

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5732397号
(P5732397)

(45) 発行日 平成27年6月10日(2015.6.10)

(24) 登録日 平成27年4月17日(2015.4.17)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	9/80	(2006.01)	C 12 N	9/80	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	

請求項の数 22 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-530980 (P2011-530980)
(86) (22) 出願日	平成21年10月9日(2009.10.9)
(65) 公表番号	特表2012-504958 (P2012-504958A)
(43) 公表日	平成24年3月1日(2012.3.1)
(86) 國際出願番号	PCT/PT2009/000051
(87) 國際公開番号	W02010/041970
(87) 國際公開日	平成22年4月15日(2010.4.15)
審査請求日	平成24年10月9日(2012.10.9)
(31) 優先権主張番号	61/104,594
(32) 優先日	平成20年10月10日(2008.10.10)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	511087121 ルソメディカメンタ、エス.エー. LUSOMEDICAMENTA, S.A. .
	ポルトガル国 バルカレナ ピー-273 0-055 クエルツ デ バイショ 6 9ピー エストラダ コンシグリエリ ペ ドロソ
(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(72) 発明者	ダコスタ ガルシア ミグエル アンジ エロ ポルトガル国 リスボア ピー-1800 -297 4ピー 10番 アヴェニュー デ パドウア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗菌性ファージペプチド及びその使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、
黄色ブドウ球菌に対するターゲティング活性を有する、ファージF87s/06由来の溶
解素タンパク質のドメインと、配列番号4で示されるアミノ酸配列の1～182番目のア
ミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を有する、ファージF170
/08由来の異種溶解素タンパク質の触媒ドメインとを含むか、或いは

配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、
黄色ブドウ球菌に対するターゲティング活性を有する、ファージF87s/06由来の溶
解素タンパク質のドメインと、配列番号6で示されるアミノ酸配列の1～159番目のア
ミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を有する、ファージF168
/08由来の異種溶解素タンパク質の触媒ドメインとを含む、

キメラポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号4のアミノ酸配列又はその断片を含み、前記断片が、配列番号2で示されるアミ
ノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗
菌活性及びターゲティング活性を有する、請求項1に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号6のアミノ酸配列又はその断片を含み、前記断片が、配列番号2で示されるアミ
ノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗

10

20

菌活性及びターゲティング活性を有する、請求項1に記載のキメラポリペプチド。

【請求項4】

同一サイズの第2ポリペプチドと少なくとも95%の配列同一性を有するキメラ第1ポリペプチドであって、前記第1ポリペプチドが黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有し、前記第2ポリペプチドが配列番号4のアミノ酸配列又はその断片を有し、前記断片が、配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有する、キメラ第1ポリペプチド。

【請求項5】

同一サイズの第4ポリペプチドと少なくとも95%の配列同一性を有するキメラ第3ポリペプチドであって、前記第3ポリペプチドが黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有し、前記第4ポリペプチドが配列番号6のアミノ酸配列又はその断片を有し、前記断片が、配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有する、キメラ第3ポリペプチド。

10

【請求項6】

請求項1～5のいずれかに記載のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項7】

配列番号3のヌクレオチド配列又はその断片を含み、前記断片が、配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有するポリペプチドをコードする、請求項6に記載の核酸。

20

【請求項8】

配列番号5のヌクレオチド配列又はその断片を含み、前記断片が、配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有するポリペプチドをコードする、請求項6に記載の核酸。

【請求項9】

請求項6～8のいずれかに記載の核酸を含むベクター。

30

【請求項10】

発現ベクターである、請求項9に記載のベクター。

【請求項11】

請求項10に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項12】

薬学的に許容される担体と、請求項1～5のいずれかに記載のキメラポリペプチドとを含む医薬組成物。

【請求項13】

キメラポリペプチドが、配列番号4のアミノ酸配列又はその断片を含み、前記断片が、配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有する、請求項12に記載の医薬組成物。

40

【請求項14】

キメラポリペプチドが、配列番号6のアミノ酸配列又はその断片を含み、前記断片が、配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有する、請求項12に記載の医薬組成物。

【請求項15】

薬学的に許容される担体と、同一サイズの第2ポリペプチドと少なくとも95%の配列同一性を有するキメラ第1ポリペプチドとを含む医薬組成物であって、前記第1ポリペプチ

50

ドが黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有し、前記第2ポリペプチドが配列番号4のアミノ酸配列又はその断片を有し、前記断片が、配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有する、医薬組成物。

【請求項16】

薬学的に許容される担体と、同一サイズの第4ポリペプチドと少なくとも95%の配列同一性を有するキメラ第3ポリペプチドとを含む医薬組成物であって、前記第3ポリペプチドが黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有し、前記第4ポリペプチドが配列番号6のアミノ酸配列又はその断片を有し、前記断片が、配列番号2で示されるアミノ酸配列の148～251番目のアミノ酸残基を含み、かつ、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及びターゲティング活性を有する、医薬組成物。

10

【請求項17】

請求項12～16のいずれかに記載の医薬組成物を含む、それを必要とする対象における細菌感染症の治療剤。

【請求項18】

細菌感染症がグラム陽性菌による感染症である、請求項17に記載の治療剤。

【請求項19】

グラム陽性菌がスタフィロコッカス属、ミクロコッカス属、バチルス属、又はエンテロコッカス属である、請求項18に記載の治療剤。

20

【請求項20】

グラム陽性菌がスタフィロコッカス属である、請求項19に記載の治療剤。

【請求項21】

スタフィロコッカス属が黄色ブドウ球菌である、請求項20に記載の治療剤。

【請求項22】

請求項1～5のいずれかに記載のキメラポリペプチドを組換えによって產生するための方法であって、(i)前記ポリペプチドをコードするキメラ核酸を構築すること；(ii)前記ポリペプチドの発現に適した条件下で、前記キメラ核酸を含む宿主細胞を培地中で培養すること；及び(iii)前記培地から前記ポリペプチドを回収することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本出願は、2008年10月10日出願の米国特許仮出願第61/104594号の利益を主張するものであり、これは参照によりその全体を本明細書に組み込まれているものとする。

【0002】

本発明は、抗生物質活性を有するバクテリオファージ起源の単離されたキメラポリペプチド並びに細菌感染症の治療及び制御におけるその使用を対象とする。具体的には、本発明は、バクテリオファージF87s/06由来の新規の抗菌性ポリペプチド及びそのキメラ構築物の使用、並びに黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)を含むグラム陽性菌によって引き起こされる感染症の治療及び制御のためのその使用を対象とする。

40

【背景技術】

【0003】

バクテリオファージ(ファージ)は、特に細菌に感染し溶解するウイルスである。ファージ治療、すなわち細菌性感染症の治療のために全ファージウイルスを使用する方法は、1920年頃にファージを発見したFelix d'Herelleにより導入された。20世紀初頭、ヒトの他にも動物における治療のためのファージの適用について様々な研究が行われた。1940年、Eli Lilly社は、ブドウ球菌種(*Staphylococcus sp.*)、大腸菌(*E.coli*)及び他の病原菌により引き起こされる様々な疾病を治療するためのファージ調製物を含む、ヒト使用のための7種のファージ産物を作製した。これらの調製物は、膿瘍、化膿性創傷、膿炎、急性慢性上気道感染症及び乳様突起感染症を引き起こす感染症を治療するために

50

利用された。

【0004】

しかし、1940年代の抗生物質の出現とともに、ファージベース治療の発展は西洋世界では衰退した。西洋世界におけるファージ治療への関心の減退の一因となったもっとも重要な要因の1つは、信頼性の問題であった。適切に行われる研究の数が減少し、確立したプロトコール及び標準化が欠如しているために、ファージ治療の価値の厳格な文書化が妨げられた。ファージ試料／検体の作製に関連する多くの問題も、ファージ治療に関連する初期研究／調査を複雑にした。ファージ治療の実行可能性を増加させようと試みて多様な安定剤及び保存剤が使用された。しかし、ファージの生物学的性質並びに様々な物理的及び化学的薬剤に応じたその安定性が十分に理解されていなかったために、ファージ調製物の生存能を延ばすために添加された成分の多くがファージの生存能にマイナス効果をもたらし、いくつかの場合には、ヒトにとって毒性があることが判明した。ファージ作製に関連する別の問題は、これらのウイルスの市販製剤の純度であった。米国及び他の国の安定した会社を起源とするファージ治療調製物を含むファージ治療調製物は、所望のファージを用いて処置される宿主細菌の生溶菌液からなっていた。したがって、その調製物は、これらの調製物で治療される患者、特に静脈内投与を受ける患者に有害作用を及ぼすおそれのあるエンドドキシンを含む細菌成分を有していた。しかし、抗生物質の入手機会が限られている東ヨーロッパ及びかつてのソ連では、治療目的のバクテリオファージの使用は、抗生物質と一緒に又は抗生物質の代わりに継続された。

【0005】

細菌の抗生物質耐性菌の増加とともに、ファージベース治療法はより広い関心を抱かれた。新規クラスの抗生物質が開発されても、細菌が結局は新薬に対する耐性を生じるという見通しがあるために、細菌感染を制御し治療するための非化学療法的手段の探求が強化されてきた。臨床環境においてファージベース治療を使用するための一般的戦略には、1) 活動性の病原性ファージの使用；2) バクテリオファージから単離されるエンドリシン又は精製溶解素の使用、及び3) 細菌のペプチドグリカンを合成するために重要な酵素の代謝阻害剤としての同定されたファージの構造タンパク質の使用の3つがある。

【0006】

現在開発中のもっとも有望な戦略の1つにファージ溶解素(phage lysin)がある。精製エンドリシンの調製物は、それ自体を治療薬として、又は古典的抗生物質と組み合わせて使用することが可能である。外来性溶解素を感受性グラム陽性菌に添加すれば、バクテリオファージがなくても完全に溶解させることが可能である(Loeffler et al., 2001, Science 294:2170-2172; Shuch et al., 2002, Nature 418:884-889)。溶解素を用いて処置される細菌の顕微鏡画像は、これらの酵素が、ペプチドグリカンを消化し細胞壁に穴を開けることによりその致死効果を発揮することを示している。外部環境と比べると、細菌の内部は高浸透圧であり、細菌壁がその構造的完全性を失うと、細胞膜が押し出されて高張溶解する。

【0007】

ペニシリン及びセファロスポリンクラスの抗生物質はペプチドグリカンの合成を阻害し、細胞分裂中に細菌細胞壁を溶解させるが、ファージ溶解素は投与された数秒後にはその溶菌効果を発揮してペプチドグリカンを直接破壊する。前記溶解素は、増殖しておらず多くの抗生物質には非感受性の細菌の細胞壁も破壊することができる。同時投与されると、異なる標的配列を有する2つの溶解素は、相乗効果を表してペプチドグリカンを多くの領域で攻撃し得る。

【0008】

正常な周辺細菌叢に影響を与えることなく病原菌を取り除くためにインビオにおいて有用な潜在的治療及び予防薬として溶解素酵素をさらに研究する必要性が明らかに存在する。病院における耐性菌、特にブドウ球菌種及び肺炎球菌種(*Pneumococcus sp.*)という深刻な問題のために、これらの酵素はこうした類の環境において同時に利益となる可能性がある。

【0009】

10

20

30

40

50

しかし、今日までに発見された大半の溶解素が、それを產生する細菌の菌種（又は亜種）に特異的である。例えば、連鎖球菌ファージから単離される溶解素がある種の連鎖球菌のみを死滅させること、及び肺炎球菌ファージにより產生される溶解素が肺炎球菌のみを死滅させることが明らかにされている（Fishcetti, 2005, Trends in Microbio 13:491-496）。したがって、抗生物質耐性を生じたますます增加する細菌種を処置するために使用し得るかつてない新規の溶解素酵素を発見する必要性がますます高まっている。種交差反応性を可能にする溶解素構築物を開発する必要性も存在する。特に、それが単離される元の特定種を超えて溶菌死滅及び抗菌活性を有する新規の溶解素の単離及び／又は開発は特に価値があると考えられる。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Loeffler et al., 2001, Science 294:2170-2172

【非特許文献2】Shuch et al., 2002, Nature 418:884-889

【非特許文献3】Fishcetti, 2005, Trends in Microbio 13:491-496

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、バクテリオファージ起源の単離された抗菌性ポリペプチド、特に、バクテリオファージF87s/06（黄色ブドウ球菌の感染ファージ）由来のポリペプチド、並びにそのキメラ構築物を対象とする。単離されたキメラポリペプチドは、グラム陽性菌、例えば、表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、スタフィロコッカス・アウリクラーリス（*S. auricularis*）、スタフィロコッカス・キャピティス（*S. capitis*）、スタフィロコッカス・ヘモリチカス（*S. haemolyticus*）、スタフィロコッカス・ホミニス（*S. hominis*）、スタフィロコッカス・サプロフィチカス（*S. saprophyticus*）、スタフィロコッカス・シミュラヌス（*S. simulans*）、スタフィロコッカス・キシロシス（*S. xylosis*）、ミクロコッカス・ルテウス（*Micrococcus luteus*）、枯草菌（*Bacillus subtilis*）、バチルス・プミルス（*B. pumilus*）、エンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）、エンテロコッカス・ヒラエ（*E. hirae*）、エンテロコッカス・フェシウム（*E. faecium*）、エンテロコッカス・アビウム（*E. avium*）による感染に付随する状態の治療又は管理のための医薬組成物に使用し得る。ある種の実施形態では、本発明の医薬組成物は、黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性菌（MRS A, methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*）による感染に付随する状態の治療に有用である。

20

【0012】

ある種の実施形態では、本発明は、グラム陽性菌、例えば、黄色ブドウ球菌に対して抗生物質活性及び／又はターゲティング活性を示す、バクテリオファージ87（F87s/06）から単離されるポリペプチドを対象とする。特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含む又はそれからなる。他の実施形態では、本発明のポリペプチドは、グラム陽性菌、例えば、黄色ブドウ球菌に対して抗生物質（例えば、溶菌死滅活性）活性及び／又はターゲティング活性を有する配列番号2の断片、バリアント又は誘導体を含む。本実施形態に従った特定の例では、本発明は、本発明は、同じ長さ（すなわち、同数の残基からなる）の第2アミノ酸配列と少なくとも60%、65%、70%、75%、85%、95%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供し、第2アミノ酸配列は配列番号2又はその断片である。

30

【0013】

ある種の実施形態では、本発明は、グラム陽性菌、例えば、黄色ブドウ球菌に対して抗生物質活性を示す、バクテリオファージ87（F87s/06）由来のキメラポリペプチドを対象とする。キメラポリペプチドは、単離されたポリペプチドの触媒ドメインが、黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性又は抗生物質活性を有するファージF170/08又はフ

40

50

アージ F 1 6 8 / 0 8 由来の異種溶解素タンパク質等の異種溶解素タンパク質の触媒ドメインで置換されている本発明の単離されたポリペプチド由来であつてよい。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性又は抗生物質活性を有する、配列番号 4 若しくは配列番号 6 のアミノ酸配列、又はどちらかの断片を含む、又はそれからなる。他の実施形態では、キメラポリペプチドは、グラム陽性菌、例えば、黄色ブドウ球菌に対して抗生物質活性又は抗菌活性（例えば、溶菌死滅活性）を有する、配列番号 4 又は 6 の断片、バリエント又は誘導体を含む。本実施形態に従つた特定の例では、本発明は、同一の長さの（すなわち、同数の残基からなる）アミノ酸配列と少なくとも 60%、65%、70%、75%、85%、95%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超える配列同一性のアミノ酸配列を有し、配列番号 4 若しくは配列番号 6 のアミノ酸配列、又はどちらかの断片を有するキメラポリペプチドを提供する。
10

【 0 0 1 4 】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも包含する。特定の実施形態では、本発明は、グラム陽性菌、例えば、黄色ブドウ球菌に対して抗生物質活性（例えば、溶菌死滅活性）及び／又はターゲティング活性を示す、F 8 7 s / 0 6 のポリペプチド、又はその活性断片をコードする核酸配列を含む単離された核酸を提供する。本実施形態に従つた特定の例では、本発明は、配列番号 1 の核酸配列又はその断片を含む又はそれからなる核酸を提供する。本発明は、前記核酸を含むベクターにも関する。特定の一実施形態では、前記ベクターは発現ベクターである。本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含有する宿主細胞をさらに提供する。
20

【 0 0 1 5 】

別の特定の実施形態では、本発明は、ファージ F 8 7 s / 0 6 のポリペプチド、又はその活性断片をコードする核酸配列を含むキメラ核酸を提供し、単離されたポリペプチド又は活性断片の触媒ドメインは異種溶解素タンパク質の触媒ドメインで置換されている。本実施形態に従つた特定の例では、本発明は、配列番号 3 若しくは 5 の核酸配列、又はその断片を含む又はそれからなる核酸を提供する。本発明は、前記キメラ核酸を含むベクターにも関する。特定の一実施形態では、前記ベクターは発現ベクターである。本発明は、本発明のキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含有する宿主細胞をさらに提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明は、単離されたポリペプチド及びキメラポリペプチドの抗生物質活性（例えば、本発明のポリペプチドの抗菌活性及び／又は溶菌活性に基づく死滅）を評価するための方法を包含する。抗生物質活性は、当技術分野で既知の及び／又は本明細書に記載されるどんな方法によって評価してもよい。ある種の実施形態では、抗生物質活性は、標準技法に従つて（例えば、液体培養中において又は寒天プレート上で）グラム陽性菌を培養し、培養物を本発明のポリペプチドに接触させ、前記接触後の細胞増殖をモニターすることにより評価される。例えば、液体培養中では、細菌、例えば黄色ブドウ球菌を、培養物の指指数関数的増殖の中間点を表す光学密度（optical density、「OD」）まで増殖させ、培養物の一部は本発明の 1 又は 2 以上のポリペプチドの 1 又は 2 以上の濃度に曝され、OD は対照培養物と比べてモニターされ得る。対照培養物と比べて減少した OD は、ポリペプチドが抗生物質活性を示していることを表している（例えば、抗菌活性及び／若しくは溶菌死滅活性を示している）。同様に、細菌コロニーを寒天プレート上で形成させ、プレートを本発明のポリペプチドに曝露させ、コロニーのそれに続く増殖を対照プレートと比べて評価することが可能である。コロニーのサイズが減少すれば、又はコロニーの総数が減少すれば、ポリペプチドが抗生物質活性を有することを示している。
40

【 0 0 1 7 】

「ターゲティング活性（targeting activity）」は、当技術分野で既知の及び／又は本明細書に記載されるいかなる方法によって評価してもよい。例えば、特定の細菌宿主に対するターゲティング活性は、特定の宿主細胞の溶解を引き起こすことが知られている溶解素から候補配列及び触媒ドメインを含むキメラポリペプチドを作製することにより評価し
50

得る。そのような実験では、キメラ分子の抗生物質活性は、候補配列のターゲティング活性を示すものとして使用することが可能である。

【0018】

本発明は、特に医薬組成物、例えば、抗生物質又は抗菌組成物の使用のための、本発明のポリペプチド又はその活性断片を产生するための方法を包含する。ある種の実施形態では、本発明のポリペプチドは、当技術分野で既知の及び／又は本明細書に記載される標準技法を使用して、バクテリオファージF 87s / 06に感染している細胞培養物（例えば、細菌細胞培養物）から直接単離される。他の実施形態では、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチド、例えば、配列番号2、4若しくは6、又はその活性断片、誘導体若しくはバリアント（すなわち、その活性断片は抗生物質及び／若しくはターゲティング活性を有する）をコードする核酸配列を含む発現ベクターを使用する組換え手段により產生される。10

【0019】

本発明のポリペプチド又はその断片は、ポリペプチドを产生するための当技術分野で既知のいかなる方法によっても、特に、化学的合成により又は組換え発現技法により产生することが可能である。特定の実施形態では、本発明は、本発明の溶解素タンパク質、又はその活性断片を組換えによって产生するための方法であって、(i) 培地中でのタンパク質の発現に適した条件下で、配列番号1の核酸配列又はその断片を含むベクターを含有する宿主細胞を培養すること；及び(ii) 前記培地から前記タンパク質を回収することを含む方法に関する。ある種の実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、異種プロモーターに作動可能に連結されている。本明細書において使用される「異種」とは、天然には存在しないエレメントの組合せのことである。20

【0020】

別の特定の実施形態では、本発明は、本発明のキメラポリペプチド、又はその活性断片を組換えによって产生するための方法であって、(i) 本発明のキメラポリペプチドをコードするキメラ核酸を構築すること；(ii) キメラポリペプチドを発現するのに適した条件下で、キメラ核酸を含む宿主細胞を培地中で培養すること；及び(iii) 培地からキメラポリペプチドを回収することを含む方法に関する。ある種の実施形態では、本発明のキメラポリペプチドをコードするキメラ核酸配列は、異種プロモーターに作動可能に連結されている。ある種の好ましい実施形態では、キメラ核酸は、バクテリオファージF 87s / 06 溶解素タンパク質に由来する配列及び抗生物質活性又は抗菌活性を有するバクテリオファージF 170 / 08又はF 168 / 08由来の配列等の、異種溶解素タンパク質由来の配列を含む。ファージF 87s / 06由来の配列は、ターゲティングドメインを含み、ファージF 170 / 08又はF 168 / 08由来の配列は、例えば、それを標的とする場合、黄色ブドウ球菌に対して抗生物質活性又は抗菌活性を有する触媒ドメインを含み得る。30

【0021】

本発明は、バクテリオファージF 87s / 06から単離された又はそれに由来するポリペプチド、特に、抗菌活性及び／又は抗生物質活性を有する単離された又はキメラのポリペプチドを含む医薬組成物を包含する。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定剤をさらに含んでもよい。特定の実施形態では、医薬組成物は、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。別の実施形態では、医薬組成物は、グラム陽性菌、例えば、黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性及び／又はターゲティング活性を保持している、配列番号2のバリアント、誘導体又は断片であるポリペプチドを含む。他の特定の実施形態では、医薬組成物は、配列番号4又は6のアミノ酸配列を有するキメラポリペプチドを含む。別の実施形態では、医薬組成物は、グラム陽性菌、例えば、黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性及び／又は抗生物質活性を保持している、配列番号4又は6のバリアント、誘導体又は断片であるキメラポリペプチドを含む。40

【0022】

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物は、それを必要とする対象におけるグラム陽50

性菌による感染に付随する疾病又は障害の症状を治療する、予防する、及び／又は寛解するための抗生物質組成物又は治療組成物である。本発明の医薬組成物を与える対象は、哺乳動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ類、靈長類（例えば、ヒト）、げっ歯類、ウサギ類）又はトリ（例えば、ニワトリ、アヒル、ガチョウ）であってよい。本発明の文脈では、「治療」とは、治療的処置と予防措置（prophylactic or preventative measures）の両方のことであり、その目的は、病的状態若しくは障害の重症度を除去する、和らげる、減少する、病的状態若しくは障害の進行を遅らせる、又は病的状態若しくは障害に付随する症状若しくは根底原因（例えば、細菌感染）を予防することである。本発明の医薬組成物は、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、スタフィロコッカス・アウリクラーリス、スタフィロコッカス・キャピティス、スタフィロコッカス・ヘモリチカス、スタフィロコッカス・ホミニス、スタフィロコッカス・サプロフィチカス、スタフィロコッカス・シミュラムス、スタフィロコッカス・キシリシス、ミクロコッカス・ルテウス、枯草菌、バチルス・プミルス、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・ヒラエ、エンテロコッカス・フェシウム、エンテロコッカス・アビウム、及びその組合せを含むが、これらに限定されない任意のグラム陽性菌に関する感染症の治療又は管理に使用し得る。前記医薬組成物を使用して、術後眼内炎、心内膜炎、中枢神経系の感染症、肺炎、骨髄炎、創傷感染症（例えば、糖尿病性足部潰瘍）、乳腺炎、敗血症、食中毒及び髄膜炎を含むがこれらに限定されない細菌感染に付随する状態又は障害を治療し得る。

【 0 0 2 3 】

ある種の実施形態では、本発明は、単剤療法としての溶解素ポリペプチド (lysin poly peptide) の使用を提供する。別の実施形態では、本発明の溶解素ポリペプチドは、例えば、キメラポリペプチドを産生するために、バクテリオファージ F 170 / 08 又は F 168 / 08 由来の溶解素等の、バクテリオファージ F 87s / 06 以外のバクテリオファージ由来の 1 又は 2 以上の溶解素と組み合わせてもよい。さらに他の実施形態では、本発明は、グラム陽性菌感染に対する標準又は実験的治療と組み合わせた、溶解素ポリペプチド、又はその活性断片、バリエント、誘導体、若しくはキメラ構築物の使用を提供する。さらに他の実施形態では、本発明は、さらに別の治療分子（例えば、ペプチド又は非ペプチド細胞毒）に化学的にコンジュゲートされている溶解素タンパク質 (lysin protein)、キメラ構築物、又はどちらかの活性断片の使用を提供する。そのような組合せ療法は、標準治療又は実験的治療の効力を増強し得る。本発明のポリペプチドと組み合わせると特に有用である治療薬の例には、抗炎症剤、標準化学療法抗生物質製剤（例えば、ペニシリン、合成ペニシリン、バシトラシン、メチシリン、セファロスボリン、ポリミキシン、セファクロル、セファドロキシル、セファマンドールナファート、セファゾリン、セフィキシム、セフメタゾール、セフォニオイド、セフォペラゾン、セフォラニド、セフォタム、セフォタキシム、セフォテタン、セフォキシチン、セフポドキシム、プロキセチル、セフタジジム、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフトリアキソンモキサラクタム、セフロキシム、セファレキシン、セファロスボリン C、セファロスボリン C ナトリウム塩、セファロチン、セファロチンナトリウム塩、セファピリン、セフラジン、セフロキシムアキセチル、セファロチン二水和物、モキサラクタム、ロラカルベスマファテ及びキレート剤）がある。本発明が包含する組合せ療法は、单一医薬組成物に製剤化されてもよいし、全体的治療計画の一部として別々の組成物で投与されてもよい。

【 0 0 2 4 】

本発明の医薬組成物は、抗生物質化合物の投与に適した当技術分野で既知のいかなる方法によっても（例えば、経口で又は非経口で（例えば、吸入、筋肉内、静脈内、又は表皮送達））投与し得る。

【 0 0 2 5 】

本発明の医薬組成物は、グラム陽性菌のコロニー形成を予防するための化粧品中、又は固体面上での使用のための噴霧剤若しくは溶液中の抗菌剤（例えば、殺菌剤若しくは抗感染剤として）等の伝統的に非治療的な使用のために使用してもよい。

【 0 0 2 6 】

本発明は、抗生物質活性及び／又はターゲティング活性についてペプチドをスクリーニングするための方法も対象とする。一実施形態では、この方法は、抗生物質活性及び／又はターゲティング活性について、配列番号2、4又は6由来の長さが少なくとも6、10、15、20又は25残基の連続するアミノ酸配列をスクリーニングすることを含み、前記抗生物質活性及び／又はターゲティング活性は、寒天又は液体培養における細菌増殖を阻害するペプチドの能力により測定される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、Lys87のN末端領域とファージP8、トウォート(Twort)、及び11のエンドリシンのアラインメントを示す。エンドペプチダーゼドメインに存在することが知られている保存残基は箱形により示されている。
10

【図2】図2a-2cは、発現ベクターpQE-30(a)及びpET-29(b及びc)の概略図である。

【図3】図3a-3bは、pCC1プラスミドで形質転換された大腸菌JM109細胞におけるLys87発現の誘導から生じる細胞抽出物の不溶性(a)及び可溶性(b)画分のウェスタンプロットである。バンドは、抗His6抗体を使用して検出した。レーン1は、誘導4時間後のpCC1プラスミドなしのJM109細胞を表す。レーン2～6は、誘導の0時間、1時間、2時間、3時間及び4時間後のpCC1プラスミドを有するJM109細胞に対応している。

【図4】図4は、Ni-NTAカラム上で精製されたLys87His6試料のSDS-PAGEの結果をクーマシープルーでの染色により示している。レーン1は細胞抽出物を表している。レーン2は、精製中にカラムを通過した洗浄緩衝液を表している。レーン3～14は、His6-Lys87融合タンパク質の精製中に収集された画分に対応している。
20

【図5】図5a-5bは、プラスミドpCC2で形質転換された大腸菌BL21(DE3)pLysEにおける、Lys87の誘導から生じる細胞抽出物の可溶性及び不溶性画分を、クーマシープルーでの着色(a)及び抗His6抗体を用いた免疫検出(b)で示す。レーン1は不溶性画分を表している。レーン2～4は不溶性画分に、レーン6～8は可溶性画分に対応し、それぞれ誘導の0時間、2時間、及び4時間後である。

【図6】図6a-6bは、封入体からの精製後のLys87の濃縮された及び希釈された試料を示す。レーン1は濃縮されたLys87に対応し、レーン2は希釈されたLys87に対応する。
30

【図7】図7a-7bは、AKTA FPLC上の精製後に溶出されたLys87試料のクーマシープルー染色(a)及びウェスタンプロット(b)を使用した解析を示す。

【図8】図8a-8bは、バクテリオファージF87s/06から単離された溶解素ペプチドのそれぞれ核酸配列(配列番号1)及びそのコードされたアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図9】図9a-9bは、キメラ構築物溶解素170-87のそれぞれ核酸配列(配列番号3)及びそのコードされたアミノ酸配列(配列番号4)をそれぞれ示す。遺伝子lys170に由来する配列は太字、遺伝子lys87由来の配列は標準文字、ベクター産の配列は斜字体である。
40

【図10】図10a-10bは、キメラ構築物溶解素168-87のそれぞれ核酸配列(配列番号5)及びそのコードされたアミノ酸配列(配列番号6)をそれぞれ示す。遺伝子lys168に由来する配列は太字、遺伝子lys87由来の配列は標準文字、ベクター産の配列は斜字体である。

【図11】図11a-11bは、Lys170-87(a)及びLys168-87(b)の精製工程のSDS-PAGE解析を示す。Mは分子量マーカーを、SFは全可溶性画分を、FTはアフィニティーカラム通過画分を、AFはアフィニティーピークに対応する画分を、Dは脱塩酵素調製物を表す。
50

【図12】図12は、標的細菌の菌叢上のその活性についてアッセイした場合のLys1

68-87 及び Lys 170-87 について得られた結果を図示する 3 つの例を示す。

【図 13】図 13 は、液体培地 (25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5、250 mM NaCl) に懸濁された黄色ブドウ球菌株 566/07 の細胞上の Lys 168-87 及び Lys 170-87 の溶菌活性を示す。各酵素は 10 µg/ml の濃度で添加した。対照は、酵素保存緩衝液を添加された細胞懸濁液である。示されたデータは、3 つの独立した実験の平均に対応している。

【発明を実施するための形態】

【0028】

定義

本明細書で使用されるように、用語「断片」とは、第 2 ポリペプチドのアミノ酸配列のうち、少なくとも 5 連続アミノ酸残基、少なくとも 10 連続アミノ酸残基、少なくとも 15 連続アミノ酸残基、少なくとも 20 連続アミノ酸残基、少なくとも 25 連続アミノ酸残基、少なくとも 40 連続アミノ酸残基、少なくとも 50 連続アミノ酸残基、少なくとも 60 連続アミノ酸残基、少なくとも 70 連続アミノ酸残基、少なくとも 連続 80 アミノ酸残基、少なくとも 連続 90 アミノ酸残基、少なくとも 連続 100 アミノ酸残基、少なくとも 連続 125 アミノ酸残基、少なくとも 150 連続アミノ酸残基、少なくとも 連続 175 アミノ酸残基、少なくとも 連続 200 アミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチド又はポリペプチドのことである。特定の実施形態では、断片は、第 2 ポリペプチドの少なくとも 1 つの機能（例えば、抗菌活性若しくは抗生物質活性；又はターゲティング活性）を保持している点で機能的断片である。

10

20

【0029】

本明細書で使用されるように、ペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質という文脈における用語「単離された」とは、それが由来する細胞若しくは組織供給源由来の細胞物質若しくは夾雜タンパク質が実質的でない、又は化学的に合成される場合、化学的前駆物質若しくは他の化学物質が実質的でないペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質のことである。用語「細胞物質が実質的でない」は、ペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質が、それが単離された又は組換えによって產生された元の細胞の細胞成分から分離されているペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質の調製物を含む。したがって、細胞物質が実質的でないペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質は、約 30%、20%、10%、又は 5%（乾燥重量で）未満の異種タンパク質（本明細書では「夾雜タンパク質（contaminating protein）」とも呼ばれる）を有するペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質の調製物を含む。ペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質が組換えによって產生される場合、ペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質は好ましくは培養培地も実質的でない、すなわち、培養培地はタンパク質調製物の容積の約 20%、10%、又は 5% 未満を表す。ペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質が化学合成により生成される場合、ペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質は好ましくは化学的前駆物質若しくは他の化学物質が実質的でない、すなわちペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質は、ペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質の合成に関与する化学的前駆物質若しくは他の化学物質から分離されている。したがって、ペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質のそのような調製物は、所望のペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質以外の約 30%、20%、10%、又は 5%（乾燥重量で）未満の化学的前駆物質若しくは化合物を有する。

30

40

【0030】

本明細書で使用されるように、核酸分子という文脈における用語「単離された」とは、第 1 核酸分子の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離されている第 1 核酸分子のことである。さらに、cDNA 分子等の「単離された」核酸分子は、組換え技法により產生される場合は他の細胞物質若しくは培養培地が実質的でない、又は化学的に合成される場合は化学的前駆物質若しくは他の化学物質が実質的でなく、例えば、核酸ライブラリー中の他のクローンから単離されている場合には cDNA 若しくは他のゲノム DNA 分子がないこともある。

50

【0031】

用語「精製された」は、溶解素又はキメラ溶解素構築物が、それにより溶解素又はキメラ溶解素構築物の調製に関する前駆物質又は他の化学物質等の不純物質を部分的に、実質的に、又は完全に取り除くカラムクロマトグラフィー、HPLC、沈殿、電気泳動、等を含むがこれらに限定されない任意の精製工程によって測定可能な程度に濃度が増加していることを意味する。当業者であれば、所与の使用に必要な精製量は認識されるであろう。例えば、ヒトへの投与用である治療組成物における使用を目的とする単離されたタンパク質は、通常、規制基準に従って高純度（例えば、実験用の単離されたタンパク質よりも高純度）でなければならない。

【0032】

本明細書で使用されるように、ポリペプチドという文脈における用語「誘導体」とは、アミノ酸残基置換、欠失又は付加の導入により改変されているアミノ酸配列を含むポリペプチドのことである。本明細書において使用される用語「誘導体」とは、修飾されている、すなわちポリペプチドへ任意の種類の分子が共有結合されているポリペプチドのことでもある。例えば、限定のためではないが、ポリペプチドは、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への連結、等により修飾されていてよい。誘導体ポリペプチドは、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成、等を含むがこれらに限定されない当業者には既知の技法を使用する化学的修飾により作製され得る。さらに、誘導体ポリペプチドは、1又は2以上の非古典的アミノ酸を含有し得る。ポリペプチド誘導体は、それが誘導された元のポリペプチドに類似の若しくは同一の機能を有し得る、又はポリペプチド誘導体は改良された機能を有し得る。生物に「由来する」ポリペプチドに関して使用される用語「由来する」とは、直接前記生物（例えば、細菌細胞又はファージ）からポリペプチドを単離することであってもよい。

【0033】

本明細書で使用されるように、用語「キメラ」とは、2又は3以上の異種供給源に由来する構築物のことである。例えば、キメラ遺伝子又はキメラ核酸は、第1核酸と第2核酸が異なる種類のバクテリオファージを原産とする、第2核酸由来の配列と組み合わせた第1核酸由来の配列を含むことが可能である。各核酸由来の配列は、典型的には、それぞれコードされたポリペプチドの機能ドメインに対するコード配列に対応する。異種核酸配列は、例えば、適切な条件下でそこから発現させることが可能な融合タンパク質又はキメラポリペプチドをコードするように、組換え法により、インフレームに組み合わせ得る。キメラポリペプチドは、操作して、2若しくは3以上の天然タンパク質の完全配列、又はいずれかの部分のみを含むことが可能である。キメラポリペプチドは、通常、元のタンパク質それぞれ由来の機能性を、得られるキメラポリペプチドに分け与えるように作製される。タンパク質機能ドメインは通常モジュラーであり、したがって触媒ドメイン等の所与のドメインをなすポリペプチドの線形部分は、その酵素機能を破壊することなくタンパク質の残りの部分から取り除き得るという事実によって、融合タンパク質の二重（又は高次）機能性は実現可能になる。2又は3以上の異なる溶解素遺伝子又はポリペプチド由来の配列を含むキメラ核酸又はキメラポリペプチドは、「キメラ溶解素(chymeric lysin)」又は「キメラ溶解素構築物(chymeric lysine construct)」と呼ぶことができる。

【0034】

本明細書で使用されるように、用語「宿主細胞」とは、核酸分子でトランスフェクトされた特定の対象細胞及びそのような細胞の子孫又は潜在的な子孫のことである。そのような細胞の子孫は、後続世代において生じ得る変異体若しくは環境の影響、又は核酸分子の宿主細胞ゲノムへの組込みのために、核酸分子でトランスフェクトされた親細胞と同一でなくてもよい。

【0035】

本明細書で使用されるように、用語「組み合わせて」とは、1より多い予防薬及び／又は治療薬の使用のことである。用語「組み合わせて」の使用は、予防薬及び／又は治療薬

10

20

30

40

50

が疾病又は障害を抱える対象に投与される順番を制限しない。第1の予防薬又は治療薬は、第2の予防薬又は治療薬（第1の予防薬又は治療薬とは異なる）の投与に先立って（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、若しくは12週間前に）、と同時に、又は続いて（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、若しくは12週間後に）疾病又は障害を抱える対象に投与することが可能である。

【0036】

本明細書で使用されるように、用語「核酸」及び「ヌクレオチド配列」は、DNA分子（例えば、cDNA若しくはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、DNAとRNA分子の組合せ、キメラDNA及びRNA分子、又はハイブリッドDNA/RNA分子並びにDNA若しくはRNA分子のアナログを含む。そのようなアナログは、例えば、イノシン又はトリチル化塩基を含むがこれらに限定されないヌクレオチドアナログを使用して作製することができる。そのようなアナログは、例えば、ヌクレアーゼ耐性又は細胞膜を通過する増加した能力等の有利な属性を分子に与える修飾された骨格を含むDNA又はRNA分子を含むことも可能である。核酸又はヌクレオチド配列は、一本鎖、二本鎖であることが可能であり、一本鎖と二本鎖部分の両方を含有してもよく、三本鎖部分を含有していてもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0037】

本明細書で使用されるように、用語「予防薬（単数）」及び「予防薬（複数）」とは、グラム陽性菌による感染に付随する1又は2以上の症状を予防する、治療する、管理する又は寛解するのに使用可能な本発明のポリペプチドのことである。

【0038】

本明細書で使用されるように、用語「治療薬（単数）」及び「治療薬（複数）」とは、疾病若しくは障害の1若しくは2以上の症状、又は疾病若しくは障害の根本原因（例えば、細菌による感染）を予防する、治療する、管理する又は寛解するのに使用可能な本発明のポリペプチドのことである。

【0039】

本明細書で使用されるように、用語「治療有効量」とは、対象の疾病若しくは障害（例えば、グラム陽性菌による感染に付随する疾病若しくは障害）の1若しくは2以上の症状を寛解する、又は前記対象の全細菌負荷を減少させるのに十分な量の治療薬のことである。

【0040】

本明細書で使用されるように、用語「治療する（treat）」、「治療（treatment）」及び「治療すること（treating）」とは、グラム陽性菌による感染に付隨する1若しくは2以上の症状を寛解すること、又は本発明の1若しくは2以上のポリペプチドの投与から生じる全細菌負荷を減少することである。

【0041】

用語「抗生物質活性」とは、微生物を死滅させる及び/又は微生物の増殖若しくは繁殖を阻害する能力のことであり、「抗菌活性」と互換的に使用することが可能である。ある種の実施形態では、抗生物質活性又は抗菌活性は、標準技法に従って（例えば、液体培地中において又は寒天プレート上で）グラム陽性菌を培養し、培養物を本発明のポリペプチドに接触させ、前記接触後の細胞増殖をモニターすることにより評価される。例えば、液体培地では、細菌、例えば、黄色ブドウ球菌は、培養物の指數関数的増殖の中間点を表す光学密度（「OD」）まで増殖させてよく、培養物は本発明の1又は2以上のポリペプチドの1又は2以上の濃度に曝され、ODは対照培養物に比べてモニターされる。対照培養物に比べて減少したODは、ポリペプチドが抗生物質活性を示している（例えば、溶菌死滅活性を示している）ことを表している。同様に、細菌コロニーを寒天プレート上に形成させ、プレートを本発明のポリペプチドに曝し、それに続くコロニーの増殖を対照プレー

10

20

30

40

50

トとの関連で評価することが可能である。コロニーのサイズが減少する、又はコロニーの総数が減少すればポリペプチドが抗生物質活性を有することを示している。抗生物質活性又は抗菌活性を有する溶解素ポリペプチドの断片、バリアント、又は誘導体とは、宿主細菌細胞死をもたらす触媒能力を有する断片、又はそのような触媒能力の他にも下で定義される宿主に対するターゲティング活性を有する断片のことである。

【0042】

用語「ターゲティング活性」とは、抗生物質活性又は抗菌活性等の触媒活性を所与の細菌宿主細胞に向ける溶解素ポリペプチドの能力のことである。ターゲティング活性はポリペプチドの特定の領域又はドメインに関連していてよく、例えば、第1宿主種産の第1溶解素ポリペプチドのターゲティングドメインを含むキメラ構築物は、キメラ構築物の抗生物質活性等の触媒活性を、第1宿主種の細菌細胞に向けることができる。本明細書で使用されるように、特定の宿主細胞又は細菌種に「向けた」ターゲティング活性は、宿主細胞又は細菌種「への」又は「に対する」ターゲティング活性という関連する表現と互換的に使用される。10

【0043】

一般に、ファージF87s/06から単離される断片、バリアント、又は誘導体に関しては、「抗菌活性」又は「抗生物質活性」とは、両方の機能性、すなわち、グラム陽性菌、例えば、ファージF87s/06の生来の宿主である黄色ブドウ球菌の細胞死をもたらす触媒及びターゲティング活性のことである。ファージF170/08又はF168/08から単離される溶解素ポリペプチドの断片、バリアント、又は誘導体に関しては、「抗菌活性」又は「抗生物質活性」とは、例えば、前記断片が他の方法で宿主細胞に標的される場合、宿主細胞死をもたらす触媒活性のみのことである。20

【0044】

一態様では、本発明は、グラム陽性菌に感染するファージから単離されるポリペプチドを対象とする。前記ポリペプチドは、黄色ブドウ球菌の1又は2以上の株に対して抗菌(例えば、溶菌)及び/又はターゲティング活性を有する。一実施形態では、黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性株(MRSA)に対して抗菌活性及び/又はターゲティング活性を示すポリペプチドが提供される。さらに、表皮ブドウ球菌、スタフィロコッカス・アウリクラーリス、スタフィロコッカス・キャピティス、スタフィロコッカス・ヘモリチカス、スタフィロコッカス・ホミニス、スタフィロコッカス・サブロフィチカス、スタフィロコッカス・シミュランス、スタフィロコッカス・キシロシス、ミクロコッカス・ルテウス、枯草菌、バチルス・プミルス、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・ヒラエ、エンテロコッカス・フェシウム、エンテロコッカス・アビウム等の1又は2以上の細菌性病原体に対して抗菌活性及び/又はターゲティング活性を有するポリペプチドが本明細書では提供される。30

【0045】

好ましくは、本発明のポリペプチドは、宿主黄色ブドウ球菌に感染するバクテリオファージF87s/06から単離される。一実施形態では、ポリペプチドは、そのポリペプチドが黄色ブドウ球菌に対して抗生物質活性及び/又はターゲティング活性を示す、配列番号2と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、95%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。本明細書で開示されるポリペプチド配列に関する配列同一性は、本発明のアミノ酸配列と同じ長さの(すなわち、同数の残基からなる)候補配列において同一であるアミノ酸残基の割合として定義される。本発明は、抗菌活性及び/又はターゲティング活性を保持している配列番号2のバリアント、誘導体及び/又は断片も包含する。40

【0046】

別の態様では、本発明は、融合タンパク質又はキメラポリペプチドを作製するために、治療薬、例えば、小分子又は異種ポリペプチドと組換えによって融合された又は化学的にコンジュゲートされた(共有結合的と非共有結合的コンジュゲーションの両方を含む)本発明の単離されたポリペプチドを対象とする。融合は必ずしも直接的である必要はなく、50

リンカー配列を通して又は化学的コンジュゲーションを通じて生じてもよい。本発明のポリペプチドがコンジュゲートされ得る治療薬の非限定的例には、ペプチド又は非ペプチド細胞毒（抗菌薬及び／又は抗生物質を含む）、トレーサー／マーカー分子（例えば、放射性核種及びフルオロフォア）並びに当技術分野で既知の他の抗生物質化合物が挙げられる。

【0047】

特定の実施形態では、本発明は、ファージF87s / 06から単離されたポリペプチドの少なくとも1つのドメイン、又はその断片が、異種タンパク質の少なくとも1つのドメインで置換されているキメラポリペプチドを対象とする。好ましいキメラ構築物は、ファージF87s / 06から単離された溶解素(Lys87)の触媒ドメインを、エンテロコッカス種の宿主に感染するファージF170 / 08又はF168 / 08から単離された溶解素(Lys170又はLys168)の対応するドメインを用いた置換を含む。10 得られたキメラ溶解素構築物は、それぞれLys170-87及びLys168-87と改名される。好ましくは、Lys170-87はLys87のターゲティングドメイン及びLys170の触媒ドメインを含み、Lys168-88はLys87のターゲティングドメイン及びLys168の触媒ドメインを含む。Lys87のターゲティングドメインは、溶解素ポリペプチドの細胞壁結合ドメインに対応することが可能である。本明細書で使用される「ターゲティングドメイン」とは、溶解素ポリペプチドを宿主細胞、例えば、黄色ブドウ球菌に向か、それによって宿主細胞への溶菌作用を促進することができる溶解素ポリペプチドの機能ドメインのことである。本明細書で使用されるように、「溶解素(lysin)20」は「エンドリシン」と互換的に使用される。

【0048】

一実施形態では、キメラポリペプチドLys170-87及びLys168-87は、そのキメラポリペプチドが黄色ブドウ球菌に対して抗生物質活性又は抗菌活性を示す、それぞれ配列番号4又は配列番号6と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、95%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、そのキメラポリペプチドは黄色ブドウ球菌に対して抗生物質活性又は抗菌活性を示す。本明細書で開示されるキメラポリペプチド配列に関する配列同一性も、本発明のアミノ酸配列と同一の長さの（すなわち、同数の残基からなる）候補配列において同一であるアミノ酸残基の割合として定義される。30 本発明は、抗菌活性及び／又は抗生物質活性を保持している配列番号4及び配列番号6のバリアント、誘導体及び／又は断片も包含する。特に好ましい実施形態では、キメラポリペプチド並びにそのバリアント、誘導体及び／又は断片は、増加した溶解性、収率、安定性及び／又は溶解性能の点でLys87の特性を改良する。

【0049】

抗生物質組成物

本発明の単離された及びキメラポリペプチドは、黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌により引き起こされる細菌感染の治療及び予防において使用するため、単独で投与してもよいし医薬組成物に組み込まれてもよい。そのような実施形態では、医薬組成物は抗生物質組成物であり得る。ポリペプチドは、薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定化剤と組み合わせてもよい。薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定化剤の例には、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン及びゼラチン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、若しくはリシン等のアミノ酸；グルコース、マントース若しくはデキストリンを含む单糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール若しくはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；並びに／又は当技術分野で既知のTWEEN（商標）、40 ポリエチレングリコール（PEG）及びPLURONICS（商標）等の非イオン性界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物（例えば、抗生物質組成物）は、上記成分に加えて、潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁剤、及び保存剤も50

含むことが可能である。

【0050】

本発明のポリペプチドは、グラム陽性菌による感染の治療に有用な1又は2以上の治療薬及び/又は予防薬（例えば、当技術分野で既知の1又は2以上の抗生物質及び/又は溶解素）と組み合わせてもよい。本発明のポリペプチドと組み合わせて使用し得る治療薬は、標準抗菌薬、抗炎症薬、及び抗ウイルス薬を含む。

【0051】

本発明のポリペプチドを含む医薬組成物と一緒に使用し得る標準抗生物質には、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、パロモマイシン、ロドストレプトマイシン、ストレプトマイシン、トプラマイシン、アプラマイシン、リファマイシン、ナフトマイシン、ゲルダナマイシン、アンサマイシン、カルバセフェム、イミペネム、メロペネム、エルタペネム、ファロペネム、ドリペネム、パニペネム/ベタミプロン、ビアペネム、PZ-601、セファロスボリン、セファセトリル、セファドロキシル、セファレキシン、セファログ溶解素、セファロニウム、セファロリジン、セファロチン、セファピリン、セファトリジン、セファザフル、セファゼドン、セファゾリン、セフラジン、セフロキサジン、セフテゾール、セファクロル、セフォニシド、セフプロジル、セフロキシム、セフゾナム、セフメタゾール、セフォテタン、セフォキシチン、セフカベン、セフダロキシム、セフジニル、セフジトレーン、セフェタメト、セフィキシム、セフメノキシム、セフテラム、セフチブテン、セフチオフル、セフチオレン、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフタジジム、ラタモキセフ、セフクリジン、セフェピム、セフルプレナム、セフォセリス、セフォゾプラン、セフピロム、セフキノム、フロモキセフ、セフトビプロール、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、アズトレオナム、ペニシリン及びペニシリン誘導体、アクチノマイシン、バシトラシン、コリスチン、ポリミキシンB、シノキサシン、フルメキン、ナリジクス酸、オキソリニン酸、ピロミド酸、ピペミド酸、ロソクサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、フレロキサシン、ロメフロキサシン、ナジフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、ペフロキサシン、ルフロキサシン、バロフロキサシン、ガチフロキサシン、グレパフロキサシン、レボフロキサシン、モキシフロキサシン、パズフロキサシン、スバルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン、クリナフロキサシン、ガレノキサシン、ゲミフロキサシン、スチフロキサシン(stifloxacin)、トロバルフロキサシン(trovalflloxacin)、ブルリフロキサシン、アセタゾラミド、ベンゾラミド、ブメタニド、セレコキシブ、クロルタリドン、クロバミド、ジクロフェナミド、ドルゾラミド、エトキシゾラミド、フロセミド、ヒドロクロロチアジド、インダパミド、マフェンダ碍(mafendide)、メフルシド、メトラゾン、プロベネシド、スルファセタミド、スルファジメトキシン、スルファドキシン、スルファニルアミド、スルファメトキサゾール、スルファサラジン、スルチアム、スマトリップタン、キシパミド、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、ドキシサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、ロリテトラサイクリン並びのその任意の組合せが挙げられるが、これらに限定されない。ある種の実施形態では、本発明の1又は2以上のポリペプチドと当技術分野で既知の1又は2以上の抗生物質の組合せは、所与の感染症に対する本発明のポリペプチドの治療効果を（例えば、相加的に又は相乗的に）増強し得る。

【0052】

本発明のキメラポリペプチドは、異種溶解素が組換えによって融合されている、好ましくは、ファージF87s/06から単離される溶解素の触媒ドメインが、ファージF170/08又はF168/08のどちらか由来の溶解素の触媒ドメインで置換されている組合せを含んでいる。好ましくは、溶解素構築物は、ファージF87s/06由来の溶解素のターゲティングドメイン及びエンテロコッカス種に自然に感染するファージF170/08又はF168/08由来の溶解素由来の触媒ドメインを含む。理論に縛られたくはないが、本発明に従ったキメラ構築物は、ファージF87s/06溶解素ターゲティングド

メインに基づいて、ファージ F 87 s / 06 の天然宿主である黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌を標的にし、それからファージ F 170 / 08 又は F 168 / 08 触媒ドメインが宿主細胞壁を破壊して、溶解し細胞死が起こると考えられている。すなわち、前記構築物は、エンテロコッカス属という一種に自然に作用する溶解素に、黄色ブドウ球菌等の他の種に対して抗菌作用を発揮させる。したがって、本発明は、本発明の目的に従って種交差反応性を可能にするキメラ溶解素構築物を提供する。いくつかの特に好ましい実施形態では、この交差反応性は、Ly s 87 の溶菌活性と比べて、黄色ブドウ球菌を含むある種のグラム陽性菌に対するキメラポリペプチドの溶解性能を改良する働きをする。

【0053】

本発明のポリペプチドは、バクテリオファージ F 87 s / 06 以外の並びに / 又はバクテリオファージ F 170 / 08 及び F 168 / 08 以外のバクテリオファージから単離される 1 又は 2 以上の溶解素と組み合わせてもよい。溶解素は、一般に、アミダーゼ、エンドペプチダーゼ、ムラミダーゼ又はグルコサミニダーゼ活性のいずれかを有する。したがって、溶解素、特に異なる酵素活性の溶解素の組合せは、本発明により企図されている。

【0054】

医薬組成物は、吸入により、坐薬若しくはペッサリーの形態で、局所的に（例えば、ローション、溶液、クリーム、軟膏、若しくは散布剤として）、上皮に（例えば、皮膚パッチを使用して）、経口的に（例えば、香味料若しくは着色料及び / 又は賦形剤を含有していてもよい、錠剤（例えば、デンプン若しくはラクトース等の賦形剤を含有する）、カプセル、オビュール（ovule）、エリキシル、溶液若しくは懸濁液として）投与することが可能であり、又は医薬組成物は、非経口的に、例えば、静脈内に、筋肉内に、若しくは皮下に注射することが可能である。非経口的投与では、組成物は、他の物質、例えば、血液と等張の溶液を作製するのに十分な塩分又は单糖類を含有し得る無菌水溶液の形態で使用するのがもっともよい。頬側又は舌下投与では、組成物は、従来の方法で処方することが可能な錠剤又はトローチの形態で投与し得る。

【0055】

皮膚への局所的適用では、本発明のポリペプチドは、水溶液、アルコールベース溶液、水溶性ゲル、ローション、軟膏、非水溶液ベース、ミネラルオイルベース、ミネラルオイルとワセリンの混合物、ラノリン、リポソーム、血清アルブミン又はゼラチン等のタンパク質担体、粉末セルロースカーメル、及びその組合せを含むがこれらに限定されない担体の 1 つ又は組合せと組み合わせ得る。局所的送達様式は、塗抹、噴霧、徐放性パッチ、液体吸収ワイプ、及びその組合せを含み得る。本発明のポリペプチドは、パッチに直接又は担体の 1 つ中でのどちらかで塗布し得る。パッチは湿気があっても乾燥していてもよく、溶解素又はキメラ溶解素がパッチ上で凍結乾燥形態である。局所的組成物の担体は、ポリマー増粘剤、水、保存剤、活性界面活性剤、又は乳化剤、抗酸化剤、日焼け止め、及び溶剤又は混合溶剤系を含む半流動性又はゲル状媒体を含み得る。米国特許第 5 863560 号明細書は、皮膚を薬物に曝露するのに役立つことが可能であるいくつかの異なる担体組合せを開示している。

【0056】

示されるように、本発明の治療薬は、鼻腔内又は吸入により投与することが可能であり、適切な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロテトラフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、1,1,1,2-テトラフルオロエタン (HFA 134A.TM.) 若しくは 1,1,1,2,3,3-ヘプタフルオロプロパン (HFA 227EA.TM.) 等のハイドロフルオロアルカン、二酸化炭素又は他の適切な気体を使用して、圧縮容器、ポンプ、スプレー又はネプライザーから乾燥粉末吸入器又はエアゾールスプレー提示の形態で都合よく送達される。圧縮エアゾールの場合では、投薬単位は、計量された量を送達するバルブを提供することにより決定し得る。圧縮容器、ポンプ、スプレー又はネプライザーは、例えば、溶剤としてエタノールと噴霧剤の混合物を使用して、活性化合物の溶液又は懸濁液を含有していてもよく、この溶液又は懸濁液は潤滑剤、例えば、ソルビタントリオレイン酸をさらに含有し得る。吸入器又は散布器で使

10

20

30

40

50

用するためのカプセル及び薬包（例えば、ゼラチンから作製される）は、薬剤の粉末混合物及びラクトース又はデンプン等の適切な粉末ベースを含有するように処方し得る。

【0057】

坐薬又はペッサリーの形態での投与では、治療組成物は、ゲル、ハイドロゲル、ローション、溶液、クリーム、軟膏又は散布剤の形態で局所的に適用し得る。本発明の治療薬は、例えば、皮膚パッチを使用して、経皮的に投与してもよい。本発明の治療薬は、肺経路又は直腸経路により投与してもよい。本発明の治療薬は、眼経路により投与してもよい。点眼使用では、化合物は、等張、pH調整、無菌食塩水の微粒子化懸濁液として、又は好ましくは、等張、pH調整、無菌食塩水の、塩化ベンジルアルコニウム (benzylalkonium chloride) 等の保存剤と組み合わせてもよい溶液として処方することが可能である。代わりに、本発明の治療薬は、ワセリン等の軟膏で処方してもよい。10

【0058】

錠剤形での投与では、錠剤は、微結晶セルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム及びグリシン等の賦形剤、デンプン（好ましくは、トウモロコシ、ジャガイモ若しくはタピオカデンプン）、デンブングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム及びある種の複合ケイ酸塩等の崩壊剤、並びにポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (hydroxypropylmethylcellulose、HPMC)、ヒドロキシプロピルセルロース (hydroxypropylcellulose、HPC)、ショ糖、ゼラチン及びアカシア等の造粒結合剤を含有し得る。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル及びタルク等の潤滑剤が含まれていてよい。20

【0059】

本発明の医薬組成物の投与量及び所望の薬物濃度は、特定の用途に応じて変わり得る。適切な投与量及び投与経路の決定は十分に普通の医者の技量の範囲内である。動物実験は、ヒト治療における効果的用量の決定に信頼性のある指針を提供することが可能である。効果的用量の種間スケーリングは、当業者であればMordenti, J. and Chappell, W., "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" in Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp42-96 (前記文献はこれによりその全体を参照により組み込まれているものとする) に記載されている原則に従って実施することが可能である。30

【0060】

治療的使用

本発明のポリペプチドは、黄色ブドウ球菌を含む、及び黄色ブドウ球菌の多くのメチシリソ耐性株を含むいくつかのグラム陽性菌に対して抗生物質活性を有する。したがって、本発明のポリペプチドは、それがヒトと動物の両方において溶菌活性（例えば、抗生物質活性又は抗菌活性）を有している対象となる細菌に関連する感染症を治療する方法において使用し得る。一実施形態では、本発明の組成物を使用して、以下の黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、スタフィロコッカス・アウリクラーリス、スタフィロコッカス・キャピティス、スタフィロコッカス・ヘモリチカス、スタフィロコッカス・ホミニス、スタフィロコッカス・サブロフィチカス、スタフィロコッカス・シミュランス、スタフィロコッカス・キシロシス、ミクロコッカス・ルテウス、枯草菌、バチルス・プミルス、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・ヒラエ、及びエンテロコッカス・フェシウムのうちの1又は2以上により引き起こされる感染症を治療し得る。ある種の実施形態では、本発明のポリペプチドは、グラム陰性菌又はグラム陽性にもグラム陰性にも分類されない細菌に対しても抗生物質活性又は抗菌活性（例えば、溶菌死滅活性）を示し得る。そのような実施形態では、本発明のポリペプチドを使用して、非グラム陽性菌に関連する感染症を治療する又は管理し得る。40

【0061】

本発明の医薬組成物を用いて治療し得るグラム陽性菌の感染により引き起こされる疾病的例には、術後眼内炎、心内膜炎、中枢神経系の感染症、創傷感染症（例えば、糖尿病性50

足部潰瘍)、肺炎、骨髄炎、敗血症、乳腺症及び髄膜炎が挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

殺菌及び抗感染使用

ほぼすべての細菌病原体が粘膜部位で感染する(上部及び下部気道、腸、泌尿生殖器並びに眼球)。粘膜自体は、多くの場合、病原巣であり、環境中に存在する多くの病原性細菌(例えば、肺炎球菌、ブドウ球菌及び連鎖球菌)の唯一の病原巣であることもある。病原性細菌の保菌状態を制御するよう設計されている抗感染薬はほとんどない。しかし、病院及び養護施設等の環境においてこの病原巣を減少させる又は除去することにより、これらの細菌による感染症の発生は著しく減少することが研究により示されている。

10

【0063】

本発明のポリペプチドは、重篤な感染症の発生を予防する又は軽減するために、黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌を制御するための抗感染組成物で使用し得る。粘膜への適用のための組成物での使用に加えて、本発明の溶解素又は溶解素構築物は、皮膚及び他の固体表面上でのグラム陽性菌のコロニー化を制御するためのスプレー又は軟膏等の製剤に組み込んでもよい。

【0064】

診断法

本発明は、細菌感染における原因病原体を決定するための診断法も包含する。一実施形態では、前記方法は、細菌感染症から単離される細菌を培養し、本発明の抗菌ペプチドに対する感受性を測定することを含み、前記ポリペプチドに対する感受性がグラム陽性菌の存在を示し、感受性の欠如が非応答細菌(例えば、非応答グラム陰性菌又は非応答グラム陽性菌)の存在を示す。

20

【0065】

アミノ酸バリエント

本発明は、バクテリオファージF87s/06から単離される溶解素ポリペプチドのバリエント又はその活性断片若しくは誘導体も包含する。ある種の実施形態では、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列バリエント、又はその活性断片若しくは誘導体を包含する。本発明のポリペプチドのアミノ酸配列バリエントは、それが置換の、挿入の又は欠失バリエントであるように作製することが可能である。欠失バリエントは、機能(例えば、抗菌活性及び/又はターゲティング活性)に不可欠ではない天然のタンパク質の1又は2以上の残基を欠く。挿入変異体は、典型的には、ポリペプチドの非末端点での物質の付加を含む。置換バリエントは、典型的には、タンパク質内の1又は2以上の部位での一アミノ酸の別のアミノ酸との交換を含み、他の機能又は特性を喪失することなく、タンパク質分解的切断に対する安定性等のポリペプチドの1又は2以上の特性を調節するように設計し得る。この種の置換は、好ましくは、保存的であり、すなわち、一アミノ酸は類似の形状及び電荷のアミノ酸で置き換えられる。保存的置換は当技術分野では公知であり、例えば、アラニンからセリンへの；アルギニンからリシンへの；アスパラギンからグルタミン又はヒスチジンへの；アスパラギン酸からグルタミン酸への；システインからセリンへの；グルタミンからアスパラギンへの；グルタミンからアスパラギン酸への、グリシンからプロリソへの；ヒスチジンからアスパラギン又はグルタミンへの；イソロイシンからロイシン又はバリンへの；ロイシンからバリン又はイソロイシンへの；リシンからアルギニンへの；メチオニンからロイシン又はイソロイシンへの；フェニルアラニンからチロシンへの；ロイシンからメチオニンへの；セリンからスレオニンへの；スレオニンからセリンへの；トリプトファンからチロシンへの；チロシンからトリプトファン又はフェニルアラニンへの；及びバリンからイソロイシン又はロイシンへの変化を含む。

30

【0066】

本明細書に記載されるように、遺伝子の通常領域が、特定の溶解素タンパク質、又は活性断片をコードしているとして同定されると、点変異誘発を用いて特にどのアミノ酸残基が抗生物質活性に重要であるかを同定し得る。したがって、当業者であれば、DNA鎖に

40

50

単一塩基変化を生み出して改変されたコドン及びミスセンス変異を生じることができるであろう。

【0067】

好ましくは、タンパク質のアミノ酸の変異は、等価の、又は改良された第二世代の分子でさえ作り出す。例えば、ある種のアミノ酸は、機能（例えば、抗菌活性及び／又はターゲティング活性）の検出可能な喪失なしにタンパク質構造において他のアミノ酸で置換され得る。そのような変化をもたらす際に、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮し得る。タンパク質に相互作用的生物学的機能を与える際の疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、一般に当技術分野で理解されている。アミノ酸の相対的疎水性親水性特徴は、結果として生じるタンパク質の二次構造に寄与し、次にこの二次構造が前記タンパク質と他の分子との相互作用、例えば、グラム陽性菌の外皮内でのペプチドグリカンとの相互作用を規定することが認められている。各アミノ酸は、その疎水性及び電荷特徴に基づいて疎水性親水性指標を割り当てられており、例えば、イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン／シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；スレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リシン（-3.9）；及びアルギニン（-4.5）である。類似のアミノ酸の置換は、親水性に基づいて効果的に行うことが可能であることも当技術分野では理解されている。疎水性と同様に、親水性の値が各アミノ酸に割り当てられており、アルギニン（+3.0）；リシン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）及びトリプトファン（-3.4）である。等価な分子は、その親水性指標が、互いに±2、好ましくは±1、又はもっとも好ましくは±5以内であるアミノ酸の別のアミノ酸との置換により入手し得る。

【0068】

キメラ構築物

本発明は、キメラポリペプチドがグラム陽性菌、例えば、黄色ブドウ球菌に対して抗生物質活性を示す、バクテリオファージF87s/06由来のキメラポリペプチドも包含する。キメラポリペプチドは、異種溶解素と組換えによって融合される、ファージF87s/06から単離される溶解素、又はその断片若しくはバリアント由来でもよい。特定の実施形態では、本発明は、ファージF87s/06から単離される溶解素、又はその断片若しくはバリアントの少なくとも1つのドメインが、異種溶解素、又はその断片若しくはバリアントの少なくとも1つのドメインで置換されているキメラポリペプチドを対象とする。好ましいキメラ構築物は、黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性又は抗生物質活性を有する、ファージF170/08又はF168/08（Ly s170又はLy s168）のどちらかから単離される溶解素の対応する触媒ドメインによるファージF87s/06から単離される溶解素（Ly s87）の触媒ドメインの置換を含む。さらに好ましくは、キメラ溶解素は、Ly s170の又はLy s168の触媒ドメインと組換えによって融合されたLy s87のターゲティングドメインを含む。

【0069】

ある種の実施形態では、キメラポリペプチドは、配列番号4若しくは配列番号6のアミノ酸配列、又は黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性若しくは抗生物質活性を有するどちらかの断片を含む。他の実施形態では、キメラポリペプチドは、断片、バリアント又は誘導体がグラム陽性菌、例えば、黄色ブドウ球菌に対する抗生物質活性又は抗菌活性を有する、配列番号4又は6の断片、バリアント又は誘導体を含む。本発明のキメラポリペプチドの

10

20

30

40

50

アミノ酸配列バリアントは、本発明の単離されたポリペプチドに関して上記の通りに、例えば、置換、挿入、欠失等により、好ましくは改良された第2（又は第3又はそれ以上の）世代分子をさらに生み出すように、作製することが可能である。特に好ましい実施形態では、キメラポリペプチド並びにそのバリアント、誘導体及び／又は断片は、天然の単離されたポリペプチドと比べて、増加した溶解性、収率、安定性及び／又は溶解性能について改良された特性を示す。

【0070】

組合せ療法

本発明は、本発明の1又は2以上のポリペプチド及び1又は2以上の異なる予防薬又は治療薬を含む組成物、並びに前記組成物のうちの1又は2以上を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における細菌感染の治療のための方法（例えば、グラム陽性菌による感染症に付随する1若しくは2以上の症状の発症を予防し、治療し、遅延させる、グラム陽性菌による感染症に付随する1若しくは2以上の症状の進行を遅らせる、又はグラム陽性菌による感染症に付随する1若しくは2以上の症状を寛解させる）をさらに提供する。治療薬又は予防薬には、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、核酸分子、小分子、模倣薬、合成薬、無機分子、及び有機分子が挙げられるが、これらに限定されない。グラム陽性菌による感染の予防若しくは治療のために又はグラム陽性菌による感染症に付随する1若しくは2以上の症状の予防、治療又は寛解のために有用であることが知られている、又はこれまで使用されてきた若しくは現在使用されているどの薬物も、本明細書に記載される本発明に従って、抗生物質又は抗菌性ポリペプチドと組み合わせて使用することが可能である。

【0071】

ある種の実施形態では、「組み合わせて」とは、本発明の単離されたポリペプチドが上記の通りに別のポリペプチドに共有的に又は非共有的に結合されている、融合タンパク質又はキメラポリペプチドの使用のことである。好ましい融合タンパク質には、腸内菌種ファージ由来のLys170又はLys168等の1又は2以上の異種溶解素とのLys87のキメラポリペプチドが挙げられる。天然のLys87触媒ドメインをLys170又はLys168のどちらかの対応するドメインで置換すれば、それぞれLys170-87及びLys168-87が作製される。前記キメラ構築物は、グラム陽性菌について、特に黄色ブドウ球菌について、天然のLys87と比べて増加した溶解性能を示す。

【0072】

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに、高ストリンジェント、中ストリンジェント又は低ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。「高ストリンジェントな条件」は、（1）洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50で0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%デシル硫酸ナトリウムを用いる；（2）ハイブリダイゼーション中に、ホルムアミド等の変性剤、例えば、42で0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムと一緒にpH6.5の50mMリン酸ナトリウム緩衝液を有する50%（v/v）ホルムアミドを用いる；又は（3）42で50%ホルムアミド、5×SSC（0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH6.8）、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハート液、超音波処理されたサケ精液DNA（50μg/mL）、0.1%SDS、及び10%デキストラン硫酸、42、0.2×SSC（塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム）での及び55、50%ホルムアミドでの洗浄に続いて、55でのEDTAを含有する0.1×SSCからなる高ストリンジェントな洗浄を用いる条件を含むことが可能であるが、これらに限定されない。「中ストリンジェントな条件」は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2.sup.nd Ed., New York: Cold Spring

10

20

30

40

50

ng Harbor Press, 1989中の条件により記載されているが、これらに限定されず、洗浄液及び上記の条件ほど厳密ではないハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度及びSDS%）の使用を含む。中ストリンジエント条件の例は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハート液、10%デキストラント硫酸、及び20mg/ml変性剪断サケ精液DNAを含む溶液での37℃一晩インキュベーション、続いて約37~50℃での1×SSC中フィルターの洗浄である。

【0073】

ポリヌクレオチドは、当技術分野で既知のどんな方法によっても入手し、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定し得る。例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは適切な供給源（例えば、バクテリオファージF87s/06）由来の核酸から作製し得る。特定のポリペプチドをコードする核酸を含有する供給源は入手できないが、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列が既知の場合は、ポリペプチドをコードする核酸は、当技術分野で公知の方法を使用して、化学的に合成し、複製可能なクローニングベクターにクローニングし得る。

【0074】

本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定されると、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを作製するために、例えば、アミノ酸置換、欠失、及び/又は挿入を作り出すために、ヌクレオチド配列の操作のために当技術分野で公知の方法、例えば、組換えDNA技法、部位特異的変異誘発法、PCR、等（例えば、Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY and Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載されている技術を参照。これらの文献は両方とも参照によりその全体を本明細書に組み込まれているものとする）を使用してヌクレオチド配列を操作し得る。

【0075】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、ファージF170/08又はF168/08から単離された溶解素の触媒ドメインと融合されたファージF87s/06から単離された溶解素のターゲティングドメインを含むキメラポリペプチド等の、本発明のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。本発明は、例えば、上に定義されるように、本発明のキメラポリペプチドをコードするキメラポリヌクレオチドに、高ストリンジエント、中ストリンジエント又は低ストリンジエントハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。

【0076】

キメラポリヌクレオチドは、当技術分野で公知であり常に実施されている組換え技法により入手し得る。組換えキメラポリヌクレオチドは、典型的には、最初は別々のタンパク質をコードしている2若しくは3以上の遺伝子、又はその部分を結合することにより作製される。個々の配列は、典型的には、キメラポリペプチドが二重機能性を有する融合タンパク質をコードするように、それぞれのタンパク質それぞれの機能ドメインのコード配列に相当する。例えば、第1コード配列、又はその部分は、第2コード配列、又はその部分にインフレームで結合され得、この結合は典型的にはライゲーション又は重複伸長(overlap extension)PCRにより実現される。ライゲーションは、「カセット変異導入法」と呼ばれるキメラ遺伝子を作製する従来の方法と一緒に使用される。この方法では、DNAを制限エンドヌクレアーゼ認識部位で作用する制限エンドヌクレアーゼにより特定の断片に切断することが可能であり、次に前記特定の断片をライゲーションすることが可能である。特定の断片は、それを親DNAにライゲーションするために互換性のある末端を有する異種断片で置換することが可能である。例えば、Wells et al., Gene 34:315-23 (1985)を参照されたい。前記文献は、参照によりその全体を本明細書に組み込まれているものとする。

【0077】

10

20

30

40

50

代わりに、重複伸長PCR法等の、PCRを含む様々なアプローチを使用し得る。Ho, S.N., et al (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene. 77: 51-59を参照されたい。前記文献は、参考によりその全体を本明細書に組み込まれているものとする。このPCRアプローチのいくつかの変種は既知でありキメラを生み出すために使用されてきた。例えば、1つのそのようなアプローチは、3つのステップ：(i)キメラ分子を作製するために融合されることになる隣接する断片に部分的に相補的なプライマーを5'末端で使用する従来のPCRステップ；(ii)第1のステップにおいて作製されたPCR断片がプライマーの相補的末端を使用して融合される第2のPCRステップ；及び(iii)融合産物のPCR増幅を含む第3のステップにおいて、制限酵素不在の下でキメラ遺伝子を作製するために修正された重複伸長PCRを含む。最終PCR産物は、異なる増幅されたPCR断片を用いて構築されたキメラ遺伝子である。例えば、Wurch, T. et al (1998) A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. Biotechnology Techniques. 12(9):653-657を参照されたい。前記文献は、参考によりその全体を本明細書に組み込まれているものとする。どんなライゲーション及び／又はPCRベース組換えアプローチを使用して本発明のキメラポリヌクレオチドを作製してもよい。

【0078】

代わりに、キメラポリペプチドをコードする核酸は化学的に合成してもよい。例えば、本発明のキメラポリペプチドの所望のアミノ酸配列を使用して、対応するヌクレオチド配列を考案し、化学的に合成し、例えば、当技術分野で公知の方法を使用して複製可能なクローニングベクターにクローニングしてもよい。

【0079】

本発明の分子の組換え発現

本発明の分子（例えば、バクテリオファージ起源のポリペプチド、又はその活性誘導体、キメラ構築物、バリアント若しくは断片）をコードする核酸配列が得られると、前記分子の產生のためのベクターが、当技術分野で公知の技法を使用する組換えDNA技術により作製され得る。当業者に公知の方法を使用して、本発明の分子のコード配列及び適切な転写と翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することが可能である。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えDNA技法、合成技法、及びインビトロ遺伝子組換えが挙げられる。（例えば、Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY and Ausubel et al. eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載される技法を参照）。

【0080】

本発明の方法により同定される分子のヌクレオチド配列を含む発現ベクターは、従来の技法（例えば、エレクトロポレーション、リポソームトランスフェクション、及びリン酸カルシウム沈殿）により宿主細胞に移入することが可能であり、次にトランスクレプトされた細胞は従来の技法により培養されて本発明の分子を产生する。特定の実施形態では、本発明の分子の発現は構成的、誘導性又は組織特異的プロモーターにより調節される。特定の実施形態では、発現ベクターはpQE-30 (Qiagen社製) 又はpET-29 (a) (Novagen社製) である。

【0081】

本発明の方法により同定される分子を発現するために使用される宿主細胞は、大腸菌等のどちらの細菌細胞（本発明の溶解素タンパク質、溶解素構築物又はその断片に非感受性である）でもよい。様々な宿主発現ベクター系を利用して、本発明の方法により同定される分子を発現し得る。そのような宿主発現系は、本発明の分子のコード配列を产生して続いて精製する媒体を意味するが、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換又はトランスクレプトされるとき、本発明の分子をin situで発現し得る細胞も意味する。これらの媒体には、本発明により包含される分子のコード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換された、本発明の

溶解素タンパク質、溶解素構築物又は断片に非感受性である細菌等の微生物（例えば、大腸菌及び枯草菌）；本発明により包含される分子をコードする配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス・ピキア (*Saccharomyces Pichia*)）；本発明により包含される分子をコードする配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染された昆虫細胞系；本発明により包含される分子をコードする配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワー・モザイクウイルス (*cauliflower mosaic virus*、 *C a M V*) 及びタバコモザイクウイルス (*tobacco mosaic virus*、 *T M V*)）で感染された若しくは組換えプラスミド発現ベクター（例えば、*T i* プラスミド）で形質転換された植物細胞系；又は哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）若しくは哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス *7 . 5 K* プロモーター）を含有する組換え発現構築物を宿す哺乳動物細胞系（例えば、*C O S*、*C H O*、*B H K*、*2 9 3*、*2 9 3 T*、*3 T 3* 細胞、リンパ細胞（米国特許第5,807,715号参照）、*P e r C . 6* 細胞（Crucell社により開発されたヒト網膜細胞））が挙げられるが、これらに限定されない。
10

【0082】

本発明の溶解素タンパク質、溶解素構築物、又は断片に感受性ではない細菌系では、分子が発現されることを目的とする使用に応じていくつかの発現ベクターを有利に選択し得る。例えば、ポリペプチドの医薬組成物の作製のために、大量のそのようなタンパク質が產生される場合、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指示するベクターが好ましい可能性がある。そのようなベクターとしては、融合タンパク質が产生されるように、タンパク質配列がベクターに *L a c Z* コード領域とインフレームに個別にライゲーションされ得る大腸菌発現ベクター *p U R 2 7 8* (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791, この文献は参照によりその全体を本明細書に組み込まれる)；*p I N* ベクター（(Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509; 前記文献はそれぞれ参照によりその全体を本明細書に組み込まれている）；及び同類のものが挙げられるが、これらに限定されない。*p G E X* ベクターを使用して、グルタチオン *S* - トランスフェラーゼ (glutathione *S*-transferase、*G S T*) との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現してもよい。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、吸着及びマトリックスグルタチオン - アガロースビーズへの結合、続いて遊離グルタチオンの存在下での溶出により溶解された細胞から容易に精製することが可能である。*p G E X* ベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物が *G S T* 部分から放出されるように、トロンビン又は活性化第 *X* 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。
20
30

【0083】

昆虫系では、オウトグラファ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*、 *A c N P V*) は外来遺伝子を発現するベクターとして使用される。前記ウイルスはヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞において増殖する。ポリペプチドコード配列は前記ウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）に個別にクローニングし、*A c N P V* プロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に置いてもよい。
40

【0084】

哺乳動物宿主細胞では、いくつかのウイルスベース発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合には、所望のポリペプチドコード配列を、アデノウイルス転写 / 翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーター及びトリパートイティリーダー (tripartite leader) 配列にライゲーションし得る。次に、このキメラ遺伝子は、インビトロ又はインビオ組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入し得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、*E 1* 又は *E 3* 領域）へ挿入すれば、感染宿主において生存可能でありポリペプチド分子を発現することができる組換えウイルスを生じることになる（例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359を参照）。前記文献は参
50

照によりその全体を本明細書に組み込まれている)。挿入されたコード配列の効率的翻訳には、特定の開始シグナルが必要になることもある。これらのシグナルは、ATG開始コドン及び隣接する配列が含まれる。さらに、全挿入物の翻訳を確実にするためには、開始コドンは望ましいコード配列のリーディングフレームと同調していなければならない。これらの外來性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然でも合成でも、様々な起源であることが可能である。発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター、等を含むことにより増強され得る(Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544、前記文献は参照によりその全体を本明細書に組み込まれている)。

【0085】

組換えタンパク質の長期高収率產生のためには、安定した発現が好ましい。例えば、本発明のポリペプチドを安定的に発現する細胞系統を操作し得る。ウイルス複製起点を含有する発現ベクターを使用するよりは、適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、等)により制御されるDNA及び選択マーカーを用いて宿主細胞を形質転換することが可能である。外來DNAの導入に統いて、操作された細胞は富栄養培地(enriched media)において1~2日間増殖することができ、その後選択培地に切り替えられる。組換えプラスミド中に選択マーカーがあれば、選択に対して耐性が与えられ、細胞がプラスミドをその染色体に安定的に組み込ませ、今度は細胞系統中に増殖、展開される(cloned and expanded)ことが可能な細胞増殖巣(foci)に増殖することができる。この方法を有利に使用して、本発明のポリペプチドを発現する細胞系統を操作し得る。そのような操作された細胞系統は、本発明のポリペプチドに感受性の細菌種をスクリーニングし評価するのに特に有用である可能性がある。

【0086】

tk細胞、hprt細胞、又はaprt細胞においてそれぞれ使用され得る単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., 1977, Cell 11: 223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシリトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 202)、及びアデニンホスホリボシリトランスフェラーゼ(Lowy et al., 1980, Cell 22: 817)遺伝子を含むさまざまな選択系が使用され得るが、これらに限定されない。さらに、抗代謝物質耐性が以下の遺伝子の選択の基準として利用され得る;メトトレキサート耐性を与えるdhfr(Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527);ミコフェノール酸耐性を与えるgpt(Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072);アミノグリコシドG-418耐性を与えるneo(Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu and Wu, 1991, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215)、使用することが可能な当技術分野で周知の組換えDNA技術の方法は、Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1に記載されている;及びハイグロマイシン耐性を与えるhygro(Santerre et al., 1984, Gene 30:147)に対する選択基準として代謝拮抗剤耐性を使用することが可能である。

【0087】

本発明のポリペプチドの発現レベルは、ベクター増幅により増加することができる(概説は、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)参照)。ポリペプチドを発現しているベクター系におけるマーカーが増幅可能な場合には、宿主細胞の培養液中に存在する阻害剤のレベルが増

10

20

30

40

50

加すれば、マーカー遺伝子のコピー数が増加することになる。增幅された領域はポリペプチドのスクレオチド配列に関連しているので、ポリペプチドの産生も増加することになる(Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

【0088】

本発明の分子(すなわち、ポリペプチド)は、組換えによって発現された後は、ポリペプチド産生のために当技術分野で既知のどの方法によっても、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、親和性及びサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差的溶解性によって、又はポリペプチド若しくは抗体の精製のための他のどんな標準技法によっても精製し得る。

【0089】

以下の実施例は本発明を説明するが、限定するものではない。したがって、実施例は、修正を加えられる可能性がありそれでも本発明の精神と範囲内であるという理解とともに提供される。

[実施例]

【0090】

実験方法

以下の細菌株、すなわち大腸菌JM109及び大腸菌BL21(DE3)pLysE(Novagen社製、San Diego)を、クローニング及び配列決定目的に使用した。

【0091】

細菌は、37°CでLB培地(1Lの蒸留水中10gトリプトン、5g酵母エキス、5gNaCl、1mLの1N NaOH)とLB寒天(1Lの蒸留水中10gトリプトン、5g酵母エキス、5gNaCl、15gの寒天)の両方において又は2×YT(1Lの蒸留水中16gトリプトン、10g酵母エキス、5gNaCl)において増殖させた。必要な場合には、抗生物質カナマイシン及びアンピシリンを選択マーカーとして増殖培地に添加した。

【0092】

バクテリオファージF87s/06は、マイトマイシンとのインキュベーションにより黄色ブドウ球菌の臨床分離株(表Iの分離株番号77)から単離した。

【0093】

使用した発現ベクターは、pQE-30(Qiagen社製、Hilden、Germany)及びpET-29(a)(Novagen社製)であった。プラスミド地図は、図2a)、b)及びc)に示している。所望のタンパク質を発現するのに使用された組換えプラスミドpQE-30/Lys87及びpET-29(a)/Lys87は、それぞれpCC1及びpCC2と命名した。本実験の臨床アッセイにおいて使用した細菌分離株は表Iに収載されている。

【0094】

10

20

30

【表1】

1. 表I. D

[表1]

[表]

番号D	種D	出所D	試料タイプD	ラインD	所見D
1	黄色ブドウ球菌D	H1	化膿性滲出液	STA入院	-
2	黄色ブドウ球菌D	H2	ドレイン滲出液	STA入院	-
3	黄色ブドウ球菌D	H2	創傷滲出液	STA入院	MRSA
4	黄色ブドウ球菌D	H2	創傷滲出液	STA入院	MRSA
5	黄色ブドウ球菌D	H3	透析カテーテルからの滲出液	STA入院	-
6	黄色ブドウ球菌D	H1	化膿性滲出液	STA入院	-
7	黄色ブドウ球菌D	H3	褥瘡からの滲出液	STA入院	MRSA
8	黄色ブドウ球菌D	H4	褥瘡からの滲出液	STA入院	-
9	黄色ブドウ球菌D	H2	皮膚からの滲出液	STA入院	MRSA
10	黄色ブドウ球菌D	H1	膿	STA入院	-
11	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA通院	MSSA
12	黄色ブドウ球菌D	H4	褥瘡からの滲出液	STA入院	MRSA
13	黄色ブドウ球菌D	H5	創傷からの滲出液	STA入院	MRSA
14	黄色ブドウ球菌D	H5	臍帯からの滲出液	STA通院	MSSA
15	黄色ブドウ球菌D	H3	褥瘡からの滲出液	STA入院	MRSA
16	黄色ブドウ球菌D	H6	褥瘡からの滲出液	STA通院	MSSA
17	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA通院	MRSA
18	黄色ブドウ球菌D	H4	創傷からの滲出液	STA入院	MRSA
19	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA通院	-
20	黄色ブドウ球菌D	H5	皮膚からの滲出液	STA入院	-
21	黄色ブドウ球菌D	H5	膿瘍滲出液	STA通院	-
22	黄色ブドウ球菌D	H5	臍帯からの滲出液	STA通院	MSSA
23	黄色ブドウ球菌D	H5	膿	STA通院	MSSA
24	黄色ブドウ球菌D	H7	膿	STA入院	-
25	黄色ブドウ球菌D	H7	膿	STA入院	-
26	黄色ブドウ球菌D	H3	フレグモーネ膿	STA入院	MRSA
27	黄色ブドウ球菌D	H5	足からの滲出液	STA入院	MRSA
28	黄色ブドウ球菌D	H4	褥瘡からの滲出液	STA入院	MRSA
29	黄色ブドウ球菌D	H5	潰瘍からの滲出液	STA入院	MRSA
30	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MRSA
31	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	-
32	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MRSA
33	黄色ブドウ球菌D	H5	創傷からの滲出液	STA通院	-
34	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	-
35	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA通院	MSSA
36	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	-
37	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MSSA
38	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MRSA
39	黄色ブドウ球菌D	H5	創傷からの滲出液	STA入院	MRSA
40	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MSSA

10

20

30

40

41	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MSSA
42	黄色ブドウ球菌D	H5	創傷からの滲出液	STA入院	MRSA
43	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MRSA
44	黄色ブドウ球菌D	H5	創傷からの滲出液	STA通院	MRSA
45	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MRSA
46	黄色ブドウ球菌D	H5	蜂巣炎滲出液	STA通院	MSSA
47	黄色ブドウ球菌D	H5	創傷からの滲出液		MRSA
48	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MSSA
49	黄色ブドウ球菌D	H5	創傷からの滲出液	STA入院	MRSA
50	黄色ブドウ球菌D	H5	滲出液	STA入院	MSSA
51	黄色ブドウ球菌D	H5	創傷からの滲出液	STA入院	MRSA
52	黄色ブドウ球菌D	H5	創傷からの滲出液		MSSA
53	黄色ブドウ球菌D	H8	尿	STA通院	-
54	黄色ブドウ球菌D	H8	尿	STA通院	-
55	黄色ブドウ球菌D	H6	潰瘍からの滲出液	STA通院	-
56	黄色ブドウ球菌D	H2	痰	STA入院	-
57	黄色ブドウ球菌D	H2	腹水	STA入院	MRSA
58	黄色ブドウ球菌D	H1	血液培養	STA入院	-
59	黄色ブドウ球菌D	H2	カテーテル先端	STA入院	-
60	黄色ブドウ球菌D	H2	血液培養	STA入院	R-Oxa
61	黄色ブドウ球菌D	H3	膿	STA入院	-
62	黄色ブドウ球菌D	H1	気管支吸引液	STA入院	-
63	黄色ブドウ球菌D	H3	痰	STA入院	MRSA
64	黄色ブドウ球菌D	H4	皮膚病変からの滲出液	STA入院	-
65	黄色ブドウ球菌D	H2	膿	STA入院	S-Oxa
66	黄色ブドウ球菌D	H4	尿	STA入院	-
67	黄色ブドウ球菌D	H2	膿	STA入院	MSSA
68	黄色ブドウ球菌D	H2	転子からの滲出液	STA入院	MSSA
69	黄色ブドウ球菌D	H1	気管支吸引液	STA入院	-
70	黄色ブドウ球菌D	H5	眼からの滲出液	STA入院	MRSA
71	黄色ブドウ球菌D	H5	血液培養	STA入院	MRSA
72	黄色ブドウ球菌D	H4	褥瘡からの滲出液	STA入院	MRSA
73	黄色ブドウ球菌D	H5	皮膚からの滲出液	STA入院	MSSA
74	黄色ブドウ球菌D	H4	痰	STA入院	MRSA
75	黄色ブドウ球菌D	-	ATCC	ATC	-
76	黄色ブドウ球菌D	H8	尿	STA通院	-
77	黄色ブドウ球菌D	H2	滑液	STA入院	-
78	黄色ブドウ球菌D	H6	尿	STA通院	-
79	表皮ブドウ球菌D	H2	血液培養	SCN入院	-
80	表皮ブドウ球菌D	H3	透析カテーテルからの滲出液	SCN入院	-
81	表皮ブドウ球菌D	H5	血液培養	SCN通院	-
82	表皮ブドウ球菌D	H7	尿	SCN入院	-
83	表皮ブドウ球菌D	H4	尿	SCN入院	-
84	表皮ブドウ球菌D	H5	カテーテル	SCN入院	-
85	スタフィロコッカス・アウリク ラーリスD	H1	血液培養	SCN入院	-
86	スタフィロコッカス・キャピテ イスD	H1	膿	SCN入院	-
87	スタフィロコッカス・キャピテ イスD	H5	血液培養	SCN通院	-

10

20

30

40

88	スタフィロコッカス・キャピティスD	H5	ドレイン液	SCN入院	-
89	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	H1	痰	SCN入院	-
90	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	H5	カテーテル先端	SCN入院	-
91	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	H7	尿	SCN入院	-
92	スタフィロコッカス・ホミニスD	H5	血液培養	SCN通院	-
93	スタフィロコッカス・ホミニスD	H4	痰	SCN入院	-
94	スタフィロコッカス・サプロフィチカスD	H2	尿	SCN入院	R-Oxa
95	スタフィロコッカス・サプロフィチカスD	H7	尿	SCN入院	多耐性
96	スタフィロコッカス・サプロフィチカスD	H4	尿	SCN入院	-
97	スタフィロコッカス・シミュランスD	H1	血液培養	SCN入院	-
98	スタフィロコッカス・キシリオスD	H5	血液培養	SCN通院	-
99	ミクロコッカス・ルテウスD	-	ATCC	ATC	-
100	枯草菌D	-	ATCC	ATC	-
101	バチルス・プミルスD	-	ATCC	ATC	-
102	大腸菌D	-	ATCC	ATCC	大腸菌ATCC25922
103	エンテロコッカス・フェカリスD	-	子宮内膜	-	-
104	エンテロコッカス菌種	H8	尿	EN通院	-
105	エンテロコッカス・ヒラエD	-	CIP	CI	-
106	エンテロコッカス・フェシウムD	H2	尿	EFM入院	-
107	エンテロコッカス・アビウムD	H8	-	ENA通院	-
108	肺炎連鎖球菌D	H4	痰	STR入院	-
109	A群連鎖球菌 (Streptococcus A) D	H5	咽頭滲出液	STR入院	-
110	B群連鎖球菌 (Streptococcus B) D	H5	血液培養	STR通院	-

【0095】

表Ⅰは、配列番号2の抗菌活性を試験するために使用された臨床細菌分離株を収載している。以下の略字が使用されており、ATCC - アメリカ培養細胞系統保存期間；CIP - ATCCの同等物；ECO - 大腸菌；EN - エンテロコッカス菌種；ENA - エンテロコッカス・アビウム；EFM - エンテロコッカス・フェシウム；EFS - エンテロコッカス・フェカリス；MRSA - メチシリン耐性黄色ブドウ球菌；STA - 黄色ブドウ球菌；SCN - コアグラーゼ陰性ブドウ球菌；STR - 連鎖球菌；R-Oxa - オキサシリニア耐性；S-Oxa - オキサシリニア感受性である。細菌分離株は、リスボン地区の病院、アルトアレンテージョ州の病院、及びアルガルベ州の病院から入手した。

【0096】

ファージF87s/06由来の推定溶解素タンパク質のバイオインフォマティックス解析標的DNA及びアミノ酸配列の解析は、スイスバイオインフォマティックス研究所のExpert Protein Analysis System (Expert Protein Analysis System)を使用することにより実施した。追加の解析も、プログラムTranslate Tool, Prosite and ProtParamを使用して実施した。UniProt Knowledgebaseデータベース中の配列との標的アミノ酸配列の相同性は、FASTA3を使用して実施した。配列アラインメントは、ClustalWを使用して実施した。両プログラムとも、歐州分子生

10

20

30

40

50

物学研究所 - 欧州バイオインフォマティックス研究所 (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute、EMBL-EBI) ウェブサイトを通じてアクセス可能である。標的配列の二次構造の決定は、プログラム FoldIndexを使用して実施した。

【0097】

ファージF87s/06の精製

ストックファージF87s/06の調製は、Carlson K., 2005, 'Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches,' in Kutter, E. Sulakvelidze, A. (eds.) Bacteriophages: Biology and Applications, 5th ed. CRC press ('Carlson'は参照によりその全体を本明細書に組み込まれている)に記載されているプロトコールを使用して実施した。 10

【0098】

ストックファージF87s/06は、Yamamoto et al., 2004, PNAS 101:6415-6420(前記文献は、参照によりその全体を本明細書に組み込まれている)及びCarlsonに記載されているプロトコールに従ってPEGを用いて沈殿により濃縮した。

【0099】

ファージF87s/06ストックは、4で1時間、1M NaCl中で攪拌しながらインキュベートした。次に、PEG8000(AppliChem社製、Cheshire、MA)を10%(p/v)の最終濃度に達するまで徐々に添加した。次に、組成物を4で一晩インキュベートした。インキュベーション期間後、組成物は4、10000×gで30分間遠心分離した。次に、沈殿物をSM(pH7.4の0.05M Tris-HCl、0.1M NaCl、10mM MgSO₄及び1%p/vのゼラチン)中に再懸濁し、4、1000rpmで10分間、再び遠心分離した。懸濁されたファージを含有する上清は、さらに精製するために保存した。 20

【0100】

ファージF87s/06の精製は、Carlsonにより記載されている通りにCsCl勾配を使用して実現された。

【0101】

ファージ保存物からのCsClの除去は、透析により実現された。透析膜Cellulose Sep H1 High Grade Regenerated Cellulose Tubular Membrane(Cellu.Sep社製、River Street、USA)は、製造元の説明書に従って調製した。透析は、4で100mM Tris-HCl及び3M NaCl(pH7.4)中30分間の最初のインキュベーションからなった。これに、4で100mM Tris-HCl及び0.3M NaCl(pH7.4)中30分間の第2のインキュベーションが続いた。透析後、懸濁されたファージは透析袋の中から取り出され、4で保存された。 30

【0102】

ファージDNAの抽出

ファージF87s/06 DNAはCsCl上で精製した保存ファージから得られた。5mlの精製されたファージに、pH8.0の20mM EDTA、0.5%(p/v)のSDS及びプロテイナーゼKを最終濃度40μg/mlで添加した。次に、混合物は56で1時間インキュベートした。これに続いて、水相と有機相間の界面がはっきりするまで、25:24:1の割合のフェノール:クロロホルム:アルコール中で連続抽出を行った。次に、水相を等量のクロロホルムで処理し、4、130000×gで10分間遠心分離した。水相は再び取り除き、DNAは2容量の無水エタノールを添加することにより沈殿させ、20で30分間インキュベートした。次に、試料は4、11000×gで30分間遠心分離した。次に、ペレットを室温で70%エタノールを用いて洗浄し、50μlの超純水(Gibco社製、California)に再懸濁した。次に、DNA濃度を、ND-1000 Spectrophotometerにおいて260nmの吸光度を測定することにより決定した。次に、単離されたファージDNAの完全性は、1%アガロースゲルの電気泳動により解析した。 40 50

【0103】

次に、ファージF87s / 06 DNAは塩基配列決定し、アミノ酸配列をコードするオープンリーディングフレーム(open reading frames、ORF)を、バイオインフォマティックス解析項下に記載されるツールを使用して同定した。さらに、ファージF87s / 06 DNAの相同性を、プログラムFASTA3を使用して既存の配列と比較した。

【0104】

コンピテント細胞の調製

コンピテント細胞を調製するために、LB培地をコンピテント大腸菌と一緒にインキュベートし、37、135 rpmで攪拌しながら一晩インキュベートした。次の日、培養したLB培地から5mlを200mlの新しいLB培地に添加した。培養液は、0.7～0.8の光学密度(OD₆₀₀)に達するまで37で攪拌しながらインキュベートした。光学密度は、UV/Vis Spectrometer UVA(Unicam社製)上で測定した。次に、細胞は4、5000 rpmで20分間遠心分離した。上清を除去した後、ペレットは、予め氷上で冷却した10mlの10%グリセロール液に再懸濁した。次に、前記容量は10%グリセロール液をさらに加えることにより50mlとし、4、5000 rpmで20分間再び遠心分離した。上清を除去した後、ペレットは前記の通りに再懸濁し、追加時間遠心分離した。次に、ペレットはデカンテーション後に管内に残る残留10%グリセロール液に再懸濁した。次に、試料を分注し-80で保存した。

【0105】

エレクトロポレーションによるコンピテント細胞の形質転換

コンピテント大腸菌細胞を形質転換するために、一定分量のコンピテント細胞を-80の貯蔵庫から取り出し、4で10～20分間解凍した。次に、1μlのプラスミドDNAを25μlのコンピテント細胞に添加した。次に、懸濁された細胞はエレクトロポレーションキュベット(Electroporation Cuvettes Plus model No. 610、BTX、Holliston、USA)に移し、Gene Pulser Xcell System(Bio-Rad社製、Hertfordshire、U.K.)で電気穿孔処理した。1mmキュベットに使用したパラメーターは以下の通りであった：電気インパルス-10μF、抵抗-600オーム及び電位-1800V。エレクトロポレーション後直ちに、細胞は1mlのLB培地に再懸濁し、37、135 rpmで攪拌しながら1時間インキュベートした。次に、細胞は室温、13000 rpmで1分間遠心分離した。次に、細胞は50μlのLB培地に再懸濁し、LB寒天(50μl/プレート)及び必要な選択マーカーを含有するペトリ皿に蒔いた。プレートは37で一晩インキュベートした。

【0106】

プラスミドDNAの抽出(ミニプレップ)

形質転換された細菌の選択後、所望のDNAプラスミドを、Sambrook and Russel, 2001, Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(前記文献は、参照によりその全体を本明細書に組み込まれている)に記載されているプロトコールに従って抽出した。次に、DNA濃度の決定は、260nmでの吸光度の測定によりND-1000 Spectrophotometer上で行った。次に、単離されたDNAの完全性は、1%アガロースゲルでの電気泳動及び視覚化により解析した。

【0107】

DNAの電気泳動

電気泳動は、0.5～10Kb間の断片を分離することができる1%アガロースゲル上で実施した。アガロースは、TBE 0.5×(1Lの蒸留水中108gTris、55gホウ酸、pH 8.0の0.5M EDTA 20ml)中に溶解し、続いて、臭化エチジウムを最終濃度0.5pg/mlで添加した。6×ローディング色素(20%フィコール400、0.1M Na₂EDTA pH 8.0、1% SDS、0.25%プロモフェノールブルー及び0.25%キシレンレッド)を添加することにより、ゲル上に充填するためのDNA試料を調製した。電気泳動は、TBE 0.5×中、100mAで1時間行った。Gene Ruler(商標)1 kb DNA Ladder Mix(Fermentas社製、Maryland、USA)を使用して、電気

10

20

30

40

50

泳動完了後にバンドのサイズを決定した。

【0108】

プラスミドの構築

プラスミドpCC1及びpCC2は、ファージF87s/06の単離された溶解素(Lys87)に相当するcDNA配列をベクターpQE-30及びpET-29(a)に挿入することにより構築した。ファージF87s/06の溶解素の遺伝子に相当するDNA断片は、それぞれプライマー；87F(CGGGATCCAAACATACTAGTG、配列番号3)及び87R(CTAAGAAGCTTAAACACTTCTTT、配列番号4)；87F及び87R1(CGCTCGAGAACACTTCTTCAC、配列番号5)を使用してPCRにより増幅させた。PCR反応は、以下の条件：puReTaq Ready-to-Go PCR Beads(Amersham Biosciences社製、U.K.)、ファージF87s/06由来の200ngのゲノムDNA、最終濃度0.4pmol/μlのプライマー及び最終容積25μlまでの超純水を使用して設定した。以下のサーモサイクラー条件を使用した。
：95℃で1分を1サイクル、95℃で1分+57℃で1分+72℃で1分を30サイクル、及び72℃で5分を1サイクル。

【0109】

ベクターpQE-30及びpET-29(a)は、それぞれ制限酵素BamHI、HindIII並びにBamHI及びXhol(Fermentas社製)で消化した。制限消化混合物は製造元の説明書に従って調製した。Lys87の増幅されたDNAと同様に、ベクターの消化から生じるDNA断片も1%アガロースゲル上に流した。次に、前記DNAは、High Pure PCR Product Purification Kit(Roche社製、Germany)を製造元の説明書に従って使用してゲルから精製した。

【0110】

1のT4DNAリガーゼ(New England Biolabs社製、Frankfort、Germany)、10×ライゲーション緩衝液(25℃で50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATP、pH 7.5)及び超純水と一緒に最終容積20μlと一緒に、精製されたベクターDNA及びLys87をコードするcDNAを1:5モルの比で組み合わせた。ライゲーション混合物は22℃で一晩インキュベートし、続いて大腸菌株JM109及びBL21(DE3)pLysEを形質転換した。形質転換は前記のプロトコールに従って行った。

【0111】

形質転換細胞は、LB寒天及びそれぞれの選択マーカーを含有するペトリ皿に蒔くことにより選択した。ペトリ皿上で検出されるpCC1及びpCC2を含有する形質転換細胞のコロニーを使用して、適切な選択マーカーを含有するLB培地に播種し一晩インキュベートした。次に、培養物を遠心分離してDNAを前記の通りに抽出した。

【0112】

クローニングされた断片が正確に挿入されたかどうかは、プラスミドを構築するのに使用した同一の制限酵素を使用して組換えプラスミドを消化することにより決定した。Lys87断片のクローニングのための方法及び手順はすべて、標準プロトコールに従って行った。

【0113】

塩基配列決定

Lys87のDNAに相当する所望のDNAを含有する組換えプラスミドはMacrogen(Coreia do Sul)によって塩基配列が決定された。

【0114】

Lys87の発現及びその溶解度の決定

Lys87を発現するために、それぞれpCC1及びpCC2を用いて形質転換したJM109及びBL32(DE3)pLysEを使用して、適切な選択マーカーを含有する5mLの2×YT培地に播種した。培養物は、0.6のOD(600nm)が得られるまで37℃で攪拌しながら一晩インキュベートした。溶解素の発現は、1mM～0.5mMのIPTGを添加することにより誘導した。これは、およそ、37℃、攪拌しながらの4時間のイ

ンキュベーション後に行った。大腸菌 J M 1 0 9 (pCC1) の試料は、誘導時点から 0 、 1 、 2 、 3 及び 4 時間で採取した。大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s E (pCC2) の試料は、誘導時点から 0 、 2 及び 4 時間で採取した。

【 0 1 1 5 】

インキュベーションが終了後、大腸菌 J M 1 0 9 細胞の溶解は、リゾチーム (Sigma-Aldrich 社製) を最終濃度 0 . 1 m g / m l で及び 1 μ l のプロテアーゼ阻害剤 Cocktail Set I (Calbiochem 社製、 USA) を添加し、続いて凍結融解により実現された。試料は 5 サイクルの凍結融解を受けさせた。次に、試料を 4 、 1 4 0 0 0 0 \times g で 1 0 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を取り除き、ペレットを 5 0 0 の P B S 1 \times に再懸濁した。

【 0 1 1 6 】

大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s E (pCC2) を溶解するために、試料を 4 、 1 3 2 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットを、 1 μ l のプロテアーゼ Cocktail Inhibitor Set I に加えて 1 5 0 μ l の BugBuster Master Mix (Novagen 社製) に再懸濁した。細胞の溶解は、製造元の説明書に従って BugBuster Master Mix を使用して実施した。溶解後、 5 0 0 μ l の各試料を 4 、 1 4 0 0 0 \times g で 1 0 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を取り除き、ペレットを 5 0 0 μ l の P B S 1 \times に再懸濁した。

【 0 1 1 7 】

試料はすべて、 L y s 8 7 の活性を決定するために、 S D S - P A G E 及びウェスタンプロットにより解析した。

【 0 1 1 8 】

S D S - P A G E

この実験では、 1 5 % ポリアクリルアミドゲルを使用した。分解ゲルは、 6 . 2 5 m l Protogel 、 3 . 3 5 m l Protogel Resolving Buffer (National Diagnostics 社製、 Georgia 、 USA) を添加することにより調製した。濃縮用ゲルは、 6 5 0 Protogel 、 1 . 2 5 m l Protogel Stacking Buffer (National Diagnostics 社製) 、 3 m l 蒸留水、 5 0 4 1 A P S 1 0 % 、及び 7 . 5 T E M E D を使用して調製した。次に、解析されるタンパク質試料を、 6 \times 変性緩衝液 (pH 6 . 8 の 0 . 3 5 M Tris-HCl 、 1 0 . 2 8 % D S 、 3 6 % グリセロール、 0 . 6 M D T T 及び 0 . 0 1 2 % プロモフェノールブルー) に入れ、 1 0 0 で 1 0 分間加熱することにより変性した。ゲルは Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad 社製) に流した。試料が濃縮用ゲル中にある間、電位は 1 4 0 V に維持した。試料が分解ゲルに入った後、電位を 2 0 0 V まで上げた。 Precision Plus Protein (商標) Standards Dual Color of Bio-Rad 及び PageRuler (商標) Prestained Protein Ladder of Fermentas を、分子量ラダーとして使用した。

【 0 1 1 9 】

ニトロセルロース膜への転写

S D S - P A G E ゲル上のタンパク質バンドを視覚化するために、ゲルを外気温で 1 時間クーマシー染色溶液に浸した。次に、ゲルを脱染緩衝液 (1 L の蒸留水中 1 0 % 酢酸、 1 0 % メタノール) に移して過剰な染色を除去した。

【 0 1 2 0 】

次に、ゲルを外気温で 1 \times トランスファー緩衝液 (4 8 m M Tris 、 3 9 m M グリシン、 0 . 0 4 % S D S 、 1 0 % メタノール、及び 1 L の蒸留水) に入れた。次に、タンパク質を、 Mini Transblot Module (Bio-Rad 社製) を使用して、ゲルからニトロセルロース Hybond C (GE Healthcare 社製、 Germany) に転写した。移送は 2 0 0 m A で 1 時間行われた。

【 0 1 2 1 】

ウェスタンプロット

ニトロセルロース膜は、 P B S 1 \times 、 5 % 牛乳タンパク質、 0 . 0 5 % Tween (商標) 2 0 中、 4 で一晩ブロッキングされた。次に、膜は P B S 1 \times 、 0 . 0 5 % Tween 20 中、室温で 5 回洗浄した。次に、膜は、 P B S 1 \times 、 2 % 牛乳タンパク質、 0 . 0 5 % Tween 20 及び 1 : 5 0 0 0 で希釈された過酸化酵素にコンジュゲートされた抗 H i s 6 抗体 (Ro

10

20

30

40

50

che社製)を含有する溶液中、室温で攪拌しながら1時間インキュベートした。次に、膜はPBS 1×、0.05%Tween 20中、室温で15分間3回洗浄した。

【0122】

所望のタンパク質は、ECL(商標)Plus Western Blotting Detection System(GE Healthcare社製)を製造元の説明書に従って使用して検出した。次に、膜はAmersham Hyperfilm ECLに曝し、AGFA Curix 60 processorで現像した。

【0123】

Lys 87の溶菌活性の評価

表Iに収載されている細菌の調製では、BHI上で増殖させ、15μlのLys 87を発現している細胞由来の不溶性画分、Lys 87を発現している細胞由来の可溶性画分、又は精製されたLys 87の15μlと一緒にインキュベートした。pH 7.0の100mM Tris-HCl緩衝液を陰性対照として使用した。単離された細菌はすべて、連鎖球菌属に属する細菌以外は、前のプロトコールにより試験した。連鎖球菌属由来の細菌におけるLys 87の溶菌活性を試験するために、播種ループを使用して液体培養物から細菌を血液寒天プレート上に移した。連鎖球菌を蒔いた後、pH 7.0の100mM Tris-HCl中のLys 87の15μl試料をプレートに添加し37℃で一晩インキュベートした。

10

【0124】

Lys 87の精製のための細胞抽出物の調製

大腸菌JN109(pCC1)におけるLys 87の発現の誘導は、500mlの細菌培養物中で数時間、前記のプロトコールに従って行った。細菌はフレンチプレスにおいて100001b/in²の圧力で溶解した。次に、細胞溶解物は4℃で30分間インキュベートし、続いて4℃、4000×gで10分間遠心分離した。遠心分離後、上清は保持し、Lys 87を精製するのに使用した。試料は、SDS-PAGE及びウェスタンプロットによっても解析した。

20

【0125】

大腸菌BL21(DE3)pLysE(pCC2)は、前記のプロトコールに従って調製した。細菌は、OD(600nm)が0.6になるまで増殖させた。次に、溶解素の発現は、0.5mM IPTGの添加により誘導し、続いて25℃で攪拌しながら一晩インキュベートした。インキュベーション後、液体培養物を4℃、11000rpmで40分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットは、1:1000の希釈率のプロテアーゼ阻害剤Cocktail Set Iを含むBugBuster Master mix 5mlに再懸濁した。細胞は製造元の説明書に従って溶解した。次に、試料は4℃、14000×gで10分間遠心分離した。遠心分離後、上清を取り除き、ペレットを5mlのPBS 1×に再懸濁した。次に、試料は4℃、14000×gで10分間再び遠心分離した。Lys 87を含有する封入体を含有するペレットは4℃で保存した。試料を解析し、Lys 87はSDS-PAGE及びウェスタンプロットにより精製した。

30

【0126】

Ni-NTAカラムを使用するLys 87の精製

Lys 87は、Ni-NTAカラム(Qiagen社製)を使用して精製した。Ni-NTA樹脂は、カラムへの添加に先立って4℃で保存した。次に、カラムは、蠕動ポンプを中速で使用して50mlの洗浄緩衝液(1Lの蒸留水中50mM Na₂HPO₄、300mM NaCl、20mMイミダゾール、pH 8.0)を用いて洗浄した。次に、前記のプロトコールに従って調製した細胞抽出物を、低速に設定された蠕動ポンプを用いて載せた。次に、カラムは50mlの洗浄緩衝液を用いて洗浄して、非特異的タンパク質及び他の不純物質を除去した。次に、タンパク質を、溶出緩衝液(1Lの蒸留水中50mM Na₂HPO₄、300mM NaCl、250mMイミダゾール、pH 8.0)を使用してカラムから溶出させ、1.5ml画分に収集した。画分はすべてSDS-PAGEにより解析した。

40

【0127】

Ni-NTAクロマトグラフィーにより精製されるLys 87試料の透析

50

CELLU.Sep H1 High Grade Regenerated Cellulose Tubular Membraneは、製造元の説明書に従って調製した。試料は、4で穏やかに攪拌しながら一晩pH7.5の50mM Tris-HCl 1000容積に対して透析した。全インキュベーション時間が24時間に達するまで前記手順を繰り返した。透析後、溶解素は膜内部から取り出し4で保存した。試料はSDS-PAGE及びウェスタンプロットにより解析し、タンパク質の量はブラッドフォードアッセイを使用して定量した。

【0128】

封入体からのLys87の精製

Lys87を含有する封入体は、10mlのTriton X-100洗浄緩衝液(100mlの蒸留水中0.5% Triton X-100、50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaCl、0.1% アジ化ナトリウム)中に再懸濁した。次に、試料は4、15000rpmで10分間遠心分離した。上清を取り除き、洗浄ステップは7回繰り返した。最終洗浄では、試料は50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaClの溶液中に入れ、4、15000rpmで10分間遠心分離した。試料はSDS-PAGE及びウェスタンプロットにより解析した。

【0129】

尿素を用いたLys87の変性

Lys87を含有する封入体は、50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaCl、8M尿素及び100mlの蒸留水の溶液中に溶解し、4で攪拌しながら一晩インキュベートした。次の日、試料は4、15000rpmで30分間遠心分離した。変性Lys87を含有する上清は保持し、タンパク質の量を、280nmでの試料の吸光度を調べることにより測定した。上清の試料とペレットは両方ともSDS-PAGE及びウェスタンプロットにより解析した。

【0130】

Lys87のリフォールディング

変性Lys87試料は、150mlのリフォールディング緩衝液(200mlの水中100mM Tris-HCl pH7.0、10ml EDTA pH8.0、5%グリセロール、1mM DTT、100mM NaCl、0.005% Tween-20)に試料を入れることによりリフォールディングさせた。変性Lys87を、ほぼ30分の時間をかけて一滴ずつリフォールディング緩衝液に添加した。次に、溶液は4で16~24時間インキュベートした。次に、溶液は4、15000rpmでほぼ30分間遠心分離した。上清は保持し4で保存した。次に上清はSDS-PAGE及びウェスタンプロットにより解析した。Lys87の量は、280nmでの試料の吸光度を測定することにより決定した。

【0131】

FPLCを使用するLys87の精製

pCC2から発現されるLys87は、AKTA FPLCクロマトグラフィーシステム(Amersham Biosciences社製)を使用して封入体から精製した。精製に先立って、試料は前記のプロトコールに従って変性した。融合Lys87-His6タンパク質を精製するために、His-trap(GE Healthcare社製)をAKTA FPLCに接続して使用した。全試料の精製は、280nmでの溶出液の吸光度を測定することによりモニターした。

【0132】

最初に、精製カラムは10mlの緩衝液A(50mM Na₃PO₄ 12H₂O、1M NaCl、8M 尿素、20mMイミダゾール)を用いて平衡化した。次に、変性Lys87の試料をカラムに載せた。次に、カラムは60mMイミダゾールを含有する緩衝液Aを用いて洗浄し、カラム上に保持されている不純物質を除去した。次に、溶解素は、10ml増加分中60~500mMの直線勾配を使用してカラムから溶出させ、1.2mlずつ7画分を収集した。所望のタンパク質を含有する画分をSDS-PAGE及びウェスタンプロットを用いて解析した。

【0133】

Lys87の濃縮

10

20

30

40

50

所望のタンパク質は、Amicon Centrifugal Filter Device (Millipore社製、U.S.A.) 上で製造元の説明書に従って濃縮した。Amicon Centrifugal Filter Deviceは、タンパク質試料の緩衝液の交換にも使用された。この方式では、pH 7.0 の 100 mM Tris-HCl 緩衝液 12 mL を Lys 87 の試料とともに添加した。次に、カラムは 4 、 5000 rpm で 30 分間遠心分離した。Lys 87 の濃縮試料は、精製されたタンパク質の完全性を確認するために SDS-PAGE 及びウェスタンプロットにより解析した。Lys 87 の濃度は、280 nm での吸光度を測定する ND-1000 Spectrophotometer を使用し及びプラッドフォードアッセイを使用して決定した。

【0134】

Lys 87 の最小阻害濃度の決定

表 I の分離株 77 を使用して、黄色ブドウ球菌における Lys 87 の最小阻害濃度 (minimum inhibitory concentration、MIC) を決定した。分離株 77 の単離されたコロニーは 5 mL の BHI 培地に播種され、37 、 135 rpm で攪拌しながら一晩インキュベートに使用された。連続希釈を使用して、細胞の平均数がほぼ $10^3 \sim 10^4$ の間であることを特定した。 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲の様々な濃度の Lys 87 を、蓋付きの 96 丸底ウェル (Sarstedt 社製、U.S.A.) に蒔いた。各ウェルに、 $100 \mu\text{l}$ の細菌細胞培養物を添加した。試料緩衝液のみを含む試料及び細菌培養物のみを含む別の試料を陰性対照として使用した。試料は 37 で一晩インキュベートした。次の日、対照を含む、 $15 \mu\text{l}$ の各試料を BHI 培地プレート上にスポットした。プレートは 37 で一晩インキュベートした。

【0135】

液体培地中の Lys 87 の溶菌活性の評価

液体培地中の Lys 87 の溶菌活性の評価は、Fischetti, 2003, Ann. NY Acad. Sci. 987:207-214; Loessner et al., 1998, FEMS Microbiol. Lett. 162:265-274; Loeffler et al., 2001, Science 294:2170-2172 and Takae et al., 2005, Microbiology 151:233 1-2342 (前記文献はそれぞれ、参照によりその全体を本明細書に組み込まれている) に記載されているプロトコールに従って実施した。黄色ブドウ球菌分離株 77 を使用して、5 mL の BHI 培地に播種した。培養物は 37 、 135 rpm で攪拌しながら一晩増殖させた。次の日、前播種物を使用して、OD₆₀₀ が 0.8 と 1 の間の液体培養物を調製した。OD の減少は、決定された量の溶解素を添加した後に測定した。 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の AKTA FPLC を使用して精製された Lys 87 の濃度が試験された。陰性対照は、溶解素を含有する緩衝液の代わりに pH 7.0 の 100 mM Tris-HCl を等容量受けた。溶解素又は対照は、OD₆₀₀ が 0.8 と 1 間の液体培養物試料 1 mL に添加された。試料は 37 で穏やかに攪拌しながらインキュベートし、600 nm での OD は 2 時間後に測定した。

【実施例 1】

【0136】

バクテリオファージ F 87 s / 06 の単離及び特徴付け

バクテリオファージ F 87 s / 06 は二本鎖 DNA ウィルスである。前記ウィルスのゲノムは以前単離され特徴付けられたことはなかった。ゲノム DNA は、黄色ブドウ球菌 (表 I の分離株番号 77) の臨床分離株から得られたファージ F 87 s / 06 のストックから単離された。ファージ F 87 s / 06 のゲノム DNA は、実験法の項に記載されているプロトコールに従って単離され、クローニングされ、塩基配列決定された。バクテリオファージゲノムの塩基配列決定により、ゲノム内の有望なオープンリーディングフレーム (ORF) の同定が可能になった。バクテリオファージの推定 ORF は、その相当するアミノ酸配列に翻訳され、前記アミノ酸配列を使用して、プログラム FASTA 3 を使用して UniProt Knowledgebase を検索した。他のバクテリオファージ由来の他の既知の溶解素タンパク質とのアラインメントにより、ファージ F 87 s / 06 溶解素タンパク質 (Lys 87) (配列番号 2) 及びその対応する遺伝子配列 (配列番号 1) を同定することができた。アミノ酸配列の解析により、CHAP ドメインの存在が明らかになった。このドメイ

10

20

30

40

50

ンは多数のタンパク質配列中に存在し、一般に S H 3 タイプの細菌ドメインに関連している。C H A P ドメインは、ペプチドグリカンに対するエンドペプチダーゼ及びアミダーゼ活性を有することが実験的に明らかにされているエンドリシンと関連していることも分かっている。図 1 は、L y s 8 7 の N 末端領域とファージ P 6 8 、T w o r t 及び 1 1 の既知の溶解素とのアラインメントを示している。前記アラインメントは、L y s 8 7 がエンドペプチダーゼ活性と関連していることが知られているいくつかの保存された残基を共有することを示している。

【実施例 2】

【0 1 3 7】

L y s 8 7 のクローニング及び発現

10

発現された溶解素の精製を可能にするために、ヒスチジンテイルを利用する原核生物発現系に基づく 2 つの異なる戦略を使用した。図 2 は、使用した 2 つの発現ベクターのベクター地図を示している。第 1 戦略では、L y s 8 7 をコードする c D N A 配列を、発現ベクター p Q E - 3 0 (pCC1) にライゲーションした。図 3 に示されるように、この発現ベクターを用いて得られた結果は非常に低く、溶解素それ自体が不溶性であった。N i - N T A システムを使用する L y s 8 7 H i s 6 の精製により得られる結果は満足のいくものではなかった(図 4)。最後に、精製された L y s 8 7 の試料は、黄色ブドウ球菌の株ではまったく溶菌活性を示さなかった。

【0 1 3 8】

前の戦略は効果的ではなかったため、発現ベクター及び精製戦略を変更した。使用した新しい発現ベクターは、L y s 8 7 の C 末端ドメインへの 6 ヒスチジンのテイル融合体をコードする配列を有する p E T - 2 9 (a) (pCC2) であった。このベクターは、所望のタンパク質の直接発現のための T 7 プロモーターも利用する。pCC2 の使用により、pCC1 に比べて L y s 8 7 の発現が増加した(図 5)。溶解素発現量は著しく改善されたが、以前の戦略の場合と同じように、溶解素は不溶性凝集体又は封入体の形態で発現された。封入体を可溶化し所望の精製されたタンパク質を回収しようと試みて、封入体を連続洗浄により可溶化し、続いて尿素中で溶解素を変性し、続いてタンパク質を再生し濃縮した。図 6 に観察できるように、封入体の連続洗浄は、望まれないタンパク質の一部を取り除いたが、望まれないタンパク質を完全に取り除くことはなかった。

20

【0 1 3 9】

30

最初の精製及び可溶化工程後に得られる L y s 8 7 の純度を改善するために、L y s 8 7 を AKTA FPLC クロマトグラフィーシステムを使用してさらに精製した。精製工程中に溶出する試料は、望まれないタンパク質の数の減少及び溶解素の量の増加を示していた(図 7 a 及び 7 b)。

【実施例 3】

【0 1 4 0】

L y s 8 7 の溶菌活性の解析

封入体から単離された不純な L y s 8 7 と AKTA FPLC システムを使用して精製された L y s 8 7 の両方を、グラム陽性菌のいくつかの臨床分離株において溶菌活性について試験した。前記アッセイは、実験法の項に記載されているプロトコールに従って実施した。表 II は、封入体から単離された L y s 8 7 が、連鎖球菌種を除いて試験されたグラム陽性菌のすべてにおいて増殖を阻害したことを示している。予想通りに、溶解素はグラム陰性菌の大腸菌に対しては溶菌活性を示さなかった。表 III は、AKTA FPLC システムを使用して単離された精製された L y s 8 7 が、表 II の分離株のサブセットを使用して封入体から単離される不純な L y s 8 7 と同じ範囲の溶菌活性を有することを立証している。

40

【0 1 4 1】

【表2】

表II-封入体から単離されたLys87の溶菌作用

[表2]

[表]

番号D	種D	溶菌活性D
1	黄色ブドウ球菌D	+++
2	黄色ブドウ球菌D	+
3	黄色ブドウ球菌D	+++
4	黄色ブドウ球菌D	++
5	黄色ブドウ球菌D	+
6	黄色ブドウ球菌D	+++
7	黄色ブドウ球菌D	++
8	黄色ブドウ球菌D	+
9	黄色ブドウ球菌D	++
10	黄色ブドウ球菌D	++
11	黄色ブドウ球菌D	++
12	黄色ブドウ球菌D	+
13	黄色ブドウ球菌D	+++
14	黄色ブドウ球菌D	++
15	黄色ブドウ球菌D	+++
16	黄色ブドウ球菌D	++
17	黄色ブドウ球菌D	+
18	黄色ブドウ球菌D	++
19	黄色ブドウ球菌D	++++D
20	黄色ブドウ球菌D	++
21	黄色ブドウ球菌D	+++
22	黄色ブドウ球菌D	+
23	黄色ブドウ球菌D	+++
24	黄色ブドウ球菌D	+++
25	黄色ブドウ球菌D	+++
26	黄色ブドウ球菌D	+
27	黄色ブドウ球菌D	++
28	黄色ブドウ球菌D	+
29	黄色ブドウ球菌D	++
30	黄色ブドウ球菌D	+
31	黄色ブドウ球菌D	+++
32	黄色ブドウ球菌D	++
33	黄色ブドウ球菌D	++
34	黄色ブドウ球菌D	++
35	黄色ブドウ球菌D	++
36	黄色ブドウ球菌D	+++
37	黄色ブドウ球菌D	+++

10

20

30

40

38	黄色ブドウ球菌D	+
39	黄色ブドウ球菌D	+
40	黄色ブドウ球菌D	+++
41	黄色ブドウ球菌D	+
42	黄色ブドウ球菌D	++
43	黄色ブドウ球菌D	++
44	黄色ブドウ球菌D	++
45	黄色ブドウ球菌D	++
46	黄色ブドウ球菌D	+++
47	黄色ブドウ球菌D	++
48	黄色ブドウ球菌D	+++
49	黄色ブドウ球菌D	++
50	黄色ブドウ球菌D	+++
51	黄色ブドウ球菌D	+
52	黄色ブドウ球菌D	++
53	黄色ブドウ球菌D	+
54	黄色ブドウ球菌D	++
55	黄色ブドウ球菌D	++
56	黄色ブドウ球菌D	++
57	黄色ブドウ球菌D	+
58	黄色ブドウ球菌D	+
59	黄色ブドウ球菌D	++
60	黄色ブドウ球菌D	+
61	黄色ブドウ球菌D	+
62	黄色ブドウ球菌D	+++
63	黄色ブドウ球菌D	++
64	黄色ブドウ球菌D	+++
65	黄色ブドウ球菌D	++
66	黄色ブドウ球菌D	+++
67	黄色ブドウ球菌D	++
68	黄色ブドウ球菌D	++
69	黄色ブドウ球菌D	+++
70	黄色ブドウ球菌D	+
71	黄色ブドウ球菌D	+++
72	黄色ブドウ球菌D	+
73	黄色ブドウ球菌D	++
74	黄色ブドウ球菌D	++
75	黄色ブドウ球菌D	+++
76	黄色ブドウ球菌D	+++
77	黄色ブドウ球菌D	+++
78	黄色ブドウ球菌D	++
79	表皮ブドウ球菌D	+
80	表皮ブドウ球菌D	+
81	表皮ブドウ球菌D	+
82	表皮ブドウ球菌D	+
83	表皮ブドウ球菌D	++

10

20

30

40

84	表皮ブドウ球菌D	++
85	スタフィロコッカス・アウリクラーリスD	++
86	スタフィロコッカス・キャピティスD	+
87	スタフィロコッカス・キャピティスD	+
88	スタフィロコッカス・キャピティスD	+
89	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	+
90	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	+
91	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	+
92	スタフィロコッカス・ホミニスD	+++
93	スタフィロコッカス・ホミニスD	+++
94	スタフィロコッカス・サプロフィチカスD	++
95	スタフィロコッカス・サプロフィチカスD	++
96	スタフィロコッカス・サプロフィチカスD	++
97	スタフィロコッカス・シミュランスD	++
98	スタフィロコッカス・キシロシスD	++
99	ミクロコッカス・ルテウスD	+++
100	枯草菌D	++
101	バチルス・プミルスD	++
102	大腸菌D	-
103	エンテロコッカス・フェカリスD	+
104	エンテロコッカス菌種	+
105	エンテロコッカス・ヒラエD	+
106	エンテロコッカス・フェシウムD	+
107	エンテロコッカス・アビウムD	+
108	肺炎連鎖球菌D	-
109	ストレプトコッカスA D	-
110	ストレプトコッカスB D	-

(++) =強度の溶菌活性、(++) =中程度の溶菌活性、(+) =軽度の溶菌活性、(-) =溶菌活性なし

【表3】

表III-FPLC精製されたLys87の溶菌活性

[表3]

[表]

番号D	種D	溶菌活性D
75	黄色ブドウ球菌D	++
76	黄色ブドウ球菌D	+++
77	黄色ブドウ球菌D	+++
78	黄色ブドウ球菌D	++
83	表皮ブドウ球菌D	+
85	スタフィロコッカス・アウリクラーリスD	++
88	スタフィロコッカス・キャピティスD	+
91	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	++
92	スタフィロコッカス・ホミニスD	+++
94	スタフィロコッカス・サプロフィチカスD	++
97	スタフィロコッカス・シミュランスD	++
98	スタフィロコッカス・キシリシスD	++
99	ミクロコッカス・ルテウスD	+++
100	枯草菌D	++
101	バチルス・プミルスD	+++D
102	大腸菌D	-
103	エンテロコッカス・フェカリスD	++
104	エンテロコッカス菌種	+
105	エンテロコッカス・ヒラエD	+++D
106	エンテロコッカス・フェシウムD	+
107	エンテロコッカス・アビウムD	+D
108	肺炎連鎖球菌D	-
109	ストレプトコッカスA D	-
110	ストレプトコッカスB D	-D

(++) =強度の溶菌活性、(++) =中程度の溶菌活性、(+) =軽度の溶菌活性、(-) =溶菌活性なし

10

20

30

【実施例4】

【0143】

黄色ブドウ球菌に対するLys87のMICの決定

分離株77を使用して、黄色ブドウ球菌におけるLys87の最小阻害濃度(MIC)を決定した。前記アッセイは実験法の項に記載されているプロトコールに従って実施した。黄色ブドウ球菌に対するLys87のMICは、30mg/mlであると決定した。

【実施例5】

【0144】

液体培養におけるLys87の溶菌活性

液体培地中のLys87の溶菌活性の評価は、上記方法に従って実施した。精製されたLys87の50mg/mlの濃度は、液体培養における黄色ブドウ球菌の増殖を阻害するのに十分であることが分かった。結果は表IVに示されている。

【0145】

40

【表4】

表IV

[表4]

[表]

時間 (分)	黄色ブドウ球菌 +Lys87 (OD600)	黄色ブドウ球菌+試料 緩衝液 (OD600)	黄色ブドウ球菌 (OD600)
0	0.967	0.932	1.190
5	0.965	0.960	1.205
10	0.970	0.983	1.220
15	0.970	0.995	1.240
20	0.963	1.026	1.280
25	0.950	1.080	1.330
30	0.930	1.116	1.378
35	0.910	1.163	1.412
40	0.910	1.202	1.450
45	0.897	1.240	1.472
50	0.896	1.271	1.486
55	0.879	1.307	1.515
60	0.845	1.338	1.536
70	0.869	1.373	1.572
80	0.851	1.394	1.600
100	0.816	1.417	1.618
120	0.809	1.479	1.620

10

20

30

【実施例6】

【0146】

キメラ遺伝子の構築

lys87の細胞壁結合ドメイン (cell wall binding domain、CWB D) コード配列と融合されたlys170又はlys168のCDドメインのコード配列を担うキメラエンドリシン遺伝子lys170-87及びlys168-87をそれぞれ構築した。Overlap-Extension by polymerase Chain Reaction (O E - P C R) の技法が使用された。例えば、Ho, S.N., Hunt, H. D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989) . Site-Directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene. 77: 51-59を参照されたい。図9及び10は、キメラ遺伝子のヌクレオチド配列及びこうして得られた産物の一次配列の詳細を描いている。具体的には、図9 a 及び 9 b は、キメラ構築物溶解素170-87の核酸配列 (配列番号3) 及びそのコードされたアミノ酸配列 (配列番号4) をそれぞれ示している。遺伝子lys170由来の配列は太字であり、遺伝子lys87由来の配列は標準文字であり、ベクター生まれの配列は斜

40

50

字体である。同様に、図10a及び10bは、キメラ構築物溶解素168-87の核酸配列（配列番号5）及びそのコードされたアミノ酸配列（配列番号6）をそれぞれ示している。遺伝子lys168由来の配列は太字であり、遺伝子lys87由来の配列は標準文字であり、ベクター生まれの配列は斜字体である。

【実施例7】

【0147】

Lys170-87及びLys168-87の発現及び精製

キメラ遺伝子lys170-87及びlys168-87は、誘導性プロモーターP_{T7}の制御下の発現ベクターpIVEX2.3d (Roche Applied Science社製)にクローニングし、それぞれ組換えプラスミドpSF170-87及びpSF168-87を生じた。これらの構築物から產生されるキメラエンドリシンは、ベクターにコードされた11アミノ酸残基(PGGGSHHHHHH)のC末端伸長を示し、この残基は酵素の免疫検出及び親和性精製のために用いられるヘキサヒスチジンテイルとリンカー領域を構成する（図9及び10）。

【0148】

これらのコンストラクトを使用して、発現株CG61を形質転換した (Sao-Jose, C., Parreira, R., Vieira, G. and Santos, M.A. (2000))。オエノコッカス・オエニ (Oenococcus oeni) バクテリオファージfOg44溶解素のN末端領域は、大腸菌における本物のシグナルペプチドとして、及びオエノコッカス細胞上での溶菌活性を妨げるシス阻害エレメントとして振る舞い (J. Bacteriol. 182: 5823-5831)、この細胞はプラスミドpGP1-2を担っておりそれが熱誘導によりT7RNAポリメラーゼの供給源を提供する。こうして得られた株 (SF170-87及びSF168-87) は、600nmでの培養物光学密度(OD₆₀₀)が0.8~1.0に到達するまで100μg/mlのアンピシリン及び30μg/mlカナマイシンを補充したLB培地で増殖させた。この時点で、培養物は熱誘導され（攪拌しながら42度30分間）、次に16度で14時間インキュベートに供された。

【0149】

細胞は遠心分離により回収し、1/50容積の溶解素緩衝液A (20mM Hepes pH 6.5、500mM NaCl、1%グリセロール、1mM DTT及び20mMイミダゾール)に再懸濁した。細胞は超音波処理により破壊され、可溶性画分は、FPLCシステム (AKTA、GE Healthcare社製)に連結させたHiTrap (商標) HP (GE Healthcare社製)への適用前に0.22μmのフィルターでろ過した。カラムは、先ず10~15カラム容積の溶解素緩衝液Aを用いて洗浄し、次に同容積の溶解素緩衝液B (イミダゾールが50mMの濃度であること以外、緩衝液Aと同一組成)を用いて洗浄した。カラムに結合したタンパク質は再び、イミダゾールが500mMの濃度であること以外、緩衝液Aと同一組成を有する溶出緩衝液を用いて1ステップで溶出させた。純粋な酵素を含有する画分を貯め、濃縮し、HiTrap (商標) 脱塩カラム (GE Healthcare社製)を使用して酵素貯蔵緩衝液 (50mM Pho-Na pH 6.5、500mM NaCl、25%グリセロール、1mM DTT)に変えた。純粋なキメラエンドリシンの調製物は使用するまで-20度維持された。

【0150】

上記の方法論により、可溶性形態での大量のキメラ酵素の產生が可能になった。精製プロトコール後、高度に純粋な状態で高収率の酵素が得られた（図11a及び11b）。

【実施例8】

【0151】

Lys170-87及びLys168-87溶菌活性の解析

キメラエンドリシンの溶菌活性を調べるために、5μl容積での純粋な酵素の異なる量 (10、5、1及び0.2μg)を、生存可能な標的細菌を含有する軟寒天培地表面にスポットした（全部で123株を試験した）。異なる標的細菌を、適切な培地でOD₆₀₀=0.8~1.0まで増殖させ、新しい培地で100倍に濃縮した。この細胞懸濁液の100マイクロリットルを10mlの軟寒天培地 (25mM リン酸ナトリウム緩衝液pH 50

6 . 5 、 2 5 0 m M N a C l 、 0 . 7 % 寒天) に取り込み、ペトリ皿に流した。この手順であれば、標的細菌の均質で高密度な菌叢が保証された。様々な酵素量を用いて得られる相対的溶菌活性は、37 での一晩のインキュベーション後、溶解ハローの寸法及び透明度を記載することにより定性的に評価した。

【 0 1 5 2 】

試験された細菌株は、101株の黄色ブドウ球菌（そのうちの39%がM R S Aであった）、5株の表皮ブドウ球菌、3株のS . ヘモリチカス、3株のS . サブロフィチカス、4株のエンテロコッカス種、1株のミクロコッカス・ルテウス、2株の化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、1株の枯草菌、1株のバチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) 及び2株の大腸菌であった。これらの細菌株は、ミクロコッカス及びバチルス株 (ATCC株) を除いて、異なったポルトガルの病院及び臨床環境において臨床試料（血液、尿、皮膚病変及び医療機器を含む）から2005～2009年中に単離された。
10

【 0 1 5 3 】

黄色ブドウ球菌株 566 / 07 に対する L y s 1 7 0 - 8 7 及び L y s 1 6 8 - 8 7 の溶菌活性も液体培地 (25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6 . 5 、 250 mM N a C l) において評価された。黄色ブドウ球菌株 566 / 07 の培養物は、対数増殖期 (O D₆₀₀ = 0 . 3 ~ 0 . 4) まで増殖させ、遠心分離により回収し、液体培地で2倍に濃縮した。次に、各精製された酵素の 10 マイクログラム (5 μl 容積中) を 1 ml のこの細胞懸濁液に添加し、細胞溶解はエンドリシン添加後の異なる時点での O D₆₀₀ 値を記録することによりモニターした。5 μl の酵素貯蔵緩衝液を添加された 1 ミリリットルの細胞懸濁液は陰性対照の働きをした。
20

【 0 1 5 4 】

軟寒天培地に取り込まれた生存可能な細菌を溶解するキメラ酵素の能力は上記の通りに評価した。手短に言えば、異なった量の酵素を生存可能な標的細菌（試験された 123 細菌株）の高密度の菌叢上にスポットし、溶菌活性を 37 での一晩のインキュベーション後の溶解ハローの外見によりモニターした。図 12 は、得られた結果の数例を示している。
。

【 0 1 5 5 】

前記結果は、キメラ溶解素が、予想通りにグラム陰性菌種の大腸菌を除いて、試験された細菌種すべての株を溶解することができる事を示していた（表V及びVI）。表Vは、123の細菌株における L y s 1 6 8 0 - 8 7 及び L y s 1 7 0 - 8 7 の相対的活性を示している。
30

【 0 1 5 6 】

【表5】

表V

[表5]

[表]

株ID	細菌種	溶菌活性 ^{a)}	D	D	D	D	D	D	D
D	D	Lys168-87D	D	D	D	Lys17-0-87	D	D	D
D	溶解素量(μg) D	10	5	1	0.2	10	5	1	0.2
919/05 D	黄色ブドウ球 菌D	+++	++	+	+/-	++	+	+	+/-
964/05 D	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	+	+	+++	++	+	+/-
1011/0 5	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+++	++	+	+/-	++	+	+	+/-
1013/0 5	黄色ブドウ球 菌D	+++	++	+	+/-	+	+	+/-	+/-
1018/0 5	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+++	+++	++	+	+++	++	++	+
1133/0 5	黄色ブドウ球 菌D	++	+	-	-	+	+/-	-	-
1152/0 5	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	-	-	++	+	-	-
1154/0 5	黄色ブドウ球 菌D	++	+	-	-	+	+/-	-	-
1275/0 5	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+++	+	+	-	++	+	-	-
1319/0 5	黄色ブドウ球 菌D	++	+/-	-	-	+/-	-	-	-
1390/0 5	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	++	+	++	+	+/-	-
1463/0 5	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	++	+	+/-	-	++	+	+/-	-
1538/0 5	黄色ブドウ球 菌D	+++	+	+/-	-	++	+	-	-
1623/0 5	黄色ブドウ球 菌D	++	+	-	-	+	-	-	-
1627/0 5	黄色ブドウ球 菌D	++	+	-	-	+	-	-	-
1641/0 5	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	++	+	-	-	+	-	-	-
1644/0 5	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-
1745/0 5	黄色ブドウ球 菌D	++	-	-	-	+	-	-	-
1862/0	黄色ブドウ球	+++	++	+/-	-	++	+/-	-	-

10

20

30

40

5	菌D (MRSA)								
1872/05	黄色ブドウ球菌D	+++	++	+/-	-	-	-	-	-
1976/05	黄色ブドウ球菌D	++	+	-	-	+/-	-	-	-
2121/05	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	-	-	-	-	+/-	-	-	-
124/06 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	++	+	-	+	+	+/-	-
351/06 D	黄色ブドウ球菌D	+++	++	+	-	+	+/-	-	-
399/06 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	+/-	+/-	+	+/-	-	-
400/06 D	黄色ブドウ球菌D	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
623/06 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+	-	-	-	+/-	-	-	-
644/06 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	+	+/-	+	+	+/-	+/-
746/06 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	++	++	+/-	+	+/-	-	-
748/06 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+	+	+/-	-	+	+	-	-
815/06 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	+	+/-	++	+	+	+
920/06 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	+	+	+	+/-	-
1035/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	++	+	++	++	+	+
1037/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	++	+	+	+++	++	+	+/-
1038/06	黄色ブドウ球菌D	+++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
1039/06	黄色ブドウ球菌D	+++	++	++	+	++	+	+/-	-
1076/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	++	++	++	++	+	+/-
1077/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	++	++	+	+	+	+/-	-
1102/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	++	+	+/-	++	+	+/-	-
1149/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	++	+	++	+	+/-	-
1156/06	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	+	+	+/-	-	-
1157/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	+++	+/-	++	++	++	+/-
1159/06	黄色ブドウ球菌D	++	++	+	+	+	+	+/-	+/-
1201/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	++	++	+/-	+	+	+/-	-

10

20

30

40

1203/06	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	+/-	+	+/-	-	-
1204/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	++	++	+/-	-	-	-	-	-
1209/06	黄色ブドウ球菌D	+++	++	+	-	+	+/-	-	-
84/07	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	++	+	++	++	+	+/-
161/07 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	++	+	+	+	+/-	-
86/07D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
163/07 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	++	+	+	+	+	-	-
166/07 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+	+	+/-	-	+	+	-	-
196/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	+	+	+	+	+
214/07 D	黄色ブドウ球菌D	++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
224/07 D	黄色ブドウ球菌D	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
400/07 D	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	++	+	+	+	+/-	-
463/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	++	+	+/-	+	+	+/-	-
464/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	++	+	-	+	+	+/-	-
545/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	+	++	+	+	+
547/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	+/-	++	++	+	-
565/07 D	黄色ブドウ球菌D	++	++	+/-	-	+	+/-	-	-
566/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	+++	+	+++	++	+	+/-
567/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	+	+	+	+	+/-
662/07 D	黄色ブドウ球菌D	++	++	+	+/-	+	+/-	+/-	-
171/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
223/07 D	黄色ブドウ球菌D	++	++	+	+/-	+/-	-	-	-
546/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	++	+	+/-	+	+	+	+/-
578/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	-	+	+	+	-
586/07 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	+	+++	++	++	+
594/07	黄色ブドウ球	-	-	-	-	-	-	-	-

10

20

30

40

D	菌D								
663/07 D	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	++	-	++	++	+	-
322/07 D	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-
325/07 D	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	++	+/-	++	++	+	+/-
743/06 D	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	++	+	+	+	+	+/-
162/07 D	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+++	+++	++	+	+	+	+	+
465/07 D	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+++	++	+	-	++	++	+	-
466/07 D	黄色ブドウ球 菌D	+++	++	+	+/-	++	+	+	-
590/07 D	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+++	+++	++	+/-	++	++	+	+/-
53/08	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	++	+/-	++	++	+	+
55/08	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	++	+/-	+	+	+/-	+/-
56/08	黄色ブドウ球 菌D	++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
97/08	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+++	+++	++	-	++	+	+	+/-
129/08 D	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	+++	++	+	+	+	+
130/08 D	黄色ブドウ球 菌D	++	++	+/-	-	+	+	+	+/-
1020/0 5	黄色ブドウ球 菌D	+++	++	+	+	+++	++	+	+
941/05 D	黄色ブドウ球 菌D	++	+	+/-	-	+/-	-	-	-
965/05 D	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+++	++	+	-	+/-	-	-	-
1094/0 5	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	++	++	++	++	+	-
2013/0 5	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	+++	+	+/-	-	+	-	-	-
793/06 D	黄色ブドウ球 菌D	++	++	+	+/-	+/-	-	-	-
862/06 D	黄色ブドウ球 菌D (MRSA)	-	-	-	-	-	-	-	-
455/05 D	黄色ブドウ球 菌D	-	-	-	-	-	-	-	-
755/05 D	黄色ブドウ球 菌D	+++	+++	++	+	++	+	+/-	-
1389/0 5	黄色ブドウ球 菌D	+++	++	+	-	++	-	-	-
1649/0 5	黄色ブドウ球 菌D	+++	++	+	+/-	++	+	+/-	-

10

20

30

40

2030/05	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	++	+	-	-	+/-	-	-	-
2144/05	黄色ブドウ球菌D	+++	++	+	+/-	+	+/-	-	-
541/06 D	黄色ブドウ球菌D	+++	+++	++	+/-	+/-	-	-	-
1007/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	++	+	+/-	-	+	+/-	-	-
1211/06	黄色ブドウ球菌D (MRSA)	+++	+++	+++	++	+	+	+	+/-
1736/05	表皮ブドウ球菌D	++	+	-	-	+	+/-	-	-
107/08 D	表皮ブドウ球菌D	+++	++	+	+/-	-	-	-	-
114/08 D	表皮ブドウ球菌D	++	++	+	-	+/-	-	-	-
546/06 D	表皮ブドウ球菌D	+++	++	+	+/-	++	++	+/-	-
158/08 D	表皮ブドウ球菌D	+++	+++	++	+	+	+	-	-
1930/05	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	++	++	+	+	++	+	+	+
05/06	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	+++	++	++	+	+	+	+	+/-
06/06	スタフィロコッカス・ヘモリチカスD	+++	++	+	+	++	++	+	+
1908/05	スタフィロコッカス・サブロフィチカスD	-	-	-	-	-	-	-	-
1909/05	スタフィロコッカス・サブロフィチカスD	++	++	+	+	+	++	+	-
110/08 D	スタフィロコッカス・サブロフィチカスD	++	++	+	+	++	++	+	+
1518/05b)	エンテロコッカス菌種D	+/-	+/-	-	-	++	+	+/-	-
926/05 c)	エンテロコッカス菌種D	++	++	+	+/-	+++	+++	++	+
46/06	エンテロコッカス・フェカリスD	++	++	+	+/-	+++	+++	++	+
188/06 D	エンテロコッカス・フェシウムD	+/-	-	-	-	++	+	+/-	-
12/08	化膿性連鎖球	+	+	+/-	-	++	++	+	-

10

20

30

40

	菌D								
13/08	化膿性連鎖球菌D	++	+	-	-	+	+/-	-	-
575/07 D	ミクロコッカス・ルテウスD	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+/-
01/09	バチルス・リケニフォルミスD	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	++
02/09	枯草菌D	+++	++	++	+	+	+	++	+
35/08	大腸菌D	-	-	-	-	-	-	-	-
44/08	大腸菌D	-	-	-	-	-	-	-	-

【0157】

表Vでは、「溶菌活性^{a)}」は、キメラ酵素の溶菌作用に対する各株の感受性を示しており、この感受性は、濁り／小(+/-)から澄んだ／大(++)溶解ハローまでの範囲の相対的尺度に基づいて評価し、溶菌作用に対する耐性は(-)として示されている。1518/05^{b)}は、ファージF168/08の宿主株を表し、926/05^{c)}は、ファージ170/08の宿主株を表している。特に、試験された40のM R S A株のうち、1つ(862/06)だけが両酵素に対して耐性を示した(表V)。興味深いことに、上記の通りに両酵素の活性を黄色ブドウ球菌株566/07に対して液体培地で試験した場合、Lys170-87はLys168-87と比べるとより高い溶菌効率を示しており(図13)、軟寒天培地で得られた結果と対照的であった(表V)。

【0158】

下の表VIは、Lys168-87とLys170-87の溶菌活性を比較している。

【0159】

【表6】

[表6]

[表]

細菌種(株番号) a)	溶菌活性(%)	D	D	D	D	D	D	D	D
D	Lys168-87(μg)	D	D	D	Lys170-87(μg) D	D	D	D	D
D	10	5	1	0.2	10	5	1	0.2	
黄色ブドウ球菌(101)	96	94	85	59	94	78	44	30	
表皮ブドウ球菌(5)	100	100	80	60	80	60	20	0	
スタフィロコッカス・ヘモリチカス(3)	100	100	100	100	100	100	100	100	
スタフィロコッカス・サプロフィチカス(3)	67	67	67	67	67	67	67	33	
エンテロコッカス菌種(4)	100	75	50	50	100	100	100	50	
ミクロコッカス・ルテウス(1)	100	100	100	100	100	100	100	100	
化膿性連鎖球菌(2)	100	100	50	0	100	100	50	0	
バチルス菌種(2)	100	100	100	50	100	100	100	100	
大腸菌(2)	0	0	0	0	0	0	0	0	

【0160】

溶菌活性(%)^{a)}は、試験された異なった量のLys168-87及びLys170

10

20

30

40

50

- 87 の溶菌作用に感受性の各細菌種の株の割合を示す。Ly s 170-87 及び Ly s 168-87 为主要標的とするようデザインされた黄色ブドウ球菌株を考えると、試験された株の 90% 以上が 10 μg のどちらの溶解素の溶菌作用に対しても感受性であることが観察された（表VI）。記載された実験条件及び同量の酵素では、Ly s 168-87 は Ly s 170-87 と比べると黄色ブドウ球菌に対してより強い溶菌作用を示しているように思われた（表VI）。

【 0 1 6 1 】

特定の組成物、検出のための方法、活性の供給源、有効性の提案、その他同類のものに
関して記載してきたので、添付の特許請求の範囲により定義されているように、本発明が
そのような実例となる実施形態又は機構により限定されることを意図しておらず、本発明
の範囲又は精神から逸脱することなく修正を加えることができることは、当業者には明ら
かであろう。そのような明白な修正及び変化すべてが添付の特許請求の範囲により定義さ
れている本発明の範囲内に含まれることは意図されている。いずれの実施形態由来の上記
の 1 又は 2 以上の要素のうちのいずれも、他のいずれの実施形態中のいずれの 1 又は 2 以
上の要素とも組み合わせることが可能であることは理解されるはずである。さらに、範囲
が言及されている場合、その範囲に含まれるいずれの実数も予期されるエンドポイントで
あることが企図されていることは理解されるはずである。例えば、0.9 ~ 1.1 g / k
g の範囲が与えられている場合、その範囲に含まれるいずれの実数値（例えば、0.95
4 ~ 1.052 g / kg）も、たとえそれらの値がはっきりと言及されていなくても、本
発明の亜属範囲として予期されていることが企図されている。本明細書において参照され
る参考文献はすべて、参照によりその全体を組み込まれている。最後に、上の説明は本発
明を限定すると解釈されるべきではなく、むしろ本発明は下の特許請求の範囲により定義
されるはずである。

10

20

【圖 1】

```

P68 -----MKSQQQAKEWYIKHEGAGVDFDGAAGPCDIDSVAYVYYITDGKVRM-----GN
#11 NS1MEVATWALKTFLKNPFEMLTSEKQPNLWDLWPGCDDTANAGKVLFLGLLKLGL-----GN
Twrt -----MTKLLAQAESTINSVKNSVTFIDPGLGKCDIDCAGVADYIYXHDGKIRMM-----GN
Lys87 -----MKTYSFARARLRYWQGRYIIDEWLGKPCDIDCAGVADYIYXWLEL--TRM-----GN

P68 -----GNAKDAINN-DFKGALTYKVNPKVTPQEDVATVPSV-----QYEVGPPCWL-----GN
#11 -----GAKDIPFANPEFGGLATVYQTPDIAPOZMWTMVTNSYNG-AQGYHAWI-----GN
Twrt -----GNAKDAINN-SFGPATATVYKVNPKVTPRKYGVWVITGKF--ATYGHAEVATNPDPYGD-----GN
Lys87 -----GNAKDAINN-DFKNAWMTYENPSPVFOICEVATVLTGKF--KQYEVGLVYNG-----GN

P68 LDVYTCLCLENLLGGGT 114
#11 LD1111VVEEQLLGGGT 129
Twrt LQVTVTVEEQLLNGGGT 121
Lys87 TNQFLILQVNEQHANT 115

```

Figure 1

〔 図 2 〕

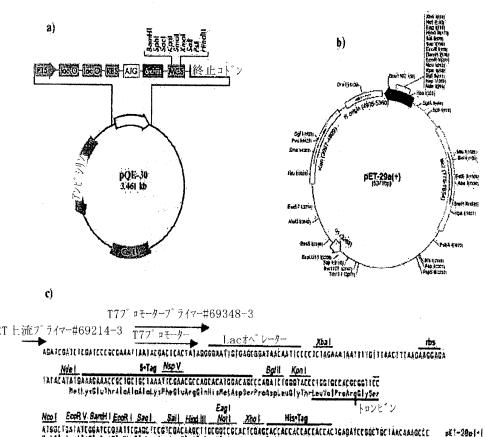


Figure 2

【図3】

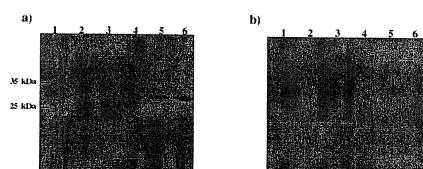


Figure 3

【 図 4 】

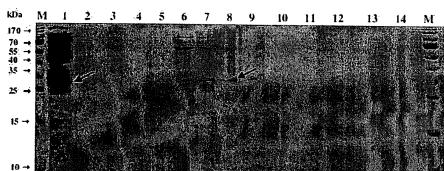


Figure 4

【 図 6 】

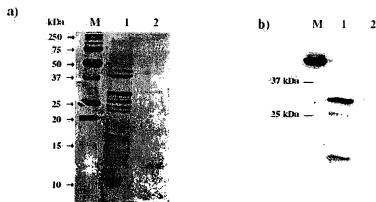


Figure 6

【図5】

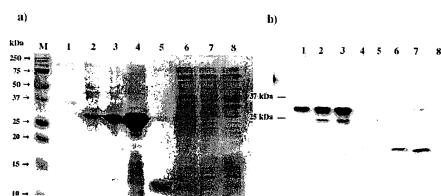


Figure 5

【 図 7 】

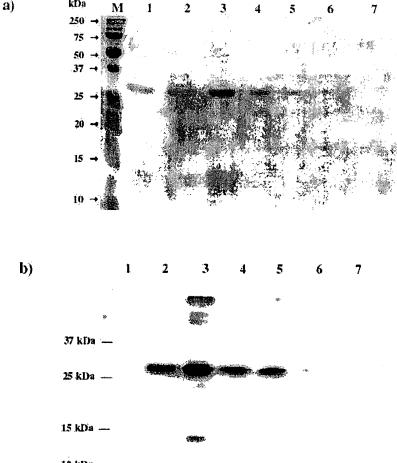


Figure 7

(四 8)

配列番号 1

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

配列番号 2

Figure 8

〔 四 9 〕

配列番号 3

Figure 9

配列番号 2

【図10】

a)

```

ATGGTTAAATTAAAATGATGTACTTAACTGGACTCTGCGAAAAGCCGTGAGCCTGAGGGATGTTATGG
ATCTCAATTTATGGCTTGAACTAGAACGCTTATGGAACTGGCTTCTGGGGTGGGGCGCTTAACGGAAACGAGG
TGGTGACGCCATCCAGGGCTTCAAAAGATCGGTACCGAAACGCTGAGAAGAAATGAAACGCTGGCTGAGG
ATGATAATGGGGCTTGGAACTACTATGCTCAATACGGGAACTGCAACCGGAAGTCAACGGAGGAGCTAACGGAAAC
CTTGTGAGGTGGTGGACAAAACCTGGATAACCCCAAGGCTTGAAGTAGGGCATTCAGCAAGCTGGCTGACACAAATA
TGATGTGTCTGGGGAGTTATCCGACCACTTACGGGCTGAACTCAAAAGGCTTAAACCACTTGACCCAAAACAGAT
AAACCAAATCTAGGACAAAAGTTAAACCCACCTGCTCAAAAAGCAGTCGGTAAATCTGCAAGTAAAATAACGTTG
AAAGTAAAGCGGCTTAAACCTTAAATGGTCATACTTAAAGGGTCACTTAAATGGGAAATCGACGGCTTAGGTGCTACTT
CAGCCACTAGATACGGTGTAAATCGTACTTAACTATGATTCGATGTTGGACAGGGCTGATACGGGGCTGGACATTTA
ATATATGTGTTGAAATATAGATGTTGTTGCTGGCAATTATGGACACAATCATATGAGTGGATATGGCATGAGAG
ATGATGTGAAAGAAGTGTTCGGGGGGGTTCTCATCATCATCATGAGAG

```

配列番号5

b)

```

MVKLNDVLSYVRLWGEGLDADGTYGTOQBDLTVDVUMQRFFGWRPYGNALIVDQPPIAGFQRIRTSSTQIKAGDV
HINOLOTYKQDNGRGTATSDSISDGTPTVTDVDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTGDTG
KPNLQKVPDPNQKVKGSKKSHKTVESHLAIVVLPNSKGAYFNAKIDGLGATSAHYGDNRNTYRFDVQQAVALPGL
IYVPSIIDGNCRUYANNNHNEWIWHERLIVKEVFPGGOSHRRHHHH

```

配列番号6

Figure 10

【図11】

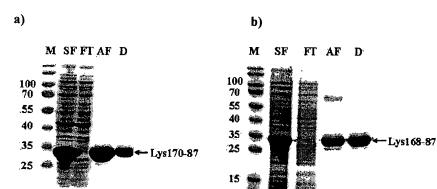


Figure 11

【図12】

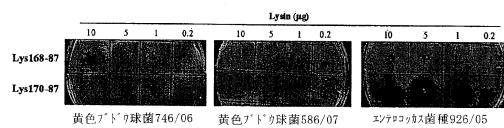


Figure 12

【図13】

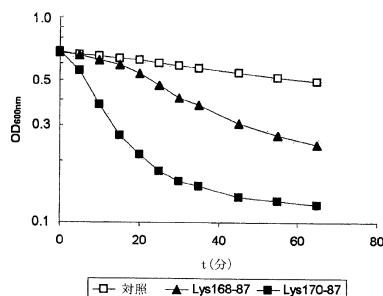


Figure 13

【配列表】

0005732397000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/18	(2006.01)	C 1 2 Q	1/18	

(72)発明者 ピレラ ピメンテル マダレナ マリア
 ポルトガル国 リスボア ピー-1600-042 2エー 3番 ルアプロフェッサーカルロス
 ティエシェラ
 (72)発明者 ソーサ デ サンジョセ カルロス ジョルジエ
 ポルトガル国 リスボア ピー-1800-007 2ディーティーオー/7 9番 ルアアルフ
 エレスパッリラロルアス

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第2008/077397 (WO , A2)

Bae,T.et al. , "Accession:NC_008617 REGION: 38847..39602[gi:118725053],Definition:Staphylococcus aureus phage phiNM3 provirus, complete genome." , NCBI Entrez Nucleotide[online];05-DEC-2006 uploaded,NCBI,[retrieved on 7 April 2014] , Retrieved from the Internet :<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/118725053?sat=12&satkey=851685>>
 Gene,2002 May 1,289(1-2),p.109-18
 Zou,D.et al. , "Accession:NC_002486 REGION: 39175..39930[gi:9635677],Definition:Staphylococcus prophage phiPV83, complete genome." , NCBI Entrez Nucleotide[online];01-OCT-2007 uploaded,NCBI,[retrieved on 8 April 2014] , Retrieved from the Internet:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/9635677?sat=12&satkey=7681180>>
 Biosci.Biotechnol.Biochem.,2000 Dec,64(12),p.2631-43
 FEMS Microbiol.Lett.,2008 Oct,287(1),p.22-33,Epub 2008 Jul 31
 J.Bacteriol.,2005 Oct,187(20),p.7161-4
 J.Infect.Dis.,2007 Oct 15,196(8),p.1237-47
 Microb.Drug Resist.,1997 Summer,3(2),p.199-211

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
 UniProt / GeneSeq
 JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)
 Capplus / BIOSIS (STN)
 Thomson Innovation