

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6261560号  
(P6261560)

(45) 発行日 平成30年1月17日 (2018. 1. 17)

(24) 登録日 平成29年12月22日 (2017. 12. 22)

(51) Int. Cl.

F I

<b>A 6 1 K</b>	<b>38/05</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>38/05</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/10</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>31/10</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/04</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>31/04</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/08</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>37/08</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>17/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>17/00</b>

請求項の数 12 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-501713 (P2015-501713)
(86) (22) 出願日	平成25年3月7日 (2013. 3. 7)
(65) 公表番号	特表2015-512386 (P2015-512386A)
(43) 公表日	平成27年4月27日 (2015. 4. 27)
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/029696
(87) 国際公開番号	W02013/142088
(87) 国際公開日	平成25年9月26日 (2013. 9. 26)
審査請求日	平成28年2月17日 (2016. 2. 17)
(31) 優先権主張番号	61/613, 212
(32) 優先日	平成24年3月20日 (2012. 3. 20)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	513000148 ヘリックス バイオメディックス, インコーポレイテッド HE L I X B I O M E D I X, I N C. アメリカ合衆国 98021 ワシントン , ボセル, セブンティーンズ アベニュー エスイー 22121, #112
(74) 代理人	110001438 特許業務法人 丸山国際特許事務所
(72) 発明者	ジャン, リジュアン アメリカ合衆国 98028 ワシントン , ケンモア, シックスティース アベニュー エヌイー 20429

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗微生物性の短リポペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類の皮膚、頭皮または粘膜組織における細菌又は酵母若しくは真菌感染の治療用製剤であって、

式  $C_{14-16}$  脂質 - リシン - プロリン -  $NH_2$  又は式  $C_{14-16}$  脂質 - リシン - d - プロリン -  $NH_2$  で示されるペプチドを少なくとも一種含む組成物を治療に有効な量と、医薬的に許容可能なキャリアとを含む、製剤。

【請求項 2】

治療に有効な量の前記組成物は、前記ペプチドを約  $0.1 \mu g / mL$  ~ 約 10% (w / v) の濃度で含む、請求項 1 の製剤。

【請求項 3】

前記細菌又は酵母若しくは真菌感染は、プロピオニバクテリウム・アクネス、黄色ブドウ球菌、大腸菌およびカンジダ・アルビカンスからなる群から選択される細菌又は酵母若しくは真菌によって引き起こされる、請求項 1 の製剤。

【請求項 4】

前記組成物のペプチドは、

パルミトイル - リシン - プロリン -  $NH_2$  ;

パルミトイル - リシン - d - プロリン -  $NH_2$  ;

ミリストイル - リシン - d - プロリン -  $NH_2$  ; 又は

ペンタデカノイル - リシン - d - プロリン -  $NH_2$

である、請求項 1 の製剤。

【請求項 5】

皮膚、頭皮又は粘膜組織の細菌又は酵母若しくは真菌による感染に関する症状は、座瘡、アトピー性皮膚炎、酒さ、細菌性膣疾患、膣カンジダ症、頭垢、水虫又は毛包炎である、請求項 1 の製剤。

【請求項 6】

哺乳類の創傷治療用製剤であって、

式  $C_{16}$  脂質 - リシン - プロリン -  $NH_2$ 、式  $C_{16}$  脂質 - リシン - ヒスチジン -  $NH_2$  又は式  $C_{16}$  脂質 - リシン - アルギニン -  $NH_2$  で示されるペプチドを少なくとも一種含む組成物を治療に有効な量と、医薬的に許容可能なキャリアとを含む、製剤。

10

【請求項 7】

創傷のある皮膚組織は、過形成性瘢痕、酒さ又は湿疹性病斑である、請求項 6 の製剤。

【請求項 8】

前記過形成性瘢痕は、座瘡、毛包炎、火傷、外傷性損傷、外科手術処置又は細菌による皮膚感染によって引き起こされる、請求項 7 の製剤。

【請求項 9】

前記ペプチドは、

パルミトイル - リシン - プロリン -  $NH_2$  ;

パルミトイル - リシン - ヒスチジン -  $NH_2$  ; 又は

パルミトイル - リシン - アルギニン -  $NH_2$

20

である、請求項 6 の製剤。

【請求項 10】

前記細菌感染は、体臭、口臭又は歯肉疾患の原因である、請求項 1 の製剤。

【請求項 11】

哺乳類の皮膚、頭皮または粘膜組織における細菌又は酵母若しくは真菌感染の治療用製剤であって、

$C_{16}$  脂質 - リシン - ヒスチジン -  $NH_2$  又は  $C_{16}$  脂質 - リシン - アルギニン -  $NH_2$  で示されるペプチドを少なくとも一種含む組成物を治療に有効な量と、医薬的に許容可能なキャリアとを含む、製剤

【請求項 12】

30

ペプチドは、パルミトイル - リシン - ヒスチジン -  $NH_2$  又はパルミトイル - リシン - アルギニン -  $NH_2$  である、請求項 11 の製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2012年3月20日出願の米国特許仮出願第61/613,212号の優先権の利益を主張し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれるものとする。

【0002】

本発明は、生物学的活性および治療活性を有するペプチドに関する。特に、本発明は、抗微生物活性を示すK P VまたはK d P Tの脂質化した(lipidated)ジペプチドまたはトリペプチドの類似体(analogues)に関する。具体的には、本発明のペプチドによる抗微生物活性の向上は、塩基性トリペプチドであるリシン - プロリン - バリンおよびリシン - d - プロリン - チロシンを超えるものである。本発明はさらに、これらのペプチドを用いて、種々の外傷、炎症または皮膚およびその他関連する体表面(口腔等)に悪影響を及ぼす細菌感染症を治療する方法に関する。

40

【背景技術】

【0003】

抗微生物治療および抗微生物剤に対する研究はこの数十年間に発展しているが、近年、増加する薬剤耐性細菌、ウイルス、および真菌の感染症を治療するための新規な抗微生物剤が要請されている。

50

## 【 0 0 0 4 】

生体活性ペプチドは、様々なものが、科学文献および発行特許の中で報告されている。ペプチドは、歴史的に天然源から単離されており、近年は、構造機能関係の研究対象となっている。さらに、天然ペプチドは、合成ペプチド類似体の設計のための出発点となっている。

## 【 0 0 0 5 】

短ペプチドが含まれる化粧品組成物について記載した種々の特許が存在する。例えば、米国特許第6,492,326号は、ペンタペプチドおよび皮膚ケア活性成分が含まれる皮膚ケア組成物の調製および使用を開示している。

## 【 0 0 0 6 】

化学修飾が含まれる超短ペプチド(ダイマーおよびトリマー)に主に焦点を合わせた抗菌性短ペプチドについて記載した文献がある(Strom et al.2003(Journal of Medicinal Chemistry 46:1567-1570)。幾つかのヘキサペプチドも記載されている。しかしながら、これらヘキサペプチドの抗微生物活性については試験も考察もなされていない。

## 【 0 0 0 7 】

アルファ - メラニン細胞刺激ホルモン(  $\alpha$ -MSH)は、有効な抗炎症活性を有する13-アミノ酸ニューロペプチドである。 $\alpha$ -MSHは、大きな前駆体分子のプレ - オピオメラノコルチンの翻訳後プロセッシング(posttranslational processing)によって作られる。 $\alpha$ -MSHのカルボキシ末端トリペプチドは、残基11乃至13にKPVを含み、インビボおよびインビトロにて抗炎症活性を発揮することが示されている(Brzoska,T.,Luger,T.A. et al.,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides:biochemistry,anti-inflammatory and protective effects in vitro and in vivo,and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases.Endocrine Reviews 2009.29(5):581-602)。構造的に関連する誘導体KdPT(KPT)が、IL-1の残基193-195に対してコリニア(collinear)であり、IL-1レセプタタイプIと相互作用する能力を有することが記載されている(Luger T.A.,and Brzoska T.  $\alpha$ -MSH related peptides:a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs.Ann Rheum Dis 2007;66(suppl III):iii52-iii55)。KPVが、黄色ブドウ球菌(S.aureus)およびカンジダ・アルビカンス(C.albicans)に抗微生物作用を有することを示唆する1つの報告があったが、MICは測定されていない(Cutuli M et al.,2000,antimicrobial effects of  $\alpha$ -MSH peptides,J.Leukocyte Biology,67:233-239)。KPVとは異なり、KdPTトリペプチドが抗微生物作用を有することはこれまで報告されていない。

## 【 0 0 0 8 】

それゆえ、グラム陰性菌およびグラム陽性菌を含む多くの微生物に対して広範囲の抗微生物活性能力を有するペプチドの開発が要請されている。抗微生物性ペプチドの製造コストもまた、医薬品および化粧品への適用に際して重要な検討事項である。本発明は、コスト効率の良い抗微生物性短ペプチドを開示するもので、細菌および真菌の感染に関連する皮膚症状の局所的治療または管理用として、医薬品組成物または化粧品組成物に用いられることができる。

## 【発明の概要】

## 【 0 0 0 9 】

本発明は、抗微生物活性を示すKPVまたはKdPTの脂質化したジペプチドまたはトリペプチドの類似体に関する。特に、本発明のペプチドは、塩基性トリペプチドであるリシン - プロリン - バリンおよびリシン - d - プロリン - チロシンを超える抗微生物活性の向上をもたらす。単離ペプチドが目標とする抗菌活性は、皮膚および関連する粘膜表面に悪影響を及ぼす細菌に対するものである。特定のいかなる機構にも制限されるものでないが、本発明のペプチドは、細菌増殖を阻害することにより、また、細菌感染に伴う炎症を阻害することにより、皮膚の健康を促進することができる。

## 【 0 0 1 0 】

本発明の一実施形態は、一般式： $C_{12-18}$ 脂質 - KXZ - NH<sub>2</sub>で示される脂質化

10

20

30

40

50

したジペプチドまたはトリペプチドに関するもので、式中、Kはリシンであり、Xはプロリン、D-プロリン(プロリンのD-異性体)、ヒスチジンまたはアルギニンであり、Zはバリン、トレオニン、アラニンまたはロイシンであって任意選択的に存在し、末端COOHは、アミド化され、NH<sub>2</sub>を有している。ペプチドは、C<sub>12-18</sub>脂質で脂質化され、好ましくはラウリン酸(C<sub>12</sub>)、ミリスチン酸(C<sub>14</sub>)、ペンタデカン酸(C<sub>15</sub>)、パルミチン酸(C<sub>16</sub>)またはステアリン酸(C<sub>18</sub>)の脂質部分である。最も好ましい脂質基は、ペンタデカノイルおよびパルミトイルである。

#### 【0011】

脂質化したジアミノ酸およびトリアミノ酸の好ましい例として次のものを挙げる事ができる。

10

- C<sub>12-18</sub>脂質-リシン-プロリン-バリン-NH<sub>2</sub>;
- C<sub>12-18</sub>脂質-リシン-d-プロリン-トレオニン-NH<sub>2</sub>;
- C<sub>12-18</sub>脂質-リシン-プロリン-アラニン-NH<sub>2</sub>;
- C<sub>12-18</sub>脂質-リシン-プロリン-ロイシン-NH<sub>2</sub>;
- C<sub>12-18</sub>脂質-リシン-プロリン-NH<sub>2</sub>;
- C<sub>12-18</sub>脂質-リシン-d-プロリン-NH<sub>2</sub>;
- C<sub>12-18</sub>脂質-リシン-ヒスチジン-NH<sub>2</sub>;および
- C<sub>12-18</sub>脂質-リシン-アルギニン-NH<sub>2</sub>

#### 【0012】

本発明の他の実施形態は、医薬的または美容的に許容され得るキャリアおよび前記ペプチドの一種又は複数種を含有する組成物に関する。このような組成物中のペプチドは、好ましくは、濃度が約0.1μg/mL乃至約20μg/mL、または約0.1μg/mL乃至約10%(w/v)の範囲である。当該組成物の好ましい形態は、エアロゾル、エマルジョン、液体、水溶液、ローション、クリーム、ペースト、軟膏、粉末および泡であり、局所的な適用に適している。

20

#### 【0013】

本発明はまた、哺乳類の皮膚の微生物感染を治療または予防するために、前記組成物を使用する方法に関する。典型的には、本発明の治療方法は、有効量のペプチド含有組成物を、皮膚(表皮)および関連する粘膜組織の患部領域に対して、有効な期間に亘って投与することを含んでいる。当該方法はまた、細菌感染が、プロピオニバクテリウム・アクネス(P.acnes)、黄色ブドウ球菌、大腸菌(E.coli)およびカンジダ・アルビカンスから選択される細菌によって引き起こされる場合にも有用である。

30

#### 【0014】

さらに、本発明のペプチドおよびこれを含有する組成物は、一般の皮膚ケアおよび化粧品調製物に含有させると有用な特徴を発揮する。前記調製物として、様々な皮膚化粧品、皮膚クリーム、ローション、日焼け止め、及びにきび治療用ローションまたはクリーム等がある。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0015】

本明細書中に記載する本発明がより完全に理解されることができるよう、以下に発明を詳細に説明する。本発明は、一般式：C<sub>12-18</sub>脂質-KXZ-NH<sub>2</sub>で示され、抗微生物性を有し、脂質化したジペプチド類似体またはトリペプチド類似体を含む組成物及び方法に関するもので、式中、Kはリシンであり、Xはプロリン、D-プロリン(プロリンのD-異性体)、ヒスチジンまたはアルギニンであり、Zはバリン、トレオニン、アラニンまたはロイシンであって任意選択的に存在し、末端COOHは、アミド化され、NH<sub>2</sub>を有している。本発明化合物のC<sub>12-18</sub>脂質成分を得るのに用いられることができる飽和または不飽和脂肪酸の例として、以下のものが挙げられる：

40

【表 A】

系統名	慣用名	略号
ドデカン酸	ラウリン酸	12:0
テトラデカン酸	ミリスチン酸	14:0
ヘキサデカン酸	パルミチン酸	16:0
ヘプタデカン酸	マルガリン(ダツリン(daturic))酸	17:0
オクタデカン酸	ステアリン酸	18:0
9-cis-テトラデセン酸	ミリストレイン酸	14:1 (n-5)
9-cis-ヘキサデセン酸	パルミトオレイン酸	16:1 (n-7)
6-cis-ヘキサデセン酸	サピエン酸	16:1 (n-10)
all-cis-7,10,13- ヘキサデカトリエン酸		16:3 (n-3)
9-cis-オクタデセン酸	オレイン酸	18:1 (n-9)
all-cis-9,12- オクタデカジエノン酸	リノール酸	18:2 (n-6)

10

## 【0016】

アルファ・メラニン細胞刺激ホルモン(α-MSH)は、抗炎症活性を有する13-アミノ酸ニューロペプチドである。α-MSHは、大きな前駆体分子プロ-オピオメラノコルチンの翻訳後プロセッシングによって生産される。α-MSHのカルボキシ末端トリペプチドは、残基11-13がKPVであり、インビボおよびインビトロで抗炎症活性を有することが立証されている(Brzoska,T.,Luger,TA.et al., α-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides:biochemistry,anti-inflammatory and protective effects in vitro and in vivo,and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases.Endocrine reviews 2009.29(5):581-602)。構造的に関連する誘導体KdPT(KPT)が、IL-1の残基193-195に対してコリニアであることが記載されており、IL-1レセプタタイプIと相互作用する能力を有することが示唆されている(Luger T.A.,and Brzoska T. α-MSH related peptides:a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs.Ann Rheum Dis 2007;66(suppl III):iii52-iii55)。KPVが、黄色ブドウ球菌およびカンジダ・アルピカンスに抗微生物作用を有することを示唆する1つの報告があるが、これにはMICの決定は行われていない(Cutuli M et al.,2000,antimicrobial effects of α-MSH peptides,J.Leukocyte Biology,67:233-239)。なお、KPVとは異なり、KdPTトリペプチドが抗微生物作用を有することはこれまで報告されていない。

20

30

## 【0017】

発明者らは、最小阻止濃度(minimal inhibitory concentration:MIC)の決定を、CLSI(臨床・検査標準協会(Clinical and Laboratory standard Institute))が推奨する抗微生物物質用標準プロトコル(Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically;Approved Standard-Ninth Edition)を用いて行った。驚いたことに、KPVもKdPTも、大腸菌、黄色ブドウ球菌または酵母に対しては、2000μg/ml以下の濃度でMICを検出することはできなかった。このように、両ペプチドは、抗微生物性性能が劣るため、抗微生物活性を必要とする治療または化粧品用途には好ましくないものとされている。

40

## 【0018】

発明者らは、両ペプチドを、種々長さの脂質によるN末端アセチル化により、KPVおよびKdPTのアルファアミノ基に改質した。このような改質により生じる分子は、微生物の広範なスペクトルに対して、新規で、優れた、予期し得なかった抗微生物活性を有する。得られたトリペプチドは、驚くべきことに、グラム陰性菌およびグラム陽性菌ならびに酵母に対して、親ペプチドよりも優れた抗微生物活性を示した。脂質の長さもこの

50

活性に影響し、発明者らは、炭素数12～18の脂質が最も有効であることを見出した。脂質化の後、1～64 µg/mlのミューラーヒントンブロス(Muller Hinton broth)中のプロピオニバクテリウム・アクネス、黄色ブドウ球菌、大腸菌およびカンジダ・アルビカンスに対するMICは大きく向上した。Pal-KPV-NH<sub>2</sub>中の第3残基をAまたはLと置換すると抗微生物活性が保持された。発明者らは、この発見により、KPVまたはKdPTから第3アミノ酸残基を除去することにした。得られたリポジペプチドのPal-KP-NH<sub>2</sub>、Pal-K-dP-NH<sub>2</sub>は全て、新規な抗微生物活性を示した。また、KP-NH<sub>2</sub>およびKdP-NH<sub>2</sub>は両方とも、ヒト皮膚ケラチン細胞におけるヒスタミン誘導IL-6発現に対して、適度な抗炎症活性を示した(データは示していない)。発明者らはさらに、第2残基のPまたはdPを、V、A、F、G、S、H、K、I、L、D、R、S、WまたはYと置換した。この作業により、一群のリポジペプチドに、これまで報告されていなかった新規な抗微生物活性がもたらされた。抗微生物活性は、医薬品または化粧品調製物における治療用途に適用することができる。

10

#### 【0019】

要約すると、本発明は、KPVに由来し脂質-KXZからなる特定のリポジペプチドおよびリポトリペプチドが、カルボキシ末端でアミド化されているという発見に基づいており、脂質は、望ましくはパルミトイル-、ラウリル-、ミリスチル-、ペンタデカノイルおよびステアリル-から選択されることができ、Xは、L-またはD-エナンチオマー形態のP、G、I、HおよびRから選択されることができ、Zは任意選択的に存在し、バリン、トレオニン、アラニンまたはロイシンである。このような短リポペプチドは、大腸菌、黄色ブドウ球菌、プロピオニバクテリウム・アクネス、白癬菌属等の皮膚糸状菌およびカンジダ酵母(カンジダ・アルビカンス、カンジダ・グラブラータ(*C.glabrata*)、カンジダ・トロピカリス(*C.tropicalis*)を含む)を含むグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する新規な抗微生物物質である。

20

#### 【0020】

略語の説明：

上記の脂質は、標準的なペプチド化学により、アミド結合を通じて、ジペプチドまたはトリペプチドに結合され、myr=ミリスチン酸、pen=ペンタデカン酸、pal=パルミチン酸、ste=ステアリン酸、lau=ラウリン酸である。

アミノ酸の右旋型(dextro form)の略語は、「d」とする。例えば、プロリンの右旋型はd-プロリンである。また、アミノ酸の略語は、従来から用いられているように、次の通りである。

30

【表 B】

アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	ASN	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リシン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

## 【 0 0 2 1 】

医薬品の処方および投与の技術に関する詳細については、Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co,Easton Pa.)の最新版に記載されている。局所的送達が好きだが、その他の送達手段として、例えば、経口投与、非経口投与、エアロゾル投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、髄内投与、クモ膜下腔内投与、脳室内投与、静脈内投与、腹膜内投与、または鼻腔内投与がある。本発明は、多くのキャリアビークル(carrier vehicles)の中に調製されることができ、該ビークルとして、例えば、スプレー、エアロゾル、水型および油型エマルジョン、油型および水型エマルジョン、フェイスもしくはボディ用クリーム、日焼け止め用もしくは日焼け後ローション、その他の局所投与用ビークルなどがある。さらに、本発明のペプチドおよび該ペプチドが含まれる組成物は、有用成分として、一般的な皮膚ケア用および化粧品用製剤、例えば、皮膚化粧品、皮膚クリーム、ローション、日焼け止め、抗座瘡治療用ローションまたはクリームなどの種々の調製剤に含有させることができる。

## 【 0 0 2 2 】

本明細書中で用いられる「治療用製剤」という語は、患者の体調不良または疾病を治療し、治し、改善し、予防し、または向上させるのに用いられる製剤のことをいう。本発明により治療される体調不良状態として、哺乳類(ヒト等)の皮膚または粘膜領域に悪影響を及ぼす様々な細菌感染が含まれる。本発明の方法はまた、プロピオニバクテリウム・アクネス、黄色ブドウ球菌、大腸菌およびカンジダ・アルビカンスから選択される細菌または真菌によって引き起こされる細菌感染に有用である。

## 【 0 0 2 3 】

本発明に係る医薬品組成物は、適用される特定の用途に応じて、溶液、懸濁液、非経口調製物、軟膏、クリーム、ローション、スプレー、粉末、または錠剤カプセルとして製剤化されることができる。非経口調製物は、例えば、ピロゲンを含まない(pyrogen-free)蒸留水、リン酸塩緩衝液、標準的な生理食塩水等のビークルを含むことができる。軟膏、クリーム、ローションおよびスプレーは、キャリア(植物油もしくは鉱物油、白色ワセリン、またはC<sub>12</sub>をより高分子量のアルコール等)を含むことができる。錠剤またはカプセルは、希釈剤(例えば、ラクトース)、バインダー、潤滑剤(例えば、ステアリン酸)、崩壊剤(例えば、コーンスターチ)を含むことができる。

## 【 0 0 2 4 】

有効量の活性剤が入れられた口腔スプレーに、本発明の1または複数種の脂質化ペプチドを含めることができる。この材料は、抗微生物剤スプレーとして、歯および歯肉表面上に毎日1~3回、0.25~0.5mlを投与することができる。義歯装着者の場合、義歯装着前に、義歯表面に直接適用することができる。所望により、うがい剤に、有効量の抗微生物剤を含ませることができる。

## 【 0 0 2 5 】

本発明の組成物は、医薬的または皮膚科学的に許容可能なキャリアを含むことができる。キャリアの例として、エマルジョンおよびゲルが挙げられる。エマルジョンは、油相および水相の混合物であることが多い。組成物は、剥離用研磨材を含むことができる。組成物は、安定化剤を含むこともできる。組成物は、発泡制御化合物を含むこともできる。

## 【 0 0 2 6 】

組成物は、1または複数種の皮膚ケア活性成分をさらに含むことができる。皮膚ケア活性成分の例として、剥離用活性物質、抗座瘡活性物質、ビタミンB3化合物、レチノイド(レチノール、レチナール、レチノールエステル、レチニルプロピオネート、レチノイン酸およびレチニルパルミテートを含む)、ヒドロキシ酸、ラジカルスカベンジャ、キレータ、抗炎症剤、局所麻酔薬、タンニング活性物質、皮膚美白剤、抗セルライト剤、フラボノイド、抗微生物活性物質、皮膚治癒剤、抗真菌活性物質、ファルネソール、フィタントリオール、アラントイン、サリチル酸、ニコチンアミド、デクспанテノール、トコフェロールアセテートおよびグルコサミンが挙げられる。

## 【 0 0 2 7 】

組成物は、日焼け止め化合物を含もこともできる。日焼け止め化合物の例として、無機日焼け止め化合物および有機日焼け止め化合物が挙げられる。無機日焼け止め化合物として、亜鉛酸化物、チタン酸化物および鉄酸化物等の金属酸化物が挙げられる。有機日焼け止め化合物として、オクチルメトキシシナメート、オクチルサリチレート、テレフタリリデンジカンフルスルホン酸、アポベンゾンおよびオクトクリレンを挙げることができる。

## 【 0 0 2 8 】

## &lt; 材料および方法 &gt;

## 1. ペプチドの合成

開示されたペプチドは全て、標準のFmoc(9-フルオレニルメトキシカルボニル)固相化学を用いて合成した。ペプチドは、標準アミノ酸を用いて、アミド化シーケンスまたは自由酸シーケンスとして、調製した。

## 【 0 0 2 9 】

## 2. 細菌株および培養条件

この研究の中で用いられる細菌株を、表1に示す。大腸菌UB1005、黄色ブドウ球菌SAP0017(MRSA)およびカンジダ・アルビカンス105の増殖は、特に明記しない限り、ミュラーヒントン(MH)(Difco, BD Biosciences, MD)の寒天平板およびプロス(1リットル当たり、牛肉エキス2g、カゼインの酸加水分解物17.5g、デンプン1.5g)の中で37℃にて行なった。細菌は、感受性試験を行なう前に、冷凍保存していたものを新たに作製したMH寒天平板に継代培養した(subcultured)。プロピオニバク

10

20

30

40

50



テリウム・アクネスについては、細菌の増殖を、B B L (登録商標)ブレンハートインフュージョン(Becton,Dickinson & Company,Sparks MD)プロスまたは寒天平板の中で37にて行なった。なお、前記プロス又は寒天平板は嫌気的条件であり、この条件は嫌気ジャーおよびAnaeroGen(登録商標)(Oxoid,Basingstoke,Hampshire,England)を用いて発生させた。

#### 【0030】

##### 3. 抗微生物活性の決定

各ペプチドの最小阻止濃度(M I C)を、修正C L S Iマイクロタイタープロス希釈アッセイ(Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically;Approved Standard-Ninth Edition)を用いて決定した。接種量は、 $10^5 \sim 10^6$ コロニー形成単位(C F U) / m lであり、酵母は $10^4$  C F U / m lであった。37でのインキュベーション15~20時間後に、90%を超える微生物増殖が阻害された最低ペプチド濃度をM I C値とした。プロピオニバクテリウム・アクネスについては、37の嫌気条件下でインキュベーションを2週間行なった後、M I Cを決定した。キルカインेटィクス(kill kinetics)は、微生物インジケータと混合した所定濃度(M I Cの約2~5倍)のペプチドを用いて行なった。適当に希釈した後、細胞を所定時間間隔で寒天平板上に培地し、37で一晩インキュベートした。プロピオニバクテリウム・アクネスについては、インキュベーション時間を延長する必要があった。ペプチド処理後、C F Uを計数し、細菌の生存数としてプロットした。これは、微生物を殺すためのペプチドの有効性を示す。

#### 【0031】

##### 4. 皮膚組織毒性の決定

皮膚毒性および適合性の決定を、E p i D e r m (E P I - 200)皮膚組織およびM T Tキット(M T T - 100)(MatTek,Ashland,MA)を使用し、製造者の仕様に基づいて行なった。1%トリトンX - 100をポジティブ(有毒)対照、P B Sをネガティブ(非毒性)対照として用いた。

#### 【0032】

##### 5. 遺伝子プロファイリング分析

ヒト真皮線維芽細胞における細胞外マトリックス接着分子をエンコードする84の遺伝子を、P C Rアレイ(Sunny Biodiscovery, Inc(Santa Paula,CA)により作製)を用いて分析した。ヒト真皮線維芽細胞は、Zen-Bio,Research Triangle Park,NC(カタログ# D F - F ,ロット# D F M F 112410)から得た。細胞(low passage)を、D M E M / 10% F C S (フェノールレッドなし)中で増殖させ、コンフルエント段階に到達した後、3、5もしくは $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の試験材料または水と共に、2つのウェルの中で24時間インキュベートした。細胞のインキュベーション終了後、細胞を倒立型ニコンT S顕微鏡で観察した。どの実験条件についても、細胞毒性は認められなかった。定性的評価では、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ よりも $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の試験材料の方が細胞の有糸分裂が多かったので、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の条件をR N A抽出に選択した。

#### 【0033】

インキュベーション期間が終了すると、細胞をR N A l a t e r 溶液(Ambion,Austin,TX)中に6時間保存した。R N Aの抽出と精製を、N u c l e o S p i n R N A I Iキット(Machery-Nagel,Bethleem,PA)を用いて行なった。精製した全R N Aを、アジレントH P - 8452 Aダイオードアレイ分光光度計により、230nm、260nmおよび280nmにて評価した。サンプル全体のR N Aの濃度を等しくし、目的遺伝子の発現を、B i o R a d i C y c l e r i Q検出システムによるリアルタイム定量P C Rによって測定した。前記検出システムは、P C RアレイP A H S - 013A(www.sabiosciences.com/rt\_pcr\_product/HTML/PAHS-013A.html)を使用し、第1ストランド合成キット、S Y B RグリーンマスターミックスおよびP C R運転条件は、Q i a g e n (旧SA Biosciences)に基づいた。R T 2 P r o f i l e r P C R A r r a y D a t a A n a l y s i sバージョン3.5ソフトウェアを用いて、遺伝子発現を5つのハウスキーピング遺

10

20

30

40

50

伝子に正規化した後、効率の良い C t 法を使用して結果を定量化した。

#### 【 0 0 3 4 】

##### < 結果と検討 >

K P V および K d P T トリペプチドは両方とも、インビトロおよびインビボで抗炎症活性を有することは知られていた。K P V トリペプチドはまた、リン酸塩緩衝液中で、黄色ブドウ球菌およびカンジダ・アルビカンスに対する抗微生物活性を有することが報告されている(Cutulis M. et al., Antimicrobial effects of  $\alpha$ -MSH peptides. J. Leukocyte Biol. 2000 67:233-239)。しかしながら、K P V の M I C 値については、これまで、決定も報告もされていない。また、K d P T が抗微生物作用を有するかどうかは知られていない。

#### 【 0 0 3 5 】

発明者らは、培養培地中の K P V および K - d P T の抗微生物活性の試験を、インビトロでの抗生物質および抗真菌物質の M I C 決定に用いられる標準アッセイ (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition) であって、C L S I が推奨するマイクロブロス (microbroth) 希釈アッセイを用いて行なった。驚いたことに、K P V (H B 2 0 6 7、H B 2 0 6 8) も K d P T (H B 2 0 8 9、H B 2 0 9 0) も、C 末端アミド化の有無にかかわらず、濃度 2 0 0 0  $\mu$  g / m l 以下の M H ブロス中で、検出可能な M I C を示さなかった (表 1)。なお、Rauch および共同研究者らは、K P V の増殖アッセイにおいて、抗真菌感受性実験用の標準的なラボ菌株であるカンジダ・アルビカンス株 S C 5 3 1 4 に対して、1 0 0  $\mu$  M 以下では酵母増殖を阻害しなかったことを報告しているが (Rauch I., Holzmeister S., and Kofler B. Anti-Candida activity of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSK) peptides. J. Leukoc. Biol. 2009. 85(3):371-372)、表 1 の結果はこの報告と一致する。

#### 【 0 0 3 6 】

発明者らは、抗微生物プロファイルが親トリペプチドよりも良好な又は向上した類似体を得るために、K P V および K d P T を様々な長さの脂質で改質した。トリペプチドコアのアセチル化は、驚くべき結果をもたらした。脂質の長さは重要であり、表 2 は、K P V を用いた結果を例として示している。

#### 【 0 0 3 7 】

炭素数が 1 1 ~ 1 8 の脂質は、K P V と K d P T の抗微生物活性に良好な作用を有している (表 1 および表 2)。K P V および K d P T に対する最適な脂質長さは炭素数 1 5 ~ 1 6 である (表 1 および表 2)。このような脂質は、グラム陽性菌、グラム陰性菌および酵母を含む広スペクトル (broad spectrum) の微生物に対する両ペプチドの抗微生物活性を有意に向上させる。微生物の例として、配列番号 5 (H B 2 1 7 8)、配列番号 7 (H B 2 1 8 0) 配列番号 2 4 (H B 2 2 0 0)、配列番号 1 7 (H B 2 1 9 2)、配列番号 2 3 (H B 2 1 9 9) が示される (表 1 および表 2)。実際、プロピオニバクテリウム・アクネス、黄色ブドウ球菌、大腸菌およびカンジダ・アルビカンストリペプチドに対する M I C は、1 ~ 6 4  $\mu$  g / m l であり、親トリペプチド K P V - N H 2 または K d P T - N H 2 単独では 2 0 0 0  $\mu$  g / m l 以下の濃度まで不活性であったのと比べると、ほぼ 2 0 0 0 倍の向上を示した (表 1)。脂質長さが炭素数 1 8 になると、グラム陰性選択活性は消滅するが、グラム陽性選択活性と酵母選択活性は両方とも維持される (表 1 および表 2)。発明者らはさらに、P a l - K P V - N H 2 中の第 3 アミノ酸を、A または L と置換して、配列番号 3 0 (H B 2 2 0 8) および配列番号 3 1 (H B 2 2 0 9) を得た。興味深いことに、配列番号 3 0 および配列番号 3 1 は両方とも、相当な広スペクトルの抗微生物活性を維持した。この結果では、観察された新規な抗微生物活性に対して、P a l - K P V - N H 2 中の第 3 残基 V が必要かどうかは不明である。M I C によって示されるこれら広スペクトルの活性に加えて、配列番号 5 (H B 2 1 7 8)、配列番号 7 (2 1 8 0)、配列番号 3 0 (H B 2 2 0 8) および配列番号 3 1 (H B 2 2 0 9) を含む類似体は全て、全て殺性 (cidal) であり、殺アッセイにおいて 2 0 分以内に 5 ~ 6 l o g の黄色ブドウ球菌が死滅した (表 3)。要するに、炭素数 1 2 ~ 1 8 の脂質を K P V - N H 2 または K d P T - N H 2 に付着させると、

これまで報告されていない新規な広スペクトルの抗微生物活性を有するリボトリペプチドを生成することができる。P a l - K P V - N H 2 または P a l - K d P T - N H 2 中の第 3 残基は、観察された新規な抗微生物活性に必須であるかどうかは不明である。H B 2 1 8 4、H B 2 1 8 2 等の非アミド化対応物(counterparts)は低活性又は不活性であるため、C 末端アミド化は、前記抗微生物活性にとって非常に重要である。

#### 【 0 0 3 8 】

P a l - K P V - N H 2 の第 3 残基を A および L と置換しても活性が無効にならなかったことから、発明者らはさらなる改質を行なった。発明者らは、P a l - K P V - N H 2 と P a l - K d P T - N H 2 の第 3 アミノ酸残基を除去して、リボジペプチド配列番号 2 6 (H B 2 2 0 2) および配列番号 2 7 (H B 2 2 0 3) を得た。両方の誘導体は、親リボトリペプチド P a l - K P V - N H 2 および P a l - K d P T - N H 2 と同様、新規な抗微生物活性を示した(表 1)。このような活性は予期し得ぬものであり、これまで開示されていない。殺カインेटイクスの結果から、両リボジペプチド誘導体は、等しく殺性であり、P B S 中で 2 0 分以内の直接接触により、5 l o g を超える微生物(プロピオニバクテリウム・アクネス、黄色ブドウ球菌、大腸菌および酵母カンジダ・アルビカンスを含む)が死滅した(表 3)。両方とも、1 0 % 胎仔ウシ血清の存在下で、黄色ブドウ球菌に対して有意な殺活性を維持したことから(表 3)、本明細書の中で記載するリボジペプチドが抗微生物活性を有することは明らかであった。これは特に有意義である。ペプチド抗生物質は、宿主タンパク質に対する干渉および宿主タンパク質との結合により、抗微生物活性が低下するという問題が起こることがある。皮膚の切り傷または組織変化(座瘡を含む)により、創傷部は血清の浸潤を伴うことがあることを考慮すると、血清中の抗微生物活性は、治療能力に非常に重要である。

#### 【 0 0 3 9 】

P a l - K P - N H 2 が最適な活性構造を有するように、発明者らは P と K の位置をスイッチして、H B 2 2 5 1 (P a l - P K - N H 2) と H B 2 2 5 5 (P a l - P K - O H) を生成した。P a l - P K - N H 2 は、P a l - K P - N H 2 と比較すると、8 倍を超える活性の低下を示した。非 - アミド化誘導体 P a l - P K - O H および P a l - K P - O H も不活性であったことから、C 末端アミド化が抗微生物活性に重要であることを示唆している。

#### 【 0 0 4 0 】

リボジペプチドの真皮刺激性(dermal irritancy)の能力の試験を、E p i D e r m (登録商標)スキンモデル(MatTek, Ashland, MA)と修正 M T T アッセイを用いて行なった。E p i D e r m スキンモデルは、インビボ様の形態的特性および増殖特性を示し、これらは均一で、再現性が高い。E p i D e r m は、基底層、有棘層、顆粒層および角質層が組織化されており、これらはインビボで見られる層と類似している。組織の処理を、所望濃度の各化合物で 2 0 時間行なった。表 1 に示されるように、H B 2 2 0 2、H B 2 2 0 3、H B 2 1 8 0、H B 2 2 0 8 および H B 2 2 0 9 によって表される選択されたりボペプチドは、2 0 0 0 μ g / m l 以下で組織生存能力に悪影響を示したものは無かった。

#### 【 0 0 4 1 】

新規なりボジペプチド H B 2 2 0 2 および H B 2 2 0 3 に鑑みて、発明者らはさらに改質を行ない、P a l - K P - N H 2 および P a l - K - d P - N H 2 の第 2 残基を、V、A、F、G、L、S、H、K、I、S、R、T、Y または W と置換した。表 1 に示されるように、このような改質により、広スペクトルの抗微生物活性を有するリボジペプチド(P a l - K H - N H 2、P a l - K R - N H 2、P a l - K R - O H)、またはグラム陽性により選択的な活性を有するリボジペプチド(P a l - K G - N H 2、P a l - K L - N H 2 および P a l - K I - N H 2) の如き新規なりボジペプチド群の発見に繋がった。

#### 【 0 0 4 2 】

ヒト真皮線維芽細胞に関する遺伝子プロファイリング研究のために、3 種類の代表的な化合物として、配列番号 2 6 (H B 2 2 0 2)、配列番号 4 1 (H B 2 2 4 2) および配列番号 5 5 (H B 2 2 5 9) を選択した。表 4 に示されるように、3 種類の化合物は、ヒト真皮

線維芽細胞に及ぼす影響に関して、同じ様な傾向／パターンを示した。影響を受けている遺伝子は、創傷治癒(wound healing)および抗線維症(antifibrosis)のカスケードに関係している。3種類の化合物は、インテグリンに影響を及ぼす。これは、HB2202およびHB2242がITGA2(インテグリンアルファ2)の発現を上方制御し、HB2259がITGA6(インテグリンアルファ6)を誘導することによって示される(表4)。インテグリンは、コラーゲンに結合し、細胞内でマトリックス相互作用に重要な役割を果たす。これらのタンパク質は、基底ケラチン生成細胞によって無傷の皮膚中で大量発現され、ヒト皮膚創傷の上皮再形成(reepithelialization)に必要とされる。化合物はまた、創傷治癒に關与するADAMTS(トロンボスポンジン1型を有するADAMメタロペプチダーゼ)およびTHBS3(トロンボスポンジン)の発現を調節する(表4)。動物モデル研究において、THBSヌルマウスのトロンボスポンジンを下方制御することにより、虚血後の動脈形成(arteriogenesis)、血管形成(angiogenesis)および血流の回復は、対照マウスと比較して、向上することが示されている(Kyriakides TR and MacLauchlan S. The role of thrombospondins in wound healing, ischemia, and the foreign body reaction. J Cell Commun Signal 2009.3:215-225)。また、表4を参照すると、3種類の化合物は全て、CTGF(結合組織増殖因子)およびCTNND1(カテニン)の発現を有意に下方制御することが示されている。CTGFとCTNND1は両方とも、線維増殖(fibroproliferative)活性と関連があり、発現レベルの上昇が、ケロイドおよび過形成性瘢痕(hypertrophic scars)(HTS)等の疾患に認められた(Poon R et al., Catenin driven neoplastic and reactive fibroproliferative disorders. PLoS One. 2012;7:e37940)。HTSは、創傷治癒の基本的なプロセスにおける異常を表すもので、線維芽細胞による過剰なコラーゲン産生を引き起こす。火傷、外傷および外科手術処置は、HTSを生じることがある。創傷感染もまた、抗微生物剤による感染病原体(細菌および真菌等)の除去後、皮膚にHTSが残った。リボジペプチドも、KAL1に影響を及ぼす(表4)。KAL1遺伝子によってエンコードされたタンパク質が、アトピー性皮膚炎の表皮神経密度の調節に関与していることが分かったことは特に興味深い。KAL1の過剰発現は、神経突起の増殖を阻害し、アトピー性皮膚炎の過剰神経支配(hyperinnervation)および異常な痒み知覚(itch perception)を阻害する可能性がある(Tengara S et al., Keratinocyte-derived anosmin-1, an extracellular glycoprotein encoded by the X-linked Kallmann syndrome gene, is involved in modulation of epidermal nerve density in atopic dermatitis. J Dermatol Sci 2010.58:64-71)。前述した広スペクトルの抗微生物活性に加えて、短リボペプチドは、ヒト真皮細胞を活性化し、創傷治癒および抗線維化活性を促進する。それゆえ、リボペプチドは、抗微生物性治療後の創傷回復に有益であることが結論づけられる。

10

20

30

【表 1】

表 1. K P V 類似体の抗微生物活性および皮膚組織毒性

配列 番号	HB#	配列	MIC (μg/ml)				毒性 EpiDerm (登録商標)
			大腸菌	黄色ブドウ 球菌	カンジダ・ アルビカン ス	プロピオニバ クテリウム・ アクネス	
1	HB2067	KPV-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
2	HB2068	KPV-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
3	HB2089	K-dPT-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
4	HB2090	K-dPT-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
5	HB2178	Pal-K-dPT-NH2	64	4	16	2	>2000
6	HB2179	Dec-K-dPT-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
7	HB2180	Pal-KPV-NH2	128	8	16	1-2	>2000
8	HB2181	Dec-KPV-NH2	>2000	>2000	>2000	1000	ND
9	HB2182	Pal-KdPT-OH	>2000	>2000	>2000	32	ND
10	HB2183	Dec-KdPT-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
11	HB2184	Pal-KPV-OH	>2000	>2000	>2000	8	ND
12	HB2185	Dec-KPV-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
13	HB2188	オクタノイル-KPV-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
14	HB2189	ウンデシル-KPV-NH2	2000	1000	>2000	256- 500	ND
15	HB2190	ラウリル-KPV-NH2	250	250	>2000	64	ND
16	HB2191	ミリスチル-KPV-NH2	500	250	250	16	ND
17	HB2192	ペンタデカノイル- KPV-NH2	64	16	32	1	ND
18	HB2194	ステアリル-KPV-NH2	>2000	16	16	1-2	ND
19	HB2195	オクタノイル-KdPT-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
20	HB2196	ウンデシル-KdPT-NH2	2000	1000	1000	256- 500	ND
21	HB2197	ラウリル-KdPT-NH2	1000	500	500	128	ND
22	HB2198	ミリスチル-KdPT-NH2	128	64	64	8-16	ND
23	HB2199	ペンタデカノイル- KdPT-NH2	64	32	32	2-4	ND
24	HB2200	Pal-K-dPT-NH2	64	4	16	2	ND
25	HB2201	ステアリル-K-dPT-NH2	128	16	8	1-2	ND
26	HB2202	Pal-KP-NH2	64	16	16	1	>2000
27	HB2203	Pal-K-dP-NH2	128	8	16	1-2	>2000
28	HB2205	Pal-PV-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
29	HB2207	Pal-dPS-NH2	>2000	>2000	>2000	32	ND
30	HB2208	Pal-KPA-NH2	128	16	16	1	>2000
31	HB2209	Pal-KPL-NH2	>2000	16	32	4-8	>2000
32	HB2230	KP-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
33	HB2231	K-dP-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
34	HB2236	Pal-KT-NH2	>2000	>2000	>2000	256-1000	ND
35	HB2237	Pal-K-dT-NH2	>2000	>2000	>2000	128-256	ND
36	HB2238	Pal-KK-NH2	2	4	16	ND	ND
37	HB2239	Pal-KV-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
38	HB2240	Pal-KA-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
40	HB2241	Pal-KF-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
41	HB2242	Pal-KH-NH2	16	4	16	1-2	ND
42	HB2243	Pal-KG-NH2	>2000	250	>2000	32-64	ND
43	HB2244	Pal-KL-NH2	>2000	250	>2000	8	ND
44	HB2245	Pal-KS-NH2	>2000	1000	>2000	128	ND
45	HB2246	Pal-KI-NH2	>2000	128	>2000	>2000	ND
46	HB2247	Pal-KY-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
47	HB2248	Pal-KW-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
48	HB2251	Pal-PK-NH2	2000	128	128	4-16	ND
49	HB2252	Pal-KD-NH2	>2000	>2000	>2000	ND	ND
50	HB2253	Pal-KR-OH	500	16	32	2-4	ND
51	HB2255	Pal-PK-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
52	HB2256	Pal-K-dP-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
53	HB2257	Pal-KP-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
54	HB2258	Pal-KK-OH	32	16	64	1-4	ND
55	HB2259	Pal-KR-NH2	8	2	16	<1	ND

10

20

30

40

【表 2】

表 2. KPV-NH<sub>2</sub> の抗微生物活性に及ぼす脂質長さの影響

配列 番号	HB#	配列	脂質 長さ	MIC (μg/ml)		
				大腸菌	黄色ブドウ球菌	カンジダ・ アルビカンス
13	HB2188	オクタノイル-KPV-NH <sub>2</sub>	8C	>2000	>2000	>2000
8	HB2181	Dec-KPV-NH <sub>2</sub>	10C	>2000	>2000	>2000
14	HB2189	ウンデシル-KPV-NH <sub>2</sub>	11C	2000	1000	>2000
15	HB2190	ラウリル-KPV-NH <sub>2</sub>	12C	250	250	>2000
16	HB2191	ミリスチル-KPV-NH <sub>2</sub>	14C	500	250	250
17	HB2192	ペンタデカノイル-KPV-NH <sub>2</sub>	15C	64	16	32
5	HB2178	パルミトイル-KPV-NH <sub>2</sub>	16C	128	8	16
18	HB2194	ステアリル-KPV-NH <sub>2</sub>	18C	>2000	16	16

【表 3】

表 3. 選択した K P V 類似体の殺カインेटクス

殺カインेटクス（時間経過における微生物の生存数を示す）(CFU/ml) (検出限界10 CFU/ml)						
配列番号	HB#	PBS中の黄色ブドウ球菌SAP0017 (MRSA)				
		0hr	20min	1hr	2hr	3hr
-	PBS	23050000	23050000	23050000	23050000	23050000
2	HB2068	23050000	23050000	23050000	23050000	23050000
3	HB2089	23050000	23050000	23050000	23050000	23050000
5	HB2178	23050000	<10	<10	<10	<10
7	HB2180	23050000	<10	<10	<10	<10
26	HB2202	23050000	<10	<10	<10	<10
27	HB2203	23050000	<10	<10	<10	<10
30	HB2208	23050000	<10	<10	<10	<10
31	HB2209	23050000	<10	<10	<10	<10
配列番号	HB#	PBS中のプロピオニバクテリウム・アクネスATCC11827				
		0hr	20min	1hr	2hr	3hr
-	PBS	750000	750000	750000	750000	750000
2	HB2068	750000	750000	750000	750000	750000
3	HB2089	750000	750000	750000	750000	750000
5	HB2178	750000	20	<10	<10	<10
7	HB2180	750000	<10	<10	<10	<10
26	HB2202	750000	<10	<10	<10	<10
27	HB2203	750000	<10	<10	<10	<10
30	HB2208	750000	<10	<10	<10	<10
31	HB2209	750000	<10	<10	<10	<10
配列番号	HB#	PBS中のカンジダ・アルビカンズ105				
		0hr	20min	1hr	2hr	3hr
-	PBS	1300000	1300000	1300000	1300000	1300000
2	HB2068	1300000	1300000	1300000	1300000	1300000
3	HB2089	1300000	1300000	1300000	1300000	1300000
26	HB2202	1300000	3000	150	<10	<10
27	HB2203	1300000	2980	160	30	<10
配列番号	HB#	10%胎仔ウシ血清中の黄色ブドウ球菌SAP0017 (MRSA)				
		0hr	2hr	3hr	5hr	6hr
-	10% PBS中の 10%血清	30900000	30900000	30900000	30900000	30900000
2	HB2068	30900000	30900000	30900000	30900000	30900000
3	HB2089	30900000	30900000	30900000	30900000	30900000
26	HB2202	30900000	4850	1250	110	50
27	HB2203	30900000	1927000	142500	68560	34280

【表 4】

表 4. ヒト真皮線維芽細胞に関する遺伝子プロファイリング研究

記号	遺伝子名	倍率変化(ペプチド対PBS対照) 上方制御(+)または下方制御(-)		
		HB2202	HB2242	HB2259
ADAMTS	トロンボスポンジン I 型を有する ADAMメタロペプチダーゼ	3.8106	4.7899	2.4284
CDH1	カドヘリン I 型、E-カドヘリン	1.3566	1.9725	1.0718
COL1A1	コラーゲン 1 型アルファ 1	-1.0867	1.1975	-1.8661
COL8A1	コラーゲン V I I I 型アルファ 1	1.4948	-1.4044	-2.5847
CTGF	結合組織増殖因子	-2.9485	-1.8921	-3.0314
CTNND1	カテニン(カドヘリン関連タンパク質)、デルタ 1	-2.395	-2.0279	-1.1487
HAS1	ヒアルロナンシンターゼ 1	-2.395	-2.3295	-3.0314
ITGA2	インテグリンアルファ 2	2.2038	2.114	1.3195
ITGA6	インテグリンアルファ 6	1.2658	-1.014	2.1435
ITGA7	インテグリンアルファ 7	-1.815	-2.0279	-1.8661
ITGB2	インテグリンベータ 2	2.2038	1.3947	2.1435
KAL1	カルマン症候群 1 配列	3.5801	1.8404	1.2311
MMP1	マトリックスメタロペプチダーゼ 1	2.362	1.7171	1.1487
MMP8	マトリックスメタロペプチダーゼ 8	2.362	-1.6472	2.1435
MMP9	マトリックスメタロペプチダーゼ 9	-1.2834	-1.6472	-2.1435
MMP10	マトリックスメタロペプチダーゼ 10	2.9079	1.2142	1.6245
MMP13	マトリックスメタロペプチダーゼ 13	1.0281	-2.4967	-3.249
MMP14	マトリックスメタロペプチダーゼ 14	-1.0425	1.2142	-2.4623
SELE	E-セレクチン	2.0562	1.3947	1.0718
THBS3	トロンボスポンジン	-1.9453	-3.0738	-1.6245

## 【0043】

以下の例は、本発明の幾つかの好ましい実施形態を示すためのものである。

## 【0044】

MRSAのような多薬剤耐性の病原体の頻度(frequency)が増加することによって悪化する創傷感染は、深刻な問題である。本発明は、細菌が関与する皮膚症状(座瘡、アトピー性皮膚炎、酒さを含む)または真菌が関与する皮膚症状(頭垢および水虫を含む)を、治療的又は美容上の処置、改善および予防に用いられることができる。

## 【0045】

黄色ブドウ球菌は、院内感染症の主な原因であり、血流、皮膚および軟組織、人工呼吸器肺炎(ventilator-assisted pneumonia)、カテーテルと最も頻繁に関連する。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を原因とする感染の頻度の増加が特に懸念されており、特に米国では、集中治療ユニットにおける罹患率が55%を超え、発症による入院期間が長く、費用が高み、死の危険性が高くなる。市中型感染(Community-acquired)のMRSA(CA-MRSA)は、HA-MRSAとは遺伝子型が異なるが、これもまた、従来のリスク因子をもたない患者の間で脅威として確立されている。黄色ブドウ球菌に加えて、グラム陽性菌の化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)は、厄介な皮膚・皮膚組織感染症(ski



n and skin structure infections)(S S T I)の主な原因である。本発明は、M R S A 関連感染症を予防および治療できるようにするものである。

【 0 0 4 6 】

尋常性座瘡(acne vulgaris)は、一般的なヒト皮膚疾患であり、その特徴は、皮膚の領域に、脂漏、面皰、丘疹、膿疱、ノジュール及び瘢痕を伴うことである。座瘡によって影響を受ける領域は、例えば、顔、胸の上部および背中である。重篤な座瘡は炎症性であるが、座瘡は非炎症性の形態で現れることもある。プロピオニバクテリウム・アクネス細菌は、炎症を引き起こして、真皮の微小面皰(microcomedo)または面皰周囲に炎症性病斑を生じることがある。これは、発赤を生じ、瘢痕または色素沈着過剰(hyperpigmentation)を生じることがある。抗微生物性短リボペプチドは、斑点制御に用いられることができ、その使用は、ペン、泡、ワイプ、クリーム、ローション、スプレー、トナーおよび/またはクレンザーの形態を挙げられるが、これらに限定されない。なお、本発明は、サリチル酸またはレチノイドと組み合わせて使用することもできるが、組合せはこれらに限定されない。

10

【 0 0 4 7 】

毛包炎(folliculitis)という用語は、皮膚のどこにもある1または複数の毛包のあらゆる炎症を説明するために用いられ、特にアフリカ系米国人の男性に顕著なレイザーバンプおよび頭皮毛包炎(scalp folliculitis)等の偽須毛包炎(pseudofolliculitis barbae)を含む。毛包炎は、毛包の感染症である。軽度の症状では痒みを生じる程度であるが、重篤な症状では深い瘢痕を生じることがある。毛包炎は、細菌が毛包の小さな開口を通して皮膚に入ることによって引き起こされる。毛包炎は多くの場合、損傷を受けた小包が、ブドウ球菌属(*Staphylococcus*)細菌に感染する。床屋痒み症(barber's itch)は、顔の顎ひげ部、通常は上唇における毛包のブドウ球菌(staph)感染である。白癬性毛瘡(*Tinea barbae*)は床屋痒み症と同様であるが、感染は真菌によって引き起こされる。この皮膚症状の予防には、抗菌石けんおよび頭皮毛包炎用シャンプーの使用等が有効であるかもしれない。また、ヒドロコルチゾン、抗生物質またはトレチノインクリームが、カミソリ負けによって生じる炎症および腫れ物(pimples)を治療するために用いられている。本明細書の中に記載される広スペクトル抗微生物性リボペプチドは、首、股間、性器において、小包の損傷、小包の閉塞、ひげ剃りによって生じる疾患、または衣服やヘルメットのストラップ等の摩擦によって生じる障害の処理に対して理想的であろう。

20

30

【 0 0 4 8 】

頭のふけ(dandruff)は、頭皮の痒みや皮膚剥離に特徴がある、日常的な慢性的頭皮症状である。マラセジア種(*Malassezia species*)は、ヒトの頭のふけ、癬風、脂漏性皮膚炎、乾癬、アトピー性皮膚炎等のように一般的な皮膚疾患の原因となる広く知られた酵母である。頭部白癬(髪の毛の白癬または頭皮白癬としても知られている)は、頭皮の表層性真菌感染症である。疾患は、主として、毛幹に侵入する白癬菌属(*Trichophyton*)およびミクロスポルム属(*Microsporum genera*)の皮膚糸状菌(dermatophytes)によって引き起こされる。白癬菌属感染症の症例は、中央アメリカから米国、および西ヨーロッパの一部で多く見られる。疾患は感染性であり、真菌を保有するヒト、動物または物を媒介として感染する。真菌が頭皮上に存在するが臨床的兆候または病徴のないキャリア状態も存在する。水虫(足部白癬または足白癬としても知られている)もまた、足の皮膚の真菌感染症であり、感染部にかさぶた(scaling)、剥離、痒みを生じる。水虫は、白癬菌属種によって起こる。細菌の二次感染により、真菌感染を伴うこともある。抗真菌物質(テルビナフィン、イトラコナゾールおよびフルコナゾール等)が、治療用として承認された。本明細書において、細菌および真菌に対して広スペクトルの活性を有するリボジペプチドを開示するが、該リボジペプチドは、記載した症状の予防および回復のための局所治療用として適用されることができる。

40

【 0 0 4 9 】

アトピー性皮膚炎(A D)は、炎症性、慢性的な再発性、非伝染性及び掻痒性の皮膚疾患であり、子供の15 ~ 30%、成人の2 ~ 10%がこの皮膚疾患を有している。湿疹また

50

はアトピー性湿疹とも呼ばれるアトピー性皮膚炎は、赤ちゃんおよび子供に最も多く見られる。アトピー性皮膚炎の特徴は、痒み、湿疹性病斑、乾燥症(乾燥皮膚)および苔癬化(皮膚の肥厚および皮膚紋理の増大)である。ADの皮膚に見られる最も一般的な細菌は、黄色ブドウ球菌である。実際、AD患者の90%超が、損傷性および非損傷性の皮膚の上に黄色ブドウ球菌のコロニーが形成されているのに対し、健康な皮膚の上では5%である。ADの皮膚は、表皮のバリア機能の欠陥の他、表皮の先天的な免疫系の欠如を示したが、これは、抗微生物性ペプチドの発現減少によって示唆される。本明細書中に、抗微生物活性及び抗炎症性を有するリポペプチドを開示するが、これは、AD治療用としても有効である。

#### 【0050】

10

口臭(悪臭呼気としても知られている)という語は、呼吸の際に発散される著しく不快な臭気を説明するために用いられる。口臭は、歯科医療が求められる症状としては、虫歯、歯周病に続く第3番目のものである。悪臭呼気および歯肉疾患は、グラム陰性菌(例えば、*Porphyromonas gingivalis*、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Bacteroides* sp.)によって引き起こされる。細菌はまた、口腔の上皮内層の重篤な炎症を引き起こす。抗炎症活性を有する選択的な抗グラム陰性ペプチドは、健全な口腔ケアを維持するのに理想的であると考えられる。

#### 【0051】

トリクロサンは、抗菌性、抗真菌性および抗ウイルス性を有する塩素化芳香族化合物である。トリクロサンは、石けん、マウスウォッシュ、食器洗剤、歯磨剤、デオドラントおよび手の消毒剤を含む様々な家庭用品に用いられている。トリクロサンが水道水中の塩素と結合してクロロホルムを生成するという報告があり、米国環境保護局では、ヒト発癌性の虞れがある物質として分類しており、これは癌の原因になるかもしれないことを意味している。本明細書中に開示した抗微生物性リポジペプチドには、トリクロサンを、発癌リスクのない抗菌および抗真菌性質に置き換えることができる大きな潜在能力がある。

20

#### 【0052】

同じ様に、体臭についても、*Corynebacterium*属の働きによる影響を受ける。なお、前記の抗微生物特性は、腋下または足の防臭剤として、化粧用粉末、ゲル、半固体、クリームまたは他の態様に組み込まれることができる。

#### 【0053】

30

細菌性膣炎(BV)は、膣炎として知られる膣感染の中で最も一般的な原因である。通常は、「性行為によって媒介される感染症」とは考えられていない。細菌性膣炎は、女性の20%~70%に影響を及ぼす。強い臭気と異常な膣分泌物が、最も一般的な症状であるが、他に、痒みや熱くなるような感覚がある。膣カンジダ症は、カンジダとして知られている酵母または真菌の過剰増殖を伴う膣の感染症である。この酵母は、多くの他の有機体と同じように、通常は、口、腸および膣の中に存在している。微生物のバランスが、広スペクトル抗生物質の摂取、ホルモン変動その他の条件により崩れると、酵母の過剰増殖が起こることがある。膣カンジダ症は、「酵母感染症」とも呼ばれ、およそ75%の成人女性がその生涯で経験すると言われている。また、膣の炎症と関連するものとして、*C.glabrata*及び*C.tropicalis*等のカンジダ・アルビカンス以外のカンジダ属、ヘルペス及びB群ストレプトコッカスがある。また、日和見病原体に対する保護バリアとして作用する天然共生生物である乳酸桿菌属(*Lactobacillus* spp)が無くなると、状態が変動したり、悪化することがある。それゆえ、本明細書中に開示する抗微生物性ペプチドの使用は、潤滑剤に限定されるものではなく、例えば、女性用衛生製品においても有効であると考えられる。

40

#### 【0054】

化粧品製造業者は、細菌を殺して製品の保存期間を拡大するために、化学保存料を化粧品やローションに添加する。しかしながら、保存料によっては発疹その他のアレルギー反応を引き起こすことがあり、また、これら保存料の中には、癌その他の健康問題に関係するという研究もある。メチルパラベン、ブチルパラベン、エチルパラベン等の合成パラベ

50

ン保存料は、化粧品、皮膚ローションおよび防臭剤の70パーセント以上に用いられている。パラベン保存料は、エストロゲンと同様の効果を有する。これら化学物質は強力であるため、たとえ少量でも、体内にあるホルモン系のバランスを損なうことがある。エストロゲンのアンバランスが人工的に誘発されると、女性の乳癌や若少年のテストステロン欠損に関係する。また、化粧品産業では、保存料としてホルムアルデヒドを用いる。化粧品への添加量が少量であったとしても、ホルムアルデヒドは、化学物質に感受性の人にアレルギー反応を引き起こすことがある。前述の広スペクトル抗微生物性リポジペプチドはコスト効率が良いため、化粧品産業における保存料として、有害化学物質に取って代わることができるであろう。

#### 【0055】

上述の治療方法においてペプチドを送達するために用いられる組成物として、例えば、エアロゾル、エマルジョン、液体、ローション、クリーム、ペースト、軟膏、粉末、フォームや、その他医薬的に許容可能な調製物が挙げられる。また、ペプチドは、関与性の少ない調製物(脱イオン水/蒸留水、PBSまたは標準的な医学的食塩溶液等)を用いて送達されることができる。一般的に、医薬的に許容可能な調製物として、ヒトの皮膚での使用に適したあらゆるキャリアを挙げることができる。そのような医薬的に許容可能なキャリアとして、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、シリカ、アルミナ、デンプンの他、同等のキャリアおよび希釈剤が挙げられる。調製物は、所望により、美容効果をもたらすこともできるし、本発明ペプチドの治療行為の補助剤(adjuvants)として作用することができるレチノイドその他ペプチドのような他の製剤を含むことができる。調製物には、感染を防止するために抗生物質を添加することができ、これにより、最大の治療効果を得ることができる。組成物中のペプチドの濃度は、例えば、約 $0.1 \mu\text{g/mL}$  ~ 約 $50 \mu\text{g/mL}$ 、または約 $0.1 \mu\text{g/mL}$  ~ 約10w/v%であるが、この濃度は、創傷/組織の状態、本発明ペプチドの生物活性、および組成物の吸収向上を得るための補助剤または技術の使用によっては、これらの範囲外であってもよい。

#### 【0056】

本発明の組成物は、皮膚ケア活性を発揮する1または複数種の追加剤を含有することもできる。

#### 【0057】

本発明の好ましい実施形態において、組成物がヒトのケラチン組織と接触する場合、本発明のペプチドに添加されるあらゆる成分は、ケラチン組織への適用に適したものであらねばならない。すなわち、組成物中に組み込まれるそのような他の成分は、妥当な医学的判断の範囲内で、限度を超える毒性、不適合性、不安定性、アレルギー反応等を示す。皮膚ケア産業において一般的に用いられる様々な化粧品成分および医薬品成分が、CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Second Edition(1992)に例示されており、これらは、本発明の組成物における使用に適している。これら成分類の例として、研磨材、吸収剤、美容成分(香料、顔料、着色剤/染料、エッセンシャル油、皮膚感覚剤(skin sensate)、アストリンゼン等)があり、具体的には、丁字油、メントール、カンファー、ユーカリ油、オイゲノール、乳酸メンチル、ハマメリス蒸留液(witch hazel distillate)、抗座瘡剤、固化防止剤、消泡剤、抗微生物剤(例えば、ヨードプロピルブチルカルバメート)、抗酸化剤、粘結剤、生物学的添加剤、緩衝剤、充填剤、キレート化剤、化学添加剤、化粧品用殺生剤、変性剤、薬剤アストリンゼン、外部鎮痛剤、フィルム形成剤または材料、不透明化剤、pH調整剤、プロペラント、還元剤、隔離剤、皮膚漂白および美白剤(例えば、ヒドロキノン、麝酸、アスコルビン酸、リン酸アスコルビルマグネシウム、アスコルビルグルコサミン)、皮膚-コンディショニング剤(例えば、湿潤剤)、皮膚鎮静および/または治療剤(例えば、パンテノールおよびその誘導体、アロエベラ、パントテン酸およびその誘導体、アラントイン、ピサボロール、グリチルリチン酸二カリウム)、皮膚治療剤、増粘剤、ビタミンおよびその誘導体などを挙げることができる。

#### 【0058】

本発明のペプチドおよび関連する組成物は、ヒトおよび動物(全ての哺乳類を含む)に投

10

20

30

40

50

与されることができる。また、適用に際しては、組織移植片、組織培養産物、酸素および包帯材等の典型のおよび／または実験的材料と一緒に使用されることもできる。

一般的に使用される包帯材(dressings)の例は次の表に示される。

【表C】

創傷包帯材のカテゴリ	製品
フィルム	Bioclusive(登録商標) (Johson & Johson Medical, Inc)
	Omiderm(登録商標) (omicron Scientific Ltd.)
	Opsite(登録商標) (Smith & Nephew United, Inc)
	Polyskin(登録商標)II透明包帯材 (Kendall Healthcare)
	Tegaderm(登録商標) (3M Health Care)
ヒドロゲル	Intrasite(登録商標) (Smith & Nephew United, Inc)
	Nu-Gel(登録商標) (Johnson & Johnson Medical, Inc.)
	Vigilon(登録商標) (Bard Medical Division)
親水コロイド	Comfeel(登録商標) (Coloplast Sween Corp.)
	DuoDerm(登録商標) (ConvaTec(登録商標))
	Restore(登録商標) (Hollister Incorporated)
多糖類	Bard Absorption Dressing(登録商標) (Bard Medical Division)
	Debrisan (Johnson & Johnson Medical, Inc.)
	DuoDerm(登録商標)顆粒 (ConvaTec(登録商標))
アルギネート	Kaltostat(登録商標) ConvaTec(登録商標)
	Sorbsan(登録商標) (Dow Hickam Pharmaceuticals Inc)
フォーム包帯材	Allevyn(登録商標) (Smith & Nephew United, Inc)
	Lyof foam(登録商標) (Acme United Corporation)
ラミネート	Biobrane(登録商標) (Dow Hickam Pharmaceuticals Inc)

【0059】

一般的に、組成物の投与は、局所的、経口的、経皮的、全身的、または本発明のペプチドを外傷部位に送達するのに有用であることが当業者に知られているあらゆる方法によって行なうことができる。組成物はまた、インビトロまたはエキスピボにて、例えば、培養において増殖する細胞または患者移植片に適用されることができる。

【0060】

サイズが小さいため、ペプチド自体がある程度の皮膚透過性を有するものと考えられるが、移動を促進する何らかの技術を用いることもできる。例えば、ペプチドの角質層への接近性を高めて、下側表皮層への移動ができるように、ペプチドには、親油性(無極性)基を添加したり、親油性賦形剤に入れて皮膚に送達することもできる。それゆえ、このような親油性改質剤は、プロドラッグと考えることができる。また、ペプチド吸収を向上させ

るために、既知の溶媒や界面活性剤のような浸透向上剤を用いることができる。ペプチドが標的組織 / 外傷へ接近し易くするのに有用と考えられる特別な技術として、イオン泳動 (iontophoresis)、電気泳動および超音波がある。イオン泳動デバイスは、2本の電極から構成され、電極は、電解質溶液中に浸漬され、皮膚上に配置される。電流が電極間に印加されると、電場が角質層の全体に生じて、ペプチドの送達を駆動する。エレクトロポレーションは、高電圧の電気パルスを用いることにより、脂質二重層を通る浸透を増大させるものである。エレクトロポレーションは、イオン泳動とは、電流の印加時間及び強度において異なる(イオン泳動は、比較的一定の低電圧電場を用いる)。エレクトロポレーションの高電圧電気パルスが、脂質薄層膜中の親水性ポアの可逆的生成を誘導して、大きな浸透増進を達成することができると考えられる。超音波は、16 kHz を越える周波数の音波が皮膚に作用するので、音波が移動する組織を圧縮および拡張する。圧力変化が生じることにより、多くのプロセス(例えば、キャビテーション、混合、温度の上昇)においてペプチドの浸透を高めることができる。

10

**【0061】**

上記したペプチドの調製および使用は全て、当該分野において広く知られている。本発明のペプチドの調製及び使用については、例えば、米国特許第6,492,326号および米国特許第6,974,799号にも記載されており、これらは両方とも引用を以てその全体が本明細書に組み込まれるものとする。

**【0062】**

本明細書中に開示され、特許請求の範囲に記載された組成物または方法は全て、本開示を参照することにより、過度の実験をすることなく、製造し実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態に関して説明したが、当業者であれば、発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、組成物および / または方法について、また、方法のステップまたはステップの順序において変形をなし得ることができるであろう。具体的には、本明細書中に記載した製剤に代えて、化学的かつ生理的に関連性のある製剤を用いることにより、同一または同様な結果を達成できることは明らかであろう。当業者にとって自明なこれらの置換および改質は全て、本発明の範囲内であると考えられる。

20

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	1 0 1
A 6 1 P	15/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 K	8/64	(2006.01)	A 6 1 P	15/02	
A 6 1 Q	5/02	(2006.01)	A 6 1 K	8/64	
A 6 1 Q	19/00	(2006.01)	A 6 1 Q	5/02	
A 6 1 Q	11/00	(2006.01)	A 6 1 Q	19/00	
C 0 7 K	5/08	(2006.01)	A 6 1 Q	11/00	
C 0 7 K	5/06	(2006.01)	C 0 7 K	5/08	
			C 0 7 K	5/06	

(72)発明者 カーマイケル，ロビン  
 アメリカ合衆国 9 8 0 2 1 ワシントン，ボセル，トゥーハンドレッドサーティーエイス ピー  
 エル エスイー 4 1 2 9 # 5 4 シー

審査官 岩下 直人

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 1 6 0 2 1 3 ( U S , A 1 )  
 米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 3 1 2 8 4 ( U S , A 1 )  
 特表 2 0 0 7 - 5 3 7 2 1 3 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 8 / 0 5  
 A 6 1 K 8 / 6 4  
 A 6 1 P 1 5 / 0 2  
 A 6 1 P 1 7 / 0 0  
 A 6 1 P 1 7 / 0 2  
 A 6 1 P 3 1 / 0 4  
 A 6 1 P 3 1 / 1 0  
 A 6 1 P 3 7 / 0 8  
 A 6 1 Q 5 / 0 2  
 A 6 1 Q 1 1 / 0 0  
 A 6 1 Q 1 9 / 0 0  
 C 0 7 K 5 / 0 6  
 C 0 7 K 5 / 0 8  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )