

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-519311

(P2021-519311A)

(43) 公表日 令和3年8月10日(2021.8.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	Z N A 4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	4 H 0 4 5
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-551971 (P2020-551971)
 (86) (22) 出願日 平成31年3月29日 (2019. 3. 29)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年11月20日 (2020. 11. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/024854
 (87) 国際公開番号 W02019/191598
 (87) 国際公開日 令和1年10月3日 (2019. 10. 3)
 (31) 優先権主張番号 62/650, 235
 (32) 優先日 平成30年3月29日 (2018. 3. 29)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(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 1070
 1, 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
 特許業務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 AA83X AA86X AA87X
 AA95X AA95Y AA98X AA98Y AB01
 AC14 BA01 BA02 CA24 CA44

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗微生物性バクテリオファージ由来ポリペプチド及びグラム陰性細菌に対するそれらの使用

(57) 【要約】

有効量の、配列番号1～配列番号4、配列番号6～配列番号26及び配列番号54～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、及び被験体において細菌感染を治療する方法が本明細書に開示される。

【選択図】 図1A

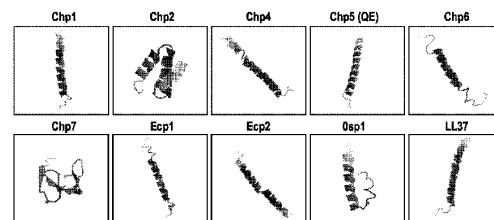


FIG. 1A

【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 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離 C h p ペプチド若しくはその活性フラグメント、又は (i i) 配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列と 8 0 % 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 C h p 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。

10

【請求項 2】

前記 C h p ペプチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列又はその活性フラグメントに対して少なくとも 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 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 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 5 4、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号 5 7、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 2、配列番号 6 3 及び配列番号 6 6 からなる群から選択される、又はその活性フラグメントである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 5】

前記アミノ酸配列が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 1 6、配列番号 1 8 及び配列番号 5 4 からなる群から選択される、又はその活性フラグメントである、請求項 1 ~ 4 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。

30

【請求項 7】

グラム陰性細菌の治療に適した 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 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する C h p ペプチド若しくはその活性フラグメント、又は (i i) 配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列と 8 0 % 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 C h p ペプチドをコードする核酸分子を含む、ベクター。

40

【請求項 9】

(i) 配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する C h p ペプチド若しくはその活性フラグメント、又は (i i) 配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列と 8 0 % 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 C h p ペプチドをコードする核酸分子を含み、該核酸が異

50

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 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、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 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、又はその活性フラグメントである、請求項 9 又は 10 に記載の組換え発現ベクター。

10

【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 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 26 及び配列番号 54 ~ 配列番号 66 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 C h p 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。

20

【請求項 15】

前記 C h p ペプチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 26 及び配列番号 54 ~ 配列番号 66 のいずれか 1 つのアミノ酸配列又はその活性フラグメントに対して少なくとも 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 14 又は 15 に記載の単離精製された核酸。

【請求項 17】

配列番号 27 ~ 配列番号 30、配列番号 32 ~ 配列番号 53 及び配列番号 68 ~ 配列番号 79 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。

30

【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、

40

前記細菌と、有効量の (i) 配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 26 及び配列番号 54 ~ 配列番号 66 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 C h p ペプチド、又は (i i) 配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 26 及び配列番号 54 ~ 配列番号 66 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 C h p ペプチドを含む組成物とを接触させることを含み、

前記 C h p ペプチド又は修飾 C h p 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 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 6

50

、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、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】

前記アミノ酸配列が、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、又はその活性フラグメントである、請求項 20 又は 21 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。

10

【請求項 23】

少なくとも 1 つの種のグラム陰性細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 24】

前記グラム陰性細菌が、アシネトバクター・パウマンニ、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 20～23 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 25】

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 20～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記細菌感染が局所又は全身の細菌感染である、請求項 20～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記グラム陰性細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 23～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗生物質が、アジスロマイシン、アズトレオナム、ホスホマイシン、セフトジジム、セフェピム、セフォペラゾン、セフトピプロール、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 27 に記載の方法。

30

【請求項 29】

前記抗生物質が、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 27 又は 28 に記載の方法。

40

【請求項 30】

請求項 1～7 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 27～29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

少なくとも 1 つの種のグラム陰性細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、第 1 の量の請求項 1～7 のいずれか一項に記載の医薬組成物と、第 2 の量のグラム陰性細菌感染の治療に適した抗生物質との組み合わせを同時投与することを含み、

50

前記第 1 及び第 2 の量が共に、前記細菌感染の予防又は治療に効果的である、方法。

【請求項 3 2】

前記抗生物質が、アジスロマイシン、アズトレオナム、ホスホマイシン、セフトジジム、セフェピム、セフォペラゾン、セフトピプロール、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 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記抗生物質が、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 3 1 又は 3 2 に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

少なくとも 1 つの種のグラム陰性細菌によって引き起こされる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、

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物と組み合わせて前記抗生物質を同時投与することを含み、

前記組み合わせの投与が、前記抗生物質又は前記医薬組成物のいずれかを個別に投与するよりも、前記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。

20

【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、2018年3月29日付で出願された米国仮特許出願第62/650,235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。2019年3月28日付けで作製された上記ASCIIコピーの名前は0341_0002 - PCT_S_L . t x tであり、28097バイトのサイズである。

30

【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。

40

【0005】

シュードモナス・エルギノーサ (P. aeruginosa) 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

50

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中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*) の薬物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: Blood Stream 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。

10

【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物耐性細菌としては、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】

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關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。

20

30

【0009】

溶解素及び *artilysin* に加えて、「アムリン」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ピウイルス科) 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 X174 (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ポド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Q (レピウイルス科アロレピウイルス属) 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

40

50

リポドIIフリッパーゼ、及びファージMS2（レピウイルス科レピウイルス属）のタンパク質Lアムリン（75アミノ酸の内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ではない。

【0010】

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・エルギノーサ及び他のグラム陰性細菌を標的とする追加の抗菌化合物、特に、溶解性が高く、血清の存在下でin vivoにおいて活性なままであり、及び/又は溶血性を有しな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】

【0011】

【特許文献1】国際公開第2001/009382号

【非特許文献】

【0012】

【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】

【0013】

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。同定されている40種のChpペプチドが本明細書に開示され、特定の溶菌性タンパク質のファミリーを構成する。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

10

20

30

40

50

書に開示される C h p 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 C h p ペプチドは、グラム陰性病原体に対する広域スペクトル活性、及び血清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】

【0014】

一態様では、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 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離 C h p ペプチド若しくはその活性フラグメント、又は (i i) 配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 の少なくとも 1 つと少なくとも 8 0 %、例えば少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 . 5 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % の配列同一性を有し、任意にヒト血清の存在下で、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 C h p ペプチドを含む、医薬組成物に関する。或る特定の実施の形態では、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。

10

【0015】

本明細書に開示される別の実施の形態では、医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体と、有効量の C h p 1、C h p 2、C h p 3、C h p 4、C h p 6、C h p 7、C h p 8、C h p 9、C h p 1 0、C h p 1 1、C h p 1 2、C P A R 3 9、G k h 1、G k h 2、U n p 1、E c p 1、T m a 1、E c p 2、O s p 1、U n p 2、U n p 3、G k h 3、U n p 5、U n p 6、S p i 1、S p i 2、E c p 3、E c p 4、L v p 1、L v p 2、A L C E S 1、A V Q 2 0 6、A V Q 2 4 4、C D L 9 0 7、A G T 9 1 5、H H 3 9 3 0、F e n 7 8 7 5 及び S B R 7 7 のペプチドからなる群から選択される単離 C h p ペプチド、又はその活性フラグメントとを含む。

20

【0016】

幾つかの実施の形態では、C h p ペプチドは、C h p 2、C h p 4、C h p 6、E c p 1 又は E c p 2 である。

【0017】

本開示の様々な実施の形態では、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 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 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 5 4、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 1、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 5 及び配列番号 6 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離 C h p ペプチド、又はその活性フラグメントとを含む。

30

【0018】

或る特定の実施の形態では、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 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 1 6、配列番号 1 8 及び配列番号 5 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離 C h p ペプチド又はその活性フラグメントとを含む。

40

【0019】

或る特定の実施の形態では、本明細書に開示される C h p 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 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 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では、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では、修飾 C h p ペプチドは、配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番

50

号54～配列番号66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。或る特定の実施の形態では、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では、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では、配列番号1～配列番号4、配列番号6～配列番号26及び配列番号54～配列番号66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。

【0020】

医薬組成物は、幾つかの実施の形態では、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では、本医薬組成物はまた、グラム陰性細菌の治療に適した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。

【0021】

或る特定の実施の形態では、(i)配列番号1～配列番号4、配列番号6～配列番号26及び配列番号54～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26及び配列番号54～配列番号66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では、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。

【0022】

また、(i)配列番号1～配列番号4、配列番号6～配列番号26及び配列番号54～配列番号66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4、配列番号6～配列番号26及び配列番号54～配列番号66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では、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では、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では、核酸は、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では、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。

【0023】

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では、核酸配列はcDNA配列である。

【0024】

更に別の態様では、本開示は、配列番号1～配列番号26及び配列番号54～配列番号

10

20

30

40

50

66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では、核酸は、配列番号1～配列番号4、配列番号6～配列番号26及び配列番号54～配列番号66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では、単離精製されたDNAは、配列番号27～配列番号53及び配列番号68～配列番号80からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、或る特定の実施の形態では、単離精製されたDNAは、配列番号27～配列番号30、配列番号32～配列番号53及び配列番号68～配列番号79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では、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。

10

【0025】

他の態様では、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1～配列番号4、配列番号6～配列番号26及び配列番号54～配列番号66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)それらと少なくとも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では、Chpペプチドは、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又はその活性フラグメントを含み、或る特定の実施の形態では、Chpペプチドは、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又はその活性フラグメントを含む。

20

30

【0026】

また、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、細菌と、有効量のChp1、Chp2、Chp3、Chp4、Chp6、Chp7、Chp8、Chp9、Chp10、Chp11、Chp12、CPAR39、Gkh1、Gkh2、Unp1、Ecp1、Tma1、Ecp2、Osp1、Unp2、Unp3、Gkh3、Unp5、Unp6、Spi1、Spi2、Ecp3、Ecp4、Lvp1、Lvp2、ALCES1、AVQ206、AVQ244、CDL907、AGT915、HH3930、Fen7875及びSBR77からなる群から選択されるChpペプチド又はその活性フラグメントを含む組成物とを接触させることを含む、Chpペプチド又はその活性フラグメントが、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、その菌数を減少させる、及び/又はそれを死滅させる特性を有する、方法が本明細書に開示される。

40

【0027】

或る特定の実施の形態では、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では、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。

【0028】

また、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本明細書に開示される

50

医薬組成物を投与することを含む、方法が本明細書に開示される。

【0029】

前述の方法／使用のいずれかにおいて、グラム陰性細菌は、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、サルモネラ属種、淋菌及びシゲラ属種からなる群から選択される少なくとも1つのグラム陰性細菌であり得る。或る特定の実施の形態では、グラム陰性細菌はシュードモナス・エルギノーサである。

【0030】

また、治療又は予防を必要とする被験体に本明細書に開示される医薬組成物を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局所又は全身の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。

10

【0031】

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、第1の量の明細書に開示される医薬組成物と、第2の量のグラム陰性細菌感染の治療に適した抗生物質との組み合わ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効果的である、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。

【0032】

幾つかの実施の形態では、グラム陰性細菌感染の治療に適した抗生物質は、セフトジジム、セフェピム、セフォペラゾン、セフトピブロール、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では、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。

20

【0033】

更に別の実施の形態では、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、該組み合わせの投与が、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。

30

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1A】クラミジアファーヂペプチド(C hp)ファミリーの成員であるC hp 1、C hp 2、C hp 4、C hp 5、C hp 6、C hp 7、E cp 1、E cp 2及びO sp 1の構造についてI - T a s s e r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。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】J P R E D 4を用いたC hp 2(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。ヘリックスは、太い縞模様のバーで示される。

40

【図1C】J P R E D 4を用いたC hp 4(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。ヘリックスは、太い縞模様のバーで示される。

【図2A】C l u s t a l Wアラインメントから生成された或る特定のC hpファミリーの成員の有根(U P G M Aクラスタリング法)系統樹を示す図である。

【図2B】C l u s t a l Wアラインメントから生成された或る特定のC hp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C hp 2(10 µg / 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。L i v e / D e a d C e l l V i a

50

bility Kit (ThermoFisher) を用いてサンプルを染色し、微分干渉観察 (DIC: Differential Interference Contrast) 及び蛍光顕微鏡の両方で調べた。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。

【発明を実施するための形態】

【0035】

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。

【0036】

「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。

10

【0037】

「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。

20

【0038】

「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 $3 \log_{10}$ (99.9%) 以上の減少の程度まで細菌の死滅を引き起こすか、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。

30

【0039】

「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 $2 \log_{10}$ (99%) 以上かつ最大 $3 \log$ 弱の減少を引き起こすことを含む、細菌増殖を阻害する特性を指す。

【0040】

「抗菌剤」は、静菌剤及び殺菌剤の両方を指す。

【0041】

「抗生物質」は、細菌に致死性又は増殖の低減等の負の影響を与える特性を有する化合物を指す。抗生物質は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌又はその両方に負の影響を与えることができる。例としては、抗生物質は、細胞壁ペプチドグリカンの生合成、細胞膜の完全性、又は細菌における DNA 若しくはタンパク質の合成に影響を及ぼし得る。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、セフトジジム、セフェピム、セフォペラゾン及びセフトピブロール等のセファロsporin; 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; ペペラシリン、チカルシリン、イミペネム、メロペネム、ドリペネム、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。

40

50

【 0 0 4 2 】

「薬物耐性」は、概して薬物の抗菌活性に耐性を示す細菌を指す。或る特定の方法で使用される場合、薬物耐性は、特に抗生物質耐性を指し得る。場合によっては、一般に特定の抗生物質の影響を受けやすい細菌は、抗生物質に対する耐性を発現し、それにより薬物耐性微生物又は株となる可能性がある。「多剤耐性」(「MDR」)病原体は、各々が単剤療法として使用される少なくとも2つのクラスの抗微生物薬に対する耐性を発現した病原体である。例えば、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、細菌が薬物耐性であるかを容易に決定することができる。

10

【 0 0 4 3 】

「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。

【 0 0 4 4 】

「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。

20

30

【 0 0 4 5 】

「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又はグラム陰性細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では、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。

40

【 0 0 4 6 】

「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 Cloni

50

ng: 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。

【0047】

「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ナ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。

10

【0048】

「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。

20

【0049】

「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に対する殺菌活性を保持するポリペプチドの部分指す。

30

【0050】

「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では、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)に置かれる。これらのペプチドは、或る特定の実施形態では、 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。

【0051】

「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では、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。

40

【0052】

「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

50

リン (P r o)、フェニルアラニン (P h e)、メチオニン (M e t) 及びトリプトファン (T r p) が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

「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。

【 0 0 5 4 】

「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では、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。一方又は両方の活性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。

10

【 0 0 5 5 】

「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。

20

【 0 0 5 6 】

「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。幾つかの実施形態では、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。

30

【 0 0 5 7 】

「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。

【 0 0 5 8 】

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では、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 P E G (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では、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。C h p 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 - B o c 及び F m o c 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 (G F P)、赤色蛍光タンパク質 (R F P)、シアン蛍光タンパク質 (C F P)、黄色蛍光タンパク質 (Y F P) 及び m C h e r r y 等の一般に使

40

50

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、C h p 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C h p 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では、蛍光タンパク質をコードするポリヌクレオチドをC h p 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C h p ペプチドの機能を妨げない融合タンパク質（例えば、C h p ペプチド：：G F P）が生じる。タンパク質へのポリエチレングリコール（P E G）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、C h p 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P E G分子の共有結合によって化学修飾されたC h p ペプチドを包含する。ペグ化C h p 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C h p 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。

10

【0059】

「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C h p 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B L A S T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、C h p 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C h p ポリペプチド及びペプチドの突然変異型、切断型、融合型、又は別の形で配列が修飾された変異体、及びその活性フラグメント、並びに参照（野生型又は他の無傷）ポリペプチドと比較して相当の配列同一性（例えば、1つ以上の上記の方法によって測定される、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。

20

30

【0060】

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C h p 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C h p 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。

40

【0061】

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）、分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び

50

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。

【0062】

「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。

【0063】

「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。

【0064】

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。

【0065】

「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、リポド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) リポド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。

【0066】

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を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（Chlamydia microvirus）属（ミクロウイルス科、ゴクシヨウイルス（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。

【0067】

10

20

30

40

50

GenBankの全てのコメント付きマイクロウイルスゲノム配列（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、40個の新規なシntenic（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 - 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、主にクラミジアマイ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。様々なマイ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。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、39種類の異なるファミリーの成員（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0.25 µg/mL～4 µg/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。さらに、シュドモナス・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。

10

20

【0068】

少なくとも2つの強力なChpペプチド、Chp2及びChp4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、シュドモナス・エルギノーサに対する最大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及びChp4はいずれも、MBECアッセイフォーマットにおいて強力な抗バイオフィーム活性（MBEC = 0.25 µg/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1 µg/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5を参照されたい。

【0069】

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*in vitro*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では、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のこの効果は下記表6で観察され得る。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ラー・ヒントン・プ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

30

40

50

、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では、Chpペプチドはナノモル量で活性となり得る。

【0070】

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)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。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、非常に強力な急速な溶菌効果、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。

10

20

【0071】

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では、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い。或る特定の実施形態では、Chpペプチドは、リンカー配列の有無にかかわらず溶解素の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。

【0072】

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ペプチド及びその誘導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。

30

【0073】

幾つかの実施形態では、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)、又は溶菌活性を有するその活性フラグメントの少なくとも1つから選択される。

40

【0074】

50

C h p ペプチドは、修飾 C h p 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では、C h p 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 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 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 つの修飾を含む。或る特定の実施形態では、修飾 C h p ペプチドは、配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 2 6 及び配列番号 5 4 ~ 配列番号 6 6 からなる群から選択される少なくとも 1 つの C h p ペプチドのアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、例えば少なくとも 8 5 %、例えば少なくとも 9 0 %、例えば少なくとも 9 2 . 5 %、例えば少なくとも 9 5 %、例えば少なくとも 9 8 % 又は例えば少なくとも 9 9 % 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 C h p ペプチドは、任意にヒト血清の存在下で、シュドモナス・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。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 5 】

幾つかの実施形態では、C h p ペプチドは、(i) C h p 1 (配列番号 1)、C h p 2 (配列番号 2)、C P A R 3 9 (配列番号 3)、C h p 3 (配列番号 5 4)、C h p 4 (配列番号 4)、C h p 6 (配列番号 6)、C h p 7 (配列番号 7)、C h p 8 (配列番号 8)、C h p 1 0 (配列番号 1 0)、C h p 1 1 (配列番号 1 1)、E c p 1 (配列番号 1 6)、E c p 2 (配列番号 1 8)、E c p 3 (配列番号 5 5)、E c p 4 (配列番号 5 6)、O s p 1 (配列番号 1 9)、U n p 2 (配列番号 2 0)、G k h 3 (配列番号 2 2)、U n p 5 (配列番号 2 3)、U n p 6 (配列番号 2 4)、S p i 1 (配列番号 2 5)、L v p 1 (配列番号 5 7)、A L C E S 1 (配列番号 5 9)、A V Q 2 0 6 (配列番号 6 0)、C D L 9 0 7 (配列番号 6 2)、A G T 9 1 5 (配列番号 6 3) 及び S B R 7 7 (配列番号 6 6) の少なくとも 1 つ若しくはその活性フラグメント、又は (i i) 配列番号 1 ~ 配列番号 4、配列番号 6 ~ 配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 1 ~ 配列番号 2 5、配列番号 5 4 ~ 配列番号 5 7、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 2、配列番号 6 3 及び配列番号 6 6 の少なくとも 1 つと少なくとも 8 0 %、例えば少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 . 5 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 若しくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有し、任意にヒト血清の存在下で、シュドモナス・エルギノーサ及び少なくとも 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 C h p ペプチドから選択される。

【 0 0 7 6 】

幾つかの実施形態では、C h p ペプチドは、(i) C h p 2 (配列番号 2)、C h p 3 (配列番号 5 4)、C h p 4 (配列番号 4)、C h p 6 (配列番号 6)、E c p 1 (配列番号 1 6) 及び E c p 2 (配列番号 1 8) の少なくとも 1 つ若しくはその活性フラグメント、又は (i i) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 1 6 及び配列番号 1 8 の少なくとも 1 つと少なくとも 8 0 %、例えば少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 . 5 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 若しくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有し、任意にヒト血清の存在下で、シュドモナス・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 C h p ペプチドから選択される。

【 0 0 7 7 】

或る特定の実施形態では、C h p ペプチドは、(i) 配列番号 2、配列番号 4 及び配列番号 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つの C h p ペプチド、若しくはその活性フラグメント、又は (i i) 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 9 2 . 5 % の配列同一性を有し、任意にヒト血清の存在下で、シュドモナス・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 C h p ペプチドから選択される。

【 0 0 7 8 】

幾つかの実施形態では、本開示の C h p ペプチドは、1つの化学修飾された参照 C h p 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 C h p 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では、C h p 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では、C h p 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、C h p ペプチド中の2以上の部位に存在し得る。

【 0 0 7 9 】

さらに、C h p 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。

【 0 0 8 0 】

幾つかの実施形態では、C h p 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。幾つかの実施形態では、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 (「 P E G 」) 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., Bi conjugate 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)。P E G 骨格 (C H₂ C H₂ - 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。C h p 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、P E G 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。

【 0 0 8 1 】

ポリヌクレオチド

C h p ペプチド及びその活性フラグメント

一態様では、本開示は、C h p 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) の外膜を透過することによる C h p 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 (M I C) を低下させる能力を包含する。

【 0 0 8 2 】

或る特定の実施の形態では、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 C h p ペプチド、又はその活性フラグメントをコードする。

【 0 0 8 3 】

或る特定の実施形態では、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

10

20

30

40

50

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 C h p ペプチド、又はその活性フラグメントをコードする。

【0084】

或る特定の実施形態では、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 C h p 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では、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 C h p ペプチド、又はその活性フラグメントをコードする。

10

【0085】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される C h p 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、C h p 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成成分であるペプチドグリカン分解し、細胞溶解をもたらすことができる。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される C h p 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。

20

【0086】

C h p ペプチド又はその活性フラグメントのグラム陰性細菌の外膜を透過する能力は、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、C h p 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、外膜が存在することから、疎水性化合物に耐性が強く、そのため 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-ナフトレンスルホン酸（ANS）等の疎水性作用物質を取り込ませない。NPN は、例えば、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、NPN 蛍光は、外膜透過性の尺度（measurement）として使用することができる。

30

【0087】

より詳しくは、外壁を透過する C h p ペプチド又はその活性フラグメントの能力は、例えば、C h p 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。C h p 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。

40

【0088】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される C h p 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 C h p 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 C h p ペ

50

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。

【0089】

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、例えば、ミューラー・ヒントン・ブロス、ヒト血清を添加したミューラー・ヒントン・ブロス、生理学的塩濃度を備えた本明細書に記載されるCAA、及びヒト血清を添加したCAAにおいて、例えばシュドモナス・エルギノーサの実験室株PA01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。

10

【0090】

幾つかの実施形態では、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 Microbiol. 37:1771-1776 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす)、及びSchuch et al., 2017, Antimicrob. Agents Chemother. 61, pages 1-18 (その全体が引用することにより本明細書の一部をなす)を参照されたい)。この方法では、例えばATCC 17647等のシュドモナス・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OD₆₀₀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。

20

30

【0091】

幾つかの実施形態では、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。幾つかの実施形態では、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)。

40

【0092】

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

50

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み合わせを持つ。細菌を、例えば、ヒト血清の有無にかかわらず、CAA中 1×10^5 G F U / m l の濃度で薬物の組み合わせに加える。次いで、単独の及び組み合わせた各薬物のMICを、例えば周囲空气中、37 で16時間後に記録する。部分阻止濃度の合計 (F I C : Summation Fractional Inhibitory Concentration) を各薬物について計算し、最小 F I C 値 (F I C m i n) を用いて

10

【0093】

幾つかの実施形態では、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。

【0094】

幾つかの実施形態では、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及び配列番号54～配列番号66のいずれか1つが挙げられる。或る特定の実施形態では、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及び配列番号54～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。

20

【0095】

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、J p r e d 4 (compio.dundee.ac.uk/jpred) 及びH e l l i c a l W h e e l (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。

30

【0096】

幾つかの実施形態では、 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。幾つかの実施形態では、 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)、幾つかの実施形態では、 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。

【0097】

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。幾つかの実施形態では、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*i n v i t r o*での(例えばパッファー及び/又は培地における)抗菌活性を改善した。他の実施形態では、修飾Chpペプチドは、*i n v i v o*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。幾つかの実施形態では、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。

40

【0098】

幾つかの実施形態では、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、ヒト血清の不在下若しくは存在下、又はヒト血清の有無に関わらず、シュドモナス・エルギノーサ及び任意に少なくとも1つの他の種のグラム陰性細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

50

死滅させることができる。

【0099】

幾つかの実施形態では、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、シュドモナス・エルギノーサ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では、活性フラグメントは、 α -ヘリックスドメインを保持するカチオン性ペプチドである。

10

【0100】

ベクター及び宿主細胞

別の態様では、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。幾つかの実施形態では、ベクターはプラスミド又はコスミドである。他の実施形態では、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。幾つかの実施形態では、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。幾つかの実施形態では、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。

20

【0101】

幾つかの実施形態では、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。

30

【0102】

幾つかの実施形態では、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。

40

【0103】

或る特定の実施の形態では、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、

50

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。

【0104】

或る特定の実施形態では、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、或る特定の実施の形態では、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。

10

【0105】

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。

20

【0106】

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。

30

【0107】

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の誘導體、並びに既知の細菌プラスミド、例えば大腸菌プラスミドcolE1、pCR1、pBR322、pMB9及びそれらの誘導體、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の多数の誘導體、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體；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.、Adgene、Takara Bio Inc.、ThermoFisher Scientific Inc.等の供給業者から市販されている。

40

【0108】

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

50

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C h p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、S V 4 0、C M V、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、l a c系、t r p系、T A C系、T R C系、L T R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、f d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、P h o 5)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、C h p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。

10

【0109】

別の態様では、本開示は、本開示のC h p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C H O細胞、R 1 . 1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、C O S 1、C O S 7、B S C 1、B S C 4 0及びB M T 1 0)、昆虫細胞(例えば、S f 9)、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、典型的な実施形態では、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、T o p 1 0(ThermoFisher Scientific, Inc.)、D H 5 a(Thermo Fisher Scientific, Inc.)、X L 1 - B l u e(Agilent Technologies, Inc.)、S C S 1 1 0(Agilent Technologies, Inc.)、J M 1 0 9(Promega, Inc.)、L M G 1 9 4(ATCC)及びB L 2 1(Thermo Fisher Scientific, Inc.)等の市販の大腸菌株が挙げられる。

20

【0110】

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. Bacteriol. 189 8746-8749 (2007))、容易に達成される高密度の培養物、外来性D N A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。

30

【0111】

本C h p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C h p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。

40

【0112】

本開示のC h p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

50

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。

【0113】

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。

【0114】

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。

10

【0115】

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ブ、及びそれらの組合せの形態をとることができる。

20

【0116】

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、パッカルで、留置されたりザーバーにより、又は任意の他の既知の方法により被験体に投与され得る。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。

30

【0117】

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。

【0118】

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、並びにシエラック、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。

40

【0119】

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

50

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、本開示の活性成分を、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、本開示の活性成分を、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。更なる態様では、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。

【0120】

一実施形態では、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。

【0121】

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)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み合わせで構成され得る。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。

【0122】

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。

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、滅菌されピロジェンフリーで提供され得る。

【0123】

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。

【0124】

別の実施形態では、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。一実施形態では、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。具体的な実施形態では、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では、溶液は、噴霧化されてもよい。

【0125】

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。

【0126】

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

【0127】

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。

【0128】

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。

【0129】

幾つかの実施形態では、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、並びに咽喉口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み合わせが挙げられる。

。

10

20

30

40

50

【0130】

別の実施形態では、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種以上の抗生物質であり得る。一実施形態では、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。

【0131】

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その量であり得る。或る特定の実施形態では、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。

【0132】

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）の範囲内に収まり得る。或る特定の実施形態では、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日間に及び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。

【0133】

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、薬物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。

【0134】

幾つかの実施形態では、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

10

20

30

40

50

。より高い単位 / m l 投与量又はより低い単位 / m l 投与量が所望され得る状況もある。

【 0 1 3 5 】

本開示の C h p 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。

10

【 0 1 3 6 】

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 カ月に 1 回等の投与を必要とし得る。一実施形態では、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。

20

【 0 1 3 7 】

方法

本開示の C h p 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、シュールドモナス・エルギノーサ等のグラム陰性細菌による細菌感染を治療するため i n v i v o 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 i n v i t r o で使用することができる。

【 0 1 3 8 】

例えば、幾つかの実施形態では、本 C h p ペプチド又はその活性フラグメントは、グラム陰性細菌によって形成される細菌バイオフィルムの予防、制御、破壊及び処理に使用され得る。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 C F 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、一実施形態では、本開示の C h p 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、グラム陰性細菌による細菌感染の予防、制御、破壊及び処理に使用することができる。

30

40

【 0 1 3 9 】

一態様では、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。

【 0 1 4 0 】

「感染」及び「細菌感染」という用語は、気道感染（R T I）、例えば囊胞性線維症（C F）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（A C E B）、急性副鼻腔炎、市中肺炎（C A P）、院内肺炎（H A P）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

50

及びカテーテル関連敗血症を含む敗血症；並びに骨髄炎を含むことが意図される。薬物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。

【0141】

シュードモナス・エルギノーサ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.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。

10

【0142】

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*)、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・タイオタオミクロン (*Bacteroides thetaioatamicron*)、バクテロイデス・ディスタソニス (*Bacteroides distasonis*)、バクテロイデス・オパトゥス (*Bacteroides ovatus*)、バクテロイデス・ウルガトゥス (*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)、パークホルデリア (*Burkholderia*) 属種 (パークホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*)、パークホルデリア・シュードマレイ (*Burkholderia pseudomallei*) 及びパークホルデリア・マレイ (*Burkholderia mallei*) 等)、フソバクテリウム (*Fusobacterium*)、プレボテラ・コーボリス (*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 (*Edwarsiella*) 属種 (エドワジエラ・タルダ (*Edwarsiella tarda*) 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*) 及びエンテロバクター・アグロメラン (*Enterobacter agglomerans*) 等)、大腸菌、野兔病菌 (*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*)、キングラ・キング (*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 (*Klebsiella ozaenae*) 等)、レジオネラ・ペヌモフィラ (*Legionella pneumophila*)、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

20

30

40

50

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*)、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 (*Rickettsia 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 (*Bartonella henselae*) の 1 つ以上から選択される。

【0143】

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、パークホルデリア・セバシア、パークホルデリア・シュードマレイ、パークホルデリア・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、野兔病菌、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。

【0144】

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、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、パークホルデリア属種、モラクセラ属種、野兔病菌、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。

【0145】

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、ペスト菌及び野兔病菌の 1 つ以上から選択される。

【0146】

幾つかの実施形態では、グラム陰性細菌による感染は、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。他の実施形態では、細菌感染は全身病原性細菌感染である。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 Ch p 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。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 7 】

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（G I）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（U T I）
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	U T I 及び血流感染症
淋菌	性行為感染症（S T D）－淋病
髄膜炎菌	髄膜炎
セラチア属種	カテーテル汚染、U T I 及び肺炎
プロテウス・ミラビリス	U T I
モルガネラ属種	U T I
プロビデンシア属種	U T I
エドワジエラ属種	U T I
チフス菌	G I 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	G I 感染症
仮性結核菌	G I 感染症
インフルエンザ菌	髄膜炎
バルトネラ・クインタナ	重壕熱
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	U T I 及び呼吸器
クラミジア属種	S T D、呼吸器及び眼

10

20

【 0 1 4 8 】

幾つかの実施形態では、本開示の C h p ペプチド及びその活性フラグメントは、グラム陰性細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。

30

40

【 0 1 4 9 】

別の態様では、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 C h p 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。

【 0 1 5 0 】

本開示の C h p ペプチド及びその活性フラグメントは、個別に又は当業者の技能の範囲内の様々な組合せで標準療法の抗生物質又は最終手段の抗生物質と同時投与することができる。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

50

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、サルモネラ菌、ペスト菌及び野兔病菌等の他のグラム陰性細菌に対する抗生物質は、シュドモナス・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。

【 0 1 5 1 】

表 B：シュドモナス・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	セフトジジム 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 ドリペネム
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

10

20

【 0 1 5 2 】

より具体的な実施形態では、抗生物質は、セフトジジム、セフェピム、セフォペラゾン、セフトピプロール、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。

【 0 1 5 3 】

本開示の C h p 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。幾つかの実施形態では、本開示の C h p 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、C h p ペプチド若しくはその活性フラグメントのいずれかが若しくは抗生物質、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、C h p 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。幾つかの実施形態では、組み合わせた C h p 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。

30

40

【 0 1 5 4 】

幾つかの実施形態では、本開示は、被験体に本明細書に開示の C h p 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。

50

【 0 1 5 5 】

本開示の抗生物質と任意に組み合わせた C h p 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、E D T A、T R I S、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。

【 0 1 5 6 】

更に別の態様では、本開示は、グラム陰性細菌の少なくとも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、有効量の明細書に記載される C h p 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 C h p 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。

10

【 0 1 5 7 】

幾つかの実施形態では、グラム陰性細菌の少なくとも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、細菌と明細書に記載される C h p 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。

20

【 0 1 5 8 】

本明細書に記載の C h p 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、膈内及び腸内器具、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。

30

【実施例】

【 0 1 5 9 】

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 C F S - 1 2 9 2 (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」)、B E I 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 (L B ; Sigma-Aldrich)、カザミノ酸 (C A A) 培地 (5 g / L カザミノ酸、Amresco/VWR ; 5 . 2 m M K₂ H P O₄、Sigma-Aldrich ; 1 m M M g S O₄、Sigma-Aldrich)、1 0 0 m M N a C l を添加した C A A、又は 2 . 5 % ヒト血清 (A B 型、男性、プールしたもの ; Sigma-Aldrich) を添加した C A A 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、T 4 リゾチーム) を Sigma-Aldrich から入手した。

40

50

【0160】

バイオインフォマティクス研究

全てのタンパク質を、全てのマイクロウイルス科及びレピ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 JPRED 4、及び www.zhanglab.ccm.b.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。

10

【0161】

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、ミュラー・ヒントン・プロスの 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。

20

【0162】

最小バイオフィーム根絶濃度 (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 ATCC 17647 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 0.15 ml 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ーム形成のため 37 で 24 時間インキュベートした。バイオフィームを洗浄し、TSB 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 OD₆₀₀ 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ームバイオマスの 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ーム活性を提供しない。

30

【0163】

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グラム陰性溶解素の倍加希釈物を含み、各行が一定量のグラム陰性溶解素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

40

50

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み合わせを含んでいた。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、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 は組み合わ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 は組み合わせでの各グラム陰性溶解素のMIC/単独での各グラム陰性溶解素のMICである)。組み合わせは、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のいずれかの組み合わせを含む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。大半の組み合わせで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ペプチドが抗生物質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。

10

【0164】

20

グラム陰性溶解素の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 Yet 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の各グラム陰性溶解素(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。

30

【0165】

グラム陰性溶解素活性の時間-死滅アッセイ

40

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1:00で希釈し、攪拌しながら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。

【0166】

顕微鏡観察

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

50

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10 μ g/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、微分干渉観察(DIC)顕微鏡及び蛍光顕微鏡により調べた。

【0167】

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(クラミジアマイクロウイルス科)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。

【0168】

クラミジアマイクロウイルスの公開されているゲノムをシnten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手法(JPREDD及びiTASSAR)を用いることで、多くのAMPの顕著な特徴であるヘリックスの存在を明らかにする構造予測が行われた。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。

【0169】

前述のとおり、シntenニック遺伝子座内の12個の保存配列をGenBankデータベースのマイクロウイルスゲノムから、具体的にはクラミジアマイ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。

【0170】

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(同じマイクロウイルス

10

20

30

40

50

科のクラミジアマイ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 14 種類の追加のペプチドをもたらした。39 種類のペプチド (Chp 5 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いずれもマイクロウイルス科の供給源に由来する。

【0171】

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 及び表 2 に提供する。この群には、ペプチドChp 1 ~ Chp 4 及びChp 6 ~ Chp 12、並びにCPAR 39 が含まれ(これらは11種類の異なるクラミジアマイクロウイルスに由来し、表 1 に記載される)、ペプチドChp 2 及びChp 3 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、Chp 5 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Chp 4 の修飾誘導体である。Chpファミリーの追加の27種類の成員は、クラミジアマイ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。27種類の追加のChpファミリーの成員は、クラミジアマイクロウイルス源に由来するものではなく、推定マイクロウイルスファージ源に由来する。

【0172】

表1ー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: Chp1 p08 GenBank: NP_044319.1 科: ミクロウイルス科	MVRRRLRRRISR RIFRRTVARVGR RRSFRGGIRF (配列番号1)	13.23/4669.64 (36)	ATGGTTCGTAGAAGACGTTTGAGAA GAAGAATAAGTAGAAGAATTTTATAG AAGAACAGTAGCTAGAGTTGGTAGA AGGCGAAGGTCTTTTCGTGGTGGTA TTAGATTTTAA (配列番号27)
Chp2	ファージ2 遺伝子: Ch-2 p5 GenBank: NP_054652.1 科: ミクロウイルス科	MRLKMARRRYRLP RRRSRLFSRTAL RMHPRNRLRRIMR GGIRF (配列番号2)	12.90/5708.98 (44)	ATGAGGTTAAAAATGGCACGAAGAA GATACAGACTTCCGCGACGTAGAAG TCGAAGACTTTTTCAAGAACTGCA TTGAGGATGCATCCAAGAAATAGGC TTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCAT TAGGTTCTAG (配列番号28)
CPAR39	ファージCPAR39 遺伝子: CPA000S GenBank: NP_063898.1 科: ミクロウイルス科	MCKKVCKKCPKKG PKNAPKIGAFYER KTPRLKQST (配列番号3)	10.26/3993.91 (35)	TTGTGCAAAAAAGTGTGCAAAAAAT GCCCAAAAAAGGGCCAAAAAATGC CCCCAAAATCGGAGCATTTTACGAG AGAAAAACACCTAGACTTAAACAGT CTACTTGA (配列番号29)
Chp3	ファージ3 遺伝子: CP3p6 GenBank: YP_022484.1 科: ミクロウイルス科	MRLKMARRRYRLP RRRSRLFSRTAL RMHPRNRLRRIMR GGIRF (Chp2と同じ配列) (配列番号54)	12.90/5708.98 (44)	ATGAGGTTAAAAATGGCACGAAGAA GATACAGACTTCCGCGACGTAGAAG TCGAAGACTTTTTCAAGAACTGCA TTAAGGATGCATCCAAGAAATAGGC TTCGAAGAATTATGCGTGGCGGCAT TAGGTTCTAG (配列番号53)
Chp4	ファージ4 遺伝子: Chp4p6 GenBank: YP_338243.1 科: ミクロウイルス科	MARRYLSRRRSR RLFSRTALRMHRR NRLRRIMRGGIRF (配列番号4)	12.88/5073.11 (39)	ATGGCACGAAGATACAGACTTTCGC GACGCAGAAGTCGACGACTTTTTTC AAGAACTGCATTAAGAATGCATCGA AGAAATAGACTTCGAAGAATTATGC GTGGCGGCATTAGGTTTTAG (配列番号30)
Chp5	ファージChpQE ファージ4の誘導体	MAEQYELSQQE QLFSETALQMHEQ NELQEIMQGGIEF (配列番号5)	3.73/4605.01 (39)	ATGGCGGAACAGTATGAACTGAGCC AGGAACAGAGCGAACAGCTGTTTAG CGAAACCGCGCTGCAGATGCATGAA CAGAACGAACTGCAGGAAATTATGC AGGGCGGCATTGAATTTTAA (配列番号31)
Chp6	モルモットクラミ	MARRRYLPRRRS	12.88/5180.2	ATGGCACGAAGAAGATACAGACTTC

10

20

30

40

	ジアフエージ GenBank : NP_510878.1 科：マイクロウイルス科	RRLFSRTALRMHP RNRLRRIMRGGIR F (配列番号6)	7 (40)	CGCGACGTAGAAGTCGAAGACTTTT TTCAAGAACTGCATTAAGGATGCAT CCAAGAAATAGGCTTCGAAGAATTA TGCGTGGCGGCATTAGGTTCTAG (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：マイクロウイルス科	MKRRKMRKGSKR LFTATADKTKSIN TAPPPMRGGIRL (配列番号7)	12.31/4302.19 (38)	ATGAAACGTAGAAAAATGACAAGAA AAGGTTCTAAGCGTCTTTTTACTGC AACTGCTGATAAACTAAATCTATC AATACTGCCCGCCGCAATGCGTG GCGGTATCCGGTTGTAA (配列番号33)	10
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：マイクロウイルス科	MSKKRSRMSRRRS KKLFSKTALRTKS VNTRPPMRGGFRF (配列番号8)	12.91/4672.61 (39)	ATGTCTAAAAAGCGTTCTCGCATGT CTCGCCCGGTTCTAAGAAGTTGTT CTCGAAAACGGCTCTCCGCACGAAG AGTGTCAACACCCGTCGCCCTATGC GCGGAGGTTCCGGTTCTGA (配列番号34)	20
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：マイクロウイルス科	MSLRRHKLSRKAS KRIFRKGASRTKT LNTRATPMRGGFRI (配列番号9)	12.91/4672.60 (40)	ATGTCTCTTCGTCGCATAAGCTTT CTCGTAAGCGTCTAAGCGTATTTT TCGTAAGGTGCATCACGCACGAAG ACTTTGAATACTCGTGCTACGCCTA TGCGCGCGGTTTCCGTATTAA (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：マイクロウイルス科	MKRRKLSKKKSRK IFTRGAVNVKKRN LRARPMRGGFRI (配列番号10)	12.91/4570.64 (38)	GTGAAACGTCGTAAACTGTCCAAAA AGAAATCTCGCAAGATTTTCACTCG CGGTGCTGTAATGTGAAAAAGCGT AACCTTCGCGCTCGCCCAATGCGCG GCGGTTTCCGGATCTAA (配列番号36)	30
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：マイクロウイルス科	MAKKMTKGKDRQV FRKTADRTKKNV RPLLYRGGIRL (配列番号11)	11.74/4375.32 (37)	ATGGCTAAAAAATGACTAAAGGCA AGGATCGTCAGGTTTTTCGTAAAC CGCTGATCGTACTAAGAACTCAAT GTTAGACCGTTGTTATATCGAGGAG GTATCAGATTATGA (配列番号37)	40
Chp12	特徴が不明なタンパク質 (クラミジ	MAGKKMVSKGKDR QIFRKTADRTKKNV	11.74/4549.53 (39)	ATGGCAGGAAAAAATGGTATCAA AAGGAAAAGATAGACAGATTTCCG	

	ア・トラコマティ ス) G e n B a n k : C R H 5 9 9 6 5 . 1 科：マイクロウイル ス科	NVRPLLYRGGIRL (配列番号 1 2)		AAAAACTGCTGATCGCACTAAAAAA ATGAATGTGCGCCCGCTATTATATC GTGGAGGTATTAGATTATGA (配 列番号 3 8)
--	--	--------------------------------	--	---

【 0 1 7 3 】

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	海洋ゴクシヨウウイルス 遺伝子: V508 _g p 1 GenBank: YP_008798245.1 未分類ゴクシヨウウイルス亜科	MRRPRKMNYKSK RMFSRTAARTHK NSLRGSRPMRGGI RL (配列番号 13)	12.66/4974.9 7 (41)	ATGAGAAGACCAAGAAAAATGAACT ATAAAAAATCAAAAAGAATGTTTTTC ACGCACAGCAGCGAGAACACACAGA AAAAACTCTCTAAGAGGTAGCCGAC CTATGAGAGCGGAATACGTCTTTA A (配列番号39)
Gkh2	ゴクシヨウウイルス 亜科 Fen672 _31 遺伝子: AFL7 8_g p 4 GenBank: YP_009160382.1 未分類ゴクシヨウウイルス亜科	MSKKASRKSFTKG AVKVHKKNPTRV PMRGGIRL (配 列番号14)	12.49/3794.6 3 (34)	ATGTCGAAGAAGGCGTCGAGGAAGA GTTTTACTAAGGGTGCCGTTAAGGT TCATAAGAAAAATGTTCTACTCGT GTTCTATGCGTGGCGGTATTAGGC TTTAG (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	MKMRKRTDKRVFT RTAAKSKVNIAP KIFRGGIRL (配 列番号15)	12.31/4104.0 4 (35)	ATGAAAATGCGTAAGCGGACGGACA AGCGAGTGTTTACCCGCACCGCTGC TAAGTCCAAGAAAGTGAACATTGCC CCGAAAATTTTAGAGGAGGTATCC GTCTGTGA (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	MARSRRMSKRSS RRSFRKYAKTHKR NFKARSMRGGIRL (配列番号16)	12.70/4812.7 2 (39)	ATGGCTCGTCTCGCCGTCGTATGT CCAAGCGTCTTCCCCTCGTTCGTT CCGTAAGTACGCAAAGACGCATAAA CGTAACTTTAAAGCCCGCTATGC GTGGTGGAAATTCGTCTTTGA (配 列番号42)
Tma1	仮想タンパク質 (サ ーモディスカス・マ リテイマス (T. maritimus)) SAMN04488044_0855 GenBank: SHG47122 .1	MESPNSRSQLGIT LYLLSTIFPDACF RYRRELPLYPLVIW GVATLCLQ (配 列番号17)	7.80/5433.39 (47)	ATGGAAAGCCGAACAGCCGAGCC AGCTGGGCATTACCCTGTATCTGCT GAGCACCATTTTTCCGGATGCGTGC TTTCGCTATCGCCGGAAGTCCGT ATCCGCTGGTGATTTGGGGCGTGGC GACCCTGTGCCTGCAGTAA (配 列番号43)
Ecp2	仮想タンパク質 E C13107_4 4c00010 (大腸菌) GenBank: OAC14041	MARSRRMSKRSS RRSFRKYAKSHKK NFKARSMRGGIRL (配列番号18)	12.66/4770.6 8 (39)	ATGGCTCGTCCCCTAGACGTATGT CTAAGCGTCTTCCCCTCGTTCGTT CCGCAAGTATGCGAAGTCGCATAAG AAGAAGTAAAGCCCGCTCAATGC GTGGCGGTATCCGTTTATAA (配 列番号44)

10

20

30

40

	. 1 乳房、急性乳腺炎				
Osp1	仮想タンパク質 S A M N 0 5 2 1 6 3 4 3 _ 1 0 3 1 5 0 (オシロバク ター種 P C 1 3) G e n B a n k : S F P 1 3 7 6 1 . 1	MRKRMSKRVDKVV FRRTAASAKKINI DPKIYRGGIRL (配 列番号 1 9)	11.90/4389.3 5 (37)	ATGAGAAAGCGAATGTCTAAGCGTG TTGACAAGAAGGTGTTCCGTCGTAC TGCCGCATCTGCCAAGAAGATTAAC ATTGACCCCAAGATTTACCGTGGAG GTATTGCCTATGA (配列番号 4 5)	
Unp2	無名のタンパク質 産物 G e n B a n k : C D L 6 5 9 1 8 . 1 染色体外 D N A R G I 0 0 3 2 7	MRRRRLSRRTSRR FFRKGLKVRRLNL RARPMRGGFRI (配 列番号 2 0)	13.18/4757.7 7 (37)	ATGAGACGTCGTCGTCTATCCCGCA GAACTTCCCGCGTTTTTCCGTAA AGGACTTAAGTTCCGCGTCGTAAC CTCCGCGGAGACCCATGAGAGGCG GATTGAGAATTTGA (配列番号 4 6)	10
Unp3	無名のタンパク質 産物 G e n B a n k : C D L 6 5 8 0 8 . 1 染色体外 D N A R G I 0 0 2 3 4	MARRKMKGKRDK RVFKQTANKTKAI NISPKNMRGGTRL (配列番号 2 1)	12.32/4545.5 1 (39)	ATGGCACGACGCAAGAAGATGAAAG GCAAGCGGGATAAACGGGTGTTAA GCAGACAGCCAACAAAACCAAGGCT ATCAACATCAGCCAAAAAATGGA GAGGGGTACGAGACTGTGA (配 列番号 4 7)	20
Gkh3	仮想タンパク質 (海 洋ゴクシヨウイ ルス) G e n B a n k : A G T 3 9 9 4 1 . 1	MLTVWSDPTIKR RKDMYRKRMSRKK SKKVFATAMKVN KRNHVKPMRGGYR I (配列番号 2 2)	11.2/6440.82 (53)	ATGTTAACTGTGTGGAGTGACACCC CTACCATAAAAAAGGAGAAAAGACAT GTATAGAAAAGAGAATGTCAAGAAAG AAAAGTAAAAAGGTTTTTGCAAAA CCGCAATGAAAGTAAATAAAGAAA CCACGTTAAACCTATGCGTGGTGA TATAGAATATAA (配列番号 4 8)	
Unp5	仮想タンパク質 (海 洋ゴクシヨウイ ルス) G e n B a n k : A G T 3 9 9 2 4 . 1	MMKYRKKMSAKSS RKQFTKGAMKVK KNFTKPMRGGIRL (配列番号 2 3)	12.04/4536.6 1 (39)	ATGATGAAGTACAGAAAAAATGA GCGCTAAAAGTAGCCGAAAGCAATT TACAAAAGCGCCATGAAAGTGAAG GGTAAAACTTACAAAACCAATGC GCGGAGGCATCCGTCTATAG (配 列番号 4 9)	30
Unp6	仮想タンパク質 (海 洋ゴクシヨウイ ルス) G e n B a n k : A G T 3 9 9 1 5 . 1	MRRYNVNGKSAK KFRKQVSKTKVAN LRSNPMRGGWRL (配列番号 2 4)	12.31/4492.3 4 (38)	ATGCGACGTTACAATGTAATAAAG GTAATCTGCTAAGAAGTTTCGAAA GCAGGTAAGTAAGACGAAGTTGCA AACCTACGTCTAATCCAATGCGAG GTGGTTGGAGACTCTAA (配列番 号 5 0)	
Spi1	仮想タンパク質 S p - 4 p 3 (スピ ロプラズマウイル ス S p V 4) O r f 9 N C B I 参照配列 : N P _ 5 9 8 3 3 7 . 1	MAYRFGKTSRVVK HRVRRWFNHRRL YR (配列番号 2 5)	12.37/3776.4 5 (28)	ATGGCTTATCGTGTTTTAAACGA GTCGTGTTGTAACATAGAGTACG TAGAAGATGGTTAATCATAGAAGA CGTTATAGATAG (配列番号 5 1)	40
Spi2	仮想タンパク質 S	MRRKVKNTKRHW	12.91/4629.4	GTGAGACGCAAGGTTAAGAACACAA	

	p-4p2 (スピロプラズマウイルス SpV4) Orf8 NCB I 参照配列: NP_598336.1	RLTHSARSIKRAN IMPSNPRGGRRF (配列番号 26)	5 (38)	AGCGTCATCAGTGGAGGTTGACTCA TTCTGCACGTTCAATTAACGTGCT AATATAATGCCGTCAAATCCTCGTG GTGGACGTCGTTTTTAG (配列番号 52)	
Ecp3	非構造タンパク質 (エシェリヒア) NCB I 参照配列: WP_105269219.1	MARSRRRMSKRSS RRSFRKYAKTHKK NFKARSMRGGIRL (配列番号 55)	12.76/4784.69 (39)	ATGGCTCGTCTCGTCGTCGTATGT CTAAACGTTCTTCTCGTCGTTCTTT TCGTAATAATGCTAAAACTCATAAA AAAAATTTAAAGCTCGTTCTATGC GTGGAGGAATTCGTTTATAA (配列番号 68)	10
Ecp4	非構造タンパク質 (エシェリヒア) NCB I 参照配列: WP_105466506.1	MARSRRRMSKRSS RRSFRKYAKSHKK NFKARSMRGGIRL (配列番号 56)	12.66/4770.68 (39)	ATGGCGCGCAGCCGCCCGCATGA GCAAACGCAGCAGCCGCCGAGCTT TCGCAAATAATGCGAAAAGCCATAAA AAAAACTTTAAAGCGCGCAGCATGC GCGGCGGCATTGCGCTG (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) NCB I 参照配列: NP_042306.1	MSSTLCRWAVKAL RCTRVYKEFIWKP LVALSYVTLYLLS SVFLSQLSYPIGS WAV (配列番号 57)	9.7/6346.6 (55)	TTGTCGTCAACCTTGTGCCGCTGGG CCGTTAAGGCCCTGCGGTGTACCCG TGTGTATAAGGAGTTTATATGGAAA CCCTTAGTAGCGCTCAGTTACGTGA CGTTGTATCTTCTGAGCTCGGTCTT CCTGTCCCAACTCAGCTACCCCATC GGGAGCTGGGCGGTGTAG (配列番号 70)	20
(ABP1) Lvp2	溶解タンパク質 (アシネトバクターファージ AP205) NCB I 参照配列: NP_085469.1	MKKRTKALLPYAV FIILSFQLTLTA LFMYHYTF (配列番号 58)	9.93/4247.21 (35)	ATGAAGAAAAGGACAAAAGCCTTGC TTCCCTATGCGGTTTTTCATCACT CAGCTTTCAACTAACATTGTTGACT GCCTTGTATGTATTACCATTATA CCTTTTAG (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マイクロウイルス MP125423) NCB I 参照配列: AXB22573.1	MAKKIRNKARRR IFTRTASRMHKAN RTPRFMRGGIRL (配列番号 59)	12.70/4599.52 (38)	ATGGCAAAGAAAATTAGAAACAAAG CACGTGATAGCGTATCTTCACAAG AACAGCTTCACGCATGCACAAGGCA AACCGCACACCAAGATTTATGAGAG GCGGTATTAGGTTATGA (配列番号 72)	30
AVQ206	仮想タンパク質 (ゴクショウイルス 亜科環境サンプル) NCB I 参照配列: AVQ10236.1	MRRKKMSRGSKK LFRRTAKRVHRKN LRARPMRGGIRM (配列番号 60)	13.10/4680.78 (38)	ATGCGTCGTAAAAAATGTCACGCG GTAATCAAAAAAATCTTTCGCCG AACAGCAAAACGCGTTCATCGAAAA AACCTACGAGCTCGCCCAATGCGTG GCGGCATACGCATGTAG (配列番号 73)	40
AVQ244	仮想タンパク質 (ゴクショウイルス 亜科環境サンプル) NCB I 参照配列: AVQ10236.1	MAKRHKIPQRSQ HSFTRHAQKVHPK NVPRLPMRGGIRL (配列番号 61)	12.8/4566.43 (39)	ATGGCGAAGCGACACAAAATCCCGC AACGCGCGTACAACATTCTTCAC GCGCCATGCGCAAAAGGTCCACCCT AAGAAGTTCCCGCCTGCCAATGC	

	N C B I 参照配列 : A V Q 1 0 2 4 4. 1	1)		GAGGCGGTATCCGTCTCTAA (配 列番号 7 4)	
CDL907	無名のタンパク質 産物 (無培養細菌) N C B I 参照配列 : C D L 6 5 9 0 7. 1	MRKKMHKSLDKRV FNRTAKKSKKINV NPVVYRGGIRL (配 列番号 6 2)	11.96/4398.2 2 (37)	ATGCGTAAAAAATGCACAAATCAT TAGACAAGCGAGTGTTTAACCGCAC TGCAAAAAAATCAAAAAATAAAT GTAAATCCTGTAGTTTATCGTGGAG GTATTAGATTATGA (配列番号 7 5)	
AGT915	仮想タンパク質 (海 洋ゴクシヨウイ ルス) N C B I 参照配列 : A G T 3 9 9 1 5. 1	MRRYVNVKGSKAK KFRKQVSKTKVAN LRSNPMRGGWRL (配列番号 6 3)	12.41/4492.3 2 (38)	ATGCGACGTACAATGTAATAAAG GTAATCTGCTAAGAAGTTTCGAAA GCAGGTAAGTAAGACGAAGGTTGCA AACCTACGTCTAATCCAATGCGAG GTGGTTGGAGACTCTAA (配列番 号 7 6)	10
HH3930	仮想タンパク質 R I N T H H _ 3 9 3 0 (リケリア・ イントラセルラリ ス (Richelia intracellularis) H H 0 1) N C B I 参照配列 : C C H 6 6 5 4 8. 1	MRPVKRSRVNKAR SAGKFRKQVGKTK MANLRSNPMRGGW RL (配列番号 6 4)	12.95/4755.6 9 (41)	ATGCGTCCAGTTAAAAGATCAAGAG TAAATAAGGCCGATCTGCAGGCAA GTTTCGTAAGCAGGTCGGTAAAACA AAGATGGCAAACTGCGTAGTAATC CGATGCGCGCGGATGGCGGCTGTG A (配列番号 7 7)	20
Fen7875	仮想タンパク質 (ゴ クシヨウウイルス 亜科 F e n 7 8 7 5 _ 2 1) N C B I 参照配列 : Y P _ 0 0 9 1 6 0 3 9 9 . 1	MKPLKRKPVQKAR SAAKFRRVSTVK AANMAVKPMRGGW RF (配列番号 6 5)	12.81/4699.7 (41)	ATGAAGCCATTGAAGCGTAAGCCGG TTCAGAAGCGCGGTCAGCAGCCAA GTTCCGTCGAAATGTGTCTACCGTT AAGGCTGCCAATATGGCGGTGAAGC CGATGCGCGCGGTTGGCGGTTCTG A (配列番号 7 8)	
SBR77	仮想タンパク質 S E A _ B A B Y R A Y _ 7 7 (マイ コバクテリウムフ ァージ B a b y R a y) N C B I 参照配列 : A O T 2 5 4 4 1	MTKRDIEYRKALG LNPSEPLPKIVGA VTRHGATLKRPRV TALAR (配列番 号 6 6)	11.48/4882.7 8 (44)	ATGACCAAGAGAGACATCGAGTACC GGAAAGCTTTGGGGCTCAACCCATC TGAGCCGCTCCCGAAGATTGTGGGT GCCGTACCCGCCACGGGGCCACTC TGAAACGCCACGGGTCACCGCACT GGCCCGATAG (配列番号 7 9)	30
Bdp1	推定の D N A 結合 タンパク質 (ブデ ロビブリオファ ージ p h i M H 2 K) N C B I 参照配列 : N P _ 0 7 3 5 4 6 . 1	MKRKPMRSKASQK TFKKTGVQRMNH LNPRAMRGGIRL (配列番号 6 7)	12.9/5708.98 (38)	ATGAAAAGAAAACCAATGAGCCGCA AGGCCTCTCAAAAAACCTTCAAAAA GAACACAGGCGTTCAACGCATGAAC CATCTCAACCCACGCGCCATGCGTG GTGGCATTAGACTATAA (配列番 号 8 0)	40

【 0 1 7 4 】

幾つかの C h p 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。C h p 1、B d p 1、L v p 1 及び L v p 2 のみが、G e n B a n k の注釈で予
測される活性が示されている C h p ファミリーの成員である。C h p 1 (G e n B a n k
配列 N P _ 0 4 4 3 1 9 . 1) は D N A 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、C h p タンパク質は互いに 3 9 % ~ 1 0 0 % 同一であり、タンバ

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。

【0175】

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	フェージ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

10

20

30

40

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	10
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	20
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	30
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	40
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	10
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	20
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	30
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	40
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	

【0176】

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（NH₂））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。対照ペプチドRI18、RP-1、WLB U2、BAC3、GN-2 amp、GN-3 amp、GN-4 amp、GN-6 amp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。

10

【0177】

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）

39種類の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。まず、2.5%のヒト血清を添加したCAA培地における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に対するMIC値を決定した（表4）。Chp1、Chp2、Chp4、Chp6、CPAR39（ジチオスレートール（DTT）を含む）、Chp7、Chp8、Chp10、Chp11、Ecp1、Ecp2、Osp1、Spi1、Gkh3、Unp2、Unp5、Unp6、Ecp3、Ecp4、Lvp1、ALCES1、AVQ206、CDL907、AGT915及びSBR77を含む幾つかのペプチドは、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は活性が不十分であり、32µg/mL以上のMIC値を示した。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。

20

30

【0178】

表 4

ペプチド	CFS-1292に対するMIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Chp1	2
Chp2	0.5
CPAR39+DTT	4
CPAR39-DTT	64
Chp4	0.5
Chp5	>64
Chp6	0.25
Chp7	4
Chp8	2
Chp9	8
Chp10	2
Chp11	4
Chp12	8
Gkh1	128
Gkh2	8
Gkh3	2
Unp1	32
Unp2	1
Unp3	8
Unp5	2
Unp6	4
Ecp1	0.5
Tma1	n. d.
Ecp2	1
Osp1	0.5
Spi1	2
Spi2	64
Ecp3	4
Ecp4	2
Bdp1	>128
Lvp1+DTT	2
Lvp2	8
ALCES1	2
AVQ206	2
AVG244	>16
CDL907	2
AGT915	1
HH3930	n. d.
Fen7875	n. d.
SBR77	0.5

10

20

30

40

50

或る特定の主要な E S K A P E 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 C h p 1、C h p 2、C h p 4、C P A R 3 9 (D T T なし)、C h p 6、E c p 1 及び E c p 2 を用いて、追加の M I C 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 C A A (生理学的塩濃度を備える) で試験を行った。1 μ g / m L ~ 4 μ g / m L の優れた M I C 値は、C h p 2、C h p 4、C h p 6、E c p 1 及び E c p 2 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 C h p ペプチドの広域スペクトル活性を示した。C h p 2 及び E c p 1 をサルモネラ菌に対して追加的に試験し、2 μ g / m L の M I C を有することを実証した。

【 0 1 8 0 】

表 5

RSC	生物 (株番号)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						
		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	クレブシエラ属の複数種 (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	クレブシエラ属の一種 (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・パウマンニ (臨床分離株HSS)	2	64	4	2	2	8	2
32	アシネトバクター・パウマンニ (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

【0181】

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

10

20

30

40

50

能になる。表6では、Chp2及びChp4のMIC値は2 μ g/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 = 1 μ g/mL ~ 4 μ g/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。

【0182】

表6

作用物質	最小阻止濃度(μ g/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

10

20

30

40

【0183】

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0.25 μ g/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4 μ g/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64 μ g/mL超であることが観察された。

【0184】

表7

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

【0185】

実施例5：Chpペプチドと抗生物質との組み合わせ

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

50

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み合わせを、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。表8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。

【0186】

10

表8

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

20

【0187】

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37種類のChpペプチドのうち33種類について、MHC値が128µg/mL超であり、溶血の証拠は認められなかった(表9)。Triton X100対照は、2%の開始濃度で試験し、MHCは0.007%で観察された。比較すると、RI18、R12、RR12p及びRR12hを含む既知の溶血活性を有する4種類のAMPでは、4µg/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及び表2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。

30

40

【0188】

表9：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 ($\mu\text{g/mL}$)
対照ペプチド	
RI18	128
RR12	8
RR12p	4
RR12h	32
T r i t o n 対照*	1
C h p 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
Unp5	>128
Unp6	>128
Spi1	>128
Spi2	>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

10

20

30

40

50

【0189】

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 - 死滅形式で調べた。濃度 $1\mu\text{g/mL}$ 及び $10\mu\text{g/mL}$ 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

において強力な殺菌活性と一致する数 10 g 倍 (multi-log fold) の減少をもたらした(表 10)。表 10 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-死滅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。

【0190】

表 10

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

10

【0191】

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、安定性の評価を行った。安定性を、100% ヒト血清中で 37 °C でのインキュベーションの 10 分後、1 時間及び 2 時間後に評価した。結果を下記表 11 に示す。

【0192】

表 1 1

ペプチド	M I C の倍変化		
	1 0 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

10

20

30

40

【 0 1 9 3 】

表 1 1 に示すように、Chp 1、Chp 2、CPAR 39、Chp 4、Chp 5、Chp 6、Chp 7、Chp 8、Chp 9、Chp 10、Chp 11、Chp 12、Gkh 1、Gkh 2、Gkh 3、Ecp 1、Ecp 2、Ecp 3、Ecp 4、Osp 1、Unp 1、Unp 2、Unp 3、Unp 5、Unp 6、Spi 1、Spi 2、Bdp 1、Lvp 1、Lvp 2、ALCES 1、AVQ 206、AVQ 244、CDL 907、AGT 915、HH 3930、Fen 7875 及び SBR 77 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。

【 図 2 B 】

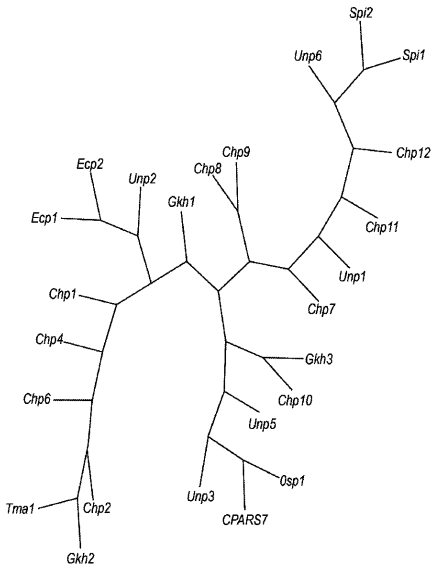


FIG. 2B

【 図 3 】

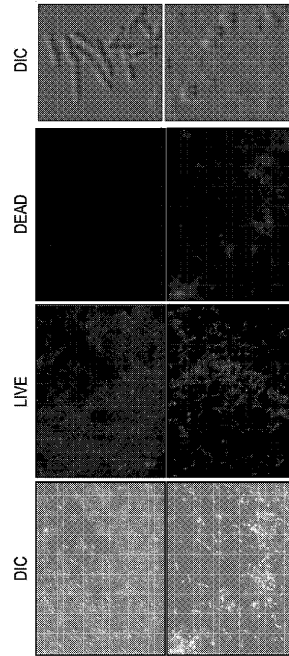


FIG. 3

【 配列表 】

2021519311000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2019/024854
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/16; A61P 31/04; C07K 14/00; C12N 15/11 (2019.01) CPC - A61K 38/00; A61K 38/16; A61P 31/04; C07K 14/00 (2019.05)		
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 USPC - 435/320.1; 514/12; 514/2.4; 514/2.3; 514/2.8; 514/21.3; 530/324; 536/23.1 (keyword delimited)		
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 -- Y	US 2005/0142547 A1 (BRUNHAM et al) 30 June 2005 (30.06.2005) entire document	1, 2, 4, 8, 14, 15, 17-19 3, 9-11, 16
Y	US 2015/0315259 A1 (MADELEINE PHARMACEUTICALS PTY LTD) 05 November 2015 (05.11.2015) entire document	3, 16
Y	US 2009/0106854 A1 (ELUMALAI et al) 23 April 2009 (23.04.2009) entire document	9-11
Y	LIU et al. "Molecular characterization of a bacteriophage (Chp2) from Chlamydia psittaci," Journal of Virology, 15 April 2000 (15.04.2000), Vol. 74, Iss. 8, Pgs. 3464-3469. entire document	11
A	WO 2017/049233 A2 (CONTRAFECT CORPORATION) 23 March 2017 (23.03.2017) entire document	1-4, 8-11, 14-22
A	US 2012/0178138 A1 (MACLEAN) 12 July 2012 (12.07.2012) entire document	1-4, 8-11, 14-22
A	STOREY et al. "Analysis of the complete nucleotide sequence of Chp1, a phage which infects avian Chlamydia psittaci," J Gen Virol, 01 December 1989 (01.12.1989), Vol. 70, Pgs. 3381-3390. entire document	1-4, 8-11, 14-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 July 2019		Date of mailing of the international search report 22 AUG 2019
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 PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/024854

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

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

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-4, 6-30, 32-66, and 68-79 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/024854

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.: 5-7, 12, 13, 23-34
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/12	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 15/33 (2006.01)	C 1 2 N 15/33	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 14/005 (2006.01)	C 0 7 K 14/005	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

Fターム(参考) 4C076 AA11 AA22 AA24 AA29 AA93 CC32 FF70
 4C084 AA02 AA19 BA01 BA08 BA19 BA23 CA01 MA13 MA17 MA23
 MA43 NA05 NA14 ZB35 ZC75
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 DA86 EA20 FA10 FA74