

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-526624

(P2022-526624A)

(43)公表日 令和4年5月25日(2022.5.25)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	4 C 0 8 6
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全36頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-559424(P2021-559424)	(71)出願人	514284475
(86)(22)出願日	令和2年4月10日(2020.4.10)		コントラフェクト コーポレイション
(85)翻訳文提出日	令和3年12月2日(2021.12.2)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 7 0
(86)国際出願番号	PCT/US2020/027752		1, ヨンカーズ, ウェルズ アベニュー
(87)国際公開番号	WO2020/210691		2 8 - 3 アールディー フロア
(87)国際公開日	令和2年10月15日(2020.10.15)	(74)代理人	110000796
(31)優先権主張番号	62/832,754		特許業務法人三枝国際特許事務所
(32)優先日	平成31年4月11日(2019.4.11)	(72)発明者	シューフ レイモンド
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 0 7 0 4 6 ニュージャ
(31)優先権主張番号	62/849,672		ージー マウンテン レイクス レイク ド
(32)優先日	令和1年5月17日(2019.5.17)		ライブ 1 1 6
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	F ターム (参考)	4C084 AA01 AA02 AA19 BA01
(31)優先権主張番号	62/938,812		BA08 BA09 BA17 BA18
			BA22 BA23 BA25 BA27
			BA34 CA04 CA59 DA42
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 骨及び関節の感染を治療及び予防する方法

(57)【要約】

本開示は、骨又は関節の感染を治療又は予防する方法であって、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1と少なくとも80%の同一性を有し、グラム陽性細菌に対する殺菌及び／又は静菌活性を備える、その変異体を含むP l y S s 2溶解素を治療有効量、それを必要とする被験体に、任意に、1つ以上の抗生物質と同時に投与することを含み、骨又は関節の感染が、スタフィロкокカス・エピデルミディス又はスタフィロкокカス・アウレウス等のグラム陽性細菌を含む、方法に関する。スタフィロкокカス・エピデルミディスによって形成されるバイオフィーム等の滑液中に形成されるグラム陽性細菌バイオフィームを予防又は破壊する方法も開示される。

【選択図】 図2

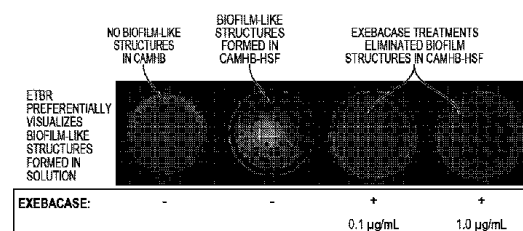


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨又は関節の感染を治療又は予防する方法であって、
配列番号 1 のアミノ酸配列、又は配列番号 1 と少なくとも 80 % の同一性を有し、グラム陽性細菌に対する殺菌及び／又は静菌活性を備える、その変異体を含む P l y S s 2 溶解素を治療有効量、それを必要とする被験体に投与することを含み、前記骨又は関節の感染がグラム陽性細菌を含む、方法。

【請求項 2】

前記骨又は関節の感染がバイオフィルムを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記骨又は関節の感染が骨髓炎を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記骨髓炎が慢性骨髓炎である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記骨髓炎が急性骨髓炎である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記骨又は関節の感染が、人工関節感染又は天然関節の敗血症性関節炎を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記骨又は関節の感染が、人工関節感染を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記人工関節感染が人工股関節感染又は人工膝関節感染を含む、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記被験体が肥満、糖尿病、関節リウマチに罹患しているか、又は高齢者である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記治療が、デブリードマン及びインプラント再置換（D A I R）を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

被験体の滑液中に形成されたバイオフィルムを予防又は破壊する方法であって、
配列番号 1 のアミノ酸配列、又は配列番号 1 と少なくとも 80 % の同一性を有し、殺菌及び／又は静菌活性を備える、その変異体を含む P l y S s 2 溶解素を治療有効量、それを必要とする被験体に投与することを含み、前記バイオフィルムがグラム陽性細菌によって形成される、方法。

【請求項 12】

前記投与工程が、治療有効量の 1 つ以上の抗生物質を共投与することを更に含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 1 つ以上の抗生物質が、ベータラクタム、アミノグリコシド、グリコペプチド、オキサゾリジノン、リボペプチド及びスルホンアミドからなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 1 つ以上の抗生物質がリファマイシンを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 1 つ以上の抗生物質がバンコマイシン、ダプトマイシン又はテジゾリドを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 1 つ以上の抗生物質がダプトマイシンを含む、請求項 12 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記グラム陽性細菌が、ブドウ球菌、腸球菌及び／又は連鎖球菌を含む、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記ブドウ球菌がスタフィロコッカス・アウレウスを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記グラム陽性細菌が抗生物質耐性グラム陽性細菌である、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記グラム陽性細菌がコアグラゼ陰性ブドウ球菌を含む、請求項 1～17 又は 19 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 21】

前記コアグラゼ陰性ブドウ球菌が、スタフィロコッカス・シミュランス、スタフィロコッカス・カブラエ、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス及び／又はスタフィロコッカス・エピデルミディスの少なくとも 1 つから選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記グラム陽性細菌がスタフィロコッカス・エピデルミディスを含む、請求項 1～17 又は 19～21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記 P l y S s 2 溶解素が配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 24】

前記 P l y S s 2 溶解素変異体が、配列番号 3～17 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つを含む、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記 P l y S s 2 溶解素変異体が配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 P l y S s 2 溶解素が、配列番号 1 のポリペプチドと少なくとも 90 % の同一性を有する、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 27】

前記被験体がヒトである、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記グラム陽性細菌がメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウスを含む、請求項 1～19 及び 23～27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記破壊が、デブリードマン及びインプラント再置換（DAIR）を含む、請求項 11～28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記 P l y S s 2 が関節鏡検査中に投与される、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 31】

前記 P l y S s 2 が関節鏡下洗浄中に投与される、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

【関連出願の相互参照】

本願は、2019年4月11日付で出願された米国仮特許出願第 62／832，754 号、2019年5月17日付で出願された米国仮特許出願第 62／849，672 号、20 50

19年11月21日付で出願された米国仮特許出願第62／938,812号、及び2020年1月23日付で出願された米国仮特許出願第62／964,755号の利益を主張し、これら出願日に依拠し、それらの開示それぞれの全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【0002】

【配列表】

本願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が引用することにより本明細書の一部をなす。2020年4月10日付けで作製された上記ASCIIコピーの名前は0341__0020-00-304__ST25.txtであり、37401バイトのサイズである。

10

【0003】

本開示は、概して、溶解素（複数の場合もある）及び任意に1つ以上の抗生物質を用いた、骨及び関節の感染、特にスタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）及びスタフィロコッカス・エピデルミディス（*Staphylococcus epidermidis*）等のグラム陽性細菌による骨髄炎及び人工関節感染の治療及び予防に関する。

【背景技術】

【0004】

微生物は、主に浮遊（planktonic）形態及びバイオフィーム形態の2つの異なる生命形態に分類され得る。浮遊微生物は浮動性であり、代謝が活発で、迅速に複製する。対照的に、バイオフィーム微生物は、多細胞で複雑な三次元構造として存在する。バイオフィームは増殖の静止期にあり、代謝的に活性が低い。

20

【0005】

典型的には、バイオフィームは、微生物細胞が宿主細胞表面等の表面に付着し、続いて細胞凝集、成熟、及びその後の脱離を含む「段階」で形成される。初期付着時に、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、及びビトロネクチン等の宿主タンパク質が表面に吸収され、コンディショニングフィルム形成をもたらす。吸収された宿主タンパク質は、細菌タンパク質と宿主タンパク質との相互作用を通じて、例えば細菌のコロニー形成を促進する。

【0006】

表面への最初の細胞付着の後、多層細胞増殖並びに細胞間接着が起こり、結果的に1つ又は幾つかの種のマイクロコロニーの形成をもたらす。この段階の後に成熟が続き、付着した細胞が増殖し、それらの間で相互作用する。この段階では、例えば、細菌細胞は、細胞を囲み、バイオフィームネットワークを安定化させる菌体外多糖の分泌を開始する。成熟すると、大きなバイオフィームはそれらの表面から浮遊形態を放出し得て、次いでそれらが分散して遠位部位の更なる局所浸潤又は播種を引き起こし、全く新しいサイクルを開始する。

30

【0007】

治療が困難な感染症の多くは、多くの骨感染及びインプラント材料、例えば人工関節に関連する感染等のバイオフィーム感染症である。これらの感染症では、微生物は、典型的には、死骨又はインプラントのいずれかに付着し、宿主機構だけでなくほとんどの抗微生物剤にも耐えるバイオフィームを形成する。したがって、抗生物質はしばしば骨及び関節の感染に対して活性不良を示し、かかる治療が有効になる前に、通常は手術と組み合わせて、長期にわたる抗生物質療法を必要とする。

40

【0008】

上記の観点から、バイオフィーム形成細菌による骨及び関節の感染を治療するための新たな戦略が必要とされる。これらの戦略には、バイオフィームを根絶するだけでなく、バイオフィーム形成細菌を死滅させることができる薬物及び／又は生物製剤が含まれる。

【発明の概要】

【0009】

一態様において、本発明の開示は、骨髄炎、例えば急性骨髄炎等の骨又は関節の感染を治

50

療又は予防する方法であって、治療有効量の本明細書に記載される P l y S s 2 溶解素又はその変異体を、それを必要とする被験体に投与することを含み、骨又は関節の感染がグラム陽性細菌を含む、方法に関する。

【0010】

本開示はまた、被験体の滑液中に形成されたバイオフィルムを予防又は破壊する方法であって、治療有効量の本明細書に記載される P l y S s 2 溶解素又はその変異体を、それを必要とする被験体に投与することを含み、バイオフィルムがグラム陽性細菌によって形成される、方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】 発明を実施するための形態に記載される、溶解素のアミノ酸配列（配列番号1）及び該溶解素をコードするポリヌクレオチド（配列番号18）を示す図である。配列番号1は、翻訳後プロセッシングの間に除去されて244アミノ酸ポリペプチドを残す、開始メチオニン残基を含む245アミノ酸ポリペプチドを表す。

【図2】 実施例に記載されるように、ヒト滑液中でスタフィロコッカス・エピデルミディスによって形成される臭化エチジウム染色バイオフィルム構造に対する溶解素処理の影響を示す図である。

【図3】 実施例に記載されるように、P l y S s 2 溶解素（本明細書においてC F - 3 0 1 及びエクセバカーゼ（exebacase）とも称される）による処理前及び処理後にヒト滑液中に形成されたバイオフィルムの蛍光画像を示す図である。

【図4】 実施例に記載されるように、P l y S s 2 溶解素による処理後のヒト滑液中のバイオフィルム破壊を示す走査電子顕微鏡写真を示す図である。

【図5】 実施例に記載されるように、単独で、又はダプトマイシンと併用したエクセバカーゼ溶解素による処理後の $\log_{10}$ c f u / 骨グラム単位のラット脛骨の定量的細菌培養物を示す図である。

【図6】 図6A～図6Cは、実施例5に記載されるように、本発明の方法を使用した治療のために選択された感染した人工膝関節を有する患者の状態を示す図である。図6Aは患者の人工膝関節を示すX線である。図6Bは、選択された患者のうち2名で観察された敗血症性関節炎の臨床徴候を示す図である。図6Cは、治療後の敗血症性関節炎患者の良好な転帰を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

定義

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

【0013】

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

【0014】

「薬学的に許容可能な担体」は、生理学的に適合するあらゆる溶媒、添加剤、賦形剤、分散媒、可溶化剤、コーティング剤、保存料、等張剤及び吸収遅延剤、界面活性剤、噴射剤、希釈剤、ビヒクル等を指す。担体（複数の場合もある）は、薬剤中で通常使用される量で治療対象の被験体に有害でないという意味で「許容可能」でなくてはならない。薬学的に許容可能な担体は、組成物をその意図される目的に不適なものにすることなく組成物の他の成分に適合する。さらに、薬学的に許容可能な担体は、過度の有害な副作用（毒性、刺激及びアレルギー応答等）なしに本明細書に提示される被験体への使用に適している。副作用は、それらのリスクが組成物によってもたらされる利益を上回る場合に「過度」で

10

20

30

40

50

ある。薬学的に許容可能な担体又は賦形剤の非限定的な例としては、任意の標準的な医薬担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水、水、並びに油／水エマルジョン及びマイクロエマルジョン等のエマルジョンが挙げられる。好適な医薬担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences by E.W. Martin, 18th Editionに記載されている。薬学的に許容可能な担体は、自然に存在しない担体であってもよい。

【0015】

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

【0016】

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

【0017】

「抗菌剤」は、静菌剤及び殺菌剤の両方を指す。

【0018】

「抗生物質」は、細菌に致死性又は増殖の低減等の負の影響を与える特性を有する化合物を指す。抗生物質は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌又はその両方に負の影響を与えることができる。例としては、抗生物質は、細胞壁ペプチドグリカンの生合成、細胞膜の完全性、又は細菌におけるDNA若しくはタンパク質の合成に影響を及ぼし得る。

【0019】

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

【0020】

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

【0021】

「共投与する」は、順次的な2種類の作用物質、例えば溶解素及び抗生物質又は任意の他の抗菌剤の投与、並びに実質的に同時の、例えば単一の混合物／組成物中での、又は別個に与えられるが、それでも実質的に同時に、例えば同日又は24時間中に異なる時点で被験体に投与される用量でのこれらの作用物質の投与を指す。2種類の作用物質、例えば溶解素と1つ以上の付加的な抗菌剤とのこのような共投与は、最大数日、数週間又は数ヶ月続く継続的な治療として行うことができる。さらに、用途に応じて、共投与は、継続的又は同延的(coextensive)である必要はない。例えば、用途が全身性抗菌剤として、例えば関節又は骨の感染を治療することがであった場合、溶解素を初めのみ、追加の抗生物質の使用の24時間以内に投与することができ、その後、追加の抗生物質の使用を溶解素の更なる投与なしに継続してもよい。

10

20

30

40

50

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

「融合ポリペプチド」は、通例、異なる特性又は機能性を有する2つ以上のドメイン又はセグメントを有するのが通例である融合発現産物を生じる、2つ以上の核酸セグメントの融合から得られる発現産物を指す。より特定の意味では、「融合ポリペプチド」という用語は、直接、又はアミノ酸若しくはペプチドリンカーを介して共有結合的に連結した2つ以上の異種ポリペプチド又はペプチドを含むポリペプチド又はペプチドも指す。融合ポリペプチドを形成するポリペプチドは通例、C末端からN末端に連結されるが、C末端からC末端、N末端からN末端又はN末端からC末端に連結されてもよい。「融合ポリペプチド」という用語は、「融合タンパク質」という用語と区別なく使用される場合もある。よって、或る特定の構造「を含むポリペプチド」というオープンエンドの表現は、融合ポリペプチド等の列挙される構造よりも大きい分子を含む。

【0025】

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

【0026】

「活性フラグメント」は、フラグメントが得られた単離ポリペプチドの1つ以上の機能又は生物活性、例えば、S. アウレウス又はS. エピデルミディス等の1つ以上のグラム陽性細菌に対する殺菌活性を保持するポリペプチドの部分指す。

10

20

30

40

50

【0027】

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

【0028】

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

10

20

【0029】

「予防する」は、細菌感染等の障害の発生、再発、拡大、発症又は確立の予防を指す。本開示が感染の完全な予防又は感染の確立の予防に限定されることは意図されない。幾つかの実施形態において、発症を遅らせるか、又は続いて発症した（contracted）疾患の重症度若しくは疾患の発症の可能性を低減すること等が予防例を構成する。

【0030】

「発症した疾患」は、発熱、敗血症又は菌血症の検出等の臨床症状又は不顕性（subclinical）症状が現れた疾患、並びにかかる病理と関連する症状が未だ現れていない場合の細菌病原体の増殖（例えば、培養物中での）によって検出され得る疾患を指す。

【0031】

ペプチド又はポリペプチド又はその活性フラグメントとの関連での「誘導体」は、例えば、溶菌活性等のポリペプチドの活性に実質的に悪影響を与えない若しくは溶菌活性等のポリペプチドの活性を損なわない、アミノ酸以外の1つ以上の化学的部分を含有するように修飾されたポリペプチドを包含することを意図する。化学的部分は、例えばアミノ末端のアミノ酸残基、カルボキシ末端のアミノ酸残基又は内部アミノ酸残基を介してペプチドに共有結合的に連結することができる。かかる修飾は、天然であっても又は非天然であってもよい。或る特定の実施形態において、非天然修飾は、反応性部分への保護基若しくはキャップ基（capping group）の付加、抗体及び／又は蛍光標識等の検出可能な標識の付加、グリコシル化の付加若しくは修飾、又はPEG（ペグ化）等の嵩高基（bulking group）の付加、並びに当業者に既知の他の変化を含み得る。或る特定の実施形態において、非天然修飾は、N末端アセチル化及びC末端アミド化等のキャップ修飾であり得る。溶解素ポリペプチドに付加することができる、例示的な保護基としては、t-Boc及びFmocが挙げられるが、これらに限定されない。限定されるものではないが、緑色蛍光タンパク質（GFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）及びmCherry等の一般に使用される蛍光標識タンパク質は、細胞タンパク質の正常機能に干渉することなく、ポリペプチドに共有結合的若しくは非共有結合的に結合するか、又はポリペプチドに融合させることができる小型のタンパク質である。或る特定の実施形態において、蛍光タンパク質をコードするポリヌクレオチドをポリヌクレオチド配列の上流又は下流に挿入する。これにより、細胞機能又はそれが結合した溶解素ポリペプチドの機能を妨げない融合タンパク質（例えば、溶解素ポリ

30

40

50

ペプチド：：GFP）が生じる。タンパク質へのポリエチレングリコール（PEG）のコンジュゲーションが、多くの医薬タンパク質の循環半減期を延長する方法として使用されている。このため、溶解素ポリペプチド誘導体等のポリペプチド誘導体との関連で、「誘導体」という用語は、1つ以上のPEG分子の共有結合によって化学修飾された溶解素ポリペプチド等のポリペプチドを包含する。ペグ化溶解素等の溶解素ポリペプチドは、生物活性及び治療活性を保持した上で非ペグ化ポリペプチドと比較して延長された循環半減期を示すことが予想される。

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

「バイオフィルム」は、表面に付着し、細菌及び／又は宿主に由来する成分で構成され得る水和したポリマーマトリックス中に凝集した細菌を指す。バイオフィルムは、生物表面又は非生物表面上で細胞が互いに接着した微生物の凝集物である。これらの接着細胞は、

10

20

30

40

50

限定されるものではないが、細胞外高分子物質（EPS）で構成されるマトリックス中に埋め込まれることが多い。バイオフィルムのEPSは、スライム（スライムと記載されたもの全てがバイオフィルムという訳ではない）又はプラークとも称され、一般に細胞外DNA、タンパク質及び多糖で構成されるポリマー集塊である。

【0035】

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

【0036】

骨及び関節の感染

本発明者は、驚いたことに、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（MRSA）及び多剤耐性（MDR）スタフィロコッカス・エピデルミディスを含むスタフィロコッカス・エピデルミディス及びスタフィロコッカス・アウレウス等の骨及び関節の感染を引き起こす可能性のあるバイオフィルム形成細菌を死滅させるために或る特定の生物製剤、すなわち溶解素を使用することができることを認識した。溶解素はまた、驚いたことに、滑液又は骨において、例えばスタフィロコッカス・エピデルミディス又はスタフィロコッカス・アウレウスによって形成される成熟したバイオフィルムを破壊することができる。これらの抗微生物剤は、バクテリオファージにコードされた加水分解酵素であり、細胞内部からペプチドグリカン分解することによって感染細菌から子孫ファージを解放し、宿主細菌の溶菌を引き起こす。溶解素は、細菌細胞の外からペプチドグリカンを攻撃することにより、病原菌に対して作用する。典型的には、溶解素は細菌種に特異性が高く、共生腸内細菌を含む非標的生物を溶菌することはまれであり、消化管の恒常性を維持する上で有益であり得る。

【0037】

一態様において、本発明の開示は、骨又は関節の感染を治療する方法であって、治療有効量の本明細書に記載されるPLYSS2溶解素を、それを必要とする被験体に投与することを含み、骨又は関節の感染がグラム陽性細菌を含む、方法に関する。

【0038】

幾つかの実施形態において、骨感染は骨髄炎、すなわち、感染生物に対する骨の炎症反応である。幾つかの実施形態において、骨髄炎等の骨感染は、スタフィロコッカス・アウレウス又はMRSA等のグラム陽性細菌によるものである。幾つかの実施形態において、グラム陽性細菌は、バイオフィルムを形成し、骨芽細胞内に侵入して生存する能力を有するため、グラム陽性細菌が免疫系及び多くの伝統的な抗生物質を回避することを可能にする。

【0039】

幾つかの実施形態において、骨髄炎は急性骨髄炎である。他の実施形態において、骨感染は慢性骨髄炎である。骨髄炎は、感染と有効な治療との間の遅延が4週間～6週間を超えると、慢性とみなされる。

【0040】

幾つかの実施形態において、骨髄炎は、大腿骨、脛骨、上腕骨、及び橈骨等の長骨の感染を含む。他の実施形態において、骨髄炎は、脊柱、特に腰椎、仙骨、及び骨盤の感染を含む。典型的には、小児は長骨に骨髄炎を発症し、成人は脊柱に骨髄炎を発症する。

【0041】

幾つかの実施形態において、骨髄炎は外因性骨髄炎である。これらの実施形態において、外因性骨髄炎は、骨が皮膚から突き出た時に発生し、膿瘍又は火傷、穿刺創又は開放骨折等の他の外傷から潜在的に感染性の生物が入ることを可能にする。他の実施形態において、外因性骨髄炎は、インプラント関連骨髄炎である。典型的には、インプラントは、例えば、骨折した骨の端部を安定させ、接合するために使用される金属製のプレート、ピン、ロッド、ワイヤ又はねじ等の機械デバイスである。幾つかの実施形態において、インプラント関連骨髄炎は、抗生物質のみが感染を治療するために使用される場合に慢性になる。

【0042】

幾つかの実施形態において、骨髓炎は血行性骨髓炎である。血行性骨髓炎は、既存の感染、例えば膿瘍、フルンケル症（持続性のおでき（persistent boils））、水痘の感染病変（水疱瘡）、並びに副鼻腔、耳、歯、軟部組織、呼吸器及び尿生殖器感染からの生物の広がりにより罹り得る。幾つかの実施形態において、尿生殖器感染は、仙骨又は腸骨の骨髓炎につながる可能性がある。

【0043】

幾つかの実施形態において、慢性骨髓炎は、抗生物質が使われる前の時期（pre-antibiotic era）又は小児期に急性骨髓炎に罹患した患者に生じる。かかる感染は、例えば、死骨に付着したバイオフィルムの無症候性の持続のために、数十年の無症状の期間において再発する可能性がある。

10

【0044】

他の実施形態において、本発明の方法の溶解素は、関節の感染を治療するために使用される。感染した関節としては、感染した股関節、膝関節、足首の関節、肩関節、肘関節、又は手首の関節を挙げることができる。典型的には、感染した関節は膝関節又は股関節である。

【0045】

幾つかの実施形態において、感染した関節は天然関節である。天然関節の感染（本明細書において天然関節の敗血症性関節炎とも称する）は、穿刺傷等の貫通傷が関節の近く又は上方に起こり、細菌が関節に直接侵入できる場合に起こることがある。他の実施形態において、関節感染は、遠隔感染からの細菌が血流を介して天然関節に広がるときに生じる。

20

【0046】

他の実施形態において、感染した関節は、人工関節（例えば、人工関節の敗血症性関節炎を含む）である。人工関節としては、臀部、膝、肩、肘、及び足首のプロテーゼを挙げることができる。典型的には、人工関節は人工股関節又は人工膝関節である。

【0047】

幾つかの実施形態において、本開示の人工関節感染は手術後1年以内に起こる。かかる感染は、手術時の微生物の導入によって開始する場合がある。これは、プロテーゼ又はプロテーゼ周囲組織の直接接触又はエアロゾル汚染のいずれかによって起こり得る。インプラントの表面と接触すると、微生物は表面にコロニーを形成する場合がある。

30

【0048】

他の実施形態において、人工関節感染は、隣接する部位からの感染の広がりによって生じる。例えば、術後早期に、表層手術部位感染（superficial surgical site infection）がプロテーゼを巻き込むように進行する場合がある。他の実施形態において、人工関節感染は、血流を介して感染の遠隔部位からの生物の拡散によって生じる。

【0049】

幾つかの実施形態において、人工関節感染が再発している。例えば、幾つかの実施形態において、関節感染は、再発性多剤耐性S．エピデルミディス人工膝関節感染（PKI）等の再発性多剤耐性感染である。

【0050】

典型的には、感染が起こった人工関節（affected prosthetic joint）から得られた少なくとも2つの別々の組織若しくは体液の試料から病原体が培養によって単離された場合、又は以下の6つの基準のうちの4つが存在する場合に、人工関節感染が指摘される：血清赤血球沈降速度（ESR）及び血清C反応性タンパク質（CRP）濃度の上昇、滑膜白血球数の上昇、滑膜好中球率（PMN%）の上昇、感染が起こった関節（affected joint）における化膿の存在、プロテーゼ周囲組織若しくは体液の1つの培養物中の微生物の単離、又は400倍の倍率でプロテーゼ周囲組織の組織学的分析から観察された5つの強拡大視野における、強拡大視野当たり6個以上の好中球。

40

【0051】

典型的には、病原体を評定するために人工関節から得られる体液は、滑液である。本明細

50

書において使用される場合、「滑液」は滑膜関節の空洞に見られる粘性体液である。滑液の主な役割は、運動中の滑膜関節の関節軟骨間の摩擦を低減することである。

【0052】

幾つかの実施形態において、吸引によって滑液試料を得ることができる。人工関節感染の指標として、総有核細胞数及び好中球パーセンテージについて吸引物 (aspirant) を評定してもよい。典型的には、マイクロリットル当たりの総有核細胞量及び／又は好中球の割合は、人工関節感染に罹患していない被験体の滑液と比較して、人工関節感染に罹患している被験体から得られた滑液中の方が大きい。例えば、幾つかの実施形態において、マイクロリットル当たりの総有核細胞 1100 個の閾値及び／又は人工関節を有する被験体からの滑液中の好中球の閾値 64% は、人工膝関節感染等の人工関節感染を示す。

10

【0053】

幾つかの実施形態において、好中球の量を決定する代わりに、又はそれに加えて、好中球に存在する酵素である白血球エステラーゼのレベルを、例えば、Parvizi et al., "Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme.", J. Bone Joint Surg. Am., 2011, 93:2242-2248 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす) に記載されるように、尿路感染の診断のための膿尿を決定するために広く利用可能な比色ストリップ (colorimetric strips) を用いて評定することができる。

【0054】

しかしながら、より典型的には、人工関節感染の診断が指摘されかどうかを判断し、感染している病原体 (複数の場合もある) を同定するために、滑液試料を培養する。この情報は、治療中に使用される場合、抗生物質の選択の情報も提供することができる。これらの実施形態において、吸引された滑液は、採取時に血液培養瓶に接種するか、又は微生物学の実験室に運ばれて、固体及び／又は液体培地上に接種することができる。例えば、Fehring et al., "Aspiration as a guide to sepsis in revision total hip arthroplasty," 1996, J. Arthroplasty, 11:543-547 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす) を参照されたい。

20

【0055】

原因微生物

幾つかの実施形態において、本発明の骨及び／又は関節の感染は、ストレプトコッカス・ガロリティクス (*Streptococcus gallolyticus*) 及びストレプトコッカス・ニューモニエを含む連鎖球菌種等のグラム陽性細菌によって引き起こされる。しかしながら、より典型的には、骨及び／又は関節の感染は、ブドウ球菌種、例えば、*S. アウレウス* 又は *S. エピデルミディス* によって引き起こされる。他の実施形態において、ブドウ球菌種は、スタフィロコッカス・エピデルミディス、スタフィロコッカス・シミュランス、スタフィロコッカス・カブラエ、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス又はそれらの組合せ等のコアグラゼ陰性ブドウ球菌種である。典型的には、スタフィロコッカス・エピデルミディスは、骨及び／又は関節感染で同定されたコアグラゼ陰性ブドウ球菌種である。

30

【0056】

幾つかの実施形態において、本発明の骨及び／又は関節感染は、腸球菌属由来のグラム陽性細菌種によって引き起こされる。

40

【0057】

幾つかの実施形態において、本発明の骨及び／又は関節感染は、複数菌感染によって引き起こされる。例えば、腸球菌種とブドウ球菌種の組合せは、骨及び／又は関節感染の原因因子として同定され得る。典型的に特定の感染構造に関連する原因微生物の例を下記表 1 に示す。

【0058】

【表 1】

表 1. 骨及び関節感染のグラム陽性細菌の原因因子

病歴	感染した構造物	原因因子（複数の場合もある）
急性	骨	
	長骨	スタフィロコッカス・アウレウス
	脊椎	スタフィロコッカス・アウレウス
	インプラント挿入後の任意の骨	スタフィロコッカス・アウレウス コアグラゼ陰性ブドウ球菌
	開放骨折後の任意の骨	スタフィロコッカス・アウレウス コアグラゼ陰性ブドウ球菌
	関節	
	天然	スタフィロコッカス・アウレウス コアグラゼ陰性ブドウ球菌
	人工	スタフィロコッカス・アウレウス コアグラゼ陰性ブドウ球菌 腸球菌
慢性	骨	
	脊椎	スタフィロコッカス・アウレウス コアグラゼ陰性ブドウ球菌
	長骨	スタフィロコッカス・アウレウス コアグラゼ陰性ブドウ球菌
	骨盤	スタフィロコッカス・アウレウス コアグラゼ陰性ブドウ球菌 腸球菌
	関節	
	天然	スタフィロコッカス・アウレウス
	人工	スタフィロコッカス・アウレウス コアグラゼ陰性ブドウ球菌 腸球菌

10

20

30

40

【0059】

溶解素

被験体において骨及び関節の感染を治療及び／又は予防し、及び／又はバイオフィルム形成を阻害又は破壊する本発明の方法は、本明細書に記載される溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体を、任意に、同じく本明細書に記載される1つ以上の抗生物質と組み合わせて、それを必要とする被験体に投与することを含む。幾つかの実施形態において、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、グラム陽性細菌に対する殺菌及び／又は静菌活性を示す。幾つかの実施形態において、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しく

50

は誘導体はまた、耐性についての低い傾向を示し、抗生物質耐性を抑制し、及び／又は従来の抗生物質との相乗作用を示す。他の実施形態において、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、細菌凝集、バイオフィーム形成を阻害する、及び／又はバイオフィーム（骨又は関節感染を有する被験体におけるバイオフィームを含む）を減少させる若しくは根絶する。

【0060】

本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の殺菌活性は、当該技術分野で既知の任意の方法を用いて決定することができる。例えば、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体を、例えば、Mueller, et al., 2004, Antimicrob Agents Chemotherapy, 48:369-377（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に記載される、タイムキルアッセイを用いて *in vitro* で評定することができる。

10

【0061】

本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の静菌活性も、当該技術分野で既知の任意の方法を用いて評定することができる。例えば、増殖曲線は、例えば最終濃度50%までヒト血清に添加したカチオン調整ミューラーヒントンエープロス（c a M H B / 5 0 % H u S）において、又は100%血清において、又は非標準培地（ウマ血清25%、及びD T Tを0.5 mM添加したc a M H B（c a M H B - H S D））において作成してもよい（performed）。グラム陽性細菌を溶解素と共に懸濁し、培養濁度を、例えば、S P E C T R A M A X（商標）M3マルチモードマイクロプレートリーダー（Molecular Devices）を用いて、例えば、24℃で11時間攪拌しながら1分ごとに読み取って、600 nmの光学密度で測定することができる。倍加時間は、Saito et al, 2014, Antimicrob Agents Chemother 58:5024-5025（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に記載される方法に従い、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体がない状態の培養物の倍加時間と比較して、フラスコ内にて通気させながら増殖させた培養物の対数増殖期において計算することができる。

20

【0062】

幾つかの実施形態において、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、ヒト滑液等の滑液の存在下で溶解素活性を示す。滑液中の溶解素の活性を評定するための好適な方法は、当該技術分野において知られており、実施例に記載されている。簡潔に述べると、滑液中の溶解素及びそのM I C値について、例えば親溶解素又は溶解素がない場合と比較して、M I C値（すなわち、対照と比較して細菌増殖の少なくとも80%を抑制するのに十分なペプチドの最小濃度）を決定することができる。

30

【0063】

より具体的には、溶解素のM I C値を、例えば、生理的塩濃度を添加したミューラーヒントンプロス（M H B）及びヒト滑液等の滑液において、例えば、S. エピデルミディス又はS. アウレウスについて決定することができる。例えば、S. エピデルミディスに対する溶解素の最小発育阻止濃度（M I C）は、非標準培地（ヒト滑液を50%まで添加したc a M H B（c a M H B - H S F））において、Clinical and Laboratory Standards Institute（C L S I）の方法論（M 0 7 - A 1 1、2 0 1 8、その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に従い、微量液体希釈（B M D）を用いて決定することができる。実施例を参照されたい。

40

【0064】

幾つかの実施形態において、溶解素、変異体溶解素、その活性フラグメント又は誘導体を含む本発明の単離されたポリペプチドは、例えばヒト血清又は滑液の存在下で細菌を阻害するために必要な抗生物質の最小発育阻止濃度（M I C）を低下させる。このM I Cを評定するための任意の既知の方法が使用され得る。幾つかの実施形態において、チェッカーボードアッセイは、抗生物質濃度に対する溶解素の効果を決定するために使用される。チェッカーボードアッセイは、微量液体希釈によるM I C決定のためのC L S I法の修正に

50

基づく (CLSI, 2015, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-10th Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす)、及びCeri et al., 1999, J. Clin. Microbiol. 37:1771-1776 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす) を参照されたい)。

【0065】

チェッカーボードは、例えば、最初に、各ウェルが横軸に沿って2倍希釈された同量の抗生物質を有する96ウェルポリプロピレンマイクロタイタープレートの列を調製することによって構築される。別々のプレートで、各ウェルが、例えば、縦軸に沿って2倍希釈された同量の溶解素を有する比較可能な行を調製する。次いで、各列が一定量の抗生物質及び溶解素の2倍希釈物を有し、各行が一定量の溶解素及び抗生物質の2倍希釈物を有するように、溶解素及び抗生物質の希釈物を組み合わせる。これにより、各ウェルは、溶解素と抗生物質との独自の組合せを有する。例えば、細菌をc a M H B - H S F 中 1×10^5 C F U / m l の濃度で薬物の組合せに添加する。次いで、単独及び組合せでの各薬物のM I Cを、例えば周囲空気中にて37℃で16時間の後に記録する。部分阻止濃度の総和 (Σ F I C) を各薬物について算出し、最小 Σ F I C 値 (Σ F I C m i n) を用いて溶解素／抗生物質の組合せの効果を決定する。

10

【0066】

細菌凝集の阻害は、当該技術分野で既知の任意の方法を用いて評価することができる。例えば、Walker et al., すなわちWalker et al., 2013, PLoS Pathog, 9:e1003819 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす) に記載される方法を使用してもよい。

20

【0067】

溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体が、i n v i t r o でバイオフィーム形成を阻害又は減少させる能力を評価する方法は、当該技術分野でよく知られており、微量液体希釈最小発育阻止濃度 (M I C) 法を修正した変法が挙げられる (Ceri et al., 1999, J. Clin Microbiol. 37:1771-1776 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす)、及びSchuch et al., 2017, Antimicrob. Agents Chemother. 61, pages 1-18 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす) を参照されたい)。最小バイオフィーム根絶濃度 (M B E C) を評価する方法では、例えばS. アウレウス株又はS. エピデルミディスの新鮮なコロニーを培地、例えばリン酸緩衝液 (P B S) に懸濁し、例えばT S B g (0.2% グルコースを添加したトリプシンソイブロス) で100倍希釈し、例えば0.15 ml アリコートとしてC a l g a r y B i o f i l m D e v i c e (96個のポリカーボネートペグを備える蓋を有する96ウェルプレート; Innovotech Inc.) に添加し、例えば37℃で24時間インキュベートする。次いで、バイオフィームを洗浄し、例えばT S B g 中の例えば2倍希釈系列の溶解素によって、例えば37℃で24時間処理する。処理後に、ウェルを洗浄し、例えば37℃で風乾し、例えば0.05% クリスタルバイオレットで10分間染色する。染色後に、バイオフィームを、例えば33% 酢酸で脱染し、例えば抽出されたクリスタルバイオレットのO D 6 0 0 を決定する。各サンプルのM B E C が、クリスタルバイオレット定量化によって評価される、バイオフィームのバイオマスの95% 超を除去するのに必要とされる最小溶解素濃度である。

30

40

【0068】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載されるように、本発明の溶解素、その変異体溶解素及びフラグメントを、骨及び／又は関節感染を有する被験体から得られたグラム陽性細菌溶解物に対して評価する。かかる分離株を得る方法は当該技術分野でよく知られており、例えば、Schmidt-Malan et al., Diag. Microbiol. Infect. Dis. 85:77-79 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす) に記載されている。

【0069】

50

本発明の方法での使用に適した溶解素としては、国際公開第2013/170015号及び国際公開第2013/170022号（それぞれ、その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に記載されているP l y S s 2溶解素が挙げられる。本明細書において使用される場合、「P l y S s 2溶解素」、「P l y S s 2溶解素（複数）」、「P l y S s 2」、「エクセバカーゼ」及び「C F - 3 0 1」という用語は、区別なく使用され、国際公開第2013/170015号及び国際公開第2013/170022号に記載されるように、本明細書において配列番号1として記載されるP l y S s 2溶解素（開始メチオニン残基の有無にかかわらず）若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体を包含する。P l y S s 2は、ストレプトコッカス・スイス（*Streptococcus suis*）ゲノムのプロファージ内にコードされる抗ブドウ球菌溶解素として同定され、以下の表2に記載の細菌に対して殺菌及び静菌活性を示す。

10

【0070】

【表2】

表2. 種々の細菌の増殖の減少及び溶解素、P l y S s 2による相対死滅（一部を掲載）

細菌	P l y S s 2による相対死滅
スタフィロコッカス・アウレウス (VRSA, VISA, MRSA, MSSA)	+++
ストレプトコッカス・スイス	+++
スタフィロコッカス・エピデルミディス	++
スタフィロコッカス・シミュランス	+++
リステリア・モノサイトゲネス	++
エンテロコッカス・フェカリス	++
ストレプトコッカス・ディスガラクティエ	++
ストレプトコッカス・アガラクティエ	+++
ストレプトコッカス・ピオゲネス	+++
ストレプトコッカス・エクイ	++
ストレプトコッカス・サングイニス	++
ストレプトコッカス・ゴルドニ	++
ストレプトコッカス・ソブリヌス	+
ストレプトコッカス・ラッタス	+
ストレプトコッカス・オラリス	+
ストレプトコッカス・ニューモニエ	+
バチルス・チューリンゲンシス	-
バチルス・セレウス	-
バチルス・サブチリス	-
バチルス・アントラシス	-
エシェリヒア・コリ	-
エンテロコッカス・フェシウム	-
シュードモナス・エルギノーサ	-

20

30

40

50

【0071】

幾つかの実施形態において、本発明の方法での使用に適した溶解素は、配列番号1のP l y S s 2溶解素である。配列番号1のP l y S s 2溶解素は、ほとんどのバクテリオファージ溶解素に特徴的なドメイン配置を有し、細胞壁結合型C末端ドメイン（図1）に連結された触媒N末端ドメイン（図1）によって規定される。N末端ドメインは、溶解素及び他の細菌細胞壁修飾酵素に共通するシステインヒスチジン依存性アミドヒドロラーゼ／ペプチダーゼ（CHAP）ファミリーに属する。C末端ドメインは、多くの場合、溶解素の細胞壁結合要素を形成するSH3bファミリーに属する。図1は、配列番号1のP l y S s 2溶解素を示し、N末端ドメイン及びC末端ドメインを影付きの領域として示す。N末端CHAPドメインは、LNNで始まる1つ目の影付きアミノ酸配列領域に対応し、C末端SH3bドメインはRSYで始まる2つ目の影付き領域に対応する。

10

【0072】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示される方法による使用に適した溶解素は、以下の溶解素の1つ以上を含む：pp55（配列番号3）、pp61（配列番号4）、pp65（配列番号5）、pp296（配列番号6）、pp324（配列番号7）、pp325（配列番号8）、pp338（配列番号9）、pp341（配列番号10）、pp388（配列番号11）、pp400（配列番号12）、pp616（配列番号13）、pp619（配列番号14）、pp628（配列番号15）、pp632（配列番号16）、及びpp642（配列番号17）。

20

【0073】

幾つかの実施形態において、本発明の方法は、変異体溶解素を、それを必要とする被験体に投与することを含む。本発明の方法での使用に適した溶解素変異体としては、参照溶解素の少なくとも1つの生物学的機能を保持する、配列番号1に対して少なくとも1つの置換、挿入及び／又は欠失を有するポリペプチドが挙げられる。幾つかの実施形態において、変異体溶解素は、S. アウレウス及びS. エピデルミディスを含む広範囲のグラム陽性細菌に対する溶菌効果及び／又は静菌効果、並びに凝集を阻害する、バイオフィーム形成を阻害する、及び／又はバイオフィームを減少させる能力を含む抗菌活性を示す。幾つかの実施形態において、本発明の溶解素変異体は、グラム陽性細菌を抗生物質の影響を受けやすいものにする。

30

【0074】

幾つかの実施形態において、本発明の方法での使用に適した溶解素変異体は、配列番号1と少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%、又は例えば少なくとも99%の配列同一性を有する単離されたポリペプチド配列を含み、変異体溶解素は、本明細書に記載される配列番号1のアミノ酸配列を有するP l y S s 2溶解素の1つ以上の生物学的活性を保持する。

40

【0075】

溶解素変異体を、国際公開第2013/170015号（その全体が引用することで本明細書の一部をなす）に記載されるように、当該技術分野で既知の任意の方法により、例えば、配列番号1のP l y S s 2溶解素を部位特異的突然変異誘発により改変するか、又は配列番号1のP l y S s 2溶解素を産生する宿主の突然変異を介して形成することでき、これらの溶解素変異体は本明細書に記載される生物学的機能を1つ以上保持する。例えば、当業者は、例えば、配列番号1のP l y S s 2溶解素のCHAPドメイン及び／又はSH3bドメインの置換又は置き換えを合理的に作製し試験することができる。Genbankデータベースとの配列比較を、例えば、置換するアミノ酸を同定するために、CHAP及び／又はSH3bドメイン配列のいずれか又は両方、又は配列番号1のP l y S s 2溶解素の全長アミノ酸配列を用いて行うことができる。例えば、配列番号1のP l y S s 2アミノ酸配列中のバリンアミノ酸残基19でバリンをアラニンに置き換えた突然変異体又は変異体は活性であり、配列番号1のP l y S s 2溶解素と同様の方法で、また同じくらい効果的にグラム陽性細菌を死滅させることができる。

50

【0076】

さらに、図 1 に示すように、CHAPドメインは、種々のポリペプチドのCHAPドメインに特徴的で保存されている、保存されたシステイン及びヒスチジンのアミノ酸配列（CHAPドメインの最初のシステイン及びヒスチジン）を含む。例えば、保存されたシステイン残基及びヒスチジン残基は、活性又は能力を維持するために、Plyss2の突然変異体又は変異体で維持されなくてはならないと予測することは妥当である。したがって、本開示の溶解素変異体で保持するために特に望ましい残基は、配列番号1のCHAPドメイン内の活性部位残基Cys26、His102、Glu118、及びAsn120を含む。特に望ましい置換として、正電荷が維持され得るようにArgからLysへの置換及びその逆、負電荷が維持され得るようにAspからGluへの置換及びその逆、遊離-OHを維持できるようにThrからSerへの置換、並びに遊離NH₂を維持できるようにAsnからGlnへの置換が挙げられる。

10

【0077】

好適な変異体溶解素は、PCT出願公開番号である国際公開第2019/165454号（国際出願第PCT/US2019/019638号、その全体が引用することで本明細書の一部をなす）に記載されている。特に、好適な変異体溶解素としては、本明細書に配列番号3～配列番号17として記載されているもの、並びに配列番号3～配列番号17のいずれか1つと少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%、又は例えば少なくとも99%の配列同一性を有する変異体溶解素が挙げられ、変異体溶解素は、本明細書に記載される配列番号1のアミノ酸配列を有するPlyss2溶解素の1つ以上の生物学的活性を保持する。

20

【0078】

配列番号3～配列番号17は、抗菌活性及び有効性を維持しながら、対応する野生型Plyss2溶解素（配列番号1）に対して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する改変溶解素ポリペプチドである。配列番号3～配列番号17を、下記表Aに示すように、配列番号1に対するそれらのアミノ酸置換を参照して記載することができる。改変溶解素ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1との相違及びそのアミノ酸残基の位置を参照する）を、以下のように一文字アミノ酸コードを使用してまとめる。

【0079】

30

40

50

【表 3】

表 A

番号	置換の場所							
	TCE 1	TCE 2	TCE 3	TCE 4	TCE 5	TCE 6	TCE 7	TCE 8
pp55 (配列番号 3)		L92W	V104S	V128T 及びY137S				
pp61 (配列番号 4)		L92W	V104S	V128T及 びY137S			S198H	I206E
pp65 (配列番号 5)		L92W	V104S	V128T及 びY137S			S198Q	V204A 及びV212A
pp296 (配列番号 6)		L92W	V104S	V128T及 びY137S	Y164K	N184D	S198Q	
pp324 (配列番号 7)		L92W	V104S	V128T及 びY137S	Y164N	N184D		
pp325 (配列番号 8)		L92W	V104S	V128T及 びY137S	Y164N		R195E	
pp338 (配列番号 9)		L92W	V104S	V128T及 びY137S		N184D	S198H	
pp341 (配列番号 10)		L92W	V104S	V128T及 びY137S		N184D		V204A 及び V212A
pp388 (配列番号 11)					Y164N	N184D	R195E	V204K 及び V212E
pp400 (配列番号 12)	R35E	L92W	V104S	V128T及 びY137S				
pp616 (配列番号 13)				V128T及 びY137S	Y164K			
pp619 (配列番号 14)		L92W	V104S	V128T及 びY137S	Y164K			
pp628 (配列番号 15)		L92W	V104S	V128T及 びY137S	Y164K			V204K 及び V212E
pp632 (配列番号 16)		L92W	V104S	V128T及 びY137S	Y164K	N184D	S198Q	V204K 及び V212E
pp642 (配列番号 17)		L92W	V104S	V128T及 びY137S	Y164K			I206E 及び V214G

10

20

30

40

50

【0080】

幾つかの実施形態において、本発明の方法は、溶解素の活性フラグメントを、それを必要とする被験体に投与することを含む。好適な活性フラグメントは、本明細書に記載される溶解素実施形態のタンパク質又はペプチドフラグメントの生物学的に活性な部分を保持するものを含む。かかる変異体は、溶解素タンパク質の全長タンパク質よりも少ないアミノ酸を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドを含み、対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を示す。典型的には、生物学的に活性な部分は、対応するタンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメイン又はモチーフを含む。Plyss2溶解素のN末端CHAPドメインの例示的なドメイン配列を図1に提供する。Plyss2溶解素のC末端SH3bドメインの例示的なドメイン配列も図1に提供する。本開示のタンパク質又はタンパク質フラグメントの生物学的に活性な部分は、例えば、長さが10、25、50、10

0のアミノ酸であるポリペプチドであり得る。タンパク質の他の領域が欠失される他の生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製され、本実施形態のポリペプチドのネイティブ形態の1つ以上の機能的活性について評価することができる。

【0081】

幾つかの実施形態において、好適な活性フラグメントとしては、本明細書に記載される活性フラグメントと、少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%、又は例えば少なくとも99%の配列同一性を有する活性フラグメントが挙げられ、その活性フラグメントは、例えば図1に示すようなCHAP及び／又はSH3ドメインの少なくとも1つの活性を保持する。

【0082】

本発明の方法で使用される、本明細書に記載の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、特定のバクテリオファージに感染した後に細菌生物によって産生され得るか、又は組換えにより若しくは合成的に製造若しくは調製され得る。溶解素ポリペプチド配列及び溶解素ポリペプチドをコードする核酸が本明細書に記載され、参照される限り、本発明の溶解素は、例えば、国際公開第2013/170015号（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に記載されるような当該技術分野の標準的な方法を用いて、ファージゲノムからの溶解素に対する単離された遺伝子を介して、該遺伝子を導入ベクターに入れ、該導入ベクターを発現系にクローニングすることにより産生され得る。本発明の溶解素変異体は、切断型、キメラ型、シャッフル型又は「天然型」であってもよく、例えば、米国特許第5,604,109号（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に記載されているように組合せであってもよい。

【0083】

特定のコドンが異なるアミノ酸をコードするコドンに変更されるか、アミノ酸が別のアミノ酸に置換されるか、又は1つ以上のアミノ酸が欠失されるように、アミノ酸配列において、又は配列番号1に記載される溶解素配列を含む本明細書に記載されるポリペプチド及び溶解素をコードする核酸配列において、又はそれらの活性なフラグメント若しくは切断型において、突然変異を作製することができる。

【0084】

かかる突然変異は、一般的には可能な限りヌクレオチド変化を少なくすることによって行われる。この種の置換突然変異は、非保存的な方法（例えば、特定のサイズ又は特性を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸から別の分類に属するアミノ酸へとコドンを変化させることによる）又は保存的な方法（例えば、特定のサイズ又は特性を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸から同じ分類に属するアミノ酸へとコドンを変化させることによる）で、得られるタンパク質中のアミノ酸を変化させることができる。かかる保存的变化は、概して、得られるタンパク質の構造及び機能の変化を少なくする。非保存的な変化は、得られるタンパク質の構造、活性又は機能を変更する可能性がより高い。本開示は、得られるタンパク質の活性又は結合特性を著しく変化させない保存的变化を含む配列を含むように考慮されるべきである。そのため、当業者は、本明細書に提供されるPLYS2溶解素ポリペプチドの配列の再検討、また他の溶解素ポリペプチドに利用可能なそれらの知識及び公開情報に基づいて、溶解素ポリペプチド配列においてアミノ酸の変化又は置換を行うことができる。本明細書に提供される溶解素（複数の場合もある）の配列内の1つ以上、1つ又は数個、1つ又は幾つか、1個～5個、1～10個又は他のその数のアミノ酸を置き換えて又は置換して、それらの突然変異体又は変異体を生成するため、アミノ酸の変化を行うことができる。それらのかかる突然変異体又は変異体を、機能について予測するか、又は例えば、ブドウ球菌、連鎖球菌、又は腸球菌に対する本明細書に記載される抗菌活性についての機能若しくは能力、及び／又は本明細書に記載され、特に提供されている溶解素（複数の場合もある）に匹敵する活性を有することについて試験してもよい。そのため、溶解素の配列に対して行われる変化、及び本明細書に記載される突然変異体又は変異体を、当該技術分野で既知であり、本明細書に記載されるアッセイ及び方法を用いて試験することができる。当業者は、本明細書の溶解素（複数の場合もある）のドメイン構

10

20

30

40

50

造に基づいて、合理的で保存的又は非保存的な置換を含む、置換若しくは置換に適した1つ以上の、1つ若しくは幾つかのアミノ酸、及び／又は置換若しくは置換に適さない1つ以上のアミノ酸を予測することができる。

【0085】

抗生物質

幾つかの実施形態において、本明細書に記載される骨及び関節感染を治療又は予防する方法は、1つ以上の抗生物質とP l y S s 2溶解素とを治療有効量で共投与することを含む。幾つかの実施形態において、溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体と、本明細書に記載される1つ以上の抗生物質との共投与は、S . アウレウス又はS . エピデルミディス等のグラム陽性細菌に対する相乗的な殺菌及び／又は静菌効果をもたらす。典型的には、共投与は、静菌及び／又は殺菌活性に対する相乗効果をもたらす。他の実施形態において、共投与は、バイオフィーム形成及び／又は凝集を含む病原性の表現型を抑制するために使用される。幾つかの実施形態において、共投与は、被験体におけるバイオフィームの量を減少させるために使用される。

10

【0086】

本発明の方法での使用に適した抗生物質としては、種々の種類及び分類の抗生物質、例えばペニシリン（例えば、メチシリン、オキサシリン）、セファロスポリン（例えば、セファレキシン及びセファクロル）、モノバクタム（例えば、アズトレオナム）及びカルバペネム（例えば、イミペネム及びエルタペネム）を含むβ-ラクタム；マクロライド（例えば、エリスロマイシン、アジスロマイシン）、アミノグリコシド（例えば、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン）、グリコペプチド（例えば、バンコマイシン、テイコプラニン）、オキサゾリジノン（例えば、リネゾリド及びテジゾリド）、リポペプチド（例えば、ダプトマイシン）、並びにスルホンアミド（例えば、スルファメトキサゾール）が挙げられる。

20

【0087】

幾つかの実施形態において、抗生物質は、リファンピン又はリファブチン等のリファマイシン抗生物質を含む。典型的には、リファマイシン抗生物質が使用される。

【0088】

幾つかの実施形態において、抗生物質は、典型的には、バンコマイシン又はダプトマイシン等の急性骨髄炎等の骨髄炎を治療するために使用される抗生物質である。幾つかの実施形態において、抗生物質、例えばダプトマイシンは骨組織によく浸透する。

30

【0089】

本開示の更なる方法

別の態様において、本開示は、本明細書に記載されるグラム陽性細菌による骨又は関節の感染を予防する方法であって、本明細書に記載されるように、治療有効量のP l y S s 2溶解素又はその変異体を、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法に関する。任意に、本明細書に記載される抗生物質はP l y S s 2溶解素と共投与される。

【0090】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載されるP l y S s 2溶解素又はその変異体は、デブリードマン及びインプラント再置換（DAIR）と併用して投与される。これらの実施形態において、例えば、インプラントの周囲の感染組織及び潜在的に感染した組織のデブリードマンは、典型的には、その後、滅菌生理食塩水等の多量の流体を用いた、関与する組織の関節鏡下洗浄が続く。幾つかの実施形態において、本明細書に記載されるP l y S s 2溶解素又はその変異体は、関節鏡検査中、関節鏡下洗浄前、その間又はその後に投与される。幾つかの実施形態において、テジゾリド等の本明細書に記載される従来の抗生物質は、その後、例えば6週間～24週間にわたり被験体に経口投与又は静脈内投与される。

40

【0091】

幾つかの実施形態において、本開示の溶解素が投与される被験体は、高齢者であるか、又は骨若しくは関節の高い感染リスクと関連する状態に罹患している。例えば、骨又は関節

50

の感染のリスクがある被験体は、肥満（例えば、ボディマスインデックス（BMI）閾値が35）に罹患している可能性がある。例えば、高齢者の被験体は、少なくとも65歳、例えば65歳～90歳、75歳～90歳、又は79歳～89歳である。理論によって制限されるものではないが、肥満を伴う人工骨又は人工関節の感染等の骨又は関節の感染リスク増加の考えられる理由としては、手術期間の延長及び／又は他の併存症の存在が挙げられる。

【0092】

幾つかの実施形態において、骨又は関節感染、特に人工関節感染のリスクがある被験体は、糖尿病に罹患している。理論によって制限されるものではないが、糖尿病に関連するリスクは、グルコースレベルの上昇、白血球機能の障害、又は糖尿病を有する被験体における微小血管の変化の存在下でのバイオフィルム形成の増加に起因する可能性があり、創傷治癒及び表層手術部位感染の発症に影響を及ぼし得る。

10

【0093】

骨及び／又は関節感染の他のリスク因子としては、関節リウマチ、男性の性別、及び喫煙が挙げられる。さらに、インプラント手術の前年の菌血症の診断も、人工関節感染等の骨及び／又は関節感染の危険因子である。

【0094】

別の態様において、本発明の開示は、グラム陽性細菌バイオフィルムの形成を阻害するか、又は滑液中に形成されたグラム陽性細菌バイオフィルムを破壊する方法であって、本明細書に記載されるグラム陽性細菌を死滅させることができる溶解素を含む組成物を投与することを含み、溶解素は、本明細書にも記載されるようにPLYS2溶解素であり、バイオフィルムが効果的に阻害又は分散される、方法に関する。本開示のこの態様におけるグラム陽性細菌は、本明細書に記載されるグラム陽性細菌のいずれかを含み得る。しかしながら、典型的には、グラム陽性細菌はスタフィロコッカス・エピデルミディスである。

20

【0095】

投与量及び投与

本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の、それを必要とする被験体に投与される投与量は、治療されている感染の活動性、治療対象の被験体の年齢、健康及び総合的な健康状態、特定の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の活性、本開示による溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体と対になり、かかる対による併用効果を有する抗生物質が存在する場合には、その抗生物質の性質及び活性を含む多くの要因に依存する。一般に、投与される本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の有効量は、0.00001mg/kg～200mg/kg、例えば0.2mg/kg～約0.3mg/kg、例えば0.25mg/kg、例えば1mg/kg～150mg/kg、例えば40mg/kg～100mg/kgの範囲に収まると予想され、最大14日間、毎日1回～4回投与される。抗生物質は、標準的な投与計画で、又は相乗作用を考慮してより少ない量で投与され得る。しかしながら、（溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体、又はそれに伴って投与される任意の抗生物質に関わらず）かかる投与量及び投与計画はいずれも、最適化の対象となる。最適な投与量は、当業者が備えている技能の範囲内であるが、本開示を考慮に入れて、*in vitro* 及び *in vivo* でのパイロット有効性実験を行うことにより決定され得る。

30

40

【0096】

本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は殺菌を提供し、より少量で使用すると静菌作用が得られ、或る範囲の抗生物質耐性菌に対して活性であり、耐性の発現と関連しないことが企図される。本開示に基づいて、臨床現場では、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、或る特定の抗生物質（耐性が生じた抗生物質であっても）と併用して、薬剤耐性細菌及び多剤耐性細菌から生じる骨及び関節の感染を治療するための組成物の強力な代替（又は添加剤若しくは成分）である。グラム陽性細菌に対する既存の耐性機構は、本発明のポリペプ

50

チドの溶菌活性に対する感受性に影響を与えないはずである。

【0097】

本開示の任意のポリペプチドでは、治療有効用量は、細胞培養アッセイ又は動物モデル（通常はマウス、ウサギ、イヌ、又はブタ）のいずれかで最初に推定され得る。望ましい濃度範囲及び投与経路を達成するために動物モデルを使用することもできる。次いで、得られた情報を、ヒトにおける有効用量及び投与経路を決定するために使用することができる。しかしながら、典型的には、全身投与、特に静脈内投与が用いられる。十分なレベルの有効成分を提供するか、又は所望の効果を維持するように、投与量及び投与を更に調整することができる。考慮され得る追加の要因としては、疾患状態の重症度、患者の年齢、体重及び性別；食餌、望ましい治療期間、投与方法、投与の時間及び頻度、薬物の組合せ（複数の場合もある）、反応感受性、並びに治療法に対する忍容性／応答及び治療医の判断が挙げられる。

10

【0098】

治療計画は、毎日（例えば、毎日1回、2回、3回等）、隔日（例えば、1日おきに1回、2回、3回等）、半週毎、毎週、2週間に1回、1ヶ月に1回等の投与を必要とし得る。一実施形態において、治療を、持続点滴として与えることができる。単位用量を複数回で投与することができる。また、臨床症状を監視することによって指示されるというように、間隔が不規則であってもよい。代替的には、単位用量を持続放出製剤として投与することができ、その場合、必要な投与頻度はより少なくなる。投与量及び頻度は、患者によって異なる可能性がある。限局性の（localized）投与、例えば、鼻腔内、吸入、直腸等、又は全身投与、例えば経口、直腸（例えば、浣腸による）、i.m.（筋肉内）、i.p.（腹腔内）、i.v.（静脈内）、s.c.（皮下）、経尿道等に対してかかるガイドラインを調整することが当業者に理解される。

20

【0099】

幾つかの実施形態において、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体と、本明細書に記載の1つ以上の抗生物質、例えば、ダプトマイシンとが同時に投与される。他の実施形態において、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体と、本発明の方法の1つ以上の抗生物質、例えば、ダプトマイシンとが任意の順序で連続して、例えば順次投与される。幾つかの実施形態において、溶解素は、標準治療抗生物質処置、例えば、オキシサシリン及びゲンタマイシン又はダプトマイシンの2週間のコースの投与中又はその後に投与される。本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体と、本発明の1つ以上の抗生物質とを、単回用量又は複数回用量で、単独で又は組み合わせて投与することができる。

30

【0100】

本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体と、1つ以上の抗生物質とを、同じ投与様式又は異なる投与様式によって投与してもよく、1回、2回又は複数回で、1つ以上を組み合わせ又は個別に投与してもよい。したがって、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体を、特に応答、例えば、殺菌及び／又は静菌効果及び／又は凝集及び／又はバイオフィルムの形成若しくはその減少に対する効果に応じて、初回用量、その後に続く用量（複数の場合もある）にて投与することができ、抗生物質の用量（複数の場合もある）と組み合わせ又はそれと交互に行ってもよい。典型的には、溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、単回ボラスで投与され、その後本開示の1つ以上の抗生物質の従来の用量及び投与様式が続く。

40

【0101】

より典型的な実施形態において、本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の単回ボラスを被験体に投与し、その後、従来の投与計画、例えば、標準治療（SOC）投与量のダプトマイシン等の本開示の1つ以上の抗生物質が続く。他の典型的な実施形態において、ダプトマイシン等の本開示の1つ以上の抗生物質を

50

被験体に投与し、その後に本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の単回ポースが続き、その後に、従来の投与量のダプトマイシン等の本開示の1つ以上の抗生物質の追加の投与量が続く。

【0102】

幾つかの実施形態において、溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、MICレベル未満、例えば、 $0.9 \times \text{MIC} \sim 0.0001 \times \text{MIC}$ の範囲のMICレベル未満で投与され得る。かかるMICレベル未満では、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、典型的には、グラム陽性細菌の増殖を阻害し、凝集を減少させ、及び／又はバイオフィーム形成を阻害するか、又はバイオフィームを減少若しくは根絶するために使用される。

10

【0103】

幾つかの実施形態において、溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の単回のMIC未満の用量を被験体に投与し、続いて本開示の1つ以上の抗生物質を1回以上投与する従来の投与計画が適用される。他の更に典型的な実施形態において、ダプトマイシン等の本開示の1つ以上の抗生物質を従来の投与量で被験体に投与し、その後にMIC未満の用量の本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の単回ポースが続き、その後に、従来の投与量のダプトマイシン等の本開示の1つ以上の抗生物質の追加の投与量が続く。

【0104】

理論によって制限されるものではないが、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体のMIC未満の投与量は、溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体のペプチドグリカン加水分解活性によって媒介される細胞エンベロープへの非致命的損傷をもたらす場合がある。幾つかの実施形態において、細胞エンベロープに生じる物理的及び機能的な変化が増殖の遅延の主な原因となる。かかる物理的及び機能的変化としては、例えば、細胞壁の不安定化、膜透過性の増加及び膜電位の消失が挙げられる。本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、典型的には、細菌の細胞膜に直接作用しないが、細胞膜透過性及び静電ポテンシャルに対するいかなる影響も、非常に低い濃度で溶解素のペプチドグリカン加水分解活性（及び細胞エンベロープの不安定化）によって誘発される浸透圧ストレスの結果である可能性が高い。また、局所的な細胞壁加水分解は、内膜の押し出し及び細胞孔の形成、並びに細胞合成及び加水分解の離脱（uncoupling）、細胞壁の厚さの変化をもたらす、その後の増殖停止をもたらす可能性があるものと仮定されている。

20

30

【0105】

幾つかの実施形態において、本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体のMIC未満の濃度は、細菌細胞エンベロープを損傷し、MIC未満の用量の本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体がない場合よりも従来の抗生物質の影響を受けやすい細菌をもたらす。

【0106】

幾つかの実施形態において、MIC未満及び／又はMICレベルの用量での本発明の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体は、バイオフィーム、特に *in vivo* バイオフィームを減少させることができる。当該技術分野で知られているように、*in vivo* バイオフィームは、*in vitro* バイオフィームとは構造的に異なる場合がある。典型的には、*in vitro* バイオフィームと *in vivo* バイオフィーム（慢性感染症に関連するもの等）との違いは、*in vitro* バイオフィーム系における防御機構曝露の欠如によるものである。ほとんどの *in vivo* バイオフィーム生育環境では、膿、並びに他の排泄された液体及びポリマーの存在と共に、食細胞、更にはバクテリオファージが存在する場合がある。かかる変数は、制御又は再現が困難な *in vitro* モデル系では一般的に回避され得る。

40

【0107】

幾つかの実施形態において、本開示の1つ以上の抗生物質を、 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、

50

3×MIC、及び4×MICのように、MICレベルで又はMICレベル超で、それを必要とする被験体に投与する。他の実施形態において、抗生物質はMICレベル未満で、例えば0.9×MIC～0.0001×MICの範囲で投与される。

【0108】

幾つかの実施形態において、本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の単回のMIC未満の用量を被験体に投与し、その後、ダプトマイシン等の本開示の1つ以上の抗生物質の1つ以上の用量が続き、ここで、抗生物質の用量（複数の場合もある）はMICレベル未満でも投与される。

【0109】

他の実施形態において、ダプトマイシン等の本開示の1つ以上の抗生物質をMIC未満の投与量で被験体に投与し、その後MIC未満の投与量の本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体の単回ポースが続き、その後、MIC未満の投与量のダプトマイシン等の本開示の1つ以上の抗生物質の1つ以上の追加の投与量が続く。

【0110】

製剤

任意に、単独で、又は本明細書に記載される1つ以上の抗生物質と組み合わせて若しくは連続してのいずれかで投与される、本開示の溶解素若しくはそれらの活性フラグメント、又はそれらの変異体若しくは誘導体は、それぞれ単一の医薬製剤に含まれ得るか、又は溶液、懸濁液（a suspension）、エマルジョン、吸入用粉末、エアロゾル、若しくはスプレー（a spray）、錠剤、丸剤、ペレット、カプセル剤、液体を含有するカプセル剤、粉末、持続放出製剤、坐剤、タンポン用途エマルジョン、エアロゾル、スプレー（sprays）、懸濁液（suspensions）、ロゼンジ、トローチ、キャンディー、注射剤、チューインガム、軟膏、スメア（smears）、時間放出パッチ、液体を吸収したワイプ、及びそれらの組合せの形態で別々に製剤化され得る。

【0111】

幾つかの実施形態において、医薬製剤の投与は、全身投与を含み得る。全身投与は、経腸又は経口（すなわち、物質を消化管を介して与える）、非経口（すなわち、物質を注射又は吸入等の消化管以外の経路によって与える）とすることができる。したがって、本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体と、任意に1つ以上の抗生物質とを、経口的に、非経口的に、吸入により、局所的に、経直腸的に、経鼻的に、バツカルで若しくは留置されたりザーバーにより、又は任意の他の既知の方法により被験体に投与することができる。本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又は変異体若しくは誘導体、及び／又は1つ以上の抗生物質を、持続放出剤形を用いて投与することもできる。

【0112】

経口投与の場合、本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体と、任意に1つ以上の抗生物質とを、固体又は液体の調製物、例えば錠剤、カプセル剤、粉末、溶液、懸濁液及び分散液に製剤化することができる。幾つかの実施形態において、本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体及び／又は1つ以上の抗生物質を、例えば、ラクトース、スクロース、コーンスターチ、ゼラチン、ジャガイモデンプン、アルギン酸及び／又はステアリン酸マグネシウム等の賦形剤と共に製剤化することができる。

【0113】

錠剤及び丸剤等の固体組成物を調製するため、本開示の溶解素若しくはその活性フラグメント、又はその変異体若しくは誘導体、及び／又は1つ以上の抗生物質を薬学的賦形剤と混合して固体プレ製剤組成物を形成する。望ましい場合、標準的な手法によって錠剤を糖コーティング又は腸溶性コーティングしてもよい。錠剤又は丸剤を、長期作用の利点を与える剤形を提供するためにコーティングしてもよく、又は他の形で配合させてもよい。例えば、錠剤又は丸剤は、内部製剤（inner dosage）及び外部製剤（outer dosage）

10

20

30

40

50

の成分を含むことができ、後者は前者を覆うエンベロープの形態である。2つの製剤成分を腸溶層によって分離することができ、胃内での崩壊に抵抗するにはたらし、内側の成分が十二指腸をそのまま通過するか、又は放出が遅延することを可能にする。かかる腸溶層又はコーティング剤には様々な材料を使用することができ、かかる材料としては、多くのポリマー酸、並びにシェラック、セチルアルコール及び酢酸セルロース等の材料とのポリマー酸の混合物が挙げられる。

【0114】

他の実施形態において、本開示の医薬製剤は吸入可能な組成物として製剤化される。幾つかの実施形態において、本発明の医薬製剤は、有利には乾燥した吸入可能な粉末として製剤化される。具体的な実施形態において、本発明の医薬製剤は、エアロゾル送達用の噴射剤を用いて更に製剤化され得る。好適な噴射剤の例としては、限定されるものではないが、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン及び二酸化炭素が挙げられる。或る特定の実施形態において、製剤は、噴霧化されてもよい。

10

【0115】

幾つかの実施形態において、吸入用医薬製剤は、賦形剤を含む。好適な賦形剤の例としては、限定されないが、ラクトース、デンプン、中鎖脂肪酸のプロピレングリコールジエステル；中鎖、短鎖若しくは長鎖、又はそれらの組合せの脂肪酸のトリグリセリドエステル；パーフルオロジメチルシクロブタン；パーフルオロシクロブタン；ポリエチレングリコール；メタノール；ラウログリコール；ジエチレングリコールモノエチルエーテル；中鎖脂肪酸のポリグリコール化グリセリド；アルコール；ユーカリ油；短鎖脂肪酸；及びそれらの組合せが挙げられる。

20

【0116】

医薬品と噴射剤との間の表面張力及び界面張力を低下させるため、界面活性剤を本開示の吸入用医薬製剤に添加することができる。界面活性剤は、本発明のポリペプチドと非反応性である任意の好適な非毒性化合物であり得る。好適な界面活性剤の例としては、限定されないが、オレイン酸；ソルビタントリオレート；塩化セチルピリジニウム；大豆レシチン；ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート；ポリオキシエチレン（10）ステアリルエーテル；ポリオキシエチレン（2）オレイルエーテル；ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンエチレンジアミンブロックコポリマー；ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート；ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート；ポリオキシプロピレンーポリオキシエチレンブロックコポリマー；ひまし油エトキシレート及びそれらの組合せが挙げられる。

30

【0117】

幾つかの実施形態において、本開示の医薬製剤は、鼻腔製剤を含む。鼻腔製剤としては、例えば、鼻腔用スプレー、鼻腔用ドロップ、鼻腔用軟膏、鼻腔用洗浄液、鼻腔用注射剤、鼻腔用パッキング、気管支スプレー、及び吸入剤、又は咽喉口ゼンジ剤、洗口液若しくは含嗽剤の間接的な使用によるもの、又は鼻孔若しくは顔へ適用される軟膏の使用によるもの、又はこれらの及び類似の適用方法の任意の組合せが挙げられる。

【0118】

本開示の医薬製剤は、より典型的には注射によって投与される。例えば、医薬製剤は、グラム陽性細菌による感染症、典型的には、S. エピデルミディスにより引き起こされる骨又は関節感染を治療するために、筋肉内、髄腔内、皮膚下（subdermally）、皮下（subcutaneously）又は静脈内に投与することができる。薬学的に許容可能な担体は、蒸留水、生理食塩水、アルブミン、血清又はそれらの任意の組合せで構成され得る。さらに、非経口注射剤の医薬製剤は、pH緩衝液、アジュバント（例えば、防腐剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤）、リボソーム製剤、ナノ粒子、分散液、懸濁液又はエマルション、及び使用の直前に滅菌注射液又は分散液に再構成するための滅菌粉末を含むことができる。

40

【0119】

非経口注射が選択される投与様式である場合、典型的には、等張性製剤が用いられる。一

50

一般的には、等張性のための添加剤としては、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール及びラクトースを挙げることができる。場合によっては、リン酸緩衝生理食塩水等の等張溶液が好ましい。安定剤としては、ゼラチン及びアルブミンを挙げることができる。血管収縮剤を製剤に添加することができる。この種の用途に応じた医薬調製物は、滅菌されパイロジェンフリーで提供される。

【0120】

本開示の医薬製剤は、単位剤形で与えられ得て、当該技術分野で既知の任意の方法によって調製され得る。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、治療対象の宿主、感染性細菌へのレシピエントの曝露期間、被験体の大きさ及び体重、並びに特定の投与様式によって異なる。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、一般に治療効果を生み出す各化合物のその量である。一般的には、100%のうち、有効成分の総量は約1%～約99%、典型的には約5%～約70%、最も典型的には約10%～約30%の範囲である。

10

【実施例】

【0121】

実施例1．ヒト滑液（HSF）中のS．エピデルミディスに対するCF-301の抗微生物活性

S．エピデルミディスに対するCF-301溶解素（配列番号1）の最小発育阻止濃度（MIC）を、CF-301を用いる抗菌感受性試験に使用することがCLSIによって承認されている（CLSI, AST Subcommittee Meeting, Jan., 2018）非標準培地（ウマ血清を25%まで、及びDTTを0.5mMまで添加したc a M H B（c a M H B-H S D））中で、CLSI方法論（M07-A11、2018）に従った微量液体希釈（BMD）を用いて決定した。HSF（Discovery Life Sciences）におけるS．エピデルミディスに対するCF-301の活性を、50%HSFを含むc a M H B（c a M H B-H S F）においてBMDを用いて同様に決定した。c a M H B-H S Fは、S．エピデルミディス及びS．アウレウスの増殖及びバイオフィーム形成を支援する。53個のS．エピデルミディス臨床分離株及び2個のMRSA株を研究のため選択し、各分離株は、先の研究でバイオフィームを形成することが以前に実証された（Schuch et al. (2017) AAC, 61:e02666-16）。

20

【0122】

以下の表3に示すように、CF-301は、0.015/0.125 μg/mLのMIC 50/90、及び0.0078 μg/mL～2 μg/mLの範囲で、ヒト滑液中のS．エピデルミディスに対する強力な活性を示した。表3にも示されるように、S．エピデルミディスに対するCF-301の活性は、S．アウレウスに対して観察されたものと同様であった。

30

【0123】

40

50

【表 4】

表 3. S. エピデルミディスに対するエクセバカーゼの抗微生物活性

生物 (分離株の数)	CF-301 MIC (μ g/mL)			caMHB-HSD		
	caMHB-HSF			caMHB-HSD		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲
S. エピデルミディス (N=53)	0.015	0.125	0.0078-2	0.5	0.5	0.25-2

S. アウレウス株	CF-301 MIC (μ g/mL)			caMHB-HSD		
	caMHB-HSF			caMHB-HSD		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲
MW2	0.03			0.5		
ATCC BAA-42	0.03			0.5		

10

【0124】

実施例 2. HSF における CF-301 による S. エピデルミディスバイオフィルムの破壊

ヒト滑液中で形成されたバイオフィルムに対する CF-301 活性の巨視的分析は、Dastgheyb et al. (2015) JID 211:641-50 及び Dastgheyb et al. (2015) AAC 59:e04579-14 に記載される方法で実施した。簡潔に述べると、 10^8 CFU の S. エピデルミディス分離株 NRS6 を、HSF を含む 24 ウェルプレートにおいて 37°C で 24 時間インキュベートした。バイオフィルム形成後、ウェルを臭化エチジウム (EtBr) で染色し、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の CF-301 で 2 時間処理した。バイオフィルムは、紫外線蛍光イメージングによって可視化した。未処理の対照も調べた。

20

【0125】

図 2 は、ヒト滑液中で NRS6 によって形成されるバイオフィルム構造の臭化エチジウム染色に対する CF-301 処理の影響を示す。図 2 において明らかなように、バイオフィルム構造は 2 時間以内に排除された。

【0126】

また、バイオフィルム (及び個々の細菌) 中の菌体外多糖を染色する Alexa Fluor 488-WGA、及びバイオフィルム全体を染色するヨウ化プロピジウム (PI) でバイオフィルムを染色した。次いで、バイオフィルムを蛍光顕微鏡検査で可視化した。図 3 において明らかなように、HSF 中で形成された表皮バイオフィルムは、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の CF-301 による処理の 2 時間後に排除された。

30

【0127】

実施例 3. HSF におけるバイオフィルム破壊の SEM 分析

また、走査型電子顕微鏡検査 (SEM) を、ヒト滑液中の S. アウレウスによるバイオフィルム形成及び $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の CF-301 による 2 時間の処理後の排除を証明するために使用した。この実施例において、CF-301 処理前にヒト滑液中に S. アウレウスのバイオフィルムが形成された。図 4 に示すように、CF-301 はこれらのバイオフィルムを破壊する。

40

【0128】

上述の実施例は、CF-301 等の溶解素が、S. エピデルミディスによって引き起こされるものを含む、骨及び関節の感染、特に人工関節感染 (これらは、抗生物質が一般的に有効でないバイオフィルムによって複雑になる) の治療薬として使用することができることを裏付ける。

【0129】

実施例 4. ダプトマイシンと組み合わせたエクセバカーゼ (CF-301) は、ラットのメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス骨髄炎において、ダプトマイシン又は C

50

F-301 単独よりも活性である。

骨中の CF-301 のレベルは、 10 mg/kg の単回投与後に血漿レベルの約 $10\% \sim 15\%$ であることが判明し、それにより骨及び関節の感染を標的とし、かかる部位で感染を引き起こす S. アウレウスを溶解する戦略を提供した。骨感染に対する CF-301 の有効性を試験するため、急性 MRSA 骨髄炎の動物モデルを使用した。感染を確立するために使用された株である MRSA IDRL-6169 は、微量液体希釈によって決定した場合、CF-301 及びダプトマイシンの両方について $0.5 \mu\text{g/ml}$ の最小発育阻止濃度を有した。最小バイオフィーム阻止濃度及び最小バイオフィーム殺菌濃度はそれぞれ、以前に記載される方法を用いて決定した場合に CF-301 では $1 \mu\text{g/ml}$ 及び $4 \mu\text{g/ml}$ 、またダプトマイシンでは $1 \mu\text{g/ml}$ 及び $2 \mu\text{g/ml}$ であった。Schmidt-Malan et al., 2016, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 85:77-79 を参照されたい。Schuch R. 2016, *Methods Development and Standardization Working Group, Clinical Laboratory Science Institute, Wayne, PA.* に記載されるように、全ての試験 CF-301 に 0.5 mM DL-ジチオスレイトール及び 25% ウマ血清を添加した。

【0130】

Zak の実験的骨髄炎のモデルを改変して用いて、64 匹の雄性 Sprague Dawley ラットにおいて急性骨髄炎を確立した (O'Reilly T et al. 1999. "Rat model of bacterial osteomyelitis of the tibia, p 561-575." In Zak O, Sande M (ed), *Handbook of animal models of infection*. Academic Press, San Diego, CA.)。動物をイソフルランで麻酔し、左膝を剃毛してクロロヘキシジンで消毒した。骨髄炎を誘発するために、膝関節を 45° の角度で曲げて、脛骨突起の頂部を露出させた。 $10 \mu\text{l}$ のアラキドン酸 ($50 \mu\text{g/ml}$) 及びトリプシンソイブロス中 10^7 cfu の MRSA IDRL-6169 懸濁液 $50 \mu\text{l}$ を含む 21 ゲージの針を備えた 1 ミリリットルの注射器を脛骨に挿入した。細菌懸濁液をゆっくりと脛骨に注入し、針を抜き取り、膝関節をまっすぐにして、注射部位に 1 分間圧力をかけた。

【0131】

感染確定から 1 週間後 (8 日目)、ラットを、1) 治療なし、2) 60 mg/kg のダプトマイシン (腹腔内にて 12 時間ごとに 4 日間)、3) 尾静脈に 40 mg/kg の CF-301 単回投与、又は 4) 40 mg/kg の CF-301 単回投与 + 60 mg/kg のダプトマイシン (腹腔内にて 12 時間ごとに 4 日間) の 4 つの治療群のうちの 1 つに無作為に割り付けた。CF-301 注射の 15 分前にダプトマイシンを投与した。CF-301 を注入まで氷上で維持した。ラットを、治療開始から 4 日後 (12 日目) に殺した。各動物から左脛骨を収集し、計量し、定量的細菌培養のため凍結粉碎した。定量的培養の結果を、クラスカル-ウォリス検定を用いて、SAS ソフトウェアバージョン 9.4 (ノースカロライナ州ケリーの SAS Inc.) を用いて比較した。平均及び標準偏差を、 $\log_{10}$ コロニー形成単位 (cfu) / 骨グラムとして報告した。全ての検定は両側検定であり、 0.05 未満の p 値を統計的に有意であるとみなした。

【0132】

結果

治療を受けなかったラットは、 $5.13 (\pm 0.34) \log_{10} \text{ cfu/骨グラム}$ の平均 ($\pm \text{SD}$) 細菌密度を有した。ダプトマイシン、CF-301、及びダプトマイシン + CF-301 の治療群のラットは、それぞれ $4.09 (\pm 0.37) \log_{10} \text{ cfu/骨グラム}$ 、 $4.65 (\pm 0.65) \log_{10} \text{ cfu/骨グラム}$ 、及び $3.57 (\pm 0.48) \log_{10} \text{ cfu/骨グラム}$ の平均 ($\pm \text{SD}$) を有した (図 5)。未治療のラットと比較して、ダプトマイシン、CF-301、及び CF-301 + ダプトマイシン療法により、それぞれ、 $1.04 \log_{10} \text{ cfu/骨グラム}$ 、 $0.65 \log_{10} \text{ cfu/骨グラム}$ 及び $1.56 \log_{10} \text{ cfu/骨グラム}$ の減少があった。全ての治療群におけるコロニー数は、未治療ラットと比較して有意に ($P \leq 0.0001$) 減少した。しかしながら、CF-301 を伴うダプトマイシンの動物は、ダプトマイシン ($P =$

0.0042)又はエクセバカーゼ ($P < 0.0001$) 単独で治療したものよりもコロニー数が低かった。

【0133】

上記の結果は、CF-301を単独で、又はダプトマイシン等の抗生物質と組み合わせて、骨髓炎の治療に使用することができることを裏付ける。ダプトマイシン又はCF-301単独での治療は感染の減少を示したが、CF-301とダプトマイシンとを併用するとより良い効果が示された。

【0134】

実施例5. 人工膝関節感染を有する患者における関節鏡下DAIR中のCF-301の有効性

再置換 (revision) 又は経大腿切断が実現不可能であり、他の経口選択肢が利用できない、再発性多剤耐性 (MDR) スタフィロコッカス・エピデルミディス人工膝関節感染を有する高齢患者 (79歳~89歳) を、DAIRと組み合わせたCF-301による治療のために特定した。各症例を現地の倫理委員会に従ってフランス保健局と協議した。治療前に、各患者は書面による同意書に署名した。関節鏡検査中に関節内にCF-301 (75 mg/mL; 30 mL) を直接投与し、続いて救済療法として抑制性テジゾリドを投与した。

【0135】

4名の患者を治療した。いずれも、プロテアーゼ弛緩はなく、以前に数回の人工膝関節再置換があった (図6A)。3名はオープンDAIRに続く抑制性抗生物質にもかかわらず、人工膝関節感染を再発した。2名は敗血症性関節炎の臨床的徴候を示し (図6B)、他の2名には瘻孔があった。関節鏡検査中に有害事象は起こらず、いずれの患者も、ダプトマイシン8 mg/kg及びリネゾリド (600 mgを1日2回投与; 4週間~6週間) を受け、続いて抑制療法としてテジゾリド200 mg/日を受けた。6ヶ月後、ベースライン時に瘻孔を有する2名の患者において、瘻孔の再発が起こった。1年間のフォローアップ後、敗血症性関節炎の臨床徴候が消失した2名の敗血症性関節炎患者において予後は良好であった (図6C)。この良好な予後は、抑制性抗生物質の有効性を改善し、かなりの機能喪失を回避するため、MDRブドウ球菌感が再発した患者において関節鏡下DAIR中にCF-301を効果的に使用することができることを裏付ける。

【0136】

実施例6. ラット骨髓炎モデルにおけるpp296の有効性

メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス (IDRL-6169; 人工股関節感染を有する患者から単離された) の感染を、Karau et al., Exebacase in Addition to Daptomycin Is More Active than Daptomycin or Exebacase Alone in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Osteomyelitis in Rats, Antimicrob. Agents Chemother. 2019 Sept 23; 63(10)に記載されるプロトコルに従ってSprague Dawleyラットにおいて確立した。具体的には、膝関節を曲げ、脛骨突起に21G針を挿入し、10 µlのアラキドン酸及び約10⁶~10⁸コロニー形成単位 (cfu) 懸濁液のメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウスIDRL-6169 50 µlを注入することにより、ラットにおいて骨髓炎を確立した。

【0137】

以下の6つの治療群を特定した: (1) 対照/治療なし (n=18); (2) 60 mg/kgのダプトマイシン (DAP) を1日2回4日間皮下投与 (n=17); (3) 40 mg/kgのpp296を4日間毎日静脈内投与 (n=17); (4) 40 mg/kgのpp296を4日間毎日静脈内投与+60 mg/kgのDAPを1日2回4日間皮下投与 (n=17); (5) 100 mg/kgのpp296を治療1日目に単回用量として1回静脈内投与 (n=17); 及び (6) 100 mg/kgのpp296を治療1日目に単回用量として1回静脈内投与+60 mg/kgのDAPを1日2回4日間皮下投与 (n=17)。ダプトマイシンをpp296と共に投与した場合、pp296の15分前にダプトマイシンを与え、pp296は氷上に維持しておいた。

【0138】

最後の治療投与から12時間後に動物を殺し、脛骨を収集し、計量し、定量的細菌培養のために凍結粉碎した。 $\log_{10}$ CFUカウント/脛骨gを、偽発見率アプローチで調整されたウィルコクソン順位和検定を用いて決定した。結果を下記表4に示す。

【0139】

【表5】

表4- $\log_{10}$ CFU/ラット脛骨g

治療群	平均 $\log_{10}$ CFU / g	中央値 $\log_{10}$ CFU / g	SD	平均 $\log_{10}$ CFU / g 減少
(1) 治療なし	5.42	5.31	1.07	--
(2) DAP 60 mg/kg	4.29	4.79	1.89	-1.14
(3) pp296 40 mg/kg	4.94	5.27	1.15	-0.49
(4) pp296 40 mg/kg + DAP	4.84	4.71	0.50	-0.59
(5) pp296 100 mg/kg	4.81	4.99	1.59	-0.61
(6) pp296 100 mg/kg + DAP	3.67	3.97	1.50	-1.76

10

【0140】

結果は、 100 mg/kg の pp296 の単回用量がダプトマイシンと相乗作用し、未治療の対照と比較して平均 $\log_{10}$ CFU / g を 1.76 CFU/g 減少させ、ダプトマイシン単独と比較して 0.62 CFU/g 減少させることを示す。この減少は、未治療の対照と比較して有意であり ($P=0.003$)、また同様に pp296 単回及び1日用量単独（すなわち、ダプトマイシンなし）と比較しても有意であった（それぞれ $P=0.0210$ 及び $P=0.0175$ ）。pp296 のこれらの結果は CF-301 で得られた結果に匹敵する。例えば、 40 mg/kg の CF-301 をダプトマイシンと組み合わせた単回用量は、ダプトマイシン単独と比較して $\log_{10}$ CFU / g の 0.52 の減少をもたらした。

20

【0141】

さらに、動物の体重を、研究中に全身の健康状態のマーカーとしてモニターした。手術時（1日目）、治療直前（8日目）、及び殺時（12日目）の動物の平均体重を表5に示す。

30

【0142】

【表6】

表5-ラットの平均体重

治療群	1日目の体重	8日目の体重	12日目の体重
(2) 治療なし	337	308	314
(2) DAP 60 mg/kg	339	312	312
(3) pp296 40 mg/kg	342	313	311
(4) pp296 40 mg/kg + DAP	335	307	298
(5) pp296 100 mg/kg	344	312	312
(6) pp296 100 mg/kg + DAP	342	309	308

40

【0143】

治療開始前の感染後最初の7日間で動物の体重が著しく減少したことが注目された。全ての治療群で、4日間の治療中に体重減少はほとんど又は全く認められなかった。

【0144】

病理学的スライドは、細胞過形成の可能性のみを示した1日用量 40 mg/kg の pp296（治療群3）を除いて、全ての群において好中球の増加を伴う細胞過形成骨髓を明らかにした。これらの知見は急性骨髓炎と一致しており、群間で顕著な区別は認められなかった。

50

【図面】
【図 1】

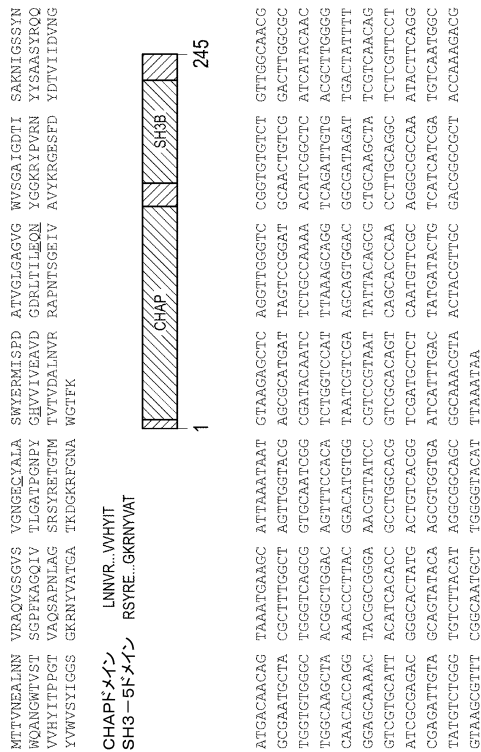


FIG. 1

【図 2】

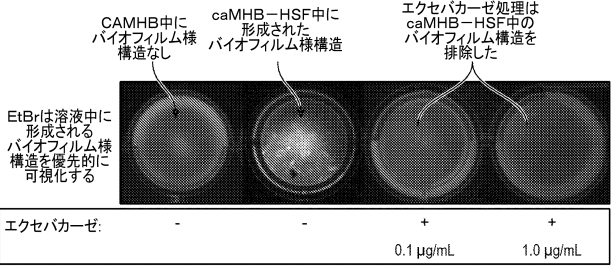


FIG. 2

【図 3】

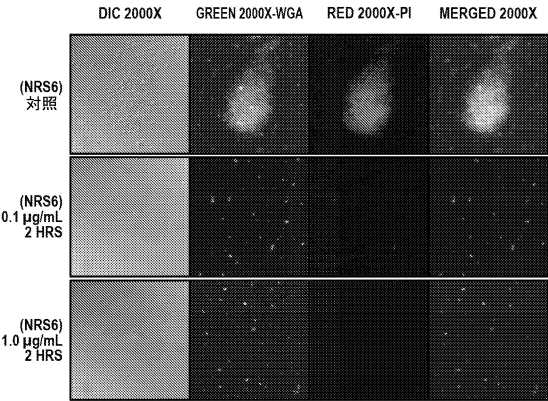


FIG. 3

【図 4】

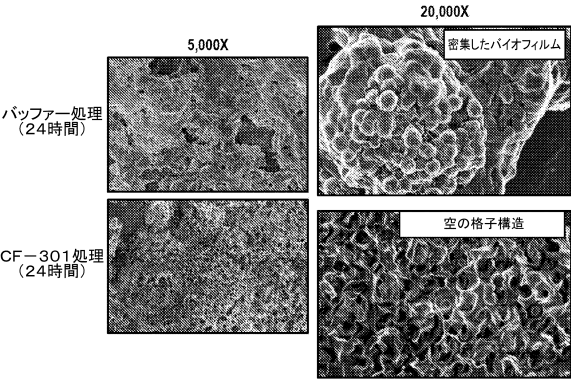


FIG. 4

10

20

30

40

50

【図 5】

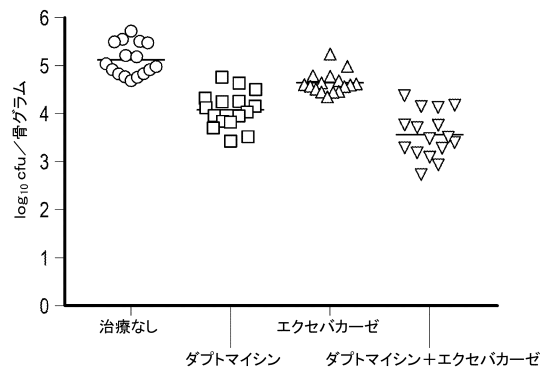


FIG. 5

【図 6】

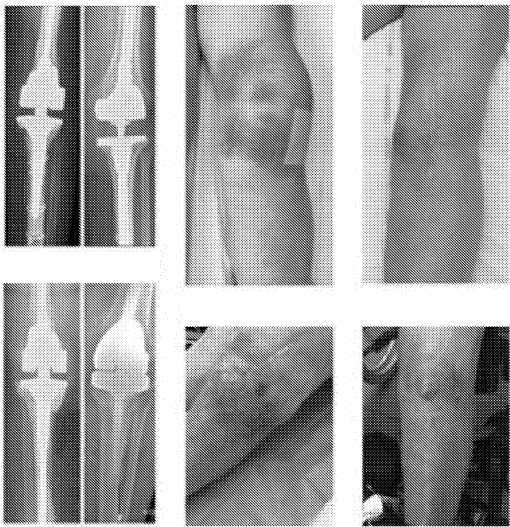


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C

【配列表】

2022526624000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/27752

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 38/16, A01N 63/40, A61P 31/04 (2020.01)

CPC - C12N 2795/10032, C12N 2795/10022, A61L 2300/404, A61L 2420/00, A61K 39/085

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/0111813 A1 (CONTRAFECT CORPORATION) 23 April 2015 (23.04.2015) para [0013], [0092], [0120], [0123], [0124], [0125], [0152], [0168], Fig. 5, SEQ ID NO: 1	1-5
X	WO 2017/197227 A1 (CONTRAFECT CORPORATION) 16 November 2017 (16.11.2017) para [00021], [00023], [00087], [00088], Fig. 1, SEQ ID NO: 1	11
A	SCHUCH et al. Bacteriophage Lysin CF-301, a Potent Antistaphylococcal Biofilm Agent, Antimicrob Agents Chemother July 2017, Vol 61, No 7, article no e02666-16, abstract	1-5, 11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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 July 2020

Date of mailing of the international search report

18 AUG 2020

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JS 20/27752

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-10, 12-31
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/395	
A 6 1 K 38/14 (2006.01)	A 6 1 K 38/14	
A 6 1 K 38/12 (2006.01)	A 6 1 K 38/12	
C 0 7 K 14/315 (2006.01)	C 0 7 K 14/315	Z N A
(32)優先日 令和1年11月21日(2019.11.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 62/964,755		
(32)優先日 令和2年1月23日(2020.1.23)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		
F ターム (参考)	DA43 DA44 NA05 NA14 ZA961 ZA962 ZB351 ZB352 ZC521 ZC522 ZC751 4C086 AA01 AA02 CB25 MA01 MA02 MA04 NA05 ZA96 ZB35 ZC52 ZC75 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA11 DA83 DA89 EA20 EA29 FA34 FA72 FA74	