

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6731348号
(P6731348)

(45) 発行日 令和2年7月29日 (2020.7.29)

(24) 登録日 令和2年7月8日 (2020.7.8)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 7/08 (2006.01)
 C O 7 K 14/435 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C O 7 K 7/08 Z N A
 C O 7 K 14/435
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19

請求項の数 19 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-559141 (P2016-559141)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月12日 (2014.12.12)
 (65) 公表番号 特表2017-502689 (P2017-502689A)
 (43) 公表日 平成29年1月26日 (2017.1.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2014/050855
 (87) 国際公開番号 W02015/088344
 (87) 国際公開日 平成27年6月18日 (2015.6.18)
 審査請求日 平成29年12月8日 (2017.12.8)
 (31) 優先権主張番号 13196989.1
 (32) 優先日 平成25年12月12日 (2013.12.12)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 511181533
 アカデミス ズィーケンハイス レイデン
 ハー. オー. デー. エン. エルユーエ
 ムセー
 オランダ国 2 3 3 3 ゼットアー レイ
 デン アルビヌスドレーフ 2
 (73) 特許権者 516175755
 アカデミス メディス セントラム
 オランダ国 1 1 0 5 アーゼット アム
 ステルダム ズイドースト メイベルクド
 レーフ 9
 (74) 代理人 110000442
 特許業務法人 武和国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗微生物ペプチドおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列 L K K L Y K R L V K I L K R W W R Y L K R P V R の変異体を含む単離または組換えのポリペプチドであって、

前記ポリペプチドが、抗細菌および／または抗真菌活性を有し、インビトロにおいて50%血漿存在下において、少なくとも1種の微生物種に対し、同じ条件下で測定した場合のOP-145の活性より、少なくとも1.3倍高い抗細菌および／または抗真菌活性を有し、

前記変異体の配列において、少なくとも14個のアミノ酸を含み、
 場合によって、

— 以下のアミノ酸置換の1から7個：

・ L、V、I、W、またはYの群から選択される1個または複数のアミノ酸の、L、V、F、A、I、W、YまたはQの群から選択されるアミノ酸による置換と、

・ Rおよび／またはKのAまたは正に帯電したアミノ酸による置換と、

— アミノ酸に対応する非天然アミノ酸による1個の置換であって、前記対応する非天然アミノ酸が参照天然アミノ酸の誘導体である置換、および／または

— 前記アミノ酸配列の少なくとも14個の連続するアミノ酸のレトロインベルソ配列を含み、

前記変異体の配列は、上記で定義したアミノ酸置換の1個または複数の場合によって有する少なくともアミノ酸配列 K R L V K I L K R W W R Y L を含む、ポリペプチド。

【請求項 2】

アミノ酸に対応する前記非天然アミノ酸による 1 個の置換が、

- ・アミノ酸に対応する β アミノ酸による置換と、
 - ・R のホモアルギニン、オルニチン、N 5-カルバモイルオルニチンまたは 3-アミノプロピオン酸による置換と、
 - ・I のイソデスモシン、N-メチルイソロイシンまたはアローイソロイシンによる置換と、
 - ・L のノルロイシン、デスモシンまたは 5, 5, 5-トリフルオロロイシンによる置換と、
 - ・K の 6-N-メチルリシン、2-アミノヘプタノン酸、N-アセチルリシン、ヒドロキシリシンまたはアローヒドロキシリシンによる置換と、
 - ・P の 3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリンまたは 1-アセチル-4-ヒドロキシ-L-プロリンによる置換と、
 - ・W の 5-ヒドロキシトリプトファン、5-メトキシトリプトファンまたは 5-フルオロトリプトファンによる置換と、
 - ・Y の O-メチル-L-チロシン、O-4-アリル-L-チロシンまたは 3-クロロチロシンによる置換と、
 - ・V のノルバリン、N-メチルバリンまたは 3-フルオロバリンによる置換と、
- からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 3】

N 末端および／または C 末端が改変されている、請求項 1 または請求項 2 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 4】

N 末端アセチル-、ヘキサノイル-、デカノイル-、ミリストイル-、NH-(CH₂-CH₂-O)₁₋₁₁-CO-またはプロピオニル残基を含み、および／あるいは C 末端アミド-、NH-(CH₂-CH₂-O)₁₋₁₁-CO-アミド-または 1 個もしくは 2 個のアミノ-ヘキサノイル基を含む、請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

LKRLYKRLAKLIKRLYRYLKPKVR、LKR VWKRVFKLLKRYWRQLKKPKVR および LKRLYKRVFRL LKRYRYRQLRRPKVR の群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 6】

請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の核酸分子および／または請求項 7 に記載のベクターを含む組換え宿主細胞。

40

【請求項 9】

請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドもしくはその薬学的に許容される塩、請求項 6 に記載の核酸分子、および／または請求項 7 に記載のベクターならびに少なくとも 1 種の薬学的に許容される担体、希釈剤および／または賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 10】

追加の抗微生物剤をさらに含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記追加の抗微生物剤は、ペニシリン、セファロスポリン、ムピロシンおよびカルバペネムからなる群から選択される、請求項 10 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 1 2】

前記ポリペプチドを含む制御放出および／または標的化送達を行う担体を含む、請求項 9 ないし請求項 1 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

前記担体は、ナノ粒子、マイクロ粒子、ナノカプセル、マイクロカプセル、リポソーム、小球体、ハイドロゲル、ポリマー、脂質複合体、血清アルブミン、抗体、シクロデキストリンおよびデキストランからなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む医療装置のためのコーティング。

10

【請求項 1 5】

治療薬、予防薬または診断薬としての使用のための、請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6】

細菌および／もしくは真菌感染の治療、ならびに／または細菌および／もしくは真菌感染から生じる状態の治療における、請求項 1 5 に記載の使用のためのポリペプチド。

【請求項 1 7】

バイオフィーム関連感染の治療および／または予防における請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の使用のためのポリペプチド。

【請求項 1 8】

20

細菌および／または真菌感染に罹患した対象の治療のための医薬を製造するための、請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 1 9】

請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドを調製するための方法であって、

— 請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子を用意すること；

— 宿主細胞を前記核酸分子で形質転換すること；

— 前記ポリペプチドの発現を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養すること；

— 前記細胞から前記ポリペプチドを収集すること；

30

— 場合によって、前記ポリペプチドの N 末端または C 末端を改変することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生化学および医薬品の分野に関する。より詳細には、本発明は、抗微生物ペプチドの分野ならびに細菌、ウイルス、真菌および寄生虫の感染を抑制することに関する。

【背景技術】

【0002】

40

抗微生物ペプチド (AMP) は、自然界全体の生物の防御系の必須成分であり、病原体の侵入に対する防御をもたらす。抗微生物ペプチドは、グラム陽性菌およびグラム陰性菌、真菌、寄生虫およびウイルスに対して強力な抗微生物活性を示す。より小さな AMP (通常約 15 ～ 40 個のアミノ酸) はたいてい微生物細胞膜の構造または機能を破壊することによって作用し、単一の明確な分子構造を標的としない。したがって、従来の抗生物質とは対照的に、それらは細菌の代謝活性とは関係なく有効である。デフェンシンおよびカテリシジン (LL-37) などのヒト AMP は白血球中に存在し、皮膚および粘膜表面の様々な上皮によって分泌される。抗微生物活性に加えて、AMP は炎症、免疫活性化および創傷治癒において重要なエフェクター分子である。AMP は配列および 2 次構造がかなり多様であるが、いくつかの共通の特性を備えている。AMP は通常、陽イオン性、両親

50

媒性であり、細菌膜の完全性を損なうことによって殺菌効果を発揮する。AMPと標的微生物の陰イオン性膜表面との相互作用によって、膜透過、細胞溶解および細胞死が引き起こされる。細胞膜は、ほとんどのAMPの主要標的であり、膜中にペプチドが蓄積すると透過性が増加し、バリア機能が失われ、細胞質成分の漏出および細胞死が引き起こされることは一般的に認められている。

【0003】

従来の抗生物質は、細胞壁上のエピトープなどの標的、または、細菌タンパク質およびDNAもしくはRNA合成中の標的に結合することによって、細菌を死滅させる。病原菌は抗生物質の標的を改変し、抗生物質がもはやこれらの標的に結合することができなくなるようにすることによって、より迅速に耐性を発現する。従来の抗生物質を上回るAMPの主な利点は、耐性が容易に発現しないことである。その理由のひとつとしては、従来の抗生物質のように単一の明確な分子構造（エピトープ）を標的とせずに、細胞膜に作用して微生物を死滅させることにある。ほとんどは細菌であるものの真菌も含まれる微生物の表面結合細胞凝集体である、いわゆる、バイオフィーム関連感染（BAI）を抑制するためにAMPは特に有用である。バイオフィームは、従来の抗生物質に対する細菌の耐性に大きく関与する。バイオフィームは、嚢胞性線維症などのヒトにおける様々な病的状態、留置した医療装置の定着および歯垢形成および創傷に関連する。従来の抗生物質でバイオフィーム関連の感染症を抑制するには、炎症誘発性微生物化合物の放出が刺激されること、バイオフィームへの浸透が不十分であること、および全身投与が必要であるために血液中において不活性化または分解されることを含む、いくつかの理由のためにことさら不十分である。従来の細菌を上回るAMPのその他の利点には、死滅の発生が急速であること、生分解性であるため環境中に抗生物質が残存するという現行の懸念が緩和され、抗炎症活性が随伴するという事実が含まれる。

【0004】

数百の天然および合成ペプチドの有望なプールのうち、臨床試験に進んだものは比較的少ない。例としては、マガイニンペプチド、オミガナン、OP-145、ノベキサチン（novexatin）およびリティキサー（lytixar）がある。ダプトマイシンおよびDPK-060の2つのAMPのみが現在臨床開発中である。P60.4Acとも呼ばれるOP-145（Peptides, 2006; 27: 649~60）は、第2相臨床試験までの実施がなされた。OP-145は、内在性ヒトカテリシジン抗微生物ペプチドLL-37から得られた24個のアミノ酸ペプチドである。OP-145は、慢性中耳炎の局所治療用に内毒素を中和する抗微生物ペプチドとして開発された。OP-145は、抗微生物ペプチドであることに加えてLPSを中和する。

【0005】

OP-145を含む現在公知のAMPにはまだいくつかの難点がある。例えば、様々な細菌、例えば、*P. aeruginosa*、*E. faecalis*、*Proteus mirabilis*、*Streptococcus pyogenes*および*S. aureus*は全て、いくつかの抗微生物ペプチド、例えば、カテリシジンLL-37を分解するプロテアーゼを分泌する。したがって、プロテアーゼ耐性の抗微生物ペプチドが治療の観点から有利である。さらに、有望な溶解効果ならびに細菌だけではなく哺乳動物の膜に対するAMPのその他の特性のため、感染した患者の細胞膜よりも細菌または真菌細胞などの微生物に対して高い特異性を備えた、すなわち、治療指数（最小溶血濃度／最小抗微生物活性；MHC／MEC）が高いAMPを開発することにより、新たなペプチドを設計することが課題の1つである。OP-145を含む公知のAMPの別の重要な欠点は、その活性が血漿成分の存在によって強く影響を受けることである。例えば、OP-145では、PBS中のLC99.9（細菌の $\geq 99.9\%$ を死滅させる最低ペプチド濃度）は1.6 μM であるが、PBS／血漿（1：1）中のLC99.9は約200 μM である。このことは、AMPを全身に投与する場合にことさら不都合である。

【0006】

酵素的分解または血漿成分への非特異的結合によるペプチドの無効化など、血漿成分に

10

20

30

40

50

よるペプチド不活性化のようないくつかの機構が、血漿存在下でAMPの活性を著しく低下させるのに関与することがある。血漿成分に耐性のあるAMPは、有望な全身治療薬であるために重要であるだけでなく、例えば、感染した創傷ならびに医療用インプラントに関連した感染症および炎症の治療のためにも重要である。特に、深部組織感染では、強いタンパク質分解活性が存在することがあり、タンパク質分解に耐性のないAMPの不活性化をもたらすことがある。慢性の創傷からの創傷液はプロテアーゼを過剰に含み、移植された材料は宿主体液の血漿成分によって迅速にカバーされる。慢性の創傷および医療用インプラントの両方とも微生物バイオフィームと関連することが多い。特に、バイオフィーム関連の感染症の治療において、抗生物質はたいてい全身投与されるため、血液および周囲の組織中において酵素的に分解されやすい。したがって、OP-145を含む多くのAMPの適用性は血漿成分に対する感受性のために、例えば、局所適用に限定される。したがって、特に、有望な全身治療薬として、ならびに／または、例えば、慢性の創傷および医療用インプラントに関連したバイオフィーム感染症に対して有効な治療薬として、血漿成分に対して耐性のある代替のAMPが必要なのは明らかである。

10

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0007】**

本発明の目的は、従来の抗生物質の短所を克服し、特に、血漿成分に耐性があることによって、公知の抗微生物ペプチドよりも改善された特性を有する新たな強力な抗微生物ペプチドを提供することである。本発明のさらなる目的は、ヒトなどの哺乳動物に導入したときにアレルギーを起こさず、病原微生物に対して高い特異性を有し、バイオフィーム関連の感染症において、病原微生物に対して特に高い抗微生物活性を有する抗微生物ペプチドを提供することである。本発明のペプチドおよびポリペプチドは、バイオフィーム中の微生物およびバイオフィーム中に組み込まれていない微生物の両方に対して強力な広域性抗微生物活性を発揮し、迅速な抗微生物活性を有し、治療薬、予防薬または診断薬として使用することができる。本発明のペプチドおよびポリペプチドは、血液、血漿および血清中ならびにそれらの成分の存在下で抗微生物活性を保持するので、効果期間が限定され、適用性が限定されるという問題を克服するために設計する。

20

【課題を解決するための手段】**【0008】**

本発明者らは、配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPRVに基づくペプチドP139～P163が、(薬剤耐性)グラム陽性菌(例えば、*Staphylococcus aureus*および*Staphylococcus epidermidis*)およびグラム陰性菌(例えば、*Pseudomonas aeruginosa*)ならびに真菌(*Candida albicans*および*Aspergillus niger*)に対して有効性が高いことを発見した、表2～4および11、図1および2を参照のこと。したがって、これらのペプチドは広域性抗微生物活性を発揮する。PBS中においてOP-145と同程度である低いIC_{99.9}値によって証明されるように、ペプチドは全て非常に強力である。重要なことに、ペプチドは全て血漿存在下でOP-145よりも有効であることが発見された。ペプチドのほとんどはさらにかなり強力で、血漿存在下でOP-145よりも16倍まで高い活性を有していた(表2～4)。表2に示したように、OP-145のIC_{99.9}は50%血漿存在下で204.8 μMである。P148およびP159のIC_{99.9}は血漿存在下で12.8 μM(16倍増加)である。P140、P141、P144、P145、P150、P151、P152、P153、P158、P160、P161、P162およびP163のIC_{99.9}は、血漿存在下で25.6 μM(8倍増加)である。血漿存在下で、P139、P142、P143、P146、P147、P154、P156およびP157のIC_{99.9}は51.2 μM(4倍増加)であり、P149およびP155のIC_{99.9}は102.4 μM(2倍増加)である。

40

【0009】

50

P145、P148およびP159は、中対数期および静止期の両方の細菌培養物に対して有効であることが示された（表2～4参照）。さらに、P145、P148およびP159は、*S. aureus*のバイオフィーム形成を阻害することができる（図3参照）。さらに、P145、P148およびP159は、内毒素リポテイコ酸（LTA）およびリポ多糖（LPS）を中和し、したがって炎症誘発応答を低下させるので明白な免疫調節活性を有する（表12）。

【0010】

少なくとも16個のアミノ酸を有する短いP148変異体は、PBS中においてP148に相当する抗微生物活性を有することがさらに発見された（表5参照）。重要なことに、血漿存在下での抗微生物活性はこの短い変異体においても保持される。14個のアミノ酸を有するP148の短い変異体はP148に比べて抗微生物活性は低下しているが、血漿存在下でOP-145よりもまだ5倍強力である。

【0011】

したがって、本発明によるポリペプチドは、血漿の存在下および非存在下の両方で、バイオフィーム中に存在していてもいなくても微生物に対して高い抗微生物活性を有し、LPSおよびLTA中和活性によって証明されるように最適な抗炎症（微生物化合物中和）活性を備えている。

【0012】

バイオフィームの感染に対する本発明の抗微生物ペプチドの効果は3つの部分からなる。バイオフィーム形成を防止し、既存のバイオフィームを分散させ、放出部位およびその周囲の細菌、真菌またはその他の微生物を死滅させ、リポテイコ酸（LTA）、ペプチドグリカン（PG）およびリポ多糖（LPS）などの炎症誘発性微生物内毒素を中和し、マクロファージを活性化し、その食作用および殺菌活性を増強することによって免疫応答を編成する。この免疫制御は、インプラント周囲の組織が病原体にとって新たな生態的適所となることを防止するために必要である。

【0013】

したがって、本発明は、アミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPVRまたは前記アミノ酸配列の変異体を含む単離または組換えポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、インビトロにおいて50%血漿存在下で、少なくとも1種の微生物種に対して、同じ条件下で測定した場合のOP-145の活性よりも少なくとも1.3倍高い抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、前記変異体配列が、少なくとも14個のアミノ酸を有し、場合によって、

— 以下のアミノ酸置換の1個もしくは複数：

・ L、V、F、A、I、W、YまたはQの群から選択される1個または複数のアミノ酸の前記群から選択される別のアミノ酸による置換、

・ Rおよび／またはKの正に帯電したアミノ酸による置換、

— アミノ酸の対応するD-アミノ酸による1個もしくは複数の置換、アミノ酸の対応する非天然アミノ酸による1個もしくは複数の置換、および／または

— 前記アミノ酸配列の少なくとも14個の連続するアミノ酸のレトロインベルソ配列を含む、ポリペプチドを提供する。

【0014】

さらに、アミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPVRを含む、または前記アミノ酸配列の変異体を含む単離または組換えのポリペプチドであって、

前記ポリペプチドが、抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、インビトロの50%血漿存在下において、少なくとも1種の微生物種に対し、同じ条件下で測定した場合のOP-145の活性より、少なくとも1.3倍高い抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、

前記変異体の配列において、少なくとも14個のアミノ酸を含み、

場合によって、

10

20

30

40

50

- ー 以下のアミノ酸置換のうち、10個まで：
 - ・ L、V、F、A、I、W、YまたはQの群から選択される1個または複数のアミノ酸の前記群から選択される別のアミノ酸による置換、
 - ・ Rおよび／またはKのAまたは正に帯電したアミノ酸による置換、
- ー アミノ酸に対応するD-アミノ酸による1個もしくは複数の置換、
- ー アミノ酸に対応する非天然アミノ酸による1個もしくは複数の置換、および／または
- ー 前記アミノ酸配列の少なくとも14個の連続するアミノ酸のレトロインベルソ配列を含み、

前記変異体の配列は、上記で定義したようなアミノ酸置換の1個または複数の場合によって有する少なくともアミノ酸配列KRLVKILKRWWRYLを含む、ポリペプチドが提供される。

【0015】

本明細書で定義したアミノ酸配列またはそれらの変異体において、アミノ酸は1文字の記号で示す。これらの1文字記号および3文字記号は当業者にはよく知られており、以下の意味を有する：A (Ala) はアラニン、C (Cys) はシステイン、D (Asp) はアスパラギン酸、E (Glu) はグルタミン酸、F (Phe) はフェニルアラニン、G (Gly) はグリシン、H (His) はヒスチジン、I (He) はイソロイシン、K (Lys) はリシン、L (Leu) はロイシン、M (Met) はメチオニン、N (Asn) はアスパラギン、P (Pro) はプロリン、Q (Gln) はグルタミン、R (Arg) はアルギニン、S (Ser) はセリン、T (Thr) はトレオニン、V (Val) はバリン、W (Trp) はトリプトファン、Y (Tyr) はチロシンである。本明細書では、「正に帯電したアミノ酸」とは、生理学的pH、すなわち7.3～7.4のpHにおいて正電荷を有するアミノ酸を意味する。

【0016】

本発明のポリペプチドは、抗微生物活性、好ましくは抗細菌、抗ウイルスおよび／または抗真菌活性、より好ましくは抗細菌および／または抗真菌活性を有する。さらに、本発明のポリペプチドは好ましくは抗微生物活性および抗炎症活性の両方を有する。本明細書ではポリペプチドの「抗微生物活性」という用語は、少なくとも1種の微生物、例えば、細菌、ウイルスおよび／または真菌の成長または増殖を抑制することを意味し、微生物の成長または増殖の阻害、低下または防止ならびに微生物を死滅させることを含む。微生物は、顕微鏡レベルの生物であり、すなわち、小さすぎるために通常ヒトの裸眼で見ることにはできない。微生物は、非常に多様であり、細菌、ウイルス、真菌、古細菌、原虫および顕微鏡レベルの藻類を含む。同様に、本明細書では「抗細菌活性」、「抗ウイルス活性」、「抗真菌活性」および「抗寄生虫活性」という用語はそれぞれ、一般的に細菌、ウイルス、真菌および寄生虫の成長または増殖を抑制することを意味し、それらの成長または増殖の阻害、低下または防止ならびにそれらを死滅させることを含む。抗微生物活性は、例えば、阻害濃度 (IC) または致死濃度 (LC) として表される。本明細書ではIC_xまたはLC_xとは、2時間後に少なくともx%の微生物を死滅させる最低ペプチド濃度を意味する。例えば、IC_{99.9}およびLC_{99.9}は、微生物の≥99.9%を死滅させる最低ペプチド濃度を意味する。抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および抗寄生虫活性は、当業界で公知の方法によって測定することができる。

【0017】

このような方法の1つは本出願の実施例において詳述され、抗微生物活性を測定するためのインビトロアッセイを含む。この方法において、微生物、例えば、細菌または真菌は、例えば、1～2時間、異なる濃度の本発明によるポリペプチドとインキュベートし、微生物-ポリペプチド混合物を、適切な培養培地中または培養培地上でインキュベートした後、ポリペプチドとインキュベートせず、同じ方法でさらに処理した微生物の試料と比較して、生存および／または死滅した微生物の数を立証する。

【0018】

ウイルスプラークアッセイを使用し、本発明のポリペプチドの抗ウイルス活性を評価することができる。簡単に説明すると、許容細胞単層に感染させる前に、ウイルス接種物をポリペプチドに曝露する。標準的な間隔をおいた後で、細胞抽出物の複数の希釈物を使用し新鮮な細胞単層に感染させ、細胞単層に対するそれらの効果を定量することによって細胞抽出物中のウイルス力価を測定する。

【0019】

抗寄生虫活性を評価するためには、本発明のポリペプチドおよび寄生虫を標準的な時間間隔でインキュベートする。その後、寄生虫の代謝活性を、例えば、MTTアッセイによって直接分析してもよく、または寄生虫を哺乳動物細胞に移行させ、インキュベートした後でこれらの細胞中における寄生虫増加を顕微鏡法によって評価する。

10

【0020】

本明細書ではポリペプチドの「抗炎症活性」という用語は、微生物、例えば、細菌、ウイルス、真菌および／または寄生虫に感染した対象における炎症応答を阻害、低下または防止することを意味する。本発明のポリペプチドの抗炎症活性は、リポテイコ酸（LTA）、ペプチドグリカン（PG）および／またはリポ多糖（LPS）などの炎症誘発性微生物化合物の放出を阻害、低下または防止することによって実現する。抗炎症活性は、当業界で公知の方法によって測定することができる。このような方法の例は、本出願の実施例で記載したようなLPS中和アッセイおよびLTA中和アッセイである。このような方法では、本発明のポリペプチドはLPSまたはLTAの固定濃度、例えば、LPS 500 ng/mlまたはLTA 2 mg/mlと混合し、30分間インキュベートする。その後、これらの混合物を希釈した新鮮なヒト全血に添加し、20時間後血液試料中のサイトカイン（例えば、LTAではIL-8および、LPSではIL-12 p40）のレベルをELISAによって測定する。

20

【0021】

本発明のポリペプチドは、血液血漿とも称される血漿、好ましくはヒト血漿に対して耐性である。本明細書では「血漿」または「血液血漿」は当業界で使用される通常の意味を有する。これは、赤血球および白血球および血小板を除去した血液の液体部分を意味し、その一部にはタンパク質、ホルモンおよびその他の有機化合物および電解質などの無機化合物が含まれる。本明細書では「血漿に対する耐性」とは、インビトロにおいて、50%血漿、好ましくはヒト血漿存在下で、少なくとも1種の微生物種に対して、同じ条件下で測定した場合のOP-145の活性よりも少なくとも1.3倍高い抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有することと定義する。好ましくは、少なくとも1種の微生物種に対する前記活性は、OP-145の活性よりも少なくとも1.5倍、より好ましくはOP-145の活性よりも少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも4倍、より好ましくは少なくとも5倍高い。特に好ましいポリペプチドは、少なくとも1種の微生物種に対して50%血漿存在下でOP-145の抗微生物活性よりも少なくとも16倍高い抗微生物活性を有する。

30

【0022】

「50%血漿存在下で」とは、ポリペプチドまたはOP-145を最終濃度50%の血漿、好ましくはヒト血漿を加えたPBSなどの液体中で微生物とインキュベートしたとき、抗微生物活性が測定されることを意味する。「同じ反応条件」とは、本発明のポリペプチドの抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫それぞれの活性を測定する条件が、OP-145の抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫それぞれの活性を測定する条件と同じであることを意味する。このような条件には、これらに限定はしないが、ポリペプチドおよび微生物をインキュベートする緩衝液、微生物種自体、微生物の濃度、インキュベーション時間および温度ならびに使用した血漿源が含まれる。

40

【0023】

OP-145は配列JIGKEFKRIVERIKRFLRELVRPLRBを有し、Jはアセチルであり、Bはアミドである。当業者は、OP-145の抗微生物活性とその

50

他のペプチドの抗微生物活性とを比較することができるよう、本明細書で以下により詳細に説明したような通常使用される固相合成法または組換え技術を使用し、OP-145を合成することができる。さらに、アセチル化およびアミド化は、当業界で使用される一般的な技術であり、したがって、当業者はOP-145のペプチド鎖のN末端のアセチル化およびC末端のアミド化を行うことができる。

【0024】

本明細書で詳述したように、インビトロにおける抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性は、好ましくはIC99.9またはIC50として表す。本明細書では「IC99.9」および「IC50」はそれぞれ、所定の期間、例えば、2時間以内に微生物の少なくとも99.9%または50%を死滅させる最低ペプチド濃度を意味する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、50%血漿存在下で少なくとも1種の微生物種に対して、同じ条件下で測定した場合におけるOP-145のIC99.9のせいぜい75%であるインビトロIC99.9を有する。50%血漿存在下での少なくとも1種の微生物種に対する本発明によるポリペプチドのインビトロIC99.9は、同じ条件下で測定したときのOP-145のIC99.9の、好ましくは、多くて70%、より好ましくは多くて60%、より好ましくは多くて50%、より好ましくは多くて40%、より好ましくは多くて30%、より好ましくは多くて20%、最も好ましくは多くて10%である。特に好ましいポリペプチドは、50%血漿存在下で少なくとも1種の微生物種に対して、同じ条件下で測定した場合のOP-145のIC99.9の多くて10%のインビトロIC99.9を有する。

【0025】

本発明のポリペプチドのインビトロIC99.9は、好ましくは50%血漿存在下で少なくとも1種の微生物種に対し、37℃、2時間後で、多くて150μMである。前記IC99.9は、実施例において本明細書で説明したように抗微生物活性を測定するための方法に従って測定することが好ましい。バイオフィームに関連しない微生物の抗微生物活性を測定するための実施例で説明した方法は、ウェル中でヒト血漿を最終濃度50%で添加したPBSに溶解させたポリペプチドの溶液50マイクロLと、PBS1mL当たり5×10⁶CFUの細菌懸濁液20マイクロLとを混合することを含む。この混合物を振盪条件下において37℃、2時間インキュベートした後、細菌数を評価するために試料が使用される。99.9%の細菌を死滅させる最低ペプチド濃度を阻害濃度(IC)99.9と呼ぶ。細菌数は手動のCFU計数で決定することができる。抗細菌活性を測定するために、例えば、1×10⁶CFU/mlの細菌を使用し、抗真菌活性を測定するために、例えば、1×10⁵細胞/mlを使用する。

【0026】

抗バイオフィーム活性を測定するために、実施例で説明した前記方法は、4℃で20%血漿と一晚インキュベートし血漿でコーティングした96ウェルポリプロピレンプレート中において、ポリペプチドをバイオフィーム調整したBM2中の*S. aureus* JAR060131 1×10⁸CFU/mlと37℃、24時間インキュベートし、PBSで4回洗浄することによってプランクトン細菌を除去し、クリスタルバイオレットでバイオフィームを染色した後、IC50を測定することを含む。エタノールで可溶化した後、590nmでの光学密度をバイオフィーム塊の測定値として測定する。

【0027】

本発明のポリペプチドは、50%血漿存在下でインビトロIC99.9が好ましくは多くとも100μM、より好ましくは多くとも80μM、より好ましくは多くとも51.2μM、より好ましくは多くとも30μMである。本発明の好ましいポリペプチドの本明細書で定義したようなIC99.9は多くとも25.6μMである。特に好ましいのは、50%血漿存在下で少なくとも1種の微生物種に対するインビトロIC99.9が、多くとも12.8μMであるポリペプチドである。

【0028】

前記少なくとも1種の微生物種は、例えば、*S. aureus*、*S. epidermi*

dis、P. aeruginosaなどの細菌種、C. albicansおよびA. nigerなどの真菌種、Plasmodium falciparumおよびToxoplasma gondiiなどの寄生虫種、またはA型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、A型インフルエンザウイルスなどのウイルス種である。好ましくは、本発明のポリペプチドは、50%血漿存在下で、少なくとも1種の細菌または真菌種、好ましくはS. aureus、S. epidermidis、P. aeruginosa、C. albicansおよび／A. nigerに対するインビトロIC99.9が、多くとも105 μMであり、最も好ましくは、本発明のポリペプチドは、50%血漿存在下で少なくともS. aureus、最も好ましくはCampocciaら(Int J Artif Organ 2008 Sep; 31(9): 841~7)で記載されたS. aureus JARに対するインビトロIC99.9が、多くとも105 μMである。本発明の好ましいポリペプチドは、S. aureusに対する本明細書で定義したようなIC99.9が、多くとも25.6 μM、より好ましくは多くとも12.8 μMである。

【0029】

好ましい変異体配列は、多くとも1個のアミノ酸がAによって置換されている。これは、任意のアミノ酸、例えば、アミノ酸位置1から24のいずれか1個のアミノ酸であってもよい。表6～8に示したように、1個のアミノ酸がアラニンによって置換されたポリペプチドは抗微生物活性の少なくとも一部を維持しているが、いくつかのアラニン置換ポリペプチドでは活性がさらに増加している。

【0030】

さらに、アミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPRまたは前記アミノ酸配列の変異体を含む単離または組換えポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、インビトロにおいて50%血漿存在下で、同じ条件下で測定した場合のOP-145の活性よりも少なくとも1.3倍高い抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、前記変異体が、少なくとも14個のアミノ酸を有し、場合によって、

ー 以下のアミノ酸置換の1個もしくは複数：

- ・ Kの正に荷電したアミノ酸、好ましくはR、ホモリシン、ホモアルギニン、オルニチン、ジアミノ酪酸およびジアミノプロピオン酸による置換、
- ・ Rの正に荷電したアミノ酸、好ましくはK、ホモリシン、ホモアルギニン、オルニチン、ジアミノ酪酸およびジアミノプロピオン酸による置換、
- ・ LのV、IまたはWによる置換、
- ・ YのWまたはQによる置換、
- ・ VのFまたはAによる置換、
- ・ IのLによる置換、
- ・ WのF、Y、LまたはIによる置換、

ー アミノ酸の対応するD-アミノ酸による1個もしくは複数の置換、

ー アミノ酸の対応する非天然アミノ酸による1個もしくは複数の置換、および／または

ー 前記アミノ酸配列の少なくとも14個の連続するアミノ酸のレトロインベルソ配列を含む、ポリペプチドが提供される。

【0031】

さらに、アミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPRまたは前記アミノ酸配列の変異体を含む単離または組換えポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、インビトロにおいて50%血漿存在下で、同じ条件下で測定した場合のOP-145の活性よりも少なくとも1.3倍高い抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、前記変異体が、少なくとも14個のアミノ酸を有し、場合によって、

- ー 以下のアミノ酸置換の1個もしくは複数：
 - ・ KのAまたは正に荷電したアミノ酸、好ましくはA、R、ホモリシン、ホモアルギニン、オルニチン、ジアミノ酪酸およびジアミノプロピオン酸による置換、
 - ・ RのAまたは正に荷電したアミノ酸、好ましくはA、K、ホモリシン、ホモアルギニン、オルニチン、ジアミノ酪酸およびジアミノプロピオン酸による置換、
 - ・ LのA、V、IまたはWによる置換、
 - ・ YのA、WまたはQによる置換、
 - ・ VのFまたはAによる置換、
 - ・ IのAまたはLによる置換、
 - ・ WのA、F、Y、LまたはIによる置換
- ー アミノ酸の対応するD-アミノ酸による1個もしくは複数の置換、
- ー アミノ酸の対応する非天然アミノ酸による1個もしくは複数の置換、および／または
- ー 前記アミノ酸配列の少なくとも14個の連続するアミノ酸のレトロインベルソ配列を含む、ポリペプチドが提供される。

10

【0032】

このような好ましい変異体配列は、さらに好ましくは多くとも1個のアミノ酸がAによって置換されている。これは、任意のアミノ酸であってもよく、したがって、アミノ酸位置1から24のいずれか1個のアミノ酸がAによって置換されていてもよい。

【0033】

20

本明細書ではアミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKR PVRの変異体の長さは少なくとも14個のアミノ酸であり、好ましくは以下のアミノ酸置換の1個または複数：

- ー Kの正に荷電したアミノ酸、好ましくはR、ホモリシン、ホモアルギニン、オルニチン、ジアミノ酪酸およびジアミノプロピオン酸、より好ましくはRによる置換、
- ー Rの正に荷電したアミノ酸、好ましくはK、ホモリシン、ホモアルギニン、オルニチン、ジアミノ酪酸およびジアミノプロピオン酸、より好ましくはKによる置換、
- ー LのV、IまたはWによる置換、
- ー YのWまたはQによる置換、
- ー VのFまたはAによる置換、
- ー IのLによる置換、
- ー WのF、Y、LまたはIによる置換、
- ー 1個または複数のアミノ酸の対応するD-アミノ酸による置換、
- ー 1個または複数のアミノ酸の対応する非天然アミノ酸による置換

30

を有する。好ましくは、前記変異体配列は、前記置換の14個まで、より好ましくは前記置換の10個まで、例えば、前記置換の9個まで、8個まで、7個まで、6個まで、5個まで、4個まで、3個まで、2個までまたは1個を有する。

【0034】

好ましくは、前記変異体配列は、場合によって以下のアミノ酸置換の1個または複数：

- ー アミノ酸位置2のKのRによる置換、
- ー アミノ酸位置3のKのRによる置換、
- ー アミノ酸位置4のLのVによる置換、
- ー アミノ酸位置5のYのWによる置換、
- ー アミノ酸位置8のLのVによる置換、
- ー アミノ酸位置9のVのFまたはAによる置換、
- ー アミノ酸位置10のKのRによる置換、
- ー アミノ酸位置11のIのLによる置換、
- ー アミノ酸位置12のLのIまたはWによる置換、
- ー アミノ酸位置15のWのF、Y、LまたはIによる置換、
- ー アミノ酸位置16のWのF、Y、LまたはIによる置換、

40

50

ー アミノ酸位置 18 の Y の Q による置換、
 ー アミノ酸位置 20 の K の R による置換、
 ー アミノ酸位置 21 の R の K による置換、
 ー 1 個または複数のアミノ酸の対応する D-アミノ酸による置換
 を有する。

【0035】

ここで、アミノ酸位置の番号付けは以下の通りである：

$L_1 K_2 K_3 L_4 Y_5 K_6 R_7 L_8 V_9 K_{10} I_{11} L_{12} K_{13} R_{14} W_{15} W_{16} R_{17} Y_{18} L_{19} K_{20} R_{21} P_{22} V_{23} R_{24}$ 。前記変異体はさらに好ましくは、場合によって 1 個または複数、より好ましくは、多くとも 1 個のアミノ酸の A による置換を有する。これは、任意のアミノ酸であってもよく、したがって、アミノ酸位置 1 から 24 のいずれか 1 個のアミノ酸が A によって置換されていてもよい。

10

【0036】

好ましくは、本明細書で定義したような変異体配列は、前記アミノ酸置換の 15 個まで、より好ましくは前記アミノ酸置換の 10 個まで、例えば、前記置換の 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個を有する。さらに、本明細書で定義したような変異体配列は好ましくは、少なくともアミノ酸配列 $KRLVKILKRWWRYL$ 、すなわち、アミノ酸 6 から 19 を含み、場合によって、前記アミノ酸置換の 1 個または複数を含む。したがって、アミノ酸配列 $LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPRV$ を含む、または前記アミノ酸配列の変異体を含む単離または組換えポリペプチドであって、前記ポリペプチドは抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、インビトロにおいて 50% 血漿存在下で、少なくとも 1 種の微生物種に対して、同じ条件下で測定した場合の OP-145 の活性よりも少なくとも 1.3 倍高い抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌および／または抗寄生虫活性を有し、前記変異体配列は少なくともアミノ酸配列 $KRLVKILKRWWRYL$ を有し、場合によって、

20

ー 以下のアミノ酸置換の 10 個まで：

・ L、V、F、A、I、W、Y または Q の群から選択される 1 個または複数のアミノ酸の前記群から選択される別のアミノ酸による置換、

・ R および／または K の A または正に荷電したアミノ酸による置換、

30

ー アミノ酸の対応する D-アミノ酸による 1 個もしくは複数の置換、

ー アミノ酸の対応する非天然アミノ酸による 1 個もしくは複数の置換、および／または

ー 前記アミノ酸配列の少なくとも 14 個の連続するアミノ酸のレトロインベルソ配列を有する、ポリペプチドが提供される。

【0037】

前記アミノ酸置換の少なくとも 1 個を有する変異体配列がさらに好ましい。

【0038】

本発明による好ましいポリペプチドは、表 1 で示したようなペプチド P139、P140、P141、P142、P143、P144、P145、P146、P147、P148、P149、P150、P151、P152、P153、P154、P155、P156、P157、P158、P159、P160、P161、P162 または P163 のアミノ酸配列を含み、なぜならば、これらのペプチドは PBS 中で高い抗微生物活性を有し、血漿存在下でペプチド OP-145 よりも高い抗微生物活性を有するからである。好ましくは、前記ポリペプチドは、表 1 で示したようなペプチド P139、P140、P141、P142、P145、P146、P147、P148、P150、P151、P152、P153、P154、P156、P157、P158、P159、P160、P161、P162 または P163 のアミノ酸配列を含み、なぜならば、これらのペプチドは血漿存在下でペプチド OP-145 よりも少なくとも 4 倍高い活性を有するからである。より好ましくは、前記ポリペプチドは、表 1 で示したようなペプチド P140、P141、

40

50

P145、P148、P150、P151、P152、P153、P158、P159、P160、P161、P162またはP163のアミノ酸配列を含み、なぜならば、これらのペプチドは血漿存在下でOP-145より、少なくとも8倍高い活性を有するからである。

【0039】

本発明の特に好ましいポリペプチドは、アミノ酸配列LKRLYKRLAKLLIKRLYRYLKKPVRを含み、これはペプチドP145のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体であり、前記変異体配列は少なくとも14個のアミノ酸を有し、場合によってアミノ酸の対応するD-アミノ酸および／もしくは対応する非天然アミノ酸による1個もしくは複数の置換を有し、ならびに／または場合によって前記アミノ酸配列の少なくとも14個の連続するアミノ酸のレトロインベルソ配列を有し、より好ましくは、前記ポリペプチドはアミノ酸配列LKRLYKRLAKLLIKRLYRYLKKPVRの少なくともアミノ酸14～19を含み、最も好ましくは、前記ポリペプチドはアミノ酸配列LKRLYKRLAKLLIKRLYRYLKKPVRを含む。このようなポリペプチドは、ペプチドP145が血清の存在下および非存在下の両方において、強力な広域性抗微生物活性および抗炎症特性を有するので、特に好ましい。

10

【0040】

本発明の別の特に好ましいポリペプチドは、アミノ酸配列LKRVRVKRVLKLLKRYWRQLKKPVRを含み、これはペプチドP148のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体であり、前記変異体の配列は少なくとも14個のアミノ酸を有し、場合によってアミノ酸の対応するD-アミノ酸および／もしくは対応する非天然アミノ酸による1個もしくは複数の置換を有し、ならびに／または場合によって前記アミノ酸配列の少なくとも14個の連続するアミノ酸のレトロインベルソ配列を有し、より好ましくは、前記ポリペプチドはアミノ酸配列LKRVRVKRVLKLLKRYWRQLKKPVRの少なくともアミノ酸14～19を含み、最も好ましくは、前記ポリペプチドはアミノ酸配列LKRVRVKRVLKLLKRYWRQLKKPVR、RVVKRVLKLLKRYWRQLKKPVR、LKRVRVKRVLKLLKRYWRQLKKP、RVVKRVLKLLKRYWRQLKK、WKRVFKLLKRYWRQLKKPVR、LKRVRVKRVLKLLKRYWRQLK、VWKRVFKLLKRYWRQLKK、WKRVFKLLKRYWRQLK、KRVFKLLKRYWRQLを含む。これらは、ペプチドP148、P325、P326、P327、P328、P329、P330、P331およびP332のアミノ酸配列である。このようなポリペプチドは、ペプチドP148が血清の存在下および非存在下の両方で強力な広域性抗微生物活性および抗炎症特性を有し、ペプチドP325、P326、P327、P328、P329、P330、P331およびP332はペプチドP148の活性を保持したため、特に好ましい。

20

30

【0041】

本発明の他の特に好ましいポリペプチドは、アミノ酸配列LKRLYKRVFRLKRYRQLRRPVRを含み、これはペプチドP159のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体であり、前記変異体配列は少なくとも14個のアミノ酸を有し、場合によってアミノ酸の対応するD-アミノ酸および／もしくは対応する非天然アミノ酸による1個もしくは複数の置換を有し、ならびに／または場合によって前記アミノ酸配列の少なくとも14個の連続するアミノ酸のレトロインベルソ配列を有し、より好ましくは、前記ポリペプチドはアミノ酸配列LKRLYKRVFRLKRYRQLRRPVRの少なくともアミノ酸14～19を含み、最も好ましくは、前記ポリペプチドはアミノ酸配列LKRLYKRVFRLKRYRQLRRPVRを含む。このようなポリペプチドは、ペプチドP159が血清の存在下および非存在下の両方で強力な広域性抗微生物活性および抗炎症特性を有するので、特に好ましい。

40

【0042】

本発明によるさらに好ましいポリペプチドは、表6、7および8で示したようなペプチドP246、P247、P248、P249、P250、P251、P252、P253

50

、P254、P255、P256、P257、P258、P259、P260、P261、P262、P263、P264、P265、P266、P267、P268、P269、P270、P271、P272、P273、P274、P275、P276、P277、P278、P279、P280、P281、P282、P283、P284、P285、P286、P287、P288、P289、P290、P291、P292、P293、P294、P295、P296、P297、P298、P299、P300、P301、P302、P303、P304、P305、P306、P307、P308、P309、P310、P311、P312、P313、P314、P315、P316またはP317のアミノ酸配列を含み、なぜならば、これらのペプチドはPBS中で高い抗微生物活性を有し、血漿存在下でペプチドOP-145よりも高い抗微生物活性を有するからである。このようなアミノ酸配列を有するポリペプチドは、1個のアミノ酸がAによって置換されたポリペプチドP145、P148またはP159の変異体である。本発明の特に好ましいポリペプチドは、位置7のRがAによって置換されたP148の変異体である、ペプチドP276のアミノ酸配列を有する。

10

【0043】

本発明による好ましいポリペプチドは、表1、2、5、6、7、8、9および/または10から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列を含む。本発明によるポリペプチドはより好ましくは、アミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPVRまたは表2もしくは表5～10から選択される50%血漿中で致死濃度(LC)99.9が多くとも102.4 μ Mであるそれらの変異体を含む。一実施形態では、表2または表5～10から選択される50%血漿中におけるLC99.9が多くとも51.2 μ M、より好ましくは多くとも51.2 μ Mであるポリペプチドが提供される。

20

【0044】

あるいは、またはアミノ酸の前述したような別のアミノ酸による置換に加えて、本明細書で定義したようなアミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPVRの変異体は、L-アミノ酸のその対応するD-アミノ酸または上記で示したアミノ酸置換の1個もしくは複数の後に前記アミノ酸配列中に存在するL-アミノ酸に対応するD-アミノ酸による1個もしくは複数の置換を含有していてもよい。大文字の1文字記号によって本明細書で示したアミノ酸、例えば、アラニンのAは、天然に生じるタンパク質中に通常見いだされるL-アミノ酸である。本明細書では「対応するD-アミノ酸」は、L-アミノ酸の対照物のD-アミノ酸と定義する。例えば、アラニン(A)に対応するD-アミノ酸はD-アラニン(a)であり、アルギニン(R)に対応するD-アミノ酸はD-アルギニン(r)であり、アスパラギン(N)に対応するD-アミノ酸はD-アスパラギン(n)であるなどである。本明細書で定義したような変異体配列のL-アミノ酸は全て、それらに対応するD-アミノ酸によって置換することができる。したがって、アミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPVRまたは前記アミノ酸配列の変異体を含む本発明によるポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌、抗寄生虫活性および/または抗炎症活性を有し、前記変異体配列が、少なくとも14個のアミノ酸を有し、場合によって以下を有するポリペプチドが提供される：

30

40

ー 以下のアミノ酸置換の1個または複数：

・ L、V、F、A、I、W、YまたはQの群から選択される1個または複数のアミノ酸の前記群から選択される別のアミノ酸またはアミノ酸L、V、F、A、I、W、YもしくはQに対応するD-アミノ酸による置換、

・ Rの正に帯電したアミノ酸、好ましくはK、ホモリシン、ホモアルギニン、オルニチン、ジアミノ酪酸およびジアミノプロピオン酸またはKもしくはRに対応するD-アミノ酸による置換、

・ Kの正に帯電したアミノ酸、好ましくはR、ホモリシン、ホモアルギニン、オルニチン、ジアミノ酪酸およびジアミノプロピオン酸またはRもしくはKに対応するD-アミ

50

ノ酸による置換、

ー アミノ酸の対応するD-アミノ酸による1個または複数の置換

このような変異体配列は、KおよびRから選択される1個または複数のアミノ酸、好ましくはせいぜい1個のアミノ酸のAまたは対応するD-アミノ酸による置換をさらに有することができる。好ましくは、前記変異体配列は場合によって以下のアミノ酸置換の1個または複数の有する：

- ・ KのRまたはRに対応するD-アミノ酸による置換、
- ・ RのKまたはKに対応するD-アミノ酸による置換、
- ・ LのV、IもしくはWまたはアミノ酸V、IもしくはWに対応するD-アミノ酸による置換、

10

- ・ YのWもしくはQまたはアミノ酸WもしくはQに対応するD-アミノ酸による置換、

- ・ VのFもしくはAまたはアミノ酸FもしくはAに対応するD-アミノ酸による置換、

- ・ IのLまたはLに対応するD-アミノ酸による置換、
- ・ WのF、Y、LもしくはIまたはアミノ酸F、Y、LもしくはIに対応するD-アミノ酸による置換、

ー アミノ酸の対応するD-アミノ酸による1個または複数の置換、

より好ましくは、前記変異体配列は、場合によって以下のアミノ酸置換の1個または複数の有する：

20

- ー アミノ酸位置2のKのRまたはRに対応するD-アミノ酸による置換、
- ー アミノ酸位置3のKのRまたはRに対応するD-アミノ酸による置換、
- ー アミノ酸位置4のLのVまたはVに対応するD-アミノ酸による置換、
- ー アミノ酸位置5のYのWまたはWに対応するD-アミノ酸による置換、
- ー アミノ酸位置8のLのVまたはVに対応するD-アミノ酸による置換、
- ー アミノ酸位置9のVのFもしくはAまたはアミノ酸FもしくはAに対応するD-アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置10のKのRまたはRに対応するD-アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置11のIのLまたはLに対応するD-アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置12のLのIもしくはWまたはアミノ酸IもしくはWに対応するD-アミノ酸による置換、

30

- ー アミノ酸位置15のWのF、Y、LもしくはIまたはアミノ酸F、Y、LもしくはIに対応するD-アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置16のWのF、Y、LもしくはIまたはアミノ酸F、Y、LもしくはIに対応するD-アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置18のYのQまたはQに対応するD-アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置20のKのRまたはRに対応するD-アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置21のRのKまたはKに対応するD-アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸の対応するD-アミノ酸による置換。

【0045】

40

本明細書で定義したようなアミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKR
PVRの変異体は、L-アミノ酸のその対応するD-アミノ酸による24個までの置換を含有していてもよい。したがって、変異体配列は、完全にD-アミノ酸から構成されていてもよい。例えば、変異体配列は、L-アミノ酸のその対応するD-アミノ酸による24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個の置換を含有していてもよい。好ましくは、L-アミノ酸のその対応するD-アミノ酸による1個または複数の置換を有する前記変異体配列は、表1で示したようなペプチドP139、P140、P141、P142、P143、P144、P145、P146、P147、P148、P149、P150、P151、P152、P153、P154、P155、P156、P157、P158

50

、P159、P160、P161、P162またはP163のアミノ酸配列の少なくとも14個のアミノ酸を含む。より好ましくは、場合によってL-アミノ酸のその対応するD-アミノ酸による1個または複数の置換を含む本発明のポリペプチドは、ペプチドP1454、P148またはP159のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本明細書で定義したような変異体配列は、アミノ酸のその対応するD-アミノ酸による1個の置換を含有する。アミノ酸配列中におけるD-アミノ酸の位置は重要ではない。別の実施形態では、変異体配列は、全てのL-アミノ酸のそれらの対応するD-アミノ酸による置換を含有する。本明細書で定義したような変異体配列はさらに、アミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKR PVRまたはペプチドP139～163、好ましくはP145、P148もしくはP159の1個のアミノ酸配列の少なくとも14個の連続するアミノ酸のレトロインベルソペプチドであってもよい。好ましくは、前記変異体配列は、前記アミノ酸配列、好ましくはペプチドP139～163、より好ましくはP145、P148またはP159の1個のアミノ酸配列の完全長のレトロインベルソペプチドである。レトロインベルソペプチドは、参照アミノ酸配列の逆向き配列においてD-アミノ酸から構成されるペプチドである。例えば、本発明の好ましい変異体配列は、P145、P148またはP159のアミノ酸配列のレトロインベルソペプチドであり、すなわち、それぞれ配列rvpkklyrylrkilkalrkylrkl、rvpkklqrwyrrklrkllkfvrrkwvrklもしくはrvprrrlqryyrklrrfvrkylrkl、または前記配列の1個の少なくとも14個のアミノ酸を有する。

【0046】

本明細書で定義したようなアミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKR PVRの変異体は、アミノ酸の非天然アミノ酸による5個までの置換、または上記で示したアミノ酸置換の1個もしくは複数後に前記アミノ酸配列中に存在するアミノ酸の非天然アミノ酸による5個までの置換を含んでもよい。本明細書では「非天然アミノ酸」とは、天然において出現するか否かに関係なく、遺伝子によってコードされていないアミノ酸を意味する。本明細書で定義したようなアミノ酸配列の変異体中に存在することができる非天然アミノ酸には、β-アミノ酸；p-アシル-L-フェニルアラニン；N-アセチルリシン；O-4-アリル-L-チロシン；2-アミノアジピン酸；3-アミノアジピン酸；ベータ-アラニン；4-tert-ブチルヒドロゲン2-アジドコハク酸；ベータ-アミノプロピオン酸；2-アミノ酪酸；4-アミノ酪酸；2,4-ジアミノ酪酸；6-アミノカブロン酸；2-アミノヘプタン酸；2-アミノイソ酪酸；3-アミノイソ酪酸；2-アミノピメリン酸；p-アミノフェニルアラニン；2,3-ジアミノ酪酸；2,3-ジアミノプロピオン酸；2,2'-ジアミノピメリン酸；p-アミノ-L-フェニルアラニン；p-アジド-L-フェニルアラニン；D-アリルグリシン；p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン；3-ベンゾチエニルアラニン；p-ブロモフェニルアラニン；tert-ブチルアラニン；tert-ブチルグリシン；4-クロロフェニルアラニン；シクロヘキシルアラニン；システイン酸；D-シトルリン；チオ-L-シトルリン；デスモシン；イブシロン-アミノヘキサ酸；N-エチルグリシン；N-エチルアスパラギン；2-フルオロフェニルアラニン；3-フルオロフェニルアラニン；4-フルオロフェニルアラニン；ホモアルギニン；ホモシステイン；ホモセリン；ヒドロキシリシン；アロ-ヒドロキシリシン；3-(3-メチル-4-ニトロベンジル)-L-ヒスチジンメチルエステル；イソデスモシン；アロ-イソロイシン；イソプロピル-L-フェニルアラニン；3-メチル-フェニルアラニン；N-メチルグリシン；N-メチルイソロイシン；6-N-メチルリシン；O-メチル-L-チロシン；N-メチルバリン；メチオニンスルホキシド；2-ナフチルアラニン；L-3-(2-ナフチル)アラニン；イソセリン；3-フェニルセリン；ノルバリン；ノルロイシン；5,5,5-トリフルオロ-DL-ロイシン；オルニチン；3-クロロ-チロシン；N5-カルバモイルオルニチン；ペニシラミン；フェニルグリシン；ピペリジン酸；ピリジルアラニン；1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボン酸；ベータ-2-チエニルアラニン；γ-カルボキシ-DL-グルタミン酸；4-フルオロ-DL-グルタミン酸；D-チロキシ；アロ-トレオニン；5-ヒドロキシ

ートリプトファン；5-メトキシートリプトファン；5-フルオロートリプトファン；3-フルオロバリンが含まれる。

【0047】

好ましくは、前記配列の天然アミノ酸は、対応する非天然アミノ酸によって置換される。本明細書では、「対応する非天然アミノ酸」とは、参照天然アミノ酸の誘導体である非天然アミノ酸を意味する。例えば、天然アミノ酸は、対応するβ-アミノ酸によって置換される。β-アミノ酸は、天然アミノ酸におけるようなα炭素ではなくβ炭素に結合したアミノ基を有する。例えば、α-アラニンはβ-アラニンによって置換される、などである。天然アミノ酸の前記天然アミノ酸の誘導体である非天然アミノ酸による置換のその他の例は以下である。アラニンは、例えば、ベータ-アラニン、 γ -ブチルアラニン、2-ナフチルアラニン；L-3-(2-ナフチル)アラニン、2-アミノイソ酪酸によって置換される。アルギニンは、例えば、ホモアルギニン、オルニチン、N5-カルバモイルオルニチン、3-アミノ-プロピオン酸によって置換される。アスパラギンは、例えば、N-エチルアスパラギンによって置換される。アスパラギン酸は、例えば、4-tert-ブチルヒドロゲン2-アジドコハク酸によって置換される。システインは、例えば、システイン酸、ホモシステインによって置換される。グルタミン酸は、例えば、 γ -カルボキシー-DL-グルタミン酸、4-フルオロ-DL-グルタミン酸によって置換される。グルタミンは、例えば、D-シトルリン、チオ-L-シトルリンによって置換される。グリシンは、例えば、N-メチルグリシン、 γ -ブチルグリシン、N-メチルグリシン、D-アリルグリシンによって置換される。ヒスチジンは、例えば、3-(3-メチル-4-ニトロベンジル)-L-ヒスチジンメチルエステルによって置換される。イソロイシンは、例えば、イソデスモシン、N-メチルイソロイシン、アローイソロイシンによって置換される。ロイシンは、例えば、ノルロイシン、デスモシン、5, 5, 5-トリフルオロロイシンによって置換される。リシンは、例えば、6-N-メチルリシン、2-アミノヘプタン酸、N-アセチルリシン、ヒドロキシリシン、アローヒドロキシリシンによって置換される。メチオニンは、例えば、メチオニンスルホキッドによって置換される。フェニルアラニンは、例えば、p-アミノ-L-フェニルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、2-フルオロフェニルアラニン、3-フルオロフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニンによって置換される。プロリンは、例えば、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、1-アセチル-4-ヒドロキシー-L-プロリンによって置換される。セリンは、例えば、ホモセリン、イソセリン、3-フェニルセリンによって置換される。トレオニンは、例えば、D-チロシン、アロートレオニンによって置換される。トリプトファンは、例えば、5-ヒドロキシトリプトファン、5-メトキシトリプトファン、5-フルオロトリプトファンによって置換される。チロシンは、例えば、O-メチル-L-チロシン、O-4-アリル-L-チロシン、3-クロロチロシンによって置換される。バリンは、例えば、ノルバリン、N-メチルバリン、3-フルオロバリンによって置換される。

【0048】

したがって、アミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWRYLKRPVRまたは前記アミノ酸配列の変異体を含む本発明によるポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌、抗寄生虫および／または抗炎症活性を有し、前記変異体配列が、少なくとも14個のアミノ酸を有し、場合によって以下を有するポリペプチドが提供される：

ー 以下のアミノ酸置換の1個または複数：

・ L、V、F、A、I、W、YまたはQの群から選択される1個または複数のアミノ酸の前記群から選択される別のアミノ酸またはアミノ酸L、V、F、A、I、W、YもしくはQに対応する非天然アミノ酸による置換、

・ RのKまたはKに対応する非天然アミノ酸による置換、

・ KのRまたはRに対応する非天然アミノ酸による置換、

10

20

30

40

50

ー アミノ酸の対応するD-アミノ酸による1個または複数の置換

このような変異体配列は、対応する非天然アミノ酸Aによって置換されたKおよびRから選択される、1個または複数のアミノ酸、好ましくはせいぜい1個のアミノ酸の置換をさらに有することができる。好ましくは、前記変異体配列は場合によって以下のアミノ酸置換の1個または複数の置換を有する：

- ・ KのRまたはRに対応する非天然アミノ酸による置換、
- ・ RのKまたはKに対応する非天然アミノ酸による置換、
- ・ LのV、IもしくはWまたはアミノ酸V、IもしくはWに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ・ YのWもしくはQまたはアミノ酸WもしくはQに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ・ VのFもしくはAまたはアミノ酸FもしくはAに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ・ IのLまたはLに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ・ WのF、Y、LもしくはIまたはアミノ酸F、Y、LもしくはIに対応する非天然アミノ酸による置換、

ー アミノ酸の対応する非天然アミノ酸による1個または複数の置換

より好ましくは、前記変異体配列は、場合によって以下のアミノ酸置換の1個または複数の置換を有する：

- ー アミノ酸位置2のKのRまたはRに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置3のKのRまたはRに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置4のLのVまたはVに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置5のYのWまたはWに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置8のLのVまたはVに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置9のVのFもしくはAまたはアミノ酸FもしくはAに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置10のKのRまたはRに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置11のIのLまたはLに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置12のLのIもしくはWまたはアミノ酸IもしくはWに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置15のWのF、Y、LもしくはIまたはアミノ酸F、Y、LもしくはIに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置16のWのF、Y、LもしくはIまたはアミノ酸F、Y、LもしくはIに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置18のYのQまたはQに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置20のKのRまたはRに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸位置21のRのKまたはKに対応する非天然アミノ酸による置換、

- ー アミノ酸の対応するD-アミノ酸による置換。

【0049】

本発明によるポリペプチドは、本明細書で定義したようなアミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPRV Rまたはこの配列の変異体から構成されてもよい。本明細書では「ポリペプチド」とは、ペプチド、ポリペプチドおよび複数のアミノ酸を含むペプチド模倣体を意味する。用語「ポリペプチド」および「ペプチド」は同義に使用される。抗微生物活性を有することが示された本発明による最小のポリペプチドの長さは、14個のアミノ酸である。しかし、アミノ酸配列またはその変異体は、大きなポリペプチド、すなわち、N末端および／またはC末端に1個または複数のアミノ酸が追加されて延長したポリペプチドの一部であってもよい。本発明のポリペプチドのアミノ酸配列またはその変異体は、N末端および／またはC末端が、好ましくはNおよび／またはC末端伸長基を含むことによって改変されていてもよい。あるいは、前記アミノ酸配列またはその変異体は、Nおよび／またはC末端が延長している。したがって、本発明によるポリペプチド

は、少なくとも14個のアミノ酸を含み、1000個までのアミノ酸を含んでいてもよい。しかし、生産費用をできる限り低く維持するためには、より小さなポリペプチドが好ましい。好ましくは、本発明によるポリペプチドの長さは、14~200個のアミノ酸、より好ましくは14~100個のアミノ酸、より好ましくは14~50個のアミノ酸である。例えば、本発明によるポリペプチドは、14から24個のアミノ酸、すなわち、16、17、18、19、20、21、22、23または24個のアミノ酸を含む。好ましくは、前記ポリペプチドは、少なくとも16個のアミノ酸、例えば、16~200個、16~100個または16~50個のアミノ酸を含む。前記ポリペプチドは、好ましくは14~24個のアミノ酸を有する。14~24個のアミノ酸を有するこのようなポリペプチドは、N末端および／またはC末端改変、例えば、アセチルー、ヘキサノイルー、デカノイルー、ミリストイルー、NH-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-およびプロピオニル残基からなる群から選択されるN末端改変、ならびに／または例えば、アミドー、NH-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-アミドーおよび1個もしくは2個のアミノヘキサノイル基からなる群から選択されるC末端改変をさらに有していてもよい。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、本明細書で定義したようなアミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPRVまたはその変異体から構成され、好ましくは表1で示したようなP145、P148もしくはP159のアミノ酸配列またはそれらの少なくとも14個のアミノ酸から構成され、場合によってN末端および／またはC末端改変を有し、好ましくはNおよび／またはC末端の伸長基を含む。

【0050】

本明細書では、「ペプチド模倣体」とは、非ペプチド構造要素を含有する化合物であって、本発明のポリペプチドの抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌、抗寄生虫および／または抗炎症特性を模倣する化合物を意味する。したがって、本発明のポリペプチドは、非ペプチド構造要素を含んでいてもよい。このような非ペプチド構造要素は、前記配列の1個または複数のアミノ酸の改変による置換の結果として、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列中に存在していてもよい。あるいは、本発明のポリペプチドは、本明細書で定義したようなアミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPRVの外側またはその変異体内、すなわち、任意選択のNおよび／またはC末端伸長基中に、非ペプチド構造要素を含んでいてもよい。ペプチド模倣体中の非ペプチド構造要素は通常、1個または複数の既存のアミノ酸の改変である。好ましいペプチド模倣体は、例えば、本明細書において上記にて定義したような非天然アミノ酸、立体拘束、ポリペプチドの環化、イソステリック置換またはその他の改変を使用した、本発明のポリペプチドの構造改変によって得られる。したがって、本発明によるポリペプチドのアミノ酸配列は、場合によって1個または複数の改変を含む。このようなポリペプチドは、天然のプロセスによって、例えば、翻訳後プロセッシングまたは化学的改変技術によって改変することができる。改変は、ポリペプチド主鎖、アミノ酸側鎖およびNまたはC末端を含む前記ポリペプチドの任意の位置に挿入することができる。1個のポリペプチドが、複数の種類の改変を含有していてもよく、1つの種類の改変をいくつか含有していてもよい。改変には、アセチル化、アミド化、アシル化、ホスホリル化、メチル化、脱メチル化、ADP-リボシル化、ジスルフィド結合形成、ユビキチン化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨウ素化、酸化、ペグ化および硫酸化が含まれる。さらに、本発明によるポリペプチドには、標識、例えば、ビオチン、フルオレセインまたはフラビン、脂質または脂質誘導体、糖基を設けてもよい。本発明によるポリペプチドにはさらに、標的化部分を設けてもよい。

【0051】

好ましい実施形態では、本発明によるポリペプチドは、N末端および／またはC末端が改変されている。したがって、本発明のポリペプチドは、好ましくはNおよび／またはC末端伸長基を含む。本発明のポリペプチドで 사용할 ことができるNおよびC末端伸長基は当業界ではよく知られている。N末端改変の好ましい例は、アセチルー、ヘキサノイルー、デカノイルー、ミリストイルー、NH-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CO-および

プロピオニル残基である。C末端改変の好ましい例は、アミドー、 $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-$ アミドーおよび1個または2個のアミノヘキサノイル基である。しかし、その他のNまたはC末端伸長基も当業者に公知の活性化合物を生じるであろう。一実施形態では、前記ポリペプチドは、N末端アセチルー、ヘキサノイルー、デカノイルー、ミリストイルー、 $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-$ またはプロピオニル残基ならびにC末端アミドー、 $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-$ アミドーおよび1個または2個のアミノヘキサノイル基を含む。一実施形態では、N末端がアセチル化され、C末端がアミド化されている本発明によるポリペプチドが提供される。

【0052】

したがって、本発明は、アミノ酸配列 $\text{LKKLYKRLVKILKRWWRYLKRPV}$ Rまたは前記アミノ酸配列の変異体を含む単離または組換えポリペプチドを提供し、前記ポリペプチドは抗微生物、抗細菌、抗ウイルス、抗真菌、抗寄生虫および／または抗炎症活性を有し、

前記変異体配列は少なくとも14個のアミノ酸を有し、場合によって以下のアミノ酸置換の1個または複数、好ましくは10個まで：

- アミノ酸位置2のKのRによる置換、
- アミノ酸位置3のKのRによる置換、
- アミノ酸位置4のLのVによる置換、
- アミノ酸位置5のYのWによる置換、
- アミノ酸位置8のLのVによる置換、
- アミノ酸位置9のVのFまたはAによる置換、
- アミノ酸位置10のKのRによる置換、
- アミノ酸位置11のIのLによる置換、
- アミノ酸位置12のLのIまたはWによる置換、
- アミノ酸位置15のWのF、Y、LまたはIによる置換、
- アミノ酸位置16のWのF、Y、LまたはIによる置換、
- アミノ酸位置18のYのQによる置換、
- アミノ酸位置20のKのRによる置換、
- アミノ酸位置21のRのKによる置換、および／または
- 1個もしくは複数のアミノ酸の対応するD-アミノ酸による置換を有し、

前記アミノ酸配列または前記その変異体はNおよび／またはC末端伸長基を含み、好ましくはN末端アセチルー、ヘキサノイルー、デカノイルー、ミリストイルー、 $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-$ またはプロピオニル残基ならびにC末端アミドー、 $\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{11}-\text{CO}-$ アミドーおよび1個または2個のアミノヘキサノイル基を含む。当業者にとっては、その他のNまたはC末端伸長基も活性化合物を生じることは明らかである。ここで、アミノ酸の番号付けは以下の通りである：

$\text{L}_1\text{K}_2\text{K}_3\text{L}_4\text{Y}_5\text{K}_6\text{R}_7\text{L}_8\text{V}_9\text{K}_{10}\text{I}_{11}\text{L}_{12}\text{K}_{13}\text{R}_{14}\text{W}_{15}\text{W}_{16}\text{R}_{17}\text{Y}_{18}\text{L}_{19}\text{K}_{20}\text{R}_{21}\text{P}_{22}\text{V}_{23}\text{R}_{24}$ 。前記ポリペプチドは、表1で示したようなP145、P148もしくはP159のアミノ酸配列またはそれらの少なくとも14個のアミノ酸を含むことが好ましい。前記ポリペプチドはさらに好ましくは14～24個のアミノ酸を有する。

【0053】

好ましい実施形態では、本発明によるポリペプチドは疎水性部分を含む。陽イオン（ポリ）ペプチドへの疎水性基の付加は、微生物内毒素を中和し、微生物の膜と相互作用するそれらの能力を改善し、したがって、微生物、例えば、病原体を排除するそれらの能力を改善する。

【0054】

本明細書で前述したように、本発明によるポリペプチドは、当業界で公知の化学的改変技術によって改変することができる。本発明によるポリペプチドの改変は、ポリペプチド合成の間または最後に導入することができる。例えば、固相合成技術を使用してポリペプ

10

20

30

40

50

チドを合成するとき、N末端アセチル化は、まだ樹脂に結合しているアミノ酸配列と酢酸との反応によって最後に実施することができる。別の例として、C末端アミド化は、例えば、固相ペプチド合成において特殊な樹脂、例えば、市販のTentagel SAM (ex Rapp, Tübingen, Germany) を使用して実施する。これらの樹脂は、切断中にアミド化した(ポリ)ペプチドを放出する化学的な取っ手を含む。これらおよびその他のポリペプチド改変法は当業者には公知である。

【0055】

好ましい実施形態では、本発明によるポリペプチドは細胞透過性ペプチドを含む。このような細胞透過性ペプチドは、本発明の抗微生物ペプチドに結合したときにポリペプチドが細胞膜を効率よく移動するのを容易にするペプチド配列である。当業界で公知のいかなる細胞透過性ペプチドも本発明のポリペプチドで使用する事ができる。細胞透過性ペプチドの例には、これらに限定はしないが、ポリアルギニン、TAT、HIV-Tat、R9-TAT、Pep-1、Pep-7、ペネトラチン、トランスポートアン、Antp、Rev、FHV被覆タンパク質、プフォルインII、MAP、K-FGF、Ku70、SynB1、HN-1、TP10、pVEC、BGSCおよびBGTCが含まれる。

【0056】

本発明のポリペプチドは、それ自体が天然において生じないポリペプチドであることが好ましい。すなわち、本発明のポリペプチドは、天然に生じないポリペプチドであることが好ましい。本明細書では「天然に生じない」とは、ポリペプチドがその形態では天然に見いだされない、好ましくは、ポリペプチドのアミノ酸配列が天然には見いだされないことを意味する。

【0057】

本明細書で定義したようなアミノ酸配列LKKLYKRLVKILKRWWRYLKR PVRまたはその変異体を含む、好ましくはP145、P148もしくはP159のアミノ酸配列またはそれらの少なくとも14個のアミノ酸を含む6個までのポリペプチドを含む本発明のポリペプチドの多量体も提供される。前記多量体は、同じアミノ酸配列を有する6個までのポリペプチドモノマーまたは2個以上のポリペプチドモノマーが、異なるアミノ酸配列を有する6個までのポリペプチドモノマーを含んでいてもよい。好ましい実施形態では、本発明による多量体は、同じアミノ酸配列を有する本発明による6個までのポリペプチドを含む。

【0058】

本発明によるポリペプチドの塩も提供される。このような塩には、これらに限定はしないが、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。本明細書では、ポリペプチドの「薬学的に許容される塩」とは、ポリペプチドの所望する抗微生物、抗細菌、抗真菌、抗ウイルス、抗寄生虫および／または抗炎症活性を保持し、ヒトまたは動物への投与に適した塩を意味する。ポリペプチドの塩の調製方法は当業界では公知であり、例えば、塩が不溶性である溶媒もしくは媒体中で、または後で真空内もしくは凍結乾燥によって除去される水などの溶媒中で、生成物の遊離酸または遊離塩基形態を、適切な酸または塩基の1当量または複数の当量と反応させることによって、あるいは既存の塩の陽イオンを適切なイオン交換樹脂上で別の陽イオンと交換することによって、ポリペプチドを薬学的に許容される酸または塩基と混合することを一般的に含む。薬学的に許容される酸および塩基の例には、ポリペプチドの遊離アミノ基とアンモニウム塩を形成するギ酸、酢酸、プロピオン酸、乳酸、グリコール酸、シュウ酸、ピルビン酸、コハク酸、マレイン酸、マロン酸、トリフルオロ酢酸、ケイ皮酸、硫酸、塩酸、臭化水素酸、硝酸、過塩素酸、リン酸およびチオシアン酸などの有機酸および無機酸ならびにポリペプチドの遊離カルボキシル基とカルボン酸塩を形成する塩基、例えば、エチルアミン、メチルアミン、ジメチルアミン、トリエチルアミン、イソプロピルアミン、ジイソプロピルアミンならびにその他のモノ、ジおよびトリアルキルアミンおよびアリルアミンが含まれる。

【0059】

本発明によるポリペプチドは、様々な方法によって調製することができる。例えば、ポ

10

20

30

40

50

リペプチドは、一般的に使用される固相合成法、例えば、当業界でよく知られているアルファアミノ基のt-BOCまたはFMOC保護が関与する方法によって合成することができる。ここで、大きくなるアミノ酸鎖に次々とアミノ酸を付加する。このような方法は、例えば、Merrifield (1963)、J. Am. Chem. Soc. 85: 2149~2156; およびAthertonら、「Solid Phase Peptide Synthesis」IRL Press、London、(1989)に記載されている。固相合成法は、ポリペプチドまたは比較的短い長さ、例えば、アミノ酸約70個までの長さのポリペプチドの大規模生産での合成に特に適している。

【0060】

あるいは、本発明のポリペプチドは、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が宿主細胞中で発現する当業界でよく知られている組換え技術を使用して調製することができる。したがって、本発明は、本発明によるポリペプチドを調製するための方法であって、

- 本発明によるポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子を用意すること；
- 宿主細胞を前記核酸分子で形質転換すること；
- 前記ポリペプチドの発現を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養すること；
- 前記細胞から前記ポリペプチドを収集すること；
- 場合によって、例えば、Nおよび／またはC末端伸長基を付加することによって前記ポリペプチドのN末端またはC末端を改変することを含む方法を提供する。

【0061】

本発明は、本発明によるポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子をさらに提供し、これをまた本明細書では、本発明による核酸分子と称する。本明細書では、本発明の核酸分子または核酸配列は、ヌクレオチド、好ましくはDNAおよび／またはRNAの鎖を含む。

【0062】

本発明による核酸配列分子を含むベクターがさらに提供される。本明細書では「ベクター」という用語は、宿主細胞に異種核酸配列を導入することができる核酸分子、例えば、プラスミド、バクテリオファージまたは動物ウイルスを意味する。本発明によるベクターは、異種核酸配列によってコードされた本発明のポリペプチドの宿主細胞における発現または産生を可能にする。本発明に従って使用されるベクターは、例えば、動物ウイルスから得られ、その例には、これらに限定はしないが、ワクシニアウイルス（改変ワクシニアウイルスアンカラ、MVAなどの弱毒化誘導物を含む）、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、アデノウイルスまたはレトロウイルスが含まれる。本発明によるベクターは好ましくは、選択された宿主細胞における本発明によるポリペプチドの転写開始に適したプロモーターを含む発現カセットを含む。真核宿主細胞における本発明によるポリペプチドの発現に適したプロモーターの例には、これらに限定はしないが、哺乳動物宿主用のベクターアクチンプロモーター、イムノグロブリンプロモーター、5S RNAプロモーターまたはサイトメガロウイルス（CMV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）およびサルウイルス40（SV40）プロモーターなどのウイルス由来プロモーターが含まれる。

【0063】

本発明は、本発明による核酸分子および／またはベクターを含む組換え宿主細胞をさらに提供する。宿主細胞は、本発明によるベクターなどの核酸分子によって形質転換した、または形質転換することができる細胞である。「形質転換」とは、外来核酸の受容細胞への導入を意味する。宿主細胞の形質転換によって、前記細胞による組換えタンパク質の一時的な発現を引き起こすことができ、組換えタンパク質は規定した期間のみ発現することを意味する。あるいは、受容細胞の形質転換は安定した発現を引き起こすことができ、核酸が細胞のゲノムに導入され、したがって次世代の細胞に受け継がれることを意味する。さらに、組換えタンパク質の誘導発現を実現することができる。誘導発現系には、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列の発現を可能にする分子の存在または非存在が必要である。誘導発現系の例には、これらに限定はしないが、Tet-OnおよびTet-Off発現系、ホルモン誘導性遺伝子発現系、例えば、エクジソン誘導性遺伝子発現系、ア

ラビノース誘導性遺伝子発現系および誘導性メタロチオネインプロモーターを含む、pMT/BiPベクター（Invitrogen）を使用した*Drosophila*誘導性発現系などが含まれる。本発明によるポリペプチドの調製方法で使用した宿主細胞は、例えば、グラム陽性原核細胞、グラム陰性原核細胞または真核細胞である。好ましくは、前記宿主細胞は、真核細胞、例えば、植物細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞または昆虫細胞、最も好ましくは昆虫細胞または哺乳動物細胞である。適切な宿主細胞の例には、トウモロコシ細胞、コメ細胞、アオウキクサ細胞、タバコ細胞（BY-2またはNT-1細胞など）およびジャガイモ細胞などの植物細胞が含まれる。酵母細胞の例は、*Saccharomyces*および*Pichia*である。昆虫細胞の例は、*Spodoptera frugiperda*細胞、例えば、Tn5、SF-9およびSF-21細胞ならびに*Drosophila*細胞、例えば、*Drosophila Schneider* 2（S2）細胞である。本発明によるポリペプチドの発現に適した哺乳動物細胞の例には、これらに限定はしないが、アフリカミドリザル腎臓（ペロ）細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK-21など）細胞、ヒト網膜細胞（例えば、PerC6細胞）、ヒト胚腎臓細胞（例えば、HEK293細胞）、メイディン・ダービーイヌ腎臓（MDCK）細胞、ニワトリ胚性線維芽細胞（CEF）、ニワトリ胚腎臓細胞（CEK細胞）、胚盤由来胚性幹細胞（例えば、EB14）、マウス胚性線維芽細胞（例えば、3T3細胞）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞およびこれらの細胞種の誘導物が含まれる。

10

【0064】

本発明による方法は好ましくは、本発明によるポリペプチドを収集、精製および／または単離するステップをさらに含む。得られた本発明によるポリペプチドは、場合によってさらなる精製、単離または処理ステップ、例えば、ゲル電気泳動またはクロマトグラフィー法を使用した精製の後で、好ましくはヒトの治療において使用する。

20

【0065】

本発明によるポリペプチドは、治療および非治療適用の両方において有利に使用することができるいくつかの活性を示す。特に、本発明によるポリペプチドは、様々な微生物感染、例えば、細菌感染、真菌感染、ウイルス感染の抑制および寄生虫感染の抑制に有用である。したがって、本発明によるポリペプチドまたはその薬学的に許容される塩ならびに少なくとも1種の薬学的に許容される担体、希釈剤および／または賦形剤を含む医薬組成物が提供される。本発明による核酸分子またはベクターならびに少なくとも1種の薬学的に許容される担体、希釈剤および／または賦形剤を含む医薬組成物も提供される。

30

【0066】

本発明は、医薬としての使用のための本発明によるポリペプチドをさらに提供する。医薬としての使用のための、本発明によるポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子がさらに提供される。前記医薬は、治療薬または予防薬であってもよい。

【0067】

一実施形態では、本発明は、細菌、真菌、ウイルスおよび／または寄生虫感染症に罹患した、または罹患する危険性がある対象の治療のための方法であって、前記対象に治療有効量の本発明によるポリペプチド、本発明による医薬組成物または本発明による核酸分子を投与することを含む方法を提供する。微生物に感染した対象の治療または微生物感染の予防のための医薬の調製方法も提供される。好ましい実施形態では、前記微生物は、細菌、真菌、ウイルスまたは寄生虫である。微生物、細菌、真菌、ウイルスおよび／もしくは寄生虫感染または微生物、細菌、真菌、ウイルスおよび／もしくは寄生虫感染によって生じる状態の予防または治療において、本発明に従って使用するためのポリペプチドおよび／または核酸分子がさらに提供される。

40

【0068】

本明細書では、「対象」は、ヒトまたは動物である。対象には、これらに限定はしないが、ヒト、ブタ、フェレット、アザラシ、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシおよびウマなどの哺乳動物、ニワトリ、アヒル、ガチョウおよびシチメンチョウなどの鳥類が含まれる。本発明の好ましい実施形態では、対象は哺乳動物である。特に好ましい実施形態では、対象は

50

ヒトである。

【0069】

本発明はまた、微生物、例えば、細菌、ウイルス、真菌または寄生虫の成長を阻害するための方法であって、前記微生物または寄生虫を本発明によるポリペプチドまたは医薬組成物と接触させることを含む方法を提供する。前記接触は、インビボまたはインビトロにおいて実施することができる。

【0070】

本発明によるポリペプチドおよび医薬組成物は、様々な微生物感染症、例えば、様々なウイルス、細菌および真菌感染症の治療に有効である。例えば、ポリペプチドおよび医薬組成物は、グラム陰性菌およびグラム陽性菌の治療に有効である。本発明のポリペプチドおよび組成物で治療できるヒトまたは動物における感染を引き起こし得る病原菌の例には、これらに限定はしないが、*Listeria*、*Escherichia*、*chlamydia*、リケッチア細菌、*mycobacteria*、*staphylococci*、*streptococci*、*pneumococci*、*meningococci*、*Klebsiella*、*pseudomonas*、*Legionella*、*diphtheria*、*salmonella*、桿菌、*Vibrio cholerae*、破傷風、*Clostridium*、*Bacillus*、*Yersinia*および*Leptospira*細菌が含まれる。

【0071】

本発明のポリペプチドおよび組成物で治療できるヒトまたは動物における感染を引き起こし得る病原ウイルスの例には、これらに限定はしないが、A、BもしくはC型肝炎、ヘルペスウイルス（例えば、VZV、HSV-I、HAV-6、HSV-II、CMV、エプスタインバーウイルス）、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器多核体ウイルス（RSV）、ロタウイルス、モルビリウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、HTLVウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス（HIVウイルス；例えば、I型およびII型）が含まれる。

【0072】

本発明のポリペプチドおよび組成物で治療できるヒトまたは動物における感染を引き起こし得る病原真菌の例には、これらに限定はしないが、*Candida*（例えば、*albicans*、*krusei*、*glabrata*、*tropicalis*）、*Aspergillus*（例えば、*fumigatus*、*niger*）、*Cryptococcus neoformans*、*Histoplasma capsulatum*、*Mucorales*属、*Blastomyces dermatitidis*、*Paracoccidioides brasiliensis*および*Coccidioides immitis*が含まれる。

【0073】

本発明のポリペプチドおよび組成物で治療できるヒトまたは動物における感染を引き起こし得る病原寄生虫の例には、これらに限定はしないが、*Entamoeba histolytica*、*Plasmodium*（例えば、*falciparum*、*vivax*）、*Entamoeba*、*Giardia*、*Balantidium coli*、*Acanthamoeba*、*Cryptosporidium*種、*Pneumocystis carinii*、*Babesia microti*、*Trypanosoma*（例えば、*brucei*、*cruzi*）、*Leishmania*（例えば、*donovani*）および*Toxoplasma gondii*が含まれる。

【0074】

好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドおよび医薬組成物は、メチシリン耐性*Staphylococcus aureus*（MRSA）および（非耐性）*S. aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、グラム陰性菌*Pseu*

10

20

30

40

50

*domonas aeruginosa*および真菌種*Candida albicans*および*Aspergillus niger*によって引き起こされる感染の治療に有効である。

【0075】

ポリペプチドを含有する組成物は、予防的および／または治療的処置のために投与することができる。治療適用において、ポリペプチドまたは組成物は、既に疾患に罹患している対象、好ましくはヒトに、感染症の症状または感染およびその合併症から生じる状態を抑制するのに十分な量で投与する。予防適用において、ポリペプチドまたは組成物は、微生物または寄生虫感染症に罹患する危険性のある対象、例えば、ヒトまたは動物に、感染を予防する、または少なくとも感染の発生を阻害するのに十分な量で投与する。ポリペプチドは通常、本発明による医薬組成物中に、状態または疾患、特に微生物または寄生虫感染に関連した症状を治すのに十分な量である治療的量で存在する。本発明によるポリペプチドまたはそれらの少なくとも2つの組合せの投与の一般的用量は、ポリペプチドの大きさに応じて、体重1kg当たりポリペプチド0.01～10mgの間である。

【0076】

本発明のポリペプチドおよび医薬組成物は、多種多様な適用のために適している。例えば、これらは、皮膚感染、創傷感染および尿路感染症の治療または予防において、局所適用するために使用することができる。本明細書で以前に詳述したように、本発明のポリペプチドは、バイオフィーム形成を防止することができ、既存のバイオフィームを分散させ、バイオフィーム形成部位およびその周囲の細菌、真菌またはその他の微生物を死滅させ、炎症誘発性微生物内毒素を中和することによって免疫応答を調節する。細菌バイオフィームは、皮膚の創傷治癒を遅延させ、感染した皮膚創傷、皮膚感染または尿路感染症の治療または治療における従来の抗生物質の局所的抗細菌効率を低下させることがある。したがって、本発明は、皮膚感染、創傷感染および／または尿路感染症の治療または予防において使用するための本発明によるポリペプチド、医薬組成物および／または核酸分子を提供する。創傷治癒に使用するための本発明によるポリペプチド、医薬組成物および／または核酸分子も提供される。皮膚感染、創傷感染、尿路感染症の治療もしくは予防および／または創傷治癒のための医薬組成物の製造における本発明によるポリペプチド、医薬組成物および／または核酸分子の使用がさらに提供される。本発明は、皮膚感染、創傷感染および／または尿路感染症に罹患した対象の治療のための方法であって、前記対象に治療有効量の本発明によるポリペプチド、本発明による医薬組成物または本発明による核酸分子を投与することを含む方法をさらに提供する。

【0077】

本発明のポリペプチドは、微生物、例えば、細菌、ウイルス、真菌、寄生虫感染に感受性のある材料の保存料としてさらに有利に使用することができる。このような材料は、本発明のポリペプチドによって含浸またはコーティングまたはカバーすることができる。本明細書で以前に詳述したように、本発明のポリペプチドは血液、血漿および血清中で、ならびに血漿成分などの成分の存在下で、抗微生物活性を保持する。したがって、本発明のポリペプチドおよび医薬組成物は、全身適用ならびにインプラントおよび医療装置に関連した感染の治療および／または予防のために特に適している。本明細書では、「医療装置」という用語は、ヒトまたは動物の体内で使用することができるいかなる種類の装置も意味し、これらに限定はしないが、医療器具、医療用具、股関節および膝関節を含む人工関節などの人工器官、ならびに歯科補綴、乳房インプラント、ペースメーカー、心臓弁、ステント、カテーテル、耳管、スプリント、医療装置用のネジなどの埋め込み型装置ならびに創傷または組織包帯が含まれる。インプラントおよび医療装置は微生物感染、特にバイオフィーム感染に関与することが多く、実施例で示したように本発明のポリペプチドによってうまく抑制される。さらにインプラントおよび医療装置は一般的に、移植後に宿主体液の血漿成分によって迅速にカバーされる。本発明のポリペプチドは実施例で示したように血漿成分の存在下で抗微生物活性を発揮するため、インプラントおよび／または医療装置の微生物感染は、本発明によるポリペプチドによって効率よく治療および／または予防

される。したがって、インプラントおよび／または医療装置の保存剤としての本発明のポリペプチドの使用が提供される。インプラントおよび／または医療装置の微生物感染、好ましくは細菌感染の予防および／または治療で使用するための本発明のポリペプチドも提供される。

【0078】

本発明のポリペプチドは、制御放出担体および／または標的化送達担体に有利に組み込まれる。本明細書では、「制御放出」という用語は、時間に依存した方法で本発明のポリペプチドを放出することを意味する。一実施形態では、制御放出は低速放出を意味する。本明細書では、「標的化送達」という用語は、部位特異的な方法で本発明のポリペプチドを放出することを意味する。制御放出担体の使用は、本発明のポリペプチドの注射などによる頻繁な投与を回避することができるという利点を有する。標的化送達担体の使用は、本発明のポリペプチドを対象の体の目的の部位、例えば、炎症部位または感染部位に効率よく送達し、および／または保持させるという利点を有する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、細菌、真菌、ウイルスおよび寄生虫を含む微生物が感染した部位を標的化する。制御放出および／または標的化送達担体は、当業界ではよく知られている。制御放出および／または標的化送達担体の非限定的な例は、ナノ粒子、マイクロ粒子、ナノカプセル、マイクロカプセル、リボソーム、小球体、ハイドロゲル、ポリマー、脂質複合体、血清アルブミン、抗体、シクロデキストリンおよびデキストランである。制御放出は、例えば、本発明のポリペプチドをこのような担体の中または表面上に組み込むことによって実現する。担体は、本発明のポリペプチドを捕捉し、適切な環境、例えば、水性、酸性もしくは塩基性環境または体液中でゆっくり分解または溶解し、それによりポリペプチドを放出する粒子を形成する材料を含む。標的化送達は、例えば、担体の表面上に標的化基を設けることによって実現する。標的化基を含むこのような担体の例は、抗体機能化担体、部位特異的リガンドを有する担体および正または負の表面電荷を有する担体である。制御放出および／または標的化送達に好ましい粒子は、場合によって標的化基を備えるナノ粒子、すなわち、直径約1から500nm、好ましくは直径約200nmまでの範囲の粒子およびリボソームである。したがって、本発明は本発明のポリペプチドを含む制御放出担体およびこのような制御放出担体を含む医薬組成物を提供する。本発明のポリペプチドを含む標的化送達担体およびこのような標的化送達担体を含む医薬組成物も提供される。前記担体は、好ましくは、ナノ粒子、マイクロ粒子、ナノカプセル、マイクロカプセル、リボソーム、小球体、ハイドロゲル、ポリマー、脂質複合体、血清アルブミン、抗体、シクロデキストリンおよびデキストランからなる群から選択される。

【0079】

好ましい標的化送達および／または制御放出担体は、生分解性材料からなる。本明細書では「生分解性」とは、生理学的条件下で分解する分子を意味する。これには、加水分解によって分解可能な分子および酵素的分解を必要とする分子が含まれる。適切な生分解性物質には、これらに限定はしないが、PLA（ポリ乳酸）、PGA（ポリグリコール酸）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリエチレンオキシド（PEO）、ポリジオキサノン（PDS）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリプロピレンフマル酸、ラクチド、グリコリドおよびカプロラクトンなどのラクトン由来のポリマー、炭酸トリメチレンおよび炭酸テトラメチレンなどの炭酸塩、ジオキサノン、エチレングリコール、ポリエステルアミド（PEA）エチレンオキシド、エステルアミド、γ-ヒドロキシ吉草酸、β-ヒドロキシプロピオン酸、α-ヒドロキシ酸、ヒドロキシブテレート（buterate）、ヒドロキシアルカノエート、炭酸ポリイミド、ポリウレタン、ポリ酸無水物およびそれらの組合せ、ヒアルロン酸、キトサンおよびセルロースなどの多糖類ならびにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質などの生分解性ポリマーおよび天然の生分解性物質が含まれる。

【0080】

好ましくはインプラントおよび／または医療装置のための、本発明のポリペプチドを含むコーティングがさらに提供される。一実施形態では、このようなコーティングは、本発

明のポリペプチドの制御放出を提供する。医療装置のためのこのような制御放出コーティングは、好ましくは、本発明のポリペプチドの放出がコーティング物質の分解によって実現するように生分解性物質を含む。したがって、本発明のポリペプチドを含む制御放出コーティングも提供される。本発明のポリペプチドおよび生分解性物質を含むこのようなコーティングを含む医療装置がさらに提供される。本発明のポリペプチドおよび生分解性物質を含むこのようなコーティングを含むインプラントがさらに提供される。本発明による生分解性コーティングは、上記で定義したような生分解性物質を含む。特に、このような生分解性コーティングは、PLA（ポリ乳酸）、PGA（ポリグリコール酸）、ポリカプロラクトン（PCA）、ポリエチレンオキシド（PEO）、ポリジオキサノン（PDS）、ポリカプロラクトン（PCL）、ポリプロピレンフマル酸、ラクチド、グリコリドおよびカプロラクトンなどのラクトン由来のポリマー、炭酸トリメチレンおよび炭酸テトラメチレンなどの炭酸塩、ジオキサノン、エチレングリコール、ポリエステルアミド（PEA）エチレンオキシド、エステルアミド、 γ -ヒドロキシ吉草酸、 β -ヒドロキシプロピオン酸、 α -ヒドロキシ酸、ヒドロキシブテレート（buterate）、ヒドロキシアルカノエート、炭酸ポリイミド、ポリウレタン、ポリ酸無水物およびそれらの組合せ、ヒアルロン酸、キトサンおよびセルロースなどの多糖類ならびにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質からなる群から選択される材料を含む。さらに、インプラントおよび／または医療装置の微生物感染、好ましくは細菌感染を予防および／または治療する方法であって、前記インプラントおよび／または医療装置に本発明のポリペプチドを含むコーティングを提供し、前記インプラントまたは医療装置を対象に移植することを含む方法が提供される。

10

20

【0081】

ポリペプチドおよび医薬組成物はまた、リポテイコ酸、ペプチドグリカンおよびリボ多糖などの炎症誘発性微生物内毒素を中和し、それによって好中球、マクロファージ／単球およびリンパ球の流入ならびに感染した対象による炎症誘発性微生物化合物の放出を阻害、低下または防止するので、抗炎症剤として有用である。したがって、炎症誘発性化合物を放出することができる細胞を本発明によるポリペプチドと接触させることを含む、炎症誘発性化合物の放出を阻害する方法も提供される。前記接触は、インビボまたはインビトロにおいて実施することができる。抗炎症剤としての使用のための本発明によるポリペプチドがさらに提供される。

30

【0082】

本発明によるポリペプチドは強力な抗微生物剤であるが、従来の抗感染薬などの公知の抗微生物剤、例えば、抗生物質、抗ウイルス薬および抗真菌薬またはその他の抗微生物ペプチド、ならびに抗体ならびに化学物質、例えば、増感剤、ナノ粒子と組み合わせることができる。このような組合せによって、抗微生物活性の増大または活性範囲の拡大を引き起こすことができる。本発明のポリペプチドは、細菌感染を治療するために、例えば、ペニシリン、セファロスポリン、マクロライド、フルオロキノロン、スルホンアミド、テトラサイクリンおよび／またはアミノグリコシドと組み合わせることができる。ウイルス感染を治療するために、ポリペプチドは、抗ウイルスヌクレオシド類似体、例えば、アシクロビル、ガンシクロビル、ジドブジン（AZT）もしくはジダノシンまたはオセルタミビル、ペラミビルもしくはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤と組み合わせることができる。真菌感染を治療するために、本発明のポリペプチドおよび組成物は、ポリエン抗真菌薬、イミダゾール、トリアゾール、アリルアミン、エキノキャンディン、シクロピロクス、フルシトシンおよび／またはグリセオフルビンと組み合わせることができる。したがって、本発明は、本発明によるポリペプチドおよび追加の抗微生物剤、例えば、好ましくは、ペニシリン、セファロスポリン、カルバペネムおよびムピロシンからなる群から選択される抗生物質または抗微生物ペプチドを含む医薬組成物を提供する。

40

【0083】

本発明による医薬組成物は、少なくとも1種の薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む。適切な担体の例には、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KL

50

H)、血清アルブミン(例えば、BSAまたはRSA)およびオボアルブミンが含まれる。好ましい実施形態では、前記適切な担体は溶液、例えば、生理食塩水である。錠剤、カプセルなどに組み込むことができる賦形剤の例は以下である:トラガカントゴム、アカシアゴム、コーンスターチまたはゼラチンなどの結合剤、結晶セルロースなどの賦形剤、コーンスターチ、アルファ化デンプン、アルギン酸などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの潤沢剤、スクロース、ラクトースまたはサッカリンなどの甘味剤、ペパーミント、ウィンターグリーンまたはチェリーのオイルなどの香味剤。投与単位形態がカプセルのとき、それは上記の種類 material に加えて、脂肪油などの液体担体を含有していてもよい。様々なその他の材料はコーティングとして、またはそうでなければ投与単位の物理的形態を改変するために存在してもよい。例えば、錠剤は、シェラック、糖またはその両方でコーティングしてもよい。シロップまたはエリキシル剤は、活性化合物、甘味剤としてスクロース、保存剤としてメチルおよびプロピルパラベン、色素ならびにチェリーまたはオレンジフレーバーなどの香味料を含有してもよい。本発明による医薬組成物は、好ましくはヒトでの使用に適している。

【0084】

本明細書で記載した医薬組成物は様々な異なる方法で投与することができる。例には、本発明によるポリペプチドを含み、薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物を、経口、鼻腔内、直腸、局所、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、真皮下、経皮、クモ膜下腔内および頭蓋内法によって投与することが含まれる。経口投与のために、活性成分は、カプセル、錠剤および散剤などの固形剤形、またはエリキシル剤、シロップおよび懸濁剤などの液体剤形で投与することができる。

【0085】

注射用の滅菌組成物は、本発明のポリペプチドを、注射用媒体、例えば、水またはゴマ油、ココナツ油、ピーナツ油、綿実油などのような天然に生じる植物油またはオレイン酸エチルなどのような合成脂肪媒体に溶解または懸濁することによって、従来の調剤実務に従って製剤化することができる。緩衝液、保存剤、抗酸化剤なども組み込むことができる。

【0086】

局所投与用組成物は、また、従来の調剤実務に従って製剤化することができる。本明細書では「局所投与」とは、微生物または寄生虫感染によって生じる状態を部分的に治療するために、皮膚または粘膜などの体表面に適用することを意味する。局所投与に適した製剤の例には、これらに限定はしないが、クリーム、ジェル、軟膏、ローション、フォーム、懸濁液、スプレー、エアロゾル、粉末エアロゾルが含まれる。局所医薬は皮膚用であり得、皮膚に直接適用することを意味する。局所医薬はまた、例えば、呼吸器の粘膜上皮に適用するための吸入用であってもよく、または結膜に適用する点眼薬もしくは耳に入れる点耳薬など皮膚以外の組織の表面に適用してもよい。局所投与用に製剤化された前記医薬組成物は好ましくは、局所適用に適した少なくとも1種の医薬賦形剤、例えば、利尿剤(emulgent)、希釈剤、湿潤剤、保存剤およびpH調整剤および/または水を含む。

【0087】

本発明によるポリペプチドはまた、診断での使用に特に適している。ポリペプチドは、例えば、血液、血漿、粘液、創傷浸出液および尿などの生理学的試料中に存在する微生物毒素、例えば、LPS、LTAおよびPGを含む細菌毒素を検出することによって、微生物感染を検出するために使用することができる。さらに、ポリペプチドは、このような試料中における微生物毒素の量を測定するために使用することができる。したがって、診断薬としての使用のための本発明によるポリペプチド核酸分子が提供される。血液、血漿、粘液、創傷浸出液および尿試料などの生理学的試料中における微生物毒素、好ましくは細菌または真菌毒素を検出するための本発明によるポリペプチドの使用がさらに提供される。前述したように、本発明によるポリペプチドは、ビオチン、フルオレセイン標識、近赤外線色素または放射性同位元素などの適切な部分に結合することができる。このような標

識ポリペプチドは、微生物が感染した部位に移動するので、細菌感染などの微生物感染を検出するための方法で使うことができる。ポリペプチドに結合した使用される標識に適した検出器を使用して、感染部位を検出することが可能である。したがって、細菌感染などの微生物感染を検出するための方法も本発明によって提供する。この方法は通常、微生物に感染した、または感染している疑いのある対象への標識ポリペプチドの投与を含む。標識ポリペプチドは感染生物と相互作用することができるので、感染部位に蓄積する。生理学的試料中の微生物毒素を検出するために、この方法は、微生物に感染した、または感染している疑いのある対象の生理学的試料への標識ポリペプチドの投与を含む。ポリペプチドに結合した標識に感受性のある様々な検出器を使用して、感染部位または試料中におけるポリペプチドの蓄積を検出することが可能である。

10

【0088】

本発明によるポリペプチドの別の有用な適用は、食品の保存である。したがって、食品保存剤としての本発明によるポリペプチドの使用も提供される。一般的に、病原微生物または腐敗微生物は、食品を60から100℃までの温度にさらして食品を熱処理することによって破壊される。このような処置は、所望しない官能効果など食品に対して所望しない効果をもたらすことがある。食品中における保存剤としての本発明によるポリペプチドの使用は、食品の貯蔵寿命の延長および／または安全性の増強をもたらすことができる。

【0089】

食品における病原微生物は、対象の感染または中毒を引き起こすことがあり、Campylobacter jejuni、Salmonella typhi、Salmonella paratyphiおよびtyphiではないSalmonella種、Staphylococcus aureus、Escherichia coli、Listeria monocytogenes、ShigellaおよびClostridium Botulinumなどの細菌、ロタウイルスおよびノーウォークウイルスなどのウイルス、Taenia solium、Taenia saginataおよびTrichinella spiralisなどの寄生虫およびカビが含まれる。食品腐敗とは、食品の見かけ、堅さ、風味および／または匂いの変化を意味し、Lactobacillus、Leuconostoc、Pseudomonas、Micrococcus、Flavobacterium、Serratia、EnterobacterおよびStreptococcusなどの細菌、Aspergillus、FusariumおよびCladosporiumおよび酵母などの真菌によって引き起こされることがある。

20

30

【0090】

本発明は、以下の非限定的実施例においてより詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】PBS中においてCandida 5 μMまたは指示したペプチド0.8～6.4 μMの存在下で培養したA. nigerの成長曲線を示した図である。値は、0hでの光学密度に対する600nmでの光学密度として表す。PBS中において16時間インキュベートした後の真菌の成長の光学顕微鏡写真。3連の代表的な光学顕微鏡写真。

【図2】PBS、Candida、OP-145または指示したペプチドで16時間インキュベートした後の25%血漿中におけるA. nigerの成長の光学顕微鏡写真。3連の代表的な光学顕微鏡写真。

40

【図3】様々な濃度(μM)のS. aureus JAR060131によるバイオフィルム形成の阻害。結果は、3回の独立した実験の未処理試料(0)に対するバイオフィルム塊平均パーセント±標準偏差として表す。(A)コーティングしていないウェルにおけるバイオフィルム形成。(B)血漿コーティングウェルにおけるバイオフィルム形成。

【発明を実施するための形態】

【実施例1】

【0092】

<材料と方法>

50

＜抗微生物ペプチドの合成＞

合成ペプチドは、予め添加した Tentagel 樹脂、インサイツ活性化のための PyBop/NMM および Fmoc 除去のための ピペリジン 20% NMP を使用した通常の Fmoc 化学法によって調製した [Hiemstra HSら、Proc Natl Acad Sci USA、94、10313～10318 (1997)]。カップリングは 6 倍のアシル化種で 60 分間実施した。最後の Fmoc 除去後、C (トリエチルシラン) または W (エタンチオール) がペプチド配列中に存在したとき、追加の捕捉剤を含有する TFA/H₂O 19/1 (v/v) でペプチドを切断した。ペプチドは、エーテル/ペンタン 1/1 (v/v) 沈殿および遠心による生成物の単離によって単離した。約 40℃ で空気乾燥した後、ペプチドを酢酸/水 1/10 (v/v) に溶解し、凍結乾燥した。ペプチドの純度は UPLC-MS (Acquity、Waters) を使用して、完全性は Maldi-ToF 質量分析 (Microflex、Bruker) を使用して検査し、予測した分子量を示した。

【0093】

＜略語＞

Fmoc: 9H-フルオレニルメチルオキシカルボニル

NMM: N-メチルモルホリン

PyBOP: ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノーホスホニウムヘキサフルオロホスフェート

TFA: トリフルオロ酢酸

【0094】

＜細菌株＞

メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA)、LUH14616 の臨床単離物は、dr. S. Croes、Maastricht University Medical Center、Maastricht、Netherlands から恵与された (Croes S BMC Microbiol. 2009; 9: 229. doi: 10.1186/1471-2180-9-229 を参照)。S. aureus JAR は、Campoccia ら (Int J Artif Organs. 2008 Sep; 31 (9): 841～7) に記載されている。Staphylococcus epidermidis RP62a は、Infect. Immun. 2008; 75: 1129～1136 に記載されている。Pseudomonas aeruginosa PAO1 は、Nucl. Acids Res 2011; 39、Suppl. 1: D596～D60 に記載されている。細菌は使用するまで -80℃ で保存した。中対数期細菌の接種物は、血液寒天プレートから単離した細菌コロニーをトリプチックソイブロス (TSB) 培地 (Becton Dickinson、Le Pont de Claix、France) 中で 2.5 時間インキュベートすることによって調製し、次に必要な濃度まで希釈した。静止期の S. aureus JAR060131 は、18～20 時間培養から得られた。

【0095】

＜抗細菌活性の測定＞

ペプチドは、プールしたヒト血漿 (Sanquin、Amsterdam、the Netherlands) を最終濃度 50% で添加していない、または添加した PBS 中における S. aureus JAR060131、メチシリン耐性 S. aureus (MRSA) LUH14616、Staphylococcus epidermidis RP62a および Pseudomonas aeruginosa PAO1 の中対数期培養物 1×10^6 CFU/ml とインキュベートした。抗微生物活性は、99.9% 致死濃度 (LC99.9)、すなわち、37℃、振盪条件下で 2 時間インキュベートした後で細菌の $\geq 99.9\%$ を死滅させた最低ペプチド濃度として表す。

【0096】

静止期細菌に対するペプチドの抗微生物活性を評価するために、18～20 時間の培養

10

20

30

40

50

物から得られた静止期 *S. aureus* JAR060131 の 1×10^6 CFU/ml とペプチドを前述の条件下でインキュベートした。

【0097】

<抗真菌活性の測定>

ペプチドは、プールしたヒト血漿を最終濃度 50% で添加せず、または添加して、*Candida albicans* Y-O1 の中対数期培養物 1×10^5 細胞/ml とインキュベートした。抗微生物活性は、99% 致死濃度 (LC99)、すなわち、37℃、振盪条件下で 2 時間インキュベートした後で細菌の $\geq 99\%$ を死滅させた最低ペプチド濃度として表す。

【0098】

ペプチドの真菌成長に対する効果は、*Aspergillus niger* を使用して評価した。ペプチドは、プールしたヒト血漿を最終濃度 25% で添加していない、または添加した PBS 中において *A. niger* PagsA-lux 7. 5×10^4 孢子/ml とインキュベートした。陽性対照として、孢子を抗真菌カスポファンギン (*Candidas*) で処理した。吸光度は、経時的に、および 16 時間後に測定し、真菌の成長は光学顕微鏡法を使用して視覚化した。

【0099】

<抗バイオフィルム活性の測定>

ペプチドは、Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 2696~2704 に記載されたように、96 ウェルポリプロピレンプレートにおいてバイオフィルム調整した BM2 中で *S. aureus* JAR060131 1×10^8 CFU/ml とインキュベートした。37℃ で 24 時間インキュベートした後、PBS で 4 回洗浄することによってプランクトン細菌を除去し、バイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色した。エタノールで可溶化した後、590 nm での光学密度をバイオフィルム塊の測定値として測定した。抗バイオフィルム活性は、50% 阻害濃度 (IC50)、すなわち、バイオフィルム塊の $\geq 50\%$ 低下を引き起こした最低ペプチド濃度として表す。

【0100】

血漿存在下でのペプチドの抗バイオフィルム活性を評価するために、96 ウェルポリプロピレンプレートに血漿 20% と 4℃ で一晚インキュベートし血漿でコーティングした。ウェルは、滅菌水で 1 回洗浄し、前述のように *S. aureus* およびペプチドを接種した。

【0101】

<免疫調節活性: LPS および LTA 中和>

ペプチドは、LPS (*E. coli* O54) 500 ng/ml または LTA (*S. aureus*、内毒素を含まない) 2 mg/ml または UV 死滅 *S. aureus* JAR060131 1×10^9 CFU/ml と 37℃ で 30 分間予めインキュベートした。希釈したヒト全血をペプチド-LPS/LTA/*S. aureus* 混合物で 37℃、20 時間刺激した。上清中の IL-12 p40 および IL-8 レベルを、ELISA を使用して測定した。LPS および LTA 中和活性は、50% または 90% 阻害濃度 (IC50 および IC90)、すなわち、LPS/LTA/*S. aureus* 誘導 IL-12 p40 または IL-8 産生において $\geq 50\%$ または $\geq 90\%$ 低下を引き起こした最低ペプチド濃度として表す。

【0102】

<結果>

<OP-145 由来の 25 個のペプチドの同定>

抗微生物性であり、OP-145 と比較して血漿成分に対する感受性が低い新たなペプチドをコンピュータ予測に基づいて同定した。

【0103】

OP-145 は、両親媒性らせん構造を取ると予測される。このような構造では、ペプ

10

20

30

40

50

チドは、荷電基をらせんの片側に含有し、疎水基を反対側に含有する α -ヘリックスに折りたたまれる。アミノ酸置換を有するペプチドを適用した以前の研究から、荷電基をらせんの疎水性側に達するように導入するか、または疎水基をらせんが帯電されている側に達するように導入すると、抗細菌活性が減少した化合物が生じることがわかっている。

【0104】

したがって、新たに設計したペプチドは両親媒性らせんに折りたたまれると予測するべきであると決定した。OP-145の配列に基づいて、アミノ酸置換のために以下のモチーフを設計した。OP-145とは大きく異なり、OP-145に対する構造類似点が最小限で、抗微生物活性に影響を与える血漿成分への結合が最小限になる機会を最大にするペプチドを生じる置換に焦点を当てた。

10

【0105】

コンピュータ予測によって、以下のモチーフが両親媒性らせんを有するペプチドを生じることが明らかになった。

【0106】

以下の25個のペプチドは、このモチーフに基づいて選択した（J＝アセチル、B＝アミド）。

【0107】

【表1】

P139	J	L	K	K	L	W	K	R	V	F	R	I	W	K	R	I	F	R	Y	L	K	R	P	V	R	B
P140	J	L	R	R	L	W	K	R	L	V	R	I	I	K	R	I	Y	R	Q	L	K	R	P	V	R	B
P141	J	L	R	R	L	Y	K	R	V	F	R	L	L	K	R	W	W	R	Y	L	K	R	P	V	R	B
P142	J	L	R	R	L	W	K	R	L	V	K	I	L	K	R	W	F	R	Y	L	R	R	P	V	R	B
P143	J	L	R	R	L	Y	K	R	V	V	K	L	W	K	R	L	F	R	Q	L	R	R	P	V	R	B
P144	J	L	K	K	L	Y	K	R	V	A	K	I	W	K	R	W	I	R	Y	L	K	K	P	V	R	B
P145	J	L	K	R	L	Y	K	R	L	A	K	L	I	K	R	L	Y	R	Y	L	K	K	P	V	R	B
P146	J	L	K	K	L	Y	K	R	L	F	K	I	L	K	R	I	L	R	Y	L	R	K	P	V	R	B
P147	J	L	K	K	L	W	K	R	L	A	R	L	L	K	R	F	I	R	Q	L	R	R	P	V	R	B
P148	J	L	K	R	V	W	K	R	V	F	K	L	L	K	R	Y	W	R	Q	L	K	K	P	V	R	B
P149	J	L	K	K	V	Y	K	R	L	A	R	L	L	K	R	Y	I	R	Y	L	R	R	P	V	R	B
P150	J	L	K	K	V	W	K	R	V	A	R	L	I	K	R	W	F	R	Y	L	R	R	P	V	R	B
P151	J	L	K	K	L	Y	K	R	L	F	K	L	W	K	R	L	Y	R	Y	L	K	K	P	V	R	B
P152	J	L	R	R	V	Y	K	R	L	A	R	L	I	K	R	Y	L	R	Q	L	K	K	P	V	R	B
P153	J	L	R	K	L	W	K	R	V	V	K	I	W	K	R	Y	L	R	Q	L	R	R	P	V	R	B
P154	J	L	R	K	L	W	K	R	L	A	K	I	I	K	R	L	Y	R	Y	L	R	R	P	V	R	B
P155	J	L	K	K	V	Y	K	R	V	A	R	L	I	K	R	L	F	R	Y	L	K	R	P	V	R	B
P156	J	L	R	R	L	W	K	R	L	V	K	L	W	K	R	F	F	R	Y	L	K	K	P	V	R	B
P157	J	L	K	K	V	W	K	R	V	F	R	I	L	K	R	F	L	R	Y	L	K	R	P	V	R	B
P158	J	L	R	R	V	Y	K	R	L	F	R	L	W	K	R	I	I	R	Q	L	R	R	P	V	R	B
P159	J	L	K	R	L	Y	K	R	V	F	R	L	L	K	R	Y	Y	R	Q	L	R	R	P	V	R	B
P160	J	L	K	K	L	W	K	R	L	A	R	L	W	K	R	I	I	R	Q	L	K	K	P	V	R	B
P161	J	L	R	R	V	W	K	R	V	A	R	I	I	K	R	L	Y	R	Y	L	K	R	P	V	R	B
P162	J	L	K	R	L	W	K	R	L	F	K	I	L	K	R	Y	Y	R	Y	L	R	R	P	V	R	B
P163	J	L	R	R	L	W	K	R	V	F	K	I	I	K	R	L	F	R	Q	L	K	K	P	V	R	B

20

30

40

表1. ペプチドP139～163の配列。J＝アセチル、B＝アミド

これらのペプチドの抗細菌活性を、血漿の非存在下および存在下で試験した（表2）。得られた結果に基づいて、P145、P148およびP159をOP-145と比較して著しく改善されたペプチドとして選択した。

【0108】

【表 2】

ペプチド		抗微生物活性 ¹ IC _{99.9} (μM)	
		PBS	50%血漿
(OP-145)	1145-01	1.6	204.8
(P139)	1231-01	0.8	51.2
(P140)	1231-02	1.6	25.6
(P141)	1231-03	0.8	25.6
(P142)	1231-04	0.8	51.2
(P143)	1231-05	1.6	51.2
(P144)	1231-06	1.6	25.6
(P145)	1231-07	1.6	25.6
(P146)	1231-08	1.6	51.2
(P147)	1231-09	1.6	51.2
(P148)	1231-10	1.6	12.8
(P149)	1231-11	1.6	102.4
(P150)	1231-12	1.6	25.6
(P151)	1231-13	1.6	25.6
(P152)	1231-14	1.6	25.6
(P153)	1231-15	1.6	25.6
(P154)	1231-16	1.6	51.2
(P155)	1231-17	1.6	102.4
(P156)	1231-18	1.6	51.2
(P157)	1231-19	0.8	51.2
(P158)	1231-20	1.6	25.6
(P159)	1231-21	1.6	12.8
(P160)	1231-22	1.6	25.6
(P161)	1231-23	1.6	25.6
(P162)	1231-24	1.6	25.6
(P163)	1231-25	0.8	25.6

表 2. OP-145 から得られたペプチドの抗微生物活性。1 抗微生物活性は、IC_{99.9} (μM)、すなわち、2 時間以内に細菌接種物 (約 1×10^6 CFU/ml *S. aureus* JAR である) の 99.9% を死滅させた最低ペプチド濃度として表す。

【0109】

< 様々な細菌に対する P145、P148 および P159 の抗微生物活性 >

PBS 中において、P145、P148 および P159 は中対数期培養物中の全細菌種に対して OP-145 と類似の抗微生物活性を有した (表 3)。50% 血漿存在下で、P145、P148 および P159 は、*S. aureus* JAR060131 (11~16 倍)、MRSA LUH14616 (21~26 倍)、*S. epidermidis* RP62a (43 倍) および *P. aeruginosa* PAO1 (>11~21 倍) に対して OP-145 よりも高い殺菌活性を示した。

【0110】

10

20

30

40

【表 3】

LC99.9 (μM)											
	<i>S. aureus</i> JAR060131			MRSA LUH14616			<i>S. epidermidis</i> RP62a			<i>P. aeruginosa</i> PAO1	
	PBS	50% 血漿		PBS	50% 血漿		PBS	50% 血漿		PBS	50% 血漿
OP-145	1.6	204.8		1.6	204.8		0.8	204.8		3.2	>204.8
P145	1.6	19.2		1.6	9.6		0.8	3.2		1.6	25.6
P148	1.6	19.2		1.6	8.0		0.8	3.2		1.6	12.8
P159	2.4	12.8		2.4	9.6		1.6	3.2		1.6	12.8

10

表 3 . P B S 及び 5 0 % 血漿中における中対数期培養物中での O P - 1 4 5 、 P 1 4 5 、 P 1 4 8 および P 1 5 9 の抗微生物活性。結果は、L C 9 9 . 9 、すなわち、細菌の $\geq 99.9\%$ 死滅をもたらした最低ペプチド濃度 (μ M) として表す。結果は、少なくとも 2 回の独立した実験の中央値である。

【 0 1 1 1 】

O P - 1 4 5 、 P 1 4 5 、 P 1 4 8 および P 1 5 9 は、静止期 *S. aureus* J A R 0 6 0 1 3 1 (表 4) に対して対数期細菌と類似の抗微生物活性を示した。したがって、5 0 % 血漿存在下で、P 1 4 5 、 P 1 4 8 および P 1 5 9 は、*S. aureus* J A R 0 6 0 1 3 1 に対して O P - 1 4 5 よりも高い殺菌活性を示した。

20

【 0 1 1 2 】

【表 4】

LC99.9 (μM)		
	PBS	50%血漿
OP-145	1.6	>204.8
P145	1.6	25.6
P148	1.6	12.8
P159	2.4	25.6

30

表 4 . P B S 及び 5 0 % 血漿中における *s. aureus* J A R 0 6 0 1 3 1 の正式懸濁液に対する O P - 1 4 5 、 P 1 4 5 、 P 1 4 8 および P 1 5 9 の高微生物活性。結果は、3 回の独立した実験の平均値である。

【 0 1 1 3 】

< P 1 4 8 の長さの変異体の抗微生物活性 >

P 1 4 8 の C および N 末端の 4 個のアミノ酸が欠失しても、*S. aureus* J A R 0 6 0 1 3 1 に対する抗微生物活性に影響はない (表 5) 。 C および N 末端の 5 個のアミノ酸が欠失すると、P 1 4 8 よりも抗微生物活性が低下するが、活性は O P - 1 4 5 よりもまだ 5 倍高い。

40

【 0 1 1 4 】

【表 5】

ペプチド	配列	LC99.9 (μM)	
		PBS	50% 血漿
P148	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	12.8
P325	J R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	9.6
P326	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P B	1.6	12.8
P327	J R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P B	1.6	8.0
P328	J W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	12.8
P329	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K B	0.8	9.6
P330	J V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K B	1.6	9.6
P331	J W K R V F K L L K R Y W R Q L K B	1.6	9.6
P332	J K R V F K L L K R Y W R Q L B	4.8	38.4

表 5 . P B S 及び 5 0 % 血漿中における P 1 4 8 の長さの変異体の高微生物活性。結果は、L C 9 9 . 9、すなわち、s . a u r e u s の以上 9 9 . 9 % 死滅をもたらした最低ペプチド濃度 (μ M) として表す。結果は、2 回の独立した実験の平均値である。J = アセチル、B = アミド

【0 1 1 5】

< 複数のアラニン置換を有する P 1 4 5、P 1 4 8 および P 1 5 9 の抗微生物活性 >

P 1 4 5、P 1 4 8 および P 1 5 9 の 1 個のアミノ酸ならびに P 1 4 8 の 2 個のアミノ酸をアラニンに置換しても、S . a u r e u s J A R 0 6 0 1 3 1 に対する抗微生物活性に影響はない (表 6 ~ 9) 。

【0 1 1 6】

【表 6】

		LC99.9 (uM)			
		2013.01.15		2013.01.18	
ペプチド	実施番号	配列	PBS	50%血漿	
P145	1255-04	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6
P246	1255-05	J A K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6
P247	1255-06	J L A R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8
P248	1255-07	J L K A L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8
P249	1255-08	J L K R A Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6
P250	1255-09	J L K R L A K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6
P251	1255-10	J L K R L Y A R L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6
P252	1255-11	J L K R L Y K A L A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8
P253	1255-12	J L K R L Y K R A A K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6
P254	1255-13	J L K R L Y K R L Y K L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8
P255	1255-14	J L K R L Y K R L A A L I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8
P256	1255-15	J L K R L Y K R L A K A I K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6
P257	1255-16	J L K R L Y K R L A K L A K R L Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	0.8
P258	1255-17	J L K R L Y K R L A K L I A R L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8
P259	1255-18	J L K R L Y K R L A K L I K A L Y R Y L K K P V R B	1.6	51.2	0.8
P260	1255-19	J L K R L Y K R L A K L I K R A Y R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6
P261	1255-20	J L K R L Y K R L A K L I K R L A R Y L K K P V R B	1.6	25.6	1.6
P262	1255-21	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y A Y L K K P V R B	1.6	51.2	1.6
P263	1255-22	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R A L K K P V R B	1.6	25.6	0.8
P264	1255-23	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y A K K P V R B	1.6	25.6	1.6
P265	1255-24	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L A K P V R B	1.6	51.2	0.8
P266	1255-25	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K A P V R B	1.6	51.2	0.8
P267	1255-26	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K A V R B	1.6	25.6	0.8
P268	1255-27	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P A R B	1.6	51.2	0.8
P269	1255-28	J L K R L Y K R L A K L I K R L Y R Y L K K P V A B	1.6	51.2	0.8

表 6. 様々な位置でアラニン置換した P 1 4 5 の P B S 及び 5 0 % 血漿中における抗微生物活性。2 回の独立した実験の結果である。J = アセチル、B = アミド

【0 1 1 7】

【表 7】

ペプチド	実施番号	配列	LC99.9 (μM)			
			2013.01.15		2013.01.18	
			PBS	50%血漿	PBS	50%血漿
P148	1255-29	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P270	1255-30	J A K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	0.8	6.4
P271	1255-31	J L A R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P272	1255-32	J L A V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P273	1255-33	J L K R A W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P274	1255-34	J L K R V A K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P275	1255-35	J L K R V W A R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P276	1255-36	J L K R V W K A V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	12.8	0.8	6.4
P277	1255-37	J L K R V W K R A F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P278	1255-38	J L K R V W K R V A K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P279	1255-39	J L K R V W K R V F A L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P280	1255-40	J L K R V W K R V F K A L K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P281	1255-41	J L K R V W K R V F K L A K R Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	6.4
P282	1255-42	J L K R V W K R V F K L A R Y W R Q L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P283	1255-43	J L K R V W K R V F K L L K A Y W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P284	1255-44	J L K R V W K R V F K L L K R A W R Q L K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P285	1255-45	J L K R V W K R V F K L L K R Y A R Q L K K P V R B	1.6	12.8	1.6	12.8
P286	1255-46	J L K R V W K R V F K L L K R Y W A Q L K K P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P287	1255-47	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R A L K K P V R B	1.6	51.2	0.8	12.8
P288	1255-48	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q A K K P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P289	1255-49	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L A K P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P290	1255-50	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K A P V R B	1.6	25.6	0.8	12.8
P291	1255-51	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K A V R B	1.6	25.6	0.8	12.8
P292	1255-52	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P A R B	0.8	25.6	0.8	12.8
P293	1255-53	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V A B	0.8	25.6	0.8	12.8

表 7. 様々な位置でアラニン置換した P 1 4 8 の P B S 及び 5 0 % 値漿中における抗微生物活性。2 回の独立した実験の結果である。J = アセチル、B = アミド

【0 1 1 8】

【表 8】

ペプチド	実施番号	配列	LC99.9 (uM)			
			2013.01.15		2013.01.18	
			PBS	50% 血漿	PBS	50% 血漿
P159	1255-54	J L K R L Y K K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P294	1255-55	J A K R L Y K K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	3.2	12.8
P295	1255-56	J L A R L Y K K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	3.2	25.6
P296	1255-57	J L K A L Y K K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	1.6	12.8
P297	1255-58	J L K R A Y K K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	12.8	3.2	12.8
P298	1255-59	J L K R L A K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	3.2	51.2	3.2	25.6
P299	1255-60	J L K R L Y A R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	1.6	25.6
P300	1255-61	J L K R L Y K A V F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P301	1255-62	J L K R L Y K R A F R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	3.2	12.8
P302	1255-63	J L K R L Y K R V A R L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	25.6
P303	1255-64	J L K R L Y K R V F A L L K R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	25.6	1.6	25.6
P304	1255-65	J L K R L Y K R V F R A L K R Y Y R Q L R R P V R B	3.2	25.6	3.2	25.6
P305	1255-66	J L K R L Y K R V F R L A K R Y Y R Q L R R P V R B	3.2	12.8	1.6	6.4
P306	1255-67	J L K R L Y K R V F R L L A R Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	>3.2	25.6
P307	1255-68	J L K R L Y K R V F R L L K A Y Y R Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P308	1255-69	J L K R L Y K R V F R L L K R A Y R Q L R R P V R B	3.2	51.2	3.2	12.8
P309	1255-70	J L K R L Y K R V F R L L K R Y A R Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P310	1255-71	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y A Q L R R P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P311	1255-72	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R A L R R P V R B	1.6	51.2	3.2	25.6
P312	1255-73	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q A R R P V R B	3.2	51.2	3.2	12.8
P313	1255-74	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L A R P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P314	1255-75	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R A P V R B	1.6	51.2	1.6	12.8
P315	1255-76	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R A V R B	3.2	>51.2	1.6	12.8
P316	1255-77	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P A R B	1.6	25.6	3.2	12.8
P317	1255-78	J L K R L Y K R V F R L L K R Y Y R Q L R R P V A B	1.6	51.2	1.6	12.8

表 8. 様々な位置でアラニン置換した P 1 5 9 の P B S 及び 5 0 % 血漿中における抗微生物活性。2 回の独立した実験の結果である。J = アセチル、B = アミド

【 0 1 1 9 】

【表 9】

ペプチド	配列	LC99.9(μM)	
		PBS	50% 血漿
P148	J L K R V W K R V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P318	J <u>A</u> K R V W K <u>A</u> V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P319	J L K R <u>A</u> W K <u>A</u> V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P320	J L K R V <u>A</u> K <u>A</u> V F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P321	J L K R V W K <u>A</u> <u>A</u> F K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P322	J L K R V W K <u>A</u> V <u>A</u> K L L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P323	J L K R V W K <u>A</u> V F K <u>A</u> L K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2
P324	J L K R V W K <u>A</u> V F K L <u>A</u> K R Y W R Q L K K P V R B	1.2	19.2

10

表 9 . 複数のアラニン置換を有する P 1 4 8 の P B S および 5 0 % 値漿中における抗微生物活性。結果は、2 回の独立した実験の平均値である。J = アセチル、B = アミド

【 0 1 2 0 】

20

< 正に帯電したアミノ酸置換を有する P 1 4 8 変異体の抗微生物活性 >

リシンまたはアルギニンを正に帯電したアミノ酸で置換した P 1 4 8 変異体は、P B S 中および 5 0 % 血漿存在下の両方で *S. aureus* に対して抗微生物活性を保持する (表 1 0) 。

【 0 1 2 1 】

【表 10】

ペプチド 配列	LC99.9 (μM)	
	PBS	50%血漿
P148	0.8	12.8
P365	0.8	12.8
P366	0.8	12.8
P367	0.8	12.8
P368	0.8	12.8
P369	0.8	12.8
P370	0.8	25.6
P371	0.8	25.6
P372	0.8	25.6
P373	0.8	25.6
P374	0.8	25.6
P375	0.8	12.8
P377	0.8	12.8
P378	0.8	12.8
P379	0.8	12.8
P380	0.8	12.8
P381	0.8	25.6
P382	0.8	25.6
P383	0.8	25.6
P384	1.6	25.6
P385	0.8	12.8
P386	0.8	25.6
P387	1.6	25.6
P389	0.8	12.8
P390	1.6	12.8
P391	0.8	25.6
P392	0.8	12.8
P393	0.8	25.6
P394	0.8	25.6
P395	1.6	25.6
P396	0.8	25.6
P397	0.8	25.6
P398	1.6	25.6
P399	3.2	51.2

表 10. 正に帯電したアミノ酸置換を有する P 1 4 8 の P B S 及び 5 0 % 血漿中における高微生物活性。J = アセチル、O = オルニチン；X = ジアミノ酪酸（D A B A）；U = ジアミノプロピオン酸（D A P A）、B = アミド

【0122】

< P 1 4 5、P 1 4 8 および P 1 5 9 の抗真菌活性 >

OP-145は、PBS中において51.2 μMでC. albicans Y-O1に対して抗真菌活性を示さなかった（表11）。P145、P148およびP159は、12.8 μM（P159の場合）から38.4 μM（P148の場合）の範囲の濃度でC. albicansの99%を死滅させた。50%血漿中では、抗真菌活性は、P145、P148およびP159では204.8 μMであった。この濃度でOP-145では抗真菌活性は認められなかった。

【0123】

10

20

30

40

【表 1 1】

	LC99(μ M)	
	PBS	50%血漿
OP-145	>51.2	>204.8
P145	25.6	204.8
P148	38.4	204.8
P159	12.8	204.8

10

表 1 1 . P B S 及び 5 0 % 血漿中における O P - 1 4 5、P 1 4 5、P 1 4 8 および P 1 5 9 の抗真菌活性。結果は、2 回の独立した実験の平均値である。

【0 1 2 4】

O P - 1 4 5 は、3 . 2 μ M の濃度で *A . n i g e r* の成長を > 9 9 . 9 % 阻害した (図 1) 。 P 1 4 5 は、O P - 1 4 5 と類似の抗真菌活性を示したが、P 1 4 8 の抗真菌活性は 4 倍高く、0 . 8 μ M で既に真菌成長を阻害した。P 1 5 9 の抗真菌活性は O P - 1 4 5 と比較して 2 倍低かった。血漿は光学密度値に影響を及ぼしたので、血漿存在下でのペプチドの抗真菌活性は光学顕微鏡写真のみに基づいて評価した。2 5 % 血漿存在下では、真菌成長は O P - 1 4 5 2 0 4 . 8 μ M によって阻害された (図 2) 。 P 1 4 5、P 1 4 8 および P 1 5 9 は、1 0 2 . 4 μ M で成長を阻害した。

20

【0 1 2 5】

< P 1 4 5、P 1 4 8 および P 1 5 9 の抗バイオフィーム活性 >

O P - 1 4 5 は、3 . 2 μ M でバイオフィーム形成の $\geq$ 5 0 % 阻害を示した (図 3 A) 。 P 1 4 5 の I C 5 0 値は 6 . 4 μ M であり、P 1 4 8 および P 1 5 9 では 1 2 . 8 μ M であった。最大バイオフィーム阻害は、約 7 5 % であった。注目すべきことに、バイオフィーム調整 B M 2 培地では、これらのペプチドは 5 1 . 2 μ M まで抗微生物活性を示さなかった。血漿でコーティングしたウェルでは、O P - 1 4 5 および P 1 5 9 3 . 2 μ M はバイオフィーム形成を 5 0 % 阻害したが、P 1 4 5 および P 1 4 8 がバイオフィーム形成を 5 0 % 阻害するには 2 倍高い濃度が必要であった (図 3 B) 。血漿存在下での最大バイオフィーム阻害は、6 1 % (P 1 4 8 の場合) から 8 2 % (P 1 5 9 の場合) に亘った。

30

【0 1 2 6】

< 免疫調節活性 : P 1 4 5、P 1 4 8 および P 1 5 9 による L P S および L T A の中和 >

O P - 1 4 5 の I C 5 0 は 0 . 1 5 n M、I C 9 0 は 1 . 2 5 n M であった。P 1 4 8 は、0 . 0 3 n M で既に L P S 誘導性 I L - 1 2 p 4 0 産生を > 5 0 % 阻害し、P 1 5 9 は 0 . 0 5 n M で阻害した。L P S 誘導性 I L - 1 2 p 4 0 の 9 0 パーセント阻害は、P 1 4 8 および P 1 5 9 では 0 . 2 5 n M ならびに P 1 4 5 では 0 . 7 5 n M で達成された (表 1 1) 。ペプチドが L T A を中和する能力は、血液細胞による L T A 誘導性 I L - 8 産生の阻害を測定することによって評価した。最終濃度 0 . 7 8 1 μ M で、O P - 1 4 5 は L T A 5 μ g / m l によって誘導される I L - 8 産生の > 5 0 % を阻害した (表 1 1) 。 P 1 4 5、P 1 4 8 および P 1 5 9 は 4 倍高い L T A 中和能力を有した。ペプチドはまた、*S . a u r e u s* J A R 0 6 0 1 3 1 の UV 死滅細菌で予めインキュベートした。O P - 1 4 5 0 . 1 9 5 μ M とインキュベートすると、*S . a u r e u s* J A R によって誘導される I L - 8 産生の > 5 0 % 低下が引き起こされた (表 1 2) 。 P 1 5 9 は O P - 1 4 5 と類似の中和活性を有したが、P 1 4 5 および P 1 4 8 では *S . a u r e u s* 誘導性 I L - 8 産生を > 5 0 % 阻害するのに 8 倍高い濃度が必要であった (表 1 2) 。

40

【0 1 2 7】

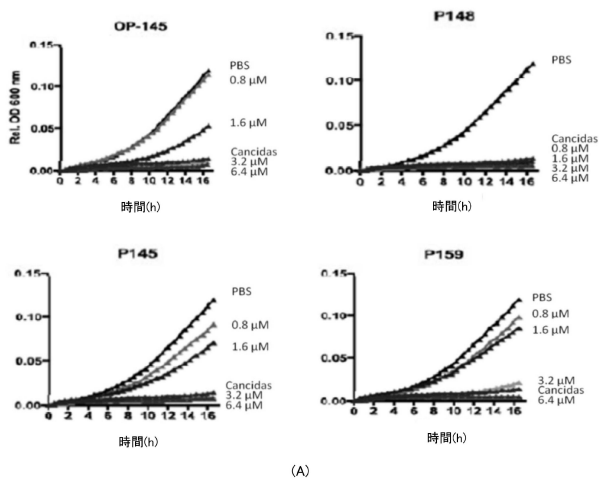
【表 1 2】

ペプチド	LPS中和 (IC90 nM)	LTA中和 (IC50 μ M)	<i>S. aureus</i> 中和 (IC50 μ M)
OP-145	1.25	0.781	0.195
P145	0.75	0.195	1.563
P148	0.25	0.195	1.563
P159	0.25	0.195	0.195

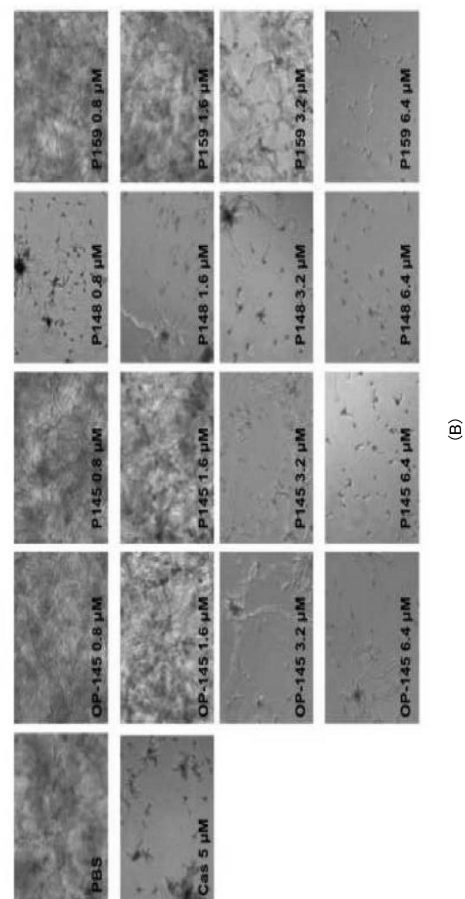
10

表 1 2 . O P - 1 4 5、P 1 4 5、P 1 4 8 および P 1 5 9 の L P S、L T A および *s . a u r e u s* 中和活性。L P S を中和するために、2 人のドナーの血液を使用して実験を実施した。L T A および *S . a u r e u s* を中和するために、1 人のドナーの血液を使用して実験を実施した。

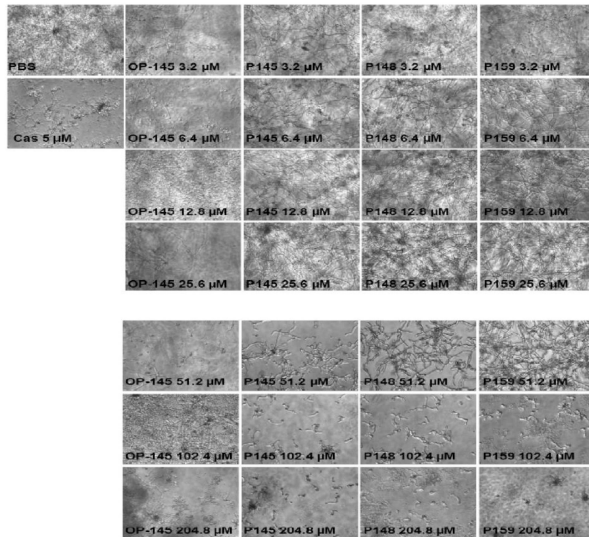
【図 1 A】



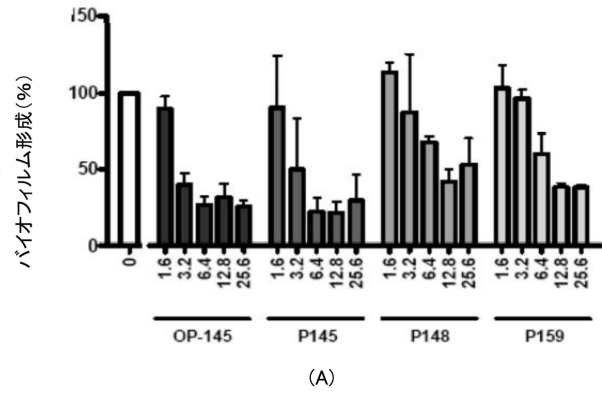
【図 1 B】



【図 2】

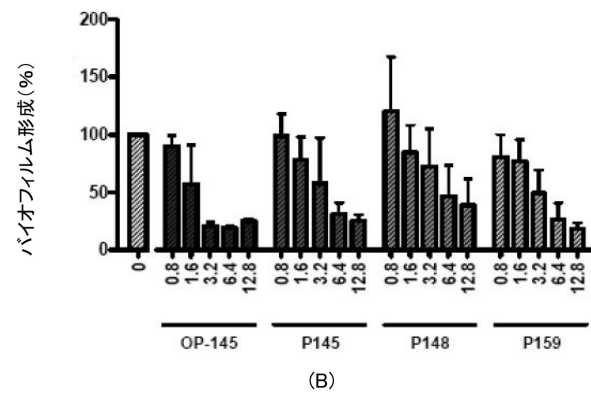


【図 3 A】



(A)

【図 3 B】



(B)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
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	5/10	
A 6 1 K	38/10	(2006.01)	A 6 1 K	38/10	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C

- (72)発明者 ニッベリング, ペトルス ヘンドリクス
 オランダ国 2 3 3 3 ゼットアー レイデン アルビヌスドレーフ 2内
- (72)発明者 デ ブレエイ, アンナ
 オランダ国 2 3 3 3 ゼットアー レイデン アルビヌスドレーフ 2内
- (72)発明者 コルドフンケ, ロベルト アレクサンデル
 オランダ国 2 3 3 3 ゼットアー レイデン アルビヌスドレーフ 2内
- (72)発明者 ザート, セバスティアヌス アントニウス ヨハンネス
 オランダ国 2 3 3 3 ゼットアー レイデン アルビヌスドレーフ 2内
- (72)発明者 デレイハウト, ヤン ウーテル
 オランダ国 2 3 3 3 ゼットアー レイデン アルビヌスドレーフ 2内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表2008-508265 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 7 / 0 0 - 7 / 6 6
 UniProt/GeneSeq
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E /
 B I O S I S / W P I D S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 PubMed