

(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2012-530073

(P2012-530073A)

(43) 公表日 平成24年11月29日(2012.11.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H O 4 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-515290 (P2012-515290)
 (86) (22) 出願日 平成22年6月18日 (2010.6.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年2月14日 (2012.2.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2010/000760
 (87) 国際公開番号 W02010/144968
 (87) 国際公開日 平成22年12月23日 (2010.12.23)
 (31) 優先権主張番号 2009902841
 (32) 優先日 平成21年6月19日 (2009.6.19)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 510007610
 オーラル ヘルス オーストラリア ピー
 ティーワイ リミテッド
 オーストラリア国 3053 ビクトリア
 カールトン スワンストン ストリート
 720 レベル 6 メルボルン デン
 タル スクール デンティストリー アン
 ド ヘルス サイエンスイズ ファカルテ
 イ オブ メディシン
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カゼイン由来のプロテアーゼ阻害ペプチド

(57) 【要約】

本発明は、プロテアーゼ活性を阻害する、化合物、ペプチド、ペプチド模倣物及び医薬組成物と、病態を治療又は予防するためのこれらの化合物、ペプチド、ペプチド模倣物及び医薬組成物の使用とに関する。特に病態は歯周病であり得る。化合物、ペプチド及びペプチド模倣物は様々なカゼイン、例えば - カゼイン、 - カゼイン及び - カゼインから誘導され得る。本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物及び医薬組成物が阻害するプロテアーゼ活性には、ジンジパインのプロテアーゼ活性が含まれる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細菌酵素の活性を阻害、低減又は阻止する化合物、ペプチド又はペプチド模倣物であって、該化合物、該ペプチド又は該ペプチド模倣物が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 及び配列番号 5、並びにそれらにおける保存的置換体からなる群から選択されるアミノ酸配列から本質的になる、細菌酵素の活性を阻害、低減又は阻止する化合物、ペプチド又はペプチド模倣物。

【請求項 2】

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 及び配列番号 5 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物。

10

【請求項 3】

前記アミノ酸配列が配列番号 5 である、請求項 1 に記載の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物。

【請求項 4】

配列番号 1 ~ 配列番号 32 のいずれか 1 つと少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列からなる、細菌酵素の活性を阻害、低減又は阻止する化合物、ペプチド又はペプチド模倣物。

【請求項 5】

前記細菌酵素がジンジバインである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物。

20

【請求項 6】

前記ジンジバインがボルフィロモナス・ジンジバリス由来である、請求項 5 に記載の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物。

【請求項 7】

カゼイン又はその断片のアミノ酸配列を含む化合物、ペプチド又はペプチド模倣物と、薬学的に許容される担体とを含む、細菌酵素を阻害する医薬組成物。

【請求項 8】

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 又は配列番号 5、及びそれらにおける保存的置換体のいずれか 1 つ又は複数から本質的になる、請求項 7 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 9】

二価カチオンを更に含む、請求項 7 又は 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記二価カチオンが亜鉛である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物と、薬学的に許容される担体とを含む、歯周病の治療に使用される医薬組成物。

【請求項 12】

二価カチオンを更に含む、請求項 11 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 13】

前記二価カチオンが亜鉛である、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

歯周病の治療用の薬剤の調製における請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物の使用。

【請求項 15】

歯周病を予防又は治療する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物を、必要とする被験体に投与することを含む、歯周病を予防又は治療する方法。

【請求項 16】

細菌酵素を阻害する方法であって、該酵素と、配列番号 1 ~ 配列番号 32、及びそれら

50

における保存的置換体のいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を含む組成物とを接触させることを含む、細菌酵素を阻害する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プロテアーゼ活性を阻害する、化合物、ペプチド、ペプチド模倣物及び医薬組成物と、病態を治療又は予防するためのこれらの化合物、ペプチド、ペプチド模倣物及び医薬組成物の使用とに関する。特に病態は歯周病であり得る。

【0002】

本願はオーストラリア仮出願第 2009902841 号（この出願はその全体が参照により本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0003】

歯周病は歯の支持組織の細菌関連の炎症性疾患であり、重大な公衆衛生上の問題である。ヒト集団のほぼ全てが或る程度歯周病に罹患している。1989 年の米国の歯科衛生調査によると、研究対象の集団の 85% が歯周病を有するという報告があった。歯周病の主形態は歯肉縁での歯垢の非特異的な集積に関連する歯肉炎である。歯周病のより破壊的な形態（歯周炎）は特定のグラム陰性細菌による歯肉縁下感染に関連する。この疾患に関与する主な細菌性病原体は「レッドコンプレックス」としても知られ、該レッドコンプレックスは、タネレラ・フォーサイシア (*Tannerella forsythia*)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) 及びトレポネマ・デンティコラ (*Treponema denticola*) からなる。ポルフィロモナス・ジンジバリス (*P. gingivalis*) は慢性歯周炎における主要病因である。

【0004】

ポルフィロモナス・ジンジバリスの主要病原性因子は、その細胞外システインプロテアーゼ（まとめてジンジパインとして知られる）であると考えられている。最も一般的なものは RgpA 及び RgpB (Arg - ジンジパイン) 及び Kgp (Lys - ジンジパイン) である。Arg - ジンジパインは Arg 残基のカルボキシル側でタンパク質を切断し、Lys - ジンジパインは Lys 残基のカルボキシル側でタンパク質を切断する。

【0005】

これらの細胞結合型システインプロテアーゼは、増殖並びに生存及び病原性に関する他の内因性機能及び外因性機能のためのペプチドをもたらすタンパク質の分解に重要であると考えられている。生存及び病原性に関するこれらの機能の幾つかは、宿主組織への細菌付着、血球凝集、並びに細菌の細胞表面タンパク質及び分泌タンパク質のプロセッシングであり得る。RgpA 及び Kgp の触媒ドメインは一連の非共有的に結合した配列関連の血液凝集因子 / 付着因子ドメインを有する細胞表面上で複合体として結合することができるが、RgpB はプロテアーゼ付着因子複合体の一部として存在するのではないことが分かっており、触媒ドメインのみからなっている可能性がある。

【0006】

ジンジパインを阻害することが見出されている天然由来型及び合成型の両方の分子が幾つか存在する。ジンジパインの天然阻害剤は生物活性産物のスクリーニングにより見出されており、幾つかの合成阻害剤はプロテアーゼ活性部位及びプロテアーゼ阻害剤の構造に基づき合成されている。例えば、Arg - ジンジパイン阻害剤及び Lys - ジンジパイン阻害剤はクランベリー果汁 [具体的にはポリフェノール、及び高分子量の非透析性成分 (NDM)]、緑茶カテキン及びニンニクから単離されている。これらの阻害剤は、合成型であるか、生産するのにコストがかかるか、許容できない風味があるか、又はヒトでの使用が認可されていない等といった 1 つ又は複数の問題を抱えている。

【0007】

様々な疾患、特に歯周病の発病に関与する細菌酵素のより良好な又は代替となる阻害剤

10

20

30

40

50

が必要とされている。

【 0 0 0 8 】

本明細書における任意の従来技術に対する参考文献は、この従来技術がオーストラリアにおける共通の一般知識若しくは権限 (jurisdiction) の一部を形成するという、又はこの従来技術が当業者によって関連があるものと確認され、理解され、かつみなされることを合理的に期待することができるという承認又は任意の形態の示唆ではなく、またそのように解釈すべきでないものとする。

【 発 明 の 概 要 】

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、細菌酵素の活性を阻害、低減又は阻止する化合物、ペプチド又はペプチド模倣物であって、該化合物、該ペプチド又は該ペプチド模倣物がカゼイン又はその断片のアミノ酸配列を含む、細菌酵素の活性を阻害、低減又は阻止する化合物、ペプチド又はペプチド模倣物が提供される。1つの実施の形態では、酵素は細胞外プロテアーゼであり得る。特定の実施の形態では、細胞外プロテアーゼはシステインプロテアーゼ、例えばジンジパインである。或る特定の実施の形態では、プロテアーゼは R g p A、R g p B 又は K g p である。

10

【 0 0 1 0 】

或る特定の実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は、

Leu Pro Gln Glu Val Leu Asn Glu Asn Leu

Leu Arg Phe (配列番号 1)、

20

Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg

Gly Pro Phe Pro Ile Ile Val (配列番号 2)、

Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu

Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly

Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu (配列番号

3)、

Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg

Gly Pro Phe (配列番号 4)、

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala

Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr

30

Glu (配列番号 5)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 1 】

更なる実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は、

Leu Pro Gln Gly Val Leu Asn Glu Asn Leu

Leu Arg Phe (配列番号 6)、

Leu Ser Pro Glu Val Leu Asn Glu Asn Leu

Leu Arg Phe (配列番号 7)、

Leu Ser Ser Glu Val Leu Asn Glu Asn Leu

Leu Arg Phe (配列番号 8)、

40

Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg

Gly Pro Phe Pro Ile Leu Val (配列番号 9)、

Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu

Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly

Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu (配列番号

10)、

Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu

Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly

Glu Pro Thr Ser Thr Pro Ile Thr Glu (配列番号

11)、

50

Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr (O結合型 GalNAc)				Pro	Thr	
Thr	Glu (配列番号 12)、									
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	
Glu	Pro	Thr (O結合型 GalNAc)				Ser	Thr	Pro	Thr	
Thr	Glu (配列番号 13)、									
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	10
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr (O結合型 GalNAc)			
Thr	Glu (配列番号 14)、									
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr (O結合型 GalNAc)				Ile	Asn	Thr	Ile	
Ala	Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	
Thr	Glu (配列番号 15)、									
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser (P)	G	
ly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu (配	20
列番号 16)、										
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Val	Ser	Gly	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu (配列番号		
17)、										
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Val	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu (配列番号		
18)、										
Pro	Pro	Lys	Lys	Asp	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	30
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu (配列番号		
19)、										
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Ala	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu (配列番号		
20)、										
Pro	Pro	Lys	Lys	Asp	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Val	Pro	Ala	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Ala	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu (配列番号		40
21)、										
Thr	Glu	Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	
Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Ile	
Glu (配列番号 22)、										
Thr	Glu	Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	
Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Thr	
Glu (配列番号 23)、										
Thr	Glu	Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	
Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr (O結合型 GalNAc)				
Pro	Thr	Thr	Glu (配列番号 24)、							
Thr	Glu	Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	50

Ser Gly Glu Pro Thr (O結合型 GalNAc) Ser Thr
 Pro Thr Thr Glu (配列番号 25)、
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr (O結合型 GalNAc) Glu (配列番号 26)、
 Thr Glu Ile Pro Thr (O結合型 GalNAc) Ile Asn
 Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr
 Pro Thr Thr Glu (配列番号 27)、
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser (P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr T 10
 hr Glu (配列番号 28)、
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Val
 Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr
 Glu (配列番号 29)、
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Val Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr
 Glu (配列番号 30)、
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr
 Glu (配列番号 31)、及び 20
 Thr Glu Val Pro Ala Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr
 Glu (配列番号 32)

からなる更なる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0012】

他の実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は配列番号 1 ~ 配列番号 32 における保存的置換体を含む。これらの置換は以下で更に記載する。

【0013】

或る特定の実施の形態では、本発明のペプチド又はペプチド模倣物の長さは少なくとも 13 アミノ酸である。他の実施の形態では、ペプチド又はペプチド模倣物の長さは 70 アミノ酸以下である。或る特定の実施の形態では、ペプチド又はペプチド模倣物の長さは 15 アミノ酸 ~ 61 アミノ酸である。他の実施の形態では、ペプチド又はペプチド模倣物の長さは 20 アミノ酸 ~ 30 アミノ酸である。

【0014】

更なる実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物はリン酸化又はグリコシル化されていない。別の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は翻訳後修飾されている。例えば、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物はリン酸化のみ、又はグリコシル化のみ、又はリン酸化及びグリコシル化の両方を受けていてもよい。1 つ又は複数の残基がこのように修飾されていてもよい。

【0015】

特定の実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は、配列番号 1 ~ 配列番号 32 (端を含む) のいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列からなるか、又はそれから本質的になる。これらの実施の形態では、配列番号 1 ~ 配列番号 32、及び更なるアミノ酸残基を含む化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は、以下に記載のアッセイに従って求めることができるように、細菌酵素の活性を阻害、低減又は阻止する活性を示していれば、配列番号 1 ~ 配列番号 32「から本質的になる」であろう。同様に、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は、以下に記載のアッセイに従って求めることができるように、細菌酵素の活性を阻害、低減又は阻止する活性を示していれば、対応する配列番号より短くても配列番号 1 ~ 配列番号 32 のうちの 1 つ「から本質的になる」。このようなときにはこれらの実施の形態は全長のカゼイン配列を含まない。

【 0 0 1 6 】

他の実施の形態では、本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は、配列番号 1 ~ 配列番号 32 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 60 %、70 %、80 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む。他の実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物はこのようなアミノ酸配列から本質的になる。幾つかの実施の形態では、該群は配列番号 1 ~ 配列番号 5 からなる。

【 0 0 1 7 】

或る特定の実施の形態では、細菌酵素の活性を阻害、低減又は阻止する化合物、ペプチド又はペプチド模倣物であって、該化合物、該ペプチド又は該ペプチド模倣物がヘリックス構造を形成することが可能であるアミノ酸配列を含み、細菌酵素の活性を非競合的に阻害、低減又は阻止する、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物が提供される。

10

【 0 0 1 8 】

他の実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は、酵素が基質と相互作用する場合、酵素、基質又は酵素及び基質の両方と結合すること等により、酵素が基質から生成物を生成するのを阻害、低減又は阻止する。

【 0 0 1 9 】

別の実施の形態では、本発明は、必要とする患者の口腔においてポルフィロモナス・ジンジバリス酵素の活性を阻害、低減又は阻止するのに使用される治療用ペプチドであって、配列番号 1、配列番号 2 及び配列番号 3、又はそのグリコシル化変異体及びリン酸化変異体、並びにその欠失突然変異体及び置換突然変異体からなる群から選択される、治療用ペプチドを提供する。幾つかの実施の形態では、配列番号 1 の変異体及び突然変異体は、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 からなる群から選択される。幾つかの実施の形態では、配列番号 2 の変異体及び突然変異体は、配列番号 4 及び配列番号 9 からなる群から選択される。幾つかの実施の形態では、配列番号 3 の変異体及び突然変異体は、配列番号 5 及び配列番号 10 ~ 配列番号 32 からなる群から選択される。

20

【 0 0 2 0 】

或る特定の実施の形態では、本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物と、薬学的に許容される担体とを含む、細菌酵素を阻害する組成物が提供される。幾つかの実施の形態では、組成物は二価カチオンを更に含む。

30

【 0 0 2 1 】

1 つの実施の形態では、1 つ又は複数の病態を治療又は予防する方法であって、有効量の本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物を、必要とする被験体に投与することを含む、1 つ又は複数の病態を治療又は予防する方法が提供される。1 つの実施の形態では、化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物は被験体の歯茎に直接投与される。1 つの実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物は、歯磨きペースト、歯磨き粉及び歯磨き液を含む歯磨き剤、洗口液、トローチ、チューイングガム、歯科用ペースト、歯肉マッサージクリーム、うがい錠剤、乳製品及び他の食品等の口に適用可能な組成物の一部であり得る。治療又は予防に好適な病態又は疾患の例としては歯周病及び齲蝕が挙げられる。ジンジバインの酵素活性により引き起こされる又はジンジバインの酵素活性に関連する任意の疾患又は病態は、本発明による治療又は予防に好適であり得る。

40

【 0 0 2 2 】

治療を必要とする又は歯周病若しくは齲蝕を発症する危険性のある被験体は動物である。幾つかの実施の形態では、被験体はヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ又はウシである。

【 0 0 2 3 】

別の実施の形態では、被験体において歯周病の症状を治療又は緩和する方法であって、本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物を被験体に投与することを含む、被験体において歯周病の症状を治療又は緩和する方法が提供される。

【 0 0 2 4 】

幾つかの実施の形態によれば、細菌酵素を阻害する方法であって、酵素と、配列番号 1

50

～配列番号5及びそれらにおける保存的置換体のいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば配列番号1～配列番号32及びそれと少なくとも60%同一である配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を含む組成物とを接触させることを含む、細菌酵素を阻害する方法が提供される。特定の実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物のアミノ酸配列は全長のカゼイン配列を含まない。これらの実施の形態のいずれかによれば、細菌酵素はジンジバインであってもよく、例えばジンジバインはボルフィロモナス・ジンジパリス由来である。

【0025】

これらの実施の形態のいずれかによれば、接触する工程は、組成物を、それを必要とする被験体（例えばヒト）、例えば歯周病若しくは齲蝕を治療する必要がある、又は歯周病若しくは齲蝕を発症する危険性のある被験体に投与することを含み得る。これらの実施の形態のいずれかによれば、該方法は歯周病又は齲蝕の症状を治療又は緩和するのに効果的であり得る。

10

【0026】

別の実施の形態では、本発明の方法は、抗炎症剤、ボルフィロモナス・ジンジパリス又はボルフィロモナス・ジンジパリスにより発現されるタンパク質と結合する抗体、抗生物質、及びバイオフィーム抑制剤からなる群から選択される作用物質を投与することを更に含む。抗生物質は、アモキシシリン、ドキシサイクリン及びメトロニダゾールからなる群から選択され得る。抗炎症剤は非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）を含む。NSAIDの例としてはシクロオキシゲナーゼを阻害する化合物が挙げられる。NSAIDの具体例としては、アスピリン、イブプロフェン及びナプロキセンが挙げられる。バイオフィーム抑制剤の一例はフマル酸レダクターゼの阻害剤、例えばオキサニテルである。

20

【0027】

別の実施の形態では、本発明は、歯周病及び／又は治療に好適であるとして本明細書中で特定された、他の病態の治療又は予防用の薬剤の調製における有効量の本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物の使用を提供する。

【0028】

本発明は、有効量の本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物と、薬学的に許容される担体とを含む、歯周病（及び／又は治療に好適であるとして上記で特定された、他の病態）の治療又は予防用の医薬組成物も提供する。組成物は、抗炎症剤、ボルフィロモナス・ジンジパリス又はボルフィロモナス・ジンジパリス由来のタンパク質と結合する抗体、抗生物質、及びバイオフィーム抑制剤からなる群から選択される作用物質を更に含むことができる。抗生物質は、アモキシシリン、ドキシサイクリン及びメトロニダゾールからなる群から選択され得る。

30

【0029】

幾つかの実施の形態によれば、被験体において細菌酵素を阻害するのに有効な量の細菌酵素を阻害するカゼイン又はその断片のアミノ酸配列、例えば配列番号1～配列番号5及びそれらにおける保存的置換体のいずれか1つ、又は配列番号1～配列番号32及びそれと少なくとも60%同一である配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を含む医薬組成物が提供される。特定の実施の形態では、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物のアミノ酸配列は全長のカゼイン配列を含まない。

40

【0030】

これらの実施の形態のいずれかによれば、組成物は、二価カチオン、例えば亜鉛、並びに／又は抗炎症剤、抗生物質、バイオフィーム抑制剤、及びボルフィロモナス・ジンジパリス又はボルフィロモナス・ジンジパリスにより発現されるタンパク質と結合する抗体からなる群から選択される作用物質を更に含み得る。

【0031】

これらの実施の形態のいずれかによれば、組成物は歯茎への局所投与用に構築すること

50

ができ、かつ / 又は単位剤形で提供することができる。

【 0 0 3 2 】

別の実施の形態では、本発明は、活性成分として本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を含む、歯周病（及び / 又は治療に好適であるとして上記で特定された、他の病態）の治療又は予防用の組成物を提供する。組成物は二価カチオンを更に含むことができる。

【 0 0 3 3 】

別の実施の形態では、本発明は、有効量の本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を主成分として含む医薬組成物を提供する。組成物は、例えば歯周病及び / 又は治療に好適であるとして上記で特定された、他の病態の治療又は予防に使用することができる。幾つかの実施の形態では、組成物は二価カチオンを更に含む。

10

【 0 0 3 4 】

別の実施の形態では、本発明は、歯周病及び / 又は治療に好適であるとして上記で特定された、他の病態の治療又は予防に使用される本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を提供する。

【 0 0 3 5 】

別の実施の形態では、本発明は、歯周病の治療又は予防に使用される、本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を含む組成物を提供する。幾つかの実施の形態では、組成物は二価カチオンを更に含む。

【 0 0 3 6 】

更なる態様では、本発明は、（ a ）本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物と、（ b ）薬学的に許容される担体とを備える部品のキットを提供する。

20

【 0 0 3 7 】

或る特定の実施の形態では、二価カチオンは、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Sn^{2+} 及び Mn^{2+} からなる群から選択される。また、二価カチオンは SnF^+ 及び CuF^+ のようなフッ化物に関連するものであり得る。幾つかの実施の形態では、二価カチオンは Ca^{2+} 又は Zn^{2+} である。

【 0 0 3 8 】

或る特定の実施の形態では、二価カチオンと化合物、ペプチド又はペプチド模倣物との比は 1 . 0 : 2 . 0 ~ 1 . 0 : 1 0 . 0 の範囲、例えば 1 . 0 : 4 . 0 の範囲である。

30

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用されるように、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む (comprise)」という用語及びその用語の変化形、例えば「含む ("comprising", "comprises" and "comprised")」は、更なる添加物、構成要素、整数又は工程を排除することを意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 0 】

【図 1】合成型の S_1 - カゼイン (1 1 ~ 2 3)

【化 1】



40

ペプチド、 - カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 5)

【化 2】



ペプチド、 - カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9)

【化 3】



ペプチド及び - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7)

50

【化 4】

(㉓)

ペプチドの存在下におけるボルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 3 3 2 7 7 の全細胞の A r g 特異的なタンパク質分解活性を示す図である。2つの別個の細菌培養物及び3回の技術的反復測定によりアッセイを実施した。アッセイにおける細胞の平均数は 4.0×10^8 c f u / m L である。

【図 2】合成型の s_1 - カゼイン (1 1 ~ 2 3)

【化 5】

(㉔)

ペプチド、 - カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9)

【化 6】

(㉕)

ペプチド及び - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7)

【化 7】

(㉖)

ペプチドの存在下におけるボルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 3 3 2 7 7 の全細胞の L y s 特異的なタンパク質分解活性を示す図である。2つの別個の細菌培養物及び3回の技術的反復測定によりアッセイを実施した。アッセイにおける細胞の平均数は 4.0×10^8 c f u / m L である。

【図 3】100 μ M の合成型のカゼイン由来ペプチドの存在下における精製プロテアーゼ複合体の A r g 特異的なタンパク質分解活性

【化 8】

(㉗)

及び L y s 特異的なタンパク質分解活性

【化 9】

(㉘)

を示す図である。6回の技術的反復測定によりアッセイを実施した。

【図 4】幾つかの濃度の - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) の存在下における精製 R g p B のタンパク質分解活性を示す図である。R g p B の濃度は 0.23μ g / m L である。

【図 5】蛍光 B S A 基質 (D Q T M B S A) 及び 500 μ M のカゼインペプチドを用いて測定されたボルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 3 3 2 7 7 の全細胞の A r g 特異的なプロテイナーゼ活性及び L y s 特異的なプロテイナーゼ活性を示す図である。 - カゼイン (1 0 6 ~ 1 6 9) は天然由来型であり、他の - カゼインペプチドは合成型であった。誤差バーを3つの技術的反復測定結果及び2つの生物学的反復測定結果の標準偏差として算出した。全てのペプチドが対照の値と有意に異なっていた ($p < 0.05$)。

- カゼイン (1 1 7 ~ 1 2 3) 及び - カゼイン (1 2 7 ~ 1 3 7) は互いに有意に ($p < 0.05$) 異なっていないが、残りのペプチドとは有意に異なっている。 - カゼイン (1 0 6 ~ 1 6 9) は - カゼイン (1 0 6 ~ 1 3 7) と有意に異なっていたが、 - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) 又は - カゼイン (1 1 7 ~ 1 3 7) とは有意に異なっていなかった。 - カゼイン (1 0 6 ~ 1 3 7) は - カゼイン (1 1 7 ~ 1 3 7) を除く全てのペプチドと有意に異なっていた。 - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) は - カゼイン (1 0 6 ~ 1 6 9) を除く全てのペプチドと有意に異なっていた。

【図 6】アッセイにおける 1 m M のシス테인濃度での合成型の - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) ペプチド及び Z n C l ₂ の存在下におけるボルフィロモナス・ジンジバリス A T

10

20

30

40

50

C C 3 3 2 7 7 の全細胞の A r g 特異的なタンパク質分解活性を示す図である。3つの別個の細菌培養物及び4回の技術的反復測定によりアッセイを実施した。

【図7】アッセイにおける1 mMのシステイン濃度での合成型の - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) ペプチド及び $ZnCl_2$ の存在下におけるボルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 3 3 2 7 7 の全細胞の L y s 特異的なタンパク質分解活性を示す図である。2つの別個の細菌培養物及び3回の技術的反復測定によりアッセイを実施した。

【図8】アッセイにおける1 mMのシステイン濃度での合成型の - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) ペプチド及び $ZnCl_2$ の存在下における精製プロテアーゼ複合体の A r g 特異的なタンパク質分解活性

【化10】

10

()

及び L y s 特異的なタンパク質分解活性

【化11】

()

を示す図である。6回の技術的反復測定によりアッセイを実施した。

【図9】アッセイにおける1 mMのシステイン濃度での合成型の S_1 - カゼイン (1 1 ~ 2 3) ペプチド

【化12】

20

()

、 - カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) ペプチド

【化13】

()

及び $ZnCl_2$ の存在下におけるボルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 3 3 2 7 7 の全細胞の A r g 特異的なタンパク質分解活性を示す図である。2つの別個の細菌培養物及び3回の技術的反復測定によりアッセイを実施した。

【図10】アッセイにおける1 mMのシステイン濃度での合成型の S_1 - カゼイン (1 1 ~ 2 3) ペプチド

【化14】

30

()

、 - カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) ペプチド

【化15】

()

及び $ZnCl_2$ の存在下におけるボルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 3 3 2 7 7 の全細胞の L y s 特異的なタンパク質分解活性を示す図である。2つの別個の細菌培養物及び3回の技術的反復測定によりアッセイを実施した。

【図11】0 . 1 5 m M、0 . 2 5 m M及び1 . 0 m Mの濃度での B A p N A 基質を用いた 0 μ M

【化16】

40

()

、 2 5 μ M

【化17】

()

50

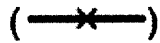
、 50 μ M
【化 18】



、 75 μ M
【化 19】



及び 100 μ M
【化 20】



10

の濃度での - カゼイン (109 ~ 137) ペプチドによる精製 R g p B の阻害のライン
ウェーバー・バークプロットを示す図である。

【図 12】 - カゼイン (109 ~ 137) ペプチドによる R g p B の阻害に関する阻害
定数 (K_i) の評価のための二次プロットを示す図である。それぞれの点集合に関する直
線は各データ集合の線形回帰分析結果を表す。 K_i を、回帰直線の負の切片として評価し
た。

【図 13】 - カゼイン (109 ~ 137)、並びにヒトセリン / システインプロテイナー
ゼ阻害剤クレード G 成員 1 スプライス変異体 3 (Q5UGI5)、血漿セリンプロテア
ーゼ C1 阻害剤 (P05155) 及び推定セリンプロテイナーゼ阻害剤 (KUファミリー
) (A3LQ30) の B L A S T 配列アラインメントを示す図である。

20

【図 14】ヒトセリンプロテアーゼ阻害剤カザールタイプ 5 短鎖アイソフォーム (Q3L
X95)、ヒトセリンプロテアーゼ阻害剤カザールタイプ 5 (Q9NQ38)、ヒトエラ
フィン (エラスターゼ特異的阻害剤) (P19957) 及びヒト P I 3 タンパク質 (ペプ
チダーゼ阻害剤 3、皮膚由来 (SKALP)、アイソフォーム C R A __ a) (Q6FG7
4) との - カゼイン (193 ~ 209) の B L A S T 配列アラインメントを示す図であ
る。

【図 15】A T P 依存性 C l p プロテアーゼ A T P 結合サブユニット c l p X (P508
66)、セリンプロテアーゼ (Q1NE66) 及び A T P 依存性亜鉛メタロプロテイナー
ゼ (Q7VHT4) との s_1 - カゼイン (11 ~ 23) の B L A S T 配列アラインメン
トを示す図である。

30

【図 16】提唱された不競合的阻害モデルを示す図である。E = A r g - ジンジバイン又
は L y s - ジンジバイン、S = B A p N A 基質又は G P K N A 基質、I = - カゼイン (
109 ~ 137) ペプチド、及び P = p - ニトロアニリド生成物。

【図 17 a】 - カゼイン (109 ~ 137)、Z n (I I) 及び基質 (B A p N A) と
の相互作用に關与する R g p B 活性部位の残基を示す図である。R g p B の H i s 211
及び G l u 152、 - カゼイン (109 ~ 137) の A s p 115 (A s p 7) 及び G
l u 118 (G l u 10) と Z n (I I) との間の静電相互作用を強調している。ペプチ
ドの I l e 122 (I l e 14) と B A p N A 基質との間の疎水性相互作用も強調してい
る。R g p B の T r p 284 及び C y s 244 がそれぞれ、基質の A r g 残基及びアミド
結合との相互作用を形成する。

40

【図 17 b】Z n (I I) の存在下で R g p B : B A p N A 複合体と結合する - カゼイ
ン (109 ~ 137) の提唱された分子モデルを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本明細書で開示及び規定される本発明は、明細書若しくは図面で言及される又は明細書
若しくは図面から明らかな 2 つ以上の個々の特徴の全ての代替的な組合せにまで及ぶこと
が理解される。これらの様々な組合せは全て本発明の様々な代替的な態様を構成する。

【0042】

50

プロテアーゼ阻害作用を示す化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を口腔ケア製品、機能性食品及び医薬品に使用することができる。本発明により、ポルフィロモナス・ジンジバリスの細胞外プロテアーゼ阻害活性を特徴とする新たなミルクカゼインペプチドが同定された。これらのペプチドは、合成的に製造するか、又はミルクカゼインの酵素消化により得ることができる。ペプチドをヒト、ウシ、ヤギ及びヒツジを含む様々な種由来のミルクカゼインから得ることができる。

【0043】

ウシのミルクカゼインは、更なるタンパク質分解に比較的耐性のあることが知られているタンパク質の天然供給源である。ウシのミルクカゼインは牛乳消化後のヒトの小腸末梢部及び血液で検出されている。

10

【0044】

これらのペプチドには幾つかの利点があり、これには天然供給源から誘導することができること、感知可能なほどの風味を有しないこと、及び併用すると、亜鉛等の二価カチオンの風味を消すことができるといったことが含まれるが、これらに限定されない。ペプチドは、

- S₁ - カゼイン (11 ~ 23) (配列番号1)
- カゼイン (193 ~ 209) (配列番号2)
- カゼイン (109 ~ 137) (配列番号3)
- カゼイン (193 ~ 205) (配列番号4)
- カゼイン (117 ~ 137) (配列番号5)

20

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0045】

本発明は配列番号1 ~ 配列番号5のアミノ酸配列の機能的断片も含む。機能的断片は配列番号1 ~ 配列番号5に対応するアミノ酸配列よりも短い、配列番号1 ~ 配列番号5に対応するアミノ酸配列の機能を維持しているアミノ酸配列である。機能的断片は、例えばエクソペプチダーゼを用いてアミノ酸配列を短くし、又はより長さの短いアミノ酸配列を合成し、その後以下の実施例に示される方法等により任意のプロテアーゼ阻害活性を試験することにより容易に求めることができる。

【0046】

配列番号1 ~ 配列番号5が誘導されるウシカゼインに対してオーソロガス及びパラロガスであるタンパク質の断片に対応する配列番号1 ~ 配列番号5のアミノ酸配列の変異体も本発明の範囲内である。

30

【0047】

配列が遺伝子重複事象により分離した場合、該配列は「パラロガス」である。すなわち同じゲノムの2つの異なる位置を占めるように、生物において遺伝子が重複する場合、2つのコピーはパラロガスである。

【0048】

配列が種分化事象により分離した場合、該配列は「オーソロガス」である。すなわち種が2つの異なる種に分化する場合、得られる種の単一遺伝子の分化コピーはオーソロガスであるといえる。

40

【0049】

本発明の範囲内にある別の変異体群は、翻訳後修飾を含有する配列番号1 ~ 配列番号5のアミノ酸配列である。特定の翻訳後修飾はリン酸化及びグリコシル化である。これらの修飾を説明するために、以下のようにウシカゼインの多くの既知の遺伝的変異体が知られている：

- A . S₁ - カゼイン類
 - 1 . S₁ - カゼイン X^a - 9 P (遺伝的変異体 - A、B、C、D、E、F、G及びH)
 - 2 . S₁ - カゼイン断片
- B . S₂ - カゼイン類

50

1. s_2 - カゼイン X^a - 15 P (遺伝的変異体 - A、B、C、D)
2. s_2 - カゼイン X^a - 9 P (f 5 1 ~ 2 0 7) (遺伝的変異体 - A、C)
3. s_2 - カゼイン X^a - 5 P (f 6 5 ~ 2 0 3) (遺伝的変異体 - A、C)
- C. - カゼイン類
 1. - カゼイン X^a - 5 P (遺伝的変異体 - A^1 、 A^2 、 A^3 、B、C、D、E、F、G、 H^1 、 H^2 及び I)
 2. - カゼイン X^a - 1 P (f 2 9 ~ 2 0 9) (遺伝的変異体 - A^1 、 A^2 、 A^3 、B、C、E、F、G、 H^1 、 H^2 及び I)
 3. - カゼイン X^a - (f 1 0 6 ~ 2 0 9) (遺伝的変異体 - A^2 、 A^3 、B、F、G、 H^2)
 4. - カゼイン X^a - (f 1 0 8 ~ 2 0 9) (遺伝的変異体 - A^2 、B、F、G 及び H^2)
 5. - カゼイン X^a - 4 P (f 1 ~ 2 8) (遺伝的変異体 - A^2 、D 及び H^1)
 6. - カゼイン X^a - 5 P (f 1 ~ 1 0 5) (遺伝的変異体 - A^1 、 A^2 、B、C、D、E、F、G、 H^1 、 H^2 及び I)
 7. - カゼイン X^a - 5 P (f 1 ~ 1 0 7) (遺伝的変異体 - A^1 、 A^2 、 A^3 、B、C、D、E、F、G、 H^1 、 H^2 及び I)
 8. - カゼイン X^a - 1 P (f 2 9 ~ 1 0 5) (遺伝的変異体 - A^1 、 A^2 、B、C、E、F、G、 H^1 、 H^2 及び I)
 9. - カゼイン X^a - 1 P (f 2 9 ~ 1 0 7) (遺伝的変異体 - A^1 、 A^2 、 A^3 、B、C、E、F、G、 H^1 、 H^2 及び I)
- D. - カゼイン類
 1. - カゼイン X^a - 2 P (遺伝的変異体 - A、B、C、E、 F^1 、 F^2 、 G^1 、 G^2 、H、I 及び J)
 2. - カゼイン X^a - 2 P (f 1 0 6 ~ 1 6 9) (遺伝的変異体 - A、B、E、 F^1 、 F^2 、 G^1 、 G^2 及び J)
 3. - カゼイン X^a - 2 P (f 1 1 7 ~ 1 6 9) (遺伝的変異体 - A、B、E、 F^1 、 F^2 、 G^1 、 G^2 及び J)

^a X は遺伝的変異体を示し、遺伝的変異体は以下の括弧内で述べられた変異体のいずれか 1 つであり得る。

【 0 0 5 0 】

上記の名称はカゼインの既知の変異体を示している。例えば - カゼイン B - 1 P (f 2 9 ~ 2 0 9) は、該タンパク質が - ファミリーのカゼインの一部であり、B 遺伝的変異体であり、リン酸化することができるアミノ酸残基を含有し、残基 2 9 ~ 残基 2 0 9 の - カゼインタンパク質の断片であることを示す。どのアミノ酸がこれらのタンパク質においてリン酸化を受けやすいかは既知である。カゼイン変異体の名称及び更なる説明は、Farrell et al. Nomenclature of Proteins of Cow's Milk - Sixth Revision. Journal of Dairy Science (2004)87:1641-1674に記載されている。したがって、配列番号 1 ~ 配列番号 5 のアミノ酸配列に対応するこれらの配列の断片は変異体であり、開示される本発明の一部を形成する。

【 0 0 5 1 】

ペプチドの特定の配列ではなくペプチドの物理的性質によりプロテアーゼ阻害活性がもたらされると考えられるため、活性を実質的に損うことなく、ペプチド配列においていわゆる保存的置換を行うことができる。本発明を限定するものではないが、幾つかの実施形態では、ペプチド又はペプチド模倣物のアミノ酸の最大 2 5 % が保存的に置換される。活性の実質的な喪失をもたらさないこのような保存的置換が本発明に包含されることが意図される。上記で言及された保存的置換の概念は当業者に十分に理解されているが、明確化のために、保存的置換は以下に記載のものである。

【 0 0 5 2 】

G l y、A l a、V a l、I l e、L e u、M e t、

Asp、Glu、Ser、
 Asn、Gln、
 Ser、Thr、
 Lys、Arg、His、
 Phe、Tyr、Trp、及び
 Pro、N - アルカルアミノ酸 (alkalamino acids)。

【0053】

当業者にとって既知のように、アミノ酸の極性群、荷電 (+) 群、荷電 (-) 群又は脂肪族群のうちの1つの成員の同じ群の別の成員による任意の置換は、保存的置換であり得る。

10

【0054】

これらの付加的な実施形態を例示するために (本発明を限定しない)、以下の配列が与えられる：

_{s1} - カゼイン (11 ~ 23)、
 Leu Pro Gln Glu Val Leu Asn Glu Asn Leu
 Leu Arg Phe (配列番号1) (ボス・タウルス (Bos taurus) (ウシ))
 Leu Pro Gln Gly Val Leu Asn Glu Asn Leu
 Leu Arg Phe (配列番号6) (ブバリス・ブバリス (Bubalus bubalis) (アジアスイギュウ (家畜種) (Domestic water buffalo)))
 Leu Ser Pro Glu Val Leu Asn Glu Asn Leu
 Leu Arg Phe (配列番号7) (キャブラ・ヒルカス (Capra hircus) (ヤギ))
 Leu Ser Ser Glu Val Leu Asn Glu Asn Leu
 Leu Arg Phe (配列番号8) (オービス・アリエス (Ovis aries) (ヒツジ))

20

- カゼイン (193 ~ 209)、
 Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg
 Gly Pro Phe Pro Ile Ile Val (配列番号2) (ボス・タウルス (ウシ))
 Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg
 Gly Pro Phe Pro Ile Leu Val (配列番号9) (キャブラ・ヒルカス (ヤギ)、オービス・アリエス (ヒツジ))

30

- カゼイン (193 ~ 205)、
 Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg
 Gly Pro Phe (配列番号4) (ボス・タウルス (ウシ))

- カゼイン (109 ~ 137)、
 Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu
 Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
 Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu (配列番号3) (ボス・タウルス (ウシ))
 Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu
 Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
 Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu (配列番号10) (アカスイギュウ (Syncerus caffer nanus) (フォーレストバッファロー (Forest Buffalo)))

40

Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu
 Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
 Glu Pro Thr Ser Thr Pro Ile Thr Glu (配列番号11) (ボス・インディカス (Bos indicus) (コブウシ (Zebu)))

50

Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu

Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	(O結合型GalNAc)	Pro	Thr			
Thr	Glu	(配列番号12)	(ボス・タウルス(ウシ))							
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	
Glu	Pro	Thr	(O結合型GalNAc)	Ser	Thr	Pro	Thr			
Thr	Glu	(配列番号13)	(ボス・タウルス(ウシ))							
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	(O結合型GalN		10
Ac)	Glu	(配列番号14)	(ボス・タウルス(ウシ))							
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	(O結合型GalNAc)	Ile	Asn	Thr	Ile			
Ala	Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	
Thr	Glu	(配列番号15)	(ボス・タウルス(ウシ))							
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	(P) G	
ly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu	(配
列番号16)	(ボス・タウルス(ウシ))									
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	20
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Val	Ser	Gly	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu	(配列番号	
17)	(ブバルス・ブバリス(アジアスイギュウ(家畜種))									
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Val	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu	(配列番号	
18)	(ブバルス・ブバリス(アジアスイギュウ(家畜種))									
Pro	Pro	Lys	Lys	Asp	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu	(配列番号	30
19)	(オレアムノス・アメリカヌス(Oreamnos americanus)(シロイワヤギ(Mountain goat))									
Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Ala	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu	(配列番号	
20)	(オレアムノス・アメリカヌス(シロイワヤギ))									
Pro	Pro	Lys	Lys	Asp	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	
Val	Pro	Ala	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Ala	
Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Glu	(配列番号	
21)	(キャブラ・ヒルカス(ヤギ)、オービス・アリエス(ヒツジ))									40
-	カゼイン(117~137)、									
Thr	Glu	Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	
Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	
Glu	(配列番号5)	(ボス・タウルス(ウシ))								
Thr	Glu	Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	
Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	Ile	
Glu	(配列番号22)	(アカスイギュウ(フォーレストバッファロー))								
Thr	Glu	Ile	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	
Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Thr	
Glu	(配列番号23)	(ボス・インディカス(コブウシ))								50

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr (O結合型 GalNAc)
 Pro Thr Thr Glu (配列番号24) (ボス・タウルス(ウシ))
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Gly Glu Pro Thr (O結合型 GalNAc) Ser Thr
 Pro Thr Thr Glu (配列番号25) (ボス・タウルス(ウシ))
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr (O結合型 GalNAc) Glu (配列番号26) (ボス・タウルス(ウシ))
 Thr Glu Ile Pro Thr (O結合型 GalNAc) Ile Asn
 Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr
 Pro Thr Thr Glu (配列番号27) (ボス・タウルス(ウシ))
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser (P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr
 Thr Glu (配列番号28) (ボス・タウルス(ウシ))
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Val
 Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr
 Glu (配列番号29) (ブバリス・ブバリス(アジアスイギュウ(家畜種))
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Val Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr
 Glu (配列番号30) (ブバリス・ブバリス(アジアスイギュウ(家畜種))
 Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr
 Glu (配列番号31) (オレアムノス・アメリカヌス(シロイワヤギ))
 Thr Glu Val Pro Ala Ile Asn Thr Ile Ala
 Ser Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr
 Glu (配列番号32) (キャブラ・ヒルカス(ヤギ)、オービス・アリエス(ヒツジ))

(P)は前述のアミノ酸がリン酸化されていることを指す。すなわちSer(P)はリン酸化されたセリンアミノ酸である。

【0055】

(O結合型 GalNAc)は、前述のアミノ酸がアミノ酸側鎖のヒドロキシ酸素と結合したN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を有することを指す。すなわちThr(O結合型 GalNAc)はその側鎖のヒドロキシ酸素と結合したN-アセチルガラクトサミンを有するトレオニンアミノ酸である。他のグリカンはGalNAcと結合し、グリカン鎖長を増大することにより、二糖類、例えばGal(1-3)GalNAc、三糖類、例えばNeuAc(2-3)Gal(1-3)GalNAc又はGal(1-3)[NeuAc(2-6)]GalNAc、及び四糖類、例えばNeuAc(2-3)Gal(1-3)[NeuAc(2-6)]GalNAcを含むようにすることができる。

【0056】

本発明は、DEPTXPTTE(式中、X=TQ又はST)、QEPVX₁GPVRGPX₂PIIX₃I(式中、X₁=L、N又はK、X₂=F、Y又はC、及びX₃=L、H又はV)及びEVLNENLLRFからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物も提供する。

【0057】

これらの実施形態では本発明は、配列番号1～配列番号32(端を含む)のいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列からなるか、又はそれから本質的になるが、全長カゼイン配列を含まない、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を提供する。

【0058】

10

20

30

40

50

配列番号 1 ~ 配列番号 32 のいずれか 1 つにより規定されるアミノ酸配列に対する 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失を、化合物、ペプチド又はペプチド模倣物のプロテアーゼ活性を阻害、低減又は阻止する能力を損わずに行うことができることが当業者に理解されるであろう。或る特定の実施形態では、配列番号 1 ~ 配列番号 32 を含むペプチド又はペプチド模倣物の最大 25 % が欠失され得るが、得られるペプチド又はペプチド模倣物はプロテアーゼ活性を阻害、低減又は阻止する能力を維持していなければならない。配列番号 1 ~ 配列番号 32 のいずれか 1 つと 1 つ又は複数のアミノ酸欠失によって異なるアミノ酸配列を有する化合物、ペプチド又はペプチド模倣物が依然として、プロテアーゼ活性を阻害、低減又は阻止することができるかどうかを判定するために、本明細書に記載のものを含む実験を実施することができる。

10

【0059】

本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物を、歯周病の治療又は予防を必要とする被験体の歯茎に直接投与することができる。幾つかの実施形態では、本発明の組成物を局所的に投与するが、化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物を非経口的に、例えば注射により静脈内に、腹腔内に、筋内に、髄腔内に又は皮下にも投与することができることが当業者に理解されるであろう。

【0060】

代替的には、本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物を、経口投与（舌下投与及び口腔投与を含む）、経肺投与（鼻内投与及び吸入投与）、経皮投与、又は直腸投与用の組成物として構築することができる。

20

【0061】

治療を必要とする被験体は歯周病の亜臨床（subclinical：無症候性）症状又は臨床症状を示す被験体であり得る。歯周病の亜臨床兆候又は臨床兆候は、歯肉の急性又は慢性の炎症を含む。血漿及び白血球の血液から損傷組織への移動の増大を含む急性炎症の特質が存在し得る。発赤（紅化）、発熱（熱増大）、腫瘍（腫脹）、痛み（疼痛）及び機能喪失（機能低下）を含む歯肉の急性感染の臨床徴候も存在し得る。慢性炎症は白血球細胞（単球、マクロファージ、リンパ球、血漿細胞）の浸潤を特徴とし得る。組織及び骨量の減少が観察される場合もある。治療を必要とする被験体は、歯周部位に存在するポルフィロモナス・ジンジバリス細菌レベルが、歯周病ではない個体で観察される正常な範囲を超えて増大していることも特徴とし得る。

30

【0062】

投与経路は、投与するアンタゴニスト又は組成物の性質、及び被験体の病態の重症度を含む多くの因子に応じて異なり得る。本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物の投与頻度、及び本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物の投与量は、特に被験体における歯周病の発症又は進行の段階に応じて被験体ごとに異なり得ることが理解される。投与頻度は臨床医が決定することができる。

【0063】

ジンジバイン又は関連のプロテアーゼ（例えば他のシステインプロテアーゼ）のプロテアーゼ活性の結果として起こる、又はそれに関連する任意の疾患、病態又は症状は、本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物により予防又は治療することができることも考慮する。さらに、歯周病の結果として起こる、若しくはそれに関連する他の疾患、病態若しくは症状も治療することができるか、又はこれらの疾患、病態若しくは症状を発症する危険性を低減することができる。例えば、歯周病は個体が心疾患を発症する危険性を増大させ得る。この心疾患を発症する増大した危険性は、歯周病の個体に本発明の化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物を投与することにより歯周病を治療することによって低減させることができる。

40

【0064】

「ペプチド模倣物」は、本発明のペプチドと実質的に同じ構造及び／又は機能的特性を有する合成化合物である（機能的特性を本明細書で更に記載する）。通常、ペプチド模倣物は本発明のペプチドと同じ又は類似の構造、例えばカゼイン又はその断片と同じ又は類

50

似の配列を有する。ペプチド模倣物は一般的に、自然には合成されない残基を少なくとも1つ含有する。ペプチド模倣化合物の非天然構成要素は、a)天然型のアミド結合(「ペプチド結合」)による連結以外の残基連結基、b)自然発生的なアミノ酸残基の代わりとなる非天然型の残基、又はc)二次構造の模倣を誘導する、すなわち二次構造、例えばターン構造(turn)、ターン構造、シート構造、ヘリックス構造等を誘導又は安定させる残基のうちの1つ又は複数によるものであり得る。

【0065】

ペプチド模倣物は、科学文献及び特許文献、例えばOrganic Syntheses Collective Volumes, Gilman et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Bio technol. 9:205-223, Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:114-119, Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27, Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267:220-234に記載の多様な手順及び方法論を用いて合成することができる。

10

【0066】

本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を医薬組成物の形態で投与することができる。これらの組成物を、GMP条件下で、又は幾つかの実施形態では従来の混合、溶解、造粒、糖衣形成、研和(levigating)、乳化、カプセル封入、封入若しくは凍結乾燥のプロセスにより製造することができる。

【0067】

医薬組成物を、1つ又は複数の生理学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤又は補助剤を用いて構築することができる。これらの成分により、ペプチド又はペプチド模倣物を薬学的に使用することができる調製物へと加工処理するのが容易となり得る。

20

【0068】

治療のための投与は非経口投与、静脈内投与、経口投与、皮下投与、動脈内投与、頭蓋内投与、髄腔内投与、腹腔内投与、局所投与、鼻内投与又は筋内投与であり得る。

【0069】

非経口投与用の医薬組成物は一般的に滅菌されており、実質的に等張である。ハンクス液、リンガー液、又は生理食塩バッファー若しくは酢酸バッファー等の生理学的に相溶性のバッファーを使用することができる。該溶液には、懸濁剤、安定化剤及び/又は分散剤が含有されていてもよい。ペプチド又はペプチド模倣物を粉末形態で準備し、使用前に発熱性物質除去滅菌水等の溶媒に溶解させてもよい。

30

【0070】

ペプチド又はポリペプチド配列、すなわち本明細書で規定の本発明のペプチドに対する「アミノ酸配列の同一性のパーセント(%)」又は「パーセント(%)同一な」は、必要に応じて最大の配列同一性パーセントを達成するために配列をアラインメントし、ギャップを導入した後に、特定のペプチド又はポリペプチド配列、すなわち本発明のペプチドにおけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合と定義される(配列同一性の一部としてはいずれの保存的置換も考慮しない)。

【0071】

当業者は、比較対象の配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するのに必要となる任意のアルゴリズム(非限定的な例が以下に記載される)を含む、アラインメントを測定するのに適切なパラメータを求めることができる。アミノ酸配列をアラインメントする場合、所定のアミノ酸配列Bに対する(to, with, or against)所定のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性パーセント(代替的には所定のアミノ酸配列Bに対して或る特定のアミノ酸配列同一性パーセントを有するか又は含む所定のアミノ酸配列Aと表すことができる)は、アミノ酸配列同一性パーセント = $X / Y \times 100$ (式中、XはA及びBの配列アラインメントプログラム又はアルゴリズムのアラインメントにより完全な一致としてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、YはBにおけるアミノ酸残基の総数である)として算出することができる。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性パーセントは、Aに対するBのアミノ酸配列同一性パーセントとは等しくない。

40

50

【 0 0 7 2 】

同一性パーセントを算出する際には、通常正確な一致数を数える。数学アルゴリズムを用いて2つの配列間の同一性パーセントの測定を達成することができる。2つの配列の比較に利用される数学アルゴリズムの非限定的な例は、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264のアルゴリズム (Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877に記載のように修正) である。このようなアルゴリズムをAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403のBLASTNプログラム及びBLASTXプログラムに組み込む。比較目的でギャップのあるアラインメントを得るために、Gapped BLAST (BLAST 2.0) をAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389に記載のように利用することができる。代替的に、PSI-Blastを、分子間の距離関係を検出する反復サーチ (iterated search) を行うのに使用することができる。上記のAltschul et al. (1997)を参照されたい。BLAST、Gapped BLAST、及びPSI-Blastプログラムを利用する場合、各プログラムのデフォルトパラメータ (例えばBLASTX及びBLASTN) を使用することができる。アラインメントを手検測 (manually by inspection) により行うこともできる。配列の比較に利用される数学アルゴリズムの別の非限定的な例はClustalWアルゴリズム (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680) である。ClustalWは配列を比較し、アミノ酸配列又はDNA配列全体をアライメントすることにより、アミノ酸配列全体の配列保存に関するデータを提供することができる。ClustalWアルゴリズムを幾つかの市販のDNA / アミノ酸分析ソフトウェアパッケージ、例えばVector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) のALIGNXモジュールに使用する。ClustalWによるアミノ酸配列のアラインメントの後、アミノ酸同一性パーセントを評価することができる。ClustalWアラインメントの分析に有用なソフトウェアプログラムの非限定的な例はGENEDOC (商標) 又はJalView (<http://www.jalview.org/>) である。GENEDOC (商標) により、多数のタンパク質間のアミノ酸 (又はDNA) の類似性及び同一性の評価が可能になる。配列の比較に利用される数学アルゴリズムの別の非限定的な例は、Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムを、GCG Wisconsin Geneticsソフトウェアパッケージ、バージョン10 (Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USAから入手可能) の一部であるALIGNプログラム (バージョン2.0) に組み込む。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重量残基表、12のギャップ長ペナルティ、及び4のギャップペナルティを使用することができる。

【 0 0 7 3 】

本発明はヒトでの適用が見出されているが、本発明は獣医学的目的にも有用である。本発明は、本明細書に記載のように、ウシ、ヒツジ、ウマ及びトリ等の家畜動物、ネコ及びイヌ等のペット、並びに動物園の動物における疾患又は病態の治療又は予防に有用である。

【 0 0 7 4 】

上述の医薬組成物を含有する本発明の経口組成物を、歯磨きペースト、歯磨き粉及び歯磨き液を含む歯磨き剤、洗口液、トローチ、チューイングガム、歯科用ペースト、歯肉マッサージクリーム、うがい錠剤、乳製品、並びに他の食品等の口に適用可能な様々な形態で調製及び使用することができる。本発明による経口組成物は特定の経口組成物の種類及び形態に応じて更なる既知の成分を更に含んでもよい。

【 0 0 7 5 】

任意で組成物は、グラム陰性の嫌気性細菌にとって毒性であるか、又はグラム陰性の嫌気性細菌の増殖を阻害する1つ又は複数の抗生物質を更に含んでもよい。潜在的に任意の静菌性又は殺菌性の抗生物質を本発明の組成物に使用することができる。好適な抗生物質としては、アモキシシリン、ドキシサイクリン又はメトロニダゾールが挙げられる。

【 0 0 7 6 】

本発明の或る特定の形態において、経口組成物は性質が実質的に液体のもの、例えば洗口液又はリンス剤であり得る。このような調製物において、ビヒクルは通常、望ましくは以下に記載のような保湿剤を含む水 - アルコール混合物である。一般的に、アルコールに対する水の重量比は約 1 : 1 ~ 約 20 : 1 の範囲である。この種の調製物における水 - アルコール混合物の総量は通常、調製物の約 70 重量% ~ 約 99.9 重量% の範囲である。アルコールは通常、エタノール又はイソプロパノールである。或る特定の実施形態では、アルコールはエタノールである。

【0077】

本発明のこのような液体及び他の調製物の pH は概して、約 5 ~ 約 9、通常約 5.0 ~ 7.0 の範囲である。pH を酸（例えばクエン酸又は安息香酸）若しくは塩基（例えば水酸化ナトリウム）で制御することができるか、又は（例えばクエン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、炭酸ナトリウム又は重炭酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等を用いて）緩衝させることができる。

10

【0078】

本発明の他の望ましい形態において、組成物は、性質が実質的に固体又はペースト状のもの、例えば歯磨き粉、歯垢検出剤（dental tablet）又は歯磨きペースト（歯科用クリーム）又はゲル歯磨き剤であり得る。このような固体又はペースト状の経口調製物のビヒクルは一般的に、歯科的に許容される研磨材料を含有する。

【0079】

歯磨きペーストにおいて、液体ビヒクルは、通常調製物の約 10 重量% ~ 約 80 重量% の範囲の量で水及び保湿剤を含み得る。好適な保湿剤 / 担体としてグリセリン、プロピレングリコール、ソルビトール及びポリプロピレングリコールが例示される。水、グリセリン及びソルビトールの液体混合物も有益である。屈折率が考慮すべき重要なものである透明なゲルにおいて、約 2.5% (w/w) ~ 30% (w/w) の水、0% (w/w) ~ 約 70% (w/w) のグリセリン、及び約 20% (w/w) ~ 80% (w/w) のソルビトールが通常用いられる。

20

【0080】

歯磨きペースト、クリーム及びゲルは通常、約 0.1% (w/w) ~ 約 10% (w/w)、例えば約 0.5% (w/w) ~ 約 5% (w/w) の割合で天然型又は合成型の増粘剤又はゲル化剤を含有する。好適な増粘剤は、合成ヘクトライト、例えば Laporte Industries Limited から市販されている Laponite（例えば CP、SP2002、D）として利用可能な合成コロイドマグネシウムアルカリ金属シリケート複合体粘土である。Laponite D はおよそ 58.00 重量% の SiO_2 、25.40 重量% の MgO 、3.05 重量% の Na_2O 、0.98 重量% の Li_2O 、並びに幾らかの水及び微量金属である。その真の比重は 2.53 であり、湿度 8% で 1.0 g/ml の見掛けのかさ密度を有する。

30

【0081】

他の好適な増粘剤には、アイリッシュモス、イオタカラギーナン、トラガカントゴム、デンプン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルプロピルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース（例えば Natrosol として利用可能）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び微砕 Syloid（例えば 244）等のコロイドシリカが含まれる。可溶化剤には、例えば、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール及びヘキシレングリコール等の湿潤ポリオール、メチルセロソルブ及びエチルセロソルブ等のセロソルブ、オリーブ油、ヒマシ油及びワセリン等の直鎖に少なくとも約 12 個の炭素を含有する植物油及びワックス、並びに酢酸アミル、酢酸エチル及び安息香酸ベンジル等のエステルも含まれ得る。

40

【0082】

従来通り経口調製物は通常、好適なラベル付きパッケージで販売又はそうでなくとも流通していると理解される。このため、マウスリンスのボトルはそれを実質的にマウスリン

50

ス又は洗口液として記載し、その使用に関して説明しているラベルを有しており、歯磨きペースト、クリーム又はゲルは通常、それを実質的に歯磨きペースト、ゲル又は歯科用クリームとして記載しているラベルを有する、押し出しチューブ（典型的にはアルミニウム、裏打ちされた鉛、若しくはプラスチック製の）、又は内容物を測り出すための他の搾り出し式ディスペンサー、ポンプ式ディスペンサー若しくは加圧式ディスペンサーに入っている。

【0083】

治療作用又は予防作用の増大を達成するために、口腔全体への活性剤の徹底的かつ完全な分散を達成するのを助けるために、及び本組成物をより化粧品として許容可能にするために有機界面活性剤を本発明の組成物に使用してもよい。有機界面活性材料はその性質がアニオン性、非イオン性又は両性であってもよく、幾つかの実施形態では活性剤と相互作用しない。組成物に洗浄性及び発泡性を与える洗浄材料を界面活性剤として利用するのが通常である。アニオン性界面活性剤の好適な例は、高級脂肪酸モノ硫酸モノグリセリドの水溶性塩、例えば硬化ヤシ油脂肪酸のモノ硫酸モノグリセリドのナトリウム塩、高級アルキル硫酸塩、例えばラウリル硫酸ナトリウム、アルキルアリールスルホン酸塩、例えばドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、高級アルキルスルホ酢酸塩、スルホン酸1,2-ジヒドロキシプロパンの高級脂肪酸エステル、及び低級脂肪族アミノカルボン酸化合物の実質的に飽和した高級脂肪族アシルアミド、例えば脂肪酸、アルキルラジカル又はアシルラジカルに12個～16個の炭素を有するもの等である。最後に言及されたアミドの例は、N-ラウロイルサルコシン、並びにセッケン又は同様の高級脂肪酸材料を実質的に含まないとされるN-ラウロイルサルコシン、N-ミリストイルサルコシン又はN-パルミトイルサルコシンのナトリウム塩、カリウム塩及びエタノールアミン塩である。本発明の経口組成物におけるこれらのサルコナイト(sarconite)化合物の使用は、これらの材料が酸溶液中での歯のエナメル質の溶解性を或る程度低減させることに加えて、炭水化物分解による口腔での酸形成の阻害における長期にわたる顕著な効果を示すために特に有益である。使用に好適な水溶性の非イオン性界面活性剤の例は、エチレンオキシドと疎水性の長鎖（例えば約12個～20個の炭素原子の脂肪族鎖）を有し、エチレンオキシドと反応性を有する様々な反応性水素含有化合物との縮合生成物（該縮合生成物（「エトキサマー(ethoxamers)」）は親水性ポリオキシエチレン部分を含有する）、例えばポリ（エチレンオキシド）と脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、多価アルコール（例えばモノステアリン酸ソルビタン）及びポリプロピレンオキシド（例えばブルロニック材料）との縮合生成物である。

【0084】

界面活性剤は通常、約0.1重量%～5重量%の量で存在する。界面活性剤が本発明の活性剤の溶解を助け、それにより必要となる可溶化保湿剤の量を減らすことができることは注目に値する。

【0085】

増白剤、保存料、シリコーン、クロロフィル化合物及び/又は尿素、リン酸二アンモニウム等のアンモニア化材料、並びにそれらの混合物等の様々な他の材料を本発明の経口調製物に組み込んでもよい。これらのアジュバントは存在する場合、所望の特性及び特質に実質的に悪影響を及ぼすことのない量で調製物に組み込まれる。

【0086】

任意の好適な芳香材料又は甘味材料を利用してもよい。好適な芳香成分の例は芳香油、例えばスペアミント、ペパーミント、ウィンターグリーン、サッサfras、チョウジ、セージ、ユーカリ、マジョラム、シナモン、レモン及びオレンジの油、並びにサリチル酸メチルである。好適な甘味剤には、スクロース、ラクトース、マルトース、ソルビトール、キシリトール、シクラミン酸ナトリウム、ペリラルチン、AMP（アスパルチルフェニルアラニンメチルエステル）、サッカリン等が含まれる。好適には芳香剤及び甘味剤はそれぞれ又はともに、調製物の約0.1%～5%以上（more）含まれ得る。

【0087】

10

20

30

40

50

本発明の組成物の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物を、例えば加温したガム基剤中に攪拌すること又はガム基剤の外面をコーティングすることによりロゼンジに、又はチューニングガム若しくは他の製品に組み込むこともできる。ガム基剤の例は、望ましくは従来の可塑剤若しくは柔軟剤、糖類、又は例えばグルコース、ソルビトール等の他の甘味料を含むジェルトン、ゴム乳液、ビニライト樹脂等である。

【0088】

更なる態様では、本発明は、(a)化合物、ペプチド、ペプチド模倣物又は組成物と、(b)薬学的に許容される担体とを備える部品のキットを提供する。望ましくは該キットは、このような治療を必要とする患者における歯周病の治療又は予防に使用される取扱説明書を更に含む。

10

【0089】

経口使用を目的とする組成物を医薬組成物の製造に関して当該技術分野で既知の任意の方法に従って調製することができ、このような組成物は薬学的に有効な(elegant)口当たりのよい調製物を提供するために、甘味剤、芳香剤、着色剤及び保存剤からなる群から選択される作用物質を1つ又は複数含有してもよい。

【0090】

錠剤は錠剤の製造に好適な非毒性の薬学的に許容される賦形剤と混合された活性成分を含有する。これらの賦形剤は例えば不活性希釈剤、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム又はリン酸ナトリウム；造粒剤及び崩壊剤、例えばコーンスターチ又はアルギン酸；結合剤、例えばデンプン、ゼラチン又はアカシア、並びに平滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルクであり得る。錠剤はコーティングされていなくてもよく、又は錠剤を胃腸管での崩壊及び吸収を遅らせ、それによりより長期にわたり作用が持続するように既知の技法でコーティングしてもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリル等の時間遅延材料を利用してもよい。

20

【0091】

経口使用のための製剤を、硬ゼラチンカプセルとして(その中で活性成分は不活性固体希釈剤、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウム又はカオリンと混合される)、又は軟ゼラチンカプセルとして(その中で活性成分は水又は油媒体、例えば落花生油、液体パラフィン若しくはオリーブ油と混合される)提示してもよい。

30

【0092】

水性懸濁液は水性懸濁液の製造に好適な賦形剤と混合された活性材料を含有する。このような賦形剤は懸濁化剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム及びアカシアゴムである。分散剤又は湿潤剤は、天然のホスファチド、例えばレシチン、又はアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えばステアリン酸ポリオキシエチレン、又はエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール、又はエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物、例えばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール、又はエチレンオキシドと脂肪酸及び無水ヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物、例えばモノオレイン酸ポリエチレンソルビタンであり得る。

40

【0093】

水性懸濁液は1つ又は複数の保存料、例えばベンゾエート、例えばエチルp-ヒドロキシベンゾエート又はn-プロピルp-ヒドロキシベンゾエート、1つ又は複数の着色剤、1つ又は複数の芳香剤、及び1つ又は複数の甘味剤、例えばスクロース又はサッカリンを含有してもよい。

【0094】

油性懸濁液を、植物油、例えば落花生油、オリーブ油、ゴマ油若しくはヤシ油、又は液体パラフィン等の鉱油中に活性成分を懸濁することにより構築してもよい。油性懸濁液は増粘剤、例えば蜜蝋、固形パラフィン又はセチルアルコールを含有してもよい。上記

50

で記載されるような甘味剤、及び芳香剤を口当たりのよい経口調製物を提供するために添加してもよい。これらの組成物をアスコルビン酸等の抗酸化剤の添加により保存してもよい。

【0095】

本発明をより詳細に説明するために、以下の実施例を記載し、本発明の幾つかの態様及び実施形態を説明する。

【実施例】

【0096】

材料及び方法

【0097】

ペプチドの酵素消化及び精製

カゼイネート - HCl (Bonlac Foods, Melbourne Australia) を、最終濃度が 21.5 g/L になるまで常時攪拌しながら、50、pH 8.0 の脱イオン水にゆっくりと添加することにより溶解させた。カゼイネートが溶解したら、温度を 37 まで下げ、1 M の HCl をゆっくりと添加することにより pH を 6.3 まで調整して、カゼインの沈殿を回避した。加水分解を開始するために、レンネット (90% キモシン (EC 3.4.23.4)、145 IMCU/ml、単一濃度 (Single Strength)、Chr. Hanson) を、カゼイン 1 g 当たり 1.2 IMCU の最終濃度となるまで添加し、溶液を 37 で 1 時間攪拌した。1 M の HCl 及び 1 M の NaOH を添加することにより、溶液の pH を 6.3 ± 0.2 に維持した。最終濃度が 4% になるまでトリクロロ酢酸を添加することにより、加水分解を停止させ、沈殿したタンパク質を遠心分離 (5000 × g、15 分、4) によりペレット状にした。カゼイノマクロペプチド (CMP) を含有する上清を、3000 Da のカットオフ膜 (S10Y3、Amicon) を用いた透析濾過により濃縮した。それからこの材料を凍結乾燥した。調製物を AKTA Explorer システム (Amersham Pharmacia Biotech, USA) に接続した Superose 12 カラム (Amersham Biosciences, USA) を用いて分画し、流速 0.5 ml/分 で 50 mM の Tris - HCl (pH 8.0) を用いて溶出した。溶出液を 214 nm 及び 280 nm の波長でモニタリングした。2 分毎に画分を回収した。全ての試料を Christ Freeze Dryer (Osterode am Harz, Germany) で凍結乾燥し、-70 で保存した。C₁₈ カラムを用いた逆相 HPLC により画分を更に分画し、90% アセトニトリル/0.1% (v/v) TFA を用いて溶出した。溶出液を、Agilent 1100 S ダイオードアレイ及び多波長検出器 (Agilent Tech., Palo Alto, California) を用いて 214 nm の一次波長でモニタリングした。回収した全ての画分を凍結乾燥し、-70 で保存した。それぞれの画分の同一性を質量分光分析により確認した。

【0098】

グリコシル化されていない - カゼイン (106 ~ 169) を、前に記載のように (Malkoski et al., 2001) キモシン消化により得た。 - カゼイン (106 ~ 137) を、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) V8 株 (Roche, Penzberg Germany) 由来のエンドプロテアーゼ - Glu - C (E : S ; 1 : 200) を用いた、37、24 時間での 50 mM の酢酸アンモニウム (pH 4.0) バッファーに溶解したグリコシル化されていない - カゼイン (106 ~ 169) の加水分解により得た。2 M の NaOH を添加することにより pH を 6.0 まで増大させることにより、加水分解を終わらせ、分析 (C₁₈) RP - HPLC を用いてペプチドを分離した。回収した画分を分析し、MS/MS 分析を用いてペプチドを同定した。

【0099】

MALDI TOF/TOF MS

ペプチド試料を、標準的なバッファー (50% アセトニトリル、0.1% TFA) 中で飽和 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) マトリクスを用いた MTP 384 ターゲットグラウンド鋼板上で同時に結晶化させた (1 : 1 (vol/vol))。試料を Ultraflex MALDI TOF/TOF 質量分析計 (Bruker, Bremen, Germany

）で分析した。ローカル M A S C O T サーバーでインストールしたカゼインデータベースに適合させた分画スペクトルを用いた Bruker Daltonics の f l e x A n a l y s i s 2 . 4 及び Bruker Daltonics の B i o T o o l s 3 . 0 ソフトウェアを用いて、分析を行った。

【 0 1 0 0 】

固相ペプチド合成

s_1 - カゼイン (1 1 ~ 2 3) ペプチド、 - カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 5) ペプチド、
- カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) ペプチド、 - カゼイン (1 0 6 ~ 1 3 7) ペプチド
、 - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) ペプチド、 - カゼイン (1 1 7 ~ 1 3 7) ペプチド
、 - カゼイン (1 1 7 ~ 1 2 3) ペプチド及び - カゼイン (1 2 7 ~ 1 3 7) ペプチ
ドを、L i b e r t y (商 標) M i c r o w a v e ペプチドシンセサイザー (C E M C o r p o r a t i o n , N o r t h C a r o l i n a) で標準的な F m o c - ケミストリプロトコルを用いて調製した。
。ペプチド合成は各 C 末端アミノ酸に結合した W a n g 樹脂上のアミド末端から進行した。
。C₁₈ カラムを用いた逆相 H P L C によりペプチドを精製した。

10

【 0 1 0 1 】

エレクトロスプレー MS

R P - H P L C により回収された画分を、エレクトロスプレー質量分析モードで操作する E s q u i r e - L C M S / M S システム (Bruker Daltonics) を用いて分析した。
試料の注入を 3 4 0 μ L / 時間で行い、窒素流は 5 L / 分、乾燥ガス温度は 3 0 0 であ
った。

20

【 0 1 0 2 】

細菌株及び増殖条件

グリセロール又はポルフィロモナス・ジンジバリス W 5 0 及び A T C C 3 3 2 7 7 細胞の凍結乾燥培養物を、ウマ血液アガー (H B A , O x o i d) 上で 3 7 で嫌氣的に増殖させた。
ポルフィロモナス・ジンジバリスの細胞を継代培養により維持し、第 3 代 ~ 第 7 代の細胞だけを用いて、ヘミン (5 m g / L) 及びシステイン (0 . 5 g / L) 、並びに
A T C C 3 3 2 7 7 ではビタミン K₃ (メナジオン) (5 m g / L) を添加したブレインハートインフュージョン培地 (B H I) (3 7 g / L) 2 0 m L 及び 2 0 0 m L に接種した。
6 5 0 n m の波長での培養物の光学密度 (O D) の測定により増殖を求めた。培養物のグラム染色を任意のコンタミネーションを確認するために行った。ポルフィロモナス
・ジンジバリスの細胞を遠心分離 (8 0 0 0 \times g , 2 0 分 , 4) により指数増殖期で回収し、0 . 5 g / L のシステインを含有する T C 1 5 0 バッファー (5 0 m M の T r i s - H C l , 1 5 0 m M の N a C l , 5 m M の C a C l₂ (p H 8 . 0)) で 1 回洗浄した。
。洗浄した細胞を 2 m L の T C 1 5 0 バッファー (0 . 5 g / L のシステインを有する) で再懸濁し、4 で維持し、すぐにタンパク質分解アッセイに使用した。

30

ポルフィロモナス・ジンジバリスの R g p A - K g p プロテイナーゼ付着因子複合体及び R g p B の精製

【 0 1 0 3 】

ポルフィロモナス・ジンジバリス W 5 0 細胞を後期指数増殖期まで 2 L のバッチ培養物中で増殖させ、前に記載された手順 (Pathirana et al. , 2006) に基づき、A r g - セファ
ロースアフィニティークロマトグラフィを用いて、T r i t o n X 1 1 4 抽出物から R g p A - K g p プロテイナーゼ付着因子複合体を精製した。前に公開された手順 (Chen et al. , 2002 , Pike et al. , 1994) を用いて、ポルフィロモナス・ジンジバリス H G 6 6 株から R g p B を精製した。

40

【 0 1 0 4 】

発色基質を用いたポルフィロモナス・ジンジバリスの A r g 特異的なタンパク質分解活性及び L y s 特異的なタンパク質分解活性の測定

インキュベーション容量を減らして 9 6 ウェルプレートを用いて行うように修正し、適合させたポルフィロモナス・ジンジバリスの全細胞の A r g 特異的なタンパク質分解活性及び L y s 特異的なタンパク質分解活性のために開発したアッセイを用いて細菌のプロテ

50

アーゼ阻害活性を求めた (O'Brien-Simpson et al., 1998、O'Brien-Simpson et al., 2001)。合成発色基質; N - - ベンゾイル - A r g - p - ニトロアニリド (L - B A p N A) 及び N - (p - トシル) - G l y - P r o - L y s - 4 - ニトロアニリド酢酸塩 (G P K - N A) (Sigma Aldrich) を用いて A r g 特異的なタンパク質分解活性及び L y s 特異的なタンパク質分解活性を求めた。A r g 特異的な反応バッファー及び L y s 特異的な反応バッファーは、30% (v / v) イソプロパノール、0.93 mM の L - システイン、400 mM の T r i s - H C l (p H 8.0) 及び 100 mM の N a C l に溶解した 2 mM の L - B A p N A 又は G P K - N A をそれぞれ含有していた。要求される濃度に応じて、カゼインペプチドを T C 150 バッファーで希釈した。10 mM の L - システイン (p H 8.0) 10 μ L 及びボルフィロモナス・ジンジバリス全細胞懸濁液、精製 R g p A - K g p プロテイナーゼ付着因子複合体 (0.01 μ g / μ L) 又は精製 R g p B (0.00116 μ g / μ L) のいずれかを最終容量が 100 μ L となるまで添加した。それから試料を 37 で 15 分間インキュベートした後、A r g 特異的な反応バッファー又は L y s 特異的な反応バッファーを添加した (総容量 200 μ L)。PerkinElmer の 1420 M u l t i l a b e l C o u n t e r V I C T O R 3 (商標) (W a l t h a m , M A) を用いて、37 で 10 秒間隔で約 20 分間、p H 8.0 で、405 nm で吸光度を測定することにより、活性を求めた。8 mM の Z n C l ₂ のストック溶液を脱イオン水で調製し、特定のアッセイで要求される濃度で凍結乾燥したカゼインペプチドを溶解させるのに使用した。対照試料は、あらゆるプロテアーゼ阻害物質、すなわちペプチド及び / 又は亜鉛を欠いていた以外は (however) 試験試料と同一であった。

10

20

【0105】

インキュベーション後、分析 (C ₁₈) カラム及びバッファー B が 0% ~ 100% という線形勾配を用いた R P - H P L C により、アッセイ内容物を分析し、アッセイ中、カゼインペプチド分解が起こったか判定した。溶出した画分を E S I - M S 分析及び M S / M S 分析により分析した。

【0106】

蛍光標識したウシ血清アルブミンを用いたボルフィロモナス・ジンジバリスのタンパク質分解活性の測定

前に公開された手順 (Grenier et al., 2002、Yoshioka et al., 2003) を修正して D Q (商標) G r e e n B S A (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いて、細菌のプロテアーゼ阻害活性も求めた。指数増殖 (O . D _{650nm} = 0.6) 中に回収したボルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 33277 の全細胞を、1つのウェル当たり 5.6 $\times 10^9$ c f u / m L でアッセイに使用した。アッセイ混合物は、ボルフィロモナス・ジンジバリスの細胞 (100 μ L 培養物)、T C 150 及び阻害剤 (最終容量 80 μ l)、並びに D Q B S A (20 μ L、200 μ g / m L) を含有していた。1 mM の N - - p - トシル - l - リシンクロロメチルケトン (T L C K) で処理した細胞を対照として使用した。T L C K は R g p 活性及び K g p 活性の両方を阻害することが知られている (Fletcher et al., 1994、Pike et al., 1994)。アッセイ混合物を 37 で 2 時間暗所でインキュベートし、その後蛍光光度計 (PerkinElmer の 1420 M u l t i l a b e l C o u n t e r V I C T O R 3 (商標)) を用いて、蛍光を測定した (E m 535 nm、E x 485 nm)。陰性対照 (T L C K 処理細胞) から得られた蛍光値を全ての値から減算した。特に明記しない限り、三連で 2 ~ 3 回の生物学的反復測定により全てのアッセイを実施した。

30

40

【0107】

部分阻害濃度指数

部分阻害濃度指数 (F I C 指数) は、2つ以上の阻害剤又は抗菌剤の相互作用 (相乗的、相加的、又は拮抗的) を規定する尺度である (Berenbaum, 1978)。F I C 指数を F I C 指数 = [(A + B) / A] + [(A + B) / B] (式中、A は - カゼイン (109 ~ 137) の効果を表し、B は塩化亜鉛の効果を表し、A + B は両方の組合せの効果を表す) として算出する。1を超える F I C 指数は拮抗効果を示し、1に等しい F I C 指数は相

50

加効果を示し、1未満のFIC指数は相乗効果を示す。

【0108】

阻害の種類及び阻害定数 (K_i) の測定

0.15 mM、0.25 mM及び1 mMの基質 (BAPNA) 濃度でのOD₄₀₅/秒として初期反応速度を得た。阻害剤 (ペプチド) 濃度は0 μ M、25 μ M、50 μ M、75 μ M及び100 μ Mの範囲であった。データをラインウェーバー・バーク (二重逆数) プロットとしてグラフにし、傾きを一次線形回帰により求めた。ラインウェーバー・バークプロットを用いて、 K_m (酵素親和性) 及び V_{max} (最大反応速度) 値、並びに酵素阻害の種類を求めて、競合阻害剤と、非競合阻害剤と、不競合阻害剤とを区別することができる (Stryer et al., 2002)。阻害剤濃度に対してラインウェーバー・バークプロットの傾きをプロットすることにより、阻害定数 (K_i) を求めた。

10

【0109】

分子モデリング

FUGUEプログラム (Shi et al., 2001) を用いて、1034個のタンパク質ファミリーと10230個のアラインメント構造とを含有するキュレーション (curated) タンパク質データベース、HOMSTRAD (Mizuguchi et al., 1998) に対して阻害剤ペプチドで起こり得る構造モチーフを特定した。FUGUEは、構造プロファイルのデータベースをスキャンし、配列構造適合性スコアを算出し、潜在的なホモログ及びアラインメントのリストを作成する。特異性、感受性及びランク付けをZスコアに従って算出する。Zスコア閾値6は99%の特異性を示し、Zスコア閾値5は95%の特異性を示す。阻害剤ペプチドモデルを、SYBYL/Triplosを用いて構築した。社内 (in-house) ソフトウェアを用いて、阻害剤ペプチドにおける潜在的な金属結合部位を、骨格に対する金属原子位置及びモデルペプチドのC原子位置の軌跡により特定した。

20

【0110】

結果

【0111】

発色基質を用いたポルフィロモナス・ジンジバリスのArg特異的なタンパク質分解活性及びLys特異的なタンパク質分解活性の測定

200 μ Mのペプチド濃度で、 α -カゼイン (109~137) は、全細胞のArg特異的なタンパク質分解活性及びLys特異的なタンパク質分解活性を約90%阻害する最も有効な結果を示したが、 β -カゼイン (11~23) はそれぞれ、全細胞のArg特異的なタンパク質分解活性及びLys特異的なタンパク質分解活性の約70%及び約60%の阻害を示した (図1、図2及び表1、表2; 陰影セル (shading key) に関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい)。 γ -カゼイン (193~209) は、全細胞のArg特異的なタンパク質分解活性及びLys特異的なタンパク質分解活性の両方を50%阻害したが、より短い δ -カゼインペプチド (193~205) はArg特異的なタンパク質分解活性を15%しか阻害しなかった (図1、図2及び表1、表2; 陰影セルに関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい)。ペプチドを様々な濃度で分析し、タンパク質分解活性の阻害率 (%) により、ペプチド濃度に対する用量応答性が実証された (図1、図2; 陰影セルに関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい)。続いて、精製された外膜プロテアーゼ複合体 (RgpA及びKgpを含む) をタンパク質分解アッセイに使用して、観察されるタンパク質分解の阻害が全細胞に存在し得る他のプロテアーゼによるものではないことが確認された。したがって、ペプチドはArg特異的なタンパク質分解活性及びLys特異的なタンパク質分解活性を阻害し、更には僅か100 μ Mのペプチドで阻害能の増大を示した (図3、表1、表2; 陰影セルに関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい)。

30

40

【0112】

Arg特異的なタンパク質分解活性及びLys特異的なタンパク質分解活性の最も有意な阻害を示す α -カゼイン (109~137) を更に評価した。ペプチドを精製RgpB

50

に対して評価し、ペプチドの結合位置を求めた。R g p Bのタンパク質分解活性の阻害は、ペプチドがプロテアーゼ複合体ではなく、プロテアーゼ自体と結合することを示した（図4、表1）。

【0113】

【表1】

表1：様々な濃度の合成ペプチドの存在下におけるアルギニン-ジンジパインのプロテアーゼ活性（%）

A r gアッセイ		W 5 0	A T C C 3 3 2 7 7	W 5 0 複合体
	濃度（ μ M）	全細胞プロテアーゼ		
κ -カゼイン（109～137）	200	7 %	8 %	
	100	25 %	36 %	8 %
	50		84 %	21 %
	20			43 %
α_{s1} -カゼイン（11～23）	300		38 %	
	200	22 %	39 %	
	100		62 %	47 %
β -カゼイン（193～209）	300		50 %	
	200	46 %	50 %	
	100		69 %	21 %

10

20

【0114】

【表2】

表2：様々な濃度の合成ペプチドの存在下におけるリシン-ジンジパインのプロテアーゼ活性（%）

L y sアッセイ		W 5 0	A T C C 3 3 2 7 7	W 5 0 複合体
	濃度（ μ M）	全細胞プロテアーゼ		
κ -カゼイン（109～137）	200	2 %	3 %	
	100	8 %	19 %	6 %
	50	35 %	41 %	39 %
	20			62 %
α_{s1} -カゼイン（11～23）	300		34 %	
	200		43 %	52 %
	100		64 %	
β -カゼイン（193～209）	300		49 %	
	200		59 %	
	100		71 %	12 %

30

【0115】

阻害に必須の残基を明らかにするため、L y sリッチN末端領域を有しない一連のペプチドを合成した； κ -カゼイン（117～123）、 α -カゼイン（127～137）及び β -カゼイン（117～137）。蛍光B S Aによる全細胞アッセイにおいて、及び発色基質による精製R g p A - K g p複合体を用いたタンパク質分解アッセイにおいて、ポルフィロモナス・ジンジパリスのプロテイナーゼの阻害に関して、これらの合成ペプチドをスクリーニングした（表3、表4、図5）。 κ -カゼイン（117～137）だけがより長い α -カゼイン（109～137）と同程度の阻害能を有する阻害活性を示した。このことにより、プロテイナーゼ阻害に関してN末端領域のL y s残基は重要ではないことが実証された。精製 β -カゼイン（106 - 169）は、蛍光B S Aによる全細胞アッセイで試験した場合、より短い α -カゼイン（109～137）と同程度の有効性を示した（図5）。

40

【0116】

50

また蛍光基質であるDQ（商標）Green BSAを、ボルフィロモナス・ジンジバリスの全細胞のプロテイナーゼ活性に対するカゼインペプチドの阻害活性を測定するのに使用した。ペプチドを添加する前に、アッセイを、1つのウェルあたりの細胞数及びインキュベーション時間に関して最適化した。アッセイに関して、1つのウェル当たり 10^9 個の細胞との2時間のインキュベーション期間を選択したが、これはタンパク質の加水分解速度がこれらの条件下で線形であったためであった。カゼインに由来するグリコシル化されていない - カゼイン（106～169）ペプチドは、アッセイにおいて $500\mu\text{M}$ のペプチド濃度でBSAに対するプロテイナーゼ活性を60%阻害した。より短い合成断片である - カゼイン（106～137）は、発色アッセイにおいて $200\mu\text{M}$ の濃度ではArg特異的なプロテアーゼ活性及びLys特異的なプロテアーゼ活性に対する効果をほとんど有しなかったが、蛍光アッセイにおいて $500\mu\text{M}$ のペプチド濃度でプロテアーゼ活性を約37%阻害した（表4及び図5）。

【0117】

【表3】

表3. 発色基質（BAPNA及びGPK-NA）を用いて測定された、様々な濃度の合成型の κ -カゼインペプチドの存在下におけるボルフィロモナス・ジンジバリスATCC 33277株の全細胞由来のArg特異的なプロテイナーゼ及びLys特異的なプロテイナーゼの活性

	濃度 (μM)	Arg特異的な活性 (ユニット/ 10^{11} 個の細胞)	(%)	Lys特異的な活性 (ユニット/ 10^{11} 個の細胞)	(%)
対照	0	17.99 ± 1.11	100%	4.41 ± 1.07	100%
κ -カゼイン (109～137)	50	$12.66 \pm 2.83^{a, b}$	70%	1.69 ± 0.64^a	41%
	100	6.89 ± 2.51^a	38%	0.76 ± 0.30^a	19%
	200	1.48 ± 1.18^a	8%	0.10 ± 0.06^a	3%
κ -カゼイン (117～123)	200	20.04 ± 1.72^e	111%	n/d	—
	500	$16.10 \pm 0.57^{c, d}$	90%	n/d	—
	1000	$16.52 \pm 3.26^{c, d}$	92%	n/d	—
κ -カゼイン (127～137)	200	$18.26 \pm 1.78^{d, e}$	102%	n/d	—
	500	$17.39 \pm 0.33^{c, d}$	97%	n/d	—
	1000	$14.83 \pm 1.19^{a, b, c}$	82%	n/d	—

*測定されなかった

^a対照とは有意に異なる ($p < 0.05$)

^{b, c, d, e}同様のマークがない他の値とは有意に異なる ($p < 0.05$)

【0118】

【表 4】

表 4. 発色基質 (B A p N A 及び G P K - N A) を用いて測定された、様々な濃度の合成型の κ -カゼインペプチドの存在下におけるボルフィロモナス・ジンジバリス W 5 0 の精製 R g p A - K g p プロテイナーゼ付着因子複合体の活性

	濃度 (μ M)	A r g 特異的な活性 (ユニット/mg)	(%)	L y s 特異的な活性 (ユニット/mg)	(%)
対照	0	4. 1 3 \pm 1. 1 1 ^d	1 0 0 %	4. 6 7 \pm 1. 0 1	1 0 0 %
κ -カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7)	2 0	1. 8 0 \pm 0. 0 6 ^{a, c}	4 3 %	2. 9 0 \pm 0. 5 5 ^a	6 2 %
	5 0	0. 8 7 \pm 0. 3 8 ^{a, b}	2 1 %	1. 8 0 \pm 0. 9 1 ^a	3 9 %
	1 0 0	0. 3 3 \pm 0. 2 8 ^{a, b}	8 %	0. 2 8 \pm 0. 1 8 ^{a, b}	6 %
κ -カゼイン (1 1 7 ~ 1 3 7)	5 0	1. 9 5 \pm 0. 3 8 ^{a, c}	4 6 %	1. 3 4 \pm 0. 2 5 ^{a, c}	2 9 %
	1 0 0	0. 4 1 \pm 0. 1 1 ^{a, b}	1 0 %	0. 9 8 \pm 0. 0 5 3 ^{a, c}	2 1 %
	2 0 0	0. 3 3 \pm 0. 0 2 ^{a, b}	8 %	0. 4 1 \pm 0. 0 1 4 ^{a, b}	9 %
κ -カゼイン (1 1 7 ~ 1 2 3)	2 0 0	3. 6 8 \pm 1. 6 9 ^d	8 9 %	4. 6 2 \pm 0. 5 1	9 9 %
κ -カゼイン (1 2 7 ~ 1 3 7)	2 0 0	4. 4 9 \pm 2. 0 5 ^d	1 0 9 %	3. 8 6 \pm 0. 0 9 ^{a, d}	8 3 %
κ -カゼイン (1 0 6 ~ 1 3 7)	2 0 0	3. 5 1 \pm 1. 7 7 ^d	8 5 %	4. 1 5 \pm 0. 6 4 ^{a, d}	8 9 %

*測定されなかった

^a対照とは有意に異なる ($p < 0. 0 5$)

^{b, c, d}同様のマークがない他の値とは有意に異なる ($p < 0. 0 5$)

【 0 1 1 9 】

補助阻害剤 (Co-inhibitor) としての塩化亜鉛

Z n C l ₂ は、ベンズアミジン及びクロルヘキシジン等の幾つかのプロテアーゼ阻害剤の阻害能を増大させることが分かっている潜在的な補助阻害剤である。補助阻害剤としての亜鉛の可能性を調べるために、全細胞の A r g 特異的なプロテアーゼアッセイ及び L y s 特異的なプロテアーゼアッセイを、ペプチド [κ -カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) / κ -カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) / κ -カゼイン (1 1 ~ 2 3)] と Z n C l ₂ とを 1 : 4 の比で用いて行った。

【 0 1 2 0 】

1 0 0 μ M では、 κ -カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) は全細胞の A r g 特異的なタンパク質分解活性を 6 0 % 阻害し、4 0 0 μ M の Z n C l ₂ は 3 0 % の阻害を示した。しかしながら、 κ -カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) 及び Z n C l ₂ を 1 : 4 の比で組み合わせると、阻害は 9 0 % まで増大した (図 6)。ペプチドと亜鉛との混合物は、精製プロテアーゼ複合体を用いて分析した場合でも、A r g 特異的なタンパク質分解活性の阻害を増大を示した (図 8 ; 陰影セルに関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい)。同様の結果が κ -カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) を用いた L y s 特異的なプロテアーゼアッセイにおいて観察された。すなわち、Z n C l ₂ の添加により、個々で分析した場合のペプチドの阻害能と比較して 9 0 % まで阻害能が増大した (図 7)。F I C 指数に基づく、Z n ²⁺ の効果は相乗的である (表 5)。

【 0 1 2 1 】

【表 5】

表 5 : Z n (I I) の存在下又は非存在下における κ -カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) ペプチドによるジンジパインの阻害の相乗効果を評価するための部分阻害定数指数

酵素	A T C C 3 3 2 7 7 による活性 ^a				
	阻害剤なし	κ -カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) (1 0 0 μ M)	亜鉛 (I I) (4 0 0 μ M)	κ -カゼイン + 亜鉛 (I I) (1 0 0 μ M : 4 0 0 μ M)	F I C 指数 ^b
A r g - ジンジパイン	1 8 . 1 + 5 . 6 9	6 . 9 2 \pm 2 . 5 1	1 2 . 1 \pm 3 . 3 2	1 . 9 5 \pm 1 . 2 9	0 . 4 4
L y s - ジンジパイン	4 . 4 \pm 1 . 0 7	0 . 7 6 \pm 0 . 3 0	2 . 2 \pm 1 . 3 1	0 . 3 1 \pm 0 . 1 8	0 . 5 4

^a 活性 \pm 標準偏差。^b 部分阻害濃度指数

10

【 0 1 2 2 】

1 0 0 μ M の κ -カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) は A r g 特異的なタンパク質分解活性を 3 0 % 阻害したが、4 0 0 μ M の Z n C l ₂ は 5 0 % の阻害を示した。1 : 4 の比で組み合わせると、タンパク質分解の阻害は 7 0 % まで増大した (図 9 ; 陰影セルに関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい) 。 L y s 特異的なプロテアーゼアッセイでは、 κ -カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) : Z n C l ₂ の混合物により、個々で分析した場合のペプチドの阻害剤の阻害能と比較して 9 0 % まで阻害能が増大した (図 1 0 ; 陰影セルに関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい) 。

κ -カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) 及び Z n C l ₂ の F I C 値は、阻害が相乗的であることを示している (表 6) 。

20

【 0 1 2 3 】

【表 6】

表 6 : Z n (I I) の存在下又は非存在下における β -カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) ペプチドによるジンジパインの阻害の相乗効果を評価するための部分阻害定数指数

酵素	A T C C 3 3 2 7 7 による活性 ^a				
	阻害剤なし	β -カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) (1 0 0 μ M)	亜鉛 (I I) (4 0 0 μ M)	β -カゼイン + 亜鉛 (I I) (1 0 0 μ M : 4 0 0 μ M)	F I C 指数 ^b
A r g - ジンジパイン	2 9 . 2 3 + 0 . 0 6	2 0 . 0 3 \pm 2 . 5 1	1 4 . 8 3 \pm 4 . 6 0	7 . 2 3 \pm 2 . 6 3	0 . 8 4 9
L y s - ジンジパイン	4 . 2 8 \pm 0 . 8 8	3 . 0 3 \pm 1 . 2 0	1 . 6 5 \pm 0 . 2 2	0 . 5 2 \pm 0 . 1	0 . 4 8 7

^a 活性 \pm 標準偏差^b 部分阻害濃度指数

30

【 0 1 2 4 】

κ -カゼイン (1 1 ~ 2 3) は 1 0 0 μ M で A r g 特異的なタンパク質分解活性を 4 0 % 阻害したが、Z n C l ₂ は 4 0 0 μ M で A r g 特異的なタンパク質分解活性を 5 0 % 阻害した。阻害剤を 1 : 4 の比で組み合わせると、タンパク質分解の阻害は 7 0 % まで増大した (図 9 ; 陰影セルに関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい) 。 L y s 特異的なプロテアーゼアッセイでは、阻害剤の混合物により、8 5 % まで阻害能が増大した (図 1 0 ; 陰影セルに関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい) 。これとは対照的に、 κ -カゼイン (1 1 ~ 2 3) 及び Z n C l ₂ に関して算出された F I C 値は、両方の阻害剤の混合物が相乗的ではなく、相加的であることを示している (表 7) 。

40

【 0 1 2 5 】

【表 7】

表 7 : $Zn(II)$ の存在下又は非存在下における α_{s1} -カゼイン (11~23) ペプチドによるジンジパインの阻害の相乗効果を評価するための部分阻害定数指数

酵素	ATCC 33277 による活性 ^a				FIC 指数 ^b
	阻害剤なし	α_{s1} -カゼイン (11~23) (100 μM)	亜鉛 (II) (400 μM)	α_{s1} -カゼイン+亜鉛 (II) (100 μM : 400 μM)	
Arg-ジンジパイン	29.23 +0.06	18.00±3.53	14.83±4.60	8.89±0.29	1.095
Lys-ジンジパイン	4.28±0.88	2.73±0.60	1.65±0.22	1.18±0.1	1.147

^a 活性±標準偏差

^b 部分阻害濃度指数

【0126】

阻害定数 (K_i) 及び阻害機構の測定

- カゼイン (109~137) ペプチドの阻害定数及び阻害機構を求めるために精製 RgpB を用いて、酵素反応速度アッセイを行なった。作成したラインウェーバー・バークプロットは、- カゼイン (109~137) による不競合阻害を示している (図 11; 陰影セルに関しては「図面の簡単な説明」での上記の図の説明文を参照されたい)。不競合阻害の場合、 K_i 値は 50% 阻害に要求される阻害剤濃度 (IC_{50}) の値に等しい。 K_i 値は阻害剤と ES 複合体との結合に関する解離定数を表し、この場合 K_i 値は 40.2 μM である (図 12)。

【0127】

カゼイン由来ペプチドの BLAST サーチ及び配列アラインメント

s_1 -カゼイン (11~23) 配列は、ATP 及び基質と結合する ClpX 及び ClpA プロテアーゼサブユニット (シャペロン様プロテアーゼ) との配列類似性を示す (図 15)。ATP 及び基質と結合する ClpX 及び ClpA は、微生物におけるストレス応答に重要な ATP 依存性セリンプロテアーゼ複合体 (それぞれ ClpXP、ClpAP と呼ばれる) のサブユニットである。黄色ブドウ球菌では、ClpXP は浸透圧ストレス、酸化ストレス及び低温下での生存に一定の役割を果たす。ボルフィロモナス・ジンジバリスでは、ClpXP の喪失は酸化ストレス耐性に影響しないが、宿主の上皮細胞の浸潤、熱耐性及びバイオフィーム形成に重要であると考えられる。ClpAP 及び ClpXP は同一の活性を有してはいないが、類似している。カゼイン配列は、ATP 依存性亜鉛メタロプロテアーゼ (FtsH-1) (これもボルフィロモナス・ジンジバリスにおけるバイオフィーム形成に一定の役割を果たす) とも類似性を示す。カゼイン配列は既知のプロテアーゼ阻害剤とは類似性を全く示さない。

【0128】

- カゼイン (193~209) は、幾つかのプロテアーゼ阻害剤との配列類似性を示す (図 14)。セリンプロテアーゼ阻害剤カザールタイプ 5 又は LEKTI (リンパ上皮カザールタイプ関連阻害剤) は、複数の異なる阻害剤単位を含有するセリンプロテアーゼ阻害剤である。該阻害剤は粘膜上皮の抗炎症保護及び / 又は抗菌保護に重要であると考えられ、トリプシン 1、カテプシン G、プラスミン、サブチリシン-A 及びエラスターゼ-2 を阻害することが分かっている。エラフィン (又は別名 SKALP (皮膚由来抗ロイコプロテアーゼ) としても知られている) は更に、エラスターゼ、アルギニルペプチダーゼ、プロテイナーゼ 3 及びミエロプラスチンを阻害するが、トリプシン、- キモトリプシン、カテプシン G 及びプラスミンを阻害しないセリンプロテアーゼ阻害剤である。エラフィンは主にセリンプロテアーゼ阻害剤として作用するが、抗炎症機能にも関与する。エラフィンはそのプロテアーゼ阻害機能とは関係なく、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、アスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*) 及びカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) に対する抗菌性及び抗真菌性も示す。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 9 】

B L A S Tサーチにより、幾つかのプロテアーゼ阻害剤との - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) の配列類似性が明らかになった (図 1 3)。これらの中でも、血漿プロテアーゼ C 1 阻害剤 (Q 5 U G I 5 及び P 0 5 1 5 5) 又はセルピン G 1 が血管透過性の調節及び炎症の抑制；第 X I I a 因子及び血漿カリクレイン (血漿カリクレイン - キニン系のプロテアーゼ)、C 1 r 又は C 1 s プロテアーゼ (相補系)、プラスミン及び組織プラスミノゲン活性化因子 (線溶系)、並びに第 X I 因子及びトロンビン (凝固系) を阻害するのに重要である可能性があると考えられている。

【 0 1 3 0 】

2 0 0 μ M の濃度では、 - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) は全細胞アッセイにおいて、A r g 特異的なタンパク質分解活性の約 9 3 % の阻害、及び L y s 特異的なタンパク質分解活性の 9 8 % の阻害を示した。またペプチドは、2 0 0 μ M 濃度で精製 R g p B プロテアーゼを 8 0 % 超阻害した (表 1 及び表 2)。これらの結果は、ペプチドが 3 つのリシル残基を有するがアルギニル残基を有さず、そのため R g p B プロテアーゼにより切断されないため特に重要である。

【 0 1 3 1 】

s_1 - カゼイン (1 1 ~ 2 3) は全細胞のプロテアーゼ活性を約 6 0 % 阻害し、 - カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) は A r g 特異的なタンパク質分解活性及び L y s 特異的なタンパク質分解活性の両方の約 4 0 % ~ 5 0 % の阻害を示した。この結果は精製プロテアーゼ複合体に対するプロテアーゼ阻害機能の改善も示している。しかしながら、 - カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 5) は、僅かに長いペプチドと比較して、両方のジンジパインに対して、さほど効力を有しなかった。このことは、追加の残基又はペプチドの長さがペプチドの阻害機能に重要な役割を果たすことを示していると考えられる。

【 0 1 3 2 】

Z n C l ₂ は、ベンズアミジン及びクロルヘキシジン等の幾つかのプロテアーゼ阻害剤の阻害能を増大させることが示されている潜在的な補助阻害剤である。様々なペプチド対亜鉛の比の効果を、両方の阻害剤の間に相乗効果があるかどうかを判定するために調べた。F I C 指数を相乗効果を算出するのに用いている。阻害剤の組合せが相加的である場合、F I C 指数は 1 に等しくなる。阻害剤同士が拮抗的である場合、同じ効果を得るのにより多くの阻害剤が必要とされ、合計が 1 より大きくなるのに対し、2 つの阻害剤の組合せが別々の場合よりも効果的である場合、相乗効果により合計は 1 未満になる。全細胞の A r g 特異的なプロテアーゼアッセイの結果及び L y s 特異的なプロテアーゼアッセイの結果から算出された F I C 指数に基づき、 - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) と Z n C l ₂ との混合物及び - カゼイン (1 9 3 ~ 2 0 9) と Z n C l ₂ との混合物は相乗的であったが、 s_1 - カゼイン (1 1 ~ 2 3) と Z n C l ₂ との混合物は相加的であった (表 5、表 6 及び表 7)。

【 0 1 3 3 】

ジンジパイン活性の反応速度のラインウェーバー・バーク分析により、酵素阻害の種類を求めて、競合阻害剤と、非競合阻害剤と、不競合阻害剤とを区別することができる。競合阻害剤は、阻害されていない酵素と同じ y 切片を有する (V_{max} が同じである) が、それぞれの阻害剤濃度に対して異なる傾き及び x 切片を有する (K_m が異なる)。非競合阻害は、阻害されていない酵素と同じ x 切片を有するプロットをもたらす (K_m が同じままである) が、異なる傾き及び y 切片を有する (V_{max} を低減させる)。不競合阻害により、y 軸及び x 軸の両方で異なる切片が生じるが、同じ傾きをもたらされる。酵素反応速度アッセイ及びラインウェーバー・バークプロットに基づくと、 - カゼイン (1 0 9 ~ 1 3 7) ペプチドは不競合阻害剤である。いずれの理論又は作用機構にも縛られるものではないが、不競合阻害剤は、ペプチドが酵素 - 基質複合体とだけ結合し、生成物の形成を妨げることを意味し得る。 K_m 値及び V_{max} 値の両方が低減する。基質の結合は酵素の構造変化を誘導すると考えられている。新たな構造により、阻害剤の結合が可能になる (図 1 6)。これは、酵素及び酵素 - 基質複合体の両方と結合することができる非競合阻

害剤 (V_{max} を低減させる (阻害剤が触媒作用を妨げる) が、 K_m 値は変化しない (酵素に対する基質の親和性には影響がない)) とは異なる。

【0134】

ペプチドの阻害定数は $40.2 \mu M$ であり、不競合阻害剤の場合、 K_i 値は IC_{50} 値と等しい。 $RgpB$ の他の阻害剤との K_i 値の比較により、このペプチド阻害剤が同程度の K_i 値を有し、クロルヘキシジン ($2.62 \times 10^{-4} M$) 及びドキシサイクリン (不競合阻害剤) と同様の $RgpB$ に対する K_i 値を有する $RgpB$ の中程度の阻害剤であり、 $3 \mu M$ の $RgpB$ に対する IC_{50} を有することが明らかになる。

【0135】

BLASTサーチにより、 S_1 -カゼイン (11~23) の、ATP 及び基質と結合する $ClpX$ 及び $ClpA$ プロテアーゼサブユニット (シャペロン様プロテアーゼ)、並びにボルフィロモナス・ジンジバリスのバイオフィーム形成に一定の役割を果たす ATP 依存性亜鉛メタロプロテアーゼ (FtsH1) との配列類似性が明らかになった。 S_1 -カゼイン (193~209) 配列は、セリンプロテアーゼ阻害剤カザールタイプ 5 又は LEKTI (リンパ上皮カザールタイプ関連阻害剤) 等の幾つかのプロテアーゼ阻害剤、及びエラフィンとの配列類似性を示す。これらのセリンプロテアーゼ阻害剤は両方ともそのプロテアーゼ阻害機能とは関係なく、抗菌機能も示す。 S_1 -カゼイン (109~137) も幾つかのプロテアーゼ阻害剤との部分的な配列類似性を示す。それらのプロテアーゼ阻害剤の中には、血漿プロテアーゼ C1 阻害剤 (Q5UGI5 及び P05155) 又はセルビン G1 が含まれる。

【0136】

Fugue プログラムを用いて、キュレーションタンパク質データベース、HOMSTRAD に対してペプチドで起こり得る構造モチーフを特定した。 3.87 の Z スコアが S_1 -カゼイン (109~137) ペプチドで得られ、 S_1 -ヘリックス構造に関する 90% の信頼性を示す。 S_1 -カゼイン (109~137) で起こり得る構造モチーフは、 S_1 -ヘリックス貫通残基 109~126、ターン構造、及び別の S_1 -ヘリックス貫通残基 129~137 とを含む。これらのモチーフに基づき、 S_1 -カゼイン (109~137) ペプチドのモデルを SYBYL ソフトウェアを用いて構築した。 $RgpB$ を阻害する S_1 -カゼイン (109~137) のモデルを、 $RgpB$ の結晶構造 (PDB 1cvr)、及び潜在的な金属結合部位を有する提唱された S_1 -カゼイン (109~137) のモデルに基づき展開した。図 17 (a) は、ペプチド阻害剤である S_1 -カゼイン (109~137)、 Zn (II)、及び合成基質 (BAPNA) との相互作用に關与する $RgpB$ 活性部位の残基を強調する提唱されたモデルを示す。このモデルは $RgpB$ の His²¹¹ 残基及び Glu¹⁵² 残基、 S_1 -カゼイン (109~137) の Asp¹¹⁵ 残基及び Glu¹¹⁸ 残基と Zn (II) との間の静電相互作用を強調している。 S_1 -カゼイン (109~137) の Ile¹²² 残基は BAPNA 基質との疎水性相互作用を形成する。また $RgpB$ の Trp²⁸⁴ 残基及び Cys²⁴⁴ 残基はそれぞれ、BAPNA 基質の Arg 残基及びアミド結合と相互作用する。図 17 (b) は、 Zn (II) の存在下での酵素-基質複合体 ($RgpB$ -BAPNA) と結合する S_1 -カゼイン (109~137) の提唱された分子モデルを示す。このモデルは相乗的阻害の実験上の証拠と一致している。

組成物及び製剤

治療又は予防を目的とする本発明の態様を具体化する組成物の例示を助けるために、以下の試料製剤を調製する。

【0137】

以下は歯磨きペースト製剤の一例である。

成分	% (w/w)
リン酸二カルシウム二水和物	50.0
グリセロール	20.0
カルボキシメチルセルロースナトリウム	1.0
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5

ナトリウムラウロイルサルコニセート	0 . 5
香料	1 . 0
サッカリンナトリウム	0 . 1
グルコン酸クロルヘキシジン (Chlorohexidine gluconate)	0 . 0 1
デキストラナーゼ	0 . 0 1
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	0 . 2
水	残り

【 0 1 3 8 】

以下は更なる歯磨きペースト製剤の一例である。

成分	% (w / w)	10
リン酸ニカルシウム二水和物	5 0 . 0	
ソルビトール	1 0 . 0	
グリセロール	1 0 . 0	
カルボキシメチルセルロースナトリウム	1 . 0	
ラウロイルジエタノールアミド	1 . 0	
モノラウリン酸スクロース	2 . 0	
香料	1 . 0	
サッカリンナトリウム	0 . 1	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 3	
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1	20
デキストラナーゼ	0 . 0 1	
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	0 . 1	
水	残り	

【 0 1 3 9 】

以下は更なる歯磨きペースト製剤の一例である。

成分	% (w / w)	
ソルビトール	2 2 . 0	
アイリッシュモス	1 . 0	
水酸化ナトリウム (5 0 %)	1 . 0	
G a n t r e z	1 9 . 0	30
水 (脱イオン水)	2 . 6 9	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 7 6	
サッカリンナトリウム	0 . 3	
ピロホスフェート	2 . 0	
アルミナ水和物	4 8 . 0	
香料オイル	0 . 9 5	
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	0 . 3	
ラウリル硫酸ナトリウム	2 . 0 0	

【 0 1 4 0 】

以下は液体歯磨きペースト製剤の一例である。

成分	% (w / w)	40
ポリアクリル酸ナトリウム	5 0 . 0	
ソルビトール	1 0 . 0	
グリセロール	2 0 . 0	
香料	1 . 0	
サッカリンナトリウム	0 . 1	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 3	
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1	
エタノール	3 . 0	
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	0 . 2	50

リノール酸	0 . 0 5	
水	残り	
【 0 1 4 1 】		
以下は洗口液製剤の一例である。		
成分	% (w / w)	
エタノール	2 0 . 0	
香料	1 . 0	
サッカリンナトリウム	0 . 1	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 3	
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1	10
ラウロイルジエタノールアミド	0 . 3	
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	0 . 2	
水	残り	
【 0 1 4 2 】		
以下は更なる洗口液製剤の一例である。		
成分	% (w / w)	
G a n t r e z (登録商標) S - 9 7	2 . 5	
グリセリン	1 0 . 0	
香料オイル	0 . 4	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 0 5	20
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1	
ラウロイルジエタノールアミド	0 . 2	
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	0 . 3	
水	残り	
【 0 1 4 3 】		
以下はロゼンジ製剤の一例である。		
成分	% (w / w)	
糖	7 5 ~ 8 0	
トウモロコシシロップ	1 ~ 2 0	
香料オイル	1 ~ 2	30
N a F	0 . 0 1 ~ 0	
. 0 5		
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	0 . 3	
ステアリン酸 M g	1 ~ 5	
水	残り	
【 0 1 4 4 】		
以下は歯肉マッサージクリーム製剤の一例である。		
成分	% (w / w)	
ホワイトワセリン	8 . 0	
プロピレングリコール	4 . 0	40
ステアリルアルコール	8 . 0	
ポリエチレングリコール 4 0 0 0	2 5 . 0	
ポリエチレングリコール 4 0 0	3 7 . 0	
モノステアリン酸スクロース	0 . 5	
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 1	
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	0 . 3	
水	残り	
【 0 1 4 5 】		
以下は歯周ゲル製剤の一例である。		
成分	% (w / w)	50

P l u r o n i c F 1 2 7 (B A S F 製)	2 0 . 0
ステアリルアルコール	8 . 0
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	3 . 0
コロイド二酸化ケイ素 (例えば A e r o s i l (登録商標) 2 0 0 (商標))	1 . 0
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 1
水	残り

【 0 1 4 6 】

以下はチューイングガム製剤の一例である。

成分	% (w / w)	
ガム基剤	3 0 . 0	10
炭酸カルシウム	2 . 0	
結晶性ソルビトール	5 3 . 0	
グリセリン	0 . 5	
香料オイル	0 . 1	
本発明の化合物、ペプチド又はペプチド模倣物	0 . 3	
水	残り	

【 0 1 4 7 】

本発明は本明細書中で詳細に説明しているが、実施例は単に例示目的にすぎないと理解すべきである。分子生物学、歯の治療及び関連の関連分野の当業者にとって明らかな本発明の実施形態の他の修正形態が本発明の範囲内であることが意図される。

20

【 0 1 4 8 】

【表 8 - 1】

参考文献

Berenbaum, M. C. (1978). "A method for testing for synergy with any number of agents." J Infect Dis **137**(2): 122-30.

Chen, Y.-Y., K. J. Cross, R. A. Paolini, J. E. Fielding, N. Slakeski, and E. C. Reynolds. 2002. CPG70 is a novel basic metallocarboxypeptidase with C-terminal polycystic kidney disease domains from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. **277**:23433-23440.

10

Fletcher, H. M., H. A. Schenkein, and F. L. Macrina. 1994. Cloning and characterization of a new protease gene (prth) from *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. **62**:4279-4286.

20

Grenier, D., S. Imbeault, P. Plamondon, G. Grenier, K. Nakayama, and D. Mayrand. 2001. Role of gingipains in growth of *Porphyromonas gingivalis* in the presence of human serum albumin. Infect. Immun. **69**:5166-5172.

Malkoski, M., S. G. Dashper, N. O'Brien-Simpson, G. H. Talbo, M. Macris, K. J. Cross, and E. C. Reynolds. 2001. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:2309-2315.

30

Mizuguchi, K., C. M. Deane, et al. (1998). "HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families." Protein Sci **7**(11): 2469-71.

【 0 1 4 9 】

【表 8 - 2】

O'Brien-Simpson, N. M., S. G. Dashper, et al. (1998). "Histatin 5 is a substrate and not an inhibitor of the Arg- and Lys-specific proteinases of *Porphyromonas gingivalis*." *Biochem Biophys Res Commun* **250**(2): 474-8.

O'Brien-Simpson, N. M., R. A. Paolini, et al. (2001). "Role of RgpA, RgpB, and Kgp proteinases in virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50 in a murine lesion model." *Infect Immun* **69**(12): 7527-34. 10

Pathirana, R. D., N. M. O'Brien-Simpson, et al. (2006). "Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*." *Microbiology* **152**(Pt 8): 2381-94.

Pike, R., W. McGraw, J. Potempa, and J. Travis. 1994. Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J. Biol. Chem.* **269**:406-411. 20

Shi, J., T. L. Blundell, et al. (2001). "FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties." *J Mol Biol* **310**(1): 243-57.

Stryer, L., J. M. Berg, et al. (2002). Biochemistry Fifth Edition. New York, W.H. Freeman and Company. 30

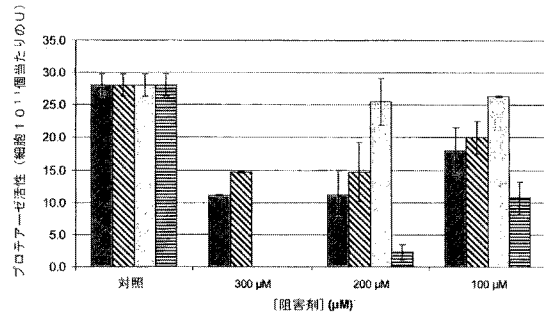
Yoshioka, M., D. Grenier, and D. Mayrand. 2003. Monitoring the uptake of protein-derived peptides by *Porphyromonas gingivalis* with fluorophore-labeled substrates. *Curr. Microbiol.* **47**:1-4.

【配列表フリーテキスト】

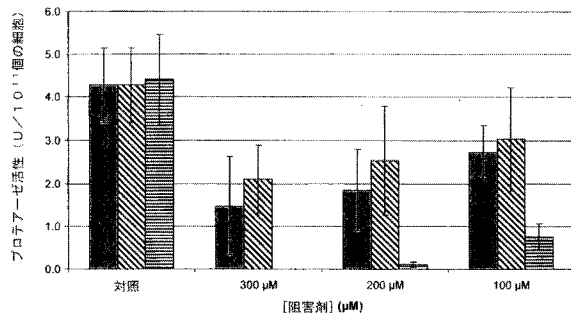
【0150】

配列番号 1 2 : X a a はグリコシル化トレオニン
 配列番号 1 3 : X a a はグリコシル化トレオニン
 配列番号 1 4 : X a a はグリコシル化トレオニン
 配列番号 1 5 : X a a はグリコシル化トレオニン
 配列番号 1 6 : X a a はリン酸化セリン
 配列番号 2 4 : X a a はグリコシル化トレオニン
 配列番号 2 5 : X a a はグリコシル化トレオニン
 配列番号 2 6 : X a a はグリコシル化トレオニン
 配列番号 2 7 : X a a はグリコシル化トレオニン
 配列番号 2 8 : X a a はリン酸化セリン 40

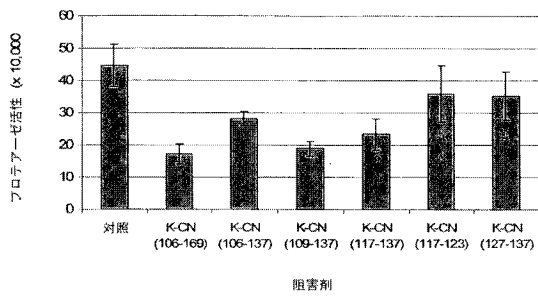
【図 1】



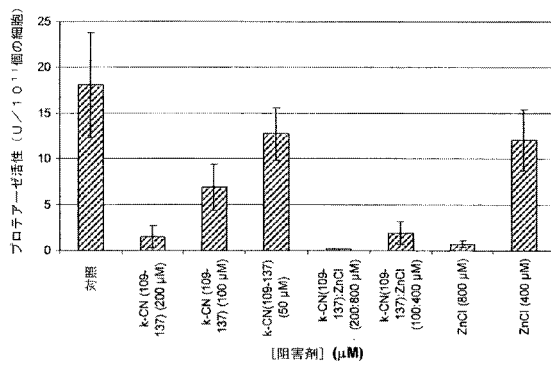
【図 2】



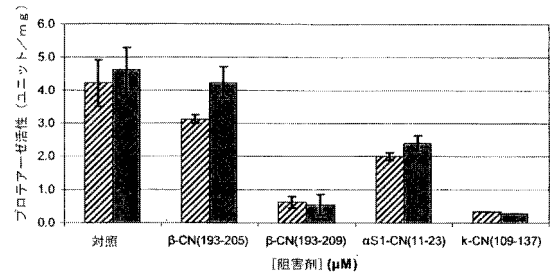
【図 5】



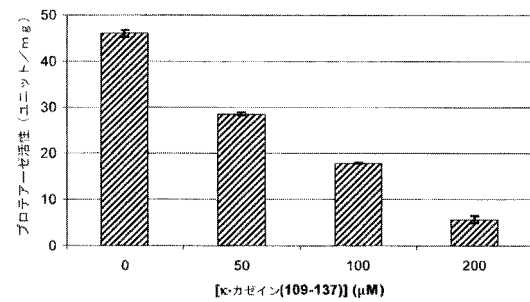
【図 6】



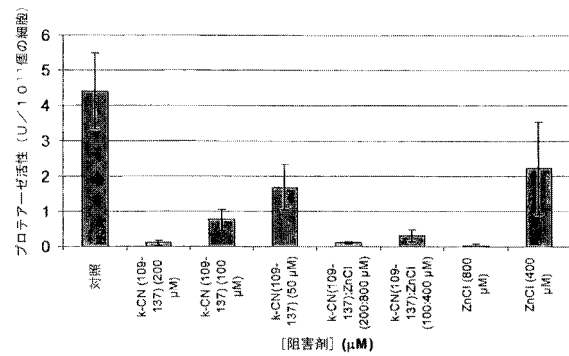
【図 3】



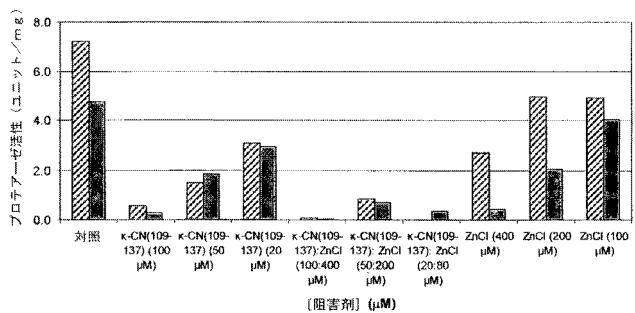
【図 4】



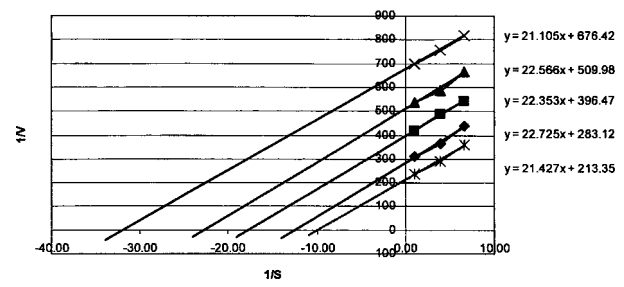
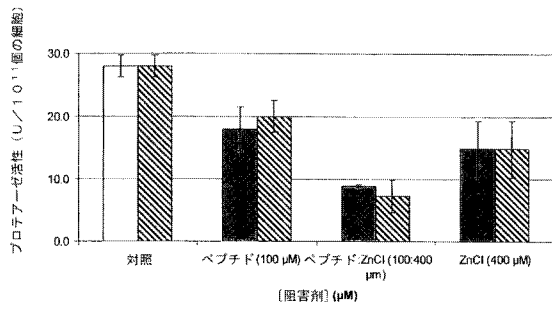
【図 7】



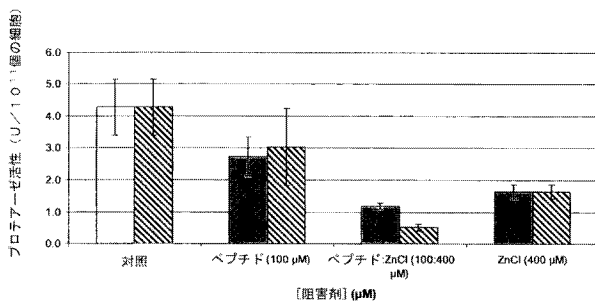
【図 8】



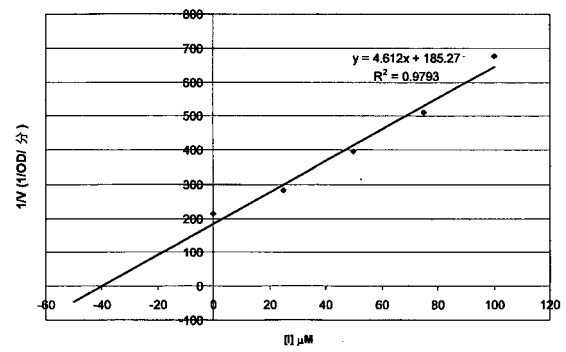
【 図 1 1 】



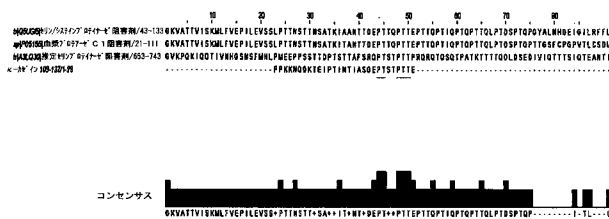
【 図 1 0 】



【 図 1 2 】



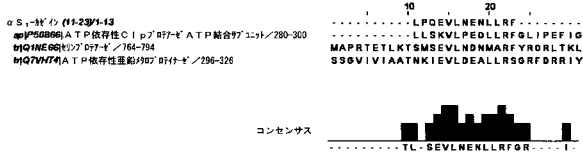
【 図 1 3 】



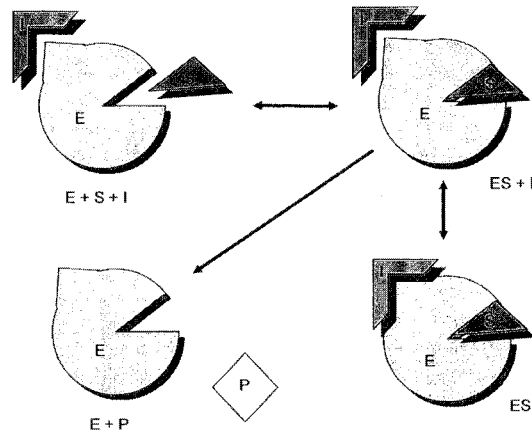
【 図 1 4 】



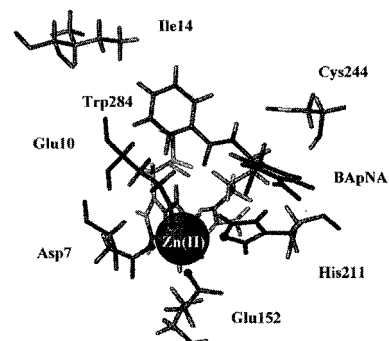
【 図 1 5 】



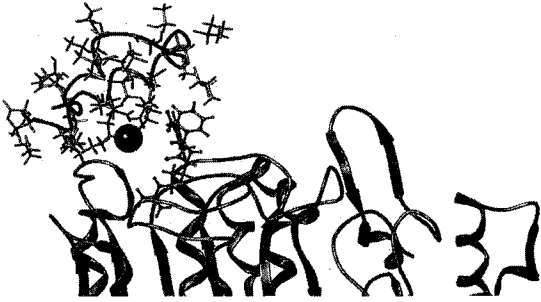
【 図 1 6 】



【 図 1 7 a 】



【図 17 b】



【配列表】

2012530073000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2010/000760

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
C07K 14/435 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01) A61Q 11/00 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenomeQuest: SEQ ID NO: 1-32 STN - MEDLINE, CA, BIOSIS, WPIDS, BIOTECHABS, FSTA, FROSTI: Keywords [(casein, bacteria, peptide, periodontal) and like terms]		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/081628 A2 (CHAY 13 MEDICAL RESEARCH GROUP N.V.) 9 September 2005 Abstract, page 60, lines 3-6, page 74, lines 19-30, claim 104, SEQ ID NO: 27, 3906, 3675, 2877, 3661, 2561	1, 2, 4-8, 11, 16
X	US 2003/0195150 A1 (REYNOLDS et al) 16 October 2003 Abstract, claims 9-10, SEQ ID NO: 8, 10-12, 14-19	7, 11, 16
X	WO 2005/058344 A1 (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 30 June 2005 Abstract, claims 6 and 15, page 2, lines 18-21, SEQ ID NO: 3, 5-7, 9, 10	7, 9-13, 16
X	US 2005/0187155 A1 (JULLERAT et al) 25 August 2005 Abstract, SEQ ID NO: 7, page 3, paragraph [0034]	1, 2, 4-8, 11, 14-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" 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 27 July 2010		Date of mailing of the international search report 29 JUL 2010
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer JOCELYN CHAN AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2914

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2010/000760

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1568377 A1 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD) 31 August 2005 Abstract, SEQ ID NO: 2	7, 11, 16
X	MALKOSKI, M. et al., 'Kappacin, a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk', Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2001, vol. 45, pages 2309-2315 Abstract, page 2311, 'Enzymatic digestion of CMP and analysis of peptides', page 2314, column 2, lines 42-45	3, 7, 11, 16
X	DASHPER, S. G. et al., 'Divalent Metal Cations Increase the Activity of the Antimicrobial Peptide Kappacin', Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005, vol. 49, pages 2322-2328 Abstract	7, 9-13, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2010/000760

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
WO	2005081628	AU	2005215943	BR	PI0507822	CA	2558155
		CN	101124261	EA	200601575	EP	1751179
		KR	20070007128	MX	PA06010014	NO	20064388
		US	2007203060	ZA	200607735		
US	20030195150	AU	13272/99	CA	2311389	EP	1032592
		HK	1030551	US	7588752	WO	9926971
		ZA	9810679				
WO	2005058344	AU	2004298285	CA	2550581	EP	1708735
		KR	20070026372	MX	PA06007043	NZ	548218
		US	2009246150	ZA	200605660		
US	2005187155	EP	1359157	EP	1501864	US	7258996
		US	2007258914	US	7597904	WO	03093308
EP	1568377	AU	2003277644	CA	2481489	CN	1691961
		KR	20050044758	NO	20044258	US	2005148504
		WO	2004050118				
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.							
END OF ANNEX							

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 33/30 (2006.01)		A 6 1 K 33/30		
C 0 7 K 7/08 (2006.01)		A 6 1 P 43/00 1 2 1		
		C 0 7 K 7/08 Z N A		

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

(72)発明者 レイノルド エリック チャールズ
 オーストラリア国 3 0 5 3 ビクトリア カールトン スワンストン ストリート 7 2 0 ザ
 ユニヴァーシティー オブ メルボルン
 (72)発明者 ダッシュパー スチュアート ジェフリー
 オーストラリア国 3 0 5 3 ビクトリア カールトン スワンストン ストリート 7 2 0 ザ
 ユニヴァーシティー オブ メルボルン

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA18 BA19 MA02 NA14 ZA671 ZA672 ZB351 ZB352
 ZC201 ZC202
 4C086 AA01 AA02 HA03 MA02 MA04 NA05 ZA67 ZB35 ZC20 ZC75
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA16 BA17 BA18 CA43 EA20