

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-521143

(P2018-521143A)

(43) 公表日 平成30年8月2日(2018.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/48 (2006.01)	A 6 1 K 38/48 1 0 0	4 B 0 5 0
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C 0 7 6
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-522872 (P2018-522872)  
 (86) (22) 出願日 平成28年7月22日 (2016.7.22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年1月22日 (2018.1.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/067570  
 (87) 国際公開番号 W02017/017027  
 (87) 国際公開日 平成29年2月2日 (2017.2.2)  
 (31) 優先権主張番号 15178209.1  
 (32) 優先日 平成27年7月24日 (2015.7.24)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 518024747  
 エンジマティカ アーベー  
 スウェーデン王国, 2 2 3 7 0 ルンド  
 , イデオン サイエンス パーク  
 (74) 代理人 110001416  
 特許業務法人 信栄特許事務所  
 (72) 発明者 ガドモンズドッター, アグスタ  
 アイスランド共和国, 1 0 7 レイキャ  
 ヴィーク, グレニメル 4 6  
 (72) 発明者 シェビーング, レイニー  
 アイスランド共和国, 2 0 1 コーパヴ  
 グル, ストレームサリー 6  
 Fターム(参考) 4B050 CC03 CC08 DD11 LL01  
 4C076 AA24 BB22 BB25 CC27 CC32  
 CC33

最終頁に続く

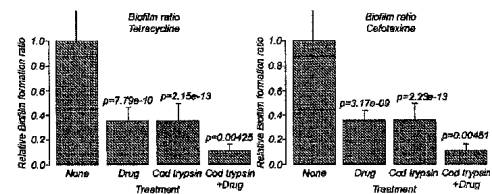
(54) 【発明の名称】 併用療法

(57) 【要約】

本発明は、患者内の細菌性バイオフィームを治療するために用いられる、(a) セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドと(b) 一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物を含む併用療法を提供する。また、そのために用いられる組成物と方法を提供する。

【選択図】 図 2

Figure 2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

(a) セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドと (b) 一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物を含む、患者内の細菌性バイオフィルムの治療における使用のための併用療法。

**【請求項 2】**

前記患者がヒトである、請求項 1 に記載の使用のための併用療法。

**【請求項 3】**

前記バイオフィルムが上気道および/または下気道に在る、請求項 1 または 2 に記載の使用のための併用療法。

10

**【請求項 4】**

前記バイオフィルムが、グラム陰性および/またはグラム陽性細菌を含むかあるいはそれらから成る、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

**【請求項 5】**

前記バイオフィルムが、肺炎連鎖球菌、ストレプトコッカス・ミティス、緑膿菌、インフルエンザ菌、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌、メシチリン感受性黄色ブドウ球菌、化膿性連鎖球菌、ミュータンス連鎖球菌、サンギス菌、レジオネラニューモフィラ、クロストリジウム・ディフィシル、およびそれらのいずれかの混合物から独立して選択される細菌を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

20

**【請求項 6】**

前記バイオフィルムが、連鎖球菌を含むかあるいは連鎖球菌から成る、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

**【請求項 7】**

前記バイオフィルムが、ストレプトコッカス・ミティスおよび/または肺炎連鎖球菌を含むかあるいはそれらから成る、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

**【請求項 8】**

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、トリプシン、またはキモトリプシン、またはそれらの混合物の成分である、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

30

**【請求項 9】**

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、自然発生のものである、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

**【請求項 10】**

前記ポリペプチドが、海洋セリンプロテアーゼである、請求項 9 に記載の使用のための併用療法。

**【請求項 11】**

前記海洋セリンプロテアーゼが、タラ、スケトウダラ、サケ、あるいはオキアミから得ることができる、請求項 10 に記載の使用のための併用療法。

**【請求項 12】**

前記海洋セリンプロテアーゼが、タイセイヨウマダラから得ることができる、請求項 11 に記載の使用のための併用療法。

40

**【請求項 13】**

前記海洋セリンプロテアーゼが、トリプシン、例えばトリプシン I である、請求項 12 に記載の使用のための併用療法。

**【請求項 14】**

トリプシンの活性が 0.1 から 16 U/g の範囲内である、請求項 13 に記載の使用のための併用療法。

**【請求項 15】**

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、SEQ ID NO: 1

50

IVGGYECKHKSQAHQVSLNSGYHFCGGSLVSKDWWWSAAHCYKSVLRVRLGEH HIRVNEGTEQYISSSSVIRHPNYSSYN  
 INNNDIMLIKLTTPATLNQYVHAVALPTECA ADATMCTVSGWGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPMITQSM  
 FCAG YLEGGKDSCQGDSSGPPWCNGVLQGWVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWWVRDTMANY

[SEQ ID NO: 1]

のアミノ酸配列を含むかまたはこのアミノ酸配列から成る、または前記アミノ酸配列のトリプシン活性を保つその断片、変異体、誘導體、または融合体である、請求項 1 から 1 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 1 6】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、自然発生源からのものを精製したものである、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

10

【請求項 1 7】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、遺伝子組み換えタンパク質である、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 1 8】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、非 - 自然発生のものである請求項 1 7 に記載の使用のための併用療法。

【請求項 1 9】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が、アモキシシリン、アンピシリン、アジスロマイシン、カルバペネム、セフォタキシム、セフトリアキソン、セフロキシム、セファロsporin、クロランフェニコル、シプロフロキサシン、クリンダマイシン、ダラシン、ダルフォプリスチン、ダプトマイシン、ドキシサイクリン、エルタペネム、エリスロマイシン、フルオロキノロン、メロペネム、メトロニダゾール、ミノサイクリン、モキシフロキサシン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリン、キヌプリスチン、リファンピン、スルファメトキサゾール、テイコプラニン、テトラサイクリン、トリメトプリム、バンコマイシン、バシトラシン、ポリミキシン B、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 1 から 1 8 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

20

【請求項 2 0】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が、テトラサイクリン、セフォタキシム、バンコマイシン、エリスロマイシン、およびオキサシリンから成る群から選択される、請求項 1 から 1 9 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

30

【請求項 2 1】

ただ一つの抗生物質化合物を含んでいる、請求項 1 から 2 0 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 2 2】

患者内の細菌性バイオフィルムの治療における使用のためのセリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドであり、一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物と組み合わせて用いられるポリペプチド。

【請求項 2 3】

前記ポリペプチドが請求項 8 から 1 8 のいずれか一項で定義されている、請求項 2 2 に記載の使用のためのポリペプチド。

40

【請求項 2 4】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が、請求項 1 9 から 2 1 のいずれか一項で定義されている、請求項 2 2 または 2 3 に記載の使用のためのポリペプチド。

【請求項 2 5】

患者内の細菌性バイオフィルムの治療のための薬剤の調剤におけるセリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドの使用であり、前記ポリペプチドは一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物との組み合わせにより使用される。

【請求項 2 6】

前記ポリペプチドが請求項 8 から 1 8 のいずれか一項で定義されている、請求項 2 5 に記載のポリペプチドの使用。

50

## 【請求項 27】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が請求項 19 から 21 のいずれか一項で定義されている、請求項 25 または 26 に記載のポリペプチドの使用。

## 【請求項 28】

(a) セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドと (b) 一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物を、医薬的に許容される緩衝剤、賦形剤、希釈剤または支持体とともに含んでいる医薬組成物。

## 【請求項 29】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、請求項 8 から 18 のいずれか一項で定義されている、請求項 28 に記載の組成物。

10

## 【請求項 30】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が、請求項 19 から 21 のいずれか一項で定義されている、請求項 28 または 29 に記載の組成物。

## 【請求項 31】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、0.001 から 10  $\mu$ M までの濃度で存在する、請求項 28 から 30 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 32】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が、0.1 重量% から 5 重量%、例えば 0.1% から 2%、0.5% から 1.5%、好ましくは、1% の濃度で存在する、請求項 28 から 31 のいずれか一項に記載の組成物。

20

## 【請求項 33】

患者の固形腫瘍を治療する方法であり、(a) セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドと (b) 一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物を治療的に効果のある分量で患者へ投与することを含んでいる方法。

## 【請求項 34】

前期患者がヒトである請求項 33 の方法。

## 【請求項 35】

前記バイオフィームが上および/あるいは下気道にある、請求項 33 または 34 に記載の方法。

## 【請求項 36】

前記バイオフィームがグラム陰性および/またはグラム陽性細菌を含んでいるか、あるいはその細菌から成る、請求項 33 から 35 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 37】

前記バイオフィームが肺炎連鎖球菌、ストレプトコッカス・ミティス、緑膿菌、インフルエンザ菌、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌、メシチリン感受性黄色ブドウ球菌、化膿性連鎖球菌、ミュータンス連鎖球菌、サンギス菌、レジオネラニューモフィラ、クロストリジウム・ディフィシル、およびそれらのいずれかの混合物から独立して選択される細菌を含んでいる、請求項 33 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 38】

前記バイオフィームが連鎖球菌を含んでいるかその菌から成る、請求項 33 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 39】

前記バイオフィームがストレプトコッカス・ミティスおよび/または肺炎連鎖球菌を含んでいるかあるいはその菌から成る、請求項 33 から 38 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 40】

前記ポリペプチドが請求項 8 から 18 のいずれか一項で定義されている、請求項 33 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 41】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が請求項 19 から 21 のいずれか一項で定義されている、請求項 33 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 4 2】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが口中スプレーで送り出される、請求項 3 3 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 3】

請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の併用療法の有効量を患者に送り出すための医療装置であり、請求項 2 8 から 3 2 のいずれか一項に記載の組成物の貯蔵器と前記組成物を前記装置から放出する手段を含んでいる装置。

## 【請求項 4 4】

前記装置が口中スプレーである、請求項 4 3 に記載の医療装置。

## 【請求項 4 5】

前記装置が鼻腔スプレーである、請求項 4 3 に記載の医療装置。

## 【請求項 4 6】

細菌性バイオフィルムの成長を生体外で死滅させる、禁ずる、または防止するための方法であり、バイオフィルム（または、バイオフィルムの成長が防止されるべき表面）を請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の併用療法に曝すことを含んでいる方法。

## 【請求項 4 7】

前記ペプチドが請求項 8 から 1 8 のいずれか一項に定義されている、請求項 4 6 に記載の方法。

## 【請求項 4 8】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が請求項 1 9 から 2 1 のいずれか一項に定義されている、請求項 4 6 または 4 7 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、再発性上気道および下気道感染症に存在するものなど、細菌性バイオフィルムの治療および防止のための併用療法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

バイオフィルムは、細胞外基質（ECM）にはめ込まれた微生物細胞集団から成る不均一な複合的な 3D 基質である。それらは、単に受動的な細胞の集まりではなく、局所的な生態系を形成する構造的および動的に複雑な生物システムである。バイオフィルム内の微生物細胞は、特別な機能を協同して受け持っているように見える。防御的な ECM を協同して形成することによって、バイオフィルムは、微生物に保護された成長形態を提供し、それによって、微生物は多様な環境で定住が可能となっている。バイオフィルムの成長形態は、細菌が、宿主の免疫システムおよび抗生物質やそれに似たような静菌剤や殺菌剤を妨害することを可能にさせている。このようにバイオフィルムの伸張は、細菌が抗生物質に対する耐性を示すことを可能にしている。バイオフィルム中で成長する細菌は、それらの浮遊する、すなわち自由生活型の相対物より、滅することが困難である。（参照、del Pozo & Patel, 2007, Clin. Pharmacol. Ther. 82: 204-9; Stewart & Costerton, 2001, Lancet 358: 135-8）

## 【0003】

バイオフィルムは、実質的にあらゆる生物学的または非生物学的表面に付着する、一種類あるいは多種類の細胞群からなる。その様な多くの細胞群において、細胞は互いに付着している。古細菌、原生生物、真菌類、および藻類と同様、細菌種の大多数は表面へ付着したり互いに付着する能力を持ち、バイオフィルム構造を形成する。バイオフィルムの形成は、典型的には、自由に漂っている微生物が表面へ付着することから始まる。多数の遺伝子の発現が変化した時、浮遊する細胞が表現型の遷移を起こし、自由生活型からバイオフィルム成長型へと変ずる。最初に入り込むものが、初めは弱く可逆的な付着で表面に付き、その付着が、ピリ線毛などのような細胞付着構造を作ることによってより強くなる。い

10

20

30

40

50

ったん入植がはじまると、バイオフィルムは、細胞分裂と発現と新しい細菌の結合が相まって成長する。最初に入植したものが、より多様な付着点を供給したバイオフィルムを共に保つ基質の形成を始めることによって、他の細胞の到来を促進する。

【0004】

バイオフィルムは、自然界、家庭内、工場、病院環境など多様な環境において形成することができ、そこで、状況によって積極的あるいは消極的な種々の影響を及ぼす。

【0005】

医療現場において、バイオフィルムは、表面上に細菌の頑固な貯蔵所を形成する。バイオフィルムは、直接患者にまた患者の直近の環境の両方に起きることができる。患者に現に直接存在するバイオフィルムは、通常、再生性の感染と関連しており、一方直近の環境から患者への細菌の移動は、初期および再生性の感染が関係している。病院環境におけるバイオフィルムの例としては、カテーテルや他の形状のチューブや、心臓弁や人工関節などの移植片に付くバイオフィルムなどである。

10

【0006】

工場環境におけるバイオフィルムは、必須なものあるいは有害なもの両方であり得る。例えば、最近の有効な微生物的バイオリアクターの開発においては、バイオフィルムが埋め込まれた電極が電気を発電するのに用いられている。バイオフィルムは、また例えばセルロース等の化合物の生物学的製造工場として開発が進められている。

【0007】

国際特許出願W000/78332は、タイセイヨウマダラのようなタラから得たトリブシンや、キモトリブシンを含む魚セリンプロテアーゼを、種々の疾病や不調の治療および/または予防するために使用することを提供している。これらの疾病としては、例えば、ウイルス、細菌、真菌が引き起こす炎症性疾患や感染性疾患および病因として、受容体結合機構が関連する疾病などがある。

20

【0008】

Augustin et al. (2004) や Gudmundsdottir et al. (2013) は、酵素を用いたバイオフィルムの除去の可能性について検討している。しかし、酵素のみの使用は、細菌の破壊には十分ではなく、細菌は、時間と適当な環境が与えられ、再び表面や付近の表面に付着しバイオフィルムを再生成する (Augustin et al., 2004; Gudmundsdottir et al., 2013)。

30

【0009】

タラから得られたトリブシンは、病巣清掃術によって死滅した皮膚の除去を促進することが示されておりそれによって正常表皮修復過程を手助けしている。冷たい環境下から得られたタラトリブシンやセリンプロテアーゼのような親水性の海洋酵素の使用の主な問題は、そのような酵素が、熱による非活性化を受けやすいことと、ゆえに室温では比較的不安定なことである (Stefansson et al., 2010)。化粧品、医薬物、や薬剤へのタラトリブシンの使用は酵素の安定性の改善にかかっている。

【0010】

バイオフィルムは、身体において、全ての感染の80%との推測もあるほど、幅広い微生物感染に関連していることが分かっている (参照、"微生物バイオフィルムの研究 (Research on microbial biofilms (PA-03-047))", NIH, National Heart, Lung, and blood Institute, 2002-12-20)。バイオフィルムが関わっている炎症のプロセスには、尿路感染、カテーテル感染、中耳感染症、コンタクトレンズのコーティングなどの一般的問題や、心内膜炎、のう胞性線維症の炎症、人工関節や心臓弁など永久的に埋め込んだ装置の炎症など一般的ではないがより致命的なプロセスが含まれている。

40

【0011】

興味深いことに、表面に付着しバイオフィルムとして成長した細菌などの微生物は、従来の抗生物質治療に対して易損性がより低い。抗生物質に対する感受性の低減は、移植片に

50

関連した炎症などバイオフィルム炎症のしつこさにつながっている。バイオフィルムにおける防御機構は、従来の抗生物質に対する抵抗機構とは性質が異なっているようである。バイオフィルムにおいては、抗生物質の浸透の低さ、栄養の制限、成長の遅さ、ストレス適応応答、生残菌細胞の形成が、多層防御を構成すると仮説され得る。

【0012】

さらに、バイオフィルム培養菌は、遺伝子型抵抗を発現せずとも、一般的に化学療法による根絶に対して非常に難治である。従って、治療の選択肢は限られており、新規の抗バイオフィルム活性を持つ抗微生物剤がますます重要である。

【0013】

それ故、細菌性バイオフィルム（医療と非医療環境の両方において）の成長を死滅させ、  
10 禁じ、防ぐための新たな方法が必要である。

【発明の概要】

【0014】

本発明の第一の態様は、(a)セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドおよび(b)一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物から成る、患者内の細菌性バイオフィルムの処置に使用される併用療法を提供することである。

【0015】

"併用療法"とは、二つあるいはそれ以上の治療剤による、同時あるいは並行したあらゆる治療を含んでいる。故に、このような治療法は、該ポリペプチドと抗生物質化合物の別々の服用と、同様に、両治療剤が混合されて含まれている単一の組成物を提供することも含  
20 んでいる。

【0016】

"処置"とは、組み合わせられた治療剤の、治療および予防への両適用を含んでいる。治療への適用に関して、当業者であれば、併用療法が、存在する細菌性バイオフィルムを撲滅するか、あるいは部分的に効能をもたらす（バイオフィルムを形成する細菌群の大きさを縮小させるおよび/あるいはバイオフィルムを形成する細菌群の成長を遅らせるなど）ことを理解するであろう。同じように、予防への適用に関して、併用療法は、バイオフィルム形成を完全に防止するか、または、細菌性バイオフィルムによる炎症の可能性および/あるいはそのひどさを抑えるなどの部分的効能をもたらす。

【0017】

一つの実施形態において、患者は、ヒトである。しかし、本発明の併用療法は、例えば、ペット動物および/あるいは農場家畜（犬、猫、馬、牛、豚、羊、等を含む）の細菌性バイオフィルムの処置など、獣医学的環境でも有用である。

【0018】

抗生物質およびセリンプロテアーゼ（トリプシンなど）は、個々には、バイオフィルム炎症を解決することはできない。抗生物質は、幅広い効果の程度で、全身のおよび局所的細菌性炎症の治療に用いることができるが、バイオフィルムの細胞外基質に侵入することができず、バイオフィルム内の細菌を死滅させる効能は限られている。抗生物質は、故に、バイオフィルムから派生する炎症を完全に解消することはできない。

【0019】

セリンプロテアーゼ（トリプシンなど）は、細菌の細胞外基質を溶解させることができ、また生物学的または無機物質に付着する細菌を放すこととその再付着を防止することもできる。しかし、細菌は、トリプシン治療では、死滅させられず、時を得て、表面に付着する能力を回復することができる。

【0020】

このように、セリンプロテアーゼまたは抗生物質の個別の服用では、完全にバイオフィルム炎症を解決することはできない。

【0021】

本発明は、セリンプロテアーゼ（トリプシンなど）と従来の抗生物質化合物を組み合わせ  
40 て服用した時の、細菌性バイオフィルムへの予期しない相乗効果の発見により成された。  
50

驚くべきことに、この選択された活性薬剤の組み合わせは細胞外基質とバイオフィルムの細菌の両方を相乗的に破壊することができる。理論に束縛されることは望まないが、バイオフィルムの細胞外基質を崩壊させることによって、セリンプロテアーゼは、抗生物質をバイオフィルムにより深く入り込ませ、そこに存する細菌細胞へ接近させることができる。これによって、抗生物質は、もしそうでなければ細胞外基質のバリアー効果によって働きを邪魔されることになるが、その機能を細菌上に発揮することが許される。

【0022】

当業者であれば、上述の併用療法は、微生物バイオフィルムが見つけれられるあらゆる環境において、該バイオフィルムの成長を死滅させ、禁じ、防ぐために用いることができることを理解するであろう。このように、バイオフィルムは、不活性な支持体あるいは生きて

10

【0023】

一つの実施形態において、バイオフィルムは生きている支持体と関連づけられる。例えば、バイオフィルムは、ヒトあるいは動物の身体内の表面上に成長し、あるいは成長することが可能である。

【0024】

それ故、上記定義したように、本発明は、バイオフィルムの存在するあるいは成長と関連する状況の処置または防止に使用するための併用療法を提供する。

【0025】

例えば、上記の併用療法は、身体内で次の部位の一つにおいて、微生物バイオフィルムの成長と関連する不調あるいは状況を治療または防止するために用いられる。

20

(a) 気道 (例えば、上気道および/あるいは下気道の再起性細菌感染症)、

(b) 尿管 (例えば、膀胱炎)、

(c) 副鼻腔 (例えば、慢性副鼻腔炎)、

(d) 耳 (例えば、内耳感染症)、

(e) 心臓 (例えば、心内膜炎)、

(f) 前立腺 (例えば、慢性細菌性前立腺炎)、

(g) 骨 (例えば、骨髄炎)、

(h) 肺 (例えば、肺炎などのう胞性線維症における炎症)、

(i) 腎臓 (例えば、伝染性腎結石および腹膜透析において)、および/あるいは

30

(j) 皮膚。

【0026】

更なる実施形態において、バイオフィルムは、不活性な支持体に関連している。このように、バイオフィルムは、ヒトまたは動物の体に移植されたあるいはその他の挿入された装置の表面において成長または成長が可能である。

【0027】

例えば、上述の併用療法は、次の身体内の不活性な表面の一つに成長する微生物バイオフィルムに関連する感染を治療または防止するために用いられる。

(a) カテーテル (例えば、血管内あるいは尿路用途)、

(b) ステント (例えば、冠状動脈のステント)、

40

(c) シャント (例えば、中枢神経系のシャント)、

(d) 挿入管または気管切開チューブ、

(e) 眼科の装置 (例えば、コンタクトレンズ、強膜バックル、眼球内レンズ)、

(f) 人工関節 (すなわち、関節形成やその他の整形外科装置の移植)、

(g) 人工心臓弁、および/または

(h) 乳房インプラント。

【0028】

このように、上述の併用療法は、院内感染の治療や予防に特に適していることが理解されるであろう。

【0029】

50



一つの実施形態において、バイオフィルムはグラム陰性および/またはグラム陽性の細菌を含んでいるか、またはそれらから成る。

【0030】

このように、細菌は、ブドウ球菌 (*Staphylococci*) あるいは連鎖球菌 (*Streptococci*) からなる群から選ばれる細菌などグラム陽性細菌である。例えば、この細菌は、黄色ブドウ球菌 (例えば、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌、MRSA) 等のブドウ球菌である。あるいは、この細菌は、ミュータンス連鎖球菌 (*Streptococcus mutans*) および/またはサンギス菌 (*Streptococcus sanguis*) など連鎖球菌である。

【0031】

細菌は、またレジオネラなどのグラム陰性細菌である。

【0032】

一つの好ましい実施形態において、バイオフィルムは、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus mitis*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌 (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)、メシチリン感受性黄色ブドウ球菌 (*methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*)、化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、ミュータンス連鎖球菌 (*Streptococcus mutans*)、サンギス菌 (*Streptococcus sanguinis*)、レジオネラニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*)、およびそれらの混合物からなる属から個別に選ばれる細菌を含んでいる。

【0033】

このように、該バイオフィルムは、肺炎連鎖球菌、ストレプトコッカス・ミティス、緑膿菌、インフルエンザ菌、あるいはこれらの混合物らから個別に選択される細菌を含んでいる。

【0034】

例えば、バイオフィルムは、ストレプトコッカス・ミティスおよび/あるいは肺炎連鎖球菌などの連鎖球菌を含むか、あるいはこれらから成っている。

【0035】

本発明の併用療法は、患者に、薬剤的有効量が投与される。ここで用いられる「治療上有効量」、または「有効量」、または「治療上有効」は、付与の状況や服用の摂生計画において、治療効果 (例えば、細菌性バイオフィルムの成長を根絶する、大きさを減少させる、あるいは遅らせることなど) をもたらす量を言う。この量は、必要な添加物や希釈剤、すなわち、支持体や服用賦形剤など、と関連する、望まれる治療効果を生み出すための計算された活性な物質のあらかじめ決められた量である。さらに、この量は、宿主の活性、機能、および応答における臨床的に著しい欠損を、抑えるか、あるいは最も好ましくは防ぐための治療上有効な量を意味する。あるいは、治療上有効量とは、宿主の臨床上著しい状況を改善するための十分な量である。当行者に理解されるように、化合物の量は、その特定の活性によって多様に異なる。服用適量は、必要な希釈剤と関連した、望ましい治療効果を引き起こすためにあらかじめ決められた量の活性組成物を含んでいる。本発明の組成物の製造方法と適用法において、治療上有効量の活性成分が提供される。治療上有効量は、当業界でよく知られているように、通常の技量を持つ医学または獣医学の当業者であれば、年齢、体重、性別、状態、合併症、その他の病気、等の患者の特性に基づいて決めることができる。薬剤的有効量の投与は、個別の服用単位あるいは、複数のより少ない服用単位の形での一回の投与か、小分けにされた一回分の服用量を特定の期間ごとに複数回に分けて投与するか、両方で実行することができる。あるいは、長い期間にわたる継続的

10

20

30

40

50

な点滴として投与してもよい。

【0036】

始めに、本発明の併用療法における非常に重要な成分は、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドである。

【0037】

セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、タンパク質のペプチド結合、ここでセリンはポリペプチドの活性点において求核アミノ酸として働くのであるが、を開裂させることができ、また自然発生的または非自然発生した触媒的ポリペプチドを含んでいる (EC Number 3.4.21により定義されている)。セリンプロテアーゼ活性は、キモトリプシンのような (すなわち、トリプシンや、キモトリプシン、やエラスターゼ) またはスブチリシンのようなものである。

10

【0038】

一つの実施形態において、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、トリプシン活性を禁ずる。例えば、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、真核生物起源または原核生物起源の自然発生的なトリプシンであるか、またはトリプシンの突然変異したものである。特定の含まれるのは、タイセイヨウマダラ (*Gadus morhua*)、大西洋および太平洋サケ (例えば、*Salmon salar*、*Oncorhynchus* の種)、スケトウダラ (*Theragra chalcogramma*) からのトリプシンやそれらの突然変異体 (以下に示す) などの低温適応トリプシンである。

20

【0039】

トリプシンの三つの主だったアイソザイムは、タイセイヨウマダラから特徴づけられ、トリプシン I、II、とIIIと呼ばれる (参照、Asgeirsson et al., 1989, Eur. J. Biochem. 180: 85-94、ここに開示されていることは、本出願の参照として組み込まれる)。例えば、GenBank登録番号AC090397参照。

【0040】

加えて、タイセイヨウマダラは、キモトリプシンの二つの主だったアイソザイムを表し、キモトリプシンAとBと名付けられている。(参照、Asgeirsson & Bjarnason, 1991, Comp. Biochem. Physiol. B998: 327-335、ここに開示されていることは、本出願の参照として組み込まれる)。例えば、GenBank登録番号CAA55242.1参照。

30

【0041】

一つの実施形態において、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、タイセイヨウマダラ (*Gadus morhua*) のトリプシンアミノ酸配列と少なくとも70%の配列が一致するアミノ酸配列を含んでいるか、またはその配列から成っている、すなわち、SEQ ID NO: 1、

16

I

I VGGYECKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSLVSKDWWSAAHCYKSVLRVRLGEHHIRVNEG

79

I

TEQYI SSSSVIRHPNYSSYNINNDIMLI KLTKPATLNQYVHAVALPTECAADATMCTVSG

141

I

WGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMI TQSMFCAGYLEGGKDCSQGDSGGPV

200

I

VCNGVLQGVVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWVRDTMANY

[SEQ ID NO: 1]

(ここで、アミノ酸配列と番号は、タンパク質立体構造データバンク[PDB]エントリー

40

50

「2EEK」に従っている)。

【0042】

多くのプロテアーゼのように、タイセイヨウマダラからのトリプシンIは、成熟した活性なトリプシンを生成するために切りはなされたプロペプチド(または「活性化」)配列を含む不活性前駆体、あるいは酵素原、として生成される。トリプシンのための初期発現生成物は、シグナル配列、これは除去された次の発現であるが、も含んでいる。

【0043】

シグナル配列を含んでいる、タイセイヨウマダラからのトリプシンIのための酵素原配列は、SEQ ID NO: 2 (ユニプロットデータベース登録番号P16049-1と対応する)。

10

【0044】

【表1】

10	20	30	40	50
<u>MKSLIFVLLL</u>	<u>GAV</u> <i><b>FAE</b>EPKI</i>	VGGYECKHS	QAHQVSLNSG	YHFCGGSLSV
60	70	80	90	100
KDWVVSAAHC	YKSVLRVRLG	EHHIRVNEG	EQYISSSSVI	RHPNYSSYNI
110	120	130	140	150
NNDIMLILT	KPATLNQYVH	AVALPTECAA	DATMCTVSGW	GNTMSSVADG
160	170	180	190	200
DKLQCLSLPI	LSHADCANSY	PGMITQSMFC	AGYLEGGKDS	CQGDSGGPW
210	220	230	240	
CNGVLQGVVS	WGYGCAERDH	PGVYAKVCVL	SGWVRDTMAN	Y

20

[SEQ ID NO: 2]

30

【0045】

ここで、  
シグナルペプチド = アミノ酸 1 から 13 (下線付き)  
プロペプチド = アミノ酸 14 から 19 (太字斜体)  
成熟トリプシン = アミノ酸 20 から 241

【0046】

ここで用いられる「アミノ酸」の用語は、標準的な20の遺伝子的に暗号化されたアミノ酸と、これらに対応するD-型(自然のL-型と比較すると)立体異性体、オメガアミノ酸およびその他の自然発生のアミノ酸、従来にないアミノ酸(例えば、 $\beta$ -二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、等)、および化学的に派生されたアミノ酸である(以下参照)。

40

【0047】

アミノ酸が「アラニン」、「Ala」、または「A」などのように特定の列挙されている場合、明確な言及がなければそれらは、L-アラニンとD-アラニンの両方のことである。

【0048】

アミノ酸が「アラニン」、「Ala」、または「A」などのように特定の列挙されてい

50

る場合、明確な言及がなければそれらは、L - アラニンとD - アラニンの両方をさす。その他の従来にないアミノ酸も、望ましい機能が、ポリペプチドによって保たれる限り、本発明のポリペプチドの成分として適当である。ポリペプチドを示すため、記号化された各アミノ酸残基は、適当な所では、通常のアミノ酸の慣用名に対応して、一文字で表わされている。

【0049】

通常通り、ここではアミノ酸配列は、N末端からC末端への方向であらわされている。

【0050】

通常、本発明の組成物中に採用されているポリペプチドは、L - アミノ酸を含むか、あるいはそれらから成る。

【0051】

セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、SEQ ID NO : 1と少なくとも80%、85%、90%、95%、95%、97%、98%または99%の配列相同性を持っているアミノ酸配列を含んでいるか、またはそれらから成っていてもよい。

【0052】

このように、一つの実施形態において、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、SEQ ID NO : 1のアミノ酸配列を含んでいるか、またはそれらから成っていてもよい。

【0053】

該ポリペプチドは、あるいは、SEQ ID NO : 1の突然変異体または変異体のアミノ酸配列を含んでいるか、またはそれらから成っている。「変異体」は、ポリペプチドが、SEQ ID NO : 1と100%相同なアミノ酸配列を持っていないことを意味する、すなわち、SEQ ID NO : 1の一つまたは二つ以上のアミノ酸が突然変異していなければならない。例えば、該ポリペプチドは、SEQ ID NO : 1のアミノ酸配列と少なくとも50%相同なアミノ酸配列を含んでいるか、またはそれらから成っており、より好ましくは、該配列に少なくとも60%、70%、または80%または85%または90%の相同性、さらにより好ましくは、該アミノ酸配列に少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の相同性である。このように、アミノ酸が特定の位置で除かれているか置換されていてもよく、一つあるいは二つ以上のアミノ酸が挿入/加えられていてもよい。当業者であれば、置換とは、伝統的であっても、非伝統的であってもよいことは理解されるであろう。

【0054】

相同性百分率は、例えば、LALIGNプログラム (Huang and Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12: 337 - 357, ここに開示されていることは、本出願の参照として組み込まれる) Expasy 施設サイト: ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) で、グローバルアライメントオプション、得点マトリックスBLOSUM62、ギャップ開始ペナルティー 14、ギャップ伸展ペナルティー - 4パラメータとして用いて計算される。あるいは、二つのポリペプチド間の配列の相同性百分率は、適当なコンピュータプログラムを用いて計算できる。例えば、ウインズコンシン大学の遺伝子電子計算グループのギャッププログラムや光学的に配列されたポリペプチドとの関連づけで相同性百分率は計算できると理解されたい。

【0055】

該整列は、あるいは、Clustal W Program (Thompson et al, 1994, Nucl. Acid Res. 22: 4673 - 4680に記載されているように、またこの内容は本出願に参照として組み込まれる)によって実行することもできる。用いられるパラメータは以下のとおりである。

- 高速対整列化パラメータ (fast pair-wise alignment parameters): K - 組 (語) サイズ (K-tuple (word) size); 1、ウィンドウサイズ (window size); 5、ギャップペナルティ (gap penalty); 3、上位対角線の数 (number of top diagona

10

20

30

40

50

1 s ) ; 5、得点法 : x percent。

【0056】

- 多重整列化パラメータ ( Multiple Alignment parameters ) : ギャップ開始ペナルティー ( gap open penalty ) ; 10、ギャップ伸展ペナルティー ( gap extension penalty ) ; 0.05。

- 得点マトリックス: B L O S U M。

【0057】

あるいは、局所配列の整列化を決定するために B E S T F I T プログラムが用いられてもよい。

【0058】

このように、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、Enzymatica A B への国際出願番号 P C T / G B 2 0 1 5 / 0 5 1 0 0 6 ( 公開番号 W O 2 0 1 5 / 1 5 0 7 9 9 ) にあるように、S E Q I D N O : 1 の変異体であってもよい。

【0059】

当業者であれば、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、二者択一的に上記定義されたアミノ酸配列のいずれかの断片、この断片は抗細菌活性を示すものであるが、を含むか、またはこれらから成ることを理解するであろう。

【0060】

「断片」とは、限定はしないが、S E Q I D N O : 1 または 2 などの、上記アミノ酸配列のいずれかの少なくとも隣り合う 5 個のアミノ酸を言う。例えば、断片は、上記アミノ酸配列のいずれかの少なくとも 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、あるいはそれ以上の隣り合うアミノ酸を含んでいる。

【0061】

抗微生物 ( すなわち、抗細菌性 ) 活性を保つ、上に定義されたセリンプロテアーゼポリペプチドの相同性を確かめる方法は当分野で公知である。例えば、異なる断片の連なりは、W O 2 0 1 5 / 1 5 0 7 9 9 に記載されている発現方法を用いて、公知の組換え方法論によって生成され、その後、試験管内で代表的な微生物 ( 細菌種、ウイルスおよび / あるいは真菌種など ) に曝露され、どの断片が該微生物の成長および / あるいは増殖を ( 部分的または全面的に ) 禁じているかを決定した。

【0062】

一つの特に好ましい実施形態において、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、自然発生のセリンプロテアーゼのアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらから成る。このように、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、真核生物起源または原核生物起源の、自然発生のトリプシンのアミノ酸配列から成る。特定的に含まれるのは、タイセイヨウマダラ ( Gadus morhua )、大西洋および太平洋サケ ( たとえば、Salmon salar、Onco rhynchus の種 )、スケトウダラ ( Theragra chalcogramma ) からのトリプシンなどの低温適応トリプシンである。例えば、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、S E Q I D N O : 1 のアミノ酸を含むか、または、これらから成る。

【0063】

その様な、自然発生のセリンプロテアーゼは、源生物 ( 例えば、タイセイヨウマダラ ) から精製または組換えによって発現してもよい。

【0064】

このように、当業者であれば、そのような自然発生の本発明のセリンプロテアーゼポリペプチドは、自然界で見つけれられたものと異なる形で提供し得ることを理解するであろう。例えば、本発明のポリペプチドは、自然発生の真核生物トリプシンのアミノ酸配列から成ってもよいが、自然界に発現されるタンパク上に存在するグリコシル化成分は欠いている。

【0065】

10

20

30

40

50

該ポリペプチド成分は、用いられているセリンプロテアーゼの効能／毒性によって、様々な濃度で調剤することができる。好ましくは、該処方は、活性薬剤を、例えば少なくとも $0.01\mu$ 、少なくとも $0.1\mu$ 、少なくとも $1\mu$ 、少なくとも $10\mu$ 、少なくとも $100\mu$ 、または少なくとも $500\mu$ など、少なくとも $0.001\mu$ の濃度で含んでいる。都合よくは、活性薬剤を、例えば $500\mu$ まで、 $100\mu$ まで、 $10\mu$ まで、 $1\mu$ まで、 $0.1\mu$ まで、あるいは $0.01\mu$ までなど、 $1\text{mM}$ の濃度で含んでいる。一つの実施形態において、セリンプロテアーゼポリペプチドは $0.001$ から $10\mu$ までの間の濃度で処方に含まれている。このように、治療的処方ではポリペプチドをバイオフィーム群の細菌の成長を死滅あるいは遅らせるのに十分な量で含んでいる。

【0066】

この態様の一つの実施形態において、セリンプロテアーゼポリペプチド（例えば、タラトリプシン）の活性は、 $0.001\text{U/g}$ から $32\text{U/g}$ である。

【0067】

本発明の併用療法の重要な、更なる成分は、一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物である。

【0068】

公知の抗生物質のいずれも用いることができる。例えば、一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物は、アモキシシリン、アンピシリン、アジスロマイシン、カルバペネム、セフトキサシム、セフトリアキソン、セフロキシム、セファロスポリン、クロランフェニコル、シプロフロキサシン、クリンダマイシン、ダラシン、ダルフォプリスチン、ダブトマイシン、ドキシサイクリン、エルタペネム、エリスロマイシン、フルオロキノロン、メロペネム、メトロニダゾール、ミノサイクリン、モキシフロキサシン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリン、キヌプリスチン、リファンピン、スルファメトキサゾール、テイコプラニン、テトラサイクリン、トリメトプリム、バンコマイシン、バシトラシン、ポリミキシンB、およびそれらの混合物である。

【0069】

一つの好ましい実施形態において、一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が、テトラサイクリン、セフトキサシム、バンコマイシン、エリスロマイシン、およびオキサシリンからなる群から選ばれる。

【0070】

当業者であれば、本発明の併用療法は、単一の抗生物質化合物か複数の抗生物質化合物から成ることを理解するであろう。

【0071】

本発明の併用療法において用いられる抗生物質の濃度は、該分野の一般常識に従って、用いられる特定の抗生物質と治療されるバイオフィームの兆候および／または位置によって決まる。一般的には、抗生物質は、例えば $0.1$ から $5\%$ （重量で）など、 $0.1\%$ から $5\%$ （重量で）の間の濃度で処方されるであろう。

【0072】

本発明の第二の関連する態様は、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドの患者内の細菌性バイオフィーム治療への使用であるが、ここで該ポリペプチドは一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物と組み合わせ用いられる。

【0073】

本発明の第三の関連する態様は、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドを患者内の細菌性バイオフィームの治療用の薬剤の調合に提供することであるが、該ポリペプチドは一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物と組み合わせ用いられる。

【0074】

本発明の第二および第三の態様との関係で用いられるのに適したセリンプロテアーゼポリペプチドと抗生物質化合物の例としては上に詳述している。

【0075】

本発明の第四の態様は、医薬的に許容される緩衝剤、賦形剤、希釈剤、あるいは支持体と

10

20

30

40

50

ともに ( a ) セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドと ( b ) 一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物を含んでいる医薬組成物を提供する。

【 0 0 7 6 】

本発明の第四の態様との関係で、用いるのに適したセリンプロテアーゼポリペプチドと抗生物質化合物の例としては上に詳述している。

【 0 0 7 7 】

一つの実施形態において、セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、例えば少なくとも  $0.01\mu$  、少なくとも  $0.1\mu$  、少なくとも  $1\mu$  、少なくとも  $10\mu$  、少なくとも  $100\mu$  、あるいは少なくとも  $500\mu$  など、少なくとも  $0.001\mu$  の濃度で存在する。都合よくは、該組成物は、活性薬剤を、例えば  $500\mu$  まで、 $100\mu$  まで、 $10\mu$  まで、 $1\mu$  まで、 $0.1\mu$  まで、あるいは  $0.01\mu$  までなど、 $1\text{mM}$  の濃度で含んでいる。一つの実施形態において、セリンプロテアーゼポリペプチドは  $0.001$  から  $10\mu$  までの間の濃度で該組成物に含まれている。

10

【 0 0 7 8 】

タラから得られるトリプシンを用いる場合、組成物におけるその濃度は、 $0.001\text{U/g}$  から  $32\text{U/g}$  (すなわち、最終組成物の1グラム中の活性単位として測定される) である。

【 0 0 7 9 】

一つの実施形態において、一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物は、重量で  $0.1\%$  から  $5\%$  、例えば  $0.1\%$  から  $2\%$  、 $0.5\%$  から  $1.5\%$  、好ましくは  $1\%$  の濃度で存在する。

20

【 0 0 8 0 】

医薬組成物は、当該分野で公知の、ヒトや動物に投与するため、十分保存に対して安定であり適した方法で調剤することができる。例えば、該治療組成物は、例えば、凍結乾燥、スプレー冷却、臨界粒子形成から粒子形成を使用することによって、高減圧化で凍らせ乾燥されてもよい。

【 0 0 8 1 】

「医薬的に許容できる」とは、本発明のポリペプチドのトリプシン活性の効果を減じない無毒性の物質のことを言う。その様な医薬的に許容できる緩衝剤、支持体、あるいは賦形剤は当該分野でよく知られている。(参照、Remington's Pharmaceutical Science, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) and handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000), この開示は参照として本明細書に組み込まれる)。

30

【 0 0 8 2 】

「緩衝剤」の用語は、pHを安定化させる目的を持つ酸塩基混合物を含む水溶液を意味する。緩衝剤の例としては、Trizma、Bicine、Tricine、MOPS、MOPSO、MOBS、トリス、ヘプス、HEPBS、MES、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、グリコール酸塩、乳酸塩、ホウ酸塩、ACES、ADA、酒石酸塩、AMP、AMPD、AMP SO、BES、CABS、カコジル酸塩、CHES、DIPSO、EPPS、エタノールアミン、グリシン、HEPPSO、イミダゾール、イミダゾール乳酸、PIPES、SSC, SSPE, POPSO、TAPS、TABS、TAPSO、およびTESがある。

40

【 0 0 8 3 】

「希釈剤」の用語は、治療調剤におけるペプチドを希釈する目的を持つ水溶性あるいは非水溶性溶液を意味する。希釈剤は、生理食塩水、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノール、あるいは油(例えば、紅花油、トウモロコシ油、ピーナッツオイル、あるいはごま油)のうちの一つあるいは二つ以上である。

【 0 0 8 4 】

50

「賦形剤」は、炭水化物、高分子、脂質、および鉱物のうちの二つあるいは二つ以上である。炭水化物の例としては、乳糖、ブドウ糖、しょ糖、マンニトール、およびシクロデキストリンがあり、これらは、例えば親油性化を促進するために組成物に加えられる。高分子の例としては、デンプン、セルロースエーテル、セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、アルギニン酸塩、カラギーナン、ヒアルロン酸とその誘導体、ポリアクリル酸アクリル酸、ポリスルフォネート、ポリエチレングリコール/ポリエチレンオキサイド、ポリエチレンオキサイド/ポリプロピレンオキサイド共重合体、加水分解の程度が異なるポリビニルアルコール/ポリビニルアセテート、およびポリビニルピロリドンがあり、これらはすべて異なる分子量を持ち、例えば、粘性の調整のためや、パイオ付着を達成するため、あるいは化学的およびタンパク分解による分解から保護するために組成物に加えられる。脂質の例としては、すべて異なるアシル鎖長と飽和を持つ脂肪酸、リン脂質、モノ-、ジ-、およびトリ-グリセリド、セラミド、スフィンゴ脂質および糖脂質、また卵レシチン、大豆レシチン、水添された卵および大豆レシチンがあり、これらは高分子と同じような理由により組成物に加えられる。鉱物の例としては、タルク、酸化マグネシウム、酸化亜鉛、および酸化チタンがあり、これらは液体の蓄積の低減や優れた含量特性の利を得るため組成物に加えられる。

10

#### 【0085】

一つの実施形態において、ポリペプチドは、塩化カルシウムなど安定化剤とともに提供される。

20

#### 【0086】

さらに、本発明の組成物に含まれるものは、紫外線吸収剤（例えば、N,N-ジメチルメチルPABA、オクチルエステル、オクチルメチル桂皮酸エステル、ブチルメトキシジベンゾイルメタン、モノ-2-エチルジ-P-メトキシ桂皮酸エステル、グリセリルヘキサ酸エステル2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン、2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン-5-ナトリウムスルフォネート）、低級アルコール（例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール）、保存剤（例えば、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、フェノキシエタノール）、殺菌剤（例えば、クロロヘキシジン、塩酸塩、トリクロロカルバニリド、トリクロサン、ジシクロピリチオン）、銀（例えば、銀単体、酸化銀、硝酸銀、スルファジアジン銀、銀ナノ粒子）、着色剤（例えば、染料、顔料）、香味料（例えば、メントール、カンファ、チモール、ユーカリプトル）、粉末、香料（例えば、エッセンシャルオイル、動物有機体の香料、人工香料）、ビタミン（例えば、ビタミンAとその誘導体、ビタミンEとその誘導体、ビタミンCとその誘導体、パントテン酸、ビタミンH、ビタミンBとその誘導体）、尿素、水溶性高分子（例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニル高分子、キサンタンガム、ヒアルロン酸）、緩衝剤（例えば、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン、アスパラギン酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム）、抗生物質、抗真菌剤、抗ウイルス剤、および抗寄生虫薬であってよい。

30

#### 【0087】

セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドは、ポリペプチド剤の放出に適していると知られているいかなるタイプの治療組成物として処方することができる。

40

#### 【0088】

一つの実施形態において、該ポリペプチドと抗生物質化合物は、水、生理食塩水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノールあるいは油（紅花油、トウモロコシ油、ピーナッツオイル、綿実油、ごま油など）、トラガカントガムおよび/または種々の緩衝剤に単純に溶解してもよい。例えば、ポリペプチドが経口投与（口中スプレーなど）として処方される場合、治療組成物は、水、グリセロールやメンソールに溶解したポリペプチドを含んでいる。口中スプレー調剤の例としては、Cold Zyme（登録商標）（Enzymatica AB社製造，Lund，Sweden）としてスキャンジナビア内で市販されている。

50



## 【0089】

ある好ましい実施形態において、本発明は、上述のポリペプチドと抗生物質化合物を浸透圧的に活性な溶液として提供する。例えば、該ポリペプチドと抗生物質化合物は、グリセロールまたはグリセリン中に調剤される。理論に束縛されることは望まないが、そのような浸透圧的に活性な溶液は、微生物細胞から細胞外環境へと液体の移動を促進するものと思われる。このことが、例えば、中咽頭などの上皮細胞による細菌やウイルスなどの微生物細胞の取り込みを禁ずる（少なくとも部分的に）薄く活性な障壁を作ることによって、順に本発明のポリペプチドの治療効果を促進するものと思われる。

## 【0090】

更なる実施形態において、本発明の治療組成物は、他の医薬的に許容できる支持体に加え、ミセルのような凝集体、不溶性単層、あるいは液晶として存在する脂質などの両親媒性薬剤とともに、該ポリペプチドと抗生物質化合物が組み合わされている形状である、リポソームの形状をしている。リポソーム処方に適した脂質は、限定はしないが、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リソレシチン、リン脂質、胆汁酸、等である。適した脂質は、また、血流循環時間を引き延ばすため水溶性頭部において、ポリ（エチレングリコール）によって修飾された上記脂質も含む。その様なリポソーム製剤の調剤は、例えばUS 4,235,871に見出すことができ、ここに開示されている内容は、参照として本明細書に組み込まれる。

10

## 【0091】

本発明の治療組成物は、また、生分解性の微粒子の形状でもよい。ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、PLAとPGAの共重合体（PLGA）またはポリ（カプロラクトン）（PCL）、およびポリ無水物が、微粒子の製造における生分解性重合体として広く用いられてきた。その様な微粒子製剤は、US 5,851,451およびEP 0213303に見出すことができ、ここに開示されている内容は参照として本明細書に組み込まれる。

20

## 【0092】

更なる実施形態において、本発明の治療組成物は、ポリマーゲルの形状で提供され、ここでデンプン、セルロースエステル、セルロースカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸塩、カラギーナン、ヒアルロン酸およびその誘導体、ポリアクリル酸、ポリビニルイミダゾール、ポリスルフォネート、ポリエチレングリコール/ポリエチレンオキサイド、ポリエチレンオキサイド/ポリプロピレンオキサイド共重合体、加水分解の程度の異なるポリビニルアルコール/ポリビニルアセテートおよびポリビニルピロリドンなどのポリマーが、ペプチドを含む溶液の濃度を濃くするために用いられる。ポリマーはまたゼラチンあるいはコラーゲンを含んでいてもよい。

30

## 【0093】

本発明の治療組成物は、ポリペプチドの相乗効果のためイオンや所定のpHを含んでいる。加えて、該組成物は、殺菌などの従来の治療用処理がほどこされまた/あるいは防腐剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝剤、フィラーなどの従来の補助剤を含んでいてもよい。

40

## 【0094】

一つの好ましい実施形態において、治療組成物は、EDTA、キシリトール、ソルビトール、プロピレングリコール、およびグリセロールのうちの一つあるいは二つ以上とともに、のポリペプチドと抗生物質化合物をトリスまたはリン酸緩衝液に含んでいる。

## 【0095】

本発明による治療組成物は、当業者によく知られており、適している、いずれかの経路を通して服用することができる。このように、可能性のある服用経路は、吸引、舌下、非経口（静脈内、皮下、髄腔内）、局所、眼、鼻、肺、非経口、膣、および直腸を含んでいる。また、移植によっても可能である。

## 【0096】

50

ある選択的实施形態において、該治療組成物は非経口的、例えば、静脈的、脳室内的、関節腔内、動脈内、腹腔内、髄腔内、側脳室内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、あるいは皮下に服用でき、あるいは該組成物は融合技術によって服用することができる。該組成物は、他の物質、例えば血液と等張にするための塩やブドウ糖、を含む無菌の水溶液の形で簡便に用いることができる。必要ならば、該水溶液は、適するように（好ましくは、pH 3 から 9 に）緩衝されるべきである。適した非経口処方薬の調剤は、無菌の条件下で、当業者に公知の標準的医薬的技術をもってたやすく成し得る。

【0097】

非経口投与に適した処方剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌薬、および目的とする受容者の血液と処方剤を等張にするための溶質を含む水溶性また非水溶性の無菌の注射液と、さらに懸濁剤および増ちょう剤を含む水溶性また非水溶性の無菌の懸濁液とを含んでいる。該処方剤は、封止されたアンプルや薬びんなどの、ユニットドースまたはマルチドース容器に入れられ、凍結乾燥（高減圧凍結乾燥）条件下で保存され、使用直前に、無菌の液体支持体、例えば水、を注射用に加えればよい様にされている。用事注射溶液および懸濁液は、すでに述べた種類の無菌の粉末、顆粒、および錠剤から準備できる。

10

【0098】

あるいは、該治療組成物は、鼻腔内的にあるいは吸引により投与してもよい（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンや、1, 1, 1, 2 - テトラフルオロエタン、(HFA 134A3 あるいは 1, 1, 1, 2, 3, 3, 3 - ヘプタフルオロプロパン (HFA 227EA3) などのハイドロフルオロアルカン、二酸化酸素、あるいはその他の適したガスなど適当な高圧ガスを用いて、加圧容器、ポンプ、スプレーまたはディスペンサーからエアゾールスプレイの形式による）。加圧エアゾールの場合、服用量単位は、測定された量を送り出すために弁を提供することで決められる。加圧容器、ポンプ、スプレーまたはディスペンサーは、例えば、エタノールと高圧ガスの混合物、この混合物はさらにソルビタントリオレートなどの潤滑剤を含んでいてもよいが、を用いた活性ポリペプチド溶液または懸濁液を含んでいる。吸引器あるいは注入器内で使用されるためのカプセルやカートリッジ（例えば、ゼラチンから作られている）は、本発明の化合物の粉末混合物と乳糖あるいはデンプンなど適した粉末塩基を含むように処方される。

20

【0099】

より発展的には、ポリペプチドは、気道の粘膜へ届けるのにふさわしい形で提供される。

30

【0100】

本発明の第四の態様は、患者の固形腫瘍を治療するための方法を提供するが、この方法は、治療的に有効な量の (a) セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドと (b) 一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物を患者に投与することを含んでいる。

【0101】

本発明の第五の態様との関係において用いられる、適したセリンプロテアーゼポリペプチドと抗生物質化合物の例は上に詳述している。

【0102】

「治療」は、組み合わせられた治療剤の治療的および予防的両方の用法を含んでいる。当業者であれば、併用療法とは、細菌性バイオフィルムを完全に死滅させること、あるいは部分的受益（バイオフィルムを構成する細菌群の大きさの減少および/またはバイオフィルムを構成する細菌群の成長を遅延）を与えることであると理解するであろう。

40

【0103】

一つの実施形態において、患者はヒトである。しかし、本発明の方法は、例えば、ペット動物および/あるいは農場家畜（犬、猫、馬、牛、豚、羊、等を含む）内の細菌性バイオフィルムの処置など、獣医学的環境でも有用である。

【0104】

当業者であれば、ここで述べられた方法は、バイオフィルムが見つけれられるあらゆる環境において、微生物バイオフィルムを死滅させる、禁ずる、または防止するために用いられ

50

ることを理解するであろう。このように、バイオフィルムは、不活性支持体あるいは生きている支持体いずれかと関連している。

【0105】

一つの実施形態において、バイオフィルムは、生きている支持体と関連している（上記参照）。例えば、バイオフィルムは、ヒトあるいは動物の身体内で表面上に成長するかまたは成長しやすい。このように、本発明は、バイオフィルムの存在または成長と関連した状況の治療あるいは防止用に、上に定義した化合物を提供することである。例えば、患者は、バイオフィルム形成と関連して、上気道および/または下気道が感染しているか、あるいは感染しやすい。

【0106】

更なる実施形態において、バイオフィルムは不活性支持体と関連している（上記参照）。このように、バイオフィルムは、ヒトあるいは動物の身体内で移植されたあるいは別に挿入された装置の表面に成長するか成長しやすい。

【0107】

このように、ここで述べられた方法は、特に院内感染の治療や防止に特に適していることは理解されるであろう。

【0108】

一つの実施形態において、バイオフィルムは、グラム陰性および/またはグラム陽性細菌を含むかまたはそれらの細菌から成る。

【0109】

このように、細菌は、ブドウ球菌または連鎖球菌からなる群から選ばれるようなグラム陽性細菌である。例えば、細菌は黄色ブドウ球菌（例えば、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌、MRSA）などのブドウ球菌である。あるいは、細菌は、ミュータンス連鎖球菌および/またはサンギス菌などの連鎖球菌である。

【0110】

細菌は、また、レジオネラなどグラム陰性細菌である。

【0111】

一つの好ましい実施形態において、バイオフィルムは、肺炎連鎖球菌、ストレプトコッカス・ミティス、緑膿菌、インフルエンザ菌、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌、メシチリン感受性黄色ブドウ球菌、化膿性連鎖球菌、ミュータンス連鎖球菌、サンギス菌、レジオネラニューモフィラ、クロストリジウム・ディフィシル、およびそれらのあらゆる混合物が個々に選ばれる細菌を含んでいる。

【0112】

例えば、該バイオフィルムは、ストレプトコッカス・ミティスおよび/または肺炎連鎖球菌などの連鎖球菌である。

【0113】

本発明の方法において、併用療法は、患者に薬剤的有効量で投与する。ここで用いられている、「治療上有効量」、または「有効量」、または「治療上有効」は所与の条件と投与の摂生法に対し治療効果をもたらす量をいう（上記参照）。

【0114】

本発明の第六の態様は、本発明の第一の態様に従った併用療法の有効量を患者に放出するための医療装置を提供することであり、該装置は、本発明の第四の態様に従った組成物の貯蔵器と該組成物を該装置から放出する手段を含んでいる。

【0115】

例えば、該装置は、本発明の第一の態様に従った併用療法を気道の粘膜にまで放出するのに適した口中スプレーあるいは鼻腔スプレーである。

【0116】

一つの実施形態において、本発明は、上述の組成物で飽和されているか、塗布されているか、さもなければ処置されている移植可能な医療装置を提供する。

【0117】

10

20

30

40

50

例えば、該医療装置は、血管内装置、カテーテル、シャント、挿入管または気管切開チューブ、眼科の装置、人工関節、人工心臓弁、および乳房インプラントからなる群から選ばれる移植可能な医療装置である。「移植可能な装置」には、例えばコンタクトレンズなど、身体の内面または外面に装着される装置を含む。

【0118】

該移植可能な医療装置は、使用前は、封止された無菌の容器に包装されていることが好ましい。

【0119】

本発明の第七の態様は、生体外で細菌性バイオフィルムの成長を死滅させる、禁ずる、あるいは防止するための方法を提供することであり、該方法は、バイオフィルム（あるいはバイオフィルムの成長が防止されるべき表面）を本発明の第一の態様に従った併用療法に曝すことを含んでいる。例えば、上に述べた本発明の組成物は、家庭内環境（例えば、台所作業表面、シャワー、パイプ、床、等）あるいは、商用または工業環境（例えば、冷却システム内、パイプ、床表面、等）などの表面や基材上の微生物バイオフィルムの成長を防ぐための殺菌溶液あるいは洗い薬として用いてもよい。

10

【0120】

その様な洗い溶液は、さらに表面活性剤あるいは界面活性剤を含んでいてもよい。適した界面活性剤としては、陰イオン界面活性剤（例えば、脂肪族スルフォネート）、両性および/または双性イオン界面活性剤（例えば、脂肪族四級アンモニウム、フォスフォニウム、およびスルフォニウム化合物の誘導体）、および非イオン界面活性剤（例えば、脂肪族アルコール、酸、アミド、またはアルキルフェノールとアルキレンオキサイド）がある。便宜上、表面活性剤は、0.5から5重量%の濃度である。

20

【0121】

生体外および生体内の両方の使用において、本発明の組成物は、好ましくは、少なくとも5分間目的の表面に曝すのがよい。例えば、曝す時間は、少なくとも10分、20分、30分、40分、50分、1時間、2時間、3時間、5時間、12時間および24時間である。

【図面の簡単な説明】

【0122】

次の図は、本明細書の一部であり、本発明のある態様をさらに示すために含めた。本発明は、ここに示した特定の実施形態の詳細な説明と図と組み合わせて参照することにより、よりよく理解されるであろう。

30

【0123】

【図1】バイオフィルム離散に対するタラトリプシンと選択された抗生物質の組み合わせの効果。図は、タラトリプシンと選択された抗生物質の組み合わせが、それぞれ単独よりもバイオフィルムを崩壊させるのにより効果的であることを示している。肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィルムは、マイクロタイタープレート内で生育されバイオフィルムのモデルとして用いられた。バイオフィルムは、抗生物質、または抗生物質とタラトリプシンの組み合わせで処理された。バイオフィルムは、クリスタルバイオレットで染められ、次に酢酸に溶解された。バイオフィルムの形成は、492nmの光吸収によって測定され、未処理のバイオフィルムの基準に適合させた。研究の結果に基づいて、一定の抗生物質、この場合テトラサイクリン、エリスロマイシン、オキサシリンおよびセフォタキシム、とタラトリプシンの組み合わせが、抗生物質のみの場合に比べ細菌性バイオフィルムの崩壊により効果があることが結論付けられる。しかし、バンコマイシンは、トリプシンとの組み合わせで、モデルのバイオフィルムに対する効能の有意な増強は示されなかった。横棒上のP値は、スチューデントのt検定で評価した時、二つの処理法の違いが有意であることを示している。

40

【0124】

【図2】バイオフィルム離散に対するタラトリプシンと選択された抗生物質の組み合わせ

50

の効果バイオフィルム離散に対するタラトリブシンと選択された抗生物質の組み合わせの効果。図は、タラトリブシンと、テトラサイクリンまたはセフトキシムとの組み合わせが、いずれか単独よりバイオフィルムの崩壊により効果があることを示している。肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィルムは、マイクロタイタープレート内で生育されバイオフィルムのモデルとして用いられた。バイオフィルムは、タラトリブシン、抗生物質、またはこの二つの物質の組み合わせを用いて処理された。バイオフィルムは、クリスタルバイオレットで染められ、次に酢酸に溶解された。バイオフィルムの形成は、492 nmの光吸収によって測定され、未処理のバイオフィルムの基準に適合させた。研究の結果に基づいて、このモデルの場合、タラトリブシンと、抗生物質のテトラサイクリンまたはセフトキシムの組み合わせが、タラトリブシンまたは抗生物質のみの場合に比べ細菌性バイオフィルムの崩壊により効果があることが結論付けられる。横棒の上のP値は、ANOVA分析により評価したとき、効果の有意性を示している。

10

20

30

40

50

#### 【0125】

【図3】バイオフィルム離散に対するタラトリブシンと選択された抗生物質の組み合わせの効果。画像は、タラトリブシンと選択された抗生物質の組み合わせが、いずれか単独な場合に比べ、バイオフィルムの離散により効果があることを鮮明に可視化している。肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィルムは、マイクロタイタープレート内で生育された。該バイオフィルムは、タラトリブシン、抗生物質、またはこの二つの物質の組み合わせを用いて処理された。バイオフィルムは次にクリスタルバイオレットで染色された。研究の結果に基づいて、タラトリブシンと抗生物質の組み合わせが、抗生物質のみの場合に比べ細菌性バイオフィルムの崩壊により効果があることが結論付けられる。バンコマイシンにより示されるように、抗生物質によるバイオフィルムの処理はバイオフィルム形成を増強させるが、カラム7と8で証明されているように、タラトリブシンの存在によりその効果が相殺されている。

#### 【0126】

画像は、肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスから成るバイオフィルムを、4時間生育し、続いてタラトリブシン(c t)、抗生物質、またはタラトリブシン/抗生物質の組み合わせによる処理がなされた96ウェルプレートを示している。各カラムは、種類の処理または処理の組み合わせを表しており、一方列は、上から下へと濃度が下がっていることを示している。処理後、バイオフィルムは、クリスタルバイオレットで染色され、より暗い色はより多くのバイオフィルムが残っていることを示す。画像は、いずれのものでも単独より、抗生物質とタラトリブシンの組み合わせがより効果的であることを示している。このことは、薬剤単独ではバイオフィルム形成を増長するように見え、一方タラトリブシンとの組み合わせにおいては、バンコマイシンはタラトリブシンの効能を増強させることができるという点で、バンコマイシンの場合特に意味深い。最下の列はブランクを表し、そこでは最初の6穴は処理なしのバイオフィルムを表し次の6穴はバイオフィルムの不在を表す。左側の表は、各列/希釈で用いられたタラトリブシンと抗生物質の濃度を表す。

#### 【0127】

画像は、トリブシンがどのように一定の抗生物質の効能を増強しているのかを示している、おそらくバイオフィルム崩壊させそれによって抗生物質を細菌に近寄らせているのであろうと思われる。

#### 【0128】

【図4】クリスタルバイオレットによるバイオフィルムの染色後、可視的に表れたスーパーバイオフィルムにおけるタラトリブシンの効果。図は、バイオフィルムの不在がクリアウェルにより観察されるように、タラトリブシンがスーパーバイオフィルムを濃度依存方法で崩壊させることを示している。肺炎連鎖球菌

とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせによるスーパーバイオフィームは、マイクロタイタープレート内で生育された。該バイオフィームは、タラトリブシンまたはプラセボで2分間処理され、ウェルは、バイオフィームの存在（ブラックウェル）またはその不在（クリアウェル）を測定するために染色された。研究の結果に基づいて、タラトリブシンは、スーパーバイオフィームの崩壊において非常に効果的であることが結論付けられる。

#### 【0129】

写真画像は、96ウェルプレート、そこで肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスから成るバイオフィームが4時間生育され続いてタラトリブシンまたはプラセボで処理されたのであるが、そのプレートを示している。各カラムは、一つの濃度を表し、始めの三つの列は、タラトリブシン処理の複写物を表し、下の三つの列は同じ希釈でタラトリブシンなしの処方複写物を示している。処理後、バイオフィームはクリスタルバイオレットで染色され、暗い色はより多くのバイオフィームが残っていることを示した。該画像は、タラトリブシンが、高い濃度の時バイオフィームの除去に効果があり、しかし低い濃度の時には追加のファクターを必要としていることを示している。

10

#### 【0130】

【図5】スーパーバイオフィームにおけるタラトリブシンの効果クリスタルバイオレットによる染色と酢酸中への溶解後の分光光度法で測定されたスーパーバイオフィームにおけるタラトリブシンの効果。図は、タラトリブシンが、スーパーバイオフィームを濃度依存方法で崩壊させることを示している。肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィームは、マイクロタイタープレート内で生育された。該バイオフィームは、タラトリブシンまたはプラセボで処理され、ウェルは、クリスタルバイオレットで染色され、続いて酢酸で溶解された。バイオフィームの形成は、492nmの光吸収によって測定され、未処理のバイオフィームの基準に適合させた。研究の結果に基づいて、タラトリブシンは、細菌性バイオフィームの崩壊に非常に効果があることが結論付けられる。データは、平均値の標準誤差（SEM）のバーとともにバーにより表示されている。プラセボとタラトリブシンで処理された細菌性バイオフィームの希釈液のデータは、互いに隣合せてある。アスタリスク\*は、 $P < 0.05$ 、\*\*は、 $P < 0.01$ 、また\*\*\*は、 $P < 0.001$ を表すが、有意差の程度をアスタリスク（\*）で示してあるように、同じ希釈液のプラセボと比べ、P-酵素のバイオフィーム形成のログ削減は、横棒より上にある。スチューデントのt検定を用いて有意性を計算した。

20

30

#### 【0131】

【図6】異なる濃度でのタラトリブシンによるスーパーバイオフィームのログ削減異なる濃度でのタラトリブシンによるスーパーバイオフィームのログ削減。図は、タラトリブシンがスーパーバイオフィームを濃度依存方法で崩壊させることを示している。肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィームは、マイクロタイタープレート内で生育された。該バイオフィームは、タラトリブシンまたはプラセボで処理され、ウェルはクリスタルバイオレットで染色され、続いて酢酸で溶解された。バイオフィーム形成は、492nmの光吸収によって測定され、削減は対数表示でプラセボで処理されたバイオフィームと比べられた。研究の結果に基づいて、タラトリブシンは、8U/g以上の濃度で2分未満で、細菌性バイオフィームの崩壊に非常に効果的であることが結論付けられる。ここで、ログ削減の3は99.9%のバイオフィームの除去を表し、ログ削減の4は99.99%のバイオフィームの削減である。

40

#### 【0132】

【図7】タラトリブシンによる前処理のバイオフィーム形成における効果タラトリブシンによる前処理のバイオフィーム形成における効果。図は、37℃で96ウェルマイクロタイタープレート内の培養に先立ち、バイオフィームを形成する細菌、肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティス、へのタラトリブシンによる前処理は、その細菌のバイオフィーム形成能力に与える影響において濃度依存性を持つことを示している。タラトリブシンとプラセボで手短に処理された後、肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み

50

合わせを用いたバイオフィルムはマイクロタイタープレート内で生育された。該バイオフィルムを4時間成長させた後、ウェルはクリスタルバイオレットで染色され、続いて酢酸で溶解された。バイオフィルム形成は、492 nmの光吸収によって測定され、未処理のバイオフィルムの基準に適合させた。研究の結果に基づいて、タラトリブシンは、細菌性バイオフィルム形成の防止に非常に効果的であることが結論付けられる。データは、ボックスプロットで表わされ、ここで、上の四角は、第三四分位を示し、四角の中ほどに近い水平ラインは中央値を示し、下の四角は、第一四分位を示す。四角の上から縦のラインが伸び最大値を示し、四角の下から他の縦のラインが伸び最小値を示す。

【0133】

【図8】タラトリブシンによる前処理のバイオフィルム形成における効果  
 タラトリブシンによる前処理のバイオフィルム形成における効果。図は、浮遊する細菌のバイオフィルム形成を可能にするのに先立ち、該細菌がタラトリブシンにより処理される時、該トリブシンは、濃度依存方法でバイオフィルムの形成を防止できることを示している。肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィルムは、タラトリブシンまたはプラセボで処理された後、マイクロタイタープレート内で生育された。バイオフィルムが4時間成長できるようにした後、ウェルはクリスタルバイオレットで染色され、続いて酢酸で溶解された。バイオフィルム形成は、492 nmの光吸収によって測定され、未処理のバイオフィルムの基準に適合させた。研究の結果に基づいて、タラトリブシンは、細菌性バイオフィルム形成の防止に非常に効果的であることが結論付けられる。統計上の有意差は、スチューデントのt検定により評価されるように、ボックスの上にある符号で示されるが、ここでは、n.s.は $p > 0.05$ を、\*は $p < 0.05$ を、\*\*は $p < 0.01$ を、および\*\*\*は $p < 0.001$ を示している。

【実施例】

【0134】

実施例1：タラトリブシン組成物による、肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの付着の抑制

図1と図2に示したように、タラトリブシンまたはプラセボで処理された後、肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィルムが、マイクロタイタープレート内で生育された。該バイオフィルムが4時間成長した後、ウェルはクリスタルバイオレットで染色され、続いて酢酸で溶解された。バイオフィルム形成は、492 nmの光吸収によって測定され、未処理のバイオフィルムの基準に適合させた。研究の結果に基づいて、タラトリブシン組成物が、細菌性バイオフィルムの形成の防止に非常に効果があったことが結論付けられる。バイオフィルムの形成に先立つ、細菌のタラトリブシン組成物による処理は、生体外におけるバイオフィルム形成に対して濃度依存効果があることを示した。タラトリブシンは、バイオフィルム形成を濃度依存の方法で防止する。タラトリブシンまたはプラセボで処理された後、肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィルムが、マイクロタイタープレート内で生育された。該バイオフィルムの4時間の成長が可能とされた後、ウェルはクリスタルバイオレットで染色され、続いて酢酸で溶解された。バイオフィルム形成は、492 nmの光吸収によって測定され、未処理のバイオフィルムの基準に適合させた。研究の結果に基づいて、タラトリブシンが、細菌性バイオフィルム形成を防止するのに非常に効果的であることが結論付けられる。データは、ボックスプロットとして示され、ここで、上の四角は第三四分位を示し、四角の中ほどに近い水平ラインは中央値を示し、下の四角は第一四分位を示す。四角の上から縦のラインが伸び最大値を示し、四角の下から他の縦のラインが伸び最小値を示す。プラセボとタラトリブシンで処理された細菌のデータは同じグラフに配置されている。箱の重なりは、バイオフィルム形成に違いのないことを示すものであろう。統計上有意味な違いは、スチューデントのt検定での評価で、箱の上にある符号によって示されているが、ここではn.s.は $p > 0.05$ を、\*は $p < 0.05$ を、\*\*は $p < 0.01$ を、また\*\*\*は $p < 0.001$ をしめしている。結果は、図1, 2に表示されている。

【0135】

10

20

30

40

50

図4、5、6、7、および8は、タラトリプシンが、濃度依存による方法で、細菌を表面から取り除くこと、また細菌の表面への付着を部分的に防ぐことの両方でかなり有能であることを示している。タラトリプシンは、細菌にとって致命的ではないので、これだけでは、しかしながら、細菌性炎症を完全に根絶するのに十分ではない。

#### 【0136】

実施例2：トリプシン組成物による優れたバイオフィーム崩壊のためのタラトリプシンと抗生物質の組み合わせ

肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィームがマイクロタイタープレート内で生育された。該バイオフィームは、抗生物質または抗生物質とタラトリプシンの組み合わせで処理された。該バイオフィームはクリスタルバイオレットで染色され、続いて酢酸で溶解された。バイオフィーム形成は、492 nmの光吸収によって測定され、未処理のバイオフィームの基準に適合させた。タラトリプシンと抗生物質の組み合わせが、抗生物質のみより、細菌性バイオフィームの崩壊により効果的であることが結論付けられた(参照、図3)。横棒上のP値は、スチューデントのt検定で評価した時、二つの処理法の違いが有意であることを示している。図1に見られるように、タラトリプシンによる治療と組み合わせで選択された抗生物質を用いることは、タラトリプシンの使用が、試験された5つの内4つにおいて、抗生物質の効果を有意に強化していることを示している。図2にあるデータは、バイオフィームがクリスタルバイオレットで染色され続いて酢酸に溶解された結果である。バイオフィーム形成は、492 nmの光吸収によって測定され、未処理のバイオフィームの基準に適合させた。横棒の上のP値は、ANOVA分析により評価したとき、効果の有意性を示している。データは、抗生物質による治療とタラトリプシンの局所的組み合わせによる使用は、抗生物質だけの場合と比べ、バイオフィームの崩壊に対して改善することを示している。タラトリプシンと抗生物質の組み合わせが、抗生物質によるバイオフィームの崩壊を良くすることが新発見された。バイオフィーム炎症を治療するとき、タラトリプシンの添加が、より低い濃度での抗生物質の使用を可能にする。図3は、バイオフィーム離散におけるタラトリプシンと選択された抗生物質の組み合わせの効果を示している。画像は、タラトリプシンと選択された抗生物質の組み合わせが、いずれか単独な場合に比べ、バイオフィームの離散により効果があることを鮮明に可視化している。肺炎連鎖球菌とストレプトコッカス・ミティスの組み合わせを用いたバイオフィームは、マイクロタイタープレート内で生育された。該バイオフィームは、タラトリプシン、抗生物質、またはこの二つの物質の組み合わせを用いて処理された。バイオフィームは次にクリスタルバイオレットで染色された。研究の結果に基づいて、タラトリプシンと抗生物質の組み合わせが、抗生物質のみの場合に比べ細菌性バイオフィームの崩壊により効果的であることを結論付けられる。

#### 【0137】

[先行技術文献]

Augustin, M., T. Ali-Vehmas, と F. Atroschi, 2004, "細菌性バイオフィームに対する酵素的浄化剤および殺菌剤の評価 (Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms)" *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 7, p. 55-64.

Bjarnason, J. B., 2000, "魚セリンプロテアーゼおよびその医薬および美容への応用 (Fish proteases and their pharmaceutical and cosmetic use)" 特許: PCT, WO00/78332A2.

Gudmundsdottir, A., H. Hilmarsson, and B. Stefansson, 2013, "バイオ医薬におけるタイセイヨウタラトリプシン応用の可能性 (Potential Use of Atlantic Cod Trypsin in Biomedicine)" *Biomed Research International*.

Stefansson, B., L. Helgadóttir, S. Olafsdóttir, A. Gudmundsdóttir, and J. B. Bjarnason

10

20

30

40

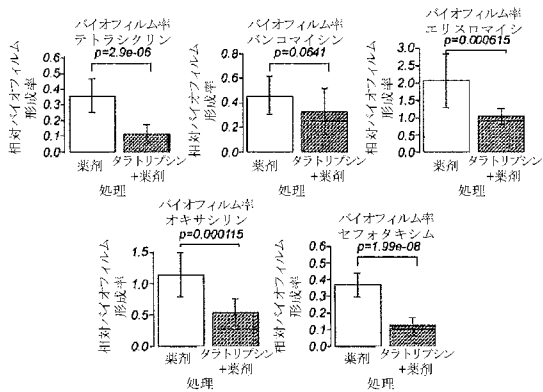
50



， 2010 ， 低温適用タイセイヨウマダラ (Gadus morhua) トリプシン I の特性 - 動的パラメータ、自己分解、および熱安定性，Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology, v. 155、p. 186 - 194 .

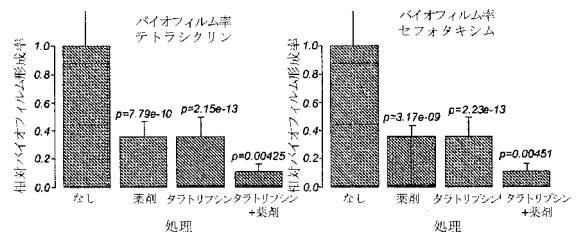
【 図 1 】

図 1



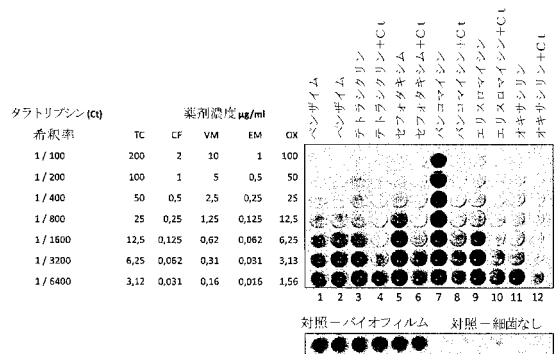
【 図 2 】

図 2



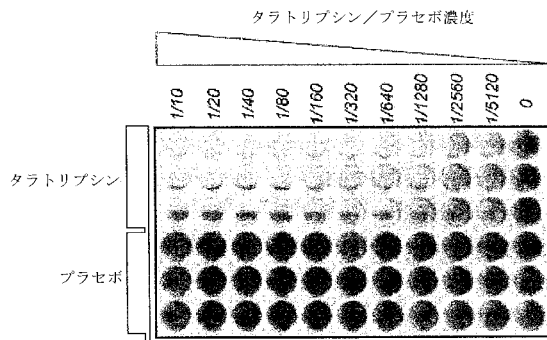
【 図 3 】

図 3



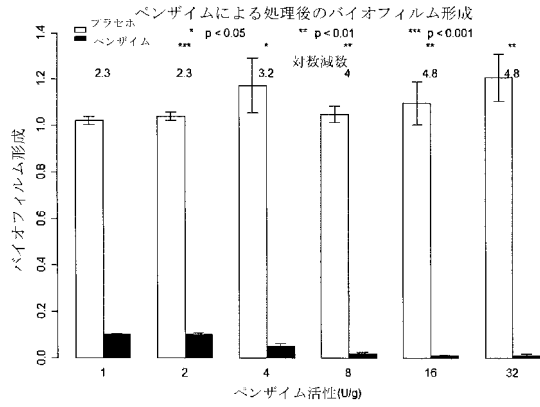
【 図 4 】

図 4



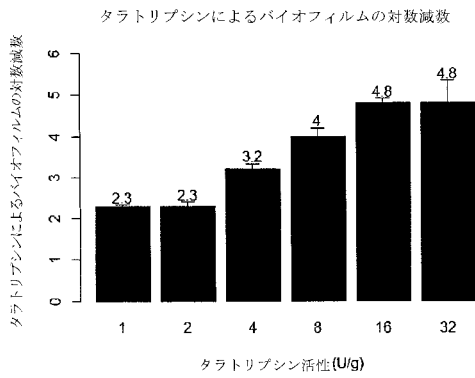
【 図 5 】

図 5



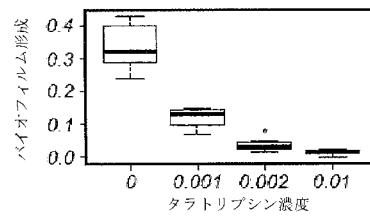
【 図 6 】

図 6



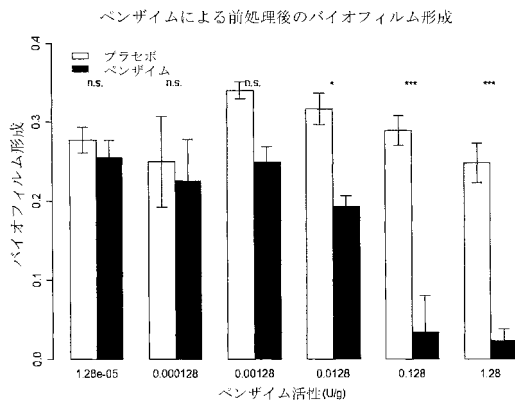
【 図 7 】

図 7



## 【 図 8 】

図 8



## 【 配列表 】

2018521143000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成29年8月10日 (2017.8.10)

## 【 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 】

患者内の細菌性バイオフィームの治療における使用のための併用療法であって、前記併用療法が、

( a ) セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドと ( b ) 一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物を含み、前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、トリプシンとキモトリプシンとから成る群から選択される海洋セリンプロテアーゼである、併用療法。

【 請求項 2 】

前記患者がヒトである、請求項 1 に記載の使用のための併用療法。

【 請求項 3 】

前記バイオフィームが上気道および / または下気道に在る、請求項 1 または 2 に記載の使用のための併用療法。

【 請求項 4 】

前記バイオフィームが、グラム陰性および / またはグラム陽性細菌を含むかあるいはそれらから成る、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【 請求項 5 】

前記バイオフィルムが、肺炎連鎖球菌、ストレプトコッカス・ミティス、緑膿菌、インフルエンザ菌、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌、メシチリン感受性黄色ブドウ球菌、化膿性連鎖球菌、ミュータンス連鎖球菌、サンギス菌、レジオネラニューモフィラ、クロストリジウム・ディフィシル、およびそれらのいずれかの混合物から独立して選択される細菌を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 6】

前記バイオフィルムが、連鎖球菌を含むかあるいは連鎖球菌から成る、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 7】

前記バイオフィルムが、ストレプトコッカス・ミティスおよび/または肺炎連鎖球菌を含むかあるいはそれらから成る、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 8】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、トリプシンとキモトリプシンの混合物として提供される、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 9】

前記海洋セリンプロテアーゼが、タラ、スケトウダラ、サケ、あるいはオキアミから得ることができる、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 10】

前記海洋セリンプロテアーゼが、タイセイヨウマダラから得ることができる、請求項 9 に記載の使用のための併用療法。

【請求項 11】

前記海洋セリンプロテアーゼが、トリプシン、例えば トリプシン I である、請求項 10 に記載の使用のための併用療法。

【請求項 12】

トリプシンの活性が 0.1 から 16 U / g の範囲内である、請求項 11 に記載の使用のための併用療法。

【請求項 13】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、SEQ ID NO: 1  
IVGGYECKHKSQAHQVSLNSGYHFCGGSLVSKDWWSAAHCYKSVLRVRLGEH HIRVNEGTEQYISSSSVIRHPNYSSYN  
INNDIMLIKLTKPATLNQYVHAVALPTECA ADATMCTVSGWGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPMITQSM  
FCAG YLEGGKDCSCQGDSSGPPWCNGVLQGWSWGYGCAERDHPGVYAKVCLSGW VRDTMANY

[SEQ ID NO: 1]

の amino 酸配列を含むかまたはこの amino 酸配列から成る、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の併用療法。

【請求項 14】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、自然発生源からのものを精製したものである、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 15】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、遺伝子組み換えタンパク質である、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 16】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が、アモキシシリン、アンピシリン、アジスロマイシン、カルバペネム、セフォタキシム、セフトリアキソン、セフロキシム、セファロsporin、クロランフェニコル、シプロフロキサシン、クリンダマイシン、ダラシン、ダルフォプリスチン、ダプトマイシン、ドキシサイクリン、エルタペネム、エリスロマイシン、フルオロキノロン、メロペネム、メトロニダゾール、ミノサイクリン、モキシフロキサシン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリン、キヌプリスチン、リファンピン、スルファメトキサゾール、テイコプラニン、テトラサイクリン、トリメトプリム、バンコマイシン、バシトラシン、ポリミキシン B、およびそれらの混合物から成る群から選択され

る、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 1 7】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が、テトラサイクリン、セフトキシム、バンコマイシン、エリソロマイシン、およびオキサシリンから成る群から選択される、請求項 1 から 1 6 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 1 8】

ただ一つの抗生物質化合物を含んでいる、請求項 1 から 1 7 のいずれかに記載の使用のための併用療法。

【請求項 1 9】

患者内の細菌性バイオフィルムの治療における使用のためのセリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドであって、前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、トリプシンとキモトリプシンとから成る群から選択される海洋セリンプロテアーゼであり、および前記ポリペプチドが一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物と組み合わせて用いることを目的とする、ポリペプチド。

【請求項 2 0】

前記ポリペプチドが請求項 8 から 1 5 のいずれか一項で定義されている、請求項 1 9 に記載の使用のためのポリペプチド。

【請求項 2 1】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が、請求項 1 6 から 1 8 のいずれか一項で定義されている、請求項 1 9 または 2 0 に記載の使用のためのポリペプチド。

【請求項 2 2】

患者内の細菌性バイオフィルムの治療のための薬剤の調剤におけるセリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドの使用であって、前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、トリプシンとキモトリプシンとから成る群から選択される海洋セリンプロテアーゼであり、および前記ポリペプチドが、一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物との組み合わせにより使用される、ポリペプチドの使用。

【請求項 2 3】

前記ポリペプチドが請求項 8 から 1 5 のいずれか一項で定義されている、請求項 2 2 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 2 4】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が請求項 1 6 から 1 8 のいずれか一項で定義されている、請求項 2 2 または 2 3 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 2 5】

患者内の細菌性バイオフィルムの治療のための方法であって、前記方法が、  
( a ) セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドと ( b ) 一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物を、治療的に効果のある分量で患者へ投与することを含み、前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、トリプシンとキモトリプシンとから成る群から選択される海洋セリンプロテアーゼである、方法。

【請求項 2 6】

前記患者がヒトである請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記バイオフィルムが上および / あるいは下気道にある、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記バイオフィルムがグラム陰性および / またはグラム陽性細菌を含んでいるか、あるいはその細菌から成る、請求項 2 5 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記バイオフィルムが肺炎連鎖球菌、ストレプトコッカス・ミティス、緑膿菌、インフルエンザ菌、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌、メシチリン感受性黄色ブドウ球菌、化膿性連鎖球菌、ミュータンス連鎖球菌、サンギス菌、レジオネラニューモフィラ、クロストリジ

ウム・ディフィシル、およびそれらのいずれかの混合物から独立して選択される細菌を含んでいる、請求項 25 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記バイオフィルムが連鎖球菌を含んでいるかその菌から成る、請求項 25 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記バイオフィルムがストレプトコッカス・ミティスおよび/または肺炎連鎖球菌を含んでいるかあるいはその菌から成る、請求項 25 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記ポリペプチドが請求項 8 から 15 のいずれか一項で定義されている、請求項 25 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が請求項 16 から 18 のいずれか一項で定義されている、請求項 25 から 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが口中スプレーで送り出される、請求項 25 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の併用療法の有効量を患者に送り出すための医療装置であって、前記装置が、医薬組成物の貯蔵器と前記組成物を前記装置から放出する手段とを含み、前記医薬組成物が、(a)セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドと(b)一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物を、医薬的に許容される緩衝剤、賦形剤、希釈剤または支持体とともに含み、および前記セリンプロテアーゼ活性をもつポリペプチドが、トリプシンとキモトリプシンとから成る群から選択される海洋セリンプロテアーゼである、医療装置。

【請求項 36】

前記装置が口中スプレーである、請求項 35 に記載の医療装置。

【請求項 37】

前記装置が鼻腔スプレーである、請求項 35 に記載の医療装置。

【請求項 38】

細菌性バイオフィルムの成長を生体外で死滅させる、禁ずる、または防止するための方法であり、バイオフィルム(または、バイオフィルムの成長が防止されるべき表面)を請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の併用療法に曝すことを含んでいる方法。

【請求項 39】

前記ペプチドが請求項 8 から 15 のいずれか一項に定義されている、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記一つあるいは二つ以上の抗生物質化合物が請求項 16 から 18 のいずれか一項に定義されている、請求項 38 または 39 に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/067570
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K38/48 A01N63/02 A01P1/00 ADD.				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A01N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	TADAYUKI IWASE ET AL: "Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization", NATURE, vol. 465, no. 7296, 20 May 2010 (2010-05-20), pages 346-349, XP055313352, United Kingdom ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature09074 page 348, left-hand column, line 21 - page 348, right-hand column, line 10 figure 2m page 348, right-hand column, lines 11-18 abstract ----- -/--	1-48		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents :				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="vertical-align: top;">           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 9 November 2016		Date of mailing of the international search report 15/11/2016		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Davies, Maxwell		

5

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/067570
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Robert Bals ET AL: "Human-Beta-Defensin 2 Is a Salt-sensitive Peptide Antibiotic Expressed in Human Lung", J. Clin. Invest, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 874-880874, XP055313290, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC508952/pdf/1020874.pdf [retrieved on 2016-10-24] abstract	1-48
X	----- Mona Augustin: "Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms",  1 January 2004 (2004-01-01), pages 55-64, XP055018827, Retrieved from the Internet: URL:https://helda.helsinki.fi/handle/1975/547 [retrieved on 2012-02-08] table 2	1-48
X	----- ÁGÚSTA GUDMUNSDÓTTIR ET AL: "Potential Use of Atlantic Cod Trypsin in Biomedicine", BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL, vol. 54, no. 8, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 16-11, XP055192029, ISSN: 2314-6133, DOI: 10.1097/WON.0b013e3181bfdf83 page 2, left-hand column, lines 17-19 Biofilm; page 5 - page 6	1-48
X,P	----- WO 2015/150799 A1 (ENZYMATICA AB [SE]; SMITH STEPHEN EDWARD [GB]) 8 October 2015 (2015-10-08) claim 99	28-30
X,P	----- WO 2015/114343 A1 (ENZYMATICA AB [SE]; SMITH STEPHEN EDWARD [GB]) 6 August 2015 (2015-08-06) page 31, lines 14-20	28-30
A	----- WO 00/78332 A2 (BJARNASON JON BRAGI [IS]) 28 December 2000 (2000-12-28) cited in the application claims 1-27 examples 1-14	1-48



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/067570

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015150799 A1	08-10-2015	NONE	
WO 2015114343 A1	06-08-2015	AU 2015212554 A1 EP 3099317 A1 KR 20160108560 A WO 2015114343 A1	18-08-2016 07-12-2016 19-09-2016 06-08-2015
WO 0078332 A2	28-12-2000	AT 278417 T AU 779700 B2 AU 4947800 A CA 2377357 A1 CN 1356907 A DE 60014659 D1 DE 60014659 T2 DK 1202743 T3 EP 1202743 A2 ES 2231200 T3 IS 6194 A JP 2003502071 A MX PA01013246 A NO 20016159 A NZ 516632 A PL 352318 A1 PT 1202743 E US 2002141987 A1 WO 0078332 A2	15-10-2004 10-02-2005 09-01-2001 28-12-2000 03-07-2002 11-11-2004 02-03-2006 14-02-2005 08-05-2002 16-05-2005 10-12-2001 21-01-2003 20-08-2003 17-12-2001 30-04-2004 11-08-2003 28-02-2005 03-10-2002 28-12-2000

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/65 (2006.01)	A 6 1 K 31/65	
A 6 1 K 31/546 (2006.01)	A 6 1 K 31/546	
A 6 1 K 38/12 (2006.01)	A 6 1 K 38/12	
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048	
A 6 1 K 31/431 (2006.01)	A 6 1 K 31/431	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 1 2 N 9/76 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/57 (2006.01)	C 1 2 N 9/76	Z N A
	C 1 2 N 15/57	

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

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA17 BA22 BA25 BA44 CA45 DA44  
DC03 MA02 MA13 MA57 MA59 NA05 NA14 ZA59 ZB26 ZB35  
ZC19 ZC75  
4C086 AA01 AA02 CC04 CC12 CC15 EA13 MA02 MA03 MA04 MA13  
MA57 MA59 NA05 NA14 ZA59 ZB26 ZB35 ZC19 ZC75