

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年12月23日(23.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/147145 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/060207
- (22) 国際出願日: 2010年6月16日(16.06.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-143600 2009年6月16日(16.06.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人 東海大学(TOKAI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1510063 東京都渋谷区富ヶ谷2-28-4 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 良原 栄策(YOSHIHARA, Eisaku) [JP/JP]; 〒2591212 神奈川県平塚市岡崎3238-7 Kanagawa (JP). 光永滋樹(MITSUNAGA, Shigeki) [JP/JP]; 〒2270036 神奈川県横浜市青葉区奈良町2824-1-A 308 Kanagawa (JP). 猪子 英俊(INOKO, Hidetoshi) [JP/JP]; 〒2450002 神奈川県横浜市泉区緑園1-19-35 Kanagawa (JP).

- (74) 代理人: 内田直人, 外(UCHIDA, Naoto et al.); 〒1010051 東京都千代田区神田神保町1-37-4 友田三和ビル302 ウインググリーン特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: ANTI-GRAM-NEGATIVE BACTERIA AGENT

(54) 発明の名称: 抗グラム陰性菌剤

[図4]

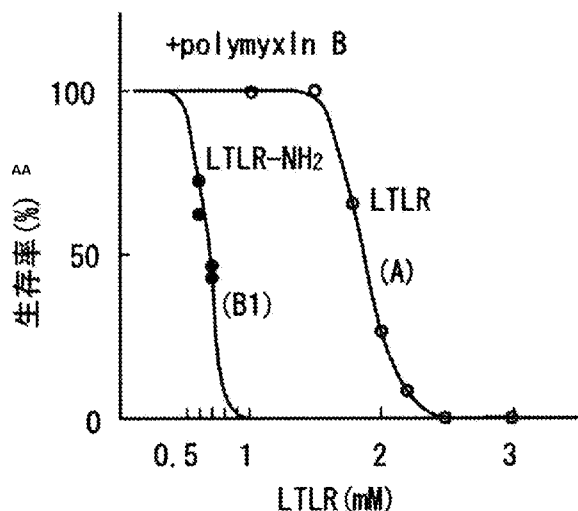


FIG. 4:
AA SURVIVAL RATE (%)

(57) Abstract: Provided are: a method for blocking the biosynthesis of an outer membrane protein (OMP), which is a protein required for the survival of bacteria, by inhibiting the formation of a YaeT complex in an outer membrane of a gram-negative bacterium; and a substance for use in the method, for the purpose of drastically solving the problem of the acquisition of multi-drug resistance of a gram-negative bacterium. Specifically disclosed is an anti-gram-negative bacteria agent which is characterized by being capable of inhibiting the formation of a YaeT complex to thereby exhibit a bactericidal activity, a proliferation-inhibiting activity and/or a drug excretion-inhibiting activity on gram-negative bacteria. The agent is preferably a peptide molecule comprising an amino acid sequence composed of at least LTLR or a peptide molecule comprising an amino acid sequence composed of at least FIRL.

(57) 要約: グラム陰性菌の外膜における Y a e T 複合体の形成を阻害することにより、菌の生存に必要な外膜タンパク質 (OMP) の生合成を遮断する方法及びそのための薬剤を提供し、以てグラム陰性菌の多剤耐性化の問題を根本的に解決することを目的とする。本発明は、Y a e T 複合体の形成を阻害することによりグラム陰性菌に対する殺菌作用、増殖阻害作用、及び/又は薬剤排出阻害作用を

発揮することを特徴とする抗グラム陰性菌剤を提供する。当該薬剤は、少なくとも L T L R からなるアミノ酸配列を含むペプチド分子又は少なくとも F I R L からなるアミノ酸配列を含むペプチド分子であるのが好ましい。



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称： 抗グラム陰性菌剤

技術分野

[0001] 本発明は、グラム陰性菌感染症の予防／治療に有効な薬剤に関する。より詳細には、グラム陰性菌の外膜に存在するYaeT複合体の形成を阻害することにより、グラム陰性菌に対する殺菌作用、増殖阻害作用、及び／又は薬剤排出阻害作用を発揮することのできる薬剤に関する。

背景技術

[0002] 多剤耐性の緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) や アシネトバクター・バウマニ (*Acinetobacter baumannii*) 等のグラム陰性菌は院内感染症の主要起因菌であり、免疫力が低下した患者を重篤な病態に至らしめる場合がある。これらの菌は多剤耐性を示すために感染症の治療が難しく大きな問題となっている。グラム陰性菌は内膜と外膜という二つの膜を備えており、抗生物質が有効に作用するためには、抗生物質はグラム陰性菌の複雑な膜構造を通過して細胞内部に到達する必要がある。ところが、薬剤修飾酵素、外膜の透過性の低下、標的の変化、薬剤排出ポンプによる薬剤の排出などによって抗生物質の効果が低下し、多剤耐性を獲得するものと考えられている。

[0003] 緑膿菌の多剤耐性獲得に大きく貢献しているのが多剤排出ポンプである。このポンプは、菌内部に入った薬剤をエネルギーを使って積極的に細胞外に輸送、排出する。多剤排出ポンプは幾つかのファミリーに分類され、それらの中で、様々な抗生剤を排出することが知られているRND (*resistance nodulation division*) ファミリーのポンプは3種類のサブユニットから構成されている。緑膿菌には複数のRND型ポンプが存在するが、そのうちで主要なポンプはMexAB-OprMポンプである。

[0004] 本発明者等は、緑膿菌のMexAB-OprMポンプに着目し、当該多剤

排出ポンプを構成するサブユニットであるO p r Mのアミノ酸配列を改変することにより、緑膿菌の薬剤排出ポンプ機能を阻害し、抗生剤の薬効を増強する方法を開発し、当該効果を奏する薬剤並びに当該薬剤をスクリーニングする方法を提案した（特許文献1）。しかしながら、標的配列において変異が生ずると、当該方法の効果が失われる可能性があった。

[0005] 一方、緑膿菌や大腸菌などを含むグラム陰性菌の研究が進んでおり、 β -バレルプロテイン（外膜の孔を形成するタンパク質）生合成にY a e T複合体が必須であることが知られるに至り（非特許文献1）、当該Y a e T複合体の立体構造も解明されてきている（非特許文献2）。Y a e Tは、Y f g L、Y f i O、N l p B及びS m p Aなる4つのリポタンパク質と複合体を形成することにより、外膜タンパク質（OMP）の生合成を司っている。言い換えれば、Y a e Tの複合体形成を阻害すれば薬剤排出ポンプを含むOMPの外膜への輸送を阻止することができると考えられる。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第WO 2 0 0 7 / 0 9 1 3 9 5号パンフレット

非特許文献

[0007] 非特許文献1：S e o k h e e K i m等、S c i e n c e、V o l. 3 1 7, p p. 9 6 1 - 9 6 4 (2007)

非特許文献2：R a j e e v M i s r a, A C S C h e m i c a l B i o l o g y, V o l. 2, p p. 6 4 9 - 6 5 1 (2007)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、上記の事情に鑑みてなされたものであり、グラム陰性菌の外膜におけるY a e T複合体の形成を阻害することにより、菌の生存に必要な外膜タンパク質（OMP）の輸送を遮断する方法及びそのための薬剤を提供し、以てグラム陰性菌の多剤耐性化の問題を根本的に解決することを目的とす

る。

課題を解決するための手段

- [0009] よって本発明は、Y a e T複合体の形成を阻害することによりグラム陰性菌に対する殺菌作用、増殖阻害作用、及び／又は薬剤排出阻害作用を発揮することを特徴とする抗グラム陰性菌剤を提供する。

発明の効果

- [0010] 本発明によれば、従来の抗生物質の存在下及び／又は非存在下で、グラム陰性菌のY a e T複合体形成を阻害し、それによりグラム陰性菌に対する殺菌作用、増殖阻害作用、及び／又は薬剤排出阻害作用が発揮されるため、外膜タンパク質の変異による多剤耐性化の問題が根本的に解決される。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1] グラム陰性菌の外膜及び内膜並びにY a e T複合体と外膜タンパク質との関係を説明する模式図である（非特許文献1から引用）。
- [図2] 種々のグラム陰性菌のY f g Lの、Y a e Tとの結合部位のアミノ酸配列を比較する図である。
- [図3] 種々のグラム陰性菌のY f i Oの保存領域のアミノ酸配列を比較する図である。
- [図4] L T L RおよびL T L R-NH₂のP A O 1株に対する殺菌作用の濃度依存性を示したグラフである。
- [図5] L T L R-NH₂（5 mM）の存在および非存在下でのn a l B株のO F L Xに対する感受性の変化のグラフである。
- [図6] L T L R-NH₂（5 mM）の存在および非存在下でのn a l B株のA Z Tに対する感受性の変化のグラフである。
- [図7] F I R L-NH₂（1. 5 mM）の存在および非存在下でのn a l B株のO F L Xに対する感受性の変化のグラフである。
- [図8] 角膜潰瘍モデル（実施例7）における細菌数変化を示すグラフである。
- [図9] 角膜潰瘍モデル（実施例7）における12時間後の角膜の外観を示す写真である。

[図10]角膜潰瘍モデル（実施例7）における24時間後の角膜の外観を示す写真である。

[図11]角膜潰瘍モデル（実施例7）における臨床スコア変化を示すグラフである。

[図12]肺炎モデル（実施例8）における細菌数変化を示すグラフである。

[図13]肺炎モデル（実施例8）における細菌数変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 上記したように、本発明の抗グラム陰性菌剤は、Y a e T複合体の形成を阻害することにより、グラム陰性菌に対する殺菌作用、増殖阻害作用、及び／又は薬剤排出阻害作用を発揮することを特徴とする。

[0013] 本発明における「グラム陰性菌」なる用語は、一般に用いられている意味で使用される。即ち、グラム染色においてクリスタルバイオレットによる染色が脱色される細菌の総称である。代表的なグラム陰性菌としては、大腸菌（*Escherichia coli*）、サルモネラ菌、シュードモナス、ヘリコバクター等のプロテオバクテリア及びシアノバクテリアが含まれる。医学に関連して分類すると、桿菌としては、呼吸器系の傷害を惹起する緑膿菌、インフルエンザ菌など、泌尿器系の障害を惹起する大腸菌、ミラビリス変形菌など、消化器系の障害を惹起するヘリコバクター・ピロリ、ゲルトネル菌などが挙げられ、球菌としては、髄膜炎菌、カタラリス菌、淋菌が挙げられる。

[0014] グラム陰性菌におけるY a e T複合体は、膜タンパク質であるY a e Tに、Y f g L、Y f i O、N l p B及びS m p Aなる4つのリポタンパク質が集合して構成されている。中でも、Y a e T複合体がOMPの生合成を行うためには、Y f g L及びY f i Oが結合することが必須とされており、これらのY a e Tへの結合を阻害することによりOMPは生合成されないことになる。

[0015] よって、本発明の第一の態様は、Y a e TとY f g Lとの結合を阻害することを特徴とする抗グラム陰性菌剤である。

この態様の薬剤を探索するに当たり、本発明者等は、各種グラム陰性菌の Y f g L の Y a e T への結合部位のアミノ酸配列を比較し（図 2 参照）、高度に保存されている領域を検討した。図 2 において、四角で囲んだ領域が高度に保存されたアミノ酸残基を示しているが、これらの中で「A」で示した領域のアミノ酸配列を基にして様々なペプチド分子を合成し、その作用を確認した。

[0016] その結果、アミノ酸配列「L T L R」を含むペプチド分子を用いた場合、Y a e T と Y f g L との結合と競合し、それらの結合を有効に阻害できることを見出した。従って、本発明の抗グラム陰性菌剤は、少なくとも L T L R からなるアミノ酸配列を含むペプチドであるのが好ましい。

[0017] 次に、本発明の第二の態様として、Y a e T と Y f i O との結合を阻害することに着目した。各種グラム陰性菌の Y f i O のアミノ酸配列を比較したのが図 3 である。高度に保存された領域の中で、アミノ酸配列「F I R L H P」を有するペプチド分子が、Y a e T と Y f i O との結合と競合し、それらの結合を有効に阻害できることを見出した。当該ペプチド分子は、アミノ酸配列「F I R L H P」全てを含まなくても、その一部のアミノ酸配列「F I R L」又は「I R L H」を含んでいれば有効であることも確認された。従って、本発明の抗グラム陰性菌剤は、少なくとも F I R L 又は I R L H からなるアミノ酸配列を含むペプチドが好ましく、特に、少なくとも F I R L H P からなるアミノ酸配列を含むペプチドであるのが好ましい。

[0018] また、上記のペプチド分子は、化学修飾されていてもよい。例えば、ペプチド分子の C 末端をアミド化したものは、未修飾のペプチド分子に比較して殺菌作用が格段に向上する。本発明者等は、C 末端の負電荷がアミド基によって打ち消されるために膜透過性が向上した結果ではないかと考えている。

[0019] しかしながら、逆に上記ペプチド分子の N 末端をアセチル化したものは、その殺菌作用が低下した。

従って、本発明の抗グラム陰性菌剤は、前記のペプチド分子の C 末端をアミド化したものであるのが好ましい。

[0020] 本発明において標的としているY a e TとY f g L及びY f i Oとの相互作用部位は菌の外膜と内膜の間にあるペリプラズムに存在する（図1参照）。従って、本発明の薬剤（ペプチド分子）が外部から作用部位に到達するためには、外膜を通過する必要がある。

特に未修飾の場合、実用的な濃度で有効性を発揮させるためには、外膜の透過性を向上させる薬剤と同時投与するのが好ましい。

[0021] 外膜の透過性を向上させる作用を有する薬剤としては、特に限定されるものではないが、細胞膜変質作用を有する抗生剤が挙げられる。具体的には、ポリミキシンB、コリスチン等である。

[0022] 一方、C末端をアミド化したペプチド分子の場合、上記したようにC末端の負電荷が消失しているので、それ自身で外膜を通過できると考えられる。実際に、ポリミキシンBではなく、膜変質作用を持たない抗生剤であるアズトレオナム（ β ラクタム剤）を同時投与した場合にも菌の生存率の低下が確認された。

[0023] 即ち、本発明のアミド化ペプチド分子を用いる場合、膜変質作用を有する抗生剤を同時投与しなくても、当該ペプチド分子が外膜を通過してY a e T複合体形成部位に到達し、外膜タンパク質の生合成を阻害すると思われる。従って、例えば、膜変質作用を持たない抗生剤を同時投与した場合には、本発明のアミド化ペプチド分子の作用によって膜が脆弱化し、その結果抗生剤に対しより感受性となり、殺菌効果を奏すると考えられる。

[0024] よって、本発明の第三の態様は、本発明の抗グラム陰性菌剤（修飾／未修飾）と、抗生剤（膜変質作用の有無によらない）とを含有することを特徴とする、グラム陰性菌感染症の治療薬である。

[0025] 膜変質作用を持たない抗生剤としては、特に限定されず、従来から一般に使用されているものが使用できる。例えば、セファロスポリン系抗生剤であるセファレキシン、セフォタキシム等、フルオロキノロン系抗生剤であるオフロキサシン、シプロフロキサシン等、アミノグリコシド系抗生剤であるアミカミン等、カルバペネム系抗生剤であるメロペネム等が挙げられる。

実施例

[0026] 以下に具体例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

以下に示す実施例等において、グラム陰性菌（緑膿菌又は大腸菌）の生菌数の測定方法は次の通りである。

37℃で一晩培養した菌の一部をフレッシュなMH培地に添加して、同じ温度で培養を続ける。菌の濁度（600nmでの吸光度）が0.7?0.8に達したとき、その菌液をMH培地に加えて100?200倍希釈した菌液を調製し、実験に供する。

菌液60?80μLとペプチド等の溶液を加えて最終的に100μLにした溶液を37℃で攪拌しながら一定時間（3時間）培養する。培養後、菌液をPBS溶液で希釈し、その希釈液をMH寒天プレートに播き、37℃で一晩培養する。翌日プレートに生えたコロニーの数をカウントすることで生菌数を求める。

[0027] （実施例1）

上記の実験系で、ポリミキシンB（polymyxin B）（最終濃度は0.4μg/mL）（この濃度では緑膿菌の生存に影響がない）を添加して、緑膿菌（PAO1株）を培養した。この時、さらにペプチドLTLR（ロイシンスレオニンーロイシンーアルギニンの配列をもつ4アミノ酸残基からなるペプチド）を種々の濃度で加えた条件で培養した。それぞれの条件下で、緑膿菌の生菌数を測定し、ペプチドを添加しないときの生菌数に比べて、ペプチド添加によって生菌数がどのように変化するかを測定した。結果を図4（A）のグラフに示した。

[0028] 0.4μg/mLのポリミキシンB存在下で、緑膿菌の生存率は、ペプチドLTLRの濃度依存的に減少し、2.5mMのLTLRを加えて培養した場合には、緑膿菌の生存率はほぼ0%になった。

[0029] （比較例1）

実施例1において、ペプチドLTLRの4番目のアミノ酸（R）をグルタ

ミン酸（E）に置換したペプチドL T L Eを合成し、実施例1と同条件で、2. 5 mMのL T L Eを加えて生菌数の変化を測定した。その結果、緑膿菌の生存率の減少は観察されなかった。従って、実施例1で観察された抗菌作用はアミノ酸配列（L T L R）に特異的であることが示唆された。

（比較例2）

実施例1において、ペプチドL T L Rのアミノ酸配列をランダム化したペプチドL R T Lを合成し、実施例1と同条件で、2. 5 mM のL R T Lを加えて生菌数の変化を測定した。その結果、緑膿菌の生存率の減少は観察されなかった。従って、実施例1で観察された抗菌作用はアミノ酸配列（L T L R）に特異的であることが示唆された。

[0030] （実施例2）

実施例1で使用したP A O 1株（標準株）の緑膿菌に代えて、臨床分離株（*P. aeruginosa* 24, 42, 83, 88および92）、*nalB*株（薬剤排出ポンプである*MexAB-Op rM*を高発現し、高度多剤耐性となった株）、及び*nfxC*株（薬剤排出ポンプである*MexEF-Op rN*を高発現し、高度多剤耐性となった株）を用い、それらに対するL T L Rの作用を測定した。この実験では*polymyxin B*の最終濃度を0. 2 μ g/mLし、3 mMのL T L Rを添加して生存率の変化を調べた。その結果を下記の表1に示す。

[0031] [表1]

菌株	生存率(%)
<i>P.aeruginosa</i> 24	0
<i>P.aeruginosa</i> 42	43
<i>P.aeruginosa</i> 83	0
<i>P.aeruginosa</i> 88	25
<i>P.aeruginosa</i> 92	9
<i>nalB</i>	0
<i>nfxC</i>	1

[0032] 生存率が最も高かった臨床分離株（*P. aeruginosa* 42株）であっても、その生存率は半数以下であり、いわゆる高度剤耐性株である *nal* B株や *nfx* C株においても菌の生存率はほぼゼロであり、本発明のペプチドが多剤耐性菌に対しても有効であることが確認された。

[0033] （実施例 3）

緑膿菌のかわりに大腸菌（ATCC 25922）を用い、実施例 2 と同様の測定を行った。その結果、大腸菌の生存率は約 1% という結果が得られた。これにより LTLR は、緑膿菌のみならず大腸菌を含むグラム陰性菌全般にも作用することが示唆された。

[0034] （比較例 2）

アミノ末端をアセチル化した LTLR を合成し、その作用を調べた。実施例 1 と同じ条件下で、LTLR をアセチル化 LTLR に変えて緑膿菌の生存率を調べた。その結果、生存率の減少は観察されず、アセチル化することで抗グラム陰性菌活性が著しく低下したことが示された。

[0035] （実施例 4）

カルボキシ末端をアミド化した LTLR を合成し、その作用を調べた。実施例 1 と同じ条件下で、種々濃度のアミド化 LTLR を加えて、緑膿菌の生存率の変化を検討した。その結果を図 4（B）に示す。アミド化によって LTLR の活性が増加した事を示しており、カルボキシ末端のアミド化はペプチドの保護作用とともにその活性の増大にも関与することが明らかとなった。

同様の実験結果は大腸菌に対しても得られた。

[0036] （比較例 3）

LTLR の長さを変えたときに活性にどのように影響するかを調べるために、カルボキシ末端をアミド化した TLR および LR をそれぞれ合成し、その活性を測定した。実施例 4 と同様の条件下で、アミド化した TLR あるいは LR を 10 mM の濃度加えて、緑膿菌に対する作用を調べた。その結果、菌の生存率の減少は見られなかった。

[0037] (実施例 5)

抗生剤として、膜変質作用を有するポリミキシンBに代えて、オフロキサシン (OFLX) 又はアズトレオナム (AZT) を使用した系で、実施例 4 と同様の実験を行った。結果を図 5 及び図 6 に示す。OFLX 又は AZT のいずれを用いた系でも、アミド化ペプチド分子 (LTLR) を添加した場合、同じ抗生剤濃度における多剤耐性株 (NaIB) の緑膿菌の生存率は添加しない場合に比較して格段に低下した。即ち、本発明のアミド化ペプチド分子は、外膜を通過して標的部位に到達し、菌を脆弱化したことが示唆された。従って、本発明のアミド化ペプチド分子は、アズトレオナム等の抗生剤の効果を向上させる作用を有することが確認された。

[0038] (実施例 6)

ペプチド分子として、Ye a T と Y f i O との結合を阻害する F I R L (Y f 2 B 1) を用い、緑膿菌 (n a i B) で実施例 1 と同様の実験を行った。結果を図 7 に示す。

Ye a T と Y f i O との結合を阻害するペプチド分子は更に優れた抗グラム陰性菌作用を示すことが確認された。

[0039] 本発明の抗グラム陰性菌剤の一例であるペプチド F I R L 及びそのアミド化物を用いて以下の動物実験を実施した。

[0040] (実施例 7)

緑膿菌感染によるウサギ角膜潰瘍モデルを用いた実験

日本白色家ウサギ (2 k g、雄) の角膜中央部に傷をつけて多剤耐性緑膿菌 (MDRP) を接種することにより潰瘍を形成させた。ウサギを以下の 3 群 (5 匹ずつ) に分け、接種の 6 時間後から各群に次の薬剤の点眼を開始した。点眼は MDRP 接種後 6 時間、12 時間、18 時間の 3 回行った。

第 1 群：生理食塩水 (コントロール)

第 2 群：オフロキサチン (OFLX) 点眼薬 (タリビット点眼液 0.3%、参天製薬)

第 3 群：OFLX 点眼薬と 50 mM の F I R L / 生理食塩水の混合液

[0041] 潰瘍形成 12 時間後（点眼開始 6 時間後）及び潰瘍形成 24 時間後（点眼開始 18 時間後）に、各群について菌数を測定した。測定方法は次の通りである。

眼脂と角膜を回収し、5 mL の生理食塩水を加えてすり鉢で乳化し、NAC 寒天培地に播種し、24 時間後に菌数をカウントした。結果を図 8 のグラフに示す。

[0042] 潰瘍形成 12 時間後（点眼開始 6 時間後）、潰瘍形成 18 時間後（点眼開始 12 時間後）及び潰瘍形成 24 時間後（点眼開始 18 時間後）に、各群の角膜実質の混濁を観察し、次の方法で臨床スコアを決定した。

角膜潰瘍部を軸に観察領域を 12 象限に分割し、各象限における混濁の有無を、混濁有り：1、混濁無し：0 により数値化し、各検体に関する臨床スコア（12 象限の合計値）を算出する。

潰瘍形成 12 時間後及び 24 時間後の各群の検体における角膜の外観を図 9 及び図 10 に示し、潰瘍形成後 12 時間から 24 時間の臨床スコアの変化を図 11 に示す。

[0043] 図 8 ～ 11 に示した結果から明らかなように、従来の抗菌剤である OFLX を投与した第 2 群では、潰瘍形成後 12 時間の時点ではコントロール群（第 1 群）より菌数が増加しているのに対し、本発明のグラム陰性菌剤（FIRL）を同時投与した第 3 群では 12 時間後には菌数が格段に減少しており、本発明の抗グラム陰性菌は即効性に優れている。また、臨床スコアにおいても、本発明のグラム陰性菌剤を動じ投与した第 3 群では、OFLX のみを投与した第 2 群に比較して混濁の解消が早く、その効果も大きいことがわかる。

[0044]（実施例 8）

緑膿菌感染によるマウス肺炎モデルを用いた実験

Balb/c マウス（7～8 週齢、雌）の気管に、 10^7 CFU/マウスの緑膿菌（PAO1 株）を作用させて肺炎モデルマウスとした。マウスを以下の 4 群（5 匹ずつ）に分け、各群に次の薬剤、各 30 μ L を緑膿菌感染と同

時に経気管投与した。

第1群：生理食塩水（コントロール）

第2群：アミド化F I R L（2.5 mM）

第3群：硫酸コリスチン（4.7 mg/kg）

第4群：アミド化F I R L（2.5 mM）と硫酸コリスチン（4.7 mg/kg）の混合液

6時間後にマウスを屠殺し、細菌数（CFU）を測定した。結果を図12に示す。

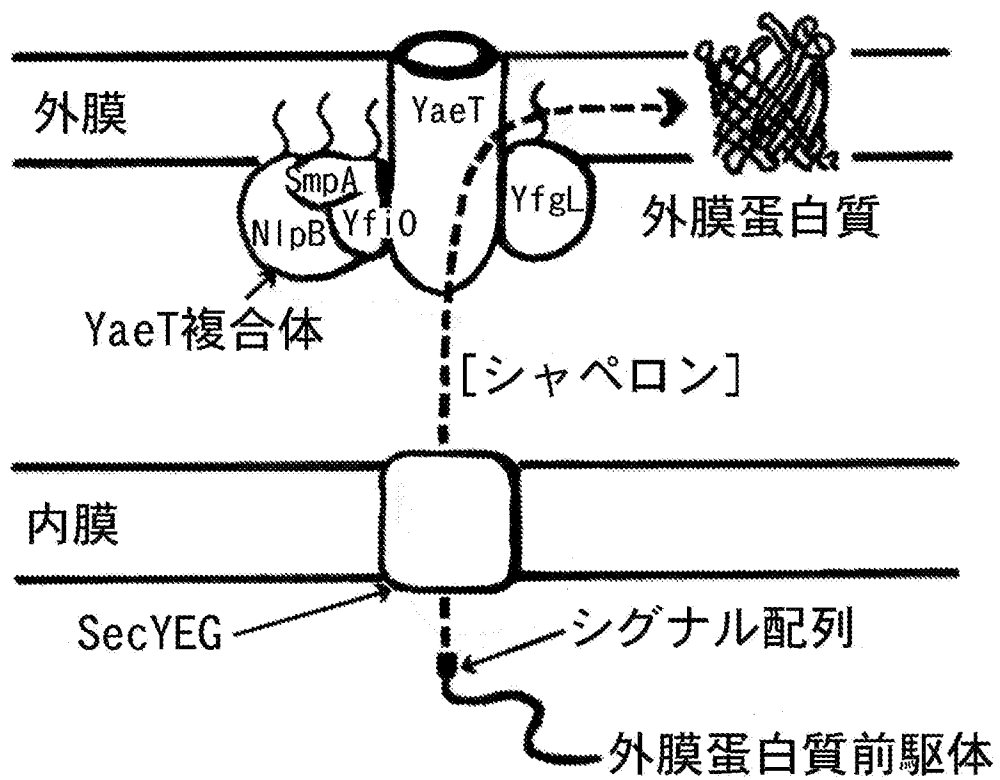
[0045] 次に、アミド化F I R Lの濃度を5.0 mMとし、硫酸コリスチン（4.7 mg/kg）をレボフロキサシン（LVFX）（5.0 mg/kg）に置換した以外は前記と同様にして第1群から第4群までの細菌数（CFU）を測定した。その結果を図13に示す。

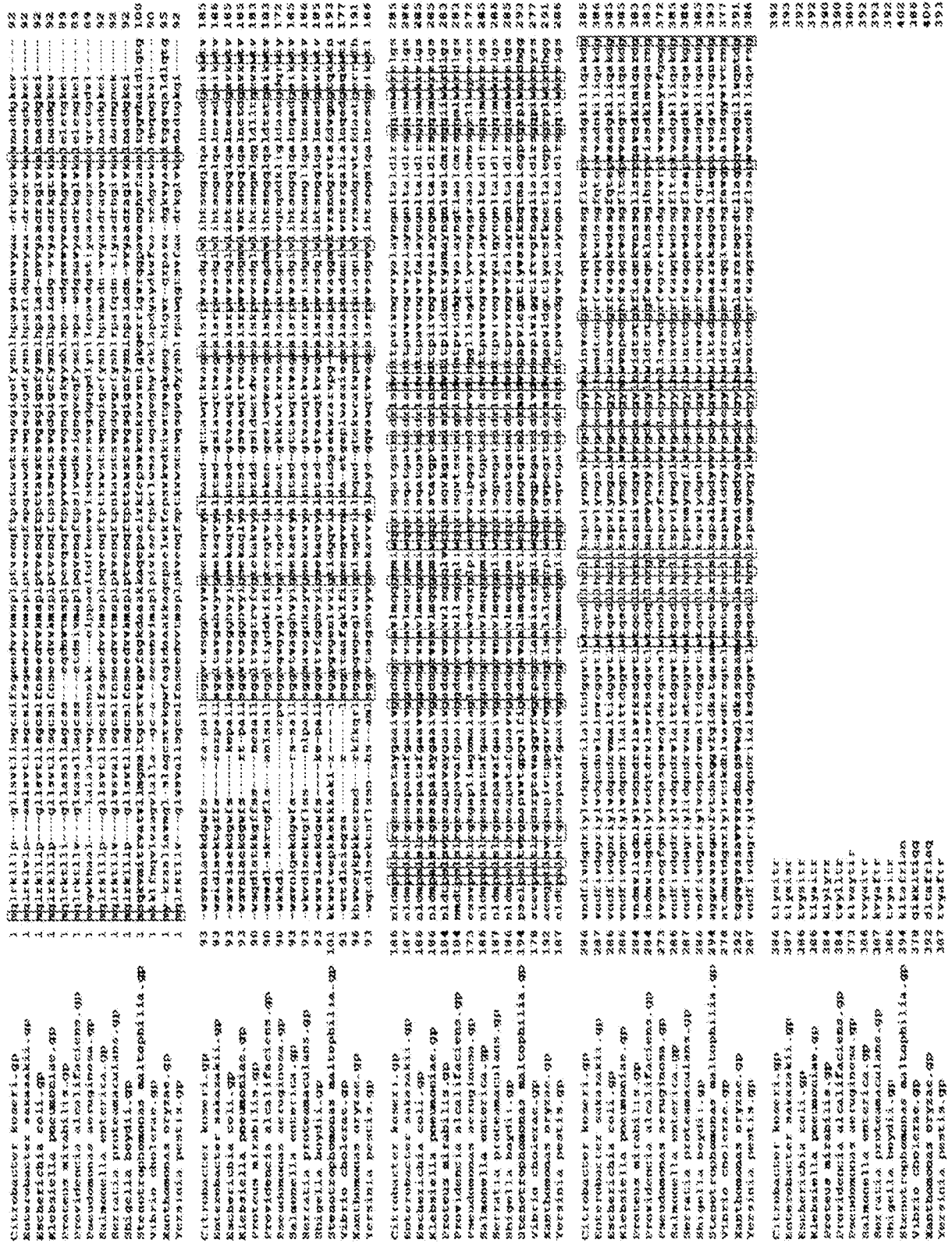
[0046] 図12及び図13に示した結果から、アミド化F I R L単独では肺炎モデルに対して即効性は見られなかったが（第2群）、他の抗菌薬と同時投与することにより相乗効果が得られ、他の抗菌薬のみを投与した第3群）に比較して細菌数が1/10程度に減少したことがわかる。

請求の範囲

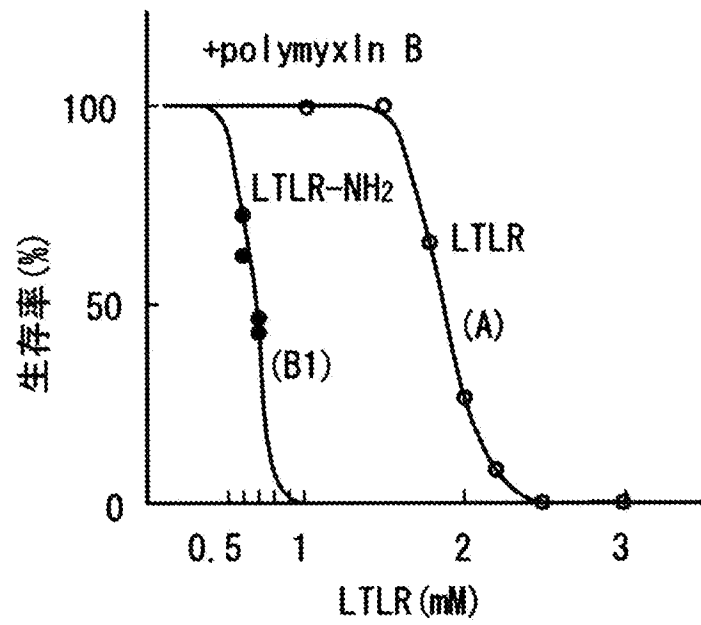
- [請求項1] Y a e T複合体の形成を阻害することによりグラム陰性菌に対する殺菌作用、増殖阻害作用、及び／又は薬剤排出阻害作用を発揮することを特徴とする抗グラム陰性菌剤。
- [請求項2] Y a e TとT f g Lとの結合を阻害することを特徴とする、請求項1に記載の抗グラム陰性菌剤。
- [請求項3] 少なくともL T L Rからなるアミノ酸配列を含むペプチド分子である、請求項2に記載の抗グラム陰性菌剤。
- [請求項4] Y a e TとY f i Oとの結合を阻害することを特徴とする、請求項1に記載の抗グラム陰性菌剤。
- [請求項5] 少なくともF I R L又はI R L Hからなるアミノ酸配列を含むペプチド分子である、請求項4に記載の抗グラム陰性菌剤。
- [請求項6] 少なくともF I R L H Pからなるアミノ酸配列を含むペプチド分子である、請求項5に記載の抗グラム陰性菌剤。
- [請求項7] 前記ペプチド分子のC末端がアミド化されていることを特徴とする、請求項3、5又は6に記載の抗グラム陰性菌剤。
- [請求項8] 請求項1から7のいずれか一項に記載の項グラム陰性菌剤と、抗生剤を含有することを特徴とする、グラム陰性菌感染症の治療薬。

[図1]

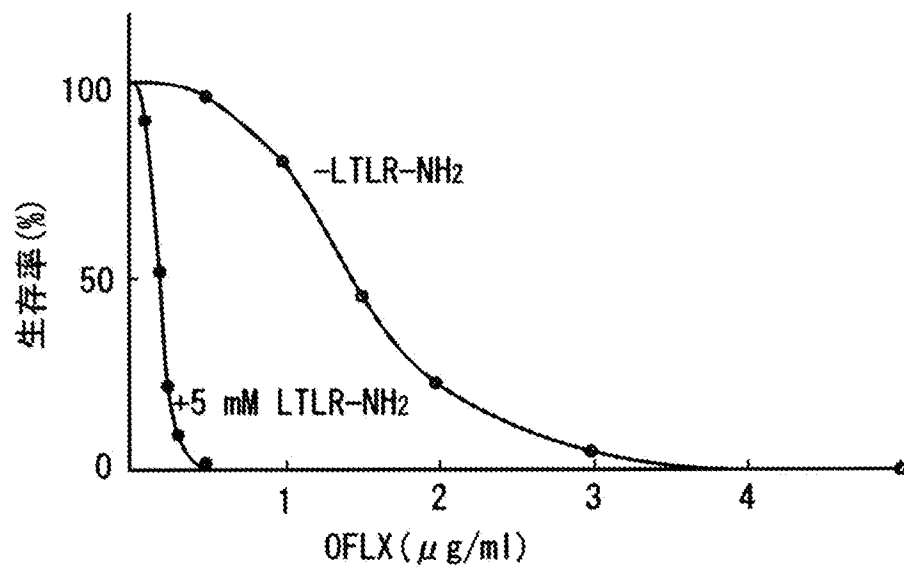




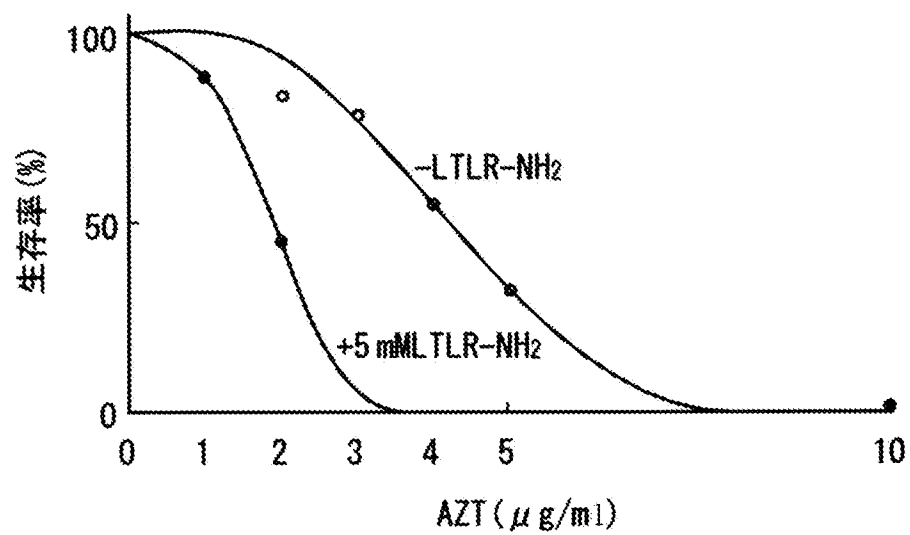
[図4]



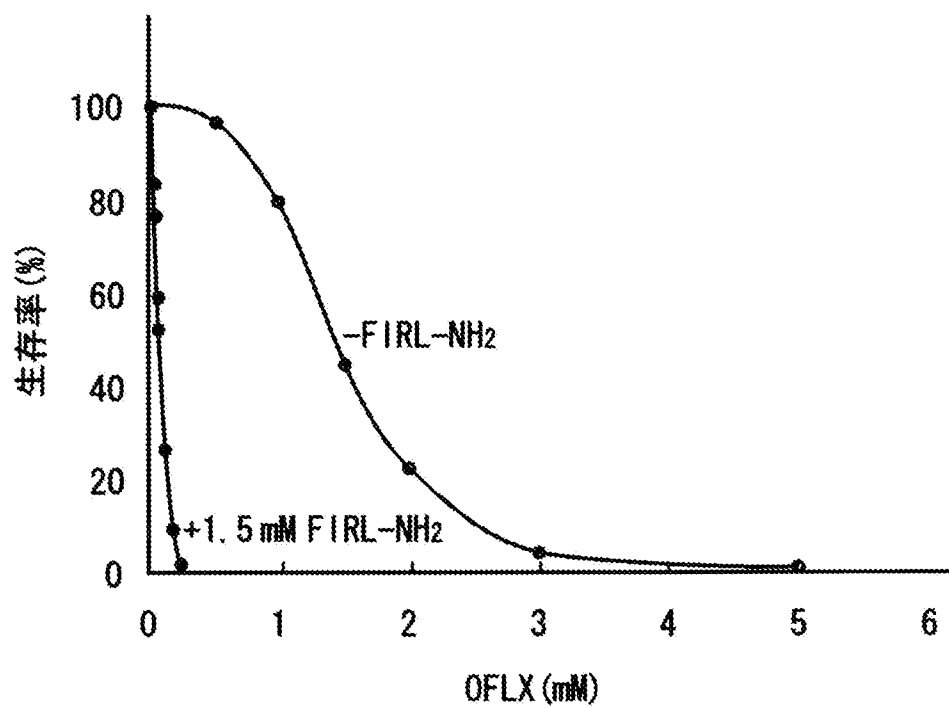
[図5]



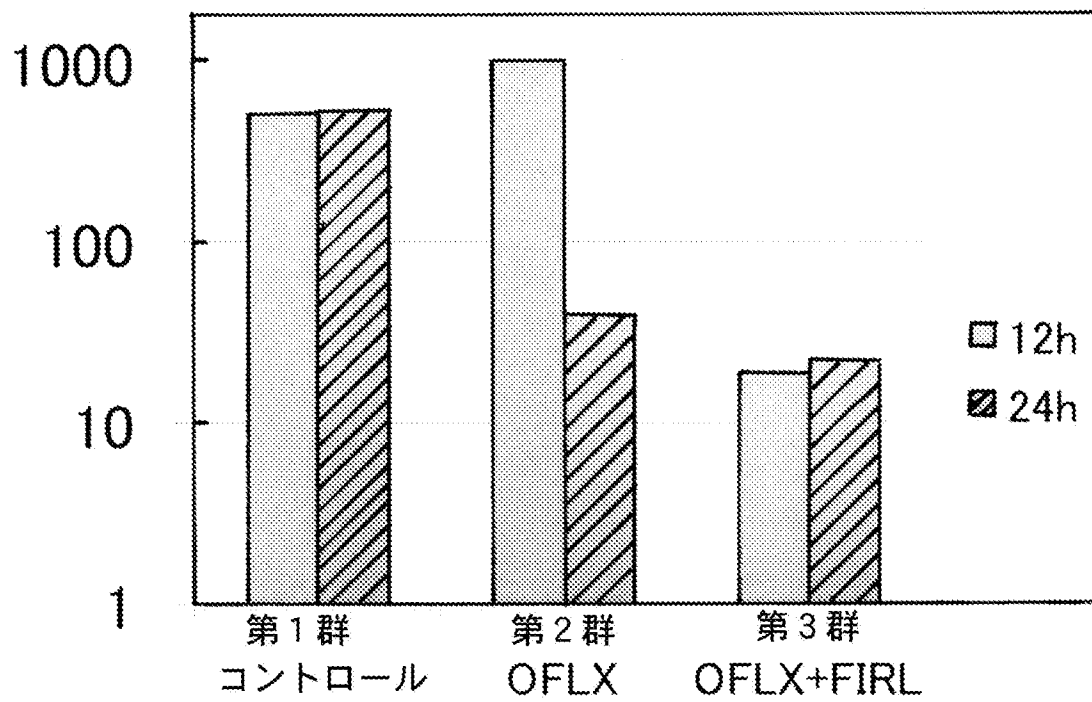
[図6]



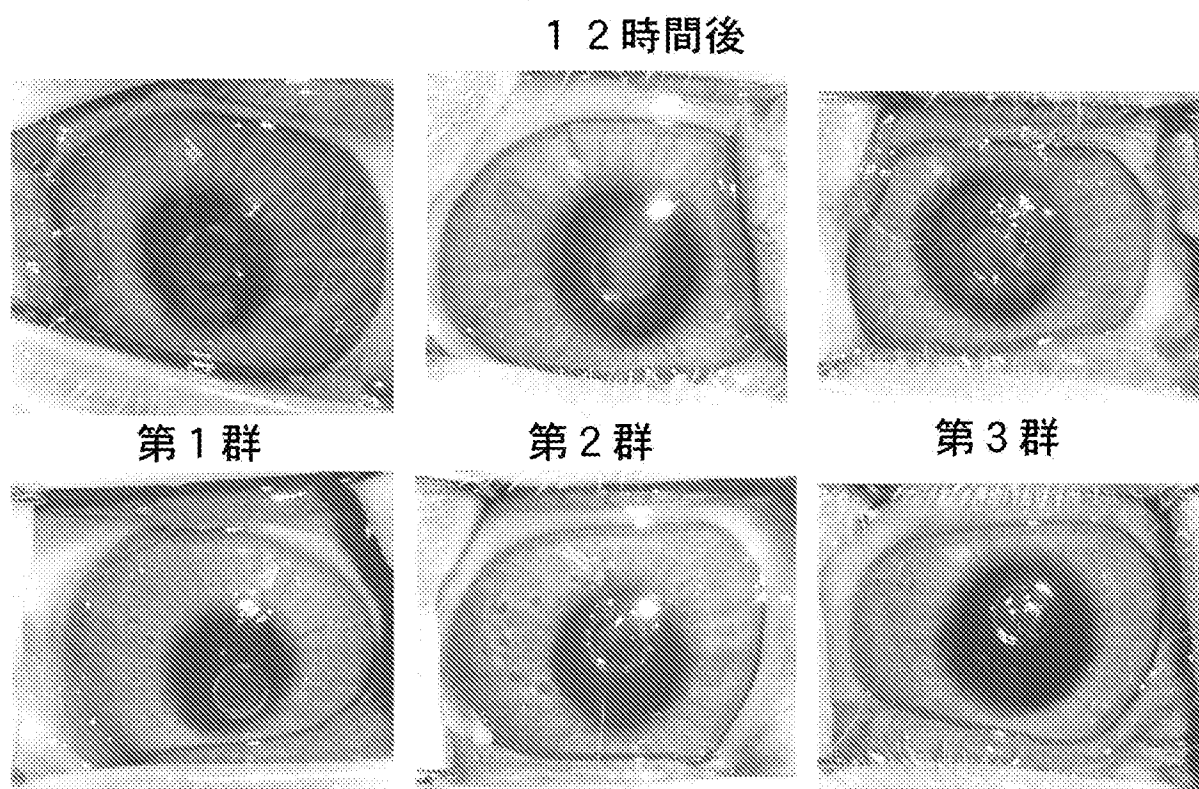
[図7]



[図8]

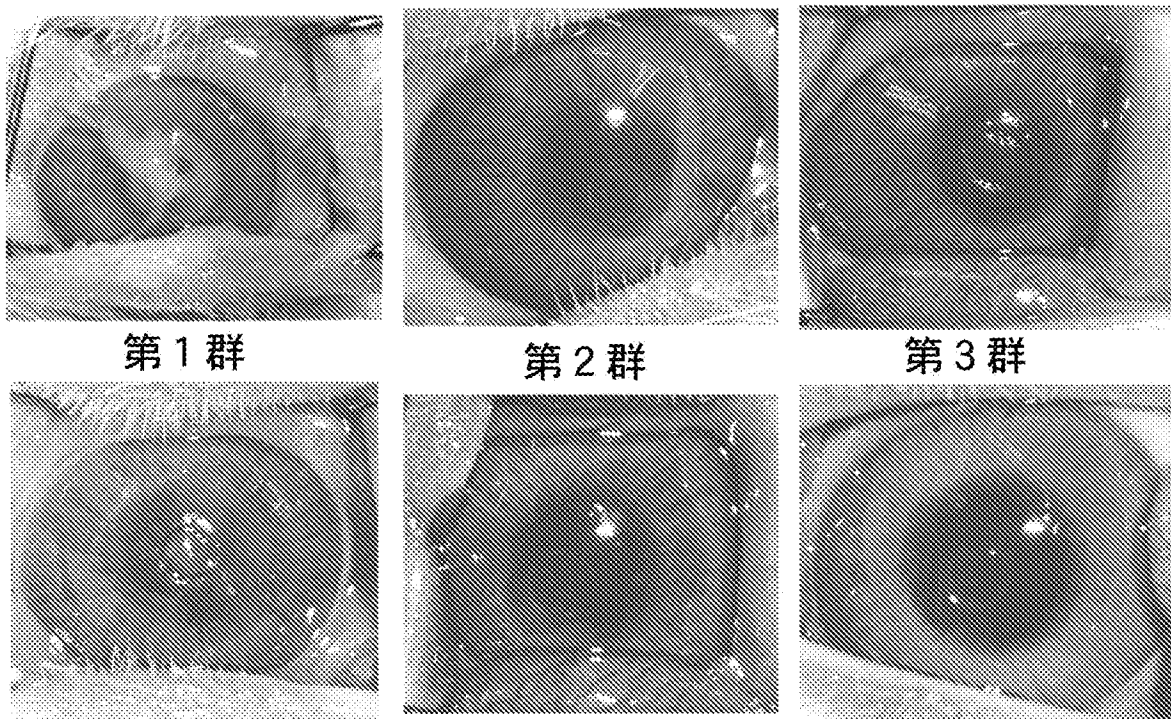


[図9]

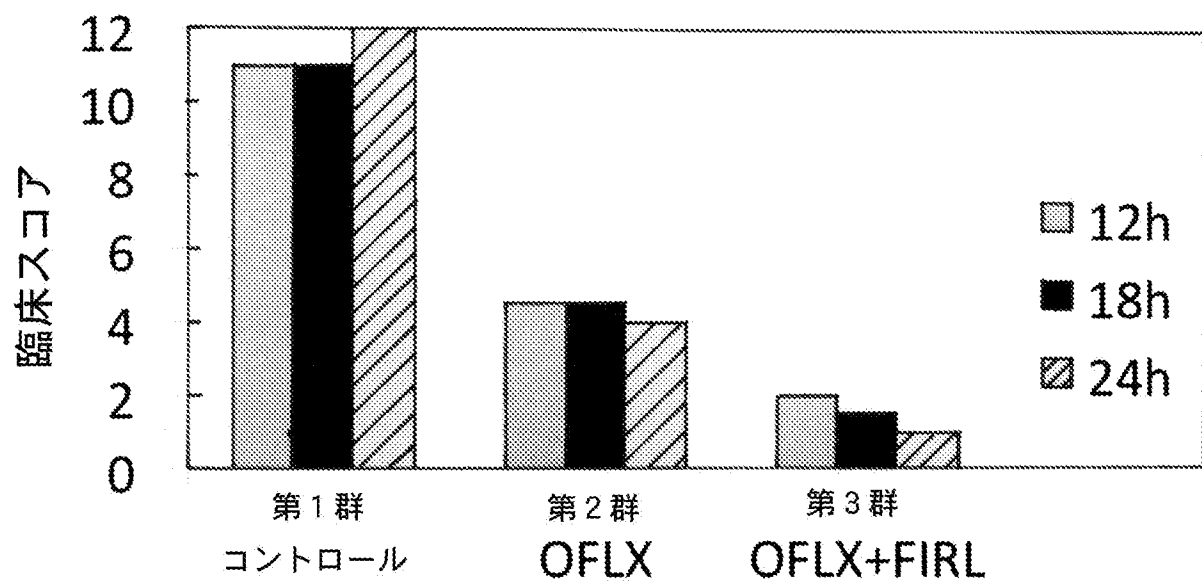


[図10]

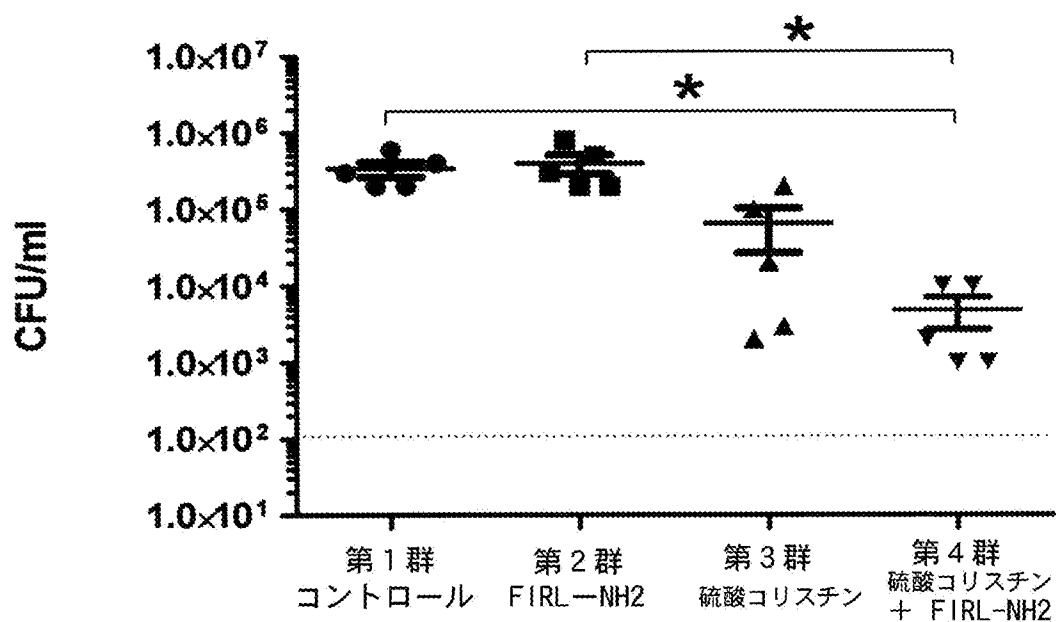
24時間後



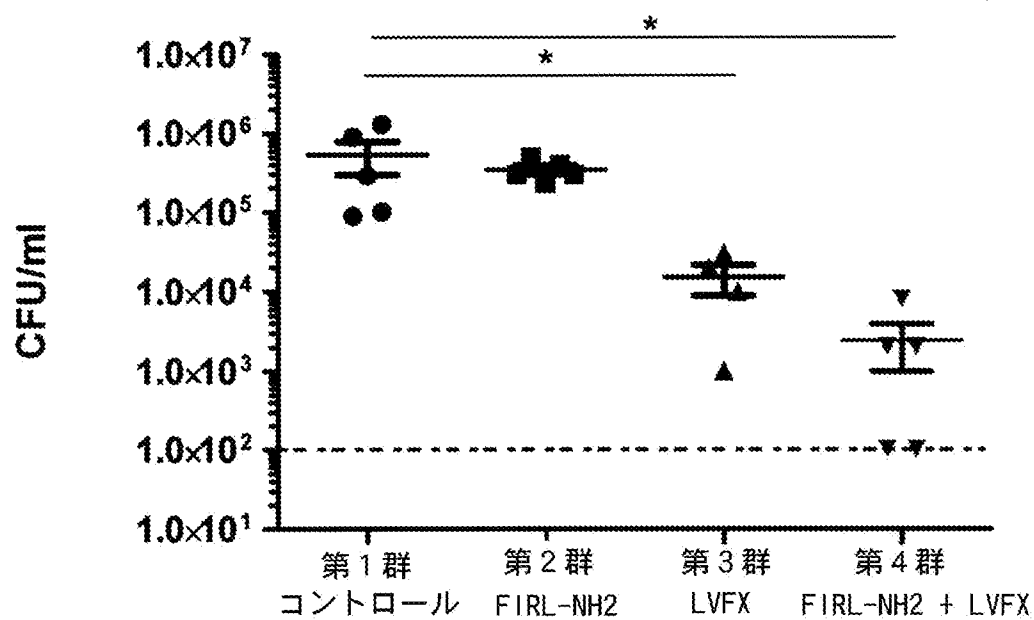
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i

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)

A61K45/00, A61K38/00, A61K45/06, A61P31/04

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Shin'ichi MATSUYAMA, "Gram Insei Saikin no Saibo Hyoso o Hyoteki to suru Kagaku Ryohozai ni Kansuru Kiso Kenkyu", Sankyo Foundation of Life Science Kenkyu Hokokushu, 2005, vol.21, pages 156 to 167 (particularly, page 159, line 8 to page 161, line 3, page 162, line 1 to page 163, line 6, page 164, lines 16 to 27)	1, 2, 4, 8 3, 5-7
A	TOKUDA, H., Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria, Biosci Biotechnol Biochem, 2009.03.07, Vol.73, No.3, p.465-73	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
06 September, 2010 (06.09.10)

Date of mailing of the international search report
14 September, 2010 (14.09.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

<Subject of search>

Claim 1:

Claim 1 relates to an "anti-gram-negative bacteria agent" which is defined by a desired property "characterized by inhibiting the formation of a YaeT complex to exhibit a bactericidal activity on gram-negative bacteria, a proliferation-inhibiting activity on gram-negative bacteria, and/or a drug excretion-inhibiting activity". Claim 1 includes all of the compounds having the property. However, just some of the compounds, which are effective when used in combination with other antibiotics, are disclosed in the meaning within PCT Article 5. Therefore, with respect to even just some compounds which are disclosed specifically, it is unclear as to whether or not the compounds have an "anti-gram-negative bacteria" activity. Therefore, it cannot be considered that claim 1 is supported by the disclosure of the description in the meaning within PCT Article 6.

Further, with regard to an "anti-gram-negative bacteria agent" which is defined by a desired property "characterized by inhibiting the formation of a YaeT complex to exhibit a bactericidal activity on gram-negative bacteria, a proliferation-inhibiting activity on gram-negative bacteria, and/or a drug excretion-inhibiting activity", even though the common technical knowledge at the time of filing the present application is taken into consideration, it is impossible to specify the scope of the compound having the property. Consequently, claim 1 does not comply with the requirement of clarity under PCT Article 6, either.

Claims 2 and 4:

See the statements relating to claim 1.

Claims 3, 5 and 7:

In claims 3 and 5-7, just a part of the amino acid sequences of the peptide molecules is specified. However, those peptide molecules which are disclosed in the meaning within PCT Article 5 are only peptide molecules each having an amino acid sequence LTLR, FIRL, IRLH or FIRLHP, and it is not mentioned about a matter that a peptide having any length is effective as long as the peptide contains the above-mentioned sequence, or it cannot be considered that there is such a common technical knowledge that a peptide having any length is effective as long as the peptide contains the above-mentioned sequence. Therefore, it cannot be considered that these claims are supported by the disclosure of the description in the meaning within PCT Article 6.

Claim 8:

As stated above, the anti-gram-negative bacteria agent described in claims 1-7 which are referred in claim 8 is not supported by the disclosure of the description in the meaning within PCT Article 6 and does not comply with the requirement of clarity under PCT Article 6. Similar comments apply to claim 8 which refers to these claims.

(continued to next sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060207

Such being the case, the search was carried out on the relationship between YaeT, YfgL (although there is found an expression "TfgL" in claim 2, the search was carried out under the understanding that the expression is an typographical error and is correctly to be read as "YfgL" in the light of the statements in the description) or YfiO and a bactericidal activity on gram-negative bacteria, a proliferation-inhibiting activity on gram-negative bacteria and/or a drug excretion activity, and was also carried out on an anti-gram-negative bacteria agent comprising a peptide having an amino acid sequence comprising LTLR, FIRL, IRLH or FIRLHP as an active ingredient.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00, A61K38/00, A61K45/06, A61P31/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	松山伸一, グラム陰性細菌の細胞表層を標的とする化学療法剤に関する基礎研究, 三共生命科学研究振興財団研究報告集, 2005, Vol. 21, p. 156-167 (特に、第 159 頁 8 行-第 161 頁 3 行、第 162 頁 1 行-第 163 頁 6 行、第 164 頁 16-27 行)	1, 2, 4, 8 3, 5-7
A	TOKUDA, H., Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria, Biosci Biotechnol Biochem, 2009.03.07, Vol. 73, No. 3, p. 465-73	1-8

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 0 9 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 4 . 0 9 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4 C

9 8 2 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

<調査の対象について>

○請求項1

請求項1は、「Y a e T複合体の形成を阻害することによりグラム陰性菌に対する殺菌作用、増殖阻害作用、及び／又は薬剤排出阻害作用を発揮することを特徴とする」という所望の性質により定義された「抗グラム陰性菌剤」に関するものである。そして、請求項1は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT 第5条の意味において開示されているのは、そのうちのごく一部の化合物について、他の抗生剤と併用した際に有効であることのみである。したがって、具体的に開示されたごく一部の化合物についてさえ、「抗グラム陰性菌」作用を有するか不明であり、PCT 第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「Y a e T複合体の形成を阻害することによりグラム陰性菌に対する殺菌作用、増殖阻害作用、及び／又は薬剤排出阻害作用を発揮することを特徴とする」という所望の性質により定義された「抗グラム陰性菌剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求項1は、PCT 第6条における明確性の要件も欠いている。

○請求項2, 4

請求項1についてを参照。

○請求項3, 5, 7

請求項3, 5-7は、ペプチド分子のアミノ酸配列の一部のみが特定されているが、PCT 第5条の意味において開示されているのは、L T L R, F I R L, I R L H, 又はF I R L H P からなるアミノ酸配列のペプチド分子のみであり、当該配列を含みさえすればいかなる長さのペプチドであっても有効であることは示されていないし、そのような技術常識があるとも認められない。したがって、PCT 第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

○請求項8

請求項8で引用する請求項1-7に記載の抗グラム陰性菌剤は、上記の通り、PCT 第6条の意味での明細書の開示による裏付け及び明確性の要件を欠くものであるから、それを引用する請求項8についても同様である。

よって、調査は、Y a e T, Y f g L (なお、請求項2には、「T f g L」との記載があるが明細書の記載を参考に、Y f g Lの誤記であるとして調査を行った。)、及びY f i Oとグラム陰性菌に対する殺菌作用、増殖阻害作用、及び／又は薬剤排出阻害作用との関係について、及び、L T L R, F I R L, I R L H, 又はF I R L H P からなるアミノ酸配列のペプチド分子を有効成分とする抗グラム陰性菌剤について行った。