

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-517245

(P2023-517245A)

(43)公表日 令和5年4月24日(2023.4.24)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/56 (2006.01)	C 1 2 N	15/56		4 B 0 5 0
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/33 (2006.01)	C 1 2 N	15/33		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全70頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-554850(P2022-554850)	(71)出願人	522359855		
(86)(22)出願日	令和3年3月11日(2021.3.11)		テラム セラピューティクス エセ. エレ.		
(85)翻訳文提出日	令和4年11月7日(2022.11.7)		スペイン国 3 1 1 1 0 (ナバラ) ノ		
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/056264		アイン プラサ セイン 5 ビー1		
(87)国際公開番号	WO2021/180892	(74)代理人	110000796		
(87)国際公開日	令和3年9月16日(2021.9.16)		弁理士法人三枝国際特許事務所		
(31)優先権主張番号	20382177.2	(72)発明者	ディエス マルティネス ロベルト		
(32)優先日	令和2年3月11日(2020.3.11)		スペイン国 3 1 1 1 0 (ナバラ) ノ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		アイン プラサ セイン 5 ビー1 テラ		
(31)優先権主張番号	20382254.9	(72)発明者	モラレス アレイサーガ マリア		
(32)優先日	令和2年3月31日(2020.3.31)		スペイン国 3 1 1 1 0 (ナバラ) ノ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		アイン プラサ セイン 5 ビー1 テラ		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	F ターム (参考)	4B050 CC03 CC05 CC07 DD20		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 新たな組換え溶解素及びグラム陰性細菌感染の治療におけるその使用

(57)【要約】

新たな組換え溶解素及びグラム陰性細菌感染の治療におけるその使用。本発明は、新たな組換え溶解素と、抗生物質耐性グラム陰性細菌を排除し、新たな耐性の出現を最小限に抑える新たな治療アプローチにおける抗微生物剤としてのその使用とに関する。本発明は、本発明の組換え溶解素をコードするポリヌクレオチド、それを含むベクター及び宿主細胞、並びに関連する方法、医学的使用、組成物及びキットに更に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 配列番号 1 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが配列番号 1 の E 15、D 24、T 33 及び R 139 に対応する残基を有し、該変異体又はフラグメントが配列番号 1 のペプチドグリカンヒドロラーゼ活性の少なくとも 90 % を有する、配列番号 1 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメント、を含むか、又はそれからなるタンパク質であって、該タンパク質が配列番号 1 からなるものではない、タンパク質。

10

【請求項 2】

前記タンパク質がキメラタンパク質であり、

a) 配列番号 1 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントを含むか、又はそれからなるポリペプチドであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが配列番号 1 の E 15、D 24、T 33 及び R 139 に対応する残基を有するとともに、配列番号 1 のペプチドグリカンヒドロラーゼ活性の少なくとも 90 % を有する、ポリペプチドと、

b) 配列番号 2 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントを含むか、又はそれからなるポリペプチドであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが配列番号 2 の細胞透過活性の少なくとも 90 % を有する、ポリペプチドと、を含み、前記 (b) のポリペプチドが、前記 (a) のポリペプチドの C 末端で直接又はペプチドリinker を介して融合している、請求項 1 に記載のタンパク質。

20

【請求項 3】

前記タンパク質が、

a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるポリペプチドと、

b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるポリペプチドと、

を含み、前記 (b) のポリペプチドが、前記 (a) のポリペプチドの C 末端で直接又はペプチドリinker を介して融合している、請求項 1 又は 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

前記キメラタンパク質が、配列番号 3 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントを含むか、又はそれからなり、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが配列番号 3 の E 15、D 24、T 33 及び R 139 に対応する残基を有するとともに、グラム陰性細菌に対する配列番号 3 の静菌又は殺菌活性の少なくとも 90 % を有する、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

30

【請求項 5】

グラム陰性細菌に対する静菌又は殺菌活性を有する、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記グラム陰性細菌がアシネトバクター属、シュドモナス属、エシェリキア属及びクレブシエラ属からなる群より選択される 1 種以上である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のタンパク質。

40

【請求項 7】

前記グラム陰性細菌が E. コリ、K. ニューモニエ、A. バウマンニ及び P. エルギノサからなる群より選択される 1 種以上である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 8】

配列番号 3 のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のタンパク質。

50

【請求項 9】

配列番号 5 のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする核酸分子を含むポリヌクレオチド。

【請求項 11】

配列番号 6 を含むか、又は配列番号 6 からなる核酸配列と、

配列番号 7 を含むか、又は配列番号 7 からなる核酸配列と、

を含む、請求項 10 に記載のポリヌクレオチド配列。

10

【請求項 12】

請求項 10 又は 11 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のタンパク質を作製する方法であって、

i. 請求項 10 又は 11 に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを適切な宿主細胞に導入することと、

ii. 前記タンパク質の発現に適した条件下で前記宿主細胞を培養することと、

iii. 任意に、前記タンパク質を単離及び／又は精製することと、

を含む、方法。

20

【請求項 15】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 10 若しくは 11 に記載のポリヌクレオチド、請求項 12 に記載のベクター、又は請求項 13 に記載の宿主細胞を含む組成物。

【請求項 16】

医薬組成物であり、薬学的に許容可能な担体、ビヒクル又は賦形剤を更に含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 10 若しくは 11 に記載のポリヌクレオチド、請求項 12 に記載のベクター、請求項 13 に記載の宿主細胞、又は請求項 15 若しくは 16 に記載の組成物を含むキット。

30

【請求項 18】

被験体におけるグラム陰性細菌感染の予防処置及び／又は治療処置に使用される、配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のタンパク質、又はそれらのいずれかを含む医薬組成物。

【請求項 19】

1 つ以上の抗生物質と組み合わせて使用され、好ましくは該抗生物質がカルバペネムであり、より好ましくは該抗生物質がイミペネム及びメロペネムから選択される、請求項 18 に記載の使用のためのタンパク質又は医薬組成物。

40

【請求項 20】

前記グラム陰性細菌がアシネトバクター属、シュードモナス属、エシェリキア属及びクレブシエラ属からなる群より選択される 1 種以上である、請求項 18 又は 19 に記載の使用のためのタンパク質又は医薬組成物。

【請求項 21】

前記グラム陰性細菌が E. コリ、K. ニューモニエ、A. バウマンニ及び P. エルギノサからなる群より選択される 1 種以上である、請求項 18 ～ 20 のいずれか一項に記載の使用のためのタンパク質又は医薬組成物。

【請求項 22】

グラム陰性細菌の成長を阻害するか、グラム陰性細菌の集団を減少させるか、又はグラ

50

ム陰性細菌を死滅させる *in vitro* 方法であって、前記細菌と配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のタンパク質、又はそれらのいずれかを含む組成物とを接触させることを含む、*in vitro* 方法。

【請求項 23】

前記グラム陰性細菌がアシネトバクター属、シュドモナス属、エシェリキア属及びクレブシエラ属からなる群より選択される 1 種以上である、請求項 22 に記載のグラム陰性細菌の成長を阻害するか、グラム陰性細菌の集団を減少させるか、又はグラム陰性細菌を死滅させる *in vitro* 方法。

【請求項 24】

前記グラム陰性細菌が E. コリ、K. ニューモニエ、A. バウマンニ及び P. エルギノーサからなる群より選択される 1 種以上である、請求項 22 又は 23 に記載のグラム陰性細菌の成長を阻害するか、グラム陰性細菌の集団を減少させるか、又はグラム陰性細菌を死滅させる *in vitro* 方法。

10

【請求項 25】

材料及び／又は表面の消毒剤としての配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のタンパク質、又はそれらのいずれかを含む組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、臨床微生物学及び獣医微生物学の分野に関する。本発明は特に、新たな組換え溶解素と、抗生物質耐性グラム陰性細菌を排除し、新たな耐性の出現を最小限に抑える新たな治療アプローチにおける抗微生物剤としてのその使用とに関する。

【背景技術】

【0002】

1940 年代に抗生物質が導入されて以来、これらの強力な化合物は、ヒト及び動物における感染の治癒、表面微生物の排除、更には食品の保存に使用されてきた（非特許文献 1）。しかしながら、細菌はすぐに上記抗生物質に対する耐性の兆候を示し始め、1946 年に最初のペニシリン耐性ブドウ球菌が検出された（非特許文献 2、非特許文献 3）。抗生物質の乱用及び誤用が、ほぼ全ての病原性細菌における抗生物質耐性の出現及び拡散を引き起こし、利用可能な全ての抗生物質に耐性を示す細菌さえも存在する。抗生物質耐性細菌は、通常は細菌を死滅させるか又はその成長を制限する抗生物質の存在下で成長可能であるのに対し、多剤耐性（MDR）細菌は、2 つ以上の関連性のない抗生物質の存在下で成長可能である。臨床状況においては、抗生物質の不適切な使用（ウイルス感染における広域スペクトル抗生物質の使用等）が消費される全抗生物質の 20%～50% を占めている（非特許文献 4、非特許文献 5）。食品産業の分野では、抗生物質が畜産において動物の成長促進に、予防法として、またこれらの動物の感染の治療に使用されてきた（非特許文献 6）。食品産業において感染治療以外の目的で抗生物質が無差別に使用された結果、産業の生産環境において耐性病原体が出現している。現在、牧畜、養鶏及び水産養殖では医療用の様々な抗微生物薬が用いられている。上記薬物の幾つか、例えばフルオロキノロンは、ヒトにおけるグラム陰性細菌による感染の治療に不可欠であるため、人畜共通感染能を有する病原体における耐性の発現によって上記抗生物質の効力が危うくなる恐れがある（非特許文献 7）。病原性 MDR 細菌の出現及び拡散の結果として、一般細菌感染を効率的に治療することが不可能となる抗生物質後の時代に突入するリスクに対する意識が高まっている（非特許文献 8）。幾つかの国際研究から、抗微生物薬耐性に対する迅速なアプローチを見つけられなかった場合の一連の世界規模の壊滅的なシナリオが予想されている。上記研究により、2050 年には年間 1000 万人の死亡が予測される（非特許文献 9、非特許文献 10）。このリスクは、新たな療法の開発が現在非常に限られていることに加え、代替抗微生物薬、好ましくは耐性の発現を最小限に抑えるための新たな作用機序を有する代替抗微生物薬を探索する必要があることを意味している。

30

40

50

【0003】

これらの問題を受け、国連食糧農業機関（FAO）、国際獣疫事務局（OIE）又は世界保健機関（WHO）等の様々な国際機関がこのテーマについて多数の文書を発表している。これに関連して、欧州委員会は、抗微生物薬耐性に対する行動計画を立てるよう加盟国に要請し、抗生物質耐性の発現及び拡散との闘いを真に効果的なものにするために、複合的な（人間及び獣医の）観点の必要性を強調している。

【0004】

スペインでは、欧州委員会の要求への対応として、保健・消費・社会福祉省（MSCBS）が抗生物質耐性に対する国家計画（Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos－PRAN）を開始した。この計画には、様々な動物種における特定の抗生物質の消費の自発的削減等のヒト及び動物の健康のための一連の共通プログラム及び戦略的方針が含まれる。特に、スペインの主要な鶏肉生産者の団体（Organización Interprofesional de la Avicultura de Carne de Pollo－PROPOLLO）は、動物用飼料への抗生物質の使用を完全に排除することに加え、スペインの鶏肉産業において2年以内に総抗生物質消費量の45%の削減を達成することを主要目標として掲げている。コリスチンの具体的な事例においては、現在の4.7mg/kgから1mg/kgへの80%の削減を達成することが目標である。

【0005】

したがって、耐性微生物を排除し、抗菌薬に対する新たな耐性の出現を最小限に抑えるための新たな抗微生物剤及び新たな治療アプローチの開発が現在、急を要する課題となっている。より有望な又は従来の抗生物質を補完する代替物としては、特にバクテリオファージ（ファージ）及びその溶解酵素が挙げられる（非特許文献11、非特許文献12）。バクテリオファージは、自然界で最も豊富な生物学的実体の1つであり、抗生物質が発見される以前から治療剤としての可能性が広く知られている（非特許文献13）。しかしながら、西洋では、抗生物質の出現以降、バクテリオファージは脇に追いやられている。耐性微生物が引き起こす問題は現在、感染、特に多剤耐性微生物による感染の治療に可能性がある候補としてバクテリオファージに対する新たな関心を引き起こした（非特許文献13）。様々な研究グループが無傷ファージを抗生物質の代替物として使用する戦略の開発を試みている。さらに、ファージ成分を抗菌薬として単離及び最適化する研究も行われており、多剤耐性感染の治療の新たな扉が開かれる。

【0006】

特に、ファージ溶解素は、バクテリオファージが複製サイクルの最後に細菌宿主のペプチドグリカン（PG）を内部から分解し、細胞溶解及び子孫ウイルス粒子の放出をもたらすために使用される。溶解素が細菌に対して外因的に（「外部から」）作用する際にも、特にグラム陽性細菌の場合、グラム陰性菌とは異なり、外膜を欠くことから細胞壁がより露出しているため、この殺菌効果が持続することが報告されている。この特性から、このタイプの酵素は、「エンザイバイオティック（enzymiotics）」とも呼ばれる抗微生物剤の候補となっている（非特許文献14、非特許文献15）。このことは、文献に広く記載されており、A群レンサ球菌による感染の予防（非特許文献16）、又はエンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）及びエンテロコッカス・フェシウム（*Enterococcus faecium*）（非特許文献17）、クロストリジウム・パーFRINGENS（*Clostridium perfringens*）（非特許文献18）、B群レンサ球菌（非特許文献19）による感染、並びにストレプトコッカス・ニューモニアエ（*Streptococcus pneumoniae*）（非特許文献20）による感染に起因する敗血症の抑制のために溶解素が治療剤として使用され得ることが実証されている。

【0007】

従来の抗生物質と比べたエンドリシンの利点は、或る特定のPG型に対する高い特異性であり、概して、その抗微生物作用は或る特定の細菌の属、種又は更には血清型のメンバーに限られる。この近種特異性は、広範囲の抗生物質の使用と関連することが多い耐性（片利共生）株の発生のリスクを大幅に低下させ、共生細菌又は付随する微生物叢の望まし

10

20

30

40

50

い生物に影響を与えることなく、所与の標的病原体を選択的に死滅させることを可能にする（非特許文献15）。PGヒドロラーゼの別の利点は、成長細胞に対して効果的であるだけでなく、非分裂細胞又はゆっくり成長する細胞、例えばバイオフィームも標的とすることである。

【0008】

近年、改善された特性を有する組換え溶解素を得るために巨額の投資が行われており、溶解素誘導体が抗生物質耐性細菌との闘いにおいて最も有望な代替物の1つとなっている。これらの改善された特性としては、溶解活性の上昇（非特許文献21、非特許文献22）、殺菌スペクトルの拡大（非特許文献23、非特許文献24、非特許文献25、非特許文献26）、及びグラム陰性細菌に対する溶解素の適用（非特許文献27、非特許文献28、非特許文献29、非特許文献30、特許文献1及び特許文献2）が挙げられる。

10

【0009】

グラム陰性細菌は、その独特の細胞エンベロープによってもたらされる透過障壁のために多くの抗生物質に対して本質的に耐性を示す。このエンベロープは、ペリプラズム空間によって隔てられる外膜（OM）と内膜（IM）とのみからなる。OMは、リン脂質が内葉にのみ分配され、リポ多糖（LPS）のリピドA部分が外葉を形成する非対称の脂質二重層である。OMのLPS層は、細胞外環境の有害な化合物に対する保護層を与える上で重要な成分である。IMは通常のリン脂質二重層である。2つの膜の間には、ペプチドグリカン層が位置する粘性の細胞内コンパートメントであるペリプラズムが存在する（非特許文献31）。

20

【0010】

溶解酵素が細菌の外側からPGにアクセスすることが外膜（OM）によって妨げられるため、溶解素によるグラム陰性細菌の処理は、より困難なものであった。OMは高分子に不透過性であり、そのLPSで覆われた表面を通して疎水性物質の限られた拡散しか許容しない（非特許文献32）。エンドリシンは、複数の溶解ドメイン及び／又は細胞壁結合ドメイン（CBD）を有することが多いモジュール構造を有することを特徴とする。溶解素をグラム陰性細菌に対して活性にするために、OMの移動を促進する遺伝子組換え構築物が近年記載されている（非特許文献14、非特許文献15）。

【0011】

アプローチの1つは、特許文献3又は特許文献4に記載されているようにPGヒドロラーゼを様々なカチオン性ペプチド、ポリカチオン性ペプチド又は他の膜破壊ペプチドに融合させることを含む。代替的なアプローチは、OM透過特性を有するペプチドとの融合を含む。特に、非特許文献29には、2つのカチオン性領域を含む、バチルス・アミロリクエファシエンス（*Bacillus amyloliquefaciens*）ファージに由来するLys1521のD8ドメインに融合したE. コリ（*E. coli*）バクテリオファージ溶解素（Lys3）が記載されている（非特許文献33）。Lys3／D8融合タンパク質がグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌の両方に対して溶解活性を有することが非特許文献29に報告されている。特に、溶解効果が14種のE. コリ株、3種のシュードモナス・エルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）株、1種のアシネトバクター・バウマンニ（*Acinetobacter baumannii*）株及び1種のストレプトコッカス株において観察されることが言及されている。このため、このキメラエンドリシンは、グラム陰性細菌に選択的ではない。

30

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際公開第2015／200783号

【特許文献2】国際公開第2017／049233号

【特許文献3】国際公開第2010149792号

【特許文献4】国際公開第2011023702号

【非特許文献】

50

【0013】

- 【非特許文献1】Farber, L. et al. 1959
- 【非特許文献2】Davies, J. & Davies, D. 2010
- 【非特許文献3】Frankel, R.B. et al. 2006
- 【非特許文献4】Tenover, F.C. 2006
- 【非特許文献5】Starrels, J.L. et al. 2009
- 【非特許文献6】Lekshmi M. et al. 2017
- 【非特許文献7】Smith, K.E. et al. 1999
- 【非特許文献8】WHO Report 2007
- 【非特許文献9】O'Neill, J. 2016
- 【非特許文献10】Adeyi, O.O. et al. 2017
- 【非特許文献11】Hojckova, K. et al. 2013
- 【非特許文献12】Czaplewski, L. et al. 2016
- 【非特許文献13】Hermoso J.A. et al. 2007
- 【非特許文献14】Nelson D., et al 2012
- 【非特許文献15】Schmelcher, M. et al. 2012
- 【非特許文献16】Pires, D.P. et al. 2016
- 【非特許文献17】Nelson D., et al. 2001
- 【非特許文献18】Yoong P. et al. 2004
- 【非特許文献19】Zimmer M. et al. 2002
- 【非特許文献20】Cheng Q. et al. 2005
- 【非特許文献21】McCullers J.A. et al. 2007
- 【非特許文献22】Schmelcher M. et al. 2011
- 【非特許文献23】Diez-Martinez, R. et al. 2015
- 【非特許文献24】Becker S.C. et al. 2009
- 【非特許文献25】Yang H. et al. 2015
- 【非特許文献26】Yang H. et al. 2016
- 【非特許文献27】Briers Y. & Lavigne 2015
- 【非特許文献28】Briers Y. et al. 2014
- 【非特許文献29】Wang, S. et al. 2017
- 【非特許文献30】Heselpoth, R.D. et al. 2019
- 【非特許文献31】Masi et al. 2017
- 【非特許文献32】Vaara M., 1992
- 【非特許文献33】Morita et al. 2001

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

しかしながら、近年の進歩にもかかわらず、MDR細菌を根絶し、更なる耐性の発現を首尾よく防ぐ目的で、改善された特性を有する新規の溶解素を探索する必要がある。特に、外部からの投与によってグラム陰性細菌を溶解する能力を有し、毒性がなく、狭い範囲の近縁病原体に特異的な新たな溶解素を特定することが継続的に必要とされている。グラム陰性細菌の中でも、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) における抗生物質耐性は、これがヒトに最もよく見られるグラム陰性病原体であることから特に懸念されている。例えば、2017年の欧州のサーベイランスでは、E. コリMDRの有病率は、12%～50%の範囲であった (European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018)。

【0015】

加えて、E. コリ、K. ニューモニエ (*K. pneumoniae*)、P. エルギノーサ (P.

aeruginosa) 及び／又はアシネトバクター種によって引き起こされるようなグラム陰性感染の治療において、(例えば、溶解素を抗生物質と組み合わせて使用することで) 抗生物質に取って代わる及び／又は抗生物質の使用を減らす所望の安全性、効力及び選択性を有する新たな組換え溶解素を発見する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

一態様において、本発明は、PGヒドロラーゼ活性を有するドメインと、OMの透過性を高める細胞透過性ドメインとを含む新たな組換えエンドリシンを提供する。

【0017】

本発明のキメラタンパク質は、グラム陰性細菌、特にE. コリ、K. ニューモニエ、A. バウマンニ (A. baumannii) 及びP. エルギノーサに対して高い殺菌効力を呈することが示された。この新たなエンザイバイオティックは、哺乳動物細胞にとって安全であり、グラム陰性細菌、特にE. コリ、K. ニューモニエ、A. バウマンニ及びP. エルギノーサに対してかなりの程度の選択性を有し、ニフトリの微生物叢からのグラム陽性細菌に影響を与えないことも本発明者らによって示された。

10

【0018】

本発明のキメラタンパク質 (すなわち、IKB206) を用いて行った *in vitro* アッセイにおいては、キメラ酵素が、非常に低い濃度 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) で、品質管理試験によく使用されるE. コリATCC 25922血清型O6参照株 (Minogue et al, 2014) の数を15分間で有意に減少させることが可能であったことを観察することができ (図3)。さらに、IKB206の濃度を $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで高めた場合、細胞数を僅か5分間で有意に減少させることができ、細胞を30分間インキュベートすると懸濁液中に存在する全ての細胞を死滅させることができた ($5 \log$)。これらの結果は、 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ と低い用量で、膜破壊剤を使用せずに得られた。さらに、この酵素は、 $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度にて僅か15分間のインキュベーション時間で培養物全体を死滅させることができた。

20

【0019】

驚くべきことに、得られた効力は、E. コリバクテリオファージ溶解素 (Lysep3) をバチルス・アミロリクエファシエンスファージに由来するLys1521のD8ドメインに融合した、非特許文献29に記載のものよりも顕著に高い (非特許文献33、Orto Y. et al. 2004)。

30

【0020】

実際に、非特許文献29においては、アッセイは $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質濃度で行われたが、本発明のキメラタンパク質の場合、僅か15分間のインキュベーション後に $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度、すなわち4倍低い量で殺菌効果 ($3 \log$ を超える減少) が観察された (図3A及び図3Bを参照されたい)。さらに、本発明のキメラタンパク質は、僅か30分間のインキュベーション期間で全ての細胞を死滅させることができると示されたが、Wang, S. et al. のタンパク質は、2時間のインキュベーション時間で $1 \log$ 又は $2 \log$ の減少しか達成することができなかった。加えて、Wang, S. et al. は、最も臨床的に関連するE. コリ血清型であるO157:H7に対する殺菌活性を実証することができなかったが、本発明のキメラ溶解素は、この血清型に対して優れた活性を呈した (図4A及び図4B)。

40

【0021】

さらに、IKB206の殺菌活性をニフトリから単離されたMDR E. コリ株に対しても決定した。IKB206が $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ で30分間のインキュベーション後にアッセイにおいて存在する細菌の数の $2 \log \sim 5 \log$ (100 倍 ~ 100000 倍) の減少を有意に達成することが可能であることが観察された (図5)。

【0022】

一方、IKB206は、抗生物質耐性株を含む、試験したK. ニューモニエ、A. バウマンニ及びP. エルギノーサ株に対して高い殺菌活性を示した (図7及び図8)。IKB

50

206は、 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度及び120分間のインキュベーション時間で試験した全ての株に対して殺菌活性を示す。さらに、 $150\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度及び120分間のインキュベーションでは、キメラタンパク質は、アッセイにおいて存在する全ての細胞を死滅させることが可能である。

【0023】

腸内微生物叢の組成が免疫機能制御 (Hooper, L.V. et al. 2012)、代謝恒常性制御 (Ley, R.E. et al. 2006、Cani, P.D. & Delzenne, N.M. 2009) 又は医薬品代謝制御 (Claus, S.P. et al. 2011) を含む広範な機構によってヒト及び動物の健康の両方に大きな影響を与えることがよく知られている。抗微生物薬の使用は、その後の代謝の低下を伴う微生物叢の多様性の低下と関連付けられている (Schulfer A.F. et al. 2018、Le Roy, C.I. et al. 2019)。したがって、抗微生物薬が宿主微生物叢に影響を及ぼすか否かを決定することが重要である。

10

【0024】

本発明のキメラタンパク質がニワトリの腸内微生物叢に存在する他の細菌に対して死滅効果を有するかを決定するために、IKB206を用いて *in vitro* アッセイを行い、ニワトリの腸内微生物叢の一部である種々の細菌種に対するその殺菌効果を決定した。上記アッセイにおいて、飼育ニワトリの腸内微生物叢の一部として研究した種がIKB206の影響を受けず、腸内微生物叢の点で安全な治療が得られることが観察された (図6)。

20

【0025】

ドメインの構造モデリング及び配列アラインメントから、IKB206の触媒ドメインがT4リゾチーム様エンドリシンに属し、残基E15、D24及びT33が酵素の触媒三残基を形成することが示唆された (図9)。

【0026】

驚くべきことに、本発明者らは、触媒ドメイン (配列番号1) 自体がグラム陰性細菌に対して固有の殺菌活性を有することを見出した。特に、 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のIKB206ΔD8は、E. コリ株ATCC 25922に対して60分後に約3 logのCFU/mLの減少を誘導し、180分で約5 logの減少に達することが見出された (図10)。

30

【0027】

得られた結果を踏まえて、ゼブラフィッシュ動物モデルにおいて一連の *in vivo* アッセイを行った。図11に示されるように、IKB206は、特に $1\mu\text{g}/\text{g}$ の用量でE. コリATCC 25922の感染による死に対して保護効果を示した (66.6%の生存)。

【0028】

さらに、ヒト細胞に対する毒性研究を *in vitro* で行った (図12)。タンパク質IKB206が試験濃度/投与量で毒性を有しないことが観察された。これらの結果から、本発明の組換え溶解素がヒト又は動物におけるE. コリ等のグラム陰性細菌による感染の予防処置及び/又は治療処置への使用に安全であることが示唆される。

40

【0029】

最後に、本発明者らは、本発明のキメラタンパク質とMDR E. コリ株に対して最も一般的に使用される幾つかの抗生物質との間、特にカルバペネム系の抗生物質との組合せの相乗効果の可能性を評定した。チェッカーボード実験から、メロペネム及びイミペネムについて相乗効果が示唆された (表3及び表4並びに図13A及び図13B)。これらの結果は、E. コリATCC 25922株を用いた細菌死滅アッセイによって確認された (図14A及び図14B)。

【0030】

したがって、第1の態様において、本発明は、

a) 配列番号1のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体

50

又はフラグメントが配列番号 1 のペプチドグリカンヒドロラーゼ活性の少なくとも 90 % を有する、配列番号 1 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 60 % の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントを含むタンパク質、又はそれからなるタンパク質であって、該タンパク質が配列番号 1 からなるものではない、タンパク質に関する。

【0031】

第 2 の態様において、本発明は、

a) 配列番号 1 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 60 % の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなるポリペプチドであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが生物活性ポリペプチドであり、特に、該変異体又はフラグメントが配列番号 1 のペプチドグリカンヒドロラーゼ活性の少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、より好ましくは少なくとも 96 %、97 %、98 %、98 %、99 % 又は 100 % を有する、ポリペプチドと、

10

b) 配列番号 2 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 60 % の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなるポリペプチドであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが生物活性ポリペプチドであり、特に、該変異体又はフラグメントが配列番号 2 の細胞透過活性の少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、より好ましくは少なくとも 96 %、97 %、98 %、98 %、99 % 又は 100 % を有する、ポリペプチドと、
を含むキメラタンパク質に関する。

20

【0032】

第 3 の態様において、本発明は、本明細書に記載されるタンパク質（キメラタンパク質を含む）をコードする核酸分子を含むポリヌクレオチドに関する。

【0033】

第 4 の態様において、本発明は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むベクターに更に関する。

【0034】

第 5 の態様において、本発明は、本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞に関する。

【0035】

第 6 の態様において、本発明は、本発明のタンパク質（キメラタンパク質を含む）を作製する方法であって、

i. 本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むベクターを適切な宿主細胞に導入することと、

ii. 上記タンパク質の発現に適した条件下で宿主細胞を培養することと、

iii. 任意に、上記タンパク質を単離及び／又は精製することと、

を含む、方法に関する。

【0036】

第 7 の態様において、本発明は、本明細書に記載されるタンパク質（キメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞を含む組成物に関する。

40

【0037】

第 8 の態様において、本発明は、グラム陰性細菌による細菌感染の予防処置及び／又は治療処置に使用される、本明細書に記載されるタンパク質（配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞又は医薬組成物（以下、「本発明による作用物質」と総称する）を提供する。

【0038】

第 9 の態様において、本発明は、グラム陰性細菌による細菌感染の予防処置及び／又は治療処置のための薬剤の製造における本明細書に記載されるタンパク質（配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質

50

を含む)、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞又は医薬組成物の使用に関する。

【0039】

第10の態様において、本発明は、細菌感染と診断された、そのリスクがある又はその症状を示す被験体に、有効量の本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞を含有する組成物を投与することを含む、グラム陰性細菌による細菌感染の予防処置及び／又は治療処置の方法に関する。

【0040】

第11の態様において、本発明は、本発明によるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞の1つ以上と薬学的に許容可能な担体、ビヒクル又は賦形剤とを混合することを含む、医薬組成物を調製するプロセスに関する。

【0041】

第12の態様において、本発明は、本明細書に定義されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞又は組成物を単独又は組合せて含むキットに関する。

【0042】

第13の態様において、本発明は、グラム陰性細菌の成長を阻害するか、又はグラム陰性細菌の集団を減少させるか、又はグラム陰性細菌を死滅させる *in vitro* 方法であって、細菌と本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞又は組成物とを接触させることを含む、*in vitro* 方法に関する。

【0043】

第14の態様において、本発明は、タンパク質又はコードされるポリペプチドがグラム陰性細菌の成長を阻害するか、グラム陰性細菌の集団を減少させるか、又はグラム陰性細菌を死滅させる特性を有する、本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド又は発現ベクター又は宿主細胞を提供する。

【0044】

第15の態様において、本発明は、本明細書に記載されるグラム陰性細菌感染を治療及び／又は予防する方法に使用される、本明細書に記載される本発明の作用物質（例えば、タンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、発現ベクター又は宿主細胞）、又はそれを含む医薬組成物にも関し、上記治療は、別の薬物と組み合わせた本明細書に記載される本発明の作用物質の投与を含む。

【0045】

本発明は、本明細書に記載される本発明の作用物質と本明細書に記載される別の薬物、好ましくは抗生物質とを用いる併用療法による本明細書に記載されるグラム陰性細菌感染の治療及び／又は予防のための薬剤の製造への本明細書に記載される本発明の作用物質の使用にも関する。

【0046】

本発明は、本明細書に記載されるグラム陰性細菌感染を治療及び／又は予防する方法であって、かかる治療を必要とする患者に治療有効量の本明細書に記載される本発明の作用物質を治療有効量の本明細書に記載される別の薬物、好ましくは抗生物質と組み合わせて投与することを含む、方法に更に関する。

【0047】

更なる態様において、本発明は、病院だけでなく一般世帯における材料及び／又は表面の消毒剤としての本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなる

10

20

30

40

50

タンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む)の使用にも関する。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】A)上、IKB206(配列番号3)の概略図。数字はアミノ酸の位置を示す。白色のボックスは、ファージAryaエンドリシンに対応し、黒色のボックスは、B. アミロリクエファシエンス(B. amyloliquefaciens)ファージ溶解素ドメインD8に対応する。下、キメラIKB206のアミノ酸配列。白色のボックス内の文字は、ファージAryaエンドリシンのアミノ酸に対応し、黒色のボックス内の文字は、B. アミロリクエファシエンスファージ溶解素ドメインD8のアミノ酸に対応する。B)上、IKB206タグ(配列番号5)の概略図。数字はアミノ酸の位置を示す。黒色及び白色の四角のボックスは、Sタグ及びトロンピン切断部位に対応し、白色のボックスは、ファージAryaエンドリシンに対応し、黒色のボックスは、B. アミロリクエファシエンスファージ溶解素ドメインD8に対応し、斜線のボックスは、トロンピン切断部位及びHisタグに対応する。下、キメラIKB206タグのアミノ酸配列。太字はSタグ及びHisタグのアミノ酸に対応し、下線付き文字はトロンピン切断部位のアミノ酸に対応し、白色のボックス内の文字は、ファージAryaエンドリシンのアミノ酸に対応し、黒色のボックス内の文字は、B. アミロリクエファシエンスファージ溶解素ドメインD8のアミノ酸に対応する。C)上、IKB206ΔD8(配列番号1)の概略図。数字はアミノ酸の位置を示す。白色のボックスは、ファージAryaエンドリシンに対応する。下、IKB206ΔD8のアミノ酸配列。

10

20

【図2】A)精製IKB206タグ、B)精製IKB206及びC)IKB206ΔD8の4%~12%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を示す図である。

【図3】E. コリ株ATCC 25922に対するIKB206タグの殺菌効果を示す図である。E. コリ培養物を緩衝液に再懸濁し、細菌懸濁液を 10^5 コロニー形成単位(CFU)/mLに調整し、培養物を酵素の非存在下(緩衝液)又は存在下にて37℃で2時間インキュベートした。データは4回の独立実験の代表である。生存細胞は、LB寒天プレート中で計数することによって決定した。A)異なる酵素濃度の存在下での経時的なCFU/mLの減少に対する発現IKB206タグの殺菌効果。B)異なる酵素濃度の存在下での経時的なlog数の減少に対する発現IKB206タグの殺菌効果。エラーバーは標準誤差を表す。星印は、正規分布及び等分散性を示すサンプルの場合には一元ANOVA検定に続くチューキー検定、正規分布を示さないか、又は分散の不均一性を示すサンプルの場合にはクラスカルウォリス検定に続くマンホイットニーU検定に従う、対照(緩衝液)に対する有意差(* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$)を表す。

30

【図4】E. コリ血清型O157:H7に対するIKB206タグの殺菌効果を示す図である。E. コリ培養物を緩衝液に再懸濁し、細菌懸濁液を 10^5 CFU/mLに調整し、培養物を酵素の非存在下又は存在下にて37℃で2時間インキュベートした。データは5回の独立実験の代表である。生存細胞は、LB寒天プレート中で計数することによって決定した。A)15μg/mLの酵素の存在下での経時的なCFU/mLの減少に対する発現IKB206タグの殺菌効果。B)15μg/mLの酵素の存在下での経時的なlog数の減少に対する発現IKB206タグの殺菌効果。エラーバーは標準誤差を表す。星印は、正規分布及び等分散性を示すサンプルの場合にはT検定、正規分布を示さないか、又は分散の不均一性を示すサンプルの場合にはマンホイットニーU検定に従う、対照(緩衝液)に対する有意差(* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$)を表す。

40

【図5】E. コリ多剤耐性株に対するIKB206タグの殺菌効果を示す図である。E. コリ培養物を緩衝液に再懸濁し、細菌懸濁液を 10^5 CFU/mLに調整し、培養物を酵素の非存在下又は存在下にて37℃で2時間インキュベートした。データは3回~5回の独立実験の代表である。生存細胞は、LB寒天プレート中で計数することによって決定し

50

た。A、C及びE) $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素の存在下での経時的なCFU/mLの減少に対する発現IKB206タグの殺菌効果。B、D及びF) $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素の存在下での経時的なlog数の減少に対する発現IKB206タグの殺菌効果。エラーバーは標準誤差を表す。星印は、正規分布及び等分散性を示すサンプルの場合にはT検定、正規分布を示さないか、又は分散の不均一性を示すサンプルの場合にはマンホイットニーU検定に従う、対照(緩衝液)に対する有意差(* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$)を表す。

【図6】ニワトリの微生物叢の様々な株に対するIKB206タグの殺菌効果を示す図である。培養物を緩衝液に再懸濁し、細菌懸濁液を $10^3 \text{CFU}/\text{mL} \sim 10^5 \text{CFU}/\text{mL}$ に調整し、培養物を酵素の非存在下又は存在下にて 37°C で2時間インキュベートした。データは4回又は5回の独立実験の代表である。生存細胞は、LB寒天プレート中で計数することによって決定した。A、C、E及びG) $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素の存在下での経時的なCFU/mLの減少に対する発現IKB206タグの殺菌効果。B、D、F及びH) $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素の存在下での経時的なlog数の減少に対する発現IKB206タグの殺菌効果。エラーバーは標準誤差を表す。星印は、正規分布及び等分散性を示すサンプルの場合にはT検定、正規分布を示さないか、又は分散の不均一性を示すサンプルの場合にはマンホイットニーU検定に従う、対照(緩衝液)に対する有意差(* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$)を表す。

【図7】E. コリ以外の腸内細菌の種に対するIKB206の殺菌効果を示す図である。培養物を緩衝液に再懸濁し、細菌懸濁液を約 $10^4 \text{CFU}/\text{mL} \sim 10^6 \text{CFU}/\text{mL}$ に調整し、培養物を酵素の非存在下又は存在下にて 30°C (E. クロアカエ(*E. cloacae*)及びS. マルセッセンス(*S. marcescens*))又は 37°C (C. フロインディイ(*C. freundii*)及びK. ニューモニエ)で2時間インキュベートした。データは2回~4回の独立実験の代表である。生存細胞は、LB寒天プレート中で計数することによって決定した。A、C、E、G、I、K及びM) $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素の存在下での経時的なCFU/mLの減少に対する発現IKB206の殺菌効果。B、D、F、H、J、L及びN) $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素の存在下での経時的なlog数の減少に対する発現IKB206の殺菌効果。エラーバーは標準誤差を表す。星印は、正規分布及び等分散性を示すサンプルの場合にはT検定、正規分布を示さないか、又は分散の不均一性を示すサンプルの場合にはマンホイットニーU検定に従う、対照(緩衝液)に対する有意差(* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$)を表す。

【図8】他の非腸内細菌グラム陰性細菌の種に対するIKB206の殺菌効果を示す図である。培養物を緩衝液に再懸濁し、細菌懸濁液を約 $10^5 \text{CFU}/\text{mL} \sim 10^6 \text{CFU}/\text{mL}$ に調整し、培養物を酵素の非存在下又は存在下にて 37°C で2時間インキュベートした。データは4回の独立実験の代表である。生存細胞は、LB寒天プレート中で計数することによって決定した。A、C、E及びG) $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素の存在下での経時的なCFU/mLの減少に対する発現IKB206の殺菌効果。B、D、F及びH) $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素の存在下での経時的なlog数の減少に対する発現IKB206の殺菌効果。エラーバーは標準誤差を表す。星印は、正規分布及び等分散性を示すサンプルの場合にはT検定、正規分布を示さないか、又は分散の不均一性を示すサンプルの場合にはマンホイットニーU検定に従う、対照(緩衝液)に対する有意差(* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$)を表す。

【図9】IKB206の触媒ドメインの構造モデル。(A) IKB206の触媒ドメインの構造モデルを示す図である。オンラインで利用可能なサーバーPhyre2 (Kelley LA et al. 2015)を用いてモデルを構築した。二次構造要素を薄灰色の略画で表し、推定触媒残基を棒で表す。(B) IKB206のD8ドメインの構造モデル。オンラインで利用可能なサーバーSwissmodel (Waterhouse A et al. 2018)を用いてモデルを構築した。二次構造要素を灰色の略画で表す。T4リゾチーム (Daopin S et al. 1991)、DLP12エンドリシン (Babu K et al. 2018)、P22リゾチーム (

Mooers BH et al. 2006) 及び A B 5075 UW ムラミダーゼ (Sykilinda NN et al. 2018) (それぞれ PDB コード 1L48、4ZPU、2ANV 及び 6ET6) の触媒残基の (C) 構造アラインメント及び (D) 配列アラインメント。IKB206 の E15、D24 及び T33 に重ね合わせた触媒残基を棒で表し (C)、星印を付ける (D)。

【図 10】E. コリ株 ATCC 25922 に対する IKB206 ΔD8 の殺菌効果を示す図である。E. コリ培養物を緩衝液に再懸濁し、細菌懸濁液を 10^5 コロニー形成単位 (CFU) / mL に調整し、培養物を酵素の非存在下 (緩衝液) 又は存在下にて 37°C で 2 時間インキュベートした。データは 3 回の独立実験の代表である。生存細胞は、LB 寒天プレート中で計数することによって決定した。A) 異なる酵素濃度の存在下での経時的な CFU / mL の減少に対する発現 IKB206 ΔD8 の殺菌効果。B) 異なる酵素濃度の存在下での経時的な log 数の減少に対する発現 IKB206 ΔD8 の殺菌効果。エラーバーは標準誤差を表す。星印は、正規分布及び等分散性を示すサンプルの場合には一元 ANOVA 検定に続くチューキー検定、正規分布を示さないか、又は分散の不均一性を示すサンプルの場合にはクラスカルウォリス検定に続くマンホイットニー U 検定に従う、対照 (緩衝液) に対する有意差 ($*P < 0.05$; $**P < 0.005$; $***P < 0.0005$) を表す。

【図 11】感染実験におけるゼブラフィッシュの生存曲線を示す図である。線は、異なる濃度の IKB206 タグで処理した又は処理していないゼブラフィッシュの生存を表す。黒色の線は $1\mu\text{g} / \text{g}$ で処理したゼブラフィッシュ、濃灰色の線は $0.5\mu\text{g} / \text{g}$ で処理したゼブラフィッシュ、薄灰色の線は $0.25\mu\text{g} / \text{g}$ で処理したゼブラフィッシュに対応し、点線は処理していないゼブラフィッシュに対応する。1 条件当たり 12 匹のゼブラフィッシュに 5.5×10^7 CFU / mL の E. コリ ATCC 25922 を感染させた。処理したゼブラフィッシュを非処理対照と比較した場合、結果は統計的に有意であった ($P = 0.001$) (マンテル-コックス検定)。

【図 12】ヒト HEK293 細胞に対する細胞毒性アッセイを示す図である。 $50\mu\text{g} / \text{mL} \sim 400\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度範囲の細胞毒性を分析した。細胞を成長させる培養培地を陰性対照として使用した。データは 3 回の独立実験の平均であり、チューキー検定によって統計的に分析した。

【図 13】(A) IKB206 タグ + メロペネム及び (B) IKB206 タグ + イミペネムのアイソログラムを表す図である。MIC を表す点線よりも下の点は、相乗効果があることが見出される。

【図 14】細菌死滅研究を用いた相乗効果研究を示す図である。(A) メロペネム及び IKB206 タグ。(B) イミペネム及び IKB206 タグ。

【発明を実施するための形態】

【0049】

定義

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」配列は、DNA 又は RNA 配列、好ましくは DNA 配列を指す。この用語には、限定されるものではないが、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルキエオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2

ーチオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューエオシン、2-チオシトシン及び2,6-ジアミノプリン等のDNA及びRNAの既知の塩基類似体のいずれかを含む配列が含まれる。

【0050】

本明細書で使用される「コード配列」、すなわち遺伝子産物を「コードする」配列は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合に *in vitro* 又は *in vivo* で転写 (DNAの場合) 及び翻訳 (mRNAの場合) される核酸配列を指す。

【0051】

本明細書で使用されるDNA「制御配列」及び「制御要素」という用語は、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製起点、内部リボソーム侵入部位 (「IRES」)、エンハンサー等をまとめて指し、これらは集合的にレシピエント細胞におけるコード配列の複製、転写及び翻訳をもたらす。選択されたコード配列を適切な宿主細胞において複製、転写及び翻訳することができる限りにおいて、これらの制御配列／要素の全てが常に存在する必要はない。

【0052】

本明細書で使用される「操作可能に連結された」とは、そのように記載された構成要素が通常の機能を果たすように構成された要素の配置を指す。このため、コード配列に操作可能に連結された制御配列は、コード配列の発現をもたらすことが可能である。制御配列は、その発現を誘導するように機能する限り、コード配列と連続する必要はない。このため、例えば、翻訳されないが、転写される介在配列がプロモーター配列とコード配列との間に存在していてもよく、プロモーター配列は、依然としてコード配列に「操作可能に連結する」とみなすことができる。

【0053】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、特定のコード配列の転写を開始するDNAの領域を指す。プロモーターは、遺伝子の転写開始部位の近くで、同じ鎖上、(センス鎖の5'領域に向かって) DNAの上流に位置する。プロモーターは、約100塩基対～1000塩基対の長さであり得る。「原核生物プロモーター」は通例、転写開始部位の上流の-10及び-35の位置に2つの短い配列を含む。-10の配列は、プリブノーボックス又は-10要素と呼ばれ、通常はTATAATの6つのヌクレオチドからなる。プリブノーボックスは、原核生物における転写の開始に必要な不可欠である。-35の他の配列 (-35要素) は、通常はTTGACAの6つのヌクレオチドからなり、転写速度を制御する。細菌細胞は、RNAポリメラーゼがプロモーター領域に結合するのを補助するシグマ因子を含む。一般的な細菌プロモーターは、T7 (構成的、T7バクテリオファージに由来するプロモーター)、Sp6 (構成的、Sp6バクテリオファージに由来するプロモーター)、lac (lacリプレッサーの非存在下で構成的、IPTG又はラクトースによって誘導することができる)、araBad (アラビノースにより誘導可能)、trp (トリプトファンにより抑制可能) 及びPtac (lacプロモーターと同様に調節される) である。

【0054】

本明細書で使用される「アミノ酸」という用語は、20種の一般的な天然に存在するアミノ酸、セレノシステイン、ピロリシン及び「非天然アミノ酸」を含む。本明細書で使用される「非天然アミノ酸」という用語は、任意の他のアミノ酸、修飾アミノ酸及び／又はアミノ酸類似体を指す。非天然アミノ酸の例としては、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-ヨード-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、p-プロパルギル-L-フェニルアラニン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAcβ-セリン、L-ドーパ、フッ化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラ

10

20

30

40

50

ニン、*L*-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、*p*-ブロモフェニルアラニン、*p*-アミノ-*L*-フェニルアラニン、イソプロピル-*L*-フェニルアラニン、チロシンアミノ酸の非天然類似体；グルタミンアミノ酸の非天然類似体；フェニルアラニンアミノ酸の非天然類似体；セリンアミノ酸の非天然類似体；トレオニンアミノ酸の非天然類似体；アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケト若しくはアミノ置換アミノ酸、又はそれらの任意の組合せ；光活性化可能な架橋剤を有するアミノ酸；スピン標識アミノ酸；蛍光アミノ酸；金属結合アミノ酸；金属含有アミノ酸；放射性アミノ酸；光ケージ化及び／又は光異性化可能なアミノ酸；ビオチン又はビオチン類似体含有アミノ酸；ケト含有アミノ酸；ポリエチレングリコール又はポリエーテルを含むアミノ酸；重原子置換アミノ酸；化学切断可能又は光切断可能なアミノ酸；伸長側鎖を有するアミノ酸；毒性基を含むアミノ酸；糖置換アミノ酸；炭素結合糖含有アミノ酸；酸化還元活性アミノ酸； α -ヒドロキシ含有酸；アミノチオ酸； α , α -二置換アミノ酸； β -アミノ酸；プロリン又はヒスチジン以外の環状アミノ酸、フェニルアラニン、チロシン又はトリプトファン以外の芳香族アミノ酸、及び／又は同類のものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0055】

本明細書で使用される「ペプチドリinker」、「リンカー」又は「スペーサー」という用語は、ポリペプチドドメイン間のヒンジ領域として作用し、個々のドメインの三次元形態を維持しながら、それらが互いに独立して移動することを可能にするスペーサーを指す。この意味で、好ましいスペーサーは、この動きを可能にする構造的延性又は柔軟性を特徴とするヒンジ領域である。通例、構造的柔軟性を有するペプチド（すなわち、柔軟な連結ペプチド又は「可動性リンカー」）は、グリシン、セリン、アラニン及びトレオニンからなる群より選択される2種以上のアミノ酸を含む。上記可動性ペプチドリinker中の少なくとも65%、好ましくは70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸がグリシン、セリン、アラニン及びトレオニンからなる群より選択されるのが好ましい。スペーサーペプチドは、好ましくはアミノ酸残基、特にGly及びSerの繰返し、又はアミノ酸残基の任意の他の好適な繰返しを含むことができる。スペーサーの長さは変化し得る。好ましい範囲は、2アミノ酸～30アミノ酸、好ましくは5アミノ酸～25アミノ酸、より好ましくは10アミノ酸～20アミノ酸である。

20

30

【0056】

「同一性」は、当該技術分野で既知のように、配列を比較することによって決定される2つ以上のポリペプチド配列間の関係である。「同一性」は、当該技術分野でよく知られる既知のアルゴリズムによって容易に算出することができる。同一性を決定する好ましい方法は、試験される配列間の最大の一致が得られるように設計される。同一性を決定する方法は、一般公開されているコンピュータプログラムにコード化される。2つの配列間のパーセント同一性は、Needelman及びWunsch (J. Mol. Biol., 48; 443-453, 1970) のアルゴリズム（例えば、NBLAST及びXBLAST）を組み込んだ分析ソフトウェア（すなわちGenetics Computer Group (Madison Wis.) の配列分析ソフトウェアパッケージ）を用いて決定することができる。

40

【0057】

同一性は、「局所的同一性」又は「全体的同一性」として測定することができる。局所的同一性は、ポリペプチド／ポリヌクレオチド間の配列の関連性の程度を、かかる配列の文字列間の一致によって決定したものを指す。全体的同一性は、完全長の参照ポリペプチド／ポリヌクレオチドと比較したポリペプチド／ポリヌクレオチドの配列の関連性の程度を指す。他に指定のない限り、本明細書で使用される同一性は全体的同一性を意味する。

【0058】

「被験体」又は「個体」という用語は、哺乳動物として分類される全ての動物を指すた

50

めに本明細書で区別なく使用され、家畜及び農場動物、霊長類及びヒト、例えばヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、家禽、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ又は齧歯類を含むが、これらに限定されない。被験体は、任意の年齢又は人種の男性又は女性のヒトであるのが好ましい。

【0059】

「治療」という用語は、予防処置又は治療処置の両方を包含する。本明細書で使用される「治療処置」又は「療法」という用語は、身体を病的状態又は疾患から正常の健常な状態に戻すことを指す。本明細書で使用する「予防処置」という用語は、病的状態を予防することを指す。この治療は、併用治療又は療法であってもよい。治療は発生率の低下、又は症状の緩和、再発の排除、再発の予防、発生の予防、症状の改善、予後の改善又はそれらの組合せも指す。「治療」は、被験体における細菌の集団、成長速度又は病原性を減少させ、それにより被験体における細菌感染又は器官若しくは組織若しくは環境の細菌汚染を制御又は低減することを更に包含する。このため、発生率を低下させる「治療」は、被験体であるか又は環境であるかを問わず、特定の環境における少なくとも1つのグラム陰性細菌の成長の阻害に効果的である。一方、既に確立された感染の「治療」は、感染又は汚染の原因となるグラム陰性細菌の集団を減少させるか、又はグラム陰性細菌を死滅させる、例えば更にはグラム陰性細菌を根絶することを指す。

10

【0060】

本明細書全体を通して使用される「併用療法」という用語は、言及された治療剤と同じ又は別の医薬品配合物において、同時に又は異なる時点で被験体に投与することを含むことが意図される。治療剤を異なる時点で投与する場合、複合効果（例えば、増強応答又は相乗応答）を生じさせるのに十分に近い時点で投与する必要がある。併用レジメンに用いられる療法の特定の組合せでは、所望の治療薬及び／又は処置の適合性、及び／又は達成すべき所望の治療効果が考慮される。用いられる療法が同じ障害に対して所望の効果を達成し得ること、及び／又は異なる効果（例えば、任意の有害作用の制御）を達成し得ることを理解されたい。

20

【0061】

本明細書で使用する「単剤」という用語は、増強応答又は相乗応答が生じるのを防ぐために、別の活性成分とは十分に離れた時点での活性成分の使用に関する。より具体的には、「単剤」としての使用は、「併用療法」としての使用を包含しない。

30

【0062】

本明細書で使用する「治療有効量」という用語は、疾患、障害又は病的状態の予防処置又は治療処置において被験体（ヒト患者等）への単回又は複数回の投与の際に有効な量を指す。

【0063】

作用物質との関連での「殺菌」という用語は従来、細菌の死滅を引き起こす特性を有するか、又は細菌の初期集団において少なくとも3 log（99.9%）以上の減少の程度まで細菌を死滅させることが可能であることを意味する。

【0064】

「静菌」という用語は従来、細菌成長を阻害する、例えば細菌細胞の成長を阻害する特性を有し、細菌の初期集団において2 log（99%）以上、最大3 log 弱の減少を引き起こすことを意味する。

40

【0065】

作用物質との関連での「抗細菌」という用語は、一般に静菌剤及び殺菌剤の両方を含むように使用される。

【0066】

病原体、より具体的には細菌との関連での「薬物耐性」という用語は、概して、薬物の抗微生物活性に耐性を示す細菌を指す。より具体的に使用される場合、薬物耐性は、特に抗生物質耐性を指す。場合によっては、一般に特定の抗生物質の影響を受けやすい細菌が、その抗生物質に対する耐性を生じ、薬物耐性微生物又は株となる可能性がある。「多剤

50

耐性」病原体は、それぞれ単剤療法として使用される少なくとも2つの抗微生物薬群に対して耐性を生じている病原体である。例えば、E. コリの或る特定の株は、いわゆる基質拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）を産生することが可能である。ESBLは、ペニシリン又はセファロスポリン等の或る特定の抗生物質を分解する酵素であるため、これらのESBLを産生する株は、これらの抗生物質に対して耐性を示す。加えて、ESBL産生E. コリに対して有効な数少ない抗生物質の1つであるカルバペネムに耐性を示すESBL産生E. コリ株が既に発見されている（<https://www.cdc.gov/hai/organisms/ESBL.html>）。

【0067】

当業者であれば、薬物又は抗生物質に対する細菌の感受性又は耐性を決定する日常的な実験技術を用いて細菌が薬物耐性であるかを容易に決定することができる。

【0068】

抗生物質が或る特定の細菌に対する使用に好適であるという文脈での「好適な」という用語は、その後耐性が生じたとしても、これらの細菌に対して有効であることが見出されている抗生物質を指す。

【0069】

詳細な説明

第1の態様において、本発明は、

a) 配列番号1のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが配列番号1のペプチドグリカンヒドロラーゼ活性の少なくとも90%を有する、配列番号1のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントを含むタンパク質であって、該タンパク質が配列番号1からなるものではない、タンパク質に関する。

【0070】

これには、例えば当該技術分野で既知の1つ以上の細胞壁結合ドメイン（CBD）を含むキメラタンパク質が含まれる。特定の実施形態においては、上記タンパク質は、本明細書で以下に記載される本発明のキメラタンパク質である。

【0071】

配列番号1の変異体及びそのフラグメントを含む、このタンパク質に関する好ましい特徴及び実施形態は、本発明のキメラタンパク質について本明細書で以下に記載される通りである。

【0072】

幾つかの実施形態においては、このタンパク質は、

a) 配列番号1のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも80%の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが配列番号1のE15、D24、T33及びR139に対応する残基を有し、該変異体又はフラグメントが配列番号1のペプチドグリカンヒドロラーゼ活性の少なくとも90%を有する、配列番号1のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも80%の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントを含むか、又はそれからなり、該タンパク質は、配列番号1からなるものではない。

【0073】

他の実施形態においては、このタンパク質は、配列番号1に対して少なくとも60%の同一性を有する変異体配列又はフラグメントからなり、該変異体は保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントは、配列番号1のペプチドグリカンヒドロラーゼ活性の少なくとも90%を有する。

【0074】

第2の態様において、本発明は、

a) 配列番号1のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなるポリペプチド

10

20

30

40

50

であって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが生物活性ポリペプチドであり、特に、該変異体又はフラグメントが配列番号1のペプチドグリカンヒドロラーゼ活性の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、97%、98%、98%、99%又は100%を有する、ポリペプチドと、

b) 配列番号2のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも60%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなるポリペプチドであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントが生物活性ポリペプチドであり、特に、該変異体又はフラグメントが配列番号2の細胞透過活性の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、97%、98%、98%、99%又は100%を有する、ポリペプチドと、
を含むキメラタンパク質に関する。

10

【0075】

配列番号1は、エンテロバクターファージArya (NCBI参照配列NC_031048.1)の推定エンドリシン(NCBI参照配列:YP_009284326.1)に相当し、以下のアミノ酸配列からなる:

```
1 mktspngiav tkyfesfear aypdpatggk pytigfgttv ypsgapvrlg dvctkeqaek
61 ylqndlakfe kivsdavrvp lnqqqfdalv sftynlgpan lrsstllkkl nagdyagaak
121 efprwnrang kvmkgltrrr aaeqclfegm ggasaiergv aaa
```

【0076】

配列番号1は、比濁アッセイによって決定されるペプチドグリカン(PG)ヒドロラーゼ活性を有する。より具体的には、配列相同性により、これはリゾチームに相当する。

20

【0077】

PGヒドロラーゼ活性の存在を決定する方法は当業者に既知である。例えば、PGヒドロラーゼ活性は、ザイモグラフィ又はマイクロコッカス・リゾディクティカス(Micrococcus lysodeikticus)細胞中の酵素の活性を追跡する比濁アッセイ(Santin and Cascales, 2017)によって決定することができ、例示目的では実施例に記載の比濁アッセイプロトコルを参照されたい。加えて、酵素が作用した後にのみ検出することができる蛍光でPGを標識する蛍光アッセイもある(InvitrogenのEnzyChек(商標)リゾチームアッセイキット)。しかしながら、これらのアッセイは、PGヒドロラーゼ活性を示すに過ぎない。切断部位を決定するためには、質量分析と組み合わせた逆相高速液体クロマトグラフィ等のより正確なアプローチが必要とされる(Santin and Cascales, 2017)。特定の実施形態においては、配列番号1の上記変異体又はフラグメントは、配列番号1のPGヒドロラーゼ活性の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、97%、98%、98%、99%又は100%を有する。

30

【0078】

配列番号2は、B. アミロリクエファシエンスファージ(非特許文献33)(GenBank:AAK40280.1)の溶解酵素Lys1521(D1)の細胞透過性ドメイン(D8)に相当し、以下のアミノ酸配列からなる:

40

```
143 ns gtpk nv srgtsstkt pkykvkngdn lt kiak khnt
181 tvatllklnp gikdpmirv gqtl nvtgsg gkthkvks gd t lsk iav d n k ttv sk l m n l n
241 peitn pnhik vgqtirls
```

【0079】

配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、細胞透過活性を有することが以前に記載されている(Orito et al. 2004)。

【0080】

塩基性アミノ酸残基を含むヘリックス形成性両親媒性ペプチドが、グラム陰性細菌において負に帯電した膜要素、すなわちLPSと相互作用するようであることが以前に報告されている(Duering, K., et al. 1999)。Morita et al. (非特許文献33)は、予

50

測された二次構造に基づいて、エンドリシンのC末端に2つのヘリカルペプチドが存在し、一方がD9領域(D1のaa171~177、配列番号2のaa29~35に相当する)、もう一方がD10領域(D1のaa212~216、配列番号2のaa70~74に相当する)に存在することを報告しており、これらのペプチドがP.エルギノーサPAO1株のLPSに結合し得ることが示唆される。さらに、D8細胞透過性ドメイン(配列番号2)の構造モデルは、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)の推定エンドペプチダーゼのLysMドメイン(Wong JE et al. 2015)と構造的類似性を示すことが本発明者らによって見出されている。実施例7を参照されたい。細菌タンパク質中のLysMドメインは、通常はペプチドグリカン等のN-アセチルグルコサミンを含む基質と相互作用することが知られる反復的な実体である。このため、理論に束縛されることを望むものではないが、このデータから、D8が酵素基質への結合に関与し得ることが示唆される。

10

【0081】

外膜透過活性の存在を決定する方法は当業者に既知である。例えば、グラム陰性細菌の外膜を透過化するエンドリシンの能力は、Orito et al., 2004に記載されて、例示を目的として本明細書で以下に再現されるように、研究対象の酵素による上記細菌の細胞の処理後にシュドモナス・エルギノーサPAO1のペリプラズムβ-ラクタマーゼの放出を試験することによって評価することができる。

【0082】

P.エルギノーサPAO1(500μl)の一晚培養物を30mlの予め温めた(37℃)LB培地で希釈し、振盪(150rpm)しながら37℃で2時間インキュベートした。0.25mg/lのイミペネムを添加してβ-ラクタマーゼ産生を誘導した後、培養物を振盪しながら更に3時間インキュベートし、室温で10分間、5000gで遠心分離して採取する。細胞ペレットをPBSで1回洗浄し、PBSで再懸濁して最終容量10mlとする。エンドリシンを40μg/ml及び200μg/mlの最終濃度で細胞懸濁液(25μl)に添加する(総容量、50μl)。混合物を37℃で10分間インキュベートし、エッペンドルフチューブにて室温で30分間、15000gで遠心分離する。対照実験条件は、超音波処理したP.エルギノーサPAO1細胞の上清を用いて行うことができる。上清を回収し、100μM発色セファロチン(CENTA)を基質として用いてβ-ラクタマーゼ活性をアッセイする。CENTAの加水分解は、405nmでの吸光度を連続的に記録することによってモニタリングすることができる。β-ラクタマーゼの放出(%)は、試験条件下に対する対照条件下でのβ-ラクタマーゼ活性の比率として定義される。

20

30

【0083】

特定の実施形態においては、配列番号2の上記変異体又はフラグメントは、配列番号2の細胞透過活性の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、97%、98%、98%、99%又は100%を有する。

【0084】

幾つかの実施形態においては、上記キメラタンパク質は、

- a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるポリペプチドと、
- b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるポリペプチドと、

40

を含むか、又はそれからなる。

【0085】

(b)のポリペプチドは、(a)のポリペプチドのC末端で直接一列に又はペプチドリンカーを介して融合することができる。(b)のポリペプチドは、(a)のポリペプチドのC末端で直接融合されるのが好ましい。

【0086】

好ましい実施形態においては、上記キメラタンパク質は、本明細書に定義されるように、グラム陰性細菌に対する静菌又は殺菌活性、好ましくはグラム陰性細菌に対する殺菌活性を有する。

50

【0087】

幾つかの実施形態においては、上記キメラタンパク質は、配列番号3のアミノ酸配列（配列番号1のC末端で直接融合した配列番号2に相当する）又はそれに対して少なくとも60%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなり、該変異体は保存的アミノ酸変化を有し、該変異体又はフラグメントは、生物学的に活性である。特に、上記変異体又はフラグメントは、グラム陰性細菌に対する配列番号3の殺菌又は静菌活性の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、97%、98%、98%、99%又は100%を有する。

【0088】

本明細書に記載されるキメラタンパク質は、特にアシネトバクター属（例えばA. バウマンニ）、シュドモナス属（P. エルギノーサ）、エシェリキア属（例えばE. コリ）及びクレブシエラ属（例えばK. ニューモニエ）の細菌においてグラム陰性細菌の成長を阻害するか、グラム陰性細菌の集団を減少させるか、又はグラム陰性細菌を死滅させるのに非常に効果的であることが本発明者らによって示されている（実施例4及び実施例6を参照されたい）。化合物の殺菌活性を分析するアッセイは、当該技術分野で既知であり、例えばLoessner et al. (Loessner, M.J. et al. 2002) 及びSchmelcher et al. (Schmelcher, M. et al. 2010) によって記載されている。例えば、抗微生物剤の殺菌効果を定量化するためには、例えば600nmでの吸光度 (A_{600}) が0.3の細菌懸濁液を、試験対象の用量範囲の抗微生物剤の存在下にて37℃でインキュベートする。異なる時点でサンプルを取り、段階希釈を行い、これらを培養培地の入ったプレートに播種して、生菌数を決定する。殺菌効果を所与のインキュベーション時間後に処理の存在下で減少したlog数として定量化する ($\log_{10}(N_0/N_i)$)、ここで、 N_0 = 処理前のCFU/mLの数及び N_i = 各処理の存在下での対応するインキュベーション時間後のCFU/mLの数である）。細菌懸濁液は、培養培地又は緩衝溶液、例えばPBS又は別の水性塩溶液中で抗微生物剤とともにインキュベートすることができる。IKB206殺菌活性の決定に用いられる特定のアッセイは、実施例に記載される。

【0089】

好ましい実施形態においては、上記静菌又は殺菌効果は、細菌との120分間のインキュベーション後、好ましくは90分後、より好ましくは60分後、更により好ましくは30分後、15分後、例えば10分後又はそれ以下、例えば9分後、8分後、7分後、6分後、5分後、4分後、3分後、2分後又は1分後にin vitroアッセイにおいて達成される。ここで、細菌培養物中のグラム陰性細菌（例えばE. コリ）の出発濃度は、0.3の A_{600} に相当する。吸光度レベルは、例えばSpectrostar Nano分光光度計 (BMG labtech) を用いて決定することができる。

【0090】

また、好ましい実施形態においては、静菌又は殺菌効果は、60 $\mu\text{g/mL}$ 未満、好ましくは55 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、45 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、35 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、15 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、9 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、7 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 又は5 $\mu\text{g/mL}$ の本発明のキメラタンパク質の濃度でin vitroアッセイにおいて達成される。ここで、細菌培養物中のグラム陰性細菌（例えばE. コリ）の出発濃度は、0.3の A_{600} に相当する。吸光度レベルは、例えばSpectrostar Nano分光光度計 (BMG labtech) を用いて決定することができる。

【0091】

この静菌又は殺菌効果は、好ましくは殺菌効果である。好ましい実施形態においては、殺菌効果は、細菌の初期集団における少なくとも4 logの減少、好ましくは少なくとも5 logの減少、少なくとも6 logの減少、少なくとも7 logの減少又はより良好な減少である。

【0092】

より好ましい実施形態においては、殺菌効果は、15 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で細菌との30

10

20

30

40

50

分間のインキュベーション後、より好ましくは15分間のインキュベーション後に *in vitro* アッセイにおいて達成される。ここで、細菌培養物中のグラム陰性細菌（例えば *E. コリ*）の出発濃度は、0.3の A_{600} に相当する。吸光度レベルは、例えば *Spectrostar Nano* 分光光度計（BMG labtech）を用いて決定することができる。

【0093】

別の好ましい実施形態においては、静菌効果は、 $15 \mu\text{g/mL}$ の濃度で細菌との10分間のインキュベーション後、より好ましくは5分後、更により好ましくは4分後、3分後、2分後又は1分後に *in vitro* アッセイにおいて達成される。ここで、細菌培養物中のグラム陰性細菌（例えば *E. コリ*）の出発濃度は、0.3の A_{600} に相当する。吸光度レベルは、例えば *Spectrostar Nano* 分光光度計（BMG labtech）を用いて決定することができる。

10

【0094】

幾つかの実施形態においては、少なくとも60%の同一性を有する上記ポリペプチドは、対応する配列に対して、好ましくは少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する。

【0095】

変異体生物活性ポリペプチド及びそれぞれのコード配列を得る際に、生物活性の喪失又は減少なしに、或る特定のアミノ酸置換、付加、欠失及び翻訳後修飾によってポリペプチドが修飾され得ることが当業者には認識される。特に、或るアミノ酸を同様のサイズ、電荷、極性及び立体構造の別のアミノ酸で置換する保存的アミノ酸置換は、タンパク質機能を顕著に変化させる可能性が低いことがよく知られている。タンパク質の構成要素である20個の標準アミノ酸は、以下のように4つの保存アミノ酸の群に大別することができる：非極性（疎水性）群にはアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン及びバリンが含まれ、極性（非荷電、中性）群にはアスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、セリン、トレオニン及びチロシンが含まれ、正荷電（塩基性）群にはアルギニン、ヒスチジン及びリジンが含まれ、負荷電（酸性）群にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。タンパク質中の或るアミノ酸を同じ群内の別のアミノ酸に置換することが、タンパク質の生物活性に対して悪影響を及ぼす可能性は低い。

20

30

【0096】

概して、本発明のキメラタンパク質の作製は、本明細書に開示の手順、及び例えばポリメラーゼ連鎖増幅反応（PCR）、プラスミドDNAの作製、制限酵素によるDNAの切断、オリゴヌクレオチドの作製、DNAのライゲーション、mRNAの単離、好適な細胞へのDNAの導入、宿主の形質転換又はトランスフェクション、宿主の培養を含む一般に認められている組換えDNA法によって達成することができる。さらに、融合分子は、カオトロピック剤並びに既知の電気泳動法、遠心分離法及びクロマトグラフィー法を用いて単離及び精製することができる。概して、これらの方法に関する開示については、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. (1989) 及び Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989) を参照されたい。

40

【0097】

本発明のタンパク質又はポリペプチドは、配列番号1、配列番号2又は配列番号3と比較して1つ以上のアミノ酸の置換、欠失又は付加を有するように作製することができる。これらの変化は、好ましくは軽微な性質のもの、すなわち、保存的アミノ酸置換及びタンパク質又はポリペプチドのフォールディング又は活性に大きな影響を及ぼさない他の変化であり、アミノ末端又はカルボキシル末端の伸長、例えばアミノ末端メチオニン残基、最

50

大約 20 残基～25 残基の小さなリンカーペプチドを含むか、又は融合タンパク質の修飾、特定及び／又は精製を容易にするためにタグを含んでもよい。2つ以上のタグ（例えば、精製を容易にするアフィニティータグ）を組み合わせて使用してもよい。アフィニティータグを含むポリペプチドは、ポリペプチドとアフィニティータグとの間にポリペプチドリンカー及び／又はタンパク質分解切断部位を更に含むことができる。

【0098】

実施例 7 において論考するように、本発明者らは、本発明のキメラタンパク質の作用機序を研究した。触媒ドメインの構造モデルから、T4 リゾチーム及び他の T4 リゾチーム様エンドリシン、例えば P22 ファージリゾチーム (Mooers BH et al. 2006) 又はエシェリキア・コリ DLP12 プロファージによってコードされるエンドリシン (Babu K et al. 2018) に類似した全体的なフォールドが明らかとなった。配列アラインメント (図 9D) 及びこれらのエンドリシンの結晶構造に対する IKB206 の構造モデルの構造重ね合わせ (図 9C) に基づいて、本発明者らは、IKB206 の触媒ドメインが T4 リゾチーム様エンドリシンに属し、残基 E15、D24 及び T33 が酵素の触媒三残基を形成することを提案する。さらに、R139 が E15 と塩橋を形成する可能性があることが示唆される。

10

【0099】

幾つかの実施形態においては、配列番号 1 又は配列番号 3 の変異体は、保存的アミノ酸変化を有することを特徴とし、変異体又はフラグメントにおいて、配列番号 1 又は配列番号 3 の E15、D24 及び T33 に対応する残基がそれぞれ維持される。幾つかの実施形態においては、アミノ酸変化は保存的であり、配列番号 1 又は配列番号 3 の 12 位～35 位又は更には 12 位～54 位に対応する残基は、それぞれ変更されないままである。加えて、上述のいずれかと組み合わせた幾つかの実施形態においては、配列番号 1 又は配列番号 3 の R139 に対応するアミノ酸は、それぞれ変更されないままであり、例えば E15、D24、T33 及び R139 に対応する残基は、変更されないままである。

20

【0100】

幾つかの実施形態においては、配列番号 2 の変異体は、保存的アミノ酸変化を有することを特徴とし、変異体又はフラグメントにおいて、配列番号 2 の 29 位～35 位及び 70 位～74 位に対応するアミノ酸が維持される。

【0101】

30

特定の実施形態においては、本発明は、

a) 配列番号 1 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 80% の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントを含むポリペプチドであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有することを特徴とし、該変異体又はフラグメントが配列番号 1 の E15、D24、T33 及び R139 に対応する残基を有し、好ましくは配列番号 1 のペプチドグリカンヒドロラーゼ活性の少なくとも 90% を有する、ポリペプチドと、

b) 配列番号 2 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 80% の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントを含むポリペプチドであって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有することを特徴とし、該変異体又はフラグメントが配列番号 2 の 29 位～35 位及び 70 位～74 位に対応するアミノ酸を有し、好ましくは配列番号 2 の細胞透過活性の少なくとも 90% を有する、ポリペプチドと、

40

を含むキメラタンパク質であって、(b) のポリペプチドが (a) のポリペプチドの C 末端で直接又はペプチドリンカーを介して融合している、キメラタンパク質に関する。

【0102】

別の実施形態においては、配列番号 3 のアミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 80% の同一性を有する変異体配列若しくはフラグメントを含むか、又はそれからなるキメラタンパク質であって、該変異体が保存的アミノ酸変化を有することを特徴とし、該変異体又はフラグメントが配列番号 3 の E15、D24、T33 及び R139 に対応する残基を有し、好ましくは配列番号 3 のグラム陰性細菌に対する静菌又は殺菌活性の少なくとも 90% を有する、キメラタンパク質に関する。

50

【0103】

タンパク質又はポリペプチドは、特定のアフィニティー精製タグを含んでいてもよい。アフィニティータグの例示的な非限定的な例としては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、プロテインA、FLAGタグ、ヘキサヒスチジン、mycタグ又はインフルエンザHAタグが挙げられる。上記アフィニティー精製タグは、直接一列に融合するか、又は代替的には、切断可能なリンカー、すなわち、酵素的又は化学的手段によって特異的に切断可能なアミノ酸配列（すなわち、認識／切断部位）を含むペプチドセグメントを介してポリペプチドに融合することができる。アフィニティータグを直接融合する場合、翻訳融合が生じるように、対象のペプチドのリーディングフレームがアフィニティータグをコードする遺伝子のリーディングフレームに接合される。特定の実施形態においては、上記切断可能なリンカーは、エンテロキナーゼ、Arg-Cエンドプロテアーゼ、Glu-Cエンドプロテアーゼ、Lys-Cエンドプロテアーゼ、ファクターXa、フリン様プロタンパク質転換酵素、トロンビン等のプロテアーゼによって切断可能なアミノ酸配列を含む。代替的には、別の特定の実施形態において、上記切断可能なリンカーは、化学試薬、例えばメチオニン残基を切断する臭化シアン、又は任意の他の好適な化学試薬によって切断可能なアミノ酸配列を含む。切断可能なリンカーは、その後のアフィニティー精製タグの除去が望ましい場合に有用である。

10

【0104】

幾つかの実施形態においては、本発明のキメラタンパク質は、ペプチド（b）の下流に認識／切断部位を更に含む。特定の実施形態においては、上記切断部位は、トロンビン切断部位（例えば、配列番号4のアミノ酸配列）である。

20

【0105】

幾つかの好ましい実施形態においては、本発明のキメラタンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列のポリペプチドを含むか、又はそれからなる。配列番号5のアミノ酸配列からなるキメラタンパク質は、配列番号1と配列番号2との融合の結果得られたものであり、配列番号2を配列番号1のC末端（配列番号3）で直接融合してからpET29b+ベクターにクローニングし、発現させる。このタンパク質は、N末端にSタグ、C末端に6-Hisタグを更に呈し、両末端にトロンビンの切断部位（配列番号4）、タグと配列番号3との間に3つの余分なアミノ酸（トロンビン切断効率を改善するため）を更に含むことを特徴とし、IKB206タグと称される329アミノ酸のキメラタンパク質を生じる。非限定的な例示を目的として、IKB206及びIKB206タグの概略図を図1（A及びB）に示す。

30

【0106】

更なる実施形態においては、本明細書に記載される実施形態及び特徴の1つ以上と任意に組み合わせて、本発明のキメラタンパク質は、OM透過化又は不安定化特性を有する更なるペプチド（ポリカチオン性ペプチド等）を含んでいてもよい。好ましい実施形態においては、OM透過化又は不安定化特性を有する別のペプチド（ポリカチオン性ペプチド等）は含まれない。

【0107】

また更なる実施形態においては、本明細書に記載される実施形態及び特徴の1つ以上と任意に組み合わせて、本発明のキメラタンパク質は、抗微生物活性を有する更なるドメインを含んでいてもよい。好ましい実施形態においては、抗微生物活性を有する更なるドメインは含まれない。

40

【0108】

幾つかの実施形態においては、本発明のキメラタンパク質は、化学修飾されていてもよい。化学修飾には、化学的部分の付加、新たな結合の生成及び化学的部分の除去が含まれるが、これらに限定されない。化学修飾は、アミノ酸側鎖だけでなく、アミノ末端又はカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのどの部分にも行うことができる。かかる修飾は、ポリペプチドの2つ以上の部位に存在することができる。さらに、ポリペプチドの1つ以上の側基又は末端基が当業者に既知の保護基によって保護されていてもよい。

50

【0109】

また、幾つかの実施形態においては、本発明のキメラタンパク質には、持続時間延長部分が付着していてもよい。持続時間延長部分の非限定的な例は、ポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコール（「PEG」）は、持続時間が延長した治療用ポリペプチドを得るために当該技術分野で使用されてきた（Zalipsky, S., Bioconjugate Chemistry, 6:150-165 (1995)、Mehvar, R., J. Pharm. Pharmaceut. Set, 3:125-136 (2000)）。PEG骨格（ $(CH_2CH_2-O)_n$ ；n：反復モノマーの数）は、柔軟かつ両親媒性である。本発明のキメラタンパク質等の別の化学的実体に付着することで、PEGポリマー鎖は、かかるポリペプチドを免疫応答及び他のクリアランス機構から保護することができる。結果として、ペグ化は薬物動態の最適化、バイオアベイラビリティの増大、並びに免疫原性及び投与量及び／又は頻度の減少によって有効性及び安全性の改善をもたらし得る。

10

【0110】

本発明のタンパク質（キメラタンパク質を含む）は単独で、又は例えばEDTA、TRIS、乳酸、ラクトフェリン、ポリミキシン、クエン酸のような金属キレート剤を含むが、これらに限定されない、グラム陰性細菌の外膜の透過化剤若しくは破壊剤と組み合わせて使用することができる（非特許文献32）。これらの透過化剤は、同じ又は異なる組成物の一部であり得る。好ましい実施形態においては、タンパク質（キメラタンパク質を含む）は、透過化剤なしで使用される。

20

【0111】

第3の態様において、本発明は、本明細書に記載されるタンパク質（キメラタンパク質を含む）をコードする核酸分子を含むポリヌクレオチドに関する。

【0112】

幾つかの実施形態においては、上記ポリヌクレオチドは、

a) 配列番号6又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなる核酸配列であって、該変異体配列又はフラグメントが生物活性ポリペプチドをコードする、核酸配列、を含む。

配列番号6

```
atgaaaacctctccaaatggtatcgccgttaccaagttacttcgaatcatttgaagcccgcgcataccct  
gaccccgccactggcggtaaaccatacacgattggcttcggaaccactgtctacccgtctggcgccacc  
cgtccgttttaggggatgtgtgtacgaaagaacaggccgagaaatatttacaaaatgacttggcgaaat  
tcgagaagattgtatctgacgcagtgcgcggttcccccttaatcaagggtcagtttgacgcgttagtgat  
ttacgtataacttaggacccgccaaatttgcgccagcagttaccctgttaaaaaagttgaacgctggggact  
atgcggggggcgctaaagagtttccgcggttggaaccgtgcaaacggtaaaagtgatgaaagggttgac  
acgtcgccgcgcgggcagaacaatgtttgtttgaagggtatgggaggcgcgagcgcgattgaacgtgggt  
gtagccgctgca
```

30

【0113】

他の実施形態においては、上記ポリヌクレオチドは、

a) 配列番号6又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなる核酸配列であって、該変異体配列又はフラグメントが生物活性ポリペプチドをコードする、核酸配列と、

40

b) 配列番号7又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなる核酸配列であって、該変異体配列又はフラグメントが生物活性ポリペプチドをコードする、核酸配列と、を含む。

配列番号7

```
aacagtgggacaccaaagaatgtttcccgcggaacctcgtccacgaagacaacacctaagtataagg  
taaaaaatggtgacaacttaactaaaatcgcgaaagaaacataatactacagtagcgacattgctgaaa  
cttaatccagggatcaaagaccccaacatgattcgtgtagggcagactttaaatgttacagggtccgg
```

50

tgggaaaactcataaagtcaagtcgggtgacacactgagtaaaatcgagttgataataagacgactgttagcaagttgatgaatcttaacccggaaatcactaatcctaaccatatcaaagtcggccagacaatccgtttgagc.

【0114】

好ましい実施形態においては、上記ポリヌクレオチドは、

a) 配列番号6又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなる核酸配列であって、該核酸配列が、本明細書に定義される配列番号1又はその変異体若しくはフラグメントをコードする、核酸配列と、

b) 配列番号7又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなる核酸配列であって、該核酸配列が、本明細書に定義される配列番号2又はその変異体若しくはフラグメントをコードする、核酸配列と、

を含む。

【0115】

更なる実施形態においては、上記ポリヌクレオチドは、配列番号8又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなり、該変異体配列又はフラグメントは、生物活性ポリペプチドをコードする。

配列番号8

atgaaaacctctccaaatggtatcgccgttaccaagtacttcgaatcatttgaagcccgcgcataccctgaccccgcgactggcggtaaacatacacgattggcttcggaaccactgtctacccgtctggcgcaccggtccgtttaggggatgtgtgtacgaaagaacaggccgagaaatatttacaataatgacttggcgaaattcgagaagattgtatctgacgcagtgccggttcccccttaatacagggtcagtttgacgcgttagtgtcatttacgtataacttaggacccgccaatgtgagcagcagtagccctgttaaaaaagttgaacgctggggactatgcggggggccgctaaagagtttccgcgttggaaaccgtgcaaacggtaagtgatgaaagggttgacacgtcgcgcgcggcgagaacaatgtttgtttgaagggtatgggaggcgcgagcgcgattgaacgtggtgtagccgctgcaaacagtgaggacaccaaagaatgtttccgcggaaacctcgtccacgaagacaacacctaagtataaggtaaaaaatggtgacaacttaactaaaatcgcgagaagaacataatactacagtagcgacattgctgaaacttaatccagggtatcaaagaccccaacatgattcgtgtaggggcagactttaaatgttacagggtccggtgggaaaactcataaagtcaagtcgggtgacacactgagtaaaatcgagttgataataagacgactgttagcaagttgatgaatcttaacccggaaatcactaatcctaaccatatcaaagtcggccagacaatccgtttgagc

【0116】

好ましい実施形態においては、上記ポリヌクレオチドは、配列番号8又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなる核酸配列を含み、該核酸配列は、本明細書に定義される配列番号3又はその変異体若しくはフラグメントをコードする。

【0117】

また更なる実施形態においては、上記ポリヌクレオチドは、配列番号9又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなり、該配列は、生物活性ポリペプチドをコードする。

配列番号9

atgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatggacagcccagatctgggtaccctggtgccacgcggttccatggcgatatcggatccgatgaaaacctctccaaatggtatcgccgttaccaagtacttcgaatcatttgaagcccgcgcataccctgaccccgcgactggcggtaaacatacacgattggcttcggaaccactgtctacccgtctggcgcacccgtccgtttaggggatgtgtgtacgaaagaacaggccgagaaatatttacaataatgacttggcgaaattcgagaagattgtatctgacgcagtgccggttcccccttaatacagggtcagtttgacgcgttagtgtcatttacgtataacttaggacccgccaatgtgagcagtagccctgttaaaaaagttgaacgctgggggactatgcggggggccgctaaagagtttccgcgttggaaacc

gtgcaaacggtaaagtgatgaaagggttgacacgtcgccgcgcggcagaacaatgtttgtttgaagg
atgggaggcgcgagcgcgattgaacgtgggttagccgctgcaaacagtgggacaccaaagaatgttt
cccgcggaacctcgtccacgaagacaacacctaagtataaggtaaaaaatgggtgacaacttaactaa
aatcgcggaagaaacataatactacagtagcgacattgctgaaacttaatccagggatcaaagacccca
acatgattcgtgttagggcagacttttaaatgtttacaggggtccgggtgggaaaactcataaagtcaagtcg
ggtagacacactgagtaaaatcgacgttgataataagacgactgttagcaagttgatgaatcttaacc
ggaaatcactaatacctaaccatatcaaagtcggccagacaatccgtttgagcctgggtaccctgggtgc
cacgcggttcctcgagcaccaccaccaccaccac

【0118】

好ましい実施形態においては、上記ポリヌクレオチドは、配列番号9又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する変異体配列又はそれらのいずれかのフラグメントを含むか、又はそれからなる核酸配列を含み、該核酸配列は、本明細書に定義される配列番号5又はその変異体若しくはフラグメントをコードする。

10

【0119】

好ましくは、少なくとも70%の同一性を有する上記核酸配列は、それぞれ配列番号6、配列番号7、配列番号8又は配列番号9に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する。

20

【0120】

幾つかの実施形態においては、上記ポリヌクレオチドは、上記の核酸配列(a)及び(b)を含み、好ましくは、該ポリヌクレオチドは、配列番号8及び配列番号9又はそれに対して少なくとも70%の同一性を有する配列から選択され、該配列は生物活性ポリペプチドをコードし、該ポリヌクレオチドは、制御配列に操作可能に連結する。好ましくは、上記ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのプロモーター、好ましくは原核生物プロモーターに操作可能に連結し、すなわち、原核細胞、例えば細菌細胞において挿入されたコード配列の発現を可能にする。特定の実施形態においては、上記ポリヌクレオチドはベクターである。

【0121】

第4の態様において、本発明は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むベクターに更に関する。「ベクター」とは、適当な制御要素と結合した場合に複製が可能であり、細胞間で遺伝子配列を伝達することができる、プラスミド、ファージ、ハイブリッドベクター、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオン等の任意の遺伝要素を意味する。本明細書に記載のペプチドをコードする配列は、細菌細胞において核酸分子を送達及び維持することが可能なベクターに挿入することができる。ポリヌクレオチドは、自律複製ベクターに挿入してもよい。ベクターはpET29b+、pGEM3Z及びpCDNA3、並びにそれらの誘導体等の細菌ベクター、又はバクテリオファージ若しくはM13、及びそれらの誘導体等のバクテリオファージDNAベクターであり得る。上記ベクターは細菌プラスミドであるのが好ましい。プラスミドは、染色体外プラスミド又は組み込みプラスミド、好ましくは染色体外プラスミドであり得る。

30

40

【0122】

上記ベクターは、コード核酸分子に加えて、プロモーター及び調節配列等の発現を可能にする要素も含む。発現ベクターは、プロモーター、エンハンサー、オペレーター及びリプレッサー配列等の転写開始を制御する転写制御配列を含んでいてもよい。様々な転写制御配列が当業者に既知である。発現ベクターは、翻訳調節配列(例えば、非翻訳5'配列、非翻訳3'配列)を含んでいてもよい。ベクターは、自律複製が可能であり得るか、又はペプチド産生中の安定性を確保するために宿主DNAに組み込むことができる。

【0123】

誘導性プロモーターを含む発現ベクターは、一般にオペレーター配列を含む。用いられ

50

得るオペレーター配列は、当該技術分野で既知であり、lac、gal、deo、gin、raf、rha、araC、fru及びmelが含まれる。1つ以上の完全回文オペレーター配列を用いてもよい。或る特定の実施形態においては、オペレーター配列は、転写開始点と重なる。オペレーター系が一般に適切なリプレッサー配列とともに用いられることが認識される。リプレッサー配列は、リプレッサータンパク質を産生し、例えばlacオペレーターを用いる場合にlacI遺伝子配列である。他のlacリプレッサー配列を使用してもよく、例えばlacIq配列を用いてlacリプレッサータンパク質のレベルを上昇させることができる。リプレッサー配列は、宿主細胞ゲノムによって、又は付加的な適合性プラスミドを用いて提供することもできる。

【0124】

誘導物質、例えばイソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG)、イソブチル-C-ガラクトシド (IBCG) 等のIPTGの類似体、ラクトース又はメリビオースの添加によって発現を誘導することができる。他の誘導物質を使用してもよく、他の部分でより十分に説明される (例えば、The Operon, eds Miller and Renznikoff (1978) を参照されたい)。誘導物質は、個別に又は組み合わせて使用することができる。適切なプラスミド又は発現ベクターの構築は、通常の技術を有する科学者には明らかである。

【0125】

本明細書に記載の核酸を含むベクターの構築に続いて宿主細胞の形質転換を行うことができる。導入には、任意の利用可能な手法を用いることができる。細菌細胞については、好適な手法には熱ショック、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、及びバクテリオファージを用いたトランスフェクションが含まれ得る。

【0126】

第5の態様において、本発明は、本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞に関する。上記宿主細胞は原核生物宿主細胞であるのが好ましい。原核細胞の例としては、細菌細胞、例えばE. コリ、サルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella typhimurium)、セラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens)、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) 及びシュードモナス・エルギノーサを含むグラム陰性細菌細胞、並びにバチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) を含むグラム陽性細菌細胞が挙げられる。好ましい宿主細胞は細菌、特に腸内細菌科、好ましくはB株又はK12株を含むE. コリである。最も好ましくは、上記宿主細胞はエシェリキア・コリBL21 (DE3) である。

【0127】

細胞への核酸の導入に続いて、例えばポリヌクレオチドの発現のための条件下で宿主細胞に侵入させることによって核酸からの発現を引き起こすか、又は可能にすることができる。通例、適切な温度及び雰囲気条件下 (例えば37℃) にて細胞培養培地中で細胞を培養する。宿主細胞に応じて、この培養培地は「微生物用培地」であってもよく、これは細菌又は真菌等の微生物の成長及び繁殖に適した任意の基質を指す。最も一般的な微生物用の成長培地は、栄養ブロス (液体栄養培地) 又はLB培地 (溶原培地) である。多くの場合、液体培地を寒天と混合し、滅菌培地ディスペンサーによってペトリ皿に注ぎ、凝固させる。「微生物用培地」という用語が固体プレート培地、並びに半固体及び液体微生物成長系を包含することが当業者には理解される。

【0128】

第6の態様において、本発明は、本発明のタンパク質 (キメラタンパク質を含む) を作製する方法であって、

i. 本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むベクターを適切な宿主細胞に導入することと、

ii. 上記タンパク質の発現に適した条件下で宿主細胞を培養することと、

iii. 任意に、上記タンパク質を単離及び／又は精製することと、を含む、方法に関する。

10

20

30

40

50

【0129】

宿主細胞に応じた最も適切な培養条件が当業者には既知である。宿主細胞及びその培養方法の例は上に示した。

【0130】

ポリペプチドの単離及び／又は精製の方法は、当該技術分野で既知である（例えば、Isolation and Purification of Proteins, February 5, 2003 by CRC Press, ISBN 9780824707262を参照されたい）。ポリペプチドを精製する手順は、初めにタンパク質の発現部位に左右される。細胞培養培地中に分泌されるタンパク質もあれば、細胞内タンパク質もある。第2の例においては、精製プロセスの最初の工程は細胞の溶解を含み、この細胞の溶解は、機械的剪断、浸透圧ショック又は酵素処理を含む様々な方法によって行うことができる。任意に、分画遠心分離又は濾過によって細胞残屑を除去する。

10

【0131】

対象のポリペプチドを含む清澄溶液が得られた後、細胞によって産生された他のタンパク質からの分離を、通常は異なるクロマトグラフィー法の組合せを用いて試みる。これらの手法では、タンパク質の混合物を電荷、疎水性の程度又はサイズに基づいて分離する。幾つかの異なるクロマトグラフィー樹脂がこれらの手法の各々に利用可能であり、精製スキームに関連する特定のタンパク質に正確に合わせることができる。精製されるタンパク質と固定化された捕捉剤との間の特異的相互作用を利用するアフィニティークロマトグラフィーも一部のポリペプチドにとって選択肢となり得る。例えば、本明細書に記載されるタンパク質がタグを含む場合、アフィニティークロマトグラフィーをその精製に用いることができる。他の実施形態においては、タンパク質がタグを含まない場合、好ましくは陽イオン交換に続いてサイズ排除クロマトグラフィーを用いてもよい。

20

【0132】

本発明のタンパク質（キメラタンパク質を含む）は、ショウジョウバエ Sf9 細胞を用いるバキュロウイルス発現系、酵母又は糸状菌発現系、哺乳動物細胞発現系を含む細菌以外のタンパク質発現系においても生成することができる。

【0133】

加えて、本明細書に記載のタンパク質（キメラタンパク質を含む）及びポリペプチドは、自動ペプチド合成装置を用いた固相法によって合成することができる。例えば、ペプチドは、Cyc(4-CH₂Bxl)-OCH₂-4-(オキシメチル)-フェニルアセトアミドメチル樹脂上で二重カップリングプログラムを用いて合成することができる。ペプチドは、従来の FMOC 保護を用いた固相合成（すなわち、DCC-HOBt によるカップリング及び DMF 中のピペリジンによる脱保護）を含む多くの他の方法によっても合成することができる。

30

【0134】

第7の態様において、本発明は、本明細書に記載されるタンパク質（キメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞を含む組成物に関する。

【0135】

適切な量のタンパク質（キメラタンパク質を含む）、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞を薬学的に許容可能な賦形剤、ビヒクル及び／又は担体と配合し、医薬組成物を得ることができる。上記医薬組成物は、本明細書に記載されるタンパク質（キメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド又は発現ベクターを含むのが好ましい。

40

【0136】

「薬学的に許容可能な」という語句は、動物又はヒトに投与した場合に副作用、アレルギー反応又は他の有害反応を生じない分子実体及び組成物を指す。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な賦形剤、ビヒクル及び／又は担体」は、ヒトへの投与に適した医薬品等の医薬品の配合への使用に許容可能な溶媒、緩衝液、溶液、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤等を含む。薬学的に活性な物質に対するかかる媒体及び作用物質の使用は、当該技術分野で既知である。任意の従来の媒体

50

又は作用物質が本開示の活性成分と不適合である場合を除き、治療用組成物におけるその使用が企図される。本発明による作用物質、例えば本発明のキメラタンパク質を不活性化しない限りにおいて、追加の活性成分を組成物に組み込んでもよい。

【0137】

第8の態様において、本発明は、グラム陰性細菌による細菌感染の予防処置及び／又は治療処置に使用される、本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞又は医薬組成物（以下、「本発明による作用物質」と総称する）を提供する。

【0138】

第9の態様において、本発明は、グラム陰性細菌による細菌感染の予防処置及び／又は治療処置のための薬剤の製造における本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞又は医薬組成物の使用に関する。

【0139】

第10の態様において、本発明は、細菌感染と診断された、細菌感染のリスクがある又は細菌感染の症状を示す被験体に、有効量の本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞を含有する組成物を投与することを含む、グラム陰性細菌による細菌感染の予防処置及び／又は治療処置の方法に関する。好ましくは、有効量の本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、タンパク質及びキメラタンパク質を含む）。

【0140】

好ましい実施形態においては、上記感染は、好ましくはアシネトバクター属、バクテロイデス属、カンピロバクター属、フゾバクテリウム属、ヘモフィルス属、ヘリコバクター属、モビルンカス属、ポルフィロモナス属、プレボテラ属、シュードモナス属及びベイロネラ属、並びに腸内細菌科（本明細書で腸内細菌とも称される）の細菌からなる群より選択される腸内グラム陰性細菌によって引き起こされる。腸内細菌の例示的であるが、限定的ではない幾つかの例としては、シトロバクター属、エンテロバクター属、エシェリキア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属、セラチア属、シゲラ属及びエルシニア属の細菌が挙げられる。

【0141】

特定の実施形態においては、上記グラム陰性細菌は、アシネトバクター属、シュードモナス属、エシェリキア属、クレブシエラ属、セラチア属及びシトロバクター属からなる群、好ましくはアシネトバクター属、シュードモナス属、エシェリキア属及びクレブシエラ属からなる群より選択される。好ましい実施形態においては、上記グラム陰性細菌は、E. コリ、K. ニューモニエ、A. バウマンニ、P. エルギノーサ、S. マルセッセンス及びC. フロインディイからなる群、好ましくはE. コリ、K. ニューモニエ、A. バウマンニ及びP. エルギノーサからなる群より選択される。或る特定の実施形態においては、上記グラム陰性細菌は、多剤耐性（MDR）株を含む薬物耐性株である。

【0142】

2019年のEARS-Netによる欧州サーベイランスにおいて、最も多く報告された細菌種はE. コリ（44.2%）、続いてスタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）（20.6%）、クレブシエラ・ニューモニエ（*Klebsiella pneumoniae*）（11.3%）、E. フェカリス（*E. faecalis*）（6.8%）、P. エルギノーサ（*P. aeruginosa*）（5.6%）、S. ニューモニエ（*S. pneumoniae*）（5.3%）、E. フェシウム（*E. faecium*）（4.5%）及びアシネトバクター種（*Acinetobacter species*）（1.7%）であった（European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) -Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm: ECDC; 2020）。こ

10

20

30

40

50

のサーベイランス研究においては、2019年に、報告されたE. コリ分離株の半数以上及びK. ニューモニエ分離株の3分の1以上がサーベイランス対象の少なくとも1つの抗微生物剤群に耐性を示し、幾つかの抗微生物剤群に対する複合耐性がしばしば見られることが観察された。P. エルギノーサ及びアシネトバクター種の場合、カルバペネム耐性が一般的であり、K. ニューモニエよりも高い割合で見られた。

【0143】

幾つかの実施形態においては、上記グラム陰性細菌は腸内細菌科のものである。好ましい実施形態においては、上記感染はエシェリキア・コリによって引き起こされる。E. コリ株は、任意の血清型に特に限定されず、例示的な例としては、尿路感染に關与することが多い血清型である血清型O1（例えば血清型O1A）、血清型O2、血清型O6（例えば血清型O6A）、血清型O25（例えば血清型O25B）又はO157血清型のE. コリ細菌が挙げられる（Huttner and Gambillara 2018）。好ましい実施形態においては、E. コリ株は、E. コリATCC 25922等の血清型O6株又はE. コリO157:H7等の血清型O157株に属する。或る特定の実施形態においては、上記E. コリ株は、多剤耐性（MDR）株を含む薬物耐性株である。

【0144】

これらのMDR株は1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ又はそれ以上の抗生物質、例えばスルホンアミド（例えば、スルファメトキサゾール及びトリメトプリム／スルファメトキサゾール）、ペニシリン（例えばチカルシリン、チカルシリン－クラブラン酸、ピペラシリン、ピペラシリン－タゾバクタム、アモキシシリン、アモキシシリン－クラブラン酸）、セファロスポリン（例えばセフトジジム、セフェピム、セフォペラゾン）、モノバクタム（例えばアズトレオナム）、リンコサミド（例えばリンコマイシン）、フルオロキノロン（例えばシプロフロキサシン、レボフロキサシン、ノルフロキサシン）、カルバペネム（例えばイミペネム、メロペネム、エルタペネム、ドリペネム）、アミノグリコシド（例えばゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン）及びポリミキシン（例えばコリスチン、ポリミキシンB）に耐性を示す可能性がある。例えば、上記MDR株はスルホンアミド、ペニシリン、リンコサミド、フルオロキノロン、アミノグリコシド及びテトラサイクリンからなるリストから選択される抗生物質の1つ以上、例えば全てに耐性を示し、好ましくは、上記MDR株はスルホンアミド、アモキシシリン、リンコマイシン、リンコースペクチン（商標）（リンコマイシン＋スペクチノマイシン）、エンロフロキサシン、ネオマイシン及びドキシサイクリンからなるリストから選択される抗生物質の1つ以上、例えば全てに耐性を示す（表1及び実施例4のMDR E. コリ株を参照されたい）。

【0145】

特定の実施形態においては、上記グラム陰性細菌はエシェリキア・コリであり、スルファミド、アモキシシリン、リンコマイシン、リンコースペクチン、エンロフロキサシン、ネオマイシン及びドキシサイクリンの1つ以上に耐性を示す。別の実施形態においては、上記グラム陰性細菌はクレブシエラ・ニューモニエであり、βラクタム（例えばカルバペネム）、フルオロキノロン及びトリメトプリム／スルファメトキサゾールの1つ以上に耐性を示す。

【0146】

更なる実施形態においては、上記グラム陰性細菌はアシネトバクター・バウマンニであり、アミノグリコシド及びトリメトプリム／スルファメトキサゾールの1つ以上に耐性を示す。

【0147】

また更なる実施形態においては、上記グラム陰性細菌はシュードモナス・エルギノーサであり、βラクタムに耐性を示す。

【0148】

グラム陰性細菌によって引き起こされる感染は、被験体の任意の器官又は組織において起こり得る。特定の実施形態においては、グラム陰性細菌によって引き起こされる感染は

10

20

30

40

50

、血液、胃腸管、心臓、心血管系、肝臓、肺、気道、腎臓、尿路、中枢神経系、皮膚、皮下組織又は外科的創傷において起こる。好ましい実施形態においては、グラム陰性細菌、例えば本明細書で上述した属又は種の1つ以上、好ましくはE. コリ株によって引き起こされる感染は、尿路において起こる。別の好ましい実施形態においては、上記感染は血液において起こる。

【0149】

治療すべき感染を引き起こすグラム陰性細菌は、ヒト又は動物の病原性細菌又は株であり得る。幾つかの実施形態においては、グラム陰性細菌は、ヒトの病原性細菌又は株である。他の実施形態においては、グラム陰性細菌は、動物の病原性細菌又は株、例えば鳥類又は非ヒト哺乳動物の病原性細菌又は株である。

【0150】

本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞、好ましくはタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）を含む組成物は、例えば、限定されるものではないが、局所（例えば局部、直腸、眼等）又は全身投与による様々な経路によって被験体に送達することができる。全身送達には、経口又は非経口（例えば静脈内、皮下、筋肉内及び腹腔内）投与が含まれ得る。さらに、本発明の作用物質を含む組成物を鼻腔内又は舌下に投与することも可能であり、これにより非攻撃的な投与様式による全身投与が可能である。また、脳室内投与も適切であり得る。好ましい送達経路は、血管内（例えば、動脈内又は静脈内）又は皮下注射である。特定の実施形態においては、本発明に従って使用される作用物質は、被験体に皮下又は静脈内投与される。当業者は、Remington's Pharmaceutical Science (17th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985)及びGoodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics (8th Ed., Pergamon Press, Elmsford, N.Y., 1990)のような広く知られており、利用可能な情報源において論考される原理及び手順に精通しており、これらはどちらも引用することにより本明細書の一部をなす。

【0151】

本発明の作用物質は、中性又は塩形態として配合することができる。薬学的に許容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来するもののような遊離アミノ基と形成される塩、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来するもののような遊離カルボキシル基と形成される塩が挙げられる。

【0152】

経口投与用の固体剤形には、従来のカプセル、持続放出性カプセル、従来錠剤、持続放出性錠剤、チュアブル錠剤、舌下錠剤、発泡錠剤、丸薬、懸濁液、粉末、顆粒及びゲルが含まれ得る。配合物は、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリド、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的な担体を含むことができる。かかる剤形は、通常の慣行のように、不活性希釈剤以外の付加的物质、例えば分散剤及び／又は造粒剤、界面活性剤及び／又は乳化剤、崩壊剤、結合剤、保存料、緩衝剤、滑沢剤及び／又は油を含んでいてもよい。カプセル、錠剤、発泡錠及び丸薬の場合、剤形は緩衝剤を含んでいてもよい。錠剤及び丸薬は、腸溶コーティングを施して調製することができる。

【0153】

例示的な希釈剤としては、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム、ラクトース、スクロース、セルロース、微結晶性セルロース、カオリン、マニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、コーンスターチ、粉糖及びそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0154】

例示的な造粒剤及び／又は分散剤としては、ジャガイモデンプン、コーンスターチ、タピオカデンプン、デンプングリコール酸ナトリウム、粘土、アルギン酸、グアーガム、柑橘類果肉 (citrus pulp)、寒天、ベントナイト、セルロース及び木製品、天然海綿、陽イオン交換樹脂、炭酸カルシウム、シリケート、炭酸ナトリウム、架橋ポリビニルピロリドン) (クロスボリドン)、ナトリウムカルボキシメチルデンプン (デンプングリコール酸ナトリウム)、カルボキシメチルセルロース、架橋ナトリウムカルボキシメチルセルロース (クロスカルメロース)、メチルセルロース、アルファ化デンプン (starch 1500)、微結晶性デンプン、水不溶性デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム (Veegum)、ラウリル硫酸ナトリウム、第四級アンモニウム化合物、並びにそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0155】

例示的な界面活性剤及び／又は乳化剤としては、天然乳化剤 (例えば、アラビアゴム、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、コンドラックス (chondrux)、コレステロール、キサントラン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、蠟及びレシチン)、コロイド粘土 (例えば、ベントナイト (ケイ酸アルミニウム) 及び Veegum (ケイ酸アルミニウムマグネシウム))、長鎖アミノ酸誘導体、高分子量アルコール (例えば、ステアリルアルコール、セチルアルコール、オレイルアルコール、モノステアリン酸トリアセチン、ジステアリン酸エチレングリコール、モノステアリン酸グリセリル及びモノステアリン酸プロピレングリコール、ポリビニルアルコール)、カルボマー (例えば、カルボキシポリメチレン、ポリアクリル酸、アクリル酸ポリマー及びカルボキシビニルポリマー)、カラギーナン、セルロース誘導体 (例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、粉末セルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース)、ソルビタン脂肪酸エステル (例えば、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 20)、ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 60)、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 80)、モノパルミチン酸ソルビタン (Span 40)、モノステアリン酸ソルビタン (Span 60)、トリステアリン酸ソルビタン (Span 65)、モノオレイン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン (Span 80))、ポリオキシエチレンエステル (例えば、モノステアリン酸ポリオキシエチレン (Myrj 45)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエトキシ化ヒマシ油、ステアリン酸ポリオキシメチレン及び Solutol)、スクロース脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル (例えば、Cremophor)、ポリオキシエチレンエーテル (例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 30))、ポリ (ビニルピロリドン)、モノラウリン酸ジエチレングリコール、オレイン酸トリエタノールアミン、オレイン酸ナトリウム、オレイン酸カリウム、オレイン酸エチル、オレイン酸、ラウリン酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、Pluronic F 68、ポロキサマー 188、臭化セトリモニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、ドクサートナトリウム等、及び／又はそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0156】

例示的な結合剤としては、デンプン (例えば、コーンスターチ及びデンプン糊) ; ゼラチン; 糖 (例えば、スクロース、グルコース、デキストロース、デキストリン、モラセス、ラクトース、ラクチトール、マンニトール) ; 天然及び合成ゴム (例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、アイリッシュモスの抽出物、パンワールゴム (panwar gum)、ガッチゴム、イサポール (isapol) 外皮の粘液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、微結晶性セルロース、酢酸セルロース、ポリビニルピロリドン)、ケイ酸アルミニウムマグネシウム (Veegum) 及び

50

カラマツアラビノガラクトン；アルギネート；ポリエチレンオキシド；ポリエチレングリコール；無機カルシウム塩；ケイ酸；ポリメタクリレート；蠟；水；アルコール；並びにそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0157】

例示的な防腐剤としては、酸化防止剤、キレート剤、抗微生物性防腐剤、抗真菌性防腐剤、アルコール防腐剤、酸性防腐剤及び他の防腐剤を挙げることができる。例示的な酸化防止剤としては、 α トコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、メタ重亜硫酸カリウム、プロピオン酸、没食子酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム及び亜硫酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なキレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、クエン酸一水和物、エデト酸二ナトリウム、エデト酸二カリウム、エデト酸、フマル酸、リンゴ酸、リン酸、エデト酸ナトリウム、酒石酸及びエデト酸三ナトリウムが挙げられる。例示的な抗微生物性防腐剤としては、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、プロノポール、セトリミド、塩化セチルピリジニウム、クロルヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、クロロキシレノール、クレゾール、エチルアルコール、グリセリン、ヘキセチジン、イミド尿素、フェノール、フェノキシエタノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀、プロピレングリコール及びチメロサルが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な抗真菌性防腐剤としては、ブチルパラベン、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム及びソルビン酸が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なアルコール防腐剤としては、エタノール、ポリエチレングリコール、フェノール、フェノール化合物、ビスフェノール、クロロブタノール、ヒドロキシベンゾエート及びフェニルエチルアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な酸性防腐剤としては、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンE、 β -カロテン、クエン酸、酢酸、デヒドロ酢酸、アスコルビン酸、ソルビン酸及びフィチン酸が挙げられるが、これらに限定されない。他の防腐剤としては、トコフェロール、酢酸トコフェロール、メシル酸デテロキシム（deteroxime mesylate）、セトリミド、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、エチレンジアミン、ラウリル硫酸ナトリウム（SLS）、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム（SLES）、亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、メタ重亜硫酸カリウム、Glydant Plus、Phenonip、メチルパラベン、Germa 115、Germa ben II、Neolone、Kathon及びEuxylが挙げられるが、これらに限定されない。或る特定の実施形態においては、防腐剤は酸化防止剤である。他の実施形態においては、防腐剤はキレート剤である。

【0158】

例示的な緩衝剤としては、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、グルセプト酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、D-グルコン酸、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、プロパン酸、レブリン酸カルシウム、ペント酸、第二リン酸カルシウム、リン酸、第三リン酸カルシウム、リン酸水酸化カルシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、第二リン酸カリウム、第一リン酸カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、第二リン酸ナトリウム、第一リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、発熱性物質除去水、等張食塩水、リンガー液、エチルアルコール及びそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0159】

例示的な滑剤としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステア

リン酸、シリカ、タルク、麦芽、ベヘン酸グリセリル、硬化植物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ラウリル硫酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム及びそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0160】

例示的な油としては、アーモンド、杏仁、アボカド、ババス、ベルガモット、クロフサスグリ種子、ルリチシャ、カデ、カモミール、キャノーラ、カラウエー、カルナウバ、ヒマシ、桂皮、ココアバター、ヤシ、タラ肝、コーヒー、トウモロコシ、綿実、エミュー、ユーカリ、月見草、魚、アマニ、ゲラニオール、ヒョウタン (gourd)、ブドウ種子、ヘーゼルナッツ、ヒソップ、ミリスチン酸イソプロピル、ホホバ、ククイナッツ、ラバンジン、ラベンダー、レモン、アオモジ、マカデミアナッツ、マロー、マンゴー種子、メドウフォーム種子、ミンク、ニクズク、オリーブ、オレンジ、オレンジラフィー、パーム、パーム核、モモ核、ピーナッツ、ケシ種子、カボチャ種子、ナタネ、ぬか、ローズマリー、ベニバナ、ビャクダン、サザンカ (sasquana)、セイバリー (savoury)、シーバックスーン、ゴマ、シアバター、シリコーン、ダイズ、ヒマワリ、ティーツリー、アザミ、ツバキ、ベチバー、クルミ及び小麦胚芽の油が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な油としては、ステアリン酸ブチル、カプリル酸トリグリセリド、カプリン酸トリグリセリド、シクロメチコン、セバシン酸ジエチル、ジメチコン360、ミリスチン酸イソプロピル、鉱油、オクチルドデカノール、オレイルアルコール、シリコーン油及びそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0161】

経口投与用の液体剤形には、手法で一般に使用される水等の不活性希釈剤を含有する薬学的に許容可能なエマルション、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルが含まれ得る。これらの組成物は、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤等の補助剤、並びに甘味料、香味料及び香料を含んでいてもよい。

【0162】

リボソーム、マイクロバブル、エマルション、マイクロ粒子、マイクロカプセル等への封入を含む様々な送達系が当該技術分野で既知である。

【0163】

注射用製剤、例えば水性又は油性懸濁液は、好適な分散剤、湿潤剤及び／又は懸濁化剤を用いて既知の手法に従って配合することができる。使用することができる許容可能なビヒクル及び溶媒には、水、リンガー溶液及び等張塩化ナトリウム溶液がある。滅菌油も溶媒又は懸濁媒体として従来使用されている。

30

【0164】

通例、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内又は脳室内投与用の組成物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。幾つかの実施形態においては、組成物は、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤を含有していてもよい。pH緩衝剤の例示的な非限定的な例としては、Tris-HCl緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液及びリン酸緩衝液又はそれらの組合せが挙げられる。本明細書で使用される「酢酸緩衝液」、「クエン酸緩衝液」及び「リン酸緩衝液」という用語は、有機酸（それぞれ酢酸、クエン酸及びリン酸）及びその塩を含む緩衝系を指すことがある。これらは各々、十分な量で添加することができる。本発明による組成物のpHは、約4～約8の範囲、好ましくは約5～約7の範囲、例えばpH5、pH5.5、pH6、pH6.5及びpH7であり得る。

40

【0165】

必要に応じて、本発明の作用物質は、可溶化剤と、注射部位でのあらゆる疼痛を和らげるために局所麻酔薬とを更に含む組成物に含まれる。概して、成分は、別個に又は単位剤形で混合して、例えば乾燥した凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、活性剤の量を示すアンブル又は小袋等の密閉容器内で供給される。組成物が注入によって投与される場合、滅菌された医薬品グレードの水又は生理食塩水の入った注入ボトルで調剤することができる。組成物が注射によって投与される場合、投与前に成分を混合し得るように、滅菌された

50

注射用水又は生理食塩水のアンブルを提供することができる。

【0166】

本発明の作用物質の有効量は、広範に変化させることができ、概して、特定の適用状況、曝露時間及び他の検討事項に応じて変化する。特定の実施形態においては、用量は0.01mg/kg～20mg/kg、好ましくは0.05mg/kg～10mg/kg、例えば0.1mg/kg～5mg/kg又は1mg/kg～2mg/kgの範囲である。

【0167】

第11の態様において、本発明は、本発明によるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞の1つ以上と薬学的に許容可能な担体、ビヒクル又は賦形剤とを混合することを含む、医薬組成物を調製するプロセスに関する。

10

【0168】

第12の態様において、本発明は、本明細書に定義されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞又は組成物を単独又は組合せで含むキットに関する。本明細書に記載の方法を行うための試薬、ツール及び／又は説明書は、キットで提供することができる。例えば、キットは、グラム陰性細菌によって引き起こされる感染の予防処置及び／又は治療処置に使用するため、又はグラム陰性細菌の成長を阻害するか、若しくはグラム陰性細菌の集団を減少させるか、若しくはグラム陰性細菌を死滅させる *in vitro* 方法を行うための試薬、ツール及び説明書を含み得る。例えば、上記グラム陰性細菌は、本明細書で上述した属又は種の1つ以上である。

20

【0169】

第13の態様において、本発明は、グラム陰性細菌の成長を阻害するか、又はグラム陰性細菌の集団を減少させるか、又はグラム陰性細菌を死滅させる *in vitro* 方法であって、細菌と本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞又は組成物とを接触させることを含む、*in vitro* 方法に関する。好ましくは、本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、タンパク質及びキメラタンパク質を含む）。例えば、上記グラム陰性細菌は、本明細書で上述した属又は種の1つ以上である。好ましい実施形態においては、上記グラム陰性細菌は、本明細書で上述した腸内細菌であり、好ましくは、上記グラム陰性細菌は、K. ニューモニエ又はE. コリである。他の好ましい実施形態においては、上記グラム陰性細菌は、アシネトバクター属、シュードモナス属、エシェリキア属及びクレブシエラ属からなる群、好ましくはE. コリ、K. ニューモニエ、A. バウマンニ及びP. エルギノーサからなる群より選択される1種以上である。

30

【0170】

第14の態様において、本発明は、タンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）又はコードされるポリペプチドがグラム陰性細菌の成長を阻害するか、グラム陰性細菌の集団を減少させるか、又はグラム陰性細菌を死滅させる特性を有する、本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、タンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、発現ベクター又は宿主細胞を提供する。例えば、上記グラム陰性細菌は、本明細書で上述した属又は種の1つ以上である。好ましい実施形態においては、上記グラム陰性細菌は、本明細書で上述した腸内細菌、好ましくはK. ニューモニエ又はE. コリである。他の好ましい実施形態においては、上記グラム陰性細菌は、アシネトバクター属、シュードモナス属、エシェリキア属及びクレブシエラ属からなる群、好ましくはE. コリ、K. ニューモニエ、A. バウマンニ及びP. エルギノーサからなる群より選択される1種以上である。

40

【0171】

本発明の作用物質（例えば、タンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク

50

質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む)、ポリヌクレオチド、発現ベクター又は宿主細胞)は、単独で、又は例えばEDTA、TRIS、乳酸、ラクトフェリン、ポリミキシン、クエン酸のような金属キレート剤を含むが、これらに限定されない、グラム陰性細菌の外膜の透過化剤と組み合わせて使用することができる(非特許文献32)。これは同じ又は別の組成物の一部であり得る。好ましい実施形態においては、本発明の作用物質は、透過化剤と組み合わせて使用されない。

【0172】

本明細書に記載される治療方法に使用されるタンパク質(配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む)、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞又は医薬組成物は、単独で(すなわち、単剤として)又は防腐試薬、ランチビオティック、バクテリオシン、他のエンドリシン若しくは抗生物質を含む1つ以上の治療剤と組み合わせて使用することができる。

【0173】

防腐試薬としては、デーキン液(Daquin's solution)、次亜塩素酸ナトリウム又はカリウム溶液、ベンゼンスルホクロラミドナトリウム溶液、ヨードポビドン等の或る特定のヨード剤、尿素過水和物溶液及びpH緩衝過酢酸溶液のような過酸化物、防腐添加物を含む又は含まないアルコール、ソルビン酸、安息香酸、乳酸及びサリチル酸等の弱有機酸、ヘキサクロロフェン、トリクロサン及びジブロモール等の幾つかのフェノール化合物、並びにベンザルコニウム、クロロヘキシジン、メチルイソチアゾロン、 α -テルピネオール、チモール、クロロキシレノールオクテニジン溶液等の陽イオン活性化化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0174】

第15の態様において、本発明は、本明細書に記載されるグラム陰性細菌感染を治療及び/又は予防する方法に使用される、本明細書に記載される本発明の作用物質(例えば、タンパク質(配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む)、ポリヌクレオチド、発現ベクター又は宿主細胞)、又はそれを含む医薬組成物)にも関し、上記治療は、別の薬物と組み合わせた本明細書に記載される本発明の作用物質の投与を含む。各作用物質は、それに一般的に用いられる用量及び/又は時間スケジュールで、単剤として又は併用療法において投与することができる。本発明のキメラタンパク質の投与量及び投与計画は、本明細書に記載されている。

【0175】

特定の実施形態においては、本明細書に記載される本発明の作用物質の投与は、同じ又は別の組成物の一部としての上記他の薬物の投与と同時である。別の特定の実施形態においては、本明細書に記載される本発明の作用物質の投与は、上記他の薬物の投与に対して順次(前又は後)である。

【0176】

好ましい実施形態においては、上記他の薬物は抗生物質である。本発明に用いられ得るグラム陰性細菌に対して使用される従来の抗生物質としては、スルホンアミド(例えば、スルファメトキサゾール及びトリメトプリム-スルファメトキサゾール)、ペニシリン(例えばチカルシリン、ピペラシリン、アモキシシリン(ウレイドペニシリン(例えばアズロシリン、ピペラシリン、メズロシリン)を含む)、セファロスポリン(例えばセフトジジム、セフェピム、セフォペラゾン)、モノバクタム(例えばアズトレオナム)、リンコサミド(例えばリンコマイシン)、フルオロキノロン(例えばシプロフロキサシン、レボフロキサシン、ノルフロキサシン)、カルバペネム(例えばイミペネム、メロペネム、エルトペネム、ドリペネム)、アミノグリコシド(例えばゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン)及びポリミキシン(例えばコリスチン、ポリミキシンB)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0177】

本発明は、本明細書に記載される本発明の作用物質と本明細書に記載される別の薬物、好ましくは抗生物質とを用いる併用療法による本明細書に記載されるグラム陰性細菌感染

の治療及び／又は予防のための薬剤の製造への本明細書に記載される本発明の作用物質の使用にも関する。

【0178】

本発明は、本明細書に記載されるグラム陰性細菌感染を治療及び／又は予防する方法であって、かかる治療を必要とする患者に治療有効量の本明細書に記載される本発明の作用物質を治療有効量の本明細書に記載される別の薬物、好ましくは抗生物質と組み合わせて投与することを含む、方法に更に関する。

【0179】

好ましい実施形態においては、上記組合せは相乗効果のある組合せである。実施例10に記載されるように、本発明のタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）と、好ましくはイミペネム及びメロペネムからなる群より選択されるカルバペネム系の抗生物質との間で相乗効果が見られた。このため、特に好ましい実施形態においては、本発明のキメラタンパク質は、カルバペネム抗生物質との併用療法として使用される。

【0180】

更なる態様において、本発明は、病院だけでなく一般世帯における材料及び／又は表面の消毒剤としての本明細書に記載されるタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）又はそれを含む組成物の使用にも関する。これらの材料及び／又は表面としては、医療機器、例えば関節置換術及び他のタイプの整形外科器具、人工心臓弁、ペースメーカー、植込み型除細動器、尿道カテーテル及びステント、腹膜透析カテーテル、血管内カテーテル、脳脊髄液シャント、乳房インプラント、並びに血管グラフト及びステントが挙げられるが、これらに限定されない。上記組成物は、本発明のタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）を含んでもよく、任意に他の消毒剤及び／又は界面活性剤を更に含み得る。

【0181】

本明細書に記載の任意の特徴を、本発明のタンパク質（配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質、本明細書に記載されるタンパク質及びキメラタンパク質を含む）、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、組成物、キット、任意の使用、医学的使用、治療方法、薬剤の製造方法、及び併用療法の実施形態のいずれかと任意に組み合わせることができ、本明細書において論考される任意の実施形態を、これらのいずれかに関して実行し得ることが企図される。本明細書に記載される特定の実施形態は、本発明の限定としてではなく、実例として示されることが理解される。

【0182】

全ての出版物及び特許出願は、各個々の出版物又は特許出願が引用することで本明細書の一部をなすことが具体的かつ個別に示されている場合と同じ程度に、引用することで本明細書の一部をなす。

【0183】

数量を特定していない語（the word "a" or "an"）の使用は「1つ」を意味する場合があるが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」、及び「1つ又は2つ以上」の意味とも一致する。「別の」という用語の使用は、1つ以上を指す場合もある。特許請求の範囲における「又は」の用語の使用は、代替物のみを指すように明示的に示されない限り、又は代替物が相互に排他的でない限り、「及び／又は」を意味するため使用される。

【0184】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される「含む、含んでいる（comprising）（及び「含む（comprise）」及び「含む（comprises）」等の「含む」の任意の形態）、「有する、有している（having）」（及び「有する（have）」及び「有する（has）」等の「有する」の任意の形態）、「含む、含んでいる（including）」（及び「含む（includes）」及び「含む（include）」等の「含む」の任意の形態）、又は「含有する、含有している（containing）」（及び「含有する（contains）」及び「含有する（

contain)」等の「含む」の任意の形態)の単語は、包括的又は無制限であり、追加の引用されていない要素又は方法の工程を除外しない。また、「含む (comprises)」という用語は、「からなる (consists of)」及び「から本質的になる (consists essentially of)」という用語も包含し、明示的に開示する。本明細書で使用される「から本質的になる」という語句は、特許請求の範囲を明示される材料又は工程、及び特許請求の範囲に記載される発明の基本的及び新規の特質 (複数の場合もある) に実質的に影響しないものに限定する。本明細書で使用される場合に、「からなる」という語句は、例えば要素又は制限に通常関連する不純物を除き、特許請求の範囲で明示されていない任意の要素、工程、又は成分を除外する。

【0185】

本明細書で使用される「又はそれらの組合せ」という用語は、その用語に先立って列挙される項目の全ての順列及び組合せを指す。例えば、「A、B、C、又はそれらの組合せ」には、A、B、C、AB、AC、BC、又はABCの少なくとも1つが含まれ、特定の文脈で順序が重要な場合は、BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC、又はCABも含まれることを意図する。この例を続けると、BB、AAA、AB、BBC、AABBCCC、CBBAAA、CABABB等の1つ以上の項目又は用語の繰り返しを含む組合せが明示的に含まれる。当業者は、文脈からそうでないことが明らかでない限り、通常、任意の組合せにおける項目又は用語の数に制限がないことを理解する。

【0186】

本明細書で使用される「約 (about)」、「程度 (around)」、「およそ (approximately)」等の限定されない近似語は、そのように修飾される場合、必ずしも絶対的又は完全であると理解されるものではなく、その状態を存在すると指定する根拠を与えるように十分近いと当業者にみなされる状態を指す。説明が変化し得る程度はどの程度の変更を行うことができるかに依存し、当業者に、修飾された特徴が必要な特質及び修飾されていない特徴の能力をまだ持っていることを認識させる。一般的に、前述の記述を条件として、「約」等の近似語によって修飾される本明細書の数値は、表示される値から±1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%又は10%異なってもよい。したがって、「約」という用語は、その値の表示値±5%、好ましくはその値の表示値±2%を意味し得て、最も好ましくは「約」という用語は表示値 (±0%) を正確に意味する。以下の実施例は、本発明を例示する役割を果たすものであり、その範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0187】

下記実施例に開示するアッセイは、以下の材料及び方法を用いて行った。

【0188】

細菌株及び培養培地

使用した細菌株及び培養培地を表1に詳細に記載する。

【0189】

使用した全ての溶液及び培養培地は、120℃及び1気圧のオートクレーブ内での湿式加熱又は直径0.2 µmの滅菌Milliporeフィルターを用いた濾過によって滅菌した。

【0190】

抗生物質は濃縮水溶液で調製した。これらの溶液を濾過によって滅菌し、-20℃で保存した。

【0191】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 細菌及び培養培地

細菌（血清型）	参照	温度 (°C)	培養培地
エシェリキア・コリ（O 6）	ATCC 25922	37	ルリアーベルターニ（L B）ブロス
エシェリキア・コリ（O 1 5 7 : H 7）	DSM 17076	37	ルリアーベルターニ（L B）ブロス
エシェリキア・コリMDR	93658 ^a	37	ルリアーベルターニ（L B）ブロス
エシェリキア・コリMDR	93729 ^a	37	ルリアーベルターニ（L B）ブロス
エシェリキア・コリMDR	93449 ^a	37	ルリアーベルターニ（L B）ブロス
エシェリキア・コリMDR	94657 ^a	37	ルリアーベルターニ（L B）ブロス
スタフィロコッカス・キシロ ーサス	ATCC 29971	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
エンテロコッカス・フェシウ ム	ATCC 19434	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
エンテロコッカス・フェカー リス	ATCC 19433	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
エンテロコッカス・アビウム	ATCC 14025	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
シトロバクター・フロインデ イイ	ATCC 30039	30	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
エンテロバクター・クロアカ エ	ATCC 13047	30	トリプチックソイブロス（T S B）
セラチア・マルセッセンス	ATCC 13880	30	トリプチックソイブロス（T S B）
クレブシエラ・ニューモニエ	ATCC 13883	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
クレブシエラ・ニューモニエ	ATCC 700603 ^b	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
クレブシエラ・ニューモニエ	ATCC BAA-170 5 ^c	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
クレブシエラ・ニューモニエ	ATCC BAA-170 6 ^d	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
アシネトバクター・バウマン ニ	ATCC 19606	30	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
アシネトバクター・バウマン ニ	NCTC 13304 ^e	30	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
シュードモナス・エルギノー サ	ATCC 10145	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）
シュードモナス・エルギノー サ	ATCC 27853 ^f	37	トリプチケースソイ酵母エキス培地 （T S Y）

^a 家禽農場において病気のニワトリから得られた多剤耐性分離株。9 3 5 6 8 はスルファミド、アモキシシリン、リンコマイシン、リンコスぺクチン、エンロフロキサシン、ネオマイシン及びドキシサイクリンに耐性を示し、9 3 7 2 9 はスルファミド、アモキシシリン、リンコマイシン、エンロフロキサシン、ネオマイシン及びドキシサイクリンに耐性を示し、9 3 4 4 9 はアモキシシリン、リンコマイシン、リンコスぺクチン、エンロフロキサシン、ネオマイシン及びドキシサイクリンに耐性を示し、9 4 6 5 7 はスルファミド、アモキシシリン、リンコマイシン、リンコスぺクチン、ネオマイシン及びドキシサイクリンに耐性を示す。

^b βラクタムに耐性を示す。

^c βラクタム、フルオロキノロン及びトリメトプリム／スルファメトキサゾールに耐性を示す。

^d カルバペネムに耐性を示す。

^e アミノグリコシド及びトリメトプリム／スルファメトキサゾールに耐性を示す。

^f βラクタムに耐性を示す。

【0192】

I K B 2 0 6 及び I K B 2 0 6 変異体の構築、発現及び精製

I K B 2 0 6 は、エンテロバクターファージ A r y a（N C B I アクセッション番号 N C _ 0 3 1 0 4 8 . 1）の推定エンドリシン（配列番号 1）（タンパク質 I D : Y P _ 0 0 9 2 8 4 3 2 6 . 1）と、バチルス・アミロリクエファシエンス（非特許文献 3 3）（アクセッション番号 A A K 4 0 2 8 0 . 1）ファージエンドリシンの推定細胞壁結合ドメイン（D 8）（配列番号 2）との融合の結果得られたものである。2つの I K B 2 0 6 構築物を設計し、G e n S c r i p t（商標）を用いて発現プラスミド p E T 2 9 b（+）にクローニングした。第 1 の構築物においては、2つのタグ（S タグ及び H i s タグ）を

コードする配列がプラスミドから除去されるように、IKB206キメラをコードするDNAフラグメントをプラスミドにクローニングした。第2の構築物においては、タグに対応する配列を除去せず、得られる融合物にトロンビンの切断部位及び3つのアミノ酸を付加して、トロンビン切断効率を改善させた。非限定的な例示を目的として、キメラ溶解素の概略図を図1に示す。

【0193】

加えて、ファージAryaのみに由来する推定エンドリシンを、タグを有しないIKB206と同じ戦略に従ってプラスミドpET29b(+)にクローニングした。この構築物をIKB206ΔD8と名付けた。

【0194】

これら3つのIKB206組換えプラスミドをコンピテントエシェリキア・コリBL21(DE3)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)に形質転換した。

【0195】

タグを用いた過剰発現については(IKB206タグ)、形質転換したBL21(DE3)細胞を、 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ の硫酸カナマイシンを添加したLB培地中にて 37°C で培養した。培養物の600nmでの吸光度(A_{600})が1.5に達した時点で、1mMのイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、 37°C で4時間～5時間インキュベートした。細胞を遠心分離($10000\times g$ 、30分)によって回収し、 $20\text{mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 0.5M NaCl 、 20mM イミダゾール(pH7)に再懸濁し、Branson Sonifier SFX150(Branson Sonic Power, Danbury)を用いて破裂させた。可溶性タンパク質画分(上清)を遠心分離($15000\times g$ 、30分)によって分離し、濾過($0.45\mu\text{m}$)した後、精製した。Niセファロースをプレロードした5mLのプレパックHiTrap FFカラムを用い、AKTASTarクロマトグラフィーシステム(GE Healthcare, USA)においてIKB206タグを精製した。 $20\text{mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 0.25M NaCl 、 0.4M イミダゾール(pH8)でIKB206タグを溶出させた。続いて、AKTASTarクロマトグラフィーシステム(GE Healthcare, USA)の5mL HiTrap(商標)Desalting及び $20\text{mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH6)を用いてIKB206タグを脱塩した。IKB206タグを -20°C で保存した。

【0196】

タグを有しないIKB206の過剰発現については、形質転換したBL21(DE3)細胞を、 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ の硫酸カナマイシンを添加した自己誘導性LBブロス培地(Studier FW, 2005)中にて 37°C で培養した。 37°C で3時間後に温度を 25°C に変化させ、細胞を4時間培養した後、採取した。細胞を遠心分離($10000\times g$ 、30分)によって回収し、 50mM Tris (pH9)、プロテアーゼ阻害剤(Thermo Fisher Scientific Massachusetts USA)及びDNase I(Roche)を含有する溶解バッファーに再懸濁し、Branson Sonifier SFX150(Branson Sonic Power, Danbury)での超音波処理によって溶解させた。可溶性タンパク質画分(上清)を遠心分離($23666\times g$ 、1時間30分)によって分離し、濾過($0.22\mu\text{m}$)した後、精製した。AKTAGoクロマトグラフィーシステム(Cytiva life sciences, USA)に接続した5mL HiTrap SP HPカラムを用いる陽イオン交換クロマトグラフィーにタンパク質溶液を供した。IKB206を 50mM Tris 、 1M NaCl (pH9)の勾配で溶出させた。タンパク質の存在をSDS-PAGEによって確認し、タンパク質を含有する画分をプールし、最終容量がおよそ2mL～5mLとなるまで濃縮した。溶液を $0.22\mu\text{m}$ で濾過し、 20mM Tris 、 500mM NaCl (pH8)で予め平衡化したHiLoad 16/600 Superdex 75サイズ排除カラムにロードした。タンパク質の存在をSDS-PAGEによって確認した。続いて、AKTAGoクロマトグラフィーシステム(Cytiva, USA)に接続した5mL HiTrap Desaltingカラム及び $10\text{mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{N}$

10

20

30

40

50

a H₂ P O₄ (p H 6) を用いて I K B 2 0 6 を脱塩した。I K B 2 0 6 を - 8 0 °C で保存した。

【0197】

I K B 2 0 6 Δ D 8 の過剰発現については、形質転換した B L 2 1 (D E 3) 細胞を、3 0 μ g / m L の硫酸カナマイシンを添加した L B プロス培地中にて 3 7 °C で培養した。培養物の 6 0 0 n m の吸光度 (A₆₀₀) が 0 . 8 に達した時点で、1 m M のイソプロピル-β-d-チオガラクトピラノシド (I P T G) を添加し、細胞を 2 5 °C で一晩インキュベートした後、採取した。細胞を遠心分離 (1 0 0 0 0 × g、3 0 分) によって回収し、5 0 m M T r i s (p H 8 . 5)、プロテアーゼ阻害剤 (Thermo Fisher Scientific Massachusetts USA) 及び D N a s e I (Roche) を含有する溶解バッファーに再懸濁し、Branson Sonifier SFX150 (Branson Sonic Power, Danbury) での超音波処理によって溶解させた。可溶性タンパク質画分 (上清) を遠心分離 (2 3 6 6 6 × g、1 時間 3 0 分) によって分離し、濾過 (0 . 2 2 μ m) した後、精製した。AKTA goクロマトグラフィーシステム (Cytiva life sciences, USA) に接続した 5 m L H i T r a p S P H P カラムを用いる陽イオン交換クロマトグラフィーにタンパク質溶液を供した。エンドリシンを 5 0 m M T r i s、1 M N a C l (p H 8 . 5) の勾配で溶出させた。タンパク質の存在を S D S - P A G E によって確認し、タンパク質を含有する画分をプールし、0 . 2 2 μ m で濾過した。AKTA goクロマトグラフィーシステム (Cytiva, USA) に接続した 5 m L H i T r a p d e s a l t i n g カラム及び 1 0 m M N a₂ H P O₄ / N a H₂ P O₄ (p H 6) を用いてタンパク質を脱塩した。I K B 2 0 6 Δ D 8 を - 8 0 °C で保存した。

10

20

【0198】

精製タンパク質の定量は、クマシーブルー (Thermo Fisher Scientific) を用いるブラッドフォード法及び Spectrostar Nano 分光光度計 (BMG labtech) での A₅₉₅ によって行った。単離タンパク質の純度は、S D S - P A G E によって検証した。S D S - P A G E 分析は、T r i s - M O P S - S D S 電気泳動バッファー (GenScript, Nanjing) 中、定電圧 (2 0 0 V) で 4 % ~ 1 2 % S u r e P a g e (商標) ゲル (GenScript, Nanjing) を用いて行った。

【0199】

酵素殺菌活性アッセイ

酵素 I K B 2 0 6 (タグなし、タグあり又は D 8 ドメインなし) の殺菌活性を分析するために行われる実験は、Loessner et al. (Loessner, M.J. et al. 2002) 及び Schmelcher et al. (Schmelcher, M. et al. 2010) によって以前に記載されているプロトコルの修正バージョンを用いて行った。簡潔に述べると、様々な細菌培養物を株に応じて特定の培地 (表 1) 中にて 3 7 °C 又は 3 0 °C で A₆₀₀ が 0 . 3 に達するまでインキュベートした。次いで、細胞を遠心分離 (4 5 0 0 × g、1 0 分) によって堆積させ、対応する緩衝液で 2 回洗浄し、A₆₀₀ を約 0 . 3 に調整した。1 6 0 μ l 容量の細菌懸濁液を滅菌 9 6 ウェルプレートに移し、4 0 μ l の研究対象の酵素を 1 μ g / m L ~ 6 0 μ g / m L の用量範囲で添加した。対照ウェルは、酵素を含有する同じ容量の緩衝液で処理した。プレートを 3 7 °C でインキュベートした。異なる時点でサンプルを取り、段階希釈を行い、特定の培地の入ったプレートに播種して、生菌数を決定した。実験は少なくとも 3 回繰り返した。I K B 2 0 6 (及びその変異体) の殺菌効果を所与のインキュベーション時間後に処理の存在下で減少した log 数として定量化した (log₁₀ (N₀ / N_i))、ここで、N₀ = 処理前の C F U / m L の数及び N_i = 各処理の存在下での対応するインキュベーション時間後の C F U / m L の数である。化合物は、該化合物とのインキュベーション後に初期細菌数が 9 9 . 9 % 以上減少した場合 (3 log 以上の減少)、殺菌活性を有するとみなされる。

30

40

【0200】

酵素比活性アッセイ

比活性 (U / m G) は、酵素の冷緩衝液 (I K B 2 0 6 タグについては 1 0 m M N a

50

$\text{H}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6)、卵白リゾチームについては 50mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.2) に再懸濁した 0.6mg/mL の M. リゾディクティカス (M. lysodeikticus) 凍結乾燥細胞の懸濁液を基質として用い、この懸濁液を異なる酵素濃度でインキュベートすることで決定した。卵白リゾチーム (Fisher BioReagents (商標) Lysozyme) を対照として用いた。具体的には、 $100\mu\text{L}$ の M. リゾディクティカス懸濁液をマルチウェルプレートに三連でプレATINGし、異なる酵素濃度の $100\mu\text{L}$ を対応するウェルに添加した。プレートを恒温分光光度計に入れて適切な温度でインキュベートし (IKB 206 タグについては 37°C 、卵白リゾチームについては 25°C)、 A_{450} の減少を 10 分間にわたってモニタリングした。

10

【0201】

単位の定義：1 単位は、約 $0.4\text{mg/mL} \sim 0.6\text{mg/mL}$ の M. リゾディクティカス懸濁液を用いて、 1cm キュベットにおいて適切な温度及び各リゾチームの pH で、溶解により 450nm での吸光度の $0.001/\text{分}$ の減少を触媒するのに必要な酵素の量である。

【0202】

物理化学的特性評価アッセイ

IKB 206 タグの酵素活性に最適な条件を研究する実験を E. コリ殺菌活性アッセイによって行った。その目的で、E. コリ株 ATCC 25922 及び $1\mu\text{g/mL} \sim 60\mu\text{g/mL}$ のタンパク質濃度を用いた。アッセイは、 $6 \sim 8$ の pH 範囲及び $10\text{mM} \sim 50\text{mM}$ のリン酸ナトリウム緩衝液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 濃度範囲で行った。

20

【0203】

安定性研究

IKB 206 の安定性を決定する実験を 60 分間のインキュベーション時間での E. コリ殺菌活性アッセイによって行った。その目的で、異なる濃度のグリセロール (0% 、 0.2% 、 2% 、 5% 及び 10%) に溶解した E. コリ株 ATCC 25922 及び $15\mu\text{g/mL}$ の IKB 206 を使用した。アッセイは、異なる保存温度 (-80°C 、 -20°C 、 4°C 、 25°C) 及び保存時間 (1 日、5 日、7 日、14 日、21 日及び 29 日) で行った。

30

【0204】

スルホローダミン B を用いた細胞毒性アッセイ

実験を行う前にヒト HEK 293 細胞を用いて播種試験を行った。その目的で、3 つの異なる細胞濃度で 96 ウェルプレート内の $100\mu\text{L}$ の DMEM 培地 + 10% ウシ胎仔血清 (FBS) に播種した。これらの細胞を 37°C 及び $5\% \text{CO}_2$ で 72 時間インキュベートし、成長をモニタリングした。72 時間で 80% のコンフルエンスを示す初期細胞濃度が更なるアッセイに選択され、この場合、 7000 細胞/ウェルであった。

【0205】

細胞の播種の 24 時間後に、試験対象の精製タンパク質 IKB 206 タグの濃度、この場合、 $400\mu\text{g/mL}$ 、 $200\mu\text{g/mL}$ 、 $100\mu\text{g/mL}$ 及び $50\mu\text{g/mL}$ を有する培地を更に $100\mu\text{L}$ 添加した。アッセイは四連で行った。対照として、細胞を培養培地のみ及びタンパク質を溶解させる緩衝液のみ (ビヒクル対照) とインキュベートした。ビヒクル対照として添加した緩衝液の容量は、最高タンパク質濃度と同じ容量とした。プレートを更に 48 時間インキュベートした。

40

【0206】

1 ウェル当たり $50\mu\text{L}$ の 50% 冷トリクロ酢酸 (TCA) を添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートすることで細胞を固定することによって結果を得た。TCA を捨てた後、プレートを蒸留水で洗浄し、 $40\mu\text{L}$ の 0.4% スルホローダミン B (SRB) を添加した。プレートを室温で 15 分間インキュベートし、 1% の酢酸で 3 回の洗浄を行い、プレートを乾燥させた。最後に 1 ウェル当たり $200\mu\text{L}$ の 10mM Tris

50

B a s eを添加し、室温で攪拌しながら20分間インキュベートし、S R Bを再懸濁した。結果をC y t a t i o n 5 (Bioteck, USA) にて510nmの吸光度で読み取った。

【0207】

ゼブラフィッシュにおける敗血症モデルを用いた有効性アッセイ

成体ゼブラフィッシュを用いた実験は、Noain (Navarre) のIkan Biotechの施設で行われた。上記アッセイの全ての科学的方法は、2013年2月8日の勅令53/2013に従い、またナバーラ大学 (Pamplona, Spain) の動物実験委員会 (Institutional Committee for the Care and Use of Animal) によって承認された国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針の規則に従って行われた。上記施設に属する委員会により、本研究において動物を用いて行われる全ての実験が承認された (プロトコル034-17及び改訂e035-17)。

10

【0208】

7日間で100%の死亡率を引き起こした最小致死量を算出するために、5匹の6ヶ月齢の野生型雌性ゼブラフィッシュの群に、LB培地中の異なる細菌希釈率のE. コリ株を腹腔内 (I P) 接種した。

【0209】

最小致死量を決定した後、6ヶ月齢の野生型ゼブラフィッシュ (1.2g) に、LB培地中で成長させた 5.5×10^7 CFU/mLの細菌E. コリを含む合計10μlを腹腔内 (I P) 接種した。全ての実験を少なくとも3回繰り返した。

20

【0210】

キメラI K B 2 0 6 タグによってもたらされる保護を研究するために、5匹の6ヶ月齢の野生型雌性ゼブラフィッシュの群に、致死量の細菌E. コリ (5.5×10^7 CFU) を腹腔内 (I P) 感染させた。1時間後に1mg/kg体重、0.5mg/kg体重及び0.25mg/kg体重の用量で10μlのI K B 2 0 6 タグを皮下投与することによって動物を処理した。対照群に含まれる魚は、タンパク質を溶解させる緩衝液で処理した。動物を1日に数回観察し、感染後72時間 (h p i) で死亡数を毎日記録した。

【0211】

相乗効果研究に使用した細菌株、抗生物質及びエンドリシン

本研究に使用したE. コリ株及びそれらのMICを表2に示す。I K B 2 0 6 タグエンドリシンは、前述のようにエシェリキア・コリB L 2 1 (D E 3) 株から精製した。

30

【0212】

【表2】

表2. 10mM T P - N a (p H 6. 15) 中の各抗生物質及びI K B 2 0 6 タグのMIC (mg/L)

抗生物質	E. コリ A T C C 25922
メロペネム (Sigma-Aldrich)	0.59
イミペネム (Sigma-Aldrich)	2.34
IKB206	9.375

40

【0213】

チェッカーボード及びアイソボログラム分析

チェッカーボード試験は、以前に記載されているように微量希釈法によって評価した (Moody JA 1992, Moellering EG., Jr. 1996)。全ての化合物を、2倍段階希釈にて通常は0.03倍~2倍MICの範囲の6つの濃度で試験した。各マイクロタイターウェルに、1ウェル当たり200μlの10mMリン酸ナトリウム (T P - N a) 緩衝液 (p H 6. 15) の最終容量で、対応する化合物を含むか又は含まない 1×10^5 CFU/mLのE. コリ接種材料を100μl入れ、プレートを37℃で17時間インキュベートした。

50

【0214】

部分阻害濃度指数 (fractional inhibitory concentration: FICI) は、単独での IKB206 又は各抗生物質の MIC で除算した組合せでの IKB206 タグ又は各抗生物質の MIC として算出した (Moody JA 1992, Moellering EG., Jr. 1996)。FICI は、以下のように FICI を合計して得た：

$$FICI_X = FICI_A + FICI_B = \text{組合せでの } MIC_A / MIC_A + \text{組合せでの } MIC_B / MIC_B$$

【0215】

薬物 A の MIC をアイソログラムの x 軸、薬物 B の MIC を y 軸に示す。これら 2 つのデータを結ぶ線が無差別線 (相互作用なし) である。組合せの様々な FICI 値が相乗的 ($FICI \leq 0.5$)、部分的な相乗効果 ($0.5 < FICI < 1$)、相加的 ($FICI = 1$)、無関係 ($1 < FICI < 2$) 又は拮抗的 ($FICI > 2$) 相互作用を示す。

【0216】

単剤及び組合せの *in vitro* 時間－死滅曲線試験

臨床・検査標準協会 (CLSI) ガイドライン (National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Wayne, PA: CLSI; 1999. Document M26-A) に従って時間－死滅アッセイを評価した。時間－死滅アッセイにおける組合せの研究は、相乗効果が証明された濃度で各抗生物質及び酵素を単独で又は組み合わせて用いて行った。これらのアッセイにおいては、 1×10^6 CFU/mL の試験株を 10 mM TP-Na (pH 6.15) 中にて個々の化合物又は組合せとともに別々のチューブでインキュベートした。17 時間の時点で、アリコートを各チューブから取り出し、滅菌生理食塩水を用いて段階希釈し (1:10)、細胞生存性を決定した。各希釈物から 10 μ l を LB 寒天プレートに添加し、37℃で 24 時間インキュベートした (検出限界、 10^2 CFU/mL)。臨床・検査標準協会によると、2 つの抗微生物剤の組合せは、実験の終了時、この場合は 17 時間の時点で、個々の化合物によって観察された減少の合計と比較して CFU/mL の 2 log 単位以上の減少を引き起こした場合に相乗的であるとみなされる (CLSI ガイドライン)。

【0217】

バイオインフォマティクス分析

BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、GenomeNet (<http://www.genome.jp>)、Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 及び PFAM (<http://pfam.xfam.org>) 等のインターネット上でアクセス可能なプログラムをバイオインフォマティクス分析に用いた。

【0218】

IKB206 の触媒キャビティ及び D8 ドメインの構造モデルは、オンラインで利用可能なソフトウェアである Phyre2 (Kelley LA et al. 2015) 及び SwissModel (Waterhouse, A et al. 2018) を用いて構築した。配列アラインメントは、Clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 及び Esprript (<http://esprript.ibcp.fr/ESPrript/ESPrript/>) を用いて作成した。

【0219】

構造分析及び図面は、Pymol (<https://pymol.org/2/>) にてオンラインで利用可能) 及び Chimera ソフトウェア (Pettersen EF et al. 2004) を用いて作成した。

【0220】

統計分析

本研究全体を通して示したデータは、アッセイのタイプに応じて 3 回～5 回の独立実験の繰返しから得られた結果の代表である。さらに、各データには平均及び標準誤差を示す。プログラム GraphPad Instat バージョン 3.0 (GraphPad Software

10

20

30

40

50

e, San Diego, CA) 及びソフトウェア *Stata* 15.0 (StataCorp LLC, Texas, TX) を統計分析に用いた。

【0221】

in vitro 殺菌活性アッセイには、データの特性（正規性及び等分散性）に応じて、クラスカルウォリス検定をマンホイットニーU検定とともに用い、分散分析（ANOVA）をチューキー検定又はt検定とともに用いた。

【0222】

ヒト細胞毒性に関するデータにはクラスカルウォリス検定を用いた。

【0223】

様々な動物モデルにおける酵素IKB206の保護効果を決定する生存実験においては、異なる実験群における生存動物の有意値を検証するために、ANOVAをダネット検定及び順序ログランク（マンテルーコックス）検定とともに用いた。

【0224】

実施例1. - IKB206及びIKB206タグの発現及び精製

N末端及びC末端にSタグ及び6xHisタグを有する（IKB206タグ、図1b）、並びにいかなるタグも有しない（IKB206、図1a）という、2つの異なる方法でキメラをpET-29b（+）プラスミドにクローニングした。最初のアッセイは、精製プロセスを容易にするためにIKB206タグを用いて行った。キメラがE. コリに対して殺菌活性を示すことが観察された後、タグを有しないキメラであるIKB206を用いて以下の殺菌アッセイを行った。

【0225】

A600が約1.5の培養物を37℃及び200rpmで4時間～5時間、1mM IPTGで誘導することによってIKB206タグを過剰発現させた。これは、精製工程において上記条件でより良好な結果が得られたためである。6xHisタグを用いるアフィニティークロマトグラフィーによってタンパク質精製を行った。図2に得られたIKB206タグのタンパク質純度を示す。図に見られるように、コンピューターによる推定サイズは、電気泳動において得られたサイズ（35.4kDa）と一致する。

【0226】

自己誘導性LBブロス（Studier FW, 2005）を用いて25℃及び200rpmで4時間、IKB206を過剰発現させた。pH9での陽イオン交換クロマトグラフィー（IKB206のpIは約10である）に続くサイズ排除クロマトグラフィーによってタンパク質精製を行った。図2bに得られたIKB206のタンパク質純度を示す。バンドの分子量は、29.9kDaであるコンピューターによるIKB206の分子量と一致する。

【0227】

実施例2. - 物理化学的特性評価

最大活性を得ることを目的として、*in vitro* アッセイにおけるIKB206タグの最適条件を決定するために、IKB206タグの殺菌活性に対する異なるリン酸ナトリウム緩衝液濃度及びpHの影響を調査した。その目的で、リン酸緩衝液に異なる濃度で再懸濁し、異なるpHに調整したE. コリATCC 25922を基質として使用した。異なる条件下での対照とタンパク質による処理との間のCFU/mLの差を測定したところ、濃度10mM及びpH6のリン酸緩衝液中で最高の殺菌活性が観察されることが見出された（データは示さない）。

【0228】

さらに、バイオインフォマティクスポータルExPASy ProtParamにより、タンパク質の正味電荷及びモジュールの正味電荷の両方を、それぞれの配列に基づいて推定した。完全なタンパク質の正味電荷は+21であり、ファージAryaエンドリシンに対応するモジュールの正味電荷は+7であり、モジュールD8の正味電荷は+15である。

【0229】

実施例3. - 安定性研究

10

20

30

40

50

キメラ I K B 2 0 6 の最適な保存条件を決定するために、異なる温度で異なる時間にわたって保存したキメラを用いて殺菌活性アッセイを行った。さらに、研究した様々な保存条件においてグリセロールがタンパク質の安定性を高めるのに役立つかを研究した。キメラタンパク質は、29日間の保存時に試験した全ての温度及びグリセロール濃度で依然として完全に活性であることが見出された（データは示さない）。

【0230】

実施例4. - I K B 2 0 6 タグの機能的特性評価

I K B 2 0 6 タグ活性の最適条件が決定された後、酵素の機能的特性評価を行った。この目的で、この酵素の比活性（U / m g）及び殺菌活性を決定した。

【0231】

リゾチームの酵素活性を決定する標準的な試験は、酵素とのインキュベーション後の無傷 M . リゾディクティカス細胞の懸濁液の A ₄₅₀ の減少を測定することである。このタイプの2回の独立アッセイを行い、上記のプロトコルに従った後、I K B 2 0 6 タグの比活性が 8 1 0 0 U / m g 程度であると決定された。

【0232】

比活性を決定した後、異なる濃度の E . コリ A T C C 2 5 9 2 2 に対するこの酵素の殺菌活性を決定した。上記のプロトコルに従い、15 μ g / m L の濃度で僅か5分間のインキュベーション後に、I K B 2 0 6 タグが対照と比べて C F U / m L の数を有意に（2 log 又は 1 0 0 倍超）減少させ得る（P < 0 . 0 5）ことが観察された（図3）。さらに、インキュベーション時間を15分まで延長すると、I K B 2 0 6 タグの存在下での C F U / m L の減少は、僅か 5 μ g / m L の濃度で有意であった（P < 0 . 0 5）。10⁵ C F U / m L からなる細菌懸濁液から開始して、このタイプのアッセイを行ったところ、この酵素が 6 0 μ g / m L の濃度では15分、15 μ g / m L の濃度では30分のインキュベーション時間で培養物全体を死滅させ得ることが観察された（図3）。言い換えると、I K B 2 0 6 は、30分以内の細菌懸濁液のインキュベーションで 5 log（1 0 0 0 0 0 倍）の減少を達成することができた。

【0233】

I K B 2 0 6 タグ活性を E . コリ株 A T C C 2 5 9 2 2（O6血清型）以外の血清型にまで拡張し得るかを決定するために、血清型 O 1 5 7 : H 7 の E . コリ株 D S M 1 7 0 7 6 を含むように研究を拡大した。前述の結果に基づいて、これらのアッセイに適した濃度として 15 μ g / m L を選択した。図4に得られた結果を示す。組換え溶解素は、培養物全体を死滅させることはできないが、E . コリ株 D S M 1 7 0 7 6 細胞の数を有意に減少させた。

【0234】

E . コリの多剤耐性（MDR）E . コリ株がヒト及び動物の健康に対して有する臨床的重要性のために、一連のアッセイを行い、ニワトリから単離された M D R 株に対する I K B 2 0 6 タグの殺菌活性を決定した（表1を参照されたい）。概して、I K B 2 0 6 タグが 15 μ g / m L で30分間のインキュベーション後に、アッセイにおいて存在する細菌数の 2 log ~ 5 log（1 0 0 倍 ~ 1 0 0 0 0 0 倍）の減少を有意に達成し得ることが観察された（図5）。

【0235】

実施例5. - ニワトリの微生物叢に対する I K B 2 0 6 タグの影響の研究

本書の目的は、ヒト及び動物の両方の健康への応用のために E . コリに対して殺菌効果を有する分子を得ることである。その目的で、E . コリに対するこの酵素の特異性を実証し、ニワトリに存在する細菌微生物叢との相互作用のあらゆる可能性、ひいては上記微生物叢に由来する影響のあらゆる可能性の存在を排除するために、40日齢を超えるニワトリに存在する細菌集団、すなわち S . キシローサス（S. xylosus）、E . アビウム（E. avium）、E . フェシウム（E. faecium）及び E . フェカリス（E. faecalis）の株に対する I K B 2 0 6 の殺菌活性を分析した（Proietti, P.C. et al. 2006）。図6の結果から、I K B 2 0 6 が分析したニワトリの微生物叢の株に対して実質的に影響を及ぼさ

10

20

30

40

50

ないことが示された。

【0236】

実施例6. - IKB206の作用スペクトルの研究

加えて、IKB206の作用スペクトルを決定するために、他の腸内細菌（シトロバクター・フロインディイ、エンテロバクター・クロアカエ、セラチア・マルセッセンス及びクレブシエラ・ニューモニエ）及び他の非腸内細菌グラム陰性細菌（アシネトバクター・バウマンニ及びシュドモナス・エルギノーサ）に対するこの酵素の殺菌活性を研究した。腸内細菌に対する効果については、IKB206がK. ニューモニエに対して高い殺菌活性を示し、すなわち、試験条件下で4対数以上の減少が観察されたことを図7に観察することができる。しかしながら、C. フロインディイにおいては同じ効果は示されず、この効果がインキュベーション時間とともに増大することが観察されたにもかかわらず、殺菌活性は、E. コリ又はK. ニューモニエにおいて観察される活性よりも顕著に低かった。S. マルセッセンスの場合、IKB206は、C. フロインディイと比較して高い効果を発揮する。S. マルセッセンスについては、試験したインキュベーション時間では、E. コリにおいて観察された致死率に達しなかったが、インキュベーション時間とともにはるかに大きな上昇傾向が観察され、120分のインキュベーション時間でほぼ3対数の殺菌効果に達した。他の非腸内細菌グラム陰性細菌に対して殺菌活性の研究を拡大すると、IKB206がA. バウマンニ及びP. エルギノーサに対しても高い殺菌活性を示し、4 log 超のCFU/mLの減少が得られることが観察された（図8）。

10

20

【0237】

実施例7. - IKB206の作用機序の研究

IKB206の作用機序を研究するために、酵素の二次構造をモデル化し、IKB206の活性におけるドメインD8の重要性を決定した。

【0238】

IKB206の推定タンパク質構造を決定するために、オンラインで利用可能なソフトウェアPhyre2 (Kelley LA et al. 2015) 及びSwissmodel (Waterhouse A et al. 2018) (図9A及び図9B)を用いて触媒ドメイン及びD8ドメインの構造モデルを別個に構築した。

【0239】

D8ドメインは、サーマス・サーモフィラスの推定エンドペプチダーゼのN末端LysMドメインを鋳型として用いて構築した(Wong JE et al. 2015)。触媒ドメインの出力モデルは、アシネトバクター・バウマンニAB 5075 UW2プロファージムラミダーゼの結晶構造を鋳型として用いて構築した(Sykilinda NN et al. 2018)。触媒ドメインの構造モデルから、T4リゾチーム及び他のT4リゾチーム様エンドリシン、例えばP22ファージリゾチーム(Mooers BH et al. 2006)又はエシェリキア・コリDLP12プロファージによってコードされるエンドリシン(Babu K et al. 2018)に類似した全体的なフォールドが明らかとなった。T4リゾチームの触媒機構は、十分に説明され、触媒反応に関与する残基も十分に説明されている(Rennel D et al, 1991、Kuroki R et al, 1995、Kuroki R et al, 1999)。P21及びP22等の他のエンドリシンが触媒クレフトに同様のアミノ酸を有し(Xu M, et al. 2005、Mooers B H et al. 2006、Maciejewska B et al. 2017)、通常はE-8aa-D/C-5aa-Tモチーフによって形成される、いわゆる触媒三残基を構成することも示されている(Babu K et al. 2018)。このモチーフの存在は、T4リゾチーム様エンドリシンの特徴として記載されている(Sun Q et al. 2009、Maciejewska B et al. 2017、Babu K et al. 2018)。IKB206の配列から、残基E15、D24及びT33が、全てT4リゾチーム様エンドリシンと特定されているDLP12エンドリシン、T4リゾチーム、P22リゾチーム及びBA 5075 UWムラミダーゼ(それぞれBabu K et al. 2018、Daopin S et al. 1991、Mooers BH et al. 2006、Sykilinda NN et al. 2018)の触媒残基とよく一致していることが明らかである(図9D)。さらに、これらのエンドリシン(それぞれPDBコード1L48、4ZPU、2ANV及び6ET6

30

40

50

）の結晶構造（図 9 C）に対する I K B 2 0 6 の構造モデルの構造重ね合わせと、配列アラインメントとから、E 1 5、D 2 4 及び T 3 3 が I K B 2 0 6 の触媒三残基を構成し得ることが示される。T 4 リゾチームの別の構造的特徴は、R 1 4 5 と触媒 E 1 1 との間の塩橋の存在である（Rennel D et al, 1991、Babu K et al. 2018）。触媒グルタミン酸と C 末端領域近くに位置するアルギニンとの間の塩橋の存在は、他の T 4 リゾチーム様エンドリシン間で保存されている（Babu K et al. 2018）。この塩橋の役割が触媒クレフト内のグルタミン酸側鎖の位置を配向することであると提唱されている（Rennel D et al, 1991、Babu K et al. 2018）。I K B 2 0 6 の構造モデルにおいては、R 1 3 9 が E 1 5 と塩橋を形成する可能性があり、E 1 5 が I K B 2 0 6 の触媒残基の 1 つであるという仮説が支持される。

10

【0240】

これらの研究結果から、I K B 2 0 6 の触媒ドメインが T 4 リゾチーム様エンドリシンに属し、残基 E 1 5、D 2 4 及び T 3 3 が酵素の触媒三残基を形成するという考えが支持される。

【0241】

ドメイン D 8 の重要性を決定するために、触媒ドメインのみに対応するタンパク質である I K B 2 0 6 Δ D 8 を得た。この構築物の過剰発現を L B ブロス中で行った。タンパク質過剰発現を、A 6 0 0 が約 0.8 に達した時点で、1 mM IPTG を用いて 25℃ 及び 200 rpm で 16 時間誘導した。I K B 2 0 6 Δ D 8 を陽イオン交換クロマトグラフィーによって pH 8.5 (pI 約 9.5) で精製した。図 2 C に得られたタンパク質の純度を示す。このバンドの分子量は、17.54 kDa であるコンピューターによるタンパク質の分子量と一致する。E. コリ株 ATCC 25922 における I K B 2 0 6 Δ D 8 の殺菌活性を決定するアッセイにより、D 8 ドメインの非存在下でポリペプチドが殺菌活性を呈することが示された。しかしながら、I K B 2 0 6 と同じレベルの殺菌活性を得るためには、より長いインキュベーション時間が必要であった（図 10）。

20

【0242】

実施例 8. - *in vivo* 敗血症モデルにおける I K B 2 0 6 タグの有効性の研究

I K B 2 0 6 タグが生物における E. コリ感染の治療に有効であることを決定可能にするために、この分子の有効性をゼブラフィッシュにおいて E. コリ誘導敗血症モデルで評価する一連のアッセイを行った。

30

【0243】

実行が容易かつ迅速であり、この手法を様々な実験動物群への使用に特に適応されるものとすることから、腹腔内 (IP) 経路を感染モデルに選択する。E. コリ ATCC 25922 による感染の 1 時間後に、様々な用量の I K B 2 0 6 を各群に投与した。72 h p i で高い保護能が観察され、使用濃度の高いものから順に 66.6%、33.3% 及び 16.6% が保護された（図 11）。さらに、成魚における I K B 2 0 6 の毒性を決定するために、有効性アッセイに使用した最高量 (1 μg/g) のタンパク質を非感染魚に接種するアッセイを行った。タンパク質緩衝液を注射した魚と 1 μg/g のタンパク質を注射した魚との間に差がないことが観察された（データは示さない）。

【0244】

40

実施例 9. - ヒト細胞に対する I K B 2 0 6 タグの毒性の研究

ヒトにおける I K B 2 0 6 の適用可能性のためにヒト細胞に対する I K B 2 0 6 タグの毒性を決定するため、ヒト HEK 293 細胞株に対して毒性アッセイを行った。アッセイの毒性がタンパク質ではなく、緩衝液に関連する場合に備えて、I K B 2 0 6 タグタンパク質を溶解する緩衝液を含めた。図 12 に示されるように、対照（培養培地）と様々なアッセイ濃度との間に有意差は観察されなかった ($p > 0.05$)。

【0245】

実施例 10. - I K B 2 0 6 タグと抗生物質との間の相乗効果の可能性の研究

I K B 2 0 6 タグ及びカルバペネム抗生物質の相乗効果

2 つ以上の抗細菌の組合せの探索は、それらが相乗的に作用し得るため有用な可能性が

50

あり、個々の薬物の殺菌活性を改善するのに効果的な方法である。抗生物質と組み合わせた I K B 2 0 6 タグの殺菌効果を試験するために、MDR E . コリ疾患に対して最も一般的に使用される幾つかの薬物を試験した (Hawkey P.M. et al. 2018)。特に、カルバペネム系に属する2つの抗生物質を使用した。E . コリ株として、C L S I ガイドラインによる標準 E . コリ株である E . コリ株 A T C C 2 5 9 2 2 を選択した。

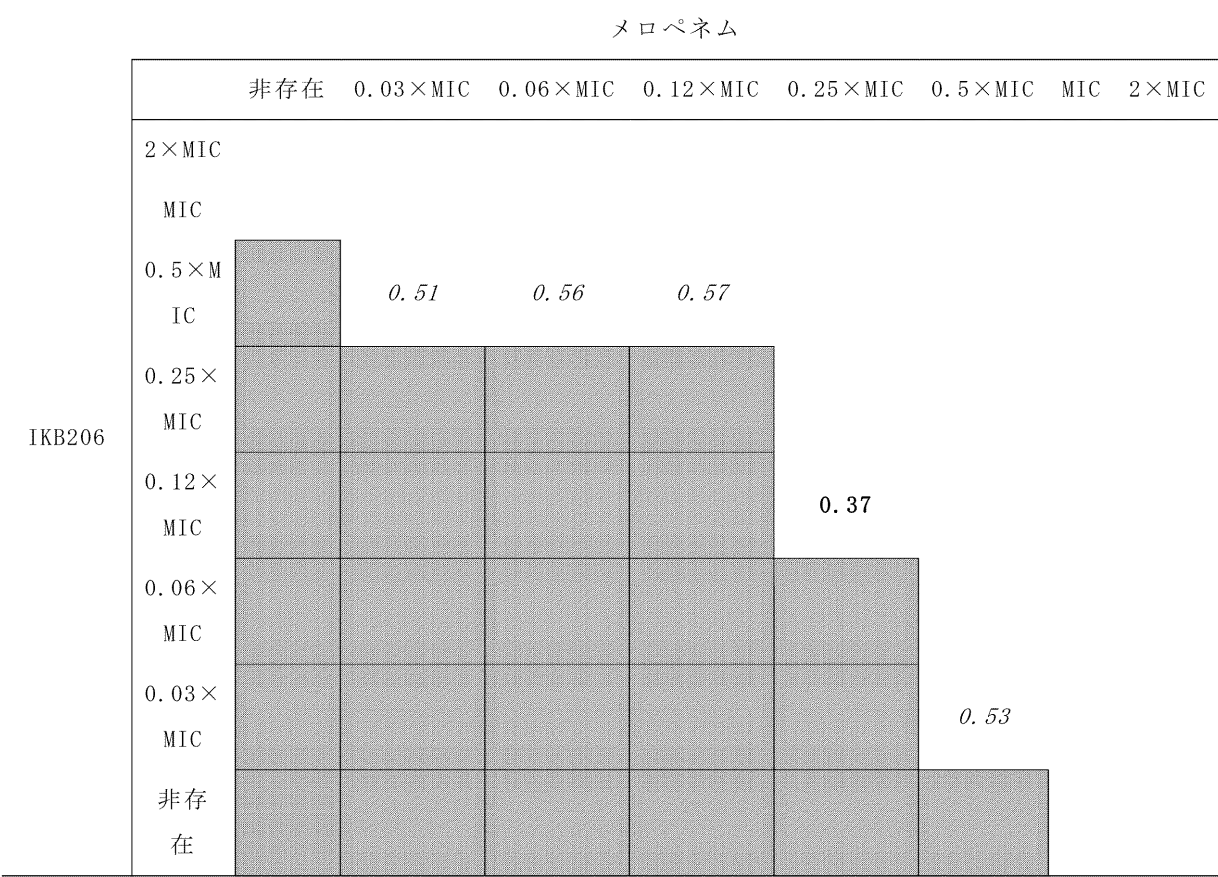
【 0 2 4 6 】

使用した組合せ (I K B 2 0 6 タグ及び抗生物質) を試験するチェッカーボード i n v i t r o 研究の結果を表 3 及び表 4 にまとめ、エンドリシン及び抗生物質の各組合せについてのアイソログラムを図 1 3 に示す。これらのデータから、特定の抗生物質に応じて相乗効果及び相加効果の両方が実証された。興味深いことに、組合せのいずれも無関係な効果又は拮抗効果をもたらさなかった。メロペネム又はイミペネムを I K B 2 0 6 タグと組み合わせて使用することで相乗効果が見られた。

【 0 2 4 7 】

【表 3】

表 3 . チェッカーボード法によってメロペネムと I K B 2 0 6 タグとの組合せから得られた F I C I 値。太字で表示される値は相乗効果、イタリック体は部分的な相乗効果を示し、縞模様のボックスは細菌成長を示す。



【 0 2 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. チェッカーボード法によってイミペネムと I K B 2 0 6 タグとの組合せから得られた F I C I 値。太字で表示される値は相乗効果、イタリック体は部分的な相乗効果を示し、縞模様のボックスは細菌成長を示す。

		イミペネム							
		非存在	0.03×MIC	0.06×MIC	0.12×MIC	0.25×MIC	0.5×MIC	MIC	2×MIC
I K B 2 0 6	2×MIC								
	MIC								
	0.5×MIC		<i>0.51</i>	<i>0.56</i>	<i>0.57</i>				
	0.25×MIC								
	0.12×MIC						0.37	0.62	
	0.06×MIC								
	0.03×MIC								
	非存在								

【0249】

E. コリ株に対する薬物の組合せの時間－死滅分析

I K B 2 0 6 タグとメロペネム及びイミペネムとの相乗活性の可能性を確認するために、E. コリ株 A T C C 2 5 9 2 2 に対して時間－死滅アッセイを行った。チェッカーボード及びアイソログラムの結果に従って抗生物質及び I K B 2 0 6 タグの濃度範囲を決定した。これらの濃度を単剤又は組合せで各処理に使用した。図 1 4 に示す結果から、抗生物質及び I K B 2 0 6 の組合せが試験化合物の M I C 未満の用量で有効であることが実証された。

【0250】

さらに、幾つかの試験濃度で効果が相乗的であることが示され、すなわち、C L S I ガイドラインと一致して、生存細胞が 1 7 時間の処理後に対照に対して少なくとも 2 l o g 単位減少した。

【0251】

全体として、最初のチェッカーボード実験では、カルバペネム系の抗生物質について相乗効果が示唆された。これらの結果は、E. コリ A T C C 2 5 9 2 2 株を用いた時間－死滅アッセイによって確認され、メロペネム及びイミペネムを I K B 2 0 6 タグと組み合わせた場合に明らかな相乗効果が示された。

【0252】

参考文献：

- (1) Farber, L. Antibiotics in Food Preservation. Annu. Rev. Microbiol. 1959. 13: 125-140.
- (2) Davies, J. y Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR. 2010. 74: 417-4335.

- (3) Frankel, R.B.; Kalmijn, A.J.; Amann, R.; Ludwig, W.; Petersen, N.; Arakaki, A.; Matsunaga, T.; Bleil, U.; Kirschvink, J.L.; Sievert, S.M.; et al. Sampling the Antibiotic Resistome. *Science*. 2006. 311: 374-378.
- (4) Tenover, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control*. 2006. 34: S3-S10.
- (5) Starrels, J.L.; Barg, F.K.; Metlay, J.P. Populations at Risk Patterns and Determinants of Inappropriate Antibiotic Use in Injection Drug Users. *J. Gen. Intern. Med*. 2009. 24: 263-269.
- (6) Manjusha Lekshmi 1, Parvathi Ammini 2, Sanath Kumar 1 and Manuel F. Varela 3. The Food Production Environment and the Development of Antimicrobial Resistance in Human Pathogens of Animal Origin. *Microorganism*. 2017. 5: 11.
- (7) Smith, K.E.; Besser, J.M.; Hedberg, C.W.; Leano, F.T.; Bender, J.B.; Wicklund, J.H.; Johnson, B.P.; Moore, K.A.; Osterholm, M.T. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. Investigation Team. *N. Engl. J. Med*. 1999. 340: 1525-1532.
- (8) WHO. The World Is Running Out of Antibiotics, WHO Report Confirms. 2017. Available online: [http:// www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/en/) (accessed on 3 January 2018).
- (9) O' Neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. 2016. Available online: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf (accessed on 1 March 2018).
- (10) Adeyi, O.O.; Baris, E.; Jonas, O.B.; Irwin, A.; Berthe, F.C.J.; Le Gall, F.G.; Marquez, P.V.; Nikolic, I.A.; Plante, C.A.; Schneidman, M.; et al. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future; Final Report; World Bank Group: Washington, DC, USA, 2017.
- (11) Antilles N, Blanco A, Camprubi Q, Jove R y Biarnes M. Analisis de resistencias a antimicrobianos de cepas de *E. coli* aisladas en aves en Espana de 1998 a 2013 Centre de Sanitat Avicola de Catalunya i Arago (CESAC) Reus, Tarragona, Espana.
- (12) Czaplewski, L.; Bax, R.; Clokie, M.; Dawson, M.; Fairhead, H.; Fischetti, V.A.; Foster, S.; Gilmore, B.F.; Hancock, R.E.; Harper, D.; et al. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *Lancet Infect. Dis*. 2016. 16: 239-251.
- (13) Hermoso J.A., Garcia J.L. and Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol*. 2007. 10: 461-472.
- (14) Fischetti V.A., Nelson D. and Schuch R. Reinventing phage therapy : are the parts greater than the sum? *Nat. Biotechnol*. 2006. 24:1508-11.
- (15) Pires, D.P.; Oliveira, H.; Melo, L.D.; Sillankorva, S. and Azeredo, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: Their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016. 100, 2141-2151.
- (16) Nelson D., Loomis L. and Fischetti V.A. Prevention and elimination colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. 98:4107-4112.
- (17) Yoong P., Schuch R., Nelson D. and Fischetti V.A. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol*. 2004. 186:4808-4812.

- (18) Zimmer M., Vukov N., Scherer S. and Loessner M.J.: The murein hydrolase of the bacteriophage Φ 3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. 68:5311-5317.
- (19) Cheng Q., Nelson D., Zhu S. and Fischetti V.A.: Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. 49:111-117.
- (20) McCullers J.A., Karlstroem A., Iverson A.R., Loeffler J.M. and Fischetti V.A.: Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* 2007. 3: e28. 10
- (21) Schmelcher M.; Tchang V.S. and Loessner M.J. Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity. *Microb. Biotechnol.* 2011. 4, 651-662.
- (22) Diez-Martinez, R.; De Paz H.D.; Garcia-Fernandez, E.; Bustamante, N.; Euler, C.W.; Fischetti, V.A.; Menendez, M. and Garcia, P. A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015.70, 1763-1773.
- (23) Becker S.C.; Foster-Frey J.; Stodola A.J.; Anacker D. and Donovan D.M. Differentially conserved staphylococcal SH3b_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain. *Gene.* 2009. 443: 32-41. 20
- (24) Yang H.; Linden S.B.; Wan J.; Yu J.; Nelson D.C. and Wei, H. A chimeolysin with extended-spectrum streptococcal host range found by an induced lysis-based rapid screening method. *Sci. Rep.* 2015. 5, 17257.
- (25) Yang H.; Bi Y.; Shang X.; Wang M.; Linden S.B.; Li Y.; Nelson D.C. and Wei H. Antibiofilm activities of a novel chimeolysin against *Streptococcus mutans* under physiological and cariogenic conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. 60: 7436-7443.
- (26) Briers Y. and Lavigne R. Breaking barriers: Expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiol.* 2015. 10: 377-390. 30
- (27) Briers Y., Walmagh M., Van Puyenbroeck V. et al. Engineered endolysin-based 'Artilyns' to combat multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *MBio.* 2014. 5 (4): e 01379 - e 01414.
- (28) Wang, S., Gu, J., Lv, M., Guo, Z., Yan, G., et al. The antibacterial activity of *E. coli* bacteriophage lysin Lysep3 is enhanced by fusing the *Bacillus amyloliquefaciens* bacteriophage endolysin binding domain D8 to the C-terminal region. *J Microbiol.* 2017. 55(5):403-408.
- (29) Heselpoth, R.D., Euler, C. W., Schuch, R. y Fischetti, V. A. Lysocins: Bioengineered Antimicrobials that Deliver Lysins Across the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. 2019. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.00342-19 40
- (30) Loessner, M.J., Kramer, K., Ebel, F. y Scherer, S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* 2002. 44: 335-349.
- (31) Schmelcher, M., Shabarova, T., Eugster, M.R., Eichenseher, F., Tchang, V.S., Banz, M., et al. Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding 50

domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. 76: 5745-5756.

(32) Tikhe, C., and Husseneder, C. Whole genome sequencing and characterization of *Enterobacter* phage Arya isolated from the termite gut. Direct submission National Center for Biotechnology Information, NIH. 2016

(33) Morita, M., Tanji, Y., Orito, Y., Mizoguchi, K., Soejima, A. and Unno, H. Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquifaciens* phage endolysin against Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*. 2001. 500: 56-59.

(34) Proietti, P.C., Castellini, C., Pedrazzoli, M., Dal Bosco, A. and Franciosini, M. Bacterial Counts and Characterization of Intestinal Flora in Organic and Conventional Chickens. World 's Poultry Science Association (WPSA), Beekbergen, the Netherlands. 2006.

(35) OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, in 236.

(36) David A and Pancharatna K. Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *J Appl Toxicol*. 2009 7:597-602.

(37) Fischetti, V., Nelson, D. and Schuch, R. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nat Biotechnology*. 2006. 24 (12): 1508-11.

(38) Vazquez, R., Garcia, E. and Garcia, P. Phage Lysins for Fighting Bacterial Respiratory Infections: A New Generation of Antimicrobials. *Front Immunol*. 2018. 9: 2252.

(39) Sao-Jose, C. Engineering of Phage-Derived Lytic Enzymes: Improving Their Potential as Antimicrobials. *Antibiotics*. 2018. 7, 29.

(40) Orito Y., Morita, M., Hori, K., Unno, H. and Tanji, Y. *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin can enhance permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane and induce cell lysis. *Appl Microbiol Biot* echnol. 2004. 65 (1): 105-9.

(41) Hojckova, K., Stano, M. y Klucar, L. phiBIOTICS: catalogue of therapeutic enzybiotics, relevant research studies and practical applications. *BMC Microbiol*. 2013. 13: 53.

(42) Letrado P., Corsini, B., Diez-Martinez, R., Bustamante, N., Yuste, J. E. and Garcia, P. Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus. *Future Microbiol*. 2018. 13 (11): 1215-1223.

(43) Vazquez, R., Domenech, M., Iglesias-Bexiga, M., Menendez, M. and Garcia, P. Csl2, a novel chimeric bacteriophage lysin to fight infections caused by *Streptococcus suis*, an emerging zoonotic pathogen. *Sci Rep*. 2017. 7(1): 16506.

(44) Hooper, L.V., Littman, D.R. and Macpherson, A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012. 336(6086):1268-1273.

(45) Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S. and Gordon, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006. 444:1022.

(46) Cani, P.D. and Delzenne, N.M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*. 2009. 15:1546-1558.

(47) Claus, S.P., Ellero, S.L., Berger, B., Krause, L., Bruttin, A., et al. Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction. *Mol Bio*.

2011. 2: e00271-e00210.

(48) Spor, A., Koren, O. and Ley, R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011. 9:279.

(49) Schulfer A.F., Battaglia, T., Alvarez, Y., Bijmens, L., Ruiz, V.E., et al. Intergenerational transfer of antibiotic-perturbed microbiota enhances colitis in susceptible mice. *Nat Microbiol.* 2018. 3:234.

(50) Le Roy, C.I., Woodward, W.J., Ellis, R. J., La Ragione, R.M. and Claus, S.P. Antibiotic treatment triggers gut dysbiosis and modulates metabolism in a chicken model of gastro-intestinal infection. *BMC Vet Res.* 2019. 25 (1): 37.

(51) Kelley L.A, Mezulis S, Yates C.M, Wass M.N, Sternberg M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015 Jun;10(6):845-58. doi: 10.1038/nprot.2015.053.

(52) Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303 (2018)

(53) Daopin, S., Alber, T., Baase, W.A., Wozniak, J.A., Matthews, B.W. Structural and thermodynamic analysis of the packing of two alpha-helices in bacteriophage T4 lysozyme.(1991) *J Mol Biol* 221: 647-667

(54) Babu K, Arulandu A, Sankaran K. The structure of DLP12 endolysin exhibiting alternate loop conformation and comparative analysis with other endolysins. *Proteins.* 2018 Feb;86(2):210-217. Doi:10.1002/prot.25428. Epub 2017 Dec 1.

(55) Mooers, B.H., Matthews, B.W.Extension to 2268 atoms of direct methods in the ab initio determination of the unknown structure of bacteriophage P22 lysozyme.(2006) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62: 165-176

(56) Sykilinda NN, Nikolaeva AY, Shneider MM, Mishkin DV, Patutin AA, Popov VO, Boyko KM, Klyachko NL, Miroshnikov KA Structure of an Acinetobacter Broad-Range Prophage Endolysin Reveals a C-Terminal α -Helix with the Proposed Role in Activity against Live Bacterial Cells. *Viruses.* 2018 Jun 6;10(6):309. doi: 10.3390/v10060309.

(57) Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ.; Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012; 7(10): 1147-1171.

(58) Minogue TD, Daligault HA, Davenport KW, Bishop-Lilly KA, Broome SM, Bruce DC, Chain PS, Chertkov O, Coyne SR, Freitas T, Frey KG, Gibbons HS, Jaissle J, Redden CL, Rosenzweig CN, Xu Y, Johnson SL. Complete Genome Assembly of Escherichia coli ATCC 25922, a Serotype O6 Reference Strain. *Genome Announc.* 2014 Sep-Oct; 2(5): e00969-14.

(59) Nelson DC, Schmelcher M, Rodriguez-Rubio L, Klumpp J, Pritchard DG, Dong S, Donovan DM., Endolysins as antimicrobials, *Adv Virus Res.* 2012;83:299-365.

(60) Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev.* 56(3):395-441 (1992).

(61) Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures.

Protein Expr Purif. 2005 May;41(1):207-34. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016

10

20

30

40

50

- (62) Santin and Cascales. Measure of peptidoglycan hydrolase activity. *Methods Mol Biol.* 1615: 151-158 (2017).
- (63) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018.
- (64) Moody JA. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology; DCUSA: 1992. pp. 5.18.1-28.
- (65) Moellering EG., Jr . Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. The Williams & Wilkins Co.; MD USA: 1996. pp. 330-396
- (66) Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004, 25, 1605-1612.
- (67) Peter M Hawkey, Roderic E Warren, David M Livermore, Cliodna A M McNulty, David A Enoch, Jonathan A Otter, A Peter R Wilson. Treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: report of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy/Healthcare Infection Society/British Infection Association Joint Working Party. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 73, Issue suppl_3, 1 March 2018, Pages iii2-iii78.
- (68) Huttner A. and Gambillara V. The development and early clinical testing of the ExPEC4V conjugate vaccine against uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Oct;24(10):1046-1050.
- (69) Wong JE, Midtgaard SR, Gysel K, Thygesen MB, Sorensen KK, Jensen KJ, Stougaard J, Thirup S, Blaise M An intermolecular binding mechanism involving multiple LysM domains mediates carbohydrate recognition by an endopeptidase.
- (70) Rennell D, Bouvier SE, Hardy LW, Poteete AR. Systematic Mutation of Bacteriophage T4 Lysozyme. *J Mol Biol* 1991;222:67-88.
- (71) Kuroki R, Weaver LH, Matthews BW. Structure-based design of a lysozyme with altered catalytic activity. *Nat Struct Biol* 1995;2:1007-1011
- (72) Kuroki R, Weaver LH, Matthews BW. Structural basis of the conversion of T4 lysozyme into a transglycosidase by reengineering the active site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8949-8954.
- (73) Xu M, Arockiasamy A, Struck DK, Swanson S, Sacchettini JC, Young R. Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science* 2005;307:113-117
- (74) Maciejewska B, Zrubek K, Espaillet A, Wisniewska M, Rembacz KP, Cava F, Dubin G, Drulis-Kawa Z Modular endolysin of Burkholderia AP3 phage has the largest lysozyme-like catalytic subunit discovered to date and no catalytic aspartate residue. *Sci Rep.* 2017 Nov 6;7(1):14501. doi: 10.1038/s41598-017-14797-9.
- (75) Sun Q, Kutty GF, Arockiasamy A, Xu M, Young R, Sacchettini JC. Regulation of a muralytic enzyme by dynamic membrane topology. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Nov;16(11):1192-4. doi: 10.1038/nsmb.1681. Epub 2009 Nov 1.
- (76) Masi, M., Refregiers, M., Pos, K. et al. Mechanisms of envelope per

10

20

30

40

50

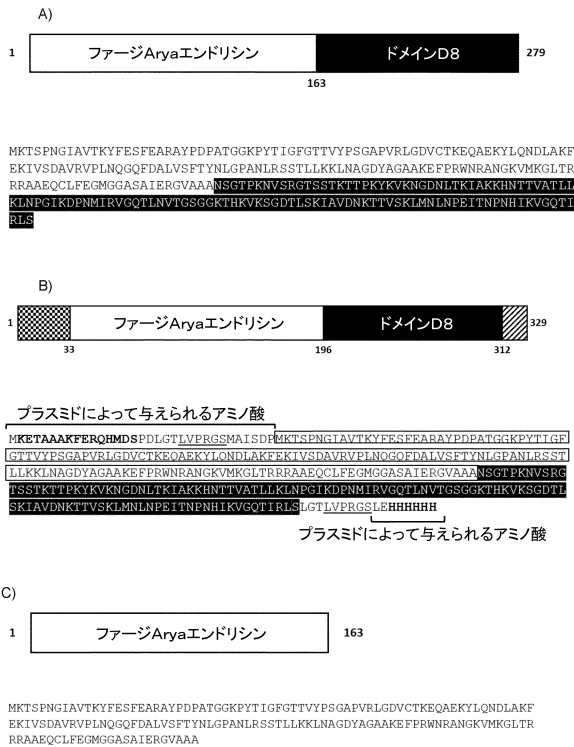
meability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol* 2, 17001 (2017).

(77) Duering, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkmann, O. and Gieffers, W. (1999) *FEBS Lett.* 449, 93-100.

【図面】

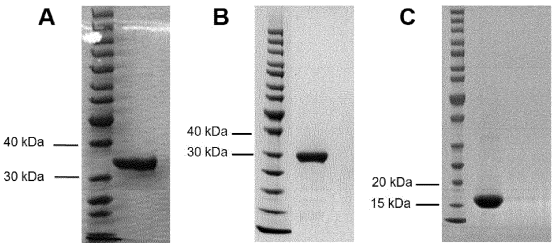
【図 1】

FIG. 1



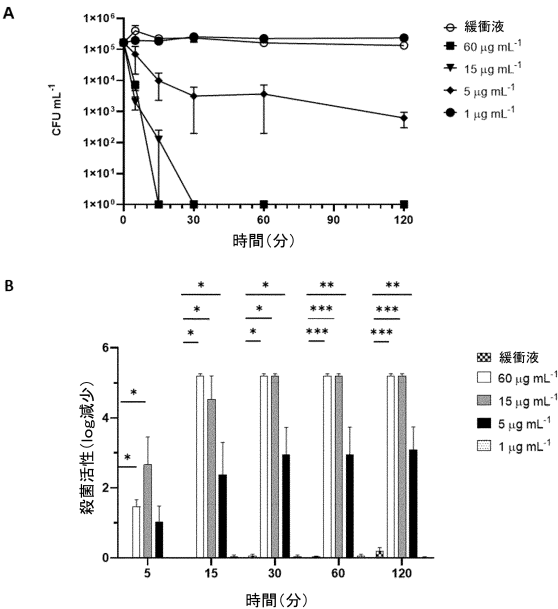
【図 2】

FIG. 2



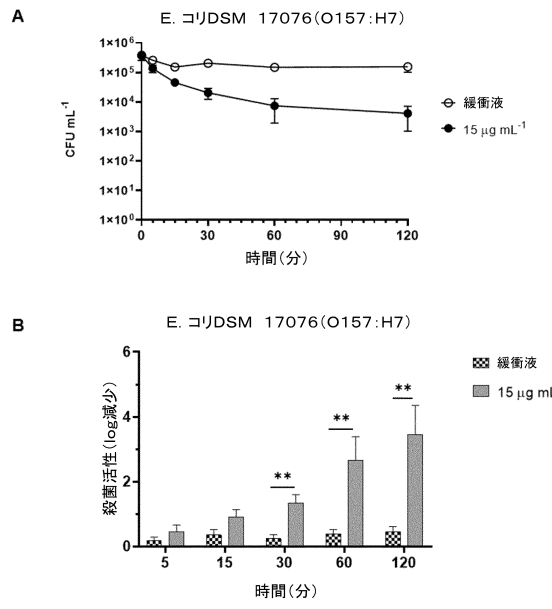
【図 3】

FIG. 3



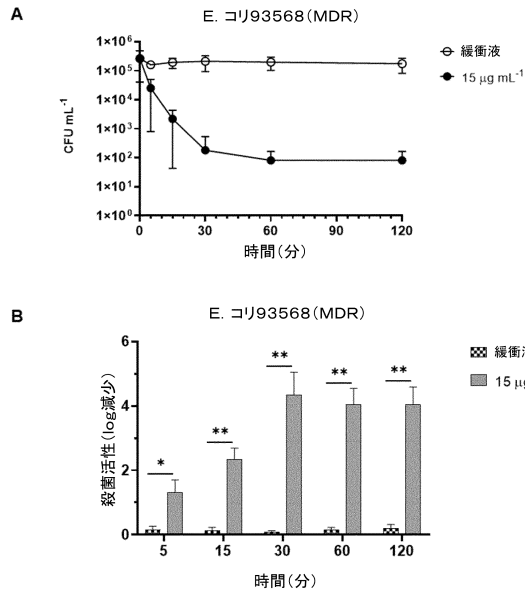
【図 4】

FIG. 4



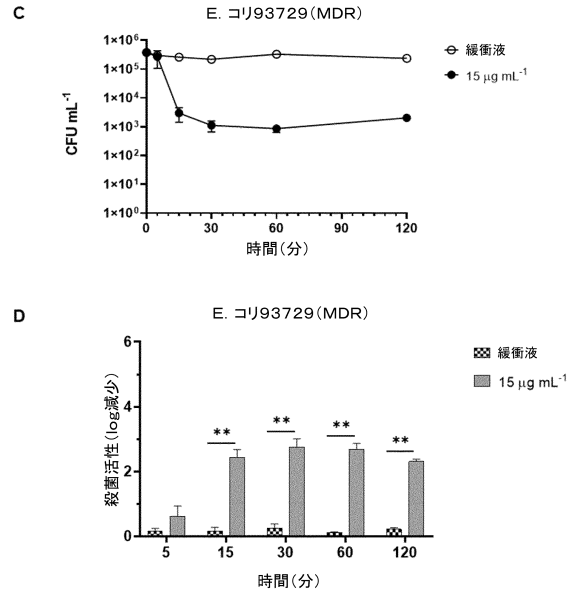
【図 5 - 1】

FIG. 5



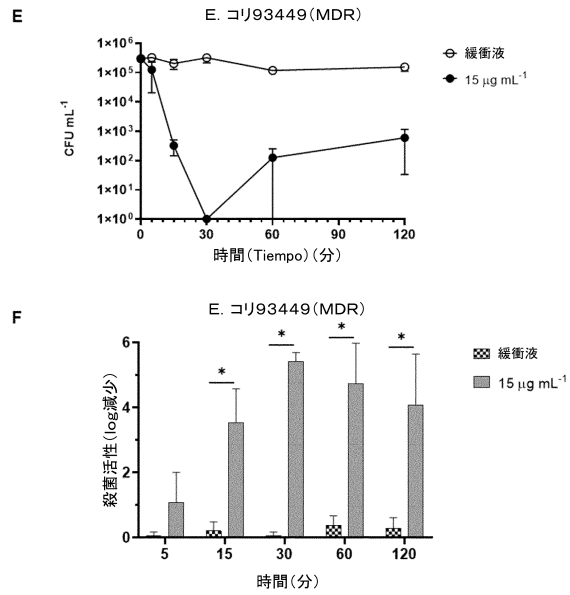
【図 5 - 2】

FIG. 5 (cont.)



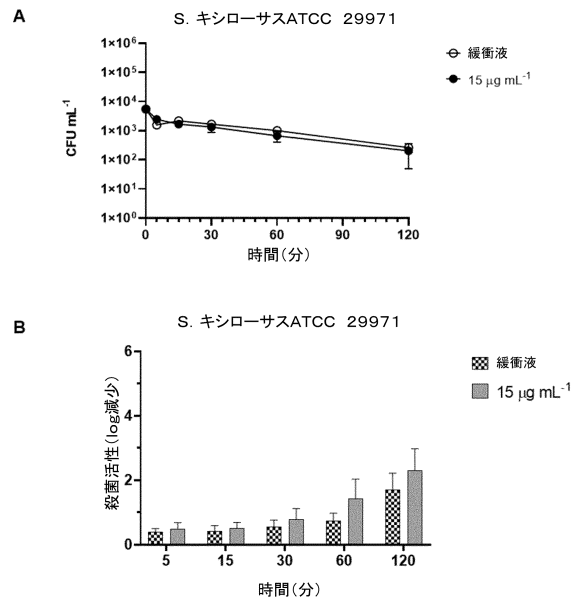
【図 5 - 3】

FIG. 5 (cont.)



【図 6 - 1】

FIG. 6



10

20

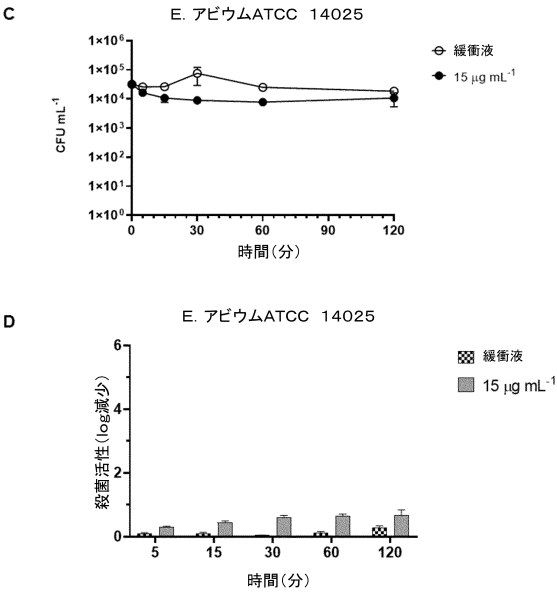
30

40

50

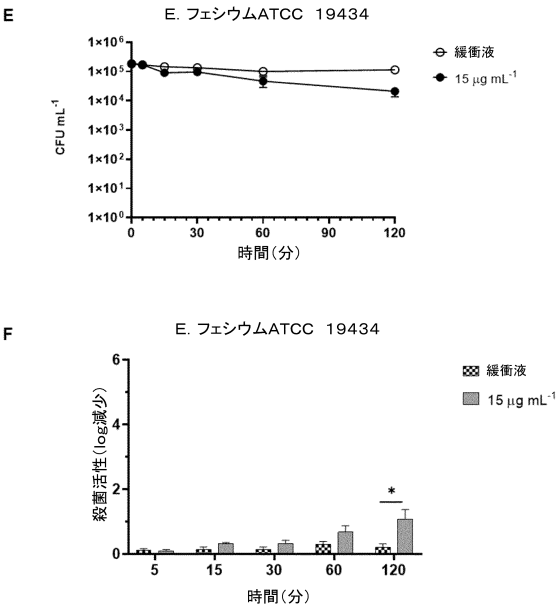
【図 6 - 2】

FIG. 6 (cont.)



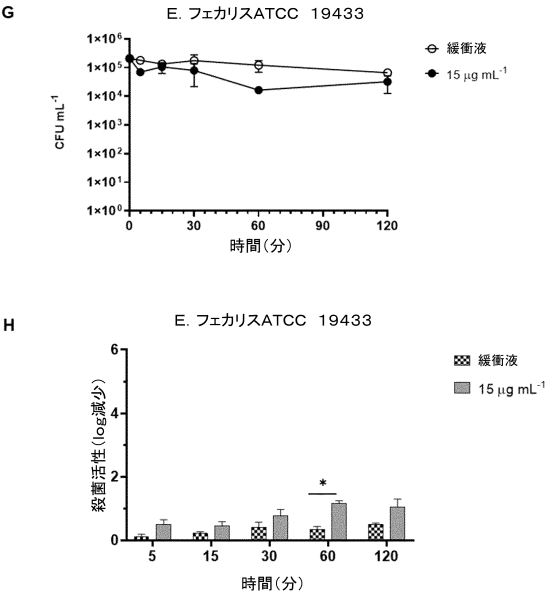
【図 6 - 3】

FIG. 6 (cont.)



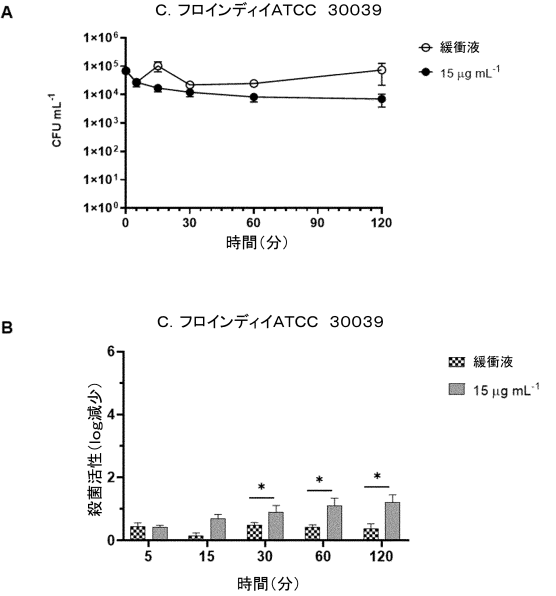
【図 6 - 4】

FIG. 6 (cont.)



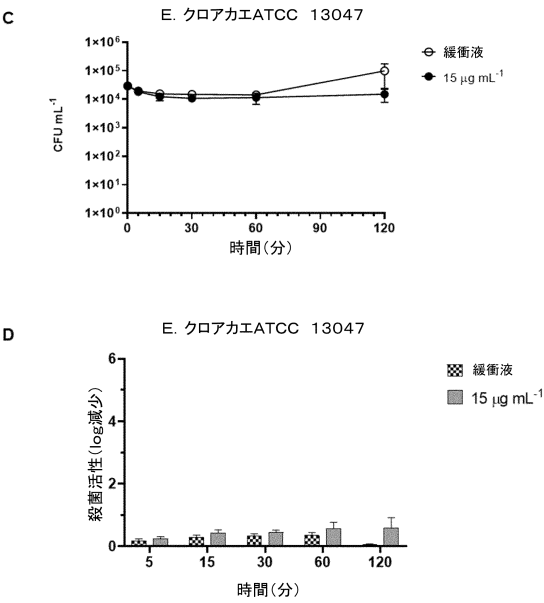
【図 7 - 1】

FIG. 7



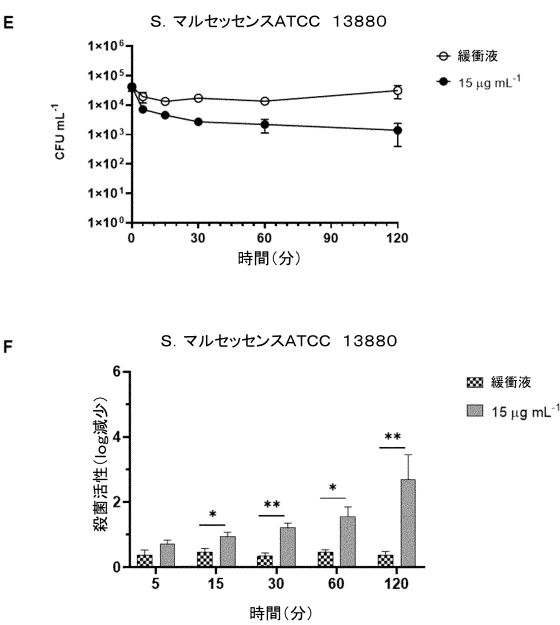
【図 7 - 2】

FIG. 7 (cont.)



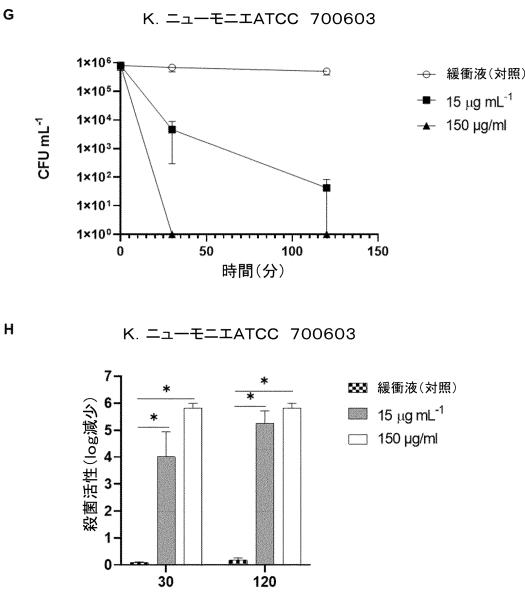
【図 7 - 3】

FIG. 7 (cont.)



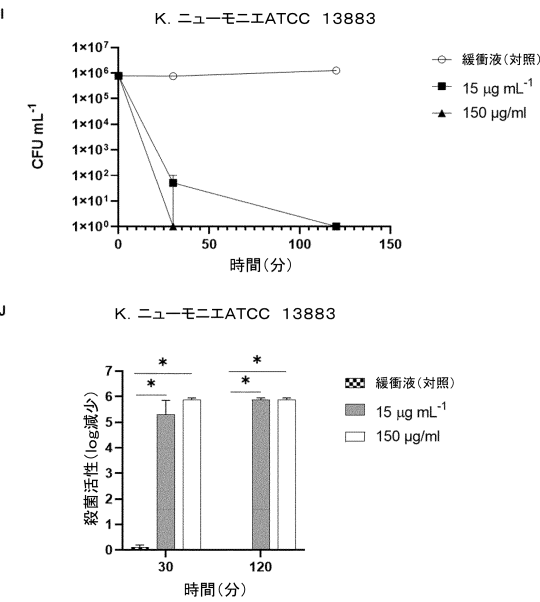
【図 7 - 4】

FIG. 7 (cont.)



【図 7 - 5】

FIG. 7 (cont.)



10

20

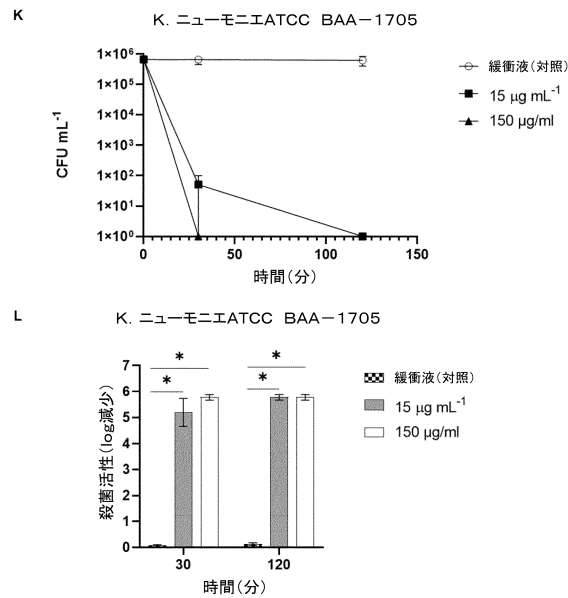
30

40

50

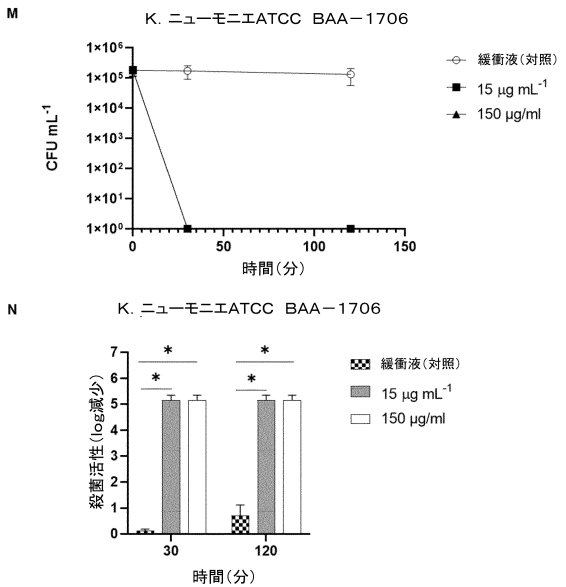
【図 7 - 6】

FIG. 7 (cont.)



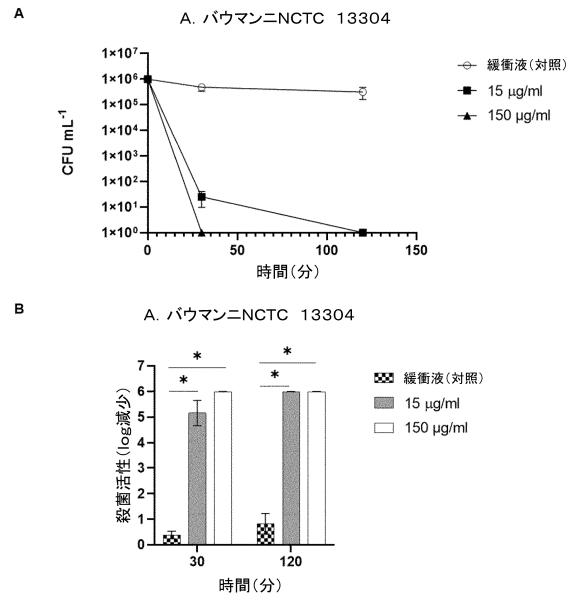
【図 7 - 7】

FIG. 7 (cont.)



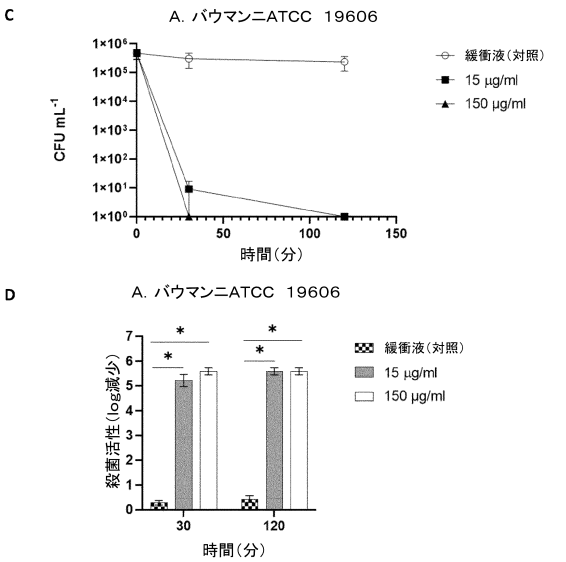
【図 8 - 1】

FIG. 8



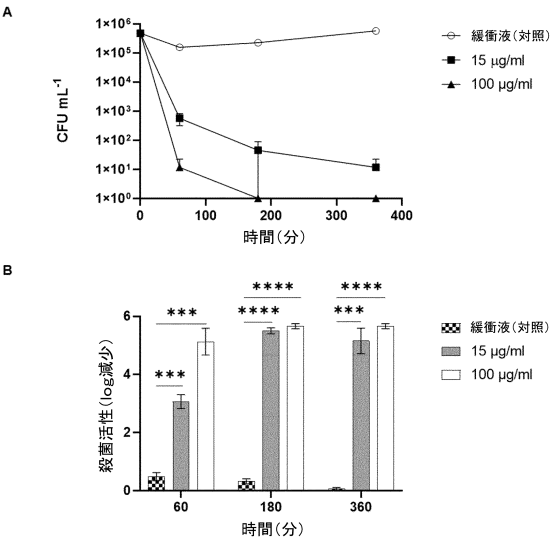
【図 8 - 2】

FIG. 8 (cont.)



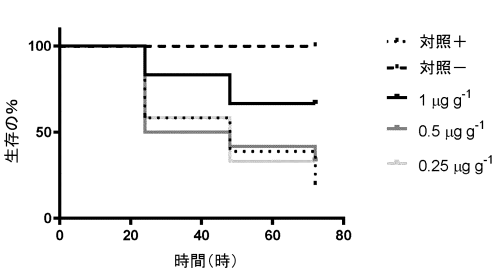
【図 1 0】

FIG. 10



【図 1 1】

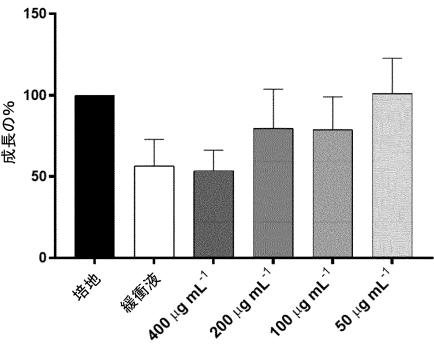
FIG. 11



10

【図 1 2】

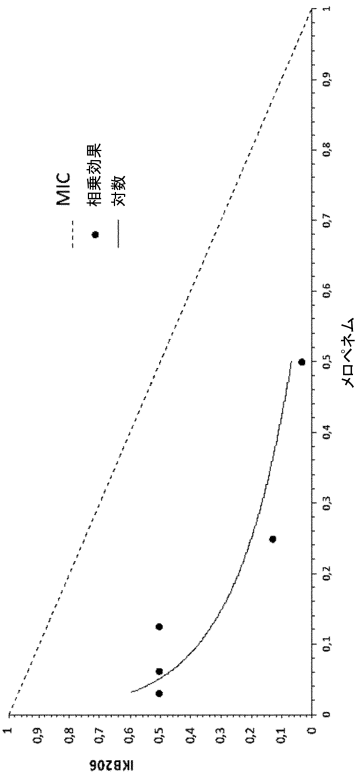
FIG. 12



【図 1 3 - 1】

FIG. 13

A



20

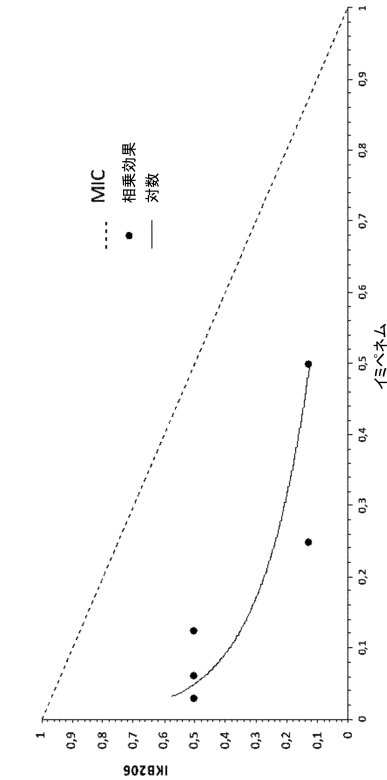
30

40

50

【図 1 3 - 2】

FIG. 13 (Cont.)
B



【図 1 4 - 1】

FIG. 14

A

		イミベネム									
		対照	0.03× MIC	0.06× MIC	0.12× MIC	0.25× MIC	0.5× MIC	MIC	MIC	2× MIC	
IKB206	2× MIC	対照	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MIC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.5× MIC	3.00E+03	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.25× MIC	3.00E+05	2.00E+05	2.00E+04	0	0	0	0	0	0	
	0.12× MIC	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+05	1.00E+05	0	0	0	0	0	
	0.06× MIC	1.00E+06	1.00E+06	3.00E+05	2.00E+05	2.00E+05	0	0	0	0	
	0.03× MIC	1.00E+06	1.00E+06	2.00E+05	2.00E+05	2.00E+05	0	0	0	0	
	MIC	1.00E+06	1.00E+06	3.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	
	対照	1.00E+06	1.00E+06	3.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	

【図 1 4 - 2】

FIG. 14 (Cont.)

B

		イミベネム									
		対照	0.03× MIC	0.06× MIC	0.12× MIC	0.25× MIC	0.5× MIC	MIC	MIC	2× MIC	
IKB206	2× MIC	対照	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MIC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.5× MIC	1.00E+03	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.25× MIC	1.00E+06	3.00E+04	3.00E+04	3.00E+01	0	0	0	0	0	
	0.12× MIC	1.00E+06	2.00E+05	1.00E+05	3.00E+02	0	0	0	0	0	
	0.06× MIC	1.00E+06	5.00E+05	3.00E+05	2.00E+05	2.00E+05	3.00E+05	0	0	0	
	0.03× MIC	1.00E+06	1.00E+06	2.00E+05	3.00E+05	2.00E+05	3.00E+05	0	0	0	
	MIC	1.00E+06	1.00E+06	3.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	
	対照	1.00E+06	1.00E+06	3.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	

10

20

30

40

50

【配列表】

2023517245000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2021/056264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/00 A61P31/04 C12N9/24
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61P C07K

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

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

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mortaza Taheri-Anganeh ET AL: "LytU-SH3b fusion protein as a novel and efficient enzybiotic against methicillin-resistant Staphylococcus aureus", Molecular Biology Research Communications, 1 January 2019 (2019-01-01), XP055722283, DOI: 10.22099/mbrc.2019.34446.1430 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6995334/pdf/mbrc-8-151.pdf [retrieved on 2020-08-13] abstract	1-25
A	EP 3 607 062 A1 (SASINAPAS CO LTD [TH]) 12 February 2020 (2020-02-12) page 1; claims 1-32; tables 1,3 ----- -/--	1-25

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

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 July 2021

Date of mailing of the international search report

20/07/2021

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vollbach, Silke

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/056264

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/002959 A2 (UNIV ROCKEFELLER [US]; FISCHETTI VINCENT A [US] ET AL.) 7 January 2010 (2010-01-07) claims 1-23	1-25
A	----- REUTER MONIKA ET AL: "Approaches to optimize therapeutic bacteriophage and bacteriophage-derived products to combat bacterial infections", VIRUS GENES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BOSTON, US, vol. 56, no. 2, 8 February 2020 (2020-02-08), pages 136-149, XP037123731, ISSN: 0920-8569, DOI: 10.1007/S11262-020-01735-7 [retrieved on 2020-02-08] page 144	1-25
A	----- BRIERS YVES ET AL: "Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria", FUTURE MICROBIOLOGY, LONDON : FUTURE MEDICINE LTD, 2006, GB, vol. 10, no. 3, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 377-390, XP008180525, ISSN: 1746-0921, DOI: 10.2217/FMB.15.8	1-25
A	----- JEONG-A LIM ET AL: "Exogenous Lytic Activity of SPN9CC Endolysin Against Gram-Negative Bacteria", JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY., vol. 24, no. 6, 28 June 2014 (2014-06-28), pages 803-811, XP055311421, KR ISSN: 1017-7825, DOI: 10.4014/jmb.1403.03035 abstract	1-25
X	----- DATABASE Uniprot [Online] uniprotKB/TrEmbl; 5 October 2016 (2016-10-05), Tikhe C. ET AL: "'Whole genome sequencing and characterization of Enterobacter phage Arya RT isolated from the termite gut.'", XP055802546, Database accession no. A0A193GZ38; the whole document	1,4-7, 10, 12-15,18

5

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

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/056264

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/056264

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3607062	A1	12-02-2020	AU 2018248060 A1
			03-10-2019
			CA 3059019 A1
			11-10-2018
			CN 110651044 A
			03-01-2020
			EP 3607062 A1
			12-02-2020
			JP 2020515295 A
			28-05-2020
WO 2010002959	A2	07-01-2010	KR 20200012844 A
			05-02-2020
			SG 11201908657V A
			30-10-2019
			US 2021108185 A1
			15-04-2021
			WO 2018185634 A1
			11-10-2018
			AU 2009266982 A1
			07-01-2010
WO 2010002959	A2	07-01-2010	AU 2015230807 A1
			15-10-2015
			CA 2729160 A1
			07-01-2010
			CA 2984933 A1
			07-01-2010
			EP 2307557 A2
			13-04-2011
			EP 3263588 A1
			03-01-2018
WO 2010002959	A2	07-01-2010	ES 2627321 T3
			27-07-2017
			HK 1248722 A1
			19-10-2018
			JP 5758291 B2
			05-08-2015
			JP 6169632 B2
			26-07-2017
			JP 2011526920 A
			20-10-2011
WO 2010002959	A2	07-01-2010	JP 2015126738 A
			09-07-2015
			US 2012258088 A1
			11-10-2012
			US 2015064156 A1
			05-03-2015
			US 2019055533 A1
			21-02-2019
			WO 2010002959 A2
			07-01-2010

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	1/06 (2006.01)	C 1 2 N	1/06	
C 1 2 N	9/24 (2006.01)	C 1 2 N	9/24	
C 0 7 K	14/005 (2006.01)	C 0 7 K	14/005	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	31/407 (2006.01)	A 6 1 K	31/407	
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. B R I J
3. P L U R O N I C
4. S P A N
5. C R E M O P H O R
6. M Y R J

Fターム (参考)

EE02 EE03 FF01 FF03E FF05E FF15E LL01

4B065 AA01X AA26X AA98Y AB01 AC14 BA02 BB37 BC03 BC11 BD15
BD18 CA24 CA31 CA34 CA44
4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA01 CA53 DA42
NA05 NA14 ZB351 ZB352 ZC751
4C086 AA01 AA02 CC08 MA01 MA02 MA04 NA05 ZB35 ZC75
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA01 DA83 DA89 EA29 FA74 GA01
GA15 GA26