

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年6月17日(2010.6.17)

【公表番号】特表2009-536033(P2009-536033A)

【公表日】平成21年10月8日(2009.10.8)

【年通号数】公開・登録公報2009-040

【出願番号】特願2009-509770(P2009-509770)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/14 (2006.01)

C 1 2 N 9/24 (2006.01)

C 1 2 N 9/80 (2006.01)

C 1 2 N 9/48 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 9/06 (2006.01)

A 6 1 K 9/107 (2006.01)

A 6 1 K 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/14

C 1 2 N 9/24

C 1 2 N 9/80

C 1 2 N 9/48

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 9/06

A 6 1 K 9/107

A 6 1 K 9/00

A 6 1 P 31/04

A 6 1 K 39/395 N

【手続補正書】

【提出日】平成22年4月22日(2010.4.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(i) 尾部関連壁分解酵素(Tail Associated Muralytic Enzyme ; TAME)ポリペプチドの壁分解性ドメイン(MD)、および

(ii) 標的細菌に結合する異種細胞結合ドメイン(CBD)

を含むキメラポリペプチドであって、該キメラポリペプチドとの接触後に、該標的細菌が増殖減少または増殖なしを示す、キメラポリペプチド。

【請求項 2】

MDがORF56タンパク質に由来する触媒ドメインである、請求項1記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3】

SEQ ID NO:4～6および8～10からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、請求項1記載のキメラポリペプチド。

【請求項 4】

SEQ ID NO:4に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、請求項3記載のキメラポリペプチド。

【請求項 5】

(i) 黄色ブドウ球菌(S. aureus)感染ファージに由来する尾部関連ムレイン分解酵素(TAME)の壁分解性ドメイン(MD)；および

(ii) 異種黄色ブドウ球菌細胞壁結合ドメイン

を含むキメラポリペプチドであって、ブドウ球菌ムレイン分解活性を示す、キメラポリペプチド。

【請求項 6】

SEQ ID NO:1のアミノ酸669～808に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

標的細菌に結合する異種細胞結合ドメイン(CBD)をさらに含む、請求項6記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 8】

CBDがリソスタフィン結合断片を含む、請求項1～5および7のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項 9】

請求項1～8のいずれか一項記載のポリペプチドをコードする、単離された核酸。

【請求項 10】

請求項9記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 11】

そのような治療を必要とする対象の細菌感染症を治療するための医薬の製造において使用するための、請求項1～8のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項 12】

細胞壁を請求項1～8のいずれか一項記載のポリペプチドと接触させる段階を含む、細菌の細胞壁を分解する方法。

【請求項 13】

表面を請求項1～8のいずれか一項記載のポリペプチドと接触させる段階を含む、表面を消毒する方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

本発明はさらに、TAMEポリペプチド配列または壁分解性ドメインを含むTAME配列のセグメントと細胞壁結合ドメイン(CBD)を構成する別のポリペプチドのセグメントとの融合物に由来する、等価なポリペプチドまたは関連したポリペプチドも提供する。これらのキメラ構築物は、TAME-CBDと呼ばれる。例えば、グラム陽性株ムレイン分解生物活性を示す実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチドであり、このポリペプチドは、グラム陽性菌感染ファージの尾部関連ムレイン分解酵素(TAME)セグメントの改変された、例えば変異誘発された配列、および/または改変された、例えば変異誘発された異種のグラム陽性菌細胞壁結合ドメインを含む。これらの場合、「変異誘発された」とは、主として、完全なTAMEタンパク質の領域が欠失し、完全長TAMEと比べて、殺菌活性もしくは酵素活性、タンパク質溶解性、および/またはタンパク質安定性を増大させる効果を有する形態のTAMEである。

[請求項101]

壁分解性ドメイン(MD)を含みかつ標的細菌に結合する異種細胞結合ドメイン(CBD)を含むキメラ尾部関連壁分解酵素(Tail Associated Muralytic Enzyme;TAME)ポリペプチドであって、該キメラTAMEポリペプチドとの接触後に、該標的細菌が増殖減少または増殖なしを示す、キメラ尾部関連壁分解酵素(TAME)ポリペプチド。

[請求項102]

MDが、ムレイングリコシダーゼ活性、グルコサミニダーゼ活性、ムラミニダーゼ活性、トランスグリコシラーゼ活性、リゾチーム活性、アミダーゼ活性、およびエンドペプチダーゼ活性からなる群より選択される活性を有する、請求項101記載のキメラTAMEポリペプチド。

[請求項103]

MDがORF56タンパク質に由来する触媒ドメインである、請求項101記載のキメラTAMEポリペプチド。

[請求項104]

MDが、リソスタフィンタンパク質由来の触媒ドメイン、ORF56タンパク質由来の触媒ドメイン、およびLytMペプチダーゼ由来の触媒ドメインから選択される、請求項101記載のキメラTAMEポリペプチド。

[請求項105]

標的細菌がブドウ球菌(Staphylococcus)種である、請求項101記載のキメラTAMEポリペプチド。

[請求項106]

標的細菌が、メチシリン耐性のブドウ球菌種である、請求項105記載のキメラTAMEポリペプチド。

[請求項107]

標的細菌が緩徐に複製する細菌種である、請求項101記載のキメラTAMEポリペプチド。

[請求項108]

細胞壁を請求項101記載のキメラTAMEポリペプチドと接触させる段階を含む、細菌の細胞壁を酵素的に分解する方法。

[請求項109]

請求項101記載のキメラTAMEポリペプチドを含む薬学的組成物を対象に投与する段階を含む、そのような治療を必要とする対象の細菌感染症を治療する方法。

[請求項110]

対象が哺乳動物である、請求項109記載の方法。

[請求項111]

対象が、ヒト、霊長類、雌ウシ、ウマ、ヤギ、ネコ、ヒツジ、げっ歯動物、イヌ、およびブタより選択される、請求項110記載の方法。

[請求項112]

対象が雌ウシであり、細菌感染症がウシ乳房炎である、請求項111記載の方法。

[請求項113]

対象がトリである、請求項109記載の方法。

[請求項114]

トリが家禽種である、請求項113記載の方法。

[請求項115]

CBDが、ORF56タンパク質およびリソスタフィンタンパク質からなる群より選択されるメンバーであるタンパク質に由来する、請求項101記載のキメラTAMEポリペプチド。

[請求項116]

MDがORF56タンパク質に由来する触媒ドメインであり、CBDがリソスタフィンタンパク質に由来する、請求項101記載のキメラTAMEポリペプチド。

[請求項117]

表面を請求項101記載のキメラTAMEポリペプチドと接触させる段階を含む、表面を消毒する方法。

[請求項118]

(a) ORF56の残基1～808、297～808、363～808、603～808、620～808、もしくは691～805に対して、少なくとも17アミノ酸からなるセグメントにわたり少なくとも85%の同一性を含むか；

(b) ORF56の残基691～805に対して、少なくとも24アミノ酸からなるセグメントにわたり少なくとも90%の同一性を含むか；または、

(c) ORF56に対して少なくとも85%の同一性を有しかつ重複しない、複数の異なるセグメントを含む、

実質的に純粋なまたは単離されたポリペプチド。

[請求項119]

(a) ORF56の残基691～805に対して、少なくとも17アミノ酸にわたり少なくとも75%の同一性を有する付加的な異なるセグメント；

(b) ORF56に対して少なくとも65%の同一性を示す、少なくとも17アミノ酸の付加的な異なるセグメント；

(c) ORF56の少なくとも30%の細胞壁溶解活性；

(d) ORF56の少なくとも50%のブドウ球菌細菌株に対する壁分解活性；

(e) 別の機能的なポリペプチド配列もしくはドメイン、例えば、シグナル配列；または

(f) 検出可能な標識

をさらに含む、請求項118記載のポリペプチド。

[請求項120]

(a) ORF56の残基690～769を少なくとも含むか；

(b) 完全長ORF56であるか；

(c) ORF56の1～808、297～808、363～808、Met-603～808、もしくは620～808に対応するか；

(d) CHAPドメインを含むか；

(e) 他のファージタンパク質を実質的に含まないか；

(f) 他のタンパク質性材料を実質的に含まないか；

(g) 抗生物質を含む別の抗微生物物質と組み合わされているか；

(h) 薬学的賦形剤と混合されているか；

(i) 緩衝化組成物もしくは無菌組成物中に存在するか；

(j) 壁分解活性、グルコサミダーゼ(glucosamidase)活性、アミダーゼ活性、もしくはエンドペプチダーゼ活性より選択される細菌細胞壁分解活性を示すか；

(k) 多数のグラム陰性細菌株に対する溶解活性を示すか；

(l) ブドウ球菌細菌株に対する溶解活性を示すか；または、

(m) 黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)、表皮ブドウ球菌(*S. epidermis*)、*S. レンティス*(*lenti s*)、および*S. カルノーサス*(*carnosus*)と記載される1種もしくは複数種の株に対する溶解活性を示す、

請求項118記載のポリペプチド。

[請求項121]

請求項118記載のポリペプチドをコードする単離された核酸または組換え核酸を含む、発現ベクター。

[請求項122]

請求項121記載の核酸を含む細胞であって、

- (a) 真核細胞もしくは原核細胞であるか；
- (b) 該核酸を発現させてタンパク質を産生するために使用されるか；または
- (c) 該核酸を発現させてタンパク質を分泌するために使用される、細胞。

[請求項123]

請求項118記載のポリペプチドに選択的に結合する抗体の抗原結合部位を含む、実質的に純粋なまたは単離されたポリペプチド。

[請求項124]

- (a) 検出可能な標識が付着しているか；または
 - (b) 標的細菌の存在を評価するために使用される、取扱い説明書付きのキット中に存在する、
- 請求項123記載のポリペプチド。

[請求項125]

細胞壁を請求項118記載のポリペプチドに曝露する段階を含む、細菌の細胞壁を酵素的に分解する方法。

[請求項126]

- (a) 細菌感受性を決定するための診断に組み入れられるか；
 - (b) 作業台表面もしくは家具表面の感受性細菌集団を少なくとも5分の1に減少させるか；
 - (c) ポリペプチドを動物に導入し、前記動物の内部もしくは表面の選択された場所の感受性細菌集団を少なくとも5分の1に減少させるか；
 - (d) 前記ポリペプチドを動物の表面もしくは区画に投与するか；
 - (e) 死滅細菌もしくは溶解された細菌を個体に接種するための手段であるか；または、
 - (f) 皮膚感染症、粘膜感染症、尿路感染症、気道感染症、胃腸管感染症、もしくは他の細菌感染症を治療するために使用される、
- 請求項125記載の方法。

[請求項127]

SEQ ID NO:1の切断型ORF56タンパク質を含む組換え壁分解性タンパク質であって、該ORF56タンパク質のアミノ末端から1~117アミノ酸が切断されているか、または該ORF56タンパク質のカルボキシ末端から1~3アミノ酸が切断されており、かつ、細菌細胞壁分解活性を有する、組換え壁分解性タンパク質。

[請求項128]

- (a) 細菌の細胞壁を分解する尾部関連ムレイン分解酵素(Tail Associated Murein-degrading Enzyme;TAME)ポリペプチド；および
- (b) 細菌細胞壁に結合する異種ターゲティングドメインを含む、単離された殺菌性ポリペプチド。

[請求項129]

請求項128記載の単離された殺菌性ポリペプチドをコードする核酸。

[請求項130]

請求項129記載の核酸を含む宿主細胞。

[請求項131]

請求項128記載の単離された殺菌性ポリペプチドと細菌とを接触させる段階を含む、細菌を死滅させる方法。

[請求項132]

TAMEポリペプチドがグラム陽性細菌の細胞壁を分解し、かつ、ターゲティングドメインがグラム陽性細菌の細胞壁に結合する、請求項128記載の単離された殺菌性ポリペプチド

°

[請求項133]

TAMEポリペプチドがブドウ球菌細菌の細胞壁を分解し、かつ、ターゲティングドメインがブドウ球菌細菌の細胞壁に結合する、請求項132記載の単離された殺菌性ポリペプチド

°

[請求項134]

TAMEポリペプチドが黄色ブドウ球菌細菌の細胞壁を分解し、かつ、ターゲティングドメインが黄色ブドウ球菌細菌の細胞壁に結合する、請求項133記載の単離された殺菌性ポリペプチド。

[請求項135]

黄色ブドウ球菌感染ファージに由来する、尾部関連ムレイン分解酵素(TAME);および異種黄色ブドウ球菌細胞壁結合ドメインを含む、ブドウ球菌株ムレイン分解活性を有する実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド。

[請求項136]

- (a) 400kDa未満のタンパク質主鎖分子量を有するか;
- (b) 黄色ブドウ球菌ムレインに対するペプチダーゼ活性を示すか;
- (c) カウドウイルス目(Caudovirales)ファージの尾部に由来するか;
- (d) ムレイン分解酵素セグメントがファージK ORF56に由来するか;
- (e) 細胞壁結合ドメインがブドウ球菌細菌タンパク質に由来するか;
- (f) 薬学的組成物中に存在するか;
- (g) 制御放出製剤中に存在するか;
- (h) 前記ブドウ球菌株が鼻区画内に認められるか;または
- (i) 前記細胞壁結合ドメインが細菌のSH3セグメントを含む、請求項135記載のポリペプチド。

[請求項137]

- (a) 250kDa未満のタンパク質主鎖分子量を有するか;
- (b) 黄色ブドウ球菌ムレインに対するアミダーゼ活性を示すか;
- (c) ミオウイルス科(myoviridae)ファージの尾部に由来するか;
- (d) ムレイン分解酵素セグメントがファージphi11 ORF49に由来するか;
- (e) 細胞壁結合ドメインがブドウ球菌リソスタフィンに由来するか;
- (f) クリーム剤もしくはゲル剤中に存在するか;
- (g) インプラント、カテーテル、もしくは医療用器具に適用されるか;
- (h) 前記ブドウ球菌株が乳房炎を引き起こすか、または熱傷創もしくは穿刺創に感染するか;または
- (i) 前記細胞壁結合ドメインがORF56、S.シミュランス(*S. simulans*)のリソスタフィン、もしくはL54アミダーゼに由来する配列を含む、請求項135記載のポリペプチド。

[請求項138]

- (a) 100kDa未満のタンパク質分子量を有するか;
- (b) 黄色ブドウ球菌ムレインに対するヒドロラーゼ活性を示すか;
- (c) ポドウイルス科(podoviridae)ファージもしくはシホウイルス科(siphoviridae)ファージの尾部に由来するか;
- (d) ムレイン分解酵素活性セグメントがMRSA由来のファージに由来するか;
- (e) 細胞壁結合ドメインがファージ尾部タンパク質に由来するか;
- (f) 1回量の容器中に存在するか;
- (g) 無菌製剤もしくは緩衝化製剤中に存在するか;
- (h) 前記ブドウ球菌株がメチシリン耐性であるか;または
- (i) 前記細胞壁結合ドメインが、結合ドメインの機能を欠く同等のポリペプチドと比べて、ポリペプチドのムレイン分解活性を少なくとも30倍増大させる、

請求項135記載のポリペプチド。

[請求項139]

SEQ ID NO:4を含む、請求項135記載のポリペプチド。

[請求項140]

培養物を請求項135記載のポリペプチドと接触させる段階を含む、細菌培養物を処理する方法。

[請求項141]

(a) 接触段階により、培養物の増殖速度が少なくとも5分の1に低下するか；

(b) 別の抗微生物療法もまた使用されるか；

(c) 異なる細菌株を標的とするポリペプチドのカクテルを使用するか；

(d) 処理段階により、細菌培養物の増殖速度が少なくとも30%低下するか；

(e) ポリペプチドが各標的細菌に対して少なくとも10個のポリペプチドの化学量論量で投与されるか；

(f) 該ポリペプチドが少なくとも500ng/mlで投与されるか；

(g) 接触段階が7日未満であるか；

(h) 該細菌培養物がブドウ球菌株を含むか；

(i) 該細菌培養物がグラム陽性細菌を含むか；または

(j) 該培養物が感染体である、

請求項140記載の方法。

[請求項142]

請求項135記載のポリペプチドをコードする核酸。

[請求項143]

請求項142記載の核酸を含む宿主細胞。

[請求項144]

グラム陽性菌感染ファージの尾部関連ムレイン分解酵素(TAME)セグメントの改変配列；および

異種グラム陽性細胞壁結合ドメイン

を含む、グラム陽性株ムレイン分解生物活性を示す実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド。