

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5753077号
(P5753077)

(45) 発行日 平成27年7月22日 (2015. 7. 22)

(24) 登録日 平成27年5月29日 (2015. 5. 29)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/47 (2006. 01)

C O 7 K 14/47 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 20 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-506235 (P2011-506235)
 (86) (22) 出願日 平成21年4月21日 (2009. 4. 21)
 (65) 公表番号 特表2011-521902 (P2011-521902A)
 (43) 公表日 平成23年7月28日 (2011. 7. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/SG2009/000144
 (87) 国際公開番号 W02009/131548
 (87) 国際公開日 平成21年10月29日 (2009. 10. 29)
 審査請求日 平成24年1月26日 (2012. 1. 26)
 (31) 優先権主張番号 61/046, 584
 (32) 優先日 平成20年4月21日 (2008. 4. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 508320723
 シンガポール ヘルス サービスズ ピ
 ーティーイー リミテッド
 シンガポール国, 1 6 8 7 5 3 シンガポ
 ール, サード ホスピタル アベニュー
 3 1, ボウヤー ブロック シー ナンバ
 ー 0 3 - 0 3
 (73) 特許権者 508320734
 エイジェンシー フォー サイエンス, テ
 クノロジー アンド リサーチ
 シンガポール国, 1 3 8 6 3 2 シンガポ
 ール, フュージョノポリス ウェイ 1,
 コネクシス ナンバー 2 0 - 1 0
 (74) 代理人 100077012
 弁理士 岩谷 龍

最終頁に続く

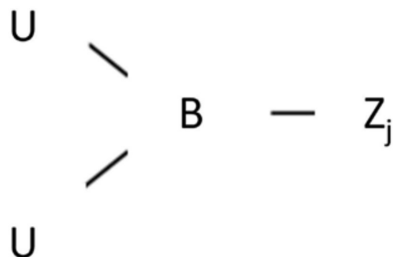
(54) 【発明の名称】 抗菌ペプチド多量体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

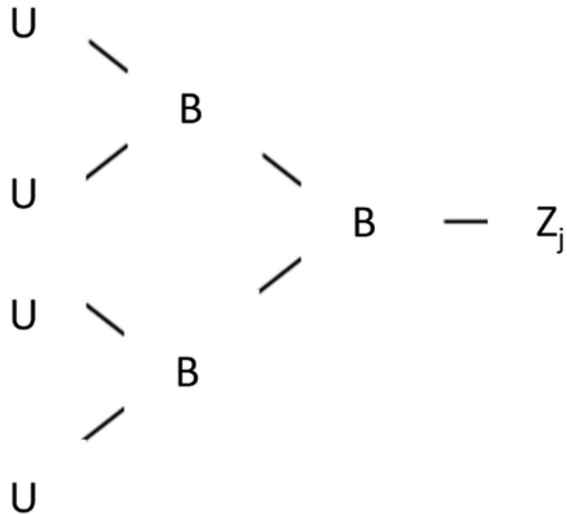
下記構造式であり、式 $(U)_n B_m Z_j$ (式中、Uは、それぞれ独立して、配列番号 3 6 ~ 4 4 から選ばれるペプチドであり、Bは、それぞれ独立して、アミン基を少なくとも 2 つ有するアミノ酸であり、Zは任意のアミノ酸であり、 n は 2 または 4 であり、 m は $n - 1$ であり、 j は 0 以上である) で表される、ディフェンシンペプチドの単離多量体。

【化 1】



または

【化 2】



10

【請求項 2】

$j = 1$ である請求項 1 に記載の単離多量体。

【請求項 3】

B が、それぞれ独立して、リジン、オルニチンおよびアルギニンから選択されるアミノ酸であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の単離多量体。

20

【請求項 4】

B が、リジンである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の単離多量体。

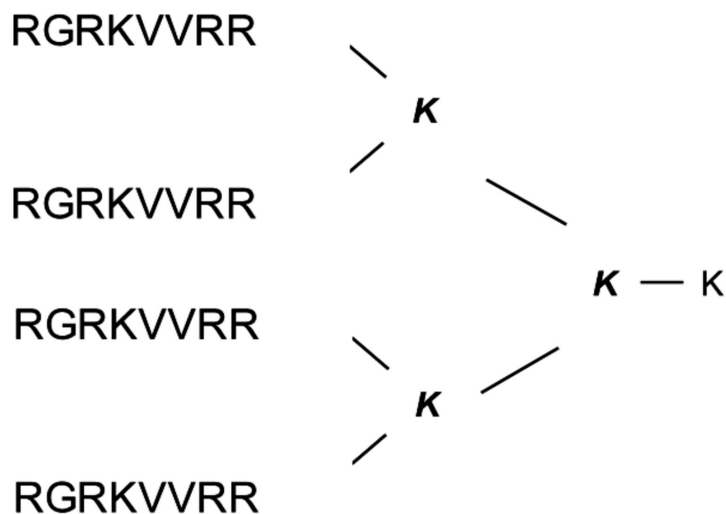
【請求項 5】

$j = 1$ かつ $B = Z = K$ であり、前記多量体が式 $(U)_n K_{n-1} K$ を有し、U が配列番号 36 ~ 44 のいずれかである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の単離多量体。

【請求項 6】

前記多量体が、下記構造式

【化 3】



30

40

で表されることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離多量体。

【請求項 7】

- (i) 少なくとも 1 つの固相を準備する工程；
- (ii) 固相に少なくとも 1 つの 1 番目のアミノ酸 Z を結合させる工程；
- (iii) 固相に結合させた Z に、保護基を有するアミノ酸残基 B を少なくとも 1 つ連結する工程；

50

(iv) 連結させたアミノ酸残基 B から保護基を除去する工程；
 (v) ペプチド U の配列に従って、保護基を有するアミノ酸残基を C 末端から N 末端の方向へ順に連結し、連結の都度、次の連結のために保護基を除去することによって、さらなる鎖の伸長を行う工程；
 (vi) 加える残基の数に応じて、アミノ酸残基の連結を終了する工程；および
 (vii) 必要に応じて、得られた多量体を固相から遊離させる工程
 を含む請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の式 $(U)_n B_m Z_j$ で表される多量体の製造方法（なお、 $j = 1$ 、U、B 及び Z は請求項 1 と同義である）。

【請求項 8】

前記工程 (iv) の後に、

10

(iv) (a) 連結させた残基 B に、保護基を有する残基 B をさらに連結する工程；
 (iv) (b) (iv) (a) で連結させた残基 B から保護基を除去する工程；および
 (iv) (c) 工程 (iv) (a) および (iv) (b) を繰り返し行う工程、または
 (iv) (d) 工程 (v) および (vi) に進む工程
 をさらに含む請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

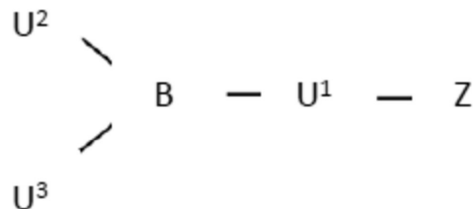
B がそれぞれ、リジン、アルギニンまたはオルニチンを包含する請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

下記構造式であり、式 $U^3 U^2 B U^1 Z$ （式中、 U^1 、 U^2 および U^3 は、それぞれ独立して、配列番号 36 ～ 44 から選ばれ、B は、アミン基を少なくとも 2 つ有するアミノ酸であり、Z は任意のアミノ酸である）で表される単離ペプチドトリマー。

20

【化 4】



30

【請求項 11】

B が、リジン、オルニチンまたはアルギニンであることを特徴とする請求項 10 に記載の単離ペプチドトリマー。

【請求項 12】

B および / または Z がリジンであることを特徴とする請求項 10 または 11 に記載の単離ペプチドトリマー。

【請求項 13】

$(RGRKVVRVRV)(RGRKVVR)K(RRVVKRGR)K$ または $(RGRKVVR)_2K(RRVVKRGR)K$ で表されることを特徴とする請求項 10、11 または 12 に記載の単離ペプチドトリマー。

40

【請求項 14】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体または請求項 10 ～ 13 のいずれか 1 項に記載のペプチドトリマーを含む、コンタクトレンズ用液剤および / もしくは点眼用液剤、医薬組成物および / もしくは抗菌組成物、ならびに / または器具をコーティングするための組成物。

【請求項 15】

抗菌組成物の製造のための請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体または請求項 10 ～ 13 のいずれか 1 項に記載のペプチドトリマーの使用。

【請求項 16】

前記抗菌組成物が、対象における少なくとも 1 種の微生物の増殖を阻害および / または

50

抑制するために用いられる請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 1 7】

微生物感染症の治療薬を製造するための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体または請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドトリマーの使用。

【請求項 1 8】

点眼用の組成物および / もしくは液剤ならびに / またはコンタクトレンズ用液剤の製造のための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体または請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドトリマーの使用。

【請求項 1 9】

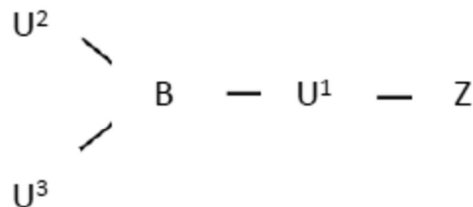
器具をコーティングするための組成物を製造するための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体または請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドトリマーの使用。

【請求項 2 0】

下記構造式であり、式 $U^3 U^2 B U^1 Z$ (式中、 U^1 、 U^2 および U^3 は、それぞれ独立して、配列番号 3 6 ~ 4 4 から選ばれ、B は、アミン基を少なくとも 2 つ有するアミノ酸であり、Z は任意のアミノ酸) で表されるペプチドトリマーを製造する方法であって、

- (i) 少なくとも 1 つの固相を準備する工程；
- (ii) 固相に少なくとも 1 つの 1 番目のアミノ酸 Z を結合させる工程；
- (iii) Z から、ペプチド U^1 の鎖を伸長させる工程；
- (iv) ペプチド U^1 のアミノ酸に、保護基を有するアミノ酸 B を連結する工程；
- (v) 連結させたアミノ酸 B から保護基を除去する工程；および
- (vi) アミノ酸 B から、2 つのペプチド U^2 および U^3 の鎖を伸長させる工程を含む方法。

【化 5】



【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、抗菌性を有するペプチドの新規多量体に関する。また本発明は、前記多量体の製造方法に関する。本発明は、広範囲の微生物の増殖を阻害するための、前記多量体の使用に関する。さらに本発明は、前記ペプチドを含む組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ディフェンシンは、カチオン性の抗菌ペプチドで、自然免疫系の構成要素である。ヒトでは、アルファディフェンシンは好中球または消化管のパネート細胞によって、ベータディフェンシンは上皮細胞によって産生される。ディフェンシンは、グラム陰性菌、グラム陽性菌、一部の真菌類やエンベロープウイルスなどの広範囲の微生物に対して抗菌性を有する。

【0 0 0 3】

この抗菌性の正確なメカニズムは完全にはわかっていないが、このペプチドの持つ疎水性や正味の正電荷が、微生物の細胞壁や細胞膜の相互作用やそれらの破壊に重要であると思われる。

【0 0 0 4】

複数の研究から、細菌の細胞膜において、全長型のディフェンシンが非共有結合の形態でダイマーを形成する可能性が示唆されている (Hoover et al., 2000

10

20

30

40

50

; Hoover et al., 2001; Schibilli et al., 2002)。またある研究では、ディフェンシンの二量体化が抗菌性に影響を与える可能性が示唆されている (Campopiano et al., 2004)。しかしながら、このダイマーの特性についての詳細な検討や解析は行われていない。

【0005】

抗生物質に対する耐性の出現は、抗生物質の開発における障害の1つである。ディフェンシンの抗菌活性は完全には理解されていないが、現在考えられるディフェンシンの作用機序からすると、耐性が現れるまでに相当時間がかかるか、または極めて弱い耐性しか現れない可能性が示唆されており、ディフェンシンの抗菌剤としての使用は有望であると言える。しかし、ディフェンシンは、哺乳動物細胞などの宿主細胞に対して毒性を示すことも知られているため、抗菌剤としての適用は制限される可能性がある。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、抗菌活性が高くかつ宿主細胞に対する毒性が低い、ディフェンシンの新たなペプチド誘導体の開発が切望されている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、hBD3由来の単離多量体(配列番号1)に関する。

hBD3(配列番号1)

20

G I I N T L Q K Y Y C R V R G G R C A V L S C L P K E E Q I G K C S T R G R K C
C R R K K

【0008】

第1の態様において、本発明は、式(U)_n(式中、Uは、配列番号2を含むペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体であり、nは2以上である)で表されるディフェンシンペプチドの単離多量体に関する。

配列番号2

G I I N T L Q K Y Y X R V R G G R X A V L S X L P K E E Q I G K X S T R G R K X
X R R Z Z

Xは任意のアミノ酸を包含し; Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。例えば、Zとしては、リジン、オルニチンまたはアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。具体的には、Zはリジンであってよい。

30

【0009】

別の態様において、本発明は、ペプチドUを少なくとも2つ含む単離多量体に関する。ただし、前記ペプチドUは、配列番号2またはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

前記多量体には、ペプチドUの繰り返しが存在する。具体的には、繰り返し単位であるペプチドU同士は共有結合により連結している。さらに、ペプチドU同士は、少なくとも1つのアミノ酸Bを介して連結していてもよい。Bはそれぞれ、アミン基を少なくとも2つ有するアミノ酸であってよい。例えば、Bとしては、リジン、オルニチンまたはアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0010】

本発明の任意の多量体における繰り返し単位、すなわちペプチドUは、WO2007/126392に記載のいずれのペプチドであってもよい。

ペプチドUとしては、配列番号2に由来するペプチドフラグメントなどが挙げられる。このフラグメントは、配列番号2に由来するものであれば、いかなる長さのフラグメントであってもよい。具体的には、ペプチドUは、配列番号3またはそのフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。

配列番号3

G I I N T L Q K Y Y X R V R G G R X A V L S X L P K E E Q I G K X S T R G R K X
X R R

50

Xは任意のアミノ酸を包含する。

多量体のペプチドUは、+1 ~ +11の電荷を有してもよい。

【0011】

別の態様において、本発明は、式 $(U)_n B_m Z_j$ （式中、Uは、配列番号3またはそのフラグメントもしくは変異体を含み、Bはそれぞれ、アミン基を少なくとも2つ有するアミノ酸残基を少なくとも1つ包含し、Zは任意のアミノ酸を包含し、nは2以上であり、mは1以上であり、jは0以上である）で表される単離多量体に関する。Bは、アミン基を少なくとも2つ有するアミノ酸を包含してもよい。具体的には、Bとしては、リジン、オルニチンまたはアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0012】

本発明の一態様において、 $(U)_n B_m Z_j$ のBとZはいずれもリジン(K)を包含してもよい。このとき、上記の式は $(U)_n K_m K_j$ で表される。また、さらなる態様において、mがn-1と等しくてもよく、jが1であってもよい。このとき、上記の多量体の式は $(U)_n K_{n-1} K$ （すなわち $(UK)_n$ ）で表される。式 $(U)_n K_m K_j$ または $(U)_n K_{n-1} K$ におけるペプチドUは、配列番号3またはそのフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。

【0013】

本発明の多量体は、直鎖状、分岐状のいずれであってもよい。多量体 $(U)_n$ が直鎖状である場合、n回繰り返されるペプチドUは、配列番号2またはその任意のフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。

分岐状の多量体、例えば多量体 $(U)_n B_m Z_j$ に関しては、末端の残基 $B_m Z_j$ で分岐していてもよい。

【0014】

本発明の多量体は、繰り返し単位であるペプチドUを任意の数含んでもよい。例えば、前記多量体は、繰り返し単位であるペプチドUを2~10個、2~20個、または2~30個含んでもよい。さらに前記多量体は、ダイマー、トリマー、テトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、ヘプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマーのいずれであってもよい。具体的には、nは偶数であってもよい。さらに具体的には、nは、2から始まる2の累乗倍に相当する値のいずれを包含してもよい。

【0015】

さらに、本発明の多量体の任意のアミノ酸残基は、保護基を少なくとも1つ有するアミノ酸を包含してもよい。前記保護基は、Boc、But、Fmoc、Pbfなどを包含してもよい。

【0016】

また本発明は、本発明の少なくとも1つの多量体を製造する方法に関する。

従って、本発明は、式 $(U)_n$ （式中、Uは、配列番号2を含むペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体である）で表される少なくとも1つの多量体を製造する方法であって、少なくとも2つのUを連結することを含む方法に関する。

【0017】

また、本発明の多量体は、組換えDNA技術により作製してもよい。本発明の多量体の全長またはその任意の一部を、組換えDNA技術により作製してもよい。例えば、複数のペプチドモノマーをそれぞれ組換えDNA法により作製し、これらを化学的手法により連結して多量体を形成させてもよい。

【0018】

従って、本発明は、本発明の多量体の全長またはその任意の一部をコードする単離核酸分子にも関する。前記核酸分子は、ベクターに挿入してもよい。さらに、本発明の多量体の全長または任意の一部を発現させるために、前記核酸分子または該核酸分子を含むベクターを宿主細胞に導入してもよい。

【0019】

また本発明の多量体は、化学合成法により新規合成(de novo合成)してもよい

10

20

30

40

50

。例えば、本発明の多量体を、本発明の固相ペプチド合成 (S P P S) 法により合成してもよい。

【 0 0 2 0 】

また本発明は、式： $(U)_n B_m Z_j$ (式中、Uは、配列番号3またはそのフラグメントもしくは変異体を含み、Bはそれぞれ、アミノ基を少なくとも2つ有するアミノ酸を包含し、Zは任意のアミノ酸を包含し、nは2以上であり、mは1以上であり、jは0以上である) で表される少なくとも1つの多量体を製造する方法であって、

- (i) 少なくとも1つの固相を準備する工程；
- (ii) 固相に少なくとも1つの1番目のアミノ酸Zを結合させる工程；
- (iii) 固相に結合させた1番目のアミノ酸残基に、保護基を有するアミノ酸残基Bを少なくとも1つ連結する工程；
- (iv) 連結させた残基Bから保護基を除去する工程；
- (v) ペプチドUの配列に従って、保護基を有するアミノ酸残基をC末端からN末端の方向へ順に連結し、連結の都度、次の連結のために保護基を除去することによって、さらなる鎖の伸長を行う工程；および
- (vi) 加える残基の数に応じて、アミノ酸残基の連結を終了する工程を含む方法に関する。

【 0 0 2 1 】

保護基を有するアミノ酸Bは、保護基で保護されている側鎖を少なくとも2つ含む。具体的には、Bとしては、リジン、オルニチンまたはアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。固相に結合させた1番目のアミノ酸Zとしても、同様に、リジン、オルニチンまたはアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 2 2 】

上記の方法を拡張し、さらなる多量体を合成してもよい。例えば、さらなる多量体を合成するために拡張した方法は、工程 (iv) の後に、

- (iv) (a) 連結させた残基Bに、保護基を有する残基Bをさらに連結する工程；
 - (iv) (b) (iv) (a) で連結させた残基Bから保護基を除去する工程；および
 - (iv) (c) 工程 (iv) (a) および (iv) (b) を繰り返し行う工程、または
 - (iv) (d) 工程 (v) および (vi) に進む工程
- をさらに含む。

【 0 0 2 3 】

形成される多量体は、Bのアミノ基の数に依存する。Bのアミノ基の数が2である場合、例えば、Bがリジン (K) またはオルニチンである場合、上記の拡張した方法により、先の方法で合成される多量体から繰り返し単位数が2の累乗倍に増加した多量体を合成できる。この拡張した方法により、4量体、8量体、16量体、32量体、64量体などが形成される。

【 0 0 2 4 】

Bが、3つのアミノ基 (2つは第一アミノ基で、1つは第二アミノ基である) を有するアルギニン (R) である場合、最初に形成される多量体はトリマーである。続いて形成される多量体は、アルギニンを用いる場合、繰り返し単位数が3の累乗倍に増加する。

【 0 0 2 5 】

多量体化する過程において、Bとして、リジンまたはオルニチンとアルギニンとの組み合わせ、またはその逆の順序での組み合わせを用いてもよく、このようにして繰り返し単位数の異なる多量体を合成することができる。

【 0 0 2 6 】

合成が終了した後、固相から多量体を遊離させてもよい。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 7 】

【 図 1 】 保護基を有するリジン残基、すなわち $Ly s (F m o c)$ 、ならびに V 2 モノマーおよび V 2 ダイマーの構造を示す。太字で示すリジン (K) 残基は、合成時に $Ly s ($

Fmoc)が組み込まれた位置を示す。

【図2】固相ペプチド合成(SPPS)法によるV2ダイマーの合成を示す。工程(i)は、DMF(N,N-ジメチルホルムアミド)中、20%ピペリジンを用いて保護基を除去する工程を示す。工程(ii)は、NMP(N-メチルピロリドン)中、0.5M HBTU((N-[1H-ベンゾトリアゾール-1-イル]-(ジメチルアミノ)メチレン)-N-メチルメタンアミニウム)、0.5M HOBt(N-ヒドロキシベンゾトリアゾール)、および2M DIEA(ジイソプロピルエチルアミン)を用いて行うカップリング反応の工程を示す。樹脂に結合しているリジン残基にFmoc(Lys)を結合させて、工程(i)を再度行う。次いで、各鎖にアルギニン残基(R)を2個ずつ加える。工程(iii)は、0.5M HBTU/0.5M HOBt/2M DIEAを用いて、SPPS法のサイクルを6回繰り返すことを含む鎖の伸長工程を示す。この工程により、V2ダイマーの残りのアミノ酸が組み込まれる。工程(iv)は、TFA(トリフルオロ酢酸)90%、フェノール5.0%、水1.5%、TIS(トリイソプロピルシラン)1.0%およびEDT(エタンジチオール)2.5%からなる切断試薬を用いて、樹脂からダイマーを遊離させる切断工程を示す。このダイマーには、RGRKVVRR(配列番号44)の繰り返しが存在する。

10

【図3】本発明のSPPS法を用いて繰り返し単位数が2の累乗倍に増加した多量体を形成できることを示す。例えばダイマー、テトラマー、オクタマーなどといったようにモノマー単位数が2の累乗倍に増加する多量体を製造することができる。イタリック太字で示すリジン(K)残基は、合成時にLys(Fmoc)が組み込まれた位置を示す。図3の配列は、RGRKVVRRKK(配列番号45)およびRGRKVVRR(配列番号46)である。

20

【図4】V2ダイマーがヒト結膜上皮細胞に対する毒性を持たないことを、天然のhBD3と比較して示すグラフである。この結果は、独立で行った4回の試験により得られたものであり、各データポイントは平均と標準偏差を示す。X軸はペプチド濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)を示し、Y軸は細胞の生存率(%)を示す。

【図5】野生型hBD3とそのC末端ペプチドのウサギ赤血球に対する溶血作用を示す。

【図6】野生型hBFD3とそのC末端ペプチドのヒト結膜上皮細胞に対する細胞毒性作用を示す。

【図7】ヘテロダイマーの製造方法の一例を示す。図7の配列は、RGRKVVRR(配列番号44)およびRGRKVVRRVV(配列番号46)である。

30

【図8】ヘテロテトラマーの製造方法の一例を示す。図8の配列は、RRVVKRGRK(配列番号58) RGRKVVRR(配列番号44)およびRGRKVVRRVV(配列番号46)である。

【図9】ホモテトラマーの製造方法の一例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

定義

ペプチド配列中または式中にXが存在する場合、Xは任意のアミノ酸を示す。任意のアミノ酸には、保護基を有するシステイン残基が含まれ、例えばC(Acm)、C(But)、C(Cam)、C(t-Buthio)、C(Bzl)、C(4-MeO-Bzl)、C(Mmt)が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0029】

ペプチドまたは多量体の変異体とは、多量体のペプチド配列が変異したものを意味し、このペプチド配列においては、1以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。この置換は、通常、類似の特性を有するアミノ酸による保存的置換である。この変異体は、通常、+1~-11の正味電荷を保持しており、通常、活性を有し、十分な抗菌性と低い細胞毒性を示す。

【0030】

保護基を有するアミノ酸とは、反応基の化学反応を抑制および/または阻止するために

50

、 1 以上の反応基が不活性分子で修飾されているアミノ酸を意味する。

【 0 0 3 1 】

第 1 の態様において、本発明は、式 (U)_n (式中、 U は、配列番号 2 を含むペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体であり、 n は 2 以上である) で表されるディフェンシンペプチドの単離多量体に関する。

配列番号 2

G I I N T L Q K Y Y X R V R G G R X A V L S X L P K E E Q I G K X S T R G R K X
X R R Z Z

X は任意のアミノ酸を包含してよく ; Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。例えば、Z としては、リジン、オルニチンまたはアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。具体的には、Z はリジンであってよい。

10

【 0 0 3 2 】

別の態様において、本発明は、ペプチド U を少なくとも 2 つ含む単離多量体を提供する。ただし、前記ペプチド U は、配列番号 2 またはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

前記多量体には、ペプチド U の繰り返しが存在する。具体的には、繰り返し単位であるペプチド U 同士は共有結合により連結している。ペプチド U 同士は、少なくとも 1 つのアミノ酸 B を介して連結していてもよい。B は、アミン基を少なくとも 2 つ有するアミノ酸を包含してもよい。例えば、B としては、リジン、オルニチンまたはアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 3 3 】

本発明の任意の多量体における繰り返し単位、すなわちペプチド U は、WO 2 0 0 7 / 1 2 6 3 9 2 に記載のいずれのペプチドであってもよい。

ペプチド U としては、配列番号 2 に由来するペプチドフラグメントなどが挙げられる。このフラグメントは、配列番号 2 に由来するものであれば、いかなる長さのフラグメントであってもよい。具体的には、ペプチド U は、配列番号 3 またはそのフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。

配列番号 3

G I I N T L Q K Y Y X R V R G G R X A V L S X L P K E E Q I G K X S T R G R K X
X R R

30

X は任意のアミノ酸を包含する。

多量体のペプチド U は、+ 1 ~ + 1 1 の電荷を有してもよい。

【 0 0 3 4 】

またペプチド U は、配列番号 4 ~ 5 8 のいずれかまたはそのフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。

配列番号 4 (h B D 3 の C 末端 3 8 アミノ酸由来のペプチド)

K Y Y X R V R G G R X A V L S X L P K E E Q I G K X S T R G R K X X R R Z Z

X は任意のアミノ酸を包含し ; Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 5 (h B D 3 の C 末端 3 6 アミノ酸由来のペプチド)

40

Y X R V R G G R X A V L S X L P K E E Q I G K X S T R G R K X X R R Z Z

X は任意のアミノ酸を包含し ; Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 6 (h B D 3 の C 末端 4 0 アミノ酸由来のペプチド)

L Q K Y Y X R V R G G R X A V L S X L P K E E Q I G K X S T R G R K X X R R Z Z

X は任意のアミノ酸を包含し ; Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 7 (h B D 3 の C 末端 2 9 アミノ酸由来のペプチド)

R X A V L S X L P K E E Q I G K X S T R G R K X X R R Z Z

X は任意のアミノ酸を包含し ; Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくて

50

もよい。

配列番号 8

K E E Q I G K X S T R G R K X X R R Z Z (h B D 3 の C 末端 2 0 アミノ酸由来のペプチド)

X は任意のアミノ酸を包含し ; Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 9

K X S T R G R K X X R R Z Z (h B D 3 の C 末端 1 4 アミノ酸由来のペプチド)

X は任意のアミノ酸を包含し ; Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

10

【 0 0 3 5 】

配列番号 1 0 (h B D 3 の第 8 ~ 2 6 番目のアミノ酸に相当する 1 9 アミノ酸由来のペプチド)

K Y Y X R V R G G R X A V L S X L P K

X は任意のアミノ酸を包含する。

配列番号 1 1

G I I N T L Q K Y Y X R V R G G R (h B D 3 の N 末端 1 7 アミノ酸由来のペプチド)

X は任意のアミノ酸を包含する。

配列番号 1 2 (C が W で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y W R V R G G R W A V L S W L P K E E Q I G K W S T R G R K W W R R Z Z

20

Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 1 3 (C が F で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y F R V R G G R F A V L S F L P K E E Q I G K F S T R G R K F F R R Z Z

Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 1 4 (C が Y で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y Y R V R G G R Y A V L S Y L P K E E Q I G K Y S T R G R K Y Y R R Z Z

Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

30

配列番号 1 5 (C が S で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y S R V R G G R S A V L S S L P K E E Q I G K S S T R G R K S S R R Z Z

Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 1 6 (C が A で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y A R V R G G R A A V L S A L P K E E Q I G K A S T R G R K A A R R Z Z

Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 1 7 (C が C (A c m) で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y C (A c m) R V R G G R C (A c m) C (A c m) V L S A L P K E E Q I G K C (A c m) S T R G R K C (A c m) C (A c m) R R Z Z

40

Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 1 8 (C が C (B u t) で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y C (B u t) R V R G G R C (B u t) C (B u t) V L S A L P K E E Q I G K C (B u t) S T R G R K C (B u t) C (B u t) R R Z Z

Z は任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 1 9 (C が C (t - B u t h i o) で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y C (t - B u t h i o) R V R G G R C (t - B u t h i o) C (t - B u t h i o) V L S A L P K E E Q I G K C (t - B u t h i o) S T R G R K C

50

(t - B u t h i o) C (t - B u t h i o) R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

【 0 0 3 6 】

配列番号 2 0 (C が C (B z l) で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y C (B z l) R V R G G R C (B z l) C (B z l) V L S A L P
K E E Q I G K C (B z l) S T R G R K C (B z l) C (B z l) R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 2 1 (C が C (4 - M e B z l) で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y C (4 - M e B z l) R V R G G R C (4 - M e B z l) C (4 -
M e B z l) V L S A L P K E E Q I G K C (4 - M e B z l) S T R G R K C (4 - M
e B z l) C (4 - M e B z l) R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 2 2 (C が C (4 - M e O B z l) で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y C (4 - M e O B z l) R V R G G R C (4 - M e O B z l) C (4 -
M e O B z l) V L S A L P K E E Q I G K C (4 - M e O B z l) S T R G R K C
(4 - M e O B z l) C (4 - M e O B z l) R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 2 3 (C が C (M m t) で置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y C (M m t) R V R G G R C (M m t) C (M m t) V L S A L P
K E E Q I G K C (M m t) S T R G R K C (M m t) C (M m t) R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 2 4 (C が修飾を受けたCで置換された全長型 h B D 3 由来のペプチド)

G I I N T L Q K Y Y X R V R G G R X X V L S A L P K E E Q I G K X S T R G R K X
X R R Z Z

XはC (A c m)、C (B u t)、C (t - B u t h i o)、C (B z l)、C (4 -
M e B z l)、C (4 - M e O B z l) またはC (M m t) を包含し ; Zは任意のアミノ
酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 2 5 (C が任意のアミノ酸 X で置換された h B D 3 の C 末端 1 0 アミノ酸由来の
フラグメント)

R G R K X X R R Z Z

Xは任意のアミノ酸を包含し ; Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくて
もよい。

配列番号 2 6 (C が W で置換された h B D 3 の C 末端 1 0 アミノ酸由来のフラグメント)

R G R K W W R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 2 7 (C が F で置換された h B D 3 の C 末端 1 0 アミノ酸由来のフラグメント)

R G R K F F R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 2 8 (C が Y で置換された h B D 3 の C 末端 1 0 アミノ酸由来のフラグメント)

R G R K Y Y R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 2 9 (C が L で置換された h B D 3 の C 末端 1 0 アミノ酸由来のフラグメント)

R G R K L L R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

【 0 0 3 7 】

配列番号 3 0 (C が I で置換された h B D 3 の C 末端 1 0 アミノ酸由来のフラグメント)

R G R K I I R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号 3 1 (C が H で置換された h B D 3 の C 末端 1 0 アミノ酸由来のフラグメント)

R G R K H H R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号32 (CがC (A c m)、C (B u t)、C (t - B u t h i o)、C (B z l)、C (4 - M e B z l)、C (4 - M e O B z l)またはC (M m t)で置換されたh B D 3のC末端10アミノ酸由来のフラグメント)

R G R K X X R R Z Z

XはC (A c m)、C (B u t)、C (t - B u t h i o)、C (B z l)、C (4 - M e B z l)、C (4 - M e O B z l)またはC (M m t)を包含し; Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号33 (CがVで置換されたh B D 3のC末端10アミノ酸由来のフラグメント)

R G R K V V R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号34 (h B D 3のC末端10アミノ酸由来のペプチド)

R G R K C C R R Z Z

Zは任意のアミノ酸を包含するか、または存在しなくてもよい。

配列番号35 (CがC (A c m)、C (B u t)、C (t - B u t h i o)、C (B z l)、C (4 - M e B z l)、C (4 - M e O B z l)またはC (M m t)で置換されたh B D 3のC末端10アミノ酸由来のペプチド)

R G R K X X R R K K

XはC (A c m)、C (B u t)、C (t - B u t h i o)、C (B z l)、C (4 - M e B z l)、C (4 - M e O B z l)またはC (M m t)を包含する。

配列番号36 (Cが任意のアミノ酸で置換されたh B D 3のC末端由来のペプチド。ただし、h B D 3のC末端のK Kは含まない。)

R G R K X X R R

配列番号37 (W 2 - 8 A A : CがWで置換されたh B D 3のC末端由来のペプチド。ただし、h B D 3のC末端のK Kは含まない。)

R G R K W W R R

配列番号38 (CがFで置換されたh B D 3のC末端由来のペプチド。ただし、h B D 3のC末端のK Kは含まない。)

R G R K F F R R

配列番号39 (Y 2 - 8 A A : CがYで置換されたh B D 3のC末端由来のペプチド。ただし、h B D 3のC末端のK Kは含まない。)

R G R K Y Y R R

【 0 0 3 8 】

配列番号40 (CがLで置換されたh B D 3のC末端由来のペプチド。ただし、h B D 3のC末端のK Kは含まない。)

R G R K L L R R

配列番号41 (CがIで置換されたh B D 3のC末端由来のペプチド。ただし、h B D 3のC末端のK Kは含まない。)

R G R K I I R R

配列番号42 (CがHで置換されたh B D 3のC末端由来のペプチド。ただし、h B D 3のC末端のK Kは含まない。)

R G R K H H R R

配列番号43 (CがC (A c m)、C (B u t)、C (t - B u t h i o)、C (B z l)、C (4 - M e B z l)、C (4 - M e O B z l)またはC (M m t)で置換されたh B D 3のC末端由来のペプチド。ただし、h B D 3のC末端のK Kは含まない。)

R G R K C X X R R

XはC (A c m)、C (B u t)、C (t - B u t h i o)、C (B z l)、C (4 - M e B z l)、C (4 - M e O B z l)またはC (M m t)を包含する。

配列番号44 (V 2 - 8 A A : CがVで置換されたh B D 3のC末端由来のペプチド。た

10

20

30

40

50

だし、h B D 3 の C 末端の K K は含まない。)

R G R K V V R R

配列番号 4 5 (V 2 モノマー)

R G R K V V R R K K

配列番号 4 6 (V 4 モノマー、V 4 - 1 0 A A)

R G R K V V R R V V

配列番号 4 7 (Y 4 モノマー、Y 4 - 1 0 A A)

R G R K Y Y R R Y Y

配列番号 4 8 (W 4 モノマー、W 4 - 1 0 A A)

R G R K W W R R W W

10

配列番号 4 9 (V 3 モノマー)

R V R K V V R R

【 0 0 3 9 】

配列番号 5 0 (V 2 R モノマー)

R R R K V V R R

配列番号 5 1 (V 2 D モノマー)

R D R K V V R R

配列番号 5 2 (E 2 モノマー)

R G R K E E R R

配列番号 5 3 (K 2 モノマー)

20

R G R K K K R R

配列番号 5 4

R R R R R R R R R R

配列番号 5 5

V V V V

配列番号 5 6

Y Y Y Y

配列番号 5 7

R R V V K R G R

配列番号 5 8

30

R R V V K R G R K

【 0 0 4 0 】

別の態様において、本発明は、式 $(U)_n B_m Z_j$ (式中、Uは、配列番号3またはそのフラグメントもしくは変異体を含み、Bは、アミン基を少なくとも2つ有するアミノ酸を包含し、Zは任意のアミノ酸を包含し、nは2以上であり、mは1以上であり、jは0以上である)で表される単離多量体に関する。具体的には、Bとしては、リジン、オルニチンまたはアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 1 】

本発明の一態様において、 $(U)_n B_m Z_j$ のBとZはいずれもリジン(K)を包含してもよい。このとき、上記の式は $(U)_n K_m K_j$ で表される。また、さらなる態様において、mがn-1と等しくてもよく、jが1であってもよい。このとき、上記の多量体の式は $(U)_n K_{n-1} K$ (すなわち $(U K)_n$) で表される。式 $(U)_n K_m K_j$ または $(U)_n K_{n-1} K$ におけるペプチドUは、配列番号3またはそのフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。

40

【 0 0 4 2 】

式 $(U)_n B_m Z_j$ 、 $(U)_n K_m K_j$ または $(U)_n K_{n-1} K$ におけるペプチドUは、配列番号3またはそのフラグメントもしくは変異体を含んでもよく、前記フラグメントまたは変異体としては、例えばR G R K X X R R (配列番号36)または配列番号37~44のいずれかが挙げられる。

例えば、 $m = n - 1$ 、 $j = 1$ 、 $B = Z = K$ であり、かつUが配列番号44を含む場合、

50

多量体は式 (配列番号 4 4) $_n K_{n-1} K$ を有する。 $n = 2$ である場合、多量体は式 (配列番号 4 4) $_2 K K$ を有する。

【 0 0 4 3 】

本発明の多量体は、直鎖状、分岐状のいずれであってもよい。多量体 (U) $_n$ が直鎖状である場合、 n 回繰り返されるペプチド U は、配列番号 2 またはその任意のフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。配列番号 2 の任意のフラグメントまたは変異体としては、配列番号 3 ~ 5 8 のいずれかが挙げられる。例えば、多量体は、(配列番号 3 5) $_n$ 、(配列番号 3 6) $_n$ 、または (配列番号 4 5) $_n$ を含んでもよい。

分岐状の多量体、例えば多量体 (U) $_n B_m Z_j$ に関しては、末端の残基 $B_m Z_j$ で分岐していてもよい。

10

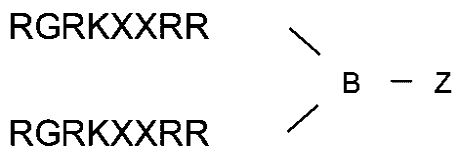
【 0 0 4 4 】

本発明の多量体は、繰り返し単位を任意の数含んでもよい。例えば、前記多量体は、繰り返しサブユニットを 2 ~ 10 個、2 ~ 20 個、または 2 ~ 30 個含んでもよい。さらに前記多量体は、ダイマー、トリマー、テトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、ヘプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマーのいずれであってもよい。

【 0 0 4 5 】

例えば、式 (配列番号 3 6) $_2 B Z$ で表される分岐状ダイマーに関しては、該ダイマーは下記の構造を含んでもよい。

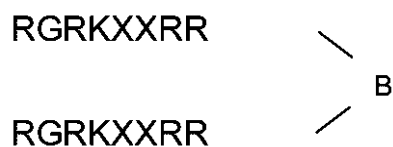
【 化 1 】



20

あるいは、Z は存在しなくてもよく、このとき、上記ダイマーは下記の構造を有する。

【 化 2 】



30

具体的には、本発明の任意の多量体において、X は V であってもよい。この V 2 モノマーは、配列 R G R K V V R R (配列番号 4 4) を有する。

【 0 0 4 6 】

また本発明は、さらなる態様において、式：(U) $_n K_m Z_j$ (式中、U は、配列番号 3 またはそのフラグメントもしくは変異体を含み、Z は任意のアミノ酸を包含し、 n は 2 以上であり、 m は 1 以上であり、 j は 1 である) で表される少なくとも 1 つの多量体を製造する方法であって、

- (i) 少なくとも 1 つの固相を準備する工程；
- (ii) 固相に少なくとも 1 つの 1 番目のアミノ酸残基 Z を結合させる工程；
- (iii) 固相に結合させた 1 番目のアミノ酸残基に、保護基を有する K 残基を少なくとも 1 つ連結する工程；
- (iv) 連結させた K 残基から保護基を除去する工程；
- (v) ペプチド U の配列に従って、保護基を有するアミノ酸残基を C 末端から N 末端の方向へ順に連結し、連結の都度、次の連結のために保護基を除去することによって、さらなる鎖の伸長を行う工程；および
- (vi) 加える残基の数に応じて、アミノ酸残基の連結を終了する工程を含む方法に関する。

40

【 0 0 4 7 】

固相に結合させた 1 番目のアミノ酸 Z は、任意のアミノ酸であってもよい。例えば、Z と

50

しては、リジン、オルニチンまたはアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 8 】

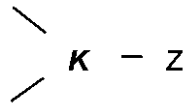
合成が終了した後、固相から多量体を遊離させてもよい。

【 0 0 4 9 】

例えば、ペプチド配列 R G R K K X X R R (配列番号 3 6) を作製するために、上記の工程を実施すると、下記のダイマーが合成される。イタリック太字で示すリジン (K) 残基は、合成時に L y s (F m o c) が組み込まれた位置を示す。

【 化 3 】

RGRKXXRR



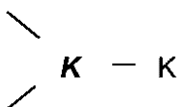
RGRKXXRR

10

この合成方法では、残基 Z およびリジン残基を 2 つのモノマー単位が共有している。具体的には、X が V で、Z が K である場合、下記のダイマーが合成される。このダイマーは、(配列番号 4 4)₂ K K で表される V 2 ダイマーである。

【 化 4 】

RGRKVRR



RGRKVRR

20

【 0 0 5 0 】

上記の方法を拡張し、さらなる多量体を合成してもよい。例えば、さらなる多量体を合成するために拡張した方法は、工程 (iv) の後に、

(iv) (a) 連結させた 2 番目のリジン残基に、保護基を有するリジン残基をさらに連結する工程；

(iv) (b) (iv) (a) で連結させたリジン残基から保護基を除去する工程；および

(iv) (c) 工程 (iv) (a) および (iv) (b) を繰り返し行う工程、または

(iv) (d) 工程 (v) および (vi) に進む工程

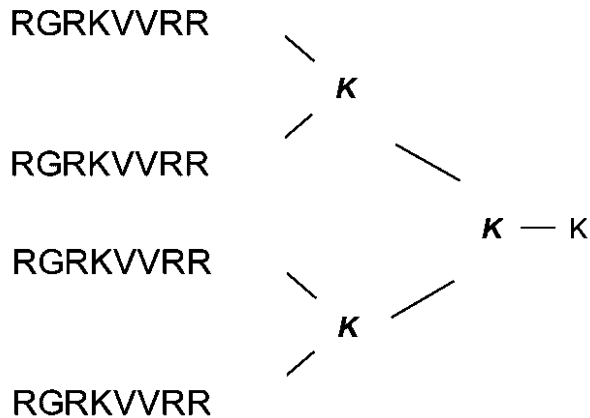
をさらに含む。

【 0 0 5 1 】

この拡張した方法により、先の方法で合成される多量体から繰り返し単位数が 2 の累乗倍に増加した多量体を合成できる。この拡張した方法により、4 量体、8 量体、16 量体、32 量体、64 量体などが形成される。この拡張した方法において追加された工程を 1 回実施することによって、下記に示すようなテトラマーが合成される。X が V で、B および Z が K である場合、得られるテトラマーは V 2 - テトラマーとして公知である。この V 2 テトラマーの繰り返し単位は R G R K V V R R (配列番号 4 4) である。

30

【化 5】



10

【0052】

さらに、この拡張した方法において追加された工程を2回繰り返すことによって、オクタマーが合成される。本発明の多量体は、末端のK残基を含まなくてもよい。

【0053】

上記のように製造される多量体は、多量体内で1種類のペプチドモノマー単位が繰り返されているホモ多量体である。本発明のペプチド多量体は、ホモダイマー、ホモテトラマーなど、いかなるホモ多量体であってもよい。

20

【0054】

さらに、上記の製造方法を拡張して、多量体内に異なるペプチド単位が存在するヘテロ多量体を製造してもよい。ホモ多量体を製造する場合、保護基を有するアミノ酸Bは、同一の保護基で保護されている側鎖を少なくとも2つ有する。しかし、ヘテロ多量体（例えばヘテロダイマー）を製造する際には、異なる保護基を有するアミノ酸Cを用いてもよい。アミノ酸Cにおいては、鎖の伸長に利用できる側鎖が、少なくとも2種類の異なる保護基で保護されている。この場合、第1の保護基を除去して、少なくとも1つの第1の反応側鎖からペプチド鎖を伸長させてもよい。第1のペプチド鎖を伸長させた後、別の保護基を除去して、少なくとも1つの第2の反応側鎖から続けて鎖を伸長させてもよい。このようにして、第1のペプチド鎖と第2のペプチド鎖が異なるアミノ酸配列を有していてもよい。

30

【0055】

本発明は、別の態様において、式 $[(U^1)(U^2)]_{n/2}(C)_{n/2}B_mZ$ （式中、 U^1 および U^2 はそれぞれペプチドを含み、 U^1 U^2 かつ $n = 2^x$ であり、 $x = 0$ または正の整数であり、 $m = 1$ または 0 である）で表されるペプチド多量体を製造する方法であって、

- (i) 少なくとも1つの固相を準備する工程；
- (ii) 固相に少なくとも1つの1番目のアミノ酸Zを結合させる工程；
- (iii) 必要に応じて、固相に結合させたZにアミノ酸Bを少なくとも1つ連結する工程；
- (iv) ZまたはBに、異なる保護基で保護された基を少なくとも2つ含むアミノ酸Cを少なくとも1つ連結する工程；
- (v) 連結させたアミノ酸Cから第1の保護基を除去して、第1の反応側鎖を露出させる工程；
- (vi) Cの第1の反応側鎖から、第1のペプチド U^1 の鎖を伸長させる工程；
- (vii) 連結させたアミノ酸Bから第2の保護基を除去して、少なくとも1つの第2の反応側鎖を露出させる工程；および
- (viii) Cの第2の反応側鎖から、第2のペプチド U^2 の鎖を伸長させる工程を含む方法に関する。

40

50

【 0 0 5 6 】

このようにして、ヘテロペプチド多量体を製造してもよい。

任意で実施できる工程 (ii) を省略すると、ヘテロダイマーが形成される。任意で実施できる工程 (ii) を 1 回行くと、ヘテロテトラマーを製造することができる。工程 (ii) を適宜繰り返すことにより、その他のヘテロ多量体を製造することができる。

【 0 0 5 7 】

本発明は、別の態様において、式 $[(U^1)(U^2)]_{n/2}(C)_{n/2}B_mZ$ (式中、 U^1 および U^2 はペプチド配列を含み、 U^1 U^2 であり、 C および B はそれぞれ、アミン基を少なくとも 2 つ有するアミノ酸を包含し、 Z は任意のアミノ酸を包含し、 $n = 2^x$ であり、 $x = 0$ または正の整数であり、 $m = 1$ または 0 である) で表される単離ペプチド多量体に関する。

C 、 B および Z としては、リジン (K)、オルニチンまたはアルギニン (R) が挙げられるが、これらに限定されない。

具体的には、 U^1 または U^2 はそれぞれ、配列番号 2 を含むペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体であってよい。

U^1 は、配列番号 1 ~ 58 のいずれかを含んでもよいが、これらに限定されない。

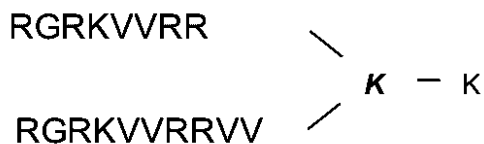
U^2 は、配列番号 1 ~ 58 のいずれかを含んでもよいが、これらに限定されない。

$n = 2$ かつ $m = 1$ である場合、多量体は、式 $[(U^1)(U^2)]CZ$ で表されるヘテロダイマーである。

【 0 0 5 8 】

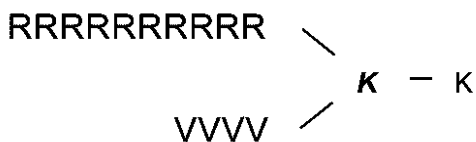
例えば、 U^1 は $RGRKVVRR$ (配列番号 44) を含んでもよく、 U^2 は $RGRKVVRRVV$ (配列番号 46) を含んでもよく、 C および Z は K であり、 $m = 0$ 、かつ $n = 2$ である。このとき、上記ヘテロダイマーは、下記の構造を含む。

【化 6】



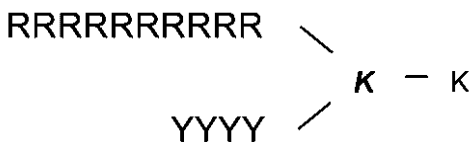
例えば、 U^1 は $RRRRRRRRRR$ (配列番号 54) を含んでもよく、 U^2 は $VVVVV$ (配列番号 55) を含んでもよく、 C および Z は K であり、 $m = 0$ 、かつ $n = 2$ である。このとき、上記ヘテロダイマーは、以下の構造を含む。

【化 7】



例えば、 U^1 は $RRRRRRRRRR$ (配列番号 54) を含んでもよく、 U^2 は $YYYY$ (配列番号 56) を含んでもよく、 C および Z は K であり、 $m = 0$ 、かつ $n = 2$ である。このとき、上記ヘテロダイマーは、以下の構造を含む。

【化 8】



$n = 4$ かつ $m = 1$ である場合、上記ヘテロ多量体はヘテロテトラマーである。このヘテロマーは、式 $[(U^1)(U^2)]_2(C)_2B_1Z$ で表すことができる。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

50

本発明の方法を拡張し、トリマーなど他のペプチド多量体を合成してもよい。ホモトリマーおよびヘテロトリマーのいずれも合成できる。

【0060】

式 $U^3 U^2 C U^1 Z$ (式中、 U^1 、 U^2 および U^3 はそれぞれペプチドを含み、 C は、アミン基を少なくとも2つ含むアミノ酸を包含し、 Z は任意のアミノ酸を包含する) で表されるペプチドトリマーを製造する方法であって、

- (i) 少なくとも1つの固相を準備する工程；
 - (ii) 固相に少なくとも1つの1番目のアミノ酸 Z を結合させる工程；および
 - (iii) Z から、ペプチド U^1 の鎖を伸長させる工程
- を含む方法。

10

ただし、

(A) 前記ペプチドトリマーが、式 $U^3 U^2 (C) U^1 Z$ で表されるヘテロペプチドである場合、

前記方法は、

- (iv) ペプチド U^1 のアミノ酸に、異なる保護基を有するアミノ酸 C を連結する工程；
- (v) 連結させたアミノ酸 C から第1の保護基を除去する工程；
- (vi) アミノ酸 C から、ペプチド U^2 の鎖を伸長させる工程；
- (vii) 連結させたアミノ酸 C から第2の保護基を除去する工程；および
- (viii) アミノ酸 C から、ペプチド U^3 の鎖を伸長させる工程

をさらに含み、

20

(B) $U^2 = U^3 = U^1$ かつ $C = B$ であり、前記ペプチドトリマーが式 $(U^1)_2 B U^1 Z$ を含む場合、

前記方法は、

- (iv) ペプチド U^1 のアミノ酸に、保護基を有するアミノ酸 B を連結する工程；
- (v) 連結させたアミノ酸 B から保護基を除去する工程；および
- (vi) アミノ酸 B から、2つのペプチド U^1 の鎖を伸長させる工程

をさらに含み、

(C) $U^2 = U^3 = U^1$ かつ $C = B$ であり、前記ペプチドトリマーが式 $(U^2)_2 B (U^1) Z$ を含む場合、

前記方法は、

30

- (iv) ペプチド U^1 のアミノ酸に、保護基を有するアミノ酸 B を連結する工程；
 - (v) 連結させたアミノ酸 B から保護基を除去する工程；および
 - (vi) アミノ酸 B から、少なくとも2つのペプチド U^2 の鎖を伸長させる工程
- をさらに含む。

上記(A)および(C)の場合には、ヘテロペプチドトリマーを製造することができる。上記(B)の場合には、ホモペプチドトリマーを製造することができる。

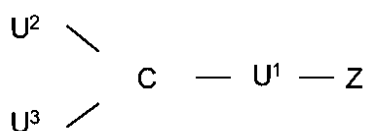
【0061】

本発明は、別の態様において、式 $U^3 U^2 C U^1 Z$ (式中、 U^1 、 U^2 および U^3 はそれぞれペプチド配列を含み、 C は、アミン基を少なくとも2つ有するアミノ酸を包含し、 Z は任意のアミノ酸を包含する) で表される単離ペプチドトリマーに関する。具体的には、このペプチドはアミノ酸 C で分岐している。

40

このとき、上記単離ペプチドトリマーは、下記の構造を含む。

【化9】



C 、 B および Z としては、リジン (K)、オルニチンまたはアルギニン (R) が挙げられるが、これらに限定されない。

50

【 0 0 6 2 】

具体的には、 U^1 、 U^2 または U^3 はそれぞれ、配列番号 2 またはそのフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。

例えば、 U^1 、 U^2 または U^3 はそれぞれ、配列番号 1 ~ 58 のいずれかを含んでもよい。ヘテロペプチドトリマーである場合、2つのペプチドが同一の配列を含み、第3のペプチドがそれとは異なる配列を有してもよい。

ヘテロペプチドトリマー $U^3 U^2 C U^1 Z$ において、 U^1 、 U^2 および U^3 はそれぞれ異なるペプチド配列であってもよいが、そうでなくてもよい。例えば、 U^1 および U^2 が同一の配列を含み、 U^3 がそれとは異なる配列を含んでいてもよい。また、 U^1 および U^3 が同一の配列を含み、 U^2 もそれと同一の配列を有してもよい。

$U^2 = U^3$ U^1 かつ $C = B$ である場合、上記ペプチドは式 $(U^2)_2 B U^1 Z$ で表される。

$U^1 = U^3$ U^2 である場合、上記ペプチドは式 $U^1 U^2 C U^1 Z$ で表される。

$U^1 = U^2$ U^3 である場合、上記ペプチドは式 $U^3 U^1 C U^1 Z$ で表される。

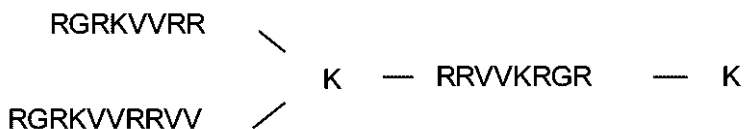
ただし、 $U^1 = U^2 = U^3$ かつ $C = B$ である場合、上記ペプチドは式 $(U^1)_2 B U^1 Z$ で表されるホモペプチドトリマーとなる。

ヘテロペプチドトリマーおよびその合成の一例を図 8 に示し、実施例 1 D に記載する。

【 0 0 6 3 】

従って、本発明は、式 $U^3 U^2 K U^1 K$ (式中、 U^1 は $RRVVKRGR$ (配列番号 57) を含み、 U^2 は $RGRKVVRR$ (配列番号 44) を含み、 U^3 は $RGRKVVRRVV$ (配列番号 46) を含む) で表される単離ペプチドトリマーに関する。このヘテロトリマーは $V2V2V4$ - ヘテロトリマーであり、下記の構造を有する。

【 化 1 0 】



【 0 0 6 4 】

本発明の多量体は、抗菌性を有する。従って、本発明の多量体は、微生物の増殖を阻害および/または抑制するために用いることができる。

【 0 0 6 5 】

また本発明は、微生物を本発明の少なくとも1つの多量体と接触させることを含む、微生物の増殖を阻害および/または抑制する方法を提供する。

【 0 0 6 6 】

また本発明は、対象に本発明の少なくとも1つの多量体を投与することを含む、少なくとも1つの微生物感染症を治療する方法を提供する。さらに本発明は、対象に本発明の少なくとも1つの多量体を投与することを含む、対象における少なくとも1種の微生物の増殖を阻害および/または抑制することを提供する。

前記微生物は、ウイルス、真菌、細菌のいずれであってもよい。

【 0 0 6 7 】

従って、本発明は、抗菌組成物の製造のための、本発明の任意の態様による多量体の使用にも関する。前記抗菌組成物は、例えば対象における、少なくとも1種の微生物の増殖を阻害および/または抑制するために用いることができる。

【 0 0 6 8 】

また本発明は、少なくとも1つの微生物感染症を治療する医薬品を製造するための、本発明の任意の態様による多量体の使用を包含する。

【 0 0 6 9 】

従って、本発明の多量体は、抗菌組成物および/または医薬組成物としてもよい。本発明の抗菌組成物および/または医薬組成物は、外用、経口投与用、非経口投与用または吸

10

20

30

40

50

入用の製剤にすることができる。また本発明の多量体は、点眼用の組成物および／もしくは液剤ならびに／またはコンタクトレンズ用液剤に製剤化することができる。

【0070】

また本発明の多量体は、器具のコーティングのための組成物としてもよい。前記器具としては、カテーテル、針、シース、ステント、包帯などの医療器具が挙げられるが、これらに限定されない。

【0071】

また本発明は、キットも包含するが、このキットとは、本発明の少なくとも1つの多量体、本発明の少なくとも1つの多量体を含む少なくとも1つの抗菌組成物および／または医薬組成物を含むものを言う。

10

【0072】

これまで、本発明について一般的な説明をしてきたが、下記の実施例を参照することにより同じ内容をより容易に理解できるであろう。ただし、下記の実施例は、例示の目的で記載されているものであり、本発明を何ら限定するものではない。

【実施例】

【0073】

具体的記載のない、当技術分野において公知の標準的な分子生物学手法については、概して Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (2001) に記載の手法に従った。

20

【0074】

実施例1：多量体の固相ペプチド合成(SPPS)法

(A) ホモダイマーの合成

以下のペプチドの合成方法は、Krajewskiら(2004)の方法を改変したものである。フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基で保護されたL-アミノ酸および樹脂は、Advanced Automated Peptide Protein Technologies社(AAPTEC社)(ケンタッキー州、米国)から購入し、側鎖保護基、すなわちLys(Fmoc)、Arg(pbf)、Lys(Boc)、Tyr(But)、Trp(Boc)およびFmoc-Lys(Boc)-Wang樹脂(置換率0.72mmol/g)と共に使用した。ただしLys(Fmoc)は、ダイマーの合成において、C末端から2番目の残基としてのみ組み込んだ。ダイマーの合成は、Apex 396(Advanced ChemTech社)を用いてFmoc法により行った。

30

【0075】

市販のFmoc-Boc-Lys-Wang樹脂を出発点として用いた。あるいは、0.5M DIC(N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド)を用いて、1番目のアミノ酸をWang樹脂へ結合させた。続くカップリング反応(またはアシル化反応)は、NMP中、0.5M HBTU/0.5M HOBT/2M DIEAを用いて行った。別法として、DMF中、HBTU-HOBTを用いて、合成スケール0.08mmolでカップリング反応を行ってもよい。Fmoc基の除去は、DMF中、20%ピペリジンを用いて行った。

40

【0076】

反応に用いた樹脂を、TFA(トリフルオロ酢酸)90%、フェノール5.0%、水1.5%、TIS(トリイソプロピルシラン)1.0%、EDT(エタンジオール)2.5%を含む試薬で処理し、多量体を遊離させた。別法として、TFA/TIS/フェノール/チオアニソール(Thionisole)/水(90/1/2.5/5/1.5(容量パーセント比))からなる混合液を新たに調製し、これを用いて、反応で得られたペプチド結合樹脂を室温で2~3時間処理してもよい。

【0077】

次いで、このペプチド粗生成物をろ過した後、氷冷したジエチルエーテルに注いで沈殿

50

させ、沈殿物を遠心分離して氷冷したエーテルで3回洗浄し、真空下室温で乾燥させた、または固形の粗生成物中に含まれるエーテルや他の残存溶媒をドラフト内で自然に蒸発させて乾燥させた。沈殿物をエーテルから直接乾燥させることにより、TFA（トリフルオロ酢酸）塩が得られた。TFA塩は、ペプチド溶液のpHや培養中の細胞の生存率に影響を与える可能性がある。TFA塩は、2%酢酸を2ml加えて凍結乾燥させると酢酸塩に変換されるため、これにより、他のペプチドの取扱いが容易になり、極微量のスキャベンジャーを除去することができる。

この合成方法のスキームを図2に示す。

【0078】

上記のSPPS法によって、ダイマーの粗生成物および精製ダイマーが高収率で得られるだろう。例えば、V2ダイマーの粗生成物および精製V2ダイマーの収率は、それぞれ90%および27%である。0.08mmolの合成スケールでは、50mgの精製V2ダイマーが得られるだろう。

10

【0079】

上述した方法は合成方法の一例であって、これに変更を加えてもよい。例えば、このSPPS法では、アミノ酸残基の保護や脱保護にいかなる方法を用いてもよい。

【0080】

(B) ホモテトラマーの合成

上記の合成方法を拡張して、図9に示すようなホモテトラマーを合成してもよい。

【0081】

20

固相化NH₂-Lys(Boc)に連結したFmoc-Lysを脱保護した後、このリジンに2つのFmoc-Lys残基を連結した。アミノ酸鎖のさらなる伸長を行うことにより、図に示すようなホモテトラマー(V2テトラマー)を合成した。脱保護反応(工程i)、カップリング反応(工程ii)および鎖の伸長反応の各条件は、ホモダイマーの合成と同様であった。

【0082】

(C) ヘテロダイマーの合成

図7に示すヘテロダイマーの合成においては、異なる保護基で保護されたアミノ酸Fmoc-Lys(Alloc)-OHを分岐点として用いてヘテロダイマーを合成した。Fmoc基とAlloc基の反応性は異なり、Fmoc基の除去に用いられる塩基条件下では、Alloc基は安定である。

30

【0083】

固相化Fmoc-NH-Lys(Boc)-Wang樹脂の脱保護は、上記と同様にして行った。

【0084】

次いで、図7に示すように、Wang樹脂に結合しているリジン残基にFmoc-Lys(Alloc)-OHを連結した(カップリング工程ii)。Fmoc-Lys(Alloc)からFmoc基のみを除去し(Fmoc脱保護)、第1の鎖の伸長を行った(工程iii)。第1の鎖のアミノ酸残基がすべて連結した(すなわち、第1の鎖が完成した)ところで、Lys(Alloc)のAlloc基をパラジウム触媒を用いて除去し(Alloc脱保護)、第2の鎖の伸長を行った。第2の鎖のアミノ酸残基がすべて連結した(すなわち、第2の鎖も完成した)後、酸分解により生成物を遊離させた。アミノ酸残基の反応基を保護するために合成時に必要に応じて使用した保護基(例えば、Boc、pbf、Mtr)が残っている場合は、それらをすべて除去した。

40

【0085】

(D) ヘテロペプチドトリマーの合成

ヘテロペプチドトリマーの合成例を図8に示す。固相化リジン(K)残基から、まずRGRKVVRR(配列番号57)で表される第1のペプチド(U¹)を伸長させる。次いで、ペプチドRGRKVVRRのN末端にあるR残基にFmoc-Lys(Alloc)-OHを連結する。次いで、Fmoc基を除去して、Lys(Alloc)残基の第1のアミ

50

ン基に、鎖の伸長反応により、R G R K V V R R (配列番号 4 4) で表される第 2 のペプチド (U^2) を加える。第 2 の鎖を伸長させた後、A l o c 基を除去して、リジン残基の第 2 のアミン基に、鎖の伸長反応により、R G R K V V R R V V (配列番号 4 6) で表される第 3 のペプチド (U^3) を加える。

【 0 0 8 6 】

あるいは、第 1 のペプチド U^1 を伸長させた後、F m o c - L y s (F m o c) - O H を加えて、ペプチド U^2 を 2 つ同時に伸長させ、ヘテロトリマー $U^2 U^2 (K) U^1 K$ を形成させることもできる。

【 0 0 8 7 】

ホモペプチドトリマーに関しては、ペプチド U を伸長させた後、F m o c - L y s (F m o c) - O H を用いて、同一のペプチド U を 2 つ同時に伸長させ、ホモトリマーを形成させることもできる。

【 0 0 8 8 】

実施例 2 : 抗菌アッセイ

抗菌ペプチドの抗菌活性の試験方法として、以下に示す絶対的殺菌の手法を用いた。

【 0 0 8 9 】

試験微生物の調製

試験微生物として、米国培養菌保存施設 (A T C C) から入手した基準培養菌、またはシンガポール総合病院病理部 (t h e D e p a r t m e n t o f P a t h o l o g y , S i n g a p o r e G e n e r a l H o s p i t a l) から入手した臨床分離株を用いた。試験に使用する培養菌はすべて、ストックからの継代数が 5 代以下のものとした。

【 0 0 9 0 】

細菌はトリプチケースソイ寒天 (T S A) 斜面培地で、酵母はサブローデキストロース寒天 (S D A) 斜面培地で、3 5 で 1 6 時間培養して増殖させた。増殖した微生物を遠心分離により回収し、2 0 にて、米国薬局方 (U S P) 規格リン酸緩衝液 (p H 7 . 2) で 2 回洗浄した。

【 0 0 9 1 】

試験微生物

以下の微生物を試験に使用した。

- 1 . セレウス菌 (B a c i l l u s c e r e u s) A T C C 1 1 7 7 8
- 2 . カンジダ・アルビカンス (C a n d i d a a l b i c a n s) A T C C 1 0 2 3 1
- 3 . 緑膿菌 (P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a) 臨床分離株
P A E 2 3 0 D R 4 8 7 7 / 0 7、唾液由来
- 4 . 緑膿菌臨床分離株 P A E 2 3 9 D M 5 7 9 0 / 0 7、創傷由来
- 5 . 緑膿菌臨床分離株 P A E 2 4 0 D U 1 4 4 7 6 / 0 7、尿由来
- 6 . 緑膿菌臨床分離株 P A E 2 4 9 D M 1 5 0 1 3、創傷由来
- 7 . 緑膿菌臨床分離株 0 7 D M 0 2 3 2 5 7、眼由来
- 8 . 緑膿菌臨床分離株 0 7 D M 0 2 3 3 7 6、眼由来
- 9 . 緑膿菌臨床分離株 0 7 D M 0 2 3 1 5 5、眼由来
- 1 0 . 緑膿菌臨床分離株 0 7 D M 0 2 3 1 0 4、眼由来
- 1 1 . 緑膿菌 A T C C 9 0 2 7
- 1 2 . 緑膿菌 A T C C 2 7 8 5 3
- 1 3 . 大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) A T C C 2 5 9 2 2
- 1 4 . 大腸菌臨床分離株 D B 1 6 0 2 7、血液由来
- 1 5 . 大腸菌臨床分離株 D U 4 6 3 8 1 R、尿由来
- 1 6 . メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (M R S A) D M 0 9 8 0 8 R、眼由来
- 1 7 . 黄色ブドウ球菌 (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) 臨床分離株
D M 4 0 0 1、眼由来

10

20

30

40

50

18. カンジダ・アルビカンス臨床分離株 D F 2 6 7 2 R、尿由来

19. フザリウム・ソラニ (*F u s a r i u m s o l a n i*) A T C C 3 6 0 3 1
【 0 0 9 2 】

化合物試験液の調製

凍結乾燥した抗菌化合物を精製水に溶解し、 $1,000\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製してスクリーキャップ付プラスチックチューブに分注した。これをストック液として-20で保存した。

【 0 0 9 3 】

試験当日、ストック液のチューブを1本解凍し、精製水で希釈して $500\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製した。次いで、USP規格リン酸緩衝液 ($\text{pH}7.2$) またはその他の溶液 (例えば 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH}7.4$) 、 10mM カリウム緩衝液 ($\text{pH}7.2$) または 155.2mM NaCl が挙げられるが、これらに限定されない) を用いてさらに希釈を行い、必要な試験濃度に調製した。試験濃度は通常 $6.25 \sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

【 0 0 9 4 】

標準的な濃度に調製した $10\mu\text{l}$ の試験微生物液を、所定の試験濃度に調製した 1ml の化合物試験液に接種し、最終的な微生物数が可能な限り $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6 \text{cfu}/\text{ml}$ となるようにした。次いで、菌を接種した試験液を35で4時間インキュベートした。インキュベーションの温度および時間は必要に応じて変更してよい。

【 0 0 9 5 】

インキュベーション後、試験液を D / E N e u t r a l i s i n g B r o t h (N B) で10倍に希釈して、抗菌作用を失わせた。さらにNBで希釈して、この希釈液を、細菌の場合は TSA プレート培地に、酵母の場合は SDA プレート培地に塗布した。これらのプレートを35で72時間インキュベートした後、各微生物の生菌数を求めた。

【 0 0 9 6 】

上記試験と並行して、試験液の代わりに、試験液の調製に使用した緩衝液に試験微生物を接種して接種コントロールとし、上記試験と同様の条件でインキュベーションを行った。接種コントロールの生菌数も上記試験と同様に求めた。

【 0 0 9 7 】

化合物の抗菌活性は、試験微生物の接種コントロールにおけるコロニー形成単位 (cfu) の対数値から、35で4時間化合物と接触した後に生存している試験微生物の cfu の対数値を減算して得られる対数減少値で表した。

【 0 0 9 8 】

実施例3～7にも上記の方法を用いた。具体的には、実施例6におけるゲンタマイシンに対するアッセイ方法は、抗菌化合物の代わりにゲンタマイシンを用いたという点を除いて上記の方法と同様である。

【 0 0 9 9 】

実施例3：緑膿菌 A T C C 9 0 2 7 に対する V 2 ダイマーの抗菌活性

V 2 ダイマーの抗菌性を緑膿菌 A T C C 9 0 2 7 を用いて調べた。

【 0 1 0 0 】

V 2 ダイマーは、USP規格リン酸緩衝液 (米国薬局方に従い調製したもの) 中、生理的 pH 値である $\text{pH}7.2$ において、緑膿菌 A T C C 9 0 2 7 に対する抗菌活性を示す。この抗菌活性は効果が高く、細菌数の大幅な減少が見られた (表1を参照) 。接種した細菌の量は $\sim 10^7$ 個であったが、 $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の V 2 ダイマーと4時間接触させることにより、溶液はほぼ殺菌された。

【表 1】

35℃におけるUSP規格リン酸緩衝液(pH7.2)中の緑膿菌ATCC 9027に対する抗菌活性(対数減少値)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h
25.0	> 6.54	> 6.38	ND
12.5	> 6.54	> 6.38	ND
6.25	2.82	1.84	3.04
3.125	0.59	0.22	0.69

10

【0101】

上記で使用したUSP規格緩衝液の塩溶液は生理的条件に比べて薄いため、10mMリン酸緩衝液(pH7.2)を使用して、生理的な塩条件におけるV2ダイマーの抗菌活性も調べた。V2ダイマーは、生理的な塩濃度においても、緑膿菌ATCC 9027に対して高い抗菌活性を維持していた(表2)。

【表 2】

20

35℃における10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)中の緑膿菌ATCC 9027に対する抗菌活性(対数減少値)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	10 mM リン酸カリウム 緩衝液
供試濃度 µg/ml	
50.0	5.63
25.0	5.63
12.5	2.93
6.25	2.20
3.125	2.00

30

【0102】

さらに、155.2mM NaClを用いて、高塩濃度条件下におけるV2ダイマーの抗菌活性も調べた。その結果、12.5~50µg/mlのV2ダイマーは、高塩濃度において抗菌活性を示すことが分かった。

【表 3】

緑膿菌ATCC 9027に対する35℃における抗菌活性(対数減少値)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	155.2 mM NaCl	155.2 mM NaCl	155.2 mM NaCl
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h
50.0	ND	5.23	2.82
25.0	2.82	2.78	1.71
12.5	1.71	2.14	0.78
6.25	0.78	ND	ND
3.125	ND	ND	ND

40

ND:測定値なし

50

【 0 1 0 3 】

実施例 4：h B D 3 由来ペプチドモノマーと V 2 ダイマーとの比較

上述した h B D 3 由来の 1 0 アミノ酸からなるペプチドモノマー（W O 2 0 0 7 / 1 2 6 3 9 2）の緑膿菌 A T C C 9 0 2 7 に対する抗菌活性も調べた。

U S P 規格リン酸緩衝液を用いて V 2、L 2、C 2、F 2 および H 2 モノマーの抗菌性を調べたものを表 4 に示す。

【表 4】

緑膿菌 ATCC 9027 に対する 10 アミノ酸からなるペプチドモノマーの 35℃ における抗菌活性（対数減少値）

	V2		L2	C2	F2	H2
濃度 μg/ml	4h	6h	4h	4h	4h	4h
200.00	ND	ND	ND	0.41	0.33	0.29
100.00	ND	ND	0.78	0.57	0.61	0.62
50.00	3.97	5.62	1.15	0.63	0.87	ND
25.00	3.33	ND	1.09	ND	ND	ND
12.5	3.23	ND	0.95	ND	ND	ND
6.25	3.80	ND	1.17	ND	ND	ND
3.125	0.50	ND	1.01	ND	ND	ND
1.558	0.35	ND	0.89	ND	ND	ND

ND:測定値なし

注：対数減少値 0 . 5 は、6 8 % の細菌が死滅したことを示す；対数減少値 1 は、9 0 % の細菌が死滅したことを示す；対数減少値 2 は、9 9 % の細菌が死滅したことを示す；対数減少値 3 は、9 9 . 9 % の細菌が死滅したことを示す。

【 0 1 0 4 】

表 1 の V 2 ダイマーの結果と表 4 の V 2 モノマーの結果とを比較すると、V 2 ダイマーは V 2 モノマーよりはるかに高い殺菌効率を示すことがわかる。V 2 ダイマーは、1 2 . 5 μ g / m l の濃度で 4 時間菌に接触させた場合、対数減少値が 6 を超えていたが（表 1）、これに対して V 2 モノマーは、1 2 . 5 μ g / m l の濃度での対数減少値が 3 . 2 3 であり、5 0 μ g / m l の濃度でも 3 . 9 7 に過ぎなかった（表 4）。

【 0 1 0 5 】

実施例 5：緑膿菌の臨床分離株に対する V 2 ダイマーの抗菌活性

唾液、創傷、尿および眼に由来する複数の緑膿菌の臨床分離株に対しても、V 2 ダイマーの抗菌活性を調べた。V 2 ダイマーは、これらの臨床分離株に対しても抗菌活性を示す（表 5 ～ 8 を参照）ことから、実際の臨床試料に対しても V 2 ダイマーを効果的に使用できることが示唆される。

【表 5】

唾液由来の緑膿菌の臨床分離株に対するV2ダイマーの35℃における抗菌活性(対数減少値)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	PA1 - PAE 230 DR4877/07 唾液由来	PA1 - PAE 230 DR4877/07 唾液由来	PA1 - PAE 230 DR4877/07 唾液由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h
50.0	4.53	> 5.52	> 5.49
25.0	4.44	5.22	> 5.49
12.5	3.02	3.65	5.07
6.25	2.21	2.41	3.12
3.125	1.49	1.99	2.41

10

【 0 1 0 6 】

【表 6】

創傷由来の緑膿菌の臨床分離株に対するV2ダイマーの35℃における抗菌活性(対数減少値)

20

(A) 緑膿菌PAE239 DM5790/07に対するデータ

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	PA2 - PAE 239 DM5790/07 創傷由来	PA2 - PAE 239 DM5790/07 創傷由来	PA2 - PAE 239 DM5790/07 創傷由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h
50.0	1.35	1.58	1.97
25.0	1.21	1.56	1.40
12.5	1.18	1.52	1.26
6.25	1.12	1.29	1.22
3.125	1.16	1.27	1.22

30

(B) 緑膿菌PAE249 DM15013に対するデータ

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	PA4 - PAE 249 DM15013 創傷由来	PA4 - PAE 249 DM15013 創傷由来	PA4 - PAE 249 DM15013 創傷由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h
50.0	5.08	4.57	>4.99
25.0	4.69	4.34	>4.99
12.5	3.96	4.19	4.60
6.25	3.13	2.41	3.18
3.125	2.12	2.00	1.71

40

【 0 1 0 7 】

50

【表 7】

尿由来の緑膿菌の臨床分離株に対するV2ダイマーの35℃における抗菌活性(対数減少値)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	PA3 - PAE 240 DU14476/07 尿由来	PA3 - PAE 240 DU14476/07 尿由来	PA3 - PAE 240 DU14476/07 尿由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h
50.0	2.08	1.88	1.72
25.0	1.58	1.52	1.56
12.5	1.21	1.52	1.42
6.25	1.25	1.52	1.28
3.125	1.15	1.52	1.13

10

【 0 1 0 8 】

【表 8 - 1】

眼から単離された緑膿菌に対するV2ダイマーの35℃におけるUSP規格リン酸緩衝液中の抗菌活性(対数減少値)

20

(A) 緑膿菌07DM02357に対するデータ

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	Ps-A 07DM02357 眼由来	Ps-A 07DM02357 眼由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h
50.0	2.41	5.53
25.0	1.76	3.66
12.5	1.75	3.17
6.25	1.60	2.35
3.125	1.37	1.94

30

(B) 緑膿菌07DM023376に対するデータ

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	Ps-B 07DM023376 眼由来	Ps-B 07DM023376 眼由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h
50.0	2.39	2.25
25.0	1.81	2.18
12.5	1.76	2.15
6.25	1.38	1.88
3.125	1.07	1.16

40

50

【表 8 - 2】

(C) 緑膿菌07DM023155に対するデータ

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	Ps-C 07DM023155 眼由来	Ps-C 07DM023155 眼由来	Ps-C 07DM023155 眼由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h
50.0	4.97	3.58	4.30
25.0	3.14	3.23	3.52
12.5	2.77	3.21	2.89
6.25	2.71	2.23	2.77
3.125	1.91	2.00	2.33

10

(D) 緑膿菌07DM023104に対するデータ

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	Ps-D 07DM023104 眼由来	Ps-D 07DM023104 眼由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h
50.0	3.45	4.53
25.0	3.42	3.92
12.5	2.82	3.48
6.25	2.68	2.89
3.125	1.71	2.27

20

30

【 0 1 0 9 】

10 mM リン酸緩衝液を用いた生理的な塩条件下における、臨床分離株に対する V 2 ダイマーの抗菌活性も調べた。V 2 ダイマーは、反復試験において、眼由来の臨床分離株（表 9 A、9 B および 9 C）、ならびに創傷由来、唾液由来および尿由来の臨床分離株（表 10 A および 10 B）に対して抗菌活性を示した。このことから、生理的条件下においても V 2 ダイマーを臨床分離株に対して使用できることが示唆される。

【表 9】

眼から単離された緑膿菌に対するV2ダイマーの35℃における10mMリン酸カリウム緩衝液中の抗菌活性(対数減少値)

(A)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	10 mM リン酸ナトリウム緩衝液	10 mM リン酸緩衝液	10 mM リン酸ナトリウム緩衝液	10 mM リン酸ナトリウム緩衝液
緑膿菌臨床分離株の種別	Ps-A 07DM02357 眼由来	Ps-B 07DM023376 眼由来	Ps-C 07DM023155 眼由来	Ps-D 07DM023104 眼由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h	4 h
50.0	2.92	2.23	3.47	3.77
25.0	2.05	1.87	3.14	2.09
12.5	1.04	1.29	1.60	1.47
6.25	0.97	1.18	1.62	1.04
3.125	0.56	0.45	0.94	0.61

(B)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	10 mM リン酸カリウム緩衝液	10 mM リン酸カリウム緩衝液	10 mM リン酸カリウム緩衝液	10 mM リン酸カリウム緩衝液
緑膿菌臨床分離株の種別	Ps-A 07DM02357 眼由来	Ps-B 07DM023376 眼由来	Ps-C 07DM023155 眼由来	Ps-D 07DM023104 眼由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h	4 h
50.0	1.77	1.51	3.06	1.54
25.0	1.36	1.45	2.99	1.49
12.5	0.78	1.35	1.68	1.19
6.25	0.69	1.12	1.41	1.09
3.125	0.62	0.76	0.79	0.73

(C)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	10 mM リン酸カリウム緩衝液	10 mM リン酸カリウム緩衝液	10 mM リン酸カリウム緩衝液
緑膿菌臨床分離株の種別	Ps-B 07DM023376 眼由来	Ps-C 07DM023155 眼由来	Ps-D 07DM023104 眼由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h
50.0	2.28	2.62	1.39
25.0	1.90	2.33	0.97
12.5	0.95	1.70	0.46
6.25	1.01	1.14	0.13
3.125	0.64	0.09	-0.54

【表 10】

創傷由来、唾液由来および尿由来の緑膿菌の臨床分離株に対するV2ダイマーの35℃における10mMリン酸カリウム緩衝液中の抗菌活性(対数減少値)

(A)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	10 mM リン酸カリウム 緩衝液	10 mM リン酸カリウム 緩衝液	10 mM リン酸カリウム 緩衝液	10 mM リン酸カリウム 緩衝液
緑膿菌臨床分離株の種別	PA1 - PAE 230 DR4877/07 唾液由来	PA2 - PAE 239 DM5790/07 創傷由来	PA3 - PAE 240 DU14476/07 尿由来	PA4 - PAE 249 DM15013 創傷由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h	4 h
50.0	2.54	1.21	1.28	3.01
25.0	2.03	0.78	1.11	2.02
12.5	1.14	0.58	0.72	1.30
6.25	0.66	0.40	0.61	0.97
3.125	0.21	0.06	0.29	0.26

10

20

(B)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	10 mM リン酸カリウム 緩衝液	10 mM リン酸カリウム 緩衝液	10 mM リン酸カリウム 緩衝液	10 mM リン酸カリウム 緩衝液
緑膿菌臨床分離株の種別	PA1 - PAE 230 DR4877/07 唾液由来	PA1 - PAE 230 DR4877/07 唾液由来	PA2 - PAE 239 DM5790/07 創傷由来	PA2 - PAE 239 DM5790/07 創傷由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h	4 h
50.0	2.54	2.36	1.21	1.59
25.0	2.03	1.97	0.78	1.27
12.5	1.14	1.26	0.58	0.77
6.25	0.66	0.97	0.40	0.62
3.125	0.21	0.64	0.06	0.49

30

【0111】

実施例6：V2ダイマーとゲンタマイシンの抗菌活性の比較

緑膿菌の臨床分離株に対するV2ダイマーとゲンタマイシンの抗菌活性を比較した。

40

【0112】

第1の試験では、V2ダイマーとゲンタマイシンのいずれについても、創傷由来および唾液由来の臨床分離株に対してアッセイを行い、両者を比較した(表5を参照)。この試験から、創傷由来の分離株に対しては、V2ダイマーはゲンタマイシンと同等の活性を有することが分かった。唾液由来の分離株に対しては、V2ダイマーの方が高い抗菌活性を示した。

【表 1 1】

唾液由来および創傷由来の緑膿菌の臨床分離株に対するゲンタマイシンとV2ダイマーの35℃における抗菌活性(対数減少値)の比較

	V2-ダイマー	V2-ダイマー	ゲンタマイシン	ゲンタマイシン
100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液	USP 規格 リン酸緩衝液	USP 規格 リン酸緩衝液	USP 規格 リン酸緩衝液
緑膿菌臨床分離株の種別	PA1 - PAE 230 DR4877/07 唾液由来	PA2 - PAE 239 DM5790/07 創傷由来	PA1 - PAE 230 DR4877/07 唾液由来	PA2 - PAE 239 DM5790/07 創傷由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h	4 h
50.0	>4.79	2.52	0.39	3.31
25.0	>4.79	2.69	0.54	3.04
12.5	>4.79	2.36	0.65	3.03
6.25	>4.79	2.28	0.35	3.07
3.125	>4.79	2.04	0.22	3.02

【0 1 1 3】

第2の試験では、V2ダイマーとゲンタマイシン双方の、尿由来および唾液由来の臨床分離株に対する抗菌活性を調べて、両者を比較した(表6を参照)。V2ダイマーは、これら2種の分離株に対してもゲンタマイシンと同等の活性を示した。

【表 1 2】

尿由来および創傷由来の緑膿菌の臨床分離株に対するゲンタマイシンとV2ダイマーの35℃における抗菌活性(対数減少値)の比較

	V2-ダイマー	V2-ダイマー	ゲンタマイシン	ゲンタマイシン
100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	PA3 - PAE 240 DU14476/07 尿由来	PA4 - PAE 249 DM15013 創傷由来	PA3 - PAE 240 DU14476/07 尿由来	PA4 - PAE 249 DM15013 創傷由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h	4 h
50.0	1.81	5.19	4.57	2.63
25.0	1.51	3.86	4.18	2.60
12.5	1.40	3.75	3.88	2.50
6.25	1.22	3.73	3.76	2.41
3.125	1.11	3.77	3.66	2.28

【0 1 1 4】

第3の試験では、V2ダイマーとゲンタマイシン双方の、眼由来の臨床分離株に対する抗菌活性を調べて、両者を比較した(表13を参照)。この試験から、V2ダイマーとゲンタマイシンは眼由来の緑膿菌臨床分離株に対して同等の活性を有することがわかる。

【表 1 3】

尿由来および創傷由来の緑膿菌の臨床分離株に対するゲンタマイシンとV2ダイマーの35℃における抗菌活性(対数減少値)の比較

	V2-ダイマー	V2-ダイマー	ゲンタマイシン	ゲンタマイシン
100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
緑膿菌臨床分離株の種別	Ps-C 07DM023155 眼由来	Ps-D 07DM023104 眼由来	Ps-C 07DM023155 眼由来	Ps-D 07DM023104 眼由来
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h	4 h	4 h
50.0	4.31	>4.33	>4.61	>4.33
25.0	3.80	>4.33	>4.61	>4.33
12.5	3.17	4.02	>4.61	>4.33
6.25	3.11	3.75	>4.61	>4.33
3.125	2.74	3.35	>4.61	>4.33

10

20

【0 1 1 5】

上記の試験結果をまとめると、V2ダイマーとゲンタマイシンは同等の抗菌活性を有しており、V2ダイマーは微生物に対してゲンタマイシンと同等の効果を発揮するものとして使用できることが示唆される。

【0 1 1 6】

実施例7：その他の微生物に対するV2ダイマーの抗菌活性

(A) カンジダ・アルビカンズ ATCC 10231

カンジダ・アルビカンズ ATCC 10231 に対する V2 ダイマーの抗菌活性を調べた。7.2 × 10⁵ CFU のカンジダ・アルビカンズを含む USP 規格リン酸緩衝液を、種々の濃度に調製した V2 ダイマーと混合し、35℃で4時間インキュベートした。その結果、50、25 および 12.5 µg/ml の濃度における V2 ダイマーのカンジダ・アルビカンズ ATCC 10231 に対する対数減少値は 3.6 ~ 4 であった(表 1 4)。

30

【表 1 4】

カンジダ・アルビカンズ ATCC 10231 に対する 35℃における抗菌活性(対数減少値)

V2ダイマーの供試濃度 (µg/ml)	時間 (h)	平均対数減少値
50	4	3.94
25	4	4.01
12.5	4	3.62
6.25	4	2.30
3.125	4	0.71

40

【0 1 1 7】

(B) セレウス菌 ATCC 11778

セレウス菌 ATCC 11778 に対する V2 ダイマーの抗菌活性を調べた。V2ダイマーは、セレウス菌に対して抗菌活性を示した(表 1 5)。

【表 15】

セレウス菌ATCC 11778に対する35℃における抗菌活性(対数減少値)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2	USP 規格 リン酸緩衝液 pH 7.2
供試濃度 µg/ml	4 h	4 h
50.0	2.29	1.70
25.0	2.76	2.04
12.5	2.75	1.32
6.25	0.86	1.26

10

【0118】

(C) 大腸菌臨床分離株 DB0016027R

さらに、V2ダイマーは、ゲンタマイシン、アンピシリンなどの抗生物質に対して耐性を有する薬剤感受性パターンを示す大腸菌の多剤耐性株 DB0016027R (血液由来の臨床分離株) の菌数を減少させることが可能であった。

【表 16】

大腸菌DB0016027Rに対する35℃における抗菌活性(対数減少値)

100 µg/ml から供試濃度へのサンプル希釈に用いた希釈液	USP 規格リン酸緩衝液 pH 7.2
供試濃度 µg/ml	4 h
50.0	2.83
25.0	2.52
12.5	2.68
6.25	2.45
3.125	2.60

20

30

【0119】

V2ダイマーがカンジダ・アルビカンズやその他の細菌に対する抗菌性を有することは、有効な広域スペクトル抗菌剤としてのV2ダイマーの可能性を示唆している。さらにV2ダイマーが大腸菌の多剤耐性株に対して効果を有することは、他の抗生物質が使用できない微生物に対する有効な治療薬としてのV2ダイマーの可能性を示唆している。

【0120】

実施例8：V2ダイマーの細胞毒性

WO2007/126392に記載の方法に従って、ヒト結膜細胞に対するV2ダイマーの毒性を調べ、野生型hBD3と比較した。図4から、V2ダイマーのヒト結膜細胞に対する毒性は野生型hBD3より低いことが分かる。野生型hBD3は、およそ15 µg/mlの濃度で細胞毒性を示したが、V2ダイマーは100 µg/mlの濃度でも細胞毒性を示さなかった。V2ダイマーの細胞毒性プロファイルは、WO2007/126392に記載のモノマーペプチドと同等であった。

40

【0121】

V2ダイマーはヒト結膜細胞に対する毒性が低く、抗菌活性が高いことから、宿主における微生物感染症の治療および/または微生物の増殖抑制の目的で、V2ダイマーを宿主に対して使用できることが示唆される。WO2007/126392に記載の他のペプチドダイマーも同様に、高い抗菌活性と低い細胞毒性を示すと考えられる。

【0122】

実施例9：マクロ液体希釈法による最小阻止濃度(MIC)の測定

50

米国臨床研究所規格委員会 (NCCCL) のマクロ液体希釈法を改変して、MIC を求めた。希釈には、 Ca^{2+} と Mg^{2+} を加えず、1/6 の濃度に希釈したミュラーヒントンブロス (Mueller Hinton Broth (MHB)) を使用した。この MHB (1/6 の濃度) を用いて、V2 ダイマー溶液の 2 倍段階希釈系列を試験管に作製した。MHB (1/6 の濃度) を用いて調製した試験微生物の接種液 1 ml を、V2 ダイマーの各希釈液 1 ml に添加し、各試験管内の終濃度が $10^4 \sim 10^5$ コロニー形成単位 / ml になるようにした。これらの試験管を 35℃ で 16 ~ 20 時間インキュベートした。試験サンプルと平行して、培地と微生物のみを含むポジティブコントロールの試験管と、培地のみを含むネガティブコントロールの試験管もインキュベートした。上記の操作を、試験微生物ごとに独立した試験として繰り返した。それぞれの臨床分離株または基準微生物に対する V2 ダイマーペプチドの MIC は、試験微生物の視認可能な増殖を阻害するペプチドの最小濃度とした。

他のペプチドの MIC も求めて、ゲンタマイシンと比較した。MIC の結果を表 17 ~ 20 に示す。

【 0 1 2 3 】

【表 17】

グラム陰性菌である緑膿菌と大腸菌の種々の菌株に対する、V2ダイマー、Y2ダイマー、W2ダイマーおよびゲンタマイシンのMIC(μ g/ml)測定結果

試験微生物	V2- ダイマー	Y2- ダイマー	W2- ダイマー	V2- テトラマー	ゲンタ マイシン
緑膿菌 ATCC 27853	12.5				
緑膿菌臨床分離株 DM 023104 眼由来	12.5	12.5	12.5	6.25	
緑膿菌臨床分離株 DM 023155 眼由来	12.5	25	12.5	6.25	
緑膿菌臨床分離株 07DM 023257 眼由来	12.5	12.5	12.5	12.5	
緑膿菌臨床分離株 07DM023376 眼由来	12.5	25	25	6.25	
緑膿菌臨床分離株 PAE 230 DR4877/07 唾液由来	12.5	12.5	12.5	12.5	400
緑膿菌臨床分離株 PAE 239 DM5790/07 創傷由来	12.5	12.5	12.5	12.5	25
緑膿菌臨床分離株 PAE 240 DU14476/07 尿由来	6.25	6.25	12.5	6.25	
緑膿菌臨床分離株 PAE 249 DM15013 創傷由来	6.25	12.5	6.25	6.25	
大腸菌 ATCC25922	12.5	12.5	25	12.5	
大腸菌臨床分離株 DB16027 血液由来	6.25	6.25	12.5	6.25	0.78
大腸菌臨床分離株 DU46381R 尿由来	6.25	12.5	6.25	6.25	

【 0 1 2 4 】

10

20

30

40

【表 1 8】

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌およびセレウス菌、ならびに真菌類であるカンジダ・アルビカンスおよびフザリウム・ソラニの種々の菌株に対する、V2ダイマー、Y2ダイマー、W2ダイマーおよびゲンタマイシンのMIC(μ g/ml)測定結果

試験微生物	V2- ダイマー	Y2- ダイマー	W2- ダイマー	V2- テトラマー	ゲンタ マイシン
メチシリン耐性 黄色ブドウ球菌(MRSA) DM09808R 眼由来	12.5				12.5
黄色ブドウ球菌 臨床分離株 DM4001 眼由来	12.5	12.5	12.5	12.5	
セレウス菌 ATCC 11778	12.5				
カンジダ・アルビカンス ATCC10231	12.5	25	12.5	12.5	
カンジダ・アルビカンス 臨床分離株 DF2672R 尿由来	12.5	12.5	12.5	12.5	
フザリウム・ソラニ ATCC 36031	25	12.5	12.5	3.125	

10

20

【 0 1 2 5 】

【表 19】

グラム陰性菌である緑膿菌と大腸菌の種々の菌株に対する、複数のC末端モノマーの
MIC(μ g/ml)測定結果

試験微生物	Y2 - 8AA	V2 - 8AA	W2 - 8AA	V4 モノマー	Y4 モノマー
緑膿菌 ATCC 27853					
緑膿菌臨床分離株 DM 023104 眼由来	>50	>50	25	>50	50
緑膿菌臨床分離株 DM 023155 眼由来	>50	>50	50	>50	25
緑膿菌臨床分離株 07DM 023257 眼由来	>50	>50	>50	>50	>50
緑膿菌臨床分離株 07DM023376 眼由来	50	>50	25	>50	>50
緑膿菌臨床分離株 PAE 230 DR4877/07 唾液由来	>50	>50	>50	>50	>50
緑膿菌臨床分離株 PAE 239 DM5790/07 創傷由来	>50	>50	>50	>50	50
緑膿菌臨床分離株 PAE 240 DU14476/07 尿由来	6.25	25	12.5	>50	25
緑膿菌臨床分離株 PAE 249 DM15013 創傷由来	>50	>50	50	>50	50
大腸菌 ATCC25922	25	>50	12.5	>50	12.5
大腸菌臨床分離株 DB16027 血液由来	25	>50	6.25	>50	6.25
大腸菌臨床分離株 DU46381R 尿由来	25	50	6.25	>50	12.5

【 0 1 2 6 】

10

20

30

40

【表 2 0】

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌およびセレウス菌、ならびに真菌類であるカンジダ・アルビカンスおよびフザリウム・ソラニの種々の菌株に対する、複数のC末端モノマーのMIC(μ g/ml)測定結果

試験微生物	Y2 - 8AA	V2 - 8AA	W2 - 8AA	V4 モノマー	Y4 モノマー
メチシリン耐性 黄色ブドウ球菌(MRSA) DM09808R 眼由来					
黄色ブドウ球菌 臨床分離株 DM4001 眼由来	>50	>50	12.5	>50	12.5
セレウス菌 ATCC 11778					
カンジダ・アルビカンス ATCC10231	25	>50	12.5	25	12.5
カンジダ・アルビカンス 臨床分離株 DF2672R 尿由来	50	>50	12.5	>50	25
フザリウム・ソラニ ATCC 36031	50	>100	25	>100	12.5

10

20

【 0 1 2 7】

参考資料

Campopiano D.J., Clarke, D. J., Polfer, N. C., Barran, P.E., Langley, R.J., Gvan . J. R., Maxwell, A., and Dorin, J. R. (2004) Structure-activity relationships i n defensin dimers: a novel link between beta-defensin tertiary structure and ant imicrobial activity. J. Biol. Chem 279(47):48671-9.

30

Hoover D.M., Rajashankar K. R., Blumenthal R., Puri A., Oppenheim J. J., Chertov O. and Lubkowski J., (2000) The structure of human beta-defensin-2 shows eviden ce of higher order oligomerization. J. Biol. Chem. 275(42):32911-8.

Hoover D.M., Chertov O. and Lubkowski J., (2001) The structure of human beta-def ensin-1: insights into structural properties of beta-defensins. J. Biol. Chem. 2 76(42):39021-6.

Krajewski K., Marchand C., Long, Y-Q., Pommier, Y. and Roller, P. P. (2004) Synth esis and HIV-1 integrase inhibitory activity of dimeric and tetrameric analogs o f indolicin Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 14: 5595-5598.

40

National Committee for Clinical Laboratory Standards (1987) Methods for determin ing bactericidal activity of antimicrobial agents by National Committee for Clin ical Laboratory Standards (Villanova, PA).

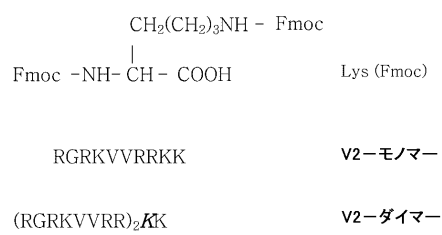
Schibli D. J., Hunter H. N. Aseyev V., Starner T, D. Wiencek J. M., McCray Jr P. B., Tack B. F. and Vogel H. J. (2002) The solution structures of the human beta -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of

50

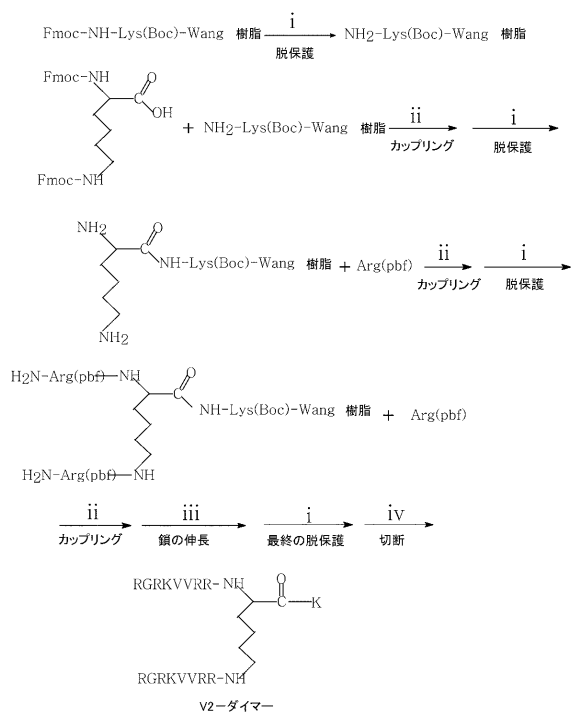
HBD3 against Staphylococcus aureus J. Biol. Chem. 276(42) :8279-8289

WO 2007/126392

【図 1】



【図 2】



[illegible]

ヒト結膜上皮細胞に対する細胞毒性

細胞生存率 (%)

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

Legend:

- L2
- v2
- y2
- v2
- F2
- L2
- c2
- H2

0005753077000001 . app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08
A 6 1 L	29/00	(2006.01)	A 6 1 L	29/00 Z
A 6 1 L	31/00	(2006.01)	A 6 1 L	31/00 Z
A 6 1 L	15/00	(2006.01)	A 6 1 L	15/00
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
G 0 2 C	13/00	(2006.01)	G 0 2 C	13/00

- (72)発明者 ベウワーマン, ロジャー, ダブリュー.
シンガポール国 1 6 8 7 5 1 シンガポール, サード ホスピタル アベニュー 1 1
- (72)発明者 リュ, ショウピン
シンガポール国 1 6 8 7 5 1 シンガポール, サード ホスピタル アベニュー 1 1
- (72)発明者 リー, ジン
シンガポール国 1 6 8 7 5 1 シンガポール, サード ホスピタル アベニュー 1 1
- (72)発明者 ジョウ, レイ
シンガポール国 1 6 8 7 5 1 シンガポール, サード ホスピタル アベニュー 1 1
- (72)発明者 ベルマ, チャンドラ, シェカール
シンガポール国 1 1 8 9 9 9 シンガポール # 1 1 - 1 5 1, ノーマントン パーク 2
- (72)発明者 タン, ドナルド
シンガポール国 1 6 8 7 5 1 シンガポール, サード ホスピタル アベニュー 1 1

審査官 荒木 英則

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 7 / 0 0 7 1 1 6 (W O , A 1)
国際公開第2 0 0 7 / 1 2 6 3 9 2 (W O , A 1)
国際公開第2 0 0 7 / 0 2 5 1 7 8 (W O , A 1)
特表2 0 0 6 - 5 0 8 7 2 0 (J P , A)
SCHIBLI, D.J., et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2 0 0 2 年, 277(10), pp.82
79-8289
DHOPPE, V., et al., Biochimica et Biophysica Acta, 2 0 0 6 年, 1758, pp.1499-1512
LIU, S., et al., ChemBioChem, 2 0 0 8 年 3 月 1 8 日, 8, pp.964-973
ARNUSCH, C.J., et al., Biochemistry, 2 0 0 7 年, 46, pp.13437-13442

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 4 / 4 7
C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 0 9
C 1 2 P 2 1 / 0 0 - 2 1 / 0 2
A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 0 8
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 4 2
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
A 6 1 L 1 5 / 0 0 - 3 1 / 0 0
G 0 2 C 1 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)