

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6840086号
(P6840086)

(45) 発行日 令和3年3月10日(2021.3.10)

(24) 登録日 令和3年2月18日(2021.2.18)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 38/16	(2006.01)
A 61 K 38/10	(2006.01)
A 61 K 38/08	(2019.01)
C 07 K 14/75	(2006.01)
A 61 P 17/00	(2006.01)
A 61 K	38/16
A 61 K	38/10
A 61 K	38/08
C 07 K	14/75
A 61 P	17/00

請求項の数 14 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-549280 (P2017-549280)
(86) (22) 出願日	平成28年3月21日 (2016.3.21)
(65) 公表番号	特表2018-512844 (P2018-512844A)
(43) 公表日	平成30年5月24日 (2018.5.24)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2016/056179
(87) 國際公開番号	W02016/150926
(87) 國際公開日	平成28年9月29日 (2016.9.29)
審査請求日	平成31年3月18日 (2019.3.18)
(31) 優先権主張番号	15305414.3
(32) 優先日	平成27年3月20日 (2015.3.20)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	509033033 ユニベルシテ・パリ・デカルト UNIVERSITE PARIS DE SCARTES フランス国、エフー75270 パリ・セ デックス 06、リュ・ドゥ・レコール・ ドゥ・メドゥシヌ 12
(73) 特許権者	591140123 アシスタンス ピュブリク-オピトー ド ウ パリ ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS フランス国、75004 パリ、アベニュー - ピクトリア 3番地

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物として、特に皮膚炎症性疾患において使用するためのフィブリノゲン由來の単離されたペプチドおよびそれらのフラグメント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

最適なグローバルアラインメントの後に配列番号 1 と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド、または、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号 2、5 および 7 ~ 13 および 47 のいずれか 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、そのフラグメントを含んでなる、皮膚炎症性疾患の治療および/または予防に使用するための薬剤。

【請求項 2】

配列番号 1 を含んでなる単離されたポリペプチドまたは配列番号 2、5 および 7 ~ 13 および 47 のいずれか 1 つを含んでなる、そのフラグメントを含んでなる、請求項 1 に記載の薬剤。 10

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、配列番号 2、5 および 7 ~ 13 および 47、または最適なグローバルアラインメントの後に配列番号 2、5 および 7 ~ 13 および 47 の 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有するポリペプチドから選択される、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 4】

前記皮膚炎症性疾患が、紫外線 (UVR)、電磁放射線、アレルゲンへの暴露、または化学刺激物との接触から生じる、皮膚搔痒および発赤を伴う偶発的発疹並びに慢性炎症性皮膚疾患から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項 5】

前記皮膚炎症性疾患が、座瘡である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項 6】

前記ポリペプチドまたはそのフラグメントが、宿主細胞への細菌接着に関与する少なくとも 1 つの微生物タンパク質のフィブリノゲンとの相互作用を阻害することができ、前記細菌は好ましくはアクネ菌であり、フィブリノゲンは好ましくはヒトフィブリノゲンである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項 7】

前記皮膚炎症性疾患が、乾癬である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項 8】

配列番号 7 ~ 1 2 の 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる、配列番号 1 の 5 ~ 1 5 アミノ酸配列のフラグメント、または、配列番号 2 、 5 、 1 3 および 4 7 から選択されるフラグメント、前記フラグメントをコードする単離された核酸分子、前記核酸分子を含んでなるベクター、前記核酸分子または前記ベクターを含んでなる宿主細胞から選択される少なくとも 1 つの化合物と薬学上許容可能なビヒクルとを含んでなる、医薬組成物。

10

【請求項 9】

皮膚炎症性疾患の治療および / または予防に使用するための、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記皮膚炎症性疾患が、紫外線 (U V R) 、電磁放射線、アレルゲンへの暴露、または化学刺激物との接触から生じる、皮膚搔痒および発赤を伴う偶発的発疹並びに慢性炎症性皮膚疾患から選択される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 11】

乾癬および / または座瘡の治療および / または予防において使用するための、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

皮膚炎症性疾患の治療および / または予防における同時、個別または逐次使用のための、

a) 配列番号 7 ~ 1 2 の 1 つから選択されるアミノ酸配列を含んでなる、配列番号 1 の 5 ~ 1 5 アミノ酸配列のフラグメント、または、配列番号 2 、 5 、 1 3 および 4 7 から選択されるフラグメント、

30

前記フラグメントをコードする単離された核酸分子、

前記核酸分子を含んでなるベクター、

前記核酸分子または前記ベクターを含んでなる宿主細胞から選択される少なくとも 1 つの化合物 ; 並びに

b) 別の薬剤

を含んでなる、組合せ医薬。

【請求項 13】

前記別の薬剤が、皮膚炎症性疾患の治療および / または予防のために使用される、請求項 1 2 に記載の組合せ医薬。

40

【請求項 14】

前記別の薬剤が、乾癬および / または座瘡の治療および / または予防のために使用される、請求項 1 3 に記載の組合せ医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、医学分野、特に炎症性皮膚疾患の分野にあり、より詳しくは、本発明は、特に、炎症性皮膚疾患、より詳しくは、座瘡の予防および / または治療のための薬物として使用するための、ヒトフィブリノゲンから得られた単離されたペプチドに関する。本発明はまた、これらのポリペプチドのフラグメント、それらをコードする核酸分子、それらを

50

含有する発現ベクター、宿主細胞、医薬組成物および組合せ物、ならびに炎症性皮膚疾患、特に座瘡を治療および/または予防するためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

炎症性皮膚障害は、軽度の搔痒から重度の医学的合併症までの重篤度範囲の多くの病態を含む広いカテゴリーを包含する。これらの障害は、あらゆる年齢層および人種に共通している。これらの障害は皮膚の刺激および炎症を特徴とする。これらの疾患は時にひどくなり、罹患者に多大な不快を引き起こし得る。炎症性皮膚障害の周知の例は座瘡である。

【0003】

座瘡は、80%を超える若年成人を侵す皮膚の多因子性疾患である。この疾患は毛包脂腺囊に局在し、炎症性病巣と非炎症性病巣の両方を特徴とする。患者は、非炎症性の面皰と炎症性の丘疹、膿疱および小結節の混合状態を呈することがある。炎症性座瘡の発生を促す要因の1つが嫌気性アクネ菌(*Propriionibacterium acnes*)(*P. acnes*)株による毛包脂腺管の細菌定着である。

【0004】

実際に、アクネ菌は、イン・ビトロ(*in vitro*)においてはケラチノサイト、皮脂細胞および単球による炎症性分子(インターロイキンIL-1/IL-8、IL-12、TNF-α/-デフェンシン)の生産を誘導でき、イン・ビボ(*in vivo*)においては座瘡病巣においても同様である。この生産は、TLR2受容体およびNF-κBおよびMAPKシグナル伝達経路ならびにNLRP3インフラマソーム経路の活性化を含む。アクネ菌はまたケラチノサイトによる反応性酸素種(ROS)の定量生産を誘導し、炎症反応の開始に寄与する(Graham 2004; Grange 2009a; Grange 2009b; Kang 2005; Nagy 2005; Trivedi 2006; Qin 2014; Kistowska 2014; Jugeau 2005)。

【0005】

現在、レチノイド(ビタミンA誘導体)、アゼライン酸、サリチル酸、過酸化ベンゾイル、局所および経口抗生剤などのいくつかの抗座瘡処置が存在する。

【0006】

これらの処置の作用は様々であり、異なる効果を有する。一般に、抗生剤は細菌を死滅させ、レチノイドおよびアゼライン酸は微小面皰の発生を予防し、抗微生物特性および抗炎症特性を有する。

【0007】

他の化学化合物は、細菌侵入に関連する特定の機構を標的とする。

【0008】

アクネ菌は、ヒト皮膚に接着することができ(Grice 2009)、非特異的相互作用を用いてその播種領域から感染部位へ移動し、その後、特異的結合を介して不可逆的接着プロセスが生じることにより、より深層への感染も引き起こし得る(Grinstein 1988)。さらに、これまでの研究で、アクネ菌のフィプロネクチンとしての細胞外基質タンパク質(ECM)への、ならびにヒト上皮細胞への(Romero-Steiner 1990)結合能(Yu 1997)が示されている。

【0009】

接着防止剤を有する化学薬物として、*Papulex*(登録商標)が周知である。

【0010】

しかしながら、上記に引用された処置には多くの副作用がある。例えば、抗生剤コースは時間的に限定するべきであり、多くの場合、脱感作または応答の喪失が見られる。さらに、化学化合物の使用は、暗色の皮膚の患者での色素脱失または治療不耐性による他の副作用などのいくつかのリスクを患者に引き起こす。座瘡治療に化学化合物を使用することのもう1つの欠点はそれらのコストが高いことである(Dawson et 2013)。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【0011】

これらの理由で、座瘡を治療および予防するための、副作用無しで処置の良好な有効性および低生産コストを可能とする他の手段、好ましくは、生物学的手段が開発されるべきである。

【0012】

本発明に関して、本発明者らは、今般、ヒトフィブリノゲンにより特異的に認識される 58 kDa のアクネ菌表面タンパク質を同定し、それを Pfg と命名した。より詳しくは、本発明者らは、ヒトフィブリノゲンのサブユニットが接着タンパク質 Pfg と特異的に結合し、従って、そのアクネ菌との接着を阻害することができることを見出した。

【0013】

本知見は、本発明者らが知る限り、ヒトフィブリノゲン認識能を有するアクネ菌表面糖タンパク質が特性決定されたのは初めてであるので、予期されないことであった。

【0014】

本知見は、皮膚細胞への細菌接着を阻害し、それにより、細菌接着により誘発される皮膚感染および炎症を予防および/または治療することにより座瘡を処置するための別の手段の開発を可能とするので極めて重要である。加えて、本発明者らは、前記フィブリノゲンサブユニットがより全般的な抗炎症特性を有していること、従って、より一般には、他の炎症性皮膚障害、好ましくは、乾癬を予防および/または治療するために使用可能であることを見出した。

【0015】

よって、第1の側面において、本発明は、薬剤として使用するための、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号1と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド、または、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号2、5および7~13および47のいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、そのフラグメントに関する。

【0016】

配列番号1は、フィブリノゲンのヒトBサブユニットに相当し、配列番号2、5および7~13および47は、この配列のフラグメントに相当する。

【0017】

本発明によるポリペプチドは、アクネ菌を認識してそれと結合することができ、また、そのリガンドであるフィブリノゲンおよび皮膚細胞へのアクネ菌の接着を阻害することができる。

【0018】

よって、本発明による治療的使用のためのポリペプチドは、好ましくは、座瘡を予防および/または治療するために使用され得る。

【0019】

本発明者らはまた、本発明による治療的使用のための単離されたポリペプチドは、他の炎症性皮膚疾患、好ましくは、乾癬の治療および/または予防のために使用可能であることも見出した。

【0020】

本発明者らはまた、アクネ菌の接着タンパク質を認識してそれと結合し、そのリガンドであるフィブリノゲンへのおよび皮膚細胞へのアクネ菌の接着を阻害する、ヒトフィブリノゲンBサブユニットのフラグメントも単離した。

【0021】

よって、第2の側面において、本発明は、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号1と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドのフラグメントに関し、前記フラグメントは、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号2、5および7~13および47のいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる。

【0022】

10

20

30

40

50

第3の側面において、本発明はまた、本発明のフラグメントをコードする単離された核酸分子、本発明の核酸を含んでなるベクター、および本発明による核酸分子または本発明によるベクターを含んでなる宿主細胞に関する。

【0023】

本発明のフラグメントは、アクネ菌を認識してそれと結合することができ、また、アクネ菌のそのリガンドであるフィブリノゲンおよび皮膚細胞への接着を阻害することもできる。結果として、これらのフラグメントは、炎症性疾患、特に座瘡を予防および/または治療するための薬物における抗接着剤として大きな可能性を持ち得る。

【0024】

よって、第4の側面において、本発明は、本発明によるフラグメント、単離された核酸分子、ベクターまたは宿主細胞から選択される少なくとも1つの化合物と薬学上許容可能なビクルとを含んでなる医薬組成物に関する。

10

【0025】

本発明はまた、薬剤として使用するための本発明による単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞または医薬組成物に関する。

【0026】

好ましくは、本発明による単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞または医薬組成物は、座瘡の治療および/または予防のために使用される。

20

【0027】

本発明者らはまた、本発明による単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞または医薬組成物は、他の炎症性皮膚疾患、好ましくは、乾癬の治療および/または予防のために使用可能であることも見出した。

20

【0028】

本発明のフラグメント、単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞または医薬組成物は、単独で、または座瘡予防および/もしくは治療ならびに/または他の炎症性疾患、好ましくは、乾癬の予防および/もしくは治療に関する別の治療剤と組み合わせて使用可能である。

【0029】

よって、第5の側面において、本発明は、薬剤としての同時、個別または逐次使用のための、

30

本発明によるフラグメント、単離された核酸分子、ベクターおよび宿主細胞から選択される少なくとも1つの化合物；および

好ましくは、乾癬および/または座瘡から選択される皮膚炎症性疾患、好ましくは、座瘡の治療および/または予防に使用される別の薬剤を含んでなる組合せ物に関する。

【0030】

本発明による組合せ物の目的は、本発明によるフラグメントの治療効果を増強することである。

【図面の簡単な説明】

【0031】

40

【図1】フィブリノゲンにより認識される58kDaアクネ菌表面タンパク質の同定。アクネ菌6919株を37℃、嫌気条件下、RCM、0.1%Tween-80を添加したRCMおよび5%ヒツジ血液を添加したコロンビアで増殖させた。(A)アクネ菌表面タンパク質(75μg)を、PBS中60(レーン2)および1M LiCl中45(レーン3)で加熱抽出し、12.5%SDS-PAGE上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、室温で2時間、ビオチン化フィブリノゲン、コラーゲンI、IV、VIおよびVIII(0.1μg/ml)とともにインキュベートした。HRP-ストレプトアビジン単独を使用することにより、対照実験を行った。レーン1：分子量標準。

【図2】アクネ菌表面タンパク質と精製ヒトフィブリノゲンの結合。(A)アクネ菌表面タンパク質(0.8~50μg/ml)を96ウェルポリスチレンプレートに固定化し、

50

室温で2時間、ビオチン化フィブリノゲン(0.1 μ g/ml)でプローブした。(B)アクネ菌表面タンパク質(25 μ g/ml)を96ウェルポリスチレンプレートに固定化し、室温で2時間、0.1~16 μ g/mlの範囲の種々の濃度のビオチン化フィブリノゲンでプローブした。結合したビオチン化フィブリノゲンを、材料および方法に記載されるようにH R P - ストレプトアビジンで検出した。

【図3】P f gの同定。c P A H E(200 μ g)を二次元電気泳動により分離した。(A)タンパク質は銀染色により検出した。(B)フィブリノゲン結合活性は、材料および方法に記載されるようにウエスタンリガンドプロットアッセイを使用することにより、ビオチン化フィブリノゲンで決定した。レーン1、分子量標準；レーン2、10%SDS-PAGE(1DE)だけによって分離されたサンプル(50 μ gのタンパク質)；レーン3、材料および方法に記載されるような2DE後のサンプル。矢印はM A L D I - T o Fによる同定のために切り出されたスポットを示す。(C)対象スポットに関して得られたM A L D I - T o Fスペクトル。モノアイソトピックペプチド質量を用いてタンパク質データベースを検索し、一致させ、続いてタンパク質スポットを同定した。

【図4】P f gの精製。アクネ菌表面タンパク質を42で2時間、1%L i C 1により抽出した後、80%飽和での硫酸アンモニウム沈澱により濃縮した。(A)c P A H E(85mg)をU N O s p h e r e Qカラムに24ml/時でロードした。25mMトリス、pH 8.0中で平衡化したタンパク質を、60分間0~160mMおよび90分間160~200mM NaCl、25mMトリス、pH 8.0の直線勾配で溶出させた()。プールしたP f g含有画分を脱塩し、0.1M NH₄HCO₃、pH 8.0中で平衡化した。(B)タンパク質をS e p h a c r y l H R S 3 0 0カラムにて6ml/時でゲル濾過クロマトグラフィーにより分画した。排除容量(Void volume)(V₀)をチログロブリン(669kDa)で決定し、ウシグロブリン(158kDa)、ニワトリオボアルブミン(44kDa)、ウマミオグロビン(17kDa)およびビタミンB12(1.3kDa)の溶出位置を矢印で示す。タンパク質濃度は280nmでモニタリングした()。フィブリノゲン結合活性()を材料および方法に記載されるようにビオチン化フィブリノゲンで決定した。水平の線F 2、F 2.2は、フィブリノゲン結合活性を含むプール画分を示す。(C)タンパク質は10%SDS-PAGEにより分離し、クーマシーブルー染色により検出した。(D)電気泳動分離の後、タンパク質をニトロセルロース膜に転写し、フィブリノゲン結合活性をビオチン化フィブリノゲンで検出した。レーン1a/bは、それぞれ非染色およびビオチン分子量マーカーを含む。レーン2：アクネ菌表面リチウム全タンパク質抽出物(10 μ g)。レーン3：濃縮表面タンパク質抽出物(10 μ g)。レーン4および5：それぞれ10 μ gのプールF 2およびF 2.2画分。

【図5】図5：アクネ菌表面タンパク質とフィブリノゲンの結合。(A)4で18時間、種々の量のヒトフィブリノゲン(h F g)およびウシフィブリノゲン(b F g)を96ウェルポリスチレンプレートに固定化し、23で2時間、0.1 μ g/mlのビオチン化P f gとともにインキュベートした。ウシ血清アルブミン(B S A)を陰性対照として使用した。結合した材料を、H R P - ストレプトアビジン結合体を使用することにより検出した。ペルオキシダーゼ活性は、A B T S基質を使用することにより405nmで測定した。タンパク質(レーン当たり10 μ g)を10%SDS-PAGEにより分離し、(B)クーマシーブルー染色により検出し、ニトロセルロース膜に転写し、(C)H R P - ストレプトアビジン単独、および(D)ビオチン化P f g(0.1 μ g/ml)とともにインキュベートした。レーン1：分子量標準。レーン2：B S A。レーン3：h F g。レーン4：b F g。

【図6】N-脱グリコシル化フィブリノゲンに対するP f g認識。精製ヒトフィブリノゲン(h F g)およびウシフィブリノゲン(b F g)に、材料および方法に記載されるようにN-グリコシダーゼF(P N G A s e F)処理を施した。無処理(レーン2および4)および処理(レーン3および5)サンプル(レーン当たりタンパク質10 μ g)を10%SDS-PAGE上で分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。(A)タンパク質はクーマシーブルー染色により検出した。(B)ビオチン化P f g(0.1 μ g/ml)

による結合活性。(C) ビオチン化 R C A - I レクチン結合活性を脱グリコシル化対照として使用した。レーン 1 : 分子量標準。

【図 7】O - 脱グリコシル化フィブリノゲンに対する P f g 認識。精製ヒトフィブリノゲンに、材料および方法に記載されるようにO - グリコシダーゼ処理を施した。無処理(レーン 2)および処理(レーン 3)サンプル(レーン当たりタンパク質 10 μ g)を 10 % SDS - PAGE 上で分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。(A) タンパク質は、クーマシーブルー染色により検出した。(B) ビオチン化 P f g (0.1 μ g / ml)による結合活性。(C) ビオチン化ジャカリントン結合活性を脱グリコシル化対照として使用した。レーン 1a および 1b は、分子量標準に相当する。

【図 8】B ヒトフィブリノゲンフラグメントのクローニングおよび P f g による結合。(A) 組換えヒト B フィブリノゲンフラグメント F g 1、F g 2、F g 3 および F g 4 のクローニングおよび発現。フィブリノゲンフラグメントは RT - PCR により得、発現プラスミドを材料および方法に記載されるように構築した。(B) GST 融合タンパク質を大腸菌で発現させ、12.5 % SDS - PAGE によって分画し、クーマシーブルー染色(B)により検出し、材料および方法に記載されるように、ビオチン化 P f g (0.1 μ g / ml)とともにインキュベートした(C)。

【図 9】フィブリノゲン由来ペプチドによるフィブリノゲンへのビオチン化 P f g の結合の用量依存的阻害。ビオチン化 P F g (0.4 mg)を漸増量の組換えペプチド F g 1 ()、F g 2 (n) または対照としての BSA () で 37 にて 1 時間前処理し、ポリスチレンプレート上のコーティングフィブリノゲン (25 μ g / ウエル) に対する結合活性を評価した。結果を平均 \pm SD として表す。各点 4 反復で実施した。

【図 10】F g 1 および F g 2 組換えペプチドで処理した後の細胞生存率の評価。ヒト不死化および初代ケラチノサイト細胞株 H a C a T および N H D K ; 不死化単球細胞株 T h P 1、および不死化および初代線維芽細胞細胞株 M R C 5 および H D F を、0.22 ~ 7 mM の範囲の濃度の F g 1 および F g 2 組換えペプチドとともに 37 で 18 時間インキュベートした。細胞生存率は、材料および方法に記載されるように MTT アッセイを用いて評価した。

【図 11】種々の細胞株に対するアクネ菌 R O N 株の結合活性の用量依存性。ビオチン化アクネ菌 R O N 株を 600 nm での吸光度が 0.01、0.1 および 0.5 となるように調整した濃度で、37 で 1 時間、ヒト不死化および初代ケラチノサイト細胞株 H a C a T および N H D K とともに；不死化単球細胞株 T h P 1 とともに、また、不死化および初代線維芽細胞細胞株 M R C 5 および H D F とともにインキュベートした。結合しなかった細菌を除去した後、接着活性を 410 nm で検出した。データは 3 回の独立した実験の平均 \pm S. D である。統計的有意性はそれぞれ * (P < 0.05)、** (P < 0.01)、*** (P < 0.001)、および **** (P < 0.0001) で示す。

【図 12】ケラチノサイトへのアクネ菌の結合の用量依存的阻害。ビオチン化アクネ菌 6919 株を 600 nm での吸光度が 0.1 となるように調整した濃度で、0.01 ~ 0.5 mM の範囲の濃度の全ヒト(濃い灰色のバー)およびウシ(薄い灰色のバー)フィブリノゲンで前処理し、37 で 1 時間、ヒト H a C a T ケラチノサイト細胞株とともにインキュベートした。結合していない細菌を除去した後、接着活性を 410 nm で検出した。データは 3 回の独立した実験の平均 \pm S. D である。統計的有意性はそれぞれ * (P < 0.05)、** (P < 0.01)、*** (P < 0.001)、および **** (P < 0.0001) で示す。

【図 13】単球細胞株に対するアクネ菌 R O N の結合の用量依存的阻害。ビオチン化アクネ菌 R O N 株を 600 nm での吸光度が 0.1 となるように調整した濃度で、組換えペプチド F g 1 および F g 2 で前処理し、37 で 1 時間、ヒト不死化単球細胞株 T h P 1 とともにインキュベートした。結合していない細菌を除去した後、接着活性を 410 nm で検出した。データは 3 回の独立した実験の平均 \pm S. D である。統計的有意性はそれぞれ * (P < 0.05)、** (P < 0.01)、*** (P < 0.001)、および **** (P < 0.0001) で示す。

10

20

30

40

50

【図14】組換えペプチドで前処理したアクネ菌により刺激されたケラチノサイトによるO₂生産の用量依存的阻害。H a C a T 細胞を18時間、600nmでの吸光度が0.2となるように調整した濃度のアクネ菌P I E 株とともに（青色のバー）、また、組換えペプチドF g 1（薄い灰色のバー）およびF g 2（濃い灰色のバー）で前処理したアクネ菌とともにインキュベートした。スーパーオキシドアニオン生産の測定は、材料および方法に記載されるように分光蛍光測定法により実施した。対照実験は無刺激H a C a T 細胞（赤色のバー）で行った。データは3回の独立した実験の平均±S.Dである。統計的有意性はそれぞれ*（P<0.05）、**（P<0.01）、***（P<0.001）、および****（P<0.0001）で示す。

【図15】組換えペプチドで前処理したアクネ菌により刺激された線維芽細胞によるIL-8生産の用量依存的阻害。M R C 5 細胞を18時間、600nmでの吸光度が0.2となるように調整した濃度のアクネ菌R O N 株（青色のバー）とともに、また、組換えペプチドF g 1（薄い灰色のバー）およびF g 2（濃い灰色のバー）で前処理したアクネ菌とともにインキュベートした。IL-8生産は、材料および方法に記載されるようにE L I S Aにより測定した。対照実験は無刺激H a C a T 細胞（赤色のバー）で行った。データは3回の独立した実験の平均±S.Dである。統計的有意性はそれぞれ*（P<0.05）、**（P<0.01）、***（P<0.001）、および****（P<0.0001）で示す。

【図16】ケラチノサイトに対する小F g 1生成ペプチド処理後の細胞生存率の評価。H a C a T 細胞を24時間、2.5~20μMの範囲の濃度の小ペプチドF g 1.1（薄い灰色のバー）、F g 1.2（水平線のバー）、F g 1.3（斜線のバー）、F g 1.4（濃い灰色のバー）、F g 1.5（ドットのバー）とともにインキュベートした。細胞傷害性の測定値は、材料および方法に記載されるようにMTTアッセイにより行った。対照実験は、P B S とともにインキュベートしたH a C a T 細胞（生細胞に相当）；および0.2%トリトンX100とともにインキュベートしたH a C a T 細胞（死細胞に相当）で行った。データは3回の独立した実験の平均±S.Dである。

【図17】小F g 1生成ペプチドで前処理され、かつ、アクネ菌で刺激された線維芽細胞によるH₂O₂生産の用量依存的阻害。M R C 5 細胞を2.5~20μMの範囲の濃度の小ペプチドF g 1.1（薄い灰色のバー）、F g 1.2（水平線のバー）、F g 1.3（斜線のバー）、F g 1.4（濃い灰色のバー）、F g 1.5（ドットのバー）とともに24時間インキュベートした。過酸化水素生産の測定は、材料および方法に記載されるように分光蛍光測定法により実施した。対照実験は無刺激M R C 5 細胞（白いバー）およびアクネ菌で刺激したM R C 5（黒いバー）で行った。データは3回の独立した実験の平均±S.Dである。統計的有意性はそれぞれ*（P<0.05）、**（P<0.01）、***（P<0.001）、および****（P<0.0001）で示す。

【図18】小F g 1生成ペプチドで前処理し、かつ、リボティコ酸（L T A）で刺激したケラチノサイトによるH₂O₂生産の用量依存的阻害。N H D K 細胞を、24時間、1.75~7μMの範囲の濃度の組換えペプチドF g 1（薄い灰色のバー）およびF g 2（濃い灰色のバー）とともにインキュベートした。過酸化水素生産の測定は、材料および方法に記載されるように分光蛍光測定法により実施した。対照実験は無刺激N H D K 細胞（白いバー）および10μg/mlのL T Aで刺激したH D F（黒いバー）で行った。データは3回の独立した実験の平均±S.Dである。統計的有意性はそれぞれ*（P<0.05）、**（P<0.01）、***（P<0.001）、および****（P<0.0001）で示す。

【図19】小F g 1生成ペプチドで前処理し、かつ、ペプチドグリカン（P G N）で刺激したケラチノサイトによるIL-8生産の用量依存的阻害。N H D K 細胞を、24時間、1.75~7μMの範囲の濃度の組換えペプチドF g 1（薄い灰色のバー）およびF g 2（濃い灰色のバー）とともにインキュベートした。IL-8生産の測定は、材料および方法に記載されるようにE L I S Aにより実施した。対照実験は無刺激N H D K 細胞（白いバー）および10μg/mlのP G Nで刺激したH D F（黒いバー）で行った。データは

3回の独立した実験の平均±S.Dである。統計的有意性はそれぞれ* (P<0.05)、** (P<0.01)、*** (P<0.001)、および**** (P<0.0001)で示す。

【図20】ケラチノサイトに対する小Fg1.1生成ペプチド処理後の細胞生存率の評価。HaCaT細胞を、24時間、2.5~20μMの範囲の濃度の小ペプチドFg1.1.1(薄い灰色のバー)、Fg1.1.2(水平線のバー)、Fg1.1.3(斜線のバー)、Fg1.1.4(濃い灰色のバー)、Fg1.1.6(ドットのバーとともにインキュベートした。細胞傷害性の測定は、材料および方法に記載されるようにMTTアッセイにより行った。対照実験はPBSとともにインキュベートしたHaCaT細胞(生細胞に相当)で、また、0.2%トリトンX100とともにインキュベートしたHaCaT細胞(死細胞に相当)で行った。データは3回の独立した実験の平均±S.Dである。

【図21】ケラチノサイトに対する、Fg1.1生成ペプチド溶液を調製するために使用したビヒクルで処理した後の細胞生存率の評価。HaCaT細胞を24時間、Fg1.1.1(薄い灰色のバー)、Fg1.1.2(水平線のバー)、Fg1.1.3(斜線のバー)、Fg1.1.4(濃い灰色のバー)、Fg1.1.6(ドットのバー)とともに使用される条件に相当するビヒクル希釈溶液とともにインキュベートした。細胞傷害性の測定は、材料および方法に記載されるようにMTTアッセイにより行った。対照実験はPBSとともにインキュベートしたHaCaT細胞(生細胞に相当)で、また、0.2%トリトンX100とともにインキュベートしたHaCaT細胞(死細胞に相当)で行った。データは3回の独立した実験の平均±S.Dである。

【図22】小Fg1.1生成ペプチドで前処理したアクネ菌により刺激されたケラチノサイトによるIL-8生産の用量依存的阻害。HaCaT細胞を、24時間、2.5~20μMの範囲の濃度の小ペプチドFg1.1.1(薄い灰色のバー)、Fg1.1.2(水平線のバー)、Fg1.1.3(斜線のバー)、Fg1.1.4(濃い灰色のバー)、Fg1.1.6(ドットのバー)とともにインキュベートした。IL-8生産の測定は、材料および方法に記載されるようにELISAにより実施した。対照実験は無刺激HaCaT細胞(白いバー)およびアクネ菌で刺激したHaCaT(黒いバー)で行った。データは3回の独立した実験の平均±S.Dである。統計的有意性はそれぞれ* (P<0.05)、** (P<0.01)、*** (P<0.001)、および**** (P<0.0001)で示す。

【図23】小Fg1.1生成ペプチドで前処理され、かつ、アクネ菌で刺激された線維芽細胞によるIL-8生産の用量依存的阻害。MCR5細胞は、24時間、2.5~20μMの範囲の濃度の小ペプチドFg1.1.1(薄い灰色のバー)、Fg1.1.2(水平線のバー)、Fg1.1.3(斜線のバー)、Fg1.1.4(濃い灰色のバー)、Fg1.1.6(ドットのバー)とともにインキュベートした。IL-8生産の測定は材料および方法に記載されるようにELISAにより実施した。対照実験は無刺激MCR5細胞(白いバー)およびアクネ菌で刺激したMCR5(黒いバー)で行った。データは3回の独立した実験の平均±S.Dである。統計的有意性はそれぞれ* (P<0.05)、** (P<0.01)、*** (P<0.001)、および**** (P<0.0001)で示す。

【図24】イン・ビボにおけるアクネ菌により誘導される炎症に対する5%Fg1.1.1ペプチドゲルの効果。マウスの耳の皮内にアクネ菌(OD_{620nm} = 1.0 PBS中2.10⁷CFU/20μlに相当)を注射し、炎症を誘導した。次に、5%Fg1.1.1ペプチドゲルをマウスの耳の皮膚表面に3日間毎日塗布した(矢印)。耳の厚さ、落屑および発赤に相当するスコアを96時間、毎日測定した。データは8回の個々の実験の平均±S.Dである。PBSは、PBSを注射した無処置群に相当する。PA+ビヒクルTOPICは、耳へのアクネ菌注射とワセリン単独処置に相当する。PA+ペプチドTOPICは、耳へのアクネ菌注射とワセリンに5%Fg1.1.1ペプチドを混合したものによる処置に相当する。統計的有意性はそれぞれ* (P<0.05)、** (P<0.01)、*** (P<0.001)、および**** (P<0.0001)で示す。

10

20

30

40

50

【図25】アクネ菌をFg1.1.1で前処理した場合のイン・ビボにおけるアクネ菌により誘導される炎症に対するFg1.1.1ペプチドの効果。アクネ菌株($OD_{620nm} = 1.5$)を37で1時間、Fg1.1.1ペプチド($140\mu M$)($PA +$ ペプチドINJECT)またはビヒクル(PBS中最終1%DMSO)($PA +$ ビヒクルINJECT)で前処理した後、マウスの耳の皮内に注射し(およそ $2.0^7CFU/20\mu l$)、炎症を誘導した。対照群にはPBS単独を注射した。耳の厚さ、落屑および発赤に相当するスコアを96時間、毎日測定した。データは8回の個々の実験の平均 $\pm S.D$ である。統計的有意性はそれぞれ*($P < 0.05$)、**($P < 0.01$)、***($P < 0.001$)、および****($P < 0.0001$)で示す。

【図26】マウスにおけるアクネ菌により誘導される炎症に対するFg1.1.1ペプチドの皮内注射および局所塗布の効果。(1)耳にPBS単独を注射した。(2)アクネ菌刺激(PBS中 $2.10^7CFU/20\mu l$)の96時間後。(3)最終1%DMSOと混合したアクネ菌の96時間後。(4)ワセリン局所塗布を伴うアクネ菌刺激の96時間後。(5)Fg1.1.1ペプチドと混合したアクネ菌の96時間後。(6)Fg1.1.1ペプチド局所塗布を伴うアクネ菌刺激の96時間後。

【図27】マウス耳の組織病理学的分析。(1)耳にPBS単独を注射した。(2)アクネ菌刺激(PBS中 $2.10^7CFU/20\mu l$)96時間後の耳の腫脹および浸潤炎症性細胞。(3および4)耳の腫脹およびほとんどの浸潤炎症性細胞はそれぞれビヒクル注射および塗布によって変化しなかった。(5および6)耳の腫脹および浸潤炎症性細胞はそれぞれFg1.1.1ペプチド注射および局所塗布により軽減された。データは、同様の結果の8回の個々の実験の代表的なものである。

【図28】マウスにおけるアクネ菌により誘導されるリンパ球活性化に対するFg1.1.1ペプチドの皮内注射および局所塗布効果。(A)マウスの耳の皮内にアクネ菌($OD_{620nm} = 1.0$ PBS中 $2.10^7CFU/20\mu l$ に相当)を注射し、炎症を誘導した。次に、5%Fg1.1.1ペプチドゲルをマウスの耳の皮膚表面に3日間毎日塗布した(矢印)。 $PA +$ ビヒクルTOPICは、耳へのアクネ菌注射とワセリン単独処置に相当する。 $PA +$ ペプチドTOPICは、耳へのアクネ菌注射とワセリンに5%Fg1.1.1ペプチドを混合したものによる処置に相当する。PBSは、PBSを注射した無処置群に相当する。(B)アクネ菌株($OD_{620nm} = 1.5$)を37で1時間、Fg1.1.1ペプチド($140\mu M$)($PA +$ ペプチドINJECT)またはビヒクル(PBS中最終1%DMSO)($PA +$ ビヒクルINJECT)で前処理した後、マウスの耳の皮内に注射し(およそ $2.0^7CFU/20\mu l$)、炎症を誘導した。対照群にはPBS単独を注射した。感染後96時間に、マウスを安楽死させ、耳の神経節を摘出し、抗CD3抗体および抗CD28抗体の存在下で72時間増殖させた後、それらの増殖能を試験した。増殖測定はUptible試薬を用いて行った。データは8回の個々の実験の平均 $\pm S.D$ である。統計的有意性はそれぞれ*($P < 0.05$)、**($P < 0.01$)、***($P < 0.001$)、および****($P < 0.0001$)で示す。

【図29】Fg1またはFg1.1.1ペプチドで前処理したアクネ菌で刺激されたケラチノサイトによるIL-8生産の用量依存的阻害。HaCAT細胞を、 $2.5 \sim 10\mu M$ の範囲の濃度のFg1ペプチド(薄い灰色のバー)およびFg1.1.1ペプチド(濃い灰色のバー)で37にて1時間前処理したアクネ菌とともに37で24時間インキュベートした。対照実験は、無刺激HaCAT細胞(細胞単独)および非前処理アクネ菌で刺激したHaCAT細胞(細胞+PA)で行った。IL-8生産の測定は、材料および方法に記載されるようにELISAにより実施した。データは3回の独立した実験の平均 $\pm S.D$ である。

【図30】IL-17、OSMおよびTNF-で刺激されたケラチノサイトによるIL-8生産の阻害。NHEK細胞をIL-17、OSMおよびTNF-(各 $3ng/ml$)の組合せで刺激し、 $10\mu M$ のJAK阻害剤(陽性対照)または $1.52 \sim 12.2\mu M$ の範囲の濃度のFg1.1.1で48時間処理した。材料および方法に記載されるように、IL-8生産の測定はELISAにより実施し、細胞傷害性はMTTアッセイにより

決定した。対照実験は無処理かつ無刺激のNHEK細胞（細胞単独）およびI1-17、OSMおよびTNF-の組合せで刺激した無処理NHEKで行った。データは3回の個々の実験の平均±S.Dである。統計的有意性はそれぞれ*（P<0.05）、**（P<0.01）、および***（P<0.001）で示す。

【図31】I1-17、OSMおよびTNF-で刺激されたケラチノサイトによるhBD-2生産の阻害。NHEK細胞をI1-17、OSMおよびTNF-（各5ng/ml）の組合せで刺激し、10μMのJAK阻害剤（陽性対照）または1.52~12.2μMの範囲の濃度のFg1.1.1で72時間処理した。材料および方法に記載されるように、hBD-2生産の測定はELISAにより実施し、細胞傷害性はMTTアッセイにより決定した。対照実験は無処理かつ無刺激のNHEK細胞（細胞単独）およびI1-17、OSMおよびTNF-の組合せで刺激した無処理NHEKで行った。データは3回の個々の実験の平均±S.Dである。統計的有意性はそれぞれ*（P<0.05）、**（P<0.01）、および***（P<0.001）で示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

定義

別の定義がされない限り、本明細書に使用される総ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の熟練者により共通に理解されているものと同じ意味を有する。

【0033】

本明細書において、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合により連結されたアミノ酸の直鎖ポリマーを意味する。タンパク質は大きなポリペプチドであり、この2つの用語は一般に互換的に使用される。

【0034】

本明細書において、互換的に使用される用語「核酸」、「核配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」は、非天然ヌクレオチドを含有するまたは含有しない、二本鎖DNA、一本鎖DNAまたは前記DNAの転写産物のいずれかである、フラグメントまたは核酸の一領域を定義する、修飾型または非修飾型のヌクレオチドの正確な配列を意味する。

【0035】

これにはまた、本発明はこれらの天然染色体環境にある、すなわち天然状態にあるヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に関するものではないことが含まれるべきである。本発明の配列は単離および/または精製されており、すなわち、それらは例えばコピーにより直接または間接的にサンプル採取されたものであり、それらの環境は少なくとも部分的に改変されている。組換え遺伝学により、例えば宿主細胞の手段により得られる、または化学生合成により得られる単離された核酸またはアミノ酸配列もここに述べられるべきである。

【0036】

本明細書において、用語「細菌株」または「株」は、何らかの微細ではあるが識別可能な違いにより同じ種の他の細菌とは異なる、細菌種のサブセットを意味する。例えば、本発明によれば、アクネ菌株は、アクネ菌6919株、RON株および/またはPIE株であり得る。

【0037】

本出願において、用語「フラグメント」は、配列、好ましくは、アミノ酸配列の一部を意味する。

【0038】

本明細書において、用語「フィブリノゲン」または「Fg」は、ジスルフィド結合により互いに連結された3つの異なる鎖（A、B、および）の2組を含有するヘキサマーである、血餅の形成に関与する糖タンパク質を意味する。これらの3つの鎖のN末端セクションは、鎖の架橋に関与するシステインを含む。A、Bおよび鎖のC末端部分は、分子認識単位として機能し得る、約225アミノ酸残基のドメインを含む。このドメ

10

20

30

40

50

インはタンパク質間相互作用に関連付けられている。

【0039】

本明細書において、用語「座瘡」(acne)または「尋常性座瘡」(acne vulgaris)は、ホルモン機構、免疫機構および微生物学的機構を含む多因子性の病因を有する一般的な障害を意味する。この疾患は、毛包脂腺嚢に局在し、炎症性と非炎症性の両方の臨床病巣をもたらす。ほとんどの患者は非炎症性の面皰と炎症性の丘疹、膿疱および小結節の混合物を有する。座瘡形成に関する主要な因子のうちの1つは、脂腺の微生物定着である。数系統のエビデンスがプロピオニバクテリウム・アクネス(アクネ菌)の座瘡および整形外科的感染における病原体としての重要な役割を含意している(Attitipoika 1990)。

10

【0040】

本発明による治療的使用のための単離されたポリペプチド

多くの病原性細菌に関して、宿主細胞の侵襲は、特異的リガンドを認識する細菌表面タンパク質またはアドヘシンにより媒介される。ブドウ球菌および連鎖球菌属などの皮膚関連細菌は、宿主細胞外マトリックス成分(ECM)と特異的に結合してそれらの標的細胞への接着を促進し、続いて定着および感染を誘発する、MSCRAMM(microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)と呼ばれる多数の細胞表面アドヘシンを発現する(Patti 1994)。宿主ECM成分は、多くの病原体が組織への定着および感染の開始のために用いている理想的な微生物接着標的である。

【0041】

20

よって、本発明において、本発明者らは、まず、アクネ菌表面タンパク質とECM成分の相互作用を検討した。直接的結合アッセイを用い、本発明者らは、58kDaの糖タンパク質がヒトフィブリノゲンにより特異的に認識されることを初めて実証した。このタンパク質はPfgと命名された。エンドグリコシダーゼ消化試験では、Pfgとフィブリノゲンの間の相互作用はヒトフィブリノゲンの非グリコシル化部分を含んでいることが示された。さらなる実験で、フィブリノゲンのN末端部分はPfgにより認識され、フィブリノゲンへのPfgの結合を阻害し得ることが実証された。

【0042】

フィブリノゲン、特に、そのサブユニットBのこの特性は、細菌タンパク質のそれらの宿主への接着を阻害するために、療法に使用可能である。

30

【0043】

よって、1つの側面において、本発明は、薬剤として使用するための、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号1と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド、または、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号2、5および7~13および47のいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、そのフラグメントに関する。

【0044】

配列番号1は、ヒトフィブリノゲンのサブユニットBに相当し、配列番号2、5および7~13および47はこの配列のフラグメントに相当する。

【0045】

40

フィブリノゲンのB鎖はFGB遺伝子によりコードされ、この遺伝子は、ヒトおよび同様の血液凝固システムを持つほとんどの他の脊椎動物に見られる遺伝子である。アミノ酸配列は、約450アミノ酸の長さである。

【0046】

1つの態様によれば、本発明の治療的使用のためのポリペプチドは、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号1と少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは、少なくとも90%、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列、または最適なグローバルアラインメントの後に配列番号2、5および7~13および47と少なくとも80%、少なくとも85%、好ましくは、少なくとも90%、少なくとも95%

50

、より好ましくは、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %または少なくとも 9 9 %の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる。

【 0 0 4 7 】

別の態様では、本発明による治療的使用のための単離されたポリペプチドは、配列番号 2、5 および 7 ~ 13 および 47、または最適なグローバルアラインメントの後に配列番号 2、5 および 7 ~ 13 および 47 の 1 つと少なくとも少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、好ましくは、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、より好ましくは、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %または少なくとも 9 9 %の同一性を有するポリペプチドから選択される。

【 0 0 4 8 】

配列番号 13 および配列番号 47 は、106 個のアミノ酸を有し、F g 1 と呼称される、ヒトフィブリノゲンの B 鎖の特定のフラグメントのアミノ酸配列に相当する。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用する場合、核酸またはアミノ酸の 2 つの配列間の「同一性パーセンテージ」は、最適なグローバルアラインメントの後に得られる比較する 2 配列間で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを意味し、このパーセンテージは純粹に統計学的なものであり、2 配列間の違いはその長さに沿ってランダムに分布している。2 つの核酸またはアミノ酸配列の比較は、慣例的に、それらをその全長にわたって完全に最適にアラインした後に配列を比較することにより行われ、前記比較は、「B l o s u m 6 2」マトリックスで 10.0 に等しい「Gap open」パラメーター、0.5 に等しい「Gap extend」パラメーターを用いるニードルソフトウェア (needle software) などの当業者に周知の任意のソフトウェアによって実行される。ニードルソフトウェアは、例えば、ウェブサイト ebi.ac.uk worldwide から「Align」の名称で入手可能である。

【 0 0 5 0 】

次に、2 つの核酸またはアミノ酸配列間の同一性パーセンテージをグローバルにかつ最適にアラインされた 2 つの配列を比較することによって決定するが、この場合、比較する核酸またはアミノ酸配列は、それら 2 配列間の最適なグローバルアラインメントのために参照配列に対して置換、付加または欠失を有することができる。同一性パーセンテージは、2 配列間でアミノ酸またはヌクレオチドが同一の位置の数を求め、その同一の位置の数を最適なグローバルアラインメント内の位置の総数で割り、その商に 100 を掛けてその 2 配列間の同一性パーセンテージを得ることより計算される。ニードルソフトウェアなどの最適なグローバルアラインメントに好適なソフトウェアを使用する場合、比較する 2 配列間の同一性パーセンテージは、このソフトウェアにより直接計算される。

【 0 0 5 1 】

参照アミノ酸配列と少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、好ましくは、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、より好ましくは、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %または少なくとも 9 9 %の同一性を示すアミノ酸配列に関して、好ましい例として、参照配列における特定の改変、特に、少なくとも 1 個のアミノ酸の欠失、付加もしくは置換、末端切断または延長を含有するものが含まれる。1 以上の保存的または非保存的アミノ酸の置換の場合、好ましい置換は、置換アミノ酸が「等価な」アミノ酸により置換されるものである。ここで、「等価なアミノ酸」という表現は、いずれのアミノ酸も対象ポリペプチドの生物活性を変更することなく構造アミノ酸のうちの 1 つで置換され得ることを示すものとし、特に、以下に定義される具体例が含まれる。

【 0 0 5 2 】

等価なアミノ酸は、それらが置換されるアミノ酸との構造的相同性において、または生成される可能性のある種々の抗体間での生物活性の比較試験の結果に基づいて決定することができる。

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

限定されない例として、以下の表1は、対象ポリペプチドの生物活性に有意な変更をもたらさずに実施され得る置換をまとめたものであり、同じ条件下で逆の置換も可能である。

【0054】

【表1】

表1

元の残基	置換
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

10

20

30

40

【0055】

上記のようなポリペプチドおよびそれらのフラグメントは、本発明者らにより同定されたアクネ菌表面タンパク質 (Pfg) を認識し、それと結合し、皮膚細胞へのアクネ菌の接着を阻害する。

【0056】

本発明において、本発明者らは、ビオチン化リガンド結合アッセイを使用することにより、驚くべきことに、ヒトフィブリノゲンにより特異的に認識される 58 kDa のアクネ菌表面タンパク質 (Pfg) を同定した。Pfg はさらに 2D 電気泳動および MALDI - TOF 分析により、その C 末端に LPXTG モチーフを含有する推定接着表面タンパク質として同定された。Pfg はほとんどが静置培養相で発現され、GalNAc 残基を含み、高グリコシル化されているものと思われる。精製 Pfg は、Fg の A および B サブユニットを強く認識する。Fg の特定の酵素的脱グリコシル化は、そのタンパク質骨格が認識プロセスに関与していたことを示した。

【0057】

本発明者らはまた、Fg の B サブユニットおよびそのフラグメントが接着タンパク質 Pfg とその標的リガンド (Fg) または標的細胞 (皮膚細胞) との相互作用を阻害できることも実証した。特に、上記のようなポリペプチドおよびそれらのフラグメントは、この相互作用と競合することができ、従って、宿主細胞への細菌の接着の防止に関与することができる。

【0058】

この能力に加え、上記のようなポリペプチドおよびそれらのフラグメントは、薬物として、特に座瘡を治療および / または予防するために使用可能である。

50

【0059】

本発明者らはまた、上記のようなポリペプチドおよびそれらのフラグメントは、アクネ菌の存在とは無関係に全般的な抗炎症特性を有することも見出し、よって、薬物として、特に、他の炎症性皮膚疾患、好ましくは、乾癬を治療および／または予防するために使用可能である。

【0060】

本明細書で使用する場合、「炎症性皮膚疾患」は、皮膚搔痒および発赤を伴う偶発的発疹から、皮膚炎（湿疹）、酒さ、脂漏性皮膚炎、および乾癬などの慢性症状まで、多くの形態で現れる疾患である。皮膚炎症は急性または慢性として特徴付けることができる。急性炎症は、紫外線（UVR）、電磁放射線、アレルゲンへの暴露、または化学刺激物（ソープ、ヘアダイなど）との接触から生じ得る。このタイプの炎症は一般に、組織破壊をほとんど伴わずに1～2週間に内に消散する。これに対して、慢性炎症は、皮膚自体の内部の持続的な免疫細胞介在炎症性応答から生じる。この炎症は長期間持続し、重大かつ重篤な組織破壊を引き起こし得る。

10

【0061】

本明細書で使用する場合、「乾癬」は、鱗状紅斑、丘疹、および斑を含む、通常は搔痒性の皮膚病巣を特徴とする一般的な慢性、再発／寛解性、免疫介在性の全身性疾患を意味する。乾癬に見られる皮膚病巣は、軽度の局在斑から全身を覆うまで重篤度が多様である。乾癬の5つの主要なタイプは、斑状、滴状、倒置、膿疱性、および紅皮性である。

20

【0062】

本発明の特定のフラグメント

フィブリノゲンのサブユニットB の配列から始め、本発明者らは、アクネ菌の接着タンパク質P_fgと結合することができ、従って、その標的タンパク質（フィブリノゲン）および宿主皮膚細胞へのアクネ菌の接着を阻害することができる特定のフラグメントを同定した。

【0063】

よって、別の側面では、本発明は、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号1と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドのフラグメントに関し、前記フラグメントは、最適なグローバルアラインメントの後に配列番号2、5および7～13および47のいずれかと少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる。

30

【0064】

これらの特定のフラグメントを得るために、ヒトフィブリノゲンのサブユニットB を同じ長さの4つのセグメント（F_g1、F_g2、F_g3およびF_g4と呼称）に分割し、クローニングし、細菌ベクター内で生産した。フィブリノゲンのサブユニットB およびこれらのフラグメントのアミノ酸配列は以下の表2aに示す。

【0065】

【表2】

表2a: フィブリノゲンのサブユニットB β およびフラグメントFg1、Fg2、Fg3およびFg4のアミノ酸配列

フラグメントの名称	アミノ酸配列	配列番号
フィブリノゲンサブユニットB β	MKRMVWSFH KLKTMKHL LLLCVFLVKS QGVNDNEEGF FSARGHRPLD KKREEAPSLR PAPPPISGGG YRARPAAKA TQKKVERKAP DAGGCLHADP DLGVLCPTGC QLQEALLQQE RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSSFQYMYL LKDLWQKRQK QVKDNENVN EYSSELEKHQ LYIDETVNSN IPTNLRLVRS ILENLRSKIQ KLESDVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVS GKE CEEIIRKGGE TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENG GWT VIQNRQDG SV DFGRKWD PYK QGFGNVATNT DGKNYCGLPG EYWLGN DKIS QLTRMGPT EL LIEMEDWKGD KVKAHYGGFT VQNEANKYQI SVNKYRGTAG NALMDGASQL MGENRTMTIH NGMFFSTYDR DNDGWL TSDPRKQCSKEDGG GWWYNRCHAA NPNGRYYWGG QYT WDMAK HG TDDGVVWM NW KGSWYS MRKM SMKIRPFFPQ Q	配列番号 1 10
Fg1	MKRMVWSFH KLKTMKHL LLLCVFLVKS QGVNDNEEGF SARGHRPLDK KREEAPSLR PAPPPISGGG RARPAKAAT QKKVERKAP DAGGCLHADP DLGV LCMKRMVWSFH KLKTMKHL LLLCVFLVKS QGVNDNEEGF SARGHRPLDKK REEAPSLR PAPPPISGGG RARPAKAAT QKKVERKAP DAGGCLHADP DLGVLC	配列番号 13
Fg1	MKRMVWSFH KLKTMKHL LLLCVFLVKS QGVNDNEEGF SARGHRPLDKK REEAPSLR PAPPPISGGG RARPAKAAT QKKVERKAP DAGGCLHADP DLGVLC	配列番号 47 20
Fg2	DAGGCLHADP DLGVLCPTGC QLQEALLQQE RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSSFQYMYL LKDLWQKRQK QVKDNENVN EYSSELEKHQ LYIDETVNSN IPTNLRLVRS ILENLRSKIQ KLESDVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVS	配列番号 14
Fg3	KLESDVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVS GKE CEEIIRKGGE TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENG GWT VIQNRQDG SV DFGRKWD PYK QGFGNVATNT DGKNYCGLPG EYWLGN DKIS QLTRMGPT EL LIEMEDWKGD KVKAHYGGFT VQNE	配列番号 15
Fg4	PTELIEMED WKGDVKAHY GGFTVQNEAN KYQISVN KYR GTAGNALMDG ASQLMGENRT MTIHNMGFFS TYDRDNDGWL TSDPRKQCSK EDGGWWY NR CHAANPNGRY YWGGQYT WDM AKHGTDDGVV WMNWKG SWYS MRKMSM KIRP FFPQ	配列番号 16 30

【0066】

試験後、フラグメントFg1、Fg2、Fg3およびFg4のうち活性なフラグメントはFg1であるものと思われる。

【0067】

さらに、フラグメントFg1を、まず、およそ同じ長さ（それぞれ35、35および36アミノ酸）の3つの非オーバーラップフラグメント（表2bに示されるFg1.1、Fg1.2およびFg1.3）に分割し、その後、同じ30アミノ酸長で、フラグメントFg1.1、Fg1.2およびFg1.3とオーバーラップするもう2つのフラグメント（表2bに示されるFg1.4およびFg1.5）が得られるように、アミノ酸15個を各切断領域に付加した。

【0068】

試験後、フラグメントFg1.1、Fg1.2、Fg1.3、Fg1.4およびFg1.5のうち活性なフラグメントはFg1.1およびFg1.4であるものと思われる。

【0069】

フラグメントFg1.1を、さらに6つの別のフラグメント（表2bに示されるFg1

40

50

. 1 . 1 、 F g 1 . 1 . 2 、 F g 1 . 1 . 3 、 F g 1 . 1 . 4 、 F g 1 . 1 . 5 および F g 1 . 1 . 6) に分割した。

【 0 0 7 0 】

【表 3 】

表2b:Fg1およびFg1.1由来のフラグメントのアミノ酸配列

フラグメントの名称	アミノ酸配列	配列番号
Fg1.1	MKRMVSWSFHKLKTMKHL ¹⁰ LLLLL ²⁰ LCVFLVKSQGVND	配列番号 2
Fg1.2	NEEGFFSARGHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGG	配列番号 3
Fg1.3	YRARPAKAAATQKKVERKAPDAGGCLHADPDLGVLC	配列番号 4
Fg1.4	LLLCVFLVKSQGVNDNEEGFFSARGHRPLD	配列番号 5
Fg1.5	APSLRPAPPPISGGGYRARPAKAAATQKKV	配列番号 6
Fg1.1.1	LLLCVFLVKSQGVND	配列番号 7
Fg1.1.2	LLLCV	配列番号 8
Fg1.1.3	FLVKS	配列番号 9
Fg1.1.4	QGVND	配列番号 10
Fg1.1.5	LLLCVFLV	配列番号 11
Fg1.1.6	KSQGVND	配列番号 12

【 0 0 7 1 】

本発明のフラグメントを療法でのより効率的な使用に適合させて最小のコストでその合成を増進するため、本発明者らは長さを短縮したフラグメントを提供する。

【 0 0 7 2 】

よって、本発明の 1 つの態様によれば、これらのフラグメントは 150 個以下、 130 個以下、好ましくは 110 個以下のアミノ酸または 90 個以下のアミノ酸の長さを有する。

【 0 0 7 3 】

より好ましくは、本発明のフラグメントは、配列番号 13 および配列番号 47 (フラグメント F g 1) に相当する 106 個のアミノ酸の長さを有する。

【 0 0 7 4 】

いっそうより好ましくは、本発明のフラグメントは、 5 ~ 50 個の間、好ましくは 5 ~ 40 個の間、より好ましくは 5 ~ 35 個の間のアミノ酸を含む長さを有する。 1 つの態様によれば、本発明によるフラグメントは、 25 ~ 40 個の間のアミノ酸、好ましくは 30 ~ 35 個の間のアミノ酸を含む長さを有し得る。

【 0 0 7 5 】

別の態様によれば、本発明によるフラグメントは、 5 ~ 20 個の間のアミノ酸、好ましくは 5 ~ 15 個の間、より好ましくは 5 ~ 10 個の間のアミノ酸を含む長さを有し得る。

【 0 0 7 6 】

好ましくは、本発明によるフラグメントは、配列番号 2 、 5 および 7 ~ 12 、より好ましくは配列番号 2 および 5 に相当する配列を有する。

【 0 0 7 7 】

本発明による単離された核酸、ベクターおよび宿主細胞

別の側面において、本発明は、本発明によるフラグメントをコードする単離された核酸分子に関する。

【0078】

核酸配列はまた、最適なグローバルアラインメントの後に好ましい配列と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性パーセンテージを示し得る。それは核配列が参照核配列に比べて特定の修飾、例えば、特に、欠失、末端切断、延長、キメラ融合および/または置換、特に、点状の(punctual)修飾を示すことを意味する。好ましくは、これらは参照配列と同じアミノ酸配列をコードする配列(これは10遺伝コードの縮重に関連する)、または好ましくは高ストリングェント条件下で参照配列と特異的にハイブリダイズし得る相補的配列である。

【0079】

本発明はまた、本発明の核酸分子を含んでなるベクターを提供する。

【0080】

用語「ベクター」は、本明細書で使用する場合、それが連結されている別の核酸を輸送できる核酸分子を意味するものとする。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」ベクターであり、付加的DNAセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを意味する。ベクターのもう1つのタイプはウイルスベクターであり、付加的DNAセグメントがウイルスゲノムにライゲートされ得る。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞で自律的複製が可能である(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞へ導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ得、それにより宿主ゲノムとともに複製される。

【0081】

本発明によるベクターは、好ましくは、宿主細胞または対象内で本明細書に記載の任意の核酸分子の送達、増殖および/または発現を可能とするのに必要なエレメントもまた含む。特に、本発明によるベクターでは、本発明による核酸分子は、好ましくは、適当な調節配列に作動可能なように連結されている。本明細書で使用する場合、用語「調節エレメント」または「調節配列」は、核酸またはその誘導体(すなわち、mRNA)の複製、倍加、転写、スプライシング、翻訳、安定性および/または輸送を含め、所与の宿主細胞または対象内で核酸分子の発現を可能とする、寄与するまたは調節するいずれのエレメントも意味する。当業者には、調節配列の選択がベクター自体、宿主細胞または対象、所望の発現レベルなどの因子によって異なり得ることを認識するであろう。

【0082】

本発明で使用されるこのような好適なプラスミドベクターの代表例としては、限定されるものではないが、原核生物ではpBSKベクター、pET、pDEST、pRSETベクター；酵母ではpYES；真核生物ではpDEST、pcDNAが挙げられる。

【0083】

さらに、本発明の核酸分子およびこれらの分子を含んでなる本発明のベクターは、好適な宿主細胞の形質転換のために使用可能である。用語「宿主細胞」は、本明細書で使用する場合、本発明のポリペプチドまたはフラグメントを発現させるために組換え発現ベクターが導入された細胞を意味するものとする。このような用語は特定の対象細胞だけではなく、そのような細胞の後代も意味するものと理解されるべきである。続いての世代では突然変異または環境的影響のいずれかのためにある種の変化が起こり得るので、このような後代は実際には親細胞と同一でない場合があるが、本明細書で使用する「宿主細胞」という用語の範囲内にお含まれる。本発明に関して好適な宿主細胞の非限定例としては、大腸菌(特に、DH5株)などの細菌細胞、酵母細胞(特に、サッカロミケス属cerevisiae)、哺乳動物細胞(特に、HeLa、CHO、3T3細胞株)が挙げられる。

【0084】

10

20

30

40

50

形質転換は、細胞宿主にポリヌクレオチドを導入するためのいずれの既知の方法によつて行ってもよい。このような方法は当業者に周知であり、デキストラン媒介形質転換、リン酸カルシウム沈殿法、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソームへのポリヌクレオチド封入、微粒子銃インジェクションおよび核へのDNAの直接的マイクロインジェクションが挙げられる。

【0085】

宿主細胞は、2以上の核酸分子、または本発明のポリペプチドまたはフラグメントを発現するベクターを含む発現ベクターで同時トランスフェクトしてもよい。

【0086】

医薬組成物、薬物および組合せ物

10

本発明者らは、本発明のフラグメント、好ましくは、配列番号2、5および7～13および47に相当するアミノ酸配列を有するフラグメントがアクネ菌のPfg接着タンパク質を認識してそれと結合し、従つて、その標的リガンド（フィブリノゲン）および宿主皮膚細胞へのアクネ菌接着を阻害することを実証した。

【0087】

よつて、別の側面において、本発明は、本発明によるフラグメント、単離された核酸分子、ベクターまたは宿主細胞から選択される少なくとも1つの化合物と薬学上許容可能なビヒクルとを含んでなる医薬組成物に関する。

【0088】

本明細書で使用する場合、「薬学上許容可能なビヒクル」は、生理学上適合する溶媒、バッファー、塩溶液、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などのいずれか、また総てを含む。担体のタイプは意図される投与経路に基づいて選択することができる。種々の態様では、担体は、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所的、経皮的なまたは経口投与に好適である。薬学上許容可能な担体には、無菌水溶液または分散液および無菌注射溶液または分散液の即時調合製剤用の無菌散剤が含まれる。薬学上活性な物質のための媒体および剤の使用は当技術分野で周知である。静脈内注入のための典型的な医薬組成物は、250mlの無菌リングル溶液と100mgの本組合せを含有するように作製することができる。非経口的に投与可能な化合物を製造するための実際の方法は当業者に既知または自明であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 第17版, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)ならびにその第18版および第19版により詳細に記載されている。本組成物中の化合物は好ましくは、有効量で処方される。「有効量」は、炎症性皮膚障害、特に座瘡の予防または治療などの所望の結果を達成するために必要な用量で、必要な期間での有効な量を意味する。「治療上有効な量」は、特定の病態の治療経過に影響を与えるのに十分な量を意味する。治療上有効な量はまた、その剤の有毒または有害な作用に治療上有益な効果が上回るものである。

20

30

【0089】

投与経路、投与計画および最適な剤形は、例えば、患者の齢、患者の健康状態の重篤性、その処置に対する患者の忍容性および受ける副作用など、患者に適切な処置を確立する際に一般に考慮される基準に従つて決定され得ると理解される。

【0090】

40

例えば、本発明によるフラグメント、単離された核酸分子、ベクターまたは宿主細胞は、本発明による医薬組成物中に0.1～10%重量/重量(w/w)、好ましくは0.5～2%w/w、より好ましくは0.5～4%w/w、いっそより好ましくは2～6%w/wの範囲で存在してよい。

【0091】

別の側面によれば、本発明は、薬剤として使用するための本発明による単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞または医薬組成物に関する。

【0092】

好ましい態様では、本発明による単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞または医薬組成物は、座瘡の治療および/または予防において使用される。

50

【0093】

本発明者らはまた、本発明による単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞または医薬組成物は、他の炎症性疾患、好ましくは、乾癬の治療および/または予防においても使用可能であることを示した。

【0094】

本発明によるフラグメント、単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞または医薬組成物は、単独で使用してもよいし、またはそれらの治療効果を増進するために他の抗炎症剤と併用してもよい。

【0095】

よって、別の側面において、本発明はまた、薬剤としての同時、個別または逐次使用のための、

本発明によるフラグメント、単離された核酸分子、ベクター、および宿主細胞から選択される少なくとも1つの化合物；および

好ましくは、乾癬および/または座瘡から選択される皮膚炎症性疾患、好ましくは座瘡の治療および/または予防のために使用される別の薬剤を含んでなる、組合せ物に関する。

【0096】

このような他の薬剤は、ドキシサイクリン、イソトレチノイン、トレチノイン、アダパレン、過酸化ベンゾイル、クリンダマイシンおよびエリスロマイシンからなる群から選択され得る。

【実施例】

【0097】

材料および方法

細菌株および増殖条件

アクネ菌6919株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(マナサス、VA)から入手し、アクネ菌RONおよびPIEは、関節感染患者から単離した。総ての株を嫌気条件下、補強クロストリジウム液体および固体培地(RCM)(Diffco Laboratories、デトロイト、MI)中で増殖させた。アクネ菌を細菌保存株からRCM寒天プレートに移し、GasPak(商標)EZ嫌気容器システム(Becton Dickinson & Co, Sparks MD, USA)を使用することにより、嫌気条件下で5日間インキュベートした。單一コロニーを100mlのRCMに移し、上記のように増殖させた。次に、細菌懸濁液を最終10%のグリセロールの存在下、-80で凍結保存した。この保存株は「スタートストック」と呼ばれ、総ての実験に使用した。通常培養では、100mlのRCMまたは0.1%Tween80を添加したRCM(RCM+T80)を使用し、細菌を37で5日後に、4で10分間、7,000×gで遠心分離することにより採取した。ペレットをプールし、約30mlの冷PBSで洗浄し、再び上記のように遠心分離した。最後に、細菌ペレットをPBS[1.5mM KH₂PO₄、2.7mM Na₂HPO₄、7H₂O、0.15M NaCl(pH7.4)]に懸濁させた(培養物容積から1:10)。細菌はまた、5%ヒツジ血液を補足したコロンビア寒天上でも、上記のように嫌気条件下、37で5~8日間増殖させた。細菌をPBS中でばらばらにし(3mlのPBS/ペトリ皿)、表面タンパク質抽出に使用した。大量の培養物の場合、5日経過したアクネ菌のRCM培養物200mlを、予め37で平衡化した2リットルのRCMに対する接種物として使用した。嫌気条件を確保するために、培養物にN₂を10分間大量に流し、封止した。2時間ごとに、10mlの培養物を採取して600nmでの吸光度およびpHを測定し、上記のように培養物にN₂を流した。細菌を10分間、7,000×gで遠心分離し、ペレットをPBSに再懸濁させた。全表面タンパク質抽出物を以下のように得た。

【0098】

全表面タンパク質の抽出

表面タンパク質をPBS単独で、または2%SDSの存在下、60で20分間もしく

10

20

30

40

40

50

は 1 % L i C l の存在下、 45 度で 2 時間、 加熱抽出した (Shen 1993)。4、20 分間、16,000 × g での遠心分離により細菌を除去した。過剰な SDS および L i C l は PBS に対する透析下で除去した。得られた溶液をアクネ菌加熱抽出物 (PAHE) と呼び、濃縮のため、4、攪拌下で 1 時間、80% 飽和での硫酸アンモニウム沈降を施した。沈殿したタンパク質を 4、30 分間、22,000 × g での遠心分離後に取り出した後、PBS に再懸濁させ、PBS に対して徹底的に透析した。このタンパク質溶液を濃縮アクネ菌加熱抽出物 (cPAHE) と呼んだ。タンパク質濃度を、Peterson (Peterson 1983) により記載された、標品として BSA を用いるローリー法により決定した。

【0099】

10

ビオチン化

cPAHE、精製 Pfg および市販の ECM リガンドを、PBS 中に 1~10 mg / ml の濃度に調整し、4 度で一晩、[74 mM 四ホウ酸ナトリウム、60 mM ホウ酸 (pH 8.8)] に対して透析した。全アクネ菌を上記のように PBS 中に回収し、ペレットをホウ酸バッファーに再懸濁させた。この操作を 2 回繰り返した。タンパク質および全細菌を外的標識試薬スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) - ビオチン (5igm a) を 1 mg のタンパク質に対して 250 µg の NHS - ビオチンの比率で用い、4 度で 4 時間、転倒攪拌しながらインキュベートした。反応を、1 M NH₄Cl を加えることにより停止させた。余分なビオチン - NHS は、タンパク質溶液については 4 度で PBS に対する透析によって、全細菌については遠心分離によって除去した。ビオチン化タンパク質調製物を -80 度で保存し、ビオチン化細菌を使用前に +4 度で保存した。ビオチン化細菌の調製物は調製後 5 日以内に使用した。

20

【0100】

結合活性

アクネ菌とリガンドの間の相互作用を特性評価するために、本発明者らは、定量的および定性的アッセイでビオチン化分子を使用した。アッセイの第 1 セットでは、標識タンパク質として ECM リガンド (フィブリノゲン、コラーゲン I、IV、VI および VII) をビオチンとともに使用した。アッセイの第 2 セットでは、アクネ菌表面タンパク質 (総抽出物および精製 Pfg) をビオチン化した。定量分析については、非標識タンパク質を 50 mM 炭酸水素塩、pH 9.6 バッファーに希釈して 0.01~50 µg / ml の範囲のタンパク質濃度とし、次に、4 度で一晩、96 ウェルポリスチレンプレートに固定化した。これらのウェルを 0.2 ml の 0.05% Tween 20 含有 PBS (PBS - Tween) で 3 回すすいだ。ビオチン化タンパク質 (PBS - Tween 中 0.01~16 µg / ml) をウェルに加え、室温で 1 時間インキュベートした。ウェルを 0.2 ml の PBS - Tween で 3 回すすいだ。ストレプトアビジンにコンジュゲートしたペルオキシダーゼ (PBS - Tween 中 0.5 µg / ml) を加え、室温で 30 分間インキュベートした。洗浄後、結合したペルオキシダーゼを、発色性ペルオキシダーゼ基質 ABTS を用いて検出した。定性分析については、非標識タンパク質 (1 レーン当たり 10~75 µg) を SDS - PAGE により分離し、次に、従前に記載されているよう (Towbin, 1979) ニトロセルロース膜 (孔径 0.45 µm) に転写した。その後、膜を 5% BSA、0.05% Tween 20 を含有する PBS (PBT バッファー) 中、4 度で一晩、飽和させた。結合活性は、20 ml のビオチン化タンパク質 (0.1 µg / ml) 含有 PBT とともに室温にて 2 時間、膜をインキュベートした後、PBT で 3 回洗浄することにより検出した。結合したビオチン化タンパク質は、ストレプトアビジンにコンジュゲートしたペルオキシダーゼ (PBT 中 0.5 µg / ml) とともに室温で 1 時間、膜をインキュベートすることにより検出した。洗浄後、結合したペルオキシダーゼ活性を、CoCl₂ および H₂O₂ の存在下で 3,3'-ジアミノベンジジンを用いて検出した (Harlow および Lane, 1988)。

30

【0101】

二次元電気泳動

40

50

13 cm pH 10 - 3 固定化pH勾配 (IPGストリップ) (Amersham-Bioscience、スウェーデン)を、20で13時間、200 μgのcPAHE由来タンパク質を含有したIEF溶液 (8M尿素 - 2%CHAPS (wt/vol) - 0.5%IPGバッファーpH4 - 7 (vol/vol) - 0.002%ブロモフェノールブルー) 250 μlで再水和物させた。等電点電気泳動は、Ettan IPGphorシステム (Amersham-Pharmacia、スウェーデン)を用い、20にて、1時間200V、1時間500V、30分8000V (勾配モード)、および3時間8000Vの4段階で行った。二次元に関しては、このIPGストリップを15分間、6M尿素 - 30%グリセロール (wt/vol) - 0.05Mトリス - HCl - 2%SDS (wt/vol) - 0.002%ブロモフェノールブルー - 100 mM DTTの溶液中で、および15分間、6M尿素 - 30%グリセロール (wt/vol) - 0.05Mトリス - HCl - 2%SDS (wt/vol) - 0.002%ブロモフェノールブルー - 400 mMヨードアセトアミド溶液中で揺動することにより平衡化した。次に、このIPGストリップを12%SDS-PAGEゲルに載せた。一般に、2つのゲルを70mAの一定電流で6時間、並行して泳動した。タンパク質を、グルタルアルデヒド工程を用いない銀染色によりゲル上で検出した。目的のスポットは、従前に記載されているようにBOAを用いて可視化した。銀染色されたゲルおよび膜を照合し、目的のスポットをゲルから切り出した。

【0102】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) - タイム・オブ・フライト (TOF) 質量分析によるペプチドマスフィンガープリンティング

二次元タンパク質スポットのゲル内トリプシン消化を、50% (vol/vol) アセトニトリルを含有する25 mM炭酸水素アンモニウムバッファー (pH 8.0) 中で行った後、真空乾燥させた (Jonsson 2001)。再水和を0.02 g / 1のシーケンシンググレードの改変ブタトリプシン (Promega、マディソン、ウィスコンシン州) を含有する50 mM炭酸水素アンモニウムバッファー (pH 8.0) で行い、37で18時間消化を行い、0.4% (vol/vol) トリフルオロ酢酸を加えることにより停止させた。回収したペプチド溶液をマトリックスフィルム上にスポットし、室温で乾燥させた。サンプル付着物を純水ですすいだ後、337 nm N₂ レーザーを備えたMALDI質量分光光度計 (Applied Biosystems, Voyager DE super STR) 内に挿入した。高速蒸発マトリックスフィルムは、アセトン中、4-ヒドロキシ- -シアノケイ皮酸 (Sigma) の飽和溶液を使用することにより、従前に記載されているように (Vorm, 1994) 作製した。総てのスペクトルの内部質量較正は、ブタトリプシン自己消化ペプチドを用いることにより達成した。ペプチド質量は SWISS-PROT および Genpept データベースで検索した。

【0103】

Pfgの精製

cPAHE (16 ml 中 90 mg) を室温にて10分間5,000 × gで遠心分離し、不溶性の材料を除去し、バッファーA [25 mMトリス (pH 8.0)] で平衡化したUNOsphere Q陰イオン交換カラム (2.5 × 10 cm) (Bioread) にて流速24 ml / 時で実施するイオン交換クロマトグラフィーにより分画した。非結合タンパク質をバッファーA (24 ml) で洗浄し、結合したタンパク質を、バッファーA + 2 M NaClを用い、0 ~ 160 (28 ml)、160 ~ 200 mM (40 ml) で段階的に溶出させた。Fg結合活性を含有する画分 (1.5 ml) をプールし、4で、バッファー - 0.1 M NH₄HCO₃、pH 8.0 に対して徹底的に透析することにより脱塩し、凍結乾燥させた。Pfgの最終精製は、0.1 M NH₄HCO₃、pH 8.0 で平衡化したSephacryl S-300 HRカラム (1 × 120 cm) (GE Healthcare) に、3 mgのタンパク質を5 mlの容量でロードすることにより、流速6 ml / 時 (1.5 ml / 画分) にて24時間行った。Fg結合活性を含有する画分 (1.5 ml) をプールし、-20で保存した。

【0104】

フィブリノゲンの脱グリコシル化

フィブリノゲンのどの部分がアクネ菌表面タンパク質により認識されるのか評価するために、タンパク質骨格の完全性を保持するためのグリカン部分を酵素的に除去した。フィブリノゲンはN結合およびO結合両方のグリカンを含有する糖タンパク質であることが示されているので(Debeire 1985; Reid Townsend 1982; L'Hotte 1996)、グリカンを除去するためのエンドグリコシダーゼ、N-グリカナーゼおよびO-グリカナーゼを使用した。使用した酵素および試薬は総てProzyme (Prozyme、サンリアンドロ、カリフォルニア州)から購入した。精製市販ヒトおよびウシFg (100 μg; Sigma)を、[0.4% SDS、200 mM -メルカプトエタノール、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0)]を含有するバッファー中、5分間100で変性させ、室温で冷却した後、3% NP-40を加えた。N結合グリカンを除去するため、大腸菌(*Escherichia coli*)中のフラボバクテリウム・メンゴセプチカム(*Flavobacterium meningosepticum*)リコンビナントPNGase F (N-グリカナーゼ)0.5 Uを加え、37で24時間インキュベートした(最終容量50 μl)。O結合グリカンを除去するため、Gal (1-3)GalNAcコアだけがタンパク質と結合した状態で残るまで单糖類が除去されなければならないので、まず、変性ヒトフィブリノゲンを0.25 Uのコレラ菌シリダーゼA、ウシ精巢 - ガラクトシダーゼ、およびジャックビーンミール - N-アセチル - グルコサミニダーゼの存在下、37で3時間インキュベートした。次に、大腸菌中の肺炎連鎖球菌リコンビナントエンド - N-アセチル - ガラクトサミニダーゼ(O-グリカナーゼ)0.5 Uを加え、37で24時間インキュベートした。酵素反応は、サンプルに電気泳動サンプルバッファーを加え、100で3分間変性させることにより停止させた。次に、N-およびO-脱グリコシル化Fgを、ビオチン化Pfgとの結合能に関して上記の結合アッセイを用いて試験した。脱グリコシル化反応は、クーマシーブルー染色の後のSDS-PAGE上で、脱グリコシル化前と後のフィブリノゲンの移動度のシフトによりモニタリングした。モニタリングはまた、下記のようにRCA-Iおよびジャカリン植物レクチンを用いることでも行った。

【0105】

プラスミドの構築

ヒトフィブリノゲンのB - サブユニットのフラグメントは、10%ウシ胎仔血清を添加したダルベッコの改变培地で培養したヒト肝細胞腫細胞株Hept-G2から抽出した全RNAからRT-PCRにより得た。簡単に述べれば、全RNAをTRIZol試薬(Invitrogen Ltd、ペイズリー、UK)を製造者の説明書に従って用いて単離し、DNアーゼI (Roche Molecular Biochemical)で処理した。RNA濃度をサンプルのA₂₆₀値により決定した。相補的DNAを2 μg全RNAからオリゴ(dT)プライマーおよび200 Uのスーパースクリプト(商標)II逆転写酵素(Invitrogen Ltd.、ペイズリー、UK)を用いて作製し、その後、標準的PCR反応の録型として使用した。0.5 UのハイフィデリティPlatinum (登録商標)Pfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen Ltd.、ペイズリー、UK)を用い、最終容量25 μlで、94 15秒、50 30秒および68 45秒に設定した合計35サイクルのサイクル条件により標準的增幅を行った。プライマーは、フィブリノゲンcDNAの318、441、462および462 bpフラグメントを增幅した。

【0106】

次のような特定のプライマー対を使用した。

【化1】

Fg1には

GCAGGAATTCTGATGAAAAGGATGGTTCTTGG (配列番号 17)と
GGCCGCTCGAGTACACAAACACCCCCAGGTCTGG (配列番号 18);

Fg2には

GCAGGAATTCTGGATGCTGGAGGCTGTCTTCAC (配列番号 19)と
GGCCGCTCGACTAGACACCACAGGAATATTGCA (配列番号 20);

10

Fg3には

GCAGGAATTCTGAAGTTAGAATCTGATGTCTCA (配列番号 21)と
GGCCGCTCGAGTTCTGTACAGTGAATCC (配列番号 22);

Fg4には

GCAGGAATTCTGCCAACAGAACTTTGATAGAA (配列番号 23)と
GGCCGCTCGAGTCTGTGGAAAGAAGGGCCTGAT (配列番号 24)。

20

【0107】

EcoRI および XhoI の制限部位をセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーそれに付加した。フィブリノゲン PCR フラグメントを精製し、まず、pBSKベクターに挿入した。EcoRI / XhoI でフラグメントを消化した後、これらのフラグメントを EcoRI および XhoI で消化した pGEX-4T-2 に挿入した。

【0108】

GST 融合タンパク質の発現および精製

大腸菌 BL21 DE3 pLys 株を種々の GST - フィブリノゲン - フラグメント融合タンパク質を生産するために使用した。細菌を 100 μg / ml のアンピシリンおよび 40 μg / ml のクロラムフェニコールを添加した LB 培地 (10 ml) で一晩増殖させ、11 の LB 培地への播種に使用した。30 でインキュベートした培養物が OD₆₅₀ = 0.7 に達した際に、0.5 mM イソプロピル - D - チオガラクトシド (IPTG) を加えることによりタンパク質発現を誘導し、培養物をさらに 4 時間拡大増殖させた。培養物を 5000 × g で 10 分間の遠心分離により採取した。ペレットを PBS で 1 回洗浄し、溶解バッファー - TEN - T (20 mM トリス HCl pH : 7.5, EDTA 0.5 mM, NaCl 150 mM、トリトン X - 100 1%) に再懸濁させ、氷上バーストにより 30 秒音波処理を施し、DTT 2 mM、N - ラウリルサルコシン 1.5% を添加した。この溶解液を 20 分、20000 × g で遠心分離し、上清を廃棄した。GST 融合タンパク質を含有する不溶性のペレット画分を TEN - T バッファー + 8 M 尿素に溶かし、この溶液を 20 分、20,000 × g での遠心分離により明澄化した。可溶化したタンパク質を Protino GST / 4B カラム (Macherey & Nagel) にロードし、バッファー 50 mM トリス、10 mM グルタチオン、pH 8.0 を用いて溶出させた。組換えペプチドを含有する画分 (ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定) をプールした。最初の工程で、利用の直前に上清を PBS に対して透析し、尿素を除去した。

30

【0109】

細胞培養および刺激

不死化ヒトケラチノサイト細胞株 HaCAT、線維芽細胞 MRC5 は、1 mM ピルビン

40

50

酸ナトリウムを含むダルベッコの改変イーグル培地 - グルタマックス - I (D M E M) で増殖させた。不死化ヒト単球細胞株 T h P 1 は、ロズウェルパーク記念研究所 1 6 4 0 培地 - グルタマックス - I (R P M I) で増殖させた。記載のように (L i f e T e c h n o l o g i e) 、 3 7 、 5 % C O₂ を含有する加湿霧囲気下、 D M E M および R P M I には、 0 . 1 % および 1 0 % 熱失活ウシ胎仔血清 (I n v i t r o g e n) 、 および 抗生剤 / 抗真菌剤溶液 (1 0 U / m l ペニシリン、 1 0 μ g / m l ストレプトマイシン、 0 . 2 5 μ g / m l アムホテリン) を添加した。初代ヒトケラチノサイト (N H D K) および 線維芽細胞 (H D F) を K G M - G o l d および F G M - 2 B u l l e t キットで、 製造者 (L o n z a) によりそれぞれ記載されているように増殖させた。不死化細胞株に、マイコプラズマ感染症の不在を評価するために慣例の検査をした。 10

【 0 1 1 0 】

アクネ菌による刺激実験については、細胞を、 0 . 8 7 、 1 . 7 5 、 3 . 5 または 7 μ M の濃度のフィブリノゲン組換えペプチド F g 1 および F g 2 で 3 7 にて 1 時間前処理した、 または前処理しなかったアクネ菌懸濁液を適当な濃度に調整したものとともに、 5 % C O₂ 中、 3 7 にて所望の時間インキュベートした。

【 0 1 1 1 】

L T A (リポテイコ酸) 、 P G N (ペプチドグリカン) または L P S (リポ多糖) による刺激実験については、細胞を 7 、 3 . 5 または 1 . 7 5 μ M の濃度のフィブリノゲン組換えペプチド F g 1 および F g 2 で 5 % C O₂ 中、 3 7 にて 2 4 時間前処理し、 または前処理せず、 次に、 終濃度 1 0 μ g / m l の L T A または P G N または L P S で 3 7 にて 1 8 時間刺激した。 20

【 0 1 1 2 】

イン・ビトロ乾癬モデルを用いる実験については、皮膚初代ヒトケラチノサイト (N H D K) を培養培地で 2 4 時間増殖させた。次に、細胞を 1 . 5 2 、 3 . 0 5 、 6 . 1 および 1 2 . 2 μ M の濃度のペプチド F g 1 . 1 . 1 または参考 (1 0 μ M の J A K 阻害剤 I ; 陽性対照) により処理し、 または処理せず (陰性対照) 、 2 または 2 4 時間プレインキュベートした。このプレインキュベーションの後、培地を除去し、 1 . 5 2 、 3 . 0 5 、 6 . 1 および 1 2 . 2 μ M の濃度の F g 1 . 1 . 1 または 1 0 μ M の濃度の J A K 阻害剤 および 炎症誘発性混合物 (I L - 1 7 + O S M + T N F - の組合せ、 各 3 または 5 n g / m l) を含有するまたは含有しない培養培地に置き換え、細胞を 4 8 または 7 2 時間インキュベートした。 30

【 0 1 1 3 】

接着アッセイ

細菌懸濁液を 6 0 0 n m で所望の濃度に調整し、 0 . 8 7 ~ 7 μ M の範囲の終濃度のペプチド F g 1 および F g 2 で 3 7 にて 1 時間前処理し、 2 時間、 P B S S V F 2 % の溶液で予め飽和させたセルに付着させた。 3 7 で 1 時間のインキュベーションの後、 結合していない細菌を P B S で 3 回洗浄することにより除去し、 固定された細菌を 0 . 5 μ g / m l のストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ溶液により 3 0 分間検出する。 3 回の洗浄の後、 検出された細菌を基質 A B T S (2 , 2 ' - アジノビス [3 - エチルベンズチアゾリン - 6 - スルホン酸] - ディアンモニウム塩) により 3 0 分間現像し、 4 1 0 n m で読み取る。 40

【 0 1 1 4 】

分光光度蛍光分析による R O S 生産の測定

総ての細胞株 (5 . 1 0 ⁴ ~ 1 0 ⁵ 細胞 / ウェル) を 9 6 ウェルプレート (C o r n i n g C o s t a r 、 ブリュトマ、 フランス) に播種し、 従前に記載されているように処理した。 刺激後、 細胞を P B S で 3 回洗浄し、 1 0 0 μ l / ウェルの 5 μ M D H E (O₂ の決定のため) または 5 μ M H₂ - D C F D A (H₂ O₂ の決定のため) とともに 3 0 分間、 従前に記載されているようにインキュベートし、 蛍光強度を 5 時間にわたり、 1 時間毎に記録した。 蛍光励起 / 発光極大は D H E : 4 8 0 / 6 1 0 n m および H₂ - D C F D A : 5 0 7 / 5 2 5 n m であった。 実験の終了時に、 接着細胞の数を下記のよう 50

にクリスタルバイオレットアッセイにより評価した。O₂⁻、およびH₂O₂は、Fusion分光蛍光計(Packard Bell、パリ、フランス)での分光光度蛍光測定法によりアッセイした。ROSのレベルを以下のように各サンプルで計算し、任意単位(A.U.)として表した:反応性酸素種率(任意単位/分/10⁶細胞)=(T5hでの蛍光強度[任意単位]-T₀での蛍光強度[任意単位])/300分/クリスタルバイオレットアッセイにより測定された接着細胞の数。

【0115】

細胞生存率アッセイ

96ウェルプレートにて接着細胞の数を決定するためにクリスタルバイオレット染色を使用した。簡単に述べれば、試験化合物とともにインキュベートした後、培養培地を廃棄し、細胞を0.05%クリスタルバイオレット溶液(Sigma)とともに室温で30分間インキュベートした。PBSで洗浄後、100%メタノールを加え、吸光度をELISAマルチウェルリーダーにて540nmで分光光度測定法により測定した。96ウェルプレートにて細胞生存率を試験するためにMTT(1-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-3,5-ジフェニルホルマザン)アッセイを行った。細胞を細胞培養培地中0.2%MTT溶液とともに37°で4時間インキュベートした。次に、MTT溶液を廃棄し、DMSOを加えて、生細胞で產生されるMTT-ホルマザン結晶を可溶化した。十分に混合した後、540nmで吸光度を測定した。

【0116】

ELISA

ヒトIL-1、IL-8、IL-12、hBD-2、およびTNF-タンパク質濃度は、刺激した細胞の上清において、種々のELISAセットキット(座瘡試験用にはe BioscienceからのReady-Set-Goキット、乾癬試験用にはR&D SystemsからのDuoセットIL-8キットおよびPeprotechからのBD-2 Human Development(hBD-2))を製造者の説明書に従って使用して測定した。本発明者らは、標準曲線のために組換えヒトIL-1、IL-8、IL-12およびTNF-の連続希釈液を使用した。540nmの波長補正で450nmにて光学密度を決定した。

【0117】

統計分析

試験群からのデータ間の差の統計的有意性は、対応のあるスチュードント検定により分析した。P=0.05のレベルは有意であると認められる。統計的有意性はそれぞれ*(P=0.05)、***(P=0.01)、および****(P=0.001)で示す。

【0118】

結果

真核生物リガンドによるアクネ菌細胞表面タンパク質の同定

ECMリガンドにより認識されるアクネ菌表面タンパク質を同定するために、本発明者らは皮膚関連細菌により認識されるコラーゲンおよびフィブリノゲンなどの最も一般的なECMタンパク質を使用した。アクネ菌株をその推定表面タンパク質の発現を可能とするために3種類の異なる培地上で増殖させ、それらのタンパク質を、細菌懸濁液を塩化リチウムの存在下または不在下で加熱することにより抽出した。表面タンパク質を同定するために、アクネ菌の全タンパク質加熱抽出物を電気泳動により分離し、銀染色により検出した(図1B)。14~100kDaの範囲のいくつかのバンドが検出され、見掛けの分子量が58kDaの1つのタンパク質は全タンパク質抽出物のおよそ>90%を占めた(図1B、レーン2)。RCMおよびRCM0.1%Tween20培地の間で大きな差は見られなかつたが、加熱抽出単独よりもリチウムの存在下でより多くのタンパク質が抽出されるものと思われる。アクネ菌を、血液を濃縮した固形培地上で増殖させた場合には、両抽出物に58kDaが存在したが、リチウム加熱抽出物にのみ約90kDaのタンパク質バンドと約20kDaの別のバンドが存在した(図1B、レーン3)。次に、推定アクネ菌表面アドヘシンを、ビオチン化リガンドを用いたウエスタンプロット法により同定した(

10

20

30

40

50

図1A)。本発明者らは、58kDaタンパク質が、加熱抽出物およびリチウム加熱抽出物の両方で、用いられた増殖培地に依存せずにビオチン化フィブリノゲンにより認識されたことを見出した(図1A、レーン2)。コラーゲンによる認識は見られなかった(図1、レーン2)。コラーゲンV Iでごくわずかで再現性のない認識が見られたが、特有なものとは考えられなかった。リチウム抽出物では認識の強度が高いことに着目することが興味深く、この方法を用いた回収がより良いことが示唆される。また、アクネ菌が異なる培地上で増殖していることが、認識される表面タンパク質の発現に劇的な影響を及ぼすことはなかった。これらの結果に従い、アクネ菌をRCM培地で増殖させ、リチウムの存在下で表面タンパク質を加熱抽出した。これらの結果を確認するために、アクネ菌全表面タンパク質をポリスチレンプレート上に固定化し、ビオチン化FgおよびコラーゲンIでプローブした(図2)。まず、数濃度のタンパク質抽出物を試験し、フィブリノゲンに対する結合活性がウェル当たり約6.25μg/mlタンパク質でプラトーに達すること、一方、コラーゲンIに関しては結合活性が検出されなかったことが示された。この結果を確認するために、ウェル当たり25μg/mlのタンパク質を固定化し、種々の量のビオチン化FgおよびコラーゲンIで試験した(図2B)。プラトーに達するフィブリノゲンとの強い結合活性が示され、認識される部位の飽和の可能性が示唆された。コラーゲンIとの結合活性は検出されず、フィブリノゲンとアクネ菌タンパク質抽出物の間の特異的相互作用が示された。これらの結果は、従前に示されている定性結果と一致する。58kDaタンパク質はまだ記載されたことがなく、従って、その特性評価をさらに進めた。58kDaはアクネ菌の表面から抽出されたフィブリノゲン結合タンパク質であることから、Pfgと命名した。

【0119】

Pfgの特性評価

アクネ菌表面抽出物を二次元ゲル電気泳動により分離した。一次元目は、10~3の広い範囲にわたるIEFであった。二次元目は、12.5% SDS-PAGEでを行い、その後、タンパク質を銀染色により検出した(図3A)。分離の後におよそ50のタンパク質スポットが見られた(図3A)。Pfgに相当するスポットの位置を決定するために、第2のゲルで並行泳動し、ビオチン化フィブリノゲンを用いてウエスタンリガンドプロットアッセイを行った(図3B)。Pfgは、2~3個の主要スポットの下に見られ(図3B、レーン3)、銀染色ゲルにおけるスポットと一致していた(図3A、レーン3)。総てフィブリノゲンにより認識されるいくつかのスポットの存在は、Pfgがグリコシル化されているであろうことを示唆し、従って、一次元目でいくつかの等電点下で分離した。対象とするタンパク質スポットを切り出し、ゲル内消化後のペプチド混合物のMALDI-Tofによって同定した。図3Cは、図3Aに矢印で示したタンパク質スポットから生成されたトリプシンペプチド混合物のMALDI質量スペクトルを示す。実験的に得られた22のトリプシンペプチド質量は、予想ペプチド質量と、アミノ酸配列の57%にわたる0.1Da内で一致することが判明した。タンパク質配列データベース検索は、このタンパク質をアクネ菌仮想タンパク質、推定接着またはS-層タンパク質YP_056792(表3)(遺伝子ID 2933198、遺伝子座タグPPA2127)の遺伝子の産物として同定した(Brugemann 2004)。PPA2127遺伝子産物は、C末端に反復するプロリンおよびトレオニンリッチ領域を有する405アミノ酸の仮想タンパク質(プロリン-トレオニン反復タンパク質[PTRP])である。PTRPのアミノ酸配列分析は、C末端領域の324~355番におけるモチーフPro-ThrまたはPro-Lysの16タンデムリピートの存在を示した。このタンパク質の理論的分子量は41.7kDaである。タンパク質配列分析によれば、ソルターゼの潜在的細胞アンカーモチーフに相当し、かつ、アクネ菌の膜上に存在する表面タンパク質との一致を支持する、C末端の400番におけるLPTGモチーフの存在が明らかとなった。

【0120】

【表4】

表3:トリプシンペプチド^aの分子量の測定値および計算値

測定値	計算値	差	質量(Da) ^b	位置	配列
503.27	503.28	-0.01	249-253	AGIDK	配列番号 25
813.50	813.51	-0.01	65-73	AAIAGALVK	配列番号 26
818.42	818.42	0.00	300-306	TAEQLEK	配列番号 27
837.53	837.53	0.00	242-248	IVTHLVR	配列番号 28
928.55	928.54	0.01	124-133	AAAADVLDGIK	配列番号 29
954.58	954.57	0.01	254-262	SLAVQIAPR	配列番号 30
979.57	979.56	0.01	214-222	AAIEHIIIGR	配列番号 31
1069.63	1069.62	0.01	270-279	EPLLALNTAK	配列番号 32
1084.60	1084.58	0.02	287-296	QJVDVITADK	配列番号 33
1101.62	1101.61	0.01	287-296	QJVDVITADK	配列番号 34
1107.67	1107.66	0.01	213-222	KAAIEHIIIGR	配列番号 35
1112.62	1112.62	0.00	307-316	ELPALDDLVK	配列番号 36
1159.66	1159.65	0.01	95-104	EGVLLINHHHK	配列番号 37
1282.75	1282.74	0.01	195-207	AEIAAQAAALLVGR	配列番号 38
1332.69	1332.69	0.00	74-87	AGFSSADAVALAPR	配列番号 39
1341.73	1341.73	0.00	152-165	DAVVANLVAAGVDK	配列番号 40
1469.84	1469.83	0.01	152-166	DAVVANLVAAGVDKK	配列番号 41
1644.93	1644.90	0.03	74-90	AGFSSADAVALAPRIAK	配列番号 42
1810.00	1810.02	-0.02	134-151	ATLAATIIPNALHSAAFK	配列番号 43
1834.08	1834.08	0.00	170-189	ATAVAAATAALNPALGPIAK	配列番号 44
1903.02	1903.02	0.00	223-241	SFDAAVATAIVSSPILNAR	配列番号 45
3284.49	3284.54	-0.05	373-405	SGGHSQGGSGTHYIHHGVAPVLTHSSDLpstgf	
					配列番号 46

^a: 58kDa タンパク質バンドと同定されたこれらのペプチドは 405 残基のうち 231 をカバーし、57% の配列包括度 (sequence coverage) に相当する。^b: モノアイソトピック質量。

【0121】

P f g の精製

典型的な P f g 精製の結果を表4にまとめた。大容量のアクネ菌リチウム抽出物の塩沈澱は、タンパク質の濃縮および得られる濃縮抽出物の比活性の若干の増加 (1ユニットのタンパク質当たり 1.45 倍のフィブリノゲン結合活性) をもたらした (表4および図4 C、D レーン3)。濃縮アクネ菌表面タンパク質を陰イオン交換カラムで分画した (図4 A)。このステップで 180 mM 濃度の NaCl から始め、多量のタンパク質夾雑物が除かれた。フィブリノゲン結合活性を含有する画分は、160 mM で始まる NaCl 濃度で溶出された (図4 A)。この画分はいくつかのわずかなタンパク質夾雑物とともに大きな割合の P f g を含有する (図4 C および D、レーン4)。P f g の最終精製は Sephacryl 高分解ゲル濾過により達成され、その際に総てのタンパク質夾雑物が完全に除

去された(図4BおよびC、D、レーン5)。この工程の後に得られた純粋なPfgの量は0.23mgであり、比活性は1840U/mgであった(表4)。

【0122】

【表5】

表4:Pfgの精製

精製工程	タンパク質 (mg)	総単位(U)	比活性 (U/mg)	Pfg収率 (%)
PAHE	1343	390000	290	/
cPAHE	378	160000	423	100
陰イオン交換	2.9	3000	1034	1.87
ゲルfiltration	0.2	368	1840	0.23

【0123】

Pfgの結合特異性

Pfgがフィブリノゲンにより認識されることが示されたので、このECMリガンドをこの相互作用の性質を分析するために使用した。まず、フィブリノゲンの精製Pfgにより認識される能力を分析した(図5)。ヒトおよびウシFg(hFg、bFg)をポリスチレンプレートに固定化しビオチン化Pfgの結合活性を測定した。PfgのhFgおよびbFgに対する結合は用量依存的であり、hFgに対してより高い親和性を有することが示された。ウシ血清アルブミンを、結合活性を示さない陰性対照として使用した(図5A)。FgのどのサブユニットがPfgにより認識されるかを決定するために、Fgを電気泳動により分離し、結合アッセイを行った(図5B、C、D)。hFg(図5D、レーン3)およびbFg(図5D、レーン4)がPfgにより認識されることが示された。さらに、BサブユニットはhFgおよびbFgの両方において強く認識され、hFgにおいてはAサブユニットのみが認識されると思われる。サブユニットならびに対照として用いた血清アルブミンに対する認識は見られなかった(図5D、レーン2)。これらの結果は、固定化フィブリノゲンで得られた結果と一致し、PfgのFgに対する特異的認識を示した。フィブリノゲンはN結合グリカンおよびO結合グリカンの両方を含有する糖タンパク質であることが示されている(Debeire 1985; Reid Townsend 1982; L'Hoste 1996)。糖タンパク質のどの部分がアクネ菌表面タンパク質による認識に関与するか決定するために、精製フィブリノゲンをPNGase F-グリコシダーゼおよびO-グリコシダーゼで処理して、タンパク質骨格からそれぞれN結合グリカンおよびO結合グリカンを特異的に除去し、アクネ菌表面タンパク質抽出物により認識されるその能力に関して試験した(図6および7)。N結合グリカンを除去した後には、フィブリノゲンはなおPfgにより強く認識された(図6B、レーン3および5)。並行して、脱グリコシル化を、電気泳動分離およびクーマシーブルー染色の後の移動度のシフトの可視化により(図6A、レーン3および5)、また末端位の結合ガラクトシル残基を認識できるRCAl植物レクチンを使用することにより評価した(図6C)(Green, 1987)。本発明者らは、脱グリコシル化されたFgはRCAl植物レクチンによってはもはや認識されなかったことを示した(図6C、レーン3および5)。同じ結果がO結合グリカンを除去した後にも得られ(図7B、レーン3)、脱グリコシル化対照は、移動度シフトにより(図7A、レーン3)、またO結合グリカン上のGal(1-3)残基を特異的に認識しているジャカリン植物レクチン(Tachibana 2006)により(図7C、レーン3)検出されるように、酵素処理は全ての炭水化物を除去したことを示した。これらの結果は、フィブリノゲンのタンパク質骨格がアクネ菌表面タンパク質による認識プロセスに関与していたことを示す。

【0124】

Pfgにより認識されるBヒトフィブリノゲン配列の詳細説明

10

20

30

40

50

ヒトフィブリノゲンのBサブユニットを4つの同等配列(Fg1、Fg2、Fg3、Fg4)に任意に分割し、これらをヒト肝細胞からRT-PCRにより得た。EcoRIおよびXhoIの制限部位を含有するアンブリコンを精製した後、これらのFgインサートの生産のためのプラスミドpBSKにクローニングし、それらをpGEX-4F-2発現プラスミドにクローニングした(図8A)。組換え大腸菌クローニングに対してIPTG誘導を行い、全タンパク質を電気泳動により分析した。Fg1およびFg2、Fg3、Fg4のそれぞれに関して37kDaおよび43kDaの見掛けの分子量の組換えタンパク質が誘導後に過剰発現された(図8B)。ビオチン化Pfgとの接触はFg1のみが認識されたことを示した(図8C)。

【0125】

10

フィブリノゲン由来ペプチドはPfgとフィブリノゲンの間の相互作用を阻害する

Fg1のみがPfgを認識できることが示されたことから、ビオチン化Pfgを種々の濃度の精製Fg1で前処理し、固定化されたフィブリノゲンを認識するその能力を試験した。Fg2およびBSAを陰性対照として使用した(図9)。Fg1はPfgとヒトフィブリノゲンの間の認識を劇的に低下させたが、Fg2およびBSAは低下させなかったことが示された。

【0126】

これらの結果は、Pfgとフィブリノゲンの間の相互作用がフィブリノゲンのタンパク質骨格を必要とする事を示す。従って、ヒトフィブリノゲンのBサブユニット由来の組換えペプチドを使用すれば、Pfgとフィブリノゲンの間の相互作用を阻害することができる。

20

【0127】

アクネ菌の種々の株に対するFg1抗接着効果の評価

全アクネ菌をビオチン化により標識し、ペプチドで前処理し、または前処理せずに、種々の細胞株と接触させた。固定されていない細菌を除去した後、接着活性をストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲートおよび発色性基質を使用することにより、分光光度的に測定した。全ロットのFg1 Fg2産物およびペプチドを、本発明で使用する5つの細胞株で細胞傷害性を試験した。Fg1およびFg2は全ての細胞株で細胞傷害活性を示さないことが示された(図10)。

【0128】

30

アクネ菌6919、RONおよびPIE株のこの能力は、種々の細胞株に接着させるために3つの濃度で試験した。アクネ菌の供試株は供試した3種類の細胞株(ケラチノサイト、単球および線維芽細胞)に結合し、ケラチノサイトに対して最大接着強度が見られたことが示された(図11)。アクネ菌はフィブリノゲンを認識できることが分かっているので、細菌と標的細胞の間の相互作用に競合させるためにヒトおよびウシ全フィブリノゲンを使用した。漸増量のヒトおよびウシの両フィブリノゲンとも、ケラチノサイトへのアクネ菌の接着を阻害できることが示された(図12)。次に、細菌およびRON PIEの接着を阻害するFg1の能力を3つの主要なタイプの細胞に対して評価した。Fg1ペプチドはケラチノサイト(NHDK)、単球(THP-1)、および線維芽細胞(HDF)に対するRON株の接着を用量依存的に阻害することが示された。並行して、陰性対照として使用したFg2ペプチドは抗接着活性を示さない(図13)。同じ結果が6919およびPIEアクネ菌株でも見られた。

40

【0129】

よって、アクネ菌株は種々の標的細胞に接着でき、ケラチノサイトに対してより親和性が高いことが示された。全フィブリノゲンは、細菌とケラチノサイトの間の接着に競合することができる。フィブリノゲンのBサブユニットに由来するFg1組換えペプチドを用いる場合、標的細胞に対する全細菌の接着は有意に低下した。

【0130】

アクネ菌で刺激した細胞においてFg1の抗炎症活性の評価

Fg1組換えペプチドの有効性を評価するために、前処理したアクネ菌6919、RO

50

N および P I E 株により刺激された H a C a T 細胞 N H D K 、 T H P - 1 、 M R C 5 および H D F による O_2^- および H_2O_2 の生産を評価した。生産された R O S の量を無処理細菌で刺激した細胞により生産されたものと比較した。生産ベースラインは、無刺激細胞で R O S を測定することにより得た。 I L - 1 、 I L - 8 、 I L - 12 および T N F - の生産もまた、上記に挙げた総ての条件で測定した。 R O S の生産の測定は、単層細胞上で直接、特異的蛍光色素の存在下で分光光度蛍光測定により行った。並行して、サイトカイン生産の測定を細胞培養上清で行った。

【 0 1 3 1 】

2 セットの実験を実施した： 1) 細胞を、 0.87 ~ 7 μM の範囲の終濃度の F g 1 および F g 2 ペプチドで 37 にて 1 時間予め前処理したアクネ菌株により刺激した (37 10 で 18 時間) ； および 2) 細胞を、 まず、 0.87 ~ 7 μM の範囲の終濃度の F g 1 および F g 2 ペプチドで 37 にて 24 時間前処理し、 アクネ菌株により刺激した (37 で 18 時間) 。

【 0 1 3 2 】

O_2^- の生産は、 アクネ菌の 3 つ総ての株により刺激した場合、 供試した総ての細胞株で重要であることが示されたが、 これらの結果は対照実験に相当する。 これに対し、 F g 1 ペプチドによるアクネ菌株の前処理は、 5 つの細胞株および 3 つの供試株に対して O_2^- の生産を用量依存的に阻害する。 両セットの実験で、 H_2O_2 の生産についても同種の結果が得られた (表 5) 。 図 14 は、 ケラチノサイト H a C a T 細胞株に対するアクネ菌 P I E 株で得られた結果に相当し、 総てのアクネ菌および供試細胞株で得られた結果の代表的なものである。 20

【 0 1 3 3 】

I L - 1 の生産は単球にのみ有効であることが示された。 使用するアクネ菌の株が何であれ、 F g 1 は I L - 1 の生産に効果が無い (表 5) 。 T N F - 生産は単球および線維芽細胞には有効であるが、 ケラチノサイトにおいてはよりランダムである。 供試した 3 つの細菌株では、 単球および線維芽細胞による T N F - 生産の低下に F g 1 用量応答効果が示された。 I L - 12 の生産は、 供試した総ての細菌株および細胞株で極めて低いか、 または存在せず、 このモデルにおいて炎症の不十分なマーカーであることを証明する (表 5) 。 I L - 8 の生産は、 アクネ菌 (6919 、 R O N および P E I) の 3 つの株により刺激した場合、 ケラチノサイト (H a C a T および初代) および線維芽細胞 (M R C 5 および初代) に対して重要である。 I L - 8 の生産が無いのは単球である。 3 つの供試細菌株に対する、 ケラチノサイトおよび線維芽細胞における I L - 8 の生産の低下に及ぼす F g 1 の用量応答効果を示した。 代表的な結果を図 15 に示し、 これはアクネ菌 R O N 株を用いて M R C 5 細胞株で得られた I L - 8 の生産に関する。 30

【 0 1 3 4 】

【表6】

表5: Fg1の抗炎症活性の評価結果の全体像

炎症性分子の生産	アクネ菌株	実験セット	試験の性質	細胞株				
				ケラチノサイト		線維芽細胞		単球
				HaCaT	NHDK	MRC5	HDF	ThP1
スーパー・オキシド陰イオン (O_2^-)	6919	I	対照	pos	pos	pos	pos	pos
			阻害	pos	pos	pos	pos	pos
		II	対照	nt	pos	nt	pos	pos
			阻害	nt	pos	nt	pos	pos
	RON	I	対照	pos	pos	pos	pos	pos
			阻害	pos	pos	pos	pos	pos
		II	対照	nt	pos	nt	pos	pos
			阻害	nt	pos	nt	pos	pos
過酸化水素 (H_2O_2)	PIE	I	対照	pos	pos	pos	pos	pos
			阻害	pos	pos	pos	pos	pos
		II	対照	nt	pos	nt	pos	pos
			阻害	nt	pos	nt	pos	pos
	6919	I	対照	pos	pos	pos	pos	pos
			阻害	pos	pos	pos	pos	pos
		II	対照	nt	pos	nt	pos	pos
			阻害	nt	pos	nt	pos	pos
インターロイキン 1 β (IL-1 β)	RON	I	対照	pos	pos	pos	pos	pos
			阻害	pos	pos	pos	pos	pos
		II	対照	nt	pos	nt	pos	pos
			阻害	nt	pos	nt	pos	pos
	PIE	I	対照	pos	pos	pos	pos	pos
			阻害	pos	pos	pos	pos	pos
		II	対照	nt	pos	nt	pos	pos
			阻害	nt	pos	nt	pos	pos
インターロイキン 8 (IL-8)	6919	I	対照	na	pos	na	na	pos
			阻害	na	pos	na	na	NO
		II	対照	na	na	na	na	pos
			阻害	na	na	na	na	NO
	RON	I	対照	na	na	na	na	pos
			阻害	na	na	na	na	NO
		II	対照	na	na	na	na	pos
			阻害	na	na	na	na	NO
インターロイキン 8 (IL-8)	PIE	I	対照	na	na	na	na	pos
			阻害	na	na	na	na	NO
		II	対照	na	na	na	na	pos
			阻害	na	na	na	na	NO
	6919	I	対照	pos	pos	pos	pos	na
			阻害	pos	pos	pos	pos	na
		II	対照	pos	pos	pos	pos	na
			阻害	pos	pos	pos	pos	na
インターロイキン 8 (IL-8)	RON	I	対照	pos	pos	pos	pos	low
			阻害	pos	pos	pos	pos	na
		II	対照	pos	pos	pos	pos	na
			阻害	pos	pos	pos	pos	na
	PIE	I	対照	pos	pos	pos	pos	low
			阻害	pos	pos	pos	pos	na
		II	対照	pos	pos	pos	pos	na
			阻害	pos	pos	pos	pos	na

10

20

30

40

表5: Fg1の抗炎症活性の評価結果の全体像(続き)

インタ- ロイキン TNF α (TNF- α)	6919	I	対照	na	na	pos	pos	pos
		II	阻害	na	na	pos	pos	pos
		I	対照	na	na	pos	pos	pos
		II	阻害	na	na	pos	pos	pos
	RON	I	対照	na	low	pos	pos	pos
		II	阻害	na	na	pos	pos	pos
		I	対照	na	na	pos	pos	pos
		II	阻害	na	na	pos	pos	pos
PIE	6919	I	対照	na	na	pos	pos	pos
		II	阻害	na	na	pos	pos	pos
		I	対照	na	na	pos	pos	pos
		II	阻害	na	na	pos	pos	pos
	RON	I	対照	na	na	na	na	low
		II	阻害	na	na	na	na	pos
		I	対照	na	na	na	na	na
		II	阻害	na	na	na	na	na
インタ- ロイキン 12 (IL-12)	PIE	I	対照	na	pos	na	na	na
		II	阻害	na	pos	na	na	na
		I	対照	na	na	na	na	na
		II	阻害	na	na	na	na	na
	6919	I	対照	na	low	low	na	na
		II	阻害	na	na	na	na	na
		I	対照	na	na	na	na	na
		II	阻害	na	na	na	na	na

na: 適用できず; nt: 試験されず

対照の pos: 無刺激およびアクネ菌刺激細胞における炎症性分子の生産はそれぞれ陰性および陽性である。

対照の low: 無刺激細胞およびアクネ菌刺激細胞における炎症性分子の生産はそれぞれ陰性および弱い。

阻害の pos: Fg1 は炎症性分子の生産を用量依存的に低下させる。

阻害の NO: Fg1 は炎症性分子の生産に影響を及ぼさない。

I: 細菌が最初に前処理される実験セット。 II: 細胞が最初に前処理される実験セット。

【0135】

Fg1 から生成された小ペプチドの抗炎症活性の評価

106 残基を含有する Fg1 アミノ酸配列を、30 ~ 36 の間のアミノ酸残基を含有する 3 つの非オーバーラップ小配列に分割した (小 Fg1 関連ペプチド ; Fg1.1 、 Fg1.2 、および Fg1.3) 。切断領域における推定活性の損失を避けるため、この切断部位から 2 つの切断領域でオーバーラップする 2 つの配列を作製した (Fg1.4 および Fg1.5) (図 16) 。

【0136】

まず、総ての Fg1 関連ペプチドの細胞傷害性を評価したところ、供試した総ての小ペプチドが 2.5 ~ 20 μ M の範囲で細胞に毒性が無かったことが示された。図 1 に、不死化ケラチノサイト HaCaT 細胞株で得られた結果を示した。同じ結果が不死化単球 THP1 および線維芽細胞 MRC5 細胞株でも得られた。

【0137】

小 Fg1 関連ペプチドの有効性を評価するため、3 つのアクネ菌株 6919 、 RON および PIE で刺激したいくつかの細胞株 (HaCaT 、 NHDK 、 THP-1 、 MRC5 および HDF) による H_2O_2 の生産をこれらの小ペプチドの存在下または不在下で測定した。 H_2O_2 の生産量を無処理細胞で H_2O_2 を測定することにより得る。 H_2O_2 生産の測定は、単層細胞上で直接、特異的蛍光色素の存在下で分光光度蛍光測定により行った。

【0138】

2 セットの実験を行った :

I) 細胞を、2.5 ~ 20 μ M の範囲の終濃度の Fg1.1 、 Fg1.2 、 Fg1.3 、 Fg1.4 、および Fg1.5 小ペプチドで 37 にて 1 時間予め前処理したアクネ菌株により刺激する (37 で 18 時間) ；

II) 細胞を、まず、2.5 ~ 20 μ M の範囲の終濃度の 5 つの小ペプチドで 37 に

10

20

30

40

50

て24時間で前処理し、アクネ菌株により刺激した（37で18時間）。

【0139】

アクネ菌の3つ総ての株で刺激した場合、総ての供試細胞株において H_2O_2 の生産は十分であることが示されたが、これらの結果は対照実験に相当する。これに対し、Fg1.1およびFg1.4小ペプチドによるアクネ菌株の前処理は、5つの細胞株および3つの供試株で用量依存的に H_2O_2 の生産を阻害するが、小ペプチドFg1.2、Fg1.3およびFg1.5は阻害しない。図17は、線維芽細胞MRC5細胞株に対してアクネ菌RON株で得られた結果に相当し、供試した総てのアクネ菌および細胞株で得られた結果の代表的なものである（表6）。

【0140】

【表7】

表6: 小Fg1生成ペプチドの抗炎症活性の評価結果の全体像

炎症性分子の生産	アクネ 菌株	実験セット	試験の 性質	細胞株				
				ケラチノサイト		線維芽細胞		単球
				HaCaT	NHDK	MRC5	HDF	ThP1
6919	RON	I	対照	pos	nt	pos	nt	pos
			阻害	pos	nt	pos	nt	pos
		II	対照	pos	pos	pos	pos	pos
			阻害	pos	pos	pos	pos	pos
過酸化水素 (H_2O_2)	PIE	I	対照	pos	nt	pos	nt	pos
			阻害	pos	nt	pos	nt	pos
		II	対照	nt	pos	nt	pos	pos
			阻害	nt	pos	nt	pos	pos
		I	対照	pos	nt	pos	nt	pos
			阻害	pos	nt	pos	nt	pos
		II	対照	pos	pos	pos	pos	pos
			阻害	pos	pos	pos	pos	pos

nt: 試験されず

対照 pos: 無刺激細胞およびアクネ菌刺激細胞における H_2O_2 の生産はそれぞれ陰性および陽性である。

阻害 pos: Fg1.1およびFg1.4は H_2O_2 の生産を用量依存的に低下させる。

I: 細菌が最初に前処理される実験セット。 II: 細胞が最初に前処理される実験セット。

【0141】

アクネ菌の不在下でのFg1フラグメントの抗炎症特性

Fg1およびFg2フラグメントの抗炎症特性をより一般に評価するために、LTA（リポテイコ酸）、LPS（リボ多糖）およびPGN（ペプチドグリカン）で刺激したいくつかの細胞株（NHDK、THP-1、およびHDF）による H_2O_2 の生産をFg1またはFg2の存在下または不在下で測定した。

【0142】

LTAで刺激したNHDK細胞に関して得られた結果を図18に示すが、Fg1はLTA刺激NHDK細胞による H_2O_2 の生産を有意に低下させるが、Fg2はそうではないことを示す。類似の結果が、LTA、LPSおよびPGNで刺激した初代線維芽細胞（HDF）および単球（ThP1）でも得られた。

10

20

30

40

50

【0143】

IL-8の生産もまた、Fg1またはFg2の存在下または不在下で、LTA、LPSおよびPGNで刺激したNHDK細胞で測定した。PGNで刺激したNHDK細胞に関して得られた結果を図19に示すが、PGN刺激NHDK細胞によるIL-8の生産をFg1は有意に低下させるが、Fg2はそうではないことを示す。類似の結果が、LTAおよびLPSで刺激したNHDK細胞でも得られた。

【0144】

これらの結果は、Fg1は、アクネ菌の存在とは無関係に、ケラチノサイトに対して抗炎症性特性も有することを示す。

【0145】

Fg1.1から生成された小ペプチドの抗炎症活性の評価

小フラグメントFg1.1.1、Fg1.1.2、Fg1.1.3、Fg1.1.4およびFg1.1.6の抗炎症性活性を評価した。

【0146】

本発明者らはまず、総ての小Fg1.1生成ペプチドの細胞傷害性を評価し、供試した総てのペプチドが2.5~20 μMの範囲で細胞に毒性が無かったことを示した。図20は、不死化ケラチノサイトHaCAT細胞株で得られた結果を示す。類似の結果が不死化線維芽細胞MRC5細胞株でも得られた。

【0147】

図21は、ペプチドを溶解させるために使用した希釈剤(ビヒクル)を同じ濃度で使用して行った同じ実験を示す。保存溶液は、Fg1.1.4ではPBS、Fg1.1.1およびFg1.1.3では60%DMSO/PBS、Fg1.1.2では100%DMSOで作製した。

【0148】

これらの結果は、20個までのアミノ酸、好ましくは15個までのアミノ酸の配列を有する本発明の小フラグメントはケラチノサイトに対して毒性作用を持たないことを明らかに示す。

【0149】

次に、本発明者らは、小フラグメントFg1.1.1、Fg1.1.2、Fg1.1.3、Fg1.1.4およびFg1.1.6の、アクネ菌刺激後に細胞の炎症性応答を軽減する能力を評価した。アクネ菌6919株で刺激した細胞株(HaCATおよびMRC5)によるIL-8の生産を測定した。IL-8の量を、無処理細胞で刺激した細胞により生産された量と比較した。生産ベースラインは、無刺激細胞でIL-8を測定することにより得た。IL-8生産の測定は、ELISAアッセイにより行った。I)アクネ菌株を、まず、2.5~20 μMの範囲の終濃度のペプチドで前処理する(図22参照)；およびII)細胞を、まず、上記のようにペプチドで前処理し、次に、アクネ菌で刺激する(図23参照)ことからなる2セットの実験を行った。この場合、IL-8分泌レベルが低いほど、供試フラグメントの抗炎症能は高くなる。

【0150】

結果は、アクネ菌で刺激した場合、総ての細胞株でIL-8の生産は十分であることを示す。しかしながら、アクネ菌株をFg1.1.1ペプチドで前処理した場合では、IL-8の生産は用量依存的に低下する。他の小フラグメントでもIL-8生産のいくらかの阻害が見られるが、その効果はFg1.1.1の場合ほど顕著でない。図22は、HaCAT細胞に対して、前処理細菌で得られた結果に相当する。類似の結果が、線維芽細胞MRC5細胞でも、ならびに細胞株をまず前処理した場合にも得られた(図23)。

【0151】

小ペプチドFg1.1.1の抗炎症活性のイン・ビトロ評価

抗炎症応答に対するFg1.1.1ペプチドのイン・ビトロ有効性を示すこれまでの結果に従い、本発明者らは、イン・ビトロ炎症モデルにおいてアクネ菌により誘導される炎症反応を阻害するその能力を試験した。

10

20

30

40

50

【0152】

このモデルは、アクネ菌が皮内注射された際のマウス耳の反応力に基づく。炎症反応は、アクネ菌注射後、14日間毎日、耳の厚さの測定、発赤ならびに落屑および/または小膿胞の存在により評価した。実験の終了時に、炎症の最終測定を行い、耳の写真を撮影した。その後、マウスを安樂死させ、耳ならびに耳関連神経節を摘出した。耳はすぐに、さらなる組織学的分析のためにホルマリン含有パッファーで固定した。耳関連神経節は氷上の適当な細胞培養培地に入れ、すぐにリンパ球を抽出する処理を施した。全リンパ球懸濁液を計数し、抗CD3抗体(2 μg/ml)および抗CD28抗体(2.5 μg/ml)で予めコーティングした96ウェルプレートで、ウェル当たり $2 \cdot 10^5$ 細胞となるように調整した。72時間の増殖の後、細胞代謝に関連する酸化還元指示薬(UptiB1ue)に基づき、増殖率を測定した。

【0153】

実験計画は、各8個体のマウスを含む5群からなった。1) PBSは、PBSを注射した無処置群に相当する。2) PA+ビヒクルTOPICは、耳へのアクネ菌注射とワセリン単独処置に相当する。3) PA+ペプチドTOPICは、耳へのアクネ菌注射とワセリンに混合した5%Fg1.1.1ペプチドによる処置に相当する。4) アクネ菌株(OD_{620nm}=1.5)をFg1.1.1ペプチド(140 μM)で37にて1時間前処理した(PA+ペプチドINJECT群)または5)ビヒクル単独で処理(PBS中最終1%DMSO)(PA+ビヒクルINJECT群)、次いで、マウスの耳に皮内注射(およそ $2 \cdot 10^7$ CFU/20 μl)して炎症を誘導。

【0154】

5%Fg1.1.1ペプチドゲルの調製は、15mgのペプチドと300mgのワセリンを室温(21)で1分間即座に穏やかに混合することからなり、次いで、マウスの耳に直接塗布した。

【0155】

結果は、Fg1.1.1ペプチドが無処理の耳に比べて、局所塗布において(図24、図26#6)ならびに細菌の前処理で(図25、図26#5)耳の炎症を軽減できることを示す。組織学的分析により、Fg1.1.1が塗布された場合に浸潤免疫細胞の数が最低であること(図27#5および6)、ならびにリンパ球活性化レベルの低減(図28)が明らかになった。

【0156】

大フラグメントFg1(106アミノ酸)および小フラグメントFg1.1.1(15アミノ酸)のIL-8分泌阻害能を比較して図29に表し、これは、10%SVF含有D MEM、10%SVF含有RPMI、KGM-Gold、FGM培地のそれぞれで5%CO₂下、37で増殖させ、種々の濃度のペプチドFg1またはFg1.1.1の存在下、 $5 \cdot 10^4 \sim 10^5$ 細胞/ウェルで播種した不死化ケラチノサイト(HaCAT)、線維芽細胞(MRC5)、単球(THP1)細胞株および初代ケラチノサイト(NHDK)、線維芽細胞(HDF)細胞株からのIL-8生産の阻害パーセンテージを正規化したものを示す。

【0157】

この場合、阻害が大きいほど、供試フラグメントの抗炎症性能が大きくなる。図29は、細胞を15アミノ酸の小フラグメントFg1.1.1で処理した方が、211アミノ酸の大フラグメントFg1で処理した場合より、IL-8生産の阻害パーセンテージが高いことも示す。

【0158】

乾癬モデルにおけるFg1.1.1の抗炎症特性

乾癬は、表皮ケラチノサイトの病態生理学的応答を誘発するTh17リンパ球浸潤により媒介される慢性炎症性疾患である。これに関して、ケラチノサイトは、炎症性応答に寄与することによってそれらの生物学的特性の調節に寄与する多くのサイトカインの標的である。このケラチノサイトの応答は、それらの分化および移動能の変動、ならびにサイト

カイン、ケモカインおよび抗微生物ペプチドにより特徴付けられ、とりわけ、IL-8、hBD-2、S100A7、IL-12RA2の分泌が良好なマーカーとなる。

【0159】

不死化ケラチノサイトHaCaT細胞を、96ウェルプレートに 10^5 細胞/ウェル(Corning Costar、Brumath、France)で播種し、37にて1時間、濃度2.5、5および $10\mu M$ のFg1およびFg1.1.1ペプチドで前処理したアクネ菌6919株(O.D._{620nm}=0.3)で、5%CO₂下、37にて18時間刺激した。次に、培養上清を除去し、IL-8濃度をELISAアッセイ(eBioscience)により測定した。

【0160】

乾癬に対するFg1.1.1の抗炎症性活性を評価するために、本発明者らは、「乾癬」の表現型を生じる炎症誘発混合物(IL-17+OSM+TNF-の組合せ)により刺激した正常ヒト表皮ケラチノサイト(NHEK)のイン・ビトロモデルを使用した。従って、本発明者らは、この条件で刺激されたケラチノサイトによるIL-8および-デフェンシン-2タンパク質(hBD-2)の放出を阻害するFg1.1.1の能力を評価した。

10

【0161】

IL-8生産に対するFg1.1.1の活性(図30):

図30は、基底状態で、正常ヒト表皮ケラチノサイト(NHEK)が少量のIL-8を放出したことを示す(細胞単独)。この放出は、3つのサイトカインの組合せで処理することにより大幅に増加した(刺激細胞)。参照としてのJAK阻害剤I(陽性対照)は、この会合の刺激効果を強く阻害した(67%阻害)。

20

【0162】

本試験の実験条件下では、6.1および12.2 μM で試験したFg1.1.1は、濃度依存的効果を伴って、NHEKによるIL-8の放出を有意に阻害した(25%および49%阻害)。濃度が低いほど(1.25および3.05 μM)、見られる効果は小さかった。

【0163】

hBD-2生産に対するFg1.1.1の活性(図31):

図31は、基底状態で、正常ヒト表皮ケラチノサイトは極めて少量の-デフェンシン-2タンパク質(hBD-2)を放出したことを示す(細胞単独)。この放出は、IL-17、TNF-およびOSMの組合せで処理することにより大幅に増加した(刺激細胞)。参照としてのJAK阻害剤I(陽性対照)は、この会合の刺激効果を強く阻害した(80%阻害)。

30

【0164】

本試験の実験条件下では、12.2 μM で試験したFg1.1.1は、NHEKによるhBD-2の放出を有意に阻害した。さらに、Fg1.1.1は、供試した総ての濃度で細胞生存率に影響を及ぼさなかった。

【0165】

イン・ビトロ乾癬モデルを用いた場合、本発明者らは、Fg1.1.1ペプチドが、いずれの細胞傷害性もなく、用量依存的にIL-8およびhBD-2分子の生産を阻害できたことを示した。さらに、供試した濃度範囲でhBD-2抗微生物ペプチド生産よりもIL-8ケモカイン生産の阻害が強く、より高い用量で両方の抗炎症性分子の生産を損なうであろうことが示唆される。よって、Fg1.1.1ペプチドは、乾癬様炎症を軽減するための良好な候補である。

40

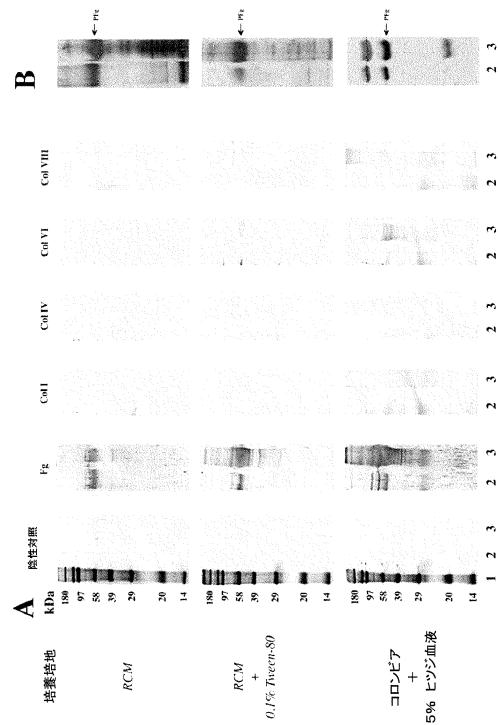
【0166】

参照文献

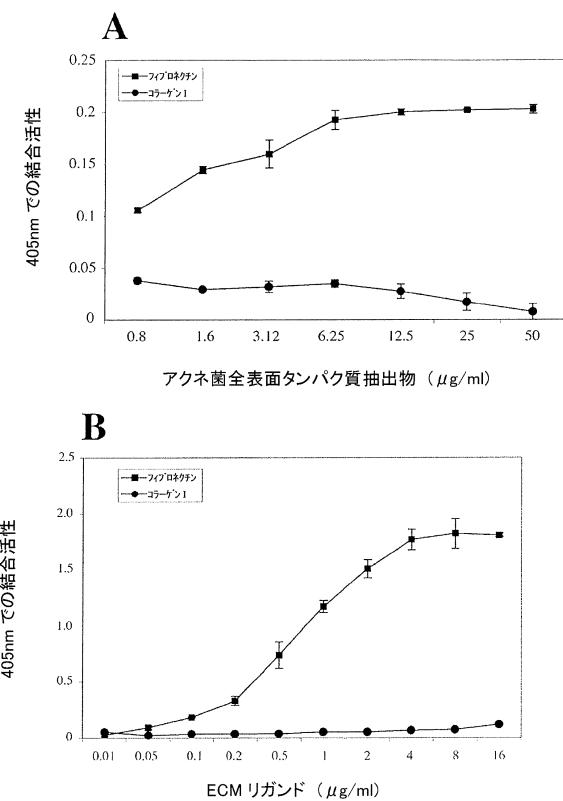
- Brüggemann, H., A. Henne, F. Hoster, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Strittmatter, S. Hujer, P. Dürre, G. Gottschalk. 2004. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*. 305:671-673.
- Debeire, P., J. Montreuil, E. Moczar, H. Van Halbeek, J. F. G. Vliegenthart. 1985. Primary structure of two major glycans of bovine fibrinogen. *Eur. J. Biochem.* 151:607-611.
- Dawson, A., Dellavalle R., 2013, *Acne vulgaris*, *BMJ*; 346:f2634.
- Graham G. M., M. D. Farrar, J. E. Cruse-Sawyer, K. T. Holland, E. Ingham. 2004. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* GroEL. *Br. J. Dermatol.* 150:421-428. 10
- Grange, P. A., C. Chéreau, J. Raingeaud, C. Nicco, B. Weill, N. Dupin, F. Batteux. 2009a. Production of superoxide anions by keratinocytes initiates *P. acnes*-induced inflammation of the skin. *PLoS Pathog.* 5(7): e1000527. doi:10.1371/journal.ppat.1000527.
- Grange, P. A., J. Raingeaud, V. Calvez, N. Dupin. 2009b . Nicotinamide inhibits *Propionibacterium acnes*-induced IL-8 production in keratinocytes through the NF- κ B and MAPK pathways. *J Dermatol. Sci.* 56:106-112.
- Green, E. D., R. M. Brodbeck, J. U. Baenziger. 1987. Lectin affinity high-performance liquid chromatography. Interactions of *N*-glycanase-released oligosaccharides with *Ricinus communis* agglutinin I and *Ricinus communis* agglutinin II. *J. Biol. Chem.* 262:12030-12039. 20
- Grice, E. A., H. H. Kong, S. Conlan, C. B. Deming, J. Davis, A. C. Young, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, P. R. Murray, E. D. Green, M. L. Turner, J. A. Segre. 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324:1190-1192.
- Gristina, A. G., P. Naylor, Q. Myrvik. 1988. Infections from biomaterials and implants : a race for the surface. *Med. Prog. Technol.* 14:205-224.
- Kang, S., S. Cho, J. H. Chung, C. Hammerberg, G. J. Fisher, J. J. Voorhees. 2005. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-B and activator protein-1 in inflammatory acne lesions *in vivo*. *Am. J. Pathol.* 166:1691-1699. 30
- Kistowska, M., S. Gehrke, D. Jankovic, K. Kerl, A. Fettelschoss, L. Feldmeyer, G. Fenini, A. Kolios, A. Navarini, R. Ganceviciene, J. Schuber, E. Contassot, L. E. French. 2014 IL-1 α drives inflammatory responses to *Propionibacterium acnes* *in vitro* and *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 134:677-685.
- L'Hôte, C., S. Berger, Y. Karamanos. 1996. O-glycosylation of fibrinogen from different mammalian species as revealed by the binding of *Escherichia coli* biotinylated lectins. *Thromb. Haemost.* 76:710-714. 40

- Nagy, I., A. Pivarcsi, A. Koreck, M. Széll, E. Urbán, and L. Kemény. 2005. Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through Toll-like receptors. *J. Invest. Dermatol.* **124**:931-938.
- Patti, J. M., M. Höök. 1994. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**:752-758.
- Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. *Methods Enzymol.* **91**:95-119.
- Qin, M., A. Pirouz, Kim M.-H, S. R. Krutzik, H. J. Garban, J. Kim. 2014 *Propionibacterium acnes* induces IL-1 secretion via the NLRP3 inflammasome in human monocytes. *J. Invest. Dermatol.* **134**:381-388. 10
- Romero-Steiner, S., T. Witek, E. Balish. 1990. Adherence of skin bacteria to human epithelial cells. *J. Clin. Microbiol.* **28**:27-31.
- Shen, W., A. Ljungh. 1993. Collagen binding to *Escherichia coli* strain NG7C. *Curr. Microbiol.* **27**:311-316.
- Tachibana, K., S. Nakamura, H. Wang, H. Iwasaki, K. Tachibana, K. Maebara, L. Cheng, J. Hirabayashi, and H. Narimatsu. 2006. Elucidation of binding specificity of jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. *Glycobiology* **16**:46-53. 20
- Trivedi, N. R., K. L. Gilliland, W. Zhao, W. Liu, D. M. Thiboutot. 2006. Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling. *J. Invest. Dermatol.* **126**:1071-1079.
- Townsend, R. R., R., E. Hilliker, Y.-T. Li, R. A. Laine, W. R. Bell, Y. C. Lee. 1982. Carbohydrate structure of human fibrinogen. Use of 300-MHz ¹H-NMR to characterize glycosidase-treated glycopeptides. *J. Biol. Chem* **257**:9704-9710.
- Yu, J.-L., R. Mansson, J.-I. Flock, A. Ljungh. 1997 Fibronectin binding by *Propionibacterium acnes*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **19**:247-253. 30
- Vorm, O., M. Mann. 1994. Improved mass accuracy in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **5**:955-958.

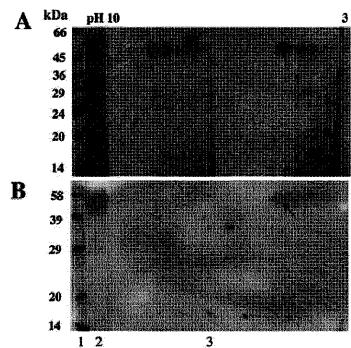
【 図 1 】



【 図 2 】



【図3A-3B】



【図3C】

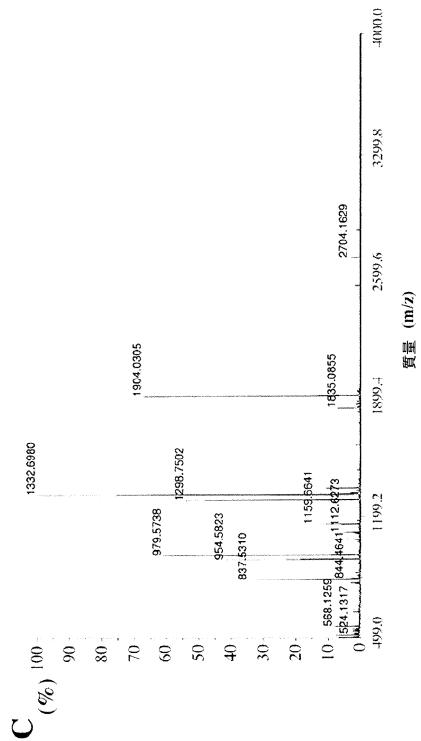
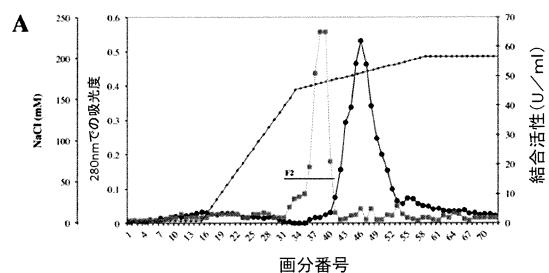
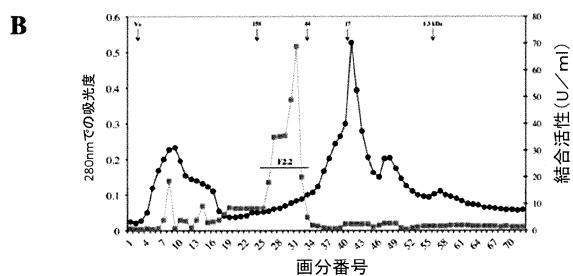


Figure 3

【図4 A】



【図4 B】



【図4 C - 4 D】

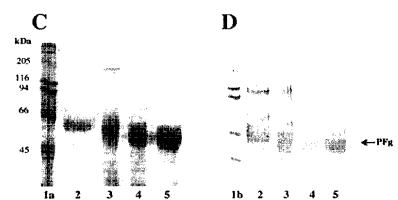
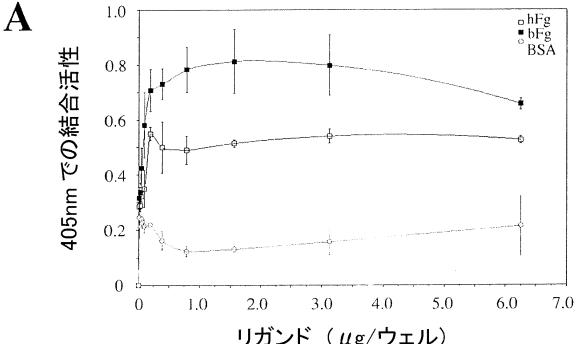
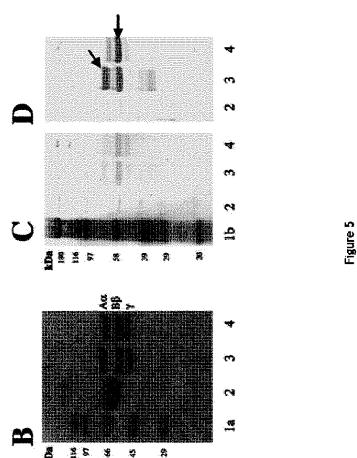


Figure 4

【図5 A】



【図5 B - 5 D】



【図7】

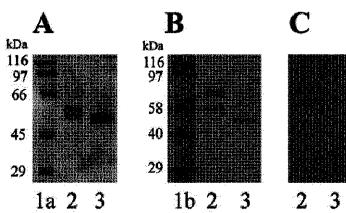


Figure 7

【図6】

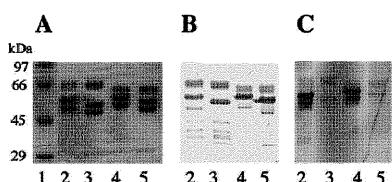
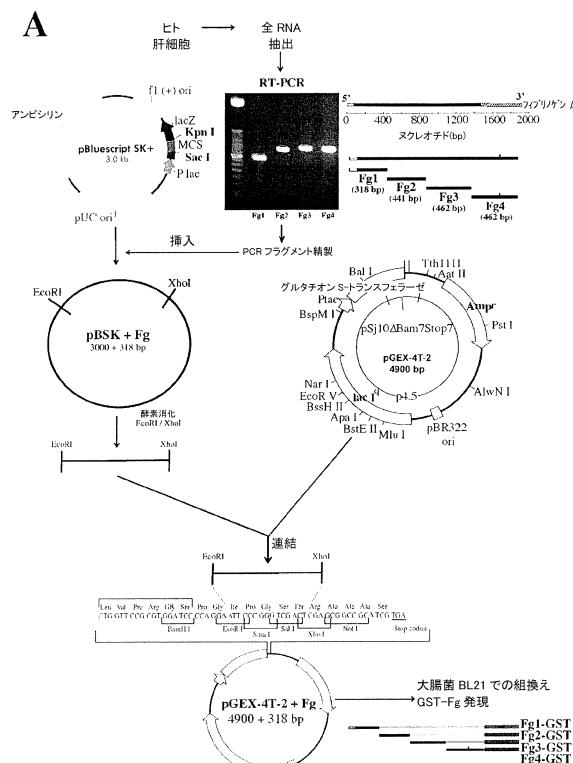


Figure 6

【図 8 A】



【図 8 B - 8 C】

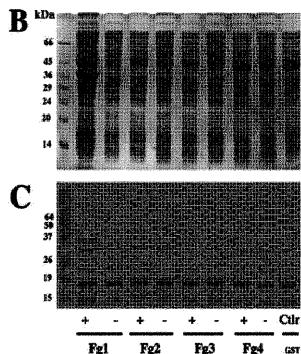
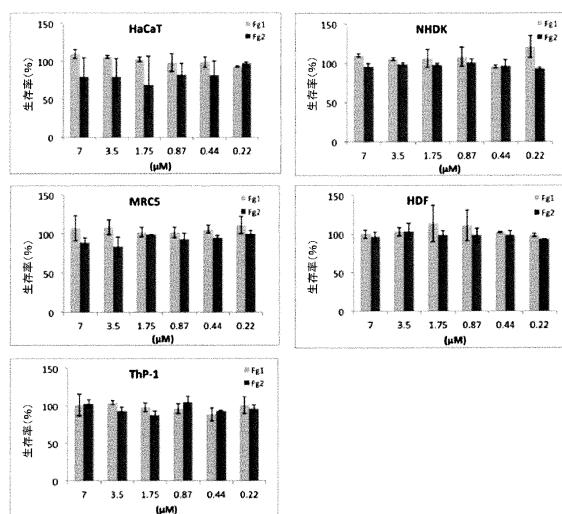
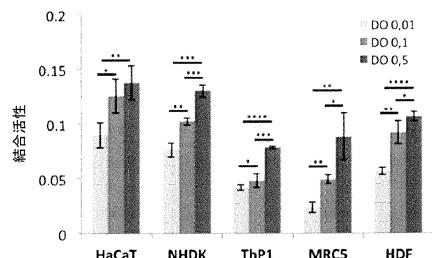


Figure 8

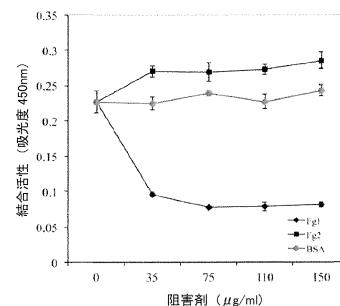
【 10 】



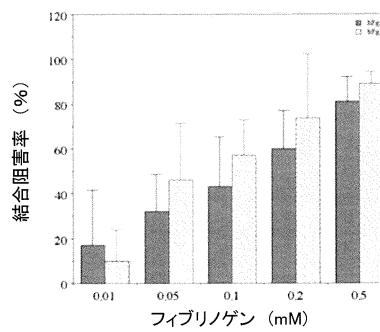
【 义 1 1 】



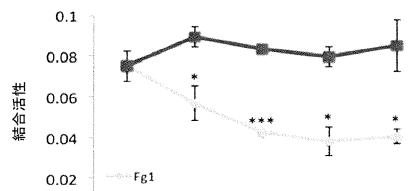
【図9】



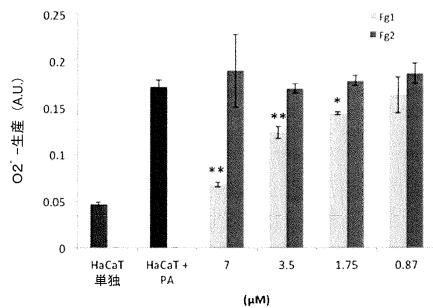
【 义 1 2 】



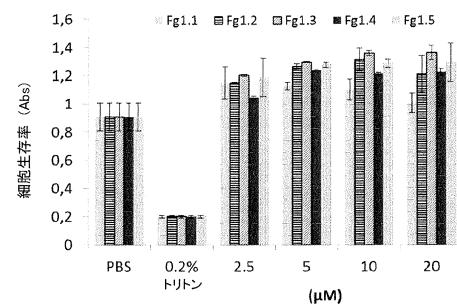
【 図 1 3 】



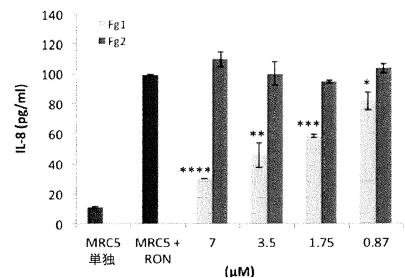
【図14】



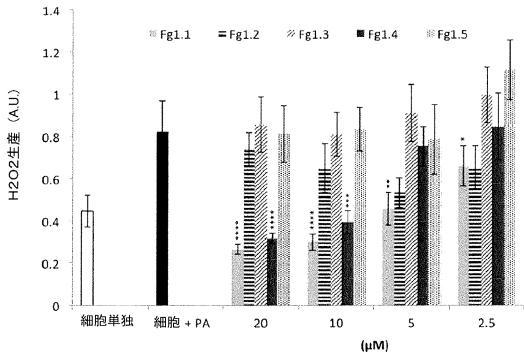
【図16】



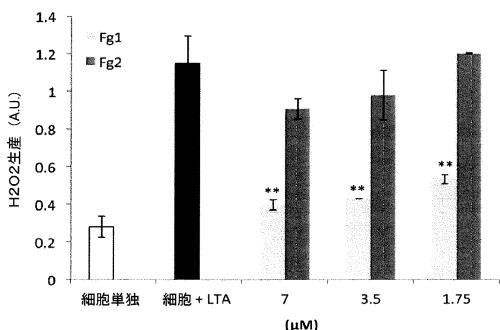
【図15】



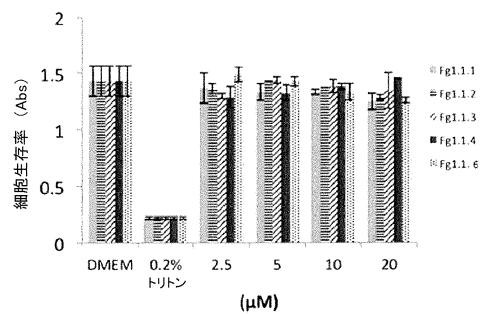
【図17】



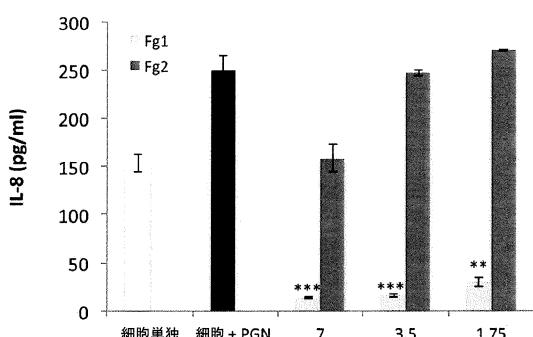
【図18】



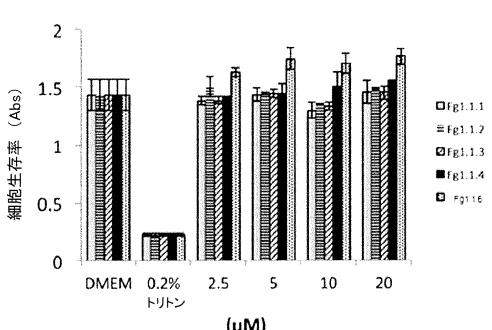
【図20】



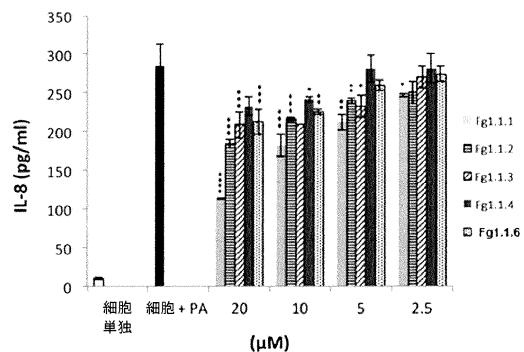
【図19】



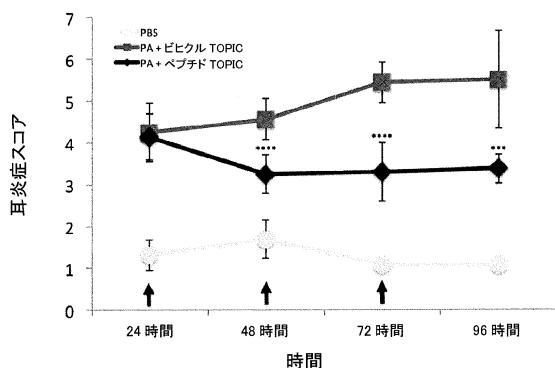
【図21】



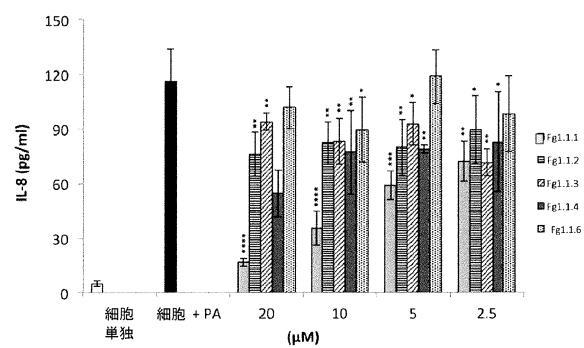
【図22】



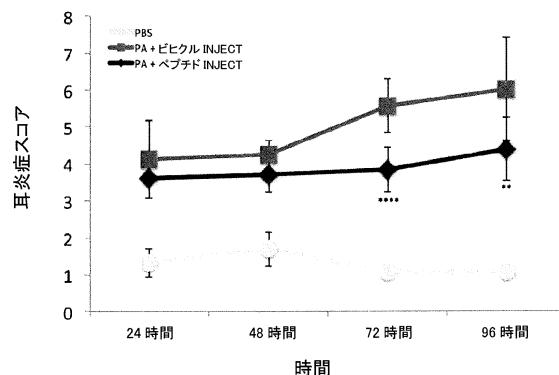
【図24】



【図23】



【図25】



【図26】

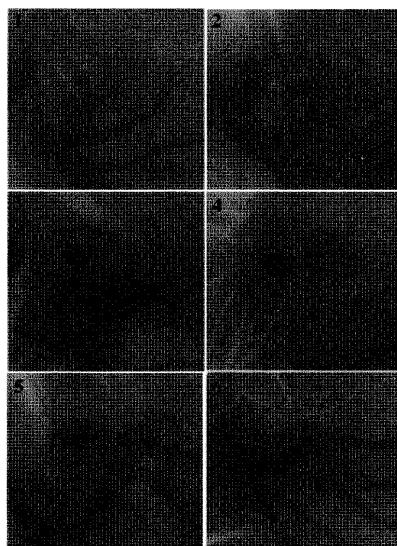


Figure 26

【図27】

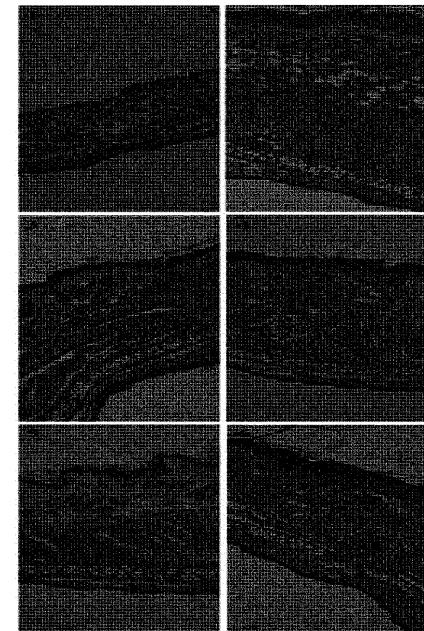
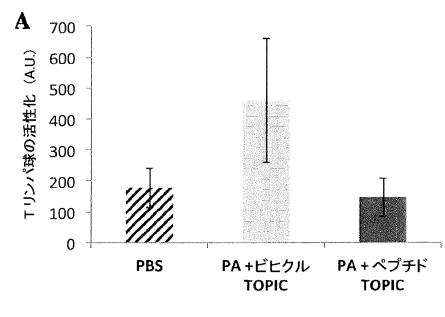
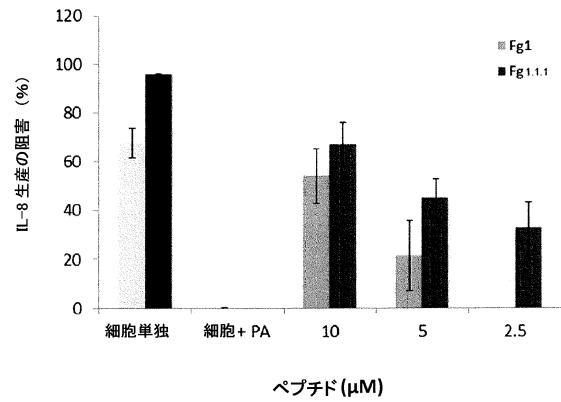
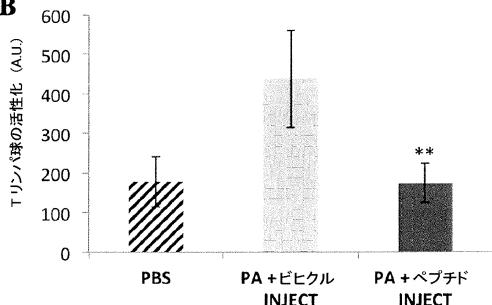


Figure 27

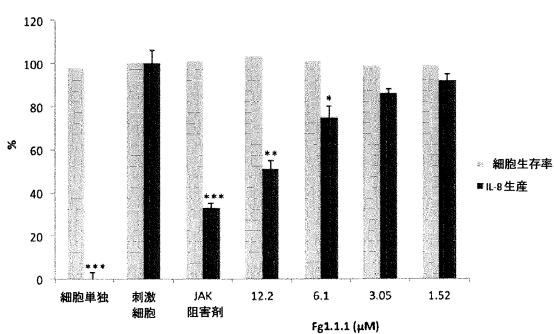
【図28】



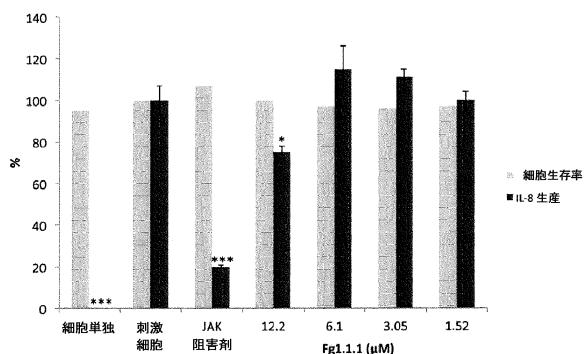
【図29】

**B**

【図30】



【図31】



【配列表】

0006840086000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	17/10	(2006.01)	A 6 1 P 17/10
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A
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

(73)特許権者 506333358

ユニヴェルシテ・パリ・シュド
 UNIVERSITE PARIS SUD
 フランス国、エフ-91405 オルセー・セデックス、リュ・ジョルジュ・クレマンソー 15

(73)特許権者 502381140

ユニベルシテ ピエール エ マリー キュリー(パリ シジェム)
 フランス国、75005 パリ、プラス・ジュショ 4

(73)特許権者 505386960

アンスティテュ ナショナル ド ラ サンテ エ ド ラ ルシェルシュ メディカル (アンセルム)
 フランス国、75013 パリ、リュ ド トルビアック 101

(73)特許権者 594016872

サントル、ナショナル、ド、ラ、ルシェルシュ、シアンティフィク、(セーエヌエルエス)
 フランス国パリ、リュ、ミケ、ランジュ、3

(73)特許権者 508061930

アンスティテュ ギュスタブ ルシ
 フランス国、エフ-94800 ビルジーフ、リュ カミーユ デスマラン 39

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74)代理人 100155631

弁理士 榎 保孝

(74)代理人 100137497

弁理士 大森 未知子

(74)代理人 100207907

弁理士 赤羽 桃子

(72)発明者 ニコラ、デュパン

フランス国コロンブ、リュ、デ、セリジエ、99

(72)発明者 フィリップ、グランジエ

フランス国シュヌビエール、アブニユ、エマニュエル、シャブリエ、6

(72)発明者 バンサン、カルベ

フランス国パリ、リュ、ゲイ、リュサック、33

(72)発明者 ジョエル、レンゴー

フランス国パレゾー、サンティエ、ド、ラ、バレ、13

審査官 梅田 隆志

(56)参考文献 特表2003-503425(JP,A)

特開2014-148541(JP,A)

特表2014-505884(JP,A)

米国特許出願公開第2004/0248807(US, A1)

QIN, H. et al., *Angewandte Chemie International Edition*, 2011年, Vol.50, No.51, pp.12218-12221.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 38 / 16

A 61 K 38 / 08

A 61 K 38 / 10

A 61 K 38 / 36

A 61 P 17 / 00

A 61 P 17 / 06

A 61 P 17 / 10

C 07 K 14 / 75

C 12 N 1 / 15

C 12 N 1 / 19

C 12 N 1 / 21

C 12 N 5 / 10

C 12 N 15 / 00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)