

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-519217

(P2006-519217A)

(43) 公表日 平成18年8月24日(2006.8.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/315 (2006.01)	CO7K 14/315	4B024
AO1N 63/02 (2006.01)	AO1N 63/02 ZNAP	4B064
AO1P 3/00 (2006.01)	AO1P 3/00	4B065
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4C084
A61P 31/04 (2006.01)	A61P 31/04	4H011
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-502278 (P2006-502278)
 (86) (22) 出願日 平成16年2月16日 (2004. 2. 16)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年9月28日 (2005. 9. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2004/000592
 (87) 国際公開番号 W02004/072093
 (87) 国際公開日 平成16年8月26日 (2004. 8. 26)
 (31) 優先権主張番号 0303375.0
 (32) 優先日 平成15年2月14日 (2003. 2. 14)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0303369.3
 (32) 優先日 平成15年2月14日 (2003. 2. 14)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 505305754
 ザ・ユニヴァーシティ・オブ・ブリストル
 イギリス国ブリストルBS8 1TH. テ
 インダルアヴェニュー. セントハウス
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100105290
 弁理士 三輪 昭次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗菌剤

(57) 【要約】

抗菌剤として使用できる、S・ミティス及びS・オラリスから得ることができる抗菌性ペプチド；それらの変異体；それらのいずれかの断片。特異的なペプチドが同定された。これらのペプチドはS・ミティス又はS・オラリスの菌株により分泌される。これらは、特に、グラム陰性菌及びブドウ球菌 spp に対して活性である。このペプチドは使用のために分離が可能であり、又は、S・ミティス又はS・オラリスは、有益共生細菌（プロバイオチック）療法において使用することも可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ストレプトコッカス・ミティス若しくはストレプトコッカス・オラリスから得ることができる抗菌性ペプチド；又は、その変異体、又は、それらのいずれかの断片。

【請求項 2】

菌株がストレプトコッカス・ミティスである、請求項 1 記載の抗菌性ペプチド。

【請求項 3】

分子量が 2,300 未満である、請求項 1 又は 2 記載のペプチド。

【請求項 4】

分子量が 1,000 未満である、請求項 3 記載のペプチド。

10

【請求項 5】

分子量が 800 未満である、請求項 4 記載のペプチド。

【請求項 6】

ストレプトコッカス・ミティスから得ることができるペプチド、又は、その変異体、又は、それらのいずれかの断片を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 7】

配列番号 1：

$X^1 X^7 X^2 X^3 X^4 X^5 X^6$ (配列番号 1)

(ここで、

X^2 は、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸；

20

X^3 は、チロシン、トレオニン、又は、セリン；

X^1 、 X^4 及び X^6 は、非荷電の非極性アミノ酸、

X^5 は、荷電アミノ酸、

並びに、 X^7 は、システイン又はヒスチジンである)

のアミノ酸を少なくとも 7 個含む、治療で使用するためのペプチド。

【請求項 8】

X^7 が、システインである、請求項 7 記載のペプチド。

【請求項 9】

X^2 が、セリンである、請求項 7 又は 9 記載のペプチド。

【請求項 10】

X^3 が、チロシンである、請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載のペプチド。

30

【請求項 11】

X^1 、 X^4 及び X^6 が、イソロイシン、ロイシン、アラニン又はバリンから選ばれる、請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 12】

X^1 が、ロイシンである、請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 13】

X^4 が、イソロイシンである、請求項 7 ~ 12 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 14】

X^6 が、バリンである、請求項 7 ~ 13 のいずれかに記載のペプチド。

40

【請求項 15】

X^5 が、アスパラギン酸又はグルタミン酸である、請求項 7 ~ 14 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 16】

X^5 が、アスパラギン酸である、請求項 15 記載のペプチド。

【請求項 17】

配列番号 2：

L C S Y I D V (配列番号 2)

を含む、請求項 7 記載のペプチド。

【請求項 18】

50

さらに配列番号 1 に融合したアミノ酸を、N - および / または C - 末端に含む、請求項 7 ~ 17 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 19】

さらなるアミノ酸が、荷電性のアミノ酸を含み、そして、このペプチドの可溶性を増進させる、請求項 18 記載のペプチド。

【請求項 20】

ストレプトコッカス・オラリスから得ることができるペプチド、又はその変異体、又はそれらいずれかの断片の、いずれかである、請求項 1 のペプチド。

【請求項 21】

単離された、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載のペプチドを、製薬的に受容できる担体と組み合わせて含む医薬組成物。 10

【請求項 22】

治療で使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 23】

グラム陰性菌により引き起こされる感染症の治療において使用するための、請求項 7 ~ 20 又は 22 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 24】

ブドウ球菌 spp により引き起こされる感染症の治療において使用するための、請求項 7 ~ 20 又は 22 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 25】

抗菌性治療のための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載のペプチドの使用。 20

【請求項 26】

医薬品が、腸内細菌、ブルクホルデリア spp、ステノトロホモナス・マルトフィリア、及び、緑膿菌、アシネトバクター spp、又は、ブドウ球菌の感染症の治療のためのものである、請求項 25 記載の使用。

【請求項 27】

S . ミティス若しくは S . オラリス、又は、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載のペプチドを発現させるために操作された菌株の、細菌性グラム陰性細菌感染症の治療用医薬品の製造における使用。 30

【請求項 28】

S . ミティス若しくは S . オラリス、又は、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載のペプチドを発現させるために操作された菌株の、腸内細菌、ブルクホルデリア spp、ステノトロホモナス・マルトフィリア、及び、緑膿菌、アシネトバクター spp、又は、ブドウ球菌の感染症の治療用医薬品の製造における使用。

【請求項 29】

抗菌的に有効量の、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載のペプチドを、それを必要としている患者に投与することを含む細菌感染症の治療方法。

【請求項 30】

方法が、S . ミティス又は S . オラリスの菌株を培養すること、及び、それ由来のペプチドを単離することを含む、請求項 1 記載の抗菌性ペプチドを製造する方法。 40

【請求項 31】

請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載のペプチドをコードする核酸。

【請求項 32】

請求項 31 記載の核酸を含むベクター又はプラスミド。

【請求項 33】

請求項 32 記載のベクター又はプラスミドにより形質転換された組換え細胞。

【請求項 34】

請求項 17 で定義された配列番号 2 のペプチド以外の、請求項 7 で定義された配列番号 1 の抗菌性ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗菌剤、特にペプチドであって、なかでもグラム陰性菌に対して活性であり、そして、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus mitis*) 又はストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) から得ることができる抗菌剤に関する。

【背景技術】

【0002】

バクテリオシンは、乳酸菌 (LAB) によって産生される、有機酸、過酸化水素、ジアセチル及び阻害性酵素を含む、多くの抗菌性物質のうちの一つである。これらは、より厳密に、「近接して関連した細菌を殺すタンパク性化合物」として定義されているが、いくつかのものは、広い範囲の阻害性を有することが知られている。それらの抗菌作用は、ほとんどがもっぱら殺菌性 (bacteriocidal) である。(Mc Auliffe et al., 2001 FEMS Microbiology Letters. 25, 285-308 ; Van Kraaij et al., 1998, Biochemistry. 37, 16033-16040)。

10

【0003】

分子には、非細菌性生産物、例えば、セクロピン (cecropin) (昆虫が生産する)、インドリシジン (indolicidin) (ウシ好中球由来)、ラナレキシ (ranalexin)、マガイニン (magainin) 及びブフォリン (buforin) (ウシガエル由来)、並びに、細菌性生産物、例えば、マセドイン (macedoin) (ストレプトコッカス・マセドニクス (*Streptococcus macedonicus*) 由来)、Sala (唾液連鎖球菌 (*Streptococcus salivarius*) 由来)、ボビシン (bovicin) (ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*) 由来)、ペジオシン (pediocin) (ペジオコッカス spp (*pediococcus* spp.) 由来)、ミュータシン (mutacin) (ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) 由来)、及び、良く研究されているニシン (nisin) (ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) 由来) が含まれる (Hillman, J. D., 2002. Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. Antoine van Leeuwenhoek. 82, 361-366 ; Venema, K. 1995. Trends in Microbiology. 3, 299-304, Montville, T. J. et al., 1998. Applied Microbiological Biotechnology. 50, 511-519)。

20

【0004】

様々なグループが、多くの区別可能なバクテリオシンを定義している；クラスIは、珍しいアミノ酸、ランチオニン及び -メチル-ランチオニンを含む、小さな (< 5 kDa) ペプチドで、例としてはニシンが挙げられる。クラスIIのバクテリオシンは、小さく (< 5 kDa)、熱に安定な、Lanを含まない膜活性ペプチドであり、例えばペジオシンが挙げられる。クラスIIIのメンバーは、大きく (< 30 kDa)、熱に不安定なタンパク質である。第4のクラスは、活性のための非タンパク質部分を含んでいることが示唆されてる。

30

【0005】

それらの中のいくつかの分子は、その抗菌作用が研究されてきているが、主としてそれらの研究は食物腐敗をもたらす細菌、例えばリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) の抑制に限定されてきた。しかしながら、二つの研究がそれらのグラム陰性菌に対する効果を調べるために実施されてきた。その最初の研究は、ニシン及び非細菌性ペプチドを単独、並びに、臨床的に使用されている抗生物質と組み合わせて、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に対する効果を調べたものである (Giacometti, A et al., 1999, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 44, 614-645)。この研究において、示された最小殺菌濃度は $1.6 \sim 12.8 \text{ mg/mL}$ であり、ニシンの活性は顕著なものではなかった。二番目の研究では、非細菌性ペプチドのブフォリン、セクロピン及びマガイニンの抗菌活性が研究され、ある程度の活性は証明できたものの、この研究には細菌性ペプチドは含まれていない (Giacometti, A et al., 2000, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44, 1716-1719)。

40

【0006】

50

グラム陰性菌は、大きく2つのグループに分類することができる：

1. 発酵菌 (fermentors)、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 及び肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) ; 並びに
2. 非発酵菌 (non-fermentors)、例えば、緑膿菌、アシネトバクター spp (*Acinetobacter* spp.)、及び、ステノトロホモナス・マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*)。

【0007】

第一のグループは、腸内フローラに由来し、尿管感染を含む広い範囲の感染症を引き起こす可能性がある。第二のグループは、主に土壌及び水資源のような環境で見られ、免疫不全の、火傷の患者及び嚢胞性線維症 (cystic fibrosis) の患者で重篤な感染症を引き起こす可能性がある。これらの細菌はまた集中治療室で特に問題とされている。「発酵菌」が標準的な抗菌性治療、例えばアンピシリン (ampicillin) 及びシプロフロキシシン (ciprofloxacin) によるものに対して耐性を増加させてきているという事実にもかかわらず、セフトジジム (ceftazidime) 及びイミペネム (imipenem) のような医薬品は、多くの場合において、なお治療での使用が保証されている。

10

【0008】

しかしながら、非発酵菌は、多くの抗生物質に対しての自由に利用できるありったけの耐性機構を備えており、それらが組み合わされることにより、それらの細菌による感染症は実質的に治療が不可能である。それらの細菌はまた、通常そうした細菌を撲滅するために選択される最後の医薬品であるカルバペネム類 (carbapenems) を含む β -ラクタムの

20

【0009】

過去5年間に、シナシッド (synercid)、ダプトマイシン (daptomycin)、リネゾリド (linezolid)、オリタバンシン (oritavancin) 及び抗MASA β -ラクタムのような多くの新規な抗グラム陽性菌に対する医薬品が開発されてきたことは注目すべきである。しかしながら、発売されたもの、又は、治験第I相が開始されたと報じられたもの、のいずれにおいても、グラム陰性菌に対して活性がある分子は含まれていないように思われる。そのために、少なくとも5年間という時間枠の中で、高度耐性を有する非発酵菌による感染症の治療は困難であると思われる。この間において、従来抗生物質に対する細菌の耐性はさらに増加していくだろう。

30

【0010】

先に、正常のフローラ (この場合、嚢胞性線維症の患者に由来する) が、グラム陰性菌に対する抗菌作用を有することが報告されている (Cystic Fibrosis Symposium, Stockholm, 2000)。

【0011】

ビリダンス連鎖球菌 (viridans Streptococci) 又は「緑色連鎖球菌 (Streptococcus viridans)」として知られる連鎖球菌のグループは、鼻咽頭の正常フローラの一部を占めており、通常は無害であると考えられるが、一旦血液のような無菌的な部位に侵入した場合に、感染性の心内膜症を引き起こすことがある。

40

【0012】

唾液連鎖球菌 (*Streptococcus salvarius*) は、ビリダンス連鎖球菌グループのメンバーである。この菌株 (Ross, K. F. et al., 1993. Applied Environmental Microbiology, 59, 2014-2021) 及び他のストレプトコッカス・ミュータンス (Hillman, 2002 前出) のようなこのグループのメンバーが、ミュータシン及びSalAのような、他の「正常口腔フローラ」に対して抗菌作用を有するバクテリオシンを産生することが示されている。これらのバクテリオシンは、一般に、高分子量のタンパク質である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0013】

本出願人は、細菌に対して、特にグラム陰性菌に対して有効な、新規な抗菌剤を同定した。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明により、ストレプトコッカス・ミティス若しくはストレプトコッカス・オラリスから得ることができる抗菌性ペプチド；又は、それらの変異体、又は、それらのいずれかの断片が提供される。このペプチドは単離され又は精製される。更に、これは治療への使用に適している。

【0015】

ここで用いられている「ペプチド」という表現は、アミノ酸の短い配列、特に20未満のアミノ酸、適切には15未満のアミノ酸長、さらに適切には12未満のアミノ酸長、好ましくは10未満のアミノ酸長のものを指す。このペプチドに含まれているアミノ酸は修飾されていても良く、この修飾は、例えば、脱水化、リン酸化又はグリコシル化である。特に、セリン又はチロシン残基のいくつかは脱水化されうる。

【0016】

好ましくは、このペプチドはストレプトコッカス・ミティスから得られる。

【0017】

ここで用いられている「変異体」の表現は、それらが由来する基礎配列とは異なり、配列中の1又はそれ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、アミノ酸配列を意味する。アミノ酸置換は、広義で類似の性質を有する異なったアミノ酸と置き換えられた場合は「保守的 (conservative)」とみなされる。非保守的 (non-conservative) な置換は、異なったタイプのアミノ酸に置き換えられた場合である。

【0018】

一般には、非保守的な置換がより少なければポリペプチドの生物学的活性は変化しないことが期待される。適切な変異体は、基礎配列に対して、少なくとも60%が同一、より適切には少なくとも70%が同一、なお更に適切には少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、そして可能ならば少なくとも95%が同一である。

【0019】

例えば、同一性は、例えば、BLASTアルゴリズム又はLipman-Pearsonのアルゴリズムで、Ktuple: 2、ギャップ・ペナルティ: 4、ギャップ長・ペナルティ: 12、標準PAMスコアリングマトリクスの条件で判定できる (Lipman, D. J. and Pearson, W. R., Rapid and Sensitive Protein Similarity Searches, Science, 1985, vol. 227, 1435-1441)。

【0020】

ここで用いられている「断片」という表現は、与えられたアミノ酸配列で、抗菌作用を有するいかなる部分をも意味している。断片は、適切には、例えば基礎的な配列由来の少なくとも5個を含んでいる。2個以上のそうした断片を結合することもできる。

【0021】

適切には、本発明のペプチドは、分子量が2,300Da未満であり、好ましくは1,000Da、例えば、800未満である。

【0022】

一つの実施態様において、抗菌性ペプチドは、ストレプトコッカス・ミティスから得ることができるペプチド、又は、その変異体、又は、それらのいずれかの断片である。

【0023】

ストレプトコッカス・ミティスもまた、ビリダンス連鎖球菌グループに属している。これは、Barsotti等により記載されている (Barsotti et al. (2002) Research Microbiology 153: 687091)。S. ミティスを構成する菌株は、例えば、Rudney J. D et al, Oral Microbiology and Immunology (1999) 14, 33-42に記載されたように、23s-rDNAの高度変異領域を増幅し、そして、アンプリコンを配列決定することにより同定される。

【0024】

10

20

30

40

50

S・ミティスは、これまで小さな抗生物質ペプチドの供給源としては同定されておらず、そして、本発明のペプチドの特に好ましい供給源である。

【0025】

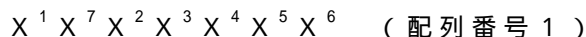
好ましくは本発明の抗菌性ペプチドは、ストレプトコッカス・ミティス又はその変種から得られるペプチドである。

【0026】

本出願人は、疎水性のアミノ酸の鎖を多く含むペプチドが抗菌活性を有することを見出した。

【0027】

そうしたペプチドの特定の例は、配列番号1のアミノ酸を少なくとも7個含むペプチド 10
である：



(式中、

X^2 は、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸；

X^3 は、チロシン、トレオニン、又は、セリン；並びに

X^1 、 X^4 及び X^6 は、非荷電の非極性アミノ酸、

並びに、 X^5 は、荷電アミノ酸、

並びに、 X^7 は、システイン又はヒスチジンである)

【0028】

非荷電の側鎖を有するアミノ酸は、セリン、チロシン、トレオニン、アスパラギン、及 20
びグルタミンを含む。

【0029】

非荷電の非極性アミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、
プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン又はシステインを含む。

【0030】

荷電アミノ酸の例は、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸又はグルタミ
ン酸を含む。

【0031】

X^2 は適切にはセリンである。

【0032】

好ましくは、 X^3 はチロシン、セリン又はトレオニンから選ばれ、好ましくはチロシン 30
である。

【0033】

X^1 、 X^4 及び X^6 は、適切には、独立して、イソロイシン、ロイシン、アラニン又はバ
リンから選ばれる。

【0034】

特に X^1 は、ロイシンである。

【0035】

好ましくは X^4 は、イソロイシンである。

【0036】

好ましくは X^6 は、バリンである。 40

【0037】

X^5 は、適切には、アスパラギン酸又はグルタミン酸から選ばれ、好ましくはアスパ
ラギン酸である。

【0038】

X^7 は、好ましくはシステインである。

【0039】

したがって、配列番号1の特定の例は、配列番号2である。



【0040】

このペプチドは *S. ミティス* により産生されることが知られていたペプチドであるが、以前にはその機能は知られていなかった。配列番号 1 に存在しているシステインが、このペプチド中の他のアミノ酸、特に X³、適切にはチロシンと架橋を形成すると信じられている。

【0041】

配列番号 2 以外の、配列番号 1 の新規な抗菌性ペプチドも、本発明の特定の態様を形成する。

【0042】

更なる実施態様で、本発明のペプチドは、更に、配列番号 1 に、N - 末端および / または C - 末端で縮合した (fused) 更なるアミノ酸を包含する。これらは、該ペプチドが由来するタンパク質から誘導されてもよく、又は、溶解性を促進し若しくはペプチドの精製若しくは分離を容易にする配列のような、合成配列を含むこともできる。

10

【0043】

ペプチドの溶解性を促進する適切な配列は、上記の荷電アミノ酸の配列である。

【0044】

ペプチドの精製又は分離を容易になるようにする配列の例は、公知のタグ (tag) 配列、例えば His タグ配列 (5 又はそれ以上のヒスチジン残基) 及びそれに類似のものである。

【0045】

他の実施態様では、本発明は、*ストレプトコッカス・オラリス* から得ることができるペプチド、又はその変異体、又はそれらいずれかの断片の、いずれかの抗菌ペプチドを提供する。好ましくは、このペプチドは *ストレプトコッカス・オラリス* から得ることができるペプチドである。

20

【0046】

S. オラリス を構成する菌株は、例えば、Rudney J. D et al, *Oral Microbiology and Immunology* (1999) 14, 33-42 に記載されたように、23s-rDNA の高度変異領域を増幅し、そして、アンプリコンを配列決定することにより同定される。

【0047】

本発明のペプチドは、*S. ミティス* 又は *S. オラリス* の適切な菌株から、従来法により単離できる。このペプチドは、分泌型ペプチドであり、そのために *S. ミティス* 又は *S. オラリス* の培養上清から単離することができる。

30

【0048】

したがって、例えば、*S. ミティス* 又は *S. オラリス* の菌株は従来法の条件下で、例えば、培養用培地の存在下、37 で培養できる。適当な培養時間、例えば 12 ~ 48 時間の後、培養上清のサンプルを取り出し、そして、所望のタンパク質を分離できる。

【0049】

例えば、上清は、目的の分子の劣化を防止するために、市販のプロテアーゼプロッカー及びアジ化ナトリウム (0.2%) で処理されうる。この段階で、タンパク質は種々の方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿法、又は超遠心分離法、又は市販のセントリコン (centricons) を用いて濃縮しうる。すべてのこれらの方法はこの技術分野で公知である。超遠心分離セントリコンの使用は、その選択によりペプチド又はタンパク質のいずれの性質にも干渉することなく、それらの天然の状態に維持するために、好ましい濃縮工程である。

40

【0050】

いったんタンパク質及びペプチドが濃縮されれば (例えば 200 ~ 400ng / nl の濃度まで)、質量分析法を行うことができ、そして抗菌ペプチドは同定される。

【0051】

本発明の抗菌ペプチドは、ついで同定され (*S. ミティス* から得ることのできる抗菌ペプチドは熱不安定でプロテアーゼ K に感受性がある)、そして分離又は精製される。

【0052】

培養された *S. ミティス* 又は *S. オラリス* から分離して抗菌ペプチドを得る方法は、本

50

発明の更なる局面である。

【0053】

いったん精製されれば、*S. ミティス*又は*S. オラリス*由来の抗菌ペプチドの配列は、従来法により容易に決定できる。

【0054】

その後、本発明のペプチドは化学的方法、例えばペプチド合成機を用いて製造することができる。

【0055】

別法として、組換えDNA法を用いて製造することもできる。一般的に、本発明のペプチドをコードする核酸は発現ベクター又はプラスミドに、従来法により組み込まれる。それらは、次に、宿主細胞（原核細胞又は真核細胞でありうる）を形質転換するために用いられるが、好ましいのは公知の原核細胞の発現用宿主の一つ、例えば乳酸球菌（*Lactococcus*）であり、この細胞はこのペプチドの作用に対して強い感受性はない。本発明のペプチドは次に培養物から回収することができる。

10

【0056】

本発明のペプチドをコードする核酸は、それらを含んでいるベクター又はプラスミド、及び、それらのベクター又はプラスミドにより形質転換された組換え細胞と共に、本発明の更なる態様を形成する。

【0057】

本出願人は、嚢胞性線維症患者の気管支洗浄液を入手し、正常フロラで示される抗菌作用に再現性があることを見出した。この洗浄液の個々の菌種の分離及び特性付けを行い、*S. ミティス*、*S. オラリス*が観察された抗菌作用のいくつかに関わっていることを見出した。

20

【0058】

本出願人はまた、この作用が全ての非発酵グラム陰性菌、及び、多くの発酵グラム陰性菌に対して起こることも見出した。さらに、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）に対する抗菌作用もまた見出された。

【0059】

本発明の特定のペプチドにより生じる抗菌作用は、殺菌性（cidality）によるのものとあり、単なる阻害性のものではなく、これはバクテリオシンに関する他の研究とも一致している。これは特に治療への応用を考えると有利である。したがって、特定の実施態様において、本発明は抗菌作用が殺菌作用であるペプチドを提供する。

30

【0060】

したがって、本発明のペプチドは広範囲の活性スペクトルを有する可能性がある。特に、それらは、腸内細菌類（例えば、大腸菌）、ブルクホルデリア spp（*Burkholderia* spp.）、ステノトロホモナス・マルトフィリア、及び、緑膿菌、アシネトバクター spp、及びブドウ球菌による感染に対して活性を有する可能性がある。

【0061】

例えば、本出願人は、配列番号2のペプチドが、腸内細菌類、ブルクホルデリア属、ステノトロホモナス・マルトフィリア、及び、緑膿菌の増殖を阻害することを見出した。このペプチドは、緑膿菌に対して μM 以下で（sub- μM ）、及び、大腸菌に対しては1~5 μM （約1~5 ng/mL）の濃度で阻害するという強い抗菌作用を示した。その上、我々の分析では、該ペプチドは、そのMIC濃度で99.9%を殺す殺菌性を有することが示された。

40

【0062】

さらに、この化合物は正常のフロラから生成されることから、毒性は非常に低いと信じられている。また、このペプチドの免疫源性も低いようである。

【0063】

本発明のペプチドは、そのために、特に細菌感染症、例えば、グラム陰性菌による感染症又は黄色ブドウ球菌感染症の治療のために用いることができる。

【0064】

50

このペプチドは、それを必要としている患者に、製薬上受容可能な担体又は賦形剤と組み合わせた医薬組成物の形態で、適切に投与される。そうした組成物は、本発明の更なる局面を形成する。

【0065】

適切な担体は、当業界で公知の固体又は液体の担体である。

【0066】

本発明の組成物は、経口での使用のための（例えば、錠剤、トローチ剤、硬質若しくは軟質カプセル剤、水性若しくは油性懸濁液、乳濁液、分散性粉剤若しくは顆粒剤、シロップ剤又はエリキシル剤）、局所での使用のための（例えば、クリーム、軟膏、ゲル剤、又は水性若しくは油性溶液若しくは懸濁液）、吸入法（inhalation）による投与のための（例えば、微細に粉碎した粉末剤又は液体エアロゾル）、吸送法（insufflation）による投与のための（例えば、微細に粉碎した粉末剤）、又は、非経口投与のための（例えば、静脈内、皮下、筋肉内投与用の無菌の水性若しくは油性溶液として、又は、直腸投与用の座薬として）適切な形態をとることができる。

10

【0067】

組成物は、他の周知の製剤用添加物、例えば、1つ又はそれ以上の、発色剤、甘味剤、矯味矯臭剤、保存剤、不活性希釈剤、顆粒化及び崩壊剤、結合剤、潤滑剤、並びに、抗酸化剤を含むことができる。この選択は、この組成物がとる特定の形態の如何によるもので、製剤化学者により、例えば、Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990の第5巻、25.2章に記載された方針により決定される。

20

【0068】

単一投与剤形を形成するために1個又はそれ以上の担体と組み合わせた活性成分の量は、治療される宿主及び特定の投与の経路に従って、必要によって変化する。例えば、ヒトに対する経口投与を目的とする剤形は、一般に、例えば、適切で都合の良い賦形剤と組み合わせて、組成物の総量の5～98質量%で変えられる0.5mg～2gの活性成分を含んでいる。投与単位剤形は、一般に、約1mg～約500mgの活性成分を有している。

【0069】

本発明のペプチドの治療目的のための投与量の大きさは、症状の性質及び重症度、動物又は患者の年齢及び性別、並びに、投与経路に依存して変えられ、そして、通常の臨床的プラクティスに応じて臨床医により決定される。しかしながら、一般に、上記の抗菌ペプチドは、通常、一日用量で例えば、体重kg当り0.5mg～75mgの範囲で受けられるように、投与される。

30

【0070】

別法として、本発明のペプチドをコードする核酸を、それを必要とする患者に、インピボでそれらのペプチドを発現できるように、投与することができる。例えば、このペプチドをコードする核酸を適切なベクター、例えばウイルス性若しくは細菌性ベクター、又はプラスミドを構築するために使用でき、次いで、それを必要とする患者に投与できる。

【0071】

ある場合には、S. ミティス又はS. オラリスそれ自体を、治療剤として投与することも便利である。WO 99/53932及びW090/09186は、特定の菌株が特定の症状を治療するために使用できることを示唆している。S. ミティス及びS. オラリスのような菌株は、本質的に、共生細菌（commensal bacteria）であり、そのために、そうした治療に適合した患者で、いかなる重篤な副作用も生じさせない。

40

【0072】

別法として、ラクトコッカスのようなドナー生物から発現された、本発明のペプチドをコードする遺伝子を担っている組換えプラスミドを、治療剤として投与することができる。したがって、適切な微生物、好ましくは、本発明のペプチドにより有害な影響を受けない共生微生物、例えばラクトコッカスが、従来法のDNA技術を用いて、本発明のペプチドを発現できるように、そして治療剤として利用されるように、操作される。

50

【0073】

これらの有用微生物治療 (probiotic therapies) は、それ単独で、又は、慣用の抗菌治療と組み合わせて行うことができる。

【0074】

使用される菌株は、製薬的に受容可能な担体と適切に組み合わせて、投与目的のための医薬組成物に成形される。

【0075】

したがって、更なる態様によれば、本発明は、*S. ミティス*若しくは*S. オラリス*の分離菌株、又は本発明のペプチドを発現するように操作された菌株の、特に、グラム陰性菌感染症、例えば、腸内細菌、ブルクホルデリア spp、ステノトロホモナス・マルトフィリア、及び、緑膿菌、アシネトバクター spp、及び、ブドウ球菌感染症から選択された細菌感染症の治療用医薬品を製造するための使用を提供する。

10

【0076】

また更なる本発明の局面は、*S. ミティス*又は*S. オラリス*を含む医薬組成物を包含する。

【0077】

また更なる局面において、本発明は、それを必要としている患者に、抗菌的に有効量の上記のペプチドを投与することを含む、細菌感染症の治療法を提供する。

【0078】

特に、この細菌感染症は、グラム陰性菌、又は黄色ブドウ球菌によって引き起こされるものである。*S. ミティス*又は*S. オラリス*の菌株の使用を含む、化合物の投与のための組成物及び方法は、上に記載されているとおりである。

20

【0079】

本発明は、特に、付属する図を参照し、実施例を用いて記載される：

図1は、*S. ミティス*の9つの菌株の存在下での、緑膿菌の菌株が生育している培養プレートを示している。

図2は、*S. ミティス*から分泌された細胞外ペプチドのHPLCによる精製の結果をしめしており、図中、Aは逆相HPLCを用いたC4カラムから0~25%アセトニトリル勾配で溶出した画分を示し、緑膿菌に対する活性について試験し、そして、Bはどのようにして3回の実施から活性画分を集め、さらに精製したかを示す。

30

図3は、本発明の抗菌性ペプチドのHPLC精製画分の抗菌活性を示すグラフである。

図4は、緑膿菌に対する抗菌活性を有するペプチド(RTA-1)のMALDI TOF質量分析スペクトルを図示する。上のそれぞれのピークに示された実験的な分子量773.5Daが得られた。

【0080】

実施例1

*S. ミティス*の9つの菌株を気管支洗浄液の正常フロラから分離した。23r-rDNAの高度変異領域を増幅し、そして、アンプリコンを配列決定し、それらがRudney等(上述)と合致する*S. ミティス*と同一であることを確認した。

血液培地から分離されたグラム陰性緑膿菌の菌株の水中の懸濁液を、寒天プレート上加えた。分離した*S. ミティス*株のそれぞれを爪楊枝を用いてプレート上にスポットした。プレートを37℃で24時間培養した。培養後のプレートを図1に示している。

40

この図において、明るいスポットは*S. ミティス*の培養菌を示す。暗い領域は緑膿菌が阻止された領域を示す。

それぞれの*S. ミティス*の検体を、次に、10mL培養液中で培養した。培養した菌株の上清を取り、培養液中の緑膿菌の容器に加えた。数分以内に、培養濁度が減少し、これはこの上清が緑膿菌の培養に対して分解作用を有することを示していた。この培養液をまた寒天上に載せたが、生きた緑膿菌の培養菌は出現しなかった。

この結果は、*S. ミティス*から分泌された抗菌的に有効なペプチドの存在を示している。このペプチドは単に阻害効果を有するというよりは、殺菌作用を有するように思われる

50

。

【 0 0 8 1 】

実施例 2

S . オラリスの 1 菌株を気管支洗浄液の正常フロラから分離した。23r-rDNAの高度変異領域を増幅し、そして、アンプリコンを配列決定し、それらがRudney等(上述)と合致するS . オラリスと同一であることを確認した。

血液培地から分離されたグラム陰性緑膿菌の菌株の水中の懸濁液を、寒天プレート上に加えた。分離したS . オラリス株を爪楊枝を用いてプレート上にスポットした。プレートを37 で24時間培養した。緑膿菌の生育が、S . オラリスの領域で阻害されていることが明らかで、これは後者が抗菌性ペプチドを分泌していることを示していた。

10

【 0 0 8 2 】

実施例 3

S . ミティスからの抗菌性ペプチドの簡単な特徴付けを以下のように行った。S . ミティスから細胞外に分泌されたタンパク質をイオン交換、サイズ排除及び疎水性相互作用クロマトグラフィーを組み合わせて精製した。

S . ミティスから細胞外に分泌されたペプチドの最終的な精製は、逆相HPLCによりC4カラムを用いて0~25%のアセトニトリルの線形勾配で行った(図2A)。得られた13個の画分のうち、6番目(図中、溶出時間が25.49)のみが、試験した濃度で緑膿菌の生育を阻止した。3回の実施からのこの画分を集めて、さらにHPLCで精製した(図2B)。この精製されたペプチド(RTA-1と名づけられた)は、培地中の緑膿菌抽出物の存在のような環境の刺激なしに産生されていることから、S . ミティスの構成的分泌性成分であるようだ。

20

分離したペプチドのマトリクス支援型レーザー脱着飛行時間型(MALDI-TOF)分析により分子量が773.5であることがわかった(図4)。

このペプチドのN-末端配列により配列LCSYIDVが明らかにされた。この配列の理論的な分子量は793であるから、このペプチドは、ランチビオチクスのクラスのペプチドの場合のように、修飾(セリン又はチロシン残基の脱水化)されている可能性がある。このRTA-1の配列は、S . ミティス遺伝子に由来する未知の小さなペプチド配列に合致する。

30

【 0 0 8 3 】

実施例 4

抗菌活性試験をFPLC及びHPLCカラムから単離された画分の活性を確認するために用いた。

HPLC-精製ペプチド調製物を緑膿菌に対する阻害活性に関して試験した。凍結乾燥し、HPLCで精製した材料を用いて、保存用10nMペプチド調製液を蒸留水中で調製した。緑膿菌を中間-対数相まで、ルリアーベルタニ(LB)培地中で生育させた。細菌培養液を1:100に希釈し、そして50μLを、96穴マイクロタイタープレート中で、50μLの水(対照)又は20μLのペプチド+30μLの水のいずれかと共にインキュベートした。細菌の生育を620nmでモニターした。

緑膿菌に対する殺菌活性を、マイクロタイターウエル中で、ペプチド又は水(対照)のいずれかと共に希釈した緑膿菌のアリコットを、37 で9時間培養した後取り出し、1:10000μLに希釈し、LB寒天プレートに載せ、そして37 で16時間培養した後観察されるコロニーの数を数えることにより証明した。

40

典型的な阻害の結果を図3に示している。これは分離されたペプチドRTA-1が緑膿菌に対して、1nMのオーダーの濃度で抗菌作用を示すことを示唆している。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 4 】

【 図 1 】 S . ミティスの 9 つの菌株の存在下での、緑膿菌の菌株が生育している培養プレートを示す。

【 図 2 】 S . ミティスから分泌された細胞外ペプチドの H P L C による精製の結果を示す

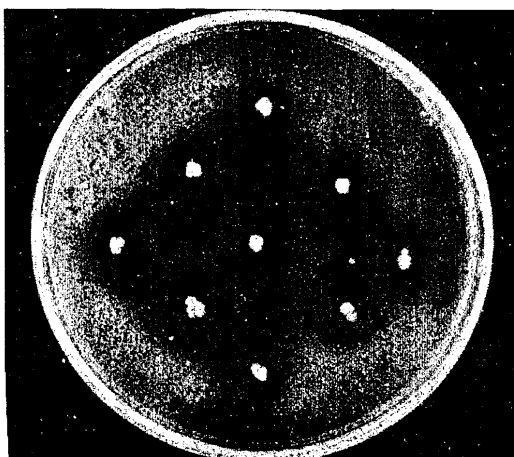
50

。

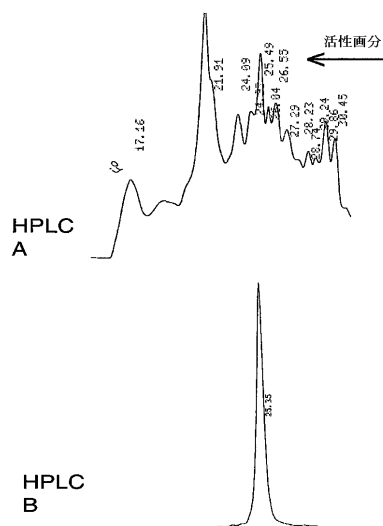
【図3】本発明の抗菌性ペプチドのHPLC精製画分の抗菌活性を示すグラフである。

【図4】緑膿菌に対する抗菌活性を有するペプチド(RTA-1)のMALDI TOF質量分析スペクトルを示す。

【図1】

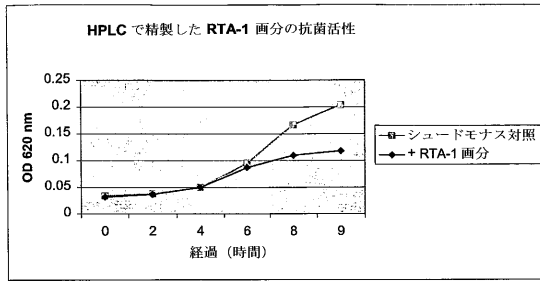


【図2】

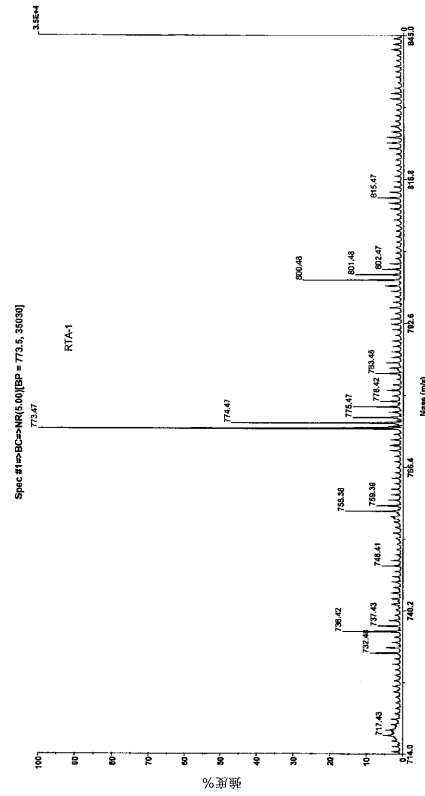


- A 逆相HPLCを用いたC4カラムから0~2.5%アセトリル勾配で溶出した画分の、緑膿菌に対する活性を試験した。
- B 三回の実施から活性画分を集めさらに精製した。

【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2006519217000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/GB2004/000592
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/315 C12N15/63		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	APELGREN L D ET AL: "PURIFICATION OF A STREPTOCOCCAL BACTERIOCCIN VIRIDIN B AND ITS SEPARATION FROM ALPHA HEMO LYSIN" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 15, no. 3, 1979, pages 436-439, XP009034498 ISSN: 0066-4804 abstract; figures 3,4 ----- -/--	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 August 2004		18/08/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griesinger, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB2004/000592

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DAJANI A S ET AL: "Viridins, bacteriocins of alpha-hemolytic streptococci: isolation, characterization, and partial purification." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. JAN 1976, vol. 9, no. 1, January 1976 (1976-01), pages 81-88, XP009034495 ISSN: 0066-4804 abstract; tables 3,4 -----	1-34
A	DAJANI A S ET AL: "SUBSTANCES THAT INTERFERE WITH ACTION OF VIRIDIN B A STREPTOCOCCUS-MITIS BACTERIOGIN" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 20, no. 1, 1978, pages 20-24, XP002290100 ISSN: 0019-9567 abstract page 20, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 -----	1-34
X	WO 99/53932 A (BACTERUM AB ; HOLM STIG (SE); ROOS KRISTIAN (SE); GRAHN HAAKANSSON EVA) 28 October 1999 (1999-10-28) cited in the application	27
A	abstract page 3, line 29 - page 5, line 32 -----	1-26, 28-34
A	WILLCOX M D P ET AL: "PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE INHIBITORY SUBSTANCES PRODUCED BY STREPTOCOCCUS-ORALIS AND RELATED SPECIES" MICROBIOS, vol. 55, no. 224-225, 1988, pages 135-146, XP009034511 ISSN: 0026-2633 abstract -----	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB2004/00059 2

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- in written format
- in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in computer readable form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB2004/000592

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 29 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2004/000592

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 29 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB2004/000592

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9953932	A	28-10-1999	
		SE 511648 C2	01-11-1999
		AU 4177799 A	08-11-1999
		CA 2325805 A1	28-10-1999
		EP 1071437 A1	31-01-2001
		ID 26655 A	25-01-2001
		JP 2002512196 T	23-04-2002
		NO 20005141 A	14-12-2000
		PL 343547 A1	27-08-2001
		SE 9801337 A	18-10-1999
		WO 9953932 A1	28-10-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 R 1/46 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	A
	C 1 2 R	1:46	

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

(72) 発明者 ティモシー・ラトランド・ウォルシュ

イギリス国ブリストル B S 8 1 T D . クリフトン . ユニヴヴァーシティウォーク . ザ・ユニヴヴァーシティ・オブ・ブリストル . スクール・オブ・メディカル・サイエンス

(72) 発明者 ロビン・アントニー・ハウ

イギリス国ブリストル B S 9 3 R S . ウェストベリー - オン - トライム . ストークレーン 1 8 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 DA05 EA04 GA11

4B064 AG01 CA02 DA02

4B065 AA49Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44

4C084 AA02 AA06 BA17 CA04 DA41 NA14 ZB35

4H011 AA01 BB21

4H045 AA10 AA30 BA14 CA11 EA29 FA73 FA74