

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504603

(P2004-504603A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/50
A 6 1 K 31/7004
A 6 1 K 31/7016
A 6 1 K 31/702
A 6 1 K 31/715

F I

GO 1 N 33/50
A 6 1 K 31/7004
A 6 1 K 31/7016
A 6 1 K 31/702
A 6 1 K 31/715

テーマコード (参考)

2 G O 4 5
4 B O 6 3
4 C O 8 4
4 C O 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-512679 (P2002-512679)
(86) (22) 出願日 平成13年7月17日 (2001.7.17)
(85) 翻訳文提出日 平成15年1月16日 (2003.1.16)
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/008208
(87) 国際公開番号 W02002/006821
(87) 国際公開日 平成14年1月24日 (2002.1.24)
(31) 優先権主張番号 00306074.6
(32) 優先日 平成12年7月17日 (2000.7.17)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 503024457
ハンサ メディカル アクチボラゲット
スウェーデン国、ルンド、エディソン パーク
(74) 代理人 100066692
弁理士 浅村 皓
(74) 代理人 100072040
弁理士 浅村 肇
(74) 代理人 100088926
弁理士 長沼 暉夫
(74) 代理人 100102897
弁理士 池田 幸弘
(72) 発明者 ビョルク、ラルス
スウェーデン国 ルンド、マグレ ストラ
キルコガタ 10

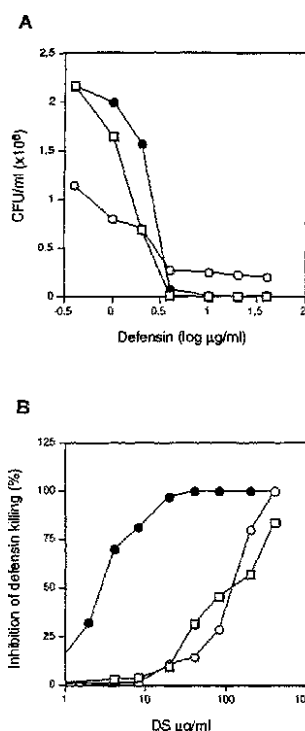
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗微生物剤

(57) 【要約】

プロテイナーゼ／グリコサミノグリカン経路の阻害作用を阻止することにより、陽イオン性抗微生物ペプチドの抗微生物活性を増強する物質の同定法であって：(i) 第1の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；(i i) 第2の成分として、細菌を提供し；(i i i) 第3の成分として、プロテイナーゼ／グリコサミノグリカン経路の成分の一部またはすべてを提供し、こうして第3の成分が第1の成分（例えば、グリコサミノグリカン、または細菌、または細菌とプロテオグリカン、または細菌プロテイナーゼ、または細菌プロテイナーゼとプロテオグリカン）の抗微生物作用を低下させ；(i v) 第1、第2、および第3の成分を、第3の成分の非存在下で抗微生物物質による細菌の死滅を可能にし、試験物質の非存在下で第3の成分による第1の成分の抗微生物活性の阻害を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；

(v) 細菌培養物の生存を監視して、試験物質が抗微生物活性を増強することができるかどうか（抗微生物活性を増強することができる試験物質は、細菌培養物の死滅



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻害することができる物質を同定する方法であって：

(i) 第 1 の成分として、グリコサミノグリカンを提供し；

(i i) 第 2 の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

(i i i) 第 1 および第 2 の成分を、試験物質の非存在下で第 1 および第 2 の成分が相互作用することを可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(i v) 第 1 の成分と第 2 の成分の相互作用を監視して、こうして試験物質が第 1 の成分と第 2 の成分の相互作用を破壊することができるかどうかを決定する、ことを含む上記方法。 10

【請求項 2】

陽イオン性抗微生物ペプチドのグリコサミノグリカン介在阻害を阻止することができる物質を同定する方法であって：

(i) 第 1 の成分として、グリコサミノグリカンを提供し；

(i i) 第 2 の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

(i i i) 第 3 の成分として、細菌培養物を提供し；

(i v) 第 1、第 2、および第 3 の成分を、第 1 の成分の非存在下で第 2 の成分による細菌培養物の死滅を可能にし、試験物質の非存在下で第 2 の成分による細菌培養物の死滅の、第 1 の成分による阻害を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして 20

(v) 細菌培養物の生存を監視し、こうして試験物質が陽イオン性抗微生物ペプチドのグリコサミノグリカン介在阻害を妨害することができるかどうかを決定する、ことを含む上記方法。

【請求項 3】

陽イオン性抗微生物ペプチドはデフェンシンである、請求項 1 または 2 の方法。

【請求項 4】

デフェンシンは α -デフェンシンである、請求項 3 の方法。

【請求項 5】

陽イオン性抗微生物ペプチドは LL-37 である、請求項 1 または 2 の方法。

【請求項 6】

グリコサミノグリカンはイズロン酸塩含量が多い、前記請求項のいずれかの方法。 30

【請求項 7】

グリコサミノグリカンは高度の硫酸化を有する、前記請求項のいずれかの方法。

【請求項 8】

グリコサミノグリカンはデルマタン硫酸である、前記請求項のいずれかの方法。

【請求項 9】

細菌培養物は、プロテオグリカンの豊富な結合組織中で増殖することができる細菌株を含む、請求項 2 の方法。

【請求項 10】

細菌株は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) または霊菌 (*Proteus mirabilis*) から選択される、請求項 9 の方法。 40

【請求項 11】

細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害することができる物質を同定する方法であって：

(i) 第 1 の成分として、細菌プロテイナーゼを提供し；

(i i) 第 2 の成分として、プロテオグリカンを提供し；

(i i i) 第 1 および第 2 の成分を、試験物質の非存在下で第 1 の成分による第 2 の成分の分解を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして 30

(i v) 第2の成分の分解を監視して、こうして試験物質が、プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害することができるかどうかを決定する、ことを含む上記方法。

【請求項12】

プロテオグリカンはデルマタン硫酸を含む、請求項11の方法。

【請求項13】

プロテオグリカンはデコリンまたはベルシカンである、請求項11または12の方法。

【請求項14】

工程(i v)においてプロテオグリカンからのデルマタン硫酸の放出が監視される、請求項12または13の方法。

【請求項15】

細菌プロテイナーゼによる陽イオン性抗微生物ペプチドの分解を阻害することができる物質を同定する方法であって：

(i) 第1の成分として、細菌プロテイナーゼを提供し；

(i i) 第2の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

(i i i) 第1および第2の成分を、試験物質の非存在下で第1の成分による第2の成分の分解を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(i v) 第2の成分の分解を監視して、こうして試験物質が、プロテイナーゼによる陽イオン性抗微生物ペプチドの分解を阻害することができるかどうかを決定する、ことを含む上記方法。

【請求項16】

陽イオン性抗微生物ペプチドは請求項3～5のいずれか1項に記載に定義されたものである、請求項15の方法。

【請求項17】

細菌プロテイナーゼは、請求項9または10で定義された細菌株から得られる、請求項11～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

細菌プロテイナーゼは、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) エラスターゼ、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) アルカリ性プロテイナーゼ、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) グラチナーゼ、および化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) システインプロテイナーゼから選択される、請求項11～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

細菌プロテイナーゼは、細菌培養物から抽出される増殖培地中に存在する、請求項11～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻害することができる物質の同定に使用するためのキットであって：

(a) グリコサミノグリカン；と

(b) 陽イオン性抗微生物ペプチド、
とを含むキット。

【請求項21】

(c) 試験物質が、グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻害するかどうかを決定するための手段、
をさらに含む請求項20のキット。

【請求項22】

(d) 細菌試料、
をさらに含む請求項20または21のキット。

【請求項23】

細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害することができる物質の同定に

10

20

30

40

50

使用するためのキットであって：

- (a) プロテオグリカン；と
 - (b) 細菌プロテイナーゼ、
- とを含むキット；

【請求項 24】

(c) 試験物質が、細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害するかどうかを決定するための手段、
をさらに含む請求項 23 のキット。

【請求項 25】

前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法により同定される物質。

10

【請求項 26】

単糖、二糖、オリゴ糖、または多糖である、請求項 25 の物質。

【請求項 27】

陽イオン性物質である、請求項 25 の物質。

【請求項 28】

陽イオン性物質は、ポリ-L-リジン、ポリ-L-アルギニン、DEAE-デキストラン、ポリブレン、キトサン、ポリエチレンイミンまたはプロタミンである、請求項 27 の物質。

【請求項 29】

請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の物質と薬剤学的に許容される担体または希釈剤
とを含む、医薬組成物。 20

【請求項 30】

陽イオン性抗微生物ペプチドをさらに含む、請求項 29 の医薬組成物。

【請求項 31】

治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において使用するための、請求項 25～
28 のいずれか 1 項に記載の物質または請求項 29 または 30 の医薬組成物。

【請求項 32】

治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において、別々に、同時に、または連続
的に使用するための、請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の物質および陽イオン性抗
微生物ペプチドとを含む、生成物。 30

【請求項 33】

治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において、同時にまたは連続的に使用す
るための、細菌の防御機構と陽イオン性抗微生物ペプチドのインヒビターとを含む生成物
であって、ここで該防御機構は、細菌プロテイナーゼによりプロテオグリカンを分解して
、陽イオン性抗微生物ペプチドに結合して該ペプチドの抗微生物活性を阻害することがで
きるグリコサミノグリカンを放出する、上記生成物。

【請求項 34】

グリコサミノグリカンは、細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解により放出
される、請求項 33 の生成物。

【請求項 35】

40

インヒビターは、グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻
止することができる、請求項 33 または 34 の生成物。

【請求項 36】

インヒビターは、細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻止することがで
きる、請求項 33 または 34 の生成物。

【請求項 37】

インヒビターは、細菌プロテイナーゼによる陽イオン性抗微生物ペプチドの分解を阻止す
ることができる、請求項 33 または 34 の生成物。

【請求項 38】

慢性または急性の細菌感染を治療する方法で使用するための医薬の製造における、請求項 50

25～28のいずれか1項に記載の物質、請求項29または30に記載の医薬組成物、または請求項32～36のいずれか1項に記載の生成物の使用。

【請求項39】

方法は、潰瘍を治療する方法である、請求項38の物質の使用。

【請求項40】

方法は、創傷治癒を促進する方法である、請求項38の使用。

【請求項41】

慢性または急性の細菌感染を治療する方法であって：

(i) 細菌による抗微生物ペプチドの不活性化を阻害する物質の同定、

(ii) 必要な患者への治療上有効量の物質の投与、

を含む上記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、慢性および急性の微生物感染症の治療に使用される物質に関する。本発明はまた、治療法、特に慢性および急性の微生物感染症の治療に有用な物質の同定方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

感染の間の1つの基本的な宿主防御機構は、微生物の白血球介在死滅に依存する。最近、膜破壊により種々のグラム陰性菌ならびにグラム陽性細菌を死滅させることができる一群の陽イオン性抗微生物ペプチドが、多くの生物の先天的な宿主防御系の重要な成分として考えられている。これらのペプチドは、感染を受ける生物学的境界に局在する好中球や上皮細胞中で見いだされる。

【0003】

病原体は、この第一線の宿主防御を乗り越えて、急性ならびに慢性の一連の臨床的に重要な病状を発症させることができるようである。感染の間、細菌は、種々の方策を利用して宿主防御機構を乗り越える。細菌は、種々のプロテイナーゼを放出し、これらは、急性感染中に、カリクレイン、プラスミノゲン、補体、サイトカイン、抗体、および抗プロテイナーゼを含む宿主の特定の経路を変化させる。細菌による外毒素の産生とタンパク質を変化させる細胞サイクルも報告されており、これは、宿主防御を易感染性にすることを目的とするさらなる経路である。

【0004】

化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) のような細菌は、容易に創傷感染や丹毒を生じる。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) および霊菌 (*Proteus mirabilis*) は、慢性の創傷中に存続することが知られている。これらの細菌はすべて、プロテオグリカン (PG) の豊富な結合組織中で増殖し繁殖する。

【0005】

(発明の要約)

本発明者らは、細菌により分泌される細胞外プロテイナーゼが、例えば結合組織中に存在するようなプロテオグリカンを分解することにより、グリコサミノグリカンを放出することを証明した。次にグリコサミノグリカンは、好中球と上皮細胞により分泌される陽イオン性抗微生物ペプチドに結合し、これらの抗微生物ペプチドが細菌を死滅させることを妨害する。特に本発明者らは、デルマタン硫酸含有プロテオグリカン (例えば、デコリン) が、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) および霊菌 (*Proteus mirabilis*) からの細菌プロテイナーゼにより分解されて、デルマタン硫酸を産生することを証明

10

20

30

40

50

した。彼らは、デルマタン硫酸が好中球由来 α -デフェンシンとLL-37に結合すること、そしてこの結合は、 α -デフェンシンとLL-37の抗微生物活性を完全に中和することを証明した。従って、感染の間のグリコサミノグリカンの放出、例えばプロテオグリカン分解によるデルマタン硫酸の放出は、重要なかつ従来は知られていなかった細菌の防御機構であり、これは、新規な抗細菌法の標的となり得る。

【0006】

従って本発明は、陽イオン性抗微生物ペプチドの抗微生物活性を増強するのに使用するための、プロテイナーゼ／グリコサミノグリカン経路の阻害作用を阻止する物質を提供する。

【0007】

本発明はまた、プロテイナーゼ／グリコサミノグリカン経路の阻害作用を阻止することにより、陽イオン性抗微生物ペプチドの抗微生物活性を増強する物質の同定法であって：

(i) 第1の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

(ii) 第2の成分として、細菌を提供し；

(iii) 第3の成分として、プロテイナーゼ／グリコサミノグリカン経路の成分の一部またはすべてを提供し、こうして第3の成分が第1の成分（例えば、グリコサミノグリカン、または細菌、または細菌とプロテオグリカン、または細菌プロテイナーゼ、または細菌プロテイナーゼとプロテオグリカン）の抗微生物作用を低下させ；

(iv) 第1、第2、および第3の成分を、第3の成分の非存在下で抗微生物物質による細菌の死滅を可能にし、試験物質の非存在下で第3の成分による第1の成分の抗微生物活性の阻害を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；

(v) 細菌の生存を監視して、試験物質が抗微生物活性を増強することができるかどうか（抗微生物活性を増強することができる試験物質は、細菌の死滅を促進する）を決定する、ことを含む上記方法を提供する。

【0008】

陽イオン性抗微生物ペプチドの阻害に至るプロテイナーゼ／グリコサミノグリカン経路は、2つ以上の段階で阻害することができ、結果としての細菌への作用を監視する必要無く、各段階で試験物質の阻害作用を監視してもよいことが理解されるであろう。特に試験物質は、グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用、グリコサミノグリカンの放出、例えばプロテオグリカンからのグリコサミノグリカンの細菌プロテイナーゼ活性化放出、または細菌プロテイナーゼによる陽イオン性抗微生物ペプチドの直接の分解を阻害する。従って、プロテイナーゼ／グリコサミノグリカン経路の阻害作用を阻止することにより、陽イオン性抗微生物ペプチドの抗微生物活性を増強する物質は、本発明により提供される以下のいずれか1つの方法により同定される：

【0009】

— グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻害することができる物質を同定する方法であって：

(i) 第1の成分として、グリコサミノグリカンを提供し；

(ii) 第2の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

(iii) 第1および第2の成分を、試験物質の非存在下で第1および第2の成分が相互作用することを可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(iv) 第1の成分と第2の成分の相互作用を監視して、こうして試験物質が第1の成分と第2の成分の相互作用を破壊することができるかどうかを決定する、ことを含む上記方法；

【0010】

— 陽イオン性抗微生物ペプチドのグリコサミノグリカン介在阻害を阻止することができる物質を同定する方法であって：

(i) 第1の成分として、グリコサミノグリカンを提供し；

(ii) 第2の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

(iii) 第3の成分として、細菌を提供し；

10

20

30

40

50

(i v) 第 1、第 2、および第 3 の成分を、第 1 の成分の非存在下で第 2 の成分による細菌の死滅を可能にし、試験物質の非存在下で第 2 の成分による細菌の死滅の、第 1 の成分による阻害を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(v) 細菌の生存を監視し、こうして試験物質が陽イオン性抗微生物ペプチドのグリコサミノグリカン介在阻害を妨害することができるかどうかを決定する、ことを含む上記方法；

【0011】

ー 細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害することができる物質を同定する方法であって：

(i) 第 1 の成分として、細菌プロテイナーゼを提供し；

10

(i i) 第 2 の成分として、プロテオグリカンを提供し；

(i i i) 第 1 および第 2 の成分を、試験物質の非存在下で第 1 の成分による第 2 の成分の分解を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(i v) 第 2 の成分の分解を監視して、こうして試験物質が、プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害することができるかどうかを決定する、ことを含む上記方法；

【0012】

ー 細菌プロテイナーゼによる陽イオン性抗微生物ペプチドの分解を阻害することができる物質を同定する方法であって：

(i) 第 1 の成分として、細菌プロテイナーゼを提供し；

(i i) 第 2 の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

20

(i i i) 第 1 および第 2 の成分を、試験物質の非存在下で第 1 の成分による第 2 の成分の分解を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(i v) 第 2 の成分の分解を監視して、こうして試験物質が、プロテイナーゼによる陽イオン性抗微生物ペプチドの分解を阻害することができるかどうかを決定する、ことを含む上記方法。

【0013】

本発明はまた、以下を提供する：

ー グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻害することができる物質の同定に使用するためのキットであって：

(a) グリコサミノグリカン；と

30

(b) 陽イオン性抗微生物ペプチド、とを含むキット；

【0014】

ー 細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害することができる物質の同定に使用するためのキットであって：

(a) プロテオグリカン；と

(b) 細菌プロテイナーゼ、とを含むキット；

ー 本発明の方法により同定される物質；

ー 本発明の物質を含む医薬組成物；

ー 治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法に使用するための本発明の物質または医薬組成物；

40

ー 治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において、同時にまたは連続的に使用するための本発明の物質と陽イオン性抗微生物ペプチドとを含む生成物；

【0015】

ー 治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において、同時にまたは連続的に使用するための、細菌の防御機構のインヒビターと陽イオン性抗微生物ペプチドとを含む生成物（ここで、該防御機構は、細菌プロテイナーゼによりプロテオグリカン分解して、陽イオン性抗微生物ペプチドに結合して該ペプチドの抗微生物活性を阻害することができるグリコサミノグリカン放出する）；

ー 慢性または急性の細菌感染を治療する方法で使用するための医薬の製造における、本発明の物質、医薬組成物または生成物の使用。

50

【0016】

(配列表の簡単な説明)

配列番号1は、陽イオン性抗微生物ペプチドLL-37のアミノ酸配列である。

配列番号2は、陽イオン性抗微生物ペプチドα-デフェンシンのアミノ酸配列である。

【0017】

(発明の詳細な説明)

本明細書と添付の請求の範囲を通して、「含んでなる」および「含む」という用語は、包括的であると理解されたい。すなわちこれらの用語は、文脈により、他の成分または整数を特に記載されていなくても含むことが可能であることを企図する。

【0018】

本発明は、細菌の防御機構を妨害することにより陽イオン性抗微生物ペプチドの作用を増強する物質の同定法を提供する。細菌の防御機構は、グリコサミノグリカンの放出と、放出されたグリコサミノグリカンの陽イオン性抗微生物ペプチドへの結合を含む。グリコサミノグリカンの陽イオン性抗微生物ペプチドへの結合は、ペプチドの抗微生物活性（本明細書において、プロテイナーゼ／グリコサミノグリカン経路と呼ぶ）を阻害する。グリコサミノグリカンは、プロテオグリカンの分解により放出される。好ましくはプロテオグリカンは、細菌プロテイナーゼにより分解される。グリコサミノグリカン放出の他の機構には、内因性金属プロテイナーゼにより仲介されるプロテオグリカンの放出の増強、プロテオグリカンの産生の増加、および結合組織中の結合部位からのプロテオグリカンの排除がある。例えば、細菌プロテイナーゼは、内因性マトリックス金属プロテイナーゼを直接活性化する。妨害は、例えば、例えばプロテイナーゼ結合または活性を阻害することによる、またはグリコサミノグリカンの陽イオン性抗微生物ペプチドへの結合を阻止することによる、プロテオグリカンの分解の阻止でもよい。

【0019】

陽イオン性抗微生物ペプチドは当該分野で公知である。例えば、レーラー（Lehrer, R. J.）とガンズ（Ganz, T.）（1999）、哺乳動物と昆虫宿主防御における抗微生物ペプチド、Curr Opin Immunol 11:23-27を参照されたい。

【0020】

陽イオン性抗微生物ペプチドは典型的には、細菌膜を破壊し従って細菌を死滅させることができる抗細菌性ペプチドである。陽イオン性抗微生物ペプチドは、外因性に加えてもよい。陽イオン性抗微生物ペプチドは好ましくは、感染部位で白血球および／または上皮細胞により産生される。好ましくは白血球は好中球である。陽イオン性抗微生物ペプチドは、好ましくはデフェンシンまたはカテリシジン（cathelicidin）である。さらに好ましくは陽イオン性抗微生物ペプチドは、α-デフェンシン（配列番号2）またはLL-37（配列番号1）である。陽イオン性抗微生物ペプチドは、配列番号1または配列番号2の変種または断片を含み、この変種または断片は、抗微生物活性、好ましくは抗細菌活性を示す。例えば、陽イオン性抗微生物ペプチドは、図7で下線を引いた配列を含む配列番号1の断片でもよい。

【0021】

本発明の方法で使用するために提供される陽イオン性抗微生物ペプチドは、任意の適当な供給源からのものである。例えば、陽イオン性抗微生物ペプチドは、組換えペプチドでも、陽イオン性抗微生物ペプチドは、白血球または上皮細胞から精製されても、または陽イオン性抗微生物ペプチドは、白血球、上皮細胞または培養物中で増殖させた組換えペプチドでトランスフェクションした細胞から抽出される増殖培地中に存在してもよい。ペプチドは、天然の配列を含んでも、人工的に変異させた配列を含んでもよい（ただし、変異は、ペプチドが細菌膜を破壊する能力またはグリコサミノグリカンと相互作用する能力に影響を与えないものとする）。

【0022】

ペプチドが抗微生物活性を示すかどうかを調べるための典型的な測定法は、細菌、例えば

10

20

30

40

50

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、霊菌 (*Proteus mirabilis*) または大腸菌 (*E. coli*) を、ペプチドとインキュベートして、細菌の生存を監視することを含む。典型的には、抗微生物ペプチドは、 $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ からの濃度、例えば $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、または $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度で、細菌を有効に死滅させる。

【0023】

細菌の生存は、適当な方法により監視される。典型的にはコロニー形成単位の数が増定される。細菌の生存はまた、宿主動物または宿主細胞への細菌の作用を評価することにより、間接的に監視してもよい。 10

【0024】

細菌は任意の適当な株でよい。細菌は、グラム陰性でもグラム陽性でもよい。好ましくは細菌株は、ヒトまたは動物の感染部位に見いだされるものである。好ましくは感染部位は、皮膚または粘膜のようなヒトまたは動物への病原体の侵入の障壁になるようなものである。好ましくは細菌は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、または霊菌 (*Proteus mirabilis*) である。

【0025】

本発明の方法または本明細書に記載の測定法において、任意の適当な細菌調製物を使用することができる。例えば細菌は、TH培地またはC培地中で対数中期まで増殖してもよい。次に細菌を、例えば5mMグルコースを含有する10mMトリス塩酸 (pH 7.5) 中で洗浄し、希釈する。典型的には、1測定当たり $5\text{ }\mu\text{l} \sim 500\text{ }\mu\text{l}$ の細菌、好ましくは $10\text{ }\mu\text{l} \sim 100\text{ }\mu\text{l}$ の細菌 ($2 \times 10^6\text{ cfu/ml}$) を使用する。細菌と抗微生物ペプチド、抗微生物ペプチドとグリコサミノグリカン、抗微生物ペプチドと試験物質または抗微生物ペプチド、グリコサミノグリカンと試験物質のインキュベーションは、典型的には 37°C で30分～6時間、好ましくは2時間～4時間行われる。抗微生物活性は、任意の適当な方法により定量され、例えばインキュベーション混合物の連続希釈物を作成し、希釈物を寒天 (例えばTH寒天) 上に蒔き、 37°C でインキュベートし (好ましくは一晩)、産生されたコロニー形成単位 (CFU) の数を測定することにより、定量される。 30

【0026】

本発明の方法での使用に適したグリコサミノグリカンは、ペプチドの抗微生物機能が阻害されるように、陽イオン性抗微生物ペプチドと相互作用することができる。グリコサミノグリカンは、典型的には内因性グリコサミノグリカンである。グリコサミノグリカンは、好ましくはヘパラン硫酸またはヘパリンであり、さらに好ましくはデルマタン硫酸である。好ましくは本発明の方法での使用に適したグリコサミノグリカンは、高度の硫酸化および/またはイズロン酸含量を示す。イズロン酸含量は、典型的には少なくとも50%、例えば少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90% である。硫酸化の程度は、少なくとも50%、例えば少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%である。本発明の方法で使用するためのグリコサミノグリカンはまた、追加の修飾を含有してもよく、例えばイズロン酸は2-O-硫酸化されてもよい。 40

【0027】

グリコサミノグリカンが陽イオン性抗微生物ペプチドと相互作用することができるかどうかを決定するための典型的な測定法には、陽イオン性抗微生物ペプチドを例えばニトロセルロース上に固定化し、放射能標識グリコサミノグリカンとプローブ結合させる方法がある。好ましくはグリコサミノグリカンのペプチドへの結合は、過剰の非標識デルマタン硫酸で阻害される。 50

【0028】

グリコサミノグリカンペプチドが陽イオン性抗微生物ペプチドの抗微生物活性を阻害することができるかどうかを決定するための典型的な測定法には、細菌、例えば緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) または霊菌 (*Proteus mirabilis*) の調製物または培養物を、グリコサミノグリカンおよびペプチドとインキュベートし、細菌の死滅を監視する方法がある。典型的には抗微生物ペプチドは、グリコサミノグリカンの非存在下で細菌を有効に死滅させる濃度で加えられるであろう。典型的にはグリコサミノグリカンは、細菌のペプチド介在死滅を、 $10\mu\text{g}/\text{ml} \sim 1\text{mg}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは $10\mu\text{g}/\text{ml} \sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または最も好ましくは $20\mu\text{g}/\text{ml} \sim 250\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で阻害する。グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとのモル比は、典型的には $0.1:1$ から $1000:1$ 、好ましくは $0.5:1$ から $100:1$ 、およびさらに好ましくは $0.5:1$ から $10:1$ である。グリコサミノグリカンは、ペプチドの抗微生物活性を部分的にのみ阻害してもよい。好ましくはグリコサミノグリカンは抗微生物活性を、少なくとも 2% 、例えば少なくとも 6% 、少なくとも 16% 、少なくとも 30% 、または少なくとも 40% 阻害する。さらに好ましくは抗微生物活性はグリコサミノグリカンにより、少なくとも 50% 、例えば少なくとも 60% 、少なくとも 70% 、少なくとも 80% 、少なくとも 90% 、または少なくとも 99% 阻害される。

10

【0029】

グリコサミノグリカンは、任意の特定の供給源から得られる。好ましくはグリコサミノグリカンは、真皮（皮膚）または軟骨のような結合組織から得られる。グリコサミノグリカンは、任意の適当な方法により調製され、例えばローデン (*L. Roden*)、ベーカー (*J. Baker*)、シフォネッリ (*J. A. Cifonelli*)、マシューズ (*M. B. Mathews*)、*Methods in Enzymology*、ギンズバーグ (*V. Ginsburg*) 編（アカデミックプレス (*Academic Press*)、ニューヨーク、1973年）、第28巻、73~140頁、フランソン (*L. -A. Fransson*)、ニーズスジンスキー (*I. A. Nieduszynski*)、フェルプス (*C. F. Phelps*)、シーハン (*J. K. Sheehan*)、*Biochim. Biophys. Acta.*, 586, 179 (1979)、またはフランソン (*L. -A. Fransson*)、シェーバーグ (*I. Sjöberg*)、ハブスマーク (*B. Havsmark*)、*Eur. J. Biochem.*, 106, 59 (1980) に記載されている。

20

30

【0030】

典型的には、本発明の方法で使用するためのグリコサミノグリカンは、1つ以上のプロテイナーゼ、例えば細菌プロテイナーゼの、1つ以上のプロテオグリカンへの作用により産生される。グリコサミノグリカンは、適当な細菌プロテイナーゼと適当なプロテオグリカンを提供することにより、間接的に提供されてよい。プロテオグリカンは、繊維芽細胞培養物の細胞外生成物でもよい。好ましくはプロテオグリカンは、ヘパリン、ヘパラン硫酸、または好ましくはデルマタン硫酸を含む。好ましくはプロテオグリカンは、ビグリカン (*biglycan*)、シンデカン (*syndecan*)、グリピカン (*glypican*) または CD44 である。さらに好ましくはプロテオグリカンは、デコリン (*decorin*) またはベルシカン (*versican*) である。

40

【0031】

プロテオグリカンが細菌プロテイナーゼにより分解されるかどうかを決定するための典型的な測定法には、プロテオグリカンを ^{35}S で放射能標識し、標識プロテオグリカンを細菌プロテイナーゼとともにインキュベートし、インキュベーション前に取った標識プロテオグリカンの試料とインキュベーション後に取った試料を、SDS-ポリアクリルアミドゲルに流し、標識プロテオグリカンと分解生成物の相対的サイズと量を測定する方法がある。例えば、もし細菌プロテイナーゼがシステインプロテイナーゼなら、還元剤（例えば

50

D T T) をインキュベーション混合物中に含めることが必要かも知れない。プロテオグリカン、任意の適当な供給源から取られ、例えば繊維芽細胞培養物の細胞外生成物でもよい。好ましくはプロテオグリカンは、80～500 kDa、好ましくは約100 kDaまたは約400 kDaの分子量を有する。分解産物は、好ましくは30～50 kDaの分子量を有し、これは遊離のまたはペプチド結合グリコサミノグリカン鎖に対応する。

【0032】

本明細書に記載の測定法に、任意の好適なプロテアーゼが使用できる。好ましくはプロテアーゼは、細菌プロテイナーゼである。任意の細菌調製物または細菌培養物が、細菌プロテイナーゼの供給源として使用される。細菌は、任意の適当な手段により刺激してプロテイナーゼを産生させてもよい。細菌の培養物からの増殖培地が使用できる。典型的には、細菌は、液体培地（例えば、TH培地またはC培地）中で静止期まで増殖される。本発明の方法で使用するのに適した増殖培地は、遠心分離により細菌をペレット化し、例えば、直径0.2 μm～0.4 μmのフィルターを使用して上清をろ過することにより得られる。あるいは細菌プロテイナーゼは、増殖培地から単離される。細菌プロテイナーゼを単離するのに、任意の適当な方法が使用される。例えばプロテイナーゼは、硫酸アンモニウム沈殿、透析、および適当なカラム（例えば、ハイQ陰イオン交換クロマトグラフィー）で分離することにより調製される。あるいはプロテイナーゼは、ハーワルト（H. Herwald）、コリン（M. Collin）、ムラーエスター（Muller-Esterl）、ビヨルク（L. Bjorck）、J. Exp. Med. 184, 665（1996）に記載のように調製される。本発明での使用に適した細菌プロテイナーゼには、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）エラスターゼ、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）アルカリ性プロテイナーゼ、エンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）グラチナーゼ、および化膿連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）システインプロテイナーゼがある。

10

20

【0033】

本発明により提供される陽イオン性抗微生物ペプチド活性を増強する物質の同定法は、グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻害することができる物質の同定法を含む。そのような方法は基本的に以下からなる：

30

(i) 第1の成分として、グリコサミノグリカンを提供し；

(ii) 第2の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

(iii) 第1および第2の成分を、試験物質の非存在下で第1および第2の成分が相互作用することを可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(iv) 第1の成分と第2の成分の相互作用を監視して、こうして試験物質が第1の成分と第2の成分の相互作用を破壊することができるかどうかを決定する。

【0034】

この方法での使用に適したグリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドは、既に本明細書に記載されている。第1および第2の成分を試験物質に接触させるために、任意の適当な条件が使用される。典型的には、陽イオン性ペプチドは、例えばニトロセルロース膜またはポリアクリルアミドゲル（これは好ましくは非変性性である）上に固定化され、固定化されたペプチドは、グリコサミノグリカンおよび試験物質とインキュベートされる。グリコサミノグリカンの固定化ペプチドへの結合、従って結合に対して試験物質が競合する能力は、任意の適当な手段により監視される。例えばグリコサミノグリカンは、例えば³⁵Sで放射能標識され、固定化ペプチドに結合した放射能標識グリコサミノグリカンは、任意の適当な手段（例えば、シンチレーション計測、ホスホリメジャー（phosphor imager）、またはX線フィルム）を使用して検出される。好ましくは、同一の条件下で、好ましくは同時に、試験物質有りおよび無しで実験を行い、実験の結果を比較して、試験物質がグリコサミノグリカンのペプチドへの結合の低下を引き起こすかどうかを決定する。一般に試験物質は、過剰に加えられる。好ましくは試験物質は、グリコサミノグリカンのペプチドへの結合を、少なくとも20%、少なくとも30%、少な

40

50

くとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%低下させるか、またはグリコサミノグリカンのペプチドへの結合を、物質の濃度0.1mg/ml、1mg/ml、10mg/ml、100mg/ml、500mg/ml、1mg/ml、10mg/ml、100mg/ml、または0.1g/mlで、実質的に妨害する。生成物の相互作用の程度と濃度の上記の低下パーセントの任意の組合せが、本発明の物質を規定するのに使用され、より低濃度でのより大きな分解が好ましい。本発明の好適な物質は、1mg/mlまたは0.5mg/mlの濃度で少なくとも50%レベルの阻害を示すものである。

【0035】

本発明により提供される陽イオン性抗微生物ペプチド活性を増強する物質の同定法は、陽イオン性抗微生物ペプチドの抗微生物活性へのグリコサミノグリカンの阻害作用を阻止することができる物質を同定する方法を含む。そのような方法は基本的に以下からなる：

(i) 第1の成分として、グリコサミノグリカンを提供し；

(ii) 第2の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

(iii) 第3の成分として、細菌を提供し；

(iv) 第1、第2、および第3の成分を、第1の成分の非存在下で第2の成分による細菌の死滅を可能にし、試験物質の非存在下で第2の成分による細菌の死滅の、第1の成分による阻害を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(v) 細菌の死滅を監視し、こうして試験物質が陽イオン性抗微生物ペプチドのグリコサミノグリカン介在阻害を妨害することができるかどうかを決定する。

【0036】

工程(iv)において第1および第2の成分は、まず試験物質と接触し、次に第3の成分と接触してもよい。第1および第2の成分を試験物質と接触させた後の適当な時間、例えば0~4時間後、例えば30秒後、1分後、5分後、15分後、30分後、または1時間後に、第3の成分を、第1の成分、第2の成分、および試験物質の混合物に接触させてもよい。

【0037】

試験物質をまず、陽イオン性抗微生物ペプチドの活性に対する直接作用について試験してもよい。好ましくは、陽イオン性抗微生物ペプチド活性を阻害しない試験物質のみが、殺菌測定法で使用される。

【0038】

この方法での使用に適したグリコサミノグリカン、陽イオン性抗微生物ペプチドおよび細菌調製物は、既に記載されている。第1、第2、および第3の成分を試験物質に接触させるために、任意の適当な条件が使用される。典型的には、1測定について、5μl~500μlの細菌、好ましくは10μl~100μlの細菌(2×10⁶ cfu/ml)が使用される。この3つの成分は典型的には、37℃で30分~6時間、好ましくは2時間~4時間インキュベートされる。細菌の死滅の監視は、公知の方法により行われ、例えばインキュベーション混合物の連続希釈物を作成し、希釈物を寒天(例えばTH寒天)上に蒔き、37℃で、好ましくは一晩インキュベートし、産生されたコロニー形成単位(CFU)の数を測定することにより定量される。好ましくは3つの測定[1つは、第2の成分(抗微生物ペプチド)のみを含有し、1つは、第1および第2の成分(グリコサミノグリカンと抗微生物ペプチド)のみを含有し、1つはすべての3つの成分を含有する]を、同一の条件下でかつ好ましくは同時に行う。3つの測定の結果を定量し、結果を比較して、グリコサミノグリカンによる抗微生物活性の阻害を阻止する試験物質の有効性を決定する。好ましくは試験物質は、ペプチドの抗微生物活性に対するグリコサミノグリカンの阻止作用を、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%逆転させるか、または陽イオン性抗微生物ペプチド活性の阻害を、物質の濃度0.1mg/ml、1mg/ml、10mg/ml、100mg/ml、500mg/ml、1mg/ml、10mg/ml、100mg/ml、または0.1

10

20

30

40

50

g / m l で、実質的に妨害する。阻害の程度と生成物の濃度の上記の低下パーセントの任意の組合せが、本発明の物質を規定するのに使用され、より低濃度でのより大きな分解が好ましい。本発明の好適な物質は、1 m g / m l または 0 . 5 m g / m l の濃度で少なくとも 5 0 % レベルの阻害を示すものである。

【0039】

第2の成分の分解もまた、既に本明細書に記載の測定法を使用して、試験物質の存在下と非存在下で、陽イオン性抗微生物ペプチドによる細菌の死滅を監視することにより、間接的に監視される。

【0040】

本発明により提供される陽イオン性抗微生物ペプチド活性を増強する物質の同定法は、例えば細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻止することにより、グリコサミノグリカン（次にグリコサミノグリカンは、陽イオン性抗微生物ペプチドと自由に相互作用する）の放出を阻害することができる物質を同定する方法を含む。そのような方法は基本的に以下からなる：

(i) 第1の成分として、細菌プロテイナーゼを提供し；

(i i) 第2の成分として、プロテオグリカンを提供し；

(i i i) 第1および第2の成分を、試験物質の非存在下で第1の成分による第2の成分の分解を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(i v) 第2の成分の分解を監視して、こうして試験物質が、プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害することができるかどうかを決定する。

【0041】

適当な第1および第2の成分、およびプロテオグリカンが細菌プロテイナーゼにより分解されるかどうかを決定するための測定法は、既に本明細書に記載されている。好ましくは2つの測定（1つは、試験物質を含み、1つは試験物質を含まない）を、同一の条件下で行う。次に、2つの測定の間の分解生成物の相対量および／または非分解プロテオグリカンの相対量を比較して、試験物質による分解の阻害程度を決定する。各生成物の相対量は、ホスホリメジャー（p h o s p h o r i m a g e r）を使用して定量される。好ましくは、プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害する試験物質は、プロテオグリカンの分解を、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%低下させるか、または物質の濃度0 . 1 m g / m l、1 m g / m l、10 m g / m l、100 m g / m l、500 m g / m l、1 m g / m l、10 m g / m l、100 m g / m l、または0 . 1 g / m l で、実質的に妨害する。相互作用の程度と生成物の濃度の上記の低下パーセントの任意の組合せが、本発明の物質を規定するのに使用され、より低濃度でのより大きな分解が好ましい。本発明の好適な物質は、1 m g / m l または 0 . 5 m g / m l の濃度で少なくとも50%レベルの阻害を示すものである。

【0042】

本発明により提供される陽イオン性抗微生物ペプチド活性を増強する物質の同定法は、細菌プロテイナーゼによる陽イオン性抗微生物ペプチドの分解を妨害することができる物質の同定法を含む。そのような方法は基本的に以下からなる：

(i) 第1の成分として、細菌プロテイナーゼを提供し；

(i i) 第2の成分として、陽イオン性抗微生物ペプチドを提供し；

(i i i) 第1および第2の成分を、試験物質の非存在下で第1の成分による第2の成分の分解を可能にする条件下で、試験物質に接触させ；そして

(i v) 第2の成分の分解を監視して、こうして試験物質が、プロテイナーゼによる陽イオン性抗微生物ペプチドの分解を阻害することができるかどうかを決定する。

【0043】

適当な第1および第2の成分は、既に本明細書に記載されている。陽イオン性抗微生物ペプチドが細菌プロテイナーゼにより分解されるかどうかを決定する典型的な測定法は、ペ

10

20

30

40

50

プチドを³⁵Sで放射能標識し、標識ペプチドを細菌プロテイナーゼとインキュベートし、インキュベーション前に取った標識ペプチドの試料とインキュベーション後に取った試料をSDS-ポリアクリルアミドゲルに流し、標識ペプチドと分解生成物の相対量を測定する方法がある。例えば、もし細菌プロテイナーゼがシステインプロテイナーゼなら、還元剤（例えばDTT）をインキュベーション混合物中に含めることが必要かも知れない。好ましくは2つの測定（1つは、試験物質を含み、1つは試験物質を含まない）を、同一の条件下で行う。次に、2つの測定の間分解生成物の相対量および／または非分解ペプチドの相対量を比較して、試験物質による分解の阻害程度を決定する。各生成物の相対量は、ホスホリメジャー（phosphorimager）を使用して定量される。好ましくは、プロテイナーゼによるペプチドの分解を阻害する試験物質は、ペプチドの分解を、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%低下させるか、またはペプチドの分解を、物質の濃度0.1mg/ml、1mg/ml、10mg/ml、100mg/ml、500mg/ml、1mg/ml、10mg/ml、100mg/ml、または0.1g/mlで、実質的に妨害する。相互作用の程度と生成物の濃度の上記の低下パーセントの任意の組合せが、本発明の物質を規定するのに使用され、より低濃度でのより大きな分解が好ましい。本発明の好適な物質は、1mg/mlまたは0.5mg/mlの濃度で少なくとも50%レベルの阻害を示すものである。

10

20

【0044】

ペプチド分解を監視するための他の適当な方法には、タンパク質染色、免疫ブロッティング、および放射性ヨード化がある。ペプチド分解はまた、機能的測定法、例えば分解産物に残存抗細菌活性があるかどうかを調べる方法により監視される。抗細菌活性は、殺菌測定法を使用して、コロニー形成単位（cfu）を測定することにより決定される。

【0045】

第2の成分の分解はまた、既に本明細書に記載の測定法を使用して、試験物質の存在下および非存在下で、陽イオン性抗微生物ペプチドによる細菌の死滅を監視することにより、間接的に監視される。

【0046】

本発明はまた、陽イオン性抗微生物ペプチド活性を増強する試験物質を同定するためのキットを提供し、このキットは以下を含む：

30

- (i) グリコサミノグリカン；および
- (ii) 陽イオン性抗微生物ペプチド。

【0047】

キットはさらに以下を含む：

- (iii) 細菌試料；および／または
- (iv) 試験物質が、グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻害するかどうかを決定するための手段。

【0048】

本発明はまた、陽イオン性抗微生物ペプチド活性を増強する試験物質を同定するためのキットを提供し、このキットは以下を含む：

40

- (i) プロテオグリカン；
- (ii) 細菌プロテイナーゼ。

【0049】

キットはさらに以下を含んでよい：

- (ii) 試験物質が、細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻害するかどうかを決定するための手段。

【0050】

本発明により提供されるキットはまた以下を含む：

- (v) または (iv) 陽イオン性抗微生物ペプチド活性を増強する試験物質の能力を決定

50

するための測定法を実施するための説明書。

【0051】

「物質」という用語は、単一の物質、および2、3またはそれ以上の物質の組合せを含むことを企図する。例えばこの用語は、単一のペプチド、2つ以上のペプチドの混合物、またはペプチドと規定される化学的物質との混合物を含んでよい。

【0052】

任意の適当な試験物質を本発明の方法で使用するができる。好ましくは試験物質は、真核細胞に対して非毒性である。上記測定法で試験される好適な試験物質には、炭水化物、化学的修飾（例えば、硫酸化および／またはカルボキシル化）を有する炭水化物骨格を含む分子、ペプチド、およびペプチド模倣物を含むことができる。特に好適な試験物質には、放出されたグリコサミノグリカンのスカベンジャーとして機能性する陽イオン性物質、ポリエチレンイミン、プロタミン、ポリブレン、ポリ-L-リジン、ポリ-L-アルギニン、キトサンおよびポリミキシンがある。他の適当な試験物質には、コンビナトリアルライブラリー、規定された化学的物質、オリゴヌクレオチドおよび例えばディスプレイライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）のような天然産物ライブラリーがある。さらに抗体生成物（例えば、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、1本鎖抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、およびヒト化抗体）、またはこれらの断片が使用される。適当な試験物質の例を表1に示す。

10

【0053】

【表1】

20

表 1

陰イオン性物質	構造
HS3	4GlcA(+/-2S)·GlcNAc(+/-6S)·IdoA(+/-2S)·GlnSO3(+/-3S,+/-6S)
HS4	
HS5	
HS6	
HSからの二糖	UA(2S)·GlcN(6S)
	UA(2S)·GlcN(6S)
	UA(2S)·GlcN
	UA(2S)·GlcNS(6S)
	UA(2S)·GlcNS
	UA·GlcN(6S)
	UA·GlcN
	UA·GlcNS(6S)
CS-6	GlcA·GalNAc(6S)ポリマー
CS-4	GlcA·GalNAc(4S)ポリマー
DS36	IdoA(+/-2S)·GalNAc(4S)/GlcA·GalNAc(6S)ポリマー
DS13	
CS/DSからの二糖	UA·GalNAc
	UA·GalNAc(4S)
	UA·GalNAc(6S)
	UA(2S)·GalNAc
	UA(2S)·GalNAc(4S)
	UA(2S)·GalNAc(6S)
	UA(2S)·GalNAc(6,4S)
	UA·GalNAc(6,4S)
CS-D	GlcA(2S)·GalNAc(4S)ポリマー
CS-E	GlcA·GalNAc(4,6S)ポリマー
シュクロースオクタ硫酸	シュクロース／8 硫酸塩
カラゲナン	～ 1 硫酸／二糖
	～ 2 硫酸／二糖
	～ 3 硫酸／二糖
デキストラン硫酸	
デキストラン	
ヘパリン	
LMW-ヘパリン	
陽イオン性物質	
ポリ-L-リジン	
ポリ-L-アルギニン	
DEAE-デキストラン	
ポリブレン (ヘキサジ メトリンブロミド)	
プロタミン	

10

20

30

40

【表 2】

ポリミキシンB	
ポリミキシンB ノナペ プチド	
ポリエチレンイミン	
キトサン	
プロテイナーゼインヒ ビター	
Ilomostat(GM6001)な ど	

10

【0054】

炭水化物試験物質は、単糖、二糖、オリゴ糖、または多糖でよい。例えばコンドロイチン硫酸のポリマー $[GlcA-GalNAc]_n$ またはデルマタン硫酸。好ましくは炭水化物試験物質は、陽イオン性抗微生物ペプチドに、その抗微生物活性に影響を与えることなく結合することができる。

【0055】

ペプチド試験物質は、陽イオン性抗微生物ペプチドの模倣物でもよい。好ましくは模倣物は、グリコサミノグリカンおよび／またはプロテアーゼに結合することができて、グリコサミノグリカンおよび／またはプロテアーゼを封鎖し、こうしてグリコサミノグリカンおよび／またはプロテアーゼが、陽イオン性抗微生物ペプチドと相互作用することを防ぐ。模倣物は、グリコサミノグリカンに結合する陽イオン性抗微生物ペプチドの領域のみでなく、抗微生物活性を有するペプチドの領域も模倣する。試験ペプチドはまた、任意の他のアミノ酸配列を含有してもよい。好ましくはペプチドは、グリコサミノグリカンおよび／またはプロテアーゼと相互作用して、これらが陽イオン性抗微生物ペプチドと結合するのを妨害することを可能にするアミノ酸配列を含む。

20

【0056】

試験物質は、例えば1回の反応につき10個の物質の最初のスクリーニングで使用され、阻害または活性化を示すこれらのバッチの物質が個々に試験される。試験物質は、1 nM ~ 1 000 μ M、好ましくは1 μ M ~ 100 μ M、または5 μ M ~ 50 μ M、さらに好ましくは1 μ M ~ 10 μ Mの濃度で使用される。

30

【0057】

本発明はまた、治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において同時にまたは連続的に使用するための、細菌プロテイナーゼ／グリコサミノグリカン防御経路のインヒビターと陽イオン性抗微生物ペプチドを含有する。

【0058】

インヒビターは、グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻止することができ、細菌プロテイナーゼによるプロテオグリカンの分解を阻止することができ、または細菌プロテイナーゼによる陽イオン性抗微生物ペプチドの分解を阻止することができる。グリコサミノグリカンと陽イオン性抗微生物ペプチドとの相互作用を阻止することができるインヒビターは、グリコサミノグリカンに結合して、これが陽イオン性抗微生物ペプチドに結合することを妨害するか、または陽イオン性抗微生物ペプチドに結合して、ペプチドがその抗微生物活性を保持するが、阻害性グリコサミノグリカンには結合できないようにする。

40

【0059】

好適なインヒビターには、炭水化物、化学的修飾（例えば、硫酸化および／またはカルボキシル化）を有する炭水化物骨格を含む分子、ペプチド、およびペプチド模倣物を含む。他の適当なインヒビターには、コンビナトリアルライブラリー、規定された化学的物質、オリゴヌクレオチドおよび、例えば、ディスプレイライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）のような天然産物ライブラリーがある。

【0060】

50

インヒビターは、陽イオン性抗微生物ペプチドの模倣物、例えばペプチドでもよい。好ましくは模倣物は、グリコサミノグリカンおよび／またはプロテアーゼに結合することができて、グリコサミノグリカンおよび／またはプロテアーゼを封鎖し、こうしてグリコサミノグリカンおよび／またはプロテアーゼが、陽イオン性抗微生物ペプチドと相互作用することを防ぐ。インヒビターは、グリコサミノグリカンに結合する陽イオン性抗微生物ペプチドの領域のみでなく、抗微生物活性を有するペプチドの領域も模倣する。好ましくは模倣物は、グリコサミノグリカンおよび／またはプロテアーゼと相互作用して、これらが陽イオン性抗微生物ペプチドと結合することを妨害することを可能にするアミノ酸配列を含む。

【0061】

インヒビターは好ましくは、単糖、二糖、オリゴ糖、または多糖である。さらに好ましくはインヒビターは、例えばポリエチレンイミン、プロタミン、ポリブレン、ポリーLーリジン、ポリーLーアルギニン、キトサンまたはポリミキシンのような陽イオン性物質である。好ましくはインヒビターは、陽イオン性抗微生物ペプチドに、その抗微生物活性に影響を与えることなく結合することができる。

【0062】

陽イオン性抗微生物ペプチドは、細菌膜を破壊し、こうして細菌を死滅させることができるペプチドである。好ましくは陽イオン性抗微生物ペプチドは、感染部位で白血球および／または上皮細胞により産生される。好ましくは白血球は好中球である。陽イオン性抗微生物ペプチドは好ましくは、デフェンシンまたはLL-37のような陽イオン性抗細菌性ペプチドである。さらに好ましくは陽イオン性抗微生物ペプチドはα-デフェンシンである。本発明の方法での使用のために提供される陽イオン性抗微生物ペプチドは、任意の適当な供給源から得られる。例えば、陽イオン性抗微生物ペプチドは、組換えペプチドでも、陽イオン性抗微生物ペプチドは、白血球または上皮細胞から精製されるか、または陽イオン性抗微生物ペプチドは、白血球、上皮細胞または培養物中で増殖させた組換えペプチドでトランスフェクションした細胞から抽出される増殖培地中に存在してもよい。ペプチドは、インビトロタンパク質合成により産生されてもよい。ペプチドは、天然の配列を含んでも、人工的に変異させた配列を含んでもよい（ただし、変異は、ペプチドが細菌膜を破壊する能力またはグリコサミノグリカンと相互作用する能力に影響を与えないものとする）。

【0063】

本発明はまた、治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において同時にまたは連続的に使用するための、細菌プロテイナーゼ／グリコサミノグリカン防御経路の2つ以上のインヒビターを含有する生成物を提供する。さらに本発明は、治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において同時にまたは連続的に使用するための、2つ以上の本発明の物質を含有する生成物を提供する。

【0064】

本発明により同定される物質と本発明の生成物は、治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において使用される。特にそのような物質および生成物は、急性または慢性の細菌感染症の治療、潰瘍（例えば、慢性静脈潰瘍）の治療、および創傷の治療に使用される。潰瘍と他の創傷は、治癒を遅らせる細菌で感染されることがある。従って細菌の根絶により創傷治癒が促進される。本発明により同定される物質を使用して治療される他の創傷には、熱傷創、目、肺および尿路感染症、および無傷の皮膚の細菌感染症がある。任意の潰瘍（例えば、胃潰瘍）が、本発明の方法により同定される物質により治療される。本発明の物質と生成物はまた、無菌の創傷が細菌に感染されることを防ぐのに使用される。そのような物質と生成物はまた、急性もしくは慢性の感染の治療法、潰瘍の治療、または創傷治癒の促進法で使用される薬剤の製造のために使用できる。急性もしくは慢性の感染患者または潰瘍または創傷の患者の症状は、本発明の物質または生成物を投与することにより改善することができる。治療上有効量の本発明の物質または生成物は、必要とする宿主に投与される。物質は、例えば好中球により放出されるような天然に存在する（内因性

10

20

30

40

50

）陽イオン性抗微生物ペプチドを増強してもよい。あるいは外因性陽イオン性抗微生物ペプチドと一緒に投与すると、物質は外因性ペプチドの抗微生物活性を増強することがある。

【0065】

本発明の方法により同定される物質は、治療法によりヒトまたは動物の体を治療する方法において、陽イオン性抗微生物ペプチドとともに使用してもよい。特にそのような併用療法は、急性または慢性の細菌感染の治療、潰瘍の治療、および創傷の治療で使用してもよい。物質と陽イオン性抗微生物ペプチドはまた、急性または慢性の感染の治療、潰瘍の治療、または創傷治癒の促進法で使用するための、薬剤の製造に使用される。急性もしくは慢性の感染患者または潰瘍または創傷の患者の症状は、本発明の物質と陽イオン性抗微生物ペプチドの組合せ投与により改善することができる。治療上有効量の本発明の物質と陽イオン性抗微生物ペプチドは、必要とする宿主に投与される。

10

【0066】

陽イオン性抗微生物ペプチドは、好中球中、生物学的境界（例えば、肺、皮膚、粘膜および尿管）で発現される。抗微生物ペプチド活性を調節する物質は、局所的治療、例えば皮膚または角膜、および内科的使用、例えば腸管、肺および尿管で使用される。

【0067】

上記で概説したスクリーニング法に従って同定され、本発明の投与のための物質は、標準的な薬剤学的に許容される担体および／または賦形剤、例えば薬剤学の分野で一般的なものの〔例えばレミントンの薬剤科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、マックパブリッシング社（Mack Publishing Company）、イースタンペンシルバニア、第17版、1985年（この開示内容は参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載のようなもの〕とともに調製される。医薬組成物は、本発明の物質を、陽イオン性抗微生物ペプチドおよび薬剤学的に許容される担体または賦形剤とともに含有してもよい。

20

【0068】

本発明はまた、細菌プロテアーゼ／グリコサミノグリカン防御経路のインヒビター、陽イオン性抗微生物ペプチド、および薬剤学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。物質、組成物および生成物は、経腸的または腸管外（例えば、経口、頬、肛門、肺、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、局所的）、または他の適当な経路により投与される。

30

【0069】

物質の、物質と陽イオン性抗微生物ペプチドまたは生成物の治療上有効量のが、患者に投与される。物質の、物質と陽イオン性抗微生物ペプチドまたは生成物の用量は、特に使用される物質に従う種々のパラメータ（治療される患者の年齢、体重、症状；投与経路；および必要な処方）に従って決定される。医師が、特定の患者のための必要な投与経路と用量は決定できるであろう。典型的な1日用量は、物質、物質と陽イオン性抗微生物ペプチドまたは生成物の活性、治療される被験体の体重と症状、変性のタイプと重症度、および投与頻度と経路に従って、約0.1～50mg/kg体重である。好ましくは1日用量は、5mg～2gである。

40

【0070】

物質、インヒビター、およびペプチドは、同時にまたは逐次的に投与される。好ましくは物質またはインヒビターは、ペプチドの投与前に投与される。物質またはインヒビターは、ペプチドの投与前1分～4時間、好ましくはペプチドの投与前5分～1時間、ペプチドの投与前10分～30分に投与される。さらに好ましくは物質またはインヒビターおよびペプチドは、同時に投与される。

【0071】

以下の例は、本発明を例示する。

【0072】

例1

50

³⁵S-硫酸標識繊維芽細胞培養物の生成物と、細菌培養物からの増殖培地によるこれらの生成物の分解を、3～12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により分析した。

【0073】

慢性静脈創傷から最初に得られた緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) とエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 分離株を、トッド-ヘウィット (Todd-Hewitt) 培地中で37℃で18時間増殖させた。化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) AP1株 (40/58) は、ストレプトコッカスの文献と研究のための世界保健機構協力センター (World Health Organization Collaborating Centre for References and Research on Streptococci) (プラハ、チェコ共和国) から得て、C培地 (ハーワルト (H. Herwaldt)、コリン (M. Collin)、ムラー-エスター (Muller-Esterl)、ビョルク (L. Bjorck)、J. Exp. Med. 184, 665 (1996)) で静止期まで増殖させた。遠心分離して細菌をペレットにし、上清を無菌ろ過した (0.3 μm)。放射能標識プロテオグリカンの分解のために、10 μl の³⁵S-硫酸代謝標識された分泌された繊維芽細胞生成物 (シュミチェン (A. Schmidtchen)、カールステット (I. Carlstedt)、マルムストローム (A. Malmstrom)、フランソン (L-A, Fransson)、Biochem. J. 265, 289 (1990)) を、10 μl の無菌ろ過細菌上清と、37℃で6時間インキュベートした。10 μl のTH培地を対照中に加えた。ストレプトコッカスのシステインプロテイナーゼの活性化のために、10 mMのDTTを加えた。

【0074】

結合組織プロテオグリカン (PG) デコリン/ビグリカンとベルシカン、インビボならびに培養物中でヒト繊維芽細胞の主要な分泌生成物を構成する (イオッツォ (R. V. Iozzo)、Annu. Rev. Biochem., 67, 609 (1998))。3～12% SDS-PAGEによる分析により、以前の結果が確認され、デコリン (~100 kDa) とベルシカン (~400 kDa) が³⁵S-標識繊維芽細胞培養物の主要な細胞外生成物として同定された (シュミチェン (A. Schmidtchen)、カールステット (I. Carlstedt)、マルムストローム (A. Malmstrom)、フランソン (L-A, Fransson)、Biochem. J. 265, 289 (1990); シュミチェン (A. Schmidtchen)、フランソン (L-A, Fransson)、Biomed. Chrom., 7, 48 (1993))。緑膿菌 (*P. aeruginosa*) とイー・フェカリス (*E. faecalis*) 培養物からの増殖培地を添加すると、デコリンが広範に分解された。また、還元剤ジチオスレイトール (DTT) を加えると、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) 細胞外生成物は、デコリンと高分子量プロテオグリカンを分解した。

【0075】

DTTの必要性は、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) システインプロテイナーゼが分解に関与していることを示唆する。この仮定は、この作用を完全に阻止した特異的システインプロテイナーゼインヒビター (E64) の作用により確認された。

【0076】

分解された物質は、分子量30～50 kDaであり、既に記載されている (シュミチェン (A. Schmidtchen)、フランソン (L-A, Fransson)、Eur. J. Biochem. 208, 537 (1992)) ように、遊離/またはペプチド結合GAG鎖のサイズに対応した。これらの実験は、細菌プロテイナーゼによる繊維芽細胞マトリックス金属プロテアーゼ (MMP) の活性化 (バーンズ (E. H. Burns)、マーシエル (A. M. Marciel)、ムッサー (J. M. Musser)、Infect. Immun., 64, 4744 (1996); オカモト (T. Okamoto) ら、J. Biol. Chem., 272, 6059 (1997))

の可能性を排除せず、分解されたPGを与えたため、特異的プロテアーゼの調製物を用いて一連の対照実験を行った。

【0077】

緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼとアルカリ性プロテイナーゼタンパク質を、硫酸アンモニウム沈殿 (70%飽和) により調製した。透析 (10mMトリス、pH8.0) 後、ハイQ陰イオン交換クロマトグラフィー (バイオラッド (Bio-Rad)) で、10mMトリス (pH8.0) 中0~1.0M NaClの勾配を使用して、分離を行った。フロースルー画分中にエラスターゼが同定されたが、アルカリ性プロテイナーゼは、~0.5M NaClで溶出された。

【0078】

化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) のシステインプロテイナーゼは、以前のプロトコール (ハーワルト (H. Herwald)、コリン (M. Collin)、ムラーエスタール (Muller-Esterl)、ビョルク (L. Bjorck)、J. Exp. Med. 184, 665 (1996)) に従って精製された。

【0079】

イー・フェカリス (*E. faecalis*) 株はグラチナーゼを含有し、上清を直接使用した。緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼとアルカリ性プロテイナーゼ、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) システインプロテイナーゼ、およびイー・フェカリス (*E. faecalis*) グラチナーゼはすべて、精製したヒト子宮頸デコリンならびに調整培地中の³⁵S-標識繊維芽細胞デコリンを分解した。段階的イオン交換クロマトグラフィー (シュミチェン (A. Schmidtchen)、カールステット (I. Carlstedt)、マルムストローム (A. Malmstrom)、フランソン (L.-A. Fransson)、Biochem. J. 265, 289 (1990)) (繊維芽細胞由来MMPの分離のため) そして次に放射能標識繊維芽細胞プロテオグリカンのPBS透析、または繊維芽細胞MMPを不活性化するための繊維芽細胞生成物の沸騰は、分解に影響を与えなかった。化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) システインプロテイナーゼをシステインプロテイナーゼインヒビターE64とプレインキュベーション (~15分) すると、分解されなかった。

【0080】

別の創傷病原体である霊菌 (*Proteus mirabilis*) もまた、デルマタン硫酸を放出する細胞外プロテアーゼを産生することが証明されている。

【0081】

例2

次に我々は、デルマタン硫酸 (DS)、ヒトデコリンのグリコサミノグリカン (GAG) 置換基 (イオッツォ (R. V. Iozzo)、Annu. Rev. Biochem., 67, 609 (1998))、結合デフェンシン、および他の硫酸化多糖が、相互作用を阻止するかどうかを調べた。

【0082】

これらの実験で使用したグリコサミノグリカンは、デルマタン硫酸 (DS) 36、DS13、ヘパラン硫酸 (HS) 3-6、コンドロイチン硫酸 (CS) -4およびCS-6である。これらの調製と性状解析は、既に記載されている (ローデン (L. Roden)、ベーカー (J. Baker)、シフォネッリ (J. A. Cifonelli)、マシューズ (M. B. Matthews)、Methods in Enzymology、ギンズバーグ (V. Ginsburg) 編 (アカデミックプレス (Academic Press)、ニューヨーク、1973年)、第28巻、73~140頁; フランソン (L.-A. Fransson)、ニーズスジンスキー (I. A. Nieduszynski)、フェルプス (C. F. Phelps)、シーハン (J. K. Sheehan)、Biochim. Biophys. Acta., 586, 179 (1979); フランソン (L.-A. Fransson)、シェーバーグ (I. Sjöberg)、ハブスマーク (B. Havsmark)、Eur. J. Biochem., 106, 59

10

20

30

40

50

(1980))。ヘパリンと追加の調製物CS-4(ウシ気管からのCS-A)と6(サメ軟骨からのCS-C)は、シグマ(Sigma)から購入した。デルマタン硫酸(分子量 $\sim 500\text{ kDa}$)は、ビーディーエィチ・バイオケミカル(BDH Biochemical)から得た。

【0083】

DS36の放射性ヨード化は、以前のプロトコール(チェング(F. Cheng)、ヨシダ(K. Yoshida)、ヘイネガード(D. Heinegard)、フランソン(L. A. Fransson)、Glycobiology, 2, 553 (1992))に従って行った。スロット結合測定法を以下のように行った: α -デフェンシンペプチド1(バッケム(Bachem)、スイス)をニトロセルロース膜(ハイボンド(Hybond)、アマシャム(Amersham))にブロットした。膜を1時間ブロッキング(PBS、pH7.4、0.25%ツイーン20、3%BSA)し、同じ緩衝液中で放射能標識DS($\sim 20\text{ }\mu\text{g/ml}$)と1時間インキュベートした。結合を競合させるために、非標識多糖を加えた(2 mg/ml)。膜を洗浄した(3×10 分)(PBS、pH7.4、0.25%ツイーン20)。Bas2000放射性イメージングシステム(フジ(Fuji))を使用して、放射活性を視覚化した。

【0084】

0.2 $\sim 5\text{ }\mu\text{g}$ の α -デフェンシン1をニトロセルロースにブロットし、放射性ヨード化デルマタン硫酸(DS)とプローブ結合させた。ペプチドに結合したDSと結合は、過剰(~ 100 倍)の非標識DS(DS36;75%イズロン酸塩[IdoA])ならびにDS13($>95\%$ IdoA)により阻害された。コンドロイチン硫酸(CS)-4ならびにCS-6は、結合を破壊しなかった。CS-4とDSは、主にウロン酸(CS-4中のグルクロン酸とDS中のIdoA)のエピマー化が異なる(フランソン(L. A. Fransson)、「多糖(The Polysaccharides)」中、アスピナール(G. O. Aspinall)編(アカデミックプレス(Academic Press)、ニューヨーク州、1985年)、第3巻、338 $\sim$ 406頁)。試験したヘパリン硫酸(HS)画分のうち(HS3 $\sim$ 6)、硫酸化とIdoA含量の高いもの(HS5; $\sim 50\%$ IdoA、および $\sim 62\%$ N-硫酸、HS6:65% IdoAおよび72% N-硫酸)のみが、DSを完全に排除することがわかった。さらにヘパリンとデキストラン硫酸(デキストランではない)は、放射能標識DSを排除した。まとめるとこの結果は、GAG-デキストラン相互作用が、多糖のIdoA残基ならびに硫酸化に依存することを示唆する。DSとHS/ヘパリン中のIdoAは、2-O-硫酸化されていることがあり(フランソン(L. A. Fransson)、「多糖(The Polysaccharides)」中、アスピナール(G. O. Aspinall)編(アカデミックプレス(Academic Press)、ニューヨーク州、1985年)、第3巻、338 $\sim$ 406頁)、 α -デフェンシン1への結合のために、DSとHSポリマーの追加の修飾が必要かも知れない。

【0085】

例3

デフェンシン機能へのDSの作用を調べるために、試験微生物である化膿連鎖球菌(S. pyogenes)、イー・フェカリス(E. faecalis)および緑膿菌(P. aeruginosa)に対する α -デフェンシン1の細菌活性を測定した。

【0086】

抗微生物測定法のために、化膿連鎖球菌(S. pyogenes)、イー・フェカリス(E. faecalis)および緑膿菌(P. aeruginosa)を、TH培地中で対数中期まで増殖させた。細菌を洗浄し、5mMグルコース含有10mMトリス-塩酸(pH7.5)で希釈した。50 μl の細菌($2\times 10^6\text{ cfu/ml}$)を、0 $\sim 40\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度の α -デフェンシンと、2 $\sim 400\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度の種々のGAG鎖の添加有りまたは無しで、インキュベートした。インキュベーションは、37 $^{\circ}\text{C}$ で2時間(化膿連鎖球菌(S. pyogenes)とイー・フェカリス(E. faecal

is)) または4時間(緑膿菌(*P. aeruginosa*)) 行った。微生物活性を定量するために、このインキュベーション混合物の連続希釈物を、TH寒天に蒔き、37℃で一晩インキュベートし、CFUの数を測定した。

【0087】

細菌株を、0~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の α -デフェンシン1とインキュベートした。緑膿菌(*P. aeruginosa*)、イー・フェカリス(*E. faecalis*) および化膿連鎖球菌(*S. pyogenes*) は、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度またはそれ以上のデフェンシンにより有効に死滅した。20~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (DS/デフェンシンモル比~0.5~1) の濃度のDSを添加すると、イー・フェカリス(*E. faecalis*) のデフェンシン介在死滅がほとんど完全に逆転し、他の2つの種の死滅が部分的に阻害された(図1B)。400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のDS(モル比~10:1) は、デフェンシンの抗微生物作用をほとんど完全に逆転させた。以前の実験は、DSが α -デフェンシン1に結合すること、および結合は~100倍過剰のHS3ならびに2つのCS型により阻害されることを示したため、我々は、これらのGAGがデフェンシンを阻害する活性が小さいかどうかという問題を調べた。実際、測定法に含めると(試験成分として化膿連鎖球菌(*S. pyogenes*)) を使用して)、デフェンシン介在細菌死滅は、ほんのわずかに阻害された; 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のHS3、CS-4およびCS-6(シグマ(*Sigma*)) は、それぞれ6、16および2%阻害を示した。

10

【0088】

例4

20

LL-37機能へのDSの作用を調べるために、試験微生物である化膿連鎖球菌(*S. pyogenes*)、イー・フェカリス(*E. faecalis*) および緑膿菌(*P. aeruginosa*) に対するLL-37の細菌活性を測定した。

【0089】

抗微生物測定は、例3に記載のように行った。LL-37の抗細菌活性を例示する結果を図2に示す。0~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のDSの添加は、化膿連鎖球菌(*S. pyogenes*)、イー・フェカリス(*E. faecalis*) および緑膿菌(*P. aeruginosa*) のLL-37死滅を阻害した。結果を図3に示す。

【0090】

例5

30

デルマタン硫酸(DS)がLL-37に結合し、および硫酸化多糖が相互作用をブロックするかどうかを調べるために、例2に示すように、スロット結合測定を行った。LL-37(0.2~5 μg) をニトロセルロースに適用し、ヨード化デルマタン硫酸(DS36)とインキュベートした。結合への競合のために、異なる多糖を加えた: DS36、DS18、DS13、CS-4、CS-6、CS-D(コンドロイチン硫酸D) およびCS-E(コンドロイチン硫酸E)。結果を図4に示す。CS-4、CS-6およびCS-DとCS-Eは、結合を破壊しなかった。しかし放射能標識DSは、DS-36、DS18、DS13、およびCS-Eにより排除された。

【0091】

例6

40

DS-LL-37相互作用への種々の陽イオン性分子の作用を、例2に記載のようスロット-ブロット測定法を使用して監視した。結果を図5に示す。LL-37へのDSの結合は、ポリ-L-リジン、ポリ-L-アルギニン、DEAE-デキストラン、ポリブレン、キトサンおよびポリエチレンジアミンによりブロックされた。結合レベルの低下は、プロタミンの存在下で観察された。ポリミキサンBおよびポリミキシンBノナペプチドは、LL-37へのDSの結合を阻止しなかった。

【0092】

例7

緑膿菌(*P. aeruginosa*) エラスターゼがLL-37を分解し不活性化することを証明するために、10 μg のLL-37を50 μl の10mMトリス-塩酸(pH

50

7. 5) 中 30 mU の緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼと、0、1、5、15 もしくは 30 分または 1、4 もしくは 20 時間インキュベートした。インキュベーション物の等量のアリコートをし、SDS-PAGE (16.5% トリスートリシンゲル) で分析したかまたは細菌活性について測定した。細菌測定法のために、 2×10^6 cfu/ml のイー・フェカリス (*E. faecalis*) を 0.1 μ g の LL-37 と、10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、5 mM グルコース中で 37 °C で 2 時間インキュベートした。図 6 に示す結果は、LL-37 が緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼにより分解され不活性化されることを示す。

【0093】

LL-37 分解産物を、液体クロマトグラフィー質量スペクトル (LC-MS)、次に飛行時間 (Time of flight) (TOF) MS-MS で測定した。断片質量が 3708.859、3178.637、2822.450、2326.269 および 1401.748 を与える主要なペプチド断片が検出され、さらに分析した。LL-37 の切断点と提唱されている抗細菌領域を図 7 に示す。

【0094】

3 mU のイー・フェカリス (*E. faecalis*) グラチナーゼまたは 3 mU の化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) システインプロテイナーゼによる LL-37 の分解を、1 μ g の LL-37 を 1 時間と 6 時間インキュベートすることにより監視した。分解産物を 16.5% のトリスートリシンゲルの SDS-PAGE により分析し、6 mU の緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼと 1 μ g の LL-37 を 5 分と 1 時間インキュベーション後の分解産物と比較した。結果を図 8 に示す。

【0095】

例 8

1 μ g の LL-37 を 12 mU の緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼ、6 mU のイー・フェカリス (*E. faecalis*) グラチナーゼまたは 6 mU の化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) プロテアーゼと、インヒビターの存在下と非存在下で 1 時間インキュベートすることにより、LL-37 の分解への種々の物質の作用を測定した。生じた物質を SDS-PAGE (16.5% トリスートリシンゲル) により分析した。金属プロテアーゼインヒビター GM6001 (100 μ M) と 1, 10-フェナントロリン (2 mM) (これらは両方とも、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼとイー・フェカリス (*E. faecalis*) グラチナーゼを阻害した) またはインヒビター E64 (10 μ M) (これは、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) システインプロテイナーゼを阻害した) により、分解は止まった (図 9)。

【0096】

DS36 と CS-E、および程度は低い CS-A と CS-C は、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼによる LL-37 の分解を阻害した (図 10)。構造 [Δ UA (2S)-GalNAc (4, 6S)] (図 11) の硫酸化二糖とシュクロースオクタ硫酸 (図 12) もまた、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼによる LL-37 の分解を阻害した。

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、デルマタン硫酸 (DS) による α -デフェンシンの殺菌活性の阻止を例示する。図 1A は、 α -デフェンシンによる細菌の死滅を例示する。 2×10^6 CFU/ml の化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) (□)、イー・フェカリス (*E. faecalis*) (●) および緑膿菌 (*P. aeruginosa*) (○) を、 α -デフェンシンと記載のペプチド濃度で 37 °C で 2 時間 (化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*)) とイー・フェカリス (*E. faecalis*) または 4 時間 (緑膿菌 (*P. aeruginosa*)) インキュベートし、CFU を測定した。図 1B は、デルマタン硫酸による細菌のデフェンシン介在死滅の阻害を例示する。種々の濃度 (0 ~ 400 μ g/ml) の DS の添加は、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) (□)、イー・フェカリス (*E. faecalis*) (●) および緑膿菌 (*P. aeruginos*

a) (○) のデフェンシン死滅を阻害した。

【図2】図2は、LL-37の殺菌作用を例示する。 2×10^6 コロニー形成単位 (c f u) / ml のイー・フェカリス (*E. faecalis*) (□)、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) AP1 (○)、および緑膿菌 (*P. aeruginosa*) (●) を、LL-37と記載のペプチド濃度で37℃で、10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、5 mM グルコース中で、2時間 (化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) とイー・フェカリス (*E. faecalis*)) または4時間 (緑膿菌 (*P. aeruginosa*)) インキュベートし、c f u を測定した。

【図3】図3は、デルマタン硫酸 (DS) によるLL-37の細菌作用の阻止を例示する。種々の濃度 (0~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) のDSの添加は、イー・フェカリス (*E. faecalis*) (□)、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) AP1 (●)、および緑膿菌 (*P. aeruginosa*) (○) のLL-37死滅を阻害した。種々の細菌株の 2×10^6 CFU/mlを、10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、5 mM グルコース中で、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (イー・フェカリス (*E. faecalis*)) と緑膿菌 (*P. aeruginosa*) または2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) AP1) のLL-37、およびデルマタン硫酸と、2時間 (AP1とイー・フェカリス (*E. faecalis*)) または4時間 (緑膿菌 (*P. aeruginosa*)) インキュベートし、c f u を測定した。

【図4】図4は、LL-37へのデルマタン硫酸の結合を示す。LL-37 (0.2~5 μg) をニトロセルロースに適用し、ヨード化したデルマタン硫酸 (DS36) とインキュベートした。結合に競合させるために、異なる多糖を加えた。DS36、DS18、DS13 (デルマタン硫酸36、18および13)、CS4とCS6 (コンドロイチン硫酸4と6)、CS-D (コンドロイチン硫酸D) およびCS-E (コンドロイチン硫酸E) 。

【図5】図5は、DS-LL-37相互作用に対する種々の陽イオン性分子の作用を示す。LL-37 (0.2~5 μg) をニトロセルロースに適用し、ヨード化したデルマタン硫酸 (DS36) とインキュベートした。結合に競合させるために、種々のパネルの上に示すように、異なる陽イオン性物質を加えた。(a) p-l-l-y-s; ポリ-L-リジン、p-l-a-r-g; ポリ-L-アルギニン、DEAE; DEAE-デキストラン、PB; ポリブレン。(b) CH; キトサン、PEI、ポリエチレンイミン、PM; プロタミン、PMX; ポリミキシンB、PMXnp; ポリマーミキシンBノナペプチド。

【図6】図6は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) エラスターゼがLL-37を分解し不活性化することを証明する実験の結果を示す。LL-37 (10 μg) を、50 μl の10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5) 中の緑膿菌エラスターゼ (*P. aeruginosa*) と、種々の時間 (x軸上に記載) インキュベートした。次にインキュベート物の等量のアリコートをし、SDS-PAGE (16.5% トリスートリシンゲル; 上の図) で分析したか、または殺菌活性 (下の図) を測定した。2 μg のLL-37に相当する容量を、ゲル上にのせた。分子量マーカーを左に示す (上の図)。殺菌測定 (下の図) のために、 2×10^6 c f u / ml のイー・フェカリス (*E. faecalis*) を、分解の開始時に0.1 μg の無傷のペプチドに相当する量のLL-37とインキュベートした。ペプチドを細菌と、10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、5 mM グルコース中で、37℃で2時間インキュベートした。コロニー形成単位を測定した (左に記載) 。

【図7】図7は、LL-37断片の性状解析を示す。LL-37 (10 μg) を、50 μl の10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5) 中で緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼ (30 mU) と、1、5、15、30分または1時間インキュベートした。生じた分解産物 (図6参照) を、液体クロマトグラフィー質量スペクトル (LC-MS)、次に飛行時間 (Time of flight) (TOF) MS-MSで測定した。主要なペプチド断片を検出し、さらに分析した。切断点を示し、LL-37の提唱されている抗細菌領域に下線を引いた。

【図 8】図 8 は、細菌プロテイナーゼによる LL-37 の分解を示す。LL-37 (1 μ g) を、それぞれ緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼ (ELA) と 5 分 (1) または 1 時間 (2) インキュベートし、イー・フェカリス (*E. faecalis*) グラチナーゼ含有培地 (GEL) または化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) システインプロテイナーゼ (CP) と 1 時間 (1) または 6 時間 (2) インキュベートした。加えたプロテイナーゼ活性 (アゾカゼイン測定法により測定した) は、10 μ l の反応物当たり 6 mU (緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼ) および 3 mU (他のプロテイナーゼ) に相当した。物質を SDS-PAGE で 16.5% トリスートリシンゲルで分析した。分子量マーカーを左に示す。

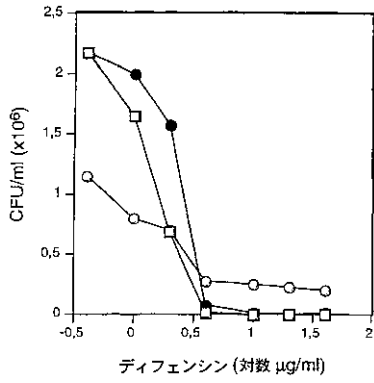
【図 9】図 9 は、プロテイナーゼインヒビターによる LL-37 分解の阻害を示す。LL-37 (1 μ g) を、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼ (ELA、12 mU)、イー・フェカリス (*E. faecalis*) グラチナーゼ (GEL、6 mU) または化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*) システインプロテイナーゼ (CP、6 mU) と、インヒビターの非存在下または存在下で 1 時間インキュベートした。GM6001; 100 μ M GM6001、PHE; 2 mM 1, 10-フェナトロリン、E64; 10 μ M E64。物質を SDS-PAGE (16.5% トリスートリシンゲル) で分析した。分子量マーカー (kDa) を左に示す。

【図 10】図 10 は、LL-37 の分解が、硫酸化グリコサミノグリカンにより阻害されることを示す。LL-37 (1 μ g) を、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼ (12 mU) と総量 15 μ l (10 mM トリス緩衝液) 中で、記載のグリコサミノグリカンの非存在下 (ELA) または存在下で、1 時間インキュベートした。DS36、デルマタン硫酸 36 (CS-B とともに記載する)、CS-A; コンドロイチン硫酸 A、CS-C、コンドロイチン硫酸 C、CS-E; コンドロイチン硫酸 E。物質を SDS-PAGE で 16.5% トリスートリシンゲルで分析した。分子量マーカー (kDa) を左に示す。

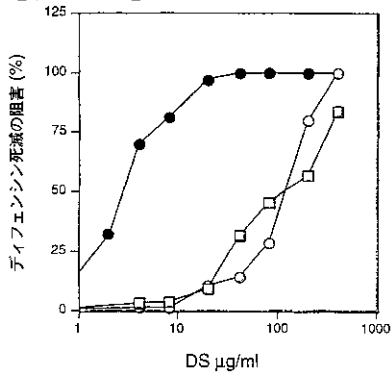
【図 11】図 11 は、LL-37 の分解が硫酸化二糖により阻害されることを示す。LL-37 (1 μ g) を、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼ (12 mU) と総量 15 μ l (10 mM トリス緩衝液) 中で、硫酸化二糖の非存在下または存在下で、1 時間インキュベートした。ELA; 緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼ、0 S, UA-GalNAc; 2 S-4 S; UA (2 S)-GalNAc (4 S)、2 S-6 S; UA (2 S)-GalNAc (6 S)、4, 6 di S; UA-GalNAc (4, 6 S)、2 S-4, 6 di S; UA (2 S)-GalNAc (4, 6 S)。物質を SDS-PAGE で 16.5% トリスートリシンゲルで分析した。分子量マーカー (kDa) を左に示す。

【図 12】図 12 は、LL-37 の分解がシュクロースオクタ硫酸により阻害されることを示す。LL-37 (1 μ g) を、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) エラスターゼ (12 mU; ELA) と総量 15 μ l (10 mM トリス緩衝液) 中で、記載の量 (ナノモル) のショ糖 (S) またはシュクロースオクタ硫酸 (SOS) の非存在下または存在下で、1 時間インキュベートした。物質を SDS-PAGE で 16.5% トリスートリシンゲルで分析した。分子量マーカー (kDa) を左に示す。

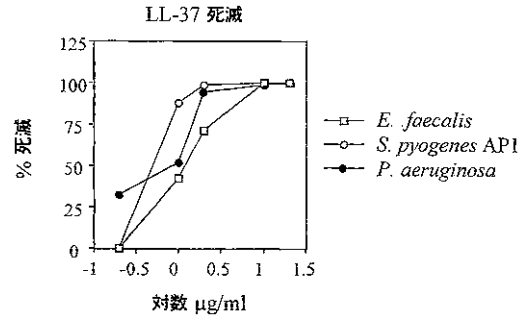
【図 1 A】



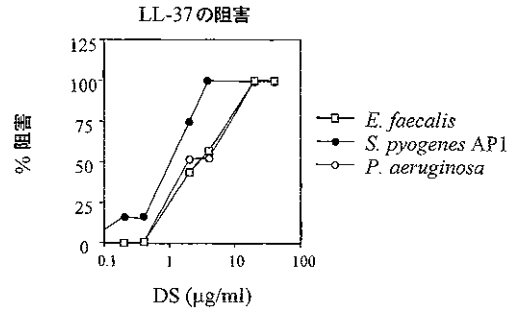
【図 1 B】



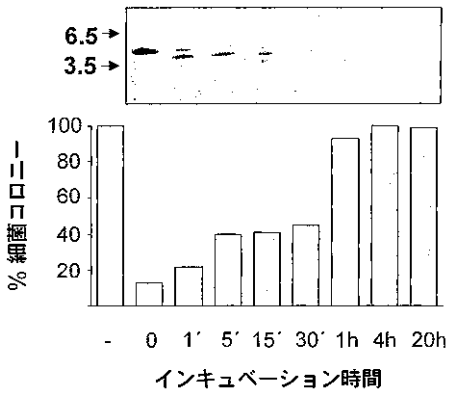
【図 2】



【図 3】



【図 6】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06821 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/00
- (21) International Application Number: PCT/EP01/08208
- (22) International Filing Date: 17 July 2001 (17.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (36) Priority Data: 00306974.6 17 July 2000 (17.07.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): HANSA MEDICAL AB [SE/SE], Box 784, S-220 07 Lund (SE).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BJÖRCK, Lars [SE/SE]; Magle Stom Kyrögata 10, S-223 50 Lund (SE); FRICK, Inge-Maria [SE/SE]; Marsvägen 3, S-215 33 Stadshuset, (SE); SCHMIDTCHEN, Arthur [SE/SE]; Gningegatan 4, S-222 41 Lund (SE).
- (74) Agent: WOODS, Geoffrey, Corlett, J.A. Kemp & Co., 14 South Square, Gray's Inn, London WC1R 5JJ (GB).
- (81) Designated States (nationally): AP, AT, AU, AM, AI, AL, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GL, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (HT, GM, KE, LS, MW, NZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTIMICROBIAL AGENT

WO 02/06821 A2

(57) Abstract: A method of identifying an agent that enhances the anti-microbial activity of cationic anti-microbial peptides by blocking the inhibitory effects of the proteinase/glycosaminoglycan pathway, which method comprises: (i) providing, as a first component, a cationic anti-microbial peptide; (ii) providing, as a second component, bacteria; (iii) providing, as a third component, part of all of the components of a proteinase/glycosaminoglycan pathway such that the third component reduces the antimicrobial effect of the first component, for example, a glycosaminoglycan or bacteria and a proteoglycan or a bacterial proteinase or a bacterial proteinase and a proteoglycan; (iv) contacting the first, second and third components with a test agent under conditions that would permit the killing of the bacteria by the antimicrobial agent in the absence of the third component, and that would permit the inhibition of the anti-microbial activity of the first component by the third component in the absence of the test agent; (v) monitoring the survival of the bacterial culture thereby determining whether the test agent is capable of enhancing anti-microbial activity wherein a test agent capable of enhancing anti-microbial activity promotes killing of the bacterial culture. Agents identified by such a method are useful in the therapy of acute and chronic infections, particularly in the treatment of ulcers and in the promotion of wound healing.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

ANTIMICROBIAL AGENT**Field of the Invention**

5 The present invention relates to agents for use in the treatment of chronic and acute microbial infections. The invention also relates to methods for identifying agents that are useful in therapy, particularly in the treatment of chronic and acute microbial infections.

Background of the Invention

10 During infection, one fundamental host defence mechanism depends on leukocyte-mediated killing of microbes. Recently, a group of cationic anti-microbial peptides, which are capable of killing various Gram-negative as well as Gram-positive bacteria by membrane disruption, have been implicated as important components of innate host defence systems in a multitude of organisms. These peptides are found in neutrophils and in epithelial cells located at biological boundaries susceptible to infection.

Pathogens appear to be able to overcome this first line of host defence, giving rise to a spectrum of clinically important conditions of an acute as well as a chronic nature. During infections bacteria utilize a combination of various strategies to overcome host defence mechanisms. Bacteria release various proteinases which modulate host specific pathways involving kallikreins, plasminogen, complement, cytokines, antibodies and antiproteinases during acute infection. Production of exotoxins and cell cycle modulating proteins by bacteria has also been reported and illustrates further the variety of pathways aimed at compromising host defence.

25 Bacteria such as *Streptococcus pyogenes* readily give rise to wound infections and erysipelas. *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Proteus mirabilis* are well known to persist in chronic wounds. These bacteria all propagate and multiply in connective tissues rich in proteoglycans (PG).

Summary of the Invention

30 The present inventors have shown that extracellular proteinases secreted by bacteria release glycosaminoglycans, for example, by degrading proteoglycans such

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

2

as those, for example, found in connective tissue. The glycosaminoglycans may then bind to cationic anti-microbial peptides secreted by neutrophils and epithelial cells and prevent these anti-microbial peptides from killing the bacteria. In particular the present inventors have shown that dermatan sulfate-containing proteoglycans, such as decorin, are degraded by bacterial proteinases from *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* and *Proteus mirabilis* to produce dermatan sulfate. They have shown that dermatan sulfate binds to neutrophil-derived α -defensin and LL-37 and that this binding completely neutralises the anti-microbial activity of α -defensin and LL-37. During infection, release of glycosaminoglycans, for example release of dermatan sulfate by proteoglycan degradation may therefore represent an important and previously unknown bacterial defence mechanism, which could serve as a target for novel antibacterial strategies.

Accordingly, the invention provides an agent which blocks the inhibitory effects of the proteinase/glycosaminoglycan pathway for use in enhancing the anti-microbial activity of a cationic anti-microbial peptide.

The invention also provides a method of identifying an agent that enhances the anti-microbial activity of cationic anti-microbial peptides by blocking the inhibitory effects of the proteinase/glycosaminoglycan pathway, which method comprises:

- (i) providing, as a first component, a cationic anti-microbial peptide;
- (ii) providing, as a second component, bacteria;
- (iii) providing, as a third component, part or all of the components of a proteinase/glycosaminoglycan pathway such that the third component reduces the antimicrobial effect of the first component, for example, a glycosaminoglycan or bacteria or bacteria and a proteoglycan or a bacterial proteinase or a bacterial proteinase and a proteoglycan;
- (iv) contacting the first, second and third components with a test agent under conditions that would permit the killing of the bacteria by the anti-microbial agent in the absence of the third component, and that would permit the inhibition of the anti-microbial activity of the first component by the third component in the absence of the test agent;

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

3

(v) monitoring the survival of the bacteria thereby determining whether the test agent is capable of enhancing anti-microbial activity, wherein a test agent capable of enhancing anti-microbial activity promotes killing of the bacteria.

5 It will be appreciated that the proteinase/glycosaminoglycan pathway leading to inhibition of the cationic anti-microbial peptide may be inhibited at more than one stage and that the inhibitory action of a test agent may be monitored at each stage without the need to monitor the resultant effect on bacteria. In particular, a test agent may inhibit the interaction between the glycosaminoglycan and the cationic
10 anti-microbial peptide, the release of glycosaminoglycan, for example the bacterial proteinase activated release of glycosaminoglycan from proteoglycan or the direct degradation of the cationic anti-microbial peptide by the bacterial proteinase. Accordingly, an agent that enhances the anti-microbial activity of cationic anti-microbial peptides by blocking the inhibitory effects of the
15 proteinase/glycosaminoglycan pathway may be identified by any one of the following methods provided by the invention:

- a method of identifying an agent which is capable of inhibiting the interaction between a glycosaminoglycan and a cationic anti-microbial peptide, which method comprises:
 - 20 (i) providing, as a first component, a glycosaminoglycan;
 - (ii) providing, as a second component, a cationic anti-microbial peptide;
 - (iii) contacting the first and second components with a test agent under conditions that would permit the first and second components to interact in the absence of the test agent; and
 - 25 (iv) monitoring any interaction between the first and second components thereby determining whether the test agent is capable of disrupting the interaction between the first and second components;
- a method of identifying an agent which is capable of blocking the glycosaminoglycan-mediated inhibition of a cationic anti-microbial peptide, which
30 method comprises:
 - (i) providing, as a first component, a glycosaminoglycan;
 - (ii) providing, as a second component, a cationic anti-microbial peptide;

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

4

- (iii) providing, as a third component, bacteria;
- (iv) contacting the first, second and third components with a test agent under conditions that would permit killing of the bacteria by the second component in the absence of the first component and that would permit inhibition by the first component of the killing of the bacteria by the second component in the absence of the test agent; and
- (v) monitoring survival of the bacteria thereby determining whether the test agent is capable of preventing glycosaminoglycan-mediated inhibition of the cationic anti-microbial peptide;
- a method of identifying an agent which is capable of inhibiting the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase, which method comprises:
- (i) providing, as a first component, a bacterial proteinase;
- (ii) providing, as a second component, a proteoglycan;
- (iii) contacting the first and second components with a test agent under conditions that would permit degradation of the second component by the first component in the absence of the test agent; and
- (iv) monitoring any degradation of the second component thereby determining whether the test agent is capable of inhibiting the degradation of the proteoglycan by the proteinase;
- a method of identifying an agent which is capable of inhibiting the degradation of a cationic anti-microbial peptide by a bacterial proteinase, which method comprises:
- (i) providing, as a first component, a bacterial proteinase;
- (ii) providing, as a second component, a cationic anti-microbial peptide;
- (iii) contacting the first and second components with a test agent under conditions that would permit degradation of the second component by the first component in the absence of the test agent;
- (iv) monitoring any degradation of the second component thereby determining whether the test agent is capable of inhibiting the degradation of the cationic anti-microbial peptide by the proteinase.
- The invention also provides:

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

5

- a kit suitable for use in identifying an agent which is capable of inhibiting the interaction between a glycosaminoglycan and a cationic anti-microbial peptide, which kit comprises:

(a) a glycosaminoglycan; and

5 (b) a cationic anti-microbial peptide;

- a kit suitable for use in identifying an agent which is capable of inhibiting the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase, which kit comprises:

(a) a proteoglycan; and

(b) a bacterial proteinase;

10 - an agent identified by a method of the invention;

- a pharmaceutical composition comprising an agent of the invention;

- an agent or a pharmaceutical composition of the invention for use in a method of treatment of the human or animal body by therapy;

15 - a product comprising an agent of the invention and a cationic anti-microbial peptide for simultaneous or sequential use in a method of treatment of the human or animal body by therapy;

- a product comprising an inhibitor of a bacterial defence mechanism and a cationic anti-microbial peptide for simultaneous or sequential use in a method of treatment of the human or animal body by therapy, wherein the said defence mechanism comprises the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase to release a glycosaminoglycan which is capable of binding to a cationic anti-microbial peptide thus inhibiting the anti-microbial activity of the said peptide;

20 - use of an agent, a pharmaceutical composition or a product of the invention in the manufacture of a medicament for use in a method of treating a chronic or acute bacterial infection.

Brief description of the figures

Fig. 1 illustrates the blocking of the bactericidal activity of α -defensin by dermatan sulfate (DS). Figure 1A illustrates the killing of bacteria by α -defensin. 2
30 $\times 10^6$ CFU/ml of *S. pyogenes* (□) *E. faecalis* (●) and *P. aeruginosa* (○) were incubated with α -defensin at the indicated peptide concentrations for 2 h (*S. pyogenes* and *E. faecalis*) or 4 h (*P. aeruginosa*) at 37°C, and CFU were determined.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

6

Figure 1B illustrates the inhibition of defensin-mediated killing of bacteria by dermatan sulfate. The addition of DS at various concentrations (0-400 µg/ml) inhibited the defensin killing of *S. pyogenes* (□), *E. faecalis* (●) and *P. aeruginosa* (○).

Fig. 2 shows the bactericidal effect of LL-37. 2×10^6 colony forming units (cfu)/ml of *E. faecalis* (□), *S. pyogenes* AP1 (○), or *P. aeruginosa* (●) were incubated with LL-37 at indicated peptide concentrations for 2 h (*S. pyogenes* and *E. faecalis*) or 4 h (*P. aeruginosa*) at 37°C in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM glucose and cfus were determined.

Fig. 3 illustrates the blocking of the bacterial effect of LL-37 by dermatan sulphate (DS). The addition of dermatan sulphate (DS) at various concentrations (0-40 µg/ml) inhibited the LL-37 killing of *E. faecalis* (□), *S. pyogenes* AP1 (●) and *P. aeruginosa* (○). 2×10^6 cfus/ml of the various bacterial strains were incubated with LL-37 at 10 µg/ml (*E. faecalis* and *P. aeruginosa*) or 2 µg/ml (*S. pyogenes* strain AP1) and dermatan sulphate for 2 h (AP1 and *E. faecalis*) or 4 h (*P. aeruginosa*) at 37°C in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM glucose, and cfus were determined.

Fig. 4 shows the binding of dermatan sulphate to LL-37. LL-37 (0.2-5 µg) was applied onto nitrocellulose and incubated with iodinated dermatan sulphate (DS36). Different polysaccharides were added for competition of binding. DS36, DS18, DS13 (dermatan sulphate 36, 18, and 13), CS4 and CS6 (chondroitin sulphate 4 and 6), CS-D (chondroitin sulphate D) and CS-E (chondroitin sulphate E).

Fig. 5 shows the effects of various cationic molecules on the DS-LL-37 interaction. LL-37 (0.2-5 µg) was applied onto nitrocellulose and incubated with iodinated dermatan sulphate (DS36). Different cationic substances, as indicated on top of the various panels, were added for competition of binding. (a), p-l-lys; poly-L-lysine, p-l-arg; poly-L-arginine, DEAE; DEAE-dextran, PB; polybrene. (b), CH; chitosan, PEI, polyethylenimine, PM; protamine, PMX; polymyxin B, PMXnp; polymyxin B nonapeptide.

Fig 6 shows the results of experiments which demonstrate that *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades and inactivates LL-37. LL-37 (10 µg) was incubated with *P. aeruginosa* elastase (30 mU) in 50 µl 10 mM Tris, pH 7.5 for

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

7

various periods of time (as indicated on the x-axis). Equal aliquots of the incubations were then analysed on SDS-PAGE (16.5% Tris-Tricine gel; upper figure) or assayed for bactericidal activity (lower figure). A volume corresponding to 2 µg LL-37 was loaded on the gels. Molecular weight markers are indicated to the left (upper figure).

5 For the bactericidal assays (lower figure), 2×10^6 cfus/ml of *E. faecalis* were incubated with an amount of LL-37 that corresponded to 0.1 µg intact peptide at the start of the degradation. The peptide was incubated with the bacteria for 2 h at 37°C, in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM glucose. Colony forming units were determined (indicated to the left).

10 Fig. 7 shows the characterisation of LL-37 fragments. LL-37 (10 µg) was incubated with *P. aeruginosa* elastase (30 mU) in 50 µl 10 mM Tris, pH 7.5 for 1, 5, 15, 30 minutes or 1 hour. The resulting degradation products (see Fig 6) were analysed by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) followed by Time of flight (TOF) MS-MS. Major peptide fragments were detected and further
15 analysed. The cleavage points are indicated and the proposed antibacterial region of LL-37 is underlined.

Fig. 8 shows the degradation of LL-37 by bacterial proteinases. LL-37 (1 µg) was incubated with *P. aeruginosa* elastase (ELA) for 5 minutes (1) or 1 hour (2), *E. faecalis* gelatinase containing medium (GEL), or *S. pyogenes* cysteine proteinase (CP), for 1 hour (1) or 6 hours (2), respectively. The proteinase activity added (as
20 determined by an azocasein assay) corresponded to 6 mU (*P. aeruginosa* elastase) and 3 mU (for the other proteinases) per 10 µl reaction. The material was analysed by SDS-PAGE on 16.5% Tris-Tricine gels. Molecular weight markers are indicated to the left.

25 Fig. 9 shows the inhibition of LL-37 degradation by proteinase inhibitors. LL-37 (1 µg) was incubated with *P. aeruginosa* elastase (ELA, 12 mU), *E. faecalis* gelatinase (GEL, 6 mU) or *S. pyogenes* cysteine proteinase (CP, 6 mU) for 1 hour in the absence or presence of inhibitors. GM6001; 100 µM GM6001, PHE; 2 mM 1, 10-phenanthroline, E64; 10 µM E64. The material was analysed by SDS-PAGE
30 (16.5% Tris-Tricine gels). Molecular weight markers (kDa) are indicated to the left.

Fig. 10 shows that the degradation of LL-37 is inhibited by sulphated glycosaminoglycans. LL-37 (1 µg) was incubated with *P. aeruginosa* elastase (12

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

8

ml) in a total of volume of 15 μ l (10 mM Tris-buffer) for 1 hour in the absence (ELA) or presence of the indicated glycosaminoglycans. DS36, dermatan sulphate 36 (also denoted CS-B), CS-A; chondroitin sulphate A, CS-C, chondroitin sulphate C, CS-E; chondroitin sulphate E. The material was analysed by SDS-PAGE on

5 16.5% Tris-Tricine gels. Molecular weight markers (kDa) are indicated to the left.

Fig. 11 shows that the degradation of LL-37 is inhibited by sulphated disaccharides. LL-37 (1 μ g) was incubated with *P. aeruginosa* elastase (12 mU) in a total of volume of 15 μ l (10 mM Tris-buffer) for 1 hour in the absence or presence of

10 sulfated disaccharides. ELA; *P. aeruginosa* elastase, 0S, UA-GalNAc; 2S-4S; UA(2S)-GalNAc(4S), 2S-6S; UA(2S)-GalNAc(6S), 4, 6diS; UA-GalNAc(4,6S), 2S-4,6diS; UA(2S)-GalNAc(4,6S). The material was analysed by SDS-PAGE on 16.5% Tris-Tricine gels. Molecular weight markers (kDa) are indicated to the left.

Fig. 12. shows that the degradation of LL-37 is inhibited by suroseoctasulphate. LL-37 (1 μ g) was incubated with *P. aeruginosa* elastase (12

15 mU; ELA) in a total of volume of 15 μ l (10 mM Tris-buffer) for 1 hour in the absence or presence of sucrose (S) or suroseoctasulphate (SOS) of the indicated amounts (in nanomoles). The material was analysed by SDS-PAGE on 16.5% Tris-Tricine gels. Molecular weight markers (kDa) are indicated to the left.

20 Brief Description of the Sequence Listing

SEQ ID NO: 1 is the amino acid sequence of the cationic antimicrobial peptide LL-37.

SED ID NO: 2 is the amino acid sequence of the cationic antimicrobial peptide α -defensin.

25

Detailed Description of the Invention

Throughout the present specification and the accompanying claims the words "comprise" and "include" and variations such as "comprises", "comprising", "includes" and "including" are to be interpreted inclusively. That is, these words are

30 intended to convey the possible inclusion of other elements or integers not specifically recited, where the context allows.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

9

The present invention provides methods for identifying an agent that enhances the action of a cationic anti-microbial peptide by interfering with a bacterial defence mechanism. The bacterial defence mechanism comprises the release of a glycosaminoglycan and the binding of the released glycosaminoglycan to a cationic anti-microbial peptide. Binding of the glycosaminoglycan to the cationic anti-microbial peptide inhibits anti-microbial activity of the peptide (herein referred to as proteinase/glycosaminoglycan pathway). The glycosaminoglycan may be released by the degradation of a proteoglycan. Preferably the proteoglycan is degraded by a bacterial proteinase. Other mechanisms of glycosaminoglycan release include enhanced shedding of proteoglycans mediated by endogenous metalloproteinases, increased production of proteoglycans and displacement of proteoglycans from binding sites in the connective tissue. For example, bacterial proteinase may directly effect activation of endogenous matrix metalloproteinases. Interference may, for example, be blocking degradation of proteoglycan, for example by inhibiting proteinase binding or activity, or by blocking binding of glycosaminoglycan to the cationic anti-microbial peptide.

Cationic antimicrobial peptides are well known in the art. See, for example, Lehrer, R.I. and Ganz, T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence *Curr Opin Immunol* 11; 23-27.

The cationic anti-microbial peptide is typically an antibacterial peptide that is capable of disrupting the bacterial membrane, thus killing the bacteria. The cationic anti-microbial peptide may be added exogenously. Preferably the cationic anti-microbial peptide is produced by a leukocyte and/or by an epithelial cell at a site of infection. Preferably the leukocyte is a neutrophil. The cationic anti-microbial peptide is preferably a defensin or a cathelicidin. More preferably the cationic anti-microbial peptide is α -defensin (SEQ ID NO: 2) or LL-37 (SEQ ID NO: 1). The cationic anti-microbial peptide may comprise a variant or fragment of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2 which variant or fragment exhibits antimicrobial, preferably antibacterial, activity. For example, the cationic antimicrobial peptide may be a fragment of SEQ ID NO: 1 comprising the sequence underlined in Fig. 7.

The cationic anti-microbial peptide provided for use in a method of the invention may be from any suitable source. For example, the cationic anti-microbial

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

10

peptide may be recombinant peptide, the cationic anti-microbial peptide may be purified from a leukocyte or epithelial cell or the cationic anti-microbial peptide may be present in growth medium extracted from leukocytes, epithelial cells or cells transfected with recombinant peptide grown in culture. The peptide may comprise a natural sequence or may comprise an artificially mutated sequence provided that the mutation does not affect the ability of the peptide to disrupt bacterial membranes or to interact with a glycosaminoglycan.

A typical assay for determining whether a peptide exhibits anti-microbial activity comprises incubating bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis* or *E. coli*, with the peptide and monitoring the survival of the bacteria. Typically the anti-microbial peptide will effectively kill the bacteria at concentrations of from 4µg/ml, for example at concentrations of 4µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml, 100µg/ml or 500µg/ml.

Survival of the bacteria may be monitored by any suitable method. Typically the number of colony forming units may be determined. Survival of bacteria may also be monitored indirectly by assessing the effect of the bacteria on a host animal or host cell.

The bacteria may be of any suitable strain. The bacteria may be gram negative or gram positive. Preferably the bacterial strain is one found at a site of infection in the human or in an animal. Preferably the site of infection is a barrier to pathogen entry into the human or animal such as the skin or a mucosal membrane. Preferably the bacteria are *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* or *Proteus mirabilis*.

Any suitable bacterial preparation may be used in a method of the invention or in an assay described herein. For example, the bacteria may be grown to mid-log phase in TH-medium or in C-medium. The bacteria may then be washed and diluted, for example in 10mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 5mM glucose. Typically from 5µl to 500µl bacteria, preferably from 10µl to 100µl bacteria (2×10^6 cfu/ml) are used per assay. Incubations of bacteria with the anti-microbial peptide, the anti-microbial peptide and glycosaminoglycan, the anti-microbial peptide and test substance or anti-microbial peptide, glycosaminoglycan and test substance are

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

11

typically carried out at 37°C for from 30 minutes to 6 hours, preferably from 2 hours to 4 hours. Anti-microbial activity may be quantified by any suitable method, for example, by making serial dilutions of the incubation mixture, plating the dilutions on agar (such as TH-agar), incubating at 37°C, preferably overnight, and determining the number of colony forming units (CFU) produced.

A glycosaminoglycan suitable for use in a method of the invention is capable of interacting with the cationic anti-microbial peptide in such a way that the anti-microbial function of the peptide is inhibited. The glycosaminoglycan is typically an endogenous glycosaminoglycan. The glycosaminoglycan is preferably heparan sulfate or heparin and is more preferably dermatan sulfate. Preferably a glycosaminoglycan suitable for use in a method of the invention exhibits a high degree of sulfation and/or iduronate content. The iduronate content is typically at least 50%, for example at least 60%, at least 70%, at least 80% or at least 90%. The degree of sulfation is typically at least 50%, for example at least 60%, at least 70%, at least 80% or at least 90%. A glycosaminoglycan for use in a method of the present invention may also comprise additional modifications, for example the iduronate may be 2-O-sulfated.

A typical assay for determining whether a glycosaminoglycan is capable of interacting with a cationic anti-microbial peptide comprises immobilising a cationic anti-microbial peptide, for example on nitrocellulose, and probing with radiolabelled glycosaminoglycan. Preferably binding of the glycosaminoglycan to the peptide may be inhibited with excess unlabelled dermatan sulfate.

A typical assay for determining whether a glycosaminoglycan peptide is capable of inhibiting anti-microbial activity of a cationic anti-microbial peptide comprises incubating a preparation or culture of bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* or *Proteus mirabilis*, with the glycosaminoglycan and the peptide and monitoring the killing of the bacteria. Typically the anti-microbial peptide will be added at a concentration that would effectively kill the bacteria in the absence of the glycosaminoglycan. Typically the glycosaminoglycan inhibits the peptide-mediated killing of the bacteria at a concentration of from 10µg/ml to 1mg/ml, more preferably from 10µg/ml to 500µg/ml or most preferably from 20µg/ml to 250µg/ml. The molar ratio of

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

12

glycosaminoglycan to cationic anti-microbial peptide is typically from 0.1:1 to 1000:1, preferably from 0.5:1 to 100:1 and more preferably from 0.5:1 to 10:1. The glycosaminoglycan may only partially inhibit the anti-microbial activity of the peptide. Preferably the glycosaminoglycan inhibits anti-microbial activity by at least 2%, for example at least 6%, at least 16%, at least 30% or at least 40%. More preferably the anti-microbial activity is inhibited by the glycosaminoglycan by at least 50%, for example at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90% or at least 99%.

The glycosaminoglycan may be obtained from any suitable source.

Preferably the glycosaminoglycan is obtained from connective tissue such as dermis (skin) or cartilage. The glycosaminoglycan may be prepared by any suitable method, for example as described in L. Rodén, J. Baker, J. A. Cifonelli, M. B. Mathews, in *Methods in Enzymology*, V. Ginsburg, ed. (Academic Press, New York, 1973), vol. 28, pp. 73-140, L.-Å. Fransson, I. A. Nieduszynski, C. F. Phelps, J. K. Sheehan, *Biochim. Biophys. Acta.*, 586, 179 (1979) or L.-Å. Fransson, I. Sjöberg, B. Havsmark, *Eur. J. Biochem.*, 106, 59 (1980).

Typically, a glycosaminoglycan for use in a method of the invention may be produced by the action of one or more proteinase, for example a bacterial proteinase, on one or more proteoglycan. The glycosaminoglycan may be provided indirectly by providing a suitable bacterial proteinase and a suitable proteoglycan. The proteoglycan may be an extracellular product of a fibroblast culture. Preferably the proteoglycan comprises heparin, heparan sulfate or more preferably dermatan sulfate. Preferably the proteoglycan is biglycan, syndecan, glypican or CD44. More preferably the proteoglycan is decorin or versican.

A typical assay for determining whether a proteoglycan is degraded by a bacterial proteinase comprises radiolabelling the proteoglycan with ^{35}S , incubating the labelled proteoglycan with a bacterial proteinase, running a sample of the labelled proteoglycan taken prior to the incubation and a sample taken after the incubation on a SDS-polyacrylamide gel and determining the relative sizes and amounts of the labelled proteoglycan and degradation products. It may be necessary to include a reducing agent, such as DTT in the incubation mix, for example if the bacterial proteinase is a cysteine proteinase. The proteoglycan may be taken from any suitable

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

13

source, for example it may be an extracellular product of a fibroblast culture. Preferably the proteoglycan has a molecular weight of from 80 to 500 kDa, preferably about 100 kDa or about 400 kDa. The degradation products preferably have a molecular weight of from 30 to 50 kDa, corresponding to the size of free or peptide linked glycosaminoglycan chains.

Any suitable proteinase may be used in the assays described herein.

Preferably the proteinase is a bacterial proteinase. Any bacterial preparation or bacterial culture may be used as a source of a bacterial proteinase. The bacteria may be stimulated to produce proteinase by any suitable means. Growth media from cultures of bacteria may be used. Typically, bacteria are grown to stationary phase in liquid media, for example in TH-medium or in C-medium. Growth media suitable for use in a method of the invention may be obtained by pelleting the bacteria by centrifugation and filtering the supernatant, for example, through a filter of from 0.2µm to 0.4µm in diameter. Alternatively bacterial proteinases may be isolated from the growth medium. Any suitable method may be used to isolate a bacterial proteinase. For example, a proteinase may be prepared by ammonium sulphate precipitation, dialysis and separation on a suitable column such as a High Q anion exchange column. Alternatively a proteinase may be prepared as described in H. Herwald, M. Collin, W. Muller-Esterl, L. Björck, *J. Exp. Med.* **184**, 665 (1996).

Bacterial proteinases suitable for use in the invention include *Pseudomonas aeruginosa* elastase, *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase, *Enterococcus faecalis* gelatinase and *Streptococcus pyogenes* cysteine proteinase.

A method of identifying an agent that enhances cationic anti-microbial peptide activity provided by the present invention may comprise a method of identifying an agent which is capable of inhibiting the interaction between a glycosaminoglycan and a cationic anti-microbial peptide. Such a method may consist essentially of:

- (i) providing, as a first component, a glycosaminoglycan;
- (ii) providing, as a second component, a cationic anti-microbial peptide;
- (iii) contacting the first and second components with a test agent under conditions that would permit the first and second components to interact in the absence of the test agent; and

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

14

(iv) monitoring any interaction between the first and second components thereby determining whether the test agent is capable of disrupting the interaction between the first and second components.

A glycosaminoglycan and a cationic anti-microbial peptide suitable for use in this method have been previously described herein. Any suitable conditions may be used for contacting the first and second components with the test agent. Typically, the cationic peptide may be immobilised, for example on a nitrocellulose membrane or on a polyacrylamide gel, which is preferably non-denaturing, and the immobilised peptide is incubated with the glycosaminoglycan and the test agent.

The binding of glycosaminoglycan to the immobilised peptide and hence the ability of the test agent to compete for binding may be monitored by any suitable means. For example, the glycosaminoglycan may be radiolabelled, for example with ^{35}S , and radiolabelled glycosaminoglycan bound to the immobilised peptide may be detected by any suitable means such as scintillation counting, using a phosphorimager or using X-ray film. Preferably experiments with and without the test substances are carried out under identical conditions, ideally at the same time, and the results of the experiments are compared to determine whether the test agent causes a reduction in the binding of the glycosaminoglycan to the peptide. Generally the test substances are added in excess. Preferably the test agent causes a reduction in the binding of the glycosaminoglycan to the peptide by at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 99% or substantially prevents the binding of the glycosaminoglycan to the peptide at a concentration of the agent of 0.1mg ml^{-1} , 1mg ml^{-1} , 10mg ml^{-1} , 100mg ml^{-1} , 500mg ml^{-1} , 1mg ml^{-1} , 10mg ml^{-1} , 100mg ml^{-1} or 0.1g ml^{-1} . Any combination of the above percentage reductions in the degree of interaction and concentrations of product may be used to define an agent of the invention, with greater disruption at lower concentrations being preferred. Preferred agents of the invention are those which show at least a 50% level of inhibition at a concentration of 1mg ml^{-1} or 0.5mg ml^{-1} .

A method of identifying an agent that enhances cationic anti-microbial peptide activity provided by the present invention may comprise a method of identifying an agent which is capable of blocking the inhibitory effect of a

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

15

glycosaminoglycan on the anti-microbial activity of a cationic anti-microbial peptide. Such a method may consist essentially of:

- (i) providing, as a first component, a glycosaminoglycan;
- (ii) providing, as a second component, a cationic anti-microbial peptide;
- 5 (iii) providing, as a third component, bacteria;
- (iv) contacting the first, second and third components with a test agent under conditions that would permit killing of the bacteria by the second component in the absence of the first component and that would permit inhibition by the first component of the killing of the bacteria by the
- 10 second component in the absence of the test agent; and
- (v) monitoring killing of the bacteria

thereby determining whether the test agent is capable of preventing glycosaminoglycan-mediated inhibition of the cationic anti-microbial peptide.

In step (iv) the first and second components may first be contacted with a test agent and then contacted with the third component. The third component may be contacted with a mixture of the first component, second component and test agent at any suitable time after contacting the first two components with the test agent, for example from 0 to 4 hours, such as 30 seconds, 1 minute, 5 minutes, 15 minutes, 30 minutes or 1 hour.

The test agents may first be tested for any direct effect on activity of the cationic anti-microbial peptide. Preferably, only test agents which do not inhibit cationic anti-microbial peptide activity are used in a bactericidal assay.

A glycosaminoglycan, a cationic anti-microbial peptide and a bacterial preparation suitable for use in this method have been previously described herein.

25 Any suitable conditions may be used for contacting the first, second and third components with the test agent. Typically from 5 μ l to 500 μ l bacteria, preferably from 10 μ l to 100 μ l bacteria (2×10^6 cfu/ml) are used per assay. The three components are typically incubated together at 37°C for from 30 minutes to 6 hours, preferably from 2 hours to 4 hours. Monitoring the killing of bacteria may be carried

30 out by any known method, for example, anti-microbial activity may be quantified by making serial dilutions of the incubation mixture, plating the dilutions on agar (such as TH-agar), incubating at 37°C, preferably overnight, and determining the number

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

16

of colony forming units (CFU) produced. Preferably three assays, one containing only the second component (anti-microbial peptide), one containing only the first and second components (glycosaminoglycan and antimicrobial peptide) and one containing all three components, are carried out under identical conditions and preferably simultaneously. The results of the three assays may be quantified and the results may be compared to determine the effectiveness of the test agent at blocking the inhibition of anti-microbial activity by the glycosaminoglycan. Preferably the test agent reverses the blocking effect of the glycosaminoglycan on the anti-microbial activity of the peptide by at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 99% or substantially prevents the inhibition of cationic anti-microbial peptide activity at a concentration of the agent of 0.1 mg ml⁻¹, 1 mg ml⁻¹, 10 mg ml⁻¹, 100 mg ml⁻¹, 500 mg ml⁻¹, 1 mg ml⁻¹, 10 mg ml⁻¹, 100 mg ml⁻¹ or 0.1 g ml⁻¹. Any combination of the above percentage reductions in the degree of inhibition and concentrations of product may be used to define an agent of the invention, with greater disruption at lower concentrations being preferred. Preferred agents of the invention are those which show at least a 50% level of inhibition at a concentration of 1 mg ml⁻¹ or 0.5 mg ml⁻¹.

Degradation of the second component may also be monitored indirectly by monitoring the killing of bacteria by a cationic anti-microbial peptide in the presence and absence of test agent using an assay as described previously herein.

A method of identifying an agent that enhances cationic anti-microbial peptide activity provided by the present invention may comprise a method of identifying an agent which is capable of inhibiting the release of a glycosaminoglycan, for example by blocking the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase, which glycosaminoglycan is then free to interact with a cationic anti-microbial peptide. Such a method may consist essentially of:

- (i) providing, as a first component, a bacterial proteinase;
- (ii) providing, as a second component, a proteoglycan;
- (iii) contacting the first and second components with a test agent under conditions that would permit degradation of the second component by the first component in the absence of the test agent; and

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

17

(iv) monitoring any degradation of the second component thereby determining whether the test agent is capable of inhibiting the degradation of the proteoglycan by the proteinase.

Suitable first and second components and a typical assay for determining

5 whether a proteoglycan is degraded by a bacterial proteinase have been described previously herein. Preferably two assays, one including the test agent and one omitting the test agent, are carried out under identical conditions. The degree of inhibition of degradation by the test agent may then be determined by comparing the relative amount of degradation products and/or the relative amounts of non-degraded
10 proteoglycan between the two assays. The relative amounts of each product may be quantified using a phosphorimager. Preferably, a test substance that inhibits the degradation of a proteoglycan by a proteinase will reduce the degradation of the proteoglycan by at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 99% or substantially
15 prevent the degradation of the proteoglycan at a concentration of the agent of 0.1mg ml⁻¹, 1mg ml⁻¹, 10mg ml⁻¹, 100mg ml⁻¹, 500mg ml⁻¹, 1mg ml⁻¹, 10mg ml⁻¹, 100mg ml⁻¹ or 0.1g ml⁻¹. Any combination of the above percentage reductions in the degree of interaction and concentrations of product may be used to define an agent of the invention, with greater disruption at lower concentrations being preferred. Preferred
20 agents of the invention are those which show at least a 50% level of inhibition at a concentration of 1mg ml⁻¹ or 0.5mg ml⁻¹.

A method of identifying an agent that enhances cationic anti-microbial peptide activity provided by the present invention may comprise a method of identifying an agent which is capable of preventing the degradation of a cationic anti-
25 microbial peptide by a bacterial proteinase. Such a method may consist essentially of:

- (i) providing, as a first component, a bacterial proteinase;
- (ii) providing, as a second component, a cationic anti-microbial peptide;
- (iii) contacting the first and second components with a test agent under
30 conditions that would permit degradation of the second component by the first component in the absence of the test agent;

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

18

(iv) monitoring any degradation of the second component thereby determining whether the test agent is capable of inhibiting the degradation of the cationic anti-microbial peptide by the proteinase.

Suitable first and second components have been described previously

5 herein. A typical assay for determining whether a cationic anti-microbial peptide is degraded by a bacterial proteinase may comprise radiolabelling the peptide with ^{35}S , incubating the labelled peptide with a bacterial proteinase, running a sample of the labelled peptide taken prior to the incubation and a sample taken after the incubation on a SDS-polyacrylamide gel and determining the relative amounts of the labelled
10 peptide and degradation products. It may be necessary to include a reducing agent such as DTT in the incubation mix, for example if the bacterial proteinase is a cysteine proteinase. Preferably two assays, one including the test agent and one omitting the test agent, are carried out under identical conditions. The degree of inhibition of degradation by the test agent may then be determined by comparing the
15 relative amount of degradation products and/or the relative amounts of non-degraded peptide between the two assays. The relative amounts of each product may be quantified using a phosphorimager. Preferably, a test substance that inhibits the degradation of a peptide by a proteinase will reduce the degradation of the peptide by at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at
20 least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 99% or substantially prevent the degradation of the peptide at a concentration of the agent of 0.1mg ml^{-1} , 1mg ml^{-1} , 10mg ml^{-1} , 100mg ml^{-1} , 500mg ml^{-1} , 1mg ml^{-1} , 10mg ml^{-1} , 100mg ml^{-1} or 0.1g ml^{-1} . Any combination of the above percentage reductions in the degree of interaction and concentrations of product may be used to define an agent of the invention, with
25 greater disruption at lower concentrations being preferred. Preferred agents of the invention are those which show at least a 50% level of inhibition at a concentration of 1mg ml^{-1} or 0.5mg ml^{-1} .

Other suitable methods for monitoring peptide degradation include protein staining, immunoblotting and radioiodination. Peptide degradation may also be
30 monitored using a functional assay, for example by determining whether there is any residual antibacterial activity of the degradation products. Antibacterial activity may be determined using bactericidal assays and measuring colony forming units (cfus).

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

19

Degradation of the second component may also be monitored indirectly by monitoring the killing of bacteria by the cationic anti-microbial peptide in the presence and absence of test agent using an assay as described previously herein.

The present invention also provides a kit for identifying a test agent that
5 enhances cationic anti-microbial peptide activity, which kit comprises:

- (i) a glycosaminoglycan; and
- (ii) a cationic anti-microbial peptide.

The kit may further comprise:

- (iii) a bacterial sample; and/or
- 10 (iv) a means for determining whether a test agent inhibits the interaction between the glycosaminoglycan and the cationic anti-microbial peptide.

The present invention also provides a kit for identifying a test agent that enhances cationic anti-microbial peptide activity, which kit comprises:

- 15 (i) a proteoglycan;
- (ii) a bacterial proteinase

The kit may further comprise:

- (ii) a means for determining whether a test agent inhibits the degradation of the proteoglycan by the bacterial proteinase.

A kit provided by the present invention may also comprise:

- 20 (v) or (iv) instructions for carrying out an assay to determine the ability of a test agent to enhance the cationic anti-microbial peptide activity.

The term 'agent' is intended to include a single substance and a combination of two, three or more substances. For example, the term agent may refer to a single peptide, a mixture of two or more peptides or a mixture of a peptide
25 and a defined chemical entity.

Any suitable test agent may be used in a method of the invention. Preferably the test substance is non-toxic to eukaryotic cells. Preferred test agents which can be tested in the above assays include carbohydrates, molecules comprising a carbohydrate backbone with chemical modifications such as sulfation and/or
30 carboxylation, peptides and peptide mimetics. Particularly preferred test agents include cationic substances which may function as scavengers for released glycosaminoglycans, polyethyleneimine, protamine, polybrene, poly-L-lysine, poly-

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

20

L-arginine, chitosan and polymyxin. Other suitable test agents include combinatorial libraries, defined chemical entities, oligonucleotides and natural product libraries, such as display libraries (for example phage display libraries). Furthermore, antibody products (for example, monoclonal and polyclonal antibodies, single chain antibodies, chimeric antibodies, CDR-grafted antibodies and humanised antibodies) or fragments thereof may be used. Examples of suitable test agents are shown in Table 1.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

21

Table 1.

Anionic substances	Structure
HS3	4GlcA(→7-2S)-GlcNAc(4/-6S)-IdoA(→7-2S)-GlcSO ₃ (4/-3S,4/-6S)
HS4	
HS5	
HS6	
disaccharides from HS	UA(2S)-GlcN(6S)
	UA(2S)-GlcN(6S)
	UA(2S)-GlcN
	UA(2S)-GlcNS(6S)
	UA(2S)-GlcNS
	UA-GlcN(6S)
	UA-GlcN
	UA-GlcNS(6S)
CS-6	GlcA-GalNAc(6S) polymer
CS-4	GlcA-GalNAc(4S) polymer
DS36	IdoA(→7-2S)-GalNAc(4S) / GlcA-GalNAc(6S) polymer
DS13	
disaccharides from CS/DS	UA-GalNAc
	UA-GalNAc(4S)
	UA-GalNAc(6S)
	UA(2S)-GalNAc
	UA(2S)-GalNAc(4S)
	UA(2S)-GalNAc(6S)
	UA(2S)-GalNAc(6,4S)
	UA-GalNAc(6,4S)
CS-D	GlcA(2S)-GalNAc(4S) polymer
CS-F	GlcA-GalNAc(4,6S) polymer
sucroseoctasulfate	sucrose/8 sulphates
Chondroitin	~1sulphate/disacch
	~2sulphate/disacch
	~3sulphate/disacch
Dextransulfate	
Dextran	
Heparin	
LMW-Heparin	
Cationic substances	
poly-L-Lysine	
poly-L-Arginine	
DEAE-dextran	
polybrene	
(hexadimethrinobromide)	
protamine	
polymyxin B	
polymyxin B nonapeptide	
polyethylenimine	
chitosan	
Proteinase inhibitors	
Homostat (GM 6001) etc	

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

22

A carbohydrate test agent may be a monosaccharide, a disaccharide, an oligosaccharide or a polysaccharide. For example, a polymer of chondroitin sulfate [GlcA-GalNAc]_n, or dermatan sulfate. Preferably the carbohydrate test agent is
5 capable of binding to the cationic anti-microbial peptide without affecting its anti-microbial activity.

A peptide test agent may be a mimic of a cationic anti-microbial peptide. Preferably the mimic is capable of binding to a glycosaminoglycan and/or to a protease to sequester the glycosaminoglycan and/or proteinase thus preventing the
10 glycosaminoglycan and/or protease from interacting with the cationic anti-microbial peptide. The mimic may mimic only the region of a cationic anti-microbial peptide that binds to the glycosaminoglycan or may also mimic a region of the peptide with anti-microbial activity. A test peptide may also comprise any other amino acid sequence. Preferably a peptide comprises an amino acid sequence that enables it to
15 interact with the glycosaminoglycan and/or proteinase to prevent their binding to a cationic anti-microbial peptide.

Test agents may be used in an initial screen of, for example, 10 substances per reaction, and the agents of these batches which show inhibition or activation tested individually. Test agents may be used at a concentration of from 1nM to
20 1000µM, preferably from 1µM to 100µM or from 5µM to 50µM, more preferably from 1µM to 10µM.

The invention also provides a product containing an inhibitor of a bacterial proteinase/glycosaminoglycan defence pathway and a cationic anti-microbial peptide for simultaneous or sequential use in a method of treatment of the human or animal
25 body by therapy.

The inhibitor may be capable of blocking the interaction between a glycosaminoglycan and a cationic anti-microbial peptide, blocking the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase or blocking degradation of a cationic anti-microbial peptide by a bacterial proteinase. An inhibitor capable of blocking the
30 interaction between a glycosaminoglycan and a cationic anti-microbial peptide may bind to the glycosaminoglycan to prevent it binding to the cationic anti-microbial peptide or may bind to the cationic anti-microbial peptide such that the peptide

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

23

retains its anti-microbial activity but is unable to bind to the inhibitory glycosaminoglycan.

Preferred inhibitors include carbohydrates, molecules comprising a carbohydrate backbone with chemical modifications such as sulfation and/or carboxylation, peptides and peptide mimetics. Other suitable inhibitors include combinatorial libraries, defined chemical entities, oligonucleotides and natural product libraries, such as display libraries (for example phage display libraries).

An inhibitor may be a mimic, for example a peptide, of a cationic anti-microbial peptide. Preferably the mimic is capable of binding to a glycosaminoglycan and/or to a protease to sequester the glycosaminoglycan and/or proteinase thus preventing the glycosaminoglycan and/or protease from interacting with the cationic anti-microbial peptide. The inhibitor may mimic only the region of a cationic anti-microbial peptide that binds to the glycosaminoglycan or may also mimic a region of the peptide with anti-microbial activity. Preferably the mimic is a peptide comprising an amino acid sequence that enables it to interact with the glycosaminoglycan and/or proteinase to prevent their binding to a cationic anti-microbial peptide.

The inhibitor is preferably a monosaccharide, a disaccharide, an oligosaccharide or a polysaccharide. More preferably the inhibitor is a cationic substance, such as polyethyleneimine, protamine, polybrene, poly-L-lysine, poly-L-arginine, chitosan or polymyxin. Preferably the inhibitor is capable of binding to the cationic anti-microbial peptide without affecting its anti-microbial activity.

The cationic anti-microbial peptide is a peptide that is capable of disrupting the bacterial membrane, thus killing the bacteria. Preferably the cationic anti-microbial peptide is produced by a leukocyte and/or by an epithelial cell at a site of infection. Preferably the leukocyte is a neutrophil. The cationic anti-microbial peptide is preferably a cationic anti-bacterial peptide such as a defensin or LL-37. More preferably the cationic anti-microbial peptide is α -defensin. The cationic anti-microbial peptide provided for use in a method of the invention may be from any suitable source. For example, the cationic anti-microbial peptide may be recombinant peptide, the cationic anti-microbial peptide may be purified from a leukocyte or endothelial cell or the cationic anti-microbial peptide may be present in

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

24

growth medium extracted from leukocytes, epithelial cells or cells transfected with recombinant peptide grown in culture. The peptide may be produced by *in vitro* protein synthesis. The peptide may comprise a natural sequence or may comprise an artificially mutated sequence provided that the mutation does not affect the ability of the peptide to disrupt bacterial membranes or to interact with a glycosaminoglycan.

The invention also provides a product containing two or more inhibitors of a bacterial proteinase/glycosaminoglycan defence pathway for simultaneous or sequential use in a method of treatment of the human or animal body by therapy. In addition, the invention provides a product containing two or more agents of the invention or simultaneous or sequential use in a method of treatment of the human or animal body by therapy.

Agents identified by a method of the invention and products of the invention may be used in a method of treatment of the human or animal body by therapy. In particular such agents, and products, may be used in the treatment of acute or chronic bacterial infections, in the treatment of ulcers, such as chronic venous ulcers, and in the treatment of wounds. Ulcers and other wounds may be infected with bacteria which may delay healing. Therefore, eradication of bacteria may increase wound healing. Other wounds which may be treated using an agent identified by a method of the invention include burn wounds, diabetic wounds, eye, lung and urinary tract infections and bacterial infections of intact skin. Any ulcer may be treated with an agent identified by a method of the invention, for example a gastric ulcer. Agents and products of the invention may also be used to prevent sterile wounds from becoming infected with bacteria. Such agents, and products, may also be used for the manufacture of a medicament for use in a method of treating an acute or chronic infection, in the treatment of ulcers or in a method of promoting wound healing. The condition of a patient suffering from an acute or chronic infection or an ulcer or a patient with a wound can be improved by administration of an agent, or product of the invention. A therapeutically effective amount of an agent, or product, of the invention may be given to a host in need thereof. An agent may enhance naturally occurring (endogenous) cationic anti-microbial peptides such as those released by neutrophils. Alternatively, given in

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

25

combination with an exogenous cationic anti-microbial peptide, the agent may enhance anti-microbial activity of the exogenous peptide.

An agent identified by a method of the invention may be used in combination with a cationic anti-microbial peptide in a method of treatment of the human or animal body by therapy. In particular such combination therapy may be used in the treatment of acute or chronic bacterial infections, in the treatment of ulcers and in the treatment of wounds. An agent and a cationic anti-microbial peptide may also be used for the manufacture of a medicament for use in a method of treating an acute or chronic infection, in the treatment of ulcers or in a method of promoting wound healing. The condition of a patient suffering from an acute or chronic infection or an ulcer or a patient with a wound can be improved by the combined administration of an agent of the invention and a cationic anti-microbial peptide. A therapeutically effective amount of an agent and cationic anti-microbial peptide of the invention and a cationic anti-microbial peptide may be given to a host in need thereof.

Cationic anti-microbial peptides are expressed in neutrophils and at biological boundaries, such as the lung, skin, mucosa and urinary tract. Agents which modulate anti-microbial peptide activity may be used for topical treatment, for example skin or cornea, and for internal use, for example gut, lungs and urinary tract.

An agent identified according to a screening method outlined above or for administration in accordance with the invention may be formulated with standard pharmaceutically acceptable carriers and/or excipients as is routine in the pharmaceutical art, and as fully described in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania (7th Ed. 1985, the disclosure of which is included herein of its entirety by way of reference. A pharmaceutical composition may comprise an agent of the invention in combination with a cationic anti-microbial peptide and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

The invention also provides a pharmaceutical composition comprising an inhibitor of a bacterial proteinase/glycosaminoglycan defence pathway, a cationic anti-microbial peptide and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. The agents, compositions and products may be administered by enteral or parenteral

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

26

routes such as via oral, buccal, anal, pulmonary, intravenous, intra-arterial, intramuscular, intraperitoneal, topical or other appropriate administration routes.

A therapeutically effective amount of an agent, of an agent and a cationic anti-microbial peptide or a product is administered to a patient. The dose of an agent, of an agent and a cationic anti-microbial peptide or a product may be determined according to various parameters, especially according to the substance used; the age, weight and condition of the patient to be treated; the route of administration; and the required regimen. A physician will be able to determine the required route of administration and dosage for any particular patient. A typical daily dose is from about 0.1 to 50 mg per kg of body weight, according to the activity of the specific agent of an agent and a cationic anti-microbial peptide or a product the age, weight and conditions of the subject to be treated, the type and severity of the degeneration and the frequency and route of administration. Preferably, daily dosage levels are from 5 mg to 2 g.

The agent, or inhibitor, and the peptide may be administered simultaneously or sequentially. Preferably the agent, or inhibitor, is administered prior to the administration of the peptide. The agent, or inhibitor, may be administered from 1 minute to 4 hours prior to administration of the peptide, preferably from 5 minutes to 1 hour, from 10 minutes to 30 minutes prior to administration of the peptide. More preferably the agent, or inhibitor, and peptide are administered simultaneously.

The following Examples illustrate the invention.

Example 1

The products of ^{35}S -sulfate labelled fibroblast cultures and the degradation of these products by growth media from bacterial cultures were analysed by 3-12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Pseudomonas aeruginosa and *Enterococcus faecalis* isolates initially obtained from chronic venous wounds, were grown for 18 hours at 37°C (stationary phase) in Todd-Hewitt medium. The *Streptococcus pyogenes* strain AP1 (40/58) was from the World Health Organization Collaborating Centre for References and Research on Streptococci (Prague, Czech Republic) and was grown to stationary phase in C-medium (H. Herwald, M. Collin, W. Müller-Esterl, L. Björck, *J. Exp. Med.* **184**, 665

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

27

(1996)). Bacteria were pelleted by centrifugation and supernatants were sterile-filtered (0.3 µm). For degradation of radiolabelled proteoglycans, 10 µl of ³⁵S-sulfate metabolically labelled secreted fibroblast products (A. Schmidtchen, I. Carlstedt, A. Malmström, L.-Å. Fransson, *Biochem. J.* 265, 289 (1990)) were
 5 incubated with 10 µl sterile-filtered bacterial supernatants at 37°C for 6 hours. 10 µl TH-medium was included in the control: 10 mM DTT was added for activation of the streptococcal cysteine proteinase.

The connective tissue proteoglycans (PGs) decorin/biglycan and versican constitute the major secreted products of human fibroblasts *in vivo* as well as in
 10 culture (R. V. Iozzo, *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 609 (1998)). Analysis by 3-12% SDS-PAGE confirmed previous results identifying decorin (~100 kDa) and versican (~400 kDa) as the dominating extracellular products of ³⁵S-sulfate labelled fibroblast cultures (A. Schmidtchen, I. Carlstedt, A. Malmström, L.-Å. Fransson, *Biochem. J.* 265, 289 (1990); A. Schmidtchen, L.-Å. Fransson, *Biomed. Chrom.*, 7, 48 (1993)).
 15 Addition of growth medium from *P. aeruginosa* and *E. faecalis* cultures resulted in extensive degradation of decorin. Also *S. pyogenes* extracellular products degraded decorin and high molecular weight proteoglycans provided that the reducing agent dithiothreitol (DTT) was added.

The requirement for DTT suggested that the *S. pyogenes* cysteine proteinase
 20 was responsible for the degradation. This assumption was confirmed by the effect of a specific cysteine proteinase inhibitor (E64) which completely blocked the effect.

The degraded material was of molecular weight 30-50 kDa, corresponding to the sizes of free/or peptide linked GAG chains as described previously (A. Schmidtchen, L.-Å. Fransson, *Eur. J. Biochem.*, 208, 537 (1992)). Since these
 25 experiments did not exclude the possibility of activation of fibroblast matrix metalloproteinases (MMP) by bacterial proteinases (E. H. Burns, A. M. Marciel, J. M. Musser, *Infect. Immun.*, 64, 4744 (1996); T. Okamoto et al. *J. Biol. Chem.*, 272, 6059 (1997)), yielding degraded PGs, a series of control experiments were performed with preparations of specific proteinases.

30 *P. aeruginosa* elastase and alkaline proteinase proteins were prepared by ammonium sulphate precipitation (70% saturation). After dialysis (10 mM Tris, pH 8.0) separation was performed on a High Q anion exchange column (Bio-Rad) using

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

28

a gradient of 0-1.0 M NaCl in 10 mM Tris, pH 8.0. Elastase was identified in the flow-through fractions whereas alkaline proteinase eluted at ~0.5 M NaCl.

The cysteine proteinase of *S. pyogenes* was purified according to previous protocols (H. Herwald, M. Collin, W. Müller-Esterl, L. Björck, *J. Exp. Med.* **184**, 665 (1996)).

The *E. faecalis* strain contained gelatinase and supernatants were used directly. *P. aeruginosa* elastase and alkaline proteinase, the *S. pyogenes* cysteine proteinase and *E. faecalis* gelatinase all degraded purified human cervix decorin as well as ³⁵S-labelled fibroblast decorin in the conditioned medium. Stepwise ion-exchange chromatography (A. Schmidchen, I. Carlstedt, A. Malmström, L.-Å. Fransson, *Biochem. J.* **265**, 289 (1990)) (for separation of fibroblast-derived MMPs) followed by PBS dialysis of the radiolabelled fibroblast proteoglycans or boiling the fibroblast products to inactivate fibroblast MMPs did not affect degradation. Preincubation (~15 min) of *S. pyogenes* cysteine proteinase with the cysteine proteinase inhibitor E64 abolished degradation.

Another wound pathogen, *Proteus mirabilis* has also been shown to produce extracellular proteinases that release dermatan sulfate.

Example 2

We then investigated whether dermatan sulfate (DS), the glycosaminoglycan (GAG) substituent of human decorin (R. V. Iozzo, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 609 (1998)), bound defensin, and whether other sulfated polysaccharides could block the interaction.

The glycosaminoglycans used in these experiments were dermatan sulfate (DS)36, DS13, heparan sulfate (HS)3-6, chondroitin sulfate (CS)-4 and CS-6. The preparation and characterisation of these have been described previously (L. Rodén, J. Baker, J. A. Cifonelli, M. B. Mathews, in *Methods in Enzymology*, V. Ginsburg, ed. (Academic Press, New York, 1973), vol. 28, pp. 73-140; L.-Å. Fransson, I. A. Nieduszynski, C. F. Phelps, J. K. Sheehan, *Biochim. Biophys. Acta.*, **586**, 179 (1979); L.-Å. Fransson, I. Sjöberg, B. Ilavský, *Eur. J. Biochem.*, **106**, 59 (1980)). Heparin and additional preparations of CS-4 (CS-A from bovine trachea) and 6 (CS-

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

29

C from shark cartilage) were purchased from Sigma. Dextran sulfate (MW ~500 kDa) was from BDH Biochemical.

Radioiodination of DS36 was performed according to previous protocols (F Cheng, K. Yoshida, D. Heinegård, L. Å. Fransson, *Glycobiology*, 2, 553 (1992)).

5 Slot-binding assays were carried out as follows: α -defensin peptide 1 (Bachem, Switzerland) was blotted onto nitrocellulose membranes (Hybond, Amersham). Membranes were blocked (PBS, pH 7.4, 0.25% Tween 20, 3% bovine serum albumin) for 1 h and incubated with radiolabelled DS (~20 μ g/ml) for 1 h in the same buffer. Unlabelled polysaccharides were added for competition of binding (2
10 mg/ml). The membranes were washed (3x10 min) (PBS, pH 7.4, 0.25 % Tween 20). Bas 2000 radioimaging system (Fuji) was used for visualization of radioactivity.

0.2-5 μ g α -defensin 1 was blotted onto nitrocellulose and probed with radiolabelled dermatan sulfate (DS). DS bound to the peptide and binding was inhibited by an excess (~100-fold) of unlabelled DS (DS36; 75% iduronate [IdoA])
15 as well as by DS13 (>95% IdoA). Chondroitin sulfate (CS)-4 as well as CS-6 did not abolish binding. CS-4 and DS differ mainly in the epimerization of the uronic acid (glucuronate in CS-4 and IdoA in DS) (L. Å. Fransson, in *The Polysaccharides*, G. O. Aspinall, ed. (Academic Press, New York, 1985), vol 3, pp. 338-406). Among the heparan sulfate (HS) fractions tested (HS 3-6), only those of higher sulfation and
20 IdoA content (HS 5; ~50% IdoA and ~62% N-sulfate, HS6; 65% IdoA and 72% N-sulphate) were found to completely displace DS. In addition heparin and dextran sulfate, but not dextran, displaced the radiolabelled DS. Taken together, the results suggest that the GAG-defensin interaction depends on IdoA residues as well as sulfation of the polysaccharide. Since the IdoA in DS and HS/heparin may be 2-O-sulfated (L. Å. Fransson, in *The Polysaccharides*, G. O. Aspinall, ed. (Academic
25 Press, New York, 1985), vol 3, pp. 338-406), additional modifications of the DS and HS polymers may be required for binding to α -defensin 1.

Example 3

30 To investigate the effects of DS on defensin function, the bactericidal activity of α -defensin 1 against the test organisms *S. pyogenes*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* was determined.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

30

For anti-microbial assays *S. pyogenes*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* were grown to mid-log phase in TH-medium. Bacteria were washed and diluted in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 5 mM glucose. 50 μ l bacteria (2×10^6 cfu/ml) were incubated with α -defensin at concentrations ranging from 0-40 μ g/ml with or without the addition of various GAG chains at concentrations of 2-400 μ g/ml. Incubations were carried out at 37 °C for 2 h (*S. pyogenes* and *E. faecalis*) or 4 h (*P. aeruginosa*). To quantitate the microbicidal activity serial dilutions of the incubation mixture were plated on TH agar, incubated at 37 °C over night and the number of CFU were determined.

The bacterial strains were incubated with 0-40 μ g/ml of α -defensin I. *P. aeruginosa*, *E. faecalis* and *S. pyogenes* were effectively killed by the defensin at or above concentrations of 4 μ g/ml. Addition of DS at concentrations of 20-40 μ g/ml (DS/defensin molar ratio ~0.5-1) yielded almost complete reversal of defensin-mediated killing of *E. faecalis* and partial inhibition of killing of the two other species (Fig. 1B). DS at 400 μ g/ml (molar ratio ~10:1) almost completely reversed the defensin anti-microbial effects. Since previous experiments showed that DS bound α -defensin I, and that binding was not inhibited by a ~100-fold excess of IIS3 as well as the two CS forms, we addressed the question whether these GAGs were less active in inhibiting defensins. Indeed, when included in the assay (using *S. pyogenes* as the test organism), defensin-mediated bacterial killing was only partly inhibited; IIS3, CS-4 and CS-6 (Sigma) at 400 μ g/ml yielded only 6, 16 and 2% inhibition, respectively.

Example 4

To investigate the effects of DS on LL-37 function, the bactericidal activity of LL-37 against the test organisms *S. pyogenes*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* was determined.

Anti-microbial assays were carried out as described in Example 3. The results illustrating the antibacterial activity of LL-37 are shown in Fig. 2. The addition of DS at various concentrations (0-40 μ g/ml) inhibited the LL-37 killing of *S. pyogenes*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*. The results are shown in Fig. 3.

Example 5

To investigate whether dermatan sulfate (DS) binds LL-37 and whether sulfated polysaccharides could block the interaction, slot-binding assays were carried out as described in Example 2. LL-37 (0.2-5 µg) was applied onto nitrocellulose and incubated with iodinated dermatan sulphate (DS36). Different polysaccharides were added for competition of binding: DS36, DS18, DS13, CS-4, CS-6, CS-D (chondroitin sulphate D) and CS-E (chondroitin sulphate E). The results are shown in Fig. 4. CS-4, CS-6 and CS-D and CS-D did not abolish binding. Radiolabelled DS was, however, displaced by DS-36, DS18, DS13 and CS-E.

Example 6

The effects of various cationic molecules on the DS-LL-37 interaction were monitored using slot-blot assays as described in Example 2. The results are shown in Fig. 5. DS binding to LL-37 was blocked by poly-L-lysine, poly-L-arginine, DEAE-dextran, polybrene, chitosan and polyethylencimine. Reduced levels of binding were observed in the presence of protamine. Polymyxin B and polymyxin B nonapeptide did not block the binding of DS to LL-37.

Example 7

To demonstrate that *P. aeruginosa* elastase degrades and inactivates LL-37, 10 µg LL-37 was incubated with 30 mU *P. aeruginosa* elastase in 50 µl 10 mM Tris, pH7.5 for 0, 1, 5, 15 or 30 minutes or 1, 4 or 20 hours. Equal aliquots of the incubations were analysed on SDS-PAGE (16.5% Tris-Tricine gel) or assayed for bactericidal activity. For the bactericidal assays 2×10^6 cfu/ml of *E. faecalis* were incubated with 0.1 µg LL-37 for 2h at 37°C in 10 mM Tris-HCl pH7.5, 5mM glucose. The results shown in Fig. 6 show that LL-37 is degraded and inactivated by *P. aeruginosa* elastase.

The LL-37 degradation products were analysed by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) followed by time of flight (TOF) MS-MS. Major peptide fragments yielding fragment masses of 3708.859, 3178.637, 2822.450, 2326.269 and 1401.748 were detected and further analysed. The cleavage points and the proposed antibacterial region of LL-37 are shown in Fig. 7.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

32

The degradation of LL-37 by 3 mU *E. faecalis* gelatinase or 3 mU *S. pyogenes* cysteine proteinase was monitored by incubating 1 µg LL-37 for 1 hour and 6 hours. The degradation products were analysed by SDS-PAGE on 16.5% Tris-Tricine gels and compared to the degradation products following incubation of 6 mU *P. aeruginosa* elastase with 1 µg LL-37 for 5 minutes and 1 hour. The results are shown in Fig. 8.

Example 8

The effects of various substances on the degradation of LL-37 were determined by incubating 1 µg LL-37 with 12 mU *P. aeruginosa* elastase, 6 mU *E. faecalis* gelatinase or 6 mU *S. pyogenes* proteinase for 1 hour in the presence and absence of inhibitors. The resulting material was analysed by SDS-PAGE (16.5% Tris-Tricine gels). Degradation was abolished by the metalloproteinase inhibitors GM6001 (100 µM) and 1,10-phenanthroline (2mM) which both inhibited *P. aeruginosa* elastase and *E. faecalis* gelatinase or by the inhibitor B64 (10 µM) which inhibited *S. pyogenes* cysteine proteinase (Fig. 9).

DS36 and CS-E, and to a lesser extent CS-A and CS-C, inhibited the degradation of LL-37 by *P. aeruginosa* elastase (Fig. 10). Sulfated disaccharides of the structure [Δ UA(2S)-GalNAc(4,6S)] (Fig. 11) and sucroseoctasulphate (Fig. 12) also inhibited the degradation of LL-37 by *P. aeruginosa* elastase.

CLAIMS

1. A method of identifying an agent which is capable of inhibiting the
5 interaction between a glycosaminoglycan and a cationic anti-microbial peptide,
which method comprises:
- (i) providing, as a first component, a glycosaminoglycan;
 - (ii) providing, as a second component, a cationic anti-microbial peptide;
 - (iii) contacting the first and second components with a test agent under
10 conditions that would permit the first and second components to interact in
the absence of the test agent; and
 - (iv) monitoring any interaction between the first and second components
thereby determining whether the test agent is capable of disrupting the
interaction between the first and second components.
- 15 2. A method of identifying an agent which is capable of blocking the
glycosaminoglycan-mediated inhibition of a cationic anti-microbial peptide, which
method comprises:
- (i) providing, as a first component, a glycosaminoglycan;
 - (ii) providing, as a second component, a cationic anti-microbial peptide;
 - 20 (iii) providing, as a third component, a bacterial culture;
 - (iv) contacting the first, second and third components with a test agent
under conditions that would permit killing of the bacterial culture by the
second component in the absence of the first component and that would
permit inhibition by the first component of the killing of the bacterial culture
25 by the second component in the absence of the test agent; and
 - (v) monitoring survival of the bacterial culture
thereby determining whether the test agent is capable of preventing
glycosaminoglycan-mediated inhibition of the cationic anti-microbial peptide.
3. A method according to claim 1 or 2 wherein the cationic anti-
30 microbial peptide is a defensin.
4. A method according to claim 3 wherein the defensin is α -defensin.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

34

5. A method according to claim 1 or 2 wherein the cationic anti-microbial peptide is LL-37.
6. A method according to any preceding claim wherein the glycosaminoglycan has a high iduronate content.
- 5 7. A method according to any preceding claim wherein the said glycosaminoglycan has a high degree of sulfation.
8. A method according to any preceding claim wherein the said glycosaminoglycan is dermatan sulfate.
9. A method according to claim 2 wherein the bacterial culture
- 10 comprises a bacterial strain capable of multiplying in a connective tissue rich in proteoglycans.
10. A method according to claim 9 wherein the bacterial strain is selected from *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* or *Proteus mirabilis*.
- 13 11. A method of identifying an agent which is capable of inhibiting the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase, which method comprises:
 - (i) providing, as a first component, a bacterial proteinase;
 - (ii) providing, as a second component, a proteoglycan;
 - (iii) contacting the first and second components with a test agent under
 - 20 conditions that would permit degradation of the second component by the first component in the absence of the test agent; and
 - (iv) monitoring any degradation of the second component
 - thereby determining whether the test agent is capable of inhibiting the degradation of the proteoglycan by the proteinase.
- 25 12. A method according to claim 11 wherein the proteoglycan comprises dermatan sulfate.
13. A method according to claim 11 or 12 wherein the proteoglycan is decorin or versican.
14. A method according to claim 12 or 13 wherein in step (iv) release of
- 30 dermatan sulfate from the proteoglycan is monitored.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

35

15. A method of identifying an agent which is capable of inhibiting the degradation of a cationic anti-microbial peptide by a bacterial proteinase, which method comprises:

- (i) providing, as a first component, a bacterial proteinase;
- 5 (ii) providing, as a second component, a cationic anti-microbial peptide;
- (iii) contacting the first and second components with a test agent under conditions that would permit degradation of the second component by the first component in the absence of the test agent;
- (iv) monitoring any degradation of the second component
- 10 thereby determining whether the test agent is capable of inhibiting the degradation of the cationic anti-microbial peptide by the proteinase.

16. A method according to claim 15 wherein the cationic anti-microbial peptide is as defined in any one of claims 3 to 5.

17. A method according to any one of claims 11 to 16 wherein the bacterial proteinase is derived from a bacterial strain as defined in claim 9 or 10.

18. A method according to any one of claims 11 to 17 wherein the bacterial proteinase is selected from *Pseudomonas aeruginosa* elastase, *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase, *Enterococcus faecalis* gelatinase and *Streptococcus pyogenes* cysteine proteinase.

19. A method according to any one of claims 11 to 18 wherein the bacterial proteinase is present in growth medium extracted from a bacterial culture.

20. A kit suitable for use in identifying an agent which is capable of inhibiting the interaction between a glycosaminoglycan and a cationic anti-microbial peptide, which kit comprises:

- 25 (a) a glycosaminoglycan; and
- (b) a cationic anti-microbial peptide.

21. A kit according to claim 20 further comprising:

- (c) means for determining whether a test agent inhibits the interaction between the glycosaminoglycan and the cationic anti-microbial peptide.

22. A kit according to claim 20 or 21 further comprising:

- 30 (d) a bacterial sample.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

36

23. A kit suitable for use in identifying an agent which is capable of inhibiting the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase, which kit comprises:

- (a) a proteoglycan; and
- (b) a bacterial proteinase.

24. A kit according to claim 23 further comprising:

- (c) means for determining whether a test agent inhibits the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase.

25. An agent identified by a method according to any preceding claim.

26. An agent according to claim 25 which is a monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide or polysaccharide.

27. An agent according to claim 25 which is a cationic substance.

28. An agent according to claim 27 wherein the cationic substance is poly-L-lysine, poly-L-arginine, DEAE-dextran, polybrene, chitosan, polyethylamine or protamine.

29. A pharmaceutical composition comprising an agent according to any one of claims 25 to 28 and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

30. A pharmaceutical composition according to claim 29 further comprising a cationic anti-microbial peptide.

31. An agent according to any one of claims 25 to 28 or a pharmaceutical composition according to claim 29 or 30 for use in a method of treatment of the human or animal body by therapy.

32. A product comprising an agent according to any one of claims 25 to 28 and a cationic anti-microbial peptide for separate, simultaneous or sequential use in a method of treatment of the human or animal body by therapy.

33. A product comprising an inhibitor of a bacterial defence mechanism and a cationic anti-microbial peptide for simultaneous or sequential use in a method of treatment of the human or animal body by therapy, wherein the said defence mechanism comprises the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase to release of a glycosaminoglycan which is capable of binding to a cationic anti-microbial peptide thus inhibiting the anti-microbial activity of the said peptide.

34. A product according to claim 33 wherein the glycosaminoglycan is

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

37

released by the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase.

35. A product according to claim 33 or 34 wherein the inhibitor is capable of blocking the interaction between a glycosaminoglycan and a cationic anti-microbial peptide.

5 36. A product according to claim 33 or 34 wherein the inhibitor is capable of blocking the degradation of a proteoglycan by a bacterial proteinase.

37. A product according to claim 33 or 34 wherein the inhibitor is capable of blocking degradation of a cationic anti-microbial peptide by a bacterial proteinase.

38. Use of an agent according to any one of claims 25 to 28, a
10 pharmaceutical composition according to claim 29 or 30 or a product according to any one of claims 32 to 36 in the manufacture of a medicament for use in a method of treating a chronic or acute bacterial infection.

39. Use of an agent according to claims 38, wherein said method is a method of treating an ulcer.

15 40. Use according to any claim 38, wherein said method is a method of promoting wound healing.

41. A method of treating a chronic or acute bacterial infection, which method comprises:

20 (i) identifying an agent which inhibits the inactivation of an anti-microbial peptide by a bacteria.

(ii) administering a therapeutically effective amount of the agent to a patient in need thereof.

WO 02/06821

PCT/EP01/08208

1/8

Fig. 1A

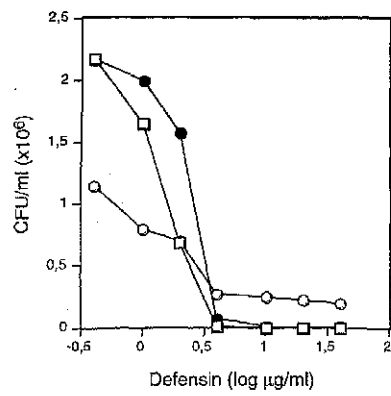
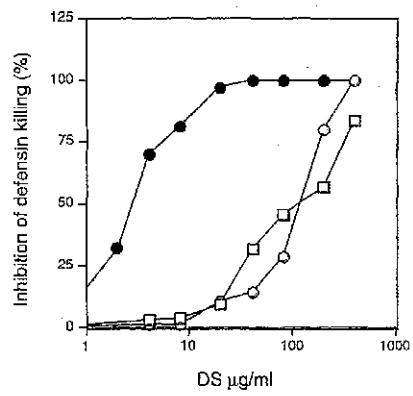


Fig. 1B



WO 02/06821

PCT/EP01/08208

2/8

Fig. 2

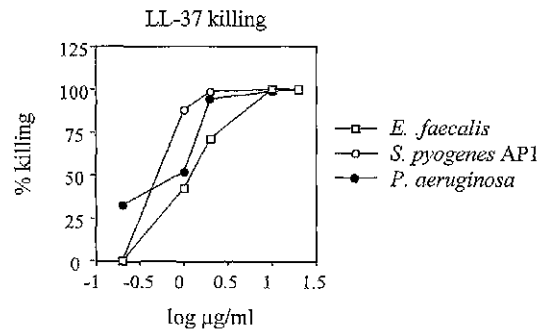
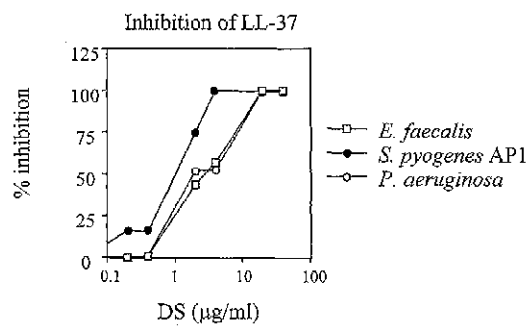


Fig. 3

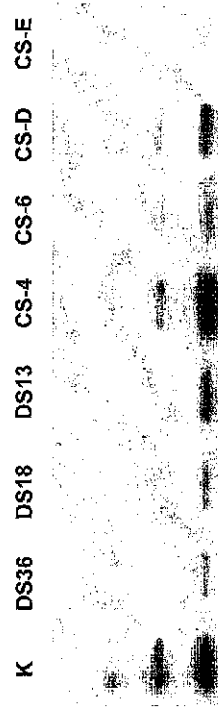


WO 02/06821

PCT/EP01/08208

3/8

Fig. 4

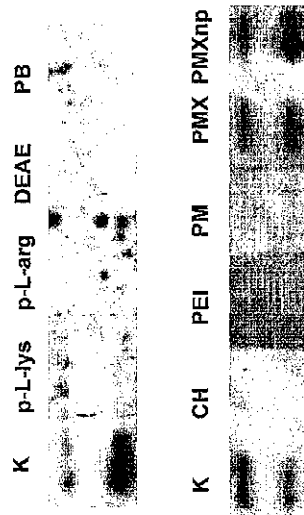


WO 02/06821

PCT/EP01/08208

4/8

Fig. 5

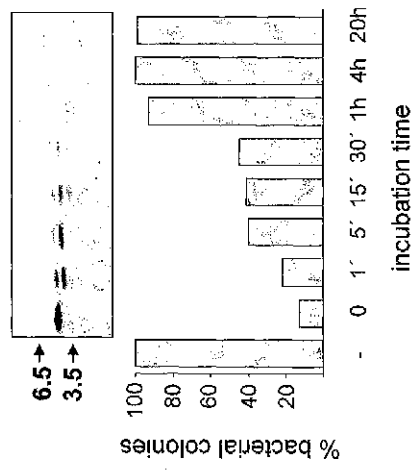


WO 02/06821

PCT/EP01/08208

5/8

Fig. 6



WO 02/06821

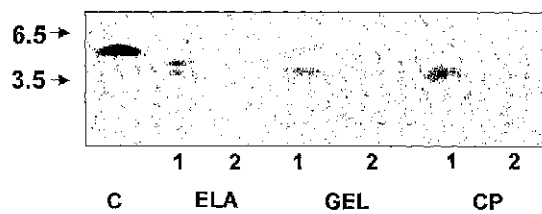
PCT/EP01/08208

6/8

Fig. 7



Fig. 8



WO 02/06821

PCT/EP01/08208

7/8

Fig. 9

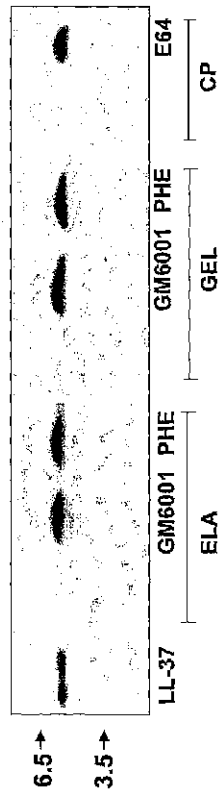
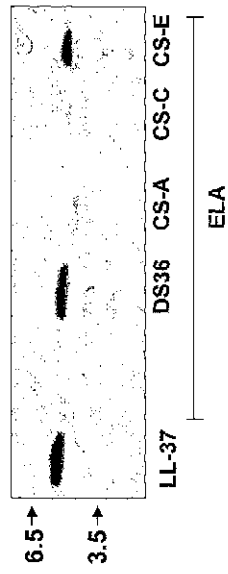


Fig. 10



WO 02/06821

PCT/EP01/08208

8/8

Fig. 11

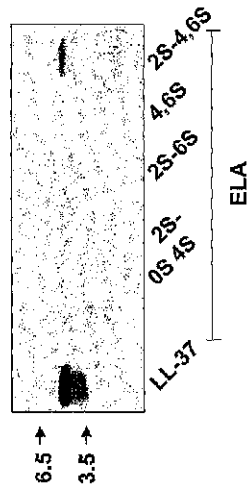
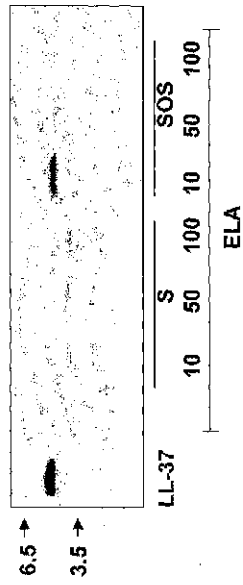


Fig. 12



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06821 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/68,
A61P 31/04[SP/SE]: Magle Stora Kyrkogata 10, S-223 50 Lund (SE).
FRICK, Inga-Maria [SE/SE]; Marsvagen 3, S-245 33
Stålbastorp (SE). NIEMDTCHEN, Artur [SE/SE];
Göingegatan 4, S-222 41 Lund (SE).

(21) International Application Number: PCT/EP01/08208

(22) International Filing Date: 17 July 2001 (17.07.2001)

(74) Agent: WOODS, Geoffrey, Corlett, J.A. Kemp & Co., 14
South Square, Gray's Inn, London WC1R 5JF (GB).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 00306074.6 17 July 2000 (17.07.2000) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): ILANSA
MEDICAL AB [SE/SE]; Box 784, S-220 07 Lund (SE).

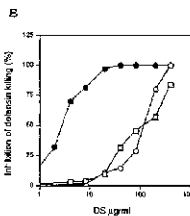
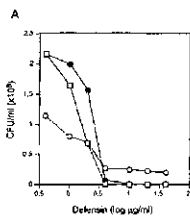
(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BJÖRCK, Lars

(84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW). Eurasian

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIMICROBIAL AGENT



(57) Abstract: A method of identifying an agent that enhances the anti-microbial activity of cationic anti-microbial peptides by blocking the inhibitory effects of the proteinase/glycosaminoglycan pathway, which method comprises: (i) providing, as a first component, a cationic anti-microbial peptide; (ii) providing, as a second component, bacteria; (iii) providing, as a third component, part of all of the components of a proteinase/glycosaminoglycan pathway such that the third component reduces the antimicrobial effect of the first component, for example, a glycosaminoglycan or bacteria or bacteria and a proteoglycan or a bacterial proteinase or a bacterial proteinase and a proteoglycan; (iv) contacting the first, second and third components with a test agent under conditions that would permit the killing of the bacteria by the antimicrobial agent in the absence of the third component, and that would permit the inhibition of the anti-microbial activity of the first component by the third component in the absence of the test agent; (v) monitoring the survival of the bacterial culture thereby determining whether the test agent is capable of enhancing anti-microbial activity wherein a test agent capable of enhancing anti-microbial activity promotes killing of the bacterial culture. Agents identified by such a method are useful in the therapy of acute and chronic infections, particularly in the treatment of ulcers and in the promotion of wound healing.

WO 02/06821 A3

WO 02/06821 A3



patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(88) Date of publication of the international search report:
27 June 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Patent Application No. PCT/EP 01/08208
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7: G01N33/68 A61P31/04 According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7: G01N C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database consulted during the international search (name of data base and relevant practical search term used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category:	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KESSLER E ET AL: "PSEUDOMONAS PROTEASE PURIFICATION PARTIAL CHARACTERIZATION AND ITS EFFECT ON COLLAGEN PROTEO GLYCAN AND RABBIT CORNEAS" INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, vol. 16, no. 6, 1977, pages 488-497, XP001064692 EN ISSN: 0146-0404 the whole document --- -/-	11-14, 23, 24
☒ Further documents are listed in the continuation of box C ☒ Patent family members are listed in annex		
1. Special categories of cited documents: *A* documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another publication or other special reason (see specification) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of making of the international search report	
8 April 2002	24/04/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Pöschelstr. 2 DK - 2500 Hvidovre Tel. (+45) - 33 60 2000, Ex. 31 65 1400 N. Fax. (+45) - 33 60 2010	Authorized officer Pellegrini, P	

Form PCT/ISA/210 (Second sheet) 1.12/1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/EP 01/08208

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BROWN S I ET AL: "THE CORNEA DESTROYING ENZYME OF PSEUDOMONAS-AERUGINOSA" INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY, vol. 13, no. 3, 1974, pages 174-180, XP001064598 ISSN: 0020-9988 the whole document ---	11-14, 23,24
X	ASPEDON A ET AL: "Involvement of a protease in antimicrobial peptide resistance in Pseudomonas aeruginosa." ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR, vol. 99, 1999, page 14 XP001064655 99th General Meeting of the American Society for Microbiology; Chicago, Illinois, USA: May 30-June 3, 1999, 1999 ISSN: 1060-2011 abstract ---	15-19
X	ADAMS PHILLIP ET AL: "Defining protease specificity with proteomics: A protease with a dibasic amino acid recognition motif is regulated by a two-component signal transduction system in Salmonella." ELECTROPHORESIS, vol. 20, no. 11, August 1999 (1999-08), pages 2241-2247, XP001064681 ISSN: 0173-0835 abstract ---	15-19
X	WO 94 03184 A (NEOSE PHARM INC) 17 February 1994 (1994-02-17) the whole document ---	25-40
X	EP 0 356 060 A (MINNESOTA MINING & MFG) 28 February 1990 (1990-02-28) claim 1 ---	25-40
X	EP 0 089 939 A (SVENSKA SOCKERFABRIKS AB) 28 September 1983 (1983-09-28) abstract claim 1 ---	25-40
X	US 5 968 525 A (FITZGERALD GERALD R ET AL) 19 October 1999 (1999-10-19) column 3, paragraph 8 --- -/-	25-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No.
PCT/EP 01/08208

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NOCK S ET AL: "REVERSIBLE, SITE-SPECIFIC IMMOBILIZATION OF POLYARGININE-TAGGED FUSION PROTEINS ON MICA SURFACES" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 414, September 1997 (1997-09), pages 233-238, XP002915201 ISSN: 0014-5793 page 233, column 2, paragraph 4	25-32
P, X	SCHMIDTCHEN ARTUR ET AL: "Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin." MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 3, February 2001 (2001-02), pages 708-713, XP002194955 ISSN: 0950-382X the whole document	1-24
A	LEHRER R I ET AL: "Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX, vol. 11, no. 1, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 23-27, XP004257652 ISSN: 0952-7915 cited in the application abstract page 23, column 2, paragraph 2	1-24

International Application No. PCT/JP 01/08208

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 25-41

Claims 25-41 relate to substances defined by reference to desirable characteristics or properties, namely being identified by the method of the invention or being an inhibitor of a bacterial defence mechanism or of the inactivation of an antimicrobial peptide by a bacterium. The claims cover all substances having at least one of these characteristics or properties, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT only for the substances which are explicitly listed in claims 26 and 28, namely monosaccharides, disaccharides, oligosaccharides, polysaccharides, poly-L-lysine, poly-L-alanine, DEAE-dextran, polybrene, chitosan, polyethyleneimine and protamine. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the subject-matter for which protection is sought in claims 25-41 is impossible. Consequently, the search has been restricted to the above-mentioned substances.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Application No.
PCT/EP 01/08208

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9403184	A	17-02-1994	AU 4993893 A	03-03-1994
			CN 1085430 A ,B	20-04-1994
			MX 9304638 A1	31-05-1994
			US 5883079 A	16-03-1999
			WO 9403184 A1	17-02-1994
			US 5620964 A	15-04-1997
			US 5514660 A	07-05-1996
			US 5753630 A	19-05-1998
EP 0356060	A	28-02-1990	US 4956350 A	11-09-1990
			AU 627204 B2	20-08-1992
			AU 3933689 A	22-02-1990
			DE 68918538 D1	03-11-1994
			DE 68918538 T2	20-04-1995
			EP 0356060 A2	28-02-1990
			ES 2063135 T3	01-01-1995
			JP 2107267 A	19-04-1990
EP 0089939	A	28-09-1983	AU 561066 B2	30-04-1987
			AU 1262583 A	29-09-1983
			DK 130983 A	23-09-1983
			EP 0089939 A1	28-09-1983
			FI 830959 A	23-09-1983
			JP 58174327 A	13-10-1983
			NO 831011 A	23-09-1983
US 5968525	A	19-10-1999	US 5338543 A	16-08-1994
			CA 2129982 A1	02-09-1993
			EP 0637250 A1	08-02-1995
			JP 7504653 T	25-05-1995
			WO 9316726 A2	02-09-1993

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/721	A 6 1 K 31/721	
A 6 1 K 31/722	A 6 1 K 31/722	
A 6 1 K 31/785	A 6 1 K 31/785	
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/16	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 17/02	C 1 2 Q 1/37	
A 6 1 P 31/04	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/37	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/569	B
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/569	A 6 1 K 37/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 フリク、インガ マリア
スウェーデン国 スタファンストルプ、マルスヴェーゲン 3

(72)発明者 シュミットヒェン、アルトゥール
スウェーデン国 ルンド、ゴインゲガタン 4

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB21 FB04 FB05 FB06
4B063 QA18 QQ95 QR10 QR16 QS28 QX01
4C084 AA02 AA17 BA04 BA08 BA23 BA44 CA59 NA14 ZA68 ZA89
ZB35
4C086 AA01 EA01 EA20 EA23 FA03 MA01 MA04 NA14 ZA68 ZA89
ZB35

【要約の続き】

を促進する)を決定する、ことを含む上記方法が提供される。そのような方法により同定される物質は、急性および慢性の感染症の治療、特に潰瘍の治療と創傷治癒の促進に有用である。