

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4441180号
(P4441180)

(45) 発行日 平成22年3月31日 (2010. 3. 31)

(24) 登録日 平成22年1月15日 (2010.1.15)

(51) Int. Cl. F I
C07K 7/08 (2006.01) C O 7 K 7/08 Z N A
A61K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02
A61L 27/00 (2006.01) A 6 1 L 27/00 F
A61P 31/04 (2006.01) A 6 1 P 31/04
C07K 14/16 (2006.01) C O 7 K 14/16

請求項の数 31 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-578400 (P2002-578400)
(86) (22) 出願日 平成14年2月19日 (2002. 2. 19)
(65) 公表番号 特表2005-505498 (P2005-505498A)
(43) 公表日 平成17年2月24日 (2005. 2. 24)
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/004812
(87) 国際公開番号 W02002/079397
(87) 国際公開日 平成14年10月10日 (2002. 10. 10)
審査請求日 平成17年2月3日 (2005. 2. 3)
(31) 優先権主張番号 09/785, 058
(32) 優先日 平成13年2月16日 (2001. 2. 16)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 09/785, 059
(32) 優先日 平成13年2月16日 (2001. 2. 16)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500091313
ユニヴァーシティ オヴ ピッツバーグ
オヴ ザ コモンウェルス システム オ
ヴ ハイアー エデュケーション
アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア州 1
5 2 6 0、ピッツバーグ、ガードナー ス
ティール コンファレンス センター 2
0 0
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74) 代理人 100119183
弁理士 松任谷 優子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス由来抗微生物ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

RRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号5)、
VRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号6)、
RRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号7)、
RVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号8)、
RVRRVRRVRR (配列番号9)、
RRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号10)、
VRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号11)、及び
RVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号12)
よりなる群から選ばれるアミノ酸配列からなるペプチド。

10

【請求項 2】

アミノ酸配列RRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号5) からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項 3】

請求項 2 記載のペプチドと担体とを含んでなる組成物。

【請求項 4】

アミノ酸配列VRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号6) からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項 5】

20

請求項4記載のペプチドと担体とを含んでなる組成物。

【請求項6】

アミノ酸配列RRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号7) からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項7】

請求項6記載のペプチドと担体とを含んでなる組成物。

【請求項8】

アミノ酸配列RVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号8) からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項9】

請求項8記載のペプチドと担体とを含んでなる組成物。

10

【請求項10】

アミノ酸配列RVRRVRRVRR (配列番号9) からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項11】

請求項10記載のペプチドと担体とを含んでなる組成物。

【請求項12】

アミノ酸配列RRWRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号10) からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項13】

請求項12記載のペプチドと担体とを含んでなる組成物。

20

【請求項14】

アミノ酸配列VRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号11) からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項15】

請求項14記載のペプチドと担体とを含んでなる組成物。

【請求項16】

アミノ酸配列RVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRV (配列番号12) からなる、請求項1記載のペプチド。

【請求項17】

請求項16記載のペプチドと担体とを含んでなる組成物。

30

【請求項18】

ペプチドが抗細菌活性を有する、請求項1記載のペプチド。

【請求項19】

ペプチドが低塩中で抗細菌活性を有する、請求項1記載のペプチド。

【請求項20】

ペプチドが生理的塩中で抗細菌活性を有する、請求項1記載のペプチド。

【請求項21】

RRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号5)、
VRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号6)、
RVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号7)、
RVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号8)、
RVRRVRRVRRVRR (配列番号9)、
RRWRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号10)、
VRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRR (配列番号11)、及び
RVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRVRRV (配列番号12)
よりなる群から選ばれる少なくとも1つのペプチドを含んでなる固相基体。

40

【請求項22】

固相基体が人工器官である、請求項21記載の固相基体。

【請求項23】

人工器官が人工関節である、請求項22記載の固相基体。

50

のである。しかし、近年、現在利用可能な抗微生物薬に、もはや感受性ではない細菌株の出現により、感染症に対処する能力が脅かされている (Files, 1999, *Chest* 115:3S-8S を参照されたい)。公衆衛生の維持の観点からは、有効な感染症対処法が適切に保たれるためには、これらの出現耐性菌を克服するために新規抗微生物薬を開発する必要がある。

【 0 0 0 2 】

多種多様な宿主由来抗微生物ペプチド群が、可能な新規治療剤として注目されている (Hancock, R. E., 1999, *Drugs* 57:469-473を参照されたい)。これらのペプチドは、感染に対する脊椎動物の先天免疫において重要な役割を果たす。例えば、カチオン性抗微生物ペプチドは全好中球タンパク質の18重量%をも構成する。それらは、損傷粘膜表面上にも高濃度で見出される。一般に、これらの宿主由来カチオン性ペプチドは以下の4つの構造カテゴリー：(i) 複数のジスルフィド結合により安定化されたシート構造 (例えば、ヒトデフェンシン1)、(ii) 共有結合により安定化されたループ構造 (例えば、バクテネシン)、(iii) トリプトファン (Trp) に富む伸長らせん状ペプチド (例えば、インドリシジン)、及び (iv) 両親媒性ヘリックス (例えば、マガイニン及びセクロピン) のうちの1つに該当する (Hwang及びVogel, 1998, *Biochemistry & Cell Biology* 76:235-246を参照されたい)。最近、これらの構造モチーフのすべてを有し、感染に対する宿主防御において明らかに重要である新規クラスの抗微生物ペプチドであるカテリシジン (cathelicidin) が報告された (Ganz及びLehrer, 1997, *Current Opinion in Hematology* 4:53-58)。

【 0 0 0 3 】

カテリシジンは、ヒト、ウシ、ヒツジ、ウサギ、マウス及びブタにおいて報告されている、高度に保存されたN末端プロペプチドセグメントを有するプレプロペプチドに由来する分子の著しく多様な集積体である (Hwang及びVogel, 1998, *Biochemistry & Cell Biology* 76:235-246を参照されたい)。約100アミノ酸の保存プロペプチドセグメントは、推定システインプロテアーゼインヒビターであるブタタンパク質カテリン (cathelin) と配列類似性を有する (したがって、ファミリー名である)。そのC末端ドメインは、それが関連している宿主及び組織に応じて、前記のもの1つに類似した抗微生物ペプチドモチーフをコードしている。カテリシジンは好中球顆粒内にプロペプチド (この形態では抗微生物活性を欠く) として貯蔵され、好中球活性化がエラスターゼ媒介エンドタンパク質分解切断及び該C末端抗微生物ペプチドの生成をもたらす。FALL-39、hCAP18、LL-37又はCAM Pとも称されるヒトカテリシジンは、そのプロセッシングされた (活性) 形態では、37アミノ酸の両親媒性らせんカチオン性ペプチドである (Zanetti, Gennaro及びRomeo, 1995, *FEBS Letters* 374:1-5を参照されたい)。LL-37の発現は炎症部位の角化細胞、及びヒト好中球、精巣細胞、呼吸上皮において検出されている。

【 0 0 0 4 】

該らせんクラスの両親媒性カチオン性ペプチドは、 $\mu\text{g/mL}$ 範囲 (他の抗微生物薬と同等のレベル) の最小殺菌濃度 (MBC) を示し、広範囲のグラム陰性及びグラム陽性病原菌 (多数の抗生物質に対して高耐性であるものを含む) を殺す (Hancock, R. E., 1999, *Drugs* 57:469-473)。これらのペプチドが細菌を殺すメカニズムは、まず、負に荷電した細菌表面に結合し、これらの結合ペプチドが細菌膜内に侵入して、その構造の完全性を破壊することによる2工程の過程で進行する。グラム陰性生物の場合には、カチオン性抗微生物ペプチドは、リポ多糖 (LPS) に結合してその内毒素活性を解毒するという更なる利点を有する (Scott, Yan, 及びHancock, 1999, *Infection & Immunity* 67:2005-2009を参照されたい)。両親媒性カチオン性らせん抗微生物ペプチドの特徴は、それが、少なくとも+2の実効正電荷を有する親水性面を示す両親媒性二次構造にフォールディングされうることにある。アミノ酸配列の多種多様な組合せが、あるペプチドがこの特徴的構造を得ることを可能にする。その結果、これまでに、何百もの宿主由来両親媒性カチオン性らせんペプチドの全てが一定の配列相同性を一次配列比較のレベルで示すことが報告されている (Hwang及びVogel, 1998, *Biochemistry & Cell Biology* 76:235-246を参照されたい)。

。

10

20

30

40

50

【0005】

細菌を殺すという特別な目的で発生した宿主由来抗微生物ペプチドとは対照的に、宿主由来ペプチドと同じ目的で発生したのではないレンチウイルス膜貫通(TM)タンパク質細胞質尾部の異なるセグメントに由来する新規クラスの抗微生物ペプチドが報告されている (Bearyら, 1998, *Journal of Peptide Research* 51:75-79; Comardelleら, 1997, *AIDS Research & Human Retroviruses* 13:1525-1532; Millerら, 1993, *AIDS research & Human Retroviruses* 9:1057-1066; Millerら, 1993, *Virology* 196:89-1000; Tenczaら, 1995, *Virology* 69:5199-5202; Tenczaら, 1997, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 41:2394-2398; Tenczaら, 1997, *AIDS Research & Human Retroviruses* 13:263-269; Yuanら, 1995, *Biochemistry* 34:10690-10696を参照されたい)。これらのペプチドはレンチウイルス溶解ペプチド(LLP)と称され、原型LLPはLLP1(HIV-1ウイルス分離株HXB2R Envのアミノ酸828-856)である。LLP1は、らせんとしてモデル化したとき、明瞭な限定されたカチオン性及び疎水性面を有する両親媒性のHIV-1 TMタンパク質C末端部分にコードされる28残基に由来する。現在までに文献に記載されている多数の抗微生物ペプチドのなかで、LLP1は、マガイニン及びヒトカテリシジンLL37に化学的に最も相同である。

10

【0006】

LLP1は、そのカルモジュリン結合及び抗微生物特性に関して研究されている。LLP1は宿主細胞Ca²⁺飽和カルモジュリンにナノモルに近いアフィニティで結合し、この特性はT細胞活性化の抑制に関連しており、このことは、これらのペプチドが炎症応答を抑制することを示唆している (Bearyら, 1998, *Journal of Peptide Research* 51:75-79; Millerら, 1993, *AIDS Research & Human Retroviruses* 9:1057-1066; Tenczaら, 1995, *Virology* 69:5199-5202; Tenczaら, 1997, *AIDS Research & Human Retroviruses* 13:263-269; Yuanら, 1995, *Biochemistry* 34:10690-10696を参照されたい)。LLP1の抗細菌活性は、多様なグラム陰性及び陽性菌分離株を調べることにより研究されてきた。この分析は、LLP1が、マガイニン-2と同等又はそれより強力な抗細菌活性を有することを示している。これらの分離株は、メチシリン及びバンコマイシン耐性株、ならびに多数の抗生物質に高耐性である他の株を含んでいた (Tenczaら, 1997, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 41:2394-2398を参照されたい)。LLP1による細菌の溶菌は迅速であり、 1×10^5 コロニー形成単位のPseudomonas aeruginosa又はStaphylococcus aureusの懸濁液を60秒以内の曝露でほぼ滅菌する (Tenczaら, 1997, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 41:2394-2398を参照されたい)。LLP1の作用メカニズムは、負に荷電した細菌膜を、そしてそれより低度ではあるが中性哺乳類細胞膜を損なうものであると考えられている。哺乳類細胞膜よりも細菌細胞に対して該ペプチドが偏向することが、その選択毒性の基礎を形成する。

20

30

【0007】

LLP1中の単一アミノ酸の変化は、そのカルモジュリン結合及び抗細菌活性に著しい影響を及ぼす (Tenczaら, 1995, *Virology* 69:5199-5202; Tenczaら, 1999, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:33-41)。一般に、親LLP1配列中の塩基性残基から酸性残基へのアミノ酸置換は、カルモジュリン結合及び殺菌活性を減少させる。同様に、単一の疎水性残基から親水性残基への改変も、これらの活性の両方を減少させた。さらに、LLP1親配列中に見出される単一のCysのジスルフィド結合形成による二量体化は、S. aureusに対するその活性を有意に増加させた (Tenczaら, 1999, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:33-41を参照されたい)。最後に、21残基へのLLP1二量体の長さの減少は(ペプチドビス-TL1)、その抗細菌活性を有意に減少させることなくその赤血球溶解活性を減少させた (Tenczaら, 1999, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:33-41を参照されたい)。これらのデータは、効力及び選択性の向上のためにLLP1親配列が改変されうることを示唆している。この改変の可能性は、本発明の基礎を形成するものである。

40

【0008】

(発明の概要)

本発明は、抗微生物活性を有するペプチド(「抗微生物ペプチド」)に関する。本発明の1つの実施形態においては、HIV-1ウイルス分離株HXB2R Envのアミノ酸828-856に対応す

50

るLLP1ペプチド親配列に由来し、それらの類似体である、3つの抗微生物ペプチドが記載されており、該抗微生物ペプチドはSA-5（配列番号1）、LSA-5（配列番号2）及びWLSA-5（配列番号3）を含む（後記表1を参照されたい）。他のLLP1ペプチド類似体の抗微生物活性は既に報告されている（Tenczaら、1999、Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:33-41、Montelaroらの米国特許第5,714,577号及びMontelaroらの米国特許5,945,507号を参照されたい）。

【0009】

本発明のもう1つの実施形態においては、該抗微生物ペプチドは、以下の原理：（i）両親媒性を最適化する、（ii）荷電面上のアルギニン（Arg）及び/又は疎水性面上のバリン（Val）もしくはトリプトファン（Trp）を別のアミノ酸で置換する、及び（iii）ペプチド長を増加させる、に基づく修飾を有するLLP1類似体（本発明では、LBUペプチドと総称され、例えば、LBU-2、配列番号4；LBU-3、配列番号5；LBU-3.5、配列番号6；LBU-4、配列番号7；WLBU-1、配列番号8、WLBU-2、配列番号9、WLBU-3、配列番号10；及びWLBU-4、配列番号11が挙げられる；表1を参照されたい）である。LBUペプチドは親LLP1から著しく逸脱し、例えば、LBU-2及びLBU-3は親LLP1配列から90%以上逸脱している。

【表1】

SA-5:	RVIRV VQRAC RAIRH IVRRI RQGLR RIL	(SEQ ID NO:1)	
LSA-5:	RVIRV VQRAC RAIRH IVRRI RQGLR RILRV V	(SEQ ID NO:2)	
WLSA-5:	RWIRV VQRWC RAIRH IWRRI RQGLR RWLRV V	(SEQ ID NO:3)	20
LBU-1	RVVVR VRRVV RR	(SEQ ID NO:4)	
LBU-2:	RRVVR RVRRV VRRVV RVVRR VVRR	(SEQ ID NO:5)	
LBU-3:	VRRVV RVVVR VRRVV VRRVR RVVRR VRRVV RVVRR	(SEQ ID NO:6)	
LBU-3.5	RRVVR RVRRV VRRVV RVVRR VRRVV RVVRR RVVRR VRRVV RR	(SEQ ID NO:7)	
LBU-4	RVVVR VRRVV RVVRR VRRVV RVVVR RVVRR VRRVV RVVRR VRRVV VRR	(SEQ ID NO:8)	
WLBU-1	RVVVR VRRVV RR	(SEQ ID NO:9)	
WLBU-2	RRVVR RVRRV WRRVV RVVRR WVRR	(SEQ ID NO:10)	
WLBU-3	VRRVV RVVVR VRRVV VRRVR RVVRR VRRVV RVVRR R	(SEQ ID NO:11)	30
WLBU-4	RVVVR VRRVV RVVRR VRRVV RVVVR RVVRR VRRVV RVVVR VRRVV VRRVV RVV	(SEQ ID NO:12)	

【0010】

本発明のLLP1類似体ペプチド及びLBUペプチド（本明細書中では「改変LLP」（eLLP）と総称する）は、既に報告されているLLP1類似体と比較して広い活性スペクトル（すなわち、高耐性細菌を殺す能力）及び増加した効力（すなわち、細菌を殺すのに必要なモル濃度が低い）を有する。本発明のeLLPは、生理塩濃度下で微生物に対して高度に抑制性であり、滑液の存在下で機能し、動物モデルにおいて最低限の毒性しか示さない。その結果、eLLPは、選択的抗微生物薬として定義することができる。また、本発明のペプチドは、細菌膜を破壊することにより機能し、固相に結合している場合にも活性である。これらのペプチドは、細菌生物膜核形成を予防することが有利な人工器官又はカテーテルのような無菌デバイスのコーティング剤として有用であるために、固相に結合しているときにもこれらのペプチドが活性を維持しうることは、通常の抗生物質と比較した場合の顕著な利点である。

【0011】

（詳細な説明）

LLP1の抗細菌活性が報告されて以来（Tenczaら、1997、Antimicrobial Agents & Chemotherapy 41:2394-2398を参照されたい）、効力を増強し（すなわち、それらのモル殺菌活性を増加させ）臨床分離株に対する活性スペクトルを広げるために親配列を改変すること

10

20

30

40

50

により、多種多様なLLP1類似体が製造されている（例えば、Montelaroらの米国特許第5,714,577号及びMontelaroらの米国特許第5,945,507号及びTenczaら, 1999, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:33041を参照されたい）。これは、モデル化らせん（ヘリックス）の親水性及び疎水性面を最適化することにより達成されている。本発明は、LLP1ペプチド類似体SA-5（配列番号1）、LSA-5（配列番号2）及びWLSA-5（配列番号3）である3つの抗微生物ペプチドに関する（前記表1を参照されたい）。また、本発明は、以下の原理：（i）両親媒性を最適化する、（ii）荷電面上のArg及び疎水性面上のValで置換する、（iii）ペプチド長を増加させる、及び（iv）ValをTrpで反復的に置換する、に基づく修飾を有するLLP1類似体である抗微生物ペプチド（本発明では、LBUペプチドと総称され、例えば、LBU-1（配列番号4）；LBU-2（配列番号5）；LBU-3（配列番号6）；LBU-3.5（配列番号7）；LBU-4（配列番号8）；WLB-1（配列番号9）；WLB-2（配列番号10）；WLB-3（配列番号11）；及びWLB-4（配列番号12）が挙げられる；表1を参照されたい）に関する。本発明のLLP1ペプチド類似体及びLBUペプチドは、本発明ではeLLPと称される。SA-5（配列番号1）、LSA-5（配列番号2）、WLSA-5（配列番号3）、LBU-4（配列番号7）及びWLB-4（配列番号12）の組成を、らせん構造としてモデル化された場合のそれらの配列を図1及び2に記載し、親ペプチドLLP1と比較する。

【0012】

SA-5と称されるペプチドにおいては、LLP1親配列の親水性面上にモデル化されたグリシン（Gly）及び2つのグルタミン酸（Glu）残基が3つのアルギニン残基により置換されており、この配列の疎水性面上にモデル化されたプロリン（Pro）がバリン（Val）により置換されている。このペプチドの生成の基礎をなす原理は、元のLLP1配列のカチオン性両親媒性特性を最適化することにある。

【0013】

LSA-5と称されるペプチドは、増加した長さのLLP1誘導体の活性を調べることにより、LLP1のトランケート化（末端切断型）誘導体の効力を記載した従来の報告（Tenozaら, 1999, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:33041を参照されたい）と比較される。LSA-5は、1ターンだけモデル化らせんの長さを延長しており、両親媒性のArgに富むカチオン性特性を維持している。

【0014】

Hwang及びVogel（Biochemistry & Cell Biology 76:235-246（1998））の構造研究によれば、Trp残基は、細菌膜内に最適にインターカレーションすることが示されている。しかし、Trpが生物膜内にインターカレートすることは、Trpを含有する特定のペプチドが細菌膜を選択的に破壊することを意味するものではない。WLSA-5ペプチドは、LSA-5の疎水性面上の4つの残基をTrp残基により置換することにより誘導した。

【0015】

また、本発明は、以下の原理：（i）両親媒性を最適化する、（ii）荷電面上のArg及び疎水性面上のValで置換する、（iii）ペプチド長を増加させる、及び（iv）ValをTrpで反復的に置換する、に基づく修飾を含むLLP1類似体ペプチドに関する。これらの原理に従い修飾されたペプチドは、本発明では、溶菌塩基単位（Lytic Base Unit）（LBU）ペプチドと称される。例えば、ペプチドLBU-2及びLBU-3は、少なくとも24残基の長さを有する最大両親媒性らせん特性を与えるよう設計されたArg及びVal残基の重合体として構成される。

【0016】

本発明のペプチドの抗微生物活性は、後記実施例において考察する。

【0017】

本発明の抗微生物ペプチドは、それらの配列及びそれらが由来する起源の点で特有である。既に報告されているLLP1配列中の微妙な変化及びペプチドの長さの増加が活性の効力及びスペクトルを劇的に改善することは自明ではないであろう。さらに、LBUペプチドは完全に改変されており、いずれの天然配列に基づくものでもない。

【0018】

Staphylococcus aureus、メチシリン耐性S. aureus、及びPseudomonas aeruginosaを含む細菌域に対するeLLP SA-5（配列番号1）、LSA-5（配列番号2）、WLSA-5（配列番号3）、LBU-1（配列番号4）、LBU-2（配列番号5）、LBU-3（配列番号6）、LBU-3（配列番号7）、LBU-4（配列番号8）、WLBU-1（配列番号9）、WLBU-2（配列番号10）、WLBU-3（配列番号11）及びWLBU-4（配列番号12）の活性を、後記表2に要約する。

【0019】

表2は、ナノモル濃度で表されたペプチドのMBCを示す。これらの結果は、これらのeLLPの抗微生物効力を示している。これらのペプチドの活性は、高い最小殺菌濃度（MBC、後記実施例2を参照されたい）に示されるとおり、同等又は低い活性を有しうる他の抗細菌ペプチドと比較して優れている。表2は、種々の生物に対する及び種々の塩条件におけるeLLPのMBC（ナノモルで表されている）を示す。

【表2】

ペプチド	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		メチシリン耐性 <i>S. aureus</i>	
	0 mM NaCl	150 mM NaCl	0 mM NaCl	150 mM NaCl	0 mM NaCl	150 mM NaCl
LLP1	1000	1000	8000	16000	16000	-
SA-5	1000	1000	1000	-	-	-
LSA-5	800	800	1000	1000	150	-
WLSA-5	1000	1000	1000	1000	150	-
LBU-2	1500	800	1500	>100,000	-	-
LBU-3	1500	800	1500	1500	-	-
LBU-3.5	400	400	1000	600	1500	200
LBU-4	800	400	800	800	-	-
WLBU-1	400	2500	30,000	10,000	50,000	50,000
WLBU-2	200	100	1000	600	200	100
WLBU-3	1500	800	3,000	600	400	100
WLBU-4	1500	400	3,000	600	1500	200

【0020】

本発明において「eLLP」と総称される本発明の抗微生物ペプチドは、多様な微生物に対して抗微生物活性を示し、HIV-1ウイルス分離株HXB2R Env TMのアミノ酸828-856に対応するLLP1ペプチドの類似体である。eLLPは、Argに富む配列を含み、これは、二次構造でモデル化された場合に、高い両親媒性及び疎水性モーメントを示す。eLLPは微生物に対して高度に抑制性であるが、哺乳類細胞に対してはそれほど有意には毒性ではない。その結果、これらのペプチドは選択的抗微生物薬として特徴づけられうる。また、本発明のeLLPは、以下の原理：(i) 両親媒性を最適化する、(ii) 荷電面上のArg及び疎水性面上のValもしくはTrpで置換する、及び(iii) ペプチド長を増加させる、に基づく修飾を含むLLP1ペプチド類似体（本発明ではLBUペプチドと総称される）を含む。

【0021】

本発明で用いる「抗微生物」なる語は、細菌、真菌、原生動物及びウイルスのような微生物の増殖を妨げ、抑制し又は破綻させる本発明のペプチドの能力を意味する。本発明で用いる「ペプチド」なる語は、ペプチド結合により互いに連結された少なくとも2つの連続的アミノ酸のオリゴマーを意味する。

【0022】

本発明のeLLPは、微生物に対して選択毒性を示す親ペプチドLLP1の構造的及び機能的類似体である。本発明で用いる「類似体」なる語は、親ペプチドのアミノ酸配列中の置換、再編成、欠失、付加及び/又は化学的修飾を含有し該親ペプチドの構造的及び機能的特性を保有するペプチドを意味する。

【0023】

本発明のeLLPは、公知抗微生物非LLPペプチド（例えば、マガイニン又はカテリシジン）に対する有意な一次配列相同性を欠く。eLLPは、正に荷電した残基に富み、両親媒性らせんを形成すると予想される。該両親媒性らせんは、特有かつ強力な抗微生物活性を本発明のペプチドに付与する。本発明の抗微生物ペプチドを特徴づける構造的特性には、とりわけ、三次元両親媒性らせん構造を形成しうることが含まれる（Eisenberg及びWesson, 1990, *Biopolymers* 29: 171-177）。両親媒性らせん構造は、3.6アミノ酸残基が該らせんの1ターンを完成するよう配置された残基を含む。よく知られたタンパク質フォールディングの制約に基づくこの配置に基づき、アミノ酸配列を調べることにより両親媒性の推定を行うことが可能である。

【0024】

本発明の1つの実施形態においては、この「理想的」両親媒性らせんモチーフの最適化が、本発明のeLLPを作製するために用いる原理の1つである。本発明のもう1つの実施形態においては、親水性面上のArg残基及び疎水性面上のTrp又はVal残基の置換が、本発明のeLLPを作製するために用いる原理の1つである。本発明の抗微生物ペプチドは更に、Ala、Gly、Ile又はPhe、及び一般的な両親媒性らせん構造内で許容されうる他のアミノ酸残基を含有しうる。これらの残基は、ペプチドの効力及び選択性を増強する構造を付与するが、それは実験によってのみ測定される。本発明の幾つかのeLLPは、1つのCysを含有するが、Cysはジスルフィド結合を形成しうるため、Cys残基を含有するペプチド（例えば、ビス-eLLP）をジスルフィド連結二量体ペプチドとすることにより、その効力の増強をもたらしうる。Cysの位置は、そのようなものとしてモデル化された場合に、該両親媒性らせん構造の親水性及び疎水性面の境界上に存在する。そのようなCys残基の置換は当業者に自明ではなく、実験的に決定されなければならない。これは、例えば、ペプチド構造のコンピューターモデリングを使用して、過度な実験を行うことなく当業者により達成されうる。例えば、本発明のペプチドを設計するために、「ヘリカル・ホイール（Helical Wheel）」（Genetics Computer Group, Madison, Wis.）のようなコンピューターモデリングプログラムを用いることができる。もう1つの実施形態においては、本発明のペプチドの長さを増加させて、それらの抗微生物活性を改善することが可能である。

【0025】

本発明のeLLPは、それらの機能特性において特有である。該抗微生物ペプチドの特有の構造は、細菌に対する選択性を維持する一方で高い効力を付与する。該抗微生物ペプチドの効力は、マガイニン又はカテリシジンの場合と比較して非常に優れている。eLLPはグラム陽性及びグラム陰性菌を迅速に殺菌し、*Listeria monocytogenes*、*Bacillus subtilis*、*Enterococcus faecalis*（バンコマイシン感受性（VSEF）及びバンコマイシン耐性（VREF）株を含む）、*Enterococcus faecium*（バンコマイシン感受性（VSEF）及びバンコマイシン耐性（VREF）株を含む）、*Staphylococcus aureus*（メチシリン感受性（MSSA）及びメチシリン耐性（MRSA）株を含む）、*Staphylococcus epidermidis*（メチシリン感受性（MSSE）及びメチシリン耐性（MRSE）株を含む）、*Staphylococcus salivarius*、*Corynebacterium minutissimum*、*Corynebacterium pseudodiphtheriae*、*Corynebacterium stratum*、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）G1群、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）G2群、*Streptococcus pneumoniae*（ペニシリン耐性（PSRP）株を含む）、*Streptococcus mitis*及び*Streptococcus sanguis*のようなグラム陽性菌；大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Burkholderia cepacia*、*Serratia marcescens*、*Haemophilus influenzae*、モラクセラ属菌（*Moraxella* sp.）、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Salmonella typhimurium*、アクチノマイセス属菌（*Actinomyces* spp.）、ポルフィロモナス属菌（*Porphyromonas* spp.）、*Prevotella melaninogenica*、*Helicobacter pylori*、*Helicobacter felis*、及び*Campylobacter jejuni*などのグラム陰性菌を含むが、これらに限定されるものではない。広い活性スペクトルを示す。機能特性には、哺乳類細胞に対して最低限の毒性しか伴わない選択的抗微生物活性も含まれる。したがって、本明細書における教示及び指針に基づき、当業者は、所望の効力及び選択性を有する本発明の範囲内のこれらのeLLPを容易に設計することが可能である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

個々の抗微生物ペプチド及び/又は他の細胞溶解性ペプチドの類似体も本発明の範囲内である。該類似体は、本明細書に記載の構造的及び機能的特性を保有する。本発明のもう1つの実施形態においては、D-アミノ酸が、L-アミノ酸の代わりに使用されることが可能であり、代謝安定性の増強をもたらさう。なぜなら、D-アミノ酸を含有するペプチドは、L-アミノ酸から構成されるペプチドを一般には切断する哺乳類プロテアーゼに対して抵抗性であるからである。例えば、D-アミノ酸を含有するセクロピン類似体は抗細菌活性を示す(Merrifieldら, Antimicrobial Peptides, Ciba Foundation Symposium, Wiley, Chichester, 5-26, 1994)。本発明はまた、LLP1親ペプチドより長いペプチド類似体に関する。これらのペプチドは、モル当たりで比較した場合にLLP1親配列より強力でありうる。該ペプチドは、より広い活性スペクトルを示す。前記のとおり、抗微生物ペプチド中にCys残基が含有されていることは、二量体ペプチドを安定化しうる分子内又は分子間ジスルフィド結合の形成の促進において有用であり、S. aureusのような或る微生物病原体に対する抗微生物効力を改善する。

10

【 0 0 2 7 】

本発明の抗微生物ペプチドは、高塩条件下及び生物流体中で非常に活性でありうる(実施例4及び図3~6を参照されたい)。生理的NaCl濃度において活性を維持する該ペプチドの能力は、該ペプチドが脊椎動物宿主の生理的流体中で抗微生物活性を示すのを可能にする。

【 0 0 2 8 】

本発明のペプチドは、例えばMillerら(AIDS Research & Human Retroviruses 7:511-19 (1991))により記載されているような当業者に公知の手動又は自動操作を用いる、又はAdvanced Chemtech Model 200(Advanced Chemtech, Louisville, Ky.)を用いる、又はFmoc合成プロトコール(Fontenotら, 1991, Peptide Research 4:19-25)でMillipore 9050+(Millipore, Bedford, Mass.)自動合成装置を若しくは他の入手可能な装置を用いる古典的なメリフィールド固相合成技術により合成することができる。切断及び脱保護の後、合成ペプチドを、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー及び当業者に公知の任意の逆相カラム/HPLC系により精製することができる。また、ヌクレオチドに基づくペプチド設計のための当業者に周知の技術を用いる標準的な組換えDNA技術によっても、ペプチドを合成することができる(Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1995)。親ペプチドからペプチド類似体を製造するために、例えば、部位特異的突然変異誘発又はオリゴヌクレオチド合成を用いることができる。また、該ペプチドのアミノ酸配列は、アミノ酸組成分析ならびに各アミノ酸の手動及び自動エドマン分解及び決定、HPLC分析又はマススペクトロメトリーにより確認し同定することができる。該ペプチドのN末端アミノ酸は遊離アミノ基を含有していたりアセチル化されていることが可能であり、該ペプチドのC末端アミノ酸はアミド化、脂質化されていたり遊離カルボキシル基を含むことが可能である。当業者に公知のペプチド末端の他の修飾も本発明の範囲内である。

20

30

【 0 0 2 9 】

ペプチド中の個々のアミノ酸残基の重要性は、関心のある残基を改変又は置換することにより試験することができる。例えば、分子内又は分子間ジスルフィド結合の形成に關与しうるCys残基の要件は、Cysから別のアミノ酸(例えば、そのような結合を形成し得ないチロシン)への変異により試験することができる。Cysは、例えば、還元及びカルボキシアミド化(この場合、システインの硫黄原子にアミド基が付加される)によりジスルフィド結合の形成を妨げるよう化学的に改変することができる(Creighton, T. E. 編, Protein Structure: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1989)。逆に、そのような結合がペプチドの抗微生物活性に關与するか否かを評価するために、ペプチド中のCys残基を酸化状態(すなわち、ジスルフィド結合の形態)で維持することができる。そのような酸化は、例えば、空気酸化法(Ellman, G. L., Arch. Biochem. 82: 70-77, 1959)又はDMS

40

50

O酸化 (Tamら, J. Am. Chem. Soc. 113: 6657-6662, 1991) により行うことができる。同様に、疎水性面上でTrp残基で置換することができる (例えば、WLSA-5ペプチド (配列番号3))。

【0030】

本発明の抗微生物ペプチドをそれらの好ましい構造的特性に基づき設計するためには、コンピューターモデリングが有用である。直鎖状配列から両親媒性らせん構造を予想するための当技術分野で公知の標準的な方法はアイゼンバーグアルゴリズム (Eisenbergら, Biopolymers 27: 171-177, 1990) であり、本発明のペプチドをモデル化するのに有用である。ペプチド配列は、予想される二次構造、疎水性モーメント及び両親媒性に関して、当業者に利用可能なプログラム (例えば、インターネットから入手可能なもの) を使用して分析される。二次構造 (Chouら, Adv. Enz. 47: 45-146, 1978; Garnierら, J. Mol. Biol. 120: 97, 1978) 又は疎水性モーメント (Eisenbergら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 140-144, 1984) を予測するアルゴリズムを一般に使用するこれらのプログラムを使用することが可能である。

10

【0031】

ペプチド濃度は、標準的なニンヒドリン比色アッセイを用いて定量する (後記実施例1を参照されたい)。市販の (Dupont) なニンヒドリン試薬と組み合わせられた漸増容量のロイシンストックの570nmにおける吸光度を分光光度計で読取り、Leu標準体による標準曲線を作成する。ペプチドサンプルの読取り値をロイシン標準曲線と比較して、各サンプル中のペプチドの量を定量する。あるいは、該ペプチドがその配列中にTrpを含有する場合には、モル吸光係数 $\epsilon_{280} = 5500^{-1} \text{ m} \cdot \text{cm}^{-1}$ を使用するUV分光法により、ペプチド濃度を測定することができる。

20

【0032】

原核及び真核細胞の生存性に対する本発明の抗微生物ペプチドの効果は、該ペプチドへの曝露又は処理の後の生存を測定する任意の方法によりアッセイすることができる。スクリーニング目的には、標準的な細菌プロス希釈アッセイを用い、赤血球溶解アッセイと比較することができる (Tenczaら, 1999, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:33-41を参照されたい)。しかし、最終的には、この選択毒性比較は、原核細胞及び真核細胞の両方をコインキュベーション中に (すなわち、同一条件下で) ペプチドにさらす際に行うべきである。また、酵母、マイコプラズマ及びウイルスを含む他の病原体の生存性に対する該抗微生物ペプチドの効果を試験することも可能である。

30

【0033】

本発明のペプチドの抗細菌特性は、例えば溶菌アッセイ (実施例1) から、ならびに、とりわけ、増殖抑制アッセイ (Blondelieら, Biochemistry 31:12688, 1992)、蛍光に基づく細菌生存性アッセイ (例えば、Molecular Probes BacLight)、フローサイトメトリ分析 (Arroyoら, J. Virol. 69:4095-4102, 1995) 及び当業者に公知の他の標準的なアッセイを含む他の方法により測定することができる。

【0034】

本発明のペプチドの抗真菌特性の測定は、当業者に良く知られた技術 (Selitrennikoff, C., Screening for Antifungal Drugs, in Biotechnology of Filamentous Fungi, Fin kelsteinら編, Butterworth-Heinemann, Boston, 1992) により行うことができる。本発明のペプチドの抗ウイルス特性の測定は、例えば、当技術分野で認められている標準的なインビトロアッセイ (例えば、Wildら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10537-10541, 1992) におけるウイルスのプラーク形成を抑制するペプチドの能力による当業者に良く知られた技術により行うことができる。

40

【0035】

該ペプチドに関する最小殺菌濃度 (MBC) 値 (すなわち、試験されている微生物サンプルの99.9%を殺すのに必要なペプチドの濃度) を導くためには、微生物標的の増殖抑制のためのアッセイを用いることができる。この値は、特定の生物又は生物群に対する特定の抗微生物薬 (例えば、抗生物質) の有効性を表すものとして当業者に良く知られている。

50

ペプチドのMBCを検出するためのアッセイにおいては、ペプチドを用いない対照実験と比較した、ペプチドに曝露後の細菌集団の増殖抑制をコロニー形成単位 (cfu) の数に関して測定ればよい。

【0036】

本発明の抗微生物ペプチドの有効性の同定及び測定において有用なもう1つのパラメーターは、ペプチドの抗微生物活性のキネティクスの測定である。そのような測定は、本発明のアッセイのいずれかを行い微生物活性を時間の相関因子として測定することにより行うことができる。好ましい実施形態においては、該ペプチドは、微生物を効率的に殺すキネティクスを示す。

【0037】

本発明の抗微生物ペプチドは、標的微生物に対する選択毒性及び哺乳類細胞に対する最小の毒性を示す。哺乳類細胞上での本発明のペプチドの毒性の測定は、好ましくは、組織培養アッセイを用いて行う。哺乳類細胞の場合、そのようなアッセイ方法には、とりわけ、トリパンブルー排除及びMTTアッセイ (Mooreら, 1994, Peptide Research 7:265-269) が含まれる。膜透過性の変化に際して特定の細胞型が特定の代謝産物を放出しうる場合には、その特定の代謝産物 (例えば、赤血球の溶解の際のヘモグロビンの放出) をアッセイすることができる (Srinivasら, 1992, Journal of Biological Chemistry 267:7121-7127を参照されたい)。また、密着結合を形成している細胞単層の経上皮抵抗 (Rte) の破壊をモニターすることができる (図9を参照されたい)。本発明のペプチドは、好ましくは、初代細胞、例えば、偏光 (polarized) 培養内のヒト気管支上皮 (HBE) 細胞又は当業者により通常使用される他の初代細胞培養を使用して試験する。永久的形質転換細胞系 (例えば、Jurkat細胞) を使用することも可能である。

【0038】

eLLPの治療能の測定においては、細菌、真菌、原生動物又はウイルスサンプルに対するMBCが、哺乳類細胞に対して観察されるMBCより低いことをもって、選択的抗微生物性とする。本発明のペプチドの抗微生物活性の特徴づけは、前記のとおり、細菌、真菌、原生動物又はウイルスなどの培養しアッセイしうる任意の微生物を使用して行うことができる。

【0039】

グラム陽性及びグラム陰性の両方の微生物に対する殺菌活性を測定するためには、本発明のペプチドに関する抗細菌アッセイを行うことができる。大腸菌 (*E. coli*) 及び *P. aeruginosa* は、グラム陰性生物の具体例である。*S. aureus* はグラム陰性微生物のモデルとして使用することが可能であり、これは重要な臨床標的である。なぜなら、ほとんどの株は、ほとんどの全身性抗生物質治療に対して無反応性だからである。メチシリン耐性 *S. aureus* は、抗生物質耐性モデル生物として使用することができる。*E. faecalis*、特に、臨床現場 (例えば、病院) で見出されるバンコマイシン耐性分離株をアッセイすることが可能である。*S. marcescens* は、眼及び他の局所感染源であり、容易にアッセイすることができる。該ペプチドは、外耳感染症 (外耳炎) の治療において又は *Neisseria gonorrhoeae* により引き起こされるような性感染症の治療において使用することができる。本発明のペプチドの標的となりうる粘膜表面上の細胞外にしばしば見出される他の細菌病原体は、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、B群ストレプトコッカス、*Gardnerella vaginalis*、*Klebsiella pneumoniae*、アシネトバクター属菌 (*Acinetobacter* spp.)、*Haemophilus aegyptius*、*Haemophilus influenzae*、*S. epidermidis*、*Propionibacterium acnes*、及び口内病原体、例えば、アクチノマイセス属菌 (*Actinomyces* spp.)、ポルフィロモナス属菌 (*Porphyromonas* spp.)、及び *Prevotella melaninogenica* を含むが、これらに限定されるものではない。他の微生物病原体も、これらのペプチドの標的となることがあり、これらの微生物病原体及びそれらが引き起こす感染症は当業者に公知である。

【0040】

マイコプラズマは、グラム陽性祖先からゲノム減数により退行的に進化したと考えられる真正細菌であるモリキューテス綱に属する。古典的な細菌とは異なり、それらは細胞壁を有さず、その代わりに単一の3層膜により囲まれており、本発明の或るペプチドに感受

10

20

30

40

50

性でありうる。本発明のペプチドの抗マイコプラズマ活性を試験するためには、抗マイコプラズマアッセイを行うことができる。マイコプラズマのヒト病原体は、*Mycoplasma pneumoniae* (呼吸器病原体)、*Mycoplasma hominis* (泌尿性器病原体)、及び*Ureaplasma urealyticum* (泌尿性器病原体)を含む。本発明のペプチドは、マイコプラズマ感染に関連した疾患を治療するために使用することができる。また、マイコプラズマ汚染は、*in vitro*で細胞を培養する際に頻繁に生じる問題であり、それを有効に排除することは非常に困難である。したがって、本発明のペプチドは、組織培養内のマイコプラズマ汚染を選択的に排除するのに有用でありうる。

【0041】

真菌も、本発明の特定のペプチドに感受性でありうる。なぜなら、それらの膜は、ヒト細胞内では見いだされないエルゴステロールを含有するからである。この相違を治療用途において利用して、真菌を選択的に抑制するがヒト又は哺乳類膜の機能を妨げない本発明のペプチドを設計することが可能である。選択的抗真菌膜標的化のメカニズムの前例は、例えば、エルゴステロールに結合し該膜内に孔を形成する抗真菌剤アンホテリシンBの使用において見出される (Goodmanら, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan Publishing, New York, 1985)。限定するものではないが、皮膚糸状菌、酵母、二形性真菌及び糸状菌を含むすべての真菌が、これらのペプチドの潜在的な標的とみなされうる。本発明のペプチドの標的となりうる特定の真菌病原体は、*Microsporium* spp.、*Epidermophyton* spp.、*Candida albicans*、*Cryptococcus neoformans*、*Trichophyton* spp.、*Sporothrix schenckii*及び*Aspergillus fumigatus*ならびに当業者に公知の他の病原体を含むが、これらに限定されるものではない。

【0042】

DNAウイルス及びRNAウイルスの両方が本発明の抗微生物ペプチドの標的となりうる。本発明の特定の実施形態においては、該ペプチドは膜構造体を標的としそれを破壊しうるため、包膜ウイルスは該ペプチドの抗ウイルス作用に感受性でありうる。すべてのウイルスが潜在的な標的であるが、例えば、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、ヘパドナウイルス、パキユロウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、レトロウイルス、トガウイルス、ラドウイルス、ブニヤウイルス及びフラビウイルスのような包膜ウイルスは、本発明の抗微生物ペプチドに特に感受性でありうる。本発明の好ましい実施形態においては、該ウイルスは、レンチウイルス、例えばHIV-1、ヘルペスウイルス、例えばHSV、又はオルトミクソウイルス、例えばインフルエンザウイルスよりなる群から選ばれる。特に好ましい実施形態においては、該ウイルスはHIV-1である。なぜなら、それは粘膜表面上に広がり、HIV-1及び他の性感染症病原体に対して活性な合成ペプチドのような殺微生物物質の局所投与により処置されうるからである (後記実施例5を参照されたい)。

【0043】

また、該ペプチドのメカニズム及びそれらの生化学的標的の更なる解明は、細胞質の及び/又は外壁膜の含有物において改変された細菌、真菌、マイコプラズマ及びウイルスの同質遺伝子突然変異体の使用から達成されるかもしれない。特定の膜構成成分に対して最適に抑制性である特定の設計体を同定するために、本発明のペプチド類似体を、これらの突然変異体に対して特異的に試験することができる。

【0044】

本発明のペプチドは、例えば、嚢胞性線維症肺感染 (後記実施例3を参照されたい)、関節敗血症 (後記実施例4を参照されたい)、眼感染症、歯周病、STD、外耳炎、皮膚感染症、熱傷感染症、膻感染症及び糖尿病性足潰瘍のような特定の微生物感染症の抑制又は治療に有用でありうる。

【0045】

さらに、本発明のペプチドは、微生物のコロニー形成を抑制するのに有用でありうる。例えば、該ペプチドは、ウイルスベクターを使用するトランスフェクションを介して運搬され、*in vivo*で真核細胞により発現されうる。該細胞内での該ペプチドの継続的発現及

10

20

30

40

50

びそれらの環境中への分泌は、微生物のコロニー形成を妨げ、微生物感染を予防しうる。これは、嚢胞性線維症に關与する細菌のコロニー形成を抑制しうる本発明のペプチドを気道上皮細胞へ運搬することにより嚢胞性線維症を予防するのに有用でありうる。該ペプチドを発現する細胞は、或る範囲の病原性微生物のコロニー形成を継続的に阻止しうる事が可能である。

【0046】

また、特定の微生物感染症の抑制又は治療に關する本発明の抗微生物ペプチドの評価は、ヒト又は他の哺乳動物におけるそのような感染症に關連していると当業者に認められた感染症の動物モデルの使用を伴いうる。後記実施例3は、ペプチドの選択毒性が試験されうる嚢胞性線維症肺感染症の細胞培養モデルを記載している。後記実施例4は、抗微生物ペプチドを評価するために使用しうる関節敗血症の動物モデルを記載している。

10

【0047】

抗生物質としてのeLLPの使用の利点には、膜構造体を標的とする抗生物質に対する耐性メカニズムを微生物が発達させることがより困難であると考えられうる事が含まれる。他の微生物病原体が、(通常の抗生物質とは対照的に)これらの物質にさらされたことがないことは、更なる利点である。本発明のペプチドの前記の特性を考慮すると、微生物により引き起こされた宿主における感染過程の治療に本発明の抗微生物ペプチドを使用しうる事が意図される。

【0048】

本発明のペプチドの全身投与は宿主における免疫原性応答を誘導しうる。したがって、全身投与された場合の該ペプチドの免疫原性を減少させるために、ポリエチレングリコール処理のような当技術分野で公知の技術を用いることができる。

20

【0049】

本発明のもう1つの実施形態は、これらのペプチドがそれらのN末端アミノ基を介して固相基体に結合したまま機能するのを可能にする該ペプチドの作用の表面活性メカニズムである。本発明のペプチドは、固相基体に結合している場合に活性である(実施例4、表3を参照されたい)。したがって、本発明のペプチドは、人工器官(例えば、人工関節及び肢)のような移植装置上のコーティング剤として有用である。該ペプチドは、人工臓器及び眼内レンズ上のコーティング剤としても有用でありうる。

【0050】

本発明のeLLPは、単一のアミノ基及び遊離スルフヒドリル基を有しうる。これらの官能基は、誘導体化表面への特異的結合を可能にする。例えば、適当に誘導体化された表面を本発明のeLLPのN末端アミノ基に結合させるために、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)化学を用いることができる。あるいは、m-マレイミドベンジル-N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル(MBS, Pierce Chemical, Rockford, IL)を使用して、遊離カルボキシル基で誘導体化された表面をeLLPのCys残基上の遊離スルフヒドリル基に架橋することが可能であろう。ペプチドを誘導体化表面に結合させるための他の方法は当業者に公知である。

30

【0051】

また、本発明のeLLPは、ペプチド-カーゴ(cargo、積荷)複合体に關する。この場合、本発明のペプチドは、標的微生物へのカーゴの運搬が可能となるようカーゴに結合されていてもよい。該カーゴは、抗微生物活性を有する因子を含むことが可能であり、本発明のeLLPの効力を改善し及び/又は本発明のeLLPの抗微生物活性を増加しうる。例えば、eLLPを、リゾチームのような抗細菌酵素又はペニシリンのような抗生物質に架橋して、それらの効力を増強することが可能である。本発明のペプチドをカーゴに結合させるための他の方法は当業者に周知である。

40

【0052】

本発明のもう1つの態様は、治癒を促進するための時間及び条件下で本発明のペプチドを患者に投与することにより、感染過程を排除する方法に關する。本発明の特定の態様においては、これらのペプチドの高い効力及び迅速な殺菌活性は、それらを、縫合前の創傷の滅菌及び手術又は他の侵襲的方法において装置を使用する前の該装置の滅菌のような予

50

防療法において使用するための魅力的な候補とする。それらの微生物特異性は、本発明のペプチドを、組織培養内の望ましくない微生物増殖の抑制において特に有用なものとする（特に、組換えタンパク質又は遺伝子治療に使用するベクターの製造に使用される場合）。本発明のもう1つの実施形態においては、該ペプチドは、宿主細胞又は微生物内への運搬を促進する1以上の他の薬物との組合せ製剤において使用することができる（例えば、実施例4、図12を参照されたい）。

【0053】

本発明はまた、治療的に有効な量（細胞培養又は宿主個体から標的微生物を最小限に抑制したり又は排除するのに十分なペプチド（又はペプチドの組合せ）の量）で宿主に投与しうる、有効成分として該抗微生物ペプチドの1以上を含有する生理的組成物に関する。

10

【0054】

該生理的組成物は、治療的に有効な用量の本発明の抗微生物ペプチドの少なくとも1つと、製薬上許容される担体とを含有する。本発明はまた、本発明の組成物を使用する、宿主における微生物感染症の治療方法に関する。そのような治療は、そのような治療を要する個体に、治療的に有効な量の生理的組成物を投与することを含む。そのような組成物は、筋肉内又は静脈内経路により非経口的に投与することが可能であるが、十中八九は、エアゾール化、皮下投与又は経口、局所及び鼻腔内投与により投与される場合に最も有用であろう。好ましくは、本発明のペプチドを含有する生理的組成物を、微生物により引き起こされる表面感染の排除のために局所的に適用する。局所医薬組成物において使用する場合には、該ペプチド有効成分を該組成物の0.001~20%（w/v）の濃度で使用することができる。

20

【0055】

局所的に適用する場合には、該ペプチド組成物を担体及び/又はアジュバントのような他の成分と組合せることができる。また、該ペプチドの拡散を最小限に抑えるために、アルブミンのようなタンパク質担体又は人工インプラントに該ペプチドを共有結合させることができる。そのような他の成分の性質に対する制限は無い。ただし、それらは、製薬上許容され、意図される投与に有効であり、該組成物の有効成分を分解させ得ないものでなければならない。本発明のペプチド組成物を局所感染部位に適用する場合、それらは刺激物（それはスカベンジャー細胞の流入を刺激するであろう）として作用する可能性がある。また、該ペプチド組成物は、軟膏剤又は坐剤（好ましくは、精製コラーゲンと組合せられている）の形態でありうる。また、該ペプチド組成物を、好ましくは液体又は半液体形態で、経皮パッチ、硬膏及び包帯に含浸させることができる。

30

【0056】

本発明のペプチドはまた、感染過程の治療を促進させるために全身投与することができる。全身適用する場合には、該ペプチド組成物は、経腸投与のための液体、丸剤、錠剤、トローチ剤など、又は非経口注射のための液体形態として製剤化することができる。該ペプチド（又はペプチド-タンパク質コンジュゲート）は、当業者に公知の担体及び/又はアジュバントのような他の成分と組合せることができる。そのような他の成分の性質に対する制限は無い。ただし、それらは、生理的に許容され、それらの意図される投与に有効であり、該組成物の有効成分を分解させ得ないものでなければならない。注射に適した生理的形態には、無菌水溶液又は分散液、及び無菌注射溶液又は分散液の用時調製用の無菌粉末が含まれる。いずれの場合においても、最終的な溶液形態は無菌であり流動性でなければならない。当技術分野において公知の典型的な担体には、例えば、水緩衝化水溶液（すなわち、生体適合性バッファー）、エタノール、ポリオール、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、それらの適当な混合物、界面活性剤又は植物油を含有する溶媒又は分散媒が含まれる。滅菌は、濾過、又は抗細菌もしくは抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸又はチメロサル）の添加を含む（これらに限定されるものではない）当技術分野において認められた技術により達成することができる。さらに、例えば糖のような等張剤を本組成物に含有させることが可能である。本ペプチドを含有する無菌注射溶液の製造は、必要な量のこれらの化合

40

50

物を、必要に応じて前記の種々の成分と共に、適当な溶媒に含有させ、ついで滅菌、好ましくは濾過滅菌することにより達成される。

【0057】

本発明のペプチドを経口投与する場合には、該ペプチドの有効量を含有するその生理的組成物はまた、不活性希釈剤、同化可能な可食担体などを含有したり、硬又は軟ゼラチンカプセル剤としたり、圧縮して錠剤としたり、あるいはエリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤などにすることが可能である。したがって、本ペプチドは、簡便かつ有効な投与のために、治療的に有効な量の適当な製薬上許容される担体と共に医薬上有効な量で配合される。

【0058】

感染を抑制するために本発明の方法において使用するペプチドの厳密な有効量は、抗生物質の活性の性質及び感染過程の性質を理解している当業者により、過度な実験を伴わずに決定できる。使用しなければならない抗生物質ペプチド（例えば、本発明のペプチド）の量は、感染の程度及び治療すべき微生物に応じて様々となりうる。投与用の複合製剤の単位体積当たりの本発明のペプチドの量も、当業者により、過度な実験を伴わずに決定されうる。しかし、一般には、該ペプチドは、好ましくは、複合組成物の1ml当たり少なくとも約1.0ナノグラム、より好ましくは、1ml当たり約1.0ミリグラムまでの量で存在すべきであると記載できる。全身用量も、患者の年齢、体重及び状態ならびに投与経路に左右される。例えば、ヒト成人への投与のための適当な用量は、約0.01～約100mg/kg体重の範囲となりうる。好ましい用量は、約0.5～約5.0mg/kg体重の範囲となりうる。本発明で用

【0059】

本発明の抗微生物ペプチド組成物は、進行中の感染過程を排除するよう設計されているため、該組成物の連続的な適用又は断続的な再適用を行うか又はそれが好ましいかかもしれない。本発明の実施は、特に示さない限り、当技術分野の技量の範囲内である合成有機化学、タンパク質化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術及び薬理学の通常の技術を用いる。そのような技術は文献に十分に説明されている（例えば、Scopes, R. K. Protein Purification: Principles and Practices, 2nd edition, Springer-Verlag, 1987; Methods in Enzymology, S. Colwick及びN. Kaplan編, Academic Press; Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1995; Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985を参照されたい）。

【0060】

以下の実施例は本発明を更に詳しく例示するものであり、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0061】

(実施例1) eLLPの設計及び合成

eLLPの設計

前記の原理を用いて、予想される両親媒性らせん構造を有するArgに富む親水性面及びより理想的な疎水性面を作製するためのLLP1親配列の残基の改変に基づく合成を目的として、ペプチド配列を設計した。1つの場合、すなわち、WLSA-5（配列番号3）の場合には、活性の効力及びスペクトルを増強するためにTrp残基を含有させた（図1）。図2に示すように、LBU-2（配列番号5）及びLBU-3（配列番号6）の場合には、親水性面及び疎水性面上にそれぞれArg残基及びVal残基よりなる理想化された両親媒性らせん構造を設計した。

【0062】

ペプチド合成

Advanced Chemtechモデル200 (Advanced Chemtech, Louisville, Ky.) 又はMillipore 9050+ (Millipore, Bedford, Mass.) 自動ペプチド合成装置をFmoc合成プロトコルで使用し、既に記載されているとおりに (Miller, Jaynes及びMontelaro, AIDS Research & Human Retroviruses 7:511-519ならびにFontenotら, Peptide Research 4:19-25を参照されたい)、ペプチドを合成した。切断及び脱保護の後、Vydac C18又はC4カラム (The Separations Group, Hesperia, Calif.) 上の逆相HPLCにより、合成ペプチドを特徴づけ精製した。各ペプチドが何であるかを質量分析により確認した (University of Pittsburgh Protein & Peptide Core Facility)。

【 0 0 6 3 】

ペプチドの定量

定量的ニンヒドリンアッセイにより、ペプチドの濃度を測定した。簡潔に説明すると、5~60nmolのペプチドを含有するサンプルに、Sarinら (Analytical Biochemistry 117:147-157) に記載のとおり調製したニンヒドリン試薬A、B及びCを加えた。0~60nmolのロイシンよりなる、通常のアミノ酸組成分析により検量したロイシン標準溶液を平行して調製して、標準曲線を作成した。100 で10分間にわたるインキュベーションの際に生成した紫色を、96ウェルプレートの3重ウェルに移された1:1 イソプロパノール/水中での希釈、及びマイクロウェルプレートリーダー (Dynatech, Chantilly, Va.) 上でのAbs₅₇₀の測定により定量した。ペプチドの濃度を、該標準曲線との比較により測定し、各ペプチドに結合した遊離アミノ基の数に関して補正した。

【 0 0 6 4 】

(実施例2) in vitro溶菌アッセイを用いるペプチドの評価

試験サンプル

この研究に使用したペプチドは前記のとおりであり、前記とおりに製造される。これらの実験に使用した細菌分離株のパネルは、グラム陽性及びグラム陰性の両方の臨床分離株を含むものであった。与えられた細菌分離株を後記のとおり調製し、与えられたeLLPに後記のとおりにさらした。

【 0 0 6 5 】

溶菌アッセイ

既に報告されている (Lehrer, R. I., M. E. Selsted, D. Szklarek及びF. J. 1983. Infect. Immun. 42:10-4,1983; Miller, M. A., R. F. Garry, J. M. Jaynes及びR. C. Montelaro, AIDS Res Hum Retroviruses 7:511-519,1991) 方法と同様の方法で溶菌アッセイを行った。細菌懸濁液をLBブロス (Luria-Bertani Broth) 中で中期対数増殖期まで培養し、遠心分離と10mM リン酸バッファーへの懸濁を2サイクル行って洗浄した。該懸濁液のAbs₆₀₀を10mMリン酸バッファーで調節して、希釈後に、5~10×10⁵ cfu/mLが該アッセイにおいて処理されるようにした。希釈剤として10mMリン酸バッファー (pH 7.2) を使用して2倍希釈 (100 µM~100nM) したペプチドと共に、細菌を96ウェルプレート中で1時間インキュベートした。細菌の10倍希釈を1:1000まで行い、各条件からの100 µlのアリコートトリプシンダイズ寒天プレート (Difco, Detroit, Mich.) の表面上に広げ、それを一晩インキュベートした。生存細菌のコロニー (cfu、コロニー形成単位) を計数し、未処理対照と比較して、各条件下でのペプチド誘導性殺菌の量を測定した。log殺菌は、ペプチドでの処理の前及び後に存在するcfuの比率の対数と定義される。最小殺菌濃度MBCは、99.9% (3 log) の殺菌が達成されたペプチド濃度である (Pearsonら, Antimicrob. Agents Chemother. 18:699-708,1980)。

【 0 0 6 6 】

結果

代表的なグラム陽性 (S. aureus) 及びグラム陰性 (P. aeruginosa) 臨床分離株を、本発明に記載のペプチドを調べるための指標細菌として使用した。S. aureus及びP. aeruginosaに関するLL37及びWLSA-5 (配列番号3) の殺菌曲線を図3及び4に示す。これらの結果は、本発明に記載のその他のペプチドを反映している。この分析は、eLLP及びLBUが、該指標細菌の殺菌において宿主由来抗微生物ペプチドLL37と同等に有効であることを示した

10

20

30

40

50

【0067】

多数の宿主由来抗微生物ペプチドの弱点は、生理的(150mM) NaCl濃度におけるそれらの活性の減少にある。Friedrichら, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1542-1548を参照されたい。ペプチドWLSA-5(配列番号3)及びLL37を、前記の2つの指標株に対して生理的NaClにおいて試験した。これらの実験の結果を図5及び6に示す。これらの実験の結果は、*S. aureus*を試験細菌として使用した場合にはWLSA-5(配列番号3)がLL37と同じようにはNaClにより影響されないことを示した。*P. aeruginosa*の殺菌は、いずれのペプチドに関してもNaClの添加により影響されなかった。これらの分析は、イオンの存在に対してeLLPが宿主由来抗微生物ペプチドほどには感受性でないことを示唆している。本発明のeLLP及びLBUの活性を、より広い臨床細菌分離株において比較した。これらは、リン酸バッファーのみ(低塩)及び150mM NaClを含有するリン酸バッファー(生理的条件)においてそれらのMBCを比較し、表2にまとめた。この表は抗微生物活性のスペクトル及び効力に関するものであるため、当業者であれば、該表を詳細に検討することにより、eLLP及びLBUの活性が宿主由来抗微生物ペプチドより優れていると結論づけるであろう。

10

【0068】

(実施例3) 選択毒性の嚢胞性線維症細胞培養モデル

細菌細胞の調製

*Burkholderia cepacia*及び*P. aeruginosa*分離株を臨床微生物学実験室から入手し、実施例2に記載のプロス希釈法を用いてアッセイした。

20

【0069】

真核細胞の調製

空気-液界面上のヒト気管支上皮(HBE)細胞(CF(嚢胞性線維症)及び非CF)の分化初代細胞培養を、抗生物質を含有しない培地内で調製した。Zabner, J.ら, 1996, *J. Virol.* 70:6994-7003を参照されたい。これらのフィルターを*P. aeruginosa*と共にインキュベートし、ついで洗浄して非付着性細菌を除去した。ついで個々のフィルターを漸増濃度のペプチドにさらした。生存性細菌を遊離させるために、トリプシン/EDTAを加え、これらの調製物を標準的な細菌学的培地上にプレティングして細菌の生存を定量した。経上皮抵抗を測定することにより、同様に調製された細胞をペプチドの毒性に関してモニターした。このモデルの利点は、それが、細菌対宿主細胞に関するペプチドの選択毒性を同一条件下で測定しうることにある。

30

【0070】

結果

LLP-1及びその誘導體SA-5(配列番号1)、LSA-5(配列番号2)及びWLSA-5(配列番号3)を、CF気道疾患に典型的には関連している病原体、すなわち、*S. aureus*、*P. aeruginosa*及び*B. cepacia*に対するそれらの殺菌活性に関して試験した。低塩(10mMリン酸バッファー(PB))及び生理的塩(150mM NaClを含有する10mM PB)濃度を、実施例2に記載の標準的なプロス希釈アッセイを用いてペプチド活性が試験される生存可能な条件として用いた。図3~6で示されたのと同様の殺菌曲線を作成し、前記のとおりMBC値を求めた。*S. aureus*及び*P. aeruginosa*のMBC値を表2にまとめる。試験したペプチドのうちWLSA-5(配列番号3)は、これらの2つの指標株に対して、低塩及び生理的塩条件中でその活性を維持した。

40

【0071】

CF気道疾患に関連している重要な細菌病原体である*B. cepacia*に対する活性に関して、WLSA-5(配列番号3)を試験し、LSA-5(配列番号2)と比較した。図7に示すとおり、*B. cepacia*に対して、WLSA-5(配列番号3)はLSA-5(配列番号2)より有意に活性であった。一般には、この生物はほとんどの抗微生物ペプチドの活性に対して耐性であると報告されており、したがって、WLSA-5(配列番号3)は顕著な*in vitro*活性を示すと考えられる。この活性が、図7で試験した*B. cepacia*の臨床分離株に特異的であるのか、多様な*B. cepacia*分離株全般に適用可能なのかを試験するために、調査研究を計画した。この研究のた

50

めに、一群の十分に特徴づけられた*B. cepacia*ゲノム変種 (genomovars) を入手し、25 μ MのWLSA-5 (配列番号3) による殺菌に対する感受性に関して試験した。これを宿主抗微生物ペプチドLL37と同一濃度で比較した。図8に示すデータは、これらの条件下での処理の後に生存した生物の数として表されている。該結果は、この群内のすべての細菌株の殺菌において、WLSA-5 (配列番号3) がLL37と同等又はそれより優れていることを示した。この知見は、WLSA-5 (配列番号3) が、CF状態 (*B. cepacia*は、CF患者において肺疾患を急発させる主要病原体である) において投与された場合に有効でありうることを示唆している。

【0072】

前記の*in vitro*での知見に基づき、WLSA-5 (配列番号3) を、より正確にその選択毒性を評価する構想で試験した。このアッセイのために、分化した初代ヒト気道上皮細胞を利用する細菌付着の細胞培養モデルを確立した。これらの細胞を*P. aeruginosa*の標準接種物にさらし、共培養内の細菌及び上皮細胞を種々の濃度の試験ペプチドで処理した。ペプチド曝露の後に上皮細胞に結合した生存性細菌の相関因子として、ペプチドの殺菌能をモニターする。上皮細胞毒性を評価するために、経上皮抵抗の測定を行った。培養内の分化気道上皮細胞は、該単層が上皮細胞損傷のような事象により損なわれていない限り電流に無反応性の密着結合を形成する。したがって、ペプチド毒性の高感度な尺度として経上皮抵抗の測定を用いることができる。図9は、漸増濃度のWLSA-5 (配列番号3) を共培養内の結合*P. aeruginosa*及び上皮細胞に加えた実験の結果を示す。細菌生存性の減少及び経上皮抵抗 (Rte) の増加がペプチド濃度の相関的要素として示された。細菌数の2桁の減少は、50%未満の経上皮抵抗の変化を引き起こした。さらに、経上皮抵抗に対するWLSA-5 (配列番号3) の効果は一過性であり、LL37と有意には異ならなかった。これらのデータは、WLSA-5 (配列番号3) がCF状態における選択細菌毒性を示すことを示唆している。

【0073】

(実施例4) 敗血症性関節炎のウサギ関節モデル

LSA-5 (配列番号2) は、関節感染症の一般的な2つの原因因子である*S. aureus* (表2) 及び*S. epidermis*に対して*in vitro*で非常に活性であり、滑液の存在はLSA-5 (配列番号2) の活性を明らかに弱めるもののLSA-5は例えば関節滑膜に由来する生物学的流体の存在下で機能しうることを、本発明者らは示した (図10)。本発明者らは、これらの知見を敗血症性関節炎動物モデルに拡張した。この研究においては、2.5kgのニュージーランド白色ウサギの一方の膝に 1×10^5 コロニー形成単位の臨床*S. aureus*分離株 (ペニシリンには耐性であるがメチシリン、セファロsporin及びクリンダマイシンには感受性である株) を接種することにより、関節敗血症を誘発させた。このモデルを使用して、敗血症性関節炎の症状 (例えば、滑膜の分解) をモニターし、感染後の関節の変性を抑制する抗微生物薬の能力を評価することができる。この適用においては、該細菌感染は、1時間にわたり確立させた。この時点で、該関節を評価し、リン酸バッファー (PB) に溶かした漸増濃度のLSA-5 (配列番号2) (0、50、100及び200 μ M) を関節内に投与した。LSA-5 (配列番号2) の点滴注入の0時間後及び1時間後、滑液の希釈液をLB寒天にプレーティングすることにより、関節流体に付着した細菌の濃度を確立した。この実験の結果は、1時間後の検査で、未ペプチド処理関節と比較してコロニー形成単位の用量依存的減少を示した (図11)。

【0074】

LSA-5 (配列番号2) の連続投与がこのウサギモデルにおける細菌負荷の抑制に有効でありうることを示すために、時間0及び1時間における150 μ M LSA-5 (配列番号2) の2通りのペプチド処理投与を評価した。処理の1時間後の細菌負荷の測定は、該ペプチド処理関節においては、ペプチドの不存在下のリン酸バッファーで処理した関節と比較して、有意な減少を示した。これを、標準的な0.35% ネオマイシン又はネオマイシンとLSA-5 (配列番号2) との組合せの複数回の注入と比較した。これらの製剤のそれぞれの投与は、時間0、1及び2時間に関節内に行った。LSA-5 (配列番号2) 又はネオマイシンのみで処理した群と比較して、LSA-5/ネオマイシンの組合せで処理した関節からは、実質的に、より少数の細菌が回収されたことを、この実験の結果は示した (図12)。さらに、これらの動物実験の

すべてにおいて、ペプチドを単独で投与した場合、有害な毒性は何ら認められなかった。これらのデータは、敗血症性関節炎に関連した慢性感染に類似しており、局所処理が初期に有効でありうることを示唆している。

【 0 0 7 5 】

敗血症性関節炎に関連したeLLPの潜在的に重要な1つの用途として、人工関節のような固相基体に結合している場合のその活性が挙げられる。これを検討するために、LSA-5 (配列番号2) のアミノ末端基をAffigel (商標) 15 (Biorad, Hercules, CA) 樹脂に共有結合させた。この透過性固体支持体を小さなカラム内に配置し、 $a \times 10^6$ 細菌/mLの1mLの懸濁液にさらした。該溶液を重力により該カラムに通過させ、溶出液を集め、生存細菌の数に関して定量した。陰性対照として、LSA-5 (配列番号2) の代わりに非抗微生物ペプチドを結合させた以外は同じカラムを調製した。結果を後記表3にまとめる。該結果は、*P. aeruginosa*又は*S. aureus*の懸濁液がいずれも、該カラムへの曝露により完全に滅菌されたことを示している。これに対して、非抗微生物ペプチド対照カラムへの曝露の後では、生存細菌の減少は全く認められなかった。さらに、同じLSA-5 (配列番号2) カラムを細菌懸濁液に繰返しさらすことが可能であり、それは、6回の通過まで、活性を維持した。これらのデータは、敗血症性関節炎を引き起こす関節置換手術で観察される生物膜形成の核形成を抑制するために、人工関節を本発明のeLLPでコーティングするという可能性を示唆している。

【表3】

ペプチド	投入細菌			
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	LSA-5	対照	LSA-5	対照
カラム曝露前の細菌数	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6
溶出液からの細菌数	0	1×10^6	0	1×10^6

【 0 0 7 6 】

(実施例5) HIV-1の感染力の抑制

本発明のペプチドが或る真核細胞膜に対して活性であった(例えば、赤血球を溶解することが示された)という観察に基づき、本発明のペプチドは包膜ウイルスの感染力の抑制において活性でありうるかと推測された。この見解を立証する証拠は、カチオン性宿主由来抗微生物ペプチドに関して既に示されているのと同様に(Wachinger, M.ら, (1998) Journal of General Virology 79:731-40; Wachinger, M., T. Saermark及びV. Erfle (1992) FEBS letters 309:235-41; Robinson, W. E., Jr., B. McDougall, D. Tran及びM. E. Selsted (1998) Journal of Leukocyte Biology 63:94-100; Yasin, B.ら (2000) European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 19:187-94) HIV-1の感染力を抑制するLLP1ペプチドLSA-5 (配列番号2) の能力を研究することにより得られた。

【 0 0 7 7 】

本実施例においては、ヒト末梢血単球(PBMC)を健康なボランティアから得て、 1×10^5 生存細胞/mL培地の濃度で培養内で維持した。これらの細胞をフィットヘマグルチニン(PHA)の添加により刺激した。これに、標準力価の精製HIV-1(IIIB株)ピリオンをPBMCに加えて、ウイルスへの曝露の5日後、14,000 pg/mLのp24抗原シグナルを得た。

【 0 0 7 8 】

LLPペプチドLSA-5 (配列番号2) がHIV-1活性を抑制しうるか否かを試験するために、0.1~100 μ Mの濃度のLSA-5を、前記のとおり測定された標準力価のウイルスと共に30分間にわたりインキュベートした。ペプチドへの曝露の後に生存しているピリオンを100,000 \times gで60分間の超遠心分離により単離した。ウイルスペレットを使用して、前記のとおり

に調製されたPHA刺激PBMCに感染させた。感染の5日後、p24抗原のレベルを測定し、非ペプチド処理対照と比較した。該データを、ペプチド処理HIV-1感染細胞に結合しているp24抗原と非ペプチド処理HIV-1感染細胞に結合しているp24抗原との比率として表して、抑制率(%)と称される値を得た。

【0079】

図13に示すとおり、100 μMでのLSA-5処理ビリオンのみが、HIV-1の感染力を約100%減少させた。10 μMでは、HIV-1の感染力は75%まで減少した。1及び0.1 μMでは、LSA-5のこの抑制活性が急激に減少した。本発明に記載の他のペプチドを使用する本明細書に記載されていない実験は、赤血球に対して高い溶血活性を有することが認められたペプチドが、モル基準で、HIV-1ビリオンに対して、低い溶血活性を有するものより活性であることを示している。これらのデータは、本発明のLLPペプチドが包膜ウイルス(特にHIV-1)に対して活性であり、この状況における効力の増強のために改変されうることを示している。

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】図1は、親LLP1配列と比較した改変LLP(eLLP)SA-5(配列番号1)、LSA-5(配列番号2)及びWLSA-5(配列番号3)の配列を示す。

【図2】図2は、改変LBUペプチドの配列(配列番号4~12)を示す。

【図3】図3は、リン酸バッファー(低塩条件)を使用する標準プロス希釈アッセイにおける*P. aeruginosa*に対するペプチドWLSA-5(配列番号3)の活性を、LL37の場合と比較して示す。

【図4】図4は、リン酸バッファー(低塩条件)を使用する標準プロス希釈アッセイにおける*S. aureus*に対するペプチドWLSA-5(配列番号3)の活性を、LL37の場合と比較して示す。

【図5】図5は、150mM NaClを含有するリン酸バッファー(生理塩条件)を使用する標準プロス希釈アッセイにおける*P. aeruginosa*に対するペプチドWLSA-5(配列番号3)の活性を、LL37の場合と比較して示す。

【図6】図6は、生理的NaClを含有するリン酸バッファーを使用する標準プロス希釈アッセイにおける*S. aureus*に対するペプチドWLSA-5(配列番号3)の活性を、LL37の場合と比較して示す。

【図7】図7は、WLSA-5(配列番号3)が、進行性嚢胞性線維症肺感染に関連した悪名高き抗生物質耐性菌である*Burkholderia cepacia*に対してLSA-5より活性であることを、標準プロス希釈モデルにおいて示している。

【図8】図8は、25 μM WLSA-5(配列番号3)又はLL37が*B. cepacia*の多重ゲノム変種(multiple genomovars)を殺す能力を比較している。この実験では、各生物の標準接種物を単一濃度(25 μM)のWLSA-5及びLL37に曝し、コロニー形成単位の減少を測定した。

【図9】図9は、分化ヒト気管支上皮細胞に結合した*Pseudomonas aeruginosa*に対するWLSA-5(配列番号3)の抗細菌活性を、気道表面流体中に見出される宿主由来抗微生物ペプチドLL37の場合と比較して示す。このデータは、嚢胞性線維症肺感染のこのモデルにおいてWLSA-5が活性であることを示している。丸印は% Rte(経上皮抵抗の変化率(%))を示す。四角印は生存細菌を示す。

【図10】図10は、ヒト滑液の1:4希釈液における*S. aureus*に対するLSA-5(配列番号2)の殺菌活性(淡色の棒グラフ)を比較する棒グラフであり、それを、生理的NaClを含有するリン酸バッファー中での殺菌と比較している。該データは、滑液の成分が該ペプチドの活性を抑制するが、それは128 μMにおいても活性であることを示唆している。

【図11】図11は、ウサギ関節敗血症モデルにおいて、50、100及び150 μMのLSA-5(配列番号2)の投与が殺菌を有意に増強することを示している。

【図12】図12は、ウサギ関節敗血症モデルにおいて、LSA-5(配列番号2)が機能的であり、該関節内の細菌負荷の減少において標準濃度のネオマイシンとほぼ同等に有効であることを示している。ネオマイシンと併用した場合に、細菌負荷の最大減少が認められた。

【図13】図13は、本発明のペプチドの代表的な実施形態であるLSA-5が抗HIV-1活性を有

10

20

30

40

50

することを例示する棒グラフを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Ronald C. Montelaro
      Timothy A. Mietzner

<120> VIRUS DERIVED ANTIMICROBIAL PEPTIDES

<130> A34001-PCT / 072396.0223

<140> 09/785,058
<141> 16/02/01                                10

<140> 09/785,059
<141> 16/02/01

<140> WO/to be announced
<141> 15/02/02

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 28
<212> PRT
<213> Artifical sequence                                20

<220>
<223> Artificial peptide derived from HIV-1

<400> 1
Arg Val Ile Arg Val Val Gln Arg Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile
 1          5          10          15
Val Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Arg Arg Ile Leu
 20          25

<210> 2
<211> 31
<212> PRT
<213> Artifical sequence                                30

<220>
<223> Artificial peptide derived from HIV-1

<400> 2
Arg Val Ile Arg Val Val Gln Arg Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile
 1          5          10          15
Val Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Arg Arg Ile Leu Arg Val Val
 20          25          30

<210> 3
<211> 31
<212> PRT
<213> Artifical sequence

```

<220>
 <223> Artificial peptide derived from HIV-1
 <400> 3
 Arg Trp Ile Arg Val Val Gln Arg Trp Cys Arg Ala Ile Arg His Ile
 1 5 10 15
 Trp Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Arg Arg Trp Leu Arg Val Val
 20 25 30

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artifical sequece

<220>
 <223> Artificial peptide derived from HIV-1

10

<400> 4
 Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg
 1 5 10

<210> 5
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artifical sequece

<220>
 <223> Artificial peptide derived from HIV-1

<400> 5
 Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg
 1 5 10 15
 Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg
 20

20

<210> 6
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artifical sequece

<220>
 <223> Artificial peptide derived from HIV-1

<400> 6
 Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val
 1 5 10 15
 Arg Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg
 20 25 30
 Val Val Arg Arg
 35

30

<210> 7
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artifical sequece

<220>

<223> Artificial peptide derived from HIV-1

<400> 7

```

Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg
 1                    5                    10                    15
Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val
                20                25                30
Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg
 35                    40

```

<210> 8

<211> 48

<212> PRT

<213> Artifical sequence

10

<220>

<223> Artificial peptide derived from HIV-1

<400> 8

```

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val
 1                    5                    10                    15
Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg
                20                25                30
Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg
 35                    40                    45

```

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artifical sequence

20

<220>

<223> Artificial peptide derived from HIV-1

<400> 9

```

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg
 1                    5                    10

```

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> Artifical sequence

<220>

<223> Artificial peptide derived from HIV-1

30

<400> 10

```

Arg Arg Trp Val Arg Arg Val Arg Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg
 1                    5                    10                    15
Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg
                20

```

<210> 11

<211> 36

<212> PRT

<213> Artifical sequence

<220>

<223> Artificial peptide derived from HIV-1

<400> 11

```

Val Arg Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val
 1           5           10           15
Arg Arg Val Arg Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg
 20           25           30
Trp Val Arg Arg
 35

```

<210> 12

<211> 48

<212> PRI

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> artificial peptides derived from HIV-1

<400> 12

```

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg Val Arg Arg Val
 1           5           10           15
Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg Val Arg
 20           25           30
Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Arg Val Val
 35           40           45

```

20

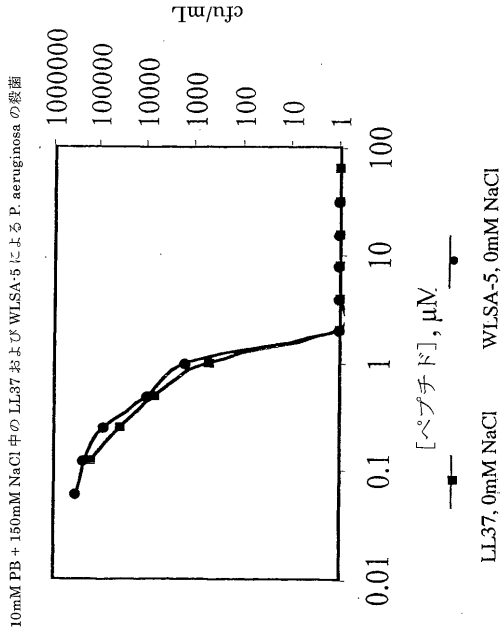
NY02:370932.1

NY02:370932.1

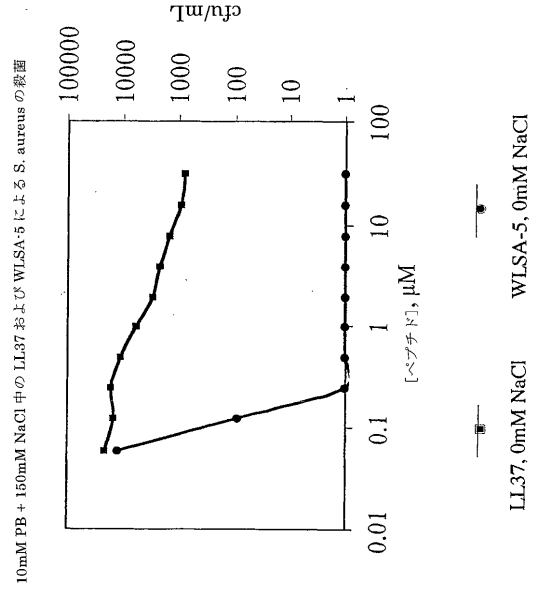
30

NY02:370932.1

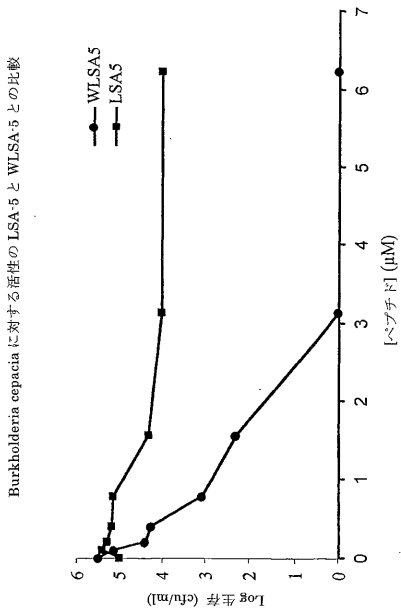
【 図 5 】



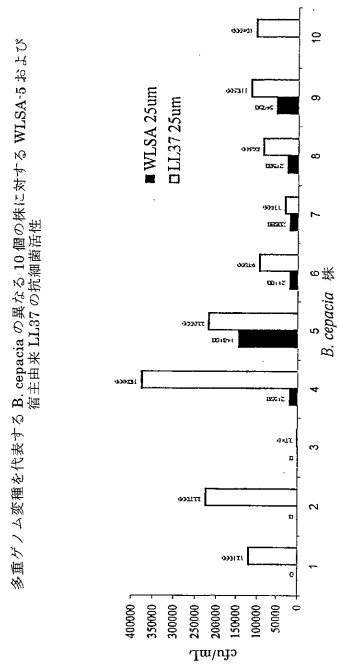
【 図 6 】



【 図 7 】

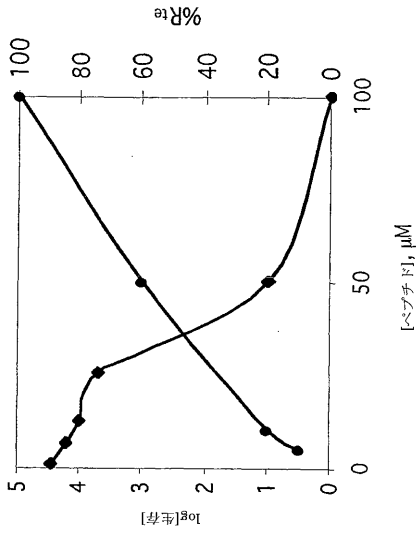


【 図 8 】



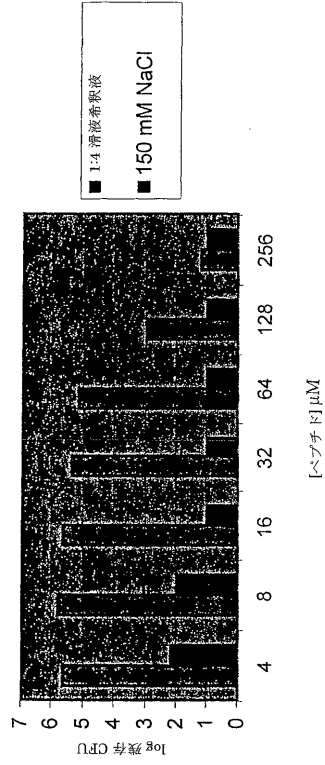
【図 9】

培養内の CF ヒト気管上皮細胞に結合した P. aeruginosa に対する WLSA-5 の選択毒性



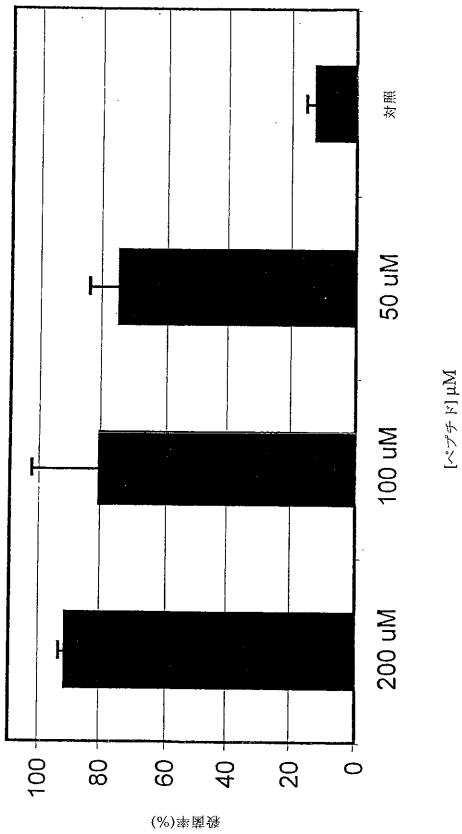
【図 10】

培養中の WLSA-5 による S aureus の in vitro 殺菌



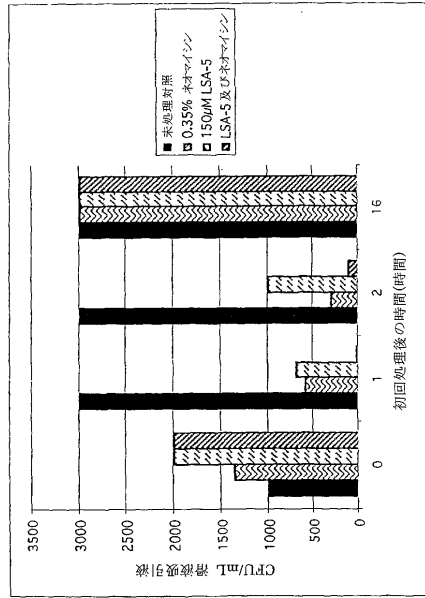
【図 11】

未処理対照と比較した、殺菌の用量依存的減少

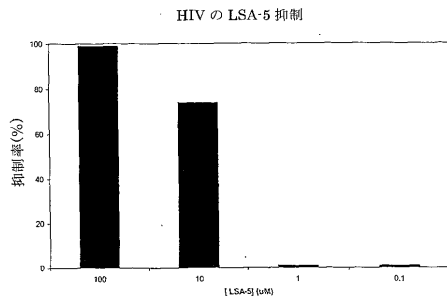


【図 12】

ウサギ胸筋モデルにおける LSA-5 がネオマイシンの殺菌



【 13】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 0 7 K 17/02 (2006.01) C 0 7 K 17/02
C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 19/00

(31)優先権主張番号 PCT/US02/04432

(32)優先日 平成14年2月13日(2002.2.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 モンテラロ, ロナルド, シー.

アメリカ合衆国 1 5 0 9 0 ペンシルバニア州, ウェックスフォード, グリーンブライアー ド
ライブ 1 2 7

(72)発明者 ミエツナー, ティモシー

アメリカ合衆国 1 5 2 0 6 ペンシルバニア州, ピッツバーグ, コルドバ ロード 1 3 4 1

審査官 三原 健治

(56)参考文献 米国特許第0 5 9 4 5 5 0 7 (U S , A)

Antimicrob. Agents Chemother. , 1 9 9 7 年, vol.41, No.11 , p.2394-2398

Antimicrob. Agents Chemother. , 2 0 0 5 年, vol.49, No.1 , p.316-322

J. Antimicrob. Chemother. , 1 9 9 9 年, vol.44 , p.33-41

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 7/08

C07K 14/00-14/16

A01N 63/00

UniProt/GeneSeq

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)