(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-529955
(P2023-529955A)
(43)公表日　令和5年7月12日(2023.7.12)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｌ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	17/00	１００	４Ｃ０８１
Ａ６１Ｋ	*38/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/06		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｌ	*17/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	17/14	１００	
Ａ６１Ｌ	*17/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	17/12		
Ａ６１Ｌ	*29/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	29/08	１００	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全59頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-576534(P2022-576534)
(86)(22)出願日　令和3年6月14日(2021.6.14)
(85)翻訳文提出日　令和5年2月8日(2023.2.8)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/065984
(87)国際公開番号　WO2021/250283
(87)国際公開日　令和3年12月16日(2021.12.16)
(31)優先権主張番号　2008980.1
(32)優先日　令和2年6月12日(2020.6.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　518176345
アミコート エイエス
ノルウェー ９０１９ トロムソ スィー
ケフースヴェーゲン ２３
(74)代理人　110000040
弁理士法人池内アンドパートナーズ
(72)発明者　ステンセン、ウェンチ
ノルウェー、９１０２ クヴァロイスレッタ、スモルブロムストヴェーゲン ３６
(72)発明者　スヴェンセン、ジョン、シガード
ノルウェー、９１０２ クヴァロイスレッタ、スモルブロムストヴェーゲン ３６

Ｆターム（参考）　4C081　AB05 AB06 AC02 AC03 AC08 BA16 BB06 CA161 CA162 CA171 CE01 EA0
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　生分解性ポリエステルを含む医療用デバイスおよび材料

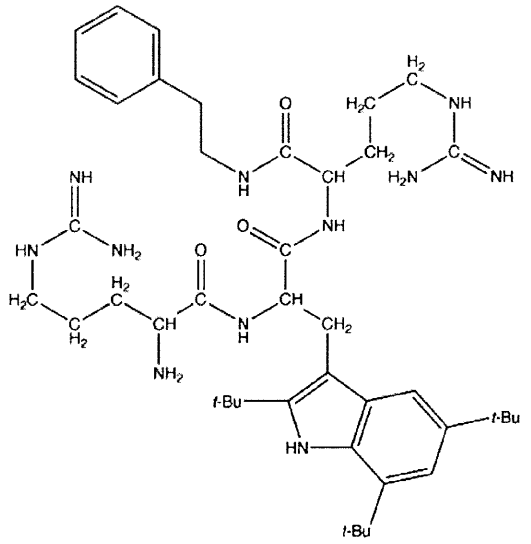
(57)【要約】
本発明は、式（Ｉ）：ＡＡ－ＡＡ－ＡＡ－Ｘ－Ｙの化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤を提供する。本発明は、このような製剤の製造方法、当該製剤を含む縫合糸などの医療用デバイス、および当該デバイスの製造方法をさらに提供する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）
ＡＡ－ＡＡ－ＡＡ－Ｘ－Ｙ　　（Ｉ）
の化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤であって、
前記ＡＡ（アミノ酸）部分のうち、順序を問わないが、２つは、カチオン性アミノ酸であり、１つは、１４～２７個の非水素原子を有する親油性Ｒ基を有するアミノ酸であり、
Ｘは、Ｎ原子であり、Ｎ、Ｏ、およびＳから選択されるヘテロ原子が最大２個まで組み込まれていてもよい分岐または非分岐の$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$アルキル基またはアリール基で置換されていてもよく、
Ｙは、$Ｒ_{1}－Ｒ_{2}－Ｒ_{3}$、$Ｒ_{1}－Ｒ_{2}－Ｒ_{2}－Ｒ_{3}$、$Ｒ_{2}－Ｒ_{2}－Ｒ_{1}－Ｒ_{3}$、$Ｒ_{1}－Ｒ_{3}$、および$Ｒ_{4}$からなる群から選択され、
式中、
$Ｒ_{1}$は、Ｃ、Ｏ、Ｓ、またはＮであり、
$Ｒ_{2}$は、Ｃであり、
$Ｒ_{1}$および$Ｒ_{2}$のそれぞれは、$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキル基で置換されていてもよく、置換されていなくてもよく、
$Ｒ_{3}$は、５個または６個の非水素原子をそれぞれが含む１～３個の環状基を含む基であり、前記環状基のうちの２個以上が縮合していてもよく、前記環状基のうちの１個以上は置換されていてもよく、$Ｒ_{3}$には、最大１５個の非水素原子が組み込まれており、
$Ｒ_{4}$は、２～２０個の非水素原子を有する、直鎖、分岐、または環状の脂肪族部分である、製剤。
【請求項２】
前記化合物がペプチドである、請求項１に記載の製剤。
【請求項３】
前記カチオン性アミノ酸が、アルギニンおよび／またはリシンである、請求項２の請求項１に記載の製剤。
【請求項４】
前記親油性Ｒ基が、２個以上の縮合または連結していてもよい環状基を含む、請求項１から請求項３のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項５】
前記親油性Ｒ基を有するアミノ酸が、トリプチルトリプトファン（Ｔｂｔ）、またはＰｈｅ（４－（２－ナフチル））、Ｐｈｅ（４－（１－ナフチル））、Ｂｉｐ（４－ｎ－Ｂｕ）、Ｂｉｐ（４－Ｐｈ）、もしくはＢｉｐ（４－Ｔ－Ｂｕ）から選択されるビフェニルアラニン誘導体から選択される、請求項１から請求項４のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項６】
前記化合物が、式（ＩＩ）
$ＡＡ_{1}－ＡＡ_{2}－ＡＡ_{1}－Ｘ－Ｙ$　　（ＩＩ）
の化合物であって、
式中、
$ＡＡ_{1}$は、カチオン性アミノ酸であり、
$ＡＡ_{2}$は、１４～２７個の非水素原子を有する親油性Ｒ基を有するアミノ酸であり、
ＸおよびＹは、請求項１に定義された通りである、請求項１から請求項５のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項７】
前記化合物が、下記の構造式を有する、請求項１から請求項６のうちのいずれか一項に記載の製剤。

【化４】



【請求項８】
前記ポリエステルが、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリジオキサノン、およびポリカプロラクトン、ならびにこれらのコポリマーからなる群から選択される、請求項１から請求項７のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項９】
前記ポリエステルの固有粘度が０．１～８ｄＬ／ｇである、請求項１から請求項８のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項１０】
前記ポリエステルの分子量が３，０００～３０，０００である、請求項１から請求項９のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項１１】
前記ポリエステルが、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）、ポリ（Ｌ－ラクチド）、またはポリカプロラクトンである、請求項１から請求項１０のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項１２】
放出制御製剤である、請求項１から請求項１１のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項１３】
前記式（Ｉ）の化合物が、前記ポリエステルに放出可能に分散している、請求項１から請求項１２のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項１４】
請求項１から請求項１３のうちのいずれか一項に記載の製剤を含むか、または該製剤からなる、医療用デバイスであって、好ましくは、前記製剤をコーティングとして含む医療用デバイス。
【請求項１５】
外科用固定材またはインプラントである、請求項１４に記載の医療用デバイス。
【請求項１６】
縫合糸である、請求項１５に記載の医療用デバイス。
【請求項１７】
請求項１から請求項１３のうちのいずれか一項に記載の製剤の製造方法であって、生分解性ポリエステルを式（Ｉ）の化合物との混和物中で溶融することを含む、方法。
【請求項１８】
請求項１から請求項１３のうちのいずれか一項に記載の製剤の製造方法であって、式（Ｉ）の化合物と生分解性ポリエステルと前記化合物および前記ポリエステルを溶解可能な

１種以上の溶媒との混合物を形成することを含む、方法。
【請求項１９】
（ｉ）式（Ｉ）の化合物を含む第１の溶液を準備することと、
（ｉｉ）生分解性ポリエステルを含む、前記第１の溶液と混和性のある第２の溶液を準備することと、
（ｉｉｉ）前記第１の溶液と前記第２の溶液とを混合することと、
を含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
請求項１４から請求項１６のうちのいずれか一項に記載の医療用デバイスの製造方法であって、（ｉ）請求項１から請求項１３のうちのいずれか一項に記載の製剤を準備することと、（ｉｉ）前記製剤を医療用デバイスに塗布することと、を含む、方法。
【請求項２１】
前記製剤の塗布を、前記デバイスを前記製剤に浸漬するかまたは前記製剤を前記デバイスに塗装することによって行う、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記製剤を前記医療用デバイスに塗布した後、乾燥させる、請求項２０または請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
療法に使用するための、請求項１から請求項１３のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項２４】
対象における感染の治療または予防に使用するための、請求項１から請求項１３のうちのいずれか一項に記載の製剤。
【請求項２５】
感染を治療または予防する方法であって、該方法を必要とする対象を、治療上有効な量の、請求項１から請求項１３のうちのいずれか一項に記載の製剤に接触させることを含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、抗菌製剤に関し、特に、小さなペプチドまたはペプチド様分子を配合したポリマーを含む製剤に関する。これらの製剤は、特に医療用デバイスにおいて使用される。
【背景技術】
【０００２】
カテーテル、整形外科用デバイス、およびその他のインプラント、ならびに縫合糸などの外科用固定材などの医療用デバイスの使用が増加している。デバイス設計や外科的手順の改善にもかかわらず、このような医療用デバイスに関連する感染は依然として大きな懸念事項となっている。従来の抗生物質治療は、実際の感染部位における抗生物質のレベルが低いことに起因して失敗することがよくある。薬剤耐性株の存在と同様に、導入されたバイオマテリアル／バイオデバイス上のバイオフィルムの存在が抗生物質治療の効力を損なう可能性がある。
【０００３】
縫合糸やカテーテルなどの医療用デバイスのための抗生物質放出コーティングが知られている。しかしながら、患者が耐性菌に感染している場合があり、局所的放出という方式のために抗生物質の濃度勾配が生じ、そのことによって耐性菌の競合的淘汰のリスクが高まる。特に、トリクロサンを含浸させた縫合糸が販売されているが、この抗生物質は、過剰使用されたことにより耐性菌株が発生したことが認識されており、さらに、他の抗生物質に対する交差耐性に寄与することが知られている。そのため、保健当局から使用を制限するよう圧力がかかっている。トリクロサンでコーティングされた縫合糸は手術部位感染の発生を減らすことが研究で示されているが、クロルヘキシジンなどの他の活性剤でコーティングされた縫合糸についてはデータが限られている（Ｏｎｅｓｔｉら、２０１８年「

Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｒｅｖｉｅｗ ｆｏｒ Ｍｅｄｉｃａｌ ａｎｄ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」、第２２巻、５７２９～５７３９頁）。
【０００４】
手術後の創感染は、米国で３番目に多い院内感染である。手術部位感染は、患者に多大な不快感を与え、生命を脅かす可能性があり、入院期間を長引かせる。縫合糸やその他の手術用固定材の表面への微生物付着は、切開創感染を引き起こす原因の１つと認識されている。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００５】
【非特許文献１】Ｏｎｅｓｔｉら、２０１８年「Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｒｅｖｉｅｗ ｆｏｒ Ｍｅｄｉｃａｌ ａｎｄ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」、第２２巻、５７２９～５７３９頁
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
したがって、デバイス自体のコロニー形成を制限するだけでなく抗菌剤の放出を制御するように作用し得る代替の縫合糸やその他の医療用デバイスが明らかに必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明者らは、ある種の小さな抗菌ペプチドを生分解性ポリエステルと組み合わせて、それ自体で使用できる材料（例えば、３Ｄ印刷で作製されたデバイス）、あるいは、別の医療用デバイスのコーティングとして使用できる材料、を提供することが可能であることを見出した。
【０００８】
抗菌ペプチドは、抗生物質耐性株を含む広範囲の浮遊性細菌およびバイオフィルムに対して活性であるため、新しい抗菌剤として有望な候補である。また、これらの速効性ペプチドは、タンパク質標的に作用するのではなく脂質膜の破壊を含む作用機序のため、細菌が耐性を獲得する可能性が低い。しかしながら、放出を制御できる基材にペプチドを調合することは簡単ではなく、これは、ペプチドが、一般に他の種類の薬剤に比べて溶解性が低く、通常、基材にペプチドをブレンドまたは配合するのに必要とされ得る温度で分解されるためである。
【０００９】
本発明者らは、活性抗菌剤の放出を制御するために使用できる材料を調製した。すなわち、抗菌剤は、浸出可能であり、周囲環境における細菌増殖を阻害できる。抗菌剤はまた、材料内での微生物増殖、および／または、ポリマーと抗菌剤とのブレンドでコーティングされたデバイス上での微生物増殖を制御する作用も有する。
【００１０】
よって、１つの態様において、本発明は、下記の式（Ｉ）の化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤を提供する。
【００１１】
ＡＡ－ＡＡ－ＡＡ－Ｘ－Ｙ　　（Ｉ）
式中、ＡＡ（アミノ酸）部分のうち、順序を問わないが、２つは、カチオン性アミノ酸、好ましくはリシンまたはアルギニンであるが、ヒスチジン、または、ｐＨ７．０で正電荷を持つ、任意の、遺伝子にコードされていないアミノ酸もしくは修飾されたアミノ酸であってもよく、ＡＡのうちの１つは、大きな親油性Ｒ基を有するアミノ酸であり、該Ｒ基は、１４～２７個の非水素原子を有し、かつ、好ましくは、２個以上、例えば２個または３個の、縮合または連結していてもよい環状基を含み、これらの環状基は、典型的には、５個または６個の非水素原子、好ましくは６個の非水素原子を含み（縮合環の場合、当然

ながら、これらの非水素原子は共有されていてもよい）、
Ｘは、Ｎ原子であり、Ｎ、Ｏ、およびＳから選択されるヘテロ原子が最大２個まで組み込まれていてもよい分岐または非分岐の$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$アルキル基またはアリール基、例えばメチル基、エチル基、またはフェニル基で置換されていてもよいが、好ましくは置換されておらず、
Ｙは、$Ｒ_{1}－Ｒ_{2}－Ｒ_{3}$、$Ｒ_{1}－Ｒ_{2}－Ｒ_{2}－Ｒ_{3}$、$Ｒ_{2}－Ｒ_{2}－Ｒ_{1}－Ｒ_{3}$、$Ｒ_{1}－Ｒ_{3}$、および$Ｒ_{4}$からなる群から選択され、
式中、
$Ｒ_{1}$は、Ｃ、Ｏ、Ｓ、またはＮ、好ましくはＣであり、
$Ｒ_{2}$は、Ｃであり、
$Ｒ_{1}$および$Ｒ_{2}$のそれぞれは、$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキル基で置換されていてもよく、置換されていなくてもよく、好ましくは、Ｙは、$－Ｒ_{1}－Ｒ_{2}－Ｒ_{3}$（$Ｒ_{1}$はＣであることが好ましい）であり、この基は置換されていないことが好ましく、Ｙが$－Ｒ_{1}－Ｒ_{2}－Ｒ_{2}－Ｒ_{3}$または$Ｒ_{2}－Ｒ_{2}－Ｒ_{1}－Ｒ_{3}$である場合は、$Ｒ_{1}$および$Ｒ_{2}$の１つ以上が置換されていることが好ましく、
$Ｒ_{3}$は、５個または６個の非水素原子（好ましくはすべてがＣ原子であるが、Ｎ、Ｏ、またはＳも含んでいてもよい）をそれぞれが含む１～３個の環状基を含む基であり、該環状基のうちの２個以上が縮合していてもよく、該環状基のうちの１個以上が置換されていてもよく、これらの置換は、通常は含まないが極性基を含んでいてもよく、好適な置換基としては、ハロゲン、好ましくは臭素またはフッ素、および$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキル基が挙げられ、$Ｒ_{3}$には、最大１５個、好ましくは５～１２個の非水素原子が組み込まれ、最も好ましくは$Ｒ_{3}$はフェニル基であり、
$Ｒ_{4}$は、２～２０個の非水素原子を有する脂肪族部分であり、好ましくはこれらの非水素原子は炭素原子であるが、酸素原子、窒素原子、または硫黄原子が組み込まれていてもよく、好ましくは、$Ｒ_{4}$は、３～１０個、最も好ましくは３～６個の非水素原子を含み、上記脂肪族部分は、直鎖、分岐、または環状であってもよい。$Ｒ_{4}$基が環状基を含む場合、これはＸの窒素原子に直接結合していることが好ましい。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】図１は、マウス皮膚感染モデルにおける黄色ブドウ球菌ＦＤＡ４８６に対し、化合物２を用いて１日局所投与を行った効果を示すグラフである。コロニー形成単位（ＣＦＵ）数をＹ軸に示し、マウスに適用した局所投与の種類をＸ軸に示す。化合物２は、本明細書中、ＡＭＣ－１０９ともいう。

【図２】図２は、マウス皮膚感染モデルにおける化膿連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）に対し、化合物２を用いて１日局所投与を行った効果を示すグラフである。コロニー形成単位（ＣＦＵ）数をＹ軸に示し、マウスに適用した局所投与の種類をＸ軸に示す。化合物２は、本明細書中、ＡＭＣ－１０９ともいう。

【図３】図３は、マウス皮膚感染モデルにおける黄色ブドウ球菌ＦＤＡ４８６に対し、１日局所投与を行った効果を示すグラフである。午前９時、正午１２時、および午後３時に、各マウスへの投与を行った。午後６時に、皮膚生検体を採取した。中央値を示す。

【図４】図４は、マウス皮膚感染モデルにおける化膿連連鎖球菌ＣＳ３０１に対し、１日局所投与を行った効果を示すグラフである。午前７時、午前１０時、および午後１時に、各マウスへの投与を行った。午後４時に、皮膚生検体を採取した。中央値を示す。

【図５】図５は、マウス皮膚感染モデルにおける黄色ブドウ球菌ＦＤＡ４８６に対し、１日局所投与を行った効果を示すグラフである。午前９時、正午１２時、および午後３時に、各マウスへの投与を行った。午後６時に、皮膚生検体を採取した。中央値を示す。

【図６】図６は、コーティングされた縫合糸の抽出によって放出されたＡＭＣ－１０９の量の定量分析を示すグラフである。１つ目のデータセットはＴｅｓｔ－０１バッチから得られたものであり、それ以降の３つのデータセットはＴｅｓｔ－０２バッチにおける３種類の縫合糸である。

【図７】図７は、初回使用時の黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）に対する増殖阻害アッセイの結果を示す写真である。
【図８】図８は、ＡＭＣコーティングされた縫合糸が液体培地中の細菌増殖に与える影響を、当該縫合糸への曝露後の増殖培地中のＣＦＵによって測定したものを示すグラフである。
【図９】図９は、実施例９で説明する発育阻止帯を示す写真である。
【図１０】図１０は、接種したＴＳＢに種々の縫合糸を投入したウェルの写真である。番号を付けたウェルは下記の通りである。
【００１３】
１：黄色ブドウ球菌、ＡＭＣ－１０９でコーティングされたＥｔｈｉｂｏｎｄ（エチボンド）
２：黄色ブドウ球菌、コーティングされていないＥｔｈｉｂｏｎｄ
３：黄色ブドウ球菌、増殖対照
４：表皮ブドウ球菌（Ｓ．ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ）、ＡＭＣ－１０９でコーティングされたＥｔｈｉｂｏｎｄ
５：表皮ブドウ球菌、コーティングされていないＥｔｈｉｂｏｎｄ
６：表皮ブドウ球菌、増殖対照
【図１１】図１１は、生体吸収性ポリエステルＲＧ５０２およびＬ２０６Ｓを含有するＡＭＣ－１０９の漏出量（総量に対する割合）を時間（分）に対して示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
好ましい化合物には、直鎖または分岐のR_4基、特に、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、ペンチル基およびそれらの異性体、ヘキシル基およびそれらの異性体などを含む直鎖または分岐のアルキル基が組み込まれており、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、およびイソブチル基が特に好ましい。
【００１５】
いくつかの実施形態では、R_4は、６～１６個の非水素原子を有する脂肪族部分（好ましくはアルキル基）であり、好ましくはこれらの非水素原子は炭素原子であるが、酸素原子、窒素原子、または硫黄原子が組み込まれていてもよく、上記脂肪族部分は、直鎖、分岐、または環状であってもよい。
【００１６】
いくつかの実施形態では、R_4は、イソプロピル基である。
【００１７】
環状基を含むR_4基のうちで好ましいのは、R_4がシクロヘキシル基またはシクロペンチル基である分子である。
【００１８】
カチオン性アミノ酸を提供することができる、好適な、遺伝子にコードされていないアミノ酸および修飾されたアミノ酸としては、ホモリシン、オルニチン、ジアミノ酪酸、ジアミノピメリン酸、ジアミノプロピオン酸、およびホモアルギニンなどの、リシン、アルギニン、およびヒスチジンの類縁体、ならびに、トリメチルリシンおよびトリメチルオルニチン、４－アミノピペリジン－４－カルボン酸、４－アミノ－１－カルバミミドイルピペリジン－４－カルボン酸、および４－グアニジノフェニルアラニンが挙げられる。
【００１９】
上記ＡＡの大きな親油性Ｒ基は、Ｏ、Ｎ、またはＳなどのヘテロ原子を含んでいてもよく、典型的にはヘテロ原子は１個以下であり、好ましくは窒素である。このＲ基は、２個以下の極性基を有することが好ましく、より好ましくは０または１個の極性基を有し、最も好ましくは極性基を有さない。
【００２０】
好ましくはペプチドである上記化合物は、下記の式（ＩＩ）の化合物であることが好ま

しい。

【００２１】

$AA_1-AA_2-AA_1-X-Y$　　（ＩＩ）

式中、

AA_1は、カチオン性アミノ酸、好ましくはリシンまたはアルギニンであるが、ヒスチジン、または、ｐＨ７．０で正電荷を持つ、任意の、遺伝子にコードされていないアミノ酸もしくは修飾されたアミノ酸であってもよく、

AA_2は、大きな親油性Ｒ基を有するアミノ酸であり、該Ｒ基は、１４～２７個の非水素原子を有し、好ましくは、２個以上、例えば２個または３個の、縮合または連結していてもよい環状基を含み、これらの環状基は、典型的に、５個または６個の非水素原子、好ましくは６個の非水素原子を含み、

ＸおよびＹは、上記で定義した通りである。

【００２２】

さらに好ましい化合物は、下記の式（ＩＩＩ）および（ＩＶ）の化合物が挙げられる。

【００２３】

$AA_2-AA_1-AA_1-X-Y$　　（ＩＩＩ）

$AA_1-AA_1-AA_2-X-Y$　　（ＩＶ）

式中、AA_1、AA_2、Ｘ、およびＹは、上記で定義した通りである。式（ＩＩ）の分子がより好ましい。

【００２４】

上記化合物の中で、ある特定の化合物が特に好ましい。特に、本明細書において便宜上AA_2と呼ぶ、大きな親油性Ｒ基を有するアミノ酸が、トリブチルトリプトファン（Ｔｂｔ）、または、Ｐｈｅ（４－（２－ナフチル））［本明細書中、Ｂｉｐ（４－（２－ナフチル）ともいう］、Ｐｈｅ（４－（１－ナフチル））［本明細書中、Ｂｉｐ（４－（１－ナフチル）ともいう］、Ｂｉｐ（４－ｎ－Ｂｕ）、Ｂｉｐ（４－Ｐｈ）、もしくはＢｉｐ（４－Ｔ－Ｂｕ）などのビフェニルアラニン誘導体である化合物が好ましく、Ｐｈｅ（４－（２－ナフチル））とＴｂｔである化合物が最も好ましい。いくつかの好ましい実施形態では、大きな親油性Ｒ基を有するアミノ酸は、トリブチルトリプトファン（Ｔｂｔ）である。

【００２５】

別の好ましい化合物群は、Ｙが上記で定義した$-R_1-R_2-R_3$である化合物であって、好ましくはR_1およびR_2が非置換、最も好ましくはR_1およびR_2の両方が炭素原子である化合物である。

【００２６】

さらに好ましい化合物群は、－Ｘ－Ｙが一緒になって$-NHCH_2CH_2Ph$基である化合物である。

【００２７】

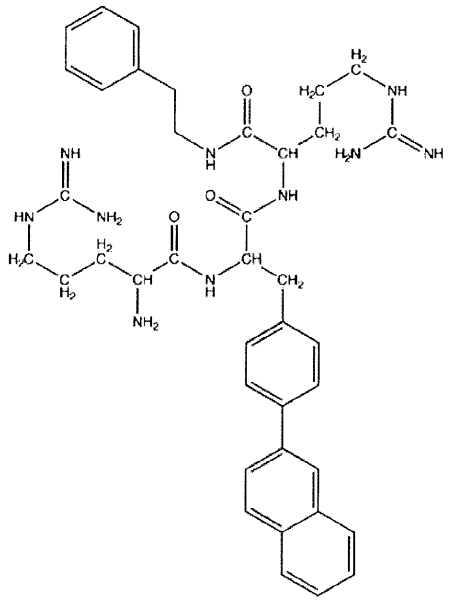
上記化合物は、すべてのエナンチオマー形態、すなわち、Ｄ－アミノ酸およびＬ－アミノ酸の両方、ならびに、アミノ酸Ｒ基およびＣ末端キャッピング基「－Ｘ－Ｙ」内のキラル中心に起因するエナンチオマーを含む。「アミノ酸」という用語にはαアミノ酸だけでなくβアミノ酸およびγアミノ酸も含まれ、すべてＡＡ単位と考えられるＮ－置換グリシン類も同様である。本発明の分子は、ベータペプチドおよびデプシペプチドを含む。

【００２８】

最も好ましい化合物は、以下のものである。

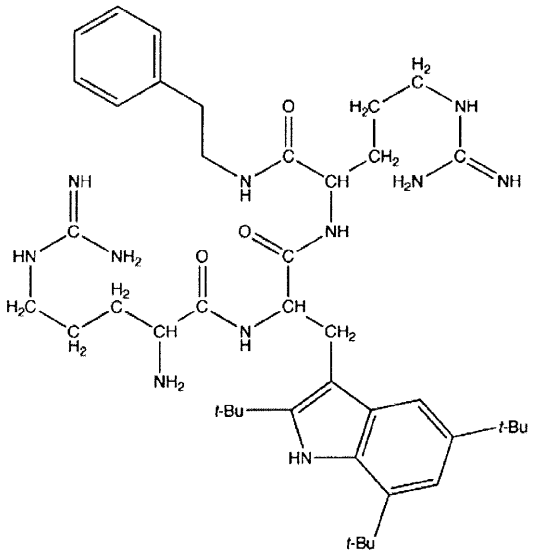
【００２９】

【化１】



【００３０】

【化２】



【００３１】

ｔ－Ｂｕは、第３級ブチル基を表す。アミノ酸２，５，７－トリス－ｔｅｒｔ－ブチル－Ｌ－トリプトファンを組み込んだこの２つ目の化合物は、本発明で使用される最も好ましい化合物である（本明細書中、ＡＭＣ－１０９ともいう）。Ａｒｇの代わりに他のカチオン性残基、特にＬｙｓを組み込んだ、この化合物の類縁体も非常に好ましい。上記で定義したような代替のＣ末端キャッピング基を組み込んだ類縁体も非常に好ましい。

【００３２】

さらに好ましい化合物群は、－Ｘ－Ｙが一緒になって、－ＮＨＣＨ（CH_3）$_2$、－ＮＨ（CH_2）$_5CH_3$、－ＮＨ（CH_2）$_3CH_3$、－ＮＨ（CH_2）$_2CH_3$、－ＮＨCH_2ＣＨ（CH_3）$_2$、－ＮＨシクロヘキシル、および－ＮＨシクロペンチルからなる群から選択される化合物であり、特に好ましいのは、－Ｘ－Ｙが、－ＮＨＣＨ（CH_3）$_2$基または－ＮＨ（CH_2）$_5CH_3$基である化合物である。特に好ましい化合物群は、－Ｘ－Ｙが一緒になってＮＨＣＨ（CH_3）$_2$である化合物である。

【００３３】

好ましい化合物は、AA_1がアルギニンであり、AA_2がトリブチルトリプトファンであり、－Ｘ－Ｙが一緒になって$NHCH(CH_3)_2$である化合物である。

【００３４】

本発明で使用される化合物はペプチドであることが好ましい。

【００３５】

上記式（Ｉ）～（ＩＶ）の化合物は、ペプチド模倣体であってもよく、本明細書中に記載および定義されるペプチドのペプチド模倣体もまた、本発明に従って使用される化合物を表す。ペプチド模倣体とは、典型的には、そのペプチド等価体の極性、三次元的な大きさ、および機能性（生物活性）を保持しているが、ペプチド結合が、しばしばより安定した結合に、置き換えられていることを特徴とするものである。「安定した」とは、加水分解酵素による酵素分解に対して、より抵抗性があるという意味である。一般に、アミド結合に置き換わる結合（アミド結合サロゲート）は、当該アミド結合の多くの特性、例えばコンフォメーション、立体容積、静電特性、水素結合の可能性などを維持している。「Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ」、Ｋｒｏｇｓｇａａｒｄ、Ｌａｒｓｅｎ、Ｌｉｌｊｅｆｏｒｓ、およびＭａｄｓｅｎ（編）、１９９６年、Ｈｏｒｗｏｏｄ Ａｃａｄ． Ｐｕｂ発行の第１４章に、ペプチド模倣体の設計と合成のための技術の一般的な議論が提示されている。本件の場合は、分子が酵素の特定の活性部位ではなく膜と反応しているため、親和性および効力または基質機能（substrate function）を正確に模倣することに関して記載された問題のいくつかは関係なく、所与のペプチド構造または必要とされる官能基のモチーフに基づいてペプチド模倣体を容易に調製することができる。好適なアミド結合サロゲートとしては、以下の基が挙げられる：Ｎ－アルキル化（Ｓｃｈｍｉｄｔ，Ｒ．ら、「Ｉｎｔ． Ｊ． Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．」、１９９５年、第４６巻、４７頁）、レトロインバースアミド（Ｃｈｏｒｅｖ，ＭおよびＧｏｏｄｍａｎ，Ｍ．、「Ａｃｃ． Ｃｈｅｍ． Ｒｅｓ．」、１９９３年、第２６巻、２６６頁）、チオアミド（Ｓｈｅｒｍａｎ Ｄ．Ｂ．およびＳｐａｔｏｌａ，Ａ．Ｆ．、「Ｊ． Ａｍ． Ｃｈｅｍ． Ｓｏｃ．」、１９９０年、第１１２巻、４３３頁）、チオエステル、ホスホネート、ケトメチレン（Ｈｏｆｆｍａｎ，Ｒ．Ｖ．およびＫｉｍ，Ｈ．Ｏ．、「Ｊ． Ｏｒｇ． Ｃｈｅｍ．」、１９９５年、第６０巻、５１０７頁）、ヒドロキシメチレン、フルオロビニル（Ａｌｌｍｅｎｄｉｎｇｅｒ，Ｔ．ら、「Ｔｅｔｒａｈｙｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．」、１９９０年、第３１巻、７２９７頁）、ビニル、メチレンアミノ（Ｓａｓａｋｉ，YおよびＡｂｅ，Ｊ．、「Ｃｈｅｍ． Ｐｈａｒｍ． Ｂｕｌｌ．」、１９９７年、第４５巻、１３頁）、メチレンチオ（Ｓｐａｔｏｌａ，Ａ．Ｆ．、「Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．」、１９９３年、第１３号、１９頁）、アルカン（Ｌａｖｉｅｌｌｅ，Ｓ．ら、「Ｉｎｔ． Ｊ． Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．」、１９９３年、第４２号、２７０頁）、およびスルホンアミド（Ｌｕｉｓｉ，Ｇ．ら、「Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．」、１９９３年、第３４巻、２３９１頁）。

【００３６】

本発明のペプチド模倣化合物は、典型的には、大きさおよび機能がアミノ酸（ＡＡ単位）とほぼ同等の３つの同定可能なサブユニットを有する。したがって、「アミノ酸」という用語は、本明細書において、あるペプチド模倣化合物の同等のサブユニットをいうために便宜的に用いられる場合がある。また、ペプチド模倣体は、アミノ酸のＲ基と同等の基を有していてもよく、好適なＲ基とＮ末端修飾基およびＣ末端修飾基とについての本明細書中の記述は、ペプチド模倣化合物にも準用される。

【００３７】

上記で参照した教科書に述べられているように、ペプチド模倣体は、アミド結合の置き換えだけでなく、より大きな構造部分がジペプチド模倣構造またはトリペプチド模倣構造に置き換えられることを含む場合があり、この場合、アゾール由来の模倣体などの、ペプチド結合を含む模倣部分が、ジペプチドへと置き換わるものとして用いられ得る。しかしながら、上述のようにアミド結合が置き換えられたペプチド模倣体ひいてはペプチド模倣体骨格が好ましい。

【００３８】
好適なペプチド模倣体としては、アミド結合を還元剤、例えば、ボランまたは水素化リチウムアルミニウムなどの水素化物試薬で処理することによってメチレンアミンに還元した還元ペプチドが挙げられる。このような還元は、分子の全体のカチオン性を高めるという追加の利点を有する。
【００３９】
他のペプチド模倣体としては、例えば、アミド官能化ポリグリシンの段階的合成によって形成されたペプトイドが挙げられる。いくつかのペプチド模倣体骨格は、パーメチル化されたペプチドなどの、それらのペプチド前駆体から容易に得ることができ、好適な方法が、Ｏｓｔｒｅｓｈ，Ｊ．Ｍ．らにより、「Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ」（１９９４年）、第９１巻、１１１３８－１１１４２頁に記載されている。強塩基性条件は、Ｏ－メチル化よりもＮ－メチル化に有利であり、ペプチド結合内の窒素原子の一部または全部とＮ末端窒素とがメチル化されることになる。
【００４０】
好ましいペプチド模倣体骨格としては、ポリエステル類、ポリアミン類、およびそれらの誘導体、ならびに置換アルカン類および置換アルケン類が挙げられる。ペプチド模倣体は、本明細書で述べるように修飾されていてもよいＮ末端およびＣ末端を有することが好ましい。
【００４１】
本発明に従って使用される化合物（例えば、ペプチド）は、抗菌活性（典型的には、抗細菌活性）を示し、特に、膜に直接影響を与えるメカニズムによって細胞傷害効果を発揮するものであり、膜作用性抗菌剤と呼ぶことができる。これらの化合物は、溶菌性を有しており、細胞膜を不安定化し、あるいは穿孔さえする。このことは、標的細胞のタンパク質成分、例えば細胞表面受容体に作用または相互作用する薬剤に比べて、明瞭な治療上の優位性をもたらす。突然変異によって標的タンパク質が新しい形態となり、抗生物質耐性を獲得することはあるが、脂質膜の急激な変化が起こって細胞傷害効果を防ぐようになる可能性は、はるかに低い。溶菌効果は、非常に急速な細胞死を引き起こすため、細菌をそれらが増殖する機会を得る前に死滅させるという利点を有する。その上、上記分子は、標的微生物を死滅または損傷させる他の有用な特性、例えばタンパク質合成阻害能力を有していることもあり、したがって、多標的活性を有し得る。
【００４２】
本発明において使用する化合物は、任意の好都合な方法で合成することができる。一般に、存在する反応性基（例えば、アミノ基、チオール基、および／またはカルボキシル基）は、合成期間の全体にわたって保護される。したがって、合成の最終工程は、保護された本発明の誘導体の脱保護である。
【００４３】
ペプチドを構築する際は、原則的にＣ末端またはＮ末端のどちらからでも開始することができるが、Ｃ末端から開始する手順の方が好ましい。
【００４４】
ペプチド合成の方法は当該技術分野においてよく知られているが、本発明では、固相支持体上で合成を行うことが特に好都合であり得、そのような支持体は当該技術分野においてよく知られている。
【００４５】
アミノ酸の保護基は幅広い選択肢が知られており、好適なアミン保護基としては、カルボベンゾキシ（Ｚとも表す）、ｔ－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃとも表す）、４－メトキシ－２，３，６－トリメチルベンゼンスルホニル（Ｍｔｒ）、および９－フルオレニルメトキシ－カルボニル（Ｆｍｏｃとも表す）を挙げることができる。ペプチドをＣ末端から構築する場合、付加された新しい残基それぞれのα－アミノ基上にアミン保護基が存在することになり、次のカップリング工程の前に選択的に除去する必要があることが理解されるであろう。

【００４６】
例えば採用し得るカルボキシル保護基としては、ベンジル（Ｂｚｌ）基、ｐ－ニトロベンジル（ＯＮｂ）基、ペンタクロロフェニル（ＯＰＣｌＰ）基、ペンタフルオロフェニル（ＯＰｆｐ）基、またはｔ－ブチル（ＯｔＢｕ）基などの易切断型（readily cleaved）エステル基、および、固体支持体上のカップリング基、例えばポリスチレンに結合したメチル基が挙げられる。
【００４７】
チオール保護基としては、ｐ－メトキシベンジル（Ｍｏｂ）、トリチル（Ｔｒｔ）、およびアセトアミドメチル（Ａｃｍ）が挙げられる。
【００４８】
アミン保護基やカルボキシル保護基を除去するための手順はさまざまなものが存在している。しかしながら、これらは採用する合成戦略に合致したものでなければならない。側鎖保護基は、次のカップリング工程の前に一時的なα－アミノ保護基を除去するために用いられる条件に対して安定でなければならない。
【００４９】
Ｂｏｃなどのアミン保護基およびｔＢｕなどのカルボキシル保護基は、例えばトリフルオロ酢酸を用いた酸処理によって同時に除去することができる。Ｔｒｔなどのチオール保護基は、ヨウ素などの酸化剤を用いて選択的に除去することができる。
【００５０】
配合する（「配合される」）とは、２種のポリマーを、またはあるポリマーと１種以上の添加剤とを、混合および／またはブレンドすることを言い表すために用いる用語である。これは、溶融状態でブレンドすること、または、溶液中で複数の成分を組み合わせることにより、便利に達成することができる。これらのアプローチの両方を本明細書中に説明する。得られる混合物は、理想的には均質またはほぼ均質である。疑義が生じるのを避けるために、配合するとは、ポリエステルと式（Ｉ）の化合物との間の共有結合を必要とするものではなく、むしろ、配合することにより、ポリエステルと式（Ｉ）の化合物との間に非共有結合による放出可能な会合が得られる。したがって、化合物は、放出可能にポリエステルに会合していると考えることもできる。
【００５１】
したがって、式（Ｉ）の化合物は、本発明の製剤から放出（または浸出もしくは拡散）可能である。このことは、本発明の文脈においては、式（Ｉ）の化合物が抗菌活性を有することから重要であり、例えば、創傷、手術部位、または医療用デバイスの埋植部位の感染を予防または治療するために、化合物は使用時に製剤から抗菌活性を必要とする領域に放出可能であることが望ましい。
【００５２】
好ましくは、使用時に、製剤から式（Ｉ）の化合物が制御放出（すなわち、持続放出）される。例えば、治療上有効な量の化合物が、少なくとも６時間、８時間、１２時間、または１４時間放出され得る。治療上有効な量とは、好ましくは、標的細菌に対する化合物の最小発育阻止濃度（Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎ：ＭＩＣ）を超える濃度の化合物が局所環境へ送達されることになる量である。放出時間は、本発明の製剤の上に、（例えば、医療用デバイスの外層として、）活性化合物が配合されていない生分解性ポリエステルの層を塗布することによって延長することができる。
【００５３】
本発明の製剤からの活性化合物の放出能力は、任意の好適な方法によって容易に測定することができ、当業者はそのような方法に精通している。好適な方法を本明細書の実施例に記載する。例えば、本発明に従って製剤でコーティングされた縫合糸を、細菌（例えば、ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）属の細菌）を接種した寒天プレートと接触させることができ、適切な培養時間の後、縫合糸の周囲に「発育阻止帯（zone of inhibition）」（すなわち、細菌増殖がないかまたは細菌増殖が抑制されたゾーン）がな

いか、プレートを検査することができる。「発育阻止帯」があれば（例えば、抗菌化合物を含まない対照縫合糸での試験と比較して）、化合物が製剤から放出可能であることを示している。

【００５４】

本発明の製剤は、インビボで式（Ｉ）の化合物を放出する放出制御製剤とみなすことができる。式（Ｉ）の化合物は、ポリエステルに分散（放出可能に分散）している（あるいは、少なくとも部分的に分散している）と考えることができる。

【００５５】

式（Ｉ）の化合物は、ポリエステルに、微生物コロニー形成およびバイオフィルム形成に対する耐性を付与する。そのため、コーティングおよび／またはデバイスは、有効にそれ自体を清潔に保つ。このことは、留置デバイスまたはその他の医療用デバイスがしばしば微生物の付着および増殖の場となるため、非常に有利である。

【００５６】

活性化合物の放出とその抗コロニー形成効果との両方を評価するには、液体培地試験を用いることができる。本発明のポリエステルでコーティングされたデバイスを、液体細菌ブロスに浸漬する。漏出効力（放出）は、ブロス中に残存している細菌数を数えることによって測定され、抗コロニー形成効力は、細菌ブロスへの曝露後のデバイスに付着している生細菌数を数えることによって測定される。

【００５７】

本発明で使用される生分解性ポリマーは、エステル基の繰り返しを含むことからポリエステル類に分類されるが、他の官能基を含んでいてもよい。典型的にはエステル基を末端に有するが、遊離カルボン酸基またはアルキルエステル基が末端基として用いられてもよい。エステル末端基やアルキルエステル基でキャッピングされたポリマーは、典型的に、遊離カルボン酸基よりも長い分解時間を示す。

【００５８】

特に好適なポリマーとしては、ポリラクチド類（Ｄ体またはＬ体）、ポリグリコリド類、ポリジオキサノン類、およびポリカプロラクトン類が挙げられる。これらの同じモノマーを組み込んだコポリマー（ブロックコポリマーを含む）、例えば、Ｄ－ラクチドとＬ－ラクチドとのコポリマー（但し、Ｌ－ラクチドポリマーが好ましい）、ラクチドとグリコリドとのコポリマー、およびラクチドとカプロラクトンとのコポリマーを用いてもよい。ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）の５０：５０のエナンチオマー混合物が好ましい。トリメチレンカーボネートモノマーを含むコポリマーをはじめとするポリマーも好適であり得る。コポリマーにおけるモノマー比はさまざまであるが、ラクチドを含むコポリマーは、典型的に、５０％以上、例えば少なくとも６０％または７０％のラクチドモノマーを含む。したがって、本製剤は、単一種類のポリマー、単一のコポリマー、または１種以上のポリマーおよび／もしくはコポリマーの混合物を含み得る。

【００５９】

生分解性ポリマーは、典型的には合成されたものである。生分解性ポリマーの使用は生物医学分野ではよく知られている。本発明で使用される生分解性ポリマーは、非毒性でなければならず、患者に異物として認識されてはならない。生分解生成物もまた、非細胞毒性でなければならず、体内から容易に排出されるものでなければならない。

【００６０】

生分解性は、使用時の、すなわち動物の体内（または、動物の体に接触した状態）での、分解速度によって判断される。生分解性ポリエステルは、生体吸収性である（すなわち、体内で分解・吸収される）と言うこともできる。分解は、ポリマーごとに大きく異なるが、典型的には１週間または２週間～４年以上である。インサイチュで、ポリエステルが、６ヶ月未満、例えば２～４ヶ月以内で完全に分解されることが好ましい。但し、他の好ましい実施形態では、ポリマーが最長４年間、またはそれ以上、存続する場合もある。当業者であれば、該当するさまざまなポリマーの分解時間を知っており、用途に応じてポリマーを選択することができる。例えば、縫合糸は、ほんの１週間または数週間だけ持続す

ることが望まれるかもしれないが、いくつかのインプラント、例えば、整形外科用インプラントまたは心臓インプラントは、何年も体内に留まり続けるかもしれない。式（Ｉ）の化合物を配合することがポリマーの分解速度に重大な影響を与えることはない。

【００６１】

ポリマーの固有粘度（ｄＬ／ｇで測定）も、ポリマーによって異なり、典型的には、０．１または０．２～６または８、好ましくは、０．５～２．５、より好ましくは、０．８～２．２、最も好ましくは、０．８～１．２である。

【００６２】

分子量（重量平均）も、選択されたポリマーと、該当する特定の医療用途とに依存する。典型的な分子量は、３，０００～３０，０００、例えば、５，０００～２５，０００である。但し、場合によっては、最大で５０，０００、８０，０００、１００，０００、またはそれ以上の分子量を用いてもよい。好ましい分子量は、３，０００～２０，０００であり、例えば、３，０００～１０，０００または１５，０００である。

【００６３】

固有粘度と分子量の両方を測定するには、ゲル浸透クロマトグラフィーを用いることができる。

【００６４】

好適な医療グレードの生分解性ポリエステルの供給業者としては、エボニック社（Ｅｖｏｎｉｋ）（同社のＲｅｓｏｍｅｒ（リソマー）（登録商標）製品ライン）が挙げられる。好適なポリマーは、市販されていて容易に入手可能であり、アルコールと酸の直接縮合、開環重合、および金属触媒重合反応をはじめとするいくつかの反応によって便利に合成することができる。

【００６５】

本発明の製剤の製造においては、２つの異なるアプローチを便利に採用することができる。

【００６６】

第１に、ポリエステルと式（Ｉ）の化合物は、双方を一緒に溶融させることによって、ブレンドすることができる。ポリマーを先に溶融させてから式（Ｉ）の化合物を添加してもよく、溶融前に化合物を添加してもよい。化合物の添加がポリマーの融点に重大な影響を与えることはない。式（Ｉ）の化合物、特に式（Ｉ）のペプチドが生分解性ポリエステルとの配合に必要な加熱に耐えることができることは、非常に驚くべきことである。これらの分子は、予想外の熱安定性を示す。

【００６７】

したがって、別の態様において、本発明は、式（Ｉ）の化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤の製造方法であって、生分解性ポリエステルを式（Ｉ）の化合物との混和物中で溶融させることを含む方法を提供する。本明細書中に記載の本発明の他の態様の実施形態は、本発明のこの態様に準用される。この溶融による配合法は、好ましくは、急速加熱によって行われ、例えば、５分未満、例えば約３分などの４分未満で、１２０～２３０℃（ポリエステルの融点に応じて異なる）まで加熱することによって行われる。このようにして、ペプチドが分解する前にポリマーが溶融する。式（Ｉ）の化合物は、高温（例えば、１００度超）に最長で２分間または３分間曝露されるだけである（それにより混合物への熱伝達を可能にする）ことが好ましい。混合物は、ポリエステルが溶融して式（Ｉ）の化合物と混ざるとすぐに熱源から外される。この実施形態では、融点が約２３０℃よりも低いポリエステルが好ましい。

【００６８】

あるいは、好ましくは、ポリマーと式（Ｉ）の化合物は、溶媒を用いて配合することができる。一実施形態では、第１の溶媒に生分解性ポリマーを溶解させ、第１の溶媒と混和性のある第２の溶媒に式（Ｉ）の化合物を溶解させ、その後、２つの溶液を混合する。どちらの溶媒も、有機溶媒であることが好ましく、ある程度の極性を有していることが好ましい。

【００６９】
２つの溶媒は、互いに混和性があるもので、ポリマーと式（Ｉ）の化合物をそれぞれ溶解可能なものを選択しなければならない。また、これらの溶媒は、混合時にそれらの成分を溶媒和する能力を保持するものでなければならい。互いに混和性のある溶媒であっても混合すると成分の１つが沈殿する場合があるからである。ポリマーに好適な溶媒としては、クロロホルム、酢酸エチル、アセトン、およびテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）が挙げられ、極性非プロトン性溶媒が好ましい場合がある。式（Ｉ）の化合物に好適な溶媒は、より多様であり、水、メタノール、エタノール、クロロホルム、ＴＨＦ、およびＤＭＳＯが挙げられる。好ましい溶媒は、ポリマーについては酢酸エチルであり、式（Ｉ）の化合物についてはアルコール、例えばエタノールである。

【００７０】
あるいは、式（Ｉ）の化合物とポリマーとの両方を、混合前、混合時、または混合後に、単一の溶媒に溶解させてもよい。このアプローチに好適な溶媒は、ＴＨＦおよびクロロホルムが挙げられる。式（Ｉ）の化合物を溶媒、例えばＴＨＦと長時間、例えば、少なくとも４時間、好ましくは少なくとも１２時間、もしかすると１日以上、場合によっては最長で７日または１４日間、組み合わせておく必要があることもある。ＡＭＣ－１０９のような式（Ｉ）の化合物がＴＨＦやクロロホルムに可溶であることは非常に驚くべきことである。

【００７１】
したがって、別の態様において、本発明は、式（Ｉ）の化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤の製造方法であって、式（Ｉ）の化合物と生分解性ポリエステルと上記化合物および上記ポリエステルを溶解可能な１種以上の溶媒との混合物を形成することと、任意に上記混合物を乾燥させることと、を含む方法を提供する。

【００７２】
好ましい実施形態において、本発明は、式（Ｉ）の化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤の製造方法であって、（ｉ）式（Ｉ）の化合物を含む第１の溶液を準備することと、（ｉｉ）生分解性ポリエステルを含む、上記第１の溶液と混和性のある第２の溶液を準備することと、（ｉｉｉ）上記第１の溶液と上記第２の溶液とを混合することと、を含む方法を提供する。本明細書中に記載の本発明の他の態様の実施形態は、本発明のこの態様に準用される。第１および第２の溶液を作るために使用する溶媒は、同じであってもよく異なっていてもよい。好ましい溶媒は上記の通りである。

【００７３】
混合後、得られた混合物を乾燥させてもよく、これは、能動的なプロセスであってもよく受動的なプロセスであってもよい。受動的な乾燥プロセスは、数日、例えば１日～６日を要する場合がある。

【００７４】
ポリエステルに式（Ｉ）の化合物を配合する別の方法として、エレクトロスピニングが挙げられる。エレクトロスピニングは、ポリマー溶液から繊維を作ることができる、電気流体力学的現象に支配された周知の電圧駆動プロセスである。エレクトロスピニング法によって本発明に従って製剤を得るには、ポリエステルを含む溶液（つまり「紡糸溶液」）と式（Ｉ）の化合物とを電界紡糸して化合物を含む繊維を形成する。この溶液は、好都合には、上述したように、互いに混和性があり、かつ個々にポリマーまたは式（Ｉ）の化合物を溶解することができる、２種の溶媒を含み得る。あるいは、ＴＨＦなどの単一の溶媒を用いてもよい。好適なエレクトロスピニング法は、Ｓｃａｆｆａｒｏら、「Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｊｏｕｒｎａｌ」、第９６巻（２０１７年）、２６６～２７７頁に記載されている通りである。

【００７５】
配合されたポリマー製剤中の式（Ｉ）の化合物の量は、重量／重量基準で、わずか２または３％～２５または３０％まで、典型的には４～１５または２０％であり得る。

【００７６】

本発明の製剤は、好ましくは、コーティングとして医療用デバイスに追加される。但し、一部の医療用デバイスは本発明の製剤からなるものであってもよく、例えば３Ｄ印刷によって該製剤から作製された部分または部品を医療用デバイスが有していてもよい。したがって、本発明のさらなる態様は、本明細書中で定義する本発明の製剤でコーティング（部分的コーティングを含む）された医療用デバイスである。好ましくは、デバイスの外面全体が本発明の製剤でコーティングされる。このコーティングにより、デバイスの表面（体液との接触を含む、体と接触する任意の表面）上に製剤の層が形成される。この層の厚さは、所望の機能性が発揮されるように、特に、インサイチュで所望の放出制御プロファイルが得られるように、選択される。

【００７７】

本発明のなおさらなる態様においては、医療用デバイスに塗布された、本明細書中で定義する本発明の製剤が提供される。

【００７８】

デバイスとしては、縫合糸、外科用固定材、カテーテル、ラインなどや、股関節インプラントや膝関節インプラントなどの整形外科用インプラントおよび歯科用インプラントをはじめとするインプラント、ピン、ステント、心調律デバイス、ならびに深部脳刺激デバイスが挙げられる。縫合糸が特に好ましい。

【００７９】

コーティング対象のデバイスを、溶融状態の本発明の製剤中、または、生分解性ポリエステルおよび式（Ｉ）の化合物の両方と１種以上の溶媒とを含む混合物中に、浸漬（おそらく数回、例えば、３～１０回）し、乾燥または自然乾燥させることができる。好適な溶媒および混和性混合溶媒は上記の通りである。浸漬法は、縫合糸のようなデバイスに特に適している。あるいは、本発明の製剤を、医療用デバイス、例えばインプラントに、例えばスプレー塗装によって当該デバイス表面に塗装することにより、塗布することができる。本発明の製剤を組み込んだ医療用デバイスは、３Ｄ印刷によって製造することもできる。

【００８０】

本発明の製剤を塗布し得る好適な縫合糸としては、吸収性の縫合糸が挙げられ、これは編組糸であってもよい。このような縫合糸は、ナイロン製であってもよく、Ｅｔｈｉｃｏｎ（エチコン）縫合糸、Ｓｕｒｇｉｌｏｎ（サージロン）縫合糸、およびＮｕｒｏｌａｎ（ニューロロン）縫合糸が挙げられる。本発明の製剤以外のコーティングを一切含まないかまたはその量を少なくした縫合糸を使用することが好ましい場合もある。例えば、縫合糸を最初に処理してシリコーンコーティングを除去してもよい。

【００８１】

吸収性（生分解性）縫合糸は、本発明に係る好ましい医療用デバイスであり、次のように形成することができる。それらは、好都合には、乳酸（エナンチオマー形態の両方（単独または組み合わせ））、グリコール酸、カプロラクトン、およびジオキサノンを含む群から選択されるモノマー由来のポリエステルから作製される。縫合糸の特性を調整するには、これらのモノマーの２種（以上）を共重合するか、または、場合により、異なるホモポリマーの短鎖をブロック重合することが一般的である。吸収性縫合糸において最もよく使われるポリマーは、Ｌ－乳酸とグリコール酸のコポリマーであるＰＬＧＡであり、好ましくは、約９０％のグリコール酸と約１０％のＬ－乳酸とからなるものである。Ｐｏｌｙｇｌａｃｔｉｎ　９１０（ポリグラクチン９１０）は、このようなコポリマーの一つであり、引張強度が高く、吸収性縫合糸におけるフィラメントとして好都合に用いられている。コーティングは、好ましくは、モル比６５／３５のラクチド－グリコリドコポリマー（例えば、Ｐｏｌｙｇｌａｃｔｉｎ　３７０（ポリグラクチン３７０））をフィラメント質量の２～１０％の量で塗布したものである。取り扱い性のために、等量のステアリン酸カルシウムを添加してもよい（すなわち、コーティングポリマーと等量である）。式（Ｉ）の化合物は、上記コーティング中、または上記コーティングに塗布されるさらなるコーティング中に配合されるのが好ましいが、フィラメント中に配合されてもよい。

【００８２】
本発明の縫合糸は、式（Ｉ）の化合物を、縫合糸の長さ１ｍ当たり０．５～１０ｍｇ、好ましくは、１～５ｍｇ／ｍ、例えば、１～３ｍｇ／ｍ含み得る。
【００８３】
別の態様において、本発明は、本発明の医療用デバイスの製造方法であって、（ｉ）式（Ｉ）の化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤を準備することと、（ｉｉ）上記製剤を医療用デバイスに塗布する（例えば、デバイスを上記製剤中に浸漬するか、または上記製剤をデバイス上、もしくは縫合糸のフィラメント部分のようなデバイスのコア上に塗装、例えばスプレー塗装することによって）ことと、を含む方法を提供する。製剤を医療用デバイスに塗布した後、能動的に乾燥（例えば、適度に加熱するかまたは気流を当てることにより）させてもよく、自然乾燥させてもよい。本明細書中に記載の本発明の他の態様の実施形態は、本発明のこの態様に準用される。製剤を含有する溶媒を塗布すると、乾燥時に溶媒が蒸発し、上記医療用デバイス上に、本発明の製剤を含むかまたは本発明の製剤からなるコーティング（もしくは層）が残る。
【００８４】
類似の方法として、本発明は、本発明の医療用デバイスの製造方法であって、（ｉ）式（Ｉ）の化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤を準備することと、（ｉｉ）上記製剤をバッキングシートまたは他の担体に塗布することと、を含む方法を提供する。このようにして、本発明の製剤からなる、または本質的に本発明の製剤からなる、医療用デバイスを作製し、例えばフィルム、膜、シート、または接着剤を形成することができる。
【００８５】
さらなる態様は、本発明の方法によって製造された、式（Ｉ）の化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤、または、そのような製剤が塗布された医療用デバイスを提供する。本明細書中に記載の本発明の他の態様の実施形態は、本発明のこの態様に準用される。
【００８６】
本発明のさらなる態様は、療法（therapy）に使用するための本発明の製剤およびデバイスを提供する。
【００８７】
「療法」には治療と予防が含まれる。すなわち、治療のための使用と予防のための使用の両方が含まれる。
【００８８】
いくつかの実施形態では、本発明は、対象における感染の治療または予防に使用するための、本発明の製剤または医療用デバイスを提供する。いくつかの好ましい実施形態では、上記感染または潜在的感染は、手術部位感染または創傷感染であり、例えば、縫合または他の外科用固定材による閉鎖が必要な創部または他の部位である。他の好ましい実施形態では、上記感染または潜在的感染は、インプラント（上術のような）に関連するものであり、デバイス上またはデバイス周囲のバイオフィルム形成を含む。
【００８９】
好ましくは、上記感染は、細菌感染、例えばグラム陽性菌（例えば、ブドウ球菌属または連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属の細菌）による感染である。いくつかの実施形態では、上記感染は、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）による感染である。いくつかの実施形態では、上記感染は、表皮ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ）による感染である。
【００９０】
本発明の製剤、デバイス、使用、および方法は、好ましくは、広範囲の細菌、特にグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して有効であり（活性化合物の放出による周辺環境における細菌増殖の完全阻害もしくは部分的阻害、および／または、完全なもしくは部分的な抗コロニー形成効果）、例えば、黄色ブドウ球菌、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａ

ｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、およびエンテロコッカス・フェシウム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆａｅｃｉｕｍ）のすべてに対して有効である。

【００９１】

本発明のさらなる態様は、対象における細菌増殖の阻害に使用するための本発明の製剤または医療用デバイスを提供する。本明細書中に記載の本発明の他の態様の実施形態は、本発明のこの態様に準用される。

【００９２】

本発明のさらなる態様は、療法に使用するため、好ましくは、対象における感染の治療または予防に使用するための、本発明の製剤または医療用デバイスを提供する。本明細書中に記載の本発明の他の態様の実施形態は、本発明のこの態様に準用される。

【００９３】

別の観点では、本発明は、感染を治療または予防する方法であって、該方法を必要としている対象に対して、本発明の製剤または医療用デバイスを適用（または投与）することを含む方法を提供する。本明細書中に記載の本発明の他の態様の実施形態は、本発明のこの態様に準用される。

【００９４】

別の観点では、本発明は、感染を治療または予防する方法であって、該方法を必要としている対象に対して、治療上有効な量の本発明の製剤または医療用デバイスを適用（または投与）することを含む方法を提供する。本明細書中に記載の本発明の他の態様の実施形態は、本発明のこの態様に準用される。

【００９５】

治療上有効な量は、臨床的評価と、選択された式（Ｉ）の化合物の標的細菌に対するＭＩＣ値とに基づいて決定される。

【００９６】

本発明のさらなる態様は、療法に使用するため、好ましくは、対象における感染の治療または予防に使用するための式（Ｉ）の化合物であって、該化合物を配合した生分解性ポリエステルを含む製剤として、あるいは、そのような製剤が塗布された医療用デバイスの形態で、対象に投与（または適用）される化合物を提供する。本明細書中に記載の本発明の他の態様の実施形態は、本発明のこの態様に準用される。

【００９７】

本明細書で用いられる「対象」または「患者」という用語は、任意の哺乳類、例えばヒト、および任意の畜産動物（livestock animal）、家畜動物（domestic animal）、または実験動物を含む。具体例としては、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウシ、サルなどが挙げられる。しかしながら、好ましくは、対象または患者は、ヒトである。したがって、本発明に従って治療される対象または患者は、好ましくはヒトである。

【００９８】

いくつかの実施形態では、対象または患者は、感染を有するもの、または感染の疑いがあるもの、または感染を有する（もしくは感染に罹患する）リスクがあるものである。リスクのある患者が好ましい患者群であり、医療用インプラントを必要とする患者、または、手術を受ける必要がある患者、または、手術創もしくはその他の創傷を閉鎖する必要がある患者が挙げられる。これらの患者のために、本発明に係る医療用デバイス、例えば、本発明の製剤を組み込んだ縫合糸、その他の固定材、または整形外科用インプラントを選択することが可能である。このようなデバイスは、式（Ｉ）の抗菌化合物を放出してデバイス周囲の患者の体に感染のない局所環境の形成を促進し、また、デバイス上／デバイス内に式（Ｉ）の化合物が存在することによって、細菌によるデバイス自体のコロニー形成が抑制される。

【００９９】

本発明はまた、本発明の医療用デバイスの１つ以上を含むキットも提供する。好ましく

は、上記キットは、本明細書中に記載の治療的な方法および用途に使用するためのものである。好ましくは、上記キットは、キット構成要素の使用説明書を含む。好ましくは、上記キットは、例えば本明細書中の他の箇所に記載するように、感染を治療または予防するためのものであり、任意に、そのような感染の治療にキットの構成要素を使用するための使用説明書を含む。

【０１００】

本願全体において用いられる「ａ」および「ａｎ」という用語は、その後で上限が具体的に記載されている場合を除き、言及された構成要素または工程の「少なくとも１つ」、「少なくとも第１の」、「１つ以上」、または「複数」を意味するという意味で用いられている。

【０１０１】

また、本明細書において「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「有する（ｈａｓ）」、もしくは「有する（ｈａｖｉｎｇ）」という用語、または他の同等の用語が用いられる場合、いくつかのより具体的な実施形態においては、これらの用語は、「～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｏｆ）」もしくは「本質的に～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という用語、または他の同等の用語を含んでいる。

【０１０２】

次に、以下の非限定的な実施例および図面を参照して、本発明をさらに説明する。

【０１０３】

図１は、マウス皮膚感染モデルにおける黄色ブドウ球菌ＦＤＡ４８６に対し、化合物２を用いて１日局所投与を行った効果を示すグラフである。コロニー形成単位（ＣＦＵ）数をＹ軸に示し、マウスに適用した局所投与の種類をＸ軸に示す。化合物２は、本明細書中、ＡＭＣ－１０９ともいう。

【０１０４】

図２は、マウス皮膚感染モデルにおける化膿連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）に対し、化合物２を用いて１日局所投与を行った効果を示すグラフである。コロニー形成単位（ＣＦＵ）数をＹ軸に示し、マウスに適用した局所投与の種類をＸ軸に示す。化合物２は、本明細書中、ＡＭＣ－１０９ともいう。

【０１０５】

図３は、マウス皮膚感染モデルにおける黄色ブドウ球菌ＦＤＡ４８６に対し、１日局所投与を行った効果を示すグラフである。午前９時、正午１２時、および午後３時に、各マウスへの投与を行った。午後６時に、皮膚生検体を採取した。中央値を示す。

【０１０６】

図４は、マウス皮膚感染モデルにおける化膿連連鎖球菌ＣＳ３０１に対し、１日局所投与を行った効果を示すグラフである。午前７時、午前１０時、および午後１時に、各マウスへの投与を行った。午後４時に、皮膚生検体を採取した。中央値を示す。

【０１０７】

図５は、マウス皮膚感染モデルにおける黄色ブドウ球菌ＦＤＡ４８６に対し、１日局所投与を行った効果を示すグラフである。午前９時、正午１２時、および午後３時に、各マウスへの投与を行った。午後６時に、皮膚生検体を採取した。中央値を示す。

【０１０８】

図６は、コーティングされた縫合糸の抽出によって放出されたＡＭＣ－１０９の量の定量分析を示すグラフである。１つ目のデータセットはＴｅｓｔ－０１バッチから得られたものであり、それ以降の３つのデータセットはＴｅｓｔ－０２バッチにおける３種類の縫合糸である。

【０１０９】

図７は、初回使用時の黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）に対する増殖阻害アッセイの結果を示す写真である。

【０１１０】

図８は、ＡＭＣコーティングされた縫合糸が液体培地中の細菌増殖に与える影響を、当該縫合糸への曝露後の増殖培地中のＣＦＵによって測定したものを示すグラフである。

【０１１１】

図９は、実施例９で説明する発育阻止帯を示す写真である。

【０１１２】

図１０は、接種したＴＳＢに種々の縫合糸を投入したウェルの写真である。番号を付けたウェルは下記の通りである。

【０１１３】

１：黄色ブドウ球菌、ＡＭＣ－１０９でコーティングされたＥｔｈｉｂｏｎｄ（エチボンド）

２：黄色ブドウ球菌、コーティングされていないＥｔｈｉｂｏｎｄ

３：黄色ブドウ球菌、増殖対照

４：表皮ブドウ球菌（Ｓ．ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ）、ＡＭＣ－１０９でコーティングされたＥｔｈｉｂｏｎｄ

５：表皮ブドウ球菌、コーティングされていないＥｔｈｉｂｏｎｄ

６：表皮ブドウ球菌、増殖対照

図１１は、生体吸収性ポリエステルＲＧ５０２およびＬ２０６Ｓを含有するＡＭＣ－１０９の漏出量（総量に対する割合）を時間（分）に対して示すグラフである。

【０１１４】

＜実施例１＞

＜ペプチド合成＞

［化学薬品］

保護アミノ酸である、Ｂｏｃ－Ｔｒｐ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ａｒｇ－ＯＨ、Ｂｏｃ－４－フェニル－Ｐｈｅ、およびＡｃ－Ａｒｇ－ＯＨは、バッケム社（Ｂａｃｈｅｍ　ＡＧ）から購入し、Ｂｏｃ－４－ヨードフェニルアラニン、Ｂｏｃ－３，３－ジフェニルアラニン、およびＢｏｃ－（９－アントリル）アラニンは、アルドリッチ社（Ａｌｄｒｉｃｈ）から購入した。ペプチドのＣ末端を形成する、ベンジルアミン、２－フェニルエチルアミン、３－フェニルプロピルアミン、（Ｒ）－２－フェニルプロピルアミン、（Ｓ）－２－フェニルプロピルアミン、Ｎ，Ｎ－メチルベンジルアミン、Ｎ，Ｎ－エチルベンジルアミン、およびＮ，Ｎ－ジベンジルアミンは、Ｎ－エチルベンジルアミンをアクロス社（Ａｃｒｏｓ）から購入した以外は、フルカ社（Ｆｌｕｋａ）から購入した。ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１－ＨＯＢｔ）、クロロトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＰｙＣｌｏＰ）、およびＯ－（ベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＨＢＴＵ）は、フルカ社から購入した。４－ｎ－ブチルフェニルボロン酸、４－ｔ－ブチルフェニルボロン酸、４－ビフェニルボロン酸、２－ナフチルボロン酸、トリオルソ－トリホスフィン、ベンジルブロミド、および酢酸パラジウムは、アルドリッチ社から購入した。溶媒は、メルク社（Ｍｅｒｃｋ）、リーデル・デ・ハーン社（Ｒｉｅｄｅｌ－ｄｅ　Ｈａｅｎ）、またはアルドリッチ社から購入した。

【０１１５】

［アミノ酸の調製］

Ｂｏｃ－２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン－ＯＨの調製：トリフルオロ酢酸（１９ｍＬ）中のＨ２Ｎ－Ｔｒｐ－ＯＨ（１．８ｇ、８．８ｍｍｏｌ）とｔ－ＢｕＯＨ（４．７ｇ、６３．４ｍｍｏｌ）の混合物を、７０℃で３時間撹拌する。得られた中褐色半透明溶液の体積をロータリーエバポレータで室温で３０分間減少させた後、６０ｍＬの７％（重量基準）ＮａＨＣＯ３を滴下することによって粉砕する。次いで、得られた灰色／白色の粒状固体を、真空ろ過により回収し、室温で２４時間真空乾燥する。生成物を、水にエタノール４０％を混合した近沸点混合物からの結晶化により単離する。体積は、典型的には、粗生成物１グラム当たり約２０ｍＬである。

【０１１６】

粗生成物からの最初の結晶化により、試料中の他のすべての物質に対して８０～８３％の純度（ＨＰＬＣ）、公知のＴＢＴ類縁体に対して約９４～９５％の純度の単離生成物が生成される。この段階での収率は、６０～６５％の範囲である。

【０１１７】

Ｂｏｃ－４－ヨードフェニルアラニンのベンジル化：Ｂｏｃ－４－ヨードフェニルアラニン（１当量）を９０％メタノール水溶液に溶解させ、炭酸セシウムを加えて弱アルカリ性のｐＨ（リトマス紙で測定）になるまで中和した。溶媒を回転蒸発によって除去し、Ｂｏｃ－４－ヨードフェニルアラニンのセシウム塩に残存する水をトルエンでの共沸蒸留を繰り返してさらに減少させた。得られた乾燥塩をジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）に溶解させ、ベンジルブロミド（１．２当量）を加え、得られた混合物を６～８時間撹拌した。反応終了時にＤＭＦを減圧下で除去し、標題の化合物を含む油を生成する。この油を酢酸エチルに溶解させ、得られた溶液を等量のクエン酸溶液（３回）、重炭酸ナトリウム溶液、およびブラインで洗浄した。ジクロロメタン：酢酸エチル（９５：５）を溶離液としたフラッシュクロマトグラフィーにより、標題の化合物を淡黄色油として８５％の収率で単離した。ｎ－ヘプタンからの再結晶化により、結晶性ベンジルＢｏｃ－４－ヨードフェニルアラニンを得ることができた。

【０１１８】

鈴木カップリングの一般的な手順：ベンジルＢｏｃ－４－ヨードフェニルアラニン（１当量）、アリールボロン酸（１．５当量）、炭酸ナトリウム（２当量）、酢酸パラジウム（０．０５当量）、およびトリオルソ－トリルホスフィン（０．１当量）を、ジメトキシエタン（ベンジルＢｏｃ－４－ヨードフェニルアラニン１ｍｍｏｌ当たり６ｍｌ）および水（ベンジルＢｏｃ－４－ヨードフェニルアラニン１ｍｍｏｌ当たり１ｍｌ）の脱気混合物に加えた。反応混合物をアルゴン下で保持し、８０℃まで４～６時間加熱した。室温まで冷却した後、混合物をシリカゲルと炭酸ナトリウムのショートパッドでろ過する。ろ過ケーキを酢酸エチルでさらに洗浄した。ろ液を合わせ、溶媒を減圧除去した。酢酸エチルとｎ－ヘキサンの混合物を溶離液として用いたフラッシュクロマトグラフィーにより、生成物を単離した。

【０１１９】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（ｎ－Ｂｕ）－ＯＢｎの調製：鈴木カップリングの一般的な手順を用いて、４－ｎ－ブチルフェニルボロン酸から標題の化合物を収率５３％で調製した。Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（ｎ－Ｂｕ）－ＯＢｎは、８０：２０の酢酸エチル：ｎ－ヘキサン溶離液を用いて単離した。

【０１２０】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（ｔ－Ｂｕ）－ＯＢｎの調製：鈴木カップリングの一般的な手順を用いて、４－ｔ－ブチルフェニルボロン酸から標題の化合物を収率７９％で調製した。Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（ｔ－Ｂｕ）－ＯＢｎは、８０：２０の酢酸エチル：ｎ－ヘキサン溶離液を用いて単離した。

【０１２１】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－Ｐｈ）－ＯＢｎの調製：鈴木カップリングの一般的な手順を用いて、４－ビフェニルボロン酸から標題の化合物を収率６１％で調製した。Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－Ｐｈ）－ＯＢｎは、ｎ－ヘプタンから粗生成物を再結晶することにより単離した。

【０１２２】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－（２－ナフチル））－ＯＢｎの調製：鈴木カップリングの一般的な手順を用いて、２－ナフチルボロン酸から標題の化合物を収率６８％で調製した。Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－（２－ナフチル））－ＯＢｎは、ｎ－ヘプタンから粗生成物を再結晶することにより単離した。

【０１２３】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－（１－ナフチル））－ＯＢｎの調製：鈴木カップリングの一般的な手順を用いて、２－ナフチルボロン酸から標題の化合物を調製した。Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－（１－ナフチル））－ＯＢｎは、ｎ－ヘプタンから粗生成物を再結晶することにより

単離した。

【０１２４】

ベンジルエステルの脱エステル化の一般的な手順：ベンジルエステルをＤＭＦに溶解させ、１０％Ｐｄ炭素を触媒として用いて周囲圧力で２日間水素化する。反応終了後、触媒を濾去し、溶媒を減圧下で除去する。ジエチルエーテルからの再結晶化により、遊離酸を単離する。

【０１２５】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－ｎ－Ｂｕ）－ＯＨの調製：脱エステル化の一般的な手順を用いて、Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（ｎ－Ｂｕ）－ＯＢｎから標題の化合物を収率６１％で調製した。

【０１２６】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－ｔ－Ｂｕ）－ＯＨの調製：脱エステル化の一般的な手順を用いて、Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（ｔ－Ｂｕ）－ＯＢｎから標題の化合物を収率６５％で調製した。

【０１２７】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－Ｐｈ）－ＯＨの調製：脱エステル化の一般的な手順を用いて、Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－ｐｈ）－ＯＢｎから標題の化合物を収率６１％で調製した。

【０１２８】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－（２－ナフチル））－ＯＨの調製：脱エステル化の一般的な手順を用いて、Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－（２－ナフチル））－ＯＢｎから標題の化合物を収率６８％で調製した。

【０１２９】

Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－（２－ナフチル））－ＯＨの調製：脱エステル化の一般的な手順を用いて、Ｂｏｃ－Ｂｉｐ（４－（２－ナフチル））－ＯＢｎから標題の化合物を収率６８％で調製した。

【０１３０】

ＨＢＴＵを用いた溶液相ペプチド合成の一般的な手順：以下の一般的な手順に従い、Ｂｏｃ保護戦略を用いた段階的アミノ酸カップリングにより、溶液中でペプチドを調製した。遊離アミノ基を有するＣ末端ペプチド部分（１当量）とＢｏｃ保護アミノ酸（１．０５当量）と１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１－ＨＯＢｔ）（１．８当量）とを、ＤＭＦ（アミノ成分１ｍｍｏｌ当たり２～４ｍｌ）に溶解させた後、ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）（４．８当量）を添加した。混合物を氷冷し、Ｏ－（ベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＨＢＴＵ）（１．２当量）を加えた。反応混合物を周囲温度で１～２時間振盪した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、クエン酸、重炭酸ナトリウム、およびブラインで洗浄した。溶媒を真空下で除去し、得られたペプチドのＢｏｃ保護基を、９５％ＴＦＡまたは塩化アセチルの無水メタノール溶液を用いて暗所で脱保護した。

【０１３１】

ＰｙＣｌｏＰを用いた溶液相アミド形成。Ｂｏｃ－Ａｒｇ－Ｎ（$CH_2Ph)_2$の合成。乾燥ＤＣＭ（アルミナでろ過後）（２ｍｌ）およびＤＭＦ（１ｍｌ）中のＢｏｃ－Ａｒｇ－ＯＨ（１当量）、ＮＨ（$CH_2Ph)_2$（１．１当量）、およびＰｙＣｌｏＰ（１当量）の溶液。この溶液を氷冷し、撹拌しながらＤＩＰＥＡ（２当量）を加えた。この溶液を室温で１時間撹拌した。反応混合物を蒸発させ、酢酸エチルに再溶解させ、クエン酸、重炭酸ナトリウム、およびブラインで洗浄した。溶媒を真空下で除去し、得られたペプチドのＢｏｃ保護基を、９５％ＴＦＡを用いて暗所で脱保護した。

【０１３２】

ペプチドの精製と分析。水とアセトニトリル（共に０．１％ＴＦＡ含有）を溶離液とするＤｅｌｔａ－Ｐａｋ（ウォーターズ社（Ｗａｔｅｒｓ））C_{18}カラム（１００Å、１５μｍ、２５×１００ｍｍ）での逆相ＨＰＬＣを用いて、ペプチドを精製した。分析用Ｄｅｌｔａ－Ｐａｋ（ウォーターズ社）C_{18}カラム（１００Å、５μｍ、３．９×１５０ｍｍ）を用いたＲＰ－ＨＰＬＣと、ＶＧ　Ｑｕａｔｔｒｏ四重極質量分析計（ＶＧインスツルメンツ社（ＶＧ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｉｎｃ．）、オールトリンガム（Altrin

gham）、英国）での陽イオンエレクトロスプレー質量分析とによって、ペプチドを分析した。

【０１３３】

＜実施例２＞

＜本明細書において定義されるペプチドのインビトロ活性＞

［材料と方法］

（抗菌剤）

あらかじめ秤量した化合物１および化合物２のバイアルは、リティクス・バイオファーマ社（Ｌｙｔｉｘ　Ｂｉｏｐｈａｒｍａ　ＡＳ）から供給された。

【０１３４】

【表１】

化合物一般式：$AA_1-AA_2-AA_1-XY$			
	AA_1	AA_2	XY
化合物１	Ａｒｇ	Ｐｈｅ（４－（２－ナフチル))	$NHCH_2CH_2Ph$
化合物２	Ａｒｇ	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	$NHCH_2CH_2Ph$

【０１３５】

（細菌分離株）

本研究で使用した細菌分離株は、ＧＲマイクロ社（ＧＲ　Ｍｉｃｒｏ　Ｌｔｄ．）で保管されている世界中のさまざまな供給源からのもので、最小限の継代培養で、未希釈のウマ血清の高タンパク質マトリックス中の高密度懸濁液として、－７０℃で凍結保存されて維持されているものであった。使用した菌種とそれらの特徴を表１に示す。その内訳は、グラム陽性菌５４種、グラム陰性菌３３種、および真菌１０種である。

【０１３６】

（最小発育阻止濃度（ＭＩＣ）の測定）

ＭＩＣの測定は、臨床・検査標準協会（Ｃｌｉｎｉｃａｌ　ａｎｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｓｔａｎｄａｒｄｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）（ＣＬＳＩ、旧ＮＣＣＬＳ）によって公表された下記の抗菌薬感受性試験用微量液体希釈法（microbroth dilution methods）を用いて行った。

【０１３７】

Ｍ７－Ａ６、Ｖｏｌ．２３、Ｎｏ．２、２００３年１月、「Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｄｉｌｕｔｉｏｎ　Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ　Ｔｅｓｔｓ　ｆｏｒ　Ｂａｃｔｅｒｉａ　ｔｈａｔ　Ｇｒｏｗ　Ａｅｒｏｂｉｃａｌｌｙ；　Ａｐｐｒｏｖｅｄ　Ｓｔａｎｄａｒｄ－Ｓｉｘｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（好気的に増殖する細菌の希釈抗菌薬感受性試験のための方法；承認標準－第６版）」。Ｍ１００－Ｓ１５、Ｖｏｌ．２５、Ｎｏ．１、２００５年１月、「Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ　Ｓｔａｎｄａｒｄｓ　ｆｏｒ　Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ　Ｔｅｓｔｉｎｇ；　Ｆｉｆｔｅｅｎｔｈ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎａｌ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（抗菌薬感受性試験のための標準法：第１５版補足情報）」。Ｍ１１－Ａ６、Ｖｏｌ．２４、Ｎｏ．２、「Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ　Ｔｅｓｔｉｎｇ　ｏｆ　Ａｎａｅｒｏｂｉｃ　Ｂａｃｔｅｒｉａ；　Ａｐｐｒｏｖｅｄ　Ｓｔａｎｄａｒｄ－Ｓｉｘｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（嫌気性菌の抗菌薬感受性試験法；承認標準－第６版）」。Ｍ２７－Ａ２、Ｖｏｌ．２２、Ｎｏ．１５、「Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　Ｍｅｔｈｏｄ　ｆｏｒ　Ｂｒｏｔｈ　Ｄｉｌｕｔｉｏｎ　Ａｎｔｉｆｕｎｇａｌ　Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ　Ｔｅｓｔｉｎｇ　ｏｆ　Ｙｅａｓｔｓ；　Ａｐｐｒｏｖｅｄ　Ｓｔａｎｄａｒｄ－Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（酵母の液体希釈抗真菌薬感受性試験のための基準方法；承認標準－第２版）」。Ｍ３８－Ａ、Ｖｏｌ．２２

、Ｎｏ．１６、「Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ Ｂｒｏｔｈ Ｄｉｌｕｔｉｏｎ Ａｎｔｉｆｕｎｇａｌ Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ Ｔｅｓｔｉｎｇ ｏｆ Ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ Ｆｕｎｇｉ； Ａｐｐｒｏｖｅｄ Ｓｔａｎｄａｒｄ（糸状菌の液体希釈抗真菌薬感受性試験のための基準方法；承認標準）」。

【０１３８】

ＭＩＣの評価は、ＧＲマイクロ社で調製された、抗細菌薬または抗真菌薬が入ったウェットプレートを用いて行った。

【０１３９】

陽イオン調整ミューラー・ヒントンブロス（オキソイド社（Ｏｘｏｉｄ Ｌｔｄ．）、ベイジングストーク、英国、および、トレック・ダイアグノスティック・システムズ社（Ｔｒｅｋ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｌｔｄ．）、イースト・グリンステッド、英国）（連鎖球菌属細菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐｐ．）、コリネバクテリウム・ジェイケイウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｊｅｉｋｅｉｕｍ）、およびリステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）については、５％ウマ溶血血液を補充）を好気性菌に使用し、約10^5コロニー形成単位（ＣＦＵ）／ｍＬの初期接種量とした。

【０１４０】

ヘモフィルス試験培地（０．５％酵母抽出物含有ミューラー・ヒントンブロス、および、ヘマチンとＮＡＤとをそれぞれ１５ｍｇ／Ｌ含有するヘモフィルス試験培地用サプリメント、すべてオキソイド社、ベイジングストーク、英国から入手）をインフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）に使用し、約10^5ＣＦＵ／ｍＬで接種した。

【０１４１】

嫌気性菌株には、サプリメント添加ブルセラブロス（ＳＢＢ）を使用し、接種量は約10^6ＣＦＵ／ｍＬとした。ＳＢＢは、１％ペプトンと、０．５％「Ｌａｂ－ｌｅｍｃｏ（ラブ－レムコ）」と、１％グルコースと、５μｇ／Ｌのヘミンおよび１μｇ／ＬのビタミンＫ（どちらもシグマ・アルドリッチ社（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ Ｌｔｄ．）から入手）を添加した０．５％塩化ナトリウムとからなるブロスである。

【０１４２】

酵母および糸状菌のＭＩＣは、ＭＯＰＳ緩衝ＲＰＭＩ１６４０培地中で行った（ＭＯＰＳ緩衝液はシグマ・アルドリッチ社から入手し、ＲＰＭＩ１６４０はインビトロジェン社（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｌｔｄ．）（ペイズリー、スコットランド）から入手した）。酵母接種量は７．５×１０２～４×１０３ＣＦＵ／ｍＬの範囲、糸状菌接種量は約８×１０３～１×10^5ＣＦＵ／ｍＬとした。

【０１４３】

常法に従って、ミューラー・ヒントンブロスを含有するすべてのプレートを予め調製し、調製日に－７０℃で凍結しておき、使用日に解凍した。真菌、ヘモフィルス属菌、および嫌気性菌のＭＩＣはいずれも、同日に調製したプレートで測定した。

【０１４４】

凍結がペプチドの活性に影響を与えたかどうかを評価するために、一部のＭＩＣ測定を、新しく調製したミューラー・ヒントンブロスを含有するプレートを用いて繰り返した。

【０１４５】

（対照菌株）

以下の対照（参照）菌株を、試験菌株のパネルに含めた。

【０１４６】

大腸菌：ＡＴＣＣ２５９２２

黄色ブドウ球菌：ＡＴＣＣ２９２１３

エンテロコッカス・フェカーリス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ）：ＡＴＣＣ２９２１２

肺炎球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）：ＡＴＣＣ４９６

１９
緑膿菌：ＡＴＣＣ２７８５３
カンジダ・クルーセイ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｋｒｕｓｅｉ）：ＡＴＣＣ６２５８
下記の対照菌株は、試験菌株のパネルに追加して用いたものであり、必要に応じて、対照薬が範囲内であることを確認するために含めた。
【０１４７】
インフルエンザ菌：ＡＴＣＣ４９２４７
カンジダ・パラプシローシス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ）：ＡＴＣＣ２２０１９
バクテロイデス・フラギリス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｆｒａｇｉｌｉｓ）：ＡＴＣＣ２５２８５
エガセラ・レンタ（Ｅｇｇｅｒｔｈｅｌｌａ　ｌｅｎｔａ）：ＡＴＣＣ４３０５５。
【０１４８】
［結果］
結果を表１にシングルラインリスト表示で示す。また、繰り返し対照菌株の結果を表２に示す。対照菌株の結果は、凍結保存した、または調製したてを用いたミューラー・ヒントンブロスを含有するプレートから得られたデータも含め、非常に再現性が高いことがわかる。プレートの凍結は、他の細菌株のＭＩＣにも影響を与えなかった。
【０１４９】
得られたＭＩＣデータは非常に有望なものであり、ペプチドが非常に幅広い活性スペクトルを持つことを示している。
【０１５０】

表１：グラム陽性菌、グラム陰性菌、および真菌のパネルに対する２種の抗菌ペプチドおよび対照薬のインビトロ活性のシングルラインリスト

種および特性	化合物１	化合物２
カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）　ＡＴＣＣ９００２８－参照株	２	８
カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）　ＡＴＣＣ２４４３３－参照株	２	８
カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）　ＡＴＣＣ７５０－参照株	２	４
カンジダ・パラプシローシス（Candida parapsilosis）　ＡＴＣＣ９００１８－参照株	４	１６
カンジダ（イッサチェンキア）・クルーセイ（Candida（Issatchenkia）krusei）　ＡＴＣＣ６２５８－参照株	４	４
アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）－ＧＲマイクロ社（G.R. Micro）コレクション	４	８
トリコフィトン・メンタグロフィテス（Trichophyton mentagrophytes）－ＧＲマイクロ社コレクション	１６	８
トリコフィトン・インタージギターレ（Trichophyton interdigitale）－ＧＲマイクロ社コレクション	８	８
イヌ小胞子菌（Microsporum canis）－ＧＲマイクロ社コレクション	８	８
クリプトコックス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）－ＧＲマイクロ社コレクション	４	４
大腸菌（Escherichia coli）　ＡＴＣＣ２５９２２－抗生物質感受性型株	３２	８
大腸菌（Escherichia coli）　ＡＴＣＣ３２５１８－β－ラクタマーゼ陽性型株	３２	８
大腸菌（Escherichia coli）　－　多剤耐性臨床分離株	３２	８
クレブシエラ・アエロゲネス（Klebsiella aerogenes）　ＮＣＴＣ１１２２８－抗生物質感受性型株	３２	１６
クレブシエラ・アエロゲネス（Klebsiella aerogenes）－多剤耐性臨床分離株	６４	１６
エンテロバクター属細菌（Enterobacter sp）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	４
エンテロバクター属細菌（Enterobacter sp）－多剤耐性臨床分離株	６４	１６
緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）　ＡＴＣＣ２７８５３－抗生物質感受性型株	１６	８
緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）－多剤耐性臨床分離株	３２	４
ステノトロホモナス・マルトフィリア（Stenotrophomonas maltophilia）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	８
サルモネラ属細菌（Salmonella sp）－抗生物質感受性臨床分離株	１６	８
サルモネラ属細菌（Salmonella sp）－多剤耐性臨床分離株	１６	８
赤痢菌属細菌（Shigella sp）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	８

種および特性	化合物１	化合物２
モルガン菌（Morganella morganii）－多剤耐性臨床分離株	≧１２８	１６
インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）－β－ラクタマーゼ陰性臨床分離株	≧１２８	８
インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）－β－ラクタマーゼ陽性臨床分離株	≧１２８	８
インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）　β－ラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性臨床分離株	≧１２８	８
モラクセラ・カタラリス（Moraxella catarrhalis）－β－ラクタマーゼ陽性臨床分離株	４	４
モラクセラ・カタラリス（Moraxella catarrhalis）－フルオロキノロン感受性の低下した臨床分離株	８	８
アシネトバクター・バウマニ(Acinetobacter baumanii)－抗生物質感受性臨床分離株	６４	１６
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）　ＡＴＣＣ２９２１３－抗生物質感受性対照株	４	２
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）　ＡＴＣＣ２５９２３－抗生物質感受性対照株	４	４
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）　ＡＴＣＣ４３３００－メチシリン耐性対照株	４	２
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）－メチシリン耐性臨床分離株	４	４
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）－多剤耐性臨床分離株	８	４
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）－テイコプラニン中等度耐性臨床分離株	４	４
表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）－抗生物質感受性臨床分離株	１６	８
表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）－メチシリン耐性臨床分離株	２	４
溶血性ブドウ球菌（Staphylococcus haemolyticus）－抗生物質感受性臨床分離株	４	４
腐生ブドウ球菌（Staphylococcus saprophyticus）－抗生物質感受性臨床分離株	１	１
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－ＡＴＣＣ２９２１２　抗生物質感受性対照株	４	４
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－バンコマイシン感受性臨床分離株	８	８
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＡ）臨床分離株	１６	８
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＢ）臨床分離株	１６	１６
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－高濃度ゲンタマイシン耐性臨床分離株	１６	８
エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）－バンコマイシン感受性臨床分離株	８	８
エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＡ）臨床分離株	１６	８
エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＢ）臨床分離株	８	４
エンテロコッカス・ガリナルム（Enterococcus gallinarum）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＣ）臨床分離株	４	４
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－ＡＴＣＣ４９６１９　抗生物質感受性対照株	３２	１６
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－ペニシリン感受性臨床分離株	６４	３２

種および特性	化合物１	化合物２
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－ペニシリン中等度耐性臨床分離株	３２	３２
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－ペニシリン耐性臨床分離株	３２	１６
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－多剤耐性臨床分離株	６４	３２
化膿連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）－マクロライド（ＭＬＳ）耐性臨床分離株	３２	１６
化膿連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）－マクロライド（M型）耐性臨床分離株	３２	１６
コリネバクテリウム・ジェイケイウム（Corynebacterium jeikeium）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	１６
コリネバクテリウム・ジェイケイウム（Corynebacterium jeikeium）－多剤耐性臨床分離株	３２	８
リステリア・モノサイトゲネス（Listeria monocytogenes）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	１６
ＭＵ５０　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＶＩＳＡ型株	４	４
ＥＭＲＳＡ３　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＳＳＣｍｅｃ型１	４	４
ＥＭＲＳＡ１６　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＳＳＣｍｅｃ型２	４	４
ＥＭＲＳＡ１　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＳＳＣｍｅｃ型３	８	８
ＥＭＲＳＡ１５　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＳＳＣｍｅｃ型４	４	４
ＨＴ２００１２５４　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＰＶＬ陽性	４	４
ストレプトコッカス･アガラクティアエ（Streptococcus agalactiae）－抗生物質感受性臨床分離株	１６	８
ストレプトコッカス･アガラクティアエ（Streptococcus agalactiae）－マクロライド耐性臨床分離株	３２	１６
Ｃ群連鎖球菌（Group C Streptococcus）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	１６
Ｃ群連鎖球菌（Group C Streptococcus）－マクロライド耐性臨床分離株	６４	３２
Ｇ群連鎖球菌（Group G Streptococcus）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	８
Ｇ群連鎖球菌（Group G Streptococcus）－マクロライド耐性臨床分離株	３２	１６
ストレプトコッカス・ミティス（Streptococcus mitis）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	１６
ストレプトコッカス・ミティス（Streptococcus mitis）－マクロライド耐性臨床分離株	≧１２８	３２
ストレプトコッカス・コンステラータス（Streptococcus constellatus）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	３２
ストレプトコッカス・コンステラータス（Streptococcus constellatus）－マクロライド耐性臨床分離株	６４	３２
ストレプトコッカス・オラリス（Streptococcus oralis）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	３２
ストレプトコッカス・オラリス（Streptococcus oralis）－マクロライド耐性臨床分離株	３２	３２
ストレプトコッカス・ボビス（Streptococcus bovis）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	３２
ストレプトコッカス・ボビス（Streptococcus bovis）－マクロライド耐性臨床分離株	８	８

種および特性	化合物１	化合物２
ストレプトコッカス・サングイス（Streptococcus sanguis）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	３２
ストレプトコッカス・サングイス（Streptococcus sanguis）－マクロライド耐性臨床分離株	３２	３２
ウェルシュ菌（Clostridium perfringens）－抗生物質感受性臨床分離株	≧１２８	３２
ディフィシル菌（Clostridium difficile）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	１６

【０１５１】

【表３】

表２：ＡＴＣＣ対照菌株に対する２種の抗菌ペプチドおよび対照薬のインビトロ活性
（試験菌株パネルに対して追加したＡＴＣＣ対照菌株を含む）

菌株番号	種および特性	化合物		プレートの種類
		１	２	
ＧＰ０１	黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）　ＡＴＣＣ２９２１３ 抗生物質感受性対照株	８	４	凍結ＭＨＢ
ＧＰ０１	黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）　ＡＴＣＣ２９２１３ 抗生物質感受性対照株	４	４	凍結ＭＨＢ
ＧＰ０１	黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）　ＡＴＣＣ２９２１３ 抗生物質感受性対照株	４	２	新鮮ＭＨＢ
ＧＮ０１	大腸菌（Escherichia coli）　ＡＴＣＣ２５９２２ 抗生物質感受性型株	３２	８	凍結ＭＨＢ
ＧＮ０１	大腸菌（Escherichia coli）　ＡＴＣＣ２５９２２ 抗生物質感受性型株	３２	８	凍結ＭＨＢ
ＧＮ０１	大腸菌（Escherichia coli）　ＡＴＣＣ２５９２２ 抗生物質感受性型株	１６	８	新鮮ＭＨＢ
ＧＮ１０	緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）　ＡＴＣＣ２７８５３ 抗生物質感受性型株	１６	８	凍結ＭＨＢ
ＧＮ１０	緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）　ＡＴＣＣ２７８５３ 抗生物質感受性型株	３２	８	凍結ＭＨＢ
ＧＮ１０	緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）　ＡＴＣＣ２７８５３ 抗生物質感受性型株	８	８	新鮮ＭＨＢ
ＧＰ１１	エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－ＡＴＣＣ２９２１２ 抗生物質感受性対照株	８	８	凍結ＭＨＢ
ＧＰ１１	エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－ＡＴＣＣ２９２１２	８	８	凍結ＭＨＢ

	抗生物質感受性対照株				
ＧＰ１１	エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－ＡＴＣＣ２９２１２ 抗生物質感受性対照株	４	４	４	新鮮ＭＨＢ
	インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）－ＡＴＣＣ４７２４７	３２	４	４	ＨＴＭ
	カンジダ・パラプシローシス（Candida parapsilosis）　ＡＴＣＣ２２０１９	４	８	８	ＲＰＭＩ１６４０
Ｆ０５	カンジダ（イッサチェンキア）・クルーゼイ（Candida (Issatchenkia) krusei）　ＡＴＣＣ６２５８ 参照株	８	８	８	ＲＰＭＩ１６４０
Ｆ０５	カンジダ（イッサチェンキア）・クルーゼイ（Candida (Issatchenkia) krusei）　ＡＴＣＣ６２５８ 参照株	８	８	８	ＲＰＭＩ１６４０
	バクテロイデス・フラギリス（Bacteroides fragilis）－ＡＴＣＣ２５２８５	６４	６４	６４	ＳＢＢ
	エガセラ・レンタ（Eggerthella lenta）－ＡＴＣＣ４３０５５	１６	３２	３２	ＳＢＢ

ＭＨＢ、ミューラー・ヒントンブロス；ＨＴＭ、ヘモフィルス試験培地；ＳＢＢ、サプリメント添加ブルセラブロス

【０１５２】

＜実施例３　トリプシン分解に対する安定性と抗菌活性＞

式$AA_1-AA_2-AA_1NHCH_2CH_2Ph$で表される化合物のトリプシン耐性および抗菌活性を調べた。

【０１５３】

［ペプチドの半減期の測定と計算］

それぞれのペプチドを０．１Ｍ　NH_4HCO_3緩衝液（ｐＨ６．５）に溶解させ、最終的なペプチド濃度を１ｍｇ／ｍｌとした。トリプシン１ｍｇを０．１Ｍ　NH_4HCO_3緩衝液（ｐＨ８．２）５０ｍｌに溶解させてトリプシン溶液を調製した。安定性を測定す

るために、新しく調製したトリプシン溶液２５０μｌと、ペプチド溶液２５０μｌとを、ロッキングテーブル上で３７℃にて０．１Ｍ NH_4HCO_3緩衝液（ｐＨ８．６）２ｍｌ中でインキュベートした。様々な時間間隔で０．５ｍｌのアリコートをサンプリングし、１％ＴＦＡを含有する水：アセトニトリル（６０：４０ｖ／ｖ）０．５ｍｌで希釈し、上述したようにＲＰ－ＨＰＬＣで分析した。３７℃で０時間および２０時間後に採取したトリプシン非添加試料を陰性対照とした。本アッセイの最初の５時間の間に採取した試料の２５４ｎｍにおけるピーク面積の積分を用いて、$\tau_{1/2}$を求めた。最初の２４時間に分解が見られなかったペプチドは、安定として分類した。

【０１５４】

［抗菌性アッセイ］

黄色ブドウ球菌ＡＴＣＣ２５９２３株、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）ＡＴＣＣ３３５９１株、およびメチシリン耐性表皮ブドウ球菌（ＭＲＳＥ）ＡＴＣＣ２７６２６株のＭＩＣ測定は、標準法を用いてＴｏｓｌａｂ　ＡＳにより行った。ウィリアムズ・アンド・ウィルキンズ社（Ｗｉｌｌｉａｍｓ　ａｎｄ　Ｗｉｌｋｉｎｓ　Ｃｏ．）（ボルティモア）、「Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ　ｉｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、第４版、（Ｌｏｒｉａｎ，Ｖ．編）」、７５～７８頁における、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，Ｄ．著（１９９６年）「Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ　ｔｅｓｔｉｎｇ　ｏｆ　ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌｓ　ｉｎ　ｌｉｑｕｉｄ　ｍｅｄｉａ（液体培地中の抗菌剤の感受性試験）」。

【０１５５】

【表４】

表３．半減期（$\tau_{1/2}$）として測定したトリプシンに対する$AA_1-AA_2-AA_1-NHCH_2CH_2Ph$ペプチドの安定性およびMICとして示される抗菌活性

ペプチド	AA_1	AA_2	$\tau_{1/2}$[a]（h）	MIC[b]（μM）		
				黄色ブドウ球菌[c]	MRSA[d]	MRSE[e]
化合物６[f]	Ａｒｇ	Ｔｒｐ	７	１４５	９７	８１
化合物５	Ａｒｇ	Ｂｉｐ（４－Ｐｈ）	安定	５	３	３
化合物４	Ｌｙｓ	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	安定		３	＜２
化合物３	Ａｒｇ	Ｐｈｅ（４－（１－ナフチル））	２０		３	３
化合物２	Ａｒｇ	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	安定	＜３	＜３	＜３
化合物１	Ａｒｇ	Ｐｈｅ（４－（２－ナフチル））	安定	４	＜３	＜３

[a]半減期の計算にはコーネル大学の医療用計算機を用いた。

[b]最小発育阻止濃度

[c]黄色ブドウ球菌　ＡＴＣＣ２５９２３株

[d]メチシリン耐性黄色ブドウ球菌　ＡＴＣＣ３３５９１

[e]メチシリン耐性表皮ブドウ球菌　ＡＴＣＣ２７６２６

[f]本発明の化合物の定義の範囲外

【０１５６】

＜実施例４　化合物２のインビボ活性＞

マウスの皮膚を黄色ブドウ球菌または化膿連鎖球菌に感染させ、その後、３時間間隔で合計３回の投与を行った。最後の投与から３時間後、皮膚生検体を採取し、皮膚試料に存在するコロニー形成単位（ＣＦＵ）数を測定した。結果を、マウス１匹当たりのコロニー形成単位数として、図１および図２に示す。

【０１５７】

実験１（図１）では、化合物２を、２％（ｗ／ｗ）の化合物２を含有するクリームまたはゲルの一部として、マウスの皮膚に塗布した。化合物２を含有しない同じクリームまた

はゲルを陰性対照（プラセボ）として用いた。化合物２を含有するクリームまたはゲルをマウスの皮膚に塗布すると、陰性対照と比較してＣＦＵ数が減少したことが明確にわかり、化合物２が黄色ブドウ球菌に対して抗菌効果を発揮したことを示している。担体、つまりクリームまたはゲルの性質は有意な影響を与えなかった。

【０１５８】

実験２（図２）では、化合物２を２つの異なる濃度で、すなわち１％または２％のゲルとして塗布した。プラセボゲルおよび公知の抗菌薬「バクトロバン（ｂａｃｔｒｏｂａｎ）」を対照として使用した。化合物２を含有するゲルは、プラセボゲルやバクトロバンよりもＣＦＵ数を減少させる効果が高かったことがわかる。また、化合物２を２％含有するゲルは、化合物２を１％しか含有しないゲルよりも効果が高かった。

【０１５９】

＜実施例５＞

＜本発明で使用される化合物の調製とその物性、抗菌特性、および溶血特性＞

＜ペプチド合成＞－関連情報は実施例１にも記載されている。

【０１６０】

（化学薬品）

保護アミノ酸Ｂｏｃ－Ａｒｇ－ＯＨおよびＢｏｃ－４－フェニル－Ｐｈｅはバッケム社から購入し、Ｂｏｃ－４－ヨードフェニルアラニンはアルドリッチ社から購入した。ペプチドのＣ末端を形成する、イソプロピルアミン、プロピルアミン、ヘキシルアミン、ブチルアミン、ヘキサデシルアミン、イソブチルアミン、シクロヘキシルアミン、およびシクロペンチルアミンは、フルカ社から購入した。ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１－ＨＯＢｔ）、クロロトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＰｙＣｌｏＰ）、およびＯ－（ベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（ＨＢＴＵ）を、フルカ社から購入した。４－ｎ－ブチルフェニルボロン酸、４－ｔ－ブチルフェニルボロン酸、４－ビフェニルボロン酸、２－ナフチルボロン酸、トリオルソ－トリホスフィン、ベンジルブロミド、および酢酸パラジウムは、アルドリッチ社から購入した。溶媒は、メルク社、リーデル・デ・ハーン社、またはアルドリッチ社から購入した。

【０１６１】

Ｂｏｃ－Ｐｈｅ（４－４’－ビフェニル）－ＯＢｎの調製：鈴木カップリングの一般的な手順を用いて、４－ビフェニルボロン酸から標題の化合物を収率６１％で調製した。Ｂｏｃ－Ｐｈｅ（４－４’－ビフェニル）－ＯＢｎは、ｎ－ヘプタンから粗生成物を再結晶することにより単離した。

【０１６２】

Ｂｏｃ－Ｐｈｅ（４－（２’－ナフチル））－ＯＢｎの調製：鈴木カップリングの一般的な手順を用いて、２－ナフチルボロン酸から標題の化合物を収率６８％で調製した。Ｂｏｃ－Ｐｈｅ（４－（２’－ナフチル））－ＯＢｎは、ｎ－ヘプタンからの粗生成物を再結晶することにより単離した。

【０１６３】

Ｂｏｃ－Ｐｈｅ（４－４’－ビフェニル）－ＯＨの調製：脱エステル化の一般的な手順を用いて、Ｂｏｃ－Ｐｈｅ（４－４’－ビフェニル）－ＯＢｎから標題の化合物を収率６１％で調製した。

【０１６４】

Ｂｏｃ－Ｐｈｅ（４－（２’－ナフチル））－ＯＨの調製：脱エステル化の一般的な手順を用いて、Ｂｏｃ－Ｐｈｅ（４－（２－ナフチル））－ＯＢｎから標題の化合物を収率６８％で調製した。

【０１６５】

ＨＢＴＵを用いた溶液相ペプチド合成の一般的な手順は、実施例１に記載した通りである。

【０１６６】

ＰｙＣｌｏＰを用いた溶液相アミド形成は、実施例１に記載した通りである。

【０１６７】

ペプチドの精製と分析は、実施例１に記載した通りである。

【０１６８】

【表５】

表４

化合物一般式：Ａｒｇ－ＡＡ$_2$－Ａｒｇ－Ｘ－Ｙ

化合物	ＡＡ$_2$	ＸＹ	純度（ＨＰＬＣ）
７	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	ＮＨＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$	
８	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_5$ＣＨ$_3$	
９	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_3$ＣＨ$_3$	８７
１０	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＣＨ$_3$	９９
１１	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_{15}$ＣＨ$_3$	８０
１２	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	ＮＨＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$	９７
１３	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	ＮＨシクロヘキシル	９５
１４	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	ＮＨシクロペンチル	９１
１５	Ｐｈｅ（４－４’－ビフェニル）	ＮＨＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$	
１６	Ｐｈｅ（４－４’－ビフェニル）	ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_5$ＣＨ$_3$	
１７	Ｐｈｅ（４－（２’－ナフチル））	ＮＨＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$	
１８	Ｐｈｅ（４－（２’－ナフチル））	ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_5$ＣＨ$_3$	

【０１６９】

［抗菌性アッセイ］

黄色ブドウ球菌ＡＴＣＣ２５９２３株、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）ＡＴＣＣ３３５９１株、およびメチシリン耐性表皮ブドウ球菌（ＭＲＳＥ）ＡＴＣＣ２７６２６株のＭＩＣ測定は、標準法を用いてＴｏｓｌａｂ　ＡＳにより行った。ウィリアムズ・アンド・ウィルキンズ社（ボルティモア）、「Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ　ｉｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、第４版、（Ｌｏｒｉａｎ，Ｖ．編）」、７５～７８

頁における、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，Ｄ．著（１９９６年）「Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ ｔｅｓｔｉｎｇ ｏｆ ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌｓ ｉｎ ｌｉｑｕｉｄ ｍｅｄｉａ（液体培地中の抗菌剤の感受性試験）」。

【０１７０】

【表６】

表５

本発明で使用される化合物の抗菌特性および毒性特性

化合物	カンジダ・アルビカンス（ｍｇ／Ｌ）	黄色ブドウ球菌（ｍｇ／Ｌ）	ＭＲＳＡ（ｍｇ／Ｌ）	ＭＲＳＥ（ｍｇ／Ｌ）	化膿連鎖球菌（ｍｇ／Ｌ）	大腸菌（ｍｇ／Ｌ）	緑膿菌（ｍｇ／Ｌ）	ＥＣ５０
７	２５	＜２	＜２	＜２	＜２	７	７	７２０
８	５	２	２	＜１	２	５	５	３２
９	１０	２	３	＜２	２			３５０
１０	１０	２	３	＜２	２			６２０
１１	＞１００	５	４	４	６	＞１００	＞１００	３８
１２	１０	＜２	３	２	２			３００
１３	１０	＜２	２	２	＜２			５５
１４	１０	＜２	＞１５	＜２	２			３４０

【０１７１】

＜実施例６＞

＜選択した化合物のインビトロブロードパネルスクリーニング＞

［材料と方法］

（抗菌剤）

あらかじめ秤量した化合物７および化合物８のバイアルは、リティクス・バイオファーマ社から供給された。

【０１７２】

【表７】

化合物一般式：$AA_1-AA_2-AA_1-X-Y$			
	AA_1	AA_2	XY
化合物７	Ａｒｇ	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	$NHCH(CH_3)_2$
化合物８	Ａｒｇ	２，５，７－トリ－ｔｅｒｔ－ブチルトリプトファン	$NH(CH_2)_5CH_3$

【０１７３】

（細菌分離株）

本研究で使用した細菌分離株は、実施例２に記載した通りである。

（最小発育阻止濃度（ＭＩＣ）の測定）

実施例２に記載したようにＭＩＣを測定した。

【０１７４】

［結果］

結果を表６にシングルラインリスト表示で示す。

【０１７５】

得られたＭＩＣデータは非常に有望なものであり、ペプチドが非常に幅広い活性スペクトルを持つことを示している。

【０１７６】

表６：グラム陽性菌、グラム陰性菌、および真菌のパネルに対する２種の抗菌ペプチドのインビトロ活性のシングルラインリスト

種および特性	化合物７（ｍｇ／Ｌ）	化合物８（ｍｇ／Ｌ）
カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）　ＡＴＣＣ９００２８－参照株	３２	４
カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）　ＡＴＣＣ２４４３３－参照株	６４	８
カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）　ＡＴＣＣ７５０－参照株	４	４
カンジダ・パラプシローシス（Candida parapsilosis）　ＡＴＣＣ９００１８－参照株	６４	８
カンジダ（イッサチェンキア）・クルーセイ（Candida（Issatchenkia）krusei）　ＡＴＣＣ６２５８－参照株	８	３２
アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）－ＧＲマイクロ社（G.R.Micro）コレクション	３２	４
トリコフィトン・メンタグロフィテス（Trichophyton mentagrophytes）－ＧＲマイクロ社コレクション	８	４
トリコフィトン・インタージギターレ（Trichophyton interdigitale）－ＧＲマイクロ社コレクション	１６	４
イヌ小胞子菌（Microsporum canis）－ＧＲマイクロ社コレクション	１６	４
クリプトコックス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）－ＧＲマイクロ社コレクション	８	２
大腸菌（Escherichia coli）　ＡＴＣＣ２５９２２－抗生物質感受性型株	３２	４
大腸菌（Escherichia coli）　ＡＴＣＣ３２５１８－β－ラクタマーゼ陽性型株	３２	８
大腸菌（Escherichia coli）－多剤耐性臨床分離株	３２	８
クレブシエラ・アエロゲネス（Klebsiella aerogenes）　ＮＣＴＣ１１２２８－抗生物質感受性型株	６４	８
クレブシエラ・アエロゲネス（Klebsiella aerogenes）－多剤耐性臨床分離株	３２	８
エンテロバクター種（Enterobacter sp）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	８
エンテロバクター種（Enterobacter sp）－多剤耐性臨床分離株	≧１２８	８
緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）　ＡＴＣＣ２７８５３－抗生物質感受性型株	３２	８
緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）－多剤耐性臨床分離株	８	４
ステノトロホモナス・マルトフィリア（Stenotrophomonas maltophilia）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	４
サルモネラ属細菌（Salmonella sp）－抗生物質感受性臨床分離株	１６	８
サルモネラ属細菌（Salmonella sp）－多剤耐性臨床分離株	１６	８
赤痢菌属細菌（Shigella sp）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	４
モルガン菌（Morganella morganii）－多剤耐性臨床分離株	３２	８

種および特性	化合物７（ｍｇ／Ｌ）	化合物８（ｍｇ／Ｌ）
インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）－β－ラクタマーゼ陰性臨床分離株	３２	１６
インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）－β－ラクタマーゼ陽性臨床分離株	１６	４
インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）－β－ラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性臨床分離株	１６	８
モラクセラ・カタラリス（Moraxella catarrhalis）－β－ラクタマーゼ陽性臨床分離株	４	１６
モラクセラ・カタラリス（Moraxella catarrhalis）－フルオロキノロン感受性の低下した臨床分離株	８	１６
アシネトバクター・バウマニ(Acinetobacter baumanii)－抗生物質感受性臨床分離株	６４	１６
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）　ＡＴＣＣ２９２１３－抗生物質感受性対照株	８	４
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）　ＡＴＣＣ２５９２３－抗生物質感受性対照株	８	４
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）　ＡＴＣＣ４３３００－メチシリン耐性対照株	８	４
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）－メチシリン耐性臨床分離株	８	４
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）－多剤耐性臨床分離株	１６	４
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）－テイコプラニン中等度耐性臨床分離株	１６	４
表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）－抗生物質感受性臨床分離株	４	８
表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）－メチシリン耐性臨床分離株	４	２
溶血性ブドウ球菌（Staphylococcus haemolyticus）－抗生物質感受性臨床分離株	４	４
腐生ブドウ球菌（Staphylococcus saprophyticus）－抗生物質感受性臨床分離株	２	０．５
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－ＡＴＣＣ２９２１２　抗生物質感受性対照株	１６	４
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－バンコマイシン感受性臨床分離株	３２	４
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＡ）臨床分離株	３２	４
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＢ）臨床分離株	≧１２８	８
エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）－高濃度ゲンタマイシン耐性臨床分離株	６４	８
エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）－バンコマイシン感受性臨床分離株	１６	４
エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＡ）臨床分離株	３２	４
エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＢ）臨床分離株	１６	４
エンテロコッカス・ガリナルム（Enterococcus gallinarum）－バンコマイシン耐性（ＶａｎＣ）臨床分離株	８	４
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－ＡＴＣＣ４９６１９　抗生物質感受性対照株	３２	１６
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－ペニシリン感受性臨床分離株	３２	８

種および特性	化合物７（ｍｇ／Ｌ）	化合物８（ｍｇ／Ｌ）
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－ペニシリン中等度耐性臨床分離株	３２	１６
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－ペニシリン耐性臨床分離株	３２	１６
肺炎球菌（Streptococcus pneumoniae）－多剤耐性臨床分離株	３２	１６
化膿連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）－マクロライド（ＭＬＳ）耐性臨床分離株	１６	８
化膿連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）－マクロライド（Ｍ型）耐性臨床分離株	１６	８
コリネバクテリウム・ジェイケイウム（Corynebacterium jeikeium）－抗生物質感受性臨床分離株	８	４
コリネバクテリウム・ジェイケイウム（Corynebacterium jeikeium）－多剤耐性臨床分離株	８	２
リステリア・モノサイトゲネス（Listeria monocytogenes）－抗生物質感受性臨床分離株	１６	８
ＭＵ５０　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＶＩＳＡ型株	１６	４
ＥＭＲＳＡ３　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＳＳＣｍｅｃ型１	８	４
ＥＭＲＳＡ１６　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＳＳＣｍｅｃ型２	１６	４
ＥＭＲＳＡ１　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＳＳＣｍｅｃ型３	１６	４
ＥＭＲＳＡ１５　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＳＳＣｍｅｃ型４	８	４
ＨＴ２００１２５４　黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（ＭＲＳＡ）－ＰＶＬ陽性	８	４
ストレプトコッカス･アガラクティアエ（Streptococcus agalactiae）－抗生物質感受性臨床分離株	８	８
ストレプトコッカス･アガラクティアエ（Streptococcus agalactiae）－マクロライド耐性臨床分離株	１６	８
Ｃ群連鎖球菌（Group C Streptococcus）－抗生物質感受性臨床分離株	１６	８
Ｃ群連鎖球菌（Group C Streptococcus）－マクロライド耐性臨床分離株	３２	１６
Ｇ群連鎖球菌（Group G Streptococcus）－抗生物質感受性臨床分離株	１６	８
Ｇ群連鎖球菌（Group G Streptococcus）－マクロライド耐性臨床分離株	１６	８
ストレプトコッカス・ミティス（Streptococcus mitis）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	１６
ストレプトコッカス・ミティス（Streptococcus mitis）－マクロライド耐性臨床分離株	６４	１６
ストレプトコッカス・コンステラータス（Streptococcus constellatus）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	１６
ストレプトコッカス・コンステラータス（Streptococcus constellatus）－マクロライド耐性臨床分離株	３２	１６
ストレプトコッカス・オラリス（Streptococcus oralis）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	１６
ストレプトコッカス・オラリス（Streptococcus oralis）－マクロライド耐性臨床分離株	６４	１６
ストレプトコッカス・ボビス（Streptococcus bovis）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	８

種および特性	化合物７（ｍｇ／Ｌ）	化合物８（ｍｇ／Ｌ）
ストレプトコッカス・ボビス（Streptococcus bovis）－マクロライド耐性臨床分離株	８	２
ストレプトコッカス・サングイス（Streptococcus sanguis）－抗生物質感受性臨床分離株	３２	１６
ストレプトコッカス・サングイス（Streptococcus sanguis）－マクロライド耐性臨床分離株	３２	１６
ウェルシュ菌（Clostridium perfringens）－抗生物質感受性臨床分離株	≧１２８	３２
ディフィシル菌（Clostridium difficile）－抗生物質感受性臨床分離株	６４	３２
アクネ菌（Propionibacterium acnes）－抗生物質感受性臨床分離株		４
アクネ菌（Propionibacterium acnes）－抗生物質耐性臨床分離株		２

【０１７７】

＜実施例７　化合物７および化合物８のインビボ活性＞

マウスの皮膚を黄色ブドウ球菌または化膿連鎖球菌に感染させ、その後、３時間間隔で合計３回の投与を行った。最後の投与から３時間後、皮膚生検体を採取し、皮膚試料に存在するコロニー形成単位（ＣＦＵ）数を測定した。結果を、マウス１匹当たりのコロニー形成単位数として、図３、図４、および図５に示す。

【０１７８】

実験１（図３）では、化合物７を、２％（ｗ／ｗ）の化合物７を含有するクリームまたはゲルの一部として、マウスの皮膚に塗布した。化合物７を含有しない同じクリームまた

はゲルを陰性対照（プラセボ）として用いた。バクトロバン２％クリームを陽性対照として用いた。化合物７を含有するクリームまたはゲルをマウスの皮膚に塗布すると陰性対照と比較してＣＦＵ数が減少したことが明確にわかり、化合物７が黄色ブドウ球菌に対して抗菌効果を発揮したことを示している。標準臨床治療であるバクトロバン２％クリームの効力は、本投与計画下では有意な影響を与えなかった。担体、つまりクリームまたはゲルの性質は有意な影響を与えなかった。

【０１７９】

実験２（図４）では、化合物７を２つの異なる濃度で、つまり１％または２％のゲルとして塗布した。プラセボゲルおよび公知の抗菌剤「バクトロバン（ムペリシン（ｍｕｐｅｒｉｃｉｎ））」を対照として使用した。化合物７を含有するゲルは、プラセボゲルやバクトロバンよりも、化膿連鎖球菌ＣＳ３０１感染に由来するＣＦＵ数を減少させる効果が高かったことがわかる。また、化合物７を２％含有するゲルは、化合物７を１％しか含有しないゲルよりも効果が高かった。

【０１８０】

実験３（図５）では、マウス皮膚感染モデルにおける黄色ブドウ球菌ＦＤＡ４８６感染に対して、化合物８を２％クリーム製剤中で適用した。プラセボクリーム１種と公知の抗菌剤２種、「フシジン（Ｆｕｃｉｄｉｎ）（フシジン酸）軟膏２％」および「バクトロバン（ムペリシン）クリーム２％」を対照として用いた。化合物８を含有するクリームは、プラセボやフシジンまたはバクトロバンよりも、ＣＦＵ数を減少させる効果が高かったことがわかる。

【０１８１】

＜実施例８　ＡＭＣ－１０９含有コーティングを用いた吸収性編組縫合糸の作製＞

ＡＭＣ－１０９を含有する典型的な生分解性ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）ポリマーを用いた編組縫合糸の溶液コーティングを調査することを目的とした。研究は下記の４つの領域で行った。

【０１８２】

１．ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）ポリマーとＡＭＣ－１０９を溶解させることができる溶媒（または混合溶媒）を調製する。

【０１８３】

２．「裸の」編組吸収性縫合糸材料を、上記項目１の溶液でコーティングする。

【０１８４】

３．コーティングされた縫合糸からのＡＭＣ－１０９の漏出を調査する。

【０１８５】

４．コーティングされた縫合糸の微生物学的効力を調査する。

【０１８６】

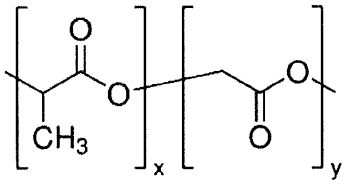
［材料と方法］

（ポリマー）

Ｒｅｓｏｍｅｒ（登録商標）ＲＧ５０２、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）、シグマ・アルドリッチ社、製品番号７１９８８９は、ラクチドとグリコリドが５０：５０で混合された、エステルを末端に有し、重量平均分子量（Ｍｗ）が７，０００～１７，０００である生分解性ポリマーである。市販の吸収性縫合糸のコーティングに一般に使用される生分解性ポリマーと類似している。化学構造を以下に示す。

【０１８７】

【化３】



【０１８８】
（ペプチド）
ＡＭＣ－１０９は、本明細書中では「化合物２」と呼ばれ、式Ａｒｇ－Ｔｂｔ－Ａｒｇ－ＮＨＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｐｈを有する。
【０１８９】
（縫合糸）
シリコーンコーティングされたナイロン製編組縫合糸である、Ｓｙｎｅｔｕｒｅ　Ｓｕｒｇｉｌｏｎのサイズ４－０を研究に使用した。
【０１９０】
（コーティングされた縫合糸の作製手順）
縫合糸を酢酸エチルで洗浄して既存のコーティング層の大部分を除去してからコーティングを行った。
【０１９１】
Ｒｅｓｏｍｅｒ（登録商標）ＲＧ５０２を酢酸エチルに溶解させ、ＡＭＣ－１０９をエタノールに溶解させた。最初の試験Ｔｅｓｔ－０１では、５０ｍｇのＲＧ５０２を酢酸エチル３００μｌに溶解させ、エタノール５０μｌに溶解させた１０ｍｇのＡＭＣ－１０９と混合した。２回目の試験Ｔｅｓｔ－０２では、５０ｍｇのＲＧ５０２を酢酸エチル４００μｌに溶解させ、エタノール１１０μｌに溶解させた１０ｍｇのＡＭＣ－１０９と混合した。得られた混合溶媒は均質であった。
【０１９２】
縫合糸基材（酢酸エチルでの洗浄後）を、コーティング用混合溶媒に繰り返し浸漬することによりコーティングした。
【０１９３】
（微生物学的評価）
・細菌株：黄色ブドウ球菌
・ＣＦＵ（コロニー形成単位）の計数に使用した縫合糸：
○ＲＧ５０２ポリマーでコーティングした縫合糸Ｓｕｒｇｉｌｏｎ　４－０、対照
○ＲＧ５０２ポリマー／ＡＭＣ－１０９でコーティングした縫合糸Ｓｕｒｇｉｌｏｎ４－０
○縫合糸Ｓｕｒｇｉｌｏｎ　４－０（コーティングなし）、対照
・液体トリプティックソイブロス（ＴＳＢ）
・ミューラー・ヒントン（ＭＨ）寒天プレート
血液寒天プレートから黄色ブドウ球菌のコロニーを採取し、０．５マクファーランドの溶液を作成した（ＣＦＵ数：1×10^8）。この溶液を用いて、
１．ＭＨ寒天プレートに接種し、
２．ＴＳＢ中で希釈してＣＦＵ数を1×10^5とした。
【０１９４】
縫合糸を、寒天プレートに載せ、発育阻止帯を観察するとともに、ＴＳＢに投入して接種し、コーティングされた縫合糸の抗菌効果をコーティングされていない縫合糸に対して調べた。
【０１９５】
試料は、３７℃で１６時間インキュベートした。
【０１９６】
ＴＳＢ中で縫合糸に接種した試験管の培養液を用いて、段階希釈によりＣＦＵ測定を行った。コーティングされた縫合糸の長期的効果を調べるために、縫合糸をすすぎ、ＴＳＢ中で３７℃で１６時間、細菌を再接種した。
【０１９７】
並行実験を３回行った。
【０１９８】
コロニー計数後にＣＦＵを決定した。

【０１９９】
［結果］
（コーティングされた縫合糸の作製）
縫合糸をＲｅｓｏｍｅｒ　ＲＧ－５０２とＡＭＣ－１０９との溶液で処理することにより、コーティングされた縫合糸を容易に製造することができた。混合溶媒の組成は、Ｒｅｓｏｍｅｒ　ＲＧ－５０２とＡＭＣ－１０９の両方を溶解・混合する（かつ、相分離や沈殿を回避する）能力にとって重要であった。
【０２００】
（ＡＭＣ－１０９の放出量の定量分析）
コーティングされた縫合糸を水で抽出した。コーティングされた縫合糸を、水０．４ｍｌに入れ、３０分間静置した。縫合糸を取り出し、乾燥させ、２回目の抽出を２２時間行った。抽出液を分析し、抽出によって放出されたＡＭＣ－１０９の量を求めた。結果を図６に示す。
【０２０１】
［ＡＭＣ－１０９でコーティングされた縫合糸の抗菌効果の測定］
Ｒｅｓｏｍｅｒ　ＲＧ－５０２およびＡＭＣ－１０９でコーティングされた縫合糸の抗菌効果を、寒天増殖阻害アッセイおよび液体ブロスアッセイによって評価した。
【０２０２】
（１日目）
ＡＭＣ－１０９でコーティングされた縫合糸の周囲の発育阻止帯を、コーティングなしの対照縫合糸およびＲＧ－５０２（ＡＭＣ－１０９添加せず）でコーティングされた縫合糸と比較して、観察した（図７）。
【０２０３】
１日目、ＡＭＣ－１０９でコーティングされた縫合糸が入った試験管内のＴＳＢ培地において明白な増殖は見られなかった。ＣＦＵ計数のための希釈を行ったところ、ＡＭＣ－１０９でコーティングされた縫合糸のＣＦＵ数は、０、５００、および3×10^{3}であった。対照が入った試験管においては、目視可能な増殖が見られ、ＣＦＵ数は、5.8×10^{8}および4.7×10^{8}（数値は並行試験の平均値）であった（図８）。
【０２０４】
（２日目）
２日目、すべての試験管において目視可能な増殖が見られた。ＲＧ５０２／ＡＭＣでコーティングされたＳｕｒｇｉｌｏｎが入った試験管と対照との間に目視可能な差異は見られなかった。
【０２０５】
［結論］
生分解性ポリマーとＡＭＣ－１０９との溶液によって縫合糸を容易にコーティングすることができる。結果として得られる、ＡＭＣでコーティングされた縫合糸は１６時間にわたって抗菌効果を発揮する。ＡＭＣ－１０９を含まない最終のＲｅｓｏｍｅｒ層を追加することで、即時拡散を抑え、より長く持続する効果を得ることができる。
【０２０６】
＜実施例９　ＡＭＣ－１０９／ポリマーでコーティングされた縫合糸＞
［材料と方法］
細菌株：黄色ブドウ球菌ＡＴＣＣ２９２１３および表皮ブドウ球菌ＲＰ４２Ａ
縫合糸：Ｅｔｈｉｂｏｎｄ（登録商標）Ｅｘｃｅｌポリマー縫合糸（ジョンソン・エンド・ジョンソン社（Ｊｏｈｎｓｏｎ　＆　Ｊｏｈｎｓｏｎ））を、ポリカプロラクトン＋５％ＡＭＣ－１０９のコーティングで被覆した。ポリマー（すなわち、ポリカプロラクトン、平均分子量（ＭＷ）：約１４，０００）とペプチドとを、ガラスバイアル内で１２０℃まで急速加熱（約３分超）することによって溶融し、ポリカプロラクトンが溶融したときに混合を行った。縫合糸をこの溶融混合物中に浸してコーティングした。
【０２０７】

対照：コーティングされていないＥｔｈｉｂｏｎｄ（登録商標）Ｅｘｃｅｌ縫合糸
１つの実験では、細菌コロニーを０．５マクファーランドに希釈したものをミューラー・ヒントン寒天プレート上に広げ、２つ目の実験では、コロニーを０．５マクファーランドに希釈し、かつトリプティックソイブロス（ＴＳＢ）で１：１００に希釈した。
【０２０８】
最初の実験では、ＡＭＣコーティングされた縫合糸とコーティングされていない対照とを、接種したプレートに載せた。プレートを３７℃で１６時間インキュベートした。２つ目の実験では、ＡＭＣコーティングされた縫合糸とコーティングされていない対照とを、接種した培地に投入し、３７℃中で１６時間振盪培養した。
【０２０９】
［結果］
表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌の両方について、ＡＭＣ－１０９でコーティングされた縫合糸の周囲の寒天プレートに、対照と比較して明らかな発育阻止帯が観察された（図９）。
【０２１０】
ＡＭＣでコーティングされたＥｔｈｉｂｏｎｄ縫合糸の一部を加えたウェル１およびウェル４では細菌増殖が明らかに阻害された（図１０）。
【０２１１】
縫合糸をＳｙｔｏ９およびヨウ化プロピジウムでさらに染色し、蛍光顕微鏡法で調べた。コーティングされた縫合糸とコーティングされていない縫合糸との間に明らかな違いがあり、コーティングされていない縫合糸では大量の細菌増殖が見られた。
＜実施例１０　ＡＭＣ－１０９でコーティングされた吸収性縫合糸＞
説明するプロセスは、スケーラブルであり、産業上の開発に適している。
【０２１２】
［材料と方法］
（縫合糸）
・コヴィディエン社（Ｃｏｖｉｄｅｎ）（メドトロニック社（Ｍｅｄｔｒｏｎｉｃ））、Ｐｏｌｙｓｏｒｂ（ポリゾーブ）　３－０
・Ｅｔｈｉｃｏｎ、Ｖｉｃｒｙｌ　ｐｌｕｓ（バイクリルプラス）　３－０（トリクロサン含有、陽性対照）
どちらの縫合糸も、Ｐｏｌｙｇｌａｃｔｉｎ　９１０で構成された内側の編組フィラメントと、それを被覆する外側のより軟質な潤滑層とからなるものであり、該潤滑層は、ステアリン酸カルシウムと混合したポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）（ラクチド：グリコリド＝６５：３５）で構成されている。Ｖｉｃｒｙｌ　ｐｌｕｓ縫合糸は、その外層にトリクロサンを活性成分として追加的に含有する。
【０２１３】
（ポリマー）
Ｒｅｓｏｍｅｒ（エボニック社）ＲＧ－５０２、分解性ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）（ラクチド：グリコリド＝５０：５０）、M_w：７０００～１７０００、分解時間：３ヶ月未満。
【０２１４】
（ペプチド）
上記と同様にＡＭＣ－１０９を使用。
【０２１５】
（縫合糸の剥離）
Ｐｏｌｙｓｏｒｂ縫合糸の外層を、縫合糸を酢酸エチルで１０分間洗浄した後、水で２分間洗浄することにより、（部分的に）除去した。縫合糸を乾燥させてからコーティングした。
【０２１６】
（縫合糸コーティング用混合液）

１つのバイアル内でＲＧ－５０２を酢酸エチルに溶解させ、別のバイアル内でＡＭＣ－１０９をエタノールに溶解させることにより、コーティング用混合液を調製した。２つの溶液を混合するとやや混濁した溶液が生じ、酢酸エチル０．５ｍｌを添加すると透明になった。

【０２１７】

（縫合糸のコーティング）

Ｐｏｌｙｓｏｒｂ縫合糸（６ｃｍの断片に切断）を、コーティング用混合液に１０分間浸し、乾燥させた後、新しく調製したコーティング用混合液に２分間浸した。

【０２１８】

縫合糸は２バッチ分を準備した。一方は、化学抽出分析と発育阻止帯試験（実験１）のためのものであり、他方は、液体培地中での効力試験（実験２）のためのものであった。

【０２１９】

【表９】

表７．コーティングに使用した質量および体積

縫合糸	ＲＧ５０２（ｍｇ）	ＥｔＯＡｃ（ｍｌ）	ＡＭＣ－１０９（ｍｇ）	ＥｔＯＨ（ｍｌ）	ＥｔＯＡｃ	濁度
実験１１５％	４５．００	０．５	８	０．２５	０．５	混濁
実験１５．９％	７７．６８	１．９０７	４．９０	０．２５	０	「透明」
実験１対照	５０．００	１．００	０	０．２５	０	
実験２１５％	９０．００	１．５	１６．１	０．５	０．５	混濁
実験２６．１％	９０．００	１．５	５．９	０．５	０．５	混濁

【０２２０】

（抽出）

縫合糸の試料を選択し、水性抽出を行った。

【０２２１】

（１回目の抽出）

縫合糸をバイアルに入れ、水（１ｍｌ）を添加した。試料を１時間静置した。抽出試料をＨＰＬＣで分析した。

【０２２２】

（２回目の抽出）

１回目の抽出から得られた縫合糸試料を新しいバイアルに入れ、水（１ｍｌ）を添加し、３．５時間抽出した。２回目の抽出試料をＨＰＬＣで分析した。

【０２２３】

（微生物学的評価）

細菌株：

・黄色ブドウ球菌（８３２５）
・緑膿菌（ＰＡＯ１）
・大腸菌
・エンテロコッカス・フェシウム

上記さまざまな細菌株の一晩培養したコロニーを用いて、０．５％ＮａＣｌ中で、０．５マクファーランド（1×10^{8}ＣＦＵ／ｍｌ）の溶液を作成し、ＬＢ（溶原性ブロス）２ｍｌが入った試験管内でさらに希釈して10^{5}ＣＦＵ／ｍｌとした。この菌液を、発育阻止帯試験用の寒天プレートへの接種と、ＬＢ培地中での縫合糸試験試料への直接接種と、に使用した。すべての試料を３７℃で１８時間インキュベートした。ＣＦＵの数え上げ

は、ｉ）試験試料への接種を行った溶液（ＬＢ培地）、または、ｉｉ）試料をすすいでボルテックス（２０秒）した溶液（１ｍｌのＮａＣｌ、０．５％）から段階希釈液を作成することによって行った。段階希釈液（10^{-1}～10^{-6}）は、１ｍｌのＮａＣｌで作成した。異なる希釈液から１００μｌを血液寒天プレート上に広げ、３７℃で１８時間さらにインキュベートした。

【０２２４】

［結果］

（ＡＭＣ－１０９放出量の定量）

【０２２５】

【表１０】

表８．縫合糸水性抽出液に含まれていたＡＭＣ－１０９の量（μｇ／ｍｌ）

ＡＭＣ－１０９	１回目の抽出	２回目の抽出
１５％	２１	４
５．９％	５	ＮＱ

*ＮＱは定量不可能を示す。

【０２２６】

縫合糸はコーティングにより０．４～０．５ｍｇ増加した。水性抽出液中のＡＭＣ－１０９濃度を表８にまとめた。データから、高配合の縫合糸からは合計４．５時間の抽出で２５マイクログラムのＡＭＣ－１０９が水溶液中に遊離したことがわかった。低配合の縫合糸からは同様の条件下で５マイクログラムのＡＭＣ－１０９が遊離した。

【０２２７】

これらのＡＭＣ－１０９の量は、高配合のコーティングに埋め込まれたＡＭＣ－１０９の少なくとも３０％が４．５時間以内に水中に放出されることを示唆している。低配合の縫合糸からの放出量は、これよりもやや低いようである。

【０２２８】

（微生物学的評価）

１５％ＡＭＣ－ＲＧ５０２でコーティングされたＰｏｌｙｓｏｒｂの周囲には常に発育阻止帯が観察された。これに対して、Ｖｉｃｒｙｌ・トリクロサンの場合は、黄色ブドウ球菌および大腸菌の発育阻止しか見られなかった（表９）。

【０２２９】

【表１１】

表９：発育阻止帯試験

		発育阻止帯			
		黄色ブドウ球菌	緑膿菌	Ｅ．フェシウム	大腸菌
実験１ １５％	Ｐｏｌｙｓｏｒｂ ３－０	４ｍｍ	２ｍｍ	３ｍｍ	３ｍｍ
実験１ ５．９％	Ｐｏｌｙｓｏｒｂ ３－０	２ｍｍ	０ｍｍ	１ｍｍ	０ｍｍ
実験１ 対照	Ｐｏｌｙｓｏｒｂ ３－０	０ｍｍ	０ｍｍ	０ｍｍ	０ｍｍ
トリクロサン	Ｖｉｃｒｙｌ	１５ｍｍ	０ｍｍ	０ｍｍ	３ｍｍ

【０２３０】

菌液中での縫合糸試験材料の直接接種によると、１５％ＡＭＣ－１０９でコーティングされた縫合糸では、すべての菌株について、ＬＢ培地中で細菌増殖が抑制された。トリクロサンでコーティングされた縫合糸は、黄色ブドウ球菌の増殖を阻害したのみであった（表１０）。

【０２３１】

【表１２】

表１０．ＬＢ培地中での縫合糸試験試料の直接接種によるＣＦＵ

		コロニー形成単位（ＣＦＵ）			
		黄色ブドウ球菌	緑膿菌	Ｅ．フェシウム	大腸菌
実験２ １５％	Ｐｏｌｙｓｏｒｂ ３－０	０	３．４×１０^{5}	０	０
実験２ ６．１％	Ｐｏｌｙｓｏｒｂ ３－０	３．２×１０^{6}	１．０×１０^{9}	１．６×１０^{3}	６×１０^{8}
対照	Ｐｏｌｙｓｏｒｂ ３－０	６．０×１０^{8}	１．０×１０^{9}	４．６×１０^{7}	１．５×１０^{8}
トリクロサン	Ｖｉｃｒｙｌ	８０	１．２×１０^{9}	１．５×１０^{7}	８．０×１０^{7}

【０２３２】

［結論］

ＡＭＣ－１０９は、説明した溶液コーティング技術を用いて吸収性縫合糸に組み込むことができる。コーティング溶液は混濁しており、過飽和溶液であることを示唆している。これにより、コーティング効率が向上し得る。

【０２３３】

ＡＭＣコーティングされた縫合糸は、４．５時間以内にそのＡＭＣ－１０９含有量の少なくとも３０％を水性環境に遊離させた。ＡＭＣ－１０９の放出量は、縫合糸中に配合された量に依存する。

【０２３４】
ＡＭＣ－１０９でコーティングされた縫合糸は、トリクロサンが効かない重要な病原体をはじめとするさまざまなグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して抗コロニー形成効果を発揮する。
【０２３５】
＜実施例１１　ＡＭＣ－１０９含有生体吸収性薄膜フィルムのキャスティング＞
［１１．１　生体吸収性ポリマー］
・ジクロロメタン（ＤＣＭ）に溶解させたＲｅｓｏｍｅｒ　Ｌ２０６Ｓ（エステルを末端に有するポリＬ－ラクチド）（シグマ・アルドリッチ社、製品番号７１９８５４）、クロロホルムに溶解させたＡＭＣ－１０９
・テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）に溶解させたＲｅｓｏｍｅｒ　ＲＧ５０２（ポリ－Ｄ，Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）（シグマ・アルドリッチ社、製品番号７１９８８９）、同じくＴＨＦに溶解させたＡＭＣ－１０９
［１１．２　生体吸収性薄膜フィルムの作製］
（キャスト溶液）
生体吸収性ポリマー材料であるＲｅｓｏｍｅｒ　ＲＧ５０２と、ＡＭＣ－１０９とを、最終的な塗装液中の生体吸収性ポリマーに対するＡＭＣ－１０９の量が５％となるように、別々にＴＨＦに溶解させた。ＡＭＣ－１０９をＴＨＦに溶解させるのに数時間かかった。
【０２３６】
生体吸収性ポリマー材料であるＲｅｓｏｍｅｒ　Ｌ２０６Ｓと、ＡＭＣ－１０９とを、それぞれジクロロメタンとクロロホルムとに別々に溶解させた。ＡＭＣ－１０９とＬ２０６Ｓの比率は上記と同じとした。
【０２３７】
（キャストプロセス）
浅い窪みのあるアルミニウム箔上にキャスト溶液８ｍｌを流延するかまたは塗装液を時計皿上に注ぐことにより、薄膜フィルム試料を作製した。乾燥（数日）後、薄膜状のキャストフィルムをその表面から機械的に剥離した。
【０２３８】
［１１．３　ＡＭＣ－１０９含有生体吸収性薄膜フィルムからのＡＭＣ－１０９漏出量の測定］
（抽出）
薄膜キャストフィルムから試料を切り出し、正確に秤量し（１００～１５０ｍｇ）、試料中のＡＭＣ－１０９の量を計算した。試料をバイアルに入れ、水（２ｍｌ）を添加し、バイアルを振盪した。抽出を６回連続して行った。抽出の各回において、前の抽出液を脱イオン水（２ｍｌ）に置き換えた。抽出は、振盪時間を１０秒、５分、３０分、３時間、２２時間、および４８時間として行った。各抽出液中のＡＭＣ－１０９の量を、予め作成した標準曲線を用いて２８０ｎｍでＵＶ分光光度法により測定した。結果を図１１にグラフで示す。
【０２３９】
［１１．４　ＡＭＣ－１０９含有生体吸収性薄膜フィルムの微生物学的評価］
（細菌株）
・黄色ブドウ球菌８３２５
（変形ＡＡＴＣＣ－１００法）
黄色ブドウ球菌の一晩培養したコロニーを、０．９％ＮａＣｌ中で０．５マクファーランドに希釈し、細菌数が1×10^{8}となる細菌濃度にした。この溶液をＴＳＢ中でさらに希釈し、細菌数を1×10^{5}とした。
【０２４０】
Ｌ２０６Ｓの薄膜フィルム材料を約０．４×０．４ｃｍの断片にカットした。この材料をdH_2O中に２分間浸し、風乾してから使用した。試料に菌液（1×10^{5}）５０μｌ

を接種した。これらの試料を、スライドガラスに載せ、湿潤チャンバ内で３７℃で２４時間インキュベートした。各試験材料について２回の生物学的反復を行った。

【０２４１】

インキュベーション後、薄膜フィルム材料を２分間十分に洗浄し、容易に抽出可能な、つまり、表面上に直接存在するＡＭＣ－１０９を除去した。その後、１０００μｌのＮａＣｌに投入し、４５秒間ボルテックスした後、段階希釈液（０～10^{-6}）を作成し、１００μｌをプレーティングしてＣＦＵ計数を行った。

【０２４２】

（微生物学的効力）

（コロニー形成単位）

ＡＭＣ含有材料については、ＣＦＵ数は検出限界未満であった。対照材料と比較して、ＣＦＵ数は７ｌｏｇ減少した（下記表参照）。

【０２４３】

【表１３】

表．ＡＭＣ－１０９含有生体吸収性薄膜フィルム試料のＣＦＵ値

ＴＰＵ／ポリマー	ＡＭＣ－１０９	対照
Ｌ２０６Ｓ	０	８．７×10^{7}
ＲＧ５０２	*	*

*ＲＧ５０２材料は、２４時間のインキュベーション中に崩壊し、スライドガラス表面に強固に付着した。この材料を回収することはできなかった。

【０２４４】

［１１．５　結論］

・Ｒｅｓｏｍｅｒは一部の溶媒で溶解可能であり、ＴＨＦとジクロロメタンは試験した溶媒の中で最も一般的な適用性があった。

【０２４５】

・ＡＭＣ－１０９はＴＨＦ溶液またはクロロホルム溶液中で溶解ポリマーに混合することができる。ＡＭＣ－１０９を溶解する溶媒は、Ｒｅｓｏｍｅｒを溶解するために用いられる溶媒との混和性を有していなければならない。

【０２４６】

・得られるキャスト溶液は、いくつかの表面に塗布することもでき、薄膜フィルムのキャスティングに用いることもできる。

【０２４７】

・薄膜キャストフィルムは、ＡＭＣ－１０９を、最初は急速に漏出させ、そして、Ｒｅｓｏｍｅｒの性質によって異なるが少なくとも２日間にわたってより低濃度で漏出させる。

【０２４８】

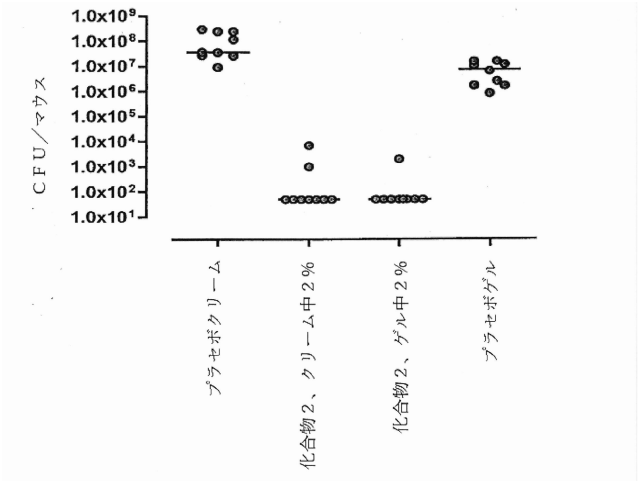
・Ｒｅｓｏｍｅｒ　ＲＧ５０２薄膜フィルムは、興味深い漏出挙動を示す。このポリマーは、時間の経過とともに崩壊し、ＡＭＣ－１０９を長期にわたって継続的に漏出させる。

【０２４９】

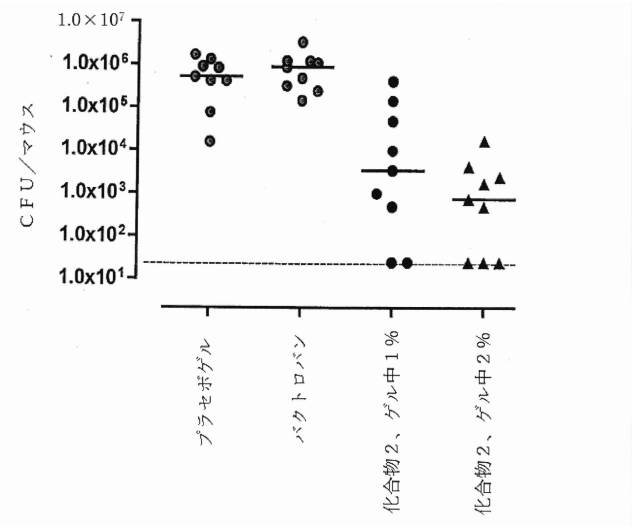
・Ｒｅｓｏｍｅｒ　Ｌ２０６Ｓ薄膜フィルムは、Ｒｅｓｏｍｅｒ　ＲＧ５０２ほど急速には崩壊せず、より長期間にわたって活性を有し得る。

【図面】

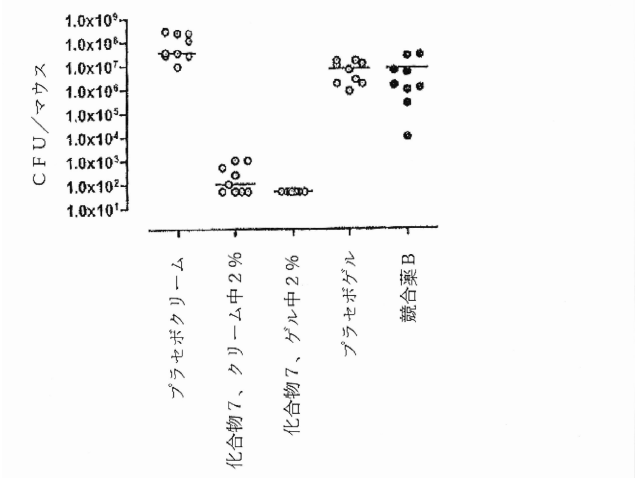
【図１】


CFU／マウス
1.0x10⁹
1.0x10⁸
1.0x10⁷
1.0x10⁶
1.0x10⁵
1.0x10⁴
1.0x10³
1.0x10²
1.0x10¹
プラセボクリーム
化合物２、クリーム中２％
化合物２、ゲル中２％
プラセボゲル

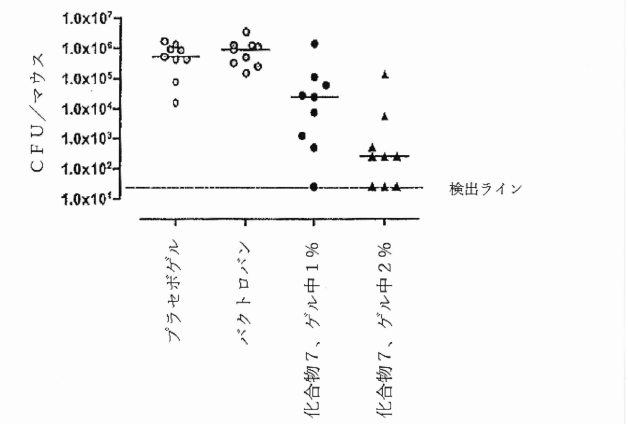
【図２】


CFU／マウス
1.0×10⁷
1.0x10⁶
1.0x10⁵
1.0x10⁴
1.0x10³
1.0x10²
1.0x10¹
プラセボゲル
バクトロバン
化合物２、ゲル中１％
化合物２、ゲル中２％

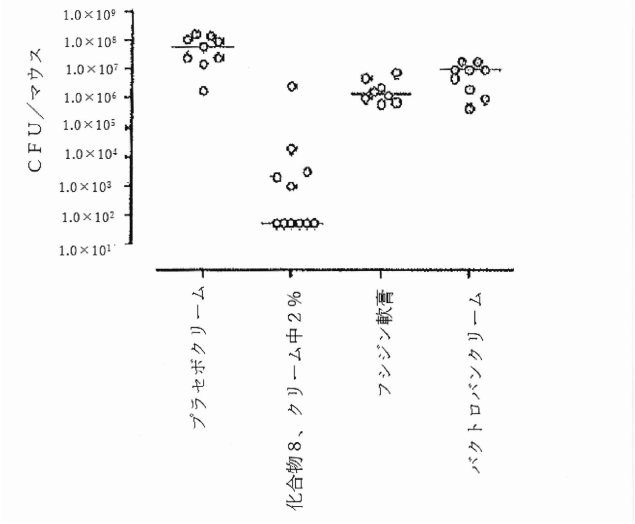
【図３】


CFU／マウス
1.0x10⁸
1.0x10⁷
1.0x10⁶
1.0x10⁵
1.0x10⁴
1.0x10³
1.0x10²
1.0x10¹
プラセボクリーム
化合物７、クリーム中２％
化合物７、ゲル中２％
プラセボゲル
競合薬Ｂ

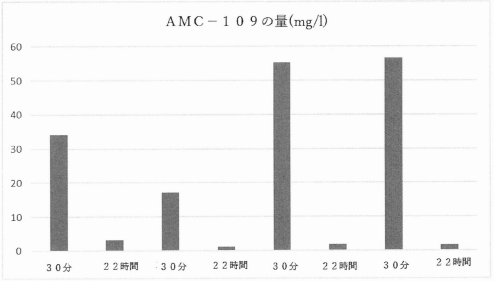
【図４】


CFU／マウス
1.0x10⁷
1.0x10⁶
1.0x10⁵
1.0x10⁴
1.0x10³
1.0x10²
1.0x10¹
検出ライン
プラセボゲル
バクトロバン
化合物７、ゲル中１％
化合物７、ゲル中２％

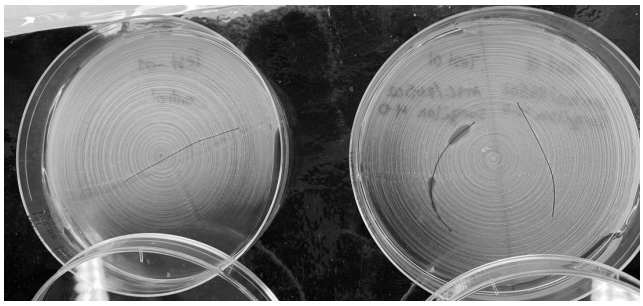
【図５】


CFU／マウス
1.0×10⁹
1.0×10⁸
1.0×10⁷
1.0×10⁶
1.0×10⁵
1.0×10⁴
1.0×10³
1.0×10²
1.0×10¹
プラセボクリーム
化合物８、クリーム中２％
フシジン軟膏
バクトロバンクリーム

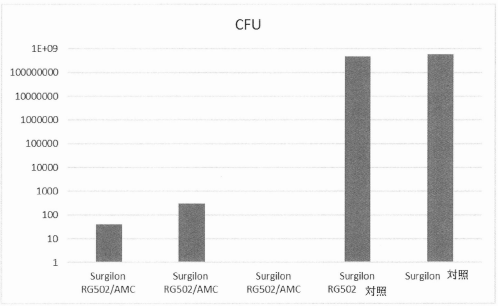
【図６】


ＡＭＣ－１０９の量(mg/l)
60
50
40
30
20
10
0
３０分
２２時間
３０分
２２時間
３０分
２２時間
３０分
２２時間

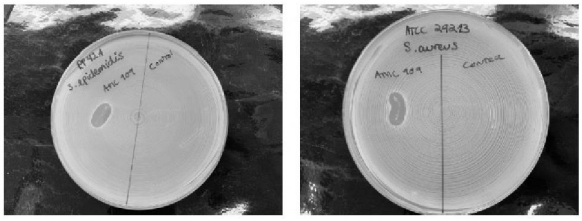
【図７】



【図８】


CFU
1E+09
100000000
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
Surgilon RG502/AMC
Surgilon RG502/AMC
Surgilon RG502/AMC
Surgilon RG502 対照
Surgilon 対照

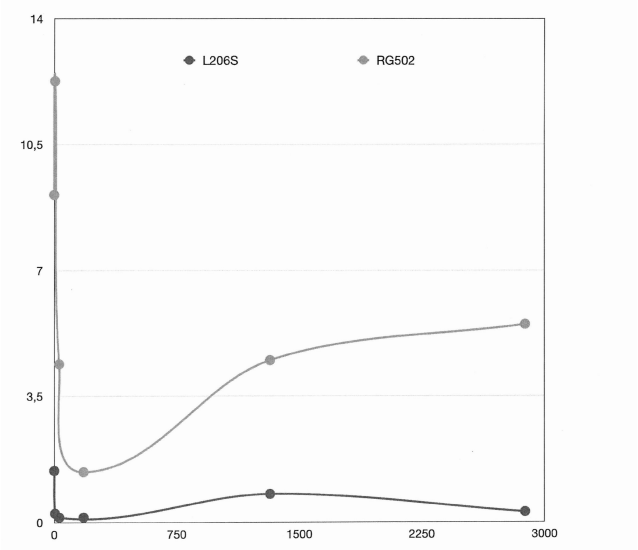
【図９】


ATCC 29213
S. aureus
Control

【図１０】


1
2
3
4
5
6

【図１１】


14
10,5
7
3,5
0
L206S
RG502
0
750
1500
2250
3000

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/065984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01N37/46 A01N47/44 A01N25/10 A01P1/00 A61L2/00
A61K38/00 A61P31/00
ADD.
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)
A61L A01N A01P A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, 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.
Y	WO 2010/038040 A1 (LYTIX BIOPHARMA AS [NO]; STENSEN WENCHE [NO] ET AL.) 8 April 2010 (2010-04-08) claims 1-22 figure 1 page 13, last paragraph - page 14, paragraph 3 page 26, paragraph 2 -----	1-25
Y	WO 2010/038041 A1 (LYTIX BIOPHARMA AS [NO]; STENSEN WENCHE [NO] ET AL.) 8 April 2010 (2010-04-08) claims 1-22 page 12, paragraph 2 - page 13, paragraph 1 page 18, paragraph 2 ----- -/--	1-25

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 October 2021	18/10/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Marie, Gérald

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/065984

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/081152 A2 (LYTIX BIOPHARMA AS [NO]; GARDNER REBECCA [GB] ET AL.) 2 July 2009 (2009-07-02) claims 1-19 page 9, last paragraph	1-25
Y	WO 2009/081151 A2 (LYTIX BIOPHARMA AS [NO]; GARDNER REBECCA [GB] ET AL.) 2 July 2009 (2009-07-02) example 2 page 11, paragraph 2	1-25
Y	WO 2019/027366 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES [SG]) 7 February 2019 (2019-02-07) claims 1-19	1-25
Y	JOHAN ISAKSSON ET AL: "A Synthetic Antimicrobial Peptidomimetic (LTX 109): Stereochemical Impact on Membrane Disruption", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 54, no. 16, 25 August 2011 (2011-08-25), pages 5786-5795, XP055493594, US ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm200450h abstract	1-25
Y	WO 01/98362 A2 (HERCULES INC [US]) 27 December 2001 (2001-12-27) claims 1-31 examples 1-28 page 22, paragraph 2	1-25
Y	WO 2007/095393 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; FERREIRA LINO [US] ET AL.) 23 August 2007 (2007-08-23) page 13, paragraph 3 page 14, paragraph 3 - page 15, paragraph 2 claims 1-47	1-25
Y	US 2006/166883 A1 (LU HELEN S M [US]) 27 July 2006 (2006-07-27) claims 1-24 page 6, paragraph 82	1-25
Y	US 5 928 916 A (KEOGH JAMES R [US]) 27 July 1999 (1999-07-27) claims 1-29	1-25
Y	WO 03/072154 A1 (GISH BIOMEDICAL INC [US]) 4 September 2003 (2003-09-04) claims 1-37	1-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/065984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010038040 A1	08-04-2010	AU 2009299579 A1	08-04-2010
		CA 2739174 A1	08-04-2010
		CN 102171238 A	31-08-2011
		CN 107233564 A	10-10-2017
		DK 2350116 T3	18-11-2019
		EP 2350116 A1	03-08-2011
		EP 3594223 A1	15-01-2020
		ES 2753886 T3	14-04-2020
		JP 6440342 B2	19-12-2018
		JP 2012504587 A	23-02-2012
		JP 2018008937 A	18-01-2018
		PL 2350116 T3	31-03-2020
		PT 2350116 T	20-11-2019
		US 2011236453 A1	29-09-2011
		WO 2010038040 A1	08-04-2010
WO 2010038041 A1	08-04-2010	AU 2009299580 A1	08-04-2010
		CA 2738974 A1	08-04-2010
		DK 2350115 T3	04-07-2016
		EP 2350115 A1	03-08-2011
		ES 2576685 T3	08-07-2016
		US 2011301076 A1	08-12-2011
		US 2017107250 A1	20-04-2017
		US 2019256558 A1	22-08-2019
		US 2021107939 A1	15-04-2021
		WO 2010038041 A1	08-04-2010
WO 2009081152 A2	02-07-2009	AU 2008339611 A1	02-07-2009
		CA 2709884 A1	02-07-2009
		CN 101970459 A	09-02-2011
		CY 1115239 T1	04-01-2017
		DK 2235041 T3	02-06-2014
		EP 2235041 A2	06-10-2010
		ES 2468250 T3	16-06-2014
		HR P20140466 T1	18-07-2014
		JP 5524858 B2	18-06-2014
		JP 2011507822 A	10-03-2011
		PL 2235041 T3	29-08-2014
		PT 2235041 E	12-06-2014
		RS 53326 B	31-10-2014
		SI 2235041 T1	29-08-2014
		US 2011172145 A1	14-07-2011
		WO 2009081152 A2	02-07-2009
WO 2009081151 A2	02-07-2009	AU 2008339610 A1	02-07-2009
		CA 2709881 A1	02-07-2009
		CN 101970454 A	09-02-2011
		EP 2235039 A2	06-10-2010
		JP 5433586 B2	05-03-2014
		JP 2011507821 A	10-03-2011
		US 2011143384 A1	16-06-2011
		WO 2009081151 A2	02-07-2009
WO 2019027366 A1	07-02-2019	CN 111542533 A	14-08-2020
		EP 3661946 A1	10-06-2020
		US 2020157144 A1	21-05-2020
		WO 2019027366 A1	07-02-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/065984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0198362 A2	27-12-2001	AU 6851201 A	02-01-2002
		BR 0111718 A	09-09-2003
		CA 2412011 A1	27-12-2001
		EP 1294740 A2	26-03-2003
		JP 2004501166 A	15-01-2004
		MX PA02012326 A	19-04-2005
		PL 363153 A1	15-11-2004
		US 2003050247 A1	13-03-2003
		WO 0198362 A2	27-12-2001
WO 2007095393 A2	23-08-2007	CA 2655168 A1	23-08-2007
		EP 1991245 A2	19-11-2008
		JP 2009526862 A	23-07-2009
		US 2007254006 A1	01-11-2007
		WO 2007095393 A2	23-08-2007
US 2006166883 A1	27-07-2006	NONE	
US 5928916 A	27-07-1999	US 5928916 A	27-07-1999
		US 2006099326 A1	11-05-2006
		US 2006193968 A1	31-08-2006
		US 2007048352 A1	01-03-2007
		US 2009324803 A1	31-12-2009
WO 03072154 A1	04-09-2003	AU 2003219747 A1	09-09-2003
		EP 1482995 A1	08-12-2004
		JP 2005524424 A	18-08-2005
		US 2003161938 A1	28-08-2003
		WO 03072154 A1	04-09-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｌ	*31/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	31/10	
Ａ６１Ｌ	*27/34*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/34	
Ａ６１Ｐ	*31/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00	
Ａ６１Ｐ	*31/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ	*31/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/10	
Ａ６１Ｌ	*27/54*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/54	
Ａ６１Ｌ	*31/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	31/16	

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

Ｆターム（参考） 6

4C084 AA03 BA01 BA15 BA23 CA59 MA67 NA12 ZB352