

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4194941号

(P4194941)

(45) 発行日 平成20年12月10日(2008.12.10)

(24) 登録日 平成20年10月3日(2008.10.3)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/435 (2006.01)

C O 7 K 14/435 Z N A

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02

C

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00

A

請求項の数 8 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2003-521261 (P2003-521261)  
 (86) (22) 出願日 平成14年5月8日(2002.5.8)  
 (65) 公表番号 特表2005-502663 (P2005-502663A)  
 (43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2002/000317  
 (87) 国際公開番号 W02003/016339  
 (87) 国際公開日 平成15年2月27日(2003.2.27)  
 審査請求日 平成17年4月7日(2005.4.7)  
 (31) 優先権主張番号 01112855.0  
 (32) 優先日 平成13年5月10日(2001.5.10)  
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(73) 特許権者 503411934  
 上海▲ふあ▼▲い▼生物技▲しゅう▼有限  
 公司  
 中華人民共和国 200233 シャンハ  
 イ、中国上海市漕宝路36号  
 (74) 代理人 230104019  
 弁護士 大野 聖二  
 (74) 代理人 100106840  
 弁理士 森田 耕司  
 (74) 代理人 100105991  
 弁理士 田中 玲子  
 (74) 代理人 100114465  
 弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マガイニン誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記に示されるアミノ酸配列を有する、マガイニンペプチド誘導体およびその医薬的に許容可能な塩：

G l y - I l e - G l y - L y s - P h e - L e u - H i s - S e r - A l a - L y s -  
 L y s - P h e - G l y - L y s - A l a - P h e - V a l - G l y - G l u - I l e -  
 X - A s n - Y - O H

(ここで、XはI l eまたはL e u、YはS e r - A r g、I l e - A r g、L e u - A r gおよびL y s - A r gからなる群より選ばれる2つのアミノ酸残基を示す)。

【請求項 2】

YがS e r - A r gである、請求項1に記載のマガイニンペプチド誘導体およびその医薬的に許容可能な塩。

【請求項 3】

XがL e u、YがS e r - A r gである、請求項1に記載のマガイニンペプチド誘導体およびその医薬的に許容可能な塩。

【請求項 4】

下記に示されるアミノ酸配列を有する、マガイニンペプチド誘導体およびその医薬的に許容可能な塩：

G l y - I l e - G l y - L y s - P h e - L e u - H i s - S e r - A l a - L y s -  
 L y s - P h e - G l y - L y s - A l a - P h e - V a l - G l y - G l u - I l e -

10

20

X - A s n - Y - O H

(ここで、XはMet、YはSer - Arg、Ile - Arg、Leu - ArgおよびLys - Argからなる群より選ばれる2つのアミノ酸残基を示す)。

【請求項5】

YがSer - Argである、請求項4に記載のマガニンペプチド誘導体およびその医薬的に許容可能な塩。

【請求項6】

請求項1～5のいずれかに記載のマガニンペプチド誘導体の組み換え技術による製造方法であって、

a．マガニンペプチド誘導体のアミノ酸配列に従った遺伝子フラグメントを合成すること；

b．遺伝子フラグメントをライゲートすること；

c．組み換えプラスミドを構築すること；

d．組み換えプラスミドを宿主細胞に形質転換すること；

e．宿主細胞を培養してマガニンペプチド誘導体を発現させること；

f．宿主細胞からマガニンペプチド誘導体を抽出すること；

g．凍結乾燥によりマガニンペプチド誘導体を精製すること；

を含む、方法。

【請求項7】

請求項1～5のいずれかに記載のマガニンペプチド誘導体の固相合成による製造方法であって、

a．固相担体としてHMP樹脂を用いて、アミノ酸のアルファアミンを9 - フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)で保護すること；

b．ペプチド合成装置で残基を合成すること；

c．合成されたペプチド誘導体を単離、精製および凍結乾燥すること；

を含む、方法。

【請求項8】

請求項1～5のいずれかに記載のマガニンペプチド誘導体またはその医薬的に許容可能な塩を含む抗菌剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マガニン誘導体に関する。特に、本発明は、抗菌活性の性質を有するマガニン誘導体に関する。

【背景技術】

【0002】

自身の生物群集を守る抗細菌ペプチド物質を生産できる、昆虫、微生物、両生類およびヒト等の多くの生物がいる。これらの抗細菌ペプチドは、細胞膜の脂質に浸透してそれらを不活性にでき、また原生動物種、生殖細胞およびウイルスにさえ影響を与えることができ、これによりこのようなペプチドは、スーパー抗生物質と呼ばれる。抗細菌ペプチドはすべて、種々の量の正電荷を有しており、これらの抗細菌のメカニズムは、ペプチドが有する正電荷と細菌細胞壁に存在するリン脂質が有する負電荷との組み合わせに立脚しており、細胞膜上にイオン経路を作り、透過性を増強し、細菌が溶解し、死滅する原因となる。それゆえ、これらのペプチドの抗菌活性は、いずれの特定のレセプターとの結合にも依存しない。

【0003】

抗細菌ペプチドは、グラム陽性およびグラム陰性細菌、並びに好気性および嫌気性細菌に対して広い抗菌活性スペクトルを示す。これらは、抗細菌ペプチドが薬剤耐性作用を生じない点で抗生物質とは異なり、多くの型の抗生物質に対して耐性を有する細菌でさえ、抗細菌ペプチドにより抑制されうる。さらに、このような抗細菌ペプチドは、原生動物種

10

20

30

40

50

およびウイルスに対しても抑制作用を有する。抗細菌ペプチドの代謝物はアミノ酸なので、これらのペプチドは、宿主細胞に対して低毒性となる。要するに、抗菌ペプチドは、抗菌薬として使用することに大きな期待が持てる化合物の類である。

【0004】

マガイニンは、抗細菌作用を有するカエルの皮膚由来の天然の抗細菌ペプチドのカテゴリのものである。マガイニンは、これまでに広く研究されており、容易に合成でき、コストが低く、そして溶血性がほとんどないという特徴を有する。

【0005】

米国特許番号5589364号において、遺伝子組み換え技術を用いてマガイニンII(23アミノ酸)を製造できる方法が開示されている。マガイニンIIは、天然のカエル皮膚抗細菌ペプチドの1種であり、以下に示すアミノ酸配列を有する。

10

【0006】

【化1】

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-OH

ここで、Glyはグリシンを、Ileはイソロイシンを、Lysはリジンを、Pheはフェニルアラニンを、Leuはロイシンを、Hisはヒスチジンを、Serはセリンを、Alaはアラニンを、Valはバリンを、Gluはグルタミン酸を、Metはメチオニンを、Asnはアスパギンを示す。

20

【0007】

米国特許番号6183992号は、マガイニン誘導体であるMSI-78(22アミノ酸)の製造方法を開示しており、以下に示すアミノ酸配列を有する。

【0008】

【化2】

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>

Harriet M. LambらによるADIS NEW DRUG PROFILEには、マガイニン誘導体MSI-78が外傷性感染および真性糖尿病により引き起こされる下腿の潰瘍の処置において、明らかな治癒効果を示すことが報告されている。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、マガイニンのいくつかの誘導体を提供することにある。これらは、マガイニン誘導体のカテゴリーを広げるものである。このような誘導体は、合成の化学的方法、またより容易には、遺伝子組み換え技術により製造することができ、これは、製造コストを削減することができる。このような誘導体の抗菌作用は、天然のマガイニンと同等かそれより高いものである。

【課題を解決するための手段】

40

【0010】

本発明は、以下に示されるアミノ酸配列を有するマガイニンのいくつかの誘導体およびこれらから製造される医薬的に許容可能な塩に関連する。

【0011】

【化3】

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH

ここで、XはMet、IleおよびLeuからなる群より選ばれるアミノ酸残基であり、YはSer、Lys、Ile、ArgおよびLeuからなる群より選ばれる2つのアミ

50

ノ酸残基の組み合わせである。

本発明のマガイニン誘導体は、配列表の< 2 1 0 > 1 に示されるアミノ酸配列を有している。

【 0 0 1 2 】

本発明のマガイニン誘導体は両性化合物であり、いずれかの多数の無機塩基、並びに無機および有機酸と反応して塩を形成するのに十分に酸性もしくは十分に塩基性でありうる。通常酸性付加塩を形成するために利用される酸は、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸、p - トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、p - 臭化フェニルスルホン酸、炭酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸等のような酸である。このような塩の例には、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、リン酸塩、一水素リン酸塩、二水素リン酸塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソブタン酸塩、カプロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオール酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン - 1 , 4 - ジオン酸塩、ヘキシシン - 1 , 6 - ジオン酸塩、安息香酸塩、塩化安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、スルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニルブタン酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、ガンマ - ヒドロキシブタン酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、プロパンスルホン酸塩、ナフタレン - 1 - スルホン酸塩、ナフタレン - 2 - スルホン酸塩、マンデル酸塩、等が含まれる。好ましい酸付加塩は、塩酸および臭化水素酸、特に塩酸のような鉱酸と塩を形成するものである。

【 0 0 1 3 】

マガイニン誘導体と反応させて塩を形成するために、アルカリを用いてもよい。このようなアルカリの代表例には、アンモニウム、アルカリ金属、アルカリ金属水酸化物、炭酸、および重炭酸が含まれる。典型的には、このようなアルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウムおよび炭酸カルシウム等が挙げられる。

本発明のマガイニン誘導体のアミノ酸は、L - 体またはD - 体の同位体でもよい。

本発明の1つの見地は、マガイニン誘導体の製造方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

前記方法は、マガイニン誘導体の遺伝子組み換え技術による製造方法であって、マガイニン誘導体のアミノ酸配列に従い遺伝子フラグメントを合成すること、遺伝子フラグメントをライゲートすること、組み換えプラスミドを構築すること、クローニングすること、並びに発酵、分離、精製および凍結乾燥工程後に産物を得ること、を含む。

本発明の他の見地は、マガイニン誘導体の製造方法を提供する。

【 0 0 1 5 】

前記方法は、マガイニン誘導体の固相合成による製造方法であって、固相担体としてHMP樹脂を用いること、残基のアルファアミンを9 - フルオレニルメトキシカルボニル ( F m o c ) で保護すること、ペプチド合成装置でペプチドを合成すること、並びに分離、精製および凍結乾燥工程後に産物を得ること、を含む。

【 0 0 1 6 】

また、他の見地としては、本発明は、そのようなマガイニン誘導体およびこれらの医薬的に許容可能な塩の、抗菌作用を有する薬 / 医薬の製造における使用を提供する。

【 0 0 1 7 】

本発明は、マガイニン誘導体のカテゴリーを広げる種々のマガイニン誘導体を提供する。このようなマガイニン誘導体は、化学合成により、またより容易には、遺伝子組み換え技術により製造でき、これは製造コストを低減することができるものである。このような誘導体は、天然のマガイニンと比べて、同等またはそれより高い抗菌作用を有する。

【 0 0 1 8 】

抗菌作用実験、時間 - 死滅試験、溶血性および急性毒性試験により、本発明のマガイニン誘導体の *Escherichia coli* に対する抗菌作用が天然マガイニンと同等

10

20

30

40

50

であることが示され、このようなマガイニン誘導体が、*Staphylococcus aureus* に対しても阻害作用を有することが示された。抗菌実験は、本発明のマガイニン誘導体の作用を試験することにより、 $50\mu\text{l}$ の細菌溶液( $10^6$ 細菌/ $\text{ml}$ )に対して行われ、細菌の90%以上が $0.5\mu\text{g}$ の投与量で3時間以内に死滅し、 $1\mu\text{g}$ の投与量ではほとんどすべての細菌が3時間以内に死滅した。本発明の誘導体の溶血試験により、50%の細菌阻害( $\text{IC}_{50}$ )に対する50%の細菌の溶血( $\text{HC}_{50}$ )の有効濃度比は約50:1であった一方、天然マガイニンの比は約24:1であったことが示され、これは、本発明の産物の安全性が天然マガイニンのものに比べて優れていることを示すものである。さらに、急性毒性試験により、本発明のマガイニン誘導体が低毒性であることが示された。

10

#### 【実施例】

#### 【0019】

以下の実施例は、例示であり、いかなる手段においても本発明の範囲を限定するものではない。

<実施例1> XがLeuでYがSer-Argである本発明のマガイニン誘導体の遺伝子組み換え技術による製造

#### 【0020】

(1) 上記のマガイニン誘導体のアミノ酸配列に従い以下の遺伝子フラグメントを合成した。

#### 【化4】

20

(a) 5'-AAT TCC ATG GGT ATC GGT AAA TTT CTG CAC AGC GCG AAA AAA

(b) 5'-TTTGGT AAA GCG TTT GTG GGT GAA ATC CTG AAC AGC CGT TAG A

(c) 5'-AG CTT CTA ACG GCT GTT CAG GAT TTC ACC CAC AAA CGC TTT

(d) 5'-ACC AAA TTT TTT CGC GCT GTG CAG AAA TTT ACC GAT ACC CAT

GG

#### 【0021】

(2) DNAフラグメントのライゲーション

$260\text{nm}$ における光学密度( $A_{260\text{nm}}$ )が0.1であるフラグメント(a), (b), (c)および(d)を用い、フラグメント(a)および(d)、またフラグメント(b)および(c)を2つの試験管に別々に入れた。ポリヌクレオチドキナーゼバッファー、ポリヌクレオチドキナーゼおよびATPを、2つの試験管にそれぞれ添加した。反応混合物を37で60分間インキュベートし、その後95の水浴中で10分間インキュベートし、そして室温まで自然に冷却した。T4リガーゼバッファーおよびATP溶液を添加し、T4リガーゼの添加後、混合物を15で一晩インキュベートしてフラグメントのライゲーションを完了させた。

30

#### 【0022】

(3) クローニング

$P_L$ プロモーター(またはLac、若しくはTac)を含むプラスミドを制限エンドヌクレアーゼEcoRIおよびHindIIIで消化し、ヒドロキシベンゼン:クロロホルム溶媒にて抽出し、クロロホルムで3回洗浄し、イソプロパノール溶媒により沈殿させ、そして遠心分離により採取した。

40

#### 【0023】

消化されたプラスミドをマガイニン誘導フラグメントとライゲートし、マガイニン誘導遺伝子フラグメントを含むプラスミドを得た。このようなプラスミドをE. coli JM103またはJM109宿主細胞に形質転換した。寒天プレートで培養後、細菌コロニーを選択した。

#### 【0024】

(4) 試験

50

マガイニン誘導体の遺伝子フラグメントを含むプラスミドを単クローン細菌から抽出し、EcoRIおよびHindIIIで2重に消化した。1%寒天ゲルにて電気泳動を行い、その後エチジウムブロマイドにより染色した。クローニングされた遺伝子フラグメントをマーカーとの比較により試験し、さらにDNA配列分析により試験した。

【0025】

(5) 発酵

細菌株を、10gのペプトン、5gの酵母抽出物、5g/Lの塩化ナトリウムからなる300mlのLB液体培地を各々含む、1リットル容量の振盪ビン(全部で10個のビン)中でインキュベートした。0.2mMのイソプロピルベータ-D-チオガラクトピラノシド( IPTG )を37で添加し、発現されるタンパク質の誘導を行った。細菌細胞を一晩インキュベートし、遠心分離により採取した。温度制御プロモーターP<sub>L</sub>を有するプラスミドを用いる場合、細菌細胞を30で8時間培養した。そして、培地の温度を42に上昇させ、細菌細胞を4時間維持して遺伝子を発現させた。

【0026】

(6) 細菌細胞壁を、37で1時間リゾチームの作用により破壊した。沈殿物を6Mのグアニジン塩酸塩で処理した。遠心分離、透析およびさらなる遠心分離工程の後、タンパク質の封入体を得た。封入体を、1%塩化ナトリウム、0.1%Triton X-100およびTris-HClバッファー(20mM、pH8)を含む洗浄溶液により、3回洗浄した。融合タンパク質を、12%のドデカンサルホン酸ナトリウム(SDS)を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により同定した。

【0027】

(7) 封入体を、8Mのカルバミド溶液に溶解した。50mMの塩酸の存在下で、臭化シアンを添加し、封入体を溶解した。溶液を、窒素保護下で光を遮蔽して攪拌した。溶解反応の完了後、マガイニン誘導体の粗産物を高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC、アマシャムファルマシアバイオテック製AKTA<sup>TM</sup>)によるセファデックスG-25を用いて得、マガイニン誘導体の最終産物を高性能液体クロマトグラフィー(HPLC、C<sub>18</sub>カラム)およびCH<sub>3</sub>CN/0.1%TFAバッファーによるグラジエント溶出を用いた精製により得た。得られた産物のHPLC分析結果は、化学合成により製造された産物のものと一致した。

【0028】

<実施例2> XがLeuでYがSer-Lysである本発明のマガイニン誘導体の遺伝子組み換え技術による製造

A. 上記のマガイニン誘導体のアミノ酸配列に従い以下の遺伝子フラグメントを合成した。

【0029】

【化5】

(a) 5' AAT TCC ATG GGT ATC GGT AAA TTT CTG CAC AGC GCG AAA AAA

(b) 5' TTT GGT AAA GCG TTT GTG GGT GAA ATC CTG AAC AGC AAG  
TAG A

(c) 5' AG CTT CTA CTT GCT GTT CAG GAT TTC ACC CAC AAA CGC TTT

(d) 5' ACC AAA TTT TTT CGC GCT GTG CAG AAA TTT ACC GAT ACC CAT  
GG

この実施例の工程(2)~(7)は、実施例1のものと同様であり、得られたマガイニン誘導体のHPLC分析結果は、化学合成により製造された結果と一致した。

<実施例3> XがLeuでYがLys-Argである本発明のマガイニン誘導体の固相合成による製造

【0030】

(1) アミノ酸モノマー

【表 1】

Fmoc-L-Ala-OH	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	Fmoc-L-Met-OH
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	Fmoc-L-Pro-OH
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Gly-OH	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH
Fmoc-L-His(Trt)-OH	Fmoc-L-Trp-OH
Fmoc-L-Ile-OH	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-L-Leu-OH	Fmoc-L-Val-OH

10

ここで、Fmocは9-フルオレニルメトキシカルボニルを、BOCはtert-ブチルオキシカルボニルを、Trtはトリチルを、OtBuはtert-ブチルエステルを、tBuはtert-ブチルを示す。

## 【0031】

## (2) 装置および試薬：

装置：モデル433Aペプチド合成装置（アプライドバイオシステム社、米国）

試薬：N-メチルケトピロリジン、塩化メチレン、ヘキサヒドロピリジン、メタノール、ジメチルアミノピリジン/DMF、N,N-ジイソプロピルエチルアミン/NMP、100mmole HBTU/DMF中0.5M HOBT、N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド/NMP

20

ここで、DMFはN,N-ジメチルホルムアミドを、NMPはN-メチルピロリドンを、HOBTは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを、HBTUは2-(1H-ベンゾトリアゾール-イル-1,1,3,3-テトラメチル-ウロニウムヘキサフロロホスフェート)を示す。

## 【0032】

## (3) 工程

## a. 合成

例として0.25スケールの合成を行い、以下に記載する合成工程とした。

0.25gのHMP樹脂を秤量し、合成装置の反応容器に入れた。1mmolの種々の残基を、各々保護基を結合させて秤量し、カルボキシル末端からアミノ末端方向にインスリン指向性ペプチド誘導体のアミノ酸配列に従い合成装置で配列させた。25の室温で、Fmoc保護基を除去し、残基を活性化させ、活性化した残基をHMP樹脂に結合させる反応を、コンピュータプログラムの制御下で自動的に行った。このような反応は、全ペプチドが合成されるまで繰り返された。合成の完了後、側鎖保護基が結合した各々の残基を有する残基結合樹脂を、ペプチド合成装置で空気乾燥させ、その後秤量した。

30

## 【0033】

## b. 保護基の除去および樹脂の分離

保護基が結合したインスリン指向性ペプチド誘導体の各々の残基を有する残基結合樹脂を、栓をしたエルレンマイヤーフラスコに入れ、その後以下に示す切断試薬を添加した。

40

## 【0034】

## 【表 2】

試薬	添加量
水	0.50ml
メチルフェノール	0.50ml
フェノール	0.75g
メルカプトエタノール	0.20ml
トリフロロ酢酸	10.0ml

50

30 の一定温度で6時間電磁石による攪拌反応を行った。ろ過工程の後、水溶性のろ液を採取した。樹脂を少量のトリフロロ酢酸で洗浄した。採取した水溶性のろ液および洗浄溶液を混合し、エーテルを加えて沈殿させた。混合物をろ過し、得られた沈殿を少量のエーテルで洗浄した。除湿装置による蒸発の後、粗産物を得た。

#### 【0035】

c. HPLCによる精製および凍結乾燥

粗産物の分離および精製を予備HPLCを用いて行った。最終産物を、凍結および凍結乾燥工程の後に得た。クロマトグラムおよび質量スペクトルの複合分析により、誘導体の分子量が、理論値に一致することがわかった。

#### 【0036】

<実施例4> 薬理学研究

実施例1により得られたマガイニン誘導体の抗菌試験を、以下の工程にしたがって行い、天然のマガイニンのものと比較した。

*Escherichia coli* JM103および*Staphylococcus aureus*の試験株を別々に培養し、 $1 \times 10^6$ 細菌/mlに希釈した。20mMの殺菌済みTris-HClバッファ（pH6.5）を添加した。そして、種々の濃度のマガイニン誘導体および天然マガイニンIIをそれぞれ添加し、37℃で異なる時間インキュベートした。50μlの培養物を採取して寒天プレートに広げ、37℃で一晩インキュベートした。残った細菌コロニーを数え、死滅した細菌の割合を計算した。

#### 【0037】

(1) 抗菌作用を示す表：

実施例1により得られたマガイニン誘導体と天然マガイニンIIとの抗菌作用の比較

【表3】

サンプル	濃度 μg/ml	残った細菌コロニー			死滅した細菌 %	
		0hr	3hr	4hr	3hr	4hr
実施例1により 得られた マガイニン誘導体	0	407 228				
		317				
	10		109 73	160 195	71.3	44.2
			91	177		
	20		9 5	2 5	97.8	99.1
			7	3		
天然の マガイニンII	10		99 57	52 44	75.4	84.9
			78	48		
	20		12 4	6 4	97.5	99.2
			8	5		

実施例1により得られたマガイニン誘導体の*Staphylococcus aureus*に対する抗菌作用を示す表

10

20

30



【表 4】

濃度 μg/ml	残った細菌コロニー			2 時間以内に 死滅した細菌 %
	0hr	1hr	2hr	
0	267			
	225			
50	158	18	2	99
	185	18	2	99
	172	18	2	99

10

## 【 0 0 3 8 】

( 2 ) 時間 - 死滅試験の結果を示す図：実施例 1 により得られたマガイニン誘導体の時間 - 死滅試験の結果を図 1 に示す。

## 【 0 0 3 9 】

( 3 ) 溶血試験の結果を示す表：

【表 5】

20

群		投与量 (μg/ml)	溶血 %
試験群	天然のマガイニン	100	0
		500	0
		1000	1.9
	実施例 1 により 得られた マガイニン誘導体	100	0
		500	0
		1000	2
対照群	Tritonx-100	0.1%	100

30

## 【 0 0 4 0 】

( 4 ) 急性毒性試験：急性毒性試験をクンミン種の 2 匹のマウスについて行った。実施例により得られたマガイニン誘導体をマウスの腹部に注射し、注射を受けた 1 時間後の 2 匹のマウスの生存率を観察した。

【表 6】

腹腔内注射の量	生存率
100μg	100%
200μg	100%
1000μg	100%

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 4 1 】

本発明は、以下の図面および実施例を参照することにより、さらに例示されることとなる。

【図 1】図 1 は、実施例 1 で得られたマガイニン誘導体の *Escherichia coli* に対する時間 - 死滅試験を示す図である。

50

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 上海华谊生物技术有限公司

&lt;120&gt; 蛙皮抗菌肽衍生物

&lt;130&gt; USP 6183992

&lt;150&gt; CN 01112855.0

&lt;151&gt; 2001-05-10

10

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Magainin analogue

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (21)..(21)

&lt;223&gt; Ile or Leu

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (23)..(23)

&lt;223&gt; Lys or Ile or Arg or Leu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (24)..(24)

&lt;223&gt; Lys or Ile or Arg or Leu

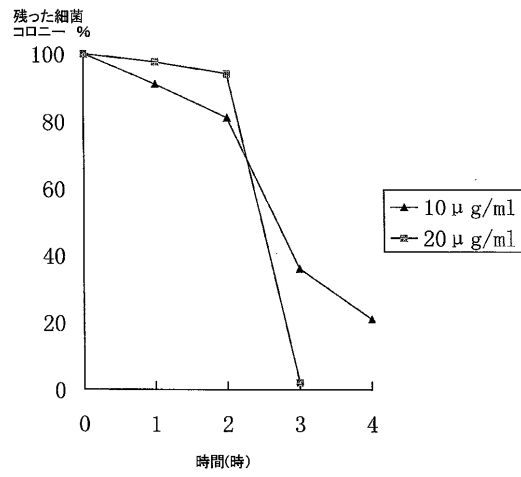
30

&lt;400&gt; 1

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe  
 1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser Ser  
 20

【図 1】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 サン, ユークン  
中華人民共和国 200233 シャンハイ, 中国上海市漕宝路36号
- (72)発明者 ウー, デンシー  
中華人民共和国 200233 シャンハイ, 中国上海市漕宝路36号
- (72)発明者 ジュー, ジーヨン  
中華人民共和国 200233 シャンハイ, 中国上海市漕宝路36号
- (72)発明者 ユー, ガン  
中華人民共和国 200233 シャンハイ, 中国上海市漕宝路36号
- (72)発明者 シェン, チュンジュアン  
中華人民共和国 200233 シャンハイ, 中国上海市漕宝路36号
- (72)発明者 ジャオ, シャオリン  
中華人民共和国 200233 シャンハイ, 中国上海市漕宝路36号
- (72)発明者 ゴウ, ジーシャン  
中華人民共和国 200233 シャンハイ, 中国上海市漕宝路36号

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 Biopolymers(Peptide Science), vol.37, pp.105-122 (1995)  
Peptide Research, vol.1(2), pp.81-86 (1988)  
FEBS Letters, vol.236(2), pp.462-466 (1988)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
CA(STN)  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq