド、ポロキサマー、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ポリエチレングリコール、並びに生物学的に生じる界面活性剤、例えば脂肪酸、グリセリド、モノグリセリド、デオキシコール酸及びデオキシコール酸のエステルを挙げることができる。

【0147】

保存料を本明細書に開示の組成物に使用してもよく、例えば全組成物の約0.05重量%～約0.5重量%を占めることができる。保存料の使用は、製品が微生物で汚染される場合、配合物が微生物の増殖を予防又は軽減する(又は配合物の効力を弱める)ことを確実にし得る。例示的な保存料としては、メチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、クロロキシレノール、安息香酸ナトリウム、DMDMヒダントイン、3-ヨード-2-プロピルブチルカルバメート、ソルビン酸カリウム、クロルヘキシジンジグルコン酸塩、又はそれらの組合せが挙げられる。

【0148】

経口投与のため、本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドは、固形又は液体の製剤、例えば錠剤、カプセル、散剤、液剤、懸濁剤、及び分散剤に配合される。錠剤又はカプセルの形態での経口投与のため、活性成分は1つ以上の薬学的に許容可能な賦形剤、例えば結合剤(例えばアルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、又はヒドロキシプロピルメチルセルロース)；増量剤(例えばラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、他の還元及び非還元糖、微結晶性セルロース、硫酸カルシウム、又はリン酸水素カルシウム)；滑沢剤(例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、ステアリン酸、フマル酸ステアリルナトリウム、ベヘン酸グリセリル、ステアリン酸カルシウム等)；崩壊剤(例えばジャガイモデンプン又はデンプングリコール酸ナトリウム)；湿潤剤(例えばラウリル硫酸ナトリウム)、着色及び矯味剤、ゼラチン、甘味料、天然及び合成ガム(例えばアカシア、トラガント又はアルギン酸塩)、緩衝塩、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ワックス等と組み合わせられ得る。液体形態での経口投与のため、薬物成分は、非毒性の、薬学的に許容可能な不活性の担体(例えばエタノール、グリセロール、水)、懸濁化剤(例えばソルビトールシロップ剤、セルロース誘導体又は水素化食用油脂)、乳化剤(例えばレシチン又はアカシア)、非水性ビヒクル(例えばアーモンド油、油性エステル、エチルアルコール又は分画された植物油)、保存料(例えばメチル若しくはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエート又はソルビン酸)等と組み合わせられ得る。安定化剤、例えば抗酸化剤(例えばBHA、BHT、プロピルガレート、アスコルビン酸ナトリウム又はクエン酸)を加えて、剤形を安定化させることもできる。

【0149】

或る特定の実施形態では、錠剤を当該技術分野で既知の方法によってコーティングしてもよい。本明細書に開示の組成物を、例えばポリグリコール酸/乳酸(PGLA)から製

10

20

30

40

50

造されたマイクロスフェア又はマイクロカプセル内に導入することもできる。経口投与用の液体製剤は、例えば溶液、シロップ、エマルジョン若しくは懸濁液の形態を取ることができ、又は使用前に水若しくは他の好適なビヒクルで再構成される乾燥製品として与えることができる。経口投与用の製剤は、活性化化合物の制御又は遅延（postponed）放出をもたらしように適切に配合することができる。

【0150】

活性剤を小型単層ベシクル、大型単層ベシクル及び多層ベシクル等のリポソーム送達系の形態で投与してもよい。リポソームは、既知のコレステロール、ステアリルアミン又はホスファチジルコリン等の様々なリン脂質から形成することができる。

【0151】

錠剤及び丸剤等の固体組成物を調製するために、本明細書に開示される修飾溶解素ポリペプチドを医薬賦形剤と混合し、固体製剤化前（preformulation）組成物を形成することができる。必要に応じて、錠剤を標準的な手法により糖コーティング又は腸溶コーティングしてもよい。錠剤又は丸剤をコーティングするか又は他の形で調合して、持続性又は遅延作用の利点をもたらし剤形を得ることができる。例えば、錠剤又は丸剤が内部投薬成分（dosage component）及び外部投薬成分を含み、後者が前者の外層の形態であってもよい。2つの成分が、胃内での崩壊に対抗し、内部成分が無傷で十二指腸に運ばれるか又は更に放出を遅らせるように働く腸溶層で隔てられてもよい。様々な材料をかかると腸溶層又はコーティングに使用することができ、かかる材料としては、多数のポリマー酸、並びにポリマー酸とセラック、セチルアルコール及び酢酸セルロース等の材料との混合物が挙げられる。同様に、経口投与される薬剤を拡散制御系、浸透圧デバイス（osmotic devices）、溶解制御マトリックス及び浸食性／分解性マトリックスを含む時間制御放出ビヒクルの形態で投与することができる。

【0152】

本明細書に開示される局所用組成物は、皮膚科学的に又は耳に（otically）許容可能な担体等の薬学的又は生理学的に許容可能な担体を更に含み得る。かかる担体は、皮膚科学的に許容可能な担体の場合、皮膚、爪、粘膜、組織及び／又は毛髪に適合することができる、これらの要件を満たす任意の通常使用される皮膚用担体を含み得る。耳に許容可能な担体の場合、担体は耳の全ての部位に適合することができる。かかる担体は、当業者が容易に選択することができる。本明細書に開示の化合物の局所投与用の担体としては、鉱油、流動パラフィン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン及び／又はポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックス、ソルビタンモノステアレート、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコール及び水が挙げられるが、これらに限定されない。皮膚用軟膏の配合では、本開示の活性成分を油脂性炭化水素基剤、無水吸水性基剤、油中水型吸水性基剤、水中油型水除去性（water-removable）基剤及び／又は水溶性基剤中に配合することができる。耳用組成物の配合では、本開示の活性成分を担体、例えばデキストラン、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、多糖ゲル、Gelrite（商標）、ヒドロキシプロピルメチルセルロースのようなセルロースポリマー、及びアクリル酸のポリマー又はコポリマー等のカルボキシ含有ポリマー、並びに他のポリマー粘滑剤を含む水性ポリマー懸濁液中に配合することができる。本明細書に開示される局所用組成物は、水性、水性アルコール性若しくは油性溶液、ローション若しくは血清分散液、水性、無水若しくは油性ゲル、水相への脂肪相（fatty phase）の分散（O/W又は水中油型）、若しくは逆に脂肪相への水相の分散（W/O又は油中水型）によって得られるエマルジョン、マイクロエマルジョン、若しくは代替的にはマイクロカプセル、マイクロ粒子、又はイオン性及び／又は非イオン性の脂質ベシクル分散液、クリーム、ローション、ゲル、フォーム（加圧キャニスター、好適なアプリケーション、乳化剤及び不活性噴射剤が用いられ得る）、エッセンス、乳液、懸濁液、又はパッチを含む局所適用に適した任意の形態であり得る。本明細書に開示の局所用組成物は、親水性又は親油性ゲル化剤、親水性又は親油性活性剤、保存剤、酸化防止剤、溶媒、香料、増量剤、日焼け止め剤、消臭剤（odor-absorbers）及び

10

20

30

40

50

染料等の補助剤を含有していてもよい。更なる態様では、本明細書に開示の局所用組成物は、被験体の皮膚、又は他の組織若しくは器官と付着するか又は他の形で結合することが可能であり、治療有効量の本明細書に開示される1つ以上の修飾溶解素ポリペプチドを送達することが可能である経皮パッチ、包帯剤、パッド、ラップ、マトリックス及び包帯等の道具と共に投与することができる。

【0153】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示の局所用組成物は、局所熱傷の治療に使用される1つ以上の成分を付加的に含む。かかる成分としては、プロピレングリコールヒドロゲル；グリコール、セルロース誘導体及び水溶性アルミニウム塩の組合せ；防腐剤；抗生物質；並びにコルチコステロイドを挙げることができるが、これらに限定されない。保湿剤（固体又は液体ワックスエステル等）、吸収促進剤（親水性クレイ又はデンプン等）、粘度上昇剤（viscosity building agents）及び皮膚保護剤を添加することもできる。局所用配合物は、洗口液等の洗浄剤の形態であってもよい。例えば、国際公開第2004/004650号を参照されたい。

【0154】

本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドは、適切な量の修飾溶解素ポリペプチドと担体とを含む治療剤の注射によって投与することもできる。例えば、修飾溶解素ポリペプチドは、グラム陽性細菌等の細菌による感染を治療するために筋肉内に、脳室内に、髄腔内に、真皮下に（subdermally）、皮下に、腹腔内に、静脈内に、又は直接注射若しくは持続注入によって投与することができる。担体は、蒸留水、生理食塩水、アルブミン、血清又はそれらの任意の組合せで構成され得る。さらに、非経口注射の医薬組成物は、修飾溶解素ポリペプチドの薬学的に許容可能な水溶液又は非水溶液を以下の1つ以上に加えて含む得る：pH緩衝液、補助剤（例えば、保存料、湿潤剤、乳化剤、安定化剤及び分散剤）、リポソーム配合物、ナノ粒子、分散液、懸濁液及びエマルション、並びに使用直前に滅菌注射用溶液又は分散液に再構成される滅菌粉末。

【0155】

或る特定の実施形態では、注射用の配合物は単位剤形で、例えばアンプル又は複数回投与用容器内で与えることができ、或る特定の実施形態では、保存料が添加され得る。組成物は、油性又は水性ビヒクル中の賦形剤、懸濁液、溶液又はエマルション等の形態を取ることができ、懸濁化剤、安定化剤、充填剤及び／又は分散剤等の調合剤（formulatory agent）を含有し得る。活性成分は、使用前に好適なビヒクル、例えば滅菌パイロジェンフリー水で再構成される粉末形態であってもよい。緩衝剤の例としては、ヒスチジン、T r i s、リン酸、コハク酸クエン酸、メチオニン、シスチン、グリシン、温和な界面活性剤、カルシウム及びマグネシウムを挙げることができる。ジチオスレイトール等の還元剤が含まれていてもよい。

【0156】

非経口注射が選ばれる投与方法である場合、等張配合物が使用され得る。概して、等張性のための添加剤としては、塩化ナトリウム、デキストロース、スクロース、グルコース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール及びラクトースを挙げることができる。場合によっては、リン酸緩衝生理食塩水等の等張液を使用してもよい。安定化剤としては、ヒスチジン、メチオニン、グリシン、アルギニン、ゼラチン、及びヒト又はウシ血清アルブミン等のアルブミンを挙げることができる。上述の賦形剤の多くが注射用の組成物にも使用され得ることが当業者には容易に理解される。

【0157】

血管収縮剤を本明細書に開示の組成物に添加することができる。或る特定の実施形態では、組成物は、滅菌かつパイロジェンフリーで提供され得る。

【0158】

別の実施形態では、本明細書に開示の組成物は、乾燥吸入用粉末、又はエアロゾル若しくはスプレー等の他の吸入用組成物であり得る。本明細書に開示の吸入用組成物は、薬学的に許容可能な担体を更に含む得る。吸入による投与については、修飾溶解素ポリペプチ

ドは、好適な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の好適なガスを用いた吸入器、加圧エアロゾルディスペンサー又はネブライザー等の器具からのエアロゾルスプレーの提供の形態で都合よく送達することができる。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は、計量された量を送達するための弁を設けることによって決定することができる。吸入器又は注入器に使用される、例えばゼラチンのカプセル及びカートリッジを、活性成分とラクトース又はデンプン等の好適な粉末基剤との粉末混合物を含有させて配合することができる。

【0159】

一実施形態では、本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドは、乾燥吸入用粉末、又はエアロゾル若しくはスプレーとして配合することができる。具体的な実施形態では、修飾溶解素ポリペプチド吸入溶液には、エアロゾル送達のための噴射剤を更に配合することができる。或る特定の実施形態では、溶液を噴霧することができる。多くの分注器具が、吸入によるポリペプチドを含む医薬組成物の送達のために当該技術分野で利用可能である。これらにはネブライザー、加圧エアロゾルディスペンサー及び吸入器が含まれる。

10

【0160】

薬剤と噴射剤との間の表面張力及び界面張力を低下させるために、界面活性剤を本明細書に開示される吸入用医薬組成物に添加することができる。薬剤、噴射剤及び賦形剤で懸濁液を形成する場合、界面活性剤が必要とされる場合も又は必要とされない場合もある。薬剤、噴射剤及び賦形剤で溶液を形成する場合、特定の薬剤及び賦形剤の溶解性に部分的に依存して、界面活性剤が必要とされる場合も又は必要とされない場合もある。界面活性剤は、薬剤と反応せず、薬剤、賦形剤及び噴射剤間の表面張力を低下させ、及び／又は弁潤滑剤として作用する任意の好適な非毒性の化合物であり得る。

20

【0161】

好適な界面活性剤の例としては、限定されないが、オレイン酸；ソルビタントリオレート；塩化セチルピリジニウム；大豆レシチン；ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート；ポリオキシエチレン（10）ステアシルエーテル；ポリオキシエチレン（2）オレイルエーテル；ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンエチレンジアミンブロックコポリマー；ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート；ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート；ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロックコポリマー；ひまし油エトキシレート及びそれらの組合せが挙げられる。

30

【0162】

好適な噴射剤の例としては、限定されないが、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン及び二酸化炭素が挙げられる。

【0163】

吸入用組成物における使用に適した賦形剤の例としては、限定されないが、ラクトース、デンプン、中鎖脂肪酸のプロピレングリコールジエステル；中鎖、短鎖若しくは長鎖、又はそれらの組合せの脂肪酸のトリグリセリドエステル；パーフルオロジメチルシクロブタン；パーフルオロシクロブタン；ポリエチレングリコール；メタノール；ラウログリコール；ジエチレングリコールモノエチルエーテル；中鎖脂肪酸のポリグリコール化グリセリド；アルコール；ユーカリ油；短鎖脂肪酸；及びそれらの組合せが挙げられる。

40

【0164】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示の組成物は、鼻腔適用を含む。鼻腔適用としては、例えば、鼻腔用スプレー、鼻腔用ドロップ、鼻腔用軟膏、鼻腔用洗浄液、鼻腔用注射剤、鼻腔用パッキング、気管支スプレー、及び吸入剤、又は咽喉ロゼンジ剤、洗口液若しくは含嗽剤の間接的な使用によるもの、又は鼻孔若しくは顔へ適用される軟膏の適用の使用によるもの、又はこれらの及び類似の適用方法の任意の組合せが挙げられる。

【0165】

本明細書に開示の組成物は、直腸投与のために、例えば坐剤又は停留浣腸（例えば、ココアバター又は他のグリセリド等の従来の坐剤基剤を含有する）として配合することもできる。

50

【0166】

或る特定の実施形態では、本明細書に開示の組成物は、グラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させるのに効果的な少なくとも1つの抗生物質等の少なくとも1つの抗生物質を更に含み得る。或る特定の実施形態では、少なくとも1つの抗生物質は、スタフィロコッカス・アウレウス；リステリア・モノサイトゲネス；スタフィロコッカス・エピデルミディス群、スタフィロコッカス・サブロフィティカス群、スタフィロコッカス・シミュランス群、スタフィロコッカス・インターメディウス群、スタフィロコッカス・シウリ群及びスタフィロコッカス・ヒイカス群等のコアグラエゼ陰性ブドウ球菌；ストレプトコッカス・スイス；ストレプトコッカス・ピオゲネス；ストレプトコッカス・アガラクティアエ；ストレプトコッカス・ディ
10 スガラクティアエ；ストレプトコッカス・ニューモニアエ；ストレプトコッカス・アンギノーサス群、ストレプトコッカス・ミティス群、ストレプトコッカス・サンガイニス群、ストレプトコッカス・ボビス群、ストレプトコッカス・サリバリウス群及びストレプトコッカス・ミュータンス群等の緑色レンサ球菌群に含まれる種；エンテロコッカス・フェカリス；並びにエンテロコッカス・フェシウムの1つ以上に対して効果的である。

【0167】

本明細書に開示の組成物の或る特定の実施形態では、少なくとも1つの抗生物質と組み合わせた修飾溶解素ポリペプチドは、相乗作用、例えばグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる修飾溶解素ポリペプチド又は抗生物質の能力における相乗作用を示すことができる。相乗作用は、2つの
20 活性剤の組合せの阻害活性を指す場合があり、組合せの部分阻止濃度（F I C）指数は1未満、強い相乗作用については、0.5以下である。作用物質のF I Cは、別の作用物質と組み合わせて使用した場合に細菌を死滅させるその作用物質の最小濃度を、第1の作用物質を単独で使用した場合に同じ効果を有する第1の作用物質の濃度で除算したものである。A及びBの組合せのF I C指数は、それらの個々のF I C値の総和である。

【0168】

相乗作用は、チェッカーボードアッセイにおいて評価することができる（時間－死滅曲線によって検証することができる）。各チェッカーボードアッセイにより多くの異なる組合せが生成し、慣例により、最も効果的な組合せのF I C値がF I C指数の算出に用いられる。F I C指数により相互作用の性質が規定される。相加的相互作用を有する抗微生物
30 剤は、F I C指数が1であり、1未満のF I C指数は、相乗的相互作用を規定し、F I C指数が1を超える組合せは、拮抗する。F I C指数が低いほど、組合せがより相乗的となる。例えば、Singh, P.K. et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279: L799-L805, 2000を参照されたい。相乗作用は、修飾溶解素ポリペプチドと抗生物質との同時投与に基づく効果的な新たな一般的抗感染戦略に影響がある。特に、修飾溶解素ポリペプチド及び抗生物質の両方の各々を、殺菌及び静菌活性を高め、耐性発現のリスクを低下させて、より少ない用量及び量で投与することができる。言い換えると、相乗作用の利点は、一方又は両方の作用物質をM I C以下の濃度で使用する場合に実現されるだけでなく、相乗作用の存在を、M I C以下の濃度の各作用物質を用いて試験することで明らかにすることができる。
40

【0169】

方法

その高度の活性及び低い毒性と共に、有利な治療指数を示すことから、本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドは、その影響を受けやすい適応症又は病態の治療、軽減若しくは改善、緩和、又は解消のために、それを必要とする被験体、例えば生きている動物（ヒトを含む）に投与することができる。

【0170】

したがって、本開示の修飾溶解素ポリペプチドは、*in vivo*で、例えば被験体においてスタフィロコッカス・アウレウス等のグラム陽性細菌による細菌感染を治療するために、並びに*in vitro*で、例えば表面、例えば医療器具の表面での、例えば細菌
50

汚染のレベルを低下させるために使用することができる。

【0171】

例えば、幾つかの実施形態では、本修飾溶解素ポリペプチドは、グラム陽性細菌によって形成される細菌バイオフィルムの予防、制御、破壊及び処理のために使用することができる。バイオフィルム形成は、微生物細胞が互いに接着し、表面上の細胞外高分子物質（EPS）のマトリックス中に埋め込まれる場合に生じる。生体高分子（例えば、多糖、核酸及びタンパク質）及び栄養素が豊富な、かかる保護環境での微生物の増殖は、微生物クlostockを増強し、病原性を増大させる。バイオフィルムは、生物表面及び非生物表面、例えばCF肺の粘液栓、汚染カテーテル、インプラント、コンタクトレンズ等を含む任意の支持環境で発生し得る（Sharma et al. *Biologicals*, 42(1):1-7 (2014)（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす））。バイオフィルムが細菌を保護するため、細菌が従来の抗微生物治療により高い耐性を示すことが多く、深刻な健康リスクとなる。これは、多くがバイオフィルム関連細菌に起因し得る、毎年100万件を超えるカテーテル関連尿路感染（CAUTI）の報告から明らかである（Donlan, RM (2001) *Emerg Infect Dis* 7(2):277-281、Maki D and Tambyah P (2001) *Emerg Infect Dis* 7(2):342-347）。

10

【0172】

このため、一実施形態では、本開示の修飾溶解素ポリペプチドは、グラム陽性細菌が細菌バイオフィルムによって保護される場合のグラム陽性細菌による細菌感染の予防、制御、阻害及び治療に使用することができる。

20

【0173】

一態様では、本開示は、細菌感染と診断された、そのリスクがある又はその症状を示す被験体に本明細書に記載される医薬組成物を投与することを含む、本明細書に記載されるグラム陽性細菌の1つ以上の種によって引き起こされる細菌感染を治療する方法に関する。

【0174】

「感染」及び「細菌感染」という用語は、気道感染（RTI）、例えば嚢胞性線維症（CF）を有する患者における気道感染、下気道感染、例えば慢性気管支炎の急性増悪（ACB）、急性副鼻腔炎、市中肺炎（CAP）、院内肺炎（HAP）及び院内気道感染；淋菌性子宮頸管炎及び淋菌性尿道炎等の性感染症；尿路感染；急性中耳炎；新生児敗血症及びカテーテル関連敗血症を含む敗血症；並びに骨髓炎を含むことが意図される。薬物耐性細菌及び多剤耐性細菌によって引き起こされる感染も企図される。

30

【0175】

グラム陽性細菌によって引き起こされる感染の非限定的な例としては、A）院内感染：1．気道感染、特に嚢胞性線維症患者及び人工呼吸器を装着している患者における気道感染、2．菌血症及び敗血症、3．創傷感染、特に火傷被害者の創傷感染、4．尿路感染、5．侵襲的器具上での術後感染、6．汚染された薬液の静脈内投与による心内膜炎、7．後天性免疫不全症候群、癌化学療法、ステロイド療法、血液悪性疾患、臓器移植、腎代替療法、及び重度の好中球減少症を伴う他の病態の患者における感染、B）市中感染：1．市中気道感染、2．髄膜炎、3．汚染水に起因する毛包炎及び外耳道感染、4．高齢者及び糖尿病患者における悪性外耳炎、5．小児における踵骨の骨髓炎、6．一般に汚染されたコンタクトレンズと関連した眼感染、7．手が頻繁に水に曝される人々における爪感染等の皮膚感染、8．消化管感染、並びに9．筋骨格系感染を挙げることができる。

40

【0176】

本方法のグラム陽性細菌の1つ以上の種には、本明細書に記載されるか又は当該技術分野で既知のグラム陽性細菌の任意の種が含まれ得る。通例、グラム陽性細菌の種としては、リステリア・モノサイトゲネス、スタフィロコッカス・アウレウス、コアグラエゼ陰性ブドウ球菌（限定されるものではないが、スタフィロコッカス・エピデルミディス群、スタフィロコッカス・サプロフィティカス群、スタフィロコッカス・シミュランス群、スタフィロコッカス・インターメディウス群、スタフィロコッカス・シウリ群、スタフィロコ

50

ツカス・ヒイカス群からの少なくとも40の認定種、及び「不特定種群」と称される任意の分離株を含む）、ストレプトコッカス・スイス、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・アガラクティアエ、ストレプトコッカス・ディスガラクティアエ、ストレプトコッカス・ニューモニアエ、緑色レンサ球菌群に含まれる任意の付加的な種（ストレプトコッカス・アンギノーサス群、ストレプトコッカス・ミティス群、ストレプトコッカス・サングイニス群、ストレプトコッカス・ボビス（現ガロリティカス）群、ストレプトコッカス・サリバリウス群及びストレプトコッカス・ミュータンス群に含まれる全ての種及び株を含むが、これらに限定されない）、エンテロコッカス・フェカーリス及びエンテロコッカス・フェシウムを挙げることができる。グラム陽性細菌の他の例としては、アクチノマイセス属、バシラス属、ラクトコッカス属、マイコバクテリウム属、コリネバクテリウム属及びクロストリジウム属が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0177】

別の態様では、本開示は、細菌感染と診断された、そのリスクがある又はその症状を示す被験体に、有効量の本明細書に記載される修飾溶解素ポリペプチドを含有する第1の有効量の組成物と、グラム陽性細菌感染の治療に適した第2の有効量の抗生物質との組合せを同時投与することを含む、細菌感染を予防又は治療する方法に関する。

【0178】

本開示の修飾溶解素ポリペプチドは、個別に又は当業者の技能の範囲内の様々な組合せで標準療法の抗生物質又は最終手段の抗生物質と同時投与することができる。グラム陽性細菌に対して使用される従来の抗生物質は本明細書に開示され、例えばメチシリン、バン

20

【0179】

本開示の修飾溶解素ポリペプチドと抗生物質とを組み合わせることで、効果的な抗菌療法がもたらされる。幾つかの実施形態では、本開示の修飾溶解素ポリペプチドと1つ以上の抗生物質との同時投与は、より少ない修飾溶解素ポリペプチド又は抗生物質のいずれか又は両方の用量及び量、及び／又はより少ない治療頻度及び／又は期間で、殺菌及び静菌活性を増大させ、抗生物質耐性のリスクを低下させ、有害な神経学的又は腎臓副作用（コリスチン又はポリミキシンBの使用と関連する副作用等）のリスクを低下させて行うことができる。本明細書で使用される場合、「より少ない用量」という用語は、同じ活性成分による単剤療法と比較した組合せでの或る活性成分の用量を指す。幾つかの実施形態では、組合せでの修飾溶解素ポリペプチド又は抗生物質の用量は、それぞれの単剤療法と比較して最適値以下又は更には閾値以下であり得る。

30

【0180】

幾つかの実施形態では、本開示は、被験体に本明細書に開示の1つ以上の修飾溶解素ポリペプチドを対象の抗生物質と共に投与することによって、グラム陽性細菌に対する1つ以上の抗生物質の抗生物質活性を単独で使用される該抗生物質の活性と比較して高める方法を提供する。組合せは、細菌に対して効果的であり、抗生物質に対する耐性を克服し、及び／又は抗生物質をより低い用量で用いることを可能し、望ましくない副作用を減少させる。

40

【0181】

また別の態様では、本開示は、グラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる方法であって、細菌と有効量の本明細書に記載される修飾溶解素ポリペプチドを含有する組成物とを接触させることを含み、修飾溶解素ポリペプチドがグラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる、方法に関する。

【0182】

幾つかの実施形態では、グラム陽性細菌の少なくとも1つの種の増殖を阻害するか、又

50

はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させることは、細菌と本明細書に記載される修飾溶解素ポリペプチドとを接触させることを含み、細菌は、例えば病院及び他の健康関連又は公共の建物における医療器具、床、階段、壁及び調理台の表面、並びに手術室、緊急治療室、病室、診療所及び浴室等における機器の表面上に存在する。

【0183】

本明細書に記載の修飾溶解素ポリペプチドを用いて保護することができる医療器具の例としては、管類及び他の表面医療器具、例えば尿道カテーテル、粘液吸引カテーテル、吸引カテーテル、臍帯カニューレ (umbilical cannulae)、コンタクトレンズ、子宮内器具、腔内及び腸内器具、気管内チューブ、気管支鏡、歯科補綴物及び歯列矯正器具、外科用器械、歯科用器械、管類、歯科用送水管、布、紙、指示薬ストリップ (例えば、紙の指示薬ストリップ又はプラスチックの指示薬ストリップ)、接着剤 (例えば、ヒドロゲル接着剤、ホットメルト接着剤又は溶剤系接着剤)、包帯、組織包帯剤 (tissue dressings) 又は治療器具、及び密封パッチ (occlusive patches)、並びに医療分野で使用される任意の他の表面器具が挙げられるが、これらに限定されない。器具には、電極、外部人工装具、固定テープ、圧迫包帯、及び様々なタイプのモニターが含まれ得る。医療器具には、挿入又は移植部位近くの皮膚等の挿入又は移植部位に設置することができ、グラム陽性細菌によるコロニー形成の影響を受けやすい少なくとも1つの表面を含み得る任意の器具も含まれ得る。

【0184】

投与量及び投与

投与される投与量は、治療される感染の活性、治療対象の被験体の年齢、健康及び全身的な身体状態、特定の修飾溶解素ポリペプチドの活性、もしあれば、本開示による修飾溶解素ポリペプチドと組み合わせられる抗生物質の性質及び活性、並びにかかる組合せの複合効果等の多数の要因によって決まる。或る特定の実施形態では、投与される修飾溶解素ポリペプチドの有効量は、約 $0.1 \text{ mg/kg} \sim 100 \text{ mg/kg}$ (又は $1 \text{ mcg/ml} \sim 100 \text{ mcg/ml}$)、例えば $0.5 \text{ mg/kg} \sim 30 \text{ mg/kg}$ の範囲内であり得る。或る特定の実施形態では、修飾溶解素ポリペプチドは、1日～14日間の範囲の期間にわたって1日1回～4回投与することができる。抗生物質も使用される場合、抗生物質は、標準的な投与計画で又は任意の相乗作用を考慮してより少ない量で投与することができる。しかしながら、かかる全ての投与量及び計画は (修飾溶解素ポリペプチド、又はそれと同時に投与される任意の抗生物質のいずれに関わらず)、最適化に供される。最適投与量は、当業者の技能の範囲内であるが、本開示を考慮に入れて *in vitro* 及び *in vivo* 予備有効性実験を行うことで決定することができる。

【0185】

本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドが急速な殺菌をもたらすことができ、MIC以下の量で使用した場合に静菌効果をもたらすことができることが企図される。本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドが様々な抗生物質耐性細菌に対して活性であり得ることが更に企図される。本開示に基づき、臨床状況では、本修飾溶解素ポリペプチドは、単独で又は抗生物質 (耐性が発現された抗生物質を含む) と共に、薬物耐性及び多剤耐性細菌から生じる感染の治療の有力な代替 (又は付加的) 手段となり得る。

【0186】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドへの曝露時間は、1 ml 当たりの活性ポリペプチド単位の所望の濃度に影響を及ぼし得る。「長時間」又は「持続」放出担体に分類される担体 (例えば、或る特定の鼻腔用スプレー又はロゼンジ剤等) は、より低濃度であるが、より長時間にわたってポリペプチド単位/ml を含む又は提供することができ、「短時間」又は「急速」放出担体 (例えば、含嗽剤等) は、高濃度であるが、より短時間でポリペプチド単位 (mcg) / ml を含む又は提供することができる。より高い単位/ml の投与量又はより低い単位/ml の投与量を有することが望ましい場合もある。

【0187】

本開示の修飾溶解素ポリペプチドについて、治療有効用量は、初めに細胞培養アッセイ、又は動物モデル、通常はマウス、ウサギ、イヌ若しくはブタのいずれかにおいて推定することができる。動物モデルは、望ましい濃度範囲及び投与経路を達成するために使用することもできる。次いで、得られた情報を用いて、ヒトにおける有効用量及び投与経路を決定することができる。投与量及び投与は、十分な活性成分のレベルをもたらすか又は所望の効果を維持するために更に調整することができる。考慮され得る付加的な要因としては、疾患状態の重症度、患者の年齢、体重及び性別、食生活、所望の治療期間、投与方法、投与の時間及び頻度、薬物の組合せ、反応感度、療法に対する耐容性／応答、並びに治療を行う医師の判断が挙げられる。

【0188】

治療計画は、連日投与（例えば、1日1回、2回、3回等）、隔日（例えば、隔日で1回、2回、3回等）、週2回、週1回、2週間に1回、月に1回等を必要とし得る。一実施形態では、治療は持続注入として行うことができる。単位用量を何度も投与することができる。間隔は、臨床症状のモニタリングによって指定されるように不規則であってもよい。代替的には、単位用量を持続放出配合物として投与してもよく、この場合、より低頻度の投与を用いることができる。投与量及び頻度は、患者に応じて異なり得る。かかる指針が限局的投与、例えば鼻腔内、吸入、直腸等、又は全身投与、例えば経口、直腸（例えば、浣腸による）、筋肉内（i. m.）、腹腔内（i. p.）、静脈内（i. v.）、皮下（s. c.）、経尿道等のために調整されることが当業者には理解される。

【実施例】

【0189】

本明細書に記載の修飾溶解素ポリペプチド、並びにそれらの調製、特性評価及び使用は、本開示の範囲の限定ではなく、説明として意図される以下の実施例との関連でより良く理解される。

【0190】

【表2】

以下の略語が本明細書で使用される。

CHAP	溶解素分子のシステインヒスチジン依存性アミドヒドロラーゼ／ペプチダーゼ（CHAP）エンドペプチダーゼドメイン（酵素活性ドメインすなわちEAD）
SH3b	溶解素分子のC末端SH3b__5（「SH3b」）細胞壁結合ドメイン（すなわちCBD）
MIC	対照において観察される細菌増殖の少なくとも80%を抑制するのに十分な最小濃度を示す、通例1ミリリットル当たりのマイクログラム数で測定される最小阻止濃度
X#Y	突然変異の表記。数字は配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型P1ySs2溶解素の配列中の位置を表し、Xは野生型溶解素中の元のアミノ酸残基であり、Yは修飾溶解素ポリペプチド中の代わりのアミノ酸残基である
VAN	バンコマイシン
DAP	ダプトマイシン
WT	野生型
TCE	T細胞エピトープ

【0191】

実施例1－修飾溶解素ポリペプチドの選択

本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドを、野生型P1ySs2溶解素の推定T細胞エピトープ（TCE）のコア配列のコンピューターによる計算ガイド特定及び野生型P1ySs2溶解素への任意TCEスコアの割当てを含む大規模スクリーニングプログラムによって得た。コンピューターによるスクリーニング方法及びアルゴリズムを商業（個別支払い）方式で用いて、野生型P1ySs2溶解素配列の潜在的免疫関連セグメント（推定T細胞エピトープ）を特定し、これらのセグメントを突然変異の標的とした。予測TCEを破壊するように設計される突然変異を特定した。商業サービスを各修飾溶解素ポリペプチドの免疫原性の評定に用いることができる。修飾溶解素ポリペプチドに破壊されたTCEに基づいて免疫原性スコアを割り当てることができる。

【0192】

次いで、推定TCEを減衰又は除去するように設計された突然変異部位を計算的に設計し、代替りのアミノ酸をTCEセグメントのTCEスコアが減少するように計算的に選択した。7個のアミノ酸位置を特定されたTCE1、TCE2及びTCE3の各々における突然変異のために選択し、47個のアミノ酸位置を特定されたTCE4について選択した。CHAPドメインにのみ突然変異を有する合計16121個の変異体を生成した。同様に、5個、8個、19個及び21個のアミノ酸残基を特定されたSH3b TCE5、6、7及び8のそれぞれにおける潜在的置換えに選択し、SH3bドメインに突然変異を有する合計15960個の変異体を生成した。次いで、突然変異体の各セットのライブラリー（CHAPドメイン及びSH3bドメインライブラリー）を、細菌細胞壁のペプチドグリカン切断能力について、オーバーレイ試験を用いてスクリーニングした。

10

【0193】

下記表2に示されるように、配列番号1の配列を有するPlySs2の野生型アミノ酸配列の以下のセグメント（それぞれ、触媒ドメイン及び細胞壁結合ドメインに位置する）が、推定T細胞エпитープ（「TCE」）のコアセグメントを構成するか又は1つ以上のT細胞エピトープの一部を潜在的に形成すると特定された。

【0194】

【表3】

表2

WTセグメント	1	2	3	4	5	6	7	8
WTドメイン	CHAP				SH3b			
AA残基	32-45	84-98	100-112	128-145	164-170	172-187	189-201	204-221
TCE #	1	2	3	4	5	6	7	8
TCEスコア	4	4	7	10	4	3	4	6

20

【0195】

次いで、1つ以上の推定TCEを「枯渇させる」（除去する又は弱める）ことによって得られるポリペプチドのTCEスコアを減少させることが予測される突然変異を特定した。最大16121個のCHAPドメイン変異体及び15960個のSH3bドメイン変異体を包含するライブラリーをpBAD24発現ベクターにクローニングし、大腸菌（*E. coli*）Top10細胞に形質転換し、溶菌活性を有する修飾溶解素を特定するために一次スクリーニングにおいて特性評価した。溶菌活性の一次スクリーニングは、溶解素の死滅活性を、最初に精製する必要なしに溶解素発現クローンをを用いて検出するために以前に開発されたプレートベースの溶原性ブロス（lysogeny broth）（LB）軟寒天オーバーレイ法を用いて行った。しかしながら、溶菌活性を確認する任意の他の方法を用いることができる。

30

【0196】

簡潔に述べると、全てのライブラリー成員（すなわち、クローン）及びベクター対照株を、アンピシリンを添加したLBガラスプレートに貼り付けた後、得られたコロニーを1時間にわたる0.2%アラビノース蒸気の噴霧によって誘導した。誘導後にプレートを一晚インキュベートし、組換えタンパク質の発現を可能にした。発現後に、大腸菌細胞壁を透過化するためにライブラリーをクロロホルム蒸気に30分間曝露し、風乾した後、LB中のスタフィロコッカス・アウレウス株MW2の75µlの一晚培養物を含む溶融軟LB寒天を重層した。重層プレートを室温で15分間固化させた後、37℃で16時間～24時間インキュベートした。活性溶解素を発現するクローンのオーバーレイにおけるスタフィロコッカス・アウレウスに対する制限増殖条件により、溶解素の特定を容易にする明らかな透明帯（clearing zones）の出現が可能になる。ベクター対照は、透明帯を有しない。

40

【0197】

スクリーニングの或る特定の実施形態では、タンパク質を過剰発現させてもよく、或る特定の実施形態では、タンパク質を過剰発現させなくてもよい。同様に、或る特定の実施

50

形態では、タンパク質を精製してもよく、或る特定の実施形態では、タンパク質を精製しなくてもよい。例示的な一実施形態では、タンパク質を過剰発現させるが、精製しなくてもよい。

【0198】

陽性クローン（すなわち、明らかな透明帯と関連するクローン）を、クローン純度を確実にするために継代培養した後、シーケンシングして独自の配列を確認し、活性変異体の脱免疫化（deimmunization；DI）スコアを決定した。様々なDIスコアを有する、1000個を超える活性変異体がこのようにして特定された。最も低いDIスコアを有する活性クローンを、大腸菌Top10細胞においてpBAD24発現ベクターを用いて高レベルで発現させ、カラムクロマトグラフィーによって精製し、ミューラーヒントンブロス及び100%ヒト血清の両方におけるMIC値、寒天プレート上での大きな透明帯、熱安定性、並びに精製の容易さを含む情報の組合せに基づいて更に選択した。

10

【0199】

これらの基準に基づいて、36個のCHAP変異体及び66個のSH3bドメイン変異体を特定した。次いで、36個のCHAPドメインの各々及び66個のSH3bドメインの各々の配列修飾を、単一大腸菌ライブラリーにおいて組み合わせ、各ドメインの修飾を組み合わせた合計で最大2376個のクローンを得た。次いで、組み合わせライブラリーを、軟寒天オーバーレイ法を用いて上記のようにスクリーニングし、溶菌活性を発現する530個の「組み合わせ」突然変異体／変異体を特定した。この突然変異体は、或る変異体に由来する触媒ドメインと別の変異体の結合ドメインを組み合わせていることから、キメラ又はシャッフルと称することができる。各クローンの配列を特定し、各々の推定タンパク質配列を免疫原性についてスコアリングした。様々なT細胞エピトープ突然変異の脱免疫化能を予測するコンピューターによる計算法が幾つか知られており、例えばStealth Biologics, LLC等の企業から商業的に利用可能である（18）。次いで、最も低いDIスコアを有する活性クローンを過剰発現、精製、更なる特性評価、及びMICアッセイを用いた溶菌活性の試験のために選んだ。そのサブセットをマウス好中球減少性大腿感染モデル（MNTI）においてin vivo有効性について更に試験した。次いで、in vitro活性（低いMIC値）、野生型タンパク質と同様のMNTIを用いたin vivo有効性、高い熱安定性、高い精製収率及び低いTCEスコア（例えば、42という野生型（WT）TCEスコアよりも少なくとも25%低い、例えば少なくとも40%低い）に基づいて、最も活性の高い修飾溶解素ポリペプチドを選択した。最終的に選択された修飾溶解素ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1との差及びそのアミノ酸残基の位置に言及する）を、以下のように下記表3にまとめる（一文字アミノ酸コードを用いる）。

20

30

【0200】

【表 4】

表 3

No.	MIC (μ g/mL)	TCE	C H A P ドメイン突然変異 (TCE 1-4)**				S H 3 b ドメイン突然変異 (TCE 5-8)**			
			TCE 1	TCE 2	TCE3	TCE4	TCE 5	TCE6	TCE 7	TCE 8
WT	1	42	DI=4	DI=4	DI=7	DI=10	DI=4	DI=3	DI=4	DI=6
pp55*	0.125	24		L92W	V104S	V128T 及び Y137S				
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=4	DI=3	DI=4	DI=6
pp388	4	26					Y164N	N184D	R195E	V204K 及び V212E
			DI=4	DI=4	DI=7	DI=10	DI=0	DI=0	DI=0	DI=1
pp61*	0.5	19		L92W	V104S	V128T 及び Y137S			S198H	I206E
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=4	DI=3	DI=1	DI=4
pp65*	1	15		L92W	V104S	V128T 及び Y137S			S198Q	V204A 及び V212A
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=4	DI=3	DI=0	DI=1
pp296	2, 1	13		L92W	V104S	V128T 及び Y137S	Y164K	N184D	S198Q	
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=0	DI=0	DI=0	DI=6
pp616	0.5	29				V128T 及び Y137S	Y164K			
			DI=4	DI=4	DI=7	DI=1	DI=0	DI=3	DI=4	DI=6
pp400	2	21	R35E	L92W	V104S	V128T 及び Y137S				
			DI=1	DI=0	DI=2	DI=1	DI=4	DI=3	DI=4	DI=6
pp628	4	15		L92W	V104S	V128T 及び Y137S	Y164K			V204K 及び V212E
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=0	DI=3	DI=4	DI=1
pp632	8	8		L92W	V104S	V128T 及び Y137S	Y164K	N184D	S198Q	V204K 及び V212E
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=0	DI=0	DI=0	DI=1
pp324	8	17		L92W	V104S	V128T 及び Y137S	Y164N	N184D		
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=0	DI=0	DI=4	DI=6
pp325	16	16		L92W	V104S	V128T 及び Y137S	Y164N		R195E	
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=0	DI=3	DI=0	DI=6

10

20

30

40

pp341	8	16		L92W	V104S	V128T 及び Y137S		N184D		V204A 及び V212A
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=4	DI=0	DI=4	DI=1
pp619	0.5	20		L92W	V104S	V128T 及び Y137S	Y164K			
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=0	DI=3	DI=4	DI=6
pp642	64	14		L92W	V104S	V128T 及び Y137S	Y164K			I206E 及び V214G
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=0	DI=3	DI=4	DI=0
pp338	4	17		L92W	V104S	V128T 及び Y137S		N184D	S198H	
			DI=4	DI=0	DI=2	DI=1	DI=4	DI=0	DI=0	DI=6

* 余分なリシン残基をC末端に有する、合計246アミノ酸。

** CHAPドメイン及びSH3bドメイン中の8つの指定のTCEの各々についてのDI（脱免疫化）スコアを示す。

【0201】

上記表では、各変異体の8つの推定TCEの各々についての総DIスコアを提示する。MIC値を試験した変異体について表に報告する。値は、0.125 μg/mL～64 μg/mLの範囲であった。小規模で精製した野生型溶解素は、変異体と同様、1 μg/mLのMICを有し、GMPグレードの野生型溶解素は、0.5 μg/mLのMICを有していた。理論に束縛されることを望むものではないが、野生型活性の差が純度の差に起因し得る可能性がある。

【0202】

グラム陽性細菌の治療に適した抗生物質、例えばダプトマイシン（DAP）及びバンコマイシン（VAN）との相乗作用研究を、チェッカーボードアッセイを用いて行った。部分阻止濃度（FIC）指数値を、5つのメチシリン感受性スタフィロコッカス・アウレウス（MSSA）分離株及び5つのメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（MRSA）分離株に対して修飾溶解素ポリペプチドpp296及び抗生物質の組合せについて決定した。0.5以下のFIC指数値は、2つの作用物質間の強い相乗作用と解釈することができ、0.5～1の値は、依然として相乗作用とみなすことができる。pp296が触媒ドメインに4つのアミノ酸置換を有するとすると、抗生物質と相乗作用を示すpp296の能力は予期せぬものであった。このため、本開示により、感受性細菌に対する修飾溶解素ポリペプチドとグラム陽性細菌の治療に適した抗生物質との組合せの注目すべき有効性及び相乗作用が実証される。定性的に同様の結果がpp55、pp61、pp65、pp400及びpp619等の他の脱免疫化活性変異体を用いた同様のアッセイを本開示に従って行うことで予想され得る。

【0203】

修飾溶解素ポリペプチドpp296のFIC指数値は、ダプトマイシン及びバンコマイシンの両方を用いた場合に主に0.5であり、野生型とほぼ同一であり、ダプトマイシン及びバンコマイシンの両方とのpp296の相乗活性が野生型溶解素とほぼ同一であることが示された。下記実施例5を参照されたい。定性的に同様の結果がpp55、pp61、pp65、pp400及びpp619等の他の脱免疫化活性変異体を用いた同様のアッセイを本開示に従って行うことで予想され得る。

【0204】

更なる研究により、変異体pp296の抗バイオフィーム活性（MBECとして測定される）を野生型Plys2と比較した。各々を17個のMSSA分離株及び20個のMRSA分離株によって形成される1日経過したバイオフィームに対して96ウェル微量液

10

20

30

40

50

体希釈フォーマットで試験した。修飾溶解素ポリペプチド p p 2 9 6 の M B E C 値から、修飾溶解素ポリペプチドが、全てではないが殆どの試験した M S S A 及び M R S A 分離株に対して野生型 P l y S s 2 と比較してより高い活性を有することが示される。結論として、修飾溶解素ポリペプチド p p 2 9 6 の i n v i t r o 活性プロファイルは、野生型 P l y S s 2 と同等及び／又はより良好であり得る。下記実施例 6 を参照されたい。これらの結果から、本修飾溶解素ポリペプチドがバイオフィーム及びそれらの形成を破壊する、消散させる、阻害する及び処理する野生型 P l y S s 2 の能力を保持又は改善することが示される。したがって、この活性が抗生物質との組合せで持続することが予想される。本開示は、医療器具（人工装具、心臓機械弁等の弁、カテーテル、人工肛門装置、乳房インプラント、人工関節、脳室シャント、ペースメーカー、除細動器、補助人工心臓（ventricular-assisted devices）、コンタクトレンズ及びコンタクトレンズケース等）を本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドで処理し、かかる器具の使用時にバイオフィームの形成を生じ得る、かかる器具の表面への細菌の付着を回避することも企図する。

10

【0205】

表 3 の選択された修飾溶解素ポリペプチドを、後続の実施例により詳細に記載される更なる試験に供した。用量応答を、より低い M I C 値（より高い i n v i t r o 活性）を示したこれらの修飾溶解素ポリペプチドの幾つかについて、下記の i n v i v o M N T I モデルを用いて確認した。M N T I において試験した全てのペプチドは、より高用量（15 mg / k g 以上）で十分に機能したが、p p 2 9 6 のみがより低用量（0.5 mg / k g）で野生型と同等に機能した。野生型対照（C F - 3 0 1 及び p p 1 1 4 9）に加え、表 3 中の 15 個の修飾溶解素ポリペプチドの幾つかをマウス毒性スクリーニングにおいて試験し、それらが野生型タンパク質と同様の毒性プロファイルを有するかを確かめた。選択した器官の完全な肉眼的剖検及び組織病理学的評価により、修飾溶解素ポリペプチド p p 2 9 6 が 30 mg / k g と高用量で外膜所見を引き起こさないことが明らかとなった。同じ 30 mg / k g 用量の P l y S s 2 は、潜在的毒性の指標となる外膜所見の 100 % の発生率を生じた。

20

【0206】

2 つの更なる毒性研究の結果は一致した。第 1 の研究は、スプラーグドーリーラットに 2 時間の単回静脈内注入として投与した場合の p p 2 9 6 の潜在的毒性及び毒物動態学プロファイルの評価を含むものであった。最低 3 日間の回復期間後の任意の効果の持続又は進行のように回復が観察された。本研究では、臨床兆候、体重、体重増加、摂餌量、臨床病理パラメーター（血液学、凝固、血清化学及び尿検査）、肉眼的剖検所見及び組織病理学的所見を評価した。研究により、5 mg / k g、25 mg / k g、50 mg / k g 及び 100 mg / k g の用量レベルでのラットへの p p 2 9 6 の単回静脈内注入が、全用量で異常な所見がなく、耐容性良好であることが見出された。

30

【0207】

第 2 の研究は、p p 2 9 6 への動物の長期の反復曝露及びこの曝露による毒性の評価を含むものであった。具体的には、0.5 mg / k g / 日、2.5 mg / k g / 日又は 10 mg / k g / 日を 7 日連続で尾静脈を介した 2 時間の注入によって毎日投与した。実施例 10 に詳述されるように毒性は見られなかった。

40

【0208】

加えて、修飾溶解素ポリペプチド単独に曝露した場合に修飾溶解素ポリペプチドに対して耐性を発現する細菌の能力、及び M I C 以下の量の修飾溶解素ポリペプチドの存在下で抗生物質に曝露した場合に D A P 又は V A N のいずれかに対して耐性を発現する細菌の能力を評定した。結果を図 3 A に示すが、3 つの異なる複製系統（p p 2 9 6 - 1、p p 2 9 6 - 2 及び p p 2 9 6 - 3 と称される）を用いた修飾溶解素ポリペプチド p p 2 9 6 の M I C の増大は、全く又は殆ど観察されない。結果を図 3 B 及び図 3 C にも示すが、M I C 以下の量の修飾溶解素ポリペプチド p p 2 9 6 の存在下での D A P 又は V A N のいずれかの M I C の増大は、全く又は殆ど観察されなかった。D A P 耐性の抑制に必要とされる p p 2 9 6 の量は、p p 2 9 6 単独の M I C の 16 分の 1 である 0.125 μ g / m L で

50

あった。DAP耐性の抑制が3つの異なる複製系統（pp296-1、pp296-2及びpp296-3と称される）において観察された。VAN耐性の発現の抑制に必要とされるpp296の量は、pp296単独のMICの8分の1である0.25 µg/mLであった。VAN耐性の抑制が3つの異なる複製系統（pp296-1、pp296-2及びpp296-3と称される）で観察された。このため、修飾溶解素ポリペプチドpp296は、野生型溶解素Plys2と同様、抗生物質耐性の発現を阻害し、MIC以下の量であってもそれに効果的である。かかる発現を阻害する目的で、溶解素のMIC以下の濃度をもたらす量よりも多量の溶解素を使用する必要はない。しかしながら、より多量の溶解素の使用が企図される。上記の結果に基づくと、細菌が耐性を発現した抗生物質と組み合わせ投与した場合にpp296が抗生物質耐性を克服し得ることが予想される。

10

【0209】

本明細書に開示の修飾溶解素ポリペプチドの特性

本明細書に記載の修飾溶解素ポリペプチドは、触媒ドメイン中で置き換えられるアミノ酸残基の大部分がTCE2、TCE3及びTCE4に集中し、最終候補の1つのみがTCE1にも置換を有するという点で或る特定の類似点を有する。さらに、置き換えられる残基は更に限定され、2つを除く全最終候補がTCE2中のL92W及びTCE3中のV104Sの修飾を有し、1つを除く全最終候補が置換V128T及びY137Sの各々も有する。さらに、TCE2、3及び4中のこれら4つの置換は、活性に実質的に影響を及ぼすことなく（実際に増大させる場合もある）、（結合ドメイン中の置換を有さずに又は最小限にして）免疫原性を実質的に減少させるのに十分であるようである。例えば、pp55、pp400、pp619及びpp388を参照されたい。このため、両方のドメイン中に野生型との差異を有する必要はない。触媒ドメイン中の付加的な置換であるR35Eは、良好な活性及び実質的に（50%超）低下した免疫原性の両方を有するポリペプチド（pp400）をもたらしした。修飾溶解素ポリペプチドpp400が結合ドメイン中に置換を有しなかったことが更に注目になる。しかしながら、概して、触媒ドメイン単独における突然変異は、溶解素を適切に脱免疫化するのに十分でない可能性がある。

20

【0210】

TCEスコアに関して、野生型溶解素の推定T細胞エピトープは、CHAPドメインをSH3bドメインよりも重要な免疫原性の全般的寄与因子とする、以下のTCEスコアを有する：TCE1=4、TCE2=4、TCE3=7、TCE4=10、TCE5=4、TCE6=3、TCE7=4及びTCE8=6。

30

【0211】

概して、触媒ドメインは、より制限された置換の多様性を許容した。

【0212】

次に結合ドメインを検討すると、両ドメインにおける置換が必要でないことがこの場合も観察された。例えば、修飾溶解素ポリペプチドpp388を参照されたい。触媒ドメインが免疫原性のより重要な寄与因子であり得るという観察結果と一致して、CHAPドメインの置換を有しない修飾溶解素ポリペプチドpp388が、CHAPドメインに置換を含む活性修飾溶解素ポリペプチドよりも低い免疫原性の低下を示した。

【0213】

SH3bドメインのTCE5、6、7及び8中の置換は、以下のように限定される：TCE5中のY164N又はY164K（まとめて、Y164N/K）、TCE6中のN184D、TCE7中のR195E、S198H又はS198Q（S198H/Q）、並びにTCE8中の組合せV204A/K及びV212A/E、又は単独若しくはV214Gと組み合わせたI206E。

40

【0214】

要約すると、CHAPドメインの35位、92位、104位、128位又は137位の1つ以上における1つ以上のアミノ酸残基、及び／又はSH3bドメインの164位、184位、195位、198位、204位、206位、212位又は214位における1つ以上のアミノ酸残基（位置は配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型溶解素の配列に従

50

って番号付けされる)を、1つ以上の標的微生物に対する野生型溶解素の実質的な溶菌活性を維持しながら野生型溶解素と比較して修飾溶解素ポリペプチドの免疫原性及び／又は毒性を低下させるように置き換えることによって溶解素 P l y S s 2 の変異体を作製することが可能であることが実証された。免疫原性は、T C E スコアにより、かかるスコアを得るための任意の利用可能なコンピューターによる計算ガイド方法(例えば、個別支払い方式の商業的に利用可能な方法)を用いて測定し、同様に得られる親溶解素の T C E スコアと比較することができる。例えば、Stealth Biologics、ProImmune、Creative Biolabs、Epivax 及び他の企業がかかる研究に取り組むことができ、その幾つかが i n v i t r o 及び i n v i v o 試験で追跡調査することができる。代替的には、免疫原性は、混合リンパ球反応又は P B M C 増殖アッセイ(並びに例えば試験されるポリペプチドによる刺激に応答して分泌された1つ以上の炎症性サイトカインの検出及び定量化による増殖の評定)等の多数の i n v i t r o 又は i n v i v o イムノアッセイのいずれかによって評定することができる。最終的に、ヒト免疫系に対する免疫原性を評定することができる。公開され、規制当局により認定された多数の戦略がこのために存在する(6)。

【0215】

表3から分かるように、免疫原性は、数に或る程度しか関係し得ない。概して、付加的なT細胞エпитープが枯渇又は減衰するにつれ、溶菌活性を実質的に損なうまでには至らない限りにおいて免疫原性が減少し得る(上記のM I Cアッセイ等の任意の利用可能な試験を用いて脱免疫化変異体を活性について試験することによる)。しかしながら、例えば p p 5 5、p p 6 1 6 及び p p 3 8 8 に示されるように、より少数のアミノ酸置換で望ましい効果をもたらすことができるように、与えられたパラメーター及び指針の範囲内で戦略化することが可能である。上記のデータに基づく、C H A P ドメイン中の最適な置換の数が、例えば T C E 2、T C E 3 及び T C E 4 の位置で3であり得ると理論化される。しかしながら、修飾溶解素ポリペプチドは、C H A P ドメイン中の3つを超える置換にも適合することができる。

【0216】

実施例2：修飾溶解素ポリペプチドの発現

野生型 P l y S s 2 は、例えば Fischetti et al に対する米国特許第 9, 0 3 4, 3 2 2 号に記載されるように得ることができる。同様の手順(アラビノースで誘導可能なプラスミド p B A D 2 4)に従い、突然変異体ポリヌクレオチドのライブラリーから本開示の修飾溶解素ポリペプチドを発現させた。野生型 P l y S s 2 溶解素サンプルも修飾溶解素ポリペプチドの精製に用いられる方法によって精製し、精製した野生型 P l y S s 2 を付加的な陽性対照として使用した。ThermoFisher (InvitroGen)により、考え得る全ての C H A P ドメイン及び S H 3 b 変異体のライブラリーが生成された。表3に特定される修飾を有する配列番号1に基づく配列を有する修飾溶解素ポリペプチドは、例えば部位特異的突然変異誘発によって野生型 P l y S s 2 溶解素から生成することができる。

【0217】

修飾溶解素ポリペプチドを p B A D 2 4 ベクターにクローニングし、大腸菌(Escherichia coli) T o p 1 0 細胞に形質転換した。p B A D 2 4 は、β-ラクタマーゼ(アンピシリン耐性をコードする)をコードし、アラビノース誘導転写の厳重な制御を可能にする。組み換え大腸菌株を L B プレート上で増殖させ、アラビノース蒸気で誘導し、スタフィロコッカス・アウレウス株 M W 2 を含有する軟寒天オーバーレイを重ねた(Schuch, R. et al., 2009, Methods Mol Biol. 2009; 502:. doi:10.1007/978-1-60327-565-1_18)。修飾溶解素ポリペプチドが活性である場合、透明帯が大腸菌コロニーの周囲に生じた(プレートベースの L B 軟寒天オーバーレイ法)。

【0218】

作製を以下のようにスケールアップした。p B A D 2 4 変異体プラスミドを含有する形質転換大腸菌を-80℃ストックから新たに画線し、100µg/mLカルベニシリン及び0.2%グルコースを含有する L B 培地に接種し、一晚増殖させた。翌日、遠沈し、P B S に再懸濁した一晚培養物の50倍希釈物を、100µg/mLカルベニシリンを含

む 2 L の L B 培地に接種した。培養物を 37℃ で 3 時間増殖させた後、アラビノースを 0.2% の最終濃度まで添加し、25℃ で 16 ± 3 時間にわたって一晩誘導した。培養物を 4000 rpm で 20 分間、無菌で遠心分離した。ペレットを Tris 緩衝液 (pH 7.2) に 30 mL 容量まで懸濁し (細胞懸濁液)、5 μl の 250 U / μl benzonase (合計 1250 U) 及び 1 錠のプロテアーゼ阻害剤の完全 EDTA フリー錠 (Roche) を添加した。次いで、混合物を超音波処理し、18000 rpm で 30 分間の遠心分離によって清澄化した。次いで、得られた上清を、精製プロセスを始める前に 1 部の dH₂O 及び 1 部の 25 mM Tris 緩衝液 (pH 7.2) で 3 倍希釈し (総容量 90 mL ~ 100 mL)、0.22 ミクロンの膜に通した。

【0219】

10

実施例 3：修飾溶解素ポリペプチドの精製

野生型 PlySs2 及び修飾溶解素ポリペプチドの精製を、イオン交換クロマトグラフィーに続く最終サイズ排除クロマトグラフィーによって行った。簡潔に述べると、再懸濁した細胞溶解物を初めに 5 mL 容 Hi Trap DEAE カラム (弱アニオン交換) に通し、次いで 5 mL 容 Hi Trap Captop MMC カラム (付加的な疎水性相互作用及び H 結合相互作用を有する弱カチオン交換カラム) から塩勾配で溶出した。画分を OD₂₈₀ によって定量化し、それらの純度を SDS-PAGE ゲル電気泳動によって評定した。タンパク質を含有する画分をプールし、25 mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) に対して透析した。透析後に、タンパク質画分を 5 mL 容 Hi Trap Q FF カラム (強アニオン交換カラム) にロードし、溶出液を回収し、第 2 の Captop MMC カラムにロードし、塩勾配によって溶出した。タンパク質を含有する溶離液をプールし、リン酸緩衝生理食塩水に対して透析し、Hi Load 16 / 600 Superdex 75 pg カラムを用いたゲル濾過 (サイズ排除) によって更に精製した。全ての精製サンプルを Demo Buffer (7.67 mM 一塩基性リン酸ナトリウム二水和物、7.33 mM 二塩基性リン酸ナトリウム一水和物、150 mM NaCl、pH 7.2) 中で保管した。サイズ排除クロマトグラフィー (精製プロセスの最終工程) の溶出ピーク下の画分の SDS-PAGE ゲルを pp1149、pp53、pp55、pp61、pp65 及び pp296 を含む精製した幾つかの修飾溶解素ポリペプチドについて図 1 に示す (既に精製されている委託製造業者から入手した野生型 PlySs2 については示さない)。

20

30

【0220】

図 1 に示される円に区分された修飾溶解素ポリペプチドの画分をプールした。

【0221】

精製収率は、培養物の 2 L バッチにつき 4 g ~ 94 g のタンパク質の範囲であった。精製された修飾溶解素ポリペプチド及び野生型対照は、下記表 4 に示されるように以下の特性を有していた。

【0222】

【表 5】

表 4

野生型又は変異体の番号	CHAP突然変異	SH3b突然変異	付加したC末端残基	MW	予測された pI
WT	なし	なし		25928	8.97
pp1149	なし	なし		25928	8.97
pp53	なし	なし	+246K	26057	9.10
pp55	L92W V104S V128T Y137S	なし	+246K	26059	8.97
pp61	L92W V104S V128T Y137S	S198H I206E	+246K	26240	9.00
pp65	L92W V104S V128T Y137S	S198Q V204A V212A	+246K	26160	9.13
pp296	L92W V104S V128T Y137S	Y164K N184D S198Q		26054	9.04
pp388		Y164N N184D R195E V204K V212E		25912	8.32
pp616	V128T Y137S	Y164K		26060	9.17
pp400	R35E L92W V104S V128T Y137S			26019	8.64
pp628	L92W V104S V128T Y137S	Y164K V204K V212E		26071	9.17
pp632	L92W V104S V128T Y137S	Y164K N184D S198Q V204K V212E		26113	9.04
pp324	L92W V104S V128T Y137S	Y164N N184D		25998	8.88
pp325	L92W V104S V128T Y137S	Y164N R195E		25970	8.67

10

20

30

40

pp341	L92W V104S V128T Y137S	N184D V204A V212A		25991	8.85
pp619	L92W V104S V128T Y137S	Y164K		26121	9.17
pp642	L92W V104S V128T Y137S	Y164K I206E V214G		25985	9.04
pp338	L92W V104S V128T Y137S	N184D S198H		26097	8.85

10

【0223】

実施例4：修飾溶解素ポリペプチドの熱安定性

熱安定性は、活性を評定する前に溶解素ポリペプチドをT r i s緩衝液（pH8.0）中で128μg/mLの一定濃度にて様々な高温（約30℃～60℃の範囲内）で30分間インキュベートすることによって評定した。次いで、サンプルを氷上で2分間冷却した後、T r i s緩衝液中の細菌接種材料（OD₆₀₀ 約0.5～1.2）を各サンプルの2倍希釈系列（96ウェルマイクロタイタープレートの上軸に沿って128μg/mL～0.25μg/mLに希釈した）に曝露することによる*in vitro*溶解アッセイによって活性を評定した。光学密度の低下を室温で15分間追跡し、15分間で50%の光学密度の低下を可能にする酵素濃度に基づいて比活性を決定した。各変異体の酵素活性を野生型CF-301酵素（GMTグレードのP l y S s 2タンパク質）と比較し、様々な温度にわたる野生型活性の%を算出した。

20

【0224】

野生型CF-301の熱安定性を任意に100に設定した。37℃の単一温度での例示的な修飾溶解素ポリペプチドについての結果を下記表5に記載する。

30

【0225】

【表6】

表5

野生型又は変異体の番号	37℃での野生型活性 (%)
WT CF-301	100
WT pp1149	95.6
pp53	149.4
pp55	122, 146
pp61	258
pp65	220
pp296	205

40

【0226】

別の実験では、修飾溶解素ポリペプチドの熱安定性を種々の温度で評定し、野生型CF-301（100に設定した）と比較した。pp296を含む幾つかの修飾溶解素ポリペプチドについて、安定性は、下記表6に示されるように、野生型溶解素よりも42℃以下の温度で実質的に高く、45℃以上の温度で実質的に低かった。

【0227】

【表 7】

表 6

	値は C F - 3 0 1 野生型に対する % として報告する					
W T / 変異体	37℃	40℃	42℃	45℃	48℃	50℃
WT pp1149	95.6	83.2	94.2	87.1	79.4	36.8
pp55	122.1	110.8	116.7	82.0	36.5	11.2
pp61	258.3	149.1	189.4	80.0	0.0	0.0
pp65	219.9	248.4	270.4	82.1	0.0	0.0
pp296	204.6	243.1	141.2	40.1	0.0	0.0

10

【0228】

実施例 5 : *in vitro*での修飾溶解素ポリペプチドの溶菌活性、抗生物質との相乗作用、及び耐性の非発現

全 P l y S s 2 変異体の *in vitro*活性をスタフィロコッカス・アウレウス分離株 C F S - 8 6 0 (C A I R D - 4 2 6) に対して 1 0 0 % ヒト血清 (H u S) 中で評定し、野生型 P l y S s 2 (C F - 3 0 1) 及び実験室で精製された P l y S s 2 (p p 1 1 4 9 と称される) と比較した。全ての変異体を、M I C を評定する C L S I (米国臨床検査標準協議会 (Clinical and Laboratory Standards Institute)) の微量液体希釈法

20

【0229】

メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (M R S A 株 M W 2) を、5 % ヒツジ血液を含む B B L (商標) トリプチケース (商標) ソイ寒天 I I のプレートに分離株を画線プレーティングすることによって 8 0 ° C 細菌ストックから 3 7 ° C で 1 8 時間 ~ 2 4 時間培養し、単一コロニーを得た。一様な外観で選択されたコロニーを 2 . 5 m L のミューラーヒントンブロス (M H B) に接種した。濁度を室温で 0 . 5 マクファーランド標準単位 (5×10^5 コロニー形成単位 (C F U) / m L) に調整した。標準化培養物を 1 0 0 % ヒト血清で 1 5 0 倍希釈した後、9 6 ウェル丸底ポリスチレンマイクロタイタープレート (B D) において野生型 P l y S s 2 又は修飾溶解素ポリペプチドの 2 倍段階希釈物に曝露

30

【0230】

修飾溶解素ポリペプチド p p 2 9 6 の *in vitro*活性を、2 5 % ウマ血清及び 0 . 5 m M D T T を添加したカチオン調整ミューラーヒントンブロス (C A M H B - H S D) において様々な 5 1 個の M S S A 分離株及び 5 1 個の M R S A 分離株に対して評定し、W T G M P グレード P l y S s 2 (C F - 3 0 1) と比較した。C F - 3 0 1 及び p p 2 9 6 を各々 C A M H B - H S D で希釈した。各溶解素について、希釈系列は、プレートの各ウェルの 2 倍希釈後に最終濃度が 6 4 μ g / m L 、 3 2 μ g / m L 、 1 6 μ g / m L 、 8 μ g / m L 、 4 μ g / m L 、 2 μ g / m L 、 1 μ g / m L 、 0 . 5 μ g / m L 、 0 . 2 5 μ g / m L 及び 0 . 1 2 5 μ g / m L を含むよう設定する。各溶解素を各株に対して二連で試験した。調製物を一晩インキュベートした。増殖を直径およそ 2 m m の増殖ボタンとして可視化した。8 0 % 以上の増殖阻害をもたらす最高の希釈率を最小阻止濃度 (M I C) と称した。下記表 7 に示されるように、p p 2 9 6 の活性は、或る 2 倍希釈範囲で C F - 3 0 1 と非常によく似ていた。

40

【0231】

【表 8】
表 7

株	N	pp296 (μg/mL)			CF-301 (μg/mL)		
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲
MSSA	51	1	1	0.5-2	0.5	1	0.5-1
MRSA	51	1	1	0.25-2	0.5	0.5	0.12-1

【0232】

別の実験では、ダプトマイシン及びバンコマイシンと相乗作用を示す修飾溶解素ポリペプチド pp296 の能力を、チェッカーボード分析を用いて評定した。FIC（部分阻止濃度）指数値を、5 個の MSSA 分離株及び 5 個の MRSA 分離株に対して pp296 及び抗生物質の組合せについて決定した。合計 50 μl のミューラーヒントンブロス（BBL）を微量希釈プレートの各ウェルに分配した。組合せの第 1 の抗生物質を縦座標に沿って段階希釈し、第 2 の薬物を横座標に沿って希釈した。0.5 マクファーランド濁度標準に等しい接種材料を、MHB 中で各スタフィロコッカス・アウレウス分離株から調製した。各マイクロタイターウェルに 5×10^5 CFU/ml の 100 μl の細菌接種材料を接種し、プレートを好気条件下にて 37℃で 18 時間インキュベートした。得られたチェッカーボードは、2 つの抗生物質の各々の組合せを含み、最高濃度の各抗生物質を含むウェルを対角に置いた。微量液体希釈についての CLSI の指針に従い、MIC を肉眼で検出される生物の増殖を完全に阻害する抗生物質の最低濃度として規定した。試験される抗生物質間の相互作用を定量化するために、FIC 指数（個々の抗生物質の MIC の最も大きな変化をもたらした抗生物質の組合せ）値を各々の株及び抗生物質の組合せについて以下のように算出した：

$$(A/MIC_A) + (B/MIC_B) = FIC_A + FIC_B = FIC \text{ 指数}$$

（式中、A 及び B は、単一ウェルにおける組合せでの各作用物質の MIC であり、MIC_A 及び MIC_B は、個別に使用した場合の各薬物の MIC である）。組合せは、FIC 指数が 0.5 以下である場合に強く相乗的とみなし、FIC 指数が 0.5 超～1 未満である場合に相乗的とみなす。

【0233】

チェッカーボードを、pp296 とダプトマイシン又はバンコマイシンのいずれかとの組合せを用いて 5 つの MRSA 株（MW2、JMI-5675、JMI-4408、JMI-6181 及び JMI-6182）及び 5 つの MSSA 株（ATCC 29213、JMI-40979、JMI-43257、JMI-41293 及び JMI-49315）に対して生成した。相乗作用は、2 つの成分を共に添加することで予測されるよりも大きな阻害活性として規定した。バンコマイシンを用いた場合、修飾溶解素ポリペプチド pp296 及び CF-301 は、試験した 10 個の株のうち 6 個に対して 0.5 と同一の FIC 指数値を示し、強い相乗作用が明らかに示された。pp296 は、1 つの MRSA 株（JMI-6182）及び 1 つの MSSA 株（JMI-40979）に対して CF-301（FIC 指数値 0.5）と比較して 0.375 と僅かに優れた FIC 指数値を示した。pp296 はまた、1 つの MSSA 株（ATCC 29213）及び 1 つの MRSA 株（JMI-41293）に対して、両方の株に対する CF-301 の値である 0.5 と比較して 0.625 及び 0.75 と僅かに高い FIC 指数値を示した。これらの研究結果から、pp296 が CF-301 と非常によく似たダプトマイシン及びバンコマイシンとの相乗作用のレベルを示すことが示される。

【0234】

別の実験では、細菌（MRSA 株 MW2）が、pp296 を用いない抗生物質の存在下で連続継代した細菌と同様に、MIC 以下の量の pp296 と組み合わせた MIC 以下の量の抗生物質の存在下で 21 日間～26 日間の連続継代後に抗生物質ダプトマイシン及び

10

20

30

40

50

バンコマイシンに対する耐性を発現しないことが決定された。

【0235】

細菌耐性の分析を p p 2 9 6 希釈系列及び抗生物質希釈系列の存在下、M I C 以下の量の p p 2 9 6 の存在下及び非存在下で 1 8 日間の連続継代にわたって M R S A 株 M W 2 を用いて行った。簡潔に述べると、微量液体希釈 M I C フォーマットを用い、2 倍希釈範囲の p p 2 9 6 単独、又は M I C 以下の一定量の p p 2 9 6 の存在下及び非存在下の抗生物質を細菌 (5×10^5 C F U / m l の出発濃度) と共に M H B 中にて 37°C で 2 0 時間培養した。次いで、細菌増殖が見られた最高濃度の修飾溶解素ポリペプチドを含むウェルを翌日の継代の接種材料として使用し、2 1 日間～2 6 日間にわたってプロセスを繰り返した。毎日各時点での M I C を記録し、耐性を M I C の段階的増大として測定した。このアッセイでは、p p 2 9 6 に対する耐性は観察されなかった。さらに、M I C 以下の量の p p 2 9 6 は、ダプトマイシン及びバンコマイシン耐性の出現を抑制した。結果を図 3 A ～図 3 C にグラフで示す。

【0236】

実施例 6：修飾溶解素ポリペプチドの抗バイオフィーム活性

p p 2 9 6 の抗バイオフィーム活性を、1 7 個の M S S A 分離株及び 2 0 個の M R S A 分離株によって形成される、1 日経過したバイオフィームに対して 9 6 ウェル微量液体希釈フォーマットで決定した。野生型 P l y S s 2 (C F - 3 0 1) と比較した p p 2 9 6 の最小バイオフィーム根絶濃度 (M B E C) 値を以下の標準的な方法論によって決定した。細菌を P B S に懸濁し (0. 5 マクファーランド単位)、T S B g (6 6 % トリプシンソイブロス、0. 2 % グルコース) で 1 0 0 倍希釈し、0. 1 5 m l アリコートとして 9 6 ウェルポリスチレンマイクロプレートに添加し、 37°C で 2 4 時間インキュベートした。次いで、バイオフィームを洗浄し、T S B g 中の 2 倍希釈系列の C F - 3 0 1 又は p p 2 9 6 によって 37°C で 2 4 時間処理した。全サンプルを三連で試験した。処理後に、ウェルを洗浄し、 37°C で風乾し、0. 0 5 % クリスタルバイオレットで 1 0 分間染色した。バイオフィームのバイオマスの減少を目視で評定し、クリスタルバイオレットを 3 3 % (体積 / 体積) 酢酸への可溶化によって定量化した。6 0 0 n m の光学密度 (OD_{600}) を、S p e c t r a M a x M 3 M u l t i m o d e マイクロプレートリーダーを用いて決定した。各サンプルの M B E C が、クリスタルバイオレット定量化によって評定される、バイオフィームのバイオマスの 9 5 % 超を除去するのに必要とされる最小溶解素濃度であった。M B E C アッセイを用いることで、全てではないが、殆どの試験した M S S A 分離株及び M R S A 分離株に対して p p 2 9 6 が野生型 P l y S s 2 と比較してより高い活性を有することが決定された。したがって、下記表 8 に示されるように、p p 2 9 6 抗バイオフィーム活性は、全体として野生型溶解素よりも僅かに良好である。

【0237】

【表 9】

表 8

C F - 3 0 1 と比較した p p 2 9 6 の抗バイオフィーム活性

	変異体 2 9 6 ($\mu\text{g/mL}$)				WT PlySs2 ($\mu\text{g/mL}$)			
	N	MBEC ₅₀	MBEC ₉₀	範囲	N	MBEC ₅₀	MBEC ₉₀	範囲
MSSA	17	0.063	0.25	0.01-1	19	0.125	0.125	0.125-0.5
MRSA	20	0.031	0.06	0.01-0.25	20	0.125	0.125	0.125-0.25

【0238】

実施例 7：i n v i v o での修飾溶解素ポリペプチドの有効性

4 つの修飾溶解素ポリペプチドの有効性を、マウス好中球減少性大腿感染 (M N T I) モデルを用いる用量応答 (0mg/kg ～ 60mg/kg) アッセイにおいて野生型 P l y S s 2 と比較した。

【0239】

細菌接種材料は、細菌細胞を600nmで約0.5の光学密度(OD)に達するまでMH₂B中で対数期へと増殖させることによって生成した。細菌細胞を十分に洗浄し、0.9%塩化ナトリウムUSPに再懸濁し、 3.9×10^8 コロニー形成単位(CFU)/mLの相当量まで希釈した。細胞を下記のように0.9%塩化ナトリウムUSPで更に希釈し、湿水上で維持した。

【0240】

好中球減少症を、雌性BALB/cByJマウス(5週～7週、Jackson Laboratories)において150mg/kg及び100mg/kgのシクロフォスファミドの腹腔内(ip)投与によって、それぞれ細菌の接種の4日前及び1日前に誘導した。細菌接種材料(スタフィロコッカス・アウレウス分離株CFS-860、100μlの 10^7 CFU/ml溶液)を各マウスの両大腿後部に筋肉内(IM)注射した。マウスに野生型PlySs2溶解素、並びに修飾溶解素ポリペプチドpp1149、pp55、pp61、pp65及びpp296(1回の投与につき2匹のマウス)をip感染の2時間後から静脈内投与した(0mg/kg、5mg/kg、15mg/kg、30mg/kg、60mg/kg)。接種の2時間後(初期対照)及び処理開始の24時間後に、動物を安楽死させ(CO₂窒息)、大腿を無菌で切除した。各大腿を秤量し、4mlの滅菌生理食塩水に入れ、7ml容の溶解チューブ内でPreceellys24ハイスループット組織ホモジナイザー(Bertin Corp, Rockville, MD)を用いてホモジナイズした。ホモジネートの希釈物をトリプシンソイ血液寒天プレート(Becton Dickinson)にプレーティングし、CO₂インキュベーターにおいて37℃で一晩インキュベートした。細菌負荷を計数し、log₁₀CFU/g(大腿重量)として表し、感染の2時間後に採取された対照動物(初期対照)及びビヒクルで処理した動物(後期対照)と比較した。

【0241】

マウス大腿細菌負荷を表すデータを図2に示す。y軸上の上の点はビヒクル単独であり、y軸上の下の点は初期対照である。実際に、pp1149は、同様に実験室において他の修飾溶解素ポリペプチドと共に過剰発現され、精製される野生型溶解素であり、付加的な陽性対照として使用される。

【0242】

4つの変異体(pp55、pp61、pp65及びpp296)が野生型PlySs2溶解素と同等の活性を有し、使用した最低用量(5mg/kg)であっても野生型PlySs2溶解素と活性が同等であることから、pp296が優れていることが図2から明らかである。

【0243】

実施例8：マウスにおける毒性スクリーニング

マウス毒物学的スクリーニングから、30mg/kgの野生型PlySs2を投与したマウスが腹部及び胸部の大動脈並びに心基部の大動脈基部に外膜病変(又は外膜所見)を伴う混合炎症細胞集団の血管周囲性浸潤を生じることが示された。外膜所見が、30mg/kgの野生型PlySs2及び野生型PlySs2(pp1149)を投与した全てのマウスにおいて観察された。外膜病変が、PlySs2野生型溶解素とはC末端246位の余分なリシンアミノ酸残基のみが異なるpp53の30mg/kg用量で処理した4匹のマウスのうち3匹で観察された。残りの修飾溶解素ポリペプチドの30mg/kg以上の用量を投与したマウスは、いかなる外膜所見も有しなかった。

【0244】

本実験で外膜病変を生じなかった4つの修飾溶解素ポリペプチド(pp55、pp61、pp65及びpp296)は、触媒ドメインに同じ突然変異(L92W、V104S、V128T及びY137S)を有しており、野生型溶解素中の対応する位置が観察される有害作用に寄与し得ることが示唆された。pp53を投与したマウスにおける外膜病変の存在から、PlySs2溶解素のC末端の余分なリシン残基が毒性を妨げるのに十分でないことが示された。

【0245】

10

20

30

40

50

他の軽度の病理所見が時折種々の群のマウスに見られたが、溶解素の投与に起因すると考えることはできなかった。腎臓の微少変化が種々の用量群のマウスにおいて観察され、理論に束縛されることを望むものではないが、野生型 P l y S s 2 (C F - 3 0 1) が腎臓所見を生じず、腎臓の変化が野生型 P l y S s 2 (p p 1 1 4 9) を投与した4匹のマウスのうち1匹で認められたことから、この差は試験ポリペプチドの純度に関連する可能性がある。いずれにしても、病理の発生率は低く、一貫せず、懸念すべきものではなかった。

【0246】

これらの実験に基づくと、p p 2 9 6 が、外膜所見の発生率によって測定される野生型溶解素と比較して低下した免疫原性及び低下した毒性と共に、野生型溶解素と同等の i n

10

v i v o 及び i n v i t r o 活性を含む最も望ましい特徴の組合せを有するようである。

【0247】

予想実施例9：i n v i t r o 免疫原性評定

種々のドナーに由来する末梢血単核細胞 (P B M C) を H L A タイピングし、評価して、包括的なヒト集団にわたる広範な説明を確認する。P B M C をタンパク質若しくは対照と共に、又は変異体に曝露せずに培養する。P B M C サンプルを14日間培養し、4日目、7日目及び11日目に培地交換及びサイトカイン補助を行った。14日目に、各培養物の P B M C サンプルを採取し、対象のサイトカインに対する抗ヒト抗体でプレコートした F l u o r o S p o t (商標) プレートに分取する。各サンプルをプレートのインキュベ

20

ーション前に変異体、又は陽性対照として野生型溶解素 (チャレンジ又は初回曝露のいずれかとして) 、又は陰性対照として無タンパク質で刺激する。

【0248】

24時間後に、F l u o r o S p o t (商標) プレートを F I T C 標識抗サイトカイン抗体 (例えば、抗 I F N - γ 抗体) の添加によって展開する。抗 F I T C - 4 9 0 抗体の添加により膜上にスポットが現れ、これを Z e i s s 自動化 F l u o r o S p o t (商標) リーダーシステムで計数する。

【0249】

陽性応答 (スチューデント T 検定) を各変異体又は対照の曝露サンプルと非曝露サンプルとの間のスポット数の差に基づいて決定する。異なる変異体にわたる応答を統計的有意性 ($p < 0.05$) について評価する。

30

【0250】

実施例10：ラットにおける毒性研究

本研究の目的は、2時間の単回静脈内注入としてスプラーグドーリーラットに投与した場合の p p 2 9 6 の潜在的毒性及び毒物動態学プロファイルを評価すると共に、最低3日間の回復期間後に任意の効果の回復、持続又は進行を評価することであった。

【0251】

以下の表9及び表10に研究群の設定を示す。フェーズAでは1群当たり5匹の雄性ラット及び5匹の雌性ラットとした。

【0252】

40

【表 10】

表 9－研究設計－フェーズ A

群番号	処理	用量レベル (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与体積 (mL/kg/hr)
1	ビヒクル ^a	0	0	5
2	pp296	5	0.5	5
3	pp296	25	2.5	5
4	pp296	50	5.0	5
5	pp296	100	10	5

^a ビヒクルは 20 mM L-ヒスチジン、5 % D-ソルビトール (w/v)、pH 7.0 (±0.1) とした。

【0253】

【表 11】

表 10－研究設計－フェーズ B 毒物動態学群

群番号	処理	用量レベル (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与体積 (mL/kg/hr)	動物の数 ^b 雄性／雌性	
6	pp296	5	0.5	5	6	6
7	pp296	25	2.5	5	6	6
8	pp296	100	10	5	6	6

^b フェーズ B の毒物動態学群 6～8 には、フェーズ A の群 1～5 と同じ方法（上に指定した投与体積で 2 時間の静脈内注入）で投与した。1 群当たり 6 匹の雄性ラット及び 6 匹の雌性ラットとした。

【0254】

主フェーズ（フェーズ A）及び毒物動態学フェーズ（フェーズ B）については、動物に 2 時間の単回静脈内注入を行った。フェーズ A の動物には、最大耐量（MTD）が 100 mg/kg の高用量まで決定されるまで漸増用量で 2 時間の単回静脈内注入を行った。最低 3 日間の観察を各 pp296 投与の間に設けた。群 2～5 に割り当てられた動物を用量投与の終了のおよそ 72 時間後に剖検した。

【0255】

以下のパラメーター及びエンドポイントを本研究で評価した：臨床兆候、体重、体重増加、摂餌量、臨床病理パラメーター（血液学、凝固、血清化学及び尿検査）、肉眼的剖検所見及び組織病理学検査。

【0256】

本研究の結果に基づくと、5 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg 及び 100 mg/kg の用量レベルでの Cr1:CD (SD) ラットへの pp296 の単回静脈内注入は、全用量で異常な所見がなく、耐容性良好であった。したがって、無毒性量 (no-observed-adverse-effect level; NOAEL) は、毒性が最高の試験用量 (100 mg/kg) で観察されなかったことから 100 mg/kg 超であると考えられた。

【0257】

実施例 11：ラットにおける付加的な毒性研究

本研究の目的は、スプラグドローラットに 7 日連続で 2 時間の注入によって毎日投与した場合の修飾溶解素ポリペプチド pp296 の潜在的毒性及び毒物動態学プロファイルを評価することであった。

【0258】

実験手順、動物及び処理を下記表 1 1 にまとめる。

【0 2 5 9】

【表 1 2】

表 1 1

群番号	処理	用量レベル (mg/kg/日)	投与体積 ^a (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	投与速度 (mL/kg/hr)	動物の数 雄性／雌性
1	ビヒ クル	0	10	0	5	5/5
2	pp296	0.5	0.5	1	0.25	5/5
3	pp296	2.5	2.5	1	1.25	5/5
4	pp296	10	10	1	5	5/5

10

【0 2 6 0】

全ての生存動物が 8 日目に剖検を受けた（終末期安楽死）。試験施設職員によって剖検が行われ、臓器重量が収集された。臓器重量データの統計分析は、個別支払いの商業ベースで従事する試験施設によって行われた。顕微鏡評価に必要とされる組織は、Charles River Laboratories Ashland, LLCによってトリミングされ、通常通りに処理され、パラフィン包埋され、ヘマトキシリン及びエオシンで染色された。顕微鏡評価は、正式な獣医病理学者によって、群 1～4 の全動物の選択プロトコルで指定される組織及び全動物の全ての肉眼的病変に対して行われた。組織を光学顕微鏡法によって評価した。

20

【0 2 6 1】

スプラーグドーリーラットは、7 日連続で尾静脈を介した 2 時間の注入によって毎日投与した場合の 0.5 mg/kg/日、2.5 mg/kg/日又は 10 mg/kg/日の用量の修飾溶解素ポリペプチド pp 2 9 6 に耐容性を示した。研究全体を通して予定外の死亡は見られず、pp 2 9 6 に関連する肉眼的所見、顕微鏡的所見又は臓器重量所見は見られなかった。

【0 2 6 2】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態に、その範囲を限定するものではない。実際、当業者にとっては、上述の記載を読めば、本明細書に記載の形態に加えて、本発明の様々な変更形態が明らかである。

【0 2 6 3】

30

本明細書に引用される全ての特許、出願、公報、試験方法、文献及び他の題材は、引用することにより本明細書の一部をなす。

【0 2 6 4】

引用文献

- (1) Fischetti VA, Nelson D, Schuch R. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? Nat Biotechnol. 2006;24:1508-1511.
- (2) Louie L, Kaw P, Liu W, Jumbe N, Miller MH, and Drusano GL. Pharmacodynamics of Daptomycin in a Murine Thigh Model of Staphylococcus aureus Infection. AAC 2001; 45(3), 845-851.
- (3) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-10th Edition. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute (US); 2015 Jan. 35(2). Report No: M07-A10.
- (4) Schuch R, Lee HM, Schneider BC, Sauve KL, Law C, Khan BK, Rotolo JA, Horiuchi Y, Couto DE, Raz A, Fischetti VA, Huang DB, Nowinski RC, and Wittekind M. JID. Combination Therapy With Lysin CF-301 and Antibiotic Is Superior to Antibiotic Alone for Treating Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus-Induced Murine Bacteremia. 2014; 209:1469-78.
- (5) VanScoy B, Mendes RE, Nicasio AM, Castanheira M, Bulik CC, Okusanya OO, Bhavnani SM, Forrest A, Jones RN, Friedrich LV, Steenbergen JN, and Ambrose PG. Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of Tazobactam in Combination with Ceftolozane in a

40

50

n In Vitro Infection Model. AAC 2013; 57, 2809-2814.

(6) Wadhwa, M. et al, "Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility," *Biologicals*, 2015, 43: 298-306; doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.06.004.

(7) Soria-Guerra, S.E. et al, An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development, *J. Biomed. Informatics* 53 (2015) 405-414.

(8) Jawa V. et al, *Clinical Immunology* (2013) 149, 534-555.

(9) Entenza JM et al., "Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats," *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Nov;49(11):4789-92.

(10) Yang, H. et al, *Sci Rep.* 2017 Jan 9;7:40182. doi: 10.1038/srep40182.

(11) Mazor, R. et al, "Dual B- and T-cell de-immunization of recombinant immunotoxin targeting mesothelin with high cytotoxic activity," 2016, *Oncotarget*, 7(21): 29916.

(12) Blazanovic, K. et al, "Structure-based redesign of lysostaphin yields potent antistaphylococcal enzymes that evade immune surveillance," 2015, *Mol. Ther.-Methods & Clin. Dev.*(2015) 2, 15021; doi:10.1038/mtm.2015.21.

(13) Zhao, H et al, "Depletion of T cell epitopes in lysostaphin mitigates anti-drug antibody response and enhances antibacterial efficacy in vivo," *Chem Biol.*, 2015, 22(5): 629-639. doi:10.1016/j.chembiol.2015.04.017.

(14) De Groot, A et al, "Prediction of immunogenicity: in silico paradigms, ex vivo and in vivo correlates," *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2008, 8:1-7.

(15) Parker AS, et al., "Structure-guided deimmunization of therapeutic proteins," *J. Comput. Biol.* 2013, 20:152-165.

(16) King, C et al., "Removing T-cell epitopes with computational protein design," 2014, *PNAS*111(23): 8577-8582.

(17) Mazor, R. et al, *PNAS* | June 10, 2014 | vol. 111, no. 23: 8571-8576.

(18) Griswold, K. et al, *Curr Opin Struct Biol.* 2016 Aug; 39: 79-88; published online 2016 Jun 17. doi: 10.1016/j.sbi.2016.06.003.

10

20

30

【図 1】

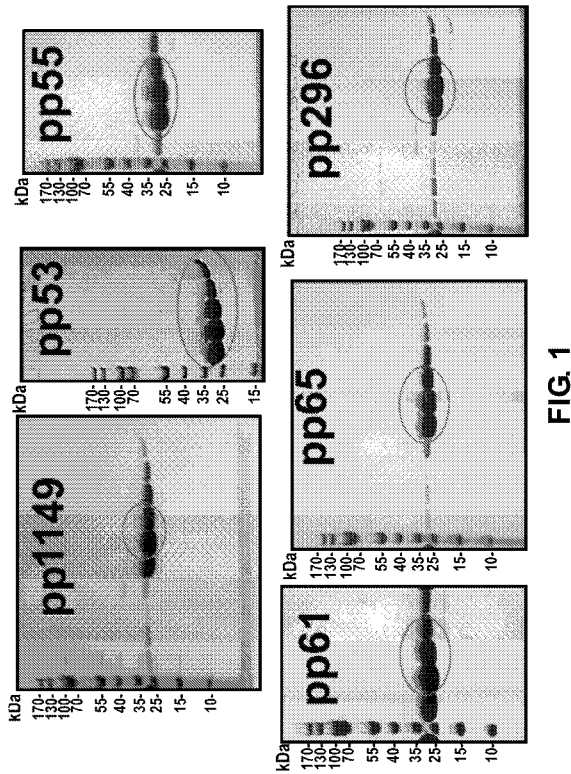


FIG. 1

【図 2】

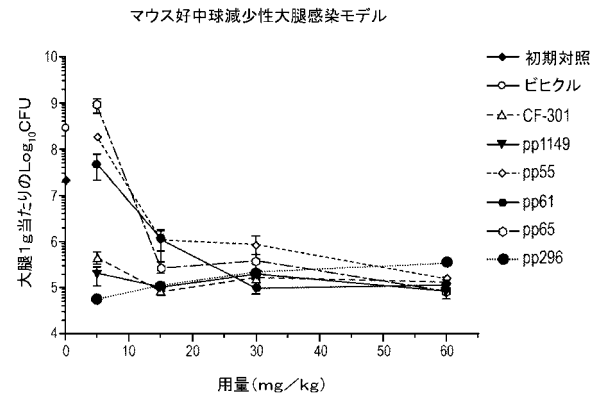


FIG. 2

【図 3】

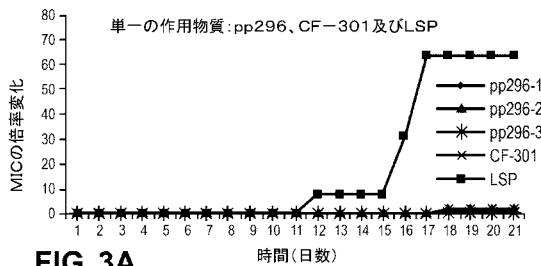


FIG. 3A

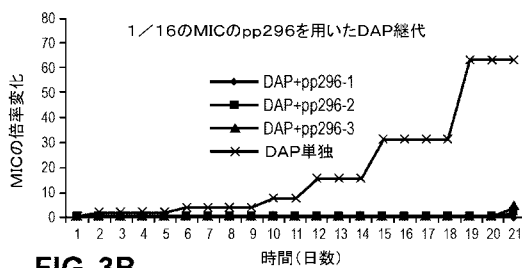


FIG. 3B

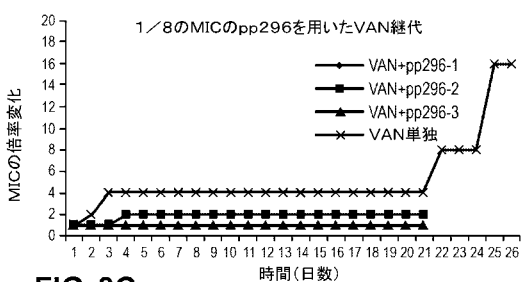


FIG. 3C

【配列表】

2021513865000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/19638

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/19638

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7-34
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

-Please See Supplemental Page-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2 (in-part), and 3 (in-part); SEQ ID NO: 1 with an R35E substitution (modified lysin)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/19638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 38/46, 38/47, 38/16; C12N 9/52, 9/14, 15/52, 15/55; A61P 31/04 (2019.01)
CPC - A61K 38/46, 38/47, 38/16, 38/43; C12N 9/52, 9/14, 15/52; A61P 31/04

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0302306 A1 (SCHUCH, R. et al.) 14 November 2013; Figure 29; paragraphs [0014], [0033], [0068], [0080], [0086], [0095]-[0097], [0103], [0121], [0147], [0160].	1
A	WO 2017/197227 A1 (CONTRAFECT CORPORATION) 16 November 2017; Figure 1; paragraphs [00029], [00043].	2-3
A	WO 2013/170022 A1 (CONTRAFECT CORPORATION) 14 November 2013; Figure 5; paragraphs [00012]-[00013], [00029], [00048], [00071], [00077], [00085].	2-3
A	(GILMER, D et al.) Novel Bacteriophage Lysin With Broad Lytic Activity Protects Against Mixed Infection By Streptococcus Pyogenes And Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 9 April 2013, Vol. 57; pages 2743-2750; abstract; page 2745, first column, fifth paragraph; page 2749, second column, first paragraph; DOI:10.1128/AAC.02526-12	2-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 May 2019 (27.05.2019)

Date of mailing of the international search report

03 JUL 2019

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/19638

-***Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking.-***

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-6 and SEQ ID NO: 1, with an R35E substitution are directed toward a modified lysin polypeptide that inhibits the growth, reduces the population, or kills at least one species of Gram-positive bacteria.

The modified lysin polypeptide will be searched to the extent it encompasses SEQ ID NO: 1 with an R35E substitution (first exemplary modified lysin). Applicant is invited to elect additional modified lysin(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), to be searched. Additional lysin(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1, 2 (in-part), and 3 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 with an R35E substitution (modified lysin). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected lysin(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 1 with an L92W substitution (modified lysin).

No technical features are shared between the modified lysins of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a modified lysin polypeptide comprising at least one amino acid substitution as compared to a wild-type PlySs2 lysin polypeptide having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, a cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP) domain, and a cell wall binding (SH3b) domain, wherein the at least one amino acid substitution is in the CHAP domain and/or the SH3b domain, wherein the modified lysin polypeptide or fragment thereof inhibits the growth, reduces the population, or kills at least one species of Gram-positive bacteria; these shared technical features are previously disclosed by US 2013/0302306 A1 to Schuch et al. (hereinafter "Schuch").

Schuch discloses a modified lysin polypeptide comprising at least one amino acid substitution as compared to a wild-type PlySs2 lysin polypeptide (an altered lytic enzyme, including a lysin polypeptide, comprising at least one amino acid substitution as compared to a wild-type PlySs2 lysin; paragraphs [0086], [0147], [0151]) having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 1); paragraph [0019], wherein Applicants' SEQ ID NO: 1 is 100% identical to SEQ ID NO: 1 of Schuch), a cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP) domain (a cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP) domain; Figure 29, paragraph [0068]), and a cell wall binding (SH3b) domain (and a cell wall binding (SH3-5) domain; Fig 29, paragraphs [0068], [0097]), wherein the modified lysin polypeptide or fragment thereof inhibits the growth, reduces the population, or kills at least one species of Gram-positive bacteria (wherein the modified lysin polypeptide or fragment thereof inhibits the growth, reduces the population, or kills at least one species of Gram-positive bacteria; paragraphs [0014], [0086], [0087]). Schuch further discloses substitutions that slightly modify the characteristics of the lysin (substitutions that slightly modify the characteristics of the lysin; paragraph [0146]); and the positions of active site residues of the CHAP domain (positions of active site residues of the CHAP domain; paragraph [0068]).

Schuch does not disclose wherein the at least one amino acid substitution is in the CHAP domain and/or the SH3b domain. However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Schuch to have specified mutation to the active site residues of the CHAP domain, as disclosed by Schuch, in order to modify the specific activity characteristic of the lysin, based on the disclosure of Schuch, to produce a less active, or attempt to produce a more active, lysin polypeptide.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Schuch reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08		
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10		
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K	9/107		
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14		
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K	9/12		
A 6 1 K 31/43 (2006.01)	A 6 1 K	31/43		
A 6 1 K 38/12 (2006.01)	A 6 1 K	38/12		
A 6 1 K 31/351 (2006.01)	A 6 1 K	31/351		
A 6 1 K 31/726 (2006.01)	A 6 1 K	31/726		
C 1 2 N 9/48 (2006.01)	C 1 2 N	9/48		
C 1 2 N 15/57 (2006.01)	C 1 2 N	15/57		
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	A	
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	Z	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TWEEN
2. TRITON

(72)発明者 インディアニ キアラ
 アメリカ合衆国 08840 ニュージャージー メアチェン ミドルセックス アベニュー 6
 58 アパートメント 422

(72)発明者 ウィッテキンド マイケル
 アメリカ合衆国 98110 ワシントン ベインブリッジ アイランド オリンパス ビーチ
 ロード ノースイースト 9515

Fターム(参考) 4B050 CC04 DD02 FF11E FF12E FF13E LL01 LL03
 4B065 AA01X AA01Y CA31 CA33 CA60
 4C076 AA11 AA17 AA22 AA24 AA29 BB01 BB11 BB13 BB16 BB29
 CC32
 4C084 AA01 AA02 AA03 AA07 AA19 BA02 BA08 BA17 BA25 BA27
 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA43 MA52 MA55 MA56 MA60
 MA66 NA05 NA14 ZB351 ZB352 ZC751
 4C086 AA01 AA02 BA07 CC04 EA22 GA02 MA02 MA04 MA13 MA17
 MA22 MA23 MA43 MA52 MA55 MA56 MA60 MA66 NA05 ZB35
 ZC75