(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-539383
(P2022-539383A)
(43)公表日　令和4年9月8日(2022.9.8)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*38/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ	*31/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*31/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/06		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*31/7052(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7052		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全122頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-577691(P2021-577691)
(86)(22)出願日　令和2年7月2日(2020.7.2)
(85)翻訳文提出日　令和4年2月18日(2022.2.18)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/040714
(87)国際公開番号　WO2021/007107
(87)国際公開日　令和3年1月14日(2021.1.14)
(31)優先権主張番号　62/870,908
(32)優先日　令和1年7月5日(2019.7.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/892,783
(32)優先日　令和1年8月28日(2019.8.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/911,900
最終頁に続く

(71)出願人　514284475
コントラフェクト コーポレイション
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０７０１， ヨンカーズ， ウェルズ アベニュー ２８ － ３アールディー フロア
(74)代理人　110000796弁理士法人三枝国際特許事務所
(72)発明者　シューフ レイモンド
アメリカ合衆国 ０７０４６ ニュージャージー マウンテン レイクス レイク ドライブ １１６

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44
4C084　AA17 BA01 BA08 BA17
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗微生物性のバクテリオファージ由来のポリペプチド、並びにグラム陰性細菌及び抗酸菌に対するそれらの使用

(57)【要約】
有効量の、配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離Ｃｈｐペプチド、又はそれと約８０％の配列同一性を有し、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、若しくはそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物が本明細書に開示される。さらに、単離Ｃｈｐペプチド、並びにＣｈｐペプチドをコードする核酸分子を含むベクター及びベクターを含む宿主細胞が本明細書に開示される。また、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる方法、被験体において細菌感染を治療する方法、及びグラム陰性細菌を含むバイオフィルムを予防、破壊、又は治療する方法が本明細書に開示される。
【選択図】図１

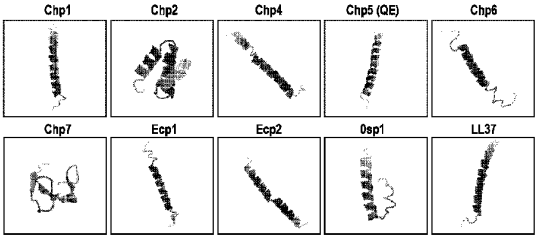


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
医薬組成物であって、
有効量の（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離Ｃｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は、（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つのアミノ酸配列と８０％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドであって、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌若しくは抗酸菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、若しくはそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドと、
薬学的に許容可能な担体と、
を含む、医薬組成物。
【請求項２】
前記Ｃｈｐペプチドが、配列番号９４及び配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、少なくとも１つの非天然修飾を含む、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３】
前記非天然修飾が、置換修飾、Ｎ末端アセチル化修飾及びＣ末端アミド化修飾からなる群から選択される、請求項２に記載の医薬組成物。
【請求項４】
前記アミノ酸配列が配列番号８１～配列番号８６からなる群から選択されるか、又はその活性なフラグメントである、請求項１又は２に記載の医薬組成物。
【請求項５】
前記アミノ酸配列が配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００、及び配列番号１０１からなる群から選択されるか、又はその活性フラグメントである、請求項１又は２のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項６】
溶液、懸濁液、エマルション、吸入用粉末、エアロゾル又はスプレーである、請求項１～５のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項７】
グラム陰性細菌又は抗酸菌の治療に適した１つ以上の抗生物質を更に含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項８】
（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つのアミノ酸配列と８０％の配列同一性を有し、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害するか、若しくはその菌数を減少させるか、若しくはそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドをコードする核酸分子を含む、ベクター。
【請求項９】
（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つのアミノ酸配列と８０％の配列同一性を有し、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドをコードする核酸分子を含み、該核酸が異種プロモーターに操作可能に連結される、組換え発現ベクター。
【請求項１０】
前記アミノ酸配列が、配列番号８１～配列番号８６からなる群から選択されるか、又はその活性フラグメントである、請求項９に記載の組換え発現ベクター。
【請求項１１】

前記アミノ酸配列が、配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００、及び配列番号１０１からなる群から選択されるか、又はその活性フラグメントである、請求項９に記載の組換え発現ベクター。
【請求項１２】
前記核酸分子がｃＤＮＡ配列である、請求項８～１１のいずれか一項に記載のベクター。
【請求項１３】
請求項８～１２のいずれか一項に記載のベクターを含む、単離宿主細胞。
【請求項１４】
配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列若しくはその活性フラグメントを含むＣｈｐペプチドをコードする単離精製された核酸又はそれに相補的な配列を含む核酸。
【請求項１５】
前記Ｃｈｐペプチドが、配列番号９４及び配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、少なくとも１つの非天然修飾を含む、請求項１４に記載の単離精製された核酸。
【請求項１６】
前記修飾が、置換修飾、Ｎ末端アセチル化修飾及びＣ末端アミド化修飾からなる群から選択される、請求項１５に記載の単離精製された核酸。
【請求項１７】
配列番号１０３～配列番号１１５及び配列番号１１８～配列番号１２４からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、単離精製されたＤＮＡ。
【請求項１８】
前記ヌクレオチド配列が、少なくとも１つの非天然修飾を含む、請求項１７に記載の単離精製されたＤＮＡ。
【請求項１９】
前記非天然修飾が、突然変異、又はＮ末端アセチル化修飾若しくはＣ末端アミド化修飾をコードする核酸配列である、請求項１７又は１８に記載の単離精製されたＤＮＡ。
【請求項２０】
少なくとも１つの種のグラム陰性細菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる方法であって、前記細菌と、有効量の（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列、若しくはその活性フラグメントを含むＣｈｐペプチド、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つのアミノ酸配列と８０％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドを含む組成物とを接触させることを含み、前記Ｃｈｐペプチド又は修飾Ｃｈｐペプチドが前記少なくとも１つの種のグラム陰性細菌の増殖の阻害、その菌数の減少、又はその死滅に十分な期間にわたって溶菌活性を有する、方法。
【請求項２１】
前記アミノ酸配列が、配列番号８１～配列番号８６からなる群から選択されるか、又はその活性フラグメントである、請求項２０に記載の少なくとも１つの種のグラム陰性細菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる方法。
【請求項２２】
少なくとも１つの種の抗酸菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる方法であって、有効量の（ｉ）配列番号１、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８～配列番号２１、配列番号２３～配列番号２６、配列番号５９～配列番号６１、配列番号６３～配列番号６５、配列番号６７、配列番号８１、配列番号８７～配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７及び配列番号９９～配列番号１０１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号１、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８～配列番号２１、配列番号２３～配列番号２６、配列番号５９～配列番号６１、配列番号６３～配列番

号６５、配列番号６７、配列番号８１、配列番号８７～配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７及び配列番号９９～配列番号１０１の少なくとも１つのアミノ酸配列と８０％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドを含む組成物を、前記細菌と接触させることを含み、前記Ｃｈｐペプチド又は修飾Ｃｈｐペプチドが前記少なくとも１つの種の抗酸菌の増殖の阻害、その菌数の減少、又はその死滅に十分な期間にわたって溶菌活性を有する、方法。

【請求項２３】

前記アミノ酸配列が、配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００、及び配列番号１０１からなる群から選択されるか、又はその活性フラグメントである、請求項２２に記載の少なくとも１つの種の抗酸菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる方法。

【請求項２４】

少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌によって引き起こされる細菌感染を予防又は治療する方法であって、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、請求項１～７のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項２５】

前記少なくとも１つの種のグラム陰性細菌が、アシネトバクター・バウマンニ、シュードモナス・エルギノーサ、大腸菌、クレブシエラ・ニューモニエ、エンテロバクター・クロアカエ、サルモネラ属、淋菌及びシゲラ属からなる群から選択される、請求項２０、２１又は２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６】

前記少なくとも１つの種のグラム陰性細菌がシュードモナス・エルギノーサである、請求項２０、２１、２４又は２５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２７】

前記少なくとも１つの種のグラム陰性細菌が生残菌細胞を含む、請求項２０、２１、又は２４～２６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２８】

前記少なくとも１つの種の抗酸菌が、マイコバクテリウム・スメグマチス、結核菌、マイコバクテリウム・アビウム、マイコバクテリウム・カンサシ、マイコバクテリウム・スクロフラセウム、マイコバクテリウム・ペレグリナム、マイコバクテリウム・マリナム、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、及びマイコバクテリウム・フォーチュイタムからなる群から選択される、請求項２２～２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２９】

前記少なくとも１つの種の抗酸菌が、結核菌である、請求項２２～２４又は２８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０】

前記細菌感染が局所又は全身の細菌感染である、請求項２０～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３１】

前記グラム陰性細菌又は抗酸菌感染の治療に適した抗生物質を前記被験体に投与することを更に含む、請求項２４～３０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３２】

前記グラム陰性細菌感染の治療に適した抗生物質が、アジスロマイシン、アズトレオナム、ホスホマイシン、セフタジジム、セフェピム、セフォペラゾン、セフトビプロール、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、アミノグリコシド、イミペネム、メロペネム、ドリペネム、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、ピペラシリン、チカルシリン、ペニシリン、リファンピシン、ポリミキシンＢ及びコリスチンの１つ以上から選択される、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

前記グラム陰性細菌感染の治療に適した抗生物質が、アミカシン、アジスロマイシン、アズトレオナム、シプロフロキサシン、コリスチン、ホスホマイシン、ゲンタマイシン、イミペネム、ピペラシリン、リファンピシン、及びトブラマイシンの１つ以上から選択される、請求項３１又は３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記抗酸菌感染の治療に適した抗生物質が、イソニアジド、リファンピン、エタンブトール、及びピラジナミドの１つ以上から選択される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３５】
請求物１～７のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与することが、前記抗生物質を単独で投与するよりも、前記グラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる上でより効果的である、請求項３０～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記グラム陰性細菌又は抗酸菌がヒト血清及び／又は肺サーファクタント中に存在する、請求項３０～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
少なくとも１つの種のグラム陰性細菌を含むバイオフィルムを予防、破壊、又は根絶する方法であって、（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離Ｃｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つのアミノ酸配列と８０％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドを含む医薬組成物を、バイオフィルムと接触させることを含み、前記修飾Ｃｈｐペプチドが少なくとも１つの種のグラム陰性細菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、前記バイオフィルムを効果的に予防するか、分散させるか、又は根絶する、方法。
【請求項３８】
前記少なくとも１つの種のグラム陰性細菌がステノトロホモナス・マルトフィリアである、請求項３６に記載の方法。
【請求項３９】
前記単離Ｃｈｐペプチドが配列番号８１のアミノ酸配列若しくはその活性フラグメントを有するか、又は配列番号８１と８０％の同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドであり、前記修飾Ｃｈｐペプチドが少なくとも１つの種のグラム陰性細菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる、請求項３６又は３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記少なくとも１つの種のグラム陰性細菌が、グラム陰性細菌感染の治療に適した少なくとも１つの抗生物質に耐性である、請求項２０、２１、２４～２６、又は２９～３８のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
［関連出願の相互参照］
本願は、２０１９年７月５日付で出願された米国仮特許出願第６２／８７０，９０８号、２０１９年８月２８日付で出願された米国仮特許出願第６２／８９２，７８３号、２０１９年１０月７日付で出願された米国仮特許出願第６２／９１１，９００号、２０１９年１２月１３日付で出願された米国仮特許出願第６２／９４８，０５２号、及び２０２０年１月２３日付で出願された米国仮特許出願第６２／９６４，７４３号の利益を主張し、その出願日に依拠し、その開示全体が引用することにより本明細書の一部をなす。
【０００２】
［配列表］
本願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が引用

することにより本明細書の一部をなす。２０２０年６月２５日付けで作製された上記ＡＳＣＩＩコピーの名前は０３４１＿００１９－００－３０４＿ＳＬ．ｔｘｔであり、５６１２８バイトのサイズである。

【０００３】

本開示は、抗微生物剤の分野に関し、より具体的にはグラム陰性細菌及び／又は抗酸菌に感染するファージ由来抗微生物性アムリンペプチドと、グラム陰性細菌及び／又は抗酸菌の死滅並びに細菌感染及び汚染への対処におけるこれらのペプチドの使用とに関する。

【背景技術】

【０００４】

グラム陰性細菌、特にシュードモナス（Pseudomonas）属の成員及び新興多剤耐性病原体であるアシネトバクター・バウマンニ（Acinetobacter baumannii）は、深刻な、生命に関わる恐れのある侵襲的感染の重要な原因である。シュードモナス感染は、熱傷創、慢性創傷、慢性閉塞性肺障害（ＣＯＰＤ）、嚢胞性線維症、脆弱な患者に対して多くの脅威を及ぼす移植生体材料上、並びに院内環境表面（hospital surface）及び給水設備内での表面増殖といった大きな問題となる。

【０００５】

シュードモナス・エルギノーサ（P. aeruginosa）（緑膿菌）は、患者において定着した後、治療が特に困難な場合がある。そのゲノムは、β－ラクタム抗生物質及びアミノグリコシド抗生物質への耐性を与える多剤排出ポンプ及び酵素を含む多くの耐性遺伝子をコードし、新規の抗微生物治療剤がないことから、このグラム陰性病原体に対する療法は、特に困難なものとなっている。この難点は、細菌を宿主防御及び化学療法から保護することによって感染を引き起こす細菌の能力を高める可能性があるバイオフィルム内で増殖するシュードモナス・エルギノーサの能力によって複雑になる。

【０００６】

医療現場では、シュードモナス・エルギノーサ（Pseudomonas aeruginosa）の薬剤耐性株の発生率が増加している。地域病院における医療関連の血流感染（ＢＳＩ：BloodStream Infection）の観察研究では、シュードモナス・エルギノーサが上位４つの多剤耐性（ＭＤＲ：Multiple Drug Resistant）病原体の１つであり、全院内死亡率は１８％であった。さらに、ＭＤＲシュードモナス・エルギノーサの大流行がよく記載されている。不良な転帰が、コリスチン等の最終手段の薬物による治療を必要とすることが多いシュードモナス・エルギノーサのＭＤＲ株と関連付けられている。

【０００７】

世界保健機関（ＷＨＯ）及び疾病管理センター（ＣＤＣ）によって重大な脅威として特定された他の薬剤耐性細菌としては、次のグラム陰性細菌：アシネトバクター・バウマンニ、シュードモナス・エルギノーサ、腸内細菌科（大腸菌（Escherichia coli）、クレブシエラ・ニューモニエ（Klebsiella pneumoniae）及びエンテロバクター・クロアカエ（Enterobacter cloacae）を含む）、サルモネラ属（Salmonella）種、淋菌（Neisseria gonorrhoeae）及びシゲラ属（Shigella）種が挙げられる（非特許文献１）。

【０００８】

一般に細胞壁にミコール酸を多く含む抗酸菌は、チール・ニールゼン染色法等の実験室染色中の酸による脱色に対する細菌の耐性を測定することで同定され得る。抗酸菌は、酸ベースの染色の脱色に耐えることができる。グラム陰性細菌と同様に、抗酸菌、例えば、放線菌門は生命を脅かす疾患の原因となる。例えば、マイコバクテリウム属（Mycobacterium）は放線菌門の属であり、結核及びらい病を含む深刻な疾患を引き起こすことが知られている病原体を含む。結核菌（Mycobacterium tuberculosis）は通常、肺に感染することによって発症し、例えば、感染した被験体が咳をしたり、くしゃみをしたり、又は話したりすると、空気中に広がる可能性がある。シュードモナス・エルギノーサと同様に、結核菌（M. tuberculosis）も薬剤耐性株の発生率が増しており、結核感染症の治療がますます困難になっている。

【０００９】
新規の機構を持つ新たな抗微生物剤の必要性に応えるため、研究者らが様々な薬物及び生物学的製剤を調査している。かかるクラスの抗微生物剤の１つに、溶解素が含まれる。溶解素は細胞壁ペプチドグリカンヒドロラーゼであり、「分子バサミ」として作用して細胞形状の維持及び内部浸透圧への抵抗に関与するペプチドグリカン網を分解する。ペプチドグリカンの分解は浸透圧溶解をもたらす。しかしながら、グラム陽性細菌に存在せず、下にあるペプチドグリカンへのアクセスを制限するグラム陰性細菌の外膜（ＯＭ）の存在のため、或る特定の溶解素は、少なくとも部分的にグラム陰性細菌に対しては有効ではなかった。修飾溶解素（「ａｒｔｉｌｙｓｉｎ」）も開発されている。ポリカチオン性、両親媒性及び疎水性の特性を有する特定のαヘリックスドメインに融合した溶解素を含有するこれらの作用物質は、ＯＭを介して移行することができる。しかしながら、或る特定のａｒｔｉｌｙｓｉｎは、ｉｎ　ｖｉｖｏで低い活性を示す。これは、ヒト血清の構成成分、具体的には生理学的塩及び２価カチオンによって引き起こされる場合がある。これらの構成成分はリポ多糖結合部位について競合し、溶解素のαヘリックス転移ドメインを妨害し、それによって血液中での活性を制限して、侵襲的感染を治療するための或る特定の溶解素及びａｒｔｉｌｙｓｉｎの有効性を制限する可能性がある。複数の異なる外膜を透過及び不安定化する抗微生物ペプチドについて、血液中での同様の活性の欠如が報告されている。

【００１０】
溶解素及びａｒｔｉｌｙｓｉｎに加えて、「アムリン（amurins）」を含む他のファージにコードされている宿主溶解システムが同定された（非特許文献２）。アムリンという用語は、ｓｓＤＮＡファージ及びｓｓＲＮＡファージ（それぞれミクロウイルス科及びレビウイルス科）の両方に由来する、限定された非壁溶解の（nonmuralytic）（「壁破壊」ではない、すなわち、細胞壁のペプチドグリカン加水分解に基づくものではない）溶解活性のセットを説明する。例えば、ファージφＸ１７４（ミクロウイルス科ミクロウイルス属）のタンパク質Ｅアムリンは、ムレイン前駆物質であるリピドＩの形成を触媒する必須膜埋め込み型酵素である細菌トランスロカーゼＭｒａＹを阻害することにより溶解を引き起こす９１アミノ酸の膜タンパク質である（非特許文献３）。さらに、ファージＱβ（レビウイルス科アロレビウイルス属）のＡ２カプシドタンパク質は、ＭｕｒＡ活性に干渉し、ペプチドグリカン生合成のプロセスを調節不全にすることにより溶解を引き起こす４２０アミノ酸の構造タンパク質（及びアムリン）である（非特許文献４）。他の非限定的な例としては、ＭｕｒＪの特異的阻害物質であるファージＭのＬｙｓＭアムリン、大腸菌（E. coli）のリピドＩＩフリッパーゼ、及びファージＭＳ２（レビウイルス科レビウイルス属）のタンパク質Ｌアムリン（７５アミノ酸の内在性膜タンパク質であり、宿主シャペロンＤｎａＪの活性を必要とする方法で溶解を引き起こす）（非特許文献５）が挙げられる。Ｌ様アムリンの推定ドメイン構造が割り当てられており、１０個～１７個の疎水性残基の伸長が直前に付されている内部ロイシルセリンジペプチドを含む。これらのアムリンは、内在性膜タンパク質であり、精製されておらず、溶解素のようには使用されていない。さらに、それらの標的は細胞質にある。それらは、溶菌剤として試験されていない。幾つかのアムリンは、例えばＰＣＴ出願公開である特許文献１に詳しく記載されているが、せいぜい治療薬の開発の基礎となるにすぎず、抗菌治療薬に開発されているものはない。

【００１１】
最近の出版物では、溶解素／ａｒｔｉｌｙｓｉｎ及び他の宿主溶解システム（例えば、アムリン）が、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて様々なレベルの有効性でグラム陰性細菌に対して使用することができると記載されているが、侵襲的感染の治療のためにＭＤＲシュードモナス・エルギノーサ、結核菌及び他のグラム陰性細菌及び抗酸菌を標的とする追加の抗菌化合物、特に、溶解性が高く、血清及び／又は肺サーファクタントの存在下でｉｎ　ｖｉｖｏにおいて活性なままであり、溶血活性を有しない及び／又は耐性傾向が低い抗菌化合物に対する必要性が残されている。

【先行技術文献】
【特許文献】
【００１２】
【特許文献１】国際公開第２００１／００９３８２号
【非特許文献】
【００１３】
【非特許文献１】Tillotson G. 2018. A crucial list of pathogens. Lancet Infect Dis 18:234-236
【非特許文献２】Chamakura KR et al., 2017. Mutational analysis of the MS2 lysis protein L. Microbiology 163:961-969
【非特許文献３】Zheng Y et al., 2009. Purification and functional characterization of phiX174 lysis protein E. Biochemistry 48:4999-5006
【非特許文献４】Gorzelnik KV et al., 2016. Proc Natl Acad Sci U S A 113:11519-11524
【非特許文献５】Chamakura KR et al., 2017. J Bacteriol 199
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１４】
この出願は、例えば、ミクロウイルス科のゲノム配列に由来し、既知の溶解素／ａｒｔｉｌｙｓｉｎ及びアムリンを含む、他のかかる作用物質とは異なる新規クラスのファージ溶菌剤を開示する。本明細書に開示されるファージ溶菌剤はクラミジアファージ（Ｃｈｐ：Chlamydia phage）ペプチドと称され、「アムリンペプチド」（アムリンとの配列類似性を意味しない機能的定義）とも称される。特定の溶菌性タンパク質のファミリーを構成する、同定された様々なＣｈｐペプチド、並びにそれらのＣｈｐペプチドの天然に存在しない修飾された変異体（配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２に対応する）が本明細書に開示される。本明細書で使用される場合、「Ｃｈｐペプチド」は、天然に存在するＣｈｐペプチド、その天然に存在しない修飾された変異体、及び野生型Ｃｈｐペプチドと比較して少なくとも１つの修飾（例えば、置換）を有する修飾Ｃｈｐペプチドの両方を指す。本明細書に開示されるＣｈｐペプチドの幾つかは、互いに顕著な配列類似性を示すが、配列データベース内の他の既知のペプチドとは異なる。Ｃｈｐペプチドに特有な配列にもかかわらず、それらはいずれも脊椎動物の自然免疫系の幾つかの以前に記載される抗微生物ペプチド（ＡＭＰ）と同様のαヘリックス構造をとると予測されている（E.F. Haney et al, 2017, In Hansen PR (ed), Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1548）が、かかるＡＭＰとの配列類似性は有していない。Ｃｈｐクラスに関する抗菌機能と一致して、幾つかの異なる精製Ｃｈｐペプチドに関して、グラム陰性病原体及び抗酸菌病原体に対する強力な広域スペクトルの殺菌活性が本明細書に開示される。外部に適用されたタンパク質によって容易にアクセスすることができない場合がある細胞壁の生合成装置に細胞質標的を有するミクロウイルス科の先に記載されるアムリンとは異なり、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドを、「ない状態から」（すなわち、細胞壁の外側に対して作用することにより）殺菌活性を発揮するために精製された形態で使用することができる。本明細書で同定されるＣｈｐペプチドは、グラム陰性病原体及び抗酸菌病原体に対する広域スペクトル活性、並びに血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で持続する能力を有する新規クラスの抗微生物剤となる。
【課題を解決するための手段】
【００１５】
一態様において、本開示は、薬学的に許容可能な担体と、有効量の（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離Ｃｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つと少なくとも８０

％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％の配列同一性を有し、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害する、その菌数（population）を減少させる、及び／又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドとを含む、医薬組成物に関する。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌は、シュードモナス・エルギノーサを含む。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、マイコバクテリウム属の少なくとも１つの種を含む。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、結核菌を含む。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、非結核性抗酸菌（ＮＴＭ：nontuberculous mycobacteria）を含む。

【００１６】

本明細書に開示される別の実施の形態において、医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体と、有効量のＣｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ２－Ｃｙｓ、Ｃｈｐ２－ＮＣ、Ｃｈｐ４：：Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－ＣＡＶ、及びＥｃｐ１－ＣＡＶのペプチドからなる群から選択される単離Ｃｈｐペプチド、又はその活性フラグメントとを含む。

【００１７】

幾つかの実施の形態において、Ｃｈｐペプチドは、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｅｃｐ１－Ｍ１、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、Ｕｎｐ２－Ｍ１、Ａｇｔ１－Ｍ１又はＥｃｐ３－Ｍ１である。

【００１８】

本開示の様々な実施の形態において、医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体と、有効量の（ｉ）配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号８４、配列番号８５及び配列番号８６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離Ｃｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号８６の少なくとも１つと、少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドであって、任意に、ヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害し、その菌数を減少させ、及び／又はそれを死滅させる、修飾Ｃｈｐペプチドとを含む。

【００１９】

或る特定の実施の形態において、医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体と、有効量の（ｉ）配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００、及び配列番号１０１からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離Ｃｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００及び配列番号１０１の少なくとも１つと、少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドであって、任意に、ヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害し、その菌数を減少させ、及び／又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドとを含む。

【００２０】

或る特定の実施の形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２、例えば配列番号９４又は配列番号１０２のいずれか１つのアミノ酸配列に対して少なくとも１つの非天然修飾を含み、或る特定の実施の形態において、非天然修飾は、アミノ酸の置換等の置換修飾、Ｎ末端アセチル化修飾及びＣ末端アミド化修飾からなる群から選択される。或る特定の実施の形態において、修飾Ｃｈｐペプチドは、配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２のいずれか１つのアミノ酸配列に対して少なくとも１つのアミノ酸の置換、挿入又は欠失を含み、該修飾Ｃｈｐペプチドは、任意にヒト血清及び

／又は肺サーファクタントの存在下で、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌は、シュードモナス・エルギノーサを含む。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、マイコバクテリウム属の種を含む。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、結核菌を含む。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、非結核性抗酸菌（ＮＴＭ）を含む。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つのアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。或る特定の実施の形態において、配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２のいずれか１つのアミノ酸配列に対して少なくとも１つのアミノ酸の置換を含む修飾Ｃｈｐペプチドは、少なくとも１つのαヘリックスドメインを有するカチオン性ペプチドである。

【００２１】

医薬組成物は、幾つかの実施の形態において、溶液、懸濁液、エマルション、吸入用粉末、エアロゾル又はスプレーであり得る。幾つかの実施の形態において、本医薬組成物はまた、グラム陰性細菌又は抗酸菌の治療に適した１つ以上の抗生物質を含んでもよい。任意に、ペプチドＣｈｐ１は、医薬組成物がＣｈｐ１を含まないように排除される。

【００２２】

或る特定の実施の形態において、（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つと少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有し、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドをコードする核酸を含むベクターが本明細書に開示される。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌は、シュードモナス・エルギノーサを含む。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、結核菌を含む。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、非結核性抗酸菌（ＮＴＭ）を含む。

【００２３】

また、（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つと少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有し、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドをコードする核酸を含む組換え発現ベクターが本明細書に開示される。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌は、シュードモナス・エルギノーサを含む。或る特定の実施の形態において、核酸は、異種プロモーターに操作可能に連結される。或る特定の実施の形態において、核酸は、配列番号８１～配列番号８６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントをコードし、或る特定の実施の形態において、核酸は、配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００及び配列番号１０１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントをコードする。

【００２４】

本明細書に開示される更なる実施の形態は、前述のベクターを含む単離宿主細胞を含む。幾つかの実施の形態において、核酸配列はｃＤＮＡ配列である。

【００２５】

更に別の態様において、本開示は、配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする単離精製された核酸に関する。或る特定の実施の形態において、核酸は、配列番号８１～配列番号８６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする。代替的な実施の形態において、単離精製されたＤＮＡは、配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００及び配列番号１０１からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。任意に、核酸はｃＤＮＡである。或る特定の実施の形態において、ヌクレオチド配列は、突然変異（例えば、置換、挿入又は欠失）等の少なくとも１つの非天然修飾、又はＮ末端修飾若しくはＣ末端修飾をコードする核酸配列を含む。

【００２６】

他の態様において、本開示は様々な方法／使用に関する。かかる使用の１つは、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる方法であって、該細菌と、有効量の（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つと少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有し、上記少なくとも１つの種のグラム陰性細菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドを含む組成物とを接触させることを含む、方法である。或る特定の実施の形態において、Ｃｈｐペプチドは、配列番号８１～配列番号８６からなる群から選択されるアミノ酸配列又はその活性フラグメントを含む。

【００２７】

他の態様において、少なくとも１種の抗酸菌の増殖を阻害し、その菌数を減少させ、及び／又はそれを死滅させる方法が提供され、該方法は、有効量の（ｉ）配列番号１、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８～配列番号１６、配列番号１８～配列番号２１、配列番号２３～配列番号２６、配列番号５９～配列番号６１、配列番号６３～配列番号６５、配列番号６７、配列番号８１～配列番号９１、及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸を含むＣｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号１、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８～配列番号１６、配列番号１８～配列番号２１、配列番号２３～配列番号２６、配列番号５９～配列番号６１、配列番号６３～配列番号６５、配列番号６７、配列番号８１～配列番号９１、及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つと、少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドであって、上記少なくとも１つの種の抗酸菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドを含む組成物と、細菌を接触させることを含む。或る特定の実施の形態において、Ｃｈｐペプチドは、配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００、及び配列番号１０１からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はその活性フラグメントを含む。

【００２８】

或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌は、シュードモナス・エルギノーサであり、或る特定の実施の形態において、上記方法は、シュードモナス・エルギノーサに加えて少なくとも１つの他の種のグラム陰性細菌を死滅させることを更に含む。

【００２９】

或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、マイコバクテリウム属の種であり、或る特定の実施の形態において、マイコバクテリウム属は、結核菌である。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種の抗酸菌は、非結核性抗酸菌の種

である。或る特定の実施の形態において、非結核性抗酸菌は、マイコバクテリウム・スメグマチス（Mycobacterium smegmatis）、マイコバクテリウム・アビウム（Mycobacterium avium）、マイコバクテリウム・カンサシ（Mycobacterium kansasii）、マイコバクテリウム・スクロフラセウム（Mycobacterium scrofulaceum）、マイコバクテリウム・ペレグリナム（Mycobacterium peregrinum）、マイコバクテリウム・マリナム（Mycobacterium marinum）、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ（Mycobacterium intracellulare）、及びマイコバクテリウム・フォーチュイタム（Mycobacterium fortuitum）の少なくとも１つから選択される。或る特定の実施の形態において、非結核性抗酸菌は、マイコバクテリウム・スメグマチス（M. smegmatis）である。

【００３０】

また、本明細書に開示される、配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド、その活性フラグメント、又はその修飾Ｃｈｐペプチドを含む医薬組成物を、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投与することを含む、グラム陰性細菌によって引き起こされる細菌感染を治療する方法も本明細書に開示される。さらに、本明細書に開示される、配列番号１、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８～配列番号１６、配列番号１８～配列番号２１、配列番号２３～配列番号２６、配列番号５９～配列番号６１、配列番号６３～配列番号６５、配列番号６７、配列番号８１～配列番号９１、及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列、その活性フラグメント、又はその修飾Ｃｈｐペプチドを含む医薬組成物を、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投与することを含む、抗酸菌によって引き起こされる細菌感染を治療する方法が本明細書に開示される。

【００３１】

更に別の態様において、グラム陰性細菌を含むバイオフィルムを予防、破壊、又は治療する方法が提供され、該方法は、（ｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離Ｃｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２の少なくとも１つのアミノ酸配列と８０％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドを含む医薬組成物を、バイオフィルムと接触させることを含み、該修飾ペプチドは、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させ、該バイオフィルムを効果的に予防するか、分散させるか、又は治療する。

【００３２】

前述の方法／使用のいずれにおいても、グラム陰性細菌は、ステノトロホモナス属（Stenotrophomonas）種、アシネトバクター・バウマンニ（Acinetobacter baumannii）、シュードモナス・エルギノーサ（Pseudomonas aeruginosa）、大腸菌（Escherichia coli）、クレブシエラ・ニューモニエ（Klebsiella pneumoniae）、エンテロバクター・クロアカエ（Enterobacter cloacae）、サルモネラ属（Salmonella）種（例えば、サルモネラ・センフテンベルク（Salmonella Senftenberg）、サルモネラ・エンテリティディス（Salmonella Enteritidis）、ネズミチフス菌（Salmonella Typhimurium）、及びサルモネラ・オスロ（Salmonella Oslo））、淋菌（Neisseria gonorrhoeae）、シトロバクター・フロウンディ（Citrobacter freundii）、セラチア・マルセセンス（Serratia marcescens）、モルガネラ・モルガニ（Morganella morganii）、ラウルテラ・オルニチノリチカ（Raoultella ornithinolytica）、クライベラ・アスコルバータ（Kluyvera ascorbata）、クレブシエラ・オキシトカ（Klebsiella oxytoca）、プロテウス・ミラビリス（Proteus mirabilis）、エンテロバクター・アエロゲネス（Enterbacter aerogenes）、エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）、バークホルデリア属（Burkholderia）種、アクロモバクター属（Achromobacter）種及びシゲラ属（Shigella）種からなる群から選

択される少なくとも１つの種のグラム陰性細菌であり得る。或る特定の実施の形態において、グラム陰性細菌はシュードモナス・エルギノーサである。或る特定の実施の形態において、ステノトロホモナス属種は、ステノトロホモナス・マルトフィリア（Stenotrophomonas maltophilia）である。

【００３３】

前述の方法／使用のいずれにおいても、抗酸菌は、マイコバクテリウム・スメグマチス、結核菌及び非結核性抗酸菌からなる群から選択される少なくとも１つの放線菌門であり得る。

【００３４】

本明細書に開示される方法／使用の或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌は、グラム陰性細菌感染の治療に典型的に適した１つ以上の抗生物質に耐性である。或る特定の実施の形態において、少なくとも１つの種のグラム陰性細菌は、多剤耐性（ＭＤＲ）病原体である。また、グラム陰性細菌によって引き起こされる局所又は全身性病原性細菌感染を治療又は予防する方法であって、本明細書に開示される、配列番号８１～９１及び配列番号９４～１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド、その活性フラグメント、又はその修飾Ｃｈｐペプチド含む医薬組成物を、治療又は予防を必要とする被験体に投与することを含む、方法も本明細書に開示される。或る特定の実施の形態において、本明細書に開示される、配列番号１、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８～配列番号１６、配列番号１８～配列番号２１、配列番号２３～配列番号２６、配列番号５９～配列番号６１、配列番号６３～配列番号６５、配列番号６７、配列番号８１～配列番号９１、及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列、その活性フラグメント、又はその修飾Ｃｈｐペプチドを含む医薬組成物を、治療又は予防を必要とする被験体に投与することを含む、抗酸菌によって引き起こされる局所又は全身性病原性細菌感染を治療又は予防する方法が本明細書に開示される。

【００３５】

さらに、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、本明細書に開示される、配列番号８１～配列番号９１、及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド、その活性フラグメント、又はその修飾Ｃｈｐペプチドを含む第１の量の医薬組成物と、グラム陰性細菌感染の治療に適した第２の量の抗生物質との組合せを同時投与することを含み、第１及び第２の量が共に、グラム陰性細菌感染の予防又は治療に有効である、細菌感染を予防又は治療する方法が本明細書に開示される。また、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、本明細書に開示される、配列番号１、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８～配列番号１６、配列番号１８～配列番号２１、配列番号２３～配列番号２６、配列番号５９～配列番号６１、配列番号６３～配列番号６５、配列番号６７、配列番号８１～配列番号９１、及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド、その活性フラグメント、又はその修飾Ｃｈｐペプチドを含む第１の量の医薬組成物と、抗酸菌感染の治療に適した第２の量の抗生物質との組合せを同時投与することを含み、第１及び第２の量が共に、抗酸菌感染の予防又は治療に有効である、細菌感染を予防又は治療する方法も本明細書に開示される。

【００３６】

幾つかの実施の形態において、グラム陰性細菌感染の治療に適した抗生物質は、アンピシリン、セフォタキシム、セフトリアキソン、ミノサイクリン、テトラサイクリン、チゲサイクリン、トリメトプリム、スルファメトキサゾール、セフタジジム、セフェピム、セフォペラゾン、セフトビプロール、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、アミノグリコシド、イミペネム、メロペネム、ドリペネム、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、ピペラシリン、チカルシリン、ペニシリン、リファンピシン、ポリミキシンＢ及びコリスチンの１つ以上から選択される。或る特定の実施の形態において、抗生物質は、アミカシン、アジスロマイシン、アズトレオナム、シプロフロキサシン、コリスチン、ホ

スホマイシン、ゲンタマイシン、イミペネム、ピペラシリン、リファンピシン及びトブラマイシンの１つ以上から選択される。幾つかの実施の形態において、抗酸菌感染の治療に適した抗生物質は、イソニアジド、リファンピン、エタンブトール、及びピラジナミドの１つ以上から選択される。

【００３７】

更に別の実施の形態において、グラム陰性細菌感染の治療に適した抗生物質の有効性を高める方法であって、本明細書に開示される、配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド、その活性フラグメント又はその修飾Ｃｈｐペプチドを含む医薬組成物と組み合わせて該抗生物質を同時投与することを含み、該組合せの投与が、上記抗生物質又はその医薬組成物のいずれかを個別に投与するよりも、グラム陰性細菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる上でより効果的である、方法が開示される。また、抗酸菌感染の治療に適した抗生物質の有効性を高める方法であって、本明細書に開示される、配列番号１、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８～配列番号１６、配列番号１８～配列番号２１、配列番号２３～配列番号２６、配列番号５９～配列番号６１、配列番号６３～配列番号６５、配列番号６７、配列番号８１～配列番号９１、及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＣｈｐペプチド、その活性フラグメント、又はその修飾Ｃｈｐペプチドを含む医薬組成物と組み合わせて抗生物質を同時投与することを含み、該組合せの投与が、上記抗生物質又はその医薬組成物のいずれかを個別に投与するよりも、抗酸菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる上でより効果的である、方法も開示される。

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１Ａ】クラミジアファージペプチド（Ｃｈｐ）ファミリーの成員であるＣｈｐ１、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ４、Ｃｈｐ５、Ｃｈｐ６、Ｃｈｐ７、Ｅｃｐ１、Ｅｃｐ２及びＯｓｐ１の構造についてＩ－Ｔａｓｓｅｒによって推定される３次元モデルを示す図である。比較のため、ヒト自然免疫エフェクターペプチドＬＬ－３７を含める。αヘリックス構造は明らかであり、一般に最上部末端はＮ末端である。

【図１Ｂ】ＪＰＲＥＤ４を用いたＣｈｐ２（配列番号２）のコンセンサス二次構造予測を示す図である。αヘリックスは、太い縞模様のバーで示される。

【図１Ｃ】ＪＰＲＥＤ４を用いたＣｈｐ４（配列番号４）のコンセンサス二次構造予測を示す図である。αヘリックスは、太い縞模様のバーで示される。

【図２Ａ】ＣｌｕｓｔａｌＷアラインメントから生成された或る特定のＣｈｐファミリーの成員の有根（ＵＰＧＭＡクラスタリング法）系統樹を示す図である。

【図２Ｂ】ＣｌｕｓｔａｌＷアラインメントから生成された或る特定のＣｈｐファミリーの成員の無根（隣接結合クラスタリング法）系統樹を示す図である。

【図３】１００％ヒト血清中でＣｈｐ２（１０μｇ／ｍＬ）又はバッファー対照（「未処理」）で１５分間処理されたシュードモナス・エルギノーサ株１２９２の顕微鏡分析（倍率２０００倍）を示す一連の顕微鏡写真である。Ｌｉｖｅ／Ｄｅａｄ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｋｉｔ（ThermoFisher）を用いてサンプルを染色し、微分干渉（ＤＩＣ：Differential Interference Contrast）顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法の両方で調べた。顕微鏡写真は、未処理の列に死んだ細菌がないこと、及び処理された列の生細菌の減少を示す。

【図４Ａ】未処理及び１μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１００μｇ／ｍＬのＣｈｐ２－Ｍ１での処理から５分後のＳｕｒｖａｎｔａ（商標）中でのシュードモナス・エルギノーサ株１２９２の顕微鏡分析（倍率２０００倍）を示す一連の顕微鏡写真である。ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ（生）及びヨウ化プロピジウム（死）を使用してサンプルを染色し、明視野（ＢＦ）顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法の両方で調べた。顕微鏡写真は、未処理の列に死菌が存在せず、処理された列では生菌が減少していることを示し、この減少はＣｈｐ２－Ｍ１の濃度が増加するにつれて増加する。

【図４Ｂ】未処理及び１μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１００μｇ／ｍＬのＣｈｐ２－Ｍ１での処理から３０分後のＳｕｒｖａｎｔａ（商標）中でのシュードモナス・エルギノーサ株１２９２の顕微鏡分析（倍率２０００倍）を示す一連の顕微鏡写真である。ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ（生）及びヨウ化プロピジウム（死）を使用してサンプルを染色し、ＢＦ顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法の両方で調べた。顕微鏡写真は、未処理の列に死菌が存在せず、処理された列では生菌が減少していることを示し、この減少はＣｈｐ２－Ｍ１の濃度が増加するにつれて増加する。

【図５Ａ】未処理及び１μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１００μｇ／ｍＬのＥｃｐ３－Ｍ１での処理から５分後のＳｕｒｖａｎｔａ（商標）中でのシュードモナス・エルギノーサ株１２９２の顕微鏡分析（倍率２０００倍）を示す一連の顕微鏡写真である。ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ（生）及びヨウ化プロピジウム（死）を使用してサンプルを染色し、ＢＦ顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法の両方で調べた。顕微鏡写真は、未処理の列に死菌が存在せず、処理された列では生菌が減少していることを示し、この減少はＥｃｐ３－Ｍ１の濃度が増加するにつれて増加する。

【図５Ｂ】未処理及び１μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１００μｇ／ｍＬのＥｃｐ３－Ｍ１での処理から３０分後のＳｕｒｖａｎｔａ（商標）中でのシュードモナス・エルギノーサ株１２９２の顕微鏡分析（倍率２０００倍）を示す一連の顕微鏡写真である。ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ（生）及びヨウ化プロピジウム（死）を使用してサンプルを染色し、ＢＦ顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法の両方で調べた。顕微鏡写真は、未処理の列に死菌が存在せず、処理された列では生菌が減少していることを示し、この減少はＥｃｐ３－Ｍ１の濃度が増加するにつれて増加する。

【図６Ａ】未処理及び１μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１００μｇ／ｍＬのＣｈｐ２－Ｍ１での処理から５分後のヒト血清中でのシュードモナス・エルギノーサ株１２９２の顕微鏡分析（倍率２０００倍）を示す一連の顕微鏡写真である。ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ（生）及びヨウ化プロピジウム（死）を使用してサンプルを染色し、ＢＦ顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法の両方で調べた。顕微鏡写真は、未処理の列に死菌が存在せず、処理された列では生菌が減少していることを示し、この減少はＣｈｐ２－Ｍ１の濃度が増加するにつれて増加する。

【図６Ｂ】未処理及び１μｇ／ｍＬ及び１０μｇ／ｍＬのＣｈｐ２－Ｍ１での処理から３０分後のヒト血清中でのシュードモナス・エルギノーサ株１２９２の顕微鏡分析（倍率２０００倍）を示す一連の顕微鏡写真である。ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ（生）及びヨウ化プロピジウム（死）を使用してサンプルを染色し、ＢＦ顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法の両方で調べた。顕微鏡写真は、未処理の列に死菌が存在せず、処理された列では生菌が減少していることを示し、この減少はＣｈｐ２－Ｍ１の濃度が増加するにつれて増加する。

【図７Ａ】未処理及び１μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１００μｇ／ｍＬのＥｃｐ３－Ｍ１での処理から５分後のヒト血清中でのシュードモナス・エルギノーサ株１２９２の顕微鏡分析（倍率２０００倍）を示す一連の顕微鏡写真である。ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ（生）及びヨウ化プロピジウム（死）を使用してサンプルを染色し、ＢＦ顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法の両方で調べた。顕微鏡写真は、未処理の列に死菌が存在せず、処理された列では生菌が減少していることを示し、この減少はＥｃｐ３－Ｍ１の濃度が増加するにつれて増加する。

【図７Ｂ】未処理及び１μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１００μｇ／ｍＬのＥｃｐ３－Ｍ１の処理から３０分後のヒト血清中でのシュードモナス・エルギノーサ株１２９２の顕微鏡分析（倍率２０００倍）を示す一連の顕微鏡写真である。ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色ＳＹＴＯＸ（商標）Ｇｒｅｅｎ（生）及びヨウ化プロピジウム（死）を使用してサンプルを染色し、ＢＦ顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法の両方で調べた。顕微鏡写真は、未処理の列に死菌が存在せず、処理された列では生菌が減少していることを示し、この減少はＥｃｐ３－Ｍ１の濃度が増加するにつれて増加する。

【発明を実施するための形態】

【００３９】
定義
本明細書で使用される場合、以下の用語及びその同語源語は、文脈上そうでないことが明示されない限り、下記の意味を有するものとする。
【００４０】
「担体」は、活性化合物と共に投与される溶媒、添加剤、賦形剤、分散媒、可溶化剤、コーティング剤、保存料、等張剤及び吸収遅延剤（absorption delaying agent）、界面活性剤、噴射剤、希釈剤、ビヒクル等を指す。かかる担体は、滅菌液、例えば水、生理食塩水、デキストロース水溶液、グリセロール水溶液、及び石油、動物、植物又は合成起源のものを含む油、例えばラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等であり得る。
【００４１】
「薬学的に許容可能な担体」は、生理学的に適合するあらゆる溶媒、添加剤、賦形剤、分散媒、可溶化剤、コーティング剤、保存料、等張剤及び吸収遅延剤、界面活性剤、噴射剤、希釈剤、ビヒクル等を指す。担体（複数の場合もある）は、薬剤中で通常使用される量で治療対象の被験体に有害でないという意味で「許容可能」でなくてはならない。薬学的に許容可能な担体は、組成物をその意図される目的に不適なものにすることなく組成物の他の成分に適合する。さらに、薬学的に許容可能な担体は、過度の有害な副作用（毒性、刺激及びアレルギー応答等）なしに本明細書に提示される被験体への使用に適している。副作用は、それらのリスクが組成物によってもたらされる利益を上回る場合に「過度」である。薬学的に許容可能な担体又は賦形剤の非限定的な例としては、任意の標準的な医薬担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水、水、並びに油／水エマルション及びマイクロエマルション等のエマルションが挙げられる。好適な医薬担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences by E.W. Martin, 18th Editionに記載されている。薬学的に許容可能な担体は、自然に存在しない担体であってもよい。
【００４２】
「殺菌」又は「殺菌活性」は、細菌の初期菌数において１８時間～２４時間にわたって少なくとも３ｌｏｇ１０（９９．９％）以上の減少の程度まで細菌の死滅を引き起こすか、又は細菌を死滅させることが可能であるという特性を指す。
【００４３】
「静菌」又は「静菌活性」は、細菌細胞の増殖を阻害し、それにより細菌の初期菌数において１８時間～２４時間にわたって２ｌｏｇ１０（９９％）以上かつ最大３ｌｏｇ弱の減少を引き起こすことを含む、細菌増殖を阻害する特性を指す。
【００４４】
「抗菌剤」は、静菌剤及び殺菌剤の両方を指す。
【００４５】
「抗生物質」は、細菌に致死性又は増殖の低減等の負の影響を与える特性を有する化合物を指す。抗生物質は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、抗酸菌及び非抗酸菌のありとあらゆる組合せに負の影響を与えることができる。例としては、抗生物質は、細胞壁ペプチドグリカンの生合成、細胞膜の完全性、又は細菌におけるＤＮＡ若しくはタンパク質の合成に影響を及ぼし得る。グラム陰性細菌に対して活性な抗生物質の非限定的な例としては、セフトリアキソン－セフォタキシム、セフタジジム、セフェピム、セフォペラゾン及びセフトビプロール等のセファロスポリン；シプロフロキサシン及びレボフロキサシン等のフルオロキノロン；ゲンタマイシン、トブラマイシン及びアミカシン等のアミノグリコシド；ピペラシリン、チカルシリン、イミペネム、メロペネム、ドリペネム、βラクタマーゼ阻害剤と併用する又は併用しない広域スペクトルペニシリン、リファンピシン、ポリミキシンＢ及びコリスチンが挙げられる。抗酸菌に対して活性な抗生物質の非限定的な例としては、イソニアジド、リファンピン、エタンブトール、及びピラジナミドが挙げられる。
【００４６】
「薬剤耐性」は、概して薬物の抗菌活性に耐性を示す細菌を指す。或る特定の方法で使

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

【００４７】

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

【００４８】

「同時投与する」は、順次的な２種類の作用物質、例えばＣｈｐペプチド及び抗生物質又は任意の他の抗菌剤の投与、並びに実質的に同時の、例えば単一の混合物／組成物中での、又は別個に与えられるが、それでも実質的に同時に、例えば同日又は２４時間中に異なる時点で被験体に投与される用量でのこれらの作用物質の投与を指す。Ｃｈｐペプチドと１つ以上の付加的な抗菌剤とのこのような同時投与は、最大数日、数週間又は数ヶ月続く継続的な治療として行うことができる。さらに、用途に応じて、同時投与は、継続的又は同延的（coextensive）である必要はない。例えば、用途が局所抗菌剤として、例えば細菌性潰瘍又は感染した糖尿病性潰瘍を治療することであった場合、Ｃｈｐペプチドを初めのみ、追加の抗生物質の２４時間以内に投与することができ、その後、追加の抗生物質の使用をＣｈｐペプチドの更なる投与なしに継続してもよい。

【００４９】

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

【００５０】

「ポリペプチド」は、本明細書で「ペプチド」という用語と区別なく使用され、アミノ酸残基からなり、概して少なくとも約３０個のアミノ酸残基を有するポリマーを指す。この用語は、単離形態のポリペプチドだけでなく、その活性フラグメント及び修飾された変異体を含むその誘導体も含む。「ポリペプチド」という用語は、本明細書に記載のＣｈｐペプチドを含み、例えば溶解機能を維持する融合タンパク質又は融合ポリペプチドも包含する。文脈に応じて、ポリペプチドは、自然発生ポリペプチド、又は組換え、改変若しくは合成的に作製されたポリペプチドであり得る。特定のＣｈｐペプチドは、例えば酵素的若しくは化学的切断によって天然タンパク質から得るか若しくは取り出しても、又は従来のペプチド合成法（例えば、固相合成）若しくは分子生物学的手法（例えば、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に開示されるもの）を用いて調製しても

、又は戦略的に切断若しくはセグメント化して、例えば、同じ若しくは少なくとも１つの一般的な標的細菌に対する溶菌活性を維持する活性フラグメントを得てもよい。

【００５１】

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

【００５２】

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

【００５３】

「活性フラグメント」は、フラグメントが得られた単離ポリペプチドの１つ以上の機能又は生物活性、例えば、１つ以上のグラム陰性細菌又は抗酸菌に対する殺菌活性を保持するポリペプチドの部分を指す。

【００５４】

「両親媒性ペプチド」は、親水性官能基及び疎水性官能基の両方を有するペプチドを指す。或る特定の実施形態において、二次構造により疎水性及び親水性アミノ酸残基が両親媒性ペプチドの反対側（例えば、ペプチドが水等の溶媒中にある場合、内側対外側）に置かれ得る。これらのペプチドは、或る特定の実施形態において、αヘリックス二次構造等のヘリックス二次構造を取ることができる。

【００５５】

「カチオン性ペプチド」は、正に帯電したアミノ酸残基を高い割合で有するペプチドを指す。或る特定の実施形態において、カチオン性ペプチドは、８．０以上のｐＫａ値を有する。本開示の文脈での「カチオン性ペプチド」という用語は、主に正に帯電したアミノ酸残基、例えばリシン（Ｌｙｓ）及び／又はアルギニン（Ａｒｇ）残基で構成される、合成的に作製されたペプチドであるポリカチオン性ペプチドも包含する。正に帯電していないアミノ酸残基は、中性に帯電したアミノ酸残基、負に帯電したアミノ酸残基、及び／又は疎水性アミノ酸残基であり得る。

【００５６】

「疎水性基」は、水分子に対する親和性が低いか又は親和性を有しないが、油分子に対してより高い親和性を有するアミノ酸側鎖等の化学基を指す。疎水性物質は、水又は水相への溶解性が低いか又は溶解性を有しない傾向があり、通例非極性であるが、油相への溶解性がより高い傾向がある。疎水性アミノ酸の例としては、グリシン（Ｇｌｙ）、アラニン（Ａｌａ）、バリン（Ｖａｌ）、ロイシン（Ｌｅｕ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）、プロリン（Ｐｒｏ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ）、メチオニン（Ｍｅｔ）及びトリプトファン（Ｔｒｐ）が挙げられる。

【００５７】
「高める（Augmenting）」は、そうでない場合よりも高い抗微生物活性等の作用物質の活性の程度を指す。「高める」は、相加的効果及び相乗（超相加的（superadditive））効果を包含する。
【００５８】
「相乗的」又は「超相加的」は、独立して働く２つの作用物質の効果の総和を超える、組合せでの２つの物質によってもたらされる有益な効果を指す。或る特定の実施形態において、相乗又は超相加的効果は、独立して働く２つの作用物質の効果の総和を有意に、すなわち統計的に有意に超える。一方又は両方の有効成分を閾値下レベル、すなわち活性物質が個別に用いられる場合に効果を生じないか、又は非常に限られた効果しか生じないレベルで用いることができる。効果は、本明細書に記載されるチェッカーボードアッセイ等のアッセイによって測定することができる。
【００５９】
「治療」は、ヒト等の被験体が、直接的又は間接的に、障害を治癒するか、病原体を根絶するか、又は被験体の状態を改善する目的で医療を受ける任意のプロセス、行為、適用、療法等を指す。治療は、発生率の低減、症状の軽減、再発の解消、再発の予防、発生の予防、発生リスクの低減、症状の改善、予後の改善、又はそれらの組合せも指す。「治療」は、被験体における細菌の菌数、増殖速度又は病原性を低減することで、被験体における細菌感染、又は器官、組織若しくは環境の細菌汚染を制御又は低減することを更に包含し得る。このため、発生率を低減する「治療」は、例えば、被験体であるか又は環境であるかを問わず、特定のミリュー（milieu）での少なくとも１つのグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害するのに効果的となり得る。一方、既に確立された感染の「治療」は、感染又は汚染の原因となるグラム陰性細菌及び／又は抗酸菌の増殖を阻害するか、その菌数を減少させるか、又はそれを死滅させること（根絶することを含む）を指す。
【００６０】
「予防する」は、細菌感染等の障害の発生、再発、拡大、発症又は確立の予防を指す。本開示が感染の完全な予防又は感染の確立の予防に限定されることは意図されない。幾つかの実施形態において、発症を遅らせるか、又は続いて発症した（contracted）疾患の重症度若しくは疾患の発症の可能性を低減することが予防例を構成する。
【００６１】
「発症した疾患」は、発熱、敗血症又は菌血症の検出等の臨床症状又は不顕性（subclinical）症状が現れた疾患、並びにかかる病理と関連する症状が未だ現れていない場合の細菌病原体の増殖（例えば、培養物中での）によって検出され得る疾患を指す。
【００６２】
ペプチド又はポリペプチド又はその活性フラグメントとの関連での「誘導体」という用語は、溶菌活性に実質的に悪影響を与えない又は溶菌活性を損なわない、アミノ酸以外の１つ以上の化学的部分を含有するように修飾されたポリペプチドを包含することを意図する。化学的部分は、例えばアミノ末端のアミノ酸残基、カルボキシ末端のアミノ酸残基又は内部アミノ酸残基を介してペプチドに共有結合的に連結することができる。かかる修飾は、天然であっても又は非天然であってもよい。或る特定の実施形態において、非天然修飾は、反応性部分への保護基若しくはキャップ基（capping group）の付加、抗体及び／又は蛍光標識等の検出可能な標識の付加、グリコシル化の付加若しくは修飾、又はＰＥＧ（ペグ化）等の嵩高基（bulking group）の付加、並びに当業者に既知の他の変化を含み得る。或る特定の実施形態において、非天然修飾は、Ｎ末端アセチル化及びＣ末端アミド化等のキャップ修飾であり得る。Ｃｈｐペプチドに付加することができる、例示的な保護基としては、ｔ－Ｂｏｃ及びＦｍｏｃが挙げられるが、これらに限定されない。限定されるものではないが、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）及びｍＣｈｅｒｒｙ等の一般に使用される蛍光標識タンパク質は、細胞タンパク質の正常機能に干渉することなく、Ｃｈｐペプチドに共有結合的若しくは非共有結合的に結合するか、又はＣｈｐペプ

チドに融合させることができる小型のタンパク質である。或る特定の実施形態において、蛍光タンパク質をコードするポリヌクレオチドをＣｈｐポリヌクレオチド配列の上流又は下流に挿入することができる。これにより、細胞機能又はそれが結合したＣｈｐペプチドの機能を妨げない融合タンパク質（例えば、Ｃｈｐペプチド：：ＧＦＰ）が生じる。タンパク質へのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）のコンジュゲーションが、多くの医薬タンパク質の循環半減期を延長する方法として使用されている。このため、Ｃｈｐペプチド誘導体との関連で、「誘導体」という用語は、１つ以上のＰＥＧ分子の共有結合によって化学修飾されたＣｈｐペプチドを包含する。ペグ化Ｃｈｐペプチドは、生物活性及び治療活性を保持した上で非ペグ化Ｃｈｐペプチドと比較して延長された循環半減期を示すことが予想される。

【００６３】

「修飾された変異体」は、溶菌活性を増強するか、又はＣｈｐペプチドの溶菌活性に実質的に悪影響を与えたり若しくは破壊したりしない、アミノ酸配列に天然に存在しない修飾が行われたＣｈｐペプチドを指す。修飾された変異体に対してなされ得る例示的な修飾としては、Ｃｈｐペプチドのアミノ酸（例えば、正に帯電したアミノ酸）をＬ型からＤ型に修飾すること、アミノ酸残基（複数の場合がある）をＣ末端及び／又はＮ末端に付加して融合ポリペプチドを形成すること、並びにアミノ酸電荷が再配列された電荷アレイ変異体（charge array variants）を形成することが挙げられる。

【００６４】

「パーセントアミノ酸配列同一性」は、最大のパーセント配列同一性を達成するように配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入した後に、任意の保存的置換を配列同一性の一部とみなさない、参照ポリペプチド配列、例えば特定のＣｈｐペプチド配列中のアミノ酸残基と同一の候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージを指す。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的でのアラインメントは、当業者の能力の範囲内の様々な方法で、例えばＢＬＡＳＴ等の公開されているソフトウェア、又は例えばDNASTARにより市販されているソフトウェアを用いて達成することができる。２つ以上のポリペプチド配列は、０％～１００％の間のいずれか、又はその間の任意の整数値で同一であり得る。本開示の文脈で、２つのポリペプチドは、アミノ酸残基の少なくとも８０％（例えば、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９２．５％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％又は少なくとも約９９％）が同一である場合に「実質的に同一」である。本明細書に記載される「パーセント（％）アミノ酸配列同一性」という用語は、Ｃｈｐペプチドにも当てはまる。このため、「実質的に同一」という用語は、本明細書に記載される単離Ｃｈｐポリペプチド及びペプチドの突然変異型、切断型、融合型、又は別の形で配列が修飾された形態、及びその活性フラグメント、並びに参照（野生型又は他の無傷）ポリペプチドと比較して相当の配列同一性（例えば、１つ以上の上記の方法によって測定される、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％の同一性）を有するポリペプチドを包含する。

【００６５】

本明細書で使用される場合、２つのアミノ酸配列は、アミノ酸残基の少なくとも約８０％（例えば、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９２．５％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、又は少なくとも約９９％）が同一であるか、又は保存的置換を示す場合に「実質的に相同」である。本開示のポリペプチドの配列は、ポリペプチド、例えば本明細書に記載のＣｈｐペプチドのアミノ酸の１つ以上、例えば最大１０％、最大１５％、又は最大２０％が同様の又は保存的アミノ酸置換で置換され、得られるペプチド、例えば本明細書に開示のＣｈｐペプチドが、参照ポリペプチドの少なくとも１つの活性（例えば、抗菌効果）及び／又は細菌特異性を有する場合に実質的に相同である。

【００６６】

本明細書で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の電荷を

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

【００６７】

「吸入用組成物」は、日常呼吸又は補助呼吸（例えば、気管気管支内（intratracheobronchial）投与、経肺投与及び／又は経鼻投与による）時の、又はそれと同時の気道への直接送達のために配合されている本開示の医薬組成物を指し、霧化、噴霧化、乾燥粉末及び／又はエアロゾル化配合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【００６８】

「バイオフィルム」は、表面に付着し、細菌及び／又は宿主に由来する成分で構成され得る水和したポリマーマトリックス中に凝集した細菌を指す。バイオフィルムは、生物表面又は非生物表面上で細胞が互いに接着した微生物の凝集物である。これらの接着細胞は、限定されるものではないが、細胞外高分子物質（ＥＰＳ）で構成されるマトリックス中に埋め込まれることが多い。バイオフィルムのＥＰＳは、スライム（スライムと記載されたもの全てがバイオフィルムという訳ではない）又はプラークとも称され、一般に細胞外ＤＮＡ、タンパク質及び多糖で構成されるポリマー集塊である。

【００６９】

「バイオフィルムの形成を予防すること」とは、バイオフィルムの出現、再発、伝播、作用発現又は確立の予防を指す。本開示はバイオフィルム確立の完全な予防又は予防に限定することを意図するものではない。幾つかの実施形態において、バイオフィルムの作用発現が遅延されるか、又はバイオフィルムの確立が減少されるか、又は新たなバイオフィルムの形成の機会が減少され、それらがバイオフィルムの予防の例を構成する。さらに、バイオフィルムの予防は、１）効果的に浮遊細菌を死滅させること；２）懸濁液中の「生残」菌細胞、すなわち代謝的に不活性であり、抗生物質に耐性で、バイオフィルム形成と高度に関連がある細菌を死滅させること；及び／又は３）「凝集」、すなわち、細菌がタンパク質若しくは多糖を介して互いに付着する能力を予防することを含む任意のメカニズムに起因し得る。

【００７０】

バイオフィルムを指して「根絶」とは、１）バイオフィルム内の生残菌細胞を含むバイオフィルム内の細菌を効果的に死滅させることと、任意に２）効果的にバイオフィルムマトリックスを破壊及び／又は損傷させることとを含む。

【００７１】

バイオフィルムを指して「破壊」とは、予防と根絶との間に当たるメカニズムを指す。破壊されるバイオフィルムは、例えば、抗生物質がより容易にバイオフィルムを透過して、細菌を死滅させるために、「開口」されるか、そうでない場合は損傷され得る。

【００７２】

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

【００７３】

「外膜（Outer Membrane）」すなわち「ＯＭ」はグラム陰性細菌の特性を指す。外膜は、リン脂質の内葉と、大部分がリポ多糖（ＬＰＳ）からなる両親媒性の外葉とを有する脂質二重層で構成される。ＬＰＳは、リピドＡと呼ばれるヘキサアシル化グルコサミンベースのリン脂質、多糖コア、及びＯ抗原と呼ばれる伸長した外部多糖鎖の３つの要部を

有する。ＯＭは、ｉ）特にカチオンが存在し、リン酸基を中和する場合のＬＰＳ分子の互いに対する強い結合、ｉｉ）殆どが飽和したアシル鎖の密な充填、及びｉｉｉ）リピドＡ部分の疎水性スタッキングを含む３つの主な相互作用によって安定化している非流動性の連続体を示す。生じる構造は、疎水性分子及び親水性分子の両方にとって障壁となる。ＯＭの下では、ペプチドグリカンが加水分解に非常に影響を受けやすい薄層を形成する。厚さ３０ナノメートル（ｎｍ）～１００ｎｍであり、最大４０層からなるグラム陰性細菌のペプチドグリカンとは異なり、グラム陰性細菌のペプチドグリカンは、厚さが僅か２ｎｍ～３ｎｍであり、１層～３層のみからなる。

【００７４】

ミクロウイルス科ファージ

ミクロウイルス科ファージの成員は、幾つかの理由で抗感染症薬の潜在源として特に関心がもたれる可能性がある。本明細書に開示されているように、クラミジアミクロウイルス（Chlamydiamicrovirus）属（ミクロウイルス科、ゴクショウイルス（Gokushovirinae）亜科）のものを含むこれらのファージの大きなサブセットは保存されたアムリン配列を有しておらず、代わりにこれまで性質が知られていない溶菌系の基礎を形成するように見える小さな性質不明のカチオン性ペプチドをコードすることがわかっている。さらに、腸内細菌科（Enterobacteriaceae）、シュードモナス科（Pseudomonadaceae）及びクラミジア科の成員を含むミクロウイルス科のバクテリオファージは、医学的に関連する生物に感染する（Doore SM et al, 2016. Virology 491:45-55.）。これらのバクテリオファージもまたアムリンを欠き、代わりに、本明細書で開示されるように、以前に同定されていないか、それらに起因する機能を有していない、独自の特徴を持たない抗微生物様ペプチド（アムリンペプチドと呼ばれる）をコードする。推定抗微生物様ペプチドが以前に記載される抗微生物ペプチド（ＡＭＰ）と同様の方式で作用するのであれば、アムリン及びそれらの細胞質標的では不可能な方法で「ない状態からの溶菌」を可能とすることが予測されると推論された。

【００７５】

ＧｅｎＢａｎｋの全てのコメント付きミクロウイルス科ゲノム配列（アムリンを欠くファージに焦点を当てている）のバイオインフォマティクス分析に基づいて、幾つかの新規なシンテニックな（syntenic）オープンリーディングフレームを同定した。それらは、様々な脊椎動物の自然免疫系に由来するＡＭＰ（但し、ＡＭＰに似ていないアミノ酸配列を有する）と同様の推定αヘリックス構造を有する小さなカチオン性ペプチドをコードする。総称して「Ｃｈｐペプチド」又は「アムリンペプチド」と称されるこれらのペプチドは、主にクラミジアミクロウイルス属に見られ、ゴクショウイルス亜科の他の関連する成員で見られる頻度はより少ない。例えば、下記表１及び表２を参照されたい。様々なミクロウイルス科ファージに由来するＣｈｐペプチドは、互いに３０％～１００％の同一性を示し、タンパク質配列データベース内の他のペプチドとの相同性を有しないか又は殆ど有しない場合がある。例えば、下記表３を参照されたい。さらに、幾つかの修飾された変異体は、同定されたＣｈｐペプチドに由来していた。ＣｈｐペプチドがＡＭＰ様活性を持つという予測に基づき、種々のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）アッセイにおける分析のため、ファミリー成員及び修飾された変異体（Ｃｈｐ２及びＣｈｐ３は同一のアミノ酸配列である）を合成した。ヒト血清の存在下での最小阻止濃度（ＭＩＣ）の値０．２５μｇ／ｍＬ～４μｇ／ｍＬに基づいて、幾つかのＣｈｐペプチドは、試験した最大１７種類の既知の一群のＡＭＰ（自然免疫エフェクター及びその誘導体を含む）と比較して優れた血清活性を示した。幾つかのＣｈｐペプチドは更に、ダプトマイシン等の他の既知の抗生物質を阻害する濃度で、肺サーファクタント（Ｓｕｒｖａｎｔａ（商標））において優れた活性を実証した。さらに、シュードモナス・エルギノーサ、大腸菌、エンテロバクター・クロアカエ、クラブシエラ・ニューモニエ、アシネトバクター・バウマンニ及びネズミチフス菌を含む世界保健機関（ＷＨＯ）及び疾病管理センター（ＣＤＣ）の優先リストにある幾つかを含む、様々なグラム陰性病原体に対する活性が実証された。同様に、抗酸菌病原体マイコバクテリウム・スメグマチスに対する活性は、幾つかのＣｈ

ｐペプチドで実証されており、Ｃｈｐ２－Ｍ１は、ステノトロホモナス・マルトフィリア等のステノトロホモナス属種を含むバイオフィルムに対して抗バイオフィルム活性を有することが実証されている。

【００７６】

Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｃｈｐ１０－Ｍ１及びＵｎｐ２－Ｍ１を含む、幾つかのＣｈｐペプチドについて、グラム陰性感染の臨床治療に使用される抗生物質を含む、シュードモナス・エルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ及び／又はアシネトバクター・バウマンニに対する最大１１種類の様々な抗生物質とｉｎ　ｖｉｔｒｏで相乗作用する能力が実証されている。さらに、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ１０－Ｍ１及びＣｈｐ４は、ＭＢＥＣアッセイフォーマットにおいて強力な抗バイオフィルム活性（ＭＢＥＣ＝０．２５μｇ／ｍＬ）を有すること、及び時間－殺菌（time-kill）アッセイフォーマットでは１μｇ／ｍＬ以下の濃度まで殺菌活性を有することが示された。下記実施例４及び実施例５を参照されたい。

【００７７】

全体として、これらの知見は、宿主細胞溶解のプロセスにおけるＣｈｐファミリーの成員の役割（バクテリオファージの生活環との関係で）及び標的であるグラム陰性病原体及び／又は抗酸菌病原体に対する広域スペクトルの抗微生物剤としての精製Ｃｈｐペプチド、修飾された変異体又はその誘導体の使用のいずれとも矛盾しない。侵襲的感染の治療として先に記載されるＡＭＰを使用することの1つの大きな欠点は、赤血球に対する毒性及び広汎な膜分解活性（すなわち溶血）に関する（Oddo A. et al., 2017. Hemolytic Activity of Antimicrobial Peptides. Methods Mol Biol 1548:427-435）。一般的に、これはヒト赤血球の溶解を検出するための標準化されたアッセイを用いてｉｎｖｉｔｒｏで試験され得る。本明細書に開示されるＣｈｐペプチドの多くは、ヒト赤血球に対して溶血活性を示さないが、これとは対照的に、文献に記載されている幾つかのＡＭＰ（及びＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）は溶血活性を有する。或る特定の実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドは、ＡＭＰと比較して、ヒトの赤血球に対して最低限の溶血活性を示すにすぎないか、又は全く溶血活性を示さない。文献に記載されているＡＭＰのもう一つの欠点は、ヒト血液マトリックス及び生理学的塩濃度の存在下での活性喪失に関し（Mohanram H. et al., 2016. Salt-resistant short antimicrobial peptides. Biopolymers 106:345-356)、実際に、既知のＡＭＰのこの効果は下記実施例６及び表２８に示されるように観察され得る。本明細書で提供されるデータは、或る特定のＣｈｐペプチドがヒトの血清又は血漿のいずれかの存在下で活性であること、及び／又は生理学的塩濃度を含むミューラーヒントンブロス及びカザミノ酸培地等の増殖培地において活性であることを実証している。理論によって制限されるものではないが、Ｃｈｐペプチド及びＡＭＰペプチドの活性で観察される違いは（文献において）、Ｃｈｐペプチドがファージ由来であり、ＡＭＰが脊椎動物免疫系の自然免疫エフェクターに大きく基づくという、供給源が異なる２種類の作用物質に起因する可能性があると考えられている。Ｃｈｐペプチドの活性が高いこと、血液マトリックス中のＣｈｐペプチドの活性、及び／又は溶血活性の欠如は、Ｃｈｐペプチドを侵襲性疾患の治療に適したものとしている。例えば、或る特定の実施形態において、Ｃｈｐペプチドはナノモル量で活性となり得る。

【００７８】

要約すると、病原体特異的標的化溶解素治療薬は、既知のＭＤＲ病原体によって引き起こされる重篤な単独菌感染症に対する個別化療法（tailored therapy）としての役割を果たす能力を有するが、複数菌耐性グラム陰性感染症（polymicrobial resistant Gram-negative infection）及び抗酸菌（例えば、結核）によって引き起こされる重篤で生命を脅かす感染（例えば或る特定の腹腔内感染、並びに重篤な熱傷、外科的及び他の創傷感染）に対処するための作用物質に対する今も満たされていない医学的必要性がある。本明細書に開示されるＣｈｐペプチドは、共通してＭＤＲと関連する全ての主なＥＳＫＡＰＥ病原体（エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）、スタフィロ

コッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）、クレブシエラ・ニューモニエ、アシネトバクター・バウマンニ、シュードモナス・エルギノーサ及びエンテロバクター属（Enterobacter））に対して強い活性を示し、多くのグラム陰性細菌及び抗酸菌に対して活性となることが期待されているため、この必要性を満たすのに役立つ。或る特定の実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドは、例えば、以下の種からのＭＤＲ菌株を含む、他のＭＤＲ菌株に対しても活性であり得る：シトロバクター・フロウンディ、セラチア・マルセセンス、サルモネラ・センフテンベルク、モルガネラ・モルガニ、ラウルテラ・オルニチノリチカ、クライベラ・アスコルバータ、クレブシエラ・オキシトカ、プロテウス・ミラビリス、エンテロバクター・アエロゲネス、サルモネラ・エンテリティディス、エンテロコッカス・フェシウム、ネズミチフス菌、及びサルモネラ・オスロ。或る特定の実施形態において、グラム陰性細菌は、イミペネム耐性菌株等のカルバペネム耐性菌株である。或る特定の実施形態において、グラム陰性細菌は、レレバクタム耐性菌株である。本明細書に開示されるＣｈｐペプチドは、高ナノモル濃度で、活性な溶解素と同程度に活性となり得る。本明細書に開示されるＣｈｐペプチドはまた、非常に強力で急速な溶菌効果、バイオフィルムを除去する能力、従来の抗生物質との相乗作用、及び互いとの相乗作用（２つ以上のＣｈｐペプチド間の相乗作用等）を担う可能性がある。

【００７９】

本開示のＣｈｐペプチドは、抗微生物ペプチドの付加によって修飾される必要はないが、或る特定の実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドは融合タンパク質に組み込まれていてもよい。例えば、融合タンパク質は、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドと、グラム陰性細菌に対して活性な溶解素等の溶解素とを含んでもよく、又は２つのＣｈｐペプチドを含んでもよい。或る特定の実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、リンカー配列の有無にかかわらず溶解素又は２つ目のＣｈｐペプチドのＮ末端又はＣ末端に付加され得る。２つ以上の溶菌セグメントを含む融合ポリペプチドは、親溶解素及び／又は親Ｃｈｐペプチドの溶菌活性に積極的に寄与し得ることが企図される。

【００８０】

ポリペプチド

本明細書で実証及び説明されるように、野生型Ｃｈｐペプチド、修飾Ｃｈｐペプチド、その誘導体、修飾された変異体又は活性フラグメントを含む本項に記載されるＣｈｐペプチドを、本明細書に記載される医薬組成物及び方法において使用することができる。

【００８１】

幾つかの実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、Ｃｈｐ１（配列番号１）、Ｃｈｐ２（配列番号２）、ＣＰＡＲ３９（配列番号３）、Ｃｈｐ３（配列番号５４）、Ｃｈｐ４（配列番号４）、Ｃｈｐ６（配列番号６）、Ｃｈｐ７（配列番号７）、Ｃｈｐ８（配列番号８）、Ｃｈｐ９（配列番号９）、Ｃｈｐ１０（配列番号１０）、Ｃｈｐ１１（配列番号１１）、Ｃｈｐ１２（配列番号１２）、Ｇｋｈ１（配列番号１３）、Ｇｋｈ２（配列番号１４）、Ｕｎｐ１（配列番号１５）、Ｅｃｐ１（配列番号１６）、Ｔｍａ１（配列番号１７）、Ｅｃｐ２（配列番号１８）、Ｏｓｐ１（配列番号１９）、Ｕｎｐ２（配列番号２０）、Ｕｎｐ３（配列番号２１）、Ｇｋｈ３（配列番号２２）、Ｕｎｐ５（配列番号２３）、Ｕｎｐ６（配列番号２４）、Ｓｐｉ１（配列番号２５）、Ｓｐｉ２（配列番号２６）、Ｅｃｐ３（配列番号５５）、Ｅｃｐ４（配列番号５６）、Ｌｖｐ１（配列番号５７）、Ｌｖｐ２（配列番号５８）、ＡＬＣＥＳ１（配列番号５９）、ＡＶＱ２０６（配列番号６０）、ＡＶＱ２４４（配列番号６１）、ＣＤＬ９０７（配列番号６２）、ＡＧＴ９１５（配列番号６３）、ＨＨ３９３０（配列番号６４）、Ｆｅｎ７８７５（配列番号６５）、ＳＢＲ７７（配列番号６６）及びＢｄｐ１（配列番号６７）の少なくとも１つから選択され、又は溶菌活性を有するその活性フラグメントである。

【００８２】

幾つかの実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、Ｃｈｐ２－Ｍ１（配列番号８１）、Ｃｈｐ２－Ｃｙｓ（配列番号８２）、Ｃｈｐ２－ＮＣ（配列番号８３）、Ｃｈｐ４：：Ｃｈｐ２（配列番号８４）、Ｃｈｐ２－ＣＡＶ（配列番号８５）、Ｅｃｐ１－ＣＡＶ（配列番

号８６）、Ｅｃｐ１－Ｍ１（配列番号８７）、Ｃｈｐ６－Ｍ１（配列番号８８）、Ｃｈｐ１０－Ｍ１（配列番号８９）、Ｍｓｅ－Ｍ１（配列番号９０）、Ｃｈｐ４－Ｍ１（配列番号９１）、Ｃｈｐ２－ＳＣＲ１（配列番号９２）、Ｃｈｐ２－ＳＣＲ１－Ｍ１（配列番号９３）、Ｕｎｐ４（配列番号９４）、Ｃｈｐ７－Ｍ１（配列番号９５）、Ｏｓｐ１－Ｍ１（配列番号９６）、Ｕｎｐ２－Ｍ１（配列番号９７）、Ｕｎｐ３－Ｍ１（配列番号９８）、Ｓｐｉ２－Ｍ１（配列番号９９）、Ｅｃｐ３－Ｍ１（配列番号１００）、Ａｇｔ１－Ｍ１（配列番号１０１）、及びＭｙｏ１（配列番号１０２）の少なくとも１つから選択され、又は溶菌活性を有するその活性フラグメントである。

【００８３】

Ｃｈｐペプチドは、修飾Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントであってもよい。或る特定の実施形態において、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、配列番号１～配列番号４、配列番号６～配列番号２６、配列番号５４～配列番号６６及び配列番号８１～配列番号１０２の少なくとも１つに対して、少なくとも１つのアミノ酸の置換、挿入若しくは欠失等の少なくとも１つの自然に存在しない修飾を含む。

【００８４】

本開示の修飾Ｃｈｐペプチドは、典型的には、αヘリックスドメインを保持するように設計されており、その有無は、Ｊｐｒｅｄ４（compio.dundee.ac.uk/jpred）及びＨｅｌｉｃａｌ　Ｗｈｅｅｌ（hael.net/helical.htm）等の様々なソフトウェアプログラムを用いて容易に決定することができる。

【００８５】

幾つかの実施形態において、αヘリックスドメインは、分子の大部分に及ぶ。例えば、図１のＣｈｐ１及びＣｈｐ４を参照されたい。幾つかの実施形態において、αヘリックスドメインは中断され（例えば、図１のＣｈｐ２を参照されたい）、また幾つかの実施形態において、αヘリックスドメインは切断される（例えば、図１のＣｈｐ６及びＯｓｐ１を参照されたい）。本開示のＣｈｐペプチドのαヘリックスドメインは、約３個～３２個のアミノ酸、より典型的には約１０個～２５個のアミノ酸残基で大きさが変化する。

【００８６】

本開示の修飾Ｃｈｐペプチドは、典型的には、参照Ｃｈｐペプチドの１つ以上の機能的活性又は生物学的活性を保持する。幾つかの実施形態において、修飾はＣｈｐペプチドの抗菌活性を改善する。典型的には、修飾Ｃｈｐペプチドは、参照Ｃｈｐペプチドと比較してｉｎ　ｖｉｔｒｏでの（例えばバッファー及び／又は培地における）抗菌活性を改善した。他の実施形態において、修飾Ｃｈｐペプチドは、ｉｎ　ｖｉｖｏでの（例えば、動物感染モデルにおける）抗菌活性を改善した。幾つかの実施形態において、修飾は、ヒト血清の不在下及び／又は存在下でのＣｈｐペプチドの抗菌活性を改善する。

【００８７】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド、又はその変異体若しくはその活性フラグメントは、ヒト血清の不在下若しくは存在下、又はヒト血清の存在に関わらず、シュードモナス・エルギノーサ、及び／又は少なくとも１つの種の抗酸菌（結核菌等）、及び任意に少なくとも１つの他の種のグラム陰性細菌若しくは抗酸菌の増殖を阻害することができるか、又はその菌数を減少させることができるか、又はそれを死滅させることができる。幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド、又はその変異体若しくは活性フラグメントは、肺サーファクタントの不在下若しくは存在下、又は肺サーファクタントの存在に関わらず、シュードモナス・エルギノーサ、及び／又は少なくとも１つの種の抗酸菌（結核菌等）、及び任意に少なくとも１つの他の種のグラム陰性細菌若しくは抗酸菌の増殖を阻害することができるか、又はその菌数を減少させることができるか、又はそれを死滅させることができる。

【００８８】

或る特定の実施形態において、修飾Ｃｈｐペプチドは、配列番号１～配列番号４、配列番号６～配列番号２６、配列番号５４～配列番号６６、配列番号８１～配列番号９１及び配列番号９４～配列番号１０２からなる群から選択される少なくとも１つのＣｈｐペプチ

ドのアミノ酸配列と少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、例えば少なくとも９０％、例えば少なくとも９２．５％、例えば少なくとも９５％、例えば少なくとも９８％又は例えば少なくとも９９％の配列同一性を有するポリペプチド配列又はその活性フラグメントを含み、該修飾Ｃｈｐペプチドは、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、シュードモナス・エルギノーサ等の少なくとも１つの種のグラム陰性細菌、又はマイコバクテリアを含む放線菌等の少なくとも１つの種の抗酸菌及び任意に少なくとも１つの追加の種の本明細書に記載されるグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる。

【００８９】

幾つかの実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、（ｉ）Ｃｈｐ１（配列番号１）、Ｃｈｐ２（配列番号２）、ＣＰＡＲ３９（配列番号３）、Ｃｈｐ３（配列番号５４）、Ｃｈｐ４（配列番号４）、Ｃｈｐ６（配列番号６）、Ｃｈｐ７（配列番号７）、Ｃｈｐ８（配列番号８）、Ｃｈｐ１０（配列番号１０）、Ｃｈｐ１１（配列番号１１）、Ｅｃｐ１（配列番号１６）、Ｅｃｐ２（配列番号１８）、Ｅｃｐ３（配列番号５５）、Ｅｃｐ４（配列番号５６）、Ｏｓｐ１（配列番号１９）、Ｕｎｐ２（配列番号２０）、Ｇｋｈ３（配列番号２２）、Ｕｎｐ５（配列番２３）、Ｕｎｐ６（配列番号２４）、Ｓｐｉ１（配列番号２５）、Ｌｖｐ１（配列番号５７）、ＡＬＣＥＳ１（配列番号５９）、ＡＶＱ２０６（配列番号６０）、ＣＤＬ９０７（配列番号６２）、ＡＧＴ９１５（配列番号６３）及びＳＢＲ７７（配列番号６６）の少なくとも１つ若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号１～配列番号４、配列番号６～配列番号８、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１６、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２１～配列番号２５、配列番号５４～配列番号５７、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６２、配列番号６３及び配列番号６６の少なくとも１つと少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有し、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、シュードモナス・エルギノーサ又は少なくとも１つの種の抗酸菌及び任意に少なくとも１つの追加の種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドから選択される。

【００９０】

幾つかの実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、（ｉ）Ｃｈｐ２－Ｍ１（配列番号８１）、Ｃｈｐ２－Ｃｙｓ（配列番号８２）、Ｃｈｐ２－ＮＣ（配列番号８３）、Ｃｈｐ４：：Ｃｈｐ２（配列番号８４）、Ｃｈｐ２－ＣＡＶ（配列番号８５）、Ｅｃｐ１－ＣＡＶ（配列番号８６）、Ｅｃｐ１－Ｍ１（配列番号８７）、Ｃｈｐ６－Ｍ１（配列番号８８）、Ｃｈｐ１０－Ｍ１（配列番号８９）、Ｃｈｐ４－Ｍ１（配列番号９１）、Ｃｈｐ７－Ｍ１（配列番号９５）、Ｏｓｐ１－Ｍ１（配列番号９６）、Ｕｎｐ２－Ｍ１（配列番号９７）、Ｕｎｐ３－Ｍ１（配列番号９８）、Ｅｃｐ３－Ｍ１（配列番号１００）、及びＡｇｔ１－Ｍ１（配列番号１０１）の少なくとも１つ、若しくはその活性なフラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号８９、配列番号９１、配列番号９５～配列番号９８、配列番号１００、及び配列番号１０１の少なくとも１つと少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドから選択され、該修飾Ｃｈｐペプチドは、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、シュードモナス・エルギノーサ又は少なくとも１つの種の抗酸菌、及び任意に少なくとも１つの追加的な種のグラム陰性細菌若しくは抗酸菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる。

【００９１】

幾つかの実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、（ｉ）Ｃｈｐ２－Ｍ１（配列番号８１）、Ｃｈｐ２－Ｃｙｓ（配列番号８２）、Ｃｈｐ２－ＮＣ（配列番号８３）、Ｃｈｐ４：：Ｃｈｐ２（配列番号８４）、Ｃｈｐ２－ＣＡＶ（配列番号８５）、及びＥｃｐ１－ＣＡＶ（配列番号８６）の少なくとも１つ、又は（ｉｉ）配列番号８１～配列番号８６の少な

くとも１つと少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９％若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドから選択され、該修飾Ｃｈｐペプチドは、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、シュードモナス・エルギノーサ又は少なくとも１つの種の抗酸菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる。

【００９２】

幾つかの実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、（ｉ）Ｃｈｐ２－Ｍ１（配列番号８１）、Ｅｃｐ１－Ｍ１（配列番号８７）、Ｃｈｐ６－Ｍ１（配列番号８８）、Ｃｈｐ１０－Ｍ１（配列番号８９）、Ｃｈｐ４－Ｍ１（配列番号９１）、Ｕｎｐ２－Ｍ１（配列番号９７）、Ｅｃｐ３－Ｍ１（配列番号１００）、及びＡｇｔ１－Ｍ１（配列番号１０１）の少なくとも１つ、若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００、及び配列番号１０１の少なくとも１つと少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有する修飾Ｃｈｐペプチドから選択され、該修飾Ｃｈｐペプチドは、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、少なくとも１つの種の抗酸菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる。

【００９３】

幾つかの実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、（ｉ）Ｃｈｐ２（配列番号２）、Ｃｈｐ３（配列番号５４）、Ｃｈｐ４（配列番号４）、Ｃｈｐ６（配列番号６）、Ｅｃｐ１（配列番号１６）及びＥｃｐ２（配列番号１８）の少なくとも１つ若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号１６及び配列番号１８の少なくとも１つと少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２．５％、少なくとも９５％、少なくとも９８％若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有し、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、シュードモナス・エルギノーサ等の少なくとも１つの種のグラム陰性細菌及び少なくとも１つの追加の種のグラム陰性細菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドから選択される。

【００９４】

或る特定の実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、（ｉ）配列番号２、配列番号４及び配列番号６からなる群からから選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも１つのＣｈｐペプチド、若しくはその活性フラグメント、又は（ｉｉ）配列番号２、配列番号４及び配列番号６の少なくとも１つと少なくとも９２．５％の配列同一性を有し、任意にヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下で、シュードモナス・エルギノーサ等の少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は少なくとも１つの種の抗酸菌及び少なくとも１つの追加の種のグラム陰性細菌の増殖を阻害する、その菌数を減少させる、及び／又はそれを死滅させる修飾Ｃｈｐペプチドから選択される。

【００９５】

幾つかの実施形態において、本開示のＣｈｐペプチドは、１つの化学修飾された参照Ｃｈｐペプチドの誘導体である。化学修飾は、限定されるものではないが、化学部分を追加すること、新たな結合を作ること、及び化学部分を除去することを含む。化学修飾は、アミノ酸側鎖、及びアミノ末端又はカルボキシル末端を含むＣｈｐペプチドのどこにでも起こり得る。例えば、或る特定の実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、Ｎ末端アセチル化修飾を含む。或る特定の実施形態において、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、Ｃ末端アミド化修飾を含む。かかる修飾は、Ｃｈｐペプチド中の２以上の部位に存在し得る。

【００９６】

さらに、Ｃｈｐポリペプチド又はその活性フラグメントの１つ以上の側鎖基又は末端基は、当業者に既知の保護基によって保護され得る。

【００９７】
幾つかの実施形態において、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、持続時間延長（duration enhancing）部分にコンジュゲートされる。幾つかの実施形態において、持続時間延長部分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、持続時間が延長された治療用ポリペプチドを得るために使用されている（Zalipsky, S., Bioconjugate Chemistry, 6:150-165 (1995)、Mehvar, R., J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 3:125-136 (2000)、それらの全体が引用することにより本明細書の一部をなす）。ＰＥＧ骨格（CH_2CH_2-O-）ｎ（ここで、ｎは繰り返しモノマーの数である）は、柔軟で両親媒性である。Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメント等の別の化学成分に付着すると、ＰＥＧポリマー鎖は、免疫応答及び他のクリアランス機構からかかるポリペプチドを保護することができる。その結果、ペグ化は、薬物動態を最適化し、バイオアベイラビリティを高め、免疫原性及び投薬の量及び／又は頻度を減少させることによって、有効性及び安全性の向上につなげることができる。
【００９８】
或る特定の実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、それらのＬ－アイソフォームに自然に現れる正のアミノ酸（アルギニン、リシン、及びヒスチジン）が、Ｄ－アイソフォームの同じアミノ酸によって置き換えられている修飾された変異体である。サポシンＢに由来する種々の抗微生物タンパク質を用いて、Ｄアイソフォームアミノ酸を含む変異体がより高い抗菌活性を示す可能性があることが示されている。例えば、Manabe et al., Scientific Reports (2017); DOI:10.1038/srep43384を参照されたい。或る特定の実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、アミノ酸残基（複数の場合がある）がＣ末端、Ｎ末端、又はＣ末端及びＮ末端の両方に付加されている修飾された変異体である。例えば、或る特定の実施形態において、システインがＣ末端及び／又はＮ末端に付加され得る。或る特定の実施形態において、αヘリックスに安定性を付与すること、及び／又は塩の存在下で活性を促進することが知られている残基を、Ｃ末端及び／又はＮ末端に付加することができる。例えば、Park et al., Helix stability confers salt resistance upon helical antimicrobial peptides, J. Biol. Chem. (2004); 279(14):13896-901を参照されたい。更なる実施形態において、Ｃｈｐペプチドは、電荷アレイ変異体である修飾された変異体であり、アミノ酸は、両親媒性ヘリックス構造を維持するためにそれらの電荷に基づいて再配列されている。更なる実施形態において、アミノ酸残基は、或る特定の実施形態において、対照ペプチドとして作用し得る修飾された変異体を作製するためにスクランブルされ得る。
【００９９】
幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド及びその活性フラグメントは、グラム陰性細菌の外膜を透過することができる。理論によって制限されるものではないが、外膜の透過後、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、細菌細胞壁の主な構造成分であるペプチドグリカンを分解し、細胞溶解をもたらすことができる。幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、グラム陰性細菌のアニオン性外膜への結合を促進して、隣接するペプチドグリカンへの移行を引き起こす、正に帯電した（及び両親媒性の）Ｎ末端及び／又はＣ末端のαヘリックスドメインを含む。
【０１００】
グラム陰性細菌の外膜を透過するＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの能力は、国際公開第２０１７／０４９２３３号（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に記載されるような当該技術分野で既知の任意の方法によって評定され得る。例えば、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントを、グラム陰性細菌及び疎水性化合物と共にインキュベートしてもよい。殆どのグラム陰性細菌は、疎水性化合物に耐性が強く、外膜が存在することから、１－Ｎ－フェニルナフチルアミン（ＮＰＮ）、クリスタルバイオレット、又は８－アニリノ－１－ナフタレンスルホン酸（ＡＮＳ）等の疎水性物質を取り込ませない。ＮＰＮは、無傷のグラム陰性細菌によって大部分が排除されるが、損傷した

、又は透過性の外膜を持つ細胞では、ＮＰＮの取り込みが促進される場合がある。ＮＰＮは、疎水性条件下では強く、水性条件下では弱く蛍光を発する。したがって、細菌のエンベロープ内の膜リン脂質とのＮＰＮの相互作用は、その蛍光シグナルを増加させ、損傷した細菌膜の指標及び外膜透過性の尺度（measurement）として使用することができる。

【０１０１】

より詳しくは、外壁を透過するＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの能力は、例えば、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントの存在下で、活性を試験するグラム陰性細菌、例えばシュードモナス・エルギノーサ株ＰＡ０１と共に、例えばＮＰＮをインキュベートすることで評定され得る。Ｃｈｐペプチドが存在しない場合（陰性対照）に放出される蛍光と比較して蛍光の誘導が高いことは、外膜透過を示す。加えて、蛍光誘導を、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）等の確立された透過剤、又はシュードモナス・エルギノーサの治療に最終手段として用いられる抗生物質、すなわち、ポリミキシンＢ（ＰＭＢ）等の抗生物質の蛍光誘導と比較することで、外膜透過のレベルを評定することができる。

【０１０２】

文献全体の複数のプロトコルは、例えば、（１）Mohamed et al., A short D-enantiomeric antimicrobial peptide with potent immunomodulatory and antibiofilm activity against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii, SCIENTIFIC REPORTS 2017; 6953(7):1-13、（２）Lv et al., Antimicrobial Properties and Membrane-Active Mechanism of a Potential α-Helical Antimicrobial Derived from Cathelicidin PMAP-36, PLoS One 2014; 9:e86364、（３）Wang et al., High specific selectivity and Membrane-Active Mechanism of the synthetic centrosymmetric α-helical peptides with Gly-Gly pairs, SCIENTIFIC REPORTS 2015; 15963(5):1-19、及び（４）Shao et al., Symmetrical Modification of Minimized Dermaseptins to Extend the Spectrum of Antimicrobials with Endotoxin Neutralization Potency, INTERNATIONAL J. MOL. SCI. 2019; 1417(20)等のＮＰＮ及びアムリンペプチドを用いる様々な作用研究の方法を詳述する。したがって、文献に基づいて、或る特定の対照ペプチドを使用し、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドと比較することができる。例えば、Lv et al. 2014は、急速な（例えば数分以内の）膜破壊及びＮＰＮ取り込みの急速な増加を引き起こすハチ毒ペプチドであるメリチンを開示する。Wang et al. 2015は、膜の破壊及びＮＰＮの取り込みを引き起こすヒトの自然免疫分子であるＬＬ－３７を開示する。さらに、強力な膜破壊活性を有する既知のペプチドであるコリスチン、及びＣｈｐ５等の本明細書に開示されるＣｈｐペプチドの電荷反転変異体は、例えば、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドの作用機序の研究を促進するために、対照として使用され得る。

【０１０３】

グラム陰性細菌の外膜を破壊するＣｈｐペプチドの能力は、例えば、EC_{50}、又は細菌サンプルが１０分で外膜にＮＰＮの最大５０％を取り込んだ濃度を測定することによって評定することができる。ＣｈｐペプチドであるＣｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１がグラム陰性細菌（シュードモナス・エルギノーサ、エンテロバクター・クロアカエ、クレブシエラ・ニューモニエ、大腸菌、及びアシネトバクター・バウマンニを含む）の外膜を透過する能力について試験された場合、コリスチン、ＬＬ３７、及びメリチンと同等の外膜透過性の用量依存的な増加が観察された。したがって、或る特定の実施形態において、グラム陰性細菌を本明細書に開示されるＣｈｐペプチドと接触させると、グラム陰性細菌は、対照ペプチド（コリスチン、ＬＬ－３７、又はメリチン等）に曝露されたグラム陰性細菌のEC_{50}に匹敵するか又はそれより少ないEC_{50}を示し得て、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドが、シュードモナス・エルギノーサ、エンテロバクター・クロアカエ、クレブシエラ・ニューモニエ、大腸菌、及びアシネトバクター・バウマンニを含むグラム陰性細菌の外膜のＮＰＮ取り込み及び透過率の増加を可能にすることを示

す。

【０１０４】

本明細書に開示されるＣｈｐペプチドの作用機序は、グラム陰性細菌の内膜の脱分極を測定することによっても評価することができる。内膜は、カルジオリピン、ホスファチジルグリセロール、及びホスファチジルセリン等のヒドロキシル化リン脂質を含む。これは、生理学的ｐＨで正味の負電荷を生成し、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドを含むカチオン性ペプチドの結合を増強すると考えられる。外膜を透過処理すると、細胞膜の電位勾配（Δψ）の散逸を誘発するＣｈｐペプチドの能力を、例えば、未処理対照と比較した時間の関数として、３，３’－ジプロピルチアジカルボシアニン（ｄｉＳＣ$_3$－５）の放出を追跡することにより調べることができる。ｄｉＳＣ$_3$－５は、細菌の内膜内に集中し、細菌の膜電位勾配の影響下にあるケージドカチオン（caged cation）であるフルオロフォアである。高濃度では、ｄｉＳＣ$_3$－５は自己消光し、蛍光の抑制につながる。内膜が劣化するか、又はプロトンを含む陽イオンが漏れると、Δψが散逸し、ｄｉＳＣ$_3$－５が放出され、続いて蛍光が増加する。ＬＬ－３７及びメリチン等の対照ペプチドはΔψを散逸させることが示されており、様々なグラム陰性細菌で本明細書に開示されているＣｈｐペプチドの散逸電位（dissipation potential）を評価するための比較として使用することができる。ＣｈｐペプチドであるＣｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１がグラム陰性細菌（シュードモナス・エルギノーサ、エンテロバクター・クロアカエ、クレブシエラ・ニューモニエ、大腸菌、及びアシネトバクター・バウマンニを含む）の内膜を脱分極する能力について試験された場合、メリチン、ＬＬ３７、ＲＩ－１８、及びＰＭＢＮと同等の又はそれよりも優れた膜脱分極の用量依存的な増加が観察された。理論によって制限されることを望まないが、Ｃｈｐペプチドの内膜への吸着及び結合、並びに脂質二重層への挿入は、膜電位の崩壊に付随する膜透過及び細孔／イオンチャネル形成をもたらすと考えられる。

【０１０５】

グラム陰性細菌の外膜及び内膜に対する本明細書に開示されるＣｈｐペプチドによって引き起こされる損傷は、ヨウ化プロピジウム等の不浸透性色素を用いて評定することもできる。ヨウ化プロピジウムがアムリンペプチドによって損傷を受けた細菌膜を通過し、ＤＮＡに挿入され、蛍光シグナルを発する能力を評定するためのプロトコルは、例えば、Mohamed et al. 2017、Wang et al. 2015、Kwon et al., Mechanism of action of antimicrobial peptide P5 truncation against Pseudomonas aeruginosa and Staphyloccus aureus, AMB Express 2019; 9:122、及びNagant et al., Identification of Peptides Derived from the Human Antimicrobial Peptide LL-37 Active against Biofilms Formed by Pseudomonas aeruginosa Using a Library of Truncated Fragments, Antimicrob. Agents Chemo.2012; 56:5698-5708を含む当該技術分野において知られている。ＮＰＮと同様に、ヨウ化プロピジウムのＥＣ$_{50}$は、所与の時間後にＣｈｐペプチドと接触したグラム陰性細菌において測定して、未処理、又は例えば、コリスチン、ＬＬ－３７、若しくはメリチン等の対照ペプチドと接触したグラム陰性細菌のＥＣ$_{50}$と比較してもよい。ＣｈｐペプチドであるＣｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１がグラム陰性細菌（シュードモナス・エルギノーサ、エンテロバクター・クロアカエ、クレブシエラ・ニューモニエ、大腸菌、及びアシネトバクター・バウマンニを含む）のヨウ化プロピジウムの取り込みを増強する能力について試験された場合、細胞エンベロープ透過性の用量依存的増加はコリスチン、ＬＬ３７、及びメリチンの場合と同等であった。

【０１０６】

さらに、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドの作用機序を、走査型電子顕微鏡法（ＳＥＭ）及び透過型電子顕微鏡法（ＴＥＭ）の手法を使用することによって評価することができる。上で検討したように、Ｃｈｐペプチドと接触すると細菌膜が急速に透過化及び脱分極するため、膜の損傷をＳＥＭ及びＴＥＭで視覚化することができる。ＳＥＭ及びＴＥＭの画像は、多くの既知の溶解素と同様に、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドが、「

膜バブル（membrane bubbles）」の出現、それに続く膜の溶解を特徴とする可能性があることを実証する。Ｃｈｐペプチド（８μｇ／ｍＬ）がシュードモナス・エルギノーサと接触してからおよそ２分後に撮影されたＴＥＭ及びＳＥＭの画像は、細菌膜上に複数のバルジ（bulges）が形成されていること、並びに細孔形成及び細胞膜の分解の出現を示す。Ｃｈｐペプチド（８μｇ／Ｌ）がシュードモナス・エルギノーサと接触してからおよそ５分後に撮影されたＴＥＭ及びＳＥＭの画像は、細胞膜の分解、電子密度の高い細胞質物質の凝縮、スフェロプラストの形成及び細孔形成と共に、膜バルジ（membrane bulges）の継続的な形成を示す。Ｃｈｐペプチド（８μｇ／ｍＬ）がシュードモナス・エルギノーサと接触してからおよそ２０分後に撮影されたＴＥＭ及びＳＥＭ画像は、細孔形成、及び細胞内内容物がないゴースト菌体の出現の複数の例を示す。まとめると、ＴＥＭ及びＳＥＭの画像は、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドとの接触による膜溶解が、膜のバブリング（membrane bubbling）又はバルジ形成（bulging）、細孔形成、及び細胞溶解を含む３段階のプロセスを通じて起こり、糸状物質の放出をもたらす可能性があることを実証する。

【０１０７】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、ヒト血清の存在下及び／又は不在下で溶菌活性を示す。ヒト血清中でＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの活性を評定するのに適した方法は、当該技術分野において既知であり、実施例に記載されている。簡潔に述べると、ＭＩＣ値（すなわち、対照と比較して細菌増殖を少なくとも８０％抑制するのに十分なペプチドの最小濃度）をＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントについて決定することができ、例えば、ヒト血清中で不活性な化合物、例えば、Ｔ４ファージリゾチーム又はａｒｔｉｌｙｓｉｎ　ＧＮ１２６と比較することができる。Ｔ４ファージリゾチームは、例えばSigma-Aldrich, Incから市販されている。ＧＮ１２６は、文献に記載されているＡｒｔ－１７５に相当し、ＡＭＰ　ＳＭＡＰ－２９をＧＮ溶解素ＫＺ１４４に融合させることによって得られる。Briers et al. 2014, Antimicrob, Agents Chemother. 58:3774-3784を参照されたい。本文献はその全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【０１０８】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、肺サーファクタントの存在下及び／又は不在下で溶菌活性を示す。肺サーファクタント中でＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの活性を評定するのに適した方法は、当該技術分野において既知であり、実施例に記載されている。ヒト血清中での活性を評定する場合と同様に、肺サーファクタント又は適切な代替物（例えば、Ｓｕｒｖａｎｔａ（商標））中でのＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントについてＭＩＣ値を決定し、任意に、ダプトマイシン等の肺サーファクタント及び／又はＳｕｒｖａｎｔａ（商標）中において活性の低下を示す化合物と比較することができる。

【０１０９】

より詳しくは、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントのＭＩＣ値は、様々な標準培地及び非標準培地、例えば、ミューラーヒントンブロス（ＭＨＢ）、ヒト血清又はＳｕｒｖａｎｔａ（商標）を添加したＭＨＢ、デンプンを含まないＭＨＢ（ＭＨＢｎｓ）、生理的塩濃度を含む本明細書に記載のＣＡＡ、ヒト血清又はＳｕｒｖａｎｔａ（商標）を添加したＣＡＡ、Ｔｗｅｅｎ８０（商標）、例えば、０．００２％Ｔｗｅｅｎ８０（商標）を添加したＣＡＡ（CAA_T）、デンプン又はビーフエキスを添加したCAA_T、改変ＲＰＭＩ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、及びトリプシンソイブロスにおいて、例えば、実験室のシュードモナス・エルギノーサ株ＰＡ０１及びＣＦＳ－１２９２を含む特定の細菌に対して決定され得る。殆どの臨床分離株とは異なり、ＰＡ０１はヒト血液マトリックスの抗菌活性に感受性がないことから、ＰＡ０１の使用により血清濃度が上昇した状態での試験が可能になる。他の細菌を使用して、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントのＭＩＣ値を決定することもでき、例えば、実験室株マイコバクテリウム・スメグマチス$MC^2$１５５；弱毒化結核菌（Ｚｏｐｆ）Ｌｅｈｍａｎｎ及びＮｅｕｍａｎｎ　Ａ

ＴＣＣ（商標）株３５８１８、株２５１７７、株３５８１７、及び株３５８１８；並びに非結核性抗酸菌株、例えば、マイコバクテリウム・アビウム株Ｃｈｅｓｔｅｒ（ＡＴＣＣ（商標）７００８９８）、マイコバクテリウム・カンサシ株Ｈａｕｄｕｒｏｙ（ＡＴＣＣ（商標）１２４７８）、マイコバクテリウムス・スクロフラセウム株Ｐｒｉｓｓｉｃｋ及びＭａｓｓｏｎ（ＡＴＣＣ（商標）１９９８１）、マイコバクテリウム・ペレグリナム株Ｋｕｓｕｎｏｋｉ及びＥｚａｋｉ（ＡＴＣＣ（商標）７００６８６）、マイコバクテリウム・マリナム株Ａｒｏｎｓｏｎ（ＡＴＣＣ（商標）９２７）、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ株（Ｃｕｔｔｉｎｏ及びＭｃＣａｂｅ）Ｒｕｎｙｏｎ（ＡＴＣＣ（商標）１３９５０）、及びマイコバクテリウム・フォーチュイタム亜種フォーチュイタムｄａ Ｃｏｓｔａ Ｃｒｕｚ（ＡＴＣＣ（商標）６８４１）が挙げられる。

【０１１０】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、バイオフィルムを低減することができる。Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントの最小バイオフィルム根絶濃度（ＭＢＥＣ：Minimal Biofilm Eradicating Concentration）を評定する方法は、修正を加えた微量液体希釈ＭＩＣ法の変法を用いて決定することができる（Ceri et al. 1999. J. Clin Microbial. 37:1771-1776（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）、及びSchuch et al., 2017, Antimicrob. Agents Chemother. 61, pages 1-18（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）を参照されたい）。この方法では、例えばＡＴＣＣ１７６４７等のシュードモナス・エルギノーサ株の新しいコロニーを培地、例えば、ＴＳＢｇ（０．２％グルコースを添加したトリプシンソイブロス）中に例えば１：１００に希釈したリン酸緩衝溶液（ＰＢＳ）に懸濁し、例えば、０．１５ｍｌのアリコートとしてこれをＣａｌｇａｒｙ Ｂｉｏｆｉｌｍ Ｄｅｖｉｃｅ（９６個のポリカーボネートペグを持つ蓋付きの９６ウェルプレート；Innovotech Inc.）に加え、例えば３７℃で２４時間インキュベートする。次いで、バイオフィルムを洗浄し、例えば、ＴＳＢｇ中の溶解素の２倍希釈系列を用いて、例えば、３７℃で２４時間処理する。処理後、ウェルを洗浄し、例えば３７℃で風乾し、例えば０．０５％クリスタルバイオレットで１０分間染色した。染色後、バイオフィルムを、例えば３３％酢酸中で脱色し、例えば、抽出されたクリスタルバイオレットのOD_{600}を決定する。各サンプルのＭＢＥＣは、クリスタルバイオレットの定量により評定されるバイオフィルムのバイオマスの少なくとも９５％を除去するのに必要な最小Ｃｈｐペプチド濃度である。

【０１１１】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、ヒト血清及び／又は肺サーファクタントの存在下及び／又は不在下での抗生物質の最小阻止濃度（ＭＩＣ）を低下させる。ＭＩＣを評定するための任意の既知の方法が使用され得る。幾つかの実施形態において、チェッカーボードアッセイを、抗生物質濃度に対するＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの影響を決定するために使用する。チェッカーボードアッセイは、微量液体希釈によるＭＩＣ決定のためのＣＬＳＩ法の修正に基づく（Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), CLSI. 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-10th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）、及びCeri et al. 1999. J. Clin. Microbiol. 37:1771-1776（同様にその全体が引用することにより本明細書の一部をなす）を参照されたい）。

【０１１２】

チェッカーボードは、最初に、例えば、各ウェルが横軸に沿って２倍に希釈された同じ量の抗生物質を有する９６ウェルポリプロピレンマイクロタイタープレートの列を準備することによって構築される。別のプレートに、各ウェルが、例えば、縦軸に沿って２倍に希釈された同じ量のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを有する比較用の行を準備する。そして、各列が一定量の抗生物質と、Ｃｈｐペプチドの倍加希釈物とを有し、各行

が一定量のＣｈｐペプチドと、抗生物質の倍加希釈物とを有するように、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメント及び抗生物質の希釈物を組み合わせる。各ウェルは、このようにＣｈｐペプチドと抗生物質との独自の組合せを持つ。細菌を、例えば、ヒト血清又は肺サーファクタントの有無にかかわらず、ＣＡＡ中１×１０^{5}ＧＦＵ／ｍｌの濃度で薬物の組合せに加える。次いで、単独の及び組み合わせた各薬物のＭＩＣを、例えば周囲空気中、３７℃で１６時間後に記録する。部分阻止濃度の合計（ΣＦＩＣ：Summation Fractional Inhibitory Concentration）を各薬物について計算し、最小ΣＦＩＣ値（ΣＦＩＣｍｉｎ）を用いてＣｈｐペプチド／抗生物質の組合せの効果を決定する。

【０１１３】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、赤血球に対して低い毒性を示す。当該技術分野で既知の任意の方法論は、本Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントの溶血活性の可能性を評定するために使用され得る。

【０１１４】

ポリヌクレオチド

Ｃｈｐペプチド及びその活性フラグメント

一態様において、本開示は、Ｃｈｐペプチド又は溶菌活性を有するその活性フラグメントをコードする核酸分子を含む単離ポリヌクレオチドに関する。本明細書で使用される場合、「溶菌活性」は、ヒト血清の存在下又は不在下で、例えばグラム陰性細菌（例えば、シュードモナス・エルギノーサ）の外膜又は抗酸菌（例えば、結核菌）の細胞壁を透過することによるＣｈｐペプチドの細菌を死滅させる能力、細菌の菌数を減少させる能力又は細菌の増殖を阻害する能力を包含する。溶菌活性はまた、ヒト血清の存在下及び／又は不在下で、バイオフィルムを除去若しくは減少させる能力及び／又は抗生物質の最小阻止濃度（ＭＩＣ）を低下させる能力を包含する。

【０１１５】

或る特定の実施形態において、核酸分子は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５及び配列番号６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする。

【０１１６】

或る特定の実施形態において、核酸分子は、配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号８４、配列番号８５、配列番号８６、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９０、配列番号９１、配列番号９２、配列番号９３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１、及び配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性なフラグメントをコードする。

【０１１７】

或る特定の実施形態において、核酸分子は、配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号８４、配列番号８５、及び配列番号８６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする。或る特定の実施形態において、核酸分子は、配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００、及び配列番号１０１からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする。

【０１１８】

或る特定の実施形態において、核酸分子は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５及び配列番号６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする。

【０１１９】

或る特定の実施形態において、核酸分子は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１６、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６２、配列番号６３及び配列番号６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードし、或る特定の実施形態において、核酸は、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号１６、配列番号１８及び配列番号５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする。

【０１２０】

幾つかの実施形態において、本開示の単離ポリヌクレオチドは、修飾Ｃｈｐペプチド、例えば、参照Ｃｈｐペプチドと比較して１つ以上の挿入、欠失及び／又はアミノ酸置換を含むＣｈｐペプチドをコードする核酸分子を含む。かかる参照Ｃｈｐペプチドとしては、配列番号１～配列番号４、配列番号６～配列番号２６、配列番号５４～配列番号６６、及び配列番号８１～配列番号１０２のいずれか１つが挙げられる。或る特定の実施形態において、修飾Ｃｈｐペプチドは、配列番号１～配列番号４、配列番号６～配列番号２６、配列番号５４～配列番号６６、及び配列番号８１～配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する参照Ｃｈｐペプチドに対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の配列同一性を有する。

【０１２１】

幾つかの実施形態において、本開示の核酸分子は、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又は修飾Ｃｈｐペプチドの活性フラグメントをコードする。「活性フラグメント」という用語は、完全長のＣｈｐペプチドの一部を指し、これは、参照ペプチドの１つ以上の生物学的活性を保持する。そのため、本明細書で使用される場合、Ｃｈｐペプチド又は修飾Ｃｈｐペプチドの活性フラグメントは、ヒト血清及び／又は肺サーファクタントの不在下若しくは存在下、又はヒト血清の有無にかかわらず、シュードモナス・エルギノーサ及び／又は少なくとも１つの種の抗酸菌及び任意に本明細書に記載される少なくとも１つの種のグラム陰性細菌又は抗酸菌の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。典型的には、活性フラグメントは、αヘリックスドメインを保持する。或る特定の実施形態において、活性フラグメントは、αヘリックスドメインを保持するカチオン性ペプチドである。

【０１２２】

ベクター及び宿主細胞

別の態様において、本開示は、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド若しくはその活性フラグメントのいずれかをコードする核酸分子を含む単離ポリヌクレオチド又は本単離ポリヌクレオチドの相補配列を含むベクターに関する。幾つかの実施形態において、ベクターはプラスミド又はコスミドである。他の実施形態において、ベクターはウイルスベクターであり、この場合、追加のＤＮＡセグメントをウイルスベクターにライゲートすることができる。幾つかの実施形態において、ベクターは、ベクターが導入された宿主細胞において自律的に複製することができる。幾つかの実施形態において、ベクターは宿主細胞へ

の導入の際に宿主細胞のゲノムに統合され、それによって宿主ゲノムと共に複製され得る。

【０１２３】

幾つかの実施形態において、特定のベクターは、本明細書において「組み換え発現ベクター」又は「発現ベクター」と称され、ベクターが操作可能に連結されている遺伝子の発現を指示することができる。ポリヌクレオチド配列は、別のヌクレオチド配列と機能的な関係に置かれる場合、「操作可能に連結」される。例えば、プロモーター又は調節ＤＮＡ配列は、２つの配列が操作可能に連結している場合、又はプロモーター若しくは調節ＤＮＡ配列がコーディングＤＮＡ配列若しくは構造ＤＮＡ配列の発現レベルに影響を与えるように位置する場合、ＲＮＡ及び／又はタンパク質をコードするＤＮＡ配列に「操作可能に連結して」いると言われる。操作可能に連結されたＤＮＡ配列は、典型的には連続的であるが、必ずしもそうであるわけではない。

【０１２４】

幾つかの実施形態において、本開示は、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５及び配列番号６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする核酸分子を含むベクターに関する。

【０１２５】

幾つかの実施形態において、本開示は、配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号８４、配列番号８５、配列番号８６、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９０、配列番号９１、配列番号９２、配列番号９３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１及び配列番号１０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする核酸分子を含むベクターに関する。

【０１２６】

幾つかの実施形態において、本開示は、配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号８４、配列番号８５及び配列番号８６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする核酸分子を含むベクターに関する。幾つかの実施形態において、本開示は、配列番号８１、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９１、配列番号９７、配列番号１００、及び配列番号１０１からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする核酸分子を含むベクターに関する。

【０１２７】

或る特定の実施形態において、ベクターは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５及び配列番号６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする核酸分子を含む。

【０１２８】

或る特定の実施形態において、ベクターは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１６、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３、配

列番号２４、配列番号２５、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６２、配列番号６３及び配列番号６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする核酸分子を含み、或る特定の実施形態において、ベクターは、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号１６、配列番号１８及び配列番号５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣｈｐペプチド、又はその活性フラグメントをコードする核酸分子を含む。

【０１２９】

一般的には、宿主においてポリペプチドを維持、増殖又は発現するのに適した任意の系又はベクターは、本明細書に開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの発現に使用され得る。適切なＤＮＡ／ポリヌクレオチド配列は、例えばSambrook et al., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (2001)に記載されるもの等、様々な既知の日常的な手法のいずれかによって発現系へと挿入され得る。さらに、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントにタグ、例えば、ｃ－ｍｙｃ、ビオチン、ｐｏｌｙ－Ｈｉｓ等を付加して、簡便な分離方法を提供することもできる。かかる発現系用のキットは市販されている。

【０１３０】

広範な宿主／発現ベクターの組合せを、本明細書に開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列の発現に用いることができる。多数の好適なベクターが当業者に既知であり、市販されている。適切なベクターの例は例えば、Sambrook et al, eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (2001)に提示されている。かかるベクターとしては、特に染色体ベクター、エピソームベクター及びウイルス由来ベクター、例えば細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入因子、酵母染色体要素、バキュロウイルス、ＳＶ４０等のパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス及びレトロウイルス等のウイルスに由来するベクター、並びにそれらの組合せに由来するベクター、例えばプラスミドとコスミド及びファージミド等のバクテリオファージ遺伝要素とに由来するベクターが挙げられる。

【０１３１】

さらに、上記ベクターは、本開示のＣｈｐペプチド又はその活性化フラグメントの構成的又は誘導性発現をもたらすことができる。好適なベクターとしては、ＳＶ４０の誘導体、並びに既知の細菌プラスミド、例えば大腸菌プラスミドｃｏｌＥｌ、ｐＣＲ１、ｐＢＲ３２２、ｐＭＢ９及びそれらの誘導体、ＲＰ４、ｐＢＡＤ２４及びｐＢＡＤ－ＴＯＰＯ等のプラスミド；ファージＤＮＡ、例えばファージＡの多数の誘導体、例えばＮＭ９８９、並びに他のファージＤＮＡ、例えばＭ１３及び繊維状一本鎖ファージＤＮＡ；２Ｄプラスミド等の酵母プラスミド又はその誘導体；昆虫又は哺乳動物細胞に有用なベクター等の真核細胞に有用なベクター；ファージＤＮＡ又は他の発現制御配列を用いるように修飾されたプラスミド等のプラスミドとファージＤＮＡとの組合せに由来するベクター等が挙げられるが、これらに限定されない。上述のベクターの多くがNew England Biolabs Inc.、Addgene、Takara Bio Inc.、ThermoFisher Scientific Inc.等の供給業者から市販されている。

【０１３２】

さらに、ベクターは、様々な調節要素（プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、エンハンサー、発現レベルを制御する様々なシスエレメントを含む）を含んでいてもよく、ベクターは、宿主細胞に応じて構築される。広範な発現制御配列（それに操作可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現を制御する配列）のいずれかを、本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を発現するために、これらのベクターに用いることができる。有用な制御配列としては、ＳＶ４０、ＣＭＶ、ワクシニア、ポリオーマ又はアデノウイルスの初期又は後期プロモーター、ｌａｃ

系、ｔｒｐ系、ＴＡＣ系、ＴＲＣ系、ＬＴＲ系、ファージＡの主要オペレーター及びプロモーター領域、ｆｄ外被タンパク質の制御領域、３－ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼ（例えば、Ｐｈｏ５）のプロモーター、酵母接合因子のプロモーター、細菌における発現のための大腸菌プロモーター、並びに原核若しくは真核細胞、又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られる他のプロモーター配列、並びにそれらの様々な組合せが挙げられるが、これらに限定されない。通例、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列は、異種プロモーター又は調節要素に操作可能に連結される。

【０１３３】

別の態様において、本開示は、本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む、本明細書に開示されるいずれかのベクターを含む宿主細胞に関する。広範な宿主細胞が本ポリペプチドの発現に有用である。本ポリペプチドの発現に適した宿主細胞の非限定的な例としては、大腸菌株、シュードモナス株、バシラス（Bacillus）株、ストレプトミセス（Streptomyces）株、酵母等の真菌、並びにＣＨＯ細胞、Ｒｌ．ｌ細胞、Ｂ－Ｗ細胞及びＬ－Ｍ細胞等の動物細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（例えば、ＣＯＳ１、ＣＯＳ７、ＢＳＣｌ、ＢＳＣ４０及びＢＭＴ１０）、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９）、並びに組織培養ではヒト細胞及び植物細胞等の既知の真核生物及び原核生物の宿主が挙げられる。発現宿主は、任意の既知の発現宿主細胞であってもよいが、典型的な実施形態において、発現宿主は大腸菌の株の１つである。これらの大腸菌株としては、限定されるものではないが、Ｔｏｐ１０（ThermoFisher Scientific, Inc.）、ＤＨ５ａ（Thermo Fisher Scientific, Inc.）、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ（Agilent Technologies, Inc.）、ＳＣＳ１１０（Agilent Technologies, Inc.）、ＪＭ１０９（Promega, Inc.）、ＬＭＧ１９４（ATCC）及びＢＬ２１（Thermo Fisher Scientific, Inc.）等の市販の大腸菌株が挙げられる。

【０１３４】

大腸菌を宿主系として使用することの利点は幾つかあり、最適な環境条件下で、その倍加時間が約２０分間である急速な増殖動態（Sezonov et al., J. Bacterial. 189 8746-8749 (2007)）、容易に達成される高密度の培養物、外来性ＤＮＡによる容易かつ急速な形質転換等が挙げられる。プラスミド選択及び株選択を含む、大腸菌におけるタンパク質発現に関する詳細は、Rosano, G. and Ceccarelli, E., Front Microbial., 5: 172 (2014)に詳細に論考されている。

【０１３５】

本Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントの効率的な発現は、最適発現シグナル（転写及び翻訳の両方のレベルで）、正確なタンパク質フォールディング及び細胞増殖特性等の様々な要因によって決まる。ベクターを構築する方法及び構築した組換えベクターを宿主細胞に形質導入する方法に関して、当該技術分野で既知の従来の方法を利用することができる。全てのベクター、発現制御配列及び宿主が本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を発現するよう同様に良好に機能するわけではないことが理解されるが、当業者は、本開示の範囲から逸脱することなく所望の発現を達成するために過度な実験なしに適当なベクター、発現制御配列及び宿主を選択することが可能である。

【０１３６】

本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含む既知の方法によって組換え細胞培養物から回収し、精製することができる。高速液体クロマトグラフィーをＣｈｐペプチド精製に用いることもできる。

【０１３７】

代替的には、本開示のＣｈｐペプチド又は活性フラグメントの作製に用いられるベクタ

ー系は、無細胞発現系であってもよい。様々な無細胞発現系が市販されており、限定されるものではないが、Promega、LifeTechnologies、Clonetech等から入手可能なものが挙げられる。

【０１３８】

上記のように、タンパク質の産生及び精製に関しては、様々な選択肢がある。タンパク質の産生及び精製において検討される好適な方法及び戦略の例は、国際公開第２０１７／０４９２３３号（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に提供され、さらにStructural Genomics Consortium et al., Nat. Methods., 5(2):135-146 (2008)に提示される。

【０１３９】

医薬組成物

本開示の組成物は、溶液、懸濁液、エマルション、錠剤、丸剤、ペレット、カプセル剤、液体を含有するカプセル剤、粉末、持続放出製剤、坐剤、タンポン用途エマルション、エアロゾル、スプレー、懸濁液、ロゼンジ、トローチ、キャンディー、注射剤、チューインガム、軟膏、スメア（smears）、時間放出パッチ、液体を吸収したワイプ、及びそれらの組合せの形態をとることができる。

【０１４０】

本開示の組成物又はその薬学的に許容可能な形態の投与は局所的であってもよく、すなわち、該医薬組成物は、その作用が望まれる場所に直接（例えば創傷に直接）適用されてもよく、又は全身的であってもよい。同様に、全身投与は、経腸又は経口（すなわち、組成物は消化管を介して与えられ得る）であってもよく、非経口（すなわち、組成物は注射又は吸入等の消化管以外の経路によって与えられ得る）であってもよい。そのため、本開示のＣｈｐペプチド及びそれらを含む組成物は、経口的に、非経口的に、吸入により、局所的に、経腸的に、経鼻的に、バッカルで、留置されたリザーバーにより、又は任意の他の既知の方法により被験体に投与され得る。本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを、持続放出剤形を用いて投与することもできる。

【０１４１】

経口投与の場合、本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを、固体又は液体の調製物、例えば錠剤、カプセル剤、粉末、溶液、懸濁液及び分散液に配合することができる。組成物を、例えば、ラクトース、スクロース、コーンスターチ、ゼラチン、ジャガイモデンプン、アルギン酸及び／又はステアリン酸マグネシウム等の賦形剤と配合することができる。

【０１４２】

錠剤及び丸剤等の固体組成物を調製するため、本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを薬学的賦形剤と混合して固体プレ製剤組成物を形成してもよい。望ましい場合、標準的な手法によって錠剤を糖コーティング又は腸溶性コーティングしてもよい。錠剤又は丸剤を、長期作用の利点を与える剤形を提供するためにコーティングしてもよく、又は他の形で配合させてもよい。例えば、錠剤又は丸剤は、内部製剤（inner dosage）及び外部製剤（outer dosage）の成分を含むことができ、後者は前者を覆うエンベロープの形態である。２つの成分を腸溶層によって分離することができ、胃内での崩壊に抵抗するようにはたらき、内側の成分が十二指腸をそのまま通過するか、又は放出が遅延することを可能にする。かかる腸溶層又はコーティング剤には様々な材料を使用することができ、かかる材料としては、多くのポリマー酸、並びにシェラック、セチルアルコール及び酢酸セルロース等の材料とのポリマー酸の混合物が挙げられる。

【０１４３】

本開示の局所組成物は、皮膚科学的に又は耳（otically）に許容可能な担体等の薬学的又は生理学的に許容可能な担体を更に含んでもよい。かかる担体は、皮膚科学的に許容可能な担体の場合、皮膚、爪、粘膜、組織及び／又は毛髪に適合性であり得て、これらの要件を満たす従来使用される任意の皮膚科担体を含むことができる。耳に許容可能な担体の場合、担体は、耳の全ての部分に適合性であり得る。かかる担体は、当業者によって容

易に選択され得る。本開示の組成物の局所投与用の担体としては、限定されるものではないが、鉱油、流動パラフィン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン及び／又はポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックス、ソルビタンモノステアレート、ポリソルベート６０、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、２－オクチルドデカノール、ベンジルアルコール及び水が挙げられる。皮膚軟膏を配合する際には、本開示の有効成分を、例えば油性炭化水素基剤、無水吸収基剤、油中水型吸収基剤、水中油型水分除去（water-removable）基剤及び／又は水溶性基剤に配合することができる。耳用組成物を配合する際には、本開示の有効成分を、例えばデキストラン、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、多糖ゲル、Ｇｅｌｒｉｔｅ（商標）等のゲランガム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセルロース系ポリマー、及びアクリル酸のポリマー又はコポリマー等のカルボキシ含有ポリマー等の担体、並びに他の高分子粘滑剤を含む、水性高分子懸濁液に配合することができる。本開示による局所組成物は、局所適用に適した任意の形態であり得て、水性、水性アルコール性若しくは油性の溶液、ローション若しくはセラム分散液、水性、無水若しくは油性のゲル、水相に脂肪相を（Ｏ／Ｗ又は水中油型）若しくはその逆に（Ｗ／Ｏ又は油中水型）分散させることで得られるエマルション、マイクロエマルション或いはマイクロカプセル、マイクロ粒子又はイオン性及び／又は非イオン性タイプの脂質ベシクル分散物、クリーム、ローション、ゲル、フォーム（加圧キャニスター、適切なアプリケーター、乳化剤及び不活性噴射剤を用い得る）、エッセンス、乳液、懸濁液及びパッチを含む。本開示の局所組成物はまた、親水性又は親油性のゲル化剤、親水性又は親油性の活性剤、保存剤、酸化防止剤、溶媒、香料、増量剤、日焼け止め剤、消臭剤（odor-absorbers）及び色素等のアジュバントを含んでもよい。更なる態様において、本明細書に開示の局所組成物は、被験体の皮膚又は他の組織に付着可能であるか、別の形で付くことが可能な、本明細書に開示される治療有効量の１つ以上のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを送達することができる経皮パッチ、包帯剤、パッド、ラップ、マトリックス及び包帯等の用具と併用して投与され得る。

【０１４４】

一実施形態において、本開示の局所組成物は、局所熱傷を治療するために使用される１つ以上の成分を追加的に含む。かかる成分としては、限定されるものではないが、プロピレングリコールヒドロゲル；グリコール、セルロース誘導体及び水溶性アルミニウム塩の組合せ；消毒薬；抗生物質；並びに副腎皮質ステロイドを挙げることができる。保湿剤（固体又は液体のワックスエステル等）、吸収促進剤（親水性粘土又はデンプン等）、増粘剤及び皮膚保護剤も添加することができる。局所製剤は、マウスウォッシュ等のリンスの形態であってもよい。例えば、国際公開第２００４／００４６５０号を参照されたい。

【０１４５】

本開示の組成物を、適切な量のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントと、担体とを含む治療剤の注射により投与することもできる。例えば、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントを、グラム陰性細菌による感染（シュードモナス・エルギノーサによって引き起こされるもの等）、及び／又は、抗酸菌による感染（例えば結核菌及び非結核性抗酸菌を含む放線菌門の種によって引き起こされるもの等）を治療するため、筋肉内、髄腔内、皮膚下（subdermally）、皮下（subcutaneously）又は静脈内に投与することができる。担体は、蒸留水、生理食塩水、アルブミン、血清又はそれらの任意の組合せで構成され得る。さらに、非経口注射剤の医薬組成物は、ｐＨ緩衝液、アジュバント（例えば、防腐剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤）、リポソーム製剤、ナノ粒子、分散液、懸濁液又はエマルション、及び使用の直前に滅菌注射液又は分散液に再構成するための滅菌粉末の１つ以上に加えて、本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの薬学的に許容可能な水性又は非水性の溶液を含むことができる。

【０１４６】

非経口注射が選択される投与様式である場合、等張性製剤が用いられ得る。一般的には、等張性のための添加剤としては、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール及びラクトースを挙げることができる。場合によっては、リン酸緩衝生理食塩

水等の等張溶液が好ましい。安定剤としては、ゼラチン及びアルブミンを挙げることができる。血管収縮剤を製剤に添加することができる。この種の用途に応じた医薬調製物は、滅菌されパイロジェンフリーで提供され得る。

【０１４７】

希釈剤は、エタノール、プロピレングリコール、油、又は薬学的に許容可能な乳化剤若しくは界面活性剤等の１つ以上の他の賦形剤を更に含んでもよい。

【０１４８】

別の実施形態において、本開示の組成物は吸入可能な組成物である。本開示の吸入可能な組成物は、薬学的に許容可能な担体を更に含むことができる。一実施形態において、本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、乾燥した吸入可能な粉末として配合され得る。具体的な実施形態において、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントを含む吸入用溶液は、エアロゾル送達用の噴射剤を用いて更に配合され得る。或る特定の実施形態において、溶液は、噴霧化されてもよい。

【０１４９】

医薬品と噴射剤との間の表面張力及び界面張力を低下させるため、界面活性剤を本開示の吸入用医薬組成物に添加することができる。医薬品と噴射剤と賦形剤とが懸濁液を形成する場合、界面活性剤は使用されてもよく、又は使用されなくてもよい。医薬品と噴射剤と賦形剤とが溶液を形成する場合、界面活性剤は、例えば、特定の医薬品及び賦形剤の溶解度に応じて、使用されてもよく、又は使用されなくてもよい。界面活性剤は、医薬品と非反応性であり、医薬品と賦形剤と噴射剤との間の表面張力を低くし、及び／又はバルブ潤滑剤として作用する、任意の適切な非毒性の化合物であり得る。

【０１５０】

好適な界面活性剤の例としては、限定されないが、オレイン酸；ソルビタントリオレエート；塩化セチルピリジニウム；大豆レシチン；ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート；ポリオキシエチレン（１０）ステアリルエーテル；ポリオキシエチレン（２）オレイルエーテル；ポリオキシプロピレン－ポリオキシエチレンエチレンジアミンブロックコポリマー；ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノステアレート；ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノオレエート；ポリオキシプロピレン－ポリオキシエチレンブロックコポリマー；ひまし油エトキシレート及びそれらの組合せが挙げられる。

【０１５１】

適切な噴射剤の例としては、限定されるものではないが、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン及び二酸化炭素が挙げられる。

【０１５２】

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

【０１５３】

幾つかの実施形態において、本開示の組成物は、鼻腔適用を含む。鼻腔適用としては、鼻腔用スプレー、鼻腔用ドロップ、鼻腔用軟膏、鼻腔用洗浄液、鼻腔用注射剤、鼻腔用パッキング、気管支スプレー及び吸入剤等の直接用途に対する適用、並びに咽喉ロゼンジ剤及び洗口液若しくは含嗽剤等の間接的用途に対する適用、又は鼻孔若しくは顔に塗布される軟膏の使用によるもの、またこれらの及び同様の適用方法の任意の組合せが挙げられる。

【０１５４】

別の実施形態において、本開示の医薬組成物は、１つ以上の抗微生物剤及び／又は１つ以上の従来の抗生物質を含む相補的な作用物質を含む。感染の治療を促進するため又は抗

菌作用を高めるため、本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを含有する治療剤は、ペプチドの殺菌活性を強化することもできる少なくとも１つの相補的な作用物質を更に含んでもよい。相補的な作用物質としては、グラム陰性細菌の治療に用いられる１種以上の抗生物質又は抗酸菌の治療に用いられる１種以上の抗生物質であり得る。一実施形態において、相補的な作用物質は、シュードモナス・エルギノーサによって引き起こされる感染症の治療に使用される抗生物質又は抗微生物剤である。一実施形態において、相補的な作用物質は、結核菌によって引き起こされる感染の治療に使用される抗生物質又は抗微生物剤であり、一実施形態において、相補的な作用物質は、非結核性抗酸菌によって引き起こされる感染の治療に使用される抗生物質又は抗微生物剤である。

【０１５５】

本開示の医薬組成物は、単位剤形で与えられ得て、当該技術分野で既知の任意の方法によって調製され得る。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、例えば治療される宿主、感染性細菌へのレシピエントの曝露期間、被験体の大きさ及び体重、並びに特定の投与様式によって異なる。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、例えば治療効果を生み出す各化合物の量であり得る。或る特定の実施形態において、１００％のうち、有効成分の総量は約１％～約９９％、例えば約５％～約７０％、又は約１０％～約３０％の範囲であり得る。

【０１５６】

投与量及び投与

適用される投与量は、治療されている感染の活動性、治療される被験体の年齢、健康及び総合的な健康状態、特定のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの活性、存在する場合には、本開示によるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントと組み合わせる抗生物質の性質及び活性、並びにかかる組合せの併用効果等の多くの要因に依存し得る。或る特定の実施形態において、投与されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの有効量は、約１ｍｇ／ｋｇ～５０ｍｇ／ｋｇ（又は１ｍｃｇ／ｍｌ～５０ｍｃｇ／ｍｌ）の範囲内に含まれ得る。或る特定の実施形態において、投与されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントの有効量は、約１μｇ／ｍＬ～５０μｇ／ｍＬの範囲内に含まれ得て、例えば、約１μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬの範囲内、約１μｇ／ｍＬ、又は約１０μｇ／ｍＬであり得る。或る特定の実施形態において、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、毎日１回～４回を１日～１４日間に及ぶ期間にわたって投与され得る。抗生物質も使用される場合は、任意の相乗作用を考慮して標準的な投与計画又は低量で投与され得る。しかしながら、（Ｃｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント、又はそれに伴って投与される任意の抗生物質に関わらず）かかる投与量及び投与計画はいずれも、最適化の対象となる。最適な投与量は、当業者が備えている技能の範囲内であるが、本開示を考慮に入れて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏでのパイロット有効性実験を行うことにより決定され得る。

【０１５７】

本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、急速な殺菌性を提供することができ、ＭＩＣ量以下で使用される場合には静菌効果を提供することができることが企図される。本明細書に開示されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、様々な抗生物質耐性細菌に対して活性であり、耐性の発現と関連しないことが更に企図される。本開示に基づいて、臨床現場では、本Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、単独で又は抗生物質（耐性が生じた抗生物質を含む）と共に、薬剤耐性細菌及び多剤耐性細菌から生じる感染を治療するための強力な代替（又は添加剤）であり得る。グラム陰性細菌に対する既存の耐性機構は、本Ｃｈｐポリペプチド又はその活性フラグメントの溶菌活性に対する感受性に影響を与えないと考えられる。

【０１５８】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントに対する時間曝露は、１ｍｌ当たりの活性ペプチド単位の所望の濃度に影響を及ぼす場合がある。「長時間」又は「緩徐（ｓｌｏｗ）」放出担体に分類される担体（例えば、或る

特定の鼻スプレー又はロゼンジ等）は、１ｍｌ当たりのペプチド単位の濃度は低いが、より長時間にわたって提供し得るのに対し、「短時間」又は「即時」放出担体（例えば、含嗽剤等）は、１ｍｌ当たりのペプチド単位（ｍｃｇ）の濃度は高いが、より短時間で提供し得る。より高い単位／ｍｌ投与量又はより低い単位／ｍｌ投与量が所望され得る状況もある。

【０１５９】

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

【０１６０】

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

【０１６１】

方法

本開示のＣｈｐペプチド及びその活性フラグメントを、被験体において、例えば、シュードモナス・エルギノーサ等のグラム陰性細菌による、又は放線菌等の抗酸菌による細菌感染を治療するためｉｎ　ｖｉｖｏで、並びに例えば、医療用具の表面等の細菌汚染のレベルを低下させるためｉｎ　ｖｉｔｒｏで使用することができる。或る特定の実施形態において、グラム陰性細菌は、少なくとも１つの抗生物質に耐性であるか、又はＭＤＲ病原体である。

【０１６２】

例えば、幾つかの実施形態において、本Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、グラム陰性細菌又は抗酸菌によって形成される細菌バイオフィルムの予防、破壊及び／又は根絶に使用され得る。バイオフィルム形成は、微生物細胞が互いに接着し、表面上の細胞外高分子物質（ＥＰＳ）のマトリックス中に埋め込まれる場合に生じる。生体高分子（例えば、多糖、核酸及びタンパク質）及び栄養素が豊富な、かかる保護環境での微生物の増殖は、微生物クロストークを増強し、病原性を増大させる。バイオフィルムは、生物表面及び非生物表面、例えば肺（例えば、嚢胞性線維症患者の肺）の粘液栓、汚染カテーテル、コンタクトレンズ等を含む任意の支持環境で発生し得る（Sharma et al. Biologicals, 42(1):1-7 (2014)（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす））。そのため、一実施形態において、本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、細菌が細菌性バイオフィルムによって保護される場合に、グラム陰性細菌又は抗酸菌による細菌感染の予防、破壊及び／又は根絶に使用され得る。一実施形態において、Ｃｈｐ２－Ｍ１又はその活性フラグメントは、細菌が細菌バイオフィルムによって保護されている場合、グラム陰性細菌による細菌感染の予防、破壊、及び／又は根絶に使用することができる。一実施形態において、Ｃｈｐ２－Ｍ１又はその活性フラグメントは、細菌が細菌

バイオフィルムによって保護されている場合、ステノトロホモナス・マルトフィリア等のステノトロホモナス属種による細菌感染の予防、破壊、及び／又は根絶に使用することができる。或る特定の実施形態において、Ｃｈｐ２－Ｍ１又はその活性フラグメントは、ステノトロホモナス・マルトフィリア細菌性バイオフィルム等のグラム陰性細菌性バイオフィルムを根絶することができる。

【０１６３】

一態様において、本開示は、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本明細書に記載される医薬組成物を投与することを含む、本明細書に記載される１つ以上の付加的なグラム陰性細菌によって引き起こされる細菌感染を治療する方法に関する。一態様において、本開示は、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本明細書に記載される医薬組成物を投与することを含む、本明細書に記載される１つ以上の付加的な種の抗酸菌によって引き起こされる細菌感染を治療する方法に関する。

【０１６４】

「感染」及び「細菌感染」という用語は、気道感染（ＲＴＩ）、例えば嚢胞性線維症（ＣＦ）を有する患者における気道感染、下気道感染、例えば慢性気管支炎の急性増悪（ＡＣＥＢ）、急性副鼻腔炎、市中肺炎（ＣＡＰ）、院内肺炎（ＨＡＰ）及び院内気道感染；淋菌性子宮頸管炎及び淋菌性尿道炎等の性感染症；尿路感染；急性中耳炎；新生児敗血症及びカテーテル関連敗血症を含む敗血症；骨髄炎；結核、並びに非結核性抗酸菌感染を含むことが意図される。薬剤耐性細菌及び多剤耐性細菌によって引き起こされる感染も企図される。

【０１６５】

シュードモナス・エルギノーサ、ステノトロホモナス・マルトフィリア（S. maltophilia）、又は抗酸菌等のグラム陰性細菌によって引き起こされる感染の非限定的な例としては、Ａ）院内感染：１．気道感染、特に嚢胞性線維症患者及び人工呼吸器を装着している患者における気道感染、２．菌血症及び敗血症、３．創傷感染、特に火傷被害者の創傷感染、４．尿路感染、５．侵襲的器具上での術後感染、６．汚染された薬液の静脈内投与による心内膜炎、７．後天性免疫不全症候群、癌化学療法、ステロイド療法、血液悪性疾患、臓器移植、腎代替療法、及び重度の好中球減少症を伴う他の病態の患者における感染、Ｂ）市中感染：１．結核等の市中気道感染、２．髄膜炎、３．汚染水に起因する毛包炎及び外耳道感染、４．高齢者及び糖尿病患者における悪性外耳炎、５．小児における踵骨の骨髄炎、６．一般に汚染されたコンタクトレンズと関連した眼感染、７．手が頻繁に水に曝される人々における爪感染等の皮膚感染、８．消化管感染、並びに９．筋骨格系感染を挙げることができる。

【０１６６】

本方法のグラム陰性細菌の１つ以上の種は、本明細書に記載されるグラム陰性細菌の任意の種を含み得る。典型的には、付加的な種のグラム陰性細菌は、アシネトバクター・バウマンニ、アシネトバクター・ヘモリティクス（Acinetobacter haemolyticus）、アクチノバシラス・アクチノミセテムコミタンス（Actinobacillus actinomycetemcomitans）、アエロモナス・ヒドロフィラ（Aeromonas hydrophila）、アクロモバクター属種、例えばアクロモバクター・ドレンズ（Achromobacter dolens）、アクロモバクター・ルランディイ（Achromobacter ruhlandii）、及びアクロモバクター・キシロソキシダンス（Achromobacter xylosoxidans）、バクテロイデス（Bacteroides）属種（バクテロイデス・フラジリス（Bacteroides fragilis）、バクテロイデス・テタイオタオミクロン、バクテロイデス・ディスタソニス（Bacteroides distasonis）、バクテロイデス・オバトゥス（Bacteroides ovatus）、及びバクテロイデス・ヴルガトゥス（Bacteroides vulgatus）、バルトネラ・クインタナ（Bartonella Quintana）、百日咳菌（Bordetella pertussis）等）、ブルセラ（Brucella）属種（ブルセラ・メリテンシス（Brucella melitensis）等）、バークホルデリア（Burkholderia）属種（バークホルデリア・アンティナ（Burkholderia anthina）、バーク

ホルデリア・セパシア（Burkholderia cepacia）、バークホルデリア・セノセパシア（Burkholderia cenacepacia）、バークホルデリア・グラディオリ（Burkholderia gladioli）、バークホルデリア・マルティボランス（Burkholderia multivorans）、バークホルデリア・シュードマレイ（Burkholderia pseudomallei）及びバークホルデリア・マレイ（Burkholderia mallei）等）、フソバクテリウム（Fusobacterium）、プレボテラ・コーポリス（Prevotella corporis）、プレボテラ・インテルメディア（Prevotella intermedia）、プレボテラ・エンドドンタリス（Prevotella endodontalis）、ポルフィロモナス・アサッカロリティカ（Porphyromonas asaccharolytica）、カンピロバクター・ジェジュニ（Campylobacter jejuni）、カンピロバクター・フィタス（Campylobacter fetus）、カンピロバクター・コリ（Campylobacter coli）、クラミジア（Chlamydia）属種（肺炎クラミジア（Chlamydia pneumoniae）及びクラミジア・トラコマティス（Chlamydia trachomatis）等）、シトロバクター・フロウンディ（Citrobacter freundii）、シトロバクター・コセリ（Citrobacter koseri）、コクシエラ・バーネッティ（Coxiella burnetii）、エドワジエラ属種（エドワジエラ・タルダ）等）、エイケネラ・コロデンス（Eikenella corrodens）、エンテロバクター属種（エンテロバクター・クロアカエ、エンテロバクター・アエロゲネス（Enterobacter aerogenes）、エンテロバクター・フェシウム（Enterobacter faecium）及びエンテロバクター・アグロメランス（Enterobacter agglomerans）等）、大腸菌、野兎病菌（Francisella tularensis）、インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）、ヘモフィルス・ドゥクレイ（Haemophilus ducreyi）、ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）、キンゲラ・キンゲ（Kingella kingae）、クレブシエラ（Klebsiella）属種（クレブシエラ・ニューモニエ、クレブシエラ・オキシトカ（Klebsiella oxytoca）、クレブシエラ・リノスクレロマティス（Klebsiella rhinoscleromatis）及びクレブシエラ・オザエナエ（Klebsiella ozaenae）等）、クライベラ・アスコルバータ（Kluyvera ascorbata）、レジオネラ・ペヌモフィラ（Legionella penumophila）、モラクセラ（Moraxella）属種（モラクセラ・カタラーリス（Moraxella catarrhalis）等）、モルガネラ（Morganella）属種（モルガネラ・モルガニ（Morganella morganii）等）、淋菌、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）、シュードモナス・エルギノーサ、パスツレラ・ムルトシダ（Pasteurella multocida）、プレシオモナス・シゲロイデス（Plesiomonas shigelloides）、プロテウス・ミラビリス（Proteus mirabilis）、プロテウス・ブルガリス（Proteus vulgaris）、プロテウス・ペンネリ（Proteus penneri）、プロテウス・ミクソファシエンス（Proteus myxofaciens）、プロビデンシア（Providencia）属種（プロビデンシア・スチュアルティ（Providencia stuartii）、プロビデンシア・レットゲリ（Providencia rettgeri）、プロビデンシア・アルカリファシエンス（Providencia alcalifaciens）等）、シュードモナス・フルオレセンス（Pseudomonas fluorescens）、ラウルテラ・オルニチノリチカ（Raoultella ornithinolytica）、チフス菌（Salmonella typhi）、ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）、パラチフス菌（Salmonella paratyphi）、セラチア（Serratia）属種（セラチア・マルセセンス（Serratia marcescens）等）、シゲラ属種（シゲラ・フレックスネリ（Shigella flexneri）、シゲラ・ボイディ（Shigella boydii）、シゲラ・ソネイ（Shigella sonnei）及び志賀赤痢菌（Shigella dysenteriae）等）、ステノトロホモナス・マルトフィリア（Stenotrophomonas maltophilia）、ストレプトバシラス・モニリフォルミス（Streptobacillus moniliformis）、コレラ菌（Vibrio cholerae）、腸炎ビブリオ（Vibrio parahaemolyticus）、ビブリオ・バルニフィカス（Vibrio vulnificus）、ビブリオ・アルギノリチカス（Vibrio alginolyticus）、エルシニア・エンテロコリチカ（Yersinia enterocolitica）、ペスト菌（Yersinia pestis）、仮性結核菌（Yersinia pseudotuberculosis）、肺炎クラミジア、クラミジア・トラコマティス、リケッチア・プロワツェキイ（Ricketsia prowazekii）、コクシエラ・バーネッティ、エーリキア・シャフェンシス（Ehrlichia chafeensis）及び／又はバ

ルトネラ・ヘンセラの１つ以上から選択される。
【０１６７】
より典型的には、グラム陰性細菌の少なくとも１つの他の種は、アシネトバクター・バウマンニ、百日咳菌、バークホルデリア・セパシア、バークホルデリア・シュードマレイ、バークホルデリア・マレイ、カンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コリ、エンテロバクター・クロアカエ、エンテロバクター・アエロゲネス、大腸菌、野兎病菌、インフルエンザ菌、ヘモフィルス・ドゥクレイ、ヘリコバクター・ピロリ、クレブシエラ・ニューモニエ、レジオネラ・ペヌモフィラ、モラクセラ・カタラーリス、モルガネラ・モルガニ、淋菌、髄膜炎菌、パスツレラ・ムルトシダ、プロテウス・ミラビリス、プロテウス・ブルガリス、チフス菌、セラチア・マルセセンス、シゲラ・フレックスネリ、シゲラ・ボイディ、シゲラ・ソネイ、志賀赤痢菌、ステノトロホモナス・マルトフィリア、コレラ菌、及び／又は肺炎クラミジアの１つ以上から選択される。
【０１６８】
更により典型的には、グラム陰性細菌の少なくとも１つの他の種は、ステノトロホモナス属種（例えば、ステノトロホモナス・マルトフィリア）、ネズミチフス菌、チフス菌、シゲラ属種、大腸菌、アシネトバクター・バウマンニ、クレブシエラ・ニューモニエ、淋菌、髄膜炎菌、セラチア属種、プロテウス・ミラビリス、モルガネラ・モルガニ、プロビデンシア属種、エドワジエラ属種、エルシニア属種、インフルエンザ菌、バルトネラ・クインタナ、ブルセラ属種、百日咳菌、バークホルデリア属種、モラクセラ属種、野兎病菌、レジオネラ・ニューモフィラ、コクシエラ・バーネッティ、バクテロイデス属種、エンテロバクター属種及び／又はクラミジア属種の１つ以上から選択される。
【０１６９】
更に典型的には、少なくとも１つの他の種のグラム陰性細菌は、クレブシエラ属種、エンテロバクター属種、大腸菌、シトロバクター・フロウンディ、ネズミチフス菌、ペスト菌、ステノトロホモナス・マルトフィリア及び／又は野兎病菌の１つ以上から選択される。
【０１７０】
本発明の方法の１つ以上の種の抗酸菌は、本明細書に記載される抗酸菌の任意の種を含み得る。典型的には、付加的な種の抗酸菌は、マイコバクテリア等の放線菌門の１つ以上の種から選択される。
【０１７１】
マイコバクテリアは、診断及び治療の目的で３つの主要なグループに分類され得る小さな棒状の桿菌のファミリーである。１つ目は、肺結核を引き起こす可能性のある結核菌複合体であり、結核菌（M. tuberculosis）、マイコバクテリウム・ボビス（M. bovis）、マイコバクテリウム・アフリカヌム（M. africanum）、マイコバクテリウム・ミクロチ（M. microti）、及びマイコバクテリウム・カネッティ（M. canetti）を含む。２つ目のグループは、ハンセン病又はらい病を引き起こすマイコバクテリウム・レプラエ（M. leprae）及びマイコバクテリウム・レプロマトシス（M. lepromatosis）を含む。３つ目のグループは、非結核性抗酸菌（ＮＴＭ）であり、これは結核に似た肺疾患、リンパ節炎、皮膚疾患、又は播種性疾患を引き起こす可能性のある他の全てのマイコバクテリアを含む。ＮＴＭとしては、限定されるものではないが、マイコバクテリウム・アビウム複合体（ＭＡＣ）、マイコバクテリウム・アビウム（M. avium）、マイコバクテリウム・カンサシ（M. kansasii）、マイコバクテリウム・アブセサス（M. abscessus）、マイコバクテリウム・ケロナエ（M. chelonae）、マイコバクテリウム・フォーチュイタム（M. fortuitum）、マイコバクテリウム・ゲナベンス（M. genavense）、マイコバクテリウム・ゴルドネ（M. gordonae）、マイコバクテリウム・ヘモフィルム（M. haemophilum）、マイコバクテリウム・イムノゲナム（M. immunogenum）、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ（M. intracellulare）、マイコバクテリウム・マルモエンセ（M. malmoense）、マイコバクテリウム・マリヌム（M. marinum）、マイコバクテリウム・ムコゲニカム（M. mucogenicum）、マイコバクテリウ

ム・ノンクロモゲニカム（M. nonchromogenicum）、マイコバクテリウム・スクロフラセウム（M. scrofulaceum）、マイコバクテリウム・シミエ（M. simiae）、マイコバクテリウム・スメグマチス、マイコバクテリウム・ツルガイ（M. szulgai）、マイコバクテリウム・テラエ（M. terrae）、マイコバクテリウム・テラエ複合体、マイコバクテリウム・ウルセランス（M. ulcerans）、及びマイコバクテリウム・ゼノピ（M. xenopi）が挙げられる。ＭＡＣは、少なくとも２つのマイコバクテリア種、マイコバクテリウム・アビウム及びマイコバクテリウム・イントラセルラーレを含む。これらの２つの種は、従来の物理的又は生化学的試験に基づいて区別することはできないが、２つの種を識別及び区別するために使用できる核酸プローブがある。

【０１７２】

或る特定の実施形態において、抗酸菌は、マイコバクテリウム・スメグマチス、結核菌、マイコバクテリウム・アビウム、マイコバクテリウム・カンサシ、マイコバクテリウム・スクロフラセウム、マイコバクテリウム・ペレグリナム、マイコバクテリウム・マリナム、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、及び／又はマイコバクテリウム・フォーチュイタムの１つ以上から選択され得る。

【０１７３】

幾つかの実施形態において、グラム陰性細菌又は抗酸菌による感染は、局所細菌感染、例えば皮膚創傷等の局在化した感染をもたらす。他の実施形態において、細菌感染は全身病原性細菌感染である。一般的な抗酸菌感染としては、結核及び非結核性抗酸菌感染が挙げられる。一般的なグラム陰性病原体及び関連感染を本開示の表Ａに収載する。これらは、本Ｃｈｐペプチド及びその活性フラグメントで治療、緩和又は予防され得る細菌感染の例となることを意味し、限定を意図するものではない。

【０１７４】

表Ａ－医学的に関連するグラム陰性細菌及び関連疾患

ネズミチフス菌	消化管（ＧＩ）感染症－サルモネラ症
シゲラ属種	赤痢菌感染症
大腸菌	尿路感染症（ＵＴＩ）
アシネトバクター・バウマンニ	創傷感染症
シュードモナス・エルギノーサ	血流感染及び肺炎
クレブシエラ・ニューモニエ	ＵＴＩ及び血流感染症
淋菌	性行為感染症（ＳＴＤ）－淋病
髄膜炎菌	髄膜炎
セラチア属種	カテーテル汚染、ＵＴＩ及び肺炎
プロテウス・ミラビリス	ＵＴＩ
モルガネラ属種	ＵＴＩ
プロビデンシア属種	ＵＴＩ
エドワジエラ属種	ＵＴＩ
チフス菌	ＧＩ感染症－腸チフス
ペスト菌	腺ペスト及び肺ペスト
エルシニア・エンテロコリチカ	ＧＩ感染症
仮性結核菌	ＧＩ感染症
インフルエンザ菌	髄膜炎
バルトネラ・クインタナ	塹壕熱
ブルセラ属種	ブルセラ症
百日咳菌	呼吸器－百日咳
バークホルデリア属種	呼吸器
モラクセラ属種	呼吸器
野兎病菌	野兎病
レジオネラ・ニューモフィラ	呼吸器－レジオネラ症
コクシエラ・バーネッティ	Ｑ熱
バクテロイデス属種	腹部感染症
エンテロバクター属種	ＵＴＩ及び呼吸器
クラミジア属種	ＳＴＤ、呼吸器及び眼
ステノトロホモナス属種	医療機器感染症、ＵＴＩ、血流感染症及び肺炎

【０１７５】

幾つかの実施形態において、本開示のＣｈｐペプチド及びその活性フラグメントは、グラム陰性細菌又は抗酸菌に起因する感染を獲得するリスクがある被験体を治療するために使用される。グラム陰性細菌又は抗酸菌感染を獲得するリスクがある被験体としては、例えば、嚢胞性線維症患者、好中球減少症患者、壊死性腸炎患者、熱傷の犠牲者、創傷感染を有する患者が挙げられ、より一般的には、病院にいる患者、特に外科の患者及びカテーテル、例えば中心静脈カテーテル、ヒックマンデバイス（Hickman device）等の留置型医療用具、又は電気生理学的心臓装置、例えばペースメーカー及び留置型除細動器を使用して治療されている患者が挙げられる。グラム陰性細菌又は抗酸菌に感染するリスクがある他の患者群としては、限定されるものではないが、関節全置換（例えば膝又は股関節の全置換）等の留置型プロテーゼを有する患者が挙げられる。

【０１７６】

別の態様において、本開示は、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Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントを含有する第１の有効量の組成物と、グラム陰性細菌感染の治療に適した第２の有効量の抗生物質との組合せを同時投与することを含む、細菌感染を予防又は治療する方法に関する。或る特定の態様において、本開示は、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Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントを含有する第１の有効量の組成物と、抗酸菌感染の治療に適した第２の有効

量の抗生物質との組合せを同時投与することを含む、細菌感染を予防又は治療の方法に関する。

【０１７７】

本開示のＣｈｐペプチド及びその活性フラグメントを、標準治療の抗生物質又は最終手段としての抗生物質と、個別に、又は当該技術分野における技術範囲内の様々な組合せで同時投与することができる。マイコバクテリア感染に対して使用される従来の抗生物質としては、例えば、マクロライド（クラリスロマイシン、アジスロマイシン）、エタンブトール、リファマイシン（リファンピン、リファブチン）、イソニアジド、ピラジナミド、及びアミノグリコシド（ストレプトマイシン、アミカシン）が挙げられる。シュードモナス・エルギノーサに対して用いられる伝統的な抗生物質を表Ｂに記載する。クレブシエラ属種、エンテロバクター属種、大腸菌、シトロバクター・フロウンディ、ネズミチフス菌、ペスト菌及び野兎病菌等の他のグラム陰性細菌に対する抗生物質は、シュードモナス・エルギノーサについて表Ｂに記載されているものと同様である。

【０１７８】

表Ｂ－シュードモナス・エルギノーサの治療に用いる抗生物質

クラス	作用物質
ペニシリン	チカルシリン－クラブラン酸 ピペラシリン－タゾバクタム
セファロスポリン	セフタジジム セフェピム セフォペラゾン
モノバクタム	アズトレオナム
フルオロキノロン	シプロフロキサシン レボフロキサシン
カルバペネム	イミペネム メロペネム ドリプネム
アミノグリコシド	ゲンタマイシン トブラマイシン アミカシン
ポリミキシン	コリスチン ポリミキシンＢ

【０１７９】

より具体的な実施形態において、抗生物質は、セフタジジム、セフェピム、セフォペラゾン、セフトビプロール、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、アミノグリコシド、イミペネム、メロペネム、ドリペネム、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、ピペラシリン、チカルシリン、ペニシリン、リファンピシン、ポリミキシンＢ及びコリスチンの１つ以上から選択される。或る特定の実施形態において、抗生物質は、イソニアジド、リファンピン、エタンブトール、及びピラジナミドから選択される。

【０１８０】

本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを抗生物質と組み合わせることで有効な抗菌投与計画を提供する。幾つかの実施形態において、本開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントと、１つ以上の抗生物質との同時投与により、Ｃｈｐペプチド若しくはその活性フラグメントのいずれか若しくは抗生物質、又はそれらの両方の用量及び量を減少して、及び／又は殺菌活性及び静菌活性を高め、抗生物質耐性のリスクを低減させ、有害な神経学的若しくは腎臓の副作用のリスク（コリスチン又はポリミキシンＢの使用に関連するもの等）を低減させて、治療頻度を減らし及び／又は治療期間を短くして行うことができる。以前の研究は、総累積コリスチン用量が腎臓損傷に関連していることを示し、Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントとの併用療法を用いる投与量の減少又は治療期間の短縮が腎毒性の発生を低下させる可能性があることを示唆している（その全体が

引用することにより本明細書の一部をなす、Spapen et al. Ann Intensive Care. 1: 14 (2011)）。本明細書で使用される場合、「用量の減少」という用語は、同じ有効成分を用いる単剤療法と比較した、組合せにおける１つの有効成分の用量を指す。幾つかの実施形態において、組み合わせたＣｈｐペプチド若しくはその活性フラグメント又は抗生物質の用量は、それぞれの単剤療法と比較して最適以下、更には閾値以下となる場合がある。

【０１８１】

幾つかの実施形態において、本開示は、被験体に本明細書に開示のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを対象の抗生物質と共に投与することによって、グラム陰性細菌又は抗酸菌に対する１つ以上の抗生物質の抗生物質活性を単独で使用される該抗生物質の活性と比較して高める方法を提供する。組合せは細菌に対して有効であり、抗生物質に対する耐性を克服すること及び／又は抗生物質をより低用量で用いることを可能とし、ポリミキシンＢの腎毒性及び神経毒性作用等の望ましくない副作用を減少させる。

【０１８２】

本開示の抗生物質と任意に組み合わせたＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを、限定されるものではないが、例えば、ＥＤＴＡ、ＴＲＩＳ、乳酸、ラクトフェリン、ポリミキシン、クエン酸（その全体が引用することにより本明細書の一部をなす、Vaara M. Microbial Rev. 56(3):395-441 (1992)）等の金属キレート剤を含む、グラム陰性細菌の追加の外膜透過化剤と更に組み合わせることができる。

【０１８３】

更に別の態様において、本開示は、グラム陰性細菌又は抗酸菌の少なくとも１つの種の増殖を阻害する、又はその菌数を減少させる、又はそれを死滅させる方法に関し、該方法は、細菌を、有効量の本明細書に記載されるＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを含有する組成物と接触させることを含み、ここで、該Ｃｈｐペプチド又はその活性フラグメントは、グラム陰性細菌又は抗酸菌の少なくとも１つの種の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させる。

【０１８４】

幾つかの実施形態において、グラム陰性細菌又は抗酸菌の少なくとも１つの種の増殖を阻害するか、又はその菌数を減少させるか、又はそれを死滅させることは、細菌と本明細書に記載されるＣｈｐペプチド又は活性フラグメントとを接触させることを含み、細菌は、例えば病院及び他の健康関連又は公共の建物における医療器具、床、階段、壁及び調理台の表面、並びに手術室、緊急治療室、病室、診療所及び浴室等における機器の表面上に存在する。

【０１８５】

本明細書に記載のＣｈｐペプチド又はその活性フラグメントを用いて保護することができる医療器具の例としては、管類及び他の表面医療器具、例えば尿道カテーテル、粘液吸引カテーテル、吸引カテーテル、臍帯カニューレ（umbilical cannulae）、コンタクトレンズ、子宮内器具、膣内及び腸内器具、気管内チューブ、気管支鏡、歯科補綴物及び歯列矯正器具、外科用器械、歯科用器械、管類、歯科用送水管、布、紙、指示薬ストリップ（例えば、紙の指示薬ストリップ又はプラスチックの指示薬ストリップ）、接着剤（例えば、ヒドロゲル接着剤、ホットメルト接着剤又は溶剤系接着剤）、包帯、組織包帯剤（tissue dressings）又は治療器具、及び密封パッチ（occlusive patches）、並びに医療分野で使用される任意の他の表面器具が挙げられるが、これらに限定されない。器具には、電極、外部人工装具、固定テープ、圧迫包帯、及び様々なタイプのモニターが含まれ得る。医療器具には、挿入又は移植部位近くの皮膚等の挿入又は移植部位に設置することができ、グラム陰性細菌及び／又は抗酸菌によるコロニー形成の影響を受けやすい少なくとも１つの表面を含み得る任意の器具も含まれ得る。

【実施例】

【０１８６】

材料及び方法

細菌株及び増殖条件

本明細書に開示される研究の大半は、ニューヨークの特殊外科病院（Hospital for Special Surgery）でヒト血液から得られたカルバペナム耐性シュードモナス・エルギノーサ臨床分離株ＣＦＳ－１２９２（病理学及び臨床検査医学の教授であるLars Westblade博士により提供された）を用いて行われたが、市販の抗生物質耐性分離株を使用することもできる。他の全ての分離株は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（「ＡＴＣＣ」）、デレルコレクション（d'Herelle collection）（「ＨＥＲ」）、ＢＥＩリソース（BEI Resources）（「ＨＭ」）又はニューヨークの特殊外科病院（「ＨＳＳ」）のいずれかから得られた。分離株を、溶原培地（ＬＢ；Sigma-Aldrich）、カザミノ酸（ＣＡＡ）培地（５ｇ／Ｌカザミノ酸、Ameresco/VWR；５．２ｍＭ K_2HPO_4、Sigma-Aldrich；１ｍＭ $MgSO_4$、Sigma-Aldrich）、１００ｍＭ ＮａＣｌを添加したＣＡＡ、又は２．５％ヒト血清（ＡＢ型、男性、プールしたもの；Sigma-Aldrich）を添加したＣＡＡのいずれかで培養し、試験した。特に示されていない限り、全ての抗生物質及びタンパク質試薬（例えば、Ｔ４リゾチーム）をSigma-Aldrichから入手した。

【０１８７】

バイオインフォマティクス研究

全てのタンパク質を、全てのミクロウイルス科及びレビウイルス科のゲノムに関する注釈付きＧｅｎＢａｎｋデータベースエントリにおいて同定した。各Ｃｈｐ群のペプチドのアクセッション番号を下記表１及び表２に示す。Ｂｌａｓｔｐ解析をuniprot.org/blast/で利用可能なＵｎｉＰｒｏｔサーバーを使用して行った。タンパク質二次構造予測を、www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/indexで利用可能なＪＰＲＥＤ４、及びwww.zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/で利用可能なＩ－Ｔａｓｓｅｒを用いて行った。系統発生解析を、www.genome.jp/tools-bin/clustalwで利用可能なＣｌｕｓｔａｌＷ多重配列アラインメントツール（Multiple Sequence Alignment tool）を用いて行った。予測される分子量及び等電点を、web.expasy.org/compute_pi/で利用可能なＥｘＰＡＳｙ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ Ｐｏｒｔａｌを用いて決定した。

【０１８８】

最小阻止濃度（ＭＩＣ）の決定

米国臨床検査標準協議会（ＣＬＳＩ：Clinical and Laboratory Standards Institute）によって規定される標準微量液体希釈参照法（2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-10th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.）の修正を用いてＭＩＣ値を決定した。修正は、場合によっては、ミューラーヒントンブロスのＣＡＡ培地（ＮａＣｌを含む又は含まない）又は２．５％ヒト血清を添加したＣＡＡのいずれかによる置換えに基づくものであった。本明細書で使用される場合、ＭＩＣは、対照と比較して細菌増殖の少なくとも８０％を抑制するのに十分なペプチドの最小濃度である。

【０１８９】

最小バイオフィルム根絶濃度（ＭＢＥＣ）の決定

修正された微量液体希釈ＭＩＣ法の変法（Ceri H et al., 1999. J Clin Microbiol 37:1771-1776、及びSchuch R et al., 2017. Antimicrob Agents Chemother 61）を用いてＭＢＥＣ値を決定した。シュードモナス・エルギノーサ株ＡＴＣＣ１７６４７の新鮮なコロニーをＰＢＳ（０．５マクファーランド単位）に懸濁し、０．２％グルコースを含むＬＢに１：１００で希釈し、９６ウェルＣａｌｇａｒｙ Ｂｉｏｆｉｌｍ Ｄｅｖｉｃｅ（Innovotech）の各ウェルに０．１５ｍｌのアリコートとして加えて、ポリカーボネートペグ上でのバイオフィルム形成のため３７℃で２４時間インキュベートした。バイオフィルムを洗浄し、ＴＳＢｇ中の各ペプチドの２倍希釈系列を用いて３７℃で１６時間処理した。処理後、ウェルを洗浄し、３７℃で風乾し、０．０５％クリスタルバイオレットで１０分間染色し、３３％酢酸で脱色した。抽出されたクリスタルバイオレ

ットのＯＤ$_{600}$を決定した。各サンプルのＭＢＥＣ値を、クリスタルバイオレットの定量（未処理対照との比較）によって評定されるバイオフィルムバイオマスの９５％超を除去するのに必要な最小薬物濃度として決定した。Ｔ４ファージリゾチームを陰性対照として使用し、これは抗バイオフィルム活性を提供しない。

【０１９０】

チェッカーボードアッセイ

チェッカーボードアッセイは、微量液体希釈（CLSI 2015; and Moody J. 2010. Synergy testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods, p 5.12.11-15.12.23. In Garcia LS (ed), Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol 2）によるＭＩＣ決定のためのＣＬＳＩ法の修正に基づく。チェッカーボードを、初めに、横軸に沿って各ウェルが同量の２倍希釈した抗生物質を含む９６ウェルポリプロピレンマイクロタイタープレートの列を作成することによって構築した。別のプレートに、縦軸に沿って各ウェルが同量の２倍に希釈したペプチドを含む比較用の行を作成した。次いで、各列が一定量の抗生物質及びＣｈｐペプチドの倍加希釈物を含み、各行が一定量のＣｈｐペプチド及び抗生物質の倍加希釈物を含むように、ペプチド及び抗生物質の希釈物を組み合わせた。これにより、各ウェルはペプチド及び抗生物質の独自の組合せを含んでいた。細菌を、２．５％ヒト血清を含むＣＡＡ中１×１０^{5}ＣＦＵ／ｍＬの濃度で各ウェルに加えた。次いで、単独の及び組み合わせた各作用物質のＭＩＣを、特に示されていない限り、周囲空気中にて３７℃で１６時間の後に記録した。部分阻止濃度指数（ＦＩＣＩ）の合計を各薬物について算出し、最小のＦＩＣＩを用いて相乗作用を決定した。ＦＩＣＩを次のように計算した。ＦＩＣＩ＝ＦＩＣ　Ａ＋ＦＩＣ　Ｂ（ここで、ＦＩＣ　Ａは組合せでの各抗生物質のＭＩＣ／単独での各抗生物質のＭＩＣであり、ＦＩＣ　Ｂは組合せでの各ＣｈｐペプチドのＭＩＣ／単独での各ＣｈｐペプチドのＭＩＣである）。組合せは、ＦＩＣＩが０．５以下である場合に相乗的、ＦＩＣＩが０．５超～１未満である場合に強く相加的、ＦＩＣＩが１～２未満である場合に相加的、及びＦＩＣＩが２以上である場合に拮抗的とみなされる。アミカシン、アジスロマイシン、アズトレオナム、シプロフロキサシン、コリスチン、ホスホマイシン、ゲンタマイシン、イミペネム、ピペラシリン、リファンピシン及びトブラマイシンを含む１１種類の異なる様々な抗生物質に対するＣｈｐ２又はＣｈｐ４のいずれかの組合せを含むＣＡＡ／Ｈｕｓにおいてシュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２を用いる、チェッカーボードアッセイを行った。大半の組合せで０．５以下のＦＩＣＩ値が観察され、Ｃｈｐ２及びＣｈｐ４が幅広い抗生物質と相乗作用する能力を示している（下記の表８を参照されたい）。これらの知見は、ＣｈｐペプチドがＡＭＰの存在下で強力な抗菌活性を提供する可能性があることを示唆している。

【０１９１】

ＣｈｐペプチドのＡＭＰ溶血活性のアッセイ

ヒト赤血球の溶解によって放出されるヘモグロビンの量として、溶血活性を測定した（Lv Y et al, 2014. PLoS One 9:e86364）。簡潔に述べると、ヘパリンの入ったポリカーボネートチューブ内のプールした健常ドナー（BioreclamationIVT）から得られた３ｍｌの新鮮ヒト血液細胞（ｈＲＢＣ）を１０００×ｇにて４℃で５分間遠心分離した。得られた赤血球をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）溶液（ｐＨ７．２）で３回洗浄し、３０ｍｌのＰＢＳ中に再懸濁した。５０μｌ容量の赤血球溶液を、２倍希釈範囲（１２８μｇ／ｍＬ～０．２５μｇ／ｍＬ）の５０μｌの各ＣｈｐペプチドＡＭＰ（ＰＢＳ中）と共に３７℃で１時間の間インキュベートした。無傷赤血球を１０００×ｇにて４℃で５分間の遠心分離によってペレット化し、上清を新たな９６ウェルプレートに移した。ヘモグロビンの放出を、５７０ｎｍでの光学密度（ＯＤ）における吸光度を測定することによってモニタリングした。最小溶血濃度を、目に見える溶解を示す最も低いペプチド濃度として決定した（これは、未処理の対照サンプルの５％以上のＯＤ値をもたらす最小濃度に相当する）。０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、又はＲＲ１２、ＲＲ１２極性及びＲＲ１２疎水性（Mohanram H. et al, 2016. Biopolymers 106:345-356）を含む既知の溶

血活性を有する、並びにＲＩ１８（Lyu Y. et al., 2016. Sci Rep 6:27258）及びＲＲ２２を含む溶血活性の低い又は溶血活性のない一連の各抗微生物ペプチドのいずれかを用いて上記のように処理したＰＢＳ中のｈＲＢＣを含む追加の対照を使用した。

【０１９２】

Ｃｈｐペプチド活性の時間－殺菌アッセイ

シュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２の一晩培養物を、２．５％ヒト血清を含む新鮮なＣＡＡ培地（ＣＡＡ／ＨｕＳ）に１：１００で希釈し、撹拌しながら３７℃で２．５時間増殖させた。次いで、対数期細菌をＣＡＡ／ＨｕＳに１：１００で希釈し、１μｇ／ｍＬ又は１０μｇ／ｍＬのいずれかの最終濃度でペプチドを添加した。ペプチドを添加しない対照培養物（すなわち、バッファー対照）を含めた。培養物を、通気しながら３７℃でインキュベートし、１時間、３時間及び２４時間の時点で、サンプルをＣＡＡ寒天プレート上での定量的プレーティングのため取り出した。

【０１９３】

顕微鏡法

ＬＢ中で２．５時間増殖させたシュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２のアリコートをＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ又は１００％ヒト血清のいずれかに再懸濁して、最終濃度１０μｇ／ｍＬのペプチドＣｈｐ２を用いて又はそれを用いずに室温にて１５分間処理した。サンプルのサブセットを製造業者のプロトコルに従いＬｉｖｅ／Ｄｅａｄ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｋｉｔ（ThermoFisher）を使用して染色し、微分干渉（ＤＩＣ）顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法により調べた。

【０１９４】

実施例１：Ｃｈｐペプチドの同定

グラム陰性細菌であるクラミジアに特異的に感染してこれを死滅させる、説明が十分になされていない或る特定のバクテリオファージ（クラミジアミクロウイルス科）の知識を持ち、これらの生物の公開されているゲノムを研究して、当初は新規な溶解素を同定することに注目していたが、溶解素様配列も先に記載されたアムリンに類似するいかなる配列も観察されなかった。クラミジアは、それらの構造において他の細菌と同じように豊富にはペプチドグリカン（溶解素の既知の標的）を利用しておらず、むしろクラミジアは、一般的に分裂時にのみペプチドグリカンを使用する。したがって、クラミジアファージの標的が何であるかという疑問が生じた。クラミジアファージが標的に侵入する機構は以前に知られていたものとは異なる可能性があること、またそれらの標的は異なり、グラム陰性細菌の外膜の主な構成要素であって外膜の溶解素による透過にとって障害であるリポ多糖（ＬＰＳ）に焦点を当てている可能性があることが仮定された。

【０１９５】

クラミジアミクロウイルスの公開されているゲノムをシンテニック遺伝子座（すなわち、遺伝的に関連するファージ群のゲノム内の同じ位置にある類似する遺伝子）を同定することを視野に入れて検討したところ、同様の機能が示唆された。小さくカチオン性の高いペプチドは、以前に同定された抗微生物ペプチド（ＡＭＰ）と非常によく似た分子電荷プロファイルを有することが同定された。クラミジアファージ配列は、ＡＭＰ、溶解素、又は既知のアムリンタンパク質（例えば、タンパク質Ａ２、タンパク質Ｅ及びその他）に対してタンパク質配列の類似性はなかったが、全体的な正電荷が顕著な特徴であった。上記のようなバイオインフォマティクスの手法（ＪＰＲＥＤ及びｉＴＡＳＳＡＲ）を用いることで、多くのＡＭＰの顕著な特徴であるαヘリックスの存在を明らかにする構造予測が行われた。αヘリックス、全体的な電荷、クラミジア間の保存、及び関連するグラム陰性細菌ファージゲノムはいずれも、これらのタンパク質がこれまで特徴がわかっていないファージ溶菌性ポリペプチドのファミリーとなる可能性があり、それらがこれまで説明されていないファージの溶菌機構を定義する可能性があることを示唆した。これらのタンパク質はサイズが小さく、（それらの電荷プロファイルに基づいて）可溶性であると予測されたという事実もまた、一旦合成されると、単に感受性の細菌培養物にそれらを加えるだけで容易に試験を受けられるようになる可能性が高いことを意味した。

【０１９６】
前述のとおり、シンテニック遺伝子座内の１２個の保存配列をＧｅｎＢａｎｋデータベースのミクロウイルスゲノムから、具体的にはクラミジアミクロウイルスのゲノム（及び後述する幾つかの他のウイルス）から抽出した。１２個の保存配列は、仮定上の、特徴が不明な又は非構造的なタンパク質としてのみ注釈が付され、αヘリックス構造をとると予測される小さな（推定）カチオン性タンパク質をコードしていた。これらの１２個の配列を表１に示す。表１にあるペプチドの１つであるＣｈｐ５は、正に帯電しているアルギニン及びリシンを、負に帯電したアミノ酸残基で置き換えることによってＣｈｐ４とは異なる分子電荷を有するように合成された。Ｃｈｐ５は非活性であると予測された。これらのペプチドは他の溶菌性又は抗微生物性のタンパク質と配列類似性を示さないが、抗菌剤であるＡＭＰの大きなファミリーのサブセットに類似するαヘリックス構造をとると予測されている（例えば、図１を参照されたい）。Ｃｈｐペプチドは、それらが由来するファージに対して宿主溶菌機能を果たすと仮定した。

【０１９７】
前述の検討に基づいて、グラム陰性細菌に感染する他のファージ（同じミクロウイルス科のクラミジアミクロウイルスに関連する）のゲノムの更なる研究、並びに同じシンテニー（synteny）及び電荷プロファイルを提示する他の特徴が不明な供給源は、表２に収載される２９種類の追加のペプチドをもたらした。４１種類のペプチド（Ｃｈｐ５を除く）の全てが共に、新規のファージの溶菌剤の関連ファミリーを形成する。それらのペプチドは、マイクロバクテリウム属由来のＭｙｏ１（配列番号１０２）を除いて、いずれもミクロウイルス科を起源とする。

【０１９８】
さらに、これらのペプチドの幾つかを、新規変異体を合成するために修飾した。特に、Ｃｈｐ２の場合、正に帯電した各アミノ酸（アルギニン及びリシン）のＬ型を、そのアミノ酸のＤ型に置き換えて、Ｄ型が抗菌活性を高めるかどうかを確認した。

【０１９９】
この修飾は、Ｃｈｐ２－Ｍ１（配列番号８１）をもたらした。同様のＤ型変異体は、ネイティブＣｈｐペプチド又はＣｈｐペプチドの修飾された変異体から作製され、Ｅｃｐ１－Ｍ１（配列番号８７）、Ｃｈｐ６－Ｍ１（配列番号８８）、Ｃｈｐ１０－Ｍ１（配列番号８９）、Ｍｓｅ－Ｍ１（配列番号９０）、Ｃｈｐ４－Ｍ１（配列番号９１）、Ｃｈｐ２－ＳＣＲ－Ｍ１（配列番号９３）、Ｃｈｐ７－Ｍ１（配列番号９５）、Ｏｓｐ－Ｍ１（配列番号９６）、Ｕｎｐ２－Ｍ１（配列番号９７）、Ｕｎｐ３－Ｍ１（配列番号９８）、Ｓｐｉ２－Ｍ１（配列番号９９）、Ｅｃｐ３－Ｍ１（配列番号１００）、及びＡｇｔ１－Ｍ１（配列番号１０１）に到達した。

【０２００】
同様に、Ｃｈｐ２の場合、システイン残基をＣ末端に付加してＣｈｐ２－Ｃｙｓ（配列番号８２）に到達し、αヘリックスの安定性を付与し、塩の存在下で活性を促進することが以前に示された追加の残基をＣ末端とＮ末端の両方に付加してＣｈｐ２－ＮＣ（配列番号８３）に到達した（Park et al., Helix stability confers salt resistance upon helical antimicrobial peptides, J. Biol. Chem. (2004); 279(14):13896-901）。

【０２０１】
Ｃｈｐ４：：Ｃｈｐ２（配列番号８４）は、Ｃｈｐ４（配列番号４）及びＣｈｐ２（配列番号２）からのαヘリックスを含む融合ペプチドであり、Ｃｈｐ２－ＣＡＶ（配列番号８５）及びＥｃｐ１－ＣＡＶ（配列番号８６）は電荷アレイ変異体であり、両親媒性ヘリックスを維持するために様々なアミノ酸電荷が再配列されている。Ｃｈｐ２－ＳＣＲ１（配列番号９２）は、Ｃｈｐ２（配列番号２）の修飾された変異体であり、アミノ酸残基がスクランブルされて対照ペプチドを作る。

【０２０２】
したがって、Ｃｈｐファミリーの全ての成員（各ペプチドの或る特定の特徴を含む）の

完全な一覧を表１、表２、及び表Ｃに提供する。この群には、ペプチドＣｈｐ１～Ｃｈｐ４及びＣｈｐ６～Ｃｈｐ１２、並びにＣＰＡＲ３９が含まれ（これらは１１種類の異なるクラミジアミクロウイルスに由来し、表１に記載される）、ペプチドＣｈｐ２及びＣｈｐ３は２つの異なるファージに由来する２つの同一のペプチドである。上述したように、Ｃｈｐ５は、アルギニン及びリシンを含む全ての正に帯電したアミノ酸を、グルタミン及びグルタミン酸を含む負に帯電したアミノ酸で置き換えることによって生成されるＣｈｐ４の修飾誘導体である。Ｃｈｐファミリーの追加の成員は、クラミジアミクロウイルスタンパク質との相同性によって同定され、表２（「追加のＣｈｐファミリーの成員」）に記載されている。追加のＣｈｐファミリーの成員は、クラミジアミクロウイルス源に由来するものではなく、推定ミクロウイルスファージ源及びマイクロバクテリウムファージ源に由来する。表Ｃは、上で検討されるＤ型変異体及び電荷アレイ変異体を含むＣｈｐペプチドの幾つかの修飾された変異体を示す。表Ｃでは、イタリック体で太字のアミノ酸は、Ｌ型からＤ型に変更されたアミノ酸残基を示す。

【０２０３】

【表１】

表１－クラミジアファージ（Ｃｈｐ）由来溶菌剤

タンパク質名	識別情報	タンパク質配列	pI/kDa（アミノ酸）	ＤＮＡ配列
Chp1	ファージＣｈｐ１遺伝子：Ｃｈｐ１ｐ０８ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＰ＿０４４３１９．１科：ミクロウイルス科	MVRRRRLRRRISRRIFRRTVARVGRRRRSFRGGIRF（配列番号１）	13.23/4669.64（36）	ATGGTTCGTAGAAGACGTTTGAGAAGAAGAATAAGTAGAAGAATTTTTAGAAGAACAGTAGCTAGAGTTGGTAGAAGGCGAAGGTCTTTTCGTGGTGGTATTAGATTTTAA（配列番号２７）
Chp2	ファージ２遺伝子：Ｃｈ－２ｐ５ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＰ＿０５４６５２．１科：ミクロウイルス科	MRLKMARRRYRLPRRRSRRLFSRTALRMHPRNRLRRIMRGGIRF（配列番号２）	12.90/5708.98（44）	ATGAGGTTAAAAATGGCACGAAGAAGATACAGACTTCCGCGACGTAGAAGTCGAAGACTTTTTTCAAGAACTGCATTGAGGATGCATCCAAGAAATAGGCTTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCATTAGGTTCTAG（配列番号２８）
CPAR39	ファージＣＰＡＲ３９遺伝子：ＣＰＡ００８ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＰ＿０６３８９８．１科：ミクロウイルス科	MCKKVCKKCPKKGPKNAPKIGAFYERKTPRLKQST（配列番号３）	10.26/3993.91（35）	TTGTGCAAAAAAGTGTGCAAAAAATGCCCAAAAAAAGGGCCAAAAAATGCCCCCAAAATCGGAGCATTTTACGAGAGAAAAACACCTAGACTTAAACAGTCTACTTGA（配列番号２９）
Chp3	ファージ３遺伝子：ＣＰ３ｐ６ＧｅｎＢａｎｋ：ＹＰ＿０２２４８４．１科：ミクロウイルス科	MRLKMARRRYRLPRRRSRRLFSRTALRMHPRNRLRRIMRGGIRF（Ｃｈｐ２と同じ配列）（配列番号５４）	12.90/5708.98（44）	ATGAGGTTAAAAATGGCACGAAGAAGATACAGACTTCCGCGACGTAGAAGTCGAAGACTTTTTTCAAGAACTGCATTAAGGATGCATCCAAGAAATAGGCTTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCATTAGGTTCTAG（配列番号５３）
Chp4	ファージ４遺伝子：Ｃｈｐ４ｐ６ＧｅｎＢａｎｋ：ＹＰ＿３３８２４３．１科：ミクロウイルス科	MARRYRLSRRRSRRLFSRTALRMHRRNRLRRIMRGGIRF（配列番号４）	12.88/5073.11（39）	ATGGCACGAAGATACAGACTTTCGCGACGCAGAAGTCGACGACTTTTTTCAAGAACTGCATTAAGAATGCATCGAAGAAATAGACTTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCATTAGGTTTTAG（配列番号３０）
Chp5	ファージＣｈｐＱＥファージ４の誘導体	MAEQYELSQEQSEQLFSETALQMHEQNELQEIMQGGIEF（配列番号５）	3.73/4605.01（39）	ATGGCGGAACAGTATGAACTGAGCCAGGAACAGAGCGAACAGCTGTTTAGCGAAACCGCGCTGCAGATGCATGAACAGAACGAACTGCAGGAAATTATGCAGGGCGGCATTGAATTTTAA（配列番号３１）
Chp6	モルモットクラミ	MARRRYRLPRRR	12.88/5180.2	ATGGCACGAAGAAGATACAGACTTCC

	ジアファージ ＧｅｎＢａｎｋ： ＮＰ＿５１０８７８．１ 科：ミクロウイルス科	SRRLFSRTALRM HPRNRLRRIMRG GIRF（配列番号６）	7（40）	GCGACGTAGAAGTCGAAGACTTTTTT CAAGAACTGCATTAAGGATGCATCCA AGAAATAGGCTTCGAAGAATTATGCG TGGCGGCATTAGGTTCTAG（配列番号３２）
Chp7	特徴が不明なタンパク質（クラミジア・トラコマティス） ＧｅｎＢａｎｋ： ＣＲＨ７３０６１．１ 科：ミクロウイルス科	MKRRKMTRKGSK RLFTATADKTKS INTAPPPMRGGI RL（配列番号７）	12.31/4302.1 9（38）	ATGAAACGTAGAAAAATGACAAGAAA AGGTTCTAAGCGTCTTTTTACTGCAA CTGCTGATAAAACTAAATCTATCAAT ACTGCCCCGCCGCCAATGCGTGGCGG TATCCGGTTGTAA（配列番号３３）
Chp8	特徴が不明なタンパク質（クラミジア・トラコマティス） ＧｅｎＢａｎｋ： ＣＲＨ６４９８３．１ 科：ミクロウイルス科	MSKKRSRMSRRR SKKLFSKTALRT KSVNTRPPMRGG FRF（配列番号８）	12.91/4672.6 1（39）	ATGTCTAAAAAGCGTTCTCGCATGTC TCGCCGCCGTTCTAAGAAGTTGTTCT CGAAAACGGCTCTCCGCACGAAGAGT GTCAACACCCGTCCGCCTATGCGCGG AGGGTTCCGGTTCTGA（配列番号３４）
Chp9	特徴が不明なタンパク質（クラミジア・トラコマティス） ＧｅｎＢａｎｋ： ＣＲＨ８４９６０．１ 科：ミクロウイルス科	MSLRRHKLSRKA SKRIFRKGASRT KTLNTRATPMRG GFRI（配列番号９）	12.91/4672.6 0（40）	ATGTCTCTTCGTCGTCATAAGCTTTC TCGTAAGGCGTCTAAGCGTATTTTTC GTAAAGGTGCATCACGCACGAAGACT TTGAATACTCGTGCTACGCCTATGCG CGGCGGTTTCCGTATTTAA（配列番号３５）
Chp10	特徴が不明なタンパク質（クラミジア・トラコマティス） ＧｅｎＢａｎｋ： ＣＲＨ９３２７０．１ 科：ミクロウイルス科	MKRRKLSKKKSR KIFTRGAVNVKK RNLRARPMRGGF RI（配列番号１０）	12.91/4570.6 4（38）	ATGAAACGTCGTAAACTGTCCAAAAA GAAATCTCGCAAGATTTTCACTCGCG GTGCTGTAAATGTGAAAAAGCGTAAC CTTCGCGCTCGCCCAATGCGCGGCGG TTTCCGGATCTAA（配列番号３６）
Chp11	特徴が不明なタンパク質（クラミジア・トラコマティス） ＧｅｎＢａｎｋ： ＣＲＨ５９９５４．１ 科：ミクロウイルス科	MAKKMTKGKDRQ VFRKTADRTKKL NVRPLLYRGGIR L（配列番号１１）	11.74/4375.3 2（37）	ATGGCTAAAAAAATGACTAAAGGCAA GGATCGTCAGGTTTTTCGTAAAACCG CTGATCGTACTAAGAAACTCAATGTT AGACCGTTGTTATATCGAGGAGGTAT CAGATTATGA（配列番号３７）
Chp12	特徴が不明なタンパク質（クラミジア・トラコマティス） ＧｅｎＢａｎｋ： ＣＲＨ５９９６５．１ 科：ミクロウイルス科	MAGKKMVSKGKD RQIFRKTADRTK KMNVRPLLYRGG IRL（配列番号１２）	11.74/4549.5 3（39）	ATGGCAGGAAAAAAAATGGTATCAAA AGGAAAAGATAGACAGATTTTCCGAA AAACTGCTGATCGCACTAAAAAAATG AATGTGCGCCCGCTATTATATCGTGG AGGTATTAGATTATGA（配列番号３８）

【０２０４】

【表２】

表２－追加のＣｈｐファミリーの成員

タンパク質名	識別情報	タンパク質配列	pI/kDa（アミノ酸）	ＤＮＡ配列
Gkh1	海洋ゴクショウイルス 遺伝子：Ｖ５０８＿ｇｐ１ ＧｅｎＢａｎｋ：ＹＰ＿００８７９８２４５．１ 未分類ゴクショウイルス亜科	MRRPRKMNYKKSKRMFSRTAARTHRKNSLRGSRPMRGGIRL（配列番号１３）	12.66/4974.97（41）	ATGAGAAGACCAAGAAAAATGAACTATAAAAAATCAAAAAGAATGTTTTCACGCACAGCAGCGAGAACACACAGAAAAAACTCTCTAAGAGGTAGCCGACCTATGAGAGGCGGAATACGTCTTTAA（配列番号３９）
Gkh2	ゴクショウイルス亜科Ｆｅｎ６７２＿３１ 遺伝子：ＡＦＬ７８＿ｇｐ４ ＧｅｎＢａｎｋ：ＹＰ＿００９１６０３８２．１ 未分類ゴクショウイルス亜科	MSKKASRKSFTKGAVKVHKKNVPTRVPMRGGIRL（配列番号１４）	12.49/3794.63（34）	ATGTCGAAGAAGGCGTCGAGGAAGAGTTTTACTAAGGGTGCCGTTAAGGTTCATAAGAAAAATGTTCCTACTCGTGTTCCTATGCGTGGCGGTATTAGGCTTTAG（配列番号４０）
Unp1	無名のタンパク質産物（無培養細菌） ＧｅｎＢａｎｋ：ＣＤＬ６６９４４．１ 環状プラスミド、ラット盲腸	MKMRKRTDKRVFTRTAAKSKKVNIAPKIFRGGIRL（配列番号１５）	12.31/4104.04（35）	ATGAAAATGCGTAAGCGGACGGACAAGCGAGTGTTTACCCGCACCGCTGCTAAGTCCAAGAAAGTGAACATTGCCCCGAAAATTTTTAGAGGAGGTATCCGTCTGTGA（配列番号４１）
Ecp1	非構造タンパク質（大腸菌） ＧｅｎＢａｎｋ：ＷＰ＿１００７５６４３２．１ ｓＥＰＥＣ糞便株	MARSRRRMSKRSSRRSFRKYAKTHKRNFKARSMRGGIRL（配列番号１６）	12.70/4812.72（39）	ATGGCTCGTTCTCGCCGTCGTATGTCCAAGCGTTCTTCCCGTCGTTCGTTCCGTAAGTACGCAAAGACGCATAAACGTAACTTTAAAGCCCGCTCTATGCGTGGTGGAATTCGTCTTTGA（配列番号４２）
Tma1	仮想タンパク質（サーモディスカス・マリティマス（T. maritimus））ＳＡＭＮ０４４８８０４４＿０８５５ ＧｅｎＢａｎｋ：ＳＨＧ４７１２２．１	MESPNSRSQLGITLYLLSTIFPDACFRYRRELPYPLVIWGVATLCLQ（配列番号１７）	7.80/5433.39（47）	ATGGAAAGCCCGAACAGCCGCAGCCAGCTGGGCATTACCCTGTATCTGCTGAGCACCATTTTTCCGGATGCGTGCTTTCGCTATCGCCGCGAACTGCCGTATCCGCTGGTGATTTGGGGCGTGGCGACCCTGTGCCTGCAGTAA（配列番号４３）
Ecp2	仮想タンパク質ＥＣ１３１０７＿４４ｃ０００１０（大腸菌） ＧｅｎＢａｎｋ：ＯＡＣ１４０４１	MARSRRRMSKRSSRRSFRKYAKSHKKNFKARSMRGGIRL（配列番号１８）	12.66/4770.68（39）	ATGGCTCGTTCCCGTAGACGTATGTCTAAGCGTTCTTCCCGCCGTTCGTTCCGCAAGTATGCGAAGTCGCATAAGAAGAACTTTAAAGCCCGCTCAATGCGTGGCGGTATCCGTTTATAA（配列番号４４）

	.1 乳房、急性乳腺炎			
Osp1	仮想タンパク質SAMN05216343_10315 0（オシリバクター属種PC13） GenBank：SFP13761.1	MRKRMSKRVDKKVFRRTAASAKKINIDPKIYRGGIRL（配列番号19）	11.90/4389.35（37）	ATGAGAAAGCGAATGTCTAAGCGTGTTGACAAGAAGGTGTTCCGTCGTACTGCCGCATCTGCCAAGAAGATTAACATTGACCCCAAGATTTACCGTGGAGGTATTCGCCTATGA（配列番号45）
Unp2	無名のタンパク質産物 GenBank：CDL65918.1 染色体外DNA RGI003277	MRRRRLSRRTSRRFFRKGLKVRRRNLRARPMRGGFRI（配列番号20）	13.18/4757.77（37）	ATGAGACGTCGTCGTCTATCCCGCAGAACTTCCCGCCGTTTTTTCCGTAAAGGACTTAAGGTTCGCCGTCGTAACCTCCGCGCGAGACCCATGAGAGGCGGATTCAGAATTTGA（配列番号46）
Unp3	無名のタンパク質産物 GenBank：CDL65808.1 染色体外DNA RGI002334	MARRKKMKGKRDKRVFKQTANKTKAINISPKNMRGGTRL（配列番号21）	12.32/4545.51（39）	ATGGCACGACGCAAGAAGATGAAAGGCAAGCGGGATAAACGGGTGTTTAAGCAGACAGCCAACAAAACCAAGGCTATCAACATCAGCCCAAAAAACATGAGAGGGGGTACGAGACTGTGA（配列番号47）
Gkh3	仮想タンパク質（海洋ゴクショウイルス） GenBank：AGT39941.1	MLTVWSDTPTIKRRKDMYRKRMSRKKSKKVFAKTAMKVNKRNHVKPMRGGYRI（配列番号22）	11.2/6440.82（53）	ATGTTAACTGTGTGGAGTGACACCCCTACCATAAAAAGGAGAAAAGACATGTATAGAAAGAGAATGTCAAGAAAGAAAAGTAAAAAGGTTTTTGCAAAAACCGCAATGAAAGTAAATAAAAGAAACCACGTTAAACCTATGCGTGGTGGATATAGAATATAA（配列番号48）
Unp5	仮想タンパク質（海洋ゴクショウイルス） GenBank：AGT39924.1	MMKYRKKMSAKSSRKQFTKGAMKVKGKNFTKPMRGGIRL（配列番号23）	12.04/4536.61（39）	ATGATGAAGTACAGAAAAAAAATGAGCGCTAAAAGTAGCCGAAAGCAATTTACAAAAGGCGCCATGAAAGTGAAGGGTAAAAACTTCACAAAACCAATGCGCGGAGGCATCCGTCTATAG（配列番号49）
Unp6	仮想タンパク質（海洋ゴクショウイルス） GenBank：AGT39915.1	MRRYNVNKGKSAKKFRKQVSKTKVANLRSNPMRGGWRL（配列番号24）	12.31/4492.34（38）	ATGCGACGTTACAATGTAAATAAAGGTAAATCTGCTAAGAAGTTTCGAAAGCAGGTAAGTAAGACGAAGGTTGCAAACCTACGTTCTAATCCAATGCGAGGTGGTTGGAGACTCTAA（配列番号50）
Spi1	仮想タンパク質Sp－4p3（スピロプラズマウイルスSpV4） Orf9 NCBI参照配列：NP_059837.1	MAYRGFKTSRVVKHRVRRRWFNHRRRYR（配列番号25）	12.37/3776.45（28）	ATGGCTTATCGTGGTTTTAAAACGAGTCGTGTTGTAAAACATAGAGTACGTAGAAGATGGTTTAATCATAGAAGACGTTATAGATAG（配列番号51）

Spi2	仮想タンパク質Ｓｐ－４ｐ２（スピロプラズマウイルスＳｐＶ４）Ｏｒｆ８ＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿５９８３３６．１	MRRKVKNTKRHQWRLTHSARSIKRANIMPSNPRGGRRF（配列番号２６）	12.91/4629.45（38）	ATGCGTCGTAAAGTTAAAAACACCAAACGTCACCAGTGGCGTCTGACCCACTCTGCTCGTTCTATCAAACGTGCTAACATCATGCCGTCTAACCCGCGTGGTGGTCGTCGTTTC（配列番号５２）
Ecp3	非構造タンパク質（エシェリヒア）ＮＣＢＩ参照配列：ＷＰ＿１０５２６９２１９．１	MARSRRRMSKRSSRRSFRKYAKTHKKNFKARSMRGGIRL（配列番号５５）	12.76/4784.69（39）	ATGGCTCGTTCTCGTCGTCGTATGTCTAAACGTTCTTCTCGTCGTTCTTTTCGTAAATATGCTAAAACTCATAAAAAAAATTTTAAAGCTCGTTCTATGCGTGGAGGAATTCGTTTATAA（配列番号６８）
Ecp4	非構造タンパク質（エシェリヒア）ＮＣＢＩ参照配列：ＷＰ＿１０５４６６５０６．１	MARSRRRMSKRSSRRSFRKYAKSHKKNFKARSMRGGIRL（配列番号５６）	12.66/4770.68（39）	ATGGCGCGCAGCCGCCGCCGCATGAGCAAACGCAGCAGCCGCCGCAGCTTTCGCAAATATGCGAAAAGCCATAAAAAAAACTTTAAAGCGCGCAGCATGCGCGGCGGCATTCGCCTG（配列番号６９）
Lvp1	溶解タンパク質（シュードモナスファージＰＰ７）ＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿０４２３０６．１	MSSTLCRWAVKALRCTRVYKEFIWKPLVALSYVTLYLLSSVFLSQLSYPIGSWAV（配列番号５７）	9.7/6346.6（55）	ATGTCTTCTACCCTGTGCCGTTGGGCTGTTAAAGCTCTGCGTTGCACCCGTGTTTACAAAGAATTCATCTGGAAACCGCTGGTTGCTCTGTCTTACGTTACCCTGTACCTGCTGTCTTCTGTTTTCCTGTCTCAGCTGTCTTACCCGATCGGTTCTTGGGCTGTT（配列番号７０）
(ABP1)Lvp2	溶解タンパク質（アシネトバクターファージＡＰ２０５）ＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿０８５４６９．１	MKKRTKALLPYAVFIILSFQLTLLTALFMYYHYTF（配列番号５８）	9.93/4247.21（35）	ATGAAGAAAAGGACAAAAGCCTTGCTTCCCTATGCGGTTTTCATCATACTCAGCTTTCAACTAACATTGTTGACTGCCTTGTTTATGTATTACCATTATACCTTTTAG（配列番号７１）
ALCES1	仮想タンパク質（ヘラジカの糞便と関連するミクロウイルスＭＰ１２５４２３）ＮＣＢＩ参照配列：ＡＸＢ２２５７３．１	MAKKIRNKARDRRIFTRTASRMHKANRTPRFMRGGIRL（配列番号５９）	12.70/4599.52（38）	ATGGCAAAGAAAATTAGAAACAAAGCACGTGATAGACGTATCTTCACAAGAACAGCTTCACGCATGCACAAGGCAAACCGCACACCAAGATTTATGAGAGGCGGTATTAGGTTATGA（配列番号７２）
AVQ206	仮想タンパク質（ゴクショウイルス亜科環境サンプル）ＮＣＢＩ参照配列：ＡＶＱ１０２３６．１	MRRKKMSRGKSKKLFRRTAKRVHRKNLRARPMRGGIRM（配列番号６０）	13.10/4680.78（38）	ATGCGTCGTAAAAAAATGTCTCGTGGTAAATCTAAAAAACTGTTCCGTCGTACCGCTAAACGTGTTCACCGTAAAAACCTGCGTGCTCGTCCGATGCGTGGTGGTATCCGTATG（配列番号７３）
AVQ244	仮想タンパク質（ゴクショウイルス亜科環境サンプル	MAKRHKIPQRASQHSFTRHAQKVHPKNVPRLPMRGGIRL	12.8/4566.43（39）	ATGGCTAAACGTCACAAAATCCCGCAGCGTGCTTCTCAGCACTCTTTCACCCGTCACGCTCAGAAAGTTCACCCG

	） ＮＣＢＩ参照配列：ＡＶＱ１０２４４．１	（配列番号６１）		AAAAACGTTCCGCGTCTGCCGATGCGTGGTGGTATCCGTCTG（配列番号７４）
CDL907	無名のタンパク質産物（無培養細菌） ＮＣＢＩ参照配列：ＣＤＬ６５９０７．１	MRKKMHKSLDKRVFNRTAKKSKKINVNPVVYRGGIRL（配列番号６２）	11.96/4398.22（37）	ATGCGTAAAAAAATGCACAAATCTCTGGACAAACGTGTTTTCAACCGTACCGCTAAAAAATCTAAAAAAATCAACGTTAACCCGGTTGTTTACCGTGGTGGTATCCGTCTG（配列番号７５）
AGT915	仮想タンパク質（海洋ゴクショウイルス） ＮＣＢＩ参照配列：ＡＧＴ３９９１５．１	MRRYNVNKGKSAKKFRKQVSKTKVANLRSNPMRGGWRL（配列番号６３）	12.41/4492.32（38）	ATGCGACGTTACAATGTAAATAAAGGTAAATCTGCTAAGAAGTTTCGAAAGCAGGTAAGTAAGACGAAGGTTGCAAACCTACGTTCTAATCCAATGCGAGGTGGTTGGAGACTCTAA（配列番号７６）
HH3930	仮想タンパク質ＲＩＮＴＨＨ＿３９３０（リケリア・イントラセルラリス（Richelia intracellularis）ＨＨ０１） ＮＣＢＩ参照配列：ＣＣＨ６６５４８．１	MRPVKRSRVNKARSAGKFRKQVGKTKMANLRSNPMRGGWRL（配列番号６４）	12.95/4755.69（41）	ATGCGTCCAGTTAAAAGATCAAGAGTAAATAAGGCCCGATCTGCAGGCAAGTTTCGTAAGCAGGTCGGTAAAACAAAGATGGCAAATCTGCGTAGTAATCCGATGCGCGGCGGATGGCGGCTGTGA（配列番号７７）
Fen7875	仮想タンパク質（ゴクショウイルス亜科Ｆｅｎ７８７５＿２１） ＮＣＢＩ参照配列：ＹＰ＿００９１６０３９９．１	MKPLKRKPVQKARSAAKFRRNVSTVKAANMAVKPMRGGWRF（配列番号６５）	12.81/4699.7（41）	ATGAAGCCATTGAAGCGTAAGCCGGTTCAGAAGGCGCGGTCAGCAGCCAAGTTCCGTCGAAATGTGTCTACCGTTAAGGCTGCCAATATGGCGGTGAAGCCGATGCGCGGCGGTTGGCGGTTCTGA（配列番号７８）
SBR77	仮想タンパク質ＳＥＡ＿ＢＡＢＹＲＡＹ＿７７（マイコバクテリウムファージＢａｂｙＲａｙ） ＮＣＢＩ参照配列：ＡＯＴ２５４４１	MTKRDIEYRKALGLNPSEPLPKIVGAVTRHGATLKRPRVTALAR（配列番号６６）	11.48/4882.78（44）	ATGACCAAGAGAGACATCGAGTACCGGAAAGCTTTGGGGCTCAACCCATCTGAGCCGCTCCCGAAGATTGTGGGTGCCGTCACCCGCCACGGGGCCACTCTGAAACGCCCACGGGTCACCGCACTGGCCCGATAG（配列番号７９）
Bdp1	推定のＤＮＡ結合タンパク質（ブデロビブリオファージｐｈｉＭＨ２Ｋ） ＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿０７３５４６．１	MKRKPMSRKASQKTFKKNTGVQRMNHLNPRAMRGGIRL（配列番号６７）	12.9/5708.98（38）	ATGAAAAGAAAACCAATGAGCCGCAAGGCCTCTCAAAAAACCTTCAAAAAGAACACAGGCGTTCAACGCATGAACCATCTCAACCCACGCGCCATGCGTGGTGGCATTAGACTATAA（配列番号８０）
Unp4	仮想タンパク質（海洋ゴクショウイルス）	MIVRRHKMSRRRSRKLFSKTASRTRSKNLRSRPMRGGYR	12.8/4918.88（40）	ATGATCGTTCGTCGTCACAAAATGTCTCGTCGTCGTTCTCGTAAACTGTTCTCTAAAACCGCTTCTCGTACCCGT

	ＮＣＢＩ参照配列：ＷＰ＿１１３０７６９７４．１	Ｉ（配列番号９４）		TCTAAAAACCTGCGTTCTCGTCCGATGCGTGGTGGTTACCGTATC （配列番号１０３）
Myo1	仮想タンパク質Ｐｅａｃｈｅｓ ７２（マイコバクテリウムウイルスＰｅａｃｈｅｓ）ＮＣＢＩ参照配列：ＹＰ＿００３３５８７７５．１	MKLTKSDIAYREALGLSTTDPLPAEIGMVTRRANRLKRPRKTARFR（配列番号１０２）	11.7/5287.23 (46)	ATGAAACTGACCAAATCTGACATCGCTTACCGTGAAGCTCTGGGTCTGTCTACCACCGACCCGCTGCCGGCTGAAATCGGTATGGTTACCCGTCGTGCTAACCGTCTGAAACGTCCGCGTAAAACCGCTCGTTTCCGT（配列番号１０４）

【０２０５】

表Ｃ－修飾Ｃｈｐペプチドファミリーの成員

タンパク質名	識別子情報	タンパク質配列	pI/kDa（アミノ酸）	ＤＮＡ配列
Chp2-M1	Ｃｈｐ２の修飾された変異体	M*R*LK*K*MA*RRR*Y*R*LP*RRR*S*RR*LFS*R*TAL*R*MHP*R*N*R*L*RR*IM*R*GGI*R*F（配列番号８１）	12.9/5708.98（44）	ATGAGGTTAAAAATGGCACGAAGAAGATACAGACTTCCGCGACGTAGAAGTCGAAGACTTTTTTCAAGAACTGCATTGAGGATGCATCCAAGAAATAGGCTTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCATTAGGTTC（配列番号１０５）
Chp2-Cys	Ｃｈｐ２の修飾された変異体	MRLKMARRRYRLPRRRSRRLFSRTALRMHPRNRLRRIMRGGIRFC（配列番号８２）	12.8/5812.15（45）	ATGAGGTTAAAAATGGCACGAAGAAGATACAGACTTCCGCGACGTAGAAGTCGAAGACTTTTTTCAAGAACTGCATTGAGGATGCATCCAAGAAATAGGCTTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCATTAGGTTCTGT（配列番号１０６）
Chp2-NC	Ｃｈｐ２の修飾された変異体	APKAMRLKMARRRYRLPRRRSRRLFSRTALRMHPRNRLRRIMRGGIRFLQKKGI（配列番号８３）	13.00/6744.29（54）	GCTCCTAAAGCTAGGTTAAAAATGGCACGAAGAAGATACAGACTTCCGCGACGTAGAAGTCGAAGACTTTTTTCAAGAACTGCATTGAGGATGCATCCAAGAAATAGGCTTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCATTAGGTTCTTACAAAAAAAAGGAATT（配列番号１０７）
Chp4::Chp2	Ｃｈｐ４とＣｈｐ２との融合ペプチド	MARRYRLSRRRSRRLFSRTALRMHRRNRLRRIMRRLFSRTALRMHRRNRLRRIMRGGIRF（配列番号８４）	13.18/7851.54（60）	ATGGCTCGTCGTTATCGTTTATCTCGTCGTCGTTCTCGTCGTTTATTTTCTCGTACTGCTTTACGTATGCATCGTCGTAATCGTTTACGTCGTTATTATGCGTCGTTTATTTTCTCGTACTGCTTTACGTATGCATCGTCGTAATCGTTTACGTCGTATTATGCGTGGAGGAATTCGTTTT（配列番号１０８）
Chp2-CAV	Ｃｈｐ２の修飾された変異体	GRLYRFHRPRRRNAIGMSRMRRKMFLRRMLRLISRRTRRPRLRA（配列番号８５）	13.00/5709（44）	GGACGTTTATATCGTTTTCATCGTCCTCGTCGTCGTAATGCTATTGGAATGTCTCGTATGCGTCGTAAAATGTTTTTACGTCGTATGTTACGTTTAATTTCTCGTCGTACTCGTCGTCCTCGTTTACGTGCT（配列番号１０９）
Ecp1-CAV	Ｅｃｐ１の修飾された変異体	RTRNFRIRRAKARRKMMLSHFKYGMARKGSKSRSSRRSR（配列番号８６）	12.80/4812.71（39）	CGTACTCGTAATTTTCGTATTCGTCGTGCTAAAGCTCGTCGTAAAATGATGTTATCTCATTTTAAATATGGAATGGCTCGTAAAGGATCTAAATCTCGTTCTTCTCGTCGTTCTCGT（配列番号１１０）
Ecp1-M1	Ｅｃｐ１の修飾された変異体	MA*R*S*RRR*MS*KR*SS*RR*SF*RK*YA*K*TH*KR*NF*K*A*R*SM*R*GGI*R*L（配列番号８７）	12.7/4812.72（39）	ATGGCTCGTTCTCGTCGTCGTATGTCTAAACGTTCTTCTCGTCGTTCTTTTCGTAAATATGCTAAAACTCATAAACGTAATTTTAAAGCTCGTTCTATGCGTGGAGGAATTCGTTTATAA（配列番号１１１）

Chp6-M1	Ｃｈｐ６の修飾された変異体	MA*RRR*Y*R*LP*RRR*S*RR*LFS*R*TAL*R*MHP*R*N*R*L*RR*IM*R*GGI*R*F（配列番号８８）	12.31/4492.34（38）	ATGGCACGAAGAAGATACAGACTTCCGCGACGTAGAAGTCGAAGACTTTTTTCAAGAACTGCATTAAGGATGCATCCAAGAAATAGGCTTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCATTAGGTTCTAG（配列番号１１２）
Chp10-M1	Ｃｈｐ１０の修飾された変異体	M*KRRK*LS*KKK*S*RK*IFT*R*GAVNV*KKR*NL*R*A*R*PM*R*GGF*R*I（配列番号８９）	12.91/4570.64（38）	GTGAAACGTCGTAAACTGTCCAAAAAGAAATCTCGCAAGATTTTCACTCGCGGTGCTGTAAATGTGAAAAAGCGTAACCTTCGCGCTCGCCCAATGCGCGGCGGTTTCCGGATCTAA（配列番号１１３）
Mse-M1	Ｍｓｅの修飾された変異体	MA*KK*I*R*N*K*A*R*D*RR*IFT*R*TAS*R*MH*K*AN*R*TP*R*FM*R*GGI*R*L（配列番号９０）	12.70/4599.52（38）	ATGGCTAAAAAAATCCGTAACAAAGCTCGTGACCGTCGTATCTTCACCCGTACCGCTTCTCGTATGCACAAAGCTAACCGTACCCCGCGTTTCATGCGTGGTGGTATCCGTCTG（配列番号１１４）
Chp4-M1	Ｃｈｐ４の修飾された変異体	MA*RR*Y*R*LS*RRR*S*R**R*LFS*R*TAL*R*MH*RR*N*R*L*RR*IM*R*GGI*R*F（配列番号９１）	12.88/5073.11（39）	ATGGCACGAAGATACAGACTTTCGCGACGCAGAAGTCGACGACTTTTTTCAAGAACTGCATTAAGAATGCATCGAAGAAATAGACTTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCATTAGGTTTTAG（配列番号１１５）
Chp2-SCR1	Ｃｈｐ２の修飾された変異体	MRLRYGHRRMTAGRIRMRSRRKFMLPRFRLLRIPRRSNRRRLRA（配列番号９２）	13.00/5709（44）	ATGCGTCTGCGTTACGGTCACCGTCGTATGACCGCTGGTCGTATCCGTATGCGTTCTCGTCGTAAATTCATGCTGCCGCGTTTCCGTCTGCTGCGTATCCCGCGTCGTTCTAACCGTCGTCGTCTGCGTGCT（配列番号１１６）
Chp2-SCR-M1	Ｃｈｐ２の修飾された変異体	M*R*L*R*YGH*RR*MTAG*R*I*R*M*R*S*RRK*FMLP*R*F*R*LL*R*IP*RR*SN*R**RR*L*R*A（配列番号９３）	13.00/5709（44）	ATGCGTCTGCGTTACGGTCACCGTCGTATGACCGCTGGTCGTATCCGTATGCGTTCTCGTCGTAAATTCATGCTGCCGCGTTTCCGTCTGCTGCGTATCCCGCGTCGTTCTAACCGTCGTCGTCTGCGTGCT（配列番号１１７）
Chp7-M1	Ｃｈｐ７の修飾された変異体	MK*RRK*MT*RK*GS*KR*LFTATAD*K*T*K*SINTAPPPM*R*GGI*R*L（配列番号９５）	12.31/4302.19（38）	ATGAAACGTAGAAAAATGACAAGAAAAGGTTCTAAGCGTCTTTTTACTGCAACTGCTGATAAAACTAAATCTATCAATACTGCCCCGCCGCCAATGCGTGGCGGTATCCGGTTGTAA（配列番号１１８）
Osp1-M1	Ｏｓｐ１の修飾された変異体	M*RKR*MS*KR*VD*KK*V*RR*TAASA*KK*INIDP*K*IY*R*GGI*R*L（配列番号９６）	11.9/4389.35（37）	ATGAGAAAGCGAATGTCTAAGCGTGTTGACAAGAAGGTGTTCCGTCGTACTGCCGCATCTGCCAAGAAGATTAACATTGACCCCAAGATTTACCGTGGAGGTATTCGCCTATGA（配列番号１１９）

Unp2-M1	Ｕｎｐ２の修飾された変異体	M*RRRR*LS*RR*TS*RR*FF*RK*GL*K*V*RRR*NL*R*A*R*PM*R*GGF*R*I（配列番号９７）	13.18/4757.77（37）	ATGAGACGTCGTCGTCTATCCCGCAGAACTTCCCGCCGTTTTTTCCGTAAAGGACTTAAGGTTCGCCGTCGTAACCTCCGCGCGAGACCCATGAGAGGCGGATTCAGAATTTGA（配列番号１２０）
Unp3-M1	Ｕｎｐ３の修飾された変異体	MA*RRKK*M*K*G*KR*D*K**R**VF*K*QTAN*K*T*K*AINISP*K*NM*R*GGT*R*L（配列番号９８）	12.32/4545.51（39）	ATGGCACGACGCAAGAAGATGAAAGGCAAGCGGGATAAACGGGTGTTTAAGCAGACAGCCAACAAAACCAAGGCTATCAACATCAGCCCAAAAAACATGAGAGGGGTACGAGACTGTGA（配列番号１２１）
Spi2-M1	Ｓｐｉ２の修飾された変異体	M*RRK*V*K*NT*KR*HQW*R*LTHSA*R*SI*KR*ANIMPSNP*R*GG*RR*（配列番号９９）	12.91/4629.45（38）	ATGCGTCGTAAAGTTAAAAACACCAAACGTCACCAGTGGCGTCTGACCCACTCTGCTCGTTCTATCAAACGTGCTAACATCATGCCGTCTAACCCGCGTGGTGGTCGTCGTTTC（配列番号１２２）
Ecp3-M1	Ｅｃｐ３の修飾された変異体	MA*R*S*RRR*MS*KR*SS*RR*SF*RK*YA*K*TH*KK*NF*K*A*R*SM*R*GGI*R*L（配列番号１００）	12.76/4784.69（39）	ATGGCTCGTTCTCGTCGTCGTATGTCTAAACGTTCTTCTCGTCGTTCTTTTCGTAAATATGCTAAAACTCATAAAAAAAATTTTAAAGCTCGTTCTATGCGTGGAGGAATTCGTTTATAA（配列番号１２３）
Agt1-M1	Ａｇｔ１の修飾された変異体	M*RR*YNVN*K*G*K*SA*K**K*F*RK*QVS*K*T*K*VANL*R*SNPM*R*GGW*R*L（配列番号１０１）	12.41/5287.23（46）	ATGCGACGTTACAATGTAAATAAAGGTAAATCTGCTAAGAAGTTTCGAAAGCAGGTAAGTAAGACGAAGGTTGCAAACCTACGTTCTAATCCAATGCGAGGTGGTTGGAGACTCTAA（配列番号１２４）

【０２０６】

幾つかのＣｈｐファミリーの成員のタンパク質配列相同性に関する追加情報を表３に提供する。Ｃｈｐ１、Ｂｄｐ１、Ｌｖｐ１及びＬｖｐ２のみが、ＧｅｎＢａｎｋの注釈で予測される活性が示されているＣｈｐファミリーの成員である。Ｃｈｐ１（ＧｅｎＢａｎｋ配列ＮＰ＿０４４３１９．１）はＤＮＡ結合タンパク質として注釈が付けられているが、これを支持するデータは提供されておらず、注釈は宿主溶菌における推定的な役割と矛盾している。全体として、Ｃｈｐタンパク質は互いに３９％～１００％同一であり、タンパク質配列データベース内の他のペプチドと相同ではない。Ｃｈｐファミリーの或る特定の成員を示す有根及び無根の系統樹を図２Ａ及び図２Ｂにそれぞれ示す。

【０２０７】

【表３】

表３－Ｃｈｐファミリータンパク質の注釈及び類似性

タンパク質	注釈（機能）	注目される類似点
Chp1	ＤＮＡ結合タンパク質Ｏｒｆ８；ビリオンへのｓｓＤＮＡパッケージングを仲介する；カプシドの内部表面に位置する；宿主細胞へのウイルスの付着において役割を果たす（類似性による）	６１．５％Ｃｈｐ４と同一 ６０％Ｃｈｐ２と同一 ６０％Ｃｈｐ３と同一 他のものとも同一性を有する
Chp2	非構造タンパク質	６０％Ｃｈｐ１と同一 １００％Ｃｈｐ３と同一 ９２．５％Ｃｈｐ４と同一 ５５％Ｃｈｐ８と同一 ５４．８％Ｇｋｈ１と同一 ６０．５％Ｕｎｐ２と同一 他のものとも同一性を有する
CPAR39	特徴が不明なタンパク質	６０％Ｃｈｐ６と同一
Chp3	非構造タンパク質	６０％Ｃｈｐ１と同一 １００％Ｃｈｐ２と同一 ９２．５％Ｃｈｐ４と同一 ５５％Ｃｈｐ８と同一 ５４．８％Ｇｋｈ１と同一 ６０．５％Ｕｎｐ２と同一 他のものとも同一性を有する
Chp4	推定構造タンパク質	６１．５％Ｃｈｐ１と同一 ９２．５％Ｃｈｐ２と同一 ９２．５％Ｃｈｐ３と同一 ５５％Ｇｋｈ１と同一 ６４．１％Ｕｎｐ２と同一 ５９．５％Ｃｈｐ８と同一 他のものとも同一性を有する
Chp5	ファージＣｈｐ４の電荷逆転変異体（Charge reversed variant）陰性対照タンパク質として生成	Ｃｈｐ４のＲＫ残基をＱＥ残基に変更
Chp6	非構造タンパク質	６０％Ｃｈｐ１と同一 １００％Ｃｈｐ２と同一（４残基トランケーション） １００％Ｃｈｐ３と同一（４残基トランケーション） ９２．５％Ｃｈｐ４と同一 ５５％Ｃｈｐ８と同一 ５４．８％Ｇｋｈ１と同一 ６０．５％Ｕｎｐ２と同一 他のものとも同一性を有する
Chp7	特徴が不明なタンパク質	６１．１％Ｃｈｐ８と同一 ５６．％Ｕｎｐ３と同一 ５０％Ｃｈｐ９と同一 ５３．７％Ｇｋｈ１と同一 ５７．９％Ｕｎｐ４と同一 他のものとも同一性を有する

Chp8	特徴が不明なタンパク質	５９％Ｃｈｐ９と同一 ５５％Ｃｈｐ２と同一 ５５％Ｃｈｐ３と同一 ６１．１％Ｃｈｐ７と同一 ５６．８％Ｇｋｈ３と同一 ５９．５％Ｃｈｐ４と同一 ４７．２％Ｃｈｐ１０と同一 ５０％Ｇｋｈ２と同一 ４７．４％Ｕｎｐ５と同一 ４６．２％Ｇｋｈ１と同一 他のものとも同一性を有する
Chp9	特徴が不明なタンパク質	５９％Ｃｈｐ８と同一 ５９％Ｕｎｐ２と同一 ５７．９％Ｃｈｐ１０と同一 ５０％Ｃｈｐ７と同一 ４６．２％Ｕｎｐ６と同一 他のものとも同一性を有する
Chp10	特徴が不明なタンパク質	６３．％Ｕｎｐ２と同一 ５２．６％Ｇｋｈ２と同一 ５７．９％Ｃｈｐ９と同一 ６１．８％Ｇｋｈ２と同一 ５６．４％Ｕｎｐ５と同一 ５１．３％Ｃｈｐ４と同一 ４７．５％Ｃｈｐ２と同一 ４７．５％Ｃｈｐ３と同一 ４７．４％Ｃｈｐ７と同一 ４７．２％Ｃｈｐ８と同一 ４４．４％Ｃｈｐ１と同一 他のものとも同一性を有する
Chp11	特徴が不明なタンパク質	上記と同様
Chp12	特徴が不明なタンパク質	上記と同様
Gkh1	特徴が不明なタンパク質	５５％Ｃｈｐ４と同一 ５４．８％Ｃｈｐ２と同一 ５４．８％Ｃｈｐ３と同一 ５３．７％Ｃｈｐ７と同一 ４８．８％Ｃｈｐ１０と同一 ４６．２％Ｃｈｐ８と同一 ４０．５％Ｇｋｈ３と同一 ４２．５％Ｃｈｐ１と同一 他のものとも同一性を有する
Gkh2	特徴が不明なタンパク質	７０．６％Ｕｎｐ５と同一 ６３．６％Ｃｈｐ１０と同一
Unp1	無名のタンパク質産物	７０．６％Ｏｓｐ１と同一 ５７．９％Ｃｈｐ７と同一 ４２．４％Ｃｈｐ１と同一 ３９．５％Ｃｈｐ１０と同一 ４５．２％Ｃｈｐ４と同一 ４１．２％Ｇｋｈ２と同一 ４５．２％Ｃｈｐ２と同一 他のものとも同一性を有する
Ecp1	非構造タンパク質	６０％Ｕｎｐ２と同一 ５６．４％Ｃｈｐ４と同一 ５３．８％Ｃｈｐ２と同一

		５３．８％Ｃｈｐ３と同一 ６１．８％Ｇｋｈ２と同一 ５０％Ｃｈｐ１０と同一 ５０％Ｕｎｐ５と同一 ５１．３％Ｃｈｐ１と同一 他のものとも同一性を有する
Ecp2	仮想タンパク質	５７．１％Ｕｎｐ２と同一 ６４．７％Ｇｋｈ２と同一 ５３．８％Ｃｈｐ４と同一 ５１．３％Ｃｈｐ２と同一 ５１．３％Ｃｈｐ３と同一 ５２．８％Ｏｓｐ１と同一 ４７．２％Ｃｈｐ１０と同一 ４７．５％Ｃｈｐ１と同一 他のものとも同一性を有する
Tma1	特徴が不明なタンパク質	なし
Osp1	仮想タンパク質	７０．６％Ｕｎｐ１と同一 ３７．１％Ｃｈｐ１と同一 ４８．６％Ｃｈｐ８と同一 ４８．６％Ｇｋｈ３と同一 他のものとも同一性を有する
Unp2	無名のタンパク質産物	６３．２％Ｃｈｐ１０と同一 ５９％Ｃｈｐ９と同一 ６４．１％Ｃｈｐ４と同一 ５６．８％Ｃｈｐ１と同一 ６０．５％Ｃｈｐ２と同一 ６０．５％Ｃｈｐ３と同一 他のものとも同一性を有する
Unp3	無名のタンパク質産物	５６．８％Ｃｈｐ７と同一 ５８．８％Ｕｎｐ１と同一 ５９．５％Ｏｓｐ１と同一 ４３．２％Ｃｈｐ９と同一 ４５．９％Ｇｋｈ３と同一 他のものとも同一性を有する
Gkh3	特徴が不明なタンパク質	５２．６％Ｃｈｐ１０と同一 ５５．９％Ｃｈｐ８と同一 ５０％Ｕｎｐ２と同一 ４２．９％Ｃｈｐ４と同一 ４７．２％Ｃｈｐ９と同一 ４０％Ｃｈｐ２と同一 ４０％Ｃｈｐ３と同一 他のものとも同一性を有する
Unp5	特徴が不明なタンパク質	６１．１％Ｇｋｈ３と同一 ５６．４％Ｃｈｐ１０と同一 ７０．６％Ｇｋｈ２と同一 ５３．８％Ｃｈｐ７と同一 ４３．６％Ｕｎｐ２と同一 ４８．６％Ｃｈｐ９と同一 他のものとも同一性を有する
Unp6	特徴が不明なタンパク質	４６．２％Ｃｈｐ９と同一 ４４．７％Ｃｈｐ１０と同一 他のものとも同一性を有する

Spi1	仮想タンパク質	相同性なし
Spi2	仮想タンパク質	相同性なし

【０２０８】

実施例２：Ｃｈｐペプチドの合成

全てのＣｈｐペプチドを、米国ニュージャージー州のGenScriptにより、個別支払いで（Ｎ末端アセチル化（Ａｃ）及びＣ末端アミド化（NH_2））をキャッピングして合成した。GenScriptは、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）及び質量分析（ＭＳ）により各ペプチドの純度を評定した。GenScriptはまた、全てのペプチドについて溶解

性試験を行い、Ｖａｒｉｏ ＭＩＣＲＯ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｅｌｅｍｅｎｔａｌ Ａｎａｌｙｚｅｒを用いて正味ペプチド含有量（ＮＰＣ％）を決定した。Ｃｈｐ５、Ｌｖｐ１及びＬｖｐ２を除き、全てのペプチドは水溶性であり、これらを１ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ又は１０ｍｇ／ｍＬのいずれかの濃度で懸濁した。Ｃｈｐ５及びＬｖｐ１を、１０ｍｇ／ｍＬの濃度でＤＭＳＯに懸濁し、Ｌｖｐ２を２ｍｇ／ｍＬの濃度でＤＭＳＯに懸濁した。Ｅｃｐ１－ＣＡＶの溶解性は確認しなかった。対照ペプチドＲＩ１８、ＲＰ－１、ＷＬＢＵ２、ＢＡＣ３、ＧＮ－２ａｍｐ、ＧＮ－３ａｍｐ、ＧＮ－４ａｍｐ、ＧＮ－６ａｍｐ及びＢａｃ８ｃも上記のようにGenScriptで合成された。全ての追加ペプチドは、GenScript又はAnaspecのいずれかから購入した市販品であった。

【０２０９】

実施例３：Ｃｈｐペプチドの活性－グラム陰性細菌に対する最小阻止濃度（ＭＩＣ）

Ｃｈｐペプチド（Ｃｈｐ２と同一のペプチド配列を有するＣｈｐ３を除く）を合成し、抗菌感受性検査（ＡＳＴ：Antimicrobial Susceptibility Testing）形式で調べた。ＭＩＣ値を、１００％ＣＡＡ培地；２．５％ヒト血清を添加したＣＡＡ培地；及び１２．５％ヒト血清を添加したＣＡＡ培地中のカルバペネム耐性シュードモナス・エルギノーサ臨床分離株ＣＦＳ－１２９２に対して決定した（表４）。Ｃｈｐ１、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ４、Ｃｈｐ６、ＣＰＡＲ３９（ジチオスレイトール（ＤＴＴ）を含む）、Ｃｈｐ７、Ｃｈｐ８、Ｃｈｐ１０、Ｃｈｐ１１、Ｅｃｐ１、Ｅｃｐ２、Ｏｓｐ１、Ｓｐｉ１、Ｇｋｈ３、Ｕｎｐ２、Ｕｎｐ５、Ｕｎｐ６、Ｅｃｐ３、Ｅｃｐ４、Ｌｖｐ１、ＡＬＣＥＳ１、ＡＶＱ２０６、ＣＤＬ９０７、ＡＧＴ９１５、ＳＢＲ７７、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ２－Ｃｙｓ、Ｃｈｐ４：：Ｃｈｐ２、及びＣｈｐ２－ＣＡＶを含む幾つかのペプチドは、２．５％ヒト血清を添加したＣＡＡ培地中、０．２５μｇ／ｍＬ～４μｇ／ｍＬの範囲の優れたＭＩＣ値を示した。ペプチドＣｈｐ５、ＣＰＡＲ３９（ＤＴＴなし）、Ｇｋｈ１、Ｕｎｐ１、Ｓｐｉ２、及びＢｄｐ１は活性が低く、２．５％ヒト血清を添加したＣＡＡ培地で３２μｇ／ｍＬ以上のＭＩＣ値を示した。さらに、幾つかのペプチドは、以下の実施例１４に記載されるように、１２．５％のヒト血清を添加したＣＡＡ培地において、０．２５μｇ／ｍＬ～４μｇ／ｍＬの範囲の優れたＭＩＣ値を示した。

【０２１０】

ＣＰＡＲ３９は、内部システイン残基を含み、活性に０．５ｍＭ ＤＴＴの存在を必要とすることから、この群の中では特有である。Ｃｈｐ５は、全ての正に帯電した残基が負電荷に変更されたＣｈｐ４の誘導体として設計された。カチオン性ＡＭＰの研究に基づいて、抗細菌活性にカチオン性残基が必要であり、アニオン性残基によるカチオン性残基の除去は活性を除去すると予測される。したがって、Ｃｈｐ５（ＭＩＣ＞６４μｇ／ｍＬ）は、Ｃｈｐ４（ＭＩＣ＝０．５μｇ／ｍＬ）の不活性変異体である。ＣＰＡＲ３９（ＤＴＴなし）及びＣｈｐ５をいずれも陰性対照として使用する。

【０２１１】

【表４】

表４

ペプチド	１００％ＣＡＡでのＣＦＳ－１２９２に対するＭＩＣ（μｇ／ｍＬ）（１回目の実行／２回目の実行）	ＣＡＡ＋２．５％ヒト血清でのＣＦＳ－１２９２に対するＭＩＣ（μｇ／ｍＬ）	ＣＡＡ＋１２．５％ヒト血清でのＣＦＳ－１２９２に対するＭＩＣ（μｇ／ｍＬ）
Chp1	1	2	1
Chp2	0.5	0.5	0.5
CPAR39 + DTT	4	4	1
CPAR39 - DTT	n.d.	64	n.d.
Chp4	0.5	0.5	0.5
Chp5	>32	>64	>32
Chp6	0.5	0.25	0.5
Chp7	16	4	1
Chp8	0.5	2	2
Chp9	8	8	2
Chp10	0.5	2	0.5
Chp11	16	4	4
Chp12	8	8	4
Gkh1	1	128	1
Gkh2	16	8	4
Gkh3	0.5	2	1
Unp1	4	32	4
Unp2	0.5	1	0.5
Unp3	8	8	0.25
Unp4	2	n.d.	>16
Unp5	2	2	0.5
Unp6	n.d.	4	n.d.
Ecp1	0.5	0.5	0.25
Ecp2	0.25	1	0.25
Osp1	16	0.5	1
Spi1	2	2	0.25
Spi2	16	64	0.25
Ecp3	0.5	4	0.5
Ecp4	n.d.	2	n.d.
Bdp1	16	>128	>32
Lvp1 + DTT	>64	2	0.5
Lvp2 (Abp1)	32	8	n.d.
ALCES1	n.d.	2	n.d.
AVQ206	0.5	2	0.25
AVG244	64	>16	>32
CDL907	8	2	0.5
AGT915	2	1	0.25
HH3930	2	n.d.	4
Fen7875	2	n.d.	2
SBR77 (Sbr1)	4	0.5	>16

ペプチド	１００％ＣＡＡでのＣＦＳ－１２９２に対するＭＩＣ（μｇ／ｍＬ）（１回目の実行／２回目の実行）	ＣＡＡ＋２．５％ヒト血清でのＣＦＳ－１２９２に対するＭＩＣ（μｇ／ｍＬ）	ＣＡＡ＋１２．５％ヒト血清でのＣＦＳ－１２９２に対するＭＩＣ（μｇ／ｍＬ）
Chp2-M1	0.125	1	0.125
Chp2-Cys	8	2	n.d.
Chp2-NC	>8	>8	n.d.
Chp4::Chp2	4	2	n.d.
Chp2-CAV	n.d.	2	n.d.
Ecp1-CAV	1	n.d.	n.d.
Ecp1-M1	0.125/0.125	n.d.	0.125
Chp6-M1	0.5/0.5	n.d.	0.25
Chp10-M1	0.25/0.25	n.d.	0.25
Chp4-M1	<1/0.25	n.d.	0.25
Chp7-M1	<1	n.d.	n.d.
Osp1-M1	<1/>32	n.d.	16
Unp2-M1	<1/0.25	n.d.	0.5
Unp3-M1	<1/4	n.d.	4
Ecp3-M1	0.25/0.25	n.d.	0.25
Myo1	>64	n.d.	n.d.
Spi2-M1	8	n.d.	8
Agt1-M1	1	n.d.	2
対照ペプチド			
WLBU2	1	n.d	>64
BAC3	4	n.d	32
PRR	32	n.d	>128
RR12	4	n.d	8
ＲＲ１２極性	4	n.d	32
RI18	2	n.d	1
ＲＲ１２疎水性	16	n.d.	128

【０２１２】

或る特定の主要なＥＳＫＡＰＥ病原体を含む、シュードモナス・エルギノーサ、大腸菌、エンテロバクター・クロアカエ、クレブシエラ・ニューモニエ及びアシネトバクター・バウマンニを含む様々なグラム陰性生物に対して、ペプチドＣｈｐ１、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ４、ＣＰＡＲ３９（ＤＴＴなし）、Ｃｈｐ６、Ｅｃｐ１及びＥｃｐ２を用いて、追加のＭＩＣ試験を行った（表５）。ヒト血清の存在に対する標的生物の差次感受性のため、２．５％のヒト血清を添加しなかったＣＡＡ（生理学的塩濃度を備える）で試験を行った。１μｇ／ｍＬ～４μｇ／ｍＬの優れたＭＩＣ値は、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ４、Ｃｈｐ６、Ｅｃｐ１及びＥｃｐ２について試験した全ての株に対して観察され、生理学的塩濃度の状況における本Ｃｈｐペプチドの広域スペクトル活性を示した。Ｃｈｐ２及びＥｃｐ１をネズミチフス菌に対して追加的に試験し、２μｇ／ｍＬのＭＩＣを有することを実証した。

【０２１３】

【表５】

表５

		MIC（μg/mL）						
RSC	生物（株番号）	Chp2	CPAR39-DTT	Chp4	Ecp1	Chp6	Chp1	Ecp2
489	シュードモナス・エルギノーサ（ＡＴＣＣ　１５６９２、感染した創傷）	4	128	4	2	2	4	2
490	シュードモナス・エルギノーサ（ＰＡＯ１、代替源、ＨＥＲ１０１８）	4	128	4	2	1	8	2
815	シュードモナス・エルギノーサ（ＡＴＣＣ　２７８５３、ＭＩＣ対照株）	4	>128	4	2	1	8	2
1108	シュードモナス・エルギノーサ（ＡＴＣＣ　１９１４２、気管気管支分泌物）	2	16	4	1	2	8	4
1109	シュードモナス・エルギノーサ（ＡＴＣＣ　１７６４６、ヒト肝膿瘍）	4	>128	4	2	4	8	4
1110	シュードモナス・エルギノーサ（ＡＴＣＣ　１５１５２、中耳の膿瘍）	4	128	4	1	2	4	1
1111	シュードモナス・エルギノーサ（ＡＴＣＣ　１４２１３、ヒト股関節創傷）	4	>128	4	2	4	8	4
1113	シュードモナス・エルギノーサ（ＡＴＣＣ　ＢＡＡ－２７、実験室株）	4	>128	4	4	2	8	2
1114	シュードモナス・エルギノーサ（ＡＴＣＣ　２５１０２、バクテリオファージ宿主）	4	>128	4	2	2	8	2
1115	シュードモナス・エルギノーサ（ＡＴＣＣ　１５６９２、感染した創傷）	4	128	4	2	4	8	8
1292	シュードモナス・エルギノーサ４５３（ヒト臨床分離株、ＨＳＳ）	4	16	4	2	2	8	8
813	大腸菌（ＡＴＣＣ　２５９２２、ＭＩＣ対照株）	2	32	2	2	2	8	2
1212	大腸菌（ＨＭ３４６、結腸、クローン病）	2	16	4	2	2	8	4
1240	エンテロバクター・クロアカエ（ＡＴＣＣ　１３０４７、ＭＩＣ対照株）	4	>128	4	2	4	8	4
814	クレブシエラ・ニューモニエ（ＡＴＣＣ　１００３１（ＭＩＣ対照株）	4	64	4	2	4	16	4
1131	クレブシエラ属種（ＨＭ－２２３；クローン病患者の腸）	4	>128	4	2	4	8	2
1138	クレブシエラ・ニューモニエ（ｇ２－３　ＨＭ３５Ｋ）	4	>128	4	2	4	16	2
1139	クレブシエラ属種（ＨＭ－４４；結腸、クローン病）	2	64	4	2	1	8	4
30	アシネトバクター・バウマンニ（臨床分離株ＨＳＳ）	2	64	4	2	2	8	2
32	アシネトバクター・バウマンニ（臨床分離株ＨＳＳ）	2	64	4	2	2	8	2
27	ネズミチフス菌ＬＴ２（実験室分離株）	2	n.d.	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.

ｎ．ｄ．＝未測定

【０２１４】

ヒト血清を添加したＣＡＡにおいて、ＥＳＫＡＰＥ病原体である大腸菌、エンテロバクター・クロアカエ、クレブシエラ・ニューモニエ、及びアシネトバクター・バウマンニに対する幾つかのペプチドについて追加のＭＩＣ試験を実施した（表Ｄ）。表Ｄに示すように、幾つかのペプチドについて試験した全ての株に対して、１μｇ／ｍＬ～４μｇ／ｍＬの優れたＭＩＣ値が認められた。

【０２１５】

表Ｄ

Ｃｈｐペプチド	クレブシエラ・ニューモニエＨＭ－４４	エンテロバクター・クロアカエＡＴＣＣ　１３０４７	大腸菌ＡＴＣＣ２５９２２	アシネトバクター・バウマンニＡＴＣＣ　ＢＡＡ　７４７
Chp1	1	4	2	2
Chp2	0.125	1	1	0.125
Chp4	0.25	1	0.5	0.125
Chp6	0.125	2	1	1
Chp7	1	>32	8	>32
Chp8	4	16	0.5	2
Chp9	1	32	1	4
Chp10	0.5	1	0.5	2
Chp11	16	32	2	32
Chp12	16	32	8	1
Gkh1	0.5	32	1	2
Gkh2	16	8	1	8
Gkh3	4	4	2	4
Ecp1	0.5	16	0.25	1
Ecp2	0.25	16	0.5	1
Ecp3	0.5	4	1	2
Osp1	0.125	32	0.5	32
Unp1	8	>32	0.5	8
Unp2	0.125	16	0.25	1
Unp3	4	8	0.5	2
Unp5	4	4	1	8
Spi2	16	4	0.25	16
Bdp1	>32	>32	>32	>32
Mse1	8	8	0.5	4
Avq1	0.25	4	0.5	2
Avq2	>32	>32	2	32
Cdl1	4	>32	2	>32
Agt1	0.5	4	1	4
Hh1	4	32	2	32
Fen1	4	>32	4	32
Chp2-M1	0.125	0.25	0.125	0.125
Ecp1-M1	0.5	0.125	1	0.5
Chp4-M1	0.125	0.25	0.5	1
Chp6-M1	0.25	0.25	1	0.125
Chp10-M1	0.25	0.125	1	0.5
Osp1-M1	4	4	16	4
Unp2-M1	0.25	0.125	1	0.125
Unp3-M1	2	0.5	1	2
Spi2-M1	1	1	2	4
Ecp3-M1	1	1	1	4
Agt1-M1	1	1	8	0.125
Chp5	8	>32	4	>32
Chp2（アミノ酸スクランブル）	0.25	>32	0.5	>32
Chp2-M1（アミノ酸スクランブル）	0.125	0.5	0.5	0.25
Ecp1（アミノ酸スクランブル）	32	>32	>32	>32

【０２１６】

理論によって制限されることを望まないが、リシンの代わりにＣｈｐペプチドの或る特

定の位置にアルギニンが存在することが、グラム陰性ＥＳＫＡＰＥ病原体に対する活性の増強に寄与している可能性があると仮定される。

【０２１７】

また、５０％のヒト血漿又はヒト血清のいずれかを添加したミューラーヒントンブロス中のシュードモナス・エルギノーサの実験室株ＰＡＯ１に対して、Ｃｈｐ２及びＣｈｐ４の両方のＭＩＣ値を決定し、文献による様々なＡＭＰ（自然免疫エフェクター及びその誘導体を含む）のＭＩＣ値と比較した（表６）。ここでは、ＰＡＯ１は、殆どの臨床分離株とは異なり、ヒト血液マトリックスの抗菌活性に感受性がないことから、ＰＡＯ１（実験室分離株）を使用することにより血清濃度及び血漿濃度が上昇した状態での試験が可能になる。表６では、Ｃｈｐ２及びＣｈｐ４のＭＩＣ値は２μｇ／ｍＬであり、それと比較してＲＩ１８及びプロテグリンのみが同様に活性であり（ＭＩＣ＝１μｇ／ｍＬ～４μｇ／ｍＬ）、試験した１８種類の追加のペプチドは非活性であるか、活性が不十分であった。

【０２１８】

【表６】

表６

作用物質	最小阻止濃度（μg/mL）	
	ヒト血漿	ヒト血清
プロテグリン１	1	4
インドリシジン	>64	>64
LL-37	>64	>64
LL-37 (18-37)	>64	>64
LL-37 (17-29)	>64	>64
GN-2 amp	>64	>64
GN-3 amp	>64	>64
GN-4 amp	>64	>64
ペジオシン	>64	>64
パラシン	>64	>64
PGLa	>64	>64
OV-1	32	32
デルマセプチン	>64	>64
WLBU2	>64	>64
RP-1	32	64
T9W	16	32
BAC3	>64	>64
GN-6 amp	>64	>64
Bac 8c	>64	>64
RI18	2	1
Chp2	2	2
Chp4	2	2

【０２１９】

実施例４：Ｃｈｐペプチドの活性－グラム陰性細菌のバイオフィルムの根絶

抗バイオフィルム活性を評価するため、ＭＢＥＣ（最小バイオフィルム根絶濃度）値を、２％グルコースを添加したトリプシンソイブロス培地中でシュードモナス・エルギノーサ株ＡＴＣＣ１７６４７により形成された成熟したバイオフィルムに対してＣｈｐ２及びＣｈｐ４のペプチドについて決定した。Ｃｈｐ２及びＣｈｐ４のいずれについても０．２５μｇ／ｍＬのＭＢＥＣ値が観察され（表７）、これは成熟したバイオフィルムを根絶する強力な能力と一致する。比較すると、活性が高いＡＭＰ（１５）であるＲＩ１８の活性は４μｇ／ｍＬと実質的に低いことが観察され、また活性が不十分な溶解素であるＴ４リゾチームの活性は６４μｇ／ｍＬ超であることが観察された。

【０２２０】

【表７】

表７

作用物質	MBEC（μg/mL）
RI18	4
Chp2	0.25
Chp4	0.25
T4LYZ	>64

【０２２１】

グラム陰性細菌の５つの種の８つの異なる株のＣｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１についても同様にＭＢＥＣ値を決定した。バイオフィルムをＬＢ培地で２４時間かけて形成させ、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、次いでＣｈｐペプチド又は対照（ＬＬ－３７抗微生物ペプチド又はトブラマイシン抗生物質）のいずれかで１６時間処理した。次いで、フィルムを洗浄し、クリスタルバイオレットで染色して、ＭＢＥＣを視覚化した。下記表８に示す結果は、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１の全てが強力な抗バイオフィルム活性を示したことを実証する。

【０２２２】

【表８】

表８

細菌株	MBEC （μg/mL）				
	Chp2	Chp2-M1	Chp10-M1	LL-37 （MIC）	トブラマイシン（MIC）
シュードモナス・エルギノーサ（ATCC 27853）	0.25	0.125	0.125	8 （16）	0.03 （<0.5）
アシネトバクター・バウマンニ（ATCC BAA-747）	0.5	0.25	0.25	0.25 （16）	0.03 （<0.5）
クレブシエラ・ニューモニエ（ATCC 700603）	4	4	2	32 （16）	1 （<0.5）
クレブシエラ・ニューモニエ（KP1）	2	2	1	16 （16）	1 （<0.5）
エンテロバクター・クロアカエ（CCUG 63317）	2	2	1	8 （16）	<0.03 （<0.5）
大腸菌（ATCC 25922）	2	1	1	16 （16）	<0.03 （<0.5）
大腸菌（ATCC 35329）	4	4	2	16 （16）	<0.03 （<0.5）
大腸菌（EC2）	2	2	1	8 （16）	<0.03 （<0.5）

【０２２３】

実施例５：Ｃｈｐペプチドと抗生物質との組合せ

Ｃｈｐ２又はＣｈｐ４のいずれかと１１種類の様々な抗生物質との相乗作用を評価するため、Ｃｈｐ２と１１種類の抗生物質及びＣｈｐ４と１１種類の抗生物質との各組合せを、２．５％ヒト血清を添加したＣＡＡ培地においてシュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２を使用する標準的なチェッカーボードアッセイ形式で試験した。チェッカーボードアッセイでは、部分阻止濃度指数（ＦＩＣＩ）値を計算する。０．５以下のＦＩＣＩ値は相乗作用と一致し、０．５超～１の値は強い相加活性と一致し、１～２の値は相加活性と一致し、２超の値は拮抗的とみなされる。以下の表９に示すように、Ｃｈｐ２及びＣｈｐ４の両方について、値は、Ｃｈｐペプチドと抗生物質との間の相乗的（すなわち、

０．５以下）又は強く相加的（すなわち、０．５超～１）な相互作用のいずれかと一致していた。

【０２２４】

【表９】

表９

抗生物質	Chp2	Chp4
アミカシン	0.500	0.500
アジスロマイシン	0.156	0.156
アズトレオナム	0.500	0.375
シプロフロキサシン	0.500	0.375
コリスチン	0.375	0.375
ホスホマイシン	0.250	0.250
ゲンタマイシン	0.281	0.250
イミペネム	0.188	0.375
ピペラシリン	0.188	0.188
リファンピシン	0.563	0.750
トブラマイシン	0.266	0.266

【０２２５】

追加のＦＩＣＩ値を、シュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２にて同じ方法を使用して、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、及びＵｎｐ２－Ｍ１について計算した。結果を以下の表１０～表１５に示す。試験した全てのＣｈｐペプチドについて、ＦＩＣＩ値は、Ｃｈｐ４－Ｍ１及びイミペネムを除いて、Ｃｈｐペプチドと抗生物質との相乗的（すなわち、０．５以下）又は強い相加的（すなわち、０．５超～１）な相互作用と一致していた。

【０２２６】

【表１０】

表１０－Ｃｈｐ２及びシュードモナス・エルギノーサのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp2 MIC（μg/mL）	Chp2 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.0625	0.125	16	0.25	0.375
アズトレオナム	0.0625	0.125	16	0.25	0.375
コリスチン	0.0625	0.125	0.015625	0.25	0.375
イミペネム	0.125	0.25	4	0.125	0.375
レボフロキサシン	0.0625	0.25	2	0.25	0.5
メロペネム	0.0625	0.125	4	0.25	0.375
トブラマイシン	0.0625	0.125	0.125	0.25	0.375
アミカシン	0.25	0.25	0.5	0.25	0.5
シプロフロキサシン	0.125	0.25	0.5	0.5	0.75
ゲンタマイシン	0.03125	0.0625	0.5	0.5	0.5625
ピペラシリン	0.25	0.5	4	0.5	1

【０２２７】

【表１１】

表１１－Ｃｈｐ２－Ｍ１及びシュードモナス・エルギノーサのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp2-M1 MIC（μg/mL）	Chp2-M1 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.0625	0.25	8	0.125	0.375
アズトレオナム	0.015625	0.0625	4	0.5	0.5625
コリスチン	0.03125	0.125	0.015625	0.25	0.375
イミペネム	0.0625	0.25	8	0.25	0.5
レボフロキサシン	0.0625	0.25	2	0.25	0.5
メロペネム	0.0625	0.25	4	0.25	0.5
トブラマイシン	0.015625	0.0625	0.125	0.25	0.3125
アミカシン	0.0625	0.125	0.5	0.25	0.375
シプロフロキサシン	0.25	0.5	0.0625	0.0625	0.5625
ゲンタマイシン	0.25	0.5	0.03125	0.0625	0.5625
ピペラシリン	0.25	0.5	1	0.125	0.625

【０２２８】

【表１２】

表１２－Ｃｈｐ４－Ｍ１及びシュードモナス・エルギノーサのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp4-M1 MIC（μg/mL）	Chp4-M1 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.125	0.25	16	0.25	0.5
アズトレオナム	0.0625	0.125	2	0.25	0.375
コリスチン	0.03125	0.0625	0.03125	0.25	0.3125
イミペネム	0.0625	0.125	32	1	1.125
レボフロキサシン	0.125	0.25	4	0.5	0.75
メロペネム	0.125	0.25	4	0.25	0.5
トブラマイシン	0.125	0.25	0.125	0.25	0.5
アミカシン	0.25	0.5	0.125	0.0625	0.5625
シプロフロキサシン	0.015625	0.03125	1	0.5	0.53125
ゲンタマイシン	0.25	0.5	0.0625	0.125	0.625
ピペラシリン	0.125	0.25	8	0.5	0.75

【０２２９】

【表１３】

表１３－Ｃｈｐ６－Ｍ１及びシュードモナス・エルギノーサのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp6-M1 MIC（μg/mL）	Chp6-M1 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.0625	0.0625	16	0.25	0.313
アズトレオナム	0.125	0.125	2	0.25	0.375
コリスチン	0.125	0.125	0.015625	0.25	0.375
イミペネム	0.25	0.25	8	0.25	0.5
レボフロキサシン	0.25	0.25	2	0.25	0.5
メロペネム	0.25	0.25	4	0.25	0.5
トブラマイシン	0.0625	0.0625	0.125	0.25	0.313
アミカシン	0.125	0.25	0.5	0.25	0.5
シプロフロキサシン	0.25	0.5	0.125	0.125	0.625
ゲンタマイシン	0.25	0.5	0.03125	0.0625	0.563
ピペラシリン	0.25	0.5	2	0.25	0.75

【０２３０】

【表１４】

表１４－Ｃｈｐ１０－Ｍ１及びシュードモナス・エルギノーサのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp10-M1 MIC（μg/mL）	Chp10-M1 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.125	0.25	8	0.125	0.375
アズトレオナム	0.125	0.25	2	0.25	0.5
コリスチン	0.125	0.25	0.00780625	0.1249	0.375
イミペネム	0.125	0.125	4	0.125	0.25
レボフロキサシン	0.25	0.25	2	0.25	0.5
メロペネム	0.125	0.125	2	0.25	0.375
トブラマイシン	0.25	0.25	0.0625	0.25	0.5
アミカシン	0.03125	0.125	0.25	0.125	0.25
シプロフロキサシン	0.125	0.5	0.125	0.125	0.625
ゲンタマイシン	0.0625	0.25	0.0625	0.125	0.375
ピペラシリン	0.125	0.5	2	0.25	0.75

【０２３１】

【表１５】

表１５－Ｕｎｐ２－Ｍ１及びシュードモナス・エルギノーサのＦＩＣＩ値

抗生物質	Unp2-M1 MIC（μg/mL）	Unp2-M1 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.125	0.25	8	0.125	0.375
アズトレオナム	0.25	0.25	1	0.125	0.375
コリスチン	0.125	0.25	0.015625	0.25	0.5
イミペネム	0.0625	0.125	8	0.25	0.375
レボフロキサシン	0.125	0.25	2	0.25	0.5
メロペネム	0.03125	0.0625	4	0.25	0.3125
トブラマイシン	0.03125	0.03125	0.125	0.25	0.281
アミカシン	0.125	0.25	0.5	0.25	0.5
シプロフロキサシン	0.25	0.5	0.25	0.25	0.75
ゲンタマイシン	0.125	0.25	0.125	0.25	0.5
ピペラシリン	0.25	0.5	2	0.25	0.75

【０２３２】

また、クレブシエラ・ニューモニエ株１１３９にて同じ方法を使用して、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、及びＵｎｐ２－Ｍ１についてＦＩＣＩ値を計算した。結果を以下の表１６～表２１に示す。試験した全てのＣｈｐペプチドについて、値は、Ｃｈｐペプチドと抗生物質との相乗的（すなわち、０．５以下）又は強い相加的（すなわち、０．５超～１）な相互作用と一致していた。

【０２３３】

【表１６】

表１６－Ｃｈｐ２及びクレブシエラ・ニューモニエのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp2 MIC（μg/mL）	Chp2 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.0625	0.125	1	0.125	0.25
アズトレオナム	0.3125	0.0625	0.0078125	0.5	0.563
コリスチン	0.25	0.5	0.0078125	0.125	0.625
イミペネム	0.125	0.25	0.0625	0.25	0.5
レボフロキサシン	0.0625	0.25	0.0078125	0.25	0.5
メロペネム	0.0625	0.0625	0.015625	0.25	0.313
トブラマイシン	0.125	0.25	0.0078125	0.25	0.5

【０２３４】

【表１７】

表１７－Ｃｈｐ２－Ｍ１及びクレブシエラ・ニューモニエのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp2-M1 MIC（μg/mL）	Chp2-M1 FIC	抗生物質 MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.0625	0.25	1	0.25	0.5
アズトレオナム	0.03125	0.125	0.0078125	0.5	0.625
コリスチン	0.0625	0.25	0.015625	0.125	0.375
イミペネム	0.0625	0.25	0.0625	0.25	0.5
レボフロキサシン	0.0625	0.25	0.0078125	0.25	0.5
メロペネム	0.0625	0.25	0.015625	0.25	0.5
トブラマイシン	0.125	0.5	0.0039063	0.25	0.75

【０２３５】

【表１８】

表１８－Ｃｈｐ４－Ｍ１及びクレブシエラ・ニューモニエのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp4-M1 MIC（μg/mL）	Chp4-M1 FIC	抗生物質 MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.125	0.25	1	0.25	0.5
アズトレオナム	0.0625	0.125	0.0078125	0.5	0.625
コリスチン	0.125	0.25	0.03125	0.25	0.5
イミペネム	0.0625	0.125	0.0625	0.25	0.375
レボフロキサシン	0.125	0.25	0.0078125	0.25	0.5
メロペネム	0.25	0.25	0.0078125	0.125	0.375
トブラマイシン	0.125	0.25	0.00390625	0.125	0.375

【０２３６】

【表１９】

表１９－Ｃｈｐ６－Ｍ１及びクレブシエラ・ニューモニエのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp6-M1 MIC（μg/mL）	Chp6-M1 FIC	抗生物質 MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.0625	0.0625	1	0.5	0.563
アズトレオナム	0.125	0.125	0.0078125	0.25	0.375
コリスチン	0.25	0.25	0.015625	0.125	0.375
イミペネム	0.25	0.25	0.0625	0.25	0.5
レボフロキサシン	0.25	0.25	0.0078125	0.25	0.5
メロペネム	0.125	0.125	0.015625	0.25	0.375
トブラマイシン	0.25	0.25	0.0039063	0.125	0.375

【０２３７】

【表２０】

表２０－Ｃｈｐ１０－Ｍ１及びクレブシエラ・ニューモニエのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp10M1 MIC（μg/mL）	Chp10-M1 FIC	抗生物質 MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.125	0.25	1	0.125	0.375
アズトレオナム	0.125	0.25	0.0078125	0.25	0.5
コリスチン	0.125	0.25	0.03125	0.25	0.5
イミペネム	0.25	0.25	0.0625	0.25	0.5
レボフロキサシン	0.125	0.125	0.0078125	0.125	0.25
メロペネム	0.125	0.125	0.015625	0.125	0.25
トブラマイシン	0.25	0.25	0.00390625	0.125	0.375

【０２３８】
【表２１】
表２１－Ｕｎｐ２－Ｍ１及びクレブシエラ・ニューモニエのＦＩＣＩ値

抗生物質	Unp2-M1 MIC（μg/mL）	Unp2-M1 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.0625	0.125	1	0.125	0.25
アズトレオナム	0.03125	0.0625	0.0078125	0.0078125	0.313
コリスチン	0.125	0.25	0.03125	0.03125	0.375
イミペネム	0.03125	0.0625	0.0625	0.0625	0.313
レボフロキサシン	0.03125	0.0625	0.015625	0.015625	0.313
メロペネム	0.015625	0.03125	0.03125	0.03125	0.281
トブラマイシン	0.125	0.25	0.0039063	0.125	0.375

【０２３９】
また、アシネトバクター・バウマンニ株３０にて同じ方法を使用して、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、及びＵｎｐ２－Ｍ１についてもＦＩＣＩ値を計算した。結果を以下の表２２～表２７に示す。試験した全てのＣｈｐペプチドについて、値は、Ｃｈｐペプチドと抗生物質との相乗的（すなわち、０．５以下）又は強い相加的（すなわち、０．５超～１）な相互作用と一致していた。
【０２４０】
【表２２】
表２２－Ｃｈｐ２及びアシネトバクター・バウマンニのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp2 MIC（μg/mL）	Chp2 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.03125	0.0625	0.5	0.5	0.563
アズトレオナム	0.0625	0.0625	8	0.25	0.313
コリスチン	0.25	0.25	0.000976563	0.125	0.375
イミペネム	0.015625	0.03125	0.5	0.5	0.531
レボフロキサシン	0.25	0.25	0.03125	0.25	0.5
メロペネム	0.125	0.125	0.0625	0.25	0.375
トブラマイシン	0.0625	0.0625	0.015625	0.125	0.188
アミカシン	0.03125	0.03125	0.0625	0.25	0.281
シプロフロキサシン	0.5	0.5	0.001953125	0.03125	0.531
ゲンタマイシン	0.0625	0.0625	0.03125	0.25	0.313
ピペラシリン	0.125	0.125	8	0.25	0.375

【０２４１】

【表２３】

表２３－Ｃｈｐ２－Ｍ１及びアシネトバクター・バウマンニのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp2-M1 MIC（μg/mL）	Chp2-M1 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.03125	0.125	0.5	0.25	0.375
アズトレオナム	0.0625	0.25	8	0.25	0.5
コリスチン	0.0625	0.25	0.001953125	0.5	0.75
イミペネム	0.03125	0.125	0.125	0.125	0.25
レボフロキサシン	0.03125	0.125	0.03125	0.25	0.375
メロペネム	0.0625	0.25	0.0625	0.25	0.5
トブラマイシン	0.03125	0.125	0.015625	0.25	0.375
アミカシン	0.015625	0.03125	0.125	0.5	0.531
シプロフロキサシン	0.0625	0.0625	0.0625	0.5	0.563
ゲンタマイシン	0.125	0.125	0.03125	0.5	0.625
ピペラシリン	0.125	0.25	8	0.25	0.5

【０２４２】

【表２４】

表２４－Ｃｈｐ４－Ｍ１及びアシネトバクター・バウマンニのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp4-M1 MIC（μg/mL）	Chp4-M1 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.0625	0.125	0.5	0.25	0.375
アズトレオナム	0.03125	0.0625	16	0.25	0.313
コリスチン	0.015625	0.03125	0.00390625	0.5	0.531
イミペネム	0.0625	0.125	0.125	0.125	0.25
レボフロキサシン	0.0625	0.25	0.03125	0.25	0.5
メロペネム	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.313
トブラマイシン	0.0625	0.125	0.03125	0.5	0.625
アミカシン	0.25	0.5	0.0625	0.5	1
シプロフロキサシン	0.03125	0.0625	0.0625	0.5	0.563
ゲンタマイシン	0.0625	0.0625	0.03125	0.5	0.563
ピペラシリン	0.25	0.25	8	0.25	0.5

【０２４３】

【表２５】

表２５－Ｃｈｐ６－Ｍ１及びアシネトバクター・バウマンニのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp6-M1 MIC（μg/mL）	Chp6-M1 FIC	抗生物質MIC（μg/mL）	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.0625	0.25	0.5	0.25	0.5
アズトレオナム	0.125	0.25	8	0.25	0.5
コリスチン	0.0625	0.25	0.001953125	0.25	0.5
イミペネム	0.125	0.25	0.125	0.125	0.375
レボフロキサシン	0.0625	0.125	0.0625	0.25	0.375
メロペネム	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.313
トブラマイシン	0.0625	0.125	0.015625	0.25	0.375
アミカシン	0.0625	0.0625	0.125	0.5	0.563
シプロフロキサシン	0.0625	0.125	0.0625	0.5	0.625
ゲンタマイシン	0.0625	0.0625	0.03125	0.5	0.563
ピペラシリン	0.03125	0.0625	16	0.5	0.563

【０２４４】
【表２６】
表２６－Ｃｈｐ１０－Ｍ１及びアシネトバクター・バウマンニのＦＩＣＩ値

抗生物質	Chp10-M1 MIC (μg/mL)	Chp10-M1 FIC	抗生物質 MIC (μg/mL)	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.015625	0.03125	0.5	0.5	0.531
アズトレオナム	0.125	0.25	8	0.25	0.5
コリスチン	0.125	0.25	0.000976563	0.25	0.5
イミペネム	0.125	0.25	0.125	0.125	0.375
レボフロキサシン	0.015625	0.03125	0.0625	0.25	0.281
メロペネム	0.125	0.25	0.0625	0.125	0.375
トブラマイシン	0.0625	0.125	0.015625	0.25	0.375
アミカシン	0.0625	0.0625	0.0625	0.5	0.563
シプロフロキサシン	0.03125	0.0625	0.125	0.5	0.563
ゲンタマイシン	0.5	0.5	0.000976563	0.015625	0.516
ピペラシリン	0.125	0.25	4	0.25	0.5

【０２４５】
【表２７】
表２７－Ｕｎｐ２－Ｍ１及びアシネトバクター・バウマンニのＦＩＣＩ値

抗生物質	Unp2-M1 MIC (μg/mL)	Unp2-M1 FIC	抗生物質 MIC (μg/mL)	抗生物質ＦＩＣ	ＦＩＣ指数
アジスロマイシン	0.03125	0.03125	0.5	0.5	0.531
アズトレオナム	0.0625	0.0625	16	0.25	0.313
コリスチン	0.125	0.125	0.001953125	0.5	0.625
イミペネム	0.125	0.125	0.25	0.25	0.375
レボフロキサシン	0.0625	0.0625	0.0625	0.25	0.313
メロペネム	0.125	0.25	0.125	0.25	0.5
トブラマイシン	0.125	0.125	0.015625	0.25	0.375
アミカシン	0.0625	0.0625	0.125	0.5	0.563
シプロフロキサシン	0.0625	0.125	0.0625	0.25	0.375
ゲンタマイシン	0.0625	0.0625	0.03125	0.5	0.563
ピペラシリン	0.125	0.25	8	0.25	0.5

【０２４６】
実施例６：Ｃｈｐペプチドの溶血活性の評定

侵襲的感染の治療に使用することができる抗微生物ペプチドは、赤血球に対して低毒性を示さなければならない（Oddo A. et al, 2017. Methods Mol Biol 1548:427-435）。溶血活性の可能性を調べるため、ヒト赤血球に対する最小溶血濃度（ＭＨＣ）の決定に基づいて、赤血球を溶解するＡＭＰの能力を測定する一般的な方法論（上記の材料及び方法に記載される）を用いた。試験したＣｈｐペプチドの大半について、ＭＨＣ値が１２８μｇ／ｍＬ超であり、溶血の証拠は認められなかった（表２８）。Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ１００対照を２％の開始濃度で試験し、ＭＨＣはペプチドの最小量であり、その結果５％を超える溶菌が観察された。比較すると、ＷＬＢＵ２、ＲＩ１８、Ｒ１２、ＲＲ１２ｐ及びＲＲ１２ｈを含む既知の溶血活性を有する５種類のＡＭＰでは、１μｇ／ｍＬ～１２８μｇ／ｍＬの範囲のＭＨＣ値が観察された。Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００は、一般的に、溶血アッセイで陽性対照として使用される膜溶解性洗浄剤（membranolytic detergent）であり、２％～０．００７％の濃度の範囲にわたって溶血性であった。これらの知見は、ＣｈｐペプチドがＡＭＰについて共通して観察されるｉｎ　ｖｉｔｒｏ毒性（すなわち、溶血活性）を有していないことを示唆している。この特性は、表１、表２、及び表Ｃの残りのＣｈｐペプチドが、パーセント配列同一性、３Ｄ構造類似性及び電荷プロファ

イルに基づくだけでなく、本ペプチドが、溶菌剤としてグラム陰性細胞のエンベロープに対して非常に高特異的となる可能性が高いという期待に基づいている。

【０２４７】

【表２８】

表２８：ヒト赤血球に対して決定された最小溶血濃度（ＭＨＣ）の値

作用物質	MHC(μg/mL)
対照ペプチド(実行#1/実行#2)	
WLBU2	8
RI18	128
RR12	8/1
RR12p	4/4
RR12h	32/1
Ｔｒｉｔｏｎ対照*	1
Ｃｈｐペプチド	
Chp1	>128
Chp2	>128
CPAR39	>128
Chp4	>128
Chp5	>128
Chp6	>128
Chp7	>128
Chp8	>128
Chp9	>128
Chp10	>128
Chp11	>128
Chp12	>128
Gkh1	>128
Gkh2	>128
Gkh3	>128
Ecp1	>128
Ecp2	>128
Ecp3	>128
Ecp4	>128
Osp1	>128
Unp1	>128
Unp2	>128
Unp3	>128
Unp4	>128
Unp5	>128
Unp6	>128
Spi1	>128
Spi2	>128
Mse1	>128
Bdp1	>128
Lvp1	n.d.
Lvp2	8
ALCES1	>128
AVQ206	>128
AVQ244	>128
CDL907	>128
AGT915	>128
HH3930	n.d.

Fen7875	n.d.
SBR77	>128
Chp2-M1	>128
Chp2-Cys	8
Chp2-NC	8
Chp4::Chp2	2
Chp2-CAV	4
Ecp1-CAV	n.d.
Ecp1-M1	>128
Chp4-M1	>128
Chp6-M1	>128
Chp10-M1	>128
Osp1-M1	>128
Unp2-M1	>128
Unp3-M1	>128
Spi2-M1	>128
Ecp3-M1	>128
Agt1-M1	>128

【０２４８】

実施例７：グラム陰性細菌に対する溶菌活性の持続期間

シュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２に対するＣｈｐ２及びＣｈｐ４の活性を、材料及び方法に記載されているように２．５％ヒト血清を含むＣＡＡを用いた時間－殺菌形式で調べた。濃度１μｇ／ｍＬ及び１０μｇ／ｍＬのＣｈｐ２又はＣｈｐ４のいずれかによる処理後１時間、３時間及び２４時間での細菌生存率の評定は、全ての場合において強力な殺菌活性と一致する数ｌｏｇ倍（multi-log fold）の減少をもたらした(表２９）。表２９は、２．５％ヒト血清を添加したＣＡＡにおける処理後のシュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２に時間－殺菌形式を用いて決定された、（未処理対照と比較した）コロニー形成単位の対数減少を示す。

【０２４９】

【表２９】

表２９

処理	細菌生存能力の喪失（log10 CFU/mL）		
	１時間	３時間	２４時間
Chp2(1μg/mL)	>3.5	>4	>4.8
Chp2(10μg/mL)	>3.5	>4	>4.8
Chp4(1μg/mL)	>3.5	>4	>4.8
Chp4(10μg/mL)	>3.5	>4	>4.8

【０２５０】

シュードモナス・エルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、及びアシネトバクター・バウマンニに対して、０．２倍、１倍、及び５倍のＭＩＣ（及びバッファー対照）で１３種の異なるＣｈｐペプチドを使用して、追加の２４時間の時間－殺菌アッセイを行った。時間－殺菌アッセイを、通気しながら３７℃のＣＡＡ培地で実施した。定量的プレーティングを、０時間、１時間、３時間、及び２４時間の期間で実施した。以下のＣｈｐペプチドを評価した：Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ４、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ６、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｃｈｐ１０、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、Ｅｃｐ３、Ｅｃｐ３－Ｍ１、Ｕｎｐ２、Ｕｎｐ２－Ｍ１、及びＥｃｐ１－Ｍ１。

【０２５１】

試験した１３種のＣｈｐペプチドはいずれも未処理の対照バッファーと比較してシュー

ドモナス・エルギノーサのＬｏｇ$_{10}$　ＣＦＵ／ｍＬを大幅に減少させ、Ｃｈｐ１０を除く全てが２４時間まで強力な有効性を維持した。同様に、試験した１３種のＣｈｐペプチドはいずれも未処理の対照バッファーと比較してクレブシエラ・ニューモニエのＬｏｇ$_{10}$　ＣＦＵ／ｍＬを大幅に減少させ、２４時間まで強力な有効性を維持した。試験した１３種のＣｈｐペプチドはいずれも未処理の対照バッファーと比較してアシネトバクター・バウマンニのＬｏｇ$_{10}$　ＣＦＵ／ｍＬを大幅に減少させ、Ｃｈｐ１０－Ｍ１を除く全てが２４時間まで強力な有効性を維持した。

【０２５２】

さらに、実施例２で上述したとおりに調製したペプチドのインキュベーション後のＭＩＣの倍変化を検出するため、安定性の評定を行った。安定性を、１００％ヒト血清中で３７℃でのインキュベーションの１０分後、１時間及び２時間後に評定した。結果を下記表３０に示す。

【０２５３】

【表３０】

表３０

ペプチド	ＭＩＣの倍変化		
	１０分	１時間	２時間
Chp1	1	1	1
Chp2	1	1	2
CPAR39	1	0.5	0.5
Chp4	1	1	0.5
Chp5	1	2	2
Chp6	1	1	1
Chp7	1	1	1
Chp8	1	1	1
Chp9	1	0.5	0.5
Chp10	1	2	2
Chp11	1	2	2
Chp12	1	1	1
Gkh1	1	0.5	1
Gkh2	1	0.5	2
Gkh3	1	1	1
Ecp1	1	4	1
Ecp2	1	2	2
Ecp3	1	1	1
Ecp4	n.d.	n.d.	n.d.
Osp1	1	0.5	1
Unp1	1	0.5	2
Unp2	1	2	1
Unp3	1	1	1
Unp5	1	1	4
Unp6	1	1	1
Spi1	1	2	2
Spi2	1	1	1
Bdp1	1	1	0.25
Lvp1	n.d.	n.d.	n.d.
Lvp2	1	1	0.25
ALCES1	1	1	1
AVQ206	1	1	1
AVQ244	1	1	0.5
CDL907	1	1	1
AGT915	1	1	0.5
HH3930	n.d.	n.d.	n.d.
Fen7875	n.d	n.d.	n.d
SBR77	1	4	1
Chp2-M1	1	1	1
Chp2-Cys	1	2	4
Chp2-NC	1	1	4
Chp4::Chp2	1	1	2
Chp2-CAV	1	1	0.5
Ecp1-CAV	n.d	n.d	n.d.

【０２５４】

表３０に示すように、Ｃｈｐ１、Ｃｈｐ２、ＣＰＡＲ３９、Ｃｈｐ４、Ｃｈｐ５、Ｃｈｐ６、Ｃｈｐ７、Ｃｈｐ８、Ｃｈｐ９、Ｃｈｐ１０、Ｃｈｐ１１、Ｃｈｐ１２、Ｇｋｈ１、Ｇｋｈ２、Ｇｋｈ３、Ｅｃｐ１、Ｅｃｐ２、Ｅｃｐ３、Ｏｓｐ１、Ｕｎｐ１、Ｕｎｐ２、Ｕｎｐ３、Ｕｎｐ５、Ｕｎｐ６、Ｓｐｉ１、Ｓｐｉ２、Ｂｄｐ１、Ｌｖｐ２、ＡＬＣＥＳ１、ＡＶＱ２０６、ＡＶＱ２４４、ＣＤＬ９０７、ＡＧＴ９１５、ＳＢＲ７７、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ２－Ｃｙｓ、Ｃｈｐ２－ＮＣ、Ｃｈｐ４：：Ｃｈｐ２及びＣｈｐ２－ＣＡＶはいずれも１０分後、１時間後及び２時間後に十分に安定であった。

【０２５５】

さらに、安定性の評定を、上で検討されるのと同じ方法論を使用して、１００％ＣＡＡ及びウサギ血清中で行った。下記表３１に示す結果は、Ｃｈｐペプチドがウサギ血清及び１００％ＣＡＡ増殖培地中において３７℃で２時間安定していることを示す。

【０２５６】

【表３１】

表３１－１００％ＣＡＡ及びウサギ血清中での安定性の評定

ペプチド	ＭＩＣ（１００％ＣＡＡ）	ＭＩＣの倍率変化（１００％ＣＡＡ）			ＭＩＣの倍率変化（ウサギ血清）		
		１０分	１時間	２時間	１０分	１時間	２時間
Chp1	0.5	1	1	1	1	2	2
Chp2	0.25	1	0.5	0.5	1	2	2
CPAR39	4	1	1	1	1	0.5	0.25
Chp4	0.25	1	0.5	0.5	1	2	4
Chp6	0.25	1	0.5	0.5	1	1	1
Chp7	8	1	1	1	2	0.5	0.5
Chp8	0.5	1	0.5	0.5	1	1	1
Chp9	2	1	0.5	0.5	1	1	1
Chp10	0.5	1	0.5	0.5	1	1	1
Chp11	16	1	1	1	1	1	1
Chp12	8	1	1	1	1	1	1
Gkh1	0.5	1	0.5	0.5	1	0.5	0.5
Gkh2	16	1	0.5	0.5	1	1	1
Gkh3	0.5	1	0.5	0.5	1	1	1
Ecp1	0.25	1	1	1	1	2	1
Cdl2	8	1	0.5	0.5	1	1	1
Ecp2	0.25	1	1	0.5	1	1	1
Ecp3	0.5	1	1	1	1	1	2
Osp1	4	2	1	0.5	1	1	0.5
Unp1	4	1	1	0.5	1	1	1
Unp2	0.25	1	1	1	1	2	2
Unp3	4	1	1	0.5	1	1	1
Unp5	2	1	1	0.5	1	1	0.5
Unp6	8	1	1	0.5	1	1	1
Spi1	1	1	1	0.5	1	1	2
Spi2	4	1	1	0.5	1	1	1
Bdp1	16	1	1	0.5	1	1	1
Lvp1	>64	1	0.5	0.5	1	1	1
Mse1	4	1	1	0.5	1	1	1
AVQ206 (Avq1)	<0.25	1	2	0.5	1	1	1
AVQ244 (Avq2)	64	1	2	1	1	1	1
AGT915 (Agt1)	2	1	2	0.5	1	1	1
HH3930 (Hh1)	2	1	0.5	0.5	1	1	1
Fen7875 (Fen1)	4	1	1	0.5	1	1	1
SBR77 (Sbr1	>64	1	1	1	1	1	1
Chp2-M1	0.25	1	0.5	0.5	1	1	1
Chp2-Cys	2	1	0.5	0.5	n.d.	n.d.	n.d.
Chp4::Chp2	2	1	1	1	n.d.	n.d.	n.d.
RI18	2	1	0.5	0.5	1	1	1
WLBU2	16	1	1	1	1	0.5	1

【０２５７】

ラット血清及びウマ血清における安定性も観察し、また同様に４℃及び２４℃でインキュベーションした場合のウサギ血清及び１００％ＣＡＡでの安定性も観察した。いずれの場合も沈殿は観察されなかった。

【０２５８】

実施例８：非結核性抗酸菌（ＮＴＭ）株と結核菌株の両方におけるＭＩＣの決定

様々なＣｈｐペプチドのＭＩＣ値を、微量液体希釈のためのＣＬＳＩ法を使用して、９６ウェルマイクロタイターフォーマットで決定した。各ペプチドをｘ軸にわたって２倍に希釈し、ミューラーヒントンブロス培地中およそ１×１０^{5}細胞／ｍＬの次のＮＴＭ株の固定濃度と組み合わせた：マイコバクテリウム・スメグマチス、マイコバクテリウム・フォーチュイタム、マイコバクテリウム・アビウム、マイコバクテリウム・スクロフラセウム、及びマイコバクテリウム・イントラセルラーレ。プレートを３７℃で４５時間インキュベートし、ＭＩＣを決定した。結果を下記表３２に示す。

【０２５９】

【表３２】

表３２

Ｃｈｐペプチド	４５時間ＭＩＣ（μg/mL）						
	マイコバクテリウム・スメグマチスＭＣ^{2}１５５、実行＃１	マイコバクテリウム・スメグマチスＭＣ^{2}１５５、実行＃２	マイコバクテリウム・フォーチュイタム亜種フォーチュイタム ｄａ Ｃｏｓｔａ Ｃｒｕｚ ＡＴＣＣ ６８４１	マイコバクテリウム・アビウム Ｃｈｅｓｔｅｒ ＡＴＣＣ ７００８９８	マイコバクテリウム・カンサシ Ｈａｕｄｕｒｏｙ ＡＴＣＣ １２４７８	マイコバクテリウム・スクロフラセウム Ｐｒｉｓｓｉｃｋ及びＭａｓｓｏｎ ＡＴＣＣ １９９８１	マイコバクテリウム・イントラセルラーレ（Ｃｕｔｔｉｎｏ及びＭｃＣａｂｅ）Ｒｕｎｙｏｎ ＡＴＣＣ １３９５０
Chp1	8	16	16	4	4	4	4
Chp2	4	4	2	1	2	0.5	0.5
CPAR39	>128	--	--	--	--	--	--
Chp4	4	4	4	1	>0.125	2	1
Chp4-M1	--	0.25	2	1	1	1	1
Chp6	4	4	4	1	1	2	0.5
Chp7	128	--	--	--	--	--	--
Chp8	4	8	2	8	4	4	4
Chp9	4	8	4	>64	8	8	4
Chp10	2	1	1	0.5	4	0.5	0.5
Chp10-M1	--	1	2	1	1	2	2
Chp11	32	--	--	--	--	--	--
Chp12	64	--	--	--	--	--	--
Gkh1	4	4	1	4	2	8	4
Gkh2	32	--	--	--	--	--	--
Gkh3	>128	--	--	--	--	--	--
Ecp1	4	--	--	--	--	--	--
Ecp2	4	8	4	2	2	4	8
Ecp3	4	8	2	1	2	2	8
Osp1	32	--	--	--	--	--	--
Unp1	4	2	8	1	8	8	32
Unp2	2	4	2	0.5	2	4	1
Unp2-M1	--	1	4	1	2	4	2
Unp3	32	--	--	--	--	--	--
Unp3-M1	--	8	4	8	16	8	>64

Unp4	--	16	4	1	4	4	4
Unp5	8	--	--	--	--	--	--
Unp6	16	--	--	--	--	--	--
Spi1	2	16	8	>64	0.5	2	4
Spi2	4	4	4	>64	1	8	>64
Bdp1	32	--	--	--	--	--	--
Lvp1	>128	--	--	--	--	--	--
ALCES1	1	2	4	8	2	2	2
AVQ206 (Avq1)	4	16	2	1	2	4	4
AVQ244 (Avq2)	64	--	--	--	--	--	--
CDL907 (Cdl2)	>128	--	--	--	--	--	--
AGT915 (Agt1)	4	1	1	>64	1	>64	>64
HH3930 (Hh1)	4	16	8	4	32	16	16
Fen7875 (Fen1)	4	16	8	2	32	16	8
SBR77 (Sbr1)	>64	--	--	--	--	--	--
Chp2-M1	0.25	0.5	4	1	2	4	0.5
Ecp1-M1	1	1	4	4	4	2	4
Chp5	>64	--	--	--	--	--	--
Chp6-M1	0.5	0.25	2	2	4	4	1
Ecp3-M1	1	1	8	0.5	2	2	8
Myo1	>64	>64	>64	8	>64	--	>64
Spi2-M1	1	1	4	>64	4	16	>64
トブラマイシン（品質管理用）	--	0.125	4	0.125	16	0.25	0.25

【０２６０】

表３２に示すように、ＣｈｐペプチドはいくつかのＮＴＭ株に対して様々なレベルの活性を示した。例えば、ＡＬＣＥＳ１、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｅｃｐ－Ｍ１、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｅｃｐ－Ｍ１、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ１０、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、Ｕｎｐ２－Ｍ１、Ａｇｔ１、及びＳｐｉ２－Ｍ１を含む１１種のＣｈｐペプチドはマイコバクテリウム・スメグマチスに対して１μｇ／ｍＬ以下の強いＭＩＣ値を示した。

【０２６１】

次に、様々なＣｈｐペプチドのＭＩＣ値を、上記の微量液体希釈のためのＣＬＳＩ法を使用して、２つの異なる結核菌株について９６ウェルマイクロタイターフォーマットで決定した。ＭＩＣは、ＮＴＭ株について上で説明したように決定した。結果を下記表３３に示す。

【０２６２】

【表３３】

表３３

Ｃｈｐペプチド	MIC（μg/mL）	
	結核菌（Ｚｏｐｆ）Ｌｅｈｍａｎｎ及びＮｅｕｍａｎｎ ＡＴＣＣ　２５１７７	結核菌（Ｚｏｐｆ）Ｌｅｈｍａｎｎ及びＮｅｕｍａｎｎ ＡＴＣＣ　３５８１７
AGT915 (Agt1)	16	4
ALCES1	32	8
AVQ206 (Avq1)	16	8
Chp1	64	32
Chp10	32	8
Chp10-M1	8	8
Chp2	16	16
Chp2-M1	4	4
Chp4	16	8
Chp4-M1	8	4
Chp6	32	4
Chp6-M1	32	8
Chp8	32	8
Chp9	32	16
Myo1	--	32
Ecp1-M1	4	4
Ecp2	32	8
Ecp3	16	8
Ecp3-M1	>64	4
Fen7875 (Fen1)	16	8
Gkh1	32	4
HH3930 (Hh1)	64	16
Spi1	32	16
Spi2	8	8
Spi2-M1	16	4
Unp1	32	8
Unp2	16	4
Unp2-M1	16	4
Unp3-M1	32	16
Unp4	32	16
トブラマイシン（品質管理用）	4	4

【０２６３】

実施例９：外植された血液透析カテーテルにおけるＣｈｐペプチドの抗バイオフィルム活性

ヒトのバイオフィルムに対するＣｈｐ２－Ｍ１の活性を、カテーテル関連の血流感染が疑われる血液透析患者から取り出された３つの外植された透析カテーテルサンプルで調査した。外植された血液透析カテーテルを、等しい長さのセグメントに切断し、二分して内腔を露出させた。

【０２６４】

バイオフィルム細菌の回収及び定量化のため、Jorgensen et al., A modified chr

onic infection model for testing treatment of Staphylococcus aureus biofilms on implants, PLoS ONE 2014; 9:e103688に記載される標準的な方法論に従って、カテーテルセグメントをＰｒｅｃｅｌｌｙｓ（商標）２４組織ホモジナイザー（Bertin Technologies）でホモジナイズした。

【０２６５】

ＣＦＵカウント、溶血性表現型の評定、及び培養物の純度のためＴＳＡ血液寒天培地に定量的プレーティングを行い、ステノトロホモナス属種のコロニー形成を観察した。種の同定を１６ｓ　ｒＲＮＡアンプリコンのシーケンシングによって行い、ＭＩＣをＣｈｐ２－Ｍ１について決定した。

【０２６６】

調査された３つのカテーテルサンプルの最初のものについて、セグメントを以下の群に無作為化した（Ｎ＝１群あたり３つのセグメント）：（１）バッファー対照（すなわち、乳酸リンゲル液単独による処理）；（２）例えば、Fischetti et al.に対する米国特許第９，０３４，３２２号（その開示全体が引用することにより本明細書の一部をなす）に開示される１μｇ／ｍＬ　ＣＦ－３０１（野生型ＰｌｙＳｓ２溶解素である）による処理；（３）１μｇ／ｍＬのダプトマイシン単独による処理；及び　（４）１０μｇ／ｍＬでのＣｈｐ２－Ｍ１処理単独。サンプルを乳酸リンゲル溶液ですすぐ前に３７℃で４時間処理した。

【０２６７】

下記表３４に示すように、Ｃｈｐ２－Ｍ１は第１のカテーテルサンプルのステノトロホモナス含有バイオフィルムを１０μｇ／ｍＬで根絶したが、ＣＦ－３０１及びダプトマイシンは１μｇ／ｍＬでは根絶しなかった。

【０２６８】

【表３４】

表３４－カテーテルバイオフィルムに対するＣＦ－３０１、ダプトマイシン、及びＣｈｐ２－Ｍ１の効果

研究群	CF-301（μg/mL）	ダプトマイシン（μg/mL）	Chp2-M1（μg/mL）	カテーテルサンプル＃１のＬｏｇ$_{10}$　ＣＦＵ／ｇ（３７℃で１８時間のインキュベーション後に数えた）
バッファー対照	0	0	0	3.37
ＣＦ－３０１単独	1	0	0	3.66
ダプトマイシン単独	0	1	0	3.66
Ｃｈｐ２－Ｍ１単独	0	0	10	1

【０２６９】

第１のカテーテルサンプルから回収された細菌コロニーは、血液寒天プレート上で均一な表現型を示し、単一微生物のバイオフィルムを示唆した。１６ｓ　ｒＲＮＡアンプリコンシーケンシング（Charles River）は、主にシュードモナス属（ステノトロホモナス属）種に関連する配列を生成し、生物はＣｈｐ２－Ｍ１で２μｇ／ｍＬのＭＩＣ値を示した。

【０２７０】

次に、１μｇ／ｍＬのＣｈｐ２－Ｍ１単独による処理を使用して、同じカテーテルの異なる部分から得られた残りの２つのカテーテルサンプルのバイオフィルムへの影響を評価した。第１のカテーテルのシュードモナス属（ステノトロホモナス属）のグラム陰性臨床分離株に対して観察された前述のＭＩＣ値２μｇ／ｍＬ超に基づいて、１μｇ／ｍＬの濃度を選択した。

【０２７１】

下記表３５に示す結果は、Ｃｈｐ２－Ｍ１がＣＦＵ／ｇの３ｌｏｇ$_{10}$～４ｌｏｇ$_{10}$の減少、並びにヒト宿主において形成された、血小板、フィブロゲン（fibrogen）、及びｉｎ　ｖｉｔｒｏで複製され得ないその他の血液成分を含むバイオフィルムを除去する能力を示したことを示す。

【０２７２】

【表３５】

表３５－２つのカテーテルバイオフィルムサンプルに対するＣＦ－３０１、ダプトマイシン、及びＣｈｐ２－Ｍ１の効果

研究群	CF-301（μg/mL）	ダプトマイシン（μg/mL）	Chp2-M1（μg/mL）	カテーテルサンプル＃２のＬｏｇ$_{10}$ ＣＦＵ／ｇ	カテーテルサンプル＃３のＬｏｇ$_{10}$ ＣＦＵ／ｇ
				３７℃で２４時間のインキュベーション後に数えた	
バッファー対照	0	0	0	4.24	4.22
ＣＦ－３０１単独	1	0	0	3.77	4.10
ダプトマイシン単独	0	1	0	3.72	4.15
Ｃｈｐ２－Ｍ１単独	0	0	1	0.7	0.7

【０２７３】

第１のカテーテルサンプルと同様に、残りの２つのカテーテルサンプルでは、細菌コロニーは血液寒天プレート上で均一な表現型を示し、単一微生物のバイオフィルムを示唆した。１６ｓ　ｒＲＮＡアンプリコンシーケンシング（Charles River）は、主にシュードモナス属（ステノトロホモナス属）種に関連する配列を生成し、生物はＣｈｐ２－Ｍ１で１μｇ／ｍＬのＭＩＣ値を示した。

【０２７４】

３つの追加の感染血液透析カテーテルサンプルを２人の患者から摘出した（第１の患者から１つのカテーテル、第２の患者から２つのカテーテル）。上記のように、カテーテルセグメントを二分し、Ｃｈｐ２－Ｍ１及び乳酸リンゲルの緩衝液対照を用いて異なる処理群（ｎ＝１群あたり８セグメント）に割り当てた。１μｇ／ｍＬと１０μｇ／ｍＬの両方の濃度のＣｈｐ２－Ｍ１を使用し、第２の患者からの２つのカテーテルの１つに１μｇ／ｍＬのメロペネム対照処理を使用した。サンプルを３７℃で４時間インキュベートした。

【０２７５】

Ｃｈｐ２－Ｍ１、バッファー、又はメロペネムで４時間処理した後、サンプルをホモジナイズし（Ｐｒｅｃｅｌｌｙｓ　２４組織ホモジナイザー、Bertin Technologies）、ＴＳＡ血液寒天プレートに定量的プレーティングを行って数えた。

【０２７６】

第１の患者から外植された第１のカテーテルでは、処理対照の結果、ｌｏｇ$_{10}$ＣＦＵ／ｇは３．３７であったが、１０μｇ／ｍＬのＣｈｐ２－Ｍ１は０．７未満のｌｏｇ$_{10}$ＣＦＵ／ｇを有した。３７℃で２４時間インキュベートした後、生存した細菌を数えた。検出限界は０．７ｌｏｇ$_{10}$ＣＦＵ／ｇカテーテルであった。第２の患者からの第１のカテーテルサンプルでは、１μｇ／ｍＬのメロペネムではｌｏｇ$_{10}$ＣＦＵ／ｇは検出されず、１μｇ／ｍＬでのＣｈｐ２－Ｍ１のｌｏｇ$_{10}$ＣＦＵ／ｇは０．７未満であった。第２の患者からの第２のカテーテルサンプルでは、１μｇ／ｍＬのメロペネムではｌｏｇ$_{10}$ＣＦＵ／ｇは３．１６であり、１μｇ／ｍＬのＣｈｐ２－Ｍ１ではｌｏｇ$_{10}$ＣＦＵ／ｇは０．７未満であった。回収された細菌コロニーは、血液寒天プレート上で均一な表現型を示し、各カテーテルの単一微生物のバイオフィルムを示唆し、３つのカテーテルサンプル全てからの全ての細菌で同様のコロニー形態が観察され、これは同一又は類似の原因

物質であることを示唆するものであった。

【０２７７】

１μｇ／ｍＬと１０μｇ／ｍＬの両方のＣｈｐ２－Ｍ１によるバイオフィルムの根絶は、Ｃｈｐ２－Ｍ１を使用した様々なグラム陰性病原体の最小バイオフィルム根絶濃度２μｇ／ｍＬ以下のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの観察結果と一致する。メロペネム単独では、１μｇ／ｍＬでバイオフィルムは除去されなかった。配列分析により、２μｇ／ｍＬ以下のＭＩＣ値のＣｈｐ２－Ｍ１でステノトロホモナス生物が均一に存在することが明らかになった。

【０２７８】

ホモジナイズ後、得られた分離株のサブセット（ｎ＝１６）を調べて、１６ｓ　ｒＲＮＡアンプリコン（ＡｃｃｕＧＥＮＸ－ＩＤ、Charles River Laboratory）をシーケンシングして種分化を決定し、Ｃｈｐ２－Ｍ１及びメロペネムのＭＩＣ値を決定した。１６ｓ　ＲＮＡシーケンシングにより、３つのカテーテルサンプルのそれぞれで回収された全ての生物についてステノトロホモナス属種の存在を特定した。サンプリングされた３つのカテーテルのそれぞれについて、Ｃｈｐ２－Ｍ１のＭＩＣ値を、それぞれ２、１、及び１であると決定した。

【０２７９】

これらの結果に基づいて、Ｃｈｐ２－Ｍ１は、ヒト宿主においてカテーテルに形成されたステノトロホモナスを含むバイオフィルムをμｇ／ｍＬの濃度で根絶する可能性があると結論付けられた。

【０２８０】

実施例１０－ＮａＣｌレベル、ｐＨ、又は２価カチオンによって阻害されないＣｈｐペプチド

或る特定のＣｈｐペプチドを、生理学的ＮａＣｌレベル及びｐＨ値の範囲で評価し、様々な２価カチオンの存在下での活性について更に評価した。シュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２に対するＮａＣｌ（１４０ｍＭ）の存在下と不在下の両方で、ＣｈｐペプチドのＭＩＣ値を決定した（表３６）。以下の表３６に示すように、Ｕｎｐ３－Ｍ１を除いて、試験した全てのＣｈｐペプチドは、ＮａＣｌの存在下で４倍未満のＭＩＣ増加を示した。

【０２８１】

【表３６】

表３６

Ｃｈｐペプチド	CAA （ＮａＣｌを添加しない）	CAA + 140 mM NaCl	ＭＩＣの倍率変化
Chp1	1	1	1
Chp2	0.5	0.5	1
Chp4	0.5	0.5	1
Chp6	0.5	0.5	1
Chp10	0.5	2	4
Ecp1	0.5	2	4
Ecp2	0.25	2	8
Ecp3	0.5	2	4
Unp2	0.5	2	4
Agt1	2	8	4
Chp2-M1	0.125	0.5	4
Ecp1-M1	0.125	0.5	4
Chp4-M1	0.5	1	2
Chp6-M1	0.5	1	2
Chp10-M1	0.5	1	2
Unp2-M1	0.5	2	4
Unp3-M1	8	16	2
Spi2-M1	2	0.5	-4
Ecp3-M1	0.25	0.125	-2
Agt1-M1	1	4	4

【０２８２】

Ｃｈｐペプチドを、ｐＨレベルを変化させて更に評価した。ＭＩＣ値を、シュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２に対する１８種の異なるＣｈｐペプチドについて、ｐＨ６、ｐＨ７、及びｐＨ８で決定した。下記表３７に示すように、Ａｇｔ１及びＳｐｉ２－Ｍ１を除く全ての試験したＣｈｐペプチドは、ｐＨに関係なく４以下のＭＩＣ値を維持し、倍率変化は４未満であった。

【０２８３】

【表３７】

表３７

Ｃｈｐペプチド	MIC（μg/mL）			
	ＣＡＡ培地(pH 7)	pH 6	pH 7	pH 8
Chp1	1	0.5	1	1
Chp2	0.25	0.25	0.5	0.5
Chp4	0.5	0.25	0.5	1
Chp6	1	2	0.25	1
Chp10	0.5	2	1	1
Ecp1	0.5	1	1	1
Ecp3	1	2	2	2
Unp2	0.5	0.5	0.5	0.5
Agt1	4	8	16	8
Chp2-M1	0.125	0.25	0.25	0.25
Ecp1-M1	0.25	1	0.5	0.5
Chp4-M1	0.125	0.125	0.125	0.125
Chp6-M1	0.25	0.5	0.5	0.25
Chp10-M1	0.125	0.5	0.125	0.125
Unp2-M1	0.125	0.25	0.25	0.5
Spi2-M1	8	8	8	8
Ecp3-M1	0.25	1	0.5	0.5
Agt1-M1	1	4	4	4

【０２８４】

次に、Ｃｈｐペプチドを種々の２価カチオンの存在下で評価した。ＭＩＣを（１）カルシウムとマグネシウムの両方が存在しない状態、（２）２ｍＭ塩化カルシウムのみの存在下、（３）１ｍＭ硫酸マグネシウムのみの存在下、及び（４）２ｍＭ塩化カルシウムと１ｍＭ硫酸マグネシウムの両方の存在下で決定した。表３８に示すように、試験した全てのＣｈｐペプチドのＭＩＣ値は２以下であり、これは、２価カチオンの存在によって阻害されたＣｈｐペプチドがないことを示す。

【０２８５】

【表３８】

表３８

Ｃｈｐペプチド	MIC（μg/mL）			
	ＣＡＡ培地単独	ＣＡＡ培地+ 2 mM $CaCl_2$	ＣＡＡ培地+ 1 mM $MgSO_4$	ＣＡＡ培地+ 2 mM $CaCl_2$ + 1mM $MgSO_4$
Chp1	1	2	1	1
Chp2	0.5	0.25	0.5	0.25
Chp4	0.5	1	0.5	0.125
Chp6	1	0.5	1	1
Chp10	0.5	1	1	2
Ecp1	0.5	1	0.5	1
Ecp3	1	2	2	2
Unp2	0.25	0.25	0.25	0.5
Chp2-M1	0.25	0.25	0.25	0.25
Ecp1-M1	0.25	0.5	0.25	1
Chp4-M1	0.25	0.25	0.25	0.25
Chp6-M1	0.5	1	0.5	0.5
Chp10-M1	0.125	0.25	0.125	0.5
Unp2-M1	0.25	0.25	0.25	0.5
Ecp3-M1	0.25	1	0.25	1
Agt1-M1	2	2	2	2

【０２８６】

実施例１１－肺サーファクタントによって阻害されないＣｈｐペプチド

シュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２に対するＭＩＣ値を、２つの濃度（０．１９ｍｇ／ｍＬ及び０．７８ｍｇ／ｍＬ）の合成肺サーファクタントＳｕｒｖａｎｔａ（商標）の存在下及び不在下で決定した。試験したＳｕｒｖａｎｔａ（商標）濃度は、黄色ブドウ球菌（S. aureus）に対するダプトマイシン活性を阻害することが知られている。それにもかかわらず、表３９に報告されるように、Ｓｕｒｖａｎｔａ（商標）は、試験した各ＣｈｐペプチドのＭＩＣの４倍未満の変化によって示されるように、シュードモナス・エルギノーサに対するＣｈｐペプチド活性を阻害しなかった。

【０２８７】

【表３９】

表３９

Ｃｈｐペプチド	MIC（μg/mL）		
	ＣＡＡ培地単独	ＣＡＡ培地+ 0.78 mg/mL Survanta（商標）	ＣＡＡ培地+ 0.19 mg/mL Survanta（商標）
Chp1	1	2	2
Chp2	0.5	1	1
Chp4	0.5	0.5	0.5
Chp6	0.5	0.5	0.5
Chp10	0.5	0.5	0.5
Ecp1	0.5	0.5	0.5
Ecp3	0.5	0.5	0.5
Unp2	0.5	0.5	0.5
Chp2-M1	0.125	0.125	0.125
Ecp1-M1	0.125	0.125	0.125
Chp4-M1	0.25	0.25	0.25
Chp6-M1	0.5	0.5	0.5
Chp10-M1	0.25	0.25	0.25
Unp2-M1	0.5	2	0.25
Ecp3-M1	0.25	0.25	0.25
Agt1-M1	4	0.5	4

【０２８８】

Ｃｈｐ２－Ｍ１とＥｃｐ３－Ｍ１の両方の有効性を、Ｓｕｒｖａｎｔａ（商標）（１．５ｍｇ／ｍＬ）に懸濁したシュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２に対してＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色で評価した。１μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１００μｇ／ｍＬの様々な濃度のＣｈｐ２－Ｍ１又はＥｃｐ３－Ｍ１を懸濁液のサンプルに添加した。懸濁液を、Ｃｈｐ２－Ｍ１又はＥｃｐ３－Ｍ１で処理する１時間前、Ｃｈｐ２－Ｍ１又はＥｃｐ２－Ｍ１で処理した５分後、及びＣｈｐ２－Ｍ１又はＥｃｐ３－Ｍ１で処理した３０分後に評価した。サンプルを、明視野（ＢＦ）顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法（１０ミリ秒の露光）によって視覚化した。Ｓｙｔｏｘ　Ｇｒｅｅｎを使用して生細胞を標識し、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）を使用して損傷した細胞及び死んだ細胞を標識した。図４Ａ又は図４Ｂに示すように、Ｃｈｐ２－Ｍ１は、試験した全ての濃度で５分後（図４Ａ）及び３０分後（図４Ｂ）にシュードモナス・エルギノーサの急速な死滅を誘発した。同様に、図５Ａ又は図５Ｂに示すように、Ｅｃｐ３－Ｍ１は、試験した全ての濃度で５分後（図５Ａ）及び３０分後（図５Ｂ）にシュードモナス・エルギノーサの急速な死滅を誘発した。

【０２８９】

実施例１２－ＥＳＫＡＰＥ病原体を含む広範囲の細菌に対して活性なＣｈｐペプチド

上記の実施例３で検討した結果に加えて、幾つかのＣｈｐペプチドについて更なる試験を実施した。ＭＩＣ値を、シュードモナス・エルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、アシネトバクター・バウマンニ、エンテロバクター・クロアカエ、大腸菌、及びステノトロホモナス・マルトフィリアを含む様々な種に対して決定し、結果を下記表４０～表４５に示し、表中、ｎは各種について試験した分離株の数であり、ＭＩＣをμｇ／ｍＬとし

て測定する。良好な活性を、０から４以下の範囲のＭＩＣ（すなわち、４以下のＭＩＣ$_{100}$）に対応すると決定した。下記表４０～表４５に示すように、試験したＣｈｐペプチドの幾つかは、ＥＳＫＡＰＥ病原体（シュードモナス・エルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、アシネトバクター・バウマンニ、及びエンテロバクター・クロアカエを含む）、並びに大腸菌及びステノトロホモナス・マルトフィリアに対して良好な活性を実証した。

【０２９０】

【表４０】

表４０－シュードモナス・エルギノーサに対するＣｈｐペプチド活性

Ｃｈｐペプチド	n	MIC_{50}	MIC_{100}	範囲
Agt-1	12	>8	>8	>8
Agt1-M1	12	>8	>8	8->8
ALCES1	12	>8	>8	8->8
Avq1	12	4	8	0.25->8
Chp1	24	2	4	1-4
Chp2	25	1	1	0.25-1
Chp2-M1	65	0.25	0.5	0.0625-1
Chp4	24	1	1	0.5-1
Chp4-M1	12	0.5	0.5	0.125-0.5
Chp6	25	1	1	0.5-1
Chp6-M1	65	0.25	0.5	0.0625-1
Chp8	12	8	>8	1->8
Chp9	12	>8	>8	8->8
Chp10	24	4	8	0.5-8
Chp10-M1	24	0.25	0.5	0.25-0.5
Ecp1	12	4	>8	1->8
Ecp1-M1	65	0.25	0.5	0.0625-1
Ecp2	12	2	8	0.5-8
Ecp3	25	2	4	0.5-4
Ecp3-M1	25	0.5	1	0.125-1
Gkh1	12	8	>8	2->8
Gkh3	12	8	>8	2->8
Osp1	12	>8	>8	>8
Osp1-M1	12	>8	>8	>8
Spi1	12	4	8	2-8
Spi2	23	>8	>8	>8
Spi2-M1	23	>8	>8	2->8
Unp2	24	1	1	0.5-2
Unp2-M1	24	0.5	1	0.5-1
Unp3	12	>8	>8	8->8
Unp3-M1	12	>8	>8	4->8
Unp5	12	>8	>8	8->8

【０２９１】

【表４１】

表４１－クレブシエラ・ニューモニエに対するＣｈｐペプチド活性

Ｃｈｐペプチド	n	MIC_{50}	MIC_{100}	範囲
Agt-1	12	>8	>8	8->8
Agt1-M1	12	>8	>8	8->8
ALCES1	12	>8	>8	8->8
Avq1	12	1	1	0.5-1
Chp1	24	2	2	1-4
Chp2	25	0.5	1	0.125-1
Chp2-M1	50	0.25	0.5	0.0625-1
Chp4	12	1	1	0.5-1
Chp4-M1	24	0.5	0.5	0.25-1
Chp6	25	0.5	1	0.125-1
Chp6-M1	39	0.125	0.5	0.0625-1
Chp8	12	4	8	2-8
Chp9	12	>8	>8	>8
Chp10	24	0.25	0.5	0.125-0.5
Chp10-M1	24	0.25	1	0.125-1
Ecp1	12	1	2	1-2
Ecp1-M1	50	0.125	0.25	0.031-0.25
Ecp2	12	0.5	1	0.5-1
Ecp3	25	1	2	0.5-4
Ecp3-M1	25	0.25	0.5	0.0625-1
Gkh1	12	4	8	1-8
Gkh3	12	>8	>8	4->8
Osp1	12	>8	>8	>8
Osp1-M1	12	>8	>8	>8
Spi1	12	2	4	2-4
Spi2	12	>8	>8	>8
Spi2-M1	15	8	>8	0.5-8
Unp2	24	0.5	1	0.25-1
Unp2-M1	24	0.5	0.5	0.125-0.5
Unp3	12	>8	>8	>8
Unp3-M1	12	>8	>8	>8
Unp5	12	>8	>8	>8

【０２９２】

【表４２】

表４２－アシネトバクター・バウマンニに対するＣｈｐペプチド活性

Ｃｈｐペプチド	n	MIC_{50}	MIC_{100}	範囲
Agt-1	12	4	8	2-8
Agt1-M1	12	2	4	0.5-4
ALCES1	12	2	2	1-2
Avq1	12	0.25	0.5	0.25-0.5
Chp1	24	2	4	1-4
Chp2	24	0.5	0.5	0.25-1
Chp2-M1	19	0.125	0.25	<0.015-0.25
Chp4	16	0.5	1	0.25-1
Chp4-M1	24	0.5	1	0.25-1
Chp6	24	0.25	0.5	0.125-1
Chp6-M1	24	0.25	0.25	0.125-1
Chp8	12	0.5	1	0.25-2
Chp9	12	2	2	0.5-2
Chp10	12	0.5	0.5	0.25-0.5
Chp10-M1	24	0.5	0.5	0.06-1
Ecp1	23	0.5	1	0.125-2
Ecp1-M1	24	0.25	0.25	0.125-1
Ecp2	12	0.25	0.5	0.125-0.5
Ecp3	12	0.25	0.5	0.125-0.5
Ecp3-M1	24	0.25	0.5	0.125-1
Gkh1	12	0.5	1	0.25-2
Gkh3	12	0.5	1	0.25-1
Osp1	12	8	8	2-8
Osp1-M1	12	>8	>8	4->8
Spi1	12	1	1	1
Spi2	12	2	2	2-8
Spi2-M1	12	1	8	0.25-8
Unp2	24	0.5	0.5	0.25-1
Unp2-M1	24	0.5	1	0.25-2
Unp3	12	>8	>8	4->8
Unp3-M1	12	8	8	1-8
Unp5	12	4	8	1-8

【０２９３】

【表４３】

表４３－エンテロバクター・クロアカエに対するＣｈｐペプチド活性

Ｃｈｐペプチド	n	MIC_{50}	MIC_{100}	範囲
Agt-1	11	8	>8	4->8
Agt1-M1	11	4	4	4->8
ALCES1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Avq1	12	0.5	1	0.25-2
Chp1	11	2	4	2-4
Chp2	21	0.5	1	0.125-1
Chp2-M1	21	0.125	0.25	0.06-0.5
Chp4	21	0.5	1	0.25-2
Chp4-M1	21	0.25	0.5	0.25-5
Chp6	21	0.5	1	0.25-2
Chp6-M1	21	0.25	0.5	0.125-1
Chp8	11	2	4	1-8
Chp9	11	4	>8	2->8
Chp10	20	0.25	1	0.125-2
Chp10-M1	21	0.25	0.5	0.125-2
Ecp1	11	0.5	2	0.25-4
Ecp1-M1	21	0.0625	1	0.03-2
Ecp2	11	0.25	0.5	0.125-2
Ecp3	12	0.5	4	0.25-4
Ecp3-M1	21	0.25	0.5	0.125-0.5
Gkh1	11	1	2	0.5-8
Gkh3	11	4	4	1->8
Osp1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Osp1-M1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Spi1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Spi2	12	>8	>8	4->8
Spi2-M1	12	0.5	2	0.5-2
Unp2	21	0.25	0.5	0.25-2
Unp2-M1	21	0.25	0.5	0.25-1
Unp3	11	>8	>8	>8
Unp3-M1	11	>8	>8	>8
Unp5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

【０２９４】

【表４４】

表４４－大腸菌に対するＣｈｐペプチド活性

Ｃｈｐペプチド	n	MIC_{50}	MIC_{100}	範囲
Agt-1	11	8	>8	4->8
Agt1-M1	11	0.5	1	0.125-2
ALCES1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Avq1	23	0.5	2	0.06-4
Chp1	23	2	4	1-4
Chp2	23	0.5	2	0.25-2
Chp2-M1	23	0.03125	0.25	<0.015-0.25
Chp4	23	1	2	0.5-4
Chp4-M1	23	0.25	0.25	0.06-1
Chp6	23	0.5	1	0.25-2
Chp6-M1	23	0.25	0.5	<0.015-0.5
Chp8	11	2	4	0.5-4
Chp9	11	2	8	0.5-8
Chp10	23	0.5	1	0.03-0.2
Chp10-M1	23	0.0625	0.5	0.0312-0.5
Ecp1	11	0.5	2	0.25-4
Ecp1-M1	23	0.03	0.125	<0.015-0.125
Ecp2	11	0.5	1	0.24-4
Ecp3	11	1	2	0.125-8
Ecp3-M1	23	0.125	0.25	0.03-0.5
Gkh1	11	2	2	0.5-8
Gkh3	11	1	4	0.5-8
Osp1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Osp1-M1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Spi1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Spi2	11	4	>8	0.25->8
Spi2-M1	11	0.125	0.25	0.0625-1
Unp2	23	0.25	1	0.125-1
Unp2-M1	23	0.125	0.5	0.125-0.5
Unp3	11	>8	>8	4->8
Unp3-M1	11	1	4	0.5-8
Unp5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

【０２９５】

【表４５】

表４５－ステノトロホモナス・マルトフィリアに対するＣｈｐペプチド活性

Ｃｈｐペプチド	n	MIC_{50}	MIC_{100}	範囲
Agt-1	12	>8	>8	8->8
Agt1-M1	12	>8	>8	8->8
ALCES1	11	4	8	2->8
Avq1	11	1	4	0.5->8
Chp1	17	2	4	1-8
Chp2	17	0.5	1	0.5-1
Chp2-M1	17	0.5	0.5	0.125-2
Chp4	17	0.5	2	0.5-8
Chp4-M1	17	0.5	0.5	0.25-1
Chp6	17	0.5	1	0.25-1
Chp6-M1	17	0.5	0.5	0.125-2
Chp8	12	>8	>8	4->8
Chp9	12	>8	>8	8->8
Chp10	12	8	>8	2->8
Chp10-M1	17	1	8	0.5-8
Ecp1	12	8	>8	2->8
Ecp1-M1	17	0.5	2	0.125-2
Ecp2	12	8	>8	1->8
Ecp3	17	4	>8	1->8
Ecp3-M1	17	1	4	0.5->8
Gkh1	12	>8	>8	4->8
Gkh3	12	8	>8	2->8
Osp1	11	>8	>8	>8
Osp1-M1	11	>8	>8	>8
Spi1	11	2	2	2->8
Spi2	12	>8	>8	>8
Spi2-M1	12	>8	>8	4->8
Unp2	17	0.5	1	0.25-2
Unp2-M1	17	1	1	0.125-2
Unp3	12	>8	>8	>8
Unp3-M1	12	>8	>8	8->8
Unp5	11	>8	>8	>8

【０２９６】

データに基づいて、以下の１３種のＣｈｐペプチドは、シュードモナス・エルギノーサ、クレブシエラ・ニューモニエ、アシネトバクター・バウマンニ、エンテロバクター・クロアカエ、及び大腸菌の全てに対して良好な活性を示したことが注目される：Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ６、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｃｈｐ１０、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、Ｅｃｐ１－Ｍ１、Ｅｃｐ３、Ｅｃｐ３－Ｍ１、Ｕｎｐ２、及びＵｎｐ２－Ｍ１。さらに、これらの１３種のＣｈｐペプチドのうち、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ６、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｅｃｐ１－Ｍ１、Ｅｃｐ３－Ｍ１、Ｕｎｐ２、及びＵｎｐ２－Ｍ１がステノトロホモナス・マルトフィリアに対して同様に活性であることが注目された。さらに、アシネトバクター・バウマンニは、試験された種々のＣｈｐペプチドの最も広い範囲に感受性があった。

【０２９７】

試験した他の細菌種の中で、Ｃｈｐ２（ｎ＝１２）、Ｃｈｐ４（ｎ＝１２）、及びＵｎｐ２（ｎ＝１２）は、アクロモバクター・キシロソキシダンス（Achromobacter xylosoxidans）に対して陽性活性（ＭＩＣ≦４）を示した。Ｃｈｐ２（ｎ＝１）及びＣｈｐ４－Ｍ１（ｎ＝１）は、バークホルデリア・アンシナ（Burkholderia anthina）に対して陽性活性（ＭＩＣ≦４）を示した。Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４、Ｃｈｐ６、Ｃｈｐ６

－Ｍ１、Ｅｃｐ１－Ｍ１、Ｅｃｐ３－Ｍ１、及びＳｐｉ１－Ｍ１（全てｎ＝２）は、セラチア・マルセセンス（Serratia marcescens）に対して陽性活性（ＭＩＣ≦４）を示した。次のＣｈｐペプチドは、バークホルデリア・セノセパシア（Burkholderia cenocepacia）に対して陽性活性（ＭＩＣ≦４）を示した：Ａｇｔ１－Ｍ１、Ｍｓｅ１、Ａｖｑ１、Ｃｈｐ１、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ６、Ｃｈｐ６－Ｍ１、Ｃｈｐ８、Ｃｈｐ９、Ｃｈｐ１０、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、Ｅｃｐ１、Ｅｃｐ１－Ｍ１、Ｅｃｐ２、Ｅｃｐ３、Ｅｃｐ３－Ｍ１、Ｇｋｈ１、Ｓｐｉ１、Ｕｎｐ２、及びＵｎｐ２－Ｍ１。

【０２９８】

実施例１３－カルバペネム耐性分離株に対して活性なＣｈｐペプチド

分離された７種の異なるカルバペネム耐性菌を様々なＣｈｐペプチドを用いて試験し、ペプチドのＭＩＣを測定して表４６にμｇ／ｍＬとして示した。下記表４６に示すように、Ｃｈｐペプチドの幾つかは、カルバペネム耐性株に対して良好な活性（ＭＩＣ≦４）を示した。メロペネムのＭＩＣ値を、表４６で分析された各株の括弧内に示す。

【０２９９】

【表４６】

表４６－カルバペネム耐性分離株に対するＣｈｐペプチド活性

Ｃｈｐペプチド	PA19 (MIC 32)	PA20 (MIC 16)	PA21 (MIC 32)	PA22 (MIC 16)	PA23 (MIC 8)	PA24 (MIC 32)	WLC-452 (MIC 16)
Agt1	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8
Agt-M1	8	>8	>8	>8	>8	>8	4
Mse1	8	>8	>8	>8	>8	>8	8
Avq1	0.25	8	8	>8	4	4	0.5
Chp1	2	4	4	4	4	4	2
Chp2	0.5	1	1	1	1	1	0.5
Chp2-M1	0.0625	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25
Chp4	0.5	1	1	1	1	1	0.5
Chp4-M1	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25
Chp6	0.5	1	1	1	1	1	0.25
Chp6-M1	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Chp8	1	>8	>8	>8	>8	8	4
Chp9	8	>8	>8	>8	>8	>8	8
Chp10	0.5	8	8	8	4	4	1
Chp10-M1	0.5	0.5	0.5	1	1	0.5	0.0625
Ecp1	1	>8	>8	8	4	4	2
Ecp1-M1	0.0625	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.25
Ecp2	0.5	8	8	4	2	2	1
Ecp3	0.5	4	4	4	2	2	1
Ecp3-M1	0.125	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5
Gkh1	2	>8	>8	>8	>8	8	2
Gkh3	2	>8	>8	>8	8	8	2
Osp1	>8	>8	>8	>8	>8	>8	8
Osp1-M1	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8
Spi1	2	4	8	4	8	4	2
Spi2	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8
Spi2-M1	>8	>8	8	>8	>8	8	4
Unp2	0.5	1	2	1	1	1	0.5
Unp2-M1	0.5	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5
Unp3	8	>8	>8	>8	>8	>8	>8
Unp3-M1	4	>8	>8	>8	>8	>8	>8
Unp5	8	>8	>8	>8	>8	>8	>8

【０３００】

実施例１４－動物血清におけるＣｈｐペプチド活性

動物血清におけるシュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２に対する幾つかのＣｈｐペプチドの活性を評価した。ＭＩＣをマウス、ラット、ウサギ及びヒトの血清（それぞれ１２．５％）、並びにＣＡＡの存在下で測定し、結果を下記表４７に示す。ラット、マウス、及びウサギの血清をいずれも、プールされたジェンダーサンプル（ｇｅｎｄｅｒ ｓａｍｐｌｅ）から得た。ヒト血清と比較して８倍以下のＭＩＣの増加は、シュードモナス・エルギノーサに対する十分な活性を示し、ｉｎ ｖｉｖｏでの有効性研究のための種の特定に役立つ可能性がある。

【０３０１】

【表４７】

表４７－マウス、ラット、ウサギ及びヒトの血清におけるＣｈｐペプチド活性

Ｃｈｐペプチド	MIC（μg/mL）				
	ＢＡＬＢ／Ｃマウス血清	Ｓｐｒａｇｕｅ Ｄａｗｌｅｙラット血清	ニュージーランドホワイトウサギ血清	CAA	ヒト血清
Chp2	32	2	2	0.5	0.5
Chp4	32	2	2	0.5	0.5
Chp6	32	4	4	1	1
Chp10	32	4	4	1	1
Ecp3	>32	8	8	0.5	0.5
Unp2	>32	8	4	0.5	0.5
Chp2-M1	4	1	0.5	0.125	0.125
Ecp1-M1	4	1	1	0.125	0.125
Chp4-M1	4	1	0.25	0.25	0.25
Chp6-M1	8	1	1	0.5	0.5
Chp10-M1	2	0.5	0.5	0.25	0.25
Unp2-M1	8	1	1	0.25	0.5
Ecp3-M1	4	4	2	0.25	0.25

【０３０２】

結果は、ラット及びウサギの血清が同等のレベルの活性を支持し、ヒトの血清と類似していることを示す。しかしながら、マウスの血清は、ラット、ウサギ、及びヒトで観察されたものよりも数倍高かった。

【０３０３】

Ｃｈｐ２－Ｍ１とＥｃｐ３－Ｍ１の両方の有効性を、１００％ヒト血清に懸濁したシュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２に対してＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色で評価した。１μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１００μｇ／ｍＬの様々な濃度のＣｈｐ２－Ｍ１又はＥｃｐ３－Ｍ１を懸濁液のサンプルに添加した。懸濁液を、Ｃｈｐ２－Ｍ１又はＥｃｐ３－Ｍ１で処理する１時間前、Ｃｈｐ２－Ｍ２又はＥｃｐ２－Ｍ１で処理した５分後、及びＣｈｐ２－Ｍ１又はＥｃｐ３－Ｍ１で処理した３０分後に評価した。サンプルを、ＢＦ顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法（１０ミリ秒の露光）によって視覚化した。Ｓｙｔｏｘ Ｇｒｅｅｎを使用して生細胞を標識し、ＰＩを使用して損傷した細胞及び死んだ細胞を標識した。図６Ａ又は図６Ｂに示すように、Ｃｈｐ２－Ｍ１は、試験した全ての濃度で５分後（図６Ａ）及び３０分後（図６Ｂ）にシュードモナス・エルギノーサの急速な死滅を誘発した。同様に、図７Ａ又は図７Ｂに示すように、Ｅｃｐ３－Ｍ１は、試験した全ての濃度で５分後（図７Ａ）及び３０分後（図７Ｂ）にシュードモナス・エルギノーサの急速な死滅を誘発した。

【０３０４】

実施例１５－自然耐性

自然耐性を、Drago, et al. In vitro selection of resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with β-lactams and amikacin, J. ANTIMICROB.

CHEMOTHERAPY. 2005; 56(2):353-359、及びRodriguez-Rojas et al., Frequency of Spontaneous Resistance to Fosfomycin Combined with Different Antibiotics in Pseudomonas aeruginosa, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 2010; 54(11):4948-49に記載されるように評定した。

【０３０５】

対数増殖期後期のシュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ－１２９２を、Ｃｈｐペプチド又は抗生物質（シプロフロキサシン又はトブラマイシン）を４倍のＭＩＣで添加したＣＡＡ培地にプレーティングした。自然耐性の頻度は、４８時間後の耐性コロニーの数を、選択がない場合の定量的プレーティングによって決定されたＣＦＵの総数で割ることによって計算した。以下の表４８に示すように、試験した全てのＣｈｐペプチドは、自然耐性の傾向が低かった。

【０３０６】

【表４８】

表４８－Ｃｈｐペプチドの自然耐性

Ｃｈｐペプチド又は抗生物質	MIC(μg/mL)	突然変異頻度
Chp2	0.25	<1.25E-09
Chp2-M1	0.125	<1.25E-09
Chp4-M1	0.125	<1.25E-09
Chp6-M1	0.25	<1.25E-09
Chp10-M1	0.0625	<1.25E-09
Ecp3-M1	0.125	<1.25E-09
Unp2-M1	0.125	<1.25E-09
シプロフロキサシン	0.5	6.25E-08
トブラマイシン	0.0625	3.85E-09

【０３０７】

実施例１６－連続継代研究

シュードモナス・エルギノーサ株ＣＦＳ１２９２を用いて、２１日間にわたって７種のＣｈｐペプチド及び２種の抗生物質（２連）に対して２倍希釈連続継代研究を行った。継代培養のＭＩＣを、０日目～９日目に毎日測定し、未処理の対照と比較した。結果を下記表４９及び表５０に示す。表４９に示すように、９日目の時点で、試験した７種のＣｈｐペプチドのいずれのＭＩＣ値にも有意な変化は観察されなかったが、シプロフロキサシンはＭＩＣの４倍の増加を示した。表５０に示すように、２１日後、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ４－Ｍ１、Ｃｈｐ６－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１はいずれもＭＩＣ値に有意な変化を示さなかったが、Ｅｃｐ３－Ｍ１及びＵｎｐ２－Ｍ１はＭＩＣの２倍の増加を示した。シプロフロキサシンとトブラマイシンの両方が２１日後にＭＩＣ値の有意な増加を示し、これらの抗生物質の自然耐性の比較的高い傾向を証明した。

【０３０８】

【表４９】

表４９－９日間にわたるＣｈｐペプチドの連続継代ＭＩＣ（μｇ／ｍＬ）

Ｃｈｐペプチド又は抗生物質	０日目	１日目	２日目	３日目	４日目	５日目	６日目	７日目	８日目	９日目
Chp2 (1)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Chp2 (2)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Chp2 (未処理)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Chp2-M1 (1)	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625
Chp2-M1 (2)	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	0.125	0.125	0.125	.0625
Chp2-M1 (未処理)	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	0.125	0.125	0.125	0.125
Chp4-M1 (1)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Chp4-M1 (2)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Chp4-M1 未処理	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Chp6-M1 (1)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25	0.125
Chp6-M1 (2)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25	0.125
Chp6-M1 (未処理)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25	0.125
Chp10-M1 (1)	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625
Chp10-M1 (2)	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625
Chp10-M1 (未処理)	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625	.0625
Ecp3-M1 (1)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25
Ecp3-M1 (2)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25
Ecp3-M1 (未処理)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Unp2-M1 (1)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25
Unp2-M1 (2)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25
Unp2-M1 (未処理)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25
イミペネム (1)	8	8	8	16	16	16	16	16	16	8
イミペネム (2)	8	8	8	16	16	16	16	16	16	8
イミペネム (未処理)	8	8	8	16	16	16	8	8	8	8
Cipro (1)	0.25	0.25	0.25	1	1	1	1	1	1	2
Cipro (2)	0.25	0.25	0.25	1	1	1	2	2	2	2
Cipro (未処理)	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

【０３０９】

【表５０】

表５０－２１日間にわたるＣｈｐペプチドの連続継代ＭＩＣ（μｇ／ｍＬ）

作用物質	MIC（μg/mL）	
	０日目	２１日目
Chp2（1）	0.25	0.25
Chp2（2）	0.25	0.25
Chp2-M1（1）	0.125	0.125
Chp2-M1（2）	0.125	0.125
Chp4-M1（1）	0.125	0.125
Chp4-M1（2）	0.125	0.125
Chp6-M1（1）	0.25	0.25
Chp6-M1（2）	0.25	0.25
Chp10-M1（1）	0.0625	0.0625
Chp10-M1（2）	0.0625	0.0625
Ecp3-M1（1）	0.125	0.25
Ecp3-M1（2）	0.125	0.25
Unp2-M1（1）	0.125	0.25
Unp2-M1（2）	0.125	0.25
Cipro（1）	0.5	16
Cipro（2）	0.5	8
Tobra（1）	0.125	32
Tobra（2）	0.125	4

【０３１０】

Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、シプロフロキサシン、及びトブラマイシンのシュードモナス・エルギノーサに対する耐性の低下しやすさの可能性を調査するために、スポット希釈アッセイも実施した。シュードモナス・エルギノーサ（ＣＦＳ　１２９２）をＣＡＡ寒天培地にプレーティングし、プレートの中央に１ｍｇ／ｍＬの試験される作用物質２５μＬをスポットした。次いで、プレートを２４℃で２日間インキュベートし、透明帯を観察した。透明帯内又は周辺のいずれかに形成されたコロニーを継代培養（３回）し、ＭＩＣ値を試験した。次いで、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１の結果として得られたコロニーを、抗菌耐性を発現する傾向を調査するために、４回の追加の連続継代（合計５継代）の種菌として使用した。下記表５１は、未処理の対照、透明帯の周辺、及び透明帯の中央で試験した作用物質のＭＩＣを示す。太字の値は、その後４回の連続継代に供したコロニーを示し、その結果を下記表５２に示す。

【０３１１】

【表５１】

表５１－スポット希釈アッセイにおける作用物質のＭＩＣ（μｇ／ｍＬ）

作用物質	MIC（μg/mL）		
	未処理対照	周辺	中央
Chp2	0.25	**0.25**	増殖なし
Chp2-M1	0.125	**0.125**	増殖なし
Chp4-M1	0.125	0.125	**0.125**
Chp6-M1	0.25	**0.25**	増殖なし
Chp10-M1	0.0625	**0.0625**	増殖なし
Ecp3-M1	0.125	0.125	**0.125**
Unp2-M1	0.25	0.25	**0.25**
シプロフロキサシン	0.5	2	**2**
トブラマイシン	0.125	0.5	**0.5**

【０３１２】

【表５２】

表５２－Ｃｈｐペプチドの連続継代

作用物質	継代、ＭＩＣ（μg/mL）				
	継代＃１	継代＃２	継代＃３	継代＃４	継代＃５
Chp2 (1)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Chp2 (2)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
未処理	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Chp2-M1 (1)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Chp2-M1 (2)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
未処理	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Chp10-M1 (1)	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
Chp10-M1 (2)	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
未処理	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
Cipro (1)	2	2	2	4	4
Cipro (2)	2	2	4	4	4
未処理	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Tobra (1)	0.5	0.5	0.5	0.5	1
Tobra (2)	0.5	0.5	0.5	0.5	1
未処理	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125

【０３１３】

表５２の結果は、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１が耐性の傾向を示さなかったことを実証する。

【０３１４】

実施例１７－ＣＤＣ耐性パネルからのグラム陰性細菌分離株に対するＣｈｐペプチド活性

ＭＩＣ値を、上記の方法論、すなわちＣＬＳＩによって定義される標準的な微量液体希釈参照法を使用して決定した。本明細書で使用される場合、ＭＩＣは、対照と比較して細菌増殖の少なくとも８０％を抑制するのに十分なペプチドの最小濃度であり、一方、MIC_{50}は、対照と比較して細菌の増殖を少なくとも５０％を抑制するのに十分なペプチドの最小濃度であり、MIC_{90}は、対照と比較して細菌の増殖を少なくとも５０％抑制するのに十分なペプチドの最小濃度である。

【０３１５】

疾病対策センターの株リストから、５種の異なる抗生物質耐性分離株バンクパネルを選択した。具体的には、４１種のアシネトバクター・バウマンニ分離株及び５５種のシュードモナス・エルギノーサ分離株の２つのパネルを、感染症の治療に使用される薬物の抗微生物感受性の結果の多様性を表すために選択した。株は、例えば、アシネトバクター・バウマンニ分離株及びシュードモナス・エルギノーサ分離株について、wwwn.cdc.gov/ARIsolateBank/Panel/PanelDetail?ID=1及びwwwn.cdc.gov/ARIsolateBank/Panel/PanelDetail?ID=12にそれぞれ記載される。

【０３１６】

さらに、５３種のカルバペナマーゼ産生腸内細菌科分離株の第３のパネルを、種の多様性及びカルバペネマーゼを表すために選択した。wwwn.cdc.gov/ARIsolateBank/Panel/PanelDetail?ID=8を参照されたい。

【０３１７】

また、イミペネム及びレレバクタムに対する感受性が異なる２８種のグラム陰性細菌の第４のパネル（wwwn.cdc.gov/ARIsolateBank/Panel/PanelDetail?ID=1034を参照されたい）も選択した。最後に、新規抗生物質耐性を有すると同定された１７種の分離株のうち１１種の第５のパネルを選択し、ここでは抗生物質耐性は新たな耐性メカニズム又は表現型に基づき得る。wwwn.cdc.gov/ARIsolateBank/Panel/PanelDetail?ID=10を参照されたい。得られたデータを下記表５３～表５７に要約する。

【０３１８】

【表５３】

表５３－アシネトバクター・バウマンニパネル（ｎ＝４１）

ＣＤＣ抗生物質耐性バンク番号	MIC			ＣＤＣ抗生物質耐性バンク番号	MIC		
	Chp2	Chp2-M1	Chp10-M1		Chp2	Chp2-M1	Chp10-M1
0273	1	0.5	0.25	0294	0.5	0.5	0.25
0274	0.5	0.5	0.5	0295	1	0.5	0.25
0275	0.5	0.5	0.25	0296	0.5	0.5	0.125
0276	0.5	0.5	1	0297	1	0.5	0.25
0277	0.5	0.25	0.125	0298	0.5	0.5	0.125
0278	1	0.5	0.25	0299	1	0.5	0.25
0279	1	0.5	0.25	0300	2	1	0.25
0280	1	0.5	0.25	0301	1	1	0.25
0281	1	0.5	0.25	0302	1	1	0.25
0282	0.5	0.5	0.5	0303	1	1	0.25
0283	1	0.5	0.25	0304	0.5	0.5	0.25
0284	0.5	0.25	0.125	0305	0.5	0.5	0.125
0285	0.5	0.5	0.25	0306	0.5	1	0.5
0286	1	0.5	0.25	0307	1	1	0.5
0287	0.5	0.5	0.25	0308	1	1	0.5
0288	0.25	0.125	0.03125	0309	1	1	0.5
0289	0.5	0.5	0.25	0310	0.5	1	0.25
0290	0.5	0.5	0.25	0311	0.5	0.5	0.25
0291	0.5	0.5	0.25	0312	0.5	0.5	0.125
0292	0.5	0.5	0.25	0313	0.5	0.5	0.125
0293	0.5	0.5	0.5				

【０３１９】

【表５４】

表５４－シュードモナス・エルギノーサパネル（ｎ＝５５）

ＣＤＣ抗生物質耐性バンク番号	MIC			ＣＤＣ抗生物質耐性バンク番号	MIC		
	Chp2	Chp2-M1	Chp10-M1		Chp2	Chp2-M1	Chp10-M1
0229	0.5	0.5	0.25	0257	1	0.5	0.125
0230	0.5	0.5	0.5	0258	2	1	0.25
0231	0.5	0.5	0.5	0259	1	1	0.25
0232	0.5	0.5	0.25	0260	0.5	0.5	0.25
0233	0.5	0.25	0.125	0261	1	1	0.25
0234	0.5	0.5	0.25	0262	1	1	0.25
0235	0.5	0.5	0.5	0263	1	0.25	0.25
0236	0.5	0.5	0.125	0264	1	0.5	0.125
0237	0.5	0.5	0.125	0265	1	1	0.5
0238	0.5	1	0.25	0266	1	1	1
0239	1	0.5	0.25	0267	1	1	0.5
0240	1	0.5	0.25	0268	1	1	0.5
0241	1	0.5	0.25	0269	1	1	1
0242	0.5	1	0.125	0270	0.5	1	0.125
0243	0.5	0.25	0.03125	0271	1	1	0.5
0244	1	0.5	0.25	0272	1	1	0.5
0245	0.5	0.5	0.25	0763	1	0.5	0.0625
0246	1	1	0.5	0764	1	0.5	0.0625
0247	1	1	0.25	0765	1	0.5	0.0625
0248	1	1	0.25	0766	1	0.5	0.0313
0249	1	1	0.25	0767	1	1	0.5
0250	1	1	0.25	0768	0.5	0.0313	0.0313
0251	1	1	0.25	0769	1	1	0.5
0252	1	0.5	0.25	0770	1	1	0.25
0253	1	0.5	0.125	0771	1	1	0.5
0254	1	1	0.5	0772	1	1	0.125
0255	1	1	0.5	0773	1	1	0.5
0256	1	1	0.125				

【０３２０】

【表５５】

表５５－カルバペナマーゼ腸内細菌科パネル（ｎ＝５３）

ＣＤＣ抗生物質耐性バンク番号	生物	MIC		
		Chp2	Chp2-M1	Chp10-M1
0112	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.5	0.5
0113	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.5	0.25
0114	大腸菌	0.5	0.25	0.125
0115	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.5	0.5
0116	シトロバクター・フロウンディ	0.5	0.125	0.125
0117	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.125
0118	大腸菌	0.5	0.25	0.0625
0119	大腸菌	0.5	0.25	0.0625
0120	クレブシエラ・ニューモニエ	0.25	0.25	0.5
0121	セラチア・マルセセンス	>8	>8	>8
0122	セラチア・マルセセンス	>8	>8	>8
0123	セラチア・マルセセンス	>8	>8	>8
0124	セラチア・マルセセンス	>8	>8	>8
0125	クレブシエラ・ニューモニエ	1	1	0.5
0126	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.5	0.125
0127	サルモネラ・センフテンベルク	0.5	0.5	0.125
0128	大腸菌	0.5	0.25	0.0625
0129	クレブシエラ・ニューモニエ	1	1	0.5
0130	セラチア・マルセセンス	>8	>8	>8
0131	セラチア・マルセセンス	>8	>8	>8
0132	エンテロバクター・クロアカエ群	1	1	1
0133	モルガネラ・モルガニ	ng	ng	ng
0134	ラウルテラ・オルニチノリチカ	1	0.25	0.25
0135	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.0625
0136	エンテロバクター・クロアカエ	0.5	0.25	0.25
0137	大腸菌	0.25	0.25	0.0625
0138	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.125
0139	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.25	0.125
0140	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.0625
0141	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.0625
0142	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.0625
0143	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.5	0.0625
0144	クライベラ・アスコルバータ	0.25	0.25	0.125
0145	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.5	0.25
0146	クレブシエラ・ニューモニエ	1	1	0.5
0147	クレブシエラ・オキシトカ	1	0.25	0.25
0148	クレブシエラ・ニューモニエ	1	1	0.5
0149	大腸菌	0.5	0.25	0.03125
0150	大腸菌	0.25	0.125	0.03125
0151	大腸菌	0.25	0.125	0.0625
0152	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.5	0.25
0153	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.0625
0154	エンテロバクター・クロアカエ	0.25	0.25	0.0625
0155	プロテウス・ミラビリス	0.25	0.5	0.0625
0156	プロテウス・ミラビリス	0.5	1	0.25
0157	シトロバクター・フロウンディ	0.5	0.25	0.125
0158	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.0625
0159	プロテウス・ミラビリス	0.25	1	0.25
0160	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.5	0.25
0161	エンテロバクター・アエロゲネス	2	0.25	0.0625
0162	大腸菌	0.25	0.25	0.03125
0163	エンテロバクター・クロアカエ	0.25	0.125	0.0625
0164	エンテロバクター・クロアカエ複合体	1	0.25	0.125

【０３２１】

【表５６】

表５６－イミペネム／レレバクタムパネル（ｎ＝２８）

ＣＤＣ抗生物質耐性バンク番号	生物	MIC		
		Chp2	Chp2-M1	Chp10-M1
0501	エンテロバクター・クロアカエ	0.5	0.25	0.25
0502	エンテロバクター・クロアカエ	0.5	0.25	0.25
0504	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.25
0505	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.25	0.5
0506	クレブシエラ・ニューモニエ	1	0.5	2
0507	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.25
0508	シュードモナス・エルギノーサ	1	0.5	0.125
0509	シュードモナス・エルギノーサ	1	1	0.5
0510	シュードモナス・エルギノーサ	0.5	0.5	0.25
0511	シュードモナス・エルギノーサ	0.5	0.5	0.125
0512	シュードモナス・エルギノーサ	1	0.5	0.25
0513	シュードモナス・エルギノーサ	0.5	0.5	0.25
0514	シュードモナス・エルギノーサ	1	0.5	0.125
0515	シュードモナス・エルギノーサ	0.5	0.5	0.25
0516	シュードモナス・エルギノーサ	0.5	0.5	0.25
0517	セラチア・マルセセンス	>8	8	>8
0518	シュードモナス・エルギノーサ	1	0.5	0.125
0519	モルガネラ・モルガニ	ng	ng	ng
0520	セラチア・マルセセンス	>8	>8	>8
0521	セラチア・マルセセンス	>8	4	>8
0522	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.5	0.25
0523	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.125
0524	クレブシエラ・ニューモニエ	1	1	0.5
0525	クレブシエラ・ニューモニエ	1	1	0.25
0526	シュードモナス・エルギノーサ	2	1	0.5
0527	シュードモナス・エルギノーサ	1	0.5	0.125
0528	シュードモナス・エルギノーサ	1	1	0.25
0529	シュードモナス・エルギノーサ	0.5	0.5	0.125

【０３２２】

【表５７】

表５７－新規抗生物質耐性パネル（ｎ＝１１）

ＣＤＣ抗生物質耐性バンク番号	生物	MIC		
		Chp2	Chp2-M1	Chp10-M1
0346	大腸菌	0.25	0.25	0.03125
0347	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.5	0.25
0348	大腸菌	0.5	0.125	0.03125
0349	大腸菌	1	0.125	0.0156
0350	大腸菌	1	0.25	0.03125
0493	大腸菌	0.5	0.25	0.03125
0494	大腸菌	1	0.125	0.03125
0495	大腸菌	1	0.135	0.03125
0497	クレブシエラ・ニューモニエ	0.5	0.25	0.0625
0538	大腸菌	1	0.25	0.03125
0637	シトロバクター・フロウンディ	1	0.25	0.125

【０３２３】

表５３に要約されるアシネトバクター・バウマンニパネルの場合、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１のＭＩＣ$_{50}$はそれぞれ０．５、０．５及び０．２５であり、ＭＩＣ$_{90}$はそれぞれ１、１及び０．５であった。表５４に要約されるシュードモナ

ス・エルギノーサパネルの場合、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１及びＣｈｐ１０－Ｍ１のＭＩＣ$_{50}$はそれぞれ１、１及び０．２５であり、ＭＩＣ$_{90}$はそれぞれ１、１及び０．５であった。表５５に要約されるカルバペナマーゼ腸内細菌科パネルの場合、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１のＭＩＣ$_{50}$はそれぞれ０．５、０．２５及び０．１２５であり、ＭＩＣ$_{90}$はそれぞれ１、１及び０．５であった。表５６に要約されるイミペネム／レレバクタムパネルの場合、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１及びＣｈｐ１０－Ｍ１のＭＩＣ$_{50}$はそれぞれ０．５、０．５及び０．２５であり、ＭＩＣ$_{90}$はそれぞれ１、１及び０．５であった。表５７に要約される新規抗生物質耐性パネルの場合、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１及びＣｈｐ１０－Ｍ１のＭＩＣ$_{50}$はそれぞれ０．５、０．１２５及び０．０３１３であり、ＭＩＣ$_{90}$はそれぞれ１、０．２５及び０．１２５であった。

【０３２４】

結果は、様々な標準治療抗生物質に対して抗生物質耐性を示す様々な細菌株が、それにもかかわらず、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１を含む、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドに対して非常に感受性が高いことを立証する。

【０３２５】

実施例１８－Ｃｈｐペプチドによるエンドトキシン中和

ポリグリカン及びエンドトキシンとしても知られるリポ多糖（ＬＰＳ）は、グラム陰性細菌の外膜全体に広く存在する。ＬＰＳは炎症性サイトカインの発現を刺激することができる。或る特定のアムリンペプチドは、抗菌活性に加えて、ＬＰＳに結合して中和する能力も示す。例えば、ＬＬ－３７とコリスチンはどちらもＬＰＳに強く結合する。例えば、Rosenfeld et al., Endotoxin (Lipopolysaccharide) Neutralization by Innate Immunity Host-Defense Peptides, J. BIO. CHEM. 2005; 281(3):1636-1643、及びMohamed et al., A short D-enantiomeric antimicrobial peptide with potent immunomodulatory and antibiofilm activity against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii, SCIENTIFIC REPORTS 2017; 6953(7):1-13を参照されたい。ＬＰＳに結合し、その毒性効果を中和する分子は臨床応用できる可能性があるため、本明細書に開示されるＣｈｐペプチドの能力を評価して、ＬＰＳへのそれらの結合能を決定した。

【０３２６】

ｉｎ ｖｉｔｒｏカブトガニ血球抽出成分（ＬＡＬ）酵素アッセイを使用して、ＣｈｐペプチドであるＣｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１がＬＰＳに結合し、ＬＰＳによるＬＡＬ酵素の活性化及び発色レポーターの下流切断を阻害する能力を調べた。

【０３２７】

Mohamed et al., 2017及びRoberts et al., In Vitro Evaluation of the Interaction of Dextrin-Colistin Conjugates with Bacterial Lipopolysaccharide, J. MED. CHEM. 2016; 59:647-654に記載されるプロトコルを使用し、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｃ Ｅｎｄｏｔｏｘｉｎ Ｑｕａｎｔ Ｋｉｔ（Thermo Fisher Scientific）を使用してエンドトキシン中和を評価したことを除いて、コリスチン、ＬＬ－３７、及びＣｈｐ５を対照として使用した。具体的には、ＬＰＳを、指定される濃度範囲（０．１２５μｇ／ｍＬ～６４μｇ／ｍＬ）のＣｈｐペプチド又は対照ペプチドを含むパイロジェンフリー水（０．８ＥＵ／ｍＬ、ＥＵはエンドトキシン単位を示し、１ＥＵは約０．１ｎｇ～０．２ｎｇエンドトキシン／ｍＬ溶液に相当）に溶解した。標準の参照サンプルは、パイロジェンフリー水に溶解したＬＰＳのみを含んだ。溶液を十分に混合し、２４℃で１時間インキュベートし、エンドトキシンを定量的に検出するための製造業者の試験手順に従った。表５８は、Ｃｈｐペプチド及び対照ペプチドの投与量を増やしたときに観察されたＬＰＳ結合のパーセンテージを示す。

【０３２８】

【表５８】

表５８－ＬＰＳのＣｈｐペプチド結合

ペプチド濃度（μg/mL）	結合したＬＰＳ％					
	Chp2	Chp2-M1	Chp10-M1	Chp5	コリスチン	LL-37
0.125	74.4	60.5	49.8	2.8	10.5	61.7
0.25	57.9	50.6	35.1	6.0	14.8	88.7
0.5	28.7	27.5	13.3	0.1	22.5	90.6
1	28.0	18.3	7.5	0.1	51.9	92.2
2	27.0	16.5	15.6	0.1	74.2	92.9
4	29.3	20.4	11.8	0.1	88.2	92.3
8	31.0	25.9	10.3	5.4	92.4	92.4
16	40.8	20.4	7.7	0.1	92.8	92.1
32	58.1	17.	0.5	0.1	92.2	87.3
64	71.0	31.9	9.1	0.9	93.4	75.4

【０３２９】

結果は、コリスチンとＬＬ－３７の両方がＬＰＳ結合の用量依存的な増加を実証し、Ｃｈｐ５はＬＰＳに結合しないことを示す。Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈ１０－Ｍ１はいずれも、ＬＰＳへの結合を実証し、非常に低い濃度と非常に高い濃度の両方で優先的に結合するパターンを示す。

【０３３０】

実施例１９－生残菌細胞に対するＣｈｐペプチド活性

アシネトバクター・バウマンニ及びシュードモナス・エルギノーサの生残菌細胞（種々のクラスの抗生物質に対して耐性の高い細菌細胞の変異体）に対するＣｈｐペプチドであるＣｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１及びＣｈｐ１０－Ｍ１の活性を、Defraine, V. et al., Efficacy of Artilysin Art-175 against Resistant and Persistent Acinetobacter baumannii, Antimicrob. Agents and Chemother. 2016; 60(6):3480-3488に記載される方法を使用して評価した。簡潔に述べると、アシネトバクター・バウマンニ株ＢＡＡ－７４７を、５％トリプシンソイブロス中において３７℃で振盪しながら一晩増殖させた。１８時間の時点で、培養物を６０倍のＭＩＣのトブラマイシンに３７℃で５時間曝露し、生残菌細胞を選択した。抗生物質処理で生き残った生残菌細胞を採取し、次いで、シプロフロキサシン、リゾチーム、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、Ｃｈｐ１０－Ｍ１、Ｃｈｐ５、及びバッファー対照のサンプルを１００μＬの単離された生残菌細胞画分に添加し、サンプルを３７℃で１時間インキュベートした。次いで、細胞を回収し、寒天プレートにプレーティングし、３７℃で最大３日間インキュベートした。次いで、生き残った任意の細菌のＭＩＣを測定し、ここで検出限界は１．６$\log_{10}$ＣＦＵ／ｍＬであった。結果を下記表５９に示す。

【０３３１】

【表５９】

表５９－アシネトバクター・バウマンニ生残菌細胞のＭＩＣ　Log_{10}（ＣＦＵ／ｍＬ）

	実行＃１ (CFU/mL)	実行＃２ (CFU/mL)	実行＃３ (CFU/mL)	平均 (CFU/mL)	デルタログ
バッファー	4.2	5.6	4.8	4.9	0.0
シプロフロキサシン	3.5	4.9	4.5	4.3	0.6
リゾチーム	3.5	5.2	5.0	4.6	0.3
Chp2	1.5	2.2	1.5	1.8	3.1
Chp2-M1	1.5	1.6	1.5	1.6	3.3
Chp10-M1	1.5	1.6	2.5	1.9	3.0
Chp5	4.1	5.1	4.5	4.6	0.3

【０３３２】

表５９に示すように、アシネトバクター・バウマンニの生残菌細胞は、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１０－Ｍ１の全てに感受性があり、それぞれ３．１、３．３、及び３．０のバッファーと比較してlog_{10}ＣＦＵ／ｍＬの減少が見られた。Ｃｈｐペプチド処理の生き残った生残菌細胞はＭＩＣ値の変化を示さなかった。

【０３３３】

アシネトバクター・バウマンニについて上で概説した方法を、シュードモナス・エルギノーサ株ＰＡ２０で繰り返し、ここで検出限界は２log_{10}ＣＦＵ／ｍＬであり、結果を以下の表６０に示す。

【０３３４】

【表６０】

表６０－シュードモナス・エルギノーサ生残菌細胞のＭＩＣ　Log_{10}（ＣＦＵ／ｍＬ）

	実行＃１ (CFU/mL)	実行＃２ (CFU/mL)	実行＃３ (CFU/mL)	平均 (CFU/mL)	デルタログ
バッファー	4.7	4.4	4	4.4	0.0
シプロフロキサシン	4.2	4.4	4.1	4.2	0.2
リゾチーム	4.7	4.4	4.2	4.4	0.0
Chp2	2.7	2.3	2	2.3	2.1
Chp2-M1	3	2.6	2.1	2.6	1.8
Chp10-M1	2.3	2.0	2.1	2.1	2.3
Chp5	4.4	4.3	3.1	3.9	0.5

【０３３５】

表６０に示すように、シュードモナス・エルギノーサの生残菌細胞は、Ｃｈｐ２、Ｃｈｐ２－Ｍ１、及びＣｈｐ１－Ｍ１の全てに感受性があり、それぞれ２．１、１．８、及び２．３のバッファーと比較してlog_{10}ＣＦＵ／ｍＬの減少が見られた。Ｃｈｐペプチド処理の生き残った生残菌細胞はＭＩＣ値の変化を示さなかった。

【図面】

【図１Ａ】

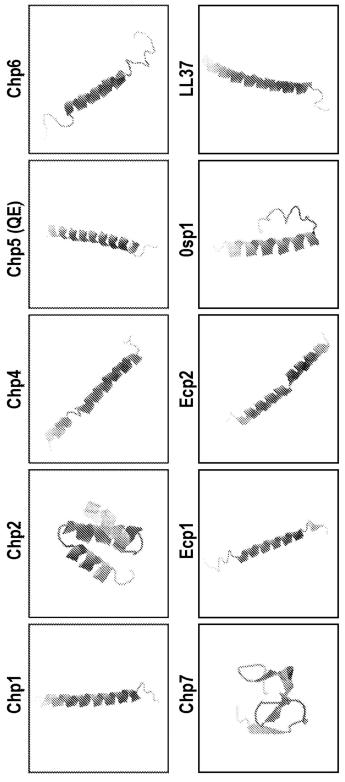


FIG. 1

【図１Ｂ】

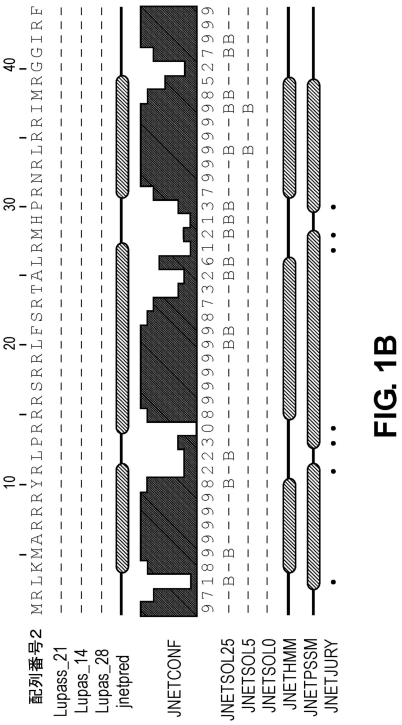


FIG. 1B

【図１Ｃ】

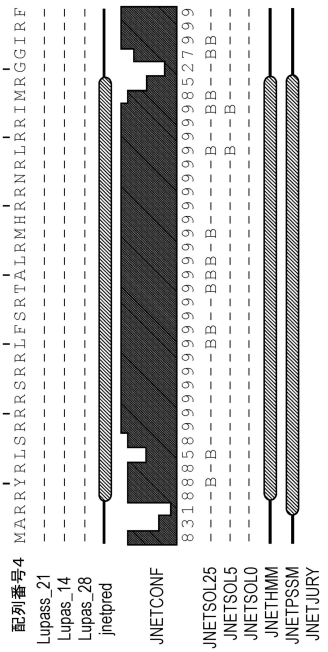


FIG. 1C

【図２Ａ】

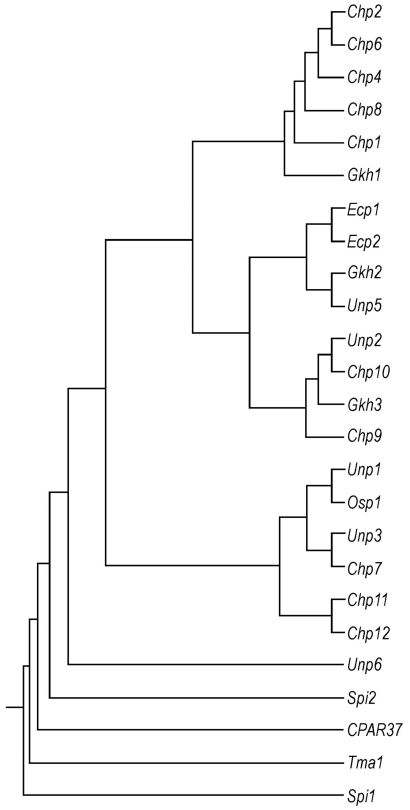


FIG. 2A

【図２Ｂ】

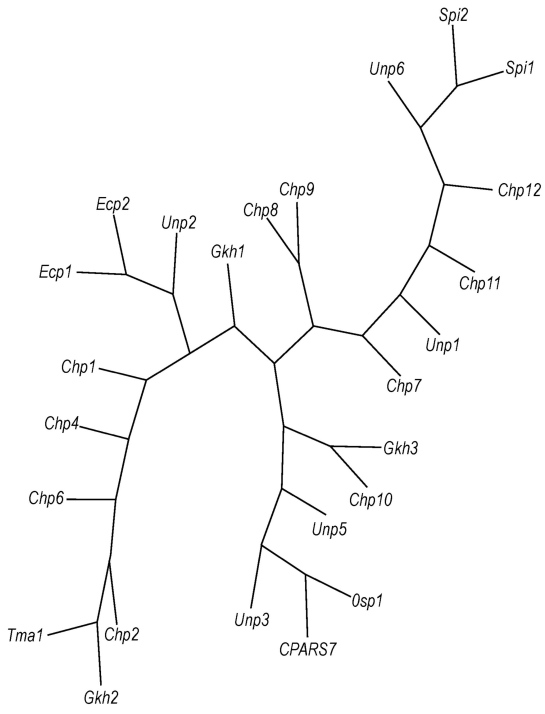


FIG. 2B

【図３】

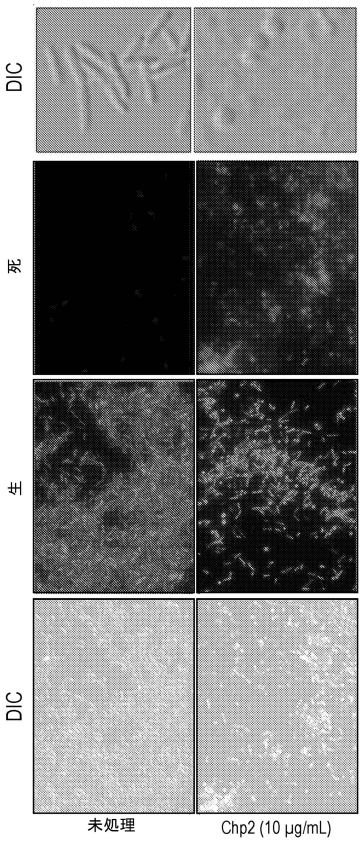


FIG. 3

【図４Ａ】

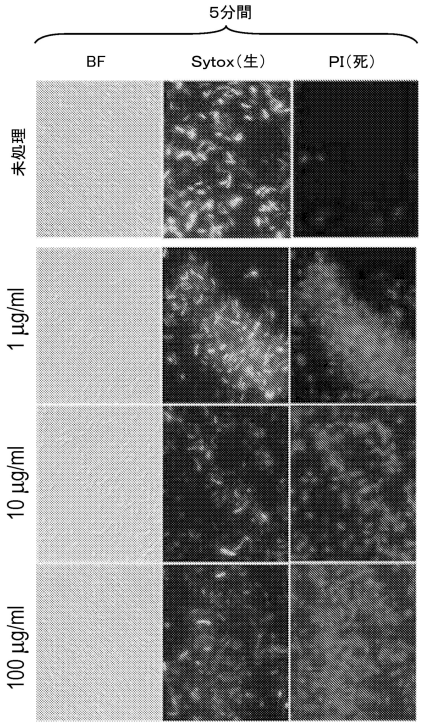


FIG. 4A

【図４Ｂ】

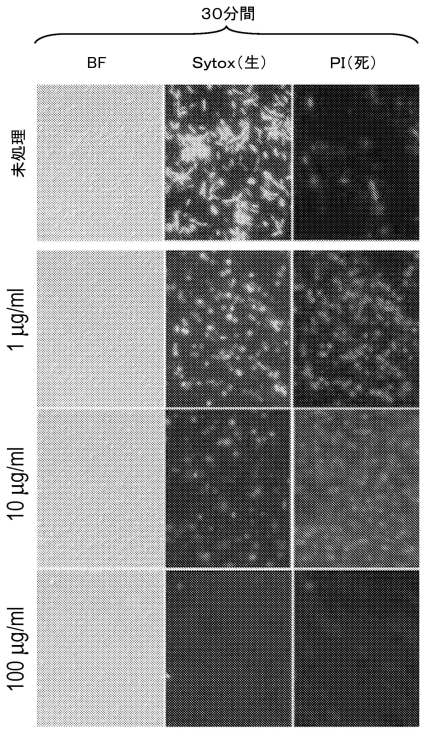


FIG. 4B

【図５Ａ】

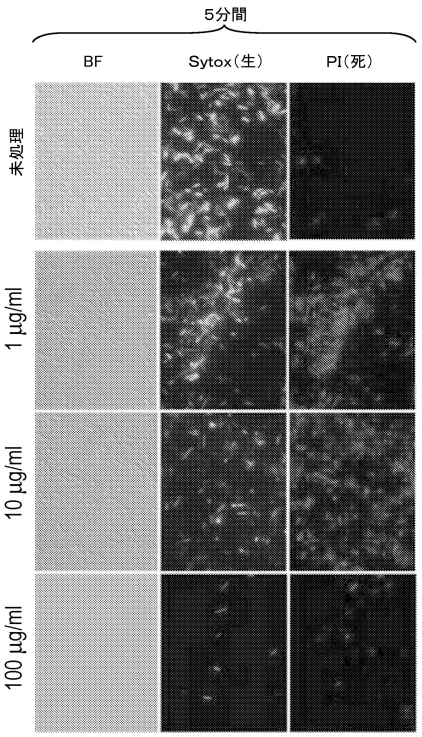


FIG. 5A

【図５Ｂ】

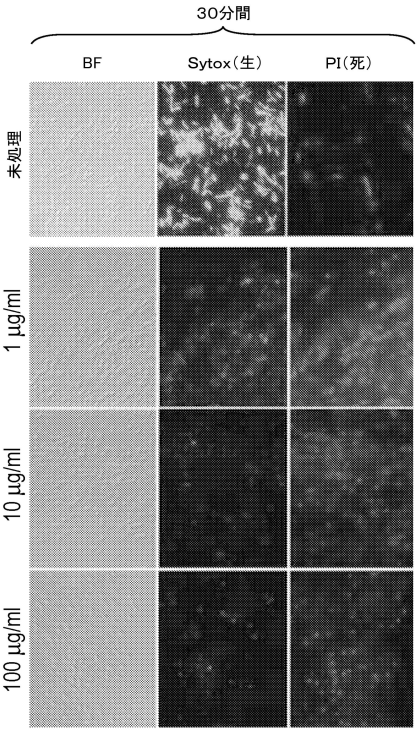


FIG. 5B

【図６Ａ】

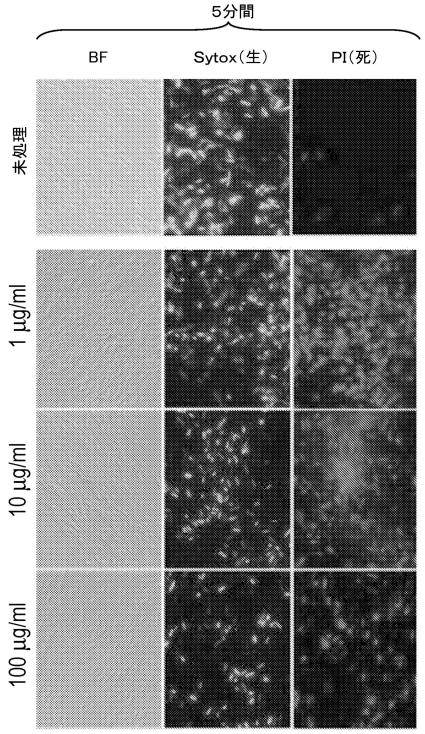


FIG. 6A

【図６Ｂ】

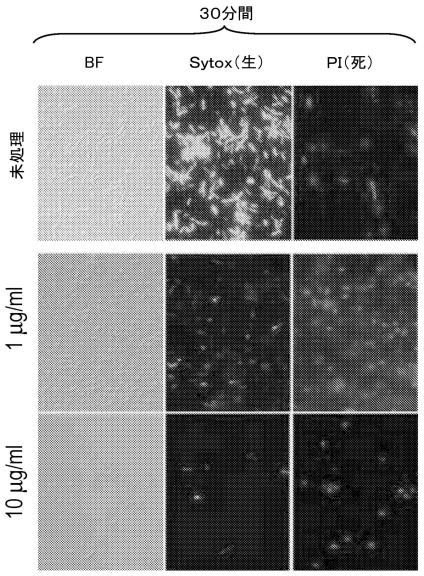


FIG. 6B

【図７Ａ】

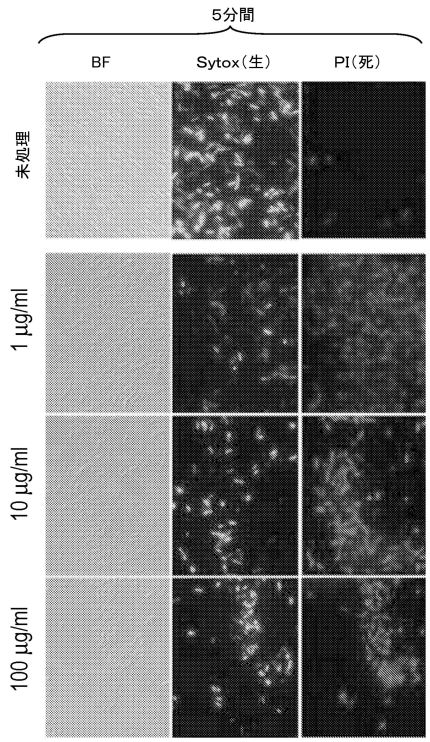


FIG. 7A

【図７Ｂ】

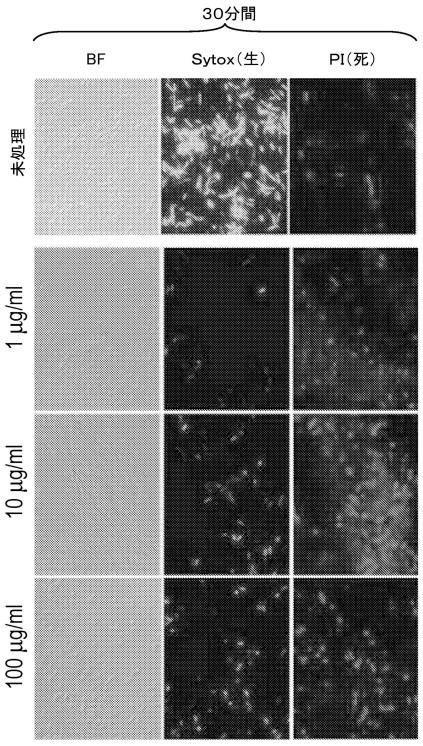


FIG. 7B

【配列表】
20225393830000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/040714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/16; A61P 31/04; C07K 14/01; C12N 15/11 (2020.01)
CPC - C12N 2795/00033; C12N 2795/14011; C12N 2795/14033; C12N 2795/14211; C12N 2795/14222; C12N 2795/14233 (2020.08)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
see Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,741,697 A (BAVOIL et al) 21 April 1998 (21.04.1998) entire document	17-19
A	US 2005/0142547 A1 (BRUNHAM et al) 30 June 2005 (30.06.2005) entire document	1-5, 8-12, 14-23, 37
P, X	WO 2019/191598 A1 (CONTRAFECT CORPORATION) 03 October 2019 (03.10.2019) entire document	1-5, 8-12, 14-23, 37
P, X	WO 2020/046747 A1 (CONTRAFECT CORPORATION) 05 March 2020 (05.03.2020) entire document	1-5, 8-12, 14-23, 37
A	LIU et al. "Molecular characterization of a bacteriophage (Chp2) from Chlamydia psittaci," Journal of Virology, 01 April 2000 (01.04.2000), Vol. 74, No. 8, Pgs. 3464-3469. entire document	1-5, 8-12, 14-23, 37
A	STOREY et al. "Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of Chp1, a Phage which Infects Avian Chlamydia psittaci," Journal of General Biology, 01 December 1989 (01.12.1989), Vol. 70, Iss. 12, Pgs. 3381-3390. entire document	1-5, 8-12, 14-23, 37

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 October 2020	02 NOV 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/040714

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 8-21, 23-26, 59-61, 63-65, 67, 81-91, 94-115, and 118-124 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/040714

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6, 7, 13, 24-36, 38-40
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/427(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/427	
Ａ６１Ｋ	*38/12 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/12	
Ａ６１Ｋ	*31/407(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/407	
Ａ６１Ｋ	*31/5383(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/5383	
Ａ６１Ｋ	*31/7036(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7036	
Ａ６１Ｋ	*31/496(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/496	
Ａ６１Ｋ	*31/395(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/395	
Ｃ１２Ｎ	*15/34 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/34	
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ
Ｃ１２Ｎ	*1/15 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15	
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19	
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ｃ０７Ｋ	*14/01 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/01	

(32)優先日　令和1年10月7日(2019.10.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/948,052
(32)優先日　令和1年12月13日(2019.12.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/964,743
(32)優先日　令和2年1月23日(2020.1.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,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,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＲＩＴＯＮ

Ｆターム（参考）
BA19 BA24 CA04 MA13 MA17 MA22 MA23 MA52 MA55 MA57
NA05 NA14 ZB352 ZC751
4C086 AA01 AA02 BC29 BC82 CB02 CB22 CB25 CC04 EA02 EA12
GA06 GA10 MA03 MA05 NA05 ZB35 ZC75
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA01 DA83 EA20 FA34 GA25