



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) RU (11)

2 735 103⁽¹³⁾ C2

- (51) МПК
A61K 38/47 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)
A61L 29/08 (2006.01)
A61L 29/16 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/47 (2020.05); *A61K 38/164* (2020.05); *C07K 14/315* (2020.05); *C12N 9/52* (2020.05); *A61L 29/08* (2020.05); *A61L 29/16* (2020.05); *A61P 31/04* (2020.05); *A61K 39/085* (2020.05); *C12Y 302/01017* (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2018102796, 09.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.05.2013Дата регистрации:
28.10.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.05.2012 US 61/644,799;
13.12.2012 US 61/736,813Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2014149348 09.05.2012

(43) Дата публикации заявки: 22.02.2019 Бюл. № 6

(45) Опубликовано: 28.10.2020 Бюл. № 31

Адрес для переписки:
190900, Санкт-Петербург, BOX-1125,
ПАТЕНТИКА

(72) Автор(ы):

ШУК Рэймонд (US),
НОВИНСКИ Роберт К. (US),
УИТТКАЙНД Майкл (US),
КХАН Бабар (US),
РОТОЛО Джимми (US)

(73) Патентообладатель(и):

КОНТРАФЕКТ КОРПОРЕЙШН (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 8105585 B2, 31.01.2012. WO
2010002959 A2, 07.01.2010. WO 2010041970 A2,
15.04.2010. WO 2011157448 A1, 22.12.2011. LOW
L. Y. et al. "Role of net charge on catalytic domain
and influence of cell wall binding domain on
bactericidal activity, specificity, and host range
of phage lysins". J Biol Chem. 2011 Sep 30;
286(39): 34391-403. doi: (см. прод.)

R U 2 7 3 5 1 0 3 C 2

(54) ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ, РАЗРУШЕНИЕ И ОБРАБОТКА БИОПЛЕНКИ ЛИЗИНОМ БАКТЕРИОФАГА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к способам для предотвращения образования, а также разрушения или эрадикации биопленок грам-положительных бактерий. Предложены способ предотвращения, разрушения или эрадикации биопленки, включающей одну или более из бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus*, и способ профилактики или лечения инфекции, ассоциированной с биопленкой у субъекта, включающей одну или более из бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Способы включают приведение биопленки в контакт с композицией, содержащей измененный лизитический фермент,

включающий домен SH-3 PlySs2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или ее вариант, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 4 и являющийся эффективным для связывания *Staphylococcus* и *Streptococcus* в биопленке, и каталитический домен, представляющий собой домен CHAP лизина стрептококковых или стафилококковых фагов. Изобретения позволяют устранять не только зрелые биопленки, но и предотвращать образование биопленок de novo на поверхности устройств, имплантатов, разделительных мембран. 2 н. и 24 з.п. ф-лы, 21 ил., 7 табл., 14 пр.

(56) (продолжение):
10.1074/jbc.M111.244160. RU 2009106069 A, 27.08.2010.

R U 2 7 3 5 1 0 3 C 2

R U 2 7 3 5 1 0 3 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 735 103⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 38/47 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)
A61L 29/08 (2006.01)
A61L 29/16 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 38/47 (2020.05); *A61K 38/164* (2020.05); *C07K 14/315* (2020.05); *C12N 9/52* (2020.05); *A61L 29/08* (2020.05); *A61L 29/16* (2020.05); *A61P 31/04* (2020.05); *A61K 39/085* (2020.05); *C12Y 302/01017* (2020.05)

(21)(22) Application: 2018102796, 09.05.2013

(24) Effective date for property rights:
09.05.2013

Registration date:
28.10.2020

Priority:

(30) Convention priority:
09.05.2012 US 61/644,799;
13.12.2012 US 61/736,813

Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2014149348 09.05.2012

(43) Application published: 22.02.2019 Bull. № 6

(45) Date of publication: 28.10.2020 Bull. № 31

Mail address:
190900, Sankt-Peterburg, BOX-1125, PATENTIKA

(72) Inventor(s):

SHUK Rejmond (US),
NOVINSKI Robert K. (US),
UITTKAJND Majkl (US),
KKHAN Babar (US),
ROTOLO Dzhimmi (US)

(73) Proprietor(s):

KONTRAFEKT KORPOREJSHN (US)

(54) PREVENTION, DESTRUCTION AND TREATMENT OF BIOFILM BY BACTERIOPHAGE LYSINE

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to methods for preventing formation, as well as destruction or eradication of biofilms of gram-positive bacteria. Disclosed are a method of preventing, destroying or eradication of a biofilm containing one or more *Staphylococcus* and *Streptococcus* bacteria, and a method of preventing or treating an infection associated with biofilm in a subject, including one or more *Staphylococcus* and *Streptococcus* bacteria. Methods involve contacting the biofilm with a composition comprising an altered lytic enzyme comprising a SH-3

PlySs2 domain comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 4 or a version thereof, having at least 80 % identity with SEQ ID NO: 4 and effective for binding *Staphylococcus* and *Streptococcus* in biofilm, and a catalytic domain which is a CHAP domain of lysine of streptococcal or staphylococcus phages.

EFFECT: inventions allow eliminating not only mature biofilms, but also preventing de novo biofilm formation on the surface of devices, implants and separation membranes.

26 cl, 21 dwg, 7 tbl, 14 ex

R U 2 7 3 5 1 0 3 C 2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится в целом к предотвращению, контролю, разрушению и обработке бактериальных биопленок с помощью лизина, в частности, лизина, имеющего способность к лизису стафилококковых бактерий, включающих 5 резистентный к лекарственным средствам *Staphylococcus aureus*, конкретно, лизина PlySs2. Изобретение также относится к композициям и способам для модуляции бактериальных биопленки(биопленок) и образования биопленки.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Развитие бактерий, резистентных к лекарственным средствам является основной

10 проблемой в медицине по мере того, как все больше антибиотиков применяют для лечения широкого ряда болезней и других состояний. Применение большего числа антибиотиков и количества бактерий, проявляющих резистентность, вынуждает использовать более длительное время для лечения. Кроме того, неспецифические антибиотики широкого спектра действия, некоторые из которых оказывают вредные 15 воздействия на пациента, применяются в настоящее время более часто. Проблема, относящаяся к этому возросшему применению, состоит в том, что многие антибиотики не проникают с легкостью через слизистые оболочки.

[0003] Грам-положительные бактерии окружены клеточной стенкой, содержащей 20 полипептиды и полисахарид. Грам-положительные бактерии включают, но не ограничены ими, роды *Actinomyces*, *Bacillus*, *Listeria*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* и *Clostridium*. Медицински значимые виды включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis*. Виды *Bacillus*, которые являются спорообразующими, вызывают сибирскую язву и гастроэнтерит. Спорообразующие виды *Clostridium* являются 25 ответственными за ботулизм, столбняк, газовую гангрену и псевдомембранный колит. Виды *Corynebacterium* вызывают дифтерию, а виды *Listeria* вызывают менингит.

[0004] Новые подходы к противомикробной терапии включают антибиотики на основе ферментов ("энзимиотики"), такие как лизины бактериофагов. Фаги используют эти лизины для расщепления клеточной стенки их бактериальных хозяев, высвобождая 30 вирусное потомство посредством гиптонического лизиса. Аналогичные конечные результаты получают, когда очищенные, рекомбинантные лизины добавляют извне к грам-положительным бактериям. Высокая летальная активность лизинов против грам-положительных патогенов делает их привлекательными кандидатами для разработки в качестве терапевтических средств (Fischetti, V.A. (2008) Curr Opin Microbiol 11:393-35 400; Nelson, D.L. et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112). Лизины бактериофагов первоначально были предложены для эрадикации носоглоточного носительства патогенных стрептококков (Loeffler, J. M. et al (2001) Science 294: 2170- 2172; Nelson, D. et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112). Лизины являются частью литического механизма, используемого двухцепочечной ДНК (дЦДНК) фага для координации лизиса 45 хозяина с завершением вирусной сборки (Wang, I. N. et al (2000) Annu Rev Microbiol 54: 799-825). Лизины представляют собой гидролазы пептидогликана, которые разрушают связи в бактериальной стенке, быстро гидролизуя ковалентные связи существенно важные для целостности пептидогликана, вызывая бактериальный лизис и сопутствующее высвобождение потомства фага.

[0005] Члены семейства лизинов имеют модульную конструкцию, в которой каталитический домен сопряжен с доменом специфичности или связывания (Lopez, R. et al (1997) Microb Drug Resist 3: 199-211). Лизины могут быть клонированы из последовательностей вирусных профагов в бактериальных геномах и применяться для

лечения (Beres, S B. et al (2007) PLoS ONE 2(8): 1-14). При добавлении извне, лизины способны получить доступ к связям Грам-положительной клеточной стенки (Fischetti, V.A. (2008) Curr Opin Microbiol 11:393-400). Было установлено, что литические ферменты бактериофагов являются применимыми при оценке и конкретном лечении различных типов инфекций у субъектов посредством различных путей введения.

Например, патент США 5604109 (Fischetti et al.) относится к быстрому обнаружению стрептококков Группы А в клинических образцах, через ферментативное расщепление посредством полуочищенного лизинового фермента, ассоциированного с фагом стрептококков Группы С. Работа с этих ферментом стала базисом для дополнительного исследования, ведущего к способам лечения заболеваний. Патенты Fischetti and Loomis (патенты США 5985271, 6017528 и 6056955) раскрывают применение лизинового фермента, продуцируемого стрептококковыми бактериями группы С, инфицированными бактериофагом С1. Патент США 6248324 (Fischetti and Loomis) раскрывает композицию для лечения дерматологических инфекций посредством применения литического фермента в носителе, подходящем для местного нанесения на кожные ткани. Патент США 6254866 (Fischetti and Loomis) раскрывает способ лечения бактериальных инфекций пищеварительного тракта, который включает введение литического фермента, специфичного для инфицирующих бактерий. Носитель для доставки по меньшей мере одного литического фермента в пищеварительный тракт выбирают из группы, состоящей из клизм с суппозиториями, сиропов или пилюль с энтеросолюбильным покрытием. Патент США 6264945 (Fischetti and Loomis) раскрывает способ и композицию для лечения бактериальных инфекций посредством парентерального введения (внутримышечно, подкожно или внутривенно) по меньшей мере одного литического фермента, продуцируемого бактериями, инфицированными бактериофагом, специфичным для данных бактерий, и соответствующего носителя для доставки литического фермента в пациента.

[0006] Ассоциированные с фагом литические ферменты были идентифицированы и клонированы из различных бактериофагов, эффективность каждого из которых при лизисе специфичных бактериальных штаммов была продемонстрирована. Патент США 7402309, 7638600 и опубликованная Заявка РСТ WO2008/018854 предоставляют различающиеся ассоциированные с фагом литические ферменты, применимые в качестве антибактериальных средств для лечения или снижения степени инфекций *Bacillus anthracis*. Патент США 7569223 описывает литические ферменты для *Streptococcus pneumoniae*. Лизин, применимый для *Enterococcus* (*E. faecalis* и *E. faecium*, включая ванкомицин-резистентные штаммы) описан в Патенте США 7582291. US 2008/0221035 описывает мутантные лизины Ply GBS, высокоэффективные при лизисе стрептококков Группы В. Химерный лизин, обозначенный ClyS, с активностью против стафилококковых бактерий, включая *Staphylococcus aureus*, подробно описан в WO 2010/002959. ClyS является специфичным для стафилококковых бактерий и является неактивным против *Streptococcus* и других грам-положительных бактерий.

[0007] Исходя из их свойства быстрого, активного и специфичного разрушения клеточной стенки и бактерицидных свойств, было предложено использовать лизины в качестве противомикробных терапевтических средств для борьбы с Грам-положительными патогенами посредством атаки на экспонированные пептидогликановые клеточные стенки снаружи клетки (Fenton, M et al (2010) Bioengineered Bugs 1:9-16; Nelson, D et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112). Эффективности действия различных лизинов в качестве средств монотерапии были продемонстрированы на моделях фарингита у грызунов (Nelson, D et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-

4112), пневмонии (Witzenrath, M et al (2009) Crit Care Med 37:642-649), отита среднего уха (McCullers, J.A. et al (2007) PLOS pathogens 3:0001-0003), абсцессов (Pastagia, M et al. Antimicrobial agents and chemotherapy 55:738-744), бактериемии (Loeffler, J.M. et al (2003) Infection and Immunity 71:6199-6204), эндокардита (Entenza, J.M. et al (2005) Antimicrobial agents and chemotherapy 49:4789-4792) и менингита (Grandgirard, D et al (2008) J Infect Dis 197: 1519-1522). В дополнение, лизины, в целом, являются специфичными для их бактериальных хозяйственных видов и не лизируют нецелевые организмы, включая симбиотические бактерии человека, которые могут быть благоприятными по отношению к желудочно-кишечному гомеостазу (Blaser, M. (2011) Nature 476:393-394; Willing, B.P. et al (2011) Nature reviews. Microbiology 9:233-243).

[0008] Микроорганизмы имеют тенденцию к образованию прикрепленных к поверхности сообществ биопленки в качестве важной стратегии выживания в различных окружающих условиях. Биопленки состоят из микробиальных клеток, и широкого ряда самогенерируемых внеклеточных полимерных веществ, включающих полисахариды, нуклеиновые кислоты и белки (Flemming HC et al (2007) J Bacteriol 189:7945-7947). Биопленки обнаруживаются в природных и промышленных водных средах, тканях, и медицинских материалах и устройствах (Costerton JW et al (1994) J Bacteriol 176:2137-2142). Биопленки могут быть образованы одиночным бактериальным штаммом, несмотря на то, что большинство природных биопленок образуются множеством бактериальных видов (Yang L et al (2011) Int J Oral Sci 3:74-81). Применения антибиотиков часто являются неэффективными для биопленочных популяций вследствие их уникальной физиологии и физического матриксного барьера.

[0009] Стафилококки часто образуют биопленки, фиксированные сообщества, заключенных во внеклеточный матрикс, который прилипает к биомедицинским имплантатам или поврежденной и здоровой ткани. Инфекции, ассоциированные с биопленками, часто являются трудными для лечения, и было оценено, что фиксированные бактерии в биопленках являются в 1000-1500 раз более резистентными к антибиотикам, чем их планктонные аналоги. Данная антибиотическая резистентность биопленок часто приводит к неудаче общепринятой антибиотической терапии и диктует необходимость удаления инфицированных устройств. Было показано, что лизостафин лизировал *S. aureus* в биопленках и также разрушал внеклеточный матрикс биопленок *S. aureus* *in vitro* на пластмассовых и стеклянных поверхностях (Wu, JA et al (2003) Antimicrob Agents и Chemoth 47(11):3407-3414). Данное разрушение биопленок *S. aureus* являлось специфичным для лизостафина-чувствительного *S. aureus*, и биопленки лизостафина-резистентного *S. aureus* не подвергались воздействию. Высокие концентрации оксациллина (400 мкг/мл), ванкомицина (800 мкг/мл) и клиндамицина (800 мкг/мл) не имели никакого эффекта на установленные биопленки *S. aureus*, даже через 24 часа. Лизостафин также разрушал биопленки *S. epidermidis*, однако, требовалась более высокие концентрации. Сообщалось о применении фаговых лизинов для удаления стафилококковых биопленок, со смешанными результатами. Сообщалось, что лизин бактериофага SAL-2 удалял биопленки *S. aureus* (Son JS et al (2010) Appl Microbiol Biotechnol 86(5): 1439-1449), в то время как в случае двух сходных фаговых лизинов, phi1 1 и phi1 2, в то время как phi1 1 гидролизовал стафилококковые биопленки, phi1 2 был неактивным (Sass P and Bierbaum G (2007) Appl Environ Microbiol 73(1):347-352). Исследовали различные комбинации ферментов для удаления и дезинфекции бактериальных биопленок в различных системах (Johansen C et al (1997) Appl Environ Microbiol 63:3724-3728). Данный процесс, однако, требует минимально двух ферментов или средств, одного фермента или средства для удаления прилипших бактерий из

биопленок и второго фермента или средства с бактерицидной активностью.

[00010] Недостатки и проблемы, связанные с применяемыми в настоящее время традиционными антибактериальными средствами, наглядно показывают, что в данной области все еще существует потребность в дополнительных специфичных

- 5 антибактериальных средствах, комбинациях и терапевтических модальностях, а также средствах с более широким спектром действия, в особенности, лишенных высоких рисков приобретенной резистентности, для эффективных и действенных обработки, контроля и предотвращения образования бактериальных биопленок. Следует отметить, что до настоящего времени, не было показано, что лизин, демонстрирующий высокую
- 10 литическую активность против множественных различных видов патогенных и клинически значимых грамм-положительных бактерий, который является легко производимым промышленно и стабильным, и не имеет риска или имеет ограниченный риск появления резистентности, является эффективным на биопленках. Соответственно, существует коммерческая необходимость в новых антибактериальных подходах,
- 15 особенно тех, что функционируют через новые модальности или обеспечивают новые средства для лизиса патогенных бактерий в биопленках.

[00011] Цитирование ссылок в настоящем описании не должно толковаться как допущение, что данные ссылки составляют предшествующий уровень техники по отношению к настоящему изобретению.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00012] В соответствии с настоящим изобретением, предоставлены композиции и способы для профилактики, разрушения и обработки бактериальных биопленок. В своем самом широком аспекте, настоящее изобретение предоставляет применение и использование лизина, имеющего литическую активность широкого спектра действия

- 25 против множества бактерий, в частности Грам-положительных бактерий, включающих, в частности, бактериальные штаммы *Staphylococcus*, *Streptococcus*, конкретно, *Streptococcus pyogenes* (Группа А стреп) и *Streptococcus agalactiae* (Группа В стреп), при предотвращении, разрушении и обработке биопленок. Лизин и композиции изобретения являются применимыми и применяемыми при лизисе бактериальных штаммов
- 30 *Enterococcus* и *Listeria*, и их применяемых биопленок. Данное изобретение предоставляет способ для деколонизации, диспергирования и удаления бактериальной биопленки, использующий лизин бактериофага, способный к лизису бактерий эффективно и действенно в биопленке. Изобретение таким образом предусматривает обработку, деколонизацию и/или обеззараживание бактериальных биопленок и предотвращение
- 35 инфекций после диспергирования биопленки(биопленок), где один или более видов грам-положительных бактерий, в частности, один или более из видов бактерий *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Listeria* бактерии, предполагается или присутствует.

- 40 [00013] В соответствии с настоящим изобретением лизин бактериофага, полученный из бактерий *Streptococcus suis*, используют в способах и применениях изобретения. Лизиновые полипептид(ы), применяемые в настоящем изобретении, конкретно лизин PlySs2, предоставленный в настоящем документе и на ФИГУРЕ 5 (SEQ ID NO: 1), являются уникальными при демонстрации литической активности широкого спектра действия против множества бактерий, в частности, грам-положительных бактерий,
- 45 включающих бактериальные штаммы *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Listeria*. В одном таком аспекте, лизин PlySs2 является способным к лизису штаммов и бактерий *Staphylococcus aureus* в биопленках, как демонстрируется в настоящем описании. PlySs2 является эффективным против антибиотик-резистентных бактерий, включающих

Staphylococcus aureus, таких как метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA), ванкомицин-резистентные *Staphylococcus aureus* (VRSA), даптомицин-резистентные *Staphylococcus aureus* (DRSA) и линезолид-резистентные *Staphylococcus aureus* (LRSA).
5 PlySs2 является эффективным против бактерий с измененной чувствительностью к антибиотику, таким как *Staphylococcus aureus* с умеренной чувствительностью к ванкомицину (VISA).

[00014] В аспекте изобретения предоставлен способ лизиса грам-положительных бактерий в биопленке, включающий стадию приведения биопленки в контакт с композицией, содержащей количество изолированного полипептида лизина,

10 эффективного для лизиса грам-положительных бактерий в биопленке, включающей *S. aureus*, изолированного полипептида лизина, содержащего полипептид лизина PlySs2 или его варианты, эффективные для лизиса грам-положительных бактерий. Таким образом, предоставлен способ лизиса грам-положительных бактерий в биопленке, включающий стадию приведения биопленки в контакт с композицией, содержащей

15 количество изолированного полипептида лизина, эффективного для лизиса грам- положительных бактерий в биопленке, изолированного полипептида лизина, содержащего аминокислотную последовательность, предоставленную на ФИГУРЕ 5 или SEQ ID NO: 1 или ее варианты, имеющие по меньшей мере 80% идентичности, 85% идентичности, 90% идентичности, 95% идентичности или 99% идентичности с

20 полипептидом ФИГУРЫ 5 или SEQ ID NO: 1, и эффективного для лизиса грам- положительных бактерий в биопленке.

[00015] В аспекте изобретения предоставлен способ диспергирования грам- положительных бактерий в биопленке, таким образом, чтобы обеззараживать и высвобождать бактерии, затем чувствительные к антибиотикам, включающий стадию

25 приведения биопленки в контакт с композицией, содержащей количество изолированного полипептида лизина, эффективного для диспергирования грам-положительных бактерий в биопленке, включающей *S. aureus*, изолированного полипептида лизина, содержащего полипептид лизина PlySs2, включающего представленный на ФИГУРЕ 5 или SEQ ID NO: 1, или его варианты эффективные для лизиса грам-положительных бактерий.

30 [00016] В аспекте вышеуказанных способов способы осуществляют *in vitro* или *ex vivo*, таким образом, чтобы провести стерилизацию или обеззараживание раствора, материала или устройства, конкретно предназначенного для применения человеком или в человеке.

[00017] Изобретение предоставляет способ уменьшения популяции грам-

35 положительных бактерий в биопленке, включающий стадию приведения биопленки в контакт с композицией, содержащей количество изолированного полипептида, эффективного, чтобы лизировать или высвобождать по меньшей мере часть грам- положительных бактерий в биопленке, изолированного полипептида, содержащего аминокислотную последовательность ФИГУРЫ 5 (SEQ ID NO: 1) или ее варианты, имеющие по меньшей мере 80% идентичности с полипептидом ФИГУРЫ 5 (SEQ ID NO: 1), и эффективного для лизиса грам-положительных бактерий.

40 [00018] Настоящее изобретение дополнительно предоставляет способ для диспергирования или лечения антибиотикорезистентной инфекции *Staphylococcus aureus*, которая вовлечена в или включает биопленку у человека, включающий стадию введения 45 человеку с биопленкой инфекции антибиотикорезистентных *Staphylococcus aureus*, эффективного количества композиции, содержащей изолированный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность ФИГУРЫ 5 (SEQ ID NO: 1) или ее варианты, имеющие по меньшей мере 80% идентичности, 85% идентичности, 90%

идентичности или 95% идентичности с полипептидом ФИГУРЫ 5 (SEQ ID NO: 1), и эффективный для диспергирования биопленки и лизиса в ней и/или высвобождаемых из нее *Staphylococcus aureus*, посредством чего количество *Staphylococcus aureus* у человека снижается, а биопленка и присутствующая инфекция уничтожаются.

- 5 [00019] Способ изобретения также включает способ для предотвращения, диспергирования или обработки биопленки грам-положительных бактерий, содержащих один или более из видов бактерий *Staphylococcus* или *Streptococcus* у человека, включающий стадию введения субъекту, имеющему или подозреваемому на обладание, или имеющему риск бактериальной биопленки, эффективного количества композиции, 10 содержащей изолированный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность ФИГУРЫ 5 (SEQ ID NO: 1) или ее варианты, имеющие по меньшей мере 80% идентичности, 85% идентичности, 90% идентичности или 95% идентичности с полипептидом ФИГУРЫ 5 (SEQ ID NO: 1), и эффективного для лизиса грам- положительных бактерий, посредством чего количество грам-положительных бактерий 15 у человека снижается, и зараженность или инфицированность биопленки устраняются. В аспекте способа, биопленка, содержащая или включающая один или более из видов бактерий *Enterococcus* или *Listeria*, эффективно предотвращается, диспергируется или обрабатывается. В конкретном аспекте этого способа, где субъект подвергается воздействию или имеет риск появления одного или более из видов бактерий 20 *Staphylococcus* (таких как *Staphylococcus aureus*), *Streptococcus* (в частности, Группы А стреп или Группы В стреп, таких как *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*, соответственно). Альтернативные бактерии, такие как бактерии *Listeria* (такие как *L. monocytogenes*) или *Enterococcus* (такие как *E. faecalis*) могут также включаться и быть объектом воздействия, предотвращаться, диспергироваться или обрабатываться в 25 соответствии со способами и композициями изобретения. Субъект может являться человеком. Субъект может являться взрослым человеком, ребенком, младенцем или плодом.

[00020] В любых таких вышеуказанных способах, чувствительные, лизируемые, диспергируемые или обрабатываемые биопленочные бактерии могут быть 30 выбраны из *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equi zoo*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* Группы G, *Streptococcus* Группы E, *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus pneumoniae*.

35 [00021] В соответствии с любыми из способов изобретения чувствительные бактерии или биопленочные бактерии могут представлять собой антибиотикоустойчивые бактерии. Бактерии могут являться резистентными к антибиотикам, включая метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA), ванкомицин-резистентные *Staphylococcus aureus* (VRSA), даптомицин-резистентные *Staphylococcus aureus* (DRSA) 40 или линезолид-резистентные *Staphylococcus aureus* (LRSA). Бактерии могут иметь измененную чувствительность к антибиотику, такие как например, *Staphylococcus aureus*, обладающие умеренной чувствительностью к ванкомицину (VISA). Чувствительные бактерии могут представлять собой клинически значимые или патогенные бактерии, в частности, для людей. В аспекте способа(способов), лизиновый 45 полипептид(ы) являются эффективными для лизиса бактериальных штаммов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Listeria*.

[00022] Было показано, что покрытие медицинских имплантатов противомикробными средствами может эффективно предотвращать первоначальное прилипание

стафилококковых биопленок к имплантатам. Покрытие биомедицинских материалов лизином может также оказаться успешным для предотвращения раннего прилипания бактерий, включая стафилококки, к имплантатам, таким образом, предотвращая образование биопленки. Настоящее изобретение, таким образом, также предоставляет способы для снижения и предотвращения роста биопленки на поверхности устройств, имплантатов, разделительных мембран (например, первапорационных мембран, мембран для диализа, обратного осмоса, ультрафильтрационных и микрофильтрационных мембран) посредством введения или покрытия лизином изобретения, включая лизин PlySs2.

[00023] Альтернативные активные и подходящий лизин(ы) могут использоваться в соответствии со способами и композициями настоящего изобретения, включающие как применяемый лизин(ы) и/или один или более дополнительных эффективных и применимых лизинов. В дополнительном аспекте или варианте осуществления способов и применений, предоставленных в настоящем описании, стафилококковый специфичный лизин ClyS применяют в настоящем описании по отдельности или в комбинации с лизином PlySs2, как предоставлено и описано в настоящем описании.

[00024] Другие цели и преимущества станут очевидными для специалистов в данной области из обзора следующего описания, которое приводится со ссылками на следующие иллюстративные чертежи.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00025] ФИГУРА 1 изображает биопленки ВАА-42 MRSA, обработанные даптомицином, ванкомицином, лизином PlySs2 или линезолидом в количествах и в течение времени до 4 часов. Антибиотики даптомицин, ванкомицин и линезолид добавляли при 1000ХМПК для каждого антибиотика. PlySs2 добавляли при 1ХМПК.

После обработки, биопленки визуализируют с использованием кристаллического фиолетового.

[00026] ФИГУРА 2 изображает биопленки ВАА-42 MRSA, обработанные даптомицином, ванкомицином, лизином PlySs2 или линезолидом в количествах и в течение времени до 6 часов. После обработки, биопленки визуализируют с использованием кристаллического фиолетового.

[00027] ФИГУРА 3 изображает биопленки ВАА-42 MRSA, обработанные даптомицином, ванкомицином, лизином PlySs2 или линезолидом в количествах и в течение времени до 24 часов. После обработки, биопленки визуализируют с использованием кристаллического фиолетового.

[00028] ФИГУРА 4 изображает биопленки ВАА-42 MRSA в 24-луночных чашках Петри, обработанные лизином PlySs2 или даптомицином в течение 0,5 часа, 1 часа, 4 часов и 24 часов при указанных количествах дозирования. После обработки, биопленки визуализируют с использованием кристаллического фиолетового.

[00029] ФИГУРА 5 предоставляет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 1) и кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 2) лизина

PlySs2. N-концевой CHAP-домен и C-концевой SH-3-домен PlySs2 лизина заштрихованы, с CHAP-доменом (SEQ ID NO: 3), начинающимся с LNN... и заканчивающимся ... YIT, и SH-3-доменом (SEQ ID NO: 4), начинающимся с RSY ... заканчивающимся ... VAT. Остатки активного центра CHAP-домена (Cys₂₆, His₁₀₂, Glu₁₁₈ и Asn₁₂₀),

идентифицированные по гомологии с PDB 2K3A (Rossi P et al (2009) Proteins 74:515-519), подчеркнуты.

[00030] ФИГУРА 6 предоставляет двадцати-четырех часовой анализ по определению зависимости активности PlySs2 и антибиотика от времени на биопленках MRSA, как

оценивали по окрашиванию кристаллическим фиолетовым. Антибиотики даптомицин (ДАП), ванкомицин (ВАН) и линезолид (ЛЗД) добавляли при 1000Х МПК для каждого антибиотика. PlySs2 добавляли при 1Х МПК.

[00031] ФИГУРА 7 изображает количественное определение красителя,

5 удерживаемого в качестве индикатора биопленки, удерживаемого при двадцати-четырех часовом анализе по определению зависимости активности PlySs2 и антибиотика от времени на биопленках MRSA. Антибиотики даптомицин (ДАП), ванкомицин (ВАН) и линезолид (ЛЗД) добавляли при 1000Х МПК для каждого антибиотика. Лизин PlySs2 добавляли при 1Х МПК.

10 [00032] ФИГУРА 8 показывает 24-часовую зависимость от времени суб-МПК концентраций PlySs2 в сопоставлении со средой по отдельности на биопленках MRSA, как оценивали посредством окрашивания кристаллическим фиолетовым. PlySs2 добавляли к биопленке штамма BAA-42 MRSA при уровнях 0,1Х МПК и 0,01Х МПК.

15 [00033] ФИГУРА 9А и 9В изображает исследования эрадикации биопленки против MRSA, выращенных на DEPC-катетерах. А: Катетерные биопленки обрабатывали средой по отдельности, 1Х МПК даптомицина, 1000Х МПК даптомицина и 1Х МПК PlySs2 в течение 24 часов перед интенсивной промывкой, окрашиванием Метиленовым Синим и фотографированием. В: Через 24 часа обработки, образцы катетера в двух повторностях обрабатывали буфером для лизиса, чтобы удалить остаточные биопленки, 20 и бактериальные КОЕ оценивали на основании относительных световых единиц, с использованием люциферазного реагента, калиброванного против известных концентраций бактерий.

25 [00034] ФИГУРА 10 изображает анализ методом титрования окрашивания биопленки MRSA DEPC-катетера метиленовым синим через 4 часа обработки буфером или титрованным PlySs2 с МПК, равными 1Х МПК, 0,1Х МПК, 0,01Х МПК, 0,001Х МПК, 0,0001Х МПК и 0,00001Х МПК PlySs2.

30 [00035] ФИГУРА 11 изображает анализ методом титрования окрашивания биопленки MRSA DEPC-катетера метиленовым синим через 4 часа обработки буфером или титрованным даптомицином (ДАП) при 5000Х МПК, 1000Х МПК, 100Х МПК, 10Х МПК и 1Х МПК.

35 [00036] ФИГУРА 12А и В показывает анализ зависимости от времени активности PlySs2 против биопленок MRSA в DEPC-катетерах. А: катетеры обрабатывали 1Х МПК PlySs2 (32 мкг/мл) в течение 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин, 90 мин, 2 часов, 3 часов, 4 часов и 5 часов перед быстрой промывкой, окрашиванием метиленовым синим и фотографированием. В: После каждой обработки при фиксированном времени, образцы катетера в двух повторностях обрабатывали буфером для лизиса, чтобы удалить остаточные биопленки, и бактериальные КОЕ оценивали на основании относительных световых единиц с использованием люциферазного реагента, калиброванного против известных концентраций бактерий.

40 [00037] ФИГУРА 13 изображает анализ методом титрования подсчеты КОЕ биопленки MRSA DEPC-катетера после 4-х часовой обработки катетерных биопленок с указанными концентрациями лекарственного средства в соответствии с исследованиями, показанными на ФИГУРАХ 11 и 12. Бактериальные КОЕ, оставшиеся после обработки лекарственным средством оценивали на основании относительных 45 световых единиц с использованием люциферазного реагента, калиброванного против известных концентраций бактерий. Биопленки, образованные штаммом ATCC BAA-42 *Staphylococcus aureus* на просветах катетеров из ди(2-этилгексил)фталата (DEHP) обрабатывали в течение 4 часов с указанными концентрациями PlySs2 или даптомицина

(ДАП). Раствор Рингера с лактатом по отдельности включали в качестве контроля. После обработки, катетеры сливали и промывали, и колониеобразующие единицы (КОЕ) измеряли с использованием метода, основанного на высвобождении аденозинтрифосфата (АТФ) (набор BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay kit).

5 Красная линия указывает концентрации ДАП при 5000Х минимальной подавляющей концентрации (МПК) и PlySs2 при 0,01Х МПК, которые приводили в результате к примерно эквивалентным снижениям в биопленках в обработанных катетерных трубках. Обозначение: * = Нижняя граница обнаружения.

[00038] ФИГУРА 14 изображает активность лизина ClyS против биопленки *S. aureus*.

10 Биопленки из ВАА-42 MRSA обрабатывали указанными концентрациями лизина ClyS (1Х МПК 32 мкг/мл, 0,1Х МПК 3,2 мкг/мл, 0,01Х МПК 0,32 мкг/мл и 0,001Х МПК 0,032 мкг/мл) или средой по отдельности в течение 24 часов. Каждую лунку промывали и окрашивали 2% кристаллическим фиолетовым.

[00039] ФИГУРА 15 предоставляет исследований биопленки *in vivo* у мышей с

15 имплантатами подкожного катетера, обработанными лизином PlySs2 посредством различных способов введения. Биопленки выращивали на катетерах, катетер имплантировали в мышь, и мышь обрабатывали. Катетеры удаляли, окрашивали метиленовым синим, и окрашивание количественно определяли по поглощению при 600 нм. OD при 600 нм/г катетера наносили на график для каждого отрицательного 20 контроля (без бактерий), контроля PlySs2 (без бактерий, холостая обработка), обработки средой, PlySs2, вводимого внутрибрюшинно (ВБ), PlySs2, вводимого внутривенно (ВВ), и PlySs2, вводимого подкожно (ПК).

25 [00040] ФИГУРА 16 изображает исследования зависимости от времени с оценкой люминального содержимого катетерных биопленок MRSA, обработанных лизином PlySs2 или даптомицином, и оценку бактериальной жизнеспособности и люминальной стерилизации с течением времени при обработке PlySs2 или антибиотиком даптомицином.

30 [00041] ФИГУРА 17 изображает анализ методом титрования исследования бактериальной биопленки катетера с штаммом CFS 313 *Staphylococcal epidermidis* (NRS34, VISE штамм). Окрашивание биопленки метиленовым синим показано через 4 часа обработки буфером или титрованными МПК PlySs2, равными 10Х МПК, 1Х МПК (8 мкг/мл), 0,1Х МПК, 0,01Х МПК, 0,001Х МПК и 0,0001Х МПК PlySs2.

35 [00042] ФИГУРА 18 изображает анализ предотвращения образования биопленки бактерий ВАА-42 MRSA, инокулированных в 24-луночных планшетах и комбинированных немедленно с буфером или PlySs2 при 1Х МПК (32 мкг/мл), или разбавлений, отмеченных до 0,0001Х МПК. Планшеты инкубировали в течение 6 часов, промывали PBS, окрашивали кристаллическим фиолетовым для оценки генерации биопленки и фотографировали.

40 [00043] ФИГУРА 19 изображает анализ методом титрования окрашивания катетерной биопленки штамма CFS 553 MRSA (ATCC 43300) метиленовым синим после 4-часовой обработки буфером или титрованными МПК PlySs2, равных 10Х МПК, 1Х МПК (16 мкг/мл), 0,1Х МПК, 0,01Х МПК и 0,001Х МПК PlySs2.

45 [00044] ФИГУРА 20 изображает анализ методом титрования окрашивания катетерной биопленки штамма CFS 992 MRSA (JMI 5381) метиленовым синим после 4-часовой обработки буфером или титрованными PlySs2, равных 10Х МПК, 1Х МПК (32 мкг/мл), 0,1Х МПК, 0,01Х МПК и 0,001Х МПК PlySs2.

[00045] ФИГУРА 21 изображает результаты сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) 3-дневных катетерных биопленок *S. aureus*, обработанных PlySs2, промытых,

фиксированных и сканированных. Показаны 0 минут, 30 секунд и 15 минут обработки PlySs2. 5000X увеличение.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00046] В соответствии с настоящим изобретением могут использоваться

общепринятые методы молекулярной биологии, микробиологии и технологии рекомбинантных ДНК в пределах компетентности в данной области. Такие методы поясняются в полном объеме в литературе. См., например, Sambrook et al, "Molecular Cloning: Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

[00047] Следовательно, при появлении в настоящем описании, следующие термины будут иметь определения, приведенные ниже.

[00048] Термины "лизин(ы) PlySs", "лизин PlySs2", "PlySs2" и любые варианты, не перечисленные конкретно, могут применяться в настоящем описании взаимозаменяя, и, при использовании на протяжении настоящей заявки и формулы изобретения относятся к белковому материалу, включающему одиночные белки или множество белков, и распространяются на эти белки, имеющие данные по аминокислотной последовательности, описанные в настоящем описании, и представленные на ФИГУРЕ 5 и SEQ ID NO: 1, и профиль активностей, приведенный в настоящем описании и в Формуле изобретения. Соответственно, белки, проявляющие по существу эквивалентные или измененные активности, предусматриваются аналогичным образом. Эти модификации могут быть преднамеренными, например, такими, как модификации, полученные посредством сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, такими, как модификации, полученные посредством мутаций у хозяев, которые являются продуцентами комплекса или его указанных субъединиц. Также, термины "лизин(ы) PlySs", "лизин PlySs2", "PlySs2" предназначены для включения в пределы их объема, белков, конкретно перечисленных в настоящем описании, а также всех по существу гомологичных аналогов, фрагментов или усечений и аллельных вариаций. Лизин PlySs2 описан в патентной заявке США 61/477,836 и заявке PCT PCT/US2012/34456. Более недавняя статья Gilmer et al описывает лизин PlySs2 (Gilmer DB et al (2013) Antimicrob Agents Chemother Epub 2013 April 9 [PMID 23571534]).

[00049] Термин "ClyS", "лизин ClyS" относится к химерному лизину ClyS, с активностью против стафилококковых бактерий, включая *Staphylococcus aureus*, подробно описанному в WO 2010/002959 и описанному также в Daniel et al (Daniel, et al (2010) Antimicrobial Agents and Chemother 54(4): 1603-1612). Примерная аминокислотная последовательность ClyS представлена в SEQ ID NO: 5.

[00050] "Литический фермент" включает любой литический фермент бактериальной клеточной стенки, который лизирует одну или более бактерий в подходящих условиях и в течение значимого периода времени. Примеры литических ферментов включают, не ограничиваясь ими, различные амидазные литические ферменты клеточной стенки.

[00051] "Литический фермент бактериофага" относится к литическому ферменту, экстрагированному или выделенному из бактериофага, или синтезированному литическому ферменту с аналогичной белковой структурой, которая поддерживает функциональность литического фермента.

[00052] Литический фермент способен к специальному расщеплению связей, которые присутствуют в пептидогликане бактериальных клеток, чтобы разрушить бактериальную клеточную стенку. В настоящее время также постулируют, что пептидогликан бактериальной клеточной стенки является высококонсервативным среди большинства бактерий, и расщепление только нескольких связей может разрушить бактериальную клеточную стенку. Примерами литических ферментов, которые расщепляют эти связи, являются мурамидазы, глюкозаминидазы, эндопептидазы или N-ацетил-мурамоил-L-аланинамидазы. Fischetti et al (1974) сообщал, что фермент лизин стрептококкового фага C1 представлял собой амидазу. Garcia et al (1987, 1990) сообщал, что Cp1 лизин из *S. pneumoniae* из фага Cp-1 представлял собой лизоцим. Caldentey и Bamford (1992) сообщали, что литический фермент из фага phi 6 *Pseudomonas* представлял собой эндопептидазу, расщепляющую пептидный мостик, образованный мелодиаминопимелиновой кислотой и D-аланином. Литические ферменты фага T1 и T6 *E. coli* представляют собой амидазы, как и литический фермент из фага (ply) *Listeria* (Loessner et al, 1996). Существуют также другие литические ферменты, известные в данной области, которые способны к расщеплению бактериальной клеточной стенки.

[00053] Термин "литический фермент, генетически кодируемый бактериофагом", включает полипептид, способный к лизису бактерий-хозяев, например, обладая по меньшей мере некоторой литической активностью по отношению к клеточной стенке против бактерий-хозяев. Полипептид может иметь последовательность, которая охватывает нативную последовательность литического фермента и его вариантов. Полипептид может быть выделен из разных источников, таких как, бактериофаг ("фаг"), или получен посредством рекомбинантных или синтетических методов. Полипептид может, например, содержать холин-связывающую часть по карбоксильной концевой стороне и может характеризоваться ферментной активностью, способной к расщеплению пептидогликана клеточной стенки (такой как амидазной активности для действия на амидные связи в пептидогликане) по аминоконцевой стороне. Были описаны литические ферменты, которые включают множество ферментных активностей, например, два ферментативных домена, таких как лизин PlyGBS. Дополнительно, были описаны другие литические ферменты, содержащие только каталитический домен и не содержащие домена для связывания с клеточной стенкой.

[00054] "Нативная последовательность ассоциированного с фагом литического фермента" включает полипептид, имеющий такую же аминокислотную последовательность, как и фермент, полученный из бактериального генома (т.е. профага). Такая нативная последовательность фермента может быть выделена или может быть получена рекомбинантными или синтетическими средствами.

[00055] Термин "нативная последовательность фермента" охватывает природные формы (например, альтернативно сплайсированные или измененные формы) и природные варианты фермента. В одном варианте осуществления изобретения, нативная последовательность фермента представляет собой зрелый или непроцессированный полипептид, который генетически кодируется геном из бактериофага, специфичного для *Streptococcus suis*. Разумеется, возможными и известными являются несколько вариантов, как признают в публикациях, таких как Lopez et al., Microbial Drug Resistance 3: 199-211 (1997); Garcia et al., Gene 86: 81-88 (1990); Garcia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 914-918 (1988); Garcia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 914- 918 (1988); Garcia et al., Streptococcal Genetics (J. J. Ferretti и Curtis eds., 1987); Lopez et al., FEMS Microbiol. Lett. 100: 439-448 (1992); Romero et al., J. Bacteriol. 172: 5064-5070 (1990); Ronda et al., Eur. J. Biochem. 164: 621-624 (1987) и Sanchez et al., Gene 61: 13-19 (1987). Содержание каждой

из этих ссылок, в частности, списки последовательностей и связанный с ними текст, в котором сравнивают последовательности, включая утверждения о гомологии последовательностей, конкретно, полностью включено посредством ссылки.

[00056] "Вариантная последовательность литического фермента" включает литический

- 5 фермент, характеризуемый полипептидной последовательностью, которая отличается от последовательности литического фермента, но сохраняет функциональную активность. Литический фермент может, в некоторых вариантах осуществления, генетически кодироваться бактериофагом, специфичным для *Streptococcus suis*, как в случае PlySs2, имеющего конкретную идентичность аминокислотной последовательности
- 10 с последовательностью (последовательностями) его литического фермента, как предоставлено на ФИГУРЕ 5 и в SEQ ID NO: 1. Например, в некоторых вариантах осуществления, функционально активный литический фермент может лизировать бактерии *Streptococcus suis*, и другие чувствительные бактерии, как предоставлено в настоящем документе, включая показанные данные в ТАБЛИЦЕ 1, 2 и 3, посредством
- 15 разрушения клеточной стенки бактерий. Активный литический фермент может иметь 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью(последовательностями) литического фермента, предоставленными на ФИГУРЕ 5 (SEQ ID NO: 1 , SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4). Такие ассоциированные с фагом варианты литического фермента включают,
- 20 например, полипептиды литического фермента, где один или более аминокислотных остатков являются добавленными, или подвергнутыми делеции по N- или C-концу последовательности из этих последовательности(последовательностей) литического фермента, предоставленных на ФИГУРЕ 5 (SEQ ID NO: 1).

[00057] В конкретном аспекте, ассоциированный с фагом литический фермент будет

- 25 иметь по меньшей мере приблизительно 80% или 85% идентичности аминокислотной последовательности с нативными последовательностями ассоциированного с фагом литического фермента, в частности, по меньшей мере приблизительно 90% (например, 90%) идентичности аминокислотной последовательности. Наиболее конкретно, ассоциированный с фагом вариант литического фермента будет иметь по меньшей мере
- 30 приблизительно 95% (например 95%) идентичности аминокислотной последовательности с этими нативными последовательностью(последовательностями) ассоциированного с фагом литического фермента, предоставленными на ФИГУРЕ 5 и в SEQ ID NO: 1 для лизина PlySs2, или, как описано ранее, для ClyS, включая WO 2010/002959, а также как описано у Daniel et al (Daniel, et al (2010) Antimicrobial Agents и Chemother 54(4): 1603-
- 35 1612) и SEQ ID NO: 5.

[00058] "Процент идентичности аминокислотной последовательности" по отношению к идентифицированным последовательностям ассоциированного с фагом литического фермента определяют в настоящем описании, как процентное содержание аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются

- 40 идентичными с аминокислотными остатками в последовательности ассоциированного с фагом литического фермента, после выравнивания последовательностей в одной и той же рамке считывания и введения пробелов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и без учета каких либо консервативных замен как части идентичности последовательности.

- 45 [00059] "Процент идентичности последовательности нуклеиновой кислоты" по отношению к идентифицированным в настоящем описании последовательностям ассоциированного с фагом литического фермента, определяют как процентное содержание нуклеотидов в кандидатной последовательности, которые являются

идентичными с нуклеотидами в последовательности ассоциированного с фагом литического фермента, после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности.

- 5 [00060] Для определения процента идентичности двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в последовательность первой нуклеотидной последовательности). Нуклеотиды или аминокислоты в соответствующих нуклеотидных или аминокислотных положениях затем сравнивают.
- 10 Когда положение в первой последовательности занято такими же нуклеотидом или аминокислотой, как соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы являются идентичными по этому положению. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, разделенных между последовательностями (т.е., % идентичности = # идентичных 15 положений/суммарное # положений × 100).

[00061] Определение процента идентичности между двумя последовательностями может проводиться с использованием математического алгоритма. Неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей представляет собой алгоритм из Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993), который включен в программу NBLAST, которую можно применять для идентификации последовательностей, имеющих желательные идентичности с нуклеотидными последовательностями изобретения. Чтобы получить выравнивания с пробелами с целью сравнения, может использоваться Gapped BLAST, как описано в Altschul et al, Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 (1997). При использовании 25 программ BLAST и Gapped BLAST, могут применяться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, NBLAST). См. программы, предоставленные Национальным центром биотехнологической информации, Национальной медицинской библиотекой, Национальными институтами здравоохранения.

[00062] "Полипептид" включает полимерную молекулу, состоящую из множества 30 аминокислот, объединенных вместе линейным образом. Полипептид может, в некоторых вариантах осуществления, соответствовать молекулам, кодируемым полинуклеотидной последовательностью, которая является природной. Полипептид может включать консервативные замены, где природная аминокислота заменена аминокислотой, имеющей аналогичные свойства, где такие консервативные замены не изменяют функцию 35 полипептида.

[00063] Термин "измененные литические ферменты" включает перетасованные и/или химерные литические ферменты.

[00064] Было обнаружено, что литические ферменты фага, специфичные для бактерий, инфицированных специфичным фагом, эффективно и производительно разрушают 40 клеточную стенку рассматриваемой бактерии. Полагают, что у литического фермента отсутствует протеолитическая ферментативная активность, и, он, следовательно, является неразрушающим по отношению к белкам и тканям млекопитающих, когда присутствует во время расщепления бактериальной клеточной стенки. Кроме того, поскольку было обнаружено, что действие литических ферментов фага, в отличие от 45 антибиотиков, было довольно специфичным для целевого патогена (патогенов), вероятно, что нормальная flora будет оставаться по существу в неизменном виде (M. J. Loessner, G. Wendlinger, S. Scherer, Mol Microbiol 16, 1231-41. (1995), включенная в настоящее описание посредством ссылки). Действительно, лизин PlySs2, при

демонстрации уникально широкого спектра лизиса бактериальных видов и штаммов, является сравнительно и особенно неактивным против бактерий, содержащих нормальную флору, включая *E. coli*, как описано в настоящем описании.

[00065] Литический фермент или полипептид для использования в изобретении может 5 продуцироваться бактериальным организмом после его инфицирования конкретным бактериофагом или может быть произведен или получен рекомбинантно или синтетически в качестве профилактического средства для предотвращения от заболевания тех субъектов, которые были подвержены воздействию других субъектов, имевших симптомы инфекции, или в качестве терапевтического средства для субъектов, 10 которые уже заболели в результате инфекции. Ввиду того, что последовательности полипептидов лизина и нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды лизина, описаны и являются предметом ссылок в настоящем описании, литические фермент(ы) /полипептид(ы) могут предпочтительно производиться посредством изолированного гена для литического фермента из генома фага, при помещении гена в вектор переноса, 15 и клонировании указанного вектора переноса в систему экспрессии, с использованием стандартных методов в данной области, включая иллюстрируемые примерами в настоящем описании. Литические фермент(ы) или полипептид(ы) могут являться процессированными, химерными, перетасованными или "природными," и могут находиться в комбинации. Релевантный патент США № 5604109 полностью включен 20 в настоящее описание посредством ссылки. "Измененный" литический фермент может производиться различными путями. В предпочтительном варианте осуществления, ген для измененного литического фермента из генома фага помещают в вектор переноса или перемещаемый вектор, предпочтительно плазмиду, и плазмиду клонируют в вектор экспрессии или систему экспрессии. Вектор экспрессии для производства полипептида 25 лизина или фермента изобретения может быть подходящим для *E. coli*, *Bacillus*, или ряда других подходящих бактерий. Векторная система может также представлять собой бесклеточную систему экспрессии. Все из методов экспрессирования гена или набора генов являются известными в данной области. Литический фермент может также быть создан посредством инфицирования *Streptococcus suis* бактериофагом, специфичным 30 для *Streptococcus suis*, где указанный по меньшей мере один литический фермент эксклюзивно лизирует клеточную стенку указанного *Streptococcus suis*, обладая по большей мере минимальными эффектами на другую, например, природную или симбиотическую присутствующую бактериальную флору (см. ТАБЛИЦУ 5, которая предоставляет результаты исследований литической активности против различных 35 симбиотических кишечных бактерий человека).

[00066] "Химерный белок" или "гибридный белок" содержит всю или (предпочтительно, биологически активную) часть полипептида, используемого в изобретении, функционально связанного с гетерологичным полипептидом. Химерные белки или пептиды производятся, например, посредством комбинирования двух или 40 более белков, имеющих два или более активных центров. Химерные белок и пептиды могут действовать независимо на одну и ту же или различные молекулы, и, следовательно, иметь потенциал для лечения двух или более различных бактериальных инфекций в одно и то же время. Химерные белки и пептиды также могут применяться для лечения бактериальной инфекции посредством расщепления клеточной стенки в 45 более чем одном расположении, таким образом, потенциально обеспечивая более быстрый или эффективный (или синергетический) лизис от единственной молекулы лизина или химерного пептида.

[00067] "Гетерологичная" область конструкции ДНК или конструкции пептида

представляет собой идентифицируемый сегмент ДНК внутри более крупной молекулы ДНК или пептида внутри более крупной молекулы пептида, которая не обнаруживается в ассоциации с более крупной молекулой в природе. Таким образом, когда гетерологичная область кодирует ген млекопитающего, ген будет обычно фланкирован 5 ДНК, которая не фланкирует геномную ДНК млекопитающих в геноме организма-источника. Еще одним примером гетерологичной кодирующей последовательности является конструкция, где кодирующая последовательность сама по себе не обнаруживается в природе (например, кДНК, где геномная кодирующая 10 последовательность содержит интроны, или синтетические последовательности, имеющие кодоны, отличающиеся от нативного гена). Аллельные вариации или природные мутационные события не способствуют возникновению гетерологичной области ДНК или пептида, определенных в настоящем описании.

[00068] Термин "функционально связанный" означает, что полипептид раскрытия и гетерологичный полипептид гибридизируются внутри рамки. Гетерологичный 15 полипептид может быть гибридизирован по N-концу или C-концу полипептида раскрытия. Химерные белки получают ферментативно химическим синтезом, или посредством технологии рекомбинантных ДНК. Несколько химерных лизических ферментов были получены и исследованы. Одним примером применимого гибридного белка является гибридный белок GST, в котором полипептид раскрытия гибридизован 20 с C-концом последовательности GST. Такой химерный белок может способствовать очистке рекомбинантного полипептида раскрытия.

[00069] В еще одном варианте осуществления, химерный белок или пептид содержат гетерологичную сигнальную последовательность по их N-концу. Например, нативная 25 сигнальная последовательность полипептида раскрытия может быть удалена и заменена на сигнальную последовательность из еще одного известного белка.

[00070] Гибридный белок может комбинировать полипептид лизина с белком или полипептидом, имеющими различную способность, или обеспечивающими дополнительную способность или добавленный признак полипептиду лизина. Гибридный белок может представлять собой иммуноглобулиновый гибридный белок, в котором 30 весь полипептид или часть полипептида раскрытия гибридизирована с последовательностями, полученными из члена семейства иммуноглобулиновых белков. Иммуноглобулин может представлять собой антитело, например, антитело, направленное к поверхности белка или эпитопа чувствительных или целевых бактерий. Иммуноглобулиновый гибридный белок может изменять биодоступность когнитного 35 лиганда полипептида раскрытия. Ингибирирование лиганд/рецепторного взаимодействия может быть применимым терапевтически, как для лечения связанных с бактериями заболеваний и расстройств, так и для модуляции (т.е. инициирования или ингибирования) выживаемости клеток. Гибридный белок может включать средство для направления 40 или нацеливания лизина на конкретные ткани или органы или на поверхности, такие как устройства, пластик, мембранны. Химерные и гибридные белки и пептиды раскрытия могут быть получены посредством стандартных технологий рекомбинантных ДНК.

[00071] Модифицированная или измененная форма белка или пептидов и пептидных фрагментов, раскрытых в настоящем описании, включает белок или пептиды и пептидные фрагменты, которые химически синтезируют или получают посредством 45 технологий рекомбинантных ДНК или применяя оба подхода. Эти методы включают, например, химеризацию и перетасовку. Как используют в настоящем описании, перетасованные белки или пептиды, генные продукты или пептиды для нескольких родственных белков фага или пептидных фрагментов белка статистически расщепляли

и повторно собирали в более активный или специфичный белок. Перетасованные молекулы олигонуклеотидов, пептидов или пептидных фрагментов отбирают или подвергают скринингу для идентификации молекулы, имеющей желательное функциональное свойство. Перетасовку можно применять для создания белка, который

- 5 является более активным, например, в 10-100 раз более активным, чем матричный белок. Матричный белок выбирают среди различных разновидностей белков лизина. Перетасованные белок или пептиды составляют, например, один или более доменов связывания и один или более катализических доменов. Когда белок или пептид получают посредством химического синтеза, он предпочтительно не содержит по существу
10 химических предшественников или других химикатов, т.е. его отделяют от химических предшественников или других химикатов, которые вовлечены в синтез белка. Соответственно, такие препараты белка имеют менее чем приблизительно 30%, 20%, 10%, 5% (массы сухого вещества) химических предшественников или соединений, отличающихся от полипептида, представляющего интерес.

- 15 [00072] Настоящее изобретение также имеет отношение к другим вариантам полипептидов, применимых в изобретении. Такие варианты могут иметь измененную аминокислотную последовательность, которая может функционировать либо как агонисты (миметики) или как антагонисты. Варианты могут быть генерированы посредством мутагенеза, т.е. дискретной точечной мутации или процессирования.
20 Агонист может сохранять по существу такую же биологическую активность, или ряд биологических активностей природной формы белка. Антагонист белка может ингибировать одну или более из активностей природной формы белка посредством, например, конкурентного связывания с восходящим или нисходящим компонентом клеточного сигнального каскада, который включает целевой белок. Таким образом,
25 конкретные биологические эффекты могут быть достигнуты посредством лечения с использованием варианта с ограниченной функцией. Лечение субъекта с использованием варианта, имеющего ряд биологических активностей природной формы белка, может иметь меньшее количество побочных эффектов у субъекта относительно лечения с использованием природной формы белка. Варианты белка, используемые в раскрытии,
30 которые функционируют либо как агонисты (миметики) или как антагонисты, могут быть идентифицированы посредством скрининга комбинаторных библиотек мутантов, таких как процессированных мутантов раскрытоого белка. В одном варианте осуществления, мозаичную библиотеку вариантов генерируют посредством комбинаторного мутагенеза на уровне нуклеиновой кислоты и кодируют посредством
35 мозаичной генной библиотеки. Существуют различные методы, которые могут использоваться для получения библиотек потенциальных вариантов раскрытых полипептидов из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Библиотеки фрагментов кодирующей последовательности раскрытых полипептидов могут применяться для генерации мозаичной популяции полипептидов для скрининга и
40 последующей селекции вариантов, активных фрагментов или процессированных вариантов. Несколько технологий известны в данной области для скрининга генных продуктов комбинаторных библиотек, полученных посредством точечных мутаций или процессирования, и для скрининга библиотек кДНК для генных продуктов, имеющих выбранное свойство. Наиболее широко применяемые технологии, которые подвержены
45 высокоскоростному анализу для скрининга крупных генных библиотек, обычно включают клонирование генной библиотеки в реплицируемые векторы экспрессии, трансформацию соответствующих клеток с помощью полученной в результате библиотеки векторов, и экспрессию комбинаторных генов в условиях, при которых

обнаружение желательной активности способствует выделению вектора, кодирующего ген, продукт которого был обнаружен. В данном контексте, наименьшая часть белка (или нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок) в соответствии с вариантами осуществления представляет собой эпитоп, который является распознаваемым в качестве

- 5 специфичного для фага, который создает белок лизина. Соответственно, наименьший полипептид (и ассоциированная нуклеиновая кислота, которая кодирует полипептид), который, как можно ожидать, связывается с мишенью или рецептором, таким как антитело, и является применимым для нескольких вариантов осуществления, может иметь длину в 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85 или 100
- 10 аминокислот. Несмотря на то, что небольшие последовательности с длиной в 8, 9, 10, 11, 12 или 15 аминокислот надежно содержат достаточную структуру для действия в качестве мишней или эпитопов, более короткие последовательности с длиной в 5, 6 или 7 аминокислот могут проявлять целевую или эпитопную структуру при некоторых условиях и иметь значение в варианте осуществления. Таким образом, наименьшая
- 15 часть белка(белков) или полипептидов лизина, предоставленных в настоящем описании, включая представленные на ФИГУРЕ 5 и SEQ ID NO: 1 и доменные последовательности SEQ ID NO: 3 и 4, включает полипептиды с длиной в пределах 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 или 16 аминокислот.

- [00073] Биологически активные части белка или пептидного фрагмента вариантов осуществлений, описанных в настоящем описании, включают полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, в достаточной степени идентичные аминокислотной последовательности раскрытоого белка лизина или полученные из нее, которые включают меньшее количество аминокислот, чем непроцессированный белок лизина, и проявляют по меньшей мере одну активность соответствующего 25 непроцессированного белка. Обычно, биологически активные части содержат домен или мотив с по меньшей мере одной активностью соответствующего белка. Биологически активная часть белка или белкового фрагмента раскрытия может представлять собой полипептид, который имеет длину, например, на 10, 25, 50, 100 аминокислот меньше или больше. Более того, другие биологически активные части, в которых другие области 30 белка были подвергнуты делеции или добавлены, могут быть получены посредством рекомбинантных технологий и оценены на предмет наличия одной или более из функциональных активностей нативной формы полипептида вариантов осуществлений.

- [00074] Могут быть получены гомологичные белки и нуклеиновые кислоты, которые разделяют функциональность с такими небольшими белками и/или нуклеиновыми 35 кислотами (или областями белка и/или нуклеиновой кислоты более крупных молекул), как будет ясно специалистам в данной области. Такие малые молекулы и короткие области более крупных молекул, которые могут являться гомологичными, конкретно предназначены в качестве вариантов осуществления. Предпочтительно, гомология таких значимых областей составляет по меньшей мере 50%, 65%, 75%, 80%, 85% и 40 предпочтительно по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% в сравнении с полипептидами лизина, предоставленными в настоящем описании, включая представленные на ФИГУРЕ 5 и SEQ ID NO: 1. Эти процентные значения гомологии не включают изменения вследствие консервативных аминокислотных замен.

- [00075] Две аминокислотные последовательности являются "по существу 45 гомологичными", когда по меньшей мере приблизительно 70% аминокислотных остатков (предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90 или 95%) являются идентичными, или представляют консервативные замены. Последовательности

сравниваемых лизинов, таких как сравниваемые PlySs2 лизины, или сравниваемые ClyS лизины, являются по существу гомологичными, когда один или более, или вплоть до 10%, или вплоть до 15%, или вплоть до 20% аминокислот полипептида лизина замещены на аналогичную или консервативную аминокислотную замену, и, где сравниваемые лизины имеют профиль активностей, антибактериальные эффекты, и/или бактериальные специфичности лизина, такого как лизин PlySs2 и/или лизин ClyS, раскрытые в настоящем описании.

[00076] Предпочтительно, чтобы аминокислотные остатки, описанные в настоящем описании, находились в "L" изомерной форме. Однако, остатки в "D" изомерной форме могут быть заменены на любой остаток L-аминокислоты, поскольку желательное функциональное свойство связывания с иммуноглобулином сохраняется полипептидом. NH₂ относится к свободной аминогруппе, присутствующей на аминоконце полипептида. COOH относится к свободной карбоксигруппе, присутствующей на карбоксонце полипептида. Следуя стандартной номенклатуре полипептидов, *J. Biol. Chem.*, 243:3552-59 (1969), сокращенные обозначения аминокислотных остатков показаны в следующей таблице соответствия:

ТАБЛИЦА СООТВЕТСТВИЯ		
СИМВОЛ		АМИНОКИСЛОТА
1-буквенный	3-буквенный	
Y	Tyr	тироzin
G	Gly	глицин
F	Phe	фенилаланин
M	Met	метионин
A	Ala	аланин
S	Ser	серин
I	Ile	изолейцин
L	Leu	лейцин
T	Thr	тронин
V	Val	валин
P	Pro	пролин
K	Lys	лизин
H	His	гистидин
Q	Gln	глутамин
E	Glu	глутаминовая кислота
W	Trp	триптофан
R	Arg	аргинин
D	Asp	аспарагиновая кислота
N	Asn	аспарагин
C	Cys	цистеин

[00077] Мутации могут быть проделаны в аминокислотных последовательностях или в последовательностях нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды и лизины настоящего описания, включая последовательности лизина, приведенные на ФИГУРЕ 5 и SEQ ID NO: 1 или в доменных последовательностях SEQ ID NO: 3 и 4 или в активных фрагментах или продуктах их процессирования, таким образом, что конкретный кодон заменяют на кодон, который кодирует отличающуюся аминокислоту, причем аминокислоту заменяют на другую аминокислоту, или одну или более аминокислот подвергают делеции. Такую мутацию обычно проводят, делая возможным наименьшее количество изменений аминокислот или нуклеотидов. Заменяющая мутация этого типа может быть проведена для замены аминокислоты в полученном в результате белке неконсервативным образом (например, посредством изменения кодона для

аминокислоты, принадлежащей к группе аминокислот, имеющих конкретный размер или характеристику, на аминокислоту, принадлежащую к другой группе), или консервативным образом (например, посредством изменения кодона для аминокислоты, принадлежащей к группе аминокислот, имеющих конкретный размер или

- 5 характеристику, на аминокислоту, принадлежащую к той же самой группе). Такая консервативная замена обычно приводит к меньшему изменению в структуре и функции полученного в результате белка. Неконсервативная замена более вероятно изменяет структуру, активность или функцию полученного в результате белка. Настоящее изобретение следует рассматривать как включающее последовательности, содержащие 10 консервативные замены, которые не изменяют значительно активность или характеристики связывания полученного в результате белка.

[00078] Далее следует один пример различных классификационных групп аминокислот:

Аминокислоты с неполярными R группами

15 Аланин, Валин, Лейцин, Изолейцин, Пролин, Фенилаланин, Триптофан, Метионин
Аминокислоты с незаряженными полярными R группами

Глицин, Серин, Треонин, Цистеин, Тирозин, Аспарагин, Глутамин

Аминокислоты с заряженными полярными R группами (отрицательно заряженные при pH 6,0)

20 Аспарагиновая кислота, Глутаминовая кислота

Основные аминокислоты (положительно заряженные при pH 6,0)

Лизин, Аргинин, Гистидин (при pH 6,0)

[00079] Еще одна классификация может включать группу аминокислот с фенильными группами:

25 Фенилаланин, Триптофан, Тирозин

[00080] Еще одна классификация может быть выделена в соответствии с молекулярной массой (т.е., размером R групп):

Глицин	75	Аланин	89
Серин	105	Пролин	115
Валин	117	Треонин	119
Цистеин	121	Лейцин	131
Изолейцин	131	Аспарагин	132
Аспарагиновая кислота	133	Глутамин	146
Лизин	146	Глутаминовая кислота	147
Метионин	149	Гистидин (при pH 6,0)	155
Фенилаланин	165	Аргинин	174
Тирозин	181	Триптофан	204

[00081] Особенno предпочтительные замены представляют собой:

- Lys на Arg и наоборот, таким образом, чтобы мог сохраняться положительный

40 заряд;

- Glu на Asp и наоборот, таким образом, чтобы мог сохраняться отрицательный заряд;

- Ser на Thr таким образом, чтобы могла сохраняться свободная -OH; и

- Gln на Asn таким образом, чтобы могла сохраняться свободная NH₂.

45 [00082] Иллюстративные и предпочтительные консервативные аминокислотные замены включают любую из замены:

глутамина (Q) на глутаминовую кислоту (E) и наоборот; лейцина (L) на валин (V) и наоборот; серина (S) на треонин (T) и наоборот; изолейцина (I) на валин (V) и наоборот;

лизина (K) на глутамин (Q) и наоборот; изолейцина (I) на метионин (M) и наоборот; серина (S) на аспарагин (N) и наоборот; лейцина (L) на метионин (M) и наоборот; лизина (L) на глутаминовую кислоту (E) и наоборот; аланина (A) на серин (S) и наоборот; тирозина (Y) на фенилаланин (F) и наоборот; глутаминовой кислоты (E) на

- 5 аспарагиновую кислоту (D) и наоборот; лейцина (L) на изолейцин (I) и наоборот; лизина (K) на аргинин (R) и наоборот.

[00083] Аминокислотные замены могут также быть введены для замены аминокислоты с особенно предпочтительным свойством. Например, Cys может быть введен для создания потенциального участка для образования дисульфидных мостиков 10 с еще одним Cys. His может быть введен в качестве конкретно "катализического" участка (т.е. His может действовать в качестве кислоты или основания и является наиболее часто встречающейся аминокислотой в биохимическом катализе). Pro может быть введен вследствие его особенно плоской структуры, которая индуцирует β-складки в структуре белка.

- 15 [00084] Таким образом, специалист в данной области, на основании обзора последовательности полипептида лизина PlySs2, представленной в настоящем описании, и собственного уровня знаний и публичной информации, доступной для других полипептидов лизина, может проводить изменения или замены аминокислот в последовательности полипептида лизина. Изменения аминокислот могут быть 20 проделаны для замены или замещения одной или более, от одной до пяти, от одной до десяти, или такого другого количества аминокислот в последовательности лизина (лизинов), предоставленных в настоящем описании, для генерации мутантов или их вариантов. Такие мутанты или их варианты могут быть предсказаны для функции или тестированы на предмет функции или способности к лизису бактерий, включая 25 стафилококковые, стрептококковые, листериевые или энтерококковые бактерии, и/или обладания сравниваемой активности к лизину(лизинам), описанных и конкретно предоставленных в настоящем описании. Таким образом, изменения могут быть проделаны в последовательности лизина, и мутанты или варианты, имеющие изменение 30 в последовательности могут подвергаться тестированию с использованием аналитических тестов и методов, описанных и иллюстрируемых в настоящем описании, включая приведенные в примерах. Специалист в данной области, на основании доменной структуры данных лизина(лизинов) может предсказать одну или более аминокислот, подходящих для замещения или замены и/или, одну или более аминокислот, которые не являются подходящими для замещения или замены, включая целесообразные 35 консервативные или неконсервативные замены.

- [00085] В этой связи, и с иллюстративной ссылкой на лизин PlySs2, отмечают, что, несмотря на то, что полипептид лизина PlySs2 представляет дивергентный класс литического фермента профага, лизин содержит N-концевой CHAP-домен (цистеингистидинамидогидролазы/пептидазы) (SEQ ID NO: 3) и C-концевой домен SH3-типа 5 40 (SEQ ID NO: 4), как показано на ФИГУРЕ 5. Домены изображают в аминокислотной последовательности в раздельных областях с цветной штриховкой, причем CHAP-домен соответствует первой заштрихованной области аминокислотной последовательности, начинающейся с LNN..., и домен SH3-типа 5 соответствует второй заштрихованной области, начинающейся с RSY.... CHAP-домены включены в несколько ранее 45 охарактеризованных лизинов стрептококковых и стафилококковых фагов. Таким образом, специалист в данной области может целесообразно проделать и тестировать замещения или замены в CHAP-домене и/или SH-3-домене PlySs2. Сравнения последовательностей с базой данных Genbank могут быть проделаны с каждой

последовательностью или обеими последовательностями CHAP- и/или SH-3-доменов или с полной аминокислотной последовательностью лизина PlySs2, например, для идентификации аминокислот для замещения.

[00086] Лизин PlySs2 проявляет активность и способность к лизису многочисленных

- 5 различных штаммов и видов грам-положительных бактерий, включая стафилококковые, стрептококковые, листериевые или энтерококковые бактерии. В частности, и
значительно, PlySs2 является активным при лизисе штаммов *Staphylococcus*, включая
Staphylococcus aureus, в частности, как чувствительных к антибиотикам, так и различных
антибиотик-резистентных штаммов. PlySs2 является также активным при лизисе
10 штаммов *Streptococcus*, и показывает особенно эффективный лизис против
стрептококковых штаммов Группы А и Группы В. Способность лизина PlySs2 против
бактерий изображена ниже в ТАБЛИЦЕ 1, основанной на оценках log лизиса с
использованием изолированных штаммов *in vitro*. Активность PlySs2 против различных
грамм-положительных и грам-отрицательных организмов и против резистентных к
15 антибиотикам штаммов *Staphylococcus aureus* представлена в табличной форме ниже в
ТАБЛИЦАХ 2 и 3. Отмечают, что интервалы МПК для PlySs2 против бактерий
обеспечивают относительную активность к лизису.

ТАБЛИЦА 1

Снижение роста различных бактерий с использованием PlySs2 (частичный список)		
	Бактерии	Относительный лизис с PlySs2
20	<i>Staphylococcus aureus</i> (VRSA, VISA, MRSA, MSSA)	+++
	<i>Streptococcus suis</i>	+++
25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++
	<i>Staphylococcus simulans</i>	+++
	<i>Lysteria monocytogenes</i>	++
	<i>Enterococcus faecalis</i>	++
30	<i>Streptococcus dysgalactiae -GBS</i>	++
	<i>Streptococcus agalactiae -GBS</i>	+++
	<i>Streptococcus pyogenes -GAS</i>	+++
	<i>Streptococcus equi</i>	++
35	<i>Streptococcus sanguinis</i>	++
	<i>Streptococcus gordoni</i>	++
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	+
	<i>Streptococcus ratti</i>	+
	<i>Streptococcus oralis</i>	+
40	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
	<i>Bacillus cereus</i>	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	-
	<i>Bacillus anthracis</i>	-
	<i>Escherichia coli</i>	-
	<i>Enterococcus faecium</i>	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-

ТАБЛИЦА 2

Чувствительные и нечувствительные бактериальные штаммы				
Организм и выборка по чувствительности (кол. тестируемых)	МПК (мкг/мл)			
	50%	90%	Интервал	
45	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Метициллин-чувствительные (103)	4	8	1-16
	Метициллин-резистентные (120)	4	8	1-16

	<i>Streptococcus pyogenes</i> , Группа А (54)	2	8	0,5-8
	<i>Streptococcus agalactiae</i> , Группа В (51)	8	16	1-64
	Другие грам-положительные организмы			
5	<i>Staphylococcus lugdensis</i> (10)	8	8	8
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (11)	128	512	4-512
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (26)	16	64	1-64
	<i>Streptococcus mutans</i> (12)	64	256	2-256
	<i>Listeria monocytogenes</i> (12)	128	512	1-512
10	<i>Enterococcus faecalis</i> (17)	>512	>512	32->512
	<i>Enterococcus faecium</i> (5)	>512	>512	32->512
	<i>Bacillus cereus</i> (10)	>512	>512	>512
	Грам-отрицательные организмы			
15	<i>Acinetobacter baumannii</i> (8)	>512	>512	>512
	<i>Escherichia coli</i> (6)	>512	>512	>512
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (5)	>512	>512	>512

ТАБЛИЦА 3

Активность PlySs2 против антибиотикорезистентных <i>Staphylococcus aureus</i>				
Выборка по чувствительности (кол. тестируемых)	МПК (мг/мл)			Интервал
	50%	90%		
Ванкомицин-резистентные (14)	2	4		1-4
Ванкомицин-промежуточные (31)	8	32		1-64
Линезолид-резистентные (5)	2	2		2-4
Даптомицин-резистентные (8)	2	4		2-4

[00087] Фраза "моноклональное антитело" в ее различных грамматических формах относится к антителу, имеющему только один вид антитела, комбинирующего участок, способный к иммунореактивности с конкретным антигеном. Моноклональное антитело, таким образом, обычно проявляет единичную активность связывания для любого антигена, с которым оно вступает в иммунную реакцию. Моноклональное антитело может, следовательно, содержать молекулу антитела, имеющую множество участков, комбинирующих антитело, причем каждый является иммunoспецифичным для различного антигена; например, биспецифичное (химерное) моноклональное антитело.

[00088] Термин "специфичный" может применяться для ссылки на ситуацию, при которой один элемент пары специфичного связывания не будет показывать значительного связывания с молекулами, отличными от его партнера(партнеров) для специфичного связывания. Термин является также применимым, где, например, антиген-связывающий домен является специфичным для конкретного эпитопа, которого несет ряд антигенов, и в этом случае элемент специфичного связывания, несущий антиген-связывающий домен будет способен к связыванию различных антигенов, несущих эпитоп.

[00089] Термин "содержит", обычно применяется в смысле включает, иначе говоря, допускает присутствие одного или более признаков или компонентов.

[00090] Термин "существующий по существу из" относится к продукту, в частности, пептидной последовательности, определенное количество остатков которой не присоединено ковалентно к более крупному продукту. В случае рассматриваемого пептида изобретения, специалисты в данной области смогут учесть то, что миорные модификации по направлению к N- или C-концу пептида, однако, могут предусматриваться, такие как химическая модификация конца с добавлением защитной группы или т.п., например, амидирование C-конца.

[00091] Термин "изолированный" относится к состоянию, при котором лизиновые

полипептид(ы) изобретения, или нуклеиновая кислота, кодирующая такие полипептиды будут представлены, в соответствии с настоящим изобретением. Полипептиды и нуклеиновая кислота не будут содержать или не будут содержать по существу материал, с которым они природным образом связаны, такой как другие полипептиды или

5 нуклеиновые кислоты, с которыми их обнаруживают в их природном окружении, или окружение, в котором их получают (например, клеточная культура), когда такое получение осуществляют на практике посредством технологии рекомбинантных ДНК *in vitro* или *in vivo*. Полипептиды и нуклеиновая кислота могут быть составлены вместе с разбавителями или адъювантами и еще для практических целей являться

10 изолированными - например, полипептиды будут обычно смешивать с полимерами или мукоадгезивами или другими носителями, или будут смешаны с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, при использовании в диагностике или терапии.

[00092] Нуклеиновые кислоты, способные кодировать лизиновый полипептид(ы)

15 PlySs2 *S. suis*, применимые и применяемые в изобретении, предоставлены в настоящем описании. Представительные последовательности нуклеиновой кислоты в данном контексте представляют собой полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид ФИГУРЫ 5 или SEQ ID NO: 1, в частности, полинуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 2, способные кодировать полипептид SEQ ID NO: 1, и

20 последовательности, которые гибридизируются, в строгих условиях, с комплементарными последовательностями ДНК SEQ ID NO: 2 и/или последовательностью(последовательностями) ФИГУРЫ 5. Дополнительные варианты этих последовательностей и последовательностей нуклеиновых кислот, которые гибридизируются с последовательностями, показанными на фигурах, также

25 предусматриваются для применения при получении лизирующих ферментов в соответствии с раскрытием, включая природные варианты, которые могут быть получены. Большое разнообразие изолированных последовательностей нуклеиновых кислот или последовательностей кДНК, которые кодируют асоциированные с фагом лизирующие ферменты, и частичные последовательности, которые гибридизируются

30 с такими генными последовательностями, являются применимыми для рекомбинантного получения лизинового ферmenta(ферментов) или полипептида(полипептидов) изобретения.

[00093] "Репликон" представляет собой любой генетический элемент (например, плазмиду, хромосому, вирус), который функционирует как автономная единица

35 репликации ДНК *in vivo*; т.е., способная к репликации под своим собственным контролем. [00094] "Вектор" представляет собой репликон, такой как плазмида, фаг или космида, к которому может быть присоединен еще один сегмент ДНК, таким образом, чтобы вызвать репликацию присоединенного сегмента.

[00095] "Молекула ДНК" относится к полимерной форме дезоксирибонуклеотидов

40 (аденина, гуанина, тимина или цитозина) в ее либо одноцепочечной форме или форме двухцепочечной спирали. Этот термин относится только к первичной и вторичной структуре молекулы и не ограничивает ее какими-либо конкретными третичными формами. Таким образом, данный термин включает двухцепочечную ДНК,

45 обнаруженную, в том числе, в линейных молекулах ДНК (например, рестрикционных фрагментах), вирусах, плазмidaх и хромосомах. При обсуждении структуры конкретных молекул двухцепочечной ДНК, последовательности в настоящем описании могут быть описаны в соответствии с обычной договоренностью о представлении только

последовательности в направлении от 5' до 3' вдоль нетранскрибуемой цепи ДНК

(т.е. цепи, имеющей последовательность, гомологичную мРНК).

[00096] "Точка начала репликации" относится к тем последовательностям ДНК, которые участвуют в синтезе ДНК.

[00097] "Кодирующая последовательность" ДНК представляет собой

последовательность двухцепочечной ДНК, которая транскрибируется и транслируется в полипептид *in vivo*, когда ее помещают под контроль соответствующей регуляторной последовательности. Границы кодирующей последовательности определяются инициирующим кодоном по 5'-(амино) концу и терминирующим кодоном по 3'-(карбоксильному) концу. Кодирующая последовательность может включать, но не ограничена ими, прокариотные последовательности, кДНК из эукариотных мРНК, геномные последовательности ДНК из эукариотных (например, млекопитающих) ДНК, и даже синтетические последовательности ДНК. Последовательность сигнала полиаденилирования и терминации транскрипции будут обычно располагаться 3' по отношению к кодирующей последовательности.

[00098] Транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности представляют собой регуляторные последовательности ДНК, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы и т.п., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине.

[00099] "Промоторная последовательность" представляет собой регуляторную область ДНК, способную к связыванию РНК-полимеразы в клетке и инициации транскрипции нисходящей (в направлении к 3'-концу) кодирующей последовательности. С целью определения объема настоящего изобретения, промоторная последовательность связана по своему 3'-концу посредством сайт инициации транскрипции и продлевается в восходящем направлении (направлении к 5'-концу), для включения минимального количества оснований или элементов, необходимых для инициации транскрипции на уровнях, обнаруживаемых выше фона. В пределах промоторной последовательности будет обнаруживаться сайт инициации транскрипции (обычно определяемый посредством картирования с помощью нуклеазы SI), а также белок-связывающие домены (консенсусные последовательности), отвечающие за связывание РНК-полимеразы. Эукариотные промоторы часто, но не всегда, будут содержать "ТАТА"-боксы и "САТ"-боксы. Прокариотные промоторы содержат последовательности Шайна-Дальгарно в дополнение к -10 и -35 консенсусным последовательностям.

[000100] "Последовательность контроля экспрессии" представляет собой последовательность ДНК, которая контролирует и регулирует транскрипцию и трансляцию еще одной последовательности ДНК. Кодирующая последовательность находится "под контролем" транскрипционных и трансляционных контрольных последовательностей в клетке, когда РНК-полимераза транскрибирует кодирующую последовательность в мРНК, которая затем транслируется в белок, кодируемый кодирующей последовательностью.

[000101] "Сигнальная последовательность" может быть включена перед кодирующей последовательностью. Данная последовательность кодирует сигнальный пептид, N-концевой для полипептида, который сообщается с клеткой-хозяином, чтобы направить полипептид к клеточной поверхности или секретировать полипептид в среду, и данный сигнальный пептид удаляется клеткой-хозяином перед тем, как белок покидает клетку.

[000102] Можно найти сигнальные последовательности, ассоциированные с различными белками, нативными для прокариотов и эукариотов.

[000102] Термин "олигонуклеотид", как его используют в настоящем описании, по отношению к зонду настоящего изобретения, определяют как молекулу, состоящую

из двух или более рибонуклеотидов, предпочтительно более чем трех. Его точный размер будет зависеть от многих факторов, которые, в свою очередь, зависят от конечной функции и применения олигонуклеотида.

[000104] Клетка была "трансформирована" экзогенной или гетерологичной ДНК,

5 когда такая ДНК была введена внутрь клетки. Трансформирующая ДНК может быть интегрирована или не интегрирована (ковалентно связана) в хромосомную ДНК, составляющую геном клетки. У прокариотов, дрожжей и клеток млекопитающих, например, трансформирующая ДНК может поддерживаться на эпизомальном элементе, таким как плазмида. По отношению к эукариотным клеткам, стабильно

10 трансформированная клетка является клеткой, в которой трансформирующая ДНК становится интегрированной в хромосому, таким образом, что она наследуется дочерними клетками через репликацию хромосомы. Эта стабильность демонстрируется способностью эукариотной клетки основывать клеточные линии или клоны, состоящие из популяции дочерних клеток, содержащих трансформирующую ДНК. "Клон" является 15 популяцией клеток, производимой из одиночной клетки или общего предка посредством митоза. "Клеточная линия" является клоном первичной клетки, которая способна к устойчивому росту *in vitro* в течение многих поколений.

[000105] Две последовательности ДНК являются "гомологичными по существу", когда по меньшей мере приблизительно 75% (предпочтительно по меньшей мере 20 приблизительно 80%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90 или 95%) нуклеотидов совпадают на протяжении определенной длины последовательностей ДНК. Последовательности, которые являются гомологичными по существу, могут быть идентифицированы посредством сравнения последовательностей с использованием стандартного программного обеспечения, доступного в банках данных последовательностей, или в эксперименте с Саузерн-гибридизацией, например, в жестких условиях, как определено для данной конкретной системы. Определение соответствующих условий гибридизации находится в пределах компетентности в данной области. См., например, Maniatis et al., *выше*; DNA Cloning, Vols. I & II, *выше*; Nucleic acid Hybridization, *выше*.

[000106] Молекулы ДНК и нуклеотидные последовательности, которые являются производными нуклеотидных последовательностей, конкретно раскрытых в настоящем описании, и которые отличаются от раскрытых нуклеотидных последовательностей делецией, присоединением или заменой нуклеотидов, в то же время еще кодирующие белок, который обладает функциональной характеристикой лизинового полипептида (полипептидов), являются предусмотренными посредством раскрытия. Также включенными являются малые молекулы ДНК, которые получают из раскрытых молекул ДНК. Такие малые молекулы ДНК включают олигонуклеотиды, подходящие для использования в качестве гибридационных зондов или праймеров полимеразной цепной реакции (ПЦР). Как таковые, эти малые молекулы ДНК будут содержать по 35 меньшей мере сегмент литического фермента, генетически кодируемого бактериофагом *Staphylococcus suis* и, с целью проведения ПЦР, будут содержать по меньшей мере последовательность из 10-15 нуклеотидов и, более предпочтительно, последовательность из 15-30 нуклеотидов из гена. Молекулы ДНК и нуклеотидные последовательности, которые являются производными из раскрытых молекул ДНК, описанных выше, могут 40 также определяться как последовательности ДНК, которые гибридизируются в строгих условиях с раскрытыми последовательностями ДНК или их фрагментами.

[000107] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего раскрытия, строгие условия могут быть определены как условия, при которых молекулы ДНК с

более чем 25% вариацией последовательности (также называемой "несоответствием") не будут гибридизоваться. В более предпочтительном варианте осуществления, строгие условия являются условиями, при которых молекулы ДНК с более чем 15% несоответствием не будут гибридизоваться, и еще более предпочтительно, строгие

5 условия являются условиями, при которых последовательности ДНК с более чем 10% несоответствием не будут гибридизоваться. Предпочтительно, строгие условия являются условиями, при которых последовательности ДНК с более чем 6% несоответствием не будут гибридизоваться.

[000108] Вырождение генетического кода дополнительно расширяет объем вариантов

10 осуществлений, так как оно обеспечивает основные вариации в нуклеотидной последовательности молекулы ДНК, в то же время поддерживая аминокислотную последовательность кодируемого белка. Таким образом, нуклеотидная последовательность гена может быть изменена по этому положению на любой из трех кодонов, не оказывая воздействия на аминокислотный состав кодируемого белка или 15 характеристик белка. Генетический код и вариации в нуклеотидных кодонах для конкретных аминокислот являются хорошо известными специалисту в данной области. На основании вырождения генетического кода, вариантные молекулы ДНК могут быть получены из молекул кДНК, раскрытых в настоящем описании, с использованием стандартных технологий мутагенеза ДНК, описанных выше, или посредством синтеза 20 последовательностей ДНК. Последовательности ДНК, которые не гибридизуются в строгих условиях с раскрытыми последовательностями кДНК вследствие вариации последовательности, основанной на вырождении генетического кода, охвачены в настоящем описании посредством данного раскрытия.

[000109] Таким образом, следует учитывать, что также в пределах объема настоящего

25 изобретения включены последовательности ДНК, кодирующие лизин настоящего изобретения, включая PlySs2 и PlySs1, последовательности, которые кодируют полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную представленной на ФИГУРЕ 5 или SEQ ID NO: 1, но которые, к тому же, являются вырожденными или вырожденными до иллюстративных последовательностей 30 нукleinовых кислот, представленных на ФИГУРЕ 5 и в SEQ ID NO: 2. Под "вырожденными до" подразумеваются, что различный трехбуквенный кодон используется для определения конкретной аминокислоты. В данной области хорошо известны кодоны, которые могут применяться взаимозаменяющими для кодировки каждой конкретной аминокислоты.

35 [000110] Специалист в данной области признает, что технологии мутагенеза ДНК, описанные здесь, и известные в данной области, позволяют продуцировать широкое разнообразие молекул ДНК, которые кодируют лизин бактериофага *Streptococcus suis* и еще поддерживают существенные характеристики литических полипептидов, описанных и предоставленных в настоящем описании. Вновь полученные белки также 40 могут быть отобраны, чтобы получить вариации характеристики литического полипептида(полипептидов), как будет более полно описано ниже. Такие производные включают производные с вариациями в аминокислотной последовательности, включающей минорные делеции, присоединения и замены.

[000111] В то время как сайт для введения вариации аминокислотной

45 последовательности может быть заранее задан, нет необходимости заранее задавать мутацию саму по себе. Аминокислотные замены состоят обычно из одиночных остатков или могут состоять из одного или более одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи остатков; вставки обычно имеют порядок приблизительно от 1 до 10

аминокислотных остатков; и делеции будут находиться в интервале приблизительно от 1 до 30 остатков. Делеции или вставки могут находиться в одиночной форме, но предпочтительно их получают в виде смежных пар, т.е. делеции из 2 остатков или вставки из 2 остатков. Замены, делеции, вставки или любое их сочетание могут

- 5 комбинироваться для приближения к конечной конструкции. Заместительные варианты представляют собой варианты, в которых по меньшей мере один остаток в аминокислотной последовательности был удален, а отличающийся остаток вставляют на его место. Такие замены могут быть проведены таким образом, чтобы не генерировать существенного воздействия на характеристики белка, или, когда
- 10 желательно провести тонкую модуляцию характеристик белка. Аминокислоты, которые могут быть заменены на исходную аминокислоту в белке, и, которые считаются консервативными заменами, описаны выше и будут распознаваться специалистом в данной области.

[000112] Как хорошо известно в данной области, последовательности ДНК могут

- 15 быть экспрессированы посредством их функционального связывания с экспрессионными контрольными последовательностями в соответствующем векторе экспрессии и использования данного вектора экспрессии для трансформации соответствующего одноклеточного хозяина. Такое функциональное связывание последовательности ДНК данного изобретения с экспрессионной контрольной последовательностью, как известно,
- 20 включает, если уже не части последовательности ДНК, предоставление инициирующего кодона, ATG, в корректной рамке считывания выше последовательности ДНК. Большое разнообразие комбинаций хозяин/вектор экспрессии может использоваться при экспрессировании последовательностей ДНК данного изобретения. Применимые векторы экспрессии, например, могут состоять из сегментов хромосомных,
- 25 нехромосомных и синтетических последовательностей ДНК. Любая из большого разнообразия экспрессионных контрольных последовательностей - последовательностей, которые контролируют экспрессию последовательности ДНК, функционально связанной с нею - могут использоваться в данных векторах для экспрессии последовательностей ДНК данного изобретения. Большое разнообразие одноклеточных клеток-хозяев также
- 30 является применимым при экспрессировании последовательностей ДНК данного изобретения. Эти хозяева могут включать хорошо известные эукариотные и прокариотные хозяева, такие как штаммы *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, грибы, такие как дрожжи, и клетки животных, клетки человека и клетки растений в культуре ткани. Специалист в данной области будет в состоянии выбрать надлежащие
- 35 векторы, экспрессионные контрольные последовательности и хозяева без чрезмерного экспериментирования для совершения желательной экспрессии без отступления от объемов притязаний данного изобретения.

[000113] Как используют в настоящем описании и приводят ссылки в данной области, биопленка представляет собой агрегат из микробов с различной архитектуры.

- 40 Образование биопленки включает прикрепление свободно плавающих микрорганизмов к поверхности. Биопленка по существу является сообществом, в котором микробные клетки, каждая из которых имеет длину, равную только микрометру или двум микрометрам, образует конволюционные структуры, включающие башни, которые могут иметь высоту в сотни микрометров. Канальцы внутри биопленок действуют как
- 45 проходы, заполненные текучими средами, в которых циркулируют питательные вещества, кислород, продукты жизнедеятельности, и т.д., как требуется для поддержания жизнеспособного сообщества биопленки. Биопленка или микробиальное (бактериальное, грибковое или водорослевое) сообщество обычно имеет оболочку из внеклеточных

биополимеров, продуцируемых микробиальными клетками, и прилипает к границе раздела между жидкостью и поверхностью. Инкапсулирующее свойство биопленок является одной из нескольких характеристик, которая придает их микробиальным организмам высокую резистентность к стандартным противомикробным

5 терапевтическим средствам. Бактерии, растущие в биопленке, например, являются высокорезистентными к антибиотикам, и, в некоторых случаях являются вплоть до 1000 раз более резистентными, чем такие же самые бактерии, растущие без биопленочной суперструктуры.

[000114] Стандартные антибиотические терапии могут быть бесполезными там, где

10 обнаруживается загрязненный биопленкой имплантат, и, в таких обстоятельствах, можно только обращаться за помощью, чтобы удалить загрязненный бактериями имплантат. Биопленки, кроме того, являются вовлеченными в многочисленные хронические заболевания. Пациенты с кистозным фиброзом (муковисцидозом), например, страдают от инфекций *Pseudomonas*, которые часто приводят к

15 антибиотикорезистентным биопленкам. Образование биопленки происходит, когда свободно плавающие микрорганизмы прикрепляются к поверхности. Поскольку биопленки защищают бактерии, они часто являются более резистентными к традиционным противомикробным обработкам, что делает их серьезной угрозой для здоровья, что подтверждается более чем одним миллионом случаев ассоциированных 20 с катетером инфекций мочевого тракта (CAUTI), о чём сообщается ежегодно, многие из которых могут быть отнесены к ассоциированным с биопленкой бактериями (Donlan, RM (2001) Emerg Infect Dis 7(2):277-281; Maki D и Tambyah P (2001) Emerg Infect Dis 7(2): 342-347).

[000115] Были опробованы различные подходы, чтобы предотвратить образование

25 биопленки, и они включают ингибирование адсорбции белка или адгезии биопленки с использованием химических и механических средств. Химические подходы включают противомикробные покрытия на постоянных устройствах и полимерные модификации. Антибиотики, биоциды и ионные покрытия являются примерами химических методов 30 предотвращения биопленки, и они могут оказывать воздействие на прикрепление и экспансию незрелых биопленок. Однако, эти покрытия являются эффективными только в течение короткого периода времени (приблизительно 1 неделя), после которого вымывание противомикробного средства снижает эффективность покрытия (Dror N et al (2009) Sensors 9(4):2538-2554). Несколько исследований *in vitro* подтвердили 35 эффективность серебра при предотвращении инфекции, как в форме покрытия, так и в виде наночастиц, дисперсированных в полимерной матрице. Однако, при применении серебра *in vivo* сохраняется обеспокоенность по поводу потенциальных токсических эффектов на человеческую ткань, и применение серебряных покрытий имеет ограниченное применение. Несмотря на это, серебряные покрытия применяют на 40 устройствах, таких как катетеры (Vasilev K et al (2009) Expert Rev Med Devices 6(5):553-567). Посредством полимерной модификации, противомикробные средства могут быть иммобилизованы на поверхностях устройства с использованием длинных, эластичных полимерных цепей. Эти цепи закрепляют к поверхности устройства посредством ковалентных связей, получая невымываемые, контактно-лизисные поверхности. В 45 исследовании *in vitro* было обнаружено, что когда бромид N-алкилпиридиния, противомикробное средство, присоединяли к поли(4-винил-N-гексилпиридину), полимер был способен к инактивации более чем 99% бактерий *S. epidermidis*, *E. coli* и *P. aeruginosa* (Jansen B and Kohnen W (1995) J Ind Microbiol 15(4):391-396).

[000116] Механические подходы к предотвращению биопленок включают изменение

поверхности устройств, таких как катетеры, включающее модификацию гидрофобности поверхности устройства, с изменением его физической природы с использованием материалов с гладкой поверхностью, и изменение поверхностного заряда.

Гидрофобность и заряд полимерных цепей могут контролироваться посредством

- 5 использования некоторых соединений скелета и противомикробных средств, включающих положительно заряженные поликатионы. При другом подходе, низкоэнергетические поверхностные акустические волны генерируют от устройства с питанием от батареи, которое доставляет периодические прямоугольные импульсы и волны, распространяемые к поверхности, в ланом случае, катетер, создающий
- 10 горизонтальные волны, которые препятствуют адгезии бактерий к поверхностям. Данный метод был тестирован на белых кроликах и морских свинках и снижал рост биопленки (Hazan, Z et al (2006) *Antimicrob Agents and Chemother* 50(12):4144-152).

[000117] В соответствии с настоящим изобретением, предоставлены способы и композиции для предотвращения, диспергирования и обработки бактериальных

- 15 биопленок. В частности предоставлены способы и композиции для предотвращения образования, диспергирования и обработки биопленок, содержащих стафилококковые бактерии. В частности, способы и композиции для предотвращения образования, диспергирования и обработки биопленок, содержащих *Staphylococcus aureus*, включающих или содержащих антибиотик-резистентные и/или
- 20 антибиотикочувствительные *S. aureus*, составляют аспект изобретения. В аспекте изобретения, способы и композиции изобретения включают лизин, конкретно лизин PlySs2, который является способным к лизису стафилококковых и стрептококковых бактерий, включающих антибиотик-резистентные бактерии.

[000118] Способы и композиции изобретения, в частности, содержащие лизин PlySs2,

- 25 могут комбинироваться или являться включенными в химические или механические средства, композиции или подходы для предотвращения образования или диспергирования биопленок. Таким образом, композиции в настоящем описании, могут комбинироваться или включаться с антибиотиками, биоцидами, и ионными покрытиями при минимизации роста или установления биопленок, в частности, в или на постоянных
- 30 устройствах или катетерах. Посредством примера, но не ограничения, композиция, содержащая PlySs2, может вводиться или иным образом обеспечиваться при предварительной стерилизации или поддержания постоянного устройства или катетера в состоянии без биопленки или со сниженной бактериальной адгезией или с пониженным риском образования биопленки. Таким образом, композиция, содержащая PlySs2, может
- 35 использоваться в растворе для быстрой промывки или постоянной очистки и поддержания постоянного устройства, катетера и т.д. в состоянии без биопленки или со сниженной бактериальной адгезией или с пониженным риском образования биопленки. В случае, где биопленка находится под подозрением, является очевидной или демонстрируемой, композиция, содержащая PlySs2, может вводиться или иным
- 40 образом приводиться в контакт с биопленкой или устройством, областью, расположением, участком таким образом, чтобы облегчать, инициировать или приводить к диспергированию, ослаблению, удалению или обработке биопленки. Таким образом, например, в случаях, где пациент присутствует с повышенной температурой или с ощущением дискомфорта, краснотой, набуханием, ассоциированным с окружающим
- 45 устройством или катетером, композиция, содержащая PlySs2, может вводиться пациенту или приводиться в контакт с устройством или катетером для ослабления, рассеивания или лечения соответствующих температуры, ощущения дискомфорта, красноты, набухания посредством диспергирования, предотвращения или обработки любой

биопленки, образующейся или образованной.

[000119] В соответствии с изобретением, композиция, содержащая лизин, конкретно лизин PlySs2 или его активные варианты, может вводиться или иным образом приводиться в контакт с установленной или предполагаемой биопленкой или

- 5 устройством, областью, расположением, участком в биопленке, в виде однократной или множественных доз или введений. Лизин может вводиться наряду с, до или после одного или более антибиотиков. Лизин может вводиться в первоначальной дозе, например, с последующим введением антибиотика или наряду с антибиотиком, и первоначальная доза лизина может сопровождаться последующей дозой лизина. В
- 10 одной такой ситуации, первоначальная доза лизина, конкретно PlySs2, может служить для диспергирования биопленки, сопровождаемая последующей дозой лизина (с более низким, таким же или более высоким количеством, которое может зависеть от части от первоначального ответа и диспергирования биопленки), которая может служить для дополнительного диспергирования или дополнительных лизиса или деколонизации
- 15 бактерий в или от или из биопленки. Доза антибиотика может вводиться также последовательно или в дополнение, чтобы дополнительно служить для диспергирования или дополнительно лизировать или деколонизировать бактерии в или от или из биопленки.

[000120] В настоящем описании предоставлены терапевтические или

- 20 фармацевтические композиции, содержащие литические фермент(ы)/полипептид(ы), применяемые в способах и областях применения, представленных в изобретении, а также родственные способы применения. Терапевтические или фармацевтические композиции могут содержать один или более литических полипептидов, и необязательно включают природные, процессированные, химерные или перетасованные литические
- 25 ферменты, необязательно комбинированные с другими компонентами, такими как носитель, среда, полипептид, полинуклеотид, холиновые белок(белки), один или несколько антибиотиков или подходящие эксципиенты, носители или среды. Изобретение предоставляет терапевтические композиции или фармацевтические композиции лизинов изобретения, включающие PlySs2 для применения при лизисе, ослаблении,
- 30 деколонизации, профилактике или обработке грам-положительных бактерий в биопленках, и, в частности, для диспергирования, предотвращения образования или обработки биопленок.

[000121] Фермент(ы) или полипептид(ы), включенные в терапевтические композиции, могут представлять собой один или более или любую комбинацию неизмененных,

- 35 ассоциированных с фагом литических фермента(ферментов), процессированных литических полипептидов, вариантов литических полипептида(полипептидов) и химерных и/или перетасованных литических ферментов. Дополнительно, могут применяться различные литические полипептид(ы), генетически кодируемые различными фагами, для лечения от таких же бактерий. Данные литические ферменты могут также
- 40 представлять собой любую комбинацию "неизмененных" литических ферментов или полипептидов, процессированных литических полипептида(полипептидов), вариантов литических полипептида(полипептидов), и химерных и перетасованных литических ферментов. Литические фермент(ы)/полипептид(ы) в терапевтической или фармацевтической композиции для грам-положительных бактерий, включая
- 45 *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* и *Listeria*, могут применяться по отдельности или в комбинации с антибиотиками или, если существуют другие инвазивные бактериальные организмы, подлежащие лечению, в комбинации с другими ассоциированными с фагом литическими ферментами, специфичными для других

бактерий, являющихся целевыми. Литический фермент, процессированный фермент, вариантный фермент, химерный фермент, и/или перетасованный литический фермент могут применяться совместно с холиновым белком. Количество холинового белка может также варьироваться. Различные антибиотики могут необязательно включаться

- 5 в терапевтическую композицию с ферментом(ферментами) или полипептидом (полипептидами) и с присутствием лизостафина или без него. Более одного литического фермента или полипептида может быть включено в терапевтическую композицию.

[000122] Фармацевтическая композиция может также включать один или более измененных литических ферментов, включая изоферменты, аналоги или их варианты,

- 10 получаемые посредством химического синтеза или технологий рекомбинантных ДНК. В частности, измененный литический белок может быть получен посредством аминокислотной замены, делеции, процессирования, химеризации, перетасовки или их комбинации. Фармацевтическая композиция может содержать комбинацию из одного или более природных литических белков и одного или более процессированных,

- 15 вариантов, химерных или перетасованных литических белков. Фармацевтическая композиция может также содержать пептид или пептидный фрагмент из по меньшей мере одного литического белка, являющегося производным от одинаковых или различных видов бактерий, с необязательным добавлением одного или нескольких дополнительных средств и фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя.

- 20 [000123] Фармацевтическая композиция для применения в настоящем изобретении может содержать дополнительное средство, включающее одно или более противомикробных средств и/или один или более общепринятых антибиотиков, в частности, предоставленных в настоящем описании. Чтобы ускорить лечение инфекции или диспергирование бактериальной биопленки, терапевтическое средство может

- 25 дополнительно включать по меньшей мере одно дополнительное средство, которое может также потенцировать бактерицидную активность литического фермента. Противомикробные средства действуют, в основном, посредством оказания воздействия на структуру или функцию бактериальной клетки посредством ингибиования синтеза клеточной стенки, ингибиования функции клеточной мембранны и/или ингибиования

- 30 метаболических функций, включая синтез белка и синтез ДНК. Антибиотики могут быть подразделены в широкие группы, на антибиотики, действующие на биосинтез пептидогликана клеточной стенки, и антибиотики, действующие на синтез ДНК или белка в грам-положительных бактериях. Ингибиторы синтеза клеточной стенки, включая пенициллин и подобные ему антибиотики, разрушают жесткую внешнюю клеточную

- 35 стенку таким образом, что относительно неподдерживаемая клетка набухает и постепенно разрывается. Дополнительное средство может представлять собой антибиотик, такой как эритромицин, кларитромицин, азитромицин, рокситромицин, другие члены семейства макролидов, пенициллины, цефалоспорины и любые их комбинации в количествах, которые являются эффективными для синергического

- 40 усиления терапевтического эффекта литического фермента. Практически любой другой антибиотик может применяться вместе с измененным и/или неизмененным литическим ферментом. Антибиотики, действующие на биосинтез пептидогликана клеточной стенки, включают: гликопептиды, которые ингибируют синтез пептидогликана, предотвращая введение пептидных субъединиц N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) и

- 45 N-ацетилглюкозамина (NAG) в пептидогликановый матрикс. Доступные гликопептиды включают ванкомицин и тейкопланин; пенициллины, которые действуют посредством ингибиования образования пептидогликановых сшивок. Функциональная группа пенициллинов, β-лактамный фрагмент, связывает и ингибирует DD-транспептидазу,

которая связывает молекулы пептидогликана в бактериях. Гидролитические ферменты продолжают разрушать клеточную стенку, вызывая цитолиз или гибель вследствие осмотического давления. Общеизвестные пенициллины включают оксациллин, ампициллин и клоксациллин; и Полипептиды, которые препятствуют

5 дефосфорилированию С₅₅-изопренилпирофосфата, молекулы, которая несет билдинг-блоки пептидогликана вне плазматической мембранны. Полипептидом, наносящим ударное воздействие на клеточную стенку, является бацитранин. Другие применимые и значимые антибиотики включают ванкомицин, линезолид и даптомицин.

[000124] Аналогично, другие литические ферменты могут быть включены в носитель 10 для лечения или диспергирования других бактерий или бактериальных инфекций.

Фармацевтическая композиция может также содержать пептид или пептидный фрагмент по меньшей мере одного литического белка, одного холинового белка, или по меньшей мере одного холинового и одного литического белка, причем каждый из литического и холинового белков получают от одинаковых или различных видов бактерий, с 15 необязательным добавлением одного или более дополнительных средств(а) и подходящего носителя или разбавителя.

[000125] Также в способах применяют композиции, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, которые, либо по отдельности или в комбинации с другими молекулами нуклеиновой кислоты, обладают способностью экспрессировать 20 эффективное количество литического полипептида(полипептидов) или пептидного фрагмента литического полипептида(полипептидов) *in vivo*. Также предоставлены клеточные культуры, содержащие данные молекулы нуклеиновой кислоты, полинуклеотиды и векторы, несущие и экспрессирующие эти молекулы *in vitro* или *in vivo*.

[000126] В способах настоящего изобретения могут использоваться терапевтические или фармацевтические композиции, которые содержат литический полипептид(ы), комбинированные с различными носителями, чтобы диспергировать или деколонизовать 25 бактерии или для лечения болезней, вызываемых чувствительными грам- положительными бактериями. Носитель подходящим образом содержит минорные количества добавок, таких как вещества, которые усиливают изотоничность и 30 химическую устойчивость. Такие материалы являются нетоксичными по отношению к реципиентам при используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, сукцинатный, уксусно-кислотный и другие органические кислоты или их соли; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота;

35 низкомолекулярные (менее чем из приблизительно десяти остатков) полипептиды, например, полиаргинин или трипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; глицин; аминокислоты, такие как глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, гистидин, или аргинин; моносахарины, дисахарины и другие

40 углеводы, включая целлюлозу или ее производные, глюкозу, маннозу, трегалозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахароспирты, такие как маннит или сорбит; противоионы, такие как натрий; неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как поисорбаты, полоксамеры или полиэтиленгликоль (ПЭГ); и/или нейтральные соли. Глицерин или глицерол (1,2,3-пропантриол) является доступным

45 для приобретения для фармацевтического применения. ДМСО представляет собой аprotонный растворитель с отличительной способностью усиливать проницаемость многих местно применяемых лекарственных средств. Среда носителя может также включать раствор Рингера, забуференный раствор и раствор декстрозы, в частности

тогда, когда получают раствор для внутривенного введения.

[000127] Литический полипептид(ы) может добавляться к этим веществам в жидкой форме или в лиофилизированном состоянии, вследствие чего он будет солюбилизирован при встрече с жидкими средами организма, такими как слюна. Полипептид(ы)/фермент могут также находиться в мицелле или липосоме.

[000128] Эффективные мощности дозы или количества измененных или неизмененных литического фермента/полипептида(полипептидов) настоящего изобретения и для применения в настоящем изобретении будут зависеть от части от того, будут ли литический фермент/полипептид(ы) применяться терапевтически или профилактически,

10 продолжительности воздействия инфекционных бактерий на реципиента, размеров и массы тела индивидуума и т.д. Продолжительность применения композиции, содержащей фермент/полипептид(ы), также зависит от того, проводится ли применение с профилактическими целями, где применение может являться почасовым, ежедневным или еженедельным, в течение короткого периода времени, или будет ли применение

15 проводится с терапевтическими целями, где может потребоваться более интенсивный режим применения композиции, такой, что применение может длиться в течение часов, дней или недель, и/или на суточной основе, или при временных интервалах в течение дня. Любая использованная дозированная форма должна предоставлять минимальное число единиц в течение минимального количества времени. Носители, которые

20 классифицируют как носители с "длительным" или "медленным" высвобождением (такие как, например, некоторые назальные спреи или пастилки) могут обладать более низкой концентрацией активных (ферментных) единиц на мл или обеспечивать такую

25 концентрацию, но в течение более длительного периода времени, в то время как носители с "коротким" или "быстрым" высвобождением (такие как, например, полоскание) могут обладать более высокой концентрацией активных (ферментных) единиц на мл или обеспечивать такую концентрацию, но в течение более короткого периода времени. Количество активных единиц на мл и продолжительность времени воздействия зависят от природы инфекции, вне зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим и других переменных. Существуют ситуации, где может быть

30 необходимо иметь более высокую дозировку единиц/мл или более низкую дозировку единиц/мл.

[000129] Литический фермент/полипептид(ы) должен находиться в окружении, имеющем pH, который обеспечивает активность литического фермента/полипептида (полипептидов). Стабилизирующий буфер может обеспечить оптимальную активность

35 фермента/полипептида(полипептидов) лизина. Буфер может содержать восстановитель, такой как дитиотреитол или бета-меркаптоэтанол (BME). Стабилизирующий буфер может также представлять собой или включать хелатирующий металлы реагент, такой как динатриевая соль этилендиаминететрауксусной кислоты, или он может также содержать фосфатный или цитрат-фосфатный буфер или любой другой буфер.

40 [000130] Поверхностно-активное вещество мягкого действия может быть включено в терапевтическую или фармацевтическую композицию в количестве, эффективном для усиления терапевтического эффекта литического фермента/полипептида(полипептидов), которые могут применяться в композиции. Подходящие поверхностно-активные вещества мягкого действия включают, в числе других, сложные эфиры

45 полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (ряд Твина), октилфеноксиполиэтиоксистанол (ряд Тритона-Х), н-Октил-бета-D-глюкопиранозид, н-октил-.бета.-D-тиоглюкопиранозид, н-Децил-.бета.-D-глюкопиранозид, н-Додецил-.бета.-D-глюкопиранозид и биологические поверхностью-активные вещества, например, жирные

кислоты, глицериды, моноглицериды, дезоксихолат и сложные эфиры дезоксихолата.

[000131] Консерванты могут также применяться в данном изобретении и предпочтительно содержат приблизительно от 0,05% до 0,5% масс. от общей массы композиции. Применение консервантов гарантирует то, что, если продукт является зараженным микробами, готовая форма будет предотвращать или уменьшать рост микроорганизмов. Некоторые консерванты, применимые в данном изобретении, включают метилпарабен, пропилпарабен, бутилпарабен, хлороксиленол, бензоат натрия, DMDM Гидантоин, 3-Иод-2-Пропилбутилкарбамат, сорбат калия, диглюконат хлоргексидина или их комбинацию.

[000132] Терапевтическая композиция может дополнительно содержать другие ферменты, такие как фермент лизостафин для лечения от любых бактерий *Staphylococcus aureus*, присутствующих наряду с чувствительными грам-положительными бактериями. Лизостафин, генный продукт *Staphylococcus simulans*, проявляет бактериостатический и бактерицидный эффект на *S. aureus* посредством ферментативного разрушения полиглициновых сшивок клеточной стенки (Browder et al., Res. Comm., 19: 393-400 (1965)). Ген для лизостафина был впоследствии клонирован и секвенирован (Recsei et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1127-1131 (1987)). Терапевтическая композиция может также включать мутанолизин и лизоцим.

[000133] Средства применения терапевтической композиции, содержащей литический фермент/полипептид(полипептиды) и антибиотик(и), включают, но не ограничены ими прямые, косвенные, носительные и особые средства или любую комбинацию средств. Непосредственное средство применения литического фермента/полипептида (полипептидов) может представлять собой любое подходящее средство, чтобы непосредственно привести полипептид в контакт с очагом инфекции или бактериальной колонизации, таким как в области носа (например, назальные спреи), дермальные или кожные средства применения (например, мази или составы для местного применения), суппозитории, тампоны и т.д. Средства для назального применения включают, например, назальные спреи, капли для носа, мази для носа, промывки для носа, назальные инъекции, тампонады для носа, бронхиальные спреи и ингаляторы, или опосредованно посредством применения пастилок (леденцов) для горла, промывания рта или полоскания, или посредством применения мазей, наносимых в ноздри, или на лицо или любую комбинацию из этих и аналогичных способов применения. Формы, в которых литический фермент может вводиться, включают, но не ограничены ими, пастилки, лепешки, леденцы, инъекционные средства, жевательные резинки, таблетки, порошки, спреи, жидкости, мази, и аэрозоли.

[000134] Способ применения для литического фермента и антибиотика включает ряд различных типов и комбинаций носителей, которые включают, но не ограничены ими, водную жидкость, жидкость на спиртовой основе, водорастворимый гель, лосьон, мазь, неводную жидкую основу, основу из минерального масла, смесь минерального масла и вазелина, ланолин, липосомы, белковые носители, такие как сывороточный альбумин или желатин, порошкообразную целлюлозную кармель и их комбинации. Способ доставки носителя, содержащего терапевтическое средство, включает, но не ограничен ими, мазок, спрей, пластырь с замедленным высвобождением, салфетка с абсорбированной жидкостью и их комбинации. Литический фермент может быть нанесен на бандаж, либо непосредственно или в одном из других носителей. Бандажи могут поставляться на рынок влажными или сухими, где фермент находится в лиофилизированной форме на бандаже. Этот способ нанесения является наиболее эффективным для лечения инфицированной кожи. Носители местных композиций могут

содержать полутвердые и гелеобразные среды, которые включают полимерный загуститель, воду, консерванты, активные поверхностно-активные вещества или эмульгаторы, антиоксиданты, светозащитные средства и растворитель или смешанную систему растворителей. Полимерные загустители, которые могут применяться, включают

5 загустители, известные специалисту в данной области, такие как гидрофильные и гидроспиртовые желирующие средства, часто применяемые в косметической и фармацевтической отраслях промышленности. Другие предпочтительные желирующие полимеры включают гидроксиэтилцеллюзу, целлюлозную камедь, декадиеновый кросс-полимер MVE/МА, сополимер PVM/МА, или их комбинацию.

10 [000135] Может являться преимущественным иметь материалы, которые проявляют адгезию к слизистым тканям, для введения с одним или несколькими ферментами фагов и другими дополнительными средствами в течение некоторого времени. Материалы, имеющие способность к контролируемому высвобождению, являются особенно желательными, и применение мукоадгезивов с замедленным высвобождением

15 заслуживает значительного внимания. Известны другие подходы, включающие мукоадгезивы, которые являются комбинацией гидрофильных и гидрофобных материалов. Мицеллы и многослойные мицеллы могут также применяться для контроля высвобождения фермента. Материалы, имеющие способность к нацеливанию на поверхности или прилипанию к поверхностям, такие как пластмасса, мембранны,

20 устройства, используемые в клинической практике, включая, в частности, любой материал или компонент который помещают в организм, и является подверженным бактериальной адгезии или развитию биопленки, такой как катетеры, клапаны, протезные устройства, помпы для введения лекарственных средств или соединений, стенты, ортопедические материалы и т.д., могут комбинироваться, смешиваться или

25 совмещаться с лизином(лизинами), применяемыми в настоящем изобретении.

[000136] Терапевтические или фармацевтические композиции изобретения могут также содержать полимерные мукоадгезивы, включающие привитой сополимер, содержащий гидрофильную основную цепь и гидрофобные привитые цепи для контролируемого высвобождения биологически активных средств. Композиции для

30 данного применения могут необязательно содержать другие полимерные материалы, такие как пластификаторы из поли(акриловой кислоты), поли-(винилпирролидона) и карбоксиметилцеллюзы натрия, и другие фармацевтически приемлемые эксципиенты в количествах, которые не вызывают неблагоприятного эффекта на мукоадгезивность композиции.

35 [000137] Литические фермент/полипептид(ы) и антибиотик(и) изобретения могут вводиться для применения в соответствии с изобретением посредством фармацевтически применимых или приемлемых средств, включающих местные, пероральные или парентеральные. Например, литический фермент/полипептид(ы) могут вводиться внутримышечно, интракальконо, чрескожно, подкожно или внутривенно для лечения

40 от инфекций, вызываемых грам-положительными бактериями. В случаях, где парентеральная инъекция является выбранным способом введения, предпочтительно используют изотоническую готовую форму. Как правило, добавки для изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. В некоторых случаях, изотонические растворы, такие как забуференный фосфатом физиологический

45 раствор являются предпочтительными. Стабилизаторы включают желатин и альбумин. К готовой лекарственной форме может быть добавлено вазоконстрикторное средство. Фармацевтические препараты в соответствии с этим применением предоставляются стерильными и апирогенными.

[000161] Для любого соединения, терапевтически эффективная доза может оцениваться первоначально либо в аналитических тестах с культурами клеток или на животных моделях, обычно, мышах, кроликах, собаках или свиньях. Животную модель также применяют для достижения желательного интервала концентраций и пути

- 5 введения. Такая информация может затем использоваться для определения применимых доз и путей для ведения у людей. Точную дозировку выбирает индивидуальный терапевт с учетом пациента, подлежащего лечению. Дозировку и введение регулируют для обеспечения достаточных уровней активного фрагмента или для поддержания желательного эффекта. Дополнительные факторы, которые могут учитываться
 10 включают тяжесть болезненного состояния, возраст, массу тела и пол пациента; диету, желательную продолжительность лечения, способ введения, время и частоту введения, комбинацию(комбинации) лекарственных средств, чувствительности реакции, и переносимость/ответ к терапии. Фармацевтические композиции пролонгированного действия могут вводиться каждые 3-4 дня, каждую неделю, или однократно каждые
 15 две недели в зависимости от времени полужизни и скорости выведения конкретной лекарственной формы.

[000162] Эффективные мощности дозы или количества липического фермента/ полипептида(полипептидов), подлежащих введению, и продолжительность лечения будут зависеть от части от серьезности инфекции, массы тела пациента, в частности,
 20 человека, продолжительности воздействия инфекционных бактерий на реципиента, количества квадратных сантиметров кожи или ткани, которые являются инфицированными, глубины инфекции, серьезности инфекции, и разнообразного ряда других переменных. Композиция может применяться в любом месте, от одного до нескольких раз в день или неделю, и может применяться в течение короткого времени,
 25 такого как дни, или вплоть до нескольких недель или длительного периода времени, такого как много недель или вплоть до месяцев. Применение может длиться в течение дней или недель. Любая используемая дозированная форма должна обеспечивать минимальное число единиц в течение минимального количества времени. Концентрация активных единиц ферментов, предполагаемая для эффективного количества или
 30 дозировки ферментов, может быть выбрана соответствующим образом.

[000140] Лизин может вводиться в однократной дозе или множестве доз, по отдельности или в комбинации с еще одним средством, таким как один или более антибиотиков. Лизин, необязательно с еще одним средством, таким как антибиотик, может вводиться посредством одного и того же способа введения или посредством
 35 различных путей введения. Лизин может вводиться один раз, дважды или множество раз, один или более в комбинации или индивидуально. Таким образом, лизин может вводиться в первоначальной дозе, сопровождаемой последующими дозой или дозами, в частности, в зависимости от ответа и бактериального лизиса или деколонизации или диспергирования биопленки или лизиса бактерий в биопленке, и может комбинироваться
 40 или чередоваться с дозой(дозами) антибиотика. В конкретном аспекте изобретения, лизин, конкретно PlySs2, или комбинации антибиотика и лизина могут вводиться в течение более длительных периодов, и дозирование может быть расширено без риска резистентности.

[000141] Термин “средство” означает любую молекулу, включая полипептиды, 45 антитела, полинуклеотиды, химические соединения и малые молекулы. В частности, термин средство включает соединения, такие как тестируемые соединения, добавленные дополнительные соединение(соединения) или соединения лизинового фермента.

[000142] Термин “агонист” относится к лиганду, который стимулирует рецептор, с

которым связывается лиганд в самом широком смысле.

[000143] Термин “аналитический тест” означает любой процесс, применяемый для измерения специфического свойства соединения. “Скрининговое исследование” означает процесс, применяемый для характеристизации или выбора соединений, на основании их активности из коллекции соединений.

[000144] Термин “предотвращение” или “предупреждение” относится к снижению степени риска приобретения или развития заболевания или расстройства (т.е. тому, что препятствует развитию по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания) у субъекта, который может подвергаться воздействию болезнетворного агента, или быть предрасположенным к заболеванию перед наступлением заболевания.

[000145] Термин “профилактика” является родственным и охватывается термином “предотвращение”, и относится к мероприятию или процедуре, целью которых является предотвратить, в большей степени, чем лечить или излечивать заболевание.

Неограничивающие примеры профилактических мероприятий могут включать введение вакцин; введение низкомолекулярного гепарина стационарным пациентам имеющим риск тромбоза вследствие, например, иммобилизации; и введение противомалярийного средства, такого как хлорохин, перед посещением географического региона, где малярия является эндемическим заболеванием или риск заразиться малярией является высоким.

[000146] “Терапевтически эффективное количество” означает, что количество лекарственного средства, соединения, противомикробного средства, антитела, полипептида или фармацевтического средства, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ субъекта, который предполагается медицинским доктором или другим клиницистом. В частности, по отношению к грам-положительным бактериальным инфекциям и росту грам-положительных бактерий, термин “эффективное количество” подразумевает включение эффективного количества соединения или средства, которое принесет приблизительно биологически значимое уменьшение количества или степени инфекции грам-положительных бактерий, включая обладающего бактерицидным и/или бактериостатическим эффектом. Фразу “терапевтически эффективное количество” применяют в настоящем описании для обозначения количества, достаточного для предотвращения, и предпочтительно снижения на по меньшей мере приблизительно 30 процентов, более предпочтительно на по меньшей мере 50 процентов, наиболее предпочтительно на по меньшей мере 90 процентов, клинически значимого изменения роста или количества инфекционных бактерий, или другого признака патологии, такого как, например, повышенное лихорадочное состояние или уровень лейкоцитов в крови, при проявлении его присутствия и активности.

[000147] Термин “проведение лечения” или “лечение” любого заболевания или инфекции относится, в одном варианте осуществления, к уменьшению интенсивности заболевания или инфекции (т.е. прекращению заболевания или роста возбудителя инфекции или бактерий или снижению проявления, степени или тяжести по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В еще одном варианте осуществления “проведение лечения” или “лечение” относится к уменьшению интенсивности по меньшей мере одного физического параметра, который может не ощущаться субъектом. В еще одном варианте осуществления, “проведение лечения” или “лечение” относится к модуляции заболевания или инфекции, либо физически (например, стабилизации ощущаемого симптома), физиологически, (например, стабилизации физического параметра) или им обеим. В дополнительном варианте осуществления, “проведение лечения” или “лечение” относится к замедлению прогрессирования заболевания или

снижению инфицирования.

[000148] Фраза "фармацевтически приемлемые" относится к молекулярным видам и композициям, которые являются физиологически переносимыми и обычно не приводят к аллергической или аналогичной нежелательной реакции, таким как расстройство желудка, головокружение и т.п., при введении человеку.

[000149] Следует отметить, что в контексте способов лечения, которые осуществляют *in vivo*, или медицинских и клинических способов лечения в соответствии с настоящей заявкой и формулой изобретения, термин субъект, пациент или индивидуум предназначен для обозначения человека.

[000150] Термины "грам-положительные бактерии", "Грам-положительные бактерии", "грам-положительные" и любые варианты, не перечисленные конкретно, могут применяться в настоящем описании взаимозаменяя, и в применении ко всему тексту настоящей заявки и формулы изобретения относятся к Грам-положительным бактериям, которые являются известными и/или могут быть идентифицированы по присутствию некоторых характеристик клеточной стенки и/или клеточной мембраны и/или посредством окрашивания красителем Грама. Грам-положительные бактерии являются известными и легко могут идентифицированы и могут быть выбраны из, но не ограничиваясь ими, родов *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* и *Clostridium*, и включают любые и все их распознанные или нераспознанные виды или штаммы. В аспекте изобретения, чувствительные к лизину PlyS грам-положительные бактерии включают бактерии, выбранные из одного или более из *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*.

[000151] Термин "бактерицидный" относится к способности к лизису бактериальных клеток.

[000152] Термин "бактериостатический" относится к способности к подавлению бактериального роста, включая подавлению растущих бактериальных клеток.

[000153] Фраза "фармацевтически приемлемые" относится к молекулярным видам и композициям, которые являются физиологически переносимыми и обычно не приводят к аллергической или аналогичной нежелательной реакции, таким как расстройство желудка, головокружение и т.п., при введении человеку.

[000154] Фразу "терапевтически эффективное количество" применяют в настоящем описании для обозначения количества, достаточного для предотвращения, и предпочтительно снижения на по меньшей мере приблизительно 30 процентов, более предпочтительно на по меньшей мере 50 процентов, наиболее предпочтительно на по меньшей мере 90 процентов, клинически значимого изменения в активности целевой клеточной массы в S-фазе, или другого признака патологии, такого как, например, повышенное лихорадочное состояние или уровень лейкоцитов в крови, при проявлении его присутствия и активности.

[000155] Данное изобретение предоставляет способы предотвращения,

диспергирования, обработки и/или деколонизации бактериальных биопленок и предотвращения инфекций после диспергирования биопленки(биопленок), где один или более типов грам-положительных бактерий, в частности, один или более бактериальных типов из *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Listeria*, подозревается на присутствие или присутствует, включающий введение лизина, конкретно лизина PlySs2, имеющего способность к лизису бактерий *S. aureus*, включая MRSA. Изобретение предоставляет способы снижения и предотвращения роста биопленки на поверхности устройств, имплантатов, разделительных мембран (например, первапорационной, для диализа, обратного осмоса, ультрафильтрационной и

микрофильтрационной мембран), включающий введение или использование лизина, конкретно лизина PlySs2, имеющего способность к лизису бактерий *S. aureus*, включая MRSA.

[000156] Изобретение предоставляет способ лечения ассоциированной с катетером

- 5 инфекции мочевых путей (CAUTI), где инфекцию связывают с бактериями, ассоциированными с биопленкой, посредством введения композиции, содержащей лизин PlySs2. Изобретение предоставляет композиции, содержащие лизин PlySs2 для применения при лечении ассоциированной с катетером инфекции мочевых путей (CAUTI), где инфекцию связывают с ассоциированными с биопленкой бактериями. Способы или 10 композиции включают лизин PlySs2, включающий полипептид, предоставленный на ФИГУРЕ 5 или SEQ ID NO: 1, или его варианты, способный к лизису стафилококковых и стрептококковых бактерий, включая *S. aureus*. Способы или композиции may дополнительно включать один или более антибиотиков.

[000157] Эндокардит, включая стафилококковый эндокардит в сердце, такой как в

- 15 аортальном клапане или другом клапане или стенте или устройстве, имплантированном в сердце или его сосудах, является предметом значительного клинического беспокойства, с риском возникновения и реальностью для множества кардиологических пациентов. Изобретение предоставляет способ снижения, предотвращения, диспергирования или 20 лечения эндокардита, включая стафилококковый эндокардит, и для предотвращения или лечения биопленки(биопленок) на клапанах сердца или сосудистых стентах. В этих способах, лизин, конкретно лизин PlySs2 или его активные варианты, как предоставлено в настоящем документе, вводят для предотвращения или лечения стафилококкового эндокардита или биопленки(биопленок) на клапанах сердца или сосудистых стентах.

[000158] Изобретение может быть лучше понято при ссылке на следующие

- 25 неограничивающие Примеры, которые предоставлены в качестве иллюстрации изобретения. Следующие примеры представлены, чтобы более полно иллюстрировать предпочтительные варианты осуществления изобретения и не должны никаким образом рассматриваться, однако, как ограничивающие широкий объем притязаний изобретения.

ПРИМЕР 1

- 30 [000159] Лизин PlySs2 демонстрирует способность к лизису различных штаммов клинически значимых грам-положительных бактерий, включая резистентные к антибиотикам штаммы, такие как метициллин- и ванкомицин-резистентные и чувствительные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA, MSSA, VRSA, VISA). PlySs2 представляет собой уникальный лизин, имея лизическую активность по отношению к 35 широкому спектру видов, и может лизировать множество видов бактерий, в частности, грам-положительных бактерий, в значительной степени различных антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных *Staphylococcus*, а также *Streptococcus*, включая стрептококки Группы А и Группы В. Другие чувствительные к PlySs2 бактерии включают бактериальные штаммы *Enterococcus* и *Listeria*. Табличное 40 представление чувствительности различных бактерий, включая стафилококки и стрептококки, к лизину PlySs2, предоставлено выше, включая приведенные данные в ТАБЛИЦАХ 2 и 3.

[000160] Табличное представление результатов дополнительных исследований МПК показано ниже в ТАБЛИЦЕ 4.

45

ТАБЛИЦА 4

Активность PlySs2 и антибиотика против штаммов <i>S. aureus</i> *					
Организмы (кол. штаммов)	PlySs2	Даптомицин	Ванкомицин	Оксациллин	Линезолид

	МПК ₉₀ [мкМ]	МПК ₉₀ [мкМ]	МПК ₉₀ [мкМ]	МПК _{50/90} [мкМ]				
MRSA (n=45)	4	0,15	1	0,6	1	0,7	>4*	>10,0
MSSA (n=28)	4	0,15	1	0,6	1	0,7	н/д	н/д
VISA (n=10)	32	1,2	8	4,9	4	2,7	н/д	н/д
VRSA (n=14)	2	0,08	1	0,6	>16	>10,6	н/д	н/д
LRSA (n=5)	2	0,08	1	0,6	1	0,7	н/д	н/д
DRSA (n=8)	4	0,15	16	9,9	1	0,7	н/д	2

* МПК определяли, используя метод микроразведения в бульоне и оценку 80% ингибирования роста в соответствии с методами CLSI (M07-A9).

*Красный/Жирный шрифт=неэффективность лекарственного средства (значение МПК составляет выше предельных значений EUCAST для указанного лекарственного средства с *S. aureus*)

[000161] Примечательным и уникальным является то, что несмотря на активность против многочисленных клинически значимых бактерий, включая многочисленные штаммы *Staphylococcus* и *Streptococcus*, и другие штаммы, тестируемые, как указано в Таблицах, приведенных выше, PlySs2 проявляет по большей мере только минимальные эффекты на другие бактерии, в частности, природную или симбиотическую бактериальную флору. ТАБЛИЦА 5 ниже демонстрирует низкую лизическую активность PlySs2 против различных симбиотических бактерий человеческого кишечника.

ТАБЛИЦА 5 Чувствительность кишечных бактерий человека к PlySs2		
Организм	N (кол. тестируемых)	CF-301 МПК (мкг/мл)
Salmonella enteritidis	1	>512
Pseudomonas aeruginosa	11	>512
Escherichia coli	10	>512
Klebsiella spp.	8	>512
Proteus mirabilis	2	>512
Lactobacillus spp.	6	>512
Lactococcus spp.	3	>512

[000162] Образование биопленки является ключевым признаком при патогенезе многих бактериальных инфекций (31). В инфицированных тканях (т.е. сердечных клапанах при эндокардите или костях при остеомиелите) или на имплантатах (т.е. протезах суставов и катетерах), бактериальные патогены, такие как *S. aureus*, существуют в биопленках, обеспечивающих благоприятное окружение для роста и персистации, защищенное от действия антибиотиков и иммунной системы (32). Исследования, предоставленные в настоящем описании, теперь демонстрируют высокую активность лизина PlySs2 против биопленки уже при 1Х МПК концентрации, в сравнении с полным отсутствием активности антибиотиков, применяемых при концентрациях 1000Х МПК. Данная высокая активность лизина против биопленки предоставляет средства и композиции, которые являются эффективными против биопленок, и будут уникальным образом дополнять действие антибиотиков, посредством обеспечения доступа к биопленкам, разрушенным лизином.

[000163] Принимая во внимание быстрый бактериальный лизис PlySs2 и эффекты на многочисленные клинически значимые бактериальные штаммы и виды, эффективность действия лизина PlySs2 против биопленок *Staphylococcus aureus* тестировали *in vitro* с использованием аналитических тестов биопленки.

[000164] Минимальная подавляющая концентрация лизина PlySs2 против метициллин-45 резистентного штамма ATCC BAA-42MRSA *S. aureus* была определена, равной 16 мкг/мл. Данное значение представляет собой МПК, определенную в присутствии восстановителя (такого как DTT или BMS) в аналитическом тесте на МПК. Восстановитель добавляют с целью улучшения воспроизведимости между и среди

аналитических тестов при определении значений МПК. Исследования биопленки проводили без добавленного восстановителя. Значение МПК для ВАА-42 в отсутствии восстановителя составляет 32 мкг/мл. Значение МПК согласуется с другими штаммами MRSA в среднем, как отмечено в таблицах, представленных выше (см. таблицы 2 и 4).

⁵ Значения МПК определяли с использованием метода микроразведения в бульоне в соответствии со стандартами, и как, описано в документе M07-A9 Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) (*Methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria that grow aerobically. Volume 32* (Wayne [PA]: Институт клинических и лабораторных стандартов [US], 2012)).

¹⁰ [000165] Биопленки генерировали с использованием вариации способа, описанного Wu et al (Wu JA et al (2003) *Antimicrob Agents и Chemother* 47(11):3407-3414). Вкратце, 1×10^6 клеток в стационарной фазе метициллин-резистентного штамма *S. aureus* (MRSA) штамма ATCC ВАА-42 инокулировали в 2 мл триптического соевого бульона, дополненного 1% глюкозой и выращенного в течение 18 часов в 24-луночных чашках ¹⁵ Петри для культур тканей при 37°C без аэрации. Планктонные клетки (неприлипающие бактерии) удаляли промывкой 1X PBS, и оставшиеся бактерии (фиксированные или биопленочные бактерии) затем обрабатывали лизином PlySs2 или антибиотиком (даптомицином, линезолидом или ванкомицином, полученными от Sigma-Aldrich) при различных концентрациях в течение времени до 24 часов. При различных отметках ²⁰ времени (0 часов, 2 часов, 4 часов, вплоть до 24 часов), лунки промывали 1X PBS, фиксировали сушкой на воздухе при 37°C в течение 15 минут, и окрашивали 1 мл 1% раствора кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich) для визуализации оставшейся биопленки. Оптическую плотность биопленок, окрашенных кристаллическим ²⁵ фиолетовым также определяли для обеспечения более количественного сравнения.

²⁵ Иллюстративное исследование плотности представлено на ФИГУРЕ 7.

[000166] При первоначальных исследованиях, биопленки ВАА-42 MRSA обрабатывали 1000Х МПК концентрациями (1000 мкг/мл) для каждого из даптомицина, линезолида и ванкомицина, и 1Х МПК (32 мкг/мл) для лизина PlySs2 (без добавленного восстановителя). Все значения МПК определяли с использованием метода ³⁰ микроразведения в бульоне, описанного в документе M07-A9 Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) (*Methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria that grow aerobically. Volume 32*. Wayne [PA]: Институт клинических и лабораторных стандартов [US], 2012)). Биопленки MRSA, обработанные в течение времени до 4 часов, показаны на ФИГУРЕ 1, до 6 часов показаны на ФИГУРЕ 2, и до 24 часов показаны ³⁵ на ФИГУРЕ 3. Биопленку считывают в интервале 2 часов при обработке лизином PlySs2 по отдельности при 1Х МПК 32 мкг/мл (ФИГУРА 1, 2 и 3). Никакие изменения биопленки не выявлялись визуально за 4 часа или 6 часов при обработке 1000 мкг/мл (1000Х МПК) даптомицина, ванкомицина или линезолида (ФИГУРА 1 и 2). Данное наблюдение согласуется с предшествующими сообщениями, в которых была показана ⁴⁰ минимальная чувствительность биопленок к ванкомицину при очень высоких дозах (10000 мкг/мл) (Weigel LM et al (2007) *Antimicrob Agents и Chemother* 51(1):231-238).

[000167] Более низкие концентрации при обработке лизино PlySs2 и даптомицином оценивали против биопленок штамма ВАА-42 MRSA. Биопленки обрабатывали при ⁴⁵ более низких суб-МПК дозах PlySs2 в течение 0,5 часов, 1 часа, 4 часов и 24 часов. Как описано выше, биопленки ВАА-42 генерировали в 24-луночных чашках и лунки обрабатывали либо лизином PlySs2 или даптомициновым антибиотиком (с соответствующими контролями среды). Для PlySs2, использовали суб-МПК дозы, равные либо 3,2 мкг/мл (1/10Х МПК значение) или 0,32 мкг/мл (1/100Х МПК значение).

Для даптомицина применяли либо 1 мкг/мл (значение 1Х МПК) или 10 мкг/мл (10Х МПК значение). Лунки инкубировали в течение времени до 24 часов, промывали, фиксировали и окрашивали. Результаты показаны на ФИГУРЕ 4. Даже при 1/100^{ой} МПК лизина PlySs2, наблюдали растворение биопленки. Значительное растворение было продемонстрировано с 3,2 мкг/мл лизина PlySs2 (1/10Х МПК) при 4 часах, и даже некоторое растворение наблюдали с 0,32 мкг/мл (1/100Х МПК) при 4 часах. С концентрацией даптомицина вплоть до 10Х МПК, никакого растворения не было видно.

[000168] Сравнительные исследования МПК проводили с использованием альтернативного стафилококкового лизина, конкретно, лизина ClyS против биопленок ATCC BAA-42 MRSA. МПК лизина ClyS для данного штамма *S. aureus* составляла 32 мкг/мл. Полиэтиловые планшеты для культуры тканей инокулировали 5×10^5 КОЕ штамма ATCC BAA-42 *S. aureus* на лунку (в триптическом соевом бульоне с 0,2% глюкозой) и инкубировали в течение 24 часов при 35°C для обеспечения образования биопленки. Полученные в результате биопленки промывали 3 раза, чтобы удалить планктонные клетки, и обрабатывали при концентрациях лизина ClyS, равных 32 мкг/мл, 3,2 мкг/мл, 0,32 мкг/мл и 0,032 мкг/мл (или средой отдельно) в течение 24 часов при 35°C. Каждую лунку промывали и окрашивали 2% кристаллическим фиолетовым. Кристаллический фиолетовый окрашивал материал прилипающей биопленки. Результаты с использованием различных концентраций ClyS изображены на ФИГУРЕ 14. ClyS эффективно дисперсировал биопленку при 32 мкг/мл (1Х МПК) и 3,2 мкг/мл (0,1Х МПК). Восстановление в окрашенной биопленке также наблюдали при 0,32 мкг/мл и в некоторой степени при 0,032 мкг/мл. Стафилококковый лизин ClyS является способным к дисперсированию и восстановлению биопленки *S. aureus*.

ПРИМЕР 2

[000169] Комбинации даптомицина плюс лизин при суб-МПК дозах, оценивали на биопленках. Было обнаружено, что лизин PlySs2 и даптомицин оказывают синергетический летальный эффект на планктонные клетки *S. aureus* (Предварительная заявка США №. 61/644,944 и 61/737,239). Был предпринят ряд экспериментов, чтобы исследовать, может ли данный синергетический эффект быть также направлен на бактерии в биопленке. Метод микроразведений в бульоне с использованием серийных разведений (Spirala MM et al. (2010) Antimicob Agents and Chemother 54(11):4678-4683) применяли к зрелым биопленкам *S. aureus*, выращенным в 96-луночных микротитрационных планшетах. Исследовали активность суб-МПК комбинаций лизина и даптомицина против 18-часовых биопленок штамма ATCC BAA-42MRSA, выращенного способом, описанным выше, за исключением того, что клетки выращивали в 0,2 мл суспензиях. После образования биопленки, лунки промывали 1Х PBS и обрабатывали PlySs2 и даптомицином по отдельности или в ряду комбинаций в течение 24 часов без аэрации. Биопленки затем промывали, фиксировали и окрашивали, как описано выше, чтобы оценить образования биопленки. Эффект суб-МПК комбинаций лекарственных средств, таким образом, оценивали посредством сравнения с эффектами обоих лекарственных средств по отдельности при тех же самых суб-МПК концентрациях.

ПРИМЕР 3

Исследования смешанной биопленки In Vitro

[000170] Лизин PlySs2 также применяли в комбинации с даптомицином, чтобы направленно воздействовать на многовидовые биопленки. Биопленки часто содержат более одного бактериального вида (Yang L et al (2011) FEMS Immunol and Med 62(3):339-347). Лизин PlySs2 и даптомицин использовали, чтобы направленно воздействовать на биопленки, содержащие PlySs2- и даптомицин-чувствительный штамм ATCC BAA-42

S. aureus и PlySs2-резистентный, даптомицин-чувствительный штамм Enterococcus faecalis. В то время как штаммы E. faecalis являются чувствительными к даптомицину в планктонной форме, они, тем не менее, являются резистентными к даптомицину как фиксированный компонент биопленки. Только тогда, когда энтерококки

5 высвобождаются из биопленки, они могут стать резистентными к даптомицину. Чтобы тестировать способность PlySs2 опосредовать это высвобождение (и, таким образом, сенсибилизировать E. faecalis к даптомицину), проводили следующий эксперимент.

[000171] Биопленки генерировали, как описано выше в 24-луночных чашках с

использованием первоначальных инокулятов из 1×10^6 стафилококков и 1×10^6 10 энтерококков (каждого по отдельности и вместе). Биопленки промывали PBS и обрабатывали PlySs2 и даптомицином по отдельности и в комбинации (с использованием ряда комбинаций суб-МПК) в течение 24 часов. После обработки, биопленки из лунок разделяли на две фракции, включающие неприлипающие (включающие как живые, так и мертвые бактерии) и прилипающие (биопленочные формы). Неприлипающую фракцию 15 помещали в планшет для оценки жизнеспособности, чтобы определить относительные подсчеты КОЕ для стафилококков и энтерококков. Производили подсчет КОЕ в сравнении с подсчетами КОЕ для биопленок, обработанных буферными контролями. В то же время, оставшиеся биопленки разрушали посредством ультразвуковой 20 обработки и помещали в планшет для оценки жизнеспособности. Таким образом, можно определить, опосредует ли PlySs2 высвобождение E. faecalis из биопленок, где он может быть лизирован даптомицином.

[000172] Биопленки, обработанные комбинациями лизин^S антибиотик^R, лизин^R антибиотик^S, лизин^R антибиотик^S также оценивали, как отмечено ниже.

25 I. Смешанная биопленка Staphylococcus/Enterococcus - обработка лизином плюс антибиотик, как описано выше.

II. Смешанную биопленку S. aureus/S. epidermidis, или только биопленки S. epidermidis генерировали и оценивали. Эксперименты также проводили, как описано выше, с использованием биопленок, образованных из бактерий S. aureus и S. epidermidis.

30 III. Комбинация биопленок из бактерий Staph + Strep, обработка PlySs2 и дапто или другие антибиотики.

Эксперименты осуществляли, как описано выше, с использованием биопленок, образованных как из S. aureus, так и S. pyogenes (или S. dysgalactiae). Так как обе S. 35 pyogenes (streptococcus Группы А) и S. dysgalactiae (streptococcus Группы В) являются чувствительными к PlySs2, в этих экспериментах не использовали даптомицин. Напротив, лизин PlySs2 оценивали по отдельности, для разрушения и лизиса организмов в смешанной биопленке, состоящей из стафилококков и стрептококков.

ПРИМЕР 4

Модели биопленки на основе катетера

40 [000173] Инфекции Staphylococcus aureus, ассоциированные с постоянными устройствами, могут являться очень трудными для обработки вследствие рекальцитрантной природы бактериальных биопленок по отношению к общепринятым антибиотикам, и, как правило, требуется удаление инфицированных устройств, таких как катетеры. Могут вводиться курсы антибиотиков, и может также казаться, что они 45 устраняют большинство из ассоциированных с устройством бактерий, но только, чтобы получить повторное проявление инфекции в пределах нескольких дней. Полагают, что это является результатом остаточных персистирующих стафилококков при разрастании биопленки, восстанавливающих популяцию биопленки и повторно распространяющих

инфекцию на участке устройства или где-либо еще (Darouiche RO (2004) N Engl J Med 350: 1422-1429). Следовательно, обработка, которая осуществляла бы быстрый лизис стафилококков в биопленках, а также была бы эффективной по отношению к планктонным бактериям, имела бы значительный благоприятный эффект. В

5 предшествующих примерах было продемонстрировано, что лизин PlySs2 быстро и эффективно проводит очистку биопленок *S. aureus* *in vitro*. В данном исследовании оценивали способность лизина PlySs2 уничтожать установленные биопленки *S. aureus* на имплантированных катетерах *in vivo* у мышей.

[000174] Модель на основе катетера оценивали с использованием катетеров,

10 расположенных подкожно в подвздошной области, внутрибрюшинно или внутримышечно в бедре (модифицировано из Zhu Y et al (2007) Infect Immunol 75(9):4219-4226). Данную мышнюю модель на основе катетера применяли, чтобы оценить воздействие PlySs2 на жизнеспособность биопленки *in vivo*. Перед имплантацией, биопленки выращивали *in vitro* на сегментах катетерной трубы (ПВХ

15 [поливинилхлорид], содержащий DEHP [ди(2-этилгексил)фталат] в качестве пластификатора); набор для инфузии CareFusion SmartSite infusion set, #72023). Просвет каждого 2-дюймового катетера инокулировали 200 мкл триптического соевого бульона (TSB), дополненного 0,25% глюкозой, содержащих 2×10^7 КОЕ *S. aureus*, и биопленки выращивали в течение 72 часов при 37°C. Альтернативно, катетеры нарезали на 2-мм сегменты и помещали в 1,0 мл инокулированного TSB, дополненного 0,25% глюкозой, и сегменты катетера пересаживали ежедневно в свежую среду в течение трех дней перед имплантацией. Анестезию индуцировали у 6-8-недельных мышей Balb/c посредством внутрибрюшинной инъекции 0,15 мл 100 мг/кг кетамина и 10 мг/кг ксилазина (Butler-Schein). Сегменты катетера имплантировали подкожно в каждую подвздошную область мышей, или, альтернативно, во внутрибрюшинное пространство или бедренную мышцу. Группам из 5-10 мышей имплантировали биопленку. Мышей обрабатывали соответствующим количеством PlySs2, антибиотика или среды, или комбинацией PlySs2 + антибиотик через 1-24 часа после имплантации. Всех мышей из каждой группы умерщвляли гуманным образом через 1-4 дня после инфицирования. Для

20 количественной оценки образования биопленки, инфицированные катетеры удаляли немедленно после умерщвления, аккуратно промывали три раза в стерильном PBS, чтобы удалить неприлипающие бактерии, и последовательно помещали в 5 мл стерильного PBS. Прилипающие бактерии удаляли из катетеров посредством ультразвуковой обработки. Количество извлеченных бактерий затем количественно

25 оценивали посредством серийного разведения и подсчета на чашках Петри на соответствующей селективной среде. Альтернативно, промытые катетеры окрашивали при 15-минутной инкубации в Метиленовом Синем, промывали два раза в 5 мл стерильной PBS и визуализировали. Окраску Метиленовым Синим можно затем количественно определить посредством обесцвечивания в 0,2 мл 30% уксусной кислоты 30 при комнатной температуре и считыванием поглощения при 600 нм. Степень остаточной массы биопленки выражали в виде считываемого значения поглощения при 600 нм, разделенного на массу катетерного сегмента ($OD_{600}/\text{гм}$).

35 [000175] ФИГУРА 15 представляет результаты такого исследования катетера, где катетеры с биопленкой *S. aureus* (MRSA, штамм ATCC BAA-42), выращенной в течение 3 дней имплантировали в подкожное пространство у мышей и затем обрабатывали через 24 часа после установки имплантата. Каждую мышь имплантировали 2 катетерами и 2 мышей оценивали на предмет каждого из следующих условий: отрицательный контроль (отсутствие биопленки, отсутствие средства), контроль PlySs2 (отсутствие

биопленки с фиктивной обработкой средством PlySs2), только среда, PlySs2, вводимый внутрибрюшинно (ВБ), PlySs2, вводимый внутривенно, (ВВ), и PlySs2, вводимый подкожно (ПК). PlySs2 вводили в виде однократного болюса из 100 мкг (соответствующего 5мг/кг у мыши и ~50 мкг/мл дозы). Катетеры удаляли через 6 часов 5 после обработки и окрашивали Метиленовым Синим. Относительное количество окрашивания (визуализированного при 600 нм) при каждом условии, представлено на ФИГУРЕ 15. Каждая из ВБ, ВВ и ПК доз уменьшала окрашивание, причем подкожный болюс приводил в результате к устраниению окрашивания в катетере до почти контрольных уровней.

ПРИМЕР 5

[000176] В еще одной серии экспериментов, имплантированные в яремную вену катетеры у мышей предварительно прокапывали лизином PlySs2, чтобы оценить защиту мышей от инфицирования биопленкой с помощью этой предобработки. С использованием животной модели с яремным катетером, описанной выше, катетеры яремной вены катетеризированных мышей предварительно обрабатывали с прокапыванием лизина PlySs2 в PBS за 24 ч перед контрольным заражением *S. aureus*. Контрольные животные получали катетеры предобработанные только PBS. В день контрольного заражения, за 2 ч перед контрольным заражением, все катетеры промывали PBS, чтобы удалить избыточный несвязанный лизин, и затем мышей 15 подвергали контролльному заражению *S. aureus* через хвостовую вену, как описано выше. Зараженных животных умерщвляли в различные дни после бактериального заражения, и катетеры и органы извлекали, и бактерии количественно оценивали, как описано выше.

ПРИМЕР 6

[000177] Стафилококковый эндокардит представляет собой инфекцию на основе биопленки, которая может быть экспериментально индуцирована в аортальном клапане крыс (Entenza JM et al (2005) IAI 73:990-998). Вкратце, получают стерильные аортальные вегетации у крыс, и инфузионные помпы для подачи лизина устанавливают, как описано (Entenza et al). Эндокардит индуцировали через 24 ч посредством внутривенного 25 заражения 10^5 - 10^7 стафилококков. Либо через 24 часа или через 48 часов после инфицирования, лизин и/или антибиотики, такие как даптомицин, ванкомицин, или линезолид вводят внутривенно. Контрольные крысы получали буфер по отдельности. При различных временных отметках после инфицирования вплоть до 72 часов, животных 30 умерщвляли и проводили количественную оценку крови и вегетационных культур. 35 Бактериальные плотности выражали в виде \log_{10} КОЕ на мл или грамм ткани, соответственно.

ПРИМЕР 7

[000178] Чтобы сравнить относительные активности по эрадикации биопленки у PlySs2 и антибиотиков стандартного лечения, двадцатичетырехчасовой анализ по 40 определению зависимости активности PlySs2 и антибиотиков от времени проводили на биопленках MRSA. Биопленки генерировали в 24-луночных полистироловых планшетах посредством инокуляции 10^5 бактерий (MRSA, штамм ATCC BAA-42) в 0,5 мл триптического соевого бульона с 0,2% глюкозой (TSB+) на лунку и инкубировали в 45 течение 24 часов при 37°C. Один планшет генерировали для оценки каждой временной отметки обработки (0, 0,5, 1, 2, 4, 6 и 24 часов). Через 24 часа среду аспирировали, лунки промывали дважды 1X PBS, и добавляли обработку лекарственным средством и инициировали время обработки. Указанные концентрации лекарственных средств

(1000ХМПК для даптомицина, ванкомицина или линезолида; 1ХМПК для лизина PlySs2) в 1 мл МНВ2 (или МНВ2, дополненного до 50 мкг CaCl₂ на мл) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение указанных периодов времени перед аспирацией, проводили 2 промывки с 1X PBS и сушку воздухом в течение 15 минут. Лунки 5 окрашивали 3% раствором кристаллического фиолетового в 1 мл в течение 5 мин, затем аспирировали, промывали 3 раза с 1X PBS, сушили воздухом в течение 15 минут и фотографировали. Все эксперименты проводили в двух повторностях. Результаты показаны на ФИГУРАХ 6 и 7. Окрашивание лунок кристаллическим фиолетовым 10 показано на ФИГУРЕ 6 и количественное определение красителя, удерживаемого в лунках планшета, показано на ФИГУРЕ 7. PlySs2 при 1Х МПК полностью удалял биопленку за 2 часа, в то время как даптомицин, ванкомицин и линезолид при концентрациях 1000Х МПК не показали никакой очистки от биопленки за 24 часа.

[000179] Чтобы определить способность суб-МПК концентраций PlySs2 к обработке биопленок, осуществляли двадцати-четырех часовой анализ по определению зависимости 15 от времени. Биопленки генерировали в 24-луночных полистироловых планшетах посредством инокуляции 10⁵ бактерий (MRSA, штамм ATCC BAA-42) в 0,5 мл триптического соевого бульона с 0,2% глюкозой (TSB+) на лунку и инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Один планшет генерировали для оценки каждой временной 20 отметки при обработке (30 мин, 1 час, 4 часа, 24 часа). Через 24 часов, среду аспирировали, лунки промывали дважды с 1X PBS, и добавляли PlySs2, и инициировали время обработки. Указанные концентрации PlySS2 (0,1Х МПК и 0,01Х МПК) в 1 мл МНВ2 или среды, по отдельности, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 25 указанных периодов времени перед аспирацией, проводили 2 промывки с 1X PBS и сушку воздухом в течение 15 минут. Лунки окрашивали 3% раствором кристаллического фиолетового в 1 мл в течение 5 минут и затем аспирировали, промывали 3 раза с 1X PBS, сушили воздухом в течение 15 минут и фотографировали. Все эксперименты проводили в двух повторностях. Результаты показаны на ФИГУРЕ 8. PlySs2 при 0,1 X МПК удалял биопленку за 4 часа. PlySs2 при 0,01X МПК обеспечивал частичную очистку за 4 часа, в то время как полное удаление наблюдали при 24-часовой временной 30 отметке.

ПРИМЕР 8

[000180] Активности по эрадикации биопленки оценивали как для PlySs2, так и даптомицина против биопленок MRSA, выращенных на катетерах. Биопленки генерировали в 2-х дюймовых сегментах катетерной трубы (ПВХ [поливинилхлорид], 35 содержащий DEHP [ди(2-этилгексил)фталат] в качестве пластификатора; (CareFusion SmartSite infusion set, #72023) посредством инокуляции 10⁵ бактерий (MRSA, штамм ATCC BAA-42) в 0,2 мл триптического соевого бульона с 0,2% глюкозой (TSB+) на сегмент и инкубировали в течение 72 часов при 37°C. Все образцы устанавливали в двух 40 повторностях либо для окрашивания Метиленовым Синим или количественного определения КОЕ. Через 72 часа, среду смывали, сегменты промывали 1 мл 1X PBS, и добавляли обработку. Указанные концентрации лекарственного средства (1Х МПК и 1000Х МПК для даптомицина, 1Х МПК для PlySs2) в 0,2 мл раствора Рингера с лактатом добавляли к каждому сегменту и инкубировали в течение 24 часов перед смывкой, и 45 проводили промывку 1 мл 1X PBS. Образцы в двойном повторе затем исследовали следующим образом: чтобы оценить эрадикацию биопленки, сегменты окрашивали 0,02% раствором Метиленового Синего (в воде) в 0,22 мл в течение 15 мин. Сегменты затем интенсивно промывали, промывали 3 раза дистиллированной H₂O, сушили на

воздухе в течение 15 минут и фотографировали. Чтобы количественно определить количество живых клеток, удержанных внутри остаточных биопленок, сегменты в двух повторностях обрабатывали 0,22 мл буфера для лизиса (100 мкг/мл лизостафина в растворе Рингера с лактатом) в течение 8 минут. Затем, образцы по 0,1 мл удаляли,

5 добавляли в 96-луночный твердый планшет из белого полистирола, и смешивали с 0,1 мл Люциферин/Люциферазного реагента Promega BacTiter-Glo, и относительные световые единицы (OCE) немедленно измеряли (как описано в инструкциях производителя к набору), и сравнивали с ранее созданной стандартной кривой, коррелирующей значения OCE с известными концентрациями бактерий. Таким образом, была определена

10 оценка бактериальных КОЕ в каждой биопленке.

[000181] Результаты показаны на ФИГУРЕ 9. Относительное окрашивание биопленки показано на ФИГУРЕ 9А. PlySs2 полностью удалял биопленку из катетера при 1Х МПК, в то время как даптомицин не удалял значительной части биопленки даже при 1000Х МПК. Как видно на ФИГУРЕ 9В, PlySs2 при 1Х МПК понижал КОЕ до 100

15 Кое/мл, что является пределом обнаружения, в то время как никакого снижения КОЕ не было видно с даптомицином при 1Х МПК, и два log снижения от 100 миллионов до 1 миллиона Кое/мл наблюдали при 1000Х МПК даптомицина.

[000182] Для определения самого низкого количества PlySs2, необходимого для эрадикации биопленки из катетеров, осуществляли эксперимент с титрованием (ФИГУРА 10). Биопленки генерировали в 2 см-сегментах катетерной трубки из DEHP посредством инокуляции 10^5 бактерий (MRSA, штамм ATCC BAA-42) в 0,2 мл триптического соевого бульона с 0,2% глюкозой (TSB+) на сегмент и инкубировали в течение 72 часов при 37°C. Через 72 часа, среду удаляли, сегменты промывали с 1 мл 1Х PBS, и добавляли обработку лекарственным средством. Указанные концентрации лекарственного средства (1Х, 0,1Х, 0,01Х, 0,001Х, 0,0001Х и 0,00001Х МПК количества PlySs2) в 0,2 мл раствора Рингера с лактатом добавляли к каждому сегменту и инкубировали в течение 24 часов перед быстрой промывкой, и проводили промывку с 1 мл 1Х PBS. Сегменты окрашивали 0,02% раствором Метиленового Синего (в воде) в 0,22 мл в течение 15 мин, перед интенсивной смывкой, промывали 3 раза дистиллированной H₂O, сушили воздухом в течение 15 минут, и фотографировали. Количество PlySs2, необходимое для полной эрадикации биопленки, как определяли по окрашиванию, составляло 0,01Х МПК (0,32 мкг/мл) (ФИГУРА 10). Аналогичный анализ методом титрования, проведенный с даптомицином (1Х, 10Х, 100Х, 1000Х, 5000Х МПК даптомицина) показал, что концентрации даптомицина, вплоть до 5000Х МПК (5 мг/мл) не удаляли биопленку (ФИГУРА 11).

[000183] Для количественной оценки КОЕ, оставшихся после обработки биопленки лизином или антибиотиком, сегменты в двух повторностях, подвергнутые оценке на ФИГУРЕ 10 и 11, обрабатывали 0,22 мл буфера для лизиса (100 мкг/мл лизостафина в растворе Рингера с лактатом) в течение 8 минут. Затем, образцы по 0,1 мл удаляли, добавляли в 96-луночный твердый планшет из белого полистирола, и смешивали с 0,1 мл Люциферин/Люциферазного реагента Promega BacTiter-Glo, и относительные световые единицы (OCE) немедленно измеряли (как описано в инструкциях производителя к набору), и сравнивали с ранее созданной стандартной кривой, коррелирующей значения OCE с известными концентрациями бактерий. Таким образом, была определена оценка бактериальных КОЕ в каждой биопленке. Анализ методом титрования подтвердил результаты окрашивания Метиленовым Синим и представлен на ФИГУРЕ 13. PlySs2 является активным при удалении биопленочных бактерий до 0,01Х МПК концентрации, в то время как даптомицин является полностью неэффективным вплоть

до концентраций 5000x МПК.

[000184] Далее проводили анализ зависимости от времени активности PlySs2 против катетерных биопленок MRSA (ФИГУРА 12). Биопленки генерировали в 2-дюймовых сегментах катетерной трубки из DEHP посредством инокуляции 10^5 бактерий (MRSA, штамм ATCC BAA-42) в 0,2 мл триптического соевого бульона с 0,2% глюкозой (TSB+) на сегмент и инкубировали в течение 72 часов при 37°C. Два образца устанавливали для каждой указанной временной отметки (0 мин, 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин, 90 мин, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов) для проведения окрашивания Метиленового Синего и количественного определения КОЕ. Через 72 часа, среду интенсивно смывали, сегменты промывали с 1 мл 1X PBS, и добавляли обработку. PlySs2 (1X МПК концентрация или 32 мкг/мл) в 0,2 мл раствора Рингера с лактатом добавляли к каждому сегменту и инкубировали в течение указанных временных отметок перед интенсивной промывкой, и промывкой с 1 мл 1X PBS. Образцы в двух повторностях затем исследовали при каждой временной отметке следующим образом: сегменты окрашивали 0,02% раствором Метиленового Синего (в воде) в 0,22 мл в течение 15 мин. Сегменты затем интенсивно промывали, промывали 3 раза дистиллированной H₂O, сушили на воздухе в течение 15 минут, и фотографировали. Сегменты в двух повторностях обрабатывали 0,22 мл буфера для лизиса (100 мкг/мл лизостафина в растворе Рингера с лактатом) в течение 8 минут. Затем, образцы по 0,1 мл удаляли, добавляли в 96-луночный твердый планшет из белого полистирола, и смешивали с 0,1 мл Люциферин/Люциферазного реагента Promega BacTiter-Glo, и относительные световые единицы (OCE) немедленно измеряли (как описано в инструкциях производителя к набору), и сравнивали с ранее созданной стандартной кривой, коррелирующей значения OCE с известными концентрациями бактерий. Таким образом, была определена оценка бактериальных КОЕ в каждой биопленке. Анализ по определению зависимости от времени показал прогрессирующую удаление окрашиваемой биопленки из катетеров при 1X МПК PlySs2 с течением времени, с полным удалением за 60 минут (ФИГУРА 12А). Анализ КОЕ показал аналогичную прогрессирующую зависимость от времени, со значениями КОЕ при пределе обнаружения (100 Кое/мл) за 60 минут (ФИГУРА 12В).

ПРИМЕР 9

[000185] Для определения стабильности PlySs2 в имитирующей установке катетера, PlySs2 инкубировали при различных концентрациях в растворе Рингера с лактатом при 37°C. Через 7 дней, литическую активность PlySs2 оценивали посредством добавления 1×10^5 стафилококков, инкубации в течение 4 часов, затем обработки протеазой K, чтобы удалить остаточный PlySs2, и серийного разведения и посевом на жизнеспособность. Полученное в результате значение КОЕ для каждого условия делили на 1×10^5 для определения % потери активности.

[000186] Результаты приведены ниже в табличной форме в ТАБЛИЦЕ 6. После 7-дневной инкубации в растворе Рингера с лактатом при 37°C, необнаруживаемые потери активности наблюдали для концентраций, соответствующих 10X и 100X МПК PlySs2, в то время как 58,3% потерю определяли для образца с 1X МПК.

ТАБЛИЦА 6

Стабильность PlySs2 Stability при 37°C в растворе Рингера с лактатом	
ОБРАБОТКА	% ПОТЕРИ АКТИВНОСТИ (7 дней)
1X МПК	58,3
10X МПК	<0,002
100X МПК	<0,002

[000187] Приведенное выше указывает на то, что PlySs2 является активным и стабильным по меньшей мере вплоть до 7 дней в имитируемой установке катетера и может эффективно лизировать Стафилококки и, посредством этого, предотвращать бактериальную колонизацию даже после увеличенного периода времени инкубации в растворе Рингера с лактатом, иллюстративном растворе для стандартной внутривенной инъекции и промывочном растворе.

ПРИМЕР 10

[000188] Исследование зависимости от времени проводили для оценки люминальной стерилизации в катетере, чтобы оценить жизнеспособность бактерий, которые являются перемещенными из биопленки и суспендированы в жидкой фазе просвета после обработки или при обработке лизином. На ФИГУРЕ 12, описанной выше, было продемонстрировано, что биопленка (прилипшая к стенкам) теряется и полностью диспергируется за 1 час. В настоящем исследовании, стерилизация (полный лизис) бактерий в просвете, как оценивали посредством анализа КОЕ, который обнаруживает живые клетки, происходит приблизительно между 6 и 24 часами. Биопленки были образованы с использованием штамма ATCC BAA-42 в течение 3 дней при 37°C. Биопленки промывали с 1X PBS (чтобы удалить планктонные клетки) и обрабатывали либо раствором Рингера с лактатом (буферный контроль) или раствором Рингера с лактатом, содержащим лизин PlySs2 (при концентрации 1X МПК), или даптомицином (при концентрации 1X МПК), а также лизином PlySs2 (при концентрации 10X МПК). Биопленки обрабатывали в течение времени до 24 часов, и КОЕ оценивали при 2 минутах, 15 минутах, 30 минутах, 1 часе, 2 часах, 6 часах и 24 часах. При каждой временной отметке, содержимое просвета катетеров удаляли и проводили посев на жизнеспособность. ФИГУРА 16 представляет результаты для уровней обработки 1X МПК (32 мкг/мл), 1X МПК даптомицина, и 10X МПК (320 мкг/мл) в сопоставлении с буфером по отдельности.

ПРИМЕР 11

[000189] Лизин оценивали на эффективность против биопленок *Staphylococcus epidermidis*. Биопленки различных штаммов *S. epidermidis* генерировали в полистирольных 24-луночных планшетах для микротитрования и обрабатывали лизин PlySs2 для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) и концентрации эрадикации биопленки (КЭБ) PlySs2 против каждого штамма. Результаты приведены ниже в табличной форме в ТАБЛИЦЕ 7 для более двадцати различных штаммов *S. epidermidis*. МПК (в микрограммах/мл) определяли и рассчитывали с использованием стандартного метода CLSI для микроразведения в бульоне, описанного и цитируемого в Примерах выше. Концентрация эрадикации биопленки (КЭБ) для PlySs2 (в микрограммах/мл) представляет собой самую низкую концентрацию интервала разведения, которая полностью разрушает 24-часовую биопленку указанных штаммов.

[000190] Для определения КЭБ, 24-часовые биопленки выращивали в 24-луночных планшетах, промывали 2x с PBS, и обрабатывали PlySs2 или без PlySs2 (интервал разведения), полученном в растворе Рингера с лактатом. Обработанные планшеты инкубировали при 37°C (окружающий воздух) в течение 24 часов, промывали с PBS и окрашивали Кристаллическим Фиолетовым (КФ) в течение 15 минут. Окраску КФ далее солюбилизовали с 1 мл 33% уксусной кислоты в каждой лунке, и поглощение (OD_{600nm}) считывали с использованием 200 мкл солюбилизированного КФ. Процентное содержание биопленки определяли посредством деления поглощения лунки на поглощение в лунке без лизина (контроль биопленки). КЭБ определяли как значение, которое показывало >75% очистки от биопленки.

ТАБЛИЦА 7

CFS	Тип	Обозначение	МПК	КЭБ
5	166	Staphylococcus epidermidis Контамиант из лаб. окружения; секвенирование NY,NY, 168 pPHK	нд	5,12
	224	Staphylococcus epidermidis HER 1292	512	5,12
	225	Staphylococcus epidermidis HPH-6	128	0,512
	226	Staphylococcus epidermidis HPH-5	512	5,12
	227	Staphylococcus epidermidis HCN-4	>512	5,12
	272	Staphylococcus epidermidis NRS53 (VISE)	128	0,215
10	280	Staphylococcus epidermidis NRS101 (MRSE)	128	0,512
	300	Staphylococcus epidermidis NRS8, (VISE)	32	0,512
	313	Staphylococcus epidermidis NRS34 (VISE)	8	0,512
	533	Staphylococcus epidermidis NRS6; (VISE); bloodstream USA	>512	0,512
	552	Staphylococcus epidermidis ATCC #12228 (MSSE)	нд	51,2
	769	Staphylococcus epidermidis NRS101	64	0,512
15	1152	Staphylococcus epidermidis ATCC-14990	нд	5,12
	1154	Staphylococcus epidermidis ATCC-49461	нд	5,12
	1161	Staphylococcus epidermidis NRS850-VCU028	нд	5,12
	1164	Staphylococcus epidermidis NRS853-VCU041	нд	5,12
	1165	Staphylococcus epidermidis NRS854-VCU045	нд	5,12
	1168	Staphylococcus epidermidis NRS857-VCU065	нд	0,512
20	1174	Staphylococcus epidermidis NRS864-VCU112	нд	51,2
	1184	Staphylococcus epidermidis NRS874-VCU126	нд	51,2
	1185	Staphylococcus epidermidis NRS875-VCU127	нд	51,2
	1186	Staphylococcus epidermidis NRS876-VCU128	нд	0,512
	МПК = минимальная ингибирующая концентрация PlySs2 (в мкг/мл), рассчитанная с использованием стандартного метода CLSI для микроразведения в бульоне. нд указывает, что данные недоступны			
	КЭБ = Концентрация эрадикации биопленки для PlySs2 (для мкг/мл) представляет собой самую низкую концентрацию интервала разведения, которая полностью разрушает 24-часовую биопленку указанных штаммов			

25 [000191] Эти результаты демонстрируют высокую активность лизина PlySs2 против биопленок *S. epidermidis*; примечательно, что высокая активность распространяется на штаммы *epidermidis* с высокой МПК PlySs2; примечательно, что высокая активность распространяется на штаммы с высокими уровнями МПК для PlySs2. Эти данные указывают на то, что PlySs2 будет активным против широкого диапазона биопленок *S. epidermidis*.

30 [000192] Биопленки *S. epidermidis* в катетерах обрабатывали PlySs2 и оценивали с использованием методов, аналогичных описанным выше для исследований *S. aureus*. *S. epidermidis* не продуцирует биопленки на катетерах так сильно, как ранее описанные штаммы *S. aureus*, однако рост биопленки имел место и мог быть подвергнут оценке.

35 [000193] Результаты исследований биопленки *S. epidermidis* (штамм CFS 313 NRS34, который является штаммом *S. epidermidis* с умеренной чувствительностью к ванкомицину (VISE)), на катетерах, обработанных PlySs2 при 10Х МПК и ниже, показаны на ФИГУРЕ 17. Биопленка *S. epidermidis* разрушается при понижении концентраций PlySs2 до 0,1Х МПК. МПК здесь составляет 8 мкг/мл. Аналогичный результат и сравниваемый уровень 40 активности наблюдали с штаммом CFS 218 *S. aureus* (MRSA, штамм ATCC BAA-42).

ПРИМЕР 12

45 [000194] Результаты аналитического теста на предотвращение образования биопленки представлены на ФИГУРЕ 18. Штамм MRSA BAA-42 *S. aureus* (5×10^5 бактерий/мл) инокулировали в 2 мл TSB + 0,2% глюкозы в каждую лунку ряда 24-луночного планшета. Лизин PlySs2 добавляли немедленно (при концентрациях, соответствующих 1Х МПК (32 мкг/мл), 0,1Х МПК, 0,01Х МПК, 0,001Х МПК и 0,0001Х МПК, и затем инкубировали в течение 6 часов при 37°C в окружающем воздухе. Лунки промывали с PBS, окрашивали Кристаллическим Фиолетовым и фотографировали для оценки развития биопленки

при каждом из условий. Буферный контроль также оценивали одновременно. В данном исследовании, бактерии и лизин PlySs2 (различные концентрации) добавляют в одно и то же время, и обеспечивают протекание образования биопленки в течение 6 часов. Как демонстрируется на ФИГУРЕ 18, предварительная инкубация с 1Х и 0,1Х МПК 5 PlySs2 может эффективно и полностью предотвратить последующее образование биопленки. Таким образом, PlySs2 может не только устранять зрелые биопленки, но также он может предотвращать образование биопленки *de novo*.

ПРИМЕР 13

[000195] В дополнение к биопленкам, генерируемым посредством BAA-42 MRSA,

10 как описано выше, биопленки дополнительных штаммов *S. aureus* оценивали на чувствительность к лизину PlySs2. Каждый из штаммов MRSA CFS 553 (ATCC 43300) (ФИГУРА 19) и CFS 992 (JMI 5381) оценивали при исследованиях катетера, с использованием способов, как описано выше. В каждом случае, 3-х дневные биопленки промывали и обрабатывали указанными концентрациями PlySS2 в течение 4 часов. 1Х 15 МПК для штамма ATCC 4330 составляла 16 мкг/мл, а 1Х МПК для штамма JMI 5381 составляла 32 мкг/мл. Как показано на ФИГУРЕ 19 и 20, эти биопленки альтернативных штаммов MRSA были чувствительными к PlySs2, и Plyss2 уничтожал и полностью дисперсировал катетерную биопленку при уровнях, равных 10Х МПК, 1ХМПК, и 0,1Х 20 МПК. Биопленки значительно уменьшались у каждого штамма с использованием 0,01Х МПК PlySs2.

ПРИМЕР 14

Биопленки генерировали на катетерной трубке (ПВХ с DEHP в качестве пластификатора), как описано выше, и оценивали на чувствительность к PlySs2 посредством сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Трехдневные биопленки 25 штамма CFS 218 MRSA (штамм ATCC BAA-42 MRSA) на поверхности катетера обрабатывали концентрацией 1Х МПК (т.е. 32 мкг/мл) PlySs2 в растворе Рингера с лактатом в течение либо 30 секунд или 15 минут перед смыткой обработки, и оставшуюся биопленку фиксировали с помощью глутаральдегида. После фиксации на поверхности катетера, образцы дополнительно обрабатывали и анализировали посредством сканирующей электронной микроскопии при 5000 \times увеличении (ФИГУРА 21). Обработка буфером по отдельности (т.е., раствором Рингера с лактатом по отдельности) была включена в качестве контроля. Как показано на ФИГУРЕ 21, PlySs2 обработка быстро уменьшает биопленку (в пределах 30 секунд) и за 15 минут почти полностью удаляет биопленку.

35 [000196] **ССЫЛКИ**

1. Klevens, R.M., et al. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *JAMA*298, 1763-1771 (2007).
2. Brink, A.J. Does resistance in severe infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* give you the 'creeps'? *Current opinion in critical care*18, 451-459 (2012).
- 40 3. Ben-David, D., Novikov, I. & Mermel, L.A. Are there differences in hospital cost between patients with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and those with methicillin-susceptible *S. aureus* bloodstream infection? *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*30, 453-460 (2009).
- 45 4. Fischetti, V.A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current opinion in microbiology*11, 393-400 (2008).
5. Fenton, M., Ross, P., McAuliffe, O., O'Mahony, J. & Coffey, A. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs*1, 9-16 (2010).

6. Nelson, D., Loomis, L. & Fischetti, V.A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***98**, 4107-4112 (2001).
7. Witzenrath, M., et al. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Critical care medicine***37**, 642-649 (2009).
8. McCullers, J.A., Karlstrom, A., Iverson, A.R., Loeffler, J.M. & Fischetti, V.A. Novel Strategy to Prevent Otitis Media Caused by Colonizing Streptococcus pneumoniae. *PLOS pathogens***3**, 0001-0003 (2007).
9. Pastagia, M., et al. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy***55**, 738-744 (2011).
10. Loeffler, J.M., Djurkovic, S. & Fischetti, V.A. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia. *Infection and Immunity***71**, 6199-6204 (2003).
11. Entenza, J.M., Loeffler, J.M., Grandgirard, D., Fischetti, V.A. & Moreillon, P. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy***49**, 4789-4792 (2005).
12. Grandgirard, D., Loeffler, J.M., Fischetti, V.A. & Leib, S.L. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *The Journal of infectious diseases***197**, 1519-1522 (2008).
13. Blaser, M. Stop killing beneficial bacteria. *Nature***476**, 393-394 (2011).
14. Willing, B.P., Russell, S.L. & Finlay, B.B. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature reviews. Microbiology***9**, 233-243 (2011).
15. Gilmer, D.B., Schmitz, J.E., Euler, C. & Fischetti, V.A. Novel Bacteriophage Lysin with Broad Lytic Activity Protects against Mixed Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *TBD* (2012).
16. Schuch, R., Fischetti, V.A. & Nelson, D.C. A Genetic Screen to Identify Bacteriophage Lysins. in *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 2: Molecular and Applied Aspects*, Vol. 502 307-319 (2009).
17. Bateman, A. & Rawlings, N.D. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem Sci***28**, 234-237 (2003).
18. Whisstock, J.C. & Lesk, A.M. SH3 domains in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences***24**, 132-133 (1999).
19. Rossi, P., et al. Structural elucidation of the Cys-His-Glu-Asn proteolytic relay in the secreted CHAP domain enzyme from the human pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. *Proteins***74**, 515-519 (2009).
20. Mueller, M., de la Pena, A. & Derendorf, H. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrobial agents and chemotherapy***48**, 369-377 (2004).
21. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Vol. 32 (Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute (US), 2012).
22. Friedman, L., Alder, J.D. & Silverman, J.A. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy***50**, 2137-2145 (2006).
23. Donlan, R.M. & Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews***15**, 167-193 (2002).
24. Cottarel, G. & Wierzbowski, J. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends in biotechnology***25**, 547-555 (2007).
25. Tallarida, R.J. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug

- synergism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*342, 2-8 (2012).
26. LaPlante, K.L., Leonard, S.N., Andes, D.R., Craig, W.A. & Rybak, M.J. Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and in vitro pharmacodynamic models. *Antimicrobial agents and chemotherapy*52, 2156-2162 (2008).
27. Crandon, J.L., Kuti, J.L. & Nicolau, D.P. Comparative efficacies of human simulated exposures of telavancin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a range of vancomycin MICs in a murine pneumonia model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*54, 5115-5119 (2010).
28. Abad, C.L., Kumar, A. & Safdar, N. Antimicrobial therapy of sepsis and septic shock--when are two drugs better than one? *Critical care clinics*27, e1-27 (2011).
29. Fischbach, M.A. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Current opinion in microbiology*14, 519-523 (2011).
30. Loeffler, J.M., Nelson, D. & Fischetti, V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*294, 2170-2172 (2001).
31. Costerton, J.W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*284, 1318-1322 (1999).
32. Kiedrowski, M.R. & Horswill, A.R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*1241, 104-121 (2011).
33. Domenech, M., Garcia, E. & Moscoso, M. In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*55, 4144-4148 (2011).
34. Meng, X., et al. Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. *Applied and environmental microbiology*77, 8272-8279 (2011).
35. Schuch, R., Nelson, D. & Fischetti, V. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*418, 884-889 (2002).
36. Fischetti, V.A., Nelson, D. & Schuch, R. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nature Biotechnology*24, 1508-1511 (2006).
37. Manoharadas, S., Witte, A. & Blasi, U. Antimicrobial activity of a chimeric enzybiotic towards *Staphylococcus aureus*. *Journal of biotechnology*139, 118-123 (2009).
38. Rashel, M., et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *The Journal of infectious diseases*196, 1237-1247 (2007).
39. Daniel, A., et al. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*54, 1603-1612 (2010).
40. Kokai-Kun, J.F., Chanturiya, T. & Mond, J.J. Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*60, 1051-1059 (2007).
41. Dhand, A., et al. Use of antistaphylococcal beta-lactams to increase daptomycin activity in eradicating persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of enhanced daptomycin binding. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*53, 158-163 (2011).
42. Matias, V.R. & Beveridge, T.J. Cryo-electron microscopy of cell division in *Staphylococcus aureus* reveals a mid-zone between nascent cross walls. *Molecular microbiology*64, 195-206 (2007).

43. Kashyap, D.R., *et al.* Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems. *Nature medicine*17, 676-683 (2011).
44. Moise, P.A., North, D., Steenbergen, J.N. & Sakoulas, G. Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. *Lancet Infect Dis*9, 617-624 (2009).
- 5 45. Jobson, S., Moise, P.A. & Eskandarian, R. Retrospective observational study comparing vancomycin versus daptomycin as initial therapy for *Staphylococcus aureus* infections. *Clinical therapeutics*33, 1391-1399 (2011).
- 10 46. Schweizer, M.L., *et al.* Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC infectious diseases*11, 279 (2011).
47. Berti, A.D., *et al.* Altering the proclivity towards daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using combinations with other antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*56, 5046-5053 (2012).
- 15 48. Sopirala, M.M., *et al.* Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*54, 4678-4683 (2010).
49. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Vol. 32 (Clinical and Laboratory Standards Institute (US), Wayne (PA), 2012).
- 20 50. *Clinical Microbiology Procedures Handbook 3rd Ed.* Washington DC, (ASM Press, 2010).
51. Pereira, P.M., Filipe, S.R., Tomasz, A. & Pinho, M.G. Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*51, 3627-3633 (2007).
52. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*9, 40 (2008).
- 25 53. Pettersen, E.F., *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*25, 1605-1612 (2004).

[00197] Данное изобретение может воплощаться в других формах или осуществляться другими путями без отступления от его сущности или незаменимых характеристик.

30 Раскрытие настоящего изобретения, следовательно, должно рассматриваться во всех аспектах как иллюстративное, а не ограничивающее, причем объем притязаний данного изобретения обозначен посредством прилагаемой Формулы изобретения, и все изменения, которые появляются в пределах значения и интервала эквивалентности, подразумеваются включенными в ее объем.

35 [000198] Различные ссылки цитируются по всему тексту данного описания, каждая из которых полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Schuch, Raymond
 <120> ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ, РАЗРУШЕНИЕ И ОБРАБОТКА БИОПЛЕНКИ ЛИЗИНОМ
 40 БАКТЕРИОФАГА
 <130> 3136-1-008РСТ
 <140> UNASSIGNED
 <141> 2013-05-09
 <150> 61/644,799
 45 <151> 2012-05-09
 <150> 61/736,813
 <151> 2012-12-13
 <160> 5

<170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 245
 <212> PRT
 5 <213> Streptococcus suis
 <400> 1

Met	Thr	Thr	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Val	Arg	Ala	Gln	Val	Gly
1							5			10				15	
Ser	Gly	Val	Ser	Val	Gly	Asn	Gly	Glu	Cys	Tyr	Ala	Leu	Ala	Ser	Trp
10				20					25					30	
Tyr	Glu	Arg	Met	Ile	Ser	Pro	Asp	Ala	Thr	Val	Gly	Leu	Gly	Ala	Gly
			35				40				45				
Val	Gly	Trp	Val	Ser	Gly	Ala	Ile	Gly	Asp	Thr	Ile	Ser	Ala	Lys	Asn
			50			55			60						
Ile	Gly	Ser	Ser	Tyr	Asn	Trp	Gln	Ala	Asn	Gly	Trp	Thr	Val	Ser	Thr
15				65		70			75			80			
Ser	Gly	Pro	Phe	Lys	Ala	Gly	Gln	Ile	Val	Thr	Leu	Gly	Ala	Thr	Pro
				85			90			95					
Gly	Asn	Pro	Tyr	Gly	His	Val	Val	Ile	Val	Glu	Ala	Val	Asp	Gly	Asp
20				100			105			110					
Arg	Leu	Thr	Ile	Leu	Glu	Gln	Asn	Tyr	Gly	Gly	Lys	Arg	Tyr	Pro	Val
			115			120			125						
Arg	Asn	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Val	Val	His	Tyr
			130			135			140						
Ile	Thr	Pro	Pro	Gly	Thr	Val	Ala	Gln	Ser	Ala	Pro	Asn	Leu	Ala	Gly
25				145		150			155			160			
Ser	Arg	Ser	Tyr	Arg	Glu	Thr	Gly	Thr	Met	Thr	Val	Thr	Val	Asp	Ala
				165			170			175					
Leu	Asn	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Asn	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Val
30				180			185			190					
Tyr	Lys	Arg	Gly	Glu	Ser	Phe	Asp	Tyr	Asp	Thr	Val	Ile	Ile	Asp	Val
			195			200			205						
Asn	Gly	Tyr	Val	Trp	Val	Ser	Tyr	Ile	Gly	Gly	Ser	Gly	Lys	Arg	Asn
			210			215			220						
Tyr	Val	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Arg	Phe	Gly	Asn	Ala
35				225		230			235			240			
Trp	Gly	Thr	Phe	Lys											
			245												
<210>	2														
40	<211>	738													
<212>	ДНК														
<213>	Streptococcus suis														
<400>	2														
45	atgacaacag	taaaatgaagc	attaaataat	gttaagagctc	agggtgggtc	cggtgtgtct									60
	gttggcaacg	gcgaatgcta	cgctttggct	agttggtacg	agcgcatgat	tagtccggat									120
	gcaactgtcg	gacttggcgc	tggtgtggc	tgggtcagcg	gtgcaatcgg	cgataacaatc									180
	tctgccaaaa	acatcggctc	atcatacaac	tggcaagcta	acggctggac	agtttccaca									240
	tctggtccat	ttaaaggcagg	ttagattgtg	acgcttgggg	caacaccagg	aaacccttac									300

RU 2735 103 C2

ggacatgtgg taatcgctcg agcagtggac ggcgatacat tgactatttt ggagcaaaac 360
 tacggcggga aacgttatcc cgtccgtaat tattacagcg ctgcaagcta tcgtcaacag 420
 gtcgtgcatt acatcacacc gcctggcacg gtcgcacagt cagcacccaa ccttgcaggc 480
 tctcgttcct atcgcgagac gggcactatg actgtcacgg tcgatgctct caatgttcgc 540
 5 agggcgccaa atacttcagg cgagattgta gcagtataca agcgtggtga atcatttgac 600
 tatgatactg tcatcatcgta tgtcaatggc tatgtctggg tgtcttacat aggcccgc 660
 ggcaaacgta actacgttgc gacgggcgct accaaagacg gtaagcgaaa cggcaatgct 720
 tggggtacat ttaaataaa 738
 <210> 3
 10 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Streptococcus suis
 <400> 3
 Leu Asn Asn Val Arg Ala Gln Val Gly Ser Gly Val Ser Val Gly Asn
 15 1 5 10 15
 Gly Glu Cys Tyr Ala Leu Ala Ser Trp Tyr Glu Arg Met Ile Ser Pro
 20 20 25 30
 Asp Ala Thr Val Gly Leu Gly Ala Gly Val Gly Trp Val Ser Gly Ala
 35 35 40 45
 20 Ile Gly Asp Thr Ile Ser Ala Lys Asn Ile Gly Ser Ser Tyr Asn Trp
 50 50 55 60
 Gln Ala Asn Gly Trp Thr Val Ser Thr Ser Gly Pro Phe Lys Ala Gly
 65 65 70 75 80
 Gln Ile Val Thr Leu Gly Ala Thr Pro Gly Asn Pro Tyr Gly His Val
 25 85 90 95
 Val Ile Val Glu Ala Val Asp Gly Asp Arg Leu Thr Ile Leu Glu Gln
 100 100 105 110
 Asn Tyr Gly Gly Lys Arg Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Tyr Ser Ala Ala
 115 115 120 125
 30 Ser Tyr Arg Gln Gln Val Val His Tyr Ile Thr
 130 135
 <210> 4
 <211> 67
 <212> PRT
 35 <213> Streptococcus suis
 <400> 4
 Arg Ser Tyr Arg Glu Thr Gly Thr Met Thr Val Thr Val Asp Ala Leu
 1 1 5 10 15
 Asn Val Arg Arg Ala Pro Asn Thr Ser Gly Glu Ile Val Ala Val Tyr
 40 20 25 30
 Lys Arg Gly Glu Ser Phe Asp Tyr Asp Thr Val Ile Ile Asp Val Asn
 35 35 40 45
 Gly Tyr Val Trp Val Ser Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Lys Arg Asn Tyr
 50 50 55 60
 45 Val Ala Thr
 65
 <210> 5
 <211> 280

<212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 5

5	Met Glu Thr Leu Lys Gln Ala Glu Ser Tyr Ile Lys Ser Lys Val Asn	
	1 5 10	15
	Thr Gly Thr Asp Phe Asp Gly Leu Tyr Gly Tyr Gln Cys Met Asp Leu	
	20 25 30	
	Ala Val Asp Tyr Ile Tyr His Val Thr Asp Gly Lys Ile Arg Met Trp	
	35 40 45	
10	Gly Asn Ala Lys Asp Ala Ile Asn Asn Ser Phe Gly Gly Thr Ala Thr	
	50 55 60	
	Val Tyr Lys Asn Tyr Pro Ala Phe Arg Pro Lys Tyr Gly Asp Val Val	
	65 70 75 80	
	Val Trp Thr Thr Gly Asn Phe Ala Thr Tyr Gly His Ile Ala Ile Val	
15	85 90 95	
	Thr Asn Pro Asp Pro Tyr Gly Asp Leu Gln Tyr Val Thr Val Leu Glu	
	100 105 110	
	Gln Asn Trp Asn Gly Asn Gly Ile Tyr Lys Thr Glu Leu Ala Thr Ile	
	115 120 125	
20	Arg Thr His Asp Tyr Thr Gly Ile Thr His Phe Ile Arg Pro Asn Phe	
	130 135 140	
	Ala Thr Glu Ser Ser Val Lys Lys Lys Asp Thr Lys Lys Pro Lys	
	145 150 155 160	
	Pro Ser Asn Arg Asp Gly Leu Asn Lys Asp Lys Ile Val Tyr Asp Arg	
25	165 170 175	
	Thr Asn Ile Asn Tyr Asn Met Val Leu Gln Gly Lys Ser Ala Ser Lys	
	180 185 190	
	Ile Thr Val Gly Ser Lys Ala Pro Tyr Asn Leu Lys Trp Ser Lys Gly	
	195 200 205	
30	Ile Tyr Phe Asn Ala Lys Ile Asp Gly Leu Gly Ala Thr Ser Ala Thr	
	210 215 220	
	Arg Tyr Gly Asp Asn Arg Thr Asn Tyr Arg Phe Asp Val Gly Gln Ala	
	225 230 235 240	
	Val Tyr Ala Pro Gly Thr Leu Ile Tyr Val Phe Glu Ile Ile Asp Gly	
35	245 250 255	
	Trp Cys Arg Ile Tyr Trp Asn Asn His Asn Glu Trp Ile Trp His Glu	
	260 265 270	
	Arg Leu Ile Val Lys Glu Val Phe	
	275 280	

40

(57) Формула изобретения

- Способ предотвращения, разрушения или эрадикации биопленки грам-положительных бактерий, включающих одну или более из бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus*, включающий:
 - приведение поверхности, содержащей биопленку, в контакт с композицией, содержащей измененный лизический фермент, где указанный измененный лизический фермент является эффективным для лизиса одной или более из бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus* в биопленке,

где указанный измененный литический фермент включает домен SH-3 PlySs2, содержащий SEQ ID NO: 4 или ее вариант, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью с полипептидом SEQ ID NO: 4 и являющийся эффективным для связывания одной или более из бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus* в биопленке, и

5 каталитический домен, представляющий собой домен СНАР лизина стрептококковых или стафилококковых фагов,

где биопленка разрушается или эрадицируется, или где образование биопленки предотвращается.

2. Способ по п.1, в котором поверхность включает поверхность медицинского

10 устройства.

3. Способ по п.2, в котором медицинское устройство представляет собой катетер, клапан, протезное устройство, помпу для введения лекарственных средств, стент или ортопедический материал.

4. Способ по п.1, в котором композиция дополнительно содержит один или более

15 антибиотиков.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что способ дополнительно включает приведение поверхности в контакт с одним или более антибиотиками.

6. Способ профилактики или лечения инфекции, ассоциированной с грам- положительной бактериальной биопленкой у субъекта, включающей одну или более

20 из бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus*, где указанный способ включает:

введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей измененный литический фермент, эффективный для лизиса одной или более из бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus* в биопленке на поверхности,

где указанный измененный литический фермент содержит домен SH3 PlySs2,

25 содержащий SEQ ID NO: 4 или ее вариант, обладающий по меньшей мере 80%

идентичностью с полипептидом SEQ ID NO: 4 и являющийся эффективным для

связывания одной или более из бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus* в биопленке, и каталитический домен, представляющий собой домен СНАР лизина стрептококковых или стафилококковых фагов,

30 где биопленка разрушается или эрадицируется, или где образование биопленки предотвращается.

7. Способ по п.6, в котором грам-положительная бактериальная биопленочная инфекция включает эндокардит, остеомиелит или инфекцию протеза сустава.

8. Способ по п.6 или 7, в котором грам-положительная бактериальная биопленочная

35 инфекция включает эндокардит.

9. Способ по п.6 или 7, в котором поверхность включает поверхность медицинского устройства, имплантированного субъекту.

10. Способ по п.9, в котором медицинское устройство представляет собой катетер, клапан, протезное устройство, помпу для введения лекарственных средств, стент или

40 ортопедический материал.

11. Способ по п.9, в котором медицинское устройство имплантируют в сердце или сосуды сердца субъекта.

12. Способ по п.11, в котором медицинское устройство представляет собой стент.

13. Способ по п.6, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит

45 один или более антибиотиков.

14. Способ по п.13, в котором один или более антибиотиков вводят субъекту до, во время или одновременно с введением фармацевтической композиции.

15. Способ по любому из пп.4, 5, 13 или 14, в котором один или более антибиотиков

включают гликопептид, цефалоспорин, макролид и/или пенициллин.

16. Способ по любому из пп.4, 5, 13 или 14, в котором один или более антибиотиков включают пенициллин, и где пенициллин включает оксациллин, ампициллин и/или клоксациллан.

⁵ 17. Способ по любому из пп.4, 5, 13 или 14, в котором один или более антибиотиков включают гликопептид, и где гликопептид включает ванкомицин и/или тейкопланин.

18. Способ по любому из пп.4, 5, 13 или 14, в котором один или более антибиотиков включают даптомицин, ванкомицин и/или линезолид.

¹⁰ 19. Способ по любому из пп.4, 5, 13 или 14, в котором один или более антибиотиков включают макролид, и где макролид включает эритромицин, кларитромицин, азитромицин и/или рокситромицин.

¹⁵ 20. Способ по любому из пп.1-6, в котором биопленка содержит одну или несколько бактерий *Staphylococcus* и/или *Streptococcus*, выбранных из *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equi* zoon, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus dysgalactiae*, Group G *Streptococcus*, Group E *Streptococcus* и *Streptococcus pneumoniae*.

²⁰ 21. Способ по любому из пп.1-6, в котором бактерии *Staphylococcus* и/или *Streptococcus* содержат антибиотик-резистентные бактерии и/или бактерии с измененной чувствительностью к антибиотику.

²⁵ 22. Способ по п.21, где антибиотик-резистентные бактерии включают метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA), ванкомицин-резистентные *Staphylococcus aureus* (VRSA), даптомицин-резистентные *Staphylococcus aureus* (DRSA) и/или линезолид-резистентные *Staphylococcus aureus* (LRSA), и бактерии с измененной чувствительностью к антибиотику включают *Staphylococcus aureus* с умеренной чувствительностью к ванкомицину (VISA).

³⁰ 23. Способ по любому из пп. 1-6, где измененный литический фермент представляет собой химерный полипептид лизина, и где указанный каталитический домен получен из лизина, отличного от PlySs2.

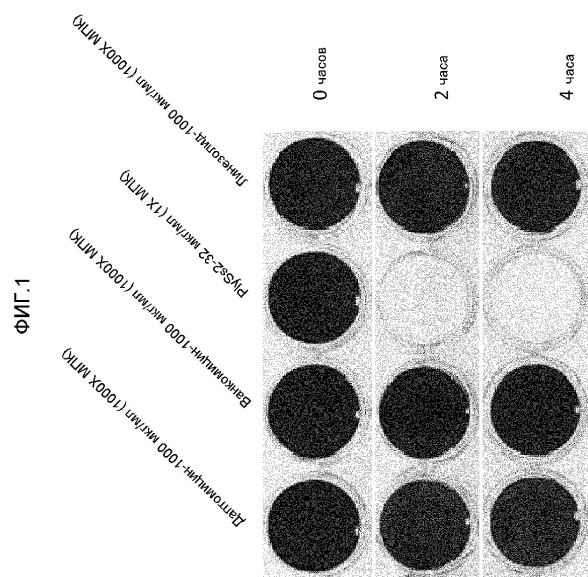
24. Способ по п. 1, где указанный домен CHAP представляет собой домен CHAP PlySs2, содержащий SEQ ID NO: 3 или его вариант, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью с полипептидом SEQ ID NO: 3.

25. Способ по п. 6, где указанный измененный литический фермент вводят субъекту в виде однократной дозы.

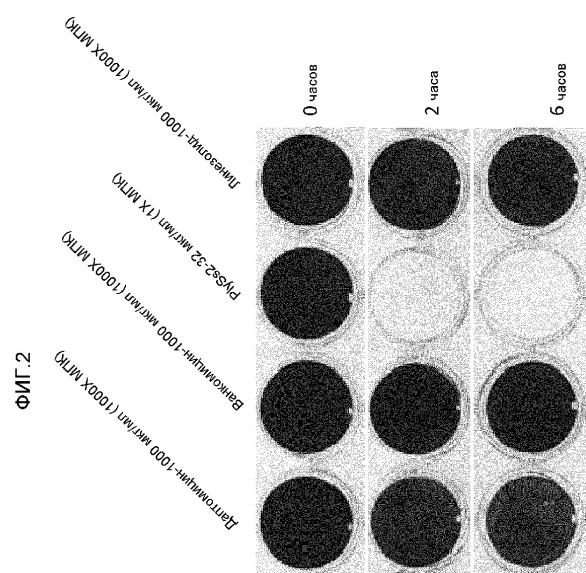
³⁵ 26. Способ по п. 6, где указанный измененный литический фермент вводят субъекту в виде многократных доз.

1

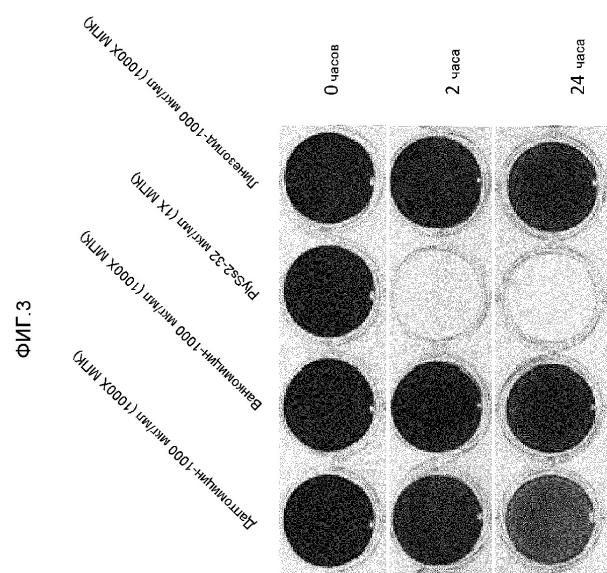
1/21



2

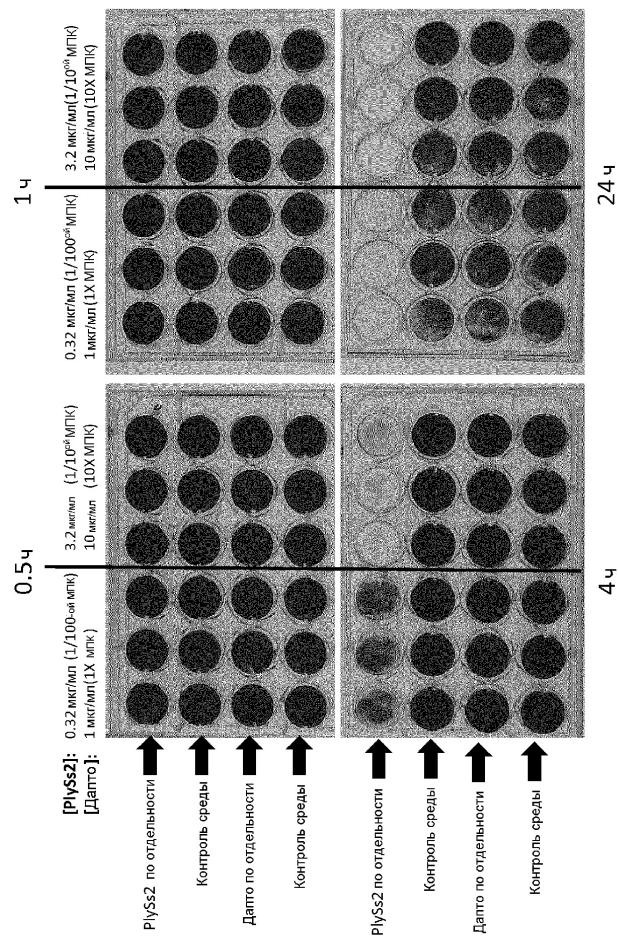


3/21



ФИГ. 4

Эффект PlySs2 (при 1/100-ой и 1/10-ой МПК) и даптомицина (при 1Х и 10X МПК) на биопленки S. aureus



ФИГ.5

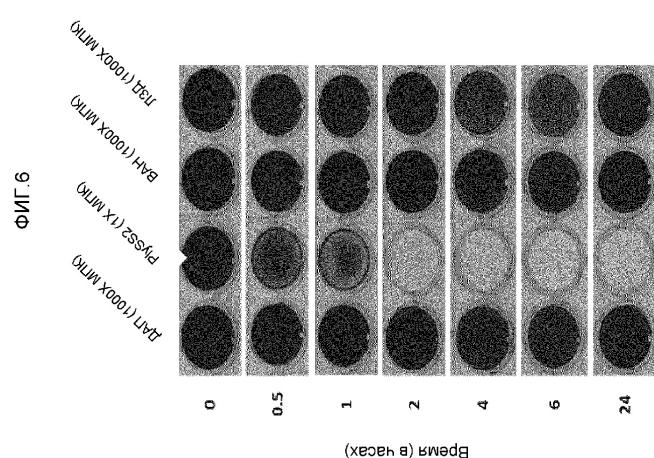
MTTVNEALNN VRAQVGSYS VGNGE¹CYALA SWYERMSPD A²T³VGLGAGVG WWSGAIGDTI SAKNIGSSYN
WQANGRIVST SGPERAQIV T⁴LGA⁵PGNPV GHVVIVEAVID GDR⁶LTILEQN YGGKRYPVEN YISAA⁷SYRQO
VYH⁸YIT⁹PGT VACSAANL¹⁰AG SRSYET¹¹GTM TVTD¹²DALN¹³Y RAPNTSGE¹⁴IV AVTRGE¹⁵SEFD YDTRV¹⁶IVDVRG
YWWVS¹⁷ZIGGS GRNRYVATGA TKDGKRF¹⁸FGNA WGTFK

CHAP Домен зеленого цвета LNNVR...VVIHYIT
SH3-5 Домен красного цвета RSYRE...GKRNYVAT



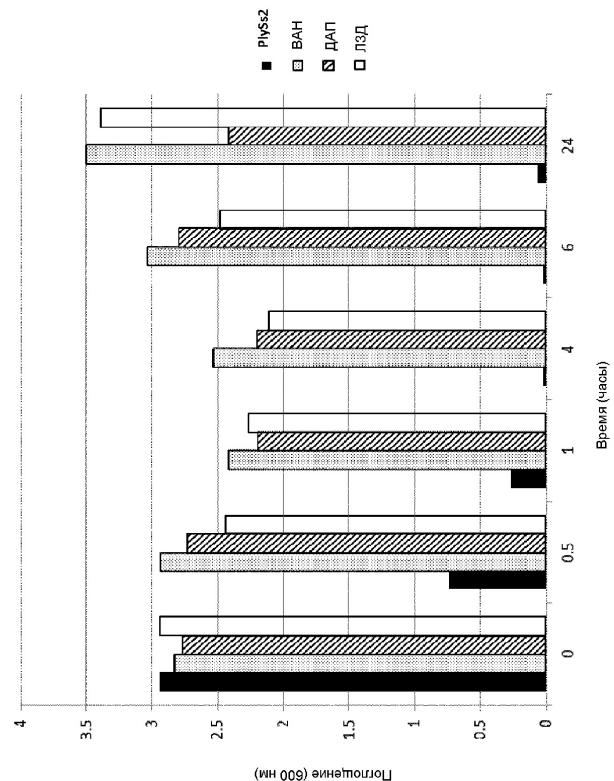
ATGACACAG TAATGAAGC ATTAATAAAT GTAAAGACTC AGGTGGTC CGGTGTGCT GTGGCAACG
CGAAAGCTA CGTTTGCT AGTGGTAGC AGCGCATGAT TAGICGGAT GCAACTGTC GACTGTGCC
TGGTG¹GGGC TG²GGTAGC³G GTGCAAT⁴TCGGCAAT⁵ CGATACAAT⁶ TCTG⁷CCAA⁸ ACATGGCTC ATCATACAA⁹
TGGCAAGCTA AGGCTGGAC AGT¹⁰TCACCA¹¹ TCTGG¹²CCAT TTAAAGCAGG TCAGATTG¹³TG AGC¹⁴GTGGGG
CAA¹⁵CCAGG AACCC¹⁶TAC GGACAGTGG TAAT¹⁷GTGA AGCA¹⁸TGGAC GGCA¹⁹ATGAT²⁰TG TGAT²¹ATTT
GGAGCAAAAC TACGGCGGA AACGT²²TATCC CGTCC²³GTAA²⁴ TATACAGG C²⁵GAZGCTA TCGUCA²⁶CAG
GTC²⁷GTCA²⁸TTT ACATCACACC GCCTGGCAGG GT²⁹CGACAGT CAGGACCCAA CCTTG³⁰CAGGC TCTG³¹GTCCT
ATGCCAGAC GGCACAT³²TG ACTGTCACGG TCGA³³GTCTC CAA³⁴ATGTCGC AGGGCGCAA ATACTTCAGG
CGAGA³⁵TTGA GCAGTATACA AGCGTGGTGA ATCAATTGAC TATGATAC³⁶TG TCATCATCGA TGTC³⁷ATGGC
TATGTC³⁸GGG TGCTTACAT AGGCGCAGC GGCA³⁹AACGT⁴⁰ ACTACGTTGC GACGGGCGCT ACCAAAGACG
GTAAGCG⁴¹TT CGCAATGCT TGGGT⁴²ACAT TTAA⁴³AA

6/21

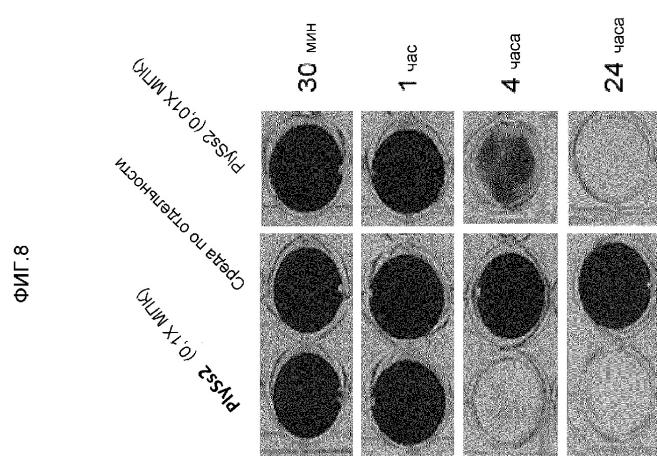


7/21

ФИГ.7

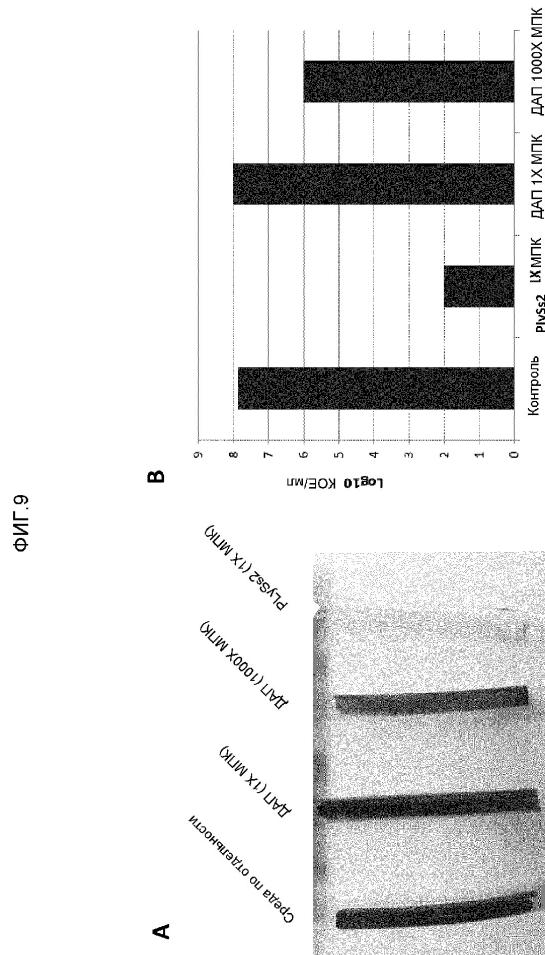


8/21

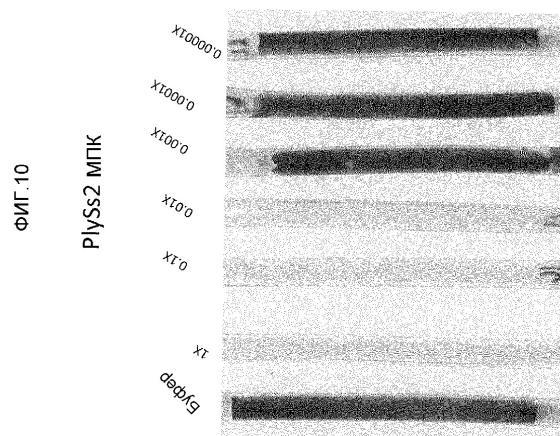


ФИГ.8

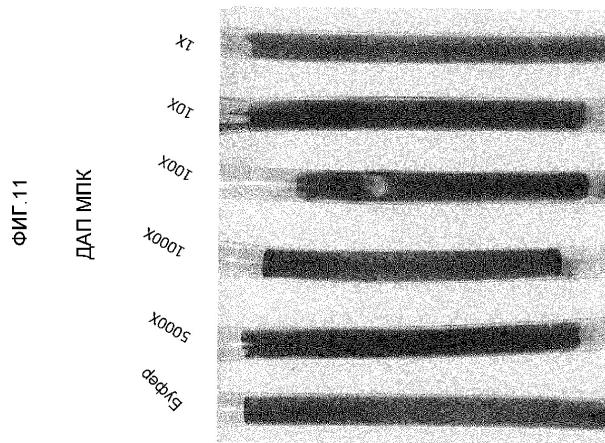
9/21



10/21



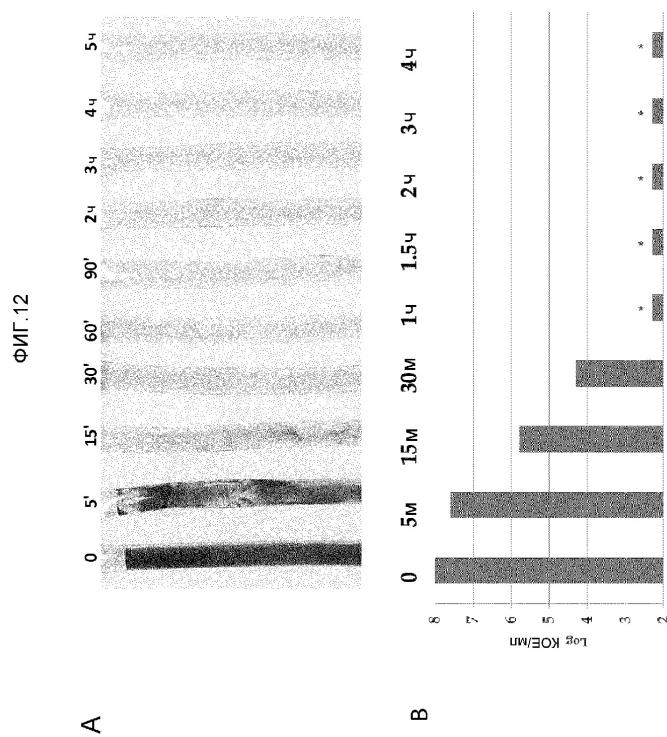
11/21



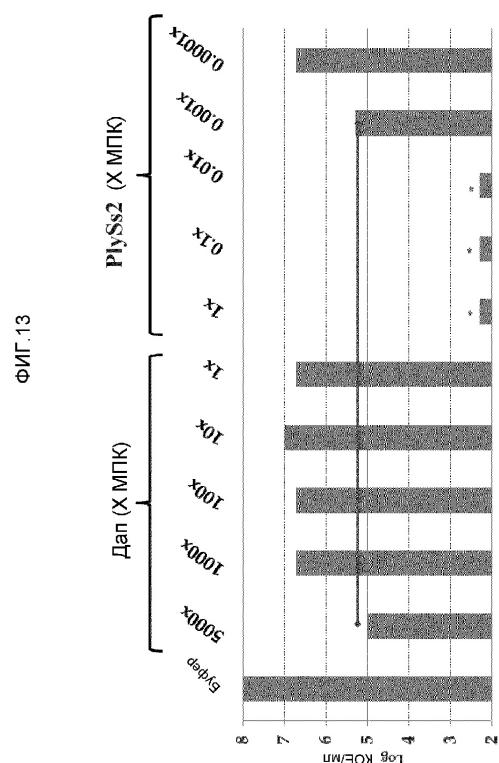
ФИГ.11

ДАГМПК

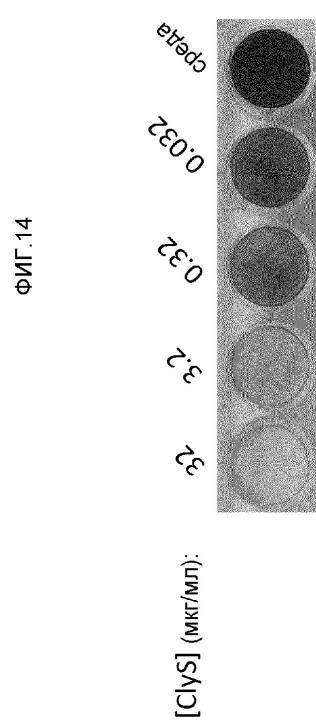
12/21



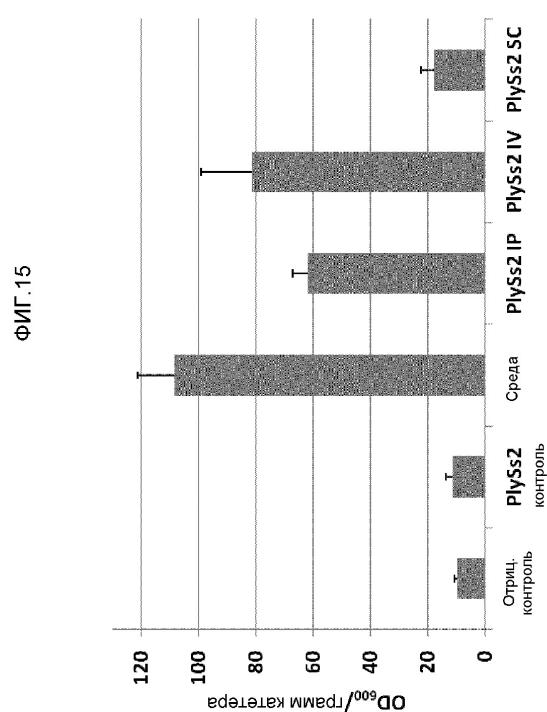
13/21



14/21

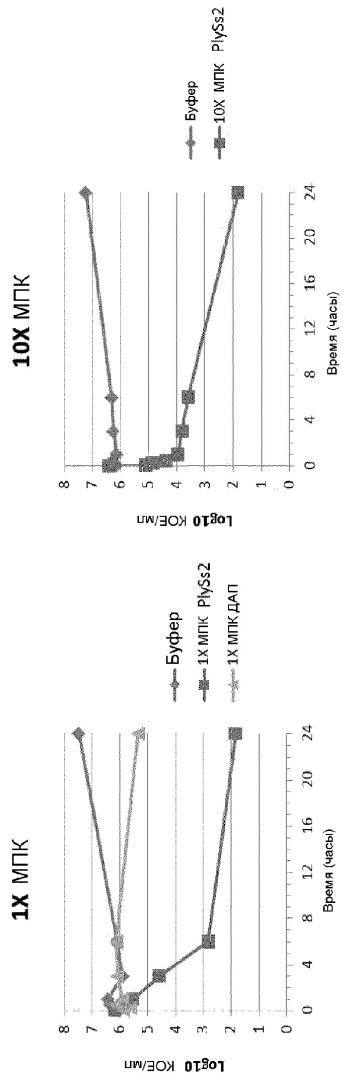


15/21

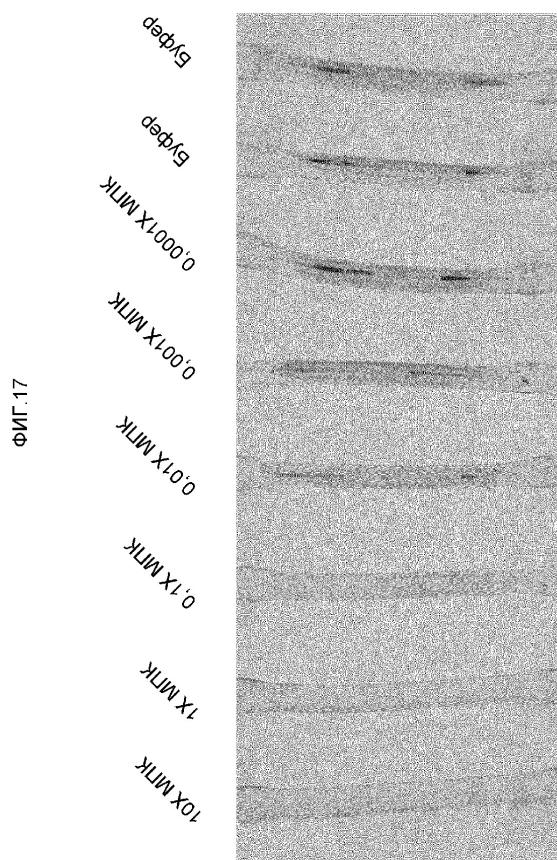


16/21

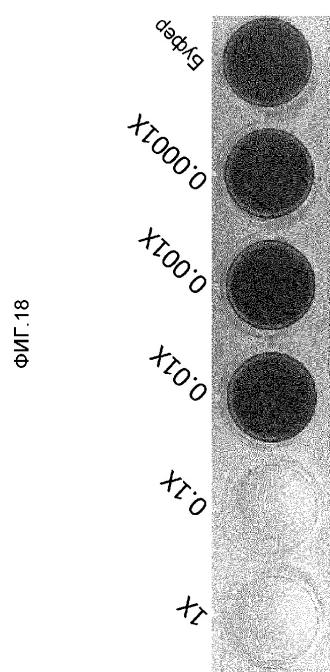
ФИГ.16



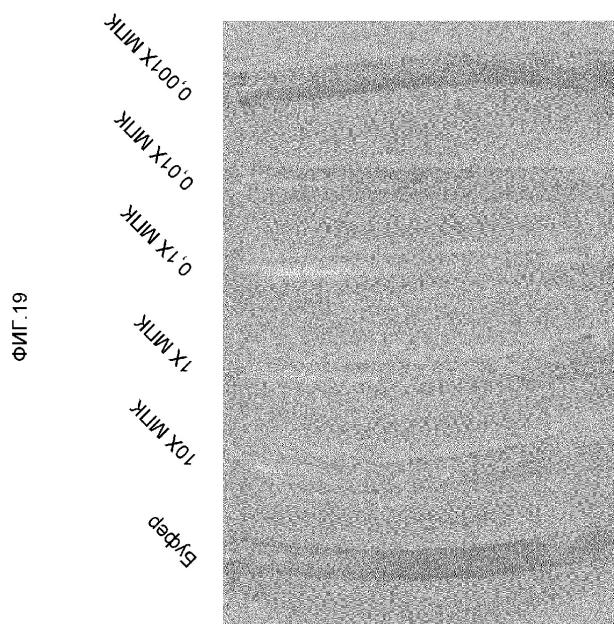
17/21



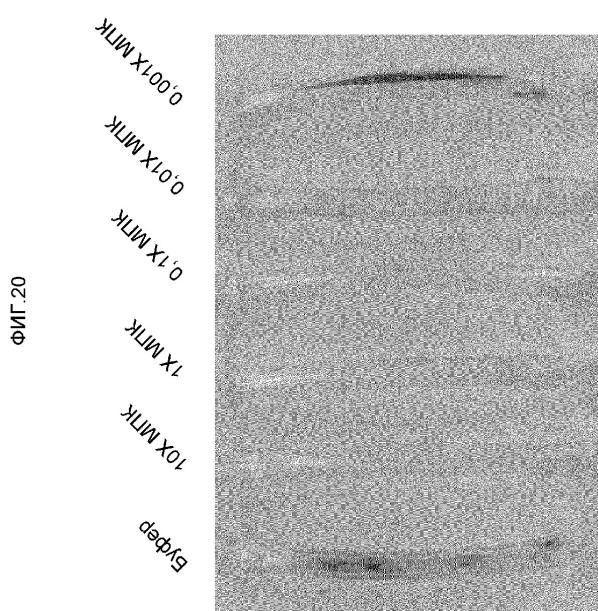
18/21



19/21



20/21



ФИГ. 20

21/21

ФИГ.21

